

# DNA 解析による性別判定

田 中 幸 一

信州大学医学部麻酔・蘇生学教室

(主任: 清野 誠一教授)

## Sex Determination by DNA Analysis

Koichi TANAKA

*Department of Anesthesiology and Resuscitology,*

*Shinshu University School of Medicine*

*(Director: Prof. Seiichi KIYONO)*

Sex determination in the human species normally depends on the presence or absence of the Y chromosome.

DNA was extracted from 10  $\mu$ l of one-year-old dried blood spots on paper, digested with restriction enzyme, subjected to electrophoresis, transfer and hybridization. The human male Y-specific probe was hybridized with Y-specific 3.5kb repetitive-DNA.

In order to make a comparison with DNA microextraction methods for the PCR (polymerase chain reaction) template, many DNA samples were prepared from bloodstains and hairs with various methods, such as phenol-microconcentrator, phenol-ethanol precipitation, Tween 20-treatment and boiling. PCR was carried out at 95°C, 55°C and 72°C for 30 cycles using two pairs of primers (Y1, Y2 and X1, X2). The 170-bp amplification product was detected in male DNA from 0.5~1.0  $\mu$ l of three-year-old bloodstains extracted by either the phenol-microconcentrator method or phenol-ethanol precipitation method. Although the same patterns of PCR product were obtained for 1  $\mu$ l 6-month-old male bloodstains extracted by Tween 20-treatment, amplified DNA was not detected in one-year or older bloodstains. In contrast, a relatively large amount of bloodstains was required for sex determination of DNA extracted by the boiling method. Amplified results were reobtained from DNA of hair roots or the hair shaft (2cm) extracted by both. The phenol-microconcentrator method has been successfully applied to DNA extracted from 2-year-old paraffin blocks.

For clinical application, PCR was performed to detect Y-specific DNA in abnormal Y-chromosomes. These results obtained by PCR were consistent with those of Southern hybridization. This PCR method may be very useful in neonatal screening for some genetic diseases and in forensic research for the analysis of biological evidence. *Shinshu Med. J.*, 40: 61-70, 1992 (Received for publication September 27, 1991)

---

**Key words:** sex determination, PCR, Y-specific probe, Y-specific primers

性別判定, PCR, Y 特異的プローブ, Y 特異的プライマー

---

### I 緒 言

現在, 2千種類を越える遺伝性疾患が知られているが, その全ての病因遺伝子が解明されているわけでは

ない<sup>1)</sup>。出生した子供の遺伝病診断や出生前診断には一般に分子遺伝学の手法によらない診断法が広く用いられている。当然ながら, 検査方法の限界があり, また出生前診断に用いられる材料は, 羊水や絨毛細胞,

胎児血液などであるため、これらに発現されない酵素などについては診断できない場合が多い。ところが、近年の遺伝子工学の進歩に伴い、従来原因不明であった遺伝性疾患が次々と分子レベルで明らかにされるようになってきた。

DNA 診断に用いられる方法として、①サザンハイブリダイゼーション法、②ドットハイブリダイゼーション法、③DNA 塩基配列決定法、④ *in situ* ハイブリダイゼーション法、⑤PCR (polymerase chain reaction) 法等があげられ、遺伝子の欠損、挿入、突然変異の検出が可能となった。ところで、血友病や筋ジストロフィーなどの伴性劣性遺伝疾患の負荷をもつ女性の場合、妊娠時に胎児の性別を確定することは重要であり、このような胎児の性別判定にY染色体に特異的なDNAプローブを用いた性別判定が試みられてきた。しかし、従来のサザンプロット法は数 $\mu\text{g}$ 以上のDNA量を必要とし、さらに検出感度の点から放射性同位元素を用いるためルーチン検査としては利用価値の高い方法とは言えなかった。

近年、Saikiら<sup>2)</sup>によって開発された耐熱性DNAポリメラーゼを用いたPCR法は目的DNAを増幅してDNA診断に応用する方法である。従来のDNAプローブを使用するサザンハイブリダイゼーション法に比べ操作が簡単であり、放射性同位元素を用いなくても検出感度はきわめて優れている。また、性別判定は出生前DNA診断のみならず法医学上個人識別の一分野として非常に重要な課題である。

本研究では極微量試料から種々の方法でDNAを抽出し性別判定を試みた。さらに臨床応用として性染色体異常疾患症例などの性別を検討した。

## II 材料および方法

### A DNA抽出法

#### 1 フェノール抽出・エタノール沈殿法

血液はEDTA (ethylene diamine tetra acetate) 入り真空採血管で採血後、マイクロチューブに一定量を分注した。また、血痕の作成は、それぞれ一定量の血液を濾紙 (Whatman 3MM) に染み込ませた後、室温で暗所に保存した。

試料に、Blood Lysis Buffer<sup>3)</sup> (0.32M Sucrose, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1% Triton X-100, 10mM Tris-HCl, pH7.6) を添加後13,000rpmで5分間遠心し、上清を捨てた。次いで、30 $\mu\text{l}$ のbuffer (0.1M Tris-HCl, 0.1M EDTA, 1M NaCl, pH8.0), 30 $\mu\text{l}$ の10% SDS

(sodium dodecyl sulfate) に Proteinase K (最終濃度50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加え蒸留水にて総量300 $\mu\text{l}$ とし60°Cで2時間インキュベートした。

