

# Quenching Probe 法による歯髄 DNA からの性別判定

野上宏明

日本大学歯学部法医学講座

ランニングタイトル：Quenching Probe 法による歯髄 DNA からの性別判定

要旨：

室内にて 5～26 年間保存されていた 32 例（男性 20 例，女性 12 例）の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 Quenching Probe (QP) 法による性別判定の可否について検討した。

Quenching Probe 法とは，特殊な蛍光色素が標識されたシトシン塩基にグアニン塩基が結合した場合に蛍光が減少する，すなわち「蛍光消光現象」を利用した遺伝子解析法である。

まず，本法による鋳型 DNA 量と PCR 産物との関係を検討したところ，鋳型 DNA 量を最終濃度 2 ng に調整して用いることにより，安定した PCR 産物，すなわち増幅された X および Y 特異塩基配列の得られることが判明した。また，PCR サイクルについて検討したところ，35 回以上で行えば安定した PCR 産物の得られることが判明した。さらに，陳旧歯髄 32 例について検討したところ，女性試料では X 特異的 Qprobe のみの，また男性試料では X および Y 特異的 Qprobe の解離ピーク温度が 69°C 付近で認められ，すべての例で性別判定は可能であった。

本法は迅速性，特異性および検出感度に優れており，法医鑑識上，有用性の高い解析法であると思われる。

キーワード：個人識別，性別判定，歯髄，アメロゲニン，Quenching Probe 法

## 緒 言

わが国の法医学鑑識領域において DNA 鑑定による個人識別が始まって四半世紀になろうとしている。今では、4 兆 7000 億人に一人にまで絞り込むことができるほど、鑑定精度は向上している<sup>1)</sup>。さらに近年、鑑定のための世界共通の常染色体、X 染色体および Y 染色体 STR (short tandem repeat : 短鎖縦列反復配列) 型解析用キットが開発・市販され、それらの解析結果は全世界において共有も可能であることから、自国の犯罪者はもとより国際的なテロリストの検挙にまでも利用できるようになった。わが国の警察庁では犯罪者の DNA 型をデータベース化し、個々の事案に際して遺留された体液斑痕等試料から得られた DNA 型と照合することにより容疑者の検挙ならびに余罪の追求等に利用しているところである。

常染色体 STR 15 ローカスの解析用キットには、X および Y 染色体上に位置しエナメル質形成に関与するアメロゲニン遺伝子領域を指標とする性別判定が組み込まれている<sup>2)</sup>。法医学領域ではこのアメロゲニンローカスの capillary gel electrophoresis (CGE) 法による解析結果をもとに性別を判定することがほぼ定着している。ところで、鑑定試料は汚染、希釈および陳旧化などを避けることができず、古い試料になればなるほど検査にあたり、性染色体上に位置する X および Y 特異塩基配列の両者が PCR 増幅された場合は男性と判定されるが、X 特異塩基配列のみが PCR 増幅された場合は女性と判定してよいのか、あるいは男性にもかかわらず DNA が断片化されたために Y 特異塩基配列が増幅されないのか<sup>3,4)</sup>など、判定に苦慮することはよく経験するところである。このような場合、鑑定結果の正否を評価するためにも、別の DNA 型解析技術による鑑定が求められ、その鑑定法の開発が強く望まれる。

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な配列に設計した Qprobe は、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著しく減少する。この蛍光消光現象を利用し、その際の蛍光強度を測定することで、標的遺伝子の SNP (single nucleotide polymorphism : 一塩基多型) タイピングを行うことができる Quenching Probe (QP) 法が 2004 年に開発された。QP 法は、薬物の代謝酵素の遺伝子多型を検査し、副作用を抑えて患者に応じた安全な薬物治療に資するため<sup>5)</sup>、また血液疾患における遺伝子変異を検索するため<sup>6)</sup>など、主に臨床医学において利用されている。法医学領域において QP 法を用いた報告例は、堤ら<sup>7-9)</sup>および Tsutsumi ら<sup>10)</sup>が血液、血痕および歯髄を試料として ABO 式および Rh 式血液遺伝子型検査を行い、それぞれの型判

定が可能であることを報告したのが初めてである。また、QP法を性別判定に応用し報告したのも堤および著者ら<sup>11)</sup>が初めてである。

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、室内にて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た。

## 試料および方法

### 1. 試料

室内にて5年～26年間保存された血縁関係のない32例(女性12例, 男性20例)の歯を試料とした。

### 2. 歯髄からのDNA抽出

歯を生理食塩水で洗浄した後、0.5 M EDTA で24時間脱灰し、再び生理食塩水で洗浄した。つぎに脱灰した歯に、500  $\mu$ l TNE 緩衝液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl), 125  $\mu$ l SDS(最終濃度2%, 和光純薬)および6  $\mu$ l プロテナーゼ K(最終濃度100  $\mu$ g/ml, Merck)を加え、56°Cで一昼夜酵素処理し、フェノール・クロロホルム法およびエタノール沈殿によりDNAを抽出した。DNA量は分光光度計(Spectrophotometer ND-1000, NanoDrop)を用いて260 nmで測定したところ、10～40 ng/ $\mu$ lであった。

