—原著—

解離試験法と ELISA とを組み合わせた高感度 ABO 式血液型検査法の開発と自動化

渡辺清之^{*1}, 土井裕輔^{*1}, 重田佳昭^{*1}, 鈴木 茂^{*1}, 勝 孝^{*2}岡山県警察本部刑事部科学捜査研究所^{*1}, 岡山大学薬学部^{*2}〒700-0816 岡山市富田町 1 丁目3-2^{*1}〒700-8530 岡山市津島中 1 丁目1-1^{*2}**Highly Sensitive Method for Determination of ABO Blood Groups Using Absorption-Elution Test Combined with ELISA and Its Automation**Kiyoyuki Watanabe^{*1}, Yusuke Doi^{*1}, Yoshiaki Shigeta^{*1},
Shigeru Suzuki^{*1} and Takashi Katsu^{*2}*Criminal Investigation Laboratory, Okayama Prefectural Police H. Q.,
1-3-2, Tonda-cho, Okayama 700-0816, Japan^{*1}**Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University,
1-1-1, Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan^{*2}*

(Received 25 December 2001; accepted 16 July 2002)

A highly sensitive method for forensic ABO blood grouping using monoclonal antibodies was developed in combination with an absorption-elution test and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In this method, monoclonal antibodies eluted from bloodstains with the absorption-elution, were determined by ELISA, for detection of ABO blood group substances in bloodstains. This method enabled us to determine blood group substances in bloodstains with high sensitivity about 10 times greater than a usual absorption-elution test and also to handle many samples (32 samples per a ELISA plate) at the same time. Furthermore, changing the heat elution of antibodies to the acid elution permitted automated analysis for ABO blood grouping using BIOMEK 1000 apparatus (Beckman Instrument, California, U. S. A.).

Key words: Monoclonal antibody, ABO blood grouping, Absorption-elution test, ELISA, Automated analysis

緒 言

血痕の ABO 式血液型検査法として, ヒト由来のポリクローナル抗体を使用した解離試験法が広く利用されてきた。しかし, 人道上的理由から, ヒト由来ポリクローナル抗体の供給を1998年秋に多くの

メーカーが中止したことから, 血液型検査用抗体はマウス由来のモノクローナル抗体に切り替えられることになった。市販のマウス由来モノクローナル抗体を使用した血痕からの ABO 式血液型検査については, すでにいくつかの報告がなされている¹⁻⁴⁾。

モノクローナル抗体使用の問題点として、希釈血痕に対する抗体の反応の弱さが指摘されており、ヒト由来ポリクローナル抗体と同等の検出感度を得ることが重要な検討課題となっている。また、モノクローナル抗体の法医血液型検査への導入にあたり、警察関係研究機関によって種々の検討がなされ、その問題点や対応策が報告されている⁵⁾。その報告書において、解離試験に適したモノクローナル抗体のメーカーの選定や解離温度・時間について検討をおこない、特定の検査条件下では20倍に希釈した血痕からの血液型検出は可能としている。

一方、著者らはモノクローナル抗体を用いたABO式血液型を高感度で判定するために、解離試験法での解離液に含まれる抗体をELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) で検出する方法 (以下、「解離ELISA」と略記する) を検討してきた。この「解離ELISA」は酵素免疫反応を用いることから従来の血液型検査法に比較して極めて高感度測定が可能であるが、操作が煩雑で、多くの検査試料を処理することが難しいことから、この方法を実際の鑑定に導入するためにはさらに改良を加える必要があった。

そこで、本研究では、これらの問題点を解決し、「解離ELISA」を実用的な方法に改良することを目的とした。すなわち、解離試験法のなかで熱解離をとりあげ、簡単に多数の検査試料を扱える方法 (以下、「熱解離ELISA」と略記する) を確立し、希釈血痕の高感度血液型検出を試みた。さらに、この方法を酸解離法 (以下、「酸解離ELISA」と略記する) に展開し、全自動検査についての検討も併せておこなったので報告する。

材料および方法

1. ABO式血液型判定用モノクローナル抗体

使用したABO式血液型判定用モノクローナル抗体は以下の通りである。

① マウス由来モノクローナル抗A抗体：いずれもIgMタイプの4社の製品を用いた。Ortho Clinical Diagnostics (Lot. BBA 610A21), Immucor, Inc. (Lot. 101200), 国際試薬 (Lot. 028), 和光純薬工業 (Lot. YF965)。

