

血痕鑑定における予備試験陰性検体の  
証拠資料としての有用性の検討

日本大学大学院医学研究科博士課程

社会医学系法医学専攻

側嶋 絵里菜

修了年 2019年

指導教員 内ヶ崎 西作

## 目次

第1章	概要	1
第2章	緒語	5
第3章	研究の目的	11
第4章	材料と方法	12
第5章	結果	23
第6章	考察	26
第7章	まとめ	32
第8章	謝辞	33
第9章	図	34
	図説	59
第10章	参考文献	61
第11章	研究業績	66

## 略語表

LMG : ロイコマラカイトグリーン法

OC-HC: OC-ヘモキャッチ S '栄研' 法

STR: Short Tandem Repeat

mRNA : Messenger RNA

miRNA : micro RNA

PK : Proteinase K

PAGE : ポリアクリルアミドゲル電気泳動

## 第1章 概要

**背景：**法医学は人が生活する上で発生する様々な法的問題を自然科学及び医学の知識や技術を使って解決に導くことを目的とする学問であり、殺人事件などの刑事事件、親子鑑定を代表とするような民事的問題を解決するために応用されている。それらの問題は最終的には裁判で争われ、その結果は関係者の今後の人生に大きな影響を及ぼすことになる。従って行われる検査についても、証拠物が信頼できる物か否か、適切な検査方法が用いられたか否か、結果の解釈が適切か否かなどについても厳密な評価が求められる。

血痕は法医学において証拠資料として使用され、その鑑定は①「血液か否か」をスクリーニングする血痕予備試験：ロイコマラカイトグリーン法 (LMG) などによるヘモグロビンの触媒作用を指標とする検査などが用いられる、②ヒトの血液であることを証明する人獣血鑑別試験：OC-ヘモキャッチ S' 栄研' ((以下 OC-HC) 栄研化学株式会社, 日本, 栃木) などによるヒトのヘモグロビンに対する抗原抗体反応などが用いられる、③生物学的特徴を用いた個人の絞り込みの順で行われる。個人の絞り込みについては現在、Short tandem repeat (STR) 型 (反復単位からなる DNA 領域であり、その繰り返し回数が個人によって異なることを利用し個人識別を行う) を用いた DNA 型が用いられているが、以前は ABO 式などの血液型が使用されていた。しかし、ABO 式血液型の型物質はヒト以外の血液にも存在し、また抗血清と反応する物質が自然界にも存在するので、前述のようなステップを踏んで人の血液であることを証明した上で型判定を行うことが非常に重要であった。平成元年、日本においても DNA 型が犯罪捜査に導入されて以降は DNA 型が ABO 式などの血液型にとって代わったが、血痕鑑定の基本的考え方に変わりはなく現在もこのステップの順番で行われている。予備試験や人獣血鑑別で陰性となった血痕様検査資料はヒトの血痕ではないと判断され、その後の検査は行われていない。

しかし、実際の現場に残された血痕は、付着してからの時間に加えて、様々な影響を受けて変性あるいは変質している場合が多い。それらの影響により実際には血痕であっても、予備試験は反応を示さない場合があることが知られているが、人獣血鑑別試験や DNA 型判定へも影響が及んでいるのか否かを調べた研究は乏しい。もし影響を受けるのが予備試験だけであり、他の検査への影響がなく正確に DNA 型判定が可能なのであれば、検討されつつある RNA

(Messenger RNA : mRNA や micro RNA : miRNA) を用いた新たな血痕スクリーニングが新たに予備試験として導入された場合、現時点では血痕ではないとされて鑑定資料から除外されている場合であっても、それを用いた鑑定が可能となるだろう。本研究は現在の予備試験を否定したり、新たな予備試験について論じたりするものではない。しかし、平成 28 年だけで、凶悪犯といわれる刑法犯の認知件数は 5,130 件にもおよび、そのうち検挙されたのは 4,435 件であり、665 件は未解決となっている。平成 22 年「刑法及び刑事訴訟法の一部を改訂する法律」により殺人罪の時効が廃止となった。これにより時効により捜査が終了する事件はなくなったが、一方で未解決事件は増加し、今まで以上に変性・変質した鑑定資料を扱わざるを得なくなるだろう。そこで、こういった因子により、現在の予備試験が影響を受けるのか、また、その因子によって、人獣血鑑別や DNA 型の検出への影響があるのかを調べることは、現在は鑑定資料から除外されている検体の有用性を示すことにつながると考えた。

このような着想から、本研究では血痕鑑定における種々の検査法に影響を及ぼす因子と前述のような鑑定の流れに着目し、血痕鑑定の中で最初に行われる LMG などの予備試験に影響を与えうる、紫外線、タンパク分解酵素や飲料などの因子 (LMG 阻害因子とする) が実際に LMG に与える影響と、OC-HC に与える影響、さらにそれらにより陰性と判定された血痕からの STR 型による DNA 型検査の可否を検討した。

**目的：** 本研究は血痕鑑定における予備試験の影響因子の検討及び、それらの因子が人獣血鑑別や DNA 型検査へ及ぼす影響を総合的に検討し、加えて、影響因子によって予備試験陰性となった資料の有用性を明らかにすることを目的とする。

**材料と方法：** 新鮮血より作成した 20 人分の血痕を用いて、①紫外線（UVA、UVB、UVC）、②洗剤や血痕の染み抜きに用いられる成分（タンパク分解酵素、炭酸ナトリウム）、③日常生活でよく見られる食品類（煎茶、紅茶、コーヒー、味噌、酢酸）に数日～数ヶ月反応させ、LMG に及ぼす影響を検討した。また、それらの因子への OC-HC への影響も併せて検討した。さらに、LMG で陰性となったものに対しては、DNA の定量と STR 型の検査を行った。

**結果：** LMG は、UVA、UVB、UVC を照射した血痕検体ではそれぞれ 45 日、45 日、10 日で、トリプシン、ブロメラインではそれぞれ 8 日、4 日で、煎茶、紅茶、コーヒーの検体ではそれぞれ 15 日、20 日、15 日ですべての検体から陽性反応が認められなくなり陰性となった。一方、炭酸ナトリウムや酢酸、味噌で反応させた検体では、LMG での反応は半年近く認められたため、STR 型の検出等は行わなかった。

OC-HC は UVA、UVB、UVC を照射した血痕検体ではそれぞれ 40 日、35 日、4 日で、トリプシン、ブロメライン、炭酸ナトリウムではそれぞれ 10 日、6 日、7 日で、煎茶、紅茶、コーヒー、味噌、酢酸では、紅茶、酢酸、味噌ではそれぞれ 10 日、4 日、7 日ですべての検体が陰性となったが、煎茶とコーヒーに浸漬した検体の一部は、LMG ですべての検体が陰性となったのちも、陽性反応が認められた

STR 型の検出を LMG 陰性検体で試みたところ、紫外線ですべての検体で判

定が可能であった。一方、それ以外の検体では STR 型は検出されなかった。しかし、トリプシン、プロメラインなどのタンパク分解酵素や煎茶、紅茶、コーヒーなどの抗酸化物質を含む飲料に浸漬された検体でも、酵素の不活化、より PCR 阻害因子に強い DNA Polymerase の使用、着色の除去といった工夫により検出が可能となった。

**考察：**予備試験はタンパク分解酵素、飲料、紫外線等の因子により影響を受け陰性となることが改めて確認された。また、人獣血鑑別試験である OC-HC では飲料に浸漬させた検体の一部は検出可能であったため、飲料のような因子では、OC-HC への影響は LMG に比べ比較的少ないことが示唆された。さらに、STR による DNA 型の検出では、紫外線ではすべての検体で判定が可能であり、また、タンパク分解酵素や、抗酸化物質を含む飲料でも、抽出法の工夫により検出が可能となるため、DNA 型検査へのこれらの因子の影響は少ないと考えられた。法医学においては前述のように血液様斑痕があった場合、それが血痕 (Hb) でヒトの血液 (ヒト Hb) であると証明する必要がある。このため、LMG などの予備試験が陰性の検体は鑑定資料から除外されている。近年では RNA などによる血液の新しい証明方法が確立されてきているが、まだそれらの新しい証明方法は血痕鑑定の予備試験として応用されていない。それらが様々な面から検討され予備試験として導入されれば、現在は血痕予備試験陰性の検体であっても今後は血痕鑑定資料としての有用性が出てくるだろう。

## 第2章 緒言

### 法医学とは

法医学は医学的知識・技術を使って人が生活する上で発生する様々な法的問題を解決に導くことを目的とする学問であり、殺人事件などの刑事事件、親子鑑定を代表とするような民事的問題を解決するために応用されている。それらの問題は最終的には裁判で争われ、その結果は関係者の今後の人生に大きな影響を及ぼすことになる。従って行われる検査についても、証拠物が信頼できる物か否か、適切な検査方法が用いられたか否か、結果の解釈が適切か否かなどについても厳密な評価が求められる。

### 法医学における血痕鑑定

法医学で血痕は非常によく使われる鑑定資料の一つである。その鑑定は①「血液か否か」をスクリーニングする血痕予備試験（従来からヘモグロビンの触媒作用を指標とする検査が用いられている）、②ヒトの血液であることを証明する人獣血鑑別試験（ヒトのヘモグロビンに対する抗原抗体反応が用いられている）、③生物学的特徴を用いた個人の絞り込みの順で行われる。これはかつて、血痕検査において ABO 式などの血液型検査が主に用いられていたからである。この ABO 式血液型の型物質はヒト以外の血液にも存在し、また抗血清と反応する物質が自然界にも存在する<sup>1</sup>ため、前述のようなステップを踏んで人の血液であることを証明した上で型判定を行うことが非常に重要であった。例えば、事件現場から採取された血痕様の斑痕について ABO 式血液型検査を行ったところ B 型物質（被害者は A 型）が検出されたので、捜査上に挙がってきた人物の中で出血するような怪我を負っている B 型の人を容疑者として逮捕されたとする。しかし、様々な動物の血液型は B 型物質のような反応を示すので、採取し検査された血液は動物の血液かもしれない。もしくは血液のように汚れた部分に分泌型の B 型のヒトの唾液が付着してただけかもしれない。容疑者がそのよう



な反論をすれば、「出血するような怪我を負った B 型の人物」という犯人像は崩れてしまうのである。斑痕が血痕であり、更にその血痕がヒトの血液によるものであることを証明できて初めて、意味のある血液型検査、つまりの個人識別鑑定を行う事ができることになる。現在の犯罪捜査においては、ABO 式血液型に代わって STR などの DNA 型による検査が用いられているが、基本は同じである。鑑定において血液の DNA 型が求められているケースにおいて血痕のような斑痕があれば、まずはその斑痕が「血痕」であり、そしてその血痕が「ヒトの血液」であることを証明し得て初めて DNA などを用いた個人識別の検査が行われるのである。予備試験には通常、ロイコマラカイトグリーン法 (LMG) やルミノール法<sup>2</sup>などがもちいられ、人獣血鑑別には、OC-ヘモキャッチ S '栄研' (OC-HC)<sup>3</sup>などが用いられる。これらの検査でヒトの血痕であると証明された場合、DNA 型による個人識別が行われる (Fig. 1) が、予備試験や人獣血鑑別において陰性と判定された場合においては、その後の検査は行われない。

先行研究によると前述の予備試験は飲料や洗剤などのいくつかの因子の影響を受け陰性を示すことが報告されている<sup>4-10</sup>。また、自然界に存在する因子として紫外線が DNA 検査に及ぼす影響についても検討されている<sup>11-14</sup>。しかしこれらの研究の多くは、一つ一つの検査に及ぼす影響を調べた報告であり、予備試験、人獣血鑑別及びその後の DNA 型検査に及ぼす影響など一連の流れに着目して検討を行った報告は極めて少ない。

## 血痕鑑定で使われる主な検査法とその原理

### ○血痕予備試験

#### ●ロイコマラカイトグリーン法

ロイコマラカイトグリーン (LMG) は無色のロイコマラカイトグリーンがヘモグロビンと過酸化水素によって酸化され、青緑色のマラカイトグリーンと塩素になるという反応を利用したものである<sup>2</sup> (Fig. 2)。これは、安価で簡便あり、短時間で判定でき、また他の酸化作用のあるペルシダーゼを持つ植物等には反応しないなど、日本でもよく行われている。一方で上述のように LMG は、タンパク質であるヘモグロビンを標的とした酸化反応であるため、タンパク分解酵素や抗酸化物質の影響を受けることが想定される。他に同様の目的として行われる検査として、ルミノール法などがある<sup>2</sup>。

### ○人獣血鑑別試験

#### ●OC-ヘモキャッチ S '栄研' を用いた方法

以前は抗ヒトヘモグロビン抗体と斑痕滲出液とを反応させて沈降輪を生じさせて、ヒトの血液であると判定していたが、現在は OC-ヘモキャッチ S '栄研' ((以下 OC-HC)、栄研化学株式会社, 日本, 栃木) を用いた方法が広く用いられている。OC-HC は元々、便中のヒトの潜血を検出するキットであり (Fig. 3)、ヒトヘモグロビン A<sub>0</sub> に対するマウスのモノクローナル抗体を用いたイムノクロマトグラフアッセイである。これは人血では 500,000 倍希釈まで検出が可能で、体液の混合試料に強くさまざまな体液の混合試料であってもヒトヘモグロビン、つまりヒトの血液が存在すれば検出可能とされている<sup>3</sup>。しかし、加熱や日光の照射、洗濯洗剤や漂白剤に影響を受け、陽性反応を示さなくなることが知られている<sup>15</sup>。

## ○DNA 型に関する検査

### ●Short tandem repeat(STR)型検査

DNA には遺伝子情報を持つエクソンと、それを持たないイントロンが存在する。このイントロンはエクソンに比べ多様性を有する領域が多く知られている。そのような多様性を有するイントロン領域の特定の遺伝子座には、反復単位からなる DNA 領域がある。この配列が 10 塩基対以上のものをミニサテライトと呼び、2~5 塩基対のものをマイクロサテライト、または Short tandem repeat (STR) と呼ぶ<sup>16,17</sup>。これは個人によって繰り返し回数が異なることから、その回数の違いによって個人識別を行う (Fig. 4)。DNA マーカーの中では、単一のローカスにおいて STR はそれほど多様性が高くないが、複数のローカスが組み合わさることによって高い識別能力が得られることが知られており、常染色体上の 15 座位以上の組み合わせによる STR 型検査が法医学における個人識別の方法として現在広く用いられている<sup>18</sup>。STR 型の特徴は、基礎となる塩基配列が比較的短いため、それまで判定が困難であった劣悪な状況下におかれた試料や、採取までに時間を要した試料及び血液型などの検査ができないほど微量の資料など、DNA が断片化した試料であっても検出可能な場合があることである。

## 血痕検査に影響しうる因子

### ●紫外線照射

太陽から地球に届く光、これは様々な波長の電磁波からなりその多くは可視光線である。それより少し波長の短い電磁波を紫外線と呼ぶが、これは太陽光全体の 5~6% に過ぎない。紫外線は生物学的影響を考慮して、UVA、UVB、UVC に分類される<sup>19</sup>。これらの紫外線は DNA 損傷を引き起こすことが知られている<sup>20-22</sup>。例えば、UVB や UVC をピリミドン塩基が吸収すると DNA は活性化されサイクロブタンピリミジンダイマーやピリミジン (6-4) ピリミドン光産物などの構造変化を生じることが知られている。また UVB は細胞内に活性酸素を生じることが知られており、DNA 鎖を開裂させる。 野外に存在する血痕や証拠品

はこのような紫外線の影響を受ける場合が多く、DNA 鑑定に影響を及ぼすことが知られている<sup>10-14</sup>。ちなみに、環境省によると、つくば市における紫外線の月平均積算量は平均で 13.89KJ/m<sup>2</sup><sup>23</sup>、南極昭和基地では何月に計測するかによって差は大きいですが平均すると月積算量は 11.53KJ/m<sup>2</sup><sup>24</sup> である。

#### ●タンパク分解酵素 及び 炭酸ナトリウム

微生物や植物、食品、肉軟化剤等の食品添加物などにはタンパク質分解酵素を有するものが多くある。これらのタンパク分解酵素は血痕の染み抜きとして有用であることが報告されており<sup>25・26</sup>、一部の家庭用洗剤にも含有されている。このようなタンパク分解酵素による染み抜きは重大な証拠物件の隠匿になり兼ねないが、これらのタンパク分解酵素に反応させた検体において血痕鑑定を行った文献は乏しくその影響は定かではない。

炭酸ナトリウムも家庭用洗剤に含まれている成分であり、血痕などのしみの洗浄効果があるとされている。このため洗剤が血痕鑑定に及ぼす影響について検討された文献はよく見かけられる<sup>6・7</sup>。これによると洗剤で反応させた検体では LMG の感度が低下したという。一般的なアルカリ性の洗剤で最も洗浄力が強力なものは、炭酸ナトリウムを含む洗剤である。過去の研究においては OC-HC は pH 2~3 では反応性が著しく低下したがアルカリ性 (pH 8~11) では酸性条件よりも影響が少なかったと述べられている<sup>3・15</sup>。

### ●抗酸化物質を含む飲料 及び 味噌

現在世界中では様々な飲料が飲まれている。その多くに抗酸化物質が含まれており、その抗酸化作用によって血痕検査が困難になる場合がある。前述のように、LMG やルミノール法などの血痕検査の予備試験法はヘモグロビン中の鉄錯体を触媒に過酸化水素と反応して酸化し、発光や発色を示すという反応である<sup>2</sup>。そのため、抗酸化物質が存在するとこの酸化反応が阻害されるので、発光や発色に影響するなど鑑定に支障をきたす場合があると報告されている<sup>4・5</sup>。また、例えば天然の抗酸化物質として知られるポリフェノールは、ワインに多く含まれていると思われがちであるがコーヒーや紅茶、煎茶にも多く含まれており、紅茶や煎茶ではルミノールの反応に影響を及ぼしたという報告もある<sup>4</sup>。また同様に抗酸化物質であるビタミン C を多く含むような飲料でも STR 型個人識別は可能であるもののその抗酸化作用により LMG の反応に影響を受けたという<sup>5</sup>。

味噌と血痕鑑定の関連については、静岡県清水市で一家四人が殺害された事件（いわゆる 袴田事件）が有名である。この事件では味噌工場のタンクの中から衣類が発見され、血痕が付着した衣類を味噌の中に隠蔽したとされた。この着衣の血痕様の部位について行った DNA 鑑定が決め手となり、容疑者であった袴田氏には有罪（死刑）判決が下された。しかしその後行われた再審において DNA 鑑定の信憑性が疑われ、袴田氏は保釈となった<sup>27・28</sup>。味噌は *Aspergillus* 属菌をはじめ *Streptococcus* 属菌など様々なバクテリアを使用して作られる発酵食品であり<sup>29</sup>、血痕予備検査は一部のバクテリアの感作により陰性になるとの報告もある<sup>30</sup>が、味噌による影響はよくわかっていない。

### 第3章 研究の目的

現状の血痕鑑定の方法論やそれぞれの検査法の機序、種々の影響を及ぼしうる因子を検討してみると、血痕鑑定に用いられているそれぞれ検査方法と影響因子に関して総合的な検討はなされておらず、また、ある影響因子によって予備試験では陰性になっても人獣血鑑別や DNA 型検査が可能な場合があり得ることも推定される。これらのことから、本研究では血痕鑑定における予備試験の影響因子の検討及び、それらの因子が人獣血鑑別や DNA 型検査へ及ぼす影響を総合的に検討し、加えて、影響因子によって予備試験陰性となった資料の有用性を明らかにすることを目的とする。

