

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21060

研究課題名（和文）法花粉学的検査法マニュアルの作成に向けて - 検査法の構築・体系化に関する基礎研究

研究課題名（英文）Pretreatment methods of pollen grains on clothing and in surface soil samples for LM and SEM observation in forensic palynology

研究代表者

三宅 尚（MIYAKE, Nao）

高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・准教授

研究者番号：60294823

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：土壤表層・衣服資料を法花粉学的検査の対象として想定し、検査試料から必要な花粉情報を得るための合理的、効率的な処理法を構築・体系化した。検査試料の光学顕微鏡観察にあたっては、水酸化カリウム法とアセトリシス法との併用が推奨される。衣服検査試料の走査型電子顕微鏡観察にあたり、詳細な花粉リストが必要とされ、十分な試料量と検査時間が確保できる場合、花粉学分野の従来の標準的処理法を採用した方がよい。それ以外の場合、金属被覆法、イオン液体法あるいはナノスーツ法を適用することが望ましい。特に試料作成がより簡便でより均質な被膜を形成でき、無処理の状態に近い花粉を高真空下で観察できるナノスーツ法が推奨される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法花粉学は、法花粉学的検査が実際に事件解決に寄与した研究事例の蓄積をもとに発展してきた。しかも、これらの事例での検査法の記述が不明瞭で、検査法自体や検査データの解釈の妥当性の検証が困難なものも少なくない。本研究では、土壤表層・衣服資料を対象とし、検査試料から必要な花粉情報を得るための合理的、効率的な処理法を構築・体系化した。本研究を通して、現場捜査官や検査者の検査法に対する正しい理解を促し、法花粉学を志向する初学者の分野理解や育成を図ることで、司法制度への応用を通じ犯罪解決に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Pollen grains on clothing and in surface soil samples, applied different methods of pretreatment to, were observed via light microscopy (LM) and scanning electron microscopy (SEM) in terms of forensic palynology. The combination of KOH and acetolysis methods was the most suited for pollen identification using LM. For detailed morphological comparisons and taxonomy of pollen using SEM, the standard palynological pretreatment (heavy metal coating with successive pretreatments of KOH, acetolysis and osmium tetroxide) was more appropriate in the case that there were enough time and sample volume. In other cases, heavy metal coating without pretreatment, ionic liquid, or NanoSuit methods were more effective. Especially, the NanoSuit method is expected to be used for SEM observation of pollen, because it was simpler and more rapid than other pretreatment methods, and pollen sculpture could be observed in a near non-treated state under high-vacuum condition.

研究分野：古生態学，花粉学

キーワード：花粉標本作製法 検査法マニュアル 走査型電子顕微鏡 証拠物件資料 法花粉学的検査法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

法花粉学 (forensic palynology) とは、司法制度への科学技術の応用である「法科学」の一分野であり、花粉に関する研究領域である。法花粉学は、特にイギリス、ニュージーランド、オーストラリアなどで、花粉が犯罪の証拠物件の 1 つとして容疑者の供述の裏付けや犯罪現場の推定などに活用されている。現在、法科学に用いる種々の試料の採取法や土壌試料から得た花粉組成の解釈のほか、衣服を含む試料への花粉の残存状況、刑事裁判への花粉学的証拠物件の価値、花粉データによる殺人現場の特定など、多様な観点から議論されている。しかし、日本やアメリカ合衆国などでは、基礎研究あるいは司法制度への応用事例は極めて少ない。さらに、この分野の先進国でも、法花粉学は主として、法花粉学的検査が実際に事件解決に寄与した研究事例の蓄積をもとに発達してきた。しかも、これらの事例での検査法の記述が不明瞭で、検査法自体や検査データの解釈の妥当性の検証が困難な場合がある。

2. 研究の目的

本研究では、法花粉学的検査の現状や問題点を把握した上で、花粉学分野における従来の花粉標本作製法の点検整理や他の微粒子の処理法の探索・適用を通して、土壌表層・衣服検査試料から必要な花粉情報を得るための合理的、効率的な処理法を構築・体系化することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 法花粉学的検査の現状や問題点の把握