反応後、等量のフェノールを加えてゆっくり30分間混和した。その後、13,000rpmで5分間遠心し水層を新しいマイクロチューブに取り、等量のクロロホルムを加え、同様の操作を繰り返した。さらに、13,000rpmで5分間遠心し水層を新しいマイクロチューブに取り、水層の10分の1量の3M酢酸ナトリウム (pH5.2) を添加し、100%冷エタノールを2倍量加え軽く混和したのち13,000rpmで10分間遠心した。上清を捨て70%冷エタノールを加えて軽く混和したのち、13,000rpmで10分間遠心した。上清を除去し、真空乾燥後、TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5) を加えて4°Cにて保存した。

毛髪はエタノールと蒸留水で2度洗浄して細切した後、血痕の場合と同じように Proteinase K 処理後、同様の処理を行った。

性染色体異常疾患① Turner 症候群 (45,XO) ② Phenotype 男性 (46,XX) ③ mosaic (46,XY/47, XYY) ④ Supermale (47, XYY) ⑤ Phenotype 女性 (46,XY) などのDNAは血液よりフェノール抽出・エタノール沈殿法によって得られた試料で、東京医大 (生化学 長井光三講師) から供与されたものを使用した。

#### 2 フェノール抽出・微量濃縮法

血痕および毛髪試料はフェノール抽出・エタノール沈殿法の場合と同様にフェノール抽出までを施行後、遠心分離を行い水層部分を微量濃縮器 (セントリコン30, アミコン社) に移し、TE buffer を1ml添加して2,000rpmで20分間遠心した。さらにTE buffer を1ml加えて20分間遠心後、滅菌蒸留水を1ml加え、再度2,000rpmで30 $\mu\text{l}$ 程度になるまで濃縮遠心した。

#### 3 Tween 20可溶化法

血痕試料を細切したのち、Blood Lysis Buffer を添加し室温にて30分間適宜攪拌し、13,000rpmで10分間遠心後上清を捨てた。Digestive Buffer (50mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20, pH8.5) 0.3mlを加えて、13,000rpmで5分間遠心後上清を除去し、同様の操作を2度繰り返し、Proteinase K (最終濃度50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む Digestive Buffer 30 $\mu\text{l}$ を加えて、60°Cにて2時間反応した。酵素を失活させるため10分間煮沸熱処理し、さらに遠心分離後上清を4°Cにて保存した。

## 4 沸騰法

Witt と Erickson<sup>4)</sup>の方法に従い処理を行った。まず、血痕濾紙の入ったマイクロチューブ①に生理食塩水を添加し室温にて2時間適宜攪拌後、水層を新しいマイクロチューブ②に採取し13,000rpmで5分間遠心し上清を除去した。次に、血痕試料の入った最初のマイクロチューブ①に再度生理食塩水を加え、攪拌後水層をマイクロチューブ②に採取し、これを13,000rpmで5分間遠心し上清を捨て、その沈渣に蒸留水を30 $\mu$ l加えて10分間煮沸熱処理し4°Cにて保存した。

5 パラフィン切片からの抽出<sup>5)</sup>

パラフィン切片(5~10 $\mu$ m数枚)に1mlのキシレンを加え、12,000rpmで3分間遠心後上清を捨て、この操作を2回繰り返した。次いで、1mlのエタノールを加え、12,000rpmで3分間遠心後上清を捨て、この操作を2回繰り返した。次いで、1mlのエタノールを加え、12,000rpmで3分間遠心後上清を捨て、再度同様の操作を行い風乾した。30 $\mu$ lのbuffer(0.1M Tris-HCl, 0.1M EDTA, 1M NaCl, pH8.0), 30 $\mu$ lの10% SDSにProteinase K(最終濃度250 $\mu$ g/ml)を加え蒸留水にて総量300 $\mu$ lとし60°Cで5時間以上インキュベートした。反応後等量のフェノールを加え、以後微量濃縮器(セントリコン 30)を用いて血痕試料と同様な操作を行った。

## B サザンハイブリダイゼーション法

フェノール抽出・エタノール沈殿法にて抽出調製したDNA試料を制限酵素(Hae III)にて切断後、0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動した。変性溶液中で穏やかに振盪し、蒸留水で洗った。アルカリ溶液中で振盪後、ナイロンメンブレン(アマシャム社製)にDNA断片を転写し、メンブレンを室温にて風乾した。

メンブレンをプレハイブリダイゼーション溶液(6 $\times$ SSC, 0.5% SDS, 5 $\times$ Denhardt's solution, 0.1 mg/ml of salmon sperm DNA)に65°Cで1時間浸し、<sup>32</sup>P(111 TBq/mmol, NEN社製)にて標識したY染色体特異的DNAプローブ(東京医大より供与)をプレハイブリダイゼーション溶液に加え、65°Cで5~10時間ハイブリダイゼーションを施行した<sup>6)</sup>。その後、メンブレンを①2 $\times$ SSC(0.15M NaCl, 15mM citrate-Na)溶液で15分間2回、②2 $\times$ SSC, 0.1% SDS溶液で10分間③0.1 $\times$ SSC溶液で10分間、それぞれ洗浄し、-80°Cで1~3時間X線フィルムに感光した。

## C PCR法

表1 プライマーの組成

X1:5'-	AAT	CAT	CAA	ATG	GAG	ATT	TG
X2:5'-	GTT	CAG	CTC	TGT	GAG	TGA	AA
Y1:5'-	ATG	ATA	GAA	CGG	AAA	TAT	G
Y2:5'-	AGT	AGA	ATG	CAA	AGG	GCT	CC

