

Multiplex-PCR 法による人獣・個人同時識別法の検討

松田洋和、瀬尾泰久、柿崎英二、小澤周二、村岡恵里、湯川修弘

宮崎大学医学部法医学講座

緒言

我々はこれまでにミトコンドリア DNA (mtDNA) チトクロム *b* 領域を指標とした PCR 法による人獣鑑別法を確立した。この方法は、チンパンジーを含む霊長類の DNA は増幅せず、ヒト DNA のみを増幅する高い特異性を示した。しかし、チトクロム *b* 領域と個人識別に用いられている mtDNA 高変異領域 (D-loop) とが近接しているため、2つの領域を multiplex-PCR 法で同時に増幅することは困難であった。そこで、新たに人獣鑑別用の primer を設計することで、D-loop 領域の増幅と人獣鑑別が同時に行える multiplex-PCR 法を開発したので報告する。

材料及び方法

1. 試料

ヒト試料は、新鮮試料としてインフォームド・コンセントを得た血液・毛髪各 10 例を、陳旧試料として教室員から採取してあった 20 年経過した血痕、毛髪各 10 例を用いた。また身元の明らかでない 13-25 年前の人骨 5 例を用いた。動物試料はチンパンジー、ゴリラ、ニホンザル、カニクイザル、ブタ、ウシ、イヌ、ヤギ、ニワトリ、ラット、マグロの計 11 種の

血液を用いた。尚、本研究は宮崎大学医学部医の倫理委員会の承認を得て行われた。

2. DNA の抽出

新鮮血については 0.5 ml、毛髪は毛幹部 10 mm を、また陳旧試料として血痕付着ガーゼ片 5 x 5 mm、毛幹部 10 mm、人骨 20 mg をそれぞれ用いて、Wako 社製 DNA Extractor FM Kit で添付書類に従って DNA を抽出した。抽出した DNA はエタノール沈殿、風乾後、TE 緩衝液に溶解した。DNA 濃度は吸光度法で定量し、終濃度を 2 ng/μl に調製した。

3. PCR 増幅

1) primer の設計

コンピュータデータベース (Genbank) をもとに、ヒト及び霊長類の mtDNA の全長を比較し、NADH dehydrogenase サブユニットの ND4 領域におけるヒト特異的な塩基配列領域に primer を設定した (Table 1)。また mtDNA 高変異領域 (D-loop) HV-1 及び HV-2 の各 primer を Table 1 に示した。尚、ヒト及び各種動物の ND4 primer pair (L11233/H11570) 領域の塩基配列を Table 2 に示した。

Table 1 Primers used for amplification of ND4 and D-loop regions in mtDNA

primer	nucleotide sequence	primer pairs	multiplex-PCR
ND4			
L11233	5'-tcccctactcatcgcactaatttacact-3'	HV-1: HV-1-1: L15997/H16236 HV-1-2: L16159/H16401	HV-1-1/ND4 HV-1-2/ND4
H11570	5'-taattatgcctcataggatagtagacaagga-3'		
HV-1			
L15997	5'-caccattagcaccctaaagct-3'	HV-2: HV-2-1: L29/H285 HV-2-2: L172/H408	HV-2-1/ND4 HV-2-2/ND4
L16159	5'-tacttgaccacctgtagtac-3'		
H16236	5'-ctttggagttgcagttgatg-3'		
H16401	5'-tgatttcacggaggatggtg-3'		
HV-2			
L29	5'-ggtctatcacctattaaccac-3'		
L172	5'-attattatcgcacctacgt-3'		
H285	5'-ggggttggtggaaattttttg-3'		
H408	5'-ctgttaaagtcataccgcca-3'		

Table 2 Nucleotide sequences of the regions for L11233/H11570 primer pair in human and various animals

