



Title	赤血球表面糖鎖の改変による血液凝集度の比較検討
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2025
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/101268
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	つるた かずは 鶴田 一葉	学部 学科	理学部化学科	学年	2年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	樺山一哉	所属	放射線科学基盤機構		
研究課題名	赤血球表面糖鎖の改変による血液凝集度の比較検討				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

【研究目的】

30種類以上発見されている血液型のうち、免疫系に最も大きな影響を与えるとされているのがABO式血液型である。ABO式血液型を用いることで血液は、A型、B型、AB型、O型の4種類に大別される。

ABO式血液型における型の違いは赤血球表面上の糖鎖構造によって決定される。特に糖鎖構造の違いのみに着目すると、A型、B型はそれぞれO型赤血球が持つ糖鎖構造に、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)とガラクトース(Gal)を付加した構造をとる。

ここに糖鎖を切断できる酵素を作用させることでB型赤血球をO型赤血球に変換できると考え、3年前SEEDSプログラムを通じて同研究室にて研究を行った。しかし、実験の手法が確立できず、正しい評価を行うことができなかった。

そこで私は、この実験の手法を確立し、B型赤血球からO型赤血球へ変換することを目的とする。また、同様の手法をA型赤血球にも適応することによって、O型赤血球への変換を行う。この研究を遂行することにより赤血球の血液型変換が可能になれば、血液型不適合問題の解決に寄与することができる。

【研究計画】

上記の研究目的を達成するために、以下の研究計画を実行した。糖鎖の変換は対応する抗血液型糖鎖抗体を用いた赤血球凝集反応(Hemagglutination)を基準に評価した。

Hemagglutinationは赤血球と結合する能力がある物質と赤血球との反応を評価する手法である。

1. 赤血球と抗体の凝集反応の確認
2. α -N-Acetylgalactosaminidase (NAGase)添加ヒトA型赤血球の評価
3. α -Galactosidase A (Gase)添加ヒトB型赤血球の評価

【研究方法】

以下では市販の赤血球を使用した。

- 1) 赤血球に抗体を反応させたときの凝集を確認する。プロトコルは市販の抗体溶液に記載されている使用方法に基づいて決定した。
- 2) A型赤血球にNAGaseを添加する。その後抗A抗体を用いたHemagglutinationの評価でO型赤血球への変換を確認する。A型赤血球は抗A抗体と反応し、凝集する。一方O型赤血球は抗A抗体と反応せず、凝集はおこらない。
- 3) B型赤血球にGaseを添加する。1と同様に抗B抗体を用いたHemagglutinationの評価でO型赤血球への変換を確認する。

