

Effectiveness of New Bloodstain Preliminary Examination Reagent

○Kotaro Yamagishi^{*1}, Kazuhiko Tsukada^{*2}, Akihiro Kato^{*1},
Yuzo Shiozawa^{*1}, Masamitsu Ichioka^{*1}

^{*1} Nagano Prefectural Police Department Identification Unit
First Mobile Identification Group

^{*2} Nagano Prefectural Police Department Forensic Science Laboratory

Prolusion

Various items such as fingerprints, hair, semen and bloodstain were left in the crime scene. Since they are very important evidences to support the crime, crime scene investigations without any oversight are being requested. On the other hand, the occurrences of murders with illegal disposal of body which criminals destroy evidences at the crime scenes by thoroughly cleaning up the walls and floors of the room shows that the criminals are becoming sophisticated in their methods.

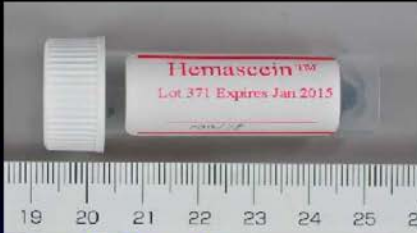
Currently, the bloodstain preliminary examination at the crime scenes in our prefecture are mainly consisted of a luminol luminescence examination method and a leucomalachite green examination method. A wide range of bloodstain preliminary examination has been done by the luminol luminescence examination. However, these methods have disadvantages to affect DNA tests, have short luminescence time and require the examination room to be kept completely dark.

This time, in order to detect and collect bloodstains left at the crime scene, we newly obtained Hemascein reagent as a method to enable examinations and picture taking in bright environment and not to affect DNA tests and studied its effectiveness.

About Hemascein

Reagent preparation is easy.

- Stock Solution... Add 5ml purified water in the container with powder reagent.
- Test Solution..... Collect necessary amount of the stock solution and dilutes it with purified water by 100 times.



Hemascein Reagent

Long term storage is possible.

- Powder Reagent...7 years in room temp.
- Stock Solution...15 months in refrigerator
- Test Solution...7 months in refrigerator

Manufacturer

Abacus Diagnostics (U.S.A.)

It's main ingredient, "fluorescein," has been used in medical department as a test Agent for fundus exams, endoscopy exams to check the bleeding area.

Purposes

We verified the following items such as performance of Hemascein Reagent.

1. Wavelength, filter color combination, picture taking method
2. Comparison with the leucomalachite green method and the luminol method.
 - Detection Sensitivity
 - Abnormality
 - Effects on DNA tests

Method 1

Wavelength, Filter Color Combination and Picture Taking

Wavelength: 350nm – 515nm



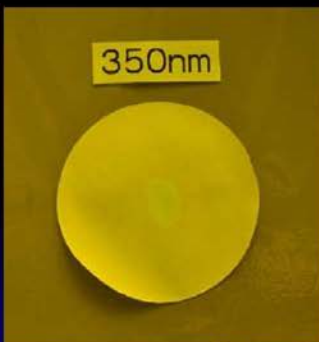
Crime Scope
CS-16-500

Filter: Yellow filter (Y48, light yellow)
Yellow filter (Y51, dark yellow)
Orange filter (O56)

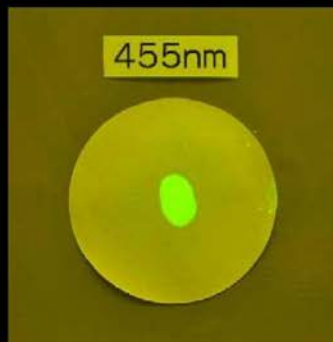
Result 1

Illuminate within a scope of special light 350nm-515nm.

Wavelength 350nm



Wavelength 455nm



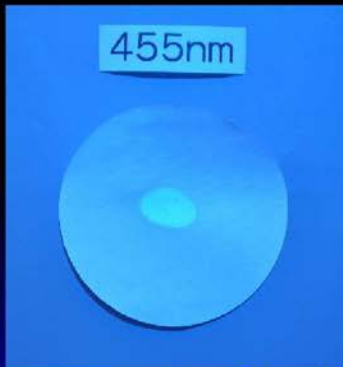
Wavelength 515nm



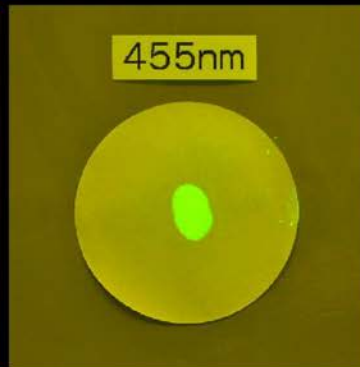
Wavelength 455nm had the strongest fluorescence.

