

## 新たな腸内細菌叢解析手法としての FISH- フローサイトメトリー法

### はじめに

FISH (fluorescence *in situ* hybridization)-フローサイトメトリー法 (FISH-FCM 法) と聞くと、動物細胞の迅速な集団解析に用いられる方法、というのが多くの本誌読者の認識と思われる。しかし 1990 年代に入ると、光学的な技術開発および蛍光分子の開発が進み、FISH-FCM 法による細菌集団の解析が可能になってきた<sup>1)</sup>。特に、環境中や動物の腸内に存在する細菌集団については、単離・培養されている菌株の割合は非常に低く、培養困難な細菌が大多数を占めているため、16S rDNA/RNA をターゲットとした分子生物学的な培養非依存的菌叢解析法 (culture-independent method) が主流となっている。FISH-FCM 法はその中の重要な方法の一つとして位置づけられており、ヒト腸内細菌叢の解析にも応用され始めている。本稿では、ヒト腸内細菌叢とその解析手法の概要、FISH-FCM 法と腸内細菌叢解析への応用例を紹介し、他の培養非依存的な解析法との比較から、本手法の有用性を論じたい。

#### 1. ヒト腸内細菌叢とその解析手法

ヒトの腸内には数百から千を超える種の細菌が存在し、その数はおよそ  $10^{14}$  と言われており、ヒトの持つ細胞数の 10 倍にも及ぶ。また、その約 80% がいまだ培養されていない (uncultured) と考えられている<sup>2)</sup>。このような非常に複雑な腸内細菌叢の構造はどのようにして明らかにされてきたのだろうか。

東京大学名誉教授の光岡知足先生をはじめとする本邦研究者の精力的な技術開発により、ヒト腸内細菌叢の大多数を占める、酸素が存在すると生育できない偏性嫌気性菌の培養法が確立された。その技術を用いて、ヒト腸内細菌叢の構造が明らかにされてきた。しかしながら、培養法による解析には技術的な習熟と膨大な数・種類の培地の調製、および菌数計測という時間と労力のかかる作業が必要とされること、上述のように培養困難な菌が菌叢の多くを占めていることなどの理由から、より簡便で正確な菌叢解析手法の開発が望まれていた。

1990 年代に入り、塩基配列の解析技術が進歩するのに伴い、細菌の分類指標として 16S rRNA 遺伝子の塩基配列データが蓄積され、データベース化が進められた。その進行に伴って、16S rRNA/DNA をターゲットとした分子生物学的な菌叢解析法の開発が進み、大きな発展を遂げた。現在は定量的 PCR 法、DGGE/TGGE 法、FISH 法、16S rDNA クローンライブラリー法、T-RFLP 法などの様々な手法が開発され、研究の目的に応じて使い分けられている。これらの手法の詳細については他の総説<sup>3)</sup>を参照頂くこととして、次に 16S rDNA/RNA を標的分子とする菌叢解析の原理と、FISH-FCM 法について概説したい。

分子生物学的な菌叢解析の標的分子である 16S rDNA/RNA は、すべての細菌に共通する分子であるが、分子内にはほとんどの細菌で塩基配列が一致する保存領域と、細菌の属・グループ・種によって配列の異なる九つの変領域 (variable region, V1-V9) が存在する (図 1)<sup>4)</sup>。この変領域における菌種・属ごとの塩基配列の類似性を利用して、菌種・属特異的な検出を行うことができる。FISH 法はプローブと細胞内の 16S rRNA 分子とのハイブリダイゼーションにより解析対象菌群を検出する方法であるため、解析対象菌の属・種特異的なプローブの設計に際して

