

論文内容の要旨

氏 名 横 田 信
 学位の種類 博士(医学)
 学位記番号 医 第 8 9 8 号
 学位授与の日付 平成 18 年 3 月 22 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
 学位論文題目 Detection of ABH blood group antigens in human cardiac muscle by the highly sensitive immunohistochemical staining method EnVision+ (高感度免疫染色 EnVision+法によるヒト心筋からの ABH 型抗原の検出)

論文審査委員 (主査) 教授 杉 山 静 征
 (副主査) 教授 金 丸 昭 久
 (副主査) 教授 宮 澤 正 顯

【目的】

法医学的個人識別において、DNA分析が主流になりつつあることは否めない事実であるが、我が国では ABO式血液型はすべての新生児に対し検査されるため、最も広く知られた血液型であり、捜査情報としての価値は高い。しかしながら、従来法医学的試料の血液型検査に用いられてきたヒト由来ポリクローナル抗体は、既に生産が中止されたため、新しい検査法の開発が必須である。

そこで、デキストランポリマー試薬を2次抗体とする高感度免疫染色法である EnVision+ 法に着目し、心筋からのABH型抗原の検出について研究した。

【方法】

死後6時間以内の剖検体から採取した心筋をパラフォルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋切片を作製した。免疫染色は、1次抗体に抗A、抗B、抗Hモノクローナル抗体、2次抗体に EnVision+ を用い、発色までの工程を4℃で行った。また、37℃の密閉容器内で心筋を3日から1ヶ月インキュベートし、腐敗させた試料および死後1日から4ヶ月経過した剖検体についても型検出を試みた。

【結果】

AおよびB型心筋では、間質に強いAおよびB型抗原が見られたが、心筋繊維には見られなかった。H型抗原は、心筋繊維に強く発現したが、血管内皮細胞や平滑筋では弱く、間質には存在しなかった。O型心筋では、血管内皮細胞、間質双方にH型抗原が強く発現したが、心筋繊維では弱かった。37℃で1ヶ月インキュベートし、高度に腐敗させた心筋組織および死後4ヶ月経過した剖検体の心筋からでも本法により正しい血液型判定が可能であった。

【考察】

我が国では、ABO式血液型は身元確認において依然として重要な情報源である。法医学的試料からのABO遺伝子型については、いくつかの報告があるが、時間と費用をついやすため、著者は EnVision+ 法を用いた免疫組織化学的手法により心筋からのABH型抗原の検出を試みた。

その結果、H型抗原の発現が、Thorpe らの蛍光免疫染色法による報告と顕著に異なっていた。彼女らは、毛細血管内皮細胞にのみH型抗原が存在し、心筋繊維には存在しないと報告したが、著者は、血管内皮細胞だけでなく心筋繊維にも存在することを明らかとし、本法が従来の染色法より高感度であることを証明した。さらに、高度に腐敗した心筋からでも正しい血液型判定を可能とし、本法の法医学的有用性を明らかとした。

	公 表 年 月 日	出 版 物 の 種 類 及 び 名 称
博士論文の印刷公表	2004年6月25日 公 表	出版物名 Acta Medica Kinki University 第29巻 第1号 11頁~17頁 (Vol.29 No.1) 2004年6月25日 発 行
	公 表 内 容	
	全 文	

論文審査結果の要旨

法医解剖において、剖検体からの ABO 式血液型検査は必須項目である。しかしながら、赤血球が溶血したことにより凝集反応では血液型検査が行えないような剖検例の場合は、毛髪や爪を試料とし、解離試験法により血液型を判定している。解離試験法は、試料中に含まれる ABH 型抗原を抗原抗体反応で検出する方法であり、抗体には ABO 式血液型判定用ヒト由来ポリクローナル抗体を用いる。ところが、ヒトに免疫して得られるこの抗体は、感染や人道的な問題を内包していたため生産が中止された。一方、モノクローナル抗体は感染の危険性も無く、ロット間での品質のばらつきも少ないことから、ポリクローナル抗体に代わり急速に広まっている。新鮮赤血球から凝集反応により ABO 式血液型を判定するには問題のないモノクローナル抗体も、毛髪など法医学的試料について解離試験を行った場合、型検出ができないことが明らかとなっている。そこで、モノクローナル抗体を用い、法医学的試料から血液型を判定する新しい検査法の開発が必要となった。

