—技術報告—

二次抗体吸着ラテックス粒子を用いた繊維片からの抗原検出法の開発

中西宏明^{*1}, 大森 毅^{*2}, 木戸 啓^{*3}, 安達 登^{*3}山梨県警察本部刑事部科学捜査研究所^{*1}科学警察研究所^{*2}, 山梨大学医学部^{*3}〒406-0036 山梨県笛吹市石和町窪中島312-4^{*1}〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-1^{*2}〒409-3898 山梨県中央市下河東1110^{*3}**Development of detection method for antigen on single fiber using latex particles adsorbing secondary antibody**Hiroaki Nakanishi^{*1}, Takeshi Ohmori^{*2}, Akira Kido^{*3} and Noboru Adachi^{*3}*Forensic Science Laboratory, Yamanashi Prefectural Police H.Q.^{*1}**312-4, Kubonakajima, Isawa-cho, Fuefuki-city, Yamanashi 406-0036^{*1}**National Research Institute of Police Science^{*2}**6-3-1, Kashiwanoha Kashiwa-city, Chiba 277-0882^{*2}**Department of Legal Medicine, Faculty of Medicine, University of Yamanashi^{*3}**1110, Shimokato, Chuo-city, Yamanashi 409-3898^{*3}**(Received 7 December 2006; accepted 23 February 2007)*

We established a new method using latex particles that adsorbed secondary antibody to detect the antigen on single fiber. Single fiber sample fixed on slide glass with double-sided adhesion tape was blocked by 4% Block-Ace, and reacted with 50- or 100-fold diluted primary antibody. The secondary antibody that adsorbed to latex particles captured the primary antibody combined with antigen on the fiber. Positive reaction was observed clearly on the fiber sample as adhesion of latex particles, and no reaction was observed in negative cases. It was possible to detect maximally 1,000-fold diluted saliva and 10,000-fold diluted semen on single fiber by this method. This method was able to be applied to ABO blood grouping as well. Moreover, we succeeded in simultaneous detection of antigen from body fluid and ABO blood-group substances, using different color of latex particle adsorbing each of secondary antibodies. Quality of latex particles adsorbing secondary antibody had been unchanged for at least three months since latex reagent was prepared. This method was able to be applied to forensic examination such as a test of aged body fluid stain and very small amount of body fluid stain. Therefore, it was suggested that this method has wide applicability and is useful for forensic science examination.

Key words: Latex particle, Secondary antibody, Body fluid stain, ABO blood group, Single cotton fiber

緒 言

法科学的検査は、微量の斑痕試料を扱う場合が極めて多い。これら微量の斑痕試料を用いて、体液の種類の特特定や人獣鑑別、引き続き血液型やDNA型による個人識別のための検査が行われる。しかし、DNA型検査に先立つ体液の識別あるいは血液型検査などのために、微量な試料を多く消費してしまうことは好ましくない。現在では体液の識別法として、特異成分を化学反応や血清学的手法により検出している¹⁾。血清学的手法は比較的高感度であるが、試料から成分を抽出しなければならないことが多く、希薄な斑痕の場合、検出が困難になる。また、切り取れない鑑定物件では、ガーゼ糸などに転写しなければならず、付着物が希釈されてしまうのを余儀なくされる。斑痕のまま検査が可能となれば、試料の消費を最小限に抑えることが可能となる。そこで我々は、繊維上の抗原物質を検出する方法として、ラテックス粒子に吸着させた抗体を標識抗体として利用することを考案した。免疫組織染色では、一次抗体に標識する直接法よりも、二次抗体に標識する間接法の方が一次抗体の組織内への浸透性は良くなり、抗原検出に適している²⁾ことから、担体に付着した抗原検出に関しても同様であると考えられる。そこで、繊維上に付着した抗原と一次抗体を反応させた後、二次抗体を吸着させたラテックス粒子によって、一次抗体を検出する方法を試みた。なお、抗体を吸着させた粒子を用いた法科学的検査としては、人血証明検査³⁾、月経血検査⁴⁾、妊娠血検査⁵⁾、死体血検査⁶⁾、血液型検査⁷⁾などが挙げられるが、いずれも直接目的抗原を認識する抗体を吸着させた粒子を用いており、ラテックス吸着抗体を二次抗体として使用した報告はみられない。また、いずれの方法も斑痕試料の場合、抽出操作が必要になる。今回、体液の識別を目的に、ラテックス吸着抗体を二次抗体として使用することで、抗原の有無を視認化し、繊維のまま抗原を検出する手法を確立した。さらに本法の血液型判定への適用も同時に試みたので報告する。

