—事例報告—

骨および歯牙の DNA 型鑑定事例における 3 種類の DNA 抽出法の比較

宮田 崇¹, 石川公昭¹, 中西宏明², 大森 毅³¹山梨県警察本部科学捜査研究所
〒406-0036 山梨県笛吹市石和町窪中島312-4²順天堂大学法医学研究室
〒113-8421 文京区本郷2-1-1³科学警察研究所
〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-1

A comparison of three methods of DNA extraction from bone and tooth samples

Takashi Miyata¹, Hiroaki Ishikawa¹, Hiroaki Nakanishi² and Takeshi Ohmori³¹*Forensic Science Laboratory, Yamanashi Prefectural Police H.Q.
312-4, Kubonakajima, Isawa-cho, Fuefuki, Yamanashi, 406-0036, Japan*
²*Department of Forensic Medicine, Juntendo University School of Medicine
2-1-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8421, Japan*
³*National Research Institute of Police Science
6-3-1, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, 277-0882, Japan**(Received 10 June 2019; accepted 26 August 2019;
Published online 7 October 2019 in J-STAGE DOI: 10.3408/jafst.765)*

DNA obtained from hard tissues, such as bones and teeth, is used to identify highly decomposed or skeletonized corpses. Effective DNA extraction is critical; the quantity and quality of DNA and the levels of co-extracted PCR inhibitors greatly influence subsequent steps. We evaluated three methods used to extract DNA from bones and teeth: use of the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), the standard phenol/chloroform-based method, and the PrepFiler Express BTA Forensic DNA Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). We modified the protocols of the two kits. We assessed DNA quantity and quality. The QIAamp DNA Mini Kit yielded more DNA and more informative STR profiles than did the other methods; that kit is optimal.

Key words: DNA extraction, Bone, Tooth, DNA quantification, STR typing

緒 言

腐敗もしくは白骨化した変死体の身元確認には、骨や歯牙といった硬組織を用いた DNA 型検査が利

用されるが、しばしば低い DNA 収量、DNA の高度な分解あるいは PCR 阻害が問題になる。そのため、骨や歯牙から良質かつ十分量の DNA を得ることが DNA 型検査にとって重要となることから、フ

ェノール/クロロホルムによる DNA 抽出（以後、フェノール・クロロホルム法とする）¹⁻⁵⁾や、各種市販キットを利用した DNA 抽出を行った例⁶⁻¹³⁾が報告されている。

我々は、骨試料、歯牙試料における DNA 型鑑定実務において、鑑定資料の試料量が多いものについては、より確実な型判定を行うために原理が異なる 2 種類の抽出法での DNA 抽出を行うダブルチェックを実施している。平成21年から平成30年までのダブルチェックを実施した50事例では、DNA 抽出は QIAGEN 社のプロトコール¹⁴⁾に若干の変更を加えた QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN 社製)を用いた方法（以後、Mini Kit 法とする）、フェノール・クロロホルム法および ThermoFisher Scientific 社のプロトコール¹⁵⁾に若干の変更を加えた PrepFiler ExpressBTA Forensic DNA Extraction Kit (ThermoFisher Scientific 社製)を用いた方法（以後、Prep 法とする）の 3 種類の方法から 2 種類を組み合わせることで実施してきた。そして、これらの方法で抽出した DNA を用いて AmpFISTR Identifier Amplification kit 若しくは AmpFISTR Identifier Amplification kit Plus（どちらも ThermoFisher Scientific 社製）による STR 型検査を実施してきた。今回、これらの方法で抽出した骨試料および歯牙試料の DNA 収量および STR 型解析結果を比較検討したところ、若干の知見が得られたので報告する。

材料および方法

1 事例

試料は身元不明死体の骨および歯牙であり、骨試料は 9 事例11試料、歯牙試料は41事例42試料の計53試料である。死体の状況から推定した死後経過時間および試料の詳細については Table 1 に示すとおりである。

2 DNA 抽出の前処理

骨については、ブラシでこすり洗浄し、肉片などの付着物を取り除いた後、検査に必要な量を切り取った。歯牙については 1 本をそのまま用いた。切り取った骨および歯牙を超音波洗浄機で中性洗剤を用いて洗浄し、その後十分な量の蒸留水ですすぎ、乾燥

