顕微鏡下における血液型判定に関する研究
II. 単繊維レベルでの血痕からの人血証明と血液型判定

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大島, 徹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7845

顕微鏡下における血液型判定に関する研究

II．単繊維レベルでの血痕からの人血証明と血液型判定

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61年1月8日受付)

単繊維血痕についての人血証明および血液型判定に用いうる微視的方法を確立するため，ヒトおよび各種動物（チンパンジー，ニホンザル，ウマ，ブタ，イヌ，ネコおよびニワトリ）の血痕を対象に免疫組織化学的方法を応用し，一連の実験を行った．あらかじめ120°C，30秒加熱固定された血痕撚糸をほぐして単繊維血痕を取り出し，非血痕単繊維（陰性対照）と混じて検索した．人血証明は，市販の抗ヒト赤血球・ウサギ血清IgG画分をチンパンジー，ニホンザル，ウマ，イヌおよびブタの赤血球で各々吸収したものを用い，酵素抗体法（アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体；ABC法）と螢光抗体法直接法で行った．その結果，霊長類以外の動物血痕では陰性となり，霊長類，特にチンパンジー血痕では弱陽性を示した．しかし，螢光抗体法直接法ではニホンザル血痕はほぼ陰性であった．次いで，単繊維血痕の微視的血液型判定について，市販のマウスモノクローナル抗体を1次抗体とする免疫組織化学的方法の有効性を検討した．ABO式血液型については，モノクローナル抗A，抗Bと標識UEA-Iレクチンを用い，酵素抗体法（ABC法，直接法）と螢光抗体法のいずれでも，A，BおよびO (H) 活性を特異的に検出しえた．ABO式血液型の判定結果は，同一血痕撚糸について行った解離試験の成績と完全に一致した．MN式血液型については，モノクローナル抗M抗体を用いた螢光抗体法（ビオチン-アビジン法）で，MおよびMN型試料にN型のものより明瞭にM活性が示されたが，N型試料でもその一部に微弱な螢光が認められた．モノクローナル抗N抗体を用い検出されたN活性は，O-N型で最も明瞭に観察されたが，螢光強度はMN型で減弱していた．また，M型でもその一部に弱いN活性が認められた．しかしながら，使用試薬を適切に選択することにより，混合凝集反応（MCAR）を用いMN型判定が可能であった．Lewis式血液型については，Le (a－b＋) 型血痕でのLe^a活性の分布と強度は Le (a＋b－) 型のものとほぼ同程度であった．以上得られた成績から，ヒト単繊維血痕はチンパンジー以外の動物血痕との鑑別が可能であり(人血証明)，モノクローナル抗体を用いる免疫組織化学的方法により，単繊維血痕について微視的レベルでABO式血液型を正確に判定しえることが示された．

Key words　forensic serology, species identification, blood grouping, blood-stained fibril, immunohistochemical method

法医学領野における最も重要な実務上の課題の一つに血痕鑑定があげられる．血痕鑑定の目的とするところは，究極的には血痕の由来，すなわち血液の個人識別にほかならない．具体的には血痕血液の可及的多系式の血液型を決定することである．血痕量が多い場合，実務上その血液型判定は比較的容易であるが，微量血痕では従来の諸方法を適応して判定することは不可能である．

このような問題を解決するため，著者らは微量血痕および微小組織の法医学的検査法について，系統的に一連の研究を進めており，前編[1]においてヒト組織・細胞における血液型抗原の分布・局在について，免疫組織化学的方法の特異性および感度の点を含めて検討し，細胞レベルでのABO式血液型判定の可能性を示唆した．このことは，とりもなおさず微量血痕を対象とする顕微鏡レベルでの血液型判定に根拠を与えるも

Abbreviations: ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; DAB, diaminobenzidine; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FITC, fluorescein isothiocyanate; Hb, hemoglobin; Le, Lewis; MCAR, mixed-cell-agglutination-reaction; m-Mo, mouse monoclonal;

のであり，本研究では，これをうけて単繊維血痕からの人血証明および血液型判定を免疫組織化学的に検討した．

材料および方法

I．材　料

型既知のヒト供血者並びにチンパンジー，ニホンザル，ウマ，ブタ，イヌ，ネコおよびニワトリから採取したヘパリン加新鮮血液をJIS規格染色堅ろう度試験用の綿，ナイロンおよびレーヨン布片に5 μl ずつ滴下風乾し，直径約4～5 mmの血痕を作製した．この血痕付着布片から織り糸（以下，撚糸）を取り出し，120°C, 30秒間加熱固定した後，実体顕微鏡下で多数の繊維（以下，単繊維）にほぐし試料とした．なお，ヒトおよび動物血痕の型活性についてはあらかじめ解離法[2)~4)]により検査した．

II．方　法

1．人血証明

1）酵素抗体法

ヒト赤血球膜の局在を顕微鏡レベルで直接証明するため，別報[1)]のようにavidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法を用いた．すなわち，単繊維血痕試料の内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した後，1次抗体として抗ヒト赤血球・ウサギ血清IgG画分（Cappel社，U.S.A.，チンパンジー，ウマ，イヌ，ブタの赤血球で吸収済，Lot. No. 20453, ×100）を室温で90分反応後，0.02 M PBS (pH 7.3) で十分に洗浄した．以後，ウサギIgG検出用Vectastain ABC kit (Vector社，U.S.A) を用い，3, 3'-ジアミノベンチジン (DAB) 溶液による呈色反応で生じた茶褐色反応産物の有無を観察した．なお，常に陰性対照として非血痕単繊維をおき反応の特異性を確認した．

2）螢光抗体法（直接法）

fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト赤血球・ウサギ血清IgG画分(Cappel社，U.S.A., Lot. No. 16620, ×30) と，チンパンジー，ニホンザル，ウマ，イヌおよびブタの赤血球で吸収した同標識抗血清（30倍稀釈）を用い，室温で30ないし60分反応，洗浄後無螢光グリセリンで封入し落射螢光顕微鏡装置で観察（UVまたはB励起法）した．

2．免疫組織化学的血液型判定

1）ABO式血液型判定

i）酵素抗体法：単繊維血痕のAおよびB活性は，1次抗体にマウスモノクローナル（mouse monoclonal，以下m-Mo）抗A，抗B・IgM抗体（Biotest社，West Germany, Lot. No. 111084, 112084, ×50, 100）を用い，2次抗体にアフィニティ精製・ビオチン化・抗マウスIg Mヤギ血清（Tago社，U.S.A., Lot. No. 51-06-01, ×100）またはヒトAB型血清で吸収したもの（100倍稀釈）を用い，前者は1～2時間，後者は40分室温で反応させ，ABC法で検出した．

