

抗 KEL26 (TOU) と考えられる抗体が検出された 1 症例

米元めぐみ¹⁾ 紺谷圭奈美¹⁾ 岡島さやか²⁾ 伊佐 和美³⁾ 常山 初江²⁾
宮崎 孔³⁾ 渡邊 理香⁴⁾ 藤川 奈央⁴⁾ 中邑 幸伸⁴⁾ 平田 康司¹⁾
川田 明志¹⁾ 本田 豊彦¹⁾⁵⁾ 小林 正夫¹⁾

Kell 血液型抗原は、そのほとんどが *KEL* 遺伝子のミスセンス変異によることが明らかにされており、現在、国際輸血学会において、37 種類の抗原が登録されている。その中で、26 番目の抗原として登録されている KEL26 (TOU) は、1995 年にネイティブアメリカンの男性とラテン系の女性から検出された高頻度抗原に対する抗体が発端である。

今回、血清学的検査で Kell 関連抗体が示唆され、遺伝子解析により抗体の特異性が推定できた症例を経験した。

症例の *KEL* 遺伝子は、 K_o ($K_{ell_{nm}}$) 型に対応する *KEL*02N.24* と KEL26 陰性に対応する *KEL*02-.26* のヘテロ接合型と推測された。*KEL*02-.26* は、c.1217G>A の置換により KEL26 の抗原活性を担う 406 番目のアルギニンがグルタミンへ置換することが報告されており、抗 KEL26 の保有が推定できた。

キーワード：Kell 血液型、抗 KEL26 (TOU)、*KEL* 遺伝子

はじめに

Kell 血液型には、国際輸血学会において KEL1 から KEL40 まで 37 種類の抗原が存在し、高頻度抗原は 25 種類が登録されている¹⁾ (図 1)。*KEL* 遺伝子は第 7 染色体の長腕 (7q34) にあり、21.5kb の長さで 19 個のエキソンで構成され²⁾、Kell 血液型抗原のほとんどは *KEL* 遺伝子のミスセンス変異によることが明らかにされている。1946 年に最初に報告された KEL1 (K) に対する同種抗体、1957 年に報告された KEL3 (K_p^a) に対する同種抗体は重篤な輸血副反応や新生児溶血性疾患を引き起こすことが知られており^{3)~5)}、Kell 血液型は臨床的に重要な血液型と考えられている。

KEL26 (TOU) は 26 番目の抗原として登録されている高頻度抗原で、1995 年にネイティブアメリカンの男性とラテン系の女性で報告された⁶⁾。

今回、我々は、血清学的検査で Kell 関連抗体の保有を認め、遺伝子解析により抗 KEL26 の保有が推定された症例を経験した。

患者背景

40 歳代女性。B 型 RhD 陽性。妊娠歴は 2 回あるが胎

児・新生児溶血性疾患の既往は不明。輸血歴および移植歴なし。使用中薬剤等なし。手術予定のため医療機関で実施した不規則抗体検査において、間接抗グロブリン試験で自己対照以外の全てのパネル赤血球に凝集を認め、高頻度抗原に対する抗体が疑われた。

本症例報告は、本人の書面による承諾と日本赤十字社の倫理審査において承認 (承認番号：2019-038) を得て実施した。

方 法

1. 血清学的検査

1) 試験管法による凝集反応

常法に従い実施した。間接抗グロブリン試験では、反応増強剤として 20% ポリエチレングリコール溶液 (自家製) を用いた。なお、抗体価測定と酵素および化学物質による処理赤血球との反応は、37°C 60 分感作の反応増強剤無添加間接抗グロブリン試験で実施した。酵素および化学物質による赤血球の処理は Ficin, Trypsin, α -Chymotrypsin, Pronase, 0.2M DTT, AET, 酸を用い、既報に従って実施した⁷⁾⁸⁾。

