

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670347

研究課題名(和文)ヒト特異性の高いmRNAを標的とした血液証明法の開発：個人識別の新たな展開

研究課題名(英文)Application of mRNA expression analysis for human blood identification to degenerated samples that were false-negative by immunochromatography

研究代表者

久保 真一 (KUBO, Shin-ichi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：10205122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト特異性の高いmRNAを標的とした血液証明法の開発を目指して、血液からのRNAの抽出、cDNAの合成、RT-PCRによる遺伝子確認の一連の検査系を構築した。標的遺伝子Glycophorin A (GLYA)、beta-Spectrin (SPTB)、beta-Hemoglobin (HBB) について、血液特異性、種特異性、検出感度、陳旧試料、洗剤・消毒剤が及ぼす影響、覚せい剤が及ぼす影響を検討した。結果、血液特異性、検出感度、安定性の点ではHBB、人獣鑑別の点ではGYPAが有効であった。従って、GYPAとHBBを指標とするヒト血痕証明法は正常な血痕資料に対しては適用可能と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We often encounter cases in which methamphetamine (MA) mixed blood is unable to be identified as human blood by immunochromatography against human hemoglobin A0. We investigated the application of mRNA expression analysis for those samples that showed a false-negative with immunochromatography as an alternative approach that does not depend on the antigen-antibody reaction. We used real-time PCR to examine the expression levels of blood markers such as glycophorin A (GYPA), beta-spectrin (SPTB) and beta-hemoglobin (HBB). HBB was the only marker detected in blood specifically, and GYPA was useful in determining human specificity. HBB showed good detection sensitivity, and was detectable from older blood stains. HBB was exclusively detectable in MA-mixed blood stains. Detergents and disinfectants did not significantly influence the mRNA markers. The proposed mRNA expression analysis was suitable for human blood identification as an alternative method to immunochromatography.

研究分野：法医学

キーワード：個人識別 血液証明法 ヒト特異性 血液特異性 mRNA glycophorin遺伝子 beta-spectrin遺伝子 beta-hemoglobin遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

血痕からの個人識別を行う場合、血液中の Hb の構成成分であるヘムのペルオキシダーゼ様活性を利用した呈色反応による予備検査と抗ヒト Hb 抗体を利用したイムノクロマトグラフィーによる人血証明の 2 段階の検査を実施したうえで、血液型検査、DNA 多型検査が実施される。しかし、血液(血痕)からの個人識別の実際において、覚せい剤乱用者が使用した注射器内に残存する血液(血痕)では、イムノクロマトグラフィーによる、ヒト血液であることの証明ができない事例にしばしば遭遇する。

抗ヒト Hb 抗体を利用した人血証明が出来なくなった血液(血痕)から、ヒト血液であることを証明する新たな検査法の開発は必須である。このような背景のもと、血液で特異的に高発現を示す遺伝子の mRNA を指標とした方法の開発を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、抗原抗体反応に頼らない、血液中の標的遺伝子 mRNA を用いた RT-PCR で、ヒト由来血液であることを証明する方法の開発である。さらに、開発した新たなヒト血液証明法の、法医実務への応用を図る。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験試料

ヒトの体液試料として、同意を得た被験者から提供を受けた血液、唾液、尿および精液を使用した。これらの体液試料から、採取後直ちに total RNA を抽出した。また、血液については、ガーゼに附着させ斑痕試料を作成した。陳旧試料として、室温で 3 年から 37 年間保管した血痕を使用した。

動物の試料として、チンパンジー、ボルネオオランウータン、シロテテナガザル、ニホンザル、シシオザル、ブラッザグエノン、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、キツネおよびタヌキの血液を使用した。これらの試料から、入手後直ちに total RNA を抽出した。

