

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592345

研究課題名（和文） DNA多型による法歯学的個人識別精度の確実な進展を目指して

研究課題名（英文） Pursuing steady improvement in accuracy of personal identification using DNA polymorphisms in the field of Forensic Odontology

研究代表者

水口 清（MINAGUCHI KIYOSHI）

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00133380

研究成果の概要（和文）：本研究は母性遺伝をするミトコンドリア DNA、父性遺伝をする Y 染色体、特殊な遺伝パターンを示す X 染色体の特徴を最大限に生かし得るように DNA 型の検査領域を拡大することにより、戦没者遺骨などの高度変性資料と家族資料との比較による個人識別の精度を向上し、また事件や事故による犠牲者が日本人か否かを明らかにすることを可能にするための研究であり、すでに研究期間内にいくつかの事例に応用し、その有用性を実証してきた。

研究成果の概要（英文）：This study aims to improve accuracy for personal identification in the comparison with highly-degraded DNA derived from deceased person in the war and their family members or to identify whether victims in the criminal case or accidents are Japanese or not, by making the best use of characteristics of maternally-inherited mitochondrial DNA and paternally-inherited Y-chromosomal DNA, and X-chromosomal DNA. We have already applied the results of this research to some examples and demonstrated their usefulness.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：歯科法医学

1. 研究開始当初の背景

変性度合いの高い生物学的資料からの DNA 多型検査で、検出率・再現性・識別能力の高い

検査法を作り上げるためには、先端的な技術の応用だけで目的は達成できない。各染色体やミトコンドリアなどそれぞれの DNA の特徴

的な違いを考慮した上でケースに応じて識別能力を上げていく必要がある。そのため、ミトコンドリア DNA、Y 染色体、X 染色体多型につき、それぞれ異なるアプローチが必要であった。それぞれの対象に対する、当初の背景は以下のごとくであった。

(1) mtDNA はコピー数が多く、高度変性 DNA からの検出効率が高い。法医学領域では HV1、HV2 の塩基配列多型による比較が中心で、ヨーロッパでは Parson ら、アメリカでは Budowle らがデータベースの作製に貢献してきた。Coding 領域を含めた系統分類は主に人類学的な研究に用いられ、Kivisild、Kong、Torroni、Macaulay らが日本を除く東アジア地域のデータを報告している。国内では私達が 211 人の日本人における HV1、HV2 領域と coding 領域の情報を含めた系統分類を最初に報告し、その後 Tanaka らは多数例の疾患患者の mtDNA の全ゲノム配列を報告し、Mabuchi ら、Asari ら、Sekiguchi らは HV1、HV2 領域を主としたデータを報告した。私達はさらに 100 例の日本人につき全ゲノムを対象とした系統分類を行い、その中で 14% に新しい系統を見出し、HV1 と HV2 では 80 型に分類されたものが 94 型に増加した。つまり、mtDNA データは、coding 領域の情報を加えることで識別力が格段に上昇する。しかも末端までの細分類は、日本人に特有な系統が見出せ、身元不明対象者が日本人か否かといった推定に役立つ。そこで、少ない検査回数で系統の末端に到達できる方法が必要であった。

(2) Y 染色体多型は法医学領域では STR が主体で Keyser らが中心となり精力的に進められてきたが、近年は kit の市販により集団データは kit を中心に報告されるようになってきた。Y-SNPs の研究は人類学分野で多用され、YCC (Y Chromosome Consortium) の Hammer、Underhill らが SNPs 主体の biallelic marker

の分類を纏める役割を果たしてきた。国内では私達が日本人を対象に新しい系統も含め Y-SNPs による系統分類と Y-STR 多型との関連を最初に報告した。近年 Mizuno ら、Hayashida らは kit を用いた多数例の Y-STR のデータを報告しているが、日本人では kit の 16 種の Y-STR でもまだ同じ型の人が出現する。STR 検査では個人を特定できることが望まれることから、男性系統の変異の高いローカスの検討を増やす必要がある。日本人の Y-SNPs は他の報告もあるが、いずれも集団間の大きな比較で、私たちより詳細な分類はない。Y-SNPs の系統は、1 つか 2 つの型を決定することで対象を絞り込めるため、変性度合いが高い微量な資料の検査に最適で、現在の系統を細分類できれば極めて有効な識別手段となりうると考えられた。

(3) X-STR 多型は Edelman、Szibor らが ChrX-STR.org のデータベースを立ち上げている。日本人では Asamura らと私達が多座位の STR を報告しているのみで、X-SNP haplotype については Katoh らが東アジア集団の調査をしているのみであった。X-STR 多型は、父から娘にはそのまま伝わるが、母からは組替え体が子供に伝わる性質を持ち、男の型から一般集団の haplotype が決定できるため、この性質を利用して常染色体多型では解決できないケースに極めて有用な情報として利用できる場合が多くある。さらに STR に関連する SNPs の情報を加えれば、組換えの確認、および個人識別情報としても利用できると考えられた。