Human (NC001807)	-tcccctactcatcgcactaatttacact	~	tgtactataccctatgaggcataatta-
Chimpanzee (NC001643)	-c-----c--t--c	~	ca---g---t-----t-----c--
Gorilla (NC001645)	-c-----t-----t-----cc-----	~	c-cc-----tt---g---t-----c--
Monkey (NC002764)	-a---t-g--t--tat-----gcc-----c	~	-a-----c--
Pig (NC000845)	-a--a--g--ag-a-----g---t--tc	~	ca-g--t--a-----c--
Cow (NC001567)	-t-----t-ag-----t--tc	~	-a---c-----
Dog (NC002008)	-c--a--c--ag-a--t--cc---t--tc	~	aa--t-g--t-----c--
Chicken (NC001323)	-----ag--t-ca-cc-c---ct-	~	cacc---g-----tgccc-a--
Rat (X14848)	-c--a--ct-a--t--c--c-----a	~	ca-c--c--at-----

2) 検討項目

a) ND4 primer のヒト特異的増幅の検証

各種動物血液から抽出した DNA を用いて、L11233/H11570 primer pair で ND4 fragment の PCR 増幅を行い、各種属における増幅産物の有無について検証した。また、動物由来 DNA を試料とした場合の HV-1 及び HV-2 における増幅産物の有無についても検討した。反応液の組成は、10 x PCR buffer 5 μ l、dNTPs (2.5 mM) 1 μ l、primer (20 pM) 各 0.5 μ l、template DNA (2 ng/ μ l) 1 μ l、TaKaRa EX Taq (5 U/ μ l) 0.5 μ l とし、総量 50 μ l で反応させた。PCR 反応は、先ず ND4 fragment は initial denaturation 95°C 3 min、denaturation 95°C 30 sec、annealing 60°C 40 sec、extension 72°C 1 min を 40 cycle、final extension 72°C 7 min で行った。また D-loop 領域は initial denaturation 95°C 3 min、denaturation 95°C 30 sec、annealing 55°C 30 sec、extension 72°C 1 min を 40 cycle、final extension 72°C 7 min で行った。

b) 各種試料における ND4 fragment 及び D-loop 領域の PCR 増幅

multiplex-PCR 増幅を行うにあたり、先ず各種新鮮試料及び陳旧試料を用いて、ND4 fragment 及び各 D-loop 領域の single-PCR 増幅を行い、増幅産物の有無とその検出感度について検証した。

c) multiplex-PCR 増幅

multiplex PCR 増幅の primer の組み合わせは、HV-1-1/ND4、HV-1-2/ND4、HV-2-1/ND4 及び HV-2-2/ND4 の 4 種類 (Table 1) とし、それぞれの組み合わせについてヒト新鮮血から得た DNA を試料として PCR 条件を設定した。続いてヒト並びに動物の各種試料から抽出した DNA を用いて multiplex-PCR 増幅を行い、得られた結果について

single-PCR 増幅の結果と比較検討した。multiplex-PCR 増幅における反応液の組成は 10 x PCR buffer 5 μ l、dNTPs (2.5 mM) 1 μ l、ND4 primer (20 pM) 各 0.3 μ l、D-loop primer (20 pM) 各 0.7 μ l、template DNA (2 ng/ μ l) 1 μ l、TaKaRa EX Taq (5 U/ μ l) 0.5 μ l とし、総量 50 μ l で反応させた。PCR 反応は、initial denaturation 95°C 3 min、denaturation 95°C 30 sec、annealing 60°C 40 sec、extension 72°C 1 min を 40 cycle、final extension 72°C 7 min で行った。

4. シーケンシング

multiplex-PCR 増幅産物を MiniEluteTM PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製し、DNA 量として 3-10 ng をサイクルシーケンス (BigDyeTM Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction) に用いた。反応手順はキット添付のマニュアルに従い、順逆両方向よりサイクルシーケンス反応を行った。反応後、ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer を用いて各塩基配列を解析した。

