

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月27日現在

機関番号：82505

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790606

研究課題名（和文） 抗菌ペプチドを指標とした新規汗垢証明法の開発とDNA型検出率との関連性

研究課題名（英文） Development of a method for identifying sweat using antimicrobial peptide markers and relationship between sweat identification and DNA typing

研究代表者

阿久津 智子（AKUTSU TOMOKO）

科学警察研究所・法科学第一部・主任研究官

研究者番号：50356151

研究成果の概要（和文）：

犯人が「接触した」と考えられる部位からの効率的なDNA型鑑定の実施を目的として、抗菌ペプチド dermcidin (DCD) および psoriasin を指標とした積極的汗垢証明法の開発およびそれらの検出量とDNA型検出率との関連性について検討を行った。その結果、DCDが法科学的資料における積極的な汗垢証明の指標として応用できる可能性が確認された。しかし、汗垢試料におけるDCDの検出とヒトゲノムDNA定量結果との間に関連性は認められなかったため、DCDの検出結果からDNA型検査の実施可否を推測することは困難であると考えられた。今後は、DNAと同じ角化上皮細胞に由来する検査指標を検討することが望ましいと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

For the purpose of more efficient DNA typing in samples recovered from touched surfaces, a method for identifying sweat using antimicrobial peptides dermcidin (DCD) and psoriasin was developed. In addition, relationship between results of sweat identification and DNA typing was investigated. As a result, ELISA detection of DCD could be an effective tool for forensic identification of sweat. However, there was no relationship between the results of the detection of DCD and the amount of human genome DNA. It was therefore difficult to predict the applicability of DNA typing from the result of detection of DCD. Further investigations are required for new makers originated from keratinized epithelium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	500,000	0	500,000
2011年度	800,000	0	800,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	0	1,300,000

研究分野：法科学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医学、汗垢、DNA型、抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

犯罪現場に遺留された体液については、血液型検査やDNA型鑑定に先立って体液の識別が行われる。体液の識別により、資料から得

られた血液型やDNA型が何に由来するのかを明確にしておくことは、犯罪の立証上重要であると考えられる。近年、DNA型鑑定の精度が向上し、微量の生体資料からもDNA型の検

出が可能となる中、痴漢事案等、犯人が「接触した」と考えられる部位からの DNA 型検出に対する需要が高まっている。しかし、「接触した」部位に付着すると考えられる汗垢を積極的に証明する方法は確立されておらず、汗垢付着量と DNA 型検出率との関連性も明らかとされていない。

2. 研究の目的

応募者はこれまでに、エクリン汗腺より汗中に分泌される抗菌ペプチド dermcidin (DCD) が汗証明に応用できる可能性を確認している (Sakurada K., Akutsu T., Fukushima H., Watanabe K., Yoshino M., Forensic Sci. Int. 194, 80-84, 2010)。本研究では、DCD に加えて、角化上皮細胞に発現することが知られている psoriasin (PSOR) を組みわせることにより、より積極的な汗垢証明法を確立し、それらの検出量と DNA 型検出率との関連性を明らかとすることで、犯人が「接触した」と考えられる部位から、より効率的な DNA 型鑑定を実施可能とするとともに、得られた DNA 型の証拠価値を高めることを目的とする。

3. 研究の方法

まず、汗垢からの PSOR の検出に最適な検査法を選択するため、ELISA 法、免疫細胞化学染色法、あるいは real time RT-PCR 法について検討した。つづいて、確立した PSOR 検出法およびすでに確立している DCD 検出法について、他の体液との交差性を確認した。さらに、汗試料からゲノム DNA を抽出し、ヒト染色体 D17Z1 領域をリアルタイム PCR 増幅することにより、ヒトゲノム DNA 定量を行った。ヒトゲノム DNA が定量された試料については、STR 型検査における各座位の検出率を算出し、汗垢中の DCD および PSOR 検出量と STR 型検出率との関連性について検討することとした。また、各種条件で採取された汗垢模擬鑑定試料について、DCD および PSOR の定量値から DNA 型検査実施の可否が推測可能かどうかを検証した。

4. 研究成果

(1) PSOR 検出法の検討

間接 ELISA 法、免疫細胞化学染色法、および real time RT-PCR 法による、汗垢からの PSOR 検出法について検出条件等の検討を行った。

その結果、間接 ELISA 法により、検討したすべての汗垢試料から PSOR を検出可能であった。一方、real time RT-PCR 法では、汗垢試料からは PSOR 遺伝子およびコントロール遺伝子 (GAPDH) のいずれの増幅も認められなかった。また、免疫細胞化学染色法では、抗 PSOR 抗体による皮膚角化上皮細胞の染色

は非常に弱かった。

(2) DCD および PSOR 検出法の体液交差性

間接 ELISA 法による DCD および PSOR の検出について、汗垢以外の体液に対する交差性を確認した。

その結果、PSOR は腔内容物の一部で弱い発色が認められたものの、それ以外の体液からは検出されなかった (Table 1)。一方、DCD は、汗垢以外の体液からは検出されなかった (Table 1)。

Table 1 Results of ELISA detection of dermcidin and psoriasin in various body fluids.

