

博士論文

法科学的試料の活用と人獣鑑別におけるDNA多型に関する研究

平成15年7月

中木真一

目 次

	頁
第一章 緒論	1
第二章 特異的な法科学的試料からのDNA型検出	
1 自然脱落毛からのDNA多型 (D1S80型) 検出	17
2 各種予備検査試薬が付着する試料からのDNA多型検出	24
第三章 法科学的混合試料からのDNA多型 (STR多型) の判定	28
第四章 DNAを利用した人獣鑑別・動物種識別	
1 Cytochrome <i>b</i> 遺伝子を用いた人獣鑑別法の検討	37
2 Cytochrome <i>b</i> 遺伝子を用いたヒト, イヌ, ネコの識別	44
3 ニワトリMHCの <i>B-G</i> 遺伝子を用いたニワトリの識別	48
第五章 総合考察	54
要 約	65
謝 辞	68
引用文献	69
図 表	79

第一章 緒 論

法科学分野の物体検査の対象となる法科学的試料は、犯罪現場等から採取された試料（現場試料）と個人から採取された試料（対照試料）に分類される。一般に現場試料は、外観検査と予備検査（試料は何か）、人獣鑑別検査（試料はヒト由来のものか）を経て、個人識別検査（血液型等の判定）が行われる。予備検査には、ルミノール法などの血液予備検査、SMテストなどの精液予備検査、DAC法などの尿予備検査などがあり、検出目的に応じて使い分けられる。人獣鑑別検査は主に試料が「ヒト由来である」ことの証明を目的に各種試料に対する抗ヒト血清を用いた免疫学的手法が行われる。個人識別検査はABO式血液型検査をはじめ、蛋白多型の検出や赤血球酵素型多型の検出などが行われる。この個人識別検査には、1985年にJeffreysら¹⁾⁻³⁾がヒトDNA多型（DNA fingerprint法）が個人識別に有用であることを発表して以来、ヒトDNAが利用されるようになった。さらに、1988年にSaikiら⁴⁾により耐熱性のpolymeraseを利用したPCR法が発表されて以来、微量なDNAから目的とする多型部位を特異的に増幅することが可能となり^{5),6)}、現在ではほとんどの生物試料からDNA多型を検出することが可能となった。このため、個人識別の精度は従来の方法に比べ飛躍的に向上し、DNA多型検出は現在では欠くことのできない検査法として確立されている。

1 DNA鑑定と法科学的試料

DNA鑑定の試料は様々な状態を呈する法科学的試料が対象になる。個人識別を目的としたDNA鑑定はJeffreysら(1985)¹⁾らが発表したDNA fingerprint法から始められた。この方法はDNAの繰り返し配列を制限酵素で切

断し、その断片を電気泳動することでバーコードのごとくバンドが検出され、このバンドの組み合わせにより個人識別を行う。しかし、検査結果の再現性が低く、また分解したDNAからはバンドが検出されにくいなどの欠点があり、法科学的試料に応用されるに至らなかった。しかし1988年にPCRがDNA鑑定に利用されるようになって以来⁴⁾、微量な試料から多型を検出することが可能になった。このPCRは、検出目的とする遺伝子領域をprimerで挟み、耐熱性のDNA合成酵素 (taq polymerase) により目的とする領域のみを増幅する方法である。この結果、腐敗などにより分解が進んだDNAや微量なDNAからでも多型の検出が可能になり、法科学的試料に広く応用されるようになった。法科学分野で行われるPCRを利用した主なDNA多型には鎖長多型と配列多型がある。鎖長多型は、個人により異なるDNA領域の鎖長の差を検出するもので、代表的なものとしては、繰り返し配列の繰り返し数の差異を検出するVNTR (variable number of tandem repeat) 多型やSTR (short tandem repeat) 多型がある。VNTR多型の一つであるD1S80型 (MCT118型)⁷⁾は、ヒト第一染色体のイントロン領域にある16塩基を一単位とするVNTR多型で、その繰り返し数は高い多型性を有することから、個人識別を目的とした場合に非常に有効な座位であることが知られている^{8),9)}。しかし、増幅産物のサイズが約300bp以上であるため、分解したDNAから多型を検出することが困難な場合がある。この問題を解決するために、2から5塩基を一単位とするCSF1PO型¹⁰⁾、TH01型^{11),12)}などのSTR多型が利用されるようになった¹³⁾⁻¹⁵⁾。STR多型は増幅産物のサイズが約100bpから300bp程度であることから、D1S80型などに比べ、分解したDNAからも多型を検出しやすい。しかし、個々のSTR座位は多型性が低いため、単独の座位のみでは個人識別の精度が低いことが欠点である。そこでmultiplex法と呼ばれる、複数のSTRの座位を同時に

検出し各STR座位の型を判定する方法が用いられ、個人識別の精度を上げることが可能になった¹⁶⁾⁻²¹⁾。現在では複数のSTR座位をmultiplex法によりPCRし、得られたPCR産物をフラグメントアナライザーを用いて解析し多型を検出する方法がキットとして販売されている²²⁾。配列多型は、個人により塩基配列が置換、欠失している部位を検出するもので、PCRと逆位ドットハイブリダイゼーションを用いて検出する方法がHLADQ α 型検査キット (Applied Biosystems)²³⁾、PM検査キット (Applied Biosystems)²⁴⁾として販売され、DNA鑑定に広く利用されている^{8), 25)-27)}。

DNA多型の検出は、試料からDNAが得られることが前提である。法科学分野で扱う試料は、血液、体液、毛髪、骨など生体由来の試料が中心である。これらの試料は、新鮮なものから腐敗しているもの、あるいは採取されるまでに時間が経過しているものまであり、その性状は多様である。新鮮な血液、体液、組織片、骨、細胞の付着する毛根部（抜去毛の毛根部）などからは良質のDNAを得ることが可能であり²⁸⁾⁻³¹⁾、それぞれの試料に対するDNAの抽出法も検討されている。しかし、物体検査に用いる試料の中には、毛髪の毛幹部^{33), 34)}のように潜在的に含まれるDNAが少ない、あるいは分解している試料や、予備検査試薬が付着した試料のように、法医物体検査の過程において試薬が付着、混在する試料がある。さらに、法科学的試料の中にはこのようなDNA多型の検出が困難と考えられる試料の他に、DNA多型の判定が困難な試料がある。すなわち、試料から良質なDNAが得られ多型が検出されたとしても、その判定に窮する複数の人物に由来するDNAが混合する試料である。

2 法科学的検査における毛髪試料と予備検査試薬

(1) 毛髪

毛髪は哺乳類特有の皮膚の付属器官で、発生学的には表皮から生じたものである。ヒトの毛髪は頭毛、陰毛、腋毛などの長毛と眉毛、睫毛、鼻毛などの短毛に分類される。さらに1本の毛髪は毛幹部と毛根部に大別され、皮膚面から外部に出ている部分を毛幹部、皮膚内に埋没している部分を毛根部という。毛髪はこの毛根部にある毛母基と呼ばれる細胞の活動により成長し、伸長するに従って角化し毛幹部を形成する。毛根部はその形態により、抜去毛と自然脱落毛に分けられる。抜去毛は、いわゆる「引き抜いた」毛であり毛根部に白い付着物がある。この付着物は皮膚由来の細胞で、毛根鞘と呼ばれる。自然脱落毛は、毛髪の成長過程において毛根部が退行し自然に抜け落ちた毛で、毛根にはほとんど細胞が付着していない。従って、自然脱落毛の毛根部にある細胞は、毛根に付着する皮膚由来のわずかな細胞と、毛根内の毛母基由来の細胞である。毛幹部の構造は、毛の表面を覆う毛小皮、毛の主要部分である毛皮質、毛の中心部分で多数の空胞がある毛髄質に分けられる。毛小皮、毛皮質は毛根部にある毛母の細胞が毛髪の伸長とともに角化して作られたものである。従って、毛幹部には有核細胞は存在しない。また毛皮質、毛髄質にはメラニン色素が含まれている。毛幹部の成分は主に弾力性に富むケラチン蛋白質でできており、S-S結合により強く結びつけられている。このため水、アルコールなどには強い抵抗性を持っているが、アルカリに対しては弱い^{38),39)}。

法科学的分野における毛髪試料は、主に形態の比較による人獣鑑別や個人識別³⁸⁾、A B O式血液型の検査^{38),40)}に用いられる。個人の形態的な特徴が観察されるのは頭毛と陰毛である。その他の毛は、長さが短く細い毛であることから個人差が観察されにくい。形態は、外観的な毛髪の形

状，長さ，色調と顕微鏡下における毛先部，毛根部の形状，色調，太さ，髓質の形状などを観察する³⁸⁾。これらの検査項目について対照とする人物の毛の特徴を把握し，犯罪現場などから採取された毛髪の状態と比較する。しかし，犯罪現場から採取される多数の毛の中から対照とする人物由来と考えられる毛を探すことは容易ではなく，その作業は煩雑である。毛髪のA B O式血液型検査は，解離試験法^{38), 41)}やM C A R法⁴²⁾などにより行われる。解離試験は，毛髪中の血液型物質に抗原抗体反応により抗血清を吸着させた後，一定の温度まで上昇させることで吸着した抗血清を解離させ，解離した抗血清と作用血球の凝集の有無から血液型を判定する方法である。M C A R法は毛髪中の血液型物質に抗血清を吸着させ，余分な抗血清を洗浄した後に作用血球と感作させ，顕微鏡下で凝集の有無を観察する方法である。しかし，いずれの方法も力価と特異性の高い抗血清を必要とし，またA B O式血液型は4種類の多型であるため，精度の高い個人識別を行うには十分とはいえない。

これらの問題を解決するために，毛髪からのD N A多型の検出が検討されてきた。Higuchiら(1988)³⁴⁾やUchihiら(1992)⁴³⁾は，P C Rを利用して1本の毛髪からのD N A多型(H L A D Q A 1型)の検出について報告している。吉井ら(1992, 1993)^{44), 45)}は，毛髪中(毛幹部)のメラニンがP C Rのtaq polymeraseの活性を阻害することを報告し，その除去方法についても報告している。しかし，これらは多型性の高いD 1 S 8 0型検出に関する報告ではない。笠井ら(1992)⁴⁶⁾は，抜去毛の毛根部から得られたD N Aについて，D 1 S 8 0型(M C T 1 1 8型)検出が可能であると報告している。前述のように，毛根部に細胞が付着する抜去毛の毛根部からは，良質のD N Aを得ることが可能でD N A多型が検出されると考えられる。毛髪，特に自然脱落毛は，本人の意思には関係なく犯

罪現場などに遺留されることが多く、有効な証拠試料になることが多い。
しかし、自然脱落毛からD1S80型検出についての報告はない。

(2) 予備検査試薬と法科学的試料

法科学物体検査における予備検査は、犯罪現場等から採取される未知試料が何かを把握することと、検査目的とする物質の付着状況、付着範囲等を把握するために用いられる。これら試薬は、検査対象となる物質に対して特異性が高いが、ヒト以外の動物に由来する同様の物質でも陽性となる場合がある。従って、人獣鑑別検査とは異なり、未知の物質のスクリーニングとして行われる検査である。予備検査は試料の一部を切断して滴下したり、切断できない試料の場合は、検査部位を濾紙などに転写し、その転写物に試薬を滴下、あるいは噴霧することで行う。また、検査部位が判然としない場合は、犯罪現場等から採取された試料に直接滴下、噴霧し、検査部位を検索する。

① SMテスト

精液予備検査試薬の一つであるSMテストは、前立腺の分泌液中に含まれる酸性フォスファターゼを指標とする検査試薬である。須山ら(1959, 1974)^{47), 48)}は、血液及び体液に含まれる酸性フォスファターゼの中で、特に前立腺由来の酸性フォスファターゼが精液中に多量に含まれることに注目し、精液予備検査法としてこの酸性フォスファターゼを利用する検査法(SMテスト)を開発した。SMテストの反応は、精液中の酸性フォスファターゼがpH5.5前後の条件下で基質

(α -naphthyl phosphoric acid)と反応し、加水分解により生じた α -naphtholがdiazonium o-dianisidineと反応し紫色を呈する呈色反応である。試薬も「SMテスト(和光)」として販売されており、簡

便に活用できることから法科学分野で広く用いられている。しかし、精液以外の体液にも酸性フォスファターゼが含まれていることから、精液以外の体液からも陽性の反応が認められる場合がある。

② D A C 法

尿予備検査法は、尿中の尿素を指標としたウリカーゼ B T B 検査⁴⁹⁾と D A C 法（パラジメチルアミノシンナムアルデヒド法）^{49), 50)}が代表的な検査方法である。このうち D A C 法は尿素に対する特異性が高く、発色部位が退色しないことから法科学分野で広く利用されている。D A C 試薬の反応は、強酸性の条件下で D A C と尿素が反応し桃色を呈する呈色反応である。D A C 法は塩酸（硫酸）溶液に D A C 試薬を溶解させ、試料に噴霧あるいは滴下して用い、陽性であれば桃色を呈する⁵⁰⁾。尿素に反応する試薬であるため、汗斑の予備検査法としても活用される。

③ ルミノール法

血痕予備検査法の一つであるルミノール法は、ルミノール試薬と過酸化水素の混合液にヘモグロビンが作用すると、その触媒作用により生成されたアミノフタル酸イオンが蛍光を発することを利用した検査法である⁴⁰⁾。発光を利用する方法であるため、広範囲から血痕を探す場合や、肉眼的に付着部位が不明な場合などに有効な方法である。従って、試料の一部について行うよりも、試料に直接噴霧して用いることが多い。しかし、ルミノール試薬は血痕に繰り返し噴霧することで A B O 式血液型検査や、M N 式血液型検査に影響を及ぼすとされている⁵¹⁾。また、笠井ら(1992)⁴⁶⁾は血痕に噴霧したルミノール試薬が、D 1 S 8 0 型検出に影響を及ぼすことを報告している。

以上のように、法科学的物体検査には目的に応じて様々な予備検査試薬

があり，これら試薬を試料に直接噴霧，滴下することがある。また，試料によってはそれぞれの検査法を併用することもある。従って，DNA多型検出に際して，予備検査試薬が付着する試料を用いなければならないことも予想され，各種予備検査試薬がDNA多型検出に及ぼす影響を把握しておくことは重要と考える。しかし，その影響については前述のように血痕予備検査（ルミノール試薬）とDNA多型の一つであるD1S80型（MCT118型）検出の関係についての報告⁴⁶⁾があるのみで，他の予備検査試薬については検討されていない。

3 法科学分野における混合試料

(1) 混合試料とDNA多型

法科学分野における混合試料とは，同一人に由来する異種の体液などが混合する試料や2人以上に由来する試料が混合する試料を示す。混合試料には，血液同士，唾液同士など同種のものが混合する試料と，血液と唾液，精液と膣液，唾液と精液のように異種の体液が混合する試料がある。法科学検査，特にDNA多型の判定において問題となるのは，2名以上に由来する試料が混合する混合試料である。このような試料からDNA多型を検出する場合，複数の血液や体液等に由来する型が混合した形で検出される⁵²⁾。Kasaiら(1990)⁷⁾が報告したD1S80型（MCT118型）の検出方法は，PCR増幅産物を電気泳動し，その多型をバンドとして検出する方法で，ヘテロ型の場合は2本のバンド，ホモ型の場合は1本のバンドが検出される。従って，3本以上のバンドが検出されれば試料が明らかに混合していると判断される。吉田ら(1993)⁵³⁾やKloostermanら(1993)⁵⁴⁾は，D1S80型についてDNAが混合した場合

の混合比が型検出に及ぼす影響及び検出限界について報告している。また、HLA DQ α 型についてもConeyら(1991)⁵⁵⁾やGyllenstenら(1992)⁵⁶⁾が、混合したDNA多型の検出限界などについて報告している。これらは、混合するDNAの混合比に大きな差がある場合(混合比10:1, 20:1)は、一方のDNA多型のみが検出され、混合比が近接するほど混合した結果になると報告している。実際の鑑定においては、混合比が不明であるため、混合したDNA多型が検出された場合、その判定は困難である。

混合試料の中でも最も一般的なものは、性犯罪事件における精液と膣液が混合する試料である。このような精液・膣液混合試料は、精子と細胞の構造上の差異を利用し、精液・膣液混合試料の精子と膣液由来の細胞からそれぞれのDNAを得ることができる二段階抽出法が報告されている⁵⁷⁾⁻⁵⁹⁾。この方法は、はじめにバッファーにproteinase Kを添加し細胞成分を消化させる。精子核蛋白質の主成分であるプロタミンは、この段階では消化されないため、精子由来のDNAは抽出されない。次に遠心し、上清(細胞成分)と沈渣(精子)に分け、沈渣を上記バッファーにdithiothreitol(DTT)を添加し溶解させる。この操作により、精液(精子)及び膣液(細胞)由来のそれぞれのDNAを分離して得ることができ、それぞれの多型が検出できるようになる。現在では、この方法は精液・膣液混合試料の一般的なDNA抽出方法として確立している。しかし、血液と血液、血液と唾液あるいは精液と精液のように、細胞(白血球と細胞)同士、精子同士が混合する試料では、現在報告されている方法では、それぞれのDNAを得ることはできない。このような試料から検出されたDNA多型が、混合した多型として検出された場合は、対照となる試料との矛盾を考察するか、判定できないと判断することになり、多型の判定が大きな問題となる。

(2) 混合試料からの S T R 多型の判定

近年の法科学分野における個人識別法は、複数の S T R (short tandem repeat) 部位の多型を、遺伝子解析装置 (フラグメントアナライザー) とキットを用い、同時に検出する multiplex 法が主流になっている。この方法は精度の高い個人識別が可能であることに加え⁶⁰⁾、キットを用いることや機器による判定が可能であることから、得られた結果が客観性を有する優れた個人識別法である。S T R 多型検出については、キットに含まれる S T R 座位の特徴^{22), 61)-64)}、付着担体や試薬の影響及び解析条件⁶⁵⁾⁻⁶⁷⁾などについて様々な検討がなされている。

S T R 部位多型検出キットの一つである AmpF1STR Profiler (Applied Biosystems) は、4色の蛍光色素 (1色はサイズスタンダード) を用い amelogenin 遺伝子と 9つの遺伝子座 (D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820座位) の S T R 多型を同時に検出するキットである²²⁾。このキットを用いて P C R を行い、その産物をフラグメントアナライザー (ABI PRISM310: Applied Biosystems) で電気泳動し、得られたデータを専用のソフトウェア (Genescan, Genotyper: Applied Biosystems) で解析する。各 S T R 多型はその繰り返し数が検出され、7回と8回の繰り返しを持つ S T R 多型であれば 7-8型と判定される。amelogenin 遺伝子は性染色体上にある遺伝子で、男性由来の試料ならば X と Y が、女性由来の試料ならば X のみが検出され、それぞれ X Y, X X と判定される。従って、この遺伝子座により試料の由来する人物の性別判定が可能になる。このキットによる amelogenin 遺伝子及び各遺伝子座の S T R 多型は、ピーク (波形) として検出される。ピークの有無や検出位置及び蛍光強度 (relative fluorescence intensity unit: R F U) は Genescan ソフト (Applied Biosystems) で解析され、各遺伝子座

に対応する型がGenotyperソフト (Applied Biosystems) によって自動的に判定される。従って、ホモ型の場合は一座位に1本、ヘテロ型の場合には一座位に2本のピークが検出される。AmpFlSTR Profilerのマニュアルによれば、男性のamelogenin遺伝子 (X Y) と各座位のヘテロのSTR多型の平均のピーク比はいずれも0.9前後であるとされてる²²⁾。

LaFountainら (2001)⁶³⁾は、単独試料のAmpFlSTR Profiler Plusキット及びAmpFlSTR CO filerキット (Applied Biosystems) のヘテロ型の座位について、これらの座位の平均のピーク比が0.9以上であることを報告し、Morettiら (2001)⁶⁶⁾は、これらのキットにある各座位のヘテロ型のピーク比が「ピーク比の平均値 - 3 × 標準偏差」の範囲に98%以上含まれたと報告している。これらの結果はキットにより検出されるヘテロ型の2本のピークの蛍光強度に、ほとんど差が見られないことを示している。しかし、このデータは、いずれもキットに含まれる座位のヘテロ型のピークバランスを把握するために算出されたもので、混合試料のSTR型判定には利用されていない。

混合試料の場合、検出される各座位のピークは、試料に由来するピークの本数の組み合わせによりいくつかのパターンが考えられ、混合比によればピークの高さに偏りが生じることが予想される。従って、Genescan及びGenotyperソフトでは混合した型と判定されても、ピーク比により混合試料の混合量の多い試料のSTR型を推定したり、逆に2本のピークのみが検出された座位から、試料が混合していることを推定できる可能性が考えられる。DNA多型をバンドやドットの発色で検出し、判定する方法とは異なり、フラグメントアナライザーにより検出されるピークの強度は数値として検出されるため、ピーク比による混合試料のSTR型判定は可能と考えられる。これらのことを検証するためには、

単独試料の各座位のピーク比を算出し，座位ごとにピーク比による判定基準を設定する必要がある。

4 DNA多型と人獣鑑別・動物種識別

現在行われているDNA鑑定は，主に個人識別を目的とする鑑定を意味するが，他の法科学検査にもDNAは活用できると考えられている。その一つが人獣鑑別検査である。人獣鑑別検査は，試料がヒト由来のものであることを証明するために行われる検査で，現在，主に行われている方法は，抗ヒト血清を用いた抗原抗体反応による免疫学的手法によるものである⁴⁰⁾。この抗ヒト血清は，証明検査を行う試料に応じ，抗ヒトヘモグロビン，抗ヒト唾液，抗ヒト精液など，様々なものが市販されている。また，ヒトヘモグロビンを電気泳動法⁶⁸⁾やELISA法⁶⁹⁾により特異的に識別する方法が報告されている。これらの方法は，いずれも試料が血液，体液，皮膚や筋肉などの軟組織である場合にのみに有効な手法で，毛髪や骨などの硬組織には対応できない。毛髪や骨などはその形態により人獣鑑別を行うことが可能である^{38), 70)-73)}が，部分的なものや完全な形態を呈していないものについては，形態の比較が困難になる。また，人獣鑑別検査はヒト由来の証明を目的としているため，ヒト由来ではないと判定された試料について，それが何に由来するものかは不明のままであることが多い。事件・事故によっては動物種を推定あるいは特定できればより効果的な場合があり，特にイヌやネコなどは事件・事故に関わることが多い。免疫学的手法で用いる抗血清は，一部の動物については市販されているものの，様々な法科学的試料に用いるためにはその種類が十分ではない。そこで微量試料や完全な形態を呈していない硬組織でも検査が可能で，より詳細な結果を得ることを目的として，人獣鑑別検査にもDNAを

利用した方法が検討されるようになった。DNAを利用する人獣鑑別法は、DNAが得られる試料であれば検査が可能であることから、多種多様な試料が対象となる鑑定検査に対応できる。DNAを利用した人獣鑑別法にはTylerら(1986)⁷⁴⁾やYokoiら(1989)⁷⁵⁾が報告したヒト特異的Alu配列を検出する方法やキットとして市販されているD17Z1座位を検出する方法(Quantiblot

Human DNA Quantitation Kit: Applied Biosystems)⁷⁶⁾などがある。また、amelogenin遺伝子⁷⁷⁾やミオグロビン遺伝子⁷⁸⁾、rRNA⁷⁹⁾、p53遺伝子^{80),81)}、ミトコンドリアDNA⁸²⁾を利用した方法も報告されている。これらの方法はいずれも他の動物との比較が行われており、ヒト特異的な結果を得ることができるが、その多くは「ヒト由来」を証明するもので、幅広い動物種の識別までには至っていない。人獣鑑別と動物種の識別が同時に行える方法としてRAPD-PCR法⁸³⁾がある。この方法は様々な動物種から増幅産物が得られるように、短いプライマーを用いて低いアニーリング温度でPCRを行い、得られた増幅産物を制限酵素で切断し、そのバンドパターンを比較するものである。しかし、この方法はどの遺伝子を指標としているかが不明で、検出されるバンドの由来が判然としない。DNAをより有効に活用するためには、ヒト由来の判定の他に、動物種の識別も可能で、かつ再現性や実務に用いることを考慮すると指標とする遺伝子が明らかなものが望ましい。このためには、動物種ごとに塩基配列が異なる領域や、特定の動物だけが持つ遺伝子領域を検出することが有効である。

(1) Cytochrome *b* 遺伝子と動物種識別

個人識別の分野ではDNAを利用した個人識別法が盛んに研究され、PCR法により微細、微量試料の個人識別が可能になった⁴⁾⁻⁶⁾。人獣鑑別の分野にもPCR法が利用できれば、従来の検査法では判定が困難であ

