

電気泳動を利用したゲル内同時的沈降反応による微量血痕の種属鑑別

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: forensic serology species identification bloodstain electrophoresis simultaneous precipitin reaction 作成者: 藤岡, 良憲 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8201

電気泳動を利用したゲル内同時的沈降反応による 微量血痕の種属鑑別

金沢大学医学部法医学講座 (主任: 永野耐造教授)

藤岡良憲

(平成2年5月31日受付)

微量血痕の人獣鑑別(人血証明)法に関しては、これまで、幾つかの方法がある。しかしながら従来の方法では、いずれも一回の検査で一種類の抗血清のみしか使用し得ないため、法医鑑識実務上試料の状態やその量的問題により、時として血痕の人獣鑑別(人血証明)が明確に判定できず、犯罪の立証はもとより犯罪捜査上非常に困難をきたす場合も少なくなかった。そこで、種々の状態の微量試料から、複数のヒト特異的抗原について容易に検査しうる、且つ信頼度の高い方法の開発が急務とされてきた。このような観点から、Naganoら(1986年)は血痕捺糸をそのままアガロースゲル内に挿入して電気泳動し、分離された種々の可溶血液成分について、同時的にゲル内沈降反応を行い種属鑑別する方法を報告している。本研究では、同法が種々の鑑定資料に法医鑑識実務上果たして実際に適用し得るかどうかについて、実験的に種々の条件下の微量血痕について基礎的に検討した。さらに、実際の犯罪現場から採取された鑑定資料にも応用し、本法の実用性について検討した。本法では、試料を加熱固定(120°C, 30秒間)して、直接アガロースゲル内に挿入し、電気泳動(5V/cm 2時間)を行った。試料を取出したのち、ゲル内の各血液成分の泳動位置に小孔をあけ、抗ヒトアルブミン(anti-human albumin, 抗Alb)、抗ヒト全血清(anti-human whole serum, 抗WS)、抗ヒトヘモグロビン(anti-human hemoglobin, 抗Hb)、抗ヒトトランスフェリン(anti-human transferrin, 抗Tf)、抗ヒト α 1アンチトリプシン(anti-human α 1 antitrypsin, 抗AT)および抗ヒト免疫グロブリン(anti-human immunoglobulins, 抗Ig)の各抗血清を注入、感作後(6時間)沈降反応を観察した。その結果、市販の抗血清を未吸収のまま使用した場合でも、抗ATおよび抗Tf血清での沈降反応により、霊長類以下の動物血痕と識別可能であった。さらに、ニホンザル血清および溶血液で吸収した抗血清を使用するとニホンザル血痕とも識別可能であった。希釈された血液の斑痕(希釈血痕)では、本実験条件下では、4倍希釈血痕まではすべての抗血清に対して沈降反応が認められた。また、血痕作製後、1年位までのものではすべての抗血清で沈降反応が認められた。2年から4年位経過したものでは抗Albおよび抗WS血清で沈降反応が認められたが、6年以上経過するとすべての沈降反応は認められなくなった。調味料、果実汁、飲料、鉱物油などと重畳したいわゆる汚染血痕試料では、いずれの場合でもこれらの汚染物質の影響はなく、特異的沈降反応が観察された。ロイコマラカイトグリーン試薬またはルミノール試薬の1回噴霧による血痕予備検査は、本法施行上悪影響を及ぼすことが認められた。ルミノール反応による影響は前者より少なかった。木綿繊維製品、ティッシュペーパー、トイレットペーパー、半紙、障子紙、ろ紙などの紙製品をはじめ、従来の方法では検査し得なかった薄板、ベニヤ板、マッチ棒などの木製品に浸透付着した血痕試料でも、抽出操作などの前処理を施すことなく、試料の小片そのままの状態でも本法を適用しうるため、簡便迅速に種属鑑別し得た。また、新鮮野菜片などに付着した血痕については、一般に加熱固定を行わずにそのまま検査する方がよい成績が得られることも判明した。さらに、犯罪現場などから採取した実際の鑑定資料に適用したところ、ガーゼ片転写血痕、着衣、ティッシュペーパー、木材片など種々の物体に付着した血痕について、検体の種類あるいは汚染の有無にかかわらず人血証明が可能で、実務上の種々の状態の試料について広く適用し得ることが示された。

Key words forensic serology, species identification, bloodstain, electrophoresis, simultaneous precipitin reaction

法医鑑識実務の中で、血痕の種属鑑別(人血証明)は重要な日常業務の一つである。被検試料が比較的少量で新鮮な場合には特段の問題はないが、微量で種々の修飾を受けている場合の検査は極めて困難である。試料放置の環境によって、腐敗、汚染、熱などの影響が加わったり、加えて陳旧化など種々の悪条件が重なり、更に浸透性血痕など血痕自身の問題もあるためである。このような種々様々の血痕試料すべてについて

正確且つ簡単に人血証明を行うにはまだ多くの問題がある。

血証明は、主として法医免疫学的方法、特にヒトヘモグロビン(hemoglobin, Hb)やヒト血清タンパクを指標とする沈降反応によって検査が行われており、従来、顕微沈降反応¹⁾、沈降電気泳動法²⁾、リングテスト(重層法)、オクタロニー法などが利用されてきている。微量血痕の種属鑑別法として、顕微沈降反応は前処理は不要で試料そのものについて検査しうるすぐれた方法であるが、希釈血痕には不向きとされている³⁾。その他はいずれも試料の浸出(抽出)液について検査を行うもので、沈降電気泳動法は泳動中に検体が濃縮され鋭敏度は高まるが、非特異的な沈降物が生ずることがあり³⁾、リングテスト(重層法)は混濁した試料あるいはルミノール検査後の試料には不向きで、オクタロニー法は感度が低い。また、これらの諸法はそのままでは汚染など様々な修飾をうけた血痕すべてに適用されうるものではない。さらに、これらの方法の持つ宿命的な難点として、一回の検査でヒトに由来する抗原を一つだけしか検出し得ないことがあげられる。もし同一試料について、ヒト由来の複数の抗原を同時に検出し得るなら、より多面的な情報が得られ、正確な種属鑑別が可能となる。以上の観点から、Naganoら⁴⁾は血痕捺糸を直接ゲル内で電気泳動し、分離した種々の可溶成分について、同時にゲル内沈降反応を行い種属鑑別する方法を報告している。本研究では、法医鑑識実務上への具体的応用の可能性を検討するため、対象の試料の種類も捺糸のみでなく、実生活上のさまざまなものに広げ付着浸透、汚染など種々の状態を想定した血痕試料を実験的に作製し検討し、さらに実際の犯罪現場における種々の鑑定資料にも応用し、本法の実用性について検討した。

材料および方法

I. 材 料

1. 血液

血液型既知のヒト(30名)および9種類の動物(チンパンジー、ニホンザル、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ニワトリ、魚(タイ)各2個体)の血液を採取し、実験に供した。

2. 血痕付着物体(担体)

実務上よく取扱われる血痕の付着物体(担体)として、下記のものを選んだ。

1) 繊維製品

天然繊維製品、化学繊維製品およびそれらの混紡品を以下のように20品目選んだ。シャツ(綿100%)、ワイシャツ(ポリエステル65%麻35%)、ポロシャツ(ポリエステル30%綿70%)、ポロシャツ(ポリエステル50%綿50%)、スポーツシャツ(綿100%)、背広(ポリエステル50%毛50%)、ブラウス(綿100%)、パジャマ(綿100%)、ズボン(綿100%)、ズボン(ポリエステル100%)、ズボン(ポリエステル70%毛30%)、靴下(綿100%)、パンティーストッキング(ナイロン100%)、ハンカチ(綿100%)、シーツ(綿100%)、包帯(綿100%)、ロープ(綿100%)、紐(麻またはビニロン100%)、風呂敷(ナイロン100%)。

2) 紙類

ティッシュペーパー、トイレットペーパー、半紙、ろ紙、障子紙、新聞紙、上白紙、藁半紙、封筒紙、タバコ紙の10品目。

3) 木製品

マッチ棒、爪楊枝、割箸、薄板、アイスキャンディー棒、角材片、竹串、障子棧、摺粉木、ベニヤ板の10品目。

4) 植物片

キャベツ、レタス、ホウレンソウ、ハクサイ、ネギ、玉ネギ、ピーマン、ジャガイモ、サツマイモ、ダイコン、ゴボウ、サトイモ、ニンジン、トマト、ブロッコリ、モヤシ、シイタケ、シメジ、ナメコ、エノキタケの20品目。

3. 汚染物質

1) 調味料類

Abbreviations: 抗 Alb 血清, anti-human albumin serum; 抗 AT 血清, anti-human α 1 antitrypsin serum; 抗 Hb 血清, anti-human hemoglobin serum; 抗 Ig 血清, anti-human immunoglobulins serum; 抗 Tf 血清, anti-human transferrin serum; 抗 WS 血清, anti-serum against human whole serum; CBB, Coomassie brilliant blue

醤油, 味噌, ソース, ケチャップ, マヨネーズ, ドレッシング, 酢, 日本酒, 味淋, サラダ油の10種類.

