

唾液および毛髪の血液型検査法の確立による
鑑識科学への応用研究

2003年

大 森 毅

唾液および毛髪の血液型検査法の確立による
鑑識科学への応用研究

2003年

大森 毅

目次

	ページ
略語表	3
緒論	4
第一章 分泌型・非分泌型における唾液中 A 型糖鎖の単離と同定	8
第一節 唾液中 A 型糖タンパク質の単離	11
第二節 唾液中 A 型糖タンパク質の糖組成	14
第三節 唾液中 A 型糖鎖の同定	16
第四節 考察	20
第二章 唾液中 A 型糖鎖に対するモノクローナル抗体の作製	22
第一節 新規抗 A 型抗体の作製	23
第二節 新規抗 A 型抗体の反応特性	24
第三節 考察	31
第三章 新規抗 A 型抗体の ABO 式血液型鑑定への応用	34
第一節 新規抗 A 型抗体の体液鑑定への応用	36
第二節 新規抗 A 型抗体を用いた解離試験法の確立と 毛髪 of 血液型鑑定への応用	41
第三節 考察	50

総括	51
実験の部	54
第一章実験	54
第二章実験	63
第三章実験	69
謝辞	77
引用文献	78
論文目録	93

略語表

CWS	: cell-wall skeleton
DEAE	: diethylaminoethyl
DNA	: deoxyribonucleic acid
ELISA	: enzyme linked immunosorbent assay
Fuc	: fucose
Gal	: galactose
Glc	: glucose
GalNAc	: <i>N</i> -acetylgalactosamine
GlcNAc	: <i>N</i> -acetylglucosamine
HRP	: horseradish peroxidase
IgA	: immunoglobulin A
IgG	: immunoglobulin G
IgM	: immunoglobulin M
HPLC	: high performance liquid chromatography
Le ^a	: Lewis a
Le ^b	: Lewis b
mAb	: monoclonal antibody
Man	: mannose
MPL	: monophosphoryl LipidA
nMu	: salivary mucin obtained from non-secretors
PBS	: phosphate buffered saline
QAE	: quaternary aminoethyl
SD	: standard deviation
SDS	: sodium dodesylsulfate
sMu	: salivary mucin obtained from secretors
TCA	: trichloroacetic acid
TDM	: trehalose-dimycolates
UV	: ultraviolet
Xyl	: xylose

緒 論

鑑識科学は、犯罪・事故現場に遺留された種々の資料を科学的な方法で検査し、証拠的価値を引き出すための学問である。鑑識科学が取り扱う証拠資料には様々な物があるため、証拠資料の検査には、自然科学の各分野における知識、技術が応用される¹⁾。血液、体液、毛髪などの生物学的試料からは、形態学的、生化学的あるいは免疫学的な検査によって様々な情報を得ることができる。鑑定資料から得られる種々の情報の中でも ABO 式血液型は捜査情報としての必要性が高く、警察鑑識においては ABO 式血液型検査は未だ重要な業務である。

ABO 血液型物質は糖鎖であるので (Fig.

1), タンパク質抗原に比べて時間経過に伴う変化が少なく、古い鑑定資料からも検出することが可能である^{2, 3)}。また、血液型物質は、赤血球^{4) ~7)}以外にも、唾液⁸⁾、精液⁹⁾、胃液¹⁰⁾、毛髪¹¹⁾、骨¹²⁾、爪¹³⁾などほとんど全身に分布していることから、事件・事故現場に遺留された証拠資料のうち、血液を始め分泌液、体組織など、かなりの種類の資料からの検査が可能である^{2), 14) ~22)}。また、日本人に

おいては、A 型 : O 型 : B 型 : AB 型の比率は約 4 : 3 : 2 : 1 であり^{23), 24)}、他民族に比べて特定の型への偏りが少なく、血液型情報だけでもある程度の関係者の絞り込みが可能である。さらに、多くの日本人は医療機関などで血液型検査を行っており、その検査結果は記録として残っている可能性が高いため、個人情報として信頼性が高い。このこと

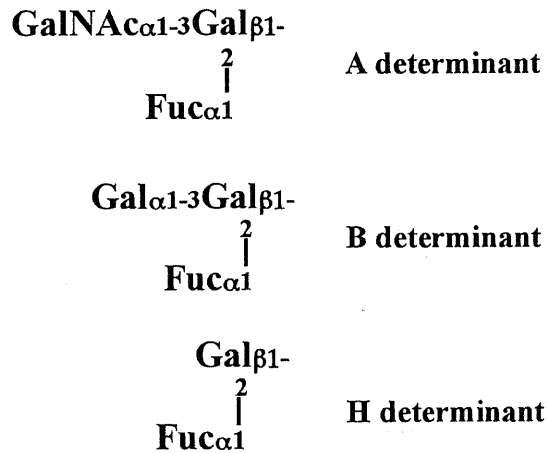


Fig. 1 Structures of ABH blood group determinants.

は、対照資料との比較が必要な DNA 型鑑定とは異なり、証拠資料の血液型鑑定結果が直ちに捜査情報となり得ることを示す。近年、鑑定に導入された DNA 型検査法は、特定の染色体上に存在する高い多型性を持つ繰り返し配列部位を利用してグループ化する手法であり^{25)~28)}、鑑定資料と、比較すべき資料（対照資料）とが同一であるか、あるいは異なるものであるかを鑑定する場合（異同識別）には極めて有効な鑑定手法であるが、対照資料が存在しない場合には、鑑定資料の検査結果が得られても情報としては有用ではない。これらの理由により、ABO 式血液型鑑定結果は未だに捜査情報としては有用である。また、DNA 型検査は相当の手間と時間を要するため、現場から採取された全ての資料に DNA 型検査を適用することは現実的には困難であるが、ABO 式血液型の検査は、DNA 型検査に進む前段階としてのスクリーニングテストとしての意味も持つ。実際に全国の警察本部科学捜査研究所で実施されている DNA 型検査の物件数は、年間二千数百件である²⁹⁾が、一方、ABO 式血液型検査の物件数は、年間約 19 万件に上っている³⁰⁾ことから、警察鑑識においては ABO 式血液型検査が未だ重要な業務であると言える。刑法犯の認知件数が増加の一途をたどる現状では³¹⁾、今後処理しなければならない鑑定資料数の増加が見込まれ、スクリーニングテストとしての ABO 式血液型検査法の価値もますます重要なものになると予想されるため、ABO 式血液型検査を維持していくための基礎的研究は今後も重要な課題である。

警察鑑識における血液型検査は、血液型物質を抗原抗体反応を用いて検出する方法が用いられており、A 型、B 型、O 型あるいは AB 型の型判定を行っているが、臨床医学の現場における検査試料のように、常に新鮮な赤血球を用いた検査が可能なわけではなく、溶血した血液や斑痕化した血液、または体液や体液斑あるいは毛髪や爪などの硬組織を鑑定資料とした検査を行う必要がある。そのため、臨床検査とは異なった特殊な検査技術の開発や、微量な、あるいは古い現場資料から、確実な血液型判定を可能にするための検査法の改良が、現在でも重要な課題である。その一方で血液型遺伝子の研究が進み^{32)~41)}、遺伝子から ABO 式血液型を推定する研究が行われつつあるが^{38), 42)~47)}、

表現型の判定と遺伝子からの判定が食い違う例が報告されており^{48) 49)}、血液型検査法として導入するにはまだ問題もある。さらに、抗原抗体反応を用いた検査は手技が簡単で、短時間での検査が可能である一方で、遺伝子からの血液型検査には相当の長時間を要する。このため、大量の鑑定資料の検査を行わなければならない第一線においては、全ての鑑定資料について遺伝子からの血液型検査を行う余裕はなく、抗原抗体反応を用いた検査が今後も主流であり続けると予想される。

従来より、抗原抗体反応を用いた血液型検査にはヒトの血清中に存在する抗 A 凝集素あるいは抗 B 凝集素を原料として作製された検査試薬が使用されてきた^{2), 17), 50)}。しかし、人道的な理由から、ヒト血清を原料とした試薬の製造が中止になり、検査試薬はマウス由来のモノクローナル抗体にほぼ全面的に切り替わった。現在市販されている血液型検査用マウスモノクローナル抗体は、輸血に備えての臨床検査など、医療現場で使用されることを目的として作製されているため、その反応特性が分泌液や毛髪などの、血液以外の鑑定資料からの検査には、必ずしも適しているとは限らず、従来より用いられてきたヒト血清由来の検査試薬で行った検査結果と一致しない例が多数確認された^{51), 52), 53)}。特に、分泌型唾液と非分泌型唾液の検査結果が、従来のヒト血清由来検査試薬を用いた場合に得られた結果とは異なるものであった点、および毛髪から A 型の判定が全く不可能であった点が極めて大きな問題点であり、A 型の判定における問題解決が最優先課題であると考えられた。このため、血液型鑑定精度の向上を目的として以下の研究を行った。

先ず、重要な証拠資料である唾液の血液型抗原には、分泌型と非分泌型との間で相違が存在するか否か調べた。なお、ヒトは唾液・精液などの分泌液中に、ABO 式血液型物質を多量に分泌する分泌型と、分泌しない非分泌型の二通りのタイプがある^{54), 55)}。白色人種の非分泌型では、唾液中に血液型物質を全く分泌しないが^{56), 57)}、日本人においては、少量の血液型物質が合成され、唾液中にも分泌される^{58), 59)}。従って、日本人

の非分泌型唾液中の血液型糖鎖を分析することは可能である。なお、これまでに唾液タンパク中の糖鎖を切り出して分析を行った報告はあるが^{60)~62)}、これらは分泌型と非分泌型を区別してそれぞれからの唾液を採取しているわけではない。そこで著者は、A型のヒトから分泌型・非分泌型を区別して、唾液を採取し、血液型物質を保持する糖タンパク質を分離し、さらにそれらが持つ糖鎖の特徴を調べ、分泌型と非分泌型との間で比較を試みた（第一章）。

続いて分泌型唾液と非分泌型唾液それぞれのA型物質に対する抗体の作製を試みた。分泌型唾液と非分泌型唾液の血液型物質のそれぞれを識別する抗体が存在すれば、型判定と同時に分泌・非分泌の判定も可能になる。なお、唾液のABO式血液型物質に対する抗体作製の報告はあるが^{63)~67)}、全て分泌型唾液を免疫して作製しており、非分泌型唾液を免疫してABO式血液型物質を認識する抗体を作製した報告はない。しかしながら、前述のとおり、日本人においては非分泌型であっても少量の血液型物質を唾液中に分泌するので、日本人の非分泌型の血液型物質を認識する抗体を作ることは可能であると考えられる。さらに、分泌型・非分泌型それぞれの唾液を免疫して作製された抗体の特異性が互いに異なる可能性も考えられる。そこで、分泌型・非分泌型それぞれの唾液から得た血液型物質を保持する糖タンパク質を免疫してマウスモノクローナル抗体を作製し、それらの反応特異性を比較した。その結果、特異性の異なる数種類の抗体が得られた（第二章）。

さらに、これらの抗体を鑑定に用いた場合に、血液型判定と同時に分泌型・非分泌型の識別が可能であるか否か検討し、作製した抗体の実用化の可能性を探った。また同時に、毛髪からの血液型検査の問題解決のために、それぞれのモノクローナル抗体間での熱安定性の差異に着目して、解離試験における加熱条件についての基礎的な検討を行い、検査精度の改善を試みた。続いて確立した方法のブラインドテストによる評価を行って、改良の効果を確認した（第三章）。

第一章 分泌型・非分泌型における唾液中 A 型糖鎖の 単離と同定

ABO 式血液型は、1901 年に Landsteiner によって発見された最初の血液型である^{54), 68)}。各表現型については Table 1-1 に示すとおりである。ABO 式血液型物質は、赤血球膜上においては糖脂質および糖タンパク質中の N-結合型糖鎖として存在し、一方、分泌液中や血清中にはムチンなどの糖タンパク質中の O-結合型糖鎖として主に存在する^{69) ~71)}。また、ヒトは唾液・精液などの分泌液中に、ABO 式血液型物質を多量に分泌する分泌型と、分泌しない非分泌型の二通りのタイプに分けられる^{54), 55)}。しかしながら、日本人の非分泌型個体においては、しばしば唾液中に少量の血液型物質が存在することが認められている。これまで我が国では分泌型と非分泌型の識別は血液型物質を凝集阻止試験で半定量的に測定することで行われてきたが、分泌型と非分泌型の間での型物質量の明確な境界は定められていない^{14), 72)}。なお、日本人では約 8 割が分泌型、約 2 割が非分泌型である⁷²⁾。

Table 1-1 ABO system of antigens on erythrocytes and antibodies in plasma

	Erythrocytes	Plasma
Phenotype	Antigens	Antibodies
A	A, H	anti-B
B	B, H	anti-A
O	H	anti-A, anti-B
AB	A, B, H	—

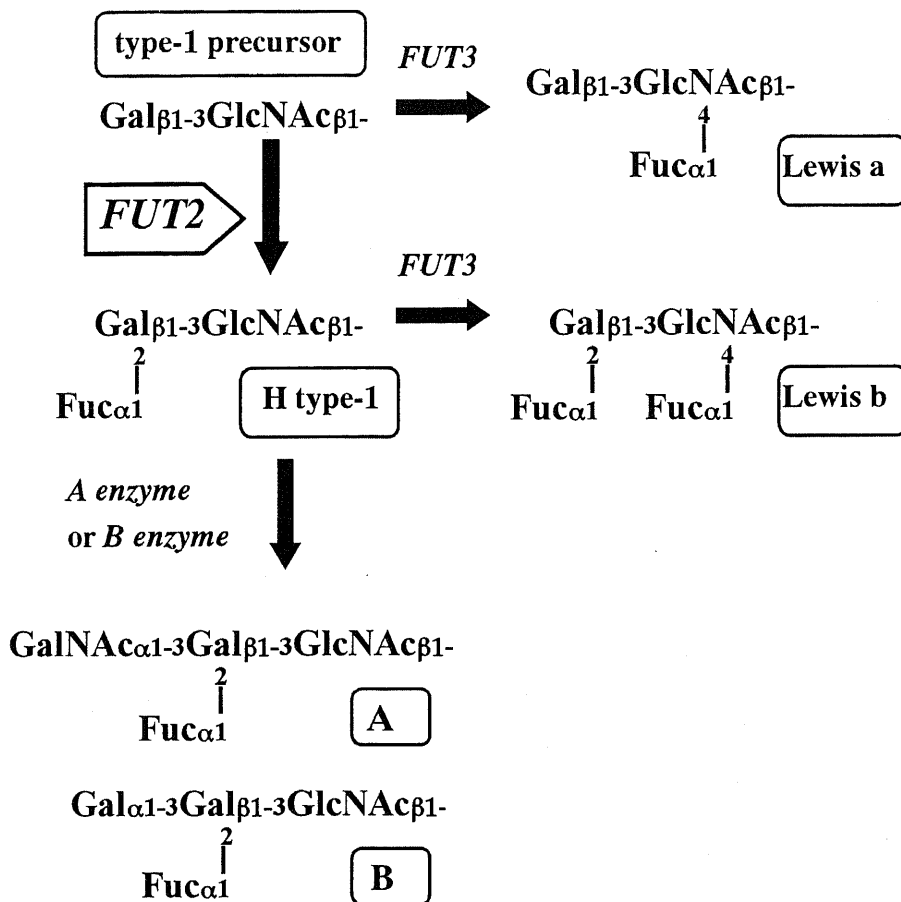


Fig.1-1 Biosynthetic pathway involved in synthesis of Lewis blood group antigens and secretion of ABH antigens in saliva. *FUT2*; $\alpha 1,2$ -fucosyltransferase. *FUT3*; $\alpha 1,3/4$ -fucosyltransferase.

分泌型・非分泌型の間の遺伝的相異は、以下のように説明されている。

A型あるいはB型物質は、H物質のガラクトース残基の3位に α -D-N-アセチルガラクトサミンあるいは α -D-ガラクトースを転移することでそれぞれ合成されるが^{54), 73) ~77)}、A型、B型物質の原料となるH物質は、 $\alpha 1,2$ -フコース転移酵素により、前駆体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基の2位に α -L-フコースを転移することにより合成される。H物質の合成に関与する $\alpha 1,2$ -フコース転移酵素にはH遺伝子によりコードされている酵素(*FUT1*)と、Se遺伝子によりコードされている酵素(*FUT2*)の二種類がある^{56), 78) ~82)}。唾液腺などの分泌組織では、Se遺伝子による制御を受けており、H物質の合

成は *FUT2* に依存する⁷⁴⁾。分泌型と非分泌型の違いは、この *FUT2* が、正常型であるか、あるいは変異型であるかという点である^{56), 80), 81)}。分泌型は正常な *FUT2* 活性を有し、唾液などの分泌液中に大量の ABO 式血液型物質を分泌する。一方で非分泌型は *FUT2* 活性が失われているか、あるいは極めて弱いため、分泌液中への ABO 式血液型物質の分泌は起こらないか、あるいは極めて少ない。なお、最近の知見によれば *FUT2* の変異には民族間において差異が認められ^{58), 83) ~90)}、日本人の大多数の非分泌型において観察される A385T の変異を有する個体では、*FUT2* 活性が正常型の 2~3% 程度残存しており、そのため、非分泌型であっても少量の血液型物質が唾液中に分泌される^{58), 59)}。一方、白人、黒人あるいは中近東系人種に多く見られる変異は G428T であるが、この場合はナンセンス変異となるため酵素は合成されず、従って *FUT2* 活性も現れないため、ABO 式血液型物質の分泌は全く起こらない⁵⁶⁾。なお、血球上の H 物質の合成は *FUT2* ではなく、*FUT1* による制御を受ける。従って、血球上においては分泌型・非分泌型の別に関わらず ABO 式血液型物質は存在する。但し、ポンベイ型やパラポンベイ型と称される変異型では、*FUT1* をコードしている遺伝子上の変異が原因で、血球上の H 物質の合成が不可能となっている^{91) ~93)}。

また、分泌型・非分泌型と関係の深い血液型として、ルイス式血液型がある^{54), 68), 79), 94) ~96)}。ルイス式血液型には Lewis a (以下 Le^a) 物質を主に合成する $Le(a+b-)$ 型、Lewis b (以下 Le^b) 物質を主に合成する $Le(a-b+)$ 型、Lewis 物質を合成しない $Le(a-b-)$ 型が存在する⁹⁶⁾。 Le^a 物質は、H 物質の前駆体糖鎖である $Gal\beta 1-3GlcNAc\beta 1$ 構造の *N*-アセチルグルコサミン残基 (GlcNAc) の 4 位に、 $\alpha 1,3/4$ -フコース転移酵素 (*FUT3*) の作用により α -L-フコースを転移することで合成される。また、 Le^b 物質は H 物質の *N*-アセチルグルコサミン残基の 4 位に、同じく *FUT3* の作用により α -L-フコースを転移することにより合成される⁹⁷⁾ (Fig. 1-1)。このことから、以下の関係が成り立つ。

Le(a-b+)型 → 分泌型

Le(a+b-)型 → 非分泌型

Le(a-b-)型 → 分泌型・非分泌型両方の可能性

これまで述べてきたように、日本人の非分泌型においては、少量の ABO 式血液型物質を合成し、分泌することができるため、非分泌型であっても唾液などの分泌液から血液型判定が可能である。しかしながら、分泌型および非分泌型唾液からの血液型検査を市販モノクローナル抗体を用いて行ったところ、ヒト血清由来の検査試薬を用いて行った結果と一致しなかった例が認められ、分泌型と非分泌型の間では血液型抗原に何らかの差異が存在するのではないかと考えられた。そこで、鑑識科学的に重要である唾液からの血液型検査の精度向上のためには、唾液中血液型物質の分泌型・非分泌型の間での相違点を明らかにする必要があると考えた。なお、これまでに唾液中の糖鎖を分離して分析を行った報告はあるが^{60)~62)}、これらの報告では O 型 1 名 (分泌型) から採取⁶⁰⁾、O 型 20 人 (分泌型・非分泌型の区別は不明) から採取⁶¹⁾ あるいは O 型 1 名 (分泌型・非分泌型の区別は不明) から採取⁶²⁾ しており、分泌型と非分泌型それぞれを区別して唾液を採取し、糖鎖を分離して比較検討した報告はない。著者は、A 型のヒトから分泌型・非分泌型を区別し、唾液を採取し、それぞれの唾液中糖タンパク質の血液型糖鎖について比較検討した⁹⁸⁾。

第一節 唾液中 A 型糖タンパク質の単離

唾液中の血液型物質を保持する糖タンパク質は単一成分であるか否かを調べるために、まずアフィニティークロマトグラフィーを用いて唾液中に存在する血液型物質全てを集め (Fig. 1-2)、次いで溶出した分画を回収し、SepharoseCL-

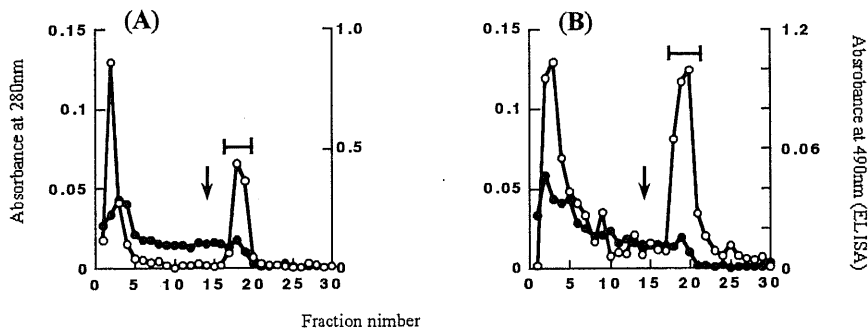


Fig. 1-2 The affinity chromatograms of secretor's saliva (A) and non-secretor's saliva (B). Arrows indicate each elution-starting point. The open circles indicate change of absorbance at 280nm and the closed circles indicate change of absorbance at 490nm as results of ELISA. The bar in each figure indicates fractions pooled as a type-A active fraction

6B を用いたゲル濾過を行った。その結果、分泌型では回収した成分の大部分がボイドボリュームに溶出され、さらに低分子分画にもわずかにピークが認められた(Fig. 1-3)。ボイドボリュームに溶出されたピークは、モノクローナル抗体を用いた ELISA により A 型物質の存在が確認された。また、低分子分画に認められた小さいピークは、回収の後、濃縮し、モノクローナル抗体を用いた ELISA あるいはヒト由来抗 A 血清を用いた凝集阻止試験により、A 型物質の存在を確認した。一方、非分泌型ではボイドボリュームに溶出されるピークのみが認められた(Fig. 1-3)。従って、血液型物質は分泌型においても非分泌型においても主に SepharoseCL-6B のボイドボリュームに溶出される糖タンパク質上に存在すると考えられる。

また、分泌型・非分泌型から得られた糖タンパク質が、均一な物質であるか否かを検討するため、キャピラリー電気泳動を行ったところ、分泌型から得られた糖タンパク質も、非分泌型から得られた糖タンパク質も、ともに 1 本のピークを与えた (Fig. 1-4)。このことから 両者とも、電気泳動的に均一な成分から成り立っていると考えられる。なお、両者を混合して分析したところ、一本

のピークが得られたため、両者は電気泳動的には同一と判断できるものと考えられた。

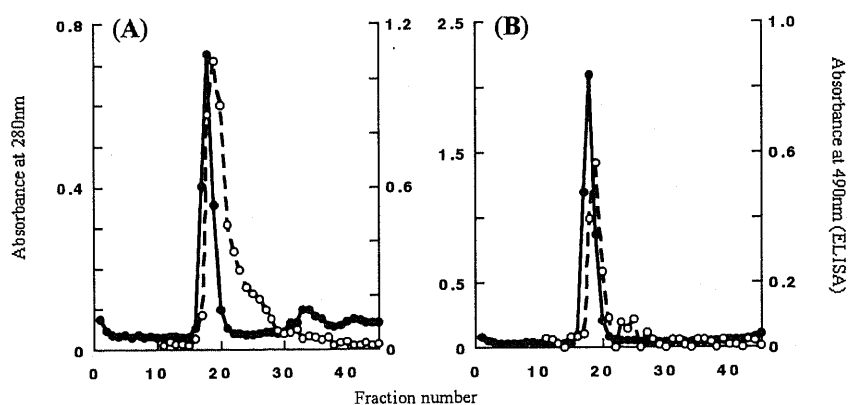


Fig. 1-3 The patterns of Sepharose CL-6B gel filtration of the type-A active fraction obtained from saliva by affinity chromatography. The open circles indicate change of absorbance at 280nm and the closed circles indicate change of absorbance at 490nm as results of ELISA: A; The sample from secretor's saliva, B; The sample from non-secretor's saliva.

