—技術報告—

酵素抗体法による無髄毛髪の ABO 式血液型検査

阿久津智子*¹, 池谷 博*², 渡邊 賢*¹, 櫻田宏一*¹科学警察研究所*¹, 京都府立医科大学医学部法医学教室*²〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-1*¹〒602-0841 京都府京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465*²

ABO Blood Grouping of Non-medullated Scalp Hair Using Immunohistochemical Staining

Tomoko Akutsu*¹, Hiroshi Ikegaya*², Ken Watanabe*¹, and Koichi Sakurada*¹*National Research Institute of Police Science*¹**6-3-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan**Department of Legal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine*²**465 Kajii-cho Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto, Kyoto 602-0841, Japan**(Received 11 May 2009; accepted 1 July 2009)*

In this study, to apply immunohistochemical staining to the ABO blood grouping of non-medullated hair samples, the blocking condition and chromogenic substrate of the current protocol were modified. When 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine was used as a substrate, the cortex of the longitudinally sectioned non-medullated scalp hair was positively stained parallel to the hair fiber; however, non-specific staining were shown in the medullae of medullated scalp hair. Non-specific staining was improved when blocking was performed using 10% normal rabbit serum at 37°C for 1 h. In the blind trial, the ABO blood group of all medullated and non-medullated scalp hair was successfully determined by immunohistochemical staining modified in this study. The biotin-conjugated *ulex europaeus* I suitable for this method was also validated. In conclusion, it is thought that ABO blood grouping of hair samples using this modified protocol of immunohistochemical staining is useful for screening hair samples before DNA analysis.

Key words: Forensic science, ABO blood grouping, Non-medullated hair, Immunohistochemical staining

緒 言

毛髪は、毛根鞘が付着している場合、DNA 型鑑定
の有用な資料となりうるが、採取された多数の毛

髪資料について、より効率的かつ効果的に DNA 型
鑑定を実施するためには、前段階での資料の選別が
重要となる。

一般的な毛髪の異同識別検査では、まず、現場資

料と対照資料について形態学的検査が行われ、対照資料との間に形態学的類似性が認められる現場資料について、ABO式血液型検査が実施される。つづいて、対照資料とABO式血液型が一致した現場資料について、STR型検査あるいはミトコンドリアDNA型検査によるDNA型鑑定が実施される。

毛髪を試料としたABO式血液型検査は、解離試験法¹⁻³⁾あるいは酵素抗体法⁴⁻⁹⁾で実施されている。解離試験法は、以前より広く行われている方法であるが、試料を数cm消費することから^{2,3)}、短い毛髪には適用できない。一方、酵素抗体法は、毛髪の縦断切片などを作製し、露出させた毛髄質を免疫組織化学的に染色する方法であり、peroxidase-anti-peroxidase法⁴⁻⁶⁾あるいはAvidin-Biotin-Peroxidase Complex法またはLabeled Streptavidin Biotin法(LSAB法)⁷⁻⁹⁾による検出法が報告されている。また、圧挫した毛髪を試料としたビオチン標識タイラマイドあるいはアルカリホスファターゼ標識抗体による検出法も報告されている^{10,11)}。このうち、警察における鑑定実務に用いられているのは主に、縦断切片を試料としたLSAB法による酵素抗体法であり、試料の消費量が数mmと少ないことから、短い資料にも適用可能であるが、毛髄質の発色を観察し、判定を行うため、無髄毛髪には適用できていないのが現状である。

毛幹部の毛皮質にも血液型物質が存在することは免疫電顕法で確認されており¹²⁾、また、解離試験法では毛髄質の有無を問わずABO式血液型が判定可能であることから、毛皮質にも血液型検査に十分量の血液型物質が存在すると考えられる。松井ら¹¹⁾は近年、一晚脱メラニン処理し、高圧で均一に圧挫した毛髪試料を用いた酵素抗体法により、無髄毛髪からも型判定が可能であることを示唆している。そこで本研究では、鑑定実務への応用を前提に、毛髄質の有無を問わず適用可能な、酵素抗体法によるABO式血液型検査法を確立することを目的とし、発色基質やブロッキング条件について改良を行った。