Wavelength of Special Light and Filter Color Combination

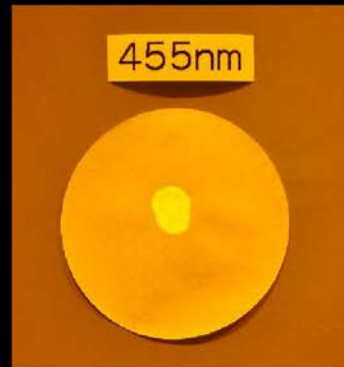
Yellow Filter
(Y48, light yellow)



Yellow Filter
(Y51, dark yellow)



Orange Filter
(O56)



Through a dark yellow filter,
fluorescence was most clearly confirmed

Taking Pictures

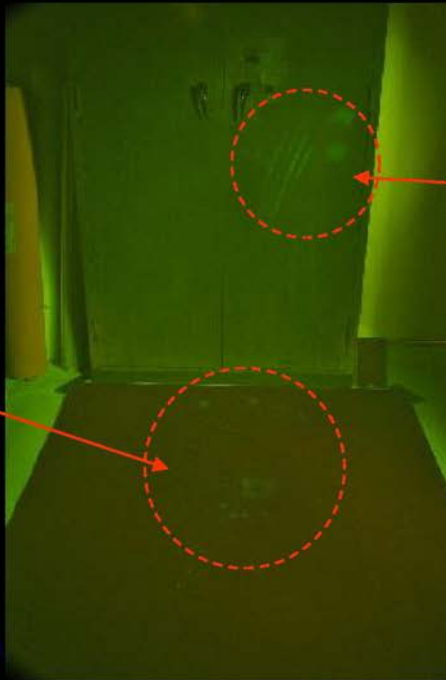
Investigation
Digital Camera
(K20D)



V40 Square
Lens Filter

Yellow Filter

Shooting Results



Bloodstain Reaction

Bloodstain Reaction

Method 2

Comparison with Leucomalachite Green Method and Luminol Method

~Detection Sensitivity~

Continuously dilute all blood samples

(100, 500, 1000, 5000, 10,000, 50,000, 100,000, 500,000 times diluted)



Apply them in cloth and dry.



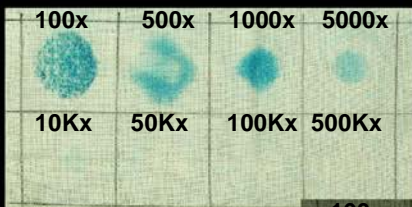
Spray



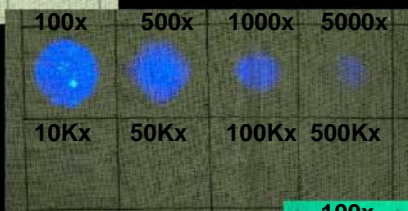
Blood is applied.			
100x	500x	1000x	5000x
10Kx	50Kx	100Kx	500Kx

Result 2

~Detection Sensitivity~

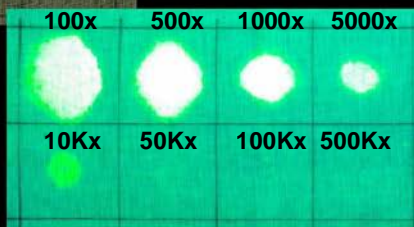


Leucomalachite Green Reagent (15.6, 1/30)



Luminol Reagent (12.8, "20)

Hemasecin Reagent (12.8, 1/16)



Method 3

Comparison with Leucomalachite Green Method and Luminol Method

~Abnormality~

Four different materials
(Wood, Carpet, P Tile, Cloth)

