早期公開
—技術報告—

TaqMan 法に基づくヒト DNA 定量キットの比較

深川貴志, 綿引晴彦, 三田裕介, 北山哲史, 藤井宏治, 水野なつ子

科学警察研究所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1

Comparison of human DNA quantification kits based on a TaqMan assay

Takashi Fukagawa, Haruhiko Watahiki, Yusuke Mita,
Tetsushi Kitayama, Koji Fujii and Natsuko Mizuno

*National Research Institute of Police Science
6-3-1, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan*

(Received 21 June 2021; accepted 7 September 2021;

Published online 14 October 2021 in J-STAGE DOI: 10.3408/jafst.821)

Human DNA quantification is an important step for subsequent short tandem repeat (STR) analysis and interpretation because it can provide various information on the quantity and quality for the extracted DNA. In this study, we compared four commercially available quantification kits based on a TaqMan assay and an intercalating-dye based quantification kit. The following three points were investigated: 1) variations of the average peak heights among individuals when 1 ng of DNA, the amount being determined by each quantification kit, was amplified using GlobalFiler and Yfiler Plus PCR Amplification Kits, 2) effect of the presence of a female DNA on the quantification of male DNA, and 3) relationship between “Degradation Index” and the STR electropherograms. The average peak heights generated using GlobalFiler showed less individual-dependent variations in the four TaqMan based kits than the intercalating-dye based kit. The average peak heights generated using Yfiler Plus showed similar variations among the three TaqMan based kits capable of male DNA quantification along with total human DNA. The presence of a large amount of female DNA had little effect on male DNA quantification in all the three kits. When highly degraded DNA samples were quantified, the “Degradation Indices” differed significantly among three kits. It was probably due to the different amplicon sizes of the long fragment targets among kits. Before implementing a new human DNA quantification kit in casework, it is essential to understand the characteristics of the adopted quantification kit.

Key words: Forensic science, Human DNA quantification kit, Degradation index

緒 言

現在、DNA 型鑑定による個人識別では、Short Tandem Repeat (STR) 領域を検査する STR 型検査が主流となっている。

STR 型検査においては、まず試料から抽出精製した DNA 溶液についてヒト DNA 定量を行い、DNA の量および品質を確認し、適切な鋳型 DNA 量から STR 領域を PCR 増幅する。次に、多色の蛍光色素により標識された増幅産物をキャピラリー電気泳動装置により分離および検出し、解析ソフトウェアでピークを検出し型判定を行う¹⁾。ヒト DNA 定量では、用いる試薬によっては、ヒト DNA の量だけでなく、阻害物質の存在、ヒト DNA の変性の程度、男性 DNA の存在およびその量などの情報も得ることもできる²⁻⁴⁾。これらの情報は、PCR 反応液の調整に用いるほか、STR 型検査で最終的に得られるエレクトロフェログラムの解釈にも非常に有用であることから、ヒト DNA 定量は STR 型検査において重要な工程の一つといえる。

法科学分野におけるヒト DNA 定量には、リアルタイム PCR 装置を用いた定量 PCR 法が用いられることが多い。現在、定量 PCR 法を用いたヒト DNA 定量キットは、日本の警察で広く用いられているタカラバイオ製のヒトゲノム DNA 定量キット Ver.2⁵⁾をはじめとした複数のキットが販売されている。これらのヒト DNA 定量キットの標的配列には、検出感度の向上のために、ヒトゲノム上に複数コピーが存在する配列（以下「マルチコピー配列」）が主に用いられている^{2-4,6)}。

定量 PCR 法の 1 つである TaqMan 法に基づくヒト DNA 定量キットには、アプライドバイオシステムズ製の Quantifiler Trio DNA Quantification Kit および Quantifiler HP DNA Quantification Kit、プロメガ製の PowerQuant System ならびにキアゲン製の Investigator Quantiplex Pro などがある。これらの定量キットは、いずれも複数の常染色体上に存在する短めのマルチコピー配列、長めのマルチコピー配列および Y 染色体上のマルチコピー配列（ただし Quantifiler HP は除く）を同時に定量可能であ

