—技術報告—

***Bacillus cereus* の VNTR 型解析による法科学的土壌資料の異同識別**吉川ひとみ^{*1}, 藤浪良仁^{*1}, 横山栄二^{*2}, 杉田律子^{*1}, 安田二郎^{*1}, 鈴木真一^{*1}

科学警察研究所^{*1}, 千葉県衛生研究所^{*2}
〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1^{*1}
〒260-8715 千葉市中央区仁戸名町666-2^{*2}

**Discrimination of Forensic Soil Samples Using
Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Bacillus cereus***Hitomi S. Kikkawa^{*1}, Yoshihito Fujinami^{*1}, Eiji Yokoyama^{*2}, Ritsuko Sugita^{*1},
Jiro Yasuda^{*1} and Shinichi Suzuki^{*1}

National Research Institute of Police Science^{*1}
6-3-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan
Chiba Prefectural Institute of Public Health^{*2}
666-2, Chuo, Chiba, Chiba 260-8715, Japan

(Received 28 May 2008; accepted 4 July 2008)

Soil is one of the most important physical evidence in criminal investigations, which provides useful information regarding with the relations between suspects, victims and crime scenes. Forensic soil samples are conventionally discriminated based on physical properties, such as color and mineral examinations. It is considered that molecular analysis of DNA of soil bacteria can contribute to the criminal investigation substantially, because improvement of discrimination ability of soil will be achieved by addition of biological analysis. This report describes the application of molecular analysis, which is used for discrimination of pathogens in epidemiological investigations, to forensic soil samples. Samples were taken from three sites (A, B and C), and sites B and C, which were 300 m apart, were located about 42 km from site A. Discrimination of soil samples by color and X-ray diffraction analyses were difficult. Then, *Bacillus cereus* was isolated from the small amount of soil samples which were as little as the lowest quantity required by the conventional method, and discriminated by variable-number tandem repeat (VNTR). The result showed that two VNTR types isolated from A were not included among isolates from B and C even 2 years later. These results suggested that the VNTR analysis using *Bacillus cereus* might be useful for the discrimination of forensic soil sample analysis. However, *Bacillus cereus* isolate shows a diversity even isolated from the same soil, therefore further data collection is required to evaluate this method for forensic soil identification.

Key words: Forensic soil analysis, Microbial analysis, Molecular analysis, *Bacillus cereus*, Variable-number tandem repeat (VNTR)

緒言

土壌は様々な犯罪現場において証拠資料として、被疑者と犯罪現場の結びつきを証明する重要な手がかりとなりうる¹⁾。現在、土壌の鑑定は主として色調や鉱物組成など土壌学的あるいは鉱物学的な検査によって行われている²⁻⁶⁾。これらの手法は有用であるが、検査に比較的多くの分析試料を必要とすることから微量な証拠物件では適用が難しい場合もあり、また、数 km 以上離れた地点から採取した土壌であっても類似した鉱物組成を示し、識別困難であることもある。土壌試料の鑑定検査において、土壌学的あるいは鉱物学的な検査に加え、これまで用いられてきたものとは異なる生物学的な指標を利用することにより識別能力の向上を図ることができれば、犯罪捜査に多大な貢献が期待できる。

微生物を利用した土壌資料の異同識別は、酵素活性の差異を利用した方法などにより以前から試みられてきた⁷⁾。近年では、terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法や16S rRNA 遺伝子の amplicon length heterogeneity-polymerase chain reaction (ALH-PCR) 法による土壌試料中の細菌種の相違を資料の判別に用いた研究が活発に行われており、鑑定資料の異同識別⁸⁾や地域推定に有効と考えられる情報を把握できるという報告がある⁸⁻¹⁰⁾。しかしながら、これら網羅的解析手法は環境の変化に極めて影響を受けやすく¹¹⁻¹⁴⁾、T-RFLP 法を法科学的資料に応用した場合には8ヶ月後に解析すると由来が同じ土壌であっても異なるパターンを示すことも報告されている⁸⁾。そこで、法科学的にはより変化が遅く長期的に安定な指標を選択する必要がある。近年、食中毒や院内感染事案において病原菌の近縁関係による感染経路の特定や、関連菌株か否かを判別するために variable number tandem repeats (VNTR) の分析による多型解析、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による解析、あるいは amplified fragment length polymorphism (AFLP) 法による解析が行われてい

