

筑波大学

博士（医学）学位論文

細胞凝集反応を用いた  
細胞選択的 DNA 抽出法の  
混合試料鑑定への応用

2017

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

矢野 志津枝

## 目次

略語一覧.....	4
1. はじめに.....	6
2. 背景.....	8
2.1 DNAによる個人識別法.....	8
2.2 STR.....	10
2.3 市販のSTRマーカーキット.....	12
2.4 DNA抽出.....	13
2.5 DNA型の分離検出.....	15
2.6 抗体.....	16
2.7 レクチン.....	17
2.8 L-fucose lectin.....	19
2.9 混合試料の判定.....	20
3. 目的.....	23
4. 方法1——細胞選択的DNA抽出法——.....	24
4.1 新鮮試料への応用.....	24
4.1.1 方法の概略.....	25
4.1.2 試料と方法.....	26
4.1.3 結果.....	31
4.2 陳旧試料への応用.....	35
4.2.1 方法の概略.....	35
4.2.2 試料と方法.....	35
4.2.3 結果.....	36
4.3 汚染試料から血液由来細胞の選択的抽出.....	37
4.3.1 方法の概略.....	37
4.3.2 試料と方法.....	37

4.3.3	結果.....	38
4.4	考察.....	38
4.4.1	新鮮試料.....	38
4.4.2	陳旧試料.....	40
4.4.3	DNA 型の分離検出.....	41
5.	方法 2——抽出後の DNA 精製への応用——.....	43
5.1	背景.....	43
5.2	方法の概略.....	44
5.3	試料と方法.....	44
5.4	結果.....	45
5.5	考察.....	46
6.	おわりに.....	48
	謝辞.....	49
	文献目録.....	78
Figure 1	主な DNA 抽出方法.....	50
Figure 2	Maxwell® 16.....	54
Figure 3	ピラノースの C3、C4 の水酸基の配位と代表的な単糖.....	56
Figure 4	L-fucose lectin による細胞凝集の模式図.....	57
Figure 5	混合試料の解読ステップ.....	58
Figure 6	抗 B 抗体による B 型血液の凝集 (HE 染色).....	59
Figure 7	BioMag® Plus Carboxyl Protein Coupling Kit.....	60
Figure 8	抗 A 抗体、抗 B 抗体による分離.....	61
Figure 9	抗 H 抗体による分離.....	62
Figure 10	AB 型血液での抗 A・抗 B・抗 H 抗体による分離.....	63
Figure 11	A、B、O 型 3 名の血液からなる混合試料を抗 A 抗体、抗 B 抗体により分離.....	64
Figure 12	A、B、O 型 3 名の血液からなる混合試料を抗 A 抗体、抗 B 抗体により分離.....	65

Figure 13	1名の血液と2名の唾液から成る混合試料を CD45 (抗白血球抗体) により分離 .....	66
Figure 14	2名の男性血液と1名の男性唾液から成る混合試料を CD326 (抗上皮抗体) により分離 .....	67
Figure 15	6か月経過した血痕から得られた凝集塊(抗Hレクチン使用) .....	68
Figure 16	6か月経過した血痕に抗Hレクチンを加えて得られた凝集塊 .....	69
Figure 17	6か月経過した血痕に抗Hレクチンを加えて得られた凝集塊 (HE染色) .....	70
Figure 18	6か月間放置した血痕を抗Hレクチンで処理した後作成した DNAプロファイル .....	71
Figure 19	抗Hレクチンによる分離 .....	72
Figure 20	抗Hレクチンによる分離 .....	73
Figure 21	Deoxy-ribose と L-fucose の構造図 .....	75
Figure 22	抽出後の DNA と L-fucose lectin による凝集塊から再抽出した DNA で作成した DNAプロファイル .....	76
Table 1	市販されているマルチプレックス STR マーカーキットの変遷	51
Table 2	レクチンの種類と分類 .....	55
Table 3	抗Hレクチンによる分離 結果のまとめ .....	74

## 略語一覧

AFP	$\alpha$ -fetoprotein、 $\alpha$ フェトプロテイン
BSA	Bovine Serum Albumin、ウシ血清アルブミン
CE	Capillary Electrophoresis、キャピラリー電気泳動
ConA	Conavalia ensiformis、Concanavalin A、コンカナバリン
DNA	Deoxyribonucleic acid、デオキシリボ核酸
DTT	Dithiothreitol、ジチオトレイトール
EDAC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule、上皮細胞接着因子
FBI	Federal Bureau of Investigation、連邦捜査局
HE 染色	Hematoxylin-Eosin 染色、ヘマトキシリン・エオジン染色
LCA	Lens culinaris agglutinin-A、レンズマメレクチン
MES	Methyl ethane sulfonate、エタンスルホン酸メチル

PCR	Polymerase Chain Reaction、ポリメラーゼ連鎖反応
PHA	Phaseolus vulgaris、red kidney bean、赤いんげん豆
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RFU	Relative Fluorescent Unit、相対蛍光単位
SDS	Sodium dodecyl sulfate、ドシデル硫酸ナトリウム
STR	Short Tandem Repeat
TAE	Tris Acetate EDTA、トリス・酢酸・エチレンジアミン四酢酸
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat

## 1. はじめに

DNA による個人識別法、すなわち「DNA フィンガープリンティング」もしくは「DNA タイピング (プロファイリング)」は、1985 年に英国の遺伝学者であるアレック・ジェフリーズにより初めて発表されたものである。[Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S., 1985] [Jefferys A. J.; Wilson V.; Thein S. L., 1985]

以降、技術的な改良がおこなわれ、DNA タイピングを用いる個人識別法は、広く普及していき、法医学領域において、重要な個人識別法となってきた。今や、DNA によるタイピング識別法は、100 年以上前に開発された指紋に取って代わりつつある、とも言える程となっている。

現在においては、DNA による個人識別法は、殺人・レイプなどの凶悪犯罪者の特定のみならず、未知の親子関係の解明、および行方不明者の遺体の身元確認や、飛行機事故や大規模な自然災害時の犠牲者の特定など、多くの場面で、決定的な証拠として必要とされてきており、今後もさらに、その需要が高まっていくものと予想されている。

このため、DNA による個人識別法を、より正確に、より迅速に行っていくことが、社会的な要請に答えていく上で、重要となっているのである。

しかしながら、DNA による個人識別法を行っていく際に、法医学領域特有の問題がある。それは、対象となる生体試料は、試料の汚染や混合、DNA の劣化が避けられないということである。

例えば、行方不明者の捜査や犯罪捜査に関する生体試料の場合には、何日も、何か月も、あるいは何年もの長い間、対象となる DNA 分子が、直射日光や森



の中の湿気や、腐食性の化学物質にさらされているなど、厳しい環境にさらされてきており、このような環境の中にあった生体試料の中から、対象となる試料だけ、すなわち、被害者の血痕だけとか、唾液の成分だけを取り出すということは非常に困難である。しかし、犯罪捜査に関わる法医学的鑑定では、そのような生体試料が対象となるのである。

ここまで極端ではないとしても、程度の差こそあれ、事件現場や災害現場というものは、DNAを取り扱う一般的な分子生物学研究室よりも、ずっと不衛生な環境であり、そういった環境から採取された生体試料を取り扱わなければならないのであり、そして、このような環境から採取された生体試料から、DNAによる個人識別法を行わなければならないという困難さがあるのである。

この問題点については、高感度なDNA検出技術の発展により、少しずつ改善されてきている。

しかしながら、現場試料からの、DNAによる個人識別法は、依然として、判定が困難であるというのが現状である。

というのは、このような汚染や混合が起こりうる試料では、DNAバンドが複合的となり易いため、それが混合試料なのか、あるいは試料の劣化による、見かけ上の複合バンドによるものなのかの判断が、難しいからである。

したがって、混合試料から、個人識別を行う上で必要となる細胞をあらかじめ選択することは、有効な方法である。

このため、細胞凝集反応を利用して、あらかじめ必要とする細胞を選択し、分離してからDNAによる個人識別を行うという方法は、法医学領域特有の問題点である混合試料を解析するという問題点を改善する一助となるのみならず、より正確かつ迅速な判定を必要としている社会の要請に答えるという意味においても、大きな意味を持つものになると考える。

## 2. 背景

### 2.1 DNA による個人識別法

歴史的には、ジェフリーズ博士が、DNA 中にある連続して繰り返すある配列の、その配列の反復回数が個人間で異なることを発見し、これらの DNA 反復領域は、Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) として知られるようになった。そして、この個人間で異なる反復回数を検査するための技術を開発し、DNA を用いて個人識別の鑑定を行う方法、すなわち、「DNA フィンガープリンティング」を発表したのが、最初である。そして、これらの個人差のある部位を取り出して、VNTR 部位として調べるために応用された手法は、Restriction Fragment Length Polymorphism (RELP) であった。 [Jefferys A. J.; Wilson V.; Thein S. L., 1985] [Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S., 1985]

VNTR は、ジェフリーズ博士が、ミニサテライトと呼んだ部位と同種のもので、中規模の長さの反復配列で構成されており、約 10~100bp の反復単位からなるものである [Tautz, D., 1993]。

しかし現在、DNA による個人識別法で、一般的に多用されているのは、Short

Tandem Repeat (STR) と呼ばれる、2～6bp の反復単位からなる反復配列を用いた手法へと発展してきた。

その手法は、一般的には、以下である。

犯罪現場、災害現場、あるいは親子調査等から収集し、得られた生体試料から、まずは、DNA を抽出する。

さらに、その抽出された DNA の量を測定し、その後、DNA の特定領域を、PCR を用いて増幅する。PCR は非常に高感度でごく微量の DNA でも検査が可能であることから、十分な量の生体試料を得られない場合もある法医学領域においては、非常に有効な方法となっている。

次に、増幅させた PCR 産物を、増幅断片ごとに分離し検出することで、その中に含まれる STR 領域を明らかにする。DNA の分離手法は、スラブゲルとキャピラリー電気泳動 (Capillary Electrophoresis; CE) などがあるが、現在主流となっているのは、CE である。

STR アレル検出後、DNA 配列の反復回数を決定していく作業過程が、サンプル・ジェノタイピング (sample genotyping) である。

そして、最終的に、個人ごとに STR 遺伝子型を組み合わせ得られる DNA プロファイリングを他のサンプルのものと比較する。例えば、鑑定の場合、犠牲者とか容疑者などの生体試料 (対象試料、リファレンスサンプル) と、犯行現場に残された証拠検体との比較がなされることが多い。

対象の生体試料と既知のサンプルとの間で、遺伝子型の同一性が否定されない場合は、一致 (inclusion)、遺伝子型が一致しない場合、すなわち二つのプロファイル間で一致しない場合には、排除 (exclusion)、結果が不確定な場合には、不確定 (inconclusive) と判断される。

一方、二つのプロファイル間で一致した場合には、さらに、血縁関係のない

個人から収集した DNA プロファイルのデータベースを用いて DNA プロファイルを比較する。

そして、二つの DNA パターンが、一致した場合は、偶然一致する場合の偶然一致率（ランダムマッチ）、すなわち、特定集団から偶然に選んだ個人の STR プロファイルと鑑定した DNA マーカーによる遺伝子型の組み合わせが、偶然一致する確率を記載して、異同識別について判断し、鑑定結果の報告書を作成することとなるのである。 [Butler, M. J., 2009]

## 2.2 STR

STR は、2～6bp の反復単位からなる反復配列であり、現在、DNA による個人識別法において、主流の DNA マーカーとなっている。

その理由としては、以下である。

最初に開発された RFLP プローブ [Jefferys A. J.; Wilson V.; Thein S. L., 1985] [Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S., 1985] は、個人間できわめて変化に富んでいるが、一回の検査で多数の部位を同時に検出するためには、解析に膨大な労力、時間を要し、DNA プロファイリングを作成するための高い専門性が要求される。このため、マルチローカスプローブ（多部位検出探索法）を自動化することは難しいものとなっていた。

また、VNTR アレルを検出する PCR 増幅（1kbp）のためには、生体試料中に、高分子量の DNA 分子が存在していなくてはならない。PCR 増幅も、10ng 以上の DNA が必要であった。PCR 増幅のためには、2 本のプライマーが結合

する部分とプライマー間の鋳型 DNA が完全な状態でなければ、鋳型鎖として機能できず、壊れた鋳型のところでプライマー伸長が中断するので、PCR は失敗してしまう。DNA サンプルが劣化すればするほど、鋳型上での中断が多発してしまうからである。

一方、STR は、長さが短いため、3 個ないしそれ以上を一度に解析すること、すなわち、同じ DNA 検査の中で複数の STR を検査することができる、マルチプレックス（多重化）が可能である [Ellegren, H., 2004]。

このマルチプレックス STR は、高い識別能力を持っており、また、混合物質や劣化した DNA 分子を含む生体サンプルでも評価できる。さらに、自動化が可能であるという利点も持っている。

さらに、PCR 増幅においても、劣化した DNA サンプルを試料として取り扱うことが多い法医学領域では、長さの長い VNTR を使用するよりも、PCR 産物の長さが短い STR の方が成功しやすく、短いアレルを優先的に増幅させることで、アレル欠如を起こしにくくするという有利な点がある。すなわち、マルチプレックス STR の場合、STR ローカスの増幅産物は、サイズのとても小さいので、STR プライマーを用いれば、損傷していない DNA 鎖を検出できる可能性が高くなるのである。

このため、今日では、マルチプレックス STR 法を使用することで、1ng 以下の DNA でも、PCR 増幅可能となっているのである。

さらに、STR のアレルサイズは範囲が狭く、ヘテロ接合のある個人のアレルが両方ともサイズ面の差異が少ないため、小さいアレルのみが選択的に増幅されてアレルが欠落するということがほとんどなく、この点においても、劣化した DNA サンプルの解析できる見込みを高くしているといえる。

このように、STR マーカーを用いた手法は、高い識別能力と高速な解析が可

能で、現時点で最良の方法となっている。 [Butler, M. J., 2009]

### 2.3 市販の STR マーカーキット

DNA による個人識別法に使用される STR マーカーのシングルプレックスあるいはマルチプレックス PCR 増幅キットは、数多く市販されている。

1990 年代後半に、STR アレルを高感度で、高速に、そして、正確に測定する技術が、急速に発展した。

市販の STR マーカーキットが発売された当初は、同時に増幅できる STR アレルの数が、ゲル電気泳動による銀染色の方法で 3 個あるいは 4 個程度であったのが、その後、少しずつ同時に増幅できる STR アレル数が増え、現在では、CE とマルチカラー蛍光標識を使用することにより、15 個以上にまで増えていった [Butler, M. J., 2009] (Table 1)。

通常、プライマーを設計し、マルチプレックス PCR 条件を最適化し、プライマー合成の品質管理を行うには、様々な設備と人手が必要となるが、市販のキットを使用することで、国際的に普及しているローカスのプライマーセットと、最適とされる実験条件を使うことで、ヌルアレル (PCR で増幅されない STR アレル) が出現する危険性が少なくなるという利点がある。

また、実験室間で、データを共有しやすくなるというのも、市販のキットを使用する利点の一つである。このため、世界中の法医学教室や警察の科学捜査研究所等で、市販の STR マーカーキットが使用されている。

## 2.4 DNA 抽出

事件現場や災害現場等から採取された生体試料には、血液や臓器の断片、精液痕などがあり、これらには、DNA 以外にも多くの物質が含まれていることから、これらの生体試料の中から、DNA 分子を抽出しなくてはならない。

その DNA 抽出方法としては、歴史的には、有機抽出（フェノール・クロロフォルム抽出）法、Chelex 抽出法、FTA<sup>TM</sup> ペーパー法、以上 3 つの方法が主流となってきた。（Figure 1） [Butler, M. J., 2009]

有機抽出（フェノール・クロロフォルム抽出）法では、最初に、ドシデル硫酸ナトリウム（Sodium dodecyl sulfate: SDS）とプロテイナーゼ K（Proteinase K）を添加して、細胞膜を開いて、染色体中の DNA 分子を保護しているたんぱく質を分解する。次に、フェノール・クロロフォルム混合液を加える。DNA は、水（下層）—有機混合溶媒の水性部分（上層）に溶解しやすいため、フェノール・クロロフォルム混合液を加えた状態で、遠心分離をした場合、不要なたんぱく質と細胞の断片が水性部分から分離されることにより、DNA からたんぱく質を分離させることができるのである [Corney, C. T.; et al., 1994]。

Chelex 抽出法は、Chelex というスチレン—ジビニルベンゼン共重合体（styrene divinylbenzene copolymer）により構成された、イオン交換樹脂を添加する方法である [Walsh P. S.; et al., 1991]。

Chelex は、マグネシウムイオンをひきつけ結びつける働きがあり、Chelex によってマグネシウムを除去することにより、DNA 分解酵素を不活性化させ、DNA 分子を保護する働きを行うので、生体試料に、5%の Chelex 懸濁液を添加

後、数分間沸騰させ、DNA を一本鎖に変性させるとともに、細胞膜を破壊し、細胞たんぱく質も破壊することによって、DNA を抽出するという方法である。

FTA™ ペーパー法は、DNA の保管方法の一つとして開発された FTA™ ペーパーを使用する方法である [Burgoyne, L.; et al., 1994]。

FTA™ ペーパーは、吸着性セルロースでできた紙であり、ヌクレアーゼ劣化から DNA 分子を保護し、細菌増殖から紙を保護するための 4 種類の化学物質が含まれていて、これにより、DNA 分子は、数年間にわたり、室温で安定した状態を保つことができるというものである。 [U.S. 特許番号: 5496562, 1996]

