

氏名	まつむら しゅうさく 松村 秀策		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	乙第 1738 号		
学位授与の日付	平成 30 年 10 月 4 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当（論文博士）		
学位論文題目	Application of mRNA Expression Analysis to Human Blood Identification in Degenerated Samples that were False-negative by Immunochromatography （イムノクロマトグラフィー法で偽陰性を呈する変性試料のヒト血液証明に対する mRNA 発現解析の応用）		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	安永 晋一郎
	（副査） 福岡大学	教授	白澤 専二
	福岡大学	准教授	大久保 久美子

## 内 容 の 要 旨

### 【目的】

ヒト血痕は犯罪現場に頻繁に遺留され、多くの犯罪捜査で重要な証拠となっている。ヒト血痕の証明には、通常、簡便迅速なイムノクロマトグラフィー（ICG）が用いられている。法科学鑑定においては、メタンフェタミン（MA）が混入することで、血痕が水に不溶となり、ICG で偽陰性を示すために、ヒト血痕証明ができないという事例にしばしば遭遇する。したがって、ICG を適用できない血痕を検査するためには、抗原抗体反応の代替的な検査手法が必要である。

体液特異的な mRNA の発現解析は近年体液種特定の有力な手法として報告されている。我々は real-time RT-PCR を用いた新たなヒト血痕証明法の開発のため、血液で高発現している遺伝子に由来する mRNA に着目した。本研究では、血液特異性や検出感度だけでなく、法科学鑑定に応用可能かを調べるため、種特異性、様々な環境条件や薬物等の mRNA 発現解析への影響について検討した。

### 【対象と方法】

#### (1) 実験試料

ヒトの体液試料として、血液、唾液、尿および精液を使用した。

陳旧試料として、室温で 3 から 37 年間保存したヒト血痕を使用した。

動物試料として、霊長類 6 種（オランウータン、ニホンザル他 4 種）、非霊長類 6 種の

血液を使用した。

## (2) real-time PCRによる遺伝子の検出

試料から RNA を抽出した後、逆転写反応を行い、cDNA を調製した。標的遺伝子として、赤血球マーカーの glycophorin A (GYPA)、spectrin beta (SPTB)、hemoglobin beta (HBB) を選定した。また、CD3 gamma (CD3G) を白血球マーカーとして使用した。リファレンス遺伝子として、actin beta (ACTB) を使用した。遺伝子の検出には real-time PCR を使用し、TaqMan (TM) 法と SYBR GREEN (SG) 法の 2 種類の検出法を実施した。標的遺伝子の Ct 値の cut-off 値は 38-40 とした。異なる体液種や動物種での比較には、delta Ct (dCt) 値 (標的遺伝子の Ct 値から ACTB の Ct 値を差し引いた値で、標的遺伝子の発現量を試料の RNA 量で補正したものを表す。) を使用した。遺伝子の発現量は、Ct 値や dCt 値が小さいほど高いとされる。

## (3) ICGによるヒト血痕証明

試料を PBS で抽出し、OC-Hemocatch (OC-H) を用いて検査した。

## 【結果】

### (1) 血液特異性

唾液と尿ではいずれの遺伝子も検出されなかった。GYPA および SPTB は全ての血液と一部の精液で検出されたが、血液試料の dCt 値は検出された精液試料の dCt 値よりも有意に小さかった。HBB は血液サンプルのみで検出された。

### (2) 種特異性

GYPA は TM 法ではオランウータン、ニホンザル他 2 種の霊長類の血液、SG 法ではオランウータンのみで検出された。SPTB は TM 法では霊長類のみ、SG 法では霊長類に加え 2 種で検出された。HBB は TM 法では全ての種、SG 法では霊長類に加え 4 種で検出された。

dCt 値を比較することで、ヒト血液と識別可能か検討した。試料がヒトの血液に由来するかもしれないとする許容範囲をヒト血液の dCt 値の「平均値±標準偏差×5」に設定した。SG 法による GYPA はオランウータンのみで検出されたが、その dCt 値は許容範囲には入らなかった。その他の遺伝子と検出法の組み合わせの許容範囲には、霊長類を中心に複数の動物種が入った。

OC-H は霊長類の血液のみ陽性を示した。

### (3) 検出感度

GYPA は 1・L までの血痕では全ての検体で検出可能であった。SPTB は TM 法では 1・L、SG 法では 10・L で全て、1・L で一部の検体で検出された。HBB は 0.01・L までは全て、0.001・L では一部の検体で検出された。

