

原 著

ゴーヤ種子抽出抗Hレクチンの臨床検査への応用

安藝健作^{1,4)}, 相原美奈子²⁾, 森内貴子²⁾, 森美和³⁾, 細井英司⁴⁾

¹⁾徳島大学保健科学教育部医用検査学領域, ²⁾国立病院機構京都医療センター臨床検査科, ³⁾国立循環器病研究センター研究所生化学部, ⁴⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部医用検査学講座細胞・免疫解析学分野

(平成23年11月17日受付) (平成23年11月27日受理)

植物の種子抽出液から多くの植物性血球凝集素(レクチン)が見出され, 特に血液型特異性のあるレクチンが輸血検査に利用されている。なかでも *Ulex europaeus* (ハリエニシダ) 種子抽出液は ABO 血液型抗原の H 抗原の L-fucose に親和性が強く, 特に O 型血球を特異的に凝集させる抗 H 活性を持つ。従来, このレクチンは検査室において調製・使用されていたが, 原材料の種子入手が困難となり, 高価な市販品の購入でしか入手できなくなった。しかし, 近年ゴーヤ種子の抽出液が高い抗 H 活性を示すことが明らかにされ, 試薬として用いられるようになった(製品としては高価である)。そこで今回, 輸血検査の現場で調製しやすくするため, ゴーヤ種子からの抗 H レクチン調製法を検討した。

その結果, ゴーヤ種子から簡単に抗 H レクチンを調製することが可能となり, さらに長期保存や温度による安定性, 抗 H レクチンとしての有用性を確認できた。今後, 臨床検査の現場での利用が期待される。

はじめに

1888年 Peter Hermann Stillmark がヒマの実の抽出液が赤血球を凝集するという現象を報告して以来¹⁾, 主にマメ科植物の種子抽出液中から多くの植物性血球凝集素が見出された。その後, これらの凝集素が糖を特異的に認識・結合する性質からボストン大学の William Clouser Boyd らが「レクチン」と提唱した^{2,3)}。レクチンは単糖やオリゴ糖に対する結合特異性, 生理活性や赤血球凝集における血液型特異性あるいは非特異性により分類され, ささまざまな生物学的イベントに関与している^{4,5)}。特に, 血液型特異性のあるレクチンは, 輸血検査における ABO 血液型の亜型検査において重要であり, もっとも使用さ

れているレクチンに *Dolichos biflorus* (ヒマラヤフジマメ) 種子抽出 *Dolichos* レクチンと *Ulex europaeus* (ハリエニシダ) 種子抽出 *Ulex* レクチンがある。*Dolichos* レクチンは A 型抗原決定基である GalNAc に親和性が強い代表的な抗 A₁レクチンであり, A₁血球を特異的に凝集させるため A 型あるいは AB 型の亜型の区別に有用である。一方, *Ulex* レクチンは ABO 血液型抗原の共通抗原である H 抗原の L-fucose に親和性が強く, 特に O 型血球を特異的に凝集させる抗 H レクチンとして ABO 血液型の亜型の検査に重要である^{6,7)}。従来, これらのレクチンは日常の輸血検査では必要不可欠な試薬であり, 検査室において各種子から調製し, 使用していた施設が多かったが, 近年原材料である種子の入手が困難となり, 市販品としてのレクチン購入でしか入手できなくなった。またこれらの試薬は極めて高価なわりに, 各レクチン力価は低く, コストパフォーマンスは良くない。しかし, 最近 *Momordica charantias* (ゴーヤ) 種子抽出液が従来の *Ulex europaeus* 由来の抗 H レクチンより, 極めて高い抗 H 活性を持つことが明らかにされ, 輸血検査用試薬として実用化されているが, 製品としては高価である。

そこで今回, 各施設の輸血検査の臨床現場で実際に調製可能となるように, 比較的簡単で安価に入手可能であるゴーヤ種子からの簡単な抗 H レクチン調製法についての手順をまとめ, さらに調製した抗 H レクチンの ABO 血液型の各型の血球に対する凝集活性と特異性, 熱・長期保存による安定性と検査での有用性を検討したので報告する。

