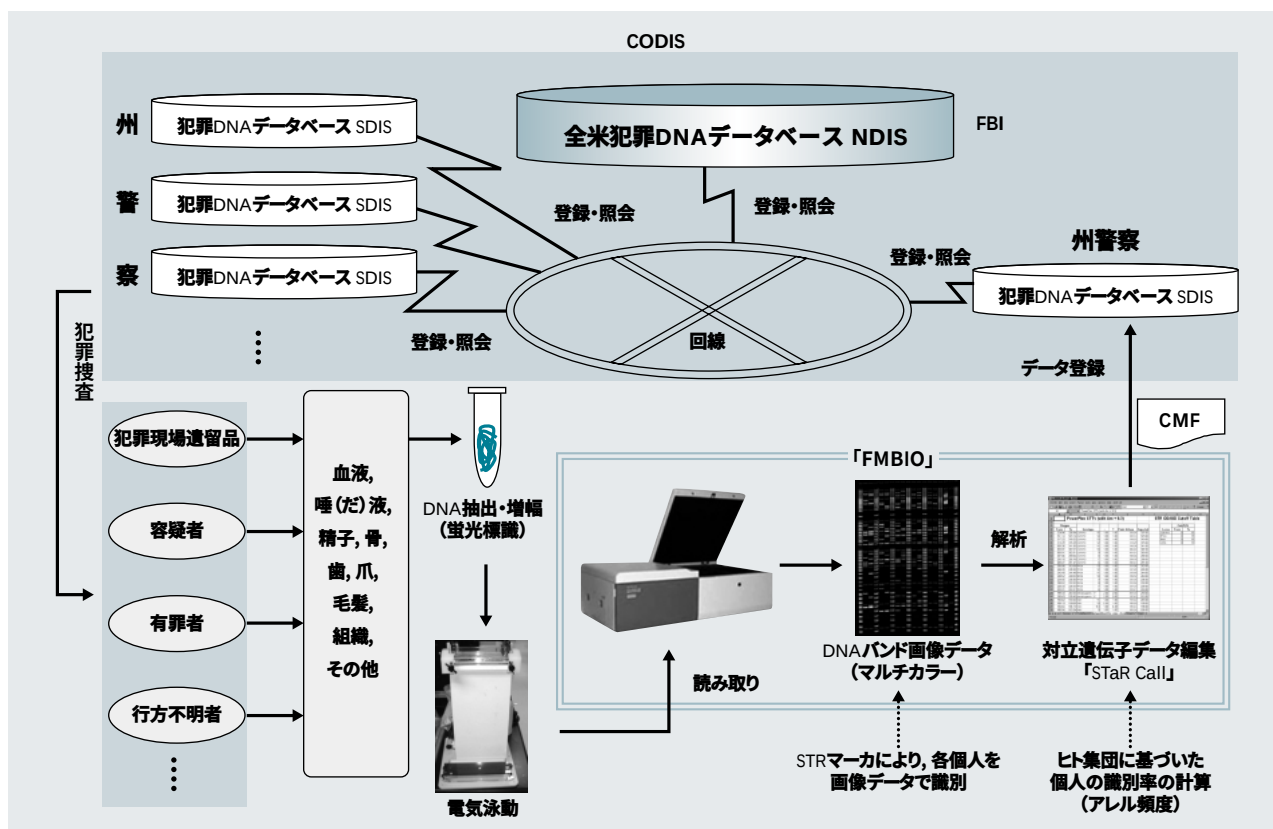


蛍光式イメージアナライザ「FMBIO」による 犯罪捜査支援のDNA法鑑定アプリケーション

DNA Forensics Application for Assisting Criminal Investigations with Fluorescent Image Analyzer "FMBIO"

長崎 華奈子 Kanako Nagasaki
清水 学志 Takashi Shimizu

山本 顕次 Kenji Yamamoto
福岡 義也 Yoshiya Fukuma



注:略語説明 CODIS(Combined DNA Index System), SDIS(State DNA Index System), DNA(Deoxyribonucleic Acid), NDIS(National DNA Index System)
FBI(Federal Bureau of Investigation), CMF(Common Message Format), STR(Short Tandem Repeat)

