ELISA を応用したアミラーゼ検出による 唾液の法医学的検査に関する研究

佐々木 晃 一

日本大学歯学部法医学教室 (指導: 竹井哲司教授)

[受付: 昭和60年1月17日]

Forensic examination for amylase detection by ELISA

Koichi Sasaki

*Department of Legal Medicine, Nihon University School of Dentistry
1-8, Surugadai, Kanda, Chiyoda-ku, Tokyo, JAPAN (101)*

(Director: Tetsuji Takei)

[Accepted for publication: January 17, 1985]

Key words: amylase / enzyme-linked immunosorbent assay / forensic immunology / saliva

Abstract: In forensic examination of saliva and saliva stains, the author tried to detect only human salivary amylase by ELISA. The results obtained were as follows:

Rabbit anti-human salivary amylase antibody absorbed by human red cells was diluted 1 : 200 in PBS containing 1 % horse serum. It was effective in differentiating human saliva from human body fluids and animal saliva except monkeys.

By ELISA high amylase activity saliva with the same dilution ratio tended to show darker hue than low activity saliva.

Attempts at detection of human salivary amylase were performed on various saliva stains and human body fluid stains after they were incubated 24 hours under room temperature. It was possible to detect human salivary amylase in human saliva stain samples which were the size of 2×2 mm (about 0.5 μ l saliva samples had been attached). Negative results were obtained, however, from all animal saliva stain samples and human body fluid samples except human saliva stain samples.

Human saliva stain samples preserved under various conditions were periodically examined. It was recognized that human salivary amylase preserved under low temperature was more detectable for a long time.

Amylase was detected from old saliva stains which had been preserved in the room for two years. The amylase detection was possible from the samples with high amylase activity saliva.

緒 言

唾液および唾液斑の証明は、法医鑑識上の物体検査のひとつとして、血液および血痕について重要である。その証明法としては、酵素学的検査および血清学的検査など種々の方法が考案されている¹⁻¹⁰⁾。一般的には、唾液のアミラーゼを指標とした酵素学的検査法が、現在広く利用されている。

当教室では山内⁷⁾が、唾液アミラーゼの検出に Blue starch 法を応用したのを初めとして、三輪⁸⁾

は、唾液および唾液斑からのアミラーゼ検出に Blue starch 法を agarose 平板に応用し、また与那城¹⁰⁾は、洗滌下における唾液斑からのアミラーゼの検出について報告している。さらに向山⁹⁾は、抗分泌型 IgA 抗体を利用して、唾液の分泌型 IgA の検出をすることにより、唾液斑の証明が可能であることを報告している。しかし Blue starch agarose 平板法では、脾液、血清および尿などの唾液以外の体液や、また動物唾液でも陽性反応を示し、さらに抗ヒト分泌型 IgA 抗体を利用した証明法では、血痕、精液斑、乳汁斑などの体液

の分泌型 IgA と交差反応を示すことから、ヒト唾液のみを鑑別する微量測定法の開発が望まれる。

近年、高感度で特異性の高い微量測定法として、radioimmunoassay (RIA)^{11,12)} が開発され、広く利用されている。しかし、ラジオアイソトープの取り扱い上種々の制約があることから、RIAにかわる測定法として、Engvall & Perlmann により ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)^{13,14)} が開発された。ELISA は、測定すべき抗原あるいは抗体に、酵素標識抗体あるいは抗原を反応させてその酵素活性から抗原あるいは抗体の定量をおこなう方法であり、現在多方面にわたり利用されている¹⁵⁻¹⁸⁾。この方法は法医学の分野でも応用されており、すでに人血あるいは精液の証明¹⁹⁻²³⁾、唾液斑からの血液型の判定²⁴⁾およびリンパ球上の HLA 抗原の検出²⁵⁾などについての報告がなされている。しかし唾液あるいは唾液斑に関しては、分泌型 IgA の検出²⁶⁻²⁸⁾ およびプロゲステロンの検出²⁹⁾などの報告が散見されるが、アミラーゼの検出について検討した報告はみあたらない。

そこで今回著者は、まずはじめにヒト唾液と、動物唾液およびヒト体液の鑑別、ならびにそれらの斑痕試料の鑑別を目的として、ELISA によるヒト唾液アミラーゼの検出が可能になるような抗体を得るために種々検討した。つぎに、得られた抗体を用いて、ELISA によるアミラーゼの検出を検討したところ、唾液および唾液斑の証明について法医学的に有効な方法であるとの知見を得たので以下に報告する。

材料および方法

1. 試料

1) 唾液および唾液斑

健康成人14名から食後約2時間後に、自然に流出する混合唾液を約5ml 採取した。1000×g で約15分間遠沈後、上清を限外ろ過 (Amicon microporous filter 0.2μm Amicon 社製) し、Blue starch 法によりアミラーゼ活性値を測定したのち、本実験に用いた (Table 1)。