OC-H の検出限界は 0.1・L であった。

### (4) 陳旧血痕

GYPA と SPTB は 3 年保存血痕のみで検出可能であった。HBB は TM 法では 6 年以内と 24 年保存血痕で、SG 法では 37 年保存血痕を含む全ての血痕で検出可能であった。

#### (5) 覚せい剤の影響

OC-H 陰性の MA 混入血痕では、GYPA、SPTB、ACTB は検出されなかった。HBB はほぼ全ての試料から検出可能であったが、正常 (MA 非混入) 血痕に比べて Ct 値が 10 程度上昇した。検出力低下への血液成分の関与を調べるため、正常血痕から抽出した RNA を 2 つに分け、一方に MA を加えた後、双方とも RNA を再抽出し、HBB を検出したところ、MA 添加の有無で Ct 値に有意な差はなかった。

mRNA と DNA で MA による影響に差があるかを調べるために、MA 混入血痕から DNA を抽出し、real-time PCR による定量を行った。高濃度の MA 混入血痕は正常血痕に比べ、有意に Ct 値が大きかったものの、その差は 3 程度であった。血液の DNA は白血球に存在していることから、白血球マーカーであれば検出可能と考えられたが、CD3G は MA 混入血痕では検出されなかった。

### 【結論】

#### (1) 血液特異性

GYPA と SPTB は血液と精液で検出されたが、dCt 値を用いることで両者は識別可能と考えられた。hemoglobin A (HBA) は唾液、膿液、精液と交差すると報告されているが、これは歯肉等からの出血により血液が存在していたためと考えられ、HBB も同様に他の体液から検出される可能性はある。

#### (2) 種特異性

SG 法による GYPA はオランウータンのみで検出され、最も有効なマーカーであった。また、dCt 値の比較により、ヒトとオランウータンの識別は可能と考えられた。ニホンザルの SG 法による SPTB と HBB の dCt 値はヒトと比較して著しく小さかった。日本ではニホンザルによる傷害事件等がしばしば発生しており、本法はニホンザルが関与した事件事故における血液証明に有効と考えられた。本法はヒトとその他の霊長類の血液を識別可能であり、従来法よりも優れていた。

#### (3) 検出感度

HBB は 0.001 ・ L の血痕から検出可能であり、HBB のみが従来法よりも優れていた。

#### (4) 陳旧化の影響

HBB は陳旧血痕に対する優秀なマーカーであると考えられた。一方、GYPA と SPTB は陳旧試料には適用困難であった。

#### (5) 覚せい剤の影響

HBB は MA 混入血痕においても、ほぼ全ての試料で検出可能であったが、著しい検出力低下が認められ、これには血液成分の関与が示唆された。

DNA は mRNA よりも MA の影響を受けにくいと考えられた。これは、核膜による保護や水酸基の有無による安定性が影響しているのかもしれない。

CD3G は MA 混入血痕では検出されなかったことから、MA は血液の細胞の種類に関わらず mRNA を変性させていると考えられた。

MA 混入血痕では GYPA を用いた人獣鑑別は困難であるが、ヒト特異的な DNA 配列を用いた人獣鑑別は可能と考えられた。したがって、HBB mRNA と DNA を用いたヒト血痕証明が、MA 混入血痕に対して有効と考えられた。

以上のことから、HBB と GYPA を用いたヒト血液証明法は、犯罪現場に遺留された血痕に対しても応用可能と考えられた。

### 審査の結果の要旨

ヒト血痕は犯罪現場に頻繁に遺留され、多くの犯罪捜査で重要な証拠となっている。ヒト血痕の証明には、通常、簡便迅速なイムノクロマトグラフィー (ICG) 法が用いられている。

法科学鑑定においては、メタンフェタミン (MA) が混入することで、血痕が水に不溶となり、ICG 法で偽陰性を示すために、ヒト血痕証明ができないという事例にしばしば遭遇する。したがって、ICG 法を適用できない血痕を検査するためには、抗原抗体反応の代替的な検査手法が必要である。

