

氏 名	吉 田 日 南 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2279 号
学位授与の日付	平 成 12 年 1 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Analysis of DNA polymorphisms for human identification (DNA 型分析法による個人識別に関する研究)

論文調査委員	(主 査) 教 授 佐々木隆造	教 授 熊谷英彦	教 授 天知輝夫
--------	--------------------	----------	----------

論 文 内 容 の 要 旨

社会の情報化の発展等に伴い、犯罪の凶悪化や隠蔽の巧妙化などが著しく、犯罪現場に残される証拠資料も微量であることが多い。そのため、微量な生体試料から該当人物を特定する必要性が生じており、より高い検出感度そしてより正確な識別力を持つ検査法が求められている。近年、核 DNA の塩基配列中の高度な多型性を分析する個人識別法である DNA 型分析法が開発された。また、極微量であったり、断片化している DNA を含む証拠資料から DNA 型分析を行うには、多型性を示す部位のみを増幅して検出する PCR (Polymerase Chain Reaction) 法の導入が不可欠である。そこで、本研究では、PCR 増幅法を応用した DNA 型分析法による個人識別を、犯罪鑑識に関係する証拠資料の DNA 型鑑定法として確立することを目的とした。

まず、限定された微量の生体試料中の DNA を効率的に抽出する方法について研究を行った。精液を含む混合斑痕は重要な証拠資料の一つである。このような試料から、精子の DNA 型を正確に検出するために、精子に由来する DNA と精子以外の細胞に由来する DNA とを分離して抽出する方法を検討した。精子頭部のタンパク質を分解するには、還元剤の存在が必要であるため、第 1 段階として還元剤を含まない条件で精子以外の細胞を分解し、さらに第 2 段階として精子頭部を分解して精子に由来する DNA の抽出を行う 2 段階抽出の方法を確立した。この方法により得られた精子 DNA は、他の細胞の DNA と良好に分離されていた。本資料を用いることにより、精子由来の DNA 型が検出されることが明らかとなった。

ヒトの核 DNA には、ある長さの塩基配列の反復回数の違いにより高度な多型性を示す VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) 部位がある。DNA 型鑑定法として証拠資料の分析に応用するために、特に日本人において高い多型性を示す VNTR 部位の一つである MCT 118 (D 1 S 80) 部位の検査法をとり上げ、再現性ならびに信頼性に関する研究を行った。2 名以上の同種の体液が混在した試料からは、それぞれに由来する DNA を分離抽出することはできないので、複数の DNA 型が混在して検出される。混合体液試料から MCT 118 部位 DNA 型検出を行い、DNA の混在が型判定に及ぼす影響及び検出限界の確認と評価を行った。その結果、混在比 5:1 が低濃度側の MCT 118 部位 DNA 型の検出限界であった。なお、反復回数が多く、PCR 増幅断片の長い対立遺伝子ほど検出されにくい傾向があり、混在 DNA 試料においては、それが顕著になる可能性も示唆された。以上の検討により、MCT 118 部位 DNA 型分析法は DNA 混在時の検出に有効であり、極微量の汚染などは検出されないため、証拠資料の DNA 型鑑定法として信頼性を持つことが明らかとなった。

2～5 塩基の短い反復単位を持つ VNTR, STR (Short Tandem Repeat) 部位を検査することにより、核 DNA の断片化が進行している試料からでも DNA 型分析ができる可能性がある。高分解能を示す変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動及び銀染色法を用い、STR 部位の一種である TH 01 (HUMTH 01) 部位の DNA 型検出法を確立した。また、TH 01 部位は対立遺伝子出型頻度の解析から、日本人の個人識別に有効な多型部位であることを示した。

また、STR 部位の一つである CSF 1 PO (HUMCSF 1 PO) 部位は高い個人識別が可能と考えられるが、特異配列は短いものである。PCR 増幅断片をさらに短くするようにプライマーの位置を改良することによって、断片化の進んだ DNA 試料からの CSF 1 PO の検出の可能性を検討した。その結果、新たに設定した、短い PCR 増幅断片を生じるプライマーを用いるこ

とにより、従来用いられていたプライマーによっては増幅が不可能であった陳旧血痕試料からも、CSF 1 PO 部位を増幅することが可能となった。

このことより、断片化の進んだ DNA を含む証拠資料の DNA 型分析として PCR 増幅断片の短い STR 部位を対象とすることが有効であることを証明した。

論文審査の結果の要旨

近年、犯罪の凶悪化や隠蔽の巧妙化などが顕著となっており、犯罪現場に残された微量な生体試料からの個人識別が大きな課題となっている。本論文は、核 DNA の多型性の分析による個人識別法の信頼性及び再現性について検討を行い、証拠資料の DNA 型鑑定法を確立するに至った研究成果をまとめたものである。

本論文の評価すべき主要な点は以下の通りである。

1. 精液と他の体液の混合斑痕から、精子由来の DNA 分析を可能とするために、効率的な DNA の分離抽出法を開発した。この方法により精子 DNA は他の細胞 DNA から良好に分離抽出され、感度の高い PCR 増幅法により、精子由来の DNA 型を得ることが可能となった。

2. 異なる人の体液が混在した試料を用いて、MCT 118 部位 DNA の検出感度について検討したところ、混合比 5 : 1 が低濃度側の DNA 分析の検出限界であった。このことより、MCT 118 部位検査法は混在斑痕の DNA 型分析に有用であり、証拠資料の DNA 型鑑定法として信頼性を持つことを明らかにした。

3. STR 多型部位の一種である TH 01 部位の正確で安定した検出法を確立した。さらに、TH 01 部位は日本人の個人識別に有用な STR 部位であることを明らかにした。

4. CSF 1 PO 部位のプライマー位置を、短い PCR 増幅断片を生じるように改良した。これより、PCR 増幅断片の短い STR 部位の検査が可能となり、断片化の進んだ DNA からの DNA 型分析が可能であることを示した。

以上のように、本論文は、微量のヒト生体試料の DNA 多型性を解析することにより個人識別法を開発したものであり、犯罪鑑識科学に貢献し、応用生命科学に寄与するところが大きい。よって、本論文は、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 11 年 11 月 11 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。