5. STR 多型解析

今回用いた陳旧試料 (血痕、毛髪、人骨) の STR 多型解析を行い、増幅産物の検出率、検出限界について本法と比較検討した。STR 多型解析には Gene Print STR systems (Promega) を用い、CSF1PO 型、TPOX 型、TH01 型、F13A01 型、FESFPS 型、vWA 型の計 6 種類について、DNA 量 10 ng で添付マニュアルに従って PCR 増幅した。電気泳動は 5.5% 変性 PAGE で行い、銀染色してバンドを検出した。

結果及び考察

1. ND4 primer (L11233/H11570)

ヒト新鮮血から抽出した DNA を試料として、今回設定した ND4 primer で目的断片の PCR 増幅を行ったところ、340 bp 前後の明瞭なシングルバンドを

示す増幅産物を得た。この増幅産物についてはシーケンス解析を行い、ヒト mtDNA NADH dehydrogenase サブユニット ND4 コード領域の塩基配列と一致していることを確認した。そこで、各種動物血液から抽出した DNA を用いて ND4 fragment の PCR 増幅を行い、ヒト特異的増幅が可能であるかについて検討したところ、霊長類を含め今回検証した全ての動物試料からは ND4 fragment の増幅を全く認めず、ヒト DNA のみを増幅する高い特異性を示した (Fig. 1)。尚、新鮮血以外の試料、即ち毛髪、陳旧血痕、陳旧毛髪及び人骨から抽出した DNA についても全例で ND4 fragment の増幅が可能であった (データ示さず)。



Fig. 1 Amplification of the mtDNA ND4 fragment using DNA from human and various animals. M: 100 bp ladder marker, lane 1: human, 2: chimpanzee, 3: gorilla, 4: Japanese monkey, 5: crab-eating monkey, 6: pig, 7: cow, 8: dog, 9: goat, 10: chicken, 11: rat, 12: tuna, NC: negative control (no template DNA was added)

2. 動物試料における D-loop 領域の PCR 増幅産物

各種動物 DNA を試料として、今回用いた mtDNA D-loop 領域の HV-1 (L15997/H16236, L16159/H16401) 及び HV-2 (L29/H285, L172/H408) の PCR

増幅を行い、ヒト試料以外での増幅産物の有無について検証した。その結果、Fig. 2 に示されるように、多くの動物試料からヒトと同サイズの増幅産物が検出され、特に HV-2 では霊長類以外の動物試料からヒトと同サイズの増幅産物が検出された。今回用いた primer と異なる領域に設定されたものを用いれば或いは違った結果となったかもしれないが、我々の実験結果からは、D-loop 領域のみを PCR 増幅してその増幅産物が例え得られたとしても、用いた試料が真にヒトに由来するものか否かの判断は困難であると考えられた。

3. multiplex-PCR 増幅

ヒト及び各種動物血液から抽出した DNA を試料として、ND4 primer と HV-1 或いは HV-2 primer の組み合わせ (計 4 組) による multiplex-PCR 増幅を行った。その結果、何れの組み合わせであっても、ヒト試料の場合、目的サイズと一致する明瞭な 2 本のバンド、即ち上方にヒト由来を示す ND4 fragment、下方に各 D-loop 領域のバンドが検出された (Fig. 3)。一方動物試料では、全く増幅産物を認めないか (HV-1-1/ND4, HV-1-2/ND4)、或いは D-loop 領域にヒトと同サイズの非特異的増幅産物を認めた (HV-2-1/ND4, HV-2-2/ND4)。動物 DNA を試料とした D-loop 領域の single-PCR の結果からも明らかのように、D-loop 領域の PCR 反応ではヒト以外の試料から増幅産物が検出されやすい傾向にあると考えられ、これまでのように D-loop 領域のみを PCR 増幅

