

赤血球 A・B 抗原減弱血液疾患における I 抗原発現低下： フローサイトメトリー法による血液型鑑別の可能性

佐藤 英洋¹⁾ 安江 静香¹⁾ 内海 真紀¹⁾ 野村 美奈¹⁾ 上田 幹夫²⁾
高見 昭良¹⁾

血液疾患でみられる赤血球 A・B 抗原発現低下と血液型亜型を血清学的に鑑別するのは難しい。ABH 抗原に転換するオリゴ糖末端付近の I 抗原は、フローサイトメトリー法で解析できるので、A・B 抗原と発現動態が一致すれば、血液疾患による A・B 抗原発現低下との診断に役立つ。A・B 抗原に異常がみられた骨髓異形成症候群 2 例、急性骨髄性白血病 1 例の I 抗原発現率をフローサイトメトリー法で調べたところ、cis AB 型を含む健常人に比べ、いずれも有意に低下していた。したがって、フローサイトメトリー法による I 抗原測定が、A・B 抗原発現低下診断の一助となる可能性が示唆された。

キーワード：ABO 血液型，AB 抗原発現低下，血液疾患，I 抗原，フローサイトメトリー

はじめに

白血病などの血液がんや骨髓異形成症候群などの疾患（以下、血液疾患）では、赤血球の A・B 抗原発現低下が疑われ、血液型亜型との鑑別に困ることがある。抗 A や抗 B 試薬との反応が弱いもしくは O 型と区別できない抗原減弱、A 血球・O 血球が並存するキメラ・モザイク様反応も報告されている¹⁾²⁾。抗原減弱を疑う症例は唾液を用いた型物質検査や血液型糖転移酵素活性測定で判定することもできるが、非分泌型では判断できない、酵素活性の低下が血液型の変異程度に比例しないなど、不確実な要素もある³⁾⁴⁾。また、フローサイトメトリー (FCM) 法による A・B 抗原検査は、血球表面への表出を量的に解析でき、亜型の分類や減弱現象の経過観察には有用とされている⁵⁾⁶⁾が、減弱現象による抗原量の変化は多岐に渡るため亜型との鑑別に利用できる可能性は低い。そこで、ABH 糖鎖と同じ糖蛋白、糖脂質、ポリグリコシルセラミドにあり、ABH 抗原を担う糖鎖末端付近にある I 抗原に着目した⁷⁾。I 抗原は糖脂質上にポリラクタミン鎖やその β 1-6 分枝構造を有し、その構造をもつバリエーションは ABO 式血液型抗原のグルカンを形成する組織特異的な糖鎖修飾を受ける⁸⁾。また、分化抗原として生後 2 年の間に i 抗原から I 抗原へ発達し、日本人での I 抗原の陽性頻度は 99.9% 以上である⁹⁾。よって、まれに存在する成人血球の Adult-i を除けば、I 抗原発現に異常を呈する可能性は低い。

そこで、A・B 抗原減弱現象を呈する血液疾患患者の I 抗原の発現動態を FCM 法で解析し、I 抗原発現低下から A・B 抗原減弱現象が予想できれば、血液型判定に役立つ。血液疾患 3 例の赤血球と亜型を含む正常な赤血球を用い、これを検証した。

対象と方法

対象は、抗 A または抗 B との反応で部分凝集を認めた血液疾患の 3 例 (3 歳男性急性骨髄性白血病 M4, 57 歳男性骨髓異形成症候群不応性貧血, 58 歳女性骨髓異形成症候群不応性貧血)。試験管法で血液型検査 (イムコア社モノクローナル抗体) を行い、抗 A₁ および抗 H レクチンとの反応 (オーソ)、抗 A、抗 B に対する被凝集価 (イムコア社モノクローナル抗体) も調べた。FCM 解析用に、人由来ポリクローナル抗 A 血清 128 倍、抗 B 血清 64 倍 (国際試薬)、人由来モノクローナル抗 I 抗体 (血液センターより供与) は 4 倍希釈し、0.01% 赤血球浮遊液 50 μ l と等量混合後、60 分間室温で反応した。非遠心にて上清除去後、FITC 標識 2 次抗体 50 μ l (Goat F(ab')₂ Anti-Human IgM, FITC, Bio Source) を加え、さらに 30 分間暗所、室温で反応した。非遠心にて上清除去後、生理食塩水 (PBS) で再浮遊した。FACS Calibur (Becton Dickinson) を用いて、抗原発現率と幾何学的平均蛍光強度 (GMFI : geometric mean fluorescence intensity) を測定し、ヒストグラムパターンより

