氏名(本籍)	本田克也(熊本県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	博甲第917号
学位授与年月日	平成3年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	硬組織から抽出したDNAの解析と個人識別への応用 (Dissertation形式)

主査	筑波大学教授	歯学博士	根本一男	
副査	筑波大学教授	薬学博士	後藤勝年	
副査	筑波大学教授	医学博士	濱口秀夫	
副査	筑波大学教授	医学博士	三輪正直	
副査	筑波大学教授		吉川靖三	

論文の要旨

〈目　的〉

身元不明屍体の個人識別は，犯罪捜査に方向づけを与える重要な情報となるので，法医学的鑑定の大きな問題の一つである。しかし現在も個人識別の鑑定法として主要な部分は，顔貌などの外見的特徴や指紋などを利用する形態学的鑑定法なので，これらの情報は屍体の死後変化により失われ，識別が極めて困難あるいは不可能になることも多い。屍体から得られた試料として最終的には骨片や歯牙のみということもあり，この場合には人獣鑑別や性別推定すら大問題となる。

本研究の目的は硬組織から抽出したDNAを細胞レベル，分子レベルの情報として解析し，それの個人識別への応用の可能性と問題点を明らかにすることであり，骨，骨髄および歯牙から抽出したDNAによる人獣鑑別，性別判定および母子鑑定について検討を行った。

〈試料と方法〉

(1) 試　料

筑波大学で司法解剖された35遺体から骨（41例），骨髄（35例），歯牙（25例）および血液（57例）を採取し試料とした。これらの遺体の死後経過時間は8時間から15年以上で，焼死体，腐乱屍体および白骨屍体などが含まれている。

(2) DNAの抽出

骨髄および血液ではプロテアーゼによる消化後，フェノール／クロロホルム抽出を行い，エタノール沈殿によってDNAを回収した。骨および歯牙ではコラゲナーゼによる消化後前記と同じ方法で

DNAを回収した。

(3) 抽出DNAの量と質の解析

抽出DNAは260nmにおける吸光度測定によりその量を計算し（1.0oD=50μg/ml），0.5%アガロースゲル電気泳動により高分子DNAの保存状態を調べた。

(4) 硬組織DNAによる人獣鑑別

BLUR2(Alu sequence)プローブによるドットブロットハイブリダイゼーションを行い，プローブとのハイブリダイズの有無により人獣鑑別をした。対照としてリスザルおよびウサギの血液と硬組織を用いた。

(5) 硬組織DNAによる性別判定

pHY10（Y染色体特異的プローブ）によるSouthernハイブリダイゼーションとXおよびY染色体のalphoid repeat, Y染色体のKogan segmentの増幅によるpolymerase chain reaction (PCR)を併用して性別判定を行った。

(6) ミトコンドリアDNA (mtDNA)の解析

ヒト胎盤より抽出したmtDNAをプローブとしてSouthernハイブリダイゼーションによる検出と，Non-coding region V (121bp)のPCRによる増幅を併用した。

(7) 試料の保存条件とDNAの変化

骨，骨髄，歯牙および血液の試料が水中（蒸溜水，生理的食塩水）にあった場合およびそれと乾燥状態にあった場合とを性別判定の判定限界の差として実験的に検討した。さらに実際の屍体試料の種々な条件とも比較検討した。

〈結果と考察〉

(1) 抽出DNAの量と質の解析

骨，骨髄および歯牙からSouthernハイブリダイゼーションやPCRで解析可能なDNAが抽出できた。その量は死後経過時間とともに対数函数的な減少を示した。また死後変化に伴うDNAの低分子化も初期の1カ月以後は比較的緩徐に進行し，死後15年以上の試料から20kb以上の高分子DNAが確認された。

(2) 硬組織DNAによる人獣鑑別

いずれの硬組織のDNAでも人獣鑑別は可能であったが，死後経過時間の長い試料からのDNAの場合とある種のサルでは鑑別が困難であった。これは古いDNA程プローブとハイブリダイズしにくくなることと，サルとヒトのDNAの相同性が高いためである。

(3) 硬組織DNAによる性別判定

Southernハイブリダイゼーションによる性別判定はいずれの硬組織DNAを用いても可能であったが，歯牙のDNAを用いた場合正答率96%で最もよく，骨髄では86%で血液と同程度であった。骨では71%と他よりも低くまた死後3ケ月を過ぎてからの判定に困難なものが多くなっている。これは同じ硬組織でも歯牙と骨ではDNAの変化のしかたが違っている可能性を示しており，組織としての保存性とDNAの保存性とは別の問題として区別しなければならないことを示唆している。PCRによる性

別判定ではalphoid repeatの増幅とKogan segmentの増幅を併用することによりSouthernハイブリダイゼーションの判定限界を上回る例もみられた。

(4) mtDNAの解析

SouthernハイブリダイゼーションおよびPCRによるmtDNAの解析は骨，骨髄および歯牙のいずれのDNAについても適用できる，mtDNAが母性遺伝することから母子鑑定の可能性を示している。

(5) 試料の保存条件とDNAの変化

歯牙のDNAについては保存状態による差があまりみられなかったが，骨のDNAについては特に水中保存の例で解析が難しくなる傾向があったこと，骨髄および血液のDNAでは腐敗の影響を受けにくい傾向があったことなどから，組織によって影響を受けやすい環境の条件が異なっていると考えられる。

〈批　評〉

本研究により，相当長期にわたって放置され，さまざまに死後変化が進んだ遺体から得られた硬組織であっても，その硬組織の性質に応じて試料を調整することによってDNAの抽出が可能であることが明らかにされた。さらにその硬組織DNAは人獣鑑別，性別判定および母子鑑定に応用できるものでありその有用性が確かめられた。これらの結果がそのまま個人識別に使用できるわけではないが，その基礎となる新知見として高く評価できる。

よって，著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。