## 第4章 材料と方法

### 血痕検体の作成

- ① サンプル提供に同意した健康なボランティア 20 人から静脈血を採血した。
- ② 採血した各ボランティアの血液をすべて使用し、それぞれ 2 枚重ねの滅菌ガーゼに直径 4 cm の大きさになるまで滴下した。
- ③ 直射日光の当たらない室内にて、室温で十分に乾燥させて 20 人分の血痕を作成した。
- ④ 各血痕ガーゼをそれぞれ 1 枚ずつに分けそれぞれ 6 等分し、その小片を作成した。
- ⑤ ④で作成した小片 12 枚のうち 11 枚を検体とし、各検査にそれぞれ使用した。また、残りをすべての実験に対する総括的な陽性コントロールとして各実験に用いた（使用するまでアルミホイルで遮光し、4°Cで保管）。
- ⑥ また、血痕のついていないガーゼを陰性コントロールとした。
- ⑦ すべての検体とは使用するまでアルミホイルで遮光し、4°Cで保管した。

なお本研究は、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の3省合同による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成20年12月1日一部改正）並びに日本大学医学部における「ヒトゲノム・遺伝子解析研究」に関する実施要綱等にとり、本人から同意書を得て、日本大学医学部倫理委員会の承認を得て行った（許可番号：239-0）。

## 2. 検討した LMG 阻害因子の条件

LMG 阻害因子として、①紫外線 (UVA、UVB、UVC) 照射、②洗剤や血痕の染み抜きに用いられる成分 (タンパク分解酵素、炭酸ナトリウム)、③日常生活でよく見られる食品類 (煎茶、紅茶、コーヒー、味噌、酢酸) を検討した。

### (1) 紫外線

UV Cross linker (UVP, Upland, USA) を照射機械として用いた。照射は、UVA (365 nm) では 32,000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2/\text{sec}$ 、UVB (302 nm) では 23,000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2/\text{sec}$ 、UVC (254 nm) では 32,000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2/\text{sec}$  にてそれぞれ行った。血痕付きガーゼ (検体) は照射機内の底面におき、すべての血痕に均等に照射されるようにした。なお、この照射量は過去の研究<sup>29</sup>を参考に決定した。

### (2) タンパク分解酵素及び炭酸ナトリウム

トリプシン (和光純薬工業株式会社, 大阪市, 日本) とブロメライン (EMD Millipore corporation, Darmstadt, Germany)、炭酸ナトリウム (国産化学, 東京, 日本) を用いた。

#### トリプシン溶液の作成(0.005%)

トリプシン溶液は付属の説明書の指示通り以下のように作成した。

- ① 1 mol/L の Tri-HCL buffer を 22 倍に希釈し、0.046 mol/L にした。
- ② 0.1 mol の塩酸を 100 倍に希釈し、0.001 mol/L にした。
- ③ 100  $\mu\text{l}$  のトリプシンに B 液を 5 ml 入れトリプシン液を作成した。
- ④ 蒸留水 0.6 ml、Tri-HCL buffer 5.2 ml トリプシン液 0.2 ml を入れ(0.005%) よく混和した。



### ブロメライン溶液の作成(0.1%)

ブロメライン液は以下のように作成した。

- ① 蒸留水 100 ml に 0.1 g のブロメラインを加え (0.1%水溶液) よく混和した。

### 炭酸ナトリウム水溶液の作成(0.1%)

炭酸ナトリウムは以下のように溶解した。

- ① 蒸留水 100 ml に 0.1 g の炭酸ナトリウムを加え (0.1%) よく混和した。

各反応液は 5 ml をチューブに入れ、トリプシン及びブロメライン溶液では検体を 37°C で、炭酸ナトリウム水溶液では室温で浸漬した。

濡れた検体の LMG 検査は経験上、濾紙等で乾燥させて使用すると、濾紙の方に血液を含む液体成分が吸い取られ、糸では陽性反応が出ないにもかかわらず濾紙を検査すると陽性になることがあるため、これらの検体は濾紙等で乾燥させず、濡れたまま使用した。

## **(3)食品等**

一般に市販されている煎茶 (小野園 深蒸し 知覧茶)、紅茶 (日東紅茶 デーリークラブティーバック)、インスタントコーヒー (ネスレ ゴールドブレンド レギュラーソリブルコーヒー)、味噌 (マルコメ だし入り 料亭の味) と酢酸 (和光純薬工業株式会社) を用いた。

### 飲料の抽出 (製品記載の抽出方に準じた)

- ① コーヒーは市販のインスタントコーヒー 2 g に熱湯 140 ml を入れコーヒーを作成した。
- ② 紅茶では市販のティーバックを一袋にたいし 150 ml の熱湯をいれ、1 分間蒸らして作成した。
- ③ 煎茶は 4~5 g 程度の茶葉を 180 ml の熱湯をいれて一分間蒸らして作成した。

各反応液は室温に戻し、5 ml をチューブに入れ、それぞれに検体を室温で浸漬した。

これらの検体は乾燥させず、濡れたまま使用した。

### 味噌

ホールスライド上に味噌を 1.5 g おき、そのなかに検体を埋めるようにいれ検体を室温で反応させた。

### 酢酸

特級試薬酢酸 (17.5 mol/L) を用いた。

5 ml をチューブに入れ、それぞれに検体を室温で浸漬した。

これらの検体は乾燥させず、濡れたまま使用した。

## **3. LMG・OC-CH の方法**

### **(1) LMG**

#### LMG 試薬の作成

- ① ロイコマラカイトグリーン (東京化成工業, 東京, 日本) 0.1 g に酢酸(和光純薬工業株式会社) 10 ml と蒸留水 15 ml をまぜ A 液を作成した。
- ② 30%の過酸化水素水に蒸留水を加えて 10 倍に希釈し B 液を作成した。
- ③ 使用直前に A 液と B 液を 4 : 1 に混合して、LMG 試薬を作成した。

#### LMG による検査

- ① 検体から糸を取り出し長さ 3 mm 程度、切りとった。
- ② この 3 mm の糸各 1 本をホールスライド上におき上から試薬を滴下した。

すべての LMG 検査は 24 時間毎に 10 日間行った。それ以降は 120 時間ごとに行い、すべての検体において LMG の陽性反応が 5 分以内にはっきりと認められなくなるまで各因子に反応させた。なお、実際の鑑定では pH の調整を行われないことが多いため本研究においても pH の調整等は行わなかった。

## (2)OC-HC

- ① 検体から糸を取り出し各検体長さ 3 mm程度、切りとった。
- ② この 3 mmの糸各 1 本をサンプルウェルに入れ、付属の緩衝液を 2 滴たらして 5 分間静置し、反応させた。

OC-HC による検査は LMG 実施時に行った。

## 4. DNA の抽出・定量及び STR 型の解析

### (1)DNA の抽出

血痕などの試料から QIAamp® DNA Investigator Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用い DNA の抽出を行った。抽出方法はキットの「プロトコールとトラブルシューティング」<sup>32</sup>に従って行ったが、タンパク分解酵素と飲料に浸漬した検体の DNA 抽出液では、浸漬したタンパク分解酵素や飲料に含まれる多糖類などの植物成分が残留し、PCR 増幅が阻害されて、STR 型の検出が困難となる可能性が考えられた。このため、検体を 10 検体ずつ 2 群に分け、I 群では一般的な方法で抽出を行い、II 群 (II a 群：タンパク分解酵素検体、II b 群：飲料浸漬検体) では以下のような処理を追加した。

- ① 血痕を切り取り小さい切片にし、1.5 ml のマイクロチューブに入れた。
- ② II a 群では、この時点で、95℃で 5 分間インキュベートし、酵素を失活させた。
- ③ 付属の Buffer ATL を入れ、Proteinase K (PK) をそれぞれ 300 µl と 20 µl を先ほどのチューブに入れ蓋をして 10 秒間攪拌した。
- ④ チューブを 900 rpm で振動させながら 56℃で 1 時間以上インキュベートした。
- ⑤ マイクロチューブをスピンドウンし、蓋内側に付着した溶液を回収した。
- ⑥ Buffer AL と Buffer ATE に溶かしたキャリア RNA を、それぞれ 300 ml と

1  $\mu$ l 添加後、10 秒間攪拌し、混和した。

- ⑦ チューブをサーモミキサーにセットし、900 rpm で振動させながら 70°C で 10 分間インキュベートした。
- ⑧ II 群 b では 14000 回転で 3 分間遠心し上清をとり、1.5 ml の新しいチューブに移し、また同様に遠心して DNA 溶液の着色を除いた。
- ⑨ 150  $\mu$ l のエタノールを添加し蓋を閉め、15 秒間攪拌後、スピンドウンして液を回収した。
- ⑩ 付属の 2 ml のコレクションチューブのついたカラムに先ほど回収した液を全量アプライした。
- ⑪ 蓋を閉め、8000 rpm で 1 分間遠心した。
- ⑫ カラムを新しいコレクションチューブに入れ、濾液を含むコレクションチューブを捨てた。
- ⑬ カラムを静かに開き、縁をぬらさないように付属の buffer AW1 を 500  $\mu$ l 添加した。
- ⑭ 蓋を閉めて 8000 rpm で 1 分間遠心した。
- ⑮ カラムを新しいコレクションチューブに入れ、濾液を含むコレクションチューブを捨てた。
- ⑯ カラムを静かに開き、縁をぬらさないように付属の buffer AW2 を 700  $\mu$ l 添加した。
- ⑰ 蓋を閉めて 8000 rpm で 1 分間遠心した。
- ⑱ カラムを新しいコレクションチューブに入れ、濾液を含むコレクションチューブを捨てた。
- ⑲ カラムを静かに開き、縁をぬらさないようにエタノールを 700  $\mu$ l 添加した。
- ⑳ 蓋を閉めて 8000 rpm で 1 分間遠心した。
- ㉑ カラムを新しいコレクションチューブに入れ、濾液を含むコレクションチューブを捨てた。
- ㉒ 14000 rpm で 3 分間遠心メンブレンを完全に乾燥させた。
- ㉓ 新しい 1.5  $\mu$ l の遠心チューブにカラムをセットし、濾液を含むコレクションチューブを捨てた。
- ㉔ カラムの蓋を静かにひらき室温で 10 分間インキュベートした。

- ②⑤ 35  $\mu$ l の蒸留水をメンブレンの中央にアプライした。
- ②⑥ 蓋を閉めて 5 分間インキュベートした後 14000 rpm で 1 分間遠心した。

## (2)DNA 濃度の測定

Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) を使用し、付属のプロトコールにもとづいて以下のように測定した。

- ① キットはすべて常温に戻して使用した。
- ② 付属の Quant-T Reagent と Quant-iT™ Buffer を 1:199 の割合で混和した。
- ③ 専用のアッセイチューブチューブに②で作った Working solution 195  $\mu$ l と抽出した DNA 液 5  $\mu$ l を添加した。
- ④ すべてのアッセイチューブは 2~3 秒間撹拌した後、室温で 2 分間インキュベートした。
- ⑤ Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies) を用い濃度を測定した。

## (3)DNA 試料状況の確認

5%のポリアクリルアミドゲル (PAGE) を用い、精製された DNA 試料の DNA 分子サイズの確認を行った。

### PAGE ゲルの作成

#### ゲルの組成 (1)

Ammonium Persulfate 25 mg

30%PAGE ゲルストック液 3.5 ml

5×TBE Buffer 2.5 ml

上記に蒸留水を加え全量を 25 ml とした。

直前に上述した溶液に TIMED 20  $\mu$ l を加え速やかにゲルを作成した。

ゲルサイズは 16 cm×16 cm×0.1 cm とした。

## DNA 試料の泳動と確認

- ① Gel Loading buffer (Bio teck, Houston, USA)を 1.5  $\mu$ l にサンプル 5.0 $\mu$ l を添加し混和した。
- ② 先ほど作成したゲル にアプライし 40 分間泳動した。
- ③ 泳動後はガラスからゲル を取り外した。
- ④ あらかじめ SYBR Green I 20  $\mu$ l を蒸留水 200 ml に添加して置き、室温でゲルを 15 分間染色した。
- ⑤ 染色液からゲルをとりだし、Molecular Imager ゲル Doc™ XR<sup>+</sup>(BIORAD, Hercules, USA)で画像化した。
- ⑥ スタンダードマーカである 1Kb Step Ladder (Promega, Madison, USA) に従いそれぞれ DNA 試料の状況を確認した。

## **(5) STR 型の検査**

STR 型の解析は伝統的な尿素変性 PAGE 法とキャピラリー電気泳動法の 2 種類で試料の解析を行った。後者は前者と比べ検出感度が高いため、両者を比較して検討した。

### ① 尿素変性 PAGE 法による STR 型の検査

STR 型は SilverSTR<sup>®</sup> III (Promega) を使い、Thermal Cycler 9800 Fast (Applied Biosystems™, Forster city, USA)を使用し、以下の条件で増幅した PCR 増幅した。キットには D16S539、D7S820、D13S317 の 3 種の STR ローカスが含まれている。

---

### 反応液組成 (1)

GeneAmp<sup>®</sup> Fast PCR Master Mix x2 (Applied Biosystems<sup>™</sup>) : 5  $\mu$ l

Primer Mix : 1  $\mu$ l

Template : 4  $\mu$ l

Total 10  $\mu$ l

### PCR 条件 (1)

96°C	1 分	
94°C	0 秒*	} 10 サイクル
60°C	20 秒	
70°C	30 秒	
90°C	0 秒*	} 20 サイクル
60°C	20 秒	
70°C	30 秒	
60°C	15 分	
4°C	$\infty$	

\*0 秒は温度を設定まで上昇させ、温度を保たず即座に下げるために行った 33。

増幅された PCR 産物はポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。

### 尿素変性ポリアクリルアミドゲルの作成

#### ゲルの組成 (2)

Ammonium Persulphate 25 mg

尿素 (和光純薬工業株式会社) 12.5 g

45%PAGE ゲルストック液 3.5 ml

5×TBE Buffer 2.5 ml

上記に蒸留水を加え全量を 25ml とした。

直前に上述した溶液に TIMED 20 µl を加え速やかにゲルを作成した。

ゲルサイズは 18 cm×16 cm×0.75 cm とした。

SYBR Green (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 染色後に Molecular Imager Gel Doc™ XR+ (BIO RAD) で各 STR ローカスの解析を行った。

II 群 a に対しては、PCR 阻害物質に強いとされる TKs Gflex™ DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) を使用し、試料の PCR 増幅を施行した。

#### 反応液組成 (2)

2×Gflex×PCR buffer : 6.25 µl

Primer Mix : 1.25 µl

DNA polymerase : 0.25 µl

蒸留水. : 0.75 µl

Template : 4 µl

Total 12.5 µl

#### PCR 条件 (2)

94°C	1 分	
96°C	0 秒	} 30 サイクル
60°C	20 秒	
68°C	30 秒	
72°C	7 分	
4°C	∞	

#### ② キャピラリー電気泳動による STR 型の検査

同試料は AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit (Applied Biosystems™) を用いて PCR 増幅し、増幅産物はキャピラリー電気泳動によ



り解析を行った。キットには、D8S1179、D21S11、D7S820、CSF1PO、D3S1358、TH01 D13S317、D16S539、D21338、D19S433、vWA、TPOX、D18S51、D5S818、FGA の 15 種の STR ローカスおよび Amelogenin (性別鑑別マーカー) が含まれている。

#### 反応液組成 (3)

Master Mix: 5  $\mu$ l

2mM Primer Mix: 2.5  $\mu$ l

蒸留水: 3  $\mu$ l

Template 2.0  $\mu$ l

Total 12.5  $\mu$ l

#### PCR 条件 (3)

95°C	11 分	
94°C	20 秒	29 サイクル
59°C	3 分	
60°C	10 分	
4°C	$\infty$	

得られた PCR 産物を 310 POP-4™ ポリマー (Applied Biosystems™) を用い、310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™) によりキャピラリー電気泳動で分離し、ラダーマーカーとサイズマーカーである Gene Scan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems™) に基づいて GeneMapper® 3.0 ソフト (Applied Biosystems™) により STR 型を解析した。

スタンダード DNA としてキットに付属されている K562 DNA も同様に定量及び STR 型の解析を行った。

## 第5章 結果

### 1. LMG と OC-HC

LMG と OC-HC の結果はそれぞれ Fig. 5-10 に示す通りとなった。

LMG では、UVA、UVB、UVC を照射した検体で、それぞれ 30 日目、25 日目、7 日目から一部の検体が陰性となり、全体として発色性も減退し、45 日、45 日、10 日ですべての検体が陰性となった(Fig. 5)。

トリプシン、ブロメラインに浸漬した検体ではそれぞれ、8 日、4 日から一部の検体が陰性となり、10 日、6 日ですべての検体で陰性となった。

一方、炭酸ナトリウムに浸漬した検体では、150 日浸漬させてもすべての検体で陽性反応が認められた(Fig. 6)。

煎茶、紅茶、コーヒーに浸漬した検体では、それぞれ 7 日目、9 日目、3 日目から一部の検体が陰性となり、15 日、20 日、15 日ですべての検体で陰性となった。一方、味噌や酢酸に浸漬した検体では、150 日浸漬させてもすべての検体で陽性反応が認められた(Fig. 7)。

一方陽性コントロールでは、150 日を過ぎてもすべての検体から陽性反応が認められた(Fig. 5-7)。

酢酸、炭酸ナトリウム、味噌に浸漬した検体では、LMG での反応は半年近く経過しても陽性反応を示していたので、DNA の定量や STR 型の検出は行わなかった(Fig. 6・7)。

OC-HC では UVA、UVB、UVC でそれぞれ 25 日、20 日、2 日から一部の検体が陰性となり、40 日、35 日、4 日ですべての検体で陰性になった(Fig. 8)。

トリプシン、プロメライン、炭酸ナトリウムでは、それぞれ 5 日、4 日、1 日から一部の検体が陰性となり、10 日、6 日、7 日ですべての検体で陰性となった(Fig.9)。

煎茶、紅茶、コーヒー、味噌、酢酸に浸漬させた検体では、それぞれ 2 日目、2 日目、3 日目、1 日、2 日から一部の検体が陰性となり、紅茶、酢酸、味噌では 10 日、4 日、7 日ですべての検体が陰性となったが、煎茶とコーヒーに浸漬した検体の一部は、LMG ですべての検体が陰性となったのちも、陽性反応が認められた(Fig. 10)。

一方陽性コントロールでは、45 日を過ぎてもすべての検体から陽性反応が認められた(Fig. 5-10)。

## 2. DNA の分子サイズと STR 型の検出

これらの検体から精製した DNA の分子サイズを確認した結果、UV を照射した検体は UVA、UVB では 5Kbp 付近の高分子 DNA が比較的多く含まれているのに対し、UVC では高分子の減少に伴い 2Kbp 以下の DNA の増加が認められた。また、I 群において、タンパク分解酵素に浸漬した検体では高分子の DNA が多いことが確認され、飲料に浸漬した検体では、DNA の分解が確認されなかった (Fig. 11)。II 群においても同様の結果であった。

UV 照射後に LMG で陰性となった検体では、SilverSTR<sup>®</sup> IIIにより増幅された PCR 産物から D16S539、D7S820、D13S317 のすべての STR ローカスが検出され、コントロール血痕と比較したところ正確に型判定が可能であった(Fig. 12)。

一方、タンパク分解酵素に浸漬した検体では、I群でのSTR型の検出は困難であった。しかし、IIa群では、すべての検体でSTR型が検出可能となった (Fig. 12)。

飲料に浸漬した検体においても、I群ではSTR型の検出は困難であった。しかし、IIb群では、すべての検体からSTR型が検出可能となった (Fig. 12)。

AmpFlSTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus Kit により増幅されたPCR産物からも上記同様の結果が得られた (Fig. 13-26)。Fig. 16-25 はタンパク分解酵素と飲料に添加した検体のI群 (Fig. 16、18、20、22、24) とII群 (Fig. 17、19、21、23、25) を示している。Silver STR<sup>®</sup> IIIで増幅されたもの同様処理前では小さいピークはあるものの、はっきりとしたアリのピークが認められなかったが、処理後はすべて正しく判定された。

### 3. 結果のまとめ

すべての結果をまとめたものを Fig.27 に示した。紫外線を照射した群では LMG や OC-HC が陰性となった後も、一般的な抽出方法でSTR型の検出が可能であった。トリプシンやブロメライン、紅茶に浸漬させた検体では、LMG や OC-HC が陰性となった検体では一般的な抽出方法ではSTR型の検出は困難であった一方で処理後は正しく判定された。緑茶やコーヒーでは LMG が陰性となった後も一部の検体で OC-HC が陽性となるものがあつた。また、これらの検体では一般的な抽出方法ではSTR型は検出できなかったが処理後は正しく検出された。さらに炭酸ナトリウムや酢酸、味噌に反応させた検体では半年程度反応させても LMG は陰性にならなかった (Fig.27)。

## 第6章 考 察

### 1. LMG、OC-HC に関して

UV を照射した検体については、UVA、UVB では比較的長期間照射されても LMG の反応性は持続した。環境省によると、日本（つくば市）における紫外線の月平均積算量は平均で  $13.89 \text{ KJ/m}^2$  であった<sup>23</sup>。本研究において、UVB で LMG の反応が陰性となるまで照射した場合の照射量は、UVB での反応日数が最も短かった 25 日で計算したとしても、 $23000 \mu\text{J/cm}^2/\text{sec}$  ( $23 \text{ KJ/m}^2/\text{sec}$ )  $\times$  25 日  $\times$  24 時間  $\times$  60 分  $\times$  60 秒で 49680 万  $\text{KJ/m}^2$ 、つまり月平均の約 358 万倍に相当する。OC-HC においても反応線は徐々に薄くなったものの、1 ヶ月程度までは検出可能であった。UVA、UVB は比較的エネルギーの低い紫外線であり、紫外線は核酸を変性させることはあるが、タンパク質であるヘモグロビンを標的とする LMG や OC-HC への影響は比較的少なかったと考えられる。一方、UVC ではエネルギーが強いため、タンパク質へも影響を及ぼした可能性が考えられる。

洗剤などに含まれる成分で反応させた検体にていては、タンパク分解酵素には、LMG や OC-HC がいずれもタンパク質であるヘモグロビンを検出する試験であるため影響を強くうけ、LMG や OC-HC の反応が比較的早期に阻害されたものと推測される。本研究では炭酸ナトリウムに浸漬させた検体については、LMG にあまり影響が見られなかった一方で、OC-HC においては早期に反応が阻害された。OC-HC の至適 pH は中性あるいは弱アルカリ性であり、pH2~4 の強酸によって感度の低下が起こり、pH8~11 においても酸性に比べて影響は少ないもののその影響を受けることが知られており<sup>15</sup>、本研究で使用した炭酸ナトリウムはおおよそ pH12 と比較的強いアルカリ性であるため感度の低下を招いた可能性が考えられる。

食品で反応させた検体については、飲料ではタンパク分解酵素で浸漬させた場合と同様に LMG の反応が比較的早期に阻害された。煎茶や紅茶、コーヒーなど飲料にはポリフェノールやアスコルビン酸などの抗酸化物質が含まれており、それらが LMG やルミノールの反応に影響を及ぼした<sup>4,5</sup>という報告もある一方で、OC-HC の添付文書にはアスコルビン酸には影響受けないとの記載がある。本研究においても、一般的に LMG で感度に劣る OC-HC が、煎茶やコーヒーでは LMG が陰性となった後も一部の検体で陽性と判定できるものがあり、抗酸化物質の影響により LMG の酸化反応は阻害されたが、OC-HC はそれらの影響を LMG ほどは受けなかったと考えられる。酢酸に浸漬した検体では、LMG にあまり影響を及ぼさなかった一方で、OC-HC においては早期に反応が阻害された。前述のように OC-HC は pH によって影響されることが知られており<sup>15</sup>、特に酸性環境下ではその感度が著しく低下することからその影響を受けたと考えられた。味噌においても LMG にあまり影響を及ぼさなかった。味噌は、様々な微生物を用いて産生されるが、市販される味噌は過剰膨張防止のため出荷前に加熱殺菌されていることが多く、それらの微生物の影響は受けなかったと考えられる。一方で OC-HC は比較的早期に阻害された、味噌の pH は 5 程度と大きく影響及ぼすものではないため、影響因子が何であったのかは今後の検討課題である。

## 2. DNA 分子サイズに関して

DNA への影響をみると、UVA、UVB では高分子の DNA が多く検出された一方で、UVC では高分子から低分子の DNA がほぼ均一に検出された。UVC は波長が短くエネルギーが強いため、DNA の損傷が大きかったことがうかがえる。しかし、UVA や UVB においても陽性コントロールに比べ高分子のバンドが薄くなっていることから、UVC と比較すれば損傷は少ないものの、核酸に影響している可能性は否定できない。

タンパク分解酵素に浸漬した検体では陽性コントロールに比べ多少低分子も認められるものの、高分子が多く認められた。つまり、同様に LMG が陰性となった状況であっても、タンパク分解酵素や飲料で短期間反応させた検体においては、UV を照射したものに比べて核酸への影響は少なかったと考えられる。

飲料に浸漬した検体についてもタンパク分解酵素同様に比較的核酸への影響は少なかったと考えられる。

### 3. STR 型 に関して

UVB や UVC をピリミドン塩基に照射すると DNA は活性化されサイクロブタンピリミジンダイマーやピリミジン (6-4) ピリミドン光産物などの構造変化を生じること<sup>22,24</sup>や、UVB 照射により細胞内に生じた活性酸素によって DNA 鎖を開裂させる<sup>23</sup>など、紫外線は DNA 損傷を引き起こすことが知られている。しかし本研究では、UV を照射したほぼすべての検体から STR 型が検出された。UVA、UVB では 1 ヶ月近い照射であっても、STR 型判定が可能であった。これは UVA や B が C に比べ比較的エネルギーの弱い紫外線であり、損傷の程度が STR 型の検出に影響及ぼすほどではなかったためと考えられる。この結果は紫外線 (UVA、UVB) 単独では STR 型判定に大きな影響を及ぼさないとする先行研究とも一致する<sup>11</sup>。一方、指紋検出や検体のコンタミネーション防止のために作用されることのある UVC では、一定量以上の照射で STR 型検出に影響を及ぼす場合があるとする先行研究があった<sup>12-14</sup>。しかし、本研究では UVA や UVB と同様に UVC に暴露された検体でも STR 型は検出された。UVC のこれらの文献と本研究では、抽出法は異なるものの、より長期間の照射でも検出された。このため今後、今回使用したキットと文献の抽出法を比較し検出率の差異を検討することが必要であると推察された。

タンパク分解酵素に浸漬した検体では、一般的な抽出法では STR 型判定が困難であった。これは、浸漬したタンパク分解酵素が DNA polymerase に影響し PCR を阻害したため、正しく増幅できなかったと考えられた。そこで、抽出作業前に 95 °C で 3 分間の加熱によりタンパク分解酵素を失活させ、より PCR 阻害因子につよい DNA polymerase を使用すると STR 型の判定は可能となった。このことから、血痕がタンパク分解酵素によって汚染されている場合、抽出前にタンパク分解酵素を失活させることで STR 型を検出できることが示唆された。

飲料に浸漬した検体においても一般的な抽出方法では STR 型判定が困難であった。これは、植物に含まれる多糖類などの PCR を阻害する成分<sup>32</sup>の除去が不十分だったため、その影響を受けたと考えられた。そこで不純物を可能な限り除去するため、遠心による前処理を試みたことで、STR 型は検出された (Fig. 5)。これらのことから、検体が飲料などによって汚染されている場合、抽出の際、前処理をするなど十分に PCR 阻害物質を除去することで STR 型を検出できることが示唆された。

以上のことから、本研究では、LMG が陰性であっても、抗酸化物質などの影響が考えられる場合においては、それらの影響の少ない OC-HC での判定が可能な場合があることが示唆された。さらに、LMG や OC-HC 法で血痕の証明不可能となった場合においても、紫外線に照射した検体では STR 型による個人識別は可能であることが示唆された。また、一般的な抽出法では検出困難なタンパク分解酵素や飲料などに汚染された検体についても、本研究の II 群のように加熱や PCR 阻害因子につよい DNA Polymerase の使用、遠心等の追加などの工夫で、STR 型による個人識別は可能な場合があることが示唆された。



しかし、法医学においては血液様斑痕があった場合、それが血痕でヒトの血液であると証明する必要がある。このため、LMG などの予備試験が陰性の検体は鑑定資料から除外されているのが現状である。一方、現時点では血痕鑑定の予備試験としては応用されていないが、近年では RNA (Messenger RNA: mRNA<sup>34</sup> や micro RNA: miRNA<sup>35</sup>) などによるヒト血液の新しい証明方法が研究レベルで報告されている<sup>36・37</sup>。平成 22 年「刑法及び刑事訴訟法の一部を改訂する法律」<sup>38</sup> により殺人罪の時効が廃止となったことから、これらの新たな証明法が様々な面から検討がなされて予備試験として導入されれば、現在は血痕予備試験陰性の検体であっても今後は血痕鑑定資料としての有用性が出てくるだろう。

#### 4. リミテーション

①本研究では、検体数が 20 人と比較的少ない。また LMG や OC-HC の検査の際、採取し使用しているサンプルの数は 1 検体につき 1 本であるため、実験誤差や個体での誤差が生まれている可能性が否定できない。このため、今後は検体数を増やし、さらに LMG や OC-HC の検査の際、採取する糸の本数も増やすなどして検討される方がより望ましいと考える。

②今回の研究では検討する項目が多く、そのすべてを網羅する陽性コントロールを設定した。このため、本研究を踏まえ検討項目を細分化したうえで、それぞれの検討内容に適した陽性コントロールの設定することで最終的な検討内容がより明快となると考える。

③本研究では STR 型検出の際、検体を 2 群に分け抽出方法を工夫した。今回の結果を踏まえて、今後は反応させる検体の総量をふやし、抽出方法等を工夫する場合は、考えうる阻害因子を研究の設計段階より想定し、同じ検体において 2 つの方法を同じ検体での検討することが理想的であると考ええる。

④本研究では、紫外線や洗剤、食品類などの因子について検討を行った。しかし、自然界や実際の現場では、そのほかにも微生物や土壌熱など様々な影響因子が考えられるがそのすべてを網羅できたわけではない。このため、今後は反応させる因子についても、検討を加えることが望ましいと考える。

## 第7章 まとめ

新鮮血痕を用いて血痕予備試験であるロイコマラカイトグリーン法 (LMG) に影響を及ぼす因子と、それらの因子による人獣血鑑別である OC-ヘモキャッチ S' 栄研 ' (OC-HC) や DNA 型検査である Short tandem repeat (STR) 型による個人識別への影響の可否を検討し、また予備試験陰性検体の証拠資料としての有用性を検討した。

本研究においては LMG では、トリプシンやブロメライン、煎茶、紅茶、コーヒー、UVC に最も強く影響され、UVA や B にも影響を受けることがある一方で、酢酸、炭酸ナトリウム、味噌では大きく影響されないと考えられた。一方、OC-HC では、飲料のような因子による影響は LMG に比べ比較的少ないことが示唆された。さらに、LMG や OC-HC 法で血痕の陰性となった検体においても、STR 型による個人識別は可能な場合があることが示唆された。

しかし、法医学においては血液様斑痕があった場合、それが血痕であり、ヒトの血液であると証明する必要がある。このため、予備試験が陰性の検体は鑑定資料から除外されている。近年では血液の新しい証明法が確立されてきており、そのような方法を使えば、今回のような因子によって血痕予備試験陰性となった検体についても資料としての有用性が出てくるだろう。

本研究のように、一度に様々な因子に対する影響を実際に行われる検査の順序にのっとりその検出の可否を調べた研究はない。本研究のように血痕予備試験陰性となった検体についてもヒト血液の場合もあり、これらから DNA 型が検出される可能性があることがわかった。このため、現行の予備試験で陰性の検体であっても新たな予備試験などが検討されれば、資料としての有用性が認められれば、未解決事件の解決や、冤罪事件の防止につながるだろう。

## 第9章 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導いただきました社会医学系法医学分野  
准教授 内ヶ崎西作先生、専任講師 鉄 堅先生、助手 磯部 英二先生、技  
手 飯酒盃 勇様、ならびにサンプルをご提供いただきましたボランティアの  
皆様に深謝いたします。

# Bloodstain detection



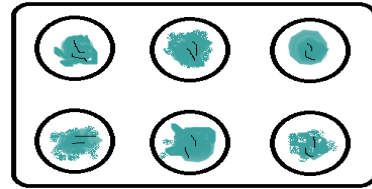
斑痕(ヒト血痕)



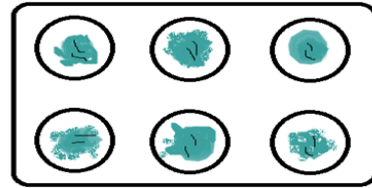
斑痕(動物血痕)



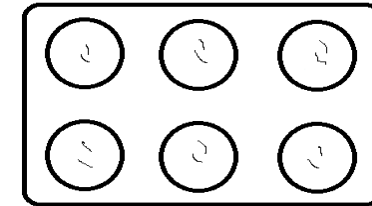
斑痕(血痕以外)



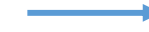
LMG陽性



LMG陽性



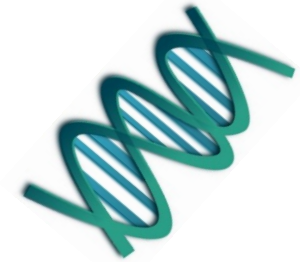
LMG陰性



OC-HC陽性



OC-HC陰性



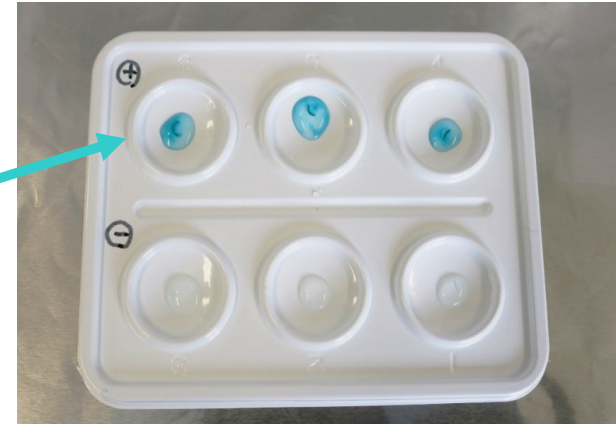
STR検査

(Fig. 1)

# LMG



試薬滴下前

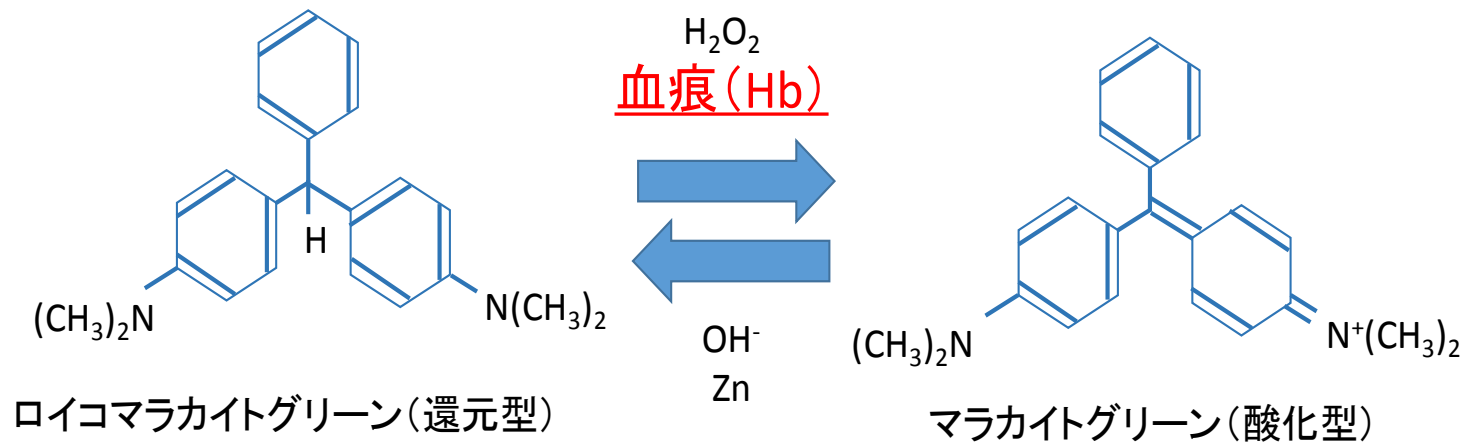


青緑色の発色

試薬滴下後

\* 上段陽性, 下段陰性

35



(Fig. 2)

# OC-HC

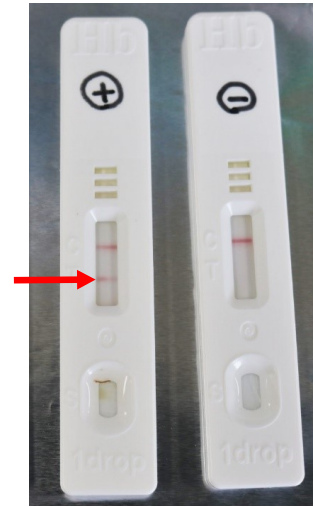
36



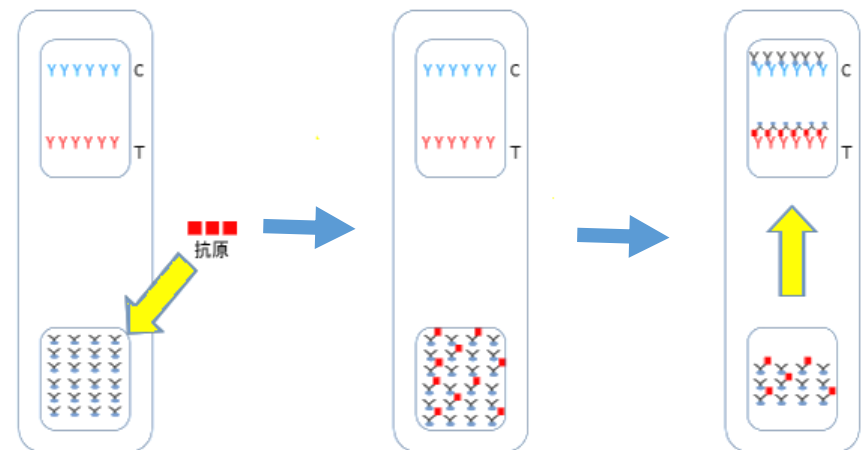
(Fig. 3)



