



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

新規間接競合ELISA法によるABO式血液型判定方法 の開発とその応用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2016-12-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高田, 直樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/51016

新規間接競合ELISA法によるABO式血液型判定方法の開発
とその応用

2014年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物資源科学

(岐 阜 大 学)

高 田 直 樹

新規間接競合ELISA法によるABO式血液型判定方法の開発
とその応用

高 田 直 樹

目次

序章

1 ABO式血液型	5
2 ABO式血液型と身元確認	7
3 ABO式血液型とDNA型	9
4 ABO式血液型検査法	10
5 ABO式血液型検査の微生物による誤判定	11
6 本研究の目的	12

第1章 間接競合ELISA法によるABO式血液型検査法の開発

1-1 緒言

1-2 間接競合ELISA法によるABO式血液型検査法の開発

1-2-1 実験材料	14
1-2-2 生体試料(ヒト唾液およびヒト血液)の収集	15
1-2-3 試料の前処理	16
1-2-4 間接ELISAによる抗原力価測定	16
1-2-5 間接ELISAによる抗体力価測定	17
1-2-6 間接競合ELISAによる唾液のABO式血液型検査	19
1-2-7 間接競合ELISAによる血液のABO式血液型検査	20

1-3 実験結果

1-3-1 間接ELISAによる抗原力価の検定	21
1-3-2 間接ELISAによる抗体力価の検定	22
1-3-3 間接競合ELISAによる唾液のABO式血液型検査	24

1-3-4	間接競合ELISAによる血液のABO式血液型検査.....	29
1-4	考察	
1-4-1	固相化抗原.....	36
1-4-2	間接ELISAによる固相化抗原力価測定	36
1-4-3	間接ELISAによる抗体力価の測定.....	36
1-4-4	間接競合ELISAによる唾液のABO式血液型検査.....	37
1-4-5	間接競合ELISAによる血液のABO式血液型検査.....	37
1-4-6	試料の前処理.....	37
1-4-7	まとめ	38
第2章	ABO式血液型検査の誤判定に關与する土壤微生物	
2-1	緒言.....	39
2-2	実験材料及び実験方法	40
2-2-1	実験材料	40
2-2-2	土壤の採取.....	40
2-2-3	菌株の分離.....	40
2-2-4	α -glycosidase活性測定	40
2-2-5	間接競合ELISAによるB型抗原分解活性測定	41
2-2-6	DNA抽出と16S rRNA遺伝子解析.....	44
2-3	実験結果	
2-3-1	土壤の採取.....	45
2-3-2	菌株の分離.....	45
2-3-3	α -glycosidase活性測定	45
2-3-4	間接競合ELISAによるB型抗原分解活性測定	48

2-3-5	DNA抽出と16S rRNA遺伝子解析.....	50
2-4	考察	
2-4-1	採取菌株	51
2-4-2	α -glycosidase活性.....	51
2-4-3	間接競合ELISAによるB型抗原分解活性.....	51
2-4-4	DNA抽出と16S rRNA遺伝子解析.....	52
2-4-5	まとめ	53
終章	総合考察	
3-1-1	生体試料の微生物汚染	55
3-1-2	環境微生物由来の糖加水分解酵素	56
3-1-3	ABO式血液型抗原の半定量的分析法	56
3-1-4	土壌微生物によるABO式血液型の改変	57
3-1-5	結論	57
	謝辞	60
	引用文献.....	61

序章

1 ABO式血液型

ABO式血液型は、1900年にオーストリアのLandsteinerにより報告されて以来、最も有名なヒトの遺伝形質の1つとして知られている²⁰⁾。ABO式血液型の表現型は、Table 1に示した通りで、A型の赤血球にはA型及びH型抗原が存在し、血漿には抗B抗体が存在している。一方、B型の赤血球にはB型及びH型抗原が、血漿には抗A抗体が存在している。O型の赤血球にはH型抗原が、血漿には抗A抗体および抗B抗体が存在しており、AB型の赤血球にはA型、B型及びH型抗原が、血漿にはABO式血液型抗原に対する抗体は存在しない。

Table 1 ABO blood group system

Phenotype	Antigen	Antibody
A	A, H	B
B	B, H	A
O	H	A, B
AB	A, B, H	—

ABO式血液型抗原は、Fig. 0-1に示した糖鎖でありO型のH型抗原を基本構造とし、H型抗原の末端に位置するFucose(Fuc)に、 α -N-acetylgalactosamine (GalNAc)が α 1-3結合したものがA型のA型抗原、Galactose (Gal)が α 1-3結合したものがB型のB型抗原となる。

日本人集団の中では、A型：O型：B型：AB型の存在比率は、約4：3：2：1であり、他民族と比較しても偏りが少ない³⁹⁾。

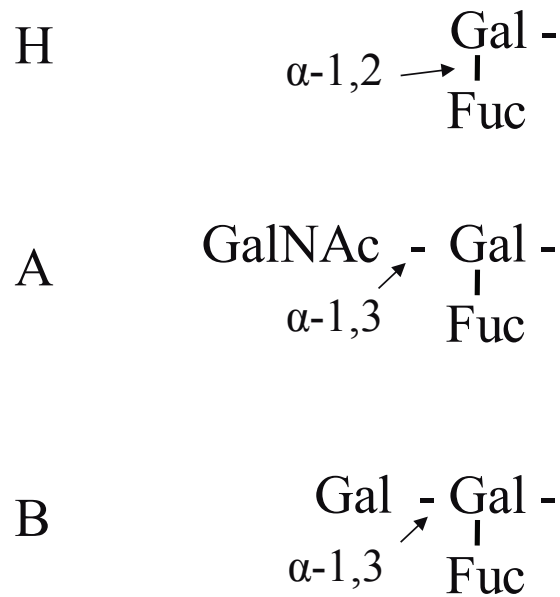


Fig. 1 Structure of ABH blood group determinant

ABO式血液型抗原は、糖脂質あるいは糖タンパク質として、赤血球¹⁹⁾のみならずあらゆる体液、組織に分布していることから、唾液⁴⁷⁾、精液³⁾、胃液²¹⁾、毛髪³⁷⁾、骨²³⁾、爪²⁹⁾などの人体に由来する様々な部位に分布している。

また、ヒトは唾液、精液などの分泌液中に、ABO式血液型抗原を多量に分泌する分泌型と、分泌型と比較してごく少量の抗原のみ分泌する非分泌型の2通りの型に分類され⁴⁰⁾、分泌型と非分泌型はABO式血液型抗原の多寡により決定している。日本人集団では、分泌型が約8割、非分泌型が約2割とされている。

ABO式血液型は、特に医療面で重要な抗原として認識されている。輸血に用いられる血液は、通常、ABO式及びRh式血液型が同型の血液を輸血する¹⁸⁾。その上、臓器移植時の組織適合検査には、ABO式血液型及びHLA型を検査し、適合の可否を決めている。

2 ABO式血液型と身元確認

身元確認とは、大規模災害や犯罪によって生じた、遺体の素性を明らかにすることをいい、個人識別とは、「生体および死体またはその一部から個人を特定すること」⁶⁾をいう。つまり、個人識別を行うことにより、身元を明らかにすることを身元確認と呼んでいる。

個人識別法には、①十分な個別性をもっている(不同性. 人によって異なっている)こと、②終生変化がない(不変性)こと、③検索のための分類保管が便利であることの3点が必要とされ、署名、印章、写真、指紋などが古くから利用されてきた³⁸⁾。

個人識別が必要となるものの対象として、生体では記憶喪失者、幼児、産院での取り違えの新生児が挙げられる。死体では、白骨死体、焼死体、分断された死体などである³²⁾。人体の一部に由来するものとしては、血液、唾液、精液などの体液や体液斑、毛髪、骨、歯、指紋などがある^{5,6)}。

現在、日本国内で個人識別に用いられている指標は、指紋、写真、静脈パターン、虹彩、網膜、署名などの形態学的特徴と、血液型、DNAなどの遺伝的特徴の2つに分類できる。

指紋は、現在最も確実な個人識別の指標となっている。イギリスのヘンリー・フォールズとウィリアム・ハーシェルは、指の隆線の紋様が、個人間で異なること(万人不同)、年月が経過しても変化しない(終生不変)であることを科学的に考察し、現在の指紋の利用に大きく貢献した³⁸⁾。指紋は、古くから犯罪捜査や身元不明死体の身元確認に利用され、また現在では、銀行ATMでのキャッシュカードの利用、クレジットカードの利用、会社やマンションなどの入退場、パソコンや携帯電話などのコンピューターシステムへのログインの本人確認にも利用されている。

歯牙による個人識別は、歯の治療痕を比較することで個人を特定する方法である。歯は、人体の中で最も硬い硬組織であり、死後何年も経過した死体でも、残存する可能性

が高い。身元不明遺体のなかには、相当の年月を経過したものも含まれるため、有効な指標となる。また、指紋と歯牙による身元確認は、直接試料を破壊することなく検査を行えることから、震災等の多数死体の身元確認で最も汎用される方法は歯牙と指紋によるものが多数である。

写真による個人識別には、古くから人間の目視による個人の特定が行われている。また、現在では、暗証番号などを利用する知識認証や磁気カードを用いた有証認証に代わり、生体認証、特に顔画像による本人確認技術が有効に利用されている。生体認証の利点は本人の特定が簡便であること、遠隔から認証ができることおよび非接触型の入力デバイスを用いることができる点である¹¹⁾。現在では、静脈認証、虹彩顔型などを用いたバイオメトリクス認証が盛んに研究されている⁴⁵⁾。しかし、身元確認という点では、死後変化が大きい死体などには、利用が困難である。

血液型は、前述のように、医療と犯罪捜査において重要な抗原であった。現在では、個人識別の手法としては後述するDNA型を利用することが多くなり、活躍の機会が限られてきた。血液型にはABO式血液型をはじめ、Lewis式、MN式、P式、Rh式、ダフィー式、キッド式などが知られ、異同識別という点では精度が低いものの、親子鑑定などの血縁関係の分析に威力を発揮する。ABO式血液型は、これらの中でも、人体に由来する組織・体液から安定して検出することができる血液型である⁵⁰⁾。

DNA型による個人識別は、1985年、イギリスのレスター大学のアレック・ジェフリーズによるDNAフィンガープリンティング法の発表¹⁶⁾により世界的に注目された。日本でも、平成15年8月には、日本人集団の中で最も出現頻度が高いDNA型の組み合わせの場合に約1100万人に1人という確率で個人識別を行うことが可能となったSTR型検査法が導入され⁶⁰⁾、平成18年11月には新たに6座位を追加し、日本人集団の中で最も出現頻度が高いDNA型の組み合わせの場合で約4兆7千億人に1人という確率で個人識別を行うことが可能となっている⁶¹⁾。

個人識別が必要とされる場合、多くの対象は死体であることが多い。日本は、1985年の日航ジャンボ機墜落事故、1994年の中華航空機の名古屋空港墜落事故、1995年の阪神淡路大震災、2004年の中越地震、2007年の中越沖地震、2011年の東日本大震災のように、不幸にも多数の犠牲者を出す災害・事故を経験している⁵⁷⁾。

このような、大災害時に個人識別を行うためには、はじめに該当者探しから始める必要がある。大災害時には、多くの行方不明、所在不明者のリストが作成され、性別、着衣、所持品(運転免許証、キャッシュカード、身分証明書)は、これらのリストから該当者を探し出す大きな手掛かりとなる。しかし、犯罪により偽装の可能性も考えられることから、無条件に断定することはできない。身元確認の際には、偽装することができない個人の身体特徴(指紋、歯の治療痕)や遺伝的形質(血液型やDNA型)による個人識別を行う必要がある⁵⁷⁾。

個人識別には、まず、指紋の採取が行われ、本人の対照となる指紋との比較が行われる。焼死体や白骨死体のように指紋の採取が困難な場合、歯牙による検査が行われ、生前の歯の治療記録と遺体の歯の治療痕との比較が行われる。これら、身体特徴による確認方法は、遺体と該当者の記録との比較・対照する異同識別を行う方法である。歯の治療痕による照合ができない場合や、人体の一部を対象とする場合には、後述する血液型やDNA型検査を行う。

3 ABO式血液型とDNA型

DNA型による個人識別は、異同識別の他、血縁関係の証明にも力を発揮するという特徴がある。しかし、血縁関係に基づいて身元確認を行うためには、身元不明者以外に、血縁関係にある人物から試料を採取する必要がある。親子鑑定には推定される両親あるいは子の試料を、同胞鑑定には男系血族にある男性、あるいは母系血族親にあたる人物の試料を必要とする。多数の身元不明遺体と血縁関係にある可能性のある人物全て

の試料について検査を行うことは、効率と時間の問題から非常に困難である。また、災害は、限定された地域にいる全ての人々に、一度に襲い掛かる。そのため、血縁関係にある家族が全て被災者となる場合が多く、比較・対照に必要となる血縁関係にある者の試料を得ることが困難になることも予想される。

一方、日本においては幸いにも献血制度が普及している。個人のABO式血液型情報が治療時や献血時に医療機関に保存されている可能性が高い。信頼できる医療機関の記録を得ることができれば、身元確認の対照として利用可能となり、有力な個人情報となる。ABO式血液型は、前述のとおり、識別精度の点では、DNA型のそれには及ばない。しかし、ABO式血液型により、可能性を排除することは可能であることから、DNA型鑑定を行う前に、該当者を絞り込む作業に適している。

また、血液型判定に利用する血清学的検査に必要な費用は、非常に安価であるという利点もあり、現在でもABO式血液型を利用した個人識別や親子鑑定は有用な手法である。

4 ABO式血液型検査法

ABO式血液型検査は、従来から凝集試験、解離試験^{7, 33, 35, 53)}、凝集阻止試験⁷⁾、混合細胞凝集法(mixed cell agglutination reaction: MCAR)⁵⁹⁾、酵素免疫測定法(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay: ELISA)⁴³⁾といった、免疫学的手法を用いてABO式血液型抗原を検出していた。ABO式血液型遺伝子解析による方法も知られているが^{4, 56)}、遺伝子型と表現型が不一致であることも考えられることから、現在でも血清学的検査による血液型判定が主流である。

5 ABO式血液型検査の微生物による誤判定

大規模災害時における検体の多くは、屋外に遺留され、気温、湿度、汚染といった環

境の影響を受けている。発見が遅れるほど、検査に適した検体の採取が困難となり、血液型抗原の検出が困難、あるいは誤った型が検出されることがある³⁵⁾。例えば、土中に埋没していた血痕が血清学的検査ではAB型、ABO式血液型遺伝子解析ではB型と判定された例が挙げられる。この例では、*Acinetobacter*属の1菌株による汚染によりA型活性を獲得したことが報告されており、原因として菌体成分由来の多糖類や糖タンパク類がA型抗原を有すると考えられている³⁵⁾。また、一部の*Aspergillus*属と*Penicillium*属がA型抗原を有していることも報告されており⁶³⁾、その他にも、自然界にはABO式血液型抗原と非常によく似た化学構造を持った細胞成分を有する微生物が存在することが報告されている¹²⁾。

反対に、環境中の微生物由来のglycosidaseにより、ABO式血液型抗原の糖鎖構造が分解されることも報告されている。Isekiらによれば、A型抗原は、*Clostridium tertium*¹⁴⁾、B型抗原は*Bacillus cereus*¹³⁾、O型抗原は*Bacillus fulminans*¹⁵⁾により分解される。さらに、*Clostridium perfringens* ATCC10543の産生するendo- β -galactosidaseによりAおよびB型抗原の主要3糖構造が切断される例も報告されている¹⁾。もし、これらのような酵素により、A型及びB型抗原の末端に存在するGalNAcあるいはGalが切断されるようなことがあれば、H型抗原が露出することになり、血液型はO型と判定されてしまう危険がある。実際に*Ruminococcus torques* strain IX-70は、A型をO型に変換すると報告されている²²⁾。

6 本研究の目的

環境中の微生物によるABO式血液型抗原の分解を原因とする血液型検査の誤判定は、十分に起こりうる。また、原因となる微生物については、いずれの研究も断片的であり、特に身元不明遺体が遺留されることの多い土壌微生物によるABO式血液型抗原への作用についてはほとんど検討されていない。前述したように、東日本大震災のような大規模災害時にABO式血液型による個人識別が必要となる場合も想定されることから、誤

った判定の原因を特定することが急務である。

そこで、特に土壌細菌由来のglycosidaseによるABO式血液型抗原の分解に注目して、ABO式血液型抗原に対する土壌微生物の影響を、詳細に検討することにした。

まずはじめに、ABO式血液型抗原の分解活性の評価方法を確立するために、抗原を特異的かつ定量的に検出することができるELISAを応用して、ABO式血液型抗原の半定量的測定法の開発を行った(第一章)。従来のELISAによるABO式血液型判定法は、血痕を試料とする場合には、適用できない欠点があったが、プロテアーゼKを用いたタンパク分解反応を前処理とすることおよび競合法を応用することで、ほぼ全ての体液試料からABO式血液型抗原の検出が可能となった。本法により、抗原の減少を半定量的に測定することが可能となり、土壌微生物による血液型改変活性を評価可能とした。

次に、岐阜県下58箇所から土壌サンプルを採取し、ヒト血液寒天培地を用いて微生物380株を単離して、実際にABO式血液型抗原(唾液)と反応させ、分解活性測定を行った(第二章)。B型抗原分解活性を示した13菌株は、全て*Bacillus*属に属する細菌で、いずれも植物の根圏や植物体に存在することが明らかにした。