る¹⁵⁻¹⁷⁾。ある細菌種から検出される DNA 型は同一事案由来の菌株を解析した場合には非常に類似したパターンを示すため、同種の細菌の近縁関係を解析するための方法として用いられており、疫学調査に信頼できる値を与えるとされている^{15,16)}。これら型判定の手法のうち、VNTR の解析は手技が簡便でかつ結果を得るまでに要する時間が少ないという利点があり、実際の鑑定へ適応するにはより適している手法であると推測される。

本研究では、分子疫学的な細菌株解析手法を土壌資料の異同識別に応用する目的で単離土壌細菌の VNTR 型判定を行った。解析の対象の細菌種は、土壌に広く分布し、さらに芽胞を形成することなどにより環境変化に強いものが望ましいと考えられる。土壌中に生息する芽胞形成菌のうち *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, そして *Bacillus anthracis* などの病原性が高いものは扱いが難しく、実用性を考慮した場合、病原性が低い *Bacillus cereus*¹⁸⁾ が最も適していると考えられる。そこで *Bacillus cereus* の VNTR 型判定による解析法が土壌識別に有用となる可能性があるか否かを検討した。

材料および方法

1. 試料

土壌試料は東京都内の A 地点から2ヶ所 (A1, A2)、千葉県内の B 地点から4ヶ所 (B1-B4) および千葉県内の C 地点から6ヶ所 (C1-C6) の合計12ヶ所から採取した。試料採取地点はいずれも関東ローム層の分布地域であり、従来の方法では異同識別が難しいと予想される。B 地点と C 地点は約300 m 離れており (近距離比較のため)、これらは更に A 地点から約42 km 離れている (遠距離比較のため)。各地点では直線状に約0.5-1 m 間隔で約5-10 cm の深さから試料の採取を行った。2005年5月6日には3地点12ヶ所全てから、2007年には B, C 両地点の採取場所のおおむね中央に位置している C3

地点（5月7日）、B3 および C4 地点（7月3日）から土壌試料を採取した。

2. 色調および X 線回折による鉱物成分の検査

色調検査および X 線回折は Marumo et al.^{2,3)} および Sugita and Marumo⁴⁾ に従い行った。すなわち、試料のうち 2 mm 以下の粒子を過酸化水素水を加えて有機物分解を行った後、粒径 0.05 mm 以上（砂画分）はアジレラ-ジャクソン法¹⁹⁾で、粒径 0.05 mm 以下（粘土画分）はメーラー-ジャクソン法²⁰⁾により脱鉄処理を行った。砂画分については、プロモホルム（比重 2.9）を用いて重鉱物画分と軽鉱物画分に分離した。色調検査は風乾試料、有機物分解後の粘土画分および脱鉄後の粘土画分について Sugita and Marumo⁴⁾ に従い標準土色帖²¹⁾を用いて行った。X 線回折は縦型ゴニオメータ付 RINT2500 型 X 線回折装置（リガク社製）を用いて、砂画分の軽鉱物と粘土画分について測定を行った。砂画分については、粉碎した試料約 2.0 mg をコロジオンを用いて無反射板に塗り広げて不定方位標本を作製し、測定に用いた。粘土画分についてはカリウムまたはマグネシウム飽和の定方位標本を作製し、カリウム飽和標本は風乾、300°C で 1 時間加熱したものおよび 600°C で 1 時間加熱したもの、また、粘土画分のマグネシウム標本は風乾したものとグリセロール処理したものを測定した。測定条件を Table 1 に示す。

3. *Bacillus cereus* の分離および同定

(1) *Bacillus cereus* 様細菌の分離

芽胞非形成菌を死滅させる目的で、200 μ g の土壌試料を 70% エタノールに懸濁して室温で 1 時間放置したのち遠心操作（100 $\times$ g, 5 min, 4°C）を行い、上清を取り除いた。エタノール処理後の沈殿を滅菌

精製水 1 ml に懸濁した後、4°C で 400 $\times$ g, 5 分間遠心操作を行い、得られた上清の 50 μ l を *Bacillus cereus* group の選択培地である NGKG 培地（日水製薬株式会社製）に塗抹して、好気性条件下において 32°C で一晩培養した。*Bacillus cereus* group の特徴であるレシチナーゼ活性を有するコロニーを再び 10% にヒツジ血液を加した普通寒天培地（日水製薬株式会社）に塗抹し、溶血活性を持つコロニーを再度普通寒天培地を用いて純化し分離菌とした。分離は 2005 年 5 月、2007 年 5 月、7 月に行った。2005 年 5 月に分離を行った際には、実際の鑑定では試料の状態によってはコロニーが少数しか得られない可能性があることから、1 ヶ所につき 1 つのコロニーを無作為に抽出して分析を行った。2007 年の 5 月には C3 地点から、7 月には B3 および C4 地点から分離操作を行い、*Bacillus cereus* 様コロニーを全て分離した。

(2) *Bacillus cereus* の種名同定

分離株のコロニーを 20 μ l の 0.25% ドデシル硫酸ナトリウム含有 50 mM 水酸化ナトリウム溶液に懸濁し、95°C で 15 分間加熱した。その後遠心操作（16,000 $\times$ g, 5 min, 4°C）を行い、上清をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の鋳型として、i-Cycler（Bio-Rad 社製）を用いて以下のように *Bacillus* 属特異的領域および *Bacillus cereus* group 特異的な領域であるホスホリパーゼ C (*cerA*) 領域を標的とした PCR 増幅を行った^{22,23)}。PCR 反応液は、KOD dash reaction buffer, 200 μ M の 4 種 dNTP, 0.65 U KOD dash DNA ポリメラーゼ（東洋紡績株式会社製）、1 μ M プライマーを含み、全量を 20 μ l とした。なお、*Bacillus* 属特異的領域の増幅は BacF (30)-BacR プライマー²²⁾を用いて、94°C 60 秒、57°C 60 秒、72°C 60 秒の温度条件を 30 サイクル、更に 72°C 3 分間の伸長反応を行った（Table 2）。*cerA* 領域は Schraft and Griffiths の方法に従い²³⁾、Table 2 に示すプライマーを用いて増幅を行った。増幅後の反応液は 1.2% アガロースゲル電気泳動を行った後、エチジウムブロマイドで染色し、*Bacillus* 属特異的領域については約 600 bp、*cerA* 領域では約 400 bp の増幅バンドの有無を確認した。

Bacillus cereus と *Bacillus thuringiensis* の識別に

Table 1 Experimental conditions for X-ray diffraction (XRD).

XRD conditions	Sand fraction	Clay fraction
Target	Cu	Cu
X-ray tube voltage	40 kV	40 kV
X-ray tube current	40 mA	100 mA
Monochromator	Graphite	Graphite
Measurement range	3~70° (2 θ)	3~20° (2 θ)
Scan speed	4°/min	1°/min

Table 2 Primers used in this study.