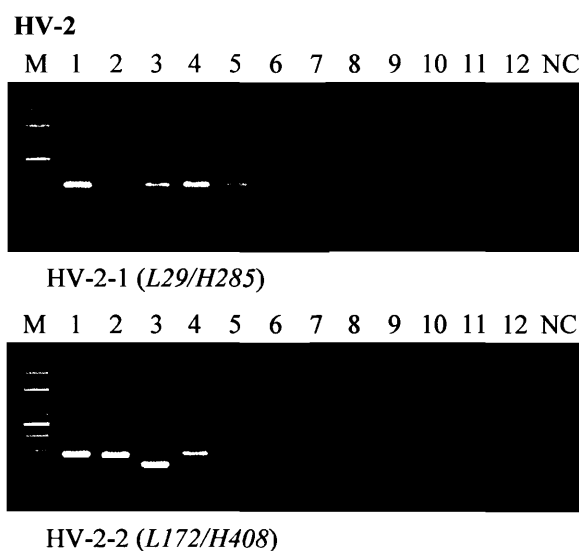
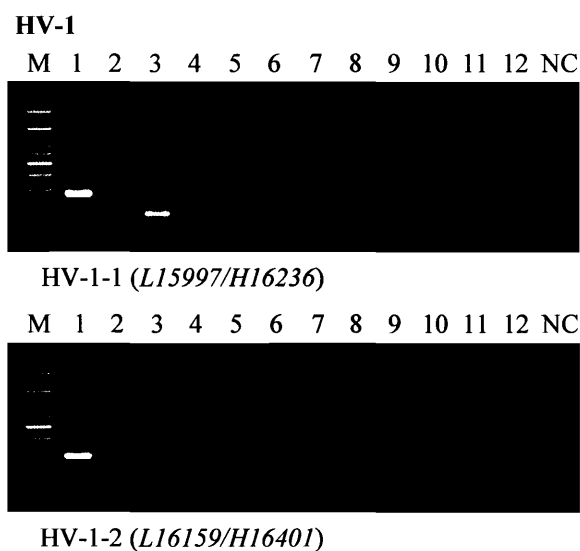


Fig. 2 Amplification products of the HV-1 and HV-2 using DNA from human and various animals. M: 100 bp ladder marker, lane 1: human, 2: chimpanzee, 3: gorilla, 4: Japanese monkey, 5: crab-eating monkey, 6: pig, 7: cow, 8: dog, 9: goat, 10: chicken, 11: rat, 12: tuna, NC: negative control (no template DNA was added)

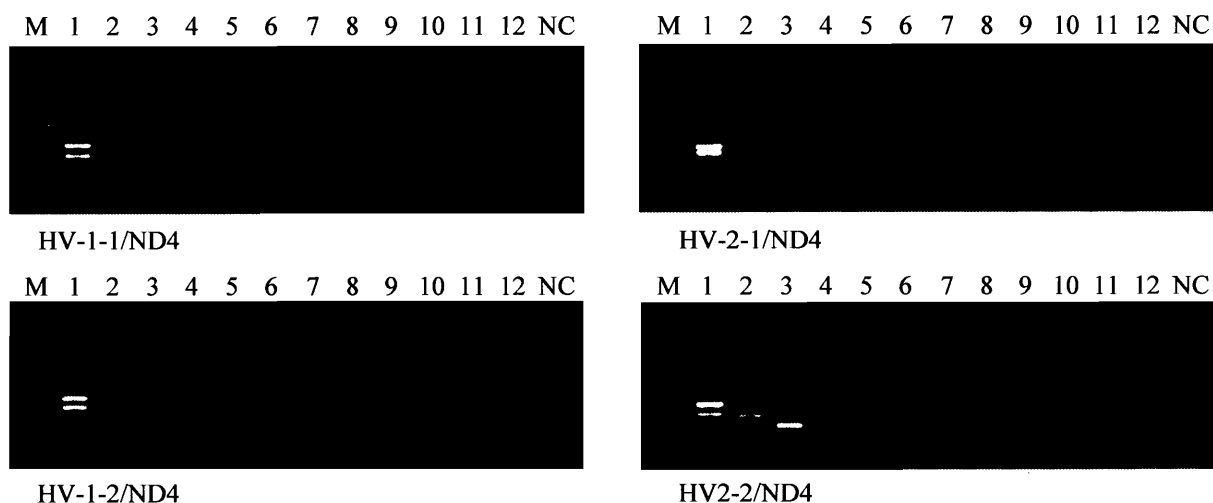


Fig. 3 Multiplex-PCR amplification using DNA from human and various animals. M: 100 bp ladder marker, lane 1: human, 2: chimpanzee, 3: gorilla, 4: Japanese monkey, 5: crab-eating monkey, 6: pig, 7: cow, 8: dog, 9: goat, 10: chicken, 11: rat, 12: tuna, NC: negative control (no template DNA was added).