唾液斑試料としては、アミラーゼ活性値に個人差のあることから、さきの14名の唾液のうちから

Table 1 Amylase activity of saliva by blue starch method

Sample No.	Amylase activity (IU/l)
1	1344000
2	792000
3	681600
4	387000
5	294400
6	292000
7	267000
8	241200
9	193200
10	144000
11	136000
12	106600
13	92800
14	27400

活性値の異なる5例を選択した。すなわち No. 1 No. 6, No. 10, No. 13, No. 14の試料をそれぞれ0.2ml ずつ、木綿さらし布 (40×40mm) に可及的にむらの生じないように滴下浸透させ、木綿さらし布唾液斑 (以下唾液斑試料とする) を作製し、24時間室内で保存後実験に用いた。またこれらを室温 (15~20℃)、孵卵器内 (37℃) および冷蔵庫内 (4~5℃) にそれぞれ保存し、経目的検索のための試料とした。

2) 唾液以外のヒト体液およびヒト体液斑

ヒト体液試料としては、健康成人の血清、尿、汗、精液、陰分泌液および乳汁を使用した。血清は静脈血を約5ml 採取し、いずれも遠心後 (1000×g 約15分間) 上清を分取した。精液および乳汁については遠心後 (1000×g 約15分間) 上清を、また陰分泌液は脱脂綿でふきとり、生理食塩液0.5ml で約24時間浸出し、その浸出液を試料とした。

これらの試料は Blue starch 法で、あらかじめアミラーゼ活性値の測定をおこなった。

各体液斑試料は、唾液斑試料作製の場合と同様に各体液0.2ml を木綿さらし布 (40×40mm) に滴下浸透させ、木綿さらし布体液斑 (以下体液斑試料とする) を作製し、室内で24時間放置後、実験に用いた。

3) 動物唾液および動物唾液斑

Fig. 1

ウマ、ブタ、イヌ、ヤギ、ネコ、ウシおよびサルの唾液を脱脂綿でふきとり、生理食塩液0.5m/で約24時間浸出し、その浸出液について Blue

starch 法でアミラーゼ活性値を測定後、本実験の試料（以下動物唾液とする）とした。

また動物唾液斑試料は、ヒト唾液斑試料と同様に作製し、室内で24時間放置後実験に用いた。

4) 陳旧ヒト唾液斑

アミラーゼ活性値既知の唾液で、本実験の唾液斑試料と同様の手技で作製し、室内で2年間放置した唾液斑試料6例を実験に用いた。

2. 抗体

1) 抗ヒト唾液アミラーゼ抗体

抗ヒト唾液アミラーゼウサギ抗体（Nordic 社製、以下抗アミラーゼ抗体とする）を用いた。この抗アミラーゼ抗体の種属および臓器特異性について種々の条件で、動物唾液およびヒト体液に対する反応を成績の項で述べるごとく検討した。

その結果、この抗体をO型ヒト赤血球で吸収後、1%ウマ血清（Cappel 社製）加0.01M pho-

Table 2 Cross-reactivity of animal saliva and human body fluids
Antibody was diluted 1 : 200 in PBS.

Human saliva			Animal saliva											
Sample No.	Dilution 20	Amylase activity IU/l	Sample	No.	Dilution									
					20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
1	卅	1344000	Horse	1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2	卅	792000		2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3	卅	681600		3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
4	卅	387000	Pig	1	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
5	卅	294400		2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6	卅	292000		3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
7	卅	267000	Dog	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	卅	241200		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	卅	193200		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	144000	Goat	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	卅	136000		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	卅	106600		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	92800	Cat	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	27400		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ox	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Monkey	1	卅	+	+	-	-	-	-	-	-	

ヒト唾液アミラーゼの検出は Voller ら³⁰⁾の方法に準じておこない、その手順を Fig. 1 に示した。

1) 抗原の固相は以下の方法によりおこなった。

唾液，体液および動物唾液は，まず0.05M carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6（以下 BCB とする）により20倍希釈した。さらにこの希釈液の倍数希釈系列を BCB により作り，これらを ELISA 用プレート（住友ベークライト社製 MS-3596F，以下プレートとする）の各 well に50 μ l ずつ分注し，2時間放置した。

唾液斑試料，体液斑試料，動物唾液斑試料 および陳旧唾液斑試料については，それぞれ 2×2 mm（唾液試料付着量約 $0.5 \mu\text{l}$ に相当）， 3×3 mm， 4×4 mm， 5×5 mm を切り取り，これらを各 well に入れ，さらに BCB を $50 \mu\text{l}$ ずつ分注

4. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

with anti-human salivary amylase antibody.

