

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10518

研究課題名（和文）シングルセルゲノミクス技術を利用した混合試料からの個人識別法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for personal identification from mixed samples using single-cell genomics technology

研究代表者

永井 淳（Nagai, Atsushi）

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00207961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：シングルセルゲノミクス技術を利用し、混合血痕からの高精度な個人識別法の開発を目指した。セルソーティングによって混合血痕から白血球を単離する際の細胞標識には、アレル判定率の点において抗ヒトCD3抗体が有用であることを明らかにした。シングルセルの全ゲノム増幅（WGA）において生じやすいアレル・ドロップアウトによりDNA型フルプロファイルが得られない問題を解決するために、新たに「重ね合わせ法」と「WGA産物混合法」を考案した。これらの方法を用いることにより、混合血痕における関与者のDNA型フルプロファイルが得られ、関与者のDNA型が未知の混合血痕にも両手法は利用可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医学・鑑識科学分野では、単独試料からの個人識別は非常に高い精度を持って行うことが可能であるが、混合試料からの個人識別はソフトウェア等による統計学的手法を用いても困難な場合が多く、混合試料に関与した人物を確実に特定するための有効な方法は未だない。本研究では、混合血痕中に含まれる個々の白血球に着目し、1個の白血球のシングルセルゲノム解析を行うことにより、混合血痕に関与した人物のDNA型フルプロファイルを得ることに成功した。本研究において得られた成果は、混合血痕から個人を特定するためのひとつの手法として、犯罪捜査に少なからず寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Single-cell genomics technology was used to develop a highly accurate individual identification method from mixed-blood spots. Anti-human CD3 antibodies were found to be useful for cell labeling when isolating single leukocytes from mixed-blood spots by the flow cytometric cell sorting in terms of allele determination rate. To solve the problem of not obtaining a complete profile of DNA types due to allele drop-out, which is likely to occur in the whole genome amplification (WGA) of a single-cell, the 'Overlay method' and the 'WGA product mixing method' were newly devised. By using these methods, the complete profile of DNA types of each contributor in the mixed-blood spots was obtained, showing that both methods can be used for mixed-blood spots where the DNA type of the contributors are unknown.

研究分野：法医学

キーワード：シングルセルゲノム解析 全ゲノム増幅 個人識別 混合血痕 DNA型フルプロファイリング アレル・スコアリング 重ね合わせ法 WGA産物混合法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在、法医・鑑識科学分野における個人識別は、主に、疾患や遺伝形質と直接関連しないマーカーである常染色体の STR (short tandem repeat) を用いた DNA 型解析により行われており、高いクオリティ・コントロールの元に製造された市販のキットを利用し、非常に正確な方法によって極めて高い識別確率で個人を特定することが可能になっている。しかしながら、そのような高精度な個人識別が可能となった現状においてもなお残されている課題のひとつが、複数の人物由来の血液や細胞等が混在する試料における個々の人物の特定である。常染色体 STR 解析によるこのような混合試料からの個人識別については、これまでにソフトウェア等による統計学的手法を利用する方法等が行なわれているが、混合試料から高い精度で個人を特定するには未だ困難な場合が多いのが現状である。

2. 研究の目的

事件や事故の現場で採取される生体由来の試料では、タッチ試料に含まれる体細胞はもとより、血痕試料中の白血球でもなお細胞の形態を保っているものが少なくない。そこで本研究では、混合試料、特に混合血痕に含まれる個々の白血球に着目し、シングルセルゲノム技術を利用して混合血痕から単離ならびに全ゲノム増幅した 1 個の白血球由来の DNA の常染色体 STR 解析を実施することにより、混合血痕からのより精度の高い個人識別法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 混合血痕試料の作製

日本人ドナーから同意を得て末梢血を採取した。2 名もしくは 3 名の血液を等量ずつ混和し、シャーレ上に滴下して乾燥混合血痕を作製した。ビーズ破碎機にて乾燥血痕を破碎した後、滅菌蒸留水を加え再水和した。