なお、鑑定実務においてLSAB法による毛髪からのH型物質の検出に用いられてきたBiomedica社製のBiotin conjugated *Ulex Europaeus* agglutinin I

(ビオチン標識抗Hレクチン)が入手不可能となったことから、代替可能な試薬について、併せて検討を行った。

材料および方法

1 毛髪試料

試料は、同意を得て提供を受けた有髄毛髪(A型9名、B型4名、O型5名およびAB型5名分)および無髄毛髪(A型7名、B型6名、O型7名およびAB型5名分)である。なお、有髄毛髪および無髄毛髪は同一人物に由来するものも含まれる。

2 試薬

ビオチン標識抗Hレクチンは、Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) 製 (VECTOR), Sigma (St. Louis, CA, USA) 製 (SIGMA), 和光純薬工業(大阪) 製 (WAKO), および EY Laboratories (San Mateo, CA, USA) 製 (EY) の4種を購入し、使用した。また、Biomedica (Foster City, CA, USA) 製 (BIO) を陽性対照として使用した。抗Aおよび抗B抗体は、バイオクロン抗Aおよび抗Bモノクローナル抗体(オーソ), モノクローナル抗Aおよび抗Bワコー(ワコー), イムコア抗Aおよび抗Bモノクロ(イムコア), 抗Aおよび抗B抗体ネオコクサイ(コクサイ)を、それぞれオーソクリニカルダイアグノスティックス(東京), 和光純薬工業, カイノス(東京) およびシスメックス(兵庫)より購入し、検討した。ブロックエースは、大日本製薬(大阪)より購入した。10%ウサギ正常血清, ビオチン標識抗マウスIgG+IgA+IgM, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン, アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンおよび3-amino-9-ethyl-carbazol (AEC) 溶液は、いずれもニチレイバイオサイエンス(東京)より購入した。また、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) stabilized substrate for HRPはPromega (Madison, WI, USA)より購入した。5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate p-toluidine (BCIP) および2-amino-2-methyl-1,3-propanediol (AMP)は和光純薬工業より購入した。BCIP/nitroblue tetrazolium chloride (NBT) liquid substrate systemはSigmaより購入した。その他の試薬は、和光純薬工業製の試薬特級品

を使用した。

3 試料の前処理

試料は、洗剤および水による洗浄、ジエチルエーテルによる脱脂を行った後、内村ら⁷⁾の方法に従い、室温で20分間脱メラニン処理を行った。脱メラニン処理を行った試料を約1 mm 長に切断し、反応板に貼付したもののについて、実体顕微鏡下でメスを用いて、最大径付近で二分されるように縦断切片を作製し、毛髓質および毛皮質を露出させた。なお、反応板は、スライドガラス上にセロハン両面テープ（セルタック，ニチバン，東京）およびファイル穴補強フィルム（プラパッチ，エーワン，東京）を貼付して作製した。

4 ビオチン標識抗 H レクチンの検討

反応性の検討は、A, B, O および AB 型の有髓毛髪を試料とし、100, 50, 25, 12.5 および 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した VECTOR, SIGMA, WAKO および EY のビオチン標識抗 H レクチンを用いて行った。酵素抗体法は、内村ら⁸⁾の方法に準じて行った。試料を10%ウサギ正常血清により室温で10分間ブロッキングした後、リン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)）で希釈したビオチン標識抗 H レクチンを4°Cで一晩反応させた。PBS(-)で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを滴下し、室温で20分間反応させた。PBS(-)で3回洗浄した後、水分をよく除き、AEC 溶液を滴下し、室温で10分間発色させた。発色は、反応板を蒸留水で洗浄することで停止させた。判定は、実体顕微鏡にて落射光下で毛髓質の赤色の発色を観察することにより行った。

