

Originalarbeiten / Original Works

Rechtsmedizinischer Nutzen der alkalischen Placenta-Phosphatase bei Kindstötung

Masakazu Oya

Lehrstuhl für Rechtsmedizin der Medizinischen Universität Yamanashi, Tamaho-mura,
409-38 Yamanashi-ken, Japan

Medicolegal Use of Placental Alkaline Phosphatase in Infanticide

Summary. By means of starch gel electrophoresis and an improved staining technique for the demonstration of isoenzyme bands, placental alkaline phosphatase types were demonstrated in placenta tissue and birth blood traces, which had been stored for several days at room temperature. This method was successfully applied in a case of infanticide and secret delivery to identify the mother of the child. The results of a study on a Japanese population are also reported.

Key words: Placental alkaline phosphatase, polymorphism – Blood stains, types of placental alkaline phosphatase – Infanticide

Zusammenfassung. Die Typen der alkalischen Placenta-Phosphatase wurden mit Hilfe der Stärkegelektrophorese und einer verbesserten Technik zur Darstellung der Isoenzymbanden an Placentageweben und Geburtsblutspuren nachgewiesen, die über mehrere Tage bei Zimmertemperatur gelagert worden waren. Die Methode wurde mit Erfolg in einem Fall von Kindstötung und verheimlichter Geburt zur Identifizierung der Kindesmutter angewandt. Ferner wird über die Ergebnisse einer Populationsstudie bei Japanern berichtet.

Schlüsselwörter: Alkalische Placenta-Phosphatase, Polymorphismus – Blutspurenuntersuchung, alkalische Placenta-Phosphatase – Kindstötung, Identifizierung der Kindesmutter

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase steigt in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft im mütterlichen Serum sukzessiv an (McMaster et al. 1964). Diese Zunahme ist ausschließlich auf ein Isoenzym placentaren Ursprungs zurückzuführen, das durch eine Resistenz gegenüber Erhitzung (30 Minuten Inkubation bei 56°C) charakterisiert ist (Neale et al. 1965). Oya et al. (1973)

schlugen früher vor, die Bestimmung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase zur Schwangerschaftsdiagnostik aus getrockneten Blutspuren zu benutzen.

Der genetisch gesteuerte Polymorphismus der alkalischen Placenta-Phosphatase wurde zum ersten Mal von Robson und Harris im Jahre 1965 beschrieben. Mittels der Stärkegelektrophorese in zwei Arbeitsgängen bei pH 8,6 und bei pH 6,0, und anschließender Enzymfärbung unterschieden sie sechs häufige Phänotypen, die auf die Existenz von drei kodominanten Allelen zurückgeführt werden. Die weitere Analyse der Placenta-Extrakte von Zwillingen zeigte, daß der Phänotyp der alkalischen Placenta-Phosphatase vom Genotyp des Fötus bestimmt wird (Robson und Harris 1967). Später wurden zahlreiche seltene Varianten gefunden und von Donald und Robson (1974) mit einer neuen numerischen Nomenklatur zusammengestellt.

Im Jahre 1977 haben Oepen und Müller den Polymorphismus der alkalischen Placenta-Phosphatase untersucht, um die Untersuchungsmöglichkeiten bei Kindstötung und verheimlichter Geburt zu verbessern; die Ergebnisse schienen jedoch wegen undeutlicher Darstellung der Enzymmuster nicht befriedigend zu sein. Ich habe nun festgestellt, daß das Substrat Naphthol-AS-MX-Phosphat eine bessere Darstellung des Enzyms liefert als das bislang benutzte Substrat β -Naphthylphosphat.

Die vorliegende Arbeit berichtet über die spurenkundliche Bedeutung der quantitativen Bestimmung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase und der Typenbestimmung der alkalischen Placenta-Phosphatase bei einem Fall von Kindstötung und verheimlichter Geburt sowie über die Ergebnisse einiger zusätzlicher Untersuchungen.

