

氏名	矢野 志津枝		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8673号		
学位授与年月	平成 30年 3月 23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	細胞凝集反応を用いた細胞選択的 DNA 抽出法の混合試料鑑定 への応用		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	竹越 一博
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	長谷川 雄一
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	猪股 伸一
副査	筑波大学助教	博士（医学）	川崎 綾

論文の内容の要旨

矢野志津枝氏の博士学位論文は、DNA 鑑定における細胞凝集反応の効果を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）

著者は法医学における DNA 鑑定は検出技術も大きく改良され、現在では高感度かつ高精度の鑑定が可能となってきた現状を概観しつつ、現場試料からの鑑定では試料の混合や汚染が生じやすく、また試料が陳旧化すると、DNA バンドが複合的になりやすくなるため、混合試料のそれぞれを区別して型判定することは、なお困難とされていることを問題点として把握している。現在では、出力されたデータのバンドの組み合わせを、バンドの位置やピークから解析する計算方法が開発されていること、データが不完全な場合には、誤判定に導かれかねないという危険があることも指摘している。それゆえ、混合試料の判定は避けられがちであるが、現実には混合試料の鑑定が不可避である事例も存在するため、これに対応できる技術の開発は重要であると考えたという。そこで著者は本研究において、混合試料の細胞を分離するために細胞特異的な抗体を用い、また陳旧化した汚染試料から血球細胞を分離するため、抗Hレクチンを用いて、遠心分離あるいは磁気分離して標的細胞を分取する方法を開発することを試みている。

（対象と方法）

著者は対象として血液（白血球）や、唾液（粘膜上皮細胞）、汚染物質（味噌）を種々の割合で混合したものを用いている。また木綿製の布を約 5mm 四方内外に切断し、そこに血液や唾液をそれぞれ一滴（約 30 μ l）ずつ滴下する方法で試料を作成している。実験としては主として、1）異なった血液型由来の細胞の分離、2）血液と唾液由来細胞の分離、3）陳旧血痕（室温にて6ヶ月経過させた。血球の劣化や分解を伴う）4）味噌につけられた陳旧血痕を用いた実験、の4つの実験を行っている。

選択方法としては、抗 A 抗体、抗 B 抗体、抗 H 抗体、抗白血球抗体（CD45）、及び抗上皮細胞抗体

(CD326)、抗 H レクチン(L-fucose lectin ; Ulex europeus) を用い、それぞれの認識物質に標的細胞を反応させ、凝集塊を遠心分離するか、あるいは磁気ビーズを付着させた抗体と反応させ、標的細胞を捕捉させたのち、磁石にて回収している。細胞選択後の DNA 抽出は磁気コーティングしたシリカビーズによる固相抽出法を自動化した Maxwell16 (Promega) 機器を用い、PCR 反応には、個人識別用キット (AmpFLSTR™ Identifiler™ Kit) 等を用い、DNA 型判定には 3130xL/3500 Genetic Analyser (Thermo Fisher™)を用いている。これらの検出系はおよそ 100pg の鋳型 DNA を検出する感度があるとされている。さらに、抗 H レクチンはデオキシ糖であるフコースの第 3 位の水酸基を特異的に識別する性質があることから、DNA のデオキシリボースも同じデオキシ等であり第 3 位の水酸基を有するため、同様に認識できる可能性があったため、DNA に抗 H レクチンを作用させ、遠心分離した粒子から DNA 鑑定を行なったとされる。

(結果)

血液型ごとに特異的抗体を使って選択的抽出を遠心分離法で行なった結果では、抗体により抽出された試料からのピークは明らかに高くするため、定量的な判断を併用すると、標的細胞の選択的な型判定が可能であることが示されている。

また血液と唾液(上皮細胞)の分離を行なった磁気分離法の結果では、抽出量がやや少なくなる傾向があったが明瞭な型判定が可能であること、6 か月経過した陳旧血痕においても、抗 H レクチンで処理することで、細胞凝集塊を形成することができたことを明らかにした。

レクチンを用いない方法(Control)で抽出した DNA プロファイルでは、高分子のアレル領域(およそ 250bp 以上)では、ローカスのドロップアウト(不検出)が認められることを示している。抗 H レクチンで処理した試料の DNA プロファイルでは高分子のアレル領域(およそ 250bp 以上)でも、アレルピークが検出することができている。また味噌漬けた試料からも、抗 H レクチンを用いることにより、明らかにコントロールより明瞭な DNA プロファイルが得られている。DNA に抗 H レクチンを作用させ、遠心分離した粒子の抽出物を用いると、コントロールでは増幅不良であった高分子のアレル領域(およそ 250bp 以上)でも、より明瞭なアレルが増幅されることを明らかにした。

(考察)

著者は本研究では、特異的抗体やレクチンによる細胞選択を行った試料は、従来の方法より、明瞭な DNA プロファイルが得られることが明らかにしている。またこの方法は陳旧血痕や味噌漬けた試料からも有効であることを示した。したがって古くかつ汚染された試料でも細胞膜を有する細胞は僅かながらも残存していることが明らかになった。また遠心分離法と磁気分離法は、微量試料において感度をあげるためには遠心分離法が、混合や汚染が強い試料において特異性をあげるためには磁気分離法が適していることを明らかにした。細胞選択が必ずしも完全でない場合もあるが、検出ピークの高さには差が出るため、高いピークを優先的に読むことにより完全な判定が可能であることも明らかにした。抗 H レクチンは DNA を直接に捕捉しうることも示されたことから、細胞膜が壊れた古い細胞への DNA 鑑定にも有効であることを示した。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は鑑定困難とされる混合試料の DNA 鑑定を、細胞特異的抗体や、L フコースレクチンを用いることにより、DNA 抽出前に細胞を分離することにより解決するための実験方法を確立しようとしたものである。試料の前処理に独創的な方法を導入することにより、実践的に解決しようとした先進的な研究であると高く評価できる。特異的抗体やレクチンには多種類があり、対象とする試料に応じた多様な応用が可能であることから、本法は法医学的な DNA 鑑定に極めて有効であると言える。

平成 29 年 12 月 22 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。