

## 学 位 論 文 の 要 旨

| 学位の種類   | 博 士 | 氏 名 | 吉 田 将 重 |
|---|-----|-----|---------|
| <h3>学 位 論 文 題 目</h3> <p>陳旧化した歯牙からの DNA を用いた性別判定</p> <p>共著者名<br/>須野 学・浅利 優・小川研人・粟屋敏雄・清水恵子・<br/>松原和夫・北 進一・塩野 寛</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>屍体の性別判定は、法医学実務上極めて重要な鑑定項目である。性別判定は、形態学的な特徴および性に基づく各種のマーカーの検出によって行われる。しかし、死後変化・損壊が進行するほど情報が失われ、判定に限界が生じる。より正確な個人識別を行うため、屍体の血液・臓器・爪・毛髪・骨・歯などの体組織から遺伝情報を抽出し性別判定を行うことが一般的となりつつある。硬組織は、他の試料と比較して、外的環境の変化に抵抗性があり、比較的高分子量の DNA が抽出可能なことから、性別判定の遺伝情報の抽出源として利用価値が高い。しかし、これらの試料を用いた場合、DNA の抽出は煩雑になり、判定結果に大きな影響を及ぼす。しかも、歯牙等の硬組織の DNA は、外的環境に抵抗性を持つとはいえ、徐々に分解を受ける。近年、著しく古い硬組織からの性別判定の結果が主に考古学領域から報告されるようになってきた。しかし、それらの判定の正確性は試料そのものの性質上知る由もない。そのため、法医学実務上、正確な性別判定を行うための試料の陳旧度・性別マーカー・検査法などに対する情報が必要となっている。</p> <p>そこでまず、新鮮歯牙からの DNA 抽出を試み抽出効率・収量について検討した。得られた DNA より、性染色体上に存在する数種の性特異性のローカスを増幅し性別判定を行い、判定結果の優劣および精度を比較した。更に、旭川医科大学法医学教室に長期間 (15 年間以上) 保存されている歯牙を含む頭蓋骨を用いて、PCR 法による性別判定の信頼性について考察を行った。</p> |     |     |         |

## 材料・方法

歯牙試料は日本人 80 名からの歯牙を用いた。陳旧化した歯牙を含む頭蓋骨は、旭川医大法医学教室に保存されていた 15 例の身元不明体で、試料とした骨片および歯牙は、それぞれ頭蓋骨と上・下顎骨から得た。形態的な性別判定は、法医認定医 2 名によって独立に行った。DNA 抽出は、試料を粉碎後、定法により行った。

性別判定の遺伝子マーカーは、X 染色体のマーカーとして DXZ-1、Y 染色体特異的マーカーとして DYZ-1 および DYZ-3、X および Y 染色体に異なる断片長マーカーとして検出される PAB および amelogenin を選択した。その内、DNA の経時的な分解を考慮して DYZ-1 は 1000 bp と 149 bp、DYZ-3 は 170 bp、amelogenin は (X = 771 bp, Y = 947 bp) と (X = 106 bp, Y = 112 bp) の断片長について polymerase chain reaction (PCR) 法に基づいて判定の信頼性を検討した。電気泳動にはアガロースゲルを使用し、エチジウムブロマイド染色により増幅産物を観察した。DYZ-1 および DYZ-3 を用いる判定は、DXZ-1 のバンドが検出されないされない試料は性別判定不能とした。amelogenin (106 bp, 112 bp) の蛍光検出は、蛍光標識したプライマーを合成、使用し、泳動結果を解析し性別判定を行った。

## 成績

新鮮歯牙を用いた、DNA 抽出量は、全体で  $8.21 \pm 5.09 \mu\text{g}$  であった。歯種別に分け、年齢別の DNA の抽出量および抽出率の比較では、どの歯種においても 10-29 歳の年齢群は、他の二つの年齢群に比べ、抽出量および抽出率はいずれも有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。また、歯牙を抜歯した際の患者年齢と DNA の抽出量および抽出率との比較では、加齢の増加と共にいずれも著明に減少した ( $p < 0.001$ )。一方、歯牙抜去後の経過日数と DNA の抽出量あるいは抽出率の間には、相関は認めなかった。

性別判定では 80 例中、女性の 2 例について、汚染が原因と思われる誤判定を認めた。この 2 例を除外した 78 例についての結果、PAB と amelogenin では 3 例で判定不能であった。この 3 例は、DNA 抽出量が微量の試料であった。しかし、この 3 個の試料も、蛍光標識プライマーを用いた性別判定では判定可能であった。78 例中、マルチローカスマーカーでの誤判定を示した 1 例は、DNA の回収量が微量で DYZ-3 のバンドが検出されなかった試料であり、シングルローカスマーカーでも全て判定不能の試料であった。また、マルチローカスマーカーでの誤判定を示すもう 1 例は、女性であるはずなのに DYZ-1 (1000bp)

