

ドロップレットデジタル PCR を用いた DNA 断片化測定ツール

西川（原田） 夏実

新潟大学大学院医歯学総合研究科

地域疾病制御医学専攻地域予防医学大講座法医学

(指導：高塚 尚和教授)

**Development of a tool for measuring DNA fragments using droplet
digital PCR**

Natsumi NISHIKAWA - HARADA

Department of Legal Medicine, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Hisakazu TAKATSUKA)

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757

新潟大学医学部法医学教室 西川 夏実

Reprint requests to : Natsumi Nishikawa

Department of Legal Medicine, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata, 951-8510, Japan

抄録

法医学分野で扱う DNA 抽出に用いられる試料は、様々な保存状態や経時変化の影響を受けて DNA が断片化していることがある。解析に必要な長さの DNA が保たれているかどうかはその後の解析結果に影響する。デジタル PCR (polymerase chain reaction) は、微細分画化させた反応液の PCR 反応陽性・陰性を測定し解析する方法で、絶対定量や高精度な検出が可能な方法であるが、本研究ではデジタル PCR を用いた DNA 断片化の測定ツールの作成およびそのツールを用いた実際の法医試料の DNA 断片化についての検証を試みた。

本研究では *BCKDHA* 遺伝子をターゲットとし、68bp, 101bp, 232bp, 394bp の各サイズの DNA 断片を検出する droplet digital PCR (ddPCR) の測定系の構築を行った。

新鮮ヒト DNA を用いて測定したところ、各サイズで検出されたコピー数に有意な差を認めなかった。次に、死後 1 日経過した血液を付着させ 2 か月間室温で保存した血液布から抽出した DNA では、101bp と 232bp, 101bp と 394bp の間でそれぞれ有意なコピー数の割合の低下を認めた。さらに、水死体 9 例の凍結保存臓器（肝臓、腎臓、肺）由来の DNA では、断片のサイズが長くなるにつれてその残存割合は減少する傾向が見られた。サイズごとに各臓器の断片化の割合を比較したところ、臓器ごとの有意な差は認められなかったが、肝臓の断片化が腎臓と肺よりも進行している傾向が認められた。また、発見時の水温 15℃未満と 15℃以上に分けて検証したところ、全ての臓器とサイズごとの検討において、水温 15℃未満では断片化が進行していない傾向が認められた。特に肝臓の 232bp, 394bp と、腎臓の 101bp, 232bp, 394bp において有意な差を認めた。

新鮮ヒト DNA と血液布由来 DNA の結果から、本研究で構築した測定ツールで断片化を検出できることが推察された。水死体由来 DNA の結果から、条件によっては肺や腎臓など断片化が比較的進んでいない可能性のある臓器から抽出した DNA で法医解析を行える可能性が示唆された。

本研究で確立した ddPCR による断片化測定ツールは法医試料全般に応用が可能であり、この手法を用いて保存状態や経時変化による DNA の断片化を明らかにしていくことが期待される。

キーワード: droplet digital PCR, DNA 断片化

諸言

法医学領域における DNA 解析は, STR (short tandem repeat) 法による個人識別をはじめ, 近年では, 遺伝子変異を背景にもつ死因の究明においても重要な意味を持つ. 一方, 法医学で扱う DNA 試料は様々な保存状態や経時変化により断片化していることがありうる¹⁾. とりわけ断片化が進んでいることは STR 法における個人識別の精度に重要な因子となる. それゆえ, DNA の断片化の程度を明らかにすることは, 個人識別の判定を行う上で重要な因子となりうるため, 定量 PCR 法を利用したキットや, コメットアッセイを利用した方法による検討が報告されている²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾. しかし, これらの方法は, 正確性や定量性に限界がある.

デジタル PCR は 1999 年に Bert Vogelstein と Kenneth W.Kinzler により最初に提唱された方法であり, がん細胞から稀な遺伝子変異を発見できることを示した⁶⁾. この方法を商用化した方法の 1 つとして登場したのが droplet digital PCR (ddPCR) である⁷⁾. ddPCR は核酸量が少ない場合であっても高精度に検出が可能である上に, 検量線を用意することなく絶対定量が可能である. したがって, ddPCR は法医学における DNA の検出において有用性が高いと推定されるが, 法医学分野での ddPCR に関する報告は未だ少ない.

