

法医学におけるイムノアッセイの応用

宮石 智

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 法医学

キーワード：イムノアッセイ，法医学，法医学生物学

Immunoassays in forensic biology

Satoru Miyaishi

Department of Legal Medicine, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

法医学では、各種試料から種々の物質を定性的、或いは定量的に検出し、法医診断に役立てている。例えば、薬毒物使用が疑われる事例では、血液等から当該物質の定性・定量検査を行って、死後変化の影響を評価しつつ中毒死の診断根拠にしている¹⁾。特定の物質を組織切片上で検出することも、凍死の診断、損傷の受傷後経過時間の特定、身元不明死体の年齢推定など、種々の法医診断に役立つ²⁻⁴⁾。身元不明死体の特定、すなわち個人識別の観点からは、昨今は DNA 多型 (STR) の多座位同時検出が威力を発揮している。また、生物斑痕の検査では、例えば血痕では人血証明のためのヒトヘモグロビンの検出が行われる。

本稿では、まず法医学という分野の全体像を俯瞰したのち、法医学におけるイムノアッセイの応用について概説した上で、特に法医学生物学領域におけるイムノアッセイの位置づけと応用について言及したい。

法医学と法医学生物学

1. 法医学の概略

法医学を分類するにはいくつかの方法がある。教科書などでは、損傷、窒息、死体現象などといった分野に分けるのが標準的であるが、生体と死体、成人と小児、人体と物体 (生物斑痕) というように分類したり、或いは刑事法医学と民事法医学に分けることもできる。そういった分類の1つでしばしば用いられるものに、法医病理学、法医中毒学、法医学生物学、およびその他に分けるものがある。この分類において、前3者は謂わば法医学の三大領域で、法律上問題となる医学的事項に解決を与えるものとして極めて重要である。

法医病理学は法医学の中核を為す領域である。英語の Forensic Pathology の訳で、法医解剖において診断されるべきことの全てを網羅しているのが法医病理学である。法医解剖例の組織診断は法医病理学に含まれるが、法医病理学と、法医解剖で得られる臓器・組織についての Pathology とは全く異なったものである。自殺か他殺か、頭を殴打されたのと胸を刺されたのはどちらが死因か、凶器の刃物は両刃か片刃か、といった事項は、法医病理学の重要な部分を占める。方法論としては、日常の剖検診断では肉眼形態学を基本としているが、組織学、生化学、生理学といった基礎医学

平成20年1月受理

〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話：086-235-7194 FAX：086-235-7201

E-mail：miyaishi@md.okayama-u.ac.jp

◆プロフィール◆

昭和35年4月 名古屋市生まれ
 昭和61年3月 岡山大学医学部卒業
 昭和61年6月 岡山大学医学部附属病院研修医
 平成3年3月 岡山大学大学院医学研究科修了
 平成3年4月 岡山大学助手 (医学部法医学講座)
 平成4年4月 岡山大学講師 (医学部法医学講座)
 平成7年3月 文部省在外研究員 (ハンブルク大学法医学研究所客員研究員)
 平成8年11月 岡山大学助教授 (法医学講座)
 平成15年7月 文部省在外研究員 (ハンブルク大学法医学研究所客員教授)
 平成19年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授 (法医学分野)

法医学は実務、教育、研究という、軽重のつけられない3者の三位一体によって成り立つ学問です。また、法医学はその対象範囲が大変広く、それでいて必ずしも浅くない分野です。この年になっても毎日が新しい勉強ですが、職務を誠実に全うし、法医学の三位一体の成就を通して、大学や社会に貢献してゆきたいと思っています。

の知識から、蛆の発育速度（腐乱死体の死後経過時間推定に利用）まで、診断に役立つものは何でも導入している。

法医学中毒学は、文字通り法医学の立場からの中毒学である。実務上も研究上も、中心となるのは、剖検試料の薬毒物分析とその結果の解釈である。薬毒物定量分析とその結果の解釈は中毒死の診断に不可欠であるが、死因には関係しなくとも薬毒物の検出が剖検診断上は不可欠な場合は多々ある。例えば催眠剤を飲ませておいて海に捨てるような場合である。このように、法医学中毒学と法医学病理学とは不可分である。