1) 金沢大学附属病院輸血部

2) 石川県立中央病院血液内科

〔受付日：2012 年 8 月 21 日，受理日：2013 年 1 月 17 日〕

解析した. コントロールは, A₁B型血球 (11例), O型血球, cis AB (A₂B₃)型血球 (2例), 臍帯血球 (1例)を使用した. A・B抗原発現率の陰性対照にはO型を, I抗原発現率の陰性対照には臍帯血球, 陽性対照には cis AB型を含む血液疾患ではない赤血球を用いた.

結 果

オモテ検査で異常を認めた血液疾患3例の赤血球を用い, A・B抗原発現を試験管法で再確認した. 正常なA₁B型血球と比べ, 症例1, 2では抗Bに, 症例2, 3では抗Aとの反応に部分凝集を認めた. 症例2, 3の赤血球は抗A₁レクチンにも部分凝集を示し, 対照である正常A₁B型血球では(4+), cisAB型は陰性であった. 一方, 抗Hレクチンは全例で正常A₁B型血球より強い

凝集反応 (2~3+) を示した (Table 1). 抗A, 抗Bに対する被凝集価を測定した症例2, 3は, いずれも2,048倍であり正常なA₁B型血球と同値であった. A・B抗原をFCMで解析したところ, ヒストグラムパターンのマーカー2 (M2) 領域でA抗原発現率は83%, 37%, 63%, B抗原発現率は52%, 66%, 78%と正常A₁B型血球の平均95%と比べ低下した (Fig. 1, Fig. 2). 正常A₁B型血球のGMFIはA抗原で1,055±300, B抗原722±190であった. A抗原のGMFIは, 症例1で700と低値だったが, 症例2と3は944, 1,089と正常A₁B型血球値の範囲内であった. B抗原のGMFIは症例1で451と低値だったが, 逆に症例2では996とわずかに高値であった. 症例3は556と正常A₁B型血球値の範囲内であった (Table 2). 次に血液疾患症例のI抗原発現率をFCM法で検討した. ヒストグラムパターンのM2領域のI抗原発現率を正常A₁B型血球の平均94%やcisAB型の平均97%と比較すると, 30%, 65%, 49%と全例で低下し, 2峰性様のピークが認められた (Fig. 3). GMFIは正常A₁B型血球と比べ, 症例1は278と低値で, 症例2, 3は1,029, 533と正常A₁B型血球値の範囲内であった (Table 3).

Table 1 Reactivity of patient RBC with blood typing reagents

	anti-A	anti-B	A ₁ lectin	H lectin
Case 1	4+	mf	4+	2+
Case 2	mf	mf	mf	3+
Case 3	mf	4+	mf	3+
cis A ₂ B ₃	4+	2+	0	3+
A ₁ B	4+	4+	4+	±
O	0	0	nt	4+

mf: mixed field agglutination
nt: not tested

考 察

急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群患者と一部のリンパ系腫瘍患者では, 白血病幹細胞由来の赤血球系