本論文では、real-time RT-PCR を用いる新たなヒト血痕証明法の開発のため、血球細胞で高発現している遺伝子に由来する mRNA に着目した。標的遺伝子として、赤血球マーカーの glycophorin A (*GYPA*)、spectrin beta (*SPTB*)、hemoglobin beta (*HBB*) を選定した。リファレンス遺伝子として、actin beta (*ACTB*) を使用した。遺伝子の検出には real-time PCR を使用し、TaqMan (TM) 法と SYBR GREEN (SG) 法の 2 種類の検出法を実施した。

血液特異性や検出感度だけでなく、法科学鑑定に応用可能かを調べるため、種特異性、様々な環境条件や薬物等のコンタミナントの mRNA 発現への影響について検討した。

血液特異性については、*GYPA* と *SPTB* は血液と精液で検出されたが、dCt 値を用いることで両者は識別可能と考えられた。種特異性については、SG 法による *GYPA* はヒトとオランウータンのみで検出され、dCt 値の比較により、ヒトとオランウータンの識別も可能であることが示され、最も有効なマーカーであると考えられた。一方、ニホンザルの SG 法による *SPTB* と *HBB* の dCt 値はヒトと比較して著しく小さかった。本法はヒトとその他の霊長類の血液の識別において、従来法よりも優れていることが明らかになった。

検出感度は、*HBB* は 0.001  $\mu$ L の血痕から検出可能であり、従来の ICG 法よりも優れていた。また *HBB* は 37 年経過した陳旧血痕でも検出可能であった。一方、*HBB* は MA 混入血痕においても、ほぼ全ての試料で検出可能であったが、著しい検出力低下が認められた (MA の DNA に対する影響は小さかった)。従って *HBB* mRNA と DNA を用いたヒト血痕証明が、

MA 混入血痕に対して有効と考えられた。

以上のことから、*HBB* と *GYP A* の real-time PCR を用いたヒト血液証明法は、犯罪現場に遺留された血痕に対しても応用可能と結論している。

#### 1. 斬新さ

本研究は、血球細胞で高発現している遺伝子に由来する mRNA を指標とした、real-time RT-PCR を用いた新たなヒト血痕証明法の開発に取り組んだ挑戦的な研究である。この検査法は、従来の ICG 法より検出感度が高く、ICG 法による血痕検査に代わり得る斬新な検査法である。

#### 2. 重要性

血痕証明法は、犯罪捜査において極めて重要である。この研究で確立された検査法は、現在主流となっている ICG 法で検出できない血痕からも検出できる検査法であり、ICG 法を補完するという点において重要である。

#### 3. 研究方法の正確性

本研究は、TM 法と SG 法の二種類の検出法で、real-time RT-PCR 解析を行っている。標的遺伝子も *GYP A*、*SPT B*、*HBB* の 3 種について調べている。結果の評価も、Ct 値や dCt 値の両者で行っている。また統計解析も適切に行われており、研究方法の正確性に対して疑う余地はない。

#### 4. 表現の明瞭性

論文は、研究結果を表や図を用い分かり易く表現されている。また発表においては、さらに分かり易く図解して説明した。表現の明瞭性は、十分確保されている。

#### 5. 質疑応答

Q1

TM 法について説明して下さい。

A1

5' 末端を蛍光物質で、3' 末端をクエンチャー物質で修飾したプローブを PCR 反応系に加える方法です。プローブは、アニーリングの際に鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズしますが、プローブ上にクエンチャーが存在するため、励起光を照射しても、蛍光の発生は抑制されます。伸長反応の際に、DNA ポリメラーゼのもつヌクレアーゼ活性により、鋳型にハイブリダイズしたプローブが分解されると、蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチャーによる抑制が解除されて蛍光が発せられます。

Q2

TM 法と SG 法を併用した理由について説明して下さい。

A2

TM 法は遺伝子検出の特異性が高いですが、プライマーおよびプローブの塩基配列は公開されていません。したがって、メーカーが販売を中止すれば、以後検査に使用することができません。一方、SG 法は TM 法と比較すると特異性が劣る可能性はありますが、融解曲線分析による増幅産物の確認が可能です。このように、両者は相互に欠点を補完しあうような関係にありますので、2つの検出法を使用しました。