非特異的反応の有無を確認するため、縦断切片に0.05 M 過ヨウ素酸溶液を滴下して室温で90分間反応させ、血液型物質を変性させた陰性対照毛髪に、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のビオチン標識抗 H レクチンを滴下し、同様の操作を行った。

至適希釈濃度の検討は、A, O および AB 型各4名分、B 型5名分の計17名分の有髓毛髪を試料とし、PBS(-)で100あるいは50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した VECTOR のビオチン標識抗 H レクチンについて行った。両濃度に対して、過ヨウ素酸処理した陰性対照毛髪を用いて非特異的反応の有無を確認した。

5 毛髪酵素抗体法による ABO 式血液型検査の改良

5-1 発色基質の検討

酵素抗体法は、内村ら⁸⁾の方法を一部改変して行った。試料を10%ウサギ正常血清により室温で10分間ブロッキングした後、抗 A 抗体および抗 B 抗体（オーソ，80倍希釈）を4°Cで一晩反応させた。ビオチン標識抗マウス IgG + IgA + IgM を室温で10分、ペルオキシダーゼ標識またはアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンを室温で5分間反応させ、発色基質を滴下して発色させた後、蒸留水で洗浄して発色を停止させた。各行程の間でそれぞれ3回の洗浄を行った。抗体の希釈および洗浄には、ペルオキシダーゼの系では PBS(-) を、アルカリホスファターゼの系ではトリス緩衝生理食塩水を使用した。BCIP は、50 mM の AMP に溶解して使用した。発色時間は、AEC は室温10分、TMB は室温5分、BCIP および BCIP/NBT は37°C 1時間とした。AEC および TMB については、A, B, O および AB 型の有髓および無髓毛髪を試料とし、BCIP および BCIP/NBT については無髓毛髪を試料とした。いずれの発色基質に対しても、過ヨウ素酸処理した陰性対照毛髪を用いて非特異的反応の有無を確認した。

5-2 抗体の検討

TMB による毛髓質の非特異的発色を改善するため、一次抗体の検討を行った。A, B, O および AB 型の有髓および無髓毛髪を試料とし、オーソ（現行法）、ワコー、イムコアおよびコクサイの4種の抗 A 抗体および抗 B 抗体について、PBS(-)で80倍希釈したものをを用いて検討を行った。その他の操作は、発色基質の検討と同様に行った。

5-3 ブロッキング条件の検討

TMB による毛髓質の非特異的発色を改善するため、ブロッキング条件の検討を行った。A, B, O および AB 型の有髓および無髓毛髪を試料とし、10%ウサギ正常血清（現行法）、ブロックエース（5%および2%）、スキムミルク（5%および2%）、あるいは bovine serum albumin (BSA, 5%) を滴下し、室温で10分間ブロッキングを行った。また、10%ウサギ正常血清は、37°Cで1時間のブロッキングについ

でも検討した．その他の操作は発色基質の検討と同様に行った．

5-4 検査法の検証

まず，毛皮質の発色部位について詳細に観察するために，AB型の有髄および無髄毛髪について，10%ウサギ正常血清で37℃ 1時間のブロッキングを行い，抗A抗体および抗B抗体としてオーソ（80倍希釈），ビオチン標識抗HレクチンとしてVECTOR（50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を用い，TMBにて発色させた後反応板からはがし，別のスライドガラスにエンテランニュー（Merck, Darmstadt, Germany）を用いて封入し，透過型の光学顕微鏡で観察した．つづいて，有髄毛髪（A型4名，B型5名，O型5名およびAB型4名分）および無髄毛髪（A型4名，B型4名，O型4名およびAB型3名分）を用いて，同検査法でいずれの毛髪試料においてもABO式血液型が正しく判定できるかを検証した．なお，判定は鑑定実務を想定し，実体顕微鏡にて落射光下で行った．

