

機関番号：3 2 7 1 0

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2010

課題番号：1 9 7 9 0 4 5 0

研究課題名 (和文) 被疑者特定を目的とした男女混合試料からの DNA 検出法の確立

研究課題名 (英文) Establishment of DNA detection method from sexual mixed samples to specify suspect

研究代表者

勝村 聖子 (KATSUMURA SEIKO)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：50410048

研究成果の概要 (和文): 本研究は、種々の犯罪資料における迅速かつ信頼性の高い DNA 検査法の開発を目的に施行された。複数男性が関与する強姦事件を想定して作製した男女混合試料から、精子を単独回収した。そこから得られた mitochondrial DNA (mtDNA) について検討した結果、特定男性の関与の有無を判断できた。皮膚に付着した唾液などに対しても有効であることが示され、犯罪捜査における鑑定法となることが期待される。

研究成果の概要 (英文): This study was enforced for development of DNA inspection method with high promptness and reliability in various crime materials. The sperm was collected from sexual mixed sample that assumed the rape event in which two or more men took part and made it alone. As a result, it succeeded in the specification of the man who took part. It is expected for the saliva etc. that adhere to the skin effective, I expect it become a judge method in the criminal investigation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2 0 0 7 年度	900,000	0	900,000
2 0 0 8 年度	700,000	210,000	910,000
2 0 0 9 年度	500,000	150,000	650,000
2 0 1 0 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総 計	2,600,000	510,000	3,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医鑑定学、mitochondrial DNA、レーザーマイクロダイゼクション・システム、男女混合試料、個人識別

1. 研究開始当初の背景

(1) 社会的背景

本国内における犯罪は、その発生数の増加のみならず、犯罪形態の複雑化や凶悪化など、増悪化する傾向が認められていた。

その中でも性犯罪については、マスコミを騒がせた 2003 年発生的事件をはじめとして、若年者による卑劣なものが目立った。この事件をきっかけに研究者が着目した点は、加害者が単独ではなく、複数の人間が

関与している犯罪において、どのように真の加害者を特定するかという点である。性犯罪では「姦淫」の有無によって、その罪名は異なる。複数の男性が関与している場合には、実際に姦淫にまで至った男性を特定することが必須であり、そのためには正確性の高い結果を得ることのできる物体検査が求められる。

(2) 精液からの DNA 検出法

DNA 抽出法や DNA 型検出法について、様々な方法やキットが開発され、商品化が進んでいた。その中で、精液からの DNA 抽出法についても研究が進んでいたが、抽出過程に時間を要するものが多く、より短時間で抽出できる方法について、検討する必要があった。

(3) 混合試料からの DNA 検出法

強姦などにおける加害者の特定には、男性の精液が混入しているであろう、被害者女性の膣内容物などを採取して試料とする。男女混合試料からの DNA 型検出については多くの報告があったが、殆どが nuclear DNA を対象としたものであった。一方、研究者は本研究課題申請時までに、独自の多型性を示す mitochondrial DNA (mtDNA) を対象に、種々の試料について検討をはじめており、mtDNA はコピー数が多く、nuclear DNA に比較しても検出能力が高いことを示してきた。また混合試料に対しては、女性由来細胞を除去する薬剤を含んだキットなどが販売されていたが、薬剤等の DNA 抽出あるいは PCR 阻害関与については明らかにはなっていないかった。

2. 研究の目的

前述したとおり、強姦事件などの性犯罪において DNA 鑑定を実施する場合には、加害者および被害者の体液が混在した試料が対象となる。近年報告されてきた方法によれば、それら男女混合試料から特定の人物の DNA を検出する為には、その中に含まれる対象外（女性由来の細胞）試料の除去や、複数の人物に由来する混在した DNA 型から、特定の多型を検出する、など様々な過程が必要であり、作業には時間と経費がかかる。また複数の薬品を用いるため、その影響についても検討しなくてはならない。

そこで本研究においては、性犯罪資料を中心とした男女混合試料において、そこに関与する個人を、迅速かつ正確に特定する方法および、法医学的個人識別への応用の可能性について検討することを目的とした。

