

解離試験法によるヒト腐敗血液の誤った 血液型判定の一因について

川崎医科大学 微生物学教室

美 禰 弘 子

川崎医科大学 法医学教室

富 田 正 文

(昭和58年9月22日受付)

A Cause for the Misjudgment of Blood Grouping with Putrefied Human Blood by Elution Test

Hiroko Mine

Department of Microbiology
Kawasaki Medical School

Masafumi Tomita

Department of Legal Medicine
Kawasaki Medical School

(Accepted on September 22, 1983)

殺害された後、土中に約10日間埋められて腐敗した婦人の体液より5種類の汚染菌を単離した。単離菌は *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus*, および3種類のグラム陰性杆菌であった。これら単離菌を1種類ずつヒトA型血液に添加し、37°Cで10日間培養して5種類の腐敗血を作製した。

腐敗血の血液型活性は吸収試験と解離試験によって調べた。吸収試験で調べるとこれら5種類の腐敗血ともA型活性の低下やB型活性の付加は全く認められなかった。ところが解離試験で測定すると *Bacillus pumilus* による腐敗血においてA型活性の大幅な減少がおこっていた。他の4種類の腐敗血においてはA型活性の変化は検出されなかった。また、*Bacillus pumilus* による腐敗血ではB型活性の付加は観察されなかったが2種類の腐敗血 (No. 1とNo. 3) においてごくわずかながらB型活性が付加していた。

Bacillus pumilus による腐敗血を用いて解離試験の各過程をくわしく観察した結果、吸着過程において固定した血球がサラシ布から遊出することが示された。このような血球の遊出が解離試験で血液型を判定する場合に誤った結果をもたらす一因となると思われる。

Five species of contaminated bacteria were isolated from the putrefied body fluid of the murdered woman who was killed and let alone for about 10 days in the soil. They are *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus* and three species of Gram negative rods.

Each of these bacteria was added to A type human blood and incubated for 10 days to obtain putrefied bloods.

Blood type activities of these putrefied bloods were examined by absorption test and elution test. Neither decrease of A type activity nor acquisition of B type activity was observed with these five species of putrefied blood by absorption test. On the other hand, by elution test the putrefied blood by *Bacillus pumilus* showed sharp decrease in A type activity without any addition of B type activity.

A little addition of B type activity was observed with two species of putrefied blood (No. 1 and No. 3) and no change was observed with three other species of putrefied blood.

Each process of elution test was carefully observed by using this putrefied blood with *Bacillus pumilus* and it was clearly shown that fixed blood escaped from the cotton cloth during the adsorption process. And it was suggested that the extrication of blood might bring about the misjudgment of blood grouping when we examine it by elution test.

Key Words ① Blood grouping ② Elution test ③ Bacterial contamination

はじめに

法医学においては腐敗した血液等を用いて血液型の判定を正しく行うことは非常に重要である。腐敗血の血液型判定は斑痕作製後、解離試験や吸収試験で行われることが多い^{1), 2)}。ところが解離試験で得られた判定結果が他の血液型判定法で得られた結果とくい違う場合が多い。またくい違いの原因も殆んど解明されていない。

今回著者らは死後約10日間土中に埋められていたA型の被害者の死体より腐敗体液を採取し解離試験と吸収試験により血液型の判定を試みた。この結果吸収試験では正しくA型と判定できたにもかかわらず解離試験ではB型となった³⁾。そこで著者らはこの腐敗血より汚染菌を単離し、これらを用いて数種類の人為的な腐敗血を作製した。このようにして得られた人為腐敗血を用いて解離試験と吸収試験により血液型を判定し、両者で異なる判定結果の得られた人為腐敗血について解離試験の各段階を詳しく観察して誤った血液型判定がどのようにして生ずるかを検討した。

材料と方法

汚染菌の単離と培養

解剖時に採取した腐敗体液を brain heart

infusion 寒天平板培地(ニッスイ)に塗布し、37°Cで2日間好氣的に培養した。生じたコロニーの中から肉眼的な性状の異なるものを単離培養し、グラム染色を施した後光学顕微鏡により細胞形態と芽胞の有無を観察した。