る²⁻⁴⁾。また、これらの定量キットは、いずれも開発時の検証 (Developmental validation) が行われており^{2,7-9)}、キットの性能などの様々な項目について検証されている。しかしながら、検証はキットごとに異なる検証用試料が用いられているため、各キットの検証結果を単純に比較することはできない。またキット間で増幅する標的配列は異なるため、同一試料に対して各キットがどのような定量結果を示すかについては不明である。さらに各キットで増幅されるマルチコピー配列は、個人間で保有するコピー数が異なるコピー数多型が存在する^{10,11)}ため、キットと試料の組み合わせによっては適切な定量値が得られない可能性がある。そこで本研究では、各種定量キットから得られた定量値により鋳型 DNA 量を調整した場合における STR 型検査の個人間のピーク高のばらつき、女性 DNA の存在が男性 DNA の定量値に及ぼす影響および Degradation Index（試料 DNA の変性の程度を表す指標、以下「DI 値」）とエレクトロフェログラムの関係性の 3 項目について、同一試料を複数のヒト DNA 定量キットで測定することで比較した。

材料および方法

1 ヒト DNA 試料

本研究の実施およびヒト試料の収集は、科学警察研究所ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号：32-1 (74)）。

成人日本人男性 8 名、成人日本人女性 7 名から採取した血液、ならびに作製から 1 年、5 年、10 年、15 年、18 年、21 年、24 年および 25 年経過した 1 名分の陳旧血痕から、EZ1 DNA Investigator kit（キアゲン）を用いて DNA を抽出した。また、成人日本人女性 1 名から採取した血液から、QIAamp DNA Investigator kit（キアゲン）を用いて DNA を抽出し、Concentrator 5301（エッペンドルフ）により DNA 溶液を真空濃縮した。

2 ヒト DNA 定量

DNA 溶液は、QuantStudio 5 Real-Time PCR System（アプライドバイオシステムズ）または 7500 Real-Time PCR System（アプライドバイオシステムズ）を用いて、最大 5 種類のヒト DNA 定量キッ

ト (Qunatifiler Trio DNA Quantification Kit (以下「Trio」, アプライドバイオシステムズ), Qunatifiler HP DNA Quantification Kit (以下「HP」, アプライドバイオシステムズ), PowerQuant System (以下「PQ」, プロメガ), Investigator Quantiplex Pro Kit (以下「QPP」, キアゲン) およびヒトゲノムDNA定量キット Ver.2 (以下「TK2」, タカラバイオ)) によるヒト DNA 定量を行った. TK2 は TaqMan 法ではなくインターカレーター色素に基づいたヒト DNA 定量キットであるが, 現在警察で広く用いられているキットであることから, TaqMan 法に基づくキットとの比較のために用いた. 反応は, Trio, HP, PQ および QPP については QuantStudio 5 用のマニュアル^{2,3,12)}に, TK2 については 7500 Real-Time PCR System 用のマニュアル⁵⁾に従って行った. なお, データコレクションおよび解析ソフトは, Trio および HP については HID Real-Time PCR Analysis Software v1.3 を, PQ および QPP については Design and Analysis Software v1.5.1 を, TK2 については HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2 を用いた. 抽出 DNA 溶液はそれぞれ 2 μ L を用い, 反応は 3 回ずつ実施した. 定量値は, 3 回の結果の平均とした.

なお, TK2 以外のキットでは複数の標的配列が存在するが, その標的配列はキットにより名称が異なるため, その標的配列の名称について, 常染色体

上の短い方の標的配列を「Short」, 常染色体上の長い方の標的配列を「Long」, および Y 染色体上の標的配列を「Y」とした (Table 1). TK2 においては, 標的配列が 1 種類であり, その塩基長が他キットの Long と類似していることから, 標的配列の名称を「Long」とした (Table 1).

3 STR 型検査

GlobalFiler PCR Amplification Kit (以下「GF」, アプライドバイオシステムズ) および Yfiler Plus PCR Amplification Kit (以下「YFP」, アプライドバイオシステムズ) を用いて, STR 型検査を行った. 検査は, それぞれのユーザーガイド^{13,14)}に従って行った. PCR 増幅に用いた鋳型 DNA 量は, GF では「Short」の定量値 (TK2 のみ「Long」の定量値) を, YFP では「Y」の定量値を基に 1 ng とした. PCR サイクル数は GF では 29 サイクル, YFP では 30 サイクルとした. PCR 装置は GeneAmp PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズ) を用い, 電気泳動装置は 3500xL Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) を用いた.

データコレクションソフトには 3500 Series Data Collection Software v3.1 (アプライドバイオシステムズ) を用いた. 電気泳動は, GF または YFP のユーザーガイド^{13,14)}に従って行った.

