—技術報告—

A 分泌型および A 非分泌型唾液を免疫原とする新規抗 A モノクローナル抗体の
法科学的検査への応用大森 毅^{*1}, 白石智子^{*1}, 岩成宏子^{*2}, 青井理恵^{*2}, 伊藤行夫^{*2}, 関口和正^{*1}, 佐藤 元^{*1}科学警察研究所^{*1}, (株)特殊免疫研究所^{*2}〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1^{*1}〒329-0512 栃木県下都賀郡石橋町下石橋170^{*2}**Application of Monoclonal Antibodies to Blood Group A Secretors
and Non-secretors Saliva for Forensic Examination**Takeshi Ohmori^{*1}, Tomoko Shiraishi^{*1}, Hiroko Iwanari^{*2},
Rie Aoi^{*2}, Yukio Ito^{*2}, Kazumasa Sekiguchi^{*1} and Hajime Sato^{*1}*National Research Institute of Police Science,
6-3-1, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, 277-0882, Japan^{*1}**Institute of Immunology,
170, Shimo-ishibashi, Ishibashi-cho, Shimotsuga, Tochigi, 329-0512, Japan^{*2}**(Received 19 June, 2003; accepted 23 July 2003)*

We had already reported a specificity of the anti-A monoclonal antibodies (mAbs) that were produced by immunization of mice with salivary mucin obtained from blood group A secretors and non-secretors. In this report, an anti-A mAb K7405 reacting to the saliva from secretor, and a K7516 anti-A mAb reacting to the saliva from both secretor and non-secretor were applied to forensic investigation. In the forensic blood typing of saliva, blood group A secretors and blood group A non-secretors can be clearly discriminated by the combined application of K7405 and K7516 for an absorption test, enzyme-linked immunosorbent assay and mixed cell agglutination reaction. However, the two mAbs could not completely discriminate between secretors and non-secretors from seminal samples.

Key words: Monoclonal antibody, ABO blood group, Saliva, Semen**緒 言**

我々は既に、A 分泌型および A 非分泌型の唾液ムチンをマウスに免疫し、反応特性の異なる抗 A 抗体を得たことを報告した¹⁾。A 分泌型唾液ムチンを免疫して作製した抗 A 抗体である K7405¹⁾と、A

非分泌型唾液ムチンを免疫して作製した抗 A 抗体である K7516¹⁾は、同じ抗 A 抗体でありながら反応特性は異っており、その相違は認識する A 型糖鎖の密度の相違と推測された¹⁾。これらの性質の異なる二種類の抗体を組み合わせて検査に使用すること

で、A 分泌型と A 非分泌型を識別することが可能と考えられたので、本稿ではこれらの抗体を法科学的検査に応用し、血液型判定と同時に分泌型と非分泌型の識別が可能であるかどうか検証した。

材料および方法

1 抗体

使用した抗体は、K7405 と K7516 である¹⁾。マウス腹水から硫酸塩析して得られたイムノグロブリン分画を使用した。タンパク濃度は 5 mg/ml である。なお、K7405 は日本人の A 分泌型唾液ムチンを免疫して得られた抗体であり、K7516 は日本人の A 非分泌型唾液ムチンを免疫して得られた抗体である¹⁾。

2 検査材料

ヒト血球浮遊液はドミニオン社より購入した（商品名 Serum Grouping A、製造番号 R1113/2）。A、B、O、AB 型の各型における分泌型および非分泌型のヒト唾液およびヒト精液は、各型につき 1 名の健康人より提供を受けた。これらの体液は使用直前まで -80℃ で保存した。また唾液および精液の一部をとりサラシ布に付着させ室温で風乾後、体液斑痕として使用した。毛髪は健康人より提供を受けた。