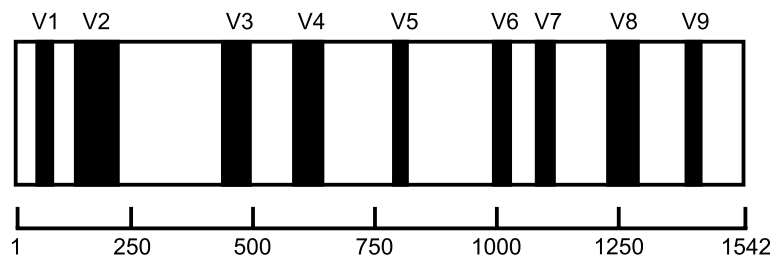


図 1 細菌 16S rRNA 遺伝子における保存領域と可変領域

16S rRNA 遺伝子の構造を模式的に示した。保存領域は白色、可変領域 (V1-V9) は黒色で示されている。一般的に大腸菌 K-12 株の 16S rRNA 遺伝子のヌクレオチド番号を元に、これらの領域やプローブの標的領域が記載される。なお本図は Neefs ら<sup>4)</sup>の報告をもとに作成したものである。

は、既知の当該属・種の 16S rRNA 遺伝子配列を多重アライメントにかけ、可変領域の中から対象特異的な配列を選択し、プローブを設計する。設計されたプローブを用いて、他の属・種に対するクロスハイブリダイゼーションが起らないことをドットプロット解析などで確認した後、使用するのが一般的である。

FISH-FCM 法の前半部分である FISH 法の実際的手法としては、①菌体の回収と洗浄、②パラホルムアルデヒド溶液で RNA を固定化、③スライドガラス上に菌体を固定、④蛍光標識プローブを含む緩衝液中でハイブリダイゼーションおよび洗浄、という流れで行われる。一般的には、FISH 法によって調製されたサンプルを蛍光顕微鏡下で観察し、菌数を手で計測することが多い<sup>9)</sup>。FISH 法は直接的な菌の検出と観察が可能のため、信頼性の高い方法として細菌叢の解析に広く用いられている。しかし短所として、蛍光顕微鏡を用いた菌数計測を手動で行う必要があり、菌叢解析には労力と時間を必要とする点があげられる。この点を改善するために、二つの改良法が開発されている。一つは画像解析による自動検出・計測であるが<sup>9)</sup>、特別なソフトウェアの使用が前提となるため、汎用的な方法ではない。もう一つが FCM を用いた迅速な検出・計測法すなわち FISH-FCM 法である。FISH-FCM 法は FISH 法により調製されたサンプルを適当な緩衝液に懸濁し、FCM 解析に供するだけであり、実験操作のほとんどは

FISH 法と同一である。FCM は 1,000 細胞/秒の非常に迅速な解析が可能であること、高額な解析機器ではあるが使用用途が広く、保有する研究機関が多いことなどから、FISH-FCM 法はより汎用的な腸内細菌叢解析手法として定着しつつある。

## 2. FISH-FCM 法を用いた腸内細菌叢解析

細菌叢解析への FISH-FCM 法の応用については、1990 年に Amann ら<sup>7)</sup>によって最初に報告されている。この報告以降、FISH-FCM 法は土壌、食品、臨床サンプル中の特定細菌種の検出や、水系環境内の菌叢解析などに応用されてきたが、ヒト糞便サンプルという非常に複雑かつ夾雑物の多いサンプル中の菌叢解析への適用は、2002 年の Zoetendal ら<sup>8)</sup>による報告を待たなければならなかった。彼らは、既知菌種 *Ruminococcus obeum* に近縁な未培養菌群について、ヒト糞便中の存在割合を調べるために特異的検出プローブを設計し、FISH-FCM 法により解析した。その結果、当該未培養菌群は糞便中の菌叢の約 2.5% を占めることが明らかになり、糞便中で菌数的に重要な一群であることを示した。

以降、腸内細菌叢内の菌群特異的なプローブの開発が精力的に進められ、腸内細菌叢で優占的な菌群の多くを FISH-FCM 法で解析することが可能になった<sup>9)</sup> (表 1)。それに加えてプローブの標識に使用する蛍光色素についても

