—技術報告—

各種自動抽出装置による法科学試料からの DNA 抽出について

藤井宏治, 井口奨太, 北山哲史, 中原弘明, 水野なつ子, 関口和正

科学警察研究所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1

DNA Extraction From Various Forensic Samples Using Automated Extraction Instruments.Koji Fujii, Shota Inokuchi, Tetsushi Kitayama, Hiroaki Nakahara,
Natsuko Mizuno and Kazumasa Sekiguchi*National Research Institute of Police Science
6-3-1, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan**(Received 13 January 2011; accepted 8 June 2011)*

We compared automated DNA extraction instruments of AutoMate Express, EZ1 Advanced XL, Maxwell 16 and QIAcube for forensic purpose. DNA was extracted from fresh bloodstains and fresh diluted bloodstains on cotton and denim, three 3-mm punches of FTA card containing buccal cells collected by EasiCollect, and head hair roots and shafts. The genomic and mitochondrial DNA was quantified by real-time PCR assay using D17Z1 locus and/or the C region of hyper variable region 1 (HV1). The extracted DNA was used to amplify 15 STR loci of Identifier kit and/or the A and the C regions in HV1.

AutoMate Express tended to give the highest DNA concentration from all the samples except for FTA cards and hair roots. Full STR profiles were obtained using all the instruments from bloodstains on cotton and denim, FTA cards and hair roots. Out of the 15 diluted bloodstain samples on cotton and denim, full STR profiles were obtained from 14 and 15 samples for AutoMate Express, 11 and 14 samples for EZ1 Advanced XL, 0 and 6 samples for Maxwell 16, and 8 and 14 samples for QIAcube, respectively. When 20 μ l of the denim extract was concentrated and amplified with 1 ng of 9947A DNA, PCR inhibition was slightly observed using AutoMate Express and Maxwell 16, but not observed when using EZ1 Advanced XL and QIAcube.

When the A and the C regions of HV1 were amplified using 2,000 copies of the hair root DNA extracted by all the instruments, positive bands were observed from almost all the samples. On the other hand, when 2,000 copies or less of the hair shaft DNA were amplified, the bands of the A region were weaker than those of the C region for all the instruments especially for AutoMate Express.

In conclusion, AutoMate Express and EZ1 Advanced XL are suitable for DNA

extraction from forensic samples, since they are easier to operate than QIAcube is, and they give higher DNA yield than Maxwell 16 does.

Key words: Forensic, DNA, Automate DNA extraction instrument, STR typing, Mitochondrial DNA

緒 言

法科学試料からの DNA 抽出には、従来から用いられているフェノール・クロロホルム法に代わり、抽出操作が簡便である DNA 抽出キットが用いられるようになってきた¹⁾。DNA 抽出キットによる DNA 抽出では、試料溶解後の DNA 抽出操作において、試料の種類による違いが少ないため、抽出操作を自動化した装置やシステムが開発されている^{2,3)}。キアゲン製の BioRobot EZ1 は、磁気ビーズ法を採用し、法科学試料に対応した DNA 抽出プロトコルを多数用意した自動抽出装置であり⁴⁻⁶⁾、手作業による QIAamp DNA Investigator kit などの QIAamp 系のキットとともに、日本警察で広く用いられている。この BioRobot EZ1 以外に、法科学試料に対応したプロトコルを用意した自動抽出装置としては、磁気ビーズ法の DNA IQ 系キットを自動化したプロメガ製の Maxwell 16⁷⁾ およびカラム法の QIAamp 系キットを自動化したキアゲン製の QIAcube が、それぞれ市販されている。また、最近では、磁気ビーズ法の PrepFiler forensic DNA extraction kit⁸⁾ を自動化したアプライドバイオシステムズ製の AutoMate Express が市販化された。本研究では、比較的小規模の試料数 (16 試料以下) を同時に処理し、かつ法科学試料用のキットやプロトコルを用意した自動抽出装置として、AutoMate Express, EZ1 Advanced XL, Maxwell 16 および QIAcube を用いて、実験的に作製した血痕 (サラシ布)、希釈血痕 (サラシ布)、血痕 (デニム布)、希釈血痕 (デニム布)、口腔内細胞 (FTA カード)、および毛根部から、DNA 抽出を行い、核 DNA の定量、および STR 型検査について検討した。また、毛幹部についても、これらの装置により DNA 抽出を行い、毛根部からの抽出した DNA 溶液とともに、ミトコンドリア DNA の定量、およびミトコ

ンドリア DNA 検査について検討した。

材料および方法

1 実験材料

実験内容について同意している成人男性 3 名 (個人 #01, 個人 #02 および 個人 #03) から提供を受けた血液、口腔内細胞および毛髪を試料とした。

1.1 血痕 (サラシ布)、希釈血痕 (サラシ布)、血痕 (デニム布) および希釈血痕 (デニム布)

