

神奈川歯科大学大学院歯学研究科  
2019年度 博士論文

指紋付着体の種類が DNA 鑑定に及ぼす影響に関する研究

2020年2月28日

藤田 紗英子

Saeko Fujita

神奈川歯科大学大学院歯学研究科  
災害医療歯科学講座

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2019年度 博士論文

指紋付着体の種類がDNA鑑定に及ぼす影響に関する研究

2020年2月28日

藤田 紗英子

Saeko Fujita

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

災害医療歯科学講座

山田良広教授 指導

## 論文内容要旨

我々は法医 DNA 鑑定実務において、付着体に付着した細胞から DNA を抽出分析する鑑定を数多く経験している。警察から鑑定嘱託される試料は、衣服など付着体試料そのものが持ち込まれる場合や鑑識が現場試料表面の細胞を拭った綿棒として持ち込まれる場合がある。

警察の鑑定機関には、日本に唯一の科学警察研究所（科警研）あるいは都道府県警察本部附属の科学捜査研究所（科捜研）がある。通常、犯罪捜査に関わる鑑定試料は、これらの機関に持ち込まれて分析される。しかし、科警研及び警視庁科捜研以外ではミトコンドリア DNA（mtDNA）分析が実施されていない。従って、核 DNA 分析が困難な現場試料においては、mtDNA 分析を実施している機関に嘱託されるのが実情である。我々の DNA 鑑定実務は、警察の鑑定機関（科学警察研究所あるいは都道府県警察本部附属の科学捜査研究所）で分析が困難である mtDNA 分析が中心である。mtDNA は、細胞に存在する小器官であるミトコンドリア内に含まれる環状二重鎖構造の DNA で、細胞に 1 つのみ存在する核 DNA と比較して細胞 1 個中に数千個存在することから、微量試料からでも PCR 法による鑑定が可能であることが報告されている。しかし、実際には多くの鑑定で試料によって増幅効率に著しい違いが認められることを経験している。その

原因として、鑑定に供される付着体からの細胞採取の効率や付着体の種類による細胞の付着状態が mtDNA の PCR 増幅に大きな影響を及ぼすと考えられる。そこで、我々が扱った DNA 鑑定の際に提供された過去 5 年分の付着体材質の種類を調べ、4 種類の付着体（金属板、プラスチック板、コピー用紙、滅菌ガーゼ）に既知濃度 DNA を付着させ、1 時間後に抽出した DNA を用いて分析を行った。既知濃度 DNA の採取法として、綿棒による拭取り法と細胞付着部を切り取る細断法について比較した。金属板とプラスチック板は、拭取り法で DNA 増幅が可能であったが、コピー用紙と滅菌ガーゼは増幅困難であった。一方で、細断法ではコピー用紙と滅菌ガーゼで増幅に必要な DNA 量を得ることが可能であった。

既知濃度 DNA の実験結果から、コピー用紙と滅菌ガーゼは細断法による採取法が有効だと考えられたことから、被験者の指紋を付着させ 4 種類の付着体から綿棒による拭取り法で DNA 抽出を行い、コピー用紙と滅菌ガーゼは、細断法も用いて DNA 抽出を行った。その結果から、指紋を付着させた場合では、金属板とプラスチック板で拭取り法から DNA を回収でき、コピー用紙と滅菌ガーゼでは、細断法の方が拭取り法よりも DNA 回収率が高いことが判明した。

以上の結果から、付着体の表面性状が平坦で均一なものは付着体に細胞がとどまりやすく綿棒による拭取り法で分析可能な DNA を採取できることが考えら

れた。一方、付着体の表面性状が均一ではなく凹凸部があるものは、綿棒による拭取り法では分析に十分な量の DNA を採取することは困難であった。細断法を用いることで分析可能な DNA を回収出来ることが明らかになった。

上記のことから、表皮細胞（指紋）からの DNA 分析は、細胞量（DNA 量）が微量なため、鑑定試料の付着体に最適な細胞採取法を用いることで DNA 鑑定の成功率を上げることが示唆された。

## 論文審査要旨

学位論文である「指紋付着体の種類が DNA 鑑定に及ぼす影響に関する研究」は、法医学の DNA 鑑定に供される付着体からの細胞採取の効率と付着体の違いによるミトコンドリア DNA (mtDNA) の PCR 増幅への影響を検討した論文である。

本学災害医療・社会歯科学講座では、長年 DNA 鑑定実務を行っている。警察から鑑定嘱託される試料には様々な種類があり、警察が現場試料から綿棒などで拭ったものや付着体が直接持ち込まれる。これまでの鑑定経験から、試料の状態によって DNA 増幅に著しい違いがあり、鑑定に供される付着体からの細胞採取の効率や付着体の種類による細胞の付着条件が DNA 増幅結果に大きな影響を及ぼしていることが考えられ、本論文において実証しようとする研究目的は高く評価できる。

過去 5 年間の鑑定付着体の材質を調べた結果、全鑑定 405 試料中、布類 199 試料 (49.1%)、プラスチック類 91 試料 (22.5%)、金属類 58 試料 (14.3%)、紙類 45 試料 (11.1%)、木類 8 試料 (2.0%) とガラス類 4 試料 (1.0%) であった。

DNA 鑑定を嘱託された鑑定試料 405 個中、mtDNA 分析は 306 例 (75.6%)、STR (Short Tandem Repeat) 分析は 69 例 (17.0%) で解析可能であった。分析結果を比較したところ、mtDNA 分析は STR 分析に比べて分析率が約 4.5 倍高

いことが判明した。この STR 分析は、遺伝子の特定領域（遺伝子座）中において数塩基～10 塩基未満の短い DNA の繰り返し領域の「反復数」を利用して、個人識別に関わる核 DNA 分析で得られる情報をもとに確率計算を行って、個人を特定することができるものである。本研究で、STR 分析よりも 4 倍以上の解析率を示した mtDNA 分析は、DNA 鑑定の鑑別において有用であり、意義ある研究である。

