

(Aus dem Gerichtlich-medizinischen Institut der Kaiserlichen Universität Kyushu,
Japan [Direktor: Prof. Dr. *Masao Takayama*].)

Eine neue Methode, Menschenblut von Affenblut zu unterscheiden.

Von

Dr. med. Kyoyetsuro Fujiwara.

Es ist bekannt, daß die Unterscheidung des Menschenblutes vom Tierblut eine große Bedeutung in der gerichtlichen Medizin hat. Darum hat man schon seit langem mit verschiedenen Methoden versucht, hier eine Klärung zu schaffen. Bedauerlicherweise haben diese Untersuchungen noch nicht genügt eine einwandfreie Methodik zu finden. Die Entdeckung der sog. biologischen Methoden — Präzipitinreaktion, Komplementablenkung, Anaphylaxie — hat uns auf diesem Gebiete große Fortschritte gebracht, wodurch wir in die Lage gekommen sind, in fast allen Fällen Menschenblut und Tierblut zu unterscheiden. Immerhin können wir heute, wegen der sog. Gruppenreaktionen, jenes vom Affenblut noch nicht unterscheiden. Zur weiteren Unterscheidung sind zwei Methoden vorgeschlagen worden: Methode der spezifischen Absättigung nach *Weichardt* und kreuzweise Immunisierung nach *Uhlenhuth*. Diese beiden Methoden bringen aber auch kein einwandfreies Resultat. Auch ich habe mich lange Zeit mit dieser Frage beschäftigt, wobei es mir schließlich auch gelungen ist, ein *neues Verfahren* zu finden, das darin besteht, *die spezifische Absättigung nach Weichardt mit der Komplementablenkungsmethode von Sachs zu vereinigen*. Meines Erachtens hat dieses Verfahren einen relativ guten Erfolg gegeben; es sei mir gestattet, es hier kurz mitzuteilen.

A. Methodik.

I. Die Grundlage dieser Methode.

Da das Immuneserum durch Adsorption der heterologen Elemente seine Spezifität zu erhöhen vermag, setzen wir das Affenserum dem Menschenantiserum zu, um das Affenblutelement abzusättigen, und wir prüfen die Komplementbindungsreaktion mit dem vom Bodensatz befreiten Serum als Antikörper.

II. Das Verfahren.

a) Zu diesem Verfahren ist erforderlich:

1. Das Antigen: Blutfleckenextrakt, mittels physiologischer Kochsalzlösung ausgezogen.

2. Amboceptor: Man setzt $\frac{1}{10}$ Volumen Affenserum dem Menschenantiserum zu, welches von Kaninchen durch Behandlung mit Menschenserum gewonnen war, und zentrifugiert dieses Gemisch nach 24stündigem Stehenlassen im Eisschrank. Das klare Zentrifugat wird durch halbstündiges Erwärmen inaktiviert.

3. Komplement: Frisches Meerschweinchenserum.

4. 5proz. Aufschwemmung von serumfrei gewaschenen Hammelblutkörperchen in physiologischer NaCl-Lösung.

5. Der auf Hammelblutkörperchen hämolytisch wirkende Amboceptor: Dieses Amboceptorserum ist zu inaktivieren, d. h. von dem darin enthaltenen Komplement durch halbstündiges Erwärmen auf 55° zu befreien.

6. 1000fach verdünnte Affenserumlösung, inaktiviert.

7. 1000fach verdünnte Lösung von Menschenserum, inaktiviert.

8. Physiologische Kochsalzlösung.

b) Gang des Verfahrens:

Dem eigentlichen Versuche muß eine Reihe von Titerbestimmungen, wie bei gewöhnlicher Komplementbindungsreaktion vorausgehen, die zunächst besprochen werden sollen.

1. Bestimmung der Titer des hämolytischen Amboceptorserums: Man muß die kleinste komplett lösende Dosis des hämolytischen Amboceptorserums für 1 ccm der 5proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung feststellen.

In eine Reihe von Reagenzröhrchen kommen absteigende Mengen des inaktiven hämolytischen Serums, 1 ccm der 5proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung und 0,1 ccm Meerschweinchenkomplement. In die Röhrchen wird so viel Kochsalzlösung gegeben, daß in jedem 2,0 ccm, also gleichviel Inhalt ist und dieser wird gut durchgemischt. Nachdem sie eine Stunde bei 37° im Brutschrank (nach 30 Minuten noch einmal umgeschüttelt) gestanden haben, untersucht man den Hämolysegrad. Als Hämolysezusatz wird zum Hauptversuch die $1\frac{1}{2}$ fache komplett lösende Dosis genommen.

