



Title	Simultaneous Detection of Multiple STR Loci on Sex Chromosomes for Forensic Testing of Sex and Identity
Author(s)	Zaw, Tun
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41624
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	Zaw Tun
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学 位 記 番 号	第 14482 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年3月25日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科社会系専攻
学 位 論 文 名	Simultaneous Detection of Multiple STR Loci on Sex Chromosomes for Forensic Testing of Sex and Identity (性別判定および個人識別のための、性染色体STR多型を用いたマルチプレックスPCR法による多座位DNA型同時検出)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 的場 梁次
	(副査) 教授 谷口 直之 教授 内山 安男

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

法医学においては、身元不明死体の個人識別や、犯行現場における遺留品などからの被疑者の同定のために、DNA型検査を用いることが行われるようになってきた。しかし、身元不明死体のうち死後経過時間の長いものや、遺体の一部のみが発見された場合などからは抽出されるDNAが分解していることが多く、抽出可能量も微量であることが多い。また、犯行現場試料では痕跡的な試料を利用しなければならない場合が多く、極めて微量のDNAから型検出をしなければならない場合が少なくない。結果として、可能な検査が限定されがちであり、個人識別に必要な精度まで検査数を増やすことが困難な場合にしばしば遭遇する。そこで本研究では、微量の試料から、性別を判定し、さらに個人識別に必要な複数のDNA型を同時検出するため、高感度かつ簡便なDNA型検出法を開発することを目的とし、その検出条件の確定を試みた。

【方法ならびに成績】

試料としては健康人から採取した新鮮血を実験条件確定のためのコントロールとして用い、さらに解剖遺体から採取した毛髪、血痕、臍内容滲出液、歯、骨、唾液、骨髄、諸臓器(脳、肝、心、脾等)に応用した。

DNAの抽出は新鮮血、血痕、臍内容滲出液についてはプロテナーゼKにて蛋白分解後、フェノール／クロロホルム法にて抽出した。毛髪、唾液については、キレックスを用いて、蛋白を熱変性させDNA分画を採取した。歯、骨についてはキレックスにて融解させた後、フェノール／クロロホルム法にて抽出した。骨髄、脾臓についてはiso-tissue DNA抽出キット(Nippon Gene)を用いた。

マルチプレックスPCRによる増幅座位としては、X染色体STR(Short Tandem Repeats)から、HPRTB, ARA, STRX1部位を、Y染色体STRからはDYS390, DYS393を選択した。従来までの研究では、X/Y染色体STRはそれぞれ単独で検査されるのが通常であり、座位によってその検出条件は異なっているため、同時に検出することは困難とされてきたが、本研究では増幅と型判定の条件が統一できる組み合わせについて検討した。マルチプレックスPCRではDNAポリメラーゼとしてAmpliTaq Gold(PE Applied Biosystems)と、蛍光ラベル(ROX, TAMRA, 6 FAM, HEX)したそれぞれのプライマーを用いた。

PCR後、増幅産物を1.5%アガロースゲルで確認した後、373 A自動DNAシーケンサ(PE Applied

Biosystems) にて電気泳動し 672GeneScan ソフトウェアにてフラグメント解析を行い、バンドサイズを決定し、さらにはあらかじめ型決定されているアレリック・ラダー・マーカーを同時に泳動することにより、ゲル・イメージとエレクトロ・フェログラム上にて DNA 型判定を行った。

またこれらのローカスについては、正常日本人集団の遺伝子頻度分布を決定し、それぞれの出現率を算出した。その結果、(STRX1 / HPRTB / DYS390 / DYS393 / ARA) についてそれぞれ (7 / 8 / 6 / 5 / 16種) のアリールを日本人集団から見出すことができた。またアリール分布はコーカシアンと比較して、やや high-repeat のアリールに分布が偏在している傾向が認められた。

以上の実験により、マルチプレックス PCR のセットとしては、(STRX1 / HPRTB : X 染色体 STR) と (DYS390 / DYS393 : Y 染色体 STR) の 4 座位のセットと、(ARA : X 染色体 STR) と (DYS390 : Y 染色体 STR) および、(ARA : X 染色体 STR) と (DYS393 : Y 染色体 STR) の 2 座位のセットについて、それぞれ共通の増幅条件を決定することができ、再現性の高い正確な型判定を行うことができた。なお鑄型 DNA はいずれの方法でも最小 100pg までの高感度増幅と型判定が可能であった。なおこれらの増幅条件を決定するにはアニーリング温度の調整に加えて、それぞれのプライマー濃度のバランスが最も重要な要因であることが判明した。

また、血液のコントロール試料により決定した実験条件を、毛髪、血痕、歯、骨、唾液、諸臓器について適用したところ、いずれについても良好な結果が得られ、この方法は体液や臓器から抽出した DNA にも適用できた。

【総括】

血液をコントロール試料として、微量 DNA から性別を判定し複数の DNA 型を検出でき、一度で高精度な個人識別が可能なマルチプレックス PCR の 3 種の実験系を確立した。この方法は多くの体液や臓器から抽出した DNA に適用でき、方法が簡便であり再現性にすぐれているという点において、実務に直ちに応用できる実践的な方法である。

論文審査の結果の要旨

本研究は、性染色体 (X / Y) 上に存在し、高度に多型性を示す STR (short tandem repeats) 領域を、マルチプレックス PCR 法で増幅し、性別判定と個人識別を同時に行う検出条件を確定したものである。

常染色体のマルチプレックス PCR 法による方法はこれまでいくつか報告されているが、性染色体 (X / Y) 上のマルチプレックス PCR 法については、検出条件が厳しいためこれまで報告はなかった。本研究では X 染色体上の STRX1 / HPRTB / ARA 部位と Y 染色体上の DYS390 / DYS393 について、反応系の濃度バランスや温度条件等について、種々の実験条件を検討した結果、4 座位検出系 (HPRTB / STRX1 / DYS390 / DYS393) と 2 種の 2 座位検出系 (ARA / DYS390 および ARA / DYS393) の条件を確定することができた。また型判定には、蛍光 DNA シークエンサーによるフラグメント解析を行い、高感度な検出を可能にした。

性染色体上の STR 領域の検出においては、性別判定と個人識別が同時にできるだけでなく、父子鑑定において、すでに父が死亡している場合にも同性間で同胞鑑定を行うことにより媒介的に父子鑑定ができるという利点がある。またこの方法では、サンプル DNA の検出限界はわずかに 100pg であり、犯罪捜査における微量の試料にも適用できる。また同一実験条件において、血痕のみならず唾液斑、精液斑などの体液斑、また歯や骨、毛髪などの硬組織にも応用できる。なお、正常日本人約 200 人について遺伝子頻度を決定したところ、それぞれについて多型数は 5 から 16 の範囲であり、この実験系すべてを用いた場合には、男性で 0.9999、女性で 0.999 の識別率となり、高感度個人識別が可能となる。以上より、本研究は実務に直ちに応用できる実践的で独創的な研究であり、簡便かつ経済的な方法を採用し、再現性にもすぐれているという長所を有する。したがって、学位の授与に値すると考えられる。