具体的には、当初、研究者が所属する機関に既存されていたレーザーマイクロダイゼクション・システムを活用し、以下について検討した。

(1) レーザーマイクロダイゼクション・システムを用いた DNA 回収法の確立

塗抹標本から、レーザーマイクロダイゼクション・システムを用いて精子を単独回収する。そこから抽出した mtDNA について塩基配列解析を行なう。個人を識別するだけの有用性をもち得るか否かを検討した。また、標本染色法が与える影響

回収 DNA 量とその質が、DNA 抽出および PCR 増幅に与える影響

を中心に、本システムの有効性を検討した。

(2) さまざまな資料からの検出

多々の混合試料あるいは、既存されている実際の犯罪資料について、上記内容について精査し、実務的応用に関する評価・検討を行なった。

3. 研究の方法

本研究は、鶴見大学倫理審査委員会の承認を得て遂行された。

(1) 作製した男女混合試料について

Informed consent を得た成人ボランティアの男女から精液および膣内容物の提供を受けるとともに、対象試料として頬粘膜細胞を採取した。男性被験者 2～3 名の精子および女性 1 名の膣内容物を混合した「男女混合試料」を作製した。作製した試料から通法に従い DNA を抽出する一方で、その一部をスライドガラスに塗布し、精子の存在を確認した。その後、レーザーマイクロダイゼクション・システムにて、混合試料中から精子のみを個々に単独で回収した（図 1）。回収した個々の精子から DNA を抽出し、mtDNA 高多型領域（Hyper variable region: HV1～3）について PCR 増幅し、その後シーケンス解析を行った。

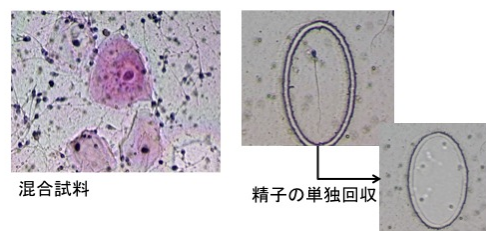


図 1

この過程における

- ・ 標本染色法と、それに伴う DNA 抽出および PCR 増幅に与える影響
- ・ 単独精子からの DNA 抽出法の確立について、検討した。

一方で、混合試料から通法に従って抽出した DNA についても同様にシーケンス解析を施すとともに、被験者から採取した頬粘膜試料についても検査を行なった。混合試料からの結果と比較して、精子単独採取法の効率性について検討し、さらに対象試料と比較することで、単独採取法から得られた結果の信頼性について、有用性について総合的に評価した。

(2) 既存の犯罪資料について

(1) で用いるのは新鮮試料である。従って、実務試料への活用を評価することを目的として、性犯罪資料の一部として既存されていた女性の膣内試料を用いて、上記方法を用いて mtDNA について解析を行なった。

(3) 皮膚に付着した唾液試料について

強姦などの性犯罪捜査では、被害女性の皮膚に、加害者男性の体液（唾液・汗・精液）が付着していることも少なくない。このため膣内容物のみならず、これらの試料を鑑定に用いるケースもある。そこで、被害女性の皮膚に加害者の唾液が付着したと想定し、ボランティアの協力を得て、試料を作製した。唾液的付着した皮膚表面を生理食塩水を浸した綿棒で拭き、塗抹標本作製して H.E 染色を施した。それにより確認される細胞の種類を確認するとともに、個々の細胞を、それぞれレーザーマイクロダイゼクション・システムで単独回収し、(1) に準じて mtDNA 多型を検出した。そのあとで、mtDNA の塩基配列について解析し、唾液付着皮膚試料および被験者の対象試料と比較することで、唾液試料に対する本法の有用性について評価した。

4. 研究成果

(1) 男女混合試料

膣内容物と精液の混合試料から直接抽出した DNA 試料には複数人の DNA が混在するため、特定個人の mtDNA のシーケンス解析は困難となった。特に、日本人での発生頻度が高い多型をもつ箇所では塩基の重複が認められ、由来者を特定することは不可能であった。さらに、挿入や欠失による変異をもつ個人に由来する DNA が入っている場合には、より解読が困難を極めてしまう（図 2）。