材料および方法

1. 材料

ゴーヤ種子 (完熟) (図1)



図1 ゴーヤ種子 (完熟)

方 法

1. ゴーヤ種子からの抗Hレクチンの分離および凝集活性の測定

1) ゴーヤ種子からの抗Hレクチンの分離：完熟したゴーヤから種子を取り出し、一晩乾燥させた。種子10gをコーヒーミルで粉碎し、pH 7.2のPBSを20~30ml加え、乳鉢で泥状になるまですり潰した。懸濁液をチューブに移し、全量が100mlになるようにPBSを加えた。懸濁後、しばらく放置してレクチン成分を抽出し、3,000rpmで30分遠心分離して上清を回収し、これを「ゴーヤレクチン原液」とした。

2) ゴーヤレクチン原液をPBSで2ⁿ倍希釈し、各試験管内の希釈液100μlに対して、A, B, O, AB型の2%生食浮遊血球50μl加え混合後、3,400rpmで15秒遠心後、ゆっくりと試験管を振って血球を再浮遊させ、肉眼で凝集の有無と最終凝集価を判定した。なお、W+の凝集を示した最高希釈倍数を最終凝集価とした。また、血球に対する凝集反応の判定基準は、Marsh WL⁸⁾の基準を用いた。

3) ゴーヤレクチン原液をPBSで2ⁿ倍希釈し、各希釈液2滴と5%A, B, O, AB型生食浮遊血球1滴あ

るいはAおよびAB型の亜型であるA₂型とcisA₂B₃型の5%生食浮遊血球1滴をスライドの上で反応させ凝集の強さを観察した。なお、スライド法による判定基準は、試験管法の基準に準じた。

2. エタノール沈殿によるゴーヤレクチンの精製および凝集活性の測定

1) ゴーヤレクチンの精製^{9,10)}：ゴーヤレクチン原液とエタノールを1：2の割合で混ぜ合わせ、4℃で一晩インキュベートし、不純物を取り除いた。その後、エタノール層を除去し、3,000rpmで30分間遠心分離し、沈殿物を回収した。この沈殿物を室温で乾燥させたものを「精製ゴーヤレクチン粉末」とした。なお、本検討では、使用時にPBSで2.23%に調整し、3,000rpmで30分間遠心分離して得た上清を「精製ゴーヤレクチン原液」とした。

2) 精製ゴーヤレクチンをPBSで2ⁿ倍希釈し、各試験管内の希釈液100μlに対してA, B, O, AB型の2%生食浮遊血球50μl加え混合後、3,400rpmで15秒遠心し、ゆっくりと試験管を振って血球を再浮遊させ、肉眼で凝集の有無と最終凝集価を判定した。

3) ゴーヤレクチンと精製ゴーヤレクチンの反応性の比較：ゴーヤレクチンと精製ゴーヤレクチンをPBSで2ⁿ倍希釈し、各試験管内の希釈液100μlに対して2%O型生食浮遊血球50μlとの反応を比較する。なお、対照はPBS100μlと2%O型生食浮遊血球50μlによる陰性対照とした。

3. 熱・長期保存による安定性

1) 温度および加温時間：ゴーヤレクチンおよび精製ゴーヤレクチンを室温、37℃、50℃で、30分あるいは20時間保存した後、2%O型生食浮遊血球を用いて試験管法にて最終凝集素価の比較を行った。

2) 冷蔵・冷凍にて保存したゴーヤレクチンおよび精製ゴーヤレクチン(原液)の力価を1ヵ月毎に測定し、前者は12ヵ月間、後者は6ヵ月間観察した。なお、力価測定は各ゴーヤレクチンをPBSにて2ⁿ倍希釈し、各試験管内の希釈液100μlに対して2%O型生食浮遊血球50μlと反応させ、試験管法にて判定した。