図1 全米における犯罪DNAデータベースシステムとFMBIOからのデータ登録

蛍光式イメージアナライザ「FMBIO」は、米国のFBIや警察などで使用されており、犯罪DNAデータベースシステム「CODIS」へのデータ登録を支援している。

1. はじめに

個人識別のDNA鑑定法は、1985年に英国レスター大学のA.J.JeffreysがRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法を発表し、それ以降1990年ごろからDQα, D1S80とヒトゲノムのマーカを一部導入した。その後、繰り返し塩基配列でも特異性の高いマイクロサテライトを複数個使用するマルチプレックスSTR(Short Tandem Repeat)法が脚光を浴びる。特に、1995年ごろに米国の法廷で注目されたO. J. シンプソン事件では検事側が提示したDQαマーカによる個人識別精度が問題となり、その結果FBI(Federal Bureau of Investigation)が中心にマルチプレックスSTR法を開発し、犯罪

捜査に採用された。

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社の蛍光式イメージアナライザ「FMBIO」は、ほぼ同時期にFBIの指導で初期のマルチプレックスSTR法に対応を開始し、徐々に米国の犯罪捜査で使用され始めた。現在ではSTRマーカの数を1検体当たり最大15マーカに拡張、人種間における個人識別を飛躍的に高めたのと同時に、犯罪捜査用DNAデータベースのCODIS(Combined DNA Index System)のデータ量が増加し続けている(2006年4月で3,275,000件)。この間、FMBIOは米国のDNA法鑑定分野でマルチプレックスSTR法の発展に対応して今日に至っている。

近年、日本では犯罪捜査活動を中心に個人識別の手段としてDNA鑑定法が注目を集めている。これは主にヒトゲノムで「多型」と呼ばれるDNAの繰り返し配列の頻度から個人差を検出し、統計的に個人を識別する技術である。

従来、DNA鑑定は犯罪捜査以外では親子鑑定が主であったが、最近では戦没者、民間犠牲者（自然災害、航空機事故、テロ災害、その他）などの個人識別にまで用途が年々と広がりつつある。日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社は、蛍光式イメージアナライザ「FMBIO」を開発し、米国の犯罪捜査分野に1995年ごろから納入して以来、FBI、警察、鑑定会社などDNA法鑑定分野で使用されている。

ここでは、蛍光式イメージアナライザ「FMBIO」のDNA法鑑定における特長と、FMBIOからCODISへのデータ登録について述べる(図1参照)。

2. 蛍光イメージアナライザ「FMBIO」を使用したSTRマーカの検出

2.1 FMBIOの特長

蛍光イメージアナライザのFMBIOは、レーザスキャニングにより、蛍光色素の読み取り表示と解析を行うことができる。

FMBIOは、532 nm、635 nm、そして488 nmの3種類の波長の励起レーザを搭載し、さまざまな蛍光色素に対応している。レーザ光はミラーを経てサンプル板に照射され、そこから発せられた蛍光は光学フィルタで選別された後、検出器で検出される。検出器を2組装備しているため、一度のスキャニングで2波長を同時に読み取ることができる(図2参照)。また、DNA法鑑定以外のライフサイエンス分野でも生体高分子の分離に利用されている、ポリアクリルアミドゲルやアガロースゲル、メンブレンフィルタの読み取りも可能である。さらに、クロマトグラフィーで利用される薄層プレートや各種分析で利用されるタイタープレートの読み取りも可能なため、分析実験でもFMBIOを利用することができる。

2.2 STRマーカの検出

STRは、ゲノムの中で遺伝子以外の非翻訳領域に存在する2～4塩基の繰り返し配列である。このSTRを検出するために蛍光色素を利用する。FMBIOの検出に特化したPromega社のDNA法鑑定専用試薬「PowerPlex 16 BIO System^{※)}」は、犯罪DNAデータベースシステムCODISに登録されているSTRマーカすべてに対応している。各マーカは蛍光色素によって標識され、各レーザによって励起される(表1参照)。

