

Studies on Microscopic Blood Grouping I. Blood Grouping by Detection of ABO(H) -and Lewis-Activities in Human Tissues and Cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7842

顕微鏡下における血液型判定に関する研究

I. ヒト組織・細胞内 ABO (H) および Lewis 活性検出による血液型判定

金沢大学医学部法医学講座 (主任: 永野耐造教授)

大 島 徹

(昭和60年12月27日受付)

微小な組織片からの顕微鏡レベルでの血液型判定法を確立する目的で、剖検および外科手術時採取されたヒト健常組織内の ABO (H), Lewis 活性分布を、酵素抗体法および蛍光抗体法と市販のマウスモノクローナル抗体、標識 ulex europaeus agglutinin-I レクチンを用い、免疫組織化学的に検討した。その結果、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法が、血液型活性の細胞内局在の検索に適していた。赤血球抗原型が Le (a-b+) 型ドナーの ABO (H) 活性については、その ABO 式血液型と同一の活性が肺 (肺胞・気管支上皮, 気管支腺), 肝臓 (類洞内皮, Kupffer 星細胞, 大型肝内胆管上皮), 腎臓 (遠位曲部, 集合管, 腎盂粘膜), 膵臓 (腺房細胞), 顎下腺 (粘液・漿液腺, 導管) と、結腸遠位部 (下行結腸から直腸まで) を除く消化管粘膜に認められた。Le (a+b-) 型顎下腺粘液腺部と小腸粘膜にはドナーと同一の ABO (H) 活性が示され、血管内皮細胞と赤血球には常に血液型と同一の活性が認められた。Lewis 活性に関しては、Lewis 式血液型に関係なく、Le^a活性が肺 (肺胞・気管支上皮), 腎臓 (近位曲部, 集合管, 腎盂) と膵臓 (腺房細胞, 小型ないし中型導管上皮) で陽性であった。Le^b活性は Le (a-b+) 型の気管支上皮, 腎盂粘膜と膵臓腺房細胞, 並びにドナーの Lewis 型に関係なく膵臓の大型導管上皮に認められた。Le (a-b+) 型試料の肝内胆管上皮は Le^a, Le^b両活性を有したが、Le (a+b-) 型では Le^b活性は認め難かった。顎下腺粘液腺部では、Le (a-b+) 型で主に Le^b活性が分布し、Le (a+b-) 型では両活性ともに検出された。Le (a-b+) 型の食道および胃粘膜は Le^b活性が陽性で、Le^a活性はほぼ陰性であった。一方、Le (a+b-) 型の胃粘膜, 小腸粘膜には両活性が認められた。結腸近位部では、Le^a, Le^b活性のいずれかまたは両者が陽性で、互いに異なる局在を示したが、結腸遠位部では Le^a活性が分布の主体をなす傾向にあった。血管内皮細胞と赤血球は Lewis 活性陰性で、中枢神経系, 心筋細胞, 脾臓, 甲状腺並びに副腎は ABO (H), Lewis 活性ともに陰性であった。以上の成績から、本研究で用いた免疫組織化学的方法は、微小なヒト組織片からの顕微鏡レベルでの ABO および Lewis 式血液型判定に有効であるといえる。

Key words forensic serology, blood grouping, ABO blood-group system, Lewis blood-group system, immunohistochemistry

微量の血痕や微小組織片などの血液型判定には、分離法¹⁾と混合凝集反応法²⁾が用いられている。前者は信頼性その他現在最も秀れた方法と考えられるが、血痕では撚糸レベルの試料量を必要とする。後者は顕微鏡レベルの試料に応用できるが、判定に際して指示血球の混合凝集を指標とするため、細胞内抗原の検出は不可能で厳密な意味では細胞レベルの血液型検査法とは

言い難い。

そこで著者は血液型抗原の直接的証明によって対象検体をより微量化し、同時に抗原の局在を明確に知るため、近年発展の著しい酵素および蛍光抗体法の法医学的血液型検査への応用について一連の系統的研究を行っている。これら免疫組織細胞化学的方法を細胞レベルでの血液型判定に導入するにあたっては、種類並

Abbreviations: ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; DAB, diaminobenzidine; FITC, fluorescein isothiocyanate; Le, Lewis; PAP, peroxidase-antiperoxidase; PAS, periodic acid-Schiff; PBS, phosphate buffered saline; UEA, ulex europaeus agglutinin.

びに条件とも様々な法医学試料について検査法の特異性がまず確認されなければならない、さらに組織・細胞については対象血液型抗原の分布あるいは局在を明らかにしておく必要がある。ヒト組織内における血液型抗原分布についてはこれまでもいくつかの報告^{9)~11)}があるが上述のような法医学的観点から総合的・系統的に検討したものはない。

本研究では免疫組織化学的方法による細胞レベルでの血液型判定法確立を目的として、剖検死体諸臓器の組織片に酵素および蛍光抗体法を適用し、使用試薬をも含めてそれらの特異性や鋭敏度などについて比較しながら検討すると同時に、血液型抗原の各臓器組織内分布および細胞内局在を検索した。

材料および方法

I. 材 料

1. ヒト臓器組織片

末梢血血液の赤血球抗原型既知の個体(ドナー)から剖検または外科手術時採取され、10%ホルマリン固定保存された健常臓器を用いた。

1) 剖検材料

可及的に死後変化の少ないものを選択した。大脳、小脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、膵臓、顎下腺および甲状腺は、Le(a-b+)型10例(A型5例、B型2例、AB型1例、O型2例)とLe(a+b-)型4例(A、B、AB、O型各1例)につき検索した。脊髄はA、Le(a-b+)型1例を用いた。食道はA、Le(a-b+)型とO、Le(a-b+)型各1例、胃はLe(a-b+)型6例(A、B型各2例、AB、O型各1例)とLe(a+b-)型2例(A、AB型各1例)、十二指腸および回腸はLe(a-b+)型2例(A、B型各1例)とAB、Le(a+b-)型1例、大腸はLe(a-b+)型2例(A、B型各1例)について検索した。

2) 外科手術材料

本研究では消化管組織のみを用いた。すなわち、O、Le(a-b+)型食道1例、Le(a-b+)型胃6例(A型3例、B、AB、O型各1例)とLe(a+b-)型胃4例(A型2例、B、AB型各1例)およびA、Le(a-b+)型回腸と結腸、O、Le(a-b+)型S字状結腸、AB型直腸各1例を検索した。

2. 光顕用組織切片作製

上記組織片から式のごとくパラフィン切片を作製、適宜卵白グリセリンでスライドガラスに貼付¹⁰⁾し、脱パラフィン後、実験に用いた。

II. 免疫組織化学的方法

1. 酵素抗体法¹¹⁾

ABO式、Lewis血液型活性の検出にはアビジン-ビ

オチン-ペルオキシダーゼ複合体(avidin-biotin-peroxidase complex, ABC)法¹²⁾を適用した。また、O(H)活性については、同時にペルオキシダーゼ標識ulex europaeus agglutinin-I(UEA-I)レクチンを使用し直接法¹³⁾でも検討した。

1) 内因性ペルオキシダーゼ阻止¹⁴⁾

酵素抗体法の適用にあたり、組織切片をあらかじめ0.074%塩化水素、0.3%過酸化水素添加100%メタノール溶液に室温で30分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性を失活させた。

2) ABC法操作手順¹⁵⁾

ABC法は、2%正常ヤギ又はウサギ血清での前処理→1次抗体→洗浄→ビオチン化2次抗体→洗浄→ABC→洗浄→呈色反応の順序で行った。

1次抗体として、AおよびB型活性検出には、マウスモノクローナル抗A・IgM抗体(Biotest社、Lot. No. 111084, 50倍稀釈)および抗B・IgM抗体(Biotest社、Lot. No. 112084, 40倍稀釈)を、O(H)型活性検出には、マウスモノクローナル抗H・IgM抗体(Chembiomed社、Lot. No. 4235, 50倍稀釈)を用い、通常室温で2時間、続いて4°Cで一昼夜反応させた。また、Lewis^a(Le^a)およびLewis^b(Le^b)活性検出には、マウスモノクローナル抗Le^a・IgM抗体(Biotest社、Lot. No. 113084, 111015, 40倍稀釈)および抗Le^b・IgM抗体(Biotest社、Lot. No. 124084, 111025, 40倍稀釈)を1次抗体として用いた。なお、一部の試料については、従来の動物免疫抗血清(ポリクローナル)も使用し、マウスモノクローナル抗体と比較検討した。すなわち、ウサギ免疫抗A血清、ヤギ免疫抗B血清(東京標準血清、各々Lot. No. 50-1, 各々100倍および50倍稀釈)、ヤギ免疫抗Le^aおよび抗Le^b血清(Ortho社、Lot. No. LA338BおよびLB537B, 各々50倍稀釈)を使用した。