材料および方法

1. 検出法の原理

Fig. 1 に本法の原理を示す。まず、試料である繊維の表面をブロックし、次に一次抗体を感作させ、未反応抗体を洗浄除去した後、二次抗体吸着ラテックス粒子を感作させる。最後に未反応ラテックス粒子を洗浄除去し、ラテックス粒子が繊維上に付着しているかどうかを生物顕微鏡で観察し、判定する。

2. 検査試料

(1) 試料台の作製

試料台は混合凝集法と同様のものを使用し、作製は淀谷らの方法⁸⁾に従った。まず、スライドガラスに両面テープ（ニチバン：CW-18）を貼り付け、その上に反応させる個数分だけプラパッチ（エーワン）を貼り付けた。プラパッチで囲まれた粘着面部分に単繊維とした試料を貼り付け、試料台とした。試薬の感作は、すべて試料台上の試料付着部位に試薬を滴下することで行った。

(2) 検査試料

体液は唾液および精液とし、健康成人各10名より提供を受けた。希釈には蒸留水を用い、各希釈液をガーゼ糸片に付着乾燥させたものを希釈体液の斑痕

Fig. 1 Principle of method described in this report.

試料とした。また、陳旧試料として、9年保存唾液斑および10年保存精液斑も用いた。

血液型の検出には唾液を試料とし、健康成人27名（分泌型のA型、B型、O型は各5名、分泌型AB型2名、非分泌型のA型、B型、O型は各3名、非分泌型のAB型1名）より提供を受けた。希釈には蒸留水を用い、各希釈液をガーゼ糸片に付着乾燥させたものを斑痕試料とした。

なお、これらの試料はすべてインフォームドコンセントを得たうえ、提供されたものである。

3. 検査試薬

(1) 一次抗体

唾液の検出には、anti-human α -amylase (SIGMA, 動物種：ウサギ, 全血清) を、精液の検出には anti-human seminal fluid (absorbed) (CAPPEL, 動物種：ウサギ, 全血清) を用いた。

ABO式血液型判定には、マウスモノクローナル抗体であるイムコブ抗A及び抗B抗体（カイノス）およびマウスモノクローナル抗H抗体（国際試薬）を用いた。

(2) 二次抗体吸着ラテックス試薬の作製

ラテックス粒子は、6 μm の青色ポリスチレンラテックス (Polybead[®]: Polyscience 社) を用いた。二次抗体吸着ラテックス試薬の作製は、既報⁹⁾を参考にした。すなわち、抗体250 μl と、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で1%に調製したラテックス懸濁液250 μl を混ぜ、25°Cで30分間攪拌したのち、ブロッキング液として1%ウシ血清アルブミン (BSA: 和光純薬) を添加した pH 7.2 のリン酸緩衝液500 μl を加え、さらに1時間攪拌した。次に、18,000 g で20分遠心分離を行い、上清を除去後、ブロッキング液を1 ml 加え、ピペッティング操作にて粒子を洗浄した。この洗浄操作を計3回繰り返す。最後に、0.05%アジ化ナトリウムを添加したブロッキング液を分散液とし、分散液1 ml に分散させたもの（ラテックス終濃度：0.25%）を二次抗体吸着ラテックス試薬とした。確実に粒子を分散させるため、ソニケーションを行った。

なお、今回作製した二次抗体吸着ラテックス試薬は、anti-rabbit IgG (H&L) (ROCKLAND社, 動物

種：ヤギ, クラス：IgG, 精製：イオン交換カラムによる) を吸着させたものと、anti-mouse IgM (H&L) (ROCKLAND 社, 動物種：ヤギ, クラス：IgG, 精製：イオン交換カラムによる) を吸着させたものの2種類である。