3. 実験

STRの検出には以下のような実験が必要である。

※) PowerPlexは、Promega Corporationの登録商標である。

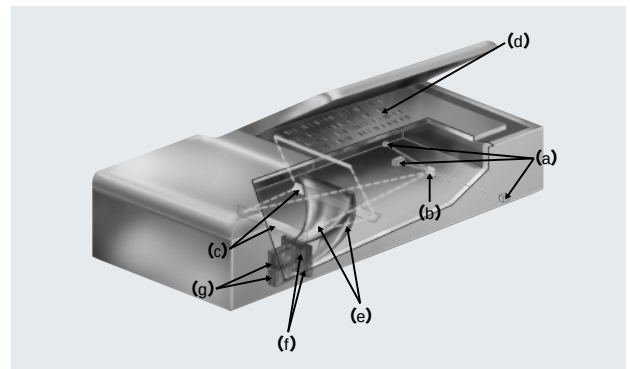


図2 FMBIO IIIの概観

(a)レーザ源、(b)可動ミラー、(c)ミラー、(d)サンプル板、(e)検出器、(f)フィルタ、(g)光電子増倍管をそれぞれ示す。

表1 FMBIO IIIの標識蛍光試薬/フィルタ/励起レーザ波長
各マーカの対応蛍光色素とその蛍光を取り込むためのフィルタを示す。

	DNAマーカ (STRマーカ)	蛍光色素	励起波長	フィルタ
チャネル1	FGA, TPOX, D8S1179, vWA, Amelogenin	Rhodamine Red [®] -X	532 nm	598 nm
チャネル2	Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818	JOE	532 nm	577 nm
チャネル3	Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358	Fluorescein	488 nm	520 nm
チャネル4	内部サイズマーカ (ILS 600 BIO)	Texas Red [*]	532 nm	650 nm

注:略語説明)ILS(Internal Lane Standard)

*Rhodamine Red, Texas Redは、Invitrogen Corporationの商標または登録商標である。

- (1) 事件現場などで採取されたサンプルからゲノムDNAを抽出する。
- (2) そのDNAとPowerPlex 16 BIO Systemに添付してある、バッファとプライマー（各マーカに対応した各蛍光試薬で標識された短い一本鎖DNA）、そして酵素を混合し、DNAをPCR（Polymerase Chain Reaction）反応で増幅する。この反応によって増幅されたDNAは、蛍光色素で標識される。
- (3) ポリアクリルアミドゲルを作成し、電気泳動装置にセットしてプレランを行う。
- (4) 内部サイズマーカであるILS 600 BIOとローディングバッファ、そしてPCR産物またはアレルラダーを混ぜてポリアクリル

アミドゲルに注入する。ILS 600 BIOは60～800塩基のマーカであり、それぞれのレーンに注入され正確に解析を行うために利用される。

(5) 1時間30分から2時間の電気泳動を行う。

(6) FMBIOでスキャニング(5～10分程度)を行う。これらの手順¹⁾はFBIが定めた品質を含む操作基準に基づいており、これにFMBIOが認定されている。

4. 画像データ解析

ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、FMBIOでスキャニングした画像は、ラダーと呼ばれるバーコードのような画像になる。PCR産物の各ラダーはSTRの塩基の繰り返し回数を示し、アレラダー(アレルは、STRの繰り返し回数、または対立遺伝子)はそれぞれのSTR特有の規定繰り返し数を示している(図3参照)。FMBIOの画像では一度に各STRのアレルを見ることができる。

画像解析は解析ソフトウェア「Image Analysis」で行う。最初に、Image Analysisではそれぞれの蛍光を1色ずつ検出する「カラーセパレーション」と呼ばれる解析を行う。この解析を行うことで各蛍光色が相互にずれ込んだ蛍光量を補正することができる。すなわち、4色に色分けされたアレル群[3色に色分

けされたアレル15個+男女判別因子(Amelogenin)一つと1色のサイズマーカ]の正確な発光量を求めることができる。その後基準となるサイズマーカILS 600 BIOを元に、各アレルの塩基数を算出する。各アレルの塩基数がわかれば相対的にSTR塩基の繰り返し数が判明する。

5. データベース登録

FMBIOで読取り解析したDNA情報をCODISに登録するために「STaR Call」という犯罪者など特定重要人物のDNAパターンを割り出すアレル検出(アレルコール)プログラムを次の手順で利用する²⁾。

(1) FMBIOのImage Analysisから出力された画像からDNAの塩基数データに変換

犯罪者などのサンプルラダーとアレラダーの塩基数を内部サイズマーカの数値と照らし合わせて算出する。

(2) (1)で得た塩基数値を各マーカに対応したテーブルを用いてSTRの繰り返し数データに変換(図4参照)

