

フローサイトメトリー法による cisA₂B₃ 型 15 例の A, B 抗原量解析

李 悦子¹⁾ 瀧本 朋美¹⁾ 尾崎 修治²⁾ 松本 真弓¹⁾ 竹内 恭子¹⁾

松本 俊夫¹⁾

Flow Cytometry (FCM) を用いた A, B 抗原検査は、個々の血球の抗原密度の定量的な測定が可能であり、亜型検査における有用性が示されている。我々は徳島県に多く存在する cisA₂B₃ 型 15 例における A, B 抗原の密度分布を FCM 法で測定するとともに、カラム凝集法や試験管法などの測定結果と比較した。cisA₂B₃ 型血球は A₁B 型対照血球と比較し、A 抗原はカラム凝集法 4+ で対照 4+ と差を認めず、試験管法は 256~512 倍と対照 1,024 倍より低値であった。FCM 法では mean fluorescence intensity (MFI) は 25.8~73.1 (陽性率 92.7%~99.4%) と比較的均一な抗原分布を示し、対照 87.6 (陽性率 99.6%) と比べて抗原減弱を認め、赤血球当たりの抗原数は 7 万~85 万と推定された。B 抗原はカラム凝集法 2+~3+ で対照 4+ より弱く、試験管法は 4~128 倍で対照 512 倍より低値であった。FCM 法の MFI は 0.7~4.3 (陽性率 11.5%~77.3%) と対照 59.9 (陽性率 99.7%) と比較し抗原量が著しく低い領域に血球が幅広く分布しており、赤血球当たりの抗原数は <1~38 万と推定され、個体差も大きいことが明らかになった。FCM 法は抗原量の定量とその分布についても詳細な判定が可能であり、ABO 亜型の診断においてきわめて有用と考えられた。

キーワード：フローサイトメトリー、cisAB、ABO 亜型、A, B 抗原解析

はじめに

ABO 式血液型の抗原定量には、試験管法による被凝集価測定が一般的に用いられている。本凝集法は血球に抗体が結合した後の凝集状態や溶血などの二次的反応の観察に基づくが、亜型においては赤血球表面上の A, B 抗原量は様々な程度で減少しており、正確な判定が困難なことが多い。これに対し、Flow Cytometry (FCM) を用いた抗原検査は、fluorescein isothiocyanate (FITC) 等の蛍光色素で標識された結合抗体の蛍光強度を測定することにより、抗体結合状態の第一相や個々の血球の抗原密度の定量的な測定が可能である¹⁾²⁾。このため、FCM 法による A, B 抗原量の測定は、亜型やキメラの解析にも広く応用されている^{3)~5)}。

ABO 亜型の中でも cisAB 型は遺伝形式に特徴を有するまれな亜型で、1964 年にポーランドの Seyfried らによる O 型と A₂B 型の両親から A₂B 型の子供が生まれた家系の報告が最初である⁶⁾。日本では山口らが 1965 年に A₂B₃ の家系を報告し⁷⁾、1966 年には O 型と A₂B₃ 型の両親から A₂B₃ 型の子供が 3 人生まれた他の家系 (徳島県の症例) 報告において、同一染色体上に A 遺伝子と B 遺伝子が同時に存在すると思われる位置関係から、こ

の血液型を cisAB 型と命名している⁸⁾。日本人の cisAB 型頻度に関しては、大久保らは 0.0015%⁹⁾、梶井は 0.0012%¹⁰⁾ 程度と報告しているが、徳島県の頻度は 0.017%⁹⁾ と全国平均の約 10 倍に達している。世界的には韓国での頻度が 0.0066% と比較的高いことが知られており、全羅南道などの南地域に片寄って多いとの報告がある¹¹⁾。このように、cisAB 型はまれな亜型であるが、適合血の選択を含む輸血医療の観点からは、その正確な診断が必須である。

今回、我々は徳島県に多く存在する cisA₂B₃ 型 15 例における A, B 抗原の密度分布を FCM 法で測定するとともに、カラム凝集法や試験管法などの測定結果と比較し、その有用性について検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象

当院で 2007 年 1 月から 2011 年 7 月までに行った血液型検査 (27,002 件) において、cisA₂B₃ 型と判定された 15 例を対象とした。うち 8 例は赤十字血液センターでの既確定および家族歴より、7 例は遺伝子検査により確定した。性別は男性 7 名、女性 8 名で、年齢は 3 歳

