

## A 型血球と O 型血球の混在を同胞間で認めた Amos の 1 家族例

柿木 康孝<sup>1)</sup> 長瀬 政子<sup>2)</sup> 高木 奈央<sup>2)</sup> 内村 大祐<sup>3)</sup> 佐藤進一郎<sup>3)</sup>高本 滋<sup>3)</sup>

発端者 (MT) は 74 歳男性で多発性骨髄腫の診断。カラム凝集法 (Ortho Auto Vue) にて抗 A に対する反応が部分凝集 (mixed-field agglutination, mf) を示した。フローサイトメトリー法 (FCM 法) では、A 型血球集団と O 型血球集団にピークをもつ 2 峰性のモザイクパターンを示した (A 型血球 72.6%, O 型血球 27.4%)。血清 A 型糖転移酵素活性は 256 倍 (対照 256 倍) と正常で、抗 A に対する非凝集赤血球を用いた抗 A 吸着解離試験は陰性であった。輸血歴はなく、双生児でもなかった。骨髄染色体は正常核型であった。これらの検査結果は治療により多発性骨髄腫が完全寛解となった後も変わらなかった。発端者の姉 (MH) は 77 歳女性で高血圧にて治療を、発端者の弟 (YT) は 71 歳男性で糖尿病にて治療を受けていた。どちらの症例も ABO 血液型検査は発端者と同様の mf を示した。FCM 法でも同様のモザイクパターンを示したが、A 型血球と O 型血球の割合は姉 (MH) では A 型血球 23.6%, O 型血球 76.4% で、弟 (YT) では A 型血球 39.3%, O 型血球 60.7% であった。血清 A 型糖転移酵素活性も正常であった。同胞 3 例の ABO 遺伝子解析 (Exon6, 7 領域の DNA シークエンス) では、発端者の遺伝子型は A101/O02 で、姉は A101/O02, 弟は A101/O01 であり、A 遺伝子型に関しては 3 例とも共通の A101 で、塩基配列の置換・欠失を認めなかった。以上の所見より同胞 3 例を Amos と判定した。今回の症例は Amos の遺伝的要因を A 型亜型と対比して考える上で示唆に富むと考えられた。

キーワード: Amos, ABO 遺伝子, フローサイトメトリー, ABO 亜型

## はじめに

同一人の個体内に血液型の異なる血球が混在する例には、1953 年 Dunsford ら<sup>1)</sup>によって報告された双生児血液型キメラ、1962 年 Gartler ら<sup>2)</sup>により報告された染色体核型 XX/XY モザイクのような重複受精キメラ (dispermic chimera) による血液型キメラ、1958 年 Cotterman ら<sup>3)</sup>による血液型モザイクなどがある。血液型キメラは異なる表現型の血球が 2 つあるいはそれ以上の異なる遺伝子に由来している状態であり、血液型モザイクは 1 つの遺伝子に由来している状態であると解釈されている。Cotterman ら<sup>3)</sup>は双生児ではない普通のヒトに 2 種類の血液型が混在している例を見出し、血液型モザイクと命名したが、その成因を体細胞の一部の突然変異 (somatic mutational change) にあると推定した。

一方、1975 年 Marsh ら<sup>4)</sup>および 1977 年 Bird ら<sup>5)</sup>は遺伝的要因を持った血液型モザイク症例を報告し、血清学的反応態度が亜型に類似していることから Amos

あるいは Bmos と呼ぶことを提唱し、その遺伝的成因は Cotterman ら<sup>3)</sup>の推定した体細胞の突然変異のみでは説明が難しいと考えられている。

今回、われわれは、ABO 血液型表試験にて部分凝集 (mixed-field agglutination, mf) を認め、フローサイトメトリー法 (FCM 法) にて A 型血球と O 型血球が混在するモザイクパターンを認める症例 (発端者) を経験した。発端者の家系調査 (姉と弟) でも、表試験では同様の mf を認め、FCM 法では A 型血球と O 型血球の割合の程度は異なっていたが同様のモザイクパターンを認めた。ABO 遺伝子検査では Exon6, 7 領域に塩基置換や欠失等のアリル変異は認めず、3 例とも A 遺伝子に関しては A101、これに対立する O 遺伝子に関しては発端者と姉は O02 で、弟は O01 であった。以上の所見からは Amos の家族例 (同胞例) であることを示唆していた。Amos の遺伝的要因を A 型亜型と対比して考える上で示唆に富む症例と考え報告する。

1) 市立旭川病院血液内科

2) 市立旭川病院中央検査科

3) 日本赤十字社北海道ブロック血液センター

〔受付日: 2013 年 1 月 7 日, 受理日: 2013 年 5 月 1 日〕

Table 1 Oligonucleotide primer pairs used for amplification and direct sequencing of ABO gene fragments

Primer designation	Primer sequence (5'-3')	Direction	Primer location	Amplified region	Tm	Fragment size (bp)
fy-46	CATGTGGGTGGCACCCGTGCCA	forward	Intron5	Exon6	77.64	240
fy-57	TCACTCGCCACTGCCTGGGTCTC	reverse	Intron6		75.78	
fy-43	CCAGGGGTGCACGGCCGGCGGC	forward	Intron6	Exon7	87.66	868
mo-71R	GGGCCTAGGCTTCAGTTACTC	reverse	3'-UTR		62.89	
ABO021s	GGAAGGATGCCTCGTGGTA	forward	Exon6	Exon6-7	63.80	2,001
mo-71R	GGGCCTAGGCTTCAGTTACTC	reverse	3'-UTR		62.89	
ABO023s	GGAAGGATGCCTCGAGGTG	forward	Exon6	Exon6-7	65.90	2,001
mo-71R	GGGCCTAGGCTTCAGTTACTC	reverse	3'-UTR		62.89	

