

1 研究課題名

DNA型分析の迅速化と高度化に関する研究

2 研究担当者

主研究担当者 北山 哲史 法科学第一部生物第四研究室
他研究員6名

3 研究期間

平成27年4月～平成31年3月（4年計画）

4 研究予算

平成27年度	28,427千円
平成28年度	27,625千円
平成29年度	47,166千円
平成30年度	32,412千円

5 研究の目的

様々な事件でDNA型鑑定が活用されている中、DNA型鑑定の迅速化や多数の資料の処理が求められている。このような問題の解決のため、DNA型鑑定手順を自動化して迅速に検査する装置（全自動DNA型分析システム）、多数の資料を同時に検査できる装置（次世代シーケンサー）を用いたDNA型分析手法を個人識別へ導入するための研究を行う。

6 成果

(1) 当初予定していた成果

本研究では、下記の成果が得られた。

- 1) 全自動DNA型分析システムについて、口腔内細胞を資料として、多量DNA用カートリッジを使用してSTR型検査を実施したところ、アレリックラダーの成功率は約90%であり、アレリックラダーが成功した資料に限れば約92%の資料が成功と判定された。また、血液を資料とした場合、多量DNA用カートリッジでは成功率が低い、少量DNA用カートリッジを使用する又は資料の前処理を実施することにより成功率が大きく向上すると判明した。遺体から採取した心臓血・筋肉を資料とした場合、新鮮な資料について、多量DNA用カートリッジでは約80%、少量DNA用カートリッジでは約90%の資料で成功と判定された。腐敗した資料について、多量DNA用カートリッジでは約14%、少量DNA用カートリッジでは約67%の資料で成功と判定された。いずれの資料においても、キャピラリー電気泳

動によるSTR型検査と比較して、DNA型を検出できたものについては、DNA型が変化して検出される例はなく、原則、両プラットフォームにより分析した資料間においても、DNA型を比較対照できると判明した。以上のように、分析に適した資料の状態・種類と分析の成功率を検討し、本研究により、全自動DNA型分析システムによるSTR型検査法が確立された。

全自動DNA型分析システムは、全行程の自動化により90分で検査が可能、条件を定めれば専門家による解析なしに正確な型判定が可能、クリーンルーム外での動作が可能であり、処理能力の向上につながるので、DNA型分析の迅速化に活用できると判明した。

- 2) 次世代シーケンサーにより、78個の口腔内細胞について、ForenSeqキットによるSTR型検査を実施し、キャピラリー電気泳動法によるSTR型検査と比較したところ、DNA型が変化して検出される例はなかった。また、82個の口腔内細胞について、GlobalFilerNGSv2キットによるSTR型検査を実施したところ、D2S441、D10S1248、D12S391、D1S1677ローカスにおいて、バイオインフォマティクスの問題が原因と考えられるDNA型の不一致が観察されたので、次世代シーケンサーによるSTR型検査とキャピラリー電気泳動によるSTR型検査によるDNA型は単純比較できないことが判明した。次世代シーケンサーはキャピラリー電気泳動法と比較して、10個のSTRローカスの41個のホモ接合体について、塩基配列分析に基づき配列の異なる2個のアレルのヘテロ接合体と分類できたことから識別力が高まることが確認できた。以上のように、キャピラリー電気泳動法によるDNA型との比較対照において、留意する点が認められたものの、本研究により、次世代シーケンサーによるSTR型検査法が確立された。

次世代シーケンサーは、一回で検査できるマーカーの数を増やすことが可能であり、STRの繰り返し回数だけではなく塩基配列分析による細分化も可能であることから、識別力の向上につながり、DNA型分析の高度化に活用できると判明した。

- (2) 当初予定していなかったが副次的に（あるいは発展的に）得られた成果

キャピラリー電気泳動法によるPowerPlexFusionキットを用いたSTR型検査のD12S391ローカスにおいて、日本人1501例のうち、22型アレル：9例、25型：1例、26型：1例から移動度のずれ（ビン右端から最大+0.12bp）によるオフラダーが観察された。本研究における次世代シーケンサーによるSTR型検査により、PowerPlexFusionキットを用いたSTR型検査のD12S391ローカスにおいてにオフラダー判定が頻出する主な原因は、そのアレリクラーダーの塩基配列が変異アレルと大きく異なるためと考えられた。

- (3) 当初想定していたが得られなかった成果なし。

7 成果の発表

(1) 論文・ノート (欧文)

