

# AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム（2000）創刊号:5.

DNA鑑定の威力

水上 創、吉田将亜、齐藤 修、小川研人、上園 崇、清水  
恵子、塩野 寛

## 依頼論文 A (総説)

## DNA 鑑定の威力

水上 創\* 吉田 将 亜\*  
斉藤 修\* 小川 研 人\* 上 園 崇\*  
清水 恵 子\* 塩 野 寛\*

## 【要 旨】

法医学領域において、個人識別は不可欠の鑑定事項である。犯罪現場にあった血痕、毛髪、体液等が被疑者および被害者のものかを特定し、焼死体や溺死体、バラバラ死体等で身元を確認するために個人識別が必要となる。近年、分子生物学的研究の飛躍的な進歩に伴い、DNA多型を応用した個人識別はより正確に行うことが可能となった。

**キーワード** 法医学、個人識別、DNA多型、PCR

## I はじめに

最近、ヒトゲノムの約30億塩基対の全塩基配列が明らかになったという報道がなされた。ヒトゲノム計画では、24種類のヒト染色体に含まれるすべてのゲノムDNAの塩基配列の決定だけではなく、その意味するところは医学・生物学的な解明が最終的な目的である。今後は、ヒトゲノム中に存在する約10万個(約3万~15万との説もある)の機能解析が進められ、これにより、例えば先天異常の遺伝子診断、発癌や生活習慣病のハイリスクの検索、薬剤に対する個体の感受性、遺伝子治療などの分野で、医療や健康にかかわる多くの情報が得られ、診断や治療に応用されることは確実であり、今後各方面の研究が飛躍的に進むことが予想される。

遺伝子に関する研究が進む中で、法医学領域においても性別判定、親子鑑定および人獣鑑定を含む個人識別においてDNA多型が応用されている。

とくに、個人識別という分野は法医学において不可欠の分野である。臨床医学の分野では対象とする患者自身について疑問となることは殆ど無いが、法医学では法のもとで個人が誰であるのかは極めて重要な鑑定項目である。また、犯罪現場に

あった血痕をはじめ、毛髪、体液(唾液、精液斑等)が被疑者および被害者のものであるのかを特定する必要がしばしばある。焼死体や溺死体、バラバラ死体で身元の確認のための個人識別も必要である。

これまで科学的に個人を特定する方法は、抗血清を用いた血液型や指紋などであった。近年、DNA多型の登場にともない、個人識別は分子生物学的手法により、より正確に行うことが可能となり、格段の進歩を遂げた。その概要について説明する。

## II 法医学とDNA鑑定(写真1)

分子生物学の進歩に伴い、4種の塩基を中心とした二重らせん構造をとるDNAが遺伝を支配するものであるということが明らかとなった。ついでDNAとタンパク合成の関係が明らかとなり、各遺伝子を単離し染色体上の座位と構造が明らかとなってきた。

ヒトでは、1個の体細胞について2セット(diploid)のゲノム(全遺伝子の1セット)を持つ。親から子へは、体細胞の半数体細胞(haploid)が合体した2倍体として受精卵ができあがる。減数分裂の際に父母の精子や卵子はそれぞれの相同染色体間で複雑に組換えが行われて形成される。

\* 旭川医科大学 法医学講座

ヒトは1個体に父由来と母由来の遺伝子を有することになる。相同染色体はまったく同じものもあるが、

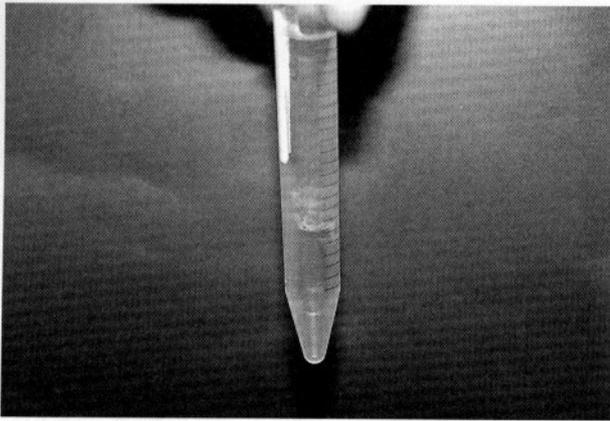


写真1 グラビア写真1参照

赤血球型、血清タンパク型、赤血球酵素型などのように異なった型もあり、これらを対立遺伝子(アリル)と呼んでいる。これらの対立遺伝子は進化の過程で突然変異により生じたと考えられている。

これら多くの型は、一卵性双生児を除いて遺伝的に完全に同一の型というものは存在しない。

ヒトのゲノムは約30億塩基対があるが、現在、このうち染色体上の座位と構造が明らかになっているもので、タンパク質に翻訳される意味のある遺伝子部分とされているもの(Exon)はわずかに約5%程度と推定されている。残る95%はタンパク質に翻訳されない無意味な部分(Intron)ということになる(実際にはこの領域は遺伝子翻訳の開始の指示や遺伝子の断片をつなぎ合わせる調節の役割をするなど重要な個所も存在すると考えられている)。