② マウス由来モノクローナル抗B抗体：いずれもIgMタイプの4社の製品を用いた。Ortho Clinical Diagnostics (Lot. BBB 610A21), Immucor, Inc. (Lot. 201220), 国際試薬 (Lot. 028), 和光純薬工業 (Lot. YF897)。

③ マウス由来モノクローナル抗H抗体：いずれもIgMタイプの2社の製品を用いた。Diagast Laboratoires (Lot. 015000), 国際試薬 (Lot. 0130)。

2. ELISA用試薬

二次抗体はペルオキシダーゼ標識抗マウスIgM抗体 (American Qualex社製) を用い、1%正常ヤギ血清 (Biomeda社製) を含むTween-PBSで600倍に希釈した。Tween-PBSはTween 20 (和光純薬工業社製) 0.05%を含むPBS (0.14 M塩化ナトリウム, 0.01 Mリン酸緩衝液, pH 7.2) で調製した。発色液は、*o*-フェニレンジアミン (Sigma社製) 5 mgをpH 5のMcIlvaine緩衝液⁶⁾ 10 mlに溶かし、さらに3%過酸化水素水20 μ lを加えて調製した⁷⁾。McIlvaine緩衝液⁶⁾は0.1 Mリン酸水素二ナトリウムと0.2 Mクエン酸から調製した。また、ブロッキング剤および抗体希釈液として、大日本製薬社製ブロックエースに0.1%アジ化ナトリウムを添加したもの (以下、ブロックエースと称する) を使用した。その他の試薬は市販の特級試薬を使用した。

3. ELISA用プレート

血痕への抗体の感作、抗体の洗浄、解離をおこなうための反応プレートはCostar社製3590 (平底ELISAプレート) を使用した。また、解離液から血液型を判定するための判定プレートは住友ベークライト社製ソフトELISAプレートSUMILON MS-7196-Fを使用した。

4. 希釈血痕

検査用試料血痕はA型、B型、O型およびAB型の各血液を凍結し溶血させたものを蒸留水で連続2倍希釈し、その希釈溶血液を太口の本綿糸を用いて浸漬付着させ、自然乾燥したものを用いた。

5. 熱解離ELISAによるABO式血液型検査

熱解離ELISAは、Fig. 1に示す手順でおこなった。すなわち希釈血痕が付着した本綿糸3 mmを切りとり、反応プレートのウェルの片端にそれぞれ1

Fig. 1 Procedures for absorption-elution test combined with ELISA.

1. Bloodstains were fixed onto polystyrene ELISA plates using diethyl ether as an adhesive.
2. Add 200 μ l of blocking solution, incubate for 1 hour at 37°C, and wash 3 times with 0.85% saline.
3. Add 100 μ l of diluted anti-A, -B or -H monoclonal antibody in each well and incubate overnight at 4 °C.
4. Wash 6 times with 0.85% saline.
5. Add 50 μ l of 0.85% saline in each well and incubate for 10 min at 53°C on hot plate, for elution of antibody.
6. Transfer the eluted solution to another ELISA plate with a multi-channel pipette.
7. Incubate for 1 hour at 37°C for binding the antibody to ELISA plates.
8. Add 200 μ l of blocking solution, incubate for 1 hour at 37°C, and wash 4 times with Tween-PBS.
9. Add 50 μ l of diluted anti-mouse IgM-HRP conjugate and incubate for 30 min at 37°C.
10. Wash 8 times with Tween-PBS.
11. Add 50 μ l of *o*-phenylenediamine solution, incubate for 10 min at room temperature.
12. Add 100 μ l of 2 N sulfuric acid to stop the reaction, and measure OD at 492 nm by an automatic spectrophotometer for ELISA microplate.