抽出処理したDNA試料に、5 $\mu$ lのPCR用buffer[500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH8.4, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% (W/V)ゼラチン, NONIDET P-40 (SIGMA社) 0.2%], 8 $\mu$ lのdNTPs(ATP, GTP, CTP, TTPそれぞれ125mM), プライマー各2 $\mu$ l(1 ng)を加えた。次に、Taq polymerase(5 units/ $\mu$ l, 宝酒造)0.25 $\mu$ lを加え全量を50 $\mu$ lとし、よく攪拌後Light Mineral Oil (SIGMA社)を重層した。プライマーの塩基配列は表1に示す。Thermal Sequencer (Iwaki社)を用いて、95°Cで1分間熱処理した後、熱変性ステップ95°C・1分間、アニーリング・ステップ55°C・1分間、相補鎖合成ステップ72°C・2分間で30サイクル行い、最後に72°C・5分間を追加した。PCR終了後、4°Cにて保存した。

電気泳動(ミニのサブマリン型泳動)には12%ポリアクリルアミドゲルと $\times 1/2$  TBE buffer(8.9mM Tris-HCl, 8.9mM boric acid, 0.25mM EDTA)を用い、エチジウムブロマイドで染色後130bp(X染色体特異的)と170bp(Y染色体特異的)のバンドを確認した。分子量マーカーにはpBR322を制限酵素(Hae III)にて切断したものを用いた。

## III 結 果

## A サザンハイブリダイゼーション法による性別判定

濾紙に付着した種々の血痕量からフェノール抽出・エタノール沈殿法によってDNAを抽出し、制限酵素(Hae III)で切断後、サザンハイブリダイゼーション法によって性別判定を行った。<sup>32</sup>Pで標識したY染色体特異的プローブを用いて3.5kbのバンドの有無を検討したところ、10 $\mu$ lの血痕(男性)でしかも1年経過した試料で性別判定が可能であった(図1)。一方、女性の血痕試料からは3.5kbのバンドが検出されなかった。

## B PCRによる性別判定

## 1 PCR反応条件の検討

新鮮血液(男性)からフェノール抽出・エタノール沈殿法によって比較的の不純物の少ないDNAを精製し、

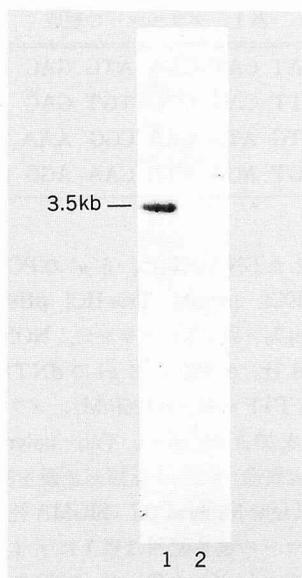


図1 血痕からの3.5kb (Y染色体特異的) バンドの検出  
 レーン1: 10 $\mu$ l (男性, 1年経過)  
 レーン2: 10 $\mu$ l (女性)

このDNAを用いてPCRの反応条件を検討した。PCR反応には特にMg<sup>2+</sup>濃度が重要であり、1.5mM、2.5mMのMg<sup>2+</sup>濃度で反応した場合Y1、Y2プライマーでは男性に特異的な170bpのバンドが検出された(図2A)。しかし、2.5mMでは170bp以外に多くの非特異的バンドが認められ(図2A, レーン2)、以後のPCR反応には1.5mMのMg<sup>2+</sup>濃度を用いた。

テンプレートDNAの量的変化と増幅DNAの関係をみたのが図2のBとCである。Y1・Y2プライマーでは170bpの、またX1・X2プライマーでは130bpの濃いバンドが得られたが、テンプレートDNAが増加するに伴って非特異的バンドが多くみられた。したがって、テンプレートDNA量は50ng以下が至適濃度である。

## 2 極微量試料からのDNA抽出

極微量の血液を濾紙に付着させて、一定期間保存した血液試料から4種類の方法でDNAを抽出し、性別判定を試みた。DNA抽出には①フェノール抽出・微量濃縮法、②フェノール抽出・エタノール沈殿法、③Tween 20可溶化法、④沸騰法の4種類を用いた。3年経過した男性の血痕からフェノール抽出・微量濃縮

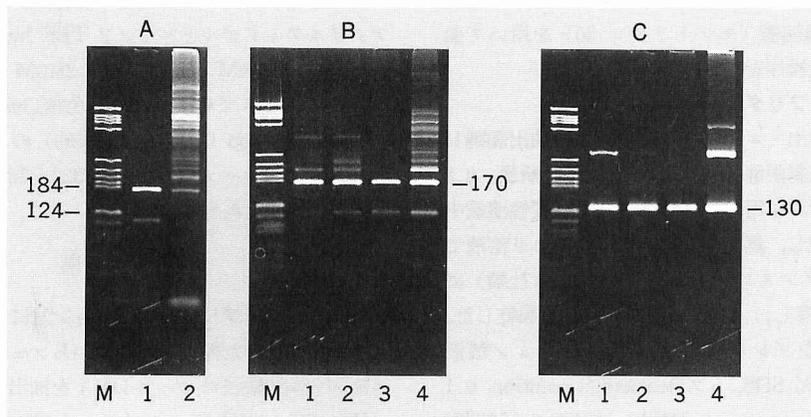


図2 PCR反応条件(男性DNA使用)

