—技術報告—

Y-STR タイピングキット PowerPlex Y System の法科学試料への応用

森川俊雄, 中木真一, 中山英樹, 森好浩行, 日野大樹, 三好美紀, 糸原幸次

広島県警察本部刑事部科学捜査研究所
〒730-0825 広島市中区光南二丁目26-3

Application of the Y-STR Typing Kit PowerPlex Y System to Forensic Samples

Toshio Morikawa, Shin-ichi Nakaki, Hideki Nakayama, Hiroyuki Moriyoshi, Daiki Hino,
Miki Miyoshi and Koji Itoharu*Forensic Science Laboratory, Hiroshima Prefectural Police H.Q.
2-26-3 Kohnan, Naka-ku, Hiroshima 730-0825, Japan**(Received 13 December 2004; accepted 16 February 2005)*

Y chromosome-specific short tandem repeat (Y-STR) analysis has become a widely accepted tool for forensic DNA analysis. The PowerPlex Y System is a fluorescent multiplex PCR kit that enables simultaneous amplification of 12 Y-STR loci (DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438 and DYS439). In this study, we evaluated the application of this kit to forensic evidential samples.

The complete profiles were successfully determined using the recommended condition of 30 PCR cycles in the modified 12.5 μ L reaction volumes. Using this protocol, it was possible to type all Y-STR loci from 62.5 pg of male DNA. The male/male DNA mixtures produced full profiles from the minor component up to the 1:2.5 ratio, which contained 0.2 ng of minor male DNA and 0.5 ng of major male DNA. The minor male component in a male/female DNA mixture was detected in all loci up to the 1:3200 ratio, which contained 125 pg of male DNA and 400 ng of female DNA. Experimentally decomposed DNA samples produced full Y-STR profiles using 10 ng or 2 ng template DNA and 32 cycles of PCR amplification.

The 12 Y-STR systems were investigated in 92 unrelated Japanese males (Hiroshima Prefecture). Gene diversity and haplotype diversity values were calculated from the allelic frequency for each locus. The DYS385 locus was proved to be highly polymorphic (0.9451), and the other loci showed gene diversity values ranging from 0.1229 to 0.7863. A total of 88 haplotypes was observed and the haplotype diversity was calculated to be 0.9990.

These results suggested that the PowerPlex Y System was possible to discriminate most of the male individuals in the Japanese population and can be used in forensic investigation, such as analysis of male/male or male/female DNA mixture and decomposed DNA samples.

Key words: Y-chromosome, Short tandem repeat (STR), DNA typing, Allele frequency, PowerPlex Y System

緒 言

反復配列が2～5塩基からなるSTR多型は、DNA型鑑定における有用な遺伝マーカーとして用いられている。Y染色体上のSTR多型(Y-STR)は男性のDNAのみから多型が検出されるため、性犯罪事例などの法科学試料に対して有効なSTR多型であり、アレルは父系遺伝を示すことから、疑問の父やその近親者が死亡している場合の父子鑑定には特に有用性が高いことも指摘されている¹⁾。

1992年に Roewer et al.²⁾により Y染色体短腕上に存在する Y-STR である DYS19 (当時の名称は Y-27H39) が報告され、本邦においても山本ら³⁾により日本人における多型性の高さが明らかにされた。その後、新たな Y-STR が次々と報告され^{4,5)}、個人識別能力が高い数種類の Y-STR を1回のPCR増幅で検出できるタイピングキットが市販されるようになった^{6,7)}。これらのキットは、簡便な操作で複数の Y-STR の増幅が可能であり、鑑定実務における有用性が指摘されている⁸⁾。

Promega 社製の PowerPlex Y System は、3色の蛍光色素で標識された DYS391, DYS389I, DYS439, DYS389II (FL 標識), DYS438, DYS437, DYS19, DYS392 (JOE 標識), DYS393, DYS390, DYS385a/b (TMR 標識) の12ローカスを含んでいる⁹⁾。このタイピングキットは、これらのローカスを1回のPCR反応で増幅し、増幅産物を自動シーケンサーで検出し専用のマクロ (PowerTyper Y Macro) により型判定するものである。これらのローカスには、日本人において高度な多型性を示すものが含まれており、キットとしての個人識別能力は高いものと考えられる。しかし、実務で扱う試料は微量で、混合していたり陳旧化している場合が多い。市販のキットを法科学試料に応用するためには、これらの点について実験的に検討する必要がある。そこで、今回、本キットの検出限界、男性のDNAと男性のDNAおよび男性のDNAと女性のDNAを混合した混合試料、実験的に低分子化させたDNAからの型検出についての検討を行った。また、広島県在住の

血縁関係のない男性のサンプルにおける各ローカスの出現頻度とハプロタイプについても調査したので報告する。

なお、本研究は、鑑識科学技術学会倫理審査委員会の審査と承認を得て実施された。

材料および方法

1 実験材料

実験内容について説明し、同意を得られた広島県在住の血縁関係のない日本人成人男性92名および日本人成人女性4名から、口腔内細胞(男性87名)あるいは血液(男性5名、女性4名)を得た。DNAの抽出は、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) により行い、DNAの溶出には滅菌水を使用した。DNAの定量は、紫外分光光度計 DU 650 (BECKMAN) により吸光度測定法で行った。検出限界についての検討においては、キットに添付の9948 Male DNAを定量し、調整して使用した。混合試料の検討においては、血液から抽出したDNAを定量し、希釈して混合した。低分子化DNAの試料とするために、1M Tris・HCl (pH7.0) 5 μ l, 100 mM MgCl₂ 10 μ l, 滅菌水79 μ l に、0.7 U/ μ l に調整した DNaseI (Takara) 1 μ l と、血液から抽出し100 ng/ μ l に調整したDNAを5 μ l 加えて、37°Cのインキュベータに10分間放置しDNAを低分子化した。その後、80°C温浴中にてDNaseIを失活させ、エタノール沈殿を行ってDNAを回収した。この試料については、滅菌水にて希釈し、5%ポリアクリルアミドゲルにより未処理のDNAおよびREADY-LOAD 100bp DNA Ladder (Invitrogen) と同時に泳動し、高分子DNAのバンドがなく広範囲にスメア状のバンドが認められることを確認して鋳型DNAとして用いた。

2 PCR 増幅

今回検討した PowerPlex Y System に含まれる Y-STR のローカスの名称、ラダーマーカーに含まれるアレルの大きさとアレルの名称、蛍光色素の種類および反復構造を Table 1 に示す。PCR 反応液量

Table 1 General information on STR loci in PowerPlex Y System.