表 1 FISH-FCM 法による腸内細菌叢解析に用いられる 16S rRNA を標的としたプローブ<sup>a)</sup>

プローブ名	塩基配列 (5'から 3')	標的菌群	標的部位 <sup>b)</sup>
Non 338	ACATCCTACGGGAGGC	Negative probe	—
Eub 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	真正細菌 (Eubacteria)	338
Bac 303	CCAATGTGGGGACCTT	<i>Bacteroides-Prevotella</i>	303
Enter 1432	CTTTTGCAACCCACT	Enterobacteria	1432
Lab 158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	<i>Lactobacillus-Streptococcus</i> group	158
Bif 164m	CATCCGGYATTACCACCC	<i>Bifidobacterium</i>	164
Ato 291	GGTCGGTCTCTCAACCC	<i>Atopobium</i> cluster	291
Erec 482	GCTTCTTAGTCARGTACCG	<i>Clostridium coccoides-Eubacterium rectale</i> cluster	482
Fprau 645	CCTCTGCACTACTCAAGAAAAAC	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> cluster	645
Rbro 730	TAAAGCCCAAGYAGGCCGC	<i>Ruminococcus</i> group	730
Cvir 1414	GGGTGTTCCCGRCTCTCA	<i>Clostridium viride</i> group	1414
Ecyl 387	CGCGGCATTGCTCGTTCA	<i>Eubacterium cylindroides</i> subgroup	387
Strc 493	GTTAGCCGTCCTTTCTGG	<i>Streptococcus-Lactococcus</i> group	493
Cra 757	CCACGCTTTCGKGMATGA	<i>Clostridium ramosum</i> assemblage	757
Clep 866	GGTGGATWACTTATTGTG	<i>Clostridium leptum</i> subgroup	866
Rcal 733	CAGTAAAGGCCAGTAAGCC	<i>Ruminococcus callidus</i> cluster	733
Edes 635	AGACCARCAGTTTTGAAA	<i>Eubacterium desmolans</i> cluster	635
Rfla 729	AAAGCCAGTAAGCCGCC	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> cluster	729
Veil 223	AGACGCAATCCCCTCCTT	<i>Veillonella</i>	223

<sup>a)</sup> Lay ら<sup>9)</sup>より改変。

<sup>b)</sup> 標的部位の位置は大腸菌 16S rRNA 遺伝子配列の塩基番号に基づいて記載。

検討が行われ、FITC (fluorescein isothiocyanate) および Cy5 (indodicarbocyanine) で末端標識したプローブで二重染色したサンプルを FCM 解析に供し、全菌数に対する特定菌群の割合を算出する方法が一般的に用いられるようになった。

このような手法の確立に基づいて、FISH-FCM 法は腸内細菌叢解析に応用され始めた。最も典型的な例としては、その特徴である迅速な解析能力を利用して多検体の解析を行った疫学調査に近い解析が挙げられる。Lay ら<sup>10)</sup>は、系統的に異なるグループに特異的な 18 種類のプローブを用いて、91 名の北ヨーロッパ (5 カ国) 在住者について糞便内菌叢を調査した。その結果、平均としては *Clostridium cocoides* および *Clostridium leptum* グループがそれぞれ菌叢の 28.0% および 25.2% を占める最優占菌群であり、*Bacteroides* (8.5%) がそれに続いた。ただし個人間の菌叢の違いは大きく、主成分分析を行っても、地域間、年齢、性別による有意な相関は観察されなかった。一方 Mueller ら<sup>11)</sup>は、EU 4 カ国 (フランス、ドイツ、イタリア、スウェーデン) に居住する 230 名のボランティアについて、20~50 歳 (n=85) と 60 歳以上 (n=145) の年齢別に二群に分けて、14 種類のプローブを用いて糞便内菌叢を解析した。その結果、年齢による菌叢の差異は国ごとに異なり、ドイツ在住者では *Clostridium cocoides* および *Bacteroides* グループが 60 歳以上で多く、イタリア在住者では同じグループが 60 歳以上で少ないことが観察された。フランスおよびスウェーデン在住者には年齢による有意な菌叢の差異は観察されなかった。また、居住地による効果として、イタリア在住者においてビフィズス菌の割合が有意に高かった (他の国の 2~3 倍、平均で 4%)。このように FISH-FCM 法によって、これまでは技術的、時間的に困難であった居住地や年齢などの因子による菌叢の差異の解析が可能になっている。