2次抗体としては、上記1次抗体に対応する以下の抗体を反応させた。すなわち、アフィニティ精製・ビオチン化・抗マウスIgMヤギ血清(Tago社、Lot. No. 51-06-01, 100倍稀釈)、ウサギまたはヤギIgG検出用Vectastain ABC kit(Vector社)のビオチン化2次抗体を使用し、室温で60分反応させた。ABCはVectastain ABC kitのものを使用時調整し、室温で45分反応させた。

ペルオキシダーゼ反応は、3, 3'-ジシアミノベンチジン(DAB) 25 mgを0.05 M トリス緩衝液(pH 7.6) 100 mlに溶解、pH 7.6に調整後、過酸化水素を最終濃度0.005%になるように添加し、室温で5~10分程度組織片を浸漬させた。この反応により茶褐色状を呈した部位が活性の局在部位に相当する(Graham-

Karnovsky 法¹⁶⁾。

なお、以上の操作間の洗浄は 0.02 M リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered-saline, PBS, pH7.3) で十分に行った。

3) 直接法操作手順

O (H) 活性検出のため 1%ウシアルブミン加 0.02 M PBS (pH7.3) で組織切片を前処理し、続いてペルオキシダーゼ標識 UEA-I レクチン (E・Y 社, Lot. No. 0723D, 2 mg/2 ml, 40~50 倍希釈) を室温で 2 時間反応させ、PBS で洗浄後、ABC 法と同様に呈色反応を行った。

4) 核染色

酵素抗体法における呈色反応後、PBS で洗浄し、Mayer のヘマトキシリン液または 1%メチルグリーン液で核染色を施し、式のごとく脱水、封入後、光学顕微鏡で観察した。

2. 蛍光抗体法

1) 間接法操作手順

マウスモノクローナル IgM 抗体を前法同様 1 次抗体とし、反応後洗浄し、AB 型ヒト血清で吸収した fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ヤギ抗マウス IgM 抗体 (Cappel 社, Lot. No. 21136, 2~5 倍希釈) を室温で 60 分反応させた。

2) avidin-FITC 法操作手順

ABC 法の場合と同様に、マウスモノクローナル 1 次抗体およびビオチン化 2 次抗体を反応させた後、avidin-FITC (Vector 社, Lot. No. 40221, 30~50 倍希釈) を加え、室温で 60 分反応させた。

3) 直接法操作手順

O(H) 活性については、FITC 標識 UEA-I (E・Y 社, Lot. No. 022902, 30 倍希釈) を用いた直接法でも検討した。この場合の反応条件は室温で 60~90 分とした。

以上の蛍光抗体法染色後、組織切片を無蛍光グリセリンで封入し、ニコン落射蛍光顕微鏡装置 XF-EF を用い UV および B 励起法で観察した¹⁷⁾。

3. 対照試験

以上の酵素、蛍光抗体法における反応の特異性確認のため、以下の対照試験¹⁸⁾¹⁹⁾を各染色方法の個々について行った。

1) 1 次抗体の代わりに同一種属の動物の正常血清を使用 (1 次抗体の特異性の検討)。

2) ビオチン化 2 次抗体の省略。

3) ビオチン化ペルオキシダーゼ、ABC あるいは avidin-FITC それぞれ単独での反応 (内因性アビジンやビオチンの検討)。

4) 内因性ペルオキシダーゼを除去後、直接 DAB 反応 (前処理の検討)。

5) 直接法の場合、非標識レクチンによる阻止試験。

成 績

I. 血液型活性検出における酵素および蛍光抗体法の特異性と鋭敏度

1. 1 次抗体の比較検討

マウスモノクローナル抗体と動物免疫ポリクローナル抗血清をそれぞれ 1 次抗体とする ABC 法の染色結果を比較検討したところ、モノクローナル抗体では間質の結合組織などへの非特異的吸着が少なく、したがってバックグラウンドが低くなり血液型活性の局在部位が明瞭に認められた。この傾向は特に酵素抗体法で明らかであり、たとえば胃底腺壁細胞内・核周囲部に認められる ABO (H) 活性では、動物免疫抗血清を用いた場合、壁細胞全体が茶褐色状に染色 (バックグラウンド) され、コントラストが悪くなるのに対し、モノクローナル抗体を使用した場合は、核周囲部に存在する型活性のみを染色できるため明瞭な染色結果が得られた。

2. 酵素抗体法と蛍光抗体法の比較検討

本研究ではホルマリン固定・パラフィン切片に酵素および蛍光抗体法を適用し、特異性と鋭敏度を比較した。その結果、ABO (H) および Lewis 活性については前述のいかなる方法においても特異性や鋭敏度には大差はなく、パラフィン切片からでもほぼ満足すべき成績が得られた。なお、自己蛍光発光はごく微弱で型活性の判定には影響しない程度であった。ただし、肺胞上皮細胞などの比較的弱い活性の検出には背景が暗視野となる蛍光抗体法がすぐれ、細胞内小器官などに局在する活性の検出・同定には組織・細胞の構造を同時に観察できる酵素抗体法が適していた。

II. 血液型抗原の組織内分布

観察したすべての試料組織片には、いずれの方法によってもほぼ同様の血液型活性の存在が観察され、前記対照試験はすべて陰性であった。また、O (H) 活性については、モノクローナル抗 H 抗体と標識 UEA-I レクチンの間に差はなかった。さらに、今回検索した比較的死後変化の少ない消化管・剖検材料と外科手術材料の間には、光顕上、著明な差異は認められなかった。

以下、ABO, Lewis 式血液型活性の各々について臓器組織別に記載する。

1. ABO 式血液型活性

大脳、小脳および脊髄：ドナーの Lewis 式血液型と無関係に、ABO 式血液型と同一の ABO (H) 活性が血管内皮細胞と赤血球に認められたが、神経細胞、神経膠細胞および神経線維では陰性であった (図 1)。

心臓：Lewis 式血液型と関係なく、心筋細胞では

ABO (H) 活性は陰性であり、血管内皮細胞と赤血球にドナーと同一の型活性が認められた。

肺: Le (a-b+) 型試料では血液型と同一の ABO (H) 活性が肺胞上皮細胞, 気管支粘膜, 気管支腺, 血管内皮細胞および赤血球に認められた。肺胞上皮細胞のうち大肺胞上皮細胞では細胞質 (びまん性) と核周囲~核上部 (小桿状~顆粒状) に ABO (H) 活性が認められ, 一方扁平肺胞細胞にも核周囲部 (小顆粒状) と細胞質に, ABO (H) 活性が存在していた (図 2)。一方, Le (a+b-) 型では ABO (H) 活性は血管内皮細胞, 赤血球に限られていた。また, A あるいは B 型ドナーからの試料の一部には同時に弱い O (H) 活性も検出された (図 3)。

肝臓: Lewis 型と無関係に ABO 式血液型と同一の ABO (H) 活性が肝類洞内皮細胞, Kupffer 星細胞, 小葉間胆管より大型の胆管上皮細胞, 血管内皮細胞および赤血球に認められたが, 肝細胞および小葉間胆管上皮細胞では陰性であった。なお, Kupffer 星細胞内活性の一部は小桿状を呈した (図 4)。また, A あるいは B 型材料の一部で比較的大型の胆管上皮, 血管内皮細胞の一部に微弱な O (H) 活性が同時に認められた。

腎臓: Le (a-b+) 型では皮質深部から髄質に存在する尿管遠位曲部および集合管上皮細胞の管腔側, 腎盂移行上皮, 血管内皮細胞と赤血球に血液型と同一の ABO (H) 活性が認められた。特に集合管上皮細胞では管腔に面する細胞表面に明瞭な型活性が認められたのに加え, 核上部細胞質内と基底膜に微細な顆粒状を呈する活性が存在していた (図 5, 6)。尿管遠位曲部と集合管上皮管腔側に認められる型活性は皮質から髄質へ移行するに従い明瞭になった。一方, Le (a+b-) 型では, 尿管, 集合管上皮および腎盂粘膜の型活性は陰性で, A または B 型試料の一部に微弱な O (H) 活性も同時に認められた。

