

ヒト男性生殖器A B H関連抗原発現メカニズムの
組織化学的・分子生物学的解析

課題番号 04670353

平成6年度科学研究費補助金 (一般研究 C)
研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者 西 克治

滋賀医科大学医学部教授



目 次

	ページ
はじめに	1
研究組織	2
研究経費	2
研究発表	
学会誌	3
口頭発表	4
研究成果の概要	
ヒト生殖臓器におけるA B O式血液型関連抗原分布の組織化学的解析	6
脊椎動物におけるA B O式血液型関連抗原の反応性	7
A B O式血液型遺伝子型判定方法の開発	9
パラフィン包埋臓器からのA B O式血液型遺伝子型判定方法の開発	9
味蕾細胞でのA B O式血液型関連抗原糖鎖の存在	10
A型亜型(A 1型A 2型)での臓器・組織での抗原発現様式の検討	11
A B O式血液型糖転移酵素遺伝子の哺乳類での存在	12
生殖器官特に精巣での糖鎖と精子成熟についての検索	13
ネコ生殖器官特に精巣上体での糖鎖と精子成熟についての検索	14
ラット生殖器官特に精巣上体での糖鎖と精子成熟についての検索	15
人種によるA B O式血液型関連抗原発現の相違	15
研究成果のまとめ	16
研究発表	
学会誌発表	
ABH-related antigens in human male genital tract	18
A histochemical examination,	
Species identification from tissue particles using lectin-	24

and immuno-histochemical methods	
D N A 試料を用いての A B O 式血液型判定	2 7
Determination of ABO genotypes with DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues	2 9
D N A 試料を用いての A B O 式血液型判定	3 2
— パラフィン包埋臓器を用いて —	
Lectin- and immuno-histochemistry on mucous substances of the taste buds and lingual glands in some mammals	3 9
Comparative lectin- and immuno-histochemistry on antigen expression in blood group A1 and A2 individuals	4 2
D N A 試料を用いての種差識別	4 5
— A B O 式血液型関連糖転移酵素遺伝子について	
口頭発表	
数種哺乳類における A B H 関連抗原分布 (犬)	5 8
日本猿舌腺の A B H 関連抗原分布	5 9
Lectin- and immuno-histochemistry on mucous substances of the taste buds and lingual glands in some mammals	6 0
Comparative lectin- and immuno-histochemistry on antigen expression in blood group A1 and A2 individuals	6 1
D N A 試料を用いての A B O 式血液型判定	6 2
— パラフィン包埋臓器を用いて —	
数種哺乳動物精細管の組織化学的検索	6 3
D N A 試料を用いての種差識別	6 4
— A B O 式血液型関連糖転移酵素遺伝子について	
ネコ泌尿生殖器における A B H 関連抗原の発現	6 5
ラット精子成熟には A B H 関連抗原と複合糖鎖が関連する	6 6
唾液腺細胞における血液型抗原発現の人種差	6 7

は し が き

精子、精液に関連する研究は生命科学はもとより法医学分野においても重要な研究である。精液、精液斑に含まれる精子の血液型判定は免疫学・血清学の進歩による様々の方法により確実に実施できるようになった。しかしながら、それは、単に射精された後の状態についての検査に過ぎない。射精後の精液、精液斑に存在するA B O式血液型物質の本質に迫るには、男性生殖器官各組織における血液型抗原糖鎖発現様式とその遺伝子支配メカニズムを検討する必要があると考え、男性生殖器官各組織をA B O式関連血液型別に、また人種別に収集し、組織化学的手法とDNA分子生物学的手法を組み合わせ、赤血球でのA B O式血液型関連抗原の表現型と臓器・組織でのA B O式血液型関連抗原物質の発現様式の相違を検討した。一方、脊椎動物の組織の構成成分や分泌物の多くは糖蛋白あるいは糖脂質としての性質を有し、その糖鎖部分に様々の抗原性を発現していることが知られていたが、糖鎖含む物質の生理学的意義に関しては、A B O式血液型関連糖鎖抗原物質を含めて従来ほとんど知られていなかった。最近になりA B O式血液型関連糖鎖抗原物質を含むガングリオシドなどの特定分子類に『細胞分化誘導能』、『細胞間情報伝達能』あるいは『細胞増殖制御作用』という生物活性作用が発見され、また、ヒト組織では癌化にともない、A B O式血液型関連抗原の糖鎖構造が変化することも報告されて来ている。これらのことを踏まえてヒトでの生殖器官と唾液腺等の他の組織との抗原発現の相違、哺乳動物をはじめとする各種脊椎動物におけるA B O式血液型関連抗原発現部位、ヒトと動物でのこれらの抗原発現の相違をも検索し、ラントシュタイナーによる発見以来95年を経て、豊富な情報が集積されているが今だ十分に解明されていないA B O式血液型関連抗原物質の生理学的意義を探るべく研究を行った。