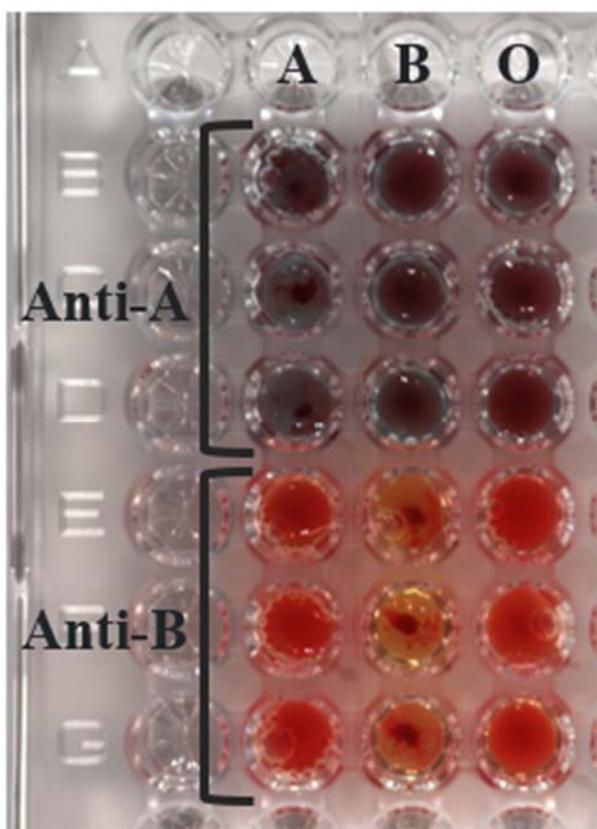
【研究結果】

2. 赤血球と抗体の凝集反応の確認

A型、B型、O型の4%赤血球浮遊液に対して、抗A抗体と抗B抗体をそれぞれ添加した。

A型赤血球は抗A抗体と、B型赤血球は抗B抗体とそれぞれ反応し赤血球凝集体を形成する。一方でO型赤血球は抗A抗体と抗B抗体のどちらとも反応せず、赤血球凝集体を形成しない。

以降の実験ではこの凝集体の有無を評価に用いるため、まず抗体と赤血球のみの反応を確認した。(図1) V底のマイクロプレートを使用したため、凝集体は底に沈んだ赤黒い点として観察できる。



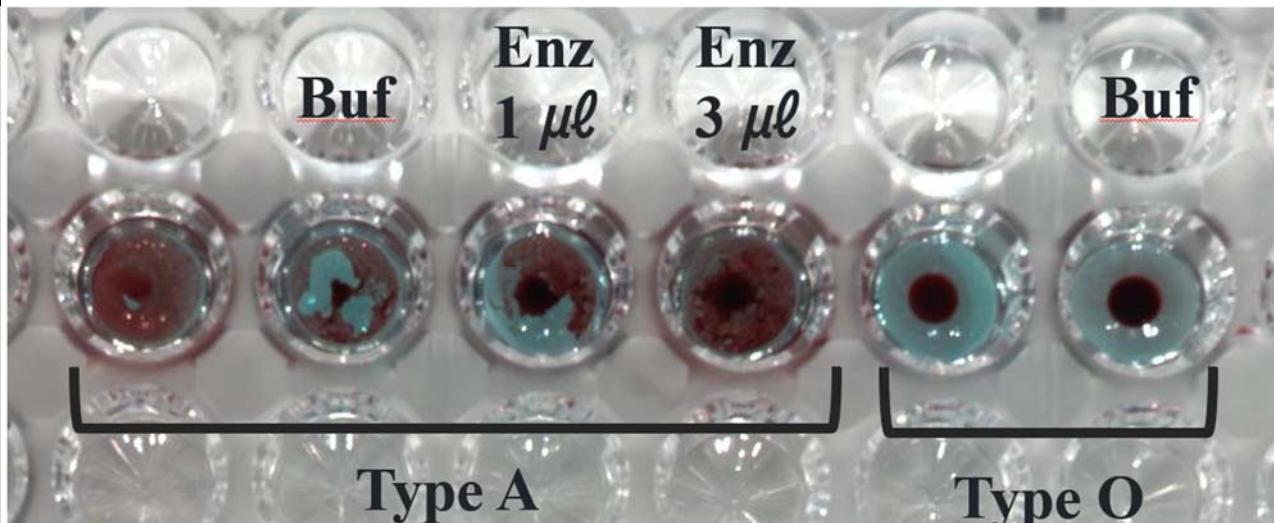
(図1) 赤血球と抗体の凝集反応

図1より、抗A抗体を添加したものではA型赤血球のみが凝集体を形成していることが確認できる。また、抗B抗体を添加したものではB型赤血球のみが凝集体を形成していた。このことから、実験で使用した赤血球浮遊液と抗体試薬は正常に反応したといえる。