Abbreviation Tm: melting temperature (°C)

## 対象および方法

### 【症例】

発端者 (MT) は 74 歳男性. 2008 年 8 月に多発性骨髄腫 (BJP-λ 型) と診断された. 初診時とサリドマイド治療が奏効し完全寛解 (CR) となった 2010 年 8 月の血液型検査にて同様のパターンを示す mf を認めた. 発端者の姉 (MH) は 77 歳女性, 発端者の弟 (YT) は 71 歳男性で, それぞれ高血圧, 糖尿病にて当院外来通院していた. 3 例とも, 輸血歴はなく, 双生児でもなかった. 3 例の血液型精査, 遺伝子検査の実施に当たっては, 各主治医から患者に説明し, 文書により同意を得た. また, 遺伝子検査実施に関しては院内倫理委員会の承認を得た.

### 【血液型検査】

ABO 血液型表試験はカラム凝集法 (Ortho Auto Vue) で行い, 精査では試験管法とスライド法も併用した. 使用した抗 A, 抗 B 試薬はカラム凝集法では抗 A, B モノクローナル抗体 (オーソ), 試験管法とスライド法では抗 A モノクローナル抗体 (シスメックス) を使用した. また, 市販されている抗 A 試薬の特異性に対する反応性の違いも考慮し, 抗 A ポリクローナル抗体 1 種類 (コクサイ) と抗 A モノクローナル抗体 5 種類 (ガンマ, ワコー, シスメックス, イムコア, セラクローン) 及び動物免疫 (動免) 抗 A 試薬 1 種類 (ワコー) の計 7 種の抗 A 試薬を使用して試験管法にて常法に従い検討を加えた. 試験管法の反応時間は immediate spin と室温 15 分 (15-min room temperature) で行った. 抗 A<sub>1</sub> レクチン (イムコア), 抗 H レクチン (ワコー) に対する反応も常法に従い行った. その他, Rh, MNS, Lewis, P 等の ABO 血液型以外の血液型検査には抗 A モノクローナル抗体 (シスメックス, オーソ, メディオン・ダイアグノスティックス) を用い, 試験管法にて検討を加えた. ABO 血液型裏試験はカラム凝集法 (Ortho Auto Vue) にて行い, 血清 A 型糖転移酵素活性測定にはガルサーブ AB キット (三光純薬) を用いた. 唾液中の型物質判定には抗 A モノクローナル抗体

(シスメックス) を用いて常法に従い行った.

### 【混合赤血球分離試験と吸着解離試験】

糖密度勾配法により非凝集赤血球を分離した. すなわち, 生理食塩液 (生食) にて 5% 赤血球浮遊液を調製後, 抗 A モノクローナル抗体 (シスメックス) を等量混和し反応させた. 遠心, 再浮遊後, 20% ブドウ糖に重層し, 3 分間室温垂直静置した. その後, 上層部分 (非凝集赤血球) を採取し, 生食で 3 回洗浄後, 5% 赤血球浮遊液を再調製した. 抗 A の吸着解離試験は常法に従った. すなわち, 浮遊液に抗 A モノクローナル抗体 (シスメックス) を 4~6°C で 60 分間反応させた後, 生食で 5 回洗浄し, 熱解離操作 (56°C, 8 分) を行った. その後, 上清 (解離液) を採取し, 3% A<sub>1</sub> 型, B 型, および O 型赤血球浮遊液とそれぞれ反応させた.

### 【FCM 検査】

pH7.4 phosphate buffer saline (PBS) にて調製した 5% 赤血球浮遊液と 0.5% グルタルアルデヒド含有 PBS を 1:1 で混合し, 室温で 5 分間固定後, PBS にて洗浄した. その後, PBS にて 10 倍希釈した抗 A モノクローナル抗体 (オーソ) 25μl と処理血球 10μl を混合し室温にて 30 分間反応後 PBS にて 2 回洗浄した. 次に, 標識抗体として RPE-Goat antiMouse IgMμchain Specific (ジャクソン社) 20μl を加え遮光室温にて 30 分間反応させた. PBS にて 1 回洗浄後, FACSCalibur (ベクトン・ディッキンソン社) にて細胞数 10,000 個を解析した. 陰性コントロールには O 型血球を, 陽性コントロールには A<sub>1</sub> 血球を使用した.

### 【ABO 遺伝子検査】

使用したプライマーの一覧を Table 1 に示した.

Exon6 は島ら<sup>6)</sup>が報告したプライマーセットのデザインを一部変更して作成した (fy-46, fy57). また, Exon7 の forward プライマーについても島ら<sup>6)</sup>が報告したプライマーデザイン (fy-43) を一部変更して作成し, reverse プライマーは Olsson ら<sup>7)</sup>が報告したプライマー (mo-71R) を使用した. A 型および O 型遺伝子の増幅は, Exon6 の 261 番目の欠失 (261delG) が確認できる

Table 2 Laboratory data on ABO blood typing, A antigen hemagglutination titer, serum A-glycosyltransferase activity, salivary blood group substances, and anti-A adsorption-elution test