DNA鑑定では、生体内で必ずしも機能的役割を有する部分を検索するわけではない。個体間で少しずつ配列が異なる部位(多型)を検索し、各個体ごとの特徴ある部位を検出し、また、親子鑑定では父親由来および母親由来の特徴を比較する、という作業を行う。このように検索する領域は、塩基配列がより多型性に富む領域ほど個人識別上有用であるといえる。個人識別や性別判定では稀な多型が存在するかどうかということが重要となってくる。このため、なんらかのタンパク質の暗号となる Exon 領域よりも、タンパク質の暗号とはならない Intron 領域のほうが自然淘汰により除去されず、挿入や欠失といった変異が子孫に伝えられ易く、Intron領域の遺伝的多型は個人識別上より有用である。

## II 具体的にはどこをどのように検査するのか

DNA鑑定に用いられる方法はかつてはDNA指紋法(マルチローカス方式)であったが、現在はミニサテライト・マイクロサテライトを用いたシングルローカス方式、PCR-RFLP(Polymerase Chain Reaction-Restriction Enzyme Fragment Length Polymorphism)法などが用いられている<sup>1)</sup>。また、ミトコンドリアDNAやHLAなどを用いた新しい手法が次々に研究され、応用されている。近年、これらの技術的なベースとして重要な役割を果たしたのはPCR(Polymerase Chain Reaction)法の登場である。PCR法により臓器特異性に関係なく、また、微量な試料からでも検査・判定ができるようになった。

ゲノムDNA配列の多型部位とこれを認識する制限酵素を用い、その特異的なプローブを作成し、サザンハイブリダイゼーション法を用いることより多型判定するRFLP法がまず考案された。制限酵素による切断の有無から多型部位を確認するものであったが、もともと発癌遺伝子の点突然変異や遺伝子病の鑑別診断を対象としており、正常なヒトでは多型部位が少なく、また多型を示す頻度も低く、個人識別には不適切であると考えられた。

現在はPCR法の登場で、RFLP法と組み合わせることよりABO式血液型判定などに用いられている<sup>1)2)</sup>。

マルチローカス方式はヒトDNAの95%を占める無意味な配列中に存在する多くの短い繰り返し配列(ミニサテライトもしくはVNTR(variable number of tandem repeatと呼ばれる))を用いる。この繰り返し配列は場所によって繰り返し数が異なり、また人によっても繰り返し数が異なっている。そこで、これらの配列を特異的な制限酵素で切断し、電気泳動を行うと、バーコードのような20本程度のバンドとして観察される。このバンドは個人に特異的であることから「DNA指紋」と呼ばれている。この方式は手技的に多少の技術が必要とされ、検査者や古い試料によっては再現性が問題となる場合があるため次第に使われなくなった<sup>3)</sup>。

これに代わって登場したシングルローカス方式はマルチローカス方式とは異なり、特定の領域に絞って繰り返し配列数をみる方法である。このアリルは父および母由来の2本であり、単座位であることから出現頻度を正確に計算することが可能である。これにより、

複数検体が同一人物のものであるか否か、もしくは親子鑑定における父権肯定確率の計算に用いることが可能となった(写真2)。例を挙げると、FBIやわが国で

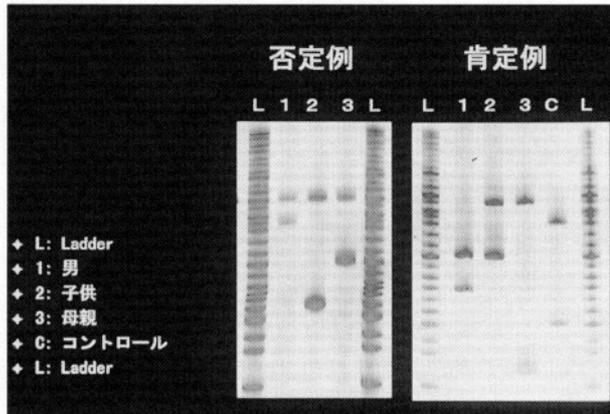


写真2 グラビア写真2 参照

は科学警察研究所・科学捜査研究所等で導入され、最も検索の進んでいるVNTR領域のひとつであるD1S80(MCT118)はヒトの1番染色体上の16塩基対を単位とする繰り返し配列である(写真3)<sup>4)</sup>。この領域では、16塩基対が12回~42回以上繰り返す30種類以上のアリルが知られており、PCR産物とアレリックラダーマーカーという各対立遺伝子を混合したマーカーを対象に置く電気泳動により各個人から2本のバンドが検出される。

