

ヒト特異的塩基配列を指標としたヒト mtDNA 検出法  
の開発とその法医学的応用

(課題番号 15590581)

平成 15 年度～平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C) (2))

研究成果報告書

平成 17 年 5 月

研究代表者 湯川修弘

(宮崎大学医学部法医学講座)

## はしがき

法医学の実務上、犯罪に関連する様々な試料から被害者をはじめとした個人を特定するための情報を得ることが求められる。このような個人識別のために必要となる試料は多岐に亘るが、まずそれらの試料が真にヒトに由来するものか否かを鑑別する必要がある、現在では主に試料中に含まれる蛋白質を指標とした検査が行われている。一方、法医学の鑑定業務にも DNA 分析が取り入れられつつあるが、DNA 分析の目的は個人識別に関するものが殆どであり、対象とする DNA がヒト由来のものか否かの鑑別については、回収された DNA の量的問題等により、殆ど実施されないままその後の DNA 検査が行われる傾向にあった。このような事実を鑑み、DNA そのものの人獣鑑別法の確立が急務であると考えた。

法医学の分野では STR 等の多型検出により、極めて高い精度で個人を識別することが可能となってきたが、一方で検査試料の経時的変化により抽出されるゲノム DNA は極微量で、且つ変性が高度である場合が多く、実際に実施可能な検査項目は極めて限定されることを免れない。その点、ミトコンドリア DNA (mtDNA) は細胞中のコピー数が多いため、微量且つ陳旧な試料を取り扱うことの多い法医学的な DNA 鑑定においても有用であることが指摘されている。

研究者らは mtDNA 検査の高精度化を目的に研究を進めてきたが、本研究助成によりその研究は大きく進展し、「ヒト特異的塩基配列を指標としたヒト mtDNA 検出法の開発とその法医学的応用」という所期の目的を達成することが出来た。即ち、以前より mtDNA cytochrome *b* コード領域に種属特異的な塩基配列のあることが知られていたが、研究者らはこれまで報告のなかった領域にヒト特異的な塩基配列のあることを発見し、これらの領域に primer を設定することで、チンパンジーをはじめとする高等霊長類も識別可能な PCR 法をベースとした人獣鑑別法を確立した (*Forensic Science International* 2005, *in press*)。本法における検出感度は高く、そのため数十年経過した血痕・毛髪・骨片など、ゲノム DNA での鑑別が困難な変性試料においてもその威力を十分に発揮した。一方、DNA 鑑定の最終目的は個人識別であり、特に陳旧或いは変性が高度な試料の場合、mtDNA D-loop 領域のその有用性はよく知られた事実である。そこで検査試料の人獣・個人同時識別法の開発を目的に、独自に設計した人獣鑑別用の cytochrome *b* primer と個人識別用の D-loop 領域の各 primer とを組み合わせた multiplex-PCR 法の開発を試みた。しかしながら、それぞれの primer 領域が近接していることが原因で、電気泳動上、増幅産物が不明瞭なバンドとなって出現したため multiplex-PCR 増幅は困難であると判断した。そこで新たに人獣鑑別用の primer

を設計するため、ヒトと霊長類の mtDNA の全長を比較したところ、NADH dehydrogenase サブユニット ND4 コード領域にヒト特異的な塩基配列のあることを見出した。この ND4 primer による PCR 増幅は、cytochrome *b* primer と比較しても何ら遜色のない検出感度を示し、またヒト特異的増幅が可能な primer であることが確認された。更に ND4 primer を用いることで multiplex-PCR 増幅も可能となり、これまでの mtDNA D-loop 領域の PCR 反応手順を何ら変えることなく、本法によって試料の人獣鑑別を同時に実施することが可能となった。即ち本法は、特に変性試料における法医学的 DNA 検査法の一つとして有用であることが示唆された。尚、これら multiplex-PCR 法の研究結果については現在欧文雑誌に投稿準備中であり、本報告書では日本語報告書を添付した。

## 研究組織

研究代表者： 湯川 修弘 宮崎大学医学部教授  
(医学科法医学講座)

研究分担者： 松田 洋和 宮崎大学医学部助手  
(医学科法医学講座)

瀬尾 泰久 宮崎大学医学部助教授  
(医学科法医学講座)

柿崎 英二 宮崎大学医学部助手  
(医学科法医学講座)

## 研究経費

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	1,800	0	1,800
平成 16 年度	1,300	0	1,300
総計	3,100	0	3,100

## 研究発表

### 1) 学会誌等

1. 松田洋和、瀬尾泰久、柿崎英二、小澤周二、湯川修弘：ミトコンドリア DNA チトクロム b 領域のヒト特異的塩基配列を指標とした人獣鑑別について. *日本法医学雑誌* 57 (1); p83: 2003.
2. 松田洋和、瀬尾泰久、柿崎英二、小澤周二、村岡恵里、湯川修弘：Multiplex-PCR 法による人獣・個人同時識別法の検討. *日本法医学雑誌* 58 (1); p104: 2004.
3. Hirokazu Matsuda, Yasuhisa Seo, Eiji Kakizaki, Shuji Kozawa, Eri Muraoka, Nobuhiro Yukawa. Identification of DNA of human origin based on amplification of human-specific mitochondrial cytochrome *b* region. *Forensic Sci Int* 2005, in press

### 2) 学会発表

1. 松田洋和、瀬尾泰久、柿崎英二、小澤周二、湯川修弘：ミトコンドリア DNA チトクロム b 領域のヒト特異的塩基配列を指標とした人獣鑑別について. 第 87 次日本法医学会総会, 平成 15 年 4 月 23 日～25 日, 富山.
2. 松田洋和、瀬尾泰久、柿崎英二、小澤周二、村岡恵里、湯川修弘：Multiplex-PCR 法による人獣・個人同時識別法の検討. 第 88 次日本法医学会総会, 平成 16 年 6 月 2 日～4 日, 旭川.