

血清学的性状による分類が困難であった稀な A 亜型の家系

前島理恵子¹⁾ 藤原 孝記¹⁾ 富山 秀和¹⁾ 大曾根和子¹⁾ 永友ひとみ¹⁾
 金子 強¹⁾ 蟹井はるか¹⁾ 笠井 英利¹⁾ 難波 宏美¹⁾ 灰野 夏澄¹⁾
 伊佐 和美³⁾ 小笠原健一³⁾ 松本 謙介¹⁾²⁾ 白藤 尚毅¹⁾²⁾

発端者は46歳女性、既往歴なし、近医で血液型判定不能であったため当院での精査を希望し受診した。家系調査を目的として母親70歳および長男19歳、長女17歳についても血液型検査を行った。発端者の血液型検査はAutoVueによるカラム凝集法で抗Aの反応が1+と弱く、試験管法にて抗Aは1+、抗Bは陰性、抗A₁レクチンは陰性、抗Hレクチンは4+の反応を示した。転移酵素活性測定では血漿中にA転移酵素活性は検出されなかった。フローサイトメトリーによるA抗原の解析では陰性領域にピークを有し、A_s型と類似したヒストグラムであった。ABO遺伝子解析ではexon 6と7における直接シーケンス法にてA307/O01と判定した。子供2名は発端者と同様の結果が得られた。A307は血清学的にA_sB型と分類した家系から報告されており、トランスの位置にB101を有していたことからallelic enhancementによりA抗原が増強していたと考えられている。本症例はトランスの位置にO01を有するためA抗原の発現が弱く、血清学的検査において通常検出されるA_s型よりも弱い反応を示したと考えられた。

キーワード：ABO 亜型、ABO 遺伝子、allelic enhancement

はじめに

ABO血液型には抗A、抗Bとの反応が弱い種々の亜型が存在し、血清学的に分類されている¹⁾²⁾。A亜型は、抗Aや抗A₁、抗H、抗A、Bなどの抗体試薬やレクチンとの凝集反応、血清中の抗A₁抗体の有無、転移酵素活性測定や分泌型唾液中の型物質検査により分類されている。また、近年では血液型検査にフローサイトメトリーによる抗原量の解析^{3)~7)}が行われており、ABO亜型において抗原量の違いによりヒストグラムが異なることが報告されている^{3)~6)}。一方、1990年にYamamotoら⁸⁾によってA型糖転移酵素のcDNA塩基配列が決定され、ABO遺伝子解析が行われるようになった。血清学的検査において亜型に分類された症例について遺伝子解析を行った結果、エクソンおよびスプライスサイトに塩基置換や欠失などの変異が報告されている⁹⁾¹⁰⁾。また、プロモーター領域やエンハンサー領域に変異をもつ亜型も報告されており^{11)~13)}、A、B抗原の発現が弱くなる原因について解明されている。今回我々は、血清学的性状では分類が困難なA亜型を経験した。

症 例

発端者は46歳女性、既往歴なし、近医にて血液型判定不能のため当院での精査を希望し受診した。家系調査を目的として母親70歳および長男19歳、長女17歳についても同意を得た上で検査を行った。

材料及び方法

患者検体

抗凝固剤EDTA-2Kで採血された発端者および母親、長男、長女の末梢血を使用した。

カラム凝集法

全自動輸血検査システムOrtho[®]AutoVue[®]Inova(Ortho Clinical Diagnostics, NJ, USA)を用いた。

試験管法

抗A、抗B試薬はオーソ[®]バイオクロン[®]抗A、抗B(Ortho Clinical Diagnostics)およびガンマクロン[®]抗A、抗B(IMMUCOR GAMMA, GA, USA)を用いた。抗A₁レクチン(Dolichos biflorus)および抗Hレクチン(Ulex europaeus)、Ortho[®]抗A、B血清(Ortho Clinical Diagnostics：凍結保存)との反応も常法に