2. NAGase 添加ヒト A 型赤血球の評価

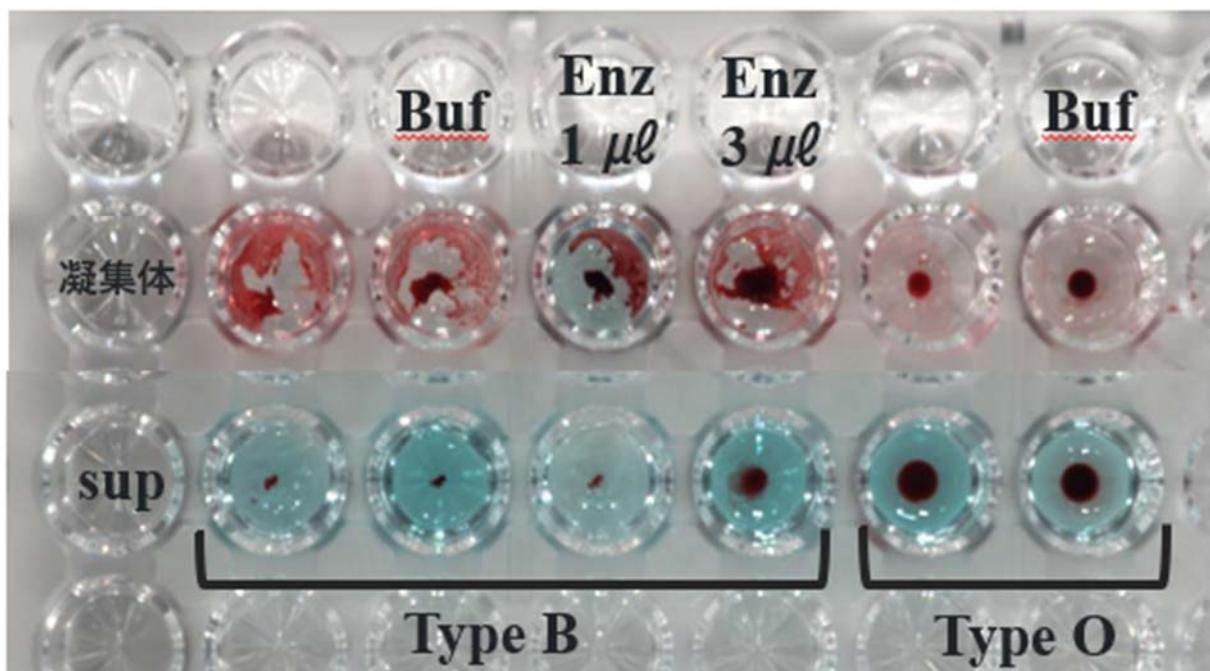
4%B 型赤血球浮遊液に NAGase を添加し、Hemagglutination を用いて O 型赤血球への変換を評価した。(図2) 今回の実験では A 型赤血球と反応し凝集する抗 A 抗体を用いた。

A 型赤血球に添加した NAGase によって A 型赤血球が O 型赤血球に変換されていたならば抗 A 抗体は凝集反応を引き起こさない。これより、凝集反応に基づいて血液型変換の有無を評価できる。



(図2) Hemagglutination の結果 (A 型赤血球)

A 型赤血球に NAGase を加えたものでは、ピペッティングで溶解しない成分 (凝集体) と溶解する赤血球成分の両方が確認された。両者を判別するのが困難であったため、上清のみを取り出した。(図3)



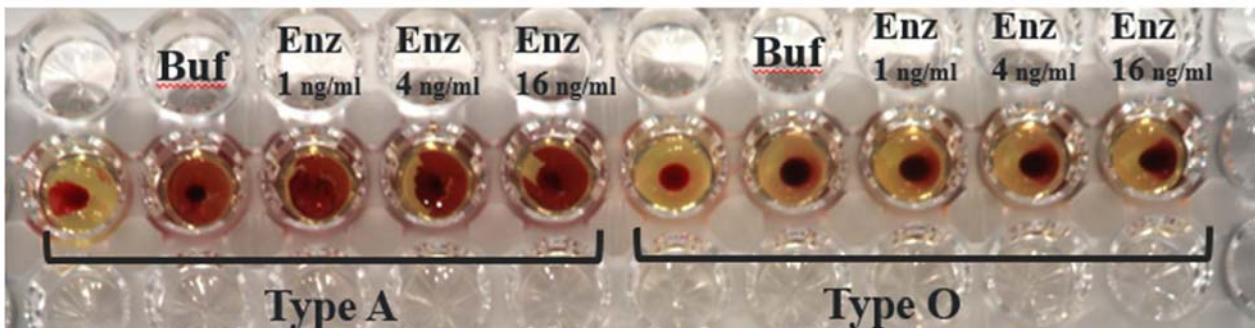
(図3) 上清のみを抽出した結果 (A 型赤血球)