結 果

1. ゴーヤ種子からの抗Hレクチン凝集活性の測定

試験管法にてゴーヤレクチンとA, B, O, AB型の各血球を反応させるとすべての血球で凝集が認められ、最終凝集素価はA型血球に対して1:2048, B型血球に対して1:2048, O型血球に対して1:8192で、AB型血球に対して1:512であった(表1)。この結果より、試験管法におけるゴーヤレクチンの抗Hレクチン活性としての至適希釈率を1:256~512と決定した。また、スライド法による判定では、ゴーヤレクチンの32~256倍希釈における2分および5分間反応後の結果からゴーヤレクチンの抗Hレクチンとしての至適希釈率は1:64, 反応時間を5分とした(表2)。なお、64倍希釈ゴーヤレクチンとA, B, O, AB型の各血球あるいはAおよびAB型の亜型であるA₂型とcisA₂B₃型の各血球のスライド法による結果を図2, 図3に示した。O型血球で特に反応性が強く、各亜型血球では凝集反応の増加を認めた。

表1 ゴーヤレクチンの各血液型との反応性(試験管法)

血液型 \ 希釈倍数	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192
A	3+	3+	3+	2+	2+	1+	w+	0	0
B	4+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	0	0
O	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	w+
AB	3+	3+	2+	1+	w+	0	0	0	0

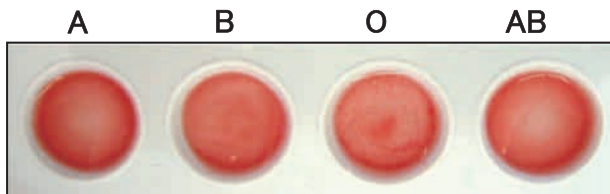
W+ (最終凝集価)

表2 ゴーヤレクチンの各血液型との反応性(スライド法)

血液型 \ 希釈倍数	1:32		1:64		1:128		1:256	
	2	5	2	5	2	5	2	5
A	w+	w+	0	w+	0	0	0	0
B	2+	2+	w+	1+	w+	w+	0	0
O	3+	3+	1+	2+	w+	w+	0	0
AB	w+	w+	0	w+	0	0	0	0

W+ (最終凝集価)

反応時間:2分

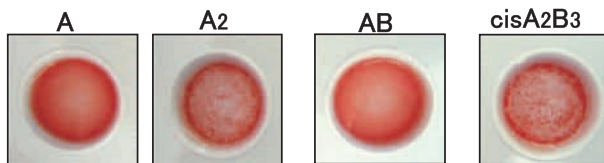


反応時間:5分



図2 各血液型赤血球とゴーヤレクチンとの反応(スライド法) 上段が2分判定, 下段が5分後判定の結果。ゴーヤレクチンは64倍希釈, 各血球は5%生食浮遊血球(A, B, O, AB型各型)を使用。

反応時間:2分



反応時間:5分

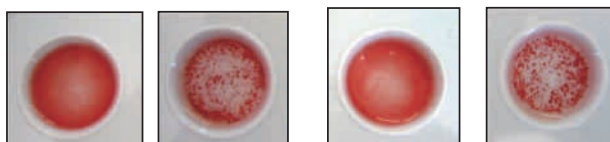


図3 AおよびAB血液型の亜型赤血球とゴーヤレクチンとの反応(スライド法) 上段が2分判定, 下段が5分後判定の結果。ゴーヤレクチンは64倍希釈, 血球は5%生食浮遊血球(A, AB, A₂, cisA₂B₃型各型)を使用。A₂はA型の亜型, cisA₂B₃はAB型の亜型である。

2. エタノール沈殿法によるゴーヤレクチンの精製と凝集活性の測定

精製したゴーヤレクチンを用いた場合の試験管法による最終凝集素価はA型血球に対して1:64, B型血球に対して1:128, O型血球に対して1:512となり, AB型血球では凝集が認められなかった(表3)。また, ゴーヤレクチンを用いた場合, 1管目から4管目までは溶血が認められ判定を行うことができなかった。一方, ゴーヤレクチンをエタノール沈殿法によって精製した精製ゴーヤレクチンでは, 1管目から溶血せず強い凝集が