1) 帝京大学医学部附属病院輸血・細胞治療センター

2) 帝京大学医学部血液内科

3) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

〔受付日：2015年11月5日、受理日：2016年2月19日〕

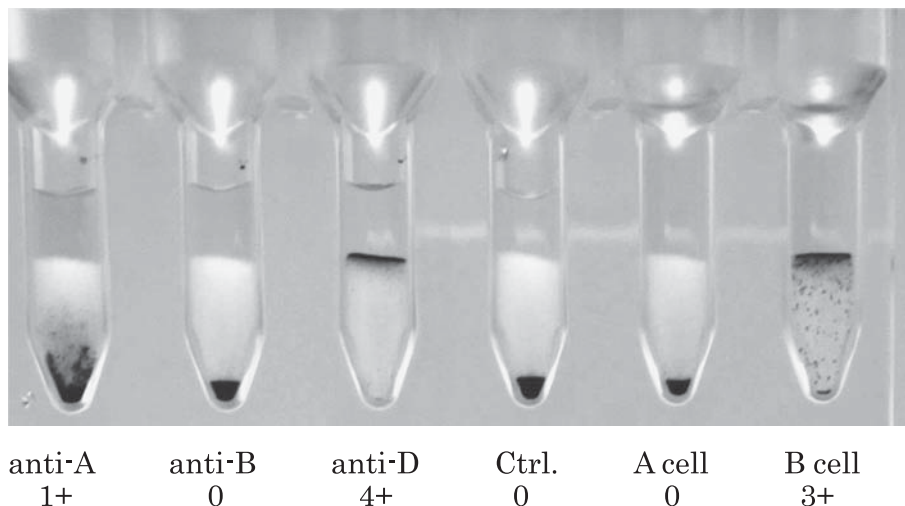


Fig. 1 Representative results of the column agglutination method. Agglutination reaction is weakly observed in anti-A column.

従い行った。また、血漿中の A 転移酵素活性測定はガルサーブ[®] AB(エーディア株式会社)を使用した。吸着解離試験は、ヒト由来抗 A 血清 (Ortho Clinical Diagnostics :凍結保存) を使用し、熱解離により得られた解離液を 3% A₁ 型, B 型, O 型の赤血球浮遊液と反応させた。

フローサイトメトリー (FCM) 法

ダルベッコ phosphate buffer saline (PBS) (和光純薬) にて調製した 0.02% 赤血球浮遊液と 0.25% 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, 22% Bovine serum albumin (BSA) (IMMUCOR GAMMA) を 0.3ml 加え混和後, 0.2% BSA-PBS で 4 回洗浄した。4% BSA-PBS 600 μ l を加えて作製した 10% 赤血球浮遊液 6 μ l とマウス由来モノクローナル抗 A (オーソ[®]バイオクロン[®]抗 A) 100 μ l を混合し, 4 $^{\circ}$ C にて 2 時間反応後 PBS で 3 回洗浄した。次に, PBS で 10 倍希釈した FITC-Goat anti-Mouse IgM+IgG (Jackson Immuno Research, PA, USA) 30 μ l を加え遮光 4 $^{\circ}$ C にて 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後, 3ml の PBS に浮遊し, BD FACSAria[™] II (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) 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 A₁ 型血球を使用した。

ABO 遺伝子検査

末梢白血血球より QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を用いてゲノム DNA を抽出した。ABO 遺伝子タイピングはジェノサーチ[™] ABO (MBL) を用いた PCR-rSSO 法を実施した。直接シーケンス法は, Ogasawara ら¹⁴⁾ の報告したプライマーを用いて ABO 遺伝子領域の Exon6 から 7 を対象とし, ABO-9 と ABO-10 により ABO 遺伝子を増幅し,

GS-AB と ABO-10 により A 遺伝子を特異的に増幅した。ABO 遺伝子および A 遺伝子を解析し, 配列を決定した。

結 果

カラム凝集法

Fig. 1 に発端者の結果を示す。抗 A (1+) であり, 部分凝集は認められなかった。抗 B は (0) であり, A₁ 血球 (0), B 血球 (3+) であった。子供 2 名も同様の反応を示し, 母親は通常の O 型と判定された。