5-5 ブラインドテスト

確立した検査法について，検査者に血液型が分からないようにランダムに番号を付した，毛髪48試料（有髄毛髪23試料および無髄毛髪25試料）を用いて，ブラインドテストを実施した．なお，判定は鑑定実務を想定し，実体顕微鏡にて落射光下で行った．

結 果

1 ビオチン標識抗Hレクチンの検討

VECTOR, SIGMA, WAKO および EY のビオチン標識抗Hレクチンを100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し，各血液型の有髄毛髪に対する反応性を実体顕微鏡にて落射光下で観察した結果を Fig. 1 に示す．VECTOR においては，毛髄質に赤色の特異的な発色が認められたが，一部の陰性対照毛髪の毛髄質が非特異的に弱く発色していた．また，特異的な発色の強さは試料によって異なっていた．一方，SIGMA および WAKO は，すべての試料において陰性対照毛髪の毛皮質および毛髄質に強い非特異的な発色が認められた．また，EY については，いずれの試料に対しても発色が認められなかった．なお，いずれの試料においても，陽性対照である BIO で毛髄質に特異的

Table 1 Results of immunohistochemical staining of scalp hair using different concentrations of biotin-conjugated *ulex europaeus* agglutinin 1.

Blood group	Number of hair donors	Number of stained samples			
		100 $\mu\text{g}/\text{ml}$		50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
		Sample	Control*	Sample	Control*
A	4	4	1	4	0
B	5	5	0	4	0
O	4	4	1	3	0
AB	4	3	1	3	0
Total	17	16	3	14	0

* Negative control samples treated with 0.05 M orthoiodic acid.

な発色が認められることを確認した．

つづいて，A, B, O および AB 型計17名分の有髄毛髪を用いて，VECTOR のビオチン標識抗Hレクチンの至適希釈濃度について検討を行った結果を Table 1 に示す．希釈濃度100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合，AB型の1試料を除いて，いずれの試料においても発色が認められた．また，A型，O型およびAB型それぞれ1試料において，陰性対照毛髪の毛髄質に弱い非特異的な発色が認められた．希釈濃度50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においては，いずれの試料においても，Fig. 1 に示すように，陰性対照試料における非特異的な発色は認められなかったが，100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と比較して発色が弱い傾向にあり，B型，O型およびAB型それぞれ1試料において，発色が弱いために判定困難となった．また，100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ いずれの場合も，発色の強さは試料ごとに異なっていた．

なお，SIGMA および WAKO においては，希釈濃度を変えても非特異的な反応を完全には抑えることができなかった（Data not shown）．

2 毛髪の酵素抗体法による ABO 式血液型検査の改良

2-1 発色基質の検討

A, B, O および AB 型の有髄および無髄毛髪を試料とし，発色基質の検討を行い，実体顕微鏡にて落射光下で観察した結果を Fig. 2 に示す．無髄毛髪においては，TMB を発色基質とした場合，過ヨウ素酸処理した陰性対照毛髪とは明らかに異なる，線状の青い発色が毛皮質に認められた．AEC を用い

Fig. 1. Comparison of reactivities of four biotin-conjugated *ulex europaeus* agglutinin 1 for immunohistochemical staining of scalp hair.

Dilution of 100 µg/ml of four manufacturers' biotin-conjugated *ulex europaeus* agglutinin 1 (biotin-UEA-1) and dilution of 50 µg/ml Vector Laboratories' biotin-UEA-1 were applied to longitudinally sectioned scalp hair. Following the reaction at 4°C overnight, the sample was treated with peroxidase-conjugated streptavidin and then stained with AEC as the substrate. Stained samples were observed with a conventional stereomicroscope. VECTOR: Vector Laboratories, WAKO: Wako pure chemical industries, EY: EY Laboratories, BIO: Biomeda. Control: Negative control samples treated with 0.05 M orthoperiodic acid.

Fig. 2. Comparison of four chromogenic substrates in the ABO blood grouping of scalp hair by immunohistochemical staining.