表3 精製ゴーヤレクチンの各血液型との反応性 (試験管法)

血液型 \ 希釈倍数	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192
A	1+	w+	0	0	0	0	0	0	0
B	1+	1+	w+	0	0	0	0	0	0
O	4+	3+	2+	1+	w+	0	0	0	0
AB	0	0	0	0	0	0	0	0	0

W+ (最終凝集価)

認められ判定が可能であった。また、ゴーヤレクチンでは A, B, O, AB 型血球で全体的に強く反応したが、高希釈することにより O 型血球に特異的に反応させることが可能となった。さらに、精製することによって、特に O 型血球に強い反応性を示すようになり、抗 H レクチンとしての特異性が向上した (図4)。この結果から、精製ゴーヤレクチンの抗 H レクチンとしての至適希釈率を 1:32~64 とした。

3. 熱・長期保存による特異性への影響

温度によるレクチンの影響では、ゴーヤレクチンと精製ゴーヤレクチンともに加温30分間では50℃で反応性が若干落ちたが、室温・37℃では変化が認められなかった。

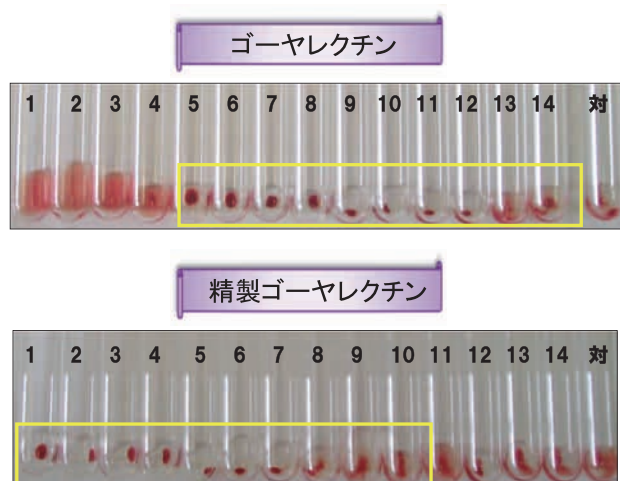


図4 ゴーヤレクチンと精製ゴーヤレクチンの比較
ゴーヤレクチンは5~14管まで、精製ゴーヤレクチンは1~10管まで凝集。ゴーヤレクチンおよび精製ゴーヤレクチンはPBSで2nd倍希釈したもの、血球は2%O型生食浮遊血球を使用。対：陰性対照

しかし、50℃で20時間加温すると、両レクチンともに反応が認められなくなった (表4)。

ゴーヤレクチンの長期保存による安定性の比較では、ゴーヤレクチンの場合、4℃と-20℃保存で、原液では4ヵ月目で1管力価が落ちたが、その後8ヵ月間、力価に変化は認められなかった。一方、精製ゴーヤレクチンを用いた場合、4℃および-20℃保存ともに、1ヵ月目で2管力価が落ちたが、その後5ヵ月間、力価に変化はなかった (表5)。

表4 ゴーヤレクチンおよび精製ゴーヤレクチン (原液) の温度による影響

試験管法	保存条件	最終凝集価	
		加温時間30分間	加温時間20時間
ゴーヤレクチン	室温	1:8192 (w+)	1:8192 (w+)
	37℃	1:8192 (w+)	1:8192 (w+)
	50℃	1:4096 (w+)	凝集(-)

試験管法	保存条件	最終凝集価	
		加温時間30分間	加温時間20時間
精製ゴーヤレクチン	室温	1:512 (w+)	1:512 (w+)
	37℃	1:512 (w+)	1:512 (w+)
	50℃	1:256 (w+)	凝集(-)

W+ (最終凝集価)