A Mg<sup>2+</sup>濃度による170bpバンドの変化  
 レーン1: 1.5mM, レーン2: 2.5mM

B DNA量による170bpバンドの変化  
 レーン1: 1ng, レーン2: 10ng  
 レーン3: 50ng, レーン4: 100ng

C DNA量による130bpバンドの変化  
 レーン1: 1ng, レーン2: 10ng  
 レーン3: 50ng, レーン4: 100ng

レーンMは分子量マーカー

X1, X2プライマー: C

Y1, Y2プライマー: A, B

DNA 解析による性別判定

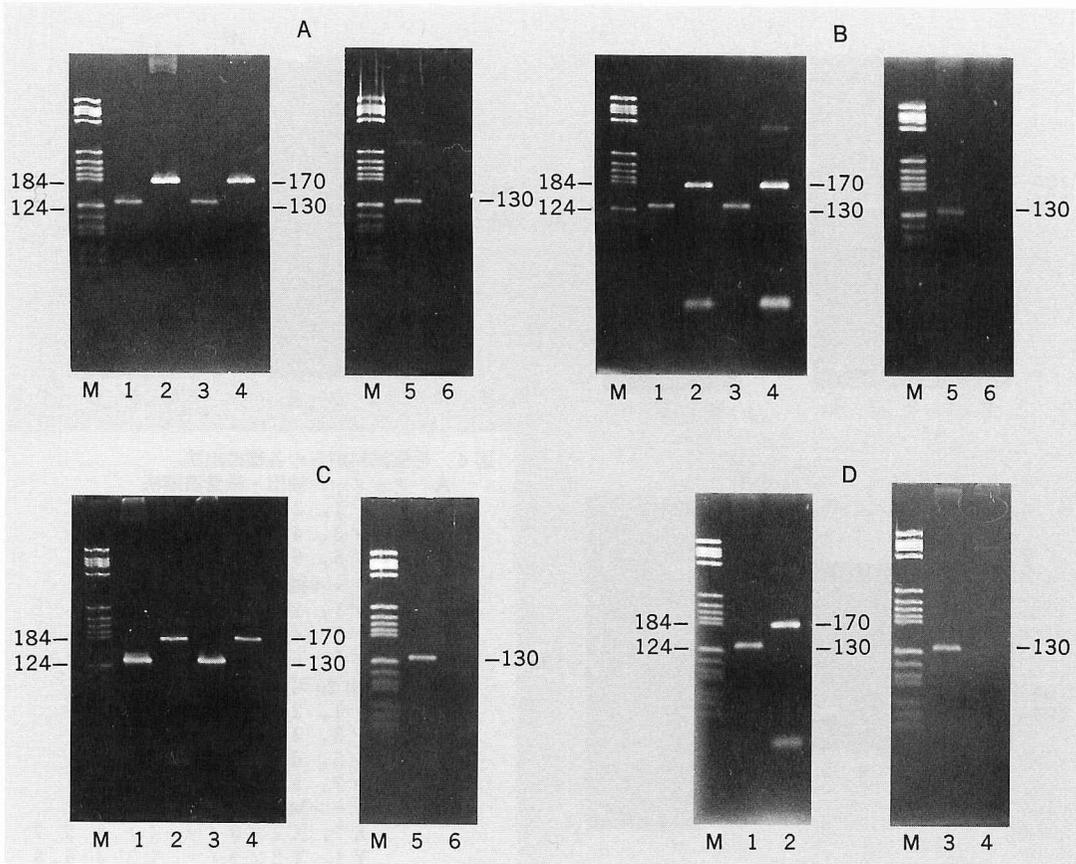


図3 血痕試料からの各種の抽出法

- A フェノール抽出・微量濃縮法  
 レーン1, 2: 0.5 $\mu$ l (男性)  
 レーン3, 4: 5 $\mu$ l (男性)  
 レーン5, 6: 5 $\mu$ l (女性)
- B フェノール抽出・エタノール沈殿法  
 レーン1, 2: 1 $\mu$ l (男性)  
 レーン3, 4: 5 $\mu$ l (男性)  
 レーン5, 6: 5 $\mu$ l (女性)
- C Tween 20 可溶化法  
 レーン1, 2: 1 $\mu$ l (男性)  
 レーン3, 4: 5 $\mu$ l (男性)  
 レーン5, 6: 5 $\mu$ l (女性)
- D 沸騰法  
 レーン1, 2: 50 $\mu$ l (男性)  
 レーン3, 4: 50 $\mu$ l (女性)  
 レーンMは分子量マーカー  
 X1, X2プライマー: 1, 3, 5  
 Y1, Y2プライマー: 2, 4, 6

法でDNAを抽出しPCRを行ったところ170bpと130bpのバンドが検出された(図3A)。フェノール抽出・エタノール沈殿法で抽出した場合、3年経過した1 $\mu$ l以上の血痕で性別判定が可能であった(図3B)。一方、6ヵ月未満の血痕ではTween 20可溶化法で抽出した場合、1 $\mu$ l以上の血痕で判定可能であったが、約6ヵ月以上経過した試料の判定ができなかった(図3C)。沸騰法は比較的多くの試料を必要とし50 $\mu$ l以上で170bpのバンド検出が可能であった(図3D)。

2cmの毛髪では、フェノール抽出・微量濃縮法とTween 20可溶化法で170bpのバンドが検出された(図4A, C)。一方、フェノール抽出・エタノール沈殿法では2cmより多くの毛髪が必要であった(図4B)。以上の結果をまとめたのが表2である。

5~10 $\mu$ mのパラフィン切片数枚からフェノール抽出・微量濃縮法でDNAを抽出し、性別判定を試みた。2年経過した試料からでも明らかなバンドが検出され、性別判定が可能であった(図5)。

