

## Liquid bead array system (Luminex) による主な赤血球型遺伝子の タイピング法

佐々木佳奈<sup>1)</sup> 鈴木 由美<sup>2)</sup> 伊佐 和美<sup>1)</sup> 長部 隆広<sup>2)</sup> 大河内直子<sup>2)</sup>  
東 史啓<sup>2)</sup> 内川 誠<sup>2)</sup> 小笠原健一<sup>1)</sup> 佐竹 正博<sup>1)</sup>

DNA による赤血球型遺伝子タイピングは血清学的検査を補う有用な方法である。しかし、人種による多型性の相違もあるため、日本人を対象とした赤血球型遺伝子検査法の開発および検討を行った。

日本人献血者 5,036 人を対象とし、Rh (RhCcEe), MNS, Duffy, Kidd, Diego, Dombrock 式血液型について検討した。血液型判定に重要な既知の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) について Liquid bead array system (Luminex) による血液型判定を行い、血清学的検査による表現型と比較した。不一致が認められた検体については、直接シーケンス法により塩基配列を解析した。

日本人 5,036 例の解析を行った結果、表現型との一致率は Duffy と Diego では 100%, Rh, MNS, Kidd についてもそれぞれ 99.8% 以上を示した。なお、不一致となった主な原因は変異型や null 遺伝子によるものであった。本法は網羅的なタイピングが可能であり、輸血後患者の血液型判定や直接クームス陽性例、抗体の入手が困難な血液型など、血清学的検査では判定の難しい例にも有用である。

キーワード：赤血球型遺伝子、遺伝子タイピング、Luminex、Liquid bead array

### はじめに

DNA による赤血球型遺伝子タイピングは血清学的検査を補う有用な方法であり、臨床的に重要な血液型を判定するための網羅的な方法も開発されている<sup>1)~4)</sup>。欧米では、赤血球型遺伝子タイピングキットとして、DNA チップや Liquid bead array system (Luminex) を利用したキットが市販されている。しかし、これらはコストが高く、新たな対立遺伝子の追加などを独自で行えないのが難点である。また、日本人の赤血球型遺伝子の解析はまだ十分に行われていないため、欧米で開発されたキットが日本人の多型に則したものであるか不明である。したがって、赤血球型遺伝子のタイピングを行うにあたり、日本人の多型を知ることが必須である。そこで、Luminex 蛍光ビーズを用いた網羅的な SNP タイピング法を検討し、その過程で表現型と不一致を生じた例をもとに改良を重ね、日本人の多型に則した赤血球型遺伝子タイピング法を確立した。

### 材料と方法

#### 血液検体

解析対象としたのは、日本赤十字社関東甲信越ブロッ

ク血液センターの日本人献血者からランダムに抽出した 5,036 人の血液検体である。本研究は日本赤十字社の倫理委員会においてヒトゲノム・遺伝子解析研究の承認を得ており (承認番号 2013-006)、献血者へは血液型の遺伝子解析を行う説明とその同意を得ている。

#### 血清学的検査

標準的な血清学的検査 (用手法) により Rh (RhCcEe), MNS, Duffy, Kidd, Diego の表現型を判定した。使用した抗体は、抗 C (自家製 HIRO-222), 抗 c (自家製 HIRO-174), 抗 E (自家製 HIRO-25), 抗 e (自家製 HIRO-38 または HIRO-223), 抗 M (自家製 CBC-1 または CBC-155), 抗 N (自家製 HIRO-29), 抗 S (バイオクロン抗 S, オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社), 抗 s (抗 s 血清, オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社), 抗 Fy<sup>a</sup> (抗 Fy<sup>a</sup> 血清, オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社), 抗 Fy<sup>b</sup> (自家製 HIRO-31), 抗 Jk<sup>a</sup> (自家製 HIRO-183), 抗 Jk<sup>b</sup> (近畿ブロック血液センター製 OSK35), 抗 Di<sup>a</sup> (自家製 HIRO-134), 抗 Di<sup>b</sup> (自家製 HIRO-87) である。なお、Dombrock 式血液型については、抗血清が市販されていないため、遺伝子タイピングのみ行った。