Sample	N of positive samples ^a /tested samples	
	DCD	PSOR
Blood	0/10	0/5
Saliva	0/10	0/5
Semen	0/10	0/5
Urine	0/10	0/5
Sweat	19/20	19/19
Vaginal fluid	0/8	1/5

DCD, dermcidin; PSOR, psoriasin.

a, absorbance at 490 nm >0.2 for DCD or >0.1 for PSOR in dilutions of 1:100 for each sample.

一方、real time RT-PCR 法では、唾液、腔内容物、胃粘膜において PSOR 遺伝子の発現が認められた。また、免疫細胞化学染色法では、腔扁平上皮細胞が強く染色され、口腔扁平上皮細胞でも一部陽性の細胞が認められた。

これまで、他の組織における PSOR の発現については不明な点が多かったが、近年、女性生殖器や舌における発現が報告されている (Mildner et al., Mucosal Immunol., 3(6), 602-609, 2010, Meyer et al., Mucosal Immunol., 1(3), 239-243, 2008)。これらの報告から、PSOR は粘膜組織全般に発現している可能性が考えられるが、間接 ELISA 法では、腔内容物の一部で弱い発色が認められたものの、それ以外の体液からは検出されなかったことから、間接 ELISA 法による検出であれば、PSOR を積極的な汗垢証明の指標として応用できる可能性が示された。

(3) 汗垢試料からの DCD および PSOR の検出とヒトゲノム DNA 量との関連性

汗垢試料から QIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN 社製)を用いてゲノム DNA を抽出し、ヒト染色体 D17Z1 領域の 207 bp あるいは 98 bp をリアルタイム PCR 増幅することにより、ヒトゲノム DNA 定量を行い、DCD および PSOR の検出との関連性について検討した。

その結果、ヒトゲノム DNA は 5 試料中 1 試料のみ定量可能であったが、STR 型検査実施可能な DNA 量は得られなかった。また、DCD および PSOR の検出との関連性は認められな

かった (Table 2)。

なお、ヒトゲノム DNA が定量された 1 試料においては、207 bp よりも 98 bp のほうが定量値が大きく、汗垢試料中では DNA が低分子化している可能性が考えられた。

Table 2 Comparison of the levels of dermcidin, psoriasis and human genome DNA in sweat samples.

Sample	DCD Absorbance at 490nm in dilution of 1:100	PSOR	Human genome DNA			
			207 bp		98 bp	
			Ct value	Concentration (ng/ μ L)	Ct value	Concentration (ng/ μ L)
Sweat-2	1.876	0.326	N.A.		N.A.	
Sweat-3	1.904	0.468	24.32	0.021	22.78	0.041
Sweat-4	1.968	0.720	27.97	<0.001*	26.91	<0.001
Sweat-6	1.868	0.242	N.A.		27.72	<0.001
Sweat-9	1.915	0.224	N.A.		N.A.	

N.A., not amplified.

a, the Ct value below the calibration range (0.001 – 10 ng/ μ L).

(4) 汗垢模擬鑑定試料からの DCD および PSOR の検出とヒトゲノム DNA 量との関連性

汗垢模擬鑑定試料として、携帯電話、サンダル、ドアノブおよびキーボードの表面を拭った布片について、抽出液の遠心上清から間接 ELISA 法による DCD および PSOR の検出を、遠心沈査からゲノム DNA を抽出した後ヒトゲノム DNA 定量を行い、それらの関連性について検討した。

その結果、DCD はほぼすべての試料から検出可能であったが、PSOR はいずれの試料からも検出されず、また、ヒトゲノム DNA はいずれの試料においても定量限界以下であった (Table 3)。以上の結果から、DCD あるいは PSOR の検出結果から DNA 型検査実施の可否を推測することは困難であると考えられた。

Table 3 Comparison of the levels of dermcidin, psoriasis and human genome DNA in simulated casework samples.

