ヒト赤血球上の A 型抗原局在に関する 免疫電子顕微鏡学的観察

松 倉 寛

(新潟大学医学部法医学教室 同学部第3解剖学教室)

(受付：昭和48年2月9日)

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS ON THE A ANTIGEN SITES OF HUMAN ERYTHROCYTES WITH FERRITIN- ANTIBODY CONJUGATES

by

Yutaka MATSUKURA

(Departments of Legal Medicine and Anatomy, Niigata University School of Medicine)

Using immuno - electron microscopical method, the localization of the A antigen sites on human erythrocytes was demonstrated.

It was shown that the A antigen sites are evenly distributed on a red cell. They are so numerous that no space seems to remain between adjacent antigen sites. In the examination using the diluted conjugates, however, the distribution of ferritin particles on the cells was diffuse and random. This suggests that the individual antigen sites on a cell were not equally capable to bind antibody.

In the experiments on the subgroup or variant, it was noted that A_2 cells have fewer than have A_1 cells and A_x cells have fewer than have A_2 cells, when A_1 cells were compared with A_2 or A_x cells in the degree of the A antigen

sites, and that the attached ferritin particles indicating the A site positions conspicuously varied in number from cell to cell in the same specimen. This indicate that the different serological behaviour of A_1 , A_2 and A_x cells in tests with anti-A reagents are due to both of a quantitative and a qualitative difference.

In the umbilical cord blood, red cells in the same specimen were divided into four populations according to the number of the A antigen sites on the cell. It was perceived that the specimen from umbilical cord consists in the following ratio of red cell numbers in each population; I (possessing A antigen sites of about 5×10^5 or more) 18%, II (possessing 2×10^5 - 4×10^5 sites) 29%, III (possessing the sites of about 10^5) 28%, IV (possessing 0 - 10^4 sites) 25%.

まえがき

著者らは、ヒト赤血球上の血液型抗原基の分布局在についてフェリチン抗体法を用いて観察をつづけている。前報^{1,2)}においてフェリチンラベル抗体が血清学的特異性をもって赤血球の外膜上

に付着することを示し、この手段が抗原基の局在分布を追究するに有効であることを述べた。

さらに赤血球を予かじめグルタルアルデヒドで固定した方がよいこと³⁾、また、抗体結合量は各赤血球によって、差異があることを明らかに

した⁴⁾。

本論文はグルタルアルデヒド固定処理血球を用い、さらに詳細な観察を行ない、A型抗原基の局在について考察した。

実験材料

1) 赤血球

A型の成人および新生児の臍帯より採血し、前報の方法⁴⁾により2.5%グルタルアルデヒド固定液で固定した後、5%生理食塩水浮遊液とした。A₂, A₂Bの亜型*およびA₂h⁵⁾, Ax⁶⁾のVariant*の血球も同様に処理し、対照としてO型およびB型血球を用いた。

2) フェリチン結合抗A抗体液

高力価のウサギ免疫抗A血清を用いSri Ramら(1962,

血球のみを残す。そこへ、フェリチン結合抗A抗体液を10滴加え前報の方法⁴⁾に従って一連の処理をしてエボン包埋試料を得た。これらの樹脂包埋試料から厚さ600Åの超薄切片を作製し、ウラン・鉛二重染色を施した後、観察した。

2) 赤血球1コ当りの抗原基数の算定法

前報¹⁾の計算式に従って算出した。ただし赤血球1コの表面積を $145\mu\text{m}^2$ ⁸⁾とした。

実験結果

1) 赤血球におけるフェリチン結合抗体粒子の付着分布状態

凝集素価×4096のフェリチン結合抗A抗体液を原液とし、4, 8, 16, 32, 64倍の希釈液のそれ

Table 1. Distribution of ferritin particles bound to red cells using diluted ferritin-antibody conjugates