(2) 白血球のシングルセル化

次の 2 つの方法を用いて白血球のシングルセル化を行った。

限界希釈法

再水和した混合血痕試料をチュルク液にて染色し、セルカウンタープレートを用いて試料中に含まれる白血球数を算出した。その後、算出した白血球数に基づきマイクロプレートを用いて限界希釈を行い、光学顕微鏡下でマイクロプレートの 1 ウェルあたり白血球が 1 個に単離されていることを確認した。

セルソーティング法

主にヒト T 細胞に発現する CD3 に対する抗 CD3 蛍光抗体もしくはヒト汎白血球抗原 CD45 に対する抗 CD45 蛍光抗体を用い、再水和した混合血痕試料中の白血球を標識した後、セルソーター SH800 (Sony) を使用して標的白血球を単離した。

(3) 全ゲノム増幅 (Whole Genome Amplification; WGA)

単離した白血球の DNA を REPLI-g Single Cell Kit (Qiagen) を用いて全ゲノム増幅した。

(4) PCR 増幅

全ゲノム増幅した DNA を精製した後、Identifiler Plus キット (ABI) を用いて常染色体 STR 15 ローカスとアメロゲニンを PCR 増幅した。

(5) 電気泳動・DNA 型判定

PCR 増幅産物を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (ABI) にて電気泳動した後、GeneMapper ID v.3.2 ソフトウェアを用いて DNA 型判定を行った。ピーク高の閾値は 50 RFU に設定した。なお、各ドナーの参照 DNA 型プロファイルを得るために、末梢血と同時にそれぞれのドナーから採取した口腔粘膜細胞より DNA を抽出し、PCR 増幅の後、同様の方法でドナーの DNA 型を判定した。

(6) DNA 型フルプロファイリング

アレル・スコアリング

ドナー2名の混合血痕を用いた。ドナーのDNA型が混合したDNA型プロファイルからアレルが4つ検出された常染色体STRローカスを選択し、各ドナーの有するヘテロ接合体の組み合わせを推定した。次いで、推定したヘテロ接合体の組み合わせを基に、単離白血球サンプルを2つのグループに分類した(D7S820ローカスを選択した場合の分類の1例を図1に示す)。これらの分類されたグループについて以下の操作を行った。

まず、混合DNA型プロファイル中の各STRローカスについて、ひとりのドナーが持ち得るすべてのアレルのパターンを列挙した。例えば、あるローカスでアレル1、2、3が検出された場合、そのローカスでの可能なアレルのパターンは[1、1]、[2、2]、[3、3]、[1、2]、[1、3]、[2、3]である。これらの可能性のあるアレルパターンの中で、一致するサンプル数が最も多いものを正しいアレルパターンとみなした。

次に、この一致するサンプル数が最も多いアレルパターンをスコアリングするために、1つのサンプルで1つのアレルが検出された場合、正しいアレルパターンと一致するホモ接合体パターンに1.0点を、そのアレルを含むヘテロ接合体パターンに0.5点を与えた。また、1つのサンプルで2つのアレルが検出された場合には、一致するパターンに1.0点を与えた。

以上のようにして、各STRローカスについて最もスコアの高いアレルを選択し、それを基にドナーのDNA型を推定した。

重ね合わせ法

アレル・スコアリングによって推定したDNA型を全ての単離白血球サンプルのシングルセルゲノム解析結果と比較し、各サンプルをドナー1、ドナー2、その他(例えば、アレル未検出、混合など)に分類した。

次いで、ドナー1に分類された全てのサンプルについて、シングルセルゲノム解析によって得られたエレクトロフェログラムを基に各アレルピークの高さをアレルごとに合計した。ドナー2に分類されたサンプルに対しても同様の操作を行った。そして、それぞれのローカスについて、最も高いアレルピークと他のアレルピークとのピーク高の比を計算し、その値が20%未満のアレルを除外した。また、1つのローカスに20%以上の比率を持つアレルが3つまたは4つある場合は、それぞれにおいて比率の最も低い1つまたは2つのアレルを除外した。このようにしてアレルを除外した後、各ローカスにおいて残ったアレルをそのドナーのDNA型フルプロファイルと判断した。