試験管法

Table 1 に発端者, 子供 2 名, 母親の検査結果を示す。発端者および子供 2 名のオモテ検査は抗 A (1+), 抗 B (0) であった。また, 抗 A₁ (0), 抗 H (4+) であり, 抗 A, B (0) であった。ウラ検査は A₁ 血球 (0), B 血球 (3+) であった。吸着解離試験では解離液中に抗 A 抗体が認められた。転移酵素活性測定では血漿中に A 転移酵素活性は認められなかった。陽性対照 (A₁ 型) の A 転移酵素活性は 1:128 であった。母親はオモテ・ウラ不一致がなく, O 型と判定された。

FCM 解析

FCM 解析では, 陰性コントロールおよび陽性コントロールと比較すると, 発端者および子供 2 名では, 陰性領域にピークを有し, 陽性領域にわずかに分布が認められるヒストグラムであった (Fig. 2)。

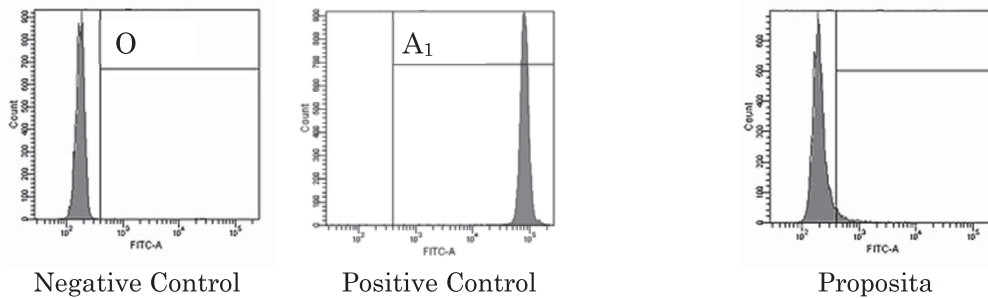
ABO 遺伝子解析

ジェノサーチ[™] ABO による遺伝子タイピングの結果を Table 2 に示す。発端者と子供 2 名は同様の結果であり, 日本人の遺伝子頻度から推定される頻度の高いアレルは A102/O01 と判定され, 189 種類の Ambiguity: 判別できないアレルの組み合わせが存在した。母親は

Table 1 Ordering ABO blood typing data, including plasma A-glycosyltransferase activity and anti-A adsorption-elution test

	Proposita	Son	Daughter	Mother
Column agglutination technology				
Anti-A	1+	1+	1+	0
Anti-B	0	0	0	0
A ₁ cell	0	0	0	4+
B cell	3+	3+	3+	4+
Tube test				
Anti-A	1+	1+	1+	0
Anti-B	0	0	0	0
Anti-A ₁	0	0	0	N.T.
Anti-H	4+	4+	4+	N.T.
Anti-A, B	0	0	0	N.T.
A ₁ cell	0	0	0	4+
B cell	3+	3+	3+	4+
Anti-A adsorption-elution test				N.T.
A ₁ cell	3+	3+	3+	
B cell	0	0	0	
O cell	0	0	0	
A-glycosyltransferase activity (reference)	0 (1 : 128)	0 (1 : 128)	0 (1 : 128)	N.T.

A: This study



B: Kamiya et al. (reference 3)

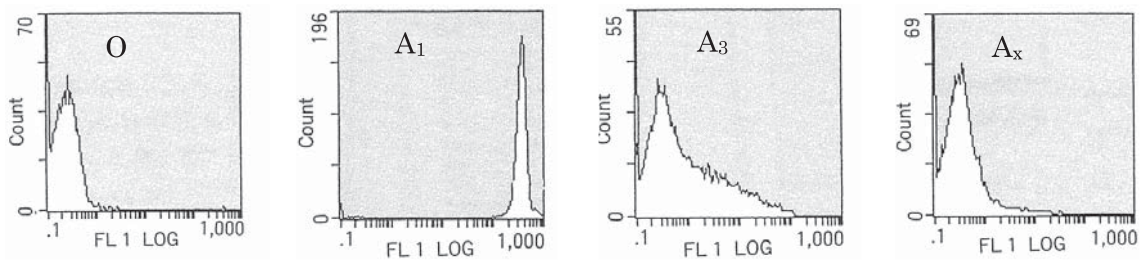


Fig. 2 Histogram patterns of A antigen using flow cytometry. Flow cytometric analysis of the expression level of A-antigen demonstrated a similar histogram pattern to A_x.