った試料の人獣鑑別が可能になり，新たな人獣鑑別法となることが期待される。ミトコンドリアDNA (mtDNA) は，一つの細胞内に複数存在する⁸⁴⁾ミトコンドリアの環状DNAで，1981年にAndersonら(1981)⁸⁵⁾によって，ヒトmtDNAの全塩基配列が明らかにされている。ヒトmtDNAはゲノムサイズが約16600塩基対と核ゲノムに比べ非常に小さく，高等動物において母性遺伝をする⁸⁶⁾ことや塩基置換速度が比較的速い⁸⁷⁾ことが知られている。このため個人識別⁸⁸⁾⁻⁹¹⁾だけでなく，人類の起源⁹²⁾や，動物の品種分化⁹³⁾⁻⁹⁹⁾の研究等にも利用されている。mtDNAを利用した個人識別法には，D-loopと呼ばれる個人差のある領域が主に利用されている^{90),91)}。しかし，同一の動物種内で高い共通性が要求される人獣鑑別，動物種識別を遺伝子レベルで行う場合，D-loopのような個人あるいは個体差の存在する領域を利用することは好ましくないと考える。

Cytochrome *b* 遺伝子はmtDNAに存在する遺伝子の一つであり，呼吸器系の酵素を支配するエクソン領域である。この遺伝子は動物種間では変異があるが，同一の動物種内では変異が存在しないと考えられ¹⁰⁰⁾，この変異を利用した系統の解析や動物種の識別が研究されている⁹⁶⁾⁻¹⁰⁰⁾。千国ら(1994)¹⁰⁰⁾は動物の食肉種の鑑別のために，Cytochrome *b* 遺伝子の一部(約700bp)を増幅し，PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphisms)パターンが，動物の肉種鑑別に有効であることを報告している。RFLPは，ゲノムDNAやPCRの増幅産物などを任意の制限酵素で切断後電気泳動し，ハイブリダイゼーションやゲルの染色により検出される切断断片の多型である。制限酵素の認識部位の変異や切断部位の差異がバンドパターンに反映される。個人識別を目的としたJeffreysら(1985)¹¹⁻³⁾の「DNA fingerprint法」はこの手法を用いている。

(2) MHCとニワトリ特異的*B-G* 遺伝子

ニワトリ主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC : major histocompatibility complex) は、ニワトリの血液型座位の一つである*B*座位であることが明らかになっており、*B-F*, *B-L*, *B-G* 遺伝子から構成されている。このうち*B-G* 遺伝子は主に赤血球膜上に発現し、腸管上皮細胞やファブリシウス嚢などにも発現していることが報告されている^{101), 102)}。*B-F*, *B-L* 抗原は哺乳類のClass I, II 抗原に相当するが、*B-G* 抗原に類似したMHC 抗原が他の脊椎動物にも存在するという報告はない¹⁰³⁾。従って、この*B-G* 遺伝子はニワトリ特異的な遺伝子と考えられている。しかし、*B-F*, *B-L* 抗原の機能が明らかにされてきているにもかかわらず、*B-G* 抗原の機能については未だ不明な点が多い¹⁰³⁾。*B-G* 遺伝子は、これまでに約20 座位があると報告され¹⁰³⁾、ニワトリ cDNA ライブラリーからこの遺伝子 (クローン) を分離し、分離したDNA をDNA プローブとして、RFLP 解析による家系および系統分析、血液型判定などが行われてきた¹⁰⁴⁾⁻¹⁰⁷⁾。これらの解析には、これまでに3つのクローン (*bg28*¹⁰⁸⁾, *bg32.1*¹⁰⁹⁾, *gene8.5*¹¹⁰⁾) がDNA プローブとして用いられたが、その塩基配列は報告されておらず、また *B-G* 抗原のどの領域を支配しているのかが明らかにされていないままである。従って、*B-G* 遺伝子のクローンの塩基配列を決定し、どの領域を支配しているものかを推定し、PCR によって*B-G* 遺伝子を検出できれば、ヒトを含む動物種の中から、ニワトリを特異的に識別できるものと考えられる。

本研究では、自然脱落毛についてより精度の高い個人識別を行うことを目的に、自然脱落毛からのD1S80型検出の可能性について検討した。また、SMテスト、DAC法、ルミノール法は法科学検査の予備検査法と

して汎用されていることから、これらの試薬がDNA多型(D1S80型, HLA DQ α 型)検出に及ぼす影響について検討した。

また、混合試料の混合量の多い試料由来の型判定を目的に、混合試料からピーク比によるSTR多型の判定を試みた。まず、単独試料からAmpF1-STR Profilerを用いて判定されたヘテロ型の座位及びXYと判定されたamelogenin遺伝子のピーク比を算出し、各座位ごとの判定基準を設定した。次に、混合試料のピークを各座位ごとの判定基準に従って型判定し、ピーク比による判定が混合試料にどの程度有効であるかを検討した。

次に、動物種間のCytochrome *b* 遺伝子の変異を利用し、法科学分野におけるPCR-RFLP法を利用した簡便な人獣鑑別、動物種識別法について検討した。また、事件・事故に関わることの多いイヌ、ネコについてCytochrome *b* 遺伝子の一部の塩基配列を決定し、新たなprimerによるヒト、イヌ、ネコの識別について検討した。また、特定の動物種に特異的な遺伝子領域を検出し、動物種の識別に利用できるか検討するため、ニワトリの*B-G* 遺伝子をPCRにより検出することを試みた。まず、*B-G* 領域のRFLP分析に用いられている3つのクローンについて塩基配列の決定を行い、得られた塩基配列と、これまでにアミノ酸配列および塩基配列が報告されている*B-G* クローンの*bg14/8*⁽¹¹¹⁾および*G3*⁽¹¹²⁾と比較し、3つのクローンが*B-G* 遺伝子上のどの位置に存在するのかを推定した。次に、*bg32.1* クローンの塩基配列からプライマーを設計し、ニワトリとヒトを含む他の動物種についてPCR法による*B-G* 遺伝子の検出を試みた。

第二章 特異的な法科学的試料からのDNA多型検出

1 自然脱落毛からのDNA多型(D1S80型)検出

序論

法医学鑑識において、毛髪は個人識別を行うための重要な鑑定試料の一つである。毛髪の鑑定は顕微鏡下で行う形態的検査や血液型、酵素型検査が一般的である³⁸⁾が、個人識別にDNAが利用されるようになり¹⁾⁻³⁾、毛髪を試料としたDNA型検査法の研究が進んできている。特にPCRを用いることで微量の試料から目的とする部位を検出することができるようになり⁴⁾、毛髪からのDNA型の検出が可能になってきた^{34), 43)}。

Kasaiら(1990)⁷⁾によって開発されたD1S80型の検査は、血液・血痕、精液・腔液混合斑^{21), 30)}、唾液¹¹⁵⁾などを試料として検討がなされており、個人識別に有効であることが報告されている。毛髪では、毛根鞘(細胞)が多量に付着する抜去毛からD1S80型の検出は可能である²¹⁾が、自然脱落毛のように毛根鞘のほとんど付着しない毛根部や毛幹部からのD1S80型検出は、得られるDNAが少ないことやDNAの分解が進んでいると予想されることから困難と考えられている。そこで本研究では、自然脱落毛の毛根部と毛幹部からD1S80型が検出される可能性について検討した。

材料と方法

試料は成人から採取した自然脱落毛(脱落毛)である。この脱落毛の毛根部(約0.2cm)と毛幹部(毛根から5cmないしは10cm)を用い、以下の実験を行っ

た。また、検出限界を検討するため自然脱落毛15本の毛根部と毛幹部5cm×15本からDNAを抽出した。脱落毛を採取した成人のD1S80型は、いずれも血液によりその型が判明しているもので、123bpラダーマーカー(BRL)により大きさを算出し、判定されたものである。

脱落毛の毛根部及び毛幹部からのDNA抽出はBeroldingenら(1990)¹¹³⁾の方法を若干改良し行った。すなわち、試料に抽出バッファー〔TNEバッファー(10mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1mM EDTA:pH8.0), 最終濃度2%のsodium dodecyl sulfate (SDS), 最終濃度300ng/ μ lのproteinase K及び最終濃度0.04Mのdithiothreitol (DTT)]を添加し、37°Cで約15時間加温し、試料を溶解させた後、TE(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA:pH8.0)飽和フェノール溶液及びクロロホルムで除蛋白を行い、抽出バッファーの約2倍量の100%エタノールを加えDNAを沈殿させた。エタノールを添加する際には、沈殿補助剤として最終濃度100ng/ μ lのグリコーゲン(BMY)を添加した。得られたDNAは70%エタノールで洗浄後、乾燥させ、TEバッファー(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA:pH8.0)に溶解し、以下の実験に用いた。毛髪中の高分子DNAは、得られたDNAを1%アガロースゲルで電気泳動し、約20Kbのバンドの有無を確認することにより行った。PCRはtaq polymerase(TAKARA)添付のPCR bufferに最終濃度0.3 μ Mのプライマー及び2unitのtaq polymerase (TAKARA)を加え、94°C・1分、65°C・1分、72°C・2分のサイクルを30回繰り返し行った。プライマーはKasaiら(1990)⁷⁾が報告したものをを用いた。PCR増幅産物は5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、D1S80型の多型を検出した。

(1) 脱落毛の高分子DNA

成人1名から得られた自然に抜け落ちた長さ10cm以上の脱落毛15本を用

い、これを毛根部 (hair root) から毛先部 (hair tip) にかけて 2cm ごと 5 部位 (A ~ E) に分割し、それぞれの部位から DNA を抽出した。得られた DNA は 1% アガロースゲルで電気泳動を行い、高分子 DNA の有無を確認した。

(2) 毛髪からの D1S80 型検出における Chelex100 と BSA の効果

Chelex は、DNA 抽出の際に金属イオンを除去し、DNase の活性を抑制し^{116), 117)}、bovine serum albumin (BSA) は PCR 系において taq polymerase の活性の阻害を抑制する^{121), 122)}ことから、Chelex100 (Chelex: BIO-RAD) と bovine serum albumin (BSA: Pharmacia) を用いて、毛髪からの D1S80 型検出におけるこれら試薬の効果について、次の 5 つの条件を設定し検討した。

<条件>

No. 1 : 対照 DNA (D1S80 型 : 16-19 型)

No. 2 : 対照 DNA + 毛幹部抽出液

No. 3 : No. 2 を Chelex で処理したもの

No. 4 : No. 2 の PCR の際に BSA を添加したもの

No. 5 : No. 2 を Chelex で処理し、PCR の際に BSA を添加したもの

No. 2 から No. 5 の条件の試料は、同一人の毛幹部 25 本 (5 cm × 25 本) を溶解させた DNA 抽出溶液 (毛幹部抽出液) を 1 試料につき 100 μl と D1S80 型の既知の DNA (16-19 型) を 200ng 添加して作製した。これらの試料から再度 DNA を抽出し、PCR を行った。Chelex を使用する No. 3 と No. 5 の試料は、DNA を抽出する際に、薬さじ 1 杯程度の Chelex を抽出バッファーに添加し、攪拌、遠心後、その上清を用いて DNA を抽出した。BSA は、Hagelberg ら (1989)¹¹⁴⁾の方法に従い、PCR の際に最終

濃度160mg/mlになるようPCR反応液に添加した。

(3) 脱落毛の毛根部，毛幹部からのD1S80型の検出

成人1名から任意に採取した脱落毛30本を蒸留水で洗浄後，毛根部（0.2cm）と毛幹部（5cm）に分け，DNAを抽出した。対照試料として同一人の新鮮血痕（サラシ布1×1cm）及び抜去毛（3本）の毛根部を用いた。次に，成人7名から脱落毛を採取し（計130本），その毛根部を実体顕微鏡で観察し，毛根部に細胞がほとんど付着しないもの（A type）と細胞が付着するもの（B type）に選別し（Fig. 1），1本ごとにDNAを抽出してPCRを行った。

結果

(1) 脱落毛の高分子DNAの存在

脱落毛の部位A～Eから得られたDNAを泳動した結果をFig. 2に示す。毛根部を含む部位Aには高分子DNAのバンドが確認されたが，部位B～Eには高分子DNAは見られなかった。部位Aには低分子化したDNAも観察され，これは部位B，C，Dにも同様に見られた。これらを比べると低分子化のDNA量は部位A > 部位B > 部位C > 部位Dの順であった。部位Eには全く発色が見られなかった。

(2) 毛根部，毛幹部からのD1S80型の検出

D1S80型既知（16-19型）の成人1名の脱落毛の毛根部と毛幹部から得られたDNA500ng相当量を用いD1S80型の検出を試みた。その結果，Fig. 3に示すように毛根部，毛幹部のいずれからもD1S80型を

検出することができた。これらの型は対照で用いた抜去毛，血痕から抽出したDNAと同型であった。バンドの発色は，抜去毛の毛根部(毛根鞘：hair root sheath)が最も強く，ついで血痕(blood stain)，毛根部(hair root)，毛幹部(hair shaft)の順であった。

(3) ChelexとBSAの効果

No. 1からNo. 5の条件でPCR後の増幅産物の泳動結果をFig. 4に示す。バンドが最も明瞭な発色を示したのはPCR反応液にBSAを添加したNo. 4の条件で，ついでNo. 2，No. 3であった。Chelexで処理しBSAを添加したNo. 5は対照であるNo. 1よりもバンドの発色がやや弱かった。

(4) 毛根部，毛幹部の検出限界

脱落毛15本の毛根部と，脱落毛の毛幹部5cm×15本からDNAを抽出し，それぞれ毛根部1, 2, 3, 4, 5本相当量と毛幹部5, 10, 15, 20, 25cm相当量に分けてPCRを行った。これらのD1S80型検出結果をFig. 5に示す。毛根部は1本相当量からでもわずかにバンドの発色が認められ，D1S80型が確認できたが，毛幹部はいずれの量からも型が確認されなかった。また，毛根部から検出されたバンドは量に比例して発色も明瞭になった。

次に成人7名から採取した脱落毛1本の毛根部について，D1S80型の検出を試みた。その結果，Table 1に示すように総数130本(A type：70本，B type：60本)のうち24.6%の32本についてD1S80型の判定が可能であった。タイプ別に見るとA typeは70本中11本(15.7%)，B typeは60本中21本(35.0%)で，細胞が付着する毛根部のD1S80型の検出率が高かった。個人で最も検出率が高かったのはホモ型のNo. 7(16-16型)で，その検出率は61.5%であった。この個体はA typeでも高

い検出率を示した。ヘテロ型を示したNo. 6 (16-19型) が41.7%, No. 4 (16-32型) が33.3%, No. 2 (16-27型) が25.0%であった。No. 1は検出率が5.6%と低く, No. 3及びNo. 5の個体についてはいずれも型が検出されなかった。

考察

一般にDNA多型検出の成否は, 試料からDNAが得られるか否かによる。毛髪中の高分子DNAは, その構造から毛幹部にはほとんど存在せず, 毛根部にあるものと予想される。本研究でも, 毛髪中の高分子DNAは毛根部においてのみ, その存在が確認され, 毛幹部に高分子DNAの存在は確認されなかった。従って, この高分子DNAは毛根部及び毛根に付着する細胞に由来するものと考えられた。また毛幹部に見られた低分子化DNAの発色は毛先に近い部位で見えなくなったことから, 毛幹部のDNAは毛先に近くなるほど長時間, 外的要因等の影響を受けるため分解が進んでいるものと思われた。

脱落毛30本を用いてD1S80型の検出を試みたところ, PCRに同量の鋳型DNAを用いたにもかかわらず, 抜去毛, 血痕と比べると毛根部, 毛幹部から検出されたバンドの発色は弱く, 特に毛幹部のバンドの発色はほとんど確認されなかった。これはDNAの状態の差及び毛幹部に含まれる阻害物質の影響⁴³⁾⁻⁴⁵⁾によるものと考えられた。毛髪に含まれるメラニンはtaq polymeraseの活性を阻害することが報告されている⁴⁵⁾。そこで, PCRの増幅効率を向上させる目的で, BSAとChelexの効果について検討した。BSAはPCR系においてtaq polymeraseの活性の阻害を抑制し^{117), 118)}, ChelexはDNaseの活性を抑制すると考えられている^{115), 116)}。その結果, Fig. 6に示すよ

うに B S A を添加した試料はバンドの発色が良好で，その効果が明瞭に確認できた。しかし，Chelexについては今回の条件では明らかな効果は確認されなかった。検討した5つの条件のうち，最も良好であった条件（P C Rの際に B S A を添加する）で毛根部，毛幹部の検出限界を検討したが，毛根部は1本相当量でもバンドが検出されたのに対し，毛幹部は B S A を添加しているにもかかわらず，試料の量を増やしてもバンドの発色が明瞭でなかった。これは，毛幹部のメラニンによる阻害に加え，毛幹部から得られる D N A 量が少ない，あるいは得られた D N A が分解されていることに起因するものと考えられた。

脱落毛の毛根を用いた場合，どの程度の確率で型検出ができるのか，成人7名から採取した脱落毛を細胞の付着量で分類し検討した結果，総数130本のうち32本（約25%）について型判定が可能であり，B typeの毛根はA type（約16%）の約2倍の検出率（約35%）であった。また，検出率の低かった毛髪は毛幹の平均の太さが約70~80 μ mで，他に比べ細い毛髪であった。D 1 S 8 0型は，ヘテロ型よりもホモ型の増幅効率が良く，繰り返し数の多いバンドほど増幅効率が悪くなることが報告されている⁴⁶⁾。今回用い7名の脱落毛でもホモ型のもの（Table 1 : sample No. 7）は特に検出率が高かった。以上のことから，1本の脱落毛の毛根部からD 1 S 8 0型が検出される可能性は2割程度であるが，毛根部に細胞が付着するものや，検出される型のパターンによっては，型が検出される可能性は高くなると考えられた。従って，脱落毛はD 1 S 8 0型検出のための補完的な試料として活用できると考えられた。

2 各種予備検査試薬が付着する試料からのDNA多型検出

序論

犯罪鑑識において、鑑定試料に対して血痕及び精液斑などの検査対象の付着の有無、付着の範囲等を把握するための検査「予備検査法」が広く用いられている。従って、DNA鑑定に際して予備検査試薬が直接噴霧された試料などから鑑定検査を行うことが予想され、各種予備検査試薬がDNA型検出に及ぼす影響を把握しておくことは重要なことと考える。しかし、その影響については、血痕予備検査法のルミノール法について、その試薬を噴霧した血痕からのDNA多型（D1S80型）検出についての報告がある⁴⁶⁾のみで、他の予備検査試薬については不明である。

そこで本研究では、血痕予備検査試薬に加え、精液予備検査試薬、尿斑予備検査試薬が血痕及び精液斑のDNA多型（D1S80型、HLADQ α 型）検出に及ぼす影響について検討した。

材料と方法

(1) 材料

材料はDNA多型（D1S80型、HLADQ α 型）既知の精液1例、血液2例を使用し、それぞれ25 μ 1ずつをサラシ布に付着させ、精液斑及び血痕（No. 1, No. 2）を作成した。これらを室温で乾燥させ、各予備検査試薬を2滴滴下した試料と滴下しない試料（対照試料）を作成した。予備検査試薬を滴下した試料は再び室温で乾燥させ、以下の実験に用いた。

(2) 予備検査試薬

今回使用した予備検査試薬は、精液予備検査試薬のSM試薬(SM)、尿予備検査試薬のパラジメチルアミノシンナムアルデヒド試薬(DAC)、血液予備検査試薬のルミノール試薬(LU)である。いずれの方法も常法^{48), 50), 51)}により試薬を作成した。ただし、ルミノール試薬に用いる過酸化水素水は3%の濃度のものを用いた。

(3) DNA多型検出

DNAの抽出、高分子DNAの確認及びD1S80型の検出は吉田ら(1991)³⁰⁾、中木ら(1994)¹²²⁾の報告に従った。高分子DNAの確認は、各試料の吸光度測定によるDNA収量の算出結果から、200ngに相当する量を用い、2%アガロースゲル電気泳動により行った。D1S80型の検出は各試料の50ngを鋳型DNAとしてPCRを行い、増幅産物の1/2量を用いて5%ポリアクリルアミド電気泳動を行った。HLADQ α 型はAmpli Type HLADQ α Forensic DNA Amplification & Typing Kit(Applied Biosystems)とキット添付のマニュアル²³⁾に従い、各試料の50ngを鋳型DNAとして行った。

結果及び考察

各試料の検査結果をFig. 7, Fig. 8, Fig. 9及びTable 2に示す。予備検査試薬を滴下した各試料のDNA収量は、ほとんどの試料の収量が対照試料に比べ低下した。特にSMを滴下した精液斑のDNA収量の低下は顕著であった。DACを滴下した試料の収量も対照試料に比べ低下した。LUを滴下した精液斑の収量は対照試料の半分程度に低下したが、血痕では対照試料と同程度の収量であった(Table 2)。

各試薬を滴下した試料の高分子DNAは、精液斑ではLUを滴下した試料から対照試料と同程の高分子DNAが確認されたが、SM、DACを滴下した試料からは確認されなかった。血痕ではDACを滴下した試料からは高分子DNAが確認されなかったが、LUを滴下した試料からは対照試料と同程度の高分子DNAが確認された。またSMを滴下した試料からもわずかに確認された (Fig. 7, Table 2)。

これらの試料について、D1S80型、HLADQ α 型検出を行ったところ、高分子DNAが確認された試料からは多型が検出された。高分子DNAが対照試料よりも少ないと考えられたSMを滴下した血痕のD1S80型のバンドの発色及びHLADQ α 型のスポットの発色は、対照に比べ弱いものであった (Fig. 8, Fig. 9, Table 2)。LUを滴下した血痕のD1S80型は、高分子DNAが確認されたものの対照と同じ鋳型DNA量では型が検出されず、鋳型DNA量を減少させることでD1S80型が検出された。

DNA多型の検出において、阻害物質や分解DNAがDNA抽出やPCRを阻害することが報告されている^{44)-46), 119)-125)}。本実験では酸を含むSM、DACを滴下した試料はDNA収量が低下し、高分子DNAが減少していたことから、これらの試薬がDNA抽出に何らかの影響を及ぼしていることが考えられた。そこでSMに用いられている0.2Mクエン酸、DACに用いられている0.6N塩酸について、予備検査試薬と同様にその影響を検討した。また、LUについては、過酸化水素水を含まないLU溶液と0.5%炭酸ナトリウム溶液について検討した。これらの試薬を滴下した試料は、DNA抽出操作の際のフェノール処理を終えた時点で溶液のpHを測定した。各試料の検査結果をFig. 10, Table 3に示す。各試料のpHは、クエン酸及び塩酸を滴下した試料では対照試料よりも酸性側に、LU溶液と炭酸ナトリウム溶液を滴下した試料は対照試料よりもアルカリ側に変化した。DNAの収量は対照試料に比

べ、いずれの試料も低下した。高分子DNAはLU溶液、炭酸ナトリウム溶液を滴下した試料のみから確認され、これらの試料からはD1S80型が検出された (Fig. 10)。

この結果から、SMに用いたクエン酸、DACに用いた塩酸は、DNA抽出の緩衝液のpHを酸性側に変化させることが考えられた。これらの酸が蛋白質分解酵素であるprotenase K (至適pH7.5~12)¹²⁶⁾の活性を阻害し、DNAの収量が低下したものと思われる。LUを滴下した試料はDNAの収量が若干低下したが、高分子DNAが確認され、D1S80型、HLADQ α 型も検出された。しかし、当初D1S80型が検出されなかった血痕のLU滴下試料で、PCRに用いる鋳型DNA量を減らすことでD1S80型が検出されたこと、精液斑のLU滴下試料では影響が見られなかったこと、過酸化水素水を含まないLU溶液や0.5%炭酸ナトリウム溶液を滴下した試料からD1S80型が検出されたことから、笠井ら(1992)⁴⁶⁾の報告と同様、血液に対する過酸化水素の存在がDNA抽出やPCRに何らかの影響を及ぼしているものと考えられた。

今回実験的に作成した試料の中でD1S80型、HLADQ α 型が検出されたものは、高分子DNAが確認された試料であった。RFLP分析でも同様のことが報告されており^{124), 125)}、良質のDNAを得ることができればDNA多型検出の可能性も高いと考えられた。今回の結果から、試料に直接予備検査試薬を付着させることはDNA多型検出にとって望ましくはないが、高分子DNAが確認できればD1S80型、HLADQ α 型検出の可能性がある。また、試料に予備検査試薬を直接付着させる場合でも、検査試薬の組成を検討することでDNA多型検出に与える影響は少なくなるであろう。

