

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08868

研究課題名(和文)劣化DNA試料の分析方法の確立と鑑定精度の向上に関する研究

研究課題名(英文) Study on establishment of forensic genetic analysis of degraded DNA samples and improvement of accuracy in the judgment

研究代表者

浅村 英樹 (ASAMURA, Hideki)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：80324250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、劣化DNA試料を対象としたDNA解析に関する鑑定精度の向上を目的とした研究である。X染色体上のinsertion-deletion多型(INDEL)に着目し、19のINDEL多型と11座位のX-STRを解析するマルチプレックスフラグメント解析システムを構築し、日本人集団の多型性と劣化DNA試料解析の有効性について検討した。さらに、硬組織解析における試料選択と最適な脱灰処理についても検討を加えた。その結果、日本人集団の識別に有効なシステムの構築に成功し、劣化試料への有効性を確認できた。また、硬組織の解析では歯牙が最も有効な試料であり、脱灰処理についても一定の傾向を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：The objective of this research is to improve accuracy in analyzing degraded DNA samples. We researched Japanese population genetic data of 19 insertion-deletion polymorphisms and 11 X-STRs in X chromosome using newly developed multiplex PCR systems. We investigated suitable parts for DNA analysis from hard tissues and researched the optimal conditions of decalcification in DNA extraction from skeletal remains.

研究分野：法医学

キーワード：DNA多型 INDEL 劣化DNA

## 1. 研究開始当初の背景

近年、犯罪捜査並びに大規模災害において DNA 型を用いた個人識別は欠かすことのできない鑑定項目であり、同時に社会的要請が極めて高いものと言えよう。現在の市販のキットで分析し得る常染色体 STR 型による異同識別は、4 兆 7000 億分の 1 と高確率であり、世界的に汎用され確立された方法の 1 つである。さらに、Y 染色体や X 染色体の STR 型解析キットも販売され、特殊な血縁関係の鑑定に実務応用されている。一方、陳旧性試料や熱などによって損壊された試料については、このようなキットによる個人識別分析が困難なことも少なくないことから、世界的にも個人識別分野において唯一といってよい解決すべき課題と位置づけられ、実務的にも劣化した試料における精度の高い DNA 型分析は、社会的要請の極めて高いものである。実際、数十年前の殺人事件の死刑判決が今日の DNA 型解析の結果をもって無罪とされた例は記憶に新しい。ところが、このような劣化 DNA 試料の解析は、現時点の研究技術を勘案すると決して精度の高い鑑定がなされているとは言えないのも事実である。このような観点から、我々はこれまでに劣化 DNA 試料に有効な個人識別のための DNA 型分析法として、MiniSTR 法を主体とした解析システムを多数構築し、劣化 DNA 試料への有効性を報告し、劣化 DNA 試料の解析技術を飛躍的に向上させることに成功した。さらに、短鎖 PCR 増幅産物を得ることで性染色体の一塩基多型 (SNP) を解析するシステム構築 (MiniPCR-SNPs 法) を構築し、劣化 DNA 試料解析のさらなる鑑定精度の向上を果たしている。一方、MiniPCR-SNPs 法を応用し、考古学分野でも実務応用に成功し、世界初となる縄文人骨の Y 染色体ハプログループ解析に成功し、これまでの縄文人のルーツに関する仮説 (縄文人が日本固有の民族であること) を実証する貴重な実績を得ることができた。

## 2. 研究の目的

本研究分野の最終目的は、劣化 DNA 試料においても、新鮮な状態のよい DNA 試料分析のような高精度の鑑定を行うことであり、そのためにはさらなる分析技術の開発が必要であることは言うまでもない。近年では、insertion-deletion 多型 (INDEL) に注目し、30 INDEL 多型を解析するキット (Investigator DIPplex kit QIAGEN 社) を用いて日本人集団の遺伝子解析を行ったところ、INDEL 解析が劣化 DNA 試料の分析に有効性であることを確認するに至った。今回、さらなる解析技術の向上のため、日本

人集団でほとんど報告のない X 染色体における insertion-deletion 多型 (INDEL) 解析を中心として、マルチプレックス解析システムを構築し、その有効性を確認し、劣化 DNA 試料解析をより高い精度で鑑定することを目標としている。加えて、劣化試料である硬組織の DNA 抽出に際しての試料の選択及び分析試料の形状と脱灰処理が、状態の良い DNA の抽出に影響するかどうかを確認するため、歯牙・大腿骨・頭蓋底錐体部の部位別の比較、脱灰時間や脱灰温度を変化させた上での分析試料の形状の比較について、各々抽出した DNA のリアルタイム PCR による定量検査や分解能の測定によって相違を確認する。