3 検査方法

(1) 力価測定

力価測定は赤血球浮遊液を使用し、ホールグラス法を用いて行った。抗体価は凝集反応が観察される最大の希釈倍率で表示した。

(2) 吸収試験

吸収試験は、定法²⁾に従って行った。唾液斑あるいは精液斑約 1.0 × 0.5 cm 大の斑痕に、抗体価 8 倍に調整した抗体溶液 100 μl を添加し、4℃ で一晩吸収させた。吸収後、上清を取り、順次希釈して抗体価を測定し、抗体価の低下の有無を確認した。本稿においては、原倍の上清において指示血球の凝集が確認できなかった場合を陽性と規定した。

(3) 凝集阻止試験

凝集阻止試験は、定法³⁾に従って行った。試料は、唾液及び精液を使用した。試料を生理食塩水で順次倍数希釈し、それら希釈液 50 μl に抗体価 8 倍に調整した抗体溶液同量を添加し、4℃ で一晩反応

させた。反応後、血球浮遊液を添加して凝集阻止の有無を調べた。

(4) 酵素免疫測定法 (ELISA)

唾液あるいは精液を 50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) で倍数希釈して作製した抗原溶液各 50 μl を ELISA プレート（住友ベークライト、MS-7196-F）のウェルに添加し、37℃ で 1 時間インキュベートして吸着させた。試料溶液を除去後、1% ウシ血清アルブミン溶液 200 μl を添加し、4℃ 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-Tween) で洗浄後、一次抗体として PBS-Tween で 1,000 倍希釈した K7405 あるいは K7516 を 50 μl 添加し、37℃ で 1 時間反応させた。プレートを洗浄後、二次抗体（ヤギ抗マウス IgM (μ)-ペルオキシダーゼ標識、アメリカンコーレックス）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 μl を添加し 37℃ で 1 時間反応させた。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)⁴⁾ 溶液 50 μl を添加し、暗所で 10 分間反応させた。反応は 2 N 硫酸 100 μl を添加して停止させ、各ウェルの 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、Power Wave200）で測定した。

なお、各資料について抗原を固相に吸着させていないウェルをネガティブコントロールとして用い、これらのウェルの吸光度の平均値をバックグラウンドレベルとした。反応が陽性か陰性かの判断の基準として、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 × 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。

(5) 微量混合凝集法 (Mixed Cell Agglutination Reaction : MCAR)

微量混合凝集法は、淀谷らの方法に従って行った⁵⁾。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テープ（エーワン、プラパッチ）を貼付した。リング状の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は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（雪印）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、スライドガ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、生理食塩水で洗浄し、さらに指示血球を滴下し、湿箱中で5分間反応させた。スライドガ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分後にスライドガ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。

(6) 解離試験

試料斑痕は糸片5mmを1本使用した。試料を試験管に入れ、力価256倍に調製した抗体溶液を滴下し、4℃で18時間静置して、抗体を吸着させた。その後、冷却したPBS-Tweenで1回、冷生理食塩水で2回洗浄した。解離液として、0.2%ゼラチンを含む生理食塩水一滴を添加後、恒温水槽中で、53℃で10分加熱して抗体を解離させた。指示血球を添加し、15分間振とうさせた後に指示血球の凝集を観察した。

なお、毛髪の解離試験は既報の方法に従った⁶⁾。

結 果

1 力価

ホールグラス法で測定した抗体の力価は、K7405が2,560倍、K7516が20,480倍であった。なお、B型、O型血球は凝集させなかった。

2 吸収試験

唾液の吸収試験の結果、K7405はA分泌型およびAB分泌型唾液のみにより吸収され、抗体価の低下が確認された。一方、K7516はA分泌型、A非分泌型、AB分泌型およびAB非分泌型のいずれの唾液によっても吸収された（Table 1）。