#### (2) Total RNA 抽出および cDNA 合成

試料の total RNA 抽出は、RNeasy® Mini Kit もしくは QIAamp® RNA Blood Mini Kit を用いて実施した。抽出後、RNase-Free DNase Set を用いて DNase I による混入 DNA の消化を行った。cDNA 合成は、PrimeScript™ RT Reagent Kit および GeneAmp® PCR System 9700 を用いて実施した。逆転写反応の primer には、random hexamers および oligo dT primer を使用した。これらのキットの使用に当たっては、製造者のプロトコルに従った。

#### (3) 使用した遺伝子

標的遺伝子として、Glycophorin A (GYPA)、Spectrin beta (SPTB) および Hemoglobin beta (HBB) を使用した。リファレンス遺伝子として、Actin beta (ACTB) を使用した。

#### (4) リアルタイム PCR

標的遺伝子、リファレンス遺伝子の検出には

リアルタイム PCR を使用し、TaqMan 法と SYBR Green 法の 2 種類のアッセイを実施した。リアルタイム PCR 装置として Smart Cycler® II System を用いた。

#### (5) データ解析

血液から抽出した total RNA を用いて ACTB の PCR 増幅曲線を得た。さらに、RNA 量と Ct 値を基に検量線を作成し、標的遺伝子の Ct 値を求めた。異なる体液種や異なる動物種での比較の際には、delta Ct (dCt) 値を使用した。統計解析は、Student t-検定ならびに 1 要因分散分析を使用した。多重比較検定には Dunnett もしくは Sheffe の方法を用いた。有意水準は 1% とした。

#### (6) 人血証明のためのイムノクロマトグラフィー検査

血痕抽出液を OC-ヘモキャッチでユーザーマニュアルに従い判定を行った。

#### (7) 様々な環境条件下に置かれた血痕の作製

ガーゼ上に作成した 10 µL の血痕に対し、200、2000 mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線(254 nm)を照射した。これらの試料は紫外線照射後、直ちに RNA を抽出した。

10 µL の血液を綿棒に附着させ、4、22、37 の各条件下で風乾した。湿度はそれぞれ約 35、55、35%であった。湿潤状態に置いたサンプル作成のため、10 µL の血液を蒸留水 50 µL を含ませた綿棒に附着させ、密封して、22 で静置した。これらの試料は 7 日後、RNA を抽出した。

(8) 洗剤、消毒剤が混入した血液の作製  
市販品の洗剤は、取扱説明書に記載されている使用濃度に希釈した。血液 30 µL と洗剤もしくは消毒剤 30 µL を混合し、室温で 30 分静置した。コントロールとして血液 30 µL と PBS 30 µL を混合したものを使用した。

(9) 覚せい剤が混入した血痕の作製  
メタンフェタミン混入血痕は、メタンフェタミンを混じた血液を滅菌したガーゼに附着させることで作成した。

#### (10) DNA 抽出、DNA 定量および DNA 型検査

DNA の抽出には、EZ1® DNA Investigator Kit および EZ1® Advanced XL を用い、50 µL の TE buffer で溶出した。DNA の定量には、ヒトゲノム定量キットおよび Smart Cycler® II System を用いた。DNA 型検査には、AmpFISTR® Identifier Kit および GeneAmp® PCR System 9700 を用いた各キットの使用に当たっては、製造者のプロトコルに従った。

### 4. 研究成果

#### (1) 血液特異性

GYPA、SPTB は中程度の血液特異性を示した。HBB は血液のみで検出されたことから、血液特異性の高い優れたマーカーであると考えられた。

#### (2) 検出感度

GYPA、SPTB および HBB の検出感度を調べ

たところ、GYPA および SPTB は 1 μL、HBB は 0.001 μL の血痕から検出可能であった。OC-ヘモキャッチの検出感度は 0.1 μL であったことから、3 つの mRNA マーカーのうち、HBB は OC-ヘモキャッチより検出感度が優れており、微量な試料を取り扱う機会の多い鑑定実務では有用性が高いと考えられた。