してその増幅産物が得られたとしても、それが真にヒトに由来するものか否かの鑑別は困難であるが、本法によれば ND4 fragment の有無によってヒト試料かの鑑別が可能であった。また今回、人獣鑑別用の ND4 fragment の増幅サイズを約 340 bp に設定したが、これは個人識別を目的とする D-loop 領域の増幅サイズがほぼ 250 bp 前後であるため、それよりも長めの増幅サイズである ND4 fragment を検出することで、D-loop 領域を増幅するために必要なヒト DNA が残存しているとの指標にもなると考えられる。

続いて、ヒト新鮮血から抽出した DNA を 1024 pg/tube から 0.25 pg/tube の範囲で段階希釈したものを試料として multiplex-PCR 増幅を行い、本法の増幅感度を検証した。Fig. 4 に示されるように、各 multiplex-PCR 増幅では 4-16 pg の DNA があれば 2 本の増幅 DNA 断片として確認することできた。single-PCR 増幅では、ND4 fragment が 1-4 pg、D-loop 領域断片が 1-16 pg の DNA から増幅可能で (Fig. 4)、multiplex-PCR とすることで検出感度の低下は殆ど認められず、本法の感度は実用上十分に高いと考えられた。

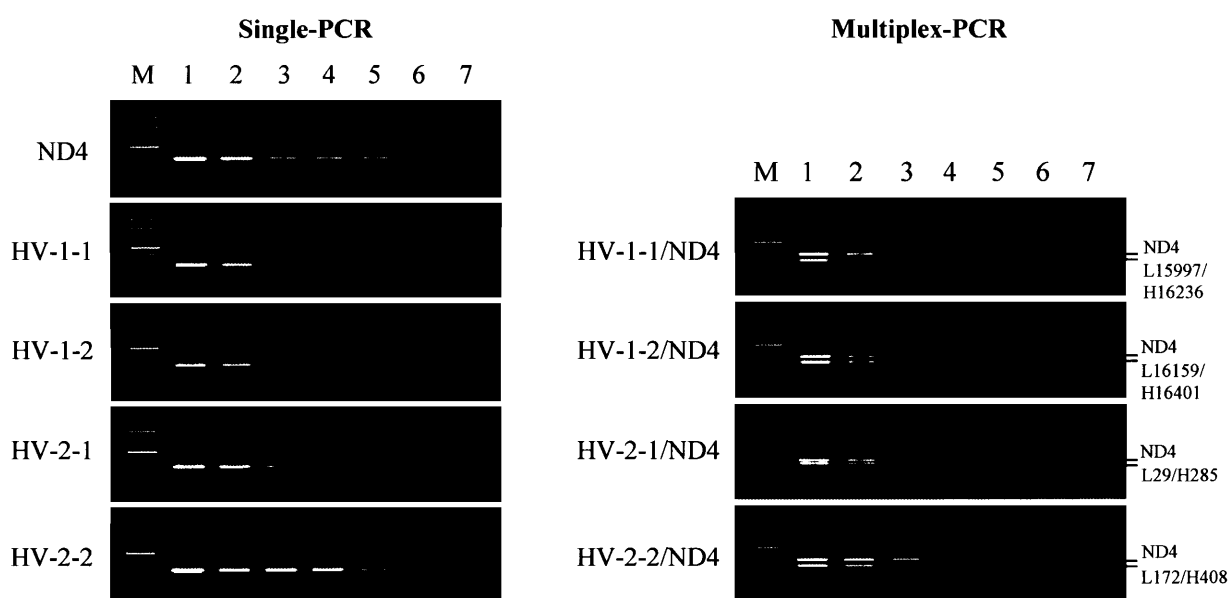


