原 著

ABC法を用いた各種血球表面のA型物質の検索

足立 昌司¹⁾²⁾ 寮 隆吉¹⁾²⁾ 吉田 明憲¹⁾²⁾ 椋本 芳樹¹⁾
山口 延男²⁾ 堂脇 義雄³⁾

1) 神戸大学病院輸血部

2) 神戸大学医学部臨床検査医学

3) 兵庫県赤十字血液センター

(昭和61年7月30日受付)

DETECTION OF BLOOD GROUP A ANTIGEN ON HUMAN BLOOD CELLS USING THE AVIDIN-BIOTIN PEROXIDASE COMPLEX (ABC) METHOD

Masashi Adachi^{***}, Ryukichi Ryo^{***}, Akinori Yoshida^{***}, Yoshiki Mukumoto^{*},
Nobuo Yamaguchi^{**} and Yoshio Douwaki^{***}

^{*}Blood Transfusion Service, Kobe University Hospital

^{**}Department of Laboratory Medicine, Kobe University School of Medicine

^{***}Hyogo Red Cross Blood Center

The blood group A antigen has been reported to exist on all blood cells's surface. However, the recent studies using the new immunological methods concluded that the A antigen could not be detected on neutrophils and monocytes.

Then we examined the presence of the A antigen on granulocytes, lymphocytes, monocytes, platelets and megakaryocytes using the mouse anti-A monoclonal antibody and the avidin-biotin peroxidase complex (ABC) method.

By this method the A antigen could not be detected on neutrophils, eosinophils, basophils and monocytes.

The A antigen was weakly detected on lymphocytes from the group A secretor [Le(a-b+)], but not on lymphocytes from the non-secretor [Le(a+b-)]. The result indicated the A antigen (type 1H chain) on lymphocytes might be derived from the plasma. In contrast, the A antigen was strongly expressed on platelets, regardless of the A secretor status (type 1H chain, type 2H chain). Nevertheless, megakaryocytes which were the precursor cells of platelets, had no expression of the A antigens on the surfaces. We must consider when and how the A antigen on the surfaces of platelets come into existence.

序 言

従来、血液型物質は赤血球、顆粒球、リンパ球、単球、および、血小板に存在すると考えられていた¹⁾。しかし、血球表面の血液型物質の検索は直接²⁾³⁾あるいは間接^{4)~6)}凝集反応、吸収解離反応^{4)7)~11)}、等によって行われていたので、分離した血球に他の血球成分、とくに赤血球の混入で誤った結論に導かれる可能性があった。近年、抗原検出のための鋭敏な方法であるフローサイトメト

リー、ラジオイムノアッセイ、高感度の免疫組織化学的手法が開発され、血液型物質が顆粒球や単球に存在しないことが明らかにされて、各種血球表面の血液型物質の存在についての再検討がせまられている^{12)~15)}。そこで、各種血球表面の血液型物質の有無を抗原検出のために免疫学的手法として Hsu ら¹⁶⁾により開発され、近年、その鋭敏な感度と個々の細胞を検討できることで注目されている avidin-biotin peroxidase complex 法 (以下

ABC法)を用いて検討した。また、抗原検出にはマウスミエローマ細胞を用いて作製され、抗原と強い親和性を有するモノクローナル抗体を用いて、血液型物質の局在の検索に際して誤判定のないように工夫した。

材料および方法

抗体：抗Aモノクローナル抗体(DAKO, Santa Barbara, Calif.)は、抗原として合成型物質である synthetic trisaccharide α D N acetyl galactosamine (1-3) (α L Fuc (1-2)) β D Gal (図1)を使用して作製されたマウスモノクローナル抗体で、IgMタイプに属していた。この抗体の力価は食塩水法で1,024倍であった。抗体の希釈は、PBSで行い、適時濃度を変えて用いた。

標本の作製：血球は、A型の正常ドナーより得られた末梢血と骨髓穿刺液の塗抹標本を用いた。また、一部、ヘパリン加採血したあと赤血球および血小板は比重遠心法で分離し、リンパ球、単球、ならびに顆粒球はMono-poly Resolving Medium (M-PRM) (Dainihon Pharmaceutical Co., Osaka)を用いて分画し、PBSにて2回洗浄後、Shandon Cytospin 2 (Shandon Ltd., England)で塗抹標本を作製した。