血液は、採取後、 -80°C に保存していたものを用いた。血液の一部は、PBS (Phosphate buffered saline) で 10 倍に希釈し、希釈血液とした。サラシ布、およびデニムで染色されたジーンズ (以下「デニム布」という) を、大きさ約 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ に切り取り、血液 $3\text{ }\mu\text{l}$ および希釈血液 $3\text{ }\mu\text{l}$ を付着させた後、室温で一夜放置して乾燥させた。各試料は、実験に必要な個数を同時に作製し、1 試料ごとに 1.5 ml チューブに入れ、使用するまで -80°C で保存した。また、デニム由来の PCR 阻害の有無を確認するため、試料を付着させない大きさ約 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ のデニム布を、実験に用いた。

1.2 口腔内細胞 (FTA カード)

口腔内細胞は、EasiCollect (GE ヘルスケア製) により⁹⁾、最低でも 3 時間の間隔をあけ、付属の説明書¹⁰⁾ にしたがって 5 回ずつ採取し、得られた FTA カードは、保存用シリカゲルパック (GE ヘルスケア製) とともに、FTA カード保護用ポーチ大 (FTA クラシックカード用, GE ヘルスケア製) に入れ、数日間、室温で乾燥させた。乾燥させた FTA カードは、ハリスマイクロパンチ (直径 3.0 mm , GE ヘルスケア製) を用いて、FTA カードの中心から、放射遠心方向に 3 箇所連続でパンチしてくり抜き、得られたディスク 3 枚を、 1.5 ml チューブ 1 本に入れ、1 回分の試料とした。このくり抜きを、1 枚の FTA カードにつき、4 回繰り返す、4 種

類の装置で1回ずつ使用するための試料を得た。3名分のFTAカード各5枚からは、各装置用に、それぞれ計15回分の試料を得たことになる。これらの試料は、使用するまで -80°C で保存した。

1.3 毛根部および毛幹部

3名分の抜去毛、各35試料について、毛根部約5 mm、および毛根側の毛幹部約20 mmを実験に用いた。毛幹部の太さの平均値と標準偏差は、個人#01のもので $89 \pm 17 \mu\text{m}$ 、個人#02のもので $74 \pm 12 \mu\text{m}$ 、および個人#03のもので $85 \pm 12 \mu\text{m}$ であった。あらかじめ、毛根部については滅菌水、毛幹部については5% Terg-A-zyme（アルコノックス製）および滅菌水により、それぞれ、洗浄した。1名あたり、35試料の毛根部および毛幹部は、それぞれ、7試料ずつをチューブ5本に分け、チューブ1本につき、QIAamp DNA Investigator kit（キアゲン製）に含まれるATL buffer 630 μl および600 mAU/ml QIAGEN proteinase K 70 μl 、ならびに1 M DTT（Dithiothreitol, プロメガ製）24.5 μl を加え、 56°C で1時間処理した。得られた溶解液は、チューブ1本（7試料分）あたり約720 μl 、チューブ5本（35

試料分）で計約3.6 mlとなるが、この35試料分の溶解液は、よく混合した後、100 μl ずつ、チューブ35本に分注し、使用するまで -80°C で保存した。

2 DNA 抽出

4種類の装置により、3名分の各試料について5試料ずつDNA抽出を行った（Table 1）。なお、EZ1 Advanced XL および QIAcube では、DNA抽出に用いる溶解液の液量が、今回検討に用いたキットの場合、それぞれ、200 μl および300 μl に固定されており、また、血痕（サラシ布）、希釈血痕（サラシ布）、血痕（デニム布）、希釈血痕（デニム布）および口腔内細胞（FTAカード）（以下、まとめて「斑痕試料」という）では、試料担体ごとに、吸収される液量が異なるため、回収できなくなる量を考慮し、試料担体ごとに、溶解液の液量を変えて、試料の溶出を行った。

2.1 AutoMate Express (AME)

AutoMate Express（アプライドバイオシステムズ製、以下「AME」という）には、PrepFiler express forensic DNA extraction kit（アプライドバイオシステムズ製）を用いた。斑痕資料は、PrepFil-

Table 1 Features of automated DNA extraction instruments used in this study.