単離菌は brain-heart infusion 寒天斜面培地に継代培養して保存している。実験に用いる時には、brain heart infusion 液体培地(ニッスイ)に移植し、37°Cで2日間培養する。培養液を遠沈集菌し、EagleのMEM培地(ニッスイ; タイプ3; 以下MEMと省略)を用いて3回遠沈洗浄を行い沈渣をMEMで10倍に希釈したものを菌液として、腐敗血の作製に用いた。

腐敗血および固定血液斑痕の作製

ヒトA型血液を無菌的に採取、調製し、純培養した単離菌を1種類ずつ加えて種々の腐敗血を作製した。すなわち、採取した血液を直ちにMEMを用いて遠沈洗浄し、沈渣の血球をMEMで2倍に希釈したものを血球液とした。血球液1mlと各単離菌液1mlを試験管に入れ、シリコ栓を施して通気可能な状態で37°Cで一定期間培養し腐敗血を作製した。

菌液のかわりに血球液にMEMを1ml加えたものを対照として同様に培養した。

培養一定日数ごとに腐敗血の一部を取り出し 50 μ l ずつサラシ布に滴下して斑痕とし室温で 3 日間以上放置して乾燥させた。乾燥後各斑痕を切り取り、メタノール 200 μ l を滴下して室温で 10 分間乾燥させたものを固定血液斑痕として実験に用いた。

吸収試験による血液型判定

固定血液斑痕を 1 枚ずつ小型のペトリ皿に入れ、倍数希釈した各濃度の抗血清 500 μ l を滴下し、37°C で 2 時間、続いて室温で 1 時間吸収させた。使用した抗血清は市販のヒト由来判定用 A 型および B 型血清（デイド社）である。

吸収後の抗血清 200 μ l を凝集板に取り、2% の A 型または B 型の指示血球 200 μ l を加えて室温で 2 時間放置し血球の沈殿像に基づいて吸収後の残余抗体の有無を判定した。すなわち完全な凝集がおこっているもの（残余抗体が存在するもの）は凝集+、凝集が不完全なもの（残余抗体がごくわずかに存在するもの）は凝集±、凝集が全くおこっていないもの（残余抗体が殆んど存在しないもの）は凝集-とした。

対照 1 は細菌を添加していない A 型血球液を 10 日間培養したもの、対照 2 は血液を滴下していないサラシ布のみで試験を行ったものである。

解離試験による血液型判定

解離試験の各段階を詳しく観察することを目的とし、一般に行われている微量な試料を用いる定性的な方法とは異なり以下に示すような定量的な方法に改変して行った。

<第一段階>

固定血液斑痕を 1 枚ずつ小型ペトリ皿に入れ力価 512 の抗血清 200 μ l を滴下し 37°C で 2 時間続いて室温で 1 時間反応させて抗血清を斑痕に吸着させた。

<第二段階>

吸着終了後、各ペトリ皿に冷却生理食塩水 10 ml を加えてはアスピレーターで吸引除去する操作を 5 回繰り返す、斑痕を十分に洗浄して余剰抗血清を洗浄除去した。

<第三段階>

洗浄し十分に水気を切った斑痕を 1 枚ずつ試験管に入れ、生理食塩水 5 ml を加えて 56°C 15 分間加温して吸着抗体を解離させた。加温終了後、直ちに斑痕を解離液から取り出し、解離した抗体が冷却により再び斑痕に吸着することを防いだ。

<第四段階>

解離液 200 μ l を凝集板に取り、生理食塩水を用いて倍数希釈列を作製した。ここに 2% の A 型または B 型の指示血球を 200 μ l ずつ加え、室温で 2 時間反応させ、血球凝集像に基づいて解離液中に存在する抗体の有無を判定した。すなわち、完全な凝集がおこっているもの（解離液中に抗体の存在するもの）は凝集+、凝集が不完全なもの（解離液中に抗体がごくわずかに存在するもの）は凝集±、凝集が全くおこっていないもの（解離液中に抗体が殆んどないもの）は凝集-とした。2 種類の対照は吸収試験と同様である。

結 果

単離菌の性質

腐乱死体液から 5 種類の細菌を単離することができた。これら単離菌のコロニーの性状、グラム染色性、細胞形態、芽胞の有無について調べた結果を Table 1 に示す。3 種類はグラム陰性杆菌であり、他の 2 種はグラム陽性の球菌である *Staphylococcus* (No. 5 菌) とグラム陽性有芽胞杆菌である *Bacillus* (No. 4 菌) であった。