WGA産物混合法

アレル・スコアリングによりドナー1由来と推定された単離白血球サンプルの全ゲノム増幅(WGA)産物の残余を全て混合し、それを用いてPCR増幅・電気泳動を行った。ドナー2由来と推定されたサンプルに対しても同様の操作を行った。得られたDNA型をそのドナーのDNA型フルプロファイルと判断した。

4. 研究成果

(1) 限界希釈法とセルソーティング法の有効性の比較

ドナー3名(A、B、C)の混合血痕試料を用いた。単離した各白血球から得られたDNA型と各ドナーの参照DNA型プロファイルとを比較し、白血球をシングルセル化する際に限界希釈法とセルソーティング法のいずれが有効か検討した。なお、本実験では、セルソーティングにおける白血球の標識には抗CD3蛍光抗体を使用した。

限界希釈法では、単離白血球30サンプル中、8サンプルがドナーAのDNA型と、7サンプルがドナーBのDNA型と、5サンプルがドナーCのDNA型と特定された。各サンプルにおけるアレル判定率(ドナーの総アレル数に対する検出されたアレル数の割合)は、最大値は75.0%、最小値は約17.2%、平均値は約46.3%であった。ドナーを特定できなかった10サンプルのうち、2サンプルではアレルピークが全く検出されず、1サンプルでは1つだけ検出されたアレルピークがドナーBとCに共通するアレルだったため、そのサンプルがどちらのドナーのものかを特定することはできなかった。残りの7サンプルには2名または3名のドナー由来と推測されるアレルピークがいくつか検出され、異なるドナー由来の白血球の混合を示唆する結果を示した。

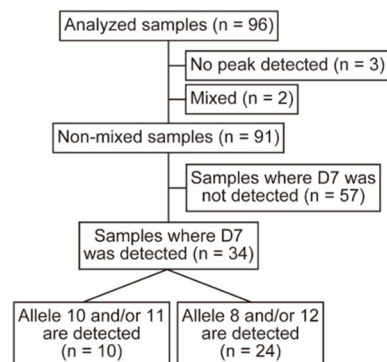


図1 .D7S820ローカスを選択した場合の単離白血球サンプルの分類

一方、セルソーティング法では、単離白血球 40 サンプル中、4 サンプルがドナーA の DNA 型と、11 サンプルがドナーB の DNA 型と、21 サンプルがドナーC の DNA 型と特定された。各サンプルにおけるアレル判定率は、最大値は約 82.8%、最小値は約 16.7%、平均値は約 52.8%であった。ドナーを特定できなかった 4 サンプルのうち、1 サンプルではアレルピークが全く検出されなかった。他の 1 サンプルでは、ドナーA および C に共通するアレルピークが 1 つだけ検出された。残りの 2 サンプルでは、2 人または 3 人のドナーに由来すると考えられるいくつかのアレルピークが検出された。

以上の成績から、限界希釈法では、解析した 30 サンプル中の 20 サンプル(66.7%)において、セルソーティング法では、解析した 40 サンプル中の 36 サンプル(90.0%)において、それぞれ個人を特定することができ、セルソーティング法は限界希釈法に比べて個人特定率の点で有効であると考えられた。

(2) 抗体の違いによる個人識別への影響の検討

ドナー2名の混合血痕試料を用いた。セルソーティング法により単離した各白血球の DNA 型を各ドナーの参照 DNA 型プロファイルと比較し、使用した抗体の違いによる個人識別への影響を検討した。

