—ノート—

OHPフィルムを用いた混合凝集反応法によるヒト唾液斑からのABO式血液型検査

春日 壽夫

静岡県警察本部科学捜査研究所
〒424-0055静岡県清水市吉川373-1**Determination of ABO Blood Groups from Human Salivary Stain
by the Mixed Agglutination Reaction Method Using an OHP Film**

Hisao Kasuga

*Forensic Science Laboratory, Shizuoka Pref. Police H.Q.
373-1 Kikkawa, Shimizu-shi, Shizuoka, 424-0055, Japan**(Received 18 March, 1999 ; accepted 21 May, 1999)*

For ABO blood typing of human salivary stains, a new mixed agglutination reaction method was devised, in which, OHP film was used as antigen-antibody reaction plate. By this method a series of examination procedures such as extraction of blood group substances, heating-fixation of the substance and incubation with monoclonal antibodies could be performed successively on the OHP film. For the secretor's salivary stain samples, specific agglutination reaction which presents an agglutination circle was observed. ABO blood typing from secretor's salivary stains was correctly performed by this method.

Key words : OHP film , Mixed agglutination reaction, ABO blood typing, Secretor's salivary stain samples.

緒 言

混合凝集反応法(型的二重結合法)が開発されて以来、この反応法は血痕、体液斑あるいは組織細胞片等の法科学的資料の血液型検査法として研究・利用されるようになった¹⁾²⁾。著者は、この反応をさらに簡便な操作法で、より明確な型判定を行なうために、OHPフィルムを担体に用いた唾液斑からの混合凝集反応法によるABO式血液型検査法を考案した³⁾。今回はこの考案した検査法を鑑定実務に供するため、モノクローナル抗Aおよび抗B抗体(以下、抗A抗体・抗B抗体と略記する)、抗H Ulex europaeus抽出液(以下、抗Hレクチンと略記する)、非特異的吸着を防ぐためのスキムミルク水溶液等を用いて、唾液斑についての検討を試みたところ、分泌型の唾

液斑試料から明確な血液型検査結果を得ることができたので報告する。

材料と方法

1 試料

ヒト唾液斑は、A分泌型(以下、A S e型と略記する)2名、B非分泌型(以下、B s e型と略記する)1名、B分泌型(以下、B S e型と略記する)1名、O分泌型(以下、O S e型と略記する)1名、AB分泌型(以下、A B S e型と略記する)2名の計7名の成人より協力を得て、それぞれの唾液付着和紙を室温で乾燥させたものを試料とした。これらの唾液斑はロイコマラカイトグリーン法に陰性で、ブルースターチ平板法に陽性であった。なお、唾液を

Fig.1 Procedure of a new mixed agglutination reaction method was showed.

1. A small piece of salivary stain was placed on OHP film.
2. $5 \mu\text{l}$ of distilled water was added to the stain for extracting.
3. After the removal of stain residue, the extracted solution was dried using hot plate at 85°C to fix on OHP film.
4. For the prevention of non-specific reaction, $5 \mu\text{l}$ of skim milk liquid was to the drying spot.
5. Anti-A and anti-B antibodies and Ulex anti-H lectin were added to the spots.
6. After the incubation for 10 min, excessive solution on the spots were aspirated.
7. The spots were re dried using a hot plate at 40°C .
8. A drop indicator red cell was added on the spot.
9. The free cells on the spot were removed by the OHP plate was put in saline.
10. The state of mixed agglutination is observed by the microscopy.

付着させていない和紙を対照試料（J）とした。

2 血液型検査用抗体、レクチンおよび指示血球

抗Aおよび抗B抗体は、コスモバイオ社のモノクローンBCAの原液を用いた。抗Hレクチンは、ホーネンコーポレーション社製の原液を用いた。スキムミルク⁹⁾は、和光純薬工業社製を1%水溶液にして用いた。指示血球は、A型およびB型の2%赤血球PBS浮遊液と和光純薬工業社のポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート(ツイーン80相当品³⁾)を0.1%含むO型の2%赤血球PBS浮遊液を用いた。

3 OHPフィルムと乾燥用ホットプレート

市販のOHPフィルム（コクヨ社：VF-5）にワープロで略号文字（Anti-A、Anti-B、Anti-H、

A1、A2、B1、B2、O1、AB1、AB2およびJ）と試料設置位置の目印のために点を印字して用いた。なお、OHPフィルムは容器にあわせて名刺大位の大きさに切ると扱い易い。一方、OHPフィルム上の浸出液を乾燥するために、ホットプレートに衝立て状の銅板を載せたものを用意した。

4 方法

OHPフィルムを用いた混合凝集反応法の操作手順は次のとおりであり、その概要をFig.1に図示した。

1: 容器内に、裏返して印字面が下になるようにセットしたOHPフィルムの目印点の側に、抗A抗体・抗B抗体感作用の $1 \times 1 \text{ mm}$ 大の唾液斑試料切片を各1枚と抗Hレクチン感作用の $1 \times 2 \text{ mm}$ 大の唾液斑試料切片を1枚置く。