O (H)活性はペルオキシダーゼ標識UEA-Iレクチン（E・Y社，U.S.A., Lot. No.0723D, 2mg/2ml）を1%ウシアルブミン（Ortho. 社，U.S.A., Lot. No. BA771A2, PBSで稀釈）で40倍稀釈し，直接法（室温，2時間）か，m-Mo抗H・IgM抗体(Chembiomed社，Canada, Lot. No.4235, ×20, 50）を1次抗体とするABC法で検索した．

ii）螢光抗体法：

a．間接法

A, B活性はm-Mo抗A，抗B抗体を5，10，20倍に稀釈し1次抗体とし，2次抗体にはFITC標識・抗マウスIgM・ヤギ血清（Cappel社，U.S.A., Lot. No. 23443）をA, B, O型ヒト赤血球とAB型ヒト血清で吸収し，2，5，10，20倍に稀釈して用い，間接法で検索した．反応時間はABC法に準じた．

b．ビオチン・アビジン法

m-Mo抗A，抗B抗体（各々50倍稀釈）を1次抗体，アフィニティ精製・ビオチン化・抗マウスIg Mヤギ血清（ヒトAB型血清で吸収，×30）を2次抗体とし，avidin-FITC (Vector社，U.S.A., Lot. No. 40221, × 20, 30)で標識した．反応時間は室温で各々2時間，1時間および1時間とした．

c．直接法

O (H)活性は，FITC標識UEA-Iレクチン(E・Y社，U.S.A., Lot. No. 022902, ×10）を室温で2時間反応させて検出した．

2）MN式血液型判定

螢光抗体法（ビオチン・アビジン法）：

1次抗体としてm-Mo抗M (IgG_1)，抗N (IgG_3) 抗体（Biotest社，West Germany, Lot. No. 118084, 119084, ×5）を室温で2時間，続いて4°Cで一夜反応させた．次に2次抗体としてアフィニティ精製ビオチン化・抗マウスIgG・ヤギ血清（H & L鎖）(Cappel社，U.S.A., Lot. No. 20126, ヒトAB型血清で吸収，× 30, 50）を室温で1時間反応させ，avidin-FITC (Vector社，U.S.A., ×30, 40) で50ないし60分螢光標識した．

PAS, periodic acid- Schiff ; PBS, phosphate buffered saline ; UEA, ulex europaeus agglutinin.

3）Lewis式血液型判定

螢光抗体法（ビオチン・アビジン法）：

1次抗体としてm-Mo抗Le^a・IgM抗体（Biotest社，West Germany, Lot. No. 113084）を4～40倍段階稀釈し，室温で2時間，4℃で一夜反応させた．2次抗体は前記FITC標識・抗マウスIgM・ヤギ血清を3倍稀釈し，室温で1時間反応させた．

以上の抗原抗体反応は湿室内で行い，各操作間では試料をPBSで十分に洗浄した．

3．混合凝集反応法による血液型判定

1）ABO式血液型判定

i）使用抗体，抗血清，レクチン

A型活性検出には，ヒト由来抗A血清（Ortho. 社，U.S.A., Lot. SA928E-2, 原液），ウサギ免疫抗A血清（東京標準血清，Lot. 50-1, 原液）およびm-Mo抗A・IgM抗体（原液）を用いた．

B型活性検出には，ヒト由来抗B血清（Ortho. 社，U.S.A., Lot. SB 417D），ヤギ免疫抗B血清（東京標準血清，Lot. 50-1）およびm-Mo抗B・IgM抗体を用いた．

O(H)活性検出にはUEA-Iレクチン（E・Y社，U.S.A., Lot. 011711, ×2）とm-Mo抗H・IgM抗体（Chembiomed社，Canada, Lot. 4235, 4326）を使用した．

ii）反応手技

混合凝集反応法は赤石ら[5]および桂ら[6]の方法に準じた．すなわち，試薬と陰性対照を混じた試料をマイクロタイター用のウエル内で室温，1時間反応させ，続いて4℃で一夜反応後，余剰試薬を十分に洗浄除去し指示血球を加えた．室温で1時間静置後，未反応の血球を洗い流し顕微鏡下で判定した．

2）MN式血液型判定

i）試　　薬

M型活性検出には，ヒト由来抗M血清（Merz& Dade社，Switzerland, Lot. No. 300, 10, 021A），ウサギ免疫抗M血清（Ortho. 社，U.S.A., Lot. No. 503D）とm-Mo抗M抗体を用いた．

N型活性検出には，ヒト由来抗N血清（Merz & Dade社，Switzerland, Lot. No. 302, 12, 021A），ウサギ免疫抗N血清（Ortho. 社，U.S.A., Lot. No. 607A）とm-Mo抗N抗体を使用した．

ii）反応手技

反応は室温2時間とし，ABO式の場合と同様に行った．

成　　績

I．人血証明

1．酵素抗体法

ヒト，チンパンジーおよびニホンザルでは，単繊維血痕部にDAB反応に基づく茶褐色塊状産物の付着が観察された（Fig. 1, 2）．ヒト試料とチンパンジー，ニホンザル試料の間には反応産物の大きさ，数および色調等について，明らかな差異は見い出しえなかったが，ニホンザル血痕ではいくらか反応が弱かった．一方，ウマ以下の前記諸動物と陰性対照ではDAB反応産物の単繊維への付着は認められず，すべて陰性であった（Fig. 3）．

綿（天然繊維），ナイロン（合成繊維），レーヨン（半合成繊維）の3種類の単繊維間では，ナイロンおよびレーヨンで加熱固定後の赤血球膜が比較的限局性に付着していたため，DAB反応による陽性結果を比較的容易に判定しえた．これに対し，綿繊維では間隙に非特異的反応産物が入り込むことがあり，十分な洗浄と適切な陰性対照を必要とした．

以上，ヒト血痕試料では，120°C, 30秒加熱しても，赤血球膜は単繊維上に抗原性を失うことなく定着されることが再確認された．

2．螢光抗体法

市販のFITC標識抗ヒト赤血球ウサギ血清IgG画分をそのまま用いると，チンパンジー，ニホンザルやイヌなどの単繊維血痕では著明な非特異的反応が認められた．しかし，同抗血清に対し，チンパンジー，ニホンザル，ウマ，イヌおよびブタ赤血球を用い吸収操作を施すと，イヌ血痕の非特異的反応は完全に，ニホンザルではほぼ消失した．しかし，チンパンジーではヒト（Fig. 4）よりは微弱ながら，若干の螢光が認められた（Fig. 5）．