第三章 法科学的混合試料からのDNA多型（STR多型）の判定

序論

STR (short tandem repeat) 多型検出キットの一つであるAmpF1STR Profiler (Applied Biosystems) は、amelogenin遺伝子と9つの遺伝子座 (D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820座位) のSTR多型を同時に検出するキットである²²⁾。このキットによるamelogenin遺伝子および各遺伝子座のSTR多型は、シーケンス解析のピーク (波形) として検出される。ピークの有無や検出位置および蛍光強度 (relative fluorescence intensity unit, RFU) はGenescanソフト (Applied Biosystems) で解析され、各遺伝子座に対応する型が Genotyperソフト (Applied Biosystems) によって自動的に判定される。従って、ホモ型の場合は一遺伝子座に1本、ヘテロ型の場合には一遺伝子座に2本のピークが検出される。amelogenin遺伝子はX, Y染色体上にあるため、男性由来試料ならば2本 (XY), 女性由来試料ならば1本 (XX) のピークが検出される。AmpF1STR Profilerのマニュアルによれば、amelogenin遺伝子のXYと各遺伝子座のヘテロのSTR多型の平均のピーク比はいずれも0.9前後であるとされている²²⁾。しかし、このピーク比は、キットに含まれる遺伝子座のヘテロ型のピークバランスを把握するために算出されたもので、混合試料には利用されていない。

混合試料の場合、検出される各遺伝子座のピークは、試料に由来するピークの本数の組み合わせにより、いくつかのパターンが考えられ、混合比によってピークの高さに偏りが生じることが予想される。従って、GenescanおよびGenotyperソフトでは混合した型と判定されても、ピーク比により混合試料の

混合割合の多い試料のSTR多型を推定したり、逆に2本のピークのみが検出された遺伝子座から、試料が混合していることを推定できる可能性が考えられる。これらを検証するためには、単独試料の各遺伝子座のピーク比を算出し、遺伝子座ごとにピーク比による判定基準を設定する必要がある。そこで本研究では、AmpFlSTR Profilerを用い、混合試料の混合割合の多い試料由来の型判定を目的に、混合試料からピーク比によるSTR多型判定を試みた。

材料と方法

1 amelogenin遺伝子のXY及び各遺伝子座のヘテロ型のピーク比

血縁関係のない日本人97名の血液からフェノール・クロロホルム法により抽出したDNA（鋳型DNA）1ngをAmpFlSTR Profiler（Applied Biosystems）キットを用いてPCRを行った。PCRはPCR buffer, dNTP, taq polymerase（AmpliTaq Gold:Applied Biosystems）を含むPCR mixに、各遺伝子座の蛍光標識されたprimerを含むprimer mixと鋳型DNAを加え、PCR反応液の総量をマニュアル²²⁾に示されている量の半量の25 μ lで行った⁶¹⁾。得られた増幅産物はABIPRISM 310（Applied Biosystems）によりキャピラリー電気泳動を行い、Genescan及びGenotyperソフト（Applied Biosystems）により解析及び型判定を行った。PCR条件、泳動条件はマニュアル²²⁾に従った。Genescan及びGenotyperソフトによるamelogenin遺伝子と各遺伝子座のSTR多型判定は、peak height:蛍光強度（RFU）が150以上のピークのみを対象に行った。解析された各遺伝子座のSTR多型とamelogenin遺伝子のうち、Genotyperでヘテロ型と判定された遺伝子座及びXYと判定されたamelogenin遺伝子のピーク比は、LaFountainら（2001）⁶³⁾の報告と同様に、Genescanソフトで解析された

右側（2番目）のpeak heightを左側（1番目）のpeak heightで割り算出した。9つの遺伝子座のヘテロ型とamelogenin遺伝子のXYのピーク比から、各遺伝子座におけるピーク比の平均値とその標準偏差を算出した。

次に鋳型DNA量、泳動時の「injection time（試料がキャピラリー内に送り込まれる時間）」、PCR増幅産物の泳動量がピーク比に与える影響について検討した。試料はamelogenin遺伝子がXYで、かつ全ての遺伝子座がヘテロ型と判定された2検体を用いた。これらの試料について、鋳型DNA量が0.5ng, 1.5ng, 2.0ngのもの、injection timeが10秒, 15秒のもの、PCR増幅産物の泳動量が $0.75\mu\text{l}$, $3.0\mu\text{l}$, $4.5\mu\text{l}$ のものから検出された各遺伝子座のピーク比を、対照試料（鋳型DNA：1.0ng, injection time：5秒, PCR増幅産物の泳動量： $1.5\mu\text{l}$ ）の各遺伝子座のピーク比で割り、対照試料のピーク比を「1.0」とした場合の各条件のピーク比の変化を算出し、比較した。

2 混合試料のSTR多型判定

上記97試料のうち、5試料（A～E）を用い、5パターン（A+B, B+C, C+D, D+E, E+A）の混合試料を作成した。混合試料は、それぞれの試料から得られたDNAを20:1, 10:1, 5:1, 2:1の比率で混合し、このうち1ngを鋳型DNAとしてPCRに用いた。これら試料の増幅産物はマニュアル²²⁾に従って泳動した。試料の各遺伝子座のピーク比は、検出されたピークのパターンにより、Fig. 1 1に示すような組み合わせに従って算出した。これらの混合試料について、ピーク比による判定方法とマニュアル²²⁾による判定方法（Genotyperによる判定）の判定限界（どの混合比率まで混合量の多い試料の多型を判定できるか）を比較した。

ピーク比による各遺伝子座の型判定は、単独試料から得られた各遺伝子

座の「ピーク比の平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差」⁶³⁾を判定基準として行った。すなわち、一座位に検出されたピークの組み合わせに対し、判定基準内のピーク比であればヘテロ型、判定基準外であればホモ型の可能性が示唆されると判断した。この基準に従って、各遺伝子座ごとに混合量の多い試料のヘテロ型のピーク比が判定基準内に含まれるときの試料の混合比率を判定限界とし、混合量の多い試料のホモ型の遺伝子座は、他のピークとの組み合わせによるピーク比が判定基準に含まれないときの混合比率を判定限界とした。Genotyperによる判定限界は、各遺伝子座において混合が明らかになった場合（ホモ型の遺伝子座でRFUが150以上のピークが2本認識された場合、若しくは遺伝子座に3本以上のピークが認識された場合）の混合比率を判定限界とした。

結果

1 amelogenin遺伝子のXY及び各遺伝子座のヘテロ型のピーク比

今回用いた単独試料のうち、Genotyperによりヘテロ型と判定された試料のデータから算出したamelogenin遺伝子のXYと各遺伝子座のヘテロ型のピーク比の平均値、最大値、最小値及び標準偏差をTable 4に示す。これらのピーク比の平均値は0.94から0.98で、その標準偏差は、最も大きいものがamelogenin遺伝子とTH01型(0.19)で、ついでCSF1P0型(0.17)であった。最も小さいものがD5S818型(0.10)であった。

amelogenin遺伝子と各遺伝子座について、判定基準とした「ピーク比の平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差」を満たした試料は、いずれも各遺伝子座におけるヘテロ型試料総数の97%以上であった。全てのヘテロ型がこの基準を満たした遺伝子座は、D3S1358型、vWA型、FGA型、D5S818型、D7S820型であっ

た。

amelogenin遺伝子がXYで、かつ全ての遺伝子座がヘテロ型である対照試料2検体の各遺伝子座のピーク比を1.0として比較した結果を、Table 5に示す。算出されたピーク比は、いずれの遺伝子座においても今回設定した各遺伝子座の判定基準を満たしたが、鋳型DNA量の差によるピーク比の変化は顕著であった。特に鋳型DNA量が0.5ngのときの変化は大きく、ピークのバランスが偏る遺伝子座も認められた。injection timeやPCR産物の泳動量に関しては、その差により全ての遺伝子座のピークのRFUは上下するものの、検出されたピーク比の変化は小さく、いずれの遺伝子座もその値は安定していた。

2 混合試料のSTR多型判定

各遺伝子座におけるSTR多型の混合パターン、ピーク比、Genotyperによる判定結果の比較をTable 6に示す。5組のうち1組(C+D)は、全ての混合比の試料でピーク比のみ、あるいはGenotyperのみの判定により混合量の多い試料の型判定が可能であった。2組(D+E, E+A)は、20:1, 10:1, 5:1の混合比の試料で、ピーク比のみ、あるいはGenotyperのみによる判定により混合量の多い試料の型判定が可能であった。別の2組(A+B, B+C)は、20:1, 10:1の混合比の試料で、Genotyperとピーク比による判定を併用することにより混合量の多い試料の型判定が可能であった。また、両者の混合比が近くなるほど、ピーク比による判定が有効であった遺伝子座が多く見られた(Table 6: ●印)。しかし混合比が2:1の試料では、1組(C+D)は全ての遺伝子座の判定が可能であったが、4組(A+B, B+C, D+E, E+A)はGenotyperによる判定及びピーク比による判定でも型判定ができない遺伝子座が認められた(Table 6: ×印)。これは、ピークが3本以

上検出された遺伝子座で今回設定した判定基準を満たすピーク比の組み合わせが2つ以上あった場合及びピーク比の判定が混合量の多い試料由来の型とは別の型を認識した場合並びに混合量の多い試料由来の型がホモ型であるのにヘテロ型と認識した場合であった。また、混合量の多い試料由来のamelogenin遺伝子がXYやSTR多型がヘテロ型の遺伝子座について、amelogenin遺伝子がXXの試料や、STR多型に混合量の多い試料と同型を有する試料が混合した遺伝子座 (peak pattern 2, peak pattern 4 (XY-XX), peak pattern 4 (he-ho)) では、Genotyperではヘテロ型と判定されたが、そのピーク比が判定基準外であった遺伝子座も認められた (Table 6 : △印)。

考察

本研究では、混合試料から検出されたamelogenin遺伝子及び各遺伝子座のピークについて、個人由来の97試料から判定されたヘテロ型遺伝子座のピーク比から設定した判定基準が、混合試料のSTR多型判定の指標になり得るか検討した。マニュアル²²⁾や Morettiら(2001)⁶⁹⁾のピーク比の算出方法は、単独試料のヘテロ型と判定された遺伝子座及びXYと判定されたamelogenin遺伝子のRFUの低いピークをRFUの高いピークで割るもので、同一遺伝子座に3本以上のピークが検出された場合に煩雑になる。従って、2番目に検出されたピークのRFUを1番目に検出されたピークのRFUで割りピーク比を算出するLaFountainら(2001)⁶³⁾の方法を用いて判定基準を設定し、試料から検出された左側のピークのRFUを右側のピークのRFUで割ることにより混合試料のピーク比を算出した (Fig. 1 1)。単独試料のピーク比から設定した判定基準は、各遺伝子座ごとのピーク比の平均値に標準偏差の3倍の

値を引いた値から，標準偏差の3倍の値を加えた値までの範囲にあるピーク比に対して，STR多型判定可能とするものである。この基準の幅を広げると，バランスの偏ったピークでもヘテロ型と判定されることになり，幅を狭くするとほぼ同程度の強度のピークを有する遺伝子座のみしか判定できなくなる。従って，混合試料に用いるためには適切な幅（ $3 \times$ 標準偏差）を持たせることが必要と考えられた。その結果，単独試料のいずれの遺伝子座においても，97%以上（5遺伝子座については100%）のヘテロ型がこの判定基準を満たし，「ピーク比の平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差」は混合試料の型判定基準として妥当なものと考えられた。しかし，amelogenin遺伝子，TH01型，CSF1PO型では，判定基準の下限が0.5以下で，amelogenin遺伝子，TH01型の判定基準の上限は1.5を越えていた。これは，これらの遺伝子座のピーク比のばらつきが大きいことによるものであり，これらの遺伝子座の判定基準はさらに試料数を増やし詳細な検討が必要と思われた。

次にピーク比の再現性を検討するため，amelogenin遺伝子がXYで全てのSTR多型がヘテロ型の試料2検体について，ピーク比の変動を検討した。これら試料2検体のピーク比は，PCRにおける鋳型DNA量の違いによる変動が顕著であった。サイズの異なる複数の遺伝子座を同時に増幅するmultiplex法では，鋳型DNA量が増動すると遺伝子座ごとの増幅効率の差が表れるものと考えられた。また，吉田ら(2000)⁶¹⁾も鋳型DNA量が少なくなるとヘテロ型のピークのバランスが悪くなることを報告しており，鋳型DNA量は混合試料のSTR多型判定では注意すべき要因である。しかし，泳動時のinjection timeや泳動するPCR増幅産物量の違いによるピーク比は，ピークそのもののRFU値は変化するが，対照試料のピーク比と比べるとほとんど変化が見られなかった。以上の結果から，ピーク比はPCRの鋳型DNA量で変動するが，injection time及び泳動するPCR増幅産物量の

差異は、ピーク全体のRFU値は上下させるものの、ピーク比にはほとんど影響を与えないものと考えられた。

任意に作成した混合試料についてSTR多型判定を行った結果、混合比が5:1から10:1程度までならば、Genotyperによる判定とピーク比による判定を併用することにより、全ての遺伝子座のSTR多型判定が可能と考えられた。また、ピーク比による判定は、混合する試料の混合比が近くなるほど有効であった。また、同型を有するヘテロ型とホモ型が混合した2本のピークが検出する遺伝子座では、Genotyperによる判定では混合していることを確認できないが、共有するピークのRFUが高くなるためピーク比が変化し、その結果ピーク比による判定基準を満たさず、ピーク比による判定では混合が疑われる遺伝子座も見られた。従って、ピーク比はヘテロ型の判定だけでなく、混合の有無についても活用できるものと思われた。実務において、精液と膣液の混合試料は2段階抽出法^{57),58)}により精子由来のDNAを得ることが可能である。しかし、両者の混合割合によっては、精子由来DNAと膣液由来DNAが混合することがある。本研究ではピーク比による混合量の多い試料のSTR多型判定を目的としたが、ピーク比が判定基準を満たさない場合や判定基準を満たすピーク比が2組ある場合などにおいて、混合量の少ない試料のSTR多型を推定することも可能と考えられた。

従来のGenescan, Genotyperによる混合試料のSTR多型判定では、混合比の偏りが大きいほど、peak heightの差から混合試料のSTR多型を推定することが可能な場合もある。しかし、このような判定に加え、統計的に算出された各遺伝子座のピーク比による判定基準があれば、より客観的な型の推定が可能となり、実務上有効な手法と考えられた。また、単独試料において同一のPCR増幅産物であれば泳動時のinjection timeや泳動するPCR産物量には影響されなかったことから、混合試料においても、これらの条件

を変え検出されるピークのRFUを上下させても判定基準による判定には影響がないものと思われた。以上の結果から、ピーク比による混合試料のSTR多型判定は有用な手法と考えられた。

第四章 DNA を利用した人獣鑑別及び動物種識別

1 Cytochrome *b* 遺伝子を用いた人獣鑑別法の検討

序論

法科学分野における人獣、動物種鑑別は、採取された試料がヒト由来のものであるか否かを証明するために必要な検査である。この検査には一般的に抗原抗体反応を利用した免疫学的手法が用いられている。また、骨、毛髪などは、形態的な特徴により人獣鑑別が行われている。免疫学的手法は感度の高い優れた手法であるが、動物種別に特異性の高い抗血清が必要なこと、硬組織に利用することが困難などの問題があり、また骨、毛髪では、微細なものや環境の影響などにより形態が変化したものは、種特有の形態が不明になり鑑別が困難な場合がある。現場試料を有効に活用し精度の高い鑑定を行うためには、これまで人獣鑑別が困難であった試料についても検査が可能な新しい人獣鑑別法が必要である。

Cytochrome *b* 遺伝子はミトコンドリアDNAに存在する遺伝子の一つであり、呼吸器系の酵素を支配するエクソン領域である。この遺伝子は動物種間では変異があるが、同一の動物種内では変異が存在しないと考えられ¹⁰⁰⁾、この変異を利用した系統解析や動物種の識別についての研究が報告されている⁹⁶⁾⁻¹⁰⁰⁾。本研究では、動物種間のCytochrome *b* 遺伝子の変異を利用し、PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphisms)法を用いた簡便な人獣鑑別、動物種識別法について検討した。

材料及び方法

(1) 材料

材料には、血縁関係のない成人5名の血液と哺乳類（ドグニラヒヒ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ツキノワグマ、ニホンジカ、ホンドタヌキ）及び鳥類（ニワトリ、アイガモ（アヒルとマガモのF1））の血液を用いた。これらの血液から常法及びDNA抽出キット（セパジーン：三光純薬）によりDNAを抽出、精製後、TEバッファー（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA:pH8.0）に溶解した。得られたDNAに最終濃度10ng/ μ lになるようにRNase（SIGUMA）を添加し、37℃で2時間の処理を行った。処理されたDNAはフェノール、クロロホルムで精製後、エタノールを加え沈殿物を得た。沈殿物を再びTEバッファーに溶解し、分光光度計を用いて波長260nmの吸光度値から収量を算出した。

(2) PCR-RFLP

PCR反応液は、Tth polymerase (TOYOBO) 添付のPCRバッファーに、各20pmol（最終濃度0.4 μ M）のprimer、各200 μ MのdNTP及び2unitのTth polymeraseを添加し、100ng及び10ngの鋳型DNAを加え、全量を50 μ lとしてPCRを行った。primerの塩基配列は千国ら(1994)¹⁰⁰⁾の報告に従った。PCRのアニーリング温度は、55℃と60℃について検討した。PCR後、1%アガロース電気泳動で増幅産物の有無及びその大きさを確認した。増幅産物が得られた試料は、そのPCR反応液に制限酵素を10unit、酵素に添付されているバッファーを1 μ l添加し、全量を10 μ lとして37℃で増幅産物を切断した。制限酵素にはHaeIII, HinfI (TAKARA)の2種類を用いた。切断された増幅産物は4%アガロースゲルで泳動し、バンドパターンを検出した。

結果

(1) ヒト及び各種動物のPCRの結果及びRFLPパターン

PCRの結果をTable 7に示す。今回用いた材料のうち、イヌ、ホンダタヌキを除く全ての動物種で約700bpの増幅産物が確認された。ヒト、ドグニラヒヒ、ウシ、ブタはアニーリング温度55℃、60℃とも良好な結果が得られた。鳥類2種については鋳型DNA量が100ngのときに、アニーリング温度55℃で非特異的なバンドが検出されたが、鋳型DNAを10ngに減らし、アニーリング温度を60℃にすると良好な結果が得られた。ネコ、ツキノワグマ、ニホンジカは、アニーリング温度が60℃では増幅産物が得られなかったが、55℃にすると増幅産物を得ることができた。この中でネコ、ツキノワグマは他の動物に比べ増幅産物量が少なく、その増幅効率が悪いと判断された。イヌ、ホンダタヌキはどちらのアニーリング温度でも増幅産物が確認できず、さらにアニーリング温度を55℃より低くしてもマーカの700bp付近に明瞭な増幅産物は確認されなかった。

制限酵素*Hae*IIIのPCR-RFLPパターンは、それぞれヒトとニワトリ、ブタとニホンジカ、ネコとツキノワグマが類似したパターンを示したが、ドグニラヒヒ、ウシ及びアイガモは固有のバンドパターンが検出された。*Hinf*Iでは、いずれの動物種も特異的なパターンが検出され、ヒトと同じパターンを示す動物種は認められなかった (Fig. 12)。

(2) ヒトにおける同一性と鋳型DNA量の検討

血縁関係のない成人5名のDNAについてPCRを行ったところ、いずれも約700bpの増幅産物が確認された。これらの増幅産物の2種類の制

制限酵素 (*Hae*III, *Hinf*I) による PCR-RFLP パターンは, 成人 5 名においていずれも同一であり個人差は認められなかった (Fig. 13)。

また, PCR に用いる鋳型 DNA 量を 1ng から 200ng まで変化させ, 検出限界について検討したところ, 1ng の鋳型 DNA から明瞭な増幅産物が確認され (Fig. 14), 2 種類の制限酵素による RFLP 分析においても Fig. 13 に示すパターンと同じパターンが検出された。

考察

法科学分野における人獣鑑別あるいは動物種識別検査で最も重要なことは, 得られた結果がヒトあるいは動物種で特異的なことである。遺伝子レベルでの人獣鑑別を試みる場合, 動物種間で差異のある領域の塩基配列を明らかにし, それらを比較することが有効と考える。しかし, 経費や検査に要する人員及び時間を考慮すれば, 日常の鑑定業務に適した検査法とはいえない。DNA を用いたヒト鑑別法として「Quanti Blot Human DNA Quantitation Kit (Applied Biosystems)」¹⁶⁾ が市販されている。このキットはヒト由来の証明及び試料に含まれるヒト DNA の定量を行うことが可能であるが, ヒトのものではないと判定された試料に由来する動物種の同定を行うことはできない。人獣鑑別と動物種識別とを同時に行うためには, 同一の動物種内では変異が少なく動物種間で変異が存在する領域について, その変異の有無を検出し利用する方法が有効と考えられる。

千国ら (1994)¹⁰⁰⁾ は Cytochrome *b* 遺伝子の一部を増幅し, その増幅産物を任意の制限酵素で切断後, 電気泳動により切断断片のパターンを検出する PCR-RFLP パターンが, 動物の肉種鑑別に有効であることを報告した。しかし, 彼らは主に食肉として供される動物種を材料にしているため, ヒト

のPCR-RFLPパターンは不明であり、そのパターンに個人差が存在するののかも不明である。そこで本研究ではヒト、イヌ、ネコなどの動物種を加え、さらに、ヒトについては血縁関係のない5名分の試料を用いて、本法が法科学分野に利用できるかを検討した。PCR-RFLPに用いる制限酵素には山崎ら(1995)⁹⁷⁾、千国ら(1994)¹⁰⁰⁾の報告から、動物種間でPCR-RFLPパターンの変異が多い*Hae*IIIと*Hinf*Iを選択した。千国ら(1994)¹⁰⁰⁾の用いたprimerから得られるCytochrome *b* 遺伝子の増幅産物の大きさは704塩基対である。今回千国ら(1994)¹⁰⁰⁾が報告したものと同一primerを用いて得られた増幅産物のサイズは約700bpであり、本研究においても千国ら(1994)¹⁰⁰⁾が報告したものと同一Cytochrome *b* 遺伝子の一部が増幅されているものと推定された。増幅産物が得られた動物種のPCR-RFLPパターンを比較したところ、制限酵素*Hae*IIIのPCR-RFLPパターンは、ドグニラヒヒ、ウシ、アイガモが特異的なパターンを示したが、ヒトとニワトリ、ブタとニホンジカ、ネコとツキノワグマがそれぞれ類似したパターンを示し、これらの動物種を識別することは困難であった。しかし、制限酵素*Hinf*Iを用いた場合、いずれの動物種も特異的なPCR-RFLPパターンを示し、今回増幅産物が得られた全ての動物種を識別することが可能であった。

ヒトについては、血縁関係のない成人5名からいずれも約700bpの増幅産物が得られ、かつ制限酵素*Hae*III、*Hinf*IのそれぞれのPCR-RFLPパターンに個人差は認められなかった。また、ヒトCytochrome *b* 遺伝子の塩基配列⁸⁵⁾の*Hae*III、*Hinf*Iの認識部位と今回検出したヒトのPCR-RFLPパターンのバンドのサイズとの間に矛盾はなかった。さらに、ヒトとニワトリのCytochrome *b* 遺伝子の塩基配列^{85),127)}を比較すると*Hae*IIIの認識部位が同じ位置にあり、*Hae*IIIによるPCR-RFLPパターンではヒトとニワトリが識別できなかった今回の結果と矛盾しなかった。また、ニワトリ10品

種を用いた実験では、4つの制限酵素 (*AluI*, *EcoT14I*, *HaeIII*, *HinfI*) によるPCR-RFLPパターンは、それぞれの制限酵素においていずれの品種も同じパターンを示し、同一品種内及び品種間の差は認められなかった (Nakaki, unpublished data)。以上の結果から、ヒトを含む動物の Cytochrome *b* 遺伝子は、同一種内に個体差がなく、動物種間に変異が存在するため、法科学分野における人獣鑑別、動物種識別に適した遺伝子領域であると考えられた。

千国ら(1994)¹⁰⁰⁾は鋳型DNAとして500ngをPCRに用いているが、法科学試料の一試料から得られる総DNA量の500ngを消費することは、実務には適していないと考えられた。そこで今回のPCRに用いる鋳型ヒトDNAの検出限界を検討したところ、1ngの鋳型DNAでも今回のRFLP分析に十分な増幅産物が得られることが明らかになった (Fig. 14)。しかし、一般的に組織片から得られるDNAに含まれるmtDNA量は臓器の種類等によって差が存在するため、一概に総DNA量の1ngが検出限界と判断することは困難であり、少なくとも新鮮な試料から得られたDNA量が1ng程度あれば、今回の方法により人獣鑑別、動物種識別ができる可能性が高いと思われた。