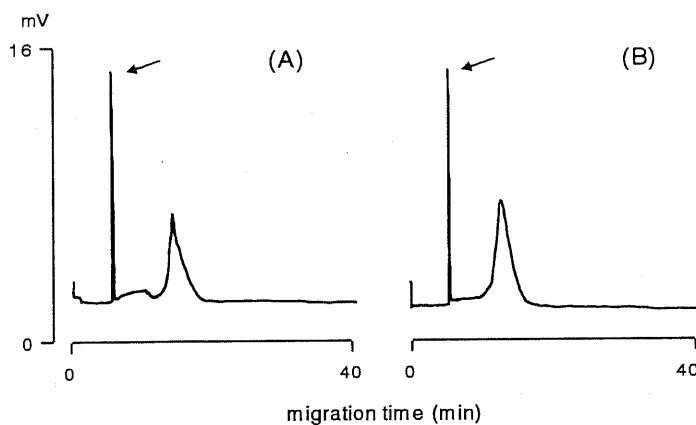


Fig. 1-4 The electropherogram of the type-A active protein separated by gel filtration. Capillary electrophoresis condition: capillary, non-coated fused-silica capillary (75 μ m i.d. x 55cm to the detector); buffer, 50 mM Glycine-HCl (pH5.0), 5 mM SDS; applied voltage, 20 kV; monitoring, 210 nm. A; Sample from secretor's saliva, B; Sample from non-secretor's saliva. Arrows indicate neutral marker (Acetone).

第二節 唾液中 A 型糖タンパク質の糖組成

次に唾液中の血液型物質を保持する糖タンパク質の糖組成を、分泌型と非分泌型の間で比較した。

A 型物質を含有する糖タンパク質を得るために、A 型唾液をグアニジン塩酸塩の存在下ゲル濾過で分離したところ、ボイドボリュームに血液型活性が確認された。この分画を集め、キャピラリー電気泳動を行ったところ 1 本のピークを与えたため、この分画中の成分は単一成分と見なし、これを分析試料とした。

糖組成分析の結果を Table 1-2 に示す。得られた糖タンパク質の糖組成分析の結果、主成分はガラクトース (Gal), *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc), フコース(Fuc)および *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) であり、グルコース (Glc) およびキシロース (Xyl) は検出されなかった。また、マンノース(Man) はほとんど検出されなかった (Table 1-2)。これらの結果から糖鎖はムチン型糖鎖と推定された。

Fuc 含量は、分泌型 (Le(a-b+)型) においては、1.24 nmol/ μ g protein であった。

Table 1-2 Saccharides composition of salivary mucin from Japanese subjects.

Secretory status	Lewis phenotype	Monosaccharide (nmol/ μ g protein)						
		Man	Fuc	Gal	Xyl	Glc	GlcNAc	GalNAc
Secretor	Le(a-b+)	trace	1.24	1.60	ND.	ND.	1.58	1.12
	Le(a-b-)	trace	1.10	1.29	ND.	ND.	1.18	0.93
Non-secretor	Le(a+b-)	trace	1.06	2.20	ND.	ND.	2.20	0.75

Man : mannose, Fuc : fucose, Gal : galactose, Xyl : xylose, Glc : glucose
 GlcNAc : N-acetylglucosamine, GalNAc : N-acetylgalactosamine
 N.D. : not detected

一方、非分泌型では 1.06 nmol/ μ g protein であり、Fuc 含量は分泌型のほうが高かった。また、GalNAc 含量も、分泌型 (Le(a-b+)型) では、1.12 nmol/ μ g protein であり、非分泌型では 0.75 nmol/ μ g protein となり、Fuc と同様に分泌型において高かった。分泌型で Fuc 含量が高いことは、分泌型個体が遺伝的に高い *FUT2* 活性を有していることと矛盾しない結果であり、また、GalNAc は、ムチン型糖鎖のコア構造において、セリンあるいはスレオニン残基と結合している糖であるが、同時に A 型構造の末端に存在する糖でもあり、分泌型において GalNAc 含量が高いことは、分泌型唾液において、血液型物質の量が多いという観察結果に一致している。一方、Gal および GlcNAc 含量は、分泌型 (Le(a-b+)型) において、それぞれ 1.60 nmol/ μ g protein および 1.58 nmol/ μ g protein であったが、非分泌型ではともに 2.20 nmol/ μ g protein であり、非分泌型では分泌型よりも Gal と GlcNAc の含有量が多かった。(Table 1-2)。分泌型・非分泌型ともに Gal と GlcNAc の量比がほぼ 1 : 1 であるという結果は、これらの糖鎖は Gal と GlcNAc が結合した構造を含むことを示唆し、これは糖鎖の中間構造として知られている Gal β 1-3GlcNAc β 1 構造あるいは Gal β 1-4GlcNAc β 1 構造と推測される⁹⁹⁾。非分泌型の糖鎖において Gal と GlcNAc 比が高いことは、Gal β 1-3GlcNAc β 1 (あるいは Gal β 1-4GlcNAc β 1) 構造が非分泌型において多いことを示唆するものであると考えられた。

なお、前述したように、Le(a-b+)型はすべて分泌型、Le(a+b-)型は全て非分泌型であり、Le(a-b-)型は両方の型の可能性がある。ここでは、Le(a-b-)型で分泌型の個体から得られた唾液についても糖組成を分析を行った。その結果、Gal および GlcNAc の含有量は非分泌型よりも低く、GalNAc 含有量は非分泌型よりも高かった。なお、Lewis 抗原を有しない個体であるにもかかわらず Fuc を含有することが示されたが、この Fuc は A 型物質あるいは H 物質の構造中に存在する Fuc であると考えられる。

Thornton らの唾液中ムチンの糖組成分析の報告によれば¹⁰⁰⁾, ムチン 1 μg 当たりの単糖は Fuc が約 0.8 nmol, Gal が約 1.4 nmol, GlcNAc が約 0.9 nmol であり, ここで示した分析結果に近い。なお, Thornton らが用いた唾液の提供者の血液型および分泌型・非分泌型の区別が不明であるため, GalNAc 量についての考察はできなかった。また, Amerongen ら¹⁰¹⁾ は, A 非分泌型唾液ムチン中の Fuc 残基数はムチン分子 1 mol 当たり 444~667 個であると述べている。本研究で得られたデータから換算すると, A 非分泌型における Fuc 残基数は約 1,000 残基となった。但し, ムチンの分子量は 10^6 Da と仮定して計算した^{100),101)}。なお, ここで用いたタンパク質濃度は Lowry のタンパク定量法¹⁰²⁾ で測定し, ウシ血清アルブミン相当量に換算した値であり, ムチンの乾燥重量とは必ずしも一致しない可能性がある。

第三節 唾液中 A 型糖鎖の同定

前節の結果, 分泌型と非分泌型との間で, 唾液中糖タンパク質の糖組成に差異が認められたので, 続いて血液型物質である糖鎖には分泌型と非分泌型との間で差異が認められるかどうか検討した。

唾液ムチンををアルカリ還元処理して糖鎖を切り出し, SephadexG-50 カラム (カラム体積約 132 ml) を用いたゲル濾過による分離を行ったところ, 分泌型においては分画番号 40 番 (溶出体積 60 ml) 付近から 48 番 (溶出体積 72 ml) 付近にかけていくつかの血液型活性を示すピークが観察されたが, 非分泌型においては, 分画番号 40 番付近に一本のピークが観察されたのみであった (Fig. 1-5)。この結果は, 分泌型の持つ糖鎖は, 非分泌型が持つ糖鎖と同程度の分子量か, それよりも小さい分子量を持つことを示している。糖組成分析の結果は, 非分泌型においては分泌型に比較して, Gal β 1-3GlcNAc (あるいは Gal β 1-

4GlcNAc) 構造が多いために平均すると長い糖鎖構造を持つ可能性を示しているが、ゲル濾過の知見は、糖組成分析の知見と一致するものであると考えられる。

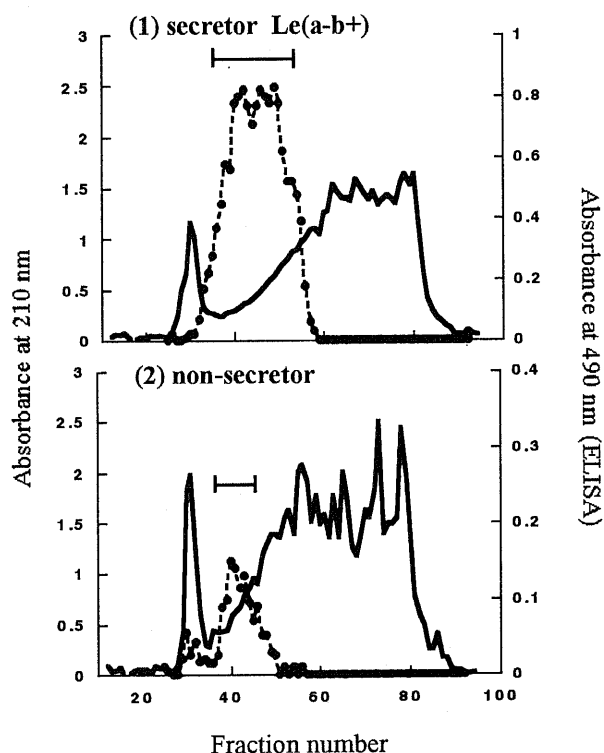


Fig. 1-5 Gel filtration of oligosaccharides liberated from salivary mucin on a column (1.5 cm i.d. x 75 cm) of Sephadex G-50, equilibrated with 20 mM NH_4HCO_3 . The oligosaccharide content of each fraction was analyzed by an absorbance measurement at 210 nm (solid line). The activities of type-A (●) were measured by ELISA. The bar in each figure indicates fractions pooled as a type-A active fraction.

続いてゲル濾過で分画した血液型活性を示す糖鎖分画を陰イオン交換クロマトグラフィーで分離した。素通り分画は中性糖鎖と考えられ、溶出液の塩濃度の上昇と共に溶出する分画が酸性糖鎖であると考えられる。分泌型 (Le(a-b+)型) においては、A型活性は、中性糖鎖分画 (素通り分画) と酸性糖鎖分画 (吸着分画) に観察された (Fig. 1-6)。Le^b 活性も同様に中性糖鎖分画と酸性糖鎖分画に観察されたが、Le^a 活性はほとんど観察されなかった。分泌型 (Le(a-b-)型)

においても、同様に A 型活性は、中性糖鎖分画と酸性糖鎖分画に観察された。なお、Le(a-b-)型はルイス抗原を有しないので、Le^a 活性も Le^b 活性も観察されなかった。非分泌型においては、A 型活性は、中性糖鎖分画のみに観察されたが、Le^a 活性は、中性糖鎖分画と酸性糖鎖分画の両方に観察された。また Le^b 活性が中性糖鎖分画に微弱であるが観察された。

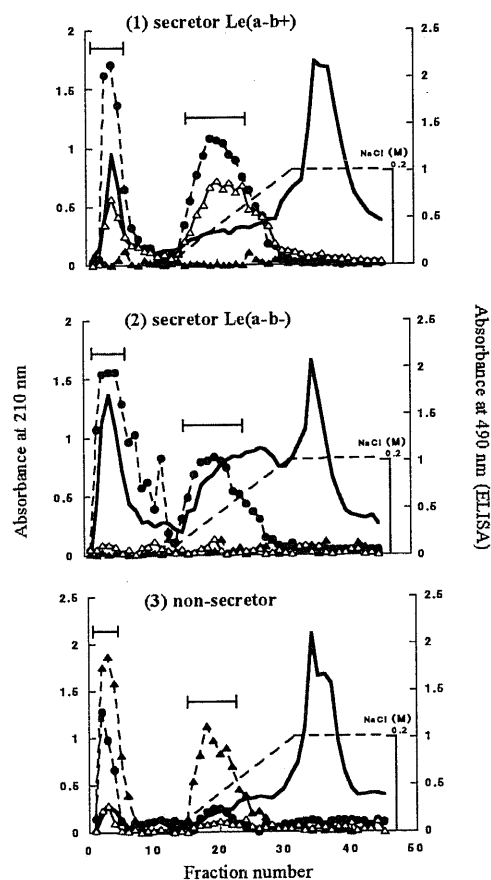


Fig. 1-6 Ion-exchange chromatography of oligosaccharides on a QAE-Sephadex A-25 column (1.2 cm i.d. x 9 cm). The oligosaccharides separated by gel filtration on the column of Sephadex G-50, were applied to the column equilibrated with 10 mM sodium bicarbonate buffer (pH 9.6). The column was washed with 12 ml of 10 mM sodium bicarbonate buffer (pH 9.6). Elution was performed using a linear concentration gradient from 0 M to 0.2 M NaCl (dotted line). The oligosaccharide content of each fraction was analyzed by absorbance measurement at 210 nm (solid line). The activities of type-A (●), Le^a (▲) and Le^b (△) were measured by ELISA. The bar in each figure indicates the fractions pooled as a type-A active fraction.

イオン交換クロマトグラフィーの結果，分泌型・非分泌型の両方において中性糖鎖分画に A 型糖鎖が観察されたので，中性糖鎖分画をアミノカラム HPLC で分析して，両者の比較を行った (Fig. 1-7)。分泌型においては，非分泌型ではほとんど観察されない溶出時間の早いピークが明瞭に観測された。また，非分泌型においては，溶出したピークのほとんどがほぼ同じ溶出位置に集中していた。アミノカラム HPLC においては，短い糖鎖ほど早く溶出する傾向が観察されることから¹⁰³⁾，分泌型は，非分泌型よりも短い糖鎖を多く含有するものと考えられる。

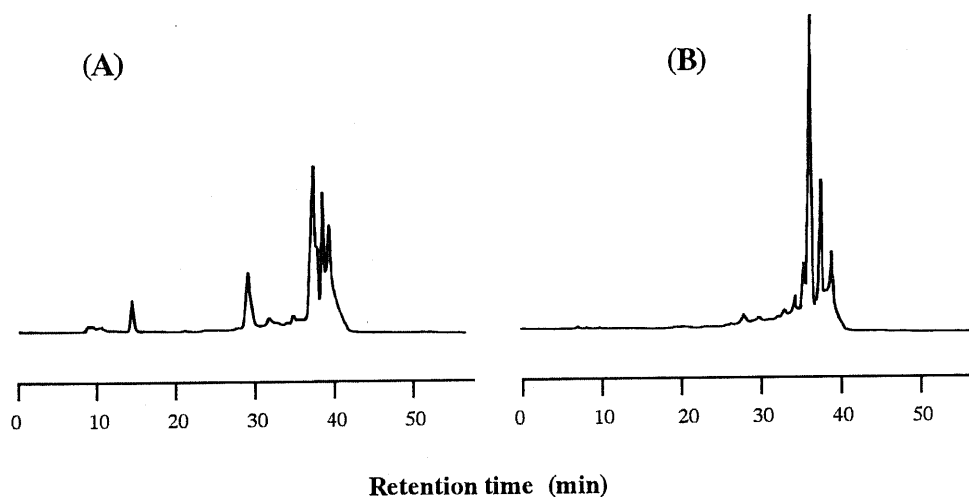


Fig. 1-7 High performance liquid chromatography of neutral oligosaccharide-alditol containing type-A determinant. The oligosaccharide-alditol samples derived from saliva of type-A secretor and non-secretor were separated by gel filtration and ion-exchange chromatography. (A), The oligosaccharide-alditol samples derived from secretor. (B), The oligosaccharide-alditol samples derived from non-secretor.

第四節 考察

唾液中血液型物質の分泌型・非分泌型の間での相違点を明らかにするために、A型の分泌型および非分泌型数名からそれぞれ唾液を採取し、血液型活性を持つ糖タンパク質の分離を行い、さらにそれらの持つ糖鎖の特徴を調べた。

その結果、唾液中の血液型物質は、分泌型・非分泌型ともに巨大分子量を持つ糖タンパク質上に存在することが示されたが、分泌型ではこのほかに2成分存在することが示唆された。また、血液型物質を保持する糖タンパク質の糖組成を比較したところ、分泌型と非分泌型との間で相違が認められ、非分泌型においては Gal β 1-3GlcNAc (あるいは Gal β 1-4GlcNAc) 構造が多いことが示唆された。さらに、糖タンパク質から糖鎖を分離し、クロマトグラフィーによる分析を行ったところ、分泌型では非分泌型よりも短い糖鎖が多く存在することが示された。これらの結果から、唾液中 A 型糖鎖には、分泌型および非分泌型の間で特徴的な差異が存在すると考えられる。このことは両者の血液型物質の相違点は、量的なものだけではないことを示している。

分泌型において、非分泌型よりも短い糖鎖が合成される可能性については、次のように考えられる。分泌型は *FUT2* 活性が高く、非分泌型では低い^{56), 80), 81)} ため、唾液ムチン上での糖鎖合成過程において、*FUT2* 活性が高い分泌型では、GlcNAc および Gal の転移による糖鎖の伸長よりも Fuc 転移による H 物質の合成が優先して起こるが、*FUT2* 活性が低い非分泌型では、Fuc 転移より糖鎖の伸長のほうが優先して起きると考えられる (Fig. 1-8)。このため、Fuc 転移された糖鎖は、相対的に分泌型では短く、非分泌型では長いものになっていると考えられる。なお、類似の知見が、小腸におけるルイス式血液型抗原を保持する糖脂質糖鎖において観察されているが^{104) ~106)}、ABO 式血液型物質における糖鎖の長さの知見は本研究において初めて示されたものである。

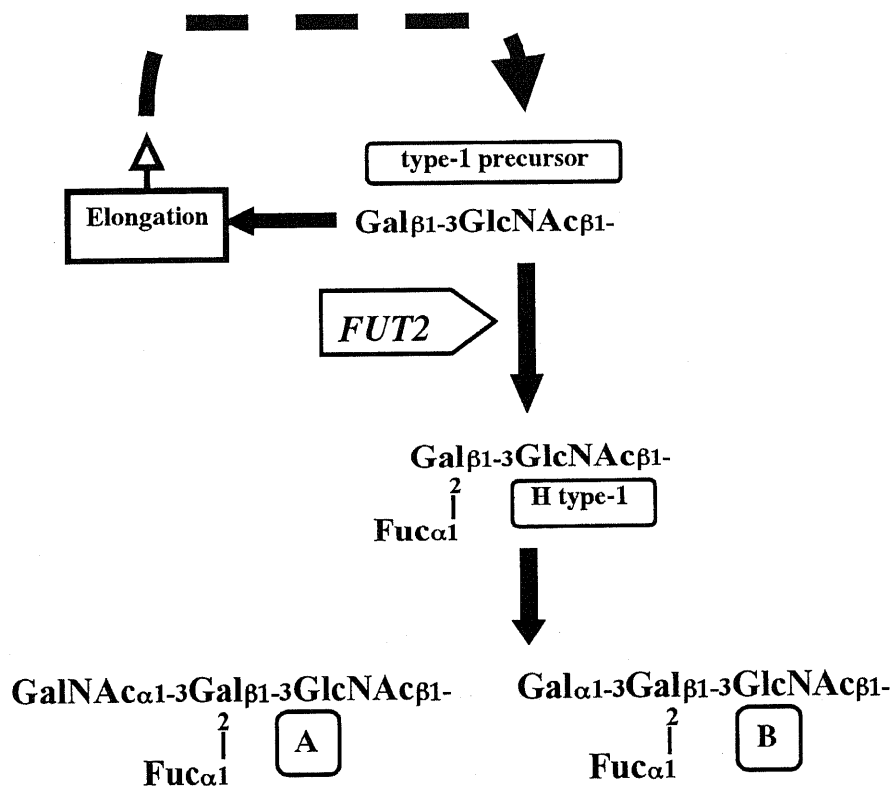


Fig. 1-8 Simplified schematic diagram of a cyclic pathway for the formation of ABH structures.