Kasuistik

Am 23.5.1984 wurde in einer Mülltonne an einer Straße eine weibliche Kindesleiche mit der Placenta gefunden, die in einer schwarzen Plastiktüte verpackt war. Das Kind war ausgezogen und lebensfähig gewesen. Die Nabelschnur war nicht unterbunden, sondern in der Mitte durchgerissen. Es fanden sich mehrere Kratzspuren in der Umgebung von Mund und Nase. Bei der Sektion waren zahlreiche punktförmige Blutaustritte in dem Lungenfell und der Brustdrüse und einige Ekchymosen in den Augenbindehäuten zu sehen. Die Lungen waren gebläht und blutreich. Deshalb wurde als Todesursache Erstickung, wahrscheinlich durch Bedeckung von Mund und Nase mit der Hand, angenommen.

Die Kindesmutter sowie der Ort und der Zeitpunkt der Geburt waren zunächst nicht bekannt. Die Polizei wurde sofort nach dem Auffinden des Kindes benachrichtet. Der Verdacht fiel bald auf eine 17jährige unverheiratete Spinnerin, die in einer Fabrik in der Nähe des Fundorts der Leiche arbeitete. In ihrer Wohnung wurden dann handtellergroße halbgetrocknete Blutflecken an der Matratze gefunden. Anfangs leugnete die Frau die Tötung, gestand aber am nächsten Tag im Anschluß an eine ärztliche Untersuchung, daß sie die Mutter des Kindes sei, worauf sie in einem Krankenhaus aufgenommen wurde.

Sie gab folgendes an: „Am Morgen des 22.5.1984 verspürte ich Schmerzen im Leib, die bald heftiger wurden. Ich habe überhaupt keine Vorbereitung für die bevorstehende Geburt getroffen. In der Nacht habe ich das Kind ohne fremde Hilfe in einem Bett geboren. Ich bemerkte viel Blut auf dem Bettlaken. Vor Angst und Schrecken legte ich die Hand auf Mund und Nase des Kindes, um das Schreien zu verhindern. Ferner deckte ich das Kind mit der Bettdecke zu. Ich habe sicher die Besinnung verloren gehabt und weiß nicht, was danach passiert ist. Als ich wieder zu mir kam, lag das Kind auf dem Bett und war tot. Dann verpackte ich die Leiche in einer Plastiktüte und versteckte sie in eine Mülltonne. Die Blutflecken an den Bettlaken und der Bettdecke habe ich schon gewaschen.“

Bestimmung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase

Etwa 2 cm² des Blutfleckensmaterials wurden ausgeschnitten; die Aktivität der hitzestabilen alkalischen Phosphatase wurde nach der von Oya et al. (1973) beschriebenen und von Oepen und Köhler (1977) nachher modifizierten Methode photometrisch bestimmt. Einzelheiten zum optimalen Arbeitsgang sind der Dissertation von Köhler (1976) zu entnehmen.

Die Blutflecken wiesen einen Extinktions-Meßwert von 0,540 auf, während sich aus Kontrollblutspuren normaler Nichtschwangerer keine Aktivität nachweisen ließ. Das Ergebnis erbrachte den Schwangerschaftsnachweis der betreffenden Blutflecken, was beweist, daß sie von einer Schwangeren verursacht werden.

Typenbestimmung der alkalischen Placenta-Phosphatase

Zur Untersuchung kamen die Blutflecken an der Matratze und das anlässlich der Obduktion entnommene Placentagewebe. Etwa 1 g des Placentagewebes wurde durch einen Ultra-Turrax-Homogenisator (Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau, BRD) homogenisiert. Spurenmaterial der Größe von ca. 20 cm² wurde mit einer Schere fein zerschnitten und in einem Reagenzglas mit 2 ml Aqua dest. eingeweicht. Dann wurde das Hämolsat durch Verrühren mit einem Glasstab eluiert. Das Plazenta-Homogenat bzw. das Blutfleckenuvat wurde eine Minute mit 0,5 ml gekühltem n-Butanol stark geschüttelt und nach Lagerung für 30 Minuten bei 20000 × g 30 Minuten lang zentrifugiert. Die wässrige Phase des Überstandes wurde zur Elektrophorese verwendet.