(4) 硬組織からの DNA 抽出法は、従来多量の DNA を抽出することが目的とされていた。しかし、私達は硬組織から如何に DNA の変性を抑え、PCR 阻害物質を取り除いた DNA を抽出できるかをテーマとしてきており、開始当時までも戦没者遺骨の鑑定でかなり条件の良い DNA を抽出できるようになってきた。

それでも変性度合いの高い資料はインヒビターと抽出効率が問題となる。つまり、できる限り良いDNAを抽出するための条件を探る必要がある状況であった。

2. 研究の目的

研究期間内の具体的目標は、(1)母性遺伝をするmtDNA多型の約300例の全ゲノム情報に近い日本人データベースを確立し、既報の全ゲノム情報約600例と総合して、HV1+HV2で推測された系統を細分化するために必要なcoding領域の変異を、できる限り少ない回数で検査できる状況を作りあげる。(2)Y染色体のbiallelic markerによる系統分類の識別精度を上げるため、JSNP(日本人SNP)データベースにある126のY-SNPsのうちY特異的な多型を検査し、系統の細分類を目指す。さらに、Y-SNPsを高度変性資料の検査に応用できるようにする。(3)Y-STR多型は、一般的に汎用されている16ローカスと上記の新しいbiallelic markerによる系統との関連を明らかにする。これはY-STR多型の結果から系統を推測し、最小限の検査で系統を確認もできるシステムを作り、あるY-STR型が得られた場合、対象者が日本人か否かを推測できるシステムを作るためである。さらにY-STRローカスを増加した場合に、系統推測の精度がどれだけ上がるか、また新しい系統の存在を予測できるか検討する。(4)X-STR多型については、16ローカスを検査し、さらに8ローカスのキットを用いることにより21ローカスの検討を行ってきた。また、X染色体全域で少なくとも6ヶ所に3種類以上の近接した座位の組み合わせを作ることができると考えられたため、このシステムに適したローカスを増加することとした。これにより複雑な遺伝関係のケースに、X染色体の一部の領域で血縁関係を証明できる可能性が増加する。さ

らにこれらの近接座位内および前後のSNPsをJSNPデータベースから選択・検査し、STR haplotypeの組換えの有無をSNPにより確認できる方法をつくる。これは同時に今後のSNPsによる変性DNAに対するX染色体多型検査の応用につながる。(6)古い資料を対象に、歯牙の歯髄腔内残遺物、歯牙硬組織、骨の処理に当たり、コンタミを減らすためのDNA抽出法、および高度変性DNAからの検査法について検討する。以上の4項目を主たる目的とした。

3. 研究の方法

(1) mtDNAのcoding領域の多型の迅速検査法の開発：すでに約100例近くの日本人試料につき現状で最も末端に近い系統を決定し報告しているが、私達の既報の211例についても検査領域を追加しながら現状で最も末端の系統を決定していく。この際、半分ほどの資料についてはミトコンドリア全領域の塩基配列を決定し、東アジアのデータと比較することで、新しい系統を確立する。

(2) Y染色体biallelic markerによる系統分化の検討：Y染色体多型の系統検査は、JSNPデータベースを元に細分類可能なマーカーを検索していく。2012年4月の段階でJSNPには126のY-SNPsの登録があったため、これらを解析し、pseudo-autosomal regionに相当しない領域の多型を、申請者らがすでに18系統に分けた上で16ローカスのSTR検査を終了している資料の中から選択したものを用いて、新たな変異を探していく。分岐年代が古い多型が見つかった場合は、マレー人試料を用いてその分岐順序を検討する。

(3) Y染色体多型データの拡大：日本人試料についてAmpF1STR Y-Filer kitにより16種のY-STR多型を検査し、新しく確立した申請者らの系統との関連を検討する。新たに120

例ほどについて同様なデータベースを増加し、これらを用いて STR 多型から系統を推測する方法を作り出す。

(4) Y-STR 多型の検査ローカスの増加 : Y-filer kit の多型に 6 ローカスを加えた PowerPlex Y23 キットが発売されたため、この検査を優先し、これにすでに検討していた多型性の高い 5 ローカスを同時検出する multiplex PCR system を追加し (当初のローカスのうち 2 ローカスはキットと重複)、約 400 人の男性について 28 種類の多型の多様性について検討する。