研究に用いられた臓器は、霊長類、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類から得られたもので、生殖器官、唾液腺、舌、胃、腸管、肺臓、肝臓その他から成り、京都大学霊長類研究所、滋賀医科大学医学部実験動物センターからの援助を得た。

研究組織

研究代表者	西 克治	(滋賀医科大学医学部教授)
研究分担者	福永龍繁	(三重大学医学部教授)
研究分担者	山田光子	(滋賀医科大学医学部助手)
研究分担者	山本好男	(滋賀医科大学医学部助手)
研究協力者	兼 正晃	(滋賀医科大学医学部研究生)
研究協力者	種子島章男	(滋賀医科大学大学院生)
研究協力者	池原 讓	(滋賀医科大学大学院生)
研究協力者	牛山郁子	(滋賀医科大学医学部学生)

研究経費

平成4年度	800千円
平成5年度	700千円
平成6年度	700千円
計	2,200千円

なお、本研究の一部を構成する、各種脊椎動物におけるA B O式血液型関連抗原発現部位の研究に際して、東京都中央区銀座4丁目 大倉本館内外施設株式会社内 南葵育英会から、『脊椎動物進化に伴うA B O式血液型関連糖鎖抗原発現の組織化学的解析』に関する調査研究のため助成金1,000千円の援助が得られた。

研 究 発 表

(1) 学会誌等

- 1) Katsuji Nishi, Tatsushige Fukunaga, Yoshio Yamamoto, Mitsuko Yamada, Masateru Kane, Akio Tanegashima, Steven Rand and Bernd Brinkmann.

ABH-related antigens in human male genital tract

A histochemical examination,

International Journal of Legal Medicine 105, 75-80, 1992

- 2) Katsuji Nishi, Tatsushige Fukunaga, Yoshio Yamamoto, Mitsuko Yamada, Masateru Kane, Nobuaki Ito and Shingo Kawahara.

Species identification from tissue particles using lectin- and immuno-histochemical methods

Advances in Forensic Haemogenetics 4, 407-409, 1992

- 3) 山田光子、兼正晃、山本好男、福永龍繁、西克治

DNA試料を用いてのABO式血液型判定

医学の歩み 161、997-998、1992

- 4) Mitsuko Yamada, Yoshio Yamamoto, Akio Tanegashima, Masateru Kane, Yuzuru Ikehara and Katsuji Nishi

Determination of ABO genotypes with DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues

International Journal of Legal Medicine, 106, 285-290, 1994

- 5) 山田光子、種子島章男、山本好男、福永龍繁、西克治、兼正晃

DNA試料を用いてのABO式血液型判定

— パラフィン包埋臓器を用いて —

DNA多型、2、128-134、1994

- 6) Katsuji Nishi, Akio Tanegashima, Mitsuko Yamada, Yuzuru Ikehara, Yoshio Yamamoto, Tatsushige Fukunaga, Masateru Kane Haruhiko Ikeda and Steven Rand
Lectin- and immuno-histochemistry on mucous substances of the taste buds and lingual glands in some mammals
Advances in Forensic Haemogenetics 5, 638-640, 1994
- 7) Akio Tanegashima, Mitsuko Yamada, Yuzuru Ikehara, Yoshio Yamamoto, Tatsushige Fukunaga, Masateru Kane, Katsuji Nishi Haruhiko Ikeda and Steven Rand
Comparative lectin- and immuno-histochemistry on antigen expression in blood group A1 and A2 individuals
Advances in Forensic Haemogenetics 5, 647-649, 1994
- 8) 山田光子、池原譲、種子島章男、牛山郁子、山本好男、西克治、上山久雄、落合由紀子、大久保岩男
DNA試料を用いての種差識別
— ABO式血液型関連糖転移酵素遺伝子について —
DNA多型、3 印刷中 1995

