

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11455

研究課題名(和文) 歯科法医学的個人識別における高度変性資料への対応を目指したDNA多型検査法の開発

研究課題名(英文) Development of the analyzing system of DNA polymorphism aiming at application to the highly degraded samples for personal identification in Forensic Odontology

研究代表者

水口 清(MINAGUCHI, Kiyoshi)

東海大学・医学部・客員教授

研究者番号：00133380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、戦没者遺骨のDNA鑑定の中で、高度変性資料や血縁の証明が困難なケースの解決を目指し、以下のような研究を行った。南方の遺骨に多い、分解程度の高い資料から母系遺伝をするミトコンドリアDNA型を判定できる方法を作り上げた。また血縁の遠い家族との比較のために、父系遺伝をするY染色体型のデータの種類を増やし、Y染色体の系統推測も含めて、データベースと比較できるシステムを作製した。分解程度の高い資料からY系統マーカーを検出する方法を考案した。特殊な遺伝様式をとるX染色体多型の種類とデータを増加し、複雑な事例に応用した。さらに高度変性資料から有効なDNA抽出法を考案し、実際の鑑定に応用してきた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at solution of two kinds of difficulties in the DNA analysis of the dead in WWII; one of them was identification of distant blood relationship between the dead and their relatives and the other was DNA typing from highly degraded DNA samples. Following results were obtained. We established a method that can determine mtDNA types from highly degraded bone or tooth samples common to southern area. The number of phylogenetic mtDNA haplogroups lineages at the basal level in the Japanese and Malay populations was increased. We constructed a system which can evaluate the identity of Y-STRs between the dead and their distant blood relative. A method to determine Y-lineage from highly degraded samples was also developed. The number and kinds of closely-linked X-STR haplotypes were increased. These were applied to elucidate complicated cases. A method to isolate amplifiable DNA from highly degraded samples was developed and was applied in actual forensic cases.

研究分野：歯科法医学

キーワード：DNA多型 戦没者遺骨 高度変性資料 ミトコンドリアDNA型 Y染色体多型 X染色体STR 硬組織 DNA抽出

## 1 . 研究開始当初の背景

本研究開始当初は、ロシアにおける戦没者遺骨のDNA鑑定を始めて12年目に入っていたが、鑑定開始時からしばらくの間は、戦没者の血縁者として、比較的近親度の近い関係の家族との比較が多かった。これらは、基本的検査の15 locusの常染色体STR、ミトコンドリアDNA (mtDNA) のHV1領域、16 locusのY染色体の検査で解決ができた。しかし、時間とともに近親度の遠い関係者との比較が増えていき、基本検査では確信的な結論が出にくいケースが出てきた。そこで、申請者らは、これらの家族との比較を補助するための検査法として、独自の血縁関係を示す多型として、mtDNAの全コントロール領域や系統解析のデータを増加し、Y-STRとY-SNP系統の関係などを明らかにしながら日本人Y-SNPの系統分類を細分化してきた。さらにX染色体について、染色体全領域に存在する18種のX-STRや、近接して存在するhaplotypeを検出するX-STR kitのデータ、近接したX-STR haplotypeを追加解析する検査法の作製とデータを増加しながら、実際の戦没者遺骨鑑定や法医学事例に役立ててきた。これらは近親者との血縁関係の検査手段の拡大を目指してきたものである。また、これらと平行して、本研究開始の3、4年ほど前から南方の戦没者遺骨のDNA鑑定の検討が始まった。南方骨に対する当初のスクリーニングをかねた検討結果では、変性度合いが極端に高い資料が4割ほどを占め、DNA抽出の段階を含めて、北方の戦没者遺骨資料の検査と同じ検査法だけで対応しているは十分な比較はできないと感じてきた。

上記のような過程で私たちが続けてきていた研究は、大きく分ければ近親度の遠い血縁者との血縁を証明するための独自の遺伝様式を示す多型に関する研究と、変性試料からの効果的なDNA抽出法の改良を目指した研究、および高度変性資料に対するDNA多