O01/-と判定され、片方のアリルを O01 と仮定すると Ambiguity は 13 種類になったがアリルを確定することができなかったため、直接シーケンス法を実施しアリルを確定した。Exon6 から 7 の全領域を対象とした直接シーケンス法の結果、A101 に対して 467 番目と 745 番目の塩基がそれぞれシトシンからチミンに置換しており、A307/O01 と判定した。子供 2 名は発端者と

同様の結果であった (Fig. 3)。母親は O01/-と判定した。

考 察

A 亜型を分類する際、抗 A との反応が弱く部分凝集を示す亜型を A₃型、さらに反応が弱い亜型を A_x型と分類し、型物質と転移酵素の有無により区別している。

Table 2 Results of Genosearch ABO

A

	Type	Ambiguity
Proposita	A102, O01	189
Son	A102, O01	189
Daughter	A102, O01	189
Mother	O01, -	54

B

Allele		intron 6		exon 7											
A101 (Reference)		163	179	425	467	539	543	556	564	745	761	767	820	860	893
		T	C	T	C	G	G	A	C	C	C	T	G	C	C
O01	A102				T										
O01	A103				T				T						
O01	A105	C	T		T										
O01	A208				T	C									
O01	A306				T								A		
O01	A307				T					T					
O01	Ael05				T							C			
O01	Ael06			C	T										
O01	Am01				T						T				
O01	Aw12				T			G							
O01	Ax09				T		T								
O01	Ax11				T									T	
O01	O14				T										T

A: Frequent ABO genotypes and their ambiguity. Possible ABO genotypes and number of ambiguity in proposita family assigned by Genosearch ABO.

B: Ambiguity allele coinherited with O01.

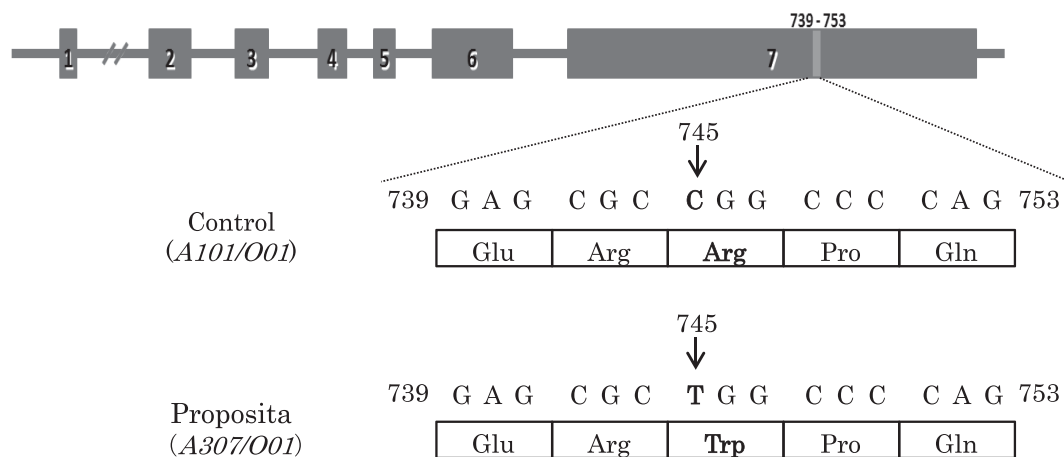


Fig. 3 Nucleotide sequence of exon 7 of ABO gene. Nucleotide sequences of exons 6 and 7 of the ABO gene revealed the genotypes A307/O01. The genotyping results for the two children were identical to the proposita. Arrows indicate the nucleotide substitution. Bold indicates the amino acid substitution.

抗 A と凝集しない亜型には A_m 型, A_{el} 型があり, 吸着解離試験により A 抗原が証明され, 抗 A₁ の有無により分類される. 近年, このような血清学的に分類された亜型について遺伝子解析が行われ, アリルの変異や抗

原発現量の違いについて研究されている.