させた。表面を歯科技工用のグラインダーで研磨した後、さらに十分な量の蒸留水ですすぎ、乾燥させた。最後に、乾燥させた試料を金槌で粉碎し、ザラメ状にした。なお、抽出には、骨試料は 1 g、歯牙試料は 0.5 g を用いた。骨試料は同一試料について検査を 3 回実施したので、DNA 収量として 3 回の抽出の平均値を求めた。ただし B3（基節骨）は試料量が少なかったため 1 回のみの検査とした。一方、歯牙は試料量が少なかったため 1 回のみの検査とした。

3 DNA 抽出

DNA 抽出は、骨 7 試料および歯牙34試料を Mini Kit 法とフェノール・クロロホルム法で行い、骨 4 試料および歯牙 8 試料を Mini Kit 法による抽出と Prep 法で行った。

3-1 Mini Kit 法による DNA 抽出

QIAamp DNA Mini Kit のプロトコール¹⁴⁾に若干の変更を加えた方法で行った。試料を 0.5 M のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) (pH8.0) で 56℃ で一晚脱灰処理後、滅菌水で 2 回洗浄し、キットに付属のバッファー ATL を 400 μ L、プロテアーゼ K を 50 μ L 加え、56℃ で 4 時間酵素処理した。その後、10 mM Tris-HCl(pH8)-1 mM EDTA 飽和フェノールを 500 μ L 加え、20 秒間転倒混和し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を分取し、キットに付属のバッファー AL を 800 μ L 加え、混和し、さらにエタノールを 800 μ L 加え混和した。この溶液をキットに付属のカラムに入れ遠心し、コレクションチューブを換えて、溶液がなくなるまでこの操作を数回繰り返した。カラムでの DNA 精製はキットのマニュアル通りに行い、DNA の溶出は滅菌水 60 μ L を加え、室温で 15 分インキュベートしたのち、遠心した。なお、エタノールを 800 μ L 加え混和した後、白濁が観察された場合、さらにバッファー AL を 800 μ L 加え、混和し、さらにエタノールを 800 μ L 加え混和した。

3-2 フェノール・クロロホルム法による DNA 抽出

フェノール・クロロホルム法は、Imaizumi らの方法⁵⁾に従い、最終的に滅菌水で 50~100 μ L の液量となるように調製した。

Table 1 Information and condition in 53 samples.

Sample ID*	Specimen type	Estimated postmortem period	Location where it was found	Reference information
B1	Tibia	9 years	Submerged in lakewater	Partially skeletonized, adipocere
B2	Femur	< 10 years	Left in a room	Completely skeletonized
B3	Proximal Phalanx			
B4	Skull		Submerged in lakewater	Completely skeletonized
B5	Femur	unknown	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
B6	Skull	unknown	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
B7	Femur			
B8	Humerus		Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
B9	Femur	> 1 year	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
B10	Femur	> 1 year	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
B11	Femur	> 1 year	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T1	Molar	10 days	Discarded in a woodland area	Almost putrefied
T2	Premolar	2 months	Discarded in a woodland area	Completely putrefied
T3	Molar	2 months	Discarded in a woodland area	Completely putrefied
T4				
T5				
T6	Incisor	2 months	Left in a room	Putrefied (face)
T7	Molar	2 months	Riverbank	Mummified (body)
T8	Canine tooth	3 months	Left in a room	Almost putrefied
T9	Molar	4 months	Discarded in a woodland area	Mummified
T10	Molar	5 months	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T11	Molar	6 months	Discarded in a woodland area	Almost skeletonized
T12	Premolar	6 months	Discarded in a woodland area	Partially skeletonized, adipocere
T13	Incisor	6 months	Left in a room	Completely skeletonized
T14	Molar	6 months	Submerged in a river	Partially skeletonized, adipocere
T15	Molar	6 months	Discarded in a woodland area	Almost skeletonized
T16	Molar	6 months	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T17	Molar	10 months	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T18	Molar	1 year	Discarded in a woodland area	Partially skeletonized, adipocere
T19	Molar	1 year	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T20	Premolar	1 year	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T21	Molar	2 years	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T22	Molar	2 years	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T23	Molar	2 years and 9 months	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T24	Premolar	4 years	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T25	Premolar	10 years	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T26	Premolar	13 years	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T27	Premolar	unknown	Riverbank	Completely skeletonized
T28	Molar	unknown	Discarded in a woodland area	Almost skeletonized
T29	Molar	unknown	Discarded in a woodland area	Mummified
T30	Molar	unknown	Discarded in a woodland area	Almost skeletonized
T31	Canine tooth	unknown	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T32	Molar	unknown	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T33	Molar	unknown	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T34	Molar	unknown	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T35	Molar	6 months	Discarded in a woodland area	Almost skeletonized
T36	Premolar	1 year	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T37	Molar	1 year	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T38	Premolar	1 year	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T39	Premolar	1 year	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T40	Molar	1 year	Discarded in a woodland area	Completely skeletonized
T41	Premolar	3 years	Discarded in a woodland area	Almost skeletonized
T42	Incisor	unknown	Discarded in a woodland area	Almost skeletonized

