

## **Immunenzymatische AB0-Blutgruppenbestimmung am Einzelhaar\***

### **I. Mitteilung**

**L. Pötsch-Schneider, L. Penzes und K. Lorenz\*\***

Institut für Rechtsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Am Pulverturm 3, D-6500 Mainz, Bundesrepublik Deutschland

### **AB0 Blood-Group Determination in Single Strands of Human Hair Using the Immunoenzyme Technique**

#### **I. Report**

**Summary.** The immunoenzyme technique was used to determine the AB0 blood group of strands of human scalp hair. The hair was obtained from 168 individuals of known blood groups ( $A_1: n = 58$ ;  $A_2: n = 11$ ;  $B: n = 28$ ;  $0: n = 46$ ;  $A_1B: n = 16$ ;  $A_2B: n = 9$ ). Immunostaining was carried out by using monoclonal anti-A, anti-B and anti-H as primary antibodies. Group-specific staining was clearly observed within the medulla of the hair. The AB0 blood group of all hair samples was determined correctly by the Sternberger (PAP) or APAAP (immunoalkaline phosphatase) technique. The present study indicates that immunoenzyme techniques can be regarded as practical methods for determining AB0 blood group of hair.

**Key words:** AB0 hair, PAP, APAAP immunoenzyme techniques – Immunoenzyme techniques, AB0 hair

**Zusammenfassung.** Untersucht wurden markhaltige Einzelhaare von 168 Personen bekannter serologischer Blutgruppenkonstellationen (Blutgruppe  $A_1: n = 58$ ;  $A_2: n = 11$ ;  $B: n = 28$ ;  $0: n = 46$ ;  $A_1B: n = 16$ ;  $A_2B: n = 9$ ). Die immunenzymatische Darstellung der AB0-Blutgruppensubstanz gelang fehlerfrei in allen Fällen am Markkanal des Haares durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern sowohl nach einer Variante des Sternberger-

\* Herrn Prof. Dr. med. J. Gerchow zum 65. Geburtstag gewidmet

\*\* Ein Teil der Ergebnisse der PAP-Technik sind Bestandteil der Dissertation von Herrn K. Lorenz

Sonderdruckanfragen an: L. Pötsch-Schneider (Adresse siehe oben)

Verfahrens als auch bei Verwendung eines monoklonalen APAAP-Komplexes als Markerenzym. Die Untersuchungen wurden parallel an Kunststoff eingebetteten Haarquer- und Haarlängsschnitten und im Flotationsverfahren durchgeführt. Mit der Immunenzymtechnik steht eine zweite unabhängige Methode neben dem serologischen Nachweis nach Yada und seinen Modifikationen zur AB0-Blutgruppenbestimmung am Haar zur Verfügung.

**Schlüsselwörter:** AB0-Bestimmung am Einzelhaar, Immunenzymtechnik – Spurenkunde, AB0-Bestimmung am Haar – Immunenzymtechnik, AB0-Bestimmung am Haar

## 1. Einleitung

Seit der Einführung des Yada-Verfahrens zur AB0-Blutgruppenbestimmung am Einzelhaar und Entwicklung zahlreicher Modifikationen ist die AB0-Bestimmung am Haar prinzipiell mit der Absorptions-Elutionstechnik oder Mischzellagglutination möglich. Die Trefferquoten dieser subtilen serologischen Untersuchungsmethoden schwanken je nach Autorengruppe [1, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 17, 19, 23, 24, 28, 29, 32, 34, 35, 37, 40–46], wobei international übereinstimmend die besten Ergebnisse mit Haaren der Blutgruppe B erzielt, die meisten Fehlbestimmungen mit AB-Haaren [14] beobachtet wurden.

In der Praxis führte die AB0-Blutgruppenbestimmung inkriminierter Einzelhaare in den meisten Fällen jedoch zu keinem verlässlichen Resultat und war, wenn überhaupt, nur über Ausschlußmöglichkeiten und im Zusammenhang mit Strukturanalysen unter größter Zurückhaltung zu verwerten.

Die Fortschritte auf den Gebieten der Immuncytochemie und Immunhistochemie sowie die Herstellung monoklonaler Antikörper führte zur Entwicklung hochsensibler und spezifischer Techniken. Unzählige Peptide und andere Marker der Histopathologie wie auch die AB0-Blutgruppensubstanzen können an Gewebsschnitten problemlos durch Immunfluoreszenz [3, 6], Immunperoxidase [22, 33] oder Peroxidase-anti-Peroxidase(PAP)-Technik [25–27, 36] nachgewiesen werden.