- 1) Allele frequencies for 21 autosomal short tandem repeat loci obtained using GlobalFiler in a sample of 1501 individuals from the Japanese population., Fujii K, Watahiki H, Mita Y, Iwashima Y, Kitayama T, Nakahara H, Mizuno N, Sekiguchi K., *Legal Medicine*, 17(5), 306-8, 2015
- 2) D5S818 typing discrepancy between PowerPlex® Fusion and other STR kits including GlobalFiler® caused by a one-base deletion in 31 nucleotides upstream of the repeat region., Fujii K, Iwashima Y, Watahiki H, Mita Y, Kitayama T, Nakahara H, Mizuno N, Sekiguchi K., *J Forensic Sci.*, 61(3), 752-8, 2016
- 3) Next-generation sequencing analysis of off-ladder alleles due to migration shift caused by sequence variation at D12S391 locus., Fujii K, Watahiki H, Mita Y, Iwashima Y, Miyaguchi H, Kitayama T, Nakahara H, Mizuno N, Sekiguchi K., *Legal Medicine*, 22, 62-7, 2016
- 4) Typing concordance between PowerPlex® Fusion and GlobalFiler® based on 1501 Japanese individuals and the causes of typing discrepancies., Fujii K, Watahiki H, Mita Y, Iwashima Y, Kitayama T, Nakahara H, Mizuno N, Sekiguchi K., *Forensic Sci Int Genet.*, 25, e12-3, 2016
- 5) Estimation of the number of contributors to mixed samples of DNA by mitochondrial DNA analyses using massively parallel sequencing., Nakanishi H, Fujii K, Nakahara H, Mizuno N, Sekiguchi K, Yoneyama K, Hara M, Takada A, Saito K., *Int J Legal Med.*, 134, 101-9, 2020
- 6) Evaluation of Rapid DNA system for buccal swab and disaster victim identification samples., Kitayama T, Fukagawa T, Watahiki H, Mita Y, Fujii K, Unuma K, Sakurada K, Sekiguchi K, Mizuno N., *Legal Medicine*, Minor Revision, February 15, 2020

(2) 論文・ノート (和文)

- 1) D12S391座位において観察されたオフラダーアレルの次世代シーケンサー(NGS)による塩基配列解析, 藤井宏治, 綿引晴彦, 三田裕介, 宮口一, 北山哲史, 中原弘明, 水野なつ子, 関口和正, *DNA多型*, 24, 232-5, 2016

(3) 学会発表

- 1) Evaluation of the quality of STR profiles generated by modified Rapid DNA systems., Kitayama T, Watahiki H, Mita Y, Fujii K, Nakahara H, Sekiguchi K., 26th World Congress of the International Society for Forensic Genetics, 157, 2015
- 2) STR型検査キット間で観察された不一致例の解析, 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, 日本法科学技術学会第21回学術集会、A28、2015
- 3) D12S391座位において観察されたオフラダーアレルの次世代シーケンサー(NGS)による塩基配列解析, 藤井宏治、綿引晴彦、三田裕介、宮口一、北山哲史、中原弘明、水野なつ子、関口和正, 日本DNA多型学会第24回学術集会、P24、2015
- 4) Evaluation of the Expert Systems of Rapid DNA instruments., Kitayama T, Mizuno N., The 27th International Symposium on Human Identification, 102, 2016
- 5) 全自動DNA型分析システムの評価, 北山哲史、綿引晴彦、三田裕介、藤井宏治、中原弘明、水野なつ子、関口和正, 第100次日本法医学会学術全国集会, B27, 2016
- 6) An Evaluation of the Quality of Short Tandem Repeat (STR) Profiles Generated by Rapid DNA Instruments., Kitayama T, Fukagawa T, Watahiki H, Mita Y, Fujii K, Mizuno N., American Academy of Forensic Sciences 70th Annual Scientific Meeting, B109, 2018
- 7) Evaluation of the quality of STR profiles by Rapid DNA Instruments for disaster victim identification, Kitayama T., 7th European Academy of Forensic Science Conference, P133, 2018
- 8) The Evaluation of the Short Tandem Repeat (STR) Genotype Concordance Between Massively Parallel Sequencing (MPS) and Capillary Electrophoresis (CE) STR Kits in Japanese Population Samples., Kitayama T, Fukagawa T, Watahiki H, Mita Y, Fujii K, Mizuno N., American Academy of Forensic Sciences 71st Annual Scientific Meeting, B129, 2019
- 9) Relation between stutter ratio and the DNA sequence: further improvement of explaining distribution of stutter ratio at complex repeat loci., Inokuchi S, Fujii K, Nakanishi H, Takada A, Saito K, Mizuno N., 28th World Congress of the International Society for Forensic Genetics, P22, 2019