### 3. PCR法

#### 1) PCRプライマー

Y特異的フォワードプライマーは5'-tggattct tcatccaaa taaagtg-3'(nt274-298)および同リバープライマーは5'-tcgga ttgactctt cctcct-3'(nt407-427)とし、Y特異的Qprobe(YQprobe)は5'-cagtttaa gctctgatgg ttggcctc-3'(nt344-369)の5'末端に蛍光標識FAMを付加し、3'末端をリン酸化させて用いた。また、X特異的フォワードプライマーは5'-tcct gattctaaga tagtcacact-3'(nt616-639)および同リバープライマーは5'-aga ctccgagaa cagc-3'(nt697-713)とし、X特異的Qprobe(XQprobe)は5'-ctatgtgtgt ctcttgcttg cctctg-3'(nt640-665)の3'末端に蛍光標識HEXを付加し用いた。なお、各プライマーおよび各Qprobeは著者が設計し、日鉄環境エンジニアリング社に依頼して合成した。

#### 2) 増幅反応液

PCR反応液は、PCRチューブに1×LightCycler480 Genotyping Master(ロッシュ), X特

異的フォワードプライマー0.3  $\mu\text{M}$ , X 特異的リバープライマー1.0  $\mu\text{M}$ , XQprobe 0.2  $\mu\text{M}$ , Y 特異的フォワードプライマー0.15  $\mu\text{M}$ , Y 特異的リバープライマー0.5  $\mu\text{M}$  および YQprobe 0.05  $\mu\text{M}$  を注入し, さらにウラシル-DNA グリコシラーゼ, 0.01 units/ $\mu\text{l}$  (熱感受性) およびリファレンス dye 0.05  $\mu\text{l}$  を注入した後, 試料 DNA を加え, さらに滅菌水を加えて 20  $\mu\text{l}$  とした。

### 3) PCR 条件および解離曲線解析

PCR 増幅は予備加熱 95°C で 10 秒間行った後, 熱変性を 95°C で 10 秒間, アニーリングを 59°C で 30 秒間, 伸長を 72°C で 15 秒間を 50 サイクル行った。ついで, 解離曲線解析のために増幅液を 95°C で 15 秒間作用させた後に温度を 45°C に下げて 60 秒間作用させ, 1 秒間に 0.2°C ずつ昇温させて Qprobe が解離し蛍光が徐々に増加する反応を 80°C まで行い, その後 10 秒間維持した。なお, PCR 増幅および解離曲線解析は Stratagene Mx3000P (アジレントテクノロジーズ) を用いて行った。

### 4. 性別の判定

性別の判定は, X および Y 特異的プライマーにより増幅された PCR 産物に結合した XQprobe のみを昇温させることで蛍光強度が増加して解離ピークが出現した場合を女性, 同じく XQprobe および YQprobe それぞれの解離ピークが出現した場合を男性とした。なお, 本検査法の結果の正否については, ライフテクノロジーズジャパン社の Identifiler キットに組み込まれたアメロゲニン遺伝子領域の CGE 法による結果と比較した。すなわち, アプライドバイオシステム 3130 Genetic Analyzer (同社) を用いた CGE 法により, キットで使用されている X 特異的プライマーによる増幅ピークのみが認められた場合を女性, X 特異的プライマーおよび Y 特異的プライマーによる 2 つの増幅ピークが認められた場合を男性とした。

(倫理面での配慮)

本研究の遂行にあたり, 日本大学歯学部倫理委員会に申請し, 承認を得た(承認番号 2009-16)。

## 結 果

まず, 女性 1 (第 1 表で示した女性 1 の試料) および男性 1 (同男性 1 の試料) の歯髄 DNA について, 女性の鋳型 DNA 量を 5 ng, 男性については 1, 2, 5, 10 および 20 ng とし, X 特異的プライマーおよび Y 特異的プライマーならびに XQprobe および YQprobe

を用いて PCR を行い、PCR 産物と鋳型 DNA 量との関係について検討した。その結果、第 1 図に示すように、DNA 増幅は X および Y 特異塩基配列いずれも鋳型 DNA 量が 20 ng の場合は 27 サイクル付近から、また 5 ng および 10 ng の場合は 29 サイクル付近から、さらに 1 ng および 2 ng の場合は 33 サイクル付近から認められた。女性試料において Y 特異塩基配列が検出されることはなく、増幅曲線として認められることはなかった。したがって、鋳型 DNA 量の最終濃度を 2 ng に調整して用いることにより、安定した PCR 産物が得られることが判明した。

つぎに、第 1 表で示した男女 1~4 の試料、計 8 例の歯髄 DNA 2 ng を鋳型として、各プライマーと各 Qprobe を用いて PCR を行い、PCR サイクル数と DNA 増幅との関係について増幅曲線で確認した。その結果、第 2 図に示すように、男性 3 の Y 特異塩基配列のように 30 サイクル付近から DNA 増幅が開始される例もあるが、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 サイクル以上で行うことで安定した PCR 産物を得ることが可能であった。なお、非特異的な反応を認めることはなかった。

