

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：26301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659800

研究課題名(和文)災害時にも使用可能な血液型検査法の確立

研究課題名(英文)Development of ABO and Lewis typing in disaster

研究代表者

佐川 輝高 (Sagawa, Terutaka)

愛媛県立医療技術大学・保健科学部・助教

研究者番号：90162320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：従来のABO式血液型関連抗原検査は注射器による採血を伴い、判定には熟練を要していた。災害等衛生状態の悪い中で行う血液型検査では唾液または指先採血程度の血液量で電気を使わず、誰でも簡単確実に判定が出来る方法が望まれる。本研究はこの方法の確立をめざした。また、一方で、唾液中におけるABO式血液型関連抗原の量(分泌型か非分泌型か)は消化器系感染症や齲歯への罹患しやすさを予測する指標となることがしだいに分かってきている。3連動大地震による衛生状態の悪い中での避難生活の長期化により、引き起こされるであろう消化器系感染症や齲歯へのリスクを予想出来ると感染症の蔓延や個人の健康に維持に大いに役立てる事ができる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop ABO blood group typing method which is useful after a disaster where we usually have no electric power, no clean areas nor human resources. Such as a giant earthquake and giant tsunami. For ABO blood group typing, we need electrical power, the clean area for collecting venous blood and substantial experience of technologists. We have little electrical power, clean areas and human resources after a disaster, such as like a giant earthquake or a giant tsunami. In this case, there is a need of the method that does not require electrical power, the clean area nor substantial experience.

The sej/sej homozygotes have an low levels of elevated ABH antigen. No activity alleles are very rare in Japanese. It was proved that the ELISA method reported here was useful for most Japanese ABO and Lewis blood group typing, and did not require electrical power and much experience. Further studies are necessary for complete nonsecretors, Rh typing and ABO reverse typing.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：ABO式血液型 ELISA 唾液

## 1. 研究開始当初の背景

従来の ABO 式血液型関連抗原検査は注射器による採血を伴い、判定には熟練を要していた。災害等衛生状態の悪い中で行う血液型検査では唾液または指先採血程度の血液量で電気を使わず、誰でも簡単確実に判定が出来る方法が望まれる。

これまで輸血検査は凝集に頼って行われてきた。凝集の判定は極めて難しく、少なからずエラーの引き金となっていた。特に、3 連動大震災を代表とする巨大災害時などでは、このような特殊技術を要する検査に十分に対応できる人材を大量に集めることは極めて困難となる。すなわち、より簡単で正確な判定が可能な検査方法が必要となる。一方、通常診療に置いても、ABO 式血液型抗体の内、極めて重要な意味を持つ IgG 型抗体の存在を確認することは極めて難しい。災害時ともなおさらである。

このような簡単な検査法が確立すれば、昔から大きな謎であった、血液型抗原における糖鎖構造の研究にも大いに役立つと考えられる。

## 2. 研究の目的

これまで輸血検査は凝集に頼って行われてきた。それからくる判定の難しさのため検査人材の不足、検査結果のエラーが少なからず起こってきた。また詳しい検査を行う際には大容量の電気を必要とし災害時にも不向きな方法であった。一方、血液型に関する知識、情報は、経験的なものと遺伝子解析からくるもの、両極端なもので成り立っており、生化学的な解析による情報が欠落しているといつて過言ではなかった。本研究では誰がやっても正確な結果のでる ELISA 法を血液型検査に導入すべく、その基礎として ABO 血液型検査への応用を試みる。また、これらを研究する過程で得られる結果も相まって、先に挙げた問題点を一挙に解決する方向へ進める手助けとする。

### 研究の学術的背景

これまで輸血検査は平板法であれ、遠心法であれ、ゲル法であれ、凝集に頼って行われてきた。

凝集の判定は極めて難しく、検査人材の不足、検査結果のエラーが少なからず起こってきた。更に、治療等に大きな情報となる IgG 型抗体の存在をこれらで確認することは極めて難しい。また、これらの方法は十分な電気や器具が必要となり災害時には不向きな方法である。

一方、血液型末端の糖鎖の違いは昔からわかっているが、実際に抗体と反応するその構造はどのようになっているのかに関しては ABO 型ですらわかっていない状況である。また、抗原の精製もこれまで多くの研究者に試みられてきたが、精製後にその抗原性がみるみる失われていくという問題を抱えている。

研究期間内に何をどこまで明らかにしよ

## うとするのか

本研究では、災害時に電気を必要とすることがなく実施できる、唾液のみを用いた ELISA 法による ABO 血液型判定法(この部分までの基礎的なマニュアルは既に完成している)を確立する。

この方法を確立することは、ABO 型検査だけではなく、その他の不規則抗体等の血液型検査を熟練者のみが行えた検査から、誰がやっても客観的に検査結果が得られる血液型検査法を確立する礎ともなる。

この過程で、カラムやモノクローナル抗体による抗原の精製とその抗原性の維持法の確立、ABO 型抗原分泌型非分泌型とルイス抗原の関係(この関係に関しては教科書通りでは無いという結果を既に得ている) 抗 ABO 抗原 IgG 抗体のサブクラス分布を明らかとしていく。

当該分野における本研究の学術的な特色及び予想される結果と意義

これまでの血液型に関する情報は、経験的なものと遺伝子解析からくるものと両極端に分かれており、生化学的な解析による情報が欠落しているといつて過言ではない。これをより“科学的なもの”へと本研究は導くとともに、災害時における ABO 血液型検査がこれまでとは異なり、誰がやっても、迷うことなく早く正確に、しかも IgG サブクラスまで一挙に同定できる(少なくとも現段階では IgG サブクラスの同定は血液を用いることになるのではないかと考えている)こととなる。