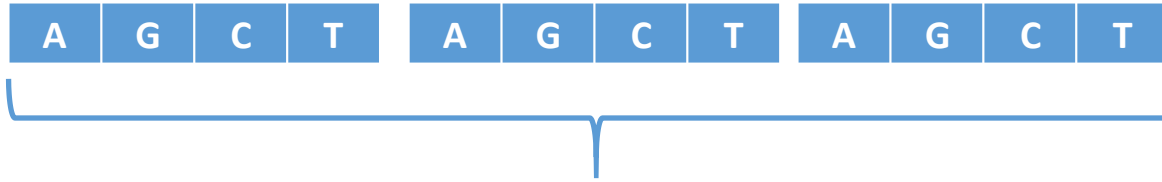
緩衝液滴下前



緩衝液滴下後  
\* 右陽性、左陰性



# STR

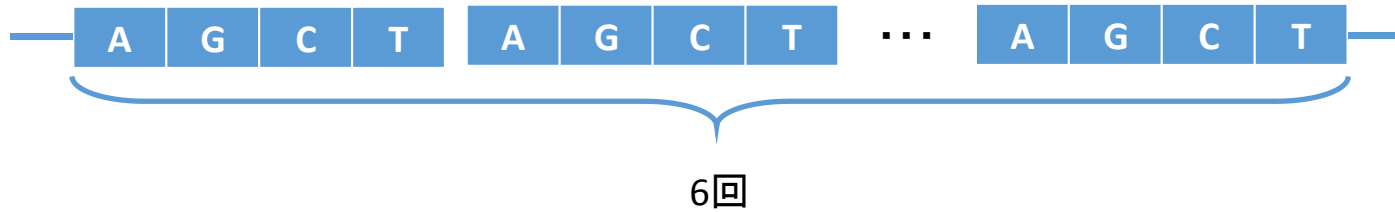


Short Tandem Repeat (STR): 5塩基以下の同じ塩基の繰り返し配列

37

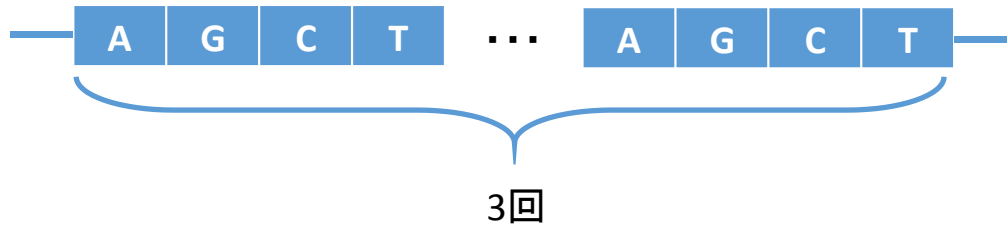


Aさん



Bさん

(Fig. 4)

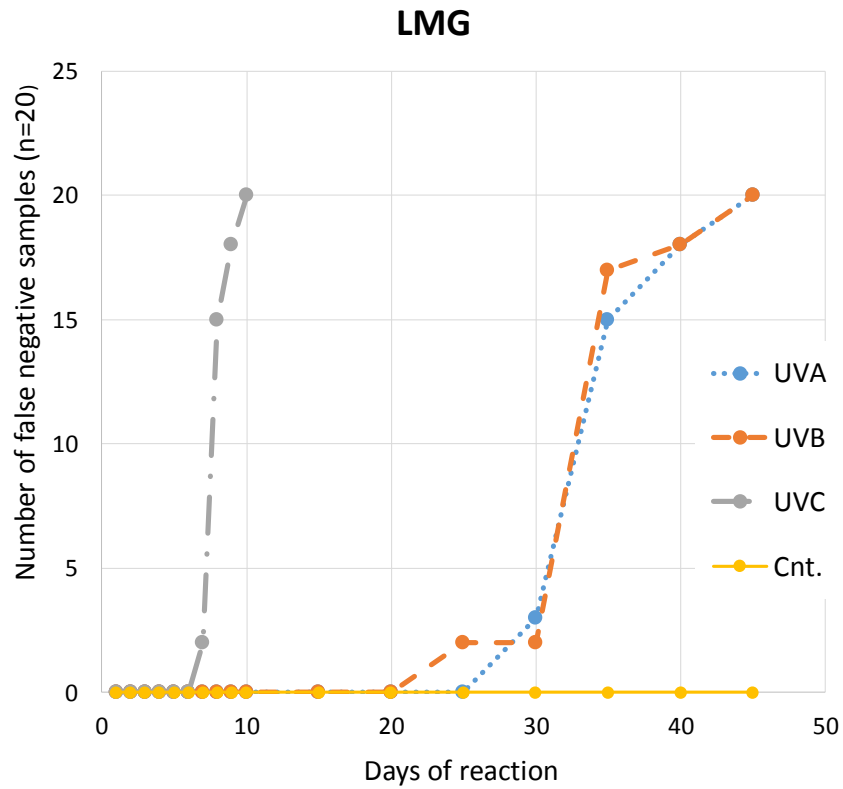


個人によって繰り返し回数  
が異なる

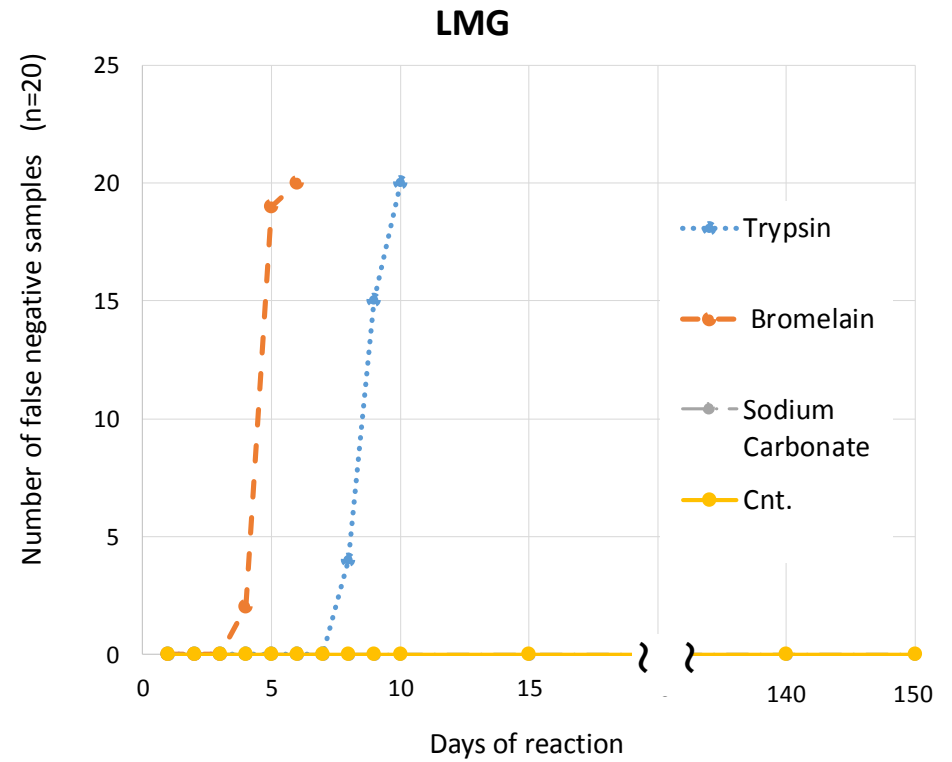


# Variation of LMG reaction on UV and detergents

88

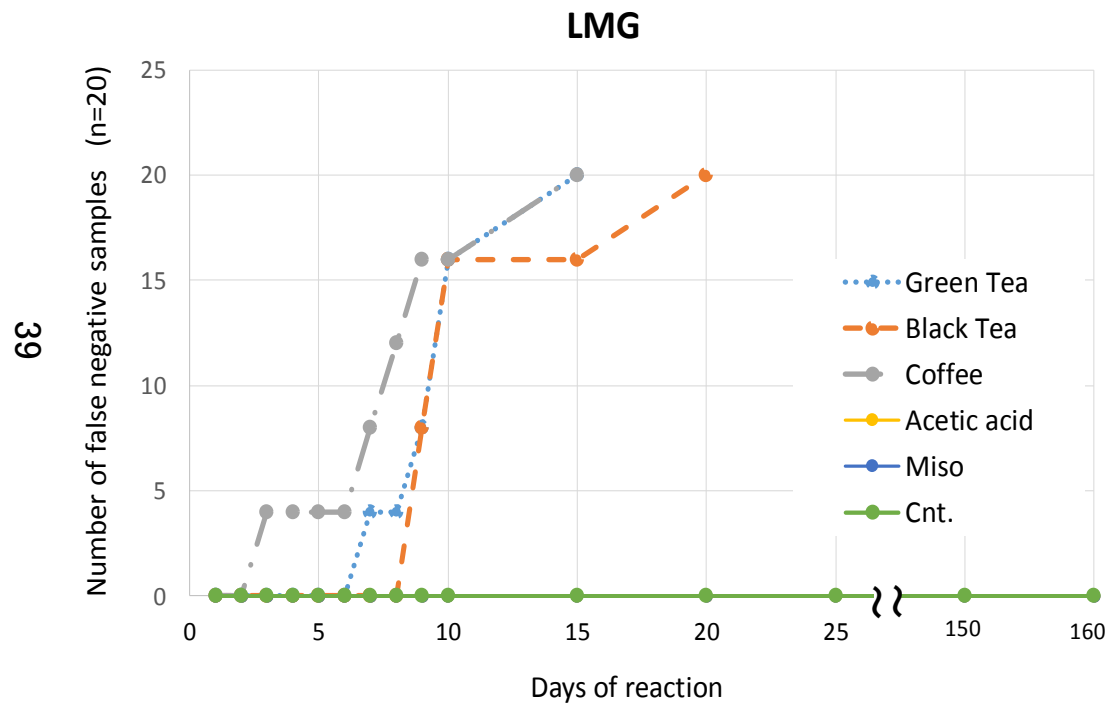


(Fig. 5)



(Fig. 6)

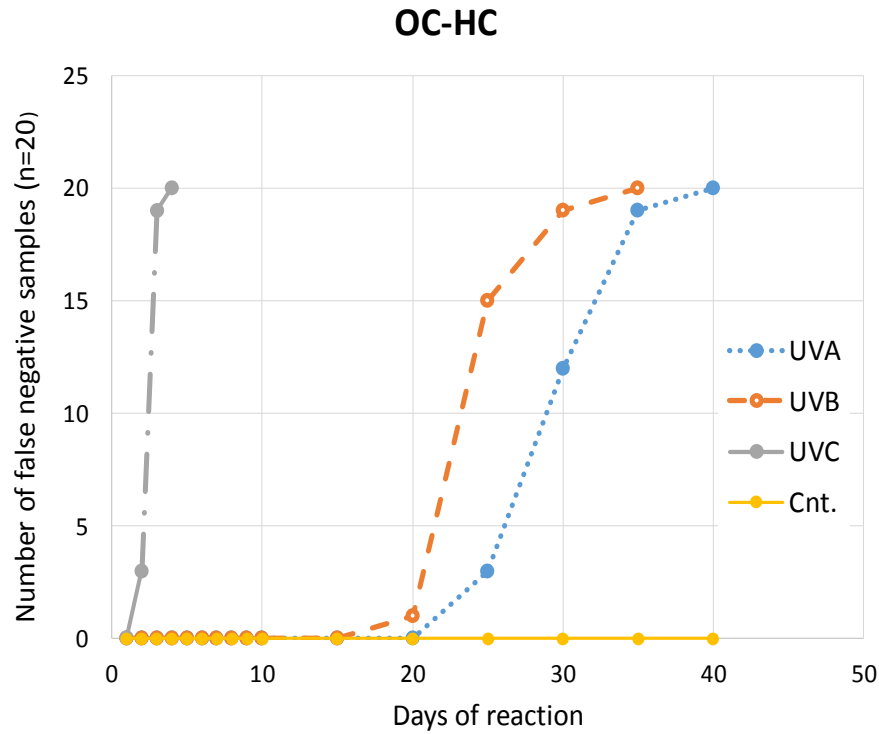
# Variation of LMG reaction on foods



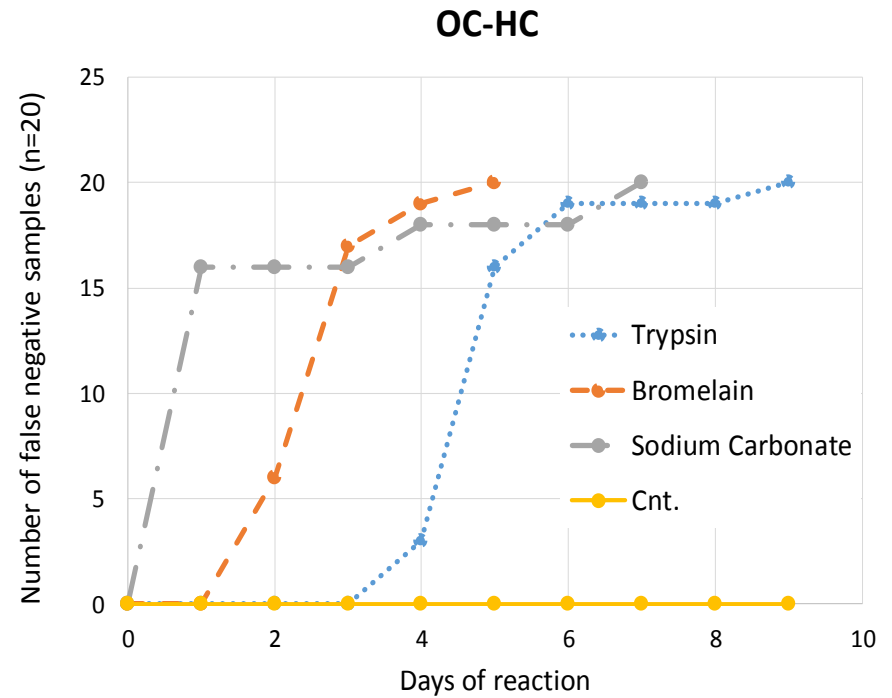
(Fig. 7)

# Variation of OC-HC reaction on UV and detergents

40



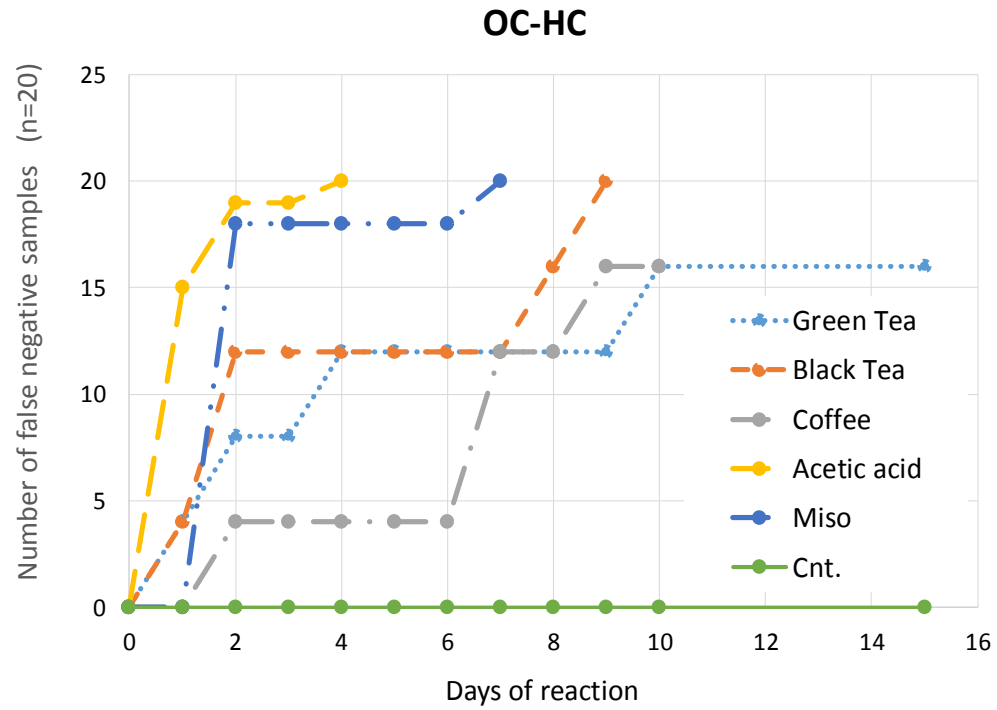
(Fig. 8)



(Fig. 9)

# Variation of LMG and OC-HC reaction on foods

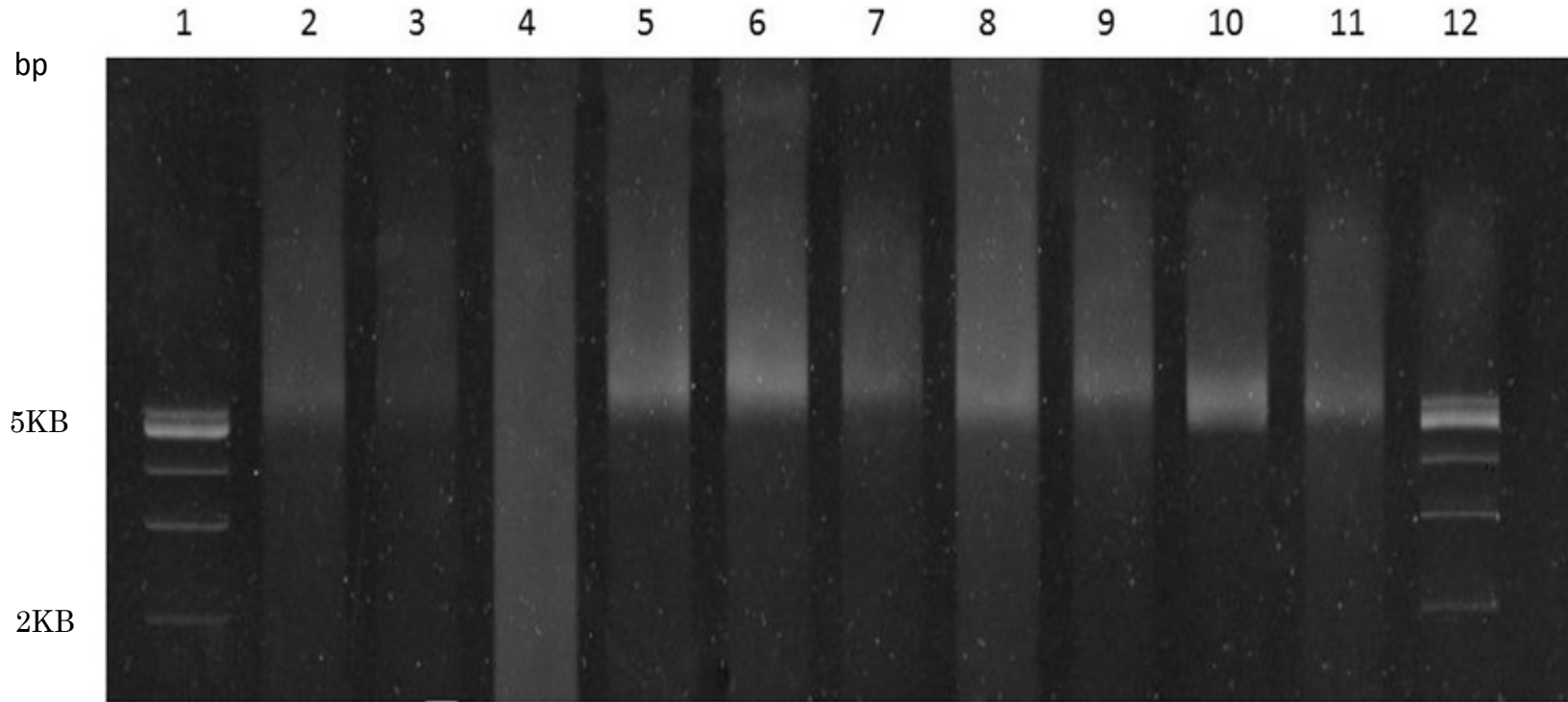
41



(Fig. 10)