本報告では, ddPCR の特徴である絶対定量を利用して, DNA 断片化の推定ツールの作成と, 法医サンプルでの応用を報告する. 経時変化による DNA 断片化を検討するために, 2 か月間経過した血液布に由来する DNA の検討を行った. また, 腐敗による DNA 断片化を検討するために, 水死体臓器 (肝臓, 腎臓, 肺) 由来の DNA についても検討し, ddPCR を用いた DNA 断片化推定法を示した.

材料と方法

1. サンプル

68bp, 101bp, 232bp, 394bp のアンプリコンサイズに設定したプライマーとプローブが正確に定量できるかどうか検討するために, 新鮮 DNA の採取を目的として, ヒト神経芽腫細胞株である SH-SY5Y 細胞を用いた. 次に, 血液布を放置することによる断片化の検証には, 死後 1 日以内の 1 例の血液を採取し包帯 6 枚に付着させ, 2 か月間室温で保存したものを使用した. 水死体における肝臓, 腎臓, 肺からの DNA の断片化の検討には, 2018 年から 2020 年に当教室で解剖された症例のうち, 対象となる臓器が全て -30°C で冷凍保存されていた 9 症例を使用した. 症例の概要については表 1 に示す. 本研究は新潟大学遺伝子倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号: G2020-0009) .

表 1
挿入箇所

2. DNA の抽出

SH-SY5Y 細胞を 6well dish に 8 ウェル分培養し, 100% confluency になった時点で細胞をそれぞれ別々に回収し DNA の抽出を行った. 培養条件は 5%CO₂ とし, 培地は D-MEM (Cat No.043-30085, 富士フイルム和光純薬) +10%ウシ胎児血清を用いた. 血液布からは, 約 1cm² に裁断し

たものを試料とした。培養細胞と血液布からの DNA 抽出は QIAamp DNA Investigator Kit (Cat No.56504, Qiagen) の標準プロトコルに従って実施し、最終溶出はキットに添付されている溶出バッファー (Buffer ATE) を用いて 40 μ L で行った。

水死体の肝臓, 腎臓, 肺は, 30mg 程度に切り出したものを試料とした。組織からの DNA 抽出は DNeasy Blood & Tissue Kit (Cat No.69504, Qiagen) の標準プロトコルに従って実施した。まず, キットに添付されている溶解バッファー (Buffer ATL) を加えビーズ破砕用チューブ (Tissue homogenizing CKMix 2mL tube (Cat No. P000918-LYSK0-A.0, エムエス機器株式会社)) および専用ホモジナイザー Minilys (エムエス機器株式会社) で破砕撹拌を行った。その後 RNase A (100mg/mL, Cat No.318-06391, ニッポンジーン) 20 μ L を添加しリボヌクレアーゼ (RNase) 処理を行った。最終溶出はキットに添付されている溶出バッファー (Buffer AE) を用いて 50 μ L で行った。全ての DNA の保存は 4°C で行った。

3. プライマーとプローブ

ターゲット遺伝子として *BCKDHA* (Branched Chain Keto Acid Dehydrogenase E1 Subunit Alpha, NM_000709.3) のイントロン 8 からエクソン 9 の領域にプライマーとプローブを設定し (図 1A), 作成した領域の BLAT search Results (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) で特異性が保たれていることを確認した。作成したプライマーとプローブの配列を表 2 に示す。全てのプライマーとプローブは Integrated DNA Technologies 社より購入したものを使用した。