型検査法の開発などを目指した研究に分けられる。

女系を通して遺伝するmtDNAの検出は、遠い系統の血縁の証明に役立ち、通常400bp強の大きさで、HV1、HV2(超過変領域)それぞれの配列を決定する。しかし、これらをそれぞれ1回のPCRで増幅しようとする高度変性資料では増幅できないケースも多かった。研究開始当初、mtDNA多型に関しては、mtDNAの全ゲノム情報については900例強(Tanaka, Ueno, Bilal, Nohira)、HV1、HV2領域については、日本人で3000例前後のデータがあったが、識別精度をあげるためには、系統解析された、より多くのデータが必要で、さらに高度変性DNAからのmtDNA多型検出のためには、少ない量のDNAで小さく分割したPCR産物で検査ができることが望ましいと考えていた。また、男性を通して遺伝するY染色体多型については、検査する多型のlocusを増やすことで、情報量が増加し、近親度の遠い血縁者の場合の比較に役立つ。さらにX染色体多型は男性から女性には同じ形のまま半分の情報が遺伝し、女性はX染色体内の組み換えにより、男子・女子に異なる組み合わせのhaplotypeを遺伝するという特殊な遺伝様式をとり、男系、女系が混合されたケースの証明にも役立つであろうと考えていた。但しこれらの中で、高度変性資料から得られるDNAは断片化の程度が高く、mtDNA多型の検出法を低分子化すると、ターゲットDNAのみでなく、コンタミに対しても非常に鋭敏になる。つまり、高度変性資料からのDNA多型検査は、コンタミの少ないDNAを抽出し、変性資料からも検出できる低分子のターゲットで検出できる多型検査法を開発し、しかもその情報量を上げていなければならない。

研究開始当初にはこれらの問題点を解決して行く必要があった。

## 2 . 研究の目的

研究の目的を個別に挙げていくと以下の如くである。

(1) 歯からの DNA 抽出には、試料のコンタミ除去法、破壊の仕方、EDTA 脱灰法、酵素処理法が、抽出された DNA の状態に最も影響するが、当初の目的は特にコンタミ除去法に重きを置いていた。しかし、研究期間内に行った新たな南方遺骨の検査結果で、当初の目的に加え、増幅に有用な DNA の回収量を増やす手段を開発することも目指す必要が出てきた。

(2) 低分子 PCR による mtDNA の検査法は、1200 人ほどの日本人のデータベースを元に、日本人の系統識別に必要不可欠な HV1、HV2 の領域を考慮しながら、約 150bp 以下の増幅産物の大きさの multiplex PCR で HV1、HV2 を決定する検査法の確立を目的とした。

(3) 南方の戦没者遺骨では、対象遺骨が日本人か否かを判断しなければいけないことがあり、高度変性資料から男性系統を推測する必要性も出てくる。私たちはそのようなケースで Y-SNP の系統変異を 50-70bp の PCR 産物で増幅し、解決した例がある。そこで高度変性資料で日本人の識別に応用できる低分子化した Y-SNP の低分子化した検出法の作製を目指した。

(4) Y-STR から Y-SNP の系統を推測するために使用していたプログラムが、別の目的にも使用できることを示すことを目的とした。

(5) 新たな Y-STR multiplex 法の作製は、16-plex Y-filer kit のデータに Y23-plex kit のデータを追加した上で、日本人で多型性を持つ新たな loci を追加することにより、個人識別と系統推定に利用する。

(6) X-STR 多型については 12-locus Argus X-12 kit で得られる近接した haplotype に、新たな haplotype を追加し、血縁関係の遠い家族資料の証明に役立てることを目的とした。

(7) 日本人およびマレー人の一定数の full

genome mtDNA data を完成する。これは高度変性資料における日本人の mtDNA 型の識別能力向上を目指すためであり、マレー人のデータは南方における遺骨が日本人か否かの識別に役立てるためである。