Immunenzymatische Standardverfahren, die bereits in der diagnostischen Pathologie etabliert sind, eröffnen auch in der Spurenkunde neue Möglichkeiten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit der PAP(Peroxidase-anti-Peroxidase)- und APAAP(alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase)-Technik Untersuchungen zur AB0-Blutgruppenbestimmung am Haar durchzuführen.

## 2. Material und Methoden

### *Probenvorbereitung*

Aus Haarproben von 168 Personen bekannter serologischer Blutgruppenzugehörigkeit (Blutgruppe A<sub>1</sub>:  $n = 58$ , Blutgruppe A<sub>2</sub>:  $n = 11$ , Blutgruppe B:  $n = 28$ , Blutgruppe 0:  $n = 46$ , Blutgruppe A<sub>1</sub>B:  $n = 16$ , Blutgruppe A<sub>2</sub>B:  $n = 9$ ) wurden am Polarisationsmikroskop je zwei markhaltige Einzelhaarsegmente von ca. 0,5 cm Länge ausgewählt. Das Probenalter betrug 1 bis 18 Monate, die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Paralleluntersuchungen erfolgten mit der PAP- und APAAP-Technik an Schnitten (a) und im Flotationsverfahren (b).

a) Direkte Einbettung in Epon 812, PSAPSB-Kunststoff oder Uhu plus schnellfest®. Herstellung von 2 µm–4 µm dicken Haarquer- bzw. Haarlängsschnitten

b) Einbettung mit Glyzeringelatine. Herstellung von 2 µm–4 µm dicken Haarquer- bzw. Haarlängsschnitten.

### *Antiseren*

*Erster Antikörper.* Monoklonal Anti-A, Monoklonal Anti-B (Labormuster, Behring-Werke, Marburg); Seracclone Anti-A, Seracclone Anti-B (Bioteest, Seruminstutitut, Frankfurt/M.); Monoklonal Anti-A, Monoklonal Anti-B, Monoklonal Anti-H (Dakopatts, Hamburg).

*Zweiter Antikörper.* Kaninchen-Anti-Mäuseimmunglobuline (Dakopatts, Hamburg).

*Dritter Antikörper.* PAP-Maus-Komplex (Dakopatts, Hamburg); APAAP-Maus-Komplex (Dakopatts, Hamburg).

*Puffer, Chemikalien.* PBS-Puffer, 0,5 m, pH 7,3; TBS-Puffer, 0,05 m, pH 7,6; Tris-Puffer, 0,05 m, pH 7,35; Tris-Puffer, 0,1 m, pH 8,2; Tris-Puffer, 0,05 m, pH 8,7; Tris-Puffer, 0,2 m, pH 9,2.

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; N,N-Dimethylformamid; Natriumnitrit; Variamin® blausalz B; Neufuchsins (Merck, Darmstadt). 3-Amino-9-äthylcarbazol; Naphthol AS.MX Phosphat; 5-Brom-4-chlor-3-Indolylphosphat; Naphthol AS-BI Phosphat; Naphthol AS-GR Phosphat; Fast Red TR Salz; Tetranitrotetraazoniumblau (TNBT) [Sigma Chemie, München].

### *Reaktionsdurchführung*

Die jeweiligen Inkubationszeiten für PAP- und APAAP-Technik sind aus praktischen Gründen der Laborarbeit identisch. Sie können jedoch für den 2. und 3. Antikörper bei Reaktionsdurchführung bei Raumtemperatur bis auf 30 min verkürzt werden.

*Erster Antikörper.* Die optimale Konzentration richtet sich nach Verwendung des jeweiligen Antikörpers. Sie wird durch Schachbrett-Titration gegen den Brückenantikörper und das Markerenzym bestimmt. Für die aufgeführten 1. Antikörperserien können Verdünnungen von 1:50 bis 1:800 eingesetzt werden. Inkubationsdauer: 48–56 Std in feuchter Kammer bei +4°C.