Item tested	Propositus (MT)	Older sister (MH)	Younger brother (YT)
Anti A			
Column agglutination technology	1 + <sup>mf</sup>	1 + <sup>mf</sup>	1 + <sup>mf</sup>
Tube test			
Immediate spin	3 +	1 +	2 +
15-minute room temperature	4 + <sup>mf</sup>	4 + <sup>mf</sup>	3 + <sup>mf</sup>
Slide test	3 + <sup>mf</sup>	2 + <sup>mf</sup>	2 + <sup>mf</sup>
Anti B	0	0	0
A <sub>1</sub> RBCs	0	0	0
B RBCs	2 +	4 +	3 +
A <sub>1</sub> lectin	4 + <sup>mf</sup>	1 + <sup>mf</sup>	1 + <sup>mf</sup>
H lectin	4 +	NT	NT
A antigen hemagglutination titer (reference)	512 × (1,024 ×)	512 × (1,024 ×)	512 × (1,024 ×)
A-glycosyltransferase activity (reference)	256 × (256 ×)	256 × (128 ×)	256 × (256 ×)
Salivary blood group substances	A · H	NT	NT
Anti-A adsorption-elution test	negative	negative	negative

Anti-A adsorption-elution test was done using non-agglutinated RBCs.

Abbreviation RBCs: red blood cells mf: mixed-field agglutination NT: not tested

ように、forward プライマーには Seltsam ら<sup>8)</sup>が報告したプライマー (ABO021s, ABO023s) を使用し、reverse プライマーは Exon7 の全長が増幅されるように Olsson ら<sup>7)</sup>が報告したプライマー (mo-71R) を使用した。PCR は、QIAamp DNA Blood Mini Kit (キアゲン社) を用いて全血 200 $\mu$ l から抽出したゲノム DNA をテンプレートとして使用し、*TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version* (タカラバイオ社) を用いて以下の条件で行った。*TaKaRa Ex Taq HS* (5units/ $\mu$ l) 0.25 $\mu$ l, 10 × *EX Taq Buffer* 5 $\mu$ l, dNTP Mixture (各 2.5mM) 4 $\mu$ l, テンプレート 50~100ng, プライマー等量混合液 (各 10 $\mu$ M) 2 $\mu$ l に滅菌蒸留水を加えて全量 50 $\mu$ l の PCR 反応液を調製し、GeneAmp PCR System9700 (アプライドバイオシステムズ社) を用いて PCR を実施した。PCR 条件は、Exon6, 7 の増幅が [98°C/10 秒→68°C/30 秒→72°C/30 秒] × 40 サイクル, A, O 遺伝子の増幅が [98°C/10 秒→66°C/30 秒→72°C/60 秒] × 30 サイクルで行った。PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動して目的のバンドをゲルより切り出し、Min Elute PCR Purification kit (キアゲン社) を用いて DNA を精製した。Exon6, 7 のダイレクトシーケンスには fy-46, fy-57, fy-43, mo-71R の 4 種類のプライマーを使用し、A および O 遺伝子のダイレクトシーケンスには ABO021s, ABO023s, fy-57, mo-71R の 4 種類のプライマーを使用した。ダイレクトシーケンスは最終プライマー濃度が 3 $\mu$ M になるよう調製し、3730xl DNA Analyzer にて塩基配列の解析を行った。

## 結 果

### 血液型および血清学的解析

Table 2 に発端者 (MT), 姉 (MH), 弟 (YT) の検査結果を示した。発端者 (MT) に関しては多発性骨髄腫発症時、治療経過中および治療により CR となった時に血液型検査を再検しているが、同様の所見であった。姉 (MH), 弟 (YT) についても繰り返し検査をし、同様の所見を得ている。発端者 (MT) は抗 A に対してカラム法 1 +<sup>mf</sup>, 試験管法 (室温 15 分) 3 +<sup>mf</sup>~4 +<sup>mf</sup>, スライド法 2 +<sup>mf</sup>~3 +<sup>mf</sup> の凝集を認めた。抗 B には凝集せず, A<sub>1</sub> レクチンに 4 +<sup>mf</sup>, H レクチンに 4 + を認めた。姉 (MH), 弟 (YT) の表試験もカラム法, 試験管法, スライド法とも全く同様の 1 +<sup>mf</sup>~4 +<sup>mf</sup> を認め, A<sub>1</sub> レクチンにも 1 +<sup>mf</sup> を認めた。3 例とも A 抗原凝集素価は 512 倍 (対照 1,024 倍), A 型糖転移酵素活性は 256 倍 (対照 256 倍) と正常であった。また, 3 例の抗 A に対する非凝集赤血球を用いた抗 A 吸着解離試験では解離液中に抗 A 抗体を認めず陰性であった。発端者 (MT) のみ唾液検査をしたが, 分泌型で A 型物質と H 型物質を認めた。種々の抗 A 試薬による反応性の違いを調べるため, 市販されている 7 種類の抗 A 試薬 (対象および方法の【血液型検査】参照) を用いて試験管法 (室温 15 分) にて凝集を調べたが, 3 例とも 7 種の抗 A 試薬に対して一律に 3 +<sup>mf</sup> ないしは 4 +<sup>mf</sup> を示した。ABO 血液型以外の血液型 (Rh, MNS, P, Lewis, Duffy, Diego, Kidd, Jr, Xg) も全血を使って検討したが (Table 3), 検査したすべての血液型で mf を全く認めなかった。