[illegible]

Table 3 Cross-reactivity of animal saliva and human body fluids
Antibody was diluted 1:200 in PBS containing 1% ho-

Human saliva			Animal saliva											
Sample No.	Dilution 20	Amylase activity IU/l	Dilution											
			Sample No.	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	
1	卅	1344000	Horse	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	卅	792000		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	卅	681600		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	卅	387000	Pig	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	卅	294400		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	卅	292000		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	卅	267000	Dog	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	卅	241200		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	卅	193200		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	+	144000	Goat	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	卅	136000		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	卅	106600		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	+	92800	Cat	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	+	27400		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Ox	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Monkey	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	

し、一昼夜放置した。

2) つぎに well 内の固相されなかった余剰試料を捨て、1% bovine serum albumin (Sigma 社製、以下 BSA とする) 加 PBS を 250 μ l ずつ加え20分間放置後、0.05% Tween 20加 PBS でプレートの各 well を4回洗滌(以後の「洗滌」はすべてこの手技による)した。

3) ついで各 well に抗アミラーゼ抗体を50 μ l ずつ分注し、2時間放置後洗滌をおこなった。

4) つぎにペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を50 μ l ずつ分注し、1時間放置後洗滌をおこなった。

5) つぎに反応基質を50 μ l ずつ分注し、暗所で20分間放置後、2N H₂SO₄ を50 μ l ずつ加えて反応を停止させた。

5. 判定方法

発色程度により(卅)、(卅)、(+), (±) および(-) に分類した。その判定基準は、 α -amylase (human saliva, 500units/ml Sigma 社製) を BCB で倍数希釈した液に対する、ELISA による発色程度を検討し、20~640 倍希釈での発色程度を(卅)、1280~2560倍希釈での発色程度を(卅)、5120~10240倍希釈での発色程度を(+)とした。また(卅)、(卅) および(+)を陽性とし、(±) および(-)を陰性とした。

なお陽性対照には α -amylase を、また陰性対照には BCB を用いた。

成 績

1. 抗体の特異性の検討結果

市販の抗アミラーゼ抗体を PBS にて200倍希釈し、ELISA による唾液、動物唾液および体液に対する交差反応について検討した結果を Table 2

with anti-human salivary amylase antibody.
rse serum.

Amylase activity IU/l		Human body fluids												Amylase activity IU/l
		Sample	No.	Dilution										
				20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	
20480	0	Serum	1	±	±	±	±	±	—	—	—	—	—	205
—	0		2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	163
—	0		3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	133
—	1116		4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	152
—	375		5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	141
—	650	Urine	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1358
—	0		2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	440
—	0		3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	480
—	0		4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	928
—	0		5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	588
—	0	Sweat	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
—	0		2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
—	0		3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
—	0		4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
—	0		5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
—	0	Semen	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
—	0	Vaginal secretion	1	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	0
—	6460	Milk	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0

に示した。唾液については14例すべてに陽性所見を認め、その発色程度は、(卅)～(+)であった。動物唾液については、イヌ、ヤギ、ネコ、ウシは全例陰性であったが、ウマ唾液では1280倍、ブタ唾液では640倍、そしてサル唾液では80倍希釈まで(+)の発色を認めた。体液については、血清No. 1については、痕跡程度の発色を認め、腺分泌液が160倍まで(+)を示したほかはすべて(—)であった。

そこで抗アミラーゼ抗体を1%ウマ血清加PBSで200倍に希釈し、唾液、動物唾液および体液に対する交差反応を検討した成績をTable 3に示した。唾液および体液については、抗体の無処理の場合と同様の成績であった。しかし動物唾液については、前回陽性反応を示したウマおよびブタ唾液がすべて陰性を示し、交差反応を阻止できたのに対し、サル唾液は80倍希釈したものまで

(+)の発色を認めた。

つぎに抗アミラーゼ抗体をO型ヒト赤血球で吸収後、1%ウマ血清加PBSで200倍に希釈し、その抗体の唾液、動物唾液および体液に対する交差反応を検討した結果をTable 4に示した。

腺分泌液に対する交差反応は痕跡程度となり、血清を含めてその他の体液についてはすべての例において陰性所見を得た。唾液は(卅)～(+)の範囲で全例陽性であり、動物唾液はサル唾液のみ陽性所見であった。

以上の成績より以後の実験には抗アミラーゼ抗体として、O型ヒト赤血球で吸収後、1%ウマ血清加PBSで200倍に希釈し、本実験に使用することにした。

2. 唾液のアミラーゼ活性値とELISAの発色程度との関係

被験唾液14例について、20倍希釈から最高20480

Table 4 Cross-reactivity of animal saliva and human body fluids
Antibody absorbed by human red cells was diluted 1:200

Human saliva			Animal saliva										
Sample No.	Dilution 20	Amylase activity IU/l	Sample No.	Dilution									
				20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
1	卅	1344000	Horse	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	卅	792000		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	卅	681600		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	卅	387000	Pig	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	卅	294400		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	卅	292000		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	卅	267000	Dog	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	卅	241200		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	卅	193200		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	144000	Goat	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	卅	136000		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	卅	106600		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	92800	Cat	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	27400		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Ox	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Monkey	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-