### 3. 研究の方法

目的に記載された項目ごとに研究の方法を述べると以下の如くである。

(1) 南方資料からの DNA 抽出は基本的に北方資料の方法を基本として続けてきており、その過程で高度に変性した骨の資料についてのみ多少条件を変えてきていたが、本研究期間内に引き受けた南方資料において、北方試料の DNA 抽出法をそのまま応用すると、資料によっては DNA の回収率が低く、mtDNA 検出では高分子の増幅率が悪く、STR は増幅がばらつくという、新たな問題が出てきた。そのため南方資料に合わせた検査法を作り出す必要性が生まれてきた。そこで、南方資料は採取地域、歯の外観検査を踏まえて、増幅の悪い試料については残された資料数を考慮に入れながら DNA 抽出をやり直し、正しいと思われる結果が得られるように型判定を繰り返した。

上記の戦没者遺骨に関する鑑定資料の検査結果は、そのまま研究結果として利用できないため、将来的に適当な法医資料を用いてコンタミ除去、DNA 抽出の過程を再現してみることができるように、南方資料の鑑定結果を比較検討した。

(2) 低分子 mtDNA の multiplex PCR 法は、当初 3 回の PCR で増幅していたものを、資料の節約のため 2 回の PCR に変更してきた。実際の資料に利用し始めてから現在で 7 年目に入るが、高度変性資料に応用すると、高分子 DNA を資料とした場合と比較して、資料の状態により、それぞれの断片の増幅度合いが多少異なって観察されることもあった。そこで、この点について primer の Tm 値や濃度を少しずつ変更しながら、より均等な増幅

を検討してきた。

(3) Y-SNP については、ケースごとに必要な低分子化したマーカーを作製し、高度変性資料に応用してみる。その結果正しい増幅ができていないか否かを確認しながら変性資料に応用可能な PCR 領域を決定していく。さらに可能であれば今後 multiplex 化を目指していく。

(4) Y-STR データからの Y-SNP 系統の推測プログラムを用いて、Y-STR 同士を比較する。その際、Y-SNP の haplogroup の情報を踏まえて評価する。また、Y23 キットにより STR ロークラスを増やして比較することにより、ロークラス増加による影響を検討する。

(5) Y-STR は DYS505, DYS485, DYS618, DYS510, DYS449 の 5 loci について multiplex PCR により型判定を行う。さらに、Y-SNP の系統との相関を検討した。

(6) Argus X-12 kit で得られる近接した 12-locus からなる 4 か所の 3-locus haplotype のうち 3 つの haplotype の組み合わせの数を追加し、さらに別の haplotype が追加される multiplex 法を作製した。

(7) 日本人およびマレー人の試料を Sanger 法により塩基配列決定し、一定数の full genome mtDNA data を完成する。まれな変異部位については再度泳動像を確認し、誤りのないデータ作成に勤める。

(8) 本研究課題のテーマである、高度変性 DNA に対応できる多型検出法の開発を目指している過程において、本研究期間内に、排水経路から回収された 300 片余りの小さな骨様物および軟組織様物の鑑定を依頼された。これらはいずれも焼損を受けた形跡が明らかで、さらにアルカリ処理を受けたともいわれ、外観からも DNA 鑑定は容易な資料ではないと判断したものであった。これらについては DNA 型が検出できても低分子の mtDNA 型検出が限界と考えた。これらの遺骨が 1 人に由来するか、また姉と考えられる

候補者と一致するか否かの検査を依頼された。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究開始後に 2 ヶ所の北方地域と 4 ヶ所の南方地域の戦没者遺骨の歯から DNA 検査を行い、結論を出す努力をしたが、南方資料は地域による違いはあるが、北方と比較して明らかに PCR 増幅されにくい。そこで、北方地域の資料の抽出法を改良した。つまり、研究開始時に考えていたコンタミを防ぐ DNA 抽出法に加えて、できる限り分解程度の低い DNA を回収し、しかもその量を増やすことを目指し、鑑定結果を出すために検査回数も増やししながら、コンタミ除去法、脱灰条件、酵素処理条件の改良を試みた。その結果、少なくとも改良により検出されるロークラスが増加した。戦没者遺骨の鑑定は発表ができないため、今後、法医学実務面の適当な資料に適用し、その効果を論文として発表し、戦没者遺骨の実際の検査に応用できるようにしたい。