Longitudinally sectioned scalp hair (type-AB) was incubated with mouse anti-A and anti-B monoclonal antibody. The sample was then treated with biotin-conjugated goat anti-mouse IgG + IgA + IgM followed by peroxidase-conjugated or alkaline phosphatase-conjugated streptavidin. The sample was then stained with AEC or TMB for substrates of peroxidase, or BCIP or BCIP/NBT for substrates of alkaline phosphatase, respectively, and observed with a conventional stereomicroscope.

AEC: 3-amino-9-ethyl-carbazol, TMB: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate *p*-toluidine, NBT: nitroblue tetrazolium chloride. Control: negative control samples treated with 0.05 M orthoperiodic acid.

た場合でも発色は認められたが、発色の程度は TMB と比較して弱く、特に抗 A 抗体を反応させた試料では、毛髪中のメラニン色素との識別が困難な場合があった。

有髄毛髪においては、AEC を発色基質とした場合、既報^{7,8)}と同様に、毛髄質に特異的な赤色の発色が認められ、過ヨウ素酸処理した陰性対照毛髪における非特異的発色は認められなかった。一方、TMB では、一部の有髄毛髪において、毛髄質が非特異的にやや青く発色していた (Data not shown)。

BCIP を発色基質とした場合は、Fig. 2 に示すように、いずれの毛髪に対しても特異的な青い発色は認められなかった。一方、BCIP/NBT を発色基質とした場合は、Fig. 2 に示すように、いずれの毛髪に対しても毛皮質および毛髄質に強い非特異的発色が認められたのに加え、発色が濃紫色から黒色であるため、毛髪のメラニン色素との識別が困難であった。

2-2 抗体の検討

TMB による毛髄質の非特異的発色を改善するため、オーソ、ワコー、イムコアおよびコクサイの 4 種の抗 A 抗体および抗 B 抗体を用いて、一次抗体の検討を行った。その結果、ワコー、イムコアおよびコクサイの抗体を用いても、オーソの抗体と同様の特異的発色は認められたものの、いずれの抗体を用いても、毛髄質における非特異的発色を改善することはできなかった (Data not shown)。

2-3 ブロッキング条件の検討

TMB による毛髄質の非特異的発色を改善するため、ブロッキング条件の検討を行った。その結果、TMB による毛髄質の非特異的発色は、ブロッキングに 5% のブロックエースあるいはスキムミルクを用いることで減少したが、同時に特異的発色も弱まる傾向にあった。また、同様の傾向は濃度を 2% に下げても認められた。そこで、10% ウサギ正常血清を用いたブロッキングを 37°C で 1 時間行ったところ、特異的発色を維持したまま非特異的発色を抑えることが可能であった。なお、BSA については、毛皮質および毛髄質全体にわたって強い青色の非特異的発色を生じた (Data not shown)。

2-4 検査法の検証

改良した検査法で染色した有髄および無髄毛髪を光学顕微鏡にて観察したところ、Fig. 3 に示すように、抗 A 抗体あるいは抗 B 抗体によって、毛皮質が点状あるいは線状に発色していることが確認された。一方、抗 H レクチンでは、毛皮質全体にわたって点状に発色していた。つづいて、有髄毛髪および無髄毛髪各 17 名分を用いて、改良した検査法の検証を行った。鑑定実務を想定し、実体顕微鏡にて落射光下で観察した、各血液型の有髄毛髪および無髄毛髪における発色例を Fig. 4 に、有髄毛髪および無髄毛髪各 17 名分を用いた検証結果を Table 2 に示す。抗 H レクチンによる発色が非常に弱い試料が認められたものの、いずれの毛髪においても、あらかじめ判明している血液型と矛盾しない判定結果が得られた。発色の強度やバランスは試料ごとに異なっていたが、全体として、無髄毛髪の毛皮質において、抗 B 抗体に比べて抗 A 抗体による発色が弱い傾向および B 型毛髪の抗 H レクチンによる発色が弱い傾向が認められた。

2-5 ブラインドテスト

確立した検査法について、ブラインドテストを実施した結果、有髄、無髄を問わず、各抗体に対して 1 mm 長に切断した試料を用いれば、48 試料いずれに対しても正しく血液型を判定することができた (Table 3)。

Table 2 Verification of the modified protocol of immunohistochemical staining for ABO blood grouping of scalp hair.