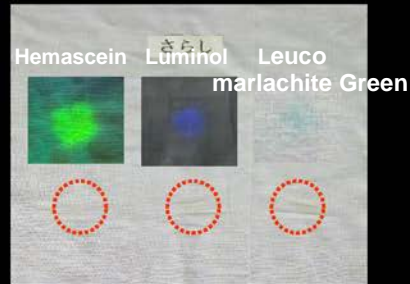
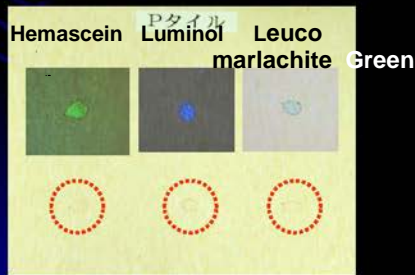
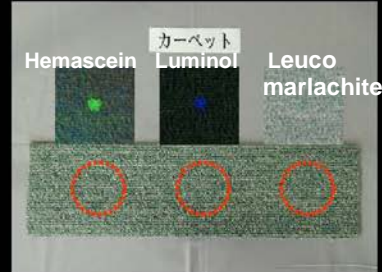
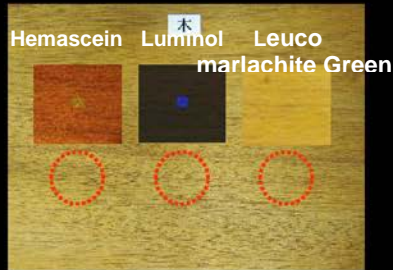
Apply blood (1000x diluted) and dry.

Spray



Result 3

~Abnormality~



Method 4

Comparison with Leucomalachite Green Method and Luminol Method

~Effects on DNA Tests~

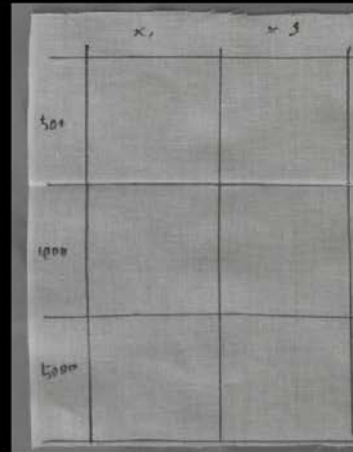
Dilute all blood samples
(500, 1000, 5000 times diluted)



Apply blood (0.1ml) and dry.



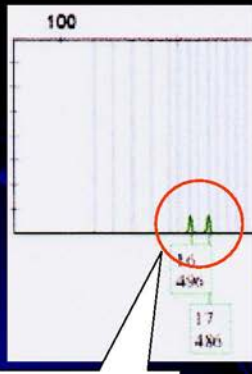
DNA Test



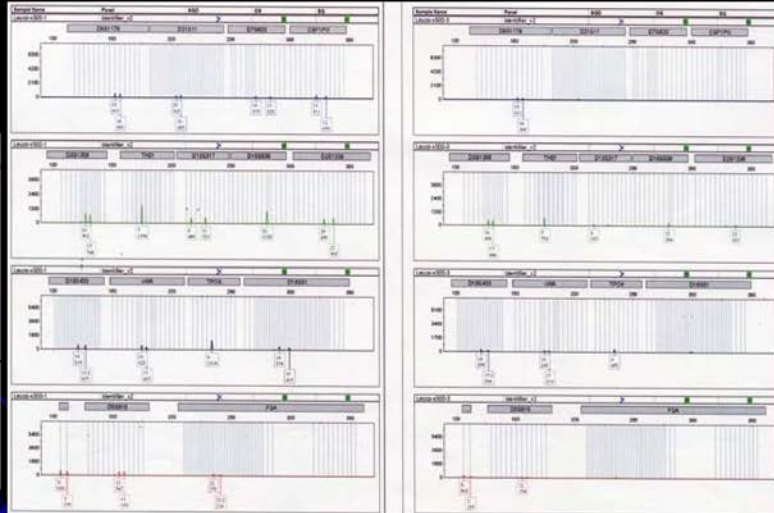
Result 4-1

~Effects on DNA Test~

Leucomalachite Green Examination Method



Low Peak

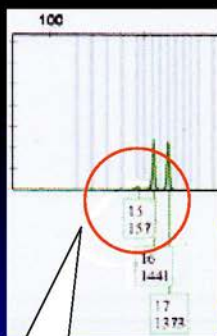


DNA's electroferogram extracted from 500 times diluted bloodstain with leucomalachite green reagent sprayed on. Left: 1 spray, Right: 3 sprays