1) 徳島大学病院輸血部

2) 徳島県立中央病院内科

〔受付日：2011 年 10 月 13 日，受理日：2012 年 2 月 25 日〕

Table 1 Method of flow cytometric detection of A and B antigens

1) Separated RBCs from EDTA anti-coagulant blood sample, and washed three times with PBS
2) Prepared 3% red blood cell suspension in 300 μ l with PBS
3) Fixed with 1.5 ml RBC/PLT Reagent* (contained 0.1% glutaldehyde) for 15 minutes at room temperature
4) Washed three times with PBS
5) Prepared 1.5% red blood cell suspension in 600 μ l with PBS
6) 30 μ l of fixed RBCs were incubated with 50 μ l of anti-A*** or anti-B*** antibody for 30 minutes at 4°C
7) Washed three times with PBS
8) Labeled with 100 μ l of FITC conjugated goat antimouse IgM**** (diluted at 1 : 100)
9) Incubated for 30 minutes at 4°C in darkness
10) Washed three times with PBS
11) RBCs resuspended in 800 μ l with 0.2% BSA-PBS
12) Analysis performed with a flow cytometer (Epics XL-MCL, Beckman Coulter)

PBS: phosphate-buffered saline
FITC: fluorescein isothiocyanate
BSA: bovine serum albumin
* Hematology system ADVIATM™ 120 reagent (Simens Healthcare Diagnostics)
** anti-A IgM clone MHO4/3D3 (BioClone®, Ortho Clinical Diagnostics)
*** anti-B IgM clone NB1,19/NB10*5A5/NB10*3B4 (BioClone®, Ortho Clinical Diagnostics)
**** Goat F (ab) 2 Fragment Anti-Mouse IgM (μ) -FITC (Beckman Coulter)

から80歳(中央値50歳)である。本研究は徳島大学病院倫理委員会の承認を受け、血液型の遺伝子検査は患者の同意を得た上で実施した。

2. 方法

1) カラム凝集法(CAT: column agglutination technology)

全自動輸血検査システム(オーソ®オートビュー®, Innova, オーソ・クリニカルダイアグノスティックス(株))を用いた。

2) 試験管法

A, B抗原被凝集価, 抗A₁および抗Hレクチンとの反応を確認し, 抗A, 抗B抗体価は未処理血清を用いた生理食塩液法によるIgMおよび, dithiothreitol(DTT)処理によりIgM成分を失活させた血清を用いた間接抗グロブリン法によるIgGを測定した。また, 糖転移酵素活性測定(ガルザーブAB, (株)エーディア)などの各種亜型検査を「新輸血検査の実際」¹²⁾に準じて行った。

3) スライド法

抗A, 抗B試薬として3社のモノクローナル抗体(オーソ®バイオクロン®, モノクローナルワコー, ネオコクサイ)を用いた。

4) FCM法

既報⁴⁾⁵⁾を参考に検討後, 以下の方法で行った。EDTA加全血をPBS(phosphate-buffered saline)で3回洗浄し3%血球浮遊液を300 μ l作製後, 被検血球を単離, 球状で均一の状態にし, 抗体感作過程での凝集阻止を図る目的で, ドデシル硫酸ナトリウム(SDS: sodium dodecyl sulfate)およびグルタルアルデヒドを含む血球固定液1.5mlを加え, 室温で15分間反応させた。PBSで3回洗浄後, 上清を取り除きPBSを600 μ l加え1.5%

の血球浮遊液とした。球状固定化した1.5%血球浮遊液30 μ lに対し抗Aおよび抗Bモノクローナル抗体(オーソ®バイオクロン®)を50 μ lずつ加え, 4°Cで30分間反応させた後, PBSで3回洗浄した。FITC標識ヤギ由来抗マウスIgM抗体(ベックマンコールター(BC)社)100倍希釈液を100 μ l加え, 4°Cで30分間反応させ, PBSで3回洗浄後, 0.2%ウシアルブミン加PBS800 μ lに再浮遊させ, フローサイトメーター(Epics XL-MCL, BC社)で測定した(Table 1)。

A, B抗原の蛍光強度ヒストグラム(横軸: 蛍光強度対数表示, 縦軸: 血球数)パターンと, 平均蛍光強度(MFI: mean fluorescence intensity)を解析した。抗原の陽性率はO型赤血球5例を陰性コントロールとして検討し, 陰性ライン位置をX軸の10⁰に設定した。また, 抗原量の定量化にあたっては蛍光強度ヒストグラムの最大値と最小値をA₁B型血球と比較することにより, cisA₂B₃型におけるA, B抗原量を対数換算により概算した。