表 2

挿入箇所

4. Droplet Digital PCR

ddPCR にあたり, 抽出した DNA 溶液について, 蛍光分析法を利用した Qubit® 3.0 Fluorometer を用いて濃度測定を行った。測定キットは Qubit® dsDNA HS アッセイキット (Cat No.Q32854, Thermo Fisher Scientific) を用いた。1ng/ μ L となるように ATE buffer で希釈したもののうち, 5 μ L を鋳型 DNA として, ddPCR Multiplex Supermix (Cat No.12005910, BioRad) 5 μ L, ターゲットプライマーの最終濃度が 250nM, ターゲットプローブの最終濃度が 900nM となるように加え, 全体の容量を 20 μ L になるように調製した。PCR は, 95°C 10 分による酵素活性反応に引き続いて, 94°C 30 秒による変性反応と 55°C 1 分によるアニーリング・伸長反応を 40 サイクル行い, 引き続き 98°C 10 分による不活性化反応を行い, 4°C で保温した。その後速やかに QX200 Droplet Digital PCR system (BioRad) による測定を実施した。解析は QuantaSoft™ Software (Version1.7, BioRad) を用いて行い, 陽性ドロップレットと陰性ドロップレットの閾値は, 全てのアンプリコンサイズで明瞭に分離確認される蛍光強度 2,000 とした (図 1B)。断片化の割合は, 最もサイズが短い 68bp で検出されたコピー数を Total genomic DNA (gDNA) 量として, 各サイズのコピー数の割合を算出して求めた (図 1A)。

5. 統計解析

解析は IBM 社 SPSS Statistics version 22 を用いて実施した。培養細胞由来の新鮮ヒト DNA を

用いた 68bp, 101bp, 232bp, 394bp における検討 (図 1C) および, 2 か月間経過した血液布の断片化率の検討 (図 1D), 水死体の肝臓, 腎臓, 肺に対する断片化率の検討 (図 2A-C) には分散分析を行い, 引き続き Tukey 法を用いた多重比較を行った. 温度の違いによる水死体の肝臓, 腎臓, 肺に対する断片化率の検討 (図 3A-C) には対応のない T 検定を行った. 全ての検定において $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとみなし, $0.01 \leq p < 0.05$ は*, $0.001 \leq p < 0.01$ は**, $p < 0.001$ は***で示した. 全てのデータは平均±標準偏差として表した.

結果

1. DNA 断片化率を検出する ddPCR 法の構築

まず 68bp から 394bp の DNA 断片を検出する ddPCR の構築を行った. 対象とした遺伝子として, コピー数多型 (Copy Number Variation: CNV) 解析のリファレンス遺伝子として利用されている *BCKDHA* (Branched Chain Keto Acid Dehydrogenase E1 Subunit Alpha, NM_000709.3) 遺伝子をターゲットとした⁸⁾. フォワードプライマーを固定しそれぞれのアンプリコンサイズに調整したリバースプライマーと全てのサイズに共通するプローブで検出を行った (図 1A). ddPCR による蛍光強度は, 全てのサイズにおいて陽性ドロップレットと陰性ドロップレットの判別が可能であり, その蛍光強度閾値は 2,000 であった (図 1B). 新鮮ヒト由来 DNA として SH-SY5Y 細胞から抽出した DNA で, 68bp のコピー数を Total gDNA 量 (100%) とした時の割合を検討したところ, 101bp は $101\% \pm 13\%$, 232bp は $107\% \pm 14\%$, 394bp は $97\% \pm 8\%$ であり有意差は認められず (図 1C), 本検出系で, 培養細胞 DNA の全てのサイズで断片化率が概ね 100% であり, 断片化が進んでいないことが示された. 一方, 室温で 2 か月間保存した血液布の DNA 断片化を検証したところ, 101bp は $104\% \pm 10\%$, 232bp は $90\% \pm 5\%$, 394bp は $87\% \pm 4\%$ であり, 101bp と 232bp, 101bp と 394bp の間でそれぞれ有意な低下を認めた (図 1D).

図 1
挿入箇所

2. 水死体臓器における断片化の検討

当教室で解剖となった水死体のうち -30°C で凍結保存していた肝臓, 腎臓, 肺組織から DNA を抽出し, 各サンプルの断片化を検討した. 対象症例は 2018 年から 2020 年の解剖症例 9 例であり男性 8 例女性 1 例であった. 死因は, 不詳が 1 例, 溺死もしくは溺死の疑いが 8 例であった. 最終生存確認日から発見されるまでの推定死後経過時間は最短で 3 日, 最長で 45 日であった. 遺体の状況は, 若干の表皮剥脱のみであった 1 例の他はいわゆる巨人様膨化状態であり, 腐敗が進行していることが推定される状況を示していた (表 1).

