

機関番号：3 2 4 0 9

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：2 0 5 9 0 6 8 4

研究課題名（和文） レーザーマイクロダイゼクションを用いた指紋隆線試料からの DNA 解析法の構築

研究課題名（英文） STR genotyping of the DNA fragments from fingerprint-lines captured by using a laser microdissection method

研究代表者

原 正昭（HARA MASAOKI）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：5 0 1 2 9 1 6 0

研究成果の概要（和文）：

テープに付着させた指紋試料からの Short Tandem Repeat（STR）解析を行ったところ、1個の指紋付着試料（約 200mm<sup>2</sup>大）からでも十分に STR 型判定が可能であることが判明した。次に、メンブレン付きスライドガラスに指紋を付着後、レーザーマイクロダイゼクション装置を用いて指紋の隆線部分を採取し、微量な隆線試料からの STR 型解析が可能であるか否かについて検討したところ、10×6mm 大で 12～6 ローカス、7×4mm 大で 7～2 ローカス、7×2mm 大で 4～1 ローカスの STR 型が判定された。

研究成果の概要（英文）：

The short tandem repeat (STR) genotyping of the extracted DNA from the single print of tape adhere the fingerprint (200mm<sup>2</sup>) were performed, resulted in STR genotyping of the single print could be identified easily. Next study, to reveal the DNA extracted from refined single line of fingerprint on the microslide glass, STR genotyping of DNA sample from the single line was performed. A STR genotyping was identifiable 12～6 loci in 10x6mm, 7～2 loci in 7x4mm and 4～1 loci in 7x2mm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2 0 0 8 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2 0 0 9 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2 0 1 0 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総 計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：レーザーマイクロダイゼクション、指紋、STR、リアルタイム PCR

## 1. 研究開始当初の背景

法医学領域における犯罪捜査・個人識別・親子鑑定等において、DNA(STR)多型検査が最も有用な検査項目となっており、国内外の研

究動向もより陣旧な試料や微量な試料からの STR 解析が進められている。また、近年、犯罪現場に残された証拠試料から被疑者を特定するための有力な手段のひとつとして、

皮膚接触痕からの DNA 型解析が注目されてきている。また、レーザーマイクロダイゼクション装置を用いることで、さらに今まで以上に微量な DNA 試料採取が可能となり、複数の細胞が混在したような試料からでも、単独の DNA 型検査への応用が期待されている。

## 2. 研究の目的

指紋は、終生不変・万人不同で、個人識別上、最も簡便で確実な方法であり、指紋照合が一致すれば、当然 DNA 解析の必要性はない。しかし、実際の捜査現場における指紋採取状況は、不鮮明で個人を対照できない部分象痕が多数存在する。本研究の目的は、そうした個人判別不能な指紋の一部の隆線部位からの DNA 解析による個人識別が可能であるか否かを明らかにすることである。また、複数人の混合した指紋試料であっても、隆線が重なってない部位を使用することにより、個別の個人識別を可能にすることが予想されるので、レーザーマイクロダイゼクション装置をもちいて、指紋の一部の隆線部位を摘出し、微量な隆線試料からの DNA 抽出法を構築すると共に、同試料からの DNA 解析が可能であることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 1 個の指紋付着試料からの DNA 抽出並びに STR 型判定

クリアファイルに両面テープを貼り付け、その上に示指第一関節部の指紋を付着させ、その指紋付着部分を約 200mm<sup>2</sup> 大に滅菌メスで切り取り、1.5ml のマイクロチューブ内に採取し DNA 抽出試料とした。DNA 抽出方法は、QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN 社) と DNA Extractor FM Kit (WAKO 社) の 2 法で実施した。抽出 DNA 試料からの DNA 解析は、市販の AmpFLSTR Identifiler™ Kit を用いて、15

ローカスの STR 型およびアメロゲニンローカスの型判定を実施した。

## (2) 指紋隆線部分からの STR 型判定

メンブレン付きのスライドガラスに示指第一関節部を付着させ、同部にアルミニウム粉末を添加した。同作成指紋試料についてマイクロダイゼクション装置を用いて、指紋隆線部分を約 10×6 mm 大 (隆線数: 約 24~18 本)、約 7×4 mm 大 (約 13~8 本)、約 7×2 mm 大 (隆線数: 約 12~6 本) を採取した (図 1 参照)。採取後、直ちに DNA Extractor FM Kit を使用し DNA 抽出した。抽出 DNA 試料は前記 (1) - と同様の方法で STR 型解析を実施した。