5) 遺伝子検査

末梢血よりDNAを抽出し, PCR-SSP(Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers)法にてRed Cell EZ Type「ABO sub Typing」(Gen-Probe GTIダイアグノスティックス(株))を用いて判定した。Case13は赤十字血液センターでPCR-SSO(Sequence Specific Oligonucleotide)法にて実施した。

結 果

cisA₂B₃型15例の検査結果を陰性対照(O型), 陽性対照(A₁B型)と共にTable 2に示した。

1) カラム凝集法

オモテ検査の抗Aは15例とも(4+)を示したが,

Table 2 Laboratory data of ABO typings in 15 cisA₂B₃ patients

Case No.	CAT				Tube Test				FCM			
	Antigen		Antibody		Antigen		Antibody		Antigen			
	Value of measurement		Value of measurement		Agglutination titer		Titer of IgM		Mean fluorescence intensity		Positive (%)	
	A	B	anti-A	anti-B	A	B	anti-A	anti-B	A	B	A	B
1	4+	2+	0	0	256	4	<1	1	51.5	0.7	97.8	11.5
2	4+	2+	0	w+	512	16	1	1	29.3	1.0	93.9	19.2
3	4+	2+	0	0	512	32	<1	1	41.2	1.1	95.1	23.0
4	4+	3+	0	w+	256	64	<1	2	58.3	1.1	97.8	23.4
5	4+	2+	0	0	256	16	<1	1	25.8	1.1	93.1	29.1
6	4+	3+	0	1+	512	32	<1	2	37.5	1.3	97.4	24.2
7	4+	2+	0	0	512	4	<1	1	44.7	1.6	97.4	38.8
8	4+	2+	0	0	512	16	<1	2	35.5	1.5	96.3	29.6
9	4+	3+	0	w+	512	16	<1	8	37.7	2.4	98.1	48.6
10	4+	3+	0	w+	512	16	<1	2	68.1	2.5	97.8	70.2
11	4+	3+	0	1+	512	128	1	4	54.0	3.3	98.8	67.0
12	4+	3+	0	0	512	16	<1	1	73.1	3.4	99.4	71.6
13	4+	3+	0	2+	512	128	<1	32	40.9	3.9	92.7	71.8
14	4+	3+	0	2+	512	8	<1	4	54.3	4.3	99.0	77.3
15*	4+	2+	0	1+	256	4	<1	1	11.4	0.3	45.4	2.7
N.C.	0	0	4+	4+	<1	<1	128	128	0.3	0.3	0.0	0.0
P.C.	4+	4+	0	0	1,024	512	<1	<1	87.6	59.9	99.6	99.7

CAT: column agglutination technology

FCM: flow cytometry technique

N.C.: negative control (O Type)

P.C.: positive control (A₁B Type)

N.C. and P.C. data were represented as the mean of five independent experiments

*AB antigens were further decreased, likely due to multiple myeloma

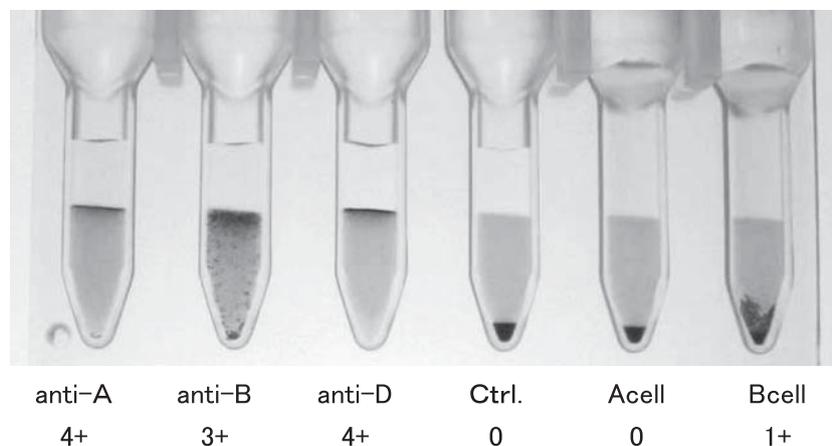


Fig. 1 Photograph of anti-A, anti-B and anti-D cassette taken using column agglutination technology (Case 6)

抗 B は (3+) 8 例, (2+) 7 例と症例差を認めた。

ウラ検査の A 血球は 15 例とも (0) で抗 A 抗体は検出されなかったが, B 血球は (0) 6 例, (w+) 4 例, (1+) 3 例, (2+) 2 例で一部の症例に抗 B 抗体が検出された。抗 B 抗体が検出された Case 6 の結果を Fig. 1 に示した。