2: OHPフィルム上に置いた全斑痕切片に蒸留水を $5 \mu\text{l}$ ずつ滴下する。さらに、容器に蓋をして室温に

10分間置き、斑痕を浸出させる。

3: OHPフィルムを85℃のホットプレート上に5分間置き、切片からの浸出液をOHPフィルム上に乾燥固定する。全斑痕切片を取り除き、再びOHPフィルムを容器に入れる。

4: OHPフィルム上の抗体感作部の固定斑痕に、スキムミルク水溶液を5 μ lずつ滴下する。なお、抗Hレクチン感作部の固定斑痕にはスキムミルク水溶液を滴下しない。

5: 直ちに、OHPフィルム上のスキムミルク水溶液中に抗Aないし抗B抗体を5 μ lずつ滴下し、また抗Hレクチン感作部の斑痕には抗Hレクチンを5 μ lずつ滴下し、容器に蓋をして、室温で10分間感作させる。

6: 全ての余剰抗体、レクチンないしスキムミルク水溶液を吸引除去する。

7: OHPフィルムを40℃のホットプレート上に3分間置き、感作物を乾燥させる。そして、OHPフィルムを容器に入れる。

8: 斑痕に、対応する指示血球を5 μ lずつ滴下したのち、容器に蓋をして、室温に10分間置き、血球凝集反応を生じさせる。

9: 続いて、フィルムを容器から出し、裏返してワープロ印字面を上にし、透明容器中の生理的食塩水中に抗原抗体反応面を着け、余剰血球の自然沈下処理を行なう³⁾。

10: 10分後に、敷板を取り出し、直ちに、肉眼による凝集の有無の観察をする。

結 果

1 OHPフィルム上に於ける唾液斑痕の浸出とホットプレートによる溶出斑痕の乾燥固定化

OHPフィルムの混合凝集反応における斑痕担体としての有用性と繁用性について調べた。すなわち、OHPフィルムの取り扱い易さについては、材質的にピンセットで持ち上げてもしなめることはなく、85℃のホットプレートで加熱しても歪むことはなかった。また、ホットプレートに衝立て状の銅板を載せた方法を用いることにより、室内環境によるプレートの定温維持への影響を軽減することができた。一方、唾液斑試料の切片をOHPフィルム上に置き蒸留水滴下で浸出させ、その浸出液をホットプレートによってフィルム面に加熱乾燥固定化したところ、いずれの斑痕もその形状は肉眼でも確認し得

る円形を呈していた。この円形斑痕をスキムミルク水溶液およびレクチンの滴下の目標物にすることができた。

2 スキムミルク水溶液と抗体の滴下操作

一般的に混合凝集反応法において最も留意せねばならないことの一つに、反応器材等への抗体の非特異的吸着を防ぎ、これによって生じる血球凝集反応の誤反応を押さえることが挙げられている。そこで、本法では、1%スキムミルク水溶液と抗A抗体・抗B抗体を連続的に滴下する操作法と、1%スキムミルク水溶液と抗A抗体・抗B抗体との各混合液を滴下する操作法との2つの方法について比較検討した。その結果、前者の操作法の方が余剰血球処理時の血球の自然沈下が生じる時間が短く、血液型判定時間を短縮することができた。

3 唾液斑の血液型検査結果

OHPフィルムを用いた混合凝集反応法について、前述の諸操作条件検討によって得られた最適条件をもとに、実際にヒト唾液斑痕を用いて血液型検査を行なったところ、Fig.2に示すような結果を得た。すなわち、OHPフィルム面のA1、A2、B2、O1、AB1、AB2の分泌型唾液試料においては抗Aおよび抗B抗体あるいは抗Hレクチンに対して、いず

Fig.2 Results of determination of ABO blood groups of human salivary stain samples by this method. Specific aggregates were observed in the circular spots.

A1, A2 : A secretor's samples.
B1 : B non-secretor's samples.
B2 : B secretor's samples.
O1 : O secretor's samples.
AB1, AB2 : AB secretor's samples.
J : control(Japanese paper)

れも肉眼的に確認できた型特異的な円形の凝集塊を得ることができ、また、その再現性は高かった。一方、OHPフィルム面のB1の非分泌型唾液斑試料では、抗B抗体ないし抗Hレクチンに対して顕著な凝集を得なかった。

4 混合凝集反応法の光学顕微鏡下での観察

本法の特徴として、全斑痕において顕著な非特異的凝集が生じないことであったが、一部においてわずかではあるが肉眼的に非特異的な凝集塊様物が生じる場合が見られた。そこで、型特異的凝集塊と非特異的な凝集塊様物についてそれぞれ低倍率光学顕微鏡で比較観察した。

Fig.3は、OHPフィルムを使って唾液斑痕試料についての結果を低倍率光学顕微鏡により観察し、写真撮影したものである。型特異的凝集塊はFig.3-aに示すように唾液斑浸出固定化斑痕の円内に生じた。一方、非特異的凝集塊様物はFig.3-bに示すように唾液斑浸出固定化斑痕の周辺部に生じた。

Fig.3 Microscopic views of specific and non-specific agglutination.