断片化の割合について, サイズが 101bp, 232bp, 394bp と長くなるにつれてその残存割合が減少する傾向が見られた (図 2A-C). さらに, サイズごとに各臓器の断片化の割合を比較したところ, 肝臓の断片化が腎臓と肺よりも進行している傾向が見られたが, 臓器ごとの有意な差は認められなかった (図 2A-C).

図 2
挿入箇所

3. 水温に着目した水死体臓器における断片化の検討

腐敗の進行には温度や湿度などの外的要因が関与するとされる。Casper (ドイツの法医学者である Johann Ludwig Casper) の法則によると、その進行は地上と比べて水中では2倍、土中では8倍遅くなるとされる。また Casper によると肝臓、肺、腎臓についてはこの順で腐敗が進むという⁹⁾。そこで、それぞれの臓器において、水温を15°C未満(5症例)と15°C以上(4症例)の場合に分け、それぞれの温度条件において断片化に差があるかどうかを検証した(表1, 図3)。その結果、全ての臓器とサイズごとの検討において、水温が15°C未満であった場合では断片化が進行していない傾向が認められた。特に、肝臓の232bpと394bp(図3, Liver, B, C)と、腎臓の101bp, 232bp, 394bp(図3, Kidney, A-C)において有意な差を認めた。

図3
挿入箇所

考察

本検討では、断片化の割合を検証するために ddPCR による絶対定量を用いた推定ツールの構築と、実症例の検討として断片化が予想される水死体における肝臓、腎臓、肺の断片化を検証した。ddPCR は第三世代の PCR 法として登場し、法医学分野では DNA メチル化に基づく年齢予測ツールに利用した報告などがあるが¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾、その数は極めて少ない。本検討では、絶対定量ができる点に着目して、断片化の割合を検証できる系の報告をした。一般的に ddPCR の PCR アンプリコンサイズは定量 PCR と同じ 100-200bp とされているが、最近の報告では、1,000bp を超えるサイズであっても、ddPCR による定量が可能であった報告がある¹³⁾¹⁴⁾。本検討では最長 394bp の ddPCR ができる系の構築が可能であった(図1C)。一方で、サイズが大きくなると陽性ドロップレットの蛍光強度が低下する傾向も認められた(図1B)。陽性ドロップレットと陰性ドロップレットの明瞭な区別は精度に影響するため、この分離は良いことが望まれる。プローブ濃度を上げることや使用するプローブにダブルクエンチャーシステムを用いることで改善するとの報告もあり、更なる検証が必要である¹⁵⁾。また、一遺伝子のみをターゲットに解析を行ったが、複数箇所を対象にしたマルチプレックス PCR による検出系を構築することでより精度の高い検証が可能となる。

また、死後1日の症例から血液布を作成し2か月間室温保存した時の断片化への影響を検証したところ、最も長い394bpのDNA断片で10%程度の低下を認めた。経時的なDNAの断片化を明らかにするものとして、 comet assay による断片化を見る方法の報告があり³⁾、断片化から死後経過時間を推定することが可能であるとされるが、ミトコンドリアDNAを含む50kb以下のDNAは検出できず、汎用性や定量性にも劣る点が問題とされている¹⁶⁾。本研究の方法は、簡便かつ定量的に断片化を推定するツールとして極めて有用性が高いと考えられ、本技術を利用して死後推定時間の検討など応用が期待される。

水温に着目した水死体臓器における断片化の検討では、発見時水温が15°C未満の症例では発見までの推定死後経過時間が4日から45日と、数十日の症例が含まれていたにもかかわらず、DNAは比較的良好に保存されていた。一方、水温が15°C以上では、発見までの推定死後経過時間は3日から11日であったが、断片化の進行が認められた(図3)。この結果から、水死体の組織