2) 試験管法

①被凝集価

抗 A については 256 倍 4 例, 512 倍 11 例であったが, 抗 B は 4 倍 3 例, 8 倍 1 例, 16 倍 6 例, 32 倍 2 例, 64 倍 1 例, 128 倍 2 例と症例による大きな差を認めた。

②レクチン

抗 A₁レクチン (Dolichos biflorus) との反応は 15 例とも陰性であり, A₁型でないことが確認された。抗

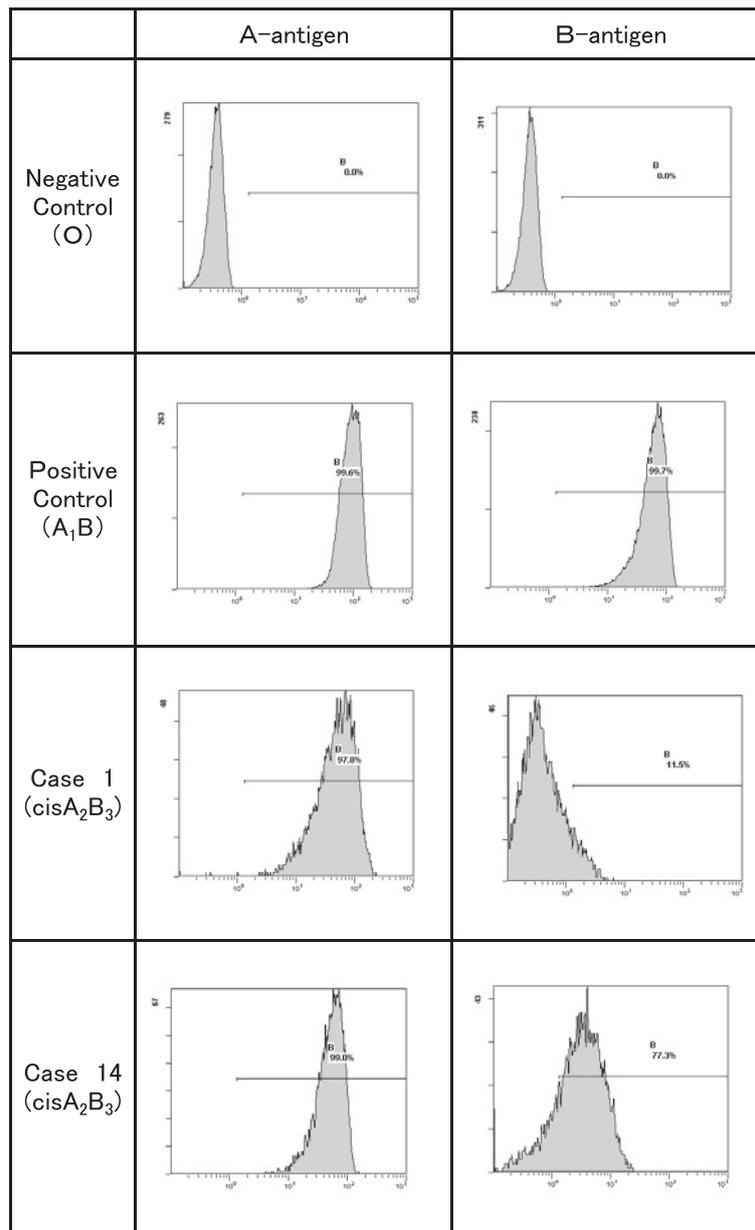


Fig. 2 Histogram patterns of A and B antigen analyzed using flow cytometry technique
 X axis: fluorescence intensity on a logarithmic scale
 Y axis: number of cells
 Data were representative of five independent experiments in negative and positive controls

H レクチン (*Ulex europaeus*) との反応においては 15 例とも (4+) と、A₁B 型対照 (w+) より強い反応で、亜型が示唆された。

③抗体価

抗 A は IgM<1 倍 13 例、1 倍 2 例であり、IgG は <2 倍が 15 例であった。

抗 B は IgM が 1 倍 7 例、2 倍 4 例、4 倍 2 例、8 倍 1 例、32 倍 1 例であり、IgG は <2 倍 11 例、2 倍 2 例、4 倍 2 例であった。CAT 法では抗 B を認めなかった 6

例を含めた 15 例全例で抗 B が確認された。

④転移酵素活性

A 転移酵素活性、B 転移酵素活性はいずれも 15 例全例において認めなかった。陽性対照 (A₁B 型) の転移酵素活性は A 1 : 128、B 1 : 64 であった。