Dilution of the conjugated solution	Cell populations according to number of ferritin particles bound to each red cells**				Number of ferritin particles on a red cell		
	I	II	III	IV***	minimum	maximum	mean
original*	% 68.4	% 30.0	% 1.6	% 0	121×10^4	20×10^4	70×10^4
× 4	55.1	40.8	3.4	0.7	115	0	54
× 8	37.4	59.1	2.7	0.8	82	0	41
× 16	8.7	85.0	5.3	1.0	57	0	34
× 32	1.8	63.0	30.0	5.2	55	0	24
× 64	0	24.0	56.0	20.0	37	0	7

* Agglutination titer of original solution was 1 : 4096

** Red blood cells of an A type adult were used this examination

*** Population I Possessing number of ferritin particles of about $10^5 \times 5$ or more
II about $10^5 \times 2-10^5 \times 4$
III about 10^5
IV about $0-10^4$

1963)⁷⁾の変法¹⁾により結合抗体液をつくった。

実験の全試料に、同一のフェリチン結合抗A抗体液を使用した。

実験方法

1) 電顕観察試料の作製

各赤血球浮遊液を4滴試験管にとり遠沈し上清を捨て

それについての試料を比較観察した。

原液の試料では赤血球膜上に密集して付着し、ほぼ全周をすきまなく覆っている(写真1)フェリチン粒子が1コ、1コ付着している部と、数コが塊になって付着している部とが混在してみられた。

抗体液の希釈度にはほぼ比例してフェリチン粒子の付着数は減少し、付着分布は、不均等で、疎であった(写真2), (表1)。

希釈度の大きい試料ほど同一試料中の赤血球個

* 亜型および Variant の血液は 本学付属病院輸血部小島健一講師より恵与されたものであり、また臍帯血は同病院産科において採血されたものである。

Fig. 1. Erythrocytes in the specimen of the group A₁ adult exposed to ferritin conjugated anti-A antibodies. × 31000

Fig. 2. A_1 cells, from an adult, treated with a diluted solution (64 times) of the same conjugated solution as used for the cells on Fig. 1. $\times 33000$

Fig. 3. An A_2 cell treated as in Fig. 1. $\times 33000$

Fig. 4. Ax cells treated with the same solution as used for the cells on Fig. 1. or Fig. 3. $\times 35000$

Fig. 5. A_1 cells, from a umbilical cord, similarly exposed to the same conjugated solution as used for the A_1 cells from adult.

× 30000

個におけるフェリチン粒子の付着数の差が顕著であった。

2) 赤血球1コ当りのA型抗原基数

成人のA₁型: 121-20万, A₁B型: 97-24万, A₂型: 19万-0, A₂B型: 20万-0, A₂h型: 7万-0, Ax, Ax B型: 2000-0, 臍帯血のA₁型: 73万-0, A₁B型: 73万-0と算出された。

成人血ではA₁B型, A₁型とも, ほぼ同じ値を示した。A₂型はA₁型の約 $\frac{1}{6}$ に相当する値を示しフェリチン粒子の付着数は少なかった(写真3)。また同一血液中の各赤血球個々におけるフェリチン

Table 2. Classification of cord blood cells according to number of their possessing A antigen sites

Type	Number of observed red blood cells	Cell Populations*			
		I	II	III	IV
Cord blood A ₁	882	17.9%	29.3%	28.1%	24.7%
	1000	18.5	29.0	27.8	24.7
	1004	18.0	29.1	28.0	24.9
	994	18.0	29.2	28.7	24.1
A ₁ B	1002	19.0	28.6	27.3	25.1
	880	17.8	29.1	28.5	24.6
	1000	17.9	29.3	27.8	25.0
Mean		18.2	29.1	28.0	24.7
Adult A ₁	585	68.4	30.0	1.6	0
A ₂	600	0	0	33.0	67.0
Ax	1000	0	0	0	100

* The Populations were divided similarly as in classification of Table 1.