これらの内容を博士論文として提出する。

第1章

間接競合ELISA法によるABO式血液型検査法の開発

1-1 緒言

ABO式血液型の判定には、ABO式血液型抗原を検出する必要がある。最も簡単な手法は、赤血球と抗血清を混合して凝集反応を観察する方法である。しかし、溶血した血液や他の体液に利用することができない。溶血した血液や他の体液から、ABO式血液型を明らかにするために、前述のように、主に解離試験、凝集阻止試験、混合凝集法等の血清学的検査法が利用されている。これらの血清学的検査法における問題点は、赤血球の凝集を目視で観察する検査法であることから、客観的な評価を得にくい、検査技法の習熟に時間がかかるといった点である。さらに、現在では、従来から主要な試薬としてABO式血液型検査に用いられてきたヒト由来ポリクローナル抗体が人道上の理由から入手困難となり、モノクローナル抗体の使用が推奨されている。その様な状況の中、モノクローナル抗体を用いたELISAは、一度に多数の検体を測定することができ、迅速かつ測定対象物質を特異的に検出することが可能であることから、ELISA法による血液型抗原検出法は、ABO式^{9, 17, 28, 31, 44, 54, 55)}、Lews式^{48, 49)}、Rh式²⁷⁾の検出に利用されている。従来のELISA法によるABO式血液型抗原の検出法は、マイクロプレートの内壁に検体中のABO式血液型抗原を物理的に吸着させて固相化し、モノクローナル抗体とペルオキシダーゼ標識された二次抗体を用いて検出する抗原固相化型の間接法が主に利用されている。唾液や精液等の体液が検体の場合、ABO式血液型抗原が糖タンパク質として存在することから、マイクロプレートへの固相化が容易である。一方で、赤血球膜上のABO式血液型抗原は糖脂質として存在していることから⁸⁾、通常の緩衝液には難溶であること。また、ABO血液型抗原を有する糖脂質と血液中に多量に存在するヘモグロビン等の血液由来のタンパク質が競合的にマイクロプレートの壁面に吸着されるため、固相化が充分ではないとされている⁴¹⁾。そのため、血液試料については、界面活性剤^{2, 30)}や有機

溶媒⁶²⁾を利用した抽出操作が必要となるが、ELISAへの影響を考慮するとこれらの使用を慎重に選択する必要がある。その結果、ELISAは、唾液や精液といった体液中のタンパク性のABO式血液型抗原の検出にのみに適用されることとなり、血液や血痕中のABO式血液型抗原の検出には、従来の血清学的手法を利用せざるを得ない。そのため、試料の種類に左右されない検出手法の開発が求められている。このような問題を解決するために、競合ELISAに注目した。競合ELISAは、土壌や食品中の残留農薬^{33, 58)}、ダイオキシン³⁴⁾、内分泌かく乱物質^{26, 36)}、乱用薬物⁵¹⁾等の固相化が困難である低分子化合物の検出に応用されている。競合ELISAは、試料を直接マイクロプレートに固相化する必要がないことから、これを応用することにより、試料の種類に左右されないABO式血液型抗原の検出が期待できる。そこで、試料の種類によらないABO式血液型抗原の検出方法の確立を目的として、試料の前処理の検討を行い、間接競合ELISAによるABO式血液型抗原の検出法について検討を行った。

1-2 間接競合ELISA法によるABO式血液型検査法の開発

1-2-1 実験材料

血液型抗原プローブ(Blood typeA(tri)-PAA, Blood typeB(tri)-PAA; Glycotech)は、ポリアクリルアミドポリマーにそれぞれA, B型抗原の主要3糖構造がスペーサーを介して結合している製品で、Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.5)に1.0 mg/mlに溶解し、使用時に適宜PBSで希釈して用いた。Proteinase Kは、QIAGEN proteinase K (PK; QIAGEN)を使用した。マイクロプレートは、F96 MAXISORP NUNC-IMMUNOPLATE (NUNC)を用い、プレートの洗浄には0.05%Tween20を含むPBS (PBS-T)を用いた。ブロッキング溶液はBovine serum albumin (BSA; 和光純薬工業)をPBSに1.0%に溶解して用いた(BSA-PBS)。一次抗体は、ガンマクロン抗A, B(gamma Biologicals), novaclone Anti A, B(Dominion Biologicals), モノクローナル抗A, Bワコー(和光純薬工業), セラクロン抗A, B(Biotest

AG), イムコア抗A,Bモノクロ (IMMUCOR)及びバイオクロン抗A, B(Ortho)をBSA-PBSで適宜希釈して使用した。二次抗体は, ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgM抗体(Peroxidase labeled Goat anti-Mouse IgM, American Qualex)をBSA-PBSで1200倍希釈して使用した。発色基質溶液は, *O*-フェニレンジアミン(和光純薬工業)を0.5 mg/ml McIlvaine緩衝液(pH 5.0)に調整し, 反応直前に30%過酸化水素水を0.002%を加えて使用した。

1-2-2 生体試料(ヒト唾液およびヒト血液)の収集

無作為に選出したABO式血液型既知の38名の健康成人より同意を得て, 唾液(A型分泌型(Se), A型非分泌型(se)各5名, B型Se型, B型se型各5名, O型Se型, O型se型各5名, AB型Se型5名, AB型se型3名)を収集した。採取方法は, 濾紙片を口に含むことにより唾液を染み込ませて提供を受けた。収集した濾紙片は風乾し, 室温で保存した。

ヒト血液は, 使用期限の切れたもの及び量不足により輸血に利用できないヒト血液(A型5例, B型3例, O型4例, AB型5例)を, 日本赤十字社血液センターより譲渡を受け, 実験開始まで-80 °Cの超低温槽で保存した。

血痕は5~10年の間, 室温で保存していたさらし布に付着したABO式血液型既知の血痕26例(A型10例, B型6例, O型8例, AB型2例)を試料とした。

なお, 本実験の手順については, 岐阜大学倫理審査委員会の承認を得た(承認番号: 25-167)。

1-2-3 試料の前処理

濾紙片に採取した唾液は, 大きさ1×2 cmに切断し, 細切した後, 250 µlのPBSで抽出を行った。血液は, PBSで50倍に希釈した。血痕は, 大きさ0.25×0.5 cmに切断し, 細切した後, 135 µlのPBSと15 µlのPKを注入して, 56 °Cで2時間Thermomixer compact

(Eppendorf)を用いて750 rpmで振とうして反応させ溶出させた。また、同大の血痕を150 μ lのPBSで溶出し、PK処理を実施しない試料を対照とした。なお、抽出、溶出、希釈操作は密封した1.5 ml容のマイクロチューブ内で行った。

全ての試料抽出液は、Thermomixer compactを用いて95 °Cで15分間熱処理を行った。熱処理後、遠心分離(15000 rpm, 5分間)して上清30 μ lを96穴プレート(PCR Plate 96 well PP, Fisher Scientific)に移し、プレート上でPBSによる段階希釈を行った。分泌型の唾液は1~4096倍、非分泌型の唾液は1~64倍、血液は10~3200倍、血痕溶出液は2~16倍に段階希釈して、実験に供した。

1-2-4 間接ELISAによる抗原力価測定

血液型抗原プローブを任意に希釈して間接ELISAを行い、血液型抗原プローブの最適濃度を検討した。

マイクロプレート1ウェルあたり2 μ g/mlから2倍段階希釈した血液型抗原プローブ各50 μ lを注入し、4 °Cで1晩固相化した。未結合の抗原は、マイクロプレートウォッシャー(MW-96CR, BioTec製)を用いて、各ウェルを250 μ l PBS-Tで3回洗浄して除去した。プレートを洗浄後、1ウェルあたり100 μ lのBSA-PBSを注入して、37 °Cで1時間インキュベートして、抗原が未結合の壁面を覆い、ブロッキングを行った。未結合のBSAは、プレートを洗浄して除去し、PBSで400倍に希釈したモノクローナル抗体50 μ lを注入し、37 °Cで1時間反応させた。未結合の一次抗体はプレートを洗浄して除去し、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgM抗体(1200倍希釈, BSA-PBS) 50 μ lを注入し、37 °Cで1時間インキュベートして反応させた。未結合の二次抗体はプレートを洗浄して除去し、直ちにOPD溶液50 μ lを注入し、遮光して、室温で10分間反応させて発色した。発色後、1 M硫酸100 μ lを注入して発色反応を停止させ、プレートリーダー(SpectraMax Plus384, Molecular Devices製)により490 nmの吸光度を測定した。なお、一次

抗体の代わりにPBSを代用したものをブランクとした。

1-2-5 間接ELISAによる抗体力価測定

血液型抗原プローブの濃度を1 $\mu\text{g/ml}$ とし、6種のモノクローナル抗体を任意に希釈して間接ELISAを行い、一次抗体の最適濃度を検討した。

マイクロプレート1ウェルあたり1 $\mu\text{g/ml}$ の血液型抗原プローブ50 μl を注入し、4 $^{\circ}\text{C}$ で1晩固相化した。洗浄、BSA-PBSによるブロッキングの工程は間接ELISAと同様に行った。PBSで400〜25600倍に希釈したモノクローナル抗体50 μl を注入し、37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させた。一次抗体の洗浄、二次抗体の注入、洗浄、発色反応は、1-2-4と同様に行なった。

1-2-6 間接競合ELISAによる唾液のABO式血液型検査

唾液斑の溶出液を2分して、一方の30 μl にセラクローン抗A抗体(800倍希釈, PBS) 30 μl を、他方の30 μl にイムコア抗B抗体(800倍希釈, PBS) 30 μl を加えて、それぞれ液量を60 μl とし、4 $^{\circ}\text{C}$ で1晩インキュベートして、試料中の抗原と一次抗体を吸着させた。

マイクロプレートへの血液型抗原プローブの固相化、洗浄、BSA-PBSによるブロッキングの工程は間接ELISAと同様に行った。固相化を行ったマイクロプレートに、唾液抽出液と一次抗体の混合液50 μl を注入し、37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させて、一次抗体を試料中の抗原と固相化抗原との間で競合的に結合させた。洗浄してウェル内の反応液を除去後、固相化抗原に結合した一次抗体を二次抗体によって検出した。なお、洗浄、発色は間接ELISAと同様に行い、プレートリーダーにより490 nmの吸光度を測定した。なお、一次抗体の代わりにPBSを代用したものをブランクとした。

吸光度の $B/B_0(\%)$ への変換は次式に従って行った。

$$B/B_0(\%) = (\text{試料の吸光度} / \text{試料を含まないものの吸光度}) \times 100$$

一連の操作は, Fig. 1-1に示した. 抗原検出の判定は, $B/B_0(\%)$ の値が90%以下になるものを陽性とした.

Y anti-B monoclonal antibody ▲ antigen ○ BSA
 ■ Anti mouse IgM HRP conjugated ● B antigen degrading enzyme

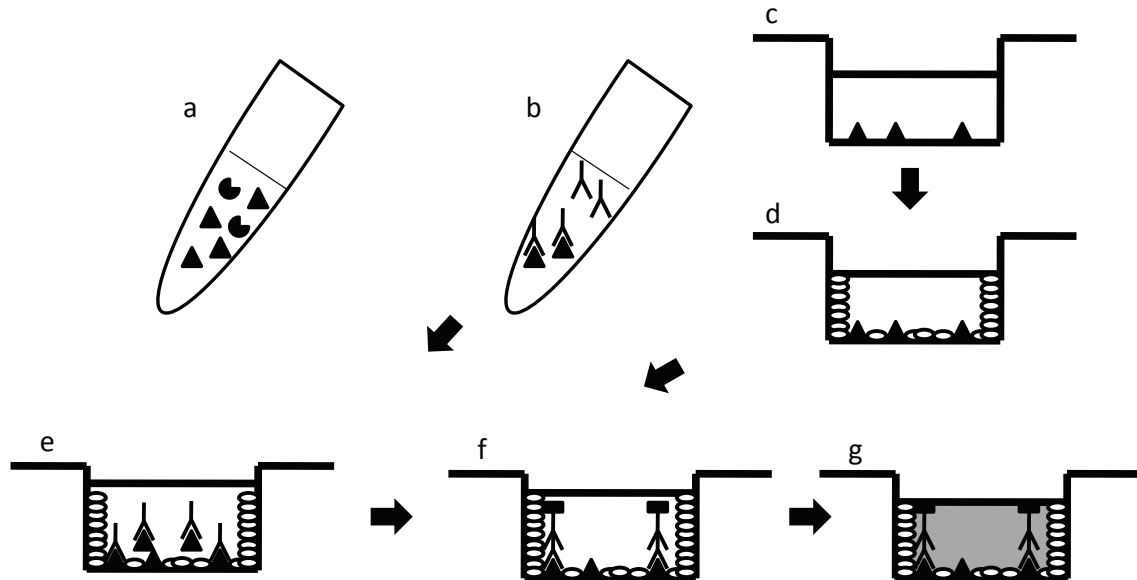


Fig. 1-1 Development of an indirect competitive ELISA for the detection of ABO

blood group antigens. (a) Samples were diluted with PBS (pH 7.5), centrifuged at 25,000g for 10 min, the supernatant recovered and divided in half. An equal volume (30 μ L) of sample was combined with either anti-A or anti-B mAb and incubated at 4 $^{\circ}$ C for 12 h. (b) The wells of ELISA plates were coated with blood group antigen probes in 50 μ L PBS at 4 $^{\circ}$ C for 12 h. The wells were washed three times with 250 μ L PBST. (c) The wells were blocked with 100 μ L BSA–PBS and incubated at 37 $^{\circ}$ C for 1 h. At the completion of the incubation the wells were washed three times. (d) A 50- μ L aliquot containing sample extract combined with either anti-A or anti-B mAb was added to the wells. Plates were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 1 h prior to washing three times. (e) Anti-mouse IgM–HRP conjugate (50 μ L) was added to each well. The plates were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 1 h, prior to washing with three times. (f) *o*-Phenylenediamine solution (50 μ L) was added to each well, the plates incubated at room temperature for 10 min, and the colorimetric reaction stopped by the addition of 100 μ L 1 M sulfuric acid to each well. The OD at 490 nm was measured using a spectrophotometer.

1-2-7 間接競合ELISAによる血液のABO式血液型検査

血液の希釈液及び血痕の溶出液をそれぞれ2分して、一方の30 μ lにセラクローン抗A抗体(800倍希釈, PBS) 30 μ lを、他方の30 μ lにイムコア抗B抗体(800倍希釈, PBS) 30 μ lを加えて、液量を60 μ lとし、4 $^{\circ}$ Cで1晩インキュベートして、試料中の抗原と一次抗体を吸着させた。

以下の操作は1-2-6と同様に行った。

1-3 実験結果

1-3-1 間接ELISAによる抗原力価の検定

血液型抗原プローブ(Blood typeA(tri)及びBloodtypeB(tri))の濃度を0.03125 ~2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に変化させ、400倍希釈した6種(ガンマクロン、ノヴァクロン、ワコー、セラクロン、イムコア及びオーソ社)のモノクローナル抗A、B抗体を用いて間接ELISAを行ったところ、A型プローブにはセラクロン社の抗A抗体、B型のプローブにはイムコア社の抗B抗体を用いた時に、いずれも1.0~2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で吸光度が最大となり、プラトーに達していた(Fig. 1-2, 3). よって、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ より高濃度の血液型プローブを用いることでマイクロプレートのウェル内壁への固相化抗原の量は最大になると判断した.

