

血痕の陳旧度に関する研究 (第1報)

— 室温放置血痕について —

川崎医科大学 法医学教室

津 々 見 明

(昭和56年7月1日受付)

Studies on the Determination of the Age of Bloodstains

Part. 1. Estimation of the Age of Bloodstains
Left Standing at Room Temperature

Akira Tsutsumi

Department of Legal Medicine, Kawasaki Medical School

(Accepted on July 1, 1981)

血痕の陳旧度の判定は法医学上最も重要な課題の一つである。この問題に関して種々の方法が試みられてきたが、満足すべき方法はいまだない。そこで著者はセルロース・アセテート膜電気泳動法を使用する新しい血痕の陳旧度の判定法を試み以下の結果を得た。

1) 全ての血痕につき Alb/Hb 比を計測したが Alb/Hb 比は経日的に血痕付着2カ月後まで減少した。

2) 血痕中の Hb および Alb 濃度は室温保存下で3カ月後まで減少しなかった。

3) 泳動後の染色液を Ponceau-3R から nigrosin および Coomassie brilliant blue-R250 に変えたがその Alb/Hb 比に変化は観察されなかった。

4) Ponceau-3R 染色の血清斑痕の NaOH 抽出液の 510 nm に於ける吸光度は2カ月後まで減少した。すなわち血清斑痕に於ける Ponceau-3R の結合能は経日的に減少する。

以上の結果よりこの Ponceau-3R 染色による電気泳動法は簡便であり実際の法医鑑識上、血痕の陳旧度の判定へ応用ができると考えられた、

It is one of the most important problems in the practice of legal medicine to determine the age of bloodstain.

Various examination methods have been devised to be applied in the practice, but these methods for bloodstain were unsatisfactory.

In this paper, the author reports a new method on the determination of the age of bloodstains by using the technique of electrophoresis on the cellulose-acetate membrane.

The results of this study obtained are as follows.

1) A quantity called the "Alb/Hb ratio" has been derived and calculated for all bloodstains examined. The Alb/Hb ratio decreased with the lapse of time until 2 months after.

2) Concentrations of Hb and Alb in bloodstains were unchanged with the lapse of time at room temperature until 3 months after.

3) When the staining solution was converted to nigrosin and Coomassie-brilliant blue R-250 from Ponceau-3R, the Alb/Hb ratio unchanged with the lapse of time.

4) The optical density (510 nm) of NaOH extracts of Ponceau-3R staining serumstain decreased with the lapse of time until 2 months after. Thus binding affinity of Ponceau-3R by serum albumin deteriorate gradually with respect to time.

From these results, it has been indicated that this Ponceau-3R staining electrophoretic technique is simple and very suitable for the determination of age of bloodstains and this technique can be applied in forensic practice.

緒 言

血痕の陳旧度の判定に関する研究は法医学上きわめて重要でありその研究も種々おこなわれているにもかかわらず、血痕はそのおかれている条件、たとえば温度、湿度、紫外線等により著しく影響をうけるためその判定は困難であり、現在でもその確実な判定方法は存在しない。過去においては血痕の時間経過にともなう色調の変化を分光学的に検討する方法¹⁾、血痕中の chloride の消長を硝酸銀と HCHO でみる方法²⁾等が使用されてはいるがいまだ確実な判定方法とはいえない現状である。

最近 Rajamannar³⁾は血痕の浸出液を免疫的に検討してその血漿蛋白の消失により血痕の陳旧度を判定する方法を報告した。著者は今回、この研究を応用して血漿蛋白の分画に用いられるセルロース・アセテート膜（以下 CA と略）電気泳動法を使用する血痕の陳旧度の研究をこころみたと、Albumin 分画と ponceau-3R との結合能が経日的に低下し、Alb と Hb 比に変化をきたす点から血痕の陳旧度の判定が可能であることを想定し研究をおこなったのでその結果を報告する。

