

北陸地方における Hp 型, Gc 型, EsD 型の分布 および血痕からの型判定

金沢大学医学部法医学講座 (主任: 何川涼教授)

林 京 子
大 口 学
中 嶋 憲 一
何 川 涼

(昭和53年5月4日受付)

赤血球膜に ABO 式血液型をはじめ多数の遺伝標識が存在することは古くから知られているが、最近では血清蛋白や赤血球酵素にも遺伝的多型現象を示す形質が次々に発見されるに至り、それぞれ血清型、赤血球酵素型と総称されている。法医学領域ではこれらを個人識別や親子鑑定に利用されるようになった。

われわれは血清型の Hp 型, Gc 型および赤血球酵素型の EsD 型について、まだ報告のなされていない北陸3県(石川, 富山, 福井)での表現型分布を求めると共に、古い血痕からのこれら各型の検出限界についても検討を行なってみた。

Haptoglobin (Hp) は α_2 -globulin 分画にあって、hemoglobin と特異的に結合する蛋白である。Smithies¹⁾ は、ヒト血清中の Hp は電気泳動によって3つの型(Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2)に分類できることを見出した。これら3型は Hp¹ および Hp² の2個の優劣のない常染色体性の対立遺伝子によって決定されるものである。

Group specific components (Gc) は α_2 -globulin 域に存在する形質である。ヒト血清は通常、Gc1-1, Gc2-1 および Gc2-2 の3型に分類できる²⁾。これらは Gc¹, Gc² という優劣のない対立遺伝子によって決定される。

Esterase D (EsD) は、Hopkinson ら³⁾ により赤血球溶血液中に存在する新しい esterase として報告された。それ以前に Tashian⁴⁾ の発見した esterase A, B および C の3種の酵素がいずれもほとんど変異型を持たないのに対して、EsD は遺伝的多型現象を示す。

その表現型は EsD1, EsD2-1 および EsD2 の3型に分類され、遺伝子 EsD¹ と EsD² の間には優劣はない。その後さらに、Bender ら⁵⁾ や Rittner ら⁶⁾ により新たに EsD³ が見い出され、また Berg ら⁷⁾ により EsD⁴ の存在が報告されている。

実験材料および方法

1. 被検血液と試料の調製法

金沢大学医学部付属病院から入手した新鮮血液を 3000rpm で3分間遠心し、血清と血球を分取した。

Hp 型の検査には、血清4滴と稀釈溶血液2滴、40% sucrose 2滴を混合して 37°C で30分間感作した試料を使用した。また、Gc 型は血清適量を用いて検討した。

EsD 型の検査には、血球を生理食塩水で3回洗浄後凍結保存し、用時室温で融解した後 3000rpm で5分間遠心分離し、その上清を試料とした。

血痕は、型既知の血液をガーゼに付着させて乾燥したものであり、1~180日間室温放置後、型の検出を行なった。

2. 電気泳動および染色

1) Hp 型

ディスク電気泳動法(ポリアクリルアミドゲル)⁸⁾ によった。分離用ゲルは A 液(1N HCl 48 ml, Tris 36.6g, TEMED 0.23 ml, 蒸留水を加えて 100 ml とする), C 液(アクリルアミド 30.0g, BIS 0.8g, 蒸留水を加え 100 ml とする) および蒸留水を 1:2:1 の割合に混じた液と、0.14% 過硫酸アンモニウム液を等

The distribution of Hp, Gc and EsD in the Hokuriku districts and the identification of these phenotypes in bloodstains. **Kyoko Hayashi, Manabu Oguchi, Kenichi Nakashima, Ryo Nanikawa**, Department of Legal Medicine (Director: Prof. R. Nanikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

量加えて調製し、濃縮用ゲルはB液(1N HCl 48 ml, Tris 5.98g, TEMED 0.46 ml, 蒸留水を加え100mlとする), D液(アクリルアミド 10.0g, BIS 2.5g, 蒸留水を加え 100 mlとする), E液(リポフラビン 4mg, 蒸留水を加え 100 mlとする) および 蒸留水を 1:2:1:4 に混じて調製した。また、電極槽用緩衝液はF液(Tris 6g, グリシン 28.8g, 蒸留水を加え 1lとする)を10倍希釈して用いた。