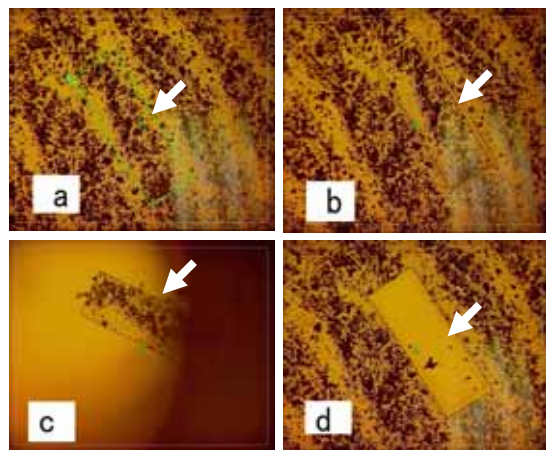


図 1 レーザーマイクロダイゼクションを用いた指紋試料採取の概略

- a: 採取部位を決定 (緑線)
- b: 紫外線レーザーを照射しメンブレン部分を切断
- c: 切断試料をキャップに飛ばし採取したところ
- d: 隆線採取後の切り取り跡

## (3) 指紋抽出試料中のヒト DNA 濃度測定

メンブレン付きのスライドガラスに前記 (2) - と同様に指紋試料を作成後、15×8 mm 大 (Y1)、10×8 mm 大 (Y2)、10×6 mm 大 (Y3)、10×3mm 大 (Y4)、10×1.5mm 大 (Y5) の各試料から、DNA Extractor FM Kit を用いて DNA 抽出を実施した。同抽出試料について、市販のヒトゲノム定量キット (タカラバイオ社)

を用いてリアルタイム PCR 法によりヒト DNA 濃度測定を行った。リアルタイム PCR 増幅は、同キットの SYBR Premix Ex Taq 及び D17Z1 Primer Mix を含む 23  $\mu$ l の反応液中に、抽出 DNA 試料 2  $\mu$ l を加えた 25  $\mu$ l をキットのプロトコールに従って、リアルタイム PCR 装置 Smart Cycler (Cepheid 社) で行い、増幅産物について融解曲線分析を行った。濃度測定後、同抽出 DNA 試料は前記(1)と同様の方法で STR 型解析を実施した。

#### 4. 研究成果

(1) 1 個の指紋付着試料からの DNA 抽出並びに STR 型判定

両面テープに付させた 1 個の指紋試料 (約 200mm<sup>2</sup> 大) からの DNA 抽出およびその解析結果を表 1 に示した。No.1~No.4 指紋試料とも AmpFLSTR Identifiler™ Kit による 15 ロークアの STR 型並びにアメロゲニンロークアによる性別判定が可能であった。また、今回使用したよう化ナトリウム法 (DNA Extractor FM Kit) とカラム法 (QIAamp DNA Micro Kit) の 2 法を比較したところ有意な差は認められなかった。(図 2、表 1 参照)

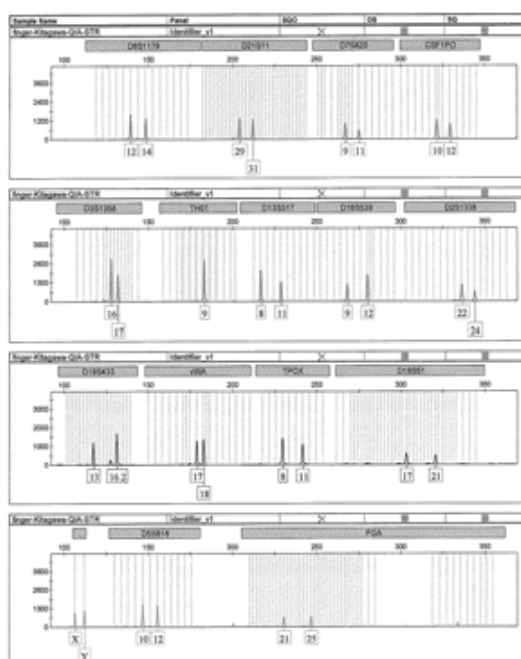


図 2 一個の指紋付着試料 (約 200mm<sup>2</sup> 大) か

らの STR 型判定結果 (No.1 の DNA Extractor FM Kit 抽出試料:判定された 15 の STR 型は、すべて既知の型と一致した。)