ABO 式血液型検査には血清学的手法、免疫組織化学的手法および分子生物学的手法があるが、血清学的検査は適切な抗体が入手できない、分子生物学的検査には時間と費用がかかるといった問題点があるため、本論文では免疫組織化学的検査に着目している。なかでも、2 次抗体にデキストランポリマー試薬を用いる EnVision+法について検討を行い、法医学的有用性について詳細に研究している。EnVision+法は、これまでの Streptavidine-Biotin(SAB)法や Labeled Streptavidine-Biotin(LSAB)法に比べ、1 次抗体との反応基や発色基質を触媒する酵素が多いデキストランポリマー試薬を用いていることから、高感度であると思われる。しかしながら、本法によりヒト臓器より ABH 型抗原を検出した報告はみられていない。

本論文では、死後 6 時間以内の剖検体から採取した A 型、O 型各 2 例および B 型 3 例の心筋をパラフォルムアルデヒドで固定し、厚さ 5 μ m のパラフィン包埋切片を作製している。腐敗による影響を検討するため、上記試料を 5mm³ にカットし、37 $^{\circ}$ C の密閉容器内で 3 日、7 日、14 日および 1 ヶ月インキュベートすることにより試料を高度に変性させた。さらに死後 1 日から 4 ヶ月経過した種々の環境下に置かれた 13 例の剖検体についても型検出を試みている。EnVision+法は、キット化されていないため非特異反応を抑え、最適な染色像を得るためには、種々の要素について検討を行う必要があった。著者は、口腔内・扁平上皮細胞を試料とし、本染色法に最適な市販の抗体を選別したうえで、心筋試料について染色条件の検討を行っている。

その結果、抗 A、H 抗体はダコ社、抗 B 抗体はカイノス社の抗体が最も適しており、至適希釈倍率は、抗 A 抗体で 400 倍、抗 B 抗体で 80 倍、抗 H 抗体で 40 倍であることを明らかにしている。また、各反応後の洗浄には Phosphate

buffered saline (PBS) に 0.1% Tween 20 を添加し、洗浄能力あげ、試薬の非特異的な付着を阻害している。さらに発色までの工程を 4 $^{\circ}$ C で行い試薬の過剰な反応を抑えている。このように染色条件を設定することにより、染色強度は強いが非特異反応の全くみられない理想的な染色像が得られている。

A 型、B 型心筋では間質および血管内皮細胞に A、B 抗原が認められたが、心筋繊維には認められていない。一方、H 型抗原はこれらの心筋の心筋繊維に強く発現し、血管内皮細胞や平滑筋では弱くなっている。また、H 型抗原は間質では全く認められていない。O 型心筋では血管内皮細胞および間質に強い H 型抗原が認められ、心筋繊維では弱かった。心筋の凍結切片を用い、蛍光免疫染色法で ABH 型抗原を検出した Thorpe らの報告では、H 型抗原が毛細血管の内皮細胞にのみ発現し、心筋繊維には認められないとされている。すなわち、EnVision+法により、従来の染色法では検出できなかった微量な型抗原を検出することができたことは、本染色法がより高感度な手法であることを証明している。

37 $^{\circ}$ C で腐敗させた心筋を材料にした実験では、3 日以内で核の染色性は失われたが、ABH 型抗原は、1 ヶ月インキュベートした心筋からでも検出されている。型抗原は腐敗した組織内に拡散し、徐々に弱くなったが、H 型抗原は高度に腐敗した心筋繊維でも強く発現している。また、この条件下では非特異的な染色像は得られていない。種々の条件下に置かれた 13 の剖検例では、すべての心筋組織から正しい型判定を行っている。最も長いものでは 4 ヶ月間海中に浮遊し、屍ろう化した剖検例からでも型抗原を検出している。

本研究は、モノクローナル抗体による法医学的試料からの ABO 式血液型検査を目的とし、アプローチの一つとして免疫組織化学的手法に着目している。すなわち、2 次抗体にデキストランポリマー試薬を用いる EnVision+法により、ヒト心筋組織内 ABH 型抗原の検出を試みている。心筋からの ABH 型抗原の検出には、凍結切片試料について蛍光免疫染色を施した報告はあるが、EnVision+を用いた報告はみられていない。本論文では、EnVision+による免疫染色法の条件設定を詳細に検討し、染色強度は強く、非特異反応の全く見られないきわめて高感度かつ高精度な検査法を確立している。これにより、微量な型抗原が検出可能となり、A、B、O 型心筋における H 型の発現に新たな知見を見いだしている。さらに、高度に腐敗させた心筋組織や種々の環境下におかれた剖検例からも正しい型判定を行い、法医学的有用性について検証している。

本研究の結果により、凝集反応では血液型が判定できないあらゆる剖検体からの ABO 式血液型判定を可能にしたといえる。これは、個人識別領域での利用価値がきわめて高く、法医学の研究および応用面に充分適応しうるものであり、法医学実務上の有用な研究と考える。本論文を博士 (医学) 学位論文に値するものと認めた。