Locus	Primer	Sequence	Product length (bp)	Unit length (bp)	Corresponding gene	No. of alleles
<i>Bacillus</i> species and relatives	BacF (30)	5'-AGGGTCATTGGAAACTGGG-3'	600			
	BacR	5'-CGTGTGTAGCCCAGGTCATA-3'				
<i>Bacillus cereus</i> group	Pf	5'-GAGTTAGAGAACGGTATTTATGCTGC-3'	400		<i>cerA</i>	
	Pr	5'-CTACTGCCGCTCCATGAATCC-3'				
<i>vrrA</i>	EW1	5'-TATGGTTGGTATTGCT-3'	90-165	12	<i>vrrA</i>	5
	EW2	5'-6FAM-CGCTGATCTTCCATTGTCAT-3'				
Bcm08	Bcm08-F	5'-GTGCTGGGCAACACAGAC-3'	460-838	18	Enterotoxin/cell wall binding protein	23
	Bcm08-R	5'-6FAM-TGGTCGCTGCTTTATAACC-3'				
Bcm17	Bcm17-F	5'-ATTGGACAAGAAAAACAAGTACTG-3'	215-272	16	Stage III sporulation protein AH	4
	Bcm17-R	5'-6FAM-CGCTGATCTTCCATTTGTCAT-3'				
Bcm18	Bcm18-F	5'-6FAM-CCTTGTTTTGCACGCTCAG-3'	230-283	15	Hypothetical protein	7
	Bcm18-R	5'-CTGGTCAACAACCTACTGAAAAATGT-3'				
Bcm20	Bcm20-F	5'-CGCCAAATGTATCGAAAGAA-3'	412-844	36	SpoVID-dependent spore coat assembly factor safA	20
	Bcm20-R	5'-6FAM-TGCTGATATGGCATTGTATATGG-3'				

については, Ohba et al. の方法^{24,25)}に準じ位相差顕微鏡を用いて観察を行い, 結晶蛋白質の有無により種名判定を行った.

(3) VNTR 領域の PCR 増幅および型判定

蛋白質および細胞由来の夾雑物を取り除く目的で, 3.(2)で PCR 反応に用いた菌体抽出液をフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール処理を行った後エタノール沈殿を行い, VNTR 解析の鋳型とした. 多数の *Bacillus cereus* 株を用いた報告があり識別力が確認されている VNTR 5 領域の解析を行った²⁶⁻²⁸⁾. 検討に用いた VNTR 領域の増幅に用いたプライマーは Table 2 に示すとおりであり, i-Cycler を用いて既報に従い増幅を行った²⁶⁻²⁸⁾. PCR は, KOD dash reaction buffer, 5 ng の鋳型 DNA, 0.65 U KOD dash DNA polymerase, 200 μ M の 4 種 dNTP, 0.5 μ M のプライマーを含んだものを超純水にて全量を 20 μ l にした. Bcm08, Bcm17, Bcm18, および Bcm20 の PCR 増幅は, 96°C 5 分の熱変性後, 96°C 30 秒, 56°C 60 秒, 70°C 60 秒のサイクルを 30 回繰り返し, 70°C で 5 分伸長反応することにより行った. *vrpA* 部位は, 94°C 60 秒の熱変性後, 94°C 60 秒, 55°C 60 秒, 72°C 60 秒のサイクルを 30 回繰り返し, 72°C で 10 分伸長反応を行い増幅した.

PCR 産物の検出は, 泳動ポリマーとして POP-7 (Applied Biosystems 社製) を使用し, ABI 3130 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) を用いて行った. 1 μ l の希釈 PCR 産物を 1 μ l の GeneScan 1200 LIZ サイズスタンダードマーカー (Applied Biosystems 社製) とともに 20 μ l の Hi-Di Formamide (Applied Biosystems 社製) に加え, 95°C で 5 分間の加熱変性を行い検出用試料とした.

結果および考察

1. 色調および X 線回折による検査結果

本研究の試料が鉱物学的な特徴により識別可能であるか検査する目的で, 現在, 土壌資料の異同識別法として日本で用いられている色調検査および X 線回折による鉱物成分の検査を行った. 色調検査の結果, 試料間の色調の差異は標準土色帖²¹⁾の隣接する 2 枚のカラーチップの範囲内であった (Table

3). 隣接する 2 枚のカラーチップの色調を示す土壌試料は識別困難とされており⁴⁾, 色調検査では試料の識別は困難であることが明らかとなった. また, X 線回折による検査を行ったところ^{2,3)}, 軽鉱物画分および粘土画分共に含有する鉱物の組み合わせは類似していた (Table 4). よって, 本研究で用いた試料は色調検査のみならず, X 線回折による識別も難しいことが判明した.