(2) 低分子 mtDNA の multiplex 法に関しては、HV1 領域の解読範囲を 16039-16401, HV2 領域を 67-319 に設定し HV1 を 4 分割, HV2 を 3 分割して、2 度の multiplex PCR でこれらの領域を増幅可能とした。本法を日本人に存在する主たる mtDNA の系統に属する資料に応用すると、特殊な変異部位有するものだけ増幅が悪い領域があるが、この系統のみ、必要に応じて単独の増幅をするものとした。また変性 DNA 資料として江戸時代の人骨および 6 年ほど経過した腐敗臭を有する毛髪の毛幹部を資料として用いてその有用性を示した。本法は現在論文作成過程にある。

(3) Y 系統を示す Y-SNP の低分子化については、実際の鑑定に応用した。靴の中敷から抽出された DNA から靴を履いていた人物が日本人か否かの鑑定を依頼された。この鑑定については mtDNA 型の検査結果から、日本人系統

とアフリカ人系統の混合型が推測されたため、Y-SNP も同様の混合を示すか否かの検討をおこなった。この際は Y-SNP を 100bp 前後で増幅することが可能であった。混合を証明するために sequencing による判定を用いた。結果的に Y-SNP の検査からも、検査部位による量的なばらつきはあったが、日本人系統とアフリカ系統の混合が推測された。以上のように Y-SNP も低分子化することで変性 DNA を資料とした検査に有用な情報を与え得ることを示した。

(4) Y-STR データからの Y-SNP 系統の推測プログラムで Y-STR のデータを比較してきた過程で、このプログラムが系統の推測のみでなく、Y-STR の突然変異や、高度変性資料において誤った増幅をした場合の推測、Y-STR データのみからの対象者の地理的由来の推定などにも役立った。この際には Y-SNP の haplogroup の情報を含めて比較することにより、STR のみの比較を補助することができた。戦没者遺骨の鑑定は主として国外でなくなった人の証明を目的としているため、常に日本人と外国人の区別が必要となり、本プログラムは非常に実用性が高いと考えている。

(5) 5 ローカスの Y-STR データは最終的なまとめを終了していないが、現状で DYS505, DYS485, DYS618, DYS510, DYS449 の 5 loci の中で DYS449 は最も多様性が高く、その他はどちらかといえば系統による偏りが大きかった。5 ローカスの情報は、実際の鑑定において、キットによる 23 ローカスの情報を補助し、複雑家系の証明に役立った。

(6) Argus X-12 に、13-plex X-STR システムを追加することにより Argus X-12 の 3 か所の haplotype は 5-locus haplotype になり、その他にそれぞれ 4 loci, 3 loci の 2 つの haplotype が追加された。これにより識別力はかなり上昇することになり、X 染色体多型の遺伝する複雑ケースに対する応用性は非常に高まった。本システムは実際の戦没者遺

骨の鑑定においても役立った。

(7) 日本人 90 例およびマレー人 100 例ほどの full genome mtDNA data を完成しているが、その中で日本人およびマレー人において、新しい系統の存在も認めている。現在データベース登録に当たり、変異部位を再確認しながら進めているため、時間がかかっているが、これらの情報は mtDNA の個人識別への応用に役立つものと確信している。

(8) 依頼された鑑定においては、表面が焼損された軟組織片様断片、焼損されアルカリ処理を受けたともされる人骨様骨片から、低分子の mtDNA の増幅を試みた。結果的に軟組織様片からは比較的高分子の mtDNA が増幅された。しかし骨片からは dual PCR で初めて低分子 mtDNA が増幅された。この塩基配列は一部を除き軟組織様片と共通した結果が得られ、両者は同一人物に由来すると結論できた。また、血縁関係が推測される候補者と軟組織、骨片との比較においては mtDNA と X-STR 多型により身元を判定した。本資料が容易に増幅できなかった理由は PCR インヒビターによるものと考えられ、dual PCR が状況により高度変性 DNA の多型検査に応用価値があることも示した。

以上の如く、法医学の高度変性資料は様々な状況下のものがあるため、型にはめた方法だけでは解決できないこともあり、いろいろな対応を試みることが必要となる。本研究においては様々な観点から実際例への応用ができたと考えている。

## 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 9 件)

水口 清, 落合恵理子, 松島 裕, 大澤資樹, 骨様および軟組織用断片の DNA 鑑定, 2018, DNA 多型, 査読無, 26 巻 (印刷中)