(2) 口頭発表

- 1) 種子島章男、藤枝園、中川季子、兼正晃、山田光子、山本好男、福永龍繁、西克治
数種哺乳類におけるABH関連抗原分布(犬)
第77次日本法医学会総会(福岡) 1993年4月23日
- 2) 種子島章男、藤枝園、中川季子、兼正晃、山田光子、山本好男、福永龍繁、西克治
日本猿舌腺のABH関連抗原分布
第77次日本法医学会総会(福岡) 1993年4月23日

3) Katsuji Nishi, Akio Tanegashima, Mitsuko Yamada, Yuzuru Ikehara, Yoshio Yamamoto, Tatsushige Fukunaga, Masateru Kane, Haruhiko Ikeda and Steven Rand

Lectin- and imuuno-histochemistry on mucous substances of the taste buds and lingual glands in some mammals

15th International Congress of International Society of Forensic Haemogenetics, Venezia, Italy,

1993年10月13日

4) Akio Tanegashima, Mitsuko Yamada, Yuzuru Ikehara, Yoshio Yamamoto, Tatsushige Fukunaga, Masateru Kane, Katsuji Nishi, Haruhiko Ikeda and Steven Rand

Comparative lectin- and immuno-histochemistry on antigen expression in blood group A1 and A2 individuals

15th International Congress of International Society of Forensic Haemogenetics, Venezia, Italy,

1993年10月13日

5) 山田光子、種子島章男、山本好男、兼正晃、福永龍繁、西克治
DNA試料を用いてのABO式血液型判定

— パラフィン包埋臓器を用いて —

DNA多型研究会 第2回学術集会 新潟

1993年11月30日

6) 池原讓、種子島章男、兼正晃、山田光子、山本好男、福永龍繁、西克治

数種哺乳動物精細管の組織化学的検索

第78次日本法医学会総会（前橋） 1993年5月12日

7) 山田光子、池原讓、種子島章男、牛山郁子、山本好男、西克治、上山久雄、落合由紀子、大久保岩男

DNA試料を用いての種差識別

— ABO式血液型関連糖転移酵素遺伝子について —

DNA多型研究会 第3回学術集会 東京

1994年12月9日

- 8) 牛山郁子、池原譲、種子島章男、兼正晃、山田光子、山本好男、西克治

ネコ泌尿生殖器におけるABH関連抗原の発現

第79次日本法医学会総会（山形） 1995年5月（予定）

- 9) 牛山郁子、池原譲、種子島章男、兼正晃、山田光子、山本好男、西克治

ラット精子成熟にはABH関連抗原と複合糖鎖が関連する

第79次日本法医学会総会（山形） 1995年5月（予定）

- 10) 種子島章男、西克治、福永龍繁、Bernd Brinkmann

唾液腺細胞における血液型抗原発現の人種差

第79次日本法医学会総会（山形） 1995年5月（予定）

研 究 成 果

- 1) ヒト生殖臓器におけるABO式血液型関連抗原分布の組織化学的解析

(ABH-related antigens in human male genital tract

A histochemical examination,

International Journal of Legal Medicine 105, 75-80, 1992において

発表)

解剖時に精巣、精巣上体、精嚢腺、前立腺の生殖臓器切片採取、ホルマリン固定後パラフィン切片を作成、単クローン抗A, B, H (1鎖及び2鎖), Lea, Leb, Lex, Ley抗体をアビチン・ビオチン・ペル

オキシダーゼ法にて各臓器切片でのそれぞれの抗原発現様式をそれぞれの個体の赤血球表現型と比較し、血液型関連遺伝子の各臓器での関与を検討した。

精巣では、精原細胞細胞膜部分に赤血球表現型に一致するA B H抗原発現が見られたが、他の抗原の発現は見られず、精子細胞や精子にはA B O式血液型関連抗原の反応性は見られなかった。精巣網上皮細胞では、S e遺伝子の支配を受け赤血球表現型に一致するA B H抗原発現が見られ、精巣輸尿管上皮細胞では、S e遺伝子の支配を受け、AもしくはBと合わせてH（1鎖及び2鎖）が、またL e aもしくはL e b抗原が発現され、S e遺伝子と関係なく、L e y抗原が発現されていた。精巣上体上皮細胞では、A、B、H、L e a、L e b抗原発現は殆ど見られず、X遺伝子の作用により主にL e y抗原が細胞核上部のいわゆるゴルジ装置領域に現局して発現されていた。精巣上体管腔内に貯蔵されている精子にはA B H血液型関連抗原の反応性は見られなかった。精嚢腺では、S e遺伝子の支配を受け、赤血球表現型に一致するAもしくはB抗原とH（2鎖）抗原、S e遺伝子と関係なく、L e y抗原が発現され、H（1鎖）とL e a、L e b抗原の発現は見られなかった。前立腺では、S e遺伝子の支配を受け、赤血球表現型に一致するAもしくはB抗原とH（1鎖と2鎖）抗原、L e aもしくはL e b抗原、また、L e x、L e y抗原の発現も見られ、S e遺伝子の支配を受けない抗原発現様式も認められた。また前立腺では、A、H、L e b、L e x、L e y抗原発現の不均一性が見られた。