2. 細菌の分離および特定

本研究で用いたすべての土壌試料から, レシチナーゼ活性および溶血活性を有する *Bacillus cereus* 様コロニーを得ることができた. 分離した菌株から DNA の抽出を行い, *Bacillus* 属の細菌を特異的に増幅する BacF (30)-BacR プライマー²²⁾を用いた PCR 増幅を行った結果, 2005 年に得られた C4 地点の株および 2007 年 7 月に得られた B3 地点の 2 株以外は全ての分離株で約 600 bp のサイズの増幅バンドが認められた. 2005 年に分離した株の PCR 増幅結果を Fig. 1A に示す. また, *Bacillus cereus*

group のみ増幅する *cerA* を標的とした Pf-Pr プライマー²³⁾を用いて増幅を行った結果, 2005 年, 2007 年全ての分離菌で約 400 bp のサイズのバンドを確認した. Fig. 1B に 2005 年分離株の PCR 増幅結果を示す. これらの結果により, 分離した細菌は *Bacillus cereus* group であると考えられた. *Bacillus cereus* group 特異的 PCR で増幅されるにもかかわらず, *Bacillus* 属特異的 PCR での増幅がみられなかった分離株が 3 株あったが, これはプライマーの領域に変異が入っているなどの原因が考えられた.

Bacillus cereus group は *Bacillus cereus* とそのきわめて近縁の 3 種の細菌で構成されるグループであり, 溶血活性を有する *Bacillus cereus* および *Bacillus thuringiensis* とこの活性を持たない *Bacillus mycoides* と *Bacillus anthracis* から成っている. 分離株はすべて溶血活性を持つことから, *Bacillus cereus* group のなかの *Bacillus cereus* または *Bacillus thuringiensis* であると考えられた. そこで, 全ての分離株を位相差顕微鏡下で観察したところ,

Table 3 Results of color examination of soil samples.

Sample treatment	A1	A2	B1	B2	B3	B4
Air-drying	10YR4/3	10YR4/3	10YR4/3	10YR4/3	10YR3/4	10YR3/3
Decomposition of organic matter	10YR6/4	10YR6/4	10YR7/4	10YR6/4	10YR5/4	10YR5/4
Removal of iron	10YR6/4	10YR6/3	10YR6/4	10YR6/4	10YR5/3	10YR6/3

Sample treatment	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Air-drying	10YR4/2	10YR4/2	10YR4/3	10YR4/3	10YR4/3	10YR3/3
Decomposition of organic matter	10YR6/4	10YR6/6	10YR6/4	10YR6/5	10YR7/4	10YR6/4
Removal of iron	10YR6/4	10YR6/4	10YR6/4	10YR6/4	10YR6/4	10YR6/3

Table 4 Mineralogical compositions of soil samples by XRD^{a)}.

Fraction	Mineral names	A1	A2	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Light minerals fraction	Quartz	+	+	+	±	±	±	+	±	+	±	+	±
	Cristobalite	—	—	—	—	—	—	±	±	—	+	—	—
	Plagioclases	±	±	+	+	+	+	+	+	±	+	±	+
	Amphibole	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Clay fraction	Chlorite	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mica	++	++	+	+	±	—	++	+	+	+	±	—
	Kaolin Minerals	++	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+
	Hydroxide Minerals	±	±	++	++	++	+	+	±	++	+	++	+

a) Abundance: ++ abundant, + medium, ± little, — none

Fig. 1 Identification of isolated bacteria species. Gel electrophoresis of PCR products amplified with primers BacF (30)-BacR (A) and Pf-Pr (B). Twelve *Bacillus cereus* isolates (A1 2005, A2 2005, B1 2005, B2 2005, B3 2005, B4 2005, C1 2005, C2 2005, C3 2005, C4 2005, C5 2005, C6 2005) are included.