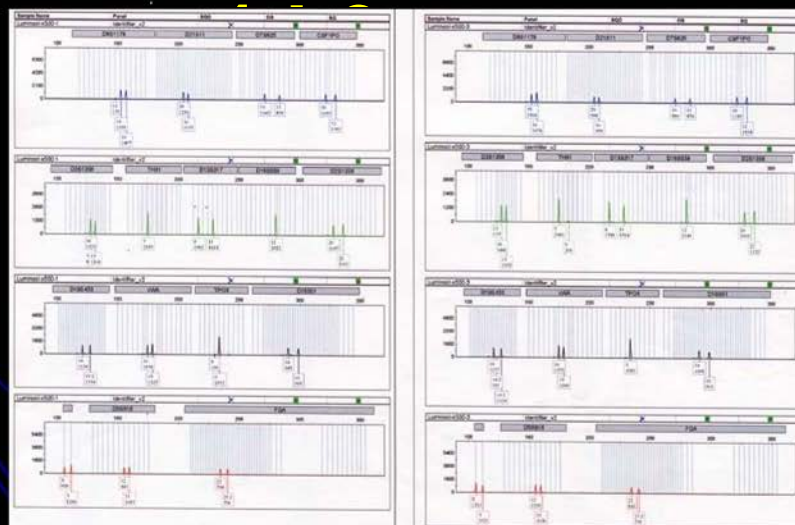
Result 4-2

~Effects on DNA Test~

Luminol Luminescence Examination Method



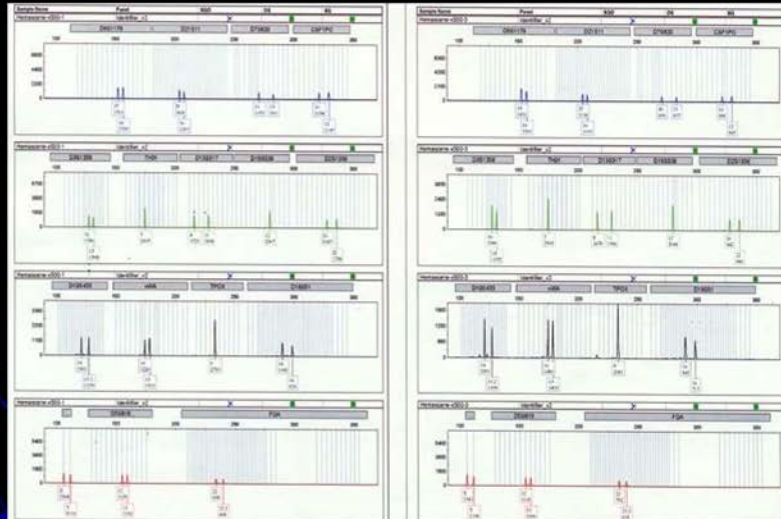
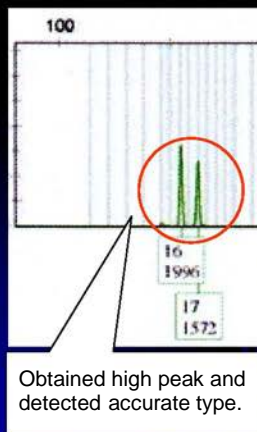
DNA Test is affected.



DNA's electroferogram extracted from 500 times diluted bloodstain with luminol reagent sprayed on. Left: 1 spray, Right: 3 sprays

Result 4-3

~Effects on DNA Test~
Hemasein Examination Method



DNA's electroferogram extracted from 500 times diluted bloodstain with hemasein reagent sprayed on. Left: 1 spray, Right: 3 sprays

Summary

- Detection wavelength was 455nm and the best filter was a dark yellow filter (Y51).
- We could search and take pictures under relatively bright environment.
- In regards to the verification of detection sensitivity, it was superior than the leucomalachite green method or the luminol method (Clear positive results with 10,000 time diluted sample)
- In abnormality examinations, the luminescence was not recognized in certain materials by the luminol method, but was recognized in the hemasein method.
- It was easy to confirm the wiped portion and after wiping.
- For the effects on DNA tests, high peak was obtained on the electroferogram compared to the leucomalachite green method or the luminol method and DNA detection wasn't affected.