からでも、水温の比較的低い時期（新潟県であれば概ね 12 月から 4 月頃¹⁷⁾）であれば STR 法による個人識別に有用な DNA が得られる可能性が示唆された。また、断片化の程度は肝臓と比し肺と腎臓で比較的進んでいない傾向を認めた（図 2）。これは腎臓が後腹膜臓器であり、肺が胸膜で覆われた胸腔内に存在するため、比較的外部からの損傷を受けづらく組織が保たれることが影響している可能性が推測される。実務的には、血液の採取が困難な腐敗の進行した症例の個人識別において、臓器からの DNA 抽出が有用となると考えられるが、腐敗が進行してきている、遺体の置かれていた条件によっては DNA 断片化が進行せずに残っている可能性もあることが示唆できた。なお、死後経過時間をそろえたうえでの遺体が置かれた条件（季節、水中か土中か空気中か、損壊の程度）の違いによる比較や、遺体が置かれた条件をそろえたうえでの死後経過時間による違いの比較はしておらず、複数の要因の影響が混ざっている状態での評価となっているため、断片化に影響する要因一つ一つについてどの要因がどの程度強く影響するかを明らかにするには今回の研究では限界があり、症例を増やして検証を進める必要がある。

結論

ddPCR を用いた断片化の程度を検出する測定ツールの確立を試み、DNA 断片化の経時変化およびサンプルを保存するまでの遺体の置かれた温度条件による断片化への影響を調べ、個人識別に必要な断片長が保たれているかを明らかにすることができた。法医学分野の DNA 解析における ddPCR の有用性を確認できた。

参考文献

- 1) Ubelaker DH, Wu Y: Fragment analysis in forensic anthropology. FORENSIC SCIENCES RESEARCH 5, 4: 260-265, 2020.
- 2) Alonso A, Martín P, Albarrán C, García P, García O, Simón LF, García-Hirschfeld J, Sancho M, Rúa C, Fernandez-Piqueras J: Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. Forensic Science International 139: 141-149, 2004.
- 3) Shukla RK: Forensic application of comet assay: an emerging technique. FORENSIC SCIENCES RESEARCH 2, 4: 180-184, 2017.
- 4) Kitayama T, Fujii K, Nakahara H, Mizuno N, Kasai K, Yonezawa N, Sekiguchi K: Estimation of the detection rate in STR analysis by determining the DNA degradation ratio using quantitative PCR. Legal Medicine 15: 1-6, 2013.
- 5) Hara M, Nakanishi H, Yoneyama K, Saito K, Takada A: Effects of storage conditions on forensic examinations of blood samples and bloodstains stored for 20 years. Legal Medicine 18: 81-84, 2016.
- 6) Vogelstein B, Kinzler KW: Digital PCR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 9236-9241, 1999.

- 7) Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA, Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, Colston BW: High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 83: 8604–8610, 2011.
- 8) Zhong Q, Bhattacharya S, Kotsopoulos S, Olson J, Taly V, Griffiths AD, Link DR, Larson JW: Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. *Lab Chip.* 11: 2167–2174, 2011.
- 9) 高取 健彦 : エッセンシャル法医学. 第3版, 医歯薬出版株式会社, 東京, p44, 2010.
- 10) Lee MH, Hwang JH, Seong KM, Ahn JJ, Kim SJ, Hwang SY, Lim SK: Application of droplet digital PCR method for DNA methylation-based age prediction from saliva. *Legal Medicine* 54 101992, 2022.
- 11) Shi L, Jiang F, Ouyang F, Zhang J, Wang Z, Shen X: DNA methylation markers in combination with skeletal and dental ages to improve age estimation in children. *Forensic Science International: Genetics* 33: 1–9, 2018.
- 12) Santurtún A, Riancho JA, Arozamena J, López-Duarte M, Zarrabeitia MT: Indel analysis by droplet digital PCR: a sensitive method for DNA mixture detection and chimerism analysis. *Int J Legal Med* 131: 67–72, 2017.
- 13) Krumbholz M, Goerlitz K, Albert C, Lawlor J, Suttorp M, Metzler M: Large amplicon droplet digital PCR for DNA-based monitoring of pediatric chronic myeloid leukaemia. *J Cell Mol Med.* 23: 4955–4961, 2019.
- 14) Lasham A, Tsai P, Fitzgerald SJ, Mehta SY, Knowlton NS, Braithwaite AW and Print CG: Accessing a new dimension in TP53 biology: multiplex long amplicon digital PCR to specifically detect and quantitate individual TP53 transcripts. *Cancers* 12,769; doi:10.3390/cancers12030769, 2020.
- 15) Aizawa Y, Koyama A, Ishihara T, Onodera O, Saitoh A: Performance of a real-time PCR-based approach and droplet digital PCR in detecting human parechovirus type 3 RNA. *Journal of Clinical Virology* 84: 27–31, 2016.
- 16) Shukla RK: An introduction to the single cell gel electrophoresis assay: a technique resolving issues in forensic science. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* 8:1; DOI 10.1186/s41935-017-0035-5, 2018.
- 17) 第九管区海上保安本部 Web ページ「管内各地 過去の水温(2020年)」
https://www1.kaiho.mlit.go.jp/KAN9/suion/kako_data/data_2020.html 2021年12月12日閲覧