本研究の試料の中で、イヌ、ホンドタヌキからは増幅産物が得られなかった。また、ネコ、ツキノワグマでは同じ量の鋳型DNAを用いた他の動物種に比べ、増幅効率は劣っていた。今回用いたprimerは、ウシ、ブタ等の食肉の肉種鑑別用として設計されたもので、これらの動物種から共通して増幅産物が得られるような塩基配列になっている¹⁰⁰⁾。そこでヒト⁸⁵⁾、ウシ (bovine)¹²⁸⁾、ブタ⁹⁶⁾、african wild dog (イヌ科)¹²⁹⁾、ネコ¹³⁰⁾、ニワトリ¹²⁷⁾のCytochrome *b* 遺伝子の塩基配列と今回用いたprimerとの相同性を比較したところ、african wild dog (イヌ科) とネコは他の動物に比べ相同性が低かった

(Fig. 15)。今回の結果のみでは増幅産物が得られない原因を特定することはできないが、少なくともイヌ、ネコについてはprimerとの相同性が低いため、明瞭な増幅産物が得られない可能性が考えられた。また、ホンダタヌキもイヌ科であることから、同様のことが推察された。

今回の結果から、mtDNAのCytochrome *b* 遺伝子を鋳型DNA 10ng、アニーリング温度55°CでPCR増幅し、その増幅産物を制限酵素*Hae*III、*Hinf*Iで切断したRFLPパターンを比較することで、簡易的に人獣鑑別、動物種識別を行うことが可能であった。しかし、より詳細な鑑別のためには、イヌ、ネコをはじめ事件・事故に比較的多く関わる動物種や抗血清が市販されていない野生の動物種のCytochrome *b* 遺伝子の塩基配列を明らかにし、動物種間で保存されている領域にprimerを設計しPCR-RFLPを行う必要がある。また、試料中のDNAが分解している場合も考慮して、PCRの増幅産物のサイズを小さくし、効率を上げることも検討する必要があると考える。

2 *Cytochrome b* 遺伝子を用いたヒト, イヌ, ネコの識別

序論

ミトコンドリアDNA (mtDNA) にある *Cytochrome b* 遺伝子は, 動物種間で多型が存在することが知られており, 家系解析や品種分化などの研究に広く用いられている⁹⁶⁾⁻¹⁰⁰⁾。千国ら(1994)¹⁰⁰⁾の方法によりヒトを含む動物種の識別を試みたところ, 事件・事故に関わることの多いイヌ, ネコについてはPCRにより十分な増幅産物が得られず, その識別は困難であった¹³¹⁾。これは, PCRに用いるprimerの相同性が大きく影響しているものと考えられた。また, このPCRにより得られる増幅産物の大きさは約704bpで, 腐敗や乾燥などの様々な状態を呈する法科学的試料には, 増幅する領域が大きいと考えられた。そこで今回, ヒト, イヌ, ネコの *Cytochrome b* 遺伝子の塩基配列の一部を明らかにし, 増幅産物の大きさを小さくした箇所に新たに primerを設計し, この遺伝子領域を用いたヒト, イヌ, ネコの識別について検討した。

材料と方法

材料は, イヌ, ネコの筋肉片と対照試料として既にミトコンドリアDNA (mtDNA) の塩基配列が報告されているヒト⁸⁵⁾, ニワトリ¹²⁷⁾の血液を用いた。これらの試料から, フェノール・クロロホルム法によりDNAを抽出した^{28), 104)}。

イヌ, ネコの塩基配列を明らかにするため, 既に報告のあるヒトmtDNAの塩基配列⁸²⁾を基に, *Cytochrome b* 遺伝子の一部(272塩基)を増幅する箇所に新たにprimerを設計した。ニワトリについては, 千国ら(1994)¹⁰⁰⁾が設

計したprimerを用いた。本研究用に新たに設計したprimerの塩基配列をFig. 1 6に示す。PCR反応液の組成は中木ら¹³¹⁾の報告に従い、鋳型DNA量10ngを用い、PCR反応液の全量を100 μ lとして行った。PCR後の試料は1%アガロースゲルで増幅産物を確認し、目的の産物についてPRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用いたDye Terminator法 (ABI Prism377:Applied Biosystems) 及び遺伝子解析ソフト(GENETYX)によりその塩基配列を決定した。今回設計したprimerにより得られたヒト、イヌ、ネコのPCR増幅産物は、試料のPCR反応液に制限酵素*Spe*I (TAKARA)を10unit、酵素に添付されているバッファーを1 μ l添加し、全量を10 μ lとして37 $^{\circ}$ Cで増幅産物を切断した。切断した産物は4%アガロースゲルで電気泳動し、RFLPパターンを検出した。

結果

ヒト、イヌ、ネコについて今回新たに設計したprimerを用いたPCRにより、約270 bpの増幅産物が得られた(Fig. 1 8)。これらの増幅産物を解析し、それぞれの塩基配列を決定した。ニワトリについては千国ら(1994)¹⁰⁰⁾が報告したprimerを用いて得られた約700bpの増幅産物から塩基配列を決定した。今回決定したヒト、イヌ、ネコ、ニワトリの229塩基 (イヌは232塩基) と、Andersonらが報告したヒトmtDNA⁸⁵⁾のうち今回決定した領域に相当するCytochrome *b* 遺伝子の塩基配列をFig. 1 7に示す。これらの塩基配列を比較したところ、ヒトとイヌでは約73%、ヒトとネコでは約79%、ヒトとニワトリでは約71%、イヌとネコでは約79%、イヌとニワトリでは約71%、ネコとニワトリでは約73%の相同性を示した。また、今回決定したニワトリの塩基配列は、Desjardinsら(1990)¹²⁷⁾が報告したニワトリのCytochrome *b*遺伝子

の塩基配列と一致していたが、ヒトの塩基配列とAndersonら(1985)⁸⁵⁾が報告した塩基配列の相同性は約93%であった。

新たに設定したprimerにより得られたヒト、イヌ、ネコのPCR増幅産物を、制限酵素*Spe I*を用いてRFLP解析を行った。その結果、ネコの増幅産物のみが切断され、そのバンドのサイズは約180bpと約90bpであった(Fig. 18)。

考察

法科学的試料の中には、微量であったり、腐敗、乾燥等の影響により、十分な量のDNAが得られない試料やDNAが分解した試料が存在する。このためPCRの増幅領域を小さく設定し増幅効率を高めることは、個人識別の分野だけでなく人獣鑑別においても有効と考えられる。今回新たに作成したprimerは、PCRの増幅産物の大きさが千国ら(1994)¹⁰⁰⁾が報告したものよりも小さくなるように設定した。このprimerを用いたPCRにより、ヒト、イヌ、ネコから目的とした領域とほぼ同じ約270bpの増幅産物が得られた。また、ニワトリからは増幅産物が確認されなかった。増幅産物から決定した塩基配列は約230塩基と小さいものであるが、これらを用いて作成した系統樹は、一般的に考えられているヒト、イヌ、ネコ、ニワトリの進化系を否定するものではなかった(Nakaki, unpublished data)。また、これらの塩基配列をアミノ酸に翻訳したところ、いずれの動物種も良好に翻訳することが可能であった。それぞれの塩基配列の相同性から、この領域内には多型を有することが確認され、その差異も特定の領域に集中するものではなかった。これらの塩基配列からイヌ、ネコを識別できる制限酵素を検索し、予想された切断断片の大きさや反応条件を考慮し、ネコのみはそのサイトを持つ制限酵素

SpeI を選択した (Fig. 17)。その結果, *SpeI* による断片のサイズは, ネコの塩基配列から予想された断片のサイズと矛盾せず, イヌとネコを識別することが可能であった。しかし, *SpeI* だけではヒト, イヌ, ネコをそれぞれ識別することはできなかつた。PCRの目的とする領域を小さく設定すると, その領域内に認識部位をもつ制限酵素の種類が限られ, 1種類の酵素で複数の動物種を識別することは困難になる。従って, 動物種が未知試料の場合は, 今回用いた方法に加えCytochrome *b* 遺伝子の別の領域のRFLP解析や免疫学的手法などを併用することがより効果的と考えられる。

本研究で対照試料として用いたニワトリは, Desjardinsら(1990)¹²⁷⁾が用いたものと同じ白色レグホン種であり, その塩基配列も一致していた。しかし, 同じニワトリでも烏骨鶏のCytochrome *b* 遺伝子は白色レグホンと異なることが報告されており¹³²⁾, 同じ品種内では変異はないが, 品種間の変異は存在するものと考えられた。同じく対照試料として用いたヒト(日本人)の塩基配列は, Andersonら(1985)⁸⁵⁾が報告した塩基配列と93%と高い相同性を示したが, 完全には一致しなかつた。Andersonらが用いたヒト試料の人種は明確ではないが, 本研究の結果から人種間においてもCytochrome *b* 遺伝子の差異が存在すると思われ, Cytochrome *b* 遺伝子は動物種識別だけでなく人種の識別にも応用できる可能性が示唆された。

3 ニワトリMHCのB-G遺伝子を用いたニワトリの識別

序論

ニワトリ主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC : major histocompatibility complex) の産物の一つであるB-G抗原は主に赤血球膜上に発現しているが、腸管上皮細胞やファブリシウス嚢などにも発現していることが報告されている¹⁰⁾、¹¹⁾、¹⁰²⁾。このB-G抗原に類似したMHC抗原が他の脊椎動物にも存在するという報告はなく、その機能については未だ不明な点が多い¹⁰³⁾。

そこで本研究はB-G領域のRFLP分析に用いられている3つのクローンについて塩基配列の決定を行い、得られた塩基配列と、これまでにアミノ酸配列および塩基配列が報告されているB-Gクローンのbg14/8¹¹¹⁾、及びG3¹¹²⁾と比較し、3つのクローンがB-G遺伝子上のどの位置に存在するのかを推定した。さらに、B-G遺伝子の特異的に検出することができれば、未知の遺伝子がニワトリのものか否かを容易に判別することが可能になると考え、bg32.1クローンの塩基配列からprimerを設計し、PCR法によるB-G遺伝子の検出を試みた。また、ニワトリ以外の鳥類や動物種からPCR産物が得られるか否かも検討した。

材料と方法

(1) 材料

材料には、Bハプロタイプがホモであるニワトリ13系統（白色レグホン10系統、白色プリマスロック2系統、ファイオミ1系統）とBハプロタイプが同定されていない烏骨鶏、地鶏（佐渡地鶏、佐渡髭地鶏、土佐小地鶏、越後南京鶏、芝鶏、尾長鶏）、野鶏4種（赤色、緑襟、灰

色，セイロン野鶏)，ニワトリと野鶏以外の鳥類10種（ウズラ，インコ，ハクチョウ，ミミズク，カラス，トビ，シチメンチョウ，ホロホロチョウ，アヒル，クジャク），ヒトを含む哺乳類9種（ヒト，ウシ，ブタ，ヒツジ，イヌ，ツキノワグマ，ホンダタヌキ，ニホンジカ，ドグニラヒヒ），両生類1種（アフリカツメガエル），魚類2種（ボラ，フナ）（Table 8）を用いた。DNAはいずれも血液あるいは血痕から，フェノール・クロロホルム法^{28),104)}により抽出した。

(2) *bg28*, *bg32.1*, *gene8.5*クローンの塩基配列の決定

*B-G*遺伝子の検出に用いられる*bg28*クローン及び*bg32.1*クローンはDr.M. M. Miller (Beckman Research Institute, USA)から，また*gene8.5*クローンはDr. C. Auffray (CNRS, France)から供与を受けた。3つのクローンがインサートされているプラスミドベクター：pBluescript (Stratagene)を，それぞれ大腸菌に取り込ませ増殖させた後，塩化セシウムを用いた密度勾配遠心法で抽出した。続いてpBluescript SK&KS Primer (Stratagene)とPRISM, Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いたDye Terminator法により，各クローンの塩基配列を決定した。*bg28*, *bg32.1*, *gene8.5*クローンの塩基配列及び翻訳されたアミノ酸配列はMillerら¹¹¹⁾が報告した*bg14/8*クローン及びKaufmanら¹¹²⁾が報告した*G3*クローンの塩基配列及びアミノ酸配列と比較した。塩基配列の翻訳及び解析は遺伝子解析ソフト（GENETYX：ソフトウェア開発）を用いて行った。

(3) P C R

P C RのPrimerは，*bg32.1*クローンの塩基配列を参考にして，451bpを増幅する箇所に設計した (Fig. 20)。P C Rは，taq polymerase

(TAKARA)添付のPCR bufferに最終濃度0.1mMのdNTP (TAKARA), 最終濃度20pmolの各primer, 2.5 unitのtaqpolymerase(TAKARA)に鋳型DNAを加え, 全量100 μ lとして行った。鋳型DNA量は500ngを用いた。PCRの条件は94 $^{\circ}$ C \cdot 1分, 55 $^{\circ}$ C \cdot 1分, 72 $^{\circ}$ C \cdot 1分のサイクルを35回繰り返した。その後, 得られたPCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動し, 増幅産物を確認した。

結果

(1) DNAプローブとして用いられているクローンの位置の推定

3つのクローンのそれぞれの大きさは, *bg28*クローンが531bp, *bg32.1*クローンが648bp, *gene8.5*クローンが640bpであった。*bg28*, *bg32.1*クローンの塩基配列をアミノ酸配列に翻訳すると, *bg28*クローンは176個のアミノ酸, *bg32.1*クローンは54個のアミノ酸と460塩基(終止コドンから3'末端側)に翻訳された。Millerら(1991)¹¹¹⁾は*bg14/8*を, そのアミノ酸配列から5'側, 3'側のUT領域(Untranslated region)と4つの翻訳領域(アミノ酸配列のみを報告)に分けて報告し, Kaufmanら(1989)¹¹²⁾は*G3*クローンの塩基配列とその一部をアミノ酸配列に翻訳して報告している。これらのアミノ酸配列を比較した結果をFig. 19, 20に示す。*bg28*クローンは*bg14/8*クローンの細胞外ドメイン(アミノ酸第67~148番), 膜貫通領域(アミノ酸第149~182番), 細胞内領域(アミノ酸第183~242番)と99%以上の相同性を示した。また, *bg14/8*クローンの細胞内領域の第244~343番のアミノ酸配列は*G3*クローンの第1~100番のアミノ酸配列と一致した。*bg14/8*クローンの細胞内領域の下流のアミノ酸配列(アミノ酸第368~397番)と, *G3*クローンの下流のアミノ酸配列

(アミノ酸第 174~203番) 及び *bg32.1* クローンの上流のアミノ酸配列 (アミノ酸第 24~53番) も一致していた。 *gene8.5* クローンの塩基配列から翻訳されたアミノ酸配列は *bg28*, *bg32.1*, *bg14/8*, *G3* クローンのアミノ酸配列といずれも相同性が低かったため解析から除いた。

bg14/8 クローンの 3' 側 UT 領域とそれぞれのクローンの塩基配列を比較した結果, Fig. 20 に示すように, *G3* クローン (614~1073bp), *bg32.1* クローン (163~623bp) の 3' 側の終止コドンから下流の配列とそれぞれ 98%, 94% の相同性を示し, *gene8.5* クローン (195~640bp) と 76% の相同性を示した。

以上の結果から, 今回アミノ酸配列及び塩基配列を決定した *bg28*, *bg32.1*, *gene8.5* クローンと *G3* クローン, *bg14/8* クローンとの関連性を検討したところ, *bg28* クローンは細胞外ドメインから細胞内領域をコードし, *G3*, *bg32.1* クローンは細胞内領域から 3' 側 UT 領域を, *gene8.5* クローンは 3' 側 UT 領域をコードするクローンと推定された。

(2) PCR による *B-G* 遺伝子の検出

3 つのクローンのうち, *bg14/8*, *G3* クローンとの相同性が高く, 細胞内領域から 3' 側 UT 領域をコードしているものと推定された *bg32.1* クローンの塩基配列から primer を設計し (Fig. 20: under line), PCR を行った。PCR 増幅産物を 1% アガロースゲルで泳動したところ, ニワトリ及び 4 種の野鶏のいずれからも約 600bp 付近に増幅産物が確認された (Fig. 21, 22)。しかし, ニワトリ, 地鶏, 野鶏以外の鳥類及び動物種からは, いずれも PCR 産物が確認されなかった (Table 8)。

考察

bg28, *bg32.1* クローンは $B^{2.1}$ ハプロタイプを持った卵胚の赤血球細胞の mRNA より作成した cDNA ライブラリーから得られた *B-G* cDNA クローンである^{108), 109)}。また, *gene8.5* クローンは *G3/G7*, *G8/G9* クローンの 3' 末端と相同性が高いことが報告され¹¹²⁾, 本実験でも *G3* クローンの 3' 下流側と高い相同性を示した。しかし, *gene8.5* クローンの詳細な由来については報告されていない¹¹⁰⁾。今回 3 つのクローン的位置が推定できたことで, これらを DNA プローブとして用いる RFLP 解析において, ニワトリのどの多型を見ているかが推察できることになった。しかし, *bg28*, *bg32.1*, *gene8.5* クローンのアミノ酸配列や塩基配列は *bg14/8* クローン, あるいは *G3* クローンと完全に一致しなかった。これはクローンが由来する *B* ハプロタイプの差異 (*bg14/8*: $B^{2.1}$ ¹⁰⁹⁾, *G3*: $B^{1.9}$ ¹¹²⁾) や *B-G* 遺伝子のハプロタイプにサブタイプが存在することなどが考えられた。*bg32.1* クローンから設計した primer による PCR 解析では, ニワトリ, 地鶏, 野鶏以外の動物種から PCR 産物が確認されなかったことから, この増幅産物は今回材料として用いた動物種の中では, ニワトリ特異的なものと考えられた。さらに, この primer により未知の遺伝子がニワトリ由来か, 他の動物種由来かを判別できる可能性が示唆された。検出された増幅産物は予想された 451bp よりも大きいものであった。これは増幅産物の中にイントロンの存在が示唆されたが, 明らかにするためには RT-PCR などによる詳細な検討が必要と考えられた。ニワトリ *B-G* 遺伝子と相同性が高いものとして, MOG 遺伝子¹³³⁾ 及びニワトリ zipper protein 遺伝子¹³⁴⁾ などが報告されている。ニワトリ zipper protein 遺伝子と *bg28*, *bg32.1* 及び *gene8.5* クローンとの関連性について遺伝子解析ソフト (GENETYX: ソフトウェア開発) を用いてそれぞれの塩基配列を比較したところ, それぞれ 77%, 75%, 64% の相同性が認められたが, これらのクローンがニワトリ zipper protein 遺伝子の一部であるかは明らか

ではなかった。

以上の結果から，本研究で作成したprimerにより得られた増幅産物は，*B-G* 遺伝子の一部であると考えられた。従って，未知試料のDNAからニワトリ（地鶏，野鶏）を特異的に識別することが可能と思われ，ニワトリを識別するprimerとして法科学分野に利用できるものと考えられた。本研究のように，ヒト以外の動物種においても，特定の動物種に特異的な遺伝子を検出することで，より詳細な人獣鑑別，動物種識別が可能になるものと思われる。今後は得られたPCR増幅産物の構造を解析し，*B-G* 遺伝子との関連性の検討，並びに*B*ハプロタイプ，ハプロタイプに存在するサブタイプとの関連性についても検討する必要があると思われた。さらに，同一系統のニワトリを複数用いて個体間の差を検討することも必要と考えられた。

第五章 総合考察

犯罪現場などから採取される証拠試料は、原則として「未知試料」である。従って、法科学分野の物体検査では、科学的な検査方法を用い、その試料が「何か」、「ヒト由来のものか」を証明し、さらに個人につながる血液型やDNA多型などの情報をできるだけ多く引き出さなければならない。これらの検査過程は予備検査、人獣鑑別検査、個人識別検査という検査に大別される。本研究では、DNA多型検出を目的とした証拠試料の有効活用という観点から、毛髪（自然脱落毛）及び法科学物体検査で用いられる予備検査試薬が付着する試料のDNA多型検出、混合試料のDNA多型判定について検討を行った。加えて、人獣鑑別検査の分野にもDNAを利用し、従来の免疫学的手法によるヒト由来の判定のみではなく、動物種の識別や動物特異的な遺伝子の検出を試みた。

第二章では、自然脱落毛のDNA多型検出について検討した。毛髪は、その毛根の形態から抜去毛と自然脱落毛に大きく分類される。抜去毛は力を加えて抜いた毛（抜けた毛）であるため、その毛根部には細胞（毛根鞘）が付着していることが多い。自然脱落毛は本人の意志に関係なく脱落する毛髪であり事件捜査などでは貴重な証拠試料となるが、自然に脱落した毛であるため毛根部にはほとんど細胞が付着していない。しかし、Higuchiら（1988）³⁴⁾やUchihiら（1992）⁴³⁾は自然脱落毛の毛根部から、PCRを用いてDNA多型（HLADQ α 型）検出を行い、1本の毛根から多型が検出できたことを報告している。このHLADQ α 型のPCR増幅産物のサイズは約240bp²³⁾で、D1S80型⁷⁾（増幅産物約300～800bp）などに比べるとサイズが小さく増幅効率が良いため、毛根1本から得られた鋳型DNAでも多型が検出されたものと考えられた。そこで本研究では、より多型性の高いD1S80型⁷⁾について、自然脱落毛の毛根部と毛髪の毛幹部を材料として、その多型検出を試みた。さらにPCRの増

幅効率を向上させるため、DNA抽出溶液をChlex100（イオン交換樹脂）で処理する方法とPCR反応液にBSA（牛血清アルブミン）を添加する方法について、その効果を比較した。その結果、PCR反応液にBSAを添加した方法により、1本の自然脱落毛の毛根からD1S80型を検出することが可能であった。さらに、毛根部に細胞が付着している自然脱落毛の毛根部であれば、より多型検出される可能性が高かった。しかし、毛幹部からは高分子DNAの存在が確認されず、D1S80型検出も困難であった。Sensabaugh(1990)¹³⁵⁾は毛髪1本から得られる平均DNA収量は、抜去毛の毛根部（毛根鞘付着）で375 ng、自然脱落毛の毛根部で3ng、毛幹部（3cm）で0.009ngであったと報告している。通常PCRは数ng程度の鋳型DNAを用いて行うことから、抜去毛や自然脱落毛の毛根部からD1S80型の検出は可能と考えられる。しかし、毛幹部は多型検出のためかなりの量が必要となる。また、本研究において毛幹部からは高分子DNAの存在が確認されなかった。さらに、毛幹部にあるメラニン色素がPCRのtaq polymeraseの活性を阻害する^{43),44)}こと、本研究においてもDNAに毛幹部抽出液を添加し再抽出した試料の増幅効率が低下したことから、毛幹部からD1S80型を検出することは困難と考えられた。自然脱落毛の毛根部について成人7名から採取した130本からD1S80型検出を行ったところ、多型が検出されたものは総数の約25%で、毛根部に細胞が付着するものの方が成績は良好であった。自然脱落毛の毛根部から得られる平均DNA収量は3ng¹³⁵⁾とされているが、この結果は1本の毛根部から得られるDNA量にばらつきがあることを示している。一般に細い毛髪の毛根部は小さく、本研究でも須藤ら³⁹⁾の分類で「細い毛髪」とされる毛幹部の太さが70~80 μ mの自然脱落毛の毛根部からは多型が検出されなかった。さらに、D1S80型のパターン（ホモ型・ヘテロ型）がホモ型の試料やD1S80型の繰り返し数が少ない試料は、他に比べ多型が検出されやすい傾向を示した。一般にDNA

多型は、ヘテロ型よりも同型が重複するホモ型の方が検出されやすい。また、D1S80型は16塩基の繰り返し数の多型であるため、繰り返し数が大きくなるほど増幅産物のサイズは大きくなり、サイズの小さいものに比べその増幅効率は劣る³⁰⁾。毛根部の細胞の付着状態に加え、毛髪の太さ（毛根の大きさ）、多型のパターン（ホモ型・ヘテロ型）、増幅産物の大きさ（繰り返し数の多い・少ない）は、自然脱落毛の毛根部からのD1S80多型検出に影響を与える要因と考えられた。