また、同じく男女各 4 例の歯髄 DNA を試料として得られた増幅曲線をもとに解離曲線を作成し、Qprobe が解離して蛍光強度を増す温度について検討したところ、第 3 図に示すように、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 65°C 付近から Qprobe の解離が認められた。すなわち、女性試料の場合は Y 特異塩基配列を有していないことから、XQprobe による蛍光強度のみが増加する一方で、男性試料の場合は XQprobe および YQprobe による蛍光強度の増加が認められた。

さらに、解離曲線の微分値データを求めて解離ピークを描出し、第 4 図に示した。男女各 4 例いずれも解離ピークは 69°C 付近を示している。解離ピークは、Qprobe が X および Y 特異塩基配列、すなわち標的遺伝子から離れる温度を示している。これらの解離ピークのうち女性 1 および男性 3 の解離ピークを描出させると、第 5 図に示すように、女性試料の場合は XQprobe のみにおいて 69°C 付近で、また男性試料の場合は XQprobe では 68.5°C および YQprobe では 69°C 付近で解離ピークが認められた。

最後に、室内にて 5 年~26 年間保存された女性 12 例および男性 20 例、計 32 例の歯から採取した歯髄 DNA を試料として、本法により XQprobe および YQprobe の解離ピーク温度による性別判定を検討した。その結果、第 1 表に示すように、女性試料では XQprobe

の解離ピーク温度が 67.0～69.5℃を示し、YQprobe の解離ピーク温度は認められなかったことから、12 例すべての試料において女性と判定することが可能であった。女性試料については CGE 法により検討し、すべてにおいて X 特異塩基配列のピークのみが検出され、Y 特異塩基配列のピークが検出されなかったことを確認した。一方、男性試料では XQprobe の解離ピーク温度は 67.0～69.5℃を、また YQprobe のそれは 68.0～69.5℃を示し、20 例すべての試料において男性と判定することが可能であった。男性試料についても CGE 法により検討し、X および Y 特異塩基配列の両ピークが検出されることを確認した。なお、本法の解析時間は 50 分程度であり、迅速性に優れた解析法であることが判明した。

## 考 察

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、性染色体を鑑定することが頻用されている。性染色体の遺伝に異常があると 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が可能である。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<sup>2,3,12-14)</sup>なかで、ヒトの性決定を解析するうえで最も確実な領域は SRY (sex determining region Y) 遺伝子の検索である。しかし、この遺伝子はシングルコピーであるために検出感度や陳旧試料からの検出限界などの点でやや難点がある<sup>12)</sup>ことから、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の検索がよく用いられる。Y 染色体上のアメロゲニン遺伝子は X 染色体上のそのホモログであり、前者の欠失部分を挟み込むように設計したプライマーを用いた PCR 法による性別判定法は信頼性が高い<sup>2,3,15)</sup>として評価されている。

ところが、鑑定の実務において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場合、あるいは Y 染色体の領域において広範な欠失が存在し PCR 産物が認められない場合のあることが分かってきた<sup>16-20)</sup>。このような欠失はオーストラリア人 3000 人を調査した結果、6 人に欠失がみられた<sup>21)</sup>、あるいはインド人集団に多い<sup>22)</sup>

とする報告もある。PCR 産物が存在しない状況等を念頭に置かなければ性別の誤判定を看過することに繋がり、注意が必要である。鑑定試料の外観をみたとき、陳旧度が高いなどのために抽出される 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る。現行の性別判定法は、シーケンサーを用いた 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。鑑定試料の保存条件いかんでは、DNA の低分子化は避けられず、DNA 解析できないこともよく経験するところであり、そのような試料を扱う場合には、結果の正当性を担保するためにも通常行われている CGE 法とは別の解析法で検討することが肝要である。

本研究で用いた 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と思われる。

本研究では、X および Y 特異的プライマーならびに XQprobe および YQprobe を用いて QP 法を行い、得られた増幅曲線から PCR 産物と鋳型 DNA 量との関係について検討した。その結果、鋳型 DNA 量の最終濃度として 2 ng あれば十分に判定することが可能であると判明した。室内にて保存された歯を試料とする場合、抽出した DNA の精製は不要であったことから、検出感度および利便性に優れていることが判明した。なお、本研究に用いた X および Y 特異的プライマーは、作成にあたりそれぞれの特異塩基配列の異なった位置に設定したが、SNP タイピングを可能とする解析法であることを考慮すると、相同性のより高度な位置に Qprobe を作成しても DNA 解析、すなわち性別判定は可能であることが推測されることから、新たな鑑定法として今後の研究課題にしたいと考えている。