3) スライド法

A₁B 型対照血球では 3 社の抗 A、抗 B 試薬において攪拌直後から強い凝集が認められた。患者検体では 15 例とも抗 A では直後に強い凝集を認めたが、抗 B の凝

集開始時間は約 30 秒から 60 秒と遅く、凝集は徐々に増強した。最終判定は 2+（部分凝集あり）で、抗 B の凝集開始時間が著しく遅い cisA₂B₃型の特徴を認めた。

4) FCM 法

陰性対照 O 型血球の MFI および陽性率は A, B 抗原共に 0.3, 0.0% であった。陽性対照 A₁B 血球の MFI および陽性率は A 抗原 87.6, 99.6%, B 抗原 59.9, 99.7% であり、ヒストグラムでは個々の血球上の抗原量がほぼ均一なピークを示した (Fig. 2)。A₂B₃型の Case 1~14 の A 抗原は、MFI が 25.8~73.1 (平均値は 46.6) で、陽性率は 92.7%~99.4% (平均値は 96.8%) と A₁B 型より抗原量が少ない血球が集合し、蛍光強度の最大値付近に血球数のピークが位置する一様のパターンを示した。一方、B 抗原の MFI は 0.7~4.3 (平均値は 2.1) で、陽性率は 11.5%~77.3% (平均値は 43.2%) と個々の血球上の抗原量は減弱しており、蛍光強度のピークが低値に位置するものや高値に位置するものなど症例により抗原量の分布に多様性を認めた (Fig. 2)。なお、Case 15 は過去の献血時に赤十字血液センターで cisA₂B₃型と確定されており、当院でも 2004 年には試験管法にて通常強度の cisA₂B₃型と判定されていたが、今回の測定時 (2008 年) には血液疾患 (multiple myeloma) により、さらに抗原減弱をきたしていたものと考えられた。その後永眠されたため、抗原回復時の検査は行えなかった。

ヒストグラムにおいては、抗原分布が二峰に独立したキメラや、連続した二峰のモザイクパターンは認めず、これらの病態は否定的であった。

次に、Economidou らのデータ¹³⁾に基づき、赤血球 1 個あたりの A₁B 型の A 抗原数を 46 万~85 万、B 抗原数を 31 万~56 万と仮定し、cisA₂B₃型における抗原数を概算した。A 抗原の蛍光強度範囲は A₁B 型が 30~200 で、これが抗原数 46 万~85 万に相当することから、蛍光強度 X における A 抗原数 Y (万) = 48.8logX - 27.1 の計算式を得た。解析した 14 例において、A 抗原の蛍光強度は 5~200 に分布したことから、この計算式により抗原数は 7 万から 85 万と概算した。一方、B 抗原の蛍光強度範囲は A₁B 型が 10~130 で、これが 31 万~56 万に相当することから、蛍光強度 X における B 抗原数 Y (万) = 22.7logX + 8.7 の計算式を得た。14 例における B 抗原の蛍光強度は 1 未満~20 より、抗原数は <1 から 38 万と概算した。

5) 遺伝子検査

Case2, 3, 5, 6, 8, 9, 13 の 7 例で cis-AB01 遺伝子を確認した。Case13 は cisAB01/O02 であることが確認された。

考 察

cisAB 型はまれな亜型であるが、国内では徳島県における頻度が高い。当院で 2007 年以降に検出された cisAB 型は 17 例 (cisA₂B₃: 15 例, cisA₁B₃: 2 例) であり、その出現頻度は 0.063% (17 例/27,002 例) と、既報の徳島県頻度の 0.017%⁹⁾ よりも高値であった。その原因として、他院で亜型と判明して当院へ紹介された症例が含まれることも一因と考えられた。

そこで本研究では、これまでに経験した cisA₂B₃型 15 例における A, B 抗原量について FCM 法を用いて解析するとともに、CAT 法や試験管法などの測定結果と比較検討した。cisA₂B₃型血球は A₁B 型対照血球と比較し、A 抗原は CAT 法 4+ で対照 4+ と差を認めず、試験管法は 256~512 倍と対照 1,024 倍より低値であり、FCM 法では MFI は 25.8~73.1 と対照 87.6 と比べて抗原減弱を認めたが、比較的均一な抗原分布を示した。B 抗原は CAT 法 2+~3+ で対照 4+ より弱く、試験管法は 4~128 倍で対照 512 倍より低値であった。FCM 法の MFI は 0.7~4.3 と対照 59.9 と比較し抗原量が著しく低い領域に血球が幅広く分布しており、個体差も大きいことが明らかになった。このように、試験管法による被凝集価測定は、CAT 法より抗原量の低下を鋭敏に検出することができたが、FCM 法ではさらに詳細な抗原量の低下を明らかに判定することが可能であり、抗原量と分布幅も詳細に判定出来た。また、ヒストグラムのパターンを観察することで、キメラやモザイクとの鑑別も可能であり、亜型解析の鑑別診断においてきわめて有用であると考えられた。

