

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590867

研究課題名(和文) 直接PCR法による法医学的な検査に用いた試料からの個人識別の研究

研究課題名(英文) Study of the individual identity from the sample which used for the forensic detection by direct PCR method

研究代表者

鉄 堅 (TIE, Jian)

日本大学・医学部・専任講師

研究者番号：40277439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は法科学試料や法医学予備検査などに使用した試料より直接PCR法を用いてDNA多型を検査し個人識別を行えることである。使用した試料は主に血痕、唾液、精液及びヒト爪などであった。周知のように法医学的な物件鑑定には血痕が最も多い。これらの斑痕のDNAを鑑定するまえに定性試験が欠かせない。しかし鑑定試料が少ないときに予備試験で試料を使い尽くすと次のDNA鑑定の試料が確保できなくなる。そこで予備試験で使用した試料をそのまま再利用でDNA鑑定を検討した。血痕、唾液斑および精液斑の定性検査後に15種類のSTR多型のPCR増幅を行い、ほとんどの試料から多型の検出ができた。

研究成果の概要(英文)：A purpose of this study is to detect DNA polymorphism using the direct PCR method from a forensic sample or a sample which used for forensic medicine pretest. The normal forensic sample includes a bloodstain, saliva stain and sperm stain, as a matter of common knowledge, there are the most bloodstains. A qualitative examination is necessary before detecting DNA polymorphisms. However, it cannot secure enough amount sample for the next DNA analysis when use up a sample in preliminary examination. Therefore in this study just examined a DNA analysis by reuse in the sample which used in preliminary examination. The PCR of 15 STR polymorphisms were amplified by a sample after the qualitative inspection of a bloodstains, saliva stains and the sperm stains, and the genotypes were able to detect from most samples.

研究分野：法医学

キーワード：法科学試料 予備検査 DNA多型 直接PCR増幅 個人識別

1. 研究開始当初の背景

法医学の個人識別は伝統的に血液型、血清型および赤血球酵素型などによって行ってきた。これらの方法は検査種目により異なり、使用する試料の量が多く、ときによって一つの鑑定には何種類の検査方法も行わなければならない。さらに陳旧な試料はほとんど検査ができないため、再鑑定には非常に困難なことが多い。

1985年以降にDNA多型が開発され、法医学の個人識別や親子鑑定に応用されている。その後、PCR技術の開発によって少ない鋳型DNAよりDNA多型をPCR増幅し増幅されたPCR産物を電気泳動で解析する。この新しい検査法は迅速に国内外に法医学の実際に応用し始めた。現在、DNA多型はすでに個人識別や親子鑑定のもっとも重要な手段になり、たんぱく質の遺伝標識から遺伝子そのものを個人標識のマーカーとしてDNA鑑定の時代に入っている。旧い個人識別方法と比較してヒトの生物試料からDNAを精製しSTR(Short Tandem Repeat)多型を用いて核細胞さえ採取できればSTR多型によるDNA鑑定が可能で、識別能力も大幅に向上され、犯罪捜査や大規模の災害の個人同定などに幅広く応用されている。

しかしDNA技術の進歩とともに微量試料の個人識別は法医学鑑定の難題として依然鑑定の実際に残されている。もちろん法医学のDNA鑑定の目的は個人識別である。ところが、大体のケースでは誰のDNAと同様に必要なのは何試料から誰のDNAを検出されたということである。特に強姦事件の場合に常に精液の証明が重要なファクターになる。すなわち現場から得られた生物試料は試料の種別を区別するため法医学では個人識別を行う前に予備試験または定性試験で確認する必要がある。しかし、法医学者にとって検査に使用する試料の量は十分あるときには問題はないが、試料の量は少ないときに予備試験と確認試験ではたくさんの試料を消費して後のDNA鑑定に十分な試料量が残されないことがしばしばある。時々予備試験が省略されるケースもあるが、この場合にはたとえDNA鑑定ができたとしても、血痕から得られたものか、それとも精液斑またはほかのものから得られたかはっきりしないといけなことが多い。そこで微量の生物試料から法医学の定性鑑定を使用した試料からDNA抽出せず直接PCR増幅を行い、STR多型を検出することが一つの解決策と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は微量の法科学試料や法医学予備検査、確認試験などに使用した試料よりDNA抽出せず直接PCR法を用いてSTR多型を検査する。現在では微量の試料に対して十分なDNA鑑定が困難な犯罪捜査や大規模の自然災害などの個人識別における新し