分泌型においては A 型糖鎖および Le^b 糖鎖が中性糖鎖分画および酸性糖鎖分画に観察されたが、A 型糖鎖あるいは Le^b 糖鎖は、非還元末端にシアル酸付加が起きることは考え難いため⁹⁹⁾、酸性基は、A 型末端は Le^b 末端ではない他の部位に結合しているものと推測される。なお、非分泌型において、酸性糖鎖分画に観察された糖鎖は Sialyl-Le^a である可能性がある⁷³⁾。

これらの結果は、分泌型と非分泌型との間には、従来考えられてきたような血液型物質の量的な差異以外にも、型物質糖鎖の構成に相違が存在するという、新しい知見を示しているものであると考えられる。

第二章 唾液中 A 型糖鎖に対するモノクローナル抗体 の作製

第一章において著者は、唾液中 A 型糖鎖は分泌型および非分泌型の間でその長さに差異が認められることを示した。続いて本章では、鑑識科学的な検査に適した抗体の作製を目指して、分泌型と非分泌型の血液型抗原の相違点を認識可能なモノクローナル抗体の作製を試みた^{107), 108)}。これまでに報告されている、ABO 式血液型物質を認識するマウスモノクローナル抗体の作製では、免疫原として赤血球^{109) ~113)}、ガン細胞^{114) ~115)}、合成抗原¹¹⁶⁾等と並んで、唾液^{63) ~67)}も用いられている。しかしながら、これらは分泌型個人から得た唾液を免疫原として使用しており、非分泌型個人より採取した唾液を免疫原として、ABO 式血液型物質に対する抗体を作製した例は報告されていない。欧米人においては非分泌型は唾液中に血液型物質を分泌しないために^{56), 57)}、ABO 式血液型物質に対する抗体を、非分泌型唾液の免疫によって作製することは不可能である。一方、日本人の非分泌型の唾液中には少量の血液型物質が存在しているが、大量に血液型物質を有する分泌型唾液を免疫原として用いる方が血液型物質に対する抗体の作製には有利と考えられたため、非分泌型を免疫して ABO 式血液型物質に対する抗体を作製した例がこれまで無かったものと推測される。しかし、第一章で明らかにしたように、唾液中 A 型糖鎖には、分泌型および非分泌型の間で特徴的な差異が認められたことから、分泌型と非分泌型の血液型物質には免疫学的に認識可能な相違点が存在するのではないかと考えられた。そこで、分泌型の A 型物質に特異的な抗体、非分泌型の A 型に特異的な抗体の作製が可能か否かを試みるために、分泌型および非分泌型唾液から分離した、血液型物質を保持する糖タンパク質をそれぞれ免疫して、モノクローナル抗体を

作製し、得られた抗体の反応特性を検討した^{107), 108)}。さらに、それぞれの抗体が認識する糖鎖抗原構造を推定した。

第一節 新規抗 A 型抗体の作製

A 型の分泌型および非分泌型の唾液ムチン（以下それぞれ sMu および nMu）を免疫原として用い、モノクローナル抗体の作製を試みた。sMu および nMu は、A 型唾液を SepharoseCL-6B でゲル濾過して得た。

sMu を免疫したマウスの脾細胞とミエローマ細胞を融合して作製したハイブリドーマが産生する抗体のうち、A 型三糖に対する抗体を選別する目的で、合成 A 型三糖がポリアクリルアミドに結合した構造を持つ市販合成抗原に対するスクリーニングを行った。さらにこれら抗体の sMu および nMu に対する反応を調べたところ、免疫抗原である sMu に対しては全てが陽性であった。しかしながら、nMu に対しては陽性である抗体と陰性である抗体が観察された。ここで得られた抗体のうち、sMu のみに反応し、nMu には反応しない抗体を産生する細胞をクローニングし、1 株のクローンを得た。同時に sMu と nMu の両方に反応する抗体を産生する細胞をクローニングし 2 株のクローンを得た。

一方、nMu を免疫したマウスから作製したハイブリドーマが産生する抗体のうち、合成 A 型三糖を認識する抗体を選別した。さらにこれらの抗体の sMu および nMu に対する反応を調べたところ、免疫抗原である nMu に対しては全てが陽性であり、また sMu に対しても全てが陽性であった。ここで得られた抗体を産生する細胞をクローニングし、1 株のクローンを得た。

得られた抗体は番号を附し、続いて、サブクラスを決定した (Table 2-1)。また、各抗体の sMu および nMu に対する反応は Fig. 2-1 に示す。

Table 2-1 Produced antibodies by immunization of salivary mucin

Antibodies	K7405	K7421	K7422	K7516
Immunogen	sMu	sMu	sMu	nMu
Immunoglobulin subclass	IgM	IgM	IgM	IgM

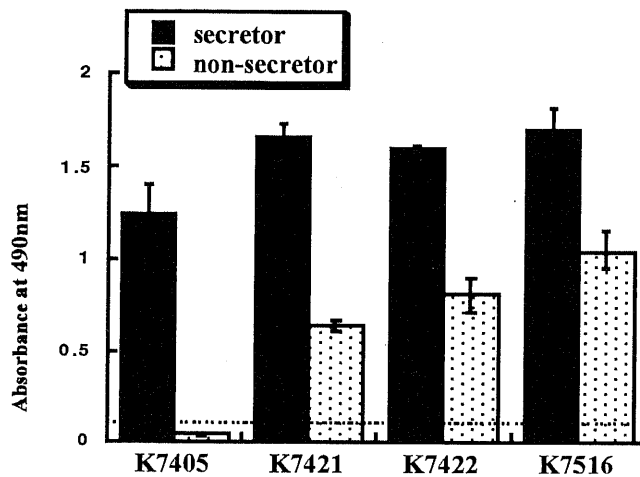


Fig. 2-1 Reactivity of anti-A monoclonal antibodies (mAbs) to salivary mucin. Reactivity of mAbs to $2\mu\text{g/ml}$ of the salivary mucin was tested by ELISA. The average and the standard deviation ($n=3$) are indicated. The dotted line shows the cut-off level calculated from the absorbance of negative control wells (without saliva).

第二節 新規抗 A 型抗体の反応特性

2-1 抗体の合成抗原に対する反応特異性

合成糖鎖をプロピルアミノ基を介してポリアクリルアミドに結合させた市販合成抗原を利用して、血液型と関連する構造を持つ糖鎖に対する抗体の反応を、ELISA で調べた。Fig. 2-2 には、A 型三糖 ($\text{GalNAc}\alpha 1-3[\text{Fuc}\alpha 1-2]\text{Gal}\beta 1$)、A 型二糖 ($\text{GalNAc}\alpha 1-3\text{Gal}\beta 1$)、N-アセチルガラクトサミン ($\text{GalNAc}\alpha 1$) および H type-1

(Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-) を結合させた抗原に対する抗体の反応を示す。全ての抗体が A 型三糖糖鎖のみに反応し、それ以外の血液型類似糖鎖、すなわち、A 型二糖、N-アセチルガラクトサミン、H type-1 に対して反応しなかった。なお、全ての抗体において、Le^a (Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1), Le^b (Fuc α 1-2Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-) および B 型三糖 (Gal α 1-3[Fuc α 1-2]Gal β 1) 抗原に対しては反応しないことを確認している。従って、得られた抗体は全て A 型に特異的な抗体であることが明らかとなった。

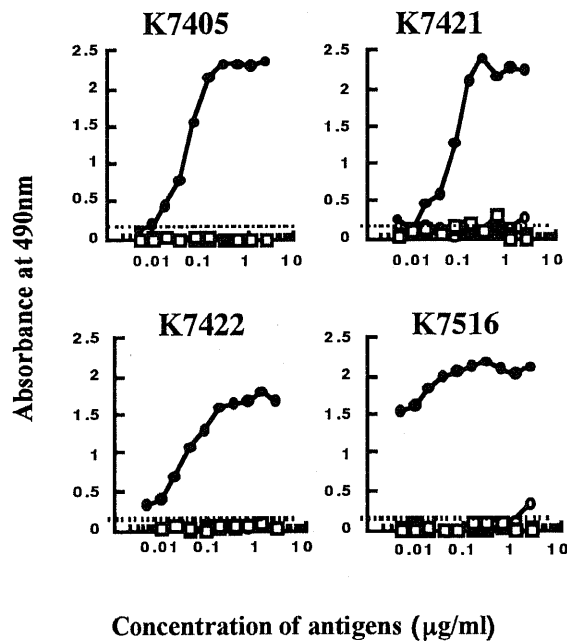


Fig. 2-2 Reaction of anti-A monoclonal antibodies (mAbs) with synthetic type-A related antigen bound to polyacrylamide beyond a propylamino group spacer. ●, type-A trisaccharides (GalNAc α 1-3[Fuc α 1-2]Gal β 1-); ○, GalNAc α 1-3Gal β 1-; ■, GalNAc α 1-; □, H type-1 (Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-). The dotted line shows the cut-off level calculated from the absorbance of negative control wells (without saliva).

2-2 唾液ムチンから切り出した糖鎖に対する抗体の反応

作製した抗体は、抗原として用いた唾液ムチン上の A 型糖鎖を認識する抗体であると考えられた。唾液ムチン上の A 型糖鎖はペプチドのアミノ酸残基に結合した状態で存在している。そこで、作製した抗体が、タンパク質に結合した状態の A 型糖鎖のみならず、タンパク質から分離した A 型糖鎖も認識することが可能か否かを調べるために、A 分泌型および A 非分泌型唾液ムチンよりアルカリ還元処理で切り出した O-結合型糖鎖を、直接 ELISA プレートに吸着させて ELISA を行い、各抗体の反応を比較した。糖鎖試料濃度は 10 $\mu\text{g/ml}$ で行った。K7405 および K7421 は、プレートに吸着させた糖鎖との反応は認められなかった。しかし、K7422 および K7516 は、糖鎖に対して反応が認められた (Fig. 2-3)。

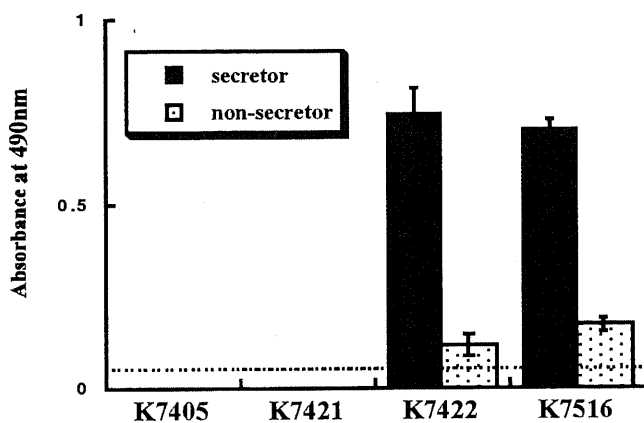


Fig. 2-3 Reactivity of anti-A monoclonal antibodies (mAbs) to oligosaccharide-alditol derived from A salivary mucin. Reactivity of mAbs to 10 $\mu\text{g/ml}$ of the oligosaccharide-alditol was tested by ELISA. The average and the standard deviation (n=3) are indicated. The dotted line shows the cut-off level calculated from the absorbance of negative control wells (without saliva).

K7405 および K7421 は、プレートに吸着させた糖鎖との反応は認められなかったが、これらの抗体は、分泌型唾液ムチンあるいは A 型三糖に対する反応が確認されている抗体であり、特異性の高い抗 A 抗体である。これらの抗体は、唾液ムチン上の A 型物質あるいはポリアクリルアミドに結合した A 型物質に対して反応する抗体であるが、分離した糖鎖とは反応できない抗体であることから、タンパク質やポリアクリルアミドなどの高分子と結合した状態の A 型物質を認識する抗体であると推定された。一方、K7422 および K7516 は、唾液ムチンから分離した糖鎖に対しても反応が認められた。これらの抗体は、担体高分子の存在の有無に関わらず、A 型物質を認識する抗体であると考えられた。なお、ELISA に使用した糖鎖は、分泌型唾液ムチン由来糖鎖、非分泌型唾液ムチン由来糖鎖ともにフェノール-硫酸法により定量し、同濃度の溶液を使用している。従って、ほぼ同量の糖に対する反応を調べていることになるが、K7422 と K7516 の分泌型と非分泌型に対する反応は大きく異なっており、分泌型に対する反応ははるかに強いものであった。この結果は試料として用いた糖鎖試料溶液の中の A 型物質の量的な差異を反映しているものと考えられる。

Table2-2 Reactivity of mAbs with type-A salivary mucin treated using several procedures^a

Antigens		Antibodies			
		K7405	K7421	K7422	K7516
sMu	Untreated	100%	100%	100%	100%
	100°C/10min	119%	97%	101%	95%
	1%TCA ^c /25°C/ 1h	90%	92%	89%	92%
nMu	Untreated	n.t. ^b	100%	100%	100%
	100°C/10min	n.t. ^b	120%	93%	105%
	1%TCA ^c /25°C/1h	n.t. ^b	101%	73%	84%

^a Activity remaining (as percentage of untreated sample).

^b Not tested

^c Trichloroacetic acid

2-3 化学的あるいは酵素的にタンパク部分を処理した唾液ムチンに対する抗体の反応

加熱処理した唾液ムチンおよびトリクロロ酢酸によりタンパク変性させた唾液ムチンに対する各抗体の反応は、未処理ムチンに対する反応とほぼ同等の強さであった(Table 2-2)。従って、タンパク質部分の変性は抗体の反応に影響を及ぼしていないと考えられる。

しかしながら、タンパク質部分をプロナーゼにより切断して断片化した唾液ムチンに対する反応は、抗体により差異が観察された(Fig. 2-4)。K7405 および K7421 の、断片化したA型唾液ムチンに対する反応は、K7422 や K7516 の反応と比較して著しく低いものであった。

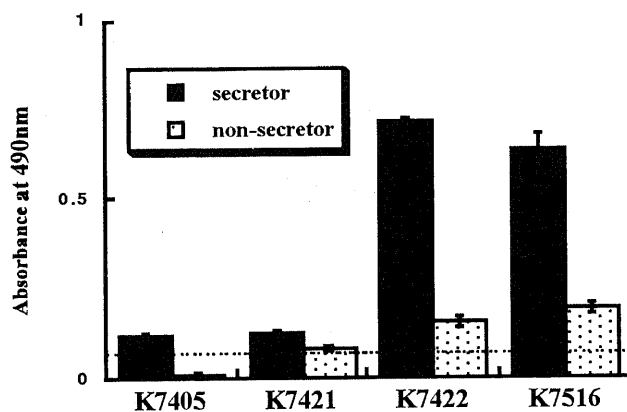


Fig. 2-4 Reactivity of anti-A monoclonal antibodies (mAbs) to salivary mucin after digestion with pronase. Reactivity of mAbs to $2\mu\text{g/ml}$ of digested salivary mucin was tested by ELISA. The average and the standard deviation ($n=3$) are indicated. The dotted line shows the cut-off level calculated from the absorbance of negative control wells (without saliva).

K7405 および K7421 は、断片化した唾液ムチンとの反応性が低かったが、これらの抗体は 2-2 における考察から、担体高分子と結合した A 型物質を認識す

る抗体であると考えられる。ここで行ったプロナーゼによるムチンの断片化は、糖鎖が結合している担体高分子を断片化する操作である。K7405 および K7421 の断片化された唾液ムチンとの反応が弱いことは、これらの抗体が担体高分子に結合した状態の A 型物質を認識するという考察を支持する結果であると考えられる。なお、担体高分子は、唾液ムチンの場合はタンパク質であり、合成抗原の場合はポリアクリルアミドであるが、どちらの抗原に対しても K7405 および K7421 は反応する。このことから、これらの抗体により認識する構造に、ペプチド部分は含まれないと考えられる。

一方、K7422 および K7516 の断片化した唾液ムチンに対する反応は、K7405、および K7421 よりも高いものであった。これは、2-2 における考察と同様に、K7422 および K7516 は A 型物質の担体高分子とは無関係に A 型糖鎖と反応すると考えられる。また、断片化した分泌型唾液ムチンと断片化した非分泌型唾液ムチンとの反応の差異は、両者に含まれる A 型物質の量的な差異を反映しているものと考えられる。

ここまで示した結果から、作製した抗体は A 型糖鎖を認識する抗体であるが、担体高分子に結合した A 型糖鎖を認識する抗体と、担体高分子の存在に関わりなく A 型糖鎖を認識する抗体の二種類が存在することが示された。前者の抗体 (K7405 および K7421) は、担体高分子から分離した A 型糖鎖や、断片化した担体上に存在する A 型糖鎖は認識しない。また、唾液ムチンに対して反応するだけでなく、A 型糖鎖のみをポリアクリルアミドに結合させてある合成抗原に対しても反応できることから、認識する抗原にはタンパク質部分は含まれず、A 型糖鎖に限られると考えられた。これらのことから、K7405 および K7421 は複数の A 型糖鎖が集合した状態を一つの抗原として認識している可能性が考えられる。また、後者の抗体 (K7422 および K7516) は、単独の A 型糖鎖を認識する抗体であると考えられる。

2-4 化学的に糖鎖部分を処理した唾液ムチンに対する抗体の反応

水酸化ナトリウムによる O-結合型糖鎖の除去を行った唾液ムチンに対しては、抗体は反応しなかった。これは、抗体の認識する抗原が O-結合型糖鎖であることを示している。

また、5 mM 過ヨウ素酸ナトリウム処理により穏やかな条件で糖を酸化した唾液ムチンに対する反応を調べた (Fig. 2-5)。過ヨウ素酸ナトリウム処理を行った分泌型ムチンを、K7405 および K7421 は認識できなかった。しかし、K7422 および K7516 は認識可能であった。これらの実験結果は、K7405 および K7421 の認識する抗原決定部位は、K7422 および K7516 の認識する抗原決定部位よりも、過ヨウ素酸による酸化分解の影響を受けやすいことを示しており、K7405

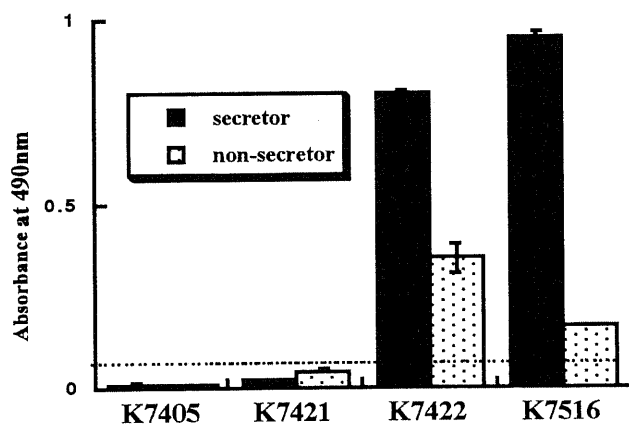


Fig. 2-5 Reactivity of anti-A monoclonal antibodies (mAbs) to salivary mucin treated with 5mM sodium periodate. Reactivity of mAbs to 2 μ g/ml of the salivary mucin treated with sodium periodate was tested by ELISA. The average and the standard deviation (n=3) are indicated. The dotted line shows the cut-off level calculated from the absorbance of negative control wells (without saliva).

や K7421 の認識する抗原と K7422 や K7516 の認識する抗原構造が異なることを示唆するものと考えられる。

第三節 考察

鑑識科学的な検査に適した抗体の作製を目指して、分泌型と非分泌型の血液型抗原の相違点を認識可能なモノクローナル抗体の作製を試みた。分泌型および非分泌型唾液から分離した、血液型物質を保持している唾液ムチンをそれぞれ免疫して、モノクローナル抗体を作製し、得られた抗体の反応特性を検討した。その結果、得られた抗体は反応特性の異なる 3 グループに分類可能と考えられる。

Group-1 : A 分泌型唾液ムチンのみを認識する。A 型糖鎖が密集した状態を認識すると考えられる。

Group-2 : A 分泌型・A 非分泌型唾液ムチンの両方を認識する。A 型糖鎖が密集した状態を認識すると考えられる。

Group-3 : A 分泌型・A 非分泌型唾液ムチンの両方を認識する。単独の A 型糖鎖を認識すると考えられる。

作製したこれらの抗体は、分泌型と非分泌型に対する反応が異なっていたが、これらの抗体が認識する抗原構造と、分泌型・非分泌型の識別の関係については以下のように考えられる。唾液中の ABO 式血液型物質は、唾液ムチン上に存在していることはよく知られている⁷⁰⁾。唾液ムチンは、高分子量の MG1 と低分子量の MG2 からなることが知られている^{101), 117)}。MG1 のコアペプチドは、MUC5B 遺伝子の産物が主成分であり^{100), 118) ~120)}、一部 MUC4 の産物も含まれるとの報告もある¹²¹⁾。一方、MG2 のコアペプチドは MUC7 によりコードされ

ていることが知られている¹²²⁾。MG1は、いくつかの高度に糖鎖が結合したドメインから成り立っており¹⁰¹⁾、またMG2は、対照的に1つのユニットから成るが、分子内に多くの糖結合サイトを含む¹⁰¹⁾。MUC5BおよびMUC7の塩基配列からは、O-結合型糖鎖の結合サイトであるセリンあるいはスレオニン残基を多量に、近接して有しているため、糖鎖が密集して存在する、いわゆるクラスターを形成していると考えられる¹²³⁾。一方、ABO式血液型物質は、Gal β 1-3GlcNAc（あるいはGal β 1-4GlcNAc）構造の末端に形成されるため^{54), 73), 74)}、ムチン型糖鎖のいずれの末端にもABO式血液型物質が存在できる可能性があると考えられる。分泌型と非分泌型との相違点は、*FUT2*の活性の相違であり^{56), 80), 81)}、この相違は唾液などの分泌液中に分泌される血液型物質の量の相違につながる^{54), 68)}。すなわち、非分泌型においては糖鎖末端におけるABO式血液型物質の量が少なく、分泌型においては多くの糖鎖末端にABO式血液型物質が存在していると考えられる。従って、分泌型においてはABO式血液型物質がクラスター化した構造が存在している可能性が高いと考えられる。一方、非分泌型においては、ABO式血液型物質の量は少なく、ABO式血液型物質のクラスターが存在する可能性は低いと考えられる。本研究において作製した、Group-1に属するK7405は、A型物質のクラスターを認識する抗体であると推定されるが、A分泌型唾液ムチン上のクラスター化したA型物質を認識するために、分泌型唾液のみを検出することが可能であると考えられた (Fig. 2-6)。一方、非分泌型唾液ムチン上においては、A型物質が量的に少ないので、クラスター構造を形成することは考えにくく、そのためにK7405によって認識されることはないと考えられる。

本研究において作製したGroup-3に属する抗体は、単一のA型構造を認識する抗体であると考えられるため、分泌型、非分泌型を問わず検出が可能であると考えられた (Fig. 2-6)。

なお、Group-2の抗体であるK7421は、クラスター化したA型物質を認識すると考えられるが、非分泌型唾液ムチンを認識することができた。この抗体が認識する抗原についてはさらに検討が必要であると考えられる。

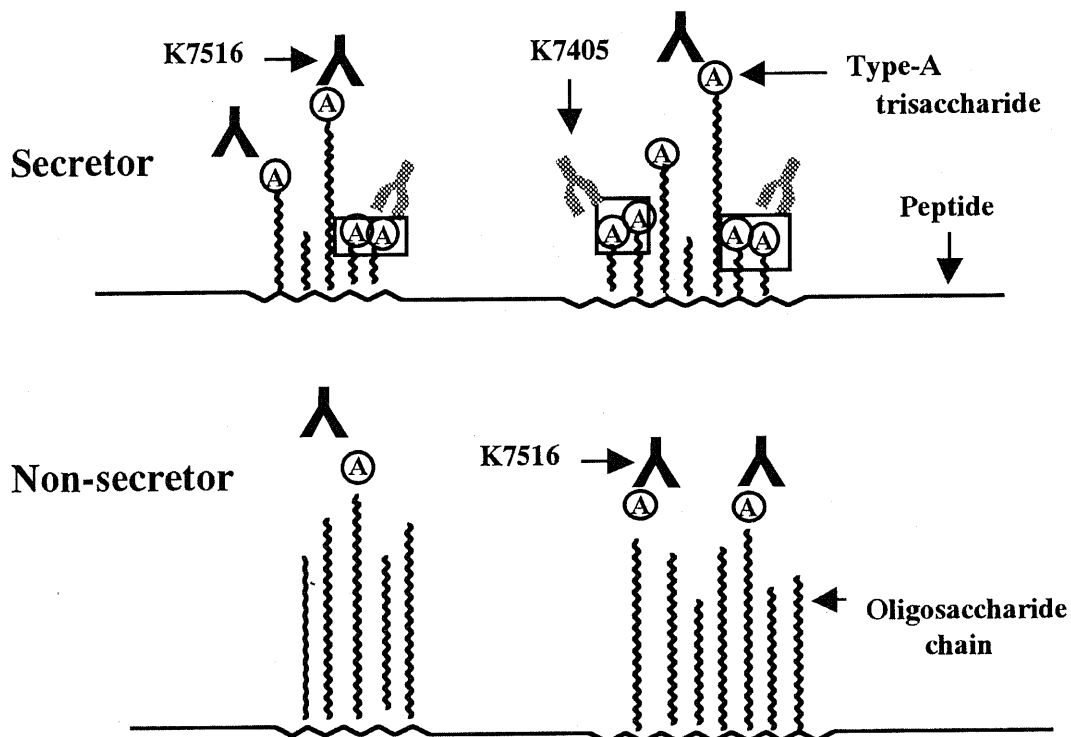


Fig. 2-6 Hypothetical structures of the antigens recognized by K7405 and K7516.