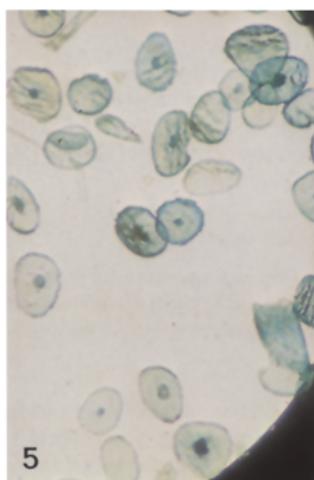
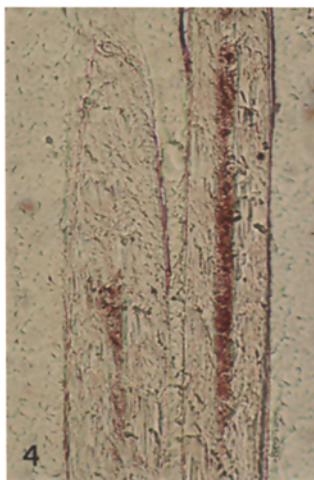
*Zweiter Antikörper.* (1:25 verdünnt), Inkubationsdauer: über Nacht in feuchter Kammer bei +4°C.

*Dritter Antikörper.* (1:300 verdünnt), Inkubationsdauer: 2 Std in feuchter Kammer bei Raumtemperatur.

Die Sichtbarmachung der Peroxidase erfolgte mit 3-Amino-9-äthylcarbazol (AEC), das der Anfärbung mit 3,3 Diaminobenzidin (DAB) deutlich überlegen war. Bei Verwendung von APAAP-Komplex kann die Anfärbung durch eine Reihe von Substrat-Farbkopplerkombinationen erfolgen, wie z. B. mit Naphthol AS-MX Phosphat und Fast Red TR Salz.

### *Kontrollen*

Die Versuche wurden unter Bedingungen einer Doppelblindstudie durchgeführt. Leerkontrollen erfolgten durch Inkubation mit PBS-Puffer. Zusätzlich wurde eine Vorinkubation mit gepooltem Serum zur Blockierung der spezifischen Bindungsstellen für den ersten Antikörper durchgeführt. Bei jedem Ansatz wurden Haare bekannter AB0-Blutgruppenzugehörigkeit als Kontrollen mitgeführt.



### 3. Ergebnisse

Nach Durchführung der PAP- und APAAP-Technik mit monoklonalen Antikörpern stellte sich bei lichtmikroskopischer Auswertung der Markkanal in allen untersuchten Einzelhaaren im Quer- und Längsschnitt bei positiver Reaktion eindeutig angefärbt dar. Die bekannte serologische AB0-Blutgruppenzugehörigkeit konnte unabhängig vom Sekretorstatus in allen Fällen immunenzymatisch am Haar zutreffend bestimmt werden (s. Abb. 1–6).

Die Verwendung des monoklonalen APAAP-Komplexes eröffnet zahlreiche Möglichkeiten der farblichen Darstellung des Endproduktes. Ein Bleichen der Haare war nicht notwendig.

Die Untersuchungen mit monoklonalem Anti-H als Primärantikörper ergaben den positiven Nachweis an allen Haaren. Eine gruppenspezifische Quantifizierung der Farbintensität ist nach unserer Erfahrung nicht möglich.

### 4. Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß der immunenzymatische Nachweis der AB0-Blutgruppenzugehörigkeit, der Krueger et al. [18] nicht gelang, am Markkanal des Haars sowohl am Kunststoffeingebetteten als auch am freiflottierenden Haarquer- bzw. Haarlängsschnitt zu führen ist.

Bei den vorliegenden lichtmikroskopischen Untersuchungen erfolgte die Antigenlokalisation mit monoklonalen Antikörpern unabhängig vom Sekretorstatus im Markkanal des Haars. Die Tatsache, daß Medullarzellen im Gegensatz zu den Cortexzellen des Haars relativ schwefelarm sind [2], bekräftigt unsere Befunde.

Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit erlangten wir Kenntnis über Ergebnisse japanischer Arbeitsgruppen [21, 47], die ebenfalls feststellten, daß die AB0-Blutgruppenantigene an der Medulla des Haars nachzuweisen sind. Die Richtigkeit der unabhängig voneinander mit verschiedenen Methoden erarbeiteten Ergebnisse kann somit als bestätigt angesehen werden.