1) 日本赤十字社中央血液研究所

2) 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター

〔受付日：2016 年 10 月 24 日, 受理日：2017 年 1 月 21 日〕

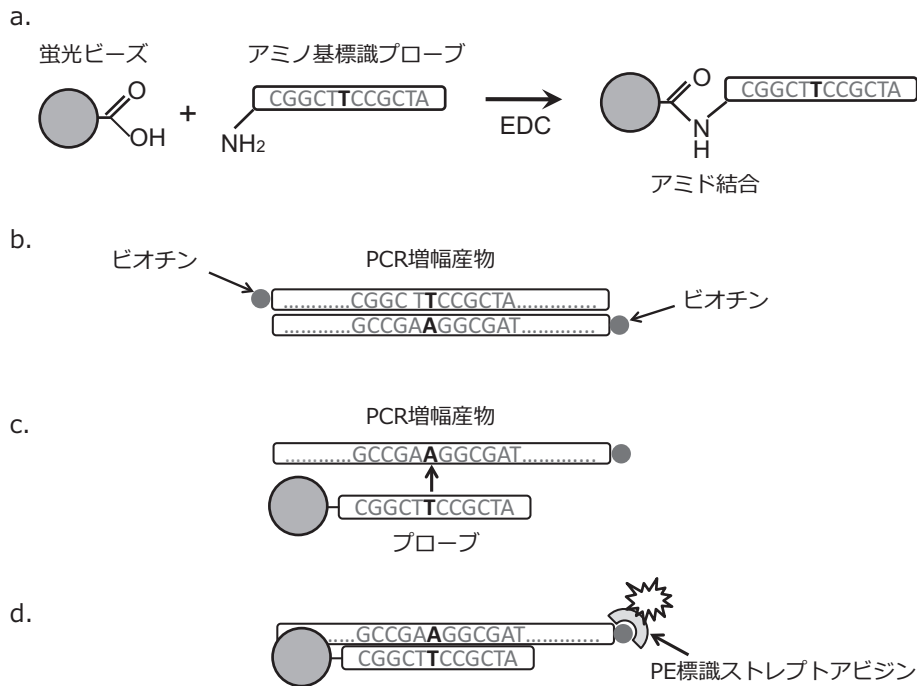


図1 カップリングからアッセイまでの概略

- カルボキシル基がコートされた蛍光ビーズとアミノ基標識したプローブをEDCを用いて脱水縮合反応により結合。
- ビオチン標識したプライマーを用いた multiplex-PCR。
- 蛍光ビーズをカップリングさせたプローブをPCR増幅産物にハイブリダイズ。
- ビオチンとPE標識ストレプトアビジンとの反応。

## DNA 試料

遺伝子タイピングには全血から抽出したゲノム DNA を用いた。ゲノム DNA の抽出は QIAamp DNA Blood mini Kit (Qiagen) を用い、製品の取り扱い説明書に従って行なった。

## Luminex 法による赤血球型遺伝子タイピング

今回検討した Luminex 法による赤血球型遺伝子タイピングの概要は、1) 遺伝子タイピング用蛍光ビーズの調整、2) Multiplex PCR による全 SNPs を含む DNA 断片の増幅、3) ハイブリダイゼーションと Luminex 100 による測定、4) cut off 値の設定および遺伝子型の判定である。図1にカップリングからアッセイまでの概略を示した。

### 1) 遺伝子タイピング用蛍光ビーズの調製

対象とした赤血球型遺伝子は、RHCE, MNS, FY, JK, DI, DO で、それぞれの抗原に対応する SNPs とプローブを表1に示した。RHCE\**C* のプローブは、イントロン2の挿入配列<sup>9)</sup>に基づき作製した。SNPs を検出するプローブ21種類と、multiplex-PCR が適切に行われたことを確認するための内標準プローブ10種類(表2)を以下の手順に従い、それぞれ色調の異なる蛍光ビーズ (MicroPlex Microspheres, Luminex Corp.) に結合させた。カルボキシル基がコートされた

蛍光ビーズ  $6.25 \times 10^5$  個を 0.1M 2-Morpholinoethanesulfonic acid (MES, pH 4.5, SIGMA) 50 $\mu$ l で懸濁し、100 $\mu$ M アミノ基標識プローブ (ユーロフィンジェノミクス株式会社) 2 $\mu$ l と 50mg/ml 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC, Thermo Scientific Pierce) 2.5 $\mu$ l を加え、室温遮光下で30分放置した。新たに調整した 50mg/ml EDC 2.5 $\mu$ l を再度加え、室温遮光下で30分放置後、0.02% polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20, Bio-Rad) 1,000 $\mu$ l で洗浄した。さらに0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS, Bio-Rad) 1,000 $\mu$ l で洗浄後、10mM Tris-HCl-1mM EDTA (TE, pH 8) 100 $\mu$ l に懸濁し、Luminex 装置を用いて 1 $\mu$ l 中のビーズ数を計測した。最終的にすべてのタイピング用蛍光ビーズがそれぞれ 500 個/ $\mu$ l となるように混合調整し、ビーズミックス試薬とした。

### 2) Multiplex PCR による全 SNPs を含む DNA 断片の増幅

5' 末端をビオチン標識したプライマーを用いて multiplex-PCR を行った(表3)。各プライマーを 25pmol/ $\mu$ l に調製し、表3に示した容量比でプライマーミックスを作製した。PCR は DNA 2 $\mu$ l (60ng)、プライマーミックス 0.8 $\mu$ l、PCR Buffer [62.3mM Tris-HCl (pH 8.8), 12.5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.25mM MgCl<sub>2</sub>, 24.9 $\mu$ M dNTP