	AutoMate Express	EZ1 Advanced XL	Maxwell 16	QIAcube
DNA extraction method	Magnetic beads	Magnetic beads	Magnetic beads	Column
Maximum sample number	13	14	16	12
Approximate processing time ^{a)}	28 min.	16 min.	30 min.	80 min.
Preparation for operation	Easy	Easy	Normal	Laborious
Reagent	Sealed in a cartridge for each sample	Sealed in a cartridge for each sample	Sealed in a cartridge for each sample	Supplied in bottles ^{b)}
DNA elution	50 μl of TE buffer	40, 50, 100 or 200 μl of TE buffer or Water.	25–50 μl of Elution buffer ^{c)}	20–100 μl in increments of 10 μl of ATE buffer or Water
Extraction kit(s) for forensic purpose	PrepFiler Express forensic DNA extraction kit ^{d)} PrepFiler Express BTA forensic DNA extraction kit	EZ-1 DNA Investigator kit ^{d)}	DNA IQ casework sample kit for Maxwell 16 ^{d)} DNA IQ reference sample kit for Maxwell 16	QIAamp DNA Investigator kit ^{d)}

^{a)}: Time for sample lysis is not included.

^{b)}: The user needs to pour each of reagents from the bottle of the kit to the bottle of the instrument.

^{c)}: The volume can be determined continuously within 25–50 μl , since the elution buffer is manually transferred to the elution tube.

^{d)}: The extraction kit used in this study.

er LySep column (キット付属) に入れ, PrepFiler lysis buffer (キット付属) 500 μ l および 1 M DTT 5 μ l の混合液のうち 500 μ l を加え, 70°C で 40 分間処理した後, この PrepFiler LySep column を, 6,000 g で 2 分間, 遠心分離して溶解液を回収し, DNA 抽出に用いた. 毛根部および毛幹部の溶解液 100 μ l には, PrepFiler lysis buffer を 400 μ l 加え, DNA 抽出に用いた. DNA 抽出には, PF Express script を用い, 最終的に, TE buffer 50 μ l で, DNA を抽出した.

2.2 EZ1 Advanced XL (EZ1 XL)

EZ1 Advanced XL (キアゲン製, 以下「EZ1 XL」という) には, EZ1 DNA Investigator kit (キアゲン製) を用いた. 斑痕試料には, 2 倍希釈した G2 buffer (キット付属) を, 血痕 (サラシ布) および希釈血痕 (サラシ布) では 240 μ l, 血痕 (デニム布) および希釈血痕 (デニム布) では 270 μ l, ならびに口腔内細胞 (FTA カード) では 210 μ l を加え, さらに, 600 mAU/ml QIAGEN proteinase K (キット付属) を 10 μ l 加え, 56°C で 15 分間加熱した後, ピペットチップを用いて溶解液を 200 μ l 回収し, DNA 抽出に用いた. 毛根部および毛幹部の溶解液 100 μ l には, QIAamp DNA Investigator kit に含まれる ATL buffer を 100 μ l 加え, DNA 抽出に用いた. DNA 抽出には, Trace mode を用い, 最終的に, 水 50 μ l で DNA を抽出した.

2.3 Maxwell 16 (MW16)

Maxwell 16 (プロメガ製, 以下「MW16」という) には, DNA IQ casework sample kit for Maxwell 16 (プロメガ製) を用いた. 斑痕試料には, Tissue and hair extraction kit (for use with DNA IQ, プロメガ製) に含まれる Incubation buffer 190 μ l および 18 mg/ml Proteinase K 10 μ l を加え, 56°C で 1 時間加熱した後, Lysis buffer (キット付属) を 400 μ l 加え, ピペットチップを用いて, できるだけ液を回収し, DNA 抽出に用いた. 毛根部および毛幹部の溶解液 100 μ l には, Lysis buffer を 400 μ l 加え, DNA 抽出に用いた. DNA 抽出には, Forensic_LEV mode を用い, 最終的に Elution buffer (キット付属) 50 μ l で DNA を抽出した.

2.4 QIAcube (QC)

QIAcube (キアゲン製, 以下「QC」という) には, QIAamp DNA Investigator kit (キアゲン製) を用いた. 斑痕試料には, ATL buffer (キット付属) を, 血痕 (サラシ布) および希釈血痕 (サラシ布) では 330 μ l, 血痕 (デニム布) および希釈血痕 (デニム布) では 360 μ l, ならびに口腔内細胞 (FTA カード) では 300 μ l 加え, さらに, 600 mAU/ml QIAGEN proteinase K (キット付属) を 20 μ l 加え, 56°C で 1 時間加熱した後, ピペットチップを用いて, 溶解液を 300 μ l 回収し, DNA 抽出に用いた. 毛根部および毛幹部の溶解液 100 μ l には, ATL buffer を 200 μ l 加え, DNA 抽出に用いた. DNA 抽出には, QIAamp DNA Investigator kit_Forensic casework samples protocol を用い, 最終的に, 水 50 μ l で DNA を抽出した.