毛髪は血液や体液と比べると、本研究で明らかになったようにDNAを得ることが容易でない試料であり、その毛根部も毛髪の発生から退行過程において様々な形態を呈している^{38),39)}。しかし、毛髪試料を有効に活用するためには、形態の比較による主観的な個人識別検査に加え、DNA多型検出などによる精度の高い客観的な個人識別検査が必要であり、犯罪捜査における毛髪試料の有用性を考慮すると、今後も様々なDNA多型について検討する必要がある試料と考える。

次に、法科学物体検査に用いる予備検査試薬が付着する試料のDNA多型検出について検討した。予備検査は未知試料の証明検査において省略できない検査であり、本研究で検討した予備検査は、試料が微量の場合や付着部位の検索などのために、試料に直接噴霧、滴下して行う検査方法である。従って、これらの試薬が付着する試料からDNA多型検出を行う必要性も予想され、試料を有効に活用するためには、これら試薬がDNA多型検出に及ぼす影響を把握する必要がある。DNA多型検出に影響を及ぼす物質については様々な報告がある。前述のように毛髪のメラニン色素^{44),122)}の他に、試料の付着担体（木材など）や担体（ジープンなど）に由来する色素^{124),125)}、調味料、飲料などの食品類¹²⁵⁾がPCRの反応を阻害することが報告されている。しかし、予備検査試薬のように法科学物体検査の過程で付着する物質がDNA多型検出に及ぼす影響につ

いての報告は少ない⁴⁶⁾。

本研究の結果、予備検査試薬に酸が用いられているものを直接滴下した試料は、DNAの収量が低下し多型検出が困難になった。これらの試料からは高分子DNAが確認されずDNA収量の低下も顕著であったことから、酸を用いる予備検査試薬はDNAの抽出に影響を及ぼしていると考えられた。また、付着する予備検査試薬の種類に関係なく、D1S80型、HLADQ α 型が検出された試料は全て高分子DNAが確認された試料であった。今泉ら(1995)³⁵⁾は、様々な環境下に放置した組織片のDNA多型検出を試みたところ、高分子DNAが確認された試料でも多型が検出されず、確認された高分子DNAは組織片の腐敗現象に伴う細菌類に由来するものと報告している。本研究の結果のみでは、高分子DNAが確認された試料からは必ずDNA多型が検出されるとは言えないが、自然脱落毛についても高分子DNAの存在が確認された毛根部について多型が検出されたことからでも分かるように、特異的な条件下にあった試料を除けば、試料中の高分子DNAはDNA多型検出の成否の指標になることが示された。従って、予備検査試薬が付着する試料についても、高分子DNAが確認されたものはDNA多型が検出される可能性が高いと考えられた。

第三章では、混合試料のSTR (short tandem repeat) 多型判定の方法について検討した。法科学分野における混合試料とは、強姦事件などの犯罪現場から採取される精液(被疑者由来)と膣液(被害者由来)が混合する試料に代表される、2名以上に由来する体液や血液が混合した試料である。この精液・膣液混合試料については、精液、膣液に由来するDNAを個々に抽出する方法が確立し³⁰⁾、それぞれのDNA多型による個人識別が可能となった。しかし両者の混合比の偏りが大きい場合は、この手法を用いても混合した多型が検出されることがある。また、血液同士、唾液同士など同種の体液が混合する試料では、個々のDNAを得ることはできない。その結果、混合したDNA多型が検

出され、精度の高い個人識別が困難になる。

法科学分野において個人識別を目的としたDNA多型を判定する際には、客観的な判断が求められる。D1S80型に関しては、統計学的に算出された「閾値」が取り入れられている⁸⁾。これは、試料と同時に「多型マーカー」を泳動し、試料から検出された多型（バンド）とマーカーとの「検出位置のずれ」を画像解析装置を用いて算出する。この「ずれ」が許容範囲（閾値）内であれば多型として判定する手法である。また、ドットハイブリダイゼーションを用い、その発色の有無により多型を判定するHLADQ α 型²³⁾やPM²⁴⁾は、ハイブリダイゼーションに用いるフィルターに「判定用ドット」が設けてあり、このドットよりも強く発色したドットのみを判定することになっている。このように、これらのDNA多型の判定には客観的な判断を行うための基準が設けられている。本研究で用いたSTR多型検出キット:AmpliSTR Profiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) は、amelogenin遺伝子座と9つのSTR座位の多型をピークとして検出し判定するものである。このキットを用いて試料から検出されたピークは、フラグメントアナライザーによりピークの強さ（ピーク強度: peak height）が算出され、ピーク強度が150以上のピークのみを型判定の対象とするという基準が設けられている²²⁾。従って、ピーク強度による判定は、多型の強度を数値として表すことが可能である。すなわち混合試料についても、検出が予想される複数のピークの強弱を数値として把握することができる。この点は、バンドの発色の強弱やドットの発色の強弱を肉眼的に観察するD1S80型⁷⁾、HLADQ α 型²³⁾、PM²⁴⁾の判定と大きく異なる。

本研究では、このピーク強度（peak height）に注目しSTR多型の判定基準を作成した。単独試料の各遺伝子座は、遺伝子座ごとにホモ型であれば1本、ヘテロ型であれば2本のピークが検出される。まず単独試料について、ヘテロ型と判定されたSTR座位と男性（XY）と判定されたamelogenin遺伝子座の

2本のピーク強度からピークの比率（ピーク比）を算出した。今回用いたキットの各遺伝子座のピーク比はマニュアル²²⁾にも報告されている。しかし、これは各遺伝子座に検出されるヘテロ型のピークバランスに差がないことを示すためのものであり、その算出方法も2本のピークのうち、「低いピークの peak height / 高いピークの peak height」という方法である。この算出方法は、分子と分母の値が遺伝子座ごとに入れ替わる可能性があり、さらに2本以上のピークの検出が予想される混合試料ではピーク比の計算が煩雑になる。そこで、本研究では「第二ピークの peak height / 第一ピークの peak height」という、各遺伝子座において2本目のピーク強度の値を、1本目のピーク強度の値で割るという算出方法を用いた。この方法は、2本のピーク強度の値にかかわらず計算方法が固定されるため、試料間や遺伝子座間のピーク比の比較が可能となる。この方法により算出したピーク比は、吉田ら(2000)⁶¹⁾の報告と同様に泳動条件の変化に対してはほとんど変わらないが、鋳型DNA量が少ない(0.5ng)ときはその変動が顕著であることが示された。すなわち、各遺伝子座のピーク比は、PCRに適正な鋳型DNA量を用いれば、その他の要因による大きな変動はないものと考えられた。そこで、鋳型DNA量として1ngを用いた単独試料(97試料)のピーク比から各遺伝子座におけるピーク比の平均値と標準偏差を求め、「ピーク比の平均値 ± 3 × 標準偏差」という判定基準を各遺伝子座ごとに作成した。この判定基準は、試料から検出された2本のピーク比が、基準内であれば多型として判定し、それ以外は判定できないとするものである。その結果、単独試料から算出されたヘテロ型の97%以上のピーク比が判定基準を満たし、本研究で作成した基準は、ピーク比による判定基準として適正なもの判断した。

この判定基準を用いて、任意に作成した混合試料のSTR多型判定を行った結果、混合比が5:1から10:1程度までならば、従来の判定法とピーク比による

判定法を併用することにより，混合比の高い試料の全てのSTR多型判定が可能であった。また，ピーク比による判定は，混合する試料の混合比が近接するほど有効であった。吉田ら(1993)⁵³⁾は，2名のDNAが混合する試料について，D1S80型の判定が可能なのは10:1から20:1の混合比で，これらよりも近接する混合比の場合は判定が困難であることを報告している。また，吉田ら(2000)⁶¹⁾は本研究で用いたキットと同じキットについても検討を行い，混合比が5:1よりも近接する試料は混合試料であることが明らかになることを報告している。すなわちこれは，混合比が5:1よりも近接するとSTR多型が判定できなくなると解釈される。本研究で行ったピーク比による判定の特徴は，明らかに混合が確認された遺伝子座でも多型が判定できる点である。実際に，混合比が2:1の試料でもピーク比により混合比の高い試料の多型を判定することが可能であった遺伝子座も見られた。さらに同型を有するヘテロ型とホモ型が混合した2本のピークが検出する遺伝子座では，従来の判定法では混合していることを確認できないが，ピーク比による判定では混合が疑われる遺伝子座も見られた。

今までピーク比をDNA多型判定に利用することは行われていなかったが，本研究の結果，ピーク比は多型の判定に有効な指標であることが明らかになった。本研究でピーク比による判定基準作成のために用いた単独試料は97検体で，さらに本研究で作成した混合試料は2名のDNAが混合したことを想定したものである。今後は単独試料の解析数を増やし判定基準の信頼性を高めるとともに，3名以上のDNAが混合する試料や混合比が不明な試料などについても検討を進めていく必要がある。

第四章では，ミトコンドリアDNAのCytochrome *b* 遺伝子を用いた人獣鑑別，動物種識別とニワトリMHCの*B-G* 遺伝子を用いたニワトリの特異的な識別について検討した。法科学分野では個人識別を目的としたDNAの利用につ

いては広く研究されているが、人獣鑑別を目的としたDNAの利用に関する報告は、個人識別を目的としたものに比べ少ない。しかし、人獣鑑別と動物種識別が同時に行える検査法があればその利用価値は大きい。例えば、従来は形態の観察により判断していた骨や毛髪（獣毛）などの人獣鑑別⁷⁰⁾⁻⁷³⁾にも、試料からDNAが得ることができればDNAレベルでの鑑別が可能になり、その結果にも客観性を与えることができる。

千国ら(1994)¹⁰⁰⁾は食肉に供される動物種の肉種鑑別を目的としてCytochrome *b* 遺伝子の一部を増幅し、そのPCR-RFLP (restriction fragment length polymorphisms)のバンドパターンから食肉種の識別が可能であったことを報告した。Cytochrome *b* 遺伝子はミトコンドリアDNAにある遺伝子で、Irwinら(1991)⁹⁶⁾は、この遺伝子に動物種間で変異が存在していることを報告している。従って、Cytochrome *b* 遺伝子はヒトとその他の動物種の間にも変異があると考えられ、法科学分野における人獣鑑別・動物種識別のために、ヒトを含むいくつかの動物種についてその識別を行った。その結果、ヒトとドグニラヒヒ、ウシ、ブタ、ネコ、ツキノワグマ、ニホンジカ及びニワトリ、アイガモは、それぞれ固有のバンドパターンを示し、動物種の識別が可能であったが、イヌとホンドタヌキからは増幅産物が得られず識別が困難であった。また、ヒト(日本人6名)のRFLPパターンはいずれも共通であった。すなわち、ヒトのRFLPパターンが予め把握できれば、未知試料についてCytochrome *b* 遺伝子による人獣鑑別が可能であると考えられた。しかし、事件・事故に関わることの多いイヌ、ネコについて、イヌからは増幅産物が得られず、ネコにおいては他の動物種と比べて増幅効率が劣っていた。PCRのアニーリング温度の検討結果やGirmanら(1993)¹²⁹⁾やLopezら(1996)¹³⁰⁾の塩基配列の報告から、イヌ、ネコから増幅産物を得るためにはprimerの塩基配列を変更する必要があると考えた。そこで、ヒト、イヌ、ネコを識別するために新たなprimerを設計

した。さらに、分解DNAなどからも増幅産物が得られるように増幅産物のサイズが約250bpになるように設計した。このprimerを用いてPCR-RFLPを行ったところ、ヒト、イヌ、ネコから増幅産物が得られ、RFLPによりネコのみを識別することが可能となった。従って、千国ら(1994)¹⁰⁰⁾が報告したprimerと新たに作成したprimerを用いることにより、ヒトを含む13種の動物種の識別が可能となった。本研究の結果から、Cytochrome *b* 遺伝子を用いた人獣鑑別法は実務に利用でき、さらにこの方法は動物種の識別も同時に行うことが可能なことから、有用な人獣鑑別、動物種識別法と考えられた。

次に、ニワトリ特異的遺伝子とされる*B-G* 遺伝子の検出によるニワトリの識別について検討した。法科学分野では、ヒト特異的遺伝子を検出し人獣鑑別を行う方法⁷⁴⁾⁻⁷⁶⁾は報告されているが、ヒト以外の動物種の遺伝子を用いて、その動物種を特異的に識別する方法は少ない。ヒト以外の動物種についても、特定の動物種のみ存在する遺伝子を指標とした動物種識別が可能であれば、「ヒトのものではない」と判定された試料に対して有効と考える。特定の動物種の識別は、動物特異的抗血清を用いた免疫学的手法により同様の結果が得られるが、抗血清の力価やその特異性により結果が左右されることがある。しかし、遺伝子レベルでの検査手法は、PCRを用いることで微量な試料についても検査が可能になり、かつ指標となる遺伝子の背景が明らかになっていれば、得られた結果に対してより信頼性が高まる。

ニワトリ主要組織適合性遺伝子複合体(MHC: major histocompatibility complex)は*B-F*, *B-L*, *B-G* 遺伝子という3つの遺伝子で構成されている。これらの遺伝子の産物の一つである*B-G* 抗原は、他の脊椎動物に存在するという報告はない。従って、*B-G* 遺伝子はニワトリ特異的な遺伝子であると考えられており¹⁰³⁾、この遺伝子が検出できればニワトリの特異的な識別が可能になると考えられた。さらにPCRにより検出することが可能であれば、法科学試料に

も利用できる。本研究に用いる primer の作製のために、ニワトリの系統解析に用いられている *B-G* クローン¹³⁶⁾ を利用した。しかし、本研究で用いた *B-G* クローンはこれまでに *B-G* 遺伝子の構造上での位置関係が明らかではなかった。Miller ら (1991)¹¹¹⁾ は、*B-G* クローンの一つである *bg14/8* の塩基配列及びアミノ酸配列を明らかにし、クローン内のそれぞれの位置を推定している。そこで本研究で用いたクローンについても塩基配列を決定し、*bg14/8* の塩基配列及びアミノ酸配列と比較してそれぞれの位置関係を推定した。比較した結果から、今回は *B-G* 遺伝子の細胞内領域をコードすると推定された塩基配列を参考に primer を設計した。この primer を用いて PCR を行ったところ、ニワトリ、地鶏から増幅産物が得られ、ニワトリの祖先種である野鶏 4 種からも増幅産物が得られた。また、本研究で用いたヒトを含む他の動物種から増幅産物は得られなかった。PCR の増幅産物の大きさは、塩基配列から推定された大きさ (約 450bp) よりも大きく (約 600bp)、増幅産物の中にイントロンの存在が示唆された。さらに、ニワトリの種類によってはサイズの異なる増幅産物も確認された。本研究で塩基配列を決定した 3 つの *B-G* クローンは、ニワトリの品種分化、家系解析、系統解析などを目的としたサザンハイブリダイゼーション法のプローブとして用いられ、品種間や系統間で多型があることが報告されている^{104), 107), 136)}。また、本研究で得られたニワトリの増幅産物を 4% アガロースゲルで電気泳動したところ、複数のバンドが検出され、ニワトリの系統間で多型が存在することが示唆された (Nakaki, unpublished data)。従って、*B-G* 遺伝子を PCR により増幅できれば、ニワトリの特異的な識別の他に、ニワトリの系統間や品種間の識別にも利用できる可能性が考えられた。

法科学分野で用いられる検査法は、実験的なデータに加え、実際の現場試料 (実務試料) に有効に活用できるかが重要である。本研究では実務試料についての検討は行っていないが、本研究で得られた結果や判明した事項は、法科学

分野におけるDNA多型検出，DNA多型の判定，人獣鑑別において有意義なものであり，実務試料について用いる場合でも十分寄与できるものとする。

法科学分野にDNAが利用されるようになり，DNAを用いた様々な検査法が報告されている。しかし新しい検査法が導入されても，犯罪現場などから採取される証拠試料に変化はない。様々な検査法に対し，証拠試料を有効に活用し，正確な結果を得るためには，試料の状態が検査法に及ぼす影響や，効果的な判定方法などを検討する必要がある。法科学分野の検査法は多岐にわたり，日々進歩していることから，有効と思われる手法については積極的に導入するように検討を続けることが必要である。

要 約

法科学分野の物体検査の対象となる法科学的試料は、犯罪現場等から採取された試料（現場試料）と個人から採取された試料（対照試料）に分類される。一般に現場試料は、外観検査と予備検査（試料は何か）、人獣鑑別検査（試料はヒト由来のものか）を経て、個人識別検査（血液型等の判定）が行われる。法科学分野にDNAが利用されるようになり、従来の検査法に比べ精度の高い個人識別検査が可能となった。本研究では、DNAを利用した法科学物体検査の証拠試料の有効活用という観点から、毛髪（自然脱落毛）及び法科学分野の物体検査で用いられる予備検査試薬が付着する試料からのDNA多型検出、混合試料のDNA多型（STR多型）判定について検討を行った。さらに、人獣鑑別検査の分野にもDNAを利用し、従来の免疫学的手法によるヒト由来の判定のみではなく、動物種の識別や動物特異的な遺伝子を検出することを試みた。

初めに自然脱落毛からのD1S80型検出について検討した。自然脱落毛は毛幹部からは高分子DNAの存在が確認されず、D1S80型検出は困難で、毛根部からのD1S80型検出は、毛根に付着する細胞に大きく依存していた。しかし、自然脱落毛の毛根部には高分子DNAが存在し、PCRの際にBSAを添加したり、毛根に細胞の付着が確認できれば、D1S80型検出の可能性は高くなるものと思われた。予備検査試薬が付着する試料では、予備検査試薬に酸が用いられているものを直接滴下した試料はDNA多型検出が困難で、これらの試薬がDNAの抽出に影響を及ぼしていると考えられた。しかし、高分子DNAが確認された試料ではDNA多型検出は可能であったことから、予備検査試薬が付着する試料からDNA多型を検出する場合、高分子DNAの存在は一つの指標になるものと思われた。

混合試料のDNA多型（STR多型）の判定について、新たな判定基準によ

る判定を試みた。現在行われているSTR多型検出はピークとして検出され、そのピーク強度により型判定が行われる。この数値を利用し混合試料に対する各STR座位の判定基準を作成した。この判定基準を用いて混合試料のSTR型判定を行ったところ、10:1、5:1程度の混合比であれば混合割合の多い試料のSTR型を判定することが可能であった。今回の結果から、従来の判定法と判定基準による判定方法を併用することで、混合試料からより正確なSTR多型の判定が可能と思われた。さらに、混合していることが不明な試料でも、得られた結果から混合していることが推定される場合もあり、今回用いた判定基準によるSTR多型の判定は有用と考えられた。

次に、ミトコンドリアDNAのCytochrome *b* 遺伝子を用いた人獣鑑別、動物種識別とニワトリ特異的遺伝子である*B-G* 遺伝子を用いたニワトリの識別について検討した。ヒトを含むいくつかの動物種についてCytochrome *b* 遺伝子を増幅し、そのRFLPパターンから識別を行ったところ、ヒトとドグニラヒビ、ウシ、ブタ、ネコ、ツキノワグマ、ニホンジカ及びニワトリ、アイガモの識別が可能であった。またヒト（日本人6名）のバンドパターンはいずれも共通であった。事件・事故に関わることの多いイヌ、ネコについては、新たな

primerを設計しPCR-RFLPを行ったところ、ネコを識別することが可能となった。これらの結果から、Cytochrome *b* *cv*遺伝子を用いた人獣鑑別法は実務に利用できるものと考えられ、さらに2組のprimerによるPCR-RFLP解析により、ヒトを含む13種の動物種の識別が可能であることから、有用な検査法と考えられた。次に、ニワトリ特異的遺伝子とされる*B-G* 遺伝子の検出によるニワトリの識別について検討した。サザンブロット解析に用いられている3つの*B-G*クローンの塩基配列から、それぞれの位置関係を推定し、PCRの目的とする領域を決定した。得られた塩基配列からprimerを設計し、PCRを行ったところ、ニワトリ、地鶏から増幅産物が得られ、今回用いたヒト

を含む他の動物種から増幅産物は得られなかった。また、ニワトリの祖先種である野鶏4種からも増幅産物が得られ、この遺伝子領域はニワトリに広く存在するものと考えられた。従って、*B-G* 遺伝子を検出する方法は、ニワトリを特異的に識別することに利用できると思われた。

謝 辞

本研究を遂行し、とりまとめるに際して、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました、広島大学生物生産学部 教授 山本義雄先生、および論文をとりまとめるにあたり有益な御助言をいただいた同学部 教授 谷口幸三先生、教授 寺田隆登先生、教授 藤田正範先生に謹んで感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行にあたり、数々の貴重な御助言、御指導を賜りました、広島大学生物生産学部 助手 西堀正英先生に心からお礼申し上げます。

また、本研究の遂行のために、貴重な研究試料を供与していただきました広島市安佐動物公園 園長 福本幸夫先生に深く感謝致します。

最後に、本研究に際して多大なる御協力をいただきました、広島県警察本部 刑事部科学捜査研究所 法医研究室の皆様をはじめ所員の皆様、ならびに諸先輩の方々に心から感謝致します。

引用文献

- 1) Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L., Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA, *Nature*, 314: 67-73 (1985).
- 2) Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L., Individual-specific 'fingerprints' of human DNA, *Nature*, 316: 76-79 (1985).
- 3) Jeffreys, A.J., Brookfield, F.Y. and Semeonoff, R., Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints, *Nature*, 317: 818-819 (1985).
- 4) Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239: 487-491 (1988).
- 5) Renolds, R., and Sensabaugh, G., Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using polymerase chain reaction, *Anal. Chem.*, 63: 2-15 (1991).
- 6) Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T. and Erlich, H.A., Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230: 1350-1354 (1985).
- 7) Kasai, K., Nakamura, Y., and White, R., Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science, *J. Forensic Sci.*, 35: 1196-1200 (1990).
- 8) 法科学的DNA型判定に関する技術作業グループ, 日本人におけるMCT118型及びHLADQ α 型の出現頻度の再評価と他の民族集団データとの比較, 科警研報告, 48: 171-185 (1995).
- 9) 関口和正, 坂井活子, 水野なつ子, 吉田日南子, 笠井賢太郎, 佐藤元, 瀬田季茂, 日本人のMCT118座位PCR増幅産物の塩基配列について, 科警研報告, 46: 172-176 (1993).
- 10) Yoshida, K., Sekiguchi, K., Kasai, Sato, H., Seta, S. and Sensabaugh, G.F., Evaluation of new primer for CSF1PO, *Int. J. Leg. Med.*, 110: 36-38 (1997).
- 11) Puers, J.C., Hammond, H.A., Caskey, C.T. and Schumm, J.W., Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01 [AATG] and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder, *Am. J. Hum. Genet.*, 53: 953-958 (1993).
- 12) Yoshida, K., Kasai, K., Sekiguchi, K., Senju, H., Mizuno, N., Sakai, I., Sato, H. and Seta, S., TH01 typing of of japanese population and its application to forensic evidential samples, *Jpn. J. Sci. Tech. Iden.*, 1: 33-37 (1997).
- 13) Jin, L., Zhong, Y. and Chakraborty, R., The exact number of possible microsatellite motifs, *Am. J. Hum. Genet.*, 55: 582-583 (1994).

- 14) Edwards,A.,Civitello,A.,Hammond,H.A. and Caskey,C.T., DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats, *Am.J.Hum.Genet.*,49: 746-756 (1991).
- 15) Edwards,A.,Hammond,H.A.,Jin,L.,Civitello,A.,Caskey,C.T. and Chakraborty,R., Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups, *Genomics*, 12: 241-253 (1992).
- 16) Gill,P.,Kimpton,C.P.,Urquhart,A.,Oldroyd,N.,Millican,E.S.,Watson,S.T. and Downes,T.J., Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework- a strategy for the future, *Electrophoresis*, 16: 1543-1552 (1995).
- 17) Frazier,R.R.E.,Millican,E.S.,Walson,S.K.,Oldroyd,N.J.,Sparkes,R.L.,Taylor, K.M.Panchal,S.,Bark,L.,Kimpton,C.P. and Gill,P., Validation of the Applied Biosystems PRISM377 automated sequencer for forensic short tandem repeat analysis, *Electrophoresis*, 17: 1550-1552 (1996).
- 18) Kimpton,C.P.,Oldroyd,N.J.,Walson,S.K.,Frazier,R.R.E.,Johnson,P.E.,Millican, E.S.,Urquhart,A.,Sparkes,R.L., and Gill,P., Validation of highly discriminating multiplex short tandem repeat amplification systems for individuals identification, *Electrophoresis*, 17: 1283-1293 (1996).
- 19) Sparkes,R.L.,Kimpton,C.P.,Walson,S.K.,Oldroyd,N.J.,Clayton,T.,Barnett,L., Arnold,J.,Thompson,C.,Hale,R.,Chapman,J.,Urquhart,A. and Gill,P.,The vadiation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework(I). Mixture,ageing,degradation and species studies, *Int.J. Leg.Med.*,109: 186-194 (1996).
- 20) Sparkes,R.L.,Kimpton,C.P.,Gilbard,S.,Andersen,J.,Oldroyd,N.J.,Thomas,D., Urquhart,A. and Gill,P. , The vadiation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework (II). Artifacts,casework studies andsuccess rates, *Int.J.Leg.Med.*, 109: 195-204 (1996).
- 21) Kasai,K.,Yoshida,K.,Sekiguchi,K.,Senju,H.,Mizuno,N.,Sakai,I.,Sato,H. and Seta,S., The improvement on STR typing system from forensic evidence samples, *Proc.Int.Works.Forensic DNA Anal.Evidential Samples*, : 83-86 (1995).
- 22) Applied Biosystems , AmpFISTR Profiler PCR Amplification Kit User's Manual, Part No.403038 (1997).
- 23) Applied Biosystems , AmpliType HLADQ α Forensic DNA Amplification & Typing Kit User's Manual, Part No.N808-0056 (1990).
- 24) Applied Biosystems , AmpliType PM Forensic DNA Amplification & Typing Kit User's Manual, Part No.N808-0057 (1994).
- 25) 法科学的DNA型判定に関する技術作業グループ, 日本人のTHO1型及びPM5座位の出現頻度-日本人の頻度データ間の比較-, 科警研報告, 50: 1-9 (1997).