II．免疫組織化学的血液型判定

1．ABO式血液型判定

AおよびB型活性：酵素抗体法，螢光抗体法のいずれでもヒトA型，ヒトAB型，チンパンジー血痕において，A型活性を特異的かつ明瞭に検出することができ，（Fig. 6 , 7, 8），この成績は同一のm-Mo抗体を用いて行った解離試験の成績と一致した．一方，ヒトB型，ヒトO型，ニホンザル，ウマ，ブタ，イヌ，ネコ，ウサギ，モルモット，ニワトリおよび陰性対照ではA型活性が陰性であり（Fig. 9, 10），解離試験の成績と一致した．

B型活性については解離試験と一致して酵素，螢光抗体法ともヒトB型，ヒトAB型血痕で明瞭に検出され，ニホンザルでも弱い活性が認められた（Fig.11）．ヒトA型，ヒトO型およびニホンザル以外の動物と陰性対照はいずれも陰性であった（Fig.12）．

酵素抗体法では使用した2次抗体の吸収操作の有無

にかかわらず同一の成績が得られた．一方，螢光抗体法間接法では，使用するFITC標識抗マウスIgM・ヤギ血清をヒト赤血球および血清で吸収する必要があり，また同標識抗体の稀釈度は2～5倍が適当であった．さらに，A, B活性検出の特異性および鋭敏度など，螢光抗体法間接法とビオチン・アビジン法に著明な差はなかった．

O (H)活性：ペルオキシダーゼ標識UEA-Iを用いる酵素抗体法，およびFITC標識UEA-Iを用いる螢光抗体法のいずれでも，ヒトO型血痕で最も強く検出された（Fig.13）．これ以外にヒトA, B, AB型では血痕の一部にO型と比べて微弱なO (H)活性を認め，チンパンジーとニホンザルでも一部に微弱なO (H)が検出された．これ以外の動物および陰性対照では陰性であり，以上の成績はUEA-Iレクチンを用いた解離試験の結果と矛盾しなかった．m-Mo抗H・IgM抗体を1次抗体としたABC法では，満足すべき成績が得られなかった．

以上，使用抗血清や反応時間などを適宜吟味することにより，単繊維血痕上に存在するABO(H)活性を特異的かつ明瞭に検出でき，ABO式血液型判定が可能なことが示された．

2．MN式血液型判定

M活性については，M型，MN型血痕でN型血痕と比べてやや強い螢光が認められたものの，N型血痕でも弱いながら螢光が認められ，M活性に特異的な成績は得られなかった．また，MおよびN型血痕間には螢光の局在様式等について明らかな差異はなかった．一方，m-Mo抗N抗体はO-N型血痕と最も良く反応していたが，AB-N型との反応は減弱していた．また，MN型との反応性はN型よりさらに弱くなっていたが，M型血痕でも所々に微弱ではあるが螢光が認められ，N型に特異的な成績とはいえなかった（Fig.14, 15, 16）．

3．Lewis式血液型判定

m-Mo抗Le^a抗体を種々稀釈して検討したが，Le (a−b+)型血痕でもLe (a+b−)型と同程度の螢光発光が，UVおよびB励起下いずれでも観察された．したがって，本条件におけるLe^a活性の微視的観察からではLe (a−b+)とLe (a+b−)型を区別しえなかった．

Ⅲ．混合凝集反応法による血液型判定

1．ABO式血液型判定

ヒトA型，B型血痕では，ヒト由来，動物免疫，m-Mo抗体いずれの場合でも各々の型活性に特異的な凝集塊が認められた．

ヒトO型血痕においても，UEA-Iレクチンおよびm-Mo抗H抗体のいずれでも特異的な凝集塊が認められた（Fig. 17）．ただし，m-Mo抗体を用いた場合はすべて凝集塊はやや少く，小型であった．

2．MN式血液型判定

M型血痕では，ヒト由来抗M血清と反応させた場合のみ陽性で，m-Mo抗N抗体および一般抗N血清ではいずれも陰性であった．

また，N型血痕については，m-Mo抗N抗体と反応させた場合に型特異的な凝集塊がえられたが，m-Mo抗M抗体および一般抗M血清との反応結果はいずれも陰性であった（Fig. 18）．

考　　察

きわめて微量な試料について信頼すべき血液型判定方法を確立することは，法医学における重要な課題の一つである．乾燥血痕を対象としたこの方面での研究は，吸着・解離法に関するKind[2]の報告を初め，CoombsとDodd[7]の混合凝集反応法，あるいは螢光標識抗体を用いるJankovič[8]，Cohenら[9]，Hasebe[10]の報告がある．また，ヒト組織切片からの血液型判定もPozzatoら[11]などいくつかの報告がみられる．これらのうち，吸着・解離法は現在すでに実用化されているが，やや多量の試料を必要とし，混合凝集反応法はヒト赤血球の凝集を指標としたもので，なお多くの問題点がある．すなわち，単繊維レベルの微量血痕を対象とする血液型判定法はまだ確立されていない．著者は単繊維血痕そのままの形で，ヒト赤血球膜の存在をまず証明し（人血証明），つづいて赤血球膜に局在する血液型抗原活性を直接同定してゆくことを考え，前報[1]での成果をふまえ免疫組織化学的方法の法医学的応用を試みた．

本論文は当講座で開発された微量血痕についての一連の系統的検査法[12]の一部を構成するものである．この検査法は，血痕から1本の撚糸を取り出し，120°C, 30秒間加熱後電気泳動法により血痕可溶成分を分離し同時的ゲル内沈降反応[13]（人血証明）を行ったのち，撚糸について繰り返し解離試験[14]で血液型の判定を行い，つづいて単繊維を採取し，本研究で検討した免疫組織化学的検査を施すものである．

血痕試料の連続的検査については，型的二重結合反応（混合凝集反応）と解離試験を用い同一試料からABO式およびMN式血液型を判定する勾坂ら[15]の連続検査法や，抗ヒトHbAo沈降素血清と型的二重結合反応（混合凝集反応）を用い同一試料から人血証明とABO式血液型判定を行う桂ら[6]の方法がある．これに対し，著者の方法は抗ヒト赤血球・ウサギ血清IgG画分とm-Mo抗体を用い免疫組織化学的方法を応用し，顕微鏡レベルで人血証明と血液型判定を行うものであ

