

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 26 日現在

機関番号：32665
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23792524
研究課題名（和文） 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
研究課題名（英文） Establishment of the identification method from the mixed samples
by the mitochondrial DNA polymorphism.
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

研究成果の概要（和文）：

顕微鏡下にてトランスファーした1個の細胞から、直接ミトコンドリアDNAのHV1およびHV2を増幅させ、シーケンスにより配列を決定したところ、対象者本人のDNA型が検出された。また、1個の細胞からDNAを抽出し、PCR増幅を行ったところ、ミトコンドリアDNAの目的の範囲が増幅され、対象者本人のDNA型を検出した。

研究成果の概要（英文）：

HV1 and HV2 of mitochondrial DNA were amplified from one cell transferred under the microscope, and the array was decided by the sequence. As a result, a DNA type of a target person was detected. Moreover, when DNA was extracted from one cell, and PCR amplification was done, a target range of mitochondrial DNA was amplified, and detected a DNA type of the person of object person.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：個人識別、斑痕試料、ミトコンドリア DNA

1. 研究開始当初の背景

申請者は平成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。

今回、これらの成果を実際の法医鑑識に発展させようとするものである。

通常、他の研究者はDNAの純度が高いものを資料としているが、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、腐敗しかつ陳旧化する等、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。性犯罪に例えるならば、検出された結果から被害者のDNA型を差し引き、残った結果から容疑者のDNA型を推定する以外に方法はなく、積極的な証明法とは言い難い。人権擁護の観点からより確度の高い検査法の開発が期待されるところである。

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コンタミネーションの呪縛から逃れることができ、結果の信頼性は極めて高くなり、容疑者を特定することは可能になることから本研究を計画した。

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のである。人権擁護の観点からも決して冤罪を看過してはならず、確度の高い鑑定法が求められる所以である。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。

そこで、混合斑痕試料から細胞を浮遊させ、顕微鏡下で細胞(mtDNA)を確実に採取し、斑痕試料からのDNA鑑定の精度向上を図り、かつマイクロマニピュレーションテクニックを用いた方法論を確立する。顕微鏡下での細胞のトランスファーには、エッペンドルフ社製のTransferman NK2およびCelltram Varioを用いることで、複雑なマイクロマニピュレーションテクニックを正確に行うことができる。

最初は単独試料からの採取とし、この方法で採取した細胞から抽出したDNAを用いてmtDNAの検査が行えるのかを確認する。その後、複数人による試料へと段階を経て機器の操作方法およびマイクロマニピュレーションテク

ニックを習得する。通常の鑑定において用いられるDNAは、癩痕試料から一部を採取し、抽出することがほとんどであり、複数人のDNAが混在していることになる。今回のこの方法では一つひとつの細胞をそれぞれ採取・抽出することで個人の識別が行える。

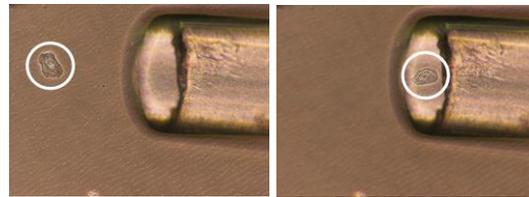
3. 研究の方法

(1) 試料

男性5例(A~E), および女性3例(F~H), 計8例について、アプリケーション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。試料作製後、数日以内、半年後および1年後に実験に用いた。

(2) 方法

口腔粘膜を擦過したアプリケーションチップの一部を切り取り、1.5ml チューブ内にてElution Buffer 1ml に浸して細胞を浮遊させ、その中から50 μ lを取り出しシャーレに分注する。倒立型リサーチ顕微鏡 CKX41N-31PHP (OLYMPUS), CellTram vario (eppendorf), 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1個を採取する。



ミトコンドリアDNAのPCR増幅には以下の3種類の方法を試みる。

- ① 滅菌水10 μ lが入った0.2ml チューブにトランスファー細胞を分注し、Tks Gflex™ DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて直接PCR増幅。
- ② 滅菌水10 μ lが入った0.2ml チューブにトランスファー細胞を分注し、AmpliAq Gold (life technologies) を用いて直接PCR増幅。
- ③ 2サンプルについて、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) の Buffer ATL 180 μ lが入った1.5ml のマイクロチューブにトランスファー細胞を分注した後、プロトコールに従ってDNAを抽出し、Buffer AE 50 μ lにて溶出した後、抽出DNA 10 μ l とAmpliAq Goldを用いてPCR増幅を行う。

