

## 今回検証したプロトコル機関

1. 京都大学（京都）
2. 福岡大学（福岡）
3. 大阪医科薬科大学（大阪）

### 1) 骨片の採取

#### ・今回実施した方法

1. DNA 抽出の元となる骨の初期状態をそろえるため、骨の切り出し方法は各機関のプロトコルでの方法ではなく、骨の一部を歯科用ダイヤモンドカッターで切り出し、それを概ね3等分し、その後の操作を各機関のプロトコルに従って実施した。

福岡と大阪は2) 試料の洗浄へ。京都は次のステップへ。

2. 京都：(アンケート引用)

- ・骨片をビニル袋（ラミジップクリア LZ-9）に入れ、ハンマー（アズワン整形用ステンレスハンマー）、（アズワン SUS ハンマー）で叩いて砕く。
- ・袋が破れてきたら新しい袋に入れ替え3～5mm 角程度まで砕く。

#### (感想・その他)

- 試料となる骨の切り出し方法は抽出対象である骨の初期状態を揃えるために統一したが、その後のハンマーで骨を砕く作業（京都のみ）を今回実施してみて、①袋が破れる、②袋から骨片を回収するのに手間取る感じがした。
- 今回はすべてダイヤモンドカッターで切り出しを行ったが、糸鋸で切り出す（京都）際には、複数検体の場合、骨それぞれで糸鋸を替えるのか、糸鋸を再利用する場合の洗浄方法等が気になるところである。
- 以前、大阪は表面を削っていたが現在は行っていない。

#### 参考：アンケートによる各機関の骨の切り出し方法

##### ・京都大学（アンケート引用）

糸鋸(HOZAN K-128 金切鋸)を使用して骨片を切出す。

##### ・福岡大学

歯科用ドリル(Ultimate 500)、Separating discs(サンデンタル社)を使用して骨片を切り出す。(アンケート引用)

##### ・大阪医科薬科大学（アンケート引用）

歯科用ダイヤモンドカッターにて適当な大きさに骨を切り出す。例えば、長管骨であれば1cm幅ぐらいの輪切り。

## 2) 試料の洗浄

### ・京都（アンケート引用）

プレ脱灰(洗浄を兼ねて)。

・骨片を 50ml チューブに入れ、0.5M EDTA pH8.0 を入れて超音波洗浄後、攪拌しながら 2 日間かけて脱灰する。

・初めは液がすぐに汚れるので、洗浄を兼ねて EDTA の交換は 5~10 分を目安に繰り返す。

### ・福岡、大阪

歯ブラシを使って中性洗剤で用手洗浄。精製水でリンスした後、エタノールでリンスして乾燥させる。

(感想・その他)

- 福岡と大阪ではほぼ同様の方法をとっているが、京都ではかなり異なる。
- 洗浄前段階のハンマーで骨を砕く（京都）という工程において、骨の状態によって、ハンマーで砕いただけで粉末状になるものや、なかなか砕けないもの様々であり、粒状のものについては上記作業（京都）は容易であるが、既に粉末状のものは（おそらく検査しても検出はされないと思う）遠心しても EDTA 溶液中に試料が沈殿せずに浮遊しており、EDTA 交換の度に試料が失われ減少し、骨によっては最終段階で試料がほとんどなくなってしまうものもあった（下記写真参照）。
- 超音波洗浄は取り入れたいと感じたが、骨片にする前（切り出し後）で良いのでは？



### 3) 骨粉への調整

#### ・京都、大阪

骨片を Multi-beads Shocker(YASUI KIKAI)を用いて骨粉にする。

#### ・福岡

歯科用ドリル(Ultimate 500)、Separating discs(サンデンタル社)を使用して約 1-2 mm 厚の細骨片を作成する。(当機関の歯科用ダイヤモンドカッター使用)

#### (感想・その他)

- 大阪のアンケートで報告した方法は歯科用ダイヤモンドカッターで骨片を採取するとしたが、福岡と方法が同じなので今回の検証は Multi-beads Shocker (MBS) で骨粉にした (以下、MBS 骨粉化という)。
- 福岡の方法では骨切り出し→洗浄→骨片の操作となるが、2 回骨を切る操作を行うこととなり操作が煩雑 (個人の主観) であるように感じる、京都のハンマーで砕く方法が簡便で有効であると感じた。
- 京都の方法ではメタルコーンに試料がこびりついて回収できない場合があった (プレ脱灰で骨によっては EDTA 液がしみ込んでいるためか?)。
- 大阪では以前は洗浄の代わりに骨の表面を削り、切り出しと同時に骨片状にしていたが、現在では上記のように、切り出し→洗浄→MBS 骨粉化の方法を行っている (表面は削らない)。

