サンドイッチ ELISA による A 型・B 型混合唾液と AB 型唾液との識別およびそれらの斑痕試料の 識別と血液型抗原の定量

大 場 有 一

日本大学歯学部法医学教室（主任：竹井哲司教授）

〔受付：平成元年12月5日〕

Differentiation of group AB from mixtures of group A
and B in saliva and saliva stains, and the quantitative
analysis of blood group antigen by sandwich ELISA

Yuichi Ohba

*Department of Legal Medicine, Nihon University School of Dentistry
1-8-13, Surugadai, Kanda, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan (101)*

(Chief: Prof. Tetsuji Takei)

〔Accepted for publication: December, 5, 1989〕

Key word: forensic immunology / ABO blood-group system / saliva stains / Enzyme-linked immunosorbent assay / monoclonal antibodies

Abstract: Differentiation of group AB saliva stains from mixed stains of group A and B saliva, and the quantitative determination of blood group antigen in the saliva stains were investigated by sandwich ELISA method.

γ -globulin fractions of rabbit anti-A serum and goat anti-B serum were used as the primary antibody: monoclonal anti-A and anti-B reagents as the secondary antibody, and goat anti-mouse IgM horseradish peroxidase conjugate as the tertiary antibody.

In mixed stains of group A and B, only A blood group antigen was detected in the rabbit anti-A-coated plate and only B blood group antigen was detected in the goat anti-B-coated plate. While, in group AB saliva stains, approximately the same amount of A and B blood group antigens were detected in the anti-A- and anti-B-coated plates. These results were observed both in secretor and non-secretor samples.

From the above it was possible to differentiate of group AB saliva stains from mixed stains of group A and B saliva clearly.

By the use of monoclonal antibodies as the secondary antibody, background levels in the ELISA were extremely low.

By the use of a computer system and calibration curves of A and B blood group substances, it was possible to quantify automatically the levels of blood group antigens in the saliva stains.

緒 言

法医鑑識における物体検査の中で、血液や唾液などの体液およびそれらの斑痕からの血液型検査は重要である。その際、対象となる試料は、犯罪状況によっては複数人の体液が混在している場合もあり、検出された血液型抗原をそのままの型として信用することはできない。

たとえば、A型とB型の体液が混在している場合、従来から行なわれている吸収試験法および解離試験法を用いると、A型抗原ならびにB型抗原がともに検出され、その結果AB型と判定されてしまうことになる。すなわち、A型とB型の体液が混合しているものなのか、あるいは真にAB型の体液であるのかを識別する必要がある。

その識別法については、これまでいくつかの報告がある。Yuasa¹⁾は、免疫沈降法と凝集阻止試験法を併用して、またSagisakaら²⁾は型的二重結合法の改良法を用いて、唾液および精液について検討している。さらに、青木ら³⁾は解離法変法を用いて、血痕について検討している。しかし、これらの方法はいずれも血球の凝集反応を肉眼によって観察し判定を行なうことから、検査者の主観が入りやすく、その結果に対する評価が疑問視される場合もあり、また常に新鮮な作用血球が必要であることなど、いくつかの問題点がある。

Engvall and Perlmann^{4,5)}によって開発されたELISAは、検査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、最終的には発色基質で抗原抗体反応物を発色させ、分光光度計で吸光度(OD)を測定して判定するため、客観的な判定が可能となり、また作用血球を必要としないことから法医学の分野で広く用いられている⁶⁻²⁰⁾。

Katsumataら⁶⁾は唾液に、佐藤ら⁷⁾は唾液および精液にサンドイッチELISAを応用して、A型およびB型の混合体液とAB型体液との識別について検討している。しかし、彼らは分泌型(以下、Se型)の試料についてのみの検討であり、非分泌型(以下、se型)の試料については検討していない。また、二次抗体としてポリクローナル抗体を用いていることなどから、backgroundが比較的

高く検出されるなど、改良すべき点がいくつか残されていた。

そこで著者は、A型とB型の混合唾液斑(以下、A型、B型混合唾液斑)とAB型唾液斑の識別を試みるにあたって、血液型判定用抗Aおよび抗B血清を固相化したプレート、そしてモノクローナル抗Aおよび抗B抗体を用いたサンドイッチELISAにより、まずはじめにA型・B型混合唾液とAB型唾液との識別をSe型およびse型について検討し、さらに血液型抗原価の測定を行なった。つぎに、これらの唾液斑の識別について検討し、血液型抗原の定量を試みたところ、法医学的に意義ある知見を得たので以下に報告する。

材料および方法

1. 唾液

A型70名、B型67名およびAB型32名の成人男女計169名から、安静時全唾液(以下、唾液)を試験管に採取した。これらの唾液を1000×gで10分間遠心分離した後、上清を限外ろ過(Amicon microporous Filter 0.2μm, AMICON社製)し、試料とした。

唾液のSe型およびse型の区別は、凝集阻止試験法²¹⁾により行なった。

A型・B型混合唾液は、各型の唾液をそれぞれ等量ずつ組み合わせ、4種類の試料を作製した。すなわち、ASe型とBSe型を組み合わせた混合唾液38例、Ase型とBse型の組み合わせ18例、ASe型とBse型の組み合わせ19例およびAse型とBse型の組み合わせ18例の4種類である。合計試料数は93例である。

2. 唾液斑

唾液斑の作製には、A型・B型混合唾液は上記の組み合わせから5例ずつ合計20例、AB型唾液はSe型5例、se型5例合計10例を用いた。

これらの唾液10μlずつを、5×5mmの木綿さらし布およびタバコ(MILD SEVEN)の吸い口紙に、可及的にむらの生じないように滴下浸透させ、唾液斑とした。これらの試料を、1, 2, 3および6カ月間室温放置し、実験に供した。

試料をサンプリングチューブに入れ、0.01 M phosphate-buffered saline pH 7.2 (GIBCO社

製, 以下 PBS) を $300\mu\text{l}$ 加えて, 軽くほぐし, 5 分間放置後, $1000\times g$ で 10 分間遠心し, その上清を唾液斑試料の抽出原液とした。さらに, high dose hook effect を考慮して⁸⁾, 抽出原液の 10 倍および 100 倍希釈液を作製した。

また, 各試料の対照試料として唾液未付着の木綿さらし布およびタバコの吸い口紙を使用した。

3. 標準血液型物質

ヒト胃粘膜内層より, ペプシン消化フェノール抽出法²³⁾によって精製された A 型および B 型物質を用いた。

4. 抗体

ELISA プレートへ固相化するための一次抗体は, 血液型判定用抗 A および抗 B 血清 (武田薬品工業社製, 以下ポリクローナル抗 A および抗 B 抗体) を硫酸分画法²³⁾により精製して用いた。なお, 精製後のタンパク濃度を Lowry 法²⁴⁾で測定したところ, ポリクローナル抗 A 抗体は 5.1mg/ml , 抗 B 抗体は 5.9mg/ml であった。

二次抗体は血液型判定用モノクローナル抗 A 抗体 (DAKO 社製 Lot 076) およびモノクローナル抗 B 抗体 (Eurobio 社製 Lot 0031) を用いた。これらの抗体はいずれもマウス IgM タイプである。