* B1–B11 are bone samples and T1–T42 are tooth samples.

3-3 Prep 法による DNA 抽出

PrepFiler ExpressBTA Forensic DNA Extraction KIT の簡易操作ガイド¹⁵⁾に若干の変更を加えた方法でおこなった。試料を滅菌水で2回洗浄し、試料を十分浸すため、PrepFiler™ BTA Lysis 溶液を上記簡易操作ガイド記載の2倍量用い、56℃で4時間酵素処理した。その後、この溶液を2つに分け、それぞれ簡易操作ガイドに従い、AutoMate Express (ThermoFisher Scientific 社製) にて溶出した。溶出液を一つにまとめ、最終的に100 µL の溶出液を得た。

4 DNA の定量

溶出液のDNA定量は、ヒトゲノム定量キット (TaKaRa RR281 : タカラバイオ社製) および Quantifiler Duo DNA Quantification Kit (ThermoFisher Scientific 社製) を、それぞれ測定機器に Smart Cycler II System (Cepheid 社製) および 7500Real Time PCR System (ThermoFisher Scientific 社製) を用いて実施した。PCR 条件は、どちらのキットもキット製造元のマニュアルに従った^{16,17)}。なお、B1-B7, B9, T1-T34, T36-38およびT41についてはヒトゲノム定量キットを用い、その他の試料については Quantifiler Duo DNA Quantification Kit を使用した。

5 STR 型検査

Mini Kit 法による抽出とフェノール・クロロホルム法による抽出を行った試料については、AmpFISTR Identifier Amplification kit (ThermoFisher Scientific 社製) を、Mini Kit 法による抽出と Prep 法による抽出を行った試料は AmpFISTR Identifier Plus Amplification kit (ThermoFisher Scientific 社製) を用いた。3130xl Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific 社製) にて電気泳動し、GeneMapper ID software v 3.2.1 (ThermoFisher Scientific 社製) により解析をした。なお、PCR に用いる鋳型 DNA 量は 1 ng とした。ただし、DNA 抽出溶液 10 µL 中の DNA 量が 1 ng 以下の試料については最大添加量となる 10 µL 中に含まれる DNA 量を鋳型量とした。さらに試料によっては、PCR 阻害の有無を確認する目的で、鋳型量を 1/10 とした検査も行った¹⁸⁾。ピーク検出条件は、製造元

が推奨する設定を用い、ピーク検出の閾値は 150 RFU (Relative Fluorescence Units) とした¹⁹⁻²¹⁾。

結 果

1 Mini Kit 法とフェノール・クロロホルム法の比較

骨試料の7試料 (B1~B7) および歯牙34試料 (T1~T34) について、DNA 収量と検出座位数を Table 2 に示し、また、フェノール・クロロホルム法における収量を1としたときの Mini Kit 法の DNA 収量を Fig. 1 に示す。DNA 収量では、2試料 (T22およびT29) を除き Mini Kit 法で抽出した方が高く、6試料が10倍量以上抽出できた。STR 型検査では、フェノール・クロロホルム法の方が Mini Kit 法よりも検出座位が上回っている試料はなかった。

2 Mini Kit 法と Prep 法の比較

骨試料の4試料 (B8~B11) および歯牙8試料 (T35~T42) について、DNA 収量と検出座位数を Table 2 に示し、また、Prep 法における収量を1としたときの Mini Kit 法の DNA 収量を Fig. 1 に示す。DNA 収量では、12試料のうち8試料で Mini Kit 法で抽出した方が高かった。STR 型検査では、1試料 (T41) を除き、Prep 法の方が Mini Kit 法よりも検出座位が上回っている試料はなかった。Quantifiler Duo DNA Quantification Kit を用いて DNA 収量を測定した試料では、得られた Threshold cycle (Ct) 値と Internal PCR Control (IPC) の Ct 値との比較から PCR 阻害について検討したところ、いずれも Non-template control (NTC) における IPC の Ct 値と比較して高い数値を示さず、PCR 阻害は確認されなかった。B9, T36, T37, T38およびT41については、DNA 抽出溶液の10倍希釈液を用いての STR 型検査も行ったが、PCR 阻害は、いずれの試料についても確認されなかった。