法花粉学に関わる既存の文献情報をもとに、証拠物件資料の検査法の記載内容を確認し、検査法自体やその解釈に関する問題点を把握した。

(2) 花粉学分野における従来の花粉標本作製法とその特性の点検整理

古生態、空中花粉などの花粉学分野における従来の花粉標本作製法のほか、他の微粒子の処理法も参照し、それらの特性の点検整理を行った。

(3) 法花粉学的検査法の構築・体系化

①検査試料の作成

a) 都市緑地を踏査した後の土壌表層 (靴泥) 資料に加えて、b) マネキンに着せた衣服資料と c) 緑化植物の花に接触した衣服資料から、検査試料を分取・作成した。a) と b) は、樹木と草本の花粉季節を考慮し、春と秋の 2 回、作成した。b) と c) では綿布地を、c) では市街地で植栽されあるいは逸出・野生化して、接触すると衣服に付着する可能性が高く、外形の複雑さや彫紋要素の構造と大きさに特徴がある、オシロイバナ、キンシバイ、タカサゴユリ、サツキおよびコマツヨイグサの 5 種の花粉を用いた。

②検査試料の観察のための前処理法の検討

前処理法の検討にあたっては、古生態・空中花粉などの花粉学分野における従来の花粉標本作製法とその特性を参照し点検整理した上で、試料処理で想定される制約のうち、試料量、検査時間、試料の再現性および検査精度の 4 つを重視して、光学顕微鏡 (LM) と走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察するための実験系を組み立て実施した。

1) 土壌表層・衣服検査試料の LM 観察のための前処理法

a) の検査試料を、無処理法、水酸化ナトリウム ((10%) KOH) 法およびアセトリシス (無水酢酸+濃硫酸) 法で処理した。処理にあたっては、それぞれの方法を単独で行うほか、両方を併用して実施した。また、いずれの処理法を採用する場合でも、篩い分け法 (目開き約 200 μ m) も適用した。

b) の試料を 1%ポリソルベート 80 溶液で洗浄し、遠心分離機で濃集した花粉を、エタノール法、KOH 法およびアセトリシス法で処理した。処理にあたっては、それぞれの方法を単独で行うほか、KOH 法とアセトリシス法を併用して実施した。

ただし、a) と b) の試料を処理にあたっては、いずれの処理法を採用する場合でも、篩い分け法 (目開き約 200 μ m) も適用した。

2) 衣服検査試料の SEM 観察のための前処理法

c) の検査試料を試料台に載台した後、近年、花粉の SEM 観察のための導電性付与剤として適用され始めたイオン液体法 ((5%) N-メチル-N-プロピルピロリジニウムビス (トリフルオロメタンスルホニル) イミド ([MPP][TFSI])) とナノスーツ法 (NanoSuit (R)・タイプ III) のほか、金属被覆法 (白金パラジウム) と無処理法も加えた 4 つの前処理を施した。また、作成した試料の一部をポリソルベート 80 溶液で洗浄し、遠心分離機で濃集した花粉を、花粉学分野で従来から行われている標準的な処理法 (従来法: KOH 処理→アセトリシス処理→四酸化オスミウム溶液固定→金属被覆) でも処理した。前処理を施した試料の観察には、電界放大型 SEM のほか、マイクロスコープとのハイブリッド式の簡易卓上型 SEM も用いた。

4. 研究成果

(1) 法花粉学的検査の現状や問題点の把握

人体や衣服資料からの検査試料の処理では、エタノール、メタノールなどを用いたアルコール法に、サフラン、酸性・塩基性フクシンなどを用いた染色法を併用した事例研究のほか、特別な処理を施さない事例が多かった。靴泥を含む土壌表層資料からの試料処理では、花粉学分野と同様、過半の事例においてアセトリシス法を標準的な処理法として採用しており、篩分け法のほか、KOH、水酸化ナトリウム、ピロリン酸ナトリウムなどを用いたアルカリ法のほか、ケイ酸塩鉱物の除去を目的としたフッ化水素酸法を併用する事例も認められた。