表1 DNA タイピングの対象 SNP とプローブの塩基配列

血液型	遺伝子 (多型)	対象 SNP または変異	プローブ名	プローブの塩基配列 (5'-3')
Rh	<i>RHCE</i> *C	イントロン2の挿入配列 <sup>5)</sup>	BC-I2F3a	<u>TGCCCTTTGTC</u> ACTTCCCAGT
	<i>RHCE</i> *c	c.307C	LC6a	TTCTGAGCCAGTTCCTCCTG
	<i>RHCE</i> *E	c.676C	BE2a	GTGTCAACTCTCCTCTGCTGA
	<i>RHCE</i> *e	c.676G	LE1a	AAGTGCAACTCTGCTCTG
MNS	<i>GYP</i> A*M	c.59C	M1a	ATATCAGCATCAAGTACCACTG
	<i>GYP</i> A*N	c.59T	N6a	ATATCAGCATTAAGTACCACTGAGG
	<i>GYP</i> B*S	c.143T	BS1a	ATAGGAGAAA <u>TGGG</u> ACAACCTT
	<i>GYP</i> B*s	c.143C	LS1a	ATAGGAGAAA <u>C</u> GGGACAACCTT
Duffy	<i>FY</i> A	c.125G	FYA4Ra	GGTTGGCACCATAGTCTCCATC
	<i>FY</i> B	c.125A	FYB2a	GGAGACTATGATGCCAACCTGG
	<i>FY</i> *X	c.265T	FYX1a	CTCTCTTCTGCTGGCAGCT
	Common	c.265C	FYNX1a	CTCTCTTCTGCTGGCAGCT
	<i>FY</i> *Null	c.67C	FYG1a	TTGGCTCTTACCTTGGGAAGCA
Kidd	Common	c.-67T	FYNG1a	TTGGCTCTTATCTTGGGAAGCA
	<i>JKA</i>	c.838G	JKA1a	CCCATTGAGACATCTACTT
	<i>JKB</i>	c.838A	JKB1a	CCCATTGAGACATCTACTT
Diego	<i>JKB</i>	c.838A & c.840T	JKBv1a	GCCCCATTGAGAAATATCTACTTT
	<i>DIA</i>	c.2561T	DIA2a	AGTCCACGCTGGCCTCCC
	<i>DIB</i>	c.2561C	DIB2a	AGTCCACGCTGGCCTCCC
Dombrock	<i>DOA</i>	c.793A	DOA2a	TACCACCAAGAGGA <u>A</u> ACTGG
	<i>DOB</i>	c.793G	DOB1a	CCAAGAGGAG <u>A</u> CTGGTTGCA

アンダーラインは SNP または特異的な配列

表2 内標準プローブの塩基配列

血液型	対象遺伝子 (多型)	プローブ位置	プローブ名	プローブの塩基配列 (5'-3')
Rh	<i>RHCE</i> *C	イントロン2挿入配列	BC-c1Ra	TCAAATGGTGGTGGCCCTGGT
	<i>RHCE</i> *c	エキソン2	LC-c2Ra	GCCAGCATGAAGAGGTTGAA
	<i>RHCE</i> *E/e	エキソン5	Ee-c2Ra	AGAACATCCACAAGAAGAGG
MNS	<i>GYP</i> A	イントロン1	MN-c1Ra	GGGATTAAGAACGAGGTGACT
	<i>GYP</i> B	イントロン3	Ss-c1Ra	AAGACATGTGCAAAGAAAA
Duffy	<i>FY</i> A/ <i>FY</i> B/ <i>FY</i> *X	エキソン2	FY-c1Ra	CATCCAGCAGGTTACAGGAGT
	<i>FY</i> *Null	エキソン1	FYG-c2Ra	CCTGTGCAGACAGTTCCCCAT
Kidd	<i>JKA</i> / <i>JKB</i>	エキソン9	JK-c1Ra	AATGCAGGCCAGAGAGCTGTTG
Diego	<i>DIA</i> / <i>DIB</i>	エキソン19	DI-c2Ra	ACAGCACTGCCAGGCAGATGA
Dombrock	<i>DOA</i> / <i>DOB</i>	エキソン2	DO-c4Ra	TAAACAGCTCATAGGGAGG

を含む]を16.04 $\mu$ l, r-Taq (TaKaRa) 0.8Uを混和し, 総量20 $\mu$ lで行なった. PCR条件は, 94 $^{\circ}$ C, 3分で熱変性後, 熱変性94 $^{\circ}$ C, 15秒とアニーリング60 $^{\circ}$ C, 60秒の2stepで35サイクル行なった後, 伸長反応72 $^{\circ}$ C, 5分を加えた.