三次抗体は horseradish peroxidase 標識ヤギ抗マウス IgM 抗体 (TAGO 社製, 以下 HRP 標識抗体) を用いた。

A 型および B 型抗原の検出感度を一定にするために, 阻止価の等しい ASe 型および BSe 型の 100 倍希釈唾液を用いて, ELISA に使用する各種抗体の希釈率を $n\times n$ 乗法で検討した。その結果, ポリクローナル抗 A 抗体は 40 倍, 抗 B 抗体は 20 倍, モノクローナル抗 A 抗体は 400 倍, 抗 B 抗体は 100 倍, そして HRP 標識抗体は 500 倍に希釈した場合に良好な成績が得られたので, この希釈率を使用することとした。なお, ポリクローナル抗 A および抗 B 抗体の希釈は, 0.05M bicarbonate-carbonate buffer pH 9.6 (以下, BCB) で, モノクローナル抗 A および抗 B 抗体の希釈は PBS で, HRP 標識抗体の希釈は 0.05% Tween 20 (和光純薬社製) を含む PBS (以下, Tween-PBS) で行なった。さらに Tween-PBS には normal goat serum (TAGO 社製) を 1% の割合で加えた。

Fig. 1 Procedure of sandwich ELISA-HRP method for differentiation of group AB saliva from mixtures of group A and B saliva. All incubation steps were preformed at 37°C .

5. 反応基質液

o-phenylenediamine (SIGMA 社製) 10mg を, 0.1M Tris-HCl buffer pH 7.6 20ml および 3% H_2O_2 $40\mu\text{l}$ で用時調製して, 実験に用いた。

6. サンドイッチ ELISA

A 型・B 型混合唾液と AB 型唾液の識別およびそれぞれの唾液斑の識別に用いた, サンドイッチ ELISA の手順を Fig. 1 に示した。

1) ELISA プレートの各ウェルに, 希釈調製したポリクローナル抗 A および抗 B 抗体を $100\mu\text{l}$ ずつ分注し, 37°C 30 分間放置し, 固相化させた (以下, 抗 A 抗体を固相化したプレートを抗 A プレート, 抗 B 抗体を固相化したものを抗 B プレートとする)。試料 1 検体について, 抗 A および抗 B プレートいずれも, モノクローナル抗 A および抗 B 抗体を加えたもの 2 例ずつ合計 4 例で検査を行なった。なお, ELISA プレートは, 数種類の市販品について検討した結果, EIA フラットプレート II (三光純薬社製) を用いた。

2) ウェルに固相化されなかった余剰の抗体を

捨て、1% bovine serum albumin (SIGMA 社製)を含むPBS (以下、BSA-PBS)を250 μ lずつ分注し、37°C 1時間ブロッキングを行なった。

つぎに、Tween-PBS で5回洗浄した (以後、洗浄はこの操作による)。

3) 試料を抗Aおよび抗Bプレートの2列にそれぞれ50 μ lずつ分注し、37°C 30分間反応させた後、洗浄した。

4) 抗Aおよび抗Bプレートにそれぞれ希釈調製したモノクローナル抗Aおよび抗B抗体を50 μ lずつ分注し、37°C 30分間反応させた後、洗浄した。

5) 希釈調製した HRP 標識抗体を50 μ lずつ分注し、37°C 30分間反応させた後、洗浄した。

6) 反応基質液を50 μ lずつ分注し、37°C 30分間暗所で反応させた後、2N H₂SO₄を50 μ lずつ加えて反応を停止させた。

判定は、Immuno Reader NJ-2000型 (Inter Med 社製)を用いて、490nm (対照405nm)におけるODを測定した。なお、血液型抗原の検出基準値は、複数の非対応抗原を測定したところ、そのOD値は常に0.025未満であったので、判定にあたっては、さらに確実性を考慮して、OD 0.050を越えた場合を陽性とした²⁵⁾。

7. A型、B型およびAB型唾液とA型・B型混合唾液中の血液型抗原価の測定

A型、B型およびAB型唾液とA型・B型混合唾液をPBSで100倍希釈し、つぎにこれらの2倍連続希釈系列を作製し、サンドイッチELISAを行なった。陽性を示す最大希釈倍数をもってその唾液を抗原価とした。

8. A型・B型混合唾液斑とAB型唾液斑の血液型抗原の定量

血液型抗原量の単位は、標準血液型物質の凝集阻止価をもとにしてunit (U)で表わした。すなわち、凝集素価8倍の血液型判定用抗体を阻止するのに必要な最少標準血液型物質量を1Uとした。なお1Uは、A型およびB型物質ともに0.125 μ g/mlであった。

唾液斑の抽出液についてサンドイッチELISAを行ない、Immuno Reader とパーソナルコンピュータ PC-9801VX (NEC 社製)、さらに血液型

判定用ソフト (Inter Med 社製)を用いて定量した。このとき得られた値 (U)を単位面積あたりの量に換算した。すなわち、5 $\times$ 5mmの斑痕試料をPBS 300 μ lで抽出し、そのうちの50 μ lを用いたので、0.24 (1/25 $\times$ 300/50)を乗じた値を斑痕試料の定量値 (U/mm²)とした。

Fig. 2 Titers of blood group antigens in saliva by the ELISA using anti-A coated plate
● : ASe, ○ : Ase, ▲ : ABSe, △ : ABSe
U : Undetected

Fig. 3 Titers of blood group antigens in saliva by the ELISA using anti-B coated plate
■ : BSe, □ : Bse, ▲ : ABSe, △ : ABSe
U : Undetected

Table 1 Titers of blood antigens in group AB saliva by the ELISA

Sample number	Maximum dilution giving a positive reaction ($2^n \times 10^2$)			
	Anti-A coated plate		Anti-B coated plate	
	MC* anti-A	MC anti-B	MC anti-A	MC anti-B
No. 1	6	6	6	6
No. 2	6	6	7	7
No. 3	6	6	7	7
No. 4	7	7	7	7
No. 5	7	7	7	7
No. 6	7	7	7	7
No. 7	7	7	7	7
No. 8	7	7	7	7
No. 9	8	8	7	7
No. 10	8	7	7	7
No. 11	8	8	8	8
No. 12	8	8	8	8
No. 13	8	8	8	8
No. 14	8	8	8	8
No. 15	8	8	8	9
No. 16	9	9	9	9
No. 17	9	9	9	9
No. 18	10	10	10	10
No. 19	10	10	10	10
No. 20	10	10	10	10
No. 21	10	10	10	10
No. 22	11	11	11	11
No. 23	2	2	2	2
No. 24	2	2	2	2
No. 25	2	3	4	4
No. 26	3	2	3	2
No. 27	3	3	3	3
No. 28	4	4	4	4
No. 29	4	4	5	5
No. 30	5	5	5	5
No. 31	6	6	6	6
No. 32	6	6	6	6