実験材料および実験方法

1) 実験材料：血痕は当大学中央検査部より得た抗凝固剤入りのヒト血液を綿布上に滴下させ室温（10～20℃）に乾燥放置したものを用い

た。同時に同じ抗凝固剤加ヒト血液を 2500 rpm、3 分遠心して得られた血清を 20 μ l ずつ分注器（ギルソン製）にて斑痕とし室温に乾燥放置した血清斑痕、および同じヒト血液を 3000 rpm、3 分遠心して血清成分を除去し 3 回生理食塩水で洗浄して遠心後、生理食塩水で希釈し Ht 値を 50 に調整し血清斑痕と同様に 20 μ l ずつ斑痕にした Hb 斑痕を実験に使用した。

2) 実験方法：血痕の一定量（1 cm \times 1 cm）を採取、細切ののち 0.1 ml の泳動用ペロナール緩衝液（pH 8.6, μ =0.05）で 5 分間抽出、その約 0.8 μ l を CA 電気泳動に使用した。泳動条件は 0.8 mA/cm、泳動時間は 1 時間である。泳動終了後 CA を 3% Ponceau-3R で染色、1% AcOH で脱色、乾燥後デカリンで透明化し自記濃度計（アスカ工業製）による Hb、Alb の積分値より Alb/Hb 比を算出した。

Hb および Alb の定量については Hb は上記血痕を用い Hb 測定キット（和光純薬製）を使用して分光光度計＜日立 100—100 2 型＞を用い 540 nm で測定した。Alb は血清斑痕を用いて Alb 測定キット（和光純薬製）を使用して Hb と同様に 630 nm で測定し、さらに M-Partigen-Albumin（ヘキスト社製）を使用して免疫的に定量した。また Ponceau-3R の血清斑痕、Hb 斑痕の染色性については 20 μ l の血清斑痕、Hb 斑痕を 3% Ponceau-3R で染色、脱色後 0.01 N NaOH 5 ml で 10 分抽出、510 nm での吸光度を測定した。

実験成績

1) CA 電気泳動法による血痕の陳旧度

血痕の CA 電気泳動法によるパターンを **Fig. 1** に示す。室温保存の血痕は **Fig. 2** に示すごとく作製直後、1 週、2 週、3 週、4 週、6 週、2 カ月と観察したが経日的に Alb/Hb 比は減少した。とくに血痕作製より 3 週で著しく減少し、4 週目以降は徐々に減少した。

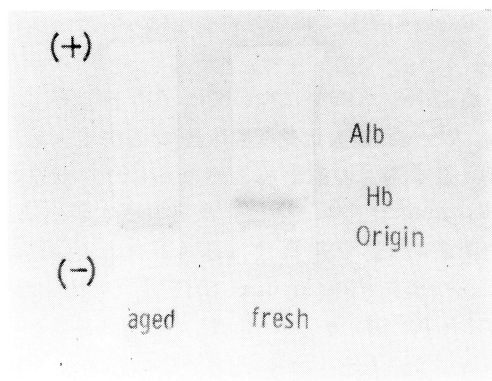


Fig. 1. Cellulose acetate membrane electrophoresis (pH 8.6) of the bloodstain.

Right: fresh bloodstain. Left: aged bloodstain.

(+): anode, (-): cathode.

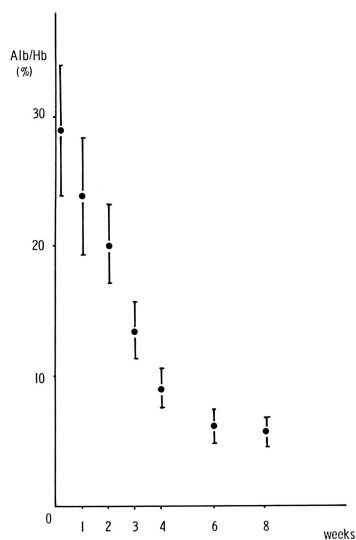


Fig. 2. Time-lapse changes concerning Alb/Hb ratio in aged bloodstains.