3) ハイブリダイゼーションとLuminex装置による測定

Multiplex PCRで得られたPCR産物5 $\mu$ lをDenaturation Solution (One Lambda Inc.) 2.5 $\mu$ lに懸濁し, 室温で15分放置後, Neutralization Buffer (One Lambda Inc.) 5 $\mu$ lで懸濁し, 氷中で5分放置した. 次に, ビーズミックス試薬1 $\mu$ lにHybridization Buffer (One Lambda Inc.) 36 $\mu$ lを加え, 50 $^{\circ}$ C, 25分でハイブリダイズした. Wash Buffer (One Lambda Inc.) 100 $\mu$ lを加えて2,000 $\times$ g, 2分で遠心後, 上清を取り除き, 再度

Wash Buffer 100 $\mu$ lを加えて2回洗浄した. 次いで, R-phycoerythrin (PE) 標識ストレプトアビジン (One Lambda Inc.) 50 $\mu$ lを加えて50 $^{\circ}$ C, 10分で反応させた. Wash Buffer 100 $\mu$ lで2回洗浄後, xMAPシース液 (Luminex Corp.) 50 $\mu$ lで懸濁し, Luminex装置 (Luminex 100)により蛍光強度の中央値 (Median Fluorescence Intensity: MFI)を測定した. 蛍光値が著しく低い場合や特異性が認められない場合は, プローブの長さや対象SNPの位置を変更するなど, 判定に適した条件を検討した. データ解析にはLuminex 100 IS Software (Luminex Corp.)を用いた.

4) cut off値の設定および遺伝子型の判定

各赤血球型遺伝子のSNPsに対してすべてに陽性(ホモ接合型とヘテロ接合型)と陰性が含まれるように15種類のDNA検体を選択し, さらに精製水を含めた16

表3 Multiplex-PCR用ビオチン標識プライマーの容量比と塩基配列

遺伝子 (多型)	プライマー	容量比	塩基配列 (5'-3')	PCR産物 (bp)
<i>RHCE</i> *C	BC-I2F4b	1	TCATTGCTATAGCTTAAGGACTCA	207
	BC-I2R7b	1	AATTAGCCGGGCATGGTAGCAG	
<i>RHCE</i> *c	LC-LF2b	1	GGGCTTCCTCACCTCAAA	264
	DCE-I2LR2b	1	GCACAGCACTGGTGCTAGA	
<i>RHCE</i> *E/e	DCE-I4LF1b	1	TGGAGCAGGAGTGTGATTCT	161
	CE-E5LR1b	1	ACCACACTGACTGCTAGAGCA	
<i>GYPB</i> *M/N	MN-LF1b	1	GAGGGAATTTGTCTTTTGCA	261
	MN-LR1b	1	GTGACAGGTCCCCTAAAATG	
<i>GYPB</i> *S/s	S-LF2b	1	GGAAACCCGCAGAACAGTTT	135
	S-LF2Gb	2	GGAAACCCGCAGAACAGTTT	
	S-LR2b	2	CATACCTGGTACAGTAAAC	
<i>FYA</i> / <i>FYB</i> / <i>FY</i> *X	FY-LF1b	1	AAGTCAGCTGGACTTCGAAG	282
	FY-LR2b	2	AATGCTGAAGAGGGCACTG	
<i>FY</i> *Null	FY-09fb	1	ATAGCCTGAGGCTTGTGCA	231
	FY-10rb	2	GCATAGGGATAAAGGACTCTG	
<i>JKA</i> / <i>JKB</i>	JK-6f01b	1	ACATCCTGCCTTTAGTCCTGA	230
	JK-6r02b	1	AGATCCTGTAGTCATGAGCA	
<i>DIA</i> / <i>DIB</i>	DI-LF1b	1	ACTTATTCACGGGCATCCAG	145
	DI-LR1b	1	TCCACGTTCTGAAGATGAG	
<i>DOA</i> / <i>DOB</i>	DO-LF1b	1	GTACAGTACTTCTCCCTCAAG	190
	DO-LR1b	1	TGGTCTGTGATCCTGAGTG	

ビオチン標識はプライマーの5'側に行なった

検体をコントロールとした。このコントロールを4重測定し、各SNPsの測定結果からMFIの最小陽性値(Pmin)と最大陰性値(Nmax)を選び、その平均値をcut off値とし、以下の式により求めた。

$$\text{cut off} = (\text{Pmin} - \text{Nmax}) \times 1/2 + \text{Nmax}$$

cut off値を求めた例を図2に示した。*RHCE*\*CはPmin=500, Nmax=9でcut off値は254になったが、*GYPB*\*NはPmin=504, Nmax=310でバックグラウンドが高く、cut off値は407であった(図2a, 2b)。しかしながら、2つの対立遺伝子(対立抗原)の測定結果とcut off値を2次元図にすると視覚的にも判定が容易で、ホモ接合型とヘテロ接合型の判別も可能であった(図2c, 2d)。なお、精製水のMFIの値は、0付近であった。このcut off値の設定に起因する表現型との不一致は認められず、この計算式は妥当であると考えられた。

一方、血清学的検査が行なえなかったDombrock式血液型遺伝子では、*DOA*と*DOB*ともにPminとNmaxの差が顕著で、判定も容易であった(図3a)。さらに、内標準コントロールもPmin=3,304に対しNmax=14と低く、高い感度と特異性が認められた(図3b)。

