

機関番号：82505
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790617
 研究課題名(和文) DNA分解度測定によるDNAの分解プロセス及び適正なDNA型検査に関する研究
 研究課題名(英文) Estimation of DNA degradation and STR success rate by determining the DNA degradation ratio using quantitative PCR
 研究代表者
 北山 哲史 (KITAYAMA TETSUSHI)
 科学警察研究所・法科学第一部・研究員
 研究者番号：60462751

研究成果の概要(和文)：長さの異なる2種の定量PCRに基づくDNAの分解度測定により、DNAの量と質が測定可能となった。陳旧血痕に由来するDNA及び実験的な分解DNAにおいて、分解度が同程度であれば、DNAによる個人識別に広く用いられるSTR型検査の検出率は同程度であり、分解度測定によるSTR型の検出率予測が可能となった。骨及び歯試料からの新規抽出法により、PCR阻害物質を効果的に除去可能となり、法科学試料においてもDNA分解度測定が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Quantitative PCR assays using primers that generate two sizes of amplicons from the same region of genomic DNA were used to determine the extent of DNA degradation. The distribution of the extent of DNA degradation and the number of loci detected by STR analysis in blood stains correlated well with that of DNA artificially degraded by DNase I in the presence of Mn^{2+} . Thus, determination of the extent of DNA degradation was helpful for estimating the number of detectable loci. We were able to remove the PCR inhibitory substances that were copurified with DNA from bone sample using the new DNA extraction procedure. Therefore, the degradation ratio appeared to be a useful for predicting the number of loci detected by STR analysis in casework sample.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	0	1,900,000
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	0	3,100,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：定量PCR、STR型検査

1. 研究開始当初の背景

法科学試料のDNA型検査においては、STR型検査が主流である。特に分解を受けた試料DNAには、検査領域がより小さいMiniSTR型検査が有効である。市販の検査キットにおいて、検査領域の数はSTR型検査がMiniSTR型

検査よりも多く、従って識別力も高くなる。STR型及びMiniSTR型検査における鋳型DNA量は定量PCR法により決定される。法科学試料は、試料DNAが分解、汚染の影響を受けることにより、必ずしも定量結果に応じて期待されるDNA型が検出されとは限らない。そのため、DNA型の検出率と定量の正確な関連

付けが望まれてきた。

2. 研究の目的

(1) DNA 分解度による DNA 型検出率予測

試料 DNA の状態を DNA 分解度測定により決定する。試料 DNA の分解度から DNA 型検出率を予測し、試料 DNA の状態に適した DNA 型検査法を推定する。

(2) 分解度及び検査法を考慮した鋳型量決定法

分解の進行した試料 DNA において、従来の DNA 定量法では、定量領域と DNA 型検査領域の長さの不一致により、DNA 量が少なく見積もられて鋳型 DNA 量が過剰となり、適正に DNA 型が検出できない可能性がある。長さの異なる複数の領域を定量し、STR 型検査及び MiniSTR 型検査に適した定量法を決定する。

(3) 分解 DNA の作成及び法科学試料との比較

法科学試料においては試料 DNA の分解度は様々である。さらに、置かれた環境により、試料 DNA が受ける分解の機序は様々である。種々の方法により分解度の異なる試料 DNA を作成し、分解度と DNA 型検出率の関連付けを行う。作成した分解 DNA と法科学試料由来の分解 DNA において、分解度 DNA 型検出率を比較し、法科学試料において、どのような機序で試料 DNA が分解するのか類推する。阻害等の影響により分解度測定及び STR 型検出率予測が困難な場合には、抽出法等を改善する。

3. 研究の方法

(1) ヒトの染色体に複数コピー存在する D17Z1 領域中に、増幅領域の長さが異なる複数のプライマーセット (50bp、98bp 及び 207bp) を設定し、インターカレーターによる定量 PCR を実施する。分解度は短い増幅領域の定量値を長い増幅領域の定量値で除したものとす。アイデンティファイラーキットによる STR 型検査を行い、STR 型の検出率と試料 DNA の分解度を比較する。

(2) 陳旧血痕より DNA を抽出し、98bp 及び 207bp の定量に従い 1ng を鋳型として、アイデンティファイラーキットによる STR 型検査を行う。同様に、0.5ng を鋳型としてミニファイラーキットによる MiniSTR 型検査を行う。分解度に応じていずれの長さの定量が適しているか検証する。

(3) 新鮮血液より DNA を抽出し、DNA 分解酵素 (DNase I, Micrococcal nuclease) 又はメチレンブルー及び可視光で処理し、分解

DNA を作成する。反応条件又は反応時間により分解度の異なる分解 DNA を作成する。分解方法の差異により、同じ分解度であっても異なる STR 型検出率となる分解 DNA を作成する。

実験的に作成した分解 DNA と陳旧血痕より抽出した分解 DNA を比較し、陳旧血痕由来の分解 DNA における分解度と STR 型検出率が、実験的に作成したいずれの分解 DNA と近いかを検討する。同様に、死後数ヶ月から数年経過した骨及び歯試料より DNA を抽出し、分解度と STR 型検出率を検証した。

4. 研究成果

(1) 陳旧血痕より抽出した DNA を、98bp 及び 207bp の定量に従い 1ng を鋳型として、アイデンティファイラーキットによる STR 型検査を行った (table 1)。

TABLE 1—Comparison of degradation ratios and number of detectable loci between bloodstains.