ゲル管1本当たり2mAの定電流、室温で120分間泳動を行なった後、ベンチジン飽和溶液で染色した。

血痕からの型判定の場合はディスク電気泳動法の他に、デンブング電気泳動法⁹⁾も行なった。

2) Gc型

免疫電気泳動法(寒天ゲル)¹⁰⁾によった。泳動用緩衝液(pH8.6)としてバルビタール(1.38g/l), バルビタールナトリウム(8.18g/l), 乳酸カルシウム(0.384g/l)を、またゲル用緩衝液(pH8.6)としてバルビタール(1.66g/l), バルビタールナトリウム(10.51g/l), 乳酸カルシウム(1.54g/l)を用いた。ゲル用緩衝液の3倍希釈液に1%のagar nobleを溶解してゲルを作製し、2mAの定電流で約120分間泳動後、抗Gc血清(Behringwerke社製抗Gcヤギ血清)を加えて、37°Cで18~20時間反応させた。染色液はアミドブラック10Bを用いた。

3) EsD型

Hopkinsonら³⁾の方法に準じ、デンブング電気泳動を行なった。泳動用緩衝液(pH7.2)として440mMホウ酸, 40mM水酸化リチウムを、またゲル用緩衝液(pH7.2)として13.5mM Tris, 3.6mMクエン酸, 4.4mMホウ酸, 0.4mM水酸化リチウムを使用した。デンブングゲルは、ゲル用緩衝液100mlにつき水解デンブング12gを混じ、加熱溶解し、アスピレーターで吸引脱気後、泳動槽(155×110×4mm)に流入して作製した。被検溶血液を濾紙片(3×6mm)に浸漬したものを、デンブングゲルの陰極側より4cmのところ

挿入し、35voltの定電圧、室温で20時間泳動した。

0.05M酢酸緩衝液(pH5.2)に、4-メチルウンベリフェロン酢酸エステルを0.01%(w/v)の割合に溶解した染色液を濾紙に浸漬し、ゲルを覆った。約5分後に紫外線を照射し、EsDのバンドを検出した。

実験結果および考察

1. Hp型の分布

Hp型はFig.1に示すような泳動パターンにより判定する。すなわち、Hp1-1型では泳動速度の速い1本のバンドが認められ、Hp2-2型は泳動の遅い数本のバンドから成り、Hp2-1型は前2者の中間のパターンを示す。

Table 1に北陸3県の513例についてのHp型の分布を示す。Hp2-2型(57.3%), Hp2-1型(35.9%), Hp1-1型(6.8%)の順で表現型の頻度は高くなっている。遺伝子頻度(Hp¹:0.2475, Hp²:0.7525)に基づいてHardy-Weinbergの法則により求めた期待値は、実測値とよく一致している。

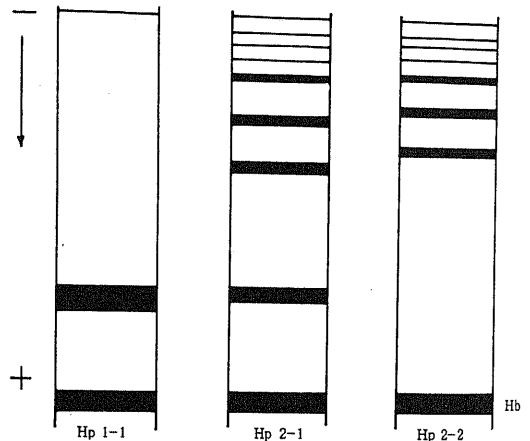


Fig. 1. Electrophoretic patterns of serum Hp in polyacrylamide gel.

Table 1. Phenotypes and gene frequencies of Hp systems in population of Hokuriku

		Phenotype				Gene frequency	
		Hp 1-1	Hp 2-1	Hp 2-2	Total	Hp ¹	Hp ²
Observed	No.	35	184	294	513	0.2475	0.7525
	%	6.8	35.9	57.3	100	$\chi^2 = 0.719$	
Expected	No.	31.4	191.1	290.5	513.0	0.7 < p < 0.8	
	%	6.1	37.3	56.6	100.0		

Hp 型には上記 3 型以外に、いくつかの変異型が知られており、とくに Hp 成分の全く認められない HpO が日本においてもかなり報告されている¹¹⁾が、今回の調査では確認することはできなかった。

北陸地方の分布と他地域のそれとを比較するため、大阪¹²⁾、北海道¹³⁾、青森¹⁴⁾、岡山¹⁵⁾、徳島¹⁶⁾、長崎¹¹⁾、鹿児島¹¹⁾における調査結果を Table 2 にまとめた。日本人における Hp 型の出現頻度は Hp1-1 型でほぼ 6~8%、Hp2-1 型で 34~39%、Hp2-2 型で 53~59% となっており、北陸地方における結果は他地域とほとんど差を認められなかった。