なお、これらの基礎データに基づいて、実務的な遺伝子タイピングでは、精製水を含む8種類のコントロールDNA検体を用いて2重測定で行なっている。

#### 直接シーケンス法とLong-Range (LR) PCR

各赤血球型遺伝子の塩基配列は、それぞれのエキソンを増幅するプライマーをデザインし、Cycle Sequencing Kit (BigDye Terminator v1.1, Invitrogen Life Sci-

ence Technologies)を用いて直接シーケンス法により決定した。*RHCE*遺伝子のエキソン1からエキソン5を調べるLR PCRは、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa)を用いて取り扱い説明書に従って行い、プライマーペアにはRh-ENT (5'-CACCATGAGCTCTAAGTACCCGC-3')とCE5-R1 (5'-TGTGACCACCCAGCATTTCTT-3')を使用した。

## 結 果

### Allelic dropoutによる偽陰性反応

献血者検体2,000例をLuminex法でタイピングし、遺伝子型と表現型を比較した結果、*JKB*遺伝子と*DIA*遺伝子に2例ずつ、*GYPB*\*s遺伝子に4例の偽陰性を認めた。直接シーケンス法で解析を行なった結果、以下のSNPsを検出した。*JKB*ではプローブ配列中にc.840C>T (rs769735265)のサイレント変異、*DIA*ではプライマー配列中にc.2626C>T (Leu876Phe: rs5025)のミスセンス変異、*GYPB*\*sではプライマー配列中にc.137-77C>G (rs145033200)を認めた。そこで、*JKB*については検出されたSNPに相補的な蛍光ビーズ*JKB*-v1aを追加し(表1)、*DI*のPCRについてはプライマーの位置を変更し、*GYPB*\*sについてはSNPに相補的なプライマーS-LF2Gbを追加した(表3)。これらの変更により偽陰性反応が解消されたため、5,036例までの遺伝子タイピングはこの改良法で行なった。