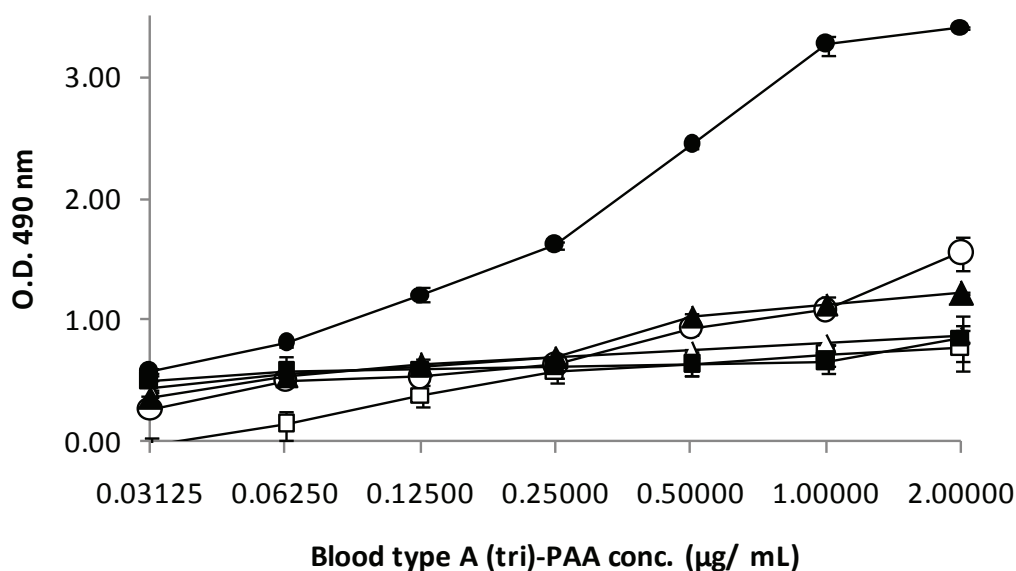


Fig. 1-2 Detection of blood group A antigens using diluted anti-A six mAbs; Gamma clone (open circle), Novacclone (open square), Wako (open triangle), Seraclone (closed circle), Immucor (closed square) and Ortho (closed triangle), (1:400 dilution). Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. highest O. D was observed for Seraclone (closed circle) when the concentration of blood group Type A (tri-PAA) was 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

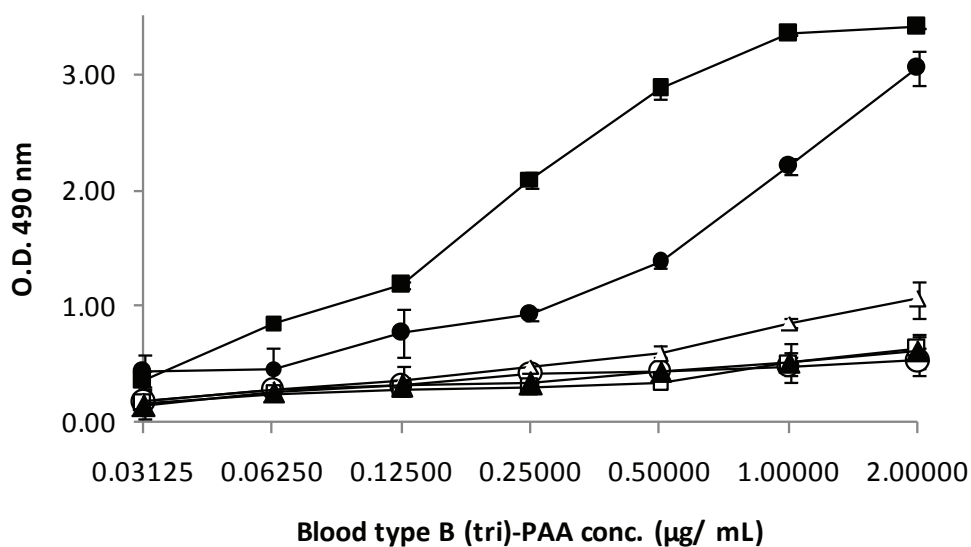


Fig. 1-3 Detection of blood group B antigens using diluted anti-B six mAbs. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. The highest O. D was observed for Immucor (closed square) when the concentration of blood group Type B(tri-PAA) was 1 µg/mL

1-3-2 間接ELISAによる抗体力価の検定

6種のモノクローナル抗体を400～25600倍希釈したものと、1.0 µg/mlの濃度の血液型抗原プローブを固相化したマイクロプレートを用いて間接ELISA法を実施した。Blood type A(tri)-PAAを固相化したプレートは、いずれの抗A抗体を用いても検出が可能であったが、セラクローン社の抗A抗体を用いた時、400～1600倍希釈で吸光度が最大となり、プラトーに達していた(Fig. 1-4).

同様に、Blood type B(tri)-PAAを固相化したプレートはいずれの抗B抗体を用いても検出が可能であったが、イムコア社の抗B抗体を用いた時、400～1600倍希釈で吸光度が最大となり、プラトーに達していた(Fig. 1-5).

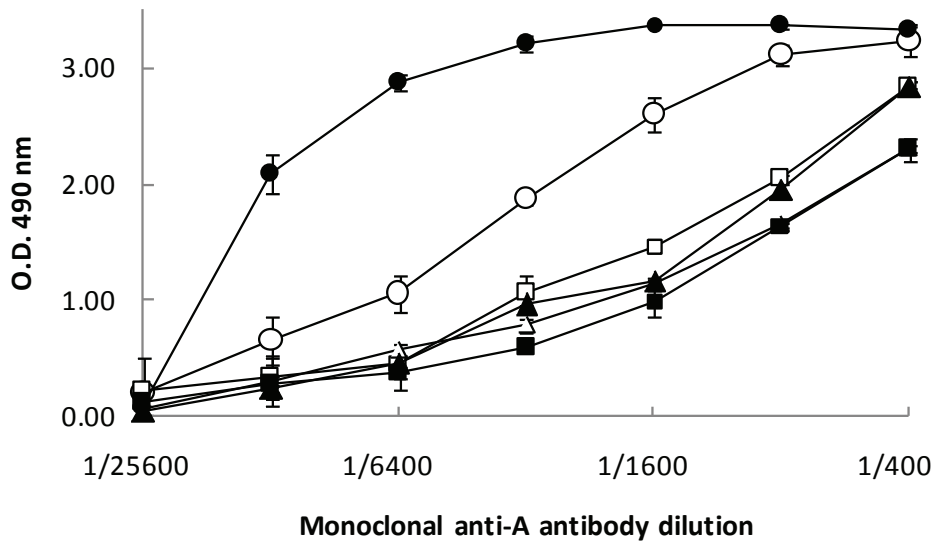


Fig. 1-4 Effect of anti-A six mAbs; Gamma clone (open circle), Novaclone (open square), Wako (open triangle), Seraclone (closed circle), Immucor (closed square) and Ortho (closed triangle) concentration on assay sensitivity. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D.

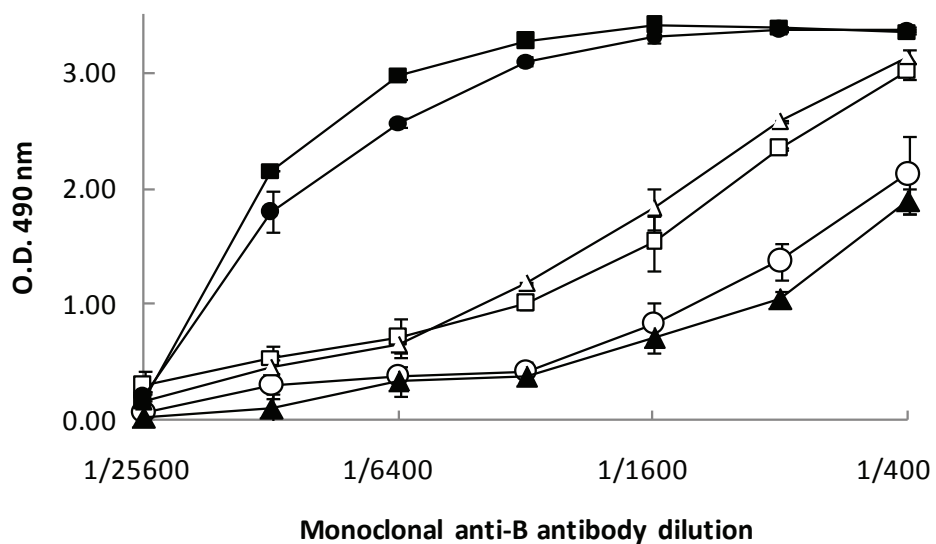


Fig. 1-5 Effect of anti-B six mAbs. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D.

以上のことから、マイクロプレートに固相化する血液型抗原プローブの濃度は1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、使用する抗A抗体はセラクロン社の抗A抗体を1600倍希釈、抗B抗体はイムコア社の抗B抗体を1600倍希釈したものを使用することとした。

1-3-4 間接競合ELISAによる唾液のABO式血液型検査

分泌型の唾液抽出液を試料とした場合の阻害曲線をFig. 1-6～1-9に示す。B/B₀の値が90%以下の値を示した各血液型の希釈率は、A型Se型唾液中のA型抗原が1024倍(B/B₀=52.1±28.9%, Fig. 1-6:A型), B型Se型唾液中のB型抗原が4096倍(B/B₀=36.0±44.4%, Fig. 1-7:B型), AB型Se型唾液中のA型抗原が1024倍(A:B/B₀=59.6±17.8%, Fig. 1-8:A型), AB型Se型唾液中のB型抗原が4096倍(B: B/B₀=81.0±8.4%, Fig. 1-8:B型)より低希釈率で、検出が可能であった。

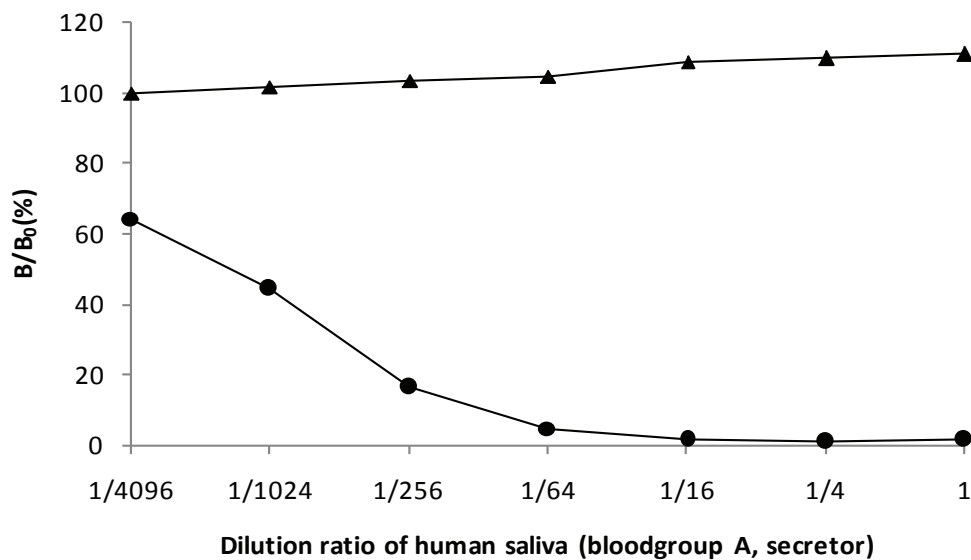


Fig. 1-6 Analysis of type A human secretor (Se) saliva using an indirect competitiveELISA. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human saliva (type A, Se) was diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

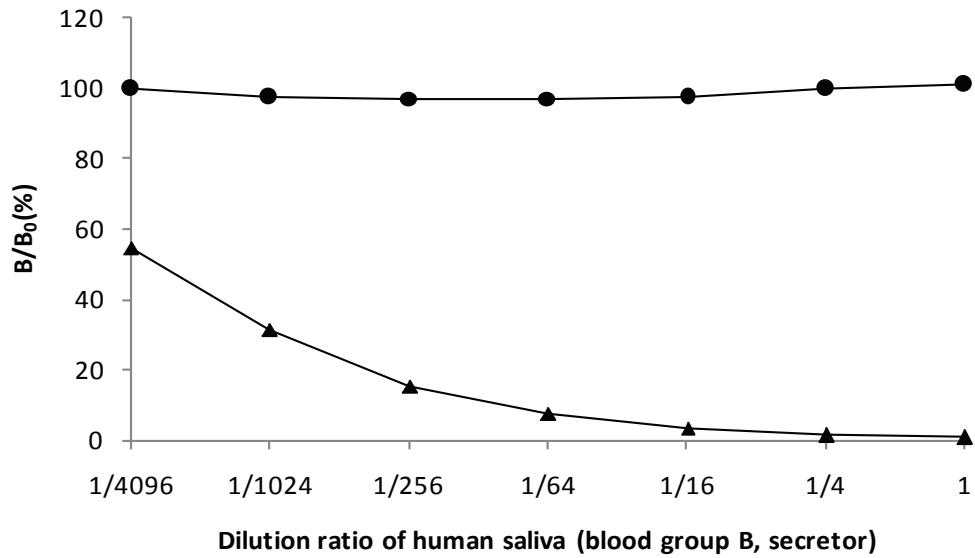


Fig. 1-7 Analysis of type B human secretor (Se) saliva. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human saliva (typeB, Se) was diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

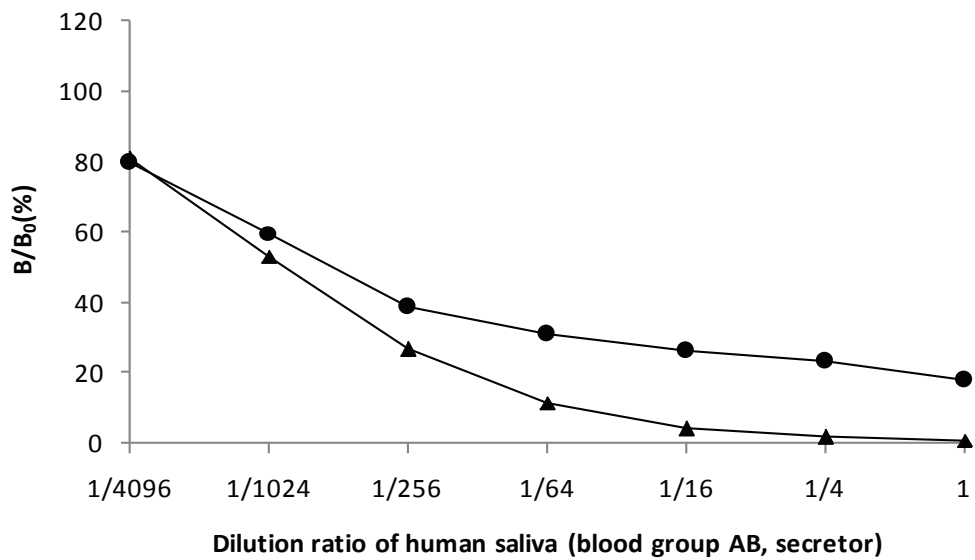


Fig. 1-8 Analysis of type AB human secretor (Se) saliva. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human saliva (type AB, Se) was diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

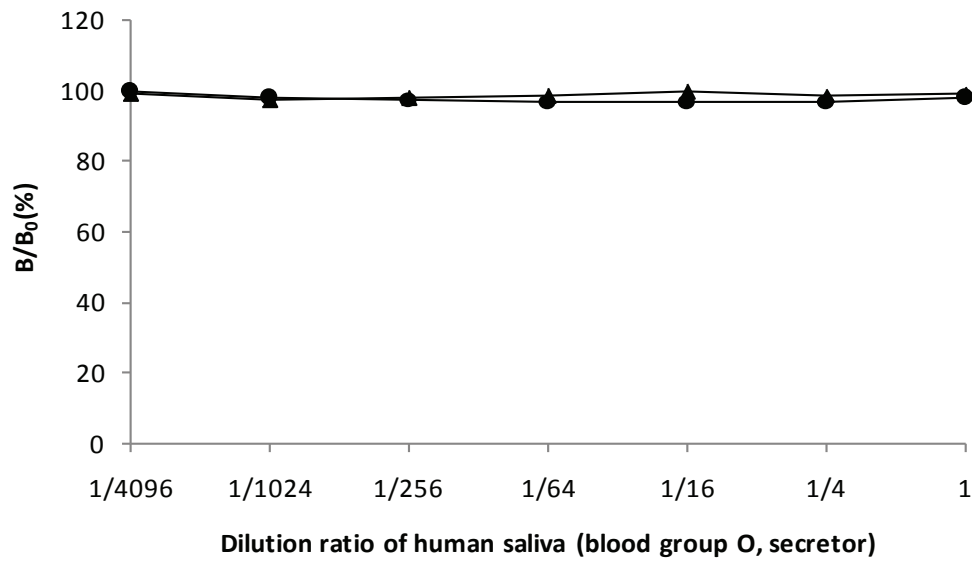


Fig. 1-9 Analysis of type O human secretor (Se) saliva. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human saliva (typeO, Se) was diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

非分泌型の唾液抽出液を試料とした場合の阻害曲線をFig. 1-10～1-13に示す。B/B₀の値が90%以下の値を示した各血液型の希釈率は、A型se型唾液中のA型抗原が64倍(B/B₀=70.4±16.1%, Fig. 1-10:A型), B型se型唾液中のB型抗原が32倍(B/B₀=72.2±13.5%, Fig. 1-11:B型), AB型se型唾液中のA型抗原及びB型抗原のいずれも32倍(A:B/B₀=74.4±10.7%, B: B/B₀=55.3±31.8%, Fig. 1-12: A型及びB型)より低希釈率で、検出が可能であった。

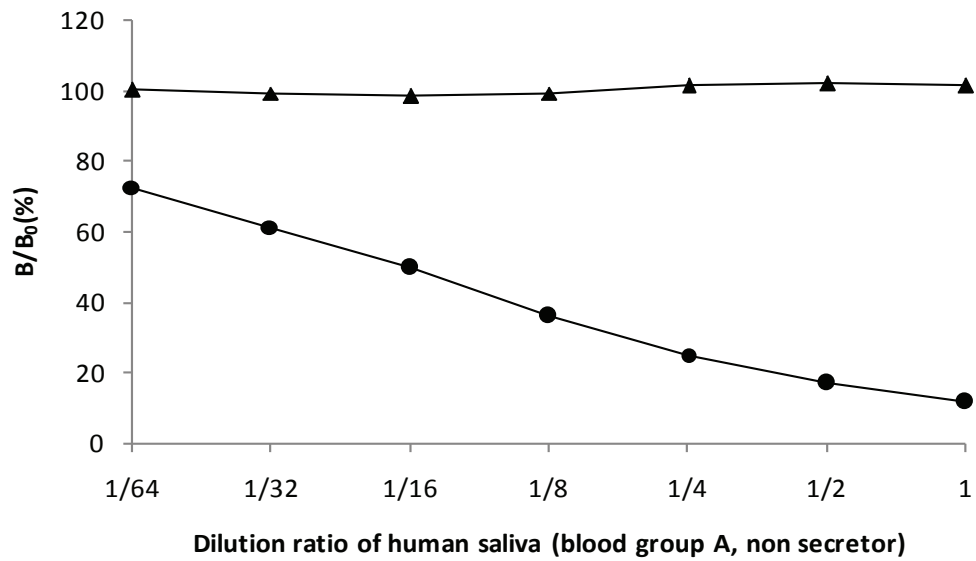


Fig. 1-10 Analysis of type A human non secretor (se) saliva. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human saliva (typeA, se) was diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