これまで報告されている FISH-FCM 法による腸内細菌叢の解析は EU 諸国からの報告がほとんどであった。我々も迅速な解析が可能な本手法に着目し、本邦在住者の糞便サンプルに対して応用を試みた<sup>12)</sup>。予備的な解析から、本邦在住者の糞便サンプルには、前述の蛍光色素のうち FITC を検出する波長領域では、16S rRNA にハイブリダイズしないネガティブプローブ (Non338, 表 1) を用いても、強い蛍光を発する粒子が検出された。蛍光顕微鏡観察を行ったところ、未消化の植物質に由来すると考えられる、細菌とほぼ同等の大きさの自家蛍光を発する粒子が存在していた。一方、Cy5 検出領域では自家蛍光はほとんど検出

されなかったことから、本邦在住者の糞便中の菌叢解析には FITC は使用できず、Cy5 の使用が最適であると考えられた。すべてのプローブを Cy5 で単一標識するため、二重染色による同時解析は不可能である。この Cy5 単一染色による腸内細菌叢解析を正確に行うため、前述のネガティブプローブを用いた際に検出される値をバックグラウンド値として、通常のプローブを使用した際に得られる値から引き算することで、より正確なデータが得られるよう補正した。この補正により、FISH-FCM 法と FISH 蛍光顕微鏡法によるデータがほぼ一致するようになったため、FISH-FCM 法による本邦在住者のヒト糞便中の菌叢解析が可能になったものと考えられた。

確立された方法の応用として、我々はオリゴ糖の一種ラフィノースの投与による腸内ビフィズス菌の増殖促進効果について解析した。この効果については、培養法による解析結果が既に得られていたが、培養されていない菌叢が無視されていること、種レベルでの動態はまったく不明なことから、種レベルでの解析を目的として、ビフィズス菌属レベルの検出プローブに加えて、7 種のヒト腸内ビフィズス菌種に対応する検出プローブ<sup>13)</sup>を用いて解析した。ヒト介入試験として、13 人の本邦在住成人に 1 日 4 g、4 週間にわたってラフィノースを摂取して頂き、摂取前、摂取中 (2 回)、摂取後の計 4 回糞便サンプルを提供頂き、FISH-FCM 解析を行った。

その結果、摂取前の糞便中のビフィズス菌属の平均値は全菌叢の 12.5% であったのに対して、ラフィノース投与 2 週間後で 28.7%、4 週間後で 37.2% にまで増加し、摂取終了 4 週間後で摂取前と同等のレベルまで低下した (図 2)。この結果から、ラフィノースは有意なビフィズス菌増殖促進効果を持つことが確認された。また、前述の EU 諸国での菌叢解析の結果<sup>11)</sup>と比較すると、本邦在住者の腸内細菌叢におけるビフィズス菌の割合は 3 倍程度高いことが示唆された。種レベルでの解析の結果、ヒト成人大腸内で優占的な 3 菌種 (*Bifidobacterium adolescentis*, *B. catenulatum* group, *B. longum*) は、属レベルでの動態とほぼ同様の挙動を示し、優占順位は試験期間中を通じて変化しなかった。一方、成人大腸内でマイナーな 4 菌種 (*B. breve*, *B. bifidum*, *B. dentium*, *B. angulatum*) は、ラフィノース摂取前の菌数は前 3 菌種に比べて少なく、摂取 2 週間後まで急増したが、4 週間後では逆に減少に転じ、優占的な 3 菌種とは異なる動態を示した。これらの結果は、それぞれの菌種が他の腸内細菌との競争に打ち勝ち、腸内におけるニッチを獲得できるか否かについては、ラフィノースによる増殖