### FCM 解析

Fig. 1 に発端者 (MT), 姉 (MH), 弟 (YT) 各々の

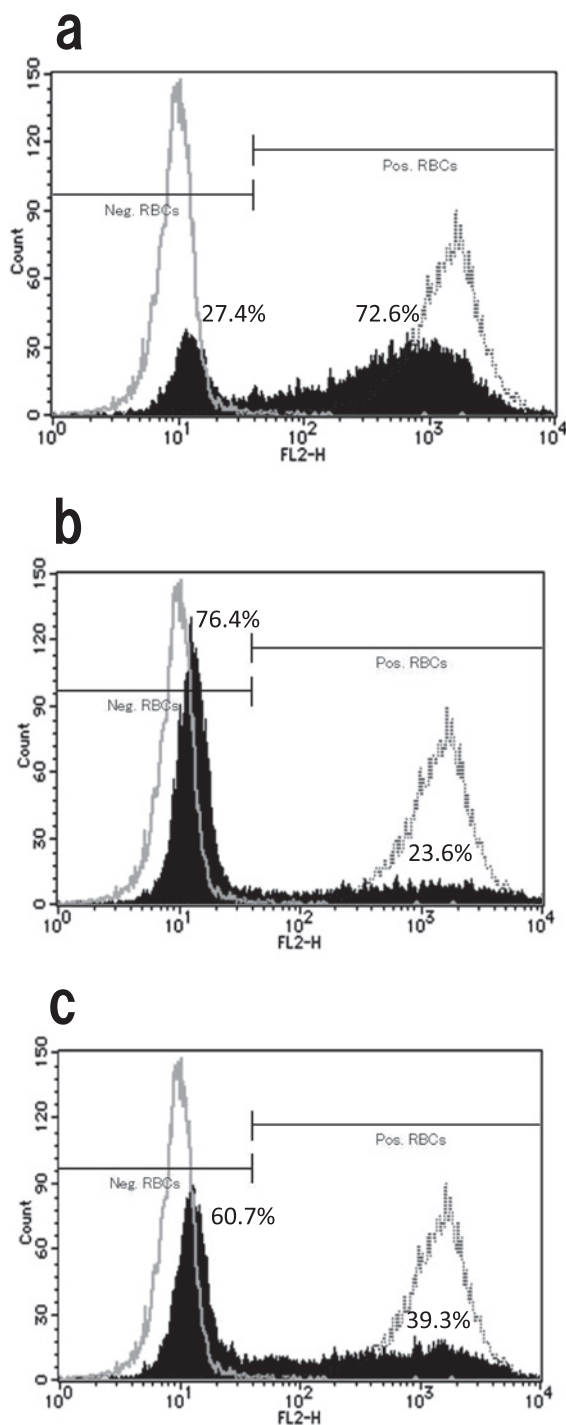


Fig. 1 Histogram patterns of A antigen analyzed by flow cytometry

Representative data from the proppositus (a), older sister of the proppositus (b), and younger brother of the proppositus (c) are shown as a dark area. Negative (O RBCs) and positive (A<sub>1</sub> RBCs) controls are shown as a thin line and a dotted line, respectively.

Values above the dark area indicates the percentage of the area occupying Neg.RBCs or Pos.RBCs tested.

X axis: fluorescence intensity on a logarithmic scale

Y axis: number of cells

Abbreviation Neg. RBCs: negative red blood cells

Pos. RBCs: positive red blood cells

赤血球と抗 A との反応をヒストグラムで示した. 3例に共通して抗 A との反応が陽性で, A<sub>1</sub> 血球の蛍光強度をもつ A 型血球集団と抗 A には全く反応しない O 型血球集団にピークをもった 2 峰性のなだらかに連続性したパターン, いわゆるモザイクパターンを認めた. しかし, A 型血球の占める割合は同胞間で異なっており, A 型血球集団のピークに高低の差を認めた. 発端者 (MT) の A 型血球は 72.6%, O 型血球は 27.4% で (Fig. 1a), 姉 (MH) の A 型血球は 23.6%, O 型血球は 76.4% (Fig. 1b), 弟 (YT) では A 型血球 39.3%, O 型血球 60.7% (Fig. 1c) であった. 発端者と比べて姉 (MH) と弟 (YT) では A 型血球の占める割合は少ない傾向にあった.

#### ABO 遺伝子解析

Exon6 (塩基 240~374) と Exon7 (塩基 375~1062) の全領域をシーケンスした. Fig. 2 には日本人に高頻度で見られる塩基置換・欠損位置 (13 カ所) での同胞 3 例の塩基配列を示した. この 13 カ所以外の 3 例の A 遺伝子塩基配列はすべて同じであった. 同胞 3 例の塩基 467, および塩基 297 はそれぞれシトシン, アデニンであり, 他の塩基にも変異, 欠損等を認めず, 3 例の A 遺伝子タイプは A101 であった. また, Fig. 2 には示していないが, 塩基 871, および塩基 1054 における塩基置換は 3 例とも認めず, それぞれグアニン, シトシンのままであった. O 遺伝子に関しては同胞 3 例とも塩基 261 のグアニンが欠損 (deletion) し, frame shift を来たしていた. 弟 (YT) はこの塩基 261 のみの欠損した O01 タイプで, 発端者 (MT) と姉 (MH) は塩基 297, 646, 681, 771, 829 がそれぞれ A→G, T→A, G→A, C→T, G→A に塩基置換した O02 タイプであった.