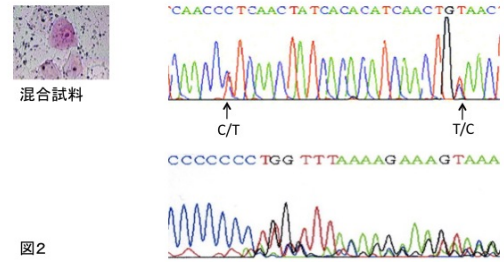


図2

精子の単独回収への検討

レーザーマイクロダイゼクション・システムを用いて、混合試料の中から個々に精子を回収した結果、mtDNA 多型を解析するに十分な DNA 量が、単独精子から得られた。mtDNA sequence についても、多くの場合で解析可能であり、個人の多型を示すことができた。この多型は、対照試料である頬粘膜試料から得られた解析結果と一致するものであり、DNA 鑑定試料として、単独精子においての有用性を評価できる結果と言える。さらに言えば、対象試料と比較することで、各精子について、由来する個人を特定することが可能になる。

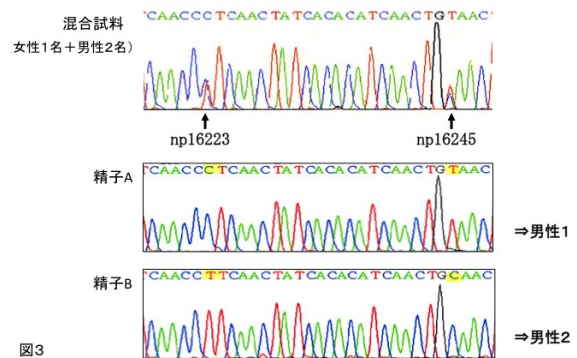


図3

図 3 に示すように、混合試料では HV1 領域において、np16223 および 16245 で、C/T の塩基が重複している。これは、混合試料を構成している 3 名に、少なくとも 2 種類以上の異なる塩基配列が存在していることを示しており、異なる多型が混在するために塩基 peak の重複が発生している。一方で、単独回収した精子 A、B をみると、同箇所の塩基配列は single peak を示しており、対象試料と比較することで、どの男性被験者に由来する精子であるかを判断することが可能になった。

集団強姦事件など、複数の男性が関与していた場合、実際に姦淫に至った人物を特定する必要があり、膣内に精子が存在するか否かは重要な争点となる。本法を用いることで、膣内容物の中に複数男性に由来する精子が混在している可能性があっても、対象試料と同じ DNA 多型を示す精子の有無を調べることで、関与する男性すべてを

対象に、鑑定することが可能になるだろう。

染色などが与える影響

混合試料からの男性由来 DNA の抽出は、精子の存在を証明することが必須である。今回、塗抹標本を作製したところ、特別な染色法を用いなくても、精子の存在を確認することができ、レーザーマイクロダイゼクション・システムを用いる際にも、特に影響は認められなかった。染色をする場合には、その過程に用いる種々の薬剤において contamination を起こす可能性も否定できない。従って、新鮮試料を対象とする際には、汚染の回避あるいは時間的短縮という点から見ても、染色の省略が可能であると判断された。

さらに、これまで男女混合試料からの DNA 抽出は、女性由来細胞の洗浄などの過程を必要としてきた。今回、レーザーマイクロダイゼクション・システムを用いることで、試料全体から選択的に、標的となる鑑定試料を細胞単位で直接採取できることから、本法の積極的な応用について期待したい。

実務試料における有用性

レーザーマイクロダイゼクション・システムを用いて単独回収した精子から mtDNA 多型を検出する本法は、人工的に作製した男女混合試料については、比較的良い結果が得られており、今後の応用が期待されるものとなった。しかし法医学実務の現状を考えると、鑑定対象は新鮮試料のみとは限らない。試料の陳旧化や、汚染物による contamination の可能性、保存状態などが与える影響についても、考えなければならない。