2. Gc 型の分布

寒天ゲル免疫電気泳動を行なった場合、Fig.2 に示すような Gc 型の泳動像が得られた。Gc 成分はゲルプレートの中央に位置する抗体溝側に 1 本の沈降線を与える。使用した抗 Gc ヤギ血清は抗 α_2 -macroglobulin を含んでおり、これも型判定に役立つ。すなわち、Gc1-1 型では Gc 沈降線と α_2 -macroglobulin 沈降線の交叉が見られ、他の 2 型では交叉しない。2-1 型の Gc 沈降線はその陽極端の位置が 2-2 型よりも長く延びることにより、両者の区別が可能である。

Gc 型の表現型の分布を Table 3 に示す。Gc1-1 型が最も多く 56.5% であり、Gc2-1、Gc2-2 型はそれぞれ 37.7%、5.8% であった。遺伝子頻度は Gc¹ : 0.754、Gc² : 0.246 となり、期待値と実測値はほとんど一致した。

Fig.2 に示した通常の 3 種表現型以外の変異型は観察されなかった。

日本の各地（三重¹⁷⁾、岐阜¹⁸⁾、東京¹⁹⁾、富山²⁰⁾）において Gc 型の出現頻度に関する調査がなされている

(Table 4)。今回調査した北陸地方における出現頻度は、他地域のそれとほぼ近似していることが明らかとなり、地域による差は認められなかった。

3. EsD 型の分布

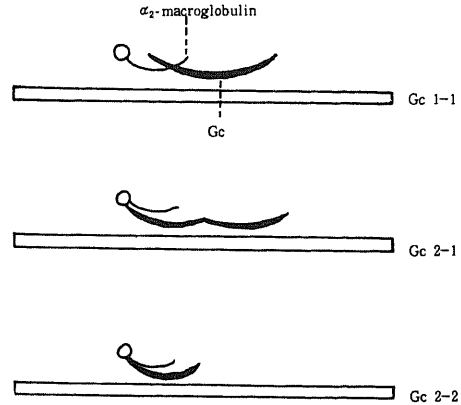


Fig. 2. Immunoelectrophoretic patterns of serum Gc in agar gel.

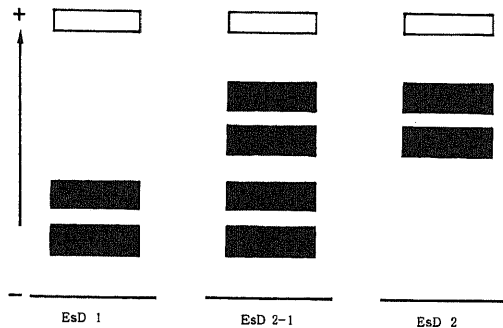


Fig. 3. Electrophoretic patterns of red cell EsD in starch gel.

Table 2. Frequency of Hp phenotypes in various districts of Japan

Place	No.	Phenotype				References
		Hp1-1	Hp2-1	Hp2-2	Hp 0	
Osaka	822	8.3%	38.5%	53.2%	%	12)
Hokkaido	250	6.8	38.4	54.8		13)
Aomori	2401	6.1	34.3	59.6		14)
Okayama	600	6.5	39.0	54.5		15)
Tokushima	865	6.1	38.4	55.5		16)
Nagasaki	608	5.9	38.0	55.6	0.5	11)
Kagoshima	560	8.6	38.0	52.9	0.5	11)
Hokuriku	513	6.8	35.9	57.3		Present data

Table 3. Phenotypes and gene frequencies of Gc systems in population of Hokuriku

		Phenotype				Gene frequency	
		Gc1-1	Gc2-1	Gc2-2	Total	Gc ¹	Gc ²
Observed	No.	285	190	29	504	0.754	0.246
	%	56.5	37.7	5.8	100		
Expected	No.	286.5	187.0	30.5	504.0	0.90 < p < 0.95	
	%	56.8	37.1	6.1	100.0		

Table 4. Frequency of Gc phenotypes in various districts of Japan

Place	No.	Phenotype			References
		Gc1-1	Gc2-1	Gc2-2	
Mie	217	55.8%	35.9%	8.3%	17)
Gifu	1098	54.3	39.3	6.4	18)
Tokyo	566	55.7	36.6	7.7	19)
Toyama	112	54.5	39.2	6.3	20)
Hokuriku	504	56.5	37.7	5.8	Present data

Table 5. Phenotypes and gene frequencies of EsD systems in population of Hokuriku

		Phenotype					Gene frequency	
		EsD 1	EsD 2-1	EsD 2	Other	Total	EsD ¹	EsD ²
Observed	No.	356	420	96	1*	873	0.649	0.351
	%	40.8	48.1	11.0	0.1	100		
Expected	No.	367.3	397.3	107.4	—	872.0	20 < p < 30	
	%	42.1	45.6	12.3	—	100.0		

* Excluded in the calculation of the gene frequencies.