4. 抗原検出法

(1) 唾液・精液の検出法

試料に4%ブロックエース（大日本住友製薬）を30分間感作させ、ブロッキングした。ブロックエースを除去した後、一次抗体を室温で4時間感作させた。一次抗体は、anti-human α -amylase は pH 7.2 の0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で50倍希釈、anti-human seminal fluid は PBS で100倍希釈して用いた。PBS で未反応抗体を洗浄除去した後、二次抗体吸着ラテックス試薬を室温で10分間感作させた。最後に、PBS を入れた容器に試料台を上向きに沈め、約60 rpm で15分間振とうし、未反応のラテックス粒子を除去した。判定は生物顕微鏡で行い、繊維に青色ラテックス粒子が付着している場合を陽性、付着していない場合を陰性とした。なお、二次抗体吸着ラテックス試薬は、anti-rabbit IgG (H&L) を吸着させたものを用いた。

(2) ABO式血液型判定への応用

ABO式血液型判定では、一次抗体の感作はブロッキング剤と混合して感作させた。すなわち、上記のプロトコールブロッキングおよび一次抗体感作の代わりに、抗Aおよび抗B抗体は5%ブロックエース溶液で10倍希釈、抗H抗体は2倍希釈したものを室温で4時間感作させた。その他の操作は体液の検出と同様である。二次抗体吸着ラテックス試薬は、anti-mouse IgM (H&L) を吸着させたものを用いた。

(3) 体液識別とABO式血液型の同時判定

二次抗体吸着ラテックス粒子の色を変えることにより、体液識別とABO式血液型の同時判定を試みた。試料は、分泌型A型および分泌型B型唾液と、分泌型A型および分泌型B型精液を各々ガーゼ糸片に付着乾燥させたものを用いた。一つの試料に試料台を2箇所用意し、一次抗体として、唾液試料については、一方に5%ブロックエース中にマウスモノクローナル抗A抗体を10%（10倍希釈）、抗

ヒトアミラーゼ抗体を2% (50倍希釈) になるように調製したものを感作させ、他方に5%ブロッケーヌ中にマウスモノクローナル抗B抗体を10%、抗ヒトアミラーゼ抗体を2%になるように調製したものを感作させた。精液試料については、前述の抗ヒトアミラーゼの代わりに、抗ヒト精液を1% (100倍希釈) になるように調製した。二次抗体吸着ラテックス試薬は、青色の粒子に anti-mouse IgM (H&L) を吸着させたものと、白色の粒子に anti-rabbit IgG (H&L) を吸着させたものを等量混合して用いた。

結 果

1. 基本プロトコルの確立

(1) 一次抗体濃度

一次抗体濃度については、anti-human α -amylase, anti-human seminal fluid とともに、10倍～500倍希釈の範囲では検出感度に著しい差異は認められなかったが、バックグラウンドへの粒子の付着の程度および高倍率に希釈した体液斑痕に対する感度などから、anti-human α -amylase は50倍希釈、anti-human seminal fluid は100倍希釈とした。

(2) 二次抗体吸着ラテックス試薬の反応条件と安定性

二次抗体吸着ラテックス試薬の感作時間は、10分以上とすれば、粒子の繊維への付着は十分であった。二次抗体吸着ラテックスの洗浄除去は、粒子を自然落下させるだけでは未反応粒子が残存してしま

うため、振とう器でふり落とす必要があった。また、Tween20は添加しても洗浄効果に差は見られなかったが、過剰に添加すると逆にテープの粘着面に粒子が付着し、判定が困難になる傾向がみられた。

また、試薬の安定性については、4℃で3カ月間保存した二次抗体吸着ラテックス試薬でも、作製直後と同様な反応を示し、試薬の劣化は認められなかったことを確認している。

(3) 判定

確立されたプロトコルを用いて唾液の検出を行った場合の陽性反応例および陰性反応例を Fig. 2 に示す。唾液付着斑痕では、繊維の周りにラテックス粒子が付着している状態が明確に観察でき、陽性と判定できた。一方、対照部位では、除去できなかったラテックス粒子も若干観察されたが、それらは繊維に付着しておらず、陰性の判定に支障はなかった。

2. 検出感度と陳旧試料の検査

唾液斑および精液斑における検出感度を Table 1 に示した。唾液斑は、100倍希釈斑痕までは10例すべて検出され、最高で1,000倍希釈斑痕まで検出された。精液斑は、2,000倍希釈斑痕までは10例すべて検出され、最高で10,000倍希釈斑痕まで検出された。

陳旧試料に対しては、9年保存唾液斑および10年保存精液斑のいずれも陽性反応を示した。

3. ABO 式血液型判定への応用

ABO 式血液型判定用抗体は、唾液・精液検出用

Fig. 2 The microscopic images in the detection of saliva. (a), 10-fold diluted saliva stain (positive result); (b), Clean cotton fiber (negative result).