抗 CD3 抗体を用いて単離した白血球では、解析した 48 サンプル中、42 サンプルでドナーを特定することができた。各サンプルにおけるアレル判定率の平均値は約 55.3%と算出された。最大値は 90.0%、最小値は約 23.3%であった。ドナーを特定できなかった 6 サンプルは、いずれも両ドナー由来の白血球の混合を示唆する結果を示した。

抗 CD45 抗体を用いて単離した白血球では、解析した 48 サンプル中、42 サンプルでドナーの特定が可能であった。各サンプルにおけるアレル判定率の平均値は約 31.8%と算出された。最大値は 70.0%、最小値は約 3.5%であった。ドナーを特定できなかった 6 サンプルのうち、2 サンプルではアレルピークが全く検出されず、1 サンプルでは両ドナーに共通のアレルピークのみが検出された。残りの 3 サンプルは両ドナー由来の白血球の混合を示唆する結果を示した。

なお、どちらの抗体を使用しても DNA 型のフルプロファイルは得られなかった。

抗 CD45 抗体で標識したサンプルと、抗 CD3 抗体で標識したサンプルの解析結果を *t* 検定により比較したところ、両サンプルのアレル判定率に有意な差を認められた($p < 0.01$) (図 2)。

以上の成績から、シングルセルゲノム解析による混合血痕の関与者の DNA 型解析において、細胞標識に使用する抗体の違いがアレルの判定率に影響することが示された。また、本個人識別法では、抗 CD45 抗体よりも抗 CD3 抗体の方が有用であることが示唆された。

抗 CD3 抗体は T 細胞を標的とするのに対し、抗 CD45 抗体はすべての白血球を標的とする。血液中では白血球の大半を好中球とリンパ球が占めることを考慮すると、抗 CD45 抗体で標識した白血球の多くが好中球とリンパ球であったと推測された。このことから、標的とした白血球の種類が個人識別の成績に影響を及ぼしたと考えられた。すなわち、好中球はリンパ球と比較して短命であるとされており、本実験で示されたアレル判定率の差は標的とした細胞の寿命に起因する可能性が示唆された。

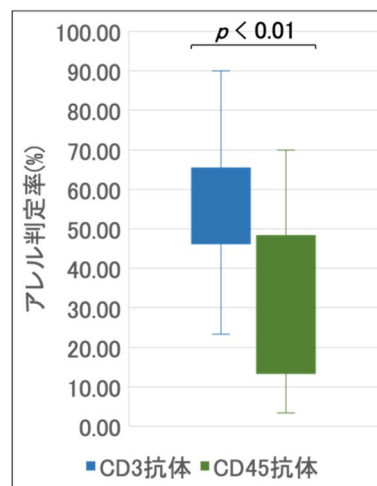


図 2 . 抗 CD3 抗体と抗 CD45 抗体を用いたシングルセルゲノム解析結果の比較

(3) DNA 型フルプロファイリングの検討

前項(1)と(2)で明らかになったように、セルソーティング法は混合血痕における個人特定に有効であるものの、いずれの抗体を用いても精度の高い個人識別に必要な DNA 型フルプロファイルを得ることはできなかった。この理由として、標的白血球の細胞寿命のほかに、本研究に使用する全ゲノム増幅法がランダムプライマーを利用した多重置換増幅であり、それに起因するアレル・ドロップアウトが複数のローカスで生じたことが考えられた。