2. Bestimmung der Titer des Komplementserums: Es kommen in eine Reihe Reagenzröhrchen absteigende Mengen von 10proz. Komplementserum + Testdosis Amboceptor + 1 ccm Hammelblutkörperchenaufschwemmung. Die Röhrchen sind wieder auf die gleiche Inhaltmenge zu bringen und kommen eine Stunde in den Brutschrank. Dann wird die noch komplett lösende kleinste Dosis festgestellt. Als Komplementserumzusatz wird zum Hauptversuch die $1\frac{1}{2}$ fache komplett lösende Dosis genommen.

3. Bestimmung des Verdünnungsgrades von spezifischem Amboceptorserum: Absteigende Mengen von 10fach verdünnter Lösung des spezifischen Amboceptorserums (das durch Zusatz des Affenblutes spezifisch gewordene Immunserum) werden mit 1 : 1000 verdünntem Menschenserum und der Testdosis Komplementserum gemischt, alle Röhrchen werden mit Kochsalzlösung auf die gleiche Inhaltmenge gebracht und 1 Stunde auf 37° gehalten. Sodann erfolgt der Zusatz von 1,0 ccm der 5proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung + 0,001 ccm Amboceptor. Nachdem die Röhrchen eine weitere Stunde im Brutschrank und eine Nacht im Kühlraum gestanden haben, wird das Resultat festgestellt. Für den Hauptversuch wählt man die komplett lösende kleinste Dosis. Außerdem muß man als Kontrolle an Stelle der Menschenserumlösung die 1000fach verdünnte Affenserumlösung benutzen und feststellen, daß in diesem Falle mit gleicher kleinster Dosis keine Hemmung der Hämolyse eintreten kann. Als weitere Kontrolle muß man auch prüfen, ob das hämolytische System funktioniert, ob die NaCl-Lösung isotonisch ist und nicht hämolytisch wirkt und ob sich das Antigen nicht allein schon mit dem Komplement verbindet.

4. Bestimmung der Empfindlichkeit des spezifischen Serums: Nun können wir mit den oben geschilderten Vorproben direkt in den Hauptversuch eingehen. Doch ist es bequemer, noch die Empfindlichkeit des spezifischen Serums, also seinen Wirkungsbezirk, vorher zu bestimmen. Wir nehmen 2 Reihen Reagensröhrchen. In die eine kommen absteigende Mengen Menschenserumlösung und in die andere absteigende Mengen verdünnter Affenserumlösung. Nachdem alle Röhrchen durch Zusatz der physiologischen Kochsalzlösung auf die gleiche Inhaltmenge gebracht worden sind, setzt man jedem Röhrchen die gefundene Testmenge Komplementserum + der des spezifischen Serums hinzu. Die Mischungen werden gut durchgeschüttelt, eine Stunde im Brutschrank auf 37° gehalten, und dann werden 1 cem Hammelblutkörperchenaufschwemmung und die Testmenge des Hämolyserums hinzugefügt. Nachdem die Seren eine Stunde lang in den Brutschrank gestellt worden sind, schüttelt man sie einmal stark durch und läßt sie einige Stunden am kühlen Ort stehen. Wenn die ungelösten Blutkörperchen allmählich absinken und sich also eine klare Flüssigkeitsschicht in dem oberen Abschnitte befindet, dann ist das Resultat schon abzulesen. Wir bezeichnen die Reaktion als negativ, wenn wir in der Flüssigkeit 2 Schichten — die oben klare hämolytische und die untere undurchsichtige Blutkörperchenschicht — getrennt erkennen. Im entgegengesetzten Falle bezeichnen wir sie als positiv.

Also nehmen wir als den Reaktionsbezirk dieses spezifischen Serums denjenigen Bezirk an, in welchem sich die Reaktion mit Menschenserumlösung negativ und mit Affenserumlösung positiv zeigt.