FTA™ ペーパー法は、この FTA™ ペーパーに、1 滴の血液を垂らし、乾燥させるだけで、細胞は FTA™ ペーパーに接触した時点で溶解され、白血球の DNA は FTA™ ペーパー内のマトリックス内に固定される。FTA™ ペーパーの血痕の部分を取り出し、ヘムや他のたんぱく質などを取り除くための溶解剤で洗浄し、DNA を抽出するという方法である。

さらに、高効率な DNA 抽出法の一つとしてシリカを使用した固相抽出 (solid-phase extraction) 法がある。

QIAGEN 社 (Valencia, CA) が最初に開発したこの手法では、塩酸グアニジン、グアニジン・イソチオシアネート、ヨウ化カリウム、過塩素酸ナトリウムなどの疎水結合を弱め水溶性を高める働きを持つ塩類が高濃度である溶液下では、微小ガラスなどのシリカ担体に核酸が特異的に吸着する性質を利用している。 [Vogelstein, B.; Gillespie, D., 1979] [Boom, R.; et al., 1990] [Duncan, E.; et al., 2003] 溶液の pH が 7.5 以下の場合、シリカに吸着する DNA は通常 95% 前後であり、これにより、不要な不純物を洗い流すことができるのである。

さらに、DNA IQ™ システム (Promega 社) では、QIAGEN キットのよう



た常磁性体樹脂を使用している。 [U.S. 特許番号: 6673631, 2004]

最初に、pH 7.5 以下の溶液内で DNA 分子が磁気ビーズへ可逆的な結合させ、シリカコーティングした磁気ビーズを、磁石を用いて、チューブの底あるいは横に集め、溶液内の不純物から分離し、洗浄を繰り返し、最後に数分間加熱することで、吸着した DNA を溶液内に溶出させて抽出するという方法である。

この磁気ビーズによる方法は、簡易化、高速化、自動化を可能にしており、自動器械が発売されている [Greenspoon S. A.; et al., 2004]。

当研究室で使用している Maxwell® 16 (Promega 社) もこの方法で DNA を抽出しているが、この方法は、アメリカヴァージニア州の鑑定科学本部で用いられている方法でもある。(Figure 2)。

## 2.5 DNA 型の分離検出

DNA を分離抽出するという方法は、特に性的暴行事件において、男性と女性の DNA の混合物である試料から、被害者あるいは加害者の DNA プロファイルを特定していかなければならないという必要性から、これまでも、いくつかの方法が報告されている。

それは、(1) 精子と膣上皮細胞との細胞膜の性状の違いに着目し、それぞれの細胞膜のたんぱく質分解酵素への反応の違いを応用した方法、(2) Y染色体上の STR のみを PCR 段階で分離する方法、(3) laser-capture microdissection を用いて、物理的に被害者の膣上皮細胞から、精子を分離する方法が挙げられる。

まず、(1) は、精子と腫上皮細胞との細胞膜の性状の違いに着目し、それぞれの細胞膜のたんぱく質分解酵素への反応の違いを応用した方法は、Peter Gill (1985) ら [Gill, P.; et al., 1985]によって、はじめて報告された。

Gill ら [Gill, P.; et al., 1985]によって報告されたこの方法は、試料に、SDS/proteinase K 混合物を加え、先に腫上皮細胞のみを分解して分離し、次に、SDS/proteinase K/dithiothreitol (DTT) 混合物を加えて、精子の漿膜を分解し、分離して DNA を抽出するという方法である。

(2) は、Y染色体上の STR のみを PCR 段階で分離する方法である。

また、すでにスライド上の周辺組織から腫瘍細胞のみを分離する方法として一般的に使われている(3) は、laser-capture microdissection を用いて、混合物から精子を物理的に分離し、分離したのち DNA を抽出するという方法である。

## 2.6 抗体

抗体は、免疫グロブリンと呼ばれるγグロブリンで、分子量は 160,000～970,000 である。その構造は、ポリペプチドの light chain (L鎖) と heavy chain (H鎖) で構成されている。

抗体には、抗体の特異性が表され、特定の抗原部位に結合する可変部と、可変部以外の残りの部分である定常部とがある。

可変部では、L鎖およびH鎖それぞれにおいて、アミノ酸が、各々の抗原特異性に対して異なった立体構造を持っている。このため、抗原がその立体構造

に接着すると、抗原の多数の補欠分子族は、抗体の鏡面像のようにぴたりと結合する。その結合は、非共有結合である。

定常部では、組織での抗体の拡散性、組織内の特定の構造への接着性、補体複合体への結合性、抗体の細胞膜等での透過性など、抗原特異性以外の性質を担っている [Guyton, A. C.; Hall, J. E., 2004]。

## 2.7 レクチン

レクチンは、Goldstein (1980) らによって、細胞を凝集させたり、多糖類や糖たんぱく質を沈降させたりする活性を持っている、免疫反応の産物（抗体）ではない糖結合たんぱく質として定義されてきた。 [Goldstein, I. J.; et al., 1980]

歴史的には、レクチンは、ほとんどが植物から発見され、赤血球の凝集活性を指標にして発見されたものが多く、「植物血球凝集素」と呼ばれていた [Franz, H., 1988]。

その後、レクチンの研究が進み、天然由来のレクチンはすでに数百も認められている。その構造や活性は多様で、様々なものが発見されてきている。

現在では、植物・動物、ウイルスといった微生物等に存在し、糖に対する特異的結合活性をもった糖結合たんぱく質の総称とされている。

その特徴としては、大きく2つある。

一つは、レクチンは、少なくとも2つ以上の結合部位を持っており、それぞれのレクチン分子が複数の結合部位を持っているので、細胞表面の糖と結合す

ることにより細胞間の架橋や、糖を含む分子間の架橋を容易に作る事ができるとのことである。 [Lis, H.; Sharon, N., 1986] [Ilomets, T., 1990]

もう一つは、レクチンによる凝集は、単糖やオリゴ糖などにより、特異的に阻害されるというものである [Goldstein, I. J.; et al., 1980]。

このような特徴を持っていることから、レクチンは、複合糖質（主として、糖たんぱく質）の検出や単離、同定のためや組織の組織化学のため、そして、細胞が脱分化してがんに至る生理学的ならびに病理学的プロセスにおいて、細胞表面で起こっている変化を調べる有益なツールとなることが明らかとなり、1960年代後半から、レクチンの重要性・有益性が認識されるようになっていった。 [Nathan, S.; Halina, L., 2012]

例えば、臨床現場においては、 $\alpha$ フェトプロテイン（AFP）のレクチン分画が、肝臓がんに対する検査法として応用されている。

AFPは、肝臓がんに伴い、量的に、増加することから、腫瘍マーカーとして使用されている。

さらに、AFPは、その分子構造の中に、1本の糖鎖がついているが、その糖鎖は、産生される細胞により異なっている。この糖鎖の違いによって、コンカナバリン（*Conavalia ensiformis*, Concanavalin A; ConA）やレンズマメレクチン（LCA）などのレクチンとの結合度の違いとなって現れることから、肝細胞由来のAFPとレクチンとの結合性と、他の組織（卵黄嚢由来AFP）とレクチンとの結合性の違いを利用した、質的な鑑別が可能となっている。 [Taketa, K.; et al., 1993] [Ohno, M.; et al., 1992] [桑原 正喜; et al., 1999] [大倉 久直, 1994]

そのほかの応用例としては、血液型判定や骨髄移植のためのリンパ球と骨髄細胞の分画や、患者の免疫状態を調べるなど、人の細胞遺伝子学における染色体分析のためのリンパ球の活性化などに利用されているレクチン(Phaseolus

vularis, red kidney bean; PHA や Conavalia ensiformis, Concanavalin A; ConA など)もある。 [Kilpatrick, D. C.; Green, C., 1992] [Matsui, T.; et al., 2001] [大沢 利昭, 1985]

さらに、膜結合型レクチンは、循環系から糖たんぱく質のクリアランスや、細胞内で糖たんぱく質を異なる細胞小器官に輸送したり、再循環するリンパ球の血流からリンパ節や脾臓あるいは他のリンパ器官への移動に関与したり、がん転移のプロセスで機能を発揮しているものもある [Nathan, S.; Halina, L., 2012]。

レクチンは、混合した赤血球の集団から特定の細胞を分離する場合、例えば、キメラ化や体細胞突然変異あるいは骨髄移植の結果、モザイク様の血液型を持つような場合でも、応用可能であるとされている [Booth, B. P.; et al., 1957]。

このように多岐にわたる活性を持つレクチンは、自然界のいたるところに存在し、様々な生体の中で見つかっており、すべての「類」や「科」には存在しているとされている [Gold, E. R.; Balding, P., 1975]。

そのうえ、すでに発見され単離されているレクチンの多くは、市販されているため、容易に利用することができる。また、今日では、遺伝子組み換え技術によっても手に入れることができるようになっている [Nathan, S.; Halina, L., 2012]。

## 2.8 L-fucose lectin

L-fucose lectin の多くは、抗 H (O) 型の特異性を有する。これは、L-fucose

lectin が、H 型抗原決定基の構造の L-fucose 残基を特によく認識しているからであると考えられている [大沢 利昭, 1985]。このため、抗 H レクチンとも呼ばれている。

レクチンは、一般に赤血球凝集における血液型特異性または非特異性、結合する単糖に対する特異性あるいはその他の生物活性の相違によって分類される [大沢 利昭 ; 森 良一, 1976]。

その中でも一番簡便で理解しやすい方法の一つとして、Mäkerä によって報告された分類法がある。Mäkerä は、レクチンによる糖に対する特異性を、単糖の C3 と C4 位の水酸基の立体配位により分類した [Mäkerä, O., 1957] (Table 2) (Figure 3)。

*Ulex europaeus* I (ハリエニシダ) は、Mäkerä の分類の第 1 群に分類され、 $\alpha$ -L-fucose の C3 位を認識することにより糖結合特異性を持ち、O 型赤血球を強く凝集させ、A2、A2B 型赤血球を弱く凝集させることが知られている (Figure 4) [Mäkerä, O., 1957] [Matsumoto, I.; Osawa, T., 1974] [Osawa, T.; Matsumoto, I., 1972] [Hořejší, V.; Kocourek, J., 1974]

## 2.9 混合試料の判定

犯罪捜査における証拠試料の鑑定では、混合試料の問題、すなわち、2 名ないしはそれ以上の、複数人物の生体試料が、採取した試料の中に混合することがある、という問題がある。

この問題については、RFLP 法が主流であった時代と比べると、PCR 技術が

飛躍的に進歩し、混合サンプルの DNA プロファイルに、わずかに含まれる成分についても解析できるようになってきている。

ヘテロ接合率が高いローカスや遺伝子マーカーを数多く使用することで、混合 DNA の検出率を上げている。たった一つの試料から複数の DNA を検出できるかどうかという確率は、それぞれの試料での複合 DNA の存在比率、それぞれの遺伝子型の組み合わせ、増幅できた DNA の合計量と関係がある。このため、数多くのアレルを含むとされる高い多型性の STR マーカーを使用すれば、多くの情報量が得られるため、混合試料中の 2 つの成分の違いを検出できる可能性が高くなってくる。

マルチプレックス STR 法の場合には、さらに多くのマーカーが調べられているので、混合試料中で、複数の成分を検出できる可能性が高くなっている。混合試料に含まれている各成分量によってもまた、混合物に対する検出力が変わってくる。例えば、二つの DNA が同じくらいの量であれば、片方がわずかしかない場合よりも、ずっと検出が簡単になる、といった具合である。しかし、この場合には、それぞれの組み合わせの区別が困難となる。

いろいろなバンドパターンに対して、混合試料を判定できるように、理論的な統計演算が、徹底的に研究されてきている [Curran, J. M., et al., 1999]。

混合試料の判定を行う際には、基本的には 6 つのステップがある (Figure 5)。すなわち、# 1 混合物であると特定する。# 2 アレルピークの検出。# 3 関与した可能性のある個人数の確定。# 4 混合試料中の各個人の成分の相対比率を予測する。# 5 遺伝子型として起こりうるすべての組み合わせを検討する。# 6 対照試料と比較する、以上 6 ステップである [Clayton, T. M.; et al., 1998]。

つまり、混合 DNA の存在を確定し (# 1)、すべてのアレルを特定 (# 2)

後は、関与したと考えられる個人数を確定する（# 3）。例えば、2名の人物からなる混合試料の場合、どのローカスにおいても、最大アレル数は4となる。それも、両人物がともにヘテロ接合体であること、また、アレルの重複が全くないことが条件である。したがって、1か所のローカスで4個以上のアレルが見つかった場合、3名以上の人物からなる混合試料であるという可能性があるのである。

混合試料は、各成分が半々であったり、どちらか一方が過剰であったりと、様々である。通常、混合 DNA の割合は、1 : 1、1 : 5 といった比率形式で表される。既知量の鋳型 DNA を用いて PCR 増幅を行った場合、原理的には、その混合比を保ったまま増幅される [Gill, P.; et al., 1998] [Perlin, M. W.; Szabady, B., 2001]。

つまり、ある一定濃度の範囲内では、電気泳動図で検出されたピークの面積と高さは、混合試料中の鋳型 DNA の量比に対応しているのである。このため、混合比を決定するためには、全体のプロファイルを調べ、そして各ローカスの全情報を調べるのが最も良いとなる。

ABI310、377、3100 などの蛍光スキャナーを用いて電気泳動図からピークの定量情報を得るためには、測定した STR アレルの相対的なピークの高さ、または相対的なピーク面積を測定する。このピーク情報を使って、混合試料解析に役立つ遺伝子型を解読し、それぞれ異なったローカスにおけるアレルの特異的な組み合わせは、試料の混合比をもとに検討されたものである（# 4）。

次に、混合試料中の各ローカスで起こりうる遺伝子型の組み合わせをすべて検討する（# 5）。

混合試料の判定における最終段階は、対照試料の遺伝子型と、混合 DNA の成分の遺伝子型プロファイルとを比較することである（# 6）。



さらに、混合試料の成分を解読し、かつ混合比を決定するために、コンピュータープログラムが利用されている。リニア混合サンプル解析 (linear mixture analysis) を行うことで、定量的な STR ピーク情報から混合比を予測できることがわかっている [Perlin, M. W.; Szabady, B., 2001]。また、テネシー大学の研究者は、混合試料の成分を自動的に解読するアルゴリズムを開発している [Wang, T.; et al., 2002]。

以上のように、技術的な進歩がみられ、様々な工夫が行われているものの、混合試料の検出および判定は、いかなる計算方法をとっても、いまだに非常に難しいのが現状である。

というのも、複数の人物に由来する試料である混合試料の場合もあれば、単一試料由来でも混合バンドパターンを示すこともある上に、試料が異なれば、そこに含まれる DNA の割合も異なってしまうということが起こってしまうからである。

このため、混合試料の検出や判定は、長い経験と入念なトレーニングが必要とされており、また、経験があり、トレーニングを受けていたとしても、「必要でない限り、混合試料の判定をしない」(Forensic Science Service の Peter Gill) ことが推奨されているのである。 [Butler, M. J., 2009]

### 3. 目的

法医学領域特有で DNA による個人識別法を行う際に問題となるのは、対象とする生体試料が、外来細胞により汚染されていたり、複数人由来の細胞が混合していたり、混合試料であることが多いということである。

そして、この混合試料が、DNA による個人識別の鑑定結果の解釈を困難にしており、できる限り、混合試料の判定を避けるようにすることが必要とされている [Gill, P.; et al., 1998]。

これらの問題を解決するために、DNA 抽出前の段階で、抗原抗体反応やレクチンによる特異的細胞凝集反応を利用して、標的細胞をあらかじめ分離する方法を検討した。

検討の範囲は、混合材料と一つの抗体、あるいはレクチンによる分離材料の比較を、モデル材料を使って行い、実捜査資料の検討のための基礎データをとることが目的である。

## 4. 方法 1 ——細胞選択的 DNA 抽出法——

### 4.1 新鮮試料への応用

#### 4.1.1 方法の概略

本方法は、目的とする細胞に特異的な抗体を用い、抗原抗体反応を利用して、目的とする細胞を選択的に細胞分離することによって、目的とする細胞だけを選択的に取り出した後、DNAを抽出するという方法である。

細胞分離の方法としては、2つの方法で行った。

一つは、遠心分離法である。これは、混合試料に抗体を加え、目的とする細胞に抗体を結合させ、遠心分離をする方法である。

もう一つは、磁気分離方法である。この方法ではまず、選択する細胞に特異的な抗体を、磁気ビーズにカップリングさせる。この磁気ビーズとカップリングした抗体を混合試料に加え、抗原抗体反応によって、磁気ビーズとカップリングした抗体に、試料中の特異的な抗原を持つ細胞を結合させる。磁気ビーズでカップリングされた抗体に特異的な抗原を持つ細胞が結合させた状態で、磁気分離を行い、磁気ビーズを丁寧に洗浄し、磁気ビーズとカップリングした抗体と結合した抗原を持つ細胞を取り出す、という方法である。

そして、取り出した細胞からDNAを抽出し、各種個人識別用STRマーカーキットを用いて、DNAプロファイルの判定を行う。

抗体は、混合血液からなる混合試料からの血液型による選択的抽出を目的として、抗A抗体、抗B抗体、抗H抗体を、いくつかの条件を設定して使用した。

次に、血液と唾液（口腔内上皮細胞）の選択的抽出を目的として、CD45抗体（抗白血球抗体）、CD326抗体（抗上皮細胞抗体）を使用した。

## 4.1.2 試料と方法

### 4.1.2.1 混合試料の作成

様々な条件に設定した、3 人由来の血液（全血、抗凝固剤無し）を各  $30\ \mu\text{l}$  および唾液各  $30\ \mu\text{l}$  による細胞混合液を 2ml チューブ内で作成した。各試料の混合の割合は、1 : 1 で行った。

