

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目： 基盤研究（C）

研究期間： 2007～2008

課題番号： 19592415

研究課題名（和文） LAMP法を用いた歯髄・歯石 DNA からの血液型判定

研究課題名（英文） Rapid and simple Blood grouping method from dental pulp and dental calculus by loop-mediated isothermal amplification.

研究代表者

堤 博文 (TSUTSUMI HIROFUMI)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号： 30188594

研究成果の概要： Loop-Mediated Isothermal Amplification 法（以下、LAMP 法とする）は、等温条件下で鎖置換反応を利用して目的の部位を増幅し、その際に生じる大量の副産物（ピロリン酸マグネシウム）が反応液を白く濁らせる状況を、目視あるいはリアルタイム濁度検出装置によって判定を可能とする検査法である。そこで、LAMP 法による MN 式血液型判定について検討した。その結果、判定までの時間が約 50 分～55 分で可能となり、また、Loop プライマーを添加すれば 30 分で判定可能とした。さらに、リアルタイム PCR 法を用いて ABO 式および MN 式遺伝子型の同時検出を試み、約 40 分で同時検出を可能とした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・社会系歯学

キーワード： 歯科法医学, DNA 多型解析

1. 研究開始当初の背景

塩基配列の繰り返し多型(VNTR : variable number of tandem repeat および STR : short tandem repeat)の遺伝子解析は、法医学における個人識別に非常に有効である。従来、これらの繰り返し数の相違を基にしたアリアル(DNA 型)の判定は、スラブゲル電気泳動法

やキャピラリー電気泳動法によって検出しているが、検査が終了するまでは煩雑な作業と時間を要し、また複数の反応温度に対応する特殊な装置が必要であった。

LAMP 法は、DNA 鎖に組み込まれたプライマーの末端が形成するループ構造を利用することで、目的の部位を等温条件下で連続的

に DNA の増幅が可能であり、反応温度が一定であるために従来の PCR 装置を必要とすることもなく、さらには、増幅の際に生じる大量の副産物（ピロリン酸マグネシウム）が反応液を白く濁らせることを利用して目視でも判定が可能である。筆者まず比較的簡単であろうと思われた性別判定に LAMP 法を応用してみたところ、反応時間約 60 分で判定が可能であることを確認した。その成果を DNA 多型学会第 14 回学術集会ならびに第 90 次日本法医学会総会にて発表した。

この技術を基に簡便な ABO 式および MN 式血液遺伝子型検査を同時に検出する方法に着手した。

2. 研究の目的

LAMP 法を用いて、ABO 式および MN 式血液型検出を、短時間で高精度に遂行するためのプライマーの設計および PCR 条件等について検討し、方法論を確立する。この簡易血液型検出法が確立できれば、高度に腐乱した死体や白骨化した死体等の個人識別を迅速に行えることから、犯罪捜査等において非常に有益である。

3. 研究の方法

(1) 試料

当教室に保存されている抜去歯 24 例から歯髄あるいは歯石を採取し、通法に従って核 DNA を抽出した。また、検査法の正確性を知る目的で、従来から行われている制限酵素法により ABO 式および MN 式血液遺伝子型を判定した。

(2) MN 式遺伝子型における検討

① プライマーの設計

MN 式遺伝子型判定を LAMP 法により行うために標的遺伝子 6 箇所領域に対して 4 つのプライマーを作製し (Fig.1)、等温条件下で連続的に DNA を増幅し、DNA 型を判定した。

M-FIP : ATTGCCACACCAGTGGTACTTG=CCTTTCTCAACTTCTATGTTATACAGC
 N-FIP : ATTGCCACCTCAGTGGTACTTA=CCTTTCTCAACTTCTATTTATACAGC
 BIP : CATCTCATCACAGACAAATGGTTTG- CATCACAAAATGATTTCCGGAG
 B3 : CAGGTCCCTTAAAATGGGTGA
 F3 : CTCAGTCACCTCGTCTCT

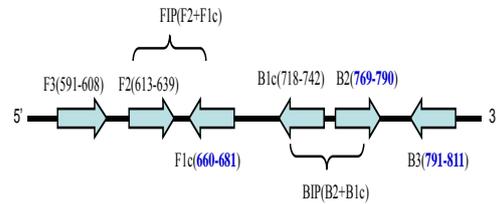


Fig.1 プライマーの設定部位

なお、FIP、BIP、F3 および B3 プライマーのうち、FIP プライマーは M 遺伝子および N 遺伝子それぞれに特異的に反応するように設計し、また、後三者のプライマーは M および N 遺伝子に共に反応するように設計した。