# Confirmation of DNA molecular size

42

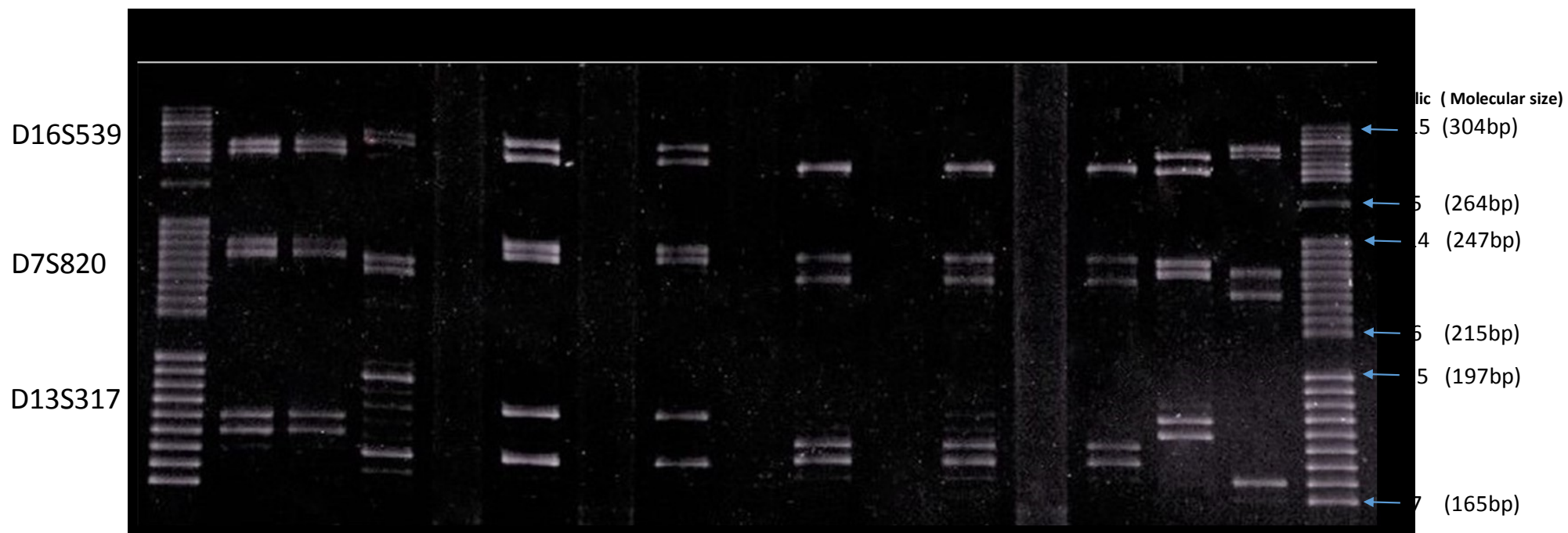


1. 12. DNA size marker,  
2. UVA, 3. UVB, 4. UVC,  
5. Blomrline, 6. Trypsin, 7. Green tea 8. Black tea, 9. Coffee,  
10. Positive control 11. K562 DNA

(Fig. 11)

# Confirmation of STR genotypes by using SilverSTR<sup>®</sup> III

43



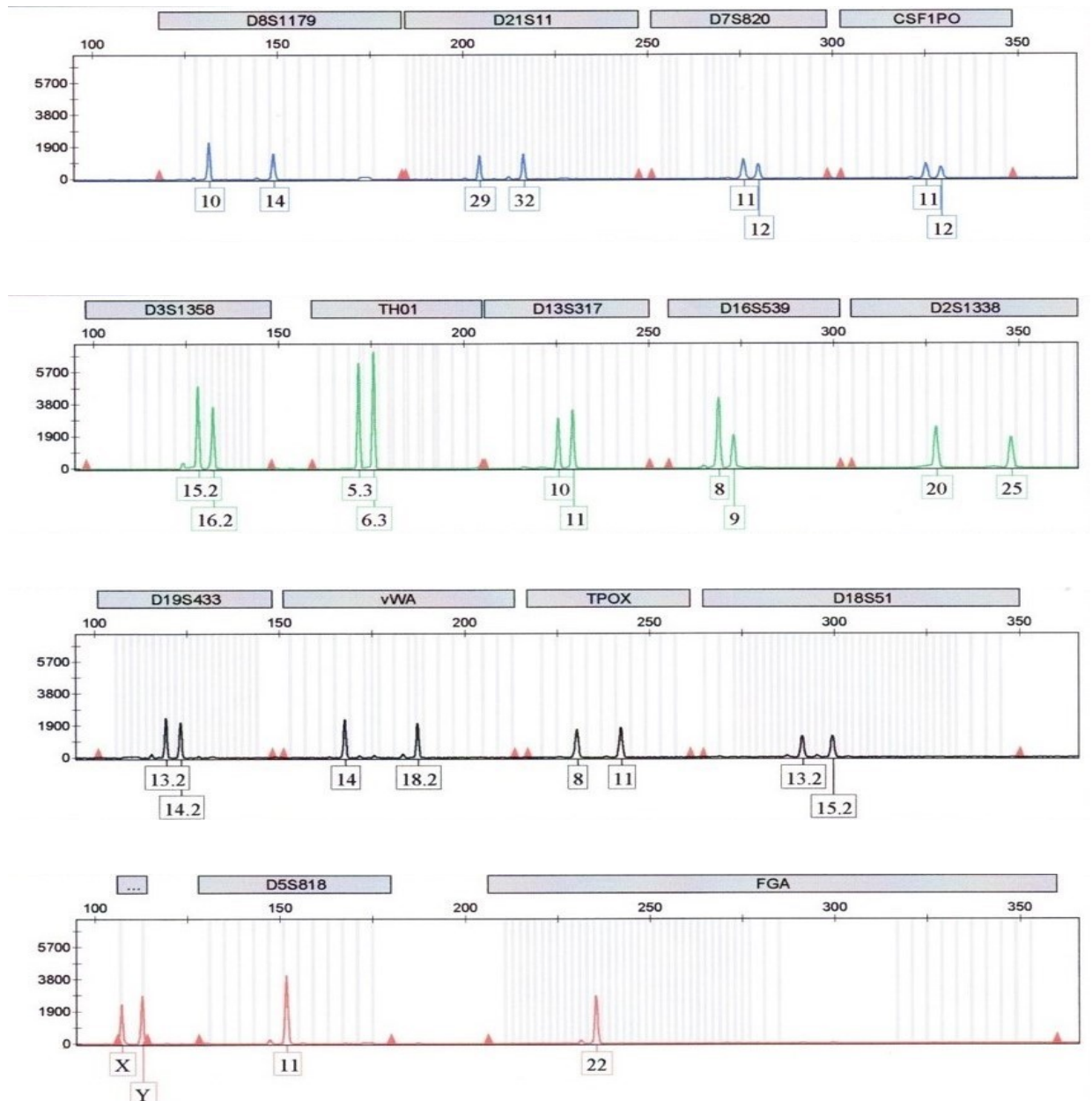
- 1, 17.Ladder,  
 2. UVA, 3. UVB, 4. UVC,  
 5.Blomline (I), 6.Blomline (II a) 7.Trypsin(I), 8.Trypsin(II a) ,  
 9.Green tea(I),10.Green ate(II b), 11.Black tea(I) , 12.Black tea(II b),13.Coffee(I), 14.Coffee(II b)  
 15.Positive control 16.K562 DNA

(Fig. 12)

# Confirmation of STR genotypes by using

## AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

### (UVA)

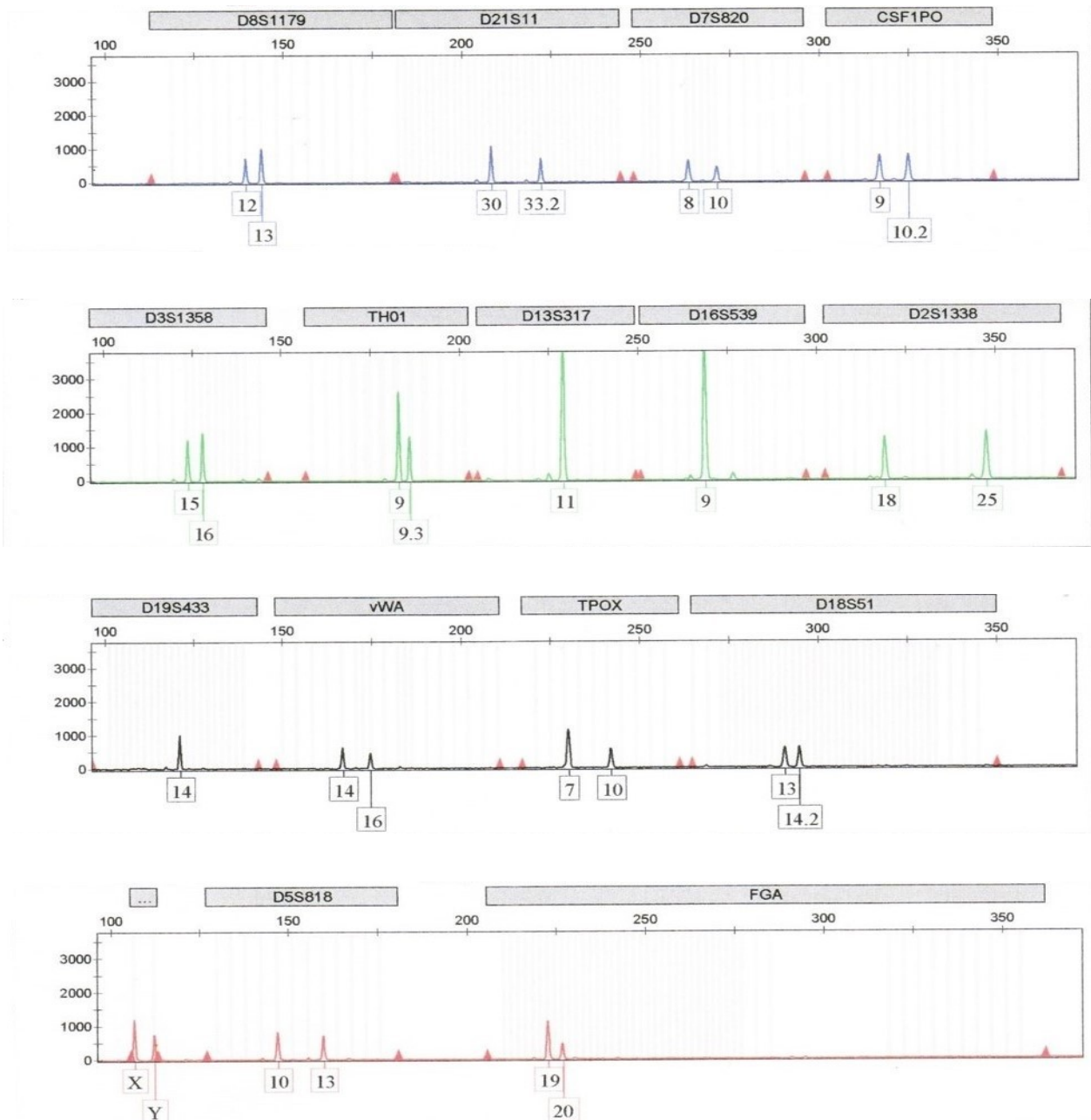


(Fig.13)

# Confirmation of STR genotypes by using

# AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

## (UVB)



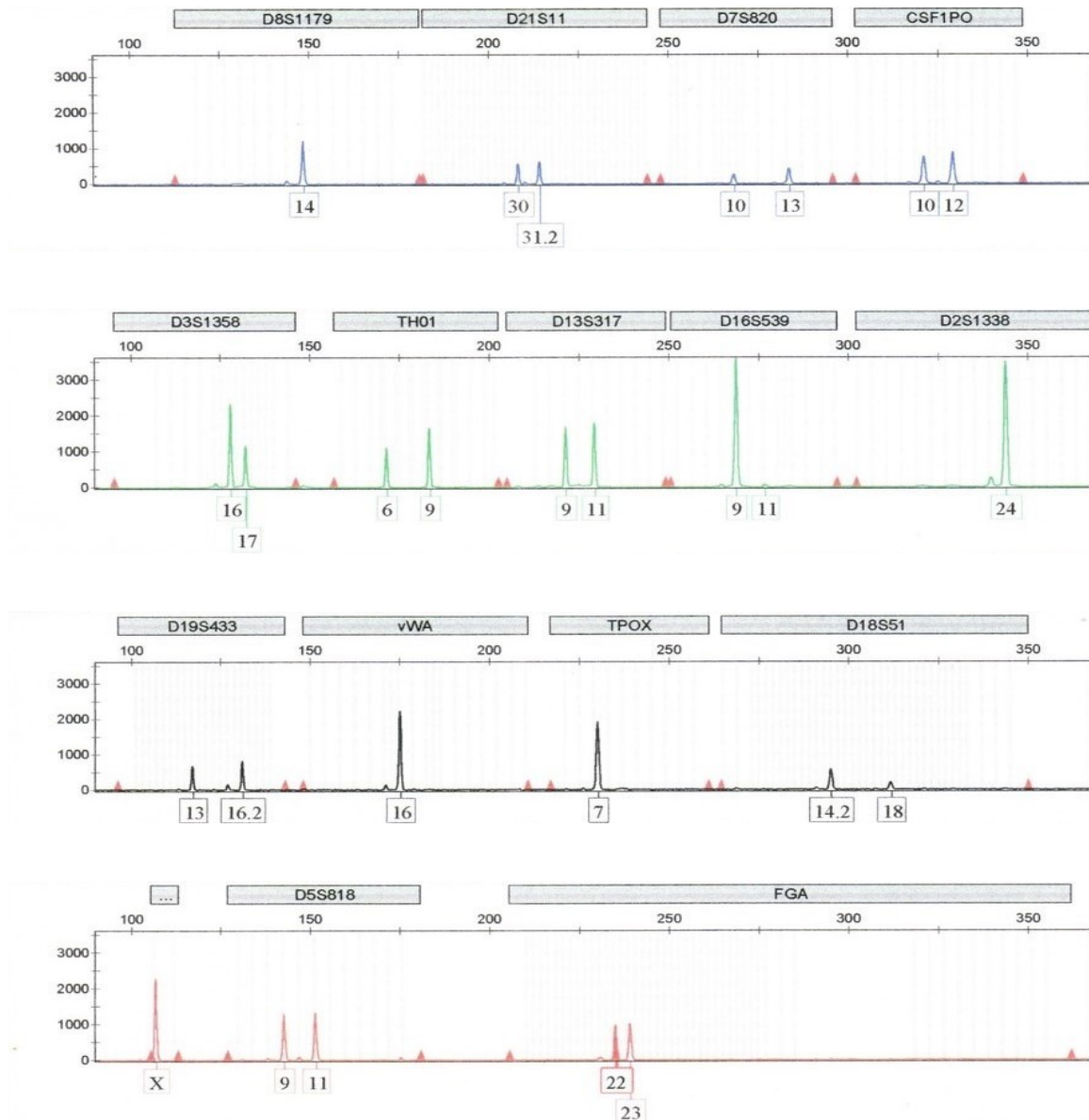
(Fig.14)



# Confirmation of STR genotypes by using

# AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

(UVC)

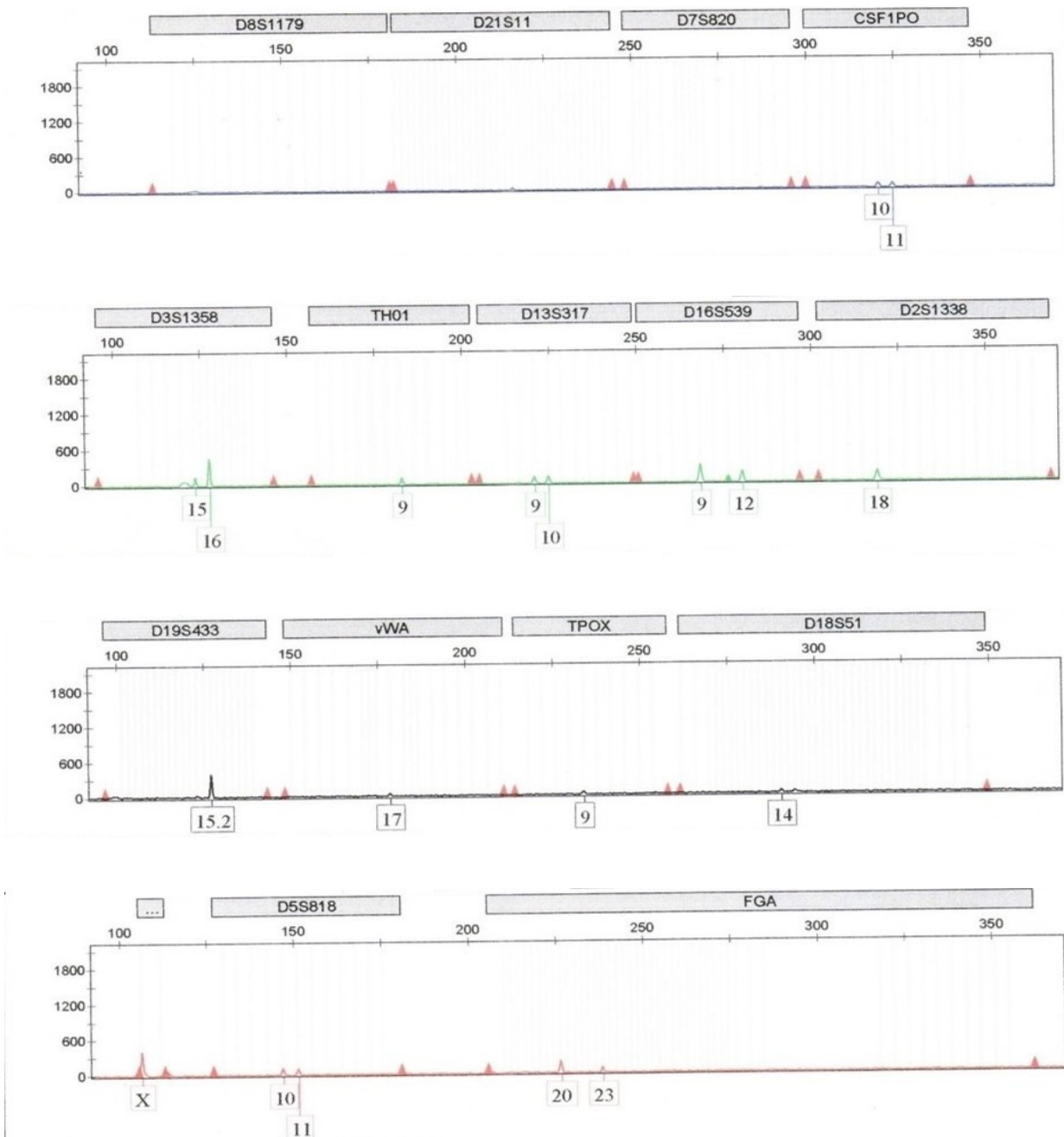


(Fig.15)

