

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10552

研究課題名(和文) DNA鑑定に最適な硬組織の部位選定のための定量解析に関する研究

研究課題名(英文) Quantitative evaluation for selection of optimal hard tissue for forensic DNA analysis

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNA鑑定が最も困難な硬組織試料について、どの部位がDNAの保存状態が良好で且つDNA回収量が多いかについて実験を行った。3個体についてそれぞれから、計16部位のDNA抽出を行い、指骨及び趾骨、四肢長管骨、歯牙、その他、に分類し、STR検出率、DNA回収量についてこれら4グループを比較した。その結果、指骨及び趾骨では、他のグループと比較してSTR検出率及びDNA回収量が安定して高い傾向が認められた。このことから、安定したSTR検出率とDNA回収量が高い指骨・趾骨が法医学分野において、保存状態が良好で且つDNA回収量が多い試料になり得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

DNA鑑定技術が飛躍的に進歩しているにも関わらず硬組織を用いたDNA解析では多くの課題が残されている。DNA鑑定が最も困難な硬組織試料について、どの部位がDNAの保存状態が良好で且つDNA回収量が多いかについて科学的な根拠を得るべく研究を行った。これまでは単に大腿骨からのDNA検出率が良いとの科学的根拠のないままDNA検査が行われてきたが、我々の研究の結果、大腿骨よりも指骨といった骨梁構造が豊富な骨のぼうが安定したDNA結果を得られることが明らかとなった。今後のDNA鑑定実務においてDNA検出率の安定した硬組織試料を選択することは法医実務にとって有用である。

研究成果の概要(英文)：Experiments were conducted to determine which regions of the most challenging hard tissue samples for DNA analysis exhibit both good DNA preservation and high DNA recovery. DNA extraction was performed from a total of 16 sites from three individuals, and the samples were categorized into four groups: phalangeal and toe bones, long bones including the femur, tooth, and others. The STR typing success rate and DNA recovery were compared among these four groups. The findings consistently indicated a prominent pattern of high STR typing success rates and DNA recovery in phalangeal and toe bones. Therefore, it was suggested that phalangeal and toe bones, which demonstrate stable STR typing success rates and high DNA recovery, can serve as samples with good preservation and high DNA recovery in the field of forensic medicine.

研究分野：法医学

キーワード：DNA多型 硬組織 劣化DNA試料 DNA抽出 DNA収量

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA 鑑定技術が飛躍的に進歩しているにもかかわらず、劣化した DNA 試料を対象とした DNA 鑑定にはいまだに多くの課題が残されている。最も劣化した DNA 試料として硬組織が挙げられ、我々はこれまでに一貫して劣化 DNA 試料に対する DNA 分析の最適化を目的とし、DNA の抽出方法の検討、miniSTR 法の開発、SNPs 解析の応用など数々の研究を行い、実績を積み上げてきた。

一方、DNA 鑑定に供する硬組織の試料選定に着目すると、「緻密質がしっかりとした部位が適している」という解釈のもと、多くの研究者が大腿骨や上腕骨といった四肢長管骨の骨幹部を試料として選定し、一部では歯牙が試料として適しているという研究者も存在する。しかしながら、その理由には科学的根拠は乏しく、単に四肢長管骨が適しているという通説に基づいたものであった。よって、DNA 鑑定の前段階、つまり劣化した試料の分析にあたって対象とすべき硬組織試料の選定については、ほとんど科学的議論がされていない状況と言える。

これまでの漠然とした通説から、「硬組織におけるどの部位の DNA 保存状態が良好で、回収できる DNA 量が多いのか」を科学的に実証し、我々がこれまでに行ってきた劣化 DNA 試料分析の最適化を合わせることで、社会的要請の高い劣化 DNA 試料の個人識別分野において大きな前進となり得る。

2. 研究の目的

今回、DNA 鑑定が最も困難な硬組織試料について、どの部位が DNA の保存状態が良好で且つ DNA 回収量が多いかについて実証することを目的とする。

現在、世界の多くの国々では DNA 鑑定を行う際、キャピラリーシーケンサー及び STR 型解析試薬を用いた検査が主流である。STR 型解析結果が良好に得られるものが、保存状態が良好な DNA と考えられることから、日本において多くの鑑定機関で用いられている STR 型解析試薬の一つである GlobalFiler PCR Amplification Kit (GF Kit) による解析で STR 型検出率の算出を行い、良好な保存状態の DNA を評価することとした。

また、法医学で用いる DNA 試料は様々な環境に晒されており、DNA の断片化や STR 解析を阻害する物質が DNA 抽出過程で持ち越される可能性がある。そこで、そのような法医実務に応じた劣化 DNA 試料の回収量を比較するため、Quantifiler HP DNA Quantification Kit (HP Kit) を用い、DNA 定量、DNA の分解度及び阻害物質の有無を同時に評価することとした。

DNA 鑑定に適した部位を選定する上では、同一個体間での各硬組織を比較することが望ましいことから、死後経過時間及び発見場所の異なる個体についてのそれぞれの部位について DNA 抽出を行い、上記 2 点について評価を行い、DNA 鑑定に適した部位を選定することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料

死後経過時間及び発見場所の異なる 3 個体について、それぞれ、歯牙、頭蓋冠、側頭骨(錐体)、後頭骨(大後頭孔周辺)、橈骨、手根骨、中手骨、基節骨(指骨)、寛骨(大坐骨切痕周辺)、大腿骨(骨幹)、大腿骨(骨端)、膝蓋骨、腓骨、基節骨(趾骨)、中足骨及び足根骨の計 16 部位の一部を採取した。

(2) DNA 抽出

採取した硬組織を洗浄し、十分に乾燥させたのち、ブロック状に切出し、マルチピースショッカー MB100 (安井器械) を用い粉末にした。歯牙については 1 本分全量、その他の硬組織は粉末 0.2 g についてトリプリケイトで検証を行った。それぞれの検体について、0.5 M EDTA (pH 8.0) を 9.3 mL、Buffer ATL (QIAGEN) を 360 μ L、Proteinase K を 200 μ L 及び 1M DTT を 50 μ L を混合したバッファーを加え、56 $^{\circ}$ C で一晩静置し、脱灰・消化を行った。消化液について Amicon Ultra-15-30 kDa (Merck) を用い限外濾過を行い、400 μ L まで濃縮後、QIAamp DNA Investigator Kit 及び QIAcube (QIAGEN) を用い DNA 精製を行った。

(3) DNA 定量及び STR 型解析

DNA 定量は HP Kit を用い DNA 濃度、DNA 分解度 (DI) 及び PCR 阻害物質による影響を IPC-Ct 値で評価した。

得られた定量値をもとに鋳型 DNA 量を 0.5ng となるように DNA を GF Kit に加えた。DNA 回収量が少なく 0.5 ng 使用できない試料では一律に 7.5 μ L の DNA 抽出液を加え PCR 増幅を行った。PCR 増幅後、3500 Genetic Analyzer で PCR 産物の分離を行い、GeneMapper ID-X v1.4 で解析を行った。解析結果から GF Kit に含まれる 24 座位中の検出された座位の割合を STR 型検出率として算出した。

4. 研究成果

死後経過時間及び発見場所の異なる 3 個体について STR 型検出率の平均値を比較したところ、3 個体間における STR 検出率で大きな差は認められなかった。

部位別に分類し、STR 型検出率の平均値を比較したところ、指骨や趾骨の STR 検出率が高く、ばらつきが少ない傾向が認められた (Table 1)。よって指骨や趾骨が DNA 鑑定に適している可能性が考えられたため、これらすべての試料を Group 1 (指骨や趾骨) Group 2 (大腿骨などを含む四肢長管骨) Group 3 (歯牙) Group 4 (その他) の 4 グループに分類し比較検討を行った。

STR 型検出率について比較を行ったところ、Group 4 と比較し Group 1、Group 2、Group 3 は STR 型検出率が高い傾向が認められた (Figure 1)。テューキー法による多重比較を行ったところ、Group 1 と Group 4 との間に有意差が認められた。次に、これらのグループの DNA 回収量を比較したところ、Group 4 と比較し Group 1、Group 2、Group 3 では DNA 回収量が高い傾向が認められ、この DNA 回収量の違いが STR 型検出率の違いに影響していることが示唆された (Figure 2)。Group 3 は DNA 回収量が高いにも関わらず、STR 検出率がやや低い傾向が認められたことから、その原因について DI 値を用い DNA 分解度を比較した。Group 1 及び Group 2 は DI 値が低い (分解度が小さい) のに対し、Group 3 及び Group 4 では DI 値が大きい (分解度が大きい) 傾向が認められた (Figure 3)。Group 3 の DNA 型解析結果を確認したところ DNA の分解度が高く特に高分子領域の STR 型が検出されていないことが確認され、鋳型 DNA 量が十分あるにも関わらず DNA が分解しているため STR 検出率が低下した可能性が示唆された。