Bacillus thuringiensis に特徴的な結晶性蛋白質を持つものは見られなかったことから、分離株は *Bacillus cereus* であると確認された (Fig. 2). 本実験では色調検査および X 線回折による検査での検査可能な最下限量の土壌試料を実験に供したが複数の *Bacillus cereus* 分離株を得ることが可能であり、現行法より少量の試料で土壌由来細菌が解析可能であることが示唆された. 化学的な処理により土壌中の微生物が死滅してしまう可能性があるため、微生物解析用試料は鑑定検査の初期段階で分取し、従来法の検査試料とは別に扱うべきであると考えられた.

3. VNTR による細菌株の DNA 型分析

本研究では、多数の *Bacillus cereus* 株を用いた報告があり識別力が確認されている 5 つの VNTR 領域を用いて解析を行った. 分離株の解析結果を Table 5 に示す. 1 ヶ所につき 1 つのコロニーを分離した 2005 年の株の解析結果では、A 地点由来株の VNTR 型は B, C 地点由来株のいずれとも異なっており、特に *vrrA* 領域と *Bcm17* 領域では B, C 地点由来株と一致しているものはみられなかった. この結果は、A 地点が B および C 地点から 42 km と比較的遠距離であったことと関連している可能性が推測される. 一方、B 地点および C 地点から得られた株には VNTR 型が類似したものも見られ、特

Fig. 2 Phase-contrast photograph of isolated *Bacillus cereus* (B4 2005). Crystal toxin is not observed.

に B1 2005 と C4 2005, B3 2005 と C2 2005 は完全に一致し、さらにこれらの株間の違いは *Bcm20* の繰り返し数が一つ変化しているのみであった. これは B, C 地点が約 300 m と近接した地点であることが関与している可能性が推測される. そこで、我々は約 2 年後の C3 地点 (2007 年 5 月), B3 および C4 地点 (2007 年 7 月) から資料を採取し、すべてのコロニーを分離して解析を試みた. その結果、C4 3-9 に見られるように、同一地点由来株の VNTR 型は類似している傾向が見られたものの、C3 あるいは B3 では様々な VNTR 型が見られ、コロニー間あるいは経時的にも多様性があることが確認された. しかしながら、このなかに A 地点からの型に一致するものは見られなかった.

一つの試料から複数の VNTR 型が認められたが、その理由として土壌中に元来、多様な VNTR 型の *Bacillus cereus* が存在している可能性がある. 微量な土壌資料中の *Bacillus cereus* は湿度の低下により芽胞を形成するが、分離されるのは元の土壌中で最も優勢な、すなわち数の多い遺伝子型の *Bacillus cereus* であると予想される. よって、土壌資料

Table 5 VNTR types of 44 *Bacillus cereus* isolates from soil.

Sample	Sampling site	Date of sampling	Number of repeat in each VNTR locus				
			<i>vrnA</i>	Bcm08	Bcm17	Bcm18	Bcm20
A1 2005	A1	6-May-05	8	27	9	10	9
A2 2005	A2		10	27	9	10	13
B1 2005	B1		5	27	8	10	12
B2 2005	B2		9	27	8	10	8
B3 2005	B3		5	27	8	10	13
B4 2005	B4		9	27	8	11	8
C1 2005	C1		5	26	8	10	12
C2 2005	C2		5	27	8	10	13
C3 2005	C3		9	26	8	10	13
C4 2005	C4		5	27	8	10	12
C5 2005	C5	5	27	8	8	11	
C6 2005	C6	6	27	8	10	8	
C3 1	C3	7-May-07	5	27	8	10	12
C3 2			5	27	8	10	12
C3 3			5	27	8	10	12
C3 4			6	27	8	10	13
C3 5			8	28	9	10	15
C3 6			8	28	9	10	15
C3 7			5	27	8	10	13
C3 8			5	27	8	7	7
C3 9			5	26	9	9	7
C3 10			5	26	8	10	13
C3 11			6	26	8	10	13
C3 12			6	27	8	10	12
C3 13			6	28	9	9	13
C3 14			9	27	8	10	13
B3 1	B3	3-Jul-07	5	24	8	10	12
B3 2			5	27	8	10	11
B3 3			5	26	8	10	12
B3 4			9	28	8	10	13
B3 5			9	28	8	10	13
B3 6			5	28	8	10	14
B3 7			5	28	8	10	14
B3 8			8	28	8	10	13
C4 1	C4		5	26	9	10	14
C4 2			5	27	9	9	9
C4 3			5	27	9	9	13
C4 4			5	27	9	9	13
C4 5			5	27	9	9	13
C4 6			5	27	9	9	13
C4 7			5	27	9	9	13
C4 8			5	27	9	9	13
C4 9			5	27	9	9	13
C4 10			5	28	9	9	14