本ずつ入れたのち少量（3～5 μ l 程度）のジエチルエーテルを加えて固定した。反応プレートの材質はポリスチレン製であるため、プレートの一部がジエチルエーテルで溶け出し、ジエチルエーテルが乾燥することによりウエルの底面に木綿糸が固定された。また、希釈血痕の固定はウォッシャーの吸引口の位置を避けておこなった。次に、各ウエルにブロックエース200 μ l を加え、37°Cで1時間ブロッキングした。反応プレートをウォッシャー1（バイオテック社製 Auto Mini Washer Model AMW-8）を用いて生理的食塩水で3回洗浄した後、ブロックエー

スで20倍に希釈したモノクローナル抗 A、抗 B および抗 H の各抗体を100 μ l 添加し、4°Cで一晩感作した。反応プレートをウォッシャー1を用いて生理的食塩水で6回洗浄し、各ウエルに50 μ l の生理的食塩水を加えた後、加熱して木綿糸に吸着した抗体を熱解離させた。なお、熱解離は、ホットプレートを53°Cに設定し、ホットプレート上に反応プレートより一回り小さなアルミ板（7 cm×11 cm、厚さ3 mm）を載せ、その上に反応プレートを置いて加熱した。加熱後直ちに熱解離液は8連ピペットを用いて判定プレートに移し、37°Cで1時間インキューベ

ト⁷⁾して固相化した。熱解離液を除去後、各ウエルに蒸留水で4倍希釈したブロックエース200 μ lを加え、37°Cで1時間ブロッキングした。判定プレートウォッシャー2（バイオテック社製 Sera Washer Model MW-96F）を用いて Tween-PBS で4回洗浄後、二次抗体50 μ lを添加し、37°Cで30分間インキュベートした。判定プレートをウォッシャー2を用いて Tween-PBS で8回洗浄後、発色液を50 μ lずつ添加し、室温暗所で10分間、発色反応させた。2 N 硫酸100 μ lを加えて反応を停止させ、イムノリーダー（Immuno Mini NJ-2300: Nalge Nunc International 社製）を用いて、各ウエルの吸光度（492 nm）を測定した。なお、洗浄液として生理的食塩水と Tween-PBS の2種類を使用するため、今回2台のウォッシャーを使用した。

6. 酸解離 ELISA による ABO 式血液型検査

熱解離 ELISA による血液型検査法で述べたように、試料を反応プレートにジエチルエーテルで固定、ブロッキング、洗浄、抗体の添加、洗浄の各処理をおこなった後、酸解離をおこなった。

酸解離⁵⁾は各ウエルに60 μ lの0.1 M グリシン-塩酸緩衝液（pH 3）を加えて、10分間静置することによりおこなった。その後、酸解離した液50 μ lを判定プレートに移し、0.08 M リン酸緩衝液（Na₂HPO₄-KH₂PO₄, pH 8.2）25 μ lを添加して中和後、1時間静置し固相化した。反応はすべて室温でおこなった。「酸解離 ELISA」では、検査試料をジエチルエーテルで固定した後の過程は、すべて（Fig. 1の②以降の操作：全自動プログラム）あるいは一部（Fig. 1の⑤以降の操作：半自動プログラム）を Beckman 社製の BIOMEK 1000 を用いて自動検査測定した。反応時間、抗体の濃度などは熱解離 ELISA と同じ最適条件下でおこなった。著者らが作成した自動測定プログラムは提供可能である（メールアドレス：kiyoyuki_watanabe@pref.okayama.jp）。

7. 解離試験法による ABO 式血液型検査

解離試験法は文献⁵⁾に記載されている方法に従った。すなわち、木綿糸に付着した血痕はメタノール固定した後、3 mm の長さで切断した。試験管1本あたり3 mm の検査試料1本を使用した。抗 A 抗

体は Immucor 社製、抗 B 抗体は和光純薬工業社製を、それぞれ試験管に1滴加え、4°Cで一晩感作させた。感作後、余剰抗体を冷生理的食塩水で3回洗浄を繰り返し除去したのち、新たに生理的食塩水を1滴加えて53°Cで抗 A 抗体は5分、抗 B 抗体は10分熱解離し、対応する A 型あるいは B 型の0.2%血球浮遊液を加えた。室温で10分間静置した後、1,000 rpm で1分間遠心分離し、凝集の有無を判定した。

H 型物質の検出には、① Ulex 抗 H レクチン（ホーネン社製）を力価8倍に調製し感作させ、指示血球としてパパイン処理した O 型血球の0.2%浮遊液を使用した場合と、② Ulex 抗 H レクチンの原液を感作させ、O 型血球の0.2%浮遊液（パパイン未処理）を使用した場合の2種類の方法を実施した。熱解離温度および時間は、いずれの場合も53°C、10分でおこなった。その後の操作は、A および B 型物質の検出の場合と同様におこなった。