Locus	Size range (bp)	Allele ladder alleles	Dye label	Repeat motif
DYS19	232-268	10-19	JOE	TAGA Complex ^{a)}
DYS389I	148-168	10-15	FL	[TCTG][TCTA] Complex ^{a)}
DYS389II	256-296	24-34	FL	[TCTG][TCTA] Complex ^{a)}
DYS390	191-227	18-27	TMR	[TCTG][TCTA] Complex ^{a)}
DYS391	90-118	6,8-13	FL	TCTA ^{a)}
DYS392	294-327	7-18	JOE	TAT ^{a)}
DYS393	104-136	8-16	TMR	AGAT ^{a)}
DYS385 a/b	243-315	7-25	TMR	GAAA ^{a)}
DYS438	101-121	8-12	JOE	TTTTTC ^{b)}
DYS439	203-231	8-15	FL	GATA ^{b)}
DYS437	183-199	13-17	JOE	[TCTA][TCTG] Complex ^{b)}

^{a)} Kyser, M. et al., *Int J Legal Med*, **110**, 125-133, 1997

^{b)} Ayub, Q. et al., *Nucleic Acids Res*, **28**, e8, 2000

は、マニュアル⁹⁾に示されている量の半量 (12.5 μ l) とし、マスターミックスに加える滅菌水の量を調整し、最終的に鋳型 DNA として加える液量を 5 μ l とした。PCR 増幅は、前加熱、最終伸長および温度上昇、下降の Ramp Rate をマニュアル⁹⁾通りの設定とし、GeneAmp PCR System 9700型 PCR 装置 (アプライドバイオシステムズ) により行った。PCR のサイクル数は、94°C・30秒、60°C・30秒、70°C・45秒のサイクルを10回繰り返す、それに続いて、90°C・30秒、58°C・30秒、70°C・45秒のサイクルを20回繰り返す、計30回とした。

3 電気泳動および型判定

PCR 産物の検出は、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) で行った。1 μ l の PCR 産物をキットに添付された ILS600 サイズスタンダードマーカー0.5 μ l とともに24.5 μ l の Hi-Di Formamide (アプライドバイオシステムズ) に加え、95°Cで3分間の加熱変性を行った。アレリックラダーはキットに添付のものを0.5 μ l 使用した。泳動ポリマーは、POP4 (アプライドバイオシステムズ) を使用し、PCR 産物の導入は15 kV で5秒、泳動は15 kV で26分間行った。増幅産物の塩基数の決定は GeneScan 3.1ソフトウェアにより、ILS600 サイズスタンダードマーカーの移動度と比較する方法で行った。DNA 型検出のための最小検

出限界値は 200RFU とした。各ローカスの型判定は、アレリックラダーマーカーにより、Genotyper 2.5ソフトウェア上の PowerTyper Y Macro (Promega) により行った。gene diversity と haplotype diversity は、 $n(1 - \sum x_i^2) / (n-1)$ (n はサンプル数、 x_i は i 番目のアレルあるいはハプロタイプの出現頻度)¹⁰⁾により計算を行った。ローカスの頻度分布の統計的比較は、DYS385については χ^2 検定¹¹⁾を行い、他のローカスについてはフィッシャーの直接法 (Fisher's exact test)¹¹⁾により行った。

結 果

1 検出限界についての検討

キットに添付された男性の DNA (9948 Male DNA, 10 ng/ μ l) を、2 ng, 1 ng, 0.5 ng, 0.25 ng, 0.125 ng, 0.0625 ng に調整して PCR 増幅を行い泳動したところ、鋳型 DNA 量 2 ng では、ほぼ全てのローカスでオフスケールとなった。鋳型 DNA 量 1 ng では、いくつかのローカスでオフスケールが認められた。Fig. 1 に、鋳型 DNA 量を、0.5 ng, 0.25 ng, 0.125 ng, 0.0625 ng とした場合のエレクトロフェログラムを示す。鋳型 DNA 量として0.5 ng を用いた場合の RFU の最大値は約5000となった。これよりも多い鋳型 DNA を加えると JOE で標識されたローカスにおいてベースラインの上昇が顕著

Fig. 1 Variation of template sensitivity. Each electropherogram indicates profile of the amplified male sample from 0.5 ng, 0.25 ng, 0.125 ng and 0.0625 ng of the template DNA (9948 male DNA) using the PowerPlex Y System. The horizontal dot line in panel B shows 2000 RFU and the horizontal solid line in panel D shows amplitude threshold of this study (200 RFU).

であったことから、この量が最大検出限界であると判断された。また、鋳型 DNA 量を 0.25 ng としたところ、RFU 値がマニュアルでの推奨値である 2000 以下となり、全てのアレルが DNA 型検出のための最小検出限界値 (200RFU) 以上となる最少鋳型 DNA 量は 0.0625 ng であった。これらについて型判定を行ったところ、いずれのローカスもマニュアル⁹⁾に記載されている型どおりに判定された。一方、キットに添付された女性の DNA (9947A DNA, 10 ng/μl) を、2 ng, 1 ng, 0.5 ng, 0.25 ng, 0.125 ng, 0.0625 ng に調整して PCR 増幅を行ったところ、特異的な増幅は認められなかった。

2 異なる比率で混合した DNA からの型検出 (男性と男性)

男性の血液サンプル 5 例から抽出した DNA それぞれについて型判定を行い、各ローカスのアレルがなるべく重ならないようなサンプルを 2 つ選び、この 1 つの組合せについて検討を行った。混合比率を 0.1 ng : 0.1 ng (1 : 1) として PCR 増幅を行い型判