患者赤血球の Kell 関連抗原検査は、抗体試薬および

1) 日本赤十字社中四国ブロック血液センター
2) 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター
3) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所
4) 山口大学医学部附属病院輸血部
5) 香川県赤十字血液センター
〔受付日：2023 年 3 月 31 日、受理日：2023 年 7 月 10 日〕

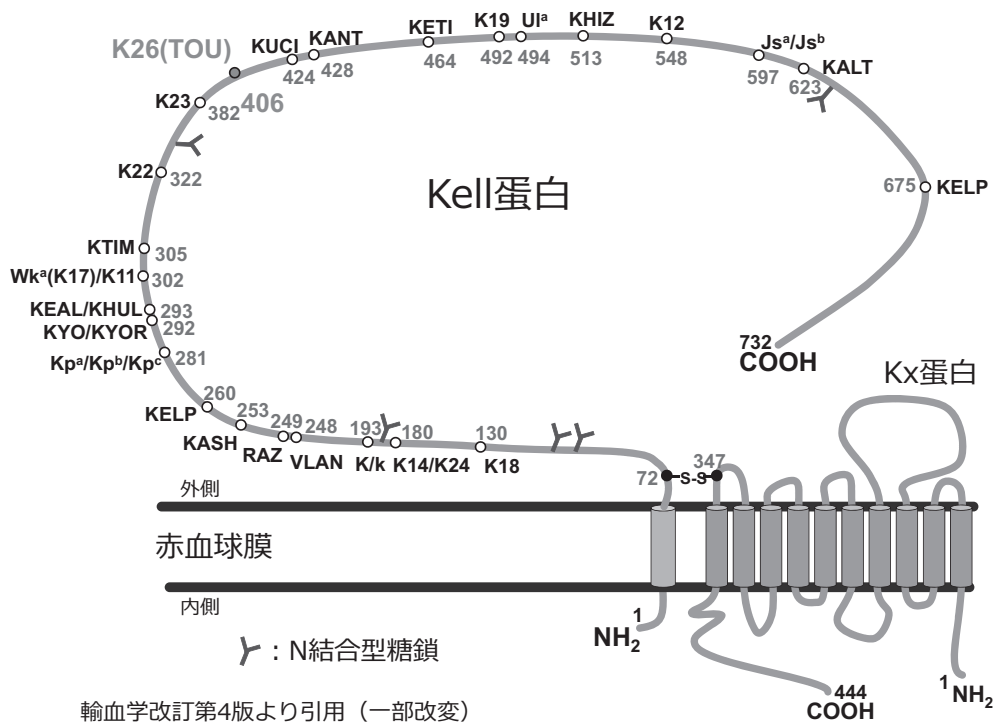


図1 Kell血液型抗原模式図

Kell蛋白は732個のアミノ酸からなる。406番目のアミノ酸であるアルギニンは、KEL26の抗原活性を担っている。

自家製モノクローナル抗体を使用し、添付文書に従って実施した。

2) 患者抗体の特異性確認(ICFA: Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis)

血液型分子を認識する7種のマウスモノクローナル抗体(MNS: CBC-450, KEL: OSK25-1, FY: CBC-438, DI: RB6, GE: CBC-374, CROM: CBC-104(全て自家製), LU: BRIC221(AbDセロテック))をそれぞれ色の異なるルミネックスビーズ(ルミネックス・ジャパン株式会社)に結合させて血液型特異的のビーズを調製し、既報に従って実施した⁹⁾。患者抗体とKEL26抗原陽性赤血球, K₀赤血球および患者赤血球を反応させ、抗体感作赤血球とした。陽性対照には抗Kuを使用した。抗体感作赤血球を界面活性剤で可溶化し、得られた抗原抗体複合物をPE標識抗ヒトIgG(Jackson社)でラベルして血液型特異的のビーズでキャプチャーした。各ビーズをLuminex200(ルミネックス・ジャパン株式会社)で測定し、得られた蛍光強度からIndex値を算出して患者抗体が結合している血液型分子を特定した。

