

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：82505
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790734
 研究課題名（和文） イメージング質量分析による混合体液斑の新しい識別法に関する研究
 研究課題名（英文） Imaging of mixed body fluid stain by MALDI-TOF-MS
 研究代表者
 藤浪 良仁（FUJINAMI YOSHIHITO）
 科学警察研究所・法科学第一部・主任研究官
 研究者番号：30335632

研究成果の概要（和文）：

ボランティア 10 人の精液及び精液斑抽出液に特徴的な巨大分子として高い強度で $m/z2890$ が検出された。さらに、精液、血液、尿、唾液の模擬混合体液斑を導電性両面テープに転写により複写物を作製し、 $m/z2890$ を用いた MALDI イメージングにより転写資料上の精液斑の場所の検出が可能であった。MALDI イメージングは、現在信頼され使用されてきた検査の前の精液斑の付着場所のスクリーニングとして有効と思われる。

研究成果の概要（英文）：

It was detected as characteristic macromolecule at high intensity on $m/z 2890$ in semen and seminal stain extract from ten healthy young volunteers. In addition, a sheet of cotton cloth attaching each stain of semen, blood, urine, and saliva was transferred to a sheet of conductive double sided carbon adhesive tape, following that the locations of seminal stains were detected by MALDI-imaging with $m/z 2890$ (as a molecular marker) on the replica. MALDI-imaging might be a useful tool for screening of the locations of seminal stains before tests that have been used and are currently trusted.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,000,000	0	2,000,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：法医学

キーワード：MALDI-TOF-MS, イメージング、精液、体液斑、質量分析

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA 型検査法の感度及び精度が高まるに伴い、これまで以上に試料が正確に取り扱われていることを明確に示す必要がある。特に性犯罪に関しては、精液及び膿液を証明した上で、混合斑の中から精液及び膿液の単独斑の位置を画像化し、ゲノム採取を確実にこなすと共に、再鑑定を想定した原試料の保存を確保できる技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

近年目覚ましい進歩を遂げているイメージング質量分析を用いて、各種体液斑の網羅的鑑別及び正確な試料採取を可能にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種体液の Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) によるスペクトルパターンの取得条件の検出から、ヒト体液斑の簡易抽出物を対象に MALDI-TOF-MS のスペクトルパターンの

取得を試みた。実験方法は、20代を中心とするボランティアの体液で、血液3名(男性2名、女性1名)、尿10名(男性5名、女性5名)、汗6名(男性2名、女性4名)、唾液10名(男性5名、女性5名)、鼻汁4名(男性3名、女性1名) 精液(男性10名) 膿液(女性5名)を用いた。体液は滅菌水で10倍段階希釈したものを用いた。

体液斑抽出液の調整法は、3 cm x 3 cm に切断したティッシュペーパーに10 μ l の体液を付着させ、3日間室温で風乾させた。これを1.5 ml の遠心チューブに入れ、1 ml の水で完全に浸し、1分間ボルテックスミキサーで攪拌し、1時間室温で放置した。これを再度1分間ボルテックスミキサーで攪拌し、遠心することなく速やかに資料として用いた。但し、膿液だけはスワブ採取し、綿球部をPBS (-)を用いて抽出した。マトリックス溶液は、10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in 50% acetonitrile (ACN) containing 0.3% trifluoroacetic acid (TFA)を用いた。これをマトリックス溶液に1:4で混和し、target plate 上で風乾することで結晶化した。これをBruker Daltonics社のAutoflex II (MALDI-TOF-MS)で解析を行った。

(2) 体液斑のMALDIイメージングを試みた。MALDIイメージング用の模擬混合体液斑は、精液、血液、尿、唾液の4体液を60 x 60 mmの綿製の晒し布に付着させ作製した。作製資料を転写媒体である68 x 98 mmの導電性両面テープに室温10秒間接着させ体液斑を転写した。これを滅菌プラスチックシャーレの蓋に載せ、ローテーター(TAITEC, RT-5)を上に向けて設置することでラウンドとして使用し、一定速度で回転させた。マトリックス溶液は、10 mg/ml CHCA in 50% ACN containing 0.3% TFA、スプレー法はコンプレッサー(IWATA, IS-800)とエアブラシ(IWATA, HP-CS)を用い、マトリックス溶液約20 mlを約2時間かけてドラフト内で均一に噴霧した。これをtarget plate上に貼付け、スキナで画像を取得した後に、Bruker Daltonics社のAutoflex II (MALDI-TOF-MS)に導入し、flexImaging (ソフトウェア)で解析を行った。

4. 研究成果

(1) 各種体液のMALDI-TOF-MSによるスペクトルパターンの取得条件の検討から、ヒト体液斑の簡易抽出物を対象にMALDI-TOF-MSのスペクトルパターンの

