

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861843

研究課題名(和文) 高度変性歯牙からのDNA抽出法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the DNA extraction method from highly denaturing teeth

研究代表者

中村 安孝 (Nakamura, Yasutaka)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40598851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯牙よりDNAを得る過程には、洗浄・粉碎、脱灰、細胞融解、タンパク除去、抽出・精製の複数の重要なステップがある。本実験では、状態の悪い試料から効率的にDNAを抽出する方法の確立をめざした抽出法を公開し、このプロトコルを用いて、脱灰操作により、最終DNA抽出量及び質にどれ程影響が有るのかを判定した。結果、24h法で最も多くのDNAが回収され、長く作用させるほど回収量は低下し、72時間で15%程悪化する事が分かった。ただし、DNAの質に置いては、長時間作用させた結果、純度にして50%から53%程改善する事が確認された。更に市販キットとの違いからタンパク除去操作においても、より良い方法が提示された。

研究成果の概要(英文)：In a process to get DNA from than teeth, there are washing, a crush, decalcification, cell fusion, the protein removal, the plural important steps including extraction and purification. I make a better DNA sampling method in this study, judged it how long there was a change in quantity of final DNA extraction and quality by difference in decalcification operation. I examined how much the action time for decalcification operation influenced final DNA. I tested it under three conditions, Decalcification time of 24 hours test, Decalcification time of 48 hours test, and Decalcification time of 72 hours test. The 24 hour test was the best. and The 72 hours test was the worst. The quantity of final DNA decreased with time. The 24h test got the result that 15% had better than the 72h test. However, about the quality of final DNA, The 24h test got the result that 3% turned worse than the 72h test. And the shown original sampling method was a good method not to be inferior to a commercial kit.

研究分野：法歯学 歯科法医学

キーワード：DNA鑑定 DNA抽出

## 1. 研究開始当初の背景

DNA 抽出は、Maniatis らが 1982 年に発表した著書 Molecular Cloning に記し、1986 年には QIAGEN(オランダ)がプラスミド精製キットを販売したほか、H. C. Birnboim と J. Doly らが 1981 年に Nucleic Acids Research で発表したアルカリ抽出法や、Walsh らが 1991 年に発表した Chelex-100 methods 等、80 年代後半から 90 年代初頭に形作られた技法で、日本では平成 4 年度(1992 年)より警察庁が DNA を個人識別に用い始めている。

個人識別のための DNA 鑑定の研究では、鑑定精度向上のための鑑定キットの評価や、その識別能力の向上、DNA 上にある STR 多型の解析、民族別、地域別の DNA 多型データの取得等に重点が置かれているが、これら DNA 鑑定及びその研究は、結果の確実性を重視する事が大前提となるために、通常、状態の良い Fresh な DNA 試料を用いて行われる。

現在 DNA 抽出法は、各研究機関、企業で Molecular Cloning 等を元にした独自のプロトコルを作成し、操作を行っていると考えられるが、状態の良い試料からの DNA 抽出技法はほぼ確立されている為に、学術論文中の DNA 抽出法に関する記載では、使用した市販キット名を記したり、アルコール沈殿法を行った、とだけ記載される場合も少なくないのが現状となっている。これは、先述のように、状態の良い試料から得た安定した DNA を用いて行う事が、DNA 鑑定における大前提となっているからに他ならない。また、各種企業は抽出キットに含まれている溶液の組成や濃度など、種々の情報は公表しておらず、DNA 抽出操作をより効果的に行って良質な DNA を取得する視点から鑑定の精度を向上させる研究はあまり行われていない。特に、DNA 抽出が困難な高度に劣化した資料から、実際の鑑定に使用可能な DNA を抽出する為の研究は停滞している。

DNA 鑑定は、親子鑑定や、刑事事件捜査用途での使用だけでなく、厚生労働省が行っている戦没者遺骨返還事業等でも使用されている。現在まで、北方地域のシベリア抑留者遺骨に対する個人識別では一定の成果をあげてきた。その結果、沖縄や硫黄島、南太平洋、東南アジアなど、南方地域での戦没者遺骨に対しての事業拡大を求める声が大きくなっている。しかし、北方地域の遺骨は、死後 70 年が経過したもので、それなりに安定した DNA を得ることが可能な状態であったが、南方地域は気温、湿度やその土壌により、骨や歯牙の状態は著しく悪く、北方の成果は見込めないものとされており、これらに対応するならば、状態の良い、安定した試料より DNA を抽出し、増幅し、鑑定対象とする現在の正しい DNA 鑑定の用法からやや外れた、状態の悪い試料から DNA を抽出する手法、不安定な DNA を増幅する手法、それらを判定する為の技法等を半ば無理やりに確立させる必要が