Table 6. Frequency of EsD phenotypes in various districts of Japan

Place	No.	Phenotype				References
		EsD 1	EsD 2-1	EsD 2	Others	
Tokyo	1066	42.6%	46.3%	11.1%	%	21)
Yokohama	591	33.4	50.4	16.2		22)
Yamagata	1038	45.2	42.9	11.7	0.2	23)
Mie	847	41.9	46.2	11.9		24)
Hokuriku	873	40.8	48.1	11.0	0.1	Present data

EsD 型の 3 型の泳動像を Fig.3 に示した。EsD 1 型は陰極側に泳動速度の遅い 2 本のバンドが認められ、EsD 2 型は陽極側に 2 本のバンドが現われる。EsD2-1 型はこの両者の中間のパターンを示す。さらに、EsD1, 2-1, 2 型のいずれとも異なり、EsD1 型より移動の遅い 2 本のバンドをもつ変異型が 1 例見いだされた。

北陸地方での EsD 型の出現頻度を Table 5 にまとめた。EsD2-1 型は 48.1% で最も多く、EsD2 型は 11.0% となり出現頻度は最も低かった。遺伝子頻度は $EsD^1: 0.649$, $EsD^2: 0.351$ であり、これにより求めた期待値は実測値とかなりよく一致した。

873 例の調査数のうち、変異型は 1 例認められた。EsD 型のごく稀にみられる変異型としては、 EsD^{356} あるいは EsD^{471} の遺伝子をもつものが報告されており、いずれも EsD1 型よりも陰極側にバンドが得られるものである。EsD3-1 型と EsD4-1 型の泳動パターンは比較的類似しているため、今回見られた変異型がいずれに一致するのかは確定できない。

Table 6 に日本各地^{21)~24)}における EsD 型の分布の調査結果のいくつかを挙げてあるが、北陸地方の成績もほぼ同様な分布を示しているといえる。

4. 血痕からの型判定

1) Hp 型

血痕に蒸留水あるいは電極槽用緩衝液を加えて得られた浸出液について、新鮮血と同様の方法でディスク電気泳動を行なったところ、多量に混在する遊離 hemoglobin と Hp とが重なるため、血痕作製後 1 日目の試料からの型判定も不可能であった。ディスク電気泳動法による血痕からの型判定は、浸出液を DEAE-cellulose で前処理した液について行なうと、1 週間～1 ヶ月間室温放置した血痕からも Hp 型を求めることができることが知られている²⁵⁾。最近、北ら⁹⁾が報告したデンブング電気泳動法により hemoglobin を陰極側に移動させ Hp 分画と分離させる方法では、120～180 日経過した血痕から型判定が可能であるという。この方法に従って実験したところ、室温で約 4 ヶ月経った血痕から型を検出できた。この方法は、かなり長期間検出可能でありかつ前処理が不要であるため、実際例への利用には有効であろうと思われる。

2) Gc 型

血痕からの Gc 型の検出は、混在している血球による妨害で沈降線が不明瞭になるため、わずか 1 日しか経過していない試料についても不可能であった。

3) EsD 型

EsD 型の判定は、1 週間経過した血痕では比較的容

易であり、2 週間経過した場合は 1 型、2-1 型、2 型の 3 型を同時に泳動したときにかろうじて可能であった。

梅津ら²³⁾は約 5 ヶ月経過の血痕からも型判定は可能であるとしているが、我々の実験では、長期間経過した試料から正確に型を決定することは困難であった。

結 論

北陸地方における Hp 型, Gc 型および EsD 型の各々の表現型の分布を調査した。また、陳旧血痕からのこれらの型の検出限界も検討した。

Hp 型については、513 例のうち 1-1 型 35 例 (6.8%), 2-1 型 184 例 (35.9%), 2-2 型 294 例 (57.3%) という結果を得た。

Gc 型は、504 例のうち 1-1 型 285 例 (56.5%), 2-1 型 190 例 (37.7%), 2-2 型 29 例 (5.8%) という出現頻度であった。

EsD 型の分布は、873 例について検討したところ、1 型 356 例 (40.8%), 2-1 型 420 例 (48.1%), 2 型 96 例 (11.0%), その他 1 例 (0.1%) であった。