ABC法：塗抹標本の固定はエタノール、アセトン、ホルマリンアセトン、グルタルアルデヒドで行い、内因性ペルオキシダーゼは0.3% H_2O_2 加PBS中にて30分間浸漬して阻害した。染色法は、

図1 抗A抗体の合成抗原

抗マウスIgM用のABCキット(Vector Labs., Burlingame, Calif)を用いて、主として森ら¹⁷⁾の方法に従い染色した。バックグランド値が上昇しないように各ステップで十分にPBSで洗浄するように留意した。発色は0.3% H_2O_2 加 diaminobenzidin (DAB) (WAKO Pharmaceutical Co., Osaka)を用いて行ったのち、水洗後、ギムザ液で核染色、顕微鏡でその反応の有無を検討した。

結 果

ABC法が血球表面のA型物質を検出するのにどの程度鋭敏であるかを検討するために、抗A抗体を128倍から1,024倍まで希釈して赤血球表面上のA型物質の有無を検討してみると抗体の濃度に応じたA型物質の存在を示す強さの染色(褐色)を示した。この抗体の力価を食塩水法で検討するとABC法と同様に1,024倍で赤血球を凝集させるので、今回用いたABC法は極めて感度よくA型物質を検出できると考えられた。固定法は、エタノール、アセトンおよびグルタルアルデヒドで良く染まり、ホルマリンアセトンでは染色性の低下を認めた。血小板表面も同様に1,024倍の抗体でコントロールに比較してA型物質の存在を示す染色を呈した。リンパ球表面のA型物質の有無は、抗体128倍を用いて観察した。A型分泌型の人[Le(a-b+)]ではリンパ球表面に図2に示したごとく僅かに陽性所見が認められA型物質の存在が示唆されたが、非分泌型の人[Le(a+b-)]ではリンパ球表面にはまったくA型物質を認めなかった。また、分泌型、非分泌型に拘らず、好中球には抗体128倍で検索してもA型物質を認めず(図3)、単球にも(図4)、好塩基球にも(図4)A型物質は証明されなかった。好酸球は図5に示したごとく顆粒が特異的に褐色に染まり、今回用いた方法でA型物質の同定は困難であった。しかし、赤血球、血小板、リンパ球のA型物質が血球表面に存在して血球全体が抗原の存在を示す褐色に染色されたが、好酸球では顆粒に一致して褐色を呈したにも拘らず血球表面は染色されなかったのでA型物質は存在しないと判定した。なお、ほ乳類には存在しないグルコースオキシダーゼ反応を利

図2 末梢リンパ球のA型物質

左上：Le(a-b+)の分泌型の人のリンパ球の抗Aモノクローナル抗体を用いたABC染色像，陽性。右上：同，ABC染色後のギムザ後染色像。左下：Le(a+b-)の非分泌型の人のリンパ球の抗Aモノクローナル抗体を用いたABC染色像陰性。赤血球は陽性。右下：同，ABC染色後のギムザ後染色像。

図3 末梢好中球のA型物質

左：抗Aモノクローナル抗体を用いたABC染色像，陰性。右：ABC染色後のギムザ後染色像。

用したABC法でも検討したが，顆粒の非特異的反応は消失しなかった。骨髓塗抹標本の巨核球表面は抗A抗体128倍に全く反応しなかった(図6)。陽性コントロールとして血小板膜糖蛋白IIB/IIIA

に対するモノクローナル抗体(224B)¹⁸⁾で染色すると，図6右下に示したごとく巨核球は褐色を呈し，表面形質の性状をABC法で解析できるので，抗Aモノクローナル抗体で巨核球表面が染色され

図4 単球および好塩基球のA型物質

左上：単球の抗Aモノクローナル抗体を用いたABC染色像，陰性。右上：同，ABC染色後のギムザ後染色像。下：左より好塩基球，リンパ球，赤血球の抗Aモノクローナル抗体を用いたABCおよびギムザ後染色像。好塩基球は陰性。リンパ球，赤血球は陽性。

図5 好酸球のA型物質

左上：抗Aモノクローナル抗体を用いたABC染色像，顆粒が強く陽性を示す。右上：同，ABC染色後のギムザ後染色像。左下：グルコースオキシダーゼ反応を利用したABC染色像。上が好酸球で顆粒は陽性を示す。下は好中球。右下：同，ABC染色後のギムザ後染色像。

