

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10278

研究課題名(和文) 種々の環境下に置かれた歯のヒト特異的DNAの定量

研究課題名(英文) Quantification of human-specific DNA in teeth placed in various environments

研究代表者

堤 博文 (TSUTSUMI, Hirofumi)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：30188594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯を4つの異なる土壌に埋め、Quantifiler Trio DNA Quantification Kitを使用して、経時的変化(3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、22ヶ月および26ヶ月間)によるDNAの分解程度とヒト特異的DNAの量を調べた。また、分解程度の違いやヒト特異的DNA量がSTRタイピングに与える影響について検討した。その結果、土壌の違いによる分解指数(DI値)の差は認めなかったが、得られたDNAは適度な断片化を示していた。しかし、STRタイピングにおいて、用いるヒト特異的DNA量が十分であればSTRタイピングが可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医学における試料は、腐敗あるいは陳旧化した微量な場合が多く、また、DNAが分解されて低分子化になっている。試料DNAが、ヒト由来であっても分解されている場合、そのDNAの分解度とTotal human genomic DNA定量値を求めることにより、後に行われるSTRタイピングに使用するDNA量を決定することが可能となれば、微量試料を無駄にせず検査することが可能となる。また、本研究では、試料が置かれていた状況あるいはさらされていた期間における、ヒト特異的DNA量およびDNA劣化度を調べ、それらの違いによるDNAがSTRタイピングに与える影響について検討した。

研究成果の概要(英文)：This study examined the extent of DNA degradation and the amount of human-specific DNA over time (3, 6, 12, 22, and 26 months) by burying teeth in four different soils and using the Quantifiler Trio DNA Quantification Kit. We also examined the effects of the degree of degradation and the amount of human-specific DNA on STR typing. The results showed that there was no difference in the degradation index (DI value) between the different soils, but the DNA obtained showed moderate fragmentation, suggesting that STR typing is possible if the amount of human-specific DNA is sufficient for STR typing.

研究分野：歯科法医学

キーワード：ヒト特異的DNA量 分解指標 STRタイピング リアルタイムPCR法 Quantifiler Trio

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の実験における DNA 定量の手法として、紫外線の吸光度による方法が広く利用されているが、ヒト以外の生物由来の DNA や分解された DNA も定量してしまうため、法生物学的試料のヒト DNA 定量には不向きである。また、DNA に選択的に結合する蛍光物質を用いて定量する方法は、微量 DNA の測定が可能でかつ簡便であることから、法生物学的試料の DNA 定量に利用^{1,2)}されている。しかし、この方法もヒト以外の生物由来の DNA や分解された DNA も定量してしまうため、ヒト DNA のみをターゲットとした STR 型検査のための定量には、やや不向きである。また、犯罪現場に遺留される法生物学的試料の DNA 型鑑定を実施する場合は、常に DNA の分解や PCR 阻害物質の混入の可能性を考え、適切な DNA 定量法を選択する必要がある。このような背景から、近年、ヒトに特異的な DNA 配列を標的としてリアルタイム PCR 法を利用する定量法が開発され、さらに最近では、PCR 阻害に強く、DNA の分解の程度も把握可能な TaqMan 法を利用した Quantifiler[®] Trio DNA Quantification Kit (Thermo Fisher: 以下 Trio とする) および Quantifiler[®] HP DNA Quantification Kit (Thermo Fisher) が市販された³⁻⁵⁾。

そこで、PCR 増幅前に正確な DNA 定量を行うことが重要であると考え、ヒトに特異的な DNA 配列を標的としたリアルタイム PCR 法を利用した定量法を用いて、当講座に保存されている歯を、種々の環境条件下に放置し、経年的変化による DNA 分解度を参考にし、型判定のために行う PCR 増幅前の正確な DNA 定量について検討した。

2. 研究の目的

陳旧化した試料の DNA 型検査は、DNA の低分子化により、型検査ができないことがある⁶⁻⁸⁾。その点歯は、死後変化が少ないため数十年経過していても、DNA 型検査による型判定は可能である。近年、ヒト特異的 DNA の塩基配列を標的としたリアルタイム PCR を行い、ヒト特異的 DNA に対する定性的および定量的評価が行われている⁹⁻¹⁴⁾。本研究では、ヒト特異的 DNA 量および DNA の分解度を測定できる Trio を用いて、4 種の異なる土壌に歯を埋め、DNA 量の経時的変化、さらにその DNA の分解度について検討した。