あり、問題は山積している。

## 2. 研究の目的

歯科的個人識別において、歯牙より DNA を抽出して行う DNA 鑑定の重要性は日々増してきている。本研究では、厚生労働省からの依頼で当講座が携わってきた戦没者遺骨の DNA 鑑定を背景とし、今後実施されると見込まれる沖縄戦や硫黄島での戦没者の DNA 鑑定を脱んで、南方地域の劣化試料を対象とした DNA 抽出法を確立する事を目的として、DNA 抽出操作における脱灰操作における改善を第一の目的としている。

これは、歯牙より DNA を得る過程には、洗浄・粉碎、12h 以上の脱灰、3h 以上の細胞融解、タンパク除去、抽出・精製など、複数の重要なステップがあるが、最も長い作用時間をかける処理となる脱灰操作において、その作用時間や試薬の違いが、獲得できる DNA の量や質に大きく影響すると思われるからである。

## 3. 研究の方法

10 年以上湿潤な薬瓶内に保存されていた状態の良好でない歯牙を試料とした。歯牙の大きさや状態により、抽出操作結果は個体差が大きい為、同一の試料を技工用エンジンとダイヤモンドディスクにより 4 分割し、その 4 つに対してそれぞれ異なる環境で抽出操作を行う事とした。

すなわち、分割された 1 つは市販の DNA キットであるキット A を使用して、そのプロトコルに従い抽出操作を行うのに対し、残る 3 つはそれぞれ 24 時間、48 時間、72 時間での脱灰操作を行った。脱灰以外の操作は同一の手法を用いて DNA を回収した。これら抽出操作は、当講座による独自のプロトコルにより行われた。

評価方法として、得られた DNA 溶液から  $6\mu\text{l}$  を使用して、分光光度計 Gene Quant (Pharmacia) により、吸光度により単純に求められた二本鎖 DNA の濃度である「OD 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )」、質の指標となる「ratio」及び「purity (%)」、DNA 濃度結果に影響する総タンパク質混入濃度である「Protein(mg/ml)」の 4 項目を測定して比較検討を行った。

## 4. 研究成果

本研究により確立させた抽出法の詳細を先に記す。

歯牙を洗浄した後、破碎・分割を行って新鮮面を露出させ、脱灰作業を行うが、この脱灰試薬の組成を(表 1)に示す。

表1 脱灰溶液組成

脱灰溶液	
0.5M EDTA2Na	186 g
0.1M Tris	12.12 g
0.9% Nacl	9 g
4M 尿素	200 g

EDTA や Tris は核酸抽出において、一般的な脱灰溶液の構成成分であるが、DNA を安定させる目的で尿素が加えられ、これらに KOH を 29~30 g 加えて Ph を 8 に整え、Autoclave 後に DDW を加えて最終的に Total 1 ℓ とする。この脱灰溶液に歯牙片を浸し、ゆっくりと回転混和させつつ、12 時間以上作用させる。(今回は、この過程において、24 時間、48 時間、72 時間の 3 種類を実施した。)

表2 細胞溶解液

細胞溶解液	
TE Buffer	500 μℓ
proteinase K	60 μℓ
10% SDS	56 μℓ

次に細胞溶解液(表 2)に歯牙片全体を浸し、12 時間、55 ℃ のウォーターバス中で作用させ、核膜や細胞膜等を破壊し、細胞から DNA を取り出す。

DNA 溶液に対し、等量の 1:1 フェノール・クロロホルム溶液を加えて 30 分間混和し、タンパク質を変性させ、12000rpm、10 分間で沈殿分離により、ヒストン等を取り除く脱タンパク操作を、計 2 回行う。更に、脱フェノールを目的として、脱タンパク操作後の DNA 溶液に等量のクロロホルム溶液を加えて 15 分間混和し、12000rpm、10 分間の遠心分離を行う事で DNA を抽出した。