副腎: Lewis 型と無関係に血管内皮細胞と赤血球のみに血液型と同一の ABO (H) 活性が認められた。

脾臓: Lewis 型と無関係に赤脾髄内の赤血球と血管内皮細胞にドナーと同一の ABO (H) 活性が認められたが, 白脾髄内のリンパ球は陰性であった。また, A あるいは B 型試料の一部では微弱な O (H) 活性も認められた。

膵臓: Lewis 型と無関係に, 大部分の外分泌腺房細胞の核上部から核周囲部で主として腺腔側に, 顆粒状から小桿状を呈する血液型と同一の ABO (H) 活性が認められた (図 7)。また, 1 例の A, Le (a-b+) 型試料では, 所々に A 型活性が陰性ないし微弱陽性の腺房細胞が島状に集合して存在しており (図 8), 同部では O (H) 活性や Le^a活性が明瞭に認められた。一般に A

または B 型試料の腺房細胞には弱い O (H) 活性が同時に存在し, 導管上皮細胞の細胞質内 ABO (H) 活性は陰性であった。血管内皮細胞と赤血球には血液型と同一の ABO (H) 活性が常に認められたが, ランゲルハンス島内分泌細胞は陰性であった。

顎下腺: Le (a-b+) 型試料では粘液細胞にドナーの血液型と同一の ABO (H) 活性が認められたが, その程度は腺房間で異なっていた。Le (a-b+) 型の漿液細胞の細胞質には比較的びまん性に O (H) 活性が認められたが, A または B 活性については陰性であった。一方, Le (a+b-) 型試料の場合, 粘液細胞にはドナーと同一の型活性を認めたが, 漿液細胞では O (H) 活性も含め陰性であった。導管上皮細胞, 血管内皮細胞および赤血球には Lewis 型と無関係に, ドナーと同一の ABO (H) 活性が検出され, A または B 型試料の一部では微弱な O (H) 活性も認められた。

甲状腺: Lewis 型と関係なく血管内皮細胞と赤血球に血液型と同一の ABO (H) 活性が認められたが, ろ胞上皮やろ胞内コロイドは陰性であった。

食道: Le (a-b+) 型試料では, ドナーと同一の型活性が基底層以外の粘膜, 特に有棘層で明瞭に認められ, 重層扁平上皮の細胞間に一致して観察された (図 9)。O 型以外の試料では弱い O (H) 活性も同時に検出された。

胃: Le (a-b+) 型試料では, 血液型と同一の ABO (H) 活性が, 表層粘液細胞, 胃底腺頸部副細胞および腺窩内分泌粘液, さらに大部分の壁細胞に認められた (図 10)。このうち, 表層粘液細胞および副細胞では核上部から細胞内粘液に, また壁細胞では細胞核周囲の多数の顆粒状, 小桿状または層状構造に一致して型活性が証明された (図 11)。また, A および B 型試料では同時に O (H) 活性も認められた。Le (a+b-) 型試料の表層粘液細胞, 副細胞および分泌粘液は型活性がほぼ陰性であった (図 12) が, 一部の壁細胞では活性を認め, 細胞内の局在様式は Le (a-b+) 型と同様であった。また, 胃底腺の主細胞は常に ABO (H) 活性陰性であった。

十二指腸~回腸: Le (a-b+) 型試料の場合, ドナーの血液型と同一の ABO (H) 活性が吸収上皮細胞核上部, 杯細胞の粘液内および吸収上皮細胞刷子縁に特に明瞭に検出された。また, A あるいは B 型試料の一部では, O (H) 活性も同時に認められた。Le (a+b-) 型についても同様の成績が得られた。

大腸: Le (a-b+) 型の盲腸から横行結腸脾曲部付近までは, ドナーと同一の ABO (H) 活性が吸収上皮細胞や杯細胞において上部消化管と比べ弱いながら認められた。しかし, 下行結腸から直腸の正常粘膜には

ABO (H) 活性は認められなかった (図 13)。

以上述べた消化管では Lewis 式血液型と無関係に、ドナーの血液型と同一の ABO (H) 活性が検索した 29 個体の全例で、血管内皮細胞と赤血球に認められた。

骨格筋、平滑筋および脂肪細胞：Lewis 型に関係なく、ABO (H) いずれの活性も検出されなかった。

2. Lewis 式血液型活性

大脳、小脳および脊髄：Lewis 型に関係なく、Le^a、Le^b両活性とも認められなかった。

心臓：Lewis 型に関係なく、Le^a、Le^b活性とも陰性であった。

肺：Le (a-b+) 型では一部の肺胞上皮細胞で Le^a 活性が検出されたが、Le^b活性は陰性であった。気管支上皮細胞と分泌粘液には弱い Le^a、Le^b活性が認められた。これに対し、Le (a+b-) 型では肺胞上皮細胞と気管支上皮細胞に Le^a活性を認めたが、Le^b活性は一部の気管支上皮以外陰性であった。

肝臓：Lewis 型に関係なくいずれの肝細胞でも Lewis 活性は認められなかった。Le (a-b+) 型試料の比較的大型の胆管上皮細胞や小葉間上皮細胞には Le^a、Le^b両活性が認められ、特に管腔側で明瞭であった (図 14)。これに対し Le (a+b-) 型の小葉間胆管上皮細胞では、Le^a活性のみ陽性で Le (a-b+) 型と同様に管腔側で強く認められた。また、小葉間胆管より大型の肝内胆管上皮細胞は Le^a活性陽性で Le^b活性は一部を除きほとんど認められなかった。

腎臓：ドナーの Lewis 型に関係なく、Le^a活性は一部の尿細管 (近位曲部)、集合管上皮および腎盂粘膜表面に認められ (図 15)、Le^b活性は Le (a-b+) 型の腎盂粘膜に検出された。このうち、集合管上皮の Le^a活性は腔面に面する表層部に強く、また髄質深部ほどその強さを増し、集合管上皮の細胞質も染色される傾向にあった。しかし、糸球体メサンギウム領域では活性を認めなかった。

副腎、脾臓：ドナーの Lewis 型に関係なく、活性を認めなかった。

膵臓：Lewis 型に関係なく、Le^a活性が外分泌腺房細胞の核上部から腺腔側に、また中程度以下の導管上皮細胞細胞質に認められた (図 16)。Le^b活性は大部分の腺房細胞で陰性であったが、陽性腺房細胞が所々島状に群集しており、そのような細胞では同活性は核周囲部に顆粒あるいは小桿状に認められた。前述した A、Le (a-b+) 型試料ではこのような Le^b活性陽性群は A 活性陰性細胞群にほぼ一致していた (図 17)。また、Le^b活性は太い導管上皮細胞質と導管内分泌物にびまん性に認められた。一方、ランゲルハンス島の内分泌細胞では Lewis 活性は陰性であった。

顎下腺：Le (a-b+) 型試料では、Le^a活性がごく一部の粘液腺細胞で微弱に認められたが、漿液腺細胞では陰性であった。Le^b活性はほぼすべての粘液腺に明瞭に認められ、大小の導管上皮細胞腔側や漿液腺細胞にもやや弱いながら存在していた (図 18)。一方、Le (a+b-) 型の粘液腺細胞には Le^a活性と比較的弱い Le^b活性が認められたが、漿液腺細胞では両活性とも陰性であった。また、導管系では介在部から線条部で Le^a、Le^b活性が陽性であった。

甲状腺：Lewis 型と無関係にすべての細胞成分とろ胞内コロイドには活性が認められなかった。

食道：Le (a-b+) 型食道粘膜の基底層を除く上皮細胞と細胞間隙に Le^b活性が認められ、ごく微弱な Le^a活性も同部に検出された。

胃：Le (a-b+) 型では粘膜表層粘液細胞、副細胞などで Le^b活性が認められた (図 19) が、Le^a活性は同部で陰性ないし稀に部分的に微弱陽性であった (図 20)。これに対し Le (a+b-) 型では、表層粘液細胞や副細胞は Le^a活性陽性で、同時に Le^b活性も弱陽性であった。また、Lewis 型と無関係に一部の壁細胞の核周囲部には、小桿から顆粒状の Le^b活性が認められた。さらに、胃底腺主細胞の腺腔側 (核上部) には、Lewis 型に関係なく小顆粒状の Le^b活性が認められた。

