



精液斑のスペルミンならびにコリンの酵素的証明法

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 修, 服部, 秀樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1767

81

精液斑のスペルミンならびにコリンの酵素的証明法

鈴木 修・服部 秀樹 (浜松医大)

精液中のスペルミンとコリンは、古くから精液の証明の示標として用いられてきた。従来の方法は、それぞれの結晶を形成させ、顕微鏡的にしらべるものであるが、今回われわれは、精液のスペルミンとコリンの新しい酵素的証明法を確立したので報告する。

1. スペルミン証明法

本法の原理は、精液中のスペルミンをウシ血漿アミン酸化酵素(スペルミン酸化酵素)と反応させ、生成した過酸化水素をペルオキシダーゼと反応させ、その際、無色の2',7'-ジクロロフルオレスチン(DCF)が黄緑色の2',7'-ジクロロフルオレサインに変化することを利用して、肉眼で判定するものである。

試薬 I: 2mgのペルオキシダーゼと 2mgのウシ血漿アミン酸化酵素を 10mlの 0.1Mトリス緩衝液(pH 7.0)(0.1Mホウ酸、0.1mM EDTAを含む)に溶解させる。

試薬 II: 1mgの DCFを少量の 0.1N NaOHに溶解させ、塩酸溶液で pHを 7.0に合わせ、全量を 10mlとする。

操作法: 試料を小試験管の底に入れ、試薬 Iと試薬 IIをそれぞれ2滴ずつ落とし、アルミホイルで遮光して、37°Cで 5~10分加熱し、出現する黄緑色を肉眼で判定する。ブランクとして、ろ紙の小片を切り出し、同上の操作を施して、判定の参考とする。

本法は感度がきわめて高く、8倍希釈の精液斑でも十分陽性となる。5年間室温に放置した精液斑でも全例陽性であり、10~20年間放置したものでは、10例中 9例陽性であり、古い精液斑にも適用していることがわかった。本法は特異性にもすぐれ、ヒト体液の斑痕では、精液以外に、尿でわずかな陽性例を認めたが、他の体液ではすべて陰性であった。本法の欠点としては、使用する DCFが光に対して不安定であり、遮光に神経をつかわなくてはならないことである。

2. コリン証明法

本法の原理は、精液中のコリンを、バクテリアから精製したコリン酸化酵素と反応させ、スペルミンのはあいと同様に、生成した過酸化水素をペルオキシダーゼと反応させ、その際、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N-アセチルエチレンジアミン(EMAE)と 4-アミノアンチピリンが反応して、紫色色素を形成させ肉眼で判定するものである。

試薬 I: 2mgのペルオキシダーゼと 2mgのコリン酸化酵素を 5mlの 0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)に溶解させる。

試薬 II: 2mgの EMAEと 2mgの 4-アミノアンチピリンを 5mlの同じ緩衝液に溶解させる。

操作法: ガラス板に試料をのせ、試薬 Iと試薬 IIをそれぞれ1滴ずつ落とし、5~10分室温で放置した後に、出現する紫色を判定する。本量色反応は安定であり、ブランクは不要である。

本法は8倍希釈の精液斑で陽性であり、5年放置した精液斑でも全例陽性である。ヒト体液斑では精液以外すべて陰性であった。本法の発色系はきわめて安定で、生成する色調も紫であり判定しやすい。本法は DCF法にくらべて感度は低い、精液中にはスペルミンよりもコリンの方がはるかに多量存在するため、実際には EMAE法で十分である。

以上のスペルミンとコリンの酵素的証明法は、従来の方法にくらべて、感度、特異性にすぐれ、しかもきわめて簡易で、30分以内に 100サンプル以上も処理することが可能であり、法医学の実用にきわめて適しているものと思われる。