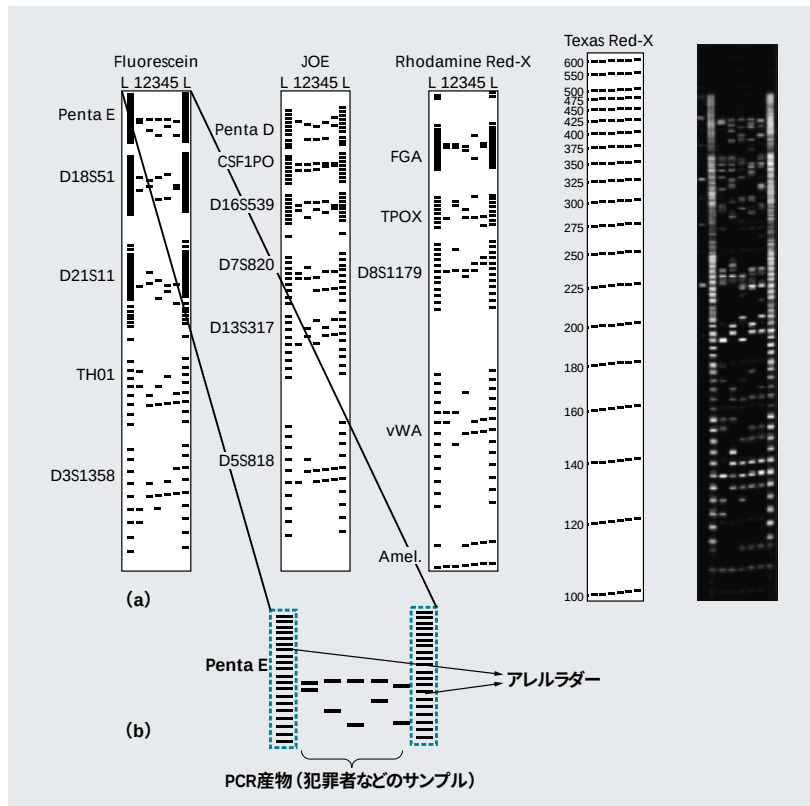
それぞれのSTRマーカ(FGA, TPOX, D8S1179など)のアレルラダーの塩基数とSTRの繰り返し数を対応させたテーブルがあり、そのテーブルからサンプルのSTR繰り返し数を算出する。

(3) (2)においてSTRの繰り返し数データに変換する際、自動的にアレルコールを行い、スタッターバンドを検出

スタッターとはPCRの際に酵素反応エラーで生じるノイズであり、FBI基準でデータ処理が求められている。スタッターバンドは、まれに真のアレルバンドと区別がつかなくなるような場合がある。この場合、STaR Callでは蛍光発光量を元に真のアレル確度値を算出することで、より厳密なデータ精度を確保することができる。確度値が算出されたアレル繰り返し数は確度の順で候補として表示され、ユーザーが設定したしきい値によって候補を除外することもできる。

(4) xmlタグを利用し、データベース登録用フォーマットを生成

CODISデータベースではアレル情報を登録する際の情報フォーマットをFBIが規定している。例えば、最新のフォーマット「CMF Ver.3.2」(Common Message Format)³⁾では、登録先情報、アレルコールを行った研究所、日時、担当者ID、検体のID、検体カテゴリなどがどういったテキスト情報や数値フォーマットで記述され



注:略語説明 PCR(Polymerase Chain Reaction)

図3 FMBIOのPowerPlex 16 BIO SystemによるSTR検出画像

(a)は、左からFluorescein, JOE, Rhodamine Red-X標識によるSTR, Texas Red標識による内部サイズマーカ、および色別表示(この図ではモノクロ)の画像を示す。(b)は、両端が各STRマーカ(この場合はPenta E)のアレルラダーであり、真ん中が犯人などのサンプルである。サンプルラダー、アレラダー、そして内部サイズマーカを比較することにより、画像データからSTR繰り返し数を算出する。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1																
2	Lane No.	Specimen No.	Population Group	Penta E	D18S51	D21S11	TH01	D3S1358	FGA	TPO						
3	Lane 2			1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1
4				8	15	13	17	30	30	8	11	16	18	20	21	8
5	Lane 3			8	9	13	17	30	30	8	11	16	18	20	21	8
6				15						7	9.3					8
7										11						
8																
9																
10																
11	Lane 5			8	15	13	17	30	30	8	9	16	18	20	21	8
12										11						
13										7	9.3					8
14										11						
15																
16	Lane 6			5	11	14	15	29	29.2	7	8	17	19	20	24	8
17								30	30.2	6	7					8
18										9.3	11					
19																
20																
21																