2) 果物汁

リンゴ, ミカン, ナシ, ブドウ, パイナップル, モモ, グレープフルーツ, プリンスメロン, イチゴ, キュウイの10品目.

3) 飲料

市販のコーヒー, ココア, 紅茶, 牛乳, ヤクルト, リンゴジュース, オレンジジュース, ジンジャエール, ハチミツレモン, オロナミンCドリンクの10品目.

4) 鉱物油

ガソリン, 灯油, 軽油, 重油の4種類.

4. 血痕試料

1) 実験的に作製した血痕試料

i. 各種担体付着血痕

上記(I-2)の各種繊維素材品, 紙類, 木製品および植物片等60品目の日常生活物品に新鮮血液 $5\mu\text{l}$ を付着させ, 室温で乾燥させた. 抗血清の検討およびブラインドテストには, 上記(I-1)のヒト血液および9種類の動物血液各 $1\mu\text{l}$ を長さ約5mmの木綿擦糸5本に付着させ, 室温で乾燥させたものを使用した.

ii. 希釈血痕試料

ヒト血液を2倍~512倍まで倍数希釈し, それらの溶血液 $1\mu\text{l}$ を木綿擦糸5本に付着させ, 室温で乾燥させた.

iii. 陳旧血痕

冷暗所に3ヶ月, 6ヶ月, 1年, 2年, 4年, 6年, 8年, 10年間保存したヒト血痕木綿擦糸を使用した.

iv. 汚染血痕

各種調味料, 飲料および鉱物油など計34品をそれぞれ $5\mu\text{l}$ 宛木綿布に付着させ, その上に血液 $3\mu\text{l}$ 重畳付着させ, 室温で乾燥させ調製した.

v. 血痕予備検査後の試料

作製後3日, 2週間, 1ヶ月, 3ヶ月, 6ヶ月経過した血痕付着木綿擦糸(全血付着のもの約5mm, 2本)に対し, 約50cm離れた位置から, ロイコマラカイトグリーン試薬⁶⁾およびルミノール試薬⁷⁾(いずれも過酸化水素水を含む)1回から5回それぞれ5秒間噴霧した試料を室温で乾燥させたものを使用した.

2) 実際例(犯罪現場での血痕鑑定資料)についての検討

昭和63年~平成元年に石川県下で発生した刑事事件の血痕鑑定資料として保存されていたもの50点について, その一部を検討資料とし, 従来の鑑定方法と組合

せて本法を適応し, 本法の実用性について検討した.

5. 使用抗血清

抗ヒトアルブミンウサギ血清(anti-human albumin serum, 抗Alb血清), 抗ヒト全血清ウサギ血清(antiserum against human whole serum, 抗WS血清), 抗ヒト $\alpha 1$ アンチトリプシンヤギ血清(anti-human $\alpha 1$ antitrypsin serum, 抗AT血清), 抗ヒトトランスフェリンヤギ血清(anti-human transferrin serum, 抗Tf血清), 抗ヒトヘモグロビンウサギ血清(anti-human hemoglobin serum, 抗Hb血清), 抗ヒト免疫グロブリンヤギ血清(anti-human immunoglobulins serum, 抗Ig血清)は, 市販(CAPPEL, Cochranville, U.S.A.)のもの各3ロットを使用した.

15%ヒトヘモグロビン(hemoglobin, Hb)溶液あるいはヒト全血清に対するこれら抗血清の一次拡散による力価は, 抗Alb血清は, 10240~20480, 抗WS血清は, 10240~20480, 抗AT血清は, 128, 抗Tf血清は, 128~256, 抗Hb血清は, 5120~20480, 抗Ig血清は, 1024であった.

なお, これら使用抗血清は, 吸収の処理を行わないそのまま, ニホンザルの血清および溶血液で吸収し, 両者を比較検討した⁸⁻¹⁰⁾.

II. 方法

1. ゲル内電気泳動および沈降反応

1) 試料

擦糸試料の場合は約5mmの長さのものを1~5本宛, その他の試料は, 約0.8mm×5mm大のものを使用した.

2) 前処理

泳動後の試料についてひきつづき血液型検査を行うため, 80°C, 100°C, 120°C, 140°C, 160°Cの各温度で, 30秒間および60秒間電気アイロン(HIA-502F, 東京芝浦電気, 東京)で圧迫加熱し, その固定効果を比較検討した.

3) 電気泳動

0.05Mペロナル緩衝液(pH 8.6)で作製した1%アガロースゲル(Agarose-L)(LKB, Bromma, Sweden)にスリットを作製し, 試料を直接挿入した.

5V/cmの電圧勾配で泳動し, プロムフェノールブルー(石津製薬, 大阪)をマーカーとして利用し, 2.5cm移動したところで泳動を終了した.

4) 抗血清注入

マーカーの泳動位置を基準として, 血痕中の各タンパク成分が分離泳動した位置付近に孔を開け, 対応抗血清を毛細管で注入した. 孔開けには, ディスポーザブルの注射針の先端を直角に切断したものを使用し

た。

5) 感作

アガロースゲルを恒温槽内におき、室温で1時間から24時間感作した後、沈降線を観察した。

6) 染色

ゲルを生食水と蒸留水でよく洗浄し、乾燥させ、クマシーブリリアントブルー (Coomassie brilliant blue, CBB) (SIGMA, St. Louis, U.S.A.) で染色した。

2. ブラインドテスト

ヒト血痕木綿燃糸 (30名), チンパンジー, ニホンザル, ウシ, ブタ, イヌ, ネコ, ウサギ, ニワトリ, 魚 (タイ) の各血痕木綿燃糸 (各2個体) に無作為に番号をつけ、吸収した抗血清で検査を行った。

成 績

1. 検査条件についての検討

1. 試料の量

使用抗血清の量を一定 (0.2 μ l) にし、ヒト血痕木綿燃糸約5mmの長さのものを1本から5本について実験を行ったところ、1本でも各抗血清に対して沈降反応が認められた。特に、抗Alb血清、抗WS血清に対しては強い沈降線の像が認められた。抗AT血清、抗Tf血清、抗Ig血清に対しては上記の抗血清に対する反応と比べ微弱であった。したがって、燃糸については、約5mmの長さのものを2本使用し検討した。

2. 抗血清使用量

ヒト血痕木綿燃糸 (約5mm, 2本) について泳動を行った後、沈降反応に使用する各抗血清の量を0.2, 0.4, 0.5, 0.8, 1.2 μ lで検討したところ、いずれの場合でも沈降反応の強さにはほとんど変化は認められなかった。

3. 感作時間

以上の各実験で、沈降反応発現に要する時間を観察したところ、抗Alb血清、抗WS血清、抗Hb血清では、1時間後ですでに沈降反応が認められ、抗Tf血清、抗Ig血清では、2時間、抗AT血清では、4時間でそれぞれ沈降反応が認められた。

4. 試料の加熱条件

電気アイロンの温度を80°C, 100°C, 120°C, 140°C, 160°Cに設定し、30秒間と60秒間熱板で圧迫加熱し比較検討した。表1に示すように、30秒間加熱においては、120°Cまでは、反応の強さに変化なく各抗血清に対し明瞭な沈降線が認められた。140°C以上では、抗AT血清、抗Tf血清、抗Ig血清に対しては沈降反応は認められなかった。抗Alb血清、抗WS血清、抗Hb血清に対しては、140°Cまで反応が陽性、160°Cでは沈降反応は陰性となった。60秒間加熱では、抗AT血清、抗Tf血清に対する反応は、100°Cまで、抗Ig血清は、120°Cまで反応の強さに変化なく明瞭な沈降線が認められたがそれ以上の温度では沈降反応は認められなかった。また、抗Alb血清、抗WS血清、

Table 1. Simultaneous precipitin reactions of human bloodstains heated at different conditions

Antiserum	Reactivity to human bloodstains heated at			
	120°C for		140°C for	
	30sec	60sec	30sec	60sec
Anti-Alb	+*	+	+	+
Anti-WS	+	+	+	+
Anti-AT	+	-	-	-
Anti-Tf	+	-	-	-
Anti-Hb	+	+	+	+
Anti-Ig	+	+	-	-

Two pieces of about 5mm thread specimens were examined after heating by an electric iron. Anti-Alb, anti-human albumin; Anti-WS, anti-human whole serum; Anti-AT, anti-human α 1 antitrypsin; Anti-Tf, anti-human transferrin; Anti-Hb, anti-human hemoglobin; Anti-Ig, anti-human immunoglobulins.