る．また，本法では単繊維血痕をあらかじめ120°Cで30秒間熱板圧迫加熱固定することも他にはない点である．この加熱固定はNaganoら[16)~18)]の一連の研究で明らかになった血液型抗原の熱安定性を利用したもので，本操作により型活性を失活させることなく赤血球膜を単繊維に確実に固着させることができる．

Ⅰ．人血証明法

ヒト以外の諸種脊椎動物赤血球にもヒト類似の赤血球型活性が存在する[19)]ので，人血証明は通常血液型判定の前に行うべきもので，抗ヒトHbAo沈降素血清や抗ヒト赤血球血清を用いる方法などがある[6)20)]．これらのうち，抗ヒト赤血球血清を用いる人血証明法としては混合凝集反応法（Coombs & Dodd）[7)]や，FITC標識血清でのMikiら[21)]の報告があるが，検査に要する試料量などなお多くの検討課題が残されている．

微視的法医血清学手技上極めて重要なものに使用試薬の特異性の問題がある．人血証明のための抗ヒト赤血球血清に関しては，原ら[22)~24)]の一連の系統的研究がある．同氏らの報告によると，この抗血清に対する抗原はPAS-1糖蛋白のシアル酸含有糖鎖であるが，同じくPAS-1糖蛋白に存在するMN活性とはシアリダーゼ消化の点で異なるとされている[23)]．未吸収の同抗血清は，ウマ，イヌ，ブタ血球をも凝集させたが，これら動物の赤血球による吸収後は，霊長類とヒト血球のみに反応するようになり，さらにニホンザルに加えてチンパンジー血球で完全に吸収すると，ヒト以外の霊長類血球とは全く反応しなくなったが，ヒト血球とはなお明瞭な凝集を認めたとしている[22)]．

本研究では成績の項で述べたように，市販のFITC標識抗ヒト赤血球ウサギ血清IgG画分をそのまま用いると，イヌ，ニホンザル，チンパンジーで非特異的反応がみられ，人血証明には不適当であった．また，吸収操作を施しても，チンパンジー血痕との反応性は微弱ながら残存していた．このことから，本吸収操作は完全なものとはいえないが，同操作を施した血清をヒト血痕に適用すると，明らかに反応は低減していた．したがって，抗ヒト赤血球ウサギIgGとチンパンジー血痕間の反応は，ヒトとチンパンジー血球の共通抗原に基づくものと考えられ[22)]，単なる非特異的吸着等によるのではないと判断される．そのため，この抗血清を用いてヒトとチンパンジー血痕を完全に区別することは難しいと思われる．

この問題に関して，原ら[24)]は前記PAS-1糖蛋白（glycophorin A）をヒト赤血球膜上のヒト特異抗原とみなし，抗ヒトPAS-1ウサギ血清を作製した．この抗血清はチンパンジー赤血球と反応せずヒト特異的と報告されているので，今後，著者の方法にも応用してヒトとチンパンジーの鑑別が可能となるよう検討する必要があろう．しかし，現実問題としてわが国ではチンパンジーが犯罪等に関与する機会はないものと考えて差支えなく，適切な吸収操作を施した上記抗ヒト赤血球血清を用いる人血証明法も，実務上は十分に使用可能と考えられる．

また，m-Mo抗体の人血証明への応用については，Fletcherら[25)]が酵素免疫測定法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）とヒトIgGに対するm-Mo抗体を用い，ヒトを含め各種動物の血痕，唾液から0.9%食塩水で抽出した試料について人血証明を試みたが，チンパンジー，マウス，ラットおよびウナギでは無視できぬ交叉反応が出現したと報告している．

以上，単繊維血痕を対象とする顕微鏡レベルでの人血証明につき，特異性に関する問題点を中心に考察した．特に，螢光抗体法直接法は操作が容易であり，血痕付着単繊維そのものを対象とし，ヒト赤血球を直接証明しうる．したがって，使用抗血清に適切な吸収操作を施すなど前述した注意点を考慮すれば，鑑定資料の原形を保存でき，法医実務上，極めて有用な方法と思われる．

Ⅱ．血液型判定法

法医血清学における血液型判定に免疫組織化学的方法を導入した研究として，本邦ではMiki，Hasebeら[10)21)26)]や岡田ら[27)]の報告がある．前者は螢光標識抗ウサギ・グロブリン・ヒツジ血清を用い，三段階法にてヒト赤血球浮遊液あるいはスライドグラス上の血液スメアからA, B並びにD (Rho) 抗原の検出を試みたものである．後者は血液斑を含む各種体液斑から酵素抗体法間接法でABO式血液型判定を試みている．

これらはともに1次抗体としてヒト由来の抗A，抗Bポリクローナル血清を用いているが，前者は単繊維血痕からの血液型判定に関して全く検討しておらず，後者はヒトO (H)活性について未検索で人血証明にもふれていない．また，顕微鏡レベルでの血液型判定を実施する場合には，従来の肉眼レベルの判定では支障をきたさない程度の非特異的反応が顕在化するため，判定不能となったり，誤った判定を下してしまう危険性が伴う．

本研究ではこうした未検討課題や微視的血液型判定に内在する問題を解決するため，前報[1)]での検討に基づき従来使用されたポリクローナル抗体（ヒト由来または動物免疫血清）のかわりに，近年実用化されたm-Mo抗体[28)]を1次抗体とし，微量抗原の高感度検出の点で現在最も優れていると考えられるビオチン・アビジン法を主に応用し，各種の吸収操作を施し，対照試料をおきながら特異的で高感度な判定法を検討した．

ABO式血液型判定では特異的なDAB反応産物またはFITC螢光を確認した上でA活性陽性・B活性陰性である場合をA型，B活性陽性・A活性陰性である場合をB型，両活性とも陽性をAB型，両活性とも陰性で標識UEA-Iレクチンで O(H)活性のみが検出される場合をO型と判定しえた．この際，AまたはB型単繊維血痕には微弱なO(H)活性が共存していてもよい．こうして判定した成績は，同一試料撚糸について別途実施した解離試験の成績と完全に一致しており，m-Mo抗体とUEA-Iレクチンを用い特異的なABO式血液型判定が可能であった．しかし，m-Mo抗H・IgM抗体については混合凝集反応法で型特異的な成績が得られたものの，螢光抗体法への応用については使用ロットの問題を含めさらに検討しなければならない．また，FITC標識・抗マウスIgM・ヤギ血清を用い螢光抗体法間接法でA，B活性を検出する際は，ヒト赤血球と血清であらかじめ吸収操作を施し，さらに特異的螢光が観察できる稀釈度をロットごとに決める必要がある．著者の使用したものでは2～5倍稀釈が適当であった．螢光顕微鏡下での観察では，まずUV励起で螢光の特異性を確認したうえで，必要ならB励起に切り換えさらに観察するのが適当と思われる．このようにすると繊維自身の螢光の問題[29]もFITCの螢光発光と充分区別しうるようになる．