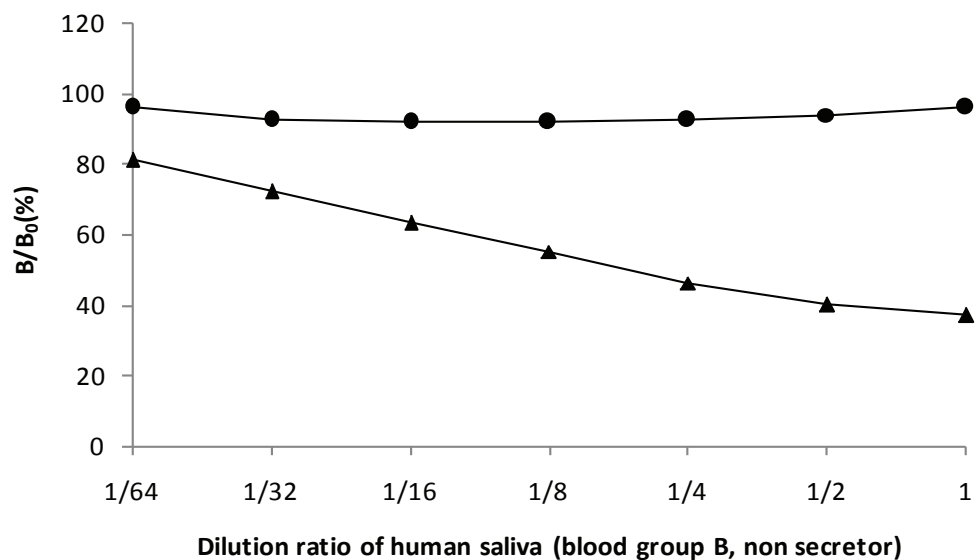


Fig. 1-11 Analysis of type B human non secretor (se) saliva. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human saliva (type B, se) was diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

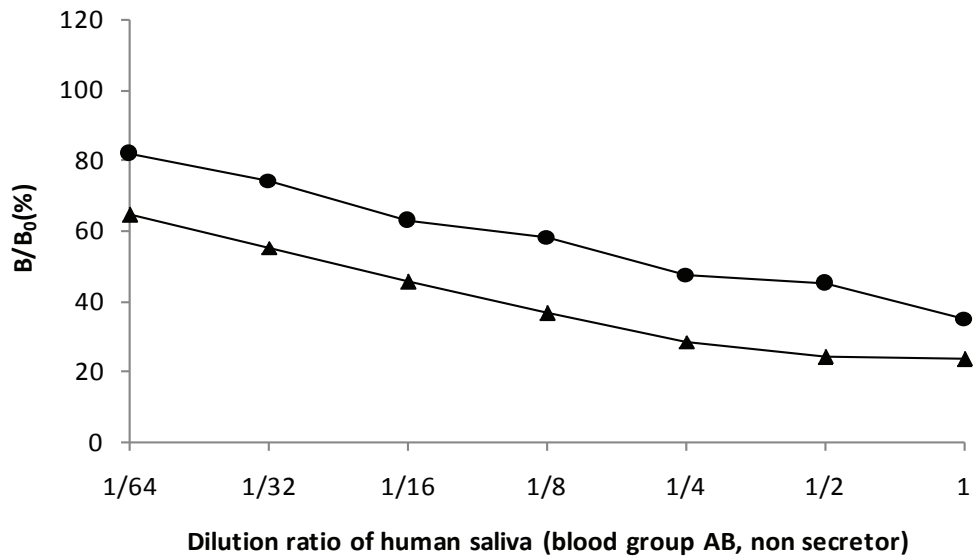


Fig. 1-12 Analysis of type AB human non secretor (se) saliva. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human saliva (type AB, se) was diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

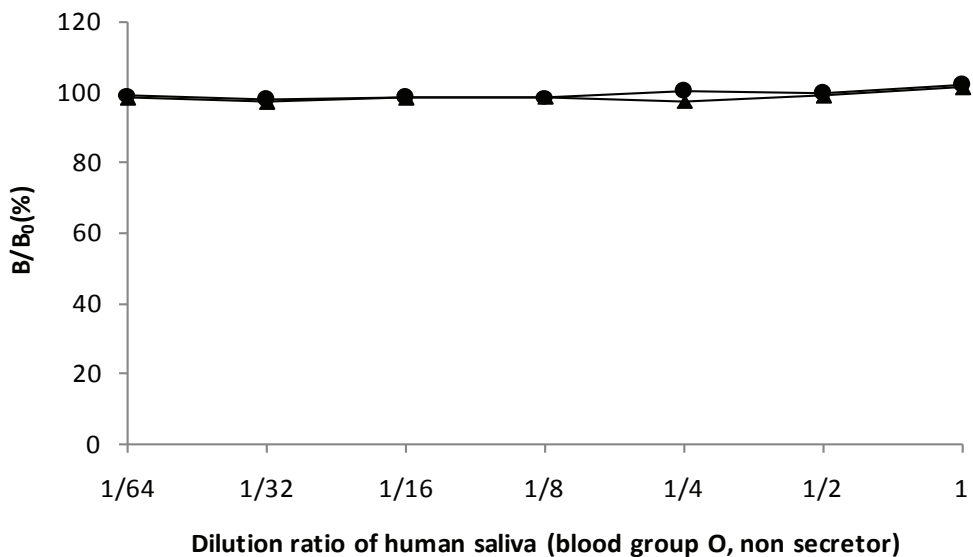


Fig. 1-13 Analysis of type O human non secretor (se) saliva. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human saliva (type O, se) was diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

1-3-5 間接競合ELISAによる血液のABO式血液型検査

血液を試料とした場合の阻害曲線をFig. 1-14～1-17に示す。希釈血液を試料とした場合、 B/B_0 の値が90%以下の値を示した各血液型の希釈率は、A型血液中のA型抗原が800倍 ($B/B_0=81.1 \pm 7.0\%$, Fig. 1-14:A型), B型血液中のB型抗原は200倍 ($B/B_0=85.1 \pm 3.6\%$, Fig. 1-15:B型), AB型血液中のA型抗原が800倍 ($B/B_0=80.9 \pm 6.6\%$, Fig. 1-16:A型), AB型血液中のB型抗原は200倍 ($B/B_0=68.6 \pm 17.1\%$, Fig. 1-16:B型)より低希釈率であり、検出が可能であった。

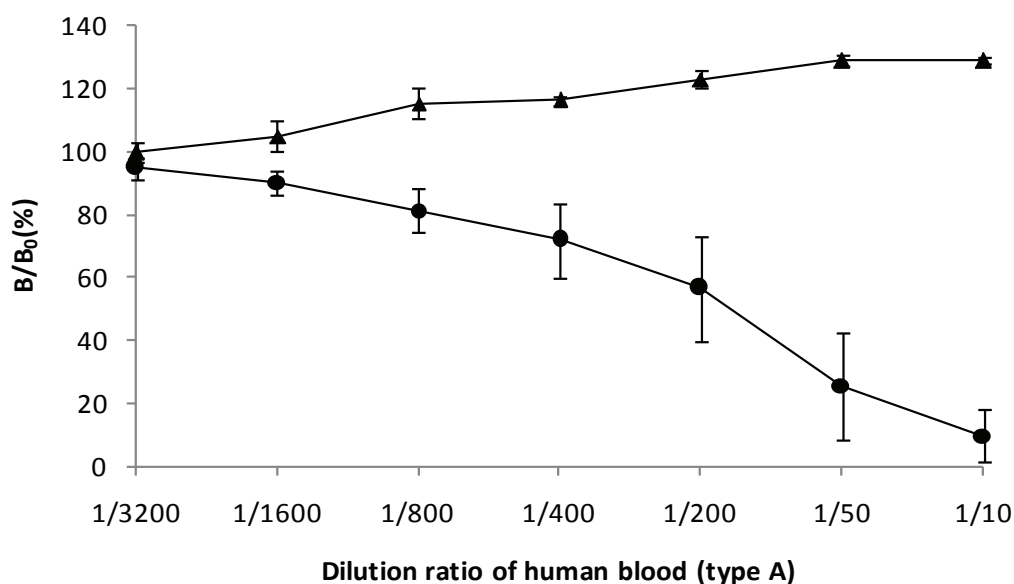


Fig. 1-14 Analysis of type A human blood. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human Blood (group A) was diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

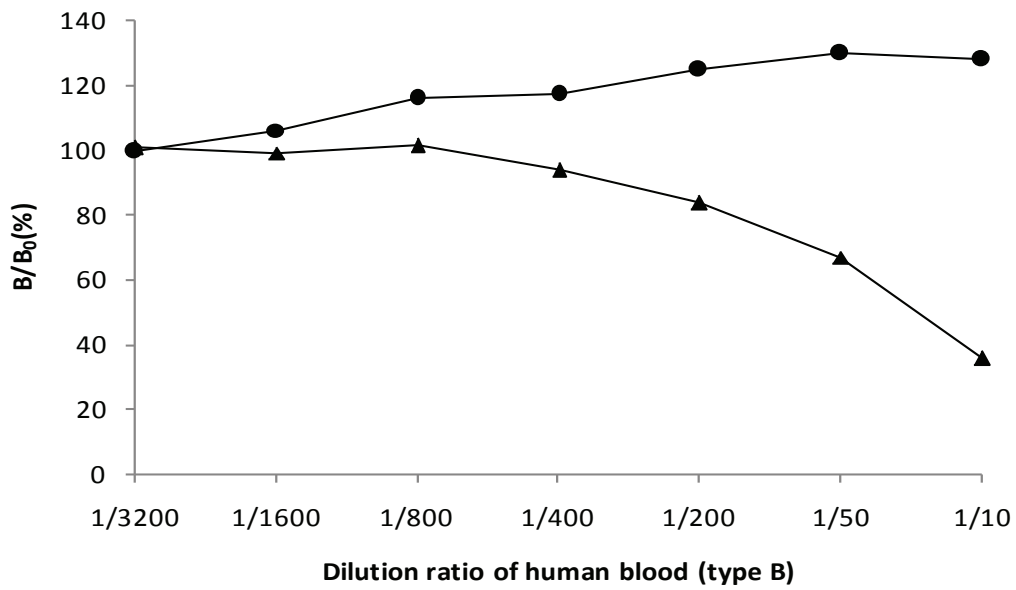


Fig. 1-15 Analysis of type B human blood. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human Blood (group A) was diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

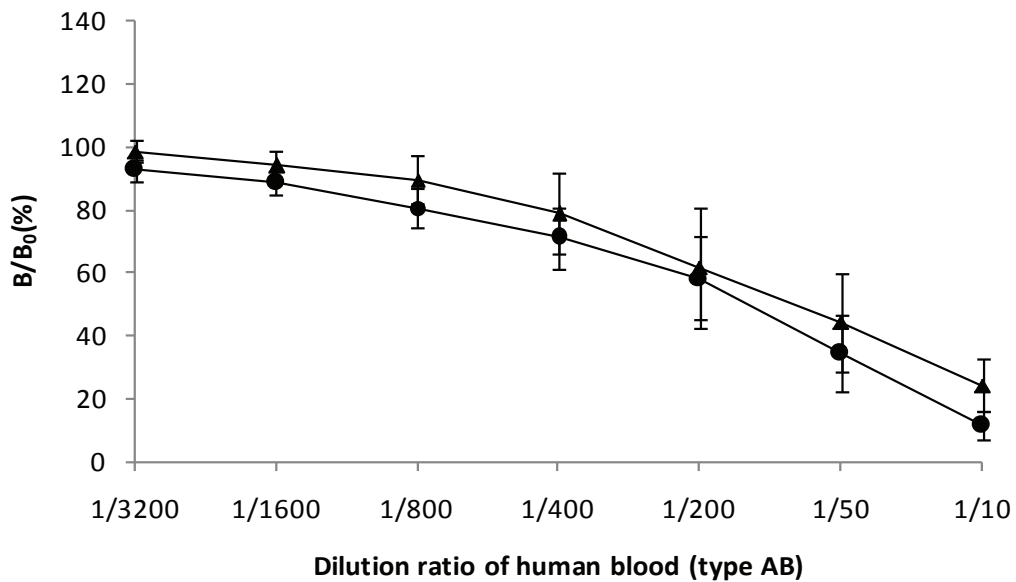


Fig. 1-16 Analysis of type AB human blood. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human Blood (group AB) was diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

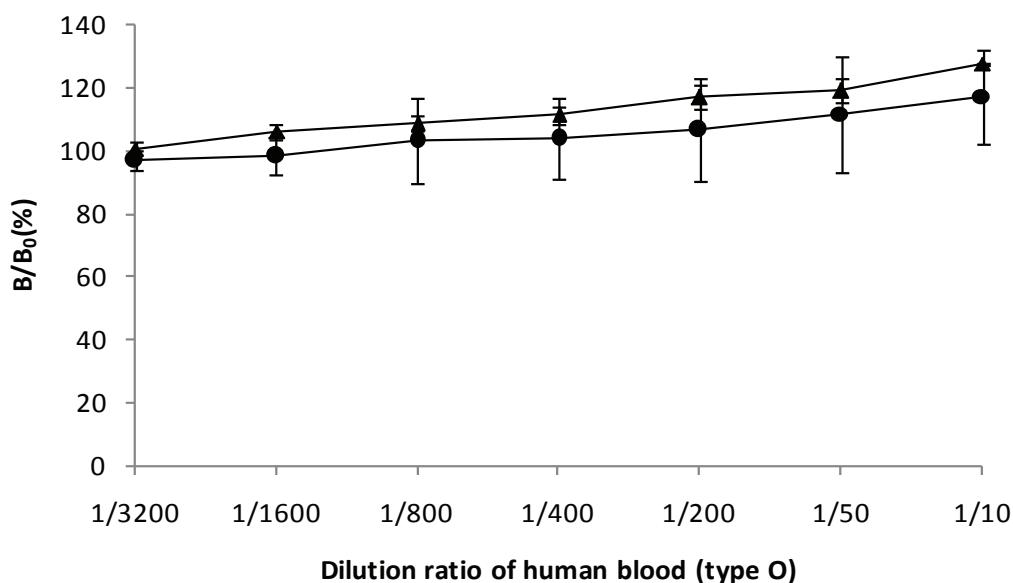


Fig. 1-17 Analysis of type O human blood. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human Blood (group O) was diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

血痕を試料とした場合の阻害曲線を, Fig. 1-18~1-21に示す. B/B_0 の値が90%以下の値を示した各血液型の希釈率は, A型血痕中のA型抗原が16倍($B/B_0=57.2 \pm 16.5\%$, Fig. 1-18:A型), B型血痕中のB型抗原が16倍($B/B_0=55.6 \pm 25.1\%$, Fig. 1-19:B型), AB型血液中のA型抗原が16倍($B/B_0=77.4 \pm 1.7\%$, Fig. 1-20:A型), AB型血液中のB型抗原は16倍($B/B_0=81.1 \pm 2.2\%$, Fig. 1-20:B型)より低希釈率で, 検出が可能であった.