3) IgGサブクラス解析

患者抗体とKEL26抗原陽性赤血球を反応させ、二次抗体にFITC標識抗ヒトIgG1, IgG2, IgG3, IgG4(THE BINDING SITE社)を使用し、BD FACSLyric™(日

本ベクトン・ディッキンソン社)を用いフローサイトメトリー解析を行った。陰性対照には正常AB型血漿を使用した。IgG1からIgG4について、患者抗体の蛍光強度(中央値)をシグナル(S: signal), 陰性対照の蛍光強度(中央値)をノイズ(N: noise)として測定し、S/N比を求めた。S/N比が2.0以上を陽性と判定した。

2. KEL 遺伝子解析

KEL 遺伝子解析はOnoderaら¹⁰⁾の方法に従って行った。すなわち、患者血液よりQIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN)を用いてゲノムDNAを抽出し、KEL遺伝子のエクソン1から19の全長をPrimeSTAR GXL DNA polymerase(タカラバイオ社)によりPCR増幅した。得られたPCR産物をDNAシーケンサー(3500xL, Applied Biosystems)を用いて直接シーケンス法により塩基配列を決定した。

結 果

1. 血清学的性状

1) 試験管法による凝集反応

不規則抗体検査は、生理食塩液法、プロメリン法で陰性、間接抗グロブリン試験で全てのスクリーニング赤血球で陽性(1+)、自己対照は陰性であった。患者抗体と酵素および化学物質による処理赤血球との反応

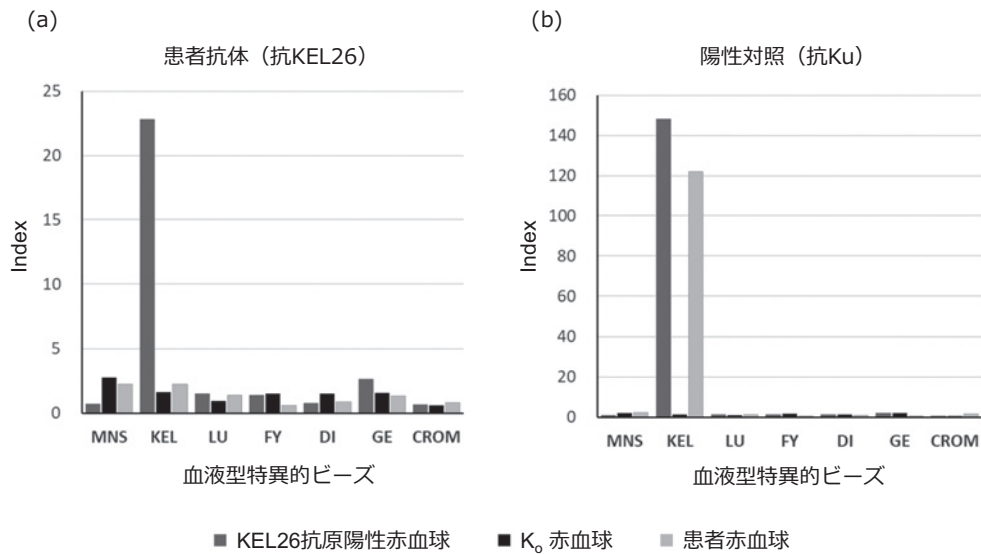


図2 患者抗体の特異性確認 (ICFA)

(a) 患者抗体 (抗 KEL26) を使用した ICFA.

(b) 陽性対照として抗 Ku を使用した ICFA.

各ビーズの蛍光強度から以下に示す計算式で Index 値を算出した.

$$\text{Index} = \frac{\frac{\text{血液型特異的ビーズの蛍光強度 (患者抗体)}}{\text{バックグラウンドビーズの蛍光強度 (患者抗体)}}}{\frac{\text{血液型特異的ビーズの蛍光強度 (陰性対照)}}{\text{バックグラウンドビーズの蛍光強度 (陰性対照)}}}$$

は, Ficin, Trypsin で陽性, Pronase, 0.2M DTT, AET, 酸で陰性, α -Chymotrypsin で減弱し, Kell 関連抗体と同様の反応性を示した. 患者抗体と高頻度抗原陰性赤血球との反応は, Jr(a-), Di(b-), D-, Jk(a-b-), In(Lu), Ok(a-), Lan-, JMH-, KANNO-とは全て陽性となった. K₀6例とは全て陰性であったが, K+k-, Kp(a-b-c+)には陽性を示した. 抗体価は2倍であった.

患者赤血球の Kell 関連高頻度抗原検査は, 入手可能であった抗 k, 抗 Kp^b, 抗 Js^b, 抗 K14, 抗 K18, 抗 Ku との反応は全て陽性であった.

2) 患者抗体の特異性確認 (ICFA)

7種の血液型(MNS, KEL, LU, FY, DI, GE, CROM)を対象とした ICFA の結果, 患者抗体と KEL26 抗原陽性赤血球の組み合わせでのみ KEL ビーズとの特異的な反応が認められ, K₀赤血球および患者赤血球では反応は認められなかった. 他のビーズとは反応しないことから, 患者抗体は Kell 分子を認識していることが確認された (図2).

3) IgG サブクラス解析

患者抗体の IgG サブクラスは IgG1 が S/N 比 4.2 で陽性を示したが, IgG2, IgG3, IgG4 は検出されなかった (図3).

2. KEL 遺伝子解析

KEL 遺伝子は c.715G>T(p.Glu239Ter)および c.1217G>A (p.Arg406Gln) の置換がそれぞれヘテロ接合で認められた. これらの置換はそれぞれ既知の遺伝子 KEL*02N.24 と KEL*02-26 に相当した (図4).

考 察

不規則抗体検査の結果より高頻度抗原に対する抗体が検出された. 患者抗体は, K₀赤血球との反応が陰性であったこと, 酵素および化学物質による処理赤血球との反応と ICFA による特異性確認から Kell 関連抗体が示唆された. しかし, 血清学的検査で確認できた患者の Kell 関連高頻度抗原は全て陽性であり抗体の特異性が特定できなかったため KEL 遺伝子解析を行った. 遺伝子解析の結果より, 患者の KEL 遺伝子は KEL*02N.24 と KEL*02-26 のヘテロ接合型と推測された. KEL*02N.24 は K₀型に対応する遺伝子であり, 715 番塩基の置換 (c.715G>T) により 239 番目のグルタミン酸 (Glu) が終止コドン (Ter) に置き換わっていることが報告されている^{11)~13)}. 一方, KEL*02-26 は 1217 番塩基の置換 (c.1217G>A) により 406 番目のアルギニン (Arg) がグルタミン (Gln) に置き換わることにより KEL26 抗原を発現しないことが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾. 本症例において, 患者の KEL26 抗原および抗 KEL26

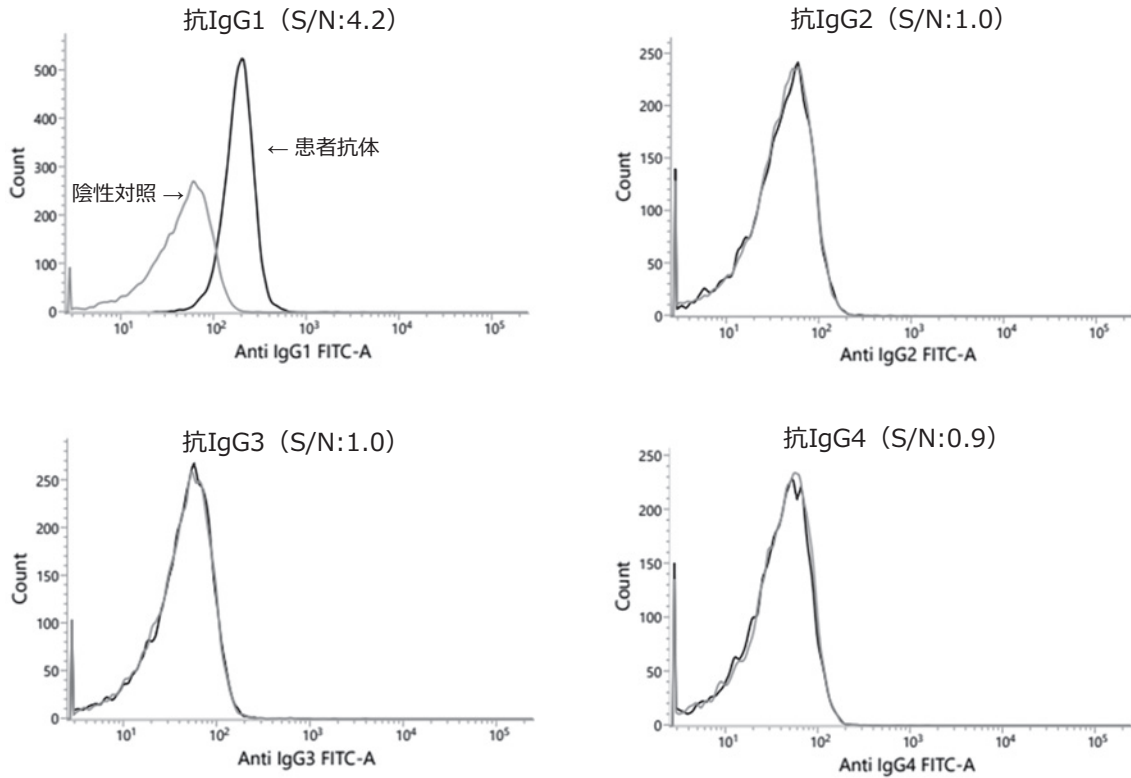


図3 フローサイトメトリーによるIgGサブクラス解析
S/N: 患者抗体の蛍光強度 (S)/陰性対照の蛍光強度 (N).

KEL遺伝子

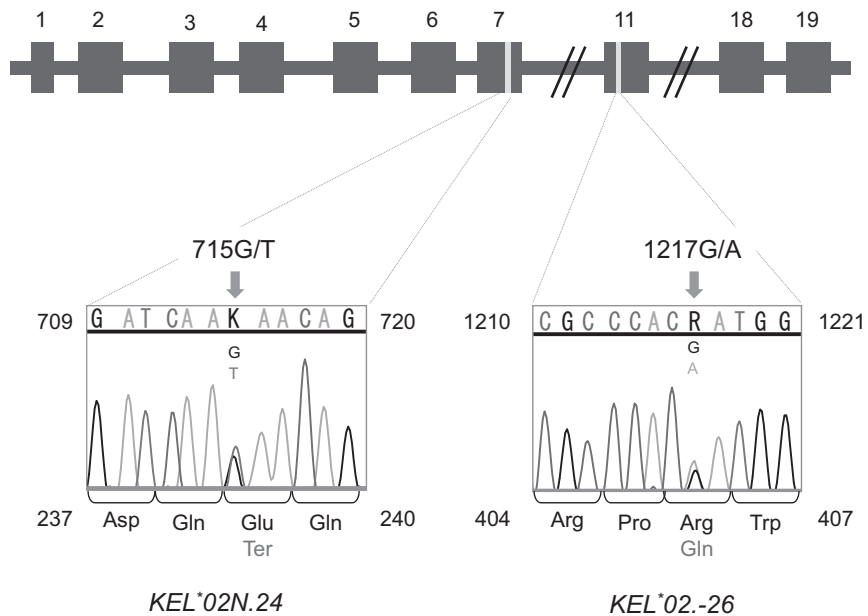


図4 KEL 遺伝子に認められた塩基置換
ヘテロ接合で認められた塩基置換を矢印で示した。
エキソン7に c.715G>T (p.Glu239Ter), エキソン11に c.1217G>A (p.Arg406Gln) を認めた。