# Confirmation of STR genotypes by using

# AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

(Trypsin without treatment)

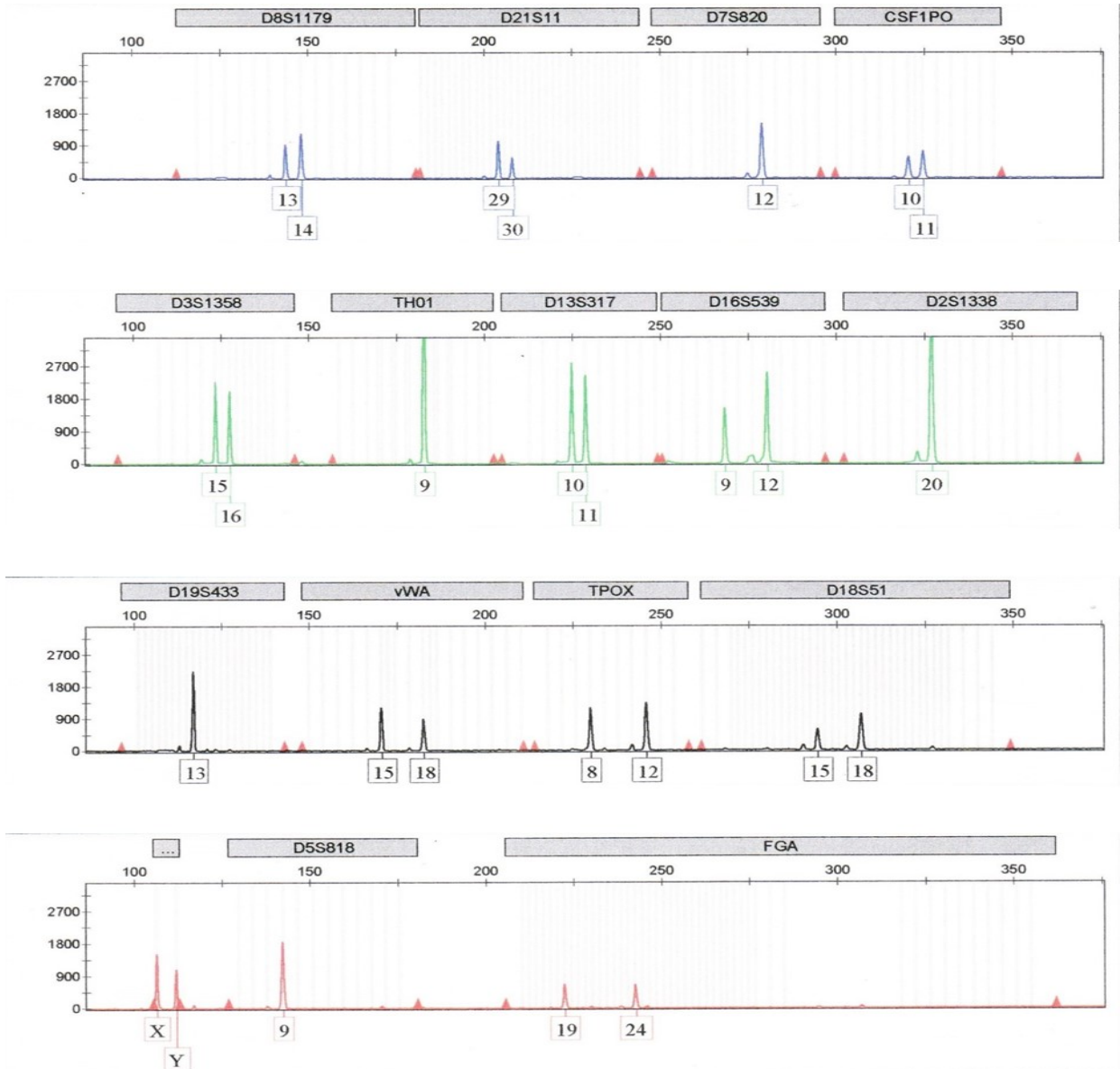


(Fig.16)

# Confirmation of STR genotypes by using

## AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

### (Trypsin with treatment)

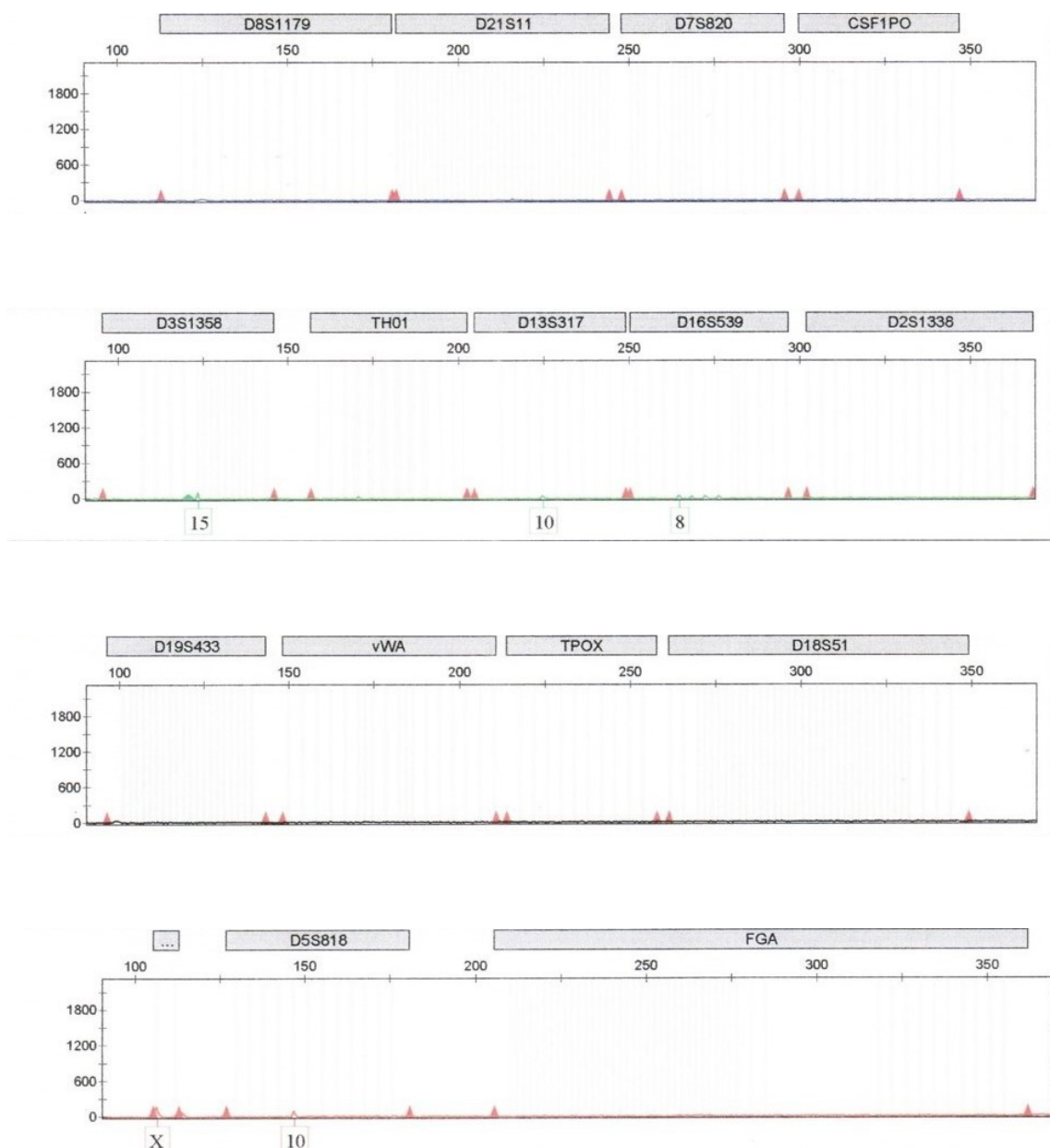


(Fig.17)

# Confirmation of STR genotypes by using

# AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

## (Bromelain without treatment)

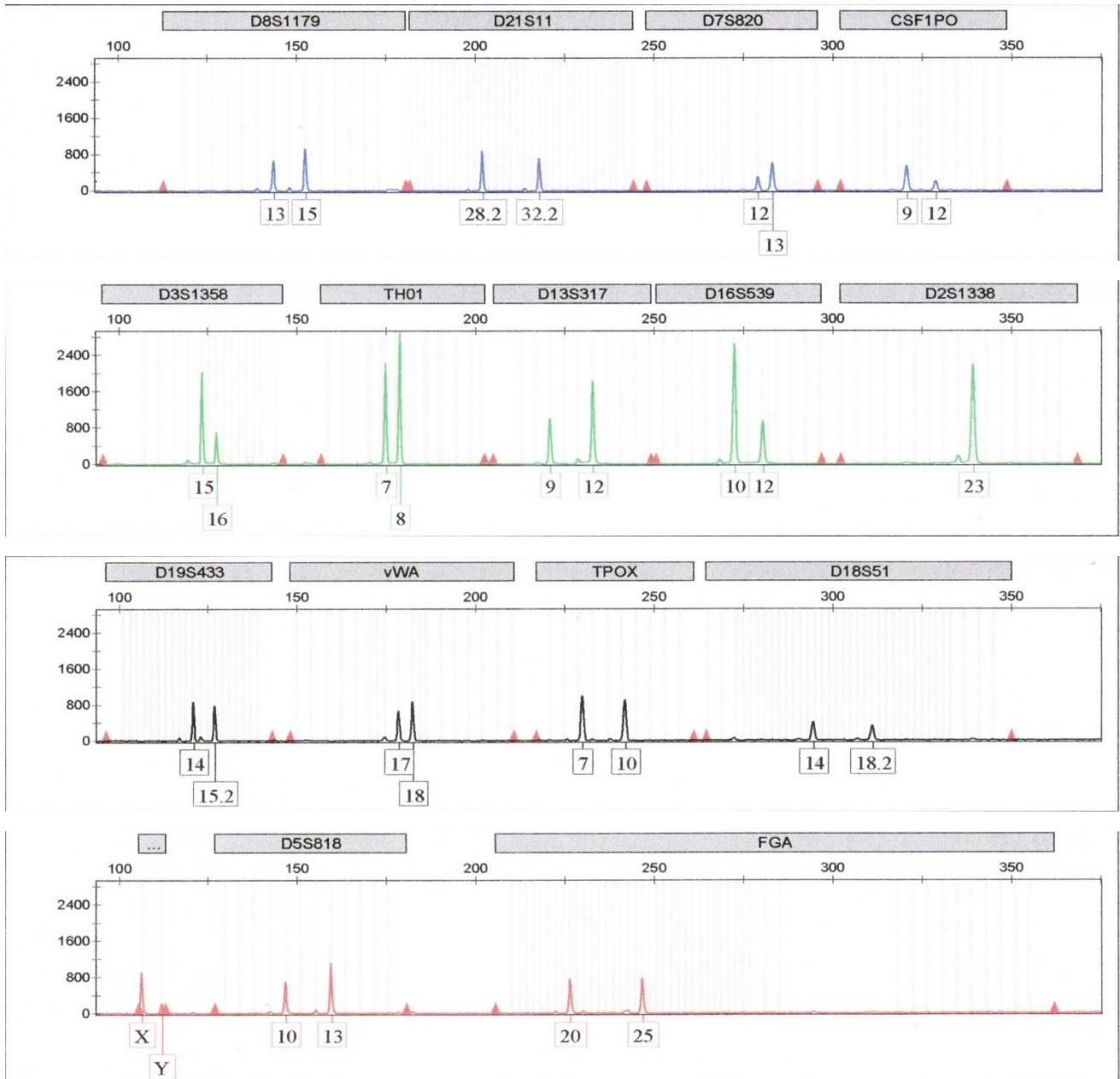


(Fig.18)

# Confirmation of STR genotypes by using

## AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

### (Bromelain with treatment)

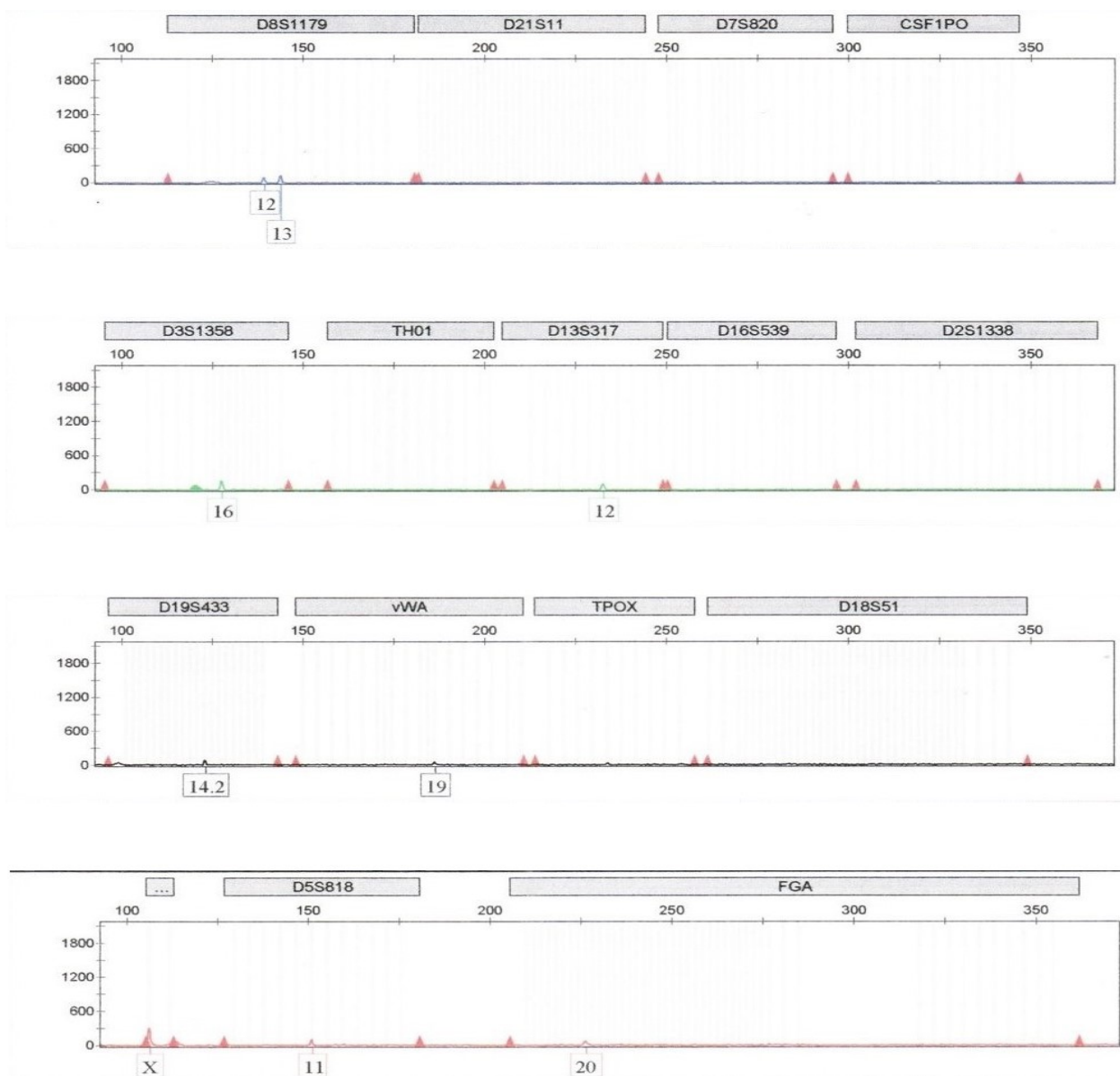


(Fig.19)

## Confirmation of STR genotypes by using

## AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

### (Green tea without treatment )

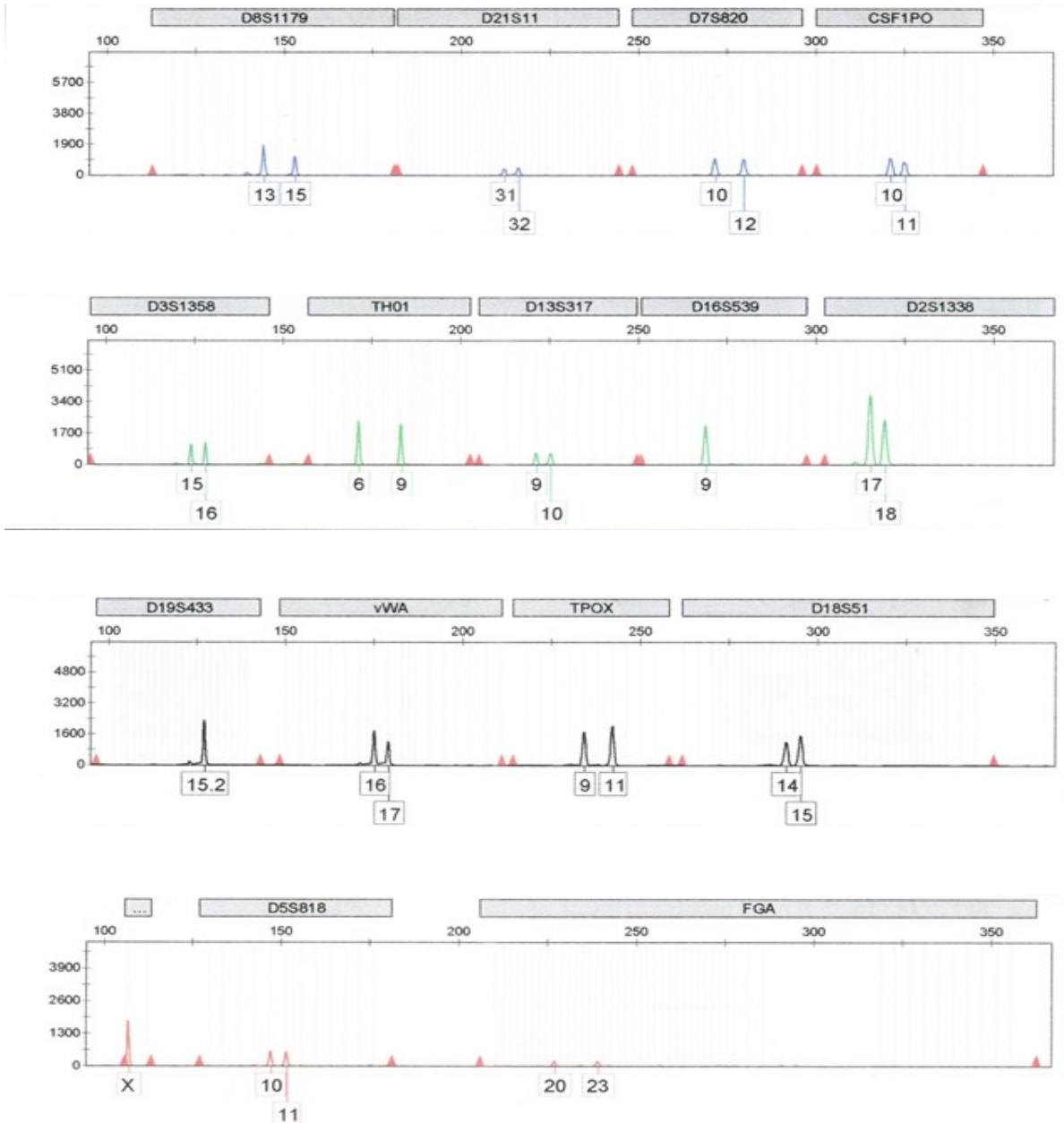


(Fig.20)