ン粒子の付着数には著しい差がみられ, 殆ど付着していない血球もあった(表2)。

Ax型では殆どの血球にフェリチン粒子の付着がみられなかった(写真4)

臍帯血ではA₁型もA₁B型もフェリチン粒子の付着数すなわち抗原基数が殆ど同値であった。臍帯血の各々に共通して, 同一血液中の個々の赤血球におけるフェリチン粒子の付着数に差があり, 殆ど付着していないものと非常に多数付着しているものとが隣接してみられた(写真5)。その

比率を求めるため各臍帯血のそれぞれの赤血球約1,000コを, 電顕下に直接拡大倍率15,000倍で観察し表2のような結果を得た。すなわち多数500,000前後)のフェリチン粒子が付着しているものをI群とし, 中等度のもの(約300,000)をII群, 少ないもの(約100,000)をIII群, 非常に少ないもの(数万より0まで)をIV群として, 4群に区分したところ, I群18%, II群29%, III群28%, IV群25%であった。

考察

現在, 血液型抗原基は, 赤血球上に一定間隔で均一な分布状態で存在すると考えられている(Lee & Feldman 1964⁹⁾, Davis *et al.* 1968¹⁰⁾).

著者らの観察では, 高力価の抗体液の試料において, 赤血球にフェリチン結合抗体粒子が殆どすきまなく付着し, しかも前報¹⁾でも指摘した如く同一赤血球においてフェリチン粒子が数コ集って塊になって付着している部と, 塊にならずに1コ1コ付着している部の両方がみられた(写真1)。低力価抗体液および亜型の試料では, フェリチン粒子の付着は不均一な分布を示した(写真2, 3)これらのことはA型赤血球にはA型抗原基が全面に密集して存在しているが, それらの抗原基は, 抗体との結合力において均等でなく, 強弱があることを推測させる。

臍帯血や亜型の赤血球ではそれらの個々の赤血球で和合力に違いがあることが知られていた(Thomsen *et al.* 1930¹¹⁾, Greenbury *et al.* 1963¹²⁾), が本実験ではそれを抗体結合数の差異として明瞭にとらえることができた(写真5)。

赤血球1コ当りのA型抗原基数については従来 Boyd *et al.* (1962)¹³⁾, Economidou *et al.* (1967)¹⁴⁾, 小暮(1970)¹⁵⁾が報告しているが, それらの値は多数の赤血球の総体として得られた値を血球数で割った平均値であるが本実験の値は各赤血球1コ, 1コが有する抗原基数として1コごとに算出された点の特長である。これらの値を基にした赤血球1コのA型抗原基数の平均値は飯田, 関(1954)¹⁶⁾, Economidou *et al.* (1967)¹⁴⁾の値とほぼ一致しており, 臍帯血の値は成人血の約 $\frac{1}{2}$ の

値であった。A₂型については Lee & Feldman⁹⁾によれば A₁型と抗体付着数が同等であり、A₁とA₂の差異は量的な差ではなく質的な差であると論じているが、本実験では量的な差も質的な差もみられた。すなわち A₂型赤血球では同一血液中の赤血球でもそのおのおので抗体結合数が大きく異なる。また、A₁型に比し抗体結合数は約 $\frac{1}{6}$ であった。Ax型血球については佐治ら(1965)¹⁷⁾の蛍光抗体法による実験成績と一致し抗原基が非常に少ないことが明らかになった。