(5) X-STR 多型と X-SNP : すでに 450 例ほどの試料につき 21 種類の X-STR 多型データを検討しているが、これに 10 locus の multiplex を加えて、少なくとも 3 ローカス以上からなるハロタイプデータを作る。また、これに加えて Argus X-12 キットが発売されたため、このキットをマレー人について検討する。X-XP は 3 ローカスの STR-haplotype の前後に少なくとも 2 ヶ所ずつ、STR 内にはできれば 4 ヶ所の多型性の高い SNPs を JSNP データベースから選択し、STR-haplotype との連鎖不平衡を調べる。検査法は原則的に TaqMan assay により多検体の型判定を行い、近接したものについては SSCP 法で判定する。SNPs 検査に関してはマレー人試料についても検討する。これは連鎖不平衡が古いものかを知る目安になるためである

(6) 古い硬組織試料を対象に、歯牙および骨から、DNA 抽出操作前の持ち込みのコンタミを減らす方法を検討する。脱灰法および酵素処理法は試料の種類によりいくつかの条件を比較していく。特に、戦没者遺骨の鑑定に応用しながら常染色体 STR を検出する Identifiler kit の結果を元に有用性を確認していく。また高度変性 DNA を資料とした場合に、できる限り少ない資料から情報を得ら

れる多型検出法を検討する。これは特にミトコンドリア DNA 及び Y 染色体多型を優先する。

4. 研究成果

研究期間内の成果を研究目的ごとに分類すると以下のごとくである。

(1) ミトコンドリア DNA 多型 : 日本人及びマレー人のミトコンドリア DNA (mtDNA) 多型の全ゲノム配列については、日本人では 99 例が完成しているが、さらに 9 例について完成させた後に論文にする計画をしている。いくつかの試料が未決定であるが、この状態で 17 種類の新しい系統が確立されることになる。またマレー人については 89 例の全ゲノムデータを完成し、さらに 55 例の新しい資料のコントロール領域の塩基配列を決定済みで、現在これらの系統を確認中で、論文準備中になっている。ミトコンドリア DNA 多型は古くから誤りが多いことが指摘されており、最終確認に非常に時間がかかっている。しかし現状で、本研究結果が日本人の mtDNA 系統の数を増し、さらに東アジアにおけるヒトの移動の複雑な地域における重要なデータベースとなることは明白である。

(2) Y 染色体多型 : 日本人における Y 染色体の JSNP に報告されている 126 ヶ所の多型について評価を行い、Y 染色体多型系統との関連を調査した。これらのうち 56 ヶ所は Pseudoautosomal region に存在し、さらに 17 ヶ所は multi-locus の性質を示したため一部については検討対象から除外し、残りの 44 ヶ所の多型について検討した。その結果、変性 DNA からの検出に適した方法で、新しい系統を検出できる 14 腫のマーカーを見出し、18 種類に分類されていた日本人を系統を 31 種類に分類し、論文として報告した。また Y-STR データから系統を推測できる方法を見出し、本研究の一部として論文作成中である。

現在、コンピューターを用いてこれらの系統を推測するプログラムも作製中である。また、本研究進行中に Y-STR の 23 ローカスキットが発売されたため、このキットについて検討し、論文を作成中である。さらにこれに加えて 5 ローカスの Y-STR を検討している。

(3) X 染色体多型については 16 ローカスの X-STR を 2 回の multiplex PCR で検出可能な方法を確立し、さらに、そのうち 1 つのローカスを除けば 15 ローカスを同時に増幅可能にし、論文として発表した。その後、X-STR の 8 ローカスを同時検出できる市販のキットを検討し、さらに 10 ローカスの STR を追加し、X 染色体上に 6 ヶ所の haplotype データが得られるようなシステム作り、報告した。また、この間に 12 ローカスを検出できるキットの改良版が販売されたため、マレー人についてこの方法を応用しその有用性を示し報告した。さらに、特に複雑な家系の血縁関係の証明を、容易にスクリーニングできるように、一度に X 染色体全体にわたる 18 ローカスを検査可能なシステムを作り報告した。またこれらの一部の近接座位の内部、前後の 8 ヶ所の SNP を検査することで、近接座位の haplotype としての安定性を検討し、X-SNP を用いた多型検査の有用性を示し、学会報告を行った。

(4) 変性 DNA からの多型検出については、実際例で DNA 抽出過程の検討をしているが、資料による違いがあるため、未だ最終結論には至っていない。これに対し、高度変性 DNA からの mtDNA 多型の検査法については、少ない資料から効率的に情報を得る方法をほぼ確立してきており、最終年度に学会発表をすることとした。この方法も論文として報告する予定である。

(5) 以上のごとく、mtDNA 多型、Y 染色体多型、X 染色体多型それぞれの分野で、日本人

について、現状を確実に 1 歩進めた結果を得たものと確信している。

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)