表 1 両面テープに付着させた指紋 1 個を用いた DNA 抽出ならびに STR 解析結果

抽出法	No.1	No.2	No.3	No.4
DNA Extractor FM Kit				
QIAamp DNA Micro Kit				

: 15 ロークアの STR 型が既知の型と全て一致

(2) 指紋隆線部分からの STR 型判定  
隆線試料約 10×6 mm 大では 12~6 ロークア、7×4 mm 大では 7~2 ロークア、7×2 mm 大では 4~1 ロークアの STR 型判定が可能であった。しかし、使用量が少なくなるに伴いアレルドロップアウト現象 (本来ヘテロ型であるのにホモ型と誤判定される現象) やコンタミ現象による判定不能なロークアが出現してきた (表 2 参照)

表 2 指紋試料からの STR 判定成績

試料面積 mm 大(隆線数)	正確に検出されたロークア数 ( /15)	
	No.1	No.2
10×6 (18~24 本)	12	6
7×4 (8~13 本)	7	2
7×2 (6~12 本)	4	1

(3) 指紋抽出試料中のヒト DNA 濃度測定  
市販のヒトゲノム定量キットを用いてリアルタイム PCR 法で指紋抽出試料中の DNA 濃度の定量結果を図 3 及び表 3 に示した。Y1~Y5 の全試料について、DNA 増幅が確認された。中でも試料面積 15×8 mm 大(Y1)が 450 pg、

10×8mm 大(Y2)が 550pg の回収量が得られ、STR 解析結果も 14～15 ローカスの STR 型判定が可能であった。しかし、10×6mm 大(Y3)以下では 25pg～50 pg しか回収量が確認されず、STR 型判定も 2～6 ローカスしか検出されなかった(図 4 参照)。

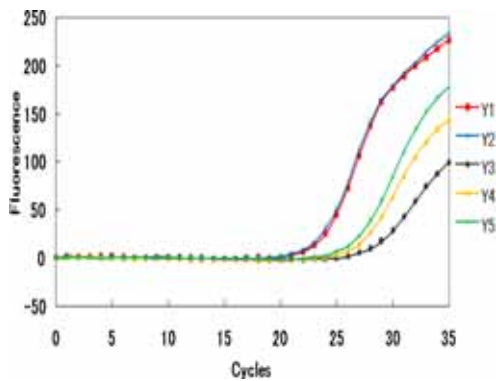


図 3 指紋抽出試料からのヒトゲノム DNA 定量キットによる DNA 増幅曲線

Y1 : 15×8mm 大, Y2 : 10×8mm 大,  
Y3 : 10×6mm 大, Y4 : 10×3mm 大,  
Y5 : 10×1.5mm 大

表 3 ヒトゲノム定量キットを用いたリアルタイム PCR 定量結果

試料	ヒト DNA 定量キット			正確に判定されたローカス数 (/15)
	回収量 (pg)	濃度 (pg/μl)	Melt Peak (°C)	
Y1	450	18	83.98	14
Y2	550	22	84.1	15
Y3	25	1	84.1	2
Y4	25	1	84.1	3
Y5	50	2	83.98	6

以上の結果から、15×8mm 大程度の指紋付着物からでも 450pg の DNA の回収が可能であり、10 数ローカスの STR 型判定が可能であることが示唆された。しかし、前記(2)の結果と同様に、試料の使用面積が少なくなるに伴いアレルドロップアウト現象やコンタミ

現象による判定不能なローカスが出現してきたので、今後は、より微量な指紋隆線試料からの解析については、さらに WGA 法(全ゲノム増幅)等の検討を実施しより確実性を高める必要が考えられた。

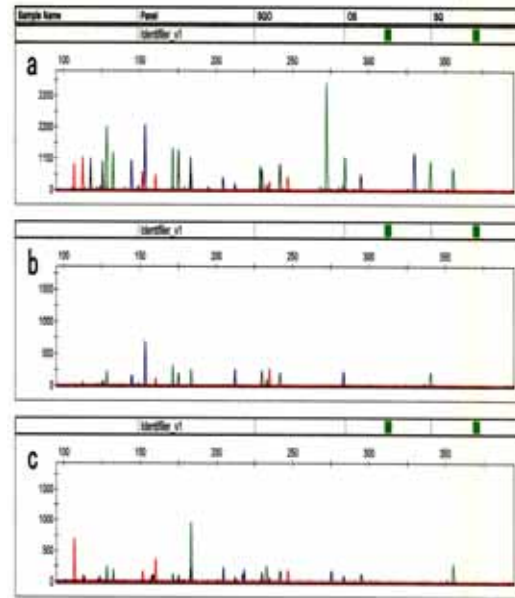


図 4 指紋抽出試料の DNA 濃度定量試料後の STR 解析結果

(AmpFLSTR Identifiler™ Kit を用いた PCR 増幅結果)