3 核 DNA およびミトコンドリア DNA の定量

斑痕試料および毛根部から抽出した DNA 溶液 2 μ l を用いて, D17Z1 領域を用いた方法により, 核 DNA を定量した¹¹⁾. また, 毛根部および毛幹部から抽出した DNA 溶液 2 μ l を用いて, ミトコンドリア DNA の HV1 領域 (Hyper variable region 1) にある C 領域を用いた方法により, ミトコンドリア DNA を定量した¹²⁾. どちらの DNA 定量についても, SYBR premix Ex Taq (タカラバイオ製) および Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ製) を用いたリアルタイム PCR で行った.

4 STR 型検査

血痕 (サラシ布), 口腔内細胞 (FTA カード) および毛根部から抽出した DNA 溶液については, 3 名分の各 5 試料のうち, それぞれ 1 試料から, また, 希釈血痕 (サラシ布), 血痕 (デニム布), 希釈血痕 (デニム布) から抽出した DNA 溶液については, 3 名分の各 5 試料すべてから, AmpFISTR Identifier kit (アプライドバイオシステムズ製) により, PCR 増幅を行った^{13,14)}. Identifier kit では, PCR 増幅の至適鋳型 DNA 量は 0.5~1 ng^{13,14)} であるが, PCR 反応液に入れることができる DNA 溶液は 10 μ l が上限であるため, 各試料の鋳型 DNA 量は, 核 DNA の濃度が 0.1 ng/ μ l 以上のものについては 1 ng, 0.1 ng/ μ l 未満のものについては, 10

μl を用いて, PCR 増幅した. 試料を付着させないデニム布から各装置により得られた抽出液 $9\mu\text{l}$ に, $1\text{ ng}/\mu\text{l}$ に希釈した 9947A DNA (プロメガ製) $1\mu\text{l}$ を混合して, PCR 増幅した. さらに, この抽出液 $20\mu\text{l}$ を濃縮乾燥した後, Identifier kit に付属の 9947A DNA ($0.1\text{ ng}/\mu\text{l}$) を $10\mu\text{l}$ 加えて, PCR 増幅した. PCR 増幅産物は, 3130 XL Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ製) で電気泳動し, GeneMapper ID software 3.2.1 (アプライ

ドバイオシステムズ製) で解析した. なお, DNA 型を判定する最小のピーク高は 150 RFU (Relative fluorescent unit) とした^{13,14)}.

5 ミトコンドリア DNA 検査

毛根部および毛幹部から抽出した DNA 溶液について, ミトコンドリア DNA の HV1 領域にある A 領域 (約 440 塩基) および C 領域 (約 230 塩基) を, 反応液 $25\mu\text{l}$ 中で PCR 増幅した¹⁵⁾. PCR 増幅に用いる鋳型量は, ミトコンドリア DNA の濃度が 500

Fig. 1 The concentrations of nuclear DNA. DNA was obtained by automated extraction instruments from $3\mu\text{l}$ of bloodstain on cotton (a), $3\mu\text{l}$ of 10-time diluted bloodstain on cotton (b), $3\mu\text{l}$ of bloodstain on denim (c), $3\mu\text{l}$ of 10-time diluted bloodstain on denim (d), and three 3-mm punches of FTA card containing buccal cells collected by EasiCollect (e). DNA was extracted by following the suppliers' instructions. DNA concentration was quantified by real-time PCR assay using human specific sequence of D17Z1 locus. The averages and standard deviations of the DNA concentrations are shown.

copies/ μ l 以上のものについては、2,000 copies を、また、500 copies/ μ l 未満のものについては、4 μ l を用いて、PCR 増幅した。得られた PCR 産物は、2 %アガロースゲルで泳動し、バンドの濃さを観察した。また、3 名分の各 5 試料のうち、それぞれ 1 試料について、HV1 領域の A 領域および HV2 領域の D 領域を、さらに個人の塩基配列により必要な場合には、HV1 領域の B 領域および C 領域、ならびに HV2 領域の E 領域を、上記と同じ鋳型量を用いて PCR 増幅し、得られた PCR 産物を精製後、BigDye terminator v1.1 cycle sequencing kit (アプライドバイオシステムズ製) を用いてシーケンス反応を行い、3130 XL Genetic Analyzer により電気泳動し、Sequencing Analysis 5.3.1 (アプライドバイオシステムズ製) および Sequencer 4.7 (ジーンコード製) により塩基配列解析を行った。

結 果

1 血痕、希釈血痕および口腔内細胞 (FTA カード) からの DNA 抽出、ならびに STR 型検査

血痕 (サラシ布)、希釈血痕 (サラシ布)、血痕 (デニム布) および希釈血痕 (デニム布) から、各装置で抽出した DNA 溶液の核 DNA の定量値は、AME, QC, EZ1 XL, MW16 の順に低くなる傾向が観察された。口腔内細胞 (FTA カード) については、MW16 が、他の装置よりも若干、低い DNA 定量値を示す傾向が観察されたものの、各装置間に大きな差は観察されなかった (Fig. 1)。

STR 型検査については、STR 型検査に十分な核 DNA の定量値が得られた血痕 (サラシ布) および口腔内細胞 (FTA カード) の試料については、いずれの装置を用いても、すべての座位が検出された。一方、希釈血痕 (サラシ布) については、3 名分の計 15 試料について検査を行い、全座位が検出されたのは、AME では 14 試料、EZ1 XL では 11 試

Table 2 Number of full STR profile(s) obtained from DNA solution extracted by automated extraction instruments.

Individual	Bloodstain on cotton (n=1)			Diluted bloodstain on cotton (n=5)		
	#01	#02	#03	#01	#02	#03
AutoMate Express	1	1	1	5	4(1) ^{a)}	5
EZ1 Advanced XL	1	1	1	5	4(1) ^{a)}	2(1) ^{a)}
Maxwell 16	1	1	1	0	0(4) ^{a)}	0(1) ^{a)}
QIAcube	1	1	1	3(2) ^{a)}	2(3) ^{a)}	3(2) ^{a)}
Individual	Bloodstain on denim (n=5)			Diluted bloodstain on denim (n=5)		
	#01	#02	#03	#01	#02	#03
AutoMate Express	5	5	5	5	5	5
EZ1 Advanced XL	5	5	5	4(1) ^{a)}	5	5
Maxwell 16	5	5	5	2(3) ^{a)}	1(4) ^{a)}	3(2) ^{a)}
QIAcube	5	5	5	5	5	4(1) ^{a)}
Individual	Buccal cells on FTA card (n=1)			Hair root (n=1)		
	#01	#02	#03	#01	#02	#03
AutoMate Express	1	1	1	1	1	1
EZ1 Advanced XL	1	1	1	1	1	1
Maxwell 16	1	1	1	1	1	1
QIAcube	1	1	1	1	1	1

^{a)}: The number in the parenthesis is the number of partial profile(s).

料, MW16では0試料, QCでは8試料であった. また, デニムは, DNA 溶液に混入した場合に, PCRを阻害する可能性があるが^{16,17)}, 血痕(デニム布)については, いずれの装置でも, 3名分の計15試料のすべてから, 全座位が検出された. 一方, 希釈血痕(デニム布)については, 3名分の計15試料のうち, 全座位が検出されたのは, AMEでは15試料, EZ1 XLでは14試料, MW16では6試料, QCでは14試料であった (Table 2). なお, 試料を付着させてないデニム布について, 各装置により抽出操作を行い, 得られた抽出液に, コントロール DNA である9947A DNAを混合してSTR型検査を行ったところ, 抽出液9 μ lを用いた場合, いずれの装置についても, 9947A DNAのSTR型がすべて検出され, PCR阻害は観察されなかった. しかし, この抽出液20 μ lを用いた場合, EZ1 XLおよびQCでは, PCR阻害が観察されなかったが, AMEでは, 9947A DNAのピークが低下し, 一部の座位が検出されず, また, MW16では, すべての座位が閾値150 RFU以上であったものの, 一部の座位において, PCR阻害によると思われるピークの大きな低下が認められた (Fig. 2).

2 毛根部および毛幹部からの DNA 抽出, ならびにSTR型検査およびミトコンドリア DNA 検査

毛根部から各装置で抽出したDNA溶液について, 核DNAおよびミトコンドリアDNAの定量値は, いずれも, EZ1 XL, AME, QC, MW16の順に低くなる傾向が観察された. 一方, 毛幹部から各装置で抽出したDNA溶液について, ミトコンドリアDNAの定量値は, AMEで顕著に高く, 以下QC, EZ1 XL, MW16の順に低くなる傾向が観察された (Fig. 3).

毛根部からのSTR型検査については, 3名分の各5試料のうち, それぞれ1試料から検査を行い, いずれの装置で抽出したDNA溶液を用いても, すべての座位が検出された (Table 2).

毛根部からのミトコンドリアDNA検査では, いずれの試料についても, 2,000 copiesをPCR増幅したところ, QCでは, 一部の試料で, 薄いバンドが観察されたものの, それ以外の装置については, A, C領域ともに, 良好なバンドが観察された

Fig. 2 Effect of denim extract on the PCR amplification of STR typing. Only denim cloth was processed by automated extraction instruments to get 50 μ l of denim extract. Twenty microliters of the denim extract was dried up, and 10 μ l of 9947A DNA (0.1 ng/ μ l) of Identifiler kit was added. From this mixture, STR typing was then performed. Only the yellow panels (NED labeled profiles) are shown. The inhibition of the PCR amplification was slightly observed for Auto-Mate Express (AME) and Maxwell 16 (MW16), but not for EZ1 Advanced XL (EZ1 XL) and QIAcube (QC). As a positive control, only 10 μ l of 9947A DNA was amplified (PC).