定を行ったところ、FL で標識された全ローカスで混合した型が検出された。しかし、JOE で標識された DYS19, TMR で標識された DYS390, DYS389 において RFU 値が 200 に達しないアレルが認められたため、それらのアレルについては型判定ができなかった。そこで、鋳型 DNA 量を 0.2 ng として、1 : 1 (0.2 ng : 0.2 ng) の等量を混合したところ、全ローカスでの型判定が可能となったことから、多い側の鋳型 DNA 量を検出限界値の 0.5 ng とした 1 : 2.5 (0.2 ng : 0.5 ng), 2.5 : 1 (0.5 ng : 0.2 ng) の比率で混合したものについて検討を行った。そのエレクトロフェログラムを Fig. 2 の左側に示す。

単独試料ではピークの数 12 本であるが、今回混合した DNA は Male-1 と Male-2 でアレルが重ならないローカス (DYS389I, DYS439, DYS389II, DYS392, DYS393, DYS390, DYS385) があるので、混合試料では RFU 値が 200 以上のピークが 21 本確認できた。Fig. 2 の右側に、これらのデータのうちの、アレルが互いにスターの位置関係にない

Fig. 2 Male/male DNA mixture analysis using the PowerPlex Y System. Panel A and E indicate the amplifications of 0.2 ng male DNA (A: Male-1, E: Male-2). Panel B, C and D shows amplifications of mixed samples, 2.5 : 1 (0.5 ng : 0.2 ng), 1 : 1 (0.2 ng : 0.2 ng) and 1 : 2.5 (0.2 ng : 0.5 ng). Left side panels show the electropherograms of each mixture ratio. Right side panels indicate the results of typing using PowerTyper Y Macro.

DYS389II (27型と31型), アレルの重なる DYS19 (17型), 短い側のアレルが長い側のアレルのスターの位置にある DYS385 (13-17型と14-18型) の型判定結果を示す. 今回の混合比率においては, アレルの関係がどの場合でも正しく型判定ができた. また, 1 : 1 の等量を混合した場合のピークの高さはほぼ等しく, 混合比率が 1 : 2.5 あるいは 2.5 : 1 の場合は, 混合比率の多い方のピークの高さが明らかに高い. このピークの高低差を見ることで, 多く混合している側, あるいは少なく混合している側の型の推定も可能であった. なお, 本例における他のローカスについても型判定を行った結果, いずれも混合した型に判定された.

3 異なる比率で混合した DNA からの型検出 (男性と女性)

女性の血液サンプルから任意に 1 例を選んで DNA を抽出し, 男性の血液サンプル 5 例から抽出

した DNA のうちの 1 例を混合して検討を行った. 男性の DNA を 0.5 ng とし, 女性の DNA を 50 ng から 400 ng まで変化させて PCR 増幅したところ, 全てのローカスの型判定が可能であった. そこで, 女性の DNA の量を 400 ng とし, 男性の DNA を 0.5 ng (1 : 800), 0.25 ng (1 : 1600), 0.125 ng (1 : 3200), 0.0625 ng (1 : 6400) と変化させて PCR 増幅した. 男性の DNA については 0.0625 ng を用いて増幅し, 全ローカスのアレルのピークが 200 RFU を超えることを確認して用いた. また, 男性の DNA を加えず, 女性の DNA のみを 400 ng 使って同様に PCR 増幅を行った. それらのエレクトロフェログラムを Fig. 3 に示す. 女性の DNA のみを 400 ng 用いても, 特異的な増幅は認められなかった. また, 男性の DNA の量の減少に伴い, 全体的にピークの高さが低くなるが, 男性対女性の混合比率が 1 : 3200 まで, すべてのピークの RFU 値が 200

Fig. 3 Male/female DNA mixture analysis. Each electropherogram shows the amplification of female DNA and male/female DNA mixture samples using the PowerPlex Y System. Profile of female sample from 400 ng of female DNA (A), male 0.5 ng: female 400 ng (B), male 0.25 ng: female 400 ng (C), male 0.125 ng: female 400 ng (D) and male 0.0625 ng: female 400 ng (E). The horizontal line in panel E shows amplitude threshold of this study (200 RFU) and arrows indicate the alleles under the threshold.

を超え、混合した男性の DNA の型判定が可能であった。また、0.0625 ng (1 : 6400) においても、JOE で標識された DYS392, TMR で標識された DYS390, DYS385 においては RFU 値が 200 に達していないため、これらのローカスの型判定はできなかったが、男性 DNA の混在は確認可能であった。

4 低分子化 DNA からの型検出

低分子化した DNA が型判定に与える影響について、男性の血液サンプル 5 例から抽出した DNA のうちの 1 例を用いて検討を行った。Fig. 4 に、対照としての未処理の DNA 0.2 ng, 低分子化した DNA 0.2 ng, 10 ng および、DNA 2 ng をサイクル数 32 回で PCR 増幅したもののエレクトロフェログラムを示す。低分子化した DNA 0.2 ng を鋳型とした場合では、RFU 値が 200 を超えるピークは認められな

った。鋳型 DNA 量を 10 ng とすると、PCR 増幅領域が短いローカス (DYS391 と DYS438) のピークが対照と比較して約 3 倍の高さとなったが、その他のローカスにおいては未処理の DNA 0.2 ng を鋳型として用いた場合とほぼ同等のピーク高となり、対照と同じ型に判定された。また、サイクル数 32 回で PCR 増幅を行うと、低分子化した DNA 2 ng を鋳型として用いることで、10 ng を用いた場合とほぼ同等のピーク高となった。この場合においても全てのローカスが対照と同じ型に判定された。

5 各ローカスの出現頻度とハプロタイプ

PowerPlex Y System を用いて検出される各ローカスのアレルについて、92 名の日本人男性における出現頻度を整理したものが Table 2 である。今回の試料で、検出されたアレル数の最も少ないローカス

Fig. 4 Decomposed DNA sample analysis. The electropherograms show the amplification of non-treated male DNA and experimentally decomposed male DNA samples using the PowerPlex Y System. Profile of the non-treated DNA sample from 0.2 ng (A), decomposed male DNA samples from 0.2 ng (B) and 10 ng (C). Panel D indicates the amplification using 2 ng decomposed male with 32 cycles of PCR amplification.