ない所見は巨核球にA型物質が存在しないことを示していると考えられた。

考 察

ABC法は avidin と biotin 間の非可逆的で，通常の抗原と抗体間の親和性よりはるかに高い親和

図6 骨髓巨核球のA型物質

左：巨核球の抗Aモノクローナル抗体を用いたABCおよびギムザ後染色像，陰性。右上：同，拡大像，赤血球は陽性。右下：血小板糖蛋白IIb/IIIaモノクローナル抗体を用いたABCおよびギムザ後染色像，陽性。

性を利用した特異性の高い免疫組織学的染色法である¹⁶⁾。この染色法のもう一つの特徴は細胞個々の観察を行えることである。Henkeら¹⁹⁾は同法にて顆粒球表面上のHLA抗原の有無を検索して良い成績を報告している。今回我々はこの特徴を利用して末梢血および骨髓細胞の血液型物質の局在の検討を行った。

従来、血液型物質は赤血球を含む全ての血球に存在すると考えられていた¹⁾。しかし、1980年代に入って、好中球¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾や単球¹⁵⁾に血液型物質が存在しないことが、新しい免疫学的検出法で証明されるようになってきた。我々の成績も好中球や単球に血液型物質が存在しないことを確認し、さらに、好酸球や好塩基球にも同様に血液型物質が無いことを明らかにした。リンパ球に関しては、分泌型の人のリンパ球にはA型物質が認められ、非分泌型の人のリンパ球にはA型物質が認められなかった。これは、Rachkewichら²⁰⁾が報告したようにリンパ球表面の血液型物質は血漿由来であることを示していると考えられた。

また、血小板にもA型物質が存在していることが明らかになった。この血小板の血液型物質はリ

ンパ球と異なり分泌型あるいは非分泌型の何れにおいても存在していたので、血小板表面のA型物質は吸着したものではなく血小板表面で合成されたものと推定された。血小板に存在する型物質の由来については諸家の研究報告がある。Keltonら²¹⁾は赤血球血小板凝集反応でO型の人の血小板がA型の人の血中のA型物質を吸着することを示したが、Dunstanら²²⁾はKeltonらの用いた方法は客観性、再現性に乏しいことを指摘した。そして、彼らは¹²⁵I-標識抗ヒトIgGのbinding assay法を用いて血小板には血漿中から吸着される1H由来の糖脂質と、赤血球膜で合成されるのと同様な内因性に存在している2H由来の糖脂質²³⁾²⁴⁾の両血液型物質が存在することを明らかにし、血小板の型物質は吸着と血小板自身により合成されたものの両者が関与している可能性を示唆した。我々の今回用いた抗Aモノクローナル抗体は、合成型物質を抗原として作製しているので1Hおよび2H両者の由来のA型物質を認識すると考えられるので我々の成績からは血小板のA型物質が吸着したものか、血小板自身が有しているものかの鑑別は困難であった。そこで、我々は血小板表面

に存在する型物質が内因性のものであれば、血小板前駆細胞である巨核球に存在すると想定して巨核球表面のA型物質の有無を検討した。予測に反してA型物質は血小板に存在するにも拘らず、巨核球には全く認められず、今回の我々の成績では血小板表面の型物質がどの時点で表現されて来るのか明らかにすることができなかった。ごく最近、Dunstan ら²⁵⁾は、巨核球前駆細胞である CFU-Meg の血液型物質の検索を行い、コロニー形成した巨核球が不均一に血液型物質を有していることを報告した。しかし、我々は、正常人 AB 型血漿を用いてメチルセルロース法で培養した CFU-Meg の型物質の検索を行なったが A 型物質を確認することはできなかった²⁶⁾。この成績の差は用いた型物質に対する抗体の差に由来するのかもしれない。血小板の型物質の由来とどの時点で発現されてくるかは今後の課題である。