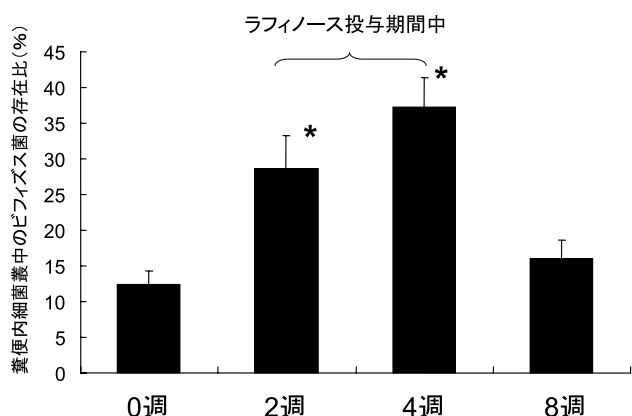


図2 ラフィノース投与によるヒト成人糞便中のビフィズス菌属の増殖促進効果の解析

ラフィノース投与ヒト介入試験におけるビフィズス菌属の動態を、FISH-FCM法により解析した結果を示した<sup>12)</sup>。横軸は試験期間中の時間経過、縦軸は糞便中の細菌叢におけるビフィズス菌の存在比をパーセントで示している。\*は摂取前のビフィズス菌の存在比に対して $P < 0.05$ において有意差があることを示す。

促進効果以外の因子が関与することを示唆するものである。このようにFISH-FCM法は、実験系を改良することにより、本邦在住者の糞便におけるビフィズス菌の種レベルでの動態解析にも適用可能であることが示された。

### 3. 他の菌叢解析法との比較

FISH-FCM法は迅速な菌叢解析が可能な点が最大の長所であるが、他の菌叢解析法と比較すると、その長所および短所が見えてくる。

一般に分子生物学的な菌叢解析には核酸の抽出を伴う実験系が多いが、腸内細菌叢は非常に複雑なため、どの菌種からも均一に核酸を抽出するには、細胞を破碎する条件を詳細に検討する必要がある。破碎条件が不十分だと、グラム陽性菌の中の細胞壁の強固な菌種からの核酸抽出効率が低くなり、結果的に真の菌叢を反映しないデータが得られてしまう場合がある。それに対してFISH-FCM法は細胞内の16S rRNAに対するプローブのハイブリダイゼーションに基づいた検出方法であるので、核酸の抽出を必要としない。つまり核酸の抽出効率によるバイアスがかかりにくいことが長所の一つである。ただしFISH-FCM法の場合、各プローブにおけるハイブリダイゼーションの条件検討は必須であり、複数プローブの同時ハイブリダイゼーション条件の設定は困難な場合が多い。また、多くの方法で共通するPCRによる遺伝子増幅を必要としない点が第二の長

所として挙げられる。特に細菌の16S rRNAの保存領域から設計したプライマーを用いてPCRを行い、増幅されたDNAを用いて解析するDGGE/TGGE法、クローンライブラリー法などの場合、プライマー配列と標的配列の間でのミスマッチによって菌種によっては増幅にバイアスがかかる場合が懸念される。

FISH-FCM法の短所としては、検出感度の問題がある。上述のようにPCRを介した増幅を伴わない分、検出感度は細胞内のrRNA量に依存する。したがって、腸内での代謝活性が低く、細胞内rRNA量の低い細菌種の正確な検出は難しい。また、FCM解析の場合、信頼性の高いデータを得るためには、解析対象の菌種が最低でも全菌数のおよそ0.5%以上の割合で存在する必要がある<sup>11,14)</sup>。言い換えると、糞便中の細菌数が $10^{11}$ 細胞/g糞便である場合、解析対象菌種は最低でも $5 \times 10^8$ 細胞/g糞便の菌数で存在しなければならない。よく比較される方法である定量的PCR法の検出感度は、DNAを鋳型とした場合は $10^{5-6}$ 細胞/g糞便、RNAを鋳型とした場合は $10^3$ 細胞/g糞便と報告されている<sup>15)</sup>。このように検出感度は定量的PCR法に劣るが、核酸抽出およびPCRによるバイアスがかからない点から、FISH-FCM解析は腸内の主要菌群の迅速な菌叢解析に最適な方法であると言える。