3. 研究の方法

4 種の異なる土壌は、川砂、黒土、赤玉土および腐葉土であり、当講座で 20~30 年間室内保存されていた抜去歯を 20 本ずつ (計 80 本: 男性 36 本、女性 44 本) 各土壌に埋め、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月、22 ヶ月および 26 ヶ月後に、各土壌から 4 歯ずつ取り出し、T-BONE KIT (DNA チップ研究所) より DNA 抽出を行った。

抽出した試料 DNA について、Trio を用いて、ヒト特異的 DNA の塩基配列のうち、増幅長の異なる 2 カ所の領域 (80 bp: Small Amplicon および 214 bp: Large Amplicon) について、測定機器は QuantStudio[®] 5 リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher) を用いて行った。反応溶液は Quantifiler[®] trio primer mix 8 μ l と Quantifiler[®] THP PCR Reaction mix 10 μ l に試料 DNA 2 μ l を加え PCR 増幅を行った。解析は、HID Real-Time PCR Analysis ソフトウェア (Thermo Fisher) を用いて分解指標 (Degradation Index: 以下、DI 値)、男女混合比率および IPCCT について検討した。表 1 には DI 値の求め方およびその解釈を示した。

次に、今回用いた試料 80 本について、GlobalFiler[™] PCR Amplification Kit (Thermo Fisher) により STR 型判定を行った。その際の添加 DNA 量は、HID Real-Time PCR Analysis ソフトウェアにより求められた、Small Autosomal Target を参考に算出された DNA 量を用いた。

なお、本研究は日本大学歯学部倫理委員会に諮り承認を得ている。また、本研究にあたり開示すべき利益相反はない。

4. 研究成果

(1) 各土壌における DI およびヒト特異的な DNA 量

今回使用した試料 80 本について、ヒト特有の DNA 含有量、DI 値、男女混合比率、IPCCT を調べた結果、各土壌における DI 値の経時的な平均値を示した (表 2)。

各土壌における平均 DI 値は、中程度の断片化、軽度の PCR 阻害の可能性があると認められたが、土壌の違いによる経年的変化における DI 値には、差は認められなかった。このことから 26 ヶ月という期間ではなく、さらに長期間土壌の中に歯を埋めて、土壌の違いによる影響についての検討が必要であると思われた。

また、DI 値が 10.0 以上認められた 2 本については、歯の根尖部に吸収があり、また進行した齶蝕歯であったため、DNA の断片化が進行し、DI 値が高くなったものと考えられる。この

Table 1. Decomposition indices and their interpretation.

$$DI = \frac{\text{ng Small Amplicon}}{\text{ng Large Amplicon}}$$

IPC CT Flag Triggered	Degradation Index	Interpretation
No	< 1	No fragmentation or inhibition
Ct: 25.5 - 30.5	1-10	Moderate fragmentation and mild PCR inhibition possible
(Ct: SD < 2.0)	> 10 or blank	Significant fragmentation and may be difficult to amplify using PCR

DI, degradation index; PCR, polymerase chain reaction, IPC CT,

Table 2 Degradation indices over time in each soil (average values).

	3 months	6 months	12 months	22 months	26 months
Kawa sand	2.593	4.765	3.096	2.483	2.594
Akadama soil	1.767	3.283	2.358	2.891	4.792
Fuyoudo	2.169	3.720	3.137	2.327	2.652
Kuro soil	2.004	4.009	2.581	3.391	2.275

ことから、歯の DI 値は土壌の違いや経年的変化だけでなく、歯の状態にも影響されることが示唆された。

(2) Globalfiler™ PCR Amplification Kit による STR の検出

本研究で使用した 80 本について、Globalfiler™ PCR Amplification Kit を用いて STR 解析を行った。本来 Globalfiler™ PCR Amplification Kit を用いて行われる型判定は 24 座位検出されるが、今回 DYS391 遺伝子座位と Y-Indel は男性特異性があるため解析から除外し、22 座位が検出されるかどうかを検討した。その結果、各試料で検出された遺伝子座位を表 3 に示した(塗りつぶした部分)。