のバンドが観察されたものであった。この試料についてダイレクトシーケンスを行ったところ、両端に DYZ-1 の塩基配列が確認された。

陳旧化した歯牙を含む頭蓋骨の性別判定を行った。抽出 DNA は、DNA の分解が高頻度で発生していた。そこで、性別はマーカの塩基長の短いものについて分析し判定した。DXZ-1、DYZ-1 (149 bp) を用いた判定で、2 名の法医学者による判定と完全に一致したものは、白骨では 7 例中 1 例もなく、歯牙では 12 例中 4 例であった。amelogenin を用いた判定では、白骨では、15 例中 9 例で、歯牙では 15 例中 11 例で判定可能であり、これらのうち 2 名の法医学者の性別判定と完全に一致したものは、白骨では 9 例中 1 例で、歯牙では 11 例中 2 例であった。amelogenin に行った蛍光標識プライマーを用いた性別判定では、骨の 1 例を除き骨、歯牙共にすべて男性と判定された。

#### 考案

本研究結果は、新鮮な歯牙を用いた場合、性別判定における遺伝子マーカの選択による差は少ないことを示すが、理論的誤判定の危険性の少ないシングルローカスマーカの選択がより有効であろう。一方、経年変化が進んだ歯牙では、DNA は断片化し、低分子のものとなっていた。従って、これらの試料からの性別判定には、コピー数が多く、短い断片長のマーカが有利となる。一方、形態学的な観察からの性別判定は、鑑定人によって異なる判定結果を得る場合がある。この場合、DNA による性別判定を行うことは極めて有用である。しかし、実際の陳旧化した骨、歯牙に、これらを応用して性別判定を試みたところ、骨、歯牙共に一致した結果が得られず、また、人類学的な性別判定とも不一致が認められた。一致例は半数以下であった。これら性別判定の不一致の原因として、土壌細菌等による汚染に基づく外来遺伝子の増幅による誤判定や PCR 反応の阻害物質による誤判定などの関与が考えられた。以上の結果は、保存状態の比較的良好な歯牙から DNA 抽出を行い、PCR 法を用いて性別判定を行うことは、例えそれがどの領域の増幅産物を用いたとしても有効であることを示す。しかし、かなりの年数を経過した試料においては、汚染・腐敗など考慮する必要があり、複数の遺伝子領域で一致した結果のみを採用すべきものとする。

#### 結論

新鮮歯牙から DNA 抽出を行い、PCR 法を用いた性別判定の有効性を示した。また、陳旧化した試料を用いた性別判定では、分子生物学的方法を採用する場合、汚染・腐敗などの理由から誤判定の危険性が増すため、複数の遺伝情報から慎重な判断が必要であることが明らかになった。

#### 引用文献

- Smith BC, Fisher DL, Weedn VW, Warnock GR, Holland MM. A systematic approach to the sampling of dental DNA. *J Forensic Sci* 1993; 38: 1194-209.
- Wandeler P, Smith S, Morin A, Pettifor A, Funk SM. Patterns of nuclear DNA degeneration over time – a case study in historic teeth samples. *Molecular Ecol* 2003; 12: 1087-1093.
- Martin PE, David MS, Andrew TC. Extraction of single nuclear DNA from forensic specimens with a variety of postmortem histories. *J Forensic Sci* 1997; 42(6): 1032-1038.

## 学位論文の審査結果の要旨

|   |         |     |         |
|---|---------|-----|---------|
| 報告番号  | 第 号     |     |         |
| 学位の種類   | 博士 (医学) | 氏 名 | 吉 田 将 亜 |
| 審査委員長 <u>吉 田 成 孝</u> ㊞<br><br>審査委員 <u>塩 野 寛</u> ㊞<br><br>審査委員 <u>松 原 和 夫</u> ㊞  |         |     |         |
| 学 位 論 文 題 目<br><br>陳旧化した歯牙からの DNA を用いた性別判定  |         |     |         |
| <p>本論文は陳旧化した歯牙 DNA より PCR 法にて複数の性別判定マーカー配列を増幅することにより性別判定を試み、その有効性を評価したものである。</p> <p>本研究の方法は新鮮歯牙および陳旧化した歯牙の歯髄と頭蓋骨より DNA 抽出を行い、性別判定マーカーである DYZ-1、DYZ-3、pseudoautosomal boundary および amelogenin 部分配列の PCR 法による増幅である。これに加え、これらの結果と法医認定医による性別判定結果を比較検討した。いずれも、確立された手法であり、得られたデータの処理方法とその解釈にも問題がないと判断できる。</p> |         |     |         |

本論文では以下の新たな知見を示した：(1) 粉碎法により比較的安定した DNA の収量を得た。(2) 加齢により DNA の収量が大きく減少した。(3) 新鮮歯牙 DNA からマルチローカス配列およびシングルローカス配列共に正確な増幅結果が得られた。(4) 陳旧化した歯牙および頭蓋骨からはいずれのマーカーを用いても一致例は半数以下であった。以上から本論文により陳旧化した試料より DNA による性別判定を行うためには複数の遺伝子領域で一致した結果のみを用いるべきである事が明らかとなった。

近年、きわめて古い歯牙からの性別判定に関する研究発表が散見されるが、その信頼性に関しては不明であった。本論文は陳旧化した試料からの DNA 鑑定の有効性と限界性を明らかにした事で今後の新鮮および陳旧化した歯牙を含む頭蓋骨からの性別判定を行う際に有益なデータとなるものである。

本論文は適切に構成され、適切な考察が行われている。

論文提出者に対して本論文および関連領域に関する試問に対し適切な応答が得られ十分な学力を有することが示された。

以上より、審査委員会は本論文を学位論文として適切なものであると判断した。