本稿で紹介したように、腸内細菌叢解析の手法としては、培養法に加えてFISH-FCM法や定量的PCR法をはじめとするさまざまな分子生物学的な手法が開発されている。しかし、それぞれの手法には長所と短所があり、一つの手法ですべての研究目的をカバーすることはできない。したがって、腸内細菌叢の解析においては、解析対象の菌種と研究の目的に応じて、手法を使い分けることが肝要である。

- 1) Davey, H.M. (2002) *Methods Cell Sci.*, 24, 91-97.
- 2) Egert, M., de Graaf, A.A., Smidt, H., de Vos, W.M., & Venema, K. (2006) *TRENDS Microbiol.*, 14, 86-91.
- 3) Zoetendal, E.G., Collier, C.T., Koike, S., Mackie, R.I., & Gaskins, H.R. (2004) *J. Nutr.*, 134, 465-472.
- 4) Neefs, J.-M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S., & De Wachter, R. (1993) *Nucleic Acids Res.*, 21, 3025-3049.
- 5) Dinoto, A., Suksomcheep, A., Ishizuka, S., Kimura, H., Hanada, S., Kamagata, Y., Asano, K., Tomita, F., & Yokota, A. (2006) *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 784-792.
- 6) Thiel, R. & Blaut, M. (2005) *J. Microbiol. Methods*, 61, 369-379.
- 7) Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., & Stahl, D.A. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.*,

- 56, 1919–1925.
- 8) Zoetendal, E.G., Ben-Amor, K., Harmsen, H.J.M., Schut, F., Akkermans, A.D.L., & de Vos, W.M. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 4225–4232.
  - 9) Lay, C., Sutren, M., Rochet, V., Saunier, K., Doré, J., & Rigottier-Gois, L. (2005) *Environ. Microbiol.*, 7, 933–946.
  - 10) Lay, C., Rigottier-Gois, L., Holmström, K., Rajilic, M., Vaughan, E.E., de Vos, W.M., Collins, M.D., Thiel, R., Namsolleck, P., Blaut, M., & Doré, J. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 4153–4155.
  - 11) Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., Cresci, A., Silvi, S., Orpianesi, C., Verdenelli, M.C., Clavel, T., Koebnick, C., Zunft, H.-J.F., Doré, J., & Blaut, M. (2006) *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 1027–1033.
  - 12) Dinoto, A., Marques, T.M., Sakamoto, K., Fukiya, S., Watanabe, J., Ito, S., & Yokota, A. (2006) *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 7739–7747.
  - 13) Takada, T., Matsumoto, K., & Nomoto, K. (2004) *J. Microbiol. Methods*, 58, 413–421.
  - 14) Fallani, M., Rigottier-Gois, L., Aguilera, M., Bridonneau, C., Collignon, A., Edwards, C.A., Corthier, G., & Doré, J. (2006) *J. Microbiol. Methods*, 67, 150–161.
  - 15) Matsuda, K., Tsuji, H., Asahara, T., Kado, Y., & Nomoto, K. (2007) *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 32–39.