Stärkegelektrophorese wurde hauptsächlich nach der Methode von Robson und Harris (1965) in zwei verschiedenen Puffersystemen bei pH 8,6 und bei pH 6,0 durchgeführt. Kleine Filterpapierstreifen der Größe von 3 × 8 mm wurden in den Butanol-Extrakt eingetaucht und auf das Gel 4 cm vom kathodalen Gelrand entfernt verimpft. Die Darstellung der Isoenzymbanden der alkalischen Placenta-Phosphatase erfolgte mittels einer verbesserten Methode, die auf der histochemischen Technik von Burstone (1958) beruht. Nach Beendigung der

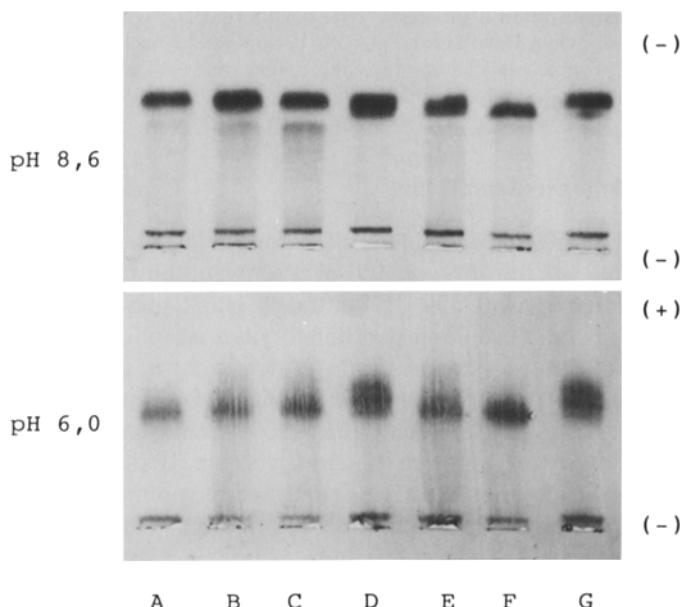


Abb.1. Muster der Typen der alkalischen Placenta-Phosphatase nach elektrophoretischer Trennung bei pH 8,6 und bei pH 6,0. A: Blutflecken an der Matratze, I₁; B: Placentagewebe, I₁; C: Referenzprobe, I₁; D: Referenzprobe, F₁S₁; E: Referenzprobe, S₁I₁; F: Referenzprobe, S₁; G: Referenzprobe, F₁I₁

Phänotyp	Beobachtet		Erwartet	
	n	%	n	%
S ₁ (1)	64	53,33	63,80	53,17
F ₁ S ₁ (2-1)	12	10,00	9,48	7,90
F ₁ (2)	0	0,00	0,35	0,29
S ₁ I ₁ (3-1)	34	28,33	35,00	29,17
F ₁ I ₁ (3-2)	1	0,83	2,60	2,17
I ₁ (3)	6	5,00	4,80	4,00
I ₁ S ₂ (4-3)	1	0,83	0,80	0,67
J ₁	1	0,83	0,04	0,03
J ₁ S ₁	1	0,83	2,93	2,44
Summe	120	99,98	119,80	99,84

Tabelle 1. Phänotypenverteilung der alkalischen Placenta-Phosphatase in einer japanischen Bevölkerung

Elektrophorese wurde das Gel horizontal durchgeschnitten und mit folgender Färbelösung für 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert: 15 mg Dinatrium-Naphthol-AS-MX-Phosphat, 20 mg Fast-Blue-RR-Salz in 15 ml 0,05 M 2-Amino-2-Methyl-1,3-Propandiol-Puffer (Einstellung mit 1 N Essigsäure auf pH 9,8).

Die Orte der Enzymwirkung stellten sich auf dem Stärkegel als blauer Azofarbstoff dar. Abb. 1 zeigt das elektrophoretische Muster der alkalischen Placenta-Phosphatase in den Blutflecken an der Matratze und im Placentagewebe sowie in Referenzproben. In beiden Puffersystemen zeigen die beiden Proben den gleichen Typ I₁. Diese Übereinstimmung der Phänotypen legt den Schluß nahe, daß die in Frage kommenden Blutflecken während der Geburt des Kindes entstanden sind; denn die Typen der alkalischen Placenta-Phosphatase sind nur an Geburtsblutspuren nachweisbar, wie nachher gezeigt wird. Da die Häufigkeit des Typs I₁ in der japanischen Bevölkerung nur 5% beträgt (siehe nachstehende Tabelle 1), kann man mit großer Wahrscheinlichkeit den Schluß ziehen, daß es sich bei der tatverdächtigen Frau um die gesuchte Kindesmutter handelt.