	Blood group	Number of hair donors	Number of positively stained samples		
			Anti-A	Anti-B	Anti-H
Medullated	A	4	4	0	4
	B	5	0	5	5
	O	4	0	0	4
	AB	4	4	4	4
Non-medullated	A	4	4	0	3
	B	4	0	4	3
	O	5	0	0	3
	AB	4	4	4	4

Fig. 3. Positive or negative staining of scalp hairs in the ABO blood grouping using modified immunohistochemical method.

Medullated and non-medullated scalp hairs (type-AB) were longitudinally sectioned and incubated with mouse anti-B monoclonal antibody or biotin-conjugated *ulex europaeus* agglutinin I at 4°C overnight. The samples were then treated with biotin-conjugated goat anti-mouse IgG + IgA + IgM (for anti-B antibody) followed by peroxidase-conjugated streptavidin. The samples were then stained with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as the substrate and observed with a conventional light microscope. Control: negative control sample treated with 0.05 M orthoperiodic acid before immunohistochemical staining.

Fig. 4. Stereomicrographs of the immunohistochemical staining in medullated and non-medullated scalp hairs.

ABO blood grouping of scalp hairs (type-A, B, O and AB) was performed by modified immunohistochemical method. Assuming the actual forensic caseworks, the immunostainability of each hair sample was evaluated under a conventional stereomicroscope.

Table 3 Results of the blind trial of ABO blood grouping of scalp hair using modified immunohistochemical staining.

	Blood group	Number of hair donors	Result		
			Correct	Incorrect	Not determined
Medullated	A	9	9	0	0
	B	4	4	0	0
	O	5	5	0	0
	AB	5	5	0	0
Non-medullated	A	7	7	0	0
	B	6	6	0	0
	O	7	7	0	0
	AB	5	5	0	0
Total		48	48	0	0

考 察

鑑定実務における酵素抗体法（LSAB 法）による毛髪の ABO 式血液型検査に用いられてきた、BIO のビオチン標識抗 H レクチンが入手不可能となったことから、現在入手可能な VECTOR, SIGMA, WAKO および EY のビオチン標識抗 H レクチンについて、鑑定実務に適用可能かどうか検討を行った。その結果、VECTOR のビオチン標識抗 H レクチンを 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈して使用することで、発色はやや弱いものの、非特異的発色を生じないことが示された。したがって、鑑定実務における LSAB 法による毛髪の ABO 式血液型検査には、VECTOR のビオチン標識抗 H レクチンを、非特異的発色が認められない希釈濃度である 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で使用するのがよいことが示された。

つづいて、鑑定資料の毛髄質の有無を問わず適用可能な、酵素抗体法による ABO 式血液型検査法を確立するため、現行法の発色基質やブロッキング条件の改良について検討を行ったところ、青色に発色し、AEC よりも高感度な¹³⁾ TMB を用いることで無髄毛髪の毛皮質が線状に発色することが示された。他の血液型の毛髪や、過ヨウ素酸処理した陰性対照毛髪ではこのような線状の発色は認められなかったため、この発色は血液型物質に特異的であることが示された。しかし、TMB を用いた場合、陰性対照毛髪や他の血液型の有髄毛髪の毛髄質に弱い非