法医学生物学と呼ばれる領域は、個人識別、斑痕検査（物体検査）、親子鑑定などを扱い、遺伝学や人類学とのオーバーラップが大きい。しかし、身元不明死体の個人識別は剖検診断の一項目であり、例えばその年齢推定は剖検の肉眼所見を基本に行われる。また、被害者と凶器付着血痕との血液型の異同識別は、凶器の特定を目的とするものである。このように、法医学生物学もまた、法医学病理学と不可分である。

三大領域に分類できないもので特に重要なのは、死者から学んだことを生者の権利に反映させる取り組みである⁵⁾。異状死体を扱う唯一の医学分野としての社会貢献は法律上の問題の解決に負けず劣らず重要であるが、本邦におけるそのような動きはようやく始まったところである⁶⁾。法医学は英語で Legal Medicine であるが、筆者の留学したドイツでは Rechtsmedizin という言葉が定着している。Recht は英語では right に概ね対応する言葉で、法以外に権利、正当性といった意味合いが強く意識されている。

2. イムノアッセイと法医学

イムノアッセイは、免疫反応を利用した定量的分析の意味で用いられることが多い。しかし assay の本来の意味は、金属を検査するということで、定量的な意味に限定されるものではない。また、新鮮血の ABO 式血液型検査のように、免疫反応を利用した定性検査は枚挙に暇がない。故に本稿では、免疫反応を利用したものは、定性ないし半定量的な検査もイムノアッセイに含めて以下を述べることにする。

イムノアッセイは、法医学の三大領域の全てにおいて広く応用されている⁷⁾。法医学病理学において最も多用されているイムノアッセイは所謂免疫染色である。例えば冒頭で例示した凍死診断では、下垂体ホルモンの免疫染色を利用している。定量的イムノアッセイで

は、死体血中サイログロブリン濃度からの頸部圧迫の証明、心嚢液中トロポニン濃度からの心臓性突然死の診断といった例を挙げることができる。法医学中毒学では、濫用薬物のスクリーニングにイムノアッセイが利用されており、多種類のキットが世界で市場に出ている。本邦ではバイオサイト社の Triage+TCA が普及しているが、これは本来ベッドサイドで利用することを念頭に開発された商品で、法医学中毒学的に利用しているものである。法医学生物学は、分析手法としてイムノアッセイの必要性が最も高い領域といっても過言ではない。次項に法医学生物学におけるイムノアッセイの有用性について述べる。

法医学生物学におけるイムノアッセイの位置づけ

法医学生物学上の目的のために、イムノアッセイは 1990年代の半ばないし後期までその中心的役割を果たしてきた。例えば、ABO 式血液型は個人識別上の基本情報として重要であるが、試料が新鮮血の場合に用いられる血球凝集反応も、唾液斑や血痕、毛髪といった検査試料の場合に用いられる吸収試験あるいは解離試験法も、赤血球膜表面の抗原と、抗 A または抗 B 抗体との間の免疫反応が利用されている。かつての親子鑑定では、Duffy 型、Kidd 型といった赤血球型も利用されてきたが、その型判定に必要であった間接クームス試験もまた免疫反応に基づいたものである。血清（血漿）蛋白型の中には、等電点電気泳動後に、免疫プロテイングや免疫固定を行って型判定するものも多かった。多型性に富み、親子鑑定では大変重要な検査項目であった HLA 型（白血球血液型）の判定には、補体結合反応が利用されていた。血痕検査では、血液型判定に先立つ法医学上の必須検査事項の一つに人獣鑑別があるが、これには抗ヒト血清、抗ヒトアルブミン、抗ヒトヘモグロビンなどの抗血清と試料との間の免疫反応（重層法、拡散法など）が利用されてきた。

法医学生物学的検査は、多くの場合に、究極の目的が広義の個人識別にある。例えば、凶器付着血痕の ABO 式血液型分析の目的は、その血液が被害者に由来するか否かを明らかにすることであり、その意味で個人識別なのである。そういった個人識別の目的には、多型性の高い遺伝標識を用いれば、それだけ識別力が上がる。1990年代の終わり頃から DNA 分析の技術が著しく発達してくると、イントロンにある高度な多型性に富む座位の検出が個人識別のための強力な武器とな

り、法医学生物学の研究は DNA 多型座位の発見とその効率的検出法に移ったが、これは自然のことといえる。今日では、多型のある座位の発見は研究の段階を終わり、日常のルーチン検査には AmpFLSTR Identifiler (アプライドバイオシステムズ社) などの市販 DNA 多型検出キットが用いられるようになってきている。また、例えば解離試験法による微小血痕からの ABO 式血液型判定は、これに適した抗血清の市場からの撤退によって困難となっていたが、DNA レベルでの分析法⁸⁾が普及しつつある。このように、今日の法医学生物学検査は DNA 分析にその中心を大きく移し、イムノアッセイが必要とされる検査は、頻度としては劇的に減じた。