*+, positive precipitin reaction; -, negative reaction.

抗 Hb 血清に対する沈降反応は、140°Cまでみられ、160°Cでは認められなかった。なお、140°C以上の加熱試料の泳動後のものを観察したところ、肉眼上明らかに Hb 色素の残存が認められた。

II. 抗血清の検討

ヒト、チンパンジー、ニホンザル、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ニワトリ、魚(タイ)の各血痕木綿燃糸について、未吸収の抗血清とニホンザルの血清および溶血液で吸収した抗血清を用い実験した。表 2 に示すように未吸収の抗血清では、ウサギ、ニワトリ、魚(タイ)の血痕ではいずれの場合でも沈降反応は認められなかった。ウシ、ブタ、イヌ、ネコの血痕では、抗 Alb 血清、抗 WS 血清で極く弱い沈降反応が認められた。また、ニホンザルの血痕では、抗 AT 血清を除く各抗血清に対して沈降反応が認められ、ヒトおよびチンパンジーの血痕では、すべての抗血清で沈降反応が認められた。吸収した抗血清を用いた場合は、表 3 に示すようにヒトおよびチンパンジーの血痕においてのみ各抗血清に対して沈降反応が認められたが、ニホンザル血痕などその他の動物の血痕に対しては沈降反応は認められなかった。本実験で使用した各抗血清については、ロットによる相違は認められなかった。

III. ブラインドテスト

吸収した抗血清を使用し、ヒト血痕木綿燃糸(30名分)、チンパンジー、ニホンザル、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ニワトリ、魚(タイ)の各 2 個体の血痕

木綿燃糸について実験したところ、表 4 に示すようにチンパンジーを除く動物の血痕は、すべての抗血清に対し陰性で、ヒト血痕と識別できた。なお、チンパンジー血痕はすべての抗血清でヒト血痕とほぼ同程度の強さで反応し両者を識別し得なかった。

IV. 各種条件下の燃糸付着血痕についての検討

1. 希釈血痕

2 倍から 512 倍までの倍数希釈したヒト溶血液を付着させた木綿燃糸(約 5mm, 2 本)について検討した。表 5 に示すように本研究に用いた市販抗血清では、沈降反応が認められた血痕の最大血液希釈倍数はそれぞれ抗 Alb 血清、抗 WS 血清に対しては 256 倍、抗 Hb 血清では 64 倍、抗 Ig 血清では 16 倍、抗 Tf 血清では 8 倍、抗 AT 血清では 4 倍であった。

2. 陳旧血痕

3 ヶ月、6 ヶ月、1 年、2 年、4 年、6 年、8 年、10 年経過したヒト血痕木綿燃糸(約 5mm, 2 本)では、6 ヶ月までは沈降反応に明らかな変化が認められなかった(表 6)。1 年経過血痕でもほぼ同様の反応であったが、抗 AT 血清、抗 Tf 血清、抗 Hb 血清、抗 Ig 血清に対する沈降線がやや微弱になった。2 年経過血痕では抗 AT 血清、抗 Tf 血清、抗 Hb 血清、抗 Ig 血清に対しての沈降線は認められなくなったが、抗 Alb 血清および抗 WS 血清に対しては依然認められ、4 年経過血痕でも微弱ながら沈降反応が認められた。6 年以上経過した陳旧血痕ではいずれの抗血清に対しても沈降反応は認められなかった。

Table 2. Simultaneous precipitin reactions of various kinds of bloodstains to unabsorbed antisera

Kind of bloodstains	Reactivity to antiserum					
	Anti-Alb	Anti-WS	Anti-AT	Anti-Tf	Anti-Hb	Anti-Ig
Human	+	*	+	+	+	+
Chimpanzee	+	+	+	+	+	+
Japanese monkey	+	+	-	+	+	+
Bovine	+	+	-	-	-	-
Pig	+	+	-	-	-	-
Dog	+	+	-	-	-	-
Cat	+	+	-	-	-	-
Rabbit	-	-	-	-	-	-
Chicken	-	-	-	-	-	-
Sea bream	-	-	-	-	-	-

Two pieces of about 5mm thread specimen were examined after heating at 120°C for 30sec.

*+, positive precipitin reaction; -, negative reaction.

For abbreviations, see Table 1.

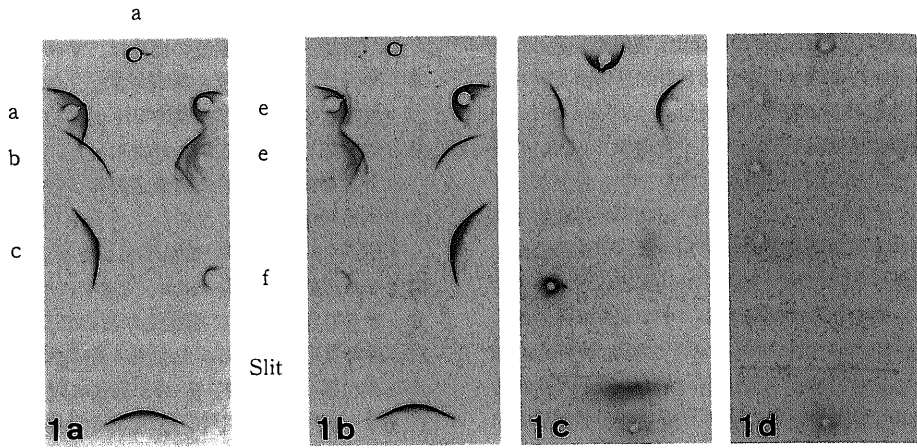


Fig. 1

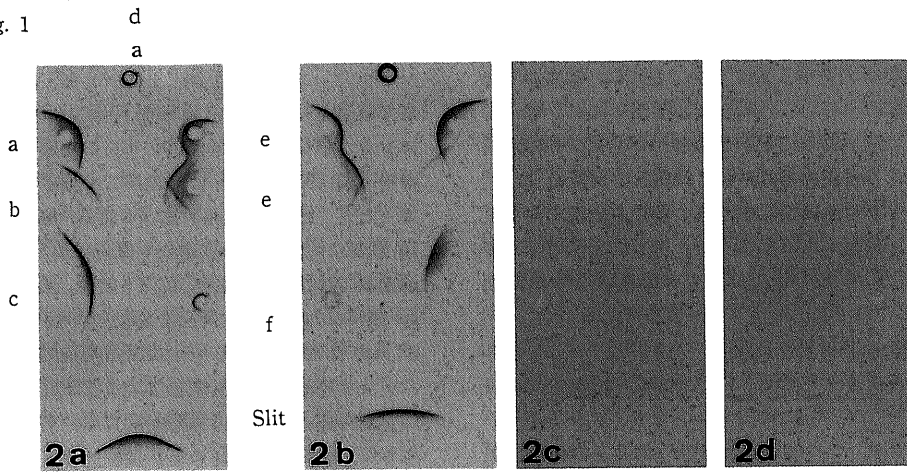
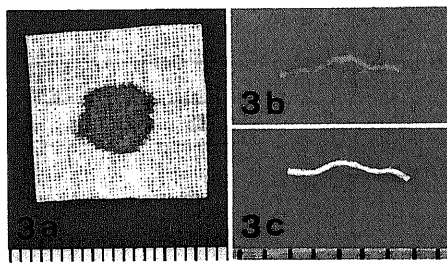


Fig. 2



Cotton cloth (bed sheets)