以上のように、A型唾液ムチン上の血液型物質の分布密度の相違を認識する抗体を作製できたと考えられ、これらの抗体は分泌型と非分泌型との相違を認識することが可能であると考えられる。従って、A型の判定と、分泌型と非分泌型の識別を同時に行うことが出来る検査用抗体として有用である可能性が示唆された。

第三章 新規抗 A 型抗体の ABO 式血液型鑑定への応用

緒論において述べたように、警察鑑識における ABO 式血液型検査は、抗原抗体反応を利用した検査が主流である。第二章において反応特異性の異なる抗 A 抗体を作製したので、本章では、作製した反応特性の異なる抗 A モノクローナル抗体の血液型鑑定への導入を試みた。作製した抗体のうち、分泌型唾液と非分泌型唾液に対する反応性が最も対照的であった、K7405 と K7516 の二つの抗体を用いて、一般的な鑑定手法による検査を行った。先ず赤血球を試料とした凝集試験を試み、続いて ELISA、微量混合凝集法、吸収試験および凝集阻止試験による体液斑痕の検査を検討した¹⁰⁸⁾。

続いてモノクローナル抗体の解離試験法への適用を試みた。解離試験法は、矢田^{124), 125)}により鑑定に導入された検査手法であり、斑痕試料や毛髪などの検査に幅広く利用されている。解離試験法は、(1) 試料への抗体の吸着、(2) 過剰な抗体の洗浄、(3) 加熱による抗体の解離の各段階から成り、解離した抗体は後から添加した赤血球を凝集させるので、その存在が確認できる。すなわち、抗 A 抗体が解離され、A 型血球を凝集させた場合、試料は A 型と判定される。しかしながら、解離試験は上に示したいずれかの段階における不適切な反応条件が原因で、正確な血液型判定が行われない場合がある。このため、すべての反応条件が適切に設定されていなければならない。反応条件あるいは操作条件の設定は検査試薬および試料に合わせて行われるべきであると考えられるが、これまではこのような条件設定の試みはなされていない。そこで、上記の解離試験の各段階における条件の見直しを行った。先ず著者は試料に吸着した抗体を解離させる際の加熱条件を適切なものにする必要があると考えた。検査試薬として用いられるモノクローナル抗体は単一の抗体から成るため、全ての性質が同一なタンパク質の集合体であると解釈できる。従って、抗体が安定に

作用できる条件は、ポリクローナル抗体に比べると、極めて限られたものになると考えられる。このことから加熱条件はポリクローナル抗体を使用する場合よりも厳密に設定されるべきものであると考え、実際に解離温度が抗体の安定性に影響するか否かを確認するために、市販抗体を用いて血痕に付着させた抗体の最適な解離温度を調べた。解離した抗体量は合成血液型抗原を固相に吸着させたプレートを用いた ELISA で測定し、合成抗原への抗体の結合量を半定量的に測定した¹²⁶⁾。この方法では、活性を失った抗体は抗原に結合できないため、結合能力を保持している抗体のみを測定できる利点がある。なお、過去における解離条件の検討では、解離した抗体の量を、添加した血球の凝集の程度から推測しており¹²⁷⁾、解離した抗体量の測定に ELISA を導入した例は今まで報告されていない。

さらに、モノクローナル抗体を用いた解離試験を毛髪の血液型検査に導入することを試みた。毛髪は、血液、体液と並ぶ重要な証拠資料である。毛髪中にも ABO 式血液型物質が存在することが証明され¹¹⁾、それは糖脂質であると報告されており^{128) ~131)}、これら血液型物質は毛髪中の髓質^{132), 133)} および皮質¹³⁴⁾の両方に存在すると考えられている。これまでの著者の検討では^{51) ~53)}、解離試験法を用いて毛髪の血液型検査を行う場合、定法に従ってモノクローナル抗体による検査を行っても、A 型の証明が不可能であり、従って血液型は判定不能であるという結果しか得られていない。また、Nagai らも、市販モノクローナル抗体での毛髪からの解離試験においては、満足できる成績を得てはいない¹³⁶⁾。そこで、確実に毛髪からの血液型判定が可能になるような検査法を早急に確立しなければならない。なお、解離試験以外の方法による毛髪の血液型検査としては、髓質を染色して血液型判定を行う組織免疫染色法^{132), 133)}が報告されているが、毛髪には必ずしも髓質が存在するとは限らないため、組織免疫染色法は、試料として無髓の毛髪を用いた場合には型判定が不可能であるという

欠点がある。一方、解離試験は毛髪髄の有無にかかわらず血液型判定が可能であり、また、この検査手法は血痕や体液斑痕などの血液型検査に導入されているため、全国に広く浸透した方法である。これらの理由から、著者は解離試験を毛髪からの血液型判定の手技として最適であると考え、毛髪の検査に適した条件の確立を目指し、毛髪試料を用いた場合の最適な温度および時間を検討した。得られた結果に基づいて毛髪からの確実な血液型検査法を確立し、続いて確立した方法のブラインドテストによる評価を行って有効性の確認を行った¹³⁵⁾。

第一節 新規抗 A 型抗体の体液鑑定への応用

1-1 赤血球の血液型検査

赤血球の血液型検査を試みた。なお、A 型の亜型である A₂ 型との区別のため、通常 A 型および AB 型と称される型を、本節では A₁ 型および A₁B 型と称する。

赤血球に対する反応の検討の結果、検査を行った抗体は全て A₁ 型血球を凝集させた。また、A₁ 型血球に対する力価を 128 倍に調整した後に、他の型の血球に対する凝集力の有無を調べたところ、A₁B および A₂B 型の血球を凝集させることができたが、B 型、O 型血球は凝集させることができなかった。A₂ 型は A 型合成に関わる GalNAc 転移酵素の遺伝子上における塩基置換に伴うアミノ酸置換と、塩基欠損に起因するフレームシフトに伴う酵素タンパク質の C 末端側の伸長が起き、その結果 A 型合成酵素の活性が変化した亜型であり¹³⁷⁾、A₁ 型と比較して A 型物質量が少ないことが大きな特徴である。また、A₁ 型では観察される赤血球上の 3 型糖鎖の A 型物質を A₂ 型は持たない¹³⁸⁾ という報告もある。なお、A₂B 型は A₂ 型 GalNAc 転移酵素と B 型酵素を併せ持つ亜型である。また、O 型血球の検査においては、P₁ 抗原（ネオラクト糖鎖を骨格とし、

Gal α 1-4Gal β 1-を非還元末端に有する)を持つ個体(P₁型)と持たない個体(P₂型)の両方の血球を検査に用いたが、どちらも凝集されなかったことから、P₁抗原に対する交差反応は起きていないと結論できる。

1-2 ELISAによる唾液の血液型検査

1,500倍に希釈した各型の唾液の血液型検査を、ELISAを用いて行った(Fig. 3-1)。全ての抗体において、B型あるいはO型唾液に対する交差反応は観察されなかった。K7405はA₁分泌型唾液およびA₁B分泌型唾液に対して強く反応した。しかし、A₂分泌型唾液に対しては、A₁型唾液に対する反応の約1/3程度の反応を示し、またA₁非分泌型唾液およびA₁B非分泌型唾液に対しては反応しなかった。A₂分泌型唾液も、A₁非分泌型も、ともにA型物質がA₁分泌型と

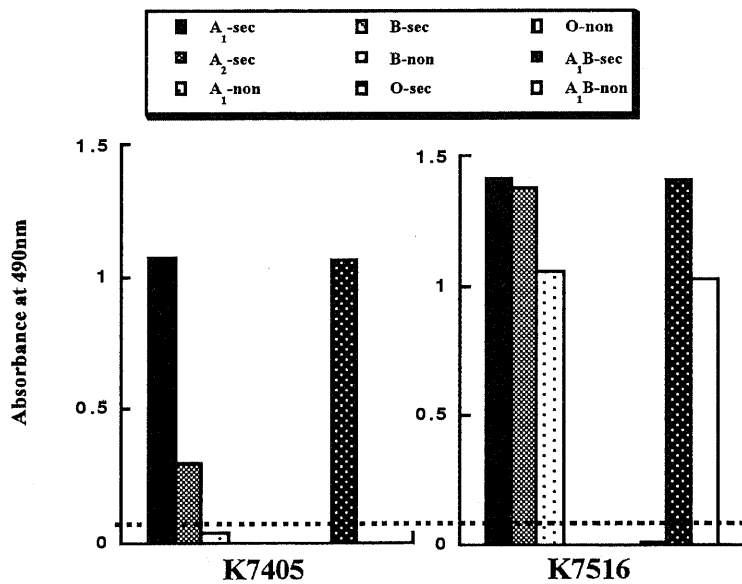


Fig. 3-1 Reactivity of anti-A monoclonal antibodies to whole saliva. Saliva samples diluted to 1500-fold were assayed by ELISA. The average values for the absorbance at 490nm in each blood group sample are indicated and the number of samples are as follows, A₁-secretor (n=5), A₂-secretor (n=1), A₁-non-secretor (n=5), B-secretor (n=4), B-non-secretor (n=2), O-secretor (n=4), O-non-secretor (n=3), A₁B-secretor (n=1) and A₁B-non-secretor (n=2). The dotted line shows the cut-off level calculated from the absorbance of negative control wells (without saliva).

比較して少ない型であるため、K7405 は血液型物質の量が多い場合にのみ認識可能な抗体と考えられた。一方、K7516 は A₁ 分泌型唾液および A₁B 分泌型唾液に対して強く反応し、また、A₂ 分泌型唾液に対しては、A₁ 分泌型唾液に対する強さと同程度、また A₁ 非分泌型唾液に対しても、A₁ 型唾液に対する反応の約 70% 程度の反応が観察された。なお、同じ分泌型であっても Le(a-b+) と Le(a-b-) の両方の可能性が存在するが、Le(a-b+) の A₁ 分泌型唾液と Le(a-b-) の A₁ 分泌型唾液に対する反応に差異は認められなかった。

1-3 微量混合凝集法 (MCAR) による唾液斑の血液型検査

MCAR を行ったところ、K7405 を用いた検査の結果 A₁ 分泌型および A₁B 分泌型唾液斑痕上に指示血球の凝集が観察された。しかし、A₁ 非分泌型、A₁B 非分泌型唾液斑痕に対しては全く反応しなかった。一方、K7516 を用いた検査の結果は A₁ 分泌型、A₁ 非分泌型、A₁B 分泌型および A₁B 非分泌型唾液のいずれの唾液斑痕上においても、指示血球の凝集が観察された。なお、B 型および O 型唾液斑痕に対しては反応は観察されなかった。A₁ 分泌型および A₁ 非分泌型唾液斑痕に対して行った MCAR の結果を Fig. 3-2 に示す。

1-4 吸収試験および凝集阻止試験による唾液斑の検査

吸収試験においては、A₁ 分泌型および分泌型唾液により K7405 も K7516 も吸収されたが、A₁ 非分泌型および A₁B 非分泌型唾液によっては K7516 のみが吸収され、K7405 は吸収されなかった。このことは、K7405 は分泌型唾液のみ型判定可能であるが、非分泌型は判定できないことを示し、一方 K7516 は分泌型・非分泌型のいずれからも型判定可能であることを示している。なお、K7405 と K7516 のいずれの抗体も、B 型および O 型の唾液には吸収されなかった (Table 3-1)。

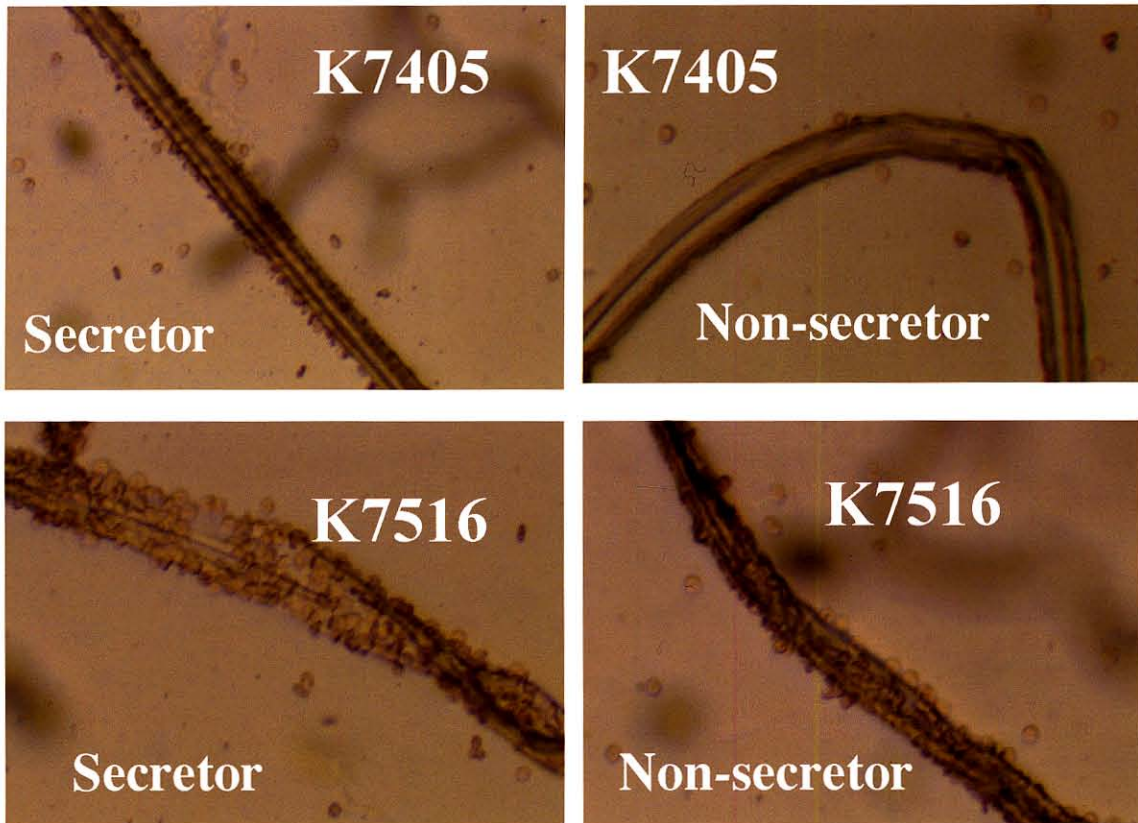


Fig. 3-2 Results of the mixed cell agglutination reaction on salivary stains obtained from secretor and non-secretor were indicated. Anti-A antibodies used were K7405 and K7516. Using K7405, agglutinations were observed on the salivary stain obtained from secretor but no agglutination was observed on the salivary stain obtained from non-secretor. By using K7516, agglutinations were observed on the salivary stains obtained from both secretor and non-secretor.

凝集阻止試験の結果、K7405 に対しては、 A_1 分泌型唾液は阻止価 128 倍、 A_1 非分泌型唾液は阻止価 8 倍であった。この結果は、K7405 は、非分泌型唾液を用いて抗体の反応を阻害させようとするれば、分泌型よりも非分泌型のほうが濃度の高い唾液が必要であることを示している。一方、K7516 に対しては、同じ唾液を用いての実験で、 A_1 分泌、 A_1 非分泌型唾液ともに阻止価 4096 倍であった。これは、K7516 抗体に関しては、 A_1 分泌、 A_1 非分泌型唾液とも同じ濃度で

Table 3-1 Application of K7405 and K7516 for detecting A substances from salivary stains

Samples	Absorption-test		ELISA		MCAR		Hemagglutination inhibition test*	
	K7405	K7516	K7405	K7516	K7405	K7516	K7405	K7516
A ₁ -secretor	+	+	+	+	+	+	128	4096
A ₁ -non-secretor	-	+	-	+	-	+	8	4096
B-secretor	-	-	-	-	-	-	n.t.**	n.t.**
B-non-secretor	-	-	-	-	-	-	n.t.**	n.t.**
O-secretor	-	-	-	-	-	-	n.t.**	n.t.**
O-non-secretor	-	-	-	-	-	-	n.t.**	n.t.**
A ₁ B-secretor	+	+	+	+	+	+	n.t.**	n.t.**
A ₁ B-non-secretor	-	+	-	+	-	+	n.t.**	n.t.**

+: Positive reaction

-: Negative reaction

*: Inhibition titer

** : Not tested

抗体の反応を阻止できるということを示している。

以上の結果を Table 3-1 にまとめる。唾液あるいは唾液斑に関しては、吸収試験、ELISA および MCAR 法を用いた場合、分泌型唾液と非分泌型唾液の明確な識別が可能であり、鑑定に応用した際には、資料から A 型の判定と同時に分泌型・非分泌型の識別が可能であると考えられる。また、凝集阻止試験では、K7516 を用いた場合では、分泌型と非分泌型唾液は同程度の阻止価を示したため、両者の識別は不可能であるが、K7405 を用いた場合、分泌型の阻止価と非分泌型の阻止価の間に大きな差が認められ、両者の識別が可能であると考えられた。

第二節 新規抗 A 型抗体を用いた解離試験法の確立と毛髪 of 血液型鑑定への応用

著者はこれまでに市販モノクローナル抗体を用いた解離試験の検討結果を報告しているが、これまで用いられてきた定法¹³⁹⁾ どのりの操作では、必ずしも生物試料からの血液型検査が可能とは限らず⁵¹⁾、特に毛髪 of A 型が検出不能であることが、証拠資料からの ABO 式血液型検査における重要な検討課題となっていた^{51) ~53)}。従来より行われている解離試験の条件はヒト由来抗血清を用いる場合の検査条件であるため、マウス由来モノクローナル抗体には適さない可能性が考えられた。著者は抗体の熱安定性に着目し、吸着した抗体を試料から解離させる際の加熱条件を適切なものにする必要があると考え、モノクローナル抗体の解離試験における解離温度、解離時間の条件を再検討し、マウス由来モノクローナル抗体に適した解離試験条件を確立することを目指した。

2-1 血痕からの解離における至適温度の検討

従来のヒト由来抗血清を使用した解離試験においては、解離温度として 55°C を用いていたが、マウスモノクローナル抗体は、ヒト由来抗血清とは動物種が異なること、また単一の性質を持つ抗体の集合体であることから、その熱安定性をヒト由来抗血清と同一視することはできないと考え、最適な解離温度を調べた。

試料として血痕を用いた場合の至適解離温度を検討した結果を Fig. 3-3 および 3-4 に示す。至適解離温度は、使用した抗体によって差異が認められた。抗 A 抗体においては、ピオテスト社製、和光純薬製、国際試薬社製およびイムコア社製抗体は 54°C が至適解離温度であり、オーソ社製抗体は 52°C が至適解離温度であった。また、高温域における抗体の失活が顕著に認められた。一方、

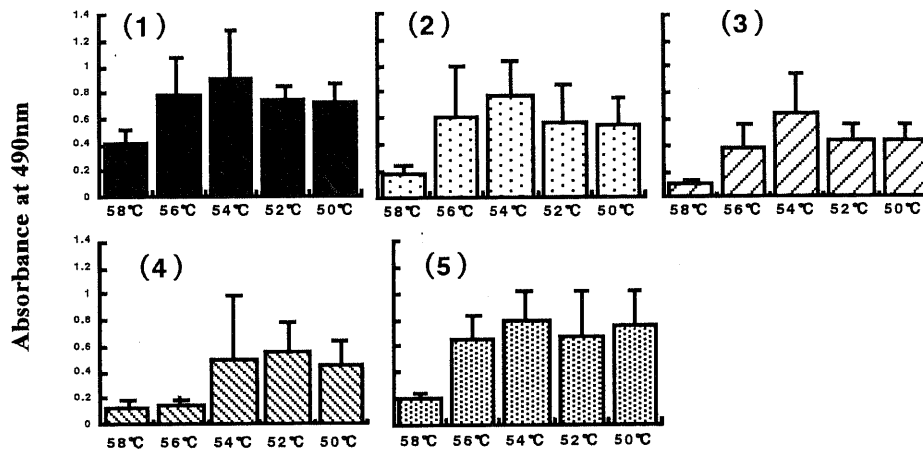


Fig. 3-3 Effects of the elution temperature on absorption-elution test. The active anti-A antibodies liberated from type-A bloodstain at several temperatures were determined by ELISA. The average and the standard deviation (n=10) were indicated. Anti-A monoclonal antibodies used were (1) Biotest 840981, (2) Wako RL389, (3) Kokusai 007, (4) Ortho BAA201A21, (5) Immucor 101010.

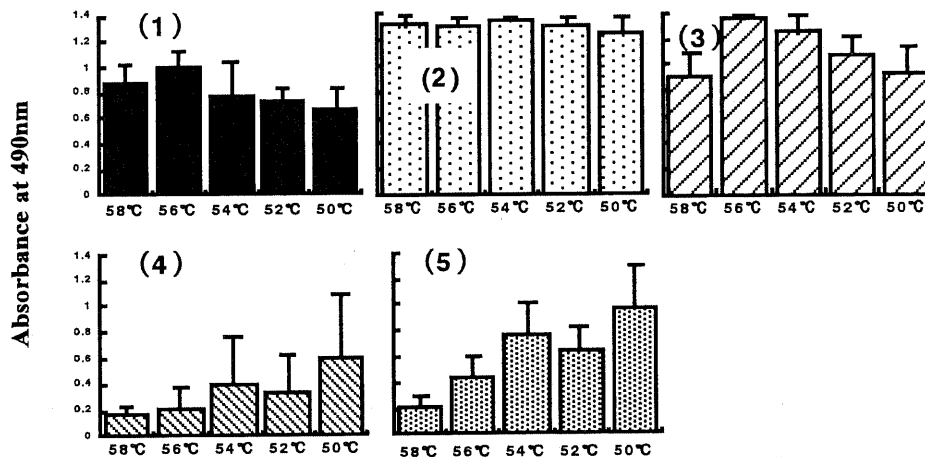


Fig. 3-4 Effects of the elution temperature on absorption-elution test. The active anti-B antibodies liberated from type-B bloodstain at several temperatures were determined by ELISA. The average and the standard deviation (n=10) were indicated. Anti-B monoclonal antibodies used were (1) Biotest 871171, (2) Wako RK489, (3) Kokusai 007, (4) Ortho BBB592A21, (5) Immucor 201020.