### 4) 脱灰

#### ・京都 (アンケート引用)

・骨粉を 50ml チューブに入れ、0.5M EDTA pH8.0 を入れて、37°C、1000rpm で インキュベート。数時間おきに EDTA を交換する。

・液が白く濁らず透明になるまで繰り返す。

#### ・福岡 (アンケート引用) (→: 今回行った方法)

約 500mg (→前記切り出した骨の約 1/3 量ずつとしたので必ずしも 500mg とは限らない) 程度の骨粉を 30ml (→15ml) チューブに入れ、0.5M EDTA pH8.0 を 30ml (→15ml で実施) 入れて 1 日半かけて脱灰する。ときどき攪拌する。

(→プロトコルは 30ml であるが、今回は 15ml チューブを使用、条件を揃えるため 1 回 EDTA を交換した。)

#### ・大阪

骨粉を 15ml チューブに入れ、0.5M EDTA pH8.0 を 15ml 入れてローターで緩やかに振

盪しながら脱灰する。約1日半。途中で1回EDTAを交換した。

(感想・その他)

- ▶ 福岡と大阪は概ね同じ方法である。
- ▶ 京都はプレ脱灰と合わせてEDTAが大量に必要となる。

## 5)DNA抽出

・京都 (アンケート引用) (→:今回行った方法)

- ・ QIAmp Investigator Kit(QIAGEN)を用いて DNA を抽出する。
- ・ 脱灰後の骨粉の入った 50ml チューブを、3500rpm 5 分間遠心して EDTA を取り除き、Buffer ATL を骨粉の容積の 2 倍程度添加し共洗いする。
- ・ 再び遠心し(同条件)、Buffer ATL を取り除き、1000 $\mu$ l の Buffer ATL、200 $\mu$ l の Proteinase K を添加する。
- ・ 56°C、1000rpm で 1~2 時間程度インキュベート。
- ・ 14,000rpm 5 分間遠心後、上清を新しい 15ml チューブに取り、フェノールクロロホルムを等量添加し、約 5 分間軽く攪拌。
- ・ 14,000rpm 5 分間遠心し、水層を新しい 50ml チューブに取り、PB Buffer (QIAquick PCR Purification Kit)を 5 倍量添加した後、QIAamp MinElute Column に 700 $\mu$ l ずつアプライ→8,000rpm 1 分間遠心。この工程を、全ライセートがなくなるまで繰り返す。以降、手順はプロトコルに従う。溶出にはプロトコル記載の「Buffer ATE」ではなく、Teknova DNA Suspension Buffer (T0223) (→TE) を用いる。(→ TE 50 $\mu$ l で溶出)

・福岡 (アンケート引用) (→:今回行った方法)

試料に Wako の DNA エキストラクター FM キットの溶解液 400 $\mu$ l と Sigma の proteinase K (→QIAGEN Protease) を 100 $\mu$ l 加え 37°Cで溶解する。溶解液を Qiagen の QIAquick PCR Purification Kit を用いてプロトコルに従って抽出するが、洗浄は 3 回行い、洗浄試薬、溶出試薬以外の量は同率に増量して抽出を行う。(→ TE 50 $\mu$ l で溶出)

・大阪

- ・ 試料に Wako の DNA エキストラクター FM キットの溶解液 190 $\mu$ l と キットに添付の proteinase K を 10 $\mu$ l 加え 56°Cで O/N 溶解する。骨が溶解していないようであれば proteinase K を 10 $\mu$ l 追加する。
- ・ 溶解液と等量のフェノール添加後 5 分間振盪後遠心し上清を回収、上清に等量のフェノールクロロホルムを添加後、5 分振盪後遠心し上清を回収。上清液を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL)を用いてプロトコルに従って DNA を精製。TE 50 $\mu$ l で溶出。

(感想・その他)