そこで、既存されている実際の性犯罪資料を用いた研究を行った。冷凍保存されていた腔内容物が付着したガーゼを生理食塩水に混濁させたものを研究試料とした。塗抹標本で確認した結果、新鮮な試料に比べて、頭部と尾部が切断された精子が多いものの、そこから単独回収した精子試料からも、mtDNA 型を検出することは可能であった。実務試料のため、事件に関連している男女の対象試料は保存されておらず、対象試料と比較して有用性を評価するまでには至らなかったが、陳旧試料にも対応できる可能性という点では、十分期待できる結果となった。

また、で用いた混合試料から、試料斑を作製し、一定期間保存したものについても検討した。その結果、塗抹標本上で、確認できる不純物が増えるとともに、前述の実務試料にもあった通り、確認される精子の状況も悪くなっていた。各試料が置かれ

ていた状況に応じて、洗浄や染色など、適宜対応していく必要性が示された。

(2) 皮膚付着体液への応用

次に、性犯罪資料のひとつとして採取できる可能性が高い、皮膚表面に付着した体液試料について研究を行った。

唾液が付着した皮膚試料から直接 DNA を抽出した際には、やはり唾液付着者と被付着者の DNA が混在し、塩基の peak の重なりが生じた(図4)。

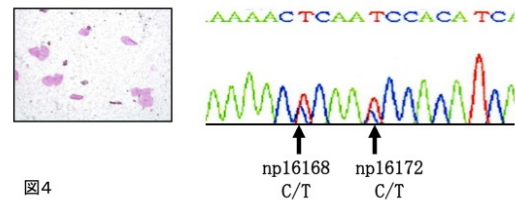


図4

一方で、塗抹した試料からは、有核細胞と無核細胞が認められ、各細胞をレーザーマイクロダイゼクション・システムで個々に単独回収した。そこから検出された mtDNA 多型は、有核細胞と無核細胞で異なる塩基配列を示すことが多かった。そこで、対象試料から得られた結果と比較してみると、有核細胞はすべて唾液付着者に由来していることが分かった。これは、唾液中に含まれる口腔内の脱落細胞に由来した有核細胞と考えられる。(図5、表1)

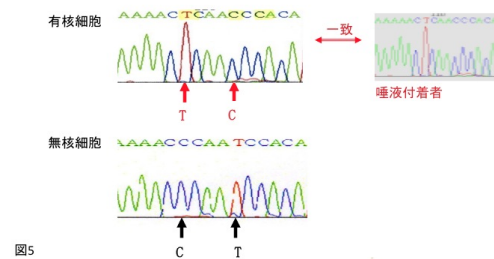


図5

	HV1		HV2		HV3	
	有核細胞	脱核細胞	有核細胞	脱核細胞	有核細胞	脱核細胞
total						
唾液付着者	100%	45.1%	100%	55.2%	100%	33.3%
被付着者	0%	54.9%	0%	45.8%	0%	66.7%

表1

一方で、無核細胞は唾液付着者由来のもの、被付着者に由来するものが混在していた(表1)。被付着者の皮膚表面で角化した細胞が、試料回収時に脱落し、試料内に混在していると推測される。従って、本法を用いて唾液付着者を特定するような鑑定を施す場合には、有核細胞を積極的に回収し、検査することが望ましいと言える。

しかしながら、唾液の付着だけでなく、

被付着者の皮膚表面に、咬傷や擦過傷などの損傷を認める場合には、注意が必要である。被付着者の皮膚組織に由来した有核細胞や血液が混在することが容易に推測されるからである。その場合には、注意深く評価しなければならない。

(3) 総合評価

本研究において、様々な男女混合試料を対象に、レーザーマイクロダイゼクション・システムを用いて、特定の鑑定試料を直接選択的に回収し、そこから抽出されるDNAとmtDNA多型の有用性について評価してきた。多くの試料で、細胞単位でのDNA型の検出が可能となった。各DNAの回収については、多くの方法が報告されているが、複数の人物が関与しているような犯罪資料において、本法は、その中から容疑者を特定する最適な方法であると言える。正確かつ迅速な検査結果を求められる犯罪捜査において役立つことが示唆された。