試料観察に際してはLMを用いた研究事例が圧倒的に多く、SEMを用いた事例は極めて稀であった。SEM観察の事例では、金属被覆法（金）による処理が施されていた。

(2) 土壌表層・衣服検査試料のLM観察のための前処理法の検討

①土壌表層検査試料

KOH法では、アルカリ可溶性の腐植物質を溶解し、弱固結した団塊をコロイド状態に戻す効果があるため、無処理法に比べ多くの花粉を濃集できたものの、花粉内容物や他の有機物の溶解が不十分で、それらの多くが残存した。アセトリシス法では、酸可溶性の腐植物質のほか、セルロースや外壁表面の微細な有機物も溶解したため、KOH法よりも花粉の外形や表面彫紋の精査に適していた。ただし、KOH法とアセトリシス法を併用すると、花粉の濃集と観察結果はさらに向上した。

②衣服検査試料

エタノール法では、検査時間が極めて短く試料の再現が可能であるが、花粉外壁表面の脂質成分であるポーレンコートは溶解する一方、花粉内容物や他の有機物は残存したままであった。KOH法でもそれら夾雑物の溶解が不十分で、花粉の外形や表面彫紋の観察に不適な場合があった。アセトリシス法では、夾雑物の溶解と外壁表面のクリーニング効果により、KOH法よりも花粉の外部形態の精査が良好であった。ただし、KOH法とアセトリシス法を併用すると、花粉の観察結果はさらに向上した。

(3) 衣服検査試料のSEM観察のための前処理法の検討

花粉の外形に関しては、従来法では花粉の粒径が大きくなる傾向を示すものの、いずれの前処理法、SEMを用いた場合でも、良好に観察することができた。イオン液体法では、無処理法でも凹みやかな外形の複雑な花粉でも、それらの過半を膨潤した状態で観察できた。表面彫紋に関しては、電界放出型SEMではいずれの処理法でも、それぞれの花粉に特有で微細な彫紋要素の特徴をほぼ良好に観察できた。ただし、イオン液体法では彫紋要素の凹部や凸部基部でその被膜がやや厚くなる傾向が認められた。他方、簡易卓上型SEMでは彫紋要素の詳細観察は困難であった。

(4) 法花粉学的検査法の構築・体系化

花粉をその外部形態によって種別同定するために重要な識別形質は、花粉の外形と表面彫紋である。したがって、種別同定にあたってはまず、分類群ごとに固有な花粉の外形と表面彫紋の特徴を顕微鏡像から明瞭に識別できることが肝要であり、花粉観察に先立ちこれを実現できる前処理法が必要不可欠である。

他方、犯罪現場で採取された証拠物件資料は、さまざまな法科学的検査に用いられる上、再検に備えて試料の一部が保管されるため、法花粉学的検査に供される試料量は限られる。また、検査においては、花粉の外部形態の観察結果が良好であることはもちろん、検査法が資料の種類・態様や検査目的に合うこと、可能な限り簡便で迅速に行われること、作成した試料は花粉以外の微粒子観察に適用できることも重要となる。

本研究では、上記を踏まえ、土壌表層・衣服資料から分取した検査試料を想定して、必要な花粉情報を得るための合理的、効率的な処理法を構築・体系化することを目的とした。本論では、現段階で推奨できる検査試料の顕微鏡観察のための前処理法について提案する。

土壌表層検査試料のLM観察にあたっては、その前処理法として、花粉の濃集と観察結果が最も良好であったKOH法とアセトリシス法の併用が推奨される。また、これは衣服検査試料を対象とした場合でも同様である。処理手順は平易であるが、毒劇法の対象物質に指定された試薬とその使用に適した検査設備を必要とし、前処理には1～数時間程度を要する。LM観察では、花粉の外形ほか、表面彫紋をつくる1～10 μ mスケールの彫紋要素の観察は充分でき、科あるいは属レベルの分類単位での識別が可能である。検査後、他の微粒子観察に供することはできないものの、より微細な彫紋要素を精査し属よりも下位の分類単位で識別するために、検査後の花粉をSEM観察に供することは可能である。