しかし、ここで銘記されなければならないことは、法医学生物学上の検査は、DNA 分析では解決できないものを含んでいる点である。例えば強姦被疑事件において、被害者の膣内から男性由来の DNA を検出したところで、それが精液である証明には全くならない。しかし、免疫学的にであれば、精液に特異的な物質の存在も証明可能である。また、法医学上の検査の必要性は、求められる頻度とは関係がない。一度事件が発生すれば、必要な検査は必要なのであって、その検査が希有にしか求められないか否かは関係がない。

また、イムノアッセイを利用した検査には、DNA 分析に比較して圧倒的に簡便であったり、場合により 1 回の検査で 2 つの結論を得られる利点もある。以下に、法医学生物学におけるイムノアッセイの応用について、筆者らの研究成果を交えて述べる。

法医学生物学におけるイムノアッセイの応用

1. 精液の証明

精液検査は、性犯罪が疑われる事案では必須のものである。古くは、前立腺由来の酸フォスファターゼを試料から化学的に検出した後、形態学的に精子を見つけるのが常道であった。しかし酸フォスファターゼの検出は特異性に難があり、形態学的方法は無(乏)精子症の被疑者には極めて無力であった。今日では、精液(前立腺液)に特異的な蛋白である PSA (prostate-specific antigen) をイムノアッセイで検出する方法が一般化している。腫瘍マーカーとしての PSA を血清中からイムノクロマトグラフィーで検出する臨床検査試薬は、法医学上の精液の証明に応用できることが確かめられ使用されてきた。現在この試薬は臨床的には

使われなくなったが、法医学検査用としては市場に残っている。

2. 人血の証明

イムノクロマトグラフィーによるヒトヘモグロビン検出試薬は、便潜血の検査用として市販されているが、これも法医学生物学上の検査に有用である。古典的な血痕検査では、高感度な方法で血痕らしいか否かを調べ(血痕予備試験)、それが血液であるか否かを確認(血痕本試験)した後に、ヒトの血液であることを明らかにして(人血証明)、最終的に血液型検査に進むことが必要であった。各種動物のヘモグロビンで吸収済みの法医学用抗ヒトヘモグロビン抗体が市場に出るようになって、血痕本試験と人血証明は 1 回の検査で可能となった。今日の便潜血検査試薬は飽くまで臨床検査のためのものであるが、法医学生物学上の血痕検査にとっても、感度、特異性とも満足のゆくものである。人獣鑑別は DNA 分析によっても可能である⁹⁾が、微量試料の場合には、試料が付着している担体などからのヒト成分の迷入が誤判の原因となり得るし、血液であることは証明できない。ヒトヘモグロビンを検出するイムノクロマトグラフィーには、そのような問題はなく、所要時間や簡便性の点でも優れている。

3. 血液の由来の証明

法医学生物学上の検査で時に求められるものに、出血源あるいは血液の由来の証明がある。妊婦血の証明¹⁰⁾、胎児血の証明¹¹⁾などはそれに該当し、やはり DNA 分析には馴染まずイムノアッセイが威力を発揮する検査である。ここでは、筆者の研究から、死体血と月経血の同定について言及する。

死体血の同定は、例えば死体遺棄が疑われている事案で、被害者を運んだとされる車から発見された血痕の検査で求められることがある。しかし古典的な死体血証明法は、死後早期の場合には適用できないなどの問題があった。筆者は、血中ミオグロビン濃度の死後上昇が極めて急激であることを定量的イムノアッセイによって確認し¹²⁾、この事実を法医学生物学上の血痕検査法に利用することで、従前の方法の問題点を解決した¹³⁾。この方法の実際の応用例を図 1 に示した。35 歳男性が絞殺され、毛布とビニルシートに包まれて 40 日間床下に隠されていた事件であるが、毛布付着の血痕が死後のものであることが分かる。ここで用いられている dot-ELISA という手法は今日では用いられなくなっているが、臨床検査としてのミオグロビン定量な