Q3

*HBB* の mRNA が、成熟赤血球の中で、intact で残っているのか、ある程度分解されているのか、調べていますか？

A3

調べておりません。

Q4

検出効率を上げるためには、それぞれの遺伝子の gene specific primer を使用して、逆転写すべきではないのですか？

A4

ご指摘のとおりと存じます。今回は、様々な遺伝子を検出するために、オリゴ dT およびランダムプライマーを使用いたしました。

Q5

ヒト用にデザインされた real-time RT-PCR のニホンザルの Ct 値がヒトの Ct 値よりも低い、すなわちニホンザルの方がヒトよりも DNA 増幅が良いという奇妙な結果が出ています。ヒトとニホンザルを区別可能な、ヒト特異性の高いプライマーを用意すべきではないですか？各種霊長類の遺伝子配列をアラインして、どの部位を解析したのかを示すべきではないですか？

A5

遺伝子配列のアラインメントを行い、より特異的なプライマーをデザインするように努力いたします。

Q6

種特性については DNA で調べれば良いのではないかと？

A6

できるとは思いますが、今回は行っておりません。

Q7

カットオフ値設定の根拠は何ですか？

A7

RNA 量と Ct を用いて検量線を作り、直線性が保たれている Ct の上限をカットオフ値としました。Ct が 40 を超えると、非特異性増幅との区別が困難となるため、カットオフ値の最大は 40 としました。

Q8

メタンフェタミンに結合している塩酸によって RNA が抽出できなくなる可能性を指摘されましたが、実際に塩酸を加えた実験はされましたか？

A8

実施しておりません。

Q9

*CD3G* を実験に使用した根拠は何ですか？

A9

*CD3G* は白血球のマーカーとして使用しました。DNA は mRNA よりも影響を受けにくいことから、白血球内に存在すると考えられる mRNA であれば、検出可能なのではないかと思い、実験に使用しました。しかし、覚せい剤混入血痕では検出されず、有効なマーカーとは言えませんでした。

Q10

白血球のマーカーとしてなら、より数の多い好中球のマーカーを、何故使用しなかったのですか？

A10

それには、考えが及んでいませんでした。

Q11

実際の鑑定資料の覚せい剤濃度はどのくらいですか？逆に言うと、この実験に使用した覚せい剤濃度は、どの程度の濃度なのですか？

A11

鑑定資料の血痕について、覚せい剤濃度を定量したことはないのですが、正確な濃度は把握しておりません。ただし、私の経験としては、125  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  では、ヘモキャッチ (ICG 法) は依然陽性反応を示しましたし、500  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  では溶解させることが困難でした。また、他の研究者は 200 や 300  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の覚せい剤混入血痕でヘモキャッチが陰性化したと報告しております。したがって、実際の資料については、200 から 500  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  程度なのではないかと推察されます。

Q12

実際の鑑定においては、物体証明のための RNA だけでなく、個人識別用の DNA も必要

と考えられますが、それぞれどの程度の検体量が必要ですか？

A12

RNAについては、5 $\mu$ lは確保したいと考えます。DNAについては、その半分から1/10程度でも差し支えないと考えます。

Q13

物体証明のために、試料を使いすぎる、という事態にはなりませんか？

A13

その可能性はあります。DNA・RNA同時抽出キットを用いて、使用する鑑定資料を可能な限り少なくする等の対策が必要と考えております。

Q14

論文の方からの質問ですが、DNAに対する洗剤等の影響については、検討しましたか？

A14

検討しておりませんし、そのような報告についても承知しておりません。ただし、洗剤に暴露されている可能性の高いシンクやトイレ等から採取された血痕からDNAが回収しにくいという印象を持ったことはありません。

Q15

*HBB*が良いのは発現量が多いからですか？

A15

そのように考えております。

Q16

他の論文でも *HBB* が多く使われているのですか？

A16

*HBB* が最も多く使われていると思います。 *SPTB* やヘモグロビン  $\alpha$  (*HBA*) を使用した論文も散見されます。

Q17

この論文が従来の論文よりも「新しい」点はどこですか？

A17

実際の鑑定資料が曝されているようなシビアな環境下でも、mRNAの発現解析は有効であることを示している点、霊長類を含む様々な動物種について検討している点であると考えています。



本論文は、血液で高発現している遺伝子に由来する mRNA を指標とした、real-time RT-PCR を用いた新たなヒト血痕証明法の開発に取り組んだものである。現在主流となっている血痕証明法である ICG 法で検出できない血痕からも証明できる方法であり、学位論文に値すると評価された。