【表の説明】

表 1

症例の概要を示す。症例数は 9 例で男性 8 例女性 1 例。死因は、不詳が 1 例、溺死もしくは溺死の疑いが 8 例。最終生存確認日から発見日までの推定死後経過時間は最短で 3 日、最長で 45 日であった。発見時水温は No.1 から No.5 までの 5 例が 15°C未満であり、No.6 から No.9 までの 4 例が 15°C以上であった。

表 2

BCKDHA 遺伝子をターゲットとしたプライマーとプローブのシーケンスを示す。フォワードプライマーを固定し、それぞれのアンプリコンサイズに調整したリバースプライマーと全てのサイズに共通するプローブで検出を行った。

【図の説明】

図 1 DNA 断片化を測定するツールの作成

(A) 構築した断片化の検出系の模式図

上:*BCKDHA* 遺伝子をターゲットとした。イントロン 8 からエクソン 9 の領域にプライマーとプローブを設定した。点線がイントロン 8 領域、白四角がエクソン 9 領域を示す。

下:断片化率の計算法。アンプリコンサイズが 68bp の時に検出された DNA コピー数を Total gDNA コピー数とし、101bp, 232bp, 394bp で検出された DNA コピー数の割合を計算した。

(B) ddPCR の結果例

各アンプリコンサイズにおける蛍光強度は、全てのサイズにおいて陽性ドロップレットと陰性ドロップレットの判別が可能であり、その蛍光強度閾値は 2,000 であった。黒矢頭は閾値を示し、閾値以上のドロップレットは陽性、それ以下は陰性と評価された。

(C) 新鮮ヒト由来 DNA の断片化率

68bp のコピー数を Total gDNA 量(100%)としたとき、101bp は 101%±13%, 232bp は 107%±14%, 394bp は 97%±8%であり有意差は認められなかった(n=8)。データは平均±標準偏差で示す。n.s. は No Significance を示す。

(D) 2 か月間室温保存した血液由来 DNA の断片化率

68bp のコピー数を Total gDNA 量(100%)としたとき、101bp は 104%±10%, 232bp は 90%±5%, 394bp は 87%±4%と、101bp と 232bp, 101bp と 394bp の間でそれぞれ有意に低下を認めた(n=6)。データは平均±標準偏差で示す。**は $0.001 \leq p < 0.01$ を示す。

図 2 水死体における臓器由来 DNA の断片化率

(A-C) 臓器ごとの 68bp のコピー数に対する各サイズの残存割合(A: 101bp, B: 232bp, C: 394bp)。いずれのサイズでも肝臓の DNA 断片化が腎臓と肺よりも進行している傾向が見られたが、有意な差は認められなかった。データは平均±標準偏差で示す。n.s.は No Significance を示す。

図3 水温による断片化率の比較

全ての臓器とサイズごとの検討において、水温が 15°C未満では 15°C以上に対して断片化が進行していない傾向が認められた。特に、肝臓の 231bp と 393bp (図 3, Liver, B, C) と、腎臓の 100bp, 231bp, 393bp (図 3, Kidney, A-C) において有意な差を認めた。水温 15°C未満は 5 症例。15°C以上は 4 症例。データは平均±標準偏差で示す。*は $0.01 \leq p < 0.05$, **は $0.001 \leq p < 0.01$, ***は $p < 0.001$ を示す。