*: Monoclonal antibody

No. 1-No. 22: Se type

No. 23-No. 32: se type

結 果

I. A 型・B 型混合唾液と AB 型唾液との識別および血液型抗原価の測定

1. A 型, B 型および AB 型唾液中の血液型抗原価の測定

唾液169例についてサンドイッチ ELISA を行ない, A 型, B 型および AB 型唾液中の血液型抗原価を測定した。

抗 A プレートを用いた場合の A 型唾液の A 型抗原価と, AB 型唾液の A 型および B 型抗原価を Fig. 2 に示した。A 型唾液の A 型抗原価は, Se

Table 2 Titers of blood group antigens in saliva by the ELISA

Blood group	Number tested	Detected antigen	Maximum dilution giving a positive reaction		
			Mean values	Max. values	Min. values
ASe	52	A *	25,600	102,400	1,600
Ase	18	A *	1,600	6,400	200
BSe	48	B **	25,600	204,800	6,400
Bse	19	B **	1,600	6,400	200
ABSe	22	A *	25,600	204,800	6,400
		B *	25,600	204,800	6,400
		A **	25,600	204,800	6,400
		B **	25,600	204,800	6,400
ABse	10	A *	1,600	6,400	400
		B *	1,600	6,400	400
		A **	1,600	6,400	400
		B **	1,600	6,400	400

* : Anti-A coated plate

** : Anti-B coated plate

型では $2^4 \times 10^2$ (1,600) から $2^{10} \times 10^2$ (102,400) であり, se 型では 2×10^2 (200) から $2^6 \times 10^2$ (6,400) であった。AB 型唾液の A 型および B 型抗原価は, ほぼ等しく, Se 型では $2^6 \times 10^2$ (6,400) から $2^{11} \times 10^2$ (204,800) であり, se 型では $2^2 \times 10^2$ (400) から $2^6 \times 10^2$ (6,400) であった。

抗 B プレートを用いた場合の B 型唾液の B 型抗原価と, AB 型唾液の A 型および B 型抗原価を Fig. 3 に示した。B 型唾液の B 型抗原価は, Se 型では $2^6 \times 10^2$ (6,400) から $2^{11} \times 10^2$ (204,800) であり, se 型では 2×10^2 (200) から $2^6 \times 10^2$ (6,400) であった。AB 型唾液の A 型および B 型抗原価は, ほぼ等しく, Se 型では $2^6 \times 10^2$ (6,400) から $2^{11} \times 10^2$ (204,800) であり, se 型では $2^2 \times 10^2$ (400) から $2^6 \times 10^2$ (6,400) であった。

AB 型唾液32例について, 抗 A プレートにおける A 型および B 型抗原価と, 抗 B プレートにおける A 型および B 型抗原価を Table 1 に示した。その結果, 抗 A プレートにおける A 型および B 型抗原価と, 抗 B プレートにおける A 型および B 型抗原価がすべて等しかった例数は24例であった。抗原価の異なったのは8例であり, その違いは, 1 段階ないし2段階であった。

つぎに, A 型, B 型および AB 型唾液中の血液

型抗原価の平均値, 最大値および最小値を Table 2 に示した。A 型および B 型唾液の抗原価の平均値は Se 型では25,600, また se 型では1,600であり, ASe 型と Ase 型における A 型抗原価ならびに BSe 型と Bse 型における B 型抗原価の割合は, ともに16 : 1 であった。AB 型唾液の場合, A 型および B 型抗原価の平均値は, 抗 A プレートおよび抗 B プレートにおいてすべて等しく, Se 型では25,600, また se 型では1,600であり, ABSe 型と ABse 型における A 型および B 型抗原価の割合は, いずれも16 : 1 であった。

2. A 型・B 型混合唾液と AB 型唾液との識別

1) ASe 型・BSe 型混合唾液と, ABSe 型唾液の血液型抗原の検出

ASe 型・BSe 型混合唾液38例と, ABSe 型唾液22例について ELISA を行ない, その反応パターンの1例を Fig. 4-a および b に示した。

抗 A プレート (Fig. 4-a) において A 型・B 型混合唾液の反応は, モノクローナル抗 A 抗体に対して A 型抗原では原液で最大の OD 値を示し, 以後唾液の希釈倍数にしたがって漸次下降し, 6,400 倍希釈まで陽性であった。非対応抗原である B 型抗原の反応はほとんど認められず, OD 値は常に 0.025 未満であった。一方, AB 型唾液の反応は,

a. Anti-A coated plate

b. Anti-B coated plate

Fig. 4 Reaction curves of blood group antigen in group AB saliva and mixtures of group A and B saliva by the ELISA

— : Monoclonal anti-A, : Monoclonal anti-B
 ● : ASe+BSe, ▲ : ABSe

a. Anti-A coated plate

b. Anti-B coated plate

Fig. 5 Reaction curves of blood group antigen in group AB saliva and mixtures of group A and B saliva by the ELISA

— : Monoclonal anti-A, : Monoclonal anti-B
 ○ : Ase+Bse, △ : ABse

モノクローナル抗Aおよび抗B抗体に対して、A型およびB型抗原がともに200倍で最大のOD値を示し、以後希釈倍数にしたがって漸次下降し、A型およびB型抗原ともに25,600倍希釈まで陽性であった。また、各希釈倍数におけるA型およびB型抗原のOD値は、比較的近似した値を示していた。

つぎに、抗Bプレート (Fig. 4-b) においてA型・B型混合唾液の反応は、モノクローナル抗B抗体に対してB型抗原では原液で最大のOD値を示し、以後希釈倍数にしたがって漸次下降し、12,800倍希釈まで陽性であった。非対応抗原のA型抗原のOD値は、常に0.025未満であった。一方、AB型唾液は、モノクローナル抗Aおよび抗B抗体に対してA型およびB型抗原がともに原液で最大のOD値を示し、以後希釈倍数にしたがってともに漸次下降し、A型およびB型抗原ともに25,600倍希釈まで陽性であった。またA型およびB型抗原のOD値は、抗Aプレートの場合と同様に、各希釈倍数において近似した値を示していた。

すなわちAB型唾液を検査した場合、抗Aプレートから検出されるA型およびB型抗原のOD値と、抗Bプレートから検出されるそれらのOD値との間にはほとんど差はなく、抗原量はほぼ1:1の割合を呈することがわかった。

2) Ase型・Bse型混合唾液と、ABse型唾液の血液型抗原の検出

Ase型・Bse型混合唾液18例と、ABse型唾液10例についてELISAを行ない、その反応パターンの1例をFig. 5-aおよびbに示した。

抗Aプレート (Fig. 5-a) において、A型・B型混合唾液の反応は、モノクローナル抗A抗体に対してA型抗原では原液で最大のOD値を示し、以後希釈倍数にしたがって漸次下降し、1,600倍希釈まで陽性であった。非対応抗原であるB型抗原の反応はほとんど認められず、OD値は常に0.025未満であった。一方、AB型唾液の反応は、モノクローナル抗Aおよび抗B抗体に対してA型およびB型抗原がともに原液で最大のOD値を示し、以後希釈倍数にしたがって漸次下降し、A型およびB型抗原ともに3,200倍希釈まで陽性であった。また各希釈倍数におけるA型およびB型抗原の