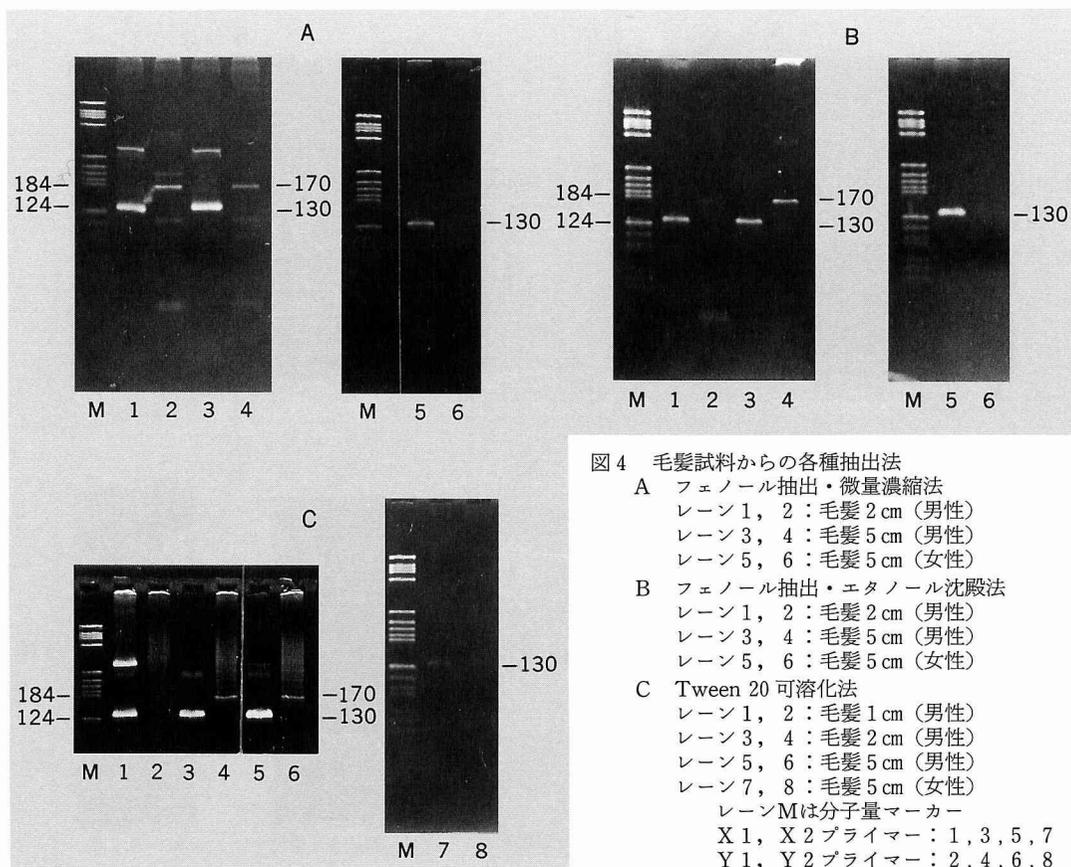


図4 毛髪試料からの各種抽出法  
 A フェノール抽出・微量濃縮法  
 レーン1, 2:毛髪2cm (男性)  
 レーン3, 4:毛髪5cm (男性)  
 レーン5, 6:毛髪5cm (女性)  
 B フェノール抽出・エタノール沈殿法  
 レーン1, 2:毛髪2cm (男性)  
 レーン3, 4:毛髪5cm (男性)  
 レーン5, 6:毛髪5cm (女性)  
 C Tween 20可溶化法  
 レーン1, 2:毛髪1cm (男性)  
 レーン3, 4:毛髪2cm (男性)  
 レーン5, 6:毛髪5cm (男性)  
 レーン7, 8:毛髪5cm (女性)  
 レーンMは分子量マーカー  
 X1, X2プライマー: 1, 3, 5, 7  
 Y1, Y2プライマー: 2, 4, 6, 8

C 性染色体異常疾患などの検討例

性染色体異常疾患4例と pure gonadal dysgenesis 1例の性別判定をPCRを用いて検討した(図6)。  
 ① Turner 症候群 (45, XO), ②モザイク (46, XY/47, XYY), ③ Phenotype は male (46, XX), ④ Supermale (47, XYY), ⑤ Phenotype は female (pure gonadal dysgenesisで46, XY) の5症例についてPCRを行ったところ, X染色体を有する場合はX特異的領域が, またY染色体を有する場合Y特異的領域が検出された。同量のDNAをテンプレートとした場合, 検出されるバンドの濃度差は認められなかった。

IV 考 察

法医学における鑑定業務の重要な目的の1つは, 発見された死体や白骨, 血液などから個人を識別・同定することである。

死体の外見的特徴からの個人識別は, 死体の損傷が激しいほど, また死体の死後変化が進めば進むほど,

個体の特徴を示す情報が失われるため, 誤判定の危険も大きくなる。

歯牙・骨などの比較的長く温存される硬組織や血液・精液などの体液から性別の判定が可能となれば, 個人識別や犯罪捜査においてきわめて重要な情報を得ることができる。白骨死体などでは形態的検査が行われており, この方法は骨の部分的な差から, 男女識別を行うもので熟練した鑑別人でも判定を誤る危険性がある。したがって, これらの欠点を補充するために統計学的方法を応用した男女の判別関数が報告されている。しかし, このような検査では骨盤等の骨がかなりよく保存されていることが必要であり, 形態的観察のみで血痕や毛髪などの遺留物より性別を正しく判定することは困難なことが多い。

性染色体の特徴的所見から歯牙, 血痕, 唾液, 毛髪などを用いて性別を判定する方法には, ドラムスティックやYクロマチンなどの性染色体上の特徴を利用する方法等がある<sup>9)</sup>。Pearsonら<sup>10)</sup>は, ヒトの23対の染色