精液の吸収試験の結果、K7405、K7516はともに、A分泌型、A非分泌型およびAB分泌型精液により吸収された（Table 2）。

なお、B型あるいはO型の唾液および精液による吸収は観察されなかった。

3 凝集阻止試験

唾液の凝集阻止試験の結果、K7405を用いた場合には、A分泌型唾液の阻止価は128倍、A非分泌型唾液の阻止価は8倍であり、分泌型と非分泌型では凝集阻止価に差異が認められた。一方、K7516を用いた場合には、A分泌型、A非分泌型唾液ともに阻止価は4,096倍であり、分泌型と非分泌型との間で、凝集阻止価に差は認められなかった（Table

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

Samples	Absorption-test		Hemagglutination inhibition test*		ELISA		MCAR		Absorption-elution test	
	K7405	K7516	K7405	K7516	K7405	K7516	K7405	K7516	K7405	K7516
A-secretor	+	+	128	4096	+	+	+	+	+	+
A-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.	-	-	-	-	-	-
AB-secretor	+	+	n.t.	n.t.	+	+	+	+	+	+
AB-non-secretor	-	+	n.t.	n.t.	-	+	-	+	-	+

+: Positive reaction

-: Negative reaction

*: Inhibition titer

n.t.: Not tested

Table 2 Application of K7405 and K7516 for detecting A substances from seminal stains.

Samples	Absorption-test		Hemagglutination inhibition test*		ELISA		MCAR		Absorption-elution test	
	K7405	K7516	K7405	K7516	K7405	K7516	K7405	K7516	K7405	K7516
A-secretor	+	+	1024	8192	+	+	+	+	+	+
A-non-secretor	+	+	16	128	-	+	-	+	-	+
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.	-	-	-	-	-	-
AB-secretor	+	+	n.t.	n.t.	+	+	+	+	-	+
AB-non-secretor	-	-	n.t.	n.t.	-	-	-	-	-	-

+ : Positive reaction

- : Negative reaction

*: Inhibition titer

n.t.: Not tested

1).

精液の凝集阻止試験の結果、K7405 を用いた場合では、A 分泌型精液の阻止価は1,024倍であり、A 非分泌型精液の阻止価は16倍であった。また、K7516 を用いた場合では、A 分泌型精液の阻止価は8,192倍、A 非分泌型精液の阻止価は128倍であり、精液の場合には、どちらの抗体を用いた場合でも分泌型と非分泌型の間で凝集阻止価に差異が認められた (Table 2)。

4 ELISA

ELISA による各血液型唾液の検査を行ったところ、K7405 ではA型およびAB型の分泌型唾液のみに反応した。一方、K7516 はA型およびAB型の分泌型あるいは非分泌型いずれの唾液に対しても、強度の差はあるものの反応した (Fig. 1)。

精液の検査を行ったところ、K7405 ではA型およびAB型の分泌型精液のみに反応した。一方、K7516 はA分泌型、A非分泌型およびAB分泌型精液に対して反応した。但し非分泌型に対する反応強度は分泌型に比べて低かった (Fig. 2)

なお、B型あるいはO型の唾液および精液に対する反応は観察されなかった。また、A分泌型は、Le(a-b+) と Le(a-b-) の両方の型を採取して比較を行ったが差異は認められなかった。

5 MCAR

MCAR を用いた唾液斑の検査を行ったところ、K7405 を用いた場合ではA分泌型およびAB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、A非分泌型、AB非分泌型唾液斑痕には反応がみとめられなかった。一方、K7516 を用いた検査の結果はA分泌型、A非分泌型、AB分泌型およびAB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 (Table 1)。A分泌型およびA非分泌型唾液斑に対して行ったMCARの結果をFig. 3に示す。

また、精液斑の検査の結果、K7405 を用いた場合ではA分泌型およびAB分泌型精液斑痕上に指示血球の凝集が観察され、A非分泌型、AB非分泌型唾液斑痕には全く反応しなかった。一方、K7516 を用いた検査の結果、A分泌型、A非分泌型およびAB分泌型の唾液斑痕上において指示血球の凝集が観察されたが、AB非分泌型唾液斑には、凝集は観察されなかった (Table 2)。A分泌型およびA非分泌型精液斑に対して行ったMCARの結果をFig. 4に示す。