5. Hauptversuch:

0,5 cem Kochsalzextrakt aus der zu untersuchenden Blutspur in der Verdünnung ca. 1 : 1000 tut man in ein Reagensröhrchen und setzt die gefundene Testmenge Komplementserum + die des spezifischen Antiserums hinzu. Diese Mischung wird gut durchgeschüttelt, eine Stunde im Brutschrank auf 37° gehalten und dann werden 1 cem Hammelblutkörperchenemulsion und die Testmenge Hämolyserum hinzugefügt. Nachdem diese Mischung eine Stunde im Brutschrank (nach je 30 Minuten gut durchgeschüttelt) und einige Stunden an einem kühlen Orte gestanden hat, ist das Resultat abzulesen. Wenn sich die ganze Flüssigkeit in 2 Schichten teilt — die obere durchsichtige hämolytische und die untere undurchsichtige Blutkörperchenschicht — lesen wir die Reaktion als negativ ab und im anderen Falle als positiv. Wenn die Reaktion negativ ist, dann handelt es sich um Menschenblut, wenn sie dagegen positiv ist, dann kommt Menschenblut nicht in Frage.

B. Die Resultate der Untersuchung mittels unserer Methode;

Ich habe unsere Methodik mit 12 verschiedenen Menschenantisera geprüft und hatte immer einen guten Erfolg. Die gebrauchten Affenserum sind alle von japanischen Affen genommen. Ich möchte die Resultate der Untersuchungen hier kurz tabellarisch zeigen:

Spez. Antiserum-Nr.	Abstammung des spez. Amboceptors Menschenantiserum Nr.	Reaktion gegen Menschenserum	Reaktion gegen Affenserum	Brauchbare Bezirke des spez. behandelten Amboceptors
1	1	1:10 — 1:10 000 — 1:13 000 — +	1:10 — 1:20 — 1:40 — +	1:40 — 1:13 000
2	2	1:10 — 1:20 000 — 1:40 000 ±	1:10 — 1:40 + 1:50 — 1:40 000 +	1:50 — 1:20 000

Spez. Amboceptor Nr.	Abstammung des spez. Amboceptors Menschenantiserum Nr.	Reaktion gegen Menschenserum	Reaktion gegen Affenserum	Brauchbare Bezirke des spez. behandelten Amboceptors
3	3	1:10 — 1:40 + 1:50 — 1:20 000 — 1:40 000 ±	1:10 — 1:40 000 +	1:50 — 1:20 000
4	4	1:10 — 1:13 000 — 1:20 000 — +	1:10 — 1:40 — 1:50 — 1:40 000 +	1:50 — 1:13 000
5	5	1:10 — 1:5 000 — 1:10 000 — +	1:10 — 1:40 000 +	1:10 — 1:5 000
6	6	1:10 — 1:50 + 1:100 — 1:10 000 + 1:3000 — +	1:10 — 1:20 — 1:40 — 1:40 000 +	1:100 — 1:10 000
7	7	1:10 — 1:10 000 — 1:13 000 — +	1:10 — 1:40 — 1:100 — 1:40 000 +	1:50 — 1:10 000
8	8	1:10 — 1:5 000 1:10 000 — 1:40 000 +	1:10 — 1:20 — 1:40 — 1:40 000 +	1:40 — 1: 5000
9	9	1:10 — 1:5 000 — 1:10 000 — 1:40 000 +	1:10 — 1:40 — 1:100 — 1:40 000 +	1:50 — 1: 5000
10	10	1:10 + 1:20 — 1:10 000 — 1:13 000 — 1:20 000 ± 1:40 000 +	1:10 — 1:20 — 1:40 000 +	1:20 — 1:10 000
11	11	1:10 — 1:20 000 — 1:40 000 ±	1:10 — 1:40 000 +	1:10 — 1:20 000
12	12	1:10 — 1:20 000 — 1:40 000 +	1:10 — 1:20 — 1:40 — 1:40 000 +	1:40 — 1:20 000

Aus den Ergebnissen dieser Prüfungen sehen wir, daß unsere Methode zwischen 100—5000facher Verdünnung der Antigenlösung immer, aber zuweilen auch in noch stärkerer Verdünnung gute Resultate gibt, obgleich diese Wirkungsbezirke auch nach den Fällen verschieden sind.