つぎに、鋳型 DNA 量を 2 ng とし、PCR サイクルの影響について検討したところ、X および Y 特異塩基配列いずれも 35 サイクル以上で行えば判定に資することが判明した。著者が所属する研究室では歯髄 DNA を試料として CGE 法とは異なった解析法で性別判定を検討している。堤ら<sup>23)</sup>および Nogami ら<sup>24)</sup>は、DNA 鎖に組み込まれたプライマーの末端がループを形成し、等温下で DNA の増幅反応が進行する loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法により、また堤ら<sup>25)</sup>は LAMP 法と同様の手法ではあるが、試料



をアルカリ熱変性させた後、*Alicyclobacillus acidocaldarius* (*Aac*) 由来の鎖置換活性を有する *Aac* DNA polymerase を用いて等温下で DNA 増幅を行う smart amplification process (SMAP) 法により性別判定を行っている。いずれも等温下で 60 分以内に結果を出すことができるうえに、LAMP 法では DNA 増幅の過程で生じるピロリン酸マグネシウムが反応液を白く濁らせることから目視で結果を判断することができることも加わって、非常に簡便で迅速に判定できる利点があり、きわめて有用性が高いと評価されている。ところが、LAMP 法では 60 分を、また SMAP 法では 30 分を超えたあたりから非特異的に DNA 増幅のみられる試料が散見され<sup>11,25)</sup>、人権擁護の観点から、とくに刑事鑑定には応用し難い面もあった。一方、本研究で検討した QP 法はそのような非特異的反応を認めないことから、結果の正否にかかわる信頼性はより高まるものと思われた。

また、得られた増幅曲線をもとに解離曲線を作成し、Qprobe が解離して蛍光強度を増す温度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 65°C 付近から Qprobe の解離が認められた。ここまでの段階で性別判定はおよそ可能になると思われるが、解離曲線の微分値データを求めて解離ピークを描出させると、目視でも明らかに判定することができるようになる。解離ピークは、Qprobe が X および Y 特異塩基配列、すなわち標的遺伝子から離れ蛍光を発したときの温度を示しており、本研究で解析対象とした女性 12 例および男性 20 例の試料について検討したところ、解離ピークは 69°C をほぼ中心として 67.0°C から 69.5°C の間に認められた。試料は 5 年～26 年間保存されたものであり、法医鑑識領域においても陳旧度の高い試料の性別判定に十分に応用可能であると思われた。なお、判定の結果については、従来の CGE 法によるアメロゲニン遺伝子領域の検討結果と一致しており、通常のキットで判定に疑義が持たれる場合、あるいは犯罪現場等に遺棄された環境によって DNA の低分子化が著しいと思われる試料を扱う場合には、当初から本法を併用することが得策であると思われる。

堤らは、QP 法を ABO 式および Rh 式血液遺伝子型検査に応用し、確度の高い判定法について報告しており<sup>7-10)</sup>、本法による性別判定を併せて行うことで高度に腐敗した、あるいは白骨化した身元不明死体の個人識別の判定精度をより向上させることができると期待される。また、従来の CGE 法による解析は高額なシーケンサーを必要とするが、QP 法は安価なりアルタイム PCR 装置があれば十分に判定が可能であり、さらに検査は 50 分程度で終わることができることから、迅速性や特異性ならびに検出感度に優れるなど、

きわめて有用性の高い解析法であると思われる。

## 結 論

室内にて5年～26年間保存した32歯から採取した歯髄DNAを試料とし、X特異的プライマーおよびY特異的プライマーならびにXQprobeおよびYQprobeを用いたQP法による性別判定を検討したところ、以下の結論を得た。

- 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2ngに調整して用いれば良いことが判明した。
- 2) 本法の解析を可能とする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℃付近で認められ、性別判定が可能であった。

以上のことから、陳旧歯髄DNAを試料としたQP法による性別判定は、法医鑑識上、有用性が高いと思われる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に際してご指導いただいた日本大学歯学部法医学講座堤博文講師に深甚なる謝意を表します。また、ご協力いただいた法医学講座員各位に深く感謝致します。

なお、本研究の一部は、平成21年度科学研究費補助金（基盤研究C：課題番号21592663）の助成を受けて行った。また、本論文の要旨の一部は、平成22年10月23日第32回日本法医学会学術中部地方集会において発表した。

