



## 論文内容要旨

1987年, Nakamura らはミオグロビンやZ-グロビン等の遺伝子の特徴的繰り返し配列をプローブとしてヒト DNA ライブラリーをスクリーニングし, 高多型性 (VNTR) マーカーを作製した。ここで得られる多型性は繰り返し配列の数に立脚するものである。今回, この遺伝的多型性を検出する高多型性マーカー 7 種をプローブとして用い, 仙台地区日本人集団における対立遺伝子の種類と頻度を求めて数理的評価を行い, 親子鑑定・個人識別への適用について検討した。

### 【材料および方法】

genomic DNA はヒト末梢血 buffy coat から actinase E, phenol/chloroform を用いる標準的な方法によって抽出した。アガロース電気泳動, サザンブロッティング, ハイブリダイゼーションは常法に従い行なった。今回用いた 7 種のプローブのうち pYNH24, pYNZ22, pYNY22 の 3 種は Nakamura らが開発したプローブであり, Japanese Cancer Research Resources Bank より供与をうけた。pYNH24 は HBV-1 fragment で 2q に局在している。pYNZ22, pYNY22 は zeta globin fragment でそれぞれ 17q, 1p に局在している。MR24/1 は X および Y 染色体のテロメアに存在する pseudoautosomal region に assign している。3' Globin は 17bp の tandem repeat array からなっており, 16p12pter に局在している。Ha-ras は 28bp の consensus sequence の繰り返しからなっており, 11p15.5 に局在している。Mucin は 60bp の tandem repeat array からなっており, 1q21 に局在している。pYNH24, pYNZ22 をプローブとして用いる場合には制限酵素 *Msp* I を使用した。pYNY22 では *Rsa* I を使用した。MR24/1, 3' Globin, Ha-ras, Mucin の 4 種では, それぞれのプローブについて 6 種の制限酵素 (*Hinf* I, *Alu* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Taq* I, *Rsa* I) を使用し対立遺伝子の出現する範囲を観察して, 適切な制限酵素を選んだ。その結果, MR24/1 をプローブとして用いる場合には *Hinf* I を使用し, 3' Globin, Ha-ras, Mucin には *Pvu* II を用いることにした。これら 7 種のプローブ-制限酵素の組合せを, 仙台地区日本人集団の対立遺伝子頻度の検討に用いた。

### 【結果および考察】

検出されるバンドは 2 本 (heterozygote) ないし 1 本 (homozygote) であり, pYNH24, pYNZ22, pYNY22 ではそれぞれ 33, 15, 5 種類の, MR24/1, 3' Globin, Ha-ras, Mucin ではそれぞれ 37, 39, 5, 10 種類の異なった対立遺伝子由来と考えられるバンド長が認められた。heterozygosity rate は対立遺伝子の種類の多い MR24/1, pYNH24, 3' Globin, pYNY22 で高く,

対立遺伝子の種類が少なく分布状態に偏りのある pYNZ2, Mucin, Ha-ras で低い。これらのプローブの親子鑑定・個人識別における4種類の指標を算出した。母子関係は確実であるが父親が不明の場合の父権排除率 (AF/M/C) は, pYNH24, pYNZ22, pYNZ2, MR24/1, 3' Globin, Ha-ras, Mucin でそれぞれ0.891, 0.828, 0.293, 0.924, 0.859, 0.252, 0.350と算出された。両親が不確実な場合の父権排除率 (P/C) はそれぞれ0.804, 0.706, 0.168, 0.859, 0.756, 0.103, 0.169と算出された。最も高値を示した MR24/1では従来の血液型10種を総合した時の排除率に匹敵し, 最も低い Ha-ras でも MNSs, Rh-Hr, PGM の排除率に匹敵する。これら7種のプローブを総合した父権排除率 (AF/M/C) は0.999931となり, これに従来の血液型17種による排除率0.9776を総合すると0.999985という極めて高い値が得られた。また血縁関係のない2名が, 同じ genotype である確率 probability of matching (2 random persons) は, それぞれ  $5.51 \times 10^{-3}$ ,  $1.35 \times 10^{-2}$ , 0.265,  $2.74 \times 10^{-3}$ ,  $8.42 \times 10^{-3}$ , 0.341, 0.237と算出された。無作為に選んだ同胞が同じ genotype である確率 probability of matching (2 siblings) は, それぞれ0.278, 0.296, 0.530, 0.269, 0.289, 0.616, 0.544と算出された。7種のプローブ全てを用いると血縁関係のない2名の個人が全く同じ genotype である確率は  $3.68 \times 10^{-11}$  である。また無作為に選んだ同胞2名が全く同じ genotype である確率は  $1.14 \times 10^{-3}$  となった。

