

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460890

研究課題名(和文)トランスファー細胞からの斑痕試料における個人識別法の確立

研究課題名(英文) Individual identification of transferred cells from the stain samples.

研究代表者

丸山 澄 (MARUYAMA, Sayaka)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30366190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：顕微鏡下にてトランスファーした細胞をWGA法で増幅し、それをDNA試料とした。実際の法医学鑑定において用いられるmtDNA多型、常染色体STR多型およびY染色体STR多型検査のいずれにおいても、個人識別が可能となる結果が得られる細胞数を検討したところ、細胞は20個以上必要であると確認した。また、WGA後に精製を行うことで、より良好な結果が得られることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We collected transfer cells and used them to perform whole genome amplification (WGA) with the REPLI-g Single Cell Kit and purified it of the genomic DNA. As for the cell count, it is thought that 15-20 are necessary because a judgment of all inspection of mtDNA, autosomal STR and Y-STR is enabled.

研究分野：法医学

キーワード：個人識別 法医学 トランスファー細胞 WGA mtDNA多型 常染色体DNA多型 Y染色体DNA多型

1. 研究開始当初の背景

代表者は平成17、18年度および20、21年度に若手研究(B)を受け、日本人のミトコンドリアDNA多型を用いた個人識別を主な研究として行ってきた。その結果、ミトコンドリアDNAの識別能力の高さから、個人識別において重要な役割を果たすことが判明し、日本人における個人識別のデータベースおよびミトコンドリアDNAの系統樹を確立した。さらに近年では人種の推定にも応用されている。

これらの成果を実際の法医鑑識に発展させるため、平成23、24年度に若手研究(B)を受け、「ミトコンドリアDNA多型による混合斑痕試料からの個人識別方法の確立」について研究を行った。われわれ法医鑑識で取り扱う試料はその殆どが斑痕化し、微量で汚染され、腐敗かつ陳旧化する等、厳しい条件下に曝されていることから、DNAの収量も極少量であり、DNA型判定に苦慮することも多い。さらに斑痕試料から検出された型が一個人に由来するものなのか、あるいは複数人に由来するものなのかの識別は判然としないことが少なくない。そこで、細胞1個を採取し、DNA鑑定を行うことができれば、混合試料等からの容疑者を特定することは可能になることから研究を始めたが、細胞数1個では個人識別への応用は厳しいものであった。

そこでmtDNA多型、常染色体STR多型およびY-STR多型の法医鑑定で用いられるDNA検査について、微量な細胞数から個人識別が確実に判定できうる、細胞数および再検査についての検討が必要であった。

2. 研究の目的

犯罪現場等に遺留された血痕や唾液・精液斑についてDNA鑑定を行う場合、一個人に由来する試料なのかあるいは複数人に由来する試料なのか、DNA鑑定の結果からは判断できない。DNA型を構成する数種類の変異が検出されたに過ぎない。そこで斑痕試料から細胞を確実に採取しDNA鑑定を行うことができれば、問題は解決するものと思われる。

代表者は、斑痕試料から細胞を浮遊させ、顕微鏡下でマイクロマニピュレーションテクニックを用いて細胞を確実に採取し、ミトコンドリアDNA(mtDNA)、常染色体のSTR多型およびY染色体のSTR多型による個人識別を試みる。

さらに、DNA型検査による個人識別に必要な細胞数の検討、より少ない細胞数での検査方法を見出し、DNA鑑定の精度向上を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料

男性4例(A~D)、および女性3例(E~H)、計

7例(A~H)について、アプリケーターチップを用いて口腔粘膜を擦過し、室温で放置・乾燥させて斑痕試料を作製した。

(2) 方法

細胞採取

アプリケーターチップの一部を切り取り、PBS Buffer (pH7.4) 1mlに浸し、倒立型リサーチ顕微鏡 CKX41N-31PHP (OLYMPUS)、トランスファー装置 CellTram vario (eppendorf) および TransferMan NK2 (eppendorf) を使用し、CellTram vario の先端にはフィルターチップを応用して細胞を採取する。採取した細胞を REPLI-g Single Cell Kit (QIAGEN) により Whole Genome Amplification (WGA) を行い(最終収量 50 μ l)、WGAにより増幅したDNAの40 μ lを QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製した(最終収量 50 μ l)。