倍までの倍数希釈系列を作製し、ELISA により、ヒト唾液アミラーゼの検出をおこなったその成績を Table 5に示した。全体的には、希釈倍数が同じ場合は、アミラーゼ活性値の大なる唾液ほど発色が強く出現する傾向を認めた。

3. ELISA によるヒト唾液斑試料と、動物唾液斑試料およびヒト体液斑試料の鑑別

ELISA による唾液斑試料と、動物唾液斑試料および体液斑試料の鑑別をおこなった結果を Table 6に示した。

唾液斑試料については、唾液斑試料の多寡と ELISA の発色程度との間には明らかな関係は認められなかった。しかし同じ切り取り量の試料では、アミラーゼ活性値の大きい唾液のほうが発色程度は強い傾向を示した。

動物唾液斑試料についてはウマ、ブタ、イヌ、ヤギ、ネコ、ウシおよびサル唾液斑試料のいずれ

の試料からも、ELISA によるヒト唾液アミラーゼの陽性所見は認められなかった。

体液斑試料については、血清、尿、汗、精液、腔分泌液および乳汁斑試料のいずれの試料からも ELISA によるアミラーゼの陽性所見は認められなかった。

4. 各種保存条件下における唾液斑試料からのアミラーゼ検出に関する経日的検索

唾液斑試料5例について、室温(15~20°C)、孵卵器(37°C)および冷蔵庫内(4~5°C)で1週間から6週間保存し、2×2、3×3、4×4および5×5mmを切り取り、ELISAによるアミラーゼ検出の経日的変化を観察した。その成績を Table 7に示した。

唾液斑試料からのアミラーゼ検出は、経過日数が同じ試料では、アミラーゼ活性値の小さいものほど、また唾液斑試料の切り取り量の小さいもの

[illegible]

ELISA において固相担体への抗原あるいは抗体の吸着は、物理的な吸着と考えられているが²³⁾、それらを吸着させるための incubation 時間については、報告によりそれぞれ異なる^{20,21,24,}

Table 5 The relation between amylase activity of saliva and ELISA data

Sample No.	Dilution											Amylase activity (IU/l)
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	
1	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	+	+	±	—	1344000
2	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	+	+	—	—	792000
3	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	+	+	±	—	681600
4	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	+	+	±	—	—	387000
5	⦿	⦿	⦿	⦿	+	+	+	+	±	—	—	294000
6	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	+	+	±	—	—	292000
7	⦿	⦿	⦿	⦿	+	+	+	+	±	—	—	267000
8	⦿	⦿	⦿	+	+	+	+	+	+	—	—	241200
9	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	+	+	+	—	—	—	193200
10	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	144000
11	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	+	+	+	—	—	—	136000
12	⦿	+	+	+	+	+	±	—	—	—	—	106600
13	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	92800
14	+	+	+	+	±	±	—	—	—	—	—	27400

Table 6 Identification of saliva stains by ELISA

Saliva stains					Animal saliva stains					Human body fluid stains				
Sample No.	Size (mm)				Sample No.	Size (mm)				Sample No.	Size (mm)			
	2×2	3×3	4×4	5×5		2×2	3×3	4×4	5×5		2×2	3×3	4×4	5×5
1	⦿	⦿	⦿	⦿	Horse	1	—	—	—	Serum	1	—	—	—
6	⦿	⦿	⦿	⦿		2	—	—	—		2	—	—	—
10	+	+	+	⦿		3	—	—	—		3	—	—	—
13	+	+	+	+	Pig	1	—	—	—		4	—	—	—
14	+	+	+	+		2	—	—	—		5	—	—	—
						3	—	—	—	Urine	1	—	—	—
					Dog	1	—	—	—		2	—	—	—
						2	—	—	—		3	—	—	—
						3	—	—	—		4	—	—	—
					Goat	1	—	—	—		5	—	—	—
						2	—	—	—	Sweat	1	—	—	—
						3	—	—	—		2	—	—	—
					Cat	1	—	—	—		3	—	—	—
						2	—	—	—		4	—	—	—
						3	—	—	—		5	—	—	—
					Ox	1	—	—	—	Semen	1	—	—	—
						2	—	—	—	Vaginal secretion	1	—	—	—
					Monkey	1	—	—	—		1	—	—	—
						1	—	—	—	Milk	1	—	—	—