#### 考 察

今回, われわれが経験した同胞 3 例では, ABO 血液型検査において, 市販されている数種類の抗 A 試薬すべてにおいて mf を認め, A 型糖転移酵素活性は正常対照と差を認めなかった (Table 2). また, 抗 A に対する非凝集赤血球を用いた抗 A 吸着解離試験でも解離液中に抗 A 抗体を認めなかった (Table 2). ABO 血液型以外の血液型においても mf を認めなかった (Table 3). FCM 法による解析 (Fig. 1) では, 同胞 3 例間で A 型血球集団の占める割合の違いにより A 型, O 型血球集団のピークに高低差を認めたが, 2 峰性のなだらかに連続性したパターン, いわゆるモザイクパターンは共通していた. さらに, ABO 遺伝子検査では同胞 3 例の遺伝子型は A101/O02 ないしは A101/O01 であった. 同胞 3 例は双生児ではなく, 発端者の骨髄染色体は正常核型であった. これらの所見から, A 型と O

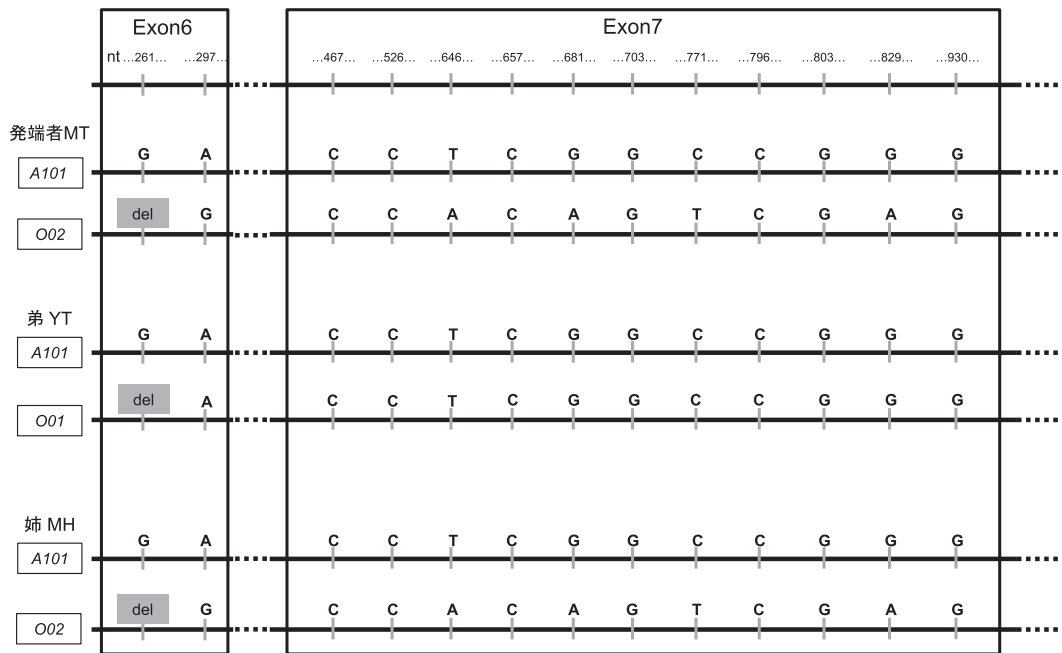


Fig. 2 Nucleotide sequences within the coding regions of exons 6 and 7 of the ABO gene. Nucleotide residues at those positions where differences were reported in ABO blood subgroups of Japanese populations are shown. Nucleotide residues at positions 871 and 1,054 were G and C, respectively (data not shown). Abbreviation nt: nucleotide del: deletion

Table 3 Blood typing except for ABO blood group

Blood type	Propositus (MT)	Older sister (MH)	Younger brother (YT)
Rh	CcDEe	cDE	CcDEe
MNSs	MNs	MNs	MNs
P	P1	P1	P1
Lewis	Le (a-b+)	Le (a-b+)	Le (a-b+)
Duffy	Fy (a+b-)	Fy (a+b+)	Fy (a+b-)
Diego	Di (a-b+)	Di (a-b+)	Di (a+b+)
Kidd	Jk (a-b+)	Jk (a+b+)	Jk (a-b+)
Jr	Jr (a+)	Jr (a+)	Jr (a+)
Xg	Xg (a+)	Xg (a+)	Xg (a+)

These blood types were identified using whole blood cells. No mixed-field agglutination was found in any of the blood types examined.

型のキメリズムは血液型キメラではなく、血液型モザイクであると考えられた。その成因としては、Cotterman<sup>3)</sup>らの推定する体細胞の突然変異では遺伝性の病態を説明することは難しく、Marshら<sup>4)</sup>およびBirdら<sup>5)</sup>が提唱した遺伝的要因を持つ血液型モザイク、Amosであると判定した。

今回の同胞3症例のように血清学的反応態度でmfを示した場合、遺伝的要因を持つA型亜型群、特にA<sub>3</sub>亜型とAmosとの鑑別が重要となる。Marshら<sup>4)</sup>およびBirdら<sup>5)</sup>は非凝集赤血球を用いた吸着解離試験ではA<sub>3</sub>亜型はA抗原を検出できるとしているが、最近では検

出できないA<sub>3</sub>亜型の報告例もある<sup>9)</sup>。A<sub>3</sub>亜型は個体差による抗Aに対する反応性の多様性により、血清学的反応態度は一様ではなく、血清学的検査では両者を明確には区別できない。一方、FCM検査では抗原量と分布幅を詳細に検討することができ、そのヒストグラムのパターンを観察することで、キメラとモザイクの鑑別が可能であり<sup>10)~12)</sup>、亜型解析の鑑別診断にも有用とされている<sup>13)14)</sup>。Fig.3にキメラ、Amos(Bmos)、A<sub>3</sub>(B<sub>3</sub>)亜型におけるFCM上のヒストグラムパターンを常山<sup>13)</sup>と李<sup>14)</sup>の報告より改変引用し模式化して示す。キメラでは陽性ピークと陰性ピークが完全に離れた明確な2峰性パターンをとり(Fig.3a)、Amos(Bmos)では2つの峰はなだらかに連なった2峰性のパターン、いわゆるモザイクパターンとなる(Fig.3b)。今回の3症例でのFCMパターンは、発端者(MT)では典型的なモザイクパターンであり、姉(MH)と弟(YT)ではA抗原量の少ないことを反映してA型血球集団のピークが小さくなっていたが、基本的には同様のパターンと考えられた。一方、A<sub>3</sub>(B<sub>3</sub>)亜型では抗A(抗B)に対する反応性の多様性から一様ではないが広がった1峰性のパターンとして観察されることが多いとされている(Fig.3c)。