臍帯血においても個々の赤血球で抗体結合力に差が存在するのではないかとこの事は蛍光抗体法を用いて Fischer & Stege (1967, 1969)¹⁸⁾ Hosol (1968)¹⁹⁾によって推測されていたがこの実験でも、その事実を明確にすると共に抗原基の少ない血球と多い血球、その中間の血球が正規分布状態で存在している事を明らかにした(表2)。ABO式血液型不適合妊娠による免疫抗体を新生児の赤血球上に直接クームステストによって証明し難いがRh抗体は証明できるという現象がある。その現象をABO式血液型とRh式血液型の両者の赤血球上の抗原量の差として説明しようとする時、新生児血液中における抗原基の多い赤血球の存在比率が重要になる。成人血においては、1コの赤血球上にA型抗原はRh₀(D)抗原の約100倍量存在する(Masouredis 1960²⁰⁾, Lee & Feldman 1964⁹⁾, Rochna & Hughes-Jones 1965²¹⁾, Davis *et al.* 1968¹⁰⁾が新生児の血球ではRh₀(D)抗原が、成人血球の5倍量存在している(Furuhata *et al.* 1949²²⁾)などから、新生児の赤血球1コが有するA型抗原はRh₀(D)抗原の10倍より多いと考えられる。またRh₀(D)抗原は新生児の血球であっても個々の赤血球に抗体結合力の差が認められないとされている(Fischer 1969¹⁸⁾)。これらの事を総合すると、クームステスト反応が陽性になる為にはABO式免疫抗体の場合にはRh式免疫抗体の10倍量以上の抗体が1コの赤血球上に結合しなければならないことが推測される。そこで仮りに、50万前後のA型抗原を有する抗体結合力の強い赤血球がクームステスト反応に有効な役割

を果たすとすれば、新生児の血液中の全体の約20%の血球のみが役割を果たし、抗体結合数の少ない残りの約80%の血球が効力を発揮しないこと、また抗体を多数結合したその20%の赤血球が白血球による貪食(松倉, 他 1969²⁾)や、白血球結合(Lo Buglio *et al.* 1967²³⁾, Abramson *et al.* 1970²⁴⁾ Matsukura 1969²⁵⁾)によって、消失、減少すればますます直接クームステストは陽性になりにくくなることより、免疫抗A抗体の存在を新生児の赤血球上に直接クームステストで証明し難い理由の1つの説明となるのではないかと考える。

結論

ヒトの赤血球に存在する血液型抗原、特にA型抗原の局在状態をフェリチンラベル抗A抗体液を用いて免疫電子顕微鏡学的に追究した。

A型抗原基は、A型赤血球上に殆どすまなく無数に存在しているが、それぞれの抗原基の抗体結合力に差異があるのではないかと考える。

A₂型の赤血球では多数の抗原基をもっているものと、非常に少数の抗原基しかもたないものとが同一血液中に混在している事、またA型のVariantであるAx型の赤血球には殆どA型抗原が存在していないことを明確にし、亜型、変異型が量的にも質的にも正常型と異なることを示した。

臍帯血中の赤血球を、それらがもっているA型抗原基数によって4群に大別し、それぞれの比率をしらべると、I群(約50万以上)18%、II群(約30万)29%、III群(約10万)28%、IV群(0より数万)25%であった。

ご指導、ご校閲を賜った新潟大学医学部法医学教室の茂野録良教授、第3解剖学教室藤田恒夫教授、福岡大学医学部解剖学教室三好万佐行教授に深謝するとともに、この研究を理解し、終始励まし、ご援助いただいた新潟大学医学部付属病院輸血部の小島健一講師に厚くお礼申し上げます。

文献

- 1) 松倉 寛, 富田哲夫, 茂野録良: ヒト赤血球膜上のABO式血液型抗原基に関する免疫電子顕微鏡学的観察 第1報, 新潟医会誌, 83: 234-244, 1969.
- 2) 松倉 寛, その他: ヒト赤血球膜上のABO