Table 7 Periodical detection of amylase from saliva stains

Saliva stains	Preservation	Size (mm)	Week				
			1	2	3	4	6
No. 1	Room	2×2	++	++	+	+	+
		3×3	++	++	+	+	+
		4×4	+++	++	++	++	++
		5×5	+++	++	++	++	++
	Incubator	2×2	++	++	+	+	+
		3×3	++	++	+	+	+
		4×4	+++	++	++	++	++
		5×5	+++	++	++	++	++
	Refrigerator	2×2	++	++	+	+	+
		3×3	++	++	++	++	++
		4×4	+++	++	++	++	++
		5×5	+++	++	++	++	++
No. 6	Room	2×2	++	++	++	+	+
		3×3	++	++	++	++	++
		4×4	++	++	++	++	++
		5×5	++	++	++	++	++
	Incubator	2×2	++	+	+	+	+
		3×3	++	++	+	+	+
		4×4	++	++	++	++	++
		5×5	++	++	++	++	++
	Refrigerator	2×2	++	++	++	++	++
		3×3	++	++	++	++	++
		4×4	++	++	++	++	++
		5×5	++	++	++	++	++
No. 10	Room	2×2	+	+	+	±	±
		3×3	+	+	+	+	+
		4×4	+	+	+	+	+
		5×5	+	+	+	+	+
	Incubator	2×2	+	+	+	±	±
		3×3	+	+	+	+	+
		4×4	+	+	+	+	+
		5×5	+	+	+	+	+
	Refrigerator	2×2	+	+	+	+	+
		3×3	+	+	+	+	+
		4×4	+	+	+	+	+
		5×5	+	+	+	+	+
No. 13	Room	2×2	+	+	+	-	-
		3×3	+	+	+	±	±
		4×4	+	+	+	+	±
		5×5	+	+	+	+	+
	Incubator	2×2	+	+	±	-	-
		3×3	+	+	±	±	±
		4×4	+	+	±	±	±
		5×5	+	+	±	±	±
	Refrigerator	2×2	+	+	+	+	±
		3×3	+	+	+	+	+
		4×4	+	+	+	+	+
		5×5	+	+	+	+	+
No. 14	Room	2×2	+	+	+	+	+
		3×3	+	+	+	+	+
		4×4	+	+	+	+	+
		5×5	+	+	+	+	+
	Incubator	2×2	+	+	±	±	±
		3×3	+	+	+	±	±
		4×4	+	+	+	+	±
		5×5	+	+	+	+	+
	Refrigerator	2×2	+	+	+	+	+
		3×3	+	+	+	+	+
		4×4	+	+	+	+	+
		5×5	+	+	+	+	+

^{27,33)}。勝又らは²⁴⁾、抗B血清のプレートへの固相化を室温で1時間、西田ら²⁷⁾は、抗ヒト α -鎖抗体のポリスチレンビーズへの固相化を4°Cで

晩、大島ら²⁰⁾は、ヒトヘモグロビンのポリスチレンビーズへの固相化を37°Cで2日間おこなっている。本実験で、唾液、動物唾液および体液をプレ

Table 8 Detection of amylase from old saliva stains

Sample No.	Size (mm)				Amylase activity (IU/l)
	2×2	3×3	4×4	5×5	
1	—	—	—	—	41000
2	—	—	—	—	64800
3	—	—	—	—	105200
4	—	—	—	—	114400
5	±	+	+	++	346400
6	+	++	++	++	518000

ートへ固相化するための incubation 時間を決定するにあたり、30分、1時間、2時間、3時間でそれぞれ検討したところ、2時間が最適であった。また唾液斑試料、動物唾液斑試料および体液斑試料については、検体の試料量が少ないための検出誤差を小さくする目的で、切り取った検体を直接プレートに入れ、次いで BCB を50 μ l 加えて、一昼夜放置することにより試料付着斑痕からの成分の浸出と固相化を同時におこなった。

ELISA には、このように抗原をプレートに固相化させる方法の他に、測定すべき抗原に対応する抗体を先に固相化させ、次いで抗原を反応させておこなう Sandwich 法^{15,18,34)}がある。この方法は測定すべき抗原以外の蛋白成分の影響を受けにくいという利点を有するが、著者の実験法にくらべ操作手順が一段加わり、さらに結果を得るまでに比較的時間を要する。

ELISA の判定法について、De Savigny ら³⁵⁾は ELISA の種々の測定法ならびにデータ表示法について検討をおこなっているが、定量を目的とした場合、吸光度による測定が一般的である。しかし法医鑑識上の実際では、まず唾液であるという証明が、第一に必要なことから、ヒト唾液アミラーゼの検出を発色の程度により(卅)、(++)、(+), (±) および (—) で、データの表示をおこなった。

今回、その抗アミラーゼ抗体を ELISA に用いるにあたり、そのヒト唾液アミラーゼに対する特異性を検討した。まず抗アミラーゼ抗体と動物唾液との反応を検討したところ (Table 2), イヌ、ヤギ、ネコ およびウシ唾液には交差反応が認めら