細胞混合液を  $500\ \mu\text{l}$  に希釈し、その希釈した細胞混合液の  $50\ \mu\text{l}$  (1/10 量) をマイクロチューブに入れた。

### 4.1.2.2 選択的細胞分離

細胞の分離は、遠心分離法と磁気分離法の両方で行った。

今回使用した抗体は、以下に示す。

CD45 抗体 (Anti-Human CD45 Purified, 2B11, Monoclonal, Murine, eBioscience)、

CD326 抗体 (Anti-Human CD326 (EpCAM) Purified, 1B7, Monoclonal, Mouse, eBioscience)、

抗 A 抗体 (HE-193, Monoclonal, Mouse, Thermo Fisher)、抗 B 抗体 (HEB-29, Monoclonal, Mouse, Thermo Fisher)、抗 H 抗体 (A70-A/A9, Monoclonal, Mouse, Thermo Fisher)

抗体は、いずれも  $20\ \mu\text{l}$  ( $20\ \mu\text{g}$ ) ずつ使用した。

## (1) 遠心分離法 (抗 A 抗体、抗 B 抗体、抗 H 抗体)

抗体 (50  $\mu$ l) と試料 (生食 2ml 中 30  $\mu$ l の細胞浮遊液) の混合液を 37°C 1 時間で十分に感作させる。その後、56°C で 5 分間振盪させた。

遠心分離法は、3400rpm (2000g、2 分) で行い、沈殿物 (Figure 6) と上清を分けて採取した。

## (2) 磁気分離法 (CD45 抗体、CD326 抗体)

まず、目的とする細胞に特異的な抗体をカップリングした磁気ビーズを作成した。

磁気ビーズキットは、BioMag® Plus Carboxyl Protein Coupling Kit (Polyscience, Inc.)<sup>1</sup>を使用した (Figure 7)。このキットで用いられている BioMag® Plus Carboxy 粒子という磁気ビーズは、EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) 溶液を加えると、磁気ビーズのカルボキシル基が活性化し、任意のたんぱく質と結合させることができる物質である。

上記の磁気ビーズキットの試薬を用いて、磁気ビーズキットのマニュアルに

---

<sup>1</sup> キットの組成は、以下である。

BioMag® Plus Carboxyl Terminated Particles: 2.5ml

EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide): 0.10g

15ml conical centrifuge tubes: 5 tubes

BioMag® MultiSep Magnetic Separator

0.05M MES Buffer (pH 5.2): 2×175ml

Quenching Solution (1M Glycine, pH8.0): 25ml

Wash Buffer: 125ml

従ったが、より回収効率を上げるために一部改変を行った。方法の一般的な手順は、BioMag<sup>®</sup> Plus Carboxy 粒子を EDAC 溶液で、BioMag<sup>®</sup> Plus Carboxy 粒子のカルボシキル基を活性化させ、目的とする細胞に特異的な抗体を半永久的に結合させた。

具体的な手順を以下に示す。

#### 1) 活性化

1. 0.5ml (10 mg) の BioMag<sup>®</sup> Plus Carboxy 粒子を 15ml のチューブに入れる。
2. 5ml の MES (Methyl ethane sulfonate、エタンスルホン酸メチル) buffer を入れ振盪する。BioMag<sup>®</sup> MultiSep Magnetic Separator よって磁気分離し、上清を捨てる。
3. 上記、2 を 3 回繰り返す。洗浄後、BioMag<sup>®</sup> Plus Carboxy 粒子を 5ml の MES buffer に溶かす。
4. EDAC buffer を 30 分、室温に放置する。
5. EDAC を 16mg (1.6mg EDAC/mg BioMag<sup>®</sup> Plus Carboxy 粒子)、BioMag<sup>®</sup> Plus Carboxy 粒子が溶け込んだ MES 溶液に入れ、振盪する。
6. ローターに 30 分振盪させる。
7. 磁気分離器に入れ、上清を捨てる。2 を 4 回繰り返す。

#### 2) カップリング反応

1. 20-55 $\mu$ g の抗体を使う。BSA (Bovine Serum Albumin、ウシ血清アルブミン) を添加する。
2. 5ml の BioMag<sup>®</sup> Plus Carboxy 粒子が溶け込んだ MES buffer に上記、抗体

を入れる。

3. 50 $\mu$ l の溶解液を取り、950 $\mu$ l の MES buffer に入れ、1:20 の割合で希釈にする。効率を図る溶液（プレカップリング溶液）として分ける。

4. 残った MES 抗体溶液と活性化した磁気ビーズによる混合液を激しくミックスし、室温に 12-24 時間放置する。

5. BioMag<sup>®</sup> MultiSep Magnetic Separator を用いて、磁気分離し、上清を保存する。ポストカップリング溶液とラベルする。

6. 残った 5ml の MES buffer の抗体とカップリングした BioMag<sup>®</sup> Plus Carboxy 粒子を懸濁させる。激しくミックスし、BioMag<sup>®</sup> MultiSep Magnetic Separator を用いて、磁気分離する。上清を捨てる。

7. 6 をもう一度繰り返す。

### 3) カップリング粒子の洗浄

1. 15ml の Quenching 液を入れ、ミックスし、BioMag<sup>®</sup> MultiSep Magnetic Separator を用いて、磁気分離する。上清を捨てる。ローターに 30 分かける。

2. 1 を 3 回繰り返す。

3. 200 $\mu$ l の Wash buffer に溶かす（粒子は 50mg/ml）。

200 $\mu$ l の抗体をカップリングした磁気ビーズによる懸濁液に、約 5 $\mu$ l の混合試料を加え、混合試料とカップリングした磁気ビーズと混合し、37 $^{\circ}$ C で 20 分反応させる。抗原抗体反応により、磁気ビーズとカップリングした抗体に、目的とする細胞を結合させる。

目的とする細胞を結合させた磁気ビーズを、これもまた磁気ビーズキットのマニュアルに従って、BioMag<sup>®</sup> MultiSep Magnetic Separator を用いて、磁気

分離を行い、磁気ビーズを Wash buffer により、洗浄し取り出した。

#### 4.1.2.3 DNA 抽出

分離し取り出した細胞を、Maxwell®16 (Promega 社) を用いて、DNA 抽出を行い、各種個人識別用キットを用いて、DNA プロファイルの判定を行った。

今回使用した個人識別用キットは、AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems™)<sup>2</sup>および Power Plex® Y23 System (Promega 社)<sup>3</sup>である。

使用したサーマルサイクラーは、Gene Amp® PCR System 9600 であり、温度条件は、それぞれのキットのマニュアルに従い、AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems™)では、95°C、11 分後、94°C、1 分、59°C、1 分、72°C、1 分 (28cycles)、60°C、60 分として行った。Power Plex® Y23 System (Promega 社)では、96°C、2 分後、94°C10 秒、61°C1 分、72°C30 秒 (30cycle)、60°C20 分で行った。

---

<sup>2</sup> キットの組成は以下である。

AmpFLSTR PCR Reaction Mix	10.5 $\mu$ l	×反応数
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	0.5 $\mu$ l	×反応数
AmpFLSTR Identifiler Primer Set	5.5 $\mu$ l	×反応数

<sup>3</sup> キットの組成は以下である。

2800M control DNA  
Power Plex® Y23 5X Master Mix  
Water (Amplification grade)  
Power Plex® Y23 Allelic Ladder Mix  
Power Plex® Y23 10X Primer Pair Mix



### 4.1.3 結果

それぞれの条件ごとに、各ローカスでの、アレルピークによって表された遺伝子型（繰り返し配列の反復数）を読み取り、型判定を行った。

#### 4.1.3.1 A型血液を抗A抗体で、B型血液を抗B抗体で遠心分離

A型血液のみ（抗体使用無し）のDNAプロファイルとA型血液を抗A抗体によって分離したDNAプロファイル、混合試料（A型血液+B型血液）のDNAプロファイル、そして、B型血液を抗B抗体によって分離したDNAプロファイル、混合試料（A型血液+B型血液）のDNAプロファイルの結果を比較した（Figure 8）。

A型血液のみのDNAプロファイルは、抗体を使用していない、すなわち、選択的抽出を行っていない、一般的なDNA抽出で作成した、単一サンプルの結果である。

A型血液に抗A抗体を使用して分離を行った場合も、A型血液と同じDNAプロファイルを示している。

A型血液とB型血液による混合試料から得られたDNAプロファイルの結果においては、A型血液（抗体使用無し、およびA型血液を抗A抗体によって分離）から得られたDNAプロファイルと、B型血液を抗B抗体によって分離して得られたDNAプロファイルとの混合バンドの結果を示している。

そして、A型血液とB型血液による混合試料に、抗A抗体を用いて分離したDNAプロファイルにおいては、ほぼA型血液と同じ遺伝子型を示している。

しかしながら、一部 B 型血液由来のアレルを拾っているローカス (D21S11 の 32.2 のアレル) もあり、完全な分離とは言えないが、定量的な判断を併用し、高いピークが A 型血液由来の型であると判断すると、選択的に分離ができていると言える。

#### **4.1.3.2 混合試料 (O 型血液+B 型血液) を抗 H 抗体によって遠心分離**

O 型血液のみ (抗体使用無し) の DNA プロファイル、O 型血液に抗 H 抗体によって分離した DNA プロファイル、混合試料 (O 型血液+B 型血液) を抗 H 抗体によって分離した DNA プロファイル、そして、B 型血液を抗 B 抗体によって分離した DNA プロファイルの結果を比較した (Figure 9)。

O 型血液のみの DNA プロファイルは、抗体を使用していない、すなわち、選択的抽出を行っていない、一般的な DNA 抽出で作成した、単一サンプルの結果である。

O 型血液に抗 H 抗体を使用して分離を行った場合も、O 型血液の DNA プロファイルと同じ DNA プロファイルを示している。

O 型血液と B 型血液による混合試料に、抗 H 抗体を用いて細胞選択し分離した DNA プロファイルでは、B 型血液由来のアレルが増幅されず、O 型血液の DNA プロファイルと同じ DNA プロファイルを示している。

#### **4.1.3.3 AB 型血液を抗 H 抗体、抗 A 抗体、抗 B 抗体によって遠心分離**

AB 型血液を、抗 H 抗体、抗 A 抗体、抗 B 抗体によって分離した DNA プロファイルの結果である (Figure 10)。

AB 型血液では、抗 H 抗体、抗 A 抗体、抗 B 抗体のいずれにおいても、同じ DNA プロファイルを示している。

#### 4.1.3.4 A 型、B 型、O 型それぞれの血液型の 3 名の混合血液を抗 A 抗体および抗 B 抗体によって遠心分離

混合試料 (A 型血液+B 型血液+O 型血液) の DNA プロファイル、混合試料 (A 型血液+B 型血液+O 型血液) を抗 A 抗体によって分離した DNA プロファイル、混合試料 (A 型血液+B 型血液+O 型血液) を抗 B 抗体によって分離した DNA プロファイルの結果を比較した (Figure 11) (Figure12)。

混合試料 (A 型血液+B 型血液+O 型血液) から、抗 A 抗体によって A 型血液由来の細胞を分離した DNA プロファイルにおいては、混合バンドである混合試料の結果と比較して、B 型血液由来のアレルの増幅がほとんど無く、A 型血液由来のアレルが優先的に増幅されており、A 型血液由来の細胞の DNA 型が分離されているといえる。そして、抗 B 抗体によって B 型血液由来の細胞の DNA 型を分離した DNA プロファイルにおいても、混合バンドである混合試料の結果と比較して、これも完全ではないが、A 型血液由来のアレルの増幅がみられず、B 型血液由来のアレルが増幅されており、B 型血液由来の細胞が分離されている。

また、混合試料では増幅エラーを起こしていた D13S317 の 12 のアレルピークが、抗 A 抗体で選択的抽出を行ったことで、抗 A 抗体では、明瞭に D13S317 の 12 のアレルピークが表れている。

#### 4.1.3.5 1名の血液と2名の唾液からなる混合試料をCD45（抗白血球抗体）によって磁気分離

混合試料（AB型血液+2名の唾液）から、CD45によって、AB型血液由来の白血球を分離したDNAプロファイルと、混合試料（AB型血液+2名の唾液）のDNAプロファイルの結果を比較した（Figure 13）。

なお、ここでの唾液由来のDNAとは、生理的に多量に唾液中に剥離してくる粘膜上皮細胞を標的にしたものである。

混合試料の結果では、各ローカスで2つ以上のアレルピークが検出され、混合バンドの結果を示しているのに対して、選択的抽出を行った結果では、ピークの高さの差などを考慮すると、各ローカスで、AB型血液の遺伝子型を示すアレルが、ヘテロ接合体として検出されたと判断することができる。

また、混合試料では増幅されていなかった、FGAの22のアレルピークが、選択的抽出を行ったことで、検出できている。

#### 4.1.3.6 2名の男性血液と1名の男性唾液からなる混合試料をCD326（抗上皮細胞抗体）によって磁気分離

混合試料（2名の男性血液+1名の男性唾液）の、男性のみに存在するY染色体上のSTRを調べることによって作成したDNAプロファイルと、混合試料（2名の男性血液+1名の男性唾液）から、CD326によって、唾液中に、生理的に多量に含まれる口腔粘膜上皮細胞由来の細胞を分離したDNAプロファイルの結果を比較した（Figure 14）。

混合試料では、各ローカスで、複数のアレルピークが検出されているのに対して、選択的抽出を行った下段では、各ローカスでアレルピークは 1 本ずつ検出されており、血液細胞由来の DNA が除去され、粘膜上皮細胞由来の DNA が選択的に分離されたことを示している。

## 4.2 陳旧試料への応用

### 4.2.1 方法の概略

布地に血液をしみこませ、室温で室内にそのまま放置して 6 か月経過したものに、生食を加えて懸濁液とし、そこに L-fucose lectin である、抗 H レクチン (*Ulex europaeus*) を加え、赤血球凝集をさせる。その凝集塊 (Figure 15) (Figure 16) (Figure 17) に、proteinase K を加え、DNA を抽出し、個人識別用キットを用いて、DNA プロファイルを作成する。

### 4.2.2 試料と方法

サラシの布地 (木綿) に血液 1 滴 ( $30 \mu\text{l}$ ) をしみこませ、室温 ( $18^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$ ) でそのまま放置し、6 か月経過した血痕を作成した。

生食 1ml に血痕 (0.5 mm 四方) を入れ、細胞懸濁液を作成した。

細胞懸濁液に、抗 H レクチン (*Ulex europaeus*) (オーソ) を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 50 分間加熱し、その後、 $56^{\circ}\text{C}$  で 5 分間加熱した。

細胞凝集塊を取り出し、取り出した凝集塊を溶解液（0.5ml）に溶解させた。

Protease K 1 mgを加えた後、Maxwell<sup>®</sup>16 (Promega 社) を用いて、DNA 抽出を行い、AmpFLSTR<sup>™</sup> Identifiler<sup>™</sup> PCR Amplification Kit (Applied Biosystems<sup>™</sup>)を用いて、DNA プロファイルを作成した。

#### 4.2.3 結果

室温の状態でも6か月経過した、布地にしみ込んだ血痕においても、抗Hレクチン (*Ulex europaeus*) (オーソ) で処理することで、細胞凝集塊を形成することができた。

室温の状態でも6か月経過した、布地にしみ込んだ血痕から抽出したDNA プロファイル (Control) では、多数のアレルピークが検出されたローカス (D8S1179、D3S1358) が認められている。さらに、高分子のアレル領域 (およそ 250bp 以上。D7S820、CSF1PO、D13S317、D16S539、D2S1338) では、ローカスのドロップアウト (不検出) が認められる。

一方で、室温の状態でも6か月経過した、布地にしみ込んだ血痕を、抗Hレクチンで処理することで得られた凝集塊から得られたDNA プロファイルでは、Controlで多数のアレルピークが検出されていたローカス (D8S1179、D3S1358) で、1~2本のアレルピークが検出され、ホモ、あるいは、ヘテロ接合体として検出されたと判断することができる。

そして、Controlでローカスのドロップアウトが認められていた高分子のアレル領域 (およそ 250bp 以上。D7S820、CSF1PO、D13S317、D16S539、D2S1338) でも、アレルが増幅され、アレルピークが検出することができている (Figure 18)。

### 4.3 汚染試料から血液由来細胞の選択的抽出

#### 4.3.1 方法の概略

犯行隠蔽のため、意図的に汚染された試料を想定して、細菌による汚染物質を伴う混合試料での細胞選択的抽出を行った。細菌等による汚染物質を伴う混合試料から、抗 H レクチン (*Ulex europaeus*) を使用して、凝集塊を作成し取り出し、ヒト由来の血液細胞を分離し、目的とする細胞だけから DNA を抽出するという方法である。

#### 4.3.2 試料と方法

下着シャツ (木綿) に、血液 1 滴 (30  $\mu$ l、あらかじめ型が判明している検体) を染み込ませ、3 週間味噌漬け (味噌は、「料亭の味 無添加」を使用。麴割合が 14 割の信州淡色系味噌。原料は、コメ・大豆・食塩) (マルコメ株式会社、長野市) にした。血痕部分を約 5mm 四方内外に切断し、そこに 2 名の男性唾液をそれぞれ一滴ずつ滴下した。

血痕と唾液痕を付着させた布辺を 2ml チューブにいれ、1ml の生食を加える。抗 H レクチン (*Ulex europaeus*) (オーソ) を一滴加え、37°C、1 時間で十分に感作させた。その後、56°C で 5 分間振盪し、試料を素早く取り除き、さらに遠心 (3400rpm, 2 分) した。上清を移し (抗 H レクチンで凝集塊を形成しなかつ