警察から鑑定嘱託される試料の多い、金属類、プラスチック類、紙類、布類の材質を選択し、実験的に既知濃度の DNA を付着させたものと手指の表皮細胞（指紋）を付着させたものを使用して、付着体の適切な DNA 採取方法を検討している。その結果、金属板・プラスチック板は、拭取り法において鑑定が可能な量までの DNA 増幅が可能であったが、コピー用紙・滅菌ガーゼは増幅困難であった。さらに、コピー用紙・滅菌ガーゼを細断した場合について検討したところ、裁断法を用いることで、増幅に必要な DNA 量を回収し、DNA 鑑定が可能であることが判明した。次に、実際の鑑定物を想定し、付着体に手指を圧接させた付着体の種類による DNA 回収量について検討を行っている。その結果、手指の表皮細胞を付着させた場合においても、金属板・プラスチック板は拭取り法が有効であり、コピー用紙や滅菌ガーゼでは、細断法を用いることにより、鑑定可能な量までの DNA が回収できたことが明らかにされている。統計分析は、検定方法

を含めて、適切に行われており、実験結果の適切な検討方法が確認された。また、本学研究倫理審査委員会の許可を得て実施されている点も確認された。

以上の結果から、付着体の表面性状が平坦で均一なものでは、付着体に細胞が付着して綿棒による拭取り法で分析可能な DNA を採取できることが示された。一方、付着体の表面性状が均一でないコピー用紙や滅菌ガーゼでは、綿棒による拭取り法では分析に必要な DNA 量を採取することが困難であり、細断法を用いることで分析可能な DNA を採取することが可能であることが示唆された。本研究により、指紋の付着した検体の DNA 鑑定において付着体の適切な DNA 抽出方法を選択することにより、精度の高い DNA 鑑定が行われるものと考えられる。研究テーマに対する研究方法の組み立ては論理的であり、適切な解析方法により実験が行われたと考えられる。

本審査委員会は、論文内容および関連事項に関して、口頭試問を行ったところ十分な回答が得られることを確認した。さらに DNA 鑑定における新しい知見は、今後の法医学領域への貢献が期待でき、DNA 鑑定の発展につながるもの結論に至った。そこで、本審査委員会は申請者の博士論文が博士（歯学）の学位に十分に値するものと認めた。

本審査委員会は申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

2020年2月28日

主 査：浜田信城

副 査：木本茂成

副 査：山本龍生

## 目次

緒言	1
実験材料（対象）および方法	3
結果	9
考察	11
結論	14
謝辞	14
文献	15
表および図	
図 1	20
図 2	21
図 3	22
図 4	23
表 1	24
表 2	25
表 3	26

## 緒 言

我々は、法医 DNA 鑑定実務において、付着体に付着した細胞から DNA を抽出分析する鑑定を数多く経験している。警察から鑑定を囑託される試料には様々な種類があり<sup>1)</sup>、警察が現場で試料から細胞を綿棒などで拭った物を持ち込む場合や、付着体試料がそのまま持ち込まれる場合もある<sup>2-7)</sup>。

DNA 鑑定は通常、最初に核 DNA を用いて分析する。すなわち、個人識別に関わる核 DNA 分析では、23 対の常染色体および性染色体の 16 箇所の情報を得ることができ、その情報をもとに確率計算を行い、非常に高い確率で個人を特定することができる<sup>8,9)</sup>。しかし、核 DNA 分析を実施するためには、ある一定量の DNA が必要となるため、犯罪現場に残された試料から分析に十分な量の核 DNA を抽出できず、その結果、核 DNA 分析を遂行できないことがある。なぜなら、現場試料の保存状態は様々であり、特に土中の試料や水中の試料の場合、DNA が加水分解を受け、あるいは低分子化するため、それらからは非常に微量の DNA しか採取できないためである<sup>10)</sup>。一方、mtDNA は細胞に存在する小器官であるミトコンドリア内に含まれる環状二重鎖構造 DNA である。細胞核内に 1 個しか存在しない核 DNA と異なり、細胞 1 個内に数千個存在する。従って、現場試料が劣化や低分子化の影響を受けていても、それらから抽出された mtDNA の polymerase chain reaction (PCR) により鑑定が可能であることが報

告されている<sup>11-13)</sup>。実際に、警察から嘱託された鑑定物の試料からの核 DNA 分析と mtDNA 分析を比較してみると、mtDNA 分析のみ可能である現場試料が非常に多い。mtDNA 分析は、塩基配列多型を検出したのち型判定を行う。mtDNA の D-loop 領域の約 1,000 塩基の配列をダイレクトシーケンス法により決定する<sup>14)</sup>。そして、基準配列との比較を行い、多型性を分析判定するものである。

警察の鑑定機関には、日本に唯一の科学警察研究所（科警研）あるいは都道府県警察本部附属の科学捜査研究所（科捜研）があり、通常、犯罪捜査に関わる鑑定試料はこれらの機関に持ち込まれて分析される。しかし、科警研及び警視庁科捜研以外ではミトコンドリア DNA（mtDNA）分析が実施されていない。従って、核 DNA 分析が困難な現場試料の場合、mtDNA 分析を実施している機関に嘱託されるのが実情である。

我々は現場試料からの DNA 鑑定の際、試料によっては DNA 増幅に著しい違いがあることを経験している<sup>15)</sup>。その原因として、鑑定に供される付着体からの細胞採取の効率や付着体の種類による細胞の付着状況が DNA 増幅結果に大きな影響を及ぼしていることが考えられる。

そこで、我々が過去 5 年間に鑑定を行った付着体の材質の種類を調べ、それらの中で多く持ち込まれた金属類、プラスチック類、紙類、布類の材質を選択し、実験的に付着体からの細胞採取の効率と付着体の違いによる DNA 鑑定の分析