い検査方法として開発して、将来、法医学の個人識別や親子鑑定などに貢献できると考えている。

3. 研究の方法

通常法医学の実際で使用されているいわゆる法科学試料は生体から離れて元の状態とかわり、さらに時間が経つことで環境に作用されることにより、法医学の検査が段々難しくなることが多い。たとえば、血管から採取した血液は新鮮な赤血球なら容易にABO式の血液型を測定できる。しかし、出血して血液が体から離れて、血痕になり、元の血液と検査するために手順に従って検査しなければならない。なぜかという、現場の血痕は血液であるという確認も必要になるからである。そこで、今回は日常で法医学の実際にもっとも使用されている血痕、精液斑、唾液斑およびヒト爪などを試料として検討を行う。

採取した血痕、精液及び唾液を滅菌ガーゼに滴下し斑痕を作成し室温に放置し検査試料とした。検査試料の結果をコントロールするため、それぞれ新鮮な試料を抽出したDNAからSTR多型を検出し、スタンダードパターンとした。血痕では各試料の棉糸1本より、直接PCR法を用い、これらのSTR多型の増幅条件の確認を行った。血痕検査の予備試験はロイコマラカイトグリーン法、ヒト血液鑑別試験はOCヘモキャッチ試験法の2種類の方法で行った。唾液検査はヨウ素デンブun反応試験法、精液斑の検査は酸性ホスファターゼ試験とSMテストの2種類の方法でそれぞれ予備検査を行った。予備試験後に使用した試料を回収しガーゼ糸をPCR増幅チューブに入れ、PCR反応液を加え、そのままSTR多型のPCRを増幅する。陳旧試料や予備検査の試薬反応で使用した試料に対して、既に我々が開発した“組織の直接PCR法に有効なdigest buffer”及び市販のViagen DirectPCR DNA Extraction Systemを用いて処理してから、STR多型の増幅を実施した。STR増幅にはABI社のAmpF0STR® Identifiler PCR Amplification kit、AmpF0STR® Identifiler Direct PCR Amplification kit及びAmpF0STR® MiniFiler™ PCR Amplification kitを用い、各試料のスタンダード型と比較して検討した。

ヒト爪は中性洗剤で洗浄してDNA抽出を行わず約0.5~1.5mm長さをそれぞれナイフで切り爪片を採取し試料とした。PCR用チューブに爪片を入れ、PCR反応液を加え、Tks Gflex DNA polymerase (Takara Bio)を用い、直接PCR増幅を行った。これらのPCR産物からSTR多型の検査はABI 310 Genetic Analyzerを使用し、増幅されたPCRプロダクトの解析を行った。

4. 研究成果

(1) 血痕の検査

血痕ガーゼを用いて血液検査の予備試験（ロイコマラカイトグリーン法）および人血確認試験（OC ヘモキャッチ）法で使用後の試料系から直接 PCR 増幅を行った。これらの PCR 産物から 15 種類の STR 多型を検出したところ、すべての試料から STR 多型の確認ができた。さらに陳旧試料（室温で 10 年間放置したもの）から検出された STR 多型は新鮮試料から精製した DNA から検出された STR 多型と比較して正確に STR 多型が検出されたことがわかった。うち、血液付着量の多い血痕に対して、1cm から半分にしてよりシャープのピークが得られた。

(2) 唾液斑の検査

唾液斑の予備試験後に 1~3 本のガーゼ系を用い、直接 PCR 法を用い 15 種類の STR 多型の検査を行った。1 本の系では 7 例の試料より STR 多型の検査ができたが、残りの 8 例において 15 STR 多型の検出できなかつた。2 本と 3 本の系を使用すると、すべての試料より 15 種類の STR 多型の検出が確認できた。しかし、唾液の中の細胞数は個人差があり、ガーゼ系が 1 本だけでは検出される STR 多型のばらつきがあり、確実に検査ができるのはやはり 2 本以上の系が必要となる。