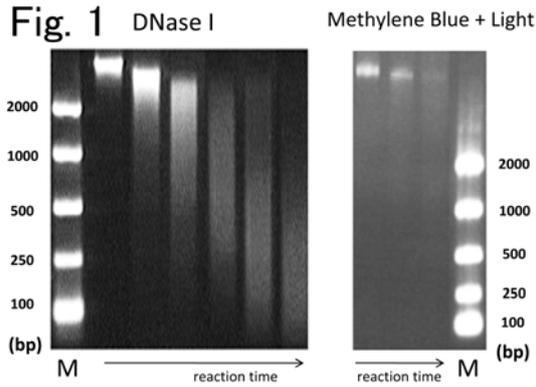
Sample	D17-098 (ng/mL)	D17-207 (ng/mL)	Degradation Ratio(D17- 098/D17- 207)	Template DNA (ng, D17-207)	Number of detectable loci	Template DNA (ng, D17-098)	Number of detectable loci
Blood Stain 1	1.568	0.158	9.9	0.22	15 ^{1,2}	1.00	12
Blood Stain 2	0.803	0.045	17.8	0.41	12 ^{1,2}	1.00	11
Blood Stain 3	1.156	0.097	11.9	0.78	12 ^{1,2}	1.40	9
Blood Stain 4	4.204	0.812	5.2	0.97	16	1.06	14
Blood Stain 5	0.216	0.008	27.0	0.08	8	1.00	7
Blood Stain 6	1.453	0.084	17.3	0.84	12 ^{1,2}	1.00	7
Blood Stain 7	2.058	0.165	12.5	0.99	12 ^{1,2}	1.00	6
Blood Stain 8	2.775	0.324	8.6	1.00	14 ^{1,2}	1.00	9
Blood Stain 9	0.274	0.008	34.3	0.08	8 ¹	1.00	6
Blood Stain 10	3.686	0.361	10.2	1.01	13 ^{1,2}	1.00	10
Blood Stain 11	6.297	2.206	2.9	-	-	1.00	16
Blood Stain 12	2.183	0.877	2.5	-	-	1.00	16
Blood Stain 13	6.199	2.246	2.8	-	-	1.00	16
Blood Stain 14	3.926	1.218	3.2	-	-	1.00	16
Blood Stain 15	7.681	2.902	2.6	-	-	1.00	16

Off-scale peak, ¹Pull-up peak, ²Incomplete adenylation

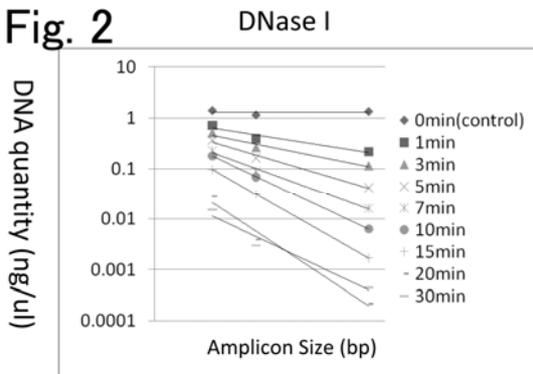
分解度の低い試料 DNA においては、定量にいずれの長さの増幅領域を用いても適切に STR 型が検出可能であった。分解度が中程度の試料 DNA においては、98bp を用いると鋳型量の不足に起因するアレドロップアウトが見られ、STR 型検出率が低下した。一方、207bp を用いると鋳型量は適正であり、STR 型検出率は増加した。分解度が高い試料 DNA においては、98bp を用いると鋳型量は適正であった。一方、207bp を用いると鋳型量が過多であることに起因するオフスケールピーク等が見られ、適正な STR 型検出は不可能となった。以上より分解度に応じ、定量領域の長さの選択が可能となった。ミニファイラーキットによる MiniSTR 型検査においては、98bp の定量に従い 0.5ng を鋳型とすることが適切であった。

(2) 新鮮血液より DNA を抽出し、DNA 分解酵素 (DNase I, Micrococcal nuclease) 若しくはメチレンブルー及び可視光で処理し、分解 DNA を作成した。ゲル電気泳動において、DNaseI 等の DNA 分解酵素によっては、DNA の断片化が確認された。一方、メチレンブルー及び可視光による酸化修飾によっては、DNA の損傷によりバンドが薄くなること確認され