また，今回検討したチンパンジーおよびニホンザル単繊維血痕試料からは，各々A型活性，B型活性が検出され，別途同一血痕撚糸について行った解離試験の成績と一致した．これに関し，ヒト以外の霊長類赤血球にみられるヒトの血液型活性についてはSochaら[30]の総説があり，チンパンジーではヒトA型活性，ニホンザルではヒトB型活性の存在が報告されている．また，東[19]は解離試験により，北陸産ニホンザル5頭中2頭，南紀産ニホンザル5頭中4頭の赤血球にB活性を検出しているが，本法により，単繊維血痕試料からでもヒトA，B活性を明瞭に判別しうることが明らかにされた．

MN式血液型判定については，m-Mo抗体を1次抗体とする螢光抗体法（ビオチン・アビジン法）では型判定が可能な程度にMまたはN活性に特異的ではなかったが，混合凝集反応法では適切な抗血清の選択によりM，N型それぞれに特異的な凝集反応が得られた．m-Mo抗M抗体は解離試験での優秀さが報告され[31]，同抗N抗体は混合凝集反応には使用しうるので，螢光抗体法についてもロットや稀釈度，吸収操作などにつき今後の検討に価すると思われる．

また，Lewis式血液型判定については，Le (a－b＋)型単繊維血痕においてもm-Mo抗Le^a抗体との反応に基づく螢光発光がみられている．本研究では，免疫組織化学的方法や使用m-Mo抗Le^a抗体の特異性について前報[1]で確認されているものを適用しているので，ここで観察された螢光は単なる非特異的な吸着によるものではなく，通常の肉眼的凝集反応の際には無視されている赤血球膜上のLe^a活性を示している可能性をも考慮すべきであろう．いずれにしても，前報[1]においても述べたように，肉眼的凝集反応により判定された赤血球のLewis型は，微視的レベルで検討されたドナーのLewis活性の分布状態を正確に反映し難いものとも考えられ，赤血球膜におけるLewis活性の局在については今後さらに多面的検討の余地があるものといえよう．

以上，免疫組織細胞化学的方法を用い，ABO式血液型については顕微鏡下で型判定しうることが判明した．本法は，最近各方面で応用が試みられているELISAとは異なり，抗原の本来の局在部位を変えることなく，単繊維上に存在する赤血球膜およびそれに担われた血液型抗原を直接証明するものである．したがって，検体の微量化を図ることが可能であると同時に，鑑定資料についてはその原形を保存しながら鑑定を進めることができ，再鑑定等将来に起こりうる事態にも対拠しえる方法と考えられる．今後は，現時点で不十分なMNおよびLewis式血液型判定法の検討を行うとともに，顕微測光法[32]の技術を導入し，螢光測光法[33]等によって現在の定性的な観察に加え，顕微鏡下での定量的な評価の可能性について究明したい．

結　　論

単繊維に付着する極めて微量な血痕について免疫組織化学的方法を応用し，顕微鏡下での人血証明および血液型判定を試みた．その結果，以下の成績を得た．

1．市販の抗ヒト赤血球・ウサギ血清IgG画分をチンパンジー，ニホンザル，ウマ，イヌおよびブタの赤血球で吸収することにより，ヒトおよびチンパンジーと他の哺乳類動物の赤血球を識別することができた．

2．マウスモノクローナル抗A，抗B・IgM抗体および標識UEA-Iレクチンを用い，酵素抗体法並びに螢光抗体法（ビオチン・アビジン法，直接法，間接法）のいずれの方法でも，単繊維血痕のABO式血液型を正確に判定できた．

3．マウスモノクローナル抗M，抗N抗体を1次抗体とする螢光抗体法（ビオチン・アビジン法）を用い，MN式血液型判定について検討したが，一部に軽微ながら特にN抗原について非特異的反応が認められた．ただし，混合凝集反応法では市販の抗血清等を適切に選択することにより，MN式血液型の判定が可能で

あった．

4．マウスモノクローナル抗 Le^a，抗 Le^b抗体を1次抗体とする螢光抗体法（ビオチン・アビジン法）では型特異的な成績は得られなかった．微視的判定法では使用抗体の特異性の検討の重要性が再確認された．

謝　辞

稿を終えるに臨み，御指導と御校閲を賜りました永野耐造教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究の遂行にあたり，御指導と御助言を戴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感謝いたします．

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69次日本法医学会総会（1985年，岩手）および第13回国際法医・社会医学会（1985年，ブタペスト）で発表した．

文　献

1）大島　徹：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．十全医会誌，**94**，印刷中．

2）**Kind, S.S.**: Absorption-elution grouping of dried blood smears. Nature, **185**, 397-398 (1960).

3）**Lincoln, P. J. & Dodd, B. E.**: The detection of the Rh antigens C, C^w, c, D, E, e and the antigen S of the MNSs system, in blood stains. Med. Sci. Law, 8, 288-295 (1968).

4）**Lincoln, P. J.& Dodd, B. E.**: The application of a micro-elution technique using anti-human globulin for the detection of the S, s, K, Fy^a, Fy^b and Jk^a antigens in stains. Med. Sci. Law, **15**, 94-101 (1975).

5）赤石　英・村上　利・工藤敏行・清水三男・田島強：型的二重結合反応に関する研究．日法医誌，**19**，181-187 (1965).

6）桂　秀策・中野英明・平野幸五郎・斎藤　茂・鈴木堅司：同一超微量血痕の人血証明と血液型判定の連続検査．日法医誌，**36**，321-328 (1982).

7）**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).

8）**Jancović, B. D.**: Specific staining of red cell antigens by the use of fluorescein-labelled antibody. Acta haemat., **22**, 278-285 (1959).

9）**Cohen, F., Zuelzer, W. W. & Evans, M. M.**: Identification of blood group antigens and minor cell populations by the fluorescent antibody method. Blood, **15**, 884-900 (1960).

10）**Hasebe, H.**: Determination of ABO blood groups in human blood stains by the fluorescent antibody technique. Jpn. J. Legal Med., **16**, 325-329 (1962).