結 果

1. 熱解離 ELISA による ABO 式血液型検査

抗体の解離方法としては、熱解離法が広く使用されている。そのため、まず熱解離法で最適な解離時間、抗体の選定、抗体濃度を決定し、その検出感度を調べた。

1.1. 解離時間の検討

解離時間の検討のために、解離温度を53°C^{5,8,9)}に設定し、A 型、B 型、O 型の各16倍希釈血痕にそれぞれ抗 A、抗 B、抗 H の各抗体を添加し、 α -フェニレンジアミンの発色による吸光度を測定した。なお、解離時間は3、5、7、8、10、12、15分で行った（Fig. 2）。抗 A 抗体および抗 B 抗体は和光純薬工業社製、抗 H 抗体は Diagast 社製を用い、ブロックエースで20倍に希釈して用いた。抗 A 抗体および抗 B 抗体ともに10分前後で最も強い吸光度を示し、抗 H 抗体は5分から15分の間で強い吸光度を示した。従って、解離時間は10分でおこなうことにした。

1.2. 市販モノクローナル抗体の評価

A 型、B 型、O 型の各16倍希釈血痕に対する抗 A、抗 B、抗 H 抗体の特異的および非特異的な反

応性を, 吸光度の強さを指標として評価した. その結果, Fig. 3 に示すように抗 A 抗体は Ortho 社および和光純薬工業社製の製品が Immucor 社および国際試薬社製のものよりも 2 倍から 4 倍強い吸光度を示した. 抗 B 抗体はいずれのメーカーもほぼ同程度の吸光度を示した. 抗 A, 抗 B 抗体ともに非特異的反応は示さなかった. また, 抗 H 抗体は Diagast 社製の製品が国際試薬社製のものよりも 2 倍

Fig. 2 Effect of heating time in absorption-elution test combined with ELISA. Anti-A, anti-B and anti-H monoclonal antibodies used were Wako (Lot. YF965), Wako (Lot. YF897) and Diagast (Lot. 015000), respectively.

以上強い吸光度を示した. 従って, 以下の実験では, 抗 A および抗 B 抗体は和光純薬工業社製, 抗 H 抗体は Diagast 社製の製品を使用した.

1.3. 抗体の希釈倍率の検討

各抗体を 10 倍, 20 倍, 50 倍, 100 倍, 200 倍, 500 倍に希釈し, 16 倍希釈血痕に感作させ, 得られた吸光度を比較した (Fig. 4). 抗 A および抗 B 抗体では, 10 倍および 20 倍希釈抗体は希釈率に依存しない高い吸光度を示したが, 50 倍以上に希釈した抗体で吸光度の低下が見られた. また抗 H 抗体では, 10

Fig. 4 Effect of dilution ratios of monoclonal antibodies on absorption-elution test coupled with ELISA.

Fig. 3 Comparison of absorption-elution test combined with ELISA using commercially available monoclonal antibodies to diluted bloodstains.

倍から50倍希釈抗体はほぼ同程度の高い吸光度を示したが、100倍希釈抗体は吸光度が低下した。以上の結果から、抗A、抗B、抗H抗体ともに20倍に希釈したものを使用することにした。

1.4. 検出感度の比較

2倍から256倍のA型、B型、O型、AB型の希釈血痕に対する反応性をFig. 5に示した。血痕は路面や着衣などから採取されることが想定され、関係人の汗垢等の汚染にさらされ非特異的発色が認められことが多いためカットオフ値を通常のELISAよりも高めの0.2に設定し判定をおこなった。その結果、いずれの型においても、256倍に希釈した血痕で型判定が可能であった。なお、今回作製した血痕で、陰性反応を示す吸光度はすべて0.1以下に抑

えられていた。

2. 熱解離ELISAと酸解離ELISAとの比較

熱解離ELISAは、ホットプレートを使用することからBeckman社製のBIOMEK 1000を用いた自動化には適さなかった。そこで、熱解離法の代わりに酸解離法を導入し、自動化することを試みた。酸解離ELISAは、BIOMEK 1000を用い、64試料まで一度に処理できるプログラムを作成した。

プログラムは、①反応プレートのプロッキングから血液型の判定までの全過程を自動的におこなう「全自動プログラム」と、②反応プレートのプロッキングから一次抗体（抗A、抗B、抗H抗体）のウォッシャーを用いた洗浄までの過程を手作業でおこない、酸解離以下の過程をBIOMEK 1000でお

Fig. 5 Reaction curves of anti-A, anti-B and anti-H monoclonal antibodies to diluted bloodstains of type A, B, O and AB.