法の有効性を明らかにするため、実験的に既知濃度の DNA と指の表皮細胞（指先の腹部分）を付着させた付着体の適切な採取方法について検討した。

## 実験材料（対象）および方法

### 1. 警察から鑑定を委嘱された付着体の材質の種類、分析方法および鑑定分析率

過去 5 年間（2013～2018 年度）に警察から鑑定を嘱託された付着体の材質の種類、分析方法および鑑定分析率（以下、分析率）を調べた。分析方法は、mtDNA による方法と核 DNA を用いた Short Tandem Repeat（STR）による方法の両方について調べ、分析率を計算した。分析率の計算は、分析できた試料数を扱った試料数で除して、100 を乗じた % で表した。

### 2. 試料

既知濃度 DNA 溶液または表皮細胞を付着させる付着体の材質の種類として、鑑定試料数の多いものを想定し、布類として滅菌ガーゼ（G）（滅菌ケーパイン、川本産業、東京）、プラスチック類としてペットボトルのプラスチック板（P）（緑茶、ローソン、東京）、金属類として鉄製の菓子箱の金属板（M）（シガール蓋、（株）ヨックモック、東京）、紙類としてコピー用紙（C）（山崎文栄堂、東京）の 4 種類を用いた。P、M および C は、表面の付着物を可及的に消毒用ア

ルコールで除去後、乾燥させた。

各付着体に 2 ng/ $\mu$ l 濃度の既知濃度 DNA 溶液 17  $\mu$ l (34 ng) を滴下して、既知濃度 DNA 試料を作製した。1 ml チップの一滴分を計量したところ 17  $\mu$ l であったため、規格化を目的として、この方法で行った。

成人ボランティア 8 名 (男性 4 名、女性 4 名、年齢 32 ~ 66 歳) の、滅菌蒸留水で湿らせた手指指紋部を、縦 2 cm  $\times$  横 2 cm 正方形区画を油性ペンで記した各付着体にまんべんなく押し当てて、指紋サンプル試料を作製した。

試料採取は、付着体表面の区画範囲を滅菌綿棒 (抗菌綿棒、サンリツ、岐阜) で 1 方向に拭取って細胞を採取する方法 (拭取り法: 全 4 種類の付着体) と、区画部分をアルコール消毒したハサミで細断して抽出する細断法 (G と C のみ) を用いた。既知濃度 DNA は滴下後、指紋サンプル試料は指紋押捺後に、それぞれ約 1 時間経過後、乾燥状態を確認して採取した。

本研究の計画書は、神奈川歯科大学研究倫理審査委員会の承認を得た (倫理審査承認番号第 512 番)。

## 2. 細胞採取と DNA 抽出

### 1) 拭取り法による DNA 抽出

DNA の精製と抽出はキット添付のマニュアルに従い行った。QIAamp DNA

Mini Kit (QIAGEN Science, Hilden, Germany) 付属の DNA 抽出用緩衝液で湿らせた滅菌綿棒で細胞付着部位を 1 回拭って細胞を採取した。綿棒の細胞付着部を切断、1.5 ml 滅菌チューブに入れ、ATL 緩衝液 300  $\mu$ l とプロテナーース K (QIAGEN Science) 10  $\mu$ l、さらに細胞の角化を考慮して DTT (和光純薬) を 5  $\mu$ l 加え、56°C で 30 分間保温した。さらにスピンドウン後 300  $\mu$ l の AL 緩衝液を加えて攪拌し、70°C、10 分間保温することで細胞を溶解した。即ち、溶解液を 14,000 rpm で 1 分間遠心後上清をキット付属のミニスピнкаラムに入れ 8,000 rpm で 1 分間遠心し、カラムのメンブレンに DNA を吸着させた。続いて、AW1 緩衝液と AW2 緩衝液を加え、それぞれ 8,000 rpm で 1 分間遠心操作によりメンブレンに吸着された DNA を精製した。最後に、14,000 rpm で 1 分間の遠心によりメンブレンを乾燥させた。その後、カラムに 20  $\mu$ l の DNA 溶出緩衝液 AE を加え 10 分間放置後、14,000 rpm で 1 分間遠心して DNA 溶液を得た。なお、DNA は、核 DNA と mtDNA が混在した状態で抽出精製した。

## 2) 細断法による DNA 抽出

アルコール消毒したハサミを用いて、G と C から指紋付着部を切り抜いて、約 0.4 mm 角に細断し、拭取り法と同様に DNA を抽出・精製した。

### 3. PCR 増幅および mtDNA 増幅測定

#### 1) ミトコンドリア DNA 増幅

mtDNA の D-loop に存在する Hyper Variable Region (HVR) 1 領域を GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を用いて PCR 増幅した<sup>16-18)</sup>。用いたプライマー配列は、Forward: 5'-CACCCAAAGCTAAGATTCTA-3' と Reverse: 5'-ATGGGCCCGGAGCGAG-3' であり、増幅条件は、PCR 混液 24  $\mu$ l (Go Taq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega, Madison, USA)) 12.5  $\mu$ l、滅菌蒸留水 11  $\mu$ l、プライマー各 0.5  $\mu$ M) 中に試料 DNA を各 1  $\mu$ l 加え、94°C 2 分間予備加熱後、94°C で 1 分、55°C で 45 秒、72°C で 45 秒のサイクルで 40 回繰り返した後、72°C で 3 分間の伸長反応を行い、最後に 4°C で保存した。

#### 2) 核 DNA の STR 増幅

核 DNA の増幅は、専用の分析キット (AmpFlSTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific)) を用いて行った。プライマーはキット付属のものを使用し、付着体から抽出した DNA 溶液 4  $\mu$ l を、95°C で 11 分、94°C で 20 秒、59°C で 3 分、60°C で 10 分のサイクルの増幅を 28 回繰り返し、最後に 4°C で保存した。