11）**Pozzato, R. & Molla, W.**: La determinazione delle proprietà gruppospecifiche ABO su frammenti di organo fissati in formalina. Riv. Med. leg., **1**, 19-33 (1959).

12）**Nagano, T., Tanaka, N., Maeda, H., Takayasu, T. & Ohshima, T.**: A procedure of systematic examination on small pieces of blood-stained thread specimens. Proceeding of the XIIIth Congress of the International Academy of Legal Medicine and Social Medicine, in press.

13）高安達典・田中宣幸・織田修吾・藤岡良憲・永野耐造：二次元的カウンター免疫電気泳動法による微量血痕の人血証明．第69次日本法医学会総会講演要旨，演題番号101 (1985).

14）前田　均・田中宣幸・高安達典・藤岡良憲・永野耐造：連続的繰り返し解離試験による各種繊維撚糸付着血痕の血液型判定．日法医誌，**39**，98-99 (1985).

15）勾坂　馨・常盤和雄・杉沢文雄：同一血痕についてのABO式及びMN式血液型の連続検査．科警研報告，**25**，181-184 (1972).

16）**Nagano, T., Tsuji, T., Nishitani, S. & Tanaka, N.**: Thermo-stability of blood group A- and B-active glycolipids obtained from human red cells. I. Qualitative activity assay of the heated glycolipids. Jpn. J. Legal Med., **29**, 10-17 (1975).

17）**Nagano, T., Tsuji, T. & Ieda, K.**: Blood groups determination of severely charred bodies——The effects of heating on the blood group activity of A, B, AB and O (H) active glycolipids and A and B active glycoproteins. J. Forensic Sci. Soc., **16**, 163-168 (1976).

18）**Nagano, T., Tsuji, T., Okada, T., Tanaka, N., Kimoto, T. & Fujioka, T.**: Thermo-stability of blood group A- and B-active glycolipids obtained from human red cells. II. Activity changes after heating the preparations in solid and solution states. Jpn. J. Legal Med., **31**, 180-184 (1977).

19）東　哲之：諸種脊椎動物の血痕および加熱肝組織片のヒト赤血球型活性と種属鑑別．十全医会誌，**90**，517-528 (1981).

20）原　三郎：人・獣鑑別に関する法医免疫学的研究—文部省科学研究費総合研究班報告—．日法医誌，**35**，223-239 (1981).

21) Miki, T., Hasebe, H., Hasekura, H., Aritome, Y. & Suzuki, I.: The fluorescent antibody technique applied in the field of legal medicine. Act. Crim. Japon., **30,** 46-54 (1964).

22) 原 三郎・井上徳治・津田亮一・秋山和子・福山武・壱岐裕志：ヒト赤血球に対する特異抗血清の作製—人・獣鑑別に関する法医免疫学的研究（第1報）—. 日法医誌, **34,** 119-124 (1980).

23) 秋山和子・井上徳治・津田亮一・原 三郎：ヒト赤血球膜のヒト特異凝集原について—人・獣鑑別に関する法医免疫学的研究(第2報)—. 日法医誌, **34,** 582-586 (1980).

24) 壱岐裕志・福山 武・原 三郎・井上徳治・津田亮一：抗ヒト赤血球凝集素血清（抗 Glycophorin A 血清）を用いる新しい人血証明法について—人・獣鑑別に関する法医免疫学的研究（第7報）—. 日法医誌, **35,** 468-473 (1981).

25) Fletcher, S. M., Dolton, P. & Harris-Smith, P.W.: Species identification of blood and saliva stains by enzyme-linked immunoassay (ELISA) using monoclonal antibody. J. Forensic Sci., **29,** 67-74 (1984).

26) 長谷部尚：螢光標識抗体法によるヒト赤血球のA, B並びにD (Rh_0)抗原の識別. 日法医誌, **16,** 311-324 (1962).

27) 井上晃孝・岡田吉郎：酵素抗体法による法医学的試料のABO式血液型判定法. 日法医誌, **32,** 66-71 (1978).

28) Gaensslen, R. E., Lee, H. C. & Carroll, J. E.: Evaluation of monoclonal anti-A and anti-B and affinity-purified *ulex europaeus* lectin I for forensic blood grouping. Z. Rechtsmed., **93,** 259-268 (1984).

29) 三木敏行・長谷部尚・支倉逸人・有留羊三郎：螢光抗体法による血痕の血液型判定法について. 日法医誌, **17,** 180-181(1963).

30) Socha, W. W., Moor-Jankowski, J. & Ruffié, J.: Blood groups of primates: present status, theoretical implications and practical applications: a review. J. Med. Primatol., **13,** 11-40 (1984).

31) 前田 均・高安達典・大島 徹・永野耐造：微量血痕の血液型判定とその特異性の検討. 第69次日本法医学会総会講演要旨, 演題番号159 (1985).

32) 藤田哲也：組織細胞化学1985（日本組織細胞化学会編), 81-100頁, 学際企画, 東京. 1985.

33) Fujita, S. : Recent progress in quantitative fluorescence histochemistry. Acta Histochem. Cytochem., **13,** 40-48 (1980).

Legends for Figures

Fig. 1. Immunostaining for human red blood cells (RBCs) on a viscous- rayon fibril by ABC method with anti-human red cell rabbit serum (IgG). The antiserum was used after absorption with the RBCs of chimpanzee, horse, dog and hog. The human RBCs are stained in brown color (arrows).

Fig. 2. Staining of chimpanzee's RBCs on a viscous-rayon fibril with the anti-human RBC serum. Positive staining is noted even after absorption of the antiserum.

Fig. 3. Staining of hog's RBCs on a nylon fibril with the absorbed rabbit anti-human RBC serum. The materials on the fibril show no positive reaction. The bloodstains of horse, dog, cat and chicken gave negative results and were distinguishable from human bloodstains as well.

Fig. 4. Demonstration of human RBCs on a cotton fibril by the direct immunofluorescence method with the FITC-labeled rabbit anti-human RBC serum (arrows). The antiserum was used after absorption with the RBCs of chimpanzee, Japanese monkey, horse, dog and hog. FITC-fluorescence is noticed on the fibril. The specimen was taken out from the blood-stained thread after the electrophoresis (ref. 12).

Fig. 5. Immunofluorescence finding for chimpanzee bloodstain on a cotton fibril after electrophoresis. The fluorescence has become remarkably weak after the electrophoresis of the specimen. Immunostained as in Fig. 4.

Fig. 6 Immunostaining for A-activity on a cotton fibril carrying group AB human bloodstain by ABC method with monoclonal anti-A antibody. Distinct brownish staining is observed (arrow). B-activity was specifically detected with monoclonal anti-B as well.