吹谷 智, 横田 篤

(北海道大学大学院農学研究院微生物生理学研究室)

FISH-flow cytometry, a new tool for the analysis of intestinal microbiota

Satoru Fukiya and Atsushi Yokota (Laboratory of Microbial Physiology, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Kita-9 Nishi-9, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8589, Japan)

## 消化管のがん性変化に伴い消失する血液型抗原 Sd<sup>a</sup> 糖鎖

### 1. はじめに

がん化に伴い、細胞表面の糖鎖構造が変化することは古くから知られている。実際、がんで発現が増加している糖鎖抗原 CA19-9 や SLX 等は腫瘍マーカーとして臨床的に広く利用されている。これらのがん抗原の一部は、「糖鎖不全現象」、すなわち正常組織に発現する複雑な構造の糖鎖を合成する経路が部分的に破綻することで、合成過程にあるより単純な構造や、途中より分枝合成された構造が出現しているものと考えられる。本稿では、胃がん・大腸がんで見られる糖鎖不全現象として、ヒト正常消化管に発現

が認められる血液型抗原 Sd<sup>a</sup> 糖鎖のがん化に伴う消失機構と、Sd<sup>a</sup> 合成不全ががん細胞のふるまいに及ぼす影響について述べる。

### 2. 血液型抗原 Sd<sup>a</sup> 糖鎖と合成酵素の同定

Sd<sup>a</sup> 糖鎖は、1967年にコーカサス地方の住民に見出された血液型抗原であり、大部分のヒトの赤血球上に発現している。その構造は、GalNAcβ1-4[NeuAcα2-3]Galβ1-4GlcNAc-R であり、CAD 抗原 (GalNAcβ1-4[NeuAcα2-3]Gal) と共通の構造を有している。末端のβ1,4結合したN-アセチルガラクトサミンが免疫原糖であり、N-アセチルガラクトサミンを付加する糖転移酵素は、2003年にMontielらにより同定された<sup>1)</sup>。Sd<sup>a</sup> 抗原の合成を担うβ1,4N-アセチルガラクトサミン転移酵素2 (β4GalNAc-T2) は他の糖転移酵素と同じ2型の膜貫通型タンパク質であるが、先にクローニングされたG<sub>M2</sub>合成酵素 (β4GalNAc-T1) と同じくβ1,4結合を触媒するガラクトース/N-アセチルガラクトサミン転移酵素に共通のGWGGEDモチーフを有さない<sup>1,2)</sup>。Sd<sup>a</sup> 合成酵素にはその遺伝子構造より二つのスプライシングバリエーションの存在が示唆されている。エクソンE2-E12は共通で、エクソンE1<sub>s</sub>を用いる短型は細胞内ドメインが6アミノ酸よりなり、一方エクソンE1<sub>L</sub>を使用する長型は66アミノ酸もの非常に長い細胞内ドメインを持つが、両者共に酵素活性を有することが明らかとなっている。Sd<sup>a</sup> 合成酵素はG<sub>M2</sub>合成酵素とは異なり、G<sub>M3</sub>ガングリオシドを基質としない。また、α2,3シアル化基質のみにN-アセチルガラクトサミンを付加し、非シアル化基質やα2,6シアル化基質はアクセプターとしないことも分かっている<sup>1,3)</sup>。

### 3. Sd<sup>a</sup> 糖鎖の組織特異的発現

Sd<sup>a</sup> 糖鎖の発現は、ヒトでは赤血球以外にも腎臓および消化管 (胃、大腸) で認められる。腎臓では遠位尿細管、集合管、及び近位尿細管上皮細胞の刷子縁に発現が見られる。尿中にも分泌され、尿中に最も多量に存在するTamm-Horsfallタンパク質上にもN-結合型糖鎖として見出される<sup>4)</sup>。胃では主として糖脂質糖鎖として発現しており、Sd<sup>a</sup> 糖脂質およびSd<sup>a</sup> 糖鎖合成酵素活性はどちらも幽門部より胃体部前庭で多く検出された<sup>5,6)</sup>。胃には胃酸の産生を担う壁細胞や、ペプシノーゲンを分泌する主細胞等、高度に分化した細胞が存在しており、その局在が部位により異なる。そこで我々は、Sd<sup>a</sup> 糖鎖が特定の分化細胞にのみ発現しているのではないかと考え、ヒト胃組織より得られた細