取得を試みた。実験方法は、体液斑を滅菌水に浸しボルテックスミキサーで簡易抽出し、体液斑抽出サンプルとした。これをマトリックス溶液に1:4で混和し、Bruker Daltonics社のAutoflex II (MALDI-TOF-MS)で解析を行った。検討の結果、ボランティア由来の唾液、鼻汁、膿液は安定した特異ピークとマススペクトルパターンが得られなかったが(data not shown)、精液、尿、汗、血液は特異ピークが観察されマススペクトルパターンのバラツキは少なく同定が容易と思われた。特に、精液希釈液または精液斑抽出液からは、精液特異分子としてm/z 2890が高感度で観察された(Fig. 1, 2)。また、精液希釈液に置いて、Positive modeとNegative modeによる検出スペクトルパターンの比較を行ったところ、共にm/z 2890を最大ピークとした各特異ピークは一致しており、全体的に類似していた(Fig. 3)。また尿斑抽出液からは尿特異分子としてm/z 1912が観察され(Fig. 4)、汗斑抽出液からは汗特異分子としてm/z 4302が観察された(Fig. 5)。さらに、血液の特異ピークは血液型の違いに関係なく一致したので、特異ピークを形成する物質は、血液型の型物質ではないと思われた(Fig. 6)。本測定は、リニアポジティブで測定し特異ピークが得られたが、リニアネガティブ、リフレクトポジティブ、リフレクトネガティブでは検出出来なかった(data not shown)。特異ピークの血液型物質で無ければ、赤血球膜タンパクで含有量の多いグライコホリン、アクチンなどかも知れない。

(2) 次に精液特異分子として得られたm/z 2890を用いて精液斑のMALDI-TOF-MSによるイメージングを行った。

Fig. 7パネルAはスキナ画像、パネルBは精液に特異的な発現分子2890m/zを赤色で表示させたMALDIイメージングの画像で、パネルCはパネルAとBを50%ずつ融合させた画像で、Bで得られた精液斑の位置が、Aの混合体液斑を転写させた導電性両面テープのスキナ画像から、本資料のどの位置に精液が付着していたかが特定が可能であった。

このように精液の特異分子の検出による精液斑のMALDI-TOF-MSによるイメージングにより、他種の体液斑の混在する資料から精液付着場所の特定が可能であった。バックグラウンドやその他の体液斑からは、精液特異分子として得られたm/z 2890のシグナルは得られなかった。

精液特異分子として得られたm/z 2890の帰属は出来ていない。しかし、検出感度が際だって高いため、MALDI-TOF-MSを用

いたマスマイメーキングに利用可能であり、精液斑の付着場所特定に有効である。このように、MALDI-TOF-MS を用いた体液の検査法は、付着場所の特定や、抽出による高感度検出が可能であるため、従来の確定検査前の迅速な1次スクリーニングとして有効と思われる。