(3) 精液斑の検査

新鮮な精液斑（採取してから室温で 1 年間以内に放置されたもの）は 2 種類の定性試験を行い、最初が精液検査の常用予備試験の一つとして酸性ホスファターゼ試験を実施し、さらにもう一種類の SM テストをそれぞれ行い、両方の検査後のガーゼ系 1 本から STR の PCR を増幅した。この 2 種類の検査方法で使用したすべての試料において STR 多型の検査に施行したところ、15 例の試料より STR 多型の型判定が成功した。対照試料は新鮮な血液、唾液および精液を使用して DNA を精製し抽出された DNA の濃度を測定してから STR 多型の検査を行った。得られた STR 型はスタンダード多型として各試料のコントロールをとした。

(4) ヒト爪の検査

爪は骨や毛髪などとヒト硬組織として法医学の物件鑑定にルーチンに使用されている。これらの硬組織から STR 多型を検査するため、DNA 抽出が必要となる。しかし、DNA 抽出にはたくさんの爪が必要されることと、操作に時間もかかる。増して小さい爪片から DNA を取れないこともたびたび経験したことがある。そこで、少量の爪片から DNA を精製せずに GenPrint SilverSTR system（Promega 社）と 15 種類の STR 多型（Identifiler, Applied Biosystems）を用いてそれぞれ STR 多型の検査を試みた。周知のようにヒト爪は法医学的な物件鑑定の試料として最も適切な試料の一つである。それは爪の長期保存ができ、大規模災害時にもっとも採取しやすいし、常温でもほかの人体資料より腐敗しにくく、さらに表面が汚れても洗浄できるなどの特徴がある。今回、直接

PCR 法でこの 2 種類の STR 検査より 15 例の採取試料からすべて型判定ができた。本研究は試料の長さを一定にして爪の DNA 濃度を丁寧に測定し STR 多型を検出する最小必要量の DNA を使い、DNA 鑑定の技術が確保できた。

GenPrint SilverSTR system 法では 0.5mm ~ 1.5mm の爪片から STR 多型の検出ができたが、爪片が長くなると、STR 検査で得られたバンドが太くなることがあった。0.5mm の爪は十分に 15 種類の STR 多型の検査が可能であることがわかった。AmpF0STR[®] Identifiler 法は 0.5~1.0mm の爪片を用いて 15 例の爪試料から 15 種類の STR 多型が正確に検出された。しかし 1.5mm の爪片は検出されたピークが高すぎて型判定しにくくなった。

本研究は初めて硬組織から直接 PCR 法で STR 多型の検査に成功した。将来毛髪についても検討して法医学の個人識別にもっと広げればと考えている。

直接 PCR 増幅法はもっとも直面する問題の一つとして予備試験や確認試験で使用した検査試薬による PCR 阻害である。DNA 精製を行わないことで予備試験後に試料そのままですすめるため、当初からこの問題を予測した。ところが、対策の一つとして、なるべく検査が出来る最小量の試料を使用することで PCR 反応液に入る検査試薬を最小限に収めることができる。そうすると、本試験に PCR 阻害がほとんど見られなかつた。

今回の研究は少量試料に対して新しい検査法の開発に検討してこれからこれらの方法は法医学の実際の応用にできるだろうと考えている。

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 2 件)

Jian Tie, Seisaku Uchigasaki. Detection of short tandem repeat polymorphisms from human nails using direct polymerase chain reaction method. Electrophoresis. 査読あり 2014. 35: 3188-3192.

Jian Tie, Seisaku Uchigasaki. Direct PCR amplification of STR loci using samples that have undergone human hemoglobin identification test. International Medical Journal. 査読あり 2013. 20: 226-228.

〔学会発表〕(計 1 件)

Jian Tie, Seisaku Uchigasaki. Detection of short tandem repeat polymorphisms from human nail samples by direct polymerase chain reaction. 2nd International Conference on Forensic Research & Technology. 2013,

October 7-9. Las Vegas, NV, USA.
〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

鉄 堅 (TIE, Jian)
日本大学・医学部・専任講師
研究者番号：40277439

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：