Samples	DCD		PSOR		Human genome DNA (98 bp)	
	A490	Result ^a	A490	Result ^b	Ct value	Concentration (ng/ μ L)
Cellular phone	1.059	+	0.019	-	28.44	<0.001 ^c
	0.728	+	0.017	-	29.27	<0.001
Insole of sandal	1.496	+	0.034	-	N.A.	
	1.413	+	0.035	-	N.A.	
Doorknob	0.470	+	0.027	-	29.22	<0.001
	0.505	+	0.007	-	N.A.	
Keyboard	1.012	+	0.007	-	28.14	<0.001
	0.060	-	<0.001	-	27.23	<0.001

a, absorbance at 490 nm >0.2 for extracts of each sample considered positive (+);

b, absorbance at 490 nm >0.1 for extracts of each sample considered positive (+);

c, the Ct value below the calibration range (0.001 – 10 ng/ μ L).

N.A., not amplified.

(5) 斑痕資料中の DCD および PSOR の経時変化

汗垢模擬鑑定試料を用いた検討において、いずれの試料からも PSOR が検出されなかった原因を明らかとするために、汗試料をさらし布に滴下し、1 週間放置して作成した汗斑試料を用いて、斑痕試料からの DCD および PSOR の検出について検討を行った。

その結果、DCD は 12 試料中 9 試料から検出

されたが、PSOR は 1 試料を除いて陰性となった (Table 4)。

Table 4 Results of ELISA detection of dermcidin and psoriasis in body fluid stains prepared with 5 μ l samples of each body fluid.

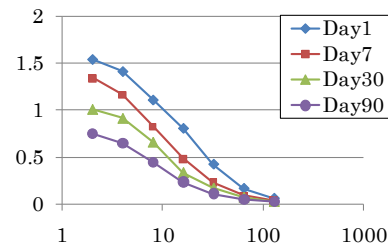
Sample	N of positive samples ^a /tested samples	
	DCD	PSOR
Blood stain	0/5	0/5
Saliva stain	0/5	0/5
Semen stain	0/5	0/5
Urine stain	0/5	0/5
Sweat stain	9/12	1/12

DCD, dermcidin; PSOR, psoriasis.

a, absorbance at 490 nm >0.2 for DCD or >0.1 for PSOR in dilutions of 1:2 for each extract.

そこで、斑痕試料中の DCD および PSOR の経時変化について、90 日まで室温、自然光条件下で放置した汗斑試料を用いて検討したところ、DCD は経時的に分解、吸光度が低下するのに対し、PSOR は斑痕化した時点で陰性となることが示され、間接 ELISA 法による PSOR の検出を斑痕試料に適用することは困難であると考えられた (Fig. 1)。

(a) DCD



(b) PSOR

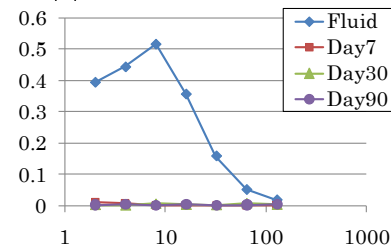


Fig. 1 The change of the levels of dermcidin (a) and psoriasis (b) in sweat stains incubated at room temperature for 1 to 90 days.

Each point represents the mean value of 5 samples.

以上の結果より、ELISA 法による DCD の検出は、法科学的資料における積極的な汗垢証明に活用できる可能性が確認された。一方、間接 ELISA 法による PSOR の検出は、斑痕試料への適用が困難であり、法科学的資料には適さないと考えられた。

また、汗垢試料から DNA 型検査に必要な量のゲノム DNA を得ることは難しく、DCD の検出との関連性も認められなかったことから、DCD の検出結果から DNA 型検査実施の可否を

推測することは困難であると考えられた。両者の関連性が認められなかったのは、DCD がエクリン汗腺由来、DNA が角化上皮細胞由来と、両者の由来が異なることがその一因であると考えられるため、「接触した」部位からの効率的なDNA型鑑定の実施に資するためには、角化上皮細胞に由来する検査指標による汗垢証明を検討することが望ましいと考えられた。

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 1 件)

- ① 阿久津智子、渡邊賢、福島久代、藤浪良仁、桜田宏一; Statherin, dermcidin および Tamm-Horsfall protein を指標とした ELISA 法による唾液、汗および尿の体系的識別法の開発. 法科学技術, 16 (1)、1-11、2011. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 阿久津智子、渡邊賢、桜田宏一; 唾液、汗および尿の ELISA 法による体系的識別法の開発と予備検査法との比較. 日本法医学会、第 80 回日本法医学会学術関東地方集会、2011 年 10 月 29 日、宇都宮東武ホテルグランデ (栃木県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿久津 智子 (AKUTSU TOMOKO)
科学警察研究所・法科学第一部・主任研究官
研究者番号：50356151