### 3) mtDNA の濃度測定

PCR 増幅後、増幅産物各 2  $\mu$ l を既知濃度の DNA サイズマーカー (100 bp DNA Ladder、タカラバイオ、京都) と共に 2% アガロースゲル (Agarose S、Nippon Gene、東京) を用いて 100V、25 分間の電気泳動後 (Mupid-2plus、Advance、東京)、エチジウムブロマイド溶液 (和光純薬) で染色後、E-Graph (ATTO、東京) を用い紫外線照射下で増幅を確認した。さらに、電気泳動画像をコンピューターに取り込み、Image J (NIH、Bethesda、USA) を用いて各増幅産物の面積の積分値から 100 bp DNA Ladder の濃度を基準にそれぞれの濃度を計算した。

なお、mtDNA 鑑定のダイレクトシーケンスでは PCR 増幅産物 20 ng を使用するため、PCR 増幅濃度 3.3 ng/ $\mu$ l 以下の試料についてはダイレクトシーケンスの対象から外した。

### 4. 核 DNA の STR と型判定

PCR 増幅産物をキット添付のマニュアルに従って処理した後、ABI Prism 3130XL (Thermo Fisher Scientific) でキャピラリー電気泳動分析、Gene Mapper ID (Thermo Fisher Scientific) でキット付属のアレリックラダーを指標に解析

判定した<sup>19-22)</sup>。型判定は、RFUが50以上のピークについて行った<sup>23)</sup>。STR型判定結果の情報を既知濃度DNAと被験者8名の指紋のローカス(遺伝子型)と照らし合わせて、検出したアリルを数えた。それぞれの付着体で検出したアリル数を総アリル数(既知濃度DNA=1,116、指紋=1,488)で除して100を乗じ、検出率(%)を算出した<sup>24,25)</sup>。

## 5. 統計分析

警察から囑託された試料において、付着体の種類ごとに、mtDNAとSTRにおける分析率を算出した。そして全試料におけるmtDNAとSTRにおける分析率の比較を $\chi^2$ 検定で検討した。

既知濃度DNAにおけるPCR増幅濃度の比較では、まず拭取り法における4種類の付着体のDNA量をKruskal-Wallis検定で検討後、2群の比較をBonferroniの補正を行ったMann-Whitney *U*検定(有意水準:  $0.05/6 = 0.0083$ )で検討した。さらに、CとGにおける拭取り法と細断法の比較を、それぞれMann-Whitney *U*検定で検討した。指紋サンプルにおける付着体の比較についても、既知濃度DNAと同様に行った。

統計分析にはSPSS Statistics 23 (IBM Co., New York, USA) および EZR version 1.36 (自治医科大学附属さいたま医療センター、さいたま)<sup>26)</sup>を用いた。

有意水準は、Bonferroni の補正を行った Mann-Whitney *U* 検定を除いて、5% とした。

## 結 果

### 1. 警察から鑑定を囑託された付着体の材質の種類と鑑定の分析率

全試料中、付着体の材質で最も多かったのは布類で 49.1%、次いでプラスチック類 (22.5%)、金属類 (14.3%)、紙類 (11.1%) の順であった (表 1)。

DNA 鑑定を囑託された 405 試料中、mtDNA 分析は 306 例 (75.6%)、STR 分析は 69 例 (17.0%) で可能であり、mtDNA は STR 分析に比べて分析率が約 4.5 倍、有意 ( $P < 0.01$ ) に高いことが判明した (表 1)。

分析率は、木材類、布類、紙類、プラスチック類、金属類、ガラス類の順に高かった。一方、核 DNA の分析率は、ガラス類、木材類、布類、紙類、プラスチック類、金属類の順であった。

### 2. mtDNA 分析結果

#### 1) 既知濃度 DNA を用いた分析

拭取り法では、M と P では、mtDNA 鑑定に必要な DNA 量 (3.3 ng/μl) を採取できたが、C と G からは DNA の採取は困難であった (図 1)。拭取り法に

における mtDNA の PCR 増幅濃度は 4 種類の付着体の間に有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められた。2 群間の比較では M-P、M-C、M-G、P-C、P-G、C-G において有意差 ( $P < 0.0083$ ) は認められなかった。

細断法と拭取り法の比較では、C では有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められたが、G では有意差は認められなかった (図 2)。

既知濃度 DNA を用いた STR 分析の検出率は、拭取り法では P、M、C、G の順に高かった (表 2)。一方、細断法による C、G においては G の分析率が高い傾向にあった。

## 2) 指紋サンプルを用いた分析結果

拭取り法では M、P、C、G は全て DNA 鑑定が可能な量まで DNA が得られたが、DNA 濃度は M、P、C、G の順に高かった (図 3)。4 群間には有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められ、2 群間の比較では M-P、M-C、M-G、P-C、P-G、C-G において有意差 ( $P < 0.0083$ ) は認められなかった (図 3)。

拭取り法と細断法のいずれにおいても C と G の付着体試料の mtDNA 鑑定の PCR 増幅濃度は 3.3 ng/ $\mu$ l 以上であった。拭取り法と細断法の比較では、C と G のいずれも拭取り法よりも細断法で PCR 増幅濃度が高い傾向にあったが、有意差は認められなかった (図 4)。

STR 分析の検出率では、拭取りでは P、M、C、G の順に高い傾向にあった（表 3）。一方、細断法による C と G においては G の分析率が高い傾向にあった。

## 考 察

警察から過去 5 年間に囑託された DNA 鑑定で供された鑑定試料について、mtDNA の分析率が核 DNA 分析に比べて約 4.5 倍有意に高かったことから（表 1）、微量試料の分析に mtDNA 分析が有効であることが示唆された。布類の mtDNA 分析による鑑定分析率は約 90%であったが、鑑定試料の布類には衣服類が多く、肌に密着している時間が長く、指紋（表皮細胞）だけではなく血液、体液や皮膚が付着している可能性が高いことが理由として考えられた<sup>27-29)</sup>。一方、プラスチック類、金属類、紙類の mtDNA 分析率は、それぞれ 60.4%、51.7%、71.1%であり、布類と比較して分析率が低かったが、布類とは違い常に肌に密着している可能性が低いこと、鑑定数が少ないことから分析率が布類よりも低くなったと思われる。なお、鑑定試料として数は少ないが、木材に付着した試料からの mtDNA 分析率は 100%、STR 分析でも 2 番目に高かった。木材は吸湿性があるため、指紋等が付着し易く、剥がれにくいことが理由として考えられた。