そこで、DNA 型フルプロファイルを得るために、新たに「重ね合わせ法」と「WGA 産物混合法」を考案し、DNA 型判定への適用を試みた。

図3にドナー2名(D、E)の混合血痕試料を用いたアレール・スコアリングと重ね合わせ法による解析結果の一部を示す。アレール未検出サンプル等を除外した単離白血球 91 サンプルの中から、まず、D7S820 ローカスにアレールが検出された 34 サンプルを選び、[10、11]のアレールを持つグループ1(10 サンプル)と[8、11]のアレールを持つグループ2(24 サンプル)に分類した。次に、グループ1についてアレール・スコアリングを行い、ドナーDの参照DNA型プロファイルと比較したところ、D8S1179 ローカスのアレール13とアメロゲニンのアレールYがドロップインし、D8S1179 ローカスのアレール14とTH01 ローカスのアレール6がドロップアウトしたDNA型が推定された。この推定されたDNA型を持つサンプルについて重ね合わせ法を行った結果、アレール・スコアリングでドロップアウトした2つのアレールが復元された(D3S1358 ローカスのアレール15はピーク高比が20%を超えていたが、このローカスの3番目のアレールであったため除外された)。これにより、ドナーDのDNA型フルプロファイルを得ることができた。グループ2について、同様にアレール・スコアリングを行ったところ、全てのアレールがドナーEの参照DNA型プロファイルと一致し、このDNA型を持つサンプルを重ね合わせた結果、ドナーEのDNA型フルプロファイルを得ることができた。なお、アレールが4つ検出された他のローカスを選択した場合でも、両ドナーのDNA型フルプロファイルを得ることは可能であった。

アレール・スコアリング

Locus	D8	D21	D7	CSF	D3	TH	D13	D16	D2	D19	vWA	TPO	D18	Amel	D5	FGA	
Inferred alleles	D	14	30	10	10	16	6	11	9	21	14	17	8	18	X	12	22
				11	11	17	7	13	10	23	14.2	18	11	21		13	23
	E	13	30	8	11		6	10		17	12		9	11	X		21
		14	31.2	12	13	15	9	11	11	22	15.2	17	11	15	Y	13	25

重ね合わせ法



図3 . D7S820 ローカスを基にしたアレール・スコアリングと重ね合わせ法の結果

WGA 産物混合法を同じドナー(D、E)の混合血痕試料を用いて検討した結果の一部を図4に示す。アレール・スコアリングによってドナーD由来と推測された単離白血球 20 サンプルを WGA 産物混合法で解析した結果、アレール・ドロップイン(図中に赤矢印で示す)が1箇所認められたものの、アレール・ドロップアウトは全く認められず、ドナーDの参照DNA型と一致するエレクトロフェログラムを得ることができた。また、ドナーE由来と推測された51サンプルの解析においても、ドナーEの参照DNA型と同一の結果が得られた。

以上の成績から、アレール・スコアリングを用いた重ね合わせ法とWGA産物混合法は、どちらも混合血痕試料から関与者のDNA型フルプロファイルを得るのに有用な手法であった。本研究期間中には十分に検討できなかったが、アレール・スコアリングに代えて主成分分析を用いる手法や、複数個の単離白血球を集めて解析する手法などもDNA型フルプロファイリングには有効と考えられた。今後はこれらの手法を用いた解析も進めていきたいと考える。