抗B抗体においては、ピオテスト社製および国際試薬社製では56°Cが至適解離温度であり、オーソ社製およびイムコア社製抗体では50°Cにおいて、最大の抗

体解離量を示した。また、和光純薬社製抗体においては温度による影響は認められなかった。ビオテスト社製、和光純薬製および国際試薬社製抗 B 抗体においては、抗 A 抗体のような、高温度域における顕著な抗体の失活は観察されなかった。

なお、温度を変動要因とする分散分析の結果、抗 A 抗体については全ての製品で、抗 B 抗体については、ビオテスト社製、イムコア社製および国際試薬製の抗体で、温度による抗体解離量には有意に差が認められた。

また、第二章で作製した抗体である K7516 を用いて至適解離温度を検討したところ、至適解離温度は 56°C であり、市販の検査抗体よりも高温で安定であることが明らかとなった。

2-2 毛髪からの解離における至適解離温度・解離時間の検討

続いて、ビオテスト社製、和光純薬製およびオーソ社製抗体を用いて、毛髪試料に吸着された抗体を解離させる際の至適解離温度を調べた。毛髪 1.5 cm を圧搾し、内部を露出させ、抗体を吸着後洗浄した。さらに抗体が吸着した毛髪を様々な温度で加熱して抗体を解離させ、解離した抗体を ELISA で測定し、解離した抗体量を比較した。

抗 A 抗体については、和光純薬社製の抗体の最適解離温度は 53°C~55°C の間と考えられ、解離温度の影響はあまり認められない。また、ビオテスト社製抗体は明らかに 53°C が最適な解離温度である。また、抗体の解離量もここで調べた抗体の中では最も多いことが示唆された。オーソ社製の抗体は解離温度の影響をあまり受けないと考えられるが、抗体の解離量がここで調べた抗体の中では最も少なかった(Fig. 3-5)。

一方、抗 B 抗体については、和光純薬社製の抗体の最適解離温度は 55°C、ビオテスト社製抗体は 53°C が最適な解離温度である。また、抗体の解離量は和光

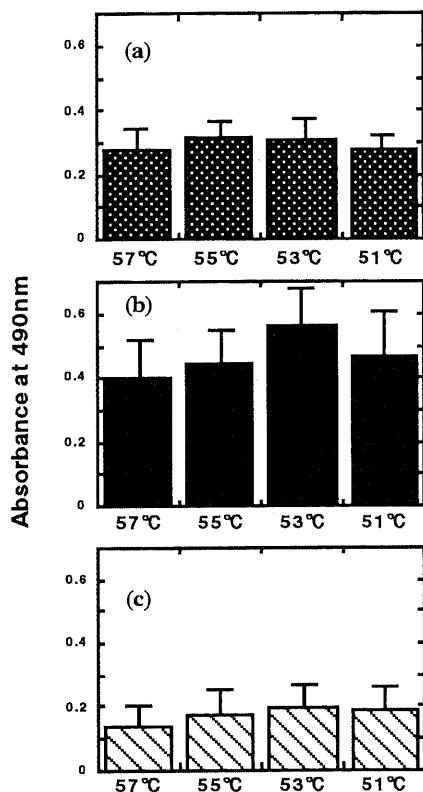


Fig. 3-5 Effects of the elution temperature on absorption-elution test. Anti-A antibody was eluted at several temperatures from antibody-absorbed hair samples. The active anti-A antibodies eluted from hair samples were analyzed by ELISA. The average and the standard deviation (n=6) were indicated. Anti A monoclonal antibodies used were (a) Wako YL473, (b) Biotest 030281, (c) Ortho BAA209A21.

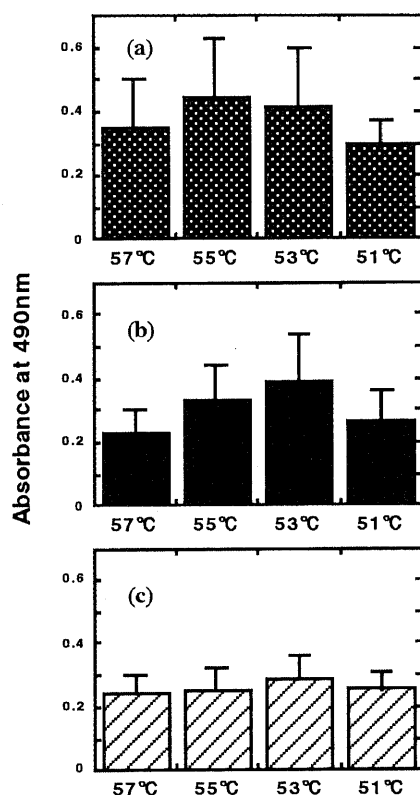


Fig. 3-6 Effects of the elution temperatures on absorption-elution test. Anti-B antibody was eluted at several temperatures from antibody-absorbed hair samples. The active anti-B antibodies eluted from hair samples were analyzed by ELISA. The average and the standard deviation (n=6) were indicated. Anti-B monoclonal antibodies used were (a) Wako YK588, (b) Biotest 030291, (c) Ortho BBB603A21.

純薬社製、ビオテスト社製の間で大差は認められなかった。オーソ社製の抗体は解離温度の影響をあまり受けないと考えられるが、抗体の解離量がここで調べた抗体の中では最も少なかった(Fig. 3-6)。

ここでの実験の結果から、至適解離温度は抗体によって違いがあることが推測された。なお、温度を変動要因とする分散分析を行ったが、温度による抗体解離量の変動には有意差は認められなかった。

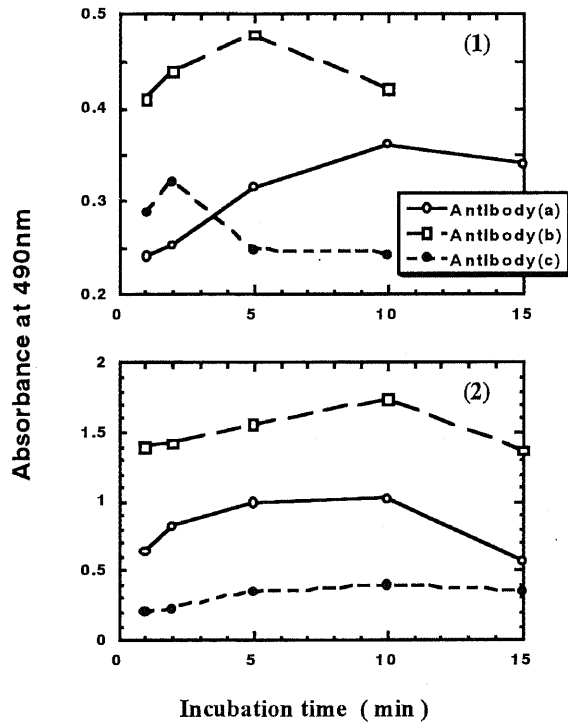


Fig. 3-7 Time courses of elution of antibodies on absorption-elution test using anti-A antibodies(1) and anti-B antibodies(2). The active antibodies eluted from antibody-absorbed hair samples were analyzed by ELISA. The values of each point were mean of multiplicate data (n=8). Anti-A monoclonal antibodies used were (a) Wako YL473, (b) Biotest 030281, (c) Ortho BAA209A21. Anti-B monoclonal antibodies used were (a) Wako YK588, (b) Biotest 030291, (c) Ortho BBB603A21. Elution temperature was 53°C.

続いて、最適な解離時間を検討した。解離温度として 53°Cを用いた実験の結果、至適解離温度には各社の抗体の間で違いが認められた。抗 A 抗体では、和光純薬社製の抗体は、解離時間 10 分までは、解離した活性を有する抗体量は増加し、10 分以降は徐々に低下した。ビオテスト社製の抗体は解離時間 5 分で活性を有する抗体の解離量が最大となり、10 分後では、活性を有する抗体の量は明らかに低下した。オーソ社製の抗体は解離時間 2 分で最大の活性を有する抗体の解離量を示し、その後は解離量は低下した(Fig. 3-7)。以上のことから、長すぎる加熱時間は、解離した抗体の失活を招くことが認められた。

ヒト由来抗血清を用いた解離試験では、解離は10分でほぼ完了し、以降少なくとも20分までは、十分な活性を保っているという報告¹²⁷⁾があり、ヒト由来抗血清は比較的熱安定性が高いものであったと考えられる。なお、従来の検査条件としては、矢田¹⁴⁰⁾を始め55°Cで10分を使用している例が多いが¹²⁷⁾^{141)~143)}、56°Cで15分¹⁴⁴⁾や、52°Cで10分¹⁴⁵⁾、52°Cで15分¹³⁶⁾、50~55°Cの範囲内で10分¹³⁹⁾、¹⁴⁶⁾の条件を用いる例も報告されている。いずれの条件でも、毛髪からのヒト由来抗血清を用いた血液型検査は可能であるので、ヒト由来抗血清は検査条件に厳密性を要求しない試薬であったことが言える。

2-3 ABO式血液型判定方法の検証

毛髪の検査用に確立した、モノクローナル抗体を用いた解離試験の手順は以下のとおりである。

- (1)毛髪試料を中性洗剤、水、メタノールで洗浄した後、エーテルで脱脂する。
- (2)毛髪試料をプレス式圧搾機を用いて圧搾する。圧搾した毛髪試料を抗A用、抗B用、抗H用として2cm : 1cm : 1cmに分割する。
- (3)アクリル製血清希釈盤のウェル内に抗A、抗B抗体（和光純薬製）および抗Hレクチン（ホーネン社製）をそれぞれ一滴ずつ滴下し、圧搾した毛髪試料を浸して抗体を感作させる。4°Cで一晩静置する。
- (4)洗浄液として0.05% Tween 20 添加生理食塩水を満たした3本の試験管に、抗A、抗B、抗H抗体を感作させた毛髪試料をそれぞれ移し、試験管を転倒混和後、氷冷下、洗浄液を吸引する。この洗浄操作を、Tween 20 添加生理食塩水で2回、生理食塩水で3回行う。
- (5)試験管を氷から取り出し、解離液として、0.5%ゼラチン生理食塩水溶液をパスツールピペットで一滴加える。試験管の温度を室温まで戻してから、恒温水槽内において53°Cで10分間加温する。

(6)パパイン処理した指示血球浮遊液 (ABO 型ともに) を加え, 1,000 rpm で 1 分遠心し, 凝集を観察して判定する。なお, 血球のパパイン処理の方法は, 常法に従った¹⁴⁷⁾。

上記の方法は, いくつかの点が従来の検査手法から改良されている。

第一点は, 解離温度と解離時間である。この根拠は, 前述のとおりである。

第二点は, 解離液に 0.5%ゼラチン添加生理食塩水を用いている点である。従来, 解離液には生理食塩水を用いていたが, 解離液中にゼラチン^{148) ~150)}あるいは血清¹⁴⁵⁾を添加すると検出感度が向上するという報告がある。毛髪は, 斑痕試料と比較すると少量の試料しか入手できない場合が多いので, 毛髪の検査においては検出感度を上昇させる必要がある。そこで, 解離液にはゼラチンを添加することとした。

第三点は, 指示血球にはパパイン処理を施した血球を使用する点である。赤血球をパパイン処理することにより, 赤血球表面上に存在する膜タンパク質を除去することができる。そのため, 未処理血球と比較して, 電荷を帯びることが少なく, 電荷に起因する赤血球同士の反発を抑制する効果がある。従って, 赤血球同士が接近しやすくなり, 抗体による凝集が起こりやすくなる¹⁵¹⁾。そのため, 微量の抗体を解離させて, その解離させた抗体の存在を血球凝集によって確認する毛髪からの解離試験では, 凝集力が高いパパイン処理血球を使用することが望ましいと考えられた¹⁴⁴⁾。

試料量は, 抗 A 抗体を感作する試料として 2 cm, 抗 B 抗体および抗 H レクチンを感作する試料として 1 cm を使用した。なお, 予備的な検討として, 各抗体につき 1.5 cm を用いて血液型判定を行ったところ, 正解率 90%であり, おおむね良好ではあったが, A 型毛髪を O 型と誤判定するミスおよび AB 型毛髪を B 型と誤判定するミスが多かった¹⁵²⁾。この対策として試料量を増やす必要があると考え, 感作する抗体によって, 異なる量の毛髪を使用することとし

た。

確立した方法でブラインドテストを行った結果を Table3-2 に示す¹⁵³⁾。毛髪試料 60 本の ABO 式血液型検査を行ったところ、正しく型判定できた試料は 58 本であり、判定保留とした試料は 2 本であった。なお、誤判定は見られなかった。判定保留とした 2 本のうち 1 本は、A 型毛髪であったが、抗 A 抗体の凝集が弱かったものであり、もう 1 本は、B 型毛髪であったが、抗 B 抗体の凝集が弱かったため、ともに回答者が判断を保留したものであった。一方、型判定が正確に行われた試料においては、抗 A、抗 B、抗 H の凝集の有無の区別及び凝集の強さは明確なものであった。

Table 3-2 Results of blind test for hair samples

Blood group	Numbers of samples	Results of blind test		
		Correct results	Incorrect results	Not determined
A	18	17	0	1
B	15	14	0	1
O	19	19	0	0
AB	8	8	0	0
Total	60	58	0	2

これらの結果から、使用するモノクローナル抗体に適した検査条件に改良した解離試験法は、毛髪からの ABO 式血液型の判定に極めて有効であると考えられた。

なお、本法を用いて第二章で作製した抗体である K7516 を用いて毛髪からの血液型検査を行ったところ、正確な型判定が可能であった。

2-4 鑑定への応用

本法は科学警察研究所において鑑定法として導入している。これまでに鑑定を行った毛髪資料の数は10本であり、全ての資料から血液型判定を行うことができた。なお、10本の資料のうち、対照資料と血液型が一致した資料は8本であり、一致しなかった資料は2本であった。血液型が対照資料と一致した毛髪はさらにDNA型検査を行い、これらの検査結果を総合して対照資料と同一か否かを判定した。また、血液型検査の結果が対照資料と一致しなかった毛髪資料は、対照毛髪とは同一ではないと判断した。このように、血液型検査法はスクリーニングテストとしての役割を果たすと同時に、他の検査法と組み合わせることで、精度の高い毛髪の異同識別が可能となった (Table 3-3)。

Table 3-3 Results of bloodgrouping of the hair samples in the forensic cases.

Sample	ABO blood grouping		Reference
	Blood group	Consistency with control samples	
1	B	Consistent	DNA type was consistent with control sample
2	B	Consistent	DNA type was consistent with control sample
3	O	Consistent	DNA type was consistent with control sample
4	O	Consistent	n.d. ¹⁾
5	O	Consistent	n.d. ¹⁾
6	O	Consistent	n.d. ¹⁾
7	O	Consistent	DNA type was inconsistent with control sample
8	B	Consistent	DNA type was inconsistent with control sample
9	A	Inconsistent	n.t. ²⁾
10	B	Inconsistent	n.t. ²⁾

¹⁾ DNA type was not determined.

²⁾ DNA typing was not tested.

第三節 考察

本研究において作製したモノクローナル抗体を用いて、血液および体液の検査を試みたところ、血液からは誤判定をすることなく確実に血液型判定が可能であった。また、唾液あるいは唾液斑の検査では、異なる分布密度の A 型糖鎖を認識する二種類の抗体を用いることで、A 型の判定と同時に分泌型・非分泌型の識別が可能であることが明らかとなった。これにより微量資料からより多くの情報を得ることが可能となり、個人特定の精度の向上に大きく貢献できるものと考えている。

また、一般的に広く用いられている鑑定手法である解離試験をモノクローナル抗体を用いて行うことを可能とするための基礎的検討として、抗体の解離における最適解離温度の検討を行ったところ、検討した抗体はそれぞれ至適な解離温度と解離時間を有していることが認められた。この知見に基づき改良した解離試験法を鑑識科学上重要な証拠資料である毛髪の血液型検査に適用した。この改良法の信頼性を検証するために、ブラインドテストによる評価を試みたところ、60本の毛髪資料中、58本は正しく型判定され、正解率は97%であった。なお、正しい型判定ができなかった2本の資料については検査者の判断により判断を保留したものであり、不正確な判定は一本も見られなかった。本法は、毛髪からの ABO 式血液型検査法として有効であると考えられる。なお、本法は実際に鑑定に導入されており、個人識別に成果を上げている。

総 括

我が国の鑑識業務においては ABO 式血液型検査の有用性は未だ低下してはおらず、検査を維持していくための基礎的研究は重要である。著者は、検査精度の向上を目的として、重要な現場資料である唾液中の血液型物質の、分泌型と非分泌型の間における相違点を検索し、比較を行った。続いて同様に重要な証拠物件である毛髪からの血液型判定に関する基礎的検討を行い、これらの研究成果を実際の鑑定へ応用することを試みた。以下に研究成果の要点を各章毎に示す。

第一章

A 型ヒト唾液ムチンから得た A 型糖鎖の、分泌型と非分泌型の間における相違の有無を検討した。糖組成分析およびムチン型糖鎖のクロマトグラフィーによる分析の結果から、分泌型と非分泌型の間では糖鎖の長さに相違があり、分泌型の唾液ムチン糖鎖は主に短い糖鎖により構成され、非分泌型では長い糖鎖から構成されていることが示唆された。この相違は分泌型と非分泌型の遺伝的な相違点である *FUT2* 活性の差異に起因すると考えられる。

第二章

A 型の分泌型と非分泌型のヒト唾液から得たムチンをそれぞれ免疫して、モノクローナル抗体を作製した。なお、非分泌型唾液を免疫して ABO 式血液型

物質に対する抗体を作製した例はこれまでにない。その結果、産生した抗体は、複数の A 型糖鎖が集合した状態を一つの抗原として認識している抗体と、単独の A 型糖鎖を抗原として認識している抗体に大別できた。分泌型唾液ムチンを免疫した場合、これら二種類の抗体が産生したが、非分泌型唾液ムチンを免疫した場合、単独の A 型糖鎖を認識する抗体のみが産生した。

第三章

第二章で作製した抗体を鑑定資料の検査に応用した。分泌型唾液ムチンを免疫して得た、複数の A 型糖鎖が集合した状態を一つの抗原として認識している抗体を使用すると、分泌型唾液のみを検出することが可能であり、非分泌型唾液糖タンパク質を免疫して得た、単独の A 型糖鎖を認識する抗体を使用すると、分泌型唾液および非分泌型唾液の両方を検出することが可能であった。これらの抗体の組み合わせによって、A 型の判定と同時に分泌型・非分泌型の識別が可能となった。なお、検査手法は、吸収試験、酵素免疫測定法、微量混合凝集法を用いることが可能であった。

また、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体との熱安定性の相違に着目して、モノクローナル抗体に適した解離試験条件の確立を行い、毛髪からの血液型検査法に適用し、検査成績を向上させることに成功した。ここで確立した方法は、全国の都道府県警察本部に導入され、鑑定に応用されている。

ABO 式血液型物質は糖鎖であるため比較的安定で、長期間経過した資料からも血液型が検出可能である。またほとんどすべての生体資料から血液型の検出

が可能であるため、現場資料から得られる重要な情報となる。また、特に日本人においては他民族に比べて特定の型への偏りが少ないこと、結果が医療機関等に記録されている場合が多く、個人情報として信頼性が高いことなどから、事件・事故関係者の絞り込みを行う場合、あるいは無関係な個人を除外する場合の手掛かりとして有効である。これらの点から、警察の鑑識活動において ABO 式血液型検査の占める重要性は未だ高いものがある。また、鑑識における検査では、常に新鮮な赤血球を用いた検査が可能なのではない。そのため、臨床の現場とは異なった特殊な検査技術が必要とされ、微量な、あるいは古くなった血液や血液斑あるいは体液斑などの現場資料から、精度の高い血液型判定を可能にするための検査法の改良が、現在でも重要な課題である。刑法犯の認知件数が増加の一途をたどる現状において、増え続ける鑑定物件に対応するためにも、ABO 式血液型検査は捜査の手掛かりとなる個人情報を提供する検査として、また DNA 型鑑定のスクリーニングテストとして、ますます重要性が高まるものと考えられる。本研究の成果は、鑑識科学における個人特定のための検査精度の向上に大きく貢献できるものと考えている。

実験の部

1. 第一章実験

(1) 試薬類

ヒト由来抗 A 血清はオーソ・クリニカル・ダイアグノスティックスから入手した。抗 A モノクローナル抗体は、オーソ・クリニカルダイアグノスティックス社製バイオクロン（体外診断薬）およびビオテスト社製セラクロン（体外診断薬）を用いた。CNBr-活性化 Sepharose 4B, Sepharose CL-6B, Sephadex G-200, Sephadex G-50(fine), DEAE-Sephadex A50 および QAE-Sephadex A-25 は, Pharmacia Finechemicals (Uppsala, Sweden) から購入した。酵素免疫測定法 (ELISA) に用いたプレートは、住友ベークライト社製の MS-7196F である。ブロッキング用のウシ血清アルブミンは、生化学用試薬を和光純薬より購入した。二次抗体として用いた西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗体は、抗マウス IgM (μ) 抗体 (ヤギ免疫) をアメリカンコーレックス社より購入した。HRP の発色基質には *O*-フェニレンジアミン (和光純薬製) を使用した。

(2) アフィニティーカラムを用いた唾液中血液型物質の分離

2-1 材料

ヒト唾液は血液型既知である健常人から任意に提出されたものを使用した。21 人の A 型/Le(a-b+) 型 (分泌型) 唾液を約 150 ml, 4 人の A 型/Le(a+b-) 型 (非分泌型) 唾液を約 200 ml 採取した。それぞれの唾液は実験まで -80°C で保存し