これらのことから、ヒト生殖器官各臓器での、A B O式血液型関連糖鎖抗原発現遺伝子の関与は非常に複雑であることが判明した。また、生殖器官内に見られる精子にはA B O式血液型関連抗原の反応性は見られず、s射精後の精子に見られるA B O式血液型関連抗原は、生殖器官各臓器からの分泌抗原が吸着されたものである可能性が示唆された。

2) 脊椎動物におけるA B O式血液型関連抗原の反応性

(Katsuji Nishi, Tatsushige Fukunaga, Yoshio Yamamoto, Mitsuko Yamada, Masateru Kane, Nobuaki Ito and Shingo Kawahara.

Species identification from tissue particles using lectin-

and immuno-histochemical methods

Advances in Forensic Haemogenetics 4, 407-409, 1992において発表)

魚類から霊長類を含む哺乳類での組織・臓器におけるA B O式血液型関連抗原発現を組織・臓器のパラフィン切片を作成後、単クローン抗体との反応性により、また数種レクチンとの反応性をも合わせて検討した。

抗Hとの反応性は、魚類であるシマアジ、ヒラメなどの腸管に見られ、トモサマガエルなどの両生類の腸管上皮細胞は抗B抗体と、血管内皮は抗A抗体との反応性を示し、脊椎動物では、魚類や両生類等の下等脊椎動物から、高等霊長類に至るまで、唾液腺などや腸管上皮細胞等のいわゆる分泌細胞に分類されるものでは、A B O式血液型の反応性が見られることが判明した。カエル血管内皮に見られたような抗A B O血液型抗体との反応性は、爬虫類や鳥類、哺乳類、霊長類の原猿類、新世界猿類には見られず、日本猿や、カニクイ猿等の旧世界猿になって見られるようになり、類人猿である、テナガ猿やチンパンジーになると、ヒトと同様に、血管内皮や赤血球にA B O式血液型の反応性が見られるようになった。ガラクトースに特異的に反応性を有するバンデリア豆レクチン(G S A I - B 4)は、魚類、両生類、爬虫類、鳥類の血管内皮に全く反応性を示さないが、ブタ、ウシ、イノシシ、シカ等の哺乳類と新世界猿までの霊長類の血管内皮や赤血球に明瞭な反応性を示した。また、B型物質を有する旧世界猿の血管内皮に反応性を示したが、それ以外の旧世界猿、類人猿、ヒトの血管内皮や赤血球に反応性を示さなかった。これに反して類人猿、ヒトの血管内皮はフコースに特異的に反応性を有するヨーロッパハリエニシダレクチン(U E A I)との反応性が見られた。

これらのことから、A B O式血液型関連抗原は、下等脊椎動物から既に発現され、発現部位は、分泌細胞、血管内皮細胞、赤血球と進化に伴って増していくこと。旧世界猿以下の哺乳類では、G S A I - B 4の反応性が血管内皮細胞、赤血球に見られ、それ以下の脊椎動物では、反応性が見られないことが判明した。法医学的には、これらの性質を応用して、小さな組織片からの人獣鑑別が可能なことを報告した。

3) ABO式血液型遺伝子型判定方法の開発

(山田光子、兼正晃、山本好男、福永龍繁、西克治

DNA試料を用いてのABO式血液型判定

医学の歩み 161、997-998、1992において発表)

ABO式血液型表現型は、A、B、AB、Oからなるが、A型には、大きな亜型A1、A2型があり、遺伝子型は、A型では、AA型とAO型とな。遺伝子型による臓器・組織でのABO式血液型抗原発現様式の相違も考えられる。このため、ABO式血液型遺伝子型判定方法の開発を試みた。