- 式血液型抗原基に関する免疫電子顕微鏡学的観察 第2報, 新潟医学会誌, **83**: 245-253, 1969.
- 3) 松倉 寛: グルタルアルデヒド固定処理血球についての血液型抗原の作用 (第1報), 第56次日本法医学会総会発表, 1972.
 - 4) Matsukura, Y.: Demonstration of ferritin labelled antibodies bound on human erythrocytes fixed with glutaraldehyde. *Vox Sang.*, **22**: 549-553, 1972.
 - 5) 松倉 寛, その他: A₂h型を示す1家系について, 第56次日本法医学会総会発表, 1972.
 - 6) 小島健一, その他: A_x型の1家系について, 第20回日本輸血学会総会発表, 1972.
 - 7) Sri Ram, J. *et al.*: Preparation of antibody-ferritin conjugates for immuno electron microscopy, *J. Cell Biol.*, **17**: 673-675, 1963.
 - 8) Westerman, M.P., Pierce, L.E. & Jencen, W.N.: A direct method for the quantitative measurement of red cell dimensions, *J. Lab. & clin. Med.*, **57**: 819-824, 1961.
 - 9) Lee, R.E. & Feldman, J.D.: Visualization of antigenic sites of human erythrocytes with ferritin-antibody conjugates. *J. Cell Biol.*, **23**: 396-401, 1964.
 - 10) Davis, W.C. *et al.*: Ferritin-antibody localization of antigenic sites in immunohemolytic anemias, *J. Immunology*, **101**: 621-627, 1968.
 - 11) Thomsen, O., Friedenreich, V. & Worsaae, E.: Die wahrscheinliche Existenz eines neuen mit den drei bekannten Blutgruppengenen (O.A.B.) allelomorphen A' benannten Gens mit den daraus folgenden zwei neuen Blutgruppen: A' und A'B. *Kin. Wschr.*, **9**: 67-69, 1930.
 - 12) Greenbury, C.L., Moore, D.H. & Nunn, L.A.C.: Reaction of 7S and 19S components of immune rabbit antisera with human blood group A and B red cells, *Immunology*, **6**: 421-433, 1963.
 - 13) Boyd, W.C. *et al.*: Quantitative study of the Combination of lima bean lectin with human erythrocyte, *J. Immunol.*, **89**: 463-470, 1962.
 - 14) Economidou, J., Hughes-Jones, N.C. & Gardner, B.: Quantitative measurements concerning A and B antigen sites, *Vox Sang.*, **12**: 321-328, 1967.
 - 15) 小暮正久: A分解酵素によるA₁およびA₂型血球のA型抗原決定群の研究, 日輸血会誌, **17**: 75-81, 1970.
 - 16) 飯田武男, 関 俊之: 血液型物質の個体発生学的研究, 日本医事新報, **1583**: 3592-3601, 1954.
 - 17) 佐治博夫, 細井武光, 松本繁之助: 蛍光抗体法による血液型重型に関する研究, 日輸血会誌, **15**: 162-163, 1968.
 - 18) Fischer, K.: The pathogenesis of hemolytic diseases of the ABO-system of the newborn, Bayer-Symposium I. Current problems in Immunology (Ed. Westphal *et al.*) 183-193, Springer-Verlag, Berlin, 1969.
 - 19) Hosoi, T.: Fluorescent antibody technique utilized for studies on cellular distribution of erythrocytic antigens, *Acta Haem. Jap.*, **31**: 138-150, 1968.
 - 20) Masouredis, S.P.: Relationship between Rh₀ (D) genotype and quantity of I¹³¹ anti-Rh₀ (D) bound to red cells. *J. clin. Invest.*, **39**: 1450-1462, 1960.
 - 21) Rochna, E. & Hughes-Jones, N.C.: The use of purified ¹²⁵I-labelled anti-γ globulin in the determination of the number of D antigen sites on red cells of different phenotypes, *Vox Sang.*, **10**: 675-686, 1965.
 - 22) Furuhashi, T. & Ino, S.: On the ontogenic development of blood group substances in fetuses and new born children, *Proc. Jap. Acad.*, **25**: 226-228, 1949.
 - 23) Lo Buglio, A.F., Cotran, R.S. & Jandl, J.H.: Red cells coated with immunoglobulin G.: Binding and Sphering by mononuclear cells in man. *Science*, **158**: 1582-1585, 1967.
 - 24) Abramson, N. *et al.*: The interaction between human monocytes and red cells, binding characteristics, *J. exp. Med.*, **132**: 1191-1206, 1970.
 - 25) Matsukura, Y.: Occurrence of electron dense Plaques in the contact sites between neutrophile leukocytes and erythrocytes coated with anti-A. An electron microscope study, *Arch. histol. Jap.*, **31**: 1-8, 1969.