

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10138

研究課題名(和文) マルチプレックスRT-PCR法による包括的な体液の識別検査法の開発

研究課題名(英文) Development of a comprehensive procedure for determination of multiple body fluids by multiplex reverse transcription-PCR

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・室長

研究者番号：50356151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、法科学的に重要な体液種の特異的、包括的かつ客観的な識別のため、血液、唾液、鼻汁、精液および膣液に対する計15種のターゲット遺伝子にリファレンス遺伝子を加えたマルチプレックスRT-PCR系を構築した。それぞれのターゲット遺伝子に対して、陽性判定のためのカットオフ値を設定することで、標的とする体液を特異的に識別可能であった。今回開発した検査法は、試料の状態やマーカーの検出感度に依存するとはいえ、様々な法科学的試料における体液種の識別にも適用可能であったことから、鑑定実務において有用な手法となりうると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犯罪現場に遺留された資料に対しては、犯罪事実の立証や証言の裏付けを目的に、体液の識別検査が行われる。現状では、体液ごとに検査法が異なるため、由来が不明あるいは混合が疑われる資料では、それぞれの検査で試料を消費してしまう。一方、本研究で開発したマルチプレックスRT-PCR法は、体液の種類や状態を問わず適用可能で、法科学的に重要な複数の体液種を包括的かつ特異的に識別が可能であることから、法科学鑑定に大きく貢献しうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, a multiplex reverse transcription PCR-based body fluid identification procedure was designed with 15 target genes for blood, saliva, nasal secretion, semen, and vaginal fluid, and a reference gene for more precise, comprehensive, and objective identification of forensically relevant body fluids. Setting the cutoff value for each target marker was highly effective for the specific determination of targeted body fluids. Our proposed procedure was applicable for the comprehensive and precise determination of body fluids in various types of simulated forensic samples, even though the successful determination of the target gene of course depends on sample condition and marker sensitivity. In conclusion, it could be a powerful and convenient tool for multiple body fluid identification in forensic laboratories.

研究分野：法生物学

キーワード：体液 mRNA 包括的検査法 マルチプレックスRT-PCR法 カットオフ値

1. 研究開始当初の背景

犯罪現場に遺留された資料における体液の識別は、犯罪の立証や証言の裏付けを行う上で重要な検査の一つである。体液の識別は、酵素の活性を指標とする酵素学的手法や、タンパク質を指標とする免疫学的手法により行われることが多いが、各組織(体液)に特徴的に発現する mRNA を指標とした分子生物学的手法は、従来の検査法と比較して特異性および検出感度が高く、また、複数種の体液を同一手法で識別可能であることから、鑑定実務への応用が期待されている。研究代表者らも、これまでに、精液、唾液、尿、汗、鼻汁、腔内容物および鼻血の識別における mRNA の有用性を報告している。一方で、mRNA を指標とした体液の識別検査法においては、DNA 型鑑定における STR 型検査のように、ゴールドスタンダードと呼べる検査法が確立されていないのが現状である。

研究代表者らは、前研究課題「抽出・精製方法の違いが mRNA を指標とした体液の識別検査に及ぼす影響」(平成 26~29 年度、基盤研究(C)、課題番号 26460895)において、RNA 抽出・精製方法の検査結果への影響を明らかとし、微量、斑痕試料にも適用可能で、抽出・精製方法の影響を受けにくい mRNA マーカーの選定等を行った。また、選定された血液、唾液あるいは精液の mRNA マーカーおよびリファレンスマーカー *ACTB* を用いて、血液、唾液あるいは精液マルチプレックス RT-PCR 系をそれぞれ構築した。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、体液の識別検査におけるゴールドスタンダードと呼べる包括的検査法を確立することである。その中で、本研究課題では、遺留資料の種類や状態を問わずに適用可能で、かつ複数の体液を同時に識別可能なマルチプレックス RT-PCR 法を開発することを目的とする。また、その検出結果に対して統計解析モデルを適用することで、体液種の客観的かつ論理的な判定を目指す。さらに、微量、斑痕、分解試料等を用いて鑑定実務を想定した検証を行う。この研究により、最小限の試料消費で体液種に関する最大限の情報を得ることが可能となり、また、より客観的かつ論理的な判定を行うことで、公判における証拠価値を高めることができると考える。

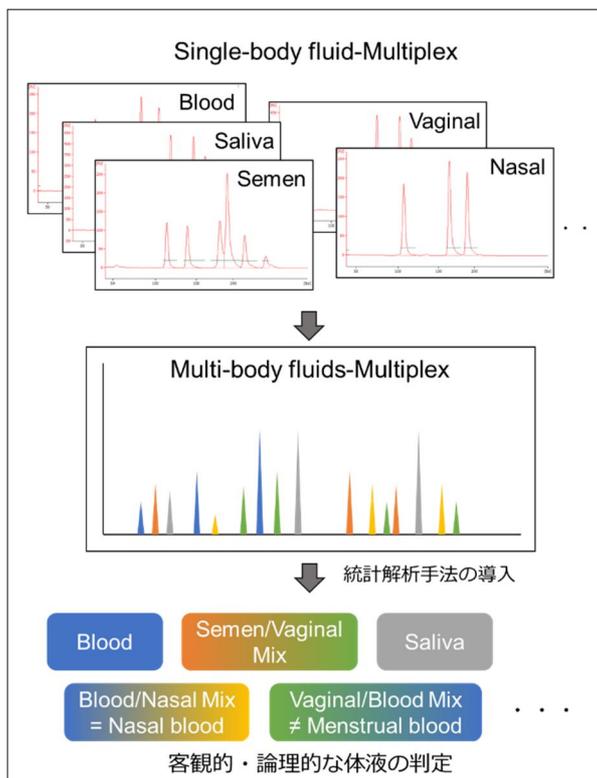


Fig. 1. 本研究のイメージ図

3. 研究の方法

(1) 血液、唾液、精液それぞれに対するマルチプレックス RT-PCR 系の改変

前研究課題で構築した、血液、唾液、精液それぞれに対するマルチプレックス RT-PCR 系について、フラグメント解析による検出に向けてプライマー配列の一部を改変した。マルチプレックス PCR 増幅には、Multiplex PCR Assay Kit ver.2 (タカラバイオ)を用い、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent)によるチップ電気泳動で、各種体液に対する特異性や増幅バランスに対するプライマー配列改変の影響を検証した。

(2) 5種の体液に対するマルチプレックス RT-PCR 系の構築

血液、唾液、精液それぞれに対するマルチプレックス RT-PCR 系を統合し、3種の体液に対する 10-plex RT-PCR 系を構築した。10-plex 化による非特異増幅や増幅バランスの乱れについて、チップ電気泳動で確認した。つづいて、血液・唾液・精液マルチプレックス RT-PCR 系に、別研究課題での成果である腔液マルチプレックス RT-PCR 系を統合し、さらに鼻汁マーカー1種を加えた、5種の体液に対する 16-plex RT-PCR 系を構築した。キャピラリー電気泳動でのフラグメント解析のため、フォワードプライマーを蛍光標識し、リバースプライマーにタグ配列 (GTTTCTT) を付加した。増幅産物の検出および同定には、SeqStudio™ジェネティックアナライザーおよびジェノタイピング用ソフトウェア Genemapper™6 (いずれも Thermo Fisher) を用いた。16-plex 化により生じた非特異増幅に対してはプライマーの再設計、増幅バランスの乱れに対してはプライマー濃度の調整を行った。PCR 産物の希釈、PCR サイクルの調整等による分析条件の最適化を行い、解析条件を決定した。

(3) 陽性判定のためのカットオフ値の導入・評価

客観的かつ論理的な判定のため、標準的な体液試料における 16-plex RT-PCR 法の解析結果から各マーカーの感度と特異度を算出し、陽性判定のためのカットオフ値を設定した。ピーク検出閾値は 150 RFU とし、各マーカーのピーク高をリファレンスマーカー *ACTB* のピーク高で補正した値に対して、特異度を優先（偽陽性判定を回避）した陽性判定のカットオフ値を設定した。これらのカットオフ値を適用し、各マーカーの体液特異性および検出感度を確認した。

(4) 鑑定実務を想定した各種試料を用いた検証

血液、唾液、精液および腔内容物を用いて混合体液斑を作成し、それぞれに対応するマーカーが検出されるか検証した。また、4 または室温で 2 ヶ月～9.5 年保管された体液斑から各マーカーが検出されるか確認した。さらに、各種模擬鑑定資料を作成し、それらを用いて、16-plex RT-PCR 法の法科学的資料への適用性を検証した。

4. 研究成果

(1) 個々の体液に対するマルチプレックス RT-PCR 系の改良および検証

プライマー配列の一部を改変した血液、唾液あるいは精液マルチプレックス RT-PCR 系について、チップ電気泳動で増幅産物を分離・検出したところ、プライマー配列の改変は、非特異増幅、増幅バランス及び他の体液に対する交差性のいずれにも影響しないことが確認された。

(2) 5 種の体液に対するマルチプレックス RT-PCR 系の構築

血液、唾液、鼻汁、精液および腔液マーカーを統合し、16-plex RT-PCR 系を構築した。陽性対照試料を用いて、各マーカーの増幅バランスを確認したところ、血液マーカー *SPTB* および腔液マーカー *SERPINB13* の増幅が著しく低下していた。両プライマーの配列から、プライマダイマーが形成されることが判明したため、*SERPINB13* のプライマーを再設計したところ、増幅バランスが改善した。その他のマーカーについても、プライマー濃度を調整した。

また、PCR 増幅産物を適宜希釈することで、チップ電気泳動での検出時に決定した PCR 条件を改変することなく、SeqStudio によるフラグメント解析にも対応可能であることが確認できた。最適化した分析・解析条件により確立した 16-plex RT-PCR 法の、標的とする各体液におけるエレクトロフェログラムを Fig. 2 に示す。

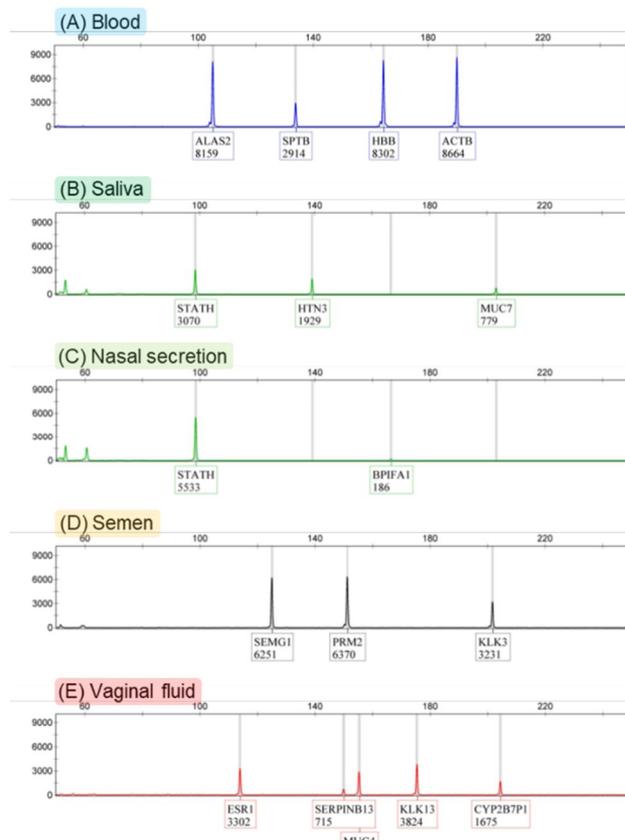


Fig. 2. 標的とする各体液における 16-plex RT-PCR 法のエレクトロフェログラム

(3) 陽性判定のためのカットオフ値の導入・評価

標準的な体液試料を用いて、16-plex RT-PCR 法における各マーカーの特異性を確認した。その結果、各マーカーは、概ね想定される体液に対して特異的であったが、一部のマーカーで、他の体液からも検出閾値 150 RFU を超えるピークが検出された。そこで、特異性の向上および客観的な評価のため、陽性判定のためのカットオフ値を設定することとした。得られた各マーカーのピーク高をリファレンスマーカー *ACTB* のピーク高で除した値の分布を、標的とする体液とそれ以外の体液とで比較したところ、標的とする体液のほとんどが高い補正值に分布し、それ以外の体液では検出されたとしても、低い補正值に分布していることが示された (Fig. 3)。

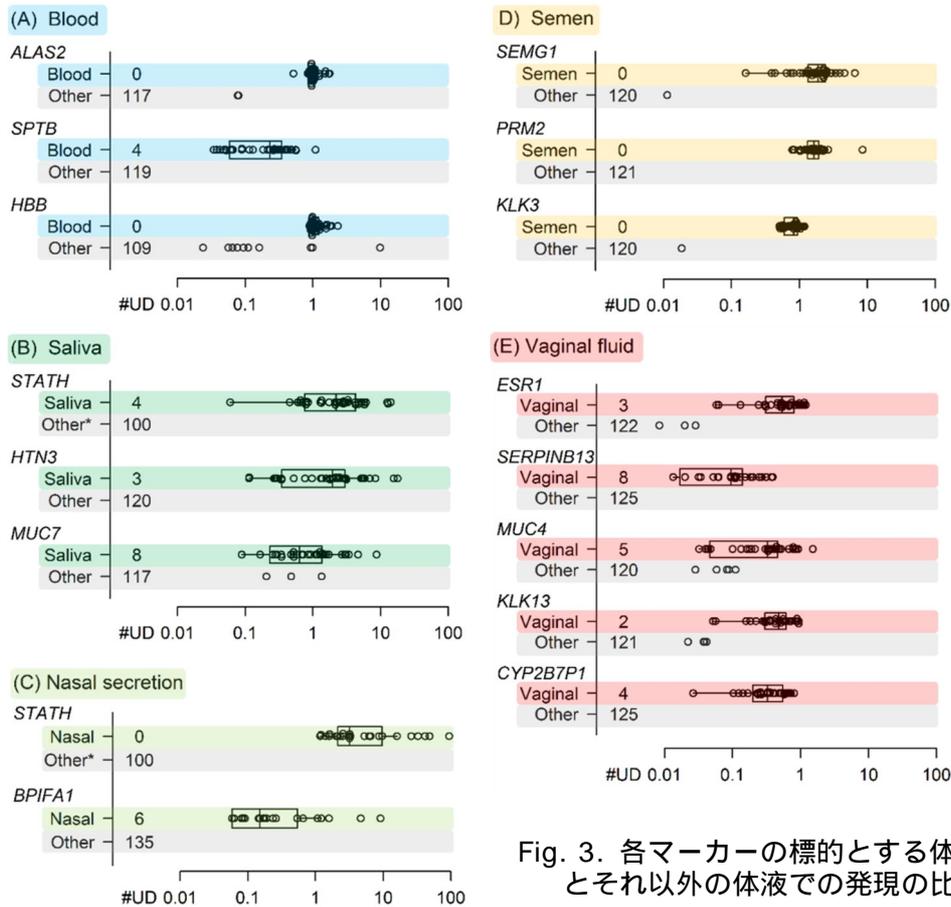


Fig. 3. 各マーカーの標的とする体液とそれ以外の体液での発現の比較

そこで、これらの体液試料における補正值の分布から感度と特異度を算出し、それらを基に、各マーカーに対して、陽性判定のためのカットオフ値を設定した (Table 1)。その結果、各マーカーの標的体液に対する特異性が大きく改善し、複雑な統計解析手法を適用せずとも、各マーカーにより特異的に各体液を識別できる可能性が示された。一方、設定した陽性判定カットオフ値を適用した場合の 16-plex RT-PCR 法の検出感度について、希釈体液斑を用いて確認したところ、マーカーごとに検出感度が大きく異なることが示された。

Table 1. 各マーカーのカットオフ値と感度・特異度

Targeted body fluid	Target gene	Cutoff value	Sensitivity (95% CI)	Minimum Specificity (95% CI)
Blood	<i>ALAS2</i>	0.1	1.00 (0.91–1.00)	1.00 (0.83–1.00)
	<i>SPTB</i>	0	0.90 (0.76–0.97)	1.00 (0.83–1.00)
	<i>HBB</i>	0.2	1.00 (0.91–1.00)	0.94 (0.81–0.99) (Saliva)
Saliva/nasal secretion	<i>STATH</i>	0	0.94 (0.85–0.98)	1.00 (0.88–1.00)
Saliva	<i>HTN3</i>	0	0.92 (0.80–0.98)	1.00 (0.83–1.00)
	<i>MUC7</i>	0	0.80 (0.64–0.91)	0.85 (0.62–0.97) (Nasal secretion)
Nasal secretion	<i>BPIFA1</i>	0	0.76 (0.55–0.91)	1.00 (0.88–1.00)
Semen	<i>SEMG1</i>	0.1	1.00 (0.91–1.00)	1.00 (0.83–1.00)
	<i>PRM2</i>	0	1.00 (0.91–1.00)	1.00 (0.83–1.00)
	<i>KLK3</i>	0.1	1.00 (0.91–1.00)	1.00 (0.83–1.00)
Vaginal fluid	<i>ESR1</i>	0.1	0.86 (0.70–0.95)	1.00 (0.83–1.00)
	<i>SERPINB13</i>	0	0.77 (0.60–0.90)	1.00 (0.83–1.00)
	<i>MUC4</i>	0.2	0.57 (0.39–0.74)	1.00 (0.83–1.00)
	<i>KLK13</i>	0.1	0.89 (0.73–0.97)	1.00 (0.83–1.00)
	<i>CYP2B7P1</i>	0	0.89 (0.73–0.97)	1.00 (0.83–1.00)

(4) 鑑定実務を想定した各種試料を用いた検証

混合体液斑、陳旧体液斑および各種模擬鑑定資料を用いて、法科学的資料への適用性を検証した結果、混合体液斑からは、混合比や検出感度にもよるが、想定される体液マーカーのうち複数陽性判定された (Table 2)。

Table 2. 混合体液斑からの各マーカーの検出

Sample	Number of positively determined samples ^{*)}		Number of positively determined samples ^{*)}																
			Blood			Saliva/nasal			Saliva			Semen			Vaginal fluid				
			ALAS2	SPTB	HBB	STATH	HTN3	MUC7	SEMG1	PRM2	KLK3	ESR1	SERP/INB13	MUC4	KLK13	CYP2B7P1			
Blood 5 µL	3	control	3	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+Saliva 5 µL	3	1	3	0	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+Saliva 50 µL	1	0	3	3	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+Semen 5 µL	2	0	3	-	-	-	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-
		+Semen 50 µL	1	0	3	-	-	-	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Saliva 5 µL	3	control	-	-	-	3	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+Blood 5 µL	3	2	3	3	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+Blood 50 µL	3	2	3	2	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+Semen 5 µL	-	-	-	3	3	0	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-
		+Semen 50 µL	-	-	-	3	3	0	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Semen 5 µL	3	control	-	-	-	-	-	-	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-
		+Blood 5 µL	1	0	3	-	-	-	3	3	3	1	-	-	-	-	-	-	-
		+Blood 50 µL	3	0	3	-	-	-	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-
		+Saliva 5 µL	-	-	-	0	0	0	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-
		+Saliva 50 µL	-	-	-	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Vaginal fluid 25 mm ²	2	control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	1	2	2	-	-
		+Blood 5 µL	2	1	2	-	-	-	-	-	-	-	2	1	1	2	2	-	-
		+Blood 30 µL	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0	1	1	-	-
		+Saliva 5 µL	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	2	2	2	2	2	-	-
		+Saliva 30 µL	-	-	-	1	2	1	-	-	-	-	2	0	0	1	2	-	-
		+Semen 5 µL	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	2	0	0	2	2	-	-
		+Semen 30 µL	-	-	-	-	-	-	2	2	2	0	0	0	0	1	-	-	-

分解試料では、陳旧唾液斑への適用は困難と考えられる一方で、陳旧血痕、精液斑あるいは膣液斑では、室温で数年保管されていても想定される体液マーカーのうち複数で陽性判定が可能であった (Table 3)。模擬鑑定資料では、想定される体液マーカーが陰性となる資料はあるものの、複数の体液マーカーが陽性という基準を適用することで、他の体液と誤判定される資料は認められなかった。

