

学 位 論 文 題 名

ラットおよびヒト臓器中 DNA 付加体量の加齢的变化  
およびその年齢推定法への応用

学位論文内容の要旨

緒 言

身元不詳死体の年齢の推定は個人識別という点で、きわめて重要な課題の一つである。年齢の推定は人体各部の加齢上の変化を種々観察し、いくつかのデータを参考にしてそれらを総括し行われるのが一般的である。通常歯牙とともに骨組織が揃っていれば、形態学的観察から年齢の推定は比較的容易であるが、部分的骨組織や軟組織のみ残存している場合には、現在の法医学の水準では年齢の推定はほとんど不可能である。しかし轢き逃げや飛行機墜落事故等の際の散乱する人体組織片の個人識別等その重要性は増してきており、硬組織からばかりでなく軟組織・臓器片からも個人識別（年齢推定）が出来るようになることが必要である。

近年分子生物学の発達に伴い<sup>32</sup>P-ポストラベル法により DNA 付加体が検出されるようになってきており、またラットにおいては加齢に伴い DNA 付加体 (I-compounds) が観察されている。ヒトにおいても DNA 付加体が検出されており、その I-compounds の量が年齢と相関していれば年齢の推定が可能になる。

今回ラットおよびヒトの諸臓器における DNA 付加体量と加齢との関係を<sup>32</sup>P-ポストラベル法を用いて検討し、その結果を用いてヒトの年齢推定法を確立した。

材料と方法

I. ラットおよびヒトの諸臓器よりの高分子 DNA の抽出

ラットは4から69週齢のウィスター系の雄性ラットを用い、屠殺後心臓・肝臓・腎臓・脳・肺の各臓器片を採取した。ヒトの各臓器片は北大医学部法医学講座および東京都監察医務院において解剖となった、18から79歳までの男性の遺体より採取した。

臓器片約1gをCell lysis bufferの中でホモジナイズし、フェノール・クロロホルム抽出を行った。その後エタノール抽出を行い、DNA量測定後に濃度を3.3mg/mlに調整した。

## II. DNA の分解と<sup>32</sup>P-ポストラベル

DNA 溶液を micrococcal nuclease と spleen phosphodiesterase で分解し、ヌクレアーゼ P I 反応液を加えた後に [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP 反応液でポストラベルした。この内の一部を全ヌクレオチド数の算出に用い、全量を付加体の解析に用いた。

## III. 正常ヌクレオチドの除去および付加体の薄層クロマトグラフィー

ポリエチレンイミンセルロースシートおよびリン酸ナトリウム溶液を用いて展開し原点から上方2.4~4.8cmの部分を切り抜き洗浄後、<sup>32</sup>Pの放射活性を測定した。

## IV. 付加体の定量

全ヌクレオチド数を放射活性測定後算出し、以下の計算式により相対的付加体量 (RAL) を計算した。

$$\text{RAL} = \frac{\text{各小片の cpm}}{\text{全ヌクレオチドの cpm} \times \text{希釈率}}$$

## 結 果

### I. ラット諸臓器 DNA の相対的付加体量と週齢との関係

ラットから剔出した心臓・肝臓・腎臓・脳・肺の各臓器から DNA 付加体が検出され、上記の計算式により算出された DNA の相対的付加体量と週齢との間には有意の相関関係があった。心臓では相関係数  $r = 0.508$  で、DNA の相対的付加体量  $X$  に対する週齢  $Y$  の回帰直線式は  $Y = 479.64X - 11.979$  であった。肝臓では  $r = 0.435$  で、上記の回帰直線式は  $Y = 23.321X + 7.384$ 、腎臓では  $r = 0.906$  で、上記の回帰直線式は  $Y = 44.204X + 3.489$ 、脳では  $r = 0.833$  で、上記の回帰直線式は  $Y = 72.498X + 4.285$ 、肺では  $r = 0.728$  で、上記の回帰直線式は  $Y = 3224.84X - 18.479$  とそれぞれ導かれた。

### II. ヒト諸臓器 DNA の相対的付加体量と年齢との関係

ヒトにおいてもラットと同様 DNA 付加体が検出され、その形成レベルを上記の計算式によって求めた。ヒトの場合ではラットに比べ相関係数が低いものの、DNA の相対的付加体量と年齢との間には有意の相関関係が認められた。心臓では  $r = 0.458$  で、年齢を  $Y$  とした上記の回帰直線式は  $Y = 44.018X + 28.527$ 、推定値の標準誤差 (S. E.) = 13.40、肝臓では  $r = 0.415$  で、上記の回帰直線式は  $Y = 88.099X + 23.833$ 、S. E. = 13.76、腎臓では  $r = 0.700$  で、上記の回帰直線式は  $Y = 218.029X + 3.263$ 、S. E. = 12.14、脳では  $r = 0.638$  で、上記の回帰直線式は  $Y = 105.626X + 21.697$ 、S. E. = 11.82、肺では  $r = 0.538$  で、上記の回帰直線式は  $Y = 36.838X +$

26.891, S. E. =12.94とそれぞれ導かれた。

## 考 察

DNA 付加体のうち加齢とともに増加するものがラットにおいて検出されており“I-compounds”と呼ばれている。この I-compounds は DNA と共有結合をもつ付加体様の物質で、通常の餌のみを与えて飼育したラットにおいて検出され、かつ腫瘍形成や加齢そのものの一因となっていると想像される化合物である。著者は今回この I-compounds に注目し、ラットおよびヒトの諸臓器から抽出した DNA の I-compounds の相対的付加体量と加齢との相関を検討した。