Populationsuntersuchung

Der Polymorphismus der alkalischen Placenta-Phosphatase wurde an einer Placenta-Stichprobe von 120 nichtverwandten japanischen Frauen untersucht, die in der Frauenklinik des zentralen Krankenhauses Yamanashi-ken entbunden hatten. Die Verteilung der Phänotypen ist in Tabelle 1 zusammengestellt. In diesem Material kamen fünf von den sechs häufigen Phänotypen vor, jedoch ließ sich der Typ F₁ nicht beobachten. Darüber hinaus wurden drei seltene Varianten gefunden, von denen die Typen J₁ und J₁S₁ bisher nur in der japanischen Bevölkerung beobachtet werden (Blake et al. 1969; Mabuchi 1971). Die Beobachtungs- und Erwartungswerte stimmen beim statistischen Vergleich mit der Chi-Quadrat-Methode gut überein, so daß anzunehmen ist, daß das Hardy-Weinberg-Gesetz Geltung hat ($\chi^2 = 2,491$, 3 F. G., $0,3 < P < 0,5$). Die Allelfrequenzen betragen: P_I^s = 0,729, P_I^f = 0,054, P_Iⁱ = 0,200 und P_I^v (Frequenz der seltenen Allele) = 0,017.

Die Allelfrequenzen der im vorliegenden Material gefundenen Phänotypen zeigen trotz einer kleinen Populationsgröße eine gute Übereinstimmung mit den von den anderen Autoren (Blake et al. 1969; Ishimoto 1970; Mabuchi 1971;

Tabelle 2. Allelfrequenzen der alkalischen Placenta-Phosphatase aus verschiedenen Rassen

Rasse	<i>n</i>	P ^I ^s	P ^I ^f	P ^I ⁱ	P ^I [*]	Autor
Japaner	120	0,729	0,054	0,200	0,017	Diese Arbeit
Engländer	597	0,637	0,270	0,085	0,008	Robson und Harris 1967
Neger	133	0,893	0,055	0,043	0,009	Robson und Harris 1967

* Frequenz der seltenen Allele

Tabelle 3. Typenbestimmung der alkalischen Placenta-Phosphatase nach Lagerung*

Material	<i>n</i>	Lagerungsdauer (Tage)					
		1	3	5	7	10	14
Placentagewebe	10	10	10	10	10	4	0
Geburtsblutspur	10	10	10	10	7	0	0
Nabelschnurblutspur	10	0	0				
Schwangerenblutspur	10	0	0				

* Anzahl der Nachweise

Ishizaki 1975) veröffentlichten Frequenzen der Japaner. Ein Vergleich der Allelfrequenzen der japanischen Bevölkerung mit denen anderer Rassengruppen (ausführliche Daten siehe Monographie von Mourant et al. 1976) ergibt, daß die P^I^f-Frequenz der Japaner niedriger ist als diejenige der Weißen, während die P^Iⁱ-Frequenz der Japaner höher ist als diejenige der Weißen und der Schwarzen. Ein typisches Beispiel dafür gibt Tabelle 2.

Lagerungsversuch

Von 10 japanischen Gebärenden wurden während der Geburt folgende Proben entnommen: Placenta, Schwangerenblut (Venenblut der Mutter), Geburtsblut (retroplacentares Blut) und Nabelschnurblut. Das Placentagewebe und die oben beschriebenen Blutspuren, die auf Filterpapier getrocknet worden waren, wurden bei Zimmertemperatur über unterschiedliche Zeitperioden von einem Tag bis zu 14 Tagen aufbewahrt, an denen dann die Typenbestimmung der alkalischen Placenta-Phosphatase durchgeführt wurde.