これら高多型性マーカーを実際の親子鑑定34事例に適用し, 父権を否定できなかった25事例について, 従来の血液型17種を併用した場合の父権指数 (paternity index, PI) を比較検討した。従来の血液型による PI は, 1290から0.11の範囲に, DNA 分析による PI は  $7.3 \times 10^6$  から770の範囲にあった。各事例においてDNA分析による PI は, 従来の血液型による PI の約4.5~2000000倍の高値を示した。これらの事例中には従来の血液型による PI が非常に低く, DNA分析なしでは父権肯定の判断が困難であった例があった。DNA分析では突然変異について留意しなければならないが, 今回著者が検討した7種のプローブではその可能性は低く, 従来の血液型をはるかに上回る父権排除率および父権指数が得られ, 親子鑑定・個人識別に極めて有用であるといえることができる。

## 審査結果の要旨

本論文は、単一遺伝子座位を認識する高多型性マーカー7種をプローブとして、仙台地区日本人集団における対立遺伝子の種類と頻度を求めて数理的評価を行い、親子鑑定・個人識別への適用について検討したものである。

まず始めにプローブと制限酵素の組合せについて検討を行っている。得られた組合せにしたがいサザンハイブリダイゼーションを行い、仙台地区日本人集団 (n=138~236) の対立遺伝子頻度の検討を行っている。

pYNH24, pYNZ22, pYNZ2ではそれぞれ33, 15, 5種類の, MR24/1, 3' Globin, Ha-ras, Mucinではそれぞれ37, 39, 5, 10種類の対立遺伝子が認められ, heterozygosity rateは対立遺伝子数の多いpYNH24, pYNZ22, MR24/1, 3' Globinで高く, 対立遺伝子数の少なくかつ分布状態に偏りのあるpYNZ2, Ha-ras, Mucinで低いという結果が得られた。これらのプローブの親子鑑定・個人識別における4種の指標, 父権排除率 (AF/M/C), 父権排除率 (P/C), probability of matching (2 random persons), probability of matching (2 siblings) の算出を行った。親子鑑定において判定能力の最も高いMR24/1の父権排除率は, 従来の血液型10種を総合したそれに匹敵し, 最も低いHa-rasでもMNSs, Rh-HrまたはPGMの排除率に相当する結果が得られた。これら7種のプローブを総合した父権排除率 (AF/M/C) は0.999931となり, これに従来の血液型17種による排除率0.9776を総合すると0.999985という極めて高い値が得られた。また7種のプローブ全てを用いた個人識別では, 血縁関係のない2名の個人が全く同じgenotypeである確率は $3.68 \times 10^{-11}$ であり, 無作為に選んだ1組の同胞2名が全く同じgenotypeである確率は $1.14 \times 10^{-3}$ となって, これらのプローブの個人識別における有用性が示された。これらの優れた成績が, 標本数が少ないための偶然かどうかを確認するため, ジャックナイフ法を用いて信頼区間の推定を行っている。

更に, これら高多型性マーカーを実際の親子鑑定34事例に適用し, 父権を否定できなかった25事例について, 従来の血液型17種を併用した場合の父権指数 (paternity index, PI) の比較検討を行っている。従来の血液型によるPIは, 1,290から0.11の範囲に, DNA分析によるPIは $7.3 \times 10^6$ から770の範囲にあり, 各事例においてDNA分析によるPIは, 従来の血液型によるPIの約4.5~2,000,000倍の高値であることが明らかになり, 親子鑑定に極めて有用であることが示された。

本研究のように, 高多型性DNAマーカーをプローブとして日本人集団における対立遺伝子数と頻度を求め, 数理的に評価する試みは, 原著発表時には殆ど報告がなく, 貴重な成績であるといえる。また実務面でも極めて有用であることが示されている。よって本論文は学位論文に値すると考えられる。