新規血痕予備検査試薬 Hemasceinの有効性について

○山岸幸太郎^{*1}, 塚田和彦^{*2}, 加藤明弘^{*1},
塩澤祐造^{*1}, 市岡正充^{*1}

^{*1}長野県警鑑識課 第一機動鑑識班

^{*2}長野県警 科学捜査研究所

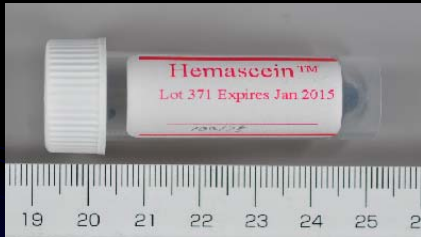
緒 言

犯罪現場には、指紋、毛髪、精液、血痕など様々なものが遺留されている。これらは、犯行を裏付けるための重要な証拠であることから、見落としのない現場活動が求められている。一方で、犯行現場でありながら部屋の壁や床がきれいに清掃され証拠隠滅が謀られている殺人死体遺棄事件の発生など、その手口は巧妙化している。

現在、当県の犯罪現場における血痕予備検査は、ルミノール発光検査法とロイコマラカイトグリーン検査法が主流であり、広範囲の血痕検査は、ルミノール発光検査法によって行っている。しかしながら、これらの方法は、DNA型検査に影響を及ぼす、発光時間が短い、検査場所を全暗黒にしなくてはならない等のデメリットも多い。

今回我々は、遺留されている血痕を見落とすことなく検出、採取するため、明るい環境下でも検査や写真撮影ができ、検査後もDNA型検査に影響を及ぼさない方法として、新たにHemascein試薬を入手し、その有効性について検討した。

Hemasceinについて



Hemascein試薬(粉末状態)

- 試薬調製が簡単
 - ・ストック溶液……粉末試薬の入った容器に5mlの精製水を加える。
 - ・検査液……ストック溶液を必要量採り、精製水で100倍に希釈。
- 長期保存が可能
 - ・粉末試薬……室温で7年間
 - ・ストック溶液……冷蔵庫で15ヶ月間
 - ・検査液……冷蔵庫で7ヶ月間
- 価格:約2万5000円(500ml分)
- 製造元
アバカス株式会社(アメリカ合衆国)
(輸入販売元:株式会社ユニコム)

主成分である「フルオレセイン」は、眼底検査、内視鏡検査など、出血部位を調べるための検査薬として医療部門で使われている。

目 的

ヘマシーン試薬の性能等、以下の項目について比較検証した。

- 1 波長、フィルター色の組み合わせ、写真撮影方法
- 2 ロイコマラカイトグリーン法、ルミノール法との比較
 - ・ 検出感度
 - ・ 特異性
 - ・ DNA型検査への影響

方法 1

波長とフィルター色の組み合わせ及び写真撮影



クライムスコープ
CS-16-500

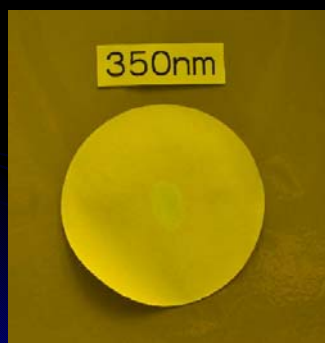
波 長 : 350nm~515nm

フィルター : イエローフィルター
(Y48, 薄い黄色)
イエローフィルター
(Y51, 濃い黄色)
オレンジフィルター
(O56)