Zur Feststellung der Eignung dieser Methode ist es wichtig, zu prüfen, ob das Immunserum durch Behandlung mit Affenserum seine Spezifität steigern könnte. Daher prüfte ich gleichzeitig zur Kontrolle die Komplementreaktionen mit nicht behandeltem Immunserum als Amboceptor. Die Resultate sind folgende:

Menschenantiserum Nummer	Reaktionen gegen Menschenserum	Reaktionen gegen Affenserum	brauchbare Bezirke des Immunserums
1	1:10 ± 1:20 — 1:20 000 — 1:40 000 ±	1:10 — 1:2000 ± 1:40 000 — 1:10 000 +	1:4000 — 1:20 000
2	1:10 — 1:4000 — 1:10 000 — 1:13 000 + 1:20 000 — 1:40 000 ±	1:10 ± 1:20 — 1:40 000 ±	1:20 — 1:4000
3	1:10 — 1:40 000 —	1:10 — 1:1300 + 1:2000 ± 1:4000 — 1:40 000 —	1:10 — 1:1300

Menschen- antiserum Nummer	Reaktionen gegen Menschenserum	Reaktionen gegen Affenserum	Brauchbare Bezirke des Immunserums
4	1:10 — 1:20 000 —	1:10 — 1:4000 —	1:10 000 — 1:20 000
	1:40 000 ±	1:10 000 — 1:40 000 +	
5	1:10 — 1:4000 —	1:10 — 1:40 000 +	1:10 — 1:4000
	1:10 000 — 1:40 000 +		
6	1:10 — 1:20 —	1:10 —	nicht brauchbar
	1:40 ±	1:20 — 1:1000 +	
	1:100 — 1:400 ±	1:2000 — 1:4000 ±	
	1:1000 ±	1:4000 — 1:40 000 +	
	1:2000 — 1:4000 ±		
	1:10 000 — 1:40 000 +		
7	1:10 — 1:4000 —	1:10 — 1:1000 —	1:2000 — 1:4000
	1:10 000 — 1:40 000 +	1:2000 — 1:40 000 +	
8	nicht brauchbar		
9	1:10 — 1:4000 —	1:10 — 1:1000 —	1:2000 — 1:4000
	1:10 000 — 1:40 000 +	1:2000 — 1:40 000 +	
10	nicht brauchbar		

Bei diesen Kontrollversuchen benutzte ich natürlich dasselbe Hämolytin- und Komplementserum wie beim Hauptversuch.

Beim Vergleichen der Resultate des Hauptversuches mit denen der Kontrolle können wir leicht ersehen, daß die Wirkungsbezirke des nicht behandelten Immunserums weit variabler als die des behandelten sind. In einem Falle erzielte ich dasselbe Resultat wie beim Hauptversuch (Nr. 5), aber in den meisten Fällen war es auf ganz kleine Bezirke beschränkt. Wir konnten also feststellen, daß das Immunserum durch Behandlung mit Affenserum seine Spezifität erheblich gesteigert hat.

C. Prüfungen mit dem Auszug des Blutfleckes.

Zur forensisch-medizinischen Untersuchung kommen am häufigsten die in Stoff oder auf sonstigen Gegenständen sich befindenden Blutflecken. Deshalb muß man dieses Verfahren auch mit Blutflecken prüfen, was ich an je 13 Flecken des von verschiedenen Individuen stammenden, und zu verschiedenen Zeiten entnommenen Menschen- und Affenblutes getan habe. Diese Blutflecken befanden sich auf weißem baumwollenen Stoff, waren getrocknet und unter Vermeidung von Sonnenlicht und Hitze aufbewahrt.

Wir haben den Blutextrakt in folgender Weise dargestellt: Zuerst haben wir ein geeignet großes Stück von einem großen Blutflecken abgeschnitten, in Reagensröhrchen getan und physiologische Kochsalzlösung hineingegossen. Dann wurde die Flüssigkeit nach mehrstündigem Auslaugen filtriert, und dieses Filtrat wurde mit physiologischer Kochsalzlösung bis zur ca. 1000fachen Verdünnung des Blutes gebracht.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, ist dieses Verfahren auch mit dem Extrakt des Blutfleckens ausführbar, und man erzielt immer ein gutes Resultat. Man kann daher durch dieses Verfahren den Fleck des Men-

schenblutes von dem des Affenblutes sogar bei 8 Jahre alten Blutflecken leicht differenzieren.