Einen Zusammenhang zwischen der Markhaltigkeit eines Haars und der Erfassung der AB0-Merkmale mit serologischen Bestimmungsmethoden vermuteten die Autoren erstmals aufgrund der Beobachtungen, die sie im Rahmen

---

**Abb.1–3.** Haarquerschnitte (serologische Blutgruppe A<sub>1</sub>), Kunststoffeinbettung. Immunenzymatischer Nachweis der AB0-Blutgruppenzugehörigkeit mit monoklonalen Antikörpern, Sichtbarmachung der Peroxidase mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol. **Abb.1.** Positive Reaktion, erster Antikörper: Anti-A. **Abb.2.** Negative Reaktion, erster Antikörper: Anti-B. **Abb.3.** Leerkontrolle

**Abb.4–6** zeigen einen positiven Reaktionsausfall bei lichtmikroskopischer Betrachtung. **Abb.4.** Haarlängsschnitte, Kunststoffeinbettung, PAP-Technik. **Abb.5.** Haarquerschnitte, Flotationsverfahren, APAAP-Technik, Anfärbung mit 5-Brom-4-chlor-3-Indolylphosphat. **Abb.6.** Haarquerschnitte, Flotationsverfahren, APAAP-Technik, Naphthol AS BI Phosphat/Neufuchsin

ihrer Experimente zur Blutgruppenbestimmung am Einzelhaarsegment [29] machten.

Es fiel auf, daß außer den bereits von zahlreichen Arbeitskreisen festgestellten Befunden eines gruppenspezifischen und auch individuell unterschiedlichen Reaktionsverhaltens des Haares, die AB0-Bestimmung mit der Absorptions-Elutionstechnik immer dann zu gut auswertbaren Agglutinaten und zu fehlerfreien reproduzierbaren Ergebnissen führte, wenn auch markhaltige Haarquerschnitte vorlagen.

Die Tatsache, daß die Parameter des eingesetzten Untersuchungsmaterials das Gesamtergebnis wesentlich beeinflussen, wird durch unsere Untersuchungen mit der Immunenzymtechnik erneut bestätigt. Sie bietet möglicherweise die Erklärung für die erheblichen Abweichungen der Resultate der einzelnen Arbeitsgruppen bei der AB0-Blutgruppenbestimmung am Einzelhaar nach dem Yada-Verfahren. Es ist denkbar, daß auch ein prozentual unterschiedlicher Anteil markhaltiger Einzelhaare am Untersuchungsgut die abweichenden Trefferquoten bedingt, da ethnische Variationen des Haares bekannt sind [9, 39].

Die Fehlbestimmungen der AB0-Blutgruppenmerkmale am Haar mit der Absorption-Elution- oder Mischzellagglutination wurden vor allem äußerem Einflüssen, wie Verschmutzungen der Cuticula, kosmetischen Haarbehandlungen usw. zugeschrieben. Auch Kontamination mit Mykoplasmen oder bakterielle Besiedlung des Untersuchungsgutes sind geeignet, den serologischen Nachweis zu beeinflussen [11, 28]. Die Reinigung und Vorbehandlung der Proben, einige der Problemschritte der serologischen Verfahren spielen bei der Immunenzymtechnik, insbesondere bei Kunststoffeinbettung, keine Rolle. Diese Technik ist für die Praxis zu empfehlen, da die Handhabung freiflottierender Schnitte für den Anfänger schwierig ist, während mit Glasobjektträgern alle Arbeitsschritte routinemäßig durchführbar sind.

Die Suche nach einem geeigneten Einbettmedium für Haare führte zunächst zu einer Eigenentwicklung eines Kunststoffes, der die erforderlichen physiko-chemischen Eigenschaften wie ausreichende Eindringtiefe bei guter Antigen-erhaltung, Hydrophilie, fehlende unspezifische Antikörperadsorption usw. besitzt und sich zur Verarbeitung in einem histologischen Routine-labor eignet. Eine Untersuchungsreihe über die Verwendbarkeit auf dem Markt befindlicher Einbettungsmittel zur immunenzymatischen Darstellung der AB0-Blutgruppenmerkmale am Haar steht kurz vor ihrem Abschluß.

Als wesentlichstes Ergebnis für lichtmikroskopische Untersuchungen kann bereits mitgeteilt werden, daß sich Uhu plus schnellfest® [20] auch zur schnellen problemlosen Einbettung von Haaren eignet und den immunenzymatischen Nachweis am Haarinneren nicht beeinflußt.

Erste Untersuchungen am TEM und REM lassen darauf schließen, daß die AB0-Bestimmung auch bei marklosem Einzelhaar zutreffend erfolgen kann. Über diese Ergebnisse sowie über die Abhängigkeit des immunenzymatischen Nachweises von Lagerungsbedingungen und vom Spurenalter wird in Kürze berichtet werden [30, 31].