は DYS391 と DYS437 であった。最も多いローカスは DYS385 で14種類のアレルからなる35種類のハプロタイプが検出され、最も頻度が高いものが13-17型 (0.141)、次いで10-20型 (0.120) であった。このローカスの haplotype diversity は0.9451 であった。各試料毎に1つのアレルが検出される他のローカスの gene diversity を計算したところ、DYS390 が0.7863 と最も高い多型性を示し、次いで DYS389II (0.7398) であった。全ローカスの haplotype diversity と gene diversity を、日本人に関する最近の研究¹²⁻¹⁴⁾と比較したところ、これらの研究とはほぼ一致した。また、ローカスの頻度分布についてこれらの研究と統計的な比較を行ったところ、DYS390 についてはいずれの報告とも有意差が認められた ($p < 0.05$)。さらに、Uchii et al.¹²⁾の沖縄のデータとは、DYS19, DYS391, DYS392, DYS393, DYS438 においても有意差が認められた ($p < 0.05$)。

一方、他のローカスについてはいずれの報告とも有意差は認められなかった。

次に、これら12種類のローカスによるハプロタイプを Table 3 に示す。92名のサンプルから88種類のハプロタイプが検出され、haplotype diversity は0.9990 であった。そのうち、複数検出されたハプロタイプは4種類 (H16, H36, H44, H46) であり、それぞれ2例ずつ観察された。DYS437を除く11ローカスのハプロタイプについて、Y Chromosome Haplotype Reference Database (<http://www.yhrd.org>) により検索を行ったところ、複数例検出された H36 については日本人、H44については日本人および中国人において同様のハプロタイプの報告が認められた。また、検出例数が1例のハプロタイプ (84種類) の中で日本人において報告例があるのは10種類 (H14, H33, H35, H39, H40, H42, H43, H54, H70, H86) であり、1例 (H62) が中国人において

Table 2 Distribution of allele frequency, gene diversity and haplotype diversity values of the 12 Y-STR loci in 92 unrelated Japanese males.

Locus	Allele	Frequency	Gene diversity	Locus	Haplotype	Frequency	Haplotype diversity
DYS19	13	0.054	0.6501	DYS385	10-16	0.011	0.9451
	14	0.076			10-18	0.076	
	15	0.543			10-19	0.109	
	16	0.152			10-20	0.120	
	17	0.174			10-21	0.033	
DYS389 I	11	0.022	0.6581		11-14	0.011	
	12	0.152			11-16	0.011	
	13	0.326			11-17	0.011	
	14	0.467			11-18	0.011	
	15	0.033			11-19	0.022	
DYS389 II	27	0.033	0.7398	11-20	0.022		
	28	0.130		12-12	0.011		
	29	0.261		12-13	0.011		
	30	0.402		12-14	0.011		
	31	0.141		12-16	0.011		
	32	0.022		12-17	0.043		
	33	0.011		12-18	0.043		
DYS390	22	0.326	0.7863	12-19	0.011		
	23	0.217		13-13	0.011		
	24	0.163		13-15	0.022		
	25	0.185		13-16	0.033		
	26	0.087		13-17	0.141		
	27	0.022		13-18	0.011		
DYS391	10	0.935	0.1229	13-19	0.033		
	11	0.065		13-20	0.011		
DYS392	11	0.326	0.6524	13-24	0.011		
	12	0.130		13-25	0.011		
	13	0.478		14-16	0.022		
	14	0.054		14-17	0.011		
	15	0.011		14-18	0.011		
DYS393	11	0.033	0.5479	14-19	0.033		
	12	0.228		14-20	0.022		
	13	0.630		15-17	0.022		
	14	0.087		15-20	0.011		
	15	0.022		16-17	0.011		
DYS438	9	0.011	0.5986				
	10	0.533					
	11	0.098					
	12	0.022					
	13	0.337					
DYS439	11	0.228	0.6040				
	12	0.565					
	13	0.174					
	14	0.033					
DYS437	14	0.804	0.3186				
	15	0.196					

Table 3 Haplotypes of the 12 Y-STR found loci in 92 unrelated Japanese males.

Haplo- type	DYS 19, 389 I, 389 II, 390, 391, 392, 393, 385, 438, 439, 437	n	Haplo- type	DYS 19, 389 I, 389 II, 390, 391, 392, 393, 385, 438, 439, 437	n
H1	13, 12, 28, 24, 10, 14, 12, 13-17, 11, 12, 15	1	H45	15, 14, 30, 22, 10, 13, 13, 10-20, 13, 13, 14	1
H2	13, 13, 29, 24, 10, 11, 13, 13-15, 10, 12, 14	1	H46	15, 14, 30, 22, 10, 13, 13, 10-21, 13, 11, 14	2
H3	13, 13, 29, 24, 10, 11, 14, 13-16, 10, 13, 14	1	H47	15, 14, 30, 22, 10, 13, 13, 10-21, 13, 12, 14	1
H4	13, 13, 29, 24, 10, 11, 14, 15-17, 10, 14, 14	1	H48	15, 14, 30, 22, 10, 14, 13, 10-19, 13, 12, 14	1
H5	13, 13, 30, 23, 10, 11, 13, 13-16, 10, 12, 14	1	H49	15, 14, 30, 23, 10, 13, 13, 10-19, 13, 12, 14	1
H6	14, 11, 27, 23, 10, 14, 12, 14-19, 11, 12, 15	1	H50	15, 14, 30, 24, 10, 13, 13, 12-18, 10, 11, 14	1
H7	14, 12, 27, 23, 10, 13, 12, 13-19, 11, 13, 15	1	H51	15, 14, 31, 22, 10, 13, 13, 10-19, 13, 12, 14	1
H8	14, 13, 28, 24, 10, 14, 12, 13-20, 11, 13, 15	1	H52	15, 14, 31, 25, 10, 11, 13, 13-17, 10, 12, 14	1
H9	14, 13, 29, 23, 10, 15, 13, 12-13, 10, 11, 15	1	H53	15, 14, 31, 25, 10, 11, 13, 13-17, 10, 14, 14	1
H10	14, 13, 29, 24, 10, 11, 14, 13-15, 10, 14, 14	1	H54	15, 14, 31, 26, 10, 11, 12, 12-17, 11, 12, 14	1
H11	14, 14, 28, 22, 10, 13, 13, 10-18, 13, 12, 14	1	H55	15, 14, 32, 23, 10, 13, 12, 13-17, 11, 12, 14	1
H12	14, 14, 29, 22, 10, 13, 12, 10-19, 13, 11, 14	1	H56	15, 14, 32, 25, 10, 11, 13, 13-17, 10, 12, 14	1
H13	15, 12, 28, 23, 10, 11, 15, 11-16, 10, 11, 14	1	H57	15, 15, 30, 22, 10, 13, 13, 10-20, 13, 12, 14	1
H14	15, 12, 28, 23, 10, 12, 13, 12-12, 10, 12, 15	1	H58	15, 15, 31, 22, 10, 13, 14, 10-20, 13, 12, 14	1
H15	15, 12, 28, 23, 11, 12, 12, 13-13, 10, 13, 15	1	H59	16, 12, 28, 24, 10, 13, 12, 14-20, 10, 12, 14	1
H16	15, 12, 29, 23, 10, 12, 13, 12-18, 10, 13, 15	2	H60	16, 13, 28, 23, 10, 11, 14, 11-18, 10, 11, 14	1
H17	15, 12, 29, 23, 10, 12, 13, 13-17, 10, 12, 15	1	H61	16, 13, 28, 25, 10, 13, 12, 12-19, 10, 11, 15	1
H18	15, 12, 29, 26, 10, 13, 12, 11-20, 10, 12, 14	1	H62	16, 13, 29, 24, 10, 13, 12, 12-18, 10, 12, 14	1
H19	15, 12, 30, 23, 10, 12, 12, 11-19, 10, 11, 15	1	H63	16, 13, 30, 25, 10, 11, 13, 13-18, 10, 12, 14	1
H20	15, 12, 31, 22, 10, 13, 12, 12-17, 10, 12, 15	1	H64	16, 13, 30, 26, 10, 11, 13, 14-17, 10, 12, 14	1
H21	15, 13, 28, 22, 11, 12, 13, 10-20, 13, 11, 14	1	H65	16, 14, 29, 23, 10, 13, 13, 10-18, 13, 12, 14	1
H22	15, 13, 29, 22, 10, 13, 13, 10-19, 13, 12, 14	1	H66	16, 14, 29, 24, 10, 13, 13, 10-16, 13, 13, 14	1
H23	15, 13, 29, 23, 10, 12, 12, 12-16, 10, 12, 15	1	H67	16, 14, 30, 22, 10, 13, 13, 10-20, 13, 12, 14	1
H24	15, 13, 29, 24, 10, 11, 12, 13-17, 10, 12, 14	1	H68	16, 14, 30, 23, 11, 14, 12, 10-20, 12, 12, 14	1
H25	15, 13, 29, 24, 10, 11, 13, 11-14, 10, 11, 14	1	H69	16, 14, 31, 23, 10, 11, 15, 11-17, 10, 11, 14	1
H26	15, 13, 30, 23, 10, 11, 14, 12-17, 11, 12, 14	1	H70	16, 14, 31, 25, 10, 11, 13, 13-17, 10, 12, 14	1
H27	15, 13, 30, 23, 10, 12, 14, 12-17, 11, 13, 14	1	H71	16, 14, 31, 27, 10, 12, 13, 13-17, 10, 12, 14	1
H28	15, 13, 30, 24, 10, 13, 11, 13-24, 10, 13, 14	1	H72	16, 15, 33, 25, 10, 12, 11, 15-20, 10, 12, 15	1
H29	15, 13, 30, 24, 10, 13, 11, 13-25, 10, 12, 15	1	H73	17, 11, 28, 26, 10, 13, 12, 14-19, 10, 12, 14	1
H30	15, 13, 30, 25, 10, 11, 13, 12-14, 11, 12, 14	1	H74	17, 12, 27, 25, 11, 13, 12, 14-18, 10, 11, 14	1
H31	15, 13, 30, 25, 10, 11, 13, 15-17, 10, 11, 14	1	H75	17, 12, 28, 27, 10, 13, 12, 14-20, 10, 11, 14	1
H32	15, 13, 30, 25, 10, 11, 13, 16-17, 10, 12, 14	1	H76	17, 13, 29, 22, 10, 13, 13, 10-18, 13, 12, 14	1
H33	15, 14, 29, 22, 10, 13, 13, 10-18, 13, 12, 14	1	H77	17, 13, 30, 25, 10, 11, 13, 13-17, 10, 11, 14	1
H34	15, 14, 29, 22, 10, 13, 13, 10-19, 12, 13, 14	1	H78	17, 13, 30, 25, 10, 11, 13, 13-17, 10, 12, 14	1
H35	15, 14, 29, 22, 10, 13, 13, 10-19, 13, 12, 14	1	H79	17, 13, 30, 25, 11, 11, 13, 13-16, 10, 11, 14	1
H36	15, 14, 29, 22, 10, 13, 13, 10-20, 13, 12, 14	2	H80	17, 13, 30, 26, 10, 11, 13, 13-19, 10, 12, 14	1
H37	15, 14, 29, 22, 10, 13, 13, 11-19, 13, 13, 14	1	H81	17, 13, 30, 26, 10, 11, 13, 13-19, 9, 11, 14	1
H38	15, 14, 30, 22, 10, 12, 13, 10-18, 13, 11, 14	1	H82	17, 14, 30, 22, 10, 13, 13, 10-20, 13, 13, 14	1
H39	15, 14, 30, 22, 10, 13, 13, 10-18, 13, 12, 14	1	H83	17, 14, 30, 25, 10, 13, 12, 11-20, 10, 12, 15	1
H40	15, 14, 30, 22, 10, 13, 13, 10-18, 13, 13, 14	1	H84	17, 14, 30, 25, 10, 13, 13, 14-19, 10, 12, 15	1
H41	15, 14, 30, 22, 10, 13, 13, 10-19, 13, 11, 14	1	H85	17, 14, 31, 24, 10, 11, 13, 13-17, 10, 13, 14	1
H42	15, 14, 30, 22, 10, 13, 13, 10-19, 13, 12, 14	1	H86	17, 14, 31, 25, 10, 11, 13, 14-16, 10, 12, 14	1
H43	15, 14, 30, 22, 10, 13, 13, 10-19, 13, 13, 14	1	H87	17, 14, 31, 26, 10, 11, 13, 13-17, 10, 12, 14	1
H44	15, 14, 30, 22, 10, 13, 13, 10-20, 13, 12, 14	2	H88	17, 14, 31, 26, 11, 11, 14, 14-16, 10, 11, 14	1

同様のハプロタイプの報告が認められた。一方、複数例検出された H16 と H46 を含む他のハプロタイプについては、Y Chromosome Haplotype Reference Database に登録されたいずれの人種においても報告例は認められなかった。

考 察

本研究において、基本的にはマニュアル⁹⁾にしたがって Y-STR のタイピングを行ったが、PCR 増幅の際の反応液量を半量 (12.5 μ l)、サイクル数を 30 回、PCR 産物の導入は 15 kV で 5 秒、DNA 型検出のための最小検出限界値は 200 RFU というプロトコルを用いた。キットに添付の男性 DNA を用いた検討の結果、鋳型 DNA 量の最大検出限界は 0.5 ng と判断され、その場合の RFU 値の最大値は約 5000 であった。また、検出限界値は 0.0625 ng であった。一方、このプロトコルを用いることで、マニュアル⁹⁾に記載されていた非特異的なスタター様ピークについては、型判定には影響を与えなかった。これらのことから、実務において DNA の定量ができない試料については、RFU の最大値を 5000 程度に抑えるように鋳型 DNA 量を調整することで、正しい型判定が行えるものと考えられた。

法科学試料の性状は様々であり、実務においてその試料が一人に由来する単独試料なのか、あるいは複数の人由来する混合試料なのかの判断は大切である¹⁵⁾。PowerPlex Y System に含まれるローカスのアレルのピークは、通常 DYS385 については 2 本、他の各ローカスについては 1 本ずつ観察されるので、単独試料の DNA を PCR 増幅した場合、12 本のピークが観察される。したがって、混合比率がいかなるものであっても、前述したプロトコルにより PCR 増幅を行い、DYS385 以外の任意のローカスでは 2 本以上、DYS385 においては 3 本以上のピークが検出されれば、2 名以上の男性由来の DNA が混合した混合試料であると推察できる。

実務においては、試料が混合しているという判断だけでなく、混合している DNA の型を明らかにすることも重要である。Y-PLEX 5 および Y-PLEX 6 を用いて、2 名の男性 DNA を混合させて検討を行った Shinha et al.^{6,7)}は、混合比率が 1 : 5 (0.2 ng :

1 ng) までは、いずれのキットにおいても混合した DNA の型判定が可能であり、Y-PLEX 6 を用いると、試料によっては混合比率が 1 : 30 (0.5 ng : 15 ng) まで可能であった例を報告している。今回のプロトコルを用いた場合、完全に型判定が可能であった男性由来の DNA の混合比率は、0.2 ng : 0.2 ng の 1 : 1 と 0.2 ng : 0.5 ng の 1 : 2.5 であった。この場合、スタターの関係にあるアレルにおいても型判定は可能であった。男性と男性の DNA の混合試料における検出限界が混合比率 1 : 2.5 であったことは、プロファイラーキット^{15,17)}や MCT118 型¹⁶⁾に比較して高いものではない。したがって、男性 2 名以上の DNA の混合が推察される試料については、対照試料がない場合、今回のプロトコルによる結果は、混在の確認程度にとどめおくのが妥当であると思われる。

一方、男性の DNA と女性の DNA を混合した場合、1 : 3200 (0.125 ng : 400 ng) の混合比率でも全てのローカスの型判定が可能であった。Shinha et al.^{6,7)}は、男性と女性の DNA を混合させて Y-PLEX 5 および Y-PLEX 6 の検出限界について検討し、Y-PLEX 5 においては混合比率が 1 : 600 (0.5 ng : 300 ng) でも型判定が可能であり、Y-PLEX 6 においては 1 : 50 (0.5 ng : 25 ng) まで男性の DNA の型判定が可能であったことを報告している。今回のプロトコルでは、そのどちらよりも高い混合比率まで型判定が可能であったことから、PowerPlex Y System は男性の DNA と女性の DNA が混合した場合の試料において、有効な Y-STR タイピングキットであることが示唆される。

性犯罪の被害者の腔内から採取された精液と腔液が混合した試料の場合、二段細胞融解法¹⁸⁾を用いて精子由来の DNA を分画し、精子の DNA 型を検出することが可能である。しかし、二段細胞融解法を用いることができない血液や体液 (腔液、唾液等) の混合試料においては、男性の型と女性の型が混合したものとして判定されたり、女性の DNA の混合比率が高くなると男性の DNA の混在が明らかにできない場合がある。そのような場合、PowerPlex Y System のような Y-STR の検査を行うことは、混合する女性の DNA の影響をほとんど受けることなく

男性の DNA の Y-STR を明らかにできるため、MCT118 型やプロファイラーキットに加えて本キットを用いることで、より積極的な混合の証明ができるものと考えられる。

今回、DNaseI により実験的に低分子化した DNA からの型検出について検討を行った。実務においては、新鮮血以外の試料については多少なりとも DNA が分解しているものと考えられる。小柳ら¹⁹⁾は、超音波で人為的に低分子化させた DNA を分画し、フラグメントサイズとプロファイラーキットにおける各ローカスの検出限界との関係について検討した。その結果、DNA の分解が進むほど長いアレルのピークが低下する傾向があり、検出感度が同程度であれば分解が進むほど増幅サイズの大きいアレルの検出が難しくなることを指摘した。また、同様の検討を行った渡辺ら²⁰⁾は、分解 DNA を試料とした場合における各ローカス間の増幅不均衡や 2 つのピーク間での増幅不均衡を観察し、誤判定の危険性について指摘している。今回は分画を行わず、低分子化した DNA をそのまま使用したが、10 ng を用いることで PCR 増幅領域が短いローカス (DYS391 と DYS438) のピークが高くなったが、他のローカスについては未処理の DNA 0.2 ng を鋳型として用いた場合とほぼ同等ピークとなり、全てのローカスで型判定が可能であった。また、PCR 増幅のサイクル数をマニュアル⁹⁾の上限である 32 回まで増やすことで、低分子化した DNA 2 ng を用いても 10 ng を用いた場合とほぼ同等のピーク高となった。種々の環境下にヒトの軟組織片を放置すると、放置後 1~2 週間でヒト由来ではない高分子 DNA が観察されるようになり、それに対応してヒト由来の DNA は低分子化することが示されている²¹⁾。そのような場合、DNA 型を検出するために鋳型 DNA を増やして PCR 増幅を行うことになるが、PowerPlex Y System を用いる場合、低分子化が予想される試料の検査においては、PCR 増幅のサイクル数を調整することによっても対応可能であり、場合によっては検査に用いる鋳型 DNA 量を減らすことができる可能性が示唆される。

Y-STR の多型性は MCT118 のような VNTR に比べて小さいが、複数の Y-STR を組み合わせ 1 回の

PCR 反応で増幅させるマルチプレックス (Multiplex) PCR 法により個人識別能力を高める方法が行われている^{6,7)}。その際、高度な多型性を示すローカスを選択することが重要となる。今回検討を行った PowerPlex Y System は、DYS437 以外は Y-PLEX 5 と Y-PLEX 6 の全てのローカスを全て含んでいる。これらの 2 種類のキットを用いて日本人における出現頻度について検討した Kido et al.¹³⁾は、それぞれのキットが日本人に対して高い個人識別能力を持つことを報告している。したがって、今回検討を行った PowerPlex Y System においては、1 回の PCR 増幅で高い個人識別能力を発揮することが期待された。各ローカスの個人識別能力の高さを gene diversity と haplotype diversity で比較するならば、DYS385 が最も高く (0.9451)、次いで DYS390 (0.7863)、DYS389II (0.7398)、DYS389I (0.6581) の順であった。また、血縁関係のない日本人成人男性 92 名のサンプルから 88 種類のハプロタイプが検出され、haplotype diversity は 0.9990 であった。このことから、PowerPlex Y System による Y-STR のハプロタイプは非常に多様性があり、日本人において個人識別に有効なキットであることが示唆される。

DYS437 を除く 11 ローカスのハプロタイプについて Y Chromosome Haplotype Reference Database で検索したところ、日本人において報告例があるハプロタイプは、今回複数例検出された 2 種類を含む計 12 種類であった。一方、他の人種については、中国人において 2 例の報告例が認められたのみであった。Y-STR の頻度分布は人種間で異なる事が明らかになっており^{22,23)}、アジア人種においてもローカスによっては頻度分布が異なることが指摘されている²⁴⁾。今回の結果は、これらの結果を支持するものであると考えられる。

これまで、日本人における Y-STR の頻度分布の地域差については、本州と沖縄で DYS393、DYS19、DYS438 において有意差があることが報告されている¹²⁾。本研究においては、これらに加えて DYS391 と DYS392 に有意差が認められた。また、個々のローカスの頻度分布を近年の日本人における報告¹²⁻¹⁴⁾と比較すると、DYS390 においては全ての報

告との間に有意差が認められた。Y-STR は父系遺伝することから、常染色体の STR に比較して同一人種においても地域差があることが考えられる。

Y-STR のタイピングを実務に応用するためには、日本をいくつかの地域に区分し、より系統だったデータ収集を行い各ローカスの頻度分布について統計的検討を行う必要があると考えられる。

今回の検討により、PowerPlex Y System は、法科学試料に対して有用なキットであることが示唆された。現在、新しく報告された Y-STR について、DYS441, DYS442, DYS443, DYS444, DYS445などが日本人において高い多型性を示すことが明らかになっている²⁵⁾。今後、このような Y-STR を検査に加えることにより、個人識別能力がより向上することが期待される。

結 語

本研究において、PowerPlex Y System を法科学試料へ応用するために、検出限界、異なる比率で混合した DNA や低分子化した DNA からの型検出に関する検討を行った。また、広島県在住の血縁関係のない日本人男性における各ローカスの出現頻度やハプロタイプについての調査を行った。

今回のプロトコルで全てのローカスが型判定可能な鋳型 DNA 量は、0.0625 ng～0.5 ng であった。DNA を異なる比率で混合した混合試料について検討を行ったところ、男性 2 名の DNA を混合した場合、混合比率が 1 : 1 (0.2 ng : 0.2 ng) と 1 : 2.5 (0.2 ng : 0.5 ng) で、すべてのローカスの型判定が可能であった。男性 1 名と女性 1 名の DNA を混合した場合は、混合比率 1 : 6400 (0.0625 ng : 400 ng) まで、全てのローカスの型判定が可能であった。

実験的に DNA を分解して、低分子化 DNA の影響について検討したところ、鋳型 DNA 量を増やすか、あるいは PCR 増幅でのサイクル数をマニュアルの上限である 32 回とすることで対応可能であることが示された。日本人男性 92 名における haplotype diversity は 0.9990 となり、PowerPlex Y System のハプロタイプの高い多様性が示された。

以上のことから、PowerPlex Y System は、日本人男性に対して高い個人識別能力を持ち、法科学試

料に対しても有益な Y-STR タイピングキットであることが示唆された。

文 献

- 1) Kayser, M., Caglia, A., Corach, D., Fretwell, N., Gehrig, C., Graziosi, G., Heidorn, F., Herrmann, S., Herzog, B., Hidding, M., Honda, K., Jobling, M., Krawczak, M., Leim, K., Meuser, S., Meyer, E., Oesterreich, W., Pandya, A., Parson, W., Penacino, G., Perez-Lezaun, A., Piccinini, A., Prinz, M., Schmitt, C., Schneider, P. M., Szibor, R., Teifel-Greding, J., Weichhold, G., de Knijff, P. and Roewer, L.: Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int. J. Legal Med.*, **110**, 125–133 (1997).
- 2) Roewer, L., Arnemann, J., Spurr, N. K., Grzeschik, K. H. and Epplen, J.T.: Simple repeat sequences on the human Y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *Hum. Genet.*, **89**, 389–394 (1992).
- 3) 山本雄二, 高田真吾, 宮石 智, 石津日出雄: Y 染色体マイクロサテライト Y-27H39 (DYS19) 多型の検出と法医学への応用. DNA 多型, **2**, 49–52 (1994).
- 4) White, P. S., Tatum, O. L., Deaven, L. L. and Longmire, J. L.: New, male-specific microsatellite markers from the human Y chromosome. *Genomics*, **57**, 433–437 (1999).
- 5) Ayub, Q., Mohyuddin, A., Qamar, R., Mazhar, K., Zerjal, T., Mehdi, S. Q. and Tyler-Smith, C.: Identification and characterisation of novel human Y-chromosomal microsatellite from sequence database information. *Nucleic Acids Res.*, **28**, e8 (2000).
- 6) Sinha, S. K., Budowle, B., Arcot, S. S., Richey, S. L., Chakraborty, R., Jones, M. D., Wojtkiewicz, P. W., Schoenbauer, D. A., Gross, A. M., Sinha, S. K. and Shewale, J. G.: Development and validation of a multiplexed Y-chromosome STR genotyping system, Y-PLEX™ 6, for forensic casework. *J. Forensic Sci.*, **48**, 93–103 (2003).