いし半定量検査が、法医学的検査試料にも適用できることを確認している。

月経血の同定は、法医学上は古くからの課題で、デーデルライン桿菌、膣上皮細胞などを検出する方法はかなり古くからあり、また、月経血が FDP を多量に含むことを利用した方法もあった。しかし、前者は膣液と血液の混合物、後者は死体血を月経血から鑑別できず、月経血の決定的な証明は長く血痕検査のピットフォールとなっていた。筆者は、月経血、死体血、及び生体末梢血について、FDP-D dimer 及びミオグロビン濃度を明らかにすることで3者の鑑別が可能であることを示した(表1)。また、この3種類の血液から実験的に作製した血痕を用いて、血痕からも月経血の同定が可能であることを示した¹⁴⁾。やや余談となるが、法医学では必要が研究の原動力となるばかりでなく、研究成果が必要を喚起する側面が意外に強い。月経血同定の必要性としては、強姦致傷被疑事件などで、被疑者が「被害者が月経中であった」と抗弁するような、かなり特殊な場合を想定していたが、本成果の発表後に、まさにそのような事例についての相談が海外からあった。

なお、免疫アッセイによる臓器(組織)特異抗原の検出については、凶器付着血痕から行う研究がある¹⁵⁻¹⁷⁾。これは受傷臓器(組織)の特定を目的としたもので、血液の由来の証明とはやや異なっているため、詳細は文献に譲る。

4. 組織の同定

物体検査と呼ばれる法医学生物学的検査において

は、現場遺留や凶器付着の組織片が対象となる場合がある。組織片の検査は頻度は低いが、一度必要となると、その同定が強く求められる。

組織の同定には、組織学的検査を行うのが基本である。しかし法医生物学的検査試料は1mgにも満たない微量の場合もあり、かつ、発見された量が全てであって、患者血清や動物実験のように採り直しややり直しは不可能である。人獣鑑別や遺伝多型分析も行わねばならず、組織学的検査に試料を消費することはできない。また腐敗・乾燥といった法医生物学上の検査試料に特有の条件下では形態学的特徴は著しく失われていたり、試料に付着する砂などが薄切を妨げることもある。これに対し組織特異抗原を検出する免疫アッセイは、液相を利用するため薄切が妨げられるようなことはなく、また抗原性は形態学的構造より遙かに安定に保存され、更には、標的抗原の種特異性を上手く利用して人獣鑑別と組織同定を1回の検査ですませるこ

表1 FDP-D dimer and myoglobin concentration in peripheral, menstrual and postmortem blood (mean±S. D., μg/ml) (文献14から引用)

	FDP-D dimer	Myoglobin
Peripheral blood (n=36)	0.047±0.019	0.028±0.0093
Menstrual blood (n=20)	102±44.7	0.066±0.031
Postmortem blood (n=26)	220±177	727±592