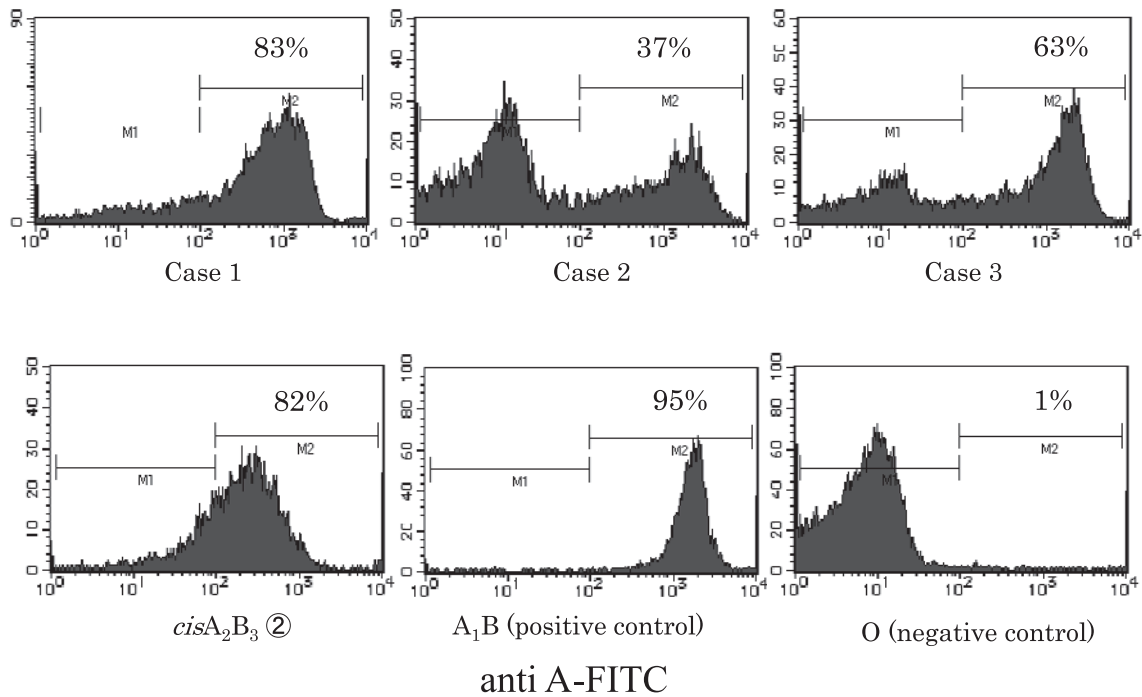


Fig. 1 Positive rate of A antigen analyzed by flow cytometry

The X axis shows anti-A fluorescence and the Y axis shows number of cells

Results are presented for red blood cells from two patients with MDS (case 2 and case 3), are patient with AML (case 1), A₁B (positive control), O (negative control), and cisA₂B₃ stained with anti-A-conjugated FITC.