こなう「半自動プログラム」の2種類を作成した。

「半自動プログラム」を利用して酸解離 ELISA で得られた検出感度は、熱解離 ELISA で得られた検出感度とはほぼ同程度の感度を有した。代表例として、Fig. 6 に A 型希釈血痕に対する両者の反応性を示す。酸解離 ELISA および熱解離 ELISA とともに類似の反応曲線を描いており、同程度の検出感度を与えた。

「全自動プログラム」を利用した結果は、「半自動プログラム」を用いた場合とはほぼ同一の結果を与えた。それぞれのプログラムの所要時間は、全自動プログラムが約16時間、半自動プログラムが約4時間であった。

Fig. 6 Reaction curves of anti-A monoclonal antibody to diluted type A bloodstains for comparison of heat elution method and acid elution method.

3. 熱解離 ELISA と解離試験法との比較

今回作製した希釈血痕を、解離試験法で判定したところ、A 型および B 型は 8 倍希釈血痕で強い凝集反応が観察された。16 倍希釈血痕では弱い反応しか示さず判定が困難であった。Ulex レクチンによる H 型物質の検出は、A 型、B 型、O 型のいずれもパパイン処理血球を使った場合では 64 倍希釈血痕でも可能であったが、未処理血球を使った場合では 2 倍希釈血痕のみが凝集反応を示した。AB 型も含めた希釈血痕について、解離試験法と解離 ELISA で得られた検出下限を Table 1 に示した。すなわち、解離試験法と比較すると熱解離 ELISA は解離試験法と比べて、10 倍以上高感度で ABO 式血液型が判定できることを示している。

考 察

モノクローナル抗体を用いる「解離試験法による ABO 式血液型検査」は 10 倍希釈程度の濃い血痕に対しては有効であるが、希釈された血痕に対しては検出が困難となる場合がある。既報⁵⁾では 20 倍希釈の血痕でも検出可能としている。著者らの結果では A 型および B 型での 8 倍希釈血痕の判定は可能であったが、16 倍希釈血痕では弱い反応しか示さず判定は困難であった。これらの結果から、モノクローナル抗体を使った解離試験の検出限界は 10~20 倍程度の希釈血痕と考えられる。また、解離試験法により O 型の血液型を判定するためには抗 A および抗 B 抗体を用いて、A 型および B 型抗原が認められないことを調べた上で、Ulex など抗 H レクチンを用いて H 型抗原の存在を積極的に証明することが

Table 1 Comparison of detection limits for ABO blood grouping of human bloodstains^{a)}.

Blood types	Absorption-elution test combined with ELISA			Absorption-elution test		
	Anti-A	Anti-B	Anti-H	Anti-A	Anti-B	Anti-H Ulex Lectin
A	> 256	—	32	8	—	2 (64 ^{b)})
B	—	> 256	> 256	—	8	2 (64 ^{b)})
O	—	—	> 256	—	—	2 (64 ^{b)})
AB	> 256	> 256	32	8	8	1 (32 ^{b)})

a) Detection limits were defined as the values of maximum dilution of bloodstains.

b) Anti-H Ulex lectin (titer: $\times 8$) and papain treated red cell were used.