考 察

我々は、実際の骨試料、歯牙試料からの DNA 型鑑定において、原理が異なる抽出法でダブルチェックを実施している。QIAamp DNA Mini Kit による

Table 2 Results of comparison between the phenol-chloroform method and the Mini Kit method, and results of comparison between the Prep method and the Mini Kit method for DNA yield from bone and tooth samples.

Sample ID	Quantity of extracted DNA (ng) ^{*1}			Detected Loci ^{*2}		
	Phenol-chloroform	Mini Kit	Prep	Phenol-chloroform	Mini Kit	Prep
B1	0.15 ± 0.13	8.5 ± 1.2		0	16	
B2	5.4 ± 1.6	14.4 ± 2.3		16	16	
B3	44.7	300		16	16	
B4	0.05 ± 0.07	0.78 ± 0.23		0	16	
B5	5.4 ± 2.5	11.6 ± 0.75		16	16	
B6	0.27 ± 0.09	0.43 ± 0.08		15	15	
B7	9.2 ± 1.99	24.0 ± 5.3		16	16	
T1	31.00	70.70		16	16	
T2	17.00	31.80		16	16	
T3	1.50	4.40		15	16	
T4	1.17	12.35		16	16	
T5	126.34	165.90		16	16	
T6	7.26	24.25		16	16	
T7	1.34	11.55		16	16	
T8	12.00	33.00		16	16	
T9	2.20	6.90		13	16	
T10	10.07	90.58		16	16	
T11	0.51	4.30		0	16	
T12	2.98	6.50		16	16	
T13	8.47	24.00		16	16	
T14	13.00	108.30		16	16	
T15	4.83	35.95		14	16	
T16	0.63	4.35		0	15	
T17	4.80	29.50		16	16	
T18	1.44	14.85		16	16	
T19	0.36	4.95		4	12	
T20	7.50	57.50		16	16	
T21	0.99	30.65		6	16	
T22	37.95	12.15		16	16	
T23	6.32	21.55		16	16	
T24	0.25	1.50		16	16	
T25	2.45	6.75		15	16	
T26	10.20	13.45		15	16	
T27	2.45	12.10		16	16	
T28	2.77	7.29		16	16	
T29	8.65	4.00		6	14	
T30	3.04	11.85		16	16	
T31	ND ^{*3}	0.65		0	12	
T32	12.03	88.55		16	16	
T33	6.93	25.35		16	16	
T34	16.19	60.59		16	16	
B8		14.69 ± 1.61	28.04 ± 5.82		16	16
B9		6.15 ± 2.03	2.40 ± 0.22		16	15
B10		2.79 ± 2.04	0.62 ± 0.26		16	0
B11		2.21 ± 1.03	1.06 ± 0.61		16	0
T35		1.97	0.70		16	15
T36		9.90	13.55		16	16
T37		6.05	5.65		16	16
T38		6.65	5.05		16	15
T39		8.14	0.53		16	13
T40		5.57	2.00		16	16
T41		0.55	11.55		0	16
T42		0.30	2.00		15	6

^{*1} TaKaRa RR281 was used in B1–B7, B9, T1–T34, T36–38 and T41, and Quantifiler Duo DNA Quantification Kit was used in other samples. The values in B1, B2 and B4–B11 were average ± standard deviation (n = 3).

^{*2} AmpFISTR Identifier PCR Plus Amplification kit was used. In B1, B2, B4–B11, the number of loci means the largest number of loci detected in three independence test.

^{*3} Not detected

Fig. 1 Comparison of DNA extraction methods by the amounts of DNA extracted. DNA ratios: QIAamp DNA Mini Kit:conventional (phenol-chloroform) method (●) and QIAamp DNA Mini Kit:PrepFiler Express BTA Forensic DNA Extraction Kit (▲). The T31 sample is not included because DNA was not extracted using the conventional method.

抽出は、DNA をシリカカラムに結合させ、カラムを洗浄した後で溶出させる方法である。フェノール/クロロホルムによる抽出は、プロテアーゼ処理後、フェノールにより除タンパク質を行い、水層に移行した DNA を Amicon Ultra4 (Sartorius stedim biotech 社製) により濃縮する方法である。PrepFiler ExpressBTA Forensic DNA Extraction Kit は、シリカコーティングされた磁性粒子に DNA を結合させ、磁性粒子を洗浄し、TE で溶出する方法であり、法医試料に適した検査法であると報告されている²²⁾。今回、Mini Kit 法、フェノール・クロロホルム法および Prep 法の計 3 種類の方法により行った DNA 型鑑定の結果について比較したところ、DNA 収量および STR 型解析結果に差異が見られた。

まず、DNA 収量について比較した。Mini Kit 法とフェノール・クロロホルム法とで抽出した DNA 収量を比較すると、41 試料中 39 試料で Mini Kit 法で抽出した方が収量は高かった (Fig. 1)。水野らによると、血痕から DNA を抽出する場合、QIAamp DNA Mini Kit による DNA 抽出はフェノール・クロロホルムによる DNA 抽出の 50% 程度

の抽出効率に留まっており、その原因は、タンパク分解処理後、フェノール・クロロホルムによる DNA 抽出は担体ごとフェノール処理を行うのに対し、QIAamp DNA Mini Kit は担体を取り除いた溶液をカラムに加えるため、担体上に残った DNA が回収できないためと考えている²³⁾。また、Hochmester¹⁾は緻密骨中の骨芽細胞に、今泉ら⁴⁾は骨小腔内、骨表面、骨髓腔表面に、それぞれ DNA が保持されていると考えている。今回、Mini-kit 法について、我々はメーカーのプロトコールに若干の変更を加えており、担体である骨試料および歯牙試料ごとフェノール処理した後、QIAamp DNA Mini Kit に担体を取り除いた溶液をカラムに加えた。そのため、フェノール処理で担体上に残った DNA が回収できているため、回収率が向上したと考えられる。一方、Mini Kit 法と Prep 法とで DNA を抽出した場合の収量を比較すると、12 試料のうち 8 試料で Mini Kit 法の方が収量は高く、4 試料で Prep 法の方が収量は高かった。Rothe らによると、Silica membranes のキットと Silica beads のキットでは Silica membranes の方が DNA 収量は高いと報告さ

れており¹²⁾、我々の結果も Silica membranes である Mini Kit 法の方が収量の高い試料が多かった。

次に PCR 障害について可能な範囲で考察した。Mini Kit 法もしくは Prep 法により抽出した試料のうち、DNA 収量の測定を、Quantifiler Duo により実施したものについては、得られた Ct 値と IPC の Ct 値との比較を行った。抽出した DNA 溶液に PCR 障害物質が含まれていれば、NTC における IPC の Ct 値と比較して、上昇することが知られている²⁴⁾が、B8, B10, B11, T35, T39, T40 および T42 については、いずれも NTC の Ct 値より高い数値を示さなかった。また、Mini Kit 法もしくは Prep 法により抽出した試料のうち DNA 収量の測定をヒトゲノム定量キットにより実施した B9, T36, T37, T38 および T41 については PCR 障害の可能性を考え、DNA 抽出溶液の10倍希釈液を用いて定量を行ったところ、PCR 障害はいずれの試料についても確認されなかった。これらのことから、これらの骨および歯牙中の PCR 障害物質は、Mini Kit 法もしくは Prep 法により除去されたか、もしくは今回検査した試料中には存在しないと考えられた。骨、歯牙試料ではないが、Liu や Maxim らによって、PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit では、PCR 障害物質が除去されることが述べられている^{10,22)}。

また、先ほどの Rothe らによると、Silica membranes のキットと Silica beads のキットでは、Silica beads の方が PCR 障害物質をより除去すると報告している¹²⁾。検討できた範囲内ではあるが、我々の結果では、Mini Kit 法および Prep 法のいずれからも PCR 障害は観察されなかった。一方、PCR 障害の確認を行っていない試料 B1~B7, T1~T34 のうち、T29 ではフェノール・クロロホルム法の収量が 8.65 ng であり、収量から考察すると、すべての座位の STR 型を検出するのに十分量の DNA が抽出されているが、一部の型のみしか検出されておらず、フェノール・クロロホルム法では 1 試料で PCR 障害の可能性が考えられた。

さらに、T29 を除く試料について、DNA 収量と STR 型検査結果から PCR 障害の可能性を検討した。Allelic drop out が観察されたものもしくはすべての座位において DNA 型が検出されなかったも

のは、DNA 濃度が低い試料であった。井口らによると、すべてのローカスについて、解析後のピーク高が 150 RFU 以上となり、本来のアレルが過不足無く検出されたのは、鋳型 DNA 量が AmpFI STR Identifier Amplification kit では 0.5 ~ 1 ng, AmpFI STR Identifier Plus Amplification kit で 28 サイクルでは 0.25 ~ 1 ng であったことが報告されている²¹⁾。井口らの報告と濃度に若干の差異はあるが、我々が鑑定した試料でも一部の型が不検出であったものは、DNA 収量の低いものであり、STR 型検出率は PCR 障害の可能性より DNA 収量に依存していると考えられ、DNA 収量が高い Mini Kit 法が他の 2 種の抽出方法より、骨、歯牙の DNA 抽出には優位と考えられた。

最後に、我々は、実際の鑑定結果より、各抽出法の差異について比較してきたが、本報は研究ではないため DNA 溶液の濃度および DNA の分解度の差異について十分に検討できていない。各抽出法の最終溶出量は Mini Kit 法が 60 μ L、フェノール・クロロホルム法が 50 ~ 100 μ L、Prep 法が 100 μ L であり、溶出後に濃縮操作は実施していないため、DNA 濃度はそれぞれ違っていると考えられる。そのため、溶出液量の多いフェノール・クロロホルム法や Prep 法では溶出液の濃縮操作を行えば、DNA 溶液の濃度が高くなり、より多くの DNA 型を検出できる可能性も考えられた。また、エレクトロフェログラムから、短鎖側はピーク高が高く、長鎖側はどピーク高が低くなる ski slope effect が観察される試料が存在し、特にフェノール・クロロホルム法による T3, T25, T26 や Prep 法による B9, T38 は、長鎖側の座位の一部型が検出されておらず、DNA の分解が推定された。これら試料についても、DNA 溶液を濃縮することで、さらに多くの座位を検出できる可能性は考えられた。しかしながら、3 種の抽出法の中では、Mini Kit 法が高濃度の DNA 溶液が回収でき、また分解していると考えられる試料からもより多くの DNA 型が検出されていることから、最も良質の DNA を回収できていると考えられた。今回、分解した DNA と各抽出キットの関連性について十分に検討できなかったが、低濃度の DNA 溶液および分解の進んだ DNA は STR 型検査結果に

多大な影響を与える。そのため、変死事案における骨や歯牙のような試料は DNA の分解が予想されるため、予め DNA 溶液の濃度と分解度を把握してから STR 型検査の鋳型量を定めるのが望ましいと考えられ、今後、DNA の分解を測定できる定量方法を用いて、DNA の抽出方法について検討する必要があると考えられた。

我々は、実際の骨および歯牙の鑑定において 3 種類の抽出法を用いた場合の結果を比較した。骨試料では Mini Kit 法ですべての骨で STR 型が検出された。また、歯牙試料についても、1 試料を除いて、Mini Kit 法は他の 2 種の抽出法と比較し、より多くの座位が検出されていた。これは、Mini Kit 法が、STR 型検出に良質且つ十分量の DNA を他の 2 種類の方法より抽出できることを示しており、腐敗もしくは白骨した変死体の骨、歯牙からの DNA 抽出には、Mini Kit 法を優先的に使用することで STR 型判定の確実性が高まるものと考えられる。