泳動データの解析は, GeneMapper ID-X Software v1.4 (アプライドバイオシステムズ) を用

Table 1 Targets name and amplicon size of the each human DNA quantification kit.

Quantification kit	Target length (bp)			Assay
	Short autosomal target (Short)	Long autosomal target (Long)	Y chromosome target (Y)	
Quantifiler Trio DNA Quantification Kit	80	214	75	TaqMan
Quantifiler HP DNA Quantification Kit	80	214	—	TaqMan
PowerQuant System	84	294	81 & 136	TaqMan
Investigator Quantiplex Pro	91	353	81	TaqMan
Human DNA Quantification Kit Ver.2	—	207	—	TB Green*

* TB Green is synthesized by Takara Bio and has the same chemical structure as that of SYBR Green I.

いた．解析に必要なパネルなどのファイルは，アプライドバイオシステムズブランドを有するサーモフィッシャーサイエンティフィック社が提供をしている GlobalFiler v1.0.1 (https://downloads.thermofisher.com/GlobalFiler_Analysis/GlobalFiler_Analysis_Files_v1.0.1X.zip) を用いた．解析においては，スタターフィルターを有効にして解析し，スタター排除の閾値はサーモフィッシャーサイエンティフィックが設定した Marker specific stutter ratio の値^{13,14)}とした．ピークの検出閾値は，著者らが過去に STR 型検査キットの評価^{15,16)}において採用した値である 175 RFU とした．なお，明確なブルアップと判断できたピーク¹⁷⁾およびアーティファクトと判断できたピーク^{14,18)}は除外した．

4 定量キット間の比較

以下の 3 項目について，定量キット間で比較した．特に記載がない限り，定量値の比較には Short の定量値を，男性 DNA の定量値の比較には Y の定量値を用いた．

4.1 各種定量キットから得られた定量値により鋳型 DNA 量を調整した場合の STR 型検査のピーク高の個人間のばらつき

成人日本人男性 6 名および成人日本人女性 6 名の血液から抽出した DNA 溶液について，まず Trio を用いてヒト DNA 定量を行い，その結果に基づいて約 1 ng/μL になるように希釈した．希釈 DNA 溶液を 5 種類のキットで定量し，各キットの定量結果を基にして STR 型検査を行った．なお，STR 型検査には GF を用いた．また，Trio，PQ および QPP については，男性試料に対して YFP も実施した．各試料について，3.5 反応分の反応液を 1 つのチューブに調製したのち，チューブ 3 本に 1 反応分ずつ分注して，同時に PCR を行った．

STR 型検査のピーク高のばらつきの評価には，エレクトロフェログラムのアレルピーク高を用いた．まず，各エレクトロフェログラムの各検査座位のピーク高を，以下の(1)から(6)のとおりにしてアレル 1 個分のピーク高に換算した．

- (1) GF において検査座位の STR 型がヘテロ接合体の場合：2 本のピーク高を平均した．
- (2) GF において検査座位の STR 型がホモ接合

体の場合：ピーク高を 1/2 にした．

- (3) GF の Yindel 座位 および DYS391 座位：ピーク高をそのまま用いた．
- (4) YFP において DYS385 座位 および DYF387S1 座位を除く検査座位：ピーク高をそのまま用いた．
- (5) YFP の DYS385 座位：6 試料すべてで DYS385 座位のピークは 2 本であったことから，2 本のピーク高を平均した．
- (6) YFP の DYF387S1 座位：コピー数多型が報告されている¹⁹⁾ため，まず相対的 PCR 増幅効率 (RA) を既報¹⁹⁾から一部改変し，次の式で算出した．

$$RA = \frac{1}{3} \left(\frac{23h_1}{H_1} + \frac{23h_2}{H_2} + \frac{23h_3}{H_3} \right)$$

h_i は i 番目の反応における DYF387S1 座位のアレルピーク，マイナススタターおよびプラススタターのピーク高の合計値であり， H_i は i 番目の反応における DYS385，DYF387S1 を除く座位のアレルピーク，マイナススタターおよびプラススタターのピーク高の合計値である．各スタターのピーク高は，スタターフィルターを無効にして泳動データを再解析し，取得した．6 試料のうち，RA が 1 程度になった 2 試料 (RA : 1.041 および 1.088) ではピークが 1 本であったので，ピーク 1 本につきアレル 1 個分と判断し，ピーク高をそのまま用いた．また，RA が 2 程度になった 4 試料 (RA : 2.097, 2.110, 2.211 および 2.346) ではピークが 2 本であったので，ピーク 1 本につきアレル 1 個分と判断し，2 本のピーク高を平均した．