### 表現型と遺伝子型の一致率

全検体5,036例の表現型と遺伝子型を調べた結果を表



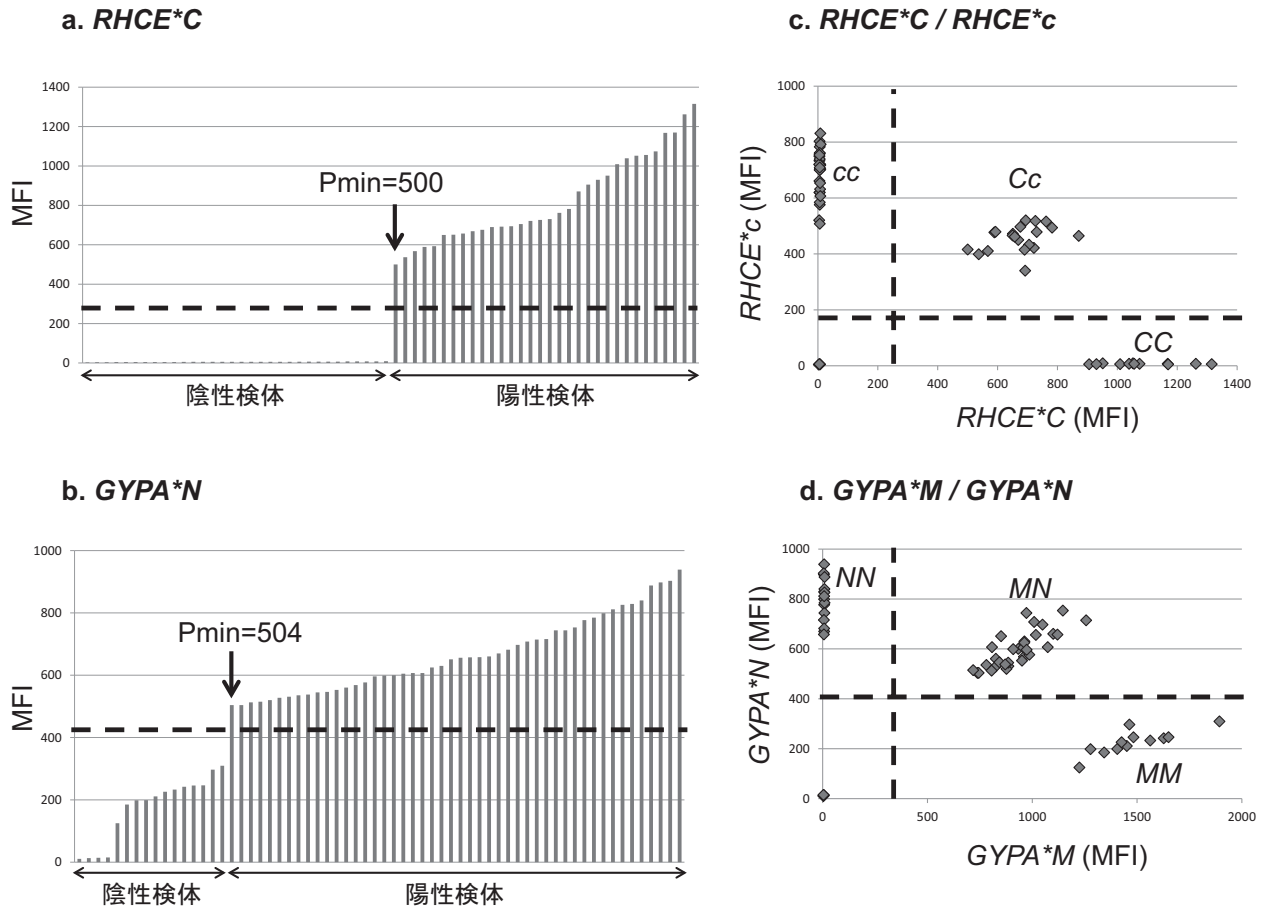


図2 Luminex法のcut off値設定

- 破線は  $RHCE^*C$  の cut off 値 = 254.
- 破線は  $GYPA^*N$  の cut off 値 = 407.
- $RHCE^*C$  (cut off = 254) と  $RHCE^*c$  (cut off = 174) の測定結果の2次元図.
- $GYPA^*M$  (cut off = 364) と  $GYPA^*N$  (cut off = 407) の測定結果の2次元図.

4に示した。表現型と遺伝子型の一致率は Duffy と Diego では 100%, Rh, MNS, Kidd についてもそれぞれ 99.8% 以上であった。

#### 不一致例の解析

Rh 式血液型では 1 例に不一致が認められ、表現型が  $C+c-E-e+$  であったのに対し、遺伝子型は  $Ce/CE$  とタイプングされ、 $RHCE^*E$  が偽陽性を示した。Luminex の測定結果では、 $RHCE^*C$  ホモ型コントロールに対してヘテロ型程度の MFI 値を示したため(図 4a 矢印)、 $RHCE^*CE$  遺伝子に何らかの変異を生じている可能性が示唆された。直接シークエンス法で調べた結果、エキソン5に  $RHCE^*E$  に特異的な SNP(c676G>C: rs609320) が認められたが、他に変異は確認できなかった。そこで、エキソン単位の欠失を疑い LR PCR を行なった結果、約 12kb の増幅産物が得られた(図 4b, レーン 3 矢印)。直接シークエンス法によりエキソン 2 を含む大規模な欠失を生じていることが分かった。

MNS 式血液型では 5 例に不一致が認められた。内訳

は表現型が  $M+N-$  で遺伝子型が  $MN$  であった 3 例、 $M-N+$  が  $MN$  であった 1 例、 $M+N+$  が  $MM$  であった 1 例である。MNS 式血液型には Stones 以外に Miltenberger など、 $GYPA$  と  $GYPB$  のハイブリッド遺伝子によるバリエーションが認められるため、直接シークエンス法による解析を試みた。詳細なデータは示さないが、ハイブリッド遺伝子をはじめ  $GYPA$  と  $GYPB$  遺伝子に変異は確認できなかった。血清学的な判定ミスも考えられたが、再検査を行なうことができなかったため、不一致の原因は不明である。

Kidd 式血液型では表現型と遺伝子型の不一致例が 9 例認められ、すべて偽陽性であった(表 5)。直接シークエンス法により、6 例から既知の null 遺伝子が検出され<sup>6)</sup>、残りの 3 例からは c.946+2T>A, c.758C>A (p.Ser253Tyr) または c.441insT (p.Leu147PhefsX70) を有する新たな  $JK$  遺伝子が検出された。これらの新たな変異は、null 遺伝子に対応するものと推定されるが、特にミスセンス変異 c.758C>A については、発現実験

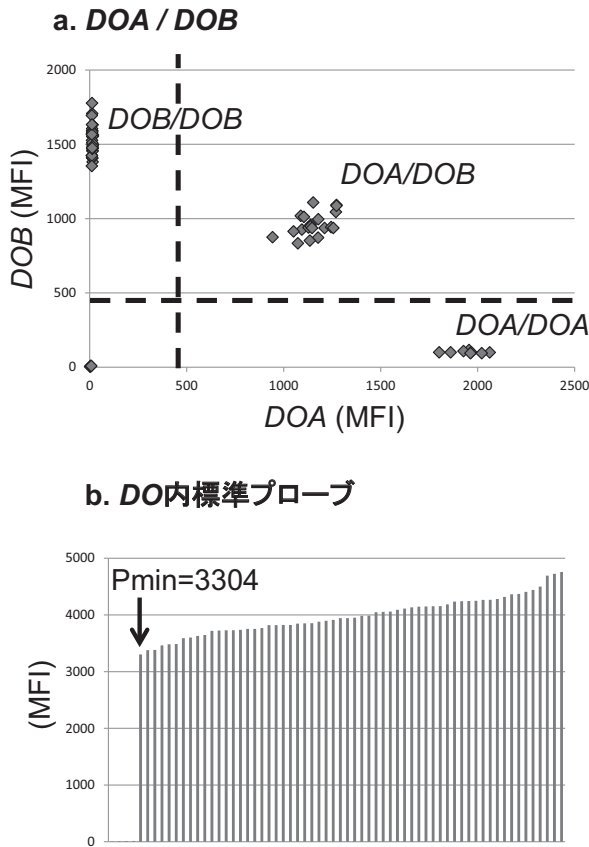


図3 Dombrock 式血液型の DNA タイピング  
 a. DOA (cut off=475) と DOB (cut off=479) の測定結果の 2 次元図.  
 b. DO 内標準コントロールの測定結果 (矢印は Pmin = 3,304).