OD値は、比較的近似した値を示していた。

つぎに、抗Bプレート (Fig. 5-b) においてA型・B型混合唾液の反応は、モノクローナル抗B抗体に対してB型抗原では原液で最大のOD値を示し、以後希釈倍数にしたがって漸次下降し、1,600倍希釈まで陽性であった。非対応抗原のA型抗原のOD値は、常に0.025未満であった。AB型唾液は、モノクローナル抗Aおよび抗B抗体に対してA型およびB型抗原がともに原液で最大のOD値を示し、以後希釈倍数にしたがってともに漸次下降し、A型抗原およびB型抗原ともに3,200倍希釈まで陽性であった。またA型およびB型抗原のOD値は、抗Aプレートの場合と同様に、各希釈倍数において近似した値を示していた。

これらのことからAB型唾液を検査した場合、抗Aプレートから検出されるA型およびB型抗原のOD値と、抗Bプレートから検出されるそれらのOD値との間にはほとんど差はなく、抗原量はほぼ1:1の割合を呈することがわかった。

以上のことから、Se型およびse型に関わらずA型・B型混合唾液の場合、抗AプレートではA型抗原のみ、また抗BプレートではB型抗原のみ

Fig. 6 Titers of blood group antigens in mixtures of group A and B saliva by the ELISA

O : ASe+BSe, X : Ase+BSe
 Δ : ASe+Bse, * : Ase+Bse
 U : Undetected

Table 3 Titers of blood group antigens in mixtures of group A and B saliva by the ELISA

Blood group	Number tested	Detected antigen	Maximum dilution giving a positive reaction		
			Mean values	Max. values	Min. values
ASe+BSe	38	A	12,800(25,600)	51,200(102,400)	800(1,600)
		B	12,800(25,600)	102,400(204,800)	3,200(6,400)
Ase+BSe	18	A	800 (1,600)	3,200 (6,400)	100 (200)
		B	12,800(25,600)	51,200(102,400)	3,200(6,400)
ASe+Bse	19	A	12,800(25,600)	51,200(102,400)	800(1,600)
		B	800 (1,600)	3,200 (6,400)	100 (200)
Ase+Bse	18	A	800 (1,600)	3,200 (6,400)	100 (200)
		B	800 (1,600)	3,200 (6,400)	100 (200)

Figures in parentheses represent titers of blood group antigens in original saliva

検出され、一方 AB 型唾液の場合は両方のプレートで A 型抗原および B 型抗原が検出されることがわかった。この違いにより、A 型・B 型混合唾液と AB 型唾液との識別は可能であった。なお、se 型の検出限界は Se 型のそれに比べて約 1/8 から 1/4 であった。

3. A 型・B 型混合唾液中の血液型抗原価の測定

A 型・B 型混合唾液中の血液型抗原価を測定した成績を Fig. 6 に示した。横軸には、抗 A プレートでの A 型抗原価、縦軸には抗 B プレートでの B 型抗原価を示した。ASe 型・BSe 型混合唾液 38 例 (○印) の場合、A 型抗原価は 800 から 51,200 で、B 型抗原価は 3,200 から 102,400 であった。Ase 型・BSe 型混合唾液 18 例 (×印) の場合、A 型抗原価は 100 から 3,200 で、B 型抗原価は 3,200 から 51,200 であった。ASe 型・Bse 型混合唾液 19 例 (△印) の場合、A 型抗原価は 800 から 51,200 で、B 型抗原価は 100 から 3,200 であった。Ase 型・Bse 型混合唾液 18 例 (*印) の場合、A 型抗原価は 100 から 3,200 で、B 型抗原価は 100 から 3,200 であった。

つぎに、A 型・B 型混合唾液中の血液型抗原価の平均値、最大値および最小値を Table 3 に示した。ASe 型・BSe 型混合唾液の場合、A 型抗原価の平均値は 12,800、B 型抗原価の平均値は 12,800 であった。Ase 型・BSe 型混合唾液の場合、A 型抗原価の平均値は 800、B 型抗原価の平均

値は 12,800 であった。ASe 型・Bse 型混合唾液の場合、A 型抗原価の平均値は 12,800、B 型抗原価の平均値は 800 であった。Ase 型・Bse 型混合唾液の場合、A 型抗原価の平均値は 800、B 型抗原価の平均値は 800 であった。

これらの A 型・B 型混合唾液の抗原価は、もとの唾液の 1/2 となった。また、Se 型および se 型同士の A 型・B 型混合唾液中における A 型および B 型抗原価の割合は、それぞれ 1 : 1 であった。そして Se 型と se 型の混合唾液の場合、Se 型の含有抗原価の割合が高く、その比は 16 : 1 であった。

II. A 型・B 型混合唾液斑と AB 型唾液斑との識別および血液型抗原の定量

1. A 型・B 型混合唾液斑と AB 型唾液斑との識別

ASe 型と BSe 型、Ase 型と BSe 型、ASe 型と Bse 型および Ase 型と Bse 型を組み合わせた混合唾液 20 例、ABSe 型と ABse 型唾液 10 例を木綿さらし布およびタバコの吸い口紙にそれぞれ付着させ、1, 2, 3 および 6 カ月間室温放置し、A 型・B 型混合唾液斑と AB 型唾液斑との識別について検討した。

ASe 型・BSe 型混合唾液斑および ABSe 型唾液斑の抽出原液、10 倍および 100 倍希釈液についての ELISA の結果の 1 例を Table 4 に示した。木綿さらし布を付着担体とした ASe 型・BSe 型混合唾液斑の場合 (Table 4-a)、いずれの放置期間においても抗 A プレートにおける A 型抗原は、

Table 4 Differentiation of group AB saliva stain from mixtures of group A and B saliva stain by the ELISA

		1			2			3			6 months		
		neat	×10	×100	neat	×10	×100	neat	×10	×100	neat	×10	×100
a. ASe+BSe (cotton gauze)	A-antigen*	1.03	0.39	0.06	1.09	0.39	0.09	0.99	0.38	0.16	0.86	0.38	0.08
	B-antigen*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	A-antigen**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B-antigen**	0.96	0.37	0.09	0.96	0.25	0.05	0.97	0.21	0.08	1.01	0.40	0.05
b. ASe+BSe (cigarette paper)	A-antigen*	0.99	0.33	0.06	0.99	0.22	0.05	0.98	0.36	0.06	0.84	0.34	0.05
	B-antigen*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	A-antigen**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B-antigen**	0.96	0.18	0.06	0.96	0.17	0.05	0.95	0.27	0.27	0.99	0.27	0.06
c. ABSe (cotton gauze)	A-antigen*	1.02	0.31	0.05	1.02	0.36	0.13	1.10	0.31	0.09	1.05	0.24	0.09
	B-antigen*	1.02	0.37	0.07	1.11	0.33	0.15	1.07	0.34	0.13	1.10	0.23	0.09
	A-antigen**	0.92	0.27	0.05	0.95	0.37	0.11	0.96	0.34	0.11	0.97	0.20	0.06
	B-antigen**	0.97	0.32	0.06	1.02	0.40	0.14	1.02	0.39	0.13	0.97	0.20	0.05
d. ABSe (cigarette paper)	A-antigen*	1.01	0.32	0.11	1.17	0.35	0.09	1.00	0.32	0.09	1.09	0.26	0.08
	B-antigen*	0.99	0.35	0.11	1.05	0.38	0.11	1.05	0.37	0.10	1.13	0.28	0.08
	A-antigen**	0.88	0.37	0.13	0.91	0.37	0.09	0.97	0.34	0.12	1.06	0.24	0.06
	B-antigen**	0.97	0.39	0.13	0.93	0.38	0.10	1.15	0.31	0.06	1.00	0.24	0.07