また、血液型物質の構造の生化学的な性質や、日本での ABO 型抗原とその抗体の動態(血液型やそれに対する抗体は人種による特異性が極めて高いが、日本に関するデータはまだあまりない)に関して、本研究が解明の一助となる。

## 3. 研究の方法

### [ELISA 法による ABO 血液型判定法]

唾液中の型物質による抗原の同定  
これは、これまでの血液型検査では、おもて試験にあたる。平成 24 年度は抗原として従来法で同定し血液型の判明している実験協力ボランティアの唾液を精製せずに使用し、また抗体としてはボランティア血清および市販の抗体を用いて、効率の良い検査マニュアルの作製を行う。

### 唾液を用いた抗体判定

これは、これまでの血液型検査では、うらにあたる。平成 24 年度はボランティア血清、市販の抗体、および唾液を抗体として用いて、IgG サブクラスまでを動的出来る効率の良い検査マニュアルの作製を行う。抗原としてボランティアの唾液を精製せずに使用する。

### [モノクローナル抗体による抗原の精製]

マウスに従来法で同定し血液型の判明している実験協力ボランティアの唾液および赤血球を免疫して ABO 抗原に対するモノクローナル抗体を作製する。

### [ゲル濾過による抗原の精製]

HPLC の種々のカラムを用いてボランティア唾液より ABO 型抗原の精製を行う。(既に通常のガラスカラムでの抗原精製法は確立している)

[抗原性の維持]

HPLC により精製した ABO 型抗原に種々のディタージェントや高分子物質を共存させ、長時間の抗原性の維持の方法を確立する。

[ABO 型抗原分泌型非分泌型、血液中の IgG サブクラス ルイス抗原の分布]

上の実験を行う際に収集するボランティアサンプルを用いて、ABO 型抗原分泌型非分泌型、血液中の IgG サブクラス ルイス抗原の分布を従来法および ELISA 法により調査し、データを蓄積する。

#### 4. 研究成果

おもて試験としては唾液を 100 倍に希釈し、マイクロプレート各ウエルに 50 $\mu$ l 添加、30 分後、0.1% Tween 加 PBS で洗浄・ブロッキングを行う。ブロッキング液を廃棄後、0.1% Tween 加 PBS で 100 倍希釈した市販の抗 H、抗 A、抗 B 抗体、必要に応じて抗 Lea、抗 Leb 抗体を 50 $\mu$ l 添加、30 分間反応させ 0.1% Tween 加 PBS で 3 回洗浄、2 次抗体として 250 倍希釈の HRPO 標識抗体を 20 分反応、洗浄後、ABTS 発色基質液を加え 15 分間発色させ目視で判定を行うことができる。裏試験は血液型既知の唾液抗原をコートしてプレートの一次抗体として微量血液を 100 倍希釈したものをを用いて行うことができる。日本人の場合、非分泌型も分泌型に比べると反応は弱いものの判定は可能なので、抗 H 抗体に対する反応の弱いものを非分泌型と判定することができる。

分泌型は 88% で Lea - Leb - 18%、Lea - Leb + 28%、Lea + Leb + 54% であり、非分泌型においては Lea + Leb - 82%、Lea - Leb - 18% であった。

市販の抗 B モノクローナル抗体では反応の認められなかった非分泌型が存在したが、その場合は抗 B ポリクローナル抗体との反応が認められた。しかしながら、抗 B ポリクローナル抗体より抗 B モノクローナル抗体の方が強く反応する個体もあった。

この問題を精査するためにも、複数の抗 A および抗 B モノクローナル抗体の作製を試みたが未だ成功していない。

精製抗原は液体状のまま保存するとその活性が無くなっていくが、精製後にプレート表面に付着させた状態で保存すれば長期間活性を保てることがわかった。また、唾液採取後 4 時間に冷却、希釈後、プレートに付着させておけば、100 $\mu$ l 処理による糖分解酵素変性の過程を省いても、抗原活性は長期に保てることも判明した。

IgG 型の抗 A 或いは抗 B 抗体所有者は 34% (各血液型内、; A 型 24%、B 型 14%、O 型 65%、AB 型 25%) であり、サブクラスは IgG 1 32%、IgG 2 84%、

IgG 3 21%、IgG 4 5% であった。本研究は電気を必要とせず、誰にも判定可能であり、1 時間以内で結果を出せる方法の確立を行った。また、一方で、唾液中における ABO 式血液型関連抗原の量 (分泌型か非分泌型か) は消化器系感染症や齲歯への罹患しやすさを予測する指標となることがしだいに分かってきている。

3 連動大地震による衛生状態の悪い中での避難生活の長期化により、引き起こされるであろう消化器系感染症や齲歯へのリスクを予想出来ると感染症の蔓延や個人の健康に維持に大いに役立てる事ができる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 件)

[学会発表](計 3 件)

1. 佐川輝高 岡田真理子

ELISA を用いた ABH 抗原分泌型・非分泌型判定法の検討

第 59 回日本臨床検査医学会学術集会、2012 年 11 月 29 日 ~ 2012 年 12 月 2 日、京都府

2. Terutaka Sagawa, Mariko Okada

Development of ABO and Lewis typing by enzyme-linked immunosorbent assay in disaster

The 12<sup>th</sup> Asian Society for Clinical Pathology and Laboratory Medicine,

2012 年 11 月 29 日 ~ 2012 年 12 月 1 日、京都府

3. 佐川輝高 岡田真理子

唾液を用いた ELISA による血液型判定における抗体による判定結果の違い

第 60 回日本臨床検査医学会学術集会、2013 年 10 月 31 日 ~ 2013 年 11 月 3 日、神戸市

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐川輝高 ( 5 6 )

愛媛県立医療技術大学 保健科学部 臨

床検査学科

研究者番号：9 0 1 6 2 3 2 0

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：