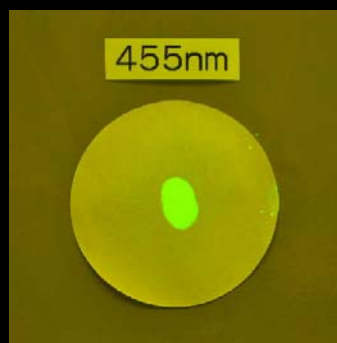
結果 1

特殊光線350nm~515nmの範囲で照射。

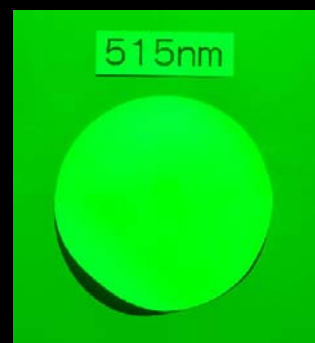
波長350nm



波長455nm



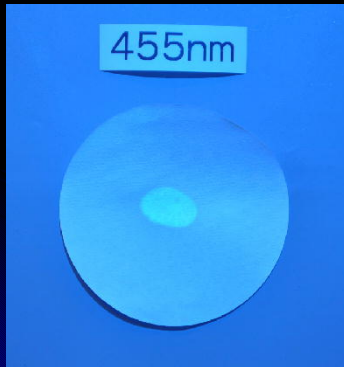
波長515nm



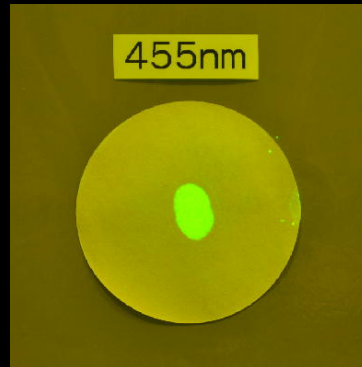
波長455nmが最も強い蛍光を発した。

特殊光線の波長とフィルター色の組み合わせ

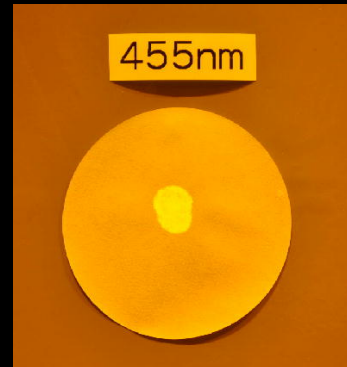
イエローフィルター
(Y48, 薄い黄色)



イエローフィルター
(Y51, 濃い黄色)



オレンジフィルター
(O56)



濃い黄色のフィルターを通すことで、蛍光を最も明瞭に確認可能

写真撮影

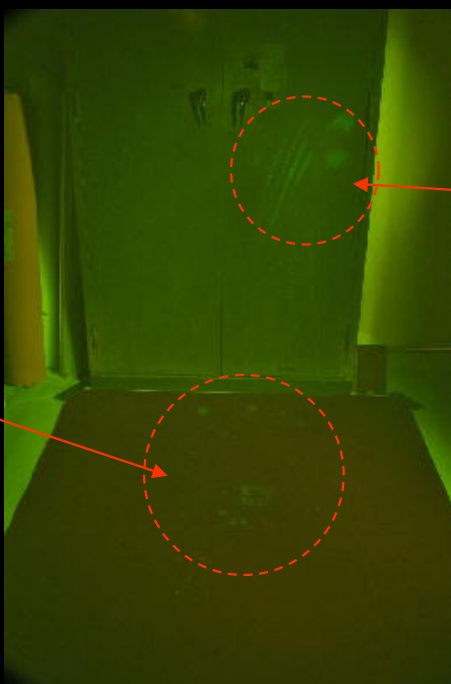
捜査用デジタル
カメラ(K20D)

イエローフィルター



V40角形
レンズフィルター

撮影結果



血痕反応

血痕反応

方法 2

ロイコマラカイトグリーン法、ルミノール法との比較

～ 検出感度 ～

全血を連続希釈
(100, 500, 1000, 5000, 1万, 5万, 10万, 50万倍希釈)

↓
晒布に付着・乾燥

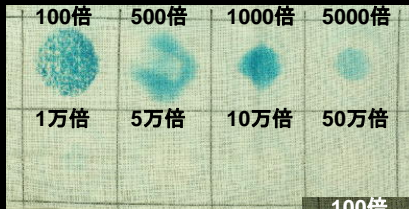
↓
噴霧



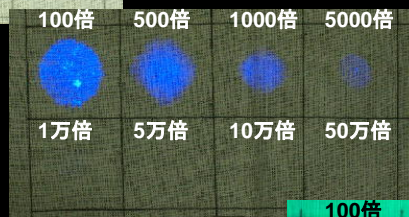
血液を付着させた状態			
100倍	500倍	1000倍	5000倍
1万倍	5万倍	10万倍	50万倍

結果 2

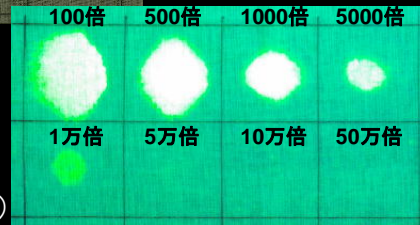
～ 検出感度 ～



ロイコマラカイトグリーン試薬 (f5.6, 1/30)