しかしながら、有用性が高く認められていく中で、研究対象の検体数増加に伴い、DNA型が検出不可能となる例も認められている。本法は顕微鏡下でレーザーを用いて対象細胞の周囲を焼切して回収する。そのため背景にある液状成分が微量ながら含まれることはやむを得ない。そしてこの液体中に含まれる腔内や精液中の脱落成分に由来するDNAが、検出結果に影響しているという可能性も否定できない。液体成分中のDNAの存在有無や、存在している場合の、脱落DNAを確実に除去する方法についての検討が、研究者に求められてきた。

今までの研究においては、mtDNA型検出に影響を与えるだけのDNA量は、液体成分から確認されていない。手技的な再現性は確認されていることから、液体成分がなんらかの影響を与えている可能性を否定できない。周囲の成分を一切含まずに精子のみを回収することは困難であることから、周囲の液状成分の影響の詳細と、有効な洗浄法について検討してきたが、現時点では、解決法の確立には至っていない。さらに実際の犯罪資料は汚染や陳旧程度など、保存状態は一様ではない。様々な環境に伴う試料への詳細な対応策と合わせて、今後の課題としたい。

mtDNAは、nuclear DNAと比較して、変異が起こりやすいとされる。本研究においてはmtDNAについてのみを対象としてきたが、一定の有用性のある検査法であることが確認されたことから、今後はY染色体遺伝子や、犯罪捜査で一般的に用いられている

nuclear DNAを対象範囲に広げて、研究を継続していきたい。

近年、DNA鑑定は犯罪捜査の主役的存在として積極的に用いられると同時に、高く評価されてきた。しかし現在、2009年に発覚した冤罪事件の発生の影響もあり、世論の注視を受けていると言っても過言ではないだろう。鑑定技術の発展はめざましく、当該事件当時のDNA鑑定技術とは比較できない点多々あるが、科学捜査の基本をもう一度見直し、DNA捜査の在り方について考えなければならない時期が来たとも言えよう。

またDNA多型は、形態学的検査や歯科所見などととも、個人識別に代表される方法である。2011年3月11日に発生した未曾有の大震災により、死者・行方不明者が3万人にのぼっている。身元確認は今後長期間を要することが考えられ、DNA型に限らない個人識別全容に用いる管理システムの必要性も考えなければならない。研究代表者は、種々の個人識別についても現在研究を遂行しており、様々な観点から複合した個人識別の可能性についても、検討していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計6件)

勝村聖子、井川知子、笠間慎太郎、小川 匠、佐藤慶太。ConeBeam CTから得られるvolume dataを活用した個人識別の可能性。日本法科学技術学会、第16回学術大会、東京、2010

勝村聖子、井川知子、笠間慎太郎、重田優子、平井真也、小川 匠、佐藤慶太。CT・3次元再構築画像における法医学的応用の可能性。第2回 鶴見大学顎口腔機能研究プロジェクト:新ハイテク・リサーチ・センター最終年度公開シンポジウム、横浜、2010

勝村聖子、佐藤慶太、茂谷久子、岩瀬博太郎、佐藤哲二。皮膚に付着した唾液からのmtDNA多型検出、第13回日本法科学技術学会学術集会、ホテルフロラシオン青山、東京、2007。

勝村聖子、井上孝二、佐藤哲二。男女混合試料からの精子由来mitochondrial DNA(mtDNA)多型の検出第49回歯科基礎医学会学術大会、北海道大学、北海道、2007。

勝村聖子、佐藤慶太、茂谷久子、岩瀬博太郎。レーザーマイクロダイゼクション・システムを用いた男女混合試料からのmtDNA

型検出。第 91 次日本法医学総会、秋田、2007。

勝村聖子、佐藤慶太、茂谷久子、岩瀬博太郎、佐藤哲二。細胞単離法による男女混合試料からの mtDNA 型検出。第 12 回日本法科学技術学会、東京。2006。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

勝村 聖子 (KATSUMURA SEIKO)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：50410048

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし