

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21033

研究課題名（和文）細菌叢解析による劣化試料からの体液種識別に有効な細菌DNAマーカーの探索

研究課題名（英文）16S rRNA gene sequencing-based exploring bacterial DNA markers for the identification of forensically relevant body fluids from degraded samples

研究代表者

大田 隼 (Ohta, Jun)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40911764

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヒト唾液の劣化に伴う細菌叢の変化を明らかにすることにより、劣化試料からの唾液識別に有用な細菌DNAマーカーを判明させることを目的とした。唾液の乾燥や劣化に伴い、常在細菌の生菌率は低下し、DNA分解度は増大した。このような試料中の細菌叢は大きく変化した一方で、Streptococcus属の細菌は比較的安定して検出されたことから、劣化試料からの唾液識別に有用なマーカーになると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法科学的な試料に含まれる体液の種類を識別することは犯罪捜査に有益な情報を提供するが、長期未解決事件の試料や状態の悪い試料に特徴的にみられる試料の劣化は、体液種識別を困難とする課題がある。本研究によって、唾液試料の状態変化に伴う細菌叢の変化が示され、この研究成果は、試料の劣化に頑強な新規唾液識別法の開発に有用な情報となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to clarify the robust bacterial DNA markers for the identification of saliva from degraded samples via analysis of the composition change of oral bacterial flora during the degradation of saliva samples. The viability of human oral bacteria in saliva samples was decreased with drying and degrading saliva, and the bacterial DNA degradation ratio of saliva samples was increased. While the bacterial composition of the above saliva samples was changed from the natural state, Streptococcal DNA was stably detected from the degraded saliva samples. Thus, we consider that the oral Streptococcal DNA markers would be useful for the identification of saliva from highly degraded saliva samples.

研究分野：法歯学

キーワード：法歯学 唾液 劣化 細菌叢解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

法科学的な試料に含まれる唾液などの体液の種類を識別することは、犯罪事実の証明や個人識別のために検査するヒト DNA の由来の説明に有用であり、犯罪捜査に有益な情報を提供する。しかしながら、長期未解決事件の試料や状態の悪い環境下に置かれた試料に特徴的にみられる試料の“劣化”は、体液種の識別を困難とする課題がある。

研究代表者らは、これまでに劣化した試料からの唾液の識別にはヒト口腔内常在細菌の DNA マーカーが有用であることを明らかにしてきたが、唾液試料中の細菌叢が劣化に伴ってどのように変化するのは明らかになっておらず、どの細菌を標的とした検査マーカーが最適なのはわかっていない。そのため、法科学的な唾液試料中で起こる細菌叢の変化に関する知見が得られれば、学術的な基盤にもとづいた試料の劣化に頑強な新規検査法の開発に有用であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト体液およびそれらの劣化試料を用いて、細菌叢の変化を DNA レベルで明らかにすることにより、劣化試料からの体液種識別に有効な細菌 DNA マーカーの菌種を判明させることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト唾液の斑痕化・劣化試料の作製

法科学的なヒト唾液試料は、液体の状態ではなく、さまざまな物体に付着して乾燥している(斑痕化している)状態から採取される場合が多い。そのため、本研究でもヒト唾液をろ紙に付着させた後、室温で乾燥させて斑痕化試料を作製した。劣化試料については、唾液の斑痕化試料を紫外線照射したもの(UV)と土壌中に埋めたもの(SD1, 7)を作製した。

(2) タンパク質分解度の推定

ヒト唾液試料の斑痕化に伴う唾液タンパク質の断片化の程度を評価するため、紫外吸収法と Bradford 法によるタンパク質の定量値の比からタンパク質分解度を推定した。はじめに、タンパク質分解度という指標がタンパク質の断片化の程度を反映することを確認するため、BSA をタンパク質分解酵素で処理したものについて測定した。

(3) 生菌率の測定

ヒト唾液試料の斑痕化に伴うヒト口腔内常在細菌の生存状態を評価するため、EMA-qPCR 法を用いて、*Streptococcus salivarius* と *Veillonella atypica* の生菌率を測定した。

(4) 細菌 DNA 分解度の推定

ヒト唾液試料の斑痕化・劣化に伴うヒト口腔内常在細菌 DNA の断片化の程度を評価するため、*S. salivarius* と *V. atypica* をターゲットとして、増幅長の異なる PCR プライマーを用いた qPCR 法による細菌 DNA の定量値の比から細菌 DNA 分解度を推定した。はじめに、細菌 DNA 分解度という指標が DNA の断片化の程度を反映することを確認するため、*S. salivarius* と *V. atypica* のゲノム DNA を DNA 分解酵素で処理したものについて測定した。

(5) 細菌叢解析

ヒト唾液試料の斑痕化・劣化に伴う細菌叢の変化を解析するため、Ion 16S™ Metagenomics Kit を用いた Ion S5 System による細菌叢解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト唾液の斑痕化に伴うタンパク質分解度および生菌率の変化

はじめに、BSA についてタンパク質分解度を推定したところ、タンパク質分解酵素の処理時間依存的な上昇が認められたことから、タンパク質分解度はタンパク質の断片化の程度を反映する指標であることが示された(Fig. 1a)。続いて、唾液の液体試料と斑痕化試料について同様にタンパク質分解度を推定したところ、統計学的に有意な変化は認められなかった(Fig. 1b)。

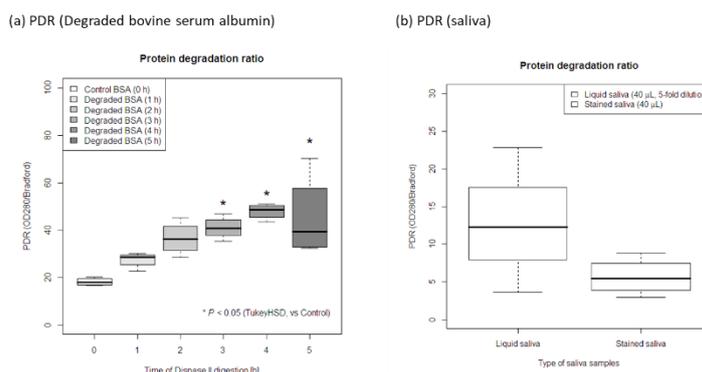


Fig. 1 唾液の斑痕化に伴うタンパク質分解度の変化

唾液中の斑痕化に伴い、唾液タンパク質の断片化の進行は確認されなかった一方で、ヒト口腔内常在細菌の *S. salivarius* と *V. atypica* の生菌率はともに約 1/3 から約 1/4 程度に低下した (Figs. 2a and 2b)。これらの結果から、法科学的な斑痕化試料からのヒト口腔内常在細菌を指標とした唾液の識別については、培養検査ではなく、DNA 検査が有用であると考えられた。

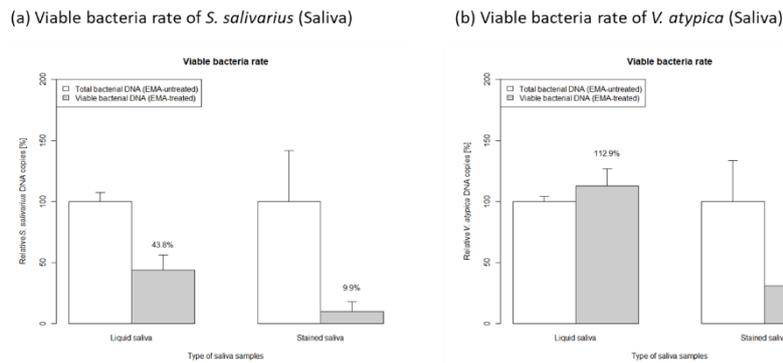


Fig. 2 唾液中の斑痕化に伴う生菌率の変化

(2) ヒト唾液中の斑痕化・劣化に伴う細菌 DNA 分解度の変化

S. salivarius と *V. atypica* のゲノム DNA を DNA 分解酵素で処理したものについて細菌 DNA 分解度を推定したところ、ともに DNA 分解酵素の処理時間依存的な上昇が認められたことから、細菌 DNA 分解度は DNA の断片化の程度を反映する指標であることが示された (Figs. 3a and 3b)。続いて、唾液中の斑痕化・劣化試料について、同様に細菌 DNA 分解度を推定したところ、紫外線照射した劣化試料 (UV) と土壌中に埋めて劣化させた試料 (SD7) において細菌 DNA 分解度の上昇が認められた (Figs. 3c and 3d)。これらの結果から、本研究で作製した上記の劣化試料は、長期未解決事件の試料や状態の悪い環境下に置かれた試料のように、DNA の断片化が進行した状態であることが確認された。

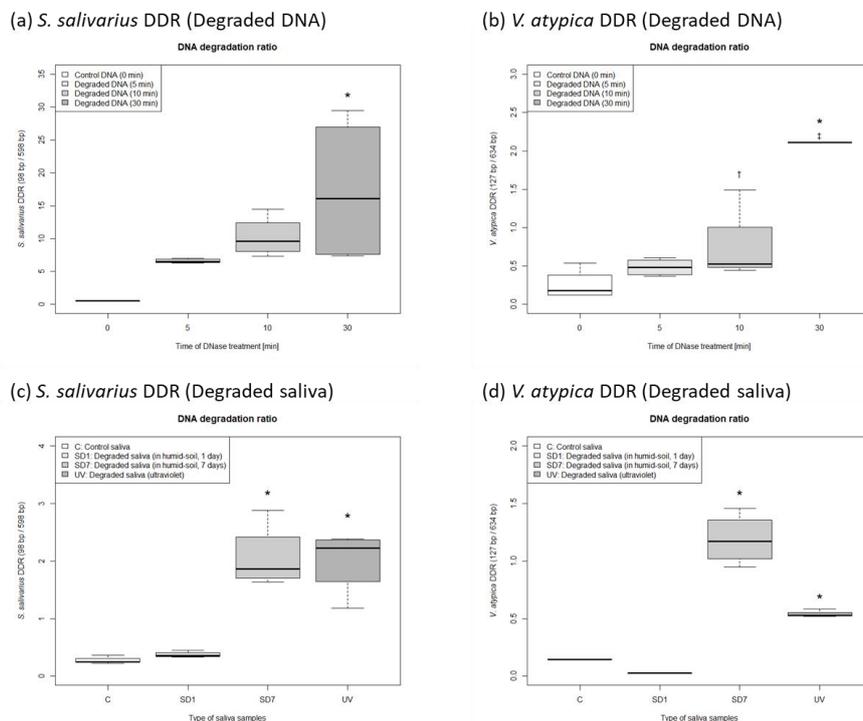


Fig. 3 唾液中の斑痕化・劣化に伴う細菌 DNA 分解度の変化

(3) ヒト唾液中の斑痕化・劣化に伴う細菌叢の変化

ヒト唾液中の斑痕化・劣化試料について Ion 16S™ Metagenomics Kit を用いた Ion S5 System による細菌叢解析を行ったところ、土壌中に埋めて劣化させた試料 (SD1, 7) において、劣化に伴う試料中の細菌叢の変化が観察された (Figs. 4 and 5)。また、細菌の属レベルでの解析結果について、主要なヒト口腔内常在細菌の占有率の変化を比較したところ、*Streptococcus* 属の細菌が他の細菌に比べて安定的に検出されていることが明らかとなった (Table 1)。

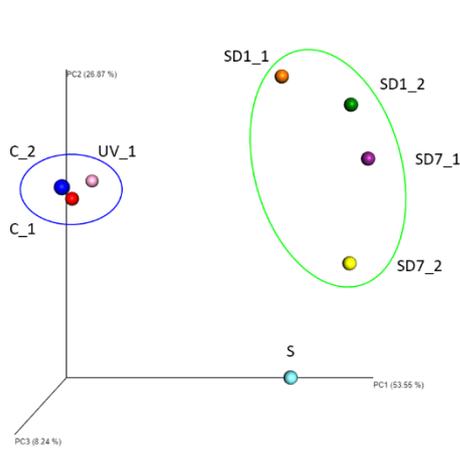


Fig. 4 唾液の斑痕化・劣化試料間の細菌叢の類似度

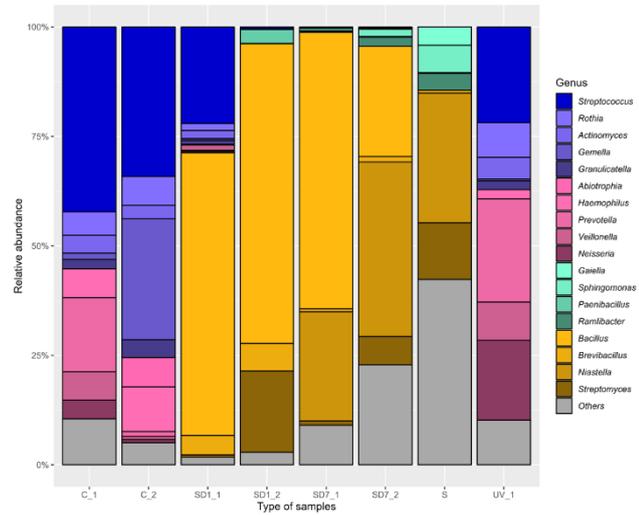


Fig. 5 唾液の斑痕化・劣化に伴う細菌叢の変化

Streptococcus 属の細菌はいくつかのグループに分類されているが、上記の劣化試料から検出された *Streptococcus* 属の細菌としては、salivarius group の *S. salivarius* や mitis group の *S. sanguinis* が挙げられた。

Table 1 唾液の斑痕化・劣化に伴う主要なヒト口腔内常在細菌の占有率の変化

Core genus of human oral microbiome	Relative abundance (% of total read)			
	C_1	SD1_1	SD7_1	UV_1
<i>Streptococcus</i>	42.3	22.0	0.1	21.9
<i>Rothia</i>	5.3	1.6	0.0	7.9
<i>Actinomyces</i>	4.1	1.8	0.0	4.9
<i>Granulicatella</i>	2.2	0.9	0.0	2.1
<i>Haemophilus</i>	6.5	0.2	0.0	2.1
<i>Prevotella</i>	16.9	0.0	0.0	23.6
<i>Veillonella</i>	6.4	1.2	0.0	8.7
<i>Neisseria</i>	4.3	0.2	0.0	18.3

以上の結果から、高度に劣化した試料からの唾液の識別には、*Streptococcus* 属の細菌 (*S. salivarius*、*S. sanguinis* など) をターゲットとした DNA マーカーが有効な可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大田隼、峰岸沙希、野田菜央、宇都野創、櫻田宏一
2. 発表標題 唾液試料の状態変化による唾液識別マーカーの性質的变化
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ohta J, Minegishi S, Utsuno H, Sakurada K
2. 発表標題 FORENSIC APPLICATION OF ORAL BACTERIAL DNA DETECTION FOR THE IDENTIFICATION OF HUMAN SALIVA
3. 学会等名 International Union of Microbiological Societies 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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