## 文 献

- 1) 小室歳信(2013) 厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）総括研究

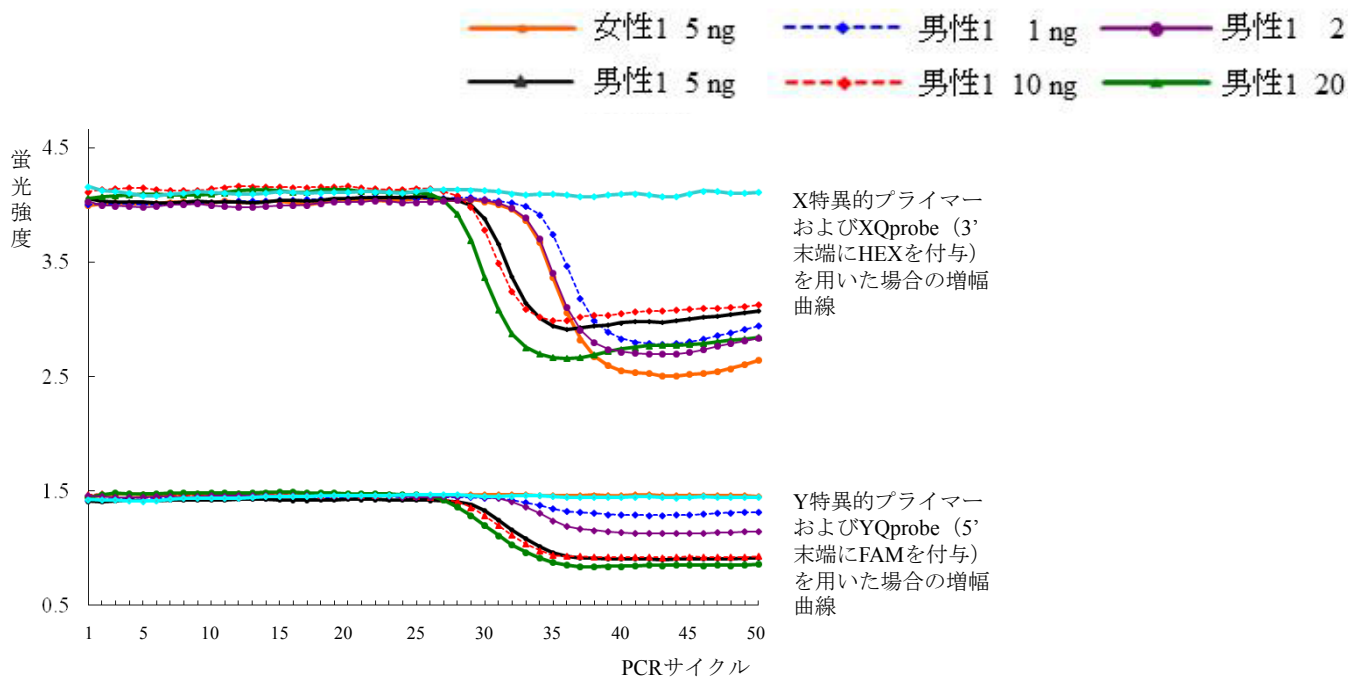
報告書 大規模災害時の身元確認に資する歯科診療情報の標準化に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)大規模災害時の身元確認に資する歯科診療情報の標準化に関する研究 平成 24 年度 総括・分担研究報告書 研究代表者 小室歳信, 1-13.

- 2) Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P (1993) A rapid and quantitative DNA sex test: Fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques* 15, 636-641.
- 3) 美浦一郎(1996) DYZ3 および DXZ1 領域を用いた Polymerase Chain Reaction 法による歯石からの性別判定. *日大歯学* 70, 249-256.
- 4) 小室歳信(2009) 歯髄, 歯石および唾液斑からの DNA 鑑定による個人識別. *臨床検査* 53, 813-818.
- 5) Matsumoto N, Kakihara F, Kimura S, Kurebayashi Y, Hirai M, Yohda M, Hasegawa S (2007) Single nucleotide polymorphism genotyping of CYP2C19 using a new automated system. *Anal Biochem* 370, 121-123.
- 6) Tanaka R, Kuroda J, Stevenson W, Ashihara E, Ishikawa T, Taki T, Kobayashi Y, Kamitsuji Y, Kawata E, Takeuchi M, Murotani Y, Yokota A, Hirai M, Majima S, Taniwaki M, Maekawa T, Kimura S (2008) Fully automated and super-rapid system for the detection of JAK2V617F mutation. *Leuk Res* 32, 1462-1467.
- 7) 堤 博文, 伊澤 光, 小室歳信, 鉄 堅, 内ヶ崎西作(2010) Quenching Probe 法による ABO 式血液遺伝子型検査. *DNA 多型* Vol.18, 219-222.
- 8) 堤 博文, 伊澤 光, 丸山 澄, 小室歳信, 鉄 堅, 内ヶ崎西作(2011) Quenching Probe 法による ABO 式血液遺伝子型検査および RhD 遺伝子検査. *DNA 多型* Vol.19, 200-204.
- 9) 堤 博文, 伊澤 光, 丸山 澄, 小室歳信(2012) Quenching Probe 法による Rh 式遺伝子型検査. *DNA 多型* Vol.20, 237-240.
- 10) Tsutsumi H, Asano M, Hagiwara Y, Nogami H, Izawa H, Maruyama S, Komuro T (2012) ABO blood group genotyping by quenching probe method, *Mol Cell Probes* 26, 198-203.
- 11) 堤 博文, 伊澤 光, 丸山 澄, 小室歳信, 野上宏明(2011) Quenching Probe 法による歯髄 DNA からの性別判定. *日法医誌* 65, 136.
- 12) Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990) A gene from the human sex-determining region