② 時間短縮のためのプライマー設計

判定時間短縮のために Loop プライマーを設計した (Fig.2)。

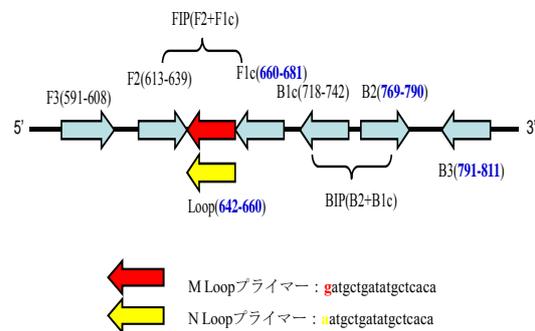


Fig.2 Loop プライマーの設定部位

判定時間短縮のためのプライマーは、M および N 型プライマーセットそれぞれに各 Loop プライマーを加え、設計した。

③ LAMP 反応

増幅反応液は、Loopamp DNA 増幅試薬キット (栄研化学) を使用し、鋳型 DNA 5 ng、2×Reaction Mix。12.5 μl、Bst DNA Polymerase 1 μl と各プライマー (FIP: 40 pmol、BIP: 40 pmol、F3: 5 pmol、B3: 5 pmol) を混合し、全量を 25 μl とした。反应用チューブとして透

明度が高い 0.2 ml の Loopamp 反応チューブ（栄研化学）を使用した。測定はリアルタイム濁度測定装置（ラテメックス）を用いて、等温条件下（62℃～63.5℃）で約 80 分間にわたって反応液の濁度変化について観察した。なお、増幅産物を 10%PAGE により確認を行った。

(3) ABO 式および MN 式遺伝子型検査

リアルタイム PCR 法により ABO 式および MN 式遺伝子型検査を同時に行った。試料は当教室に保存された血液型既知の歯髄を用いた。ABO 式遺伝子型検査は尾形ら（法科学技術, 12, 167-176, 2007）の報告を参考にし、261 番塩基の欠失および 763 番と 803 番の塩基置換を識別するプライマーとプローブを作製した。PCR1 は 261 番塩基の欠失（O 遺伝子）を識別するもので、PCR2 は 763 番と 803 番の塩基置換（B 遺伝子）を識別するものである。反応系の調整は下記に示した濃度で行った。

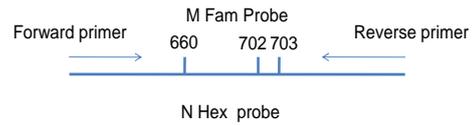
プライマーおよびプローブの調整は Fig.3 に示した。

Primer Mix	最終濃度	PCR2	最終濃度
PCR1		B-F primer	200nM
O-F & O-R primer	300nM	B-R primer	300nM
AB-Fam & O-Vic Probe	150nM	AO-Fam Probe	50nM
		O-Vic Probe	100nM

Fig.3 リアルタイム PCR におけるプライマーおよびプローブの濃度

また、MN 式遺伝子型検査には 660 番、672 番および 673 番の塩基置換を識別するプライマーとプローブを作製した（Fig.4）。なお、プローブの作製は Bioserch Technologies 社に作製を依頼した。

ABO 式および MN 式遺伝子型の検出反応溶液は、時間の短縮を目的としてアジレント社製 Brilliant II Fast QPCR Master Mix を用いた。増幅・解析はリアルタイム定量 PCR 解析システム Mx3000P（アジレント）で行った。



反応条件			
Primer Mix		Brilliant II Fast Master Mix	: 12.5 μl
	最終濃度	Primer Mix	: 7 μl
F & R primer	300nM	DNA(1~10ng)	: 1 μl
M Probe	200nM	D.W	: 4.5 μl
N Probe	150nM		

Fig.4 MN 式遺伝子型検出の反応条件

PCR 条件は ABO 式および MN 式遺伝子型検査を同時に検出するために種々検討し、初期の熱変性を 95℃・2 分の後、熱変性 95℃・5 秒、アニーリング 60℃・20 秒を 40 サイクルで行うことにした。