DNA多型検査

精製されたDNAを用いて mtDNA多型(nt.15978-16421)、常染色体STR多型検査(GlobalFiler® PCR Amplification Kit (Life Technologies)) および Y染色体STR多型(PowerPlex® Y23 System (Promega)) の各DNA型検査について行った。

検査は、これまで行ってきた細胞数1個では個人識別には応用できる結果が得られず、また、トランスファーした細胞を直接PCR増幅に用いると、1度の検査で消費してしまうことから、WGA法で増幅した試料をDNA検査に用いることとした。そこで今回行った細胞数は5および10個で、WGA法により増幅した試料を用いた場合の検査を行った。

さらに、細胞数を15、20および30個に設定しWGA法により増幅した試料を用いた場合およびWGA法で増幅後に精製を行った場合の比較を行った。これらの結果を受け、細胞数20個の試料について、PCR増幅から同条件で5回ずつ行うことで再現性の確認を行った。STR型検査におけるalleleの各DNA型検出にはRF値を100とした。なお、各自のDNA型については事前に検査し、型判定の正否の対照資料とする。

判定にはこれまで代表者が行ってきたミトコンドリアDNA多型データおよび既報のデータからミトコンドリアDNAの型判定および系統を判断し個人識別を行う。

本研究は、日本大学歯学部倫理委員会(倫理2011-19)に諮り承認を得た。

4. 研究成果

(1) これまで行った、トランスファーした細胞を直接DNA型検査用のPCR溶液に入れ増幅する方法は、1回の検査で細胞を全消費してしまうという欠点があった。法医鑑定では

再検査が必要な場合もあり、DNA は保存しておかなければならない。そのため、再検査が可能となるよう、細胞数 5 個および 10 個のトランスファー細胞を WGA キット (REPLI-g Single Cell Kit) を用いて増幅し、それを試料として各 DNA 型検査を行った。

DNA 量の測定値から良好な DNA が採取されたように思われたが、mtDNA 型を検査した結果、細胞数 5 個で判定不可であった。また、常染色体および Y 染色体 STR 型においてすべての locus が検出されたわけではなく、常染色体 STR 型では細胞数 10 個で型判定が可能な allele 数は増加したが、Y-STR 型の型判定が困難な例も認められた。

さらに、細胞数が増加したにも関わらず、判定可能な locus 数が減少など、不安定な結果を示した。これらは、採取時または精製時の手技による問題、あるいは、非常に微量な試料であるため WGA 法による増幅で DNA が均一に増加しなかったと考えられる。

しかし、WGA キットの最終量が 50 μ l であるため、再検査を行うことが可能となる。そのため、同条件で 2 回以上の DNA 多型検査が行え、より確実な識別になることが判明した。