十二指腸～回腸：Le (a-b+) 型では、吸収上皮表面の刷子縁と一部の杯細胞内粘液に Le^b活性が強く認められ、Le^a活性も刷子縁や少数の杯細胞に検出された。

大腸：Le (a-b+) 型では吸収上皮細胞と杯細胞粘液で主に Le^b活性が認められる例や、逆に Le^a活性の方が広く分布する例がみられ、両活性は互いに異なる分布を示した (図 21, 22)。また、ドナーの Lewis 型が不明の試料のうち下行結腸から直腸にかけては、上行結腸などと比べて主として Le^a活性が検出される傾向にあった。

血管内皮細胞および赤血球：ABO (H) 活性の場合と異なり、明瞭な Lewis 活性は認められなかった。

考 察

近年目ざましい発展をとげた免疫組織化学的染色法は、大別すると標識法と未標識法に分けられる²⁰⁾。前者はさらに標識抗体法 (直接法、間接法、重染色法など) と標識抗原法に細分され、後者には peroxidase-anti-peroxidase method²¹⁾ (いわゆる PAP 法)、プロテイン A 法²²⁾²³⁾並びにピオチン・アビジン法²⁴⁾などがある。標識法は標識抗体あるいは標識抗原を用いるもので、このうち直接法は検出しようとする抗原に対する抗体 (1 次抗体) を標識する方法で、特異性は高いが

やや感度が低いのが欠点である。間接法は未標識1次抗体を抗原とする抗体(2次抗体)を標識する方法であり2つの抗体を重ねて使用するためやや非特異的反応の生じる可能性は増すが、直接法に比べ高感度である。未標識法は抗体を標識する過程で抗体活性が低下するのを避けるために、すでに抗原と結合した抗体を十分量のマーカーで標識する方法で微量抗原について高感度の検出が可能である。ただし、標識マーカーが目的とする抗体以外の他の組織内成分と結合する可能性があるため、十分な対照実験が必要とされる²⁰⁾。

以上述べた抗体の標識に用いられる物質が蛍光色素である方法が蛍光抗体法(fluorescent antibody method)または蛍光色素標識抗体法(fluorescence-labeled antibody method)であり、広義には未標識法を含め蛍光色素を抗原抗体反応の指標とする染色法すべてを含んでいる。これに対し酵素で抗体を標識する方法を酵素抗体法(enzyme-labeled antibody method)あるいは総称的に免疫酵素法(immuno-enzyme method)とよんでいる²⁰⁾。

一般に蛍光抗体法は染色のコントラストが良好で、特異性に優れ微弱な活性の有無を判断しやすく生きた細胞にも応用できるという長所をもつが、反面、暗視野での観察のため組織・細胞の微細構造を捉え難く、染色後標本の保存期間も1~2週間程度と限られている²⁵⁾。この点、酵素抗体法は明視野で観察でき、ヘマトキシリンやメチルグリーンなどで核染色を施した後、永久標本とするため、組織・細胞の形態学的特徴が容易に観察でき、しかも他の特殊染色等による所見と関連づけながら検索できる点が優れている。ただし、非特異的反応により時に染色のコントラストが不良となり、活性の局在を捉え難くなる欠点がある²⁵⁾。

この酵素抗体法のなかで未標識法に属するアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(ABC)法は近年Hsuら¹²⁾により開発され、アビジンとビオチンの間の極めて特異性の高い、強い結合力を応用した高感度の検出法で¹²⁾²⁶⁾²⁷⁾、Hsuら¹²⁾²⁷⁾の原著ではPAP法よりも高感度(8倍以上)で、2次抗体の希釈度を高めることができるとしている。

こうした理由から著者はABO(H)およびLewis活性検出のため特異性と感度の両方で現在最も優れているABC法を選択し、さらに1次抗体として、従来使用されていた動物免疫血清(ポリクローナル)に代えマウスモノクローナル抗体の適用を試みた。その結果、死後変化の避けえない剖検材料でも非特異的吸着が少く、細胞内活性局在を明瞭に示しうることが可能となった。モノクローナル抗体の優秀性について、Pedalら²⁸⁾はPAP法と併用し、剖検材料(腎臓)からABO

(H)活性の検出を試みたところ、ヒト由来の抗血清に比べ非特異的吸着が少く良好な結果が得られたと報告している。また、Pedalら²⁸⁾の報告以外に、モノクローナル抗体とABC法を併用しヒト各種組織・細胞内の血液型活性を検出する試みがいくつか報告され^{29)~31)}、いずれも特異的かつ高感度な染色結果が得られている。

また、ABC法とモノクローナル抗体の併用で通常のホルマリン固定・パラフィン切片からでも、トリプシンなどの酵素処理³²⁾や界面活性剤処理³³⁾あるいはosmication³⁴⁾などの特別な操作を必要とせずに、ABO(H)、Lewis活性を明瞭に検出することができた。さらに同じビオチン・アビジン法の原理に基づきavidin-FITCなどを用いることにより、従来、かなり困難と報告されていた³⁵⁾、蛍光抗体法によるホルマリン固定・パラフィン切片からの血液型活性検出も可能であった。一般に蛍光抗体法を行う場合、パラフィン包埋切片作製過程で抗原活性を失うような物質については凍結切片を用いなければならないが、形態学的観察にはパラフィン切片の方が適しているため、少なくともABO(H)およびLewis活性については通常のパラフィン切片を用い、特別な処理なしで検出可能であると結論される。また、著者は9年前に作製され室温で保存されたパラフィン包埋組織試料からでもABO(H)活性を検出したので、パラフィン内でABH抗原は比較的安定であり、実際上試料をパラフィン包埋したまま保存しておくことは差支えないものと思われる。

血液型活性につき正常組織・細胞を対象としたいくつかの報告^{31)~35)}のうち、Szulman^{31)~32)}、Lemieuxら³³⁾の報告以外の多くは組織試料のドナーのLewis式血液型について未検索である。そこで本研究では、ドナーのLewis式血液型はもちろんすべての赤血球抗原型を可及的に検索し、対象試料をLe(a-b+)型とLe(a+b-)型に分類し、ドナーの示す分泌・非分泌形質³⁶⁾という観点から組織・細胞内活性を検討した。

その結果ABO(H)活性については肺、腎臓、顎下腺および消化管粘膜で、Le(a-b+)型とLe(a+b-)型試料の間に活性分布上の差異が認められた。特に消化管については、Le(a-b+)型試料でドナーの型と同一のABO(H)活性が食道から横行結腸まで認められるのに対し、Le(a+b-)型試料では健康胃粘膜においてもABO(H)活性が陰性を示し、従来の報告³⁶⁾と一致していた。

さらに、赤血球と血管内皮細胞は、検索したすべての臓器において、Lewis式血液型に関係なくドナーのABO式血液型と同一のABO(H)活性を有しており、

これは Szulman⁵¹⁶⁾や Oriol ら³⁷⁾の報告と一致していた。

前述した Le (a-b+) 型と Le (a+b-) 型で ABO (H) 活性の分布が異なる部位は、肝内胆管上皮を含めいずれも粘液性物質の産生、貯蔵、分泌および移動等の生理機能を有している³⁸⁾。このことは、Le (a-b+) 型が分泌型に相当し、唾液、汗、精液など各種の体液中に比較的多量の血液型物質を分泌していること³⁸⁾、また一方の Le (a+b-) 型が非分泌型に相当し、体液中に血液型物質を分泌していないか、分泌してもごく少量に限られること³⁸⁾と関連しているものと考えられる。

また、O 型以外でも A あるいは B 型試料の一部で弱いながら O (H) 活性も同時に検出されうことは、A および B 抗原がいずれも O (H) 活性を示す H 抗原を前駆物質としていること³⁹⁾から理解される。さらに、成績の項で述べたように、A, Le (a-b+) 型膵臓・膵房細胞のうち、所々島状に群集する細胞群で、A 型活性が陰性ないし微弱陽性となり、代わりに O (H) 活性と Le^a活性が他の A 活性陽性細胞に比べて強く認められた現象は、これまで報告が少く、石山⁴⁰⁾がその総説のなかでふれている程度である。これは、H 抗原を共通の前駆物質とする A 抗原と Le^a抗原の 2 つの生合成の方向³⁹⁾のうち、何らかの理由で H → A が抑制され、H → Le^aの方向のみが発現しているためと推測され、この背景には血液型合成酵素の変化が予想される。石山⁴⁰⁾はこの原因として、外因の影響や細胞の再生期の一時期において抗原の合成機能が停止または抑制された可能性を示唆している。