Table 3 Results of short tandem repeat (STR) typing in each soil

Kuro soil																						Kawa sand																													
Locus	3 months					6 months					12 months					22 months					26 months					Locus	3 months					6 months					12 months					22 months					26 months				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	1	2	3	4	5		6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20										
D3S1358	[Green]																				D3S1358	[Green]																													
vWA	[Green]																				vWA	[Green]																													
D16S539	[Green]																				D16S539	[Green]																													
CSF1PO	[Green]																				CSF1PO	[Green]																													
TPOX	[Green]																				TPOX	[Green]																													
AM	[Green]																				AM	[Green]																													
D8S1179	[Green]																				D8S1179	[Green]																													
D21S11	[Green]																				D21S11	[Green]																													
D18S51	[Green]																				D18S51	[Green]																													
D2S441	[Green]																				D2S441	[Green]																													
D19S433	[Green]																				D19S433	[Green]																													
TH01	[Green]																				TH01	[Green]																													
FGA	[Green]																				FGA	[Green]																													
D22S1045	[Green]																				D22S1045	[Green]																													
D5S818	[Green]																				D5S818	[Green]																													
D13S317	[Green]																				D13S317	[Green]																													
D7S820	[Green]																				D7S820	[Green]																													
SE33	[Green]																				SE33	[Green]																													
D10S1248	[Green]																				D10S1248	[Green]																													
D1S1656	[Green]																				D1S1656	[Green]																													
D12S391	[Green]																				D12S391	[Green]																													
D2S1338	[Green]																				D2S1338	[Green]																													

[Green] : STR typing detection was possible

すべての遺伝子座位が STR タイピングされたのは 49 本であり、その DI 値は 1.236~4.476、ヒト特異的 DNA 量は 0.0052~76.155 ng/μL であった。そのうち 42 本の DI 値は 3.0 以下で、ヒト特異的 DNA 量は 0.0053~76.1548 ng/μL であった。また、ヒト特異的 DNA 量が 0.04 ng/μL 以下の 6 本においても、すべての遺伝子座位が検出され、それらの DI 値は、1.465~2.554 と低い値を示した(表 4-1)。

また、DI 値が 3.0 以上(3.026~4.476)の試料でも、STR 解析によりすべての遺伝子座位が検出されたのは 7 本認められた(表 4-2)。これらの DNA 量を観ると、STR 解析を行うにあたって十分な量(0.119~21.246 ng/μL)があるため、すべての遺伝子座位が検出されたと考えられる。

次に、すべての遺伝子座位が検出されなかった 31 本(表 3: ブランク)の内訳は、赤土に埋められたものが 12 本、腐葉土では 10 本、黒土では 5 本、川砂では 4 本認められた。その 31 本中 27 本(4 本△を除く)のヒト特異的 DNA 量は、いずれも 0.04 ng/μL 以下と低い値(表 4-4、4-5、4-6)であったことから、すべての遺伝子座位が検出されなかった。また、DI 値が 10.0 を超えた試料を観ると、Kuro6m-8 の歯は、根尖が吸収されていて、歯の状態が悪く、さらに、ヒト特異的 DNA 量が 0.0022 ng/μL と少ないことから、DNA の断片化が進行し、PCR 増幅が困難になり、11 の遺伝子座位しか検出されなかった(表 4-3)。DI 値が 10.0 を超えたもう一本の Kawa6m-8 の歯は、齶蝕が観察され、ヒト特異的 DNA 量も 0.0277 ng/μL と低く、Kuro6m-8 と同様、DNA の断片化がかなり進んでいたことが考えられた。DI 値が 3.0 以上 10.0 以下の 16 本について STR 解析を行ったところ、15~21 座位が検出され、このうち、Aka26m-17(△)を除く 15 本は、ヒト特異的 DNA 量が 0.04 ng/μL 以下で低い値を示した。このことは、試料 DNA の軽度な断片化の可能性が認められ、検出される遺伝子座位の数が 15~21 座位と少なくなったと考えられる(表 4-4)。また、DI 値が 3.0 以下であり、STR 解析において遺伝子座位がすべて検出されなかったのは 13 本認められ、その検出された遺伝子座位数は、14~21 座位であった。また、この 13 本のうち 10 本は、ヒト特異的 DNA 量が 0.04ng/μL 以下と低いことから、検出されない遺伝子座位があったと思われる。(表 4-5)

以上の結果から、本研究で使用した異なる土壌(環境因子)における歯の DI 値は、さほど違いは認められなかった。このことから、歯の表面にあるエナメル層が、歯に残されている DNA を劣

化や汚染から保護するため、陳旧化した法医学試料から異同識別を行う場合は、歯が有用であることを再確認した^{4,7,8)}。さらには、STR 解析に使用した試料のうち、DI 値が 3.0 以上、ヒト特異的 DNA 量が 0.04 ng/μL 以下の試料では、DNA の断片化が中程度認めたとにより、検出される遺伝子座位が少なくなる傾向があった。しかし、Vernarecci ら³⁾の報告と同様に、DI 値が 4.0 以上の試料では、十分な DNA 濃度と量があれば、DNA 量の増加が検出される遺伝子座位の数に関与し、STR 解析が可能になることが判明した。また、根尖の吸収や齶蝕など歯の状態によって、試料中のヒト特異的 DNA 量が、検出される遺伝子座位の数に関与することも示唆された。

(3) 謝辞

本研究は科学研究費基盤研究(C)(20K10278)の補助を得て行った。

Table 4.