4. 研究成果

(1) LAMP 法における MN 式遺伝子型の検出

① アニーリング温度の濁度検出への影響

M 型試料、N 型試料および MN 型試料を用いて、増幅温度の違いを検討した。白濁度はリアルタイム濁度検出器により判定した。

1) 62℃の場合

M プライマーでは M 遺伝子が 42 分前後で、N プライマーでは N 遺伝子が 50 分前後で白濁を検出した。しかし、M 型試料の中には、増幅時間が 65 分以上になると N プライマーに非特異的に反応するものが出現した（Fig.5）。

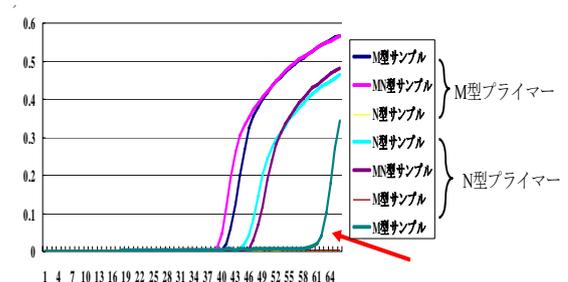


Fig.5 62℃における検討

M 型プライマーでは M 型と MN 型の試料において 42 分前後で白濁を認めた。一方、N 型プライマーでは M 型に比べ若干時間が遅く、50 分前後で認められた。しかし、M 型試

料の中で 65 分以上経過すると N 型プライマーに非特異的に反応するサンプルが認められた(→)。

2) 63°Cの場合

M プライマーでは M 遺伝子が 45~50 分前後で、N プライマーでは N 遺伝子が 56 分前後で白濁した。M 型試料の中には、増幅時間が 65 分以上になると N プライマーに反応するものが出現した (Fig.6)。

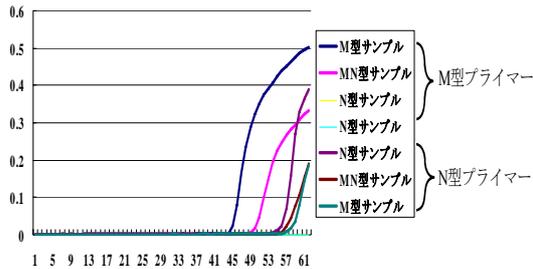


Fig.6 63°Cにおける検討

M 型プライマーでは M 型と MN 型の試料において 45~50 分前後で白濁を認めた。一方、N 型プライマーでは 62°Cと同様に M 型に比べ時間が遅く、56 分前後に認められた。

3) 63.5°Cの場合

M プライマーでは M 遺伝子が 53 分前後で、N プライマーでは N 遺伝子が 60 分前後で白濁した。M 型試料における非特異的の反応は認められなかったが、増幅時間を多少長くする必要が生じた (Fig.7)。

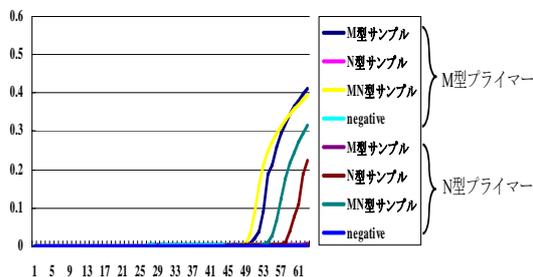


Fig.7 63.5°Cにおける検討

M 型プライマーでは M 型と MN 型の試料では 53 分前後で白濁を認めた。一方、N 型プライマーでは、M 型に比べ時間が遅く、60

分前後に認められた。しかし、N 型プライマーに非特異的に反応した M 型試料は、今回設定した 80 分以内では増幅を認めなかった。

② 陳旧歯髄 DNA からの MN 式遺伝子型判定

歯髄 DNA 24 例について、アニーリング温度 63.5°C で型判定を行った。M プライマーが平均 53 分、N プライマーが平均 60 分の増幅時間でそれぞれ白濁し、型判定が可能であった。また、M 型および MN 型試料において、M 遺伝子の検出は、M 型試料の方が短時間で認められ、同様に、N 遺伝子の検出も N 型試料の方が MN 型試料よりも短時間で認められる傾向を示した。MN 式遺伝子型判定に必要な増幅時間は 70 分以内であることが判った(表 1)。