このうち *Bacillus* (No. 4 菌) については今回の実験で主として用いたのでさらに常法に基づいて詳しい菌種の同定を行った⁴⁾。カタラーゼ+、運動性+、7% 食塩加培地における増殖性+、マンニトール分解能-、Voges-Proskauer 反応+、デンプン分解能-、硝酸塩還元能-などの諸性状に基づいて *Bacillus pumilus* であると判定することができた。

吸収試験による腐敗血の血液型判定

単離菌との 10 日間の混合培養で得られた 5 種類の腐敗血の血液型を吸収試験によって調べ

Table 1. Biological properties of isolated bacteria from the body fluid of murdered woman

bacteria biological properties	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
Colony	opaque-white, small and rough colony	transparent-white, regular sized, and smooth colony	transparent-white, large and smooth colony	yellowish-white, large and rough colony	yellow, small, and smooth colony
Gram-stain	-	-	-	+	+
Cell Morphology	large rod	small rod	rod	rod	coccus
Spore	-	-	-	+	-

Table 2. Absorption tests on putrefied blood stains

stain	titer	Anti A serum										Anti B serum					
		512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0 (saline)	8	4	2	1	0 (saline)
No. 1		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
No. 2		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
No. 3		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
No. 4		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
No. 5		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
control 1*		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
control 2**		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

* A-type blood without bacteria

** No blood (Cotton cloth without blood)

た (Table 2). この結果5種類の腐敗血とも対照の無処理A型血球と同じような吸収活性を示した. すなわちA型活性として力価16の抗A血清は吸収後も凝集反応+, 力価8の抗A血清では吸収後の凝集反応-であった. またB型活性としては力価1の抗B血清に至るまで吸収後も, 凝集反応-であった. すなわちこれら腐

敗血においてA型活性の減少もB型活性の付加も見られなかった.

解離試験による腐敗血の血液型判定

吸収試験の場合と同じく単離菌と10日間培養して得られた腐敗血の血液型を解離試験によって判定した (Table 3). この結果 No. 1, No. 2, No. 3, No. 5 の4種類の細菌による腐敗

Table 3. Elution tests on putrefied blood stains

stain	dilution	Anti A serum eluate								Anti B serum eluate							
		1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	0 (saline)	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	0 (saline)
No. 1		+	+	+	+	±	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
No. 2		+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No. 3		+	+	+	+	+	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
No. 4		+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No. 5		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
control 1*		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
control 2**		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*, ** See Table 2

血ではA型活性は対照と殆んど同じであった。No. 1 菌による腐敗血（以下 No. 1 腐敗血と省略する）と No. 3 腐敗血ではわずかながらB型活性の付加が見られた。これに対し No. 4 腐敗血ではA型活性の大幅な減少が観察された。対照の1及び2については吸収試験の場合と同様である。今回の実験では便宜的に解離の際の液量を5 mlとしたが、解離液の量を10 ml以上にすれば No. 4 腐敗血においてはA型活性は検出できないことになる。No. 4 腐敗血におけるB型活性の付加は見られなかった。これらの結果は定性的な方法で解離試験により血液型判定を行うと No. 4 腐敗血においてはA型であるはずの血液がO型と判定されてしまう可能性を示しており、また No. 1 菌や No. 3 菌のようにB型活性添加性のある菌が No. 4 菌と混合汚染して腐敗血を形成した場合にはA型血液がB型と判定される可能性があることを示している。

No. 4 腐敗血のA型活性の経日的変化

解離試験においてA型活性の減少が見られた No. 4 菌による腐敗血について培養日数とA型活性の関係を調べた (Table 4)。この結果、培養0日と1日では対照と同じA型活性量を保っているが培養7日目ではA型活性は対照に比べ大きく減少することが示された。また培養後30

Table 4. Elution tests on stains of No. 4 putrefied blood incubated for various days

dilution days for incubation	Anti A serum eluate							
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	0 (saline)
0 day	+	+	+	+	+	-	-	-
1 day	+	+	+	+	+	-	-	-
3 days	+	+	±	-	-	-	-	-
7 days	+	±	-	-	-	-	-	-
10 days	+	±	-	-	-	-	-	-
30 days	+	±	-	-	-	-	-	-
control*	+	+	+	+	+	-	-	-