望ましいが、A型やB型の検出限界とO型の検出限界に隔たりがある場合、誤判定を引き起こす可能性がある。すなわち、パパイン処理血球を使った場合では、H型物質の検出感度がA型やB型物質の検出感度よりも著しく高いため、高度に希釈されたA型やB型血痕をO型と判定してしまうことが考えられる。パパイン処理をおこなわない血球を使えば、その危険性を避けることができるものの、極めて濃い血痕でしかO型を証明することができず、判定不能の割合は増加する。

著者らが今回おこなった「解離ELISA」による検討では、256倍に希釈した「いずれの型の血痕」でも型判定が可能であり、モノクローナル抗体を使った解離試験法と比べて10倍以上も高感度であることが示された。また、A型、B型、AB型に対する抗H抗体の反応性は、O型に対する抗H抗体の反応性よりも弱いという結果が得られた。この結果は、A型やB型物質がH型物質を前駆物質として糖転移酵素が作用して形成されるために、A型、B型、AB型のH型物質は、O型のH型物質と比較して相対的に少ないことに起因しているためと考えられる。そのため、解離試験で問題となった高度に希釈されたA型やB型血痕をO型と判定することは避けられ、より正確な型判定ができることが示された。

実際に犯罪現場から採取された血痕214例について、本法と解離試験法とを比較したところ、本法で血液型が判定されたが解離試験法で判定不能であった13例（A型7例、B型4例、O型2例）を除き、すべての結果が一致した（A型64例、B型94例、O型28例、AB型15例）。また、比較できなかった13例についても状況等から本法で得られた結果に矛盾は認められなかった。「解離ELISA」は解離試験法よりも10倍以上感度が高い方法であることはすでに述べたが、分析感度が上昇すれば検査試料の汚染などによる誤判定の危険性が増えることも予想される。しかし、今回検査した214例の血痕には路面から採取されたものや、異なる血液型の人の着衣より採取されたものも含まれており、これらの結果がすべて一致していることから、通常どおり採取された血痕であれば解離試験法で得られた結果とは矛盾を

きたさないものと考えられる。

解離試験法における解離液に含まれる抗体をELISAで検出する「解離ELISA」を用いた血液型検査は、操作の煩雑さからほとんど検討されてこなかった。類似の方法として、Biwasakaらは毛髪に感作させたモノクローナル抗体をPolyvinilidene difluoride膜に熱転写し、熱転写された抗体を膜上でELISAをおこないABO式血液型を判定している¹⁰⁾。また、森山は陳旧血痕の人血を証明する目的で、著者らと同様の方法で検討をおこなっている¹¹⁾。しかし、多数の血痕の血液型を検査する目的での検討はこれまでおこなわれてこなかった。今回検討した方法では、解離試験法の抗体洗浄過程をウォッシャーでおこなうため省力化され、多数の試料を検査する場合には特に適している。

また、酸解離法を導入すれば、Beckman社製のBIOMEK 1000を用いて全過程を自動化することが可能となった。

以上述べたように、高感度で客観的、しかも多数の試料を自動的に検査できる本法は、鑑定実務に極めて有効な方法であると考えられる。

結 語

解離試験法とELISAとを組み合わせた高感度ABO式血液型検査法を開発した。本法は、モノクローナル抗体を使用した解離試験法と比べて10倍以上高感度であった。また、同時に多数の検査試料を検査することが可能であった。本法は試薬の発色を数値に換算して判定するため、経験に左右されない客観的な判定法となった。抗体の解離方法を熱解離から酸解離に変更することにより、全検査過程をBeckman社製のBIOMEK 1000を使用して自動化することが可能となった。

文 献

- 1) 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. 鑑識科学, **1**, 43-48 (1996).
- 2) 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).
- 3) 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. 科警研報告法科学編, **52**, 116-123 (1999).
- 4) 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 式血液型判定用市販モノクローナル抗体の評価. 鑑識科学, **4**, 29-35 (1999).
- 5) 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: 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. 警察庁刑事局鑑識課・科学警察研究所, 東京 (2001).
- 6) Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H. and Jones, K. M.: Data for Biochemical Research, 3rd edn, pp. 417-448, Clarendon, Oxford (1986).
- 7) 渡辺清之, 土井裕輔, 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. 鑑識科学, **6**, 11-20 (2001).
- 8) 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—毛髪からの型検出法の改良—. 日法医誌, **53**, 338-344 (1999).
- 9) 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).
- 10) Biwasaka, H., Nakayashiki, N. and Aoki, Y.: Detection of ABH blood group antigens from minute human hairs using polyvinylidene difluoride membrane with elution-ELISA method. *Jpn. J. Legal. Med.*, **52**, 37-41 (1998).
- 11) 森山英範: 解離試験を用いた ELISA 法による陳旧血痕の人血証明法について. 鑑識科学研究発表会 (法医部会) 要旨集, p. 7 (1990).