- 京都で使用の Teknova DNA Suspension Buffer (T0223)の組成が TE と思われるので TE で実施。
- Qiagen の PB Buffer を使用すると、溶液の 5 倍量を添加しなくてはならず、元の溶液の量が多いと全量がかかなり多くなり、カラムでの精製が大変である。

## 6)DNA の定量

Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて定量。

## 7)PCR

- ・ 今回の実証実験では Globalfiler を用いた。
- ・ PCR 条件は全量 15  $\mu$ l に試料 3  $\mu$ l を用い、30 サイクルで増幅。

## 8)電気泳動

- ・ PCR 産物の 2  $\mu$ l を泳動
- ・ それ以外の条件はデフォルトのまま。

## 9)結果の検証

- ・ DNA 回収率、DNA 型検出では結果は福岡の方法でもっとも良い結果を得た。
- ・ 回収量及び DNA 型判定の結果を表及びグラフに示す。
- ・ DNA 型判定の基準は GF のアレル数 (21  $\times$  2=42+Yinel+Amelogenin+DYS391:合計 46 アレル) のうち判定できたアレル数とする。

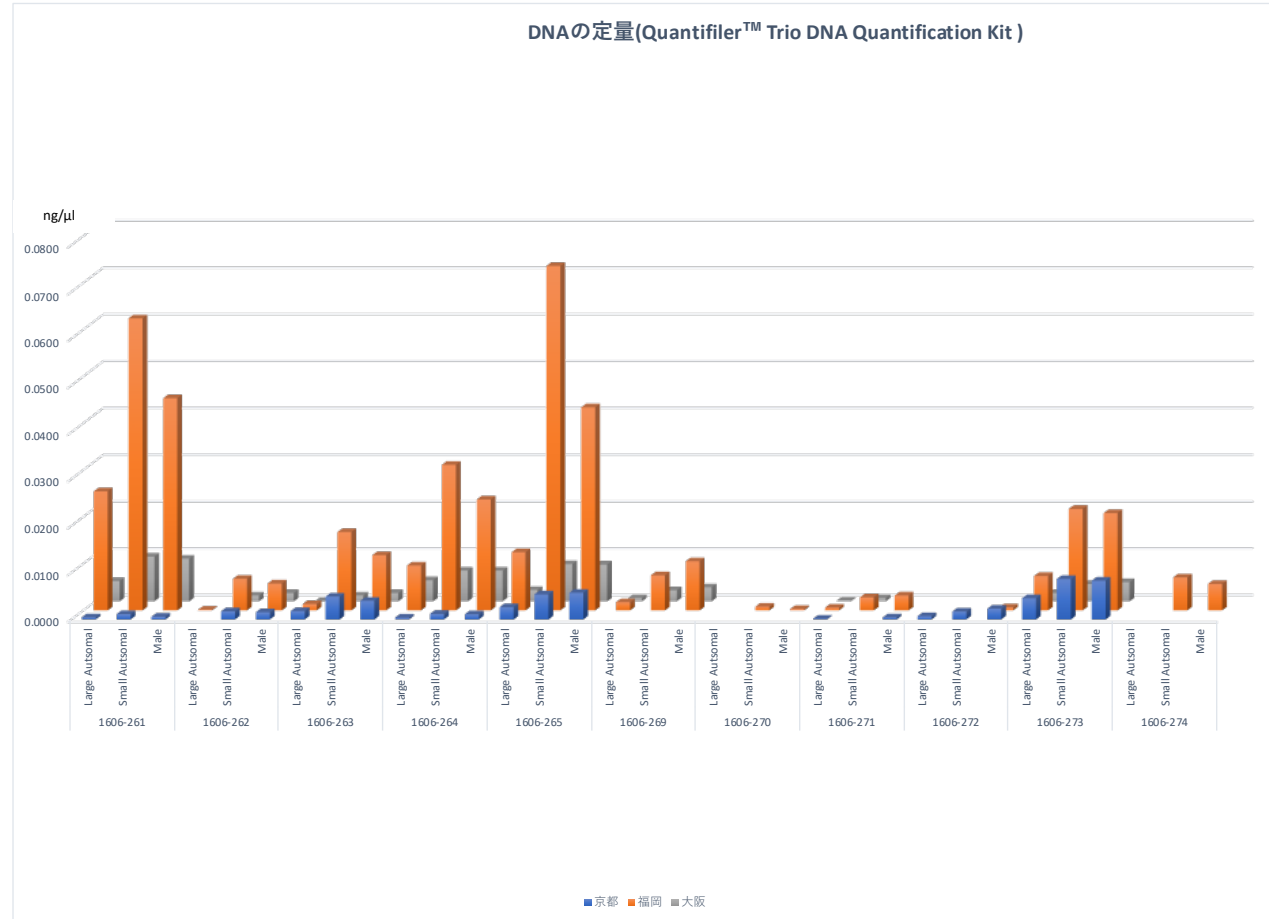
検証をまとめると、

- ・ 骨片もしくは骨粉 (以前検討したところ特に差は無いように思う) の脱灰は 2 日前後で十分。
- ・ 脱灰液 (EDTA) は頻繁に交換の必要ない (途中 1 回くらい)。
- ・ 脱灰過程では、静置し攪拌は期間中数回でよい。
- ・ DNA 溶解液は FM キット添付の溶解液と Investigator Kit 添付の ATL とでは DNA 回収に大差はなかったが、経験則として、FM キットの溶解液の方が骨の溶解が良いと感じる。
- ・ PK は最初から多めに用いた方が途中で足すより良いように感じる。
- ・ フェノールクロロホルム精製は施さないほうが良い。

※歯についての検証は、歯の試料がなかったことと、3 機関で条件を揃えることが困難であると推定されるため、骨のみの検証とした。

DNA定量結果

遺骨番号	ng/μl	京都	福岡	大阪
1606-261 (4.6g)	Large Autosomal	0.0005	0.0255	0.0044
	Small Autosomal	0.0012	0.0624	0.0096
	Male	0.0006	0.0454	0.0091
1606-262 (5.3g)	Large Autosomal	-	0.0002	-
	Small Autosomal	0.0018	0.0068	0.0013
	Male	0.0016	0.0058	0.0018
1606-263 (7.3g)	Large Autosomal	0.0018	0.0014	-