* A-type blood without bacteria incubated for 10 days

日においてもA型活性は10日目以上には減少しなかった。

解離試験過程での血液脱色について

No. 4 腐敗血による斑痕を用いて解離試験の各段階をていねいに観察したところ解離試験の第一段階である抗血清の吸着過程で斑痕の強い脱色が観察された。これはサラシ布に固定されているはずの血球が遊出したことによるものと思われる。このような脱色現象は対照はもちろん他の4種類の腐敗血では殆んど見られず No. 4 腐敗血においてのみ強く観察された。

Fig. 1 に第1段階の吸着終了後の斑痕を生理

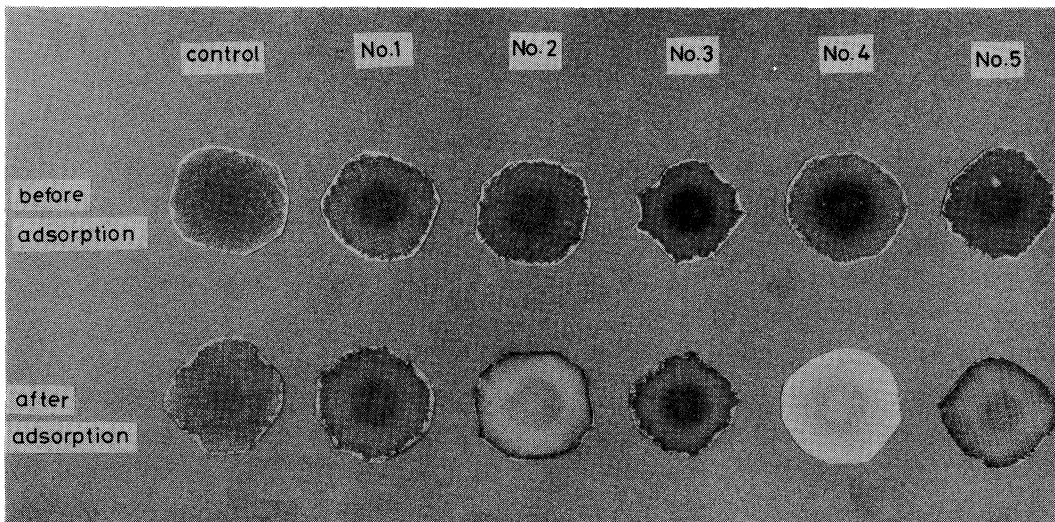


Fig. 1. Stains of putrefied blood before and after adsorption

Table 5. Absorption tests on putrefied blood stains washed after adsorption.

stain	titer	Anti A serum										
		512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0 (saline)
No. 1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
No. 2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
No. 3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
No. 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
No. 5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
control 1*	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
control 2**	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

*, ** See Table 2

食塩水で十分に洗浄し乾燥したものを吸着前の斑痕と比較して示す。No. 4 腐敗血において著しい脱色がおこっている。

吸着過程における血液型物質遊出の確認

解離試験の吸着過程で No. 4 腐敗血斑痕から固定血球が脱色する現象は肉眼的に観察されたが色素の脱色のみならず血液型物質も実際に遊出していることを確認した。すなわち10%のアルブミンを滴下して吸着過程を行い(次項参照)、肉眼的な脱色のおこっている斑痕を洗浄乾燥後、これを用いて吸収試験によりA型活性の量的変化を調べた。この結果 **Table 5** に示すように対照と比べて大幅な吸収活性の減少が見られたのは No. 4 腐敗血のみであった。このことは No. 4 腐敗血では吸着過程において肉眼的脱色だけでなくA型活性物質も遊出して斑痕にはごく一部しか残っていないことを示している。

固定血球の遊出に関与する因子について

No. 4 腐敗血を用いた場合、解離試験の第一段階である吸着過程において固定されているはずの血球の遊出が確認された。そこでこの肉眼的な脱色現象に基づいて吸着に用いる抗血清の種類、濃度、反応温度、反応時間と遊出の関係について検討した。この結果、吸着に用いる抗血清は抗A血清でも抗B血清でも同様の遊出を引きおこすだけでなく、抗B血清のかわりに牛胎児血清原液(Flow社)を用いた場合もほぼ同様の遊出が見られた。さらにこれと同様の遊