佐藤 栞, 落合恵理子, 水口 清, 垣本

由布, 大澤資樹, 日本人の姓と Y 染色体 DNA 多型の関連性, DNA 多型 査読無, 26 卷 (印刷中)

落合恵理子, 松島 裕, 水口 清, 垣内康宏, 垣本由布, 大澤資樹, 混合資料のミトコンドリア DNA 鑑定における次世代シーケンサーの応用, DNA 多型, 査読無, 26 卷 (印刷中)

Ochiai E, Osawa M, Tamura T,

Minaguchi K, Miyashita K,

Matsushima Y, Kakimoto Y, Satoh

F, GlobalFiler™ multiplex system on

parent-child analyses of cases with

single locus inconsistency, Legal Med

(Tokyo), 査読有, Vol.18, 2016, 72-74

DOI: 10.1016/j.legalmed.2015.12.009

Nakamura Y, Samejima M, Minaguchi

K, Nambiar P, Population Genetics of

Identifiler System in Malaysia, Bull

Tokyo Dent Coll, 査読有, Vol.57, 2016,

233-239.

Ochiai E, Minaguchi K, Nambiar,P,

Kakimoto Y, Satoh F, Nakatome M,

Miyashita M, Osawa M, Evaluation of

Y chromosomal SNP haplogrouping in

the HID-Ion AmpliSeq™ Identity

Panel, Legal Med (Tokyo), 査読有,

Vol.22, 2016, 58-61

DOI:10.1016/j.legalmed.2016.08.001

Kakuda T, Shojo H, Tanaka M, Nambiar

P, Minaguchi K, Umetsu K, Adachi N,

High-resolution haplogrouping of

extremely degraded East-Asian

mitochondrial DNAs. PLoS One, 査読

有, Vol.11, 2016, e0158463

DOI: 10.1371/journal.pone.0158463

落合恵理子, 宮下京子, 水口 清, 垣本由

布, 佐藤文子, 大澤資樹, 次世代シーケ

ンサーを用いた Y 染色体ハプログループ

解析, DNA 多型, 査読無, 24 卷, 2016,

169-171

水口 清, 戦没者遺骨の鑑定を目的とした複雑事例の血縁関係の証明を目指して, DNA 多型, 査読無, 24 卷, 2016, 17-21

[学会発表](計 6 件)

水口 清, 落合恵理子, 松島 裕, 大澤資樹, 骨様および軟組織用断片の DNA 鑑定, 日本 DNA 多型学会第 26 回学術集会, 平成 29 年 12 月 1 日, 東京

佐藤 栞, 落合恵理子, 水口 清, 垣本由布, 大澤資樹, 混合資料のミトコンドリア DNA 鑑定における次世代シーケン

サーの応用, 日本 DNA 多型学会第 26 回学術集会, 平成 29 年 12 月 1 日, 東京

落合恵理子, 松島 裕, 水口 清, 垣内康宏, 垣本由布, 大澤資樹, 混合資料の

ミトコンドリア DNA 鑑定における次世代シーケンサーの応用, 日本 DNA 多

型学会第 26 回学術集会, 平成 29 年 11 月 30 日, 東京

中村安孝, 鮫島道長, 水口 清, Nambiar

Phrabhakaran, 常染色体 STR における

マレーシア人と 7 多人種・地域集団との

比較, 日本 DNA 多型学会第 25 回学術集会, 平成 28 年 12 月 2 日, 柏市

水口 清, 戦没者遺骨の鑑定を目的とした複雑事例の血縁関係の証明, 日本 DNA

多型学会第 24 回学術集会, (特別講演)

平成 27 年 11 月 19 日, 岡山市

落合恵理子, 宮下京子, 水口 清, 垣本由布, 佐藤文子, 大澤資樹, 次世代シー

クエンサーを用いた Y 染色体ハプログループ解析, 日本 DNA 多型学会第 24 回学

術集会, 平成 27 年 11 月 19 日, 岡山市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水口 清 (MINAGUCHI, Kiyoshi)

東海大学・医学部・客員教授

研究者番号: 00133380