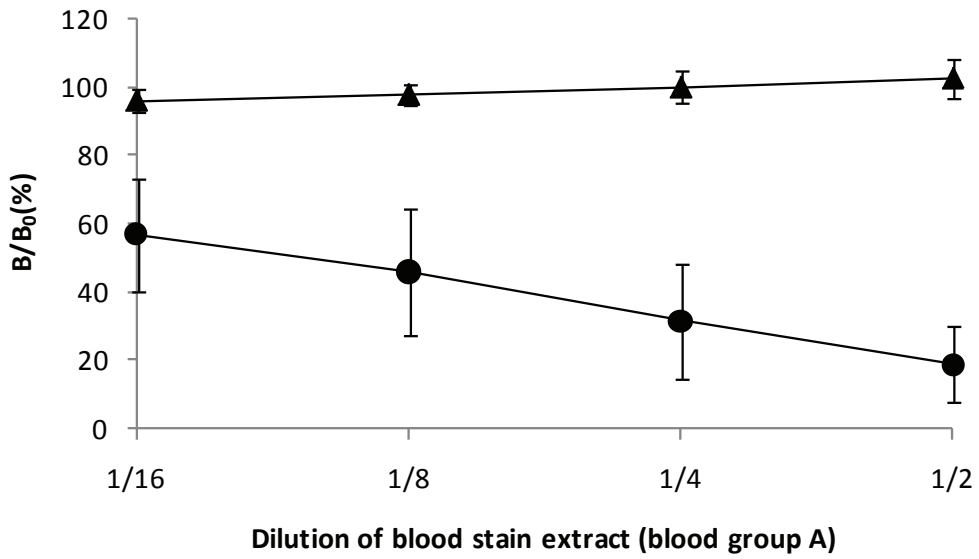


Fig. 1-18 Analysis of type A human blood stain. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human blood stain extracts (typeA) were diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

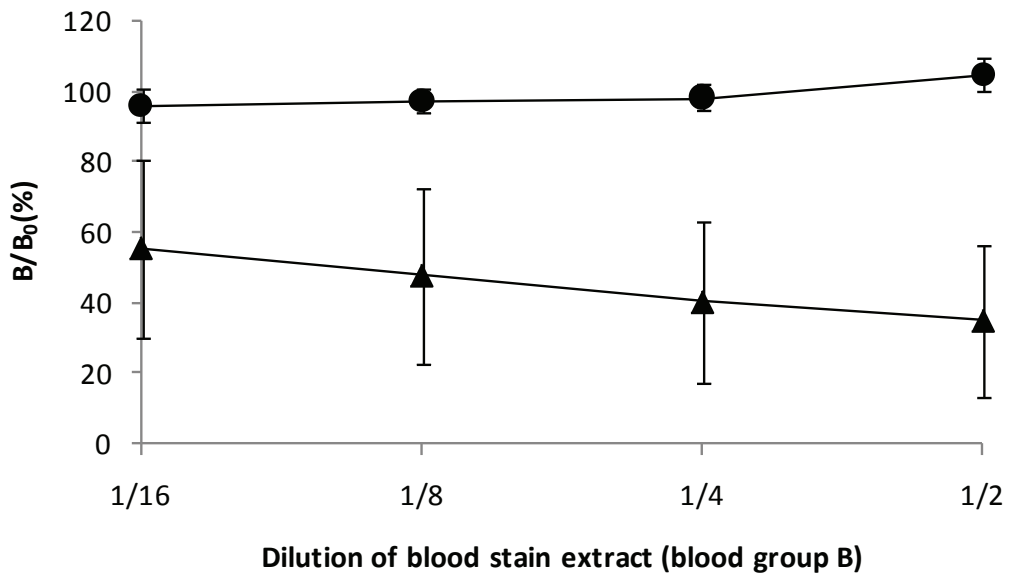


Fig. 1-19 Analysis of type B human blood stain. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human blood stain extracts (typeB) were diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

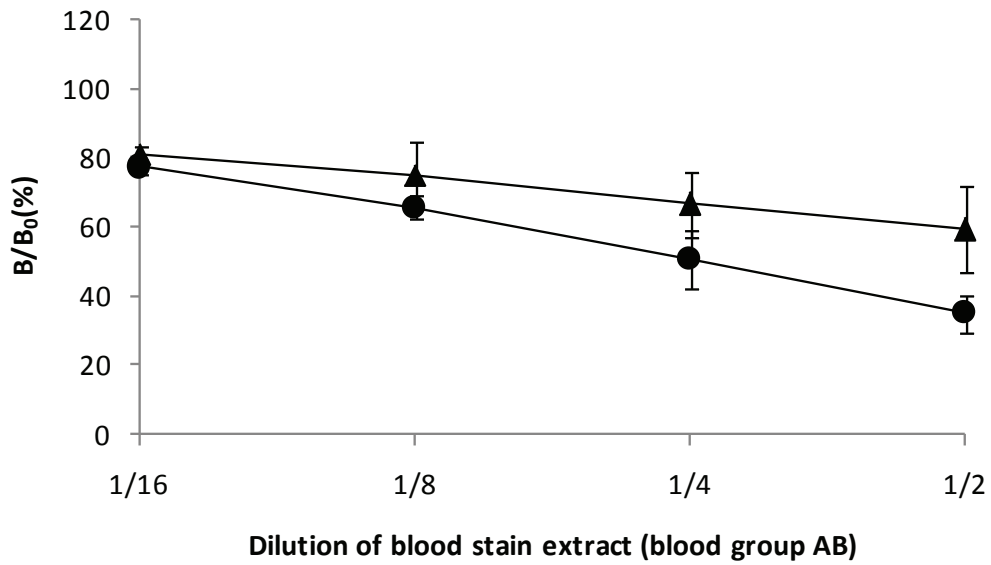


Fig. 1-20 Analysis of type AB human blood stain. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human blood stain extracts (typeAB) were diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

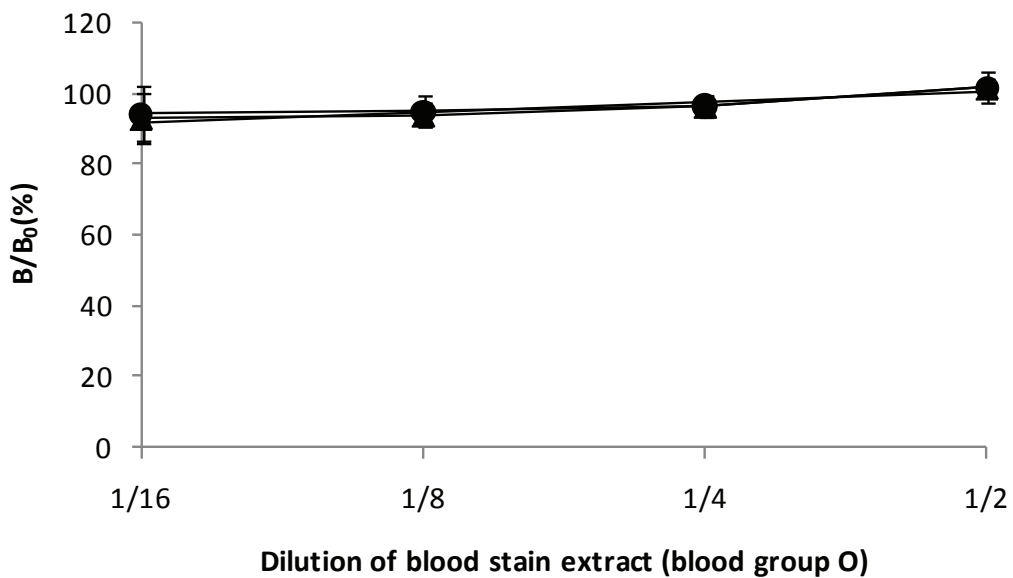


Fig. 1-21 Analysis of type O human blood stain. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Human blood stain extracts (typeO) were diluted and combined with anti-A mAb (closed circle) or anti-B mAb (closed triangle).

血痕について、PK処理及び熱処理を実施しない試料を調整し、処理試料との比較を行った。PK及び熱処理を施さなかった血痕試料では、血痕中の抗原への一次抗体の結合が不十分であったが(Fig. 1-22, 1-23), PK及び熱処理によって、血痕中の抗原への一次抗体の吸着が確認できた(Fig. 1-22, 1-23: Pk + heat treatment)。その結果、PK及び熱処理によって血痕から液中に血液型抗原が十分に溶出され、抗体との結合が容易になったと考えられた。なお、PK及び熱処理は、O型血液の検査には影響を及ぼさないことも確認出来た(Fig. 1-24)。

以上の結果から、従来より困難とされてきたELISA法による血痕のABO式血液型抗原の検出が可能になり、生体試料によって抗原の検出方法を変更することなくA型及びB型抗原の検出が可能となった。

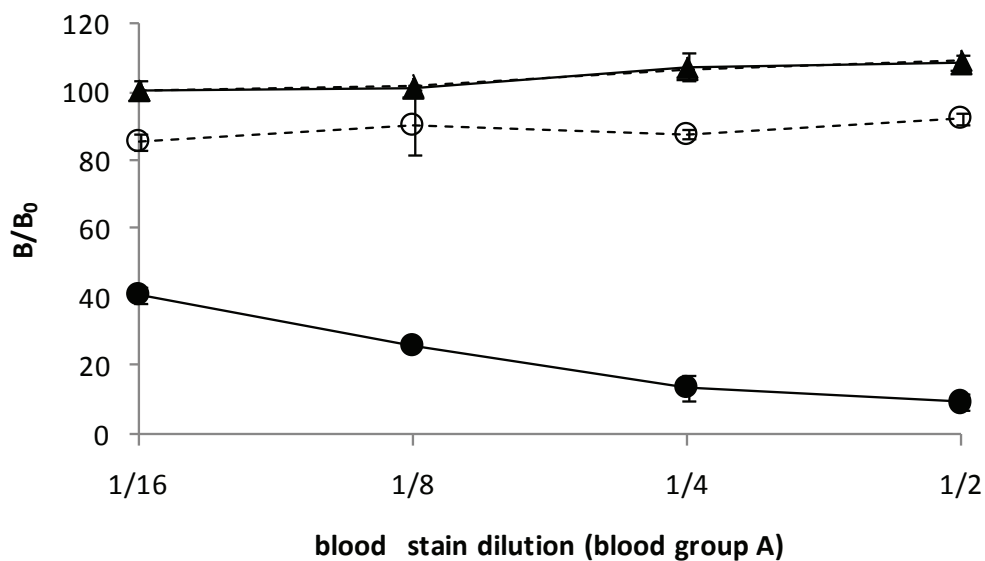


Fig. 1-22 Effect of PK treatment on the extraction of blood group antigens from type A blood stains. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Improved inhibition activity of capture anti-A mAbs was observed for type A blood stains extracted with PK; comparisons made with non PK-treated type A blood stains.

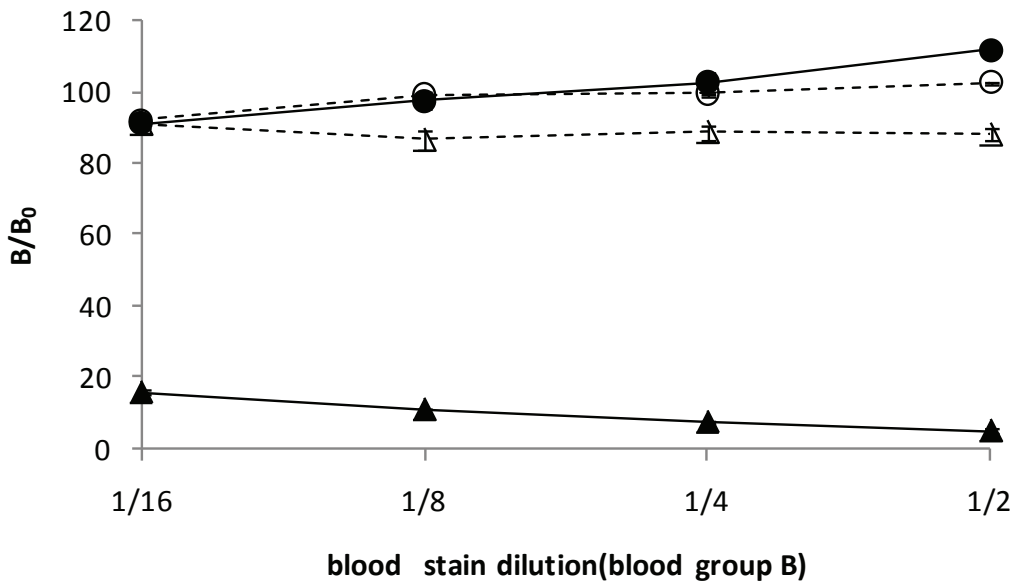


Fig. 1-23 Effect of PK treatment on the extraction of blood group antigens from type B blood stains. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D. Improved inhibition activity of capture anti-B mAbs was observed for type B blood stains extracted with PK; comparisons made with non PK-treated type B blood stains.

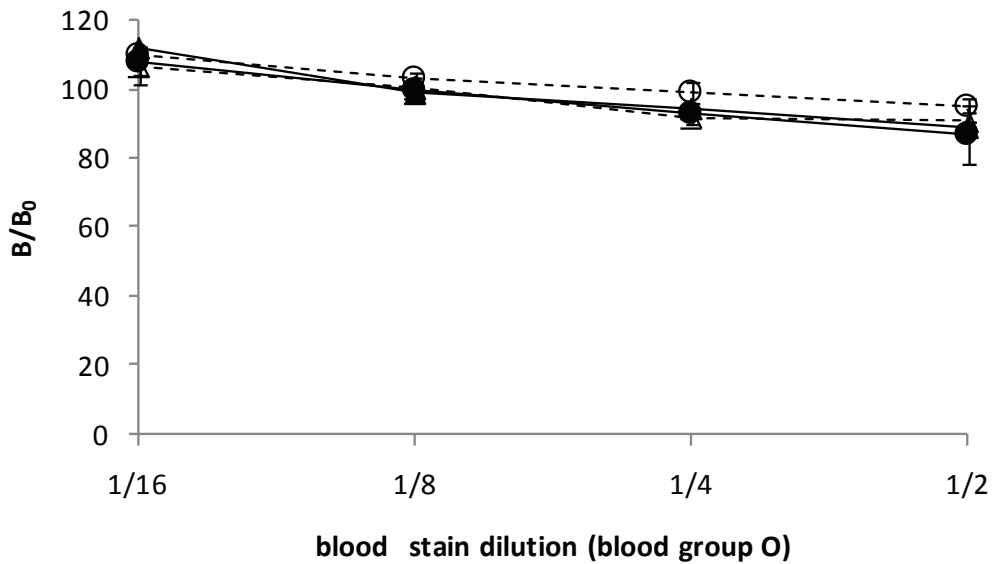


Fig. 1-24 Effect of PK treatment on the extraction of blood group antigens from type O blood stains. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D.

1-4 考察

1-4-1 固相化抗原

間接競合ELISAの測定原理は、一定量の一次抗体に、競合抗原と固相化抗原を競合的に結合させ、固相化抗原側に結合した一次抗体の量を測定することで競合抗原の濃度を測定する(Fig. 1-1). そのため、競合抗原と反応しなかった未反応の一次抗体を、可能な限り固相化抗原に結合させるためには、固相化抗原をマイクロプレートのウェル内壁に高密度に結合させることが求められる. 本法で固相化抗原に利用した市販のABO式血液型抗原プローブは、アクリルアミドポリマーにA, B型抗原の主要3糖構造がスペーサーを介して結合したもので、高密度にマイクロプレートへ固相化が容易に達成できることが確認できた.

1-4-2 間接ELISAによる固相化抗原力価測定

ABO式血液型抗原プローブの濃度を0.03125~2 $\mu\text{g/ml}$ に変化させ、6種類のモノクローナル抗体(400倍希釈)を用いて、間接ELISA法によって固相化する血液型抗原プローブの最適濃度について検討した. ABO式血液型抗原プローブは、セラクロン社の抗A抗体、イムコア社の抗B抗体を用いた場合に、それぞれ吸光度が最大となった1.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調整して、50 μl をマイクロプレートのウェルに注入して固相化を行うこととした(Fig. 1-2, 3).

1-4-3 間接ELISAによる抗体力価の測定

血液型抗原プローブの濃度を1.0 $\mu\text{g/ml}$ とし、6種のモノクローナル抗体の希釈倍率を変化させ、間接ELISA法により最適な抗体の希釈倍率を検討したところ、Blood typeA(tri)-PAAには1600希釈のセラクロン社の抗A抗体、Blood typeB(tri)-PAAには1600倍希釈のイムコア社の抗B抗体が最も反応に適していた(Fig. 1-4,1-5).

1-4-4 間接競合ELISAによる唾液のABO式血液型検査

唾液を試料とした場合、分泌型では、A型及びAB型が1024倍、B型が4096倍希釈まで (Fig. 1-6, 7, 8), 非分泌型ではA型が64倍、B型及びAB型ともに32倍希釈 B/B_0 の値が90%以下となり、陽性と判定された (Fig. 1-10, 11, 12). したがって、本法による唾液中のABO式血液型抗原の検出感度は、分泌型でおよそ1024倍希釈まで、非分泌型でおよそ32倍希釈までと考えられた。

1-4-5 間接競合ELISAによる血液のABO式血液型検査

溶血等の影響により、赤血球を得ることができない試料を想定し、凍結後、解凍して溶血させたヒト血液について、本法を用いたABO式血液型抗原の検出を行った。

血液を試料とした場合、A型は800倍希釈まで、B型は200倍希釈、AB型は200倍希釈まで陽性の反応を示した (Fig. 1-14, 15, 16). したがって、本法による血液中のABO式血液型抗原の検出感度は、およそ200倍希釈までと考えられた。なお、10~400倍希釈のA型血液に対する抗B抗体、10~400倍希釈のB型血液に対する抗A抗体及び10~400倍希釈のO型血液に対する抗A, B抗体の $B/B_0\%$ は、100%を大きく超える値を検出した (Fig. 1-14, 15, 17). これは、血液の希釈率が大きくなるほど値が小さくなっていることから、熱処理により十分にヘモグロビンを除去しきれなかったため、高濃度のヘモグロビンがELISAに影響を与えたと考えられた。

血痕を試料とした場合、PK処理により、A型、B型、AB型ともに16倍希釈まで陽性の反応を示した (Fig. 1-18, 19, 20). したがって、本法による血痕中のABO式血液型抗原の検出感度は、およそ16倍希釈までと考えられた。

1-4-6 試料の前処理

本法を応用してABO式血液型検査を行う際に必要な試料の分量は、従来の血清学的

検査法に比べると多くを使用することとなる。しかし、試料の前処理として実施しているPK処理と熱処理は、DNA抽出時の細胞融解液の調製とほぼ共通の工程であることから、DNA型検査に用いる細胞融解液を少量使用することでABO式血液型の検査を同時に実施できると考えられた。通常、DNA抽出時のPK処理にはSDS等の界面活性剤を併用するため、ELISAに影響を与えない界面活性剤の選定が可能となれば、検出感度を上げることができるとも考えられ、さらに改善の余地があると考えられる。

本法におけるPK処理及び熱処理は、サーモミキサーを利用することで複雑な操作を必要とせず簡便に実施できる。PK処理及び熱処理を採用したことにより、血液試料からもABO式血液型抗原の検出が可能となった。

1-4-7 まとめ

試料の前処理を改善し、間接競合法によるELISAを応用することで、従来困難とされていた血痕についても抗原の検出が可能となり、試料の種類によって検査方法を変更することなく、一度にABO式血液型抗原の検出が可能となった。本手法は、試料の種類に関わらず抗原の検出が可能であること、ELISAを基本フォーマットにしていることから、マイクロプレートウォッシャーやマルチチャンネルピペットを活用することで多くの操作の煩雑さを自動化でき、操作手法の習熟の困難さも軽減することができる。また、多数の試料を同時に分析することが可能なことから、東日本大震災のような多くの死者、行方不明者を発生させる大規模災害における身元確認作業時に、DNA型による身元確認作業とともに一次スクリーニング法や簡易検査として多数の試料からABO式血液型を一度に検査したい場合などに大きな貢献ができると考えられる。

第2章 ABO式血液型検査の誤判定に關与する土壤微生物

2-1 緒言

大規模災害時における身元確認が必要な検体の多くは、屋外に遺留されていることが多い。これらは、気温、湿度、汚染といった環境の影響を受け、時間の経過と共に、腐敗が進み、有機物は微生物により分解される。発見が遅れるほど、血液型判定に適した検体の採取が困難となり、血液型抗原の検出が困難、あるいは誤った型が検出されることがある。前述のとおり、一部の土壤微生物が持つ多糖類や糖タンパク類がABO式血液型抗原を有することが知られている³⁵⁾。また、微生物によって、ABO式血液型抗原が分解され本来の血液型が検出できなくなることも知られている^{1, 13, 14, 15)}。これらは、微生物の有するglycosidaseによるものと考えられている。

生体由来の有機物を分解している土壤微生物の中には、ABO式血液型抗原分解活性を持つglycosidaseを有する微生物の存在が予想されるが、それらについての検討は、あまり進展がない。

そこで、ヒト血液を唯一の成分とする寒天培地を用いて、土壤から微生物を単離して、それらの中にglycosidase活性を持つ微生物がどれほど存在するのかを調査することとした。はじめに、血液型抗原の末端に位置するGalNAc, Gal, Fucを切断する α -N-acetylgalactosaminidase, α -galactosidase, α -fucosidase活性測定を実施することとした。次に、glycosidase活性を有する菌株について、生体資料中の抗原を分解可能であるか、第一章で開発した間接競合ELISAを応用して、ABO式血液型抗原の分解を試みた。

2-2 実験材料及び実験方法

2-2-1 実験材料

4-nitrophenyl *N*-acetyl- α -*D*-galactosaminide(*p*NP- α GalNAc),

4-nitrophenyl- α -*D*-galactopyranoside(*p*NP- α Gal),

4-nitrophenyl- α -*L*-fucopyranoside(*p*NP- α Fuc) および4-nitrophenolは、Sigma社より購入した。間接競合ELISAに用いた試薬は第一章の実験と同じものを使用した。

2-2-2 土壌の採取

岐阜県内及びその近郊58カ所より、滅菌したスパーテルと50 ml容の滅菌済のプラスチック製遠心管を用いて土壌サンプルを採取した。

2-2-3 菌株の分離

土壌サンプル1 gを滅菌した生理的食塩水1 ml (0. 85% NaCl)に懸濁して10倍連続段階希釈し、希釈液100 μ lをヒト血液寒天培地に塗付して、25 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。なお、ヒト血液寒天培地は、羊血液寒天培地の調製法を参考⁴²⁾に新たに考案した。すなわち、生理的食塩水及び1. 5 %量の寒天をオートクレーブ滅菌後、室温で放置して約60 $^{\circ}$ Cまで冷やし、直ちに未滅菌のヒトAB型血液(全血)を5 %になるように無菌的に加え、滅菌シャーレに分注して固化させて作成した。

出現したコロニーを色調、サイズ、溶血反応の有無を指標としてランダムに選抜し、同培地による培養を複数回繰り返して供与菌株とした。

なお、一連の操作は無菌的に行った。

2-2-4 α -glycosidase活性測定

ABO式血液型抗原の末端の構成糖であるA型抗原のGalNAc, B型抗原のGal, O抗原の

Fucを有する*pNP-αGalNAc*, *pNP-αGal*および*pNP-αFuc*をそれぞれ基質として利用し, α -*N*-acetylgalactosaminidase, α -galactosidase, α -fucosidase活性測定を行った. すなわち, 供与菌株380株について, それぞれLB培地3 mlを用いて, 25°Cで48時間培養後, 遠心分離 (25,000 ×g 10分)して菌体と培養上清に分離した. 分離した菌体は200 μ lの0.15 M Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.5)に懸濁して, 液体窒素を用いた凍結融解処理を行い, 培養上清と凍結融解処理後の菌体抽出液を反応液とした.

pNP-αGalNAc, *pNP-αGal*, *pNP-αFuc* (いずれも濃度0.125 mM 0.15M PBS pH 7.5に溶解)それぞれ40 μ lを96穴プレートに分注後, 培養上清または菌体抽出液を10 μ lを混合し, 37 °Cで1時間反応させた. 反応後, 0.5 M炭酸ナトリウム溶液50 μ lを加えて反応を停止させ, 遊離した4-nitrophenolの吸光度(405 nm)を, プレートリーダーを用いて測定した. 検量線は, 0.125 mMの4-Nitrophenolを2倍段階希釈して作成し, タンパク質濃度は, BSAを基準としたブラッドフォード法により測定した.

2-2-5 間接競合ELISAによるB型抗原分解活性測定

α -galactosidase活性を認めた13菌株は, B型抗原の末端に存在する α Galを切断する可能性が高いと考えられたことから, これら13菌株について, 間接競合ELISAによるB型抗原の分解活性測定を行った

競合抗原として, B型のヒト唾液を利用した. 同意を得てB型・分泌型の人物から和紙片に唾液を採取し, 室温で乾燥させて収集した. 収集した和紙片(20人分)を細切して, 20 ml のPBSで抽出し, 20 分間沸騰水中で熱処理して除タンパクと唾液酵素の失活化を行い, 続いて透析チューブを用いて濃縮して, 1 mlのB型唾液抽出物を得た. ブラッドフォード法によるタンパク質濃度は, 0.177 μ g/mlであった.

α -galactosidase活性を認めた13菌株について, 前培養(LB培地3 ml, 25 °C)12時間, 本培養(LB培地100 ml, 25 °C) 48時間を行い, 菌体を遠心分離(25,000 ×g 10分)して回収後, pH

6.0のリン酸バッファーに懸濁、遠心分離の操作を3回繰り返して菌体を洗浄して、ELISAを行うまで-80 °Cで保存した。得られた菌体(湿潤重量で約1 g)を乳鉢上で液体窒素を適宜加え凍結させてすりつぶし、pH6. 0のリン酸バッファー1 mlを加えて溶解、37 °Cのインキュベーター内でシャーベット状になるまで加温して融解を行い、凍結と融解を3回繰り返した後、20分間遠心分離(4 °C, 25,000 ×g)して、上清を菌体抽出液とした。

競合抗原をpH6. 0のリン酸バッファーで400倍から段階希釈したものそれぞれ15 µlに、菌体抽出液15 µlを加え、液量を30 µlとして、37 °Cで24時間反応させた。反応後、95 °Cで15分間熱処理を行って、混合液中の酵素を失活させた。熱処理後、一次抗体として血液型判定用マウス由来モノクローナル抗B抗体(PBSで800倍希釈、イムコア社製) 30 µlを加えて液量を60 µl (競合抗原 - 一次抗体混合液)とし、4 °Cで12時間静置して競合抗原に一次抗体を吸着させた。

あらかじめ、96穴プレート(Maxisorp, Nunc社製)にB型糖鎖プローブ(1. 0 µg/ml) 50 µlを分注し、4 °Cに1晩静置して各ウェルにB型糖鎖プローブを吸着させ固相化した。プレートの洗浄、二次抗体の反応、発色反応は、第一章と同様に行なった。

なお、一次抗体の無いものをブランクとし、陰性コントロールとして菌体抽出液を煮沸処理したもの、陽性コントロールとしてα-galactosidase (green coffee bean由来, prozyme社製)を5 U/mlの濃度で用いた。

一連の操作は、Fig. 2-1に示した。

なお、9-1株について、培養を繰り返して5 g(湿潤重量)の菌体を得て、同様に凍結と融解処理により、5 mlの菌体抽出液を調整し、続いて透析チューブを用いて1 mlに濃縮して、約5倍の濃度の菌体抽出液を作成して、同様に間接競合ELISAに供した。

Y anti-B monoclonal antibody ▲ antigen ○ BSA
 ■ Anti mouse IgM HRP conjugated ● B antigen degrading enzyme

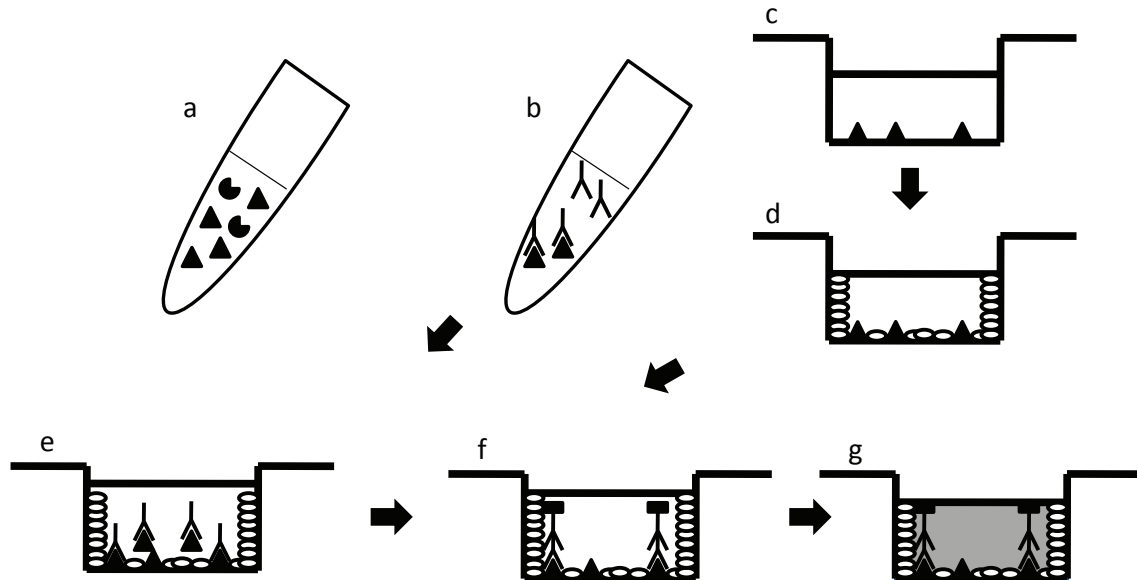


Fig. 2-1 Schematic of the indirect competitive ELISA for the detection of B antigens. a. Crude enzymes (15 μ L) were added to saliva extract (15 μ L) and placed at 37 $^{\circ}$ C for 24 hours. The reaction was stopped by boiling. b. An equal volume (30 μ L) of sample was combined with anti-B MAb and incubated at 4 $^{\circ}$ C for 12 hours. c. The wells of polystyrene ELISA plates were coated with type B (tri)-PAA in 50 μ L PBS at 4 $^{\circ}$ C for 12 hours. The wells were washed three times with 250 μ L PBST. d. The wells were blocked with 100 μ L BSA-PBS and incubated at 37 $^{\circ}$ C for 1 hour. At the completion of the incubation the wells were washed with 250 μ L PBST three times. e. A 50 μ L aliquot containing crude enzyme and saliva extract combined with anti-B MAb was added to the wells. Plates were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 1 hour prior to washing with 250 μ L PBST three times. f. Anti-mouse IgM-HRP conjugate (50 μ L) was added to each well. The plates were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 1 hour, prior to washing with 250 μ L PBST three times. g. o-Phenylenediamine solution (50 μ L) was added to each well, and the plates incubated at room temperature for 10 min. The colorimetric reaction was stopped by the addition of 100 μ L 1M sulfuric acid to each well. The OD was measured at 490 nm using a spectrophotometer.

2-2-6 DNA抽出と16S rRNA遺伝子解析

菌株をLB培地3 mlを用いて25 °Cで24時間培養後、培養液を遠心分離(15000rpm, 15 min)して菌体を回収した。回収した菌体よりISOIL Beads Beating(ニッポンジーン)を使用してビーズ粉砕法によりDNAを抽出し、細菌16SrRNA遺伝子の特異的に増幅するユニバーサルプライマーセット(Eub10F: 5' -GTTTGATCCTGGCTCA-3' ; Uni1500R: 5' -TACCTTGTTACGACTG-3')を用いてPCRを行なった。PCRの条件は、熱変性 95 °C 10分後、35サイクルの(熱変性 95 °C 3 秒, アニーリング 55 °C 1 分, 伸長反応 72 °C 90 秒), 最終伸長反応を 72 °C 10分間行なった。

増幅産物を Performa® DTR Gel Filtration Cartridges (EdgeBio)を用いて精製し、BigDye® Terminator v3. 1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてサイクルシーケンス反応を行い、Genetic analyzer 3130xl (Applied Biosystems)を用いてキャピラリー電気泳動により、シーケンスを行なった。得られた配列を用いてBLASTにより、ホモロジー検索を行った。

2-3 実験結果

2-3-1 土壌の採取

岐阜県下及びその近郊の民家(軒下, 庭), 河川敷, 畑, 山林, 運動場等58カ所から土壌を採取した. 採取場所は, 特殊な環境を選ばず, 土壌を選択した.

2-3-2 菌株の分離

ヒト血液寒天培地(AB型)を用いて培養を行ったところ, 出現したコロニーは, 糸状菌, 溶血反応を示すもの, 溶血反応を示しクリアゾーンに色素を産生するもの, 溶血反応を示さないもの等が混在していた.

2-3-3 α -glycosidase活性測定

得られた380株について, pNP - α GalNAc, pNP - α Gal および pNP - α Fuc を用いた glycosidase活性測定を行った. その結果, 380株中13菌株(1-5, 2-4, 3-5, 4-3, 9-1, 22-2, 26-2, 34-2, 34-7, 34-9, 35-2, 41-2, 55-4)に α -galactosidase活性を認めた(Fig. 2-2). これら13菌株の性状をTable 2-1に示す.

α -galactosidase活性を認めた13菌株は, いずれも溶血反応を示さず, コロニーの形態学的性状と α -galactosidase活性との相関関係は認められなかった. それらのうち11菌株のコロニーの形状は円形で, 残る26-2株は糸状であった. また, 土壌の採取場所に共通の所見は認められなかった(Table 2-1).

また, 今回選抜した微生物中には, α -N-acetylgalactosaminidase, α -fucosidase活性を有する微生物は存在しなかった.

α -galactosidase活性を認めた13菌株について, ヒトB型唾液を競合抗原に用いた間接競合ELISAに供した.

Table 2. Morphological characterization of isolated microbes.

sample	colony morphology	colony color	sample source	16S rRNA homology search (homology %)
1-5	circle	pale brown	garden	<i>Bacillus megaterium</i> strain MC-3-SDCH4
2-4	circle	colorless	river-terrace	<i>Bacillus</i> sp. SuP1
3-5	circle	colorless	river-terrace	<i>Bacillus</i> sp. WS24
4-3	circle	gray	river-terrace	<i>Bacillus megaterium</i> strain WS19
9-1	circle	pale yellow	potato plot	Bacillales bacterium strain TB5
22-2	circle	white	garden	<i>Bacillus</i> sp. WS24
26-2	filamentous	white	garden	<i>Bacillus</i> sp. SCE97(2010)
34-7	circle	pale brown	forest	<i>Bacillus</i> sp. S10
34-9	circle	gray	forest	<i>Bacillus megaterium</i> strain WS19
35-2	circle	gray	roadside	<i>Bacillus megaterium</i> strain AIMST 7.M5.2
41-2	circle	white	field	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain S22Ba-195
55-4	circle	white	persimmon field	<i>Bacillus</i> sp. SCE139(2010)

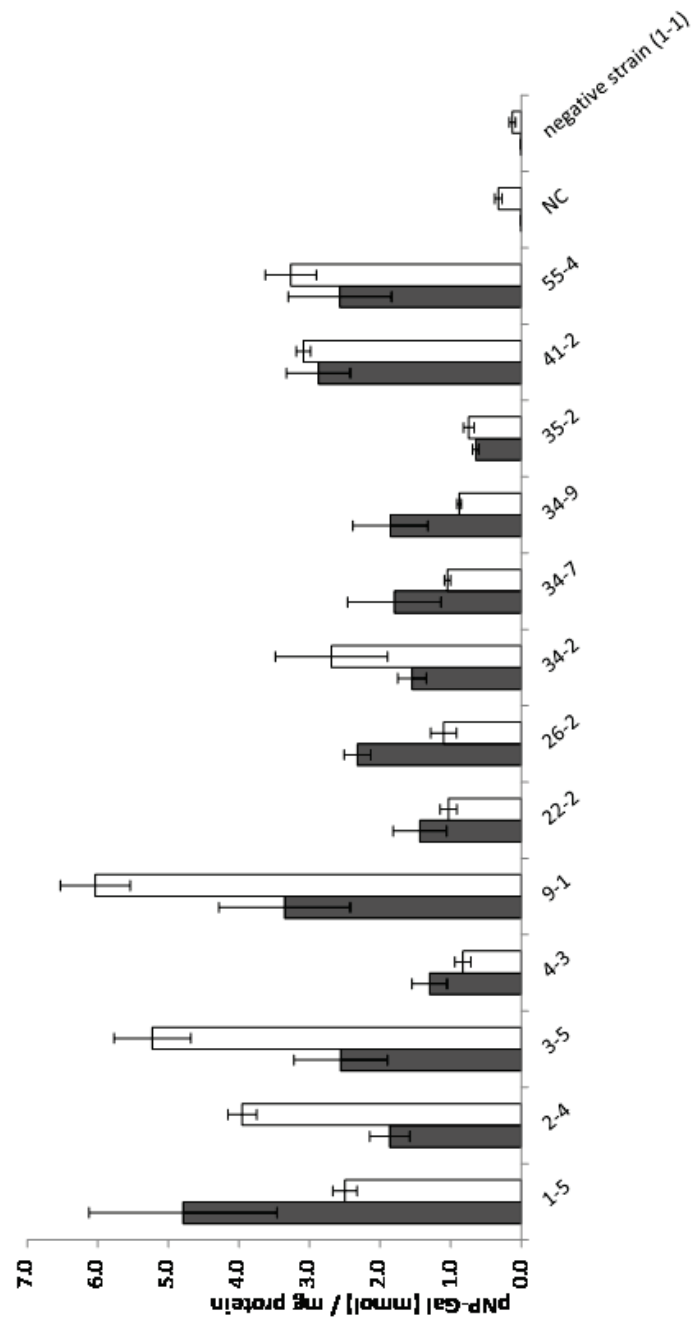


Fig. 2-1 Specific α -galactosidase activities of 13 strains using *pNP- α -Gal* as substrate *pNP- α -Gal* was incubated with cell free extract (black columns) or culture supernatant (white columns). PBS was used as negative control (NC). Galactosidase negative strain (1-1) was included in comparison. Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D.