表5 ゴーヤレクチンおよび精製ゴーヤレクチン (原液) の長期安定性

試験管法	保存温度	最終凝集価		
		作製時	4ヶ月後	12ヶ月後
ゴーヤレクチン	4℃/-20℃	1:8192 (w+)	1:4096 (w+)	1:4096 (w+)

試験管法	保存温度	最終凝集価		
		作製時	1ヶ月後	6ヶ月後
精製ゴーヤレクチン	4℃/-20℃	1:1024 (w+)	1:256 (w+)	1:256 (w+)

W+ (最終凝集価)

考 察

今回、完熟したゴーヤ種子からの抽出液 (ゴーヤレクチン) は抗 H レクチン活性を持ち、この抗 H レクチンを用いることによって各血球との反応性を確認することができた。ゴーヤレクチンは O 型血球に強く反応するだけではなく、A 型血球や B 型血球にも強い反応性を示したが、高希釈することにより O 型血球に特異的に反応させることが可能となった。A 型血球や B 型血球での反応は、おそらく各血球膜上に残っている H 抗原との反応であり、特に血球膜上に H 抗原が多く存在する O 型血球では強い凝集活性を示したものと考える。

また、スライド法による反応では亜型であるA₂型血球とcisA₂B₃型血球で対照のA型血球やAB型血球に比べて反応が強くなり、このゴーヤレクチンが従来の試薬と同様の抗Hレクチンとしての機能を有し、血液型判定に用いることが可能であることが確認できた。

抽出したゴーヤレクチンをエタノール沈殿法により精製することにより、精製前は、1管目から4管目まで溶血のため判定できなかったが、精製することによって1管目の原液から溶血せずに強い凝集を確認することができた。これはエタノール沈殿法によってゴーヤレクチン中の抗Hレクチン以外の成分が取り除かれたことによると考えられる。また、抗Hレクチンの活性においては、O型血球との反応性が強くなり、抗Hレクチンとしての特異性が向上することが確認できた。今回、ゴーヤレクチンの調製法は明石らが行った報告¹⁰⁾を一部参照し確立した。精製ゴーヤレクチンの抗Hレクチンは彼らの結果とほぼ同様の性能を示したが、われわれが報告した手順で抗Hレクチンを調製することにより、より簡単に血液型判定用の抗Hレクチンを調製することが可能となった。また今回、簡易に抗Hレクチンを調製するための方法として、未精製のゴーヤレクチンの調製法とその結果の解釈を上記で考察したが、このゴーヤレクチンは、明石らの作製したゴーヤ抗Hレクチンと比べてもその反応性に違いはなく、一般の検査室での抗Hレクチンとして有用であると考えられる。

温度によるレクチンへの影響については、ゴーヤレクチンと精製ゴーヤレクチンともに加温30分間では50℃で反応性が若干落ち、室温・37℃では変化が認められなかった。しかし、50℃で20時間加温すると、両レクチンともに反応が認められなくなったが、これは長時間の熱負荷によって抗Hレクチンが失活してしまったことが原因であると考えられる。これらのことから、短時間であるなら室温でそのまま放置してもレクチンにあまり影響はないと考えられる。また、長期保存による特異性への影響では、4℃/−20℃においてゴーヤレクチンで約12ヵ月間、精製ゴーヤレクチンで約6ヵ月間の保存で若干の力価の減少を認めたが調整時とほぼ変わらない力価となり、抽出したレクチンが長期にわたって安定して使用できることを確認した。

今回、さまざまな検討を行った結果、ゴーヤ種子からの簡単なHレクチン調製法を確立することができ、温度や長期の保存による安定性も確認することができた。また、市販の試薬などと違い、ゴーヤ種子は安価で入手