た、残りの血球と粘膜上皮細胞による、混合試料として型判定)、沈殿層 (Figure 16) を抽出液(血液試料として型判定) とし、個人識別用キット (AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems™)を用いて、DNA プロファイルを作成した。

### 4.3.3 結果

上清 (混合試料) の DNA プロファイルと、沈殿層 (血液) の DNA プロファイルの結果を比較した (Figure 19) (Figure 20)。

また、血液サンプルの DNA プロファイルと二人の唾液サンプルの DNA プロファイルと上清および沈殿層の DNA プロファイルを表に示す (Table 3)。

上清は、不完全な混合バンドの結果となっている。一方、沈殿層は、血液サンプル由来の DNA プロファイルを忠実に反映した結果となっている。

## 4.4 考察

### 4.4.1 新鮮試料

新鮮試料においては、混合試料に応じて、様々な抗体を使用していくことで、混合試料から目的とする細胞を分離することが可能であった。

分離方法としては、遠心分離法は簡便ではあるが、分離が不完全となるが、



遠心の条件によって、収集量を増やすことができるという利点がある。一方、磁気分離法では、目的とする細胞に対する抗体を磁気ビーズに付着させるという作業を要し、遠心分離法よりも時間や手間、磁気ビーズキットのコストがかかり、収集量がやや少なる傾向があったが、分離は精密であった。

このため、混合試料の状態や目的に応じて、遠心分離法と磁気分離法を使い分けていくことが必要であると思われる。

また、今回行った一連の混合試料において、血液と唾液による混合試料から、CD45 抗体（抗白血球抗体）を用いて選択的抽出を行った研究では、その結果から、唾液由来の DNA 型の混合は認められなかった。しかし、唾液中に含まれる可能性のある白血球について、唾液中に白血球がどの程度含まれていたのか、CD45 抗体を使用した際に、CD45 抗体と抗原抗体反応を起こした唾液由来の白血球が、どの程度あったのかの評価は行っていないので、唾液由来の白血球がわずかに含まれている可能性も否定できない。

唾液（混合唾液・全唾液）中には、耳下腺、顎下腺、舌下腺などの唾液腺から分泌される唾液（純唾液）に加えて、剥離した口腔粘膜上皮や歯肉溝からの浸出液や白血球、剥離した口腔粘膜上皮、食物残渣などがある [香西 克之; 光畑 智恵子, 2014] [芝 燁彦; 芝 紀代子, 2016]とされており、歯肉溝から口腔内へ遊走した白血球数は、歯周組織の炎症の指標の一つとなりうる [内田 武志; 菊池 貞介; et al., 1976] [Klinkhamer, J. M., 1968]とされている。

今回の研究において、選択的抽出を行って分離を行う際に、唾液中に含まれる白血球由来の DNA 型が検出されていない要因としては、使用した個人識別用キットの検出限界が 5%である [Butler, M. J., 2009] こと、検体である唾液中に含まれる白血球が、もう一人の全血中の白血球と比べて少量で、混合試料全体の白血球のうち、唾液中の白血球が占める割合が 5%以下でしか含まれていな

かったために、唾液由来の白血球が含まれていたとしても、その遺伝子型を示すアレルピークが検出されなかった等の理由が考えられる。

仮に、唾液由来の白血球が検出されたとしても、その量が少なければ、定量性を考慮した判定を行うことが可能であると考えられる。

しかしながら、唾液中の白血球数増加につながる歯周病の罹患率は、年代とともに次第に上昇し、特に高齢者では高く、半数以上が歯周ポケット（歯肉の炎症により病的に深くなった歯肉溝）を有しているとされている [厚生労働省, 2017] ことから、唾液中に白血球が多数含まれている可能性を、今後、考慮していかなければならないと考える。その場合には、血液型の違いに着目して分離するなど、他の方法で分離していくことで対応が可能であると考えられる。

#### 4.4.2 陳旧試料

陳旧性試料は、少なくとも室温で 6 か月間放置していたものを使用したことにより、実際の法医学領域で対象となる混合試料により近い状態の試料となっていると思われた。

レクチンによる細胞凝集反応を利用することで、細胞膜が劣化していると思われる、半年以上経過した血痕からでも、細胞凝集塊を作成することができた。

このことから、6 か月経過した血痕から得られた細胞でも、抗 H レクチンで認識可能なレベルには、細胞膜の形態が保持されている細胞が残っていることがわかった。したがって、細胞膜が劣化している陳旧試料においても、抗 H レクチンを使用することで、分離抽出できる可能性があるといえる。

さらに、試料を味噌漬けにすることで、外来物の汚染状態にある試料においても、細胞選択が可能であるかどうかも検討を行った。細胞膜が劣化している

あるいは破壊されていると思われる試料においても、レクチンにより血液細胞由来の細胞による凝集塊が形成され、細菌由来の DNA、唾液中に含まれる口腔粘膜上皮細胞由来の DNA から分離することができたといえる。

本研究では、混合試料に含まれる試料の割合が、1:1:1のみとしたこともあり、混合試料（上清）は不完全な混合バンドを示してはいるものの、これまで報告されている混合試料の判定方法でも、DNA プロファイルの型判定が可能な結果が得られているが、それぞれのバンドがどの細胞に由来するのかの判断は困難である。

しかしながら、実際の法医学分野で対象となる試料では、様々な割合の試料が含まれる混合試料であることから、今後は、血液と唾液の混合比率を変えて、検証を行っていくことも検討したい。

#### 4.4.3 DNA 型の分離検出

DNA 型を分離し検出する方法は、すでに、(1) 精子と口腔上皮細胞との細胞膜の性状の違いに着目し、それぞれの細胞膜のたんぱく質分解酵素への反応の違いを応用した方法、(2) Y 染色体上の STR のみを PCR で分離する方法、(3) laser-capture microdissection を用いて、物理的に被害者の口腔上皮細胞から、精子を分離する方法が開発されていることは、すでに述べた。

(1) 精子と口腔上皮細胞との細胞膜の性状の違いに着目し、それぞれの細胞膜のたんぱく質分解酵素への反応の違いを応用した方法 [Gill, P.; et al., 1985] は、特に、性的暴行事件において、男性と女性の DNA の混合物から、被害者あるいは加害者の DNA を分離して抽出する方法として、今日では、ゴールドスタンダードと呼べる方法となっており、FBI の科学捜査研究所をはじめとして、

世界中の犯罪捜査研究所で使用されている方法である。

しかしながら、この方法は、他の組織間での分離抽出では用いることができないという弱点がある。さらに、加害者が精管切除術を受けていたり、無精子症であったりして、試料中に精子が存在しない場合には、この方法では分離抽出することができない。

(2) Y 染色体上の STR のみを PCR で分離する方法は、無精子症などで、精子が存在しない試料の場合にも使用することができるという利点がある。

(3) laser-capture microdissection を用いて、物理的に被害者の膺上皮細胞から、精子を分離する方法は、膨大な時間を要し、設備も必要で、高価であるという欠点がある。 [Butler, M. J., 2011]

このように、(1) ~ (3) の方法は、精子と膺上皮細胞という細胞の違いを利用する、あるいは性染色体の違いを利用する方法で、性犯罪において、加害者と被害者の細胞を区別するために使用することができるのみで、使用範囲が限られてしまっている。

一方、今回行った、抗原抗体反応や抗 H レクチンによる細胞凝集反応を利用して、あらかじめ必要な細胞を選択し、DNA を抽出する方法は、必要に応じて抗体やレクチンを変更していくことで、任意の組織間での分離抽出が可能であった。

このため、これまで法医学領域で報告されている (1) ~ (3) の DNA 分離抽出法よりも、本方法は、汎用性が高いという利点があるといえる。

また、本方法は、一般的な DNA 抽出法による所要時間 (DNA 抽出 : 1 時間、PCR : 3 時間、電気泳動 : 1 時間) に、細胞抽出のためのおよそ 2 時間が加わるだけで可能であり、簡便な操作でできるという点も利点であると考えられる。

今回、抗体を付着させることのできる磁気ビーズを使用することで、磁気分

離法を行った。

抗体やレクチンを付着させた磁気ビーズは、市販されているため、市販品を使用すれば、より操作の手順は簡単で早くなると考える。

また、今回行ったように、磁気ビーズに抗体やレクチンを結合させる操作を行えば、様々な抗体と結合させることができることから、必要に応じて抗体を変更すれば、多種多様な細胞選択が可能になり、応用の幅が広い方法であると考ええる。

## 5. 方法 2 ——抽出後の DNA 精製への応用——

### 5.1 背景

L-fucose は、deoxy-ribose と同じデオキシ糖の一種である。

deoxy-ribose は、水溶液中では、フラノースの平行混合物であるピラノースとして存在していることが知られており [Watson, J. D., 1980] (Figure 21)、L-fucose とほぼ同様の構造となる。

また、L-fucose lectin は、もともと、C3 の水酸基ラジカルを認識して結合する働きを持っているため、C3 の水酸基ラジカルを有する deoxy-ribose も、認識

しうることになる。

このため、L-fucose lectin は、L-fucose だけでなく、水溶液中の deoxy-ribose とも結合することが可能であると予測できる [Hindsgaul, O.; et al., 1982]。

そこで、今回、L-fucose lectin に結合させた DNA による沈殿物から DNA を収集することが可能かどうかを実験してみた。

## 5.2 方法の概略

血液を、室温で、1 か月間放置した。

1 か月間放置した血液から DNA を抽出した。

抽出した DNA 10ng につき、30  $\mu$ g の L-fucose lectin (JOM) を加え、凝集塊を作成し、作成した凝集塊を用いて PCR を行い、個人識別用キットを用いて、DNA プロファイルを作成した。

## 5.3 試料と方法

血液を、室温で 1 か月間放置した。

1 か月後、中程度溶血した血液から DNA を抽出した。

抽出した DNA 1.5ng (DNA 溶液 1.5ng/ $\mu$ l) につき、30  $\mu$ l の L-fucose lectin (0.1 mg) (JOM) を直接加えた。

室温で 10 分間置き、テーブルトップマイクロ冷却遠心機 3500 (KUBOTA) で 15000rpm、5 分で遠心した後、L-fucose lectin によって凝集した凝集塊を乾燥させ、溶液 buffer にて、150pg/ $\mu$ l に調整した。98°C 10 分間煮沸し、L-fucose lectin を失活させたのち、AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems™) を用いて、DNA プロファイルを作成した。

なお、DNA 濃度の測定には、Naro Drop Microvolume Spectrophotometers and Fluorometer (Thermo Fisher) を使用した。

#### 5.4 結果

抽出後の DNA に L-fucose lectin を添加して凝集塊を作成し、凝集塊から作成した DNA プロファイル（濃度が 150pg/ $\mu$ l の試料を、1  $\mu$ l 使用）結果と、Control (L-fucose lectin 精製前の DNA によるプロファイル、濃度が 1.51ng/ $\mu$ l の試料を、1  $\mu$ l 使用) とを比較した (Figure 22)。

さらに、Control を 10 倍に希釈して作成した DNA プロファイル（濃度が 150pg/ $\mu$ l の試料を、1  $\mu$ l 使用）、Control を 100 倍に希釈して作成した DNA プロファイル（濃度が 150pg/ $\mu$ l の試料を、1  $\mu$ l 使用）の結果と、Control と比較した。

DNA に L-fucose lectin を加えて得られた凝集塊から作成した DNA プロファイルは、Control と同じ遺伝子型を示すアレルピークが検出された。

一方で、Control を 10 倍に希釈して作成した DNA プロファイルでは、L-fucose lectin を加えて得られた凝集塊から再抽出した DNA と等濃度であるにも関わら

ず、高分子領域（250bp 以上。D7S820、CSF1PO）でローカスのドロップアウトが認められる。また、およそ 125bp には、壊れた DNA によるバックグラウンドノイズ（非特異的増幅）が検出されている。

しかしながら、等濃度の L-fucose lectin を加えて得られた凝集塊から得られた DNA プロファイルでは、高分子領域のバンドの検出が良好であり、Control を 10 倍希釈して作成した DNA プロファイルで検出されていたバックグラウンドノイズも消失している。

100 倍希釈し作成した DNA プロファイルにおいては、D21S11 でアレロドロップアウトが起こり、その他のローカスで、ローカスドロップアウトが認められている。

## 5.5 考察

1 か月室温下で放置し、劣化し、混合試料となった血液に、L-fucose lectin を加え、凝集させ、凝集塊から DNA を再度抽出した。

L-fucose lectin は、L-fucose の C3 の水酸基を認識して結合する働きを持ち、水溶液中の Deoxy-ribose は、L-fucose と同様に C3 の水酸基ラジカルを有することから [Watson, J. D., 1980]、L-fucose lectin は、水溶液中の Deoxy-ribose と結合できる性質を利用して [Hindsgaul, O.; et al., 1982]、混合試料から抽出した DNA に L-fucose lectin を結合させた。

混合試料から抽出した DNA 鎖のうち、L-fucose lectin が認識し結合できる DNA は、混合試料中の、劣化した DNA の中でも Deoxy-ribose の糖の化学構造



が比較的保持されていた、劣化の程度が少ない DNA 鎖であったと推測される。

それゆえに、L-fucose lectin と結合した DNA だけを再抽出したことで、試料中の他の混合物（不純物）が減少したことで、Control と同じ遺伝子型を示すアレルピークが検出されたものと推測された。

また、Control を希釈し作成した DNA プロファイルでは、特に 10 倍希釈の DNA プロファイルと L-fucose lectin によって得られた凝集塊の DNA プロファイルとでは、濃度が同じにもかかわらず、ローカスのドロップアウトを起こしている。

このことから、L-fucose lectin を加えて得られた凝集塊から再度 DNA 抽出を行うということは、ただ単に、試料を希釈しているのではなく、非特異的増幅の原因となりうる劣化 DNA や低分子 DNA が除去され、高分子領域の PCR が可能なレベルで、DNA の精製が行われているものと考えた。

今日では、マルチプレックス STR 法を使用することで、1ng 以下の DNA でも、PCR 増幅可能となっており [Butler, M. J., 2009]、個人識別用の STR キットは、非常に高感度であることから、精製の過程で DNA 量が減少しても、遺伝子型を示すアレルピークの検出には問題がない。

なお、L-fucose lectin と DNA の結合の結果として DNA の一部が分解されるが、分解度は高くないので、PCR に必要な DNA の長さは十分に保持されていることから、これについても、遺伝子型を示すアレルピークの検出には、影響を与える可能性は低いと考える。

むしろ、混合試料で複数のアレルピークが検出されていたがために、混合試料の判定のための煩雑な作業を余儀なくされるのに対し、L-fucose lectin を加えたことで、DNA が精製され、他の混合物によるアレルピークの増幅がなくなり、遺伝子型を判定する作業が軽減されることのほうが、有益であると思われる。

る。

今後は、レクチンを使用することで、どの程度まで DNA の精製が可能なのかどうかを検討していくために、不純物をより多く含む試料を用いるなどが必要になると考える。

## 6. おわりに

本研究は、DNA プロファイルを作成するために、法医学領域特有の問題である、混合試料の問題を、抗体あるいはレクチンによる特異的な細胞凝集反応を利用して、目的とする細胞や物質を選択し、DNA 抽出を行うことで、混合試料の状態を回避するための方法である。

これまで行われてきた DNA の分離抽出法と比較して、汎用性が高く、有効な方法であると考えられる。

さらに、L-fucose lectin による細胞凝集反応を利用する方法を応用して、混合試料での抽出後の DNA の精製も可能であった。

現状では、本方法は、必ずしも 100% の分離が可能とは限らないが、量的なアレルピークの高さを考慮した、定量的な判断を行うことにより、ほぼ正確な DNA 型の判定が可能と言える。

今後は、抗体やレクチンの種類や遠心分離等の条件を検討して、分離の精度を向上させていくとともに、抗体やレクチンを組み合わせて使用していくなど、

さらなる応用の可能性を広げていきたい、と考える。

また一方で、本研究では、混合試料に含まれる検体の割合は、1 : 1 の割合のみとなっている。しかし、実際には、混合試料に含まれる検体は、様々な割合での混合となってしまうため、どの程度の混合比まで、施行することが可能なのかといった検討が今後必要になると思われる。

さらに、どのような混合試料の場合に、どのような抗体あるいはレクチンを用いて分離を行うことが、より効果的であるのかといった検討もまた、できていないため、実用化のためには、さらなる研究が必要となると考える。