(Fig. 4).

毛幹部については, ミトコンドリアDNAの定量値が500 copies/ μ l以上の試料では2,000 copiesを, また, 500 copies/ μ l未満の試料では4 μ l (2,000 copies未満)を, それぞれPCR増幅した. その結果, C領域については, 2,000 copies未満をPCR増幅した試料では, バンドが薄くなりやすい傾向を

Fig. 3 The concentrations of nuclear DNA and/or mitochondrial DNA obtained from hair root (a, b), and hair shaft (c). From 3 individuals, 35 hair samples were plucked from each head. Each of the hairs was cut to obtain approximately 5 mm of hair root, and approximately 20 mm of hair shaft adjacent to the hair root. The 35 samples of the hair root or the hair shaft were lysated in 7 tubes in lysis buffer consisting of ATL buffer, proteinase K, and dithiothreitol (DTT). The lysate of the hair root or the hair shaft was combined together, and then separated to 35 aliquots of 100 μ l lysate. The aliquot was mixed with 400 μ l of PrepFiler lysis buffer for AutoMate Express, 100 μ l of ATL buffer for EZ1 Advanced XL, 500 μ l of Promega's Lysis buffer for Maxwell 16, and 200 μ l of ATL buffer for QIAcube. DNA was extracted by following the suppliers' instructions. The concentration of nuclear DNA was quantified by real-time PCR assay using human specific sequence of D17Z1 locus only from the hair root samples. The concentration of mitochondrial DNA was quantified by real-time PCR assay using the C region of hyper variable region 1 (HV1) of mitochondrial DNA from the hair root and the hair shaft samples.

示したが、2,000 copies を PCR 増幅した試料では、EZ1 による個人#03の1試料を除いて、バンドの濃さは良好で、安定していた。一方、A 領域については、2,000 copies 未満を PCR 増幅した試料では、薄いバンドを示すものが多く、また、2,000 copies を PCR 増幅した試料であっても、C 領域と比較して全体的に薄くなり、バンドの濃さは、装置間、試料間で、大きな差が観察された。2,000 copies を PCR 増幅した試料について、A 領域のバンドをさらに観察すると、AME では、全体的に、A 領域のバンドが、他の装置よりも、薄くなりやすい傾向を示していた。EZ1 XL では、C 領域で薄いバンドを示した個人#03の1試料は、A 領域でも薄い

バンドを示していたが、それ以外の試料では、極端に薄いバンドのものはなかった。また、MW16およびQCでは、極端に薄いバンドのものはなかった (Fig. 4)。

毛根部および毛幹部から各装置で抽出した3名分の各5試料のうち、それぞれ1試料について、PCR 増幅、シーケンス反応および塩基配列解析を行った。いずれの試料についても、ミトコンドリア DNA 検査が最後まで実施可能であった。しかし、毛幹部では、毛根部よりも、PCR 増幅サイズが約440塩基のA領域、および約450塩基のD領域において、バンドが全体的に薄かったため、塩基配列解析においてピークが低くなり、ノイズの影響を受け

Fig. 4 Amplification of the A and the C regions in hyper variable region 1 (HV1) of mitochondrial DNA. DNA was obtained by automated extraction instruments from hair root (A) and hair shaft (B). The concentration of mitochondrial DNA was quantified by real-time PCR assay using the C region. For PCR amplification, 2,000 copies of mitochondrial DNA was used for the samples > 500 copies/ μl . Four microliters (less than 2,000 copies) of mitochondrial DNA was used for the samples < 500 copies/ μl (*).

M: size marker containing fragments of 100, 250, 500, 1,000 and 2,000 base pairs, AME: AutoMate Express, EZ1 XL: EZ1 Advanced XL, MW16: Maxwell 16, QC: QIAcube, N: negative control, P: positive control.

やすい傾向にあった。とりわけ、AMEでは、この傾向が顕著であった。ただし、AMEにより毛幹部から抽出したDNA溶液であっても、鋳型量を2,000 copies から10,000 copies に増やした場合に、バンドが濃くなったため、塩基配列解析におい

てもピークが高くなり、ノイズの影響はほとんど受けなくなった。

考 察

各種法科学試料から、4種類の自動抽出装置によ

り、DNA を抽出した。血痕（サラシ布）、希釈血痕（サラシ布）、血痕（デニム布）、希釈血痕（デニム布）および毛幹部からの DNA 抽出では、AME を用いた場合、他の装置と比較して、高い DNA 定量値が得られやすい傾向を示した。しかし、デニム布からの抽出液 9 μ l を用いた場合には、いずれの装置でも PCR 阻害は観察されなかったものの、20 μ l を用いた場合には、AME および MW16 では、PCR 阻害を受けることが示唆された。

AME の製造元の情報では、PrepFiler forensic DNA extraction kit では、磁気ビーズの粒径が、他の標準的な DNA 抽出キットより小さく、DNA 抽出効率が向上しているとされている¹⁸⁾。また、これまで、PrepFiler forensic DNA extraction kit を手作業で用いた場合、フェノール・クロロホルム法、DNA IQ System, EZ1 DNA Investigator kit (BioRobot EZ1), および QIAamp DNA Micro kit と比較して、おおむね、同等以上の高い DNA 定量値が得られたと報告されている⁸⁾。しかし、AME では、磁気ビーズの粒径が小さいため、DNA 抽出効率が向上するかわりに、デニム布からの抽出液をコントロール DNA に添加する実験で示されたように、PCR 阻害物質の除去が不十分である可能性が考えられる。したがって、AME は、PCR 阻害物質を含む試料からの DNA 抽出には、慎重に用いる必要があると考えられる。

毛髪からの DNA 抽出では、毛髪 1 本ずつに含まれる DNA 量が異なること、ならびに AME, EZ1 XL および MW16 の各キットに含まれる試薬では、溶解が不十分であったため、必要な本数の毛根部および毛幹部を、溶解力の優れた ATL buffer に、QIAGEN proteinase K および DTT を加える条件で溶解させ、得られた溶解液を混合した後、分注して各抽出装置による DNA 抽出に用いた。

毛幹部に含まれる DNA は高度に分解しており¹⁹⁾、DNA が分解した試料からのミトコンドリア DNA 検査では、STR 型検査の結果^{20,21)}と同様に、PCR 増幅サイズが短いほど、検出されやすいと報告されている^{22,23)}。今回、毛幹部からのミトコンドリア DNA 検査では、PCR 増幅サイズが約 230 塩基の C 領域を用いて定量したため、C 領域では、ほ

とんどの試料でコピー数が適正となり、良好なバンドが観察されたが、PCR 増幅サイズが約 440 塩基の A 領域では¹⁵⁾、DNA の分解により、鋳型として機能するコピー数が不足し、全体的にバンドが薄くなったと考えられる。とりわけ、AME では、この傾向が強かったことから、AME は、毛幹部からの DNA 抽出において、他の 3 種類の装置と比較して、大きいサイズの DNA 断片よりも、小さいサイズの DNA 断片を、回収しやすい可能性が示唆される。また、AME では、塩基配列解析において、ノイズの少ない結果を得るために、鋳型量を 2,000 copies から 10,000 copies に増やす必要があった。このことから、AME により毛幹部から抽出した DNA 溶液に含まれる検査に必要なミトコンドリア DNA 濃度は、Fig. 3 に示したほど高くないと考えられる。

今回、検討した自動抽出装置のうち、QC は、あらかじめ複数の試薬を、専用のボトルに移した上で、装置にセットする必要があるため、操作が煩雑であり、MW16 は、今回の検討により抽出効率が低いことが示されたので、法科学試料からの DNA 抽出には、AME および EZ1 XL が適していると考えられる。今回検討した試料では、おおむね AME は、EZ1 XL よりも高い DNA 定量値が得られやすい傾向を示した。しかし、AME については、PCR 阻害物質の除去が不十分である可能性があるため、定量値の低い DNA 溶液を濃縮して用いる場合には、注意が必要である。また、AME では、毛幹部からの DNA 抽出において、ミトコンドリア DNA の定量値が、EZ1 XL よりも安定して得られたが、ミトコンドリア DNA 検査では、EZ1 XL よりも多いコピー数の鋳型が必要であったことから、フラグメントサイズの小さい DNA 断片が優先的に回収される可能性が考えられた。今後、陳旧血痕などの DNA が分解した試料について、さらに検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) Scherczinger, C. A., Bourke, M. T., Ladd, C. and Lee, H. C.: DNA extraction from liquid blood using QIAamp. *J. Forensic Sci.* **42**, 893–896