Die vorliegenden Untersuchungen am Haar zeigen, daß die Immunenzymtechnik geeignet ist, den Beweiswert spurenkundlicher Untersuchungen weiter zu erhöhen.

*Danksagung.* Frau Doris Hieronymus sei für die Mithilfe bei der experimentellen Durchführung dieser Arbeit gedankt. Den Behringwerken, Marburg sowie der Dakopatts GmbH, Hamburg sind wir für die großzügige Überlassung von Labormustern zu Dank verpflichtet.

## Literatur

1. Brinkmann B, Lemke J (1979) Der Einfluß verschiedener Variablen auf den Blutgruppennachweis aus Haaren mit Hilfe der Absorptions-Elutionstechnik. *Arch Kriminol* 164: 93-100
2. Clement JL, Hagege R, Le Pareux A, Connet J, Gastaldi G (1981) Concepts about hair identification revealed by electron microscope studies. *J Forensic Sci* 26:447-458
3. Coons AH, Kaplan MH (1950) Localization of antigens in tissue cells. II. Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescence antibody. *J Exper Med* 91:1-13
4. Cortivo P, Breda F, Benciolini P (1981) Ulteriori verifiche delle metodiche di identificazione degli antigeni A e B nei capelli umani. *Riv Ital Med Leg* 3:450-459
5. Cortivo P, Biasiolo M, Scorretti C, Benciolini P (1984) The detection of A and B antigens on human hair by the absorption-elution technique using LISS and papain-treated test cells. *Z Rechtsmed* 91:195-199
6. Dabblesteen E, Rygaard J (1972) A sensitive immunofluorescence technique for detecting blood group substances A and B. *Acta Pathol Microbiol Scand, Sect [A]* 80:433-439
7. Del Carpio J (1960) Leproduzioni pilifere in medicina legale. *Minerva Med Leg (Torin)* 80:3-13
8. Gramer L, Tausch D (1973) Zur AB0-Blutgruppenbestimmung an Haaren. *Z Rechtsmed* 72:63-67
9. Eckes LK (1985) Bemerkungen zur ethischen Variation des Kopfhaares. *Der Hautarzt* 36:381-385
10. Grüner G, Simeoni E (1978) Zum Nachweis von AB0(H) und MN-Substanzen an menschlichen Kopfhaaren. *Beitr Gesamte Gerichtl Med* 36:89-96
11. Hauser R, Raszeja S, Pawlowski R, Samet A (1984) Mikrobielle Kontamination der Antigene AB0 im Knochengewebe. *Z Rechtsmed* 92:189-197
12. Hammer H-J, Leopold F (1968) Betrachtungen zur AB0-Blutgruppenbestimmung an Haaren. Fragen akutelle Medizin. *Wiss Beitr, Martin-Luther-Univ, Halle-Wittenberg, Math-Naturwiss Reihe III*:85-88
13. Heifer U (1968) Zum Beweiswert von AB0-Bestimmungen an Einzelhaaren. *Arch Kriminol* 142:78-84
14. Ito K, Haba K (1980) Blood grouping of human hair and fingernail of the AB-type. *Jpn J Leg Med* 34:694-696
15. Kirst R (1968) Neuere Studien zur AB0-Blutgruppenprägung des menschlichen Haares. *Wiss Z, Martin-Luther-Univ, Halle-Wittenberg, Math-Naturwiss Reihe XVII*:539-547
16. Kirst R (1970) Über die AB0-Gruppeneigenschaft der Haare. *Kriminal Forens Wiss* 1:169-177
17. Krefft S (1953) Über das Vorkommen von Gruppensubstanzen in menschlichen Haaren. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med* 42:395-408
18. Krueger H-J, Hummel K (1981) Attempts at typing AB0-blood groups in individual human hairs of less than 4 cm length. *Forensic Sci Int* 18:253
19. Lincoln PJ, Dodd E (1968) Mixed agglutination as a method for the determination of A, B and H blood groups of hair. *Med Sci Law* 8:38-40
20. Grieve MC, Kotowski TM (1986) An improved method of preparing fiber cross sections. *J Forens Sci Soc* 26:29-34
21. Miyasaka S, Yoshino M, Sato H, Mykoyama H, Seta S (1984) Immunohistochemical investigation on the AB0 blood grouping of a minute sample from human scalp hair. *Rep Natl Res Int Police Sci* 37:27-35
22. Nakane PK, Pierce GB (1966) Enzyme labelled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 14:929-931