出は10%のアルブミン液(Sigma社、子牛血清由来アルブミン)を用いてもほぼ同様に見られた。ところが、生理食塩水はもちろんのことグルコースや澱粉液などの糖類では20%以上の高濃度のものを用いても遊出をおこさせることはできなかった。抗血清の濃度についても検討したところ抗血清、牛胎児血清、アルブミンのいずれも濃度が薄くなると、だんだん遊出が少なくなることが示された。すなわち高濃度のタンパク質溶液とともに一定時間インキュベートすることが遊出の条件であった。吸着の温度と時間も重要で37°Cでインキュベートすると60分程度で著しい血液の遊出がおこるが、20°C以下では遊出に時間がかかり3時間インキュベートしても遊出は一部しかおこらなかった。

考 察

血液に細菌や真菌が混入するとこれらの汚染菌の産出する酵素や代謝産物によって、血液型を決定する糖類が分解され、血液型が変化することが知られている^{5),6)}。また一方では細菌や真菌自体、A型活性またはB型活性を有するものも多く、これらの腐敗菌の混入により血液型活性に付加的な変化がおこることも知られている⁷⁾⁻⁹⁾。

このように、汚染菌は直接的な血液型を変化させるだけでなく、タンパク分解酵素類を産生することにより、血球細胞は様々の変化を受けているものと思われる。今回著者らが腐敗体液より単離した5種類の細菌のうちの1種類であ

る *Bacillus pumilus* をA型血球に添加培養して人為的に腐敗血を作製したところ、吸収試験による血液型活性の測定結果から明らかなようにA型活性の減少もB型活性の付加もおこっていない。ところが解離試験では大幅なA型活性の減少が観察され、O型として判定され得る可能性が示された。そこで、このようなA型活性の減少の原因について検討したところ解離試験の重要な段階である吸着過程においてサラシ布に固定されているはずの血球が遊出する現象を見いだした。解離試験は一般に非常に少量の血液斑痕を用いて実施されるので、このような血球の遊出がおこればA型の血液のみならずB型やAB型の血液もすべてO型と誤って判定される可能性が大きい。また、ここで示された

Bacillus pumilus のように固定されたはずの血球の遊出をもたらすような変化を与える細菌と、菌自体が血液型活性を有する細菌が同時に汚染して生じた腐敗血においてはさらに複雑な血液型活性判定の誤りが生ずることが考えられる。

現状通りの解離法で血液型の判定を行う時は必ず他の方法による判定も同時に行うことが必要であると思われる。ここにみられた *Bacillus pumilus* の他にどのような細菌がこのような遊出をもたらすか、またどのような血球の変化がこの遊出をもたらすかを検討するとともに、今後はメタノールにかわる固定剤の検討をはじめ、解離法を改良して腐敗血でも脱離遊出しないような方法を検討していく予定である。

文 献

- 1) Pereira, M.: ABO grouping of decomposed human tissue. J. Forens. Sci. Soc. 13: 33—36, 1973
- 2) 湯浅 勲, 井上晃孝, 山崎邦彦: 腐敗したヒト血液および筋肉の ABO 式血液型について. 科学警察研究所報告 30: 28—32, 1977
- 3) Tomita, M., Mine, H. and Ijiri, I.: Misjudgment in the blood grouping of putrefied body fluid. 犯罪学雑誌 (投稿中)
- 4) Cowan, S. T. and Steel, K. J.: 医学細菌同定の手びき, 坂崎利一訳. 第2版. 東京, 近代出版. 1974, pp. 94—98
- 5) Howe, C., MacLennan, J. D. and Kabat, E. A.: Action of *Clostridium tertium* enzymes on blood group substances. Fed. Proc. 15: 592—593, 1956
- 6) 古川 研: 型特異性分解酵素, 特に新しいB型物質分解酵素について. 北関東医学 10: 175—193, 1960
- 7) Springer, G. F., Williamson, P. and Brandes, W. C.: Blood group activity of gram negative bacteria. J. exp. Med. 113: 1077—1093, 1961
- 8) Iseki, S.: Blood group substances in bacteria. Gunma J. Med. Sci. 1: 1—21, 1952
- 9) 大山玲子, 吉良清司: 血球の血液型活性に及ぼす真菌の影響. 科学警察研究所報告 32: 1—7, 1979