### (3) ヒト特性

ヒトとの識別可能性について検討した。最も有効と考えられたのは GYPA で、ボルネオオランウータンのみで検出された。さらに、dCt 値を比較することで、ヒトとボルネオオランウータンは十分に識別可能であると考えられた。SPTB および HBB では、オナガザルの仲間(ニホンザル、シシオザル、ブラッサグエノン)の dCt 値がヒトに比べて顕著に小さかった。一般に、多くの霊長類は個体数や人間社会との接点が少ないため、鑑定実務ではほぼ彼らの血液の存在を考慮する必要はない。しかし、日本では多くの野生のニホンザルが生息し、ヒトを襲う事件がしばしば報告されている。SPTB や HBB の検出方法はニホンザルが関与するような事件事故における血痕証明に有効であると考えられた。本法は、霊長類の血液をヒトと識別できることから、血痕の人獣鑑別法として優れていると考えられた。

### (4) 陳旧性試料

陳旧試料において GYPA および SPTB の発現は低下していた。HBB は、37 年経過の血痕からも検出可能であったことから、陳旧試料に対する良いマーカーになり得ると考えられた。

### (5) 環境の影響

湿潤状態に置かれた血痕は、全てのマーカーにおいて、最も警戒すべき環境要因の 1 つであることが示された。従って、長期間湿潤状態に放置された DNA 型鑑定が必要な鑑定試料に本法を適用する際は、十分注意する必要があると考えられた。

### (6) 洗剤、消毒薬の影響

台所用洗剤および洗濯用洗剤は mRNA マーカーの安定性に顕著な影響を与えなかった。トイレ用洗剤、浴室用洗剤および消毒剤の混合は検出力を低下させていた。今回の結果は、洗剤の種類によっては、mRNA の安定性に悪影響を与えることを示しており、洗剤の混入が疑われる血痕を取り扱う際は、HBB のような高感度のマーカーを使うべきと考えられた。

### (7) 覚せい剤の影響

覚せい剤混入血痕に対して本法を適用したところ、GYPA、SPTB および ACTB は OC-ヘモキャッチが陰性となった覚せい剤混入血痕では、全ての試料で検出できなかった。HBB では検出することができたが、著しい検出力の低下が認められた。

覚せい剤混入血痕においては、GYPA は検出不可となり、mRNA による人獣鑑別が困難になった。DNA は覚せい剤の影響を受けにく

いことから、DNA 型を用いたヒト証明は可能であった。そこで、OC-ヘモキャッチ検査が陰性となる覚せい剤混入血痕に対しては、HBB mRNA により血痕であることを示し、DNA 型によりヒト証明を行うことで、総合的にはヒト血痕の証明から個人識別までの一連の分析が可能であると考えられた。

### (8) まとめ

ヒト血痕の証明には、血液特異性、検出感度の点では HBB、人獣鑑別の点では GYPA が有効であると考えられた。一方、SPTB は血液特異性や種特異性など様々な面で、GYPA や HBB に劣っていた。従って、GYPA および HBB を指標とするヒト血痕証明法は正常な血痕資料に対しては適用可能と考えられた。さらに、覚せい剤混入血痕に対しては、HBB のみ検出可能であり、GYPA による人獣鑑別が困難であった。mRNA を用いたヒト血痕の証明法を覚せい剤混入血痕に応用するには、DNA 型との併用によりヒト証明を行うことで、ヒト血痕の証明から個人識別までの一連の分析が可能であると考えられた。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Evaluation of an mRNA expression analysis method to identify human blood in samples not amenable to immunochromatography.

S. Matsumura, A. Matsusue, B. Waters, M. Kashiwagi, K. Hara, S. Kubo

9<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Legal Medicine, 2014/6/16-20, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan

〔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：  
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

久保 真一 (KUBO, Shin-ichi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：10205122

(2)研究分担者

松末 綾 (MATSUSUE, Aya)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70309920

(3)連携研究者

( )

研究者番号：