次に，各エレクトロフェログラムについて全検査座位のアレル 1 個分のピーク高から平均を算出し，その値を「そのエレクトロフェログラムの換算ピーク高」とした．同一個人の 3 反応分の「そのエレクトロフェログラムの換算ピーク高」の平均を算出し，その値を「その個人のアレル 1 個分のピーク高」とした．GF では 12 試料分の「その個人のアレル 1 個分のピーク高」から，YFP では 6 試料分の「その個人のアレル 1 個分のピーク高」から変動係数

(標準偏差/平均値)を算出した。

4.2 女性 DNA の存在が男性 DNA (Y) の定量値に及ぼす影響

成人日本人男性 3 名, 成人日本人女性 2 名の血液から抽出した DNA 溶液および成人日本人女性 1 名の血液から抽出し濃縮した DNA 溶液を用いて実施した。各抽出 DNA 溶液について, まず Trio でヒト DNA 定量を行ったのち, その定量値に基づいて「男性 DNA 濃度が一定の男女混合 DNA 溶液」および「合計 DNA 濃度が一定の男女混合 DNA 溶液」を調整した。「男性 DNA 濃度が一定の男女混合 DNA 溶液」では, 男性 DNA 濃度の終濃度を $0.02 \text{ ng}/\mu\text{L}$ とし, 男性 DNA 濃度: 女性 DNA 濃度が $1:0$, $1:1$, $1:5$, $1:25$, $1:125$, $1:625$, $1:3125$ となるように調整した。「合計 DNA 濃度が一定の男女混合 DNA 溶液」では, 混合後の合計 DNA 濃度の終濃度が $0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ とし, 男性 DNA 濃度: 女性 DNA 濃度が $1:0$, $80:1$, $40:1$, $20:1$, $10:1$, $4:1$, $2:1$, $1:1$, $1:2$, $1:4$, $1:10$, $1:20$, $1:40$, $1:80$, $0:1$ となるように調整した。なお, 「合計 DNA 濃度が一定の男女混合 DNA 溶液」は, 男女ともに異なる個人試料の 2 種類の組み合わせのものを調整した。

調整した各混合 DNA 溶液について, Trio, PQ および QPP により DNA を定量した。

4.3 DI 値とエレクトロフェログラムの関係性

1 年, 5 年, 10 年, 15 年, 18 年, 21 年, 24 年および 25 年経過した 1 名分の陳旧血痕から抽出した DNA 溶液を用いた。各抽出 DNA 溶液について, Trio, HP, PQ および QPP により DNA を定量し, DI 値を算出した。DI 値の算出は, Trio および HP ではデータコレクションおよび解析ソフトの標準機能により, PQ では PowerQuant Analysis Software v1.0 により, QPP では QIAGEN Quantification Assay Data Handling and STR Setup Tool v3.4.3 により算出した。Trio の定量結果を基にして GF を実施した。

結果および考察

1 各種定量キットから得られた定量値により鋳型 DNA 量を調整した場合の STR 型検査のピーク高の個人間のばらつき

各定量キットから得られた定量値により鋳型 DNA 量を揃えたときの STR 型検査のピーク高における個人間のばらつきを検証するために, 各試料の「その個人のアレル 1 個分のピーク高」から平均値, 標準偏差および変動係数を算出した (Table 2)。

GF における Trio, HP, PQ および QPP の個人間の変動係数はそれぞれ 0.0964 , 0.1040 , 0.1293 および 0.1136 と 0.1 付近の値であったのに対し, TK2

Table 2 Coefficient of variation (CV) calculated from “adjusted one-allele peak height in electropherogram” of 12 individuals (GlobalFiler) or 6 individuals (Yfiler Plus).

Quantification kit	GlobalFiler (n=12)			Yfiler Plus (n=6)		
	Mean (RFU)	SD (RFU)	CV	Mean (RFU)	SD (RFU)	CV
Quantifiler Trio DNA Quantification Kit	5819	561.0	0.0964	5991	1092	0.1823
Quantifiler HP DNA Quantification Kit	6796	706.6	0.1040	—*	—*	—*
PowerQuant System	7263	939.3	0.1293	10370	1417	0.1366
Investigator Quantiplex Pro	8682	986.7	0.1136	8469	1467	0.1732
Human DNA Quantification Kit Ver.2	4257	931.0	0.2187	—*	—*	—*

* STR analysis using Yfiler Plus was not performed because these kits do not quantify Y chromosome.

の個人間の変動係数は0.2187であり、他のキットに比べて約2倍高い値となった (Table 2). この結果から、同一キットから得られた定量値を基に鋳型 DNA 量を調整して PCR をした場合、TK2 では他のキットに比べて、試料の由来となる個人によって STR 型検査結果のピーク高がより変動する可能性が示唆された. 変動係数が大きい原因の一つとして、TK2 では他の 4 種類のキットよりも、標的配列のコピー数多型の個人差が大きい可能性が考えられる.

また、YFP における個人間の変動係数は Trio が 0.1823, PQ が 0.1366, QPP が 0.1732 であり (Table 2), Trio および QPP は近い値となったが、PQ はそれらより小さい値であった. この結果から、同一キットから得られた Y の定量値を基に鋳型 DNA 量を調整して PCR をした場合、Y-STR 型検査結果のピーク高の変動は、Trio と QPP では同程度であり、PQ は Trio および QPP に比べて変動がより

少ない可能性がある.

2 女性 DNA の存在が男性 DNA (Y) の定量値に及ぼす影響

最初に、男性 DNA 濃度が一定の男女混合 DNA 溶液についてそれぞれのキットで定量をしたところ、いずれのキットについても、Y の定量値はほぼ一定であり、Short の定量値は女性 DNA 濃度に応じた値を示した (Fig. 1).

次に、合計 DNA 濃度が一定の男女混合 DNA 溶液について、それぞれのキットで定量をしたところ、いずれのキットについても、Short の定量値はほとんど一定であり、Y の定量値は男性 DNA 濃度に応じた値を示した (Fig. 2). しかしながら、2 種類の混合の組み合わせのうち、「組み合わせ 1」の Trio (Fig. 2A) および QPP (Fig. 2C), 「組み合わせ 2」の QPP (Fig. 2F) では、男性 DNA の混合比率が高い場合に、Short と Y の定量値の乖離がみられた. なお、これらの例では男性 DNA のみを定

Fig. 1 The mean quantification results for the mixture of the male DNA with the high concentrated female DNA in triplicate using Quantifiler Trio DNA Quantification Kit (Trio), PowerQuant System (PQ) and Investigator Quantiplex Pro (QPP).

Fig. 2 The mean quantification results for the two male/female mixture samples (Mixture 1: Panel A–C, Mixture 2: Panel D–F) with constant total DNA concentration in triplicate Quantifiler Trio DNA Quantification Kit (Trio), PowerQuant System (PQ) and Investigator Quantiplex Pro (QPP). Both male/female donors were different between the two mixtures.

量した場合 (男性 DNA 濃度 : 女性 DNA 濃度が 1 : 0) においても同様の傾向となったことから、乖離の原因は男性 DNA と定量キットの組み合わせにあると考えられる。一方、PQ では男性 DNA のみを定量した場合においても、Short と Y の定量値の乖離はみられなかった (Fig. 2B, E)。Trio および QPP と異なり、PQ では Y の標的配列が 2 種類と

なっている (Table 1)。これは、標的配列のコピー数のばらつきが Short と Y の定量値の比に与える影響を最小限に抑えるためと PQ のマニュアル³⁾に説明されており、今回 PQ において Short と Y の定量値に乖離が生じなかった要因である可能性がある。また、Trio および QPP でみられた Short と Y の定量値の乖離は、Short の定量値よりも Y の定量

値の方が高くなる場合のみであった (Fig. 2A, C, F). しかし, 男性 DNA と定量キットの組み合わせによっては, Short の定量値よりも Y の定量値の方が低くなり, 男性 DNA のみの定量にも関わらず女性 DNA が混合しているような定量結果となることも考えられることから, 定量の結果のみから男女混合の推定には限界があることに留意する必要がある.

3 DI 値とエレクトロフェログラムの関係性

DI 値 (Degradation Index) は, 試料 DNA の変性の程度を示す指標であり, Short の定量値を Long の定量値で除算することで算出される. 経過年数の異なる陳旧血痕から抽出した各 DNA 溶液について, それぞれのキットにより定量したときの Short の定量値, Long の定量値および DI 値を Table 3 に示す. また, 各 DNA 溶液を STR 型検査して得られたエレクトロフェログラムをアレル検出率が高い順に並べ, 対応する各キットの DI 値を Fig. 3 に示す.