文 献

- 1) 十字猛夫, 遠山 博, 他: 輸血学. 中外医学社, 東京, 1978, 433.
- 2) Wichels, P. and Lampe, W.: Die gruppenspezifische Differenzierung der Leukocyten. *Klin Wochenschr*, 7: 1741-1742, 1928.
- 3) Bakemeier, R.F. and Swisher, S.N.: Mixed agglutination of leukocytes and erythrocytes in relation to studies on leukocyte antigens. *Blood*, 12: 913-925, 1957.
- 4) Gurner, B.W. and Coombs, R.R.A.: Examination of human leucocytes for the ABO, MN, Rh Tj^a, Lutheran and Lewis systems of antigens by means of a mixed erythrocyte-leucocyte agglutination. *Vox Sang.*, 3: 13-22, 1958.
- 5) Ashurst, D.E., Bedford, D. and Coombs, R.R.A.: Examination of human platelets for the ABO, NM, Rh, Tj^a, Lutheran and Lewis systems of antigens by means of mixed erythrocyte-platelet agglutination. *Vox Sang.*, 1: 235, 1956.
- 6) Hellgren, H.M., Svardal, J.M. and Yunis, E.J.: Demonstration of A,B, and Rh antigens on human leukocytes. *Transfusion*, 6: 511, 1966.
- 7) Brittingham, T.E.: Immunologic studies on leukocytes. *Vox Sang.*, 2: 242-248, 1957.
- 8) Anderson, R.E. and Walford, R.L.: Direct demonstration of A,B, and Rho(D) blood group antigens on human leukocytes. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 40: 239-245, 1963.
- 9) Archer, G.T. and Kooptzoff, O.: Blood group antigens in white cells. *Austral. J. Exp. Biol.*, 36: 373-382, 1958.
- 10) Lelezari, P. and Bernard, G.: Improved leukocyte antibody detection with prolonged incubation. *Vox Sang.*, 9: 664-672, 1964.
- 11) 安藤文英: 血小板の A, B 型について. I, II, 日本輸血学会雑誌, 29: 1-18, 1983.
- 12) Dunstan, R.A., Simpson, M.B. and Borowitz, M.: Absence of ABH antigen on neutrophils. *Br. J. Haematol.*, 60: 651-657, 1985.
- 13) Kelton, J.G. and Bebenex, G.: Granulocytes do not have surface ABO antigens. *Transfusion*, 25: 569-569, 1985.
- 14) Gaidulis, L., Branch, D.R. and Lazar, G.S.: The red cell antigens A,B,D,U,Ge, Jk3 and Yt^a are not detected on human granulocytes. *Br. J. Haematol.*, 60: 659-668, 1985.
- 15) Dunstan, R.A.: Status of major red cell blood group antigens on neutrophils, lymphocytes and monocytes. *Br. J. Haematol.*, 62: 301-309, 1986.
- 16) Hus, S.M., Raine, L. and Fanger, H.: The use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 577-580, 1981.
- 17) 森眞由美, 在家裕司, 藤原睦憲, 森 茂郎: 塗抹標本による末梢血リンパ球マーカーの検索 II. ABC 法. *臨床血液*, 26: 717-720, 1985.
- 18) 吉岡 宗, 寮 隆吉: 抗人血小板膜モノクローナル抗体の作製. 投稿中.
- 19) Henke, M., Yonemoto, L.M., Lazar, G.S., Gaidulis, L., Hecht, T., Santos, S. and Blume, K.G.: Visual detection of granulocyte surface antigens using the avidin-biotin complex. *J. Histochem. Cytochem.*, 32: 712-716, 1984.
- 20) Rachkewich, R.A., Crookston, M.C., Tilley, C. A. and Wherrett, J.R.: Evidence that blood group A antigen on lymphocytes is derived from the plasma. *J. Immunogenetics*, 5: 25-29, 1978.
- 21) Kelton, J.G., Hamid, C., Aker, S. and Blajchman, M.A.: The amount of blood group A substance on platelets is proportional to the amount in the plasma. *Blood*, 59: 980-985, 1982.
- 22) Dunstan, R.A.: The origin of ABH antigens on human platelets. *Blood*, 65: 615-619, 1985.
- 23) Watkins, W.M.: Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems. *Adv. Hum. Genet.*, 10, 1980.
- 24) Crookston, M.C.: Blood group antigens acquired from the plasma. *Immunobiology of the*

- Erythrocyte, Sandler SG, Nusbacker J, Schanfield MS(eds). New York, A.R. Liss, 1980, 99—114.
- 25) Dunstan, R.A.: The expression of ABH antigens during in vitro megakaryocyte maturation: Origin of heterogeneity of antigen density. *Br. J. Haemat*, 62: 587—593, 1986.
- 26) 足立昌司, 寮 隆吉: 未発表データ.
-