Lewis 活性については肝臓、顎下腺および消化管粘膜 (特に胃粘膜) で、ドナーの Lewis 式血液型の違いにより活性分布の差異が認められた。また、ABO (H) 活性分布上差異の認められた肺胞上皮、腎尿管上皮、集合管上皮では、Lewis 式血液型に関係なく Le^a活性のみが検出された。この腎臓の所見は、本研究と同様にモノクローナル抗体と ABC 法を用い、ホルマリン固定・パラフィン切片について検索した Ernst ら³¹⁾の成績と同じであったが、今後別の固定方法やパラフィン以外の凍結切片について検討する必要があると考えられる。

さらに、既述のごとく Le (a-b+) 型試料の腎集合管および肺胞上皮には Le^a活性しか認められないが、Le (a+b-) 型の胃粘膜表層粘液細胞、副細胞、顎下腺粘液細胞などでは Le^a活性以外にも Le^b活性が認められ、Lewis 活性の分布上、Lewis 式血液型判定に用いたドナーの赤血球の Lewis 活性とは異なっている。この理由として、赤血球膜上の Lewis 活性は赤血球自

らが産生するものではなく、他の上皮組織で産生され血清中に入った type 1 chain⁴¹⁾の Lewis 活性が膜に吸着したものである⁴²⁾⁴³⁾ため、赤血球が示す Lewis 型は各種ヒト上皮組織での状態を正確に反映していないものと推測される。

また、本研究でも諸家の報告⁹⁾³¹⁾と同様、ABO (H) 活性とは対照的に血管内皮細胞と赤血球には、免疫組織化学的に明らかな Lewis 活性を認めなかった。これについて、Oriol ら⁴⁴⁾は、mesoderm 由来の血管内皮細胞や赤血球は上皮組織と異なり、Se 遺伝子や Le 遺伝子の支配を受けずに type 2 chain 骨格⁴¹⁾をもつ血液型抗原のみを産生するため、type 1 chain 構造に担われている Lewis 活性を表現しえないものと考察している。本研究では顕微鏡下で活性存在部位が示す DAB の色調や FITC 蛍光を観察しているため、低密度に分布する抗原は検出しえないものと予想され、赤血球膜上の Lewis 活性も低密度な分布状態であると考えられる。事実、赤血球 1 個あたりの抗原活性部位数は ABH 抗原の $0.43 \sim 1.9 \times 10^6$ 個に対し、Le^a抗原は $4.5 \sim 7.3 \times 10^3$ 個程度であり、Le^a抗原の密度は ABH のおよそ 1/60 と疎である⁴⁵⁾。

過ヨウ素酸・Schiff (periodic acid-Schiff, PAS) 反応⁴⁶⁾陽性を示す胃表層粘液細胞、副細胞、小腸杯細胞や膵臓膵房細胞の核上部から核周囲部⁴⁷⁾⁴⁸⁾に顆粒状、小桿状ないし層状に認められる血液型活性は、主にゴルジ装置とそれに連続する細胞内膜系に局在しているものと判断される。また、大肺胞細胞の細胞質には粗面小胞体とゴルジ装置がよく発達し、ゴルジ装置では、PAS 反応陽性を示す層板小体を産生している⁴⁹⁾。したがって、成績の項で述べた同細胞の核上部から核周囲に認められる活性も、おそらくゴルジ装置に一致しているものと思われる。周知のように、ゴルジ装置の膜系には各種の糖転移酵素が存在し、粗面小胞体から移動してきたポリペプチド鎖に糖が順次付加され、糖蛋白が生合成されている⁵⁰⁾⁵²⁾。このようなゴルジ装置にほぼ一致して血液型活性の局在がみられることは、この細胞内小器官がヒト血液型抗原の合成に関与していることを示すものと考えられる。

一方、胃の壁細胞でも核周囲部に活性分布が認められるが、壁細胞ではゴルジ装置の発達が比較的悪く⁵³⁾、標識レクチンと免疫電顕法を用いた Ito ら⁵⁴⁾の報告では、光顕で核周囲部に観察される構造の多くは細胞内分泌細管であるとされており、壁細胞内に認められる血液型活性はゴルジ装置以外に細胞内分泌細管にも局在していると考えられる。Ito ら⁵⁴⁾は、こうした壁細胞内分泌細管に局在する血液型活性は、塩酸分泌による局所の pH の低下で細胞膜が障害を受けるのを防いで

いる複合糖に存在しているものと推測している。

以上、ヒト組織・細胞内の血液型活性について考察を行った。ABO 式血液型活性については、全身諸臓器に普遍的に分布し、試料の Lewis 式血液型とは無関係に ABO (H) 活性を有する血管内皮細胞と赤血球を主な指標とし、各臓器に特有の活性分布も適宜参考にすることで、顕微鏡下における組織・細胞レベルでの型判定が十分に可能であることが判明した。この際、対象とする臓器は血管内皮細胞と赤血球が多数認められ、かつ比較的腐敗しにくい臓器⁵⁵⁾、たとえば腎臓、肺、心臓などが適当と考えられる。また、判定にあたっては当然のことながら、血管内皮細胞と赤血球で A 型活性が陽性で B 型活性が陰性であれば A 型、その逆であれば B 型、A、B 両活性がともに陽性の場合 AB 型、また A、B 両活性が陰性で O (H) 活性のみ陽性であれば O 型と判断する。血管内皮細胞の染色結果が安定しているのに対し、血管内の赤血球は腐敗の進んだ事例では溶血、断片化していたり、個々の赤血球で DAB 反応による染色性に強弱が認められるため、若干の注意が必要である。

Lewis 式血液型についても、ドナーの Lewis 式血液型により ABO (H) または Lewis 活性分布に差異が存在する胃粘膜、顎下腺、肝臓、肺および腎臓について検索することで推定が可能と考えられる。今後、実際の剖検材料について対象を拡大しさらに検討を加えていく予定であるが、Lewis 式血液型判定の場合、ABO 式における血管内皮細胞や赤血球のような各臓器共通の指標はいまのところ見い出せず、前記臓器の複数について慎重に検討する必要があると思われる。

今回著者が検索した試料は剖検材料が主であり、死後変化等の影響はまぬがれない。これに関連して、Pedal ら²⁸⁾は腎臓の集合管上皮と血管内皮細胞にみられる ABO (H) 活性は腐敗抵抗性であるが、遠位曲部には稀に 'false B' 活性が出現するうえ、赤血球膜の活性は変化しやすく細菌や真菌にも血液型活性が認められたとしている。このように、様々な環境におかれた法医学分野の試料から血液型判定を行う場合は、常に総合的な判断と細心の注意が要求される。

また、Hinglais ら⁵⁶⁾は、分泌型と比べ微弱ではあるが、蛍光抗体法を用いた彼らの以前の検索では検出できなかった、A 型・非分泌型ヒトの腎集合管上皮に局在する A 型活性を免疫電顕法で認めたと報告している。このように光顕レベルの検索では認めえず、電顕レベルの検査法を用いて初めて確認する血液型活性があることは十分に予想でき、今後、法医学試料についてもいかに電顕レベルで血液型活性の検出を行うか、検討を要する問題と考える。

最後に、著者は本研究で基礎的に検討した免疫組織化学的方法を極めて微量な単繊維付着血痕からの血液型判定にも応用しており、詳細については別報⁵⁷⁾にて報告する。また、法医実務に加えて血液型抗原が果たす生物学的役割について考える一助とするため、ヒト消化管を対象とし癌などの病的変化に伴う血液型活性の変化を、特に上皮性粘液の変化と関連させて検討した。これについても稿をあらためて報告したい⁵⁸⁾。