2) 血痕中の Hb および 血清 斑痕中の Alb の濃度変化

血痕浸出液中の Hb, 血清斑痕浸出液中の Alb の濃度変化について経日的変化を検査したが, **Fig. 3** に示すごとく Hb 量および Alb 量において変化はみられなかった。さらに M-Partigen-

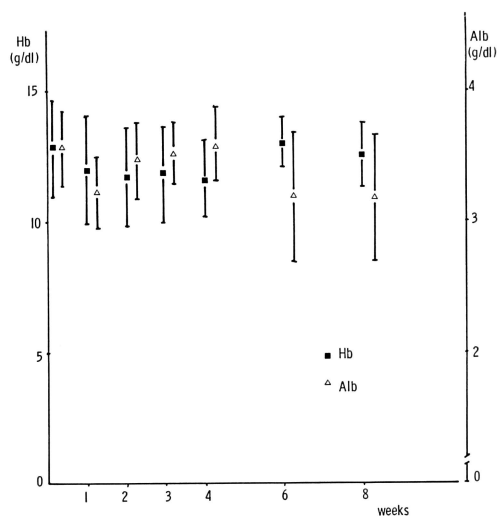


Fig. 3. Time-lapse changes of concentration of Hb in bloodstain and Alb in serumstain.

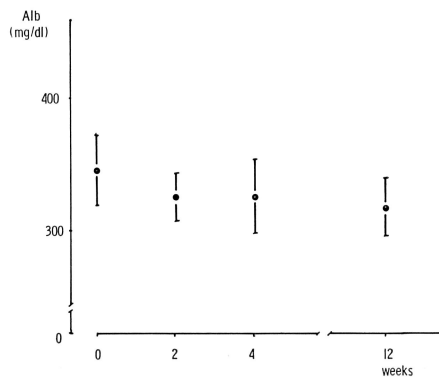


Fig. 4. Quantitative determination of human serum albumin by single radial immunodiffusion method.

Albumin を使用して一元放射状免疫拡散法により血痕を上記条件で抽出し、その血痕中の albumin 量につき検査をおこなったが血痕浸出液の Alb 量は血痕作製直後、2 週、4 週、12 週経過の血痕において差はみとめなかった (**Fig. 4**)。すなわち Hb および Alb は血痕中

ですくなくとも3カ月位では濃度変化はおこらないと考えられた。

3) 他の染色液にたいする Alb/Hb 比の変化

CA 電気泳動後の染色液を nigrosin に変えて Alb/Hb 比について検討した結果、新鮮血痕と2カ月陳旧血痕において Alb/Hb 比に差はみとめなかった。さらに Coomassie brilliant

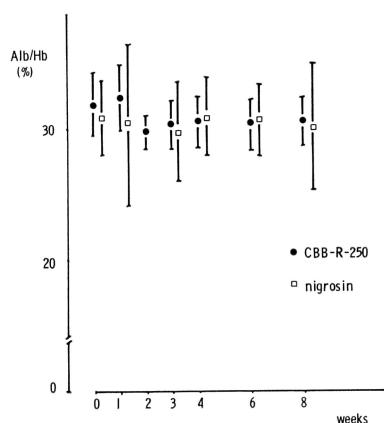


Fig. 5. Time-lapse changes of binding affinity of nigrosin and CBB-R-250 by bloodstain.

blue R-250 (以下 CBB-R-250) を使用して同様に比較したが CBB-R-250 においても差をみとめず、この Alb/Hb 比の経日的な減少は Ponceau-3R においてのみあらわれることを確認した (Fig. 5)。

4) Ponceau-3R の染色能の変化

血清斑痕および Hb 斑痕について Ponceau-3R との結合能をその 510 nm での吸光度の変化で検討したところ Table 1 に示すように血清斑痕での Alb の吸光度は有意に減少したが Hb 斑痕の Hb の吸光度に変化はなかった。

Table 1. Time-lapse changes of optical density of NaOH extracts of Ponceau-3R staining serumstain and Hb stain in visible region (510 nm).