本症例は, 抗 A に対して部分凝集を認めないことや A 転移酵素活性が検出されないことから A_x と考えられたが, 抗 A, B との反応が認められないことや抗 A₁

が存在しないことから A₃様の反応態度を示したため、亜型の分類が困難であった。また、A₃と A_xを区別する際、分泌型唾液中の型物質検査が有用であるが、本症例は3例とも非分泌型であったため実施することができなかった。

FCM解析は、抗原量の違いによりヒストグラムのパターンが異なることから亜型の解析に用いられており、抗 A で凝集が認められる A₃や A_x、キメラやモザイクの判別が可能である¹⁵⁾¹⁶⁾。本症例をこれまでに報告されているヒストグラム³⁾⁴⁾と比較すると A₃より A_xに近いヒストグラムであった。

ジェノサーチ™ ABO による遺伝子タイピングの結果では、A102/O01 が候補として判定されたが、ジェノサーチ™ ABO は、Exon 6 と 7 を対象とした特異的プローブにより 38 種類のアリルを判定する方法であり、プローブが種々のアリルに対応していないことから Ambiguity が存在し、遺伝子型を決定することは困難である。

直接シーケンス法の結果は A307/O01 と判定された。A307 は A102 に対して 745 番目のシトシンがチミンへと置換しており、この塩基置換により 249 番目のアミノ酸がアルギニンからトリプトファンに置換するため、A 糖転移酵素活性が減少することが示唆されている¹⁷⁾。

プロモーター領域やエンハンサー領域に変異をもつ A₃型¹²⁾¹³⁾について転写活性の低下が認められているが、血清学的性状において部分凝集や転移酵素活性が認められており、A₃型に特徴的な反応を示している。本症例では、このような A₃型に特徴的な反応を示しておらず、亜型分類が困難であった。

A307 は、Li ら¹⁷⁾により報告されており、A₃B (A3/B101) と A₃ (A3/O01) の同胞 2 例について調べられている。この際、A₃B のようにトランス側に B 遺伝子を有する場合は allelic enhancement により A 抗原の発現が増強し、抗 A と強く反応していたが、トランス側に O 遺伝子を有する A₃の場合、抗 A に対する反応は A₃B に比べ減弱していた。Hult ら¹⁸⁾も A_x型においてトランス側の遺伝子により A 抗原の発現量が異なることを報告している。A307 は血清学的に A₃B 型と分類された発端者より遺伝子型を決定しているが、本症例は 3 例ともトランス側に O 遺伝子を有していたため A 抗原の発現が弱く、血清学的に通常の A₃型より弱い反応を示したと考えられ、血清学的分類が困難である稀な症例であった。

同じアリルでも、もう一方のアリルとの組み合わせによって抗原の発現量が異なることがあり、血清学的検査では亜型の分類が困難な場合がある。今回、FCM解析や ABO 遺伝子解析を行うことにより血清学的反応が弱くなる原因について解明できたことから、亜型検

査においてこれらの解析を追加することは有用であると考ええる。

本症例の遺伝子型は A³/O と判定され、血清学的には A₃様もしくは A_x様亜型とし、遺伝子型を併記して報告した。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) 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，東京，2008，6—11.
- 2) Daniels G: Human Blood Groups, 3rd edition, Wiley-Blackwell, Oxford, United Kingdom, 2013, 33—38.
- 3) 神谷 忠, 佐藤陽子, 倉知 透, 他：供血者の検査—血液センターにおける血液型検査を中心に. 検査と技術, 25 : 174—181, 1997.
- 4) 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.
- 5) 李 悦子, 瀧本朋美, 尾崎修治, 他：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. 日本輸血細胞治療学会誌, 58 : 448—455, 2012.
- 6) 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.
- 7) 田中光信, 瀬尾たい子, 宮木千弥子, 他：フローサイトメトリーによる赤血球抗原の解析. [2] 間接フローサイトメトリー法による Rh 系抗原の遺伝的背景. 日本輸血学会雑誌, 33 : 702—709, 1987.
- 8) Yamamoto F., Clausen H., White T., et al: Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. Nature, 345: 229—233, 1990.
- 9) Yamamoto F., McNeill P.D., Yamamoto M., et al: Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 1. weak subgroups: A³ and B³ alleles. Vox Sang, 64: 116—119, 1993.
- 10) 小林 賢, 岩崎 誠, 鈴木洋司, 他：ABO 亜型血液型の遺伝子解析. 日本輸血学会雑誌, 40 : 107—110, 1994.
- 11) Sano R., Nakajima T., Takahashi K., et al: Expression of ABO blood-group genes is dependent upon an erythroid cell-specific regulatory element that is deleted in persons with the B_m phenotype. Blood, 119: 5301—5310, 2012.
- 12) 伊藤正一, 荻山佳子, 高橋美都保, 他：赤血球系細胞特異的な転写制御領域に一塩基置換を認めた A₃型. 日本輸血細胞治療学会誌, 60 : 273, 2014.