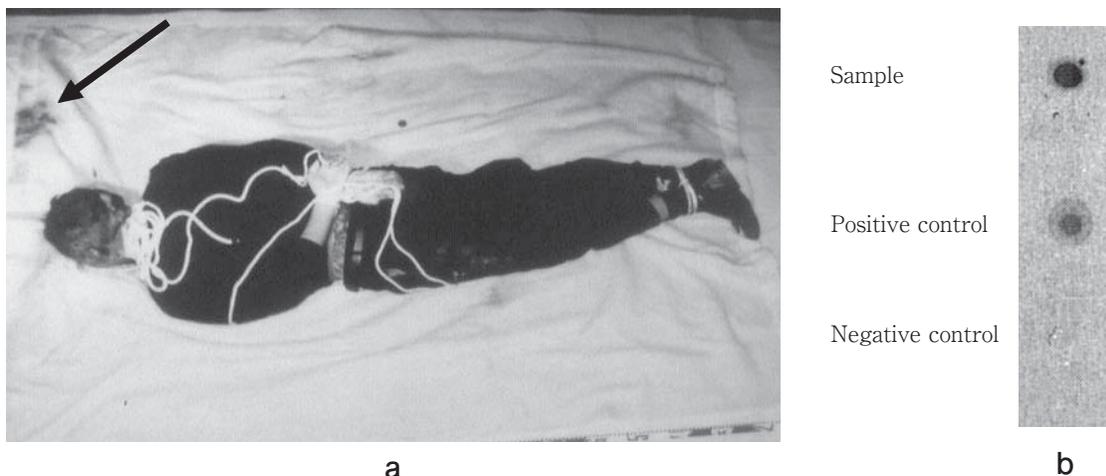


図1 イムノアッセイによる死体血証明の実例
a: 死体の状況と毛布付着血痕(矢印), b: 血痕からの dot-ELISA によるヒトミオグロビン検出成績。

とも可能である。

このような視点から、筆者らは、ミオグロビン検出に基づくヒト骨格筋の証明法ならびに扁平上皮癌関連抗原（SCC）の検出に基づくヒト皮膚の証明法¹⁸⁻²⁰⁾を開発した。図2 aは、29歳男性が左脇腹を中空の金属棒で刺されたとされる傷害被疑事件において、現場から発見された組織片である。この組織片に、筆者らのヒト皮膚ならびに骨格筋の証明法を適用すると、肉眼的に皮膚に見える1の部分、および筋肉に見える2の部分が、それぞれヒト皮膚およびヒト骨格筋であることを証明できた（図2 b）。この事例では幸運にも試料が十分あり、古典的な方法によっても結果の正しさを確認している。なお、この免疫アッセイによるヒト皮膚およびヒト骨格筋の証明法は、高度腐敗あるいは乾燥などの劣悪な状態の試料に対しても適用可能であることを確認している。

また筆者らは、ニューロフィラメントの検出による脳の同定法も考案している²¹⁾。脳は体外へ最も脱出しやすい臓器で、ひき逃げ交通事故事例で、加害車両の車底部や路上から微小組織片として発見されることも多い。多重轢過の事例2例に本法を適用して有用性を確かめているが、詳細は文献を参照されたい。

文 献

- 1) Yoshitome K, Miyaishi S, Ishikawa T, Yamamoto Y, Ishizu H : Distribution of orally-ingested hydrochloric acid in the thoracoabdominal cavity after death. *J Anal Toxicol* (2006) 30, 278-280.
- 2) Ishikawa T, Miyaishi S, Tachibana T, Ishizu H, Zhu B-L,

Maeda H : Fatal hypothermia related vacuolation of hormone-producing cells in the anterior pituitary. *Legal Medicine* (2004) 6, 157-163.

- 3) Kondo T, Ohshima T, Sato Y, Mayama T, Eisenmenger W : Immunohistochemical study on the expression of c-Fos and c-Jun in human skin wounds. *Histochem J* (2000) 32, 509-514.
- 4) Ishikawa T, Miyaishi S, Tachibana T, Yamamoto Y, Ishizu H : Role of adenohipophyseal mixed cell-follicles in age estimation. *Acta Med Okayama* (2003) 57, 83-89.
- 5) Von Renteln-Kruse W, Krause T, Anders J, Kühl M, Heinemann A, Püschel K : High-grade pressure sores in frail older high-risk persons. A retrospective postmortem case-control-study. *Z Gerontol Geriatr* (2004) 37, 81-85 (in German).
- 6) 松澤明美, 田宮菜奈子, 宮石 智, 山本秀樹, 山崎健太郎, 本澤巳代子 : 法医剖検例からみた高齢者死亡の背景要因—孤独死対策のために。厚生省の指標 (2008) 印刷中。
- 7) Miyaishi S, Moriya F : Immunoassays, forensic applications ; in *Encyclopedia of Analytical Science Vol. 4*, Worsfold, Townshend, Poole (eds), Elsevier, Oxford (2005) pp 329-334.
- 8) Doi Y, Yamamoto Y, Inagaki S, Shigeta Y, Miyaishi S, Ishizu H : A new method for ABO genotyping using a multiplex single-base primer extension reaction and its application to forensic casework samples. *Legal Medicine* (2004) 6, 213-223.
- 9) Ono T, Miyaishi S, Yamamoto Y, Yoshitome K, Ishikawa T, Ishizu H : Human identification from forensic materials by amplification of a human-specific sequence in the myoglobin gene. *Acta Med Okayama* (2001) 55, 175-184.
- 10) Vallejo G : Human chorionic gonadotropin detection by means of enzyme immunoassay : a useful method in forensic pregnancy diagnosis in bloodstains. *J Forensic Sci*

