

論文審査の結果の要旨

氏名：野上 宏 明

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Quenching Probe 法による歯髄 DNA からの性別判定

審査委員：（主査） 教授 白川 哲夫 ㊞

（副査） 教授 小室 歳信 ㊞ 教授 鈴木 直人 ㊞

教授 高橋 富久 ㊞

法医学鑑識領域における身元不明死体の個人識別は、性別判定が先ず行われる。近年はヒトの試料から抽出した DNA をもとに、性染色体を鑑定し判定することが行われるようになった。性染色体に異常があると XXY あるいは XYY もしくは XO などが出現するが、いずれにしても X のみが検出されれば女性と、Y が検出されれば男性と判定することは可能である。性染色体のなかで性別の検査に資するローカスが多々あるなかで、法医学領域では X および Y 染色体短腕上のセントロメア付近に位置するアメロゲニン遺伝子領域が信頼性の高いローカスとして評価されている。

ところが最近では、アメロゲニン遺伝子領域における X および Y 特異塩基配列が分解される、あるいは Y 特異塩基配列において広範な欠失が存在し PCR 産物を得ることができない場合のあることも分かってきており、鑑定の実務においては PCR 産物が存在しないことによる性別の誤判定を看過することのないように注意が必要である。また、現行の性別判定法は、シーケンサーを用いた capillary gel electrophoresis (CGE) 法による DNA 型解析が一般的であり、PCR 増幅されたアメロゲニンローカスの X および Y 特異塩基配列の DNA サイズを見比べることによって結果を導いている。鑑定試料の外観をみたとき、陳旧度が高いことから、抽出される DNA はかなり低分子化されているであろうと推測できる場合があり、そのようなときは結果の正当性を担保するためにも通常行われている CGE 法とは異なる解析法で検討し、性別を判定することが欠かせない。

本研究で用いた Quenching Probe (QP) 法は、蛍光標識したシトシン塩基を末端に持ち、標的遺伝子に特異的に結合するように配列を設計した Qprobe を用い、それが標的遺伝子と結合するとグアニン塩基の影響を受けて蛍光が減少し、昇温とともに解離する際の蛍光強度を測定して標的遺伝子の SNP タイピングを可能とする解析法である。このように本法は従来の CGE 法とはまったく異なった解析法であり、双方の結果が一致すれば判定結果の信頼性はより高まることになる。

そこで著者は、白骨死体や高度に腐乱した死体の性別判定に資することを目的に、室内に 5 年～26 年間保存された歯から採取した歯髄 DNA を試料とし、性染色体上のアメロゲニン遺伝子領域に位置する X および Y 特異塩基配列を指標とした QP 法による性別判定の可否について検討している。

その結果、以下の結論を得ている。

1. 本法の解析を可能とする鋳型 DNA 量について検討したところ、その最終濃度は 2 ng に調整して用いれば良いことが判明した。
2. 本法の解析可能とする PCR サイクルについて検討したところ、男女各試料の X 特異塩基配列および男性試料の Y 特異塩基配列のいずれも PCR サイクルを 35 サイクル以上で行えば安定した PCR 産物を得ることが可能であった。
3. 本法は非特異的反応が認められず、また解析時間を 50 分程度で終わることができることから、特異性、迅速性かつ検出感度に優れた解析法であることが判明した。
4. 陳旧歯髄から抽出した DNA において、XQprobe および YQprobe の解離ピーク温度が 69°C 付近で認められ、性別判定は可能であった。

以上のように、本研究は身元不明死体の性別判定において、現在頻用されている CGE 法とはまったく別の解析技術について検討し、その方法論を確立したものであり、さらに特異性、迅速性および検出感度においても優れていることを検証したものであることから、法医学および歯科法医学領域の鑑定および研究

の発展に寄与するところ大と考えられた。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成26年1月23日