## 謝辞

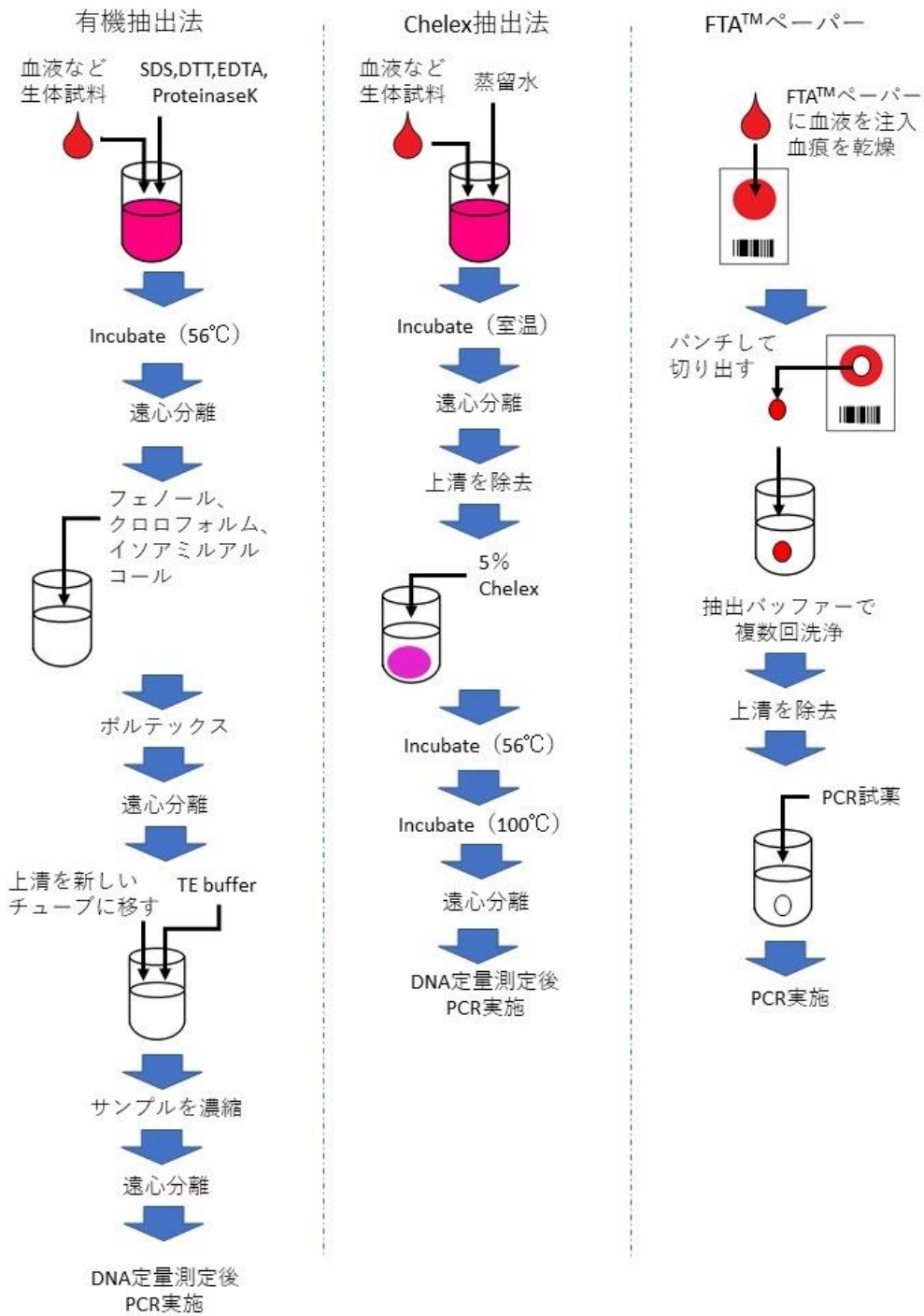
本研究において、全般にわたり、詳細なるご指導をいただいた、本田克也教授、そして、菅野幸子助教に深く感謝の意を捧げます。

実験手技面においてご指導いただいた竜沢千加技官に心より感謝を申し上げます。

この研究は、法医学教室の皆様をはじめ、他多数の方々のご協力に支えられて完成しました。

再度深く御礼を申しあげ、本稿を閉じさせていただきます。

Figure 1 主な DNA 抽出方法



参考文献： [Butler, M. J., 2009]

**Table 1** 市販されているマルチプレックス STR マーカーキットの変遷

製品名	販売元	販売 開始 時期	STR ローカス
TH01,TPOX,CSF1PO	Promega	1993 年 2月	TH01,TPOX,CSF1PO
AmpFLSTR® Blue	Applied Biosystems	1996 年 10 月	D3S1358,VWA,FGA
AmpFLSTR® Green I	Applied Biosystems	1997 年 1月	Amelogenin, TH01,TPOX,CSF1PO
CTTv	Promega	1997 年 1月	TH01,TPOX,CSF1PO, VWA(vWF)
FFFL	Promega	1997 年 1月	F13A1,FES/FPS,F13B,LPL
GammaSTR	Promega	1997 年 1月	D16S539,D13S317,D7S820, D5S539
Power Plex® 1.1, 1.2	Promega	1997 年 1月 1998 年 9月	TH01,TPOX,CSF1PO,VWA, D16S539,D13S317,D7S820, D5S539
AmpFLSTR® Profiler™	Applied Biosystems	1997 年 5月	D3S1358,VWA,FGA,Amelogenin, TH01,TPOX,CSF1PO,D5S818, D13S317,D7S820
AmpFLSTR® Profiler Plus™	Applied Biosystems	1997 年 12 月	D3S1358,VWA,FGA,Amelogenin, D8S1179,D21S11,D18S51, D5S818,D13S317,D7S820

製品名	販売元	販売 開始 時期	STR ローカス
AmpFLSTR® Cofiler™	Applied Biosystems	1998 年 5月	D3S1358,D16S539,Amelogenin, TH01,TPOX,CSF1PO,D7S820
AmpFLSTR® SGM Plus™	Applied Biosystems	1999 年 2月	D3S1358,D16S539, Amelogenin, VWA,D2S1338,D8S1179,D21S11, D18S51,D19S433,TH01,FGA
Power Plex® 2.1 (日立 FMBIO 用)	Promega	1999 年 6月	D3S1358,TH01,D21S11,D18D51, VWA,D8S1179,TPOX,FGA, Penta E
Power Plex® 16	Promega	2000 年 5月	CSF1PO,FGA,TPOX,TH01,VWA, D3S1358,D5S818,D7S820,D8S1179, D13S317,D16S539,D18S51,D21S11, Penta D,Penta E,Amelogenin
Power Plex® 16BIO (日立 FMBIO 用)	Promega	2001 年 5月	CSF1PO,FGA,TPOX,TH01,VWA, D3S1358,D5S818,D7S820,D8S1179, D13S317,D16S539,D18S51,D21S11, Penta D,Penta E,Amelogenin
AmpFLSTR® Identifiler™ *本研究で使用しているキッ ト	Applied Biosystems	2001 年 7月	CSF1PO,FGA,TPOX,TH01,VWA, D3S1358,D5S818,D7S820,D8S1179, D13S317,D16S539,D18S51,D21S11, D2S1338,D19S433,Amelogenin
AmpFLSTR® Profiler Plus™ ID (未標識 D8-R プライマ ーを追加)	Applied Biosystems	2001 年 9月	D3S1358,VWA,FGA,Amelogenin, D8S1179,D21S11,D18S51,D5S818, D13S317,D7S820
Power Plex® ES	Promega	2002 年 5月	FGA,TH01,VWA,D3S1358,D8S1179, D18S51,D21S11,SE33,Amelogenin
AmpFLSTR® SEfiler™	Applied Biosystems	2002 年 9月	FGA,TH01,VWA.D3S1358,D8S1179, D16S539,D18S51,D21S11,D2S1338, D19S433,SE33,Amelogenin

製品名	販売元	販売開始時期	STR ローカス
<b>Power Plex®</b> <b>Y23</b> *本研究で使用しているキット	Promega	2013年1月	DYS576,DYS389I,DYS448,DYS389II, DYS19,DYS391,DYS481,DYS533, DYS438,DYS437,DYS570,DYS390,DYS439, DYS392,DYS643,DYS393,DYS458, DYS385a/b,DYS456,Y-GATA-H4

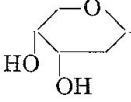
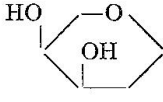
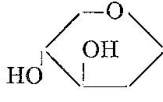
参考文献： [Butler, M. J., 2009]

Figure 2 Maxwell® 16





Table 2 レクチンの種類と分類

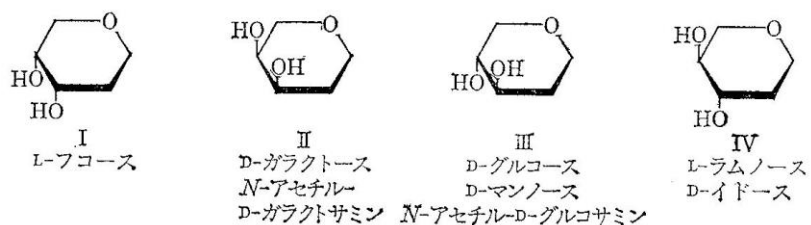
Mäkelä による分類	糖のC-3, C-4のOHの配位	凝集阻止を示すおもな糖	レ ク チ ン	赤血球凝集に対する特異性
1群		Fuc	<i>Lotus tetragonolobus</i>	抗H
			<i>Ulex europaeus</i> (凝集素 I) (ハリエンシダ)	抗H
2群		Gal や GalNAc	<i>Abrus precatorius</i>	非特異的
			<i>Agaricus bisporus</i> (マッシュルーム)	非特異的
			<i>Arachis hypogaea</i> (ピーナッツ)	抗T
			<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	抗B
			<i>Bauhinia purpurea</i>	非特異的
			<i>Calpurina aurea</i>	抗A+B
			<i>Crotalaria aegyptiana</i>	抗A
			<i>Fomes fomentarius</i>	抗B
			<i>Glycine max</i> (ダイズ)	非特異的
			<i>Maackia amurensis</i> (イヌエンジュ)	非特異的
			<i>Phaseolus lunatus</i> †1 (リママメ)	抗A
			<i>Phaseolus vulgaris</i> (インゲンマメ)	非特異的
			<i>Ricinus communis</i> (ヒマ)	非特異的
			<i>Robinia pseudoacacia</i> (ニセアカシア)	非特異的
			<i>Sophora japonica</i> (エンジュ)	抗A+B
<i>Wistaria floridunda</i> (フジ)	非特異的			
<i>Vicia cracca</i> (クサフジ)	抗A			
3群		Glc や Man	<i>Canavalia ensiformis</i> (ナタマメ)	非特異的
			<i>Lens culinaris</i> †2 (レンズマメ)	非特異的
			<i>Pisum sativum</i> (エンドウマメ)	非特異的
			<i>Vicia faba</i> (ソラマメ)	非特異的
			<i>Cytisus sessilifolius</i>	抗H
			<i>Laburnum alpinum</i>	抗H
			<i>Cerastrium fomentosus</i>	抗H
di-N-acetyl chitobiose	<i>Solanum tuberosum</i> (ジャガイモ)	非特異的		
	<i>Ulex europaeus</i> (凝集素 II) (ハリエンシダ)	抗H		
	<i>Triticum vulgare</i> (小麦胚)	非特異的		

†1 *Phaseolus limensis* ともいう。

†2 *Lens esculenta* ともいう。

出典：大沢 利昭；森 良一。(1976). レクチン. 講談社. p 40、表 3.1 レクチンの種類と分類

Figure 3 ピラノースの C3、C4 の水酸基の配位と代表的な単糖



出典：辻 勉. 図 3.1 ピラノースの C3、C4 の水酸基の配位と代表的な単糖(1985). 著：大沢利昭. レクチンと細胞生物学 (p 69) . 講談社.

Figure 4 L-fucose lectin による細胞凝集の模式図

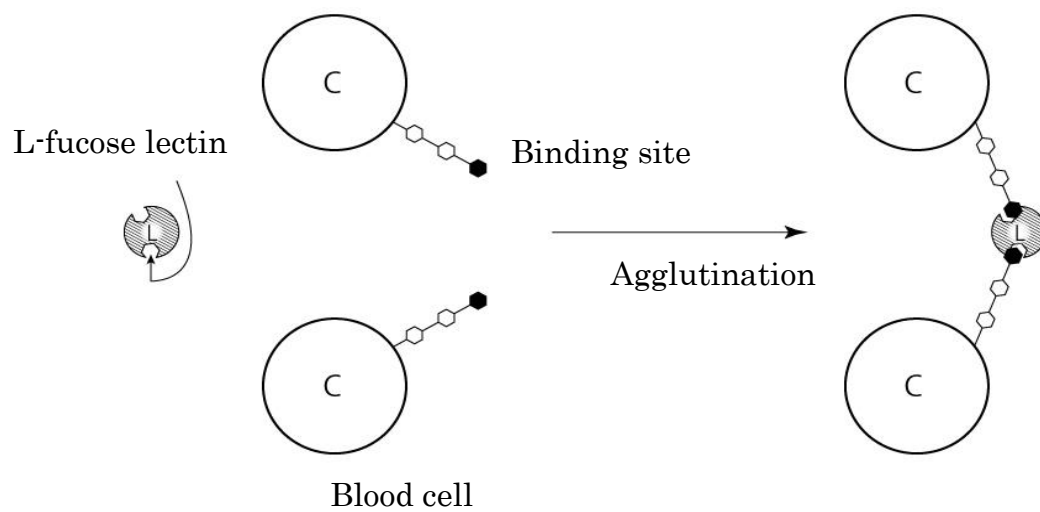
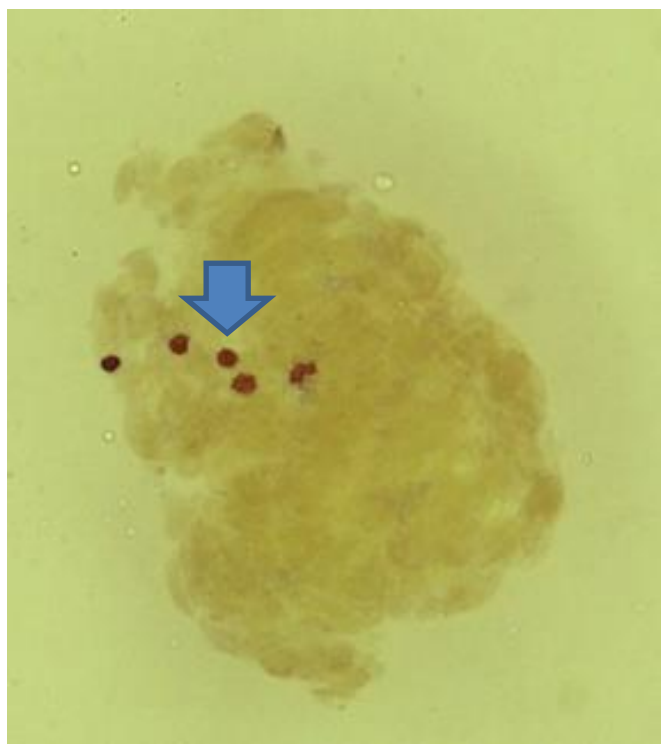


Figure 5 混合試料の解読ステップ



参考文献： [Clayton, T. M.; et al., 1998]

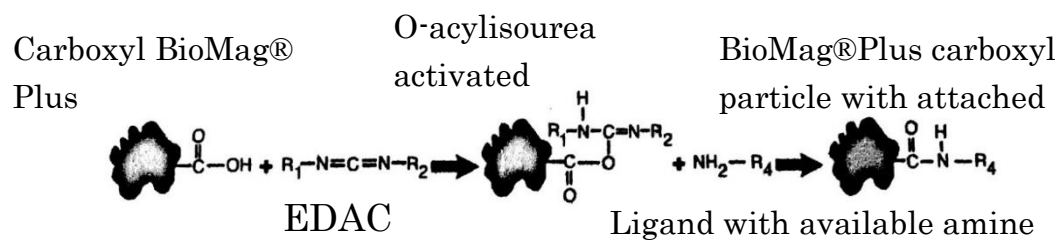
Figure 6 抗 B 抗体による B 型血液の凝集 (HE 染色)



×200

抗 B 抗体による B 型血液の凝集塊。  
凝集塊には白血球も観察される。  
矢印は白血球を示している。  
周囲の赤血球は、溶血し、不明瞭になっている。

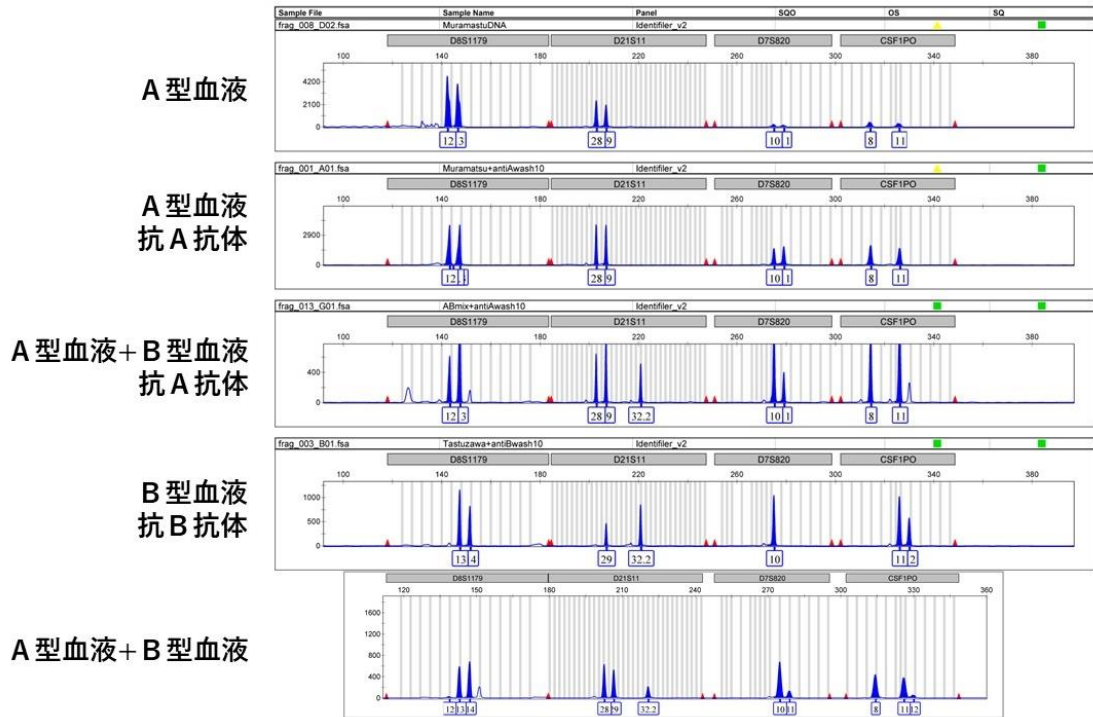
Figure 7 BioMag® Plus Carboxyl Protein Coupling Kit