Figures represent OD (—: less than 0.025)

*: Anti-A coated plate

**: Anti-B coated plate

原液で最大の OD 値を示し、以後希釈倍数にしたがって漸次下降した。また抗BプレートにおけるB型抗原についても同様な所見が認められた。非対応抗原である抗AプレートにおけるB型抗原および抗BプレートにおけるA型抗原に対する反応はすべて OD 0.025未満であった。

また、各放置期間における希釈倍数の同じ条件について見ると、斑痕試料の OD 値はほとんど変化せず、ほぼ同程度の結果であった。

付着担体としてタバコの吸い口紙を用いた場合 (Table 4-b)、木綿さらし布の場合 (Table 4-a) とほぼ同様の結果を示した。

木綿さらし布を付着担体とした ABSe 型唾液斑の場合 (Table 4-c)、抗Aおよび抗BプレートにおけるA型およびB型抗原の OD 値は、いずれの放置期間においても、原液で最大の値を示し、以後希釈倍数にしたがって漸次下降した。また、各放置期間における各希釈倍数について見ると、抗Aプレートから検出されるA型およびB型抗原

のOD 値と、抗Bプレートから検出されるそれらの OD 値との間にはほとんど差はなく、抗原量はほぼ 1 : 1 の割合であった。

また、各放置期間における希釈倍数の同じ条件について見ると、斑痕試料の OD 値はほとんど変化せず、ほぼ同程度の結果であった。

付着担体としてタバコの吸い口紙を用いた場合 (Table 4-d)、木綿さらし布の場合 (Table 4-c) とほぼ同様の結果であった。

その他の組み合わせの混合唾液斑についても、すべて同様の傾向を示した。

このようにA型・B型混合唾液斑の場合、抗AプレートではA型抗原のみ、また抗BプレートではB型抗原のみ検出された。一方、AB型唾液斑の場合は両方のプレートでA型抗原およびB型抗原が検出されることがわかった。この違いにより、A型・B型混合唾液斑とAB型唾液斑との識別は可能であった。

2. 検量線

Fig. 7 Calibration curves of A and B blood group substances

※ 1 unit (U) :

Minimum amount of standard substance inhibiting antibody (agglutinin titer 1 : 8)

ヒト胃粘膜由来のA型標準物質 (8,000U) およびB型標準物質 (8,000U) を PBS により800倍希釈し、さらに2倍連続希釈系列を作製して実験に用いた。その結果、Fig. 7 に示すように、OD 値0.05から0.80の範囲で良好な直線性を示す検量線が得られた。またA型およびB型標準物質の最少検出限界は、ともに51,200倍希釈の0.16U であった。

3. 斑痕試料中のA型およびB型抗原の定量

木綿さらし布およびタバコの吸い口紙に付着させた唾液斑を、1, 2, 3および6カ月間放置し検討したところ、いずれの試料からも血液型抗原の定量は可能であった。その値は放置期間、付着担体の違いによる差は少なく、ほとんど同様の結果であった。そこで、6カ月経過した木綿さらし布唾液斑について Table 5 に示した。

ASe 型・BSe 型混合唾液斑におけるA型抗原量は $1.74\text{U}/\text{mm}^2$ から $4.46\text{U}/\text{mm}^2$ 、B型抗原量は $0.72\text{U}/\text{mm}^2$ から $3.00\text{U}/\text{mm}^2$ の範囲で測定された。Ase 型・BSe 型混合唾液斑におけるA型抗原量は $0.15\text{U}/\text{mm}^2$ から $0.36\text{U}/\text{mm}^2$ 、B型抗原量は $0.92\text{U}/\text{mm}^2$ から $3.39\text{U}/\text{mm}^2$ の範囲で測定された。ASe 型・Bse 型混合唾液斑におけるA型抗原量は $1.88\text{U}/\text{mm}^2$ から $3.64\text{U}/\text{mm}^2$ 、B型抗原量は $0.16\text{U}/\text{mm}^2$ から $0.43\text{U}/\text{mm}^2$ の範囲で測定され

た。Ase 型・Bse 型混合唾液斑におけるA型抗原量は $0.16\text{U}/\text{mm}^2$ から $0.47\text{U}/\text{mm}^2$ 、B型抗原量は $0.10\text{U}/\text{mm}^2$ から $0.39\text{U}/\text{mm}^2$ の範囲で測定された。AB 型唾液斑の場合、A型およびB型抗原量がほぼ等しく測定され、Se 型では $1.35\text{U}/\text{mm}^2$ から $6.25\text{U}/\text{mm}^2$ 、se 型では $0.07\text{U}/\text{mm}^2$ から $0.26\text{U}/\text{mm}^2$ の範囲で測定された。

これら斑痕における型抗原量の測定値は、唾液の型抗原量におおよそ比例して検出される傾向が認められた。

考 察

法医学の実務において、血痕および体液斑から血液型検査をする機会は少なくない。その際、対象となる試料から、A型抗原およびB型抗原がともに検出された場合、A型とB型の混在と判定するのがあるいはAB型と判定するのが問題となる²⁶⁾。これまでA型・B型混合体液とAB型体液との識別は、凝集阻止試験法あるいは解離試験法などを応用して行なっていたが、結果に対する信頼性には乏しいものがあつた¹⁻³⁾。

微量定量法として開発されたELISAは、客観性に優れ、RIAに匹敵する感度を有することから、法医鑑識において頻用されている。特にサンドイッチELISAは、特定の抗原を選択的に検出することが可能な方法であり、その有用性が高く評価されている^{6,7,9,20)}。

Katsumata ら⁶⁾および佐藤ら⁷⁾は、A型・B型混合唾液とAB型唾液との識別をサンドイッチELISAにより検討し、それらの識別は可能であるとしている。しかし、これらの報告はSe型の唾液についてのみであり、また、backgroundが比較的高くなる傾向が認められている。

そこで著者は、二次抗体として特異性および信頼性の高いモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAにより、A型・B型混合唾液斑とAB型唾液斑との識別をSe型およびse型に関係なく、かつ特異的に検出できるかどうかについて検討するとともに血液型抗原の定量も行なった。