1990年に Clausenらにより単離され、山本らによって cDNA がクローニングされた糖転移酵素の遺伝子座における差異を PCR 増幅と制限酵素処理により ABO 式血液型遺伝子型判定方法を開発した。すなわち、ABO 対立遺伝子の塩基配列が異なる第 258 塩基領域で、5' - ATGTGGGTGGCACCCCTGCCA, 5' - ACTCGCCACTGCCTGGGTCT 及び第 523 塩基領域で 5' - AGGGGTGCACGGCCGGCGGC, 5' - GAAATCGCCCTCGTCC TT をプライマーとして Taq ポリメラーゼを用い、新鮮血液から抽出調整した DNA 10 ng を鋳型として増幅を行った。増幅された DNA 断片を 2 分し、第 258 塩基領域断片は、BstEII あるいは KpnI で、第 523 塩基領域は BssHII あるいは NarI で処理し、10% ポリアクリルアミド電気泳流を行い、臭化エチジウム染色あるいは銀染色を行って制限酵素による切断の有無を見、判定した。

判定した遺伝子型は、表現型と純な完全に一致し、DNA 試料を用いて、ABO 式血液型遺伝子型が判定できることが確かめられた。また、この開発により、法医学的微量資料からの ABO 式血液型遺伝子型判定が可能となった。今回の方法では A1 型と A2 型の区別は困難であった。

4) パラフィン包埋臓器からの ABO 式血液型遺伝子型判定方法の開発

(Mitsuko Yamada, Yoshio Yamamoto, Akio Tanegashima, Masateru Kane, Yuzuru Ikehara and Katsuji Nishi

Determination of ABO genotypes with DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues

International Journal of Legal Medicine, 106, 285-290, 1994

及び

山田光子、種子島章男、山本好男、福永龍繁、西克治、兼正晃

DNA試料を用いてのABO式血液型判定

— パラフィン包埋臓器を用いて —

DNA多型、2、128-134、1994で発表)

ABO式血液型遺伝子型また亜型あるいは人種の相違による臓器・組織での抗原発現の差異を既に得られているパラフィン包埋臓器を用いて検討を試みるため、パラフィン包埋臓器からABO式血液型遺伝子型の判定方法の開発を試みた。用いた臓器は肺、肝、脾、腎、胸腺、精巣で、1983年から1993年の間に剖検が行われ、死後経過時間は3時間から3日までであった。

約20mgのパラフィン包埋臓器から1ないし10 μ gのDNAが得られたが、死後変化とホルマリン固定の影響のため、DNAは分解を受け100bpから2kbpの分子量サイズであった。われわれの新鮮血液由来DNAでのABO遺伝子型判定に用いたプライマーでは、248bpの断片はPCR増幅されたが、467bpの断片は増幅が困難な例が見られた。Lee and chang (J. Forens Sciences 37, 1269-1275, 1992) の報告によるプライマーを用いたところ、128bp、200bpの断片が増幅可能であった。PCR産物が電気泳動上バンドを示さない場合には、一部を鋳型として再度増幅を行うことにより、判定に足りる量のDNAを得ることができた。

作成後10年経過したホルマリン固定、パラフィン包埋臓器からもABO式血液型遺伝子型判定が可能なが示され、同時に、保存パラフィン包埋切片からretrospectiveに遺伝子病の診断ができる可能性を示した。

5) 味蕾細胞でのABO式血液型関連抗原糖鎖の存在

(Katsuji Nishi, Akio Tanegashima, Mitsuko Yamada, Yuzuru Ikehara, Yoshio Yamamoto, Tatsushige Fukunaga, Masateru Kane Haruhiko Ikeda and Steven Rand

Lectin- and immuno-histochemistry on mucous substances of

the taste buds and lingual glands in some mammals

Advances in Forensic Haemogenetics 5, 638-640, 1994 で発表)

A B O式血液型関連抗原糖鎖の生理学的意義を探るため、味覚受容器官である味蕾細胞でのA B O式血液型関連抗原糖鎖の存在を霊長類を含む数種哺乳類の舌を用いて検討した。滋賀医科大学実験動物センターで薬理学・解剖学実験に用いられた日本猿、イヌ、ウサギ、ラットと滋賀医科大学及びドイツ ミュンスター大学法医学研究所で司法解剖に付された死体から、舌の有郭乳頭部の切片を得、ホルマリン固定後パラフィン切片を作成し、A B O式血液型関連抗原単抗体を1次抗体として、A B C法で反応性を検討した。