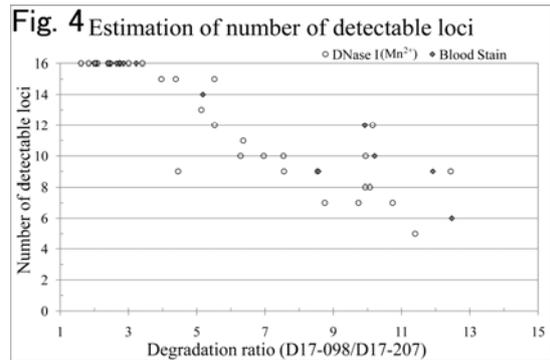
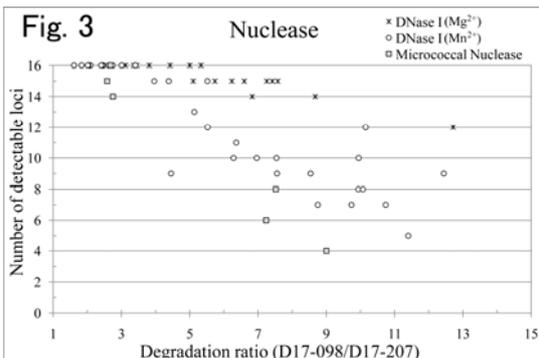
た(Fig. 1)。



DNaseI で処理した試料について、定量 PCR により、反応時間の増加に従い DNA の分解が進行することを確認した(Fig. 2)。定量 PCR における増幅領域の長さとして DNA 定量値の対数には直線性が見られたことから、試料 DNA の分解は長さが異なる 2 種の定量により表せると示唆された。



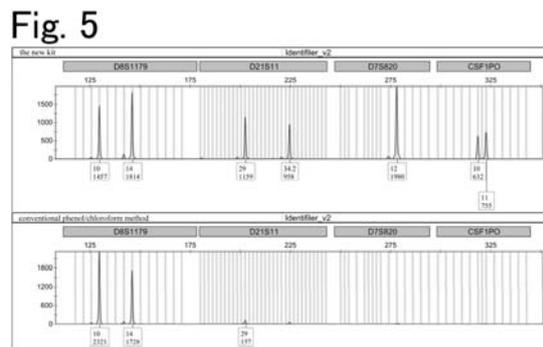
DNaseI (Mg^{2+} 又は Mn^{2+} 存在下) 若しくは Micrococcal nuclease で処理した試料について、98bp の定量に従い 1ng を鋳型として、アイデンティファイラーキットによる STR 型検査を行った(Fig. 3)。DNA 分解度が同じ試料 DNA においても、分解の機序により STR 型検出率には差異が見られた。実験的に作成した分解 DNA と陳旧血痕より抽出した分解 DNA の、分解度及び STR 型検出率を比較した。陳旧血痕由来の分解 DNA は、DNaseI (Mn^{2+} 存在下) により処理尾した分解 DNA と、分解度及び STR 型検出率が同程度であった(Fig. 4)。



死後数ヶ月から数年経過した骨及び歯試料より DNA を抽出し、アイデンティファイラーキットによる STR 型検査を行った(Table 2)。骨及び歯資料においては、PCR 阻害物質により STR 型が適切に検出されない例が見られた。試料 DNA 中に PCR 阻害物質が存在すると、定量 PCR 及びアイデンティファイラーキットによる STR 型検査の阻害が確認され、適正な STR 型検出率予測が不可能であった。PCR 阻害物質を除去し、STR 型検出率予測を可能とするために、骨及び歯試料からの新規 DNA 抽出法を確立した。新規 DNA 抽出法により、STR 型検査において確認された PCR 阻害が改善した(Fig. 5)。

Table 2
Quantity of human genomic DNA recovered using the new kit and results of the STR analysis.

Sample type	Time		Number of loci with detected allele	
	Estimated postmortem time	Elapsed time from recovery	Identifier (%)	MiniFiler (%)
femur (compact bone)	2.5 years	1 year	100	-
femur (compact bone)	1.5 years	1 year	100	-
femur (compact bone)	4 years	4 years	100	-
femur (compact bone)	1 year	8 years	56	100
costa (cancellous bone)	2 years	18 years	0	100
tooth (half size)	1 year	4 years	100	-
tooth (half size)	0.5 years	3 years	100	-
tooth (whole size)	0.5 years	3 years	19	100
tooth (whole size)	1 year	2 years	100	-



今後、骨及び歯資料等の法科学試料において、DNA 分解度から STR 型検出率を可能とすることを旨とする。さらに、DNA 分解度測定により STR 型検査、MiniSTR 型検査及び SNP 検査等複数の検査の検出率予測を行い、DNA 分解度に応じた検査法の選択を旨とする。

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 1 件)

(1) Tetsushi Kitayama, Yoshinori Ogawa, Koji Fujii, Hiroaki Nakahara, Natsuko Mizuno, Kazumasa Sekiguchi, Hirofumi Fukushima, Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method, 査読有, 12, 2010, 84-89

〔学会発表〕 (計 2 件)

(1) Tetsushi Kitayama, Quantitative PCR Assays for the Estimation of the DNA Degradation in Bone Samples, 21st International Symposium on Human Identification, 2010.10.13, San Antonio

(2) Tetsushi Kitayama, A real-time PCR assay for the estimation of the DNA degradation, 20th International Symposium on Human Identification, 2009.10.14, Las Vegas

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北山 哲史 (KITAYAMA TETSUSHI)

科学警察研究所・法科学第一部・研究員

研究者番号 : 60462751