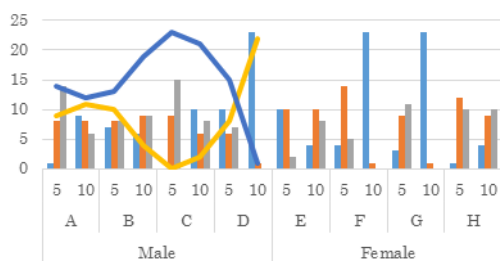


図 1 細胞数 5 個および 10 個における DNA 型検査の判定結果

Autosomal STR ; : 判定可、- : 一方の allele のみ判定可、 : 判定不可

Y-STR ; : 判定可、 : 判定不可

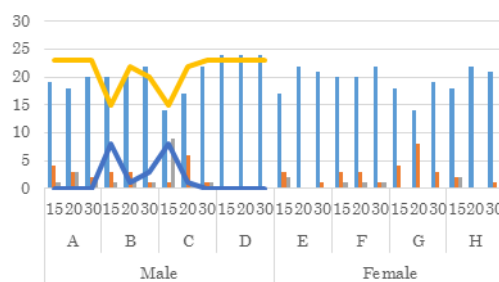
(2) (1)の結果から mtDNA 多型検査および Y-STR 多型検査では 10 個以下の細胞数でも判定可能な試料も認められた。しかし、法医学的鑑定では mtDNA 型、常染色体および Y 染色体 STR 型のいずれも必要とされることがある。そこで個人識別が確実に言い得る細胞数を確認するため、細胞数を 15、20 および 30 個と増やし、mtDNA 多型、常染色体および Y 染色体 STR 多型の検出の可否について検討した。

mtDNA 型検査では、すべての試料から個人識別可能な結果が得られ、検出された範囲に認められた変異は被験者の血液のデータと一致した。常染色体 STR 型判定ではすべての allele が検出された sample は、細胞数 15 個から認められた。しかし、ピークの高さが均等でなく、型判定に注意が必要な試料も認めら

れた。WGA 法による増幅の際に、元の試料が微量なため、すべての allele が均等に増幅されなかった可能性が考えられ、WGA の過程の考慮が必要であった。Y-STR 型判定における個人識別には 15 個以上の細胞が必要と判定した。

以上のように、mtDNA 多型検査および Y-STR 多型検査では 10 個以下の細胞数でも判定可能な試料も認められたが、mtDNA 型、常染色体および Y 染色体 STR 型の検査結果が個人識別の判定資料とされるためには、細胞数は 15~20 個必要であり、20 個以上の細胞が採取可能であればより確実と考えられる。

精製前



精製後

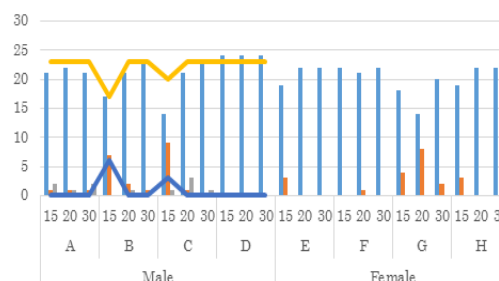


図 2 細胞 15、20 および 30 個における DNA 型検査の判定結果

Autosomal STR ; : 判定可、- : 一方の allele のみ判定可、 : 判定不可

Y-STR ; : 判定可、 : 判定不可

(3) (2)の結果から 3 種の DNA 型検査すべてにおいて個人識別が可能となるには 20 個以上必要であることが予想された。そこで、細胞数 20 個を試料とし PCR 増幅から同じ条件下で 5 回ずつ検査することによる結果の信頼性に対する検証を行った結果を図 3 に示す。

mtDNA 型検査では、すべての試料で判定可能な結果が得られ、mtDNA 多型検査において、細胞数 20 個は、DNA 鑑定に十分応用可能な数であると確認された。

常染色体 STR 型判定では細胞数 20 個の場合の再現性の検査では、全 locus が判定可能となる試料は認められたが、ヘテロにおいてピークの高さが均等でない Locus が認められ、型判定に注意が必要であった。

被検者 A では全ての検査で再現され、被検者 C, D, E および F では、1~6 ローカスで判定不可能や一方の allele のみの検出であったが、個人識別にはさほど影響はないと思われた。GlobalFiler® PCR Amplification Kit の 24 ローカスのうち、被検者 B は最多 7 ローカス、および女性試料である被験者 G では Y indel および DYS391 を除く 22 ローカス中 5 ローカスはヘテロであるにもかかわらず、一方の allele のみ検出された。しかしながら、全ローカスの 2/3 以上は検出されており、個人識別を行う上で判定可能なローカス数と考えられる。その一方で、1/3 はホモ型の判定をされることから、再現性に比較的乏しい試料の存在を念頭に置く必要があると思われた。