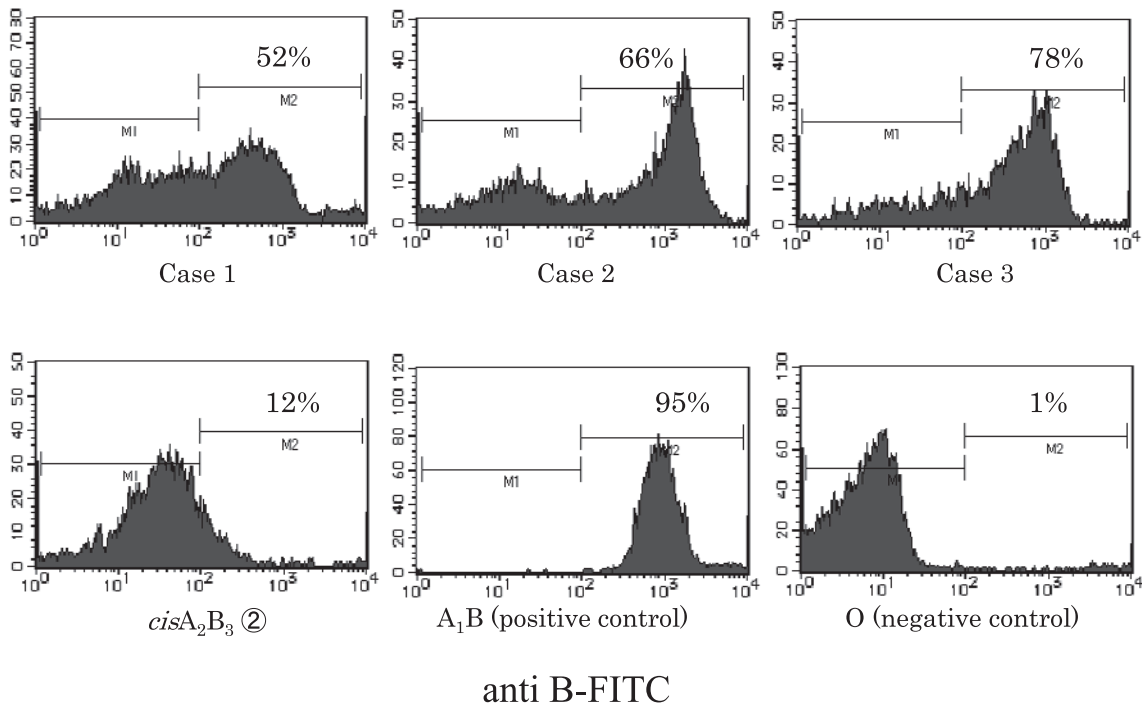


Fig. 2 Positive rate of B antigen analyzed by flow cytometry

The X axis shows anti-B fluorescence and the Y axis shows number of cells

Results are presented for red blood cells from two patients with MDS (case 2 and case 3), are patient with AML (case 1), A₁B (positive control), O (negative control), and *cis*A₂B₃ stained with anti-B-conjugated FITC.

Table 2 A and B antigen analyzed by flow cytometry

	A antigen		B antigen	
	positive rate (%)	GMFI ¹⁾	positive rate (%)	GMFI ¹⁾
Case 1	83	700	52	451
Case 2	37	944	66	996
Case 3	63	1,089	78	556
<i>cis</i> A ₂ B ₃ ①	77	287	11	259
<i>cis</i> A ₂ B ₃ ②	82	316	12	180
A ₁ B ²⁾	95±2	1,055±300	95±2	722±190

¹⁾ GMFI: geometric mean fluorescence intensity

²⁾ Value of 11 A₁B samples expressed as mean±S.D.

細胞が認められる。このような患者の 38% では、FCM 法を用いた解析により A、B および H 抗原発現は減弱している^{10)~12)}。今回の解析結果から、減弱現象が ABH 抗原と同じオリゴ糖末端付近に存在する I 抗原まで及ぶ可能性が示唆された。

試験管法で抗 A または抗 B との反応に部分凝集を示す赤血球上の A・B 抗原の発現率を FCM 法で解析したところ、試験管法では検出できない異常反応を鋭敏に捉えることができ、全症例で A・B 抗原発現率の低下が認められた。今回の解析結果から試験管法で部分凝集と捉える閾値として 70~75% 程度の発現率であることが推定された。次に、A・B 抗原をヒストグラムパターンより解析すると、症例 1 と *cis*AB 型の A 抗原発現パターンが類似、症例 2 と 3 ではキメラ様を示した(Fig.

1, Fig. 2)。GMFI を解析すると、正常 A₁B 型血球との比較で症例 1 を除き同程度であった(Table 2)。陽性分布域の血球抗原量は正常な血球と同程度維持し、抗 A や抗 B に対する被凝集価が対照 A₁B 型血球と比べ同値であること、ヒストグラムパターンが 2 峰性を示していることから、抗原発現を維持しているものとそうでない血球とが共存しているものと考えられる。また、症例 1 の数値が低いのは低年齢であるため抗原が発達段階である可能性が高い。このような減弱現象を A・B 抗原のヒストグラムパターンや蛍光強度から見ると多様なパターンを示すことが伺え、これまで報告されている亜型やキメラとの比較だけでは減弱現象との診断は困難であると考えられる。