図4 STaR Callで生成されたアレールコールの結果例

STaR Callは塩基配列情報をアレール情報に変換し、最終的にSTRの繰り返し数データに変換する。各検体はLaneとして表示され、検体番号 (Specimen No.)、個体グループ (Population Group)、各マーカのアレール数が表示される。

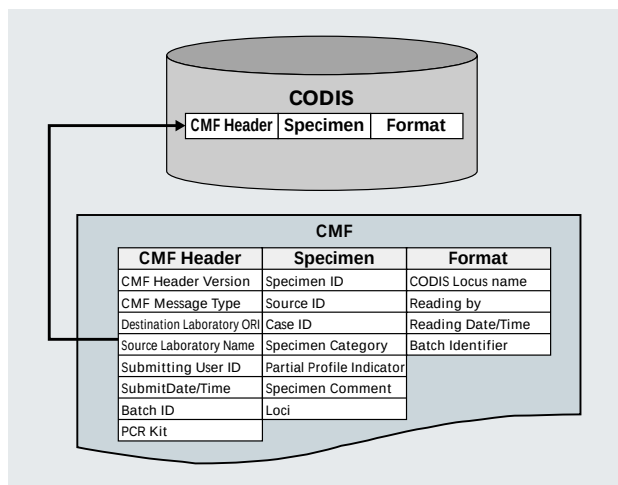


図5 CODISデータベースとCMFフォーマット

CODISには、CMFフォーマットで記載されたデータが登録される。

るべきかが詳細に記されている(図5参照)。STaR CallではそのCMFフォーマットに合わせた形式でアレール情報ファイルを生成し、CODISデータベースへ登録できるようにしている。なお、CODISへの登録は認められた警察関係者のみに限られている。

FMBIOで解析されたSTRアレール情報は、環境が異なる複数の法医学研究所で同じ検体を複数個利用して行ったバリデーション実験により、±1塩基という高い精度結果を示し、99%以上の精密性が証明されている。さらにマイクロバリエーション(塩基の挿入や欠損などの変異によって通常の繰り返し数を持たないこと)も容易に判別して除外することができるなど、FMBIOを利用した個人識別アプリケーションは米国犯罪DNAデータベース業務において確固たる地位を築いている⁴⁾。

6. おわりに

ここでは、日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社の蛍光式イメージアナライザ「FMBIO」のDNA法鑑定における特長と、FMBIOからCODISへのデータ登録について述べた。

現在、FMBIOの画像データは、米国で犯罪捜査のみならず刑事裁判でも活用されている。例えば、現地の警察関係者からは、DNA法鑑定の知識が十分でない陪審員に対し、わかりやすい証拠データとして欠かせない、FMBIOなしにはDNA法鑑定が運用できないといった報告がされている。

ヒトゲノムを中心とした分子遺伝学の発展とテロ対策などで多様化し続けるDNA法鑑定を考えると、アプリケーションは今後も発展すると予測される。

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社は、新しいゲノムマーカとして注目さ

れている一塩基多型のSNP (Single Nucleotide Polymorphism)、特異性の高い新たなSTRマーカなどにも注目し、今後も、個人識別技術の将来に重要なアプリケーションを担うシステムに取り組んでいく考えである。

参考文献など

- 1) PowerPlex® 16 BIO System protocol, <http://www.promega.com/tbs/tmd016/tmd016.pdf>
- 2) STaR Call™ v3.0 PowerPlex® 16 BIO System Manual CODIS 5.7
- 3) CODIS 5.7 Interface Specification (CMF3.2) Revision 5, U.S. Department of Justice, Federal Bureau of Investigation
- 4) Greenspoon SA et al.: Validation and Implementation of the PowerPlex® 16 BIO System STR Multiplex for Forensic Casework, Journal of Forensic Science, 49, 1, 71-80 (2004.1)

執筆者紹介



長崎 華奈子

2001年日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社入社、ライフサイエンス本部 所属
現在、DNA鑑定などの実験に従事



清水 学志

1997年日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社入社、ライフサイエンス本部 所属
現在、バイオ機器の拡販に従事



山本 顕次

1986年日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社入社、ライフサイエンス本部 所属
現在、バイオ機器の拡販に従事



福間 義也

1987年日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社入社、ライフサイエンス本部 所属
現在、バイオインフォマティクスやDNA鑑定事業に従事