表1 本検討で使用した症例の概要

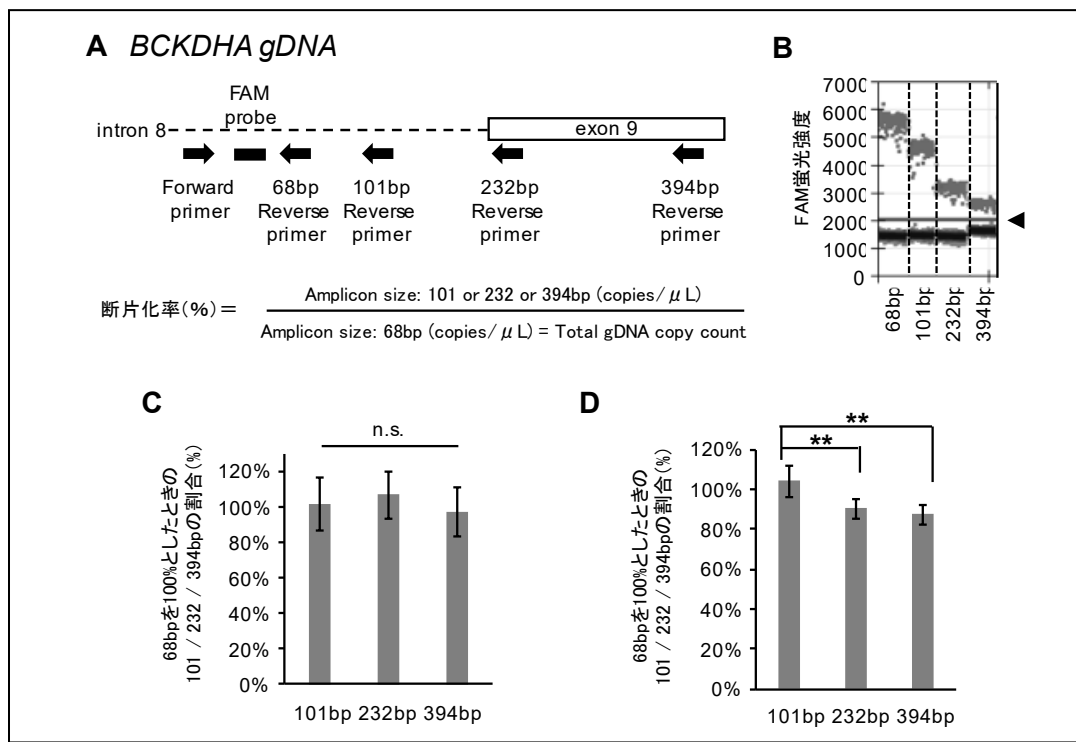
No.	性別	年代 (歳代)	死因	最終生存 確認日	発見日	推定死後経過 時間(日)	発見場所	遺体状況	腐敗変色	発見時 水温(°C)
1	男性	40	不詳	20XX/1/14	20XX/2/28	45	河口	巨人様膨化	軽度	7
2	男性	70	溺死	20XX/3/2	20XX/3/30	28	河川	巨人様膨化	軽度	9
3	女性	30	溺死の疑い	20XX/1/2	20XX/1/19	17	港	巨人様膨化	軽度	6
4	男性	40	溺死	20XX/1/19	20XX/2/4	16	海岸	巨人様膨化	軽度	7
5	男性	60	溺死	20XX/5/2	20XX/5/6	4	海岸	若干の剥脱	なし	13
6	男性	20	溺死の疑い	20XX/6/5	20XX/6/16	11	港	巨人様膨化	高度	18
7	男性	40	溺死の疑い	20XX/9/6	20XX/9/11	5	浜辺	巨人様膨化	高度	23
8	男性	20	溺死	20XX/7/26	20XX/7/29	3	埠頭海洋上	巨人様膨化	高度	25
9	男性	50	溺死の疑い	20XX/8/4	20XX/8/7	3	河川	巨人様膨化	高度	23

表2 本検討で使用したプライマーとプローブの配列

Name	Sequences
Forward Primer	5'- GAAAGCCTTAAATGATTCCAC -3'
68bp Reverse Primer	5'- AATGAAAACCCTCAAATCCC -3'
101bp Reverse Primer	5'- CGACAATGGAAATGATTATCC -3'
232bp Reverse Primer	5'- CTCAAAGGCCTCCATCAC -3'
394bp Reverse Primer	5'- GAGCAGGTCTCACTTATCG -3'
FAM Probe	FAM 5'- ACTTGATAGCACCTGATCCCTG -3'