これらの結果から, 同じ DNA 溶液でもキットによって DI 値に差がある場合があり, 特にアレル検出率が 85.4%~41.5% の DNA 溶液では, キット間の DI 値の差が大きくなっていた. 4 種類のキットのうち, Trio と HP では, すべての試料から DI 値が算出され, アレル検出率が 53.7% (21 年経過血痕) および 41.5% (18 年経過血痕) の 2 試料を除いて, DI 値は近い値となった. アレル検出率が高い順に並べた場合, Trio と HP による DI 値はアレル検出率 80.5% (15 年経過血痕) までは最大 5.74 と低い値で推移していたが, アレル検出率 53.7% から DI 値は最低でも 31.4 と高い値を示した (Fig. 3). 一方, PQ および QPP では, アレル検出率が 100% の 4 試料では DI 値が最大でも 7.14 と低い値であったものの, アレル検出率が 85.4% (25 年経過血痕) および 80.5% (15 年経過血痕) の試料では PQ の DI 値はそれぞれ 32.75 および 32.14, QPP の DI 値はそれぞれ 106.38 および 155.81 と高い値を示しており, Trio および HP, PQ ならびに QPP のあいだで DI 値に大きな差が生じていた (Fig. 3). また, PQ ではアレル検出率が 41.5% の試料において, QPP ではアレル検出率が 53.7% および 41.5% の試料において,

Table 3 The mean quantification results (n=3) for various old bloodstain samples among Quantifiler Trio DNA Quantification Kit (Trio), Quantifiler HP DNA Quantification Kit (HP), PowerQuant System (PQ) and Investigator Quantiplex Pro (QPP).

Age	Kit	Short (ng/ μ L)	Long (ng/ μ L)	Degradation Index
1 year	Trio	2.1961	2.1841	1.01
	HP	2.2432	2.1607	1.04
	PQ	2.1821	2.4555	0.89
	QPP	2.2819	2.4092	0.95
5 years	Trio	2.5117	3.4521	0.73
	HP	2.7171	3.5284	0.77
	PQ	2.5977	2.2668	1.15
	QPP	2.8647	1.7131	1.67
10 years	Trio	1.4140	0.8838	1.60
	HP	1.4319	0.8705	1.65
	PQ	1.4408	0.3628	3.97
	QPP	1.4986	0.2102	7.14
15 years	Trio	0.5716	0.1038	5.51
	HP	0.5533	0.0967	5.74
	PQ	0.6566	0.0204	32.14
	QPP	0.6263	0.0041	155.81
18 years	Trio	0.1040	0.0003	533.07
	HP	0.0911	0.0016	56.57
	PQ	0.1060	N.D.	—
	QPP	0.0908	N.D.	—
21 years	Trio	0.2115	0.0024	88.97
	HP	0.1917	0.0062	31.34
	PQ	0.2360	0.0004	544.69
	QPP	0.1923	N.D.	—
24 years	Trio	2.1137	1.7900	1.18
	HP	2.2185	1.7401	1.28
	PQ	2.2104	0.7687	2.88
	QPP	2.3516	0.5851	4.02
25 years	Trio	0.8233	0.1667	4.95
	HP	0.8157	0.1613	5.08
	PQ	0.9900	0.0302	32.75
	QPP	0.9320	0.0088	106.38

N.D. means not detected and “—” means that degradation index could not be calculated since the DNA quantity of the long fragment was not determined.

Fig. 3 The relationship of Degradation Index and electropherograms. “-” means that degradation index was not calculated. Electropherograms are listed in the descending order of allele detection rate. For the samples with allele detection rate 100%, the summation of Degradation Index of the 4 kits is arranged in ascending order.