た。なお、提供者の分泌型・非分泌型の別は、ヒト由来抗血清を用いた唾液からの凝集阻止試験で判定した。

2-2 アフィニティーカラムの調製

アフィニティーカラムは抗 A 抗体を、CNBr-活性化 Sepharose 4B に結合させて作製した。抗 A 抗体は次のようにして得た。市販抗 A 血清（オーソ・クリニカルダイアグノスティックス社製）235 ml の 40%硫酸アンモニウム分画を集めて透析後、Sephadex G-200 カラム (2 cm i.d.×88 cm) に通して、抗体活性が検出された分画を集めた。集めた分画は、50 mM Tris-HCl (pH 7.6)で透析し、DEAE -Sephadex A50 カラム(2 cm i.d.×35 cm)に添加した。溶出は 0 M から 0.5 M までの NaCl 濃度勾配溶出で行い、抗体活性が検出された分画を集めた。得られた抗 A 抗体分画中の総タンパク量を Lowry 法¹⁰²⁾で測定したところ、約 250 mg であった。なお、抗体タンパクと CNBr-活性化 Sepharose 4B とのカップリング反応は取り扱い説明書に従って行った。

2-3 アフィニティーカラムによる唾液からの A 型物質の分離

凍結保存しておいた唾液を融解し、3,000 ×g で 10 分遠心した。この上清に等量の生理食塩水を混合した。この試料溶液を抗 A 抗体結合-Sepharose 4B と混合し、4°Cで一晩穏やかに振とうした後、カラム(2.5 cm i.d.× 25 cm) に充填し、250 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄した。溶出は、4 M NaCl を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0)で行った。活性分画を併せて凍結乾燥後、最小容量の水に溶解し、10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6)+ 0.15 M NaCl で透析

した。

2-4 アフィニティー分画のゲル濾過による分離

アフィニティーカラムで分離された A 型活性物質をゲルろ過により分離した。

装置：ファルマシアバイオテック社製 FPLC システム

カラム：Sephacryl CL-6B (1.5 cm i.d. × 90 cm)

溶出液：50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6)

流速：0.2 ml/min

分取：3 ml/フラクション

検出：UV 280 nm における吸光度および抗 A 抗体（オーソ・クリニカルダイアグノスティックス社製バイオクロン）を用いた ELISA。

なお、これらのクロマトグラフィー操作において観察されたピークについてはモノクローナル抗 A 抗体を用いた ELISA の他に、ヒト由来抗 A 血清（オーソ・クリニカルダイアグノスティックス社製）を使用した凝集阻止試験によっても血液型活性の確認を行った。吸光度の測定には分光光度計（島津 UV-2100PC）を使用した。

2-5 ELISA

50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で希釈した抗原溶液 50 μ l を、プラスチックプレートに添加し 37°C で 1 時間インキュベートし、固相に吸着させた。インキュベート後、試料溶液を除去し、1% ウシ血清アルブミン溶液 200 μ l を添加し、4°C で一晩静置してブロッキングを行った。溶液を除去し、プレートを 0.05% Tween

20 を含有する 10 mM Phosphate buffered saline (以下 PBS) で洗浄後、一次抗体として市販モノクローナル抗体 (IgM) を 0.05% Tween 20 を含有する PBS (以下 PBS-Tween) で 100 倍に希釈した溶液 50 μ l を添加し、37°C で 1 時間反応させた。プレートを洗浄後、二次抗体を、1% 正常ヤギ血清 (TAGO) を含む PBS-Tween で 500 倍に希釈したもの 50 μ l を添加し 37°C で 1 時間反応させた。最終のプレート洗浄後、0.006% 過酸化水素を含む 0.1 mg/ml オルトフェニレンジアミン / 0.1 M McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0)¹⁵⁴⁾ 溶液 50 μ l を添加し、暗所で 5 分間反応させた。反応は 2 N 硫酸 100 μ l を添加して停止させ、各ウエルの 490 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (バイオテック社, Power Wave200) で測定した。

なお、ネガティブコントロールとして、抗原を固相に吸着させていないウエルを用いた。これらの複数のネガティブコントロールウエルに対して、上記の操作を行った後の吸光度を測定し、吸光度の平均値をバックグラウンドレベルとした。また、反応が陽性か陰性かの判断を必要とする場合は、ネガティブコントロールの吸光度の値の標準偏差 (SD) を計算し、3 \times SD の値を閾値として、この閾値を超えた値を示した場合を陽性と判断した。

2-6 凝集阻止試験

凝集阻止試験は、定法に従って行った¹⁵⁵⁾。アクリル製ホールプレート上のウエルに、唾液試料を原倍から生理食塩水で順次 2 倍希釈した溶液 100 μ l を入れた。それぞれの希釈唾液試料に対して、A 型赤血球に対する力価が 8 倍になるように調製した抗体溶液を 100 μ l 添加し、4°C で一晩静置して、抗体と体液を

反応させた。反応後、各ウエル中の反応液をそれぞれ 50 μ l ずつホールグラス上に移し、それぞれのウエルに A 型ヒト赤血球 3% 浮遊液を等容量滴下して血球の凝集を観察した。抗体の血球凝集が阻止された場合、唾液中に A 型物質が存在するものと解釈できる。また、凝集を阻止し得る最大の体液の希釈倍率を凝集阻止価と称する。唾液中の血液型物質が多いほど、高い凝集阻止価を示す。

2-7 キャピラリー電気泳動

分離した型活性タンパク質が単一成分であるか否かを推定するために、キャピラリー電気泳動を行った。泳動条件は以下のとおりである。

装置：日本分光製 890-CE パワーサプライ， 870-CE UV/VIS 検出器，
807-IT インテグレーター。

キャピラリー：フューズドシリカキャピラリー

(Waters 製，内径 75 μ m \times 有効長 55 cm)

移動相：50 mM グリシン-HCl (pH 5.0)+5 mM ドデシル硫酸ナトリウム

印加電圧：20 kV

検出：UV210 nm

サンプル導入：重力導入法

電氣的に中性な物質をマーカーとして添加した。マーカーにはアセトンを用いた。

(3) A 型唾液中の血液型物質の糖組成分析

3-1 材料

実験材料は、A型の健常人から採取した全唾液である。Le(a-b+)型（分泌型）3人から390 ml、Le(a-b-)型でかつ分泌型1人から280 ml、Le(a+b-)（非分泌型）3人から1,200 ml採取した。それぞれの唾液は実験まで-80°Cで保存した。なお、提供者の分泌型・非分泌型の別は、ヒト由来抗血清を用いた唾液からの凝集阻止試験で判定した。

3-2 分析試料の調製

血液型物質を保持するタンパクの分離は、Sephacryl CL-6Bを用いたゲル濾過で行った。唾液を蒸留水に対して透析し、凍結乾燥したものを6 M塩酸グアニジン水溶液に溶解させ、その上清をゲル濾過で分離した。

装置：ファルマシアバイオテク社製 FPLC システム

カラム：Sephacryl CL6B (3.0 cm i.d. × 90 cm)

溶出液：50 mM Tris-HCl (pH 7.6)+6M塩酸グアニジン

流速：0.5 ml/min

分取：12 ml/フラクション

検出：UV 280 nm における吸光度および抗 A 抗体，抗 Le^a 抗体および抗

Le^b 抗体を用いた ELISA

なお、分離した型活性タンパク質が単一成分であるか否かを推定するために、キャピラリー電気泳動を行った。移動相および印加電圧は下記のとおりである。そのほかの条件は 2-7 と同様である。

移動相：50 mM ホウ酸ナトリウム (pH 9)+0.1% Tween 20

+0.1% トリエチルアミン

印加電圧：10 kV

3-3 糖組成の分析

ゲル濾過によって得られた糖タンパク質の糖組成分析を，ポストカラム誘導化 HPLC により行った¹⁵⁶⁾。定量は，標品単糖を用いて作製した検量線に基づいて行った。糖組成分析は，千葉大学大学院薬学研究院・生体分析化学研究室 豊田英尚博士にご協力いただいた。

中性糖は，型物質糖タンパク質を 2.5 M トリフルオロ酢酸存在下，80°C で 6 時間加水分解した後，陰イオン交換カラムで分析した。

HPLC 条件は以下のとおりである。

装置：日立製作所製 HPLC システム

カラム：TSKgel sugar AX1 (4.6 mm i.d. x 150 mm, 東ソー)

移動相：0.35 M ホウ酸-NaOH 緩衝液 (pH 8.2)

誘導化：2-シアノアセトアミドを用いたポストカラム反応

検出：UV280nm

カラム温度：60°C

アミノ糖の分析は，6 M 塩酸で，80°C で 2 時間加水分解した後，陽イオン交換カラムで行った。

HPLC 条件は以下のとおりである。

装置：日立製作所製 HPLC システム

カラム：TSKgel sugar SCX1 (4.6 mm i.d. x 150 mm, 東ソー)

移動相：0.35 M ホウ酸-NaOH 緩衝液 (pH 7.6)

誘導化：2-シアノアセトアミドを用いたポストカラム反応

検出：UV280 nm

カラム温度：60°C

(4) A型唾液中の血液型物質糖鎖の比較

4-1 材料

前項 3-2 で調製した A 型唾液中型物質タンパク質。

4-2 アルカリ還元処理による O-結合型糖鎖の分離

Le(a-b+)型 (分泌型), Le(a+b-)型 (非分泌型) および Le(a-b-) (分泌型) の A 型唾液中糖タンパク質それぞれ 82 mg, 98 mg および 90 mg を, 15 ml の水に懸濁し, 等容量の 0.2 M NaOH/2M NaBH₄ を添加し, 45°C で 18 時間攪拌した。反応液は酢酸で中和し, 溶媒を減圧下留去した。残渣にメタノールを加え, 再び減圧下溶媒を留去した。残渣に蒸留水を加えて溶かし, Sephadex G-10 で脱塩した。脱塩されたオリゴ糖-alditol 分画は凍結乾燥した。

4-3 ゲル濾過による分離

NaOH/NaBH₄ 処理によって得られたオリゴ糖-alditol 分画を, ゲル濾過によって, 分子量に従った分離を行った。分離条件は以下のとおりである。

装置：ファルマシアバイオテク社製 FPLC システム

カラム：Sephadex G-50 fine (1.5 cm i.d. × 75 cm)

溶出液：20 mM NH_4HCO_3

流速：0.2 ml/min

分取：1.5 ml/フラクション

検出：UV210 nm における吸光度および抗 A 抗体を用いた ELISA。

4-4 イオン交換クロマトグラフィー

4-3 で得られた A 型活性分画を集めて凍結乾燥し、残渣を最小量の水に溶解し、陰イオン交換カラムで分離した。分離条件は以下のとおりである。

装置：ファルマシアバイオテック社製 FPLC システム

カラム：QAE-Sephadex A-25 (1.2 cm i.d. × 9 cm)

溶出液：A, 10mM 炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.6)

B, 10mM 炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.6) + 0.2 M NaCl

流速：0.2 ml/min

溶出条件：B 濃度, 0% (0~60 分),

0%→100% (60 分~150 分),

100% (150 分~180 分)

分取：1.5 ml/フラクション

検出：UV210 nm における吸光度および抗 A 抗体, 抗 Le^a 抗体および抗

Le^b 抗体を用いた ELISA。

4-5 HPLC

4-4 で得られた血液型活性分画を集めて蒸留水に対して透析後凍結乾燥し、

残渣をアセトニトリル-水混液に溶解し、アミノカラム HPLC で分析した。

HPLC 条件は以下のとおりである。

装置：Gilson 社製 HPLC システム

カラム：ShodexNH2P-50 (4.6 mm i.d.×250 mm, 昭和電工)

移動相：A, CH₃CN-H₂O (85 : 15)

B, CH₃CN-H₂O (50 : 50)

溶出条件：A 濃度, 100%→50% (0~80 min)

検出：UV206 nm

流速：0.5 ml/min

2. 第二章実験

(1) 材料

A 型ヒト唾液は、A 分泌型 (Le(a-b+)型) および A 非分泌型 (Le(a+b-)型) それぞれ 2 人および 1 人から無刺激で採取した。

(2) 試薬

モノクローナル抗体作製に用いた Freund 完全アジュバントおよび Freund 不完全アジュバントは、DIFCO 社から購入した。また、monophosphoryl LipidA (MPL), trehalose-dimycolates(TDM)および cell-wall skeleton(CWS)からなるアジュバントならびに MPL および TDM からなるアジュバントは、RIBI Immunochem Reserch 社より購入した。細胞融合に用いた NS-1 細胞は (株) 特殊免疫研究所

製を用いた。抗体のサブクラス同定に用いた抗体は、カベル社より購入した。

抗原タンパクの分離の際のアッセイ試薬として用いた抗 A モノクローナル抗体は、ビオテスト社製セラクロン（体外診断薬）を用いた。合成血液型抗原は、シンテゾーム（Syntesome 社，ミュンヘン，ドイツ）を用いた。これらは人工合成した糖鎖をプロピルアミノ基を介してポリアクリルアミドに結合させたものである。用いた糖鎖は，A 型三糖（GalNAc α 1-3[Fuc α 1-2]Gal β 1），A 型二糖（GalNAc α 1-3Gal β 1），N-アセチルガラクトサミン（GalNAc α 1-），B 型三糖（Gal α 1-3[Fuc α 1-2]Gal β 1），H type-1（Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-），Le^a（Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1 ） および Le^b（Fuc α 1-2Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-）である。

ELISA プレートは，住友ベークライト社製の MS-7196F を用いた。ブロッキング用のウシ血清アルブミンは，生化学用試薬を和光純薬より購入した。二次抗体は抗マウス IgM (μ) 抗体（ヤギ免疫，HRP 標識）をアメリカンコーレックス社より，抗マウス IgG (H+L) 抗体（ヤギ免疫，HRP 標識）をケミコン・インターナショナル社より購入して用いた。HRP の発色基質には *o*-フェニレンジアミン（和光純薬製）を使用した。

カラムクロマトグラフ用樹脂である Sepharose CL-6B，Sephadex G-150，Sephadex G-50 および Sephadex G-10 は Pharmacia Finechemicals (Uppsala, Sweden) より購入した。

(3) 抗原物質の分離

抗原物質は，A 分泌型および A 非分泌型ヒト唾液よりそれぞれ分離した唾液

ムチンである。

分離方法は、1. (3) 3-2 に示した方法と同じである。

得られたムチン分画を、10 mM リン酸緩衝液 (pH7.2) +0.15 M NaCl に対して透析した。ムチン溶液のタンパク濃度は、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質とした、Lowry 法¹⁰²⁾ で定量した。A 分泌型から得られた唾液ムチン (以下 sMu) は 240 µg/ml, A 非分泌型から得られた唾液ムチン (以下 nMu) は 300 µg/ml であった。

(4) モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体の作製には、(株) 特殊免疫研究所の協力を得た。抗体作製に使用した動物は、各抗原につき BALB/c 系マウス 2 匹ずつである。抗原タンパク質として sMu を用いた場合は、以下のスケジュールで免疫した。初回免疫は sMu 溶液 50 µg 相当量を Freund 完全アジュバントに懸濁し、腹腔内投与した。追加免疫は、初回免疫から 15 日後に sMu 溶液 25 µg 相当量を Freund 不完全アジュバントに懸濁し、腹腔内投与した。最終免疫は、追加免疫から 28 日後に sMu 溶液 12.5 µg 相当量をアジュバントを使用せずに静脈内投与した。最終免疫から 3 日後に屠殺し、細胞融合を行った。

抗原タンパクとして nMu を用いた場合には、以下のようなスケジュールで免疫を行った。初回免疫は nMu 溶液 50 µg 相当量を MPL, TDM および CWS からなるアジュバント (RIBI immunochem Research 社製) に懸濁し、腹腔内投与した。追加免疫は、初回免疫から 14 日後に nMu 溶液 25 µg 相当量を MPL および TDM からなるアジュバントに懸濁し、腹腔内投与した。最終免疫は、追

加免疫から 25 日後に nMu 溶液 12.5 μ g 相当量をアジュバントを使用せずに静脈内投与した。最終免疫から 3 日後に屠殺し、細胞融合を行った。

ハイブリドーマは、Köller と Milstein の方法に従って作製した¹⁵⁷⁾。ミエローマは NS-1 細胞を用いた。

ハイブリドーマが産生する抗体のスクリーニングは、ELISA を用いて行い、ポリアクリルアミドに結合した合成 A 型三糖抗原 (GalNAc α 1-3[Fuc α 1-2]Gal β 1) に対して反応した抗体を選択した。さらにこれら抗 A 抗体の sMu および nMu に対する反応を調べ、sMu および nMu に対する反応特性の異なる抗体群に分類した。これらの抗体を産生する細胞株を限界希釈法でクローン化し、sMu を免疫したマウスから得られたハイブリドーマからは 3 株、nMu を免疫したマウスから得られたハイブリドーマからは 1 株のクローンを得た。

得られたハイブリドーマのクローンを、プリスタンを前投与した BALB/c 系マウスの腹腔に移植し、腹水中に抗体を分泌させた。腹水を採取し、硫酸塩析の後、イムノグロブリン分画を集めて透析した。得られた抗体溶液は 0.1% アジ化ナトリウムを含む生理食塩水で希釈してタンパク濃度 5 mg/ml に調製し、この後の実験に供した。なお、抗体のクラスは、抗マウス IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM および IgA 抗体を用いた寒天平板内二重拡散法で決定した。

(5) 抗体の反応性の検討

得られた抗体の反応特性を調べるため、合成血液型抗原、唾液ムチン、唾液ムチンより切り出した O-結合型糖鎖および化学的あるいは酵素的に処理を行った唾液ムチンに対する反応を ELISA により検討した。反応特性の検討に

用いた唾液ムチンは、免疫抗原に用いたものと同一のものである。

5-1 ELISA

ELISA は 1. (2) 2-5 に示したとおりの方法で行った。なお、作製した抗体（タンパク濃度 5 mg/ml に調整されている）を 1,000 倍希釈したものを一次抗体として用いた。

5-2 唾液ムチンからの O-結合型糖鎖の分離

分泌型および非分泌型唾液ムチンそれぞれ 30 mg および 40 mg を、20 ml の水に懸濁し、等容量の 0.2 M NaOH/2 M NaBH₄ を添加し、45°C で 18 時間攪拌した。反応液は酢酸で中和し、溶媒を減圧下留去した。残渣にメタノールを加え、再び減圧下溶媒を留去した。残渣に蒸留水を加えて溶かし、Sephadex G-10 (3 cm i.d. x 45 cm) を使用して脱塩した。脱塩されたオリゴ糖-alditol 分画は凍結乾燥後、少量の水に溶解し、ゲル濾過で分離を行った。分離条件は 1. (4) 4-3 と同じである。A 型活性を有する分画を集め、凍結乾燥し、少量の水に溶解した。得られた A 型活性糖鎖水溶液の糖含量をフェノール-硫酸法¹⁵⁸⁾ で定量したところ、分泌型および非分泌型の唾液中血液型糖タンパク質から得られた糖鎖は、それぞれ約 0.26 mg/ml および 0.22 mg/ml であった。

5-3 唾液ムチンのタンパク部分構造を変化させるための処理

5-3-1 唾液ムチンの加熱処理

タンパク部分を熱変性させるために、分泌型および非分泌型ムチン 0.3 mg/ml

PBS 溶液を沸騰水浴上で 10 分間加熱した。放冷後、溶液を 50 mM 炭酸緩衝液 (pH9.6) で希釈して ELISA を行った。

5-3-2 唾液ムチンのトリクロロ酢酸 (TCA) 処理

タンパク部分を酸により変性させるため、分泌型および非分泌型唾液ムチン 3 mg/ml PBS 溶液 10 μ l に対して、1%TCA 水溶液 90 μ l を添加し、室温 (25°C) で 30 分インキュベートした。反応後、反応溶液を 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で希釈して ELISA を行った。

5-3-3 唾液ムチンのプロナーゼ処理

唾液ムチンのタンパク部分を断片化させるため、プロナーゼによる消化を行った。分泌型および非分泌型唾液ムチン 0.3 mg/ml PBS 溶液 1 ml に対してプロナーゼ 3 mg/ml PBS 溶液を 0.1 ml 添加し、37°C でインキュベートした。インキュベート開始後 24 時間後に、プロナーゼ 3 mg/ml PBS 溶液を 0.1 ml 追加し、さらに 24 時間インキュベートした。反応溶液を遠心後、上清を Sephadex G-150 カラム (2 cm i.d. x 45 cm) にアプライし、10 mM 炭酸水素アンモニウム溶液で、流速 0.2 ml/min で溶出して、断片化した糖ペプチドを、未反応の高分子糖タンパク質あるいはプロナーゼから分離した。検出は UV210 nm の吸収および抗 A 抗体を使用した ELISA で行った。UV210 nm でモニターしたクロマトグラム上には、未反応の高分子糖タンパク質がボイドボリュームに観察された。このピークの直後、やや低分子側に抗 A 抗体と反応するフラクションが確認されたので、これらのフラクションを分取した。分取したフラクションは Lowry 法¹⁰²⁾

によりタンパク定量を行い，2 $\mu\text{g/ml}$ になるように 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で希釈して ELISA を行った。

5-4 唾液ムチンの糖鎖部分を変化させるための処理

5-4-1 唾液ムチンの水酸化ナトリウム処理

唾液ムチンの O-結合型糖鎖を除去するために，分泌型および非分泌型唾液ムチン 0.6 mg/ml PBS 溶液 50 μl に対して，0.1 M NaOH 水溶液 50 μl を添加し，45°Cで一晩インキュベートした。反応後，溶液を 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で希釈して ELISA を行った。

5-4-2 唾液ムチンの過ヨウ素酸ナトリウム処理

唾液ムチンの糖鎖を構成する糖の一部を酸化分解するため，分泌型および非分泌型唾液ムチン 3 mg/ml PBS 溶液 10 μl に対して，5 mM の過ヨウ素酸ナトリウム水溶液 90 μl を添加し，室温 (25°C) で 1 時間インキュベートした。反応後，溶液を 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で希釈して ELISA を行った。

3. 第三章実験

(1) 作製したモノクローナル抗体の鑑定への応用

1-1 材料

赤血球は，A₁型，B型，O型，A₁B型およびA₂B型各1名から採取した血

液から分離した。なお、A型の亜型であるA₂型との区別のため、通常A型およびAB型と称される型を、ここではA₁型およびA₁B型と称する。糖鎖抗原であるP式血液型物質に対する反応の有無を調べるため、O型はP₁型、P₂型のそれぞれ1名から採取した。血球分画は生理食塩水で3回洗浄し、3%浮遊液を調製して実験に使用した。全唾液は、A₁分泌型5人、A₂分泌型1人、A₁非分泌型5人、B分泌型4人、B非分泌型2人、O分泌型4人、O非分泌型3人、A₁B分泌型1人およびA₁B非分泌型2人より採取した。なお、これらの分泌型個人のルイス式血液型は全てLe(a-b+)型である。抗体の反応がルイス式血液型物質に影響されるか否かを調べるために、さらにA₁分泌型(Le(a-b-)型)1人の唾液を採取した。唾液は採取直後に煮沸し、使用直前まで-20°Cで保管した。唾液斑は、唾液をサラシ布に付着させ、室温で乾燥させて作製した。作製した斑痕は使用直前まで4°Cで保存した。