a) Not detected

からは出来るだけ多くの *Bacillus cereus* を分離して優勢な遺伝子型が何であるのかを調べる必要があるかもしれない。本実験では、当初 A 地点からの採取箇所を 2 ヶ所に、また 1 地点 1 株と設定したことから、A 地点でのコロニー間の多様性を明らかにすることができなかった。2007 年資料からの結果から推測すると、A 地点でも多様な型が存在する可能性がある。しかしながら、B, C 地点では 2 年経過しても A 地点で見られる型は認められなかったことから、ある程度以上距離が離れている場合にはさらに多くのデータを積み重ねることにより、本法は新たな土壌試験法として有効となるかもしれないと考えられる。

本研究では、分子疫学的細菌株解析手法を法科学的土壌資料の解析に適応した。その結果、1 地点 1 株の解析であっても、また時間を経て採取された資料を用いた場合でも、比較的距離がある地域から採取した株には差異が認められる可能性が推測された。これまでに土壌由来細菌の VNTR 型解析による異同識別を試みた例はなく、本法は法科学的な環境由来証拠物件の検査の新たな可能性を示すものであると考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、九州大学の犬庭道夫教授には *Bacillus thuringiensis* の識別について丁寧なご指導とご助言を頂きました。この場を借りて謝意を表させていただきます。

文 献

- 1) Murray, R. C.: Evidence from the Earth. pp. 52-53, Moutain Press Publishing Company, Montana (2004).
- 2) Marumo, Y. Nagatsuka, S. and Oba, Y.: Clay mineralogical analysis using the <0.05-mm fraction for forensic science investigation-its applicaion to volcanic ash soils and yellow-brown forest soils. *J. Forensic Sci.*, **31**, 92-105 (1986).
- 3) Marumo, Y. Nagatsuka, S. and Oba, Y.: Rapid clay mineralogical analysis for forensic science investigation-clay mineralogy over the short distance. *J. Forensic Sci.*, **33**, 1360-1368 (1988).
- 4) Sugita, R. and Marumo, Y.: Validity of color examination for forensic soil identification. *Forensic Sci. Int.*, **83**, 201-210 (1996).
- 5) Sugita, R. and Marumo, Y.: Screening of soil evidence by a combination of simple techniques: validity of particle size distribution. *Forensic Sci. Int.*, **122**, 155-158 (2001).
- 6) Pye, K.: Geological and soil evidence, forensic applications. pp. 59-118 Moutain Press, Boca Raton (2004).
- 7) Thornton, J. I., McLaren, A. D.: Enzymatic characterization of soil evidence. *J. Forensic Sci.*, **20**, 674-692 (1975).
- 8) Horswell, J., Cordiner, S. J., Maas, E. W., Martin, T. M., Sutherland, K. B., Speir, T. W., Nogales, B., and Osborn, A. M.: Forensic comparison of soils by bacterial community DNA profiling. *J. Forensic Sci.*, **47**, 350-353 (2002).
- 9) Heath, L. E., and Saunders, V. A.: Assessing the potential of bacterial DNA profiling for forensic soil comparisons. *J. Forensic Sci.*, **51**, 1062-1068 (2006).
- 10) Moreno, L. I., Mills, D. K., Entry, J., Sautter, R. T., and Mathee, K.: Microbial metagenome profiling using amplicon length heterogeneity-polymerase chain reaction proves more effective than elemental analysis in discriminating soil specimens. *J. Forensic Sci.*, **51**, 1315-1322 (2006).
- 11) Kuske, C. R., Ticknor, L. O., Miller, M. E., Dunbar, J. M., Davis, J. A., Barns, S. M., and Belnap, J.: Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1854-1863 (2002).
- 12) Pesaro, M., Nicollier, G., Zeyer, J., and Widmer, F.: Impact of soil drying-rewetting stress on microbial communities and activities and on degradation of two crop protection products. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 2577-2587 (2004).