Das vorliegende Material umfaßte vier Fälle des Typs S₁, drei Fälle des Typs S₁I₁, zwei Fälle des Typs F₁S₁ und einen Fall des Typs I₁. Die hier angegebene, verbesserte Methode zur Darstellung der alkalischen Placenta-Phosphatase erlaubte eine sichere Typisierung der Enzymmuster sowohl an bis zu 7 Tage alten Placentageweben als auch an bis zu 5 Tage alten Geburtsblutspuren (Tabelle 3). Dagegen stellten sich bei der Analyse von Nabelschnurblutspuren keine sichtbaren Isoenzymbanden dar. An Spuren von Schwangerenblut färbten sich die Banden so schwach und undeutlich, insbesondere in der Auftrennung bei pH 6,0, daß die Bestimmung nicht gelang. Diesem Befund liegt

die Tatsache zugrunde, daß in Schwangerenblutspuren die Aktivität des placentaren Enzyms im Durchschnitt etwa 3–5mal niedriger ist als in Geburtsblutspuren (Oya et al. 1973).

Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse kann davon ausgegangen werden, daß bei Kindstötung oder verheimlichter Geburt die Typenbestimmung der alkalischen Phosphatase an Placentageweben und an Blutspuren eine rechtsmedizinische Relevanz haben kann, wobei in günstigen Fällen der Kreis des Kindesmordes verdächtiger Personen erheblich eingeengt wird.

Danksagung. Frau Professor Dr. med. I. Oepen, Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg, sei für die freundliche Beratung und die kritische Durchsicht der Arbeit gedankt. Fräulein R. Shibata danke ich für die technische Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche. Herrn Dr. med. M. Saito sowie den Hebammen und Schwestern, Frauenklinik des zentralen Krankenhauses Yamanashi-ken danke ich für die Hilfe bei der Beschaffung der Placenta- und Blutproben.

Literatur

- Blake NB, Kirk RL, Matsumoto H (1969) Placental alkaline phosphatase types in Japanese. *Jpn J Hum Genet* 13: 243–248
- Burstone MS (1958) Histochemical comparison of naphthol AS-phosphates for the demonstration of phosphatases. *J Nat Cancer Inst* 20: 601–615
- Donald LJ, Robson EB (1974) Rare variants of placental alkaline phosphatase. *Ann Hum Genet* 37: 303–313
- Ishimoto G (1970) Distribution of placental alkaline phosphatase types in a Japanese population. *Hum Hered* 20: 193–198
- Ishizaki K (1975) Enzyme polymorphisms in placenta and cord blood of new born babies in Japan. *J Anthropol Soc Nippon* 83: 39–48
- Köhler W (1976) Über einen photometrischen Schwangerschaftsnachweis aus hämolysefreiem und hämolytischem Serum sowie aus getrockneten Blutflecken mit Hilfe der hitzestabilen alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1). *Diss Marburg*
- Mabuchi Y (1971) Studies on the placental polymorphic systems in Japanese. *Bull Osaka Med Sch* 17: 51–59
- McMaster Y, Tennant R, Clubb JS, Neale FC, Posen S (1964) The mechanism of the elevation of serum alkaline phosphatase in pregnancy. *J Obstet Gynaec Brit Cwth* 71: 735–739
- Mourant AE, Kopeć AC, Domaniewska-Sobczak K (1976) The distribution of the human blood groups and other polymorphisms, 2nd edn. Oxford University Press, London, pp 716–719
- Neale FC, Clubb JS, Hotchkis D, Posen S (1965) Heat stability of human placental alkaline phosphatase. *J Clin Path* 18: 359–363
- Oepen I, Köhler W (1977) Ein photometrischer Schwangerschaftsnachweis an Blutspuren durch Bestimmung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1). Modifikation der Technik nach Oya, Asano und Fuwa. *Z Rechtsmed* 79: 83–86
- Oepen I, Müller F (1976) Zum Polymorphismus der alkalischen Phosphatase. *Z Rechtsmed* 77: 299–309
- Oya M, Asano M, Fuwa I (1973) Quantitative estimation of heat-stable alkaline phosphatase activity in dried blood stains and its application to the forensic diagnosis of pregnancy. *Z Rechtsmed* 73: 7–10
- Robson EB, Harris H (1965) Genetics of the alkaline phosphatase polymorphism of the human placenta. *Nature* 204: 1257–1259
- Robson EB, Harris H (1967) Further studies on the genetics of placental alkaline phosphatase. *Ann Hum Genet* 30: 219–232