- 13) 伊佐和美, 山室祐子, 小笠原健一, 他: A 遺伝子プロモーター領域に新たな一塩基置換を認めた A₃型. 日本輸血細胞治療学会誌, 61: 363, 2015.
- 14) Ogasawara K., Bannai M., Saitou N., et al: Extensive polymorphism of ABO blood group gene: three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. Hum. Genet., 97: 777—783, 1996.
- 15) 伊藤正一, 荻山佳子, 高橋美都保, 他: A₂型, 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, 2010.
- 16) 柿本康孝, 長瀬政子, 高木奈央, 他: 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. 日本輸血細胞治療学会誌, 59: 593—600, 2013.
- 17) Li L., Yang M.H., Chak K.F., et al: Three missense mutations, including a novel 860C>T transition, and allelic enhancement phenomenon associated with ABO blood subgroups A in Taiwan. Transfusion, 47: 1014—1021, 2007.
- 18) Hult A.K., Olsson M.L.: Many genetically defined ABO subgroups exhibit characteristic flow cytometric patterns. Transfusion, 50: 308—322, 2010.

A RARE SUBGROUP-A FAMILY WITH DIFFICULT SEROLOGICAL CLASSIFICATION

Rieko Maejima¹⁾, Koki Fujiwara¹⁾, Hidekazu Tomiyama¹⁾, Kazuko Osone¹⁾, Hitomi Nagatomo¹⁾, Tsuyoshi Kaneko¹⁾, Haruka Kani¹⁾, Hidetoshi Kasai¹⁾, Hiromi Namba¹⁾, Kasumi Haino¹⁾, Kazumi Isa³⁾, Kenichi Ogasawara³⁾, Kensuke Matsumoto¹⁾²⁾ and Naoki Shirafuji¹⁾²⁾

¹⁾Department of Transfusion Medicine and Cell-processing, Teikyo University School of Medicine

²⁾Department of Hematology, Teikyo University School of Medicine

³⁾Japanese Red Cross Society, Blood Service Headquarters, Central Blood Institute

Abstract:

The proposita was a healthy 45-year-old female who was admitted to our hospital for a detailed examination of ABO blood types due to difficulties in classification at another hospital. Family studies were also performed with her 70-year-old mother as well as her 19-year-old son and 17-year-old daughter. Blood type tests using the automated instrument AutoVue showed weak reactivity (1+) to anti-A. Further examinations by tube tests using anti-A, anti-B, anti-A₁ lectin, and anti-H lectin showed 1+, negative, negative, and 4+, respectively. No plasma A-glycosyltransferase activity was detected. Flow cytometric analysis of the expression level of A-antigen demonstrated a similar histogram pattern to A_s. Nucleotide sequences of exons 6 and 7 of the ABO gene revealed the genotypes A307/O01. The genotyping results for the two children were identical to the proposita. According to the allelic enhancement phenomenon, the different expression of the rare A307 allele could be due to coinherited alleles. In first reported a Taiwan family classified A₃B serologically, in which the A307 was coinherited with B101, and the expression level of A-antigen was enhanced. In contrast, here, the A307 was coinherited with O01, and the weakly expressing A-antigen was detected in our reported family, which was weaker than A_s.

Keywords:

ABO subgroup, ABO gene, allelic enhancement phenomenon