Relationship between degradation index and amount of DNA and detection of STR type.

4-1. Samples with a degradation index of 3 or less with STR typing detected at all loci.

Sample	Kuro-3m-1	Kuro-3m-2	Kuro-3m-4	Kuro-6m-5	Kuro-6m-7	Kuro-6m-8	Kuro-12m-9
Decomposition index	1.618	2.255	2.045	2.992	1.236	1.714	2.699
Amount of DNA (ng/μl)	1.7182	0.3341	0.0538	0.9608	0.1125	0.2425	0.4457
Number of detected loci*	22	22	22	22	22	22	22

Sample	Kuro-12m-10	Kuro22m-16	Kuro26m-17	Kuro26m-18	Kuro26m-20	Kawa-3m-1	Kawa-3m-2
Decomposition index	2.013	1.665	2.094	2.376	1.465	1.816	2.569
Amount of DNA (ng/μl)	0.2370	0.0730	0.8519	0.0942	0.0249	76.1548	26.8146
Number of detected loci*	22	22	22	22	22	22	22

Sample	Kawa-3m-4	Kawa-6m-5	Kawa-6m-7	kawa12m-9	kawa-22m-13	kawa-22m-14	kawa-22m-15
Decomposition index	2.188	1.768	2.711	2.040	2.792	1.559	2.554
Amount of DNA (ng/μl)	44.6600	3.1536	0.1393	1.9095	0.2492	0.4484	0.0070
Number of detected loci*	22	22	22	22	22	22	22

Sample	Kawa26m-17	Kawa26m-18	Kawa26m-19	Kawa26m-20	Aka-3m-1	Aka-3m-2	Aka-3m-4
Decomposition index	2.028	2.737	2.797	2.814	1.477	1.869	1.774
Amount of DNA (ng/μl)	1.5833	1.1475	0.5228	0.3296	0.4561	0.0154	0.2010
Number of detected loci*	22	22	22	22	22	22	22

Sample	Aka-6m-5	Aka-6m-6	Aka-12m-11	Aka22m-14	Aka22m-15	Fuyo-3m-1	Fuyo-3m-2
Decomposition index	2.343	1.719	1.696	2.678	1.812	1.841	2.131
Amount of DNA (ng/μl)	0.7154	0.3138	0.2096	0.3327	0.0147	2.9243	0.6678
Number of detected loci*	22	22	22	22	22	22	22

Sample	Fuyo-3m-3	Fuyo-3m-4	Fuyo-6m-5	Fuyo12m-11	Fuyo12m-12	Fuyo-22m-14	Fuyo26m-20
Decomposition index	2.489	2.213	2.471	1.921	2.263	2.460	1.729
Amount of DNA (ng/μl)	1.8295	0.0053	0.4493	0.3022	0.8420	0.0231	0.0658
Number of detected loci*	22	22	22	22	22	22	22

4-2. Samples with a decomposition index of 3.0 or higher and STR typing detection of all loci.

Sample	Kawa3m-3	Kawa12m-11	Kawa22m-16	Fuyo12m-9	Kuro-12m-12	Kuro22m-13	Kuro26m-19
Decomposition index	3.800	3.377	3.026	4.042	3.079	4.476	3.165
Amount of DNA (ng/μl)	21.2458	1.1028	6.5970	0.2000	0.1635	0.0470	0.1194
Number of detected loci*	22	22	22	22	22	22	22

4-3. Samples with a degradation index of 10.0 or higher.

Sample	Kawa6m-8	Kuro6m-6
Decomposition index	10.486	10.093
Amount of DNA (ng/μl)	0.0277	0.0022
Number of detected loci*	17	11

4-4. Samples with a decomposition index of 3.0 or higher and no total locus detected by STR typing.

Sample	Kawa6m-6	Kawa12m-10	Kuro22m-14	Kuro22m-15
Decomposition index	4.095	4.857	3.264	4.160
Amount of DNA (ng/μl)	0.0046	0.0097	0.0357	0.0049
Number of detected loci*	15	18	21	17

Sample	Fuyo6m-6	Fuyo6m-7	Fuyo-12m-10	Fuyo26m-17	Fuyo26m-19
Decomposition index	3.788	5.712	4.320	3.238	3.284
Amount of DNA (ng/μl)	0.0060	0.0392	0.0320	0.0365	0.0373
Number of detected loci*	20	20	21	20	21

4-5 . Samples with a degradation index of 3 or less and no total locus detected by STR typing.