まず、本実験に使用するELISAプレートについて市販の数種類を検討したところ、ポリスチレ

Table 5 Quantification of blood group antigen levels in the saliva stains

Blood group	Sample Numbre	Titers* of blood group antigens in original saliva		Quantitative value of blood group antigen (U/mm ²)			
		A-antigen	B-antigen	Anti-A coated plate		Anti-B coated plate	
				MC** anti-A	MC anti-B	MC anti-A	MC anti-B
ASe + BSe	No. 1	12,800	51,200	1.74	0	0	2.39
	No. 2	25,600	6,400	3.03	0	0	0.72
	No. 3	25,600	51,200	2.82	0	0	2.90
	No. 4	25,600	51,200	3.45	0	0	3.00
	No. 5	25,600	12,800	4.46	0	0	1.25
Ase + BSe	No. 6	1,600	51,200	0.15	0	0	2.99
	No. 7	3,200	102,400	0.29	0	0	3.39
	No. 8	3,200	25,600	0.36	0	0	2.23
	No. 9	3,200	12,800	0.23	0	0	1.08
	No. 10	3,200	6,400	0.35	0	0	0.92
ASe + Bse	No. 11	25,600	3,200	1.88	0	0	0.39
	No. 12	25,600	3,200	2.90	0	0	0.43
	No. 13	25,600	800	2.82	0	0	0.16
	No. 14	25,600	800	3.64	0	0	0.18
	No. 15	51,200	3,200	3.21	0	0	0.37
Ase + Bse	No. 16	800	800	0.16	0	0	0.10
	No. 17	1,600	6,400	0.39	0	0	0.32
	No. 18	3,200	3,200	0.47	0	0	0.33
	No. 19	3,200	800	0.31	0	0	0.16
	No. 20	6,400	3,200	0.39	0	0	0.39
ABSe	No. 21	6,400	6,400	1.60	1.55	1.35	1.35
	No. 22	12,800	12,800	2.50	2.63	2.39	2.39
	No. 23	25,600	25,600	2.99	3.08	2.63	2.63
	No. 24	51,200	51,200	5.75	5.88	5.33	5.45
	No. 25	51,200	51,200	6.25	6.25	5.88	6.03
ABse	No. 26	400	400	0.08	0.09	0.07	0.08
	No. 27	400	400	0.11	0.12	0.10	0.13
	No. 28	800	800	0.17	0.17	0.14	0.14
	No. 29	800	400	0.22	0.24	0.21	0.26
	No. 30	1,600	1,600	0.23	0.26	0.21	0.24

* : Maximum dilution giving a positive reaction by the ELISA

** : Monoclonal antibody

ン製プレート（三光純薬社製，EIA フラットプレートⅡ）が background が低く，また測定感度も比較的高く検出され，最も適していた。

ELISA プレートに固相化させるレクチンあるいは抗体として，ドリコス抗 A₁ レクチン，バンデリア抗 B レクチン，ヒト由来ポリクローナル抗 A 抗体，ヒト由来ポリクローナル抗 B 抗体，ウサ

ギ免疫ポリクローナル抗 A 抗体およびヤギ免疫ポリクローナル抗 B 抗体について検討したところ，ウサギ免疫ポリクローナル抗 A 抗体およびヤギ免疫ポリクローナル抗 B 抗体を使用した場合に，最も測定感度が高く，よい結果が得られた。本実験にあたっては，これらの抗体を硫酸分画法により γ -グロブリン画分にさらに精製して用いた。

固相化緩衝液は BCB pH 9.6を用いた。これは、抗原および抗体は、高 pH 領域で、かつ比較的低イオン強度の低い状態でプレートに良く吸着させることができるという報告に基づいたものである^{25,27)}。

二次抗体として用いる血液型判定用モノクローナル抗体は、検査試料が Se 型および se 型に関わらず、A型・B型混合唾液と AB 型唾液との識別が可能であることが望ましいので、凝集阻止試験法において Se 型および se 型の両方を阻止する抗体を選択した。

血液型判定用のモノクローナル抗体は、抗原決定基である特定のオリゴ糖または糖脂質構造を認識する抗体であり、従来のヒト由来や動物免疫のポリクローナル抗体にはみられない単一特異性を示す²⁸⁻³⁷⁾。Bolton and Thorpe¹⁰⁾ および Takizawa ら¹¹⁾ は、血液型判定用モノクローナル抗体を用いた間接 ELISA による唾液の血液型検査法について検討したところ、background をおさえ、正確に型判定ができると報告している。本実験でも、Katsumata ら⁶⁾ の方法に比べて background を低くおさえることができ、陽性試料の OD 値とは明確に区別することが可能であった。

法医鑑識の実務で取り扱われる試料は微量であったり、他の物質によって希釈されている場合が多く、検査法の鋭敏度については調べておく必要がある。そこで本法により A型、B型および AB 型唾液の検出限界を調べたところ、Se 型試料では1,600倍から204,800倍希釈、se 型試料では200倍から6,400倍希釈の範囲で検出された。またこれらの唾液の血液型抗原価の平均値は、Se 型では25,600であり、se 型では1,600であった。

また、特異性について検討したところ、A型およびB型唾液の場合、それぞれの型抗原が対応するプレートで特異的に検出され、非対応抗原には反応しなかった。一方、AB 型唾液の場合には、抗Aおよび抗Bプレート双方においてA型およびB型抗原がともに検出された。さらに、AB 型唾液の場合、抗Aプレートで検出されるA型およびB型抗原価と、抗Bプレートで検出されるA型およびB型抗原価は Table 1 に示すように32例中24例 (75%) の試料において、すべて等値であっ

た。残り8例については、抗原価は異なっていたが、それらの違いは2倍連続希釈系列において1段階ないし2段階であった。1956年 Morgan and Watkins³⁸⁾ は AB 型の型活性を示すA型およびB型抗原は、一分子上に等量ずつ存在するという説を発表し、以後 Yuasa¹⁾, Sagisaka ら²⁾, Katsumata ら⁶⁾ が追試を行ない、その仮説が正しいのではないかとの報告をしている。今回著者が用いたサンドイッチ ELISA は感度に優れ、かつ信頼性のおける方法であり、この方法を用いたところ、AB 型唾液ではA型およびB型抗原がほぼ等量ずつ検出され、このことから Morgan and Watkins の説が正しいことを立証できたと思われる。

A型・B型混合唾液の血液型判定に本法を応用すると、抗AプレートではA型抗原のみ、また抗BプレートではB型抗原のみが検出されており、それぞれ非対応抗原には反応しなかった。ASe型・BSe型を組み合わせた混合唾液の場合、A型、B型抗原価ともに高い値を、Ase型・BSe型混合唾液の場合、A型抗原価は低い値を、B型抗原価は高い値を、ASe型・Bse型混合唾液の場合、A型抗原は高い値を、B型抗原価は低い値を、Ase型・Bse型混合唾液の場合、A型、B型抗原価ともに低い値を示した。いずれの組み合わせの場合においても、A型・B型混合唾液と AB 型唾液との識別が可能であった。

A型・B型混合唾液の抗原価を Fig. 6 に示したが、その値は混合する前の唾液の約1/2となつて検出された。これは、混合唾液を作製する場合、1:1の割合で混合させたことから当然のことと思われる。