も容易であり、さらに本研究で調製したゴーヤレクチンは、実際の検査に使用可能な抗H活性を示し、必要に応じて精製することにより、さらにO型血球を特異的に凝集させることが可能である。以上のことより、ゴーヤ種子から抽出したゴーヤレクチンと精製ゴーヤレクチンは、抗Hレクチンとして輸血検査などの臨床の現場において非常に有用で、実際に利用可能であると考えられる。しかし、本レクチンの糖鎖への反応性などの詳細なメカニズムについては更なる検討が必要であり、今後の課題である。

文 献

- 1) Stillmark, P. H.: Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis. L. und anderen Euphorbiaceen. Doctoral Thesis, University of Estonia, 1888
- 2) Boyd, W. C., Shapleigh, E.: Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science*, 119 : 419, 1954
- 3) Boyd, W. C.: The lectins: their present status. *Vox Sang.*, 8 : 1-32, 1963
- 4) Roseman, S.: Reflections on glycobiology. *J. Biochem.*, 276 : 41527-41542, 2001
- 5) Lloyd, D. H., Viac, J., Werling, D., Rème, C. A., *et al.* : Role of sugars in surface microbe-host interactions and immune reaction modulation. *Vet. Dermatol.*, 18 : 197-204, 2007
- 6) Boyd, W. C., Shapleigh, E.: Antigenic relations of blood group antigens as suggested by test with lectins. *J. Immunol.*, 73 : 226-231, 1954
- 7) Morgan, W. T. J., Watkins, W. M.: The inhibitions of the haemagglutinins in plant seeds by human blood group substances and simple sugars. *Br. J. Exp. Path.*, 8 : 94-103, 1953
- 8) Marsh, W. L.: Scoring of hemagglutination reactions. *Transfusion*, 12 : 352-353, 1972
- 9) Huang, L., Ikejiri, A., Shimizu, Y., Adachi, T., *et al.* : Immunoadjuvant activity of crude lectin extracted from *Momordica charantia* seed. *J. Vet. Med. Sci.*, 70 (5) : 533-5, 2008
- 10) 明石良: 血液型判定用レクチン及び血液型判定用溶剤. 特許公報 (B2) : JP3849945, 2006

Preparation method for a specific anti-H lectin isolated from goya seeds and its application in clinical laboratories

Kensaku Aki^{1,4)}, Minako Aihara²⁾, Takako Moriuchi²⁾, Miwa Mori³⁾, and Eiji Hosoi⁴⁾

¹⁾Subdivision of Biomedical Laboratory Sciences, Graduate School of Health Sciences, the University of Tokushima, Tokushima, Japan

²⁾National Hospital Organization Kyoto Medical Center, Kyoto, Japan

³⁾Department of Biochemistry, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan

⁴⁾Department of Cells and Immunity Analytics, Institute of Health Biosciences, the University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan

SUMMARY

After the discovery of the phenomenon of aggregation of red blood cells with castor bean extract by Peter Hermann Stillmark in 1888, various plant hemagglutinins were discovered from leguminous plant seed extracts. These plant hemagglutinins were called “lectins” by William C. Boyd *et al.* Lectins are sugar-binding proteins that are highly specific for their sugar moieties, physiological activity, and hemagglutinating activity. In particular, lectins displaying blood-group specificity are important for blood-group typing and antigen recognition. In recent years, *Ulex* lectin (anti-H lectin) extracted from the *Ulex europaeus* seed was used to subdivide blood of type O, and the subgroup of ABO, but *Ulex europaeus* is now difficult to obtain, so it is necessary to buy expensive reagents.

On the other hand, *Momordica charantias* (goya) seed extract (goya lectin) was recently revealed to show higher anti-H activity than *Ulex* lectin. Goya is readily available and inexpensive to obtain. Therefore, we examined a simple method for the preparation of goya lectin.

As a result, we were able to establish a simple method for preparing goya lectin isolated from goya seeds, and confirm its stability against long-term storage and temperature and usefulness as an anti-H lectin. We expect this method to be used in clinical practice in the future.

Key words : *momordica charantias* (goya) seeds, plant hemagglutinins, anti-H lectin, ABO blood typing, clinical laboratories