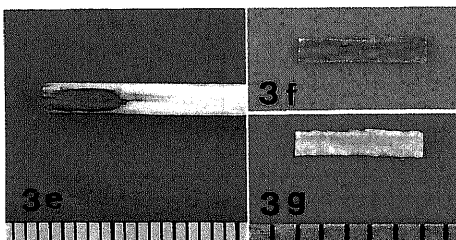


Fig. 3 Wooden piece (matchstick)

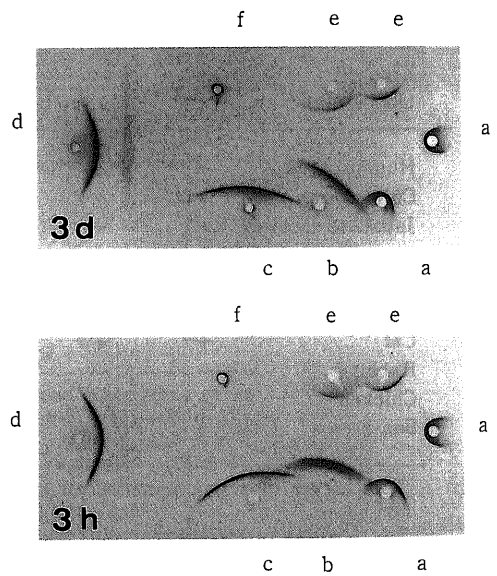


Table 3. Simultaneous precipitin reactions of various kinds of bloodstains to antisera absorbed with the serum and hemolysate of Japanese monkey

Kind of bloodstains	Reactivity to antiserum					
	Anti-Alb	Anti-WS	Anti-AT	Anti-Tf	Anti-Hb	Anti-Ig
Human	+ *	+	+	+	+	+
Chimpanzee	+	+	+	+	+	+
Japanese monkey	-	-	-	-	-	-
Bovine	-	-	-	-	-	-
Pig	-	-	-	-	-	-
Dog	-	-	-	-	-	-
Cat	-	-	-	-	-	-
Rabbit	-	-	-	-	-	-
Chicken	-	-	-	-	-	-
Sea bream	-	-	-	-	-	-

Two pieces of about 5mm thread specimens were examined.

*+, positive precipitin reaction; -, negative reaction.

For abbreviations, see Table 1.

Table 4. Blind study for species identification by simultaneous precipitin reactions

Kind of bloodstains	Number of samples examined	Number of precipitin reaction-positive samples to antiserum					
		Anti-Alb	Anti-WS	Anti-AT	Anti-Tf	Anti-Hb	Anti-Ig
Human	30	30	30	30	30	30	30
Chimpanzee	2	2	2	2	2	2	2
Japanese monkey	2	0	0	0	0	0	0
Bovine	2	0	0	0	0	0	0
Pig	2	0	0	0	0	0	0
Dog	2	0	0	0	0	0	0
Cat	2	0	0	0	0	0	0
Rabbit	2	0	0	0	0	0	0
Chicken	2	0	0	0	0	0	0
Sea bream	2	0	0	0	0	0	0

Two pieces of about 5mm thread specimens were examined.

For abbreviations, see Table 1.

Fig. 1. Simultaneous precipitin reactions of bloodstains of human and some animals with unabsorbed various sera (CBB staining). 1a, human; 1b, chimpanzee; 1c, Japanese monkey; 1d, dog. a, anti-human albumin serum; b, anti-human α 1 antitrypsin serum; c, anti-human transferrin serum; d, anti-human immunoglobulins serum; e, antiserum against human whole serum; f, anti-human hemoglobin serum.

Fig. 2. Simultaneous precipitin reactions of bloodstains of human and some animals with the antisera absorbed with the serum and hemolysate of Japanese monkey. 2a, human; 2b, chimpanzee; 2c, Japanese monkey; 2d, dog. a to f, refer to the footnotes of Fig. 1.

Fig. 3. Species identification by simultaneous precipitin reactions on the blood-stained cloth and wood. 3a, a cotton cloth material (bed sheets); 3b, a small thread piece of the sample tested; 3c, the sample after electrophoresis; 3d, precipitin lines of the blood-stained cloth (CBB staining); 3e, a wooden material (matchstick); 3f, a small piece of the sample tested; 3g, the sample after electrophoresis; 3h, precipitin lines of the blood-stained wooden material (CBB staining). a to f, refer to the footnotes of Fig. 1.

3. 汚染血痕

調味料類, 果物汁, 飲物および鉱物油の各斑痕と重畳したヒト血痕木綿糸糸(約 5mm, 2本)については, いずれの場合でも汚染物質の種類に関係なく, 各抗血清に対しヒト特異的沈降反応が認められ, なお, ブランクとして汚染物質のみ付着の試料についても, 同様に実験したところ, いずれの場合でも各抗血清に対する沈降反応は認められなかった。

V. 血痕予備検査後の試料

作製後3日, 2週間, 1ヶ月, 3ヶ月および6ヶ月後のヒト血痕木綿糸糸(全血付着のもの約 5mm, 2本)に対し, ルミノール試薬を5秒間噴霧した試料について, 同様に実験したところ, 1回噴霧では, 肉眼的には血痕試料の変化は認められず, 抗 Tf 血清, 抗 Ig 血清に対しては極めて弱いながらもヒト特異的沈

降反応が認められたが, 抗 AT 血清に対してはすべて沈降反応は認められなくなった。2回以上の噴霧後は順次抗 Tf 血清, 抗 Ig 血清に対する沈降反応が認められなくなり, 3回噴霧後で抗 Alb 血清, 抗 WS 血清に対する反応が弱くなり, 5回噴霧後ではすべての場合で各抗血清に対しほとんど沈降反応は認められなかった。一方, ロイコマラカイトグリーン試薬に対しては, 試料は青緑色に変色するとともに, やや脱色し, 1回あるいは2回噴霧後では抗 Alb 血清, 抗 WS 血清に対しわずかにヒト特異的沈降反応が認められるのみで, その他の抗血清に対しては沈降反応が認められなかった。3回以上の噴霧後では抗 Alb 血清, 抗 WS 血清に対する沈降反応も極めて弱くなり, 5回ではほとんど反応は認められなかった。

VI. 血痕付着物体の種類

Table 5. Simultaneous precipitin reactions of diluted human bloodstains

Antiserum	Reactivity to human bloodstains diluted by								
	×2	×4	×8	×16	×32	×64	×128	×256	×512
Anti-Alb	+*	+	+	+	+	+	+	+	-
Anti-WS	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Anti-AT	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Anti-Tf	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Anti-Hb	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Anti-Ig	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Two pieces of about 5mm thread specimens were examined.

*+, positive precipitin reaction; -, negative precipitin reaction.
For abbreviations, see Table 1.

Table 6. Simultaneous precipitin reactions of aged human bloodstains

Antiserum	Reactivity of bloodstains aged for							
	Month		Year					
	3	6	1	2	4	6	8	10
Anti-Alb	+*	+	+	+	+	-	-	-
Anti-WS	+	+	+	+	+	-	-	-
Anti-AT	+	+	+	-	-	-	-	-
Anti-Tf	+	+	+	-	-	-	-	-
Anti-Hb	+	+	+	-	-	-	-	-
Anti-Ig	+	+	+	-	-	-	-	-

Two pieces of about 5 mm thread specimen were examined.

*+, positive precipitin reaction; -, negative precipitin reaction.

For abbreviations, see Table 1.