Long の定量値が検出限界以下になったため、DI 値が算出されなかった (Fig. 3, Table 3)。

Table 3 より、同じ DNA 溶液であれば Short の定量値はキットにかかわらず近い値となったが、Long の定量値はキットによって大きく異なる場合があった。Short の定量値が近い値となった理由としては、Short の標的配列の塩基長が Trio および HP は 80 bp, PQ は 84 bp, QPP は 91 bp と類似していることが挙げられる (Table 1)。一方で、Long の定量値におけるキット間の差は、Long の標的配列の塩基長が Trio および HP では 214 bp, PQ では 294 bp, QPP では 353 bp と大きく異なることから生じたと考えられる (Table 1)。このことから、異なるキット間での DI 値の比較は困難と考えられる。

これらの比較検討から、同じ TaqMan 法に基づ

いたヒト DNA 定量キットでも、キットごとに異なる特徴があることがわかった。ヒト DNA 定量キットを鑑定実務で使用する際には、これらの特徴を理解しておくことが必要である。

文 献

- 1) Butler J. M., Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J. Forensic Sci.*, **51**, 253–265, 2006.
- 2) Thermo Fisher Scientific, User Guide: Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits. available from [<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485354.pdf>], accessed Jun 21, 2021.
- 3) Promega, Technical Manual: PowerQuant® System. available from [<https://www.promega.com>].

- jp/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/powerquant-system-technical-manual.pdf?la=en], accessed Jun 21, 2021.
- 4) Qiagen, Handbook: Investigator® Quantiplex® Pro Handbook. available from [https://www.qiagen.com/jp/resources/download.aspx?id=901fab34-fae8-4247-bc24-057840b27c50&lang=en], accessed Jun 21, 2021.
- 5) タカラバイオ株式会社, ヒトゲノム DNA 定量キット Ver.2 (RR281) 説明書, 2011.
- 6) 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.
- 7) Allison H., Sharon C. W., Julio J. M., Pius M. B., Emanuel L. and Robert L. G., Developmental validation of the Quantifiler® HP and Trio Kits for human DNA quantification in forensic samples. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **21**, 145–157, 2016.
- 8) Ewing M. M., Thompson J. M., McLaren R. S., Purpero V. M., Thomas K. J., Dobrowski P. A., DeGroot G. A., Romsos E. L. and Storts D. R., Human DNA quantification and sample quality assessment: Developmental validation of the PowerQuant® system. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **23**, 166–177, 2016.
- 9) Qiagen, Validation Report: Developmental validation of the Investigator® Quantiplex® Pro Kit. available from [https://www.qiagen.com/jp/resources/download.aspx?id=e80c5169-8cd1-4906-9359-de26fa0afdcf&lang=en], accessed Jun 21, 2021.
- 10) Feuk L., Carson A. R. and Scherer S. W., Structural variation in the human genome. *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 85–97, 2006.
- 11) Krenke B. E., Nassif N., Sprecher C. J., Knox C., Schwandt M. and Storts D. R., Developmental validation of a real-time PCR assay for the simultaneous quantification of total human and male DNA. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **3**, 14–21, 2008.
- 12) Qiagen, Supplementary Protocol: Investigator® Quantiplex® Pro Protocol for the Applied Biosystems® QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System.
- 13) Thermo Fisher Scientific, User Guide: GlobalFiler™ and GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kits. available from [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4477604.pdf], accessed Jun 21, 2021.
- 14) Thermo Fisher Scientific, User Guide: Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit. available from [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485610_YfilerPlus_UG.pdf], accessed Jun 21, 2021.
- 15) 藤井宏治, 綿引晴彦, 三田裕介, 北山哲史, 中原弘明, 水野なつ子, 関口和正, GlobalFiler による STR 型検査の法科学的評価. 日本法科学技術学会誌, **21**, 1–23, 2016.
- 16) 綿引晴彦, 藤井宏治, 深川貴志, 三田裕介, 北山哲史, 中原弘明, 水野なつ子, 関口和正, Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit を用いた Y-STR 型検査の法科学的評価日本法科学技術学会誌, **23**, 13–34, 2018.
- 17) Fujii K., Fukagawa T., Watahiki H., Mita Y., Kitayama T. and Mizuno N., Ratios and distances of pull-up peaks observed in GlobalFiler kit data. *Leg. Med.*, **34**, 58–63, 2018.
- 18) Thermo Fisher Scientific, Technical Note: Artifacts Identified Post – Developmental Validation: GlobalFiler and GlobalFiler IQC PCR Amplification Kits. available from [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/Technical-Notes/globalfiler-kit-artifacts-tech-note.pdf], accessed Jun 21, 2021.
- 19) Watahiki H., Fujii K., Fukagawa T., Mita Y., Kitayama T. and Mizuno N., Differences in D17S11 copy number distribution among haplogroups caused by haplogroup-specific ancestral Y-chromosome mutations. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **48**, 102315, 2020.