Fig. 4 Comparison of sensitivity in single-PCR and multiplex-PCR using four-fold serial dilution of human DNA. M: 100 ladder marker, lane 1: 1024 pg/tube of human DNA, 2: 256 pg/tube, 3: 64 pg/tube, 4: 16 pg/tube, 5: 4 pg/tube, 6: 1 pg/tube, 7: 0.25 pg/tube.

次に、陳旧試料での multiplex-PCR 増幅について検討した。先ず 20 年経過した血痕及び毛幹部から得た DNA を用いて検討したところ、全例で目的断片の増幅が可能であった (Fig. 5)。同様に、13-25 年保存してあった人骨から抽出した DNA を用いた multiplex-PCR 増幅においても、全例で増幅産物の検出が可能であった (Fig. 6)。そこで、同一人物より得た血痕及び毛髪試料各 3 例について、それぞれ 4 組の primer の組み合わせによる multiplex-PCR 増幅で得られた増幅産物についてダイレクトシーケンス解析を行った。その結果、本法によって得られた増

幅産物から D-loop 領域のシーケンス解析が可能であることが確認され (Fig. 7)、また single-PCR 増幅で得た個々の D-loop 領域のシーケンス解析と、multiplex-PCR 増幅産物の解析結果とが全例で一致していた。即ち、これまでの mtDNA D-loop 領域の PCR 増幅反応手順を何ら変えることなく、本法によって試料の人獣鑑別を同時に行うことが可能であった。また、今回設定した ND4 fragment はチンパンジーをはじめとする高等霊長類でも増幅されないため、同領域を指標とすることで極めて高い精度で人獣鑑別が可能となった。