- a: 15×8 mm 大(Y1)
- b: 10×3mm 大(Y4)
- c: 10×1.5mm 大(Y5)

#### 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 12 件)

Hiroaki Nakanishi, Takeshi Ohmori, Masaaki Hara, Aya Takada, Hideki Shojo, Noboru Adachi, Kazuyuki Saito: A Simple Identification Method of Saliva by Detecting Streptococcus salivarius Using Loop-mediated Isothermal Amplification. J Forensic Science 56 S1. 158-161, 2011. (査読有)

原正昭, 高田綾, 斎藤一之, 木戸啓, 亀山浩, 山本靖久: クマネズミ胃内容物からのヒ

ト STR 型解析の検討 . DNA 多型 . Vol.18. 144-147. 2010. ( 査読有 )

Hiroaki Nakanishi, Akira Kido, Takeshi Ohmori, Aya Takada, Masaaki Hara, Noboru Adachi, Kazuyuki Saito: A novel method for the identification of saliva by detecting oral streptococci using PCR. Forensic Science International 183, 20-23, 2009. ( 査読有 )

Masaaki Hara, Akira Kido, Aya Takada, Takasi Miyazaki, Kazuyuki Saito: STR genotyping of extracted from used Triage kits. Forensic Science International : Genetics Supplement Series 2, 157-158, 2009. ( 査読有 )

Atsushi Nagai, Masaaki Hara, Akira Kido, Aya Takada, Kazuyuki Saito, Yasuo Bunai : Sequence polymorphisms at the DXS6789, DXS8377 and DXS101 loci in Asian populations. Forensic Science International : Genetics Supplement Series 2, 49-50, 2009. ( 査読有 )

M Hara, A Kido, H Kameyama, A Takada, T Miyazaki, K Saito: STR and Y-STR genotyping assays of 25-year-old semen stains. Forensic Science International, Genetics Supplement Series 1, 428-429, 2008. ( 査読有 )

T. Miyazaki, M. Hara, A. Ichiki, Y. Yamamoto, A. Takada, A. Kido, M. Nodera, H. Yanagisawa, H. Suzuki, K Saito : A novel method for efficient analysis of STR loci from a single sperm captured by laser microdissection. Forensic Science International, Genetics Supplement Series 1, 437-438, 2008. ( 査読有 )

[ 学会発表 ] ( 計 18 件 )

永井 淳 : DXS10135 および DXS10146 の構造多型 . 日本 DNA 多型学会第 19 回学術集会 2010.11.19 ( 静岡 )

原正昭 : クマネズミの食壊により顔面部のみが白骨化した一剖検例 . 第 94 次日本法医学会学術全国集会 2010. 6.25 ( 東京 )

Masaaki Hara: STR genotyping of extracted from used Triage kits. 23<sup>rd</sup> World Congress. International Society for Forensic Genetics, 16 Sept 2009. ( Buenos Aires, Argentina )

Atsushi Nagai: Sequence polymorphisms at the DXS6789, DXS8377 and DXS101 loci in Asian populations. 23<sup>rd</sup> World Congress. International Society for Forensic Genetics, 16 Sept 2009. ( Buenos Aires, Argentina )

Masaaki Hara: Genetic data on Y-chromosome STR loci in Japanese, Bangladeshis, and Indonesians using an AmpF/STR Yfiler kit. DNA in Forensics 2008. 30 May 2008. ( Ancona Italy )

Tamura A: Genetic studies of eight X-STRs in the Japanese population. 7<sup>th</sup> International Symposium Advances in Legal Medicine. 5 Sept 2008. ( Osaka Japan )

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

原 正昭 ( HARA MASA AKI )  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 50129160

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

齋藤 一之 ( SAITO KAZUYUKI )  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 10215535  
( H20 H21 : 研究分担者 )

高田 綾 ( TAKADA AYA )  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 30245196  
( H20 H21 : 研究分担者 )