ルミノール試薬 (f2.8, "20)



ヘマシーン試薬 (f2.8, 1/16)

方法 3

ロイコマラカイトグリーン法、ルミノール法との比較

～ 特異性 ～

異なる4種類の材質
(木材、カーペット、Pタイル、晒布)

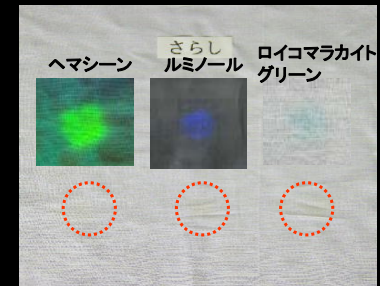
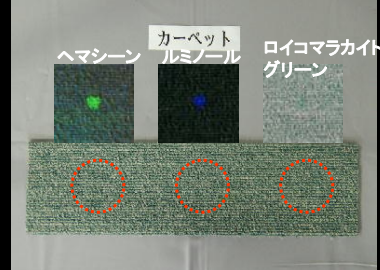
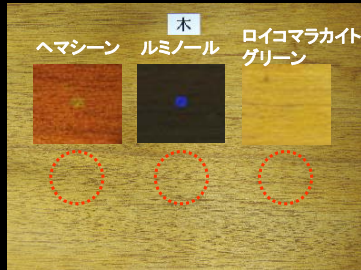
血液(1000倍希釈)を付着・乾燥

噴霧



結果 3

～ 特異性 ～



方法 4

ロイコマラカイトグリーン法、ルミノール法との比較

～ DNA型検査への影響 ～

全血を希釈
(500, 1000, 5000倍希釈)



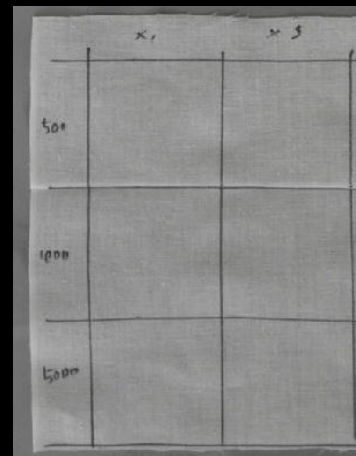
晒布に付着(0.1ml)・乾燥



噴霧(1回, 3回)