近年、mfなどのABO表現型の不一致を認めた場合、その成因、病態の検索には遺伝子レベルでの検討が必要不可欠と言われている<sup>15)16)</sup>。1990年、Yamamotoら<sup>17)</sup>

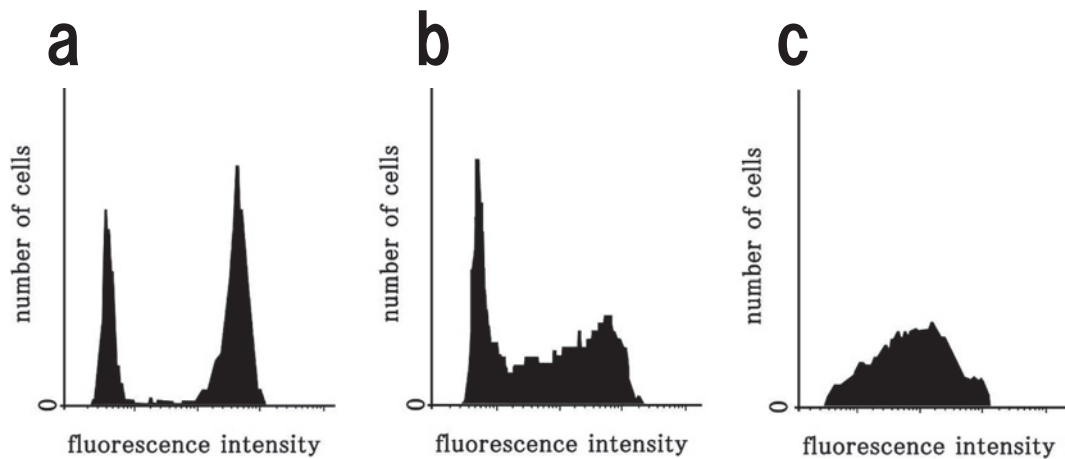


Fig. 3 Schematic representation of flow cytometric analysis in chimera (a), Amos (Bmos) (b), and A<sub>3</sub> (B<sub>3</sub>) subgroup (c) \*

\*quotation and alteration from references 13 and 14

による cDNA クローニングとゲノム DNA の構造解析により, *ABO* 遺伝子は 7 つの Exon を持ち, その cDNA は 355 アミノ酸残基をコードする 1065 塩基対からなることが明らかにされた. それ以降, A<sub>3</sub>, B<sub>3</sub> 亜型を含んだ A<sub>weak</sub> および B<sub>weak</sub> 亜型と *ABO* 遺伝子のアレル変異との関連性が多数報告されてきている<sup>7)18)~21)</sup>. Exon, Intron (Intron1 は除く) 領域を含んだ *ABO* 遺伝子の全領域にわたるシーケンス解析<sup>7)21)</sup>が行われ, *ABO* 表現型に関連するアレル変異は糖転移酵素触媒領域の 91% をコードしている Exon6 と Exon7 の 2 領域にほぼ限定して認められている. また, A<sub>3</sub> 亜型ではその領域内でのアレル変異の多様性も示されている<sup>9)</sup>. Exon6 より上流でのアレル変異で, 糖転移酵素活性に影響を与えていた症例報告は, 我々の調べた限りでは, Exon4 の塩基 203 グアニンがシトシンへの変異により A<sub>weak</sub> 亜型を呈した症例<sup>7)</sup>, Exon1 の塩基 2 チミンがシトシンへの変異で A<sub>weak</sub>B を呈していた症例<sup>22)</sup>, さらに *O* 遺伝子 *O*02 と *A* 遺伝子 *A*201 のハイブリッドアレルがあり, Exon2 の塩基 46 がグアニンからアデニンへ変異し他の既存の変異と関連して A<sub>weak</sub>B を呈していた症例<sup>23)</sup>の報告があるのみである. この 3 番目の症例は Exon6 より上流の 2 つのミスセンス変異を持つ *ABO* 遺伝子の *in vitro* 共発現により糖転移酵素活性が相加的に低下したとする結果<sup>24)</sup>を臨床的に支持している. 今回の同胞 3 例では, FCM 検査でモザイクパターンという同じ *ABO* 表現型を呈し, *A* 遺伝子は Exon6, 7 にアレル変異のない 3 例とも同じ *A*101 タイプであったということより, A<sub>3</sub> 亜型を否定し, 最終的に Amos と判定した. 岩崎ら<sup>20)</sup>は, 日本人における *ABO* 亜型の遺伝子解析 (Exon6, 7 領域) において, A<sub>3</sub> 亜型では, その 8 例中 7 例 (87.5%) で塩基 1054 がシトシンからチミンあるいはグアニンに置換していたと報告している. 今回の同胞 3 例では塩基 1054 はシ

トシンであり, われわれの判定を支持する所見の 1 つと考えられた.