哺乳動物及びヒトのA B O式血液型は、有郭乳頭部付近に存在する後舌腺やEbner腺細胞の反応性で判定した。ヒトを含むいずれの動物も味蕾細胞に、それぞれの個体に一致するA B O式血液型抗体との反応精が見られ、ウサギ、イヌ、日本猿、ヒトではL e a, L e b, L e x, L e y抗原の反応生が見られた。味覚受容器官としての機能以外の機能を有しないと思われる味蕾細胞にA B O式血液型関連抗原糖鎖がウサギ、ラット、イヌなどの哺乳類や霊長類である日本猿、ヒトに認められたことは、これらの糖鎖構造が味覚受容に深く関わっていることを示唆するものと考えられた。

6) A型亜型(A1型A2型)での臓器・組織での抗原発現様式の検討

(Akio Tanegashima, Mitsuko Yamada, Yuzuru Ikehara, Yoshio Yamamoto, Tatsushige Fukunaga, Masateru Kane, Katsuji Nishi Haruhiko Ikeda and Steven Rand

Comparative lectin- and immuno-histochemistry on antigen expression in blood group A1 and A2 individuals

Advances in Forensic Haemogenetics 5, 647-649, 1994 で発表)

A B O式血液型のうち比較的多く見られる亜型の内、A1型とA2型での生殖器官やその他の臓器組織での抗原発現様式の相違を検討した。

用いた臓器組織は、胸腺、顎下腺、舌下腺、舌腺等の唾液腺、気管腺、十二指腸、精巣上体、精嚢腺、前立腺である。各切片を得、ホルマリン固定後パラフィン切片を作成し、A B O式血液型関連抗原単抗体を1次抗

体として、A B C法で反応性、またフコース特異的レクチンであるU E A I, N-アセチルガラクトサミン特異的レクチンであるカタツムリレクチン(H P A), ドリコス豆レクチン(D B A)の反応性も合わせて検討した。

胸腺ハッサル小体、唾液腺や気管腺の粘液細胞、血管内皮細胞、十二指腸上皮細胞では、A 1型由来のものは、抗A抗体とU E A Iに反応性を示し、抗H抗体との反応性は認めなかった。A 2型由来のものは、抗A抗体、抗H抗体、U E A Iレクチンともに反応性を示した。精巣上体、精囊腺、前立腺では顕著な反応性の差異が認められなかった。胸腺ハッサル小体、唾液腺の粘液細胞、Ebner腺細胞、気管腺の粘液細胞、血管内皮細胞では、A 1型、A 2型由来の各細胞ともH P Aレクチンと明瞭な反応性を示したが、A 2型由来では、D B Aレクチンは胸腺ハッサル小体に反応性を殆ど示さず、Ebner腺細胞では非常に弱い反応性を示し、その他の細胞では、モザイク状の反応性を示した。精巣上体、精囊腺、前立腺ではH P A、D B A両者に顕著な反応性の差異が認められなかった。

これらの結果は、血液型亜型は糖転移酵素遺伝子の相違に基づき、生合成される糖鎖が違っていることを示しており、また、臓器・組織で遺伝子の関与が微妙に相違していることを示している。

7) A B O式血液型糖転移酵素遺伝子の哺乳類での存在

(山田光子、池原譲、種子島章男、牛山郁子、山本好男、西克治、上山久雄、落合由紀子、大久保岩男

D N A試料を用いての種差識別

— A B O式血液型関連糖転移酵素遺伝子について —

D N A多型、3印刷中 1995で発表)

A B O式血液型関連抗原糖鎖の生理学的意義を探るため、ヒト以外の脊椎動物で認められた抗A、B、H抗体との反応性が真にA B O式血液型抗原によるものか否かを検討するため、A B O式血液型抗原糖鎖転移酵素遺伝子あるいは類似遺伝子の脊椎動物での存在を検索した。