*Polysciences, Inc.*

参照 : technical data sheet 618 (catalog numbers: 86011, 86010)

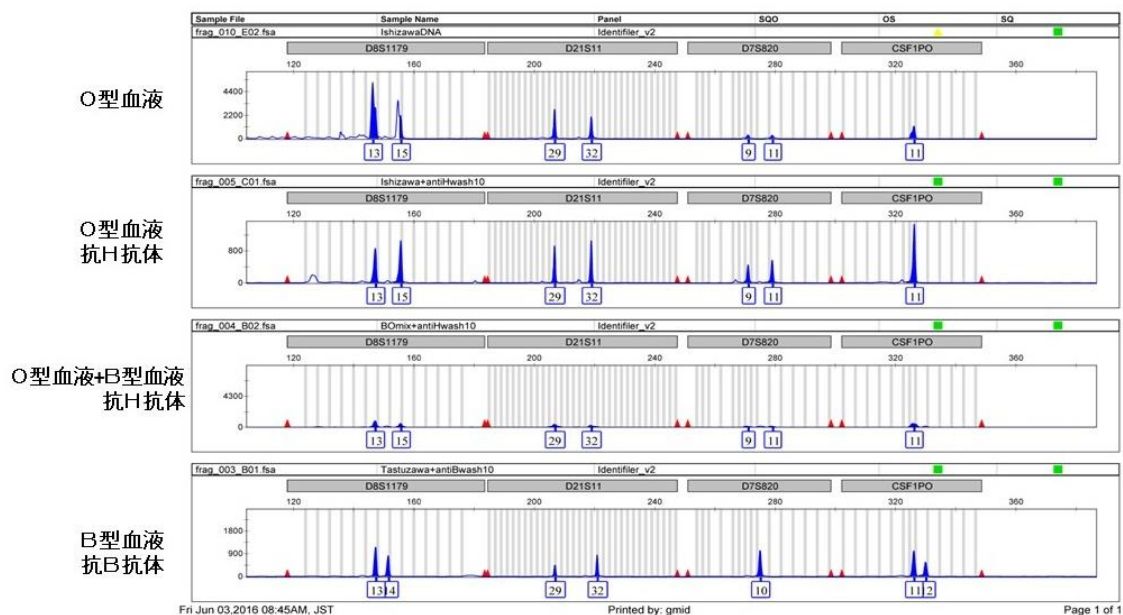
Figure 8 抗A抗体、抗B抗体による分離



AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems™)

縦軸は増幅バンドの相対蛍光強度（単位は、RFU）、横軸は塩基サイズ (bp) を表している。□の中の数値は、遺伝子型（繰り返し配列の反復数）を表している。

Figure 9 抗H抗体による分離

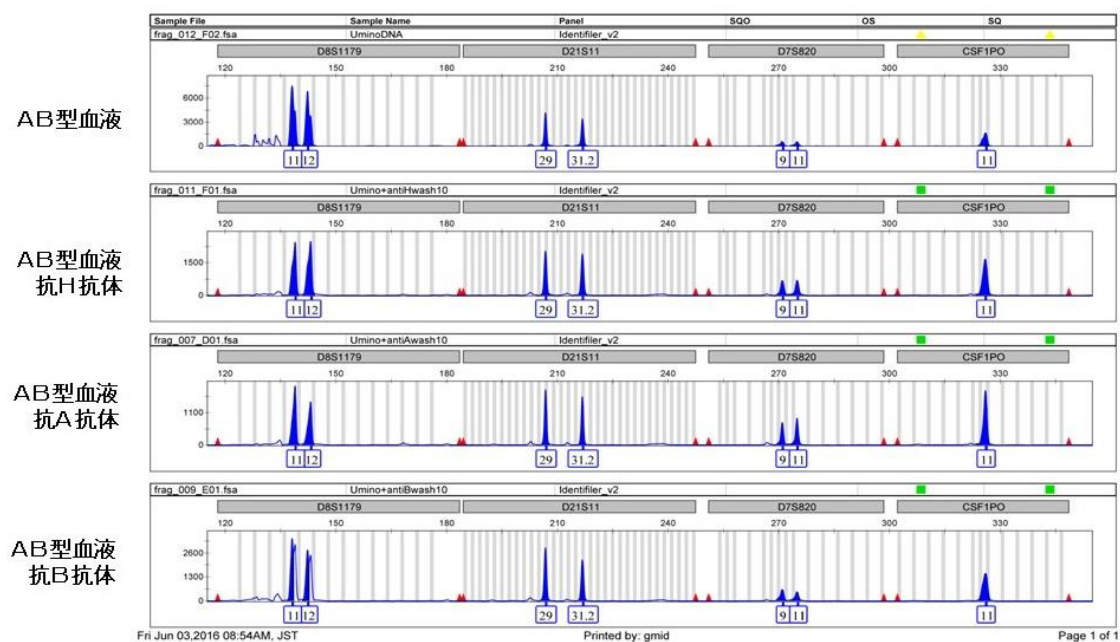


AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems™)

縦軸は増幅バンドの相対蛍光強度（単位は、RFU）、横軸は塩基サイズ (bp) を表している。□の中の数値は、遺伝子型（繰り返し配列の反復数）を表している。



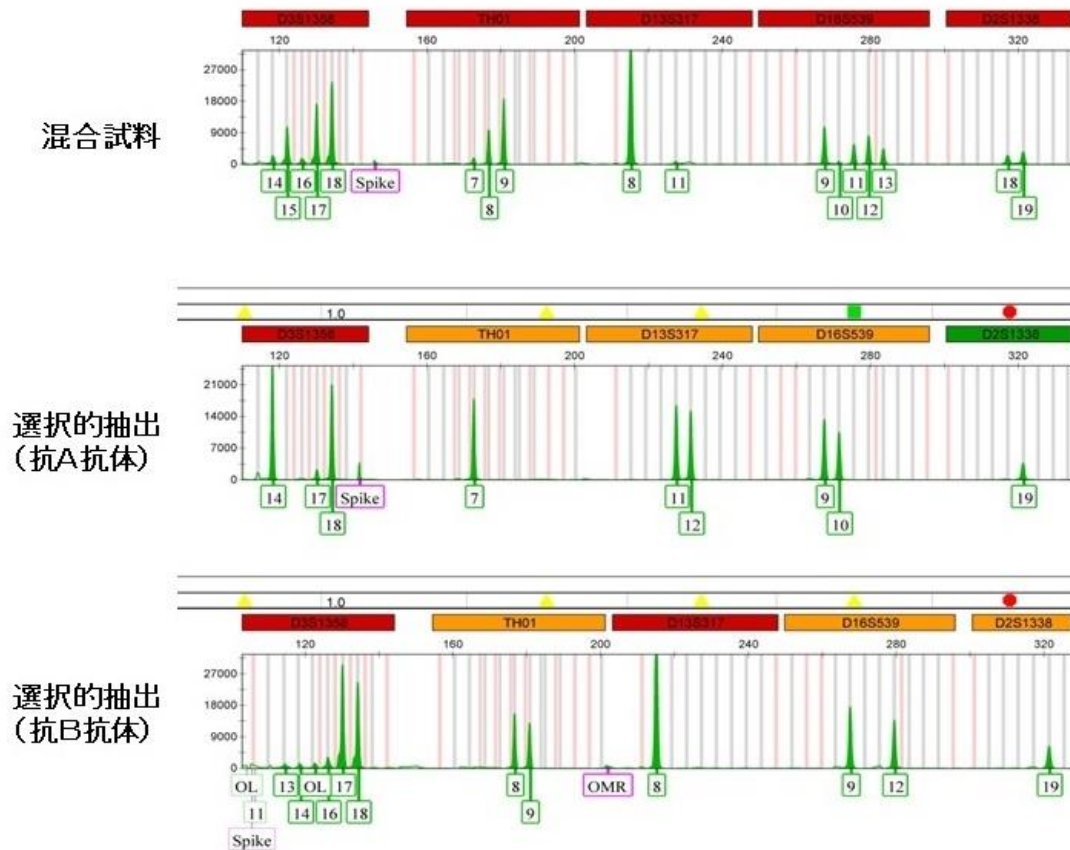
Figure 10 AB型血液での抗A・抗B・抗H抗体による分離



AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems™)

縦軸は増幅バンドの相対蛍光強度（単位は、RFU）、横軸は塩基サイズ (bp) を表している。□の中の数値は、遺伝子型（繰り返し配列の反復数）を表している。

Figure 11 A、B、O型3名の血液からなる混合試料を抗A抗体、抗B抗体により分離



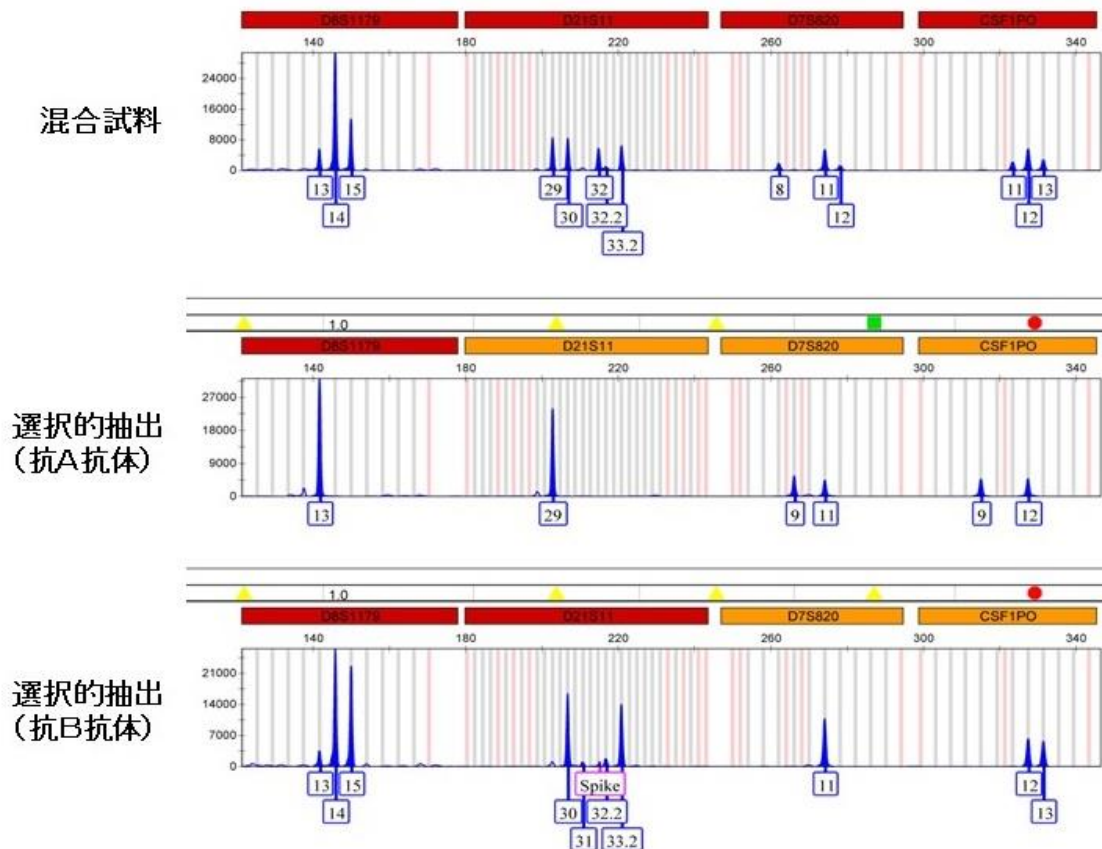
AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems™)

縦軸は増幅バンドの相対蛍光強度（単位は、RFU）、横軸は塩基サイズ (bp) を表している。□の中の数値は、遺伝子型（繰り返し配列の反復数）を表している。

なお、OLはOff-Ladderを意味しており、コンピューターでの解析上、参照アレルックラダー上のコンセンサスアレルとサイズが異なるアレルピークであると、判断されたアレルピークを示している。

Spikeは、アレルピークの形が鋭すぎるという判定結果を示しており、コンピューターによる解析上、型判定から除外されたアレルピークである。蛍光色素の解離などで生じることがあるとされる。 [Butler, M. J., 2009]

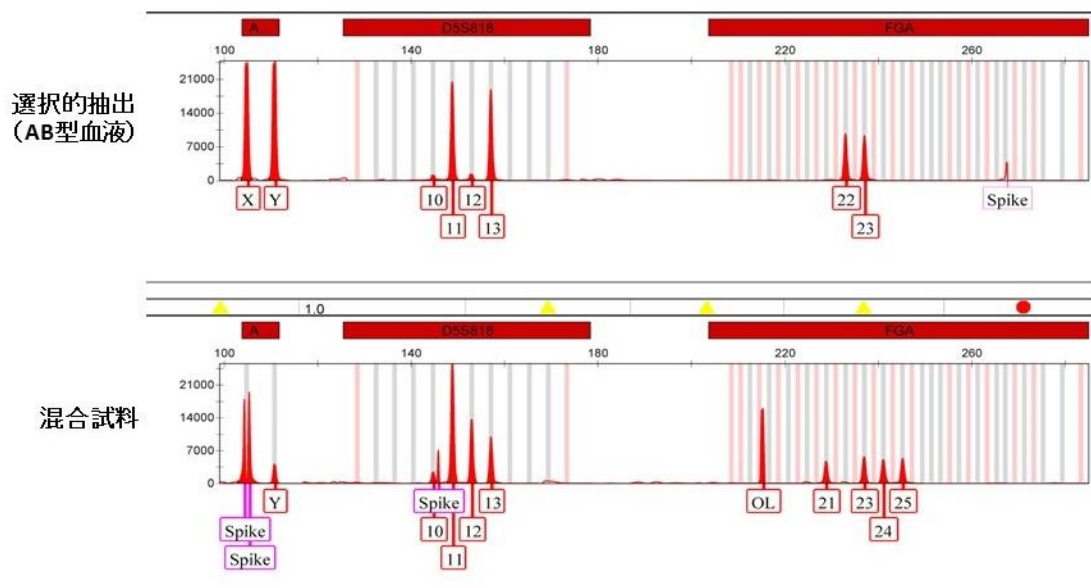
Figure12 A、B、O型3名の血液からなる混合試料を抗A抗体、抗B抗体により分離  
(続き)



AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems™)

縦軸は増幅バンドの相対蛍光強度 (単位は、RFU)、横軸は塩基サイズ (bp) を表している。□の中の数値は、遺伝子型 (繰り返し配列の反復数) を表している。

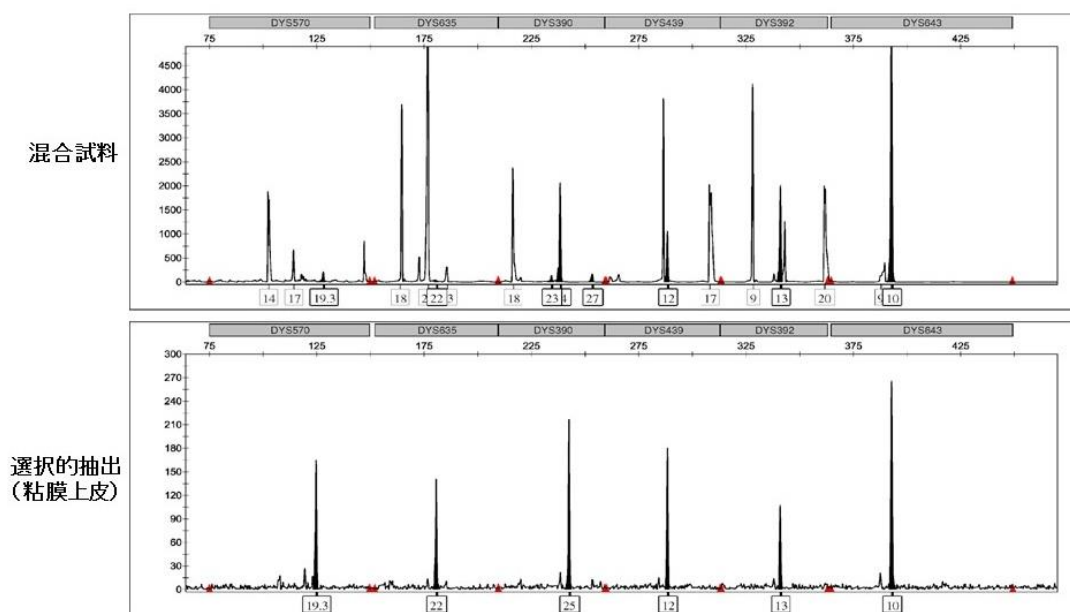
**Figure 13** 1名の血液と2名の唾液から成る混合試料をCD45（抗白血球抗体）により分離



AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems™)