- 26) 水野なつ子,関口和正,千住弘明,吉田日南子,笠井賢太郎,坂井活子,佐藤元,坂井活子,瀬田季茂, 証拠資料のDNA型検出における AmpliType PM 検出キットの有効性評価, DNA多型, 3: 314-320(1995).
- 27) 佐藤元,坂井活子,水野なつ子,吉田日南子,笠井賢太郎,瀬田季茂, 血痕及び精液斑からのHLA DQ α 型検出と日本人における出現頻度について, 科警研報告, 46:135-142(1993).
- 28) 坂井活子,笠井賢太郎,吉田日南子,向山明孝, 血痕からのDNA精製法とシングルロークラスVNTRプローブを用いたDNA型検出法について, 科警研報告, 44: 36-49(1991).
- 29) McNally,L., Shaler,R.C., Baird,M.,Balazs,I.,De Forest,P. and Kobilinsky,L., Evaluation of deoxyribonucleic acid(DNA) isolated from human blood-stains exposed to ultraviolet light, heat, humidity and soil contamination, J.Forensic.Sci., 34: 1059-1069(1989).
- 30) 吉田日南子,笠井賢太郎,坂井活子,向山明孝, ヒト精液斑からのDNA精製法とDNA型検出法, 科警研報告, 44: 23-35(1991).
- 31) Bar,W.,Kratzer,A.,Machler,M. and Schmid,W., Postmortem stability of DNA, Forensic Sci.Int., 39: 59-70(1988).
- 32) Ogata,M.,Mattern,R.,Schneider,P.M.,Schacker,U.,Kaufmann,T. and Rittner,C., Quantitative and qualitative analysis of DNA extracted from postmortem muscle tissues, Z.Rechtsmed., 103: 397-406(1990).
- 33) Gill,P.,Jeffreys,A.J. and Werrett,D.J., Forensic application of DNA 'finger-print', Nature, 318: 577-579(1985).
- 34) Higuchi,R.,Beroldingen,C.H.,Sensabaugh,G.F.,Erich,H.A., DNA typing from single hairs, Nature, 332: 543-546(1988).
- 35) 今泉和彦,松田秀明,窪田聡,宮坂祥夫,吉野峰生,瀬田季茂, 種々の環境下に放置した軟組織片からのDNA型分析, DNA多型, 3: 321-327(1995).
- 36) 今泉和彦,松田秀明,窪田聡,宮坂祥夫,吉野峰生,瀬田季茂, 骨試料のDNAタイピングにおける脱灰処理およびガラスビーズ処理の効果, 科警研報告, 51: 61-70(1998).
- 37) 原田勝二 編, ヒトDNA polymorphism 検出技術と応用, 東洋書店, 東京, 39-55(1991).
- 38) 佐藤元, 混入毛髪鑑別法, サイエンスフォーラム, 東京(2000).
- 39) 須藤武雄,瀬田季茂, 毛髪科学図説, 日本毛髪科学協会, 東京(1978).
- 40) 岸紘一郎,滝澤久夫,山本茂 編, 法医血清学的検査法マニュアル, 金原出版, 東京(1990).
- 41) 科学警察研究所編, 血痕の検査法 血痕からの血液型検査,法科学シリーズ1 血清学的物体検査法, 東京: 153-155(1974).

- 42) 淀谷順一郎,五十嵐一雄, モノクローナル抗体を用いた改良混合凝集法による A B O 式血液型検査法, 鑑識科学, 6: 85-97 (2002).
- 43) Uchihi,R.,Tamaki,K.,Kojima,T.,Yamamoto,T. and Katsumata,Y., Deoxyribonucleic acid (DNA) typing of human leukocyte antigen(HLA)-DQA1 from single hairs in japanese, J.Forensic.Sci., 37: 853-859 (1992).
- 44) 吉井富夫,田村一雄,石山昱夫, 毛髪中に産生される P C R 阻害物質についての一考察, 日法医誌, 46: 313-316 (1992).
- 45) 吉井富夫,田村一雄,谷口高広,秋山勝則,石山昱夫, 水溶性メラニンの P C R 阻害活性とその簡便除去法, 日法医誌, 47: 323-329 (1993).
- 46) 笠井賢太郎,坂井活子,吉田日南子,向山明孝, M C T 1 1 8 座位の P C R 増幅による血痕及び体液斑からの D N A 型検出法, 科警研報告, 45: 24-35 (1992).
- 47) 須山弘文,沢田英夫, 噴霧法による精液の直接検出法について, 科警研報告, 12: 473-477 (1959).
- 48) 科学警察研究所編, 精液の検査 精液斑の検査,法科学シリーズ 1,血清学的物体検査法, 東京, 183-186 (1974).
- 49) 向山明孝, 尿の検査法-人尿(斑)の証明法と血液型検査法(2)-, 科警研だより, 23: 20-26 (1981).
- 50) 向山明孝, 尿の検査法-人尿(斑)の証明法と血液型検査法(3)-, 科警研だより, 24: 34-44 (1982).
- 51) 科学警察研究所編, 血痕の検査 血痕予備検査,法科学シリーズ 1,血清学的物体検査法, 東京, 135-136 (1974).
- 52) Evett,I.W., A guide to interpreting single locus profiles of DNA mixtures in forensic cases, J.Forensic Sci., 44: 133-166 (1999).
- 53) 吉田日南子,関口和正,水野なつ子,笠井賢太郎,坂井活子,佐藤元,瀬田季茂, 異なる比率で混合した精液及び膣液からの M C T 1 1 8 型の検出に関する研究, 科警研報告, 46: 103-109 (1993).
- 54) Kloosterman,A.D., Budowel,B. and Daselar,P., PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus, Int.J.Leg.Med., 105: 257-264 (1993).
- 55) Comey,C.T. and Budowel,B., Validation studies on the analysis of HLADQ α locus using the polymerase chain reaction, J.Forensic Sci., 36: 1633-1648 (1991).
- 56) Gyllensten,U.B.,Jesefsson,A.,Schemshat,K.,Saldeen,T. and Petterson,U., DNA typing of forensic material with mixed genotypes using allele-specificenzymatic amplification, Forensic Sci.Int., 52: 149-160 (1992).
- 57) 吉田日南子,水野なつ子,笠井賢太郎,坂井活子,向山明孝, 精液・膣液混合斑痕からの精子 D N A の分離と P C R 法による精子 D N A の M C T 1 1 8 および H L A D Q α 型検出に関する研究, 科警研報告, 45: 10-21 (1992).

- 58) Yoshida, K., Sekiguchi, K., Mizuno, N., Kasai, K., Sakai, I., Sato, H. and Seta, S., The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen, *Forensic Sci.Int.*, 72: 25-33 (1995).
- 59) Giusti, A., Baird, M., Pasquale, S., Balaza, I. and Glassberg, J., Application of deoxyribonucleotide acid (DNA) polymorphism to the analysis of DNA recovered from sperm, *J.Forensic Sci.*, 31: 403-408 (1986).
- 60) Fregeau, C.J., Bowen, K.L. and Fourney, R.M., Validation of highly polymorphic fluorescent multiplex short tandem repeat systems using two generations of DNA sequencers, *J.Forensic Sci.*, 44: 133-166 (1999).
- 61) 吉田日南子, 千住弘明, 藤井宏治, 笠井賢太郎, 佐藤元, 市販の多座位STR検出キットを用いた法科学的資料からのDNA型検出, DNA多型, 9: 335-338 (2000).
- 62) Frank, W.E., Llewellyn, B.E., Fish, P.A., Riech, A.K., Marcacci, T.L., Gandor, D.W., Parker, D., Carter, R.R. and Thibault, S.M., Validation of AmpFISTR Profiler Plus PCR amplification Kit for use in forensic casework, *J.Forensic Sci.*, 46: 642-646 (2001).
- 63) LaFountain, M.J., Schwartz, M.B., Svete, P.A., Walkinshaw, M.A. and Buel, E., TWGDAM Validation of the AmpFISTR Profiler Plus and AmpFISTR COfiler STR multiplex systems using capillary electrophoresis, *J.Forensic Sci.*, 46: 1191-1198 (2001).
- 64) Wallin, J.M., Buoncristiani, M.R., Lazaruk, K.D., Fildes, N., Holt, C.L. and Walsh, P.S., TWGDAM Validation of the AmpFISTR™ Blue PCR Amplification kit for forensic casework analysis, *J.Forensic Sci.*, 43: 854-870 (1998).
- 65) Lazaruk, K., Walsh, P.S., Oaks, F., Gilbert, D., Rosenblum, B.B., Menchen, S., Scheibler, D., Michael, W.H., Holt, C. and Wallin, J., Genotyping of forensic short tandem repeat (STR) systems based on sizing precision in capillary electrophoresis instrument, *Electrophoresis*, 19: 86-93 (1998).
- 66) Moretti, T.R., Baumstark, A.L., Defenbaugh, D.A., Keys, K.M., Smerick, J.B. and Budwe, B., Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage : performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples, *J.Forensic Sci.*, 46: 647-660 (2001).
- 67) Moretti, T.R., Baumstark, A.L., Defenbaugh, D.A., Keys, K.M., Brown, A.L. and Budwe, B., Validation of STR typing by capillary electrophoresis, *J.Forensic Sci.*, 46: 661-676 (2001).
- 68) 大島美奈子, 原三郎, ヒトヘモグロビンと動物ヘモグロビン, *生物物理化学*, 30: 151-164 (1986).
- 69) 北武, 三戸聖也, 牧野容子, 黒田直人, 佐々木甚一, 石田邦夫, 北均, 小池祐史, HemoglobinA0を指標とする Sandwich Dot-ELISA 法による人血証明-人獣鑑別に関する法医学的研究(1)-, *法医の実際と研究*, 42: 63-68 (1999).
- 70) 佐藤元, 吉野峰生, 瀬田季茂, 哺乳類における毛の比較形態学的研究, *科警研報告*, 33: 1-16 (1980).

- 71) 佐藤元,吉野峰生,宮坂祥夫,瀬田季茂, 犬と猫の被毛の比較形態学的研究, 科警研報告, 35: 183-196 (1982).
- 72) 加藤嘉太郎, 家畜比較解剖図説-上巻-, 養賢堂, 東京 (1979).
- 73) 吉野峰生,瀬田季茂, 白骨死体の鑑定, 令文社, 東京 (1990).
- 74) Tyler,M.G.,Kirby,L.T.,Wood,S.,Vernon,S. and Ferris,J.A., Human blood stain identification and sex determination in dried blood stains using recombinant DNA techniques, Forensic Sci.Int., 31: 267 (1986).
- 75) Yokoi,T.,Nata,M. and Sagisaka,K, Human identification of blood using recombinant DNA probe:Comparison with radioactive and non-radioactive labelling method, Act.Crim.Japan, 55: 62-68 (1989).
- 76) Applied Biosystems , QuantiBlot Human DNA Quantitation Kit protocol, Part No.N808-0114 (1996).
- 77) 山本雄二,井上誠一,宮石智,石津日出雄, アメロゲニン遺伝子の人獣鑑別への応用, D N A 多型, 4: 195-198 (1996).
- 78) 小野俊明,宮石智,山本雄二,石津日出雄, ミオグロビン遺伝子による人獣鑑別, D N A 多型, 8: 116-119 (2000).
- 79) Naito,E.,Dewa,K. and Yamanouchi,H., Ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene typing for species identification, J.Forensic Sci., 37: 396-403 (1992).
- 80) 安積順一,松本博志,玉木敬二, p53 遺伝子を用いた人獣鑑別法の検討, D N A 多型, 10: 246-251 (2002).
- 81) 松崎雄三,向田政博,今井利夫, p53 イントロンを用いた動物種の識別, D N A 多型, 11: 252-256 (2002).
- 82) Bataille,M.,Crainic,K.,Leterreux,M.,Durigon,M.,Mazancourt,P.D., Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation, Forensic Sci.Int., 99: 165-170 (1999).
- 83) 石河淳,辻彰子,林葉康彦,池田典昭, RAPD-PCR 法による種属鑑別法の検討, 法医学の実際と研究, 43: 147-150 (2000).
- 84) Robin,E.D. and Wong,R., Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells., J.Cell.Phys., 136: 507-513 (1988).
- 85) Anderson.S.,Bankier,A.T.,Barrell,B.G.,deBruijn,M.H.L.,Coulson,A.R.,Drouin,J., Eperon,I.C., Nierlich,D.P., Roe,B.A.,Sanger,F.,Schreier,P.H.,Smith,A.J.H., Staden,R. and Young,I.G., Sequence and organization of the human mitochondrial genome, Nature, 290: 457-465 (1981).
- 86) Hutchison,C.A. III ,Newbold,J.E.,Potter,S.S. and Edgell,M., Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA, Nature, 251: 536-538 (1974).

- 87) Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. and Wilson, A.C., Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution, *J.Mol.Evol.*, 18: 225-239 (1982).
- 88) Aquadro, C.F. and Greenberg, B.D., Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals, *Genetics*, 103: 287-312 (1983).
- 89) Cann, R.L. and Wilson, A.C., Length mutations in human mitochondrial DNA, *Genetics*, 104: 699-711 (1983).
- 90) 針原伸二, 日本人地域集団におけるミトコンドリアDNA多型, *DNA多型*, 2: 105-119 (1993).
- 91) 関口和正, 今泉和彦, 藤井宏治, 千住弘明, 水野なつ子, 坂井活子, 笠井賢太郎, 佐藤元, 瀬田季茂, 日本人のミトコンドリアDNAコントロール領域の多型性, *鑑識科学*, 2: 33-40 (1997).
- 92) Horai, S. and Hayasaka, K., Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA, *Am.J.Hum. Genet.*, 46: 828-842 (1990).
- 93) Kocher, T.D., W.K.Thomas, A.Meyer, S.V.Edwards, S.Paabo and F.X.Villablanca, Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers, *Proc.Natl.Acad.Sci., USA*, 86: 6196-6200 (1989).
- 94) Fumihito, A., Miyake, T., Takada, M., Shingu, R., Endo, T., Gojobori, T., Kondo, T. and Ohno, S., Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls, *Proc.Natl.Acad.Sci., USA*, 93: 6792-6795 (1996).
- 95) Mannen, H., Tuji, S., Loftus, R.T. and G.Bradley, Mitochondrial DNA variation and evolution of Japanese black cattle (*Bos taurus*), *Genetics*, 150: 1169-1175 (1998).
- 96) Irwin, D.M., Kocher, T.D. and Wilson, A.C., Evolution of the cytochrome b gene of mammals, *J.Mol.Evol.*, 32: 128-144 (1991).
- 97) 山崎泰助, 堀野真理子, 横濱道成, 石島芳郎, 哺乳動物13種のミトコンドリアDループ領域およびシトクロームb遺伝子のRFLP分析による同定, *動物遺伝研究会誌*, 23: 53-57 (1995).
- 98) Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Suzuki, H. and Amano, T., Analysis of genetic diversity of domestic water buffaloes and anoa based on variations in the mitochondrial gene for cytochrome b, *Animal Genetics*, 28: 195-201 (1997).
- 99) 荒井勝己, 宗近功, 伊藤勇夫, 吉川昭雄, 中村耕二郎, ミトコンドリアDNAシトクロームb遺伝子の塩基配列解析によるヤギ族野生原種と家畜種の系統類縁関係, *日畜会報*, 68: 148-155 (1997).
- 100) 千国幸一, 田畑利幸, 齊藤昌義, 門間美千子, シトクロームb遺伝子の塩基配列の違いによる肉種鑑別, *日畜会報*, 65: 571-579 (1994).

- 101) Miller, M.M., Goto, R.M., Young, S., Liu, J. and Hardy, J., Antigen similar to major histocompatibility complex B-G are expressed in the intestinal epithelium in the chicken, *Immunogenetics*, 32: 45-50 (1990).
- 102) Salomonsen, J., Dunon, D., Skjodt, K., Thorpe, D., Vainio, O. and Kaufman, J., Chicken major histocompatibility complex-encode B-G antigens are found on many cell types that are important for the immune system, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88: 1359-1363 (1991).
- 103) 西堀正英, 鶏主要組織適合性遺伝子複合体研究の現状と今後の方向, *動物遺伝研究会誌*, 24: 9-19 (1996).
- 104) Kuragaki, I., Yamamoto, Y., Mizutani, M. and Okada, I., Analysis of class IV genes of the chicken major histocompatibility complex using restriction fragment length polymorphism, *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)*, 62: 330-335 (1991).
- 105) Uni, Z., Hillel, J., Waiman, R., Cahaner, A. and Heller, D.E., Restriction fragment length polymorphism. analysis of major histocompatibility complex class IV (B-G) genotypes in meat type chickens, *Animal Genetics*, 23: 385-389 (1992).
- 106) Landesman, E., Uni, Z. and Heller, E.D., Designation by restriction fragment length polymorphism. of major histocompatibility complex class IV haplotypes in meat-type chickens, *Animal Genetics*, 24: 349-354 (1993).
- 107) Yamamoto, T., Nishibori, N., Yamamoto, Y. and Okada, I., Designation of the B haplotypes by restriction fragment length polymorphism. and its application to native chicken populations, *J. Anim. Genet.*, 23: 59-64 (1995).
- 108) Goto, R.M., Miyada, C.G., Young, S., Wakenell, P.S., Abplanalp, H., Bloom, S.E., Briles, W.E. and Miller, M.M., Isolation of a cDNA clone from the B-G subregion of the chicken histocompatibility (B) complex, *Immunogenetics*, 27: 102-109 (1988).
- 109) Miller, M.M., Abplanalp, H. and Goto, R.M., Genotyping chickens for the B-G subregion of the major histocompatibility complex using restriction fragment length polymorphisms, *Immunogenetics*, 28: 374-379 (1988).
- 110) Kaufman, J., Skjodt, K. and Salomonsen, J., The B-G multigene family of the chicken major histocompatibility complex, *Critical Review in Immunology*, 11: 113-146 (1991).
- 111) Miller, M.M., Goto, R.M., Young, S., Chirivella, J., Hawke, D. and Miyada, C.G., Immunoglobulin variable-region-like domains of diverse sequence within the major histocompatibility complex of the chicken, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88: 4377-4381 (1991).
- 112) Kaufman, J., Salomonsen, J. and Skjodt, K., B-G cDNA clones have multiple small repeats and hybridize to both chicken MHC regions, *Immunogenetics*, 30: 440-451 (1989).
- 113) Beroldingen, C.H., Blake, E.T., Higuchi, R., Sensabaugh, G.F., Erlich, H.A., PCRの法医学分析への応用, PCRテクノロジー, さんえい出版, 東京: 281-300 (1990).

- 114) Hagelberg,E,Sykes.B., Ancient bone DNA amplified, Nature, 342: 485 (1989).
- 115) 大橋明美,青木隆則,松郷誠一,島崎長一郎, PCR法による人唾液(斑)中に含まれる口腔内細胞からのDNA型検出法, 日法医誌, 47: 108-118(1993).
- 116) Walsh,P,S.,Metzger,D,A.,Higuchi,R., Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material, Bio Techniques, 10: 506-513 (1991).
- 117) Hochmeister,M,N.,Budowle,B.,Jung,J.,Borer,U,V.,Comey,C,T. and Dirnhofer,R., PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts, Int.J.Leg. Med., 104: 229-233(1991).
- 118) Paabo.S., 古代のDNAの増幅,PCR実験マニュアル, HBJ出版局, 東京: 141- 146 (1991).
- 119) 赤根敦,松原和夫,高橋節典,中村博明,塩野寛, 法医学試料中汚染・損壊DNAのPCR分析, DNA多型, 1: 31-35(1993).
- 120) 岡島弘,山本敏充,小島俊典,打樋利英子,勝又義直, 血痕からのHLA DQA 1遺伝子のPCRによる増幅, 日法医誌, 47: 6-12(1993).
- 121) Aakane,A.,Shiono,H.,Matubara,K.,Nakamura,H.,Hasegawa,M. and Kagawa,M., Purification of forensic specimens for the polymerase chain reaction(PCR) analysis, J.Forensic Sci., 38: 691-701(1993).
- 122) 中木真一,糸原幸次,森好浩行,森川俊雄,佐久間澄恵,安部隆芳, 自然脱落毛からのMCT118(D1S80)型検出の検討, 科警研報告, 47: 102-109(1994).
- 123) McNally,L.,Shaler,R.C.,Baird,M.,Balazs,I.,Kobilinsky,L. and De Forest,P., The effects of environment and substrata on Deoxyribonucleic acid(DNA): The use of casework samples from New York City, J.Forensic Sci., 34: 1070-1077(1989).
- 124) Prinz,M. and Berghaus,G. , The effect of various stain carriers on the quantity of DNA extracted from dried bloodstains, Z. Rechtsmed., 103:191-197(1990).
- 125) 坂井活子,笠井賢太郎,吉田日南子,水野なつ子,関口和正,佐藤元,瀬田季茂, 血痕付着担体及び汚染物質のMCT118座位DNA型検出に及ぼす影響に関する実験的研究, 科警研報告, 46: 129-134(1993).
- 126) 丸尾文治,田宮信雄, 酵素ハンドブック, 朝倉書店, 東京: 551(1982).
- 127) Desjardins,P. and Rejean,M., Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome, J.Mon.Biol., 212: 599-634(1990).
- 128) Anderson.S.,de Bruijn,M.H.L.,Coulson,A.R.,Eperon,I.C.,Sanger,F.and Young,I.G., Complete sequence of bovine mitochondrial DNA .Conserved features of the mammalian mitochondrial genome, J.Mol.Biol., 156: 683-717(1982).

- 129) Girman, D.J., Kat, P.W., Mills, M.G.L., Ginsberg, J.R., Borner, M., Wilson, V., Fanshawe, J.H., Fitzgibbon, C., Lau, L.M. and Wayne, R.K., Molecular genetic and morphological analyses of the African wild dog (*Lycaon pictus*), *J. Hered.*, 84: 450-459 (1993).
- 130) Lopez, J.V., Cevario, S. and O'Brein, S.J., Complete nucleotide sequence of the domestic cat (*Felis catus*) mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandem repeat (Numt) in the nuclear genome, *Genomics*, 33: 229-246 (1996).
- 131) 中木真一, 西堀正英, 山本義雄, ミトコンドリアDNAの Cytochrome b 遺伝子を用いた人獣鑑別法の検討, *鑑識科学*, 4: 23-28 (1999).
- 132) Shen, X., Baba, T. and Wasana, A., Complete Cytochrome b gene information in the Silky Fowl, *Anim. Sci. Jpn.*, 70: 98-100 (1999).
- 133) Pham-Dinh, D., Mattei, M.G., Nussbaum, J.L., Roussel, G., Pontarotti, P., Roeckel, N., Mather, I., Artzt, K., Lindahl, K.F. and Dautigny, A., Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90: 7990-7994 (1993).
- 134) Bikle, D.D., Munson, S. and Komuves, L., Zipper protein, a B-G protein with the ability to regulate actin/myosin 1 interactions in the intestinal brush border, *J. Biol. Chem.*, 27: 9075-9083 (1996).
- 135) Sensabaugh, G.F., Forensic application of the polymerase chain reaction, Abstract of 12th meeting of IFFS, Aderaaid (1990).
- 136) Nishibori, M., Nakaki, N., Tsudzuki, M. and Yamamoto, Y., Utility of three restriction fragment length polymorphism probes for genotyping of the chicken major histocompatibility complex class IV region, *Poultry Science*, 79: 305-311 (2000).