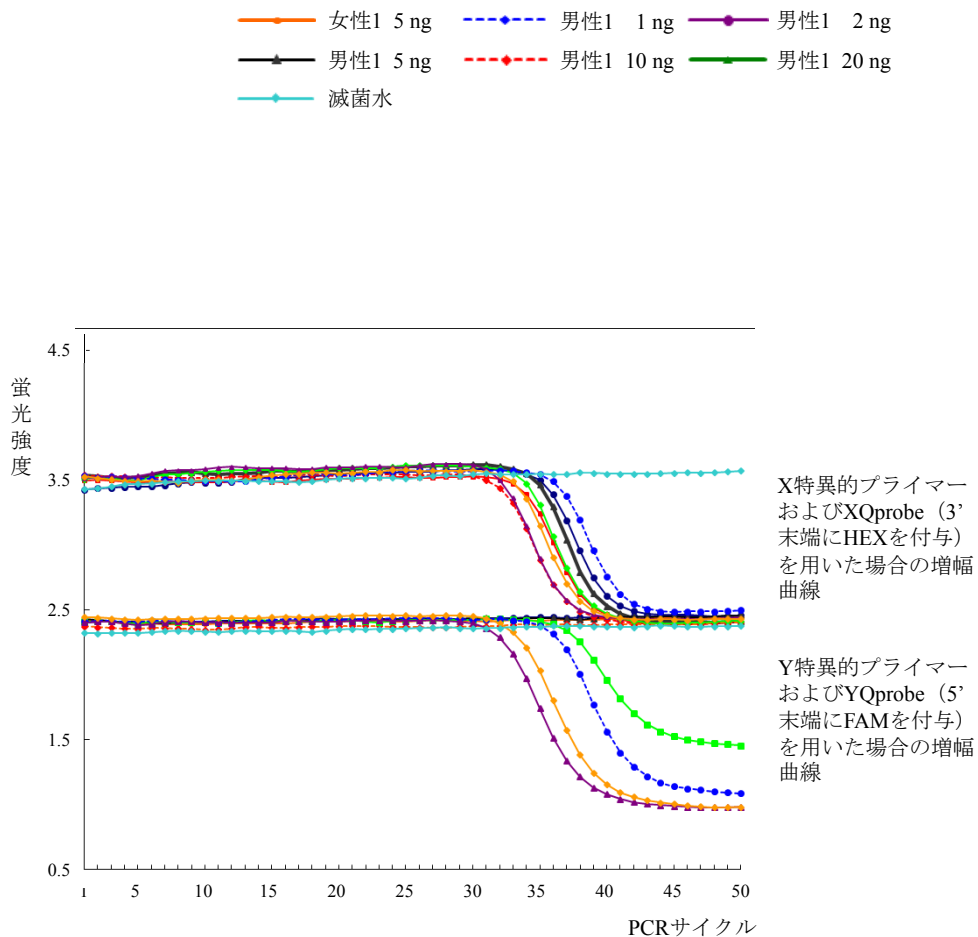
- encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240-244.
- 13) Eng B, Ainsworth P, Wayne JS (1994) Anomalous migration of PCR products using nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis: the amelogenin sex-typing system. *J Forensic Sci* 39, 1356-1359.
  - 14) Reynolds R, Varlaro J (1996) Gender determination of forensic sample using PCR amplification of ZFX/ZFY gene sequences. *J Forensic Sci* 41, 279-286.
  - 15) 山内春夫, 内藤笑美子, 出羽厚二, 藤田 一(1994) DNA と個人識別. *日本臨床* 1994年特別号, 264-271.
  - 16) Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C (1998) Reliability of DNA-based sex tests. *Nat Genet* 18, 103.
  - 17) 浅村英樹, 太田正穂, 沖 貴仁, 福島弘文(2007) Yq11.223 領域内の遺伝子欠損. *法科学技術* 12 別冊号, 29.
  - 18) Kumagai R, Sakaki Y, Tokuta T, Biwasaka H, Aoki Y (2008) DNA analysis of family members with deletion in Yp11.2 region containing amelogenin locus. *Legal Med* 10, 39-42.
  - 19) Takayama T, Takada N, Suzuki Rie, Nagaoka S, Watanabe Y, Kumagai R, Aoki Y, Butler JM (2009) Determination of deleted region from Yp11.2 of amelogenin negative male, *Legal Med* 11, S578-S580.
  - 20) Kumagai R, Sakaki Y, Tokuta T, Biwasaka H, Matsusue A, Aoki Y, Dewa K (2010) Distinct breakpoints in two cases with deletion in the Yp11.2 region in Japanese population. *Hum Genet* 127, 537-543.
  - 21) Steinlechner M, Berger B, Niederstautter H, Parson W (2002) Rare Failures in the amelogenin sex test. *Int J Legal Med* 116, 117-120.
  - 22) Thangaraj K, Reddy AG, Singh L (2002) Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? *Int J Legal Med* 116, 121-123.
  - 23) 堤 博文, 向山レイ, 小室歳信(2006) LAMP 法による歯髄 DNA からの性別判定. *DNA 多型* Vol.14, 253-255.
  - 24) Nogami H, Tsutsumi H, Komuro T, Mukoyama R (2008) Rapid and simple sex determination method from dental pulp by loop-mediated isothermal amplification. *Forensic Sci Int Genet* 2, 349-353.
  - 25) 堤 博文, 伊澤 光, 小室歳信, 鉄 堅, 内ヶ崎西作, 押田茂實(2009) SMAP 法によ

る歯髄からの性別判定. DNA 多型 Vol.17, 22-25.