Fig. 7. Marked A-activity on a cotton fibril carrying group AB human bloodstain (arrows). The activity is apparently demonstrated by the immunofluorescence (biotin-avidin) method using monoclonal anti-A and avidin-FITC. Similar findings were able to be obtained by indirect immunofluorescence technique. B-activity was also detected on this specimen. UV-excitation, 10 sec exposure.

Fig. 8. Demonstration of A-activity on the same part of the fibril as in Fig. 7. In this figure, the activity is observed under B-excitation. 10 sec exposure.

Fig. 9. Completely negative finding for A-activity on a cotton fibril carrying group B human bloodstain by ABC method with the monoclonal anti-A. The materials on the fibril show no positive staining (arrows).

Fig. 10. Nagative finding for A-activity on a cotton fibril carrying group B human bloodstain. The activity was examined by the same method as in Fig. 7. B-excitation, 10 sec exposure.

Fig. 11. B-activity markedly demonstrated on a cotton fibril carrying group B human bloodstain (arrow). Immunostaining was carried out by ABC method with monoclonal anti-B.

Fig. 12. Completely negative finding for B- activity on a cotton fibril carrying group A human bloodstain. Immunostaining was performed by ABC method with the same monoclonal anti-B as in Fig. 11. The materials on the fibril show no positive staining.

Fig. 13. O (H)-activity shown on a cotton fibril carrying group O human bloodstain (arrows). The activity is demonstrated by the direct immunoenzyme technique using labeled UEA-I lectin. O (H)-activity was weakly found in the other human ABO-types.

Fig. 14. N-activity shown on a cotton fibril carrying group O-N human bloodstain. B-excitation, 15 sec exposure. The specific fluorescence is weaker than that for ABO (H)-activities and is hardly noticeable under UV-excitation.

Fig. 15. N-activity on a cotton fibril carrying group B-MN human bloodstain (arrow). The specific fluorescence is apparently reduced in the intensity in comparison with that of group O-N shown in Fig. 14. B-excitation, 15 sec exposure.

Fig. 16. Very faint or almost negative N-activity on a cotton fibril carrying group A-M human bloodstain. However, non-specific immunostaining was weakly noticed in another locations. B-excitation, 15 sec exposure.

Fih. 17. Positive, specific O(H)-activity demonstrated by mixed-cell-agglutination-reaction (MCAR) on a cotton fibril carrying group O human bloodstain (arrow). This reaction was carried out by using mouse monoclonal anti-H.

Fig. 18. Specific demonstration of N-activity by MCAR with monoclonal anti-N on a cotton fibril carrying group O-N human bloodstain.

Studies on Microscopic Blood Grouping II. Species Identification and Blood Grouping on Blood-Stained Fibrils Tohru Ohshima, Department of Legal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 – J. Juzen Med. Soc., **95,** 7–18 (1986)

Key words: forensic serology, species identification, blood grouping, blood-stained fibril, immunohistochemical method

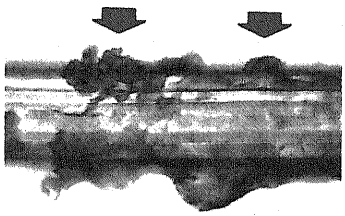
Abstract

In order to establish a microscopic method for species identification and blood grouping on bloodstained fibrils, a series of experimental studies was carried out on the bloodstains of human beings and several species of animals (chimpanzee, Japanese monkey, horse, hog, dog, cat and chicken) by using immunohistochemical techniques. Blood-stained fibrils taken out from the blood-stained thread which had been previously heated at 120°C for 30 seconds were examined with unstained fibrils as follows. Species identification was performed by the immunoenzyme (avidin-biotin-peroxidase complex; ABC) and direct immunofluorescence methods with commercial rabbit anti-human red cell serum (IgG) absorbed with the red cells of chimpanzee, Japanese monkey, horse, dog and hog, respectively. The results were negative for the animal bloodstains except for the primates of which bloodstains gave weak positive reactions, especially in the

chimpanzee. But the bloodstains of the Japanese monkey showed almost negative findings in the direct immunofluorescence method.

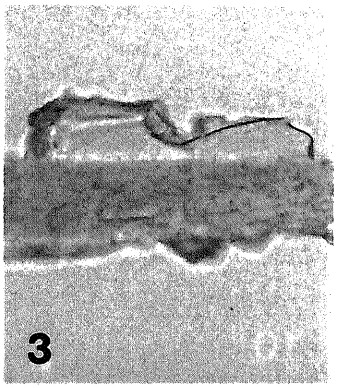
Immunohistochemical techniques were investigated concerning their availability for microscopic blood-grouping on blood-stained fibrils by using commercial mouse monoclonal antibodies as primary antibodies. In the ABO system, A-, B- and O(H)-activities were able to be specifically detected by both immunoenzyme (ABC or direct) and immunofluorescence techniques with monoclonal anti-A or -B and labeled UEA-I lectin. The grouping results were completely identical with those obtained by the absorption-elution technique on the original blood-stained threads. In the MN system, M-activity was more apparently demonstrated in the group M and MN donor than in the group N by the immunofluorescence (biotin-avidin) method using a monoclonal anti-M antibody, but faint fluorescence was partially noticed also on the specimens of group N. N-activity detected with a monoclonal anti-N was most distinctly observed in the group O-N, but the intensity of the fluorescence decreased in the group MN. Weak N-activity was partially found also in the group M. However, MN-grouping was able to be successfully carried out by mixed-cell-agglutination-reaction (MCAR) by the suitable selection of the reagents. In the Lewis system, the distribution and intensity of Le^a-activity in the Le (a-b+) group were nearly similar to those in the Le (a+b-).

The results obtained above show that human blood-stained fibrils can be distinguished from those of animals except for the chimpanzee (species identification) and microscopic ABO-grouping can be successfully performed on the fibrils by the immunohistochemical methods with monoclonal antibodies.