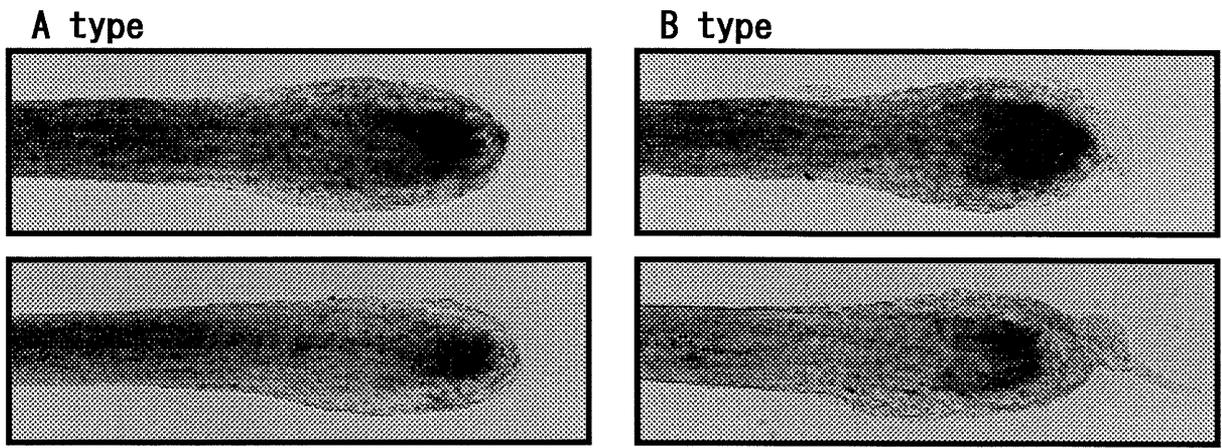


Fig. 1 Type of hair root.

A type : cells don't adhere to hair root. B type : cells adhere to hair root.

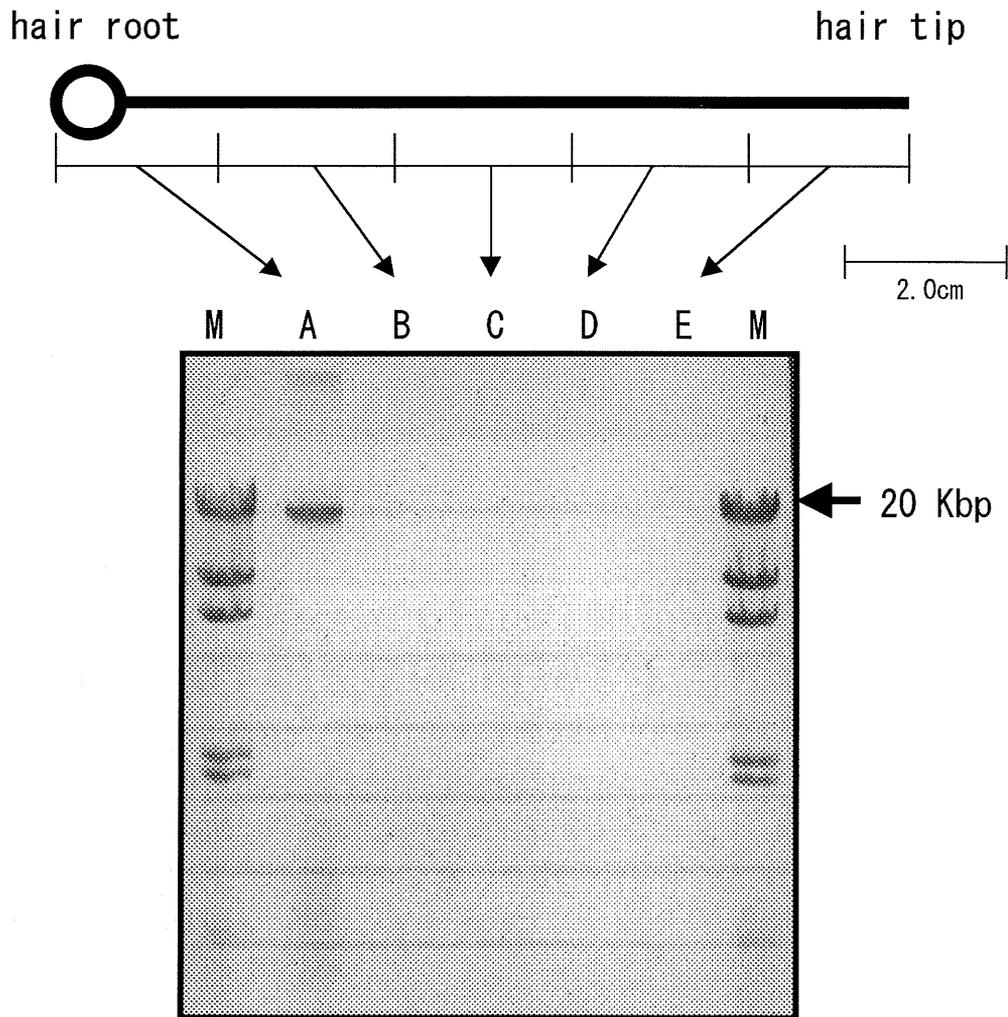


Fig. 2 High molecular weight DNA in hair.

M : λ DNA / HindIII

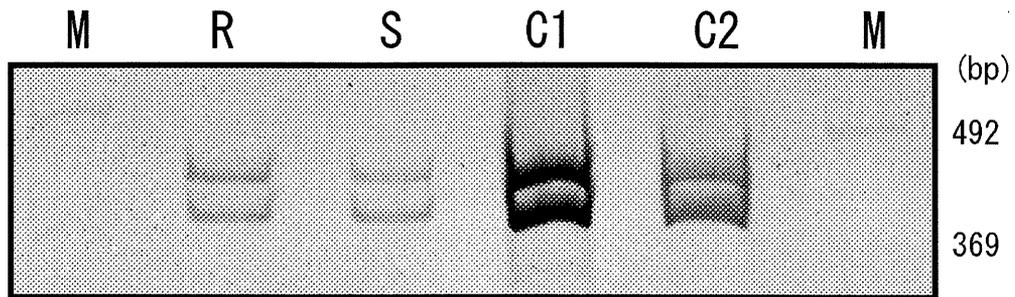


Fig. 3 Detection of D1S80 locus (16-19) from hair roots and shafts.

R : hair roots (0.2cm × 30) S : hair shafts(5.0cm × 30)
 C1: hair root sheath C2 : blood stain
 M : 123bp size marker

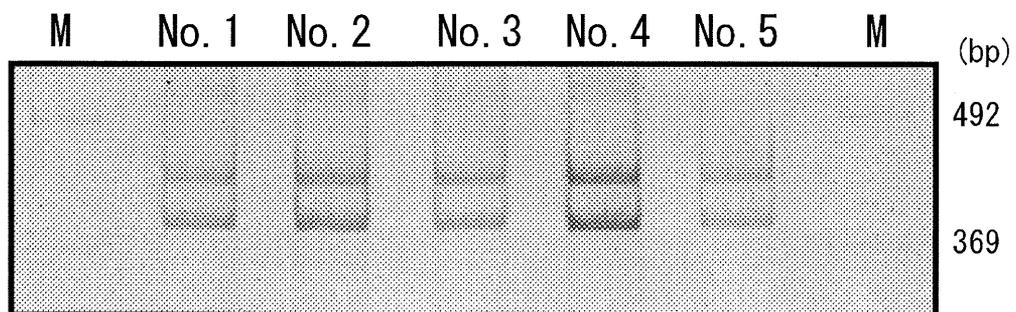


Fig. 4 Effect of Chelex100 and BSA on PCR to detect D1S80 locus(16-19).

No.1 : control DNA (16-19)
 No.2 : No.1+isolated solution from hair shafts
 No.3 : dispose of No.2 by Chelex100
 No.4 : BSA added to No.2 on PCR
 No.5 : dispose of No.2 by Chelex100 and BSA added to No.2 on PCR
 M : 123bp size marker

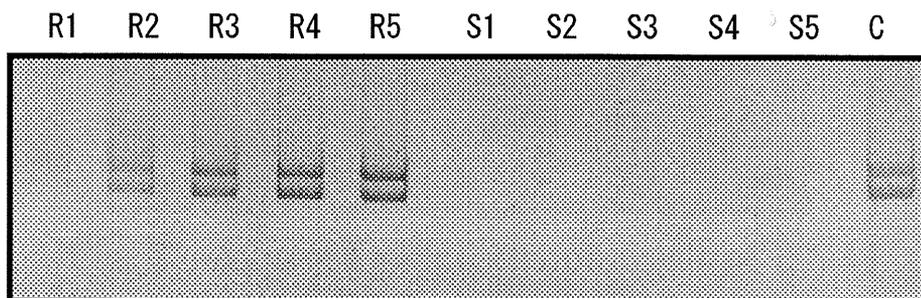


Fig. 5 Detection of D1S80 locus (16-19) from hair roots and shafts.

R1~R5 : hair roots (0.2cm), one to five.

S1~S5 : hair shafts(5.0cm), one to five.

C : control DNA (16-19)

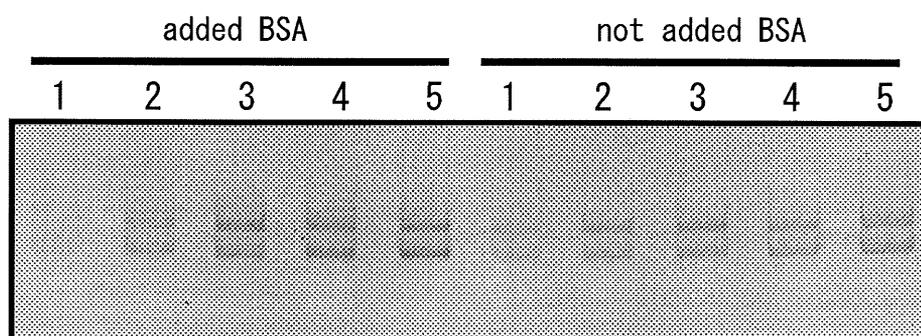


Fig. 6 Effect of BSA on PCR.

1~5 : hair roots (0.2cm), one to five.(D1S80 locus:16-19)



Fig. 7 Agarose gel electrophoresis of DNAs from a seminal stain and a blood stain treated with preliminary tests.

C : control stain (not treated with preliminary tests)
 SM : SM test DAC : DAC method LU : luminol method
 M : λ DNA / HindIII .

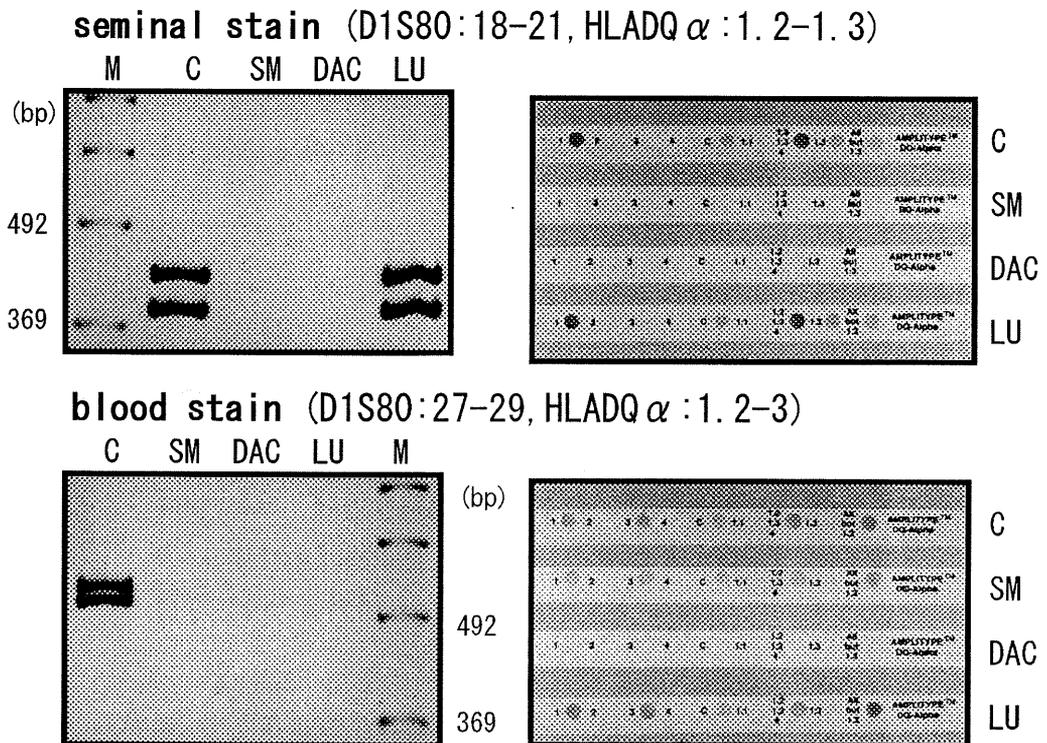


Fig. 8 Detection D1S80 locus and HLADQ α locus from a seminal stain and a blood stain treated with preliminary tests.

C : control stain (not treated with preliminary tests)
 SM : SM test DAC : DAC method LU : luminol method
 M : 123bp size marker

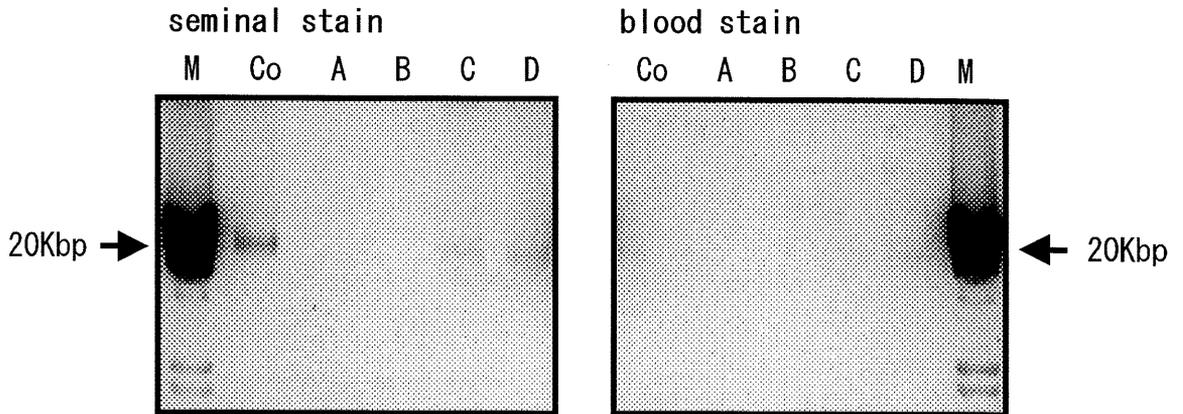


Fig. 9 Agarose gel electrophoresis of DNAs from a seminal stain and a blood stain treated with acid or alkali.

Co : control stain (not treated with acid or alkali)
 A : 0.2M citric acid
 B : 0.6N hydrochloric acid
 C : luminol solution without hydrogen peroxide
 D : 0.5% sodium carbonate solution
 M : λ DNA / HindIII .

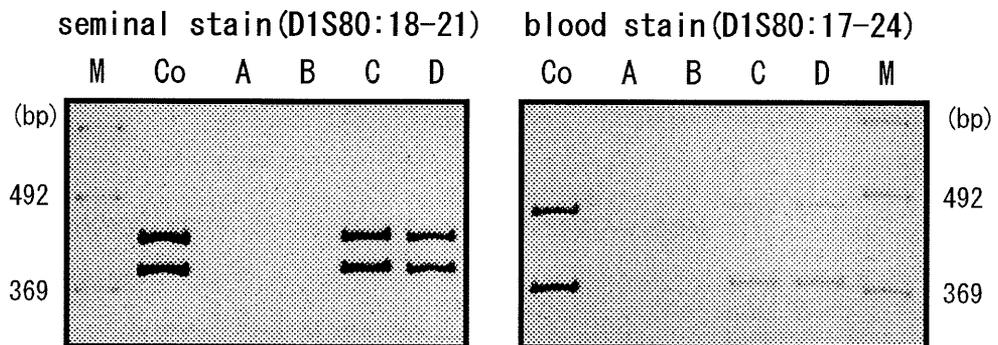
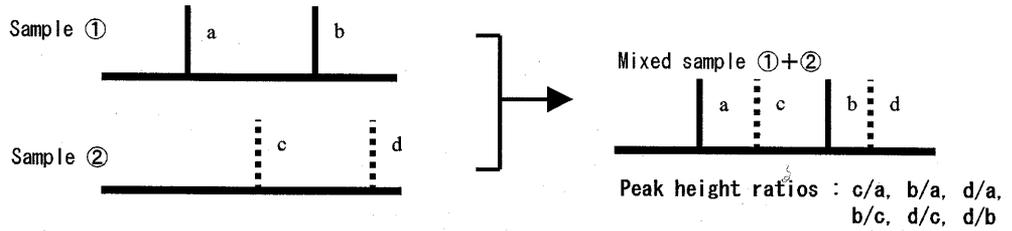


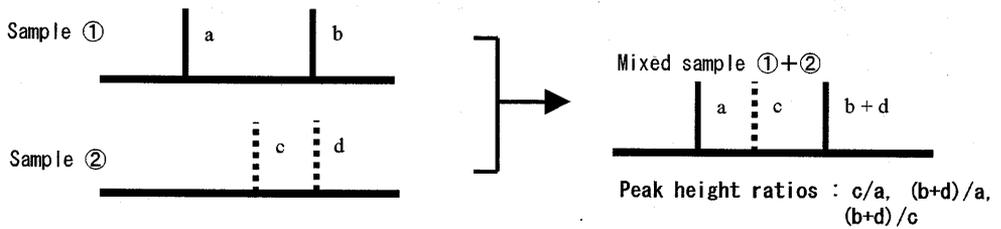
Fig. 10 Detection of D1S80 locus from a seminal stain and a blood stain treated with acid or alkali.

Co : control stain (not treated with acid or alkali)
 A : 0.2M citric acid
 B : 0.6N hydrochloric acid
 C : luminol solution without hydrogen peroxide
 D : 0.5% sodium carbonate solution
 M : 123bp size marker

Peak pattern 1 : Heterozygote + Heterozygote, no overlapping alleles

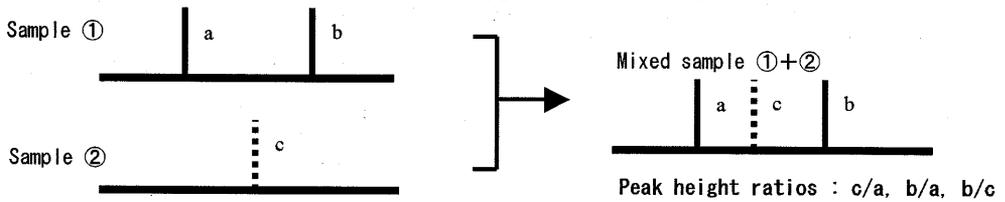


Peak pattern 2 : Heterozygote + Heterozygote, one overlapping alleles



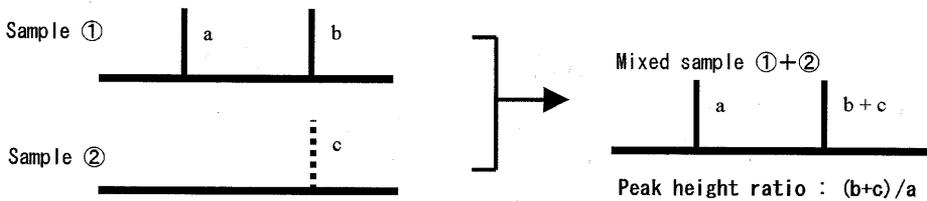
Peak pattern 3 (he + ho) : Heterozygote + Homozygote, no overlapping alleles

Peak pattern 3 (ho + he) : Homozygote + Heterozygote, no overlapping alleles

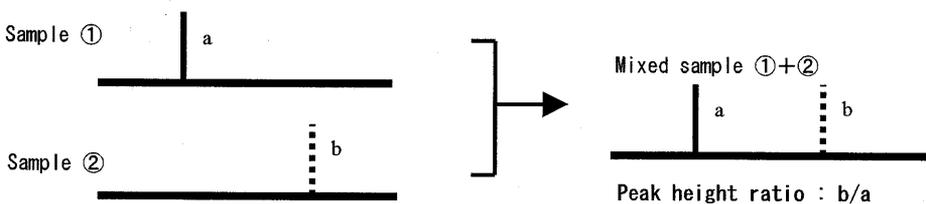


Peak pattern 4 (he + ho or XY + XX) : Heterozygote + Homozygote, overlapping alleles

Peak pattern 4 (ho + he or XX + XY) : Homozygote + Heterozygote, overlapping alleles



Peak pattern 5 : Homozygote + Homozygote, no overlapping alleles



Peak pattern 6 : Homozygote + Homozygote, overlapping alleles

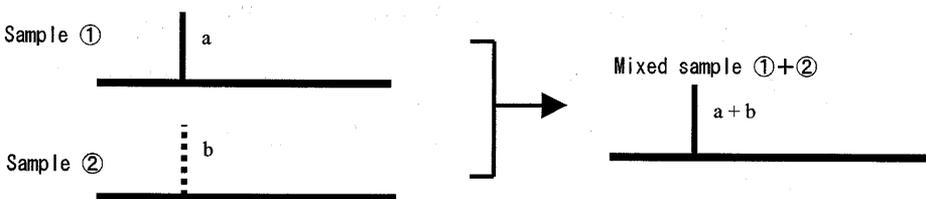


Fig.11 The possibility of peak pattern on each locus and method of calculation for peak height ratio in mixed sample.

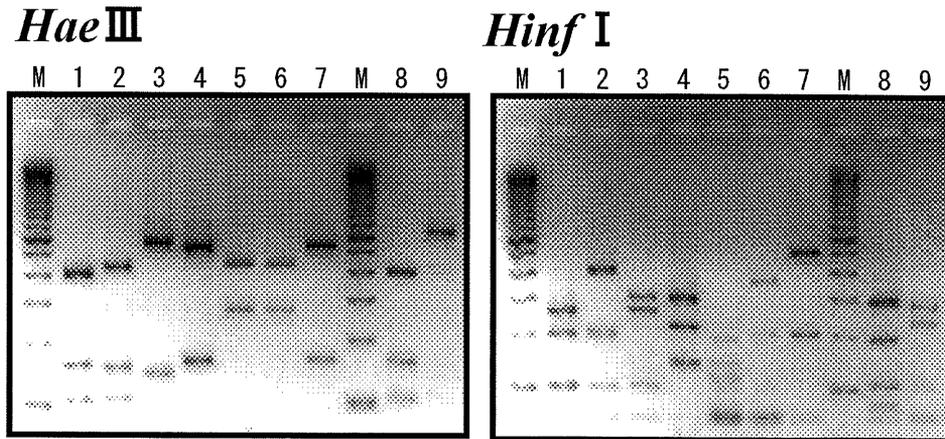


Fig. 12 PCR-RFLPs of cytochrome *b* gene, digested with *Hae* III and *Hinf* I in animals.

M : 100bp allelic ladder

1 : human 2 : baboon 3 : cow 4 : pig 5 : cat 6 : bear
7 : deer 8 : chicken 9 : duck

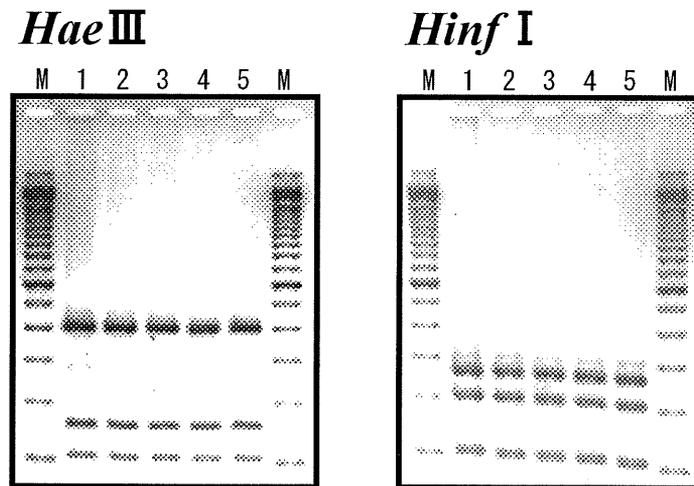


Fig. 13 PCR-RFLPs of cytochrome *b* gene, digested with *Hae* III and *Hinf* I in human.