れなかったが、ウマ、ブタおよびサル唾液にはその反応が認められた。一方、Blue starch 法でアミラーゼ活性値を測定したところ、ブタおよびサル唾液には活性が認められたが、ウマ唾液では認められなかった。このように、ウマ唾液にアミラーゼ活性が認められないにもかかわらず、ELISA では1280倍希釈まで(+)の発色が認められたことは、ウマ唾液との交差反応には、アミラーゼ以外の他の成分が関係していると考えられた。

つぎに交差反応の阻止を目的として、抗アミラーゼ抗体を1%ウマ血清加 PBS で200倍に希釈して ELISA に用いることを試みた (Table 3)。その結果、ウマおよびブタ唾液との交差反応は阻止できた。しかしサル唾液との反応は、完全には阻止できなかった。血液試料の人獣鑑別については、原ら³⁶⁾らが抗ヒトヘモグロビン血清と各種動物血液との交差反応を検討したところ、サルとの反応が強くあらわれ、ヒトのみに特異性を示す抗体を作製することは困難であったと報告している。

つぎに抗アミラーゼ抗体のヒト体液に対する反応を検討したところ (Table 2, および3), 抗体を PBS で200倍に希釈した場合、および1%ウマ血清加 PBS で200倍に希釈した場合のどちらに対しても、ヒト血清の1例で痕跡程度の反応を、また腔分泌液で陽性反応が認められた。そこで抗アミラーゼ抗体を O型ヒト赤血球で吸収後、1%ウマ血清加 PBS で200倍に希釈し、ヒト体液に対する反応を検討した (Table 4)。その結果、ヒト血清との反応は阻止でき、また腔分泌液に対しては、痕跡程度を示す反応にとどめることができた。以上のことから、抗アミラーゼ抗体を O型ヒト赤血球で吸収後、1%ウマ血清加 PBS で200倍に希釈して使用することにより、ヒト唾液と、サル以外の動物唾液およびヒト体液の鑑別は可能と考えられる。

そこで抗アミラーゼ抗体を、O型ヒト赤血球で吸収後1%ウマ血清加 PBS で200倍に希釈して用いた ELISA の発色程度と、唾液のアミラーゼ活性値との関係を検討したところ (Table 5), 希釈倍数が同じ場合、全体的にはアミラーゼ活性値の大なる唾液ほど発色が強くあらわれる傾向にあっ

た。

ヒト唾液斑試料からのアミラーゼ検出は、試料作成1日後では、 2×2 mm (唾液試料付着量 $0.5 \mu\text{l}$ に相当)の切り取り量でも充分検出可能であった。なお動物唾液斑試料および体液斑試料については、すべて陰性の結果を得た (Table 6)。すなわち交差反応が認められたサル唾液および陰分泌液も、布地に付着して斑痕状態となった場合には、陰性を示した。三輪⁸⁾は、ヒト唾液と動物唾液との鑑別について、Blue starch agarose 平板法では、人獣鑑別は困難であるとし、向山⁹⁾は抗分泌型 IgA を用いた検査法で、唾液斑試料とヒト体液斑試料の鑑別は困難であったと報告している。しかし著者の実験方法では、唾液斑試料と、動物唾液斑試料および体液斑試料の鑑別は可能と考えられたが、本実験では少数例であるので、さらに検討を重ねる必要がある。

各種条件下に保存した唾液斑試料について、経日的にアミラーゼの検出をおこなったところ (Table 7)、冷蔵庫内保存が最も長期経過後まで検出が可能であり、ついで室温保存、孵卵器内保存の順であった。与那城¹⁰⁾は、Blue starch agarose 平板法で、経日的に唾液斑試料からのアミラーゼ検出をおこない、室温で15週間経過後からも検出が可能であったと報告している。本実験の結果からみると、室温以下の低温で保存された唾液斑試料では、唾液付着後4週間経過以前で、少なくとも 4×4 mm (唾液試料付着量約 $2 \mu\text{l}$ に相当)の試料量があれば、アミラーゼの検出が可能であるということがわかった。

結 論

ヒト唾液と、動物唾液およびヒト体液の鑑別ならびにそれらの斑痕試料の鑑別を目的とし、enzyme-linked immunosorbent assay をヒト唾液アミラーゼの検出に応用したところ以下の結論を得た。

抄録：著者は、法医鑑識上の唾液および唾液斑の物体検査において、ヒト唾液のみを鑑別する目的で ELISA を応用したヒト唾液アミラーゼの検出をおこなった。

抗ヒト唾液アミラーゼウサギ抗体を、O型ヒト赤血球で吸収後、1%ウマ血清加 PBS で200倍に希釈して用いることにより、ヒト唾液と、サル唾液以外の各種動物唾液および各種ヒト体液との鑑別に有効であった。

1. 抗ヒト唾液アミラーゼウサギ抗体を、O型ヒト赤血球で吸収後、1%ウマ血清加 PBS で200倍に希釈して用いることにより、ヒト唾液と、サル以外の各種動物唾液および各種ヒト体液との鑑別に有効であった。