A, B 抗原量の判定に関しては、CAT 法カセット内の抗 A および抗 B 試薬は、試験管用試薬より高濃度の抗体が充填されており、免疫複合体形成を促進するためにポリエチレングリコールも添加されている。これにより、陽性時の正常反応は通常 4+ であり、抗原量が著しく少ない場合に弱反応として認められる。今回の検討でも A₂レベルは 4+, B₃レベルは 2+~3+ と判定された。Case 1, 5, 6, 11 においては被凝集価が 4, 16, 32, 128 倍に対し、FCM 法の MFI は 0.7, 1.1, 1.3, 3.3 と相関を示したが、Case 4, 7, 14 においては被凝集価が 64, 4, 8 倍であるのに対し、MFI は 1.1, 1.6, 4.3 と相関を示さなかった。これについては、被凝集価測定は希釈試薬の作成手技や個人の判定主観に左右されやすいことが一因と考えられ、FCM 法の方が客観的な判定においてより優れていると考えられた。なお、糖転移酵素活性は cisA₂B₃型の場合は通常の方法では検出できないとされており¹²⁾¹⁴⁾、本例でも 15 例全てにおいて A, B 酵素活性とも認めなかった。

抗 A, 抗 B 抗体に関しては、cisAB 型の個体は例外なく、血清中に自己血球と反応しない抗 B をもつとさ

れている¹⁴⁾。CAT法では15例中6例(Case1, 3, 5, 7, 8, 12)で抗Bを認めなかったが、試験管法では15例全てに抗Bを認めた。この原因はCAT法では判定前の5分間遠心(55g 2分 199g 3分)中に、抗Bの力価が低く結合力の弱いIgM抗体架橋が外れ、弱反応が陰性化したことによると推察された。このことは、ウラ試験でCAT法が試験管法よりも弱反応を示し易く、弱反応検体の80%がIgM抗体であったとの日高らの報告¹⁵⁾からも支持される。抗体価と抗原量の関係では、抗A1倍を認めた2例(Case2 74歳, Case11 3歳)は、いずれも輸血歴のない男性であったが、A抗原のMFIが29.3と54.0であり、抗体保有と抗原量低値との相関は認めなかった。抗BにおいてもIgM 32倍, IgG 4倍と最も高い抗Bを保有していたCase13(6歳男性, 輸血歴なし)のB抗原のMFIが3.9と高く、相関は認めなかった。

FCM法により赤血球上のA, B抗原を測定するには、抗体感作過程で凝集しやすく円盤状である赤血球を、単離、球状状態で物理的に均一の状態にすることが最も重要である。そこで、血球球状化の固定方法を検討し、SDSおよびグルタルアルデヒドを含む血球固定液を全血と混合することにより、赤血球の骨格タンパク質(スペクトリン, アンキリン等)を無力化し、等容積のまま球状の細胞となる反応を即時的に進行させる方法を試みた。固定処理細胞がフローセル内を単離状態で通過させることができる「自動血算計ADVIA™ 120のRBC/PLT希釈液」(シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティックス(株))を用いることにより、再現性のある結果を得ることが可能となった。FCM法による亜型のA, B抗原解析に関しては、ヒストグラムの形状と陽性率(%)を算出した報告³⁾¹⁶⁾があるが、A₂B₃型の検討は各1例のみであった。Hultらは遺伝子型確定済の複数亜型のFCM解析を報告しているが、cisAB型に関する報告はない¹⁷⁾。我々はヒストグラムの蛍光強度からcisA₂B₃型の赤血球当たりの抗原量の定量を試み、A抗原数は7万~85万程度、B抗原数は<1~38万程度と推察した。

cisAB遺伝子検査に関してはPCR-RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法を用いた検討報告があり¹⁸⁾¹⁹⁾、新しいアレルも発見されている²⁰⁾。2011年9月現在、The Blood Group Antigen Gene Mutation Databaseにはcis-AB01からcis-AB06までの6種類の対立遺伝子が報告されている。日本人の対立遺伝子は大部分がcis-AB01(A101に対してC467T, G803C)であり、今回測定した7例も全てcis-AB01であった。cisAB遺伝子検査は家系調査が行えない場合などの診断補助として大変有用である。本邦でcis-AB01以外の報告は、cis-AB02があるが、この症例はB抗原がやや強くB