## 3. 研究の方法

### X 染色体 INDEL 解析システムの確立。

特異な血縁関係の鑑定に有効な X 染色体に着目し、日本人集団に多型性があると推定される X 染色体の insertion-deletion 多型 (INDEL) (MID2047, MID2612, MID218, MID219, MID383, MID2692, MID1338, MID220, MID2693, MID1511, MID1361, MID2637, MID2781, MID111, rs10561439, MID1566, MID1355, MID2665, MID1545) を選定し、マルチプレックスフラグメント解析システムの構築を試みた。この際、DNA の断片化が予想される劣化 DNA 試料に対応すべく、増幅産物が 150 bp 以下になるようにプライマーを設計し、5'末端にアデニール化 (gtttct) を付加し、サイズ調節として (gact) を加えている。その上で、日本人集団 (男性 100 人、女性 100 人) を解析し、法医学的指標を算出して多型性を検討した。

### 新たな X 染色体 STR システムの構築。

X 染色体 STR のマルチプレックスシステムを拡充すべく、新たな 11 座位の X 染色体 STR (DXS9907, DXS10078, DXS10159, DXS10612, DXS10164, DXS10165, G10583, DXS6801, DXS6804, DXS7130, DXS6854) のマルチプレックスシステムを開発し、日本人集団 (男性 100 人、女性 100 人) を解析し、法医学的指標を算出して多型性を検討した。

### 硬組織の試料選択と DNA 抽出法の検討。

歯牙・大腿骨・頭蓋底錐体部の部位別の比較、脱灰時間 (無脱灰、12 時間、24 時間、48 時間、3 日間、5 日間) や脱灰温度 (4、23、56) を変化させた上での分析試料の形状 (1 cm 大のブロック、米粒大に粉碎、パウダー状に粉碎) の比較について、KAPA Human Genomic DNA Quantification and QC Kit を用いたリアルタイム PCR での定量検査を行い、DNA 回収量や分解能の相違を解析した。

#### 4. 研究成果

##### X染色体 INDEL 解析システムの確立。

19 INDEL 多型 ( MID2047, MID2612, MID218, MID219, MID383, MID2692, MID1338, MID220, MID2693, MID1511, MID1361, MID2637, MID2781, MID111, rs10561439, MID1566, MID1355, MID2665, MID1545 ) を分析するマルチプレックスフラグメント解析システムの構築に成功し、良好な型判定が可能となった。このシステムを用いて日本人集団の解析を試みたところ、ハーディー・ワインベルグ平衡から乖離するものはなく、いずれの座位についても連鎖不平衡は認めなかった。さらに、日本人集団における総合識別能は男性で 0.99996、女性で 0.99999990 と算出され、X染色体の鑑定に極めて有効なシステムであることが判明し、市販の STR キットで、型判定が不良な劣化試料についても、本マルチプレックスシステムの解析に成功し、劣化 DNA 試料に対して有効なシステムであることが確認できた。

##### 新たな X 染色体 STR システムの構築。

新たな 11 座位の X 染色体 STR のマルチプレックスシステムの開発に成功し、良好な型判定が可能であることを確認できた。また、日本人集団における総合識別能は男性で 0.99999917、女性で 0.99999998 と算出され、一層の鑑定精度の向上を図ることができた。

##### 硬組織の試料選択と DNA 抽出法の検討。

部位別では、3 人の白骨死体について歯牙、大腿骨、頭蓋底錐体部から各々 0.5g の試料を採取して定量検査を行った結果、いずれの白骨死体でも歯牙からの DNA 抽出量が最も多いことが判明した。さらに、分解程度を確認したところ、いずれの部位でも DNA の低分子化が進行していることが明らかであったが、頭蓋底錐体部の低分子化が最も高率であった。従って、硬組織の分析には歯牙が最も有効な試料であるという結論に至った。試料の形状と脱灰処理では形状の違いによる分析効率の有意差はないものの、脱灰温度については高温の方が短期間の脱灰時間でも抽出効率が高く、2, 3 日から 5 日間の脱灰処理を行った場合が最も抽出効率が高まり、仮にそれ以上の長時間の脱灰処理を行ったとしても抽出効率の低下がないことを確認できた。

#### 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7件)

佐藤紀子, 塩崎哲也, 永井みどり, 太田正穂, 浅村英樹. 11 X-STRs multiplex システムシステム及び 19INDELs フラグメン

ト解析システムによる日本人集団遺伝子解析. DNA 多型(査読有). Vol.25: 2017, pp.161-163.