1. 繊維製品

天然繊維製品、化学繊維製品およびそれらの混紡品を任意に20品目選んで、それらに血痕を付着させ検討した。血痕付着状況から、ポリエステルやビニロン等の製品に付着した血痕は、他のものと比較してやや大きな広がりを示し、木綿製品に付着した血液は速やかに深部まで浸透し、境界が明瞭な斑痕を形成した。一方毛、ナイロン等の製品に付着した血液はほとんど浸透せず、そのまま乾燥して隆起状の斑痕を形成した。以上の試料を対象に実験を行ったところ木綿製品に付着の血痕に対しては、各抗血清でヒト特異的沈降反応が認められた。一方、隆起状の斑痕を形成した試料については、乾燥血液片(乾燥血粉)が付着物体から容易に剥ぎとれたため、その乾燥血粉について、直接あるいは木綿燃糸に付着させ検査したところ、いずれの場合でも各抗血清に対して明瞭なヒト特異的沈降反応が認められた。なお、血痕を剝離除去した試料で、肉眼上わずかに血液の浸透が認められるものについて検査したところ、抗 Alb 血清、抗 WS 血清および抗 Hb 血清に対し極めてわずかながらヒト特異的沈降反応が認められた。

2. 紙類

血液が速やかに深部まで浸透するティッシュペーパー、トイレットペーパー、半紙、障子紙、ろ紙に付着の血痕は、操作も容易で各抗血清でヒト特異的沈降反応が明瞭に認められた。一方、あまり浸透しない新聞紙、藁半紙、タバコ紙、上白紙、封筒紙では、付着させた血液は、紙質内への浸透は少なく、表面で隆起状に乾燥したため、乾燥血粉について、直接あるいは木綿燃糸に付着させ検査したところ、いずれの場合でも各抗血清に対して明瞭なヒト特異的沈降反応が認められた。なお、乾燥血液片を剝離除去した試料で、肉眼上わずかに血液の浸透した紙片について検査すると、抗 Alb 血清、抗 WS 血清および抗 Hb 血清に対し微弱ながらヒト特異的沈降反応が認められた。

3. 木製品

血痕付着状況から、表面が加工して滑らかなものはいずれもほとんど血液は浸透せずそのまま乾燥して隆起状の乾燥血液片を形成した。表面が粗ざうで榎目部分にあらわれているものたとえば薄板、ベニヤ板、マッチ棒等は、比較的深部まで血液の浸透がみられた。これらの表面をうすく削るか、或いは小片をそのままゲル内に適用すると、薄板、ベニヤ板、マッチ棒では、各抗血清に対してヒト特異的沈降反応が明瞭に認められた。乾燥血粉では前述同様の成績が得られた。なお、乾燥血液片を剝離除去した試料で、肉眼上

わずかに血液の浸透が認められるものについては、その表面を薄く削りとり、細片をそのままゲル内に挿入し検査すると、抗 Alb 血清、抗 WS 血清および抗 Hb 血清に対し微弱ながらヒト特異的沈降反応が認められた。

4. 植物片

食料品の中から任意に20品目選んで、それらの表面に血液を付着させると、いずれの試料でもほとんど血液の浸透がみられず、そのまま乾燥して隆起状の斑痕となった。各植物片の切断面に付着させた場合、シイタケ、シメジ等のキノコ類およびニンジン、ダイコン、ジャガイモ、サツマイモ等の根菜類でわずかに広がりのある血痕を形成した。上記の試料について同様に検査したところ、乾燥血液片として容易に剥ぎとれる場合は、乾燥血液片について、直接あるいは木綿燃糸に付着させ検査したところ、いずれの場合でも各抗血清に対して明瞭なヒト特異的沈降反応が認められた。なお、血痕を剝離した試料で、肉眼上わずかに血液の浸透が認められるものについて検査したところ、抗 Alb 血清、抗 WS 血清および抗 Hb 血清に対し極めてわずかながらヒト特異的沈降反応が認められた。また、広がりのある血痕を形成した試料について検査したところ、シイタケ、シメジ等のキノコ類では、加熱固定を行うと試料に付着した血痕は植物組織と密着し、肉眼的にも Hb のゲル内への溶出も各種沈降反応もほとんど認められなかった。一方、ニンジン、ダイコン、ジャガイモ、サツマイモ等の根菜類では、上記のような現象は認められず、血痕木綿燃糸の場合と同様各抗血清に対し明瞭なヒト特異的沈降反応が認められた。なお、加熱固定を行わず実験したところ、いずれの場合でも各抗血清に対し明瞭なヒト特異的沈降反応が認められた。また、選択した20種類の植物片等の各成分の影響をみるため各植物片等の浸出液を木綿燃糸に付着させ、同様に検査したところ、いずれも各抗血清に対し沈降反応が認められなかった。電気泳動後のこれらの担体は、原形と特異的性状を残存していた。

VII. 犯罪現場での血痕鑑定資料についての検討

石川県内で昭和63年～平成元年に発生した刑事事件に関して、保存されていた検査資料50点(ガーゼ片に転写した血痕20点、ティッシュペーパーに付着の血痕10点、着衣に付着した血痕16点、木材片に付着した血痕2点、組織片2点)についての検査結果を表7および8に示した。

ガーゼ片に転写した血痕の場合には、肉眼上資料の血痕量もその色調からかなり違いが感じられ、各抗血

Table 7. Simultaneous precipitin reactions of bloodstains on gauze transferred from the actual criminal evidence

Sample number	Color of stain	Preservation period	Contamination	Precipitin reaction
1	Red brown	19m*		++**
2	Red brown	18m	Oil, mud	++
3	Brown	17m		+
4	Dark red	16m	Mud, sand	+++
5	Dark red	15m	Mud, sand	+++
6	Dark red	14m	Mud, sand	+++
7	Brown	13m		+
8	Dark red	12m	Mud, sand	+++
9	Dark red	11m	Oil, mud	+++
10	Brown	10m		+
11	Dark red	9m		+++
12	Red brown	8m		++
13	Dark red	7m	Mud, sand	+++
14	Dark red	6m		+++
15	Dark red	5m		+++
16	Dark red	4m		+++
17	Red brown	3m		++
18	Dark red	1m		+++
19	Dark red	2w		+++
20	Dark red	2w	Mud, sand	+++

* m, month; w, week.

**+, positive reaction to anti-Alb, anti-WS and anti-Hb sera (for abbreviations, see Table 1); ++, positive reaction to all antisera; +++, strong positive reaction to all antisera.

清に対する反応も色調の濃淡に相関した(表7)。すなわち、肉眼的に色調の濃い資料では、各抗血清に対していずれも明瞭な沈降反応が認められた。一方、色調の淡い資料では、抗 AT 血清、抗 Tf 血清、抗 Ig 血清に対しては沈降反応が認められず、抗 Alb 血清、抗 WS 血清、抗 Hb 血清に対してのみ沈降反応が認められた。採取後の経過日数は 2週間~19ヶ月に亘っていたがその影響は特に各抗血清間に認められなかった。資料のうち約半数に油類、泥、土砂等の付着が認められたが、これら汚染された血痕試料でも全てヒト特異的沈降反応を示した。ティッシュペーパーに付着した血痕では、ほとんどの場合肉眼的に血痕の色調も濃厚で各抗血清に対して沈降反応が認められた(表8-a)。それらのうち1点はヒトだ液で希釈された血痕資料で、この資料については、抗 AT 血清、抗 Tf 血清、抗 Ig 血清に対しては沈降反応が認められなかったが、抗 Alb 血清、抗 WS 血清、抗 Hb 血清に対しては明瞭な沈降反応が認められた。着衣に付着した血痕については、いずれの場合も汚染がなく、各抗血清に対して明瞭な沈降反応が認められた(表8-b)。木材に付着し

た2点の血痕については、各抗血清に対して明瞭な沈降反応が認められた(表8-c)。さらに、業務上過失致死事件(いわゆるひき逃げ事件)の被疑車両の底部から採取された微小組織片についても、同様に検査したところ、油類、泥等が僅かに付着している試料であったが、各抗血清に対して沈降反応が認められた(表8-d)。

なお、泳動後のヒト血痕試料について、解離法による ABO 式血液型検査を行ったところ、いずれも型判定可能であった。

考 察

犯罪現場における血痕検査は、法医鑑識上最も重要なものである。これらの血痕は実生活上極めて多種類の担体や、さまざまな修飾をうけたり、新旧多種のものなど、実務上には文字通り種々雑多の血痕について、正確に人血証明が遂行され、個人識別上の根拠を得なければならない。本研究は、このような多種類で且つ微量の血痕について、電気泳動法を適用し血痕中の可溶性成分についてゲル内での同時的沈降反応による種属鑑別法の確立を目的としたものである。一般

Table 8. Simultaneous precipitin reactions of various materials collected on the scene of crime

Kind of materials	Sample number	Color of stain	Preservation period	Contamination	Precipitin reaction
a. Blood-stained paper	1	Brown	17m*	Saliva	+**
	2	Dark red	12m		+++
	3	Dark red	11m		+++
	4	Dark red	7m		+++
	5	Dark red	6m		+++
	6	Dark red	5m		+++
	7	Dark red	3m		+++
	8	Dark red	3m		+++
	9	Dark red	2m		+++
	10	Dark red	2w		+++
b. Blood-stained textile	11	Dark red	20m	+++	
	12	Dark red	19m	+++	
	13	Dark red	17m	+++	
	14	Dark red	16m	+++	
	15	Dark red	15m	+++	
	16	Dark red	14m	+++	
	17	Dark red	11m	+++	
	18	Dark red	10m	+++	
	19	Dark red	9m	+++	
	20	Dark red	7m	+++	
	21	Dark red	4m	+++	
	22	Dark red	3m	+++	
	23	Dark red	2m	+++	
	24	Dark red	1m	+++	
	25	Dark red	2w	+++	
	26	Dark red	1w	+++	
c. Blood-stained wooden wares	27	Dark red	1m	Saliva	+++
	28	Dark red	2w		+++
d. Tissue specimens	29	Dark red	10m		++
	30	Dark red	6m		++

* m, month; w, week.

