

Immunochemical detection of human hemoglobin from deteriorated bloodstains due to methamphetamine contamination, aging, and heating

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2021-03-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 村橋, 将崇 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/00028727

学位論文の要旨

※ 整理番号		ふりがな 氏名	むらはし まさたか 村橋 将崇
学位論文題目	Immunochromatographic detection of human hemoglobin from deteriorated bloodstains due to methamphetamine contamination, aging, and heating (覚醒剤、陳旧化、加熱の影響を受けた変性血痕からのイムノクロマトグラフィー法を応用したヒトヘモグロビンの検出)		
<p>1 研究の目的</p> <p>現在、高い精度で個人を特定できる DNA 型鑑定が犯罪捜査に活用されているが、犯罪を立証するためには、犯罪現場に遺留された生体資料の体液種を特定し、検出される DNA 型の由来を明らかにすることが重要である。中でもヒト血液は採取されやすい資料の一つであり、イムノクロマトグラフィー法を原理とする便潜血検査試薬 OC-ヘモキャッチ S ‘栄研’ (HC-S) を利用して、簡便かつ高感度にヒトヘモグロビン (Hb) の有無を検査することにより、人血か否かを判断している。</p> <p>ところが、覚醒剤事案の鑑定においては、血痕が十分量あるにも関わらず Hb を検出できない事例にしばしば遭遇する。深刻な覚醒剤乱用者は一度に 300 mg 程度のメタンフェタミン塩酸塩 (MA) を自身の血液で溶かすなどして静脈注射するため、押収される注射筒内に使用者の血痕が残存している場合が多い。そして、この血痕に対して人血証明を行うも HC-S 検査が陰性となるために、続く DNA 型検査が実施できず、覚醒剤入りの注射器を使用した客観的証拠を提示できなくなる。この 20 年来の課題を解決するため、覚醒剤が Hb に及ぼす影響を解明し、現行法では検出困難な資料に対しても実施可能な新規人血検査法の開発を目的とした。</p> <p>2 方法</p> <p>(1) MA 血液の作製</p> <p>1 μL の全血あるいは 2 μL の溶血液 (洗浄赤血球から膜成分を除いた Hb 溶液) に MA 溶液を加えて 10 μL とし (MA 終濃度 0-300 mg/mL)、37°C で 3 日間静置することで作製した。</p> <p>(2) FRED (Fukui' s Reduction and Eiken' s Dilution) 法による Hb 検出</p> <p>FRED 法は、血液資料から正確かつ高感度に Hb を検出するための二段階前処理法である。まず、血液資料に還元液 (50 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES) [pH 7.4], 20 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), 50 mM L-Arg, 3 M guanidine hydrochloride (GuHCl)) を加えて室温で 30 分間反応させ、続いて希釈液 (50 mM phosphate [pH 6.6], 0.3% BSA, 0.095% Na_3N, 0.005% Lipidure-BL1201) で 10 倍に希釈して室温で 30 分間静置後、Hb を測定した。</p> <p>Hb 検出にはイムノクロマトグラフィー法を原理とする HC-S を使用し、陽性の際に出現するテストラインをイムノクロマトリーダにより定量測定することで Hb 濃度を算出した。</p> <p>3 結果および考察</p> <p>(1) 変性 Hb の解析</p> <p>まず、MA 処理した溶血液を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (native-PAGE) で解析したところ、高濃度の MA を処理した際に Hb の凝集体が観察された。また、SDS-PAGE を行うと、非還元条件下で MA 濃度依存的に Hb が重合し、還元条件下で重合が解離していた。α 鎖、β 鎖に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行うと、MA 処理でいずれのサブユニットも重合しており、還元により大部分が解離した。さらに、チオール基特異的な蛍光色素 monobromo(trimethylammonio)bimane bromide (qBBBr) を標識後に SDS-PAGE を行うと、非還元条件では MA 濃度依存的に蛍光が消失し、還元することで蛍光が検出された。</p>			

Hb は、 α 鎖に 1 つ、 β 鎖に 2 つの Cys 残基を有するが、天然状態ではジスルフィド結合を形成しない。それが MA 存在下で過剰にジスルフィド結合を形成して凝集し、HC-S に使用される 2 種類の抗ヒト Hb マウスモノクローナル抗体（モノクロ抗体 A/B）のエピトープが立体的に遮蔽されたことにより、Hb を認識できなくなっていると考えられた。

(2) Biacore による分子間相互作用解析と、ポリクローナル抗体を用いた Hb 検出

ポリクローナル抗体は多様なエピトープを認識するため、凝集 Hb を検出できる可能性がある。そこで、3 種類の抗体（モノクロ抗体 A/B、抗ヒト Hb ウサギポリクローナル抗体（ポリクロ抗体））を用いて、MA 血痕中の Hb との結合性を Biacore 3000 により解析した。その結果、モノクロ抗体 A/B は反応を示さなかったが、ポリクロ抗体は MA 未処理の Hb と同程度の結合性を示した。そこで、ポリクロ抗体を使用する Hb 検出試薬として、便潜血検査試薬 OC-ヘモディアオートⅢ「栄研」（HA-Ⅲ）を用いて検査したところ、MA 処理 Hb を検出することはできたものの、測定値は未処理の血痕に比べて 3.2%に留まった。一方、MA 血痕に対して還元処理を施したところ、モノクロ抗体 A/B においても反応を示し、HA-Ⅲの使用抗体をモノクロ抗体 A/B に換えた HA-mono でも検出可能となった。

(3) 前処理法の最適化

MA 血痕から Hb を検出するには、TCEP による還元処理が有効であった。また、変性剤 GuHCl を加えることで溶解性が増し、検出感度も向上した。ただし、還元剤や変性剤は抗原抗体反応に悪影響を及ぼすことから、測定に影響しない程度まで希釈し、かつ、Hb をリフォールドさせるための希釈液を考案した。この希釈液を併用することで、検出感度が大幅に上昇したことから、「還元」と「リフォールディング」による FRED 法を確立させた。本手法により、MA 血痕からの高感度検出（血液 16.7 pL 相当）が可能となった。

(4) 長期間乾燥させた MA 血痕からの Hb 検出

実際の注射筒内に残存する血液を想定し、0-60 日間乾燥させた MA 血痕に対して FRED 法の有効性を比較検討した。その結果、従来の PBS 浸出では全く Hb を検出できなかったが、FRED 法を行うことでいずれの MA 血痕においても高感度に検出することができた。

(5) 法科学的資料への応用

時効延長・撤廃あるいは再審請求を受けて、今後ますます陳旧斑痕に対する再鑑定が想定される。陳旧斑痕に有効とされる 5% NH₃ 浸出では 16 年前の血痕が検出限界であったのに対し、FRED 法では 26 年前の血痕からでも十分に Hb 検出が可能であった。さらに、煮沸血液に対しても有効性が示された。つまり、MA 血痕だけでなく、陳旧化や熱凝固により抗体反応性（溶解性）が低下している血液資料に対しても、FRED 法が効果的であるといえる。

4 結論

FRED 法は、覚醒剤によって変性した血痕に留まらず、火災現場の血痕や時効撤廃による陳旧斑痕など、あらゆる法科学的血液資料に適用可能な前処理法である。今後、公判における犯罪立証に大きく貢献することが期待される。

備考 1 ※印の欄は、記入しないこと。

2 学位論文の要旨は、和文により研究の目的、方法、結果、考察、結論等の順に記載し、2,000 字程度にまとめタイプ等で印字すること。

3 図表は、挿入しないこと。