表 1 各プライマーにおける

M および N 型遺伝子の検出時間

試料	M型プライマー	N型プライマー	判定
1	52.1	-	M型
2	-	59.8	N型
3	50.2	55.7	MN型
4	51.1	-	M型
5	57.0	-	M型
6	53.7	62.5	MN型
7	-	58.8	N型
8	-	63.8	-
9	50.5	-	M型
10	53.9	-	M型
11	-	58.8	N型
12	52.5	56.6	MN型
13	53.4	58.8	MN型
14	50.6	62.3	MN型
15	52.7	-	M型
16	-	63.1	N型
17	52.1	58.2	MN型
18	53.8	59.4	MN型
19	53.2	-	M型
20	-	59.6	N型
21	-	57.8	N型
22	54.5	-	M型
23	56.5	59.8	MN型
24	-	57.5	N型
平均	52.99	59.53	

③ Loop プライマーによる検討(Fig.8)

1) Loop プライマーを添加しない場合

M 型プライマーを用いた判定では M 型と MN 型の試料において、また、N 型プライマーでの判定は N 型と MN 型の試料で、目視による白濁が認められた。M 型プライマーでは平均 53 分、N 型プライマーでは平均 59 分であった。

2) Loop プライマーを添加した場合

M および N 型血液遺伝子型の判定時間は、

M および N いずれも 30 分前後で判定は可能であった。

以上のことから、Loop プライマーを設定した LAMP 法による MN 式血液遺伝子型判定は短時間で正確に行うことができ、犯罪捜査等における個人識別に有効であると思われた。

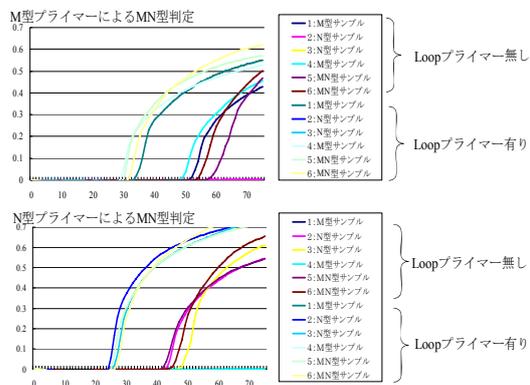


Fig.8 Loop プライマー設計による反応時間の変化

また、PCR 産物について 10%PAGE を行い、EtBr 染色で増幅産物を確認した (Fig.9)。

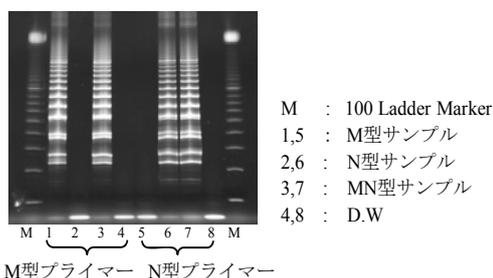


Fig.9 10%PAGE による増幅産物の確認

LAMP 法により様々な鎖長を有する PCR 産物が作製されることから、電気泳動像はラダーパターンを示し、正確に増幅されていることが確認できた。

(2) リアルタイム PCR 法による ABO および MN 式遺伝子型検査

① ABO 式遺伝子型検査

ABO 式遺伝子型検査には、2 種類の PCR 反応系を用い検討した。

その結果、PCR1 系で Fam 蛍光のみ増幅が認められた場合の遺伝子型は AB、AA、BB 型、Hex 蛍光のみに増幅が認められた場合を OO 型、Fam および Hex 蛍光どちらにも増幅

が認められた場合を AO、BO 型、PCR2 系で Fam 蛍光のみ増幅が認められた場合を AO、AA、OO 型、Hex 蛍光のみに増幅が認められた場合は BB 型、Fam および Hex 蛍光どちらにも増幅が認められた場合を AB、BO 型になり、PCR1 および PCR2 の共通した型がその遺伝子型と判定される (Fig.10)。