23. Oepen J, Noever H (1980) Zur AB0-Blutgruppenprägung des menschlichen Haares. *Z Rechtsmed* 85:205–209
24. Parkitna-Cegla Z (1980) Erfahrungen mit der AB0-Bestimmung in menschlichen Haaren. *Kriminol Forens Wissensch* 45:63–65
25. Pedal I (1986) Immunhistochemischer Beitrag zur individuellen Zuordnung mikrobiell zersetzter menschlicher Gewebe. Untersuchungen in den Systemen AB0(H) und Lewis. *Habilitationsschrift Tübingen*
26. Pedal I, Baedeker Ch (1985) Immunenzymatische Darstellung der Isoantigene A, B und H in fäulnisverändertem Nierengewebe. *Z Rechtsmed* 94:9–20
27. Pedal I, Hülle J (1984) Immunenzymatische Bestimmung des AB0- und Sekretorstatus an paraffineingebettetem Autopsiematerial. *Z Rechtsmed* 93:289–300
28. Pereira M (1973) AB0 grouping of decomposed human tissue. *J Forensic Sci Soc* 13:33–36
29. Pötsch-Schneider L, Penzes L, Hornbach J (1986) Bestimmung der AB0-Blutgruppenmerkmale am Einzelhaarsegment. *Arch Kriminol* (im Druck)
30. Pötsch-Schneider L, Penzes L (1986) AB0-Blutgruppenbestimmung an authentischen Haarasservaten mit der Immunenzymtechnik. *Arch Kriminol* (im Druck)
31. Pötsch-Schneider L, Penzes L, Graf Ch (in Vorbereitung)
32. Politi M (1967) L'agglutinazione mista nell'identificazione delle proprie gruppo-specifiche AB0 su formazioni pilifere umane. *Med Leg* 15:85–88
33. Ram JS, Nakane PK, Rowlings DG, Pierce GB (1966) Enzyme labelled antibody for ultrastructural studies. *Fed Proc* 25:732–741
34. Schaidt G, Specht I (1969) Untersuchung zur Blutgruppenbestimmung am menschlichen Einzelhaar. *Arch Kriminol* 143:82–86
35. Steinhäuser A (1980) Kritische Untersuchungen über die Nachweisbarkeit der klassischen Blutgruppeneigenschaften an Haaren und Nägeln. *Diss, Bonn*
36. Sternberger LA (1979) Immunocytochemistry, 2. Aufl. John Wiley & Sons, New York
37. Tröger HD, Baur C (1978) Beweiswert der AB0-Gruppenbestimmung an Haaren. *Beitr Gesamte Gerichtl Med* 36:97–99
38. Tesář J (1962) Laboratorní vyšetřovací metody v soudním lèkařství, Uročování skupinových vlasností ve vlasach. *Soudní Lèkařství* V:3–5
39. Wella (Hrsg) (1984) Das Haar und seine Struktur. Wella AG, Darmstadt
40. Wynbrandt F, Chisum WJ (1971) Determination of the AB0 blood groups in hair. *J Forensic Sci Soc* 11:201–204
41. Yada S, Okane M, Sano Y (1966) Bloodgrouping of a single human hair by means of elution technique. *Act Crim Leg Jap* 32:7–8
42. Yada S, Okane M, Sano Y (1966) Bloodgrouping of human hairs derived from various parts of the body. *Act Crim Leg Jap* 32:52–55
43. Yada S, Okane M, Sano Y (1966) Bloodgrouping of aged and formalin-fixed human hairs. *Act Crim Leg Jap* 32:92–95
44. Yada S, Okane M, Sano Y, Funomovi Y (1966) Bloodgrouping of eyebrows, eyelashes and vibrissae by means of the elution technique. *Act Crim Leg Jap* 32:173–175
45. Yada S, Ishimoto G, Okane M (1968) Use of a “hair toller” in the practice of bloodgrouping age human hairs. *Act Crim Leg Jap* 34:152–154
46. Yada S, Tsugawa N, Yamada S, Kido A, Chashi K (1974) Absorption-elution grouping of a single pieces of human hair measuring only 0.5 cm in length. *Act Crim Leg Jap* 40:187–189
47. Yoshida H, Ono M (1984) Application of immunohistochemical staining to the determination of the AB0 blood groups of short gray hair. *Rep Natl Res Inst Police Sci* 37:8–12