Yuasa¹⁾ は阻止価64のA型およびB型の唾液を混合し、ドリコス抗 A₁ レクチンおよびニワトリ抗 B 沈降素を反応させてできた沈澱物について凝集阻止試験法により検討したところ、A型およびB型抗原がそれぞれ64倍希釈まで検出し得たと報告している。著者の実験では阻止価64の唾液では、6,400倍希釈まで検出できた。したがって本法は、凝集阻止試験法に比べて検出感度を100倍高くすることができた。

また Katsumata ら⁶⁾ は、サンドイッチ ELISA を用いて阻止価約8,000から16,000の原唾液につ

いて検討したところ、約10,000倍から100,000倍希釈の範囲で検出可能であったと報告している。著者の実験では阻止価約2,000から4,000の唾液では、約120,000倍から240,000倍希釈の範囲で検出できた。原唾液の阻止価は異なっているものの、Katsumata ら⁶⁾の方法に比べて約50倍検出感度が高まっており、さらには background が極めて低くおさえられたことで、本法は信頼性の高い検査方法であると思われる。

検査試料が液体の場合は、抗Aおよび抗Bプレートでの抗原価を抗原量として表わせばよいが、斑痕化している場合は唾液の付着量が不明であることなどの問題があり、抗原量を抗原価で表わすことができない。そこで、滝沢の方法⁹⁾に準じて標準型物質の凝集阻止価をもとにした unit (U) で斑痕の抗原量を表わすことにした。1カ月から6カ月間室温に放置した斑痕試料について検討したところ、その定量値は放置期間や付着担体(木綿さらし布およびタバコの吸い口紙)の条件に関わらず、ほぼ同程度の結果を得た。Se 型の血液型抗原量は $0.72\text{U}/\text{mm}^2$ から $6.25\text{U}/\text{mm}^2$ の範囲で、また se 型のそれは $0.07\text{U}/\text{mm}^2$ から $0.47\text{U}/\text{mm}^2$ の範囲で検出され、それらの比は平均値でおよそ10:1の割合であった。血液型抗原量は6カ月程度の放置期間ではあまり変化しなかったことから、さらに陳旧化した試料や放置条件の異なるものについて検討する必要があると思われる。

また本研究においてはA型とB型の唾液の混合比を1:1に設定したが、今後さらに混合比を変化させた場合の識別についても検討する必要があると考えている。

以上、ポリクローナル抗Aおよび抗B抗体を固相化したプレート、そしてモノクローナル抗体を二次抗体として用いたサンドイッチ ELISA により、Se 型および se 型に関わらずA型・B型混合唾液斑と AB 型唾液斑の識別、ならびに血液型抗原の定量はほぼ満足する成績を得、法医鑑識に十分応用可能と思われた。

結 論

サンドイッチ ELISA によりA型とB型の混合唾液と AB 型唾液との識別を Se 型および se 型

について検討し、さらにそれらの斑痕試料の識別と血液型抗原の定量を試みたところ、以下の結論を得た。

1) 唾液中の血液型抗原の検出限界は、Se 型では1,600倍から204,800倍希釈、se 型では200倍から6,400倍希釈の範囲であり、従来の凝集阻止試験法に比べて検出感度は約100倍高かった。また、本法によれば background をきわめて低くおさえることが可能であった。

2) A型・B型混合唾液と AB 型唾液との識別について検討したところ、Se 型および se 型に関わらずA型・B型混合唾液の場合、抗AプレートではA型抗原のみ、また抗BプレートではB型抗原のみ検出され、一方 AB 型唾液の場合は両方のプレートでA型抗原およびB型抗原がともに検出された。この違いにより、A型・B型混合唾液と AB 型唾液との識別は可能であった。

3) A型とB型の唾液を1:1に混合した試料93例について検討したところ、ASe 型と BSe 型、Ase 型と Bse 型、ASe 型と Bse 型および Ase 型と Bse 型いずれの組み合わせにおいても、A型・B型混合唾液のA型およびB型抗原価はいずれも原唾液の約1/2であった。

4) 1カ月から6カ月間室温に放置したA型・B型混合唾液斑と AB 型唾液斑について検討したところ、唾液試料の場合と同様にA型・B型混合唾液斑の場合、抗AプレートではA型抗原のみ、また抗BプレートではB型抗原のみ検出された。一方、AB 型唾液斑の場合は両方のプレートでA型抗原およびB型抗原がともに検出された。

この違いにより、A型・B型混合唾液斑と AB 型唾液斑との識別は可能であった。

5) 標準試料による検量線を作成し、1カ月から6カ月間室温に放置した斑痕試料中の血液型抗原の定量を試みたところ、斑痕試料の放置期間や付着担体(木綿さらし布およびタバコの吸い口紙)の条件に関わらず、その定量値はほぼ同程度であった。

以上のことから、本法は Se 型および se 型に関わらず、A型・B型混合唾液斑と AB 型唾液斑との識別が可能であり、また定量法としても優れていることから、法医鑑識に十分応用可能であ

と思われる。

稿を終わるに臨み、懇切なる御指導、御校閲を賜りました竹井哲司教授に深謝致します。また御協力をいた

きました法医学教室員各位に謝意を表わします。

なお、本論文の一部を第73次日本法医学会総会ならびに第41回日本大学歯学総会において発表した。

抄録: サンドイッチ ELISA-HRP 発色法を応用して、A 型と B 型の混合唾液斑と AB 型唾液斑との識別ならびに血液型抗原の定量について検討した。抗体は一次抗体としてポリクローナルウサギ抗 A およびヤギ抗 B 抗体、二次抗体としてモノクローナル抗 A および抗 B 抗体を用いた。A 型・B 型混合唾液斑の場合、ポリクローナル抗 A 抗体を固相化したプレートでは A 型抗原のみ、またポリクローナル抗 B 抗体を固相化したプレートでは B 型抗原のみ検出され、また AB 型唾液斑の場合は両方のプレートで A 型および B 型抗原がともに検出された。これらの反応は Se 型および se 型に関わらず認められた。この違いにより、A 型と B 型の混合唾液斑と AB 型唾液斑との識別は可能であった。また本法では、background を極めて低くおさえることが可能であった。つぎにヒト胃粘膜由来の標準試料を用いて検量線を作製し、血液型抗原の自動定量を試みたところ、6 カ月間経過した斑痕試料からも良好な定量値が得られた。