衣服検査試料のSEM観察にあたって、当初より詳細な花粉リストが必要とされ、十分な試料量と検査時間（数時間～1日間程度）が確保できる場合、その前処理法として、最も良好な観察結果が期待できる従来法を採用した方がよい。それ以外の場合はむしろ、金属被覆法、イオン液体法あるいはナノスーツ法を適用することが望ましい。これらの処理法を用いると、布地表面での花粉の付着状態も観察可能である。観察に用いたイオン液体とナノスーツ液は市販化され、試料あたりの費用も安価である（数十円程度）。溶液の濃度調整は容易で、試料の浸潤時間は数分程度である。濃度調整した後の溶液は、遮光・冷凍環境下で長期保存が可能である。現在、毒劇法の対象物質に指定されておらず、金属被覆の際に必要なイオンスパッタ装置など、処理のための特別な設備品も不要である。観察後、試料を水洗して他の微粒子観察に供することもできる。ただし、観察にあたっては、試料ドリフトや彫紋要素の破壊に備え、加速電圧、ビーム電流などの微調整を必要とする。結論として、試料作成がより簡便でより均質な被膜を形成でき、無処理の状態に近い花粉を高真空下で観察できるナノスーツ法が推奨される。

従来、花粉学分野だけでなく、法花粉学分野でも LM を用いた花粉観察・種別同定が一般的であった。ただし、SEM の操作性の向上に加え、花粉のより高精度の種別同定に不可欠な微細な彫紋要素の精査のほか、上述した法花粉学的検査にともない想定されるさまざまな制約も考慮すると、今後は SEM を用いた花粉観察が望ましい。例えば、サツキが属する、ツツジ科ツツジ属とそれに近縁な分類群の花粉の場合、属あるいはそれよりも下位の分類単位で識別する鍵は、微粒状紋をつくる $0.1\mu\text{m}$ スケールの彫紋要素の形状観察であるためである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 A. Momohara, Y. Kudo, N. Miyake, T. Nakamura, F. Tokanai and M. Tsukagoshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Diversity of temperate flora at the Tado site, central Japan, during the last glacial stage, reconstructed from the Dr. Shigeru Miki collection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Historical Botany	6. 最初と最後の頁 53-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34596/hisbot.29.2_53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三宅 尚	4. 巻 (1)
2. 論文標題 花粉から読み解く昔の植生と人間活動	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 グリーンパワー	6. 最初と最後の頁 26-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐橋紀男・村山貢司・岸川禮子・三宅 尚・宇佐神 篤・伊藤由紀子・白崎英明・劔田幸子・佐藤護人・南 利幸・難波弘行	4. 巻 69
2. 論文標題 花粉情報等標準化委員会の再発足と新標準化花粉情報基準の紹介	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 日本花粉学会誌	6. 最初と最後の頁 49-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 碓井みどり・三宅 尚
2. 発表標題 走査型電子顕微鏡観察のための布地付着花粉試料の前処理法の検討
3. 学会等名 日本法科学技術学会第29回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三宅 尚
2. 発表標題 寒冷な時代にはどんな森があった？ - 最終氷期最盛期頃の植生分布 -
3. 学会等名 第38回日本植生史学会・第64回日本花粉学会合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三宅 尚・酒井洋平・百原 新
2. 発表標題 宮崎県加久藤盆地に分布する上部更新統白鳥層から産出した花粉化石群
3. 学会等名 日本花粉学会第62回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大江 楓・原田龍弥・三宅 尚
2. 発表標題 高知市市街中心部の都市公園における植生構造
3. 学会等名 日本法科学技術学会第27回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大江 楓・三宅 尚
2. 発表標題 高知市市街中心部の都市公園における土壌表層花粉の堆積様式
3. 学会等名 日本花粉学会第61回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 森林環境研究会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 (公財) 森林文化協会	5. 総ページ数 70
3. 書名 特集 森とともにどう生きてきたか	

〔産業財産権〕

〔その他〕

高知大学webサイト「SDGs取組事例集一覧」： https://www.kochi-u.ac.jp/SDGs/activities/report_151.html

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------