2-3-4 間接競合ELISAによるB型抗原分解活性測定

α -galactosidase活性を認めた13菌株は、B型抗原の末端に存在する α Galを切断する可能性が高いと考え、これらの菌体抽出液について、間接競合ELISAを利用したB型抗原の分解活性測定を行った。その結果をFig. 2-3に示す。陽性コントロールとして使用したコーヒー豆由来の α -galactosidaseは、唾液中のB型抗原を分解し、吸光度が上昇した(Fig. 2-3)。 α -galactosidase活性を認めた13菌株中7菌株(2-4, 9-1, 22-2, 26-2, 34-2, 34-7, 35-2)は、熱処理サンプルと比較して吸光度の上昇を観察でき(Fig. 2-3a)、中でも9-1は最も高い活性を示した(Fig. 2-3b)。

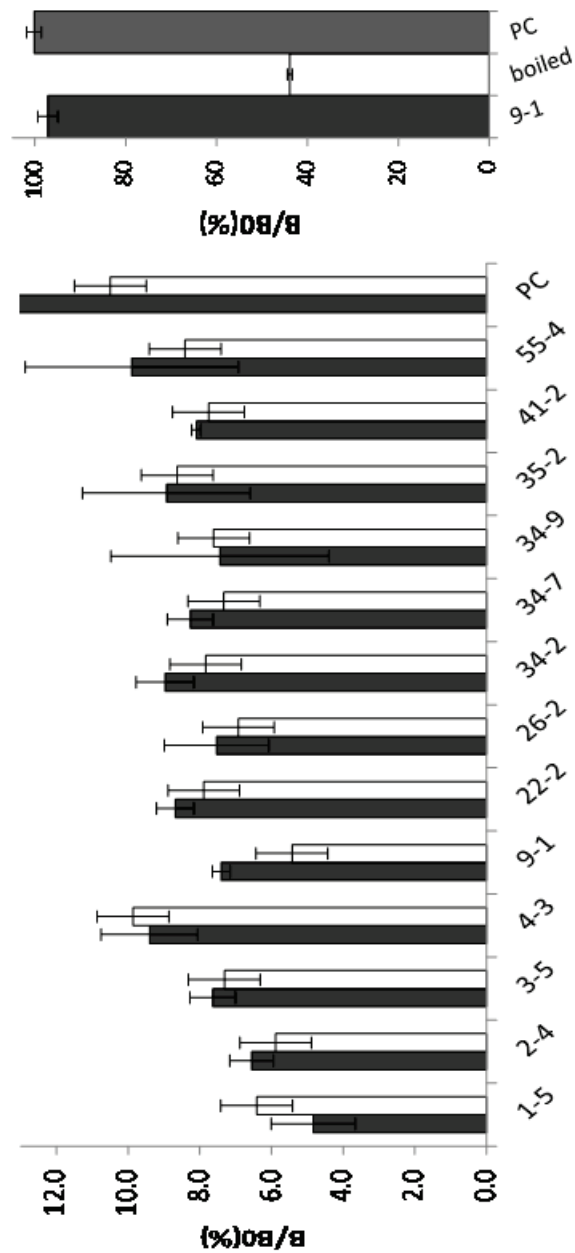


Fig. 2-2 Blood group B antigen degrading activities using an indirect competitive ELISA. Cell free extracts (black columns) or boiled extracts (boil control; white columns) were incubated with the competitive antigen (type B human saliva diluted 1:6400) at 37 °C for 24 hr. Reactions were stopped by heat treatment at 95 °C for 15 min. The quantity of B antigen was determined by the indirect competitive ELISA. PC stands for positive control (coffee bean α -galactosidase). Tests were performed in duplicate. Error bars represent the S. D.

2-3-5 DNA抽出と16S rRNA遺伝子解析

α -galactosidase活性を認めた13菌株(34-2を除く)の特性は、Table 2-1に示したとおりで、34-2株は、16S rRNA遺伝子を増幅することができなかった。

16S rRNA 遺伝子配列のホモロジー検索の結果、1-5株は*Bacillus megaterium* strain MC-3-SDCH4, , 2-4株は*Bacillus* spp. SuP1と、3-5株と22-2株は*Bacillus* sp. WS24と、4-3株と34-9株は*Bacillus megaterium* WS 19と、9-1株はBacillales bacterium TB5と、26-2株は*Bacillus* sp. SGE97(2010)と、34-7株とは*Bacillus* sp. S10,と、35-2株は*Bacillus megaterium* strain AIMST 7. M5. 2と、41-2株は*Bacillus thuringiensis* strain S22Ba-195と、55-4株は*Bacillus* sp. SGE139(2010)と、それぞれ 99%以上の相同性を示した。

2-4 考察

2-4-1 採取菌株

出現したコロニーを、色調、サイズ、溶血反応の有無を指標として選抜し、ヒト血液寒天培地を用いて380株を分離した。ヒト血液寒天培地には、ヒト血液及びNaClのみを添加していることから、土壌からヒト血液由来の成分または寒天由来成分を利用して生育可能な微生物を収集できたと考えられた。

2-4-2 α -glycosidase活性

13菌株中3菌株(1-5, 3-5, 9-1)は、反応液中のpNP- α Gal(5 mmol)を全て分解していると考えられ、その他の活性を有した菌株に比べると高い活性を示し(Fig. 2-1)、B型抗原の分解株として有力な候補と考えられた。Liuらは、2500株の単離株を用いて、7-amino-4-methyl-coumarin labeled B tetrasaccharideを基質とする α -galactosidase活性を調査し、5株に α -galactosidase活性を検出しているが、pNP- α Galの分解菌は検出していない²⁴⁾。

また、今回選抜した微生物中には、 α -N-acetylgalactosaminidase活性を示す微生物は存在しなかった。Liuらの報告でも、 α -N-acetylgalactosaminidase活性を有する微生物は検出されていない²⁴⁾。さらに、本実験では α -fucosidase活性を有する微生物は確認できなかった。

2-4-3 間接競合ELISAによるB型抗原分解活性

第一章で述べた間接競合ELISAを用いて、 α -galactosidase活性を有していた13菌株のB型抗原分解活性の測定を行った。競合抗原は、実際の生体試料であるB型のヒト唾液を用い、生体中に存在するABO式血液型抗原と菌体抽出液との反応によるB型抗原の減少を、間接競合ELISAにより測定した。

α -galactosidase活性を有していた13菌株のうち7菌株(2-4, 9-1, 22-2, 26-2, 34-2, 34-7, 35-2)の菌体抽出液と陽性コントロールとして使用したコーヒー豆由来の α -galactosidaseは、 B/B_0 (%)の値が煮沸サンプル(陰性コントロール)と比べ、高い値を示し、B型抗原が分解されていることを示している (Fig. 2-2).

それらのうち最も高いB型抗原分解活性を示した9-1株は、菌体量を5倍に増大することで、陽性コントロールと同程度の分解活性を示したことから、B型抗原分解活性は菌体量に依存していることがわかった。

また、9-1株はpNP- α Galを基質とする α -galactosidase活性も高い値を示していることから (Fig. 2-1)、間接競合ELISAにおいて観察されたB型抗原の分解活性は、B型抗原の末端に存在するGalを切断することによると考えられた。

2-4-4 DNA抽出と16S rRNA遺伝子解析

16S rRNA 遺伝子配列のホモロジー検索の結果、galactosidase活性を有していた12菌株はいずれも*Bacillus*属に非常に近縁な株であった。これまでに、B型抗原分解細菌として知られている微生物が*Bacillus cereus*であった¹³⁾ことから、galactosidase活性と*Bacillus*属には、相関関係があることが示唆された。

1-5株は、*B. megaterium* strain MC-3-SDCH4と99%以上の相同性を示し、*B. megaterium* strain MC-3-SDCH4は、鉱物の風化や土壌形成を担っていると報告されている¹⁰⁾。

3-5株と22-2株は、*Bacillus* sp. WS24と99%の相同性を示し、*Bacillus* sp. WS24は、小麦の根圏から単離されている⁶⁴⁾。

2-4株および34-7株は、*Bacillus* sp. SuP1およびS10とそれぞれ99%以上の相同性を示した。4-3株および34-9株は、*B. megaterium* WS19と99%以上の相同性を示した。*B. megaterium* WS19、*Bacillus* sp. SuP1およびS10は*Bacillus* sp. WS24と99%以上の相同性を示した。

9-1株はBacillales bacterium TB5と99%以上の相同性を示した。Bacillales bacterium TB5は、ピーナッツの根圏より単離されている。

26-2株および55-4株は、*Bacillus* spp. SGE97(2010)および SGE139(2010)とそれぞれ99%以上の相同性を示した。*Bacillus* spp. SGE97(2010)および SGE139(2010)は、*B. megaterium* strain zjzl-1と99%以上の相同性を示し、*B. megaterium* strain zjzl-1は、線虫に毒性を示すことが知られている⁴¹⁾。

35-2株は、*B. megaterium* strain AIMST 7. M5. 2と99%以上の相同性を示し、*B. megaterium* strain AIMST 7. M5. 2は、*B. megaterium* strain EL-16 と99%以上の相同性を示した。

41-2株は*B. thuringiensis* strain S22Ba-195と99%以上の相同性を示し、*B. thuringiensis* strain S22Ba-195は、*B. megaterium* strain EL-12と99%以上の相同性を示した。*B. megaterium* strains EL-12 and EL-16は、朝鮮人参の根幹より単離されている⁵²⁾。

これらの16S rRNA遺伝子の相同性解析から、本実験で単離した α -galactosidase活性を有する微生物は、植物の根圏や植物体内に存在する*Bacillus*属の微生物に非常に類似した株であることが明らかとなり、これらの産生する α -galactosidaseが自然環境中の植物の分解や根圏の形成を担っているのではないかと考えられた。

2-4-5 まとめ

今回の実験によって、ABO式血液型抗原(B型抗原)が、いくつかの*Bacillus*属細菌(得に9-1株)により分解されることが示され、それらが植物やその根圏と深い関わりがあることが示唆された。

また、今回選抜した微生物中には、 α -N-acetylgalactosaminidase活性を示す微生物は存在しなかった。Liu らの報告でも、 α -N-acetylgalactosaminidase活性を有する微生物は検出されていない²⁴⁾。さらに、本実験では α -fucosidase活性を有する微生物は確認できな

った。これらのことから、A及びH型抗原はB型抗原に比べ、安定な抗原であるともいえる。

結論として、環境中に遺留された検体のABO式血液型を検査する際には、B型からO型への変換の可能性があることに注意を払う必要があり、相当な期間、植物が存在するような場所に遺留されていた場合には、O型と判定する前に検査の誤判定を疑う必要がある。

終章 総合考察

3-1-1 生体試料の微生物汚染

屋外に遺留された試料からABO式血液型抗原を検出する際、本来の血液型とは異なる型あるいは判定が困難になることは、しばしば経験されてきた。また、微生物によるABO式血液型抗原の分解についても、研究がなされてきた^{12, 13, 14, 15, 63)}。しかし、これらの研究は散発的で、継続的に実施されておらず、分解活性を持つ微生物が存在するという事実だけが、根拠となっていた。

さらに近年は、DNA型による個人識別法が普及したことから、ABO式血液型を指標とする身元確認の機会は減少しており、誤判定の原因となる微生物について、積極的な研究がなされていない現状であった。

しかし、高度に腐敗した死体では、DNAの検出が困難になる例もあり、骨や歯など残存する試料から検出できる遺伝形質がDNA型とABO式血液型だけとなることも想定される。前述のように、日本のようにABO式血液型が高度に普及した社会では、多数の身元不明者のリストから該当者を絞り込むという点で、重要な遺伝的指標となる^{25, 46)}。

本研究で単離したB型抗原分解株は、いずれも*Bacillus*属に属する株であった。本研究以前に報告されているB型抗原分解菌も、*Bacillus cereus*¹³⁾であり、自然界で起こるB型抗原の分解にも、*Bacillus*属の微生物が関与していると考えられる。O型を判定する際には、*Bacillus*属細菌による汚染や α -galactosidase活性の有無を確かめるなど、誤判定の危険性を十分に考慮し、本来はB型である可能性を十分に考慮する必要がある。

また、本研究で単離したB型抗原分解株は、いずれも植物やその根圏に生息する*Bacillus*属細菌であることが明らかとなった。このことから、植物が自生している山、田畑、河川敷などの解放された場所に遺留された生体試料が、誤判定を引き起こす可能性が高いことを意味し、植物の自生しない運動場などの整備された土壌では、B型抗原の分解の可能性が低いと考えられた。

3-1-2 環境微生物由来の糖加水分解酵素

本研究では、380菌株中13菌株に*pNP-αGal*を基質とする α -galactosidase活性を認めた。Liu らの報告では、*pNP-αGal*を分解する微生物は検出されていない²⁴⁾。この活性の差は、培養条件や基質の違いなどが原因と考えられ、また、Liu らの報告した α -galactosidaseと、本研究で見出した9-1株では、酵素の基質特異性が異なると考えられる。

本研究では、 α -*N*-acetylgalactosaminidaseおよび α -fucosidase活性を有する微生物は検出できなかった。Liu らの報告でも、 α -*N*-acetylgalactosaminidase活性を有する微生物は検出されていない²⁴⁾ことから、*N*-acetylgalactosaminidaseおよび α -fucosidaseの存在は、非常に稀であると考えられる。

3-1-3 ABO式血液型抗原の半定量的分析法

第一章で述べた間接競合ELISAは、吸光度が測定対象抗原の量に比例していることから、従来の血清学的手法が陽性か陰性であるかを判定するのに比べ、抗原の量を定量的に比較することが可能となった。この間接競合ELISAを応用すれば、微生物だけでなく、その他の要因による抗原の分解も評価することができ、今後の血液型鑑定の精度向上につなげることができると考えられる。

また、本実験ではA型、H型抗原の分解菌の発見はできなかったが、A型についてはB型と同様に、環境中の微生物による抗原分解活性測定が可能となった。

3-1-4 土壌微生物によるABO式血液型の改変

本実験の目的は、血液型鑑定の誤判定の原因となる微生物の解析を目的としていたが、ABO式血液型抗原の分解株の探索は、その他にもさまざまな理由から研究されている。近年、輸血に用いる血液を無駄にしないために、A型、B型あるいはAB型の赤血球の

血液型を変換して、O型の赤血球に変えて利用するいわゆるuniversal red blood cellの開発が行われている²⁴⁾。前述のとおり、A型抗原の末端のGalNAc、あるいはB型抗原の末端にあるGalを切断することにより、H型抗原を露出させ、O型の赤血球を人工的に作成する方法である。O型の赤血球は、全てのABO式血液型の人物に輸血することが可能であることから、臨床的に使用が可能となれば、血液不足を解消することができる。

3-1-5 結論

間接競合ELISAを利用したABO式血液型判定法を新たに開発した。この手法を用いることで、抗原の増減を定量的に測定することが可能になり、また、ELISAベースの判定法を応用することで、多数の試料を同時に測定することが可能となった。

さらに、本手法は、従来のELISAでは判定が困難であった血痕等の血液試料についても応用が可能であり、検体の種類を問わず抗原の検出が可能となった。血液は、人体を構成する体液の中で最も体積が大きく、また、全身を巡っていることから、人体のどこからでも採取が可能である。一度採取した血液は、清潔な綿棒等の担体に付着させて血痕を作成しておけば、長く安定してABO式血液型抗原およびDNA型の鑑定に利用することができ、長期保存が容易であることから、有用な手法となりえると考えた。しかし、長期間環境中に暴露されていた検体からの試料の採取は、爪や毛髪などの硬組織が含まれることから、これらの前処理方法を改善することで、将来的にはすべての検体を一度に判定できる血液型判定法の開発の一助になると考えた。