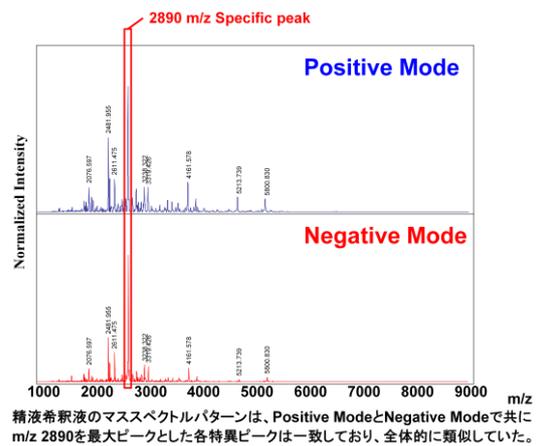


Fig.3 MALDI-TOF-MS による精液希釈液の Positive mode と Negative mode の比較

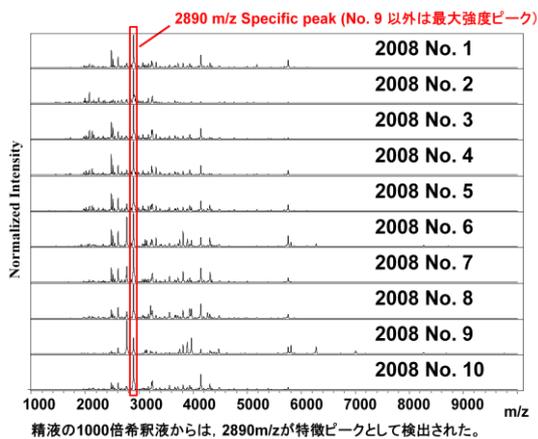


Fig.1 MALDI-TOF-MS による精液希釈液のマススペクトルパターン

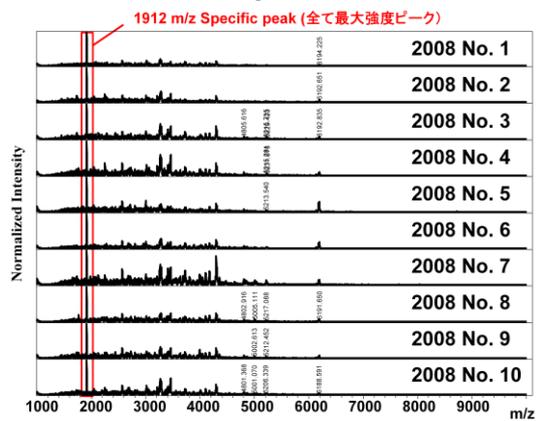


Fig.4 MALDI-TOF-MS による尿斑抽出物のマススペクトルパターン

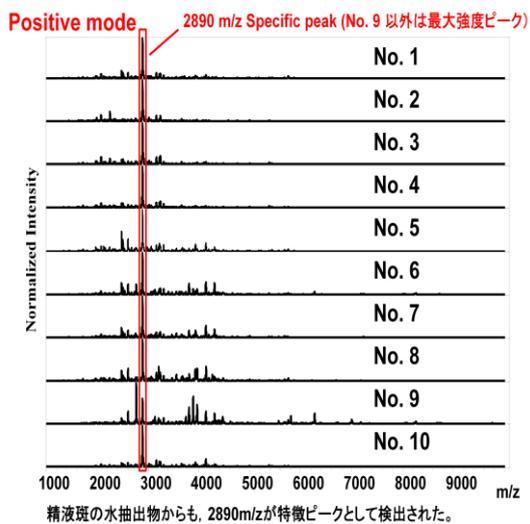


Fig.2 MALDI-TOF-MS による精液斑抽出物のマススペクトルパターン

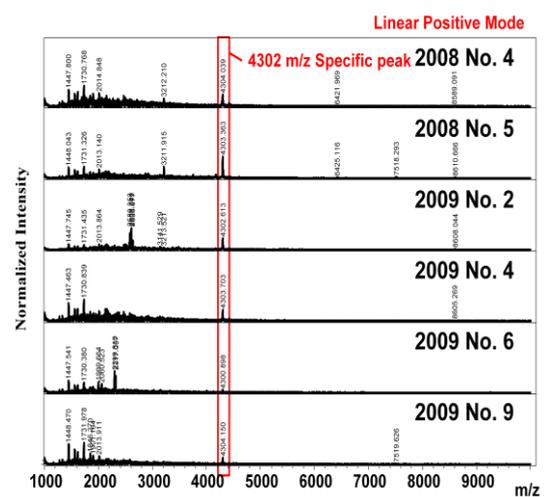


Fig.5 MALDI-TOF-MS による汗斑抽出物のマススペクトルパターン

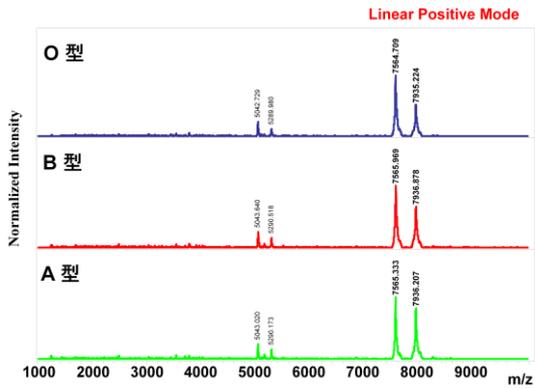


Fig.6 各血液型におけるMALDI-TOF-MSで検出される血液の特徴ピーク

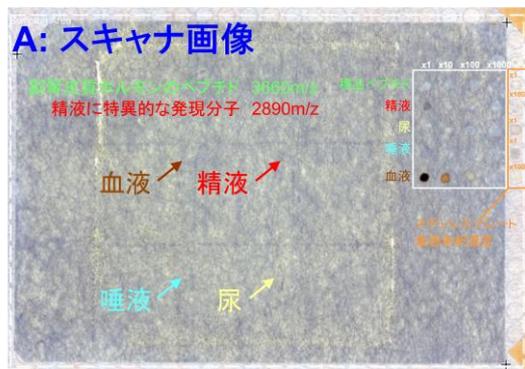


Fig.7 混合する体液斑からの精液斑のイメージング

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0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤浪 良仁 (FUJINAMI YOSHIHITO)

科学警察研究所・法科学第一部・主任研究官

研究者番号：30335632

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし