

京都大学	博士 (医 学)	氏 名	濱野悠也
論文題目	Forensic age prediction by use of methylation-sensitive high resolution melting (メチル化感受性高精度融解分析を用いた法医学的年齢推定)		
(論文内容の要旨)			
<p>現在の法医学領域における年齢推定は、試料として白骨や歯を用いる手法に限定されている。そこで、血液や唾液等の犯罪現場に遺留される体液試料における DNA のメチル化率を指標とした年齢推定の研究が進められているが、高コストな測定機器を必要としたり、年齢予測結果を得るまで一週間近くの時間を要したりするため、現在のところ実務応用には至っていない。また、DNA のメチル化率を指標とした年齢推定手法が、死体血についても適用可能かどうかや、煙草の吸殻に付着する唾液のような犯罪現場に遺留される試料にも適用できるかどうか等の知見も存在しない。</p> <p>本研究では DNA のメチル化率を指標とした年齢推定を科学捜査実務に応用することを目的とし、大きく分けて二つの検討を行った。第一は、メチル化感受性高精度融解分析 (Methylation-sensitive high resolution melting; MS-HRM) を用いた安価かつ迅速なメチル化率検出系による、血液 DNA を対象とした年齢推定手法の構築である。また、開発した手法を実務応用する上で必要となってくる条件検討として、生体血と死体血の比較による死後経過に伴う DNA のメチル化への影響調査も行った。第二は、唾液 DNA を対象とした年齢推定手法の構築である。人体から直接採取した唾液とタバコの吸殻に付着する唾液の比較による喫煙習慣や、煙草の含有成分による年齢推定への影響調査も併せて行った。</p> <p>第一の検討である MS-HRM を用いた血液を対象とする年齢推定系の構築では、ELOVL2 と FHL2 のプロモーター領域に対して、新たに HRM 用プライマーを設計し、生体あるいは死体から採取した 74 名分の血液 DNA に対しバイサルファイト処理を行った。次に、設計したプライマーを用いて PCR 増幅し、メチル化率既知のサンプルと合わせて MS-HRM を行うことでメチル化率を算出した結果、両マーカーとも年齢とメチル化率の正の相関が観察された。これについて機械学習の一種であるサポートベクター回帰を行い、年齢予測モデルを構築したところ、実年齢と予測年齢との誤差の平均 (MAD) は 7.05 年であった。また、生体血と死体血のメチル化率の差及び性別による差は、統計学的に無視できる程度であった。実際に、独立した 35 名分の死体血を用いてこのモデルを検証した結果、MAD は 7.28 年となり、年齢予測モデルが有効であることが示唆された。</p> <p>第二の検討である唾液では、ELOVL2 と EDARADD に対してプライマーを設計した。197 名から唾液を収集し、DNA を抽出した上でバイサルファイト処理を行い MS-HRM による測定を行った。ELOVL2 のメチル化率は、血液と同様に年齢と正の相関を示したが、EDARADD は負の相関を示した。これらのデータをもとに年齢予測モデルを構築した結果、MAD は 5.96 年となった。また、独立した 50 名分の唾液に対してこの予測モデルを適用した結果、MAD は 6.25 年となり、本予測モデルが有効であることが示唆された。さらに、犯罪現場試料を想定し、7 本の煙草から採取した唾液について年齢推定を行ったところ MAD は 7.65 年</p>			

となった。また、喫煙習慣や煙草の含有物自体が年齢推定結果に与える影響は統計学的に無視できる程度であった。

これらの結果から、MS-HRM を使用することで、血液や唾液から科学捜査実務に十分応用可能な年齢推定を行えることが明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

年齢推定は法医学において重要な役割を果たしているが、費用や時間等の実際的な制約のため、体液を対象とした年齢推定実務は行われていない現状にある。本研究では、近年開発されたメチル化感受性高精度融解分析 (MS-HRM) を DNA のメチル化率の定量に応用し、血液及び唾液の 2 種類の体液について、実務志向の年齢推定法を考案した。

従来の年齢予測マーカーについて血液 DNA を用いて MS-HRM でメチル化率を定量したところ、ELOVL2 及び FHL2 のプロモーター領域にある CpG 群が有効であることが示された。また、両マーカーのメチル化率をもとにした年齢予測モデルの作成には、機械学習の一種であるサポートベクター回帰の利用が効果的であった。さらに、生体血と死体血の差あるいは男女の性別の差は統計学的に無視できる程度であった。予測年齢と実年齢の差の平均値 (MAD) は 7 年程度に留まった。

一方唾液では、ELOVL2 及び EDARADD のプロモーター領域の CpG 群が有効であり、MAD は 6 年程度であった。また、喫煙習慣の有無や煙草の成分が年齢予測に与える影響は統計学的に無視できる程度であることが判明し、本手法が煙草の吸殻に付着した唾液からの年齢推定についても有効であり、実務応用が可能であることが示された。

以上の研究は年齢と体液 DNA のメチル化率の関係の解明に貢献し、法医学における年齢推定手法の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 2 月 13 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降