などによる確認が必要と考えられる。

考 察

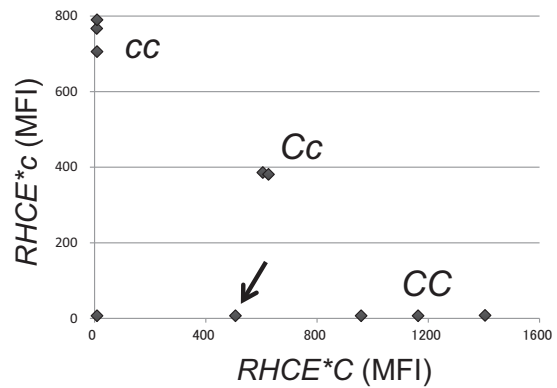
Luminex 蛍光ビーズを使用して、赤血球型遺伝子のタイピング法を検討し、その過程で表現型に対し偽陰性を示した例から、プローブ配列中やプライマー配列中に新たな SNPs が認められた。これらの SNPs を考慮し、日本人の多型に則した Rh(RhCcEe), MNS, Duffy, Kidd, Diego 式血液型の遺伝子タイピング法を確立した。日本人 5,036 例の解析を行った結果、表現型との一致率は Duffy と Diego では 100%, Rh, MNS, Kidd についてもそれぞれ 99.8% 以上を示し、有用なタイピング方法であると考えられた。

本法による血液型判定は、輸血後患者の血液型判定や直接タームス陽性例、Dombrock 式血液型など抗体の入手が困難な血液型など、血清学的検査では判断の難しい場合に有用である。特に、医療機関からの依頼検査で不規則抗体をもつ患者の血液型を判定する際、輸血後であれば部分凝集によって血清学的判定は困難になる。症例は示さないが、現在このような依頼検査で

表 4 献血者検体 5,036 例の表現型と遺伝子型の一一致率

血液型	一致例	不一致例	一致率 (%)
Rh	5,035	1	99.98
MNS	5,031	5	99.90
Duffy	5,036	0	100.00
Kidd	5,027	9	99.82
Diego	5,036	0	100.00

a. RHCE\**C* / RHCE\**c*



b. LR PCRによる増幅産物の電気泳動結果

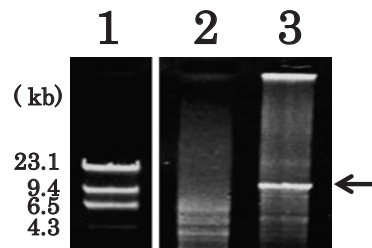


図4 Rh 表現型と遺伝子型の不一致例  
 a. RHCE\**C* と RHCE\**c* の測定結果の 2 次元図 (矢印が不一致例).  
 b. LR PCR による増幅産物の電気泳動結果 (レーン 1: 分子量マーカー, レーン 2: 通常検体, レーン 3: 不一致検体).

も本法を活用している。

また、Luminex 法は異なる種類のビーズを使用することにより、多種類の変異を同時に測定できるため、少ない試料で網羅的な遺伝子タイピングが可能であり、遺伝子頻度の解析など大量スクリーニングにも利用できる。一方、自家調整しているパネル赤血球については本法を用いて遺伝子型を決定しており、リファレンスラボでの不規則抗体の検出に大いに役立っている。特に、血液型がホモ接合型かヘテロ接合型かによって抗原が顕著な「量的効果」を示す場合があるため、パ

表5 Kidd 式血液型で表現型と遺伝子型に不一致を認めた例

検体	表現型	遺伝子型	変異	対立遺伝子
0695	Jk (a+b-)	<i>JKA/JKB</i>	c.896G>A (p.Gly299Glu)	<i>JK*02N.07</i>
0864	Jk (a+b-)	<i>JKA/JKB</i>	c.946+2T>A (エキソンスキップ?)	New-1
1070	Jk (a+b-)	<i>JKA/JKB</i>	c.191G>A (p.Arg64Gln)	<i>JK*02N.09</i>
1169	Jk (a-b+)	<i>JKA/JKB</i>	c.757_759del (p.Ser253del)	文献6
1248	Jk (a-b+)	<i>JKA/JKB</i>	c.758C>A (p.Ser253Tyr)	New-2
1750	Jk (a+b-)	<i>JKA/JKB</i>	c.342-1G>A (エキソンスキップ)	<i>JK*02N.01</i>
3696	Jk (a+b-)	<i>JKA/JKB</i>	c.342-1G>A (エキソンスキップ)	<i>JK*02N.01</i>
3807	Jk (a+b-)	<i>JKA/JKB</i>	c.441insT (p.Leu147PhefsX70)	New-3
4481	Jk (a+b-)	<i>JKA/JKB</i>	c.191G>A (p.Arg64Gln)	<i>JK*02N.09</i>