特異的発色が認められたため、一次抗体やブロッキング条件を検討した結果、室温で10分間行っていた10%ウサギ正常血清によるブロッキングを37°Cで1時間とすることで、毛髄質における非特異的発色を抑えることができた。改良した検査法で染色した有髄および無髄毛髪を光学顕微鏡にて観察したところ、抗 A 抗体および抗 B 抗体では毛皮質が点状あるいは線状に、抗 H レクチンでは毛皮質全体にわたって点状に発色していることが確認された。つづいて、多試料による検証およびブラインドテストを実施したところ、発色の強さは試料ごとに異なっていたものの、各抗体に対して 1 mm 長の試料を用いることで、各血液型の有髄および無髄毛髪いずれにおいても血液型を正しく判定することができた。したがって、本法により、鑑定資料の毛髄質の有無を問わず、酵素抗体法による毛髪の ABO 式血液型検査が実施可能であることが示された。なお、顕微鏡写真では光学顕微鏡像に劣るものの、判定自体は実体顕微鏡にて落射光下で十分可能であったことから、鑑定実務においては、より簡便な実体顕微鏡を用いて判定を行えばよいと考えられた。

毛幹部、毛皮質における血液型物質は、Inter-macrofibrillar Matrix（ケラチン線維間基質）に局在することが免疫電顕法により確認されており¹²⁾、本検討で確認された毛皮質の発色は、この部位に局在する血液型物質を検出しているものと考えられる。発色基質として現行法の AEC を用いた場合で

も、毛皮質に線状の発色が認められたが、AECによる発色はメラニン色素と混同しやすい赤色であり、かつTMBと比較して感度が低いことから、陰性対照との比較なしに判定することが困難な試料も見受けられ、これまでの報告においても判定できていなかったのではないかと考えられた。また、毛髪を試料として血液型検査を実施する場合、圧挫などにより抗原を十分に露出させる必要があり^{14,15)}、高压で均一に圧挫した試料では、皮質全体に発色が認められるとの報告¹¹⁾があるが、今回のように、メスを用いて縦断切片を作成する方法でも、縦断切片の切断面は粗面となることから、多くの抗原が露出し、発色しやすくなったものと考えられた。なお、本研究では、A型およびB型物質と、H型物質とで異なる発色パターンが認められた。その原因は明らかではないが、検討に使用した抗Aおよび抗B抗体が5量体のIgMであるのに対し、抗Hレクチン (*ulex europaeus* agglutinin I) は分子量約6万から6.8万の2量体¹⁶⁾であり、血液型抗原に対する反応性が異なることが原因となる可能性が考えられる。

今回、A、BおよびAB型の無髄毛髪は毛皮質に共通して、抗B抗体と比較して抗A抗体に対する発色が弱い傾向が認められた。毛髪においては、抗B抗体と比較して、抗A抗体に対する反応性が低いことは以前から知られており、伊藤ら¹⁷⁾は、AB型の個人由来の頭毛および爪について解離試験法による血液型判定を実施したところ、爪については全例でAB型と正しく判定できたが、一部の頭毛については抗A血清に対する判定が陰性となり、B型と誤判定されることを報告している。また、モノクローナル抗体を用いた毛髪の解離試験法においても、抗A抗体に対する反応性の低さを補うため、抗A抗体を感作させる試料量を抗B抗体の2倍にして実施している³⁾。毛髪中のA型物質は、毛髪中に発現する α -N-acetylgalactosaminidaseによりH型物質へと分解され、その量が減少することが報告されており¹⁸⁾、このことが抗A抗体に対する反応性の低さおよび抗Hレクチンに体するA型毛髪とB型毛髪の反応性の違いの原因と考えられる。AB型の無髄毛髪においては、抗A抗体と抗B抗体に

よる発色の程度が異なることを念頭に置き、対照資料と比較しながら判定を行う必要があると考えられた。

また今回、試料間で各抗体に対する発色の強さが異なっていたが、発色の強弱と体液の分泌・非分泌型とは関連していなかった。毛髪中のABO式血液型物質は、糖タンパク質ではなく糖脂質であると推定されており¹⁹⁻²¹⁾、毛髪の解離試験においても、血球凝集の強弱と体液の分泌・非分泌型との間には関連性はないことが報告されていることから²²⁾、本検討においても矛盾のない結果が得られた。