Table 1 Number of positive results in diluted saliva and semen samples.

Samples	n	Rate of dilution									
		×1	×10	×100	×200	×500	×1000	×2000	×5000	×10000	×20000
Saliva	10	10	10	10	6	5	1	0	—	—	—
Semen	10	10	10	10	10	10	10	10	5	2	0

Table 2 Number of positive results in various bloodtype saliva samples.

Antibody	Blood group	n	Rate of dilution											
			×1	×2	×5	×10	×20	×50	×100	×200	×500	×1000	×2000	×5000
Anti-A	A Se	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	2	0
	A se	3	3	3	3	3	3	2	0	—	—	—	—	—
	AB Se	2	2	2	2	2	2	2	2	1	0	—	—	—
	AB se	1	1	1	1	1	1	0	—	—	—	—	—	—
	B Se	5	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Anti-B	B Se	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	2	0	—
	B se	3	2	1	1	1	0	—	—	—	—	—	—	—
	AB Se	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	0	—	—
	AB se	1	1	1	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	A Se	5	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Anti-H	O Se	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	0	—
	O se	3	2	1	1	1	0	—	—	—	—	—	—	—

のプロトコールに従って検査をすると、一次抗体の希釈倍率にかかわらず非特異反応が認められたが、5%ブロックエース溶液で抗 A および抗 B 抗体を10倍希釈以上、抗 H を2倍希釈以上で感作させた場合、非特異反応は抑えられた。

ABO 式血液型検査における検出感度を Table 2 に示した。分泌型唾液は、いずれの型物質も100倍希釈以上でも検出できたが、非分泌型では、特に B 型において検出感度が低い傾向が認められた。なお、非特異的反応は認められなかった。

4. 体液識別と ABO 式血液型の同時判定

体液と血液型物質をそれぞれ検出するための一次抗体は、用いる抗体ごとに決定された最適希釈濃度を最終濃度とするように5%ブロックエースで調製したところ判定が可能であったため、この条件を使用した。

Fig. 3 に体液検出と ABO 式血液型の同時判定例として、A 型唾液斑における結果を示した。A 型唾液の場合、抗 A 抗体と抗ヒトアミラーゼ抗体を

感作させたものは、繊維に青色と白色の粒子が付着しているのが明瞭に確認でき、A 型物質とアミラーゼを同時に検出できた。また、抗 B 抗体と抗ヒトアミラーゼ抗体を感作させたものは、繊維に唾液検出を示す白色の粒子のみが付着していることから、血液型も正確に判定できた。このほか、B 型唾液も同様に、唾液検出と血液型が同時に判定できた。また、精液斑についても、精液検出と血液型が明瞭に同時に判定できた。

考 察

ラテックス粒子を用いた法科学検査の検討は数多くされており、その多くは実務に適用されている。これらは抗体をラテックス粒子で標識することによって視認化・迅速化・高感度化を可能にした検査法である。これまでに報告されているラテックス粒子を利用した検査法は、検出すべき抗原を認識する抗体をラテックス粒子に吸着させておき、凝集反応¹⁰⁾あるいはイムノクロマトグラフィー法¹¹⁾により検出

Fig. 3 The microscopic images of result of simultaneous-detection of two antigens from blood group-A saliva stain. Anti-blood group substance antibody (mouse IgM) and anti-human α -amylase antibody (rabbit IgG) were used as first antibody. Second antibodies were blue latex particle-labeled anti-mouse IgM antibody and white latex particle-labeled anti-rabbit IgG antibody; (a), Result of the test using the anti-blood group-A antibody and anti-human α -amylase antibody; (b), Result of the test using the anti-blood group-B and anti-human α -amylase.