**+, positive reaction to anti-Alb, anti-WS and anti-Hb sera (for abbreviations, see Table 1); ++, positive reaction to all antisera; +++, strong positive reaction to all antisera.

に、沈降反応による種属鑑別上の特異性と鋭敏度は、使用抗血清の特異性や力価のみでなく、検査対象であるヒト特異的抗原と抗体の量的割合などの検査条件にも影響される。そこで、まず、微量血痕についての本法の至適検査条件を設定したのち、各種条件状態の血痕試料に広く応用し得るかどうか、Nagano ら⁴⁸⁾の報告に従い追試的に確認し、検討を加えた。

抗血清の量を一定 (0.2 μ l) にして、血痕試料の量と沈降反応の強さ、特異性について検討を行ったとこ

ろ、血痕木綿糸約 5mm, 1本でも各抗血清に対して明確に沈降反応が認められることが再確認された。これらの試料に付着していた血痕量としては血液に換算し 0.2 μ l, 乾燥血痕として約 20 μ g に相当する。実務上取扱われる血痕量は血液として 1回 1 μ l 以上 (乾燥血痕として 100 μ g 以上) が必要とされ、これらについて夫々の抗血清を用いるとすれば、それぞれ 5ないし 10本必要とするので、その約 25~50分の 1 の量でも明確に人血証明を行いうることが示された。

一方、血痕試料燃糸 5mm, 2 本に対し、各使用抗血清の量を、0.2 μ l から 1.2 μ l まで段階的に増量しても、沈降反応の強さにほとんど変化は認められなかった。次いで、一般市販の抗血清 0.2 μ l を用いた場合の感作時間について、沈降反応の発現時間を観察すると、抗 Alb 血清、抗 WS 血清、抗 Hb 血清に対しては、感作 1 時間後に、抗 Tf 血清、抗 Ig 血清では 2 時間後、抗 AT 血清では 4 時間後にそれぞれ沈降反応が認められた。

さらに、系統的連続的血痕検査という観点から、人血証明のための電気泳動後同一試料について血液型検査を行うことを前提としている。従って、沈降反応に影響を及ぼさない血球膜固定法として、試料の加熱条件を検討した。140°C 以上の圧迫加熱後は、可溶成分としての Hb は泳動し難くなって、試料に Hb の色調が存在する様になり、同時に各沈降反応は減弱するが、120°C、30 秒間加熱では非加熱の場合と同じ成績が得られ、各抗血清に対する沈降反応に影響を及ぼさないことが再確認された。

以上の結果から、人血証明後の同一検体について、後の血液型検査のための加熱固定条件としては、120°C、30 秒間が至適であるという Nagano ら⁹⁾の成績と一致し、抗血清使用量は 0.2 μ l、感作時間は 4 時間を要することが明らかにされた。

Hb および種々の血清タンパクを指標として免疫血清学的手段により種属鑑別を行う際、特に留意すべきことは、使用する試薬 (抗血清) の特異性の問題である。すなわち、理想的にはヒト血痕のみに反応する特異的な抗血清が得られれば、極めて信頼度の高い人血証明が可能である。この点に関し、抗ヒト HbA₂血清によりヒトとチンパンジーを区別しようという報告¹²⁾もあるが、広く一般に使用されている抗血清では、霊長類のマカク属までの識別がその限界のようである。法医鑑識実務上では、夥しい試料について検査する必要がある、少量の特殊な抗血清を用いることはできないのが実状である。従って、市販の抗血清を利用できれば、入手が容易で、検査の標準化、再現性の保証、客観的評価が可能という多くの利点がある。そこで、本研究では特殊な抗血清を求めず、すべて市販の抗血清を用いている。そのため、これら使用抗血清の特殊性について検討を施した。すなわち、ヒトおよび各種動物 (チンパンジー、ニホンザル、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ニワトリ、魚 (タイ)) の血痕を対象として以下のように検討した。

市販抗血清をそのまま使用した場合、ヒトとチンパンジーの血痕に対しては同様の反応を示し、抗 AT 血

清以外の抗血清はニホンザルの血痕にも強く反応した。さらには、ウシ、ブタ、イヌ、ネコの各血痕に対しては、抗 Alb 血清および抗 WS 血清で弱いながらも沈降反応が認められた。一方、ウサギ、ニワトリ、タイの各血痕には沈降反応は全く認められなかった。以上のうち、本実験条件下では抗 AT 血清はヒトおよびチンパンジーの血痕のみに反応陽性で、ニホンザルを含めそれ以下の動物血痕には反応が認められず注目された。このことは Nagano ら⁹⁾の報告や、壹岐ら¹³⁾の抗ヒト α 1 AT 血清ならびに抗ヒト赤血球膜血清を用いた腐敗血痕からの人血証明法での成績と同様であり、法医鑑識実務上の種属鑑別において有用なことと考えられる。また、抗 Tf 血清、抗 Hb 血清および抗 Ig 血清は、ヒト、チンパンジーおよびニホンザルの血痕のみに反応し、それ以下の動物血痕との反応は認められず¹⁴⁾、日常の鑑定において霊長類以外の動物との重要な鑑別点となり得ると考えられる。一般に、わが国では現実問題として霊長類動物の血痕との鑑別を要することはほとんどなく、特に本邦には生息していないチンパンジーについてはその所在や数が極く限られていることから、抗 AT 血清、抗 Tf 血清、抗 Hb 血清および抗 Ig 血清に対する反応に着目することにより、實際上ヒト血痕と動物血痕との識別が可能であると考えられる。この点については、モノクローナル抗体や ELISA 法などと組み合わせ、チンパンジーとの鑑別について検討したい。いずれにしても本研究では、以下すべてこの吸収抗血清を用いている。

ニホンザル血清および溶血液で吸収した抗血清を使用した場合、表 5 に示すようにヒトとチンパンジー血痕だけに沈降反応がみられ、ニホンザルを含めそれ以下の動物血痕には全く反応しなかった。これらの成績は、Nagano ら⁹⁾、桂ら⁸⁾、堤ら⁹⁾、Tokiwa¹⁰⁾、秋山¹¹⁾、津川ら¹²⁾、壹岐ら¹³⁾などの成績と一致していた。以上の基礎的実験結果をもとに、ブラインドテストを行ったところ、本法の信頼性と再現性が確認された。

法医鑑識実務上取扱われる種々の条件、状態の血痕を想定し、本研究では、希釈血痕、陳旧血痕、汚染血痕等を作製し実験的に検討してみた。

希釈血痕では、各抗血清に対する沈降反応の強さはそれらの力価に依存していた。すなわち、4 倍希釈した血液斑までは、各抗血清に対し陽性の反応を示したが、8 倍希釈血痕で抗 AT 血清 (力価 128) に対する反応が陰性になり、16 倍希釈血痕で抗 Tf 血清 (力価 128-256) に対する反応が、32 倍希釈血痕で抗 Ig 血清 (力価 1024) に対する反応がそれぞれ陰性になった。さらに、128 倍希釈で抗 Hb 血清 (力価 10240-20480) に対

する反応が陰性になり、512倍希釈ですべての抗血清に対し陰性の反応になった。本実験で白色の布に付着した血痕の場合、肉眼的に血痕様斑痕として明らかに確認できるのは256倍希釈血痕までで、それ以上希釈された斑痕では、肉眼的に斑痕として確認するのは困難であった。すなわち、肉眼的にかろうじて血痕様斑痕として識別できる場合には、約5mmの血痕燃糸で抗Alb血清および抗WS血清に対する反応のみがみられ、数本の燃糸が必要となってくる。勿論高力価の特殊な抗血清を用いると、この難点は解消される。