DNA 解析による性別判定

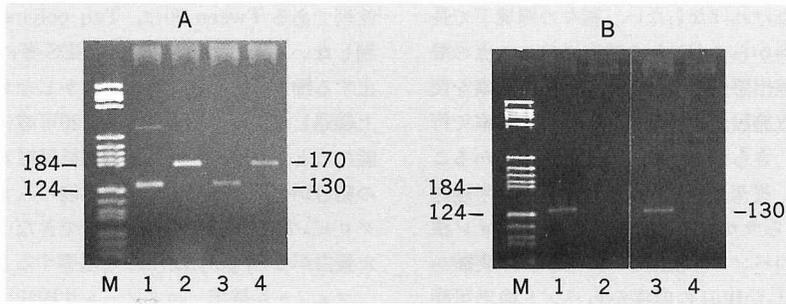


図5 2年経過したパラフィン切片からの性別判定

- A 男性の標本  
 レーン1, 2: 脳標本  
 レーン3, 4: 心臓標本
- B 女性の標本  
 レーン1, 2: 脳標本  
 レーン3, 4: 心臓標本
- レーンMは分子量マーカー  
 X 1, X 2 プライマー: 1, 3  
 Y 1, Y 2 プライマー: 2, 4

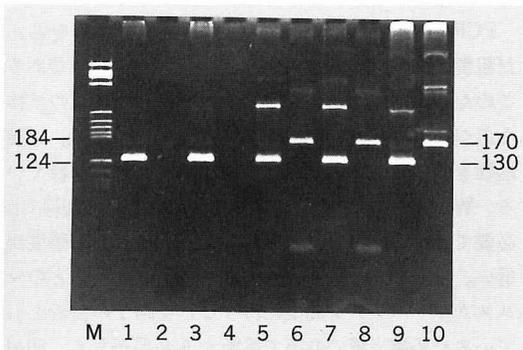


図6 性染色体異常の症例等の性別判定  
 レーン1, 2: Turner 症候群 (45,XO)  
 レーン3, 4: Phenotype 男性 (46,XX)  
 レーン5, 6: mosaic (46,XY/47,XYY)  
 レーン7, 8: Supermale (47,XYY)  
 レーン9, 10: Phenotype 女性 (46,XY)  
 レーンMは分子量マーカー  
 X 1, X 2 プライマー: 1, 3, 5, 7, 9  
 Y 1, Y 2 プライマー: 2, 4, 6, 8, 10

体をキナクリンマスタード蛍光染色で染め、蛍光顕微鏡で観察するとY染色体の長腕の遠位部が強い蛍光を発し、静止期の核においては強い蛍光を発する小体として観察されることを報告した。一部の性染色体異常症等をのぞけば、Yクロマチンは男性特有のものであり、Yクロマチンを検出できればその組織は男性由来の組織であると判定することができる。男性歯髄におけるYクロマチンの出現率は抜歯直後でも平均42%前後であり、また女性の歯髄においてもYクロマ

表2 各種抽出法によるY染色体特異的バンド (170bp) の検出限界

	血痕	毛髪
フェノール抽出・エタノール沈殿法	1.0 $\mu$ l	5cm
フェノール抽出・微量濃縮法	0.5 $\mu$ l	2cm
Tween 20 可溶化法	1.0 $\mu$ l	2cm
沸騰法	50 $\mu$ l	—

チン様スポットが平均0.7%にみられ、抜歯後時間経過とともに増加する傾向がある<sup>11)</sup>。このため、キナクリンマスタード蛍光染色によるYクロマチン検出法は、多数の細胞を染色し発色しているYクロマチン数を数えることによって男女識別を行うため、比較的多くの細胞を必要とし、性別判定も相対的判定となる。

Y染色体は進化の過程で1対の常染色体が特殊化してX染色体とY染色体に分れたものとされている。男性のY染色体上の長腕部には反復DNAが局在し、TTCCAの塩基配列を基本とする5塩基の反復単位を含む3.5kbの繰り返し配列が数千コピー存在し、これらの塩基配列も明らかにされた<sup>12)</sup>。そこで、男性に特異的なY染色体のDNAを直接検出するには、Y染色体に特異的な塩基配列の部分に対して相補的な塩基配列を有するヒトDNAプローブを用いて、サザンハイブリダイゼーションから検出する方法がある。しかしながら、この方法の欠点は目的の3.5kbのバンドを検出するためには抽出されたゲノムDNAが比較的可変性

の少ない試料でなければならない。種々の環境下で長年放置された試料からの DNA の抽出にはこの点の限界がある。また検出感度の点から放射性同位元素を使用するため特殊な施設が必要となり一般の検査室で行うことは難しく、さらに検出に比較的時間がかかることも欠点である。従来、McCabe ら<sup>13)</sup>が 4 ヶ月半経過した血痕 50 $\mu$ l からサザンハイブリダイゼーション法によって 3.5kb のバンドを検出しているが、本実験から 1 年近く経過した 10 $\mu$ l の血痕からバンド検出可能であることを明らかにした。

近年、Saiki ら<sup>14)</sup>は 2 種類の oligonucleotide と大腸菌の DNA polymerase I を用いて、目的とする DNA 部位の塩基配列を増幅することが可能な PCR 法を報告した。しかし、Klenow Polymerase は、90°C 以上を必要とする熱変性ステップにおいて失活してしまつたため、各サイクルごとに polymerase を追加する必要があり、きわめて複雑な方法であった。しかしながら、耐熱性 Taq polymerase を使用することによって、各ステップでの polymerase の追加の必要をなくし、操作を簡潔にすることが可能となった<sup>1)</sup>。さらに、アニーリング温度を高く設定可能となったため、従来の 37°C 前後の温度に比べて、プライマーが相補的な塩基配列のみと結合するため特異性が高まり、誤った塩基配列の増幅を防ぐことができるようになった。