ヒト、ニホンザル、ブタ、ウサギ、チャイニーズ・ハムスター、ラット(2系統)、マストミスの血液及びキンギョの肝臓からD N Aを抽出した。

ヒトのO遺伝子での一塩基欠失（第258塩基）部位、ヒトA，B両遺伝子間での4つの塩基置換部位のうち1部位（第700塩基）及び3部位（第700、第793、第800塩基）をはさむ3組のプライマーを使ってそれぞれから得たDNAのPCR増幅を行った。動物試料では、電気泳動上いずれも数本あるいはそれ以上のバンドが見られ、パターンは動物種で異なり、同じ動物種では同じであり、ラットの2系統では極めて類似していた。これらのパターンからの種属鑑別の可能性を示した。それぞれのPCR産物につき、ヒトPCR産物をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行うと、使用プライマーで差が見られるが、いずれかのプライマーでの産物とハイブリダイズした。ニホンザルから得られたDNA断片をクローニングし、DNAシーケンスを行ったところ、ヒトB型糖転移酵素遺伝子と非常に良く似た塩基配列が得られた。この結果は、ニホンザルがABO式血液型でB型物質を分泌しているという我々の免疫組織化学的検索結果と一致するものと考えられる。他の動物においても検索続行中であるが、キングョの肝臓から得られたDNAにヒトABO式血液型糖転移酵素遺伝子と相同性が見られたは、下等脊椎動物においてABO式血液型糖転移酵素遺伝子が存在する可能性を示していると考えられる。

8) 生殖器官特に精巣での糖鎖と精子成熟についての検索

（池原譲、種子島章男、兼正晃、山田光子、山本好男、福永龍繁、西克治

数種哺乳動物精細管の組織化学的検索

第78次日本法医学会総会（前橋）1993年5月12日で発表）

ABO式血液型抗原糖鎖や類似糖鎖の生理学的意義の解明に近づくべく、この報告では、数種類の哺乳類の精巣精細管において発現される糖鎖についてレクチン組織化学的に検討した。

滋賀医科大学実験動物センターから得たニホンザル、ラット、ウサギ及び司法解剖検査時に採取した、精巣切片をホルマリン固定後パラフィン切片を作成し、HPA，ECA，PNA，SBA，GSAI-B4，EEL，DBA，WGAなどのレクチンを用いて染色した。いずれの個体も末端にガラクトースを持つ糖鎖に特異性を有するRCA，SBA，ECA，

PNAとの反応性が精子細胞核部に見られ、精子発生過程の細胞誘導にガラクトース系糖鎖が種を越え、共通に何等かの形で関与していることを示すものと考えられた。HPAはラットの精子細胞尖体部や、精子鞭毛部を染色し、ウサギの精母細胞や精子細胞細胞膜を染色し、ヒトの第一次精母細胞ゴルジ領域に反応性を示したが、ニホンザルでは反応性を示さなかった。このことは、それぞれの動物間での精子発生に関連する糖鎖に微妙な相違が存在していることを示している。

9) ネコ生殖器官特に精巣上体での糖鎖と精子成熟についての検索

(牛山郁子、池原譲、種子島章男、兼正晃、山田光子、山本好男、西克治)

ネコ泌尿生殖器におけるABH関連抗原の発現

第79次日本法医学会総会(山形)1995年5月で発表予定)

この報告では、雄ネコ生殖器官での糖鎖の発現につき、抗ABH関連抗原抗体とレクチンを用いて検討した。

滋賀医科大学動物実験センターで生理学実験に供された15個体のネコから精巣と腎臓を採取し、ホルマリン固定後、パラフィン切片を作成し、染色を行った。ネコ精巣精細管部分では、A, B, H, Lea, Leb, Lex, Ley抗体との反応精は見られなかった。精子細胞核部にガラクトースに特異性を示すSBAとの反応性が見られ、精母細胞、精子細胞や精巣精細管分泌液にH抗原前駆物質に特異性を示すECAに反応性が見られた。精巣上体の頭部、体部、尾部では、それぞれの上皮細胞に抗A抗体に反応性が見られた。精巣輸出管部では、モザイク状の反応性を示すが、体部から尾部に至るに伴い反応性は均一性を示しかつ顕著となり、管腔内の分泌液や精子にも反応精が見られた。ECAは精巣輸出管部や体部では明瞭な反応性を示したが尾部では非常に弱かった。精巣輸出管部では、LexやLey抗体とのモザイク状の反応性も見られた。腎臓の集合管部の細胞ゴルジ領域に抗A, Lex, Ley抗体との反応性が見られる個体が約半数に認められた。これらのことにより、ネコの精子成熟には、A抗原糖鎖や前駆物質や関連糖鎖が深く関わっていることが示された。

10) ラット生殖器官特に精巣上体での糖鎖と精子成熟についての検索

(牛山郁子、池原譲、種子島章男、兼正晃、山田光子、山本好男、西克治)

ラット精子成熟にはA B H関連抗原と複合糖鎖が関連する

第79次日本法医学会総会(山形)1995年5月で発表予定)