2. 唾液の希釈倍数が同じ場合、アミラーゼ活性値の大なる唾液ほど ELISA の発色性は、強く出現する傾向にあった。

3. 各種唾液斑試料および体液斑試料を作製し、24時間室内に放置後、アミラーゼを検出したところ、ヒト唾液斑からは 2×2 mm (唾液試料付着量約 $0.5 \mu\text{l}$ に相当)の切り取り量からも充分検出が可能であったが、動物唾液斑および唾液以外のヒト体液斑については、いずれの試料からも陰性所見を得た。

4. 各種保存条件下におけるヒト唾液斑試料について、経日的に検討したところ、冷蔵庫内がもっとも長期間経過後まで検出可能であった。また室温以下で保存した場合、4週間経過以前で、少なくとも 4×4 mm (唾液試料付着量約 $2 \mu\text{l}$ に相当)の大きさであれば、全例検出可能と思われた。

5. 2年間、室温で保存した陳旧唾液斑からのアミラーゼの検出は、原唾液のアミラーゼ活性値が大であった例からは検出可能であった。

6. 以上のことから、唾液および唾液斑からのアミラーゼ検出に際し、抗ヒト唾液アミラーゼウサギ抗体を、O型ヒト赤血球で吸収後、1%ウマ血清加 PBS で200倍に希釈して、ELISA に応用することは、法医学上有意義であると考えられた。

謝辞：稿を終わるに臨み、懇切なる御指導、御校閲を賜った竹井哲司教授に深謝致します。本研究を進めるにあたり、御助力を頂きました法医学教室員各位に心から感謝致します。また、実技上御指導を下された科学警察研究所法医第2研究室向山明孝主任研究官に厚く御礼申し上げます。

唾液の希釈倍数が同じ場合、アミラーゼ活性値の大なる唾液ほど ELISA の発色性は、強く出現する傾向にあった。

各種唾液斑試料および体液斑試料を作製し、24時間室内に放置した後、ヒト唾液アミラーゼを検出したところ、ヒト唾液斑試料からは 2×2 mm (唾液試料付着量約 $0.5 \mu\text{l}$ に相当) の切り取り量からも充分検出が可能であったが、動物唾液斑試料および唾液以外のヒト体液斑試料については、いずれの試料からも陰性所見を得た。