著者 原田夏実 拡大縮小:なし(100%)

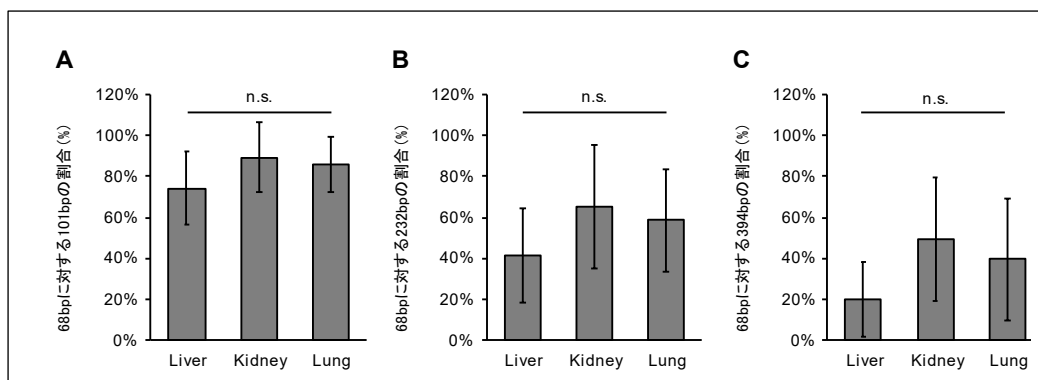
図1 上



下

著者 原田夏実 拡大縮小:なし(100%)

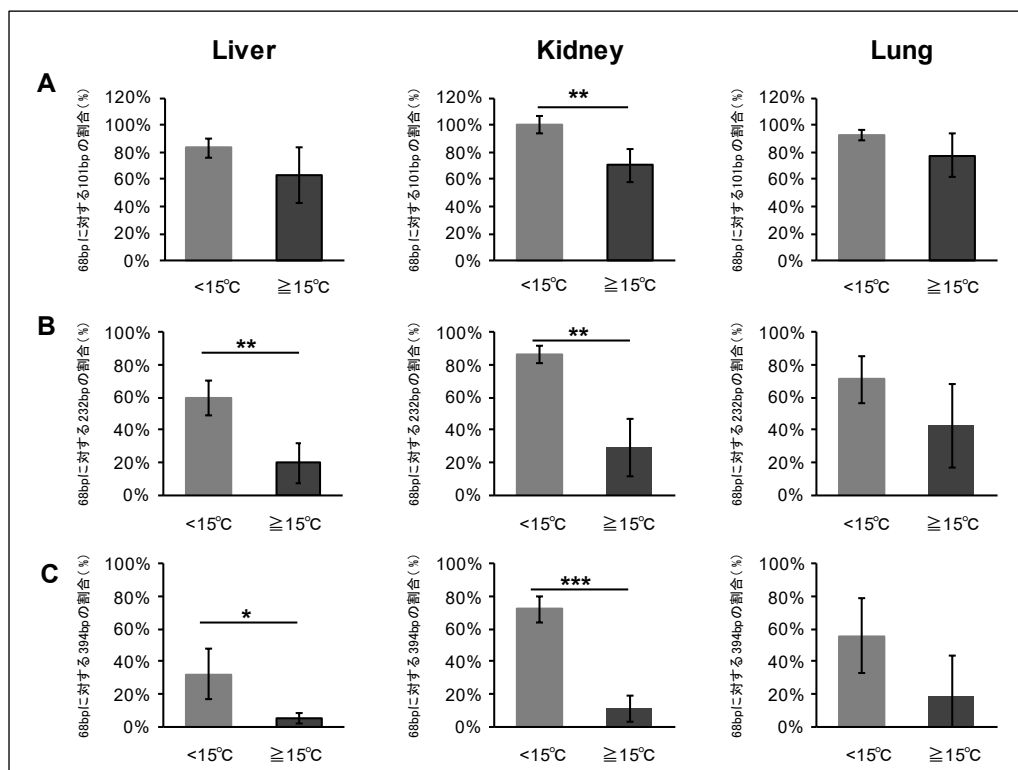
図2 上



下

著者 原田夏実 拡大縮小:なし(100%)

図3 上



下