警察から囑託される鑑定試料は、付着体の種類や環境などにより DNA 量や状

態が異なる<sup>30)</sup>。鑑定試料の付着体の種類に適した付着物の最適な採取法は、DNA 鑑定分析の成功率を上げる有効な手段であると考えられる<sup>31)</sup>。本研究で使用した既知濃度 DNA の実験結果より、同じ採取方法での 4 種類の付着体の拭取り法の検定では有意差が認められ、付着体の材質の違いで回収できる DNA 量に違いがあることが示唆された。M と P は通常行っている綿棒による拭取り法が有効であったが、C と G では分析に必要な DNA 量を得ることは困難であった。一方、C において細断法が拭取り法よりも有意に多く DNA 量を採取できたことから（図 2）、C は表面の凹凸部に入り込んだ細胞が拭き取りのみでは採取困難であったためと考えられた。また、細断法による G が C よりも DNA 量が少なかった理由としては、既知濃度 DNA 溶液がガーゼ内に留まり、ガーゼの成分と強く結合したり、成分による分解などが起こったりして、抽出が困難であったためと考えられる。一方、紙はガーゼよりも溶液を吸収しやすく付着体内部に溶液が留まり、抽出しやすかったために細断することによって拭取り法よりも多くの DNA を回収出来たと考えられた。

STR 分析では、既知濃度 DNA でも指紋サンプルでも検出率が低く、鑑定できるほどの DNA 量を回収することができなかったと思われる。これは、警察から鑑定を委嘱された試料における mtDNA と STR 分析の結果を矛盾しない。

指紋による実験では、既知濃度 DNA と同様、4 種類の付着体の拭取り法の検

定では有意差が認められたため、同じ採取方法でも付着体別で回収できる DNA 量に違いがあることが示唆された (図 3)。指紋の場合は付着体の材質の違いが大きいほど回収できる DNA 量に違いがあることが示唆された。細断法による G が拭取り法の G よりも DNA 量が多くなり、指紋に関しては、G は細断法による採取が有効であることが考えられた (図 4)。細断法による C と拭取り法の C は、細断法の方がより多くの DNA 量が採取できたため、C も細断法による採取が有効であることが考えられた。また、拭取り法と細断法のすべての付着体試料の PCR 増幅濃度は 3.3 ng/μl 以上であり、mtDNA 分析が可能であったことから、STR 分析よりも mtDNA 分析の方が有効であることが判明した。指紋は、溶液である既知濃度 DNA 溶液とは異なるため C と G に皮膚が表面のガーゼ繊維に留まる率が高いことが要因と考えられた。さらに指紋を押し付ける時の圧力が必要のため溶液を滴下するだけよりも多くの細胞が付着すると考えられる。

なお、既知濃度 DNA や指紋サンプルの経時変化、被験者の指圧や指の乾燥状態などの個人差、季節等の条件を考慮した詳細な実験を今後の課題と考えている。

## 結 論

表皮細胞付着体の種類における最適な採取法について検討した結果、以下の結論を得た。

1. 既知濃度の DNA 試料を用いた分析により、コピー用紙は綿棒による拭取り法よりも細断法が有効であることが明らかになった。
2. 指紋サンプルを用いた分析により、コピー用紙、滅菌ガーゼなどの表面性状が粗造な付着体は、拭取り法よりも細断法を用いることでより多くの DNA を採取できることが明らかになった。
3. 金属板、プラスチック板などの表面性状が平坦な付着体は、綿棒による拭取り法により、DNA 鑑定で有効な DNA を採取できることが明らかになった。
4. 指紋については、STR 分析よりも mtDNA 分析の方が有効であることが明らかになった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり研究の遂行にご協力頂きました神奈川歯科大学災害医療・社会歯科学講座法医歯科学山田良広教授を始め教室員の各位に心からお礼を申し上げます。

## 文 献

1. 中原弘明, 藤井宏治, 宮口一ほか: 法科学的 DNA 型検査を目的とした体液試料採取法の比較. 科警研報告. **66**(2): 65-73, 2017.
2. Shakhawan KM, Maji A, Nigel W: Advantage of forensicX swabs in retrieving and preserving biological fluids. *J Forensic Sci.* **60**(3): 686-689, 2015.
3. Robert JB, Kathryn ED, Carole EA: A comparison of DNA collection and retrieval from two swab types (cotton and nylon flocked swab) when processed using three QIAGEN extraction methods. *J Forensic Sci.* **57**(3): 713-717, 2012.
4. Christophe F, Fabrice N: Comparison of performance of genetics 4N6 FLOQswabs™ with or without surfactant to rayon swabs. *J Forensic Leg Med.* **42**(8): 96-99, 2016.
5. Timothy JV, Robert JM, Roland AH: Swabs as DNA collection devices for sampling different biological materials from different substrates. *J Forensic Sci.* **59**(4): 1080-1089, 2014.
6. Baechler S: Study of criteria influencing the success rate of DNA swabs in operational conditions: a contribution to an evidence-based approach to crime scene investigation and triage. *Forensic Sci Int Genet.* **20**(5): 130-139. 2015.
7. Hess S, Hass C: Recovery of trace DNA on clothing: a comparison of mini-