次に、鋳型 DNA 量と STR 型検出率の相関について調べた。鋳型 DNA 量の対数値と DNA 検出率をプロットし相関を調べたところ (Figure 4) 強い相関が認められた ($r=0.814$)。このことから HP Kit を用いた DNA 定量結果は STR 型解析結果と相関がある可能性が示唆された。各グループのプロットを確認すると Group 2 は STR 解析に使用できる鋳型 DNA 量が足りずに STR 型結果検出率のばらつきに繋がったと考えられる。

これらの結果から、指骨や趾骨は、他の硬組織と比較して STR 型検出率が安定して高い傾向が認められた。四肢長管骨については DNA 回収量の平均値は高いものの、ばらつきが大きいため、PCR 増幅に供する鋳型 DNA 量に足りず、STR 型検出率が安定しない可能性が示唆された。また、歯牙は DNA 回収量が多いにも関わらず、DNA 分解度が高い傾向が認められ、STR 型検出率が低下していると推察された。

次に指骨や趾骨において STR 型検出率が高い原因について検討を行った。ほかの骨に対して指骨や趾骨は骨梁構造が豊富であることが挙げられる。骨梁構造と STR 型検出率との関連を調べるため、骨梁構造の多い大腿骨の骨端と少ない骨幹との間で STR 型検出率を比較すると、骨端のほうがばらつきは小さく、STR 型検出率が高い傾向が認められた (Table 1)。そこで、DNA 抽出の際の洗浄法を調整し、検討を行った。骨梁構造が豊富な組織では通常以上の念入りの洗浄を行うことにより DNA 収量が大きく減少する傾向が認められた。このことから、指骨・趾骨といった骨梁構造の豊富な硬組織では、その表面付近に保存されている DNA が多いことにより DNA 回収量が多いと推察された。

しかしながら、Figure 4 の点線で囲まれた A 及び B でみられるように、一部の指骨・趾骨において、STR 型検出率と DNA 回収量が相関していないものが認められ、HP Kit を用いた DNA 定量についてはさらなる検体についての検討が必要である。

本研究の目的は硬組織においてどの部位の DNA 保存状態が良好で且つ DNA 回収量が多いかについて実証することである。DNA の回収量・STR 型検出率についていずれも指骨・趾骨は他の硬組織と比較し良好な結果が得られた。その結果、本研究により指骨や趾骨は STR 型検出率の安定性があり、かつ DNA 回収量も高い傾向が認められることから、硬組織の選定において最も適した組織の一つになり得ることが明らかとなった。

<参考文献>

小田切智海、佐藤紀子、塩崎哲也、原山雄太、林徳多郎、小林寛也、浅村英樹、硬組織から DNA 抽出を試みる際の最適部位の検討. DNA 多型、2022、30 : 65-68

Table 1

	腓骨	手根骨	膝蓋骨	基節骨 (趾骨)	中足骨	基節骨 (指骨)	中手骨	足根骨	大腿骨 (骨端)	歯牙	橈骨	大腿骨 (骨幹)	寛骨	後頭骨	錐体	頭蓋冠
Average	100.0	99.5	99.1	93.5	93.2	91.7	91.0	86.4	76.8	74.3	64.5	55.6	53.7	38.0	30.0	14.4
N	1	3	3	3	2	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Min	100.0	98.5	97.2	80.6	86.4	75.0	68.2	60.6	31.8	69.4	4.5	18.2	1.5	3.0	13.6	0.0
Max	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	81.3	100.0	100.0	100.0	58.3	56.9	22.2

Figure 1

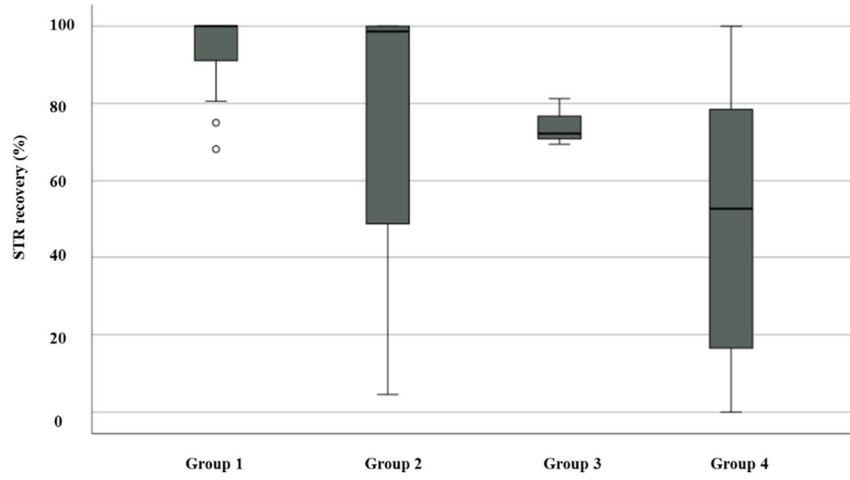


Figure 2

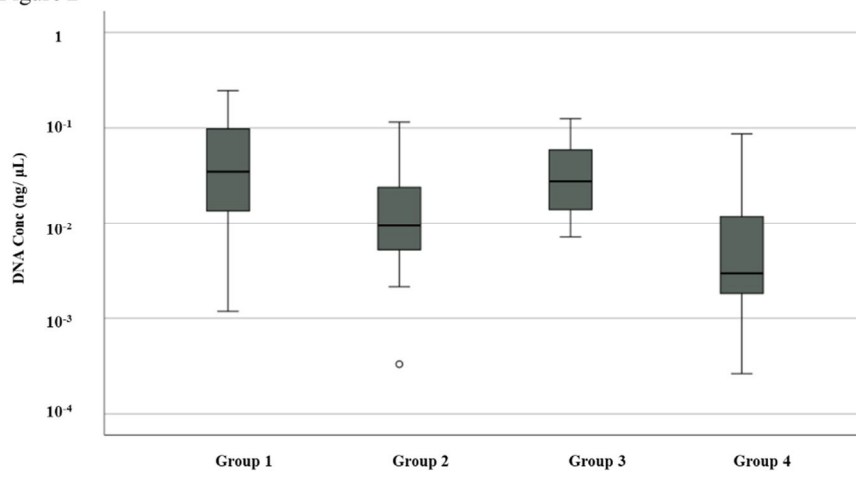
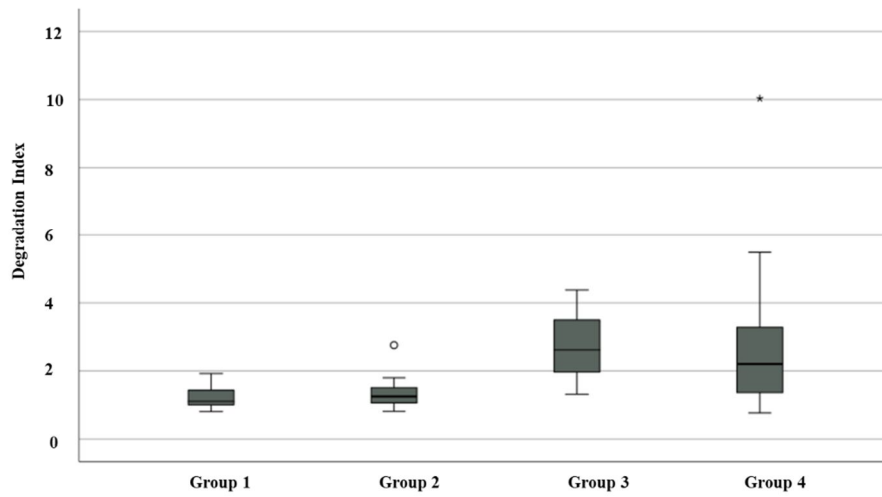


Figure 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小田切智海、佐藤紀子、塩崎哲也、原山雄太、林徳多郎、小林寛也、浅村英樹	4. 巻 30
2. 論文標題 硬組織からDNA抽出を試みる際の最適部位の検討	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 65-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 小田切智海、佐藤紀子、塩崎哲也、原山雄太、林徳多郎、小林寛也、浅村英樹
2. 発表標題 硬組織からのDNA抽出のための最適部位 指の骨を中心とした検討
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原山雄太、佐藤紀子、小田切智海、塩崎哲也、小林寛也、林徳多郎、浅村英樹
2. 発表標題 脱灰・プロティナーゼK同時処理による硬組織DNA抽出の検討
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	佐藤 紀子 (Sato Noriko) (00649254)	信州大学・医学部・助手(特定雇用) (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	塩崎 哲也 (Shiozaki Tetsuya) (00722018)	信州大学・医学部・助教（特定雇用） (13601)	
研究分担者	小林 寛也 (Kobayashi Kanya) (00826886)	信州大学・学術研究院医学系・助教 (13601)	

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
---------	---------