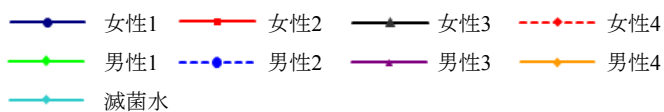
第1図 QP法による増幅曲線にみる PCR産物と鋳型DNA量との関係

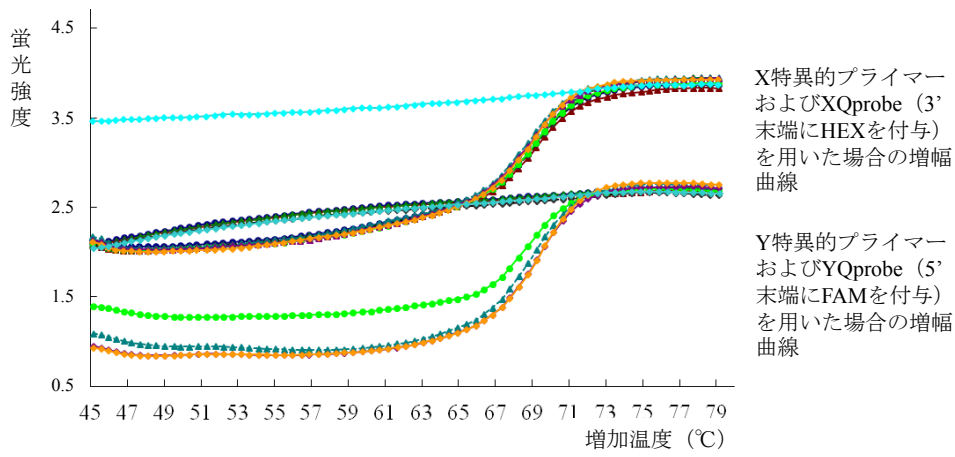


第1図 QP法による増幅曲線にみる PCR産物と鋳型DNA量との関係

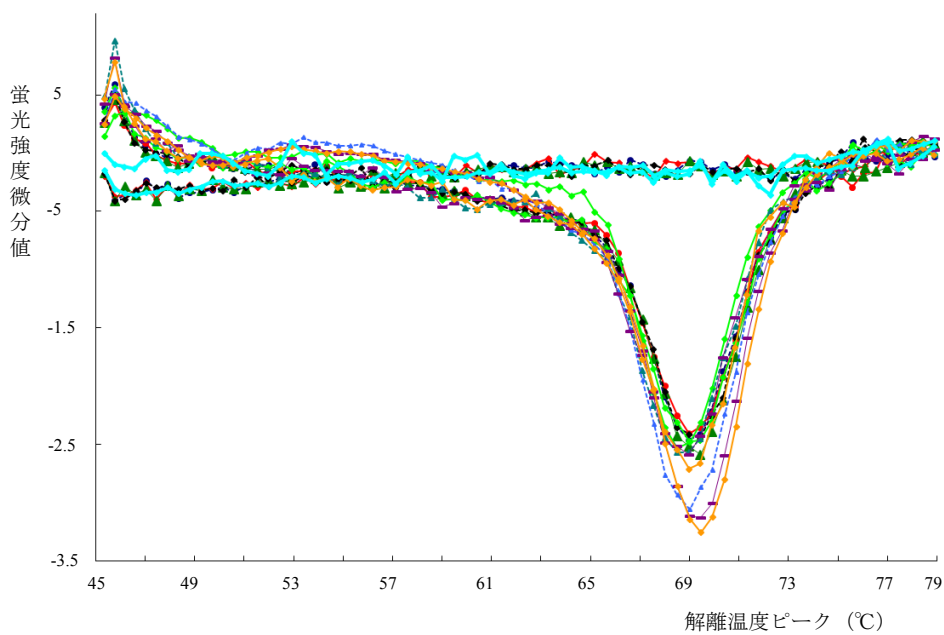
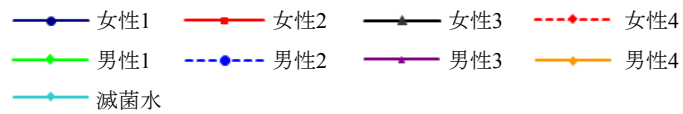