各種保存条件下におけるヒト唾液斑試料について、経目的に検討したところ、低温保存の方が長期間経過後まで検出可能であることがわかった。

2年間、室内で保存した陳旧唾液斑からのアミラーゼ検出は、原唾液においてアミラーゼ活性値が大であった例からは検出可能であった。

文 献

- 1) 捨田利康：微量唾液痕の証明に関する研究 (I). 唾液の新しい微量検出法に就て。法医・鑑識並びに社会医学誌 2: 9-17, 1955.
- 2) 捨田利康：微量唾液痕の証明に関する研究 (II). 著者のマイクロ検出法による唾液痕の検査に就て。法医・鑑識並びに社会医学誌 2: 18-25, 1955.
- 3) 捨田利康：微量唾液痕の証明に関する研究 (III). 著者の唾液痕マイクロ検出法と、唾液痕の新旧度及び附着物体の差異。法医・鑑識並びに社会医学誌 2: 82-95, 1955.
- 4) 片田江俊彦, 石松伸也：沈降反応による人唾液の証明に関する研究。科学と捜査 10: 170-175, 1957.
- 5) 吉田一美：法医学的物体検査、特に微量の血痕、唾液斑及び精液斑の検出について (II) 唾液及び唾液斑の微量検出法について。長崎医誌 35: 30-36, 1959.
- 6) 神田瑞穂, 柳 孝枝：唾液斑の簡易検出法について。科警研報告 14: 294-300, 1961.
- 7) 山内英央：唾液の法医学的研究 (I) Blue starch 法によるアミラーゼ活性値測定に関する基礎的研究。日大歯学 54: 415-422, 1980.
- 8) 三輪純吉：唾液の法医学的研究 (III) Blue starch agarose 平板法による唾液定性試験に関する基礎的研究。日大歯学 56: 413-419, 1982.
- 9) 向山レイ：抗分泌型 IgA 抗体を利用した唾液斑検査に関する研究。日大歯学 56: 420-428, 1982.
- 10) 与那城智：唾液の法医学的研究 (IV) 各種材質付着唾液斑および洗滌処理後の唾液斑からのアミラーゼ検出および血液型判定。日大歯学 57: 648-657, 1983.
- 11) Yalow, R.S. and Benson, S.A.: Assay of insulin in human subjects by immunological method. Nature 184: 1648-1649, 1959.
- 12) 齊藤史郎：ラジオイムノアッセイ。臨床病理臨時増刊特集 53: 18-36, 1983.
- 13) Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G, Immunochemistry 8: 871-874, 1971.
- 14) Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA (III) quantitation of specific in antigen-coated tubes. J. Immunol. 109: 129-135, 1972.
- 15) 宮井 潔：エンザイムイムノアッセイ。臨床検査 22: 1219-1229, 1978.
- 16) 中村敏男, 横田 博：C1q solid-phase enzyme immunoassay による流血中 Immune complex の測定。臨床免疫 14: 92-100, 1982.
- 17) 松永清二, 井上武志, 遠藤雄一, 大滝幸哉：マイクロプレート光度計を用いた血清 IgE の酵素免疫法。臨床検査 27: 90-93, 1983.
- 18) 北川常広：薬物の酵素免疫分析系の組み立て。臨床検査 28: 889-896, 1983.
- 19) Tamaki, Y. and Kishida, T.: Identification of human blood-stains by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Jpn. J. Legal Med. 37: 84-87, 1983.
- 20) 大島美奈子, 原 三郎：ヘモグロビン吸着ビーズ使用酵素免疫測定法による人血の証明法、人・獣鑑別に関する法医学免疫学的研究第16報。日法医誌 38: 170-176, 1984.
- 21) 大島美奈子, 原 三郎：ヘモグロビン吸着ビーズ使用酵素免疫測定法による人血証明法 (続) 人・獣鑑別に関する法医学免疫学的研究第17報。日法医誌 38: 403-409, 1984.
- 22) 津田亮一, 原 三郎, 佐川公燭： γ -seminoprotein に対するモノクローナル抗体 (GS-2 抗体) 結合ビーズと酵素標識 γ -Sm 抗体とを用いた Sandwich ELISA による精液検査、体液・分泌液の法医学免疫学的研究第23報。日法医誌 38: 83-87, 1984.
- 23) Kloosterman, A.D., Pouw-arnou, M. and Persijn, J.P.: Comparison of enzyme assay and radioimmunoassay for measurement of human acid phosphatase in case of sexual assault. Forensic Sci. Int. 25: 45-55, 1984.
- 24) Katsumata, Y., Sato, M., Tsutsumi, H. and Yada, S.: A novel method for ABO grouping of mixed stains of saliva using enzyme-

- linked immunosorbent assay (ELISA). *Act. Crim. Jpn.* **50** : 167-172, 1984.
- 25) Lansdorp, P.M., Oosterhof, F., Astaldi, G. C.B. and Zeijlemaker, W.P.: Detection of HLA antigen on blood platelets and lymphocytes by means of monoclonal antibodies in an ELISA technique. *Tissue Antigen* **19** : 11-19, 1982.
- 26) Johnson, R.B. and Liu, J.: The application of enzyme immunoassay to the study of salivary IgA. *J. Immunoassay* **3** : 73-89, 1982.
- 27) 西田敏信, 林 良夫, 吉田秀夫, 佐藤光信, 小阪昌明, 斎藤史郎：唾液分泌型 IgA の酵素免疫測定法とその臨床的意義. *医学のあゆみ* **129** : 767-770, 1984.
- 28) 高橋 勉：Enzyme-immunoassay 法によるヒト唾液中分泌型 IgA の測定について. *日大歯学* **58** : 627-635, 1984.
- 29) Tallon, D.F., Gosling, J.P., Buckley, P.M., Dooley, M.M., Cleere, W.F., O'Dwyer, E. M. and Fottrell, F.: Direct solid-phase enzyme immunoassay of progesteron in saliva. *Clin. Chem.* **30** : 1507-1511, 1984.
- 30) Voller, A. and De Savigny, D.: Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), *Techniques in Clinical Immunology* 2nd edn., p. 157-169, Blackwell, Oxford, 1981.
- 31) 南嶋洋一：ELISA. *臨床検査* **25** : 966-974, 1981.
- 32) 武田久雄：標識抗体法. *臨床検査* **25** : 975-982, 1981.
- 33) 向島 達：Enzyme-immunoassay 法. *最新医学* **36** : 887-893, 1981.
- 34) Voller, A., Bidwell, D. and Bartlett, A.: Microplate enzyme immunoassay for the immunodiagnosis of virus infection in *Manual of Clinical Immunology* (Rose, N.R. and Friedman), p. 506-512, American Society for Microbiology, Washington DC, 1976.
- 35) De Savigny, D. and Voller, A.: The communication of ELISA data from laboratory to clinician. *J. Immunoassay* **1** : 105-128, 1980.
- 36) 原 三郎, 井上徳治, 大島美奈子, 津田亮一, 福山 武, 壹岐裕志：ヒト Hb (溶血液, HbA₀, グロビン, α 鎖, β 鎖) 免疫血清における主反応, 副反応について, 人・獣鑑別に関する法医学的研究第8報. *日法医誌* **36** : 335-343, 1982.