なお、B型あるいはO型の唾液および精液に対する反応は観察されなかった。

6 解離試験

唾液斑の解離試験を行った結果、K7405 を用いた

Dilution of saliva

Fig. 1 Reactions of anti-A monoclonal antibodies (mAbs), K7405 and K7516, with saliva. Reactivities of mAbs to various concentrations of saliva obtained from A-secretor (●), A-non-secretor (○), B-secretor (▲), B-non-secretor (△), O-secretor (▼), O-non-secretor (▽), AB-secretor (■) and AB-non-secretor (□) were tested by ELISA. The dotted line shows the cut-off level calculated from the absorbance of negative control wells (without saliva).

場合、A 分泌型、A 非分泌型および AB 分泌型の唾液斑には陽性反応が観察され、K7516 を用いた場合には、A 分泌型、A 非分泌型、AB 分泌型および AB 非分泌型唾液のいずれの唾液斑にも陽性反応が観察された (Table 1)。

一方、精液斑の検査の結果、K7405 を用いた場合には A 分泌型のみ、K7516 を用いた場合には、A 分泌型、A 非分泌型および AB 分泌型において陽性反応が観察された (Table 2)。

なお、B 型あるいは O 型の唾液および精液に対する反応は観察されなかった。

Dilution of semen

Fig. 2 Reactions of anti-A monoclonal antibodies (mAbs), K7405 and K7516, with semen. Reactivities of mAbs to various concentrations of semen obtained from A-secretor (●), A-non-secretor (○), B-secretor (▲), B-non-secretor (△), O-secretor (▼), O-non-secretor (▽), AB-secretor (■) and AB-non-secretor (□) were tested by ELISA. The dotted line shows the cut-off level calculated from the absorbance of negative control wells (without semen).

また、毛髪検査の結果を Table 3 に示す。K7405 は A 型および AB 型毛髪に反応するとともに、O 型毛髪に対しても非特異的な反応を示したが、K7516 は A 型および AB 型毛髪にのみ反応した。

考 察

近年、分泌型と非分泌型の遺伝的差異が明らかになってきた^{7,8)}。日本人を始めとするアジア、太平洋地域の民族における非分泌型⁹⁾は、H 物質の合成に関与する酵素である *FUT2* ($\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼ) の活性が分泌型よりも低いため

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

に、分泌液中に存在する ABO 式血液型物質の量が少ないと説明され^{8,10)}、一方、白人、黒人あるいは中近東系人種の非分泌型⁹⁾は *FUT2* を合成できないタイプであるため、分泌液中には ABO 式血液型物質は存在しないと説明されている⁷⁾。このように、非分泌型の日本人の唾液中における ABO 式血液型物質の由来が明確となり、さらに分泌型と非分泌型との間での唾液中血液型糖鎖の差異も明らかとなった¹¹⁾。そこで分泌型と非分泌型のそれぞれの血液型糖鎖に対して特異的な抗体を作製すれば、血液型判定と同時に分泌型と非分泌型の識別が可能と考えられたため、我々は実際に抗体を作製し、得られた抗体の反応特性を報告した¹⁾。そこで作製した抗体のうち二種類 (K7405 および K7516) について法科学的検査への応用を試みた。K7405 と K7516 はそれぞれ A 型三糖 ($\text{GalNAc}\alpha 1-3[\text{Fuc}\alpha 1-2]-\text{Gal}\beta$) 構造を特異的に認識する抗体でありながら両者の反応特性は異なったものであり、K7405 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¹⁾。また、A 型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することから、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¹⁾。これらのことから、K7405 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。一方、K7516 は担体高分子の有無に関わらず、A 型糖鎖に対して反応し、単独の A 型糖鎖を認識する抗体であると考えられる¹⁾。