これまで, Amos の家族例が Furuhashi ら<sup>25)</sup>, 北濱ら<sup>26)</sup>, 藤井ら<sup>27)</sup>により報告され, Bmos の家族例が Ogita ら<sup>28)</sup>, 岸ら<sup>29)</sup>により報告されている. また, 家系調査からは遺伝性を確認できなかった Amos と考えられる症例<sup>30)</sup>, Bmos と考えられる症例<sup>31)</sup>も報告されている. これらの報告は Yamamoto ら<sup>17)</sup>の *ABO* 遺伝子構造の解明以前の報告であり, 分子レベルでの検討はなされていない. その後, 松尾ら<sup>32)</sup>, 白数ら<sup>33)</sup>が Amos 症例を FCM と *ABO* 遺伝子検査による検討を加え報告している. しかし, 行われた遺伝子検査は松尾ら<sup>32)</sup>では PCR-RFLP 法, 白数ら<sup>33)</sup>では PCR-SSCP 法による DNA 多型解析であり, 今回の症例のようなダイレクトシーケンスによる塩基配列での検討はなされていない.

Amos (Bmos も含めて) 発症の機序は現在不明である. 今回の同胞 3 例では, 血清 *A* 型糖転移酵素活性は正常で, FCM 上はモザイクパターンを呈し, 同胞間で *A* 抗原量の多様性を認めた. さらに, *A* 遺伝子型は 3 例ともに *A*101 (塩基 467 がシトシン) であった. 岩崎ら<sup>20)</sup>は塩基 467 がシトシンであるアレルが *A* 亜型群では 86% に認められ, 明らかに日本人の *A*<sub>1</sub> 型にみられる頻度 27% に比して高かったと報告し, 亜型発症に何らかの関与を示唆しているが, Amos 発症にも関与している可能性もあるかもしれない. *ABO* 遺伝子の Exon6, 7 以外の Exon 領域のアレル変異, Intron 領域の変化, エンハンサー, プロモーター領域の変化が糖転移酵素活性に影響を与えている可能性もある. 今回の同胞 3 例では, こういった変化が *A*101 アレルの酵素触媒領域に何らかの影響を与え, 血清中の糖転移酵素活性は正常を維持できるが, 糖転移酵素の局在 (たとえば, 骨髓微小環境など) などの外的要因も関与することに

よって酵素活性に違いを生じるといった特性を獲得しているのかもしれない。糖転移酵素の質的、量的に変化した特性が ABO 表現型の個体内、個体間の差を生み、その本質的な部分は遺伝的性質を有している可能性がある。今後の Amos 症例の集積と分子レベルでの解析が待たれる。

## 結 語

Amos の家族例（同胞例）を報告した。FCM 所見（モザイクパターン）および ABO 遺伝子所見（A101）より血液型キメラ、A 型亜型（特に A<sub>3</sub>亜型）を鑑別し、今回の同胞 3 例を最終的に Amos と判定した。Amos の発症機序およびその遺伝的要因は ABO 遺伝子のアレル変異のみではない可能性が示唆された。

## 文 献

- Dunsford I, Bowley CC, Hutchinson AM, et al: A human blood-group chimera. *Brit Med J*, 81: 4827, 1953.
- Gartler SM, Waxman SH, Giblett E: An XX/XY human hermaphrodite resulting from double fertilization. *Proc Natl Acad sci USA*, 48: 332—335, 1962.
- Cotterman CW: Erythrocyte antigen mosaicism. *J Cell & Comp Physiol*, 52: 69—95, 1958.
- Marsh WL, Nichols ME, Oyen R, et al: Inherited mosaicism affecting the ABO blood groups. *Transfusion*, 15: 589—595, 1975.
- Bird GWG, Wingham J, Watkins WM, et al: Inherited 'mosaic' within the ABO blood group system. *J Immunogenet*, 5: 215—219, 1978.
- 島 正幸, 西村拓也, 吉岡 章, 他: Polymerase Chain Reaction (PCR) を用いた ABO 血液型判定の試み. *日本輸血学会雑誌*, 38: 542—547, 1992.
- Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, et al: Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood*, 98: 1585—1593, 2001.
- Seltsam A, Hallensleben M, Kollmann A, et al: Systematic analysis of the ABO gene diversity within exons 6 and 7 by PCR screening reveals new ABO alleles. *Transfusion*, 43: 428—439, 2003.
- Barjas-Castro ML, Carvalho MH, Locatelli MF, et al: Molecular heterogeneity of the A<sub>3</sub> subgroup. *Clin Lab Haem*, 22: 73—78, 2000.
- 舞木弘幸, 丸山芳一, 田畑仁美, 他: ABO 血液型モザイク症例の Micro typing system (MTS), flow cytometry (FCM), polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) による解析. *臨床検査*, 44: 1031—1034, 2000.
- 鈴木由美: 【部分凝集のあるケース】キメラ. *Medical Technology*, 31: 1653—1656, 2003.
- 斉藤 敏, 小松由美, 大田 智, 他: 成分献血者に見られた HLA-B 座モザイクと考えられる症例の解析. *日本輸血学会雑誌*, 51: 530—536, 2005.
- 常山初江: 検査業務—血液型検査を知ろう—「ABO 血液型, Rh 血液型, 亜型試験を中心に」. *医学検査*, 54: 11—21, 2005.
- 李 悦子, 瀧本朋美, 尾崎修治, 他: フローサイトメトリ法による cisA<sub>2</sub>B<sub>3</sub>型 15 例の A, B 抗原量解析. *日本輸血細胞治療学会誌*, 58: 448—455, 2012.
- Cho D, Lee JS, Yazer MH, et al: Chimerism and mosaicism are important causes of ABO phenotype and genotype discrepancies. *Immunohematology*, 22: 183—187, 2006.
- Cho D, Lee SK, Yazer MH, et al: A dispermic chimera with mixed field blood group B and mosaic 46,XY/47, XYY karyotype. *J Korean Med Sci*, 22: 553—556, 2007.
- Yamamoto F, Clausen H, White T, et al: Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*, 345: 229—233, 1990.
- Yamamoto F: Molecular genetics of ABO. *Vox Sang*, 78: 91—103, 2000.
- Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, et al: Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 1. weak subgroups: A<sup>3</sup> and B<sup>3</sup> alleles. *Vox Sang*, 64: 116—119, 1993.
- 岩崎 誠, 小林 賢, 鈴木洋司, 他: 日本人における ABO 亜型の遺伝子解析. *日本輸血学会雑誌*, 46: 532—539, 2000.
- Seltsam A, Hallensleben M, Kollmann A, et al: The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood*, 102: 3035—3042, 2003.
- Seltsam A, Gupta CD, Bade-Doeding C, et al: A weak blood group A phenotype caused by a translation-initiator mutation in the ABO gene. *Transfusion*, 46: 434—440, 2006.
- Hosseini-Maaf B, Hellberg A, Rodrigues MJ, et al: ABO exon and intron analysis in individuals with the A<sub>weak</sub>B phenotype reveals a novel O1v-A2 hybrid allele that causes four missense mutations in the A transferase. *BMC Genet*, 4: 17, 2003.
- Seltsam A, Blasczyk R: Missense mutations outside the catalytic domain of the ABO glycosyltransferase can cause weak blood group A and B phenotypes. *Transfusion*, 45: 1663—1669, 2005.