陳旧血痕では作製後1年位まではほとんど変化なく沈降反応が認められたが、2年以上経過した血痕では抗Alb血清および抗WS血清のみに反応が見られ、6年以上経過した血痕ではすべての抗血清に対し反応は認められなかった。このような陳旧血痕に対しては、抗ヒト赤血球血清を用いた解離試験法による人血証明法¹⁹⁾を併用することで、より信頼度の高い人血証明が可能であろう。

汚染血痕の場合について、本研究では身近に存在する調味料類、果汁、飲物および鉱物油などと血液が混合する場合を想定し、実験的にそれらと重畳した血痕について検討すると、いずれの汚染物質にも影響されることなく沈降反応が認められることが確認された。

血痕鑑定に際し、付着物体の色調によっては斑痕を肉眼で識別することが困難な場合がある。そのような場合、血痕予備検査としてルミノール或はロイコマラカイトグリーン検査を行い、陽性部位を確認し試料を採取して、人血証明および血液型検査を行うことになる。そこで、ルミノール試薬などが本研究での微量血痕についての人血証明にどれ程影響するものかを実験的に検討した。ルミノール試薬1回噴霧後の試料では、肉眼的にはほとんど血痕の変化は見られなかったが、ヒト血痕の抗AT血清に対する反応がすべての検体で陰性となった。3回噴霧すると肉眼的に明らかに血痕の脱色が見られ、抗AT血清をはじめ抗Tf血清、抗Ig血清に対する反応が陰性になったが、抗Alb血清、抗WS血清および抗Hb血清に対しては陽性反応が見られた。5回噴霧すると、さらに脱色が著しく、いずれも沈降反応はほとんど陰性となった。以上から、法医鑑識実務において、血痕試料へのルミノール試薬の噴霧は、当然のことながら最小限に留めるべきであることが示された。

また、ロイコマラカイトグリーン試薬では、1回噴霧で脱色が見られ、抗AT血清、抗Tf血清、抗Ig血清および抗Hb血清に対する沈降反応がすべてで陰

性になり、3回噴霧で各抗血清に対する反応はほとんど陰性、5回噴霧ではすべてで陰性になった。以上から、ロイコマラカイトグリーン試薬も血痕に対し、大きく影響することが判明した。

犯罪現場などから鑑定を嘱託される血痕資料は、後述のように、大部分がガーゼ片への転写もしくは着衣をはじめとした繊維素材品に付着の血痕で、次いでティッシュペーパー等の紙類に付着した血痕が多く、稀に木製品などに付着した血痕がある。従って、本法の実際の鑑定への応用のためには、これら付着物体や種類の性状に関わりなく、検査が遂行されなければならない。このことは、本研究では非常に重要なポイントであり、次のように検討した。付着物体の種類については、まず実際例で多い繊維素材品(布片)について検討し、次に紙類、木製品について検討し、さらに植物片まで範囲を広げ検討した。

布片、紙類、木製品などの血痕付着試料では、血液が速やかに深部まで浸透する試料(布片では綿素材品、紙類ではティッシュペーパー、トイレットペーパー、ろ紙、半紙、障子紙、木製品では薄板、ベニヤ板、マッチ棒)ではいずれの場合でもそのまま検査することで血痕の希釈もなく、各抗血清に対し明瞭なヒト特異的沈降反応が認められた。一方、血液があまり浸透しない試料では、血液は表面で隆起状に乾燥する。このような乾燥血液粉では、木綿燃糸に転写させた場合とそのままの場合で検討したところ、いずれも明瞭にヒト特異的沈降反応が認められた。乾燥血液粉を除去し、血液がわずかに浸透している試料では弱いながらもヒト特異的沈降反応が認められた。従来の法医鑑識実務の人血証明法では、木目などにしみ込んだ微量血痕についてそのまま検査することは不可能であった。従って己むを得ず生食水で鑑定資料の木片を浸し、湿潤血液を抽出したのち検査する以外に方法はなかった。そのため、抽出操作により微量の血痕をさらに希釈させるため信頼すべき成績を得ることは困難であった。ところが、本法は直接試料をゲル内に入れ、電気泳動によって、木片内にしみ込んだ血液可溶成分をそのままゲル内に移動させ検査するため、血痕(血液)の損失がなく、木目の深部にしみ込んだ微量血痕に対しても十分信頼度の高い人血証明が可能となるもので、理論的にもすぐれた方法といえ、実務上にも十分応用可能なすぐれた方法ということがいえよう。このことは、上記木片付着血痕についての実験的検討や犯罪現場での実際例で確認された。このことは単に木片付着血痕のみでなく、以下に述べるように乾燥植物片全般についても適応しうることを示している。植

物片への付着血痕では、布片、紙類、木製品と異なり、試料自身の水分の影響のため、加熱固定時の希釈や加熱装置へ血痕が密着し、加熱固定は不適當であった。勿論、非加熱の場合では、いずれも明瞭なヒト特異的沈降反応が認められた。ただ、血液が比較的浸透した乾燥試料（ニンジン、ダイコン等の根菜類、シイタケ、シメジ等のキノコ類）について、加熱固定をし検討したところ、根菜類の場合にはヒト特異的沈降反応が認められた。ただし、キノコ類では、加熱固定した際、血痕は植物組織と密着し泳動時に血液成分が溶出しなくなる現象がみられ、その結果各抗血清に対しほとんど沈降反応は認められなかった。以上から植物片に付着の血痕については、根菜類を除いて加熱固定は検査に支障があるように思われる。

なお、植物中の成分が沈降反応に影響するかどうかをみるために各植物片を乳鉢で練り浸出した液について、同様に検査を行ったがいずれの場合でも各抗血清に対し反応は認められなかった。すなわち、本研究条件下では、血痕付着植物から泳動する物質で本法の人血証明の反応に影響するものはないものと考えられる。

石川県下で発生した刑事事件での鑑定資料のうち、血痕関係の数は、昭和60年～平成元年の5年間では年平均約550件数であり、そのうちの約80%が、血液（血痕）をガーゼ片に転写したもので、残りが血痕付着物体そのままの資料であった。それらのうち、事件の性質上本実験に使用可能な資料50点（転写血痕20点、ティッシュペーパーに付着した血痕10点、着衣に付着した血痕16点、木材片に付着した血痕2点、組織片2点）について、本法適用の可能性について検討した。それらの成績は表8に示しているように、沈降反応の強弱は認められるも、いずれの場合でも人血証明が可能であった。ガーゼ転写血痕では、路面や車両の底部等から採取されたものもあり、一部に油類、泥、土砂等の付着した試料もあったが、いずれの場合でもこれらの汚染物質の影響はなく明瞭な人血証明についての判定は可能であった。血痕の陳旧度については、2週間から19ヶ月に亘る試料もあったが、いずれも著しい差もなく判定できた。このことは2年経過した血痕試料についてもほとんど沈降反応に変化がないという実験成績と一致した。ただ、古い試料ほど実験試料の場合と同じく泳動後の試料に色素の残存がある傾向が認められた。さらに、ティッシュペーパーに付着した血痕、着衣に付着した血痕および木材に付着した血痕についても実験的に作製した時の成績と同様に各抗血清に対し明確に沈降反応が認められた。

ガーゼやろ紙などに転写できない試料のうち、血液

が浸透する試料、例えば綿素材品、ティッシュペーパー、薄板、ベニヤ板などでは、試料をそのまま本法に適用しても検査することができ、血痕を希釈させないため、極めて明瞭な反応が得られ、より微量の血痕に対し、簡便に人血証明が可能なことが明らかにされた。

汚染血痕、陳旧血痕および実際例の血痕資料についての検討結果から、法医鑑識実務上種々の血痕試料に適用可能であることが示された。

なお、本法を適用し人血証明を施行した試料について、そのまま血液型を検査することができるというすぐれた点の実証された。

以上の結果から、アガロースゲル内で電気泳動した後、分離した各種可溶性血液成分についての同時的沈降反応による種属鑑別法（人血証明）は、極めて簡便で特異性にすぐれ、法医鑑識実務上応用範囲が極めて広く、日常の血痕鑑定における人血証明に十分利用しうることが判明した。また、本法適用後の試料について、確実に血液型を判定しようという、極めて重要な利点も実証された。