- ① Nakamura Y, Minaguchi K, Sixteen X-chromosomal STRs in two octaplex PCRs in Japanese population and development of 15-locus multiplex system, Int J Legal Med, 査読有, Vol. 124, 2010, 405-414
DOI: 10.1007/s00414-010-0467-z
- ② 内藤紗絵、笠原 育、水口 清、日本人における Y 染色体多型の系統文化を示す NRY (Non-recombining portion of Y) 多型の検索、DNA 多型、Vol. 18, 2010, 184-186
- ③ 中村安孝、鮫島道長、水口 清、18-locus X-STY multiplex PCR system の開発と日本人における出現頻度、DNA 多型、Vol. 19, 2011, 218-220
- ④ 内藤紗絵、笠原 育、水口 清、日本人を推定するための Y 染色体多型の応用、Forensic Dental Science、Vol. 4, 2011, 26-28
- ⑤ Samejima M, Nakamura Y, Minaguchi K, Population genetic study of six closely-linked groups of X-STRs in a Japanese population, Int J Legal Med, 査読有, Vol. 125, 2011, 895-900
DOI: 10.1007/s00414-011-0618-x
- ⑥ Samejima M, Nakamura Y, Minaguchi K, Genetic study of 12 X-STRs in Malay population living in and around Kuala Lumpur using Investigator Argus X-12 kit, Int J Legal Med, 査読有, Vol. 125, 2012, 678-683
DOI: 10.1007/s00414-012-0705-7
- ⑦ 鮫島道長、中村安孝、水口 清、日本人における 6 ヶ所の X-STR closely-linked group の解析、DNA 多型、2012, 183-186
- ⑧ Nakamura Y, Samejima M, Tamaki K, Minaguchi K, Multiplex PCR for 18 X-chromosomal STRs in Japanese population, Leg Med, 査読有, Vol. 15, 2013, 164-170
DOI: 10.1016/j.legalmed.2012.10.006
- ⑨ Naitoh S, Kasahara-Nonaka I, Minaguchi K, Nambiar P, Assignment of Y-chromosomal SNPs found in Japanese population to Y-chromosomal haplogroup tree, J Hum Genet, 査読有, Vol. 58, 2013, 195-201

00133380

(2)研究分担者

花岡 洋一 (HANAOKA YOICHI)
東京歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：
3018091

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① 水口 清、丸山 澄、MtDNA 多型の full genome 情報の個人識別への応用と日本人の推定、第 94 次日本法医学会学術全国集会、平成 22 年 6 月 24 日、東京
- ② 内藤紗絵、笠原 育、水口 清、日本人を推定するための Y 染色体多型の応用、日本法歯科医学会第 4 回学術集会、平成 22 年 7 月 24 日、東京
- ③ 中村安孝、鮫島道長、内藤紗絵、花岡洋二、水口 清、三世代目の子孫間の血縁関係を証明するための X-STR 多型検査の応用について、第 79 回日本法医学会学術関東地方集会、平成 22 年 10 月 30 日、東京
- ④ 中村安孝、鮫島道長、水口 清、18-locus X-STR multiplex system の開発と日本人における出現頻度、日本 DNA 多型学会第 19 回学術集会、平成 22 年 11 月 18 日、三島
- ⑤ 水口 清、DNA 多型による 1 人の対象者の地理的由来の推定とデータベース情報の必要条件、日本 DNA 多型学会第 19 回学術集会、平成 22 年 11 月 19 日、三島
- ⑥ 水口 清、竹崎直子、Y-STR haplotype を用いた系統分化の推定と haplogroup、第 95 次日本法医学会学術全国集会、2011 年 6 月 16 日、福島市
- ⑦ 中村安孝、鮫島道長、水口 清、花岡洋二、18-X-STR multiplex PCR system の作成、第 95 次日本法医学会学術全国集会、2011 年 6 月 17 日、福島市
- ⑧ 中村安孝、鮫島道長、水口 清、日本人における 6 箇所 X-STR closely-linked group の解析、日本 DNA 多型学会第 20 回学術集会、2011 年 12 月 2 日、横浜市
- ⑨ 水口 清、混合資料のミトコンドリア DNA 多型検査に関する提言、第 96 次日本法医学会学術全国集会、2012 年 6 月 8 日、浜松市
- ⑩ 鮫島道長、中村安孝、水口 清、クアラルンプール及びその周辺のマレー人集団における 12 座位の X-STR の分析、第 96 次日本法医学会学術全国集会、2012 年 6 月 8 日、浜松市
- ⑪ 鮫島道長、中村安孝、水口 清、X 染色体上の近接した 1 つの STR block を含む SNP 検査と法医学的応用性の検討、日本 DNA 多型学会第 21 回学術集会、2012 年 11 月 9 日、京都市

6. 研究組織

(1)研究代表者

水口 清 (MINAGUCHI KIYOSHI)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：