- 25) Furuhashi T, Kitahama M, Nozawa T: A family study of the so-called blood group chimera. *Proc Jpn Acad*, 35: 55—57, 1959.
- 26) 北濱陸夫: 血液型モザイクの2家系について. *信州医誌*, 12: 641—648, 1963.
- 27) 藤井美和子, 松村智子, 畑中 香, 他: 献血者より検出された Amos の一例. *血液事業 Blood Programme*, 6: 305—306, 1983.
- 28) Ogita Z, Kikkawa H, Yamamoto K, et al: Erythrocyte antigen mosaicism in a Japanese family. *Jpn Jour Human Genet*, 13: 264—271, 1969.
- 29) 岸紘一郎, 古川 研: 強さの異なる B 型血球が混在する家族例について. *北関東医学*, 27: 61—68, 1977.
- 30) 生田貞義, 小川泰子, 早川善郎: 血液型モザイクの1例について. *日法医誌*, 19: 114—121, 1965.
- 31) 坂本昌子, 芥川 薫, 小川嘉子, 他: Bmos と考えられる1例. *血液事業 Blood Programme*, 4: 196—198, 1981.
- 32) 松尾美千栄, 吉山里美, 八木沢道子, 他: Amos の1家系. *血液事業 Blood Programme*, 20: 144, 1997.
- 33) 白数さと子, 阪野志津子, 月城京春, 他: A 型血球と O 型血球が混在するモザイク様の一例. *血液事業 Blood Programme*, 20: 144, 1997.

## A FAMILY CASE OF AMOS WITH A AND O BLOOD CELLS INHERITED BY SIBLINGS

*Yasutaka Kakinoki*<sup>1)</sup>, *Masako Nagase*<sup>2)</sup>, *Nao Takagi*<sup>2)</sup>, *Daisuke Uchimura*<sup>3)</sup>, *Shinichiro Sato*<sup>3)</sup> and *Shigeru Takamoto*<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Hematology, Asahikawa City Hospital

<sup>2)</sup>Department of Central Clinical Laboratory, Asahikawa City Hospital

<sup>3)</sup>Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center

### Abstract:

Propositus (MT) was a 74-year-old male who was diagnosed with multiple myeloma (MM). When he had his blood type test before transfusion, column agglutination technology (CAT) using the Ortho Auto Vue system showed mixed-field agglutination (mf) for anti-A reagent. The histogram pattern of A antigen by flow cytometric (FCM) analysis revealed bimodal distribution of fluorescence intensity with two peaks at A and O blood groups, like mosaic pattern. The percentage positive for A antigen was 72.6%, and negative for A antigen was 27.4%. Anti-A adsorption-elution test in the non-agglutinated cell fraction was negative. He has no twin and no history of blood transfusion. His bone marrow karyotype was normal. These observations were almost constant during his treatment for MM, even after complete remission of MM. The older sister (MH) and younger brother (YT) of the propositus was a 77-year-old female under treatment for hypertension and a 71-year-old male under treatment for diabetes mellitus, respectively. Both siblings showed a similar pattern of mf in serological findings, including CAT, and a similar pattern of mosaic in FCM analysis as the propositus, although the percentage of positive for A antigen in FCM was different: 23.6% positive and 76.4% negative in the sister's FCM, and 39.3% positive and 60.7% negative in the brother's FCM. Serum A-glycosyltransferase activities of three siblings were comparable with normal control. Molecular genetic analysis for the nucleotide sequences of exons 6 and 7 of the *ABO* gene revealed the genotypes of three siblings: *A101/O02* of the propositus, *A101/O02* of the sister, and *A101/O01* of the brother. These findings indicate that the three siblings should be classified as Amos. The same *A<sup>1</sup>* allele, *A101* and the different ratios of A antigen-positive cell population among three siblings suggest the possibility that the mechanisms behind the inheritance of Amos may be dissimilar from those of A subgroups.

### Keywords:

Amos, *ABO* gene, flow cytometry, *ABO* subgroup