とB₃型の間中型を示したと報告されており²¹⁾、また国内での新たなcisAB遺伝子の報告では、B抗原の蛍光強度がA₁B型(100%)に比較して121.1%と顕著に高いとしている²²⁾。このようにcisAB型のA, B抗原量は、保有する対立遺伝子により差異が生じることがあると予想されるので注意を要する。本検討ではB抗原のMFIは0.7~4.3と著しい減弱を認め、症例により抗原量の分布幅が広がった。この理由として、本15症例はA, B転移酵素活性を認めなかったが、測定感度以下の低レベルで酵素活性量の違いがある可能性、抗原発現プロセスに個体差がある可能性などが考えられ、個体差により分布幅が広がっていると推察された。Hultらは亜型遺伝子Ax02~Ax04保有症例において、トランス位置にO対立遺伝子を有する場合はA抗原の発現が弱く、B対立遺伝子を有する場合はallelic enhancementによりA抗原が増強していることを報告している¹⁷⁾。また、伊藤らもA₂およびA₃型で対立遺伝子の種類により蛍光強度値に差を認めたことを報告している²³⁾。本研究では対立遺伝子まで調べ得たのは1例(cisAB01/O02)のみであったため、抗原量発現における対立遺伝子の影響については検討できなかった。このように、同一の亜型遺伝子を保有している場合においても、対立遺伝子の種類および個体差により抗原発現量に差を認めることがあり、亜型のA, B抗原量解析においては、微量の抗原量から正確に定量確認出来るFCM法が有用であると考えられた。

結 語

cisA₂B₃型15例におけるA, B抗原量についてFCM法を用いて解析するとともに、カラム凝集法や試験管法と比較検討した。測定手技や判定主観に左右されやすい試験管法に対し、FCM法はA, B抗原量の分布状態がヒストグラムによる蛍光強度の客観的な測定値から、定量判定においてより優れていると考えられた。また、蛍光強度の解析により、cisA₂B₃型における赤血球当たりの抗原数はA抗原7万~85万、B抗原<1~38万と推定された。

文 献

- 1) 雨宮洋一：フローサイトメトリーによる赤血球抗原の解析。臨床検査, 34: 704—711, 1990.
- 2) 雨宮洋一：血液型の判別。臨床検査, 41: 1135—1141, 1997.
- 3) 西野主真, 多葉田祥代, 道野淳子, 他：FCM法によるABO式血液型亜型の解析。日本輸血学会雑誌, 36: 705—708, 1990.