性別判定にも PCR 法の導入が可能となり、現在では数種類の Y 染色体特異的プライマーが報告されている。たとえば、Kogan ら<sup>15)</sup>は、反復配列 DYZ 1 ファミリーの 1 単位の pHY10 のうち EcoR I 認識部位を挟む 154bp を増幅するプライマー (5'-TCC ACT TTA TTC CAG GCC TGT CC, 5'-TTG AAT GGA ATG GGA ACG AAT GG) を用いて性別判定を行った。また Akane ら<sup>16)</sup>は、男性では 2 本、女性では 1 本のバンドが検出されるプライマーを報告している。本研究で用いたプライマーはセントロメア付近の配列を検出するもので、170bp と増幅間隔が短く PCR 法には適したプライマーであり、また、Kogan らの用いたプライマーによる増幅部位よりも TDF (testis determination factor)<sup>17)</sup>に近いという利点を有している。

PCR 法はきわめて微量な試料より必要な DNA を増幅可能な方法であり、法医学的に利用価値は高いと考えられる。性別を判定するためには、0.5 $\mu$ l の新鮮血でフェノール抽出・微量濃縮法および Tween 20 可溶化法で性別判定が可能であった。非イオン性界面活

性剤である Tween 20 は、Taq polymerase 活性を抑制しないばかりでなく低濃度 SDS 等による阻害を防止する働きも知られている。しかしながら、6 ヶ月以上経過した血痕の場合 Tween 20 可溶化法では判定不能のことがあり、このことは濾紙繊維とヘモグロビンの結合が強く、Lysis buffer 処理のみでは十分にヘモグロビン等の蛋白を抽出・除去できないため、残存した蛋白が Taq polymerase を阻害すると考えられる。

フェノール抽出・エタノール沈殿法では、ヘモグロビン等の蛋白を十分に除去することが可能で比較的純度の高い DNA を得ることができ、遠心操作の過程で DNA の損失を伴う場合がある<sup>18)</sup>。しかし、フェノール抽出・微量濃縮法ではフェノール抽出後微量試料濃縮器 (セントリコン等) で濃縮するため DNA を十分に回収することができる利点がある<sup>19)20)</sup>。したがって、他の抽出法よりもすぐれた方法と考えられる。

PCR 法は、精製した DNA と同様に不純物を含んだ粗製 DNA でもテンプレートとして使用可能である。このため新生児のマススクリーニング等の多数の検体をあつかうのに適した方法であると考えられる。処理過程を簡単にするため種々の方法<sup>21)22)</sup>が報告されている。Witt と Erickson<sup>2)</sup>は、新鮮な血痕でも 50 $\mu$ l 以上必要であると報告しており、他の抽出法に比べ感度が低い。しかしながら、この方法は新生児検診などのマススクリーニングを簡便に行うことを第 1 の目的としているため極少量の血痕で診断する必要がなく、50 $\mu$ l 以上の新鮮な血痕による判定で十分であると考えられる。

毛髪に含まれる DNA 量のほとんどは毛根と毛根周囲細胞に含まれている。頭皮より引き抜き直後の毛髪に含まれる DNA 量について、Hukkelhoven ら<sup>21)</sup>は、0.5 $\mu$ g 前後、Higuchi ら<sup>22)</sup>は 0.2 $\mu$ g 以下で、毛根部を除くと 10ng 以下と報告している。本研究では、毛髪の DNA の大部分を含む毛根で 170bp や 130bp のバンド検出は可能であったが、毛根を含まない毛髪の場合フェノール抽出・微量濃縮法と Tween 20 可溶化法では 2cm 以上を必要とした。また、X 特異的バンドの検出は、毛髪 1cm で可能であり、このような差は両者の配列の反復数の違い (X: 5,000 copies<sup>23)</sup>, Y: 100 copies<sup>24)</sup>) によるものと考えられる。

古いパラフィン切片を用いた DNA 診断は、ウイルス疾患や癌診断を可能にすることができる非常に重要な方法である。パラフィン切片からの PCR 法にはフェノール抽出・微量濃縮法が最も有効であった。

出生前の胎児の性別を判定することは、血友病のような伴性劣性遺伝疾患の負荷をもつ妊婦にとっては重要な意味を持つと考えられる。また、Qバンド法等の染色体レベルにおける診断では正確に性別を判定できないようなXX-maleやXY-femaleについてもDNAレベルの診断が可能となった<sup>25)</sup>。性染色体異常疾患4例とPure gonadal dysgenesis 1例の性別判定を行った結果、Y染色体を有する症例のみに170bpのバンドが認められた。これは、サザンハイブリダイゼーションの結果とよく一致した<sup>26)</sup>。出生前DNA診断では胎児由来の細胞を採取する必要があり、絨毛細胞が利用されているが<sup>27)</sup>、この方法は、流産や感染の危険性があり、また大量には採取することが難しい。このためPCR法は微量の試料により検出することが可能であり、出生前胎児DNA診断には最も適した方法と考えられる。

## V 結 語

- 1 サザンハイブリダイゼーションによって、1年経過した10 $\mu$ lの男性血痕より3.5kbのバンドが検出され性別判定が可能であった。
- 2 血痕試料では、フェノール抽出・微量濃縮法を用いた場合、3年経過した0.5 $\mu$ lの血痕で170bp (Y

染色体特異的)のバンドが検出可能され、フェノール抽出・エタノール沈殿法は1.0 $\mu$ lでバンド検出が可能であった。Tween 20可溶化法の場合、6カ月までの血痕では1 $\mu$ lでバンド検出可能で、沸騰法の場合は50 $\mu$ l必要であった。