結 論

微小ヒト組織片からの顕微鏡レベルでの血液型判定法の確立を目的とし、剖検および外科手術時採取された諸臓器のホルマリン固定・パラフィン切片に酵素抗体法および蛍光抗体法を適用し、使用抗体や各方法の特異性、鋭敏度等を比較検討しながら、ABO (H)、Lewis 血液型活性のヒト組織内分布並びに細胞内局在について免疫組織化学的に検討した。その結果、以下の成績を得た。

1. 従来の動物免疫ポリクローナル抗血清とマウスモノクローナル抗体をそれぞれ 1 次抗体とし、ABC 法の染色結果を比較したところ、マウスモノクローナル抗体を用いる方が非特異的染色も少なく、活性の局在を明確に観察し得た。

2. マウスモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法では、パラフィン切片からでも酵素抗体法とほぼ同様の成績が得られた。両者のうち、組織・細胞構造を詳細に観察できる酵素抗体法は、細胞内器官に局在する活性の検出・同定に優れ、比較的微弱な活性の検出には蛍光抗体法が適していた。

3. ヒト健常組織・細胞内の ABO (H) および Lewis 活性は以下のごとくである。

1) ABO (H) 活性——肺では、赤血球抗原型が Le (a-b+) 型を示すドナーの肺胞・気管支上皮、気管支腺にドナーの ABO 式血液型と同一の活性が認められ、Le (a+b-) 型では陰性となった。肝臓では、Lewis 式血液型と無関係に、肝類洞内皮、Kupffer 星細胞と大型肝内胆管上皮に血液型と同一の活性が認められた。腎臓では、Le (a-b+) 型の尿細管遠位曲部、集合管、腎盂粘膜に同様の ABO (H) 活性がみられたが、Le (a+b-) 型では陰性であった。膵臓では常にドナーと同一の活性が膵房細胞に認められた。顎下腺は、Le (a-b+) 型の粘液腺と漿液腺 (O (H) 活性のみ) および導管系に赤血球抗原型と同一活性が認められ、このうち漿液細胞の活性は Le (a+b-) 型で陰性となった。Le (a-b+) 型の食道では、ABO 式血液型と同一の ABO (H) 活性が基底層以外の粘膜で認められた。胃では、Le (a-b+) 型の表層粘液細胞、胃底腺頸部

副細胞, 腺窩内分泌粘液および大部分の壁細胞に同様の活性が認められたが, Le (a+b-) 型では一部の壁細胞で陽性となった。十二指腸から回腸では常に吸収上皮と杯細胞で血液型と同一の ABO (H) 活性が認められた。Le (a-b+) 型の盲腸から横行結腸脾曲部までは, 血液型と同型の ABO (H) 活性が吸収上皮と杯細胞に認められたが, 下行結腸から直腸粘膜では常に陰性であった。

2) Lewis 活性——Le(a-b+) 型・肺では, Le^a活性は肺胞・気管支上皮で陽性, Le^b活性は気管支上皮で陽性であった。一方, Le (a+b-) 型では Le^a活性が肺胞・気管支上皮で認められたが, Le^b活性は陰性であった。Le (a-b+) 型・肝臓では Le^a, Le^b両活性が小葉間胆管を含め肝内胆管上皮に認められ, Le (a+b-) 型では Le^a活性は変化せず, Le^b活性が一部大型の胆管上皮のみで陽性となった。腎臓では Lewis 式血液型に関係なく, Le^a活性が尿管近位曲部, 集合管および腎盂粘膜に, Le^b活性が腎盂粘膜に認められた。膵臓では Lewis 型と無関係に Le^a活性が膵房細胞と外分泌導管(小~中型)に, Le^b活性が一部の膵房細胞と比較的大型の導管に認められた。顎下腺では, Le (a-b+) 型試料で Le^b活性が粘液腺, 漿液腺並びに大小の導管系に認められたが, Le^a活性はごく一部の粘液腺に限られた。一方, Le (a+b-) 型・顎下腺では Le^a活性が大部分の粘液腺と導管系で, Le^b活性は一部の粘液腺と小型の導管系で陽性であった。Le (a-b+) 型・食道では Le^b活性が基底層以外の粘膜で認められ, Le^a活性は微弱であった。胃では Le (a-b+) 型の場合, Le^b活性のみが表層粘液細胞, 副細胞および壁細胞にみられ, Le (a+b-) 型では壁細胞 (Le^b活性のみ) 以外で Le^a, Le^b両活性が存在した。小腸および Le (a-b+) 型の結腸では Lewis 式血液型と関係なく, 両活性が吸収上皮と杯細胞に認められた。また, Lewis 式血液型未検索の遠位側結腸では主に Le^a活性が吸収上皮と杯細胞に認められたが, 試料によっては上行および下行結腸で Le^b活性が強く認められた例も存在した。さらに直腸では Lewis 式血液型にかかわらず, Le^aおよび Le^b活性が吸収上皮と杯細胞に存在したが, Le^a活性の方が分布の主体を占めていた。中枢神経系細胞, 心筋細胞, 脾臓, 副腎および甲状腺では Lewis 式血液型に関係なく ABO (H), Lewis 活性とも陰性であった。

4. 以上得られた成績に基づき, ABO 式血液型については, 血管内皮細胞と赤血球の示す ABO (H) 活性を主たる指標とし, 同時に各組織特有の活性分布を参考にして型判定が可能であると考えられた。また, Lewis 式血液型についても, 各組織における Lewis 活

性を総合的に検討することで, 型判定を行いうるものと思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました恩師永野耐造教授に深甚なる謝意を表します。また, 終始有益な御助言, 御協力を頂きました田中宣幸助教授, 前田 均講師並びに高安達典助手に心から感謝いたします。併せて, 本研究遂行に際し御協力を頂いた法医学教室各位に深謝します。

本研究の一部は文部省科学研究費補助(奨励研究(A), 特別研究員)によった。記して謝意を表する。

なお, 本論文の一部は, 第 6 回日本法医学会中部地方会(1984 年, 名古屋), 第 64 回ドイツ法医学会総会(1985 年, ハンブルク)および第 13 回国際法医・社会医学会(1985 年, プタベスト)で発表した。

文 献

- 1) Kind, S. S.: Absorption-elution grouping of dried blood smears. *Nature*, **185**, 397-398 (1960).
- 2) Coombs, R. R. A. & Dodd, B.: Possible application of the principle of mixed agglutination in the identification of blood stains. *Med. Sci. Law*, **1**, 359-377 (1961).
- 3) Glynn, L. E., Holborow, E. J. & Johnson, G. D.: The distribution of blood-group substances in human gastric and duodenal mucosa. *Lancet*, **2**, 1083-1088 (1957).
- 4) Holborow, E. J., Brown, P. C., Glynn, L. E., Hawes, M. D., Gresham, G. A., O'Brien, T. F. & Coombs, R. R. A.: The distribution of the blood group A antigen in human tissues. *Brit. J. Exp. Pathol.*, **41**, 430-437 (1960).
- 5) Szulman, A. E.: The histological distribution of blood group substances A and B in man. *J. Exp. Med.*, **111**, 785-800 (1960).
- 6) Szulman, A. E.: The histological distribution of the blood group substances in man as disclosed by immunofluorescence. II. The H antigen and its relation to A and B antigens. *J. Exp. Med.*, **115**, 977-996 (1962).
- 7) Szulman, A. E.: The histological distribution of the blood group substances in man as disclosed by immunofluorescence. III. The A, B, and H antigens in embryos and fetuses from 18mm in length. *J. Exp. Med.*, **119**, 503-516 (1964).
- 8) Szulman, A. E.: Chemistry, distribution, and function of blood group substances. *Annu. Rev.*

Med., 17, 307-322 (1966).