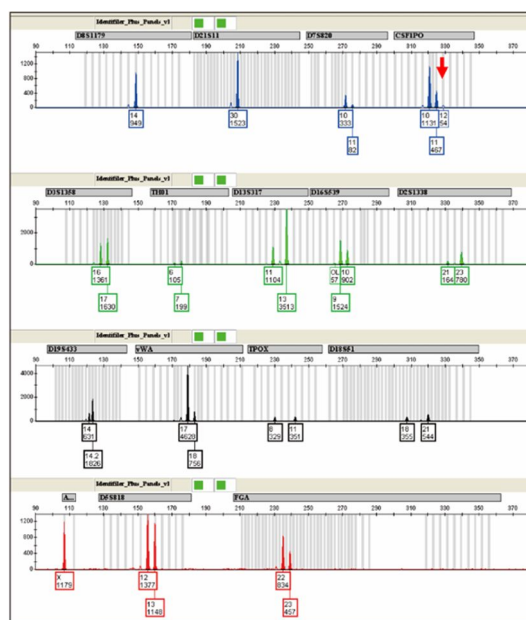


図4 . WGA 産物混合法の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 池本千紘, 山田俊輔, 同前友季子, 岡本元臣, 巽 健翔, 原 武史, 道上知美, 永井 淳	4. 巻 32
2. 論文標題 主成分分析を用いたシングルセルゲノム解析による混合血痕からの個人識別（第2報）	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 同前友季子, 三宅陽平, 林有里紗, 永井 淳, 道上知美
2. 発表標題 Personal identification from mixed and dried blood spots by single-cell genome analysis.
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dozen Y, Miyake Y, Hayashi A, Nagai A, Michiue T
2. 発表標題 Forensic identification from mixed and dried blood spots using single-cell genomic technique.
3. 学会等名 The 100th Annual Conference of the German Society for Forensic Medicine (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅陽平, 同前友季子, 岡本元臣, 巽 健翔, 林有里紗, 道上知美, 永井 淳
2. 発表標題 シングルセルゲノム解析による混合血痕からの個人識別 - DNA型フルプロファイリングの試み -
3. 学会等名 日本DNA多型学会第30回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 同前友季子, 岡本元臣, 三宅陽平, 巽 健翔, 今津有菜, 菊永紗央, 池本千紘, 赤座香予子, 道上知美, 永井 淳
2. 発表標題 シングルセルゲノム解析による混合血痕からの個人識別 (第3報)
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Dozen Y, Miyake Y, Yamada S, Okamoto M, Yoshimoto Y, Tatsumi K, Michiue T, Nagai A
2. 発表標題 Complete profiling of DNA types of each contributor from dried mixed-blood spot using single-cell genomic analysis
3. 学会等名 The 29th Congress of the International Society for Forensic Genetics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田俊輔, 同前友季子, 岡本元臣, 松本崇志, 吉本多伊貴, 松代皓太, 巽 健翔, 菊永紗央, 道上知美, 永井 淳
2. 発表標題 シングルセルゲノム解析技術を用いたDNA型フルプロファイリングにおいて必要な細胞数の検討
3. 学会等名 第44回日本法医学会学術中部地方集会・第69回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 同前友季子, 山田俊輔, 岡本元臣, 道上知美, 永井 淳
2. 発表標題 シングルセルゲノム解析による混合血痕からの個人識別に有効な新規DNA型フルプロファイリング法の開発
3. 学会等名 日本DNA多型学会第31回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池本千紘, 山田俊輔, 同前友季子, 岡本元臣, 原 武史, 道上知美, 永井 淳
2. 発表標題 Single-cell profiling from mixed-blood spots using principal component analysis
3. 学会等名 第107次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田俊輔, 岡本元臣, 同前友季子, 巽 健翔, 池本千紘, 赤座香予子, 道上知美, 永井 淳
2. 発表標題 4細胞を用いたシングルセルゲノム解析による乾燥混合血痕からの個人識別
3. 学会等名 第107次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池本千紘, 山田俊輔, 同前友季子, 岡本元臣, 巽 健翔, 原 武史, 道上知美, 永井 淳
2. 発表標題 主成分分析を用いたシングルセルゲノム解析による混合血痕からの個人識別 (第2報)
3. 学会等名 日本DNA多型学会第32回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamada S, Dozen Y, Tatsumi K, Okamoto M, Ikemoto C, Michiue T, Nagai A
2. 発表標題 Individual identification from mixed-blood spots by using 4 cells with single-cell genomic analysis
3. 学会等名 23rd Triennial Meeting of the International Association of Forensic Sciences (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田俊輔, 池本千紘, 岡本元臣, 同前友季子, 菊永紗央, 稲泉 萌, 道上知美, 原 武史, 永井 淳
2. 発表標題 主成分分析を用いたシングルセルゲノム解析による混合血痕からの個人識別 (第3報) - 近親者の混合血痕における検討
3. 学会等名 第108次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岡本元臣, 山田俊輔, 菊永紗央, 同前友季子, 稲泉 萌, 松本宗和, 道上知美, 永井 淳
2. 発表標題 シングルセルゲノム解析を目的とした乾燥血痕からのアボトース段階の細胞の単離
3. 学会等名 第108次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------