結 論

ゲル内同時的沈降反応による微量血痕の種属鑑別法について、基礎的検討を加えながら法医鑑識実務上への具体的応用の可能性を検討した。すなわち、実験対象には実生活上の60品目の物体を選び、これらに諸種動物の血液を付着或いは浸透させ、さらに汚染など種々の状態の血痕試料を実験的に作製し検討した。さらに、実際の犯罪現場における種々の状態の血痕鑑定用多数の資料にも本法を適用し、以下のような結果を得た。

1. 電気泳動法を利用したゲル内同時的沈降反応法を用いると、約 $0.2\mu\text{l}$ 程度の極く微量の血痕でも、前処理の必要もなくそのままゲル内に適用することができ、極めて簡便で明確に人血証明が可能であることが示された。

2. 同法に使用する抗血清は、特殊な抗血清の必要はなく市販のものでも、ニホンザル血清などで吸収処理を施すと、微量血痕の鑑定実務上、特異性並びに力価においても十分利用しうることが確認された。

3. 木片、紙片或いは乾燥植物片などのように、浸透性微量血痕については、従来の方法そのままでは人血証明は不可能であったが電気泳動法により、試料を破壊することなく原形を保ちながら、血液成分をゲル内に移動させ、人血証明が可能なことが明確に示された。

4. ルミノールやロイコマカイトグリーンなどの試薬による血痕予備検査を施すと、本法の検査上可成りの悪影響が認められた。

5. 調味料類10品目、果実汁10品目、飲料10品目および鉱物油4品目に汚染されたヒト血痕からも、汚染物質に影響なく、明瞭な沈降反応が認められた。

6. 陳旧血痕では、4年位までの試料でも抗Alb血清および抗WS血清で沈降反応が認められた。6年以上のものでは反応は陰性となった。

7. 繊維製品20品目、紙類10品目、木製品10品目、植物片20品目に亘る多種類の担体に付着させた血痕すべてに対し、人血証明は可能であり、さらに検査済のヒト血痕試料について、解離法でABO式血液型が判定された。

8. 犯罪現場から採取された実際の種々の性状の鑑定資料50点について、同様に検討したところ、いずれの試料にも各抗血清に対して明らかに沈降反応陽性で、血液型まで判定されることが確認された。以上から、法医鑑識実務に本法は十分適用可能であることが示された。

謝 辞

稿を終わるに臨み、御指導と御校閲を賜りました永野耐造教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり、御指導と御助言を戴きました田中宣幸教授(現、産業医科大学法医学講座)、並びに本学の前田均助教授、大島徹講師並びに高安達典助手に感謝いたします。

文 献

- 1) 桂 秀策: 顕微沈降反応法とその応用. 日法医誌, 32, 354-364 (1979).
- 2) Culliford, B. J.: Precipitin reactions in forensic problems. *Nature*, 201, 1092-1094, (1964).
- 3) 原 三郎, 吉岡尚文, 勾坂 馨, 永野耐造, 壹岐裕志: シンポジウム: 血痕検査. 日法医誌, 39, 501 (1985).
- 4) Nagano, T., Tanaka, N., Maeda, H., Takayasu, T. & Ohshima, T.: A procedure of systematic examination on small pieces of blood-stained thread specimens. *Acta. Med. Leg. Soc.*, 36, 210-214 (1986).
- 5) Nagano, T., Tanaka, N. & Maeda, H.: Species identification of bloodstains by simultaneous precipitin reactions after electrophoretic separation of various blood components from small pieces of blood-stained thread in an agarose gel. In W. Klose & M. Oehmichen (eds.), *Festschrift zum 70. Lebensjahr für Otto Pribilla*, 1st ed., p373-380, Verlag Max Schmidt-Römheld, Lübeck, 1990.
- 6) Jones, E. B. & Little, A. F. M.: The Leuco-malachite Test. In F. E. Camps (ed.), *Gradwohl's Legal Medicine*, 2nd ed, p190, John Wright & Sons, Bristol, 1968.
- 7) Jones, E. B. & Little, A. F. M.: The Luminal Test. In F. E. Camps (ed.), *Gradwohl's Legal Medicine*, 2nd ed, p191, John Wright & Sons, Bristol, 1968.
- 8) 桂 秀策, 中野英明, 平野幸五郎, 斉藤 茂, 鈴木堅司: 同一超微量血痕の人血証明と血液型判定の連続検査. 日法医誌, 36, 321-328 (1982).
- 9) 堤 肇, 勝又義直, 木戸 啓: 抗ヒト血清沈降素についての検討. 科警研報告, 35, 120-123 (1982).
- 10) Tokiwa, K.: A sequence of tests of minute human blood stains for human origin identification and ABO blood grouping. *J. Leg. Med.*, 97, 157-164 (1986).
- 11) 秋山和子: ヒト血清アルブミンの種属特異性に関する免疫化学的研究. 医学研究, 47, 27-41 (1977).
- 12) 津川 昇, 平田敬二, 山田定男, 勾坂 馨: ウサギ抗 HbA₂ の種属特異性. 第68次日本法医学会総会講演要旨, 演題番号展31 (1985).
- 13) 壹岐裕志, 大島美奈子, 津田亮一, 原 三郎: 抗ヒト α 1-AT血清ならびに抗ヒト赤血球膜血清を用いた腐敗血痕からの人血証明—人・獣鑑別に関する法医免疫学的研究(第23報)—. 日法医誌, 42, 311-317 (1988).
- 14) 津川 昇, 平田敬二, 山田定男, 大谷 勲, 勾坂 馨: ヒトおよび動物血清の免疫学的研究III. トランスフェリンのヒト特異性の検討. 法医学の実際と研究, 29, 5-12 (1986).
- 15) 壹岐裕志, 福山 武, 原 三郎, 井上徳治, 津田亮一: 抗ヒト赤血球凝集血清(抗Glycophorin A血清)を用いる新しい人血証明法について—人・獣鑑別に関する法医免疫学的研究(第7報)—. 日法医誌, 35, 468-473 (1981).
- 16) 梅津和夫, 柏村征一, 鈴木庸夫, 滝口和彦, 丸子千代松: 市販の抗ヒト赤血球血清による陳旧血痕の人血証明. 法医学の実際と研究, 25, 53-56 (1982).

Species Identification of Minute Bloodstains by Simultaneous Precipitin Reactions in an Agarose Gel after Electrophoresis Yoshinori Fujioka, Department of Legal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, 99, 529—544 (1990)

Key words forensic serology, species identification, bloodstain, electrophoresis, simultaneous precipitin reaction

Abstract

In the forensic examination of bloodstains, it has been impossible to obtain reliable results on the species identification of very minute stains, since conventional methods can identify only one human marker by one test. Nagano et al. (1986) described a technique for simultaneous identification of various human blood components by immunoprecipitation in a gel, after electrophoretic separation, from a very minute thread specimen. On the basis of their report, the present study was carried out in order to establish a method for the species identification of bloodstains on various materials. The procedure was as follows: The specimens were heated to 120°C for 30 seconds and directly introduced into an agarose gel. After electrophoresis at 5V/cm for 2 hours, the specimens were removed and the antisera against human Albumin(Alb), whole serum(WS), hemoglobin(Hb), transferrin(Tf), α 1-antitrypsin(AT), and immunoglobulins(Ig) were pipetted into the corresponding wells punched out in the gel. The precipitin lines were observed after a 6-hour incubation. When examined with the antisera without absorption, human bloodstains were distinguished from the animals, except for non-human primates, through the positive reactions with anti-human AT and Tf. Furthermore, the bloodstains of Japanese monkeys were discriminated from human by the antisera absorbed with the serum and hemolysate of the monkey. The results on the stains of diluted blood depended on the titers of the antisera. Aged bloodstains within about one year showed positive reactions with all of the antisera. The reactivities of stains with anti-human WS and Alb still remained even after 4-year storage. Six-year-old bloodstains gave negative reactions with those antisera. Bloodstains which were contaminated with several seasonings, fruit juices, drinks and mineral oils also showed specific reactions. Screening tests for blood by the luminol and leuco-malachite green reagents showed a harmful influence on the precipitin reactions. Very minute bloodstains on sixty common items of various materials such as textiles, paper and wooden-wares, even those which could not be tested by conventional methods, gave clear positive and specific reactions. In cases of bloodstains on fresh vegetables, a better result was obtained when they were tested without heating. Finally, this method was successfully applied to various kinds of material collected on the criminal scene, such as stains transferred to gauze, stained cloth, paper and wooden-wares. Additionally, using the specimens after electrophoresis, the ABO blood groups could be determined by the absorption-elution method.