- a : Specific agglutination was observed extract spot on the OHP film plate
- b : Non-specific agglutination was observed around the spot on the OHP film plate

考 察

OHPフィルムを使用した本検査法の第一の特長は、分泌型のヒト唾液斑では肉眼で確認できる明瞭な型特異的な円形の凝集塊が認められた。その出現位置はOHPフィルム面の試料浸出固定化斑痕の円内であった(Fig.3-a)。しかし、一部に非特異的な凝集塊様物を認めた。その凝集塊様物の出現位置は同フィルム面の試料浸出固定化斑痕の周辺部であり、型

特異的凝集塊と明らかに区別できた。この非特異的凝集反応が生じる原因としてまず考えられることは、非特異的吸着を防ぐためのスキムミルク水溶液が十分に効力をなさなかった場合と、抗体あるいはレクチンが浸出固定斑痕より大きく滴下され、抗体感作後の吸引しきれなかった余剰抗体が乾燥操作で辺縁部に残ったことにより線状あるいは帯状の非特異的凝集が生じる場合が考えられた(Fig.3-b)。

本検査法の第二番目の特長は簡便な操作である。すなわち、その簡便さは、フィルムの取り扱いの容易なこと、フィルム上に於ける斑痕試料切片の浸出操作、ホットプレートによる乾燥固定化操作、スキムミルク水溶液と抗A抗体・抗B抗体の連続的な滴下操作およびホットプレート乾燥操作を伴う抗体ないしレクチン洗浄の省略操作によって成り立っていることである。さらに、この検査法の利点は、フィルムの入手の容易なこと、検査に供する量の少量なことおよび検査の所要時間の短いことである。

このように、本検査法は、分泌型唾液が十分付着している和紙からは、簡便に、再現性のある血液型判定ができる方法であることから、本検査法を鑑定実務で繁用されている唾液採取紙(和紙)についてのABO式血液型検査の一手段に利用することができるものと考えられた。

一方、非分泌型唾液斑については、今回Bse型唾液斑のみしか実験を行っていないので、検出不可能であった原因を明らかにできないが、二つの理由が考えられる。一つは非分泌型斑痕の場合、型物質量が少なく、本法の検出限界以下の型物質しか含まれてなかった理由によると考えられた。この場合、非分泌型唾液斑の資料はあらかじめ数倍の使用量を用いて浸出液を作成して本法で検出するなどの工夫が必要と考えられた。もう一つの理由としては、モノクローナル抗体の種類によっては非分泌型体液中の型物質を検出できないと大森らが報告している¹⁰⁾ことから、本法においても非分泌型が検出できなかった可能性も考えられた。今後は上記の点についてさらに追試を行い検討するとともに、タバコの吸い殻、精液斑等の実務資料における血液型検査の一手段に応用が可能か否か検討する予定である。

まとめ

OHPフィルム(VF-5)上に和紙製の唾液斑切片の浸出液を熱乾燥固定化したのち、混合凝集反応法によるABO式血液型検査を、モノクローナル抗

A・抗B抗体および抗Hレクチン、また非特異的吸着防止剤としてのスキムミルク水溶液等を用いて、諸操作の条件を設定して検討したところ、本検査法は、分泌型の唾液付着和紙の少量切片から、簡便で、明確にABO式血液型検査結果を得ることができた。

文 献

- 1) 矢田昭一:塗抹標本における混合凝集反応. 日法医誌, **15**, 98-103 (1961)
- 2) 赤石 英, 村上 利, 工藤敏行, 清水三男, 田島 強:型的二重結合反応に関する研究. 日法医誌, **19**, 181-187 (1965)
- 3) 岡田健夫, 石山昱夫:微量混合凝集反応法(MCAR法)の法医学への応用. 科警研報告, **28**, 65-73 (1975)
- 4) 湯浅勲, 岡田吉郎:型的二重結合法変法による体液のABO式血液型の証明. 米子医誌, **26**, 237-245 (1975)
- 5) 犬山玲子:ヒト上皮細胞の血液型検査法. 科警研報告, **29**, 16-23 (1976)
- 6) 有馬孝, 武地誠一:MCAR法の検討. 鑑識科学研究発表会法医部会講演要旨集, p 17 (1978)
- 7) 鈴木和弘, 高橋良昭, 本多昭太郎:ELISA用プレートを利用した簡易混合凝集反応法によるだ液の血液型判定. 科警研報告, **47**, A117 (1994)
- 8) 春日壽夫:OHPフィルムを用いた混合凝集反応法によるヒト唾液斑からのABO式血液型検査. 日法医誌, **52**, (補)76 (1998)
- 9) 長江美紀子, 青木康博, 那谷雅之, 勾坂馨:羊水のABO式血液型物質担荷蛋白の検討. 法医学の実際と研究, **36**, 87-89 (1993)
- 10) 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, **51**, 102-107 (1998)