A₁ レクチンの反応では、抗 A に部分凝集を認めた全

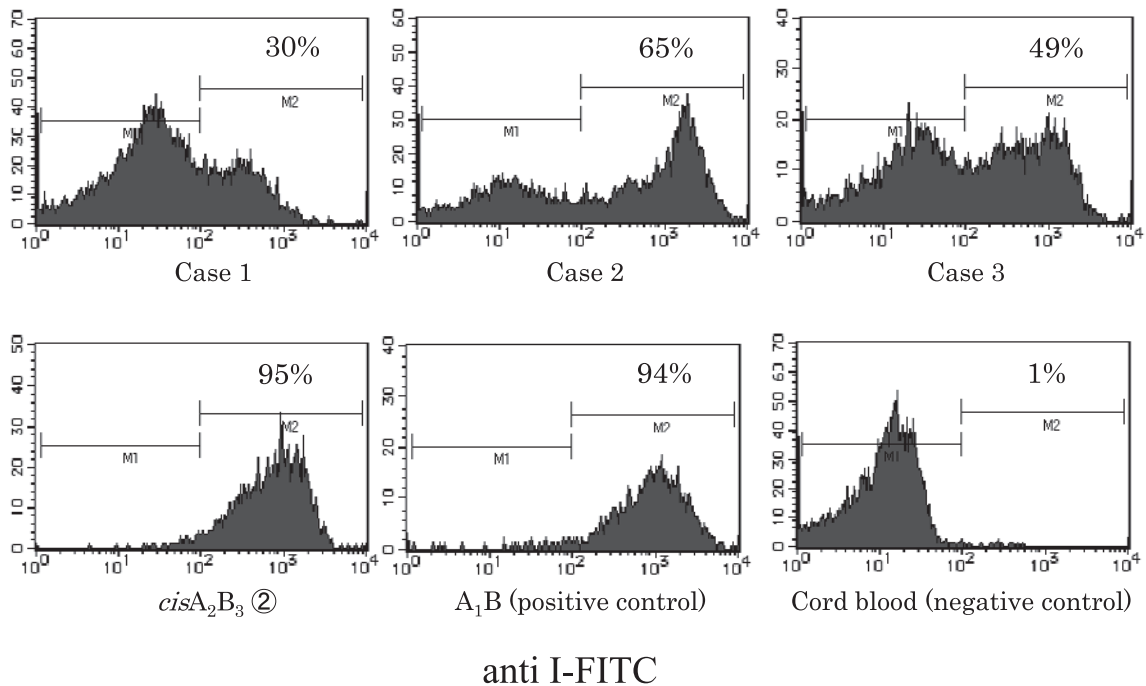


Fig. 3 Positive rate of I antigen analyzed by flow cytometry

The X axis shows anti-I fluorescence and the Y axis shows number of cells

Results are presented for red blood cells from two patients with MDS (case 2 and case 3), are patient with AML (case 1), A₁B (positive control), cord blood (negative control), and *cis*A₂B₃ stained with anti-I-conjugated FITC.

Table 3 I antigen analyzed by flow cytometry

	positive rate (%)	GMFI ¹⁾
Case 1	30	278
Case 2	65	1,029
Case 3	49	533
<i>cis</i> A ₂ B ₃ ①	98	699
<i>cis</i> A ₂ B ₃ ②	95	835
A ₁ B ²⁾	94 ± 3	853 ± 177

¹⁾ GMFI: geometric mean fluorescence intensity

²⁾ Value of 11 A₁B samples expressed as mean ± S.D.

症例に部分凝集を認めた。H レクチンには、Crookstonらの報告の通り、A₁B 型より強い反応がみられた¹³⁾(Table 1)。一方 Bianco らは¹¹⁾、骨髄由来血液疾患の A・B・H 抗原減弱現象を FCM 法で解析し、A・B・H 抗原のいずれかもしくは全てに減弱を示す症例があると報告している。本症例では、A・B 抗原発現が抑制された結果、見かけ上 H 抗原との反応が亢進したものと考えられるが、H 抗原が正常な A₁B 型と比較し減弱しているか確認が望まれる。

I 抗原の発現は正常 A₁B 型血球と比較し、血液疾患ではない *cis*AB 型では発現率の低下は認めなかった (Table 3)。これに対し全血液疾患症例で発現率の低下を認め、減弱現象が I 抗原にも存在することが明らかになっ

た (Fig. 3)。また、ヒストグラムパターンは 2 峰性を示し、GMFI は低年齢による抗原発達段階である症例 3 を除き正常 A₁B 型血球とほぼ同程度であることから、A・B 抗原での現象と同様、抗原発現を維持しているものとそうでない血球との共存状態であると考えられた。今後の検討として、減弱現象時 I 抗原発現部位における i 抗原への転換確認それに伴う抗 I 抗体の有無確認、I 遺伝子が存在する第 6 染色体 (6p24) 部位への血液疾患が及ぼす影響の検討が必要である。また、血液疾患による A・B 抗原減弱は、治療により抗原が正常に戻ることが報告されており、I 抗原の発現動態の経過観察も必要である。