その後、PureLink ゲノム DNA 精製キット (invitrogen) を使用する事により DNA を精製・回収した。

各方法で 25 サンプル、合計 100 回の抽出操作を行い、キット A の標準プロトコルに従った抽出結果と、オリジナル抽出法(24 時間法)での結果との各評価項目の平均値を表 3 に示す。

表3 キット A と抽出法での結果比較

	OD	ratio	purity	protein
キット A	24.295	0.8764	24.638	0.48
抽出法	12.765	0.9523	50.145	0.225

既に記載されているオリジナル抽出法は、脱灰液に尿素を加える等の、当講座独自の相

違がなされている。尚、キット A 付属の試薬の組成は公開されていない。両者を比べると、DNA の質の指標となる ratio、purity の 2 項目において、市販キットより質の良い DNA が得られた結果となった。DNA 回収量の指標となる OD 値では、キット A が独自抽出法の 2 倍の値を示しているが、タンパク質混入量も 2 倍であり、purity でも 1/2 となっている事を考慮し、タンパク質を核酸と誤認してしまっている割合を補正した OD(表 3-2)を示す。

表3 - 2 補正 OD 値での比較

	補正 OD
キット A	8.228
抽出法	9.519

回収量はキット A 8.228、オリジナル抽出法 9.519 となり、量においては遜色なく、質においては今回確立させた抽出法が勝っている結果となっている。

両者の間で最も違いのある protein 含有量であるが、タンパク除去操作において、キット A のプロトコルは非常に簡便であり、フェノールを用いた 1 分間程度の脱タンパク操作を標準としている。一般的にもあまり長時間を要しない過程であり、また長時間の作用は DNA を損傷する可能性があると考えられるが、オリジナル抽出法では、フェノール・クロロホルム溶液(フェノール溶液はキット A で用いた物と同じ)で 30 分間 ゆっくり回転混和し、遠心分離で変性させたタンパク質を取り除く操作を 2 回行った後、クロロホルム溶液 10 分間の作用時間で脱フェノールを行っている。その結果、キット抽出よりオリジナル抽出法でより高精度にタンパク除去がなされるだけでなく、DNA 回収量を損なわず、ratio、purity の 2 数値が向上している事から、合計 1 時間強の操作時間でも、DNA を損傷することなくタンパク質の除去が行われている事が読み取れた。

次に、3 つの脱灰法別での検査項目の平均値を表 4 に示す。

表4 脱灰 3 法での結果比較

	OD	ratio	purity	protein
24h 法	12.765	0.95235	50.145	0.225
48h 法	12.4	0.9447	51.7	0.235
72h 法	11.09	0.97325	53.75	0.205

DNA 回収量は、24 時間法が最も多く、時間を経る程に減少していく結果となった。特に 72 時間を経過すると、DNA 回収量が大きく低下する結果となっている。歯牙の石灰化状態等により、最適な脱灰時間は変化すると考え

られるが、個々の資料の結果を見ても 24 時間法で最も多量の DNA が得られたのは総検体数の 50%であり、48 時間法で 25%、72 時間法で 25%であった事から、脱灰作用の適正時間は 24 時間程度である事が強く示唆された。

回収 DNA の質においては、ratio で最も高値なのは 72 時間法、次いで 24 時間法、48 時間法となり、継時的な直線での変化は得られなかったが、ratio の比の期待値と実測値から求められた purity では、24 時間から 72 時間まで直線的に増加しており、回収量とは逆の結果が得られている。24 時間法は 72 時間法に対し、2 倍の適応力が有り、DNA 回収量で 15%程度向上し、3%程度質が低下するものであった。Protein 含有量は 0.235~0.205 mg/ml 間で近似しており、その差異はピペティング操作の精度などに由来すると考える。

実験の結果、脱灰操作時間の第一選択は 24 時間である事が好ましく、また、今回示した DNA 抽出法は、企業性の法医学キットに劣らない回収能力を持ち、徐タンパク操作や脱灰操作における一定の改善が見込まれ、更なる抽出効率の改善につながるものであった。今後は更にサンプル数を増やし、Quantus™ Fluorometer (Promega) を用いた dsDNA 定量を行うなどして、評価方法の追加を予定している。

## 5 . 主な発表論文等

今後、研究成果の論文発表を予定している。

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

中村 安孝 (NAKAMURA, Yasutaka)

東京歯科大学・法歯学法人類学講座・助教

研究者番号：40598851