

|             |   |
|-------------|---|
| 氏 名 (本国籍)   | 高田 直樹 (岐阜県)   |
| 学 位 の 種 類   | 博士 (農学)   |
| 学 位 記 番 号   | 農博甲第642号  |
| 学位授与年月日     | 平成27年3月13日  |
| 学位授与の要件     | 学位規則第3条第1項該当  |
| 研究科及び専攻     | 連合農学研究科<br>生物資源科学専攻   |
| 研究指導を受けた大学  | 岐阜大学  |
| 学 位 論 文 題 目 | 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  |
| 審 査 委 員 会   | 主査 岐阜大学 教授 石 田 秀 治<br>副査 岐阜大学 教授 高見澤 一 裕<br>副査 静岡大学 教授 河 合 真 吾<br>副査 岐阜大学 准教授 中 村 浩 平 |

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

ABO 式血液型は、最も有名なヒトの遺伝形質の1つとして知られ、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。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。一部の微生物によって、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が知られており、これらは、微生物の有するグルコシダーゼによるものと考えられている。しかし、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。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、本研究では、特に土壌細菌由来のグルコシダーゼによる 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。

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 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (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。

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。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、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。そのため、血液試料については、界面活性剤や有機溶媒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。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、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、競合ELISA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、固相化抗原と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。固相化抗原は市販のABO式血液型抗原プローブを用いた。これらはアクリルアミドポリマーにA、B抗原の主要3糖構造がスパ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。また、試料の前処理には、プロテアーゼKを用いてタンパク分解を行い、血液試料に存在するヘモグロビンを低分子化することで、血液試料を含めほぼ全ての体液からABO式血液型抗原の検出が可能となった。また、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った。

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 菌株を単離した。これら 380 菌株を培養後、パラニトロフェニルグリコシド基質を利用してグリコシダーゼ ( $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ及び $\alpha$ -フコシダーゼ) 活性を調査したところ、13 菌株が $\alpha$ -ガラクトシダーゼ性を示したが、 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ及び $\alpha$ -フコシダーゼ活性を示す株は存在しなかった。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を示した 13 菌株について ABO 式血液型抗原 (唾液) と反応させ、今回新たに開発した間接競合 ELISA 法を用いた B 型抗原分解活性測定を行ったところ、13 菌株中 7 菌株が B 型抗原分解活性を示し、B 型抗原の分解が可能であった。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を示した 13 菌株について、16S rRNA 遺伝子解析を行ない、得られた配列の相同性解析を行なったところ、いずれも *Bacillus* 属に属する細菌で、植物の根圏や植物体に存在することが明らかとなった。

以上のことから、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、B 型を判定する際には、*Bacillus* 属細菌による $\alpha$ -ガラクトシダーゼ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する必要があることが判明した。

## 審査結果の要旨

本研究は、ABO 式血液型判定での誤判定原因の探索と新たな判定方法の開発に関する内容である。

東日本大震災のような大規模災害時では、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。ABO 式血液型による個人識別での誤った判定の原因を特定することが急務である。

申請者は、土壌細菌由来のグルコシダーゼによる 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した。

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Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (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。それは、間接競合ELISAである。

固相化抗原として市販のABO式血液型抗原プローブを用いた。これはアクリルアミドポリマーにA、B抗原の主要3糖構造がスパ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。また、試料の前処理にはプロテアーゼKを用いてタンパク分解を行い、血液試料に存在するヘモグロビンを低分子化すること、血液試料を含め、ほぼ全ての体液からABO式血液型抗原の検出が可能となった。そして、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った。

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 菌株を単離した。これら 380 菌株を培養後、パラニトロフェニルグリコシド基質を利用してグリコシダーゼ ( $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ及び $\alpha$ -フコシダーゼ) 活性を調査したところ、13 菌株が $\alpha$ -ガラクトシダーゼ性を示したが、 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ及び $\alpha$ -フコシダーゼ活性を示す株は存在しなかった。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を示した 13 菌株について、ABO 式血液型抗原（唾液）と反応させ、今回新たに開発した間接競合 ELISA 法を用いた B 型抗原分解活性測定を行ったところ、13 菌株中 7 菌株が B 型抗原分解活性を示し、B 型抗原の分解が可能であった。これら 13 菌株について、16S rRNA 遺伝子解析を行ない、得られた配列の相同性解析を行なったところ、いずれも *Bacillus* 属に属する細菌で、植物の根圏や植物体に存在することが明らかとなった。

これらのことから、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、B 型を判定する際には、*Bacillus* 属細菌による $\alpha$ -ガラクトシダーゼ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する必要があることが判明した。

本研究は、ABO 式血液型判定の精度向上に寄与するとともに、微生物生態学的見地からも新たな知見を提供したものである。

以上について、慎重に審議し、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研

究科の学位論文として十分価値があるものとして認めた。

なお、学位論文の基礎となる学術論文は以下のとおりである。

1. Naoki Takada, Chikahiro Mori, Mizuho Iida, Rie Takai, Tomohiro Takayama, Yoshihisa Watanabe, Kohei Nakamura, and Kazuhiro Takamizawa : Development of an indirect competitive ELISA for the detection of ABO blood group antigens, *Legal Medicine*, 16, 3, 139-145, 2014.
2. Naoki Takada, Chikahiro Mori, Rie Takai, Tomohiro Takayama, Yoshihisa Watanabe, Kohei Nakamura, and Kazuhiro Takamizawa: Involvement of soil bacteria in ABO blood mistyping, *Legal Medicine* (in press)