- 13) Lueders, T., and Friedrich, M.: Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2732–2742 (2000).
- 14) Friedrich, M. W., Schmitt-Wagner, D., Lueders, T., and Brune, A.: Axial differences in community structure of Crenarchaeota and Euryarchaeota in the highly compartmentalized gut of the soil-feeding termite *Cubitermes orthognathus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4880–4890 (2001).
- 15) Mahon, B. E., Ponka, A., Hall, W. N., Komatsu, K., Dietrich, S. E., Siitonen, A., Cage, G., Hayes, P. S., Lambert-Fair, M. A., Bean, N. H., Griffin, P. M., and Slutsker, L.: An international outbreak of Salmonella infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *J. Infect. Dis.*, **175**, 876–882 (1997).
- 16) Van Der Zwet, W. C., Parlevliet, G. A., Savelkoul, P. H., Stoof, J., Kaiser, A. M., and Van Furth, A. M., Vandenbroucke-Grauls, C. M.: Outbreak of *Bacillus cereus* infections in a neonatal intensive care unit traced to balloons used in manual ventilation. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 4131–4136 (2000).
- 17) Noller, A. C., McEllistrem, M. C., Pacheco, A. G., Boxrud, D. J., and Harrison, L. H.: Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157: H7 isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5389–5397 (2003).
- 18) 柳原保武, 多村 憲: 微生物学—病原微生物の基礎—. pp. 122, 南江堂, 東京 (1998).
- 19) Aguirola, N. H., and Jackson, M. L.: Iron oxide removal from soils and clays. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **17**, 359–364 (1953).
- 20) Mehra, O. P., and Jackson, M. L.: Iron oxide removal from soils and clays by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. *Clays and Clay Minerals*, **7**, 317–331 (1960).
- 21) 小山正忠, 竹原秀雄: 新版標準土色帖. 日本色研事業株式会社, 東京 (1994).
- 22) Kuske, C. R., Banton KL, Adorada DL, Stark PC, Hill KK, Jackson PJ. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2463–2472 (1998).
- 23) Schraft, H., and Griffiths, M. W.: Specific oligonucleotide primers for detection of lecithinase-positive *Bacillus* spp. by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 98–102 (1995).
- 24) Ohba, M., and Aizawa, K.: Insert toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *J. Invertebr. Pathol.*, **47**, 12–20 (1986).
- 25) Ohba, M., and Lee, D. H.: *Bacillus thuringiensis* associated with faeces of the Kerama-jika, *Cervus nippon keramae*, a wild deer indigenous to the Ryukyus, Japan. *J. Basic Microbiol.*, **43**, 158–162 (2003).
- 26) Andersen, G. L., Simchock, J. M., and Wilson, K. H.: Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J. Bacteriol.*, **178**, 377–384 (1996).
- 27) Valjevac, S., Hilaire, V., Lisanti, O., Ramisse F, Hernandez E, Cavallo JD, *et al.*: Comparison of minisatellite polymorphisms in the *Bacillus cereus* complex: a simple assay for large-scale screening and identification of strains most closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 6613–6623 (2005).
- 28) Zahner, V., Cabral, D. A., Regua-Mangia, A. H., Rabinovitch, L., Moreau, G., and McIntosh, D.: Distribution of genes encoding putative virulence factors and fragment length polymorphisms in the *vrrA* gene among Brazilian isolates of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8107–8114 (2005).