- tape lifting and three other forensic evidence collection techniques. *J Forensic Sci.* **62**(1): 187-191, 2017.
8. 中留真人, 宮地章高, 望月薫帆ほか: 海中で発見された腐乱したバラバラ死体の DNA 型解析. *DNA 多型* **13**: 194-196, 2005.
  9. 佐藤彌生, 茂谷久子, 早川睦ほか: バラバラ死体の個人識別. *DNA 多型*. **17**: 191-196, 2009.
  10. 大平寛, 山田良広, 山本伊佐夫ほか: 長期水中死体の歯牙由来ミトコンドリア DNA 分析による個人識別. *DNA 多型*. **9**: 132-134, 2001.
  11. 飯田淳一, 大平寛: 犯罪捜査の DNA 鑑定におけるクローニング法の有効性. *神奈川歯学*. **48**(1): 128-129, 2013.
  12. 高取健彦: *NEW エッセンシャル*; 5, 医歯薬出版, 東京, 387-388, 2012.
  13. 岡田薫: DNA 型鑑定による個人識別の歴史・現状・課題. *レファレンス*. **56**(1): 7-31, 2006.
  14. 山田良広, 大平寛, 山本伊佐夫ほか: スクリーニングとしてのミトコンドリア DNA ダイレクトシーケンス法の有用性. *DNA 多型*. **12**: 135-136, 2004.
  15. 小林範彦, 大平寛, 山室好生ほか: 混合試料におけるミトコンドリア DNA の検出限界の基礎研究. *神奈川歯学*. **43**(2): 97-103, 2008.
  16. 山室好生, 大平寛, 山本伊佐夫: 個人識別におけるミトコンドリア DNA

- hyper-variable region 3 の有用性の検討. 神奈川歯学. **44**(1): 48-54, 2009.
17. 大平寛, 山田良広, 山本伊佐夫ほか: Direct-sequencing 法を用いたミトコンドリア DNA, D-loop 領域 (HV1, HV2) の検討. 日法医誌 **54**: 81, 2000.
18. 大平寛, 山田良広, 西村和真ほか: 混合試料からのミトコンドリア DN 検出の評価. 犯罪学雑誌. **75**(4): 108-114, 2009.
19. 高橋雅典: 犯罪捜査と DNA 検査. 臨床病理レビュー特集号. 141: 66-70.
20. 西村和真: DNA 分析による異同識別および身元確認の識別制度向上について. 神奈川歯学. **46**(2): 194-195, 2011.
21. 福島弘文: 蛍光標識プライマーを用いた STR 多型分析. 生物物理化学. **41**: 23-27, 1997.
22. Schneidr PM, Bebder K, Mayr WR: STR analysis of artificially degraded DNA-results of a collaborative European exercise. *Forensic Sci Int.* **139**(2-3): 123-134, 2004.
23. 中木真一, 日野大樹, 中谷英樹ほか: 多座位 STR 検出キットを用いたピーク比による混合試料の STR 型判定. 鑑識科学. **7** (2): 131-138, 2003.
24. 真鍋翔, 玉木敬二: Continuous model に基づく DNA 混合試料の解析. 法科学技術. **25**(1): 1-14, 2020.
25. 友成航平, 藪田彩音, 池原愛美ほか: 個人識別を目的としたパラフィン包埋

- 組織からの DNA 抽出法の比較. 法科学技術. **23**(1), 57-69, 2018.
26. Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. **48**(3): 452-458, 2013.
27. 西英二, 田代幸寛, 酒井謙二: 犯罪捜査における DNA 鑑定によるヒトの異同識別微生物群集構造プロファイリングによる新たな法科学的手法の可能性. 化学と生物. **55**(8): 559-564, 2017.
28. 大石俊一, 大平寛, 山田良広: 残留精液中の精子 DNA の DNA 分析における耐久性の検討(衣服付着の場合衣服のクリーニング後, 体表面付着の場合入浴後について). 神奈川歯学. **48**(2): 88-103, 2013.
29. 島田亮, 多木崇, 町田光世: ひき逃げ車両の DNA 鑑定. 国際交通安全学会誌. **40**(1): 45-54, 2015.
30. Bender K, Farfan MJ, Schneidr PM: Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. *Forensic Sci Int*. **139**(2-3): 135-140. 2004.
31. 押田茂實, 鉄堅, 岩上悦子: 法医学における DNA 型鑑定の歴史. 日大医誌. **68**(5): 278-283, 2009.

## 付図説明

### 図 1

M-P、M-C、M-G、P-C、P-G、C-G の 2 群間の比較をそれぞれ Bonferroni の補正を行った Mann-Whitney  $U$  検定で行い、いずれも有意差はなかった。

### 図 2

C と CC、G と CG の比較をそれぞれ Mann-Whitney  $U$  検定で行い、C-CC のみ有意差が認められた。

### 図 3

M-P、M-C、M-G、P-C、P-G、C-G の 2 群間の比較をそれぞれ Bonferroni の補正を行った Mann-Whitney  $U$  検定で行い、いずれも有意差はなかった。