Table 3. 陳旧体液斑からの各マーカーの検出

Sample	Storage period	Storage temp.	n	Body fluid marker															
				Ref.	Blood			Saliva/nasal		Saliva			Semen			Vaginal fluid			
					ACTB	ALAS2	SPTB	HBB	STATH	HTN3	MUC7	SEMG1	PRM2	KLK3	ESR1	SERP/INB13	MUC4	KLK13	CYP2B7P1
Bloodstain	1 year	RT	3	3	3	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2 years	RT	3	3	3	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9.5 years	RT	3	2	3	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saliva stain	2 months	4°C	3	3	-	-	1	3	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8 months	RT	3	0	-	-	-	1	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2 years	RT	4	1	-	-	-	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6 years	RT	4	0	-	-	-	1	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Semen stain	1 year	RT	3	3	-	-	-	-	-	-	2	3	2	-	-	-	-	-	-
	2 years	RT	3	3	-	-	-	-	-	-	3	3	2	-	-	-	-	-	-
	9.5 years	RT	3	0	-	-	1	-	-	-	1	3	0	-	-	-	-	-	-
Vaginal fluid stain	1.5 years	4°C	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	2	2	2	-
	1.5 years	RT	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	2	2	2	-
	8.5 years	4°C	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	2	1	2	2	-
	8.5 years	RT	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	-

Dilution ratios of PCR products were optimized (1:20, 1:200, or 1:2,000) to determine the maximum number of target genes that were not off scale.

All samples were negative for *BPIFA1*.

以上の結果より、本検査法は、複数の体液を同時かつ特異的に識別可能であることから、由来が不明な資料や混合資料に対して有効な検査法となりうると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akutsu Tomoko, Watanabe Ken	4. 巻 10
2. 論文標題 A Proposed Procedure for Discriminating between Nasal Secretion and Saliva by RT-qPCR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 519 ~ 519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics10080519	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akutsu Tomoko, Watanabe Ken, Toyomane Kochi	4. 巻 26
2. 論文標題 Development and practical evaluation of an RT-PCR procedure using a real-time PCR instrument for saliva identification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Forensic Science and Technology	6. 最初と最後の頁 49 ~ 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3408/jafst.790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akutsu Tomoko, Yokota Isao, Watanabe Ken, Sakurada Koichi	4. 巻 45
2. 論文標題 Development of a multiplex RT-PCR assay and statistical evaluation of its use in forensic identification of vaginal fluid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 101715 ~ 101715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2020.101715	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 Sakurada Koichi, Watanabe Ken, Akutsu Tomoko	4. 巻 10
2. 論文標題 Current Methods for Body Fluid Identification Related to Sexual Crime: Focusing on Saliva, Semen, and Vaginal Fluid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 693 ~ 693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics10090693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 2件）

1. 発表者名 阿久津 智子、横田 勲、渡邊 賢、豊間根 耕地、山岸 孝幸、櫻田 宏一
2. 発表標題 マルチプレックスRT-PCR法による包括的な体液の識別検査法の開発
3. 学会等名 日本法科学技術学会第27回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿久津智子、渡邊賢、豊間根耕地
2. 発表標題 リアルタイムPCR装置を用いたRT-PCR法による唾液検査法の開発および鑑定実務への導入に向けた検証
3. 学会等名 日本法科学技術学会第26回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoko Akutsu, Isao Yokota, Ken Watanabe, Koichi Sakurada
2. 発表標題 Development of a multiplex RT-PCR assay and its statistical evaluation for the forensic identification of vaginal fluid
3. 学会等名 The 28th Congress of the International Society for Forensic Genetics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akutsu, T., Watanabe, K.
2. 発表標題 Development of the discrimination procedures between nasal secretion and saliva by real-time RT-PCR and ELISA
3. 学会等名 71st the American Academy of Forensic Science Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿久津智子、渡邊賢
2. 発表標題 ELISA法による鼻汁と唾液の識別
3. 学会等名 日本法科学技術学会第24回学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	櫻田 宏一 (Sakurada Koichi) (10334228)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	横田 勲 (Yokota Isao) (20761414)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	

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
---------	---------