1-2 赤血球の検査

赤血球に対する反応は、ホールグラスを用いた凝集法で行った。生理食塩水で希釈した抗体25 μlをホールグラス上に滴下し、続いてA₁型、B型、O型(P₁型)、O型(P₂型)、A₁B型およびA₂B型の赤血球の3%浮遊液25 μlを滴下した後、時々攪拌し、10分後に肉眼で凝集を観察した。血球の凝集が観察された場合を+と判定した。

1-3 ELISA

唾液に対する反応は、ELISAを用いて調べた。50 mM炭酸緩衝液(pH 9.6)

で1,500倍に希釈した唾液をプレートに固相化し、1. (2) 2-5の方法に従って検査を行った。判定は前述の基準に従った。

1-4 微量混合凝集法

微量混合凝集法は、淀谷らの方法に従って行った¹⁵⁹⁾。スライドグラスに両面テープ（ニチバン，CW-18）を貼付し、さらに両面テープ上にリング状の両面テープ（エーワン社製プラパッチ）を貼付した。リング状両面テープで囲まれた内側の領域の粘着面に、斑痕試料より切り出してほぐした単繊維数本を貼付し、圧着させた。力価256倍に調整した抗体溶液と、6%ブロッケーヌ（スキムミルクより調製したブロッキング用タンパク質，雪印社製）および0.3% Tween 20を1：1：1の割合で混合したもの一滴を、試料を付着させた個所に滴下し、スライドグラスを湿箱中に入れ、室温で4時間静置して感作した。感作終了後、生理食塩水を資料付着個所に注ぎかけて、未反応の抗体を洗浄し、指示血球としてA₁型ヒト赤血球5%浮遊液一滴を、試料付着個所に滴下し、湿箱中で5分間反応させた。スライドグラスを湿箱から取り出し、浅い容器に入れた生理食塩水中に、試料付着面を下にして浸け、未反応の指示血球を除去した。10分後にスライドグラスを生理食塩水から取り出し、試料上の指示血球の付着の有無を顕微鏡下で観察した。判定は単繊維試料上において指示血球の凝集が確認されたものを陽性とした。

1-5 吸収試験

吸収試験は、常法に従って行った¹⁶⁰⁾。検査試料はサラシ布上に作製した唾液

斑を用いた。唾液斑をガラス板にはさみ、ホットプレート上において100°Cで10分加熱し、熱固定操作を行った。力価8倍の抗体0.1 mlを入れた試験管内に、熱固定した0.5 cm×0.5 cm大の唾液斑2枚を入れ、斑痕を抗体溶液に浸した後、4°Cで一晩感作した。感作の後、抗体溶液全量を取り、生理食塩水で順次倍数希釈し、8倍まで希釈した。各希釈抗体溶液をホールグラスに移し、それぞれのウエルに対して、A₁型ヒト赤血球3%浮遊液を等容量滴下し、凝集の有無を観察した。凝集が観察されなかったウエルは、唾液斑中の血液型物質が、抗体の血球凝集作用を阻害したものと解釈される。同様に、凝集が観察されたウエルは、唾液斑中の血液型物質と抗体との反応は無かったものと解釈される。

1-6 凝集阻止試験

凝集阻止試験は、1. (2) 2-6 に示した方法に従って行った。

(2) モノクローナル抗体の解離試験への応用

2-1 材料

検査材料は血痕および毛髪である。血痕は、A型およびB型の健常人から同意を得て採血した血液をサラシ布に付着させて作製した。作製した血痕は室温で乾燥させ、実験に供するまで冷蔵庫内で4°Cで保管した。毛髪はA型、B型、O型およびAB型の健常人より任意に提出されたもので、太さ70 μm以上のものである。

2-2 試薬

合成血液型抗原は、シンテゾーム (Syntesome。 Germany) を用いた。結合している糖鎖は、A 型三糖および B 型三糖である。

血痕を材料とした実験を行う際に用いた市販モノクローナル抗体は、ビオテスト社製抗 A 抗体 (Lot : 840981) および抗 B 抗体 (Lot : 871171) 和光純薬社製抗 A 抗体 (Lot : RL389) および抗 B 抗体 (Lot : 007), 国際試薬社製抗 A 抗体 (Lot : 007) および抗 B 抗体 (Lot : RK489), オーソ・クリニカルダイアグノスティックス社製抗 A 抗体 (Lot : BAA201A21) および抗 B 抗体 (Lot : BBB592A21) およびイムコア社製抗 A 抗体 (Lot : 101010) および抗 B 抗体 (Lot : 201020) である。

毛髪を材料とした実験を行う際に用いた市販モノクローナル抗体は、和光純薬社製抗 A 抗体 (Lot : YL473) および抗 B 抗体 (Lot : YK588), ビオテスト社製抗 A 抗体 (Lot : 030281) および抗 B 抗体 (Lot : 030291) およびオーソ・クリニカルダイアグノスティックス社製抗 A 抗体 (Lot : BAA209A21) および抗 B 抗体 (Lot : BBB603A21) である。

2-3 血痕からの解離試験における最適解離温度条件の検索

血痕は糸片 3 mm を 1 本使用した。血痕を試験管に入れ、抗体原液を滴下し、4°C で 18 時間静置して、抗体を吸着させた。その後、洗浄液として冷却した PBS-Tween を試験管に満たし、攪拌後洗浄液を除去した。同様の洗浄操作を冷生理食塩水を用いてさらに 2 回繰り返した。洗浄操作は氷冷下で行った。この洗浄操作により吸着しなかった抗体を洗い流した。抗体を吸着させた血痕を取り出

し、0.5 ml 容量のポリプロピレン製チューブに移し、解離液として、生理食塩水 25 μ l を添加後、DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, Wilton, USA) で加熱して抗体を解離させた。加熱温度は 50°C, 52°C, 54°C, 56°C および 58°C とし、加熱時間は 10 分とした。解離液中における活性を保持している抗体量の測定は、合成 A 型三糖あるいは合成 B 型三糖抗原 20 μ g/ml を固相化したプレートを用いた ELISA で行った。なお、検査は一つの条件につき、血痕 10 本を用いて行い、平均値を求めた。なお、得られたデータについて、解離された抗体量が温度による影響を受けているかどうか、温度を変動要因とする分散分析を行って検定を行った。

2-4 毛髪からの解離試験における最適解離温度・解離時間条件の確立

毛髪は 1.5 cm の長さに切断し、薄めた中性洗剤中に入れて超音波洗浄し、純水ですすいだ後、さらにメタノールで洗い、最後にジエチルエーテル中に浸して脱脂した。乾燥後プレス機で圧搾して内部を露出させた。実験操作は、前項 2-3 に記した操作と同様である。最適加熱温度の検討は、加熱温度を 51°C, 53°C, 55°C および 57°C とし、加熱時間は 5 分とした。また、最適加熱時間の検討は、1~15 分の間でそれぞれ検討した。解離液中における活性を保持している抗体量の測定は、合成 A 型三糖あるいは合成 B 型三糖抗原 20 μ g/ml を固相化したプレートを用いた ELISA で行った。なお、最適加熱温度の検討は、一つの条件につき毛髪試料 6 本を使用し、最適加熱時間の検討は一つの条件につき毛髪試料 8 本を用いて行い、それぞれ平均値を求めた。なお、得られたデータについて、解離された抗体量が温度による影響を受けているかどうか、温度を変動要

因とする分散分析を行って検定を行った。

2-5 確立した検査方法の検証

毛髪のために確立したモノクローナル抗体を用いた解離試験の手順は以下のとおりである。

- (ア) 毛髪試料を中性洗剤、水、メタノールで洗浄した後、エーテルで脱脂する。
- (イ) 毛髪試料をプレス式圧搾機を用いて圧搾する。圧搾した毛髪試料を抗 A 用、抗 B 用、抗 H 用として 2 cm : 1 cm : 1 cm に分割する。
- (ウ) アクリル製血清希釈盤のウェル内に抗 A、抗 B 抗体（和光純薬製）および抗 H レクチン（ホーネン社製）をそれぞれ一滴ずつ滴下し、圧搾した毛髪試料を浸して抗体を感作させる。4°Cで一晩静置する。
- (エ) 洗浄液として 0.05% Tween 20 添加生理食塩水を満たした 3 本の試験管に、抗 A、抗 B、抗 H 抗体を感作させた毛髪試料をそれぞれ移し、試験管を転倒混和後、水冷下、洗浄液を吸引する。この洗浄操作を、Tween20 添加生理食塩水で 2 回、生理食塩水で 3 回行う。
- (オ) 試験管を氷から取り出し、解離液として、0.5%ゼラチン添加生理食塩水溶液をパスツールピペットで一滴加える。試験管の温度を室温まで戻してから、恒温水槽内において 53°Cで 10 分間加温する。
- (カ) パパイン処理済み指示血球浮遊液（ABO 型ともに）を加え、1,000 rpm で 1 分遠心し、凝集を観察して判定する。なお、血球のパパイン処理は、常法に従って行った¹⁴⁷⁾。

上記の方法をブラインドテストによって検証した。

ブラインドテストに用いた検査材料は、健常な日本人（A型10人、B型8人、O型13人、AB型2人）より任意に提出された頭毛のうち、太さ70 μm ～100 μm であり、かつ長さ4 cm以上の毛髪の中から60本を使用した。

検査を行わない者1名が、6名の検査者に対して、それぞれ10本の毛髪資料を配付し、検査を行った。検査者には、配付された資料中に、どの血液型の毛髪が何本含まれるかという情報は示されていない。また、各検査者に配布された毛髪資料の血液型別の本数比は、各検査者間で同一とは限らず、この事実も検査者には知らされていない。

毛髪からのABO式血液型検査の判定結果は、A、B、OあるいはABのいずれかの型で表記し、明確な型判定ができないと判断したものについては判定保留とした。なお、頭毛提供者のABO式血液型は、提供者から採取した血球を用いて検査した。

謝 辞

本研究に当たり，懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました，千葉大学大学院薬学研究院生体分析化学研究室 今成登志男 教授に深く，心より感謝いたします。

本研究に当たり，ご高配を賜りました，千葉大学大学院薬学研究院薬品製造学研究室 石川勉 教授に深く感謝いたします。

本研究に当たり直接の御指導，御鞭撻を賜りました，警察庁科学警察研究所 附属鑑定所 佐藤元 鑑定官に深く感謝いたします。

本研究にあたり，糖組成分析を行っていただき，また，有益なる御助言，御教示を賜りました，千葉大学大学院薬学研究院生体分析化学研究室 戸井田敏彦 助教授ならびに同研究室助手 豊田英尚 博士に心より感謝いたします。また，抗体作製に当たり多大なる御助力を頂いた，(株)特殊免疫研究所 伊藤行夫氏，岩成宏子氏，青井理恵氏に深く感謝いたします。

本研究の端緒を与えて下さいました科学警察研究所 坂井活子 部付主任研究官に感謝いたします。また，数々の御協力，御助言，御支援をいただきました，笠井賢太郎 生物第四研究室長，吉田日南子主任研究官，水野なつ子主任研究官，関口和正主任研究官，千住弘明研究員，藤井宏治研究員，白石智子研究員に心より感謝いたします。また，ブラインドテストにご協力いただいた，山口県警 荒木直幸氏，佐賀県警 城野博文氏，茨城県警 五十嵐史子氏，福岡県警 廣重憲一氏，宮城県警 土屋昌弘氏に深謝いたします。

終わりに臨み，本研究に御理解と御支援を頂きました，科学警察研究所 高取健彦 所長および大津留修 化学第二研究室長に深謝いたします。

引用文献

- 1) 瀬田季茂：法科学研究に見る最近の動向. 日本鑑識科学技術学会誌, **1**, 1-10 (1996)
- 2) 松木孝澄, 滝澤久夫: 第三章 物体検査, pp.279-294, 上山滋太郎監修, 標準法医学・医事法第5版, 医学書院(東京) 2000
- 3) 永野耐造: 第13章 血液型検査法, B.血痕, 体液, 体液斑組織片の血液型検査, pp.342-347, 永野耐造, 四方一郎編, 現代の法医学改訂第二版, 金原出版(東京), 1988
- 4) Laine RA and Rush JS: Chemistry of human erythrocyte polylectosamine glycopeptides(erythroglican) as related to ABH blood group antigenic determinants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **228**, 331-347 (1988)
- 5) Allard WJ and Lienhard GE: Monoclonal antibodies to the glucose transporter from human erythrocytes. Identification of the transporter as a Mr = 55,000 protein. *J. Biol. Chem.* **260**, 8668-8675 (1985)
- 6) Tanner MJ, Martin PG and High S: The complete amino acid sequence of the human erythrocyte membrane anion-transport protein deduced from the cDNA sequence. *Biochem. J.* **256**, 703-712 (1988)
- 7) Mueckler M, Caruso C and Baldwin. SA: Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*, **229**, 941-945 (1985)
- 8) Brahn B and Schiff F: Das chemische Verhalten der serologischer Gruppenstoffe A und B, ihr Vorkommen und ihr Nachweiss in Koerperflussig keiten. *Wien Klin. Wschr.* **33**, 1523-1525, (1929)
- 9) 白井三郎: 東医事新誌, 2376, 1283, (1924)
- 10) Witelsky E and Klendshoj: The isolation of the blood group specific B substance. *J. Exp. Med.* **72**, 663-667, (1940)
- 11) 酒井哲哉: 人毛髪 of 血液型物質に関する研究, 日法医誌, **5** (6号別冊), 19-41, (1951)
- 12) 北川道安: 骨髓の型質に関する研究, 日法医誌, **5** (4号別冊), 1-23 (1951)

- 13) 清水佐, 山内俊呉: 爪の型物質について, 日法医誌, 4, 154 (1950)
- 14) 広田忠臣: 第四章血液型 II 法医学的応用, pp.126-135, 松倉豊治編, 法医学, 永井書店 (大阪) 1987
- 15) De Forest, PR, Gaensslen, RE and Lee, HC: Chapter 9, Blood, Forensic Science-an introduction to criminalistics-, McGraw-Hill Publishing Company (New York) 1983
- 16) De Forest, PR, Gaensslen, RE, Lee, HC, Chapter 10, Body fluids, Forensic Science-an introduction to criminalistics-, McGraw-Hill Publishing Company (New York) 1983
- 17) 吉岡尚文, 福島弘文, 前田均, 西克治, 寺沢浩一, 山内春夫, 中園一郎: 第7章 血液型と個人識別, pp.253-320, 高取健彦編, エssenシャル法医学第三版, 医歯薬出版 (東京) 1997
- 18) 匂坂馨: 第13章物体検査, pp.167-176, 矢田昭一編, 新基礎法医学・医事法, 南山堂 (東京) 1989
- 19) 石本剛一: 第14章親子鑑別, pp.167-176, 矢田昭一編, 新基礎法医学・医事法, 南山堂 (東京) 1989
- 20) 吉村昌雄: 第2章個人同定, pp.51-62, 松倉豊治編, 法医学, 永井書店 (大阪) 1987
- 21) Oepen I.: Identification of characteristics in blood and semen stains-a review. *Forens. Sci. Int.* 36, 183-191, (1988)
- 22) 小室歳信, 向山レイ, 向山明孝: 法医鑑識への応用. 日本臨床 53, 2322-2329 (1995)
- 23) 大久保康人, 富田忠夫, 山野孟, 湯川美鳥, 西房子: 大阪府赤十字血液センターの資料にもとづく血液型の分布-特に ABO variant とその頻度-. 衛生検査 23, 15-17 (1974)
- 24) 梶井英治: 第一章生体に関する法医学, C. 遺伝標識, 上山滋太郎監修, 標準法医学・医事法第5版, pp.28-48 医学書院 (東京) 2000
- 25) Seta S: Current research and case work activities of criminalistics in Japan. *Forensic. Sci. Int.* 80, 109-35 (1996)

- 26) 笠井賢太郎: 法科学とPCR. 蛋白質核酸酵素 **41**, 738-743 (1996)
- 27) 笠井賢太郎: PCRを利用した法科学的資料からのDNA型検出. 実験医学 **15**, 842-844 (1997)
- 28) 佐藤元: 法科学におけるDNA分析. 日本鑑識科学技術学会誌 **2**, 1-13 (1997)
- 29) 警察庁刑事局鑑識課 執務資料 (平成13年度)
- 30) モノクローナル抗体の法医血液型鑑定への導入における問題点とその対応策 (執務資料), モノクローナル抗体の警察法医鑑定への導入に関するワーキンググループ編, 警察庁刑事局鑑識課・科学警察研究所, (2001)
- 31) 平成14年警察白書, 警察庁 pp.1-3, (2002)
- 32) 山本文一郎: 6. ABO式血液型遺伝子, pp.136-165, 箱守仙一郎, 永井克孝, 木幡陽 編, グリコジーンとその世界, 講談社 (東京), 1994
- 33) Yamamoto F and Hakomori S: Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *J. Biol. Chem.* **265**, 19257-19262 (1990)
- 34) Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J and Hakomori S: Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*, **345**, 229-233 (1990)
- 35) Yamamoto F, Marken J, Tsuji T, White T, Clausen H and Hakomori S: Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc alpha 1→2Gal alpha 1→3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J. Biol. Chem.* **265**, 1146-1151 (1990)
- 36) Yamamoto F: Molecular genetics of the ABO histo-blood group system. *Vox Sang.* **69**, 1-7 (1995)
- 37) 山本文一郎: ABO式血液型: 遺伝子クローニングに始まる免疫血清学から分子生物学への変遷. 日本鑑識科学技術学会誌 **4**, 1-14 (1999)
- 38) Yamamoto F: Molecular genetics of ABO. *Vox Sang* **78**, 91-103 (2000)

- 39) Yoshida A, Yamaguchi H and Okubo Y: Genetic mechanism of cis-AB inheritance. II, Case associated with structural mutation of blood group glycotransferase. *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 645-650 (1980)
- 40) Yamamoto F, McNeill PD, Kominato Y, Yomamoto Y, Hakomori S, Ishimoto S, Nishida S, Shima M and Fujimura Y: Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 2. Cis-AB alleles. *Vox Sang.* **64**, 120-123 (1993)
- 41) Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto Y, Hakomori S, Bromilow IM and Dugid JK: Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 4. Another type of O allele. *Vox Sang.* **64**, 175-178 (1993)
- 42) Lee, JC and Chang, JG: ABO genotyping by polymerase chain reaction. *J. Forens. Sci.* **37**, 1269-1275 (1992)
- 43) Ladd C, Bourke MT, Scherczinger CA, Pagliaro EM, Gaensslen RE and Lee HC: A PCR-based strategy for ABO genotype determination. *J. Forens. Sci.* **41**, 134-1137 (1996)
- 44) Akene A, Yosimura S, Yoshida M, Okii Y, Watabiki T, Matsubara K and Kimura K: ABO genotyping following a single PCR amplification. *J. Forens. Sci.* **41**, 272-274 (1996)
- 45) Lee, JC, Tsai LC, Chen CH and Chang, JG: ABO genotyping by mutagenically separated polymerase chain reaction. *Forens. Sci. Int.* **82**, 227-232 (1996)
- 46) Mizuno N, Ohmori T, Kasai K, Sato H: ABO Genotyping Using Multiplex Sequence Specific PCR and Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis. *Proc. 53th Annual Meeting Amer. Acad. Forens. Sci.* pp.32, (2001)
- 47) Olsson ML and Chester MA: A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O² versus A/O² discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. *Vox Sang.* **69**, 242-247 (1995)
- 48) 水野なつ子, 大森毅, 関口和正, 佐藤元, 笠井賢太郎: ABO 式血液型と DNA 分析による遺伝子型の整合性について, 日本鑑識科学技術学会誌 **6**, suppl. 80 (2001)
- 49) 水野なつ子, 大森毅, 関口和正, 佐藤元, 笠井賢太郎: ABO 式血液型の表現型と遺伝子型の不一致例とその原因について, 日本鑑識科学技術学会誌 **7**, suppl. 79 (2002)

- 50) IV 血痕の検査法, pp.120-166, 科学警察研究所編, 血清学的物体検査法, 科学警察研究所(東京) 1974
- 51) 大森 毅、水野 なつ子、関口 和正、千住 弘明、坂井 活子: ABO式血液型検査用モノクローナル抗体の法科学的資料への適用について. 日本鑑識科学技術学会誌 1, 43-48 (1996)
- 52) 大森毅, 桐原俊二, 佐藤元, 坂井活子: 法科学的検査における市販 ABO 式血液型検査用モノクローナル抗体の評価. 科警研報告法科学編 51, 102-107 (1998)
- 53) 大森毅, 桐原俊二, 佐藤元: 市販 ABO 式血液型検査用モノクローナル抗体の検定結果, 科学警察研究所報告法科学編 52, 116-123 (1999)
- 54) Oriol R: ABO, Hh, Lewis and secretion, pp.37-73, *Blood Cell Biochemistry, vol 6*, edited by Cartron JP, Rouger P. Plenum Press (New York) 1995
- 55) Race RR. and Sanger R: Chapter 8 Secretors and non-secretors. pp.311-322, *Blood group in man 6th ed.* Blackwell (London) 1975
- 56) Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, Lennon GG, and Lowe JB: Sequence and expression of a candidate for the human *Secretor* blood group $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase gene(*FUT2*). *J Biol Chem* 270, 4640-4649 (1995)
- 57) Tanegashima A, Nishi K, Fukunaga T, Rand S, and Brinkmann B: Ethnic differences in the expression of blood group antigens in the salivary gland secretory cells from German and Japanese non-secretor individuals. *Glycoconjugate J.* 13, 537-545 (1996)
- 58) Kudo T, Iwasaki H, Nishihara S, Shinya N, Ando T, Narimatsu I, and Narimatsu H: Molecular genetic analysis of the human Lewis histo blood group system. *J. Biol. Chem.* 271, 9830-9837 (1996).
- 59) 成松久, ヒトとフコース転移酵素; 各種組織における血液型抗原, 癌関連抗原分布とそれを合成するフコース転移酵素. 蛋白質核酸酵素 43, 2394-2403 (1998)
- 60) Nadano D and Mukoyama H: Isolation of H and Le^b active human salivary mucin and structures of their sugar chains with the H and Le^y(Y) determinants. *Jpn. J. Legal Med.* 44, 259-266 (1990)