- (1997).
- 2) Greenspoon, S. A., Ban, J. D., Sykes, K., Ballard, E. J., Edler, S. S., Baisden, M. and Covington, B. L.: Application of the BioMek 2000 Laboratory Automation Workstation and the DNA IQ System to the extraction of forensic casework samples. *J. Forensic Sci.* **49**, 29–39 (2004).
 - 3) Frégeau, C. J., Lett, C. M., Elliott, J., Yensen, C. and Fourney, R. M.: Automated processing of forensic casework samples using robotic workstations equipped with nondisposable tips: contamination prevention. *J. Forensic Sci.* **53**, 632–651 (2008).
 - 4) Montpetit, S. A., Fitch, I. T. and O'Donnell, P. T.: A simple automated instrument for DNA extraction in forensic casework. *J. Forensic Sci.* **50**, 555–563 (2005).
 - 5) Anslinger, K., Bayer, B., Rolf, B., Keil, W. and Eisenmenger, W.: Application of the BioRobot EZ1 in a forensic laboratory. *Legal Medicine*. **7**, 164–168 (2005).
 - 6) Kishore, R., Reef Hardy, W., Anderson, V. J., Sanchez, N. A. and Buoncristiani, M. R.: Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot EZ1 and BioRobot M48. *J. Forensic Sci.* **51**, 1055–1061 (2006).
 - 7) Krnaiski, Z., Geering, S. and Steadman, S.: Performance verification of the Maxwell 16 Instrument and DNA IQ Reference Sample Kit for automated DNA extraction of known reference samples. *Forensic Sci. Med. Pathol.* **3**, 264–269 (2007).
 - 8) Brevnov, M. G., Pawar, H. S., Mundt, J., Calandro, L. M., Furtado, M. R. and Shewale, J. G.: Developmental validation of the PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit for extraction of genomic DNA from biological samples. *J. Forensic Sci.* **54**, 599–607 (2009).
 - 9) 藤井宏治, 北山哲史, 中原弘明, 水野なつ子, 吉田日南子, 関口和正: STR 型検査のための口腔内細胞採取キットの比較. 法科学技術. **14**, 55–60 (2009).
 - 10) GE ヘルスケアサイエンス: EasiCollect. (2007).
 - 11) 中原弘明, 藤井宏治, 水野なつ子, 吉田日南子, 笠井賢太郎: 法生物学的試料由来の DNA に対する定量法の検証. 法科学技術. **12**, 13–26 (2007).
 - 12) Nakahara, H., Sekiguchi, K., Imaizumi, K., Mizuno, N. and Kasai, K.: Heteroplasmies detected in an amplified mitochondrial DNA control region from a small amount of template. *J. Forensic Sci.* **53**, 306–311 (2008).
 - 13) 吉田日南子, 高橋健一, 笠井賢太郎: AmpF/STR Identifiler PCR amplification kit の法科学試料への応用に関する検討. 科警研報告. **57**, 49–56 (2006).
 - 14) 笠井賢太郎, 吉田日南子, 水野なつ子, 中原弘明, 藤井宏治, 関口和正: 証拠資料からの DNA 型検査法(第 3 報). 科警研報告. **58**, 32–36 (2007).
 - 15) Sekiguchi, K., Imaizumi, K., Matsuda, H., Mizuno, N., Yoshida, K., Senju, H., Sato, H. and Kasai, K.: MtDNA sequence analysis using capillary electrophoresis and its application to the analysis of MtDNA in hair. *Jpn. J. Sci. Tech. Iden.* **7**, 123–130 (2003).
 - 16) Del Rio, S. A., Marino, M. A. and Belgrader, P.: PCR-based human leukocyte antigen (HLA) DQ alpha typing of blood stained light and dark blue denim fabric. *J. Forensic Sci.* **41**, 490–492 (1996).
 - 17) Larkin, A. and Harbison, S.: An improved method for STR analysis of bloodstained denim. *Int. J. Legal Med.* **112**, 388–390 (1999).
 - 18) アプライドバイオシステムズ: PrepFiler Forensic DNA Extraction キット(2008).
 - 19) 松田秀明, 今泉和彦, 窪田聡, 宮坂祥夫, 吉野峰生, 瀬田季茂: 毛幹部からの DNA 抽出法に関する技術的な検討. 科警研報告. **50**, 23–28 (1997).

-
- 20) Yoshida, K., Sekiguchi, K., Kasai, K., Sato, H., Seta, S. and Sensabaugh, G. F.: Evaluation of new primers for CSF1PO. *Int. J. Legal Med.* **110**, 36–38 (1997).
- 21) Fujii, K., Senju, H., Yoshida, K., Sato, H. and Kasai, K.: A new procedure for the multiplex PCR amplification of TH01, CSF1PO and TPOX loci with small amplicon lengths. *Jpn. J. Sci. Tech. Ident.* **6**, 129–134 (2002).
- 22) Gabriel, M. N., Huffine, E. F., Ryan, J. H., Holland, M. M. and Parsons, T. J.: Improved MtDNA sequence analysis of forensic remains using a “mini-primer set” amplification strategy. *J. Forensic Sci.* **46**, 247–253 (2001).
- 23) Eichmann, C. and Parson, W.: ‘Mitominis’: multiplex PCR analysis of reduced size amplicons for compound sequence analysis of the entire mtDNA control region in highly degraded samples. *Int. J. Legal Med.* **122**, 385–388 (2008).