の血清学的な確認はできていないが、遺伝子解析の結果から患者赤血球は KEL26 抗原陰性であり、抗体は抗

KEL26 であることが推定された。
抗 KEL26 は 1995 年にネイティブアメリカンの男性

とラテン系の女性で報告された⁶⁾。その後2人の *KEL* 遺伝子配列が決定され、c.1217G>A(文献14, 15ではG1337Aと表記)の塩基置換により406番目のアルギニンがグルタミンに置き換わっていることが報告された。さらに、ネイティブアメリカンの男性の息子の *KEL* 遺伝子がc.1217G>A置換の変異型と野生型とのヘテロ接合型であることから、*KEL26*が遺伝していることが確認された¹⁴⁾¹⁵⁾。南アジアにおいても *KEL26*欠失に関連するc.1217G>Aの塩基置換が報告されている¹⁶⁾。

ネイティブアメリカンの男性の抗体は、抗体価は間接抗グロブリン試験で16倍(スコア34)、O型2例の単球を使用した単球貪食能試験はそれぞれ2.7%と3.0%(陽性 \geq 3%)で、抗体の臨床的意義は低いと推察された⁶⁾。本症例の患者抗体は、IgGサブクラスは単球貪食能が強いIgG1であったが、単球貪食能試験は陰性(結果未提示)であり、抗体の臨床的意義は低いと示唆された。一般的に *Kell* 関連抗体の臨床的意義は高いことが多いが、溶血所見を認める抗体でも抗体価が16倍以下では単球貪食能試験が陰性を示す報告もあり¹⁷⁾、抗体価が低いために陰性となった可能性が考えられる。

発端症例の2人に輸血歴はなくラテン系の女性には妊娠歴があることより、抗 *KEL26* は自然抗体と免疫抗体の存在が示唆される。本症例の患者は今日まで抗体保有の認識はなく、妊娠による免疫で抗体が産生された可能性が高いと考えられる。抗 *KEL26* の保有症例は本邦での報告例はなく、*KEL26* 陰性赤血球製剤の入手は困難なため、輸血には *K₀*型(日本人での検出頻度は約0.003%¹⁸⁾)での対応が可能である。なお、今回手術時に輸血は実施されなかった。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

謝辞：血液型判定用自家製モノクローナル抗体を提供して頂いた関東甲信越ブロック血液センター検査部(HIRO-103, CBC-117, CBC-450, CBC-438, CBC-374, CBC-104)、近畿ブロック血液センター検査部(OSK25-1)および北海道ブロック血液センター品質部(RB6)の皆様へ深謝いたします。