I 抗原は、FCM 法で簡便かつ迅速に解析できる。血液疾患において I 抗原が ABH 抗原と同期して低下する現象が普遍的に生じていれば、A・B 抗原減弱は、I 抗原減弱をもとに様々な亜型検査を実施せずに迅速に判定できる。血液疾患患者は輸血の機会も多く、臨床的有用性は高い。血液疾患における I 抗原減弱と A・B 抗原減弱の関連を証明するため、今後多数例の検討が望まれる。

結 語

血液疾患 3 例の I 抗原発現率を FCM 法を用いて解析し、A・B 抗原発現率の低下と連動して低下することが明らかになった。よって、フローサイトメトリー法に

よる I 抗原測定は、血液疾患による A・B 抗原発現低下と先天性の特殊血液型迅速に区別でき、A・B 抗原発現低下診断の一助となる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Salmon C: Blood group changes in preleukemic states. *Nouv Rev Fr Hematol Blood Cells*, 17: 211—220, 1976.
- 2) Benson K: Decreased ABH blood group antigen expression associated with preleukemic conditions and acute leukemia: loss of detectable B, then A antigens in a group AB patient progressing from a myelodysplastic syndrome to leukemia. *Immunohematology*, 7: 89—93, 1991.
- 3) 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, 164—195.
- 4) 浅井隆善, 伊藤道博, 脇田 久, 他: 白血病に伴う血液型変異と血液型糖転移酵素活性. *日本輸血学会雑誌*, 34: 505—512, 1988.
- 5) 西野主真, 多葉田祥代, 道野淳子, 他: FCM 法による ABO 式血液型重型の解析. *日本輸血学会雑誌*, 36: 705—708, 1990.
- 6) 西野主真: フローサイトメトリーを用いた血液型抗原の解析. *日本輸血学会雑誌*, 40: 790—793, 1994.
- 7) Mark EB: Technical manual, 13th ed, AABB, Maryland, 1999, 288—289.
- 8) Varki A: さまざまなタイプのグリカンに共通の構造, 監訳 鈴木康夫, コールドスプリングハーバー糖鎖生物学, 第2版, 丸善, 東京, 2010, 149—168.
- 9) 永尾暢夫: 概論: 血液型の種類と日本人の基本的表現型. *広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査第7版(3)*, 日本臨床, 2010, 721—727.
- 10) Fialkow PJ, Singer JW, Adamson JW, et al: Acute non-lymphocytic leukemia: heterogeneity of stem cell origin. *Blood*, 57: 1068—1073, 1981.
- 11) Bianco T, Farmer BJ, Sage RE, et al: Loss of red cell A, B and H antigens is frequent in myeloid malignancies. *Blood*, 97: 3633—3639, 2001.
- 12) Daniels G: *Human Blood Groups*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom, 1995.
- 13) Crookston MC, et al: H and Ii phenotype in disease. In: Garratty G, ed, *Blood group antigens and disease*, AABB, Arlington VA, 1983, 67—84.

DECREASED I ANTIGEN EXPRESSION IN HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES WITH REDUCED RED CELL A AND B ANTIGENS: POSSIBILITY OF BLOOD GROUP DIFFERENTIATION WITH FLOW CYTOMETRY

Hidehiro Sato¹⁾, Shizuka Yasue¹⁾, Maki Utsumi¹⁾, Mina Nomura¹⁾, Mikio Ueda²⁾ and Akiyoshi Takami¹⁾

¹⁾Division of Transfusion Medicine, Kanazawa University School of Medicine

²⁾Division of Hematology, Ishikawa Prefectural Central Hospital

Abstract:

Serological differentiation of decreased red cell A and B antigen expression, seen in hematological malignancies, and serovars is difficult. I antigens that reside in the subterminal portions of oligosaccharides converted to A, B, H antigens can be analyzed with flow cytometry, and so agreement between the A and B antigens and expression dynamics is useful in diagnosing decreased A and B antigen expression due to hematological malignancies. The I antigen expression rate was investigated with flow cytometry in two patients with myelodysplastic syndrome and one patient with acute myeloid leukemia in whom A and B antigen abnormalities were seen. Results showed that it was significantly lower in all three cases than in healthy subjects. This suggests that analysis of I antigen with flow cytometry may help in diagnosing decreased A and B antigen expression.

Keywords:

ABO blood typing, decreased A and B antigen expression, hematological malignancy, I antigen, flow cytometry