この報告では、雄ラット生殖器官での糖鎖の発現につき、抗A B H関連抗原抗体とレクチンを用いて検討した。

滋賀医科大学実験動物センターで中毒学的研究に供されたラットから、精巣、精巣上体、前立腺部分を採取、ホルマリン固定後パラフィン切片を作成、染色を行った。精巣上体では、頭部から体部を経て尾部に至る上皮細胞はN-アセチルガラクトサミンに特異性を示すHPAにより明瞭顕著に染色された。管腔内分泌液や精子も染色された。SBAやDBAとの反応性も弱いながら認められた。これらの部分は抗A抗体とは反応しなかった。精嚢腺部分ではレクチンや抗体との反応性は見られない。前立腺では、凝固腺部分の上皮細胞ゴルジ領域に抗A, B, Lex, Ley抗体との反応性が見られ、GSAI-B4、EEL, ECAとの反応性も見られた。これらのことことから、ラット精子成熟には、複合糖鎖やABO血液型関連糖鎖構造が何等かの形で関与していることを示していると思われる。

同時に、ネコとの検討結果及びこれまでの検討結果を合わせて、ヒトと共に生息、あるいはその周辺に生息する哺乳類あるいは、その他の脊椎動物では、消化管分泌物、唾液、精液、尿にABO式血液型関連抗原を含んでいることが示された。このことは、法医実務上において、唾液斑、精液斑、尿斑からの血液型検査においては、先ず、人獣鑑別が欠かせないことを示している。これらの斑跡検査における人獣鑑別方法はいまだ確立されていないのが現状である。この方面での検討が望まれる。

11) 人種によるABO式血液型関連抗原発現の相違

(種子島章男、西克治、福永龍繁、Bernd Brinkmann)

唾液腺細胞における血液型抗原発現の人種差

第79次日本法医学会総会(山形)1995年5月で発表予定)

この検討では、人種によるABO式血液型関連抗原発現の相違につき検

索した。

滋賀医科大学、三重大学医学部、大阪府監察医事務所で司法あるいは行政解剖に付された死体及びドイツ連邦共和国ミュンスター大学法医学研究所にて司法あるいは行政解剖に付された死体から、唾液腺、気管部、消化管、生殖器官各部の切片を採取、ホルマリン固定後、パラフィン切片を作成し、レクチン組織化学あるいは免疫組織化学的方法で各臓器・組織でのA B O式血液型関連抗原発現の検索を行った。

日本人とドイツ人での男性生殖器官では、研究成果の項1) ヒト生殖臓器におけるA B O式血液型関連抗原分布の組織化学的解析で記載した如くであった。すなわち兩人種間に相違は見られなかった。気管部、消化管でも、日本人にA 2型個体が見られなかったのみで相違は見られなかった。唾液腺では、下顎腺の漿液細胞では、個体のA B O血液型に関わらず、S e遺伝子の支配のもと、H抗原のみが発現され、前舌腺、舌下腺、口蓋腺等の漿液細胞では、A B H抗原の発現は見られず、ほぼ漿液細胞のみから成るエプナー腺では、S e遺伝子、H遺伝子、L e遺伝子、及びX遺伝子の支配のもと、抗原が発現されていた。但し、L e抗原の発現は赤血球表現型と完全には一致しなかった。唾液腺の粘液細胞では、分泌型のS e / S eあるいはS e / s e型個体では、兩人種の抗原発現に相違は見られなかったが、日本人s e / s e型の非分泌型個体では、AあるいはB抗原が分泌され、ドイツ人個体では、分泌されないか分泌されても非常に弱かった。非分泌型日本人個体粘液細胞では、Type 1鎖、Type 2鎖両抗原に特異性を有する抗AもしくはB抗体に反応性を示し、Type 2鎖抗原に特異性を有する抗体では反応性を示さなかった。このことから、日本人では、唾液腺の粘液細胞で、S e遺伝子に支配されないType 1鎖を合成する未知のフコース転移酵素が存在している可能性が示された。

研究成果のまとめ

A B O式血液型関連抗原発現に関わる遺伝子は様々で、臓器・組織によりその関与様式をかえ、抗原発現性を複雑にしている。またこれらの抗原は下等な脊椎動物で既に発現、分泌され、精子成熟過程や味覚受容器に関与している結果を合わせ考えると、A B O式血液型関連抗原糖鎖は、生命

科学上で何等かの重要な役目を担っていると結論される。