Sample	Kawa12m-12	Fuyo6m-8	Fuyo22m-13	Fuyo22m-15	Fuyo22m-16	Fuyo26m-18
Decomposition index	2.110	2.910	2.185	1.902	2.760	2.357
Amount of DNA (ng/μl)	4.937	0.0066	0.0617	0.0130	0.0146	0.0125
Number of detected loci*	21	14	21	21	21	21

Sample	Aka3m-3	Aka12m-9	Aka12m-10	Aka12m-12	Aka22m-16	Kuro3m-3	Kuro12-11
Decomposition index	1.948	2.874	2.502	2.361	2.373	2.098	2.532
Amount of DNA (ng/μl)	0.0064	0.1004	0.0072	0.0060	0.0108	0.0045	0.0022
Number of detected loci*	19	21	19	16	19	19	18

* : Total loci: 22 (including amelogenin)

< 引用文献 >

- 1) M.D. Timken, K.L. Swango, C. Orrego, M.R. Buoncristiani, A duplex real-time qPCR assay for the quantification of human nuclear and mitochondrial DNA in forensic samples: Implications for quantifying DNA in degraded samples, *J. Forensic Sci.* 50 (2005) 1044–1060.
- 2) D.Lozano-Peral, L.Rubio, I.Santos, M.J.Gaitán, E. Viguera, S. Martín-de-Las-Heras, DNA degradation in human teeth exposed to thermal stress, *Sci. Rep.* 11 (2021) 12118.
- 3) S. Vernarecci, E. Ottaviani, A. Agostino, E. Mei, L. Calandro, P. Montagna, Quantifiler^RTrio Kit and forensic sample management: A matter of degradation, *Forensic Sci. Int. Genet.* 16 (2015) 77–85.
- 4) Z.C. Goecker, S.E. Swiontek, A. Lakhtakia, R. Roy, Comparison of Quantifiler^R Trio and InnoQuantTM human DNA quantification kits for detection of DNA degradation in developed and aged fingerprints, *Forensic Sci. Int.* 263 (2016) 132–138.
- 5) A. Holt, S.C. Wootton, J.J. Mulero, P.M. Brzoska, E. Langit, R.L. Green, Developmental validation of the Quantifiler(®) HP and Trio Kits for human DNA quantification in forensic samples, *Forensic Sci. Int. Genet.* 21 (2016) 145–157.
- 6) A. Doniec, M. Januła, P. Grzmil, T. Kupiec, Assessing the utility of quantitative and qualitative metrics in the DNA quantification process of skeletal remains for autosomal and Y-chromosome STR amplification purposes, *Forensic Sci. Int. Genet.* 60 (2022) 102751.
- 7) C.M. Cupples, J.R. Champagne, K.E. Lewis, T.D. Cruz, STR profiles from DNA samples with “undetected” or low Quantifiler results, *J. Forensic Sci.* 54 (2009) 103–107.
- 8) C. Keyser-Tracqui, B., Ludes, methods for the study of ancient DNA, forensic DNA typing protocols, Humana Press, Inc., New York (2005) 253–264.
- 9) 小野孝明, 友成航平, 森 名生他: 各種 DNA 定量キットにおける PCR 阻害耐性の比較, 法科学技術, 20, 69-81, 2015 .
- 10) 堤 博文, 丸山 澄, 関野麗子他: 歯からのヒト特異的 DNA 量の定量 - QuantifilerTM Trio DNA Quantification Kit を用いて - , DNA 多型, Vol.27, 143-147 . 2018 .
- 11) Applied Biosystems: QuantifilerTM HP & Trio DNA Quantification Kit 簡易操作ガイド, 2017 .
- 12) K.L. Faber, E.C. Person, W.R. Hudlow, PCR inhibitor removal using the NucleoSpin^R DNA Clean-Up XS kit, *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (2013) 209–213.
- 13) I.Z. Zupanič Pajnič, T. Zupanc, J. Balažič, Ž.M. Geršak, O. Stojković, I. Skadrić, M. Crešnar, Prediction of autosomal STR typing success in ancient and Second World War bone samples, *Forensic Sci. Int. Genet.* 27 (2017) 17–26.
- 14) K.L. Swango, M.D. Timken, M.D. Chong, M.R. Buoncristiani, A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples, *Forensic Sci. Int.* 158 (2006) 14–26.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堤 博文、網干博文
2. 発表標題 種々の環境下に置かれた歯のヒト特異的DNAの定量
3. 学会等名 第90回日本法医学術学術関東地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堤 博文
2. 発表標題 種々の環境下に置かれた歯のヒト特異的DNAの定量
3. 学会等名 第31回日本DNA多型学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------