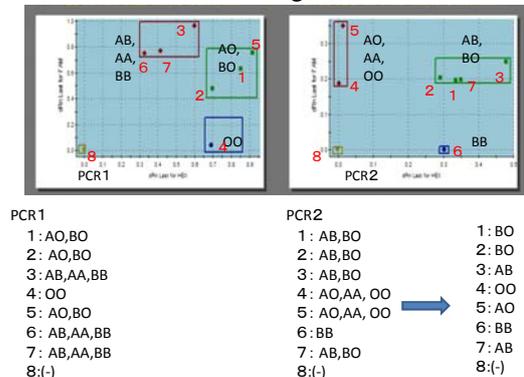


Fig.10 リアルタイム PCR 法による ABO 式遺伝子型の結果

そこで 24 例について ABO 式遺伝子型分類を行ったところ、Fig.11 に示すように分類され、これらの遺伝子型はいずれも表現型と矛盾しなかった。

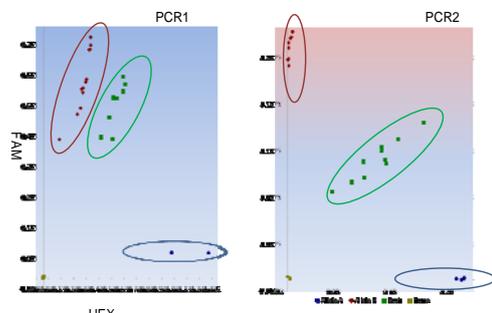


Fig.11 リアルタイム PCR 法による 24 名の ABO 式遺伝子型判定

② MN 式遺伝子型検査

ABO 式遺伝子型の分類と同じサーマルサイクルで MN 式遺伝子型を検出するためにプライマーおよびプローブ濃度調整し、検討したところ、方法で記載した条件で検出可能となった。

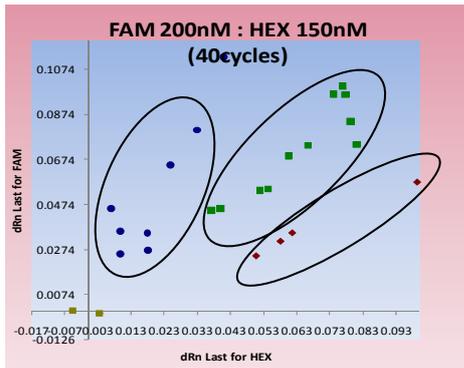


Fig.12 リアルタイム PCR による 24 名の MN 式遺伝子型の判定

Fam 蛍光のみ増幅が認められた場合を MM 型、Hex 蛍光のみに増幅が認められた場合を NN 型、Fam および Hex 蛍光どちらにも増幅が認められた場合を MN 型と判定する。そこで 24 例について MN 式遺伝子型判定を行ったところ下記のように分類され、これらの遺伝子型はいずれも表現型と矛盾しなかった。以上のことから、ABO 式および MN 式血液遺伝子型について同時に検出することを可能とし、迅速かつ簡便な検出方法が確立された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- ① 堤 博文、伊澤 光、小室歳信、鉄 堅、内ヶ崎西作、押田茂實、SMAP法による歯髄および歯石からの性別判定、DNA多型Vol.17 (日本DNA多型学会編)、2009、印刷中、査読有
- ② Nogami H、Tsutsumi H、Komuro T、Mukoyama R、Rapid and simple sex determination method from dental pulp by loop-mediated isothermal amplification、Forensic Sciences International、2008、Genetics 2、349-353、査読有
- ③ 堤 博文、向山レイ、小室歳信、鉄 堅、押田茂實、X染色体上のSTRローカスの遺伝子頻度、DNA多型Vol.16 (日本DNA多型学会編)、2008、291-294、査読有
- ④ 堤 博文、向山レイ、小室歳信、LAMP法

による歯髄DNAからのMN式遺伝子型判定、DNA多型Vol.15 (日本DNA多型学会編)、2007、272-274、査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 堤 博文、リアルタイム PCR 法による ABO および MN 式遺伝子型検査、第 93 次日本法医学会総会、2009 年 5 月 15 日、大阪
- ② 堤 博文、SMAP 法による歯髄および歯石からの性別判定、日本 DNA 多型学会第 17 回学術集会、2008 年 11 月 20 日、東京
- ② 堤 博文、LAMP 法による歯髄 DNA からの MN 式遺伝子型判定、第 92 次日本法医学会総会、2008 年 4 月 24 日、長崎
- ③ 堤 博文、X 染色体上の STR ローカスの遺伝子頻度、第 16 回 DNA 多型学会、2007 年 11 月 15 日、大阪
- ④ 堤 博文、LAMP 法による歯髄 DNA からの性別判定、第 49 回歯科基礎医学会総会、2007 年 8 月 31 日、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者 堤 博文

(TSUTSUMI HIROFUMI)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号：30188594

(2) 研究分担者 小室 歳信

(KOMURO TOSHINOBU)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：50139200

研究分担者 向山 レイ

(MUKOYAMA REI)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号：40059902

研究分担者 伊澤 光

(IZAWA HIKARU)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30514103

(3) 連携研究者

()

研究者番号：