# Confirmation of STR genotypes by using

# AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

## (Green tea with treatment )

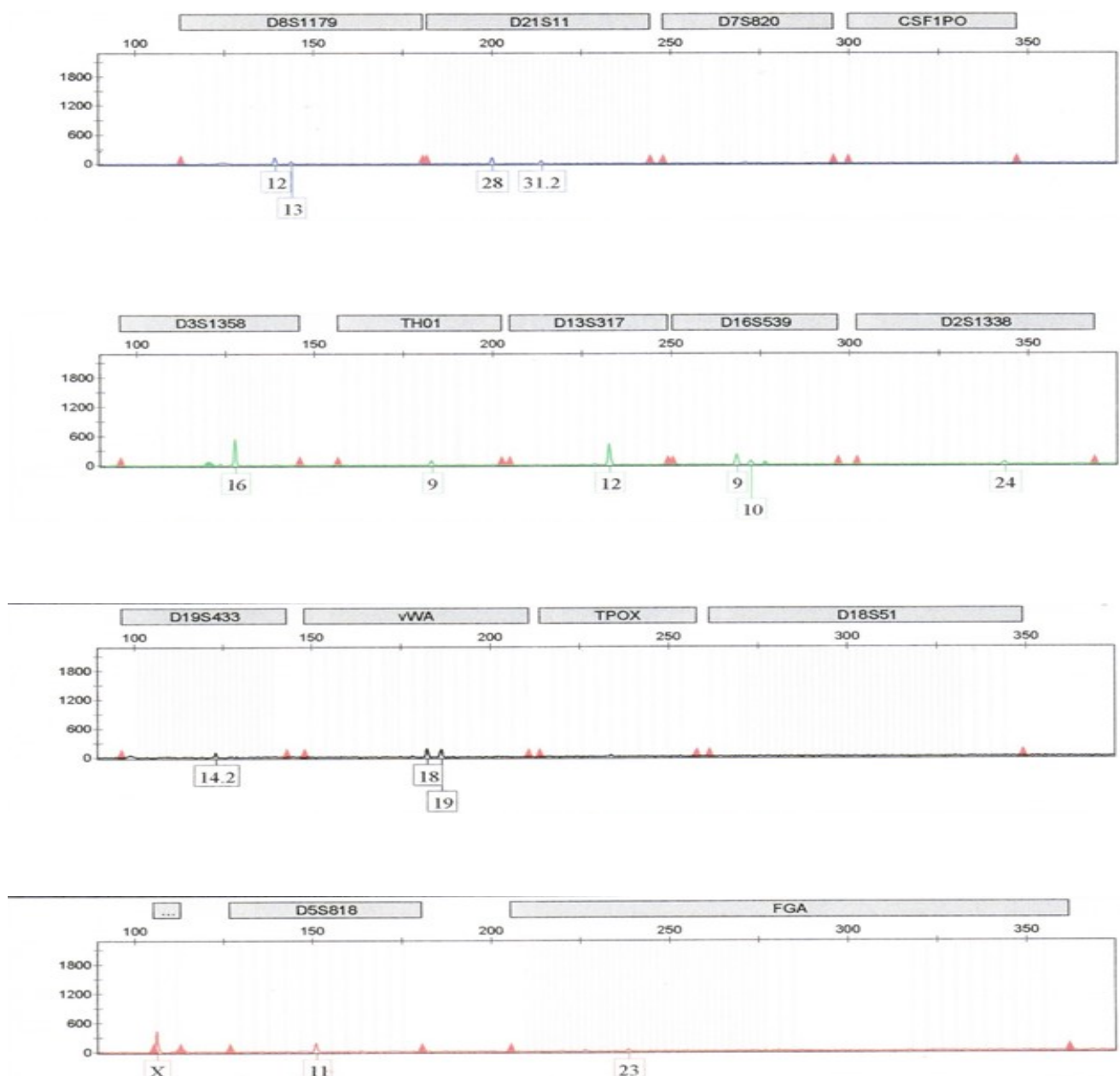


(Fig.21)

## Confirmation of STR genotypes by using

## AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

### (Black tea without treatment )



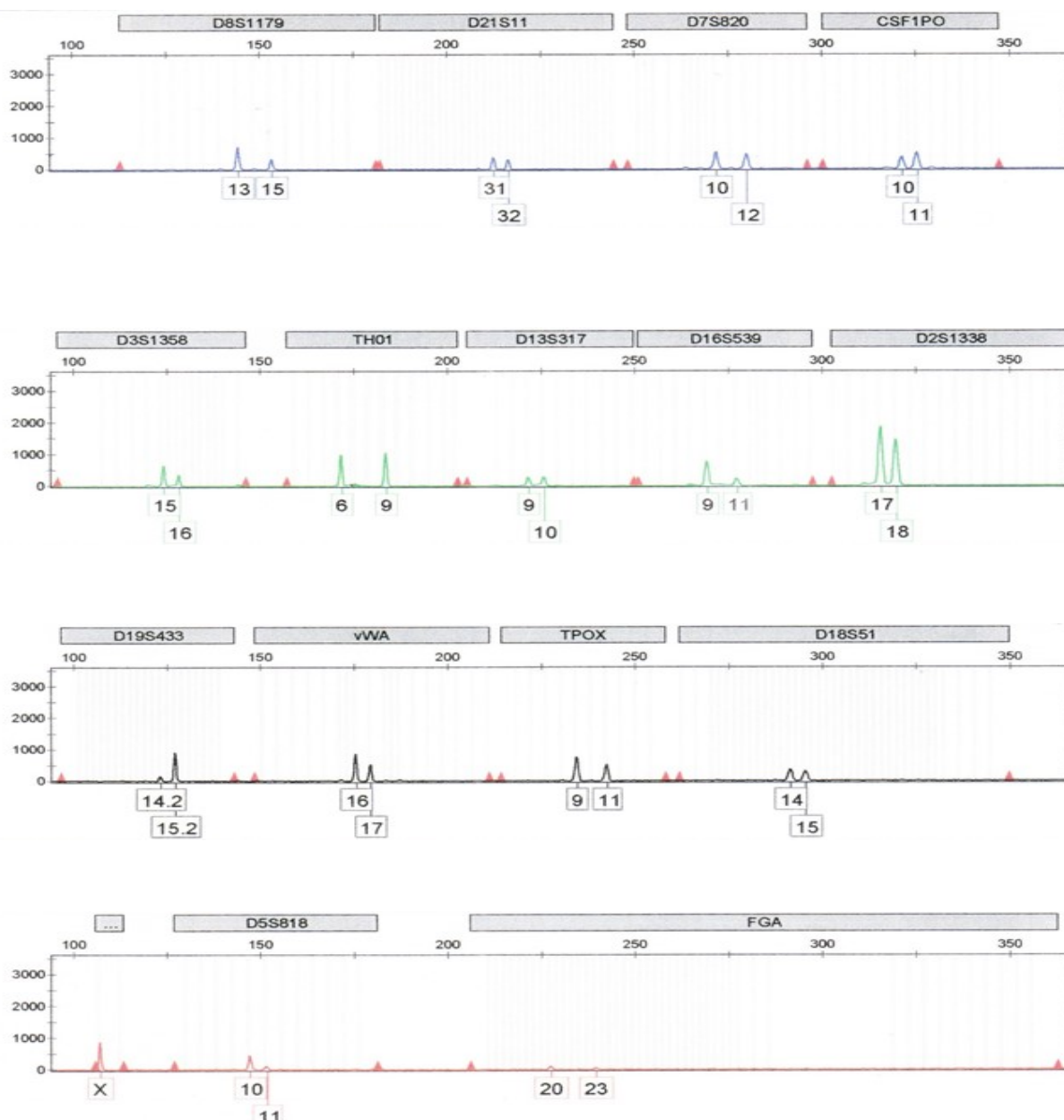
(Fig.22)



## Confirmation of STR genotypes by using

## AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

### (Black tea with treatment)

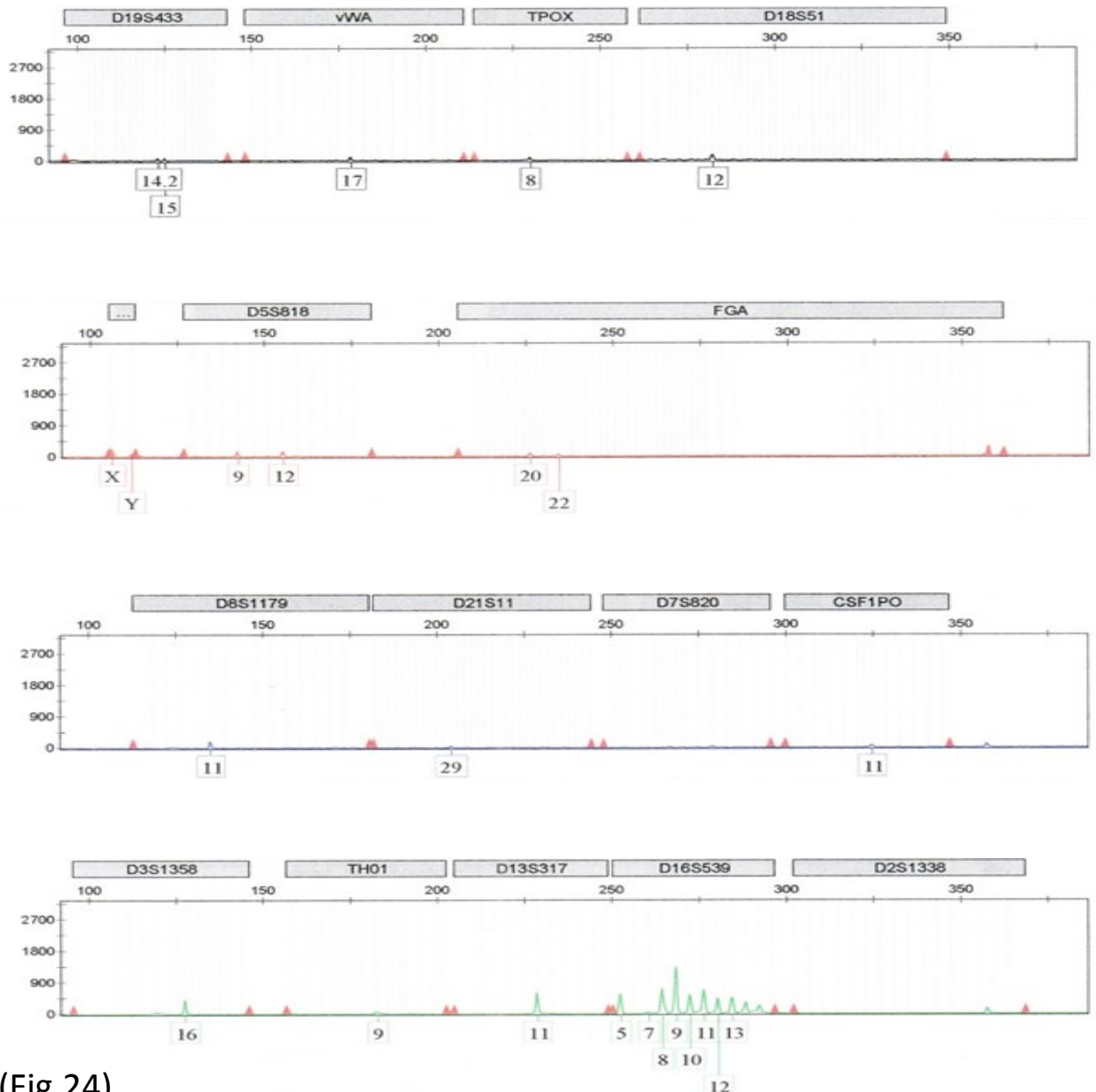


(Fig.23)

# Confirmation of STR genotypes by using

# AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

## (Coffee without treatment)

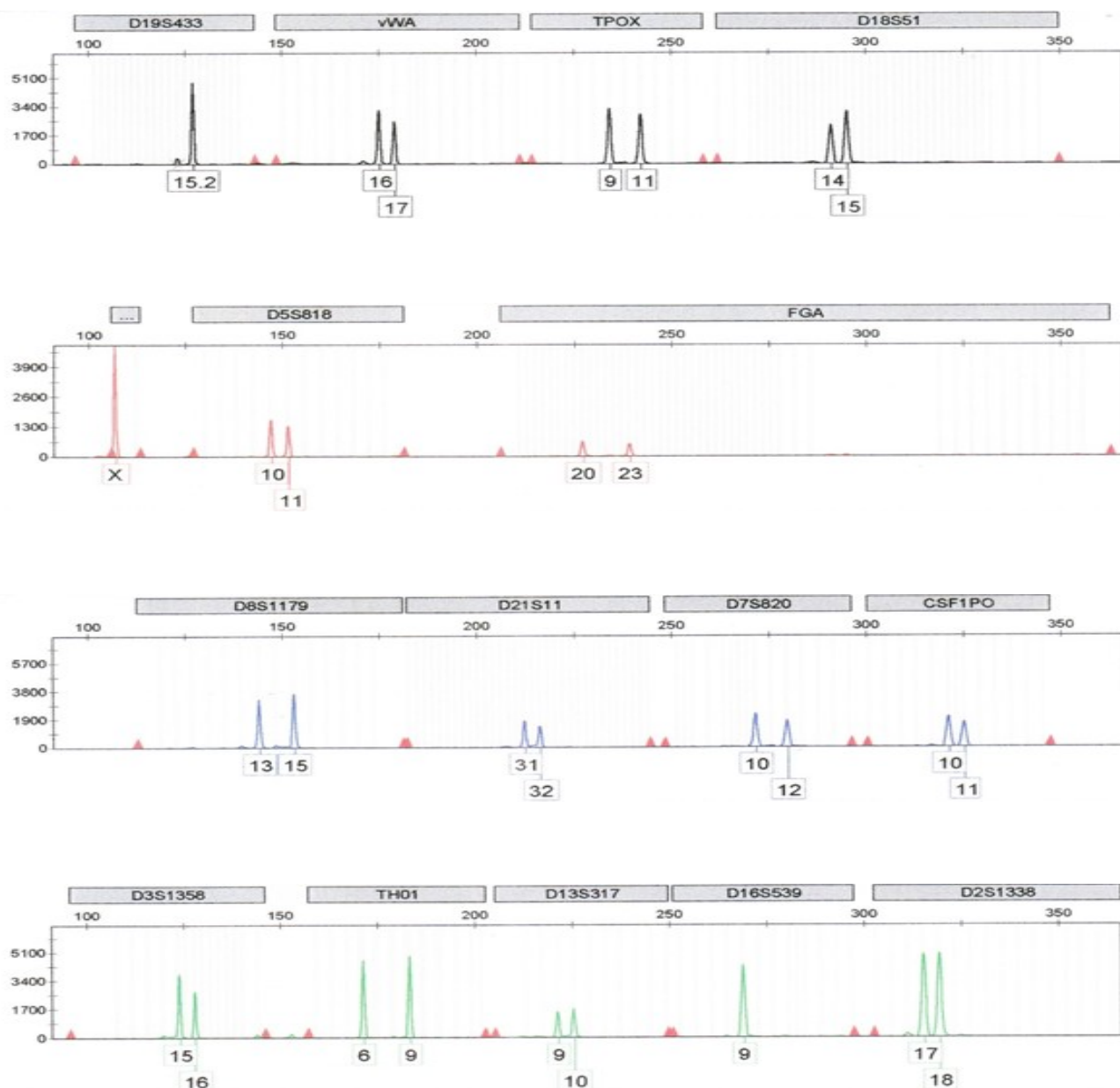


(Fig.24)

## Confirmation of STR genotypes by using

## AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

### (Coffee with treatment)

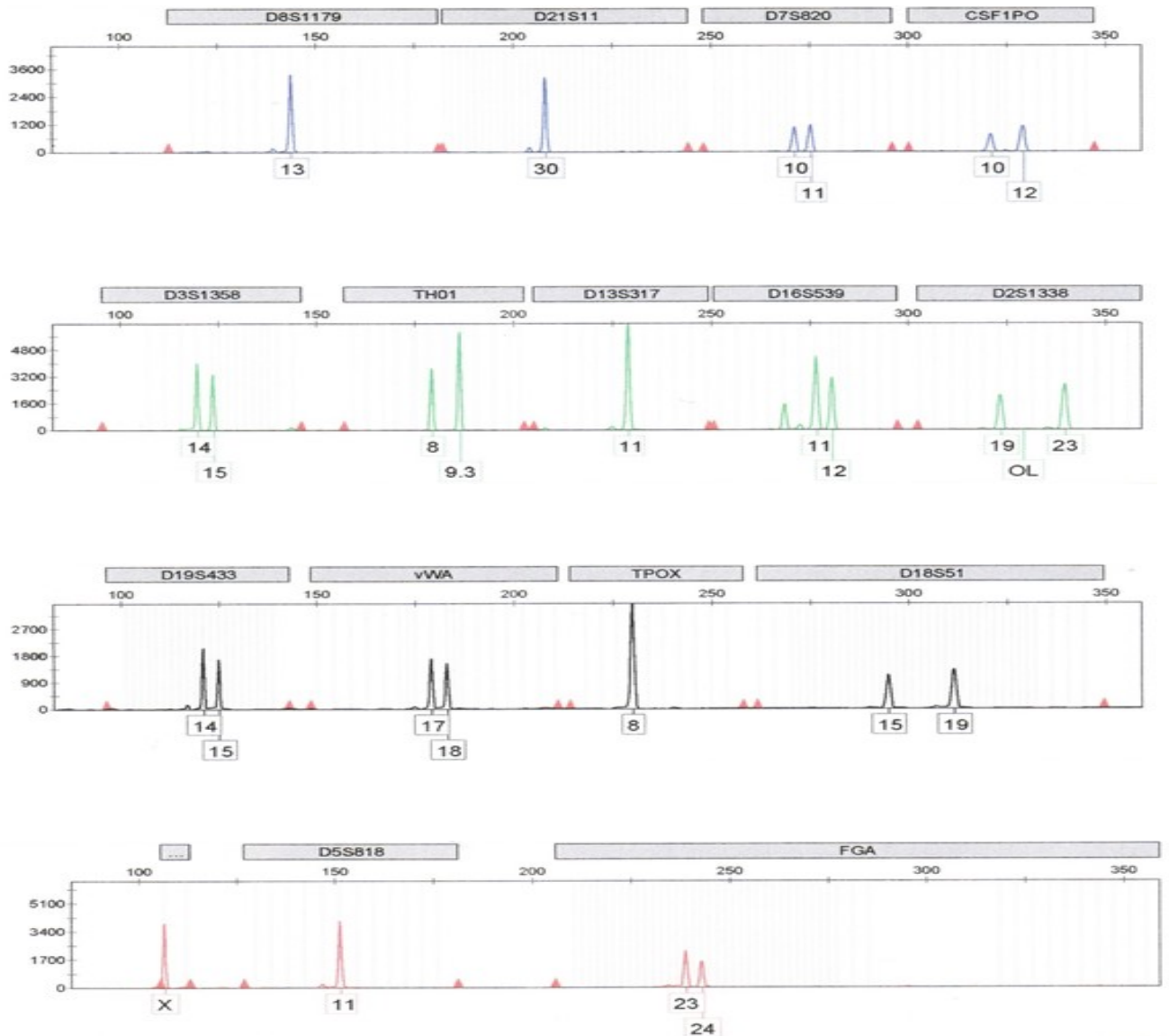


(Fig.25)