永井みどり, 佐藤紀子, 塩崎哲也, 浅村英樹. 硬組織試料の DNA 抽出法 脱灰処理条件と抽出効率の比較検討. DNA 多型(査読有). Vol.25: 2017, pp.123-126.

布谷美弥, 佐藤紀子, 永井みどり, 塩崎哲也, 林徳多郎, 浅村英樹. 10 X-STRs multiplex system を用いた日本人集団遺伝子解析. DNA 多型(査読有). Vol.24: 2016, pp.229-231.

Nunotani M, Sato N, Kamei S, Shiozaki T, Hayashi T, Asamura H. Development of Multiple Assays using 46 SNPs for Comprehensive mtDNA Haplogrouping and Application to Highly Degraded DNA. J Forensic Sci (査読有). Vol.61: 2016, pp.472-477.

Nunotani M, Shiozaki T, Sato N, Kamei S, Takatsu K, Hayashi T, Ota M, Asamura H. Analysis of 30 insertion-deletion polymorphisms in the Japanese population using the Investigator DIPplex® kit. Legal Medicine (査読有). Vol.17: 2015, pp.467-470.

塩崎哲也, 布谷美弥, 佐藤紀子, 亀井佐矢子, 高津香奈絵, 林徳多郎, 浅村英樹. 日本人集団における 30insertion-deletion 多型解析. DNA 多型(査読有). Vol.23: 2015, pp.116-117.

亀井佐矢子, 佐藤紀子, 布谷美弥, 高津香奈絵, 塩崎哲也, 林徳多郎, 浅村英樹. 硬組織における脱灰時間の DNA 抽出効率への影響. DNA 多型(査読有). Vol.23: 2015, pp.131-133.

[学会発表](計6件)

佐藤紀子, 塩崎哲也, 浅村英樹. 硬組織試料の DNA 抽出法—部位による DNA 抽出量の比較検討—. 第 26 回日本 DNA 多型学会学術集会. 2017, 11 月 29 日-12/1 日, きゅりあん.

永井みどり, 佐藤紀子, 塩崎哲也, 浅村英樹. 硬組織試料の DNA 抽出法 脱灰処理条件と抽出効率の比較検討. 第 25 回日本 DNA 多型学会学術集会. 2016, 12 月 1-2 日, 東京大学 大気海洋研究所.

佐藤紀子, 塩崎哲也, 永井みどり, 太田正穂, 浅村英樹. 11 X-STRs multiplex システム及び 19INDELs フラグメント解析システムによる日本人集団遺伝子解析. 第 25 回日本 DNA 多型学会学術集会. 2016, 12 月 1-2 日, 東京大学 大気海洋研究所.

永井みどり, 佐藤紀子, 布谷美弥, 塩崎哲也, 林徳多郎, 太田正穂, 浅村英樹. 硬組織試料の DNA 抽出法の検討—試料の陳旧度に応じた方法の確立—. 第 100 次日本法医学会学術全国集会. 2016, 6 月 15-17 日, きゅりあん.

布谷美弥, 佐藤紀子, 永井みどり, 塩崎

哲也, 林徳多郎, 太田正穂, 浅村英樹. 10 X-STRs multiplex system を用いた日本人集団遺伝子解析. 第 24 回日本 DNA 多型学会学術集会. 2015, 11 月 19-20 日, 岡山大学創立五十周年記念館.

佐藤紀子, 布谷美弥, 亀井佐矢子, 塩崎哲也, 林徳多郎, 太田正穂, 浅村英樹. INDEL 多型領域を用いたフラグメント解析システムの検討. 第 99 次日本法医学会学術全国集会. 2015, 6 月 10-12 日, 高知市文化プラザ.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅村 英樹 (ASAMURA, Hideki)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号: 8 0 3 2 4 2 5 0

### (2) 研究分担者

林 徳多郎 (HAYASHI, Tokutaro)  
信州大学・学術研究院医学系・助教  
研究者番号: 5 0 6 0 0 6 0 7

佐藤 紀子 (SATO, Noriko)  
信州大学・学術研究院医学系・助手  
研究者番号: 0 0 6 4 9 2 5 4

塩崎 哲也 (SHIOZAKI, Testuya)  
信州大学・医学部・助教 (特定雇用)  
研究者番号: 0 0 7 2 2 0 1 8

亀井 佐矢子 (KAMEI, Sayako)  
信州大学・医学部・特任助教  
研究者番号: 1 0 7 3 5 1 5 3

布谷 美弥 (NUNOTANI, Miya)  
信州大学・医学部・特任助教  
研究者番号: 1 0 7 5 9 9 2 1