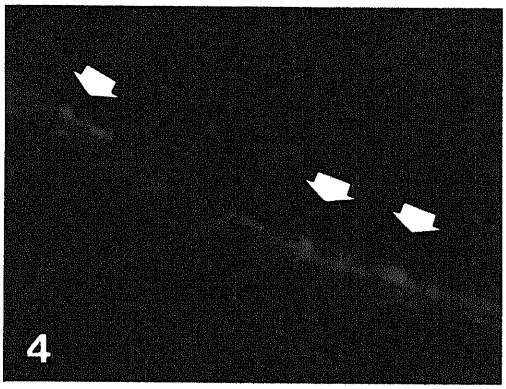


1

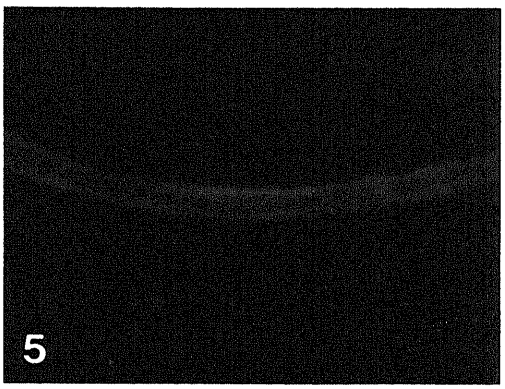
2



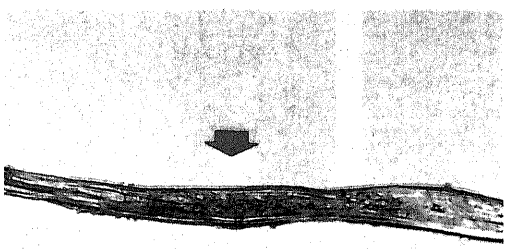
3



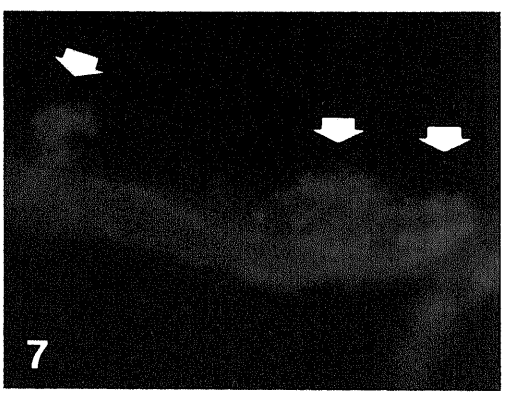
4



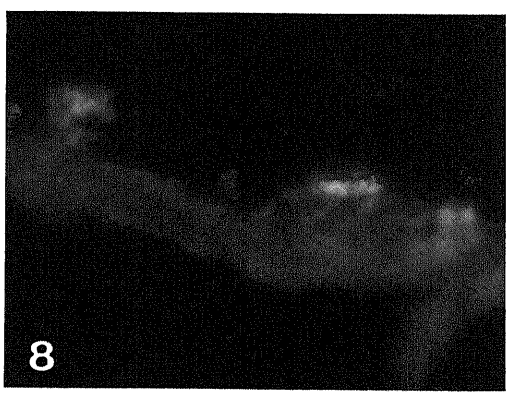
5



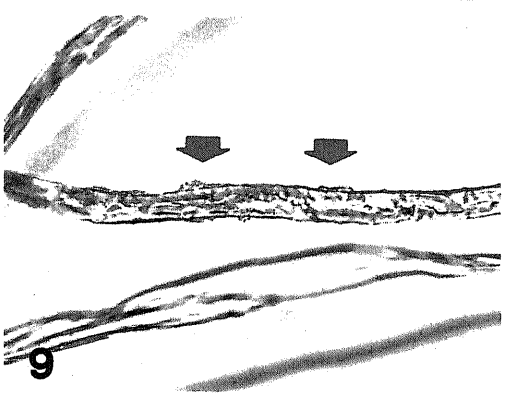
6



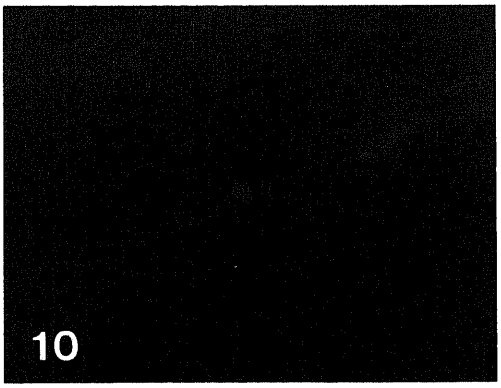
7



8



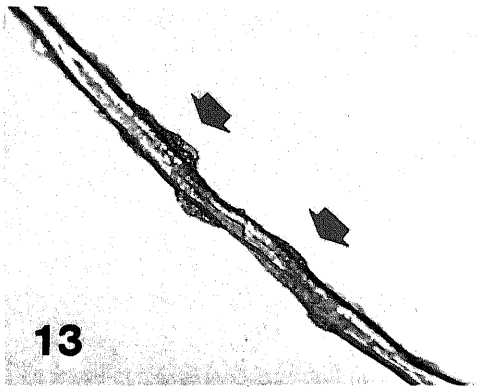
9



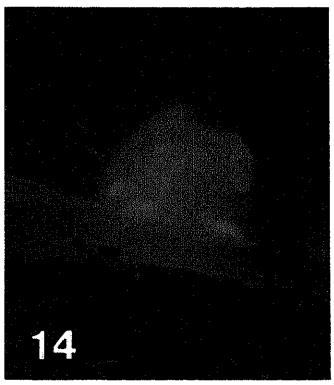
10

11

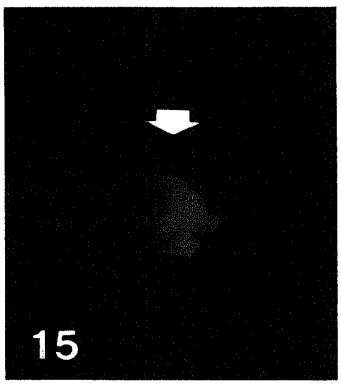
12



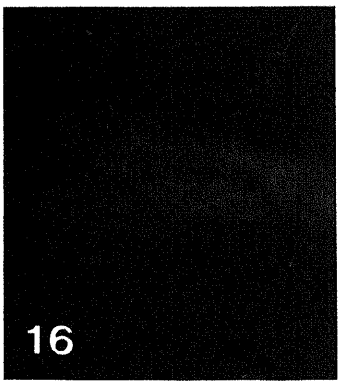
13



14

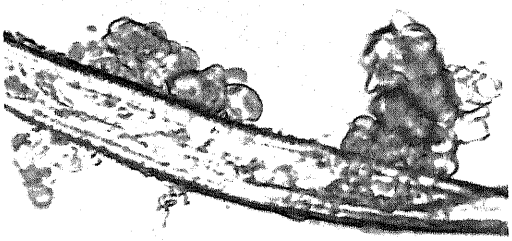


15



16

17



18