縦軸は増幅バンドの相対蛍光強度（単位は、RFU）、横軸は塩基サイズ (bp) を表している。□の中の数値は、遺伝子型（繰り返し配列の反復数）を表している。

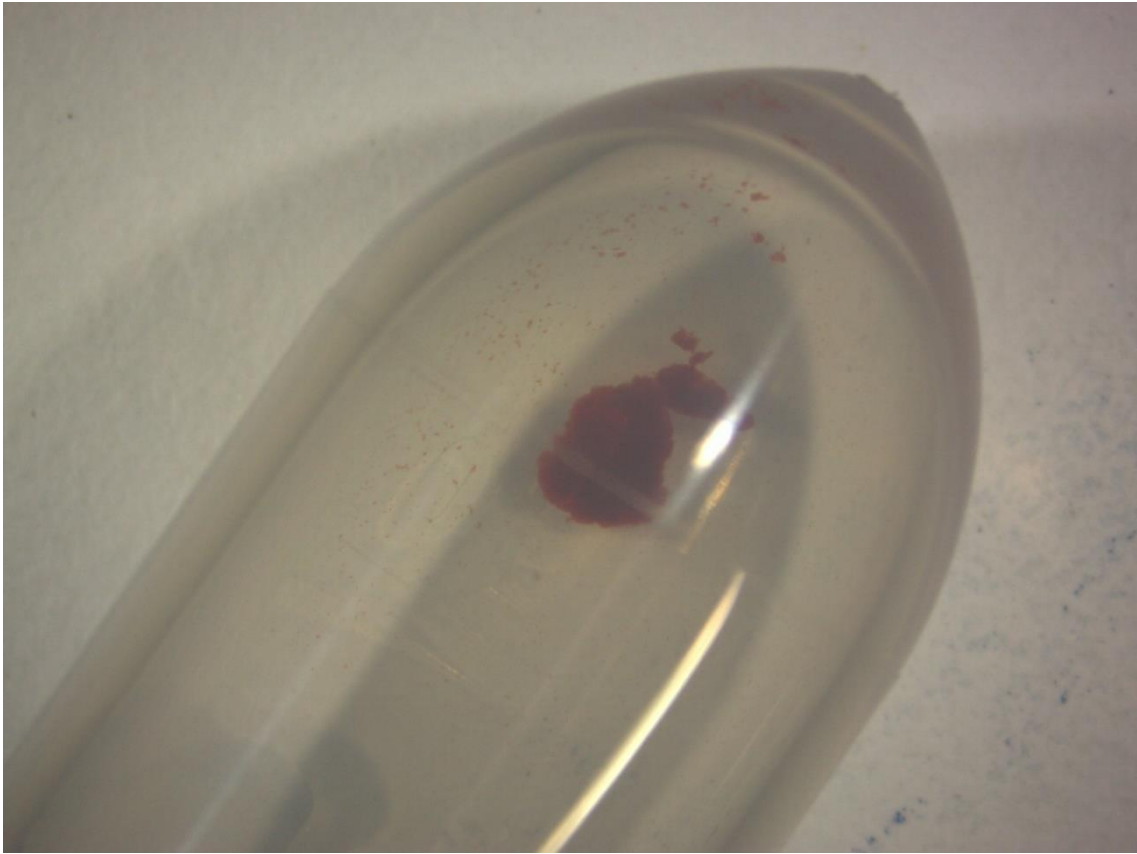
Figure 14 2名の男性血液と1名の男性唾液から成る混合試料をCD326（抗上皮抗体）により分離



Power Plex<sup>®</sup> Y23 System (Promega 社)

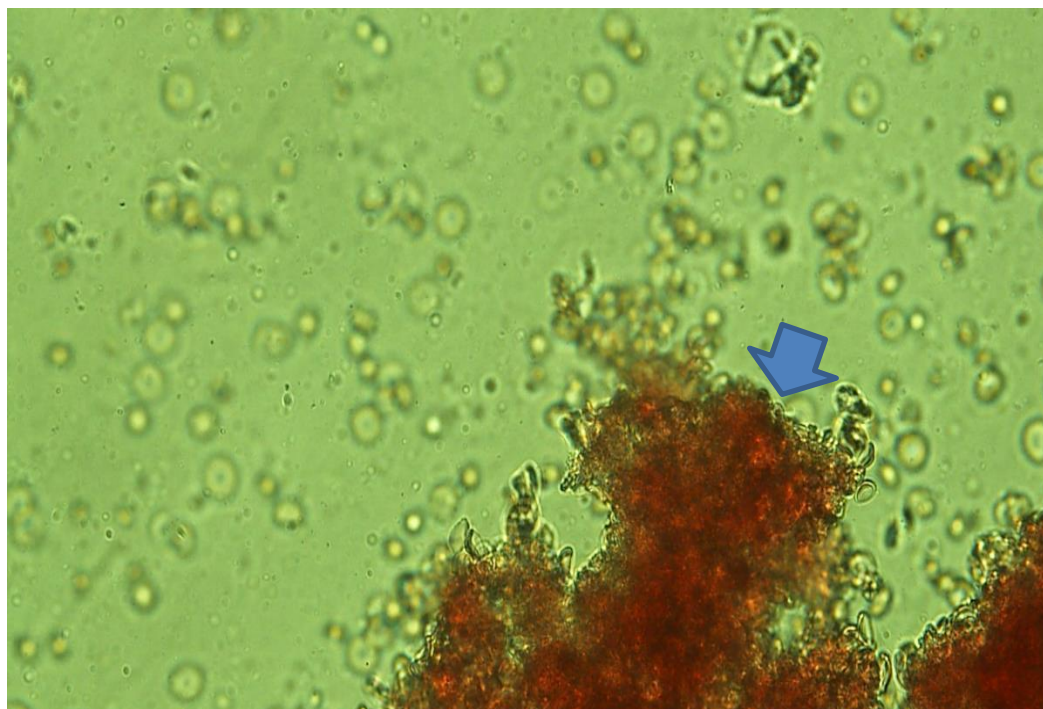
縦軸は増幅バンドの相対蛍光強度（単位は、RFU）、横軸は塩基サイズ (bp) を表している。□の中の数値は、遺伝子型（繰り返し配列の反復数）を表している。

**Figure 15** 6 か月経過した血痕から得られた凝集塊 (抗 H レクチン使用)



6 か月経過し、古くなった血痕から得られた細胞からでも、抗 H レクチンを使用することで、細胞凝集塊を作成することが可能であった。

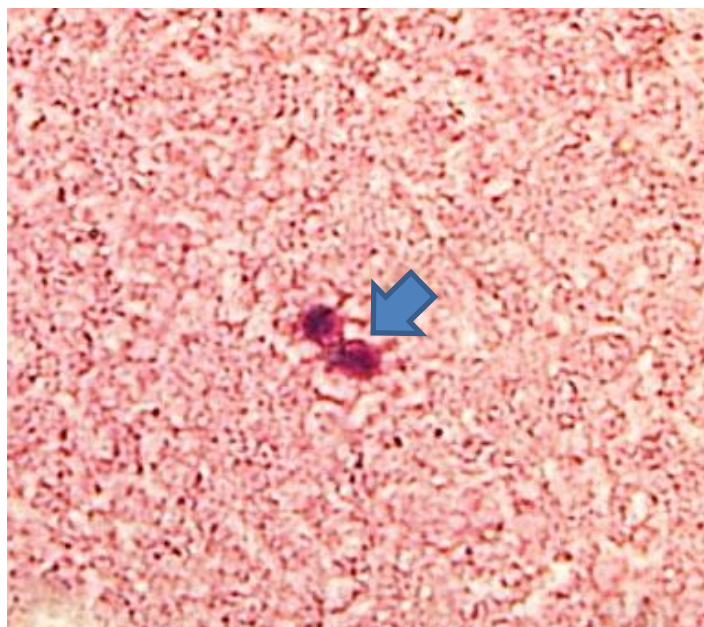
Figure 16 6 か月経過した血痕に抗 H レクチンを加えて得られた凝集塊  
(沈殿層の一部の顕微鏡写真)



×200

矢印は凝集塊。

Figure 17 6 か月経過した血痕に抗 H レクチンを加えて得られた凝集塊  
(HE 染色)



× 400

矢印は白血球。

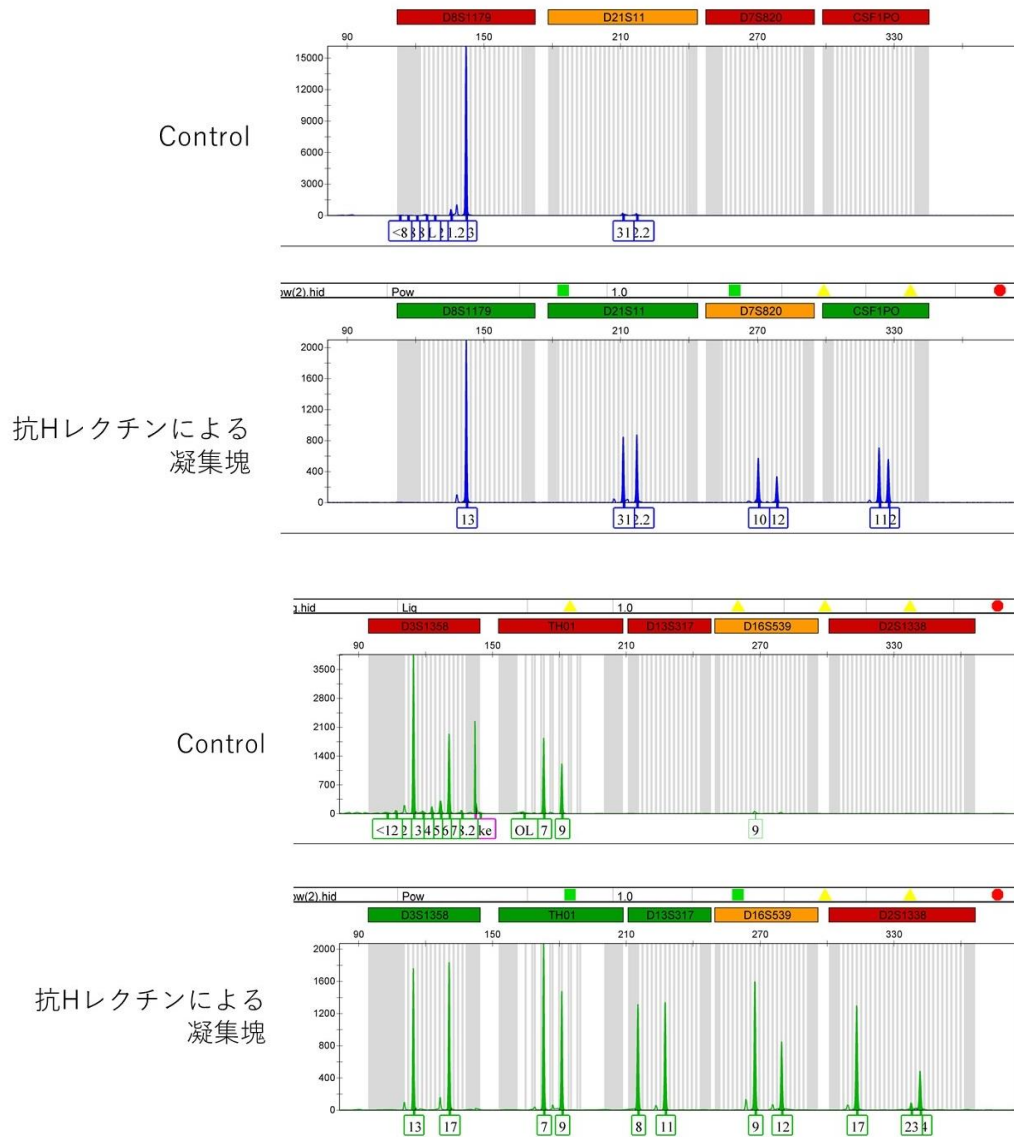
凝集塊中には、白血球も認められる。

抽出された DNA は、これら凝集塊中に認められる白血球によるものと思われる。

また、溶血し、不明瞭となっているが、細胞膜の形態も認められる。



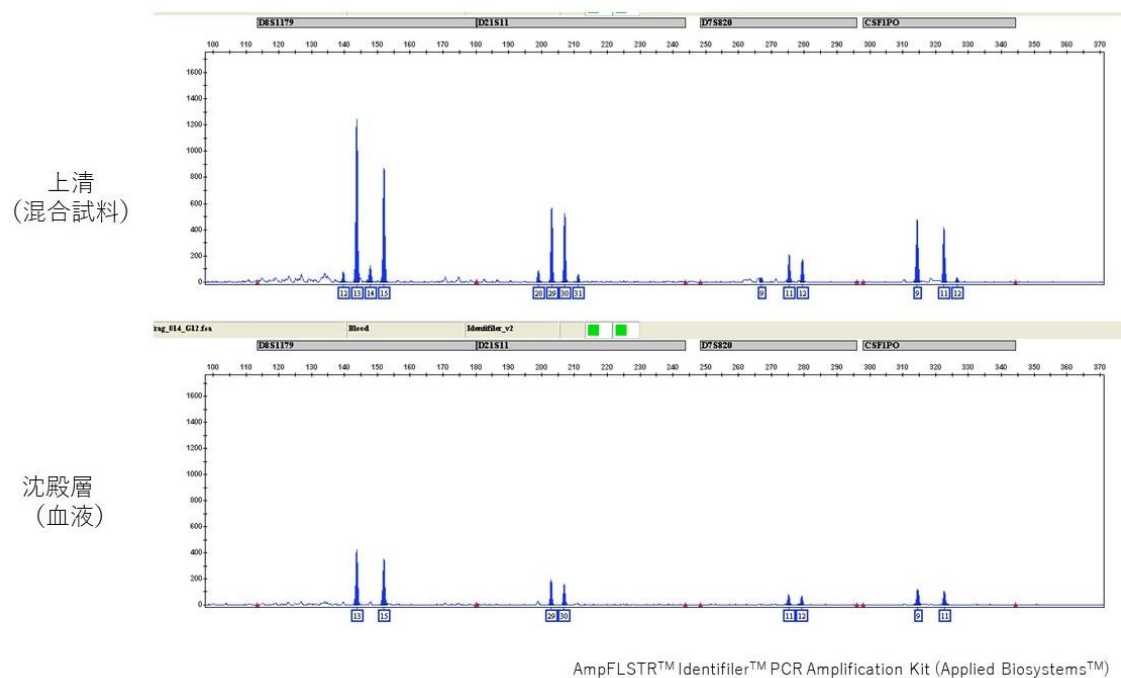
**Figure 18** 6 か月間放置した血痕を抗 H レクチンで処理した後作成した DNA プロファイル



AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems™)

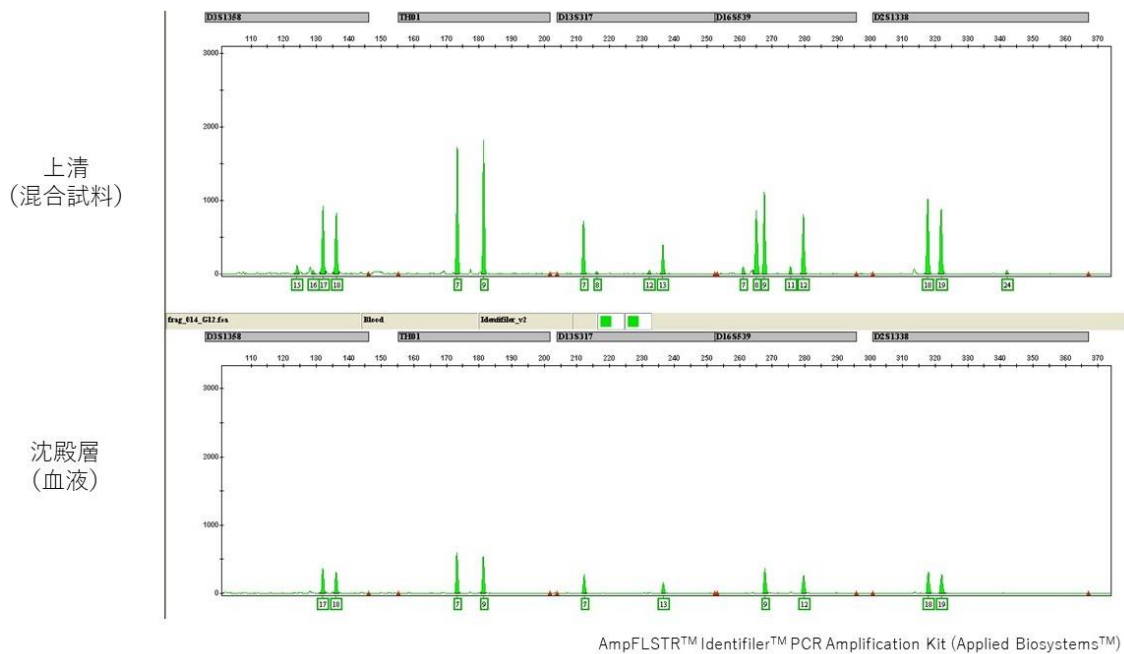
縦軸は増幅バンドの相対蛍光強度（単位は、RFU）、横軸は塩基サイズ（bp）を表している。□の中の数値は、遺伝子型（繰り返し配列の反復数）を表している。

**Figure 19 抗H レクチンによる分離**  
**(D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO)**



縦軸は増幅バンドの相対蛍光強度（単位は、RFU）、横軸は塩基サイズ (bp) を表している。□の中の数値は、遺伝子型（繰り返し配列の反復数）を表している。

**Figure 20 抗H レクチンによる分離**  
**(D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338)**



縦軸は増幅バンドの相対蛍光強度（単位は、RFU）、横軸は塩基サイズ (bp) を表している。□の中の数値は、遺伝子型（繰り返し配列の反復数）を表している。

Table 3 抗Hレクチンによる分離 結果のまとめ

検体	血液	唾液 1	唾液 2	上清	沈殿層
ローカス	遺伝子型	遺伝子型	遺伝子型	検出されたアレル	検出されたアレル
D8S1179	13-15	13-13	12-14	12, 13, 14, 15	13, 15
D21S11	29-30	29-29	29-31	28, 29, 30, 31	29, 30
D7S820	11-12	9-11	8-8	9, 11, 12	11, 12
CSF1PO	9-11	9-12	12-13	9, 11, 12	9, 11
D3S1358	17-18	15-18	16-17	15, 16, 17, 18	17, 18
TH01	7-9	7-7	7-8	7, 9	7, 9
D13S317	7-13	11-12	8-12	7, 8, 12, 13	7, 13
D16S539	9-12	9-10	9-9	7, 8, 9, 11, 12	9, 12
D2S1338	18-19	19-24	18-19	18, 19, 24	18, 19
D19S433	13.2-15.2	13-14	13-14	13.2, 14, 15.2, 17, 18	13, 2, 15.2
vWA	17-19	15-18	16-17	15, 16, 17, 18, 19	17, 19 (st18)
TPOX	7-11	8-8	7-11	7, 11	7, 11
D18S51	13-15	13-13	13-14	7, 11, 13, 15	13, 15
D5S818	11-11	10-11	11-13	7, 11, 13	11
FGA	22-15	22-23	23-25	20, 20.2, 22, 25, 29.2	22, 25
amelogenin	XY	XY	XY	XY	XY