weeks	0	1	2	3	4	6	8
serum stain	0.654 ±0.04	0.556 ±0.03	0.489 ±0.02	0.423 ±0.02	0.384 ±0.01	0.367 ±0.01	0.338 ±0.02
Hb stain	1.19 ±0.10	1.13 ±0.09	1.10 ±0.12	1.10 ±0.06	1.08 ±0.08	1.12 ±0.10	1.09 ±0.12

考 察

血痕中の Hb 量について Hb 測定キットを使用して検討したが約2カ月経過しても濃度変化は観察されなかった。また CA 電気泳動による Hb の積分値にも差はみとめられなかった。桂⁴⁾らは血痕の浸出液の透過率および免疫学的方法により血痕の Hb 量をもとめているが、彼らによれば血痕作成2週間で Hb 量は減少するが以後はほぼ一定の値を示すという。しかし著者の今回の実験ではとくに変化はみられなかった。

血痕中の Alb 量については Alb 測定キットおよび一元放射状免疫拡散法によりもとめた Alb 量に有意の差をみとめなかった。前述の Rajamannar らによれば、血痕中の血漿蛋白は免疫電気泳動で観察すると Alb は血痕作製後15日で消失、 α -globulin も15日、 β -globulin は1~10カ月、 γ -globulin は1年で消失すると報告している。しかし四宮^{5),6)}らによる一連の寒天免疫電気泳動による研究によれば Alb は12カ月までは残存すると報告されており、桂らも一元放射状免疫拡散法による血痕中の Alb は3カ月位までは減少しないと報告している。著者の実験においても Alb 量には有意の差はなく、血痕化しても血清学的な変化をうけずに室温保存環境下では相当安定であると考えられた。

以上より CA 電気泳動による Alb/Hb 比の減少は Hb, Alb の濃度変化によるものではなく Ponceau-3R との結合能の差によると考え他の染色液での Alb/Hb 比につき検討したが nigrosin および CBB-R-250 で Alb/Hb 比の減少はみとめられず、Alb/Hb 比の減少は Ponceau-3R

においてのみみとめられることを確認した。Ponceau-3R と蛋白の結合能については Hb 斑痕では吸光度に変化がなく、血清斑痕のみに変化をみとめることから Alb は経日的に Ponceau-3R との結合能が低下することが判明した。一般に蛋白と色素の結合能については Klotz ら⁷⁾ は Ponceau-3R と同じ azosulfonic acid である methyl orange とウシ Alb の結合能につき検討しているが、彼らによれば色素と蛋白の結合能は蛋白の静電的性質に由来しておりその静電的性質の変化により色素結合能が変化するとされている。実際の電気泳動では蛋白質の実効電荷が負から泳動後の固定によって酸性側の正の荷電に移行したあと色素 anion の負の電荷とが静電的に結合し錯塩を形成するが、この蛋白の電荷のいかんにより色素との結合能が低下することを Rodkey⁸⁾ も指摘している。そのためこの ponceau-3R と Alb の結合能の低下も血痕の室温放置により Alb の電荷が変化しそのために Ponceau-3R での Alb/Hb 比が低下することが示唆される。この蛋白と色素との結合能については今後検討を要する必要がある。

今回著者がおこなった研究は過去に発表された Tomellini 等⁹⁾ の色彩図による方法や Schwarzscher 等¹⁰⁾ の血痕を種々溶媒での溶解度変化をその色調で比較する方法、速水¹¹⁾、木下等¹²⁾ の溶出した血痕の血色素量を測定し陳旧度を判定する方法や、最近発表された Kind 等^{13), 14)} による血痕を 1% NH₃ 含有流動ベラフィンで抽出し可視部吸収スペクトルの α -Ratio により陳旧度を判定する方法および荒