# Confirmation of STR genotypes by using

## AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification

### (Control)



(Fig.26)

# Over all results

58

	LMG	OC-HC	STR ( I 群)	STR ( II 群)
UVA	×	×	●	---
UVB	×	×	●	---
UVC	×	×	●	---
Trypsin	×	×	×	●
Blimline	×	×	×	●
Sodium carbonate	●	×	---	---
Green tea	×	▲	×	●
Black tea	×	×	×	●
Coffee	×	▲	×	●
Acetic Acid	●	×	---	---
Miso	●	×	---	---

(Fig.27)

× : 検出不能 ▲ : 一部で検出 ● : 検出可能 --- : 検査せず

## 図説

### Fig. 1 : Bloodstain detection

一般的な血痕鑑定の流れを示した。

血痕鑑定は、一般的に血痕か否かの予備試験の後、人獣血鑑別、及び個人識別の順で検査が行われる。人血である場合、予備試験、人獣血鑑別、STR 型による DNA 検出がいずれも可能である。しかし、動物血痕の場合には予備試験では陽性として検出されるが、人獣血鑑別では陰性となりその後の検査は行われない。さらに斑痕が血痕ではない場合、予備試験で陰性となりその後の検査は行われない。

### Fig. 2 : LMG

実際の写真と、LMG の化学反応式を示した。

### Fig. 3 : OC-HC

実際のキットの写真と、OC-HC の反応図を示した。

### Fig. 4 : STR

STR に関する説明を示した。

### Fig. 5 : Variation of LMG and OC-HC reaction on UV (LMG)

紫外線照射血痕検体の LMG での反応性の経時的変化を示した。

Cnt. (コントロール): 陽性コントロールは 4°C で遮光し保存したものをを用いた。また、Fig.6~10 にも同様のコントロールを用いた。

### Fig. 6 : Variation of LMG and OC-HC reaction on UV (OC-HC)

紫外線照射血痕検体の OC-HC での反応性の経時的変化を示した。

### Fig. 7 : Variation of LMG and OC-HC reaction on detergents (LMG)

洗剤等に含まれる物質に反応させた血痕検体の LMG での反応性の経時的変化を示した。

### Fig. 8 : Variation of LMG and OC-HC reaction on detergents (OC-HC)

洗剤等に含まれる物質に反応させた血痕検体の OC-HC での反応性の経時的変化を示した。

**Fig. 9 : Variation of LMG and OC-HC reaction on foods (LMG)**

食品に反応させた血痕検体の LMG での反応性の経時的変化を示した。

**Fig. 10 : Variation of LMG and OC-HC reaction on foods (OC-HC)**

食品に反応させた血痕検体の OC-HC での反応性の経時的変化を示した。

**Fig. 11 : Confirmation of DNA molecular size**

各因子によりの全検体が陰性となった時点でのそれぞれの DNA 分子サイズを示した。(Fig11・12 は法医学の実際と研究第 61 集に掲載したものを引用 39)

**Fig. 12 : Confirmation of STR genotypes by using SilverSTR®III**

各因子によりの全検体が陰性となった時点でのそれぞれの SilverSTR®III による STR 型の検出結果とコントロールの検出結果を示した。

**Fig.13-26 : Confirmation of STR genotypes by using AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification**

各因子によりの全検体が陰性となった時点でのそれぞれの AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification による STR 型の検出結果とコントロールの検出結果を示した。

## 第 10 章 参考文献

1. 滝沢久雄: ABO 式血液型物質の生合成, 関東医学 36: 115-125, 1986.
2. S. H. James, P.E. Kish, T. Paulette Sutton: Presumptive testing and species Determination of Blood and Bloodstains. (Geberth VJ), Principles of Bloodstain Pattern Analysis: Theory and Practice, 349-368: Taylor & Francis, Sunnyvale, 2005.
3. 阿久津智子, 松村一利, 田中和佳, 渡邊 賢, 櫻田宏一: 法科学的試料における人血検査への OC-ヘモキャッチ S ‘栄研’ の有用性の検証, 法科学技術: 103-110, 2014.
4. M. Bancirova: Black and green tea –Luminol false-negative bloodstains detection, Science and Justice: 102-105, 2012.
5. H. Lee, M. J. Park, S. H. Sun, D. Choi, Y. H. Lee, K. Park, B. W. Chun: Ascorbic acid and Vitamin C-containing bevarages delays the leucomalachite green reaxtion latent bloodstains, Legal Medicine: 79-85, 2016.
6. A. Castello, F. Frances, F. Verdu: Chemistry in Crime Investigation: Sodium Percarbonate Effects on Bloodstains Detection, Journal of Forensic Science: 500-502, 2012.
7. S. Mushtaq, N. Rasoolb, S. Firiya: Detection of dry bloodstains on different fabrics after washing with commercially available detergents, Australian Journal of Forensic Sciences: 1-8, 2015.
8. 小林宏志, 富田功一: 血痕検査に及ぼす各種洗剤の影響について (第 1 報) —洗剤成分の界面活性剤などそのものの影響—, 科学警察研究所報告 19(1): 1-15, 1966.
9. 小林宏志, 富田功一: 血痕検査に及ぼす各種洗剤の影響について (第 2 報) —市販洗剤自体の影響およびそれを用いて洗った血痕にていての検査—, 科学警察研究所報告 19(2): 8-20, 1966.



10. A. C. Ponce, F. A. V. Pascual: Critical Revision of Presumptive Tests for Bloodstains, *Forensic Science communications* 1(2): 1-7, 1991.
11. A. Hall, L. M. Sims, J. Ballantyne: Assessment of DNA damage induced by terrestrial UV irradiation of dried bloodstains: Forensic implications, *Forensic Science International: Genetics*: 24-32, 2014.
12. A. Hall, J. Ballantyne: Characterization of UVC-induced DNA damage in bloodstains: forensic implications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*: 72-83, 2004.
13. B. Grskovic, D. Zrnec, M. J. Petek, D. Primorac, G. Mrcic: Effect of Ultraviolet C radiation on biological samples, *Forensic science*: 263-271, 2013.
14. 藤井宏治, 秋葉教充, 角田英俊, 黒沢健至, 黒木健郎, 中村厚, 宗田孝之, 高橋良弥, 市川文彦, 虎尾彰, 水野なつ子, 関口和正: 可搬型スペクトルイメージングシステムに用いる各種光源が STR 型検査に及ぼす影響, *法科学技術: afst.723*, 2017.
15. 白石智子, 関口和正, 大森 毅, 櫻田宏一: ヘモキャッチを用いた人血検査に及ぼす界面活性剤・消毒薬の影響, *鑑識科学* 9(2): 143-149, 2004.
16. T.O. Strachan, A.P. Read : Microsatellite DNA consists of short arrays of simple tandem repeats and is dispersed throughout the human genome, *Human Molecular Genetics*. 3, 268, Garland Science, New York, 2004.
17. D. Hildebrand: DNA for First Responders: Recognizing, Collecting, and Analyzing Biological Evidence Related to Dentistry (Bowers MC.), *Forensic Dental Evidence*. 2, 159-182, Academic Press, Massachusetts, 2011.
18. 押田茂實, 鉄 堅, 岩上悦子: 法医学における DNA 鑑定の歴史, *日大医学雑誌* 68(5) : 278-283, 2009.
19. 佐々木 政子: 太陽を知る(竹下 秀 編), 絵とデータで読む太陽紫外線ー太陽と賢くつきあう法ー, 6-44, 独立行政法人国立環境研究所, つくば市, 2006.

20. 気象庁ホームページ:  
[http://www.data.jma.go.jp/gmd/env/uvhp/uvb\\_monthave\\_tsu.html](http://www.data.jma.go.jp/gmd/env/uvhp/uvb_monthave_tsu.html)  
(参照日 : 2018 年 4 月 25 日)
21. 気象庁ホームページ:  
[https://www.data.jma.go.jp/gmd/env/uvhp/uvb\\_monthave\\_syo.html](https://www.data.jma.go.jp/gmd/env/uvhp/uvb_monthave_syo.html)  
(参照日 : 2018 年 8 月 30 日)
22. R. P. Sinha, D. Häder: UV-induced DNA damage and repair, *Photochemical & Photobiological Sciences*: 225-236, 2002.
23. J. Cadet, T. Douki, J. Ravanat: Oxidatively Generated Damage to DNA to Cellular DNA by UVB and UVA Radiation, *Journal of Photochemistry and Photobiology*: 140-155, 2015.
24. J. Ravanat, T. Douki, J. Cadet: Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components, *Journal of Photochemistry and Photobiology*: 88-102, 2001.
25. N. Vishalakshi, K. Lingappa, M. Prabhakar, A. Dayanand: Production of alkaline protease from *Streptomyces gulbargensis* and its application in removal of bloodstains, *Indian Journal of Biotechnology* 8: 280-285, 2009.
26. D. Saminathan, J. N. Sriman: Purification and characterization of bloodstain decolorizing alkaline metalloprotease from *Bacillus subtilis* IAS 01 for promising bio-detergent, *International Journal of Recent Scientific Research* 6(3): 3010-3015, 2015.
27. (社説) 袴田事件再審 釈然としない逆転決定, 朝日新聞デジタル, 2018.
28. 袴田事件の再審認めず、釈放は維持 東京高裁決定, 日本経済新聞, 2018.
29. 好井久雄: みそとしょうゆ醸造と微生物: 化学と生物 : 674-681, 1970.
30. 西 英二, 山田優子, 小野孝明, 富阪吉登, 酒井謙二, 森口充暲: 人血検査に

影響を及ぼす細菌汚染, 法科学技術: 9-18, 2006.

31. S. Uchigasaki, J. Tie, E. Sobashima, N. Shimada: Genotyping DNA isolated from UV irradiated human bloodstains using whole genome amplification, *Molecular Biology Reports* 45: 925–929, 2018.

32. QIAamp® DNA Investigator プロトコールとトラブルシューティング: sample & assay technologys: 10-12, 2010.

<https://www.qiagen.com/jp/resources/download.aspx?id=eec0cdd-a180-45e6-a842-fa5567bf6edc&lang=ja-JP> (参照日 : 2018 年 8 月 29 日)

32. J. Tie, E. Sobashima, S. Uchigasaki, E. Isobe, I. Isahai: Analysis of STR profiles from the ultraviolet irradiated bloodstain by whole genome amplification, *Forensic Science International*: 1-257, 2017.

33. T. Demeke, R. P. Adams: The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR, *biotechniques*12: 332, 1992.

34. A. Lindenbergh: Development of a mRNA profiling multiplex for the inference of organ tissues, *int J Legal Med.* 127(5): 891-900, 2013.

35. M. Berge: DNA and RNA profiling of excavated human remain with varying postmortem intervals. *Int J Legal Med.* 130 (6): 1471-1480, 2016.

36. D. Zubakov, M. Kokshoorn, A. Kloosterman, M. Kayser: New markers for old stain: stable mRNA markers for blood and saliva identification up to 16-year-old stains, *International Journal of Legal Medicine*: 71-74, 2009.

37. S.M. Park, S.Y. Park, J. H. Kim, T.W. Kang, J.L. Park, K. Woo, J. Kim, H. Lee, S. Y. Kim, S. H. Lee: Genome-wide mRNA profiling and multiplex quantitative RT-PCR for forensic body fluid identification, *Forensic Science International: genetics*: 143-150, 2013.

38. 公訴時効の改正について, 法務省だより 赤レンガ, 2010

<http://www.moj.go.jp/KANBOU/KOHOSHI/no31/one.html>

(参照日 : 2018 年 8 月 30 日)

39. 側嶋 絵里菜, 島田 奈緒美, 鉄 堅, 磯部英二, 飯酒盃 勇, 内ヶ崎 西  
作 : 血痕スクリーニング陰性検体からの STR 型の検出, 法医学の実際と研究  
61: 55-62, 2018.

## 第 11 章 研究業績

側嶋 絵里菜

I	発表		①一般発表	20
②	特別発表	なし		
II	論文		①原著 1 (共 1)	
②	症例報告	なし		
③	総説	3		
III	著書			なし

以上

## I 学会発表

### ①一般発表

1. 内ヶ崎西作, 磯部英二, 側嶋絵里菜, 鉄 堅, 飯酒盃 勇, 堤 博文, 勝又純俊, 岩上悦子, 森田 香: ヘリウムガスによる自殺の一例, 第 83 回日本法医学会学術関東地方集会, 東京, 2014 年 10 月.
2. 内ヶ崎西作, 側嶋絵里菜, 鉄 堅, 磯部英二, 飯酒盃 勇, 岩上悦子, 勝又純俊: 児童虐待に関する法医学セカンドオピニオンの問題点について, 第 99 次日本法医学会学術全国集会, 高知, 2015 年 6 月.
3. 内ヶ崎西作, 側嶋絵里菜, 磯部英二, 鉄 堅, 飯酒盃 勇, 小室歳信, 岩上悦子, 勝又純俊: 異食症に基づく胃潰瘍が死因となった一例, 第 84 回日本法医学会学術関東地方集会, 東京, 2015 年 10 月.
4. 内ヶ崎西作, 鉄 堅, 磯部英二, 飯酒盃 勇, 伊澤 光, 勝又純俊, 岩上悦子, 側嶋絵里菜: 「両側性死斑」がみられた溺水例 死斑評価の問題点, 第 100 次日本法医学会学術全国集会, 東京, 2016 年 6 月.
5. 内ヶ崎西作, 側嶋絵里菜: 自ら飛び降りた考えられる両側踵骨骨折の一例, 第 8 回日本子ども虐待医学会・学術集会, 福岡, 2016 年 7 月.
6. 側嶋絵里菜, 鉄 堅, 磯部英二, 飯酒盃 勇, 内ヶ崎西作: 血痕検査へ影響を与える因子について ～ロイコマラカイトグリーンに対する蛋白分解酵素や UV の影響～, 第 85 回日本法医学会学術関東地方集会, 神奈川 2016 年 10 月.
7. 内ヶ崎西作, 側嶋絵里菜, 磯部英二, 鉄 堅, 飯酒盃 勇, 岩上悦子, 勝又純俊: 頸部圧迫が疑われた子ども虐待疑い事例 ～児童相談所からの相談事例～, 第 85 回日本法医学会学術関東地方集会, 神奈川, 2016 年 10 月 .
8. 内ヶ崎西作, 側嶋絵里菜, 磯部英二, 鉄 堅, 飯酒盃 勇, 岩上悦子, 勝又純俊: 我が国の死因究明制度の問題点, 第 539 回日大医学会例会, 東京, 2016 年 11 月.

9. 磯部英二, 鉄 堅, 側嶋絵里菜, 内ヶ崎西作: 近年の危険ドラッグ事情について, 第 539 回日大医学会例会, 東京, 2016 年 11 月.
10. Jian Tie, Elina Sobashima, Seisaku Uchigasaki, Eiji Isobe, Isamu Isahai: Analysis of STR Profiles from the Ultraviolet Irradiated Bloodstain by Whole Genome Amplification, The 21st Triennial Meeting of the International Association of Forensic Sciences (IAFS 2017), Canada, 2017.
11. 側嶋絵里菜, 鉄 堅, 磯部英二, 飯酒盃勇, 内ヶ崎西作: Detection of STR profiles from presumptive assay negative bloodstains, 第 101 次日本法医学会学術全国集会, 岐阜, 2017 年 6 月.
12. 勝又純俊, 岩上悦子, 側嶋絵里菜, 内ヶ崎西作. 看護師らに対する行政処分の状況(平成 13 年~27 年): 第 101 次日本法医学会学術全国集会, 岐阜, 2017 年 6 月.
13. 内ヶ崎西作, 長谷川智華, 側嶋絵里菜, 島田奈緒美: 外表所見の重要性を改めて感じた大腿骨骨折の一例, 第 9 回日本子ども虐待医学会・学術集会, 横浜, 2017 年 8 月.
14. 内ヶ崎西作, 長谷川智華, 側嶋絵里菜, 島田奈緒美: 新生児頭蓋骨骨折の一例 ~転落のためか? 鉗子分娩のためか?~, 日本子ども虐待防止学会 第 23 回学術集会 ちば大会, 千葉, 2017 年 12 月.
15. 磯部英二, 鉄 堅, 飯酒盃勇, 側嶋絵里菜, 島田奈緒美, 内ヶ崎西作: 脾臓からの血液中一酸化炭素ヘモグロビン濃度の推定について, 第 86 回日本法医学会学術関東地方集会, 東京, 2017 年 10 月.
16. 勝又純俊, 岩上悦子, 側嶋絵里菜, 島田奈緒美, 内ヶ崎西作: 医療事故に関与した看護師・助産師に対する行政処分 (平成 13~28 年度), 第 86 回日本法医学会学術関東地方集会, 東京, 2017 年 10 月.
17. Jian Tie, Naomi Shimada, Elina Sobashima, Eiji Isobe, Isamu Isahai, Seisaku Uchigasaki: Genotyping single nucleotide

polymorphisms from UV irradiated human bloodstains using TaqMan assay, The 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM), Japan, 2018.

18. Eiji Isobe, Seisaku Uchigasaki, Hirofumi Tsutsumi, Isamu Isahai, Jian Tie, Elina Sobashima, Naomi Shimada: Two autopsy cases of the fatal accidents caused by nitrate gas exposure, The 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM), Japan, 2018.
19. Naomi Shimada, Seisaku Uchigasaki, Hirofumi Aboshi, Isamu Isahai, Eiji Isobe, Jian Tie, Elina Sobashima: A case of electrocution death at a home renovation construction site, The 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM), Japan, 2018.
20. 内ヶ崎西作, 島田奈緒美, 側嶋絵里菜, 鉄 堅, 飯酒盃勇, 磯部英二, 長谷川智華: 電子加熱式たばこによる火傷, 第 10 回日本子ども虐待医学学術集会, 香川, 2018 年 8 月.

②特別発表 なし

## II 論文

### ①原著論文

1. Seisaku Uchigasaki, Jian Tie, Elina Sobashima, Naomi Shimada: Genotyping DNA isolated from UV irradiated human bloodstains using whole genome amplification, *Molecular Biology Reports*, 1–5, 2018.

②症例報告 なし

### ③総説

1. 側嶋絵里菜, 荒島康友, 矢久保修嗣: 新世紀・「One Health」としての Zoonosis<第 35 回> トピックス 古くて新しいトキソプラズマ症 トキソプラズマとうつ病との関係について, *大塚薬報*, 698: 22-25, 2014.



2. 矢久保修嗣, 側嶋絵里菜, 荒島康友 : 新世紀・「One Health」としての Zoonosis<第 38 回>トピックス猫に咬まれるとうつ病?, 大塚薬報, 703: 28-30, 2015.
3. 内ヶ崎西作, 側嶋絵里菜: 異状死に関する厚生労働省の解釈について, 日大医学雑誌, 74: 192-194, 2015. .

### Ⅲ 著書 なし