ミトコンドリアDNAの検出領域はHV1 Fu11 (15978-16420), HV1 の前半(15978-16260), HV1 の後半(16140-16420) およびHV2 (8-429)

とし、通報に従ってそれぞれを増幅させ、配列を決定し、型判定を行った。なお、対象者8名のミトコンドリア DNA 型については口腔粘膜細胞または血液を試料として事前に検査し、判定の対照とした。

判定にはこれまで申請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。

なお、本研究は日本大学歯学部倫理委員会に諮り承認を得た。

4. 研究の成果

一個人由来の斑痕試料から細胞1個をトランスファーし、ミトコンドリア DNA 多型を検査したところ、本人由来の配列が検出され、細胞1個からのミトコンドリア DNA 多型解析は可能であった。また、トランスファー細胞から直接 PCR 増幅した場合および QIAamp DNA Mini Kit を用いて抽出を行った場合にも検査は可能であった。さらに、採取から数日以内、半年および1年を経て判定が可能であった試料についてシーケンス解析に差は認められなかった。しかし、斑痕試料作製後数日以内の試料であっても検出されないものがいくつか認められた。

今回、PCR 増幅に使用した試薬は汎用されている AmpliTaq Gold または TaKaRa の Tks Gflex DNA Polymerase を用えており、シーケンス解析結果に違いは認められず判定可能であった。しかし、全ての試料から結果を得ることができず、検査方法にさらなる検討が必要であることが判明した。シャーレの中で細胞を浮遊させるための水溶液として滅菌水、生理食塩水および Buffer を用いたところ、滅菌水や生理食塩水では細胞をシャーレに注ぐとただちに沈下し、トランスファーが困難であった。そこでアプリークチャーチップの一部を1.5ml チューブに入れて細胞を浮遊させる場合、さらにシャーレの中で細胞を採取する場合には Buffer を使用すると良好な成績が得られた。

本研究で行った直接 PCR 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るため、方法③のようにトランスファー細胞1個から DNA 抽出を行い、その抽出液を用いてミトコンドリア DNA の検査を行った。2サンプルのみであったが、いずれも HV1 および HV2 の本人の配列が検出された。

今後、より高い検出率をめざすために PCR 酵素や Primer 設計および PCR 条件等について検討する予定である。また、抽出による検査について、抽出方法の研究を進め、今回は1細胞中に1000~10000個存在するミトコンドリア DNA 多型について検査を行ったが、1細胞中に1個の核の常染色体や性染色体 STR 型検査についても取り組むとともに、複数人に由来し、より陳旧度の高い斑痕試料からの DNA 解析についても検討する予定である。本研究は混合斑痕試料の個人識別における新たな手法になると期待される。

試料	採取から	方法	HV1 領域			HV2 領域
			Full	前半	後半	
A	半年後	①	○	○	○	○
		②	○	○	○	○
		③	○	△	△	○
B	直後	①	×	×	×	×
		②	○	○	○	○
		③	○	△	△	○
C	直後	①	×	○	×	○
		②	○	×	○	○
D	直後	①	×	○	×	○
		②	○	×	○	○
E	半年後	①	○	○	×	○
		②	×	×	×	○
F	直後	①	○	○	○	○
		②	○	×	○	○
G	1年後	①	○	○	×	○
		②	○	○	○	○
H	直後	①	○	○	○	○
		②	×	×	×	○

△: 未実験

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1件)

- ① 丸山 澄、伊澤 光、堤 博文、小室 歳信
斑痕試料におけるトランスファー細胞からのDNA解析. 査読無、DNA多型、21、2013 (印刷中)

[学会発表] (計3件)

- ① 丸山 澄
DNA抽出によるトランスファー細胞から

のDNA解析
第97次日本法医学会学術全国集会
平成25年6月28日 札幌市：ロイトン札幌
(発表予定)

- ② 丸山 澄
斑痕試料におけるトランスファー細胞か
らのDNA解析
日本DNA多型学会第21回学術集会
平成24年11月7日-9日 京都市:京都教育文
化センター

- ③ 丸山 澄
ミトコンドリアDNAによる日本人の多型解
析 (第2報)
第53回歯科基礎医学会学術大会・総会
平成23年10月2日 岐阜市：長良川国際会
議場

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