木¹⁵⁾、支倉¹⁶⁾ らによるこの変法とは方法を異にし簡単な装置で判定できるという利点を有する。この Alb/Hb 比による血痕の陳旧度の判定は血痕付着の初期においての経日変化が著しく、日数が経過するにしたがってその変化が緩慢になり血痕付着 6 週以上経過すると正確に判定することが難しくなる。またこの方法では globulin 分画に Hb 分画が重なり Alb 以外の血漿蛋白は観察しにくくなる。そのためより詳細な判定をおこなわんとすればディスク電気泳動などを行い血漿蛋白をはっきり分画する必要があることが示唆される。しかしこの Alb/Hb 比を算出することにより血痕の早期の陳旧度は比較的正確に推定できるものと考えられ、今後本法の法医鑑識への応用を期待する。

結 語

約 1.5 か月経過以内の室温放置血痕であれば Ponceau-3R での CA 電気泳動をおこなうことにより Alb/Hb 比の変化から血痕の陳旧度を推定することができた。

また Alb/Hb 比が 0.05 以下の場合にはその値は経過時間推定に役立たない。

本論文の要旨は昭和 56 年 5 月、第 65 回日本法医学会総会にて発表した。

謝辞：稿を終わるにあたり御指導と御鞭撻さらに御校閲を賜りました三上芳雄教授に深く感謝いたします。御助言、御校閲いただきました富田正文講師に感謝いたします。さらに研究に御協力いただいた奥山敏子氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 船尾忠孝, 前田郁男: 血痕の陳旧度に関する研究. 日法医誌 13: 735—740, 1959
- 2) 来仙 隆: Chloride 反応による布および紙に附着する血痕等の陳旧度判定ならびに紙および木に附着する潜在指紋の検出. 岡山医誌 68: 1219—1231, 1956
- 3) Rajamannar, K.: Determination of the age of bloodstains using immunoelectrophoresis. J. Forens. Sci. 22: 159—164, 1977
- 4) 桂 秀策, 西成 忍, 常盤和雄, 藤沢礼子, 佐瀬正博, 鈴木堅司: 血痕からの炭酸脱水酵素検出に関する基礎的研究. 法医学の実際と研究 23: 35—48, 1980
- 5) Shinomiya, T., Muller, M., Muller, P. H. et Lesage, R.: Apport de l'immunoélectrophorèse

- pour l'expertise des taches de sang en médecine legale. *Forens. Sci. Int.* 12 : 157—163, 1978
- 6) Shinomiya, T., Shinomiya, K. and Kimura, H.: Apport de l'immunoélectrophorese pour l'expertise des taches de sang en médecine legale. *Médecine Legale, Toxicologie.* 23 : 135—145, 1980
- 7) Klotz, I. M., Walker, F. M. and Pivan, R. B.: The binding of organic ions by proteins. *J. Am. chem. Soc.* 68 : 1486—1491, 1946
- 8) Rodkey, F. L.: Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. *Clin. Chem.* 11 : 478—487, 1965
- 9) Tomelliné: *Die forensische Blutuntersuch.* Berlin, Springer. 1910
- 10) Schwarzacher, W.: Altersbestimmung von Blutspuren., *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* 15 : 119, 1930
- 11) 速水寅一: 第18次日法医総会誌 P33, 1930
- 12) 木下正市: 第18次日法医総会誌 P33, 1930
- 13) Kind, S. S., Patterson, D. and Owen, G. w.: Estimation of the age of dried bloodstains by a spectrophotometric method. *Forens. Sci.* 1 : 27—54, 1972
- 14) Kind, S. S. and Watson, M.: The estimation of blood stain age from the spectrophotometric properties of ammonical blood stain extracts. *Forens. Sci.* 2 : 325—332, 1973
- 15) 荒木篤子: 分光光度計による血痕の早期経過時間の推定. *医学と生物学* 94 : 59—63, 1977
- 16) 柳田純一, 原 正昭, 中村 博, 吉村公一, 支倉逸人: 反射光分光分析による血痕斑の陳旧度の推定について. *埼玉医科大学雑誌* 5 : 221—225, 1978