結 語

酵素抗体法におけるブロッキング条件や発色基質を改良することで、資料の毛髄質の有無を問わずABO式血液型を判定することができ、短い無髄毛髪からもABO式血液型検査が実施可能となった。本法は、DNA型鑑定の前段階での資料の選別法として有用である。

文 献

- 1) Yada, S., Okane, M. and Sano, Y.: Blood grouping of a single human hair by means of elution technique. *Act. Crim. Japon.*, **32**, 7-8 (1966).
- 2) 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).
- 3) 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. 法医学の実際と研究, **44**, 85-88 (2001).
- 4) 宮坂祥夫, 吉野峰生, 佐藤 元, 向山明孝, 瀬田季茂: 微量毛髪の血液型判定に関する免疫組織化学的検討. 科警研報告, **37**, 27-35 (1984).
- 5) Miyasaka, S., Yoshino, M., Sato, H., Miyake, B. and Seta, S.: The ABO blood grouping of a

- minute hair sample by the immunohistochemical technique. *Forensic Sci. Int.*, **34**, 85–98 (1987).
- 6) Pötsch-Schneider, L., Penzes, L. and Lorenz, K.: immunenzymatische ABO-blutgruppenbestimmung am Einzelhaar I. *Z Rechtsmed.*, **97**, 251–258 (1986).
- 7) 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, **49**, 9–15 (1996).
- 8) 内村裕光, 宮北省二: 鑑定実務における Labelled Streptavidin Biotin 法による毛髪の ABO 式血液型検査. 科警研報告, **53**, 26–28 (2000).
- 9) Nishi, K., Annuss, B., Rand, S. and Brinkmann, B.: ABO blood grouping of hairs using an avidin-biotin-peroxidase complex technique. *Z. Rechtsmed.*, **102**, 247–254 (1989).
- 10) 橋本良明, 高橋直子, 守屋文夫, 中西祥徳: ビオチン標識タイラミドによるシグナル増幅法を用いた毛髪からの ABO 式血液型検出. 法医学の実際と研究, **44**, 171–175 (2001).
- 11) 松井清司, 西尾 元, 鈴木廣一: 圧挫試料を用いた酵素抗体法による毛髪の ABO 式血液型検査. 日法医誌, **62**, 113–117 (2008).
- 12) 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 hairs. *Can. Soc. Forensic Sci. J.*, **20**, 246–247 (1987).
- 13) Hosoda, H., Takasaki, W., Oe, T., Tsukamoto, R. and Nambara, T.: A comparison of chromogenic substrates for horseradish peroxidase as a label in steroid enzyme immunoassay. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4177–4182 (1986).
- 14) 北浜陸夫, 池本卯典, 金羽レイ, 向山明孝, 葭内善悟, 平野幸五郎, 渡辺満子, 宮本尚之, 大西永一, 余島弘造, 福山 武: 毛髪からの解離試験による血液型判定法について. 科警研報告, **21**, 106–115 (1968).
- 15) 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, **32**, 48–63 (1983).
- 16) Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Pusztai, A. and Bardocz, S.: Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. pp. 397–399, John Wiley & Sons, England (1998).
- 17) 伊藤喜美子, 羽場喬一: AB 型の毛髪と爪の血液型判定. 日法医誌, **34**, 694–696 (1980).
- 18) Kimura, A., Kanekura, T., Saito, Y., Sagawa, K., Nosaka, M., Kanzaki, T. and Tsuji, T.: Blood group A glycosphingolipid accumulation in the hair of patients with alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency. *Life Sci.*, **76**, 1817–1824 (2005).
- 19) 酒井哲哉: 人毛髪の血液型物質に関する研究. 日法医誌, **5**, 19–41 (1951).
- 20) 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, **30**, 1–4 (1977).
- 21) 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, **31**, 9–11 (1978).
- 22) 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).