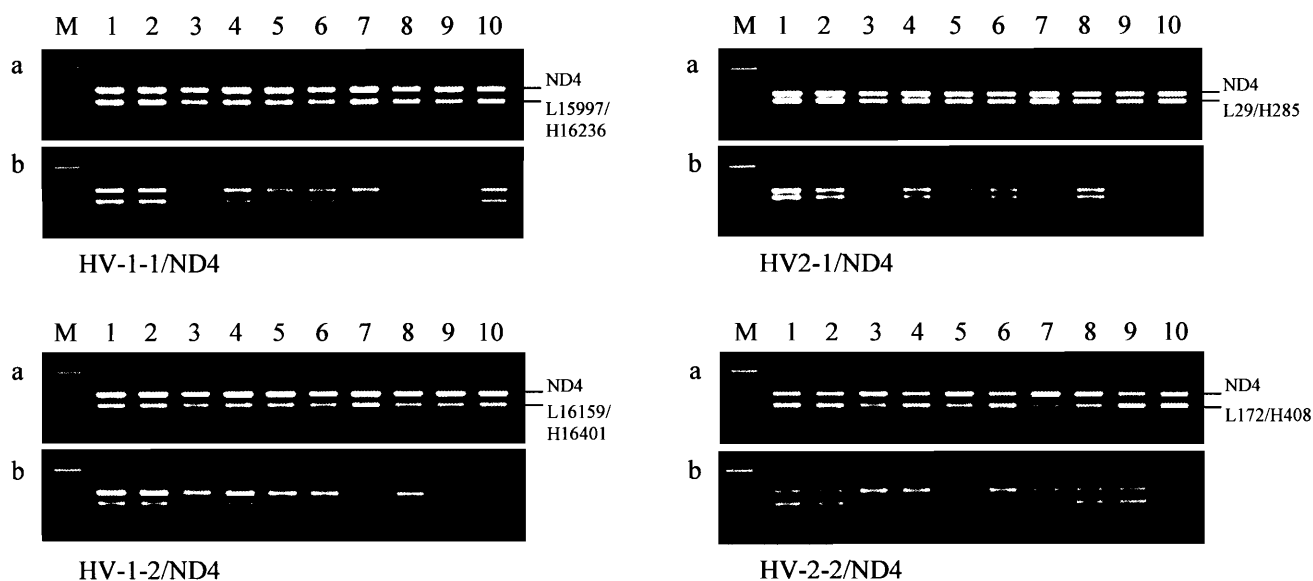


Fig. 5 Multiplex-PCR amplification from human bloodstain and hairshaft at room temperature for 20 years. a: bloodstain, b: hair shaft. Lane 1-5: male subjects, lane 6-10: female subjects, M: 100 bp ladder marker.

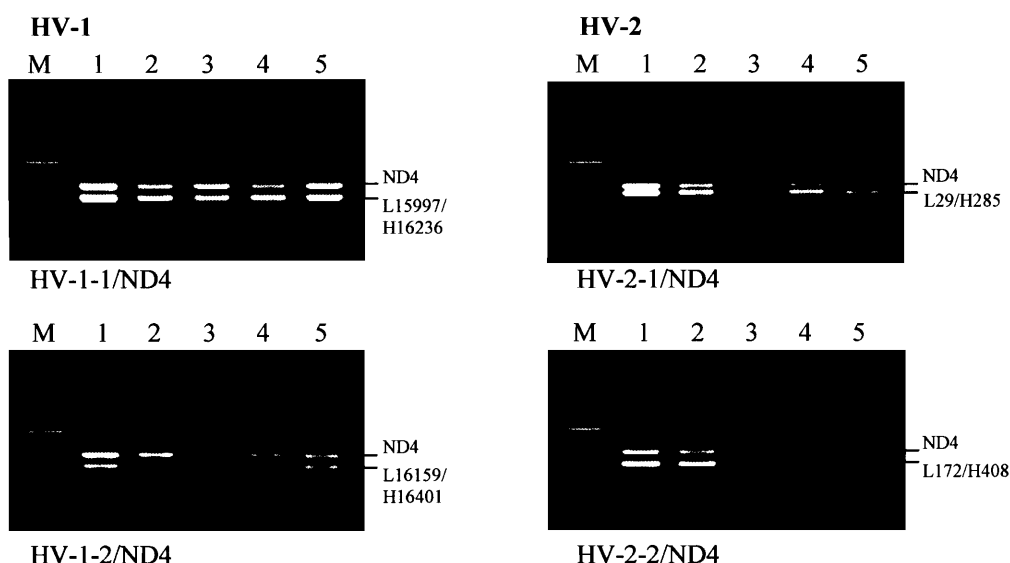


Fig. 6 Multiplex-PCR amplification from human bone stored at room temperature for 13-25 years. M: 100 bp ladder marker. Lane 1: 13years, 2: 13 years, 3: 25 years, 4: 25 years, 5: 25 years.