### 図 4

C と CC、G と CG の比較をそれぞれ Mann-Whitney  $U$  検定で行い、いずれも有意差はなかった。

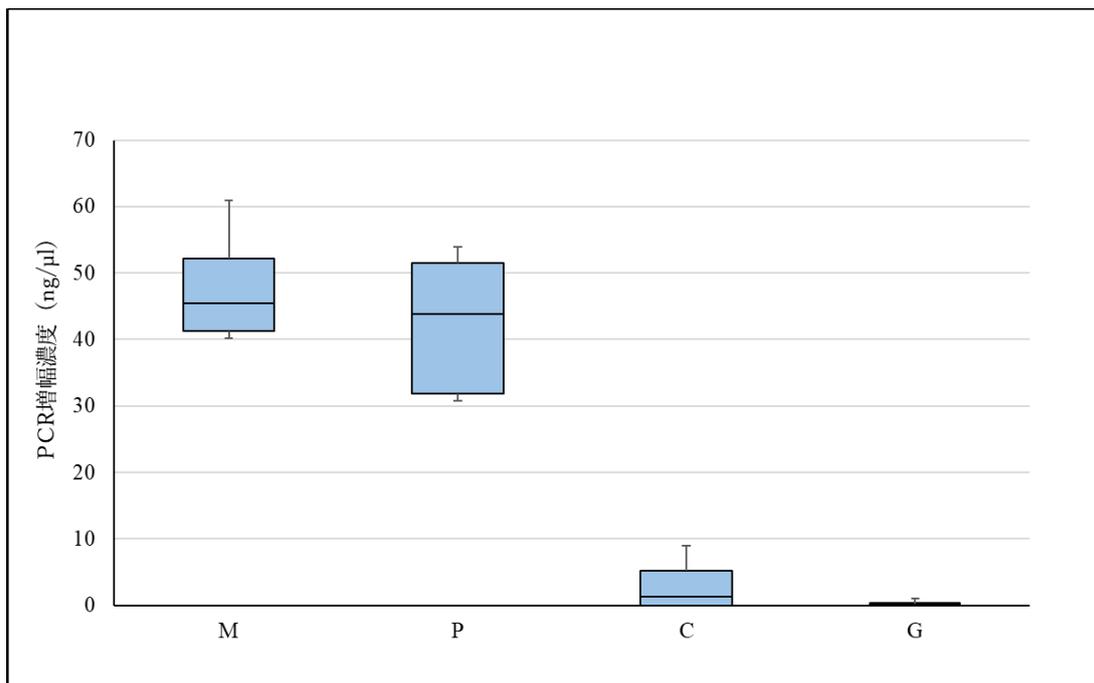


図1 既知濃度 DNA による PCR 増幅濃度の比較

M-P、M-C、M-G、P-C、P-G、C-G の 2 群間の比較をそれぞれ Bonferroni の補正を行った Mann-Whitney *U* 検定で行い、いずれも有意差はなかった。M: 金属板、P:プラスチック板、C:コピー用紙、G:滅菌ガーゼ

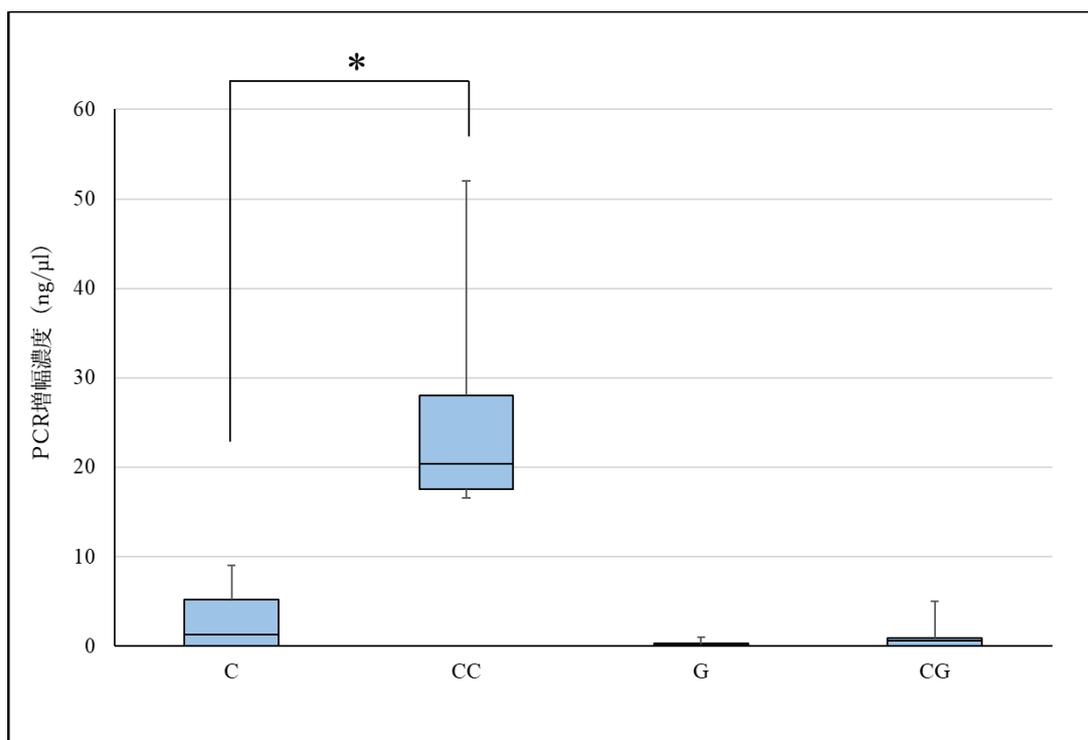


図2 既知濃度 DNA による PCR 増幅濃度の比較

C と CC、G と CG の比較をそれぞれ Mann-Whitney *U* 検定で行い、C-CC のみ有意差が認められた。C:コピー用紙、CC:コピー用紙細断、G:滅菌ガーゼ、CG:滅菌ガーゼ細断、\* $P < 0.01$ 、Mann-Whitney *U* 検定 (C と CC、G と CG の比較)