- 3 フェノール抽出・微量濃縮法とTween 20可溶化法ではそれぞれ2cmの男性毛髪から170bpのバンドが検出された。フェノール抽出・エタノール沈殿法は5cmの毛髪が必要であった。
- 4 脳と心臓のパラフィン切片からも、130bpと170bpのバンドが得られた。
- 5 PCRにより性染色体異常等の患者の性別診断が可能であり、サザン法で検出した性別判定と一致した。

本論文の趣旨は、平成3年9月、第14回国際法医学血液遺伝学会(マインツ/ドイツ)で発表した。

稿を終えるにあたり懇切なるご指導とご校閲を賜りました清野誠一教授、および法医学教室福島弘文教授に深甚なる謝意を表します。またご教示、ご助言下さいました太田講師に深謝いたします。

## 文 献

- 1 清水信義：2. ヒト染色体の遺伝子マッピング。日本臨牀，47増刊：20-58，1989
- 2 Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491, 1988
- 3 Kunkel, L. M., Smith, K. D., Boyer, S. H., Borgaonkar, D. S., Wachtel, S. S., Miller, O. J., Breg, W. R., Jones, H. W. and Rary, J. M.: Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 1245-1249, 1977
- 4 Witt, M. and Erickson, R. P.: A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction. *Hum Genet*, 82: 271-274, 1989
- 5 Goelz, S. E., Hamilton, S. R. and Vogelstein, B.: Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 130: 118-126, 1985
- 6 Fukushima, H., Hasekura, H. and Nagai, K.: Identification of male bloodstains by dot hybridization of human Y chromosome-specific deoxyribonucleic acid (DNA) probe. *J Forensic Sci*, 33: 621-627, 1988
- 7 植原和郎, 木村邦彦, 南館忠義: 判別関数による現在日本人骨格の性別判定法—その的中率の向上と実用性の検討—. *日法医誌*, 18: 107-144, 1964
- 8 石津日出雄, 安東健介, 高田秀男, 舟津保男, 延原巳智子: Y染色体による毛髪性の性別判定法. *医学のあゆみ*, 82: 86-87, 1972
- 9 Seno, M. and Ishizu, H.: Sex identification of a human tooth. *Int J Forens Dent*, 1: 8-11, 1973
- 10 Pearson, P. L., Bobrow, M. and Vosa, C. G.: Technique for identifying Y chromosomes in human

- interphase nuclei. *Nature*, 226 : 78-80, 1970
- 11) 安達弘高：ヒト歯髄による性別判定に関する研究. 第2編 室内に放置した歯牙についての性別判定. *日法医誌*, 43 : 27-39, 1989
  - 12) Nakahori, Y., Mitani, K., Yamada, M. and Nakagome, Y. : A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucleic Acids Res*, 14 : 7569-7580, 1986
  - 13) McCabe, E. R. B., Huang, S., Seltzer, W. K. and Law, M. L. : DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potential applications to newborn screening. *Hum Genet*, 75 : 213-216, 1987
  - 14) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. : Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 : 1350-1354, 1985
  - 15) Kogan, S. C., Doherty, M. and Gitschier, J. : An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N Engl J Med*, 317 : 985-990, 1987
  - 16) Akane, A., Shiono, H., Matsubara, K., Nakahori, Y., Seki, S., Nagafuchi, S., Yamada, M. and Nakagome, Y. : Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods. *Forensic Sci Int*, 49 : 81-88, 1991
  - 17) Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P. N. : A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346 : 240-244, 1990
  - 18) 福島弘文：ゲノムDNAの精製. 原田勝二(編), ヒトDNA Polymorphism, 第1版, pp.33-38, 東洋書店, 東京, 1991
  - 19) Pääbo, S., Gifford, J. A. and Wilson, A. C. : Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res*, 16 : 9775-9787, 1988
  - 20) Jung, J. M., Comey, C. T., Baer, D. B. and Budowle, B. : Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA-DQ $\alpha$  gene. *Int J Leg Med*, 104 : 145-148, 1991
  - 21) Hukkelhoven, M. W. A. C., Vromans, E., Markslag, A. M. G. and Vermorken, A. J. M. : A simple fluorimetric microassay for DNA in hair follicles or fractions of hair follicles. *Anticancer Res*, 1 : 341-344, 1981
  - 22) Higuchi, R., von Beroldingen, C. H., Sensabaugh, G. F. and Erlich, H. A. : DNA typing from single hairs. *Nature*, 332 : 543-546, 1988
  - 23) Waye, J. S. and Willard, H. F. : Chromosome-specific alpha satellite DNA : nucleotide sequence analysis of the 2.0 kilobasepair repeat from the human X chromosome. *Nucleic Acids Res*, 13 : 2731-2743, 1985
  - 24) Wolfe, J., Darling, S. M., Erickson, R. P., Craig, I. W., Buckle, V. J., Rigby, P. W. J., Willard, H. F. and Goodfellow, P. N. : Isolation and characterization of an alphoid centromeric repeat family from the human Y chromosome. *J Mol Biol*, 182 : 477-485, 1985
  - 25) 長井光三：1. 出生前性別判定とDNA診断. *日本臨牀*, 47増刊 : 827-834, 1989
  - 26) Nagai, K., Yanagisawa, I. and Hayashi, K. : The cloning of size-heterogeneous, Y-specific repetitive DNAs and their clinical application. *Mol Cell Biol*, 100 : 71-78, 1991
  - 27) 片山 進, 久保春海：絨毛診断. *実験医学*, 9 : 1139-1142, 1991

(3. 9. 27 受稿)