M : 100bp allelic ladder 1 - 5 : human

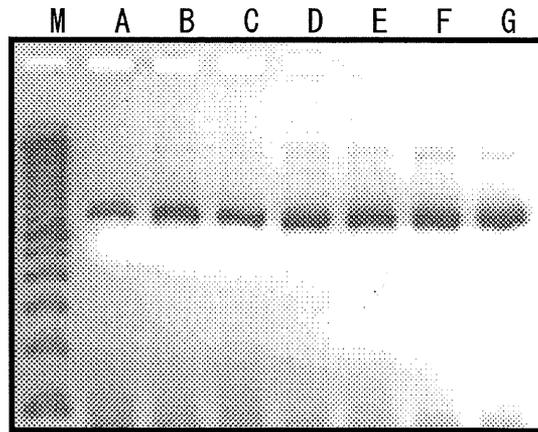


Fig. 14 PCR products of cytochrome *b* gene, in several quantities of total DNA.

M : 100bp allelic ladder
 A : 1ng B : 2ng C : 5ng D : 10ng
 E : 50ng F : 100ng G : 200ng

MI-1	5' - CAAATCCTCA CAGGCCTATT CCTAGC-3'	Homology (%)
HUM	-----AC-----A-----	88.5
BOV	-----	100.0
PIG	-----A-----G--T----	88.5
DOG	--G--T--A--T-----T----	78.3
CAT	-----C-----C--TT-G--	78.3
CHK	-----C-----C--A----	88.5
MI-2	5' - TAGGCGAATA GGAAATATCA TTCGGGTTTGAT-3'	Homology (%)
HUM	-----A--	96.7
BOV	--T--A----A--G-----C-----	84.4
PIG	-----A-----T-----A--	90.6
DOG	-----G-----A-----A--	90.6
CAT	--T-----GATA--A-----A--	78.1
CHK	-----A-----T-----	98.8

Fig. 15 Comparison of the sequence of primers with published mtDNA sequence.

HUM : human(Anderson *et al.*1981)
 BOV : bovine(Anderson *et al.*1982)
 PIG : pig(Irwin *et al.*1991)
 DOG : african wild dog(Girman *et al.*1993)
 CAT : cat(Lopez *et al.*1996)
 CHK : chicken(Desjardins *et al.*1990)

Primer for human, dog and cat

forward 5'- GTCCTACCATGAGGCCAAATATC -3' (23mer)

reverse 5'- GGGTGAATGGGATTTTGTC -3' (20mer)

Primer for chicken (Chikuni et al.1994)

forward 5'- CAAATCCTCACAGGCCTATTCCTAGC -3' (26mer)

reverse 5'- TAGGCGAATAGGAAATATCATTGGGTTTGAT -3' (32mer)

Fig.16 PCR primer for sequence and PCR-RFLP

HUM	ATTCTGAGGG	GCCACAGTAA	TTACAAACCT	GCTATCCGCC	GTCCCATACA	TTGGGACAGA
DOG	C**T*****A	**A**T**C*	*C*****G*	A**C**G**A	A****C***G	*****T**
CAT	C*****A	**A**C****	*C**C*****	C**G**A**A	A*T*****	*C*****T**
CHK	*****	*****C**T*	*C*****	AT*C**A**A	A*T**C****	**--*****C*
hum	*****	*****	*****T*	A*****	A*****	*****
HUM	-TCTGGTCCA	ATGAATCTGA	GGAGGCTACT	CAGTAGACAG	TCCCACCCTC	ACACGATTCT
DOG	-*****G*	*****	**T****T**	****TA*T*A	*G*A*****A	***T*****
CAT	- <u>A**A**AG*</u>	*****	**G****T**	*****A	AG*****A	*****
CHK	CC**A**AG*	G***GC****	**G**A*TT*	****C*****A	C**A*****T	**C*****
hum	-C**A**T**	*****	*****	*****	*****	*****
HUM	TTACCTTTCA	CTTCATCTTG	TCCTTCATTA	TCCCA---GC	CCTAGCAGCG	CTCCACCTTC
DOG	*CG*A**C**	*****C*C	C*A*****	*TG**GCA**	*****ATA	G****T**C*
CAT	**G*****C**	*****TC*T	C*A*****	**T**---**	*T*****A	**A*****CT
CHK	*CG*T**A**	****C**C*C	C***TGCA*	**G**---*G	TA*TA*TATC	A*****CA
hum	*****	*****	C*****	*TG**---**	*****A*A	*****C*
HUM	TATTCCTGCA	CGAAACAGGA	TCAAACAACC	CCCTAGGAAT	CTCCTCCCAT	TC
DOG	****T**A**	*A*****T***	**C**T*C**	*TTC*****	T**A***G*C	**
CAT	*****T**	T*****	**T*****	**TC*****	TA*A***G**	**
CHK	CC*****A**	****T***C	*****	*****C**	***A***G*C	**
hum	****T****	*****G***	*****	*****	*A**T*****	**

Fig.17 Cytochrome *b* gene sequence in human, dog, cat and chicken

HUM : human(Japanese) DOG : dog CAT : cat

CHK : chicken hum : human (Anderson et al. 1981)

underline : site of *Spe* I * : identify - : gap

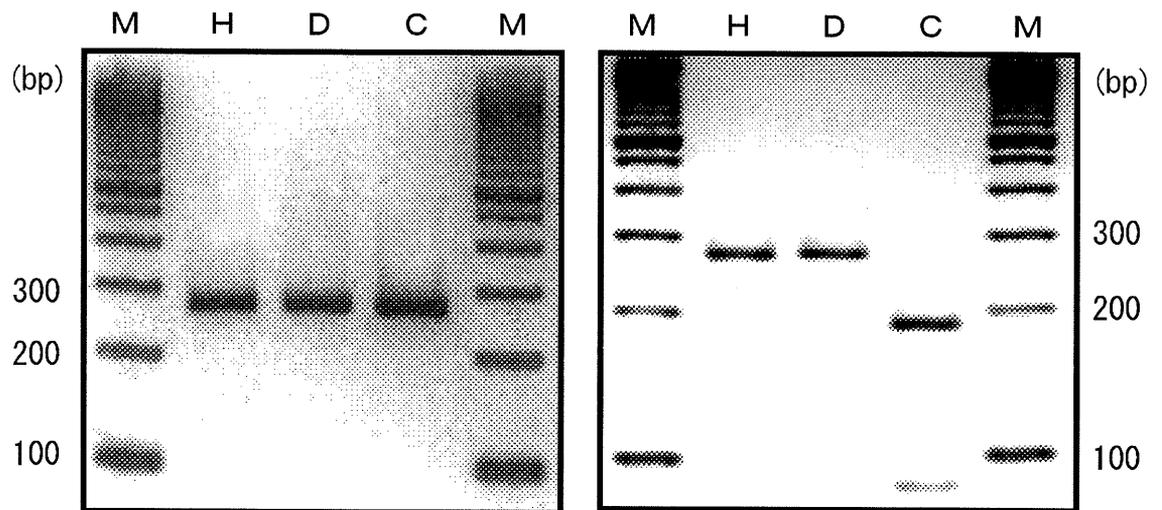


Fig.18 PCR products and PCR-RFLPs of cytochrome *b* gene, digested with *Spe* I

right : PCR products left : PCR-RFLPs, digested with *Spe* I
H: human D: dog C: cat M: 100bp allelic ladder marker

```

←signal peptide      →
bg14/8  MAFTSGCNHP SFTLPWRTLL PYLVALHLLQ PGSA

←extracellular domain
bg14/8  QITVVAPSLR VTAIVGQDVV LRCHLSPCKD VRNSDIRWIQ QRSSRLVHHY RINGVDLGQME EYKGRTELLR DGLSDGNLDL RITAVTSSDS GSYSCAVQDG DAYAEAVVNL EVSD
bg28    ****T**** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

membrane spanning region and
← associated connecting segments →
bg14/8  PFSMIILYWT VALAVIITLL VGSFVVNVFL HRKK
bg28    ***** ***** ***** ***E

← intercellular region
bg14/8  VAQSRELKRK DAELVEKAAA LERKDAELAE QAAQSKQRDA MLDKHLKLE EKTDEVENWN SVLKKDSEEM GYGFGLKKL AAELKHSSE MGTRDLKLER LAAKLEHQTK
bg28    ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
G3

bg14/8  ELEKQHSQFQ RHFQNMVLSA GKQKKMVTKL EEHCEWMVRR NVKLEIPAVK VGQQAQEKSEE QKSELKEH-- -----
G3    ***** ***** ***** ***** ***** *VRRNVKLG* SS*P**HIRS LPWDQPWDDN LNLIMCFLV PFAEIPAVKV GQQAQEKSEKQ
bg32.1  NAKLEAAAVK L*HK***** ***** ***** ***** NSGAQMERR

bg14/8  -----HEE TGQQAQEKSEK QKSELKERHE EMAEQTEAVV VETEE
G3    KSELKER*** M***** ***** ***** *****D
bg32.1  NAKLEAAAVK L*HK***** ***** ***** *****

```

Fig.19 Alignment of the deduced amino acid sequences of coding region of *B-G* clone, *bg14/8*, *G3*, *bg28* and *bg32.1*.

astarisc(**):Identity gaps(---):introduced to optimize alignment
bg14/8:Miller *et al.*(1991) *G3*:Kaufman *et al.*(1989)

```

bg32.1
gene8.5      GAAT TCCGGTGCCC AGATGGAGAG AAGGAATGCA AAGTTGGAGG CAGCAGCTGT AAAACTGGGA CACAAAGCTA
              TGCAGTCATT AAAACTGACC AAGTCTGACA CCATCCAAAA TAAC TTCATA GGCTATGAAA AATCCCCCCA GGCCGTGAAC

bg14/8 3' UT
G3 3' UT
bg32.1
gene8.5      AAGAATCAGA GAAACAGAAA TCGGAGCTGA AGGAGCGCCA TGAGGAGATG GCAGA-ACAA ACTGA--AGC AGTGGTGGTA GAAAC--TGA AGAA*****
              TACTCTCCTC TTTCTAACCC AGAGAAACAC CAGGAAGCAA AGAGGCGATG GTATATAAAG TCTGATTATC CTCAGTACCC AAACCAAAGA GGTG*G**TC

bg14/8 3' UT
G3 3' UT
bg32.1
gene8.5      AAACCATCTG AAGAATTGGA TTGAGAGATG AACTGCGCCT CGCAGTAACC ACAGGAGTTA AGCTTCATAG ATCAATAACT GCACAGCA-- TACAAA-ACC
              *****G** *****CA** *****
              ***** *A**A**CG* ***** C*****T*** *****
CTTG**CAC* TG*GCACAC* *G*GACT*CA *T***C**A GA-AA*CAA T*T*A*-A* C*AGA*TG** *-T***A* ****CT**GT ***C*CTGGT

bg14/8 3' UT
G3 3' UT
bg32.1
gene8.5      ACAATAACTC AA-ACAGGGT AAGGAGGAGC CAGTGTGTTGT GTTGAGTGAG AACACTGCAG TTCTGTCAGC CAAAGCTGCC TGAGGGACCG CCCAATTGAG
              ***** **----- *****
              **G***** C*-----A** *G*****A *****
GTT*A**A** C*T**T**AA G*A*****A ***** A***** *****G*** **C***** ****AA***A **G*GC****

bg14/8 3' UT
G3 3' UT
bg32.1
gene8.5      GGTGTGCGAC CTCCAAC TCA AAGCCAATTG GAAGAAAGAA ACCATAGAAA GGAAGAAAAG GGGAGGAAGA CAGAGATCCT GGAAGAGATA TGGGCATTG
              ***** *****
              *****T*** ***** **T***G*** *****
              *****T*** ***** C*T***** *****C**G** *****T ***T***** *****

bg14/8 3' UT
G3 3' UT
bg32.1
gene8.5      GGGAAATAGT GTGACCATGT ATCAGGCTTT GTGGACATCT AACGAATATG TCATG-TTTT GTAAATACAA GCATGCACGC AGAAACAAAG GGAGAAAAC
              ***** *****
              ***** ***** *****
              *****T***** *****C***** ***C***** *****
              *****C*** *****C** *****A**C A****A***C **T***** *A*G*C**** *G**-----* *****A* ****G**G** *|*****

bg14/8 3' UT
G3 3' UT
bg32.1
gene8.5      GCTTTGGGTG TTAGCACTGT TCTCTGTCCC TATATAATAA AGAATACCTG CTGATGGC
              ***** *****
              ***** ***** *****A *****
              *****A *C*A*C*CA* *****T*TGT A***** *****T*

```

Fig.20 Alignment of the deduced nucleotide sequences in 3' untranslated region of *B-G* clone, *bg14/8*, *G3*, *bg28*, *bg32.1* and *gene 8.5*.

astarisc(***) : Identity gaps(---) : introduced to optimize alignment under line : primer sequences in this study
bg14/8 : Miller *et al.* (1991) *G3* : Kaufman *et al.* (1989)
bg14/8 3'UT : 3' untranslated region on *bg14/8* clone *G3* 3'UT : 3' untranslated region on *G3* clone

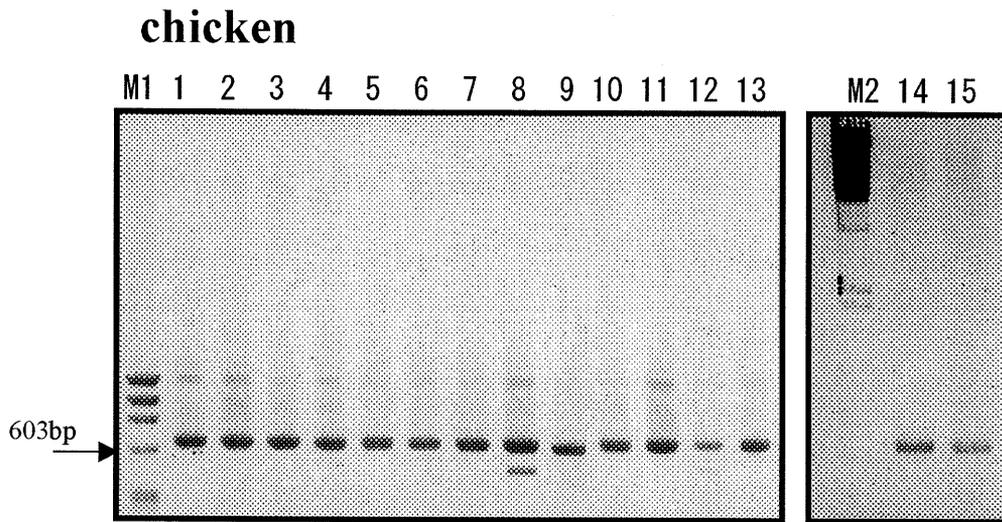


Fig. 21 PCR products in chickens.

M1 : ϕ X174 / *Hae*III M2 : λ DNA / *Hind*III
 1-8, 12, 13 : white leghorn 9 : fayoumi
 10, 11 : white plymouth rock 14, 15 : silky

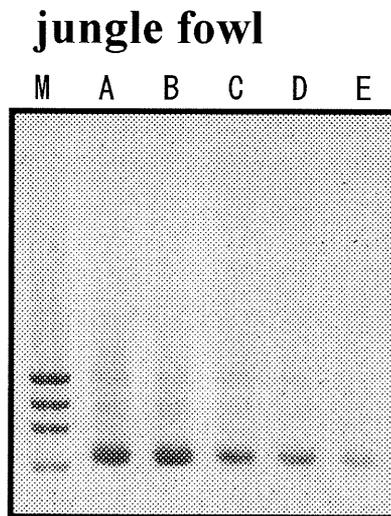


Fig. 22 PCR products in jungle fowls.

M : ϕ X174 / *Hae*III
 A : red jungle fowl B: green jungle fowl
 C : gray jungle fowl D,E : ceylon jungle fowl

Table 1 Detection of D1S80 locus from a hair root collected from seven subjects.

sample No.	number of used hair	number of detection hair	%	number of type	number of detection hair	%
1	18	1	5.6	A type	16	6.3
				B type	2	0.0
2	24	6	25.0	A type	5	40.0
				B type	19	21.1
3	14	0	0.0	A type	8	0.0
				B type	6	0.0
4	21	7	33.3	A type	10	10.0
				B type	11	54.5
5	16	0	0.0	A type	9	0.0
				B type	7	0.0
6	24	10	41.7	A type	12	16.7
				B type	12	66.7
7	13	8	61.5	A type	10	50.0
				B type	3	100.0
total	130	32	24.6	A type	70	15.7
				B type	60	35.0

Table 2 Effect of preliminary tests for detection of DNA typing.

sample	preliminary test	obtained DNA(ug)	HMW-DNA*	DNA typing	
				D1S80	HLADQ α
seminal stain	control	15.1	○	○	○
	SM	1.0	×	×	×
	DAC	3.0	×	×	×
	LU	6.7	○	○	○
blood stain	control	2.2	○	○	○
	SM	1.2	△	△	△
	DAC	1.6	×	×	×
	LU	2.3	○	●	○

HMW-DNA:high molecular weight DNA

○:detection △:low detection ×:no detection

●:It was possible to detect of D1S80 locus by condition on PCR

SM:SM test DAC:DAC method LU:luminol method

Table 3 Effect of acid and alkali solution for detection of DNA typing.

sample		pH*	obtained DNA(ug)	HMW-DNA*	DNA typing
					D1S80
seminal stain	control	7.3	20.3	○	○
	A	4.1	1.0	×	×
	B	6.3	1.7	×	×
	C	8.1	7.0	○	○
	D	8.1	4.9	○	○
blood stain	control	7.2	2.4	○	○
	A	4.0	1.0	×	×
	B	6.5	0.9	×	×
	C	8.1	2.1	○	△
	D	8.1	2.1	○	△

pH:pH of isolation buffer

HMW-DNA:high molecular weight DNA

○:detection △:low detection ×:no detection

A:0.2M citric acid

B:0.6N hydrochloric acid

C:luminol solution without hydrogen peroxide

D:0.5% sodium carbonate solution

Table 4 Summary of allele balance(peak height ratio) in heterozygous samples.

locus	n	Avg.	Min.	Max.	S. D.	①	②	% of data
						Avg. -3S. D.	Avg. +3S. D.	①<, and ②>.
D3S1358	67	0.94	0.62	1.26	0.13	0.55	1.33	100.0
vWA	80	0.94	0.70	1.29	0.12	0.58	1.30	100.0
FGA	79	0.94	0.62	1.30	0.14	0.52	1.36	100.0
Amelogenin	58	0.96	0.55	1.63	0.19	0.39	1.53	96.6
TH01	68	0.98	0.64	1.81	0.19	0.41	1.55	97.1
TPOX	53	0.97	0.66	1.58	0.15	0.52	1.42	98.1
CSF1P0	68	0.96	0.68	1.64	0.17	0.45	1.47	98.5
D5S818	68	0.95	0.75	1.22	0.10	0.65	1.25	100.0
D13S317	83	0.95	0.63	1.43	0.14	0.53	1.37	98.8
D7S820	68	0.97	0.71	1.37	0.14	0.55	1.39	100.0

n:number of heterozygotes analyzed at each locus.

Avg.:average of peak height ratio

S.D.:standard deviation.

peak height ratio : right(second) peak height / left(first) peak height

Table 5 Comparison with peak height ratio template volume, injection time and PCR products.

		D3S1358	vWA	FGA	Amelogenin	TH01	TPOX	CSF1PO	D5S813	D13S317	D8S720	
PCR template	sample 1	control (1.0ng)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
		0.5ng	0.8	0.9	1.1	0.9	0.5	0.7	1.0	1.4	0.7	0.8
		1.5ng	1.0	1.3	0.7	1.0	1.1	0.8	0.9	1.1	1.0	1.0
		2.0ng	1.0	1.4	0.9	1.3	1.0	0.9	1.0	0.9	1.2	1.1
	sample 2	control (1.0ng)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		0.5ng	1.1	1.0	0.8	0.9	1.1	0.7	0.7	1.0	0.7	0.9
		1.5ng	1.0	0.9	0.9	1.0	1.1	0.7	1.0	1.0	1.0	1.0
2.0ng		0.9	1.0	0.9	1.0	1.1	1.0	1.0	1.1	1.0	0.9	
injection time	sample 1	control (5sec.)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
		10sec.	0.9	1.1	0.9	0.8	0.9	0.8	0.9	1.1	0.8	1.0
		15sec.	0.9	1.1	0.9	0.8	0.9	0.8	0.9	1.1	0.8	1.0
	sample 2	control (5sec.)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		10sec.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		15sec.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
PCR product	sample 1	control (1.50 μ l)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
		0.75 μ l	0.9	1.1	1.0	0.8	0.9	0.8	0.9	1.1	0.8	1.1
		3.00 μ l	0.9	1.1	0.9	0.8	0.9	0.8	0.9	1.1	0.8	1.0
		4.50 μ l	0.9	1.1	0.9	0.8	0.9	0.8	0.9	1.1	0.9	1.0
	sample 2	control (1.50 μ l)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		0.75 μ l	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		3.00 μ l	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
4.50 μ l		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	

control:peak height ratio in each locus calculated as "1.0".

Table 6 Typing results of mixed sample by peak height ratio in STR locus knowned sample.

sample		D3S1358	vWA	FGA	Amelogenin	TH01	TPOX	CSF1PO	D5S813	D13S317	D8S720
A+B	pattern	2	2	1	4 (XY-XX)	same	2	1	4 (he-ho)	1	3 (he-ho)
	20:1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	10:1	●	○	○	○	○	○	●	○	○	○
	5:1	●	○	●	○	○	●	●	○	●	x
	2:1	x	x	x	△	○	x	x	△	x	x
B+C	pattern	2	2	1	4 (XX-XY)	same	4 (he-ho)	2	4 (ho-he)	2	3 (ho-he)
	20:1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	10:1	●	○	○	○	○	○	●	○	○	○
	5:1	●	●	x	●	○	○	●	●	●	●
	2:1	x	●	x	●	○	△	x	●	●	x
C+D	pattern	2	2	3 (he-ho)	4 (XY-XX)	2	5	4 (he-ho)	2	2	3 (he-ho)
	20:1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	10:1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	5:1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	2:1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D+E	pattern	2	2	3 (ho-he)	4 (XX-XY)	2	5	4 (ho-he)	2	same	5
	20:1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	10:1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	5:1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	2:1	x	○	●	○	○	●	○	△	○	●
E+A	pattern	same	2	2	same	same	3 (ho-he)	same	2	2	4 (ho-he)
	20:1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	10:1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	5:1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	2:1	○	x	△	○	○	●	○	x	x	○

pattern: Peak pattern on each locus in mixed sample. (cf. Fig. 11)

○: Typing by peak height ratio and Genotyper was same estimate.

△: Typing by Genotyper was better than typing by peak height ratio.

●: Typing by peak height ratio was better than typing by Genotyper.

x: Typing was unable by both peak height ratio and Genotyper.

same: Typing of STR or amelogenin is same in homozygous or heterozygous.

Table 7 Results of PCR.

sample	annealing temperature		
	55°C	60°C	
mammal	human	○	○
	baboon	○	○
	cow	○	—
	pig	○	○
	dog	×	×
	cat	○	×
	bear	○	×
	deer	○	×
	raccoon dog	×	×
bird	chicken	○	○
	duck	○	○

○ : PCR products (about 700bp) were detected.

× : PCR products (about 700bp) were not detected.

— : not performed PCR

Table 8 Animal samples and PCR results.

class	species	breed	number	PCR products
bird	chicken	white leghorn	10	○
		fayoumi	1	○
		white plymouth rock	2	○
		silky	2	○
	native fowl	sado jidori	1	○
		sado hige jidori	1	○
		tosa kojidori	1	○
		echigo nankin	1	○
		shiba dori	1	○
		japanese long tail fowl	4	○
	jungle fowl	red jungle fowl	1	○
		green jungle fowl	1	○
		gray jungle fowl	1	○
		ceylon jungle fowl	2	○
	japanese quail		1	×
	parakeet		1	×
swan		1	×	
owl		1	×	
crow		1	×	
kite		1	×	
turkey		2	×	
guinea fowl		2	×	
duck		2	×	
peacock		1	×	

○:detected ×:not detected

class	species	number	PCR products
mammal	human	6	×
	cattle	1	×
	pig	1	×
	sheep	1	×
	dog	1	×
	bear	1	×
	raccoon dog	1	×
	deer	1	×
	baboon	1	×
amphibian	frog	1	×
fish	mullet	1	×
	crucian carp	1	×