また、室温放置の血痕からの型判定は、Hp 型は約 4 ヶ月、EsD 型は約 2 週間経過した試料について可能であったが、Gc 型は 24 時間経過のものでも不可能であった。

以上のように、Hp 型, Gc 型および EsD 型はいずれも単純な遺伝を示し、ホモ接合型とヘテロ接合型を容易に区別することが可能であり、またそれぞれの分布に極端な偏りがなく適当な値を示すものである。さらに、血痕からの型判定も可能であり、今後さらに技術的な改良を加える余地もある。したがってこれらの遺伝形質は法医学の実際面できわめて利用価値が高いものと考えられる。

文 献

- 1) Smithies, O.: *Biochem. J.*, **61**, 629 (1955).
- 2) Hirschfeld, J.: *Acta path. microbiol. Scand.*, **47**, 160 (1959).
- 3) Hopkinson, D. A., Mestriner, M. A., Cortner, J. & Harris, H.: *Ann. Hum. Genet.*, **37**, 119 (1973).
- 4) Tashian, R. E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **108**, 364 (1961).
- 5) Bender, K. & Frank, R.: *Humangenetik*, **23**, 315 (1974).
- 6) Rittner, Ch. & Müller, G.: *Hum. Hered.*, **25**, 152 (1975).

- 7) Berg, K., Schwarzfischer, F. & Wischerath, H.: Hum. Genet., 32, 81 (1976).
- 8) 科学警察研究所: 血清学的物体検査法, 232頁, 1974.
- 9) 北 武・福士武美: 法医学の実際と研究, 第20集, 8頁, 1977.
- 10) 科学警察研究所: 血清学的物体検査法, 239頁, 1974.
- 11) Ishimoto, G. & Kuwata, M.: 日法医誌, 27, 346 (1973).
- 12) 松本秀雄: 日法医誌, 18, 380 (1964).
- 13) 石橋 宏: 日法医誌, 28, 255 (1974).
- 14) 村上 利・北 武: 日法医誌, 26, 347 (1972).
- 15) 石津日出雄・安東健介: 日法医誌, 26, 347 (1972).
- 16) 矢田昭一・津川 昇・木戸 啓・沢田英夫: 日法医誌, 28, 256 (1974).
- 17) 矢田昭一・関根光代・佐野靖子: 日法医誌, 20, 368 (1966).
- 18) 須山弘文・内田 孟: 日法医誌, 23, 302 (1969).
- 19) 池本卯典・金羽レイ・向山明孝: 科警研報告, 23, 192 (1970).
- 20) 大行慶雄・池本卯典: 医学と生物学, 74, 145 (1967).
- 21) Omoto, K., Aoki, K. & Harada, S.: Hum. Hered., 25, 378 (1975).
- 22) 吉田 宏・影山太一・渡辺嘉彦・阿部 徹・土屋恵子: 科警研報告, 28, 7 (1975).
- 23) 梅津和夫・鈴木庸夫: 法医学の実際と研究, 第19集, 1頁, 1976.
- 24) Ishimoto, G., Kuwata, M. & Fujita, H.: 人類遺伝学雑誌, 19, 157 (1974).
- 25) 高木賢治・菊池 哲: 日法医誌, 28, 253 (1974).

A b s t r a c t

The distribution of phenotypes of Hp and Gc in serum and EsD in the red cell was investigated as to the population of the Hokuriku districts.

The frequencies of Hp phenotypes in 513 individuals were Hp1-1 : 6.8%, Hp2-1 : 35.9% and Hp2-2 : 57.3%, respectively. The gene frequencies were : $Hp^1 = 0.2475$ and $Hp^2 = 0.7525$.

The frequencies of Gc phenotypes examined in 504 individuals were Gc1-1 : 56.5%, Gc2-1 : 37.7% and Gc2-2 : 5.8%, respectively. The gene frequencies were : $Gc^1 = 0.754$ and $Gc^2 = 0.246$.

The distribution of EsD phenotypes in 873 individuals was EsD 1 : 40.8%, EsD2-1 : 48.1%, EsD 2 : 11.0% and other : 0.1%, respectively. The gene frequencies were : $EsD^1 = 0.649$ and $EsD^2 = 0.351$.

For medicolegal identification, the detectabilities of these three systems from old blood stain were investigated. Hp and EsD types were detectable until about 4 months and 14 days, respectively, after bleeding. Gc types were undetectable in even 24-hour-old blood-stains.