		Datum der Blutentnahme														
Menschenblut:	a)	9. 12. 1918	b)	8. 12. 1918	c)	1. 12. 1918	d)	29. 11. 1918	e)	8. 11. 1918	f)	4. 11. 1918	g)	9. 1. 1918	h)	23. 4. 1917
	i)	28. 4. 1916	j)	16. 2. 1915	k)	28. 3. 1912	l)	10. 8. 1911	m)	20. 2. 1910						
Affenblut:	A)	27. 12. 1918	B)	25. 12. 1918	C)	4. 12. 1918	D)	17. 12. 1918	E)	16. 12. 1918	F)	1. 11. 1918	G)	5. 11. 1915	H)	20. 10. 1915
	I)	16. 3. 1915	J)	8. 2. 1913	K)	22. 12. 1911	L)	29. 10. 1911	M)	16. 10. 1908						

Spez. Serum Nr.	Datum der Untersuchung	Blut-extrakt-menge	Menschenblut													Affenblut												
			a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
4	1. 3. 1919	1,0	-----													+++++												
		0,5	-----±-----													+++++												
6	17. 3. 1919	1,0	-----													+++++												
		0,5	-----													+++++												
7	28. 3. 1919	1,0	-----													+++++												
		0,5	-----													+++++												
8	25. 5. 1919	1,0	-----													+++++												
		0,5	-----													+++++												
9	10. 6. 1919	1,0	-----													+++++												
		0,5	-----													+++++												
10	19. 6. 1919	1,0	-----													+++++												
		0,5	-----													+++++												
12	25. 6. 1919	1,0	-----													+++++												
		0,5	-----													+++++												

D. Vergleich mit der Weichardtschen Absättigungsmethode.

Unter allen Methoden, welche zur Differenzierung von Menschen- und Affenblut veröffentlicht worden sind, ist die Absättigungsmethode nach *Weichardt* die einfachste und erfolgreichste. Deshalb habe ich bei der Ausführung meiner Methode vergleichsweise diese Methode mittels desselben Immuserums mitgeprüft. Aber bei Ausführung der Absättigungsmethode habe ich das Präcipitat vom Serum durch Zentrifugieren an Stelle der Filtration durch Tonfilter angewendet, um das Verfahren vereinfachen zu können, da ich bemerkte, daß diese beiden dasselbe Resultat geben können.

Aus den Ergebnissen dieser vergleichenden Untersuchungen konnten wir folgenden Schluß ziehen:

Bei der Absättigungsmethode bleibt die Empfindlichkeit des zweimal mit Affenblut behandelten Amboceptors höchstens in 1000—2000facher Verdünnung des Blutes, wenn der Amboceptor sowohl durch Zentri-

fugieren als auch durch Filtration vom Präcipitat getrennt worden ist. Aber je empfindlicher der Amboceptor ist, desto weniger ist er spezifisch und zeigt die positive Reaktion gegen Affenblut auch bis zu 100- oder 200facher Verdünnung. Deswegen ist die Reaktion des gegen Menschenblut spezifischen Diagnoseserums sehr schwach, also höchstens bis zu 100facher Verdünnung. Das nur einmal mit Affenserum behandelte Immunserum erscheint empfindlicher, aber weniger spezifisch als das zweimal behandelte.

Mein Verfahren reagiert dagegen bis zur 5000- oder 50 000fachen Verdünnung des Blutes, und man kann dadurch die Blutlösung zwischen 50- und 5000- oder 50 000fachen Verdünnung leicht differenzieren. Also liegt die differenzierbare Grenze des Menschen- und Affenblutes mittels dieser Methode wenigstens in der Verdünnung 1 : 50 bis 1 : 5000 oder noch mehr bis 1 : 50 000. Daraus ergibt sich, daß meine Methode der Absättigungsmethode in der Empfindlichkeit und in der differenzierbaren Grenze bei weitem überlegen ist.

Zusammenfassung.

Die Spezifität des Menschenantiserums wird dadurch erhöht, daß es mit $\frac{1}{10}$ Volumen Affenserum versetzt und das in 24 Stunden ausfallende Präcipitat entfernt wird.

Die mit so vorbehandeltem Antiserum statt mit genuinem Immunserum angestellte Komplementbindungsreaktion ermöglicht Menschenblut von Affenblut zu unterscheiden.

Die Wirkungs- resp. Reaktionsbezirke dieses spezifisch behandelten Serums sind je nach den Immunseren verschieden, aber sie liegen mindestens zwischen 1 : 50 und 1 : 5000 und erstrecken sich zuweilen auf noch höhere Verdünnungen.

Die Wirkungsbezirke und die Empfindlichkeit dieses Verfahrens überschreiten mithin die des *Weichardtschen* Absättigungsverfahrens ganz bedeutend.