文 献

- 1) Hochmeister N M., Budowle B., Borer U V., Eggmann U., Comey C T. and Dirnhofer R., Typing of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Extracted from Compact Bone from Human Remains. *J. Forensic Sci.*, **36**, 1649–61, 1991.
- 2) 吉野峰生, 君島哲夫, 宮坂祥夫, 佐藤 元, 三宅文太郎, 瀬田秀茂, 白骨死体からの DNA 型分析—骨および歯の微細構造との関連性について—. 科学警察研究所報告法科学編, **45**, 1–9, 1992.
- 3) Fisher D L., Holland M M., Mitchell L., Sledzik P S., Webb Wilcox A., Wadhams M., and Weedn V W., Extraction, Evaluation, and Amplification of DNA from Decalcified and Undecalcified United States Civil War Bone. *J. Forensic Sci.*, **38**, 60–68, 1993.
- 4) 今泉和彦, 松田秀明, 窪田 聡, 宮坂祥夫, 吉野峰生, 骨試料の DNA タイピングにおける脱灰処理およびグラスビーズ処理の効果. 科学警察研究所報告法科学編, **51**, 61–70, 1998.
- 5) Imaizumi K., Noguchi K., Shiraishi T., Sekiguchi K., Senju H., Fujii K., Yoshida K., Kasai K., Yoshino M., DNA typing of bone specimens—the potential use of the profiler test as a tool for bone identification. *Legal Med.*, **7**, 31–41, 2005.
- 6) 渡辺剛太郎, 法科学的試料からの DNA 抽出における QIAamp DNA mini kit の有用性. 鑑識科学 **9**, 49–58, 2004.
- 7) Davoren J., Vanek D., Konjhodzic R., Crews J., Huffine E. and Parsons J T., Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat Med. J.*, **48**, 478–485, 2007.
- 8) Kitayama T., Ogawa Y., Fujii K., Nakahara H., Mizuno N., Sekiguchi K., Kasai K., Yurino N., Yokoi T., Fukuma Y., Yamamoto K., Oki T., Asamura H. and Fukushima H., Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method. *Legal Med.*, **12**, 84–89, 2010.
- 9) Vanek D., Silerova M., Urbanova V., Saskova L., Dubska J. and Beran M., Genomic DNA extraction protocols for bone samples: The comparison of Qiagen and Zymo Research spin columns. *Forensic Sci. Int.: Genetics Supplement*, Series 3, e397–e398, 2011.
- 10) Liu Y J., Zhong C., Holt A., Lagace R., Harrold M., Dixon B A., Brevnov G M., Shewale G J. and Hennessy K L., AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System for the extraction of genomic DNA from biological samples. *J. Forensic Sci.*, **57**, 1022–1030, 2012.
- 11) Marshall L P., Stoljarova M., Schmedes E S., King L J. and Budowle B., A high volume extraction and purification method for recovering DNA from human bone. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **12**, 155–160, 2014.
- 12) Rothe J. and Nagy M., Comparison of two silica-based extraction methods for DNA isolation from bones. *Legal Med.*, **22**, 36–41, 2016.
- 13) Izawa H., Tsutsumi H., Maruyama S. and

- Komuro T., DNA analysis of root canal-filled teeth. *Legal Med.*, **27**, 10–18, 2017.
- 14) QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. Second Edition, November 2007.
- 15) PrepFiler™ Express BTA Forensic DNA Extraction Kit 簡易操作ガイド2010年9月版
- 16) タカラバイオ株式会社, ヒトゲノム定量キット Ver.2(RR281) 説明書, 2011.
- 17) Applied Biosystems, Quantifiler Duo DNA Quantification Kit User's manual, 2008.
- 18) 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. 日本法科学技術学会誌. **12**, 13–26, 2007.
- 19) 井口奨太, 北山哲史, 藤井宏治, 中原弘明, 水野なつ子, 関口和正. AmpFISTR Identifiler Plus Kit の法科学資料への応用に関する評価. 日本法科学技術学会誌, **17**, 1–14, 2012.
- 20) 吉田日南子, 高橋健一, 笠井賢太郎. AmpFISTR Identifiler PCR amplification kit の法科学試料への応用に関する検討. 科学警察研究所報告. **57**, 49–56, 2006.
- 21) 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). 科学警察研究所報告. **58**, 32–36, 2007.
- 22) Brevnov G M., Pawar S H., Mundt J., Calandro M L., Furtado R M., and Shewale G J., Developmental validation of the PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit for extraction of genomic DNA from biological samples. *J. Forensic Sci.*, **54**, 599–607, 2009.
- 23) 水野なつ子, 関口和正, 笠井賢太郎: 血痕からの DNA 抽出における各種 DNA 精製キットの評価 [第3報]. 科学警察研究所報告法科学編, **15**, 64–67, 1998.
- 24) Barbisin M., Fang R., O'Shea E C., Calandro M L., Furtado R M. and Shewale G J., Developmental validation of the Quantifiler Duo DNA Quantification Kit for simultaneous quantification of total human and human male DNA and detection of PCR inhibitors in biological samples. *J. Forensic Sci.*, **54**, 305–319, 2009.