文 献

- 1) Yuasa, I.: Detection of blood group AB macromolecules from biological materials with mixed body fluids. *Jpn. J. Legal Med.* **36**(4): 533-541, 1982.
- 2) Sagisaka, K., Yamashita, H., Iwasa, M. and Yokoi, T.: A simple method to detect AB antigen in blood grouping of body fluid stains. *Tohoku J. exp. Med.* **141**: 237-239, 1983.
- 3) 青木康博, 舟山真人, 工藤敏行, 勾坂 馨: 分離法変法による混合血痕からの AB 型検出。法医学の実際と研究 **29**: 53-56, 1986.
- 4) Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). —Quantitative assay of immunoglobulin G—. *Immunochem.* **8**: 871-874, 1971.
- 5) Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. —Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes—. *J. Immunol.* **109**: 129-135, 1972.
- 6) Katsumata, Y., Sato, M., Sato, K., Tsutsumi, H. and Yada, S.: A novel method for ABO grouping of mixed stains of saliva using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Act. Crim. Japon.* **50**: 167-172, 1984.
- 7) 佐藤元嗣, 玉木敬二, 岡島 弘, 勝又義直: ELISA による AB 型精液と A 型 B 型混合精液の鑑別。日法医誌 **40**: 293-298, 1986.
- 8) 滝沢伸行: ヒト唾液および唾液斑の間接 ELISA による ABO 式血液型検査法に関する研究。歯基礎誌 **30**: 443-459, 1988.
- 9) Aoki, Y., Funayama, M. and Sagisaka, K.: Detection of AB antigen in blood group stain using enzyme-linked immunosorbent assay. *Tohoku J. exp. Med.* **152**: 277-281, 1987.
- 10) Bolton, S. and Thorpe, J. W.: Enzyme-linked immunosorbent assay for A and B water soluble blood group substances. *J. Forensic Sci.* **31**: 27-35, 1986.
- 11) Takizawa, N., Ohba, Y., Mukoyama, R., Komuro, T., Mukoyama, H. and Takei, T.: Determination of ABO blood groups from saliva and stains by an indirect Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using monoclonal antibodies. *Jpn. J. Legal Med.* **43**: 294-302, 1989.
- 12) Katsumata, Y., Sato, M., Tamaki, K. and Yada, S.: A sensitive method for detection of blood group H substance in human saliva and semen using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Jpn. J. Legal Med.* **39**: 15-18, 1985.
- 13) Takatori, T. and Tsutsubuchi, Y.: An ELISA using avidin-biotin complex for the determination of ABH group from saliva. *Forensic sci. Int.* **31**: 61-68, 1986.
- 14) 堤 肇, 佐藤啓造, 玉木敬二, 岡島 弘, 勝又義直: 市販の抗ヒト血清を用いた酵素免疫測定法 (ELISA) によるヒト血痕の鑑別法。犯罪学誌 **53**(1): 1-8, 1987.
- 15) 佐々木晃一: 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。歯基礎誌 **27**: 468-481, 1985.
- 16) 滝沢伸行, 大場有一, 長島 明, 津野田亮, 岡山一成, 岡村正美, 佐々木晃一, 向山レイ, 小室歳信, 竹井哲司: ELISA を応用した S-IgA 検出による唾液の法医学的検査に関する研究 [I]。日大歯学 **61**: 741-750, 1987.
- 17) 小室歳信, 滝沢伸行, 大場有一, 八重樫潤, 遠藤 宏, 中島寛隆, 伊勢卓史, 向山レイ, 竹井

- 哲司 : ELISA による唾液アミラーゼの検出—方法論の検討—. 日大歯学 63 : 93-98, 1989.
- 18) Fowler, S. J., Parry, G., Sheehan, C. P. and Fletcher, S. M. : ABO grouping by ELISA III. A comparison of premixing, and simultaneous and sequential addition of antibody and conjugate on assay sensitivity. CRE Rept. 612, Home Office Central Res. Estab., Aldermaston, Reading, Berks., England, 1986.
- 19) 向山明孝 : 超微量血痕から血液型を自動判定. Modern Medicine 16 : 49-51, 1987.
- 20) 向山明孝, 坂井活子, 笠井賢太郎 : 精液特異吸着固相プレートをを用いたサンドイッチ ELISA による精液・腔液混合斑からの血液型検査. 日法医誌 41 : 739, 1987.
- 21) 科学警察研究所 : 血清学的物体検査法, pp168-177, 科学警察研究所, 東京, 1974.
- 22) 古川 研 : 型特異性分解酵素, 特に新しいB型物質分解酵素について. 北関東医学 10 : 175-193, 1960.
- 23) 中村 弘, 尾上 薫 : 抗体の精製. 蛋白質核酸酵素 11 : 1587-1589, 1966.
- 24) 阿南功一, 根野邦夫, 田村善蔵, 松橋道生, 松本重一郎 : 基礎生化学実験法 (5) 化学的測定, pp 186-187, 丸善, 東京, 1986.
- 25) Voller, A., Bidwell, D. E. and Bartlett, A. : 酵素免疫測定法 (Enzyme linked immunosorbent assay), 三光純薬株式会社, 東京.
- 26) 岩本良二, 棟方榮治, 福士武美 : 二人の血液を混合した血痕についての実験的考察. 科警研報告 42 : 88-91, 1989.
- 27) 岩崎辰夫, 安東民衛, 市川かおる, 保井孝太郎 : 単クローン抗体—ハイブリドーマと ELISA—, pp 146-169, 講談社, 東京, 1984.
- 28) Voak, D., Sacks, S., Takei, F., Lennox, E., Jarvis, J., Milstein, C. and Darnborough, J. : Monoclonal anti-A from a hybrid-myeloma : Evaluation as a blood grouping reagent. Vox Sang. 39 : 134-140, 1980.
- 29) Sacks, S. H. and Lennox, E. S. : Monoclonal anti-B as a new blood-typing reagent. Vox Sang. 40 : 90-104, 1981.
- 30) Voak, D., Lennox, E., Sacks, S., Milstein, C. and Darnborough, J. : Monoclonal anti-A and anti-B : Development as cost-effective reagents. Med. Lab. Sci. 39 : 109-122, 1982.
- 31) Munro, A. C., Inglis, G., Blue, A., Sheridan, R. and Mitchell, R. : Mouse monoclonal anti-A and anti-B as routine blood grouping reagents : An evaluation. Med. Lab. Sci. 39 : 123-127, 1982.
- 32) Gansslen, R. E., Lee, H. C. and Carroll, J. E. : Evaluation of monoclonal anti-A and anti-B and affinity-purified *Ulex europaeus* lectin I for forensic blood grouping. Z. Rechtsmed. 93 : 259-268, 1984.
- 33) Gansslen, R. E., Lee, H. C., DeGraw, S. S. and Carroll-Reho, J. : Studies on ABH antigen grouping of ammoniacal extracts of blood stains by absorption-elution. Forensic Sci. Int. 31 : 145-157, 1986.
- 34) Lubenko, A. and Ivany, J. : Epitope specificity of blood-group-A-reactive murine monoclonal antibodies. Vox Sang. 51 : 136-142, 1986.
- 35) 落合幸子 : ヒト赤血球血液型抗原に対するモノクローナル抗体の確立. 最新医学 39 : 260-266, 1984.
- 36) 池田 透 : ハイブリドーマによって産生された血液型特異抗体とその特異性に関する研究. 帝京医誌 7 : 103-113, 1984.
- 37) 勝野 誠, 岡本宏明, 立花克巳, 今井光信, 池本卯典 : 抗M, 抗Nモノクローナル抗体の作製および特異性の検討. 日本輸血会誌 33 : 21-26, 1987.
- 38) Morgan, W. T. J. and Watkins, W. M. : The product of the human blood group A and B genes in individuals belonging to group AB. Nature 177 : 521-522, 1956.