Y-STR 多型検査では、これまで細胞数 15 個でも全ての allele が判定された試料が認められている。今回細胞数 20 個について、全てのローカスで型判定が可能で、再現性が確認された試料が認められた。また、DYS385 ローカスで一方の allele が検出されなかった試料は、他の allele はすべて判定可能であったため、個人識別には影響はないものと考えられた。以上のことから、細胞数 20 個未満でも mtDNA や Y-STR 多型の全 locus が判定可能な試料も認められた。しかし、常染色体 STR 多型検査においては細胞数 20 個未満では、個人識別には少なからず影響がある試料も認められた。再現性の実験により mtDNA、常染色体 STR および Y-STR 多型検査いずれも個人識別に応用可能である細胞数は、20 個以上であることが確認された。

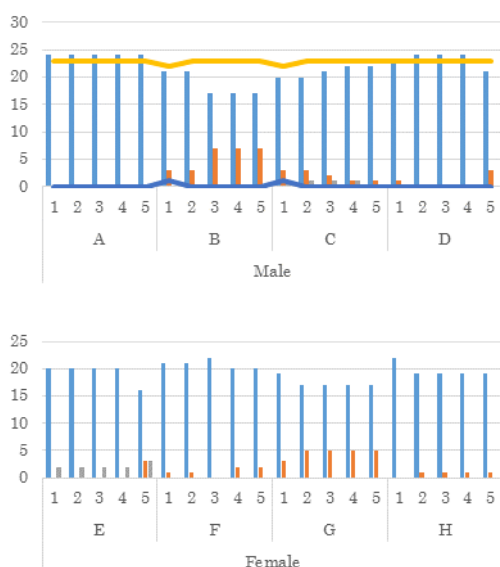


図3 細胞 20 個による再現性の確認
Autosomal STR ; : 判定可、- : 一方の allele のみ判定可、 : 判定不可
Y-STR ; : 判定可、 : 判定不可

(4) 3 年間進めた研究により、トランスファー細胞による DNA 型検査は 20 個以上の細胞が必要であると確認された。また WGA 法を用い、さらに精製を行うことでより良好な結果が得られるようになった。しかし、法医鑑識試料は微量な試料であることが多く、いずれトランスファー細胞 1 個で全ての検査が可能となるよう、さらなる検討が必要である。また、非常に微量な試料を扱うため、コンタミネーションに対する配慮が非常に重要である。今後、これらの手法により、複数人に由来する斑痕試料から 1 細胞ずつトランスファーすることで、混合斑痕試料からの個人識別における新たな手法になり、識別能力の向上に貢献するものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

丸山 澄、伊澤 光、堤 博文、小室 歳信

トランスファー細胞による DNA 型検査の再現性. 査読無、DNA 多型、25、2018 (印刷中)

〔学会発表〕(計 6 件)

丸山 澄

トランスファー細胞による DNA 型検査の再現性

日本 DNA 多型学会第 25 回学術集会

平成 28 年 12 月 2 日

東京大学大気海洋研究所 (千葉県柏市)

丸山 澄

微量試料からのトランスファー細胞を用いた DNA 型解析

第 58 回歯科基礎医学会学術大会

平成 28 年 8 月 26 日

札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

丸山 澄

微量試料からのトランスファー細胞による DNA 型判定 - 第 2 報 -

第 100 次日本法医学会学術全国集会

平成 28 年 6 月 17 日

きゅりあん (東京都品川区)

丸山 澄

微量試料からのトランスファー細胞による DNA 型判定.

第 84 回日本法医学会学術関東地方集会

平成 27 年 10 月 24 日

日本歯科大学 (東京都千代田区)

丸山 澄

4種類のWGA法によるトランスファー
細胞からのDNA解析
第99次日本法医学会学術全国集会
平成27年6月12日
高知市文化プラザかるぼーと(高知県高知市)

丸山 澄

Analysis of DNA from the transfer cell by
Genotyping by REPLI-g Single Cell Ki
9th International Symposium on ADVANCES
IN LEGAL MEDICIN .
平成26年6月19日
福岡国際会議場(福岡県福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 澄 (MARUYAMA, Sayaka)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30366190