- 4) 阿藤みや子, 小林 賢, 鈴木洋司, 他: 二卵性双生児にみられたキメラの細胞学的ならびに遺伝子解析. 日本組織適合性学会誌, 10: 67—76, 2003.
- 5) Takahashi J, Seno T, Nakade T, et al: Detection and quantitation of ABO RBC chimerism by a modified coil planet centrifuge method. *Transfusion*, 42: 702—710, 2002.
- 6) Seyfried H, Walewska I, Werblinska B: Unusual inheritance of ABO group in a family with weak B antigens. *Vox Sang*, 9: 268—277, 1964.
- 7) Yamaguchi H, Okubo Y, Hazama F: An A₂B₃ Phenotype Blood Showing Atypical Mode of Inheritance. *Proc Jpn Acad*, 41: 316—320, 1965.
- 8) Yamaguchi H, Okubo Y, Hazama F: Another Japanese A₂B₃ blood-group family with the propositus having O-group father. *Proc Jpn Acad*, 42: 517—520, 1966.
- 9) 大久保康人, 富田忠夫, 瀬尾たい子, 他: CisAB 型の血清学的性状と徳島県における分布について. 衛生検査, 28: 66—69, 1979.
- 10) 梶井英治: 最新血液型学, 南山堂, 東京, 1998, 108—109.
- 11) Cho MJ, Kim KH, Ahn DE: Eleven CisAB Families Detected Among Korean Voluntary Donors. 大韓血液学会雑誌, 20: 317—323, 1985.
- 12) 社団法人日本臨床衛生検査技師会「新輸血検査の実際」編集部会: 新輸血検査の実際, 初版, 東京, 2008, 115—144.
- 13) Economidou J, Hughes-Jones NC, Gardner B: Quantitative measurements concerning A and B antigen sites. *Vox Sang*, 12: 321—328, 1967.
- 14) 内川 誠: ABO, H, Lewis, I 血液型. 編者 遠山 博, 柴田洋一, 前田平生, 他, 輸血学, 第3版, 中外医学社, 東京, 2004, 174—195.
- 15) 日高陽子, 川田典子, 奥田 誠, 他: カラム凝集法による ABO 血液型ウラ試験弱反応検体の解析. 日本輸血学会雑誌, 51: 565—570, 2005.
- 16) 細井英司: ABO 血液型の抗原および遺伝子の解析と臨床的应用. 四国医誌, 64: 216—224, 2008.
- 17) Hult A.K., Olsson M.L.: Many Genetically defined AABO subgroups exhibit characteristic flow cytometric patterns. *Transfusion*, 50: 308—323, 2010.
- 18) 細井英司, 吉川君美枝: ABO 式血液型および cisAB 型の genotype の遺伝子解析. 臨床病理, 41: 1133—1140, 1993.
- 19) 福森泰雄: ABO variant の 1 種 cisAB 型の PCR-RFLP による診断. 日本輸血学会雑誌, 40: 111—113, 1994.
- 20) Tzeng C.H, Chen Y.J, Lyou J.Y, et al: A novel cis-AB allele derived from a unique 796C>A mutation in exon 7 of ABO gene. *Transfusion*, 45: 50—55, 2005.
- 21) 奥田久美子, 白神多佳子, 小野明子, 他: 本邦 2 例目となる cisAB02 遺伝子をもつシス AB について. 日本輸血学会雑誌, 51: 249, 2005.
- 22) 伊藤正一, 荻山佳子, 高橋美代子, 他: B 遺伝子より生じたと考えられる新たなシス AB 遺伝子. 日本輸血細胞治療学会誌, 56: 218, 2010.
- 23) 伊藤正一, 荻山佳子, 高橋美都保, 他: A₂, A₃ 型に対応する遺伝子と赤血球 A 抗原量についての解析. 日本輸血細胞治療学会誌, 56: 654—655, 2010.

QUANTITATIVE FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF A AND B ANTIGENS IN 15 PATIENTS WITH cisA₂B₃ BLOOD GROUP

Etsuko Lee¹⁾, Tomomi Takimoto¹⁾, Shuji Ozaki²⁾, Mayumi Matsumoto¹⁾,
Kyoko Takeuchi¹⁾ and Toshio Matsumoto¹⁾

¹⁾Division of Transfusion Medicine, Tokushima University Hospital

²⁾Department of Internal Medicine, Tokushima Prefectural Central Hospital

Abstract:

Flow cytometric (FCM) analysis, which can be used to detect expression levels of A and B antigens in red blood cells, is expected to be a useful method for recognizing ABO subgroups. Here, we examined the expression patterns and levels of A and B antigens using FCM in 15 patients with the cisA₂B₃ blood type, which is comparatively frequently observed in Tokushima Prefecture, and compared our findings with the results of the tube test and column agglutination technology (CAT). With regard to the A antigen, CAT findings for cisA₂B₃ red blood cells were the same level as control A₁B cells (four times level), while tube test findings were 1 : 256-512 versus 1 : 1,024 in control cells. The histogram pattern of A antigen by FCM analysis showed a relative sharp spike in cisA₂B₃, with a mean fluorescence intensity of 25.8-73.1 (%positive, 92.7-99.4%) compared with 87.6 (%positive, 99.6%) in controls. The amount of A antigen was estimated to be 70,000-850,000 molecules on cisA₂B₃ cells when compared with fluorescence intensity of controls. In contrast, the levels in B antigen in cisA₂B₃ cells were decreased to two to three times levels than control cells (four times level) as assessed using CAT, and 1 : 4-128 versus 1 : 512 in control cells as assessed using the tube test. The histogram pattern of B antigen by FCM analysis was relatively wide, with individual variation in cisA₂B₃ cells and a low mean fluorescence intensity of 0.7-4.3 (%positive, 11.5-77.3%) compared with 59.9 (%positive, 99.7%) in controls. The amount of B antigen was estimated to be <1-380,000 molecules on cisA₂B₃ cells when compared with fluorescence intensity of controls. These findings demonstrate that FCM analysis of A and B antigens can be used to more precisely evaluate the pattern and amounts of antigen expression and is extremely useful in identifying ABO subgroups.

Keywords:

flow cytometry, cisAB, ABO subgroups, analysis of A and B antigens