しかし、本研究で利用できたABO式血液型プローブはAおよびB型抗原のみで、同様のH型抗原の製品は生産が終了していたため、検討することができなかった。そのため、本法によりO型の血液及び血痕を判定するためには、A型及びB型抗原が検出されないことを確認した上で、他の分析手法によりH型抗原の検出を行い、H型抗原の存在を証明することが必要である。

間接競合ELISAを用いて、土壌よりヒト血液寒天培地を用いた単離株の α -galactosidase活性測定とB型抗原分解活性を測定したところ、380菌株中13菌株に α -galactosidase活性を、13菌株中7菌株にB型抗原分解活性を認めた。

Liuらは、2500株の単離株中5株に α -galactosidase活性を検出したが、*pNP- α Gal*の分解菌は検出していない²⁴⁾。Liuらは、別の基質(7-amino-4-methyl-coumarin labeled B tetrasaccharide)を用いて、B型抗原分解株として*Bacteroides fragilis*を選抜している²⁴⁾。*Bacteroides fragilis*と今回選抜した9-1株の有する α -galactosidaseの特異性の違いについては、非常に興味深く、今後の検討課題としたい。

さらに、今回選抜した微生物中には、 α -*N*-acetylgalactosaminidase及び α -fucosidase活性を示す微生物は存在せず、このことから、ABO式血液型抗原は比較的安定な化合物であることも考えられ、身元確認時の遺伝的指標として適しているとも言える。

α -galactosidase活性を示した13菌株中12株は、いずれも*Bacillus*属に属していることが明らかとなり、植物やその根圏に生息する*Bacillus*属と関わりがあることが明らかとなった。また、風化や土壌形成といった、有機物の分解にも関わっており、 α -galactosidaseがその一端を担っているのではないかと考えられた。

9-1株は、菌体(酵素)量に依存して、B型抗原分解活性を増大させていたことから、9-1株の産生する α -galactosidaseは、ごく少量であることがうかがえた。これは、培養条件を改変することで、改善が図られると推察され、培地、温度、pHなどを検討し、さらに研究を進めていきたい。

これらの研究成果が、環境科学学問領域の新たな発展に寄与できることを望んでいる。

謝辞

研究にあたり、直接の御指導並びに貴重な御助言を頂きました岐阜大学応用生物科学部教授 高見澤一裕博士、同准教授 中村浩平博士、教授 石田秀治博士、静岡大学農学部教授 河合真吾博士に厚く御礼申し上げます。

研究を続けるにあたり、研究の助言をして頂いた岐阜県警察本部刑事部科学捜査研究所所員の皆様に厚く御礼申し上げます。

本研究に使用した血液を提供して下さった日本赤十字社血液センターの皆様にも厚く御礼申し上げます。

北海道警察科学捜査研究所福島久代博士には、血液型抗原プローブの紹介をしていただきました。ありがとうございます。

最後に、不肖の私を陰から応援してくれました、両親、祖母、妹に心から感謝いたします。

引用文献

- 1) Anderson, K. M., Ashida, H., Maskos, K., Dell, A., Li, S.-C. and Li, Y.-T. (2005). A Clostridal Endo- β -galactosidase that cleaves both blood group A and B glycotopes. *J Biol Chem.* 280, 7720-7728.
- 2) Aoki, Y., Funayama, M., Sebetan, I. M., Sagisaka, K. and Ikemoto, S. (1987). Extraction of ABH antigens from blood stains with various reagents. *Act Crim Japon.* 53, 248-252.
- 3) Baechtel, F. S. (1985). Secreted blood group substances: distributions in semen and stabilities in dried semen stains. *J Forensic Sci.* 30(4), 1119-1129
- 4) Doi, Y., Yamamoto, Y., Inagaki, S., Shigeta, Y., Miyaishi, S. and Ishizu, H. (2004). A new method for ABO genotyping using a multiplex single-base primer extension reaction and its application to forensic casework samples. *Leg Med.* 6, 213-223.
- 5) 福永龍繁 (2006). 標準法医学・医事法, 第6版 pp220-222, 医学書院, 東京.
- 6) 福島弘文 (2009). 法医学, 改訂2版 pp206-208, 南洋堂, 東京.
- 7) Graves, M. H., White, J. M., Fitzpatrick, F. A. and Kuo, M. C. (1978). A comparison of absorption-inhibition and absorption-elution methods in the detection of ABO(H) antigens found in vaginal samples submitted in sexual offense cases. *J Forensic Sci.* 23, 345-352.
- 8) Hakomori, S-I. and Strycharz, G. (1968). Investigation on cellular blood-group substances. 1. Isolation and chemical composition of blood-group ABH and Lebisantigens of sphingolipid nature. *Biochemistry.* 7, 1279-1286.
- 9) Hamada, K., Koreeda, A., Ohtsu, Y., Yonemitsu, K. and Tsunenari, S. (2002). A simple dot enzyme-linked immunosorbent assay for ABO blood typing of biological fluid and stains: effect of heating samples. *Leg Med.* 4, 217-22.
- 10) Huang, J., Sheng, X. F., Xi, J., He, L. Y., Huang, Z., Wang, Q., and Zhang, Z. D. (2014).

Depth-related changes in community structure of culturable mineral weathering bacteria and in weathering patterns caused by them along two contrasting soil profile. *Appl Environ Microbiol.* 80, 29-42.

11) 今岡仁, 早坂昭裕, 森下雄介, 佐藤敦, 広明敏彦 (2010). 顔認証技術とその応用. *NEC技報.* 63, 26-30.

12) Inuyama, R. and Kira, K. (1979). Influence of fungi on the changes of human blood group activities. *Ann Rep Nat Res Ins Police Sci.* 32, 1-7.

13) Iseki, S. and Ikeda, T. (1956). On bacterial enzyme specifically decomposing group B substances. *Proc Japan Acad.* 32, 201-205.

14) Iseki, S. and Okada, S. (1951). On a specific enzyme which decomposes group A substances. *Proc Japan Acad.* 27, 455-458.

15) Iseki, S. and Tsunoda, S. (1952). On bacterial enzyme which specifically decomposes O substances. *Proc Japan Acad.* 28, 370-373.

16) Jeffreys, A. J., Willson, V. and Thein, S. L., 1985. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature.* 316: 76-79

17) Kimura, T., Yokoi, T. and Sagisaka, K. (1989). ABH blood grouping of urine and urine stains by ELISA. *Res Pract Forensic Med.* 32, 45-47.

18) kouseisyoushou厚生労働省 (2005). 輸血療法の実施に関する指針

19) Laine, R. A. and Rush, J. S. (1988). Chemistry of human erythrocyte polylactosamine glycopeptides (erythroglycan) as related to ABH blood group antigenic determinants. *Adv Exp Med Biol.* 228, 331-347.

20) Landsteiner, K. (1900). Kenntnis der anti fermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zentralbl Bakteriol.* 27, 357-362.

21) Langman, M. J. S. and Doll, R. (1965). ABO blood group and secretor status in relation to

clinical characteristics of peptic ulcers. *Gut*. 270-273.

22) Lansing, C. H. and Erwin, T. B. (1976). Degradation of Blood Group Antigens in Human Colon Ecosystems. *J Clinical investigation*. 74-82.

23) Lee, H. C., Gaensslen, R. E., Carver, H. W. 2nd, Pagliaro, E. M. and Carroll-Reho, J. (1989). ABH antigen typing in bone tissue. *J Forensic Sci*. 34, 7-14.

24) Liu, Q. P., Sulzenbacher, G., Yuan, H., Bennet, E. P., Pietz, G., Saunders, K., Spence, J., Nudelman, E., Levery, S. L., White, T., Neveu, J. M., Lane, W. S., Bourne, Y., Olsson, M. L., Henrissat, B. and Clausen, H. (2007). Bacterial glycosidases for the production of universal red blood cells. *Nature Biotechnol*. 25, 454-464.

25) Loyola university new orleans online. Blood Typing and Modern Forensics. <<http://elearning.loyno.edu/resource/criminal-justice/blood-typing-and-modern-day-forensics>>

26) Lu, Y., Peterson, J. R., Gooding, J. J. and Lee, N. A. (2012) Development of sensitive direct and indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for monitoring bisphenol-A in canned foods and beverages. *Anal Bioanal Chem*. 403, 1607–18.

27) Matsubara, K., Tanabe, K., Akane, A., Nakamura, H., Takahashi, S. and Kimura, K. (1994) A novel assay for typing Rh antigens in blood-stains using a lectin specific to the bisecting n-acetyl-D-glucosamine side chain of glycoprotein. *J Immunol Methods*. 173, 175–80.

28) Matsubara, K., Tanabe, K., Yusa, I., Nakamura, H., Tanabe, Y., Idzu, T., Takahashi, S. and Kimura, K. (1996). A unique and sensitive ELISA technique for ABH antigens in bloodstains using UEA-1 lectin – the removal of detergent with a Sephadex G-25 mini-column improves sensitivity. *J Forensic Sci*. 41, 35–39.

29) Michino, J., Hata, Y., Matsui, K., Takizawa, H., Kominato, Y., Tabata, S., Nishino, K., Yasumura, S. and Kitajima, I. (2005). Demonstration of A antigen and A allele of ABO histo-blood group in nail in a case with the absence of A antigen and anti-A antibody in blood.

Leg Med. 7, 194-7.

30) MsCabe, J. P., Fletcher, S. M. and Jones, M. N. (1988). The effects of detergent on the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) of blood group substances. *J Immunol Methods*. 108, 129–135.

31) Nagae, M., Aoki, Y., Nata, M., Hashiyada, M. and Sagisaka, K. (1995). Monoclonal antibody against an amniotic protein carrying ABH blood group epitopes and its forensic application. *Tohoku J Exp Med*. 177, 353–364.

32) 永井淳 (2011). 法医学における検査の役割-DNA型判定の基礎から死後画像診断まで-. *医用画像情報学会雑誌*. 28, 66-71.

33) Nakata, M. and Ohkawa H. (1999). Immunoassay for pesticides based on monoclonal antibody. *Bunseki*. 6, 62–70.

34) Nichkova, M., Park, E., Koivunen, M. E., Kamita, S. G., Gee, S. J., Chuang, J., Emon, J. M. V. and Hammock, B. D. (2004). Immunochemical determination of dioxins in sediment and serum samples. *Talanta*. 63, 1213–23.

35) Nishi, E., Sakai, K. and Moriguchi, M. (2002). Influence of Bacterial Contamination on ABO Blood Typing. *Res Pract Forens Med*. 45, 27-32.

36) Nishii, S., Soya, Y., Matsui, K., Ishibashi, T. and Kawamura, Y. (2000) Determination of bisphenol A ELISA using an organic solvent-resistant anti-bisphenol A monoclonal antibody. *Bunseki Kagaku*. 49, 969–7.

37) Ohmori, T. and Sato, H. (1999). Improvement of absorption-elution test using commercially available anti-A, anti-B monoclonal antibodies—ABO blood typing from hair samples. *Nippon Hoigaku Zasshi*. 53, 338-44.

38) 岡田薫 (2006). DNA型鑑定による個人識別の歴史・現状・課題. *レファレンス*. 7-31

39) 大久保康人, 富田忠夫, 山野孟, 湯川美鳥, 西房子 (1974). 大阪府赤十字血液セン

- ターの資料にもとづく血液型の分布-特にABO variantとその頻度-. 衛生検査. 23, 15-17.
- 40) Race, R. R. and Sanger, R. (1975). Blood group in man, 6th ed. pp311-322. Blackwell, London
- 41) Rae, R., Iatsenko, I., Witte, H. and Sommer, R. J. (2010). A subset of naturally isolated Bacillus strains show extreme virulence to the free-living nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus*. *Environ Microbiol.* 12, 3007-3021.
- 42) Russell, F. M., Biribo, S.S. N., Selvaraj, G., Oppedisano, F., Warren S, Seduadua A, Mulholland, E. K. and Carapetis, J. R. (2006). As a bacterial culture medium, citrated sheep blood agar is a practical alternative to citrated human blood agar in laboratories of developing countries. *J Clin Microbiol.* 44, 3346-3351.
- 43) Sagisaka, K., Fletcher, S. M., Katsura, S. and Yokoi, T. (1989). Specific capture of ABH blood group antigens of the red blood cell or body fluids by double antibody sandwich-ELISA. *Tohoku J Exp Med.* 158, 211-219.
- 44) Saito, S. and Tokiwa, K. (1992). Sensitive identification of human blood and simultaneous determination of ABO blood group from a minute bloodstain by an ELISA-ABC method. *Nippon Houigaku Zasshi.* 46, 483-491.
- 45) 瀬戸洋一 (2012). バイオメトリック技術の開発動向. 日本印刷学会誌. 36-42
- 46) Simpson, E. K., Byard, R. W. (2008). Unique Characteristics at Autopsy that may be Useful in identifying Human Remains. In: Tsokos, M. [eds.] *Forensic pathology reviews*, 5. pp187-194. Humana Press. Totowa.
- 47) Storry, J, R., and Olsson, M. L. (2009). The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology.* 25, 48-59.
- 48) Takatori, T., Tutsubuchi, Y. and Terazawa, K. (1987). Lewis typing of human bloodstains by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using monoclonal anti-Le(a) and anti-Le(b). *J*

Forensic Sci. 32, 9.

49) Takatori, T., Tutsbuch, Y., Terazawa, K., Nagao, M., Akabane, H. and Mikami, H. (1990). Lewistyping of human saliva stains by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using monoclonal anti-Le(a) and anti-Le(b) antibodies. *J Forensic Sci.* 47, 261–268.

50) 玉木敬二, 勝又義直 (2008) *NEW法医学・医事法*, 東京, 南江堂, 177-203

51) Tanaka, S., Watanabe, S., Furuya, K., Nomura, T., Kaizaki, A., Ito, K., Fujii, M., Hori, K., Actor, N., Aoki, K., Numazawa, S., Toriizuka, K., Arakawa, H., Ida, Y. and Yoshida, T. (2008) Preparation of methylenedioxyamphetamine antibody and its reactivity to the related compounds. *Jpn J Forensic Sci Tech.* 13, 125–32.

52) Vendan, R. T., Yu, Y. J., Lee, S. H. and Rhee, Y. H. (2010). Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. *J Microbiol.* 48, 559-565.

53) Watabiki, T., Akane, A., Okii, Y., Yoshimura, S., Tokiyasu, T. and Yoshida, M. (2003). ABO and Rh phenotyping by absorption–elution technique using cerebral dura mater. *Leg Med.* 1, 187–190.

54) Watanabe, K., Doi, Y., Shigeta, Y., Suzuki, S. and Katsu, T. (2001). Increased sensitivity for detecting ABO Blood group substances by an Indirect ELISA: basic study and application to forensic samples. *Jpn J Sci Technol Ident.* 6, 11–20.

55) Watanabe, K., Doi, Y., Shigeta, Y., Suzuki, S. and Katsu, T. (2002). Highly sensitive method for determination of ABO blood groups using absorption–elution test combined with ELISA and its automation. *Jpn J Sci Technol Ident.* 7, 61–69.

56) Watanabe, K., Ikegaya, H., Hirayama, K., Motani, H., Iwase, H., Kaneko, H., Fukushima, H., Akutsu, T. and Sakurada, K. (2010). A novel method for ABO genotyping using a DNA chip. *J Forensic Sci.* 56, 183-187.

57) 山内春夫, 高塚尚和, 舟山一寿, 蛭間有紀子 (2014) *法医学と個人識別-大規模災害*

における経験を生かして. 新潟医師会報. 4, 2-7

58) Yang, J., Wang, H., Jiang, Y., Sun, Y., Pan, K., Lei, H., Shen, Y., Xiao, Z. and Xu, Z. (2008) Development of an enzyme-linked immuno-Sorbent assay (ELISA) method for carbofuran residues. *Molecules*. 13, 871–81.

59) Yodoya, J. and Igarashi, K. (2003). Application of the modified mixed cell agglutination reaction to ABO blood grouping of various forensic biological samples. *Jpn J Sci Technol Ident.* 8, 21–29.

60) Yoshida, K., Mizuno, N., Fujii, K., Senju, H., Sekiguchi, K., Kasai, K., Sato, H. (2003). Japanese population database for nine STR loci of the AmpFISTR Profiler kit. *Forensic Sci Int.* 132, 162-167.

61) Yoshida, K., Takahashi, K., Kasai, K. (2005). Allele frequencies of 15 loci using AmpFISTR Identifiler Kit in Japanese. *J Forensic Sci.* 50, 718-719.

62) Yoshiuchi, Y., Tomii, S., Tsutsubuchi, Y. and Nanjo, K. (1980). Determination of ABO blood groups from contaminating blood stain by extraction with a solvent of chloroform–methanol. *Ann Rep Nat Res Inst Police Sci.* 33, 17–20.

63) Yuasa, I., Inoue, T. and Yamasaki, K. (1977). On ABO Bloodgroups of human Blood and muscle putrefied. *Ann Rep Nat Res Inst Police Sci.* 30, 28-32.

64) Zhang, J., Liu, J., Meng, L., Ma, Z., Tang, X., Cao, Y. and Sun, L. (2012). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat roots by wheat germ agglutinin labeled with fluorescein isothiocyanate. *J Microbiol.* 50, 191-198.