ラットにおける相対的 I-compounds 量と加齢との関係は、結果で示したように各臓器ともそれぞれ正の相関を認めた。しかしこの相関係数は最小が肝臓の0.435から最大は腎臓の0.906と、非常に差が大きかった。これは臓器の細胞レベルにおける代謝と密接に関係があると思われる。

ヒトにおける相対的 I-compounds 量と加齢の関係は、ラットと同様正の相関が認められた。ただし相関係数はラットよりも概して低く、最も高い腎臓で0.700であった。またヒトの場合においても相関係数の最も高い臓器が腎臓であり、それ以降の順序もラットの場合と全く同様であった。従って臓器別の I-compounds の蓄積量は種にかかわらず同じものではないかと強く思わせる結果であった。さらにヒトにおいては死因や生前の環境的要因等が非常に多種多様である割には、今回得られた結果は年齢推定を行うに当たり十分実用に耐えるものであった。

本研究による年齢推定は、今回得られたデータから導かれる回帰直線と推定値の標準誤差 (S. E.) から求めるものであり、的中率68%においては過去の種々の軟組織からの年齢推定法と比較しても遜色がなかった。また今回の年齢推定法は、従来法科学領域で応用されている DNA fingerprint 法が比較的長い断片の DNA が残存していないと応用不可能であるのに対し、DNA をヌクレオチドの段階まで分解してから付加体を検出するため、陳旧性死体においても十分応用可能であるものと考えられ、法医実務上への貢献度は極めて大であると評価される。

## 結 論

ヒト軟組織からの年齢推定法の開発を目標として、近年発見された DNA 付加体の一種である I-compounds に注目し、ラットおよびヒトの臓器（心臓、肝臓、腎臓、脳、肺）から抽出した I-compounds の量と加齢との関係を調べ、得られた結果を用いてヒト軟組織からの年齢推定法を確立した。

1. ラットにおいては各臓器より抽出した I-compounds の相対的量と週齢との間には正の相関関係があり、その相関係数は0.435から0.906であった。
2. ヒトにおいても I-compounds の相対的量と年齢との間には正の相関関係があり、その相関係数は0.415から0.700であった。
3. 臓器別ではラット、ヒトともに相関係数の大小は臓器により全く同じ順序であり、腎臓が最も高く、肝臓が最も低かった。
4. ヒトの各臓器における年齢と相対的 I-compounds 量の間の回帰直線式を利用することにより、臓器からの年齢推定を可能とした。また、この方法は従来の軟組織からの年齢推定法と比較しても、十分実用に耐えるものであると評価できた。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 寺 沢 浩 一  
副 査 教 授 齋 藤 和 雄  
副 査 教 授 細 川 眞 澄 男

法医実務上の年齢推定に応用するのを目的に、ラットおよびヒトの種々の臓器から抽出された DNA 中の加齢とともに増加するとされている、DNA 付加体の一種である I-compounds に注目した。I-compounds の量は DNA の付加体の解析によく使用されている<sup>32</sup>P-ポストラベル法を用い、相対的 I-compounds の量として定量した。

ラットにおいては4～69週齢のものにおいて、週齢と I-compounds の相対的量は正の相関があり、その相関係数は最も高い腎臓で0.906、最も低い肝臓で0.435であった。次いでヒトでは年齢が18～79歳（n = 22～24）の検体において、年齢と相対的 I-compounds の量はラットと同様に正の相関関係があり、その相関係数は最も高い腎臓で0.700、最も低い肝臓で0.415であった。

相関係数はラットに較べヒトのほうが全ての臓器において1割から2割低かったが、全て正の相関を示しその大小の順もラットと同じであった。

ヒトにおける今回の測定は、個々の検体が死亡するまでの環境、食事、疾病等変動要因や死因が多様多様であるなど、考慮すべき点が多々あるにもかかわらず、軟組織からの年齢推定が可能

となった。

今回の研究によって得られたヒトの各臓器別の回帰直線式（心臓； $Y = 44.018X + 28.527$ 推定値の標準誤差（S. E.）=13.40, 肝臓； $Y = 88.099X + 23.833$ , S. E. =13.76, 腎臓； $Y = 218.029X + 3.263$ , S. E. =12.14, 脳； $Y = 105.626X + 21.697$ , S. E. =11.82, 肺； $Y = 36.838X + 26.891$ , S. E. =12.94）により年齢推定が可能となり、過去に行われた軟組織からの年齢推定法と比較しても十分有用性があることがわかった。

口頭試問に際し、細川教授からは付加体量が年齢とともに増加することの説明を求められ、齋藤和雄教授からは本推定法の精度について、及び従来の方法との比較について、武市教授からは老化と遺伝子の関係について、及び早老症の際の付加体量について、西教授からは DNA フィンガープリント法との相違について、小林教授からは付加体定量値の変動係数について、及び目的物の抽出方法について、それぞれ質問がなされたが、申請者の回答は可のレベルに達しているものと判断された。

その後、副査の齋藤和雄教授・細川教授から個別に試問・試験を受けた結果、両副査からいずれも可の判定をされた。

本研究は法医学の個人識別の分野において優れた試みを行ったものであり、この研究をとおして研究者として自立できる基礎的技能が修得されたものと考えられる。よって、申請者は博士（医学）の授与に値するものと考えられる。