- 7) Sinha, S. K., Nasir, H., Gross, A. M., Budowle, B. and Shewale, J. G.: Development and validation of the Y-PLEXTM5, a Y-chromosome STR genotyping system, for forensic casework. *J. Forensic Sci.*, **48**, 985-1000 (2003).
- 8) 亀山 浩, 山本靖久, 原 正昭, 高田 綾, 斎藤 一之, 木戸 啓: Y-PLEXTM6 及び Y-PLEXTM5 を用いた Y 染色体上の STR 型検査の検討. *DNA 多型*, **11**, 123-127 (2003).
- 9) Promega Corporation: PowerPlex[®] Y System Technical Manual. (2003).
- 10) 根井正利: 分子進化遺伝学. pp. 153-179, 培風館 (1990).
- 11) 森 敏昭, 吉田寿夫: 心理学のためのデータ解析テクニカルブック. pp. 176-216, 北大路書店 (1990).
- 12) Uchii, R., Yamamoto, T., Usuda, K., Yoshimoto, T., Tanaka, M., Tokunaga, S., Kurihara, R., Tokunaga, K. and Katumata, Y.: Haplotype analysis with 14 Y-STR loci using 2 multiplex amplification and typing systems in 2 regional populations in Japan. *Int. J. Legal Med.*, **117**, 34-38 (2003).
- 13) Kido, A., Hara, M., Kameyama, H., Yamamoto, Y., Susukida, R. and Oya, M.: Y-chromosomal STR loci data in Japanese using the Y-PLEXTM5 and Y-PLEXTM6 PCR amplification kits. *J. Forensic Sci.*, **49**, 849-851 (2004).
- 14) 田村明敬, 岩田美佐, 高瀬 泉, 宮崎時子, 松井清司, 西尾 元, 鈴木廣一: 日本人集団における11種の Y-STR の遺伝子頻度の分布とハプロタイプ解析. *DNA 多型*, **12**, 228-230 (2004).
- 15) 吉田日南子, 水野なつ子, 千住弘明, 藤井宏治, 笠井賢太郎: AmpFISTR ProfilerTMPCR Amplification Kit を用いた混合試料からの DNA 型分析における型判定基準. 科警研報告, **55**, 41-52 (2003).
- 16) 吉田日南子, 関口和正, 水野なつ子, 笠井賢太郎, 坂井活子, 佐藤 元, 瀬田季茂: 異なる比率で混合した精液及び血液からの MCT118 型の検出に関する研究. 科警研報告, **46**, 103-109 (1993).
- 17) 中木真一, 日野大樹, 中山英樹, 森好浩行, 森川俊雄, 糸原幸次: 多座位 STR 検出キットを用いたピーク比による混合試料の STR 型判定. 鑑識科学, **7**, 131-138 (2003).
- 18) 吉田日南子, 水野なつ子, 笠井賢太郎, 坂井活子, 向山明孝: 精液・腔液混合斑痕からの精子 DNA の分離と PCR 法による精子 DNA の MCT118 および HLADQ α 型検出に関する研究. 科警研報告, **45**, 84-95 (1992).
- 19) 小柳幸司, 久司篤志, 吉田邦夫: DNA の低分子化が型判定に及ぼす影響. *DNA 多型*, **9**, 312-317 (2001).
- 20) 渡辺剛太郎, 梅津和夫, 湯浅 勲, 鶴殿俊史, 大澤資樹: AmpFISTR Profiler Kit による法医学的試料からの DNA 型判定の検討. 法医学の実際と研究, **43**, 53-60 (2000).
- 21) 今泉和彦, 松田秀明, 窪田 聡, 宮坂祥夫, 吉野峰生, 瀬田季茂: 種々の環境下に放置した軟組織片からの DNA 型分析—D1S80, TH01, HLA-DQ α , PM タイピングの比較—. *DNA 多型*, **3**, 321-327 (1995).
- 22) de Knijff, P., Kayser, M., Cagliá, A., Corach, D., Fretwell, N., Gehrig, C., Graziosi, G., Heidorn, F., Herrmann, S., Herzog, B., Hidding, M., Honda, K., Jobling, M., Krawczak, M., Leim, K., Meuser, S., Meyer, E., Oesterreich, W., Pandya, A., Parson, W., Penacino, G., Perez-Lezaun, A., Piccinini, A., Prinz, M., Schmitt, C., Schneider, P.M., Szibor, R., Teifel-Greding, J., Weichhold, G. and Roewer, L.: Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. *Int. J. Legal Med.*, **110**, 134-140 (1997).
- 23) Morikawa, T. and Lee S. B.: Distribution study of Y chromosomal microsatellite DYS390, DYS391, DYS395 and DYS19 loci in Caucasian, Hispanic and African American populations. *Proceedings of the IAFS 15th triennial Meeting*, pp. 28-29 Los Angeles (1999).

24) Mizuno, N., Calafell, F., Lu R., Kasai, K. and Sato, H.: Y-Specific polymorphisms in the Japanese and Taiwanese populations. *Jpn. J. Sci. Tech. Iden.*, **5**, 61–65 (2000).

25) 飯田礼子, 坪田悦子, 増山みか, 高塚尚和,

松木孝澄, 安田年博, 澤崎一三, 山場智一, 小形康宏, 岸 紘一郎: Y染色体上の新規多型性 STR 5 種の同定とハプロタイプ解析. DNA 多型, **10**, 160–163 (2002).