上清のみを取り出した下段に注目すると、A 型赤血球に添加した Gase の量が増加するに従い上清内の赤血球量が増加していることが分かる。この赤血球は抗 A 抗体と凝集反応を起こさなかったことから、NAGase による糖鎖切断が行われたと言える。

3. Gase 添加ヒト B 型赤血球の評価

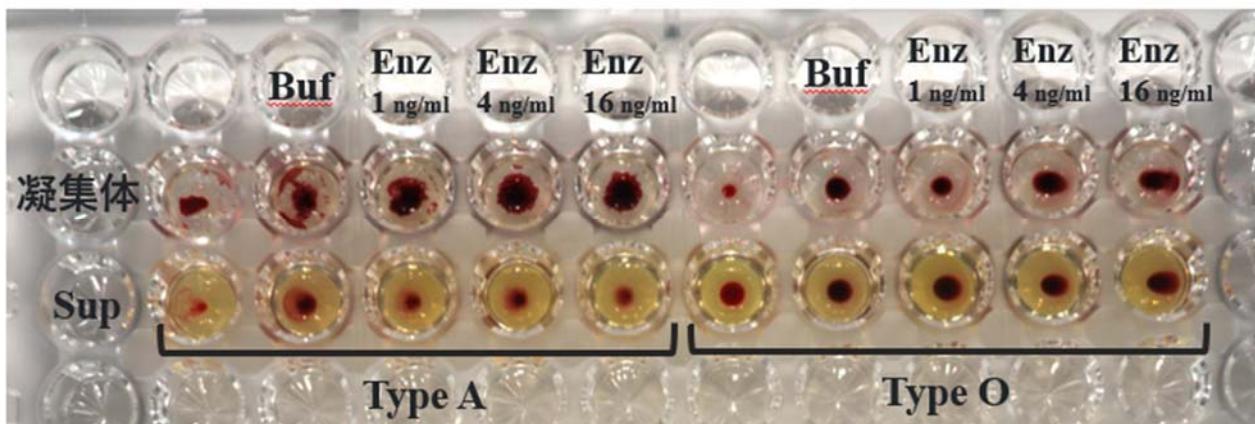
4%A 型赤血球浮遊液に Gase を添加し、Hemagglutination を用いて 0 型赤血球への変換を評価した。(図4) 凝集反応は B 型赤血球と反応する抗 B 抗体を用いて確認した。

B 型赤血球は抗 B 抗体と反応し凝集するが、Gase によって B 型赤血球が 0 型赤血球に変換されていたならば抗 B 抗体は凝集反応を引き起こさない。これより、2 と同様に凝集反応に基づいて血液型変換の有無を評価できる。



(図4) Hemagglutination の結果 (B 型赤血球)

B 型赤血球に Gase を加えたものでは、ピペッティングで溶解しない成分 (凝集体) と溶解する赤血球成分の両方が確認された。両者を判別するのが困難であったため、上清のみを取り出した。(図5)



(図5) 上清のみを抽出した結果 (B 型赤血球)

上清のみを取り出した下段に注目すると、Gase 添加量の違いによる上清内の赤血球量変化はごく僅かであった。この原因として、Gase による糖鎖切断が十分でなかった可能性が考えられる。

【今後の展望】

今回の研究にて、A 型赤血球、B 型赤血球を酵素を用いて 0 型赤血球に変換する系を確立できた。

今後は市販の赤血球ではなく、採血した血液から抽出した赤血球を対象に酵素反応を行う。

また、酵素処理を行った赤血球の糖鎖を質量分析で解析し、血液型糖鎖の変換効率を計測する。