文 献

- 1) 202 Table of blood group antigens within systems: The International Society of Blood Transfusion (ISBT) (isbtweb.org).
<https://www.isbtweb.org/resource/tableofbloodgroupantigenwithinsystems.html> (2022/12/21 accessed).
- 2) Lee S, Zambas E, Green ED, et al: Organization of the gene encoding the human Kell blood group protein. *Blood*, 85: 1364—1370, 1995.
- 3) Daniels G: *Human Blood Groups*, 3rd ed, Wiley Blackwell, Oxford, 2013, 281—285.
- 4) Koshy R, Patel B, Harrison JS: Anti-Kp^a induced severe delayed hemolytic transfusion reaction. *Immunohematology*, 25: 44—47, 2009.
- 5) Tuson M, Hue-Roye K, Koval K, et al: Possible suppression of fetal erythropoiesis by the Kell blood group antibody anti-Kp^a. *Immunohematology*, 27: 58—60, 2011.
- 6) Jones J, Reid ME, Oyen R, et al: A Novel Common Kell Antigen, TOU, and Its Spatial Relationship to Other Kell Antigens. *Vox Sang*, 69: 53—60, 1995.
- 7) Daniels G: Effect of enzymes on and chemical modifications of high-frequency red cell antigens. *Immunohematology*, 8: 53—57, 1992.
- 8) Vengelen-Tyler : *TECHNICAL MANUAL 13TH EDITION*, AABB, Maryland, 1999.
- 9) Ito S, Kaito S, Miyazaki T, et al: A new antigen SUMI carried on glycophorin A encoded by the GYPA^M with c.91A>C(p.Thr31Pro) belongs to the MNS blood group system. *Transfusion*, 60: 1287—1293, 2020.
- 10) Onodera T, Kawai M, Obara K, et al: Silent *KEL* alleles identified from Japanese individuals with the *K₀* phenotype. *Vox Sanguinis*, 113: 290—296, 2018.
- 11) Yang Y, Wang L, Wang C, et al: Two novel null alleles of the *KEL* gene detected in two Chinese women with the *K_{null}* phenotype. *Transfus Med*, 19: 235—244, 2009.
- 12) Uchikawa M, Tsuneyama H, Toyoda T, et al: Molecular basis of the *Kell_{null}* phenotype in Japanese. *Vox Sang*, 83: 151, 2002.
- 13) 豊田智津, 小笠原健一, 常山初江, 他: 日本人の *Kell* 血液型 *K₀* 遺伝子の解析. *日本輸血細胞治療学会誌*, 55: 290, 2009.
- 14) Lee S, Naime DS, Reid ME, et al: Molecular basis for the high-incidence antigens of the Kell blood group system. *Transfusion*, 37: 1117—1122, 1997.
- 15) Lee S: Molecular Basis of Kell Blood Group Phenotypes. *Vox Sang*, 73: 1—11, 1997.
- 16) Montemayor-Garcia C, Karagianni P, Stiles DA, et al: Genomic Coordinates and Continental Distribution of 120 Blood Group Variants Reported by the 1000 Genomes Project. *Transfusion*, 58: 2693—2704, 2018.
- 17) Ito S, Hishinuma T, Ogiyama Y, et al: Evaluation of erythrocyte autoantibodies with flow cytometric phagocytosis assay. *International Journal of Blood Transfusion and Immunohematology*, 8: 2018.
<https://www.ijbti.com/archive/2018-articles/2018100039Z02ST-ito/100039Z02ST-full-text.php> (2022/12 accessed).

- 18) 大久保康人, 瀬尾たい子, 山口英夫, 他: 献血者より見出したまれな血液型 K_o の 2 家系. 血液事業, 5: 437—440, 1982.

A CASE OF A PATIENT WITH ANTI-KEL26 (TOU) PREDICTED BY MOLECULAR TESTING

Megumi Yonemoto¹⁾, Kanami Kontani¹⁾, Sayaka Okajima²⁾, Kazumi Isa³⁾, Hatsue Tsuneyama²⁾, Toru Miyazaki³⁾, Rika Watanabe⁴⁾, Nao Fujikawa⁴⁾, Yukinori Nakamura⁴⁾, Yasushi Hirata¹⁾, Akeshi Kawada¹⁾, Toyohiko Honda¹⁾⁵⁾ and Masao Kobayashi¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Chu-Shikoku Block Blood Center

²⁾Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center

³⁾Japanese Red Cross Central Blood Institute

⁴⁾Division of Transfusion, Yamaguchi University Hospital

⁵⁾Kagawa Red Cross Blood Center

Abstract:

Most Kell blood group antigens have been shown to be due to amino acid substitutions associated with single nucleotide variants. Currently, 37 Kell blood group antigens are recognized by the International Society of Blood Transfusion (ISBT). KEL26 (TOU) is a high-frequency antigen recognized as the 26th antigen by the ISBT, and was reported in a Native American male and a Latino female in 1995.

Here, we report a case in which a Kell-related antibody was suggested by serological tests, and the specificity of the antibody could be estimated by *KEL* genotyping.

The *KEL* genotype was *KEL*02N.24/KEL*02-26* heterozygote determined by Sanger sequencing. *KEL*02-26* has c.1217G>A missense variant in exon 11 which leads to an Arg406Gln substitution. From these results, the Kell-related antibody was presumed to be an anti-KEL26.

Keywords:

Kell blood group system, Anti-KEL26 (TOU), *KEL* gene