上清から検出されたアレルは、血液、唾液 1、唾液 2 の遺伝子型が混ざった、混合バンドの結果を示している（赤字は血液サンプル由来の結果）。

一方、沈殿層から検出されたアレルは、血液サンプルの遺伝子型と一致している（緑字で示している）。

Figure 21 Deoxy-ribose と L-fucose の構造図

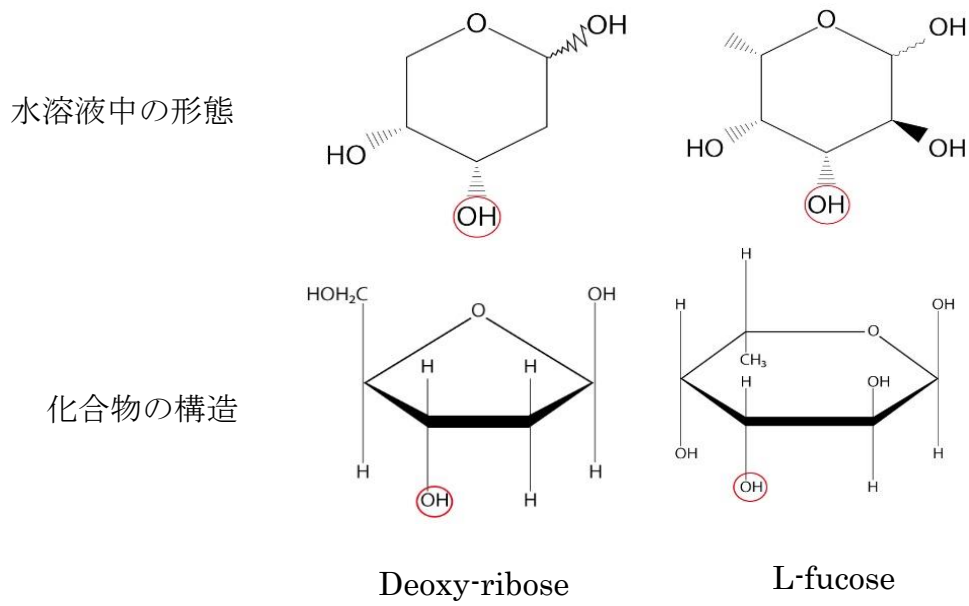
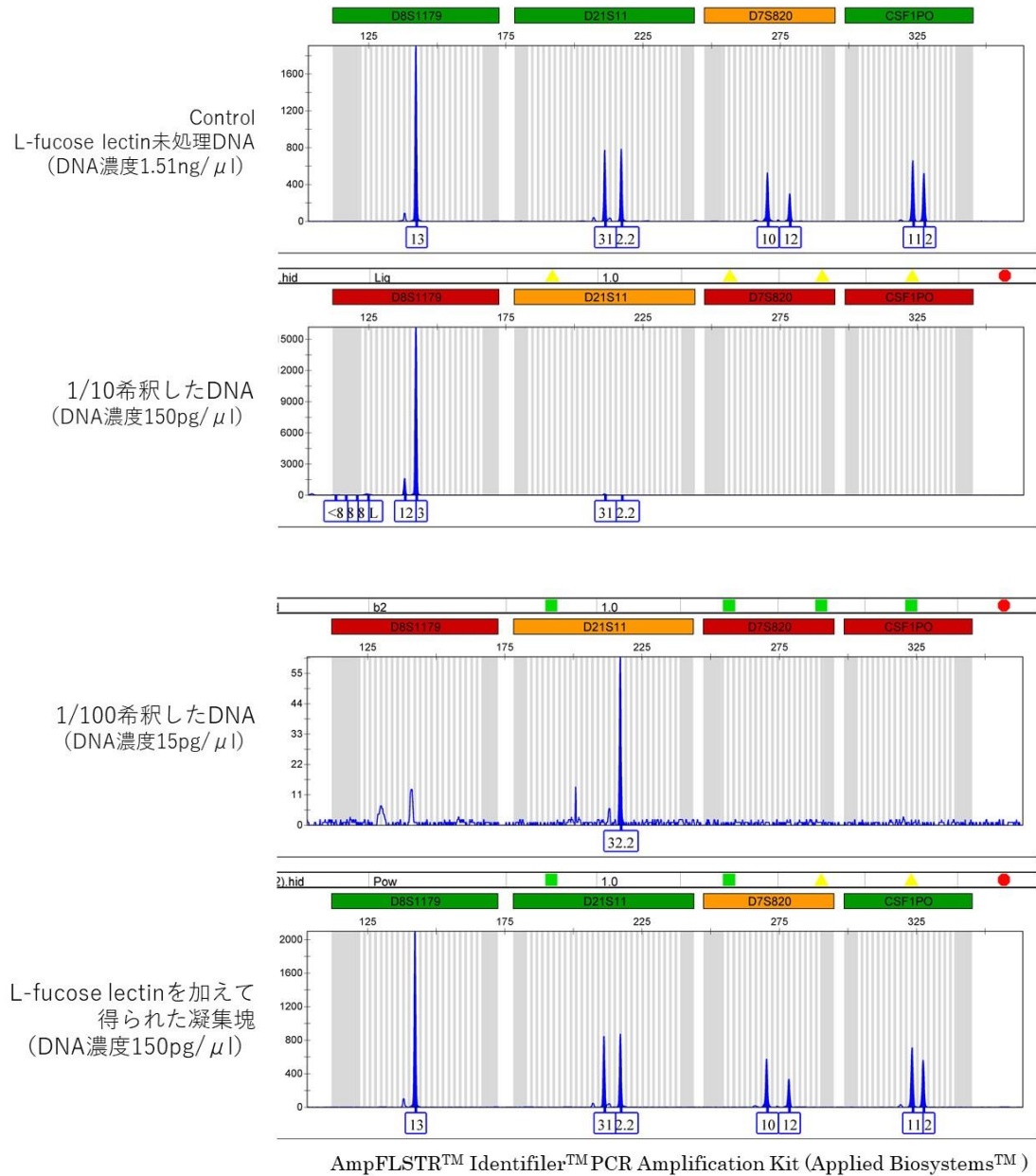


Figure 22 抽出後の DNA と L-fucose lectin による凝集塊から再抽出した DNA で作成した DNA プロファイル



\*反応には、いずれも  $1\mu$ l の DNA を使用した (実験条件は、個人識別用キットのメーカーのプロトコール通り)

縦軸は増幅バンドの相対蛍光強度 (単位は、RFU)、横軸は塩基サイズ (bp)

を表している。□の中の数値は、遺伝子型（繰り返し配列の反復数）を表している。

## 文献目録

- Belgrader, P.; Marino, M. A. (1997). Automated sample processing using robotics for genetic typing of short tandem repeat polymorphisms by capillary electrophoresis. *Laboratory Robotics and Automation*. 9, 3-7.
- Boom, R.; et al. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 28, 495-503.
- Booth, B. P.; et al. (1957). Blood chimerism in a pair of twins. *British Medical Journal*. 1, 1456-1458.
- Burgoyne, L.; et al. (1994). *Proceedings from the Fifth International Symposium on Human Identification*. Madison, Wisconsin: Promega Corporation.
- Burhoyne L.A. (1996). U.S. 特許番号: 5496562.
- Butler, M. J. (2009). DNA 鑑定とタイピング——遺伝学・データベース・計測技術・データ検証・品質管理——. 共立出版株式会社.
- Butler, M. J. (2009). 第 1 章 DNA タイピングの概要と沿革. 著: Butler J.M., DNA 鑑定とタイピング——遺伝学・データベース・計測技術・データ検証・品質管理—— (ページ: 1-12). 東京都文京区: 共立出版株式会社.
- Butler, M. J. (2009). 第 3 章 サンプル採取、DNA 抽出、DNA 定量分析. 著: Butler J.M., DNA 鑑定とタイピング——遺伝学・データベース・計測技術・データ検証・品質管理—— (ページ: 29-53). 東京都文京区: 共立出版株式会社.
- Butler, M. J. (2009). 第 5 章 ショートタンデムリピートマーカールおよび市販キット. 著: Butler J.M., DNA 鑑定とタイピング——遺伝学・データベース・計測技術・データ検証・品質管理 (ページ: 73-105). 東京都文京区: 共立出版株式会社.
- Butler, M. J. (2009). 第 6 章 STR の生物学: スタッター産物、非テンプレート付加、マイクロバリエーション、ヌルアレルと突然変異率. 著: Butler J.M., DNA 鑑定とタイピング——遺伝学・データベース・計測技術・データ検証・品質管理 (ページ: 107-126). 東京都文京区: 共立出版株式会社.
- Butler, M. J. (2009). 第 7 章 DNA 鑑定の課題: 劣化 DNA、PCR 阻害、汚染、混合サンプル、低コピー数. 著: Butler J.M., DNA 鑑定とタイピング——遺伝学・データベース・計測技術・データ検証・品質管理—— (ページ: 127-156). 東京都文京区: 共立出版株式会社.
- Butler, M. J. (2011). *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*. Waltham, MA: Elsevier.



- Clayton, T. M.; et al. (1998). Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Science International*. 91, 55-70.
- Comey, C. T.; et al. (1994). DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *Journal of Forensic Sciences*. 39, 970-974.
- Curran, J. M., et al. (1999). Interpreting DNA mixtures in structured populations. *Journal of Forensic Sciences*. 44, 987-995.
- Del Rio, S. A.; Mario, M. A. (1996). Reusing the Same blood-stained Punch for Sequential DNA Amplifications and Typing. *Bio Techniques*. 20, 970-974.
- Duncan, E.; et al. (2003). Isolation of genomic DNA. 著: BowienB., DürreP., *Nucleic Acids Isolation Methods* (ページ: 7-19). Stevenson Ranch, CA: American Scientific Publisher.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*. 5, 435-445.
- Franz, H. (1988). *Advances in Lectin Research* 1. Springer Science & Business Media.
- Gill, P.; et al. (1985). Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*. 318, 577-579.
- Gill, P.; et al. (1998). Interpretation of Mixtures Based on Peak Area - Identification of Genetic Anomalies, Stutters and Other Artefacts. *Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Identification* (ページ: 7-18). Madison, Wisconsin: Promega corporation.
- Gill, P.; et al. (1998). Interpreting simple STR mixtures using allele peak areas. *Forensic Science International*. 91, 41-53.
- Gold, E. R.; Balding, P. (1975). Receptor-specific proteins: Plant and animal lectins. Amsterdam: Excerpta Medica.
- Goldstein, I. J.; et al. (1980). What should be called a lectin. *Nature*. 285, 66.
- Greenspoon S. A.; et al. (2004). Application of the BioMek® 2000 Laboratory Automation Workstation and the DNA IQ™ System to the Extraction of Forensic Casework Samples. *Journal of Forensic Sciences*. 49, 29-39.
- Guyton, A. C.; Hall, J. E. (2004). Chapter34 生体の感染防御 : II. 免疫とアレルギー. 著: GuytonC.A., HallE.J., *ガイトン 臨床生理学* (ページ:

- 445-457). 東京都文京区: 医学書院.
- Hindsgaul, O.; et al. (1982). Synthesis of type 2 human blood-group antigenic determinant. The H, X, and Y haptens and variations of the H type 2 determinant as probes for the combining site of the lectin 1 of *Ulex europaeus*. *Carbohydrate Research*. 109, 109-142.
- Hořejší, V.; Kocourek, J. (1974). Studies on phytohemagglutinins XVII. Some properties of the anti-H specific phytohemagglutinin of the furze seeds (*Ulex europaeus* L). *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure*. 336, 329-337.
- Ilomets, T. (1990). Centenary of the discovery of lectins at Tartu University. 著: Kocourek J., Freed J.D., eds., *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* vol.7 (ページ: 3-11). St.Louis, MO: Sigma Chemical Company.
- Jefferys A. J.; Wilson V.; Thein S. L. (1985). Individual specific 'Fingerprints' of human DNA. *Nature*. 316, 76-79.
- Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S. (1985). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*. 314, 67-73.
- Kasai, K.; et al. (1990). Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science. *Journal of Forensic Sciences*. 35, 1196-1200.
- Kilpatrick, D. C.; Green, C. (1992). *Advances in Lectin Research*. 5. Springer Science & Business Media.
- Klinkhamer, J. M. (1968). Quantitative evaluation of gingivitis and periodontal disease, I The orogranulocytic migratory rate. *Periodontics*, 6, 207-211.
- Lis, H.; Sharon, N. (1986). Biological properties of lectins. 著: Liener E.I., Shalon N., Goldstein. I. J. eds., *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine* (ページ: 266-291). Orlando FL: Academic Press.
- Mäkerä, O. (1957). Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. *Annales medicinae experimentalis et biologiae Fenniae*, 35(Suppl 11), 1-133.
- Matsui, T.; et al. (2001). Comparative study of blood group recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1525, 50-57.

- Matsumoto, I.; Osawa, T. (1974). Specific purification of eel serum and *Cytisus sessilifolius* anti-H hemagglutinins by affinity chromatography and their binding to human erythrocytes. *Biochemistry*. 13, 582-588.
- Nathan, S.; Halina, L. (2012). 第1章 序論. 著: Nathan S., Halina L., *レクチン 第2版——歴史、構造・機能から応用まで——* (ページ: 1-3). 東京都千代田区: 丸善出版株式会社.
- Nathan, S.; Halina, L. (2012). 第3章 レクチンの発見、分布、単離. 著: Nathan S., Halina L., *レクチン 第2版——歴史、構造・機能から応用まで——* (ページ: 31-54). 東京都千代田区: 丸善出版株式会社.
- Ohno, M.; et al. (1992). Enzymatic basis of sugar structures of  $\alpha$ -fetoprotein in hepatoma and hepatoblastoma cell lines: Correlation with activities of  $\alpha$ 1-6 fucosyltransferase and N-acetylglucosaminyltransferases III and V. *International Journal of Cancer*. 51, 315-317.
- Osawa, T.; Matsumoto, I. (1972). Gorse (*Ulex europeus*) phytohemagglutinins. *Methods in Enzymology*. 28, 323-327.
- Perlin, M. W.; Szabady, B. (2001). Linear Mixture Analysis: A Mathematical Approach to Resolving Mixed DNA Samples. *Journal of Forensic Sciences*. 46, 1372-1378.
- Taketa, K.; et al. (1993). A collaborative study for the evaluation of lectinreactive  $\alpha$ -fetoprotein in early detection of hepatocarcinoma. *Cancer Research*. 53, 5419-5423.
- Tautz, D. (1993). Note on definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. 著: Pena J.D., Chakerabarty R., Epplen T.J., Jeffreys J.A., *DNA Fingerprinting: State of Science* (ページ: 21-28). Basel: Birkhauser Verlag.
- Tereba M.A., Bitner M.R., Koller C.S., Smith E.C., Kephart D.D., Ekenberg J.S. (2004). U.S. 特許番号: 6673631.
- Vogelstein, B.; Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76, 615-619.
- Walsh P. S.; et al. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Bio Techniques*. 10, 506-513.
- Wang, T.; et al. (2002). Least-square deconvolution (LSD): a new way of resolving STR/DNA mixture samples. 参照先: 13th International

- Symposium on Human Identification Oral Presentations:  
<https://www.promega.jp/-/media/files/resources/conference-proceedings/ishi-13/oral-presentations/wang.pdf?la=ja-jp>
- Watson, J. D. (1980). *The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA* (Norton Critical Editions). New York: W.W.Norton & Company.
- 桑原 正喜; et al. (1999). 腫瘍マーカーの分子微細多様性. 検査と技術. 27, 443-452.
- 厚生労働省. (2017年11月20日). 平成28年歯科疾患実態調査結果の概要. 参照先: 厚生労働省: <http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/62-28.html>
- 香西 克之; 光畑 智恵子. (2014). CHAPTER7 唾液の防御機能. 著: EdgerM., DawesC., O'MullaneD., 唾液——歯と口腔の健康 原著第4版 (ページ: 98-115). 東京都文京区: 医歯薬出版株式会社.
- 芝 燁彦; 芝 紀代子. (2016). 第1章 唾液の基礎知識. 著: 日本唾液腺学会, 徹底レクチャー 唾液・唾液腺 (ページ: 1-36). 東京都文京区: 金原出版株式会社.
- 大倉 久直. (1994). 3. 検査項目 各論. 著: 河合 忠, 橋本信也, 臨床検査のABC (ページ: 330-333). 東京都文京区: 日本医師会.
- 大沢 利昭. (1985). 3章 レクチンの結合特異性. 著: 大沢 利昭, レクチンと細胞生物学 (ページ: 69-112). 東京都文京区: 講談社.
- 大沢 利昭; 森 良一. (1976). 3章 レクチンの特異性と細胞表面レセプター. 著: 大沢 利昭; 森 良一, レクチン (ページ: 39-73). 東京都文京区: 講談社.
- 内田 武志; 菊池 貞介; et al. (1976). 歯周病の臨床検査としての混合唾液中の白血球数と潜血量の検討. 日本歯周病学会誌. 18, 406-413.