- 9) **Szulman, A. E. & Marcus, D. M.**: The histologic distribution of the blood group substances in man as disclosed by immunofluorescence. VI. The Le^a and Le^b antigens during fetal development. *Lab. Invest.*, 28, 565-574 (1973).
- 10) **佐野 豊**: 卵白グリセリン, 組織学研究法, 第6版, 149-150頁, 南山堂, 東京, 1981.
- 11) **堤 寛**: パラフィン切片による光顕の酵素抗体法染色, 酵素抗体法(渡辺・中根編), 改訂版, 72-88頁, 学際企画, 東京, 1985.
- 12) **Hsu, S. -M., Raine, L. & Fanger, H.**: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29, 577-580 (1981).
- 13) **渡辺慶一・中根一穂**: 直接法と間接法, 酵素抗体法(渡辺・中根編), 改訂版, 14-17頁, 学際企画, 東京, 1985.
- 14) **Straus, W.**: Inhibition of peroxidase by methanol and methanol-nitroferricyanide for use in immunoperoxidase procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 19, 682-688 (1971).
- 15) **堤 寛**: ABC法, 酵素抗体法(渡辺・中根編), 改訂版, 106-113頁, 学際企画, 東京, 1985.
- 16) **Graham, R. C. Jr. & Karnovsky, M. J.**: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14, 291-302 (1966).
- 17) **川生 明**: 図説蛍光抗体法, 初版, 43-58頁, ソフトサイエンス社, 東京, 1983.
- 18) **和泉伸一・渡辺慶一**: 抗原抗体反応の妥当性を確かめるための対照試験の行い方, 酵素抗体法(渡辺・中根編), 改訂版, 59-64頁, 学際企画, 東京, 1985.
- 19) **Heyderman, E.**: Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. *J. Clin. Pathol.*, 32, 971-978 (1979).
- 20) **川生 明**: 免疫組織化学の基礎, 組織細胞化学1985(日本組織細胞化学会編), 139-157頁, 学際企画, 東京, 1985.
- 21) **Sternberger, L. A., Hardy, P. H. Jr., Cuculis, J. J. & Meyer, H. G.**: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody

- complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 315-333 (1970).
- 22) **Falini, B., Tabilio, A., Zuccaccia, M. & Martelli, M. F.**: Protein A-peroxidase conjugates for two-stage immunoenzyme staining of intracellular antigens in paraffin-embedded tissues. *J. Immunol. Methods*, 39, 111-120 (1980).
- 23) **Roth, J., Bendayan, M. & Orci, L.**: Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. *J. Histochem. Cytochem.*, 26, 1074-1081 (1978).
- 24) **Guesdon, J. -L., Ternynck, T. & Avrameas, S.**: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, 27, 1131-1139 (1979).
- 25) **川生 明**: 図説蛍光抗体法, 初版, 179-180頁, ソフトサイエンス社, 東京, 1983.
- 26) **Heggeness, M. H. & Ash, J. F.**: Use of the avidin-biotin complex for the localization of actin and myosin with fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.*, 73, 783-788 (1977).
- 27) **Hsu, S. -M., Raine, L. & Fanger, H.**: A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.*, 75, 734-738 (1981).
- 28) **Pedal, I. und Baedeker, Ch.**: Immunenzymatische Darstellung der Isoantigene A, B und H in fäulnisverändertem Nierengewebe. *Z. Rechtsmed.*, 94, 9-20 (1985).
- 29) **Hirohashi, S., Shimosato, Y., Ino, Y., Tome, Y., Watanabe, M., Hirota, T. & Itabashi, M.**: Distribution of blood group antigens and CA19-9 in gastric cancers and non-neoplastic gastric mucosa. *Gann*, 75, 540-547 (1984).
- 30) **Ernst, C., Thurin, J., Atkinson, B., Wurzel, H., Herlyn, M., Stromberg, N., Civin, C. & Koprowski, H.**: Monoclonal antibody localization of A and B isoantigens in normal and malignant fixed human tissues. *Am. J. Pathol.*, 117, 451-461 (1984).
- 31) **Ernst, C., Atkinson, B., Wysocka, M., Blaszczyk, M., Herlyn, M., Sears, H., Steplewski, Z. & Koprowski, H.**: Monoclonal antibody localization of Lewis antigens in fixed tissue. *Lab.*

- Invest., 50, 394-400 (1984).
- 32) **Curran, R. C. & Gregory, J.**: Demonstration of immunoglobulin in cryostat and paraffin sections of human tonsil by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. Effects of processing on immunohistochemical performance of tissues and on the use of proteolytic enzymes to unmask antigens in sections. *J. Clin. Pathol.*, 31, 974-983 (1978).
- 33) **Hall, J. G., Birbeck, M. S. C., Robertson, D., Peppard, J. & Orlans, E.**: The use of detergents and immunoperoxidase reagents for the ultrastructural demonstration of internal immunoglobulin in lymph cells. *J. Immunol. Methods*, 19, 351-359 (1978).
- 34) **Busachi, C. A., Ray, M. B. & Desmet, V. J.**: An immunoperoxidase technique for demonstrating membrane localized HBsAg in paraffin sections of liver biopsies. *J. Immunol. Methods*, 19, 95-99 (1978).
- 35) **Lemieux, R. U., Baker, D. A., Weinstein, W. M. & Switzer, C. M.**: Artificial antigens. Antibody preparations for the localization of Lewis determinants in tissues. *Biochemistry*, 20, 199-205 (1981).
- 36) **岸絨一郎**: 分泌型と非分泌型, ルイス (Lewis) 式血液型, 現代の法医学 (四方一郎・永野耐造編), 初版, 254-255 頁, 金原出版, 東京, 1983.
- 37) **Bariéty, J., Oriol, J., Hinglais, N., Zanetti, M., Bretton, R., Dalix, A. -M. & Mandet, C.**: Distribution of blood group antigen A in normal and pathologic human kidneys. *Kidney Int.*, 17, 820-826 (1980).
- 38) **藤田尚男・藤田恒夫**: 標準組織学各論, 第2版, 100-136 頁, 167-202 頁, 医学書院, 東京, 1984.
- 39) **Watkins, W. M. & Morgan, W. T. J.**: Possible genetical pathways for the biosynthesis of blood group mucopolysaccharides. *Vox. Sang.*, 4, 97-119 (1959).
- 40) **石山是夫**: 抗原の局在性について. *日法医誌*, 36, 70-84 (1982).
- 41) **渡辺清博・箱守仙一郎**: 血液型と免疫, 免疫化学 (大沢利昭編), 初版, 211-229 頁, 南江堂, 東京, 1983.
- 42) **Sneath, J. S. & Sneath, P. H. A.**: Transformation of the Lewis groups of human red cells. *Nature*, 176, 172 (1955).
- 43) **Marcus, D. M. & Cass, L. E.**: Glycosphingolipids with Lewis blood group activity: uptake by human erythrocytes. *Science*, 164, 553-555 (1969).
- 44) **Oriol, R., LePendu, J., Sparkes, R.S., Sparkes, M. C., Crist, M., Gale, R. P., Terasaki, P. I. & Bernoco, M.**: Insights into the expression of ABH and Lewis antigens through human bone marrow transplantation. *Am. J. Hum. Genet.*, 33, 551-560 (1981).
- 45) **前田 均**: 赤血球膜構造と血液型抗原, 現代の法医学 (四方・永野編), 初版, 248-250 頁, 金原出版, 東京, 1983.
- 46) **McManus, J. F. A.**: Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.*, 23, 99-108 (1948).
- 47) **Goldman, H. & Ming, S. -C.**: Mucins in normal and neoplastic gastrointestinal epithelium. Histochemical distribution. *Arch. Pathol.*, 85, 580-586 (1968).
- 48) **Rambourg, A., Hernandez, W. & Leblond, C. P.**: Detection of complex carbohydrates in the Golgi apparatus of rat cells. *J. Cell Biol.*, 40, 395-414 (1969).
- 49) **藤田尚男・藤田恒夫**: 標準組織学各論, 第2版, 174-175 頁, 医学書院, 東京, 1984.
- 50) **藤田尚男・藤田恒夫**: 標準組織学総論, 第2版, 41-47 頁, 医学書院, 東京, 1981.
- 51) **Leblond, C. P. & Bennett, G.**: Biogenesis of glycoproteins as shown by radioautography. *J. Histochem. Cytochem.*, 27, 1185-1187 (1979).
- 52) **Dunphy, W. G., Brands, R. & Rothman, J. E.**: Attachment of terminal n-acetylglucosamine to asparagine-linked oligosaccharides occurs in central cisternae of the Golgi stack. *Cell*, 40, 463-472 (1985).
- 53) **藤田尚男・片岡勝子**: 胃の外分泌細胞. *細胞*, 5, 13-28 (1973).
- 54) **Ito, M., Tanaka, K., Saito, S., Aoyagi, T. & Hirano, H.**: Lectin-binding pattern in normal human gastric mucosa. A light and electron microscopic study. *Histochemistry*, 83, 189-193 (1985).
- 55) **菱田 繁**: 腐敗, 現代の法医学 (四方・永野編), 初版, 19-22 頁, 金原出版, 東京, 1983.
- 56) **Hinglais, N., Bretton, R., Rouchon, M., Oriol, R. & Bariéty, J.**: Ultrastructural localization of blood group A antigen in normal human kidneys. *J. Ultrastruct. Res.*, 74, 34-45 (1981).
- 57) **大島 徹**: 顕微鏡下における血液型判定に関する