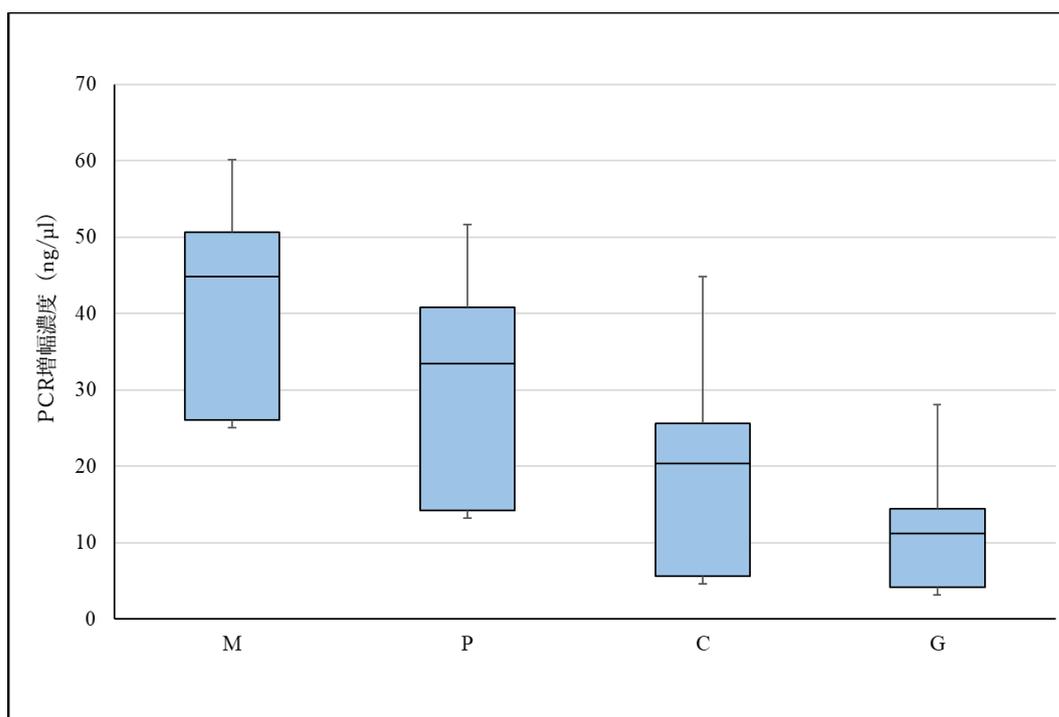


図3 指紋サンプルのPCR増幅濃度の比較

M-P、M-C、M-G、P-C、P-G、C-Gの2群間の比較をそれぞれBonferroniの補正を行ったMann-Whitney *U*検定で行い、いずれも有意差はなかった。M:金属板、P:プラスチック板、C:コピー用紙、G:滅菌ガーゼ

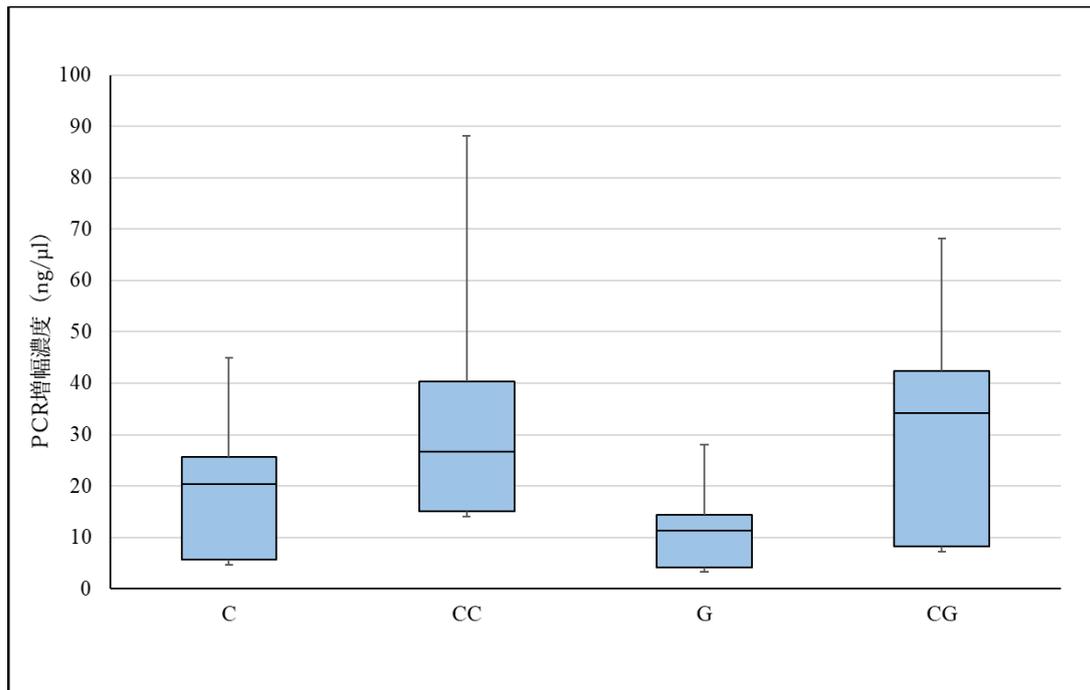


図4 指紋サンプルのPCR増幅濃度の比較

CとCC、GとCGの比較をそれぞれMann-Whitney *U*検定で行い、いずれも有意差はなかった。C:コピー用紙、CC:コピー用紙細断、G:滅菌ガーゼ、CG:滅菌ガーゼ細断

表1 警察嘱託試料の種類とDNA鑑定分析率

付着体		分析率 (%) (試料数)	
種類	試料数(%)	mtDNA	STR
布類	199(49.1%)	88.9 (177)	23.6 (47)
プラスチック類	91(22.5%)	60.4 (55)	6.6 (6)
金属類	58(14.3%)	51.7 (30)	5.2 (3)
紙類	45(11.1%)	71.1 (32)	20.0 (9)
木材類	8(2.0%)	100.0 (8)	25.0 (2)
ガラス類	4(1.0%)	50.0 (2)	50.0 (2)
合計	405(100.0%)	75.6 (306)	17.0 (69)

表2 既知濃度DNAのSTR分析

採取法	付着体の種類	検出アレル数	検出率 (%)
拭取り	金属板	16	1.4
	プラスチック板	20	1.8
	コピー用紙	4	0.4
	滅菌ガーゼ	0	0.0
細断	コピー用紙	0	0.0
	滅菌ガーゼ	2	0.2

総アレル数:1116

表3 指紋サンプルのSTR分析

採取法	付着体の種類	検出アレル数	検出率 (%)
拭取り	金属板	16	1.1
	プラスチック板	22	1.5
	コピー用紙	10	0.7
	滅菌ガーゼ	4	0.3
細断	コピー用紙	33	2.2
	滅菌ガーゼ	7	0.5

総アレル数:1488