第2図 男女各4例の歯髄DNAを試料とし、QP法による増幅曲線にみる PCRサイクルの検討

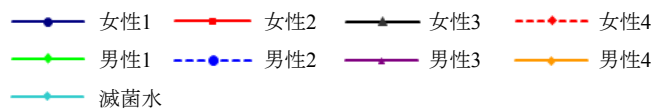


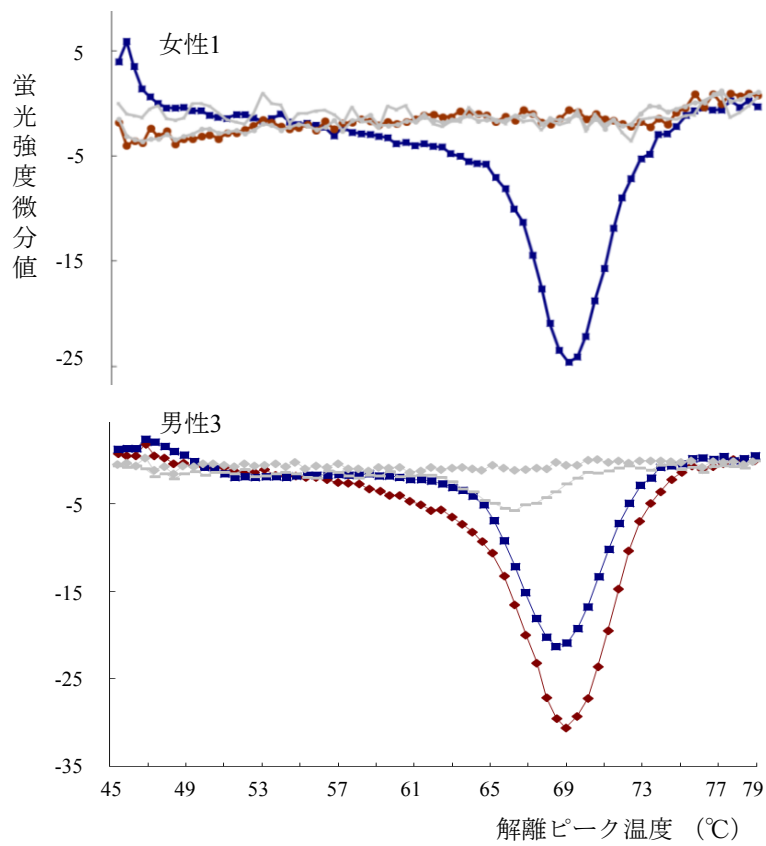


第3図 男女各4例の歯髄DNAを試料とし、QP法による解離曲線にみる  
増加温度の検討



第4図 男女各4例の歯髄DNAを試料とし、QP法による解離曲線にみる  
解離ピーク温度の検討





第5図 女性1および男性3の歯髄DNAを試料とし，QP法による  
解離ピーク温度からの性別判定

■ X特異的プライマー+DNA    ◆ X特異的プライマー+滅菌水  
◆ Y特異的プライマー+DNA    ■ Y特異的プライマー+滅菌水



第1表 QP法によるQprobeの解離ピーク温度からの性別判定

試料No.	QP法		CGE法(Identifiler*)		性別判定	試料の 保存期間
	解離ピーク温度(°C**)		X特異 塩基配列	Y特異 塩基配列		
	XQprobe	YQprobe				
女性1	69.0	—	X	—	女性	7年
女性2	69.0	—	X	—	女性	8年
女性3	69.5	—	X	—	女性	9年
女性4	69.0	—	X	—	女性	10年
女性5	69.0	—	X	—	女性	11年
女性6	69.5	—	X	—	女性	13年
女性7	69.0	—	X	—	女性	15年
女性8	69.0	—	X	—	女性	18年
女性9	69.0	—	X	—	女性	20年
女性10	67.0	—	X	—	女性	20年
女性11	69.5	—	X	—	女性	23年
女性12	69.0	—	X	—	女性	23年
-----						
男性1	69.0	69.0	X	Y	男性	5年
男性2	69.0	69.0	X	Y	男性	6年
男性3	68.5	69.0	X	Y	男性	8年
男性4	69.0	69.0	X	Y	男性	8年
男性5	69.0	69.5	X	Y	男性	10年
男性6	69.5	69.0	X	Y	男性	10年
男性7	69.0	69.0	X	Y	男性	10年
男性8	69.0	69.0	X	Y	男性	12年
男性9	69.0	69.5	X	Y	男性	14年
男性10	69.0	69.0	X	Y	男性	17年
男性11	69.0	69.0	X	Y	男性	19年
男性12	69.0	68.5	X	Y	男性	20年
男性13	69.0	69.0	X	Y	男性	21年
男性14	69.0	69.5	X	Y	男性	21年
男性15	69.0	69.5	X	Y	男性	23年
男性16	69.5	68.5	X	Y	男性	25年
男性17	68.5	68.5	X	Y	男性	25年
男性18	69.5	69.5	X	Y	男性	25年
男性19	68.5	69.0	X	Y	男性	25年
男性20	67.0	68.0	X	Y	男性	26年

\*CGE法によるIdentifilerキットに組み込まれたアメロゲニン遺伝子領域のXおよびY特異塩基配列のピーク検出からの性別判定

\*\*小数点第2位を四捨五入