している。今回確立した手法は、従来のラテックス粒子の用法とは異なり、二次抗体をラテックス粒子で標識し、抗原物質と結合した一次抗体を検出する新しい応用法と位置づけられる。通常、二次抗体はペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼなどで標識され、検出に発色基質を用いるが、法科学的な鑑定物件は着衣やガーゼ糸片といった繊維類が多いため、発色系の標識を適用すると、繊維が着色してしまい、判定が困難になる。その点、本法は繊維を着色することなく抗原を検出でき、判定も明瞭で、今回検討した唾液や精液の検出感度も問題なかった。また、陳旧斑痕にも応用でき、法科学検査として適用可能なことが示唆された。本検査法により、微細な試料からでも体液の識別が可能になり、それに伴ってより多くの試料をDNA型検査に使用できることになり、鑑定の効率化に役立つものと考えられる。二次抗体吸着ラテックス試薬は半日程度で作製でき、手技自体も煩雑なものではなく、スムーズに導入できるものと思われる。

ABO式血液型判定には、一次抗体感作法を若干改良する必要があった。これは、市販血液型判定用マウスモノクローナル抗体を用いた場合に非特異的吸着が観察されたためであり、この現象はこれまでしばしば報告されてきたものである^{8,12)}。また、本法をABO式血液型判定に適用したところ、分泌型

唾液については正確に型判定できたが、非分泌型の一部で検出できないこともあった。これは似通った検査法である間接ELISA法で、非分泌型の検出感度が低い¹³⁾ことと同様の現象であると思われる。本検査法でのABO式血液型判定は、指示血球を使用しないため、従来の検査法のように血球の善し悪しによって結果が左右されることもなく、ラテックス試薬も保存安定性が高いため、十分適用できると考えられる。

また、本法の特徴の一つとして、複数抗原の同時検出が可能になることが挙げられる。今回は血液型物質と唾液、血液型物質と精液の同時検出を試みたが、混合する抗体のクラスや動物種の組み合わせで、応用範囲が広がる可能性がある。また、試料の消費を少なくでき、手間や時間も短縮できることが期待される。

結 語

二次抗体吸着ラテックス粒子を用いて、繊維片から体液斑などの抗原を検出する方法を確立した。本法は、微細な試料にも対応でき、抗体の組み合わせによって様々な抗原の検出が可能になるため、法科学検査に幅を広げる有用な検査法と考えられた。

謝 辞

快く各資料を提供してくださいました山梨県警察本部、科学警察研究所及び法科学研修所に入所中だった各府県警察本部の方々に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 高取健彦編：捜査のための法科学，第一部．pp. 103-124，例文社，東京（2004）．
- 2) 名倉 宏，長村義之，堤寛：改訂四版渡辺・中根酵素抗体法．pp. 26-29，学際企画，東京（2002）．
- 3) 白石智子，関口和正，大森 毅：臨床用ヒトヘモグロビン検出用試薬「OC-ヘモキャッチ」の人血証明への応用．鑑識科学，7，159-165（2003）．
- 4) 松村父征生：FDP-Latex 凝集反応による人月経血痕の証明．科警研報告，35，117-119（1982）．
- 5) Ikemoto, S., Miyake, B., Arima, T., Yoshida, H., Tomita, K. and Katsuren, K.: Immunological analysis of human placental lactogen in blood stains and its application to forensic science. *Forensic Sci. Int.*, **21**, 149-152（1983）．
- 6) Sakurada, K., Sakai, I., Sekiguchi, K., Shiraishi, T., Ikegaya, H. and Yoshida, K.: Usefulness of a latex agglutination assay for FDP D-dimer to demonstrate the presence of postmortem blood. *Int. J. Legal Med.*, **119**, 167-171（2005）．
- 7) Yazawa, S. and Ohgawara, H.: A simple sensitive method for the determination of blood group antigens in secretions. *J. Immunol. Methods*, **147**, 21-25（1992）．
- 8) 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．鑑識科学，6，85-97（2002）．
- 9) Nakanishi, H., Ohmori, T., Akutsu T. and Sakurada K.: Preparation of latex reagents combined with IgM and its F(ab')₂ fragment from commercial ABO blood grouping reagent. *Colloids Surf. B: Biointerf.*, **54**, 114-117（2007）．
- 10) 山本重夫監修：バイオ検査薬の開発．pp. 113-121，シーエムシー，東京（2000）．
- 11) OC-ヘモキャッチ® ‘栄研’添付文書：栄研化学，東京．
- 12) 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）．
- 13) 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．科警研報告，52，116-123（1999）．