	Small Autosomal	0.0049	0.0168	0.0013
	Male	0.0040	0.0118	0.0018
1606-264 (5.2g)	Large Autosomal	0.0004	0.0096	0.0045
	Small Autosomal	0.0012	0.0311	0.0066
	Male	0.0011	0.0237	0.0066
1606-265 (4.4g)	Large Autosomal	0.0027	0.0125	0.0024
	Small Autosomal	0.0054	0.0736	0.0080
	Male	0.0057	0.0434	0.0079
1606-269 (2.4g)	Large Autosomal	抽出時に試	0.0018	0.0007
	Small Autosomal	料消失	0.0075	0.0024
	Male		0.0105	0.0030
1606-270 (2.1g)	Large Autosomal	抽出時に試	-	-
	Small Autosomal	料消失	0.0008	-
	Male		0.0003	-
1606-271 (2.4g)	Large Autosomal	0.0002	0.0006	0.0002
	Small Autosomal	-	0.0028	0.0007
	Male	0.0005	0.0032	-
1606-272 (2.0g)	Large Autosomal	0.0007	-	-
	Small Autosomal	0.0017	-	-
	Male	0.0023	0.0007	-
1606-273 (4.9g)	Large Autosomal	0.0046	0.0074	0.0018
	Small Autosomal	0.0087	0.0217	0.0037
	Male	0.0083	0.0208	0.0041
1606-274 (5.0g)	Large Autosomal	抽出時に試	-	-
	Small Autosomal	料消失	0.0071	-
	Male		0.0057	-



切り出した骨を概ね三等分し、各機関のプロトコルに従ってDNA抽出を行った

検出アレル数

	京都	福岡	大阪
1606-261	5	43	34
1606-262	6	11	12
1606-263	27	29	21
1606-264	2	36	36
1606-265	30	42	36
1606-269	消失	8	17
1606-270	消失	1	0
1606-271	1	8	5
1606-272	3	0	0
1606-273	28	28	26
1606-274	消失	2	2

3機関の試料を同条件で検出した場合の検出アレル数/46(GF:21×2+Yindel+AmelogeninXY+DYS391)

RFUは150

- 本来のアレルではないピークが検出された試料（検出アレルにはカウントしていない）
- 試料の型を確定できなかつたので正しいアレルが検出されているかは不明