ネル血球には遺伝子型の情報も有用である。その実例として、血清学的に Jk (a+b-) のホモ接合型と考えられたパネル血球のひとつが、本法では *JKA/JKB* ヘテロ接合型で、*JKB* が null 遺伝子 (*JK\*02N.09*) であった例を経験している。このように DNA タイピングは血清学的判定を裏付けるために重要である。

## 結 論

Rh (RhCcEe), MNS, Duffy, Kidd, Diego 式血液型について、Luminex 法による日本人の多型に則した遺伝子タイピング法を確立した。本法は表現型と 99.8% 以上の高い一致率を示し、有用なタイピング法と思われる。なお、Kidd 式血液型では、頻度は低いものの null 遺伝子に注意を払う必要があると考えられる。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

謝辞：本研究は日本赤十字社の血液事業研究「主な血液型の DNA 検査法とまれな赤血球型遺伝子の解明プロジェクト（平成 25 年～平成 27 年）」として行なった。Luminex 法の開発にあたり、北海道ブロック血液センター、東北ブロック血液センター、関東甲信越ブロック血液センター埼玉製造所、近畿ブロック血液センターに評価および助言をいただいた。ここに感謝を申し上げる。

また、抗 Jk<sup>b</sup> (OSK35) を供与いただいた近畿ブロック血液センターに深謝する。

## 文 献

- 1) Hashmi G, Shariff T, Seul M, et al: A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion*, 45: 680—688, 2005.
- 2) Karpasitou K, Drago F, Crespiatico L, et al: Blood group genotyping for *Jk<sup>a</sup>/Jk<sup>b</sup>*, *Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup>*, *S/s*, *K/k*, *Kp<sup>a</sup>/Kp<sup>b</sup>*, *Js<sup>a</sup>/Js<sup>b</sup>*, *Co<sup>a</sup>/Co<sup>b</sup>*, and *Lu<sup>a</sup>/Lu<sup>b</sup>* with microarray beads. *Transfusion*, 48: 505—512, 2008.
- 3) Avent ND, Martinez A, Flegel WA, et al: The Bloodgen project of the European union, 2003-2009. *Transfu Med Hemother*, 36: 162—167, 2009.
- 4) Peyrard T: Use of genomics for decision-making in transfusion medicine: laboratory practice. *ISBT Science Series*, 8: 11—15, 2013.
- 5) Poulter M, Kemp TJ, Carritt B: DNA-based Rhesus typing: simultaneous determination of RHC and RHA status using the polymerase chain reaction. *Vox Sanguinis*, 70: 164—168, 1996.
- 6) Onodera T, Sasaki K, Tsuneyama H, et al: *JK* null alleles identified from Japanese individuals with Jk (a-b-) phenotype. *Vox Sanguinis*, 106: 382—384, 2014.

## GENOTYPING OF RED CELL BLOOD GROUPS BY THE LIQUID BEAD ARRAY SYSTEM (LUMINEX)

*Kana Sasaki*<sup>1)</sup>, *Yumi Suzuki*<sup>2)</sup>, *Kazumi Isa*<sup>1)</sup>, *Takahiro Osabe*<sup>2)</sup>, *Naoko Watanabe-Okochi*<sup>2)</sup>,  
*Fumihiko Azuma*<sup>2)</sup>, *Makoto Uchikawa*<sup>2)</sup>, *Kenichi Ogasawara*<sup>1)</sup> and *Masahiro Satake*<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Japanese Red Cross Central Blood Institute

<sup>2)</sup>Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center

### **Abstract:**

DNA blood typing is useful to compensate for serology. However, because of the racial genetic polymorphisms in blood group systems, we developed DNA typing using the liquid bead array system (Luminex) for the Japanese population.

Blood samples from 5,036 randomly selected Japanese blood donors were used. The blood group systems of Rh (RhCcEe), MNS, Duffy, Kidd, Diego, and Dombrock were subjected to DNA typing using the known single nucleotide polymorphisms (SNPs) that correspond to the respective blood group antigens. The genotype determined by Luminex was compared with the phenotype determined by serology. To explore the cause of discrepancies between the DNA and serological results, nucleotide sequencing was performed.

From the 5,036 Japanese individuals tested, Duffy and Diego blood groups showed 100% identity in serology and Luminex inspection, and Rh, MNS, and Kidd showed more than 99.8% concordance rate. Nucleotide sequencing revealed that the majority of discrepancies between serological and Luminex results were caused by variant and null alleles. Our Luminex genotyping method is useful in cases where serology is difficult, such as when reagent antibodies for blood typing are not available, and in patients after blood transfusion and those with a positive direct antiglobulin test.

### **Keywords:**

Blood group gene, DNA typing, Luminex, Liquid bead array

---

©2017 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://yuketsu.jstmct.or.jp/>