- 61) Klein A, Carnoy C, Wieruszkeski JM, Strecker G, Strang AM, van Halbeek P, Roussel P, and Lamblin G: The broad diversity of neutral sialylated oligosaccharides derived from human salivary mucins. *Biochemistry* **31**, 6152-6165 (1992)
- 62) Thomsson KA, Prakobphol A, Leffler H, Reddy MS, Levine MJ, Fisher SJ and Hansson GC: The salivary mucin MG1 (MUC5B) carries a repertoire of unique oligosaccharides that is large and diverse. *Glycobiology* **12**, 1-14 (2002)
- 63) Nemeč M, Drimalova D, Horejsi V, Vanak J, Bartek J and Viklicky V: Murine monoclonal antibodies to human A erythrocytes: differential reactivity with N-acetyl-D-galactosamine. *Vox Sang.* **52**, 125-8 (1987)
- 64) Miyazaki S, Nakajima T and Furukawa K: Monoclonal anti-A and anti-A,B antibodies from a mouse immunized with A secretor saliva. *Exp. Clin. Immunogenet.* **8**, 16-23 (1991)
- 65) McDonald DF and Thompson JM: A new monoclonal anti-A antibody BIRMA-1. A potent culture supernatant which agglutinates Ax cells, but does not give undesirable reactions with B cells. *Vox Sang.* **61**, 53-58 (1991)
- 66) Barrie EK, Fraser RH, Munro AC, Williamson AR, Hamilton EA and Mitchell R: Monoclonal anti-B produced by the immunization of mice with soluble salivary glycoproteins. *J Immunogenet.* **10**, 41-44 (1983)
- 67) Becker MI, Juica F, Jamett A, Tzichinovsky S, Barros S, Aguayo J and De Ioannes AE: Development of anti-human B blood group monoclonal antibodies suitable as a blood typing reagent. *Hybridoma.* **13**, 303-310 (1994)
- 68) Race RR. and Sanger R: Chapter 2 The ABO blood groups, pp.8-91, *Blood group in man* 6th ed. Blackwell (London) 1975
- 69) Matsui T, Fujimura Y, Nishida S and Titani K: Human plasma alpha 2-macroglobulin and von Willebrand factor possess covalently linked ABO(H) blood group antigens in subjects with corresponding ABO phenotype. *Blood* **82**, 663-668 (1993)
- 70) Prakobphol A, Leffler H and Fisher SJ: The high-molecular weight human mucin is the primary salivary carrier of ABH, Le^a and Le^b blood group antigens. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* **4**, 325-333 (1993)

- 71) Clausen H and Hakomori S: ABH and related histo-blood group antigens: Immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang* **56**, 1-20 (1989)
- 72) V. 唾液の検査法, pp.168-176, 科学警察研究所編, 血清学的物体検査法, 科学警察研究所 (東京) 1974
- 73) Watkins WM: Molecular basis of antigenic specificity in the ABO, H and Lewis blood-group systems. pp. 313-390 *Glycoproteins*, edited by Moutreuil J, Vliegthart. J.FG, Schachter H. Elsevier Science (Amsterdam) 1995
- 74) Lowe JB: Biochemistry and biosynthesis of ABH and Lewis antigens, pp.75-115, *Blood Cell Biochemistry*, vol 6, edited by Cartron JP, Rouger P Plenum Press (New York) 1995
- 75) Le Pendu J: A hypothesis on the dual significance of ABH, Lewis and related antigens. *Immunogenetics* **16**, 53-61 (1989)
- 76) Oriol R, Le Pendu J and Mollicone R: Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang.* **51**, 161-171 (1986)
- 77) Oriol R: Genetic control of fucosylation of ABH precursor chains; Evidence for new epistatic interaction in different cells and tissues. *J Immunogenet* **17**, 235-245 (1990)
- 78) Sylvie Rouquier, John B. Lowe, Robert J. Kelly, Anne L. Fertitta, Gregory G. Lennon, and Dominique Giorgi: Molecular Cloning of a Human Genomic Region Containing the H Blood Group (1,2)Fucosyltransferase Gene and Two H Locus-related DNA Restriction Fragments. *J. Biol. Chem.* **270**, 4632-4639 (1995)
- 79) Larsen RD, Ernst LK, Nair RP, Lowe JB: Molecular cloning , sequence and expression of a human GDP-L-fucose: β -D-galactoside 2- α -L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6674-6678 (1990)
- 80) Milland J, Taylor SG, Dodson HC and McKenzie IFC: Sandrin MS, The Cytoplasmic Tail of 1,2-Fucosyltransferase Contains a Sequence for Golgi Localization. *J. Biol. Chem.* **276**, 12012-12018 (2001)
- 81) Oriol R, Candelier JJ and Mollicone R: Molecular genetics of H. *Vox Sang.* **78**, Suppl 2, 105-8 (2000)

- 82) Oriol R, Mollicone R, Cailleau A, Balanzino L and Breton C: Divergent evolution of fucosyltransferase genes from vertebrates, invertebrates, and bacteria. *Glycobiology* **9**, 323-34 (1999)
- 83) Koda Y, Soejima M and Kimura H: The polymorphisms of fucosyltransferases. *Legal Medicine* **3**, 2-14 (2001)
- 84) Koda Y, Soejima M, Liu Y and Kimura H: Molecular basis for secretor type α (1,2)fucosyltransferase gene deficiency in a Japanese population: a fusion gene generated by unequal crossover responsible for the enzyme deficiency. *Am. J Hum. Genet.* **59**, 343-350 (1996)
- 85) Yu LC, Broadberry RE, Yang YH, Chen YH, and Lin M, Heterogeneity of the human secretor α (1,2)fucosyltransferase gene among Lewis(a+b-) non-secretors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **222**, 390-394 (1996)
- 86) Yu LC, Lee HL, Chu CC, Broadberry RE and Lin M: A newly identified nonsecretor allele of the human histo-blood group α (1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). *Vox Sang.* **76**, 115-119 (1999)
- 87) Henry S, Mollicone R, Lowe JB, Samuelsson B, and Larson G: A second nonsecretor allele of the blood group α (1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). *Vox Sang.* **70**, 21-25 (1996)
- 88) Henry S, Mollicone R, Fernandez P, Samuelsson B, OriolR, and Larson G: Homozygous expression of a missense mutation at nucleotide 385 in the FUT2 gene associated with the Le(a+b+) partial-secretor phenotype in an Indonesian family. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **219**, 675-678 (1996)
- 89) Yu LC, Yang YH, Broadberry RE, Chen YH, Chan YS, and Lin M: Correlation of a missense mutation in the human secretor α 1,2-fucosyltransferase gene with the Lewis(a+b+) phenotype: a potential molecular basis for the weak *Secretor* allele (*Se^w*). *Biochem. J.* **312**, 329-332 (1995)
- 90) Koda Y, Tachida H, Pang H, Liu Y, Soejima M, Ghaderi AA, Takenaka O and Kimura H: Contrasting patterns of polymorphisms at the ABO-secretor gene (FUT2) and plasma alpha(1,3)fucosyltransferase gene (FUT6) in human populations. *Genetics.* **158**, 747-756 (2001)

- 91) Kaneko M, Nishihara S, Shinya N, Kudo T, Iwasaki H, Seno T, Okubo Y and Narimatsu H: Wide variety of point mutations in the *H* gene of Bombay and ParaBombay individuals that inactive H enzyme. *Blood* **90**, 839-849 (1997)
- 92) Wang B, Koda Y, Soejima M and Kimura H: Two missense mutation of H type α (1,2)fucosyltransferase gene (FUT1) responsible for Para-Bombay phenotype. *Vox Sang.* **72**, 31-35 (1997)
- 93) Yu LC, Yang YH, Broadberry RE, Chen YH and Lin M: Heterogeneity of the human H blood group α (1,2)fucosyltransferase gene among Para-Bombay individuals. *Vox Sang.* **72**, 36-40 (1997)
- 94) Andresen PH: The blood group system L. A new blood group L2. A case of epistasy within the blood groups. *Acta Psth. Microviol. Scand.*, **25**, 718-731 (1948)
- 95) Grubb R: Correlation between Lewis blood group and secretor character in man. *Nature* **162**, 933 (1948)
- 96) Race RR. and Sanger R : Chapter 9, The Lewis groups, pp.323-349, Blood group in man 6th ed. Blackwell (London) 1975
- 97) Nishihara S, Hiraga T, Ikehara Y, Iwasaki H, Kudo T, Yazawa S, Morozumi K, Suda Y and Narimatsu H: Molecular behavior of mutant Lewis enzymes in vivo. *Glycobiology* **9**, 373-82 (1999)
- 98) Ohmori T, Toyoda H, Toida T, Imanari T and Sato H: Comparison of oligosaccharides derived from salivary mucin of Japanese secretor and non-secretor individuals of blood group type-A. *Glycoconj. J.* **18**, 635-640 (2001)
- 99) Brockhausen I: Biosynthesis of O-glycans of the N-acetylgalactosamine- α -Ser/Thr linkage type. pp. 201-259, *Glycoproteins*, edited by Mountreuil J, Vliegenthart JFG and Schachter H. Elsevier Science (Amsterdam) 1995
- 100) Thornton DJ, Khan N, Mehrotra R, Howard M, Veerman E, Packer NH and Sheehan JK.: Salivary mucin MG1 is comprised almost entirely of different glycosylated forms of the MUC5B gene product. *Glycobiology* **9**, 293-302 (1999).

- 101) Amerongen AV, Bolscher JG, Veerman EC: Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity, *Glycobiology* **5**, 733-740 (1995)
- 102) 萩原秀昭: 第8章 生体成分の検出・定量法, pp455-465, 堀尾武一 編, 蛋白質・酵素の基礎実験法, 南江堂 (東京) 1994
- 103) Hanisch FG, Egge H, Peter-Katalinic J, Uhlenbruck G, Dienst C and Fangmann R: Primary structures and Lewis blood-group-dependent expression of major sialylated saccharides from mucus glycoproteins of human seminal plasma. *Eur. J. Biochem.* **152**, 343-351 (1985)
- 104) Henry SM, Samuelsson BE, and Oriol R: Immunochemical and immunohistological expression of Lewis histo-blood group antigens in small intestine including individuals of the Le(a+b+) and Le(a-b-) nonsecretor phenotypes. *Glycoconjugate J.* **11**, 600-607 (1994)
- 105) Henry SM, Oriol R and Samuelsson BE: Detection and characterization of Lewis antigens in plasma of Lewis-negative individuals: Evidence of chain extension as a result of reduced fucosyltransferase competition. *Vox Sang* **67**, 387-396 (1994)
- 106) Henry S, Oriol R and Samuelsson B: Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang* **69**, 166-182 (1995)
- 107) 大森毅, 岩成宏子, 青井理恵, 伊藤行夫, 佐藤元: 分泌型および非分泌型のヒト唾液中のA型物質に対するモノクローナル抗体の作製. *生化学* **73**, 696 (2001)
- 108) 大森毅, 白石智子, 関口和正, 佐藤元: A分泌型およびA非分泌型のヒト唾液中の血液型物質に対するモノクローナル抗体の作製. *日本法医学雑誌* **56**, 136 (2002)
- 109) Lowe AD, Lennox ES and Voak D: A new monoclonal anti-A. Culture supernatants with the performance of hyperimmune human reagents. *Vox Sang.* **46**, 29-35 (1984)
- 110) Messeter L, Brodin T, Chester MA, Low B and Lundblad A: Mouse monoclonal antibodies with anti-A, anti-B and anti-A,B specificities; some superior to human polyclonal ABO reagents. *Vox Sang.* **46**, 185-94 (1984)
- 111) Neron S, Lemieux R: Type 2 T-cell-independent murine immune response to the human ABO blood group antigens. *Vox Sang.* **67**, 68-74 (1994)

- 112) Sakata N, Kawakami N, Kuwaki Y and Kitahama M: Heterogeneity of anti-B monoclonal antibodies in reactivity to erythrocytes and saliva samples from various B secretor individuals. *Jpn. J. Legal Med.* **43**, 430-437 (1989)
- 113) 北浜睦夫, 血液型とその周辺における諸問題. 3.モノクローナル抗体について, 日本法医学雑誌. **41**, 543-545 (1987)
- 114) Voak D, Sacks S, Alderson T, Takei F, Lennox E, Jarvis J, Milstein C and Darnborough J: Monoclonal anti-A from a hybrid-myeloma: evaluating as a blood grouping reagent. *Vox Sang.* **39**, 134-40 (1980)
- 115) Ueda R, Ogata S, Morrissey DM, Finstad CL, Szkudlarek J, Whitmore WF, Oettgen HF, Lloyd KO and Old LJ: Cell surface antigens of human renal cancer defined by mouse monoclonal antibodies: identification of tissue-specific kidney glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 5122-5126 (1981)
- 116) Bundle DR, Gidney MA, Kassam N and Rahman AF: Hybridomas specific for carbohydrates; synthetic human blood group antigens for the production, selection, and characterization of monoclonal typing reagents. *J. Immunol.* **129**, 678-682 (1982)
- 117) Nielsen PA, Mandel U, Therkildsen MH and Clausen H: Differential expression of human high-molecular weight salivary mucin (MG1) and low-molecular weight salivary mucin (MG2). *J. Dent. Res.* **75**, 1820-1826 (1996)
- 118) Desseyn JL, Aubert JP, Van Seuningen, I, Porchet N and Laine A: Genomic Organization of the 3' Region of the Human Mucin Gene MUC5B. *J. Biol. Chem.* **272**, 16873-16883 (1997)
- 119) Nielsen PA, Bennett EP, Wandall HH, Therkildsen MH, Hannibal J and Clausen H: Identification of a major human high molecular weight salivary mucin (MG1) as tracheobronchial mucin MUC5B. *Glycobiology* **7**, 413-419 (1997)
- 120) Troxler RF, Iontcheva I, Oppenheim FG, Nunes DP and Offner GD: Molecular characterization of a major high molecular weight mucin from human sublingual gland. *Glycobiology* **7**, 965-973 (1997)
- 121) Liu B, Offner GD, Nunes DP, Oppenheim FG and Troxler RF: MUC4 is a major component of salivary mucin MG1 secreted by the human submandibular gland. *Biochem. Biophys.*

Reseach Commun. **250**, 757-761 (1998)

- 122) Boek LA, Tsai H, Biesbrock AR and Levine MJ: Molecular cloning, sequence, and specificity expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *J. Biol. Chem.* **268**, 20563-20569 (1993)
- 123) Wu AM, Csako G and Herp A: Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Mol. Cell. Biochem.* **137**, 39-55 (1994)
- 124) Yada S: Determination of ABO blood stains by means of elution test. *J. Legal Med.* **16**, 290-294 (1962)
- 125) Yada S, Okane M and Sano Y : Blood grouping of a single human hair by means of elution technique. *Acta Crim. Jpn.* **32**, 7-8 (1966)
- 126) 大森 毅, 佐藤 元 : 市販抗A, 抗Bモノクローナル抗体を用いた解離試験条件の検討—毛髪からの ABO 式血液型検査のための改良—. *日本法医学雑誌* **53**, 338-344 (1999)
- 127) 大城盛昌, 仲里 稔, 伊波 稔: 毛髪の血液型検査に用いる抗血清についての検討. *科警研報告法科学編* **35**, 113- 116 (1982)
- 128) 岸紘一郎, ヒト毛髪から得られたA型物質の免疫化学的性状について, *科警研報告法科学編* **30**, 1-4 (1977)
- 129) Kishi K and Iseki S.: Immunochemical studies on blood group A substances from human hair. *Z. Rechtsmed.* **80**, 191-195 (1977)
- 130) 岸紘一郎, ヒト毛髪から得られたHおよびB型活性のある糖脂質の免疫化学的性状, *科警研報告法科学編* **31**, 229-231 (1978)
- 131) Kishi K and Iseki S: Immunochemical studies on blood group H and B substances from human hair. *Z. Rechtsmed.* **82**, 153-155 (1978)
- 132) Miyasaka S, Yoshino M, Sato H, Miyake B and Seta S: The ABO blood grouping of a minute hair sample by the immunohistochemical technique. *Forens. Sci. Int.* **34**, 85-98 (1987).

- 133) 内村裕光, 宮北省二, 浜田希世, 岩瀬晋, 本庄弘次, 恒成茂行: Labelled streptavidin biotin 法による毛髪 の ABO 式血液型判定. 科警研報告法科学編 49, 9-15 (1996)
- 134) Miyasaka S, Yoshino M, Sato H, Miyake B and Seta S: Light and electron immunohistochemical demonstration of ABH blood group substances in mongolian and caucasian head hair. *J. Can. Soc. Forens. Sci.* 20, 246-247 (1987)
- 135) Ohmori T and Sato H: The Optimum Elution Temperature and Time in Absorption-Elution Test using Commercially Available Monoclonal Antibodies for ABO Blood typing from Hair Samples. *Jpn. J. Sci. Tech. Iden.* 6, 49-55 (2001)
- 136) Nagai K, Yokota M, Sakota S., Imura M and Maeda H: A comparative study on applicability of commercially available monoclonal ABO blood grouping reagents to identification of forensic materials. *Act. Crim. Japon.* 61, 60-69 (1995)
- 137) Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto Y and Hakomori S: Human histo-blood group A2 transferase coded by A2 allele, one of the A subtype, is characterized by a single base deletion in the coding sequence, which results in an additional domain at the carboxyl terminal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 366-374 (1992)
- 138) Clausen H, Lavery SB, Nudelman E, Tsuchiya S and Hakomori S: Repetitive A epitope (type 3 chain A) defined by blood group A1-specific monoclonal antibody TH-1: chemical basis of qualitative A1 and A2 distinction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 1199-1203 (1985)
- 139) XII 硬組織の検査法, 2.3 毛髪からの血液型検査, pp.215-217, 科学警察研究所編, 血清学的物体検査法, 科学警察研究所 (東京) 1974
- 140) 矢田昭一, 岡根光代, 佐野靖子. 解離試験による諸種体毛からの血液型判定. 犯罪学雑誌, 32, 52-55 (1966)
- 141) Wynbrandt F and Chisum WJ: Determination of the ABO blood group in hair. *J Forensic Sci Soc.* 11, 201-4 (1971)
- 142) 何川涼, 第 14 章 物体検査, 何川涼 編, 法医学 pp,233, 日本医事新報 (東京), 1977
- 143) 向山明孝, 瀬田季茂. 毛髪 の血液型と犯罪鑑識への応用. 捜査研究 (東京法令出版), 32 卷 10 号, p48-63 (1983)

- 144) Cortivo P, Biasiolo M, Scorretti C and Benciolini P: The Detection of A and B Antigen on Human Hair by the absorption-Elution Technique Using LISS and Papain-Treated Test Cells. *Z. Rechtsmed.* 91, 195-199 (1984)
- 145) 大城盛昌: 微小毛髪 of 血液型検査法. 科警研報告法科学編 29, 161-166 (1976).
- 146) Shijun S: Examination of ABO bloodgrouping of human hair. *Forens. Sci. Int.* 36, 173-177 (1988)
- 147) III. 血液型検査法, 5.6 トリプシン, パパイン, フィシン処理法, pp.93-95, 科学警察研究所編, 血清学的物体検査法, 科学警察研究所 (東京) 1974
- 148) 荒木直幸, 小泉直人, 金子史恵, 堀江望, 西野貴子, 大木栄: 解離試験法に用いる ABO 式血液型検査用市販モノクローナル抗体の評価. 鑑識科学 4, 29-35 (1999)
- 149) 筒渕美允: 抗A, 抗B血清を用いた吸収試験において認められる血球固着の防止法. 科学警察研究所鑑識科学研究発表会 (法医部会) 要旨集 pp.21, (1988)
- 150) 上林康博, 荒木直幸: モノクローナル抗A, 抗B抗体の利用に関する基礎的研究. 科学警察研究所鑑識科学研究発表会 (法医部会) 要旨集 pp.18, (1989)
- 151) 滝澤久夫, 藤倉隆, 小湊慶彦: 第2章 抗原抗体反応の基本手順, pp.29-67, 滝澤久夫, 岸紘一郎, 山本茂 編, 法医血清学的検査法マニュアル, 金原出版 (東京) 1990
- 152) 大森 毅, 水野 なつ子, 吉田 日南子, 千住 弘明, 藤井 宏治, 富田 義之, 松田 秀明, 佐藤 元: モノクローナル抗体を用いた解離試験法による毛髪からの ABO 式血液型検査. 日本法医学会 第84次総会講演要旨集 p88 (2000)
- 153) 大森 毅, 荒木 直幸, 城野 博文, 五十嵐 史子, 廣重 憲一, 土屋 昌弘, 佐藤 元: 市販モノクローナル抗体を用いた毛髪からの解離試験による ABO 式血液型判定ーブラインドテストによる評価ー. 法医学の実際と研究 44, 85-88 (2001)
- 154) 渡部清之, 土井祐輔, 重田佳昭, 鈴木茂, 勝孝: 間接 ELISA を用いる ABO 式血液型の高感度検出法の開発とその応用. 日本鑑識科学技術学会誌 6, 11-20 (2001)
- 155) V. 唾液の検査法 4・3. 凝集阻止試験による ABO 式血液型検査, 科学警察研究

- 所 編, 血清学的物体検査法, pp173, 科学警察研究所 (東京), 1974
- 156) Toyoda H, Demachi Y, Komoriya S, Furuya N, Toida T and Imanari T: Characterization and determination of human urinary keratan sulfate. *Chem Pharm Bull* **46**, 97-101 (1998)
- 157) Köler G and Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975)
- 158) 福井作蔵, VI 硫酸処理を基本とする糖の定量, pp49-80, 還元等の定量法, 学会出版センター (東京) 1998
- 159) 淀谷順一郎, 五十嵐一雄: モノクローナル抗体を用いた改良混合凝集法による ABO 式血液型検査法. *日本鑑識科学技術学会誌* **6**, 85-97 (2002)
- 160) V. 唾液の検査法 5. 唾液斑からの血液型検査, 科学警察研究所 編, 血清学的物体検査法, pp175, 科学警察研究所 (東京) 1974

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Takeshi Ohmori, Hidenao Toyoda, Toshihiko Toida, Toshio Imanari, Hajime Sato
Comparison of oligosaccharides derived from salivary mucin of Japanese secretor and non-secretor individuals of blood group type-A
Glycoconj. J. **18**, 635-640 (2001)
2. Takeshi Ohmori, Hajime Sato,
The optimum elution temperature and time in absorption-elution test using commercially available monoclonal antibodies for ABO blood typing from hair samples
Jpn. J. Sci. Tech. Iden. **6**, 49-55 (2001)
3. 大森 毅, 坂井 活子
A型唾液中の血液型活性糖タンパク質の分離およびそれら型物質とモノクローナル抗体との反応
日本法医学雑誌 **53**, 322-329 (1999)
4. 大森 毅, 佐藤 元
市販抗A, 抗Bモノクローナル抗体を用いた解離試験条件の検討
—毛髪からの ABO 式血液型検査のための改良—
日本法医学雑誌 **53**, 338-344 (1999)
5. 大森 毅, 水野 なつ子, 関口 和正, 千住 弘明, 坂井 活子
ABO 式血液型検査用モノクローナル抗体の法科学的資料への適用について
日本鑑識科学技術学会誌 **1**, 43-48 (1996)

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	今成 登志男
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	石川 勉
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	荒野 泰
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	鈴木 和夫
副査	千葉大学助教授（薬学研究院）	薬学博士	戸井田 敏彦