る研究。II. 単繊維レベルでの血痕からの人血証明と血液型判定。十全医会誌, 95, 印刷中。

58) 大島 徹: 顕微鏡下における血液型判定に関する研究。III. 胃の腸上皮化生部と消化管癌部における血液型活性。十全医会誌, 95, 印刷中。

Legends for figures

- Fig. 1. B-activity in the cerebrum of the donor of AB, Le (a+b-) group. Only the endothelium and red blood cells (RBC) are stained (arrow). The neuron, glial cells and nerve fibers are negative. A-activity is also positive. Immunostaining by ABC method. Hematoxylin counter stain (CT-H). ($\times 100$)
- Fig. 2. A-activity in the lung of A, Le (a-b+). The activity is positive in the cytoplasm of alveolar cells and is found as small brown-stained granules in the perinuclear region (arrow). Methylgreen counter stain (CT-MG). ($\times 400$)
- Fig. 3. Weak O (H)-activity detected by FITC-labeled UEA-I lectin in the alveolar cell of A, Le (a-b+). B-excitation. ($\times 200$)
- Fig. 4. A-activity in the liver of A, Le (a-b+). The sinusoidal endothelium, Kupffer's stellate cell and endothelium of vessels are positive. The liver cells and epithelium of the interlobular bile duct (arrows) are negative. CT-MG. ($\times 200$)
- Fig. 5. A-activity in the kidney of A, Le (a-b+). The activity is shown in the distal convolution of urinary tubule (arrow), endothelium and RBC. Any activity is not found in the mesangial region of glomerulus. CT-MG. ($\times 200$)
- Fig. 6. A-activity in the inner surface of the epithelium of collecting tubule of A, Le (a-b+). The activity is noticed as brown reaction products in the supranuclear region and is weakly shown in the basement membrane (arrows). CT-MG. ($\times 400$)
- Fig. 7. A-activity in the pancreas of A, Le (a-b+). The supra- and peri-nuclear regions in acinar cells are stained as brown granules or rods. CT-MG. ($\times 400$)
- Fig. 8. The acinar cells in some lobules (upper and lower right) are almost totally negative in A-activity even in the same specimen as Fig.7 (arrows). CT-MG. ($\times 100$)
- Fig. 9. O (H)-activity in the esophageal mucosa of O, Le (a-b+). The activity is located in the intercellular space except for the basal layer. CT-H. ($\times 100$)
- Fig. 10. A-activity in the mucosa of gastric body of A, Le (a-b+). The surface mucous cells and mucous neck cells are stained. CT-H. ($\times 100$)
- Fig. 11. A-activity in the gastric fundic gland. The activity is apparently demonstrated as brown granules or rods in the perinuclear region of the parietal cell (arrows). The chief cells are negative. CT-H. ($\times 400$)
- Fig. 12. Negative finding of B-activity in the surface mucous cells of stomach of B, Le (a+b-). The activity is positive both in the endothelium and RBC. CT-H. ($\times 100$)
- Fig. 13. Negative finding of A-activity in the mucosa of the rectum of group AB. B-activity was also negative. The endothelium and RBC are markedly stained. CT-H. ($\times 100$)
- Fig. 14. Lewis-activities in the liver of O, Le (a-b+). Le^b-activity is positive in the epithelium of interlobular bile ducts (arrows). Le^a-activity was found as well. Any Lewis-activity is not shown in the endothelium and RBC. CT-H. ($\times 100$)
- Fig. 15. Lewis-activities in the kidney of A, Le (a-b+). Le^a-activity is shown in the epithelium of collecting tubule. The activity was also positive in the proximal convolution of urinary tubule and the epithelium of renal pelvis. Le^b-activity was found only in the epithelium of renal pelvis. CT-MG. ($\times 100$)
- Fig. 16. Lewis-activities in the pancreas of A, Le (a-b+). Le^a-activity is shown in the acinar cells and intercellular secretory canaliculi. CT-MG. ($\times 400$)
- Fig. 17. Le^b-activity demonstrated in the acinar cells in some lobules. Those acinar cells are negative in A-activity as shown in Fig. 8. Le^b-activity is revealed as brown granules or rods in the supra- and peri-nuclear regions (arrows). CT-MG. ($\times 100$)
- Fig. 18. Le^b-activity in the mucous cells, serous cells and secretory duct of the submandibular gland of A, Le (a-b+). CT-H. ($\times 100$)
- Fig. 19. Le^b-activity in the gastric mucosa of O, Le (a-b+). The activity is noticed in the surface

mucous cells and mucous neck cells. CT-H. ($\times 200$)

Fig. 20. Negative finding of Le^a -activity in the surface mucous cells of stomach of O, Le(a-b+). CT-H. ($\times 100$)

Fig. 21. Lewis-activities in the mucosa of cecum of B, Le(a-b+). Le^b -activity is widely distributed in many goblet cells. CT-H. ($\times 100$)

Fig. 22. Le^a -activity in the mucosa of transverse colon of A, Le(a-b+). CT-H. ($\times 100$)

Studies on Microscopic Blood Grouping I. Blood Grouping by Detection of ABO (H) - and Lewis-Activities in Human Tissues and Cells Tohru Ohshima, Department of Legal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. J. J. Med. Soc., 94, 1169 - 1183 (1985)

Key words: forensic serology, blood grouping, ABO blood-group system, Lewis blood-group system, immunohistochemistry

Abstract

In order to establish a reliable method for microscopic blood grouping from very small tissue specimens, the distribution of ABO(H)- and Lewis-activities in human intact tissues obtained by autopsy or surgical resection was immunohistochemically investigated by the immuno-enzyme or -fluorescence method with commercial mouse monoclonal antibodies and labeled ulex europaeus agglutinin-I lectin. Especially, the avidin-biotin-peroxidase complex method was suitable for demonstrating the intracellular localization of the activities. As for ABO(H)- activities of donors whose red cell phenotype was Le(a-b+), the same ABO(H)- activities as donors were found in the lung (alveolar and bronchial epithelia, bronchial gland), the liver (sinusoidal endothelium, Kupfer's stellate cell, large intrahepatic bile duct), the kidney (distal convolution, collecting tubule, epithelium of renal pelvis), the pancreas (acinar cell), the submandibular gland (mucous and serous glands, secretory duct) and the gastrointestinal mucosa except for the distal colon (descending colon to rectum). The submandibular mucous gland and small intestinal mucosa of Le(a+b-) showed the same ABO(H)- activities as donors. The endothelium and red blood cells (RBC) always revealed the same activities as donors. As for Lewis-activities, Le^a -activity was positive, irrespective of donors' types, in the lung (alveolar and bronchial epithelia), the kidney (proximal convolution, collecting tubule, renal pelvis) and the pancreas (acinar cell, epithelium of small or moderately large secretory duct). Le^b -activity was found in the bronchial epithelium, renal pelvis and pancreatic acinar cells in Le(a-b+), and in the epithelium of pancreatic large duct irrespective of Lewis phenotypes. The epithelium of intrahepatic bile duct in Le(a-b+) possessed both Le^a - and Le^b -activities, while it hardly revealed Le^b -activity in Le(a+b-). In the submandibular mucous gland, Le^b was mainly distributed in Le(a-b+) and both activities were detected in Le(a+b-). Esophageal and gastric mucosae of Le(a-b+) were positive in Le^b -activity and almost negative in Le^a . The gastric mucosa of Le(a+b-) and the small intestinal mucosa showed both activities. In the proximal colon, either Le^a or Le^b was found or both activities were positive in different locations, although Le^a tended to be mainly distributed in the distal colon. The endothelium and RBC did not possess any Lewis-activity. The central nervous system, heart muscle, spleen, thyroid and adrenal gland were negative in ABO(H)- and Lewis-activities. Therefore, it can be said that the immunohistochemical technique used in this study is available for microscopic ABO- and Lewis-grouping from very small human tissues.