唾液に対して、作製した抗体を用いて各種法科学的検査を行ったところ、吸収試験、ELISA および MCAR を用いた場合には、K7405 は分泌型のみに反応し、K7516 は分泌型・非分泌型の両方に反応したことから、これら二種類の抗体を組み合わせることで A 型の判定と同時に分泌型・非分泌型の識別

Fig. 4 Results of the mixed cell agglutination reaction on seminal stains obtained from secretor and non-secretor. Anti-A antibodies used were K7405 and K7516. With K7405, agglutinations were observed on the seminal stain obtained from secretor but no agglutination was observed on the seminal stain obtained from non-secretor. With K7516, agglutinations were observed on the seminal stains obtained from both secretor and non-secretor.

Table 3 Application of K7405 and K7516 for detecting A substances from hair samples.

Antibodies	Blood type of hair samples			
	A	B	O	AB
K7405	+	—	±	+
K7516	+	—	—	+

も可能となると考えられた。一方、精液に対してはいずれの抗体も AB 非分泌型の検出が不可能であったため、これらの抗体を組み合わせた分泌型・非分泌型の識別の検査対象として精液は不適当であると考えられた。なお、唾液・精液ともに解離試験では分泌型・非分泌型の識別は不可能であったことから、解離試験で得られた結果は抗体の反応特性を反映していないと考えられた。したがって、唾液および精液の検査においては、ELISA および MCAR の

方が信頼性は高いと考えられた。なお、毛髪からの解離試験の結果、K7516 を用いた場合に正確な型判定が可能であった。

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¹²⁾。唾液ムチンのコアペプチドの塩基配列からは、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、近接して有することが示され、唾液ムチン上では糖鎖が密集して存在すると考えられる¹³⁾。分泌型と非分泌型との相違点は、FUT2 の活性の相違であり、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もので、分泌型唾液では ABO 式血液型物質が大量に密集しており、一方で非分泌型唾液では ABO 式血液型物質が密集する可能性は低いと考えられる。高い密度で存在する A 型物質を認識する抗体であると推定される K7405 は、分泌型唾液のみを検出すること

が可能であり、一方、単独で存在する A 型構造を認識する抗体であると考えられる K7516 は、分泌型唾液、非分泌型唾液を問わず検出できたものと考えられた。

これまで示した結果から、K7405 と K7516 を組み合わせることで、唾液の A 型の判定と同時に分泌型・非分泌型の判定も可能となると考えられる。なお、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知られているが、ルイス抗原を持たない Le(a-b-) 型の場合は、ルイス抗原に基づく分泌型・非分泌型の推定ができない。しかしながら、K7405 および K7516 の認識する抗原構造はルイス式血液型物質とは無関係であり、Le(a-b-) 型であっても分泌型・非分泌型の識別が可能である。

結 語

分泌型唾液と非分泌型唾液をそれぞれ免疫して得られた反応特性の異なる抗体を組み合わせることで、吸収試験、ELISA および MCAR 法によって、唾液の 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。

文 献

- 1) Ohmori T, Iwanari H, Aoi R, Shiraishi T, Ito Y and Sato H: Monoclonal antibodies against blood group A secretors and non-secretors saliva. *Hybridoma and Hybridomics* **22**, 183-186 (2003).
- 2) 科学警察研究所編：血清学的物体検査法。pp. 175-176, 科学警察研究所, 東京 (1974).
- 3) 科学警察研究所編：血清学的物体検査法。pp. 173-175, 科学警察研究所, 東京 (1974).
- 4) 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。鑑識科学 **6**, 11-20 (2001).
- 5) 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).
- 6) 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—ブラインドテストによる評価—。法医学の実際と研究 **44**, 85-88 (2001).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) Koda Y, Soejima M and Kimura H: The polymorphisms of fucosyltransferases. *Legal Medicine* **3**, 2-14 (2001).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) Wu AM, Csako G and Herp A: Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Mol. Cell. Biochem.* **137**, 39-55 (1994).