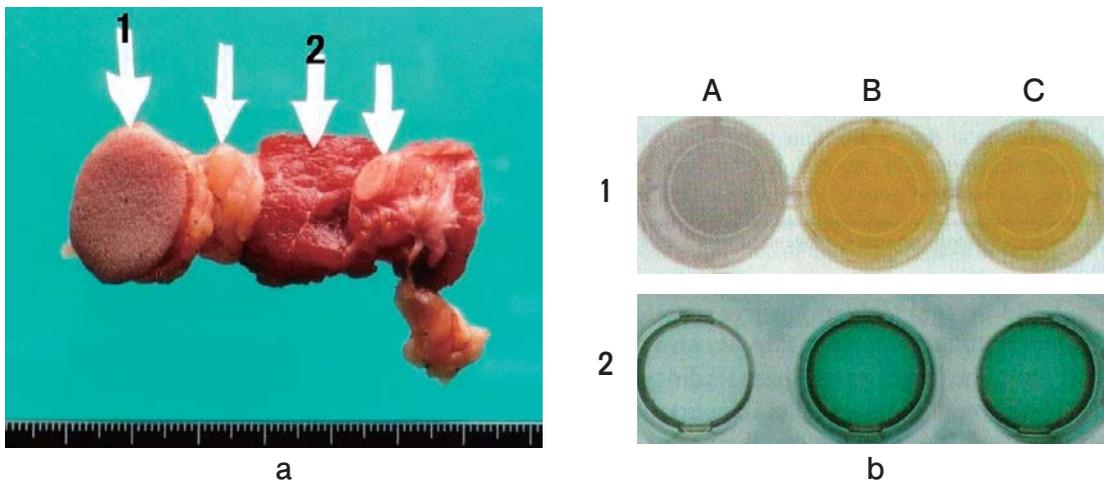


図2 イムノアッセイによるヒト皮膚および骨格筋証明の実用例
a : 現場遺留の組織片。肉眼的に皮膚様(1)あるいは骨格筋様(2)に見える部分がある。b : 組織片からの扁平上皮癌関連抗原(1)およびミオグロビン(2)の検出成績。A : 陰性対象, B : 陽性対象, C : 組織片。

- (1990) 35, 293-300.
- 11) Kunito K, Yamamoto Y, Ishizu H : Differentiation of fetal/neonatal bloodstains from adult bloodstains by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of α -fetoprotein and IgA. *Act Crim Japon* (1990) 56, 133-154.
 - 12) Miyaishi S : An Enzyme Immunoassay for Human Myoglobin and Its Application to Forensic Medicine. *Jpn J Legal Med* (1991) 45, 6-25.
 - 13) Miyaishi S, Moriya F, Yamamoto Y, Kitao T, Ishizu H : Discrimination between Postmortem and Antemortem Blood by a Dot-ELISA for Human Myoglobin. *Jpn J Legal Med* (1994) 48, 433-438.
 - 14) Miyaishi S, Kitao T, Yamamoto Y, Ishizu H, Matsumoto T, Mizutani Y, Heinemann A, Püschel K : Identification of menstrual blood by simultaneous determination of FDP-D dimer and myoglobin contents. *Jpn J Legal Med* (1996) 50, 400-403.
 - 15) Seo Y, Takahama K : A highly sensitive sandwich enzyme immunoassay for human liver-specific antigen (LSA) and its forensic application. *Jap J Legal Med* (1994) 48, 150-155.
 - 16) Seo Y, Kakizaki E, Takahama K : A sandwich enzyme immunoassay for brain S-100 protein and its forensic application. *Forensic Sci Int* (1997) 87, 145-154.
 - 17) Matsuda H, Seo Y, Takahama K : A sandwich enzyme immunoassay for human muscle-specific beta-enolase and its application for the determination of skeletal muscle injury. *Forensic Sci Int* (1999) 99, 197-208.
 - 18) Kitao T, Miyaishi S, Ishizu H : Identification of Human Skeletal Muscle by Detection of Human Myoglobin Using a Double-sandwich ELISA. *Forensic Sci Int* (1995) 71, 205-214.
 - 19) Kitao T, Miyaishi S, Yamamoto Y, Ishizu H : Identification of Human Skin from a Tissue Fragment by Detection of Squamous Cell Carcinoma-related Antigen Using an Enzyme Immunoassay. *Forensic Sci Int* (1996) 83, 81-86.
 - 20) Kitao T, Miyaishi S, Ishizu H : Identification of Human Skin from Tissue Fragments Left in Various Conditions Using an Enzyme Immunoassay for Squamous Cell Carcinoma-related Antigen. *Jpn J Legal Med* (1997) 51, 297-300.
 - 21) Takata T, Miyaishi S, Kitao T, Ishizu H : Identification of human brain from a tissue fragment by detection of neurofilament proteins. *Forensic Sci Int* (2004) 144, 1-6.