DNA型検査



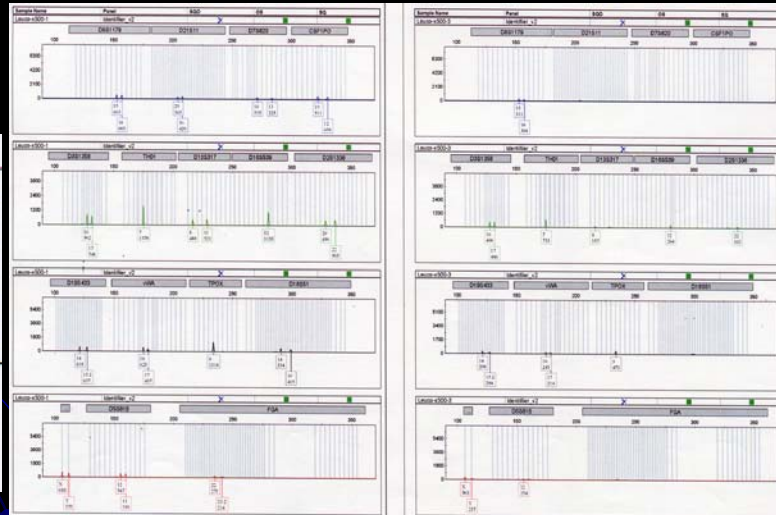
結果 4-1

～ DNA型検査への影響 ～

ロイコマラカイトグリーン検査法



ピークが低い

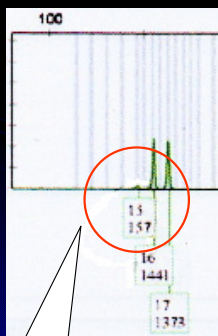


ロイコマラカイトグリーン試薬を噴霧した500倍希釈血痕から抽出したDNAのエレクトロフェログラム。左:1回噴霧, 右:3回噴霧

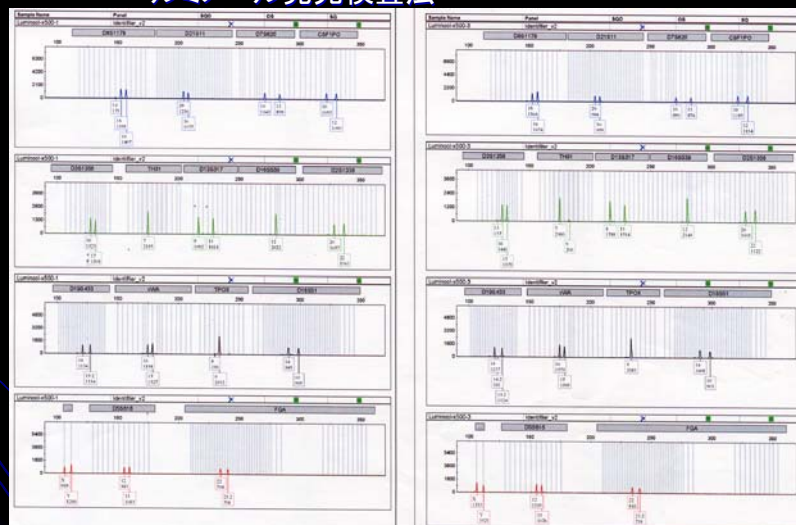
結果 4-2

～ DNA型検査への影響 ～

ルミノール発光検査法



DNA型検査
に影響

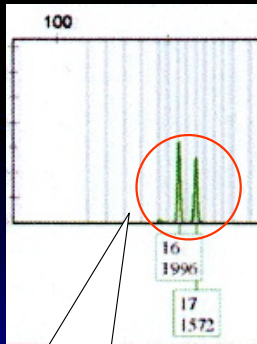


ルミノール試薬を噴霧した500倍希釈血痕から抽出したDNAのエレクトロフェログラム。左:1回噴霧, 右:3回噴霧

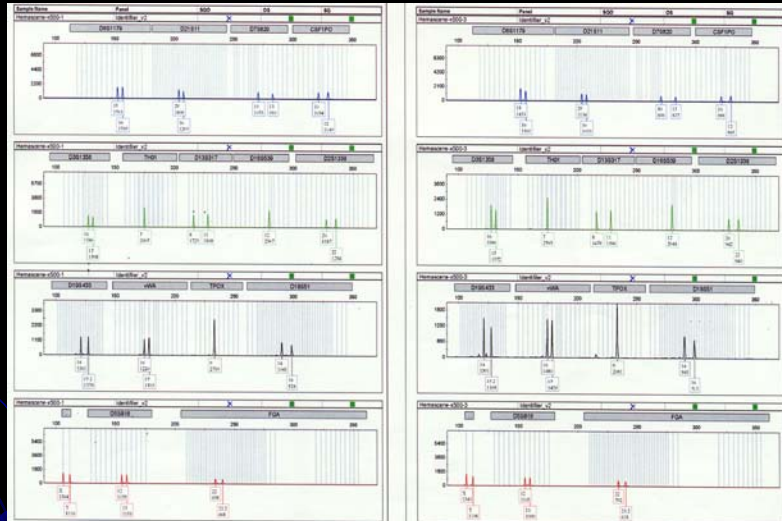
結果 4-3

～ DNA型検査への影響 ～

ヘマシーン検査法



高いピークが得られ、
正確な型を検出



ヘマシーン試薬を噴霧した500倍希釈血痕から抽出したDNAのエレクトロフェログラム。
左:1回噴霧, 右:3回噴霧

まとめ

- 検出波長は455nm、フィルターは濃いイエローフィルター (Y51) が最適であった。
- 比較的明るい環境下でも検索及び写真撮影が可能であった。
- 検出感度の検証において、ロイコマラカイトグリーン法やルミノール法より優れていた(10,000倍希釈で明確な陽性反応)。
- 特異性検査において、ルミノール法は材質によっては発光が認められなかったが、ヘマシーン法では認められた。
- 拭き取り部位及び拭き取り後の確認が可能であった。
- DNA型検査への影響は、ロイコマラカイトグリーン法やルミノール法に比べ、エレクトロフェログラム上では高いピークが得られ、DNA型の検出にも影響を与えなかった。