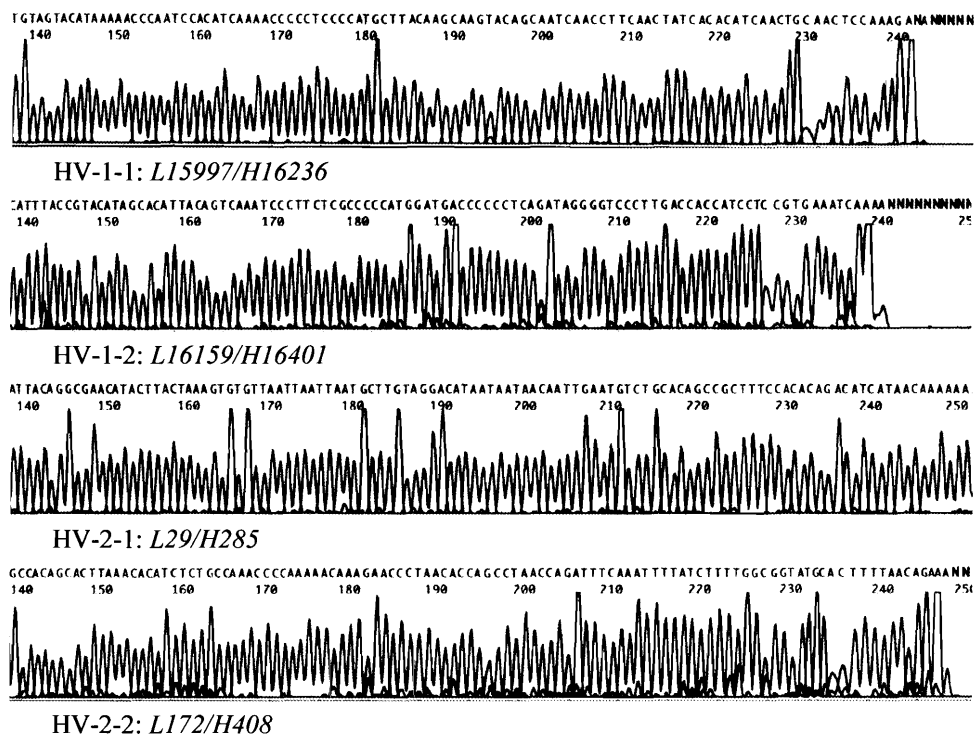


Fig. 7 Sequencing of multiplex-PCR amplification products from ancient human hair shaft. Sequencing of the multiplex-PCR amplification product from male subject (sample No. 1), forward reading.

4. 本法とSTR多型検出との相互関係

今回用いた陳旧試料についてSTR多型検出を行い、本法との検出限界について比較検討した。Table 2に示されるように、mtDNAを指標とした本法では血痕、毛髪及び人骨全てにおいてPCR増幅産物が得られ、またシーケンス解析が可能であった。一方STR

多型検出では、血痕を試料とした場合、増幅サイズの小さいTH01型やvWA型は解析可能であったが、増幅サイズが大きくなるにつれて、その検出率が低下した。また毛髪や人骨では殆ど増幅産物が検出されず、実際に実施可能な検査項目は極めて限定される結果となった。

Table 3 Amplification results of mtDNA D-loop regions and STR in ancient samples

		bloodstain										hair										bone				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	a	b	c	d	e
mtDNA	HV-1-1/ND4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	HV-1-2/ND4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	HV-2-1/ND4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	HV-2-2/ND4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CTT	TH01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
	TPOX	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	CSF1PO	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
FFV	vWA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
	FESFPS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	F13A01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Bloodstain and hair samples stored at room temperature for 20 years. Lane 1-5: male subjects, lane 6-10: female subjects. Bone samples stored at room temperature for 13-25 years. Lane a-e: one unidentified individual, each.

このように、試料の変性等によって STR 多型の検出が困難な例について個人識別を行う場合は、mtDNA を指標とする検査法が有効であり、本法についても従来の mtDNA D-loop 領域の PCR 増幅反応と比較して、検出感度の低下やシーケンス解析等に何ら問題点は認められなかった。また本法を用いることでこれまで不明確であった試料の人獣鑑別、換言すれば試料から抽出した DNA にヒト由来 DNA が含まれているかの確認が可能になるため、そのような点でも本法は変性試料の DNA 検査法の一つとして、法医学的に有用と考えられた。

一方、上記の STR 多型検出結果から明らかなよう

に、本法は mtDNA を指標としていることから、本法でヒト由来 DNA が確認されても、いわゆるヒトのゲノム DNA が含まれているかの指標とはならない。従って本法でヒト DNA が確認された場合であっても、ゲノム DNA を対象とした STR 多型検出等の結果の解釈は慎重に行う必要があると考えられる。

謝辞

貴重な試料である gorilla DNA を供与して下さった、岡山大学大学院医歯学総合研究科社会環境生命科学専攻法医生命倫理学講座法医学分野 宮石 智先生に深謝いたします。