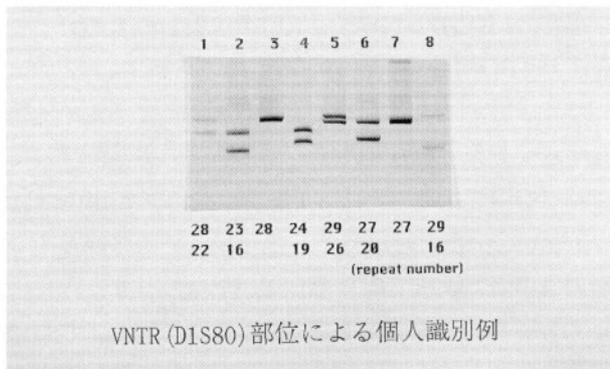


写真3 グラビア写真3 参照

また、繰り返し配列が2~4塩基対(マイクロサテライトもしくはSTR(short tandem repeatと呼ばれる)の領域についても現在多くの部位が検索されている。これは従来のVNTRに比べてさらに多型に富み、繰り返し配列が短いため腐敗した試料からでも検索が可能であるため、法医学的には極めて有用である<sup>5)</sup>。

すでにPerkin-Elmer社やPromega社などから1チューブのPCR増幅で数ローカスのSTRを検出するようなキットが販売されており、D1S80と並んでほぼこの手法は完成された感がある。

しかし、VNTR部位およびSTR部位はその成因から、減数分裂の際の乗り換え等の突然変異が起こりやすいという欠点があり、繰り返し数が増加することも稀に起こりうる。この現象が起こると、親子鑑定のときに実子であるにもかかわらず矛盾する結果が生じる可能性がある。

さらに、D1S80のVNTR領域では16塩基の繰り返し単位が完全に同じ塩基配列というわけではなく、また、検出したバンドは実際にDNAの配列を見ているわけではない。これは経験的に繰り返し配列塩基かける繰り返し数の長さのバンドを見ているのに過ぎず、さらにインターアリルが存在することも報告されていることから、本来別のアリルとして分類すべきアリルを検出している可能性も否定できない。それゆえ厳密にはアリルの塩基配列そのものをみる必要がある。

Y染色体上の男性特異的領域の検索により性別の判定を行うことができる。検索する遺伝子座位として、単遺伝子座位のものでSRY、Amelogeninがある。SRYは性決定遺伝子そのものであり、Amelogenin(写真4)はX染色体上に長さの違う同様の遺伝子座があり、これらの検出により性別を判定できる。また、Y染色体上のSTR領域を用いることは父子鑑定上有用である。さらに、性犯罪における膣内容物や男女混合血痕においてもY染色体上の遺伝子は有効となりうる<sup>1)6)</sup>。

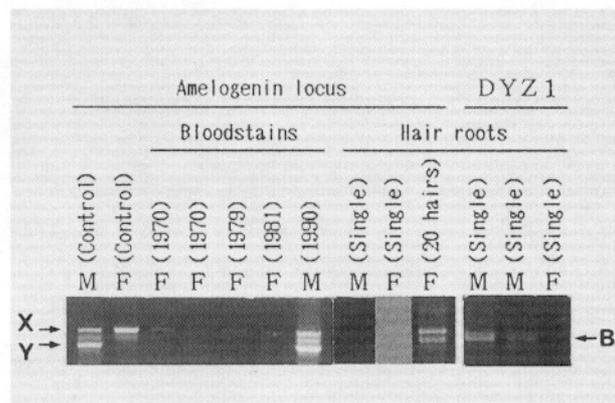


写真4 グラビア写真4 参照

また、ミトコンドリアDNAに着目した鑑定法も登場した。ミトコンドリアDNAは細胞1個あたりのコピー数がゲノムDNAよりも格段に多く、微少な試料からでも比較的検出しやすいほか、完全に母系遺伝であることから母子鑑別に有効であり、また、減数分裂時の組替えを考慮する必要がないなど利点が多い。実

際にはミトコンドリアDNAのDループ領域と呼ばれる288塩基の非コード領域が極めて高い多型性を示すことが知られており、鑑定の対象とされている<sup>7)</sup>。

最近登場し、注目を集めているのは、6番染色体上に存在するHLA（ヒト主要組織適合性抗原）の遺伝子領域を用いたDNA鑑定である。HLAは自己と非自己を識別し免疫作用の中心的役割を果たしており、クラスI（A~F）、クラスII（DP, DQ, DR）、クラスIIIに分類され、さらにこの中にもさまざまなタイプが存在することから、臓器移植においてはレシピエントとドナー間でタイプを適合させる必要がある。しかし、その一方で、一卵性双生児以外はこのタイプが完全に一致することはなく、個体間で同じタイプの人は殆ど皆無である。また、このタイプが適合しているほど拒絶反応が少ないなど、移植医療の分野を含めて、急速に研究が進んでいる部位であり、遺伝子配列や、タイプの違いが分かっていることから、逆にこの領域を用いれば、個人識別の有効な手段となる（写真5）。

具体的にはHLAのうち、約250塩基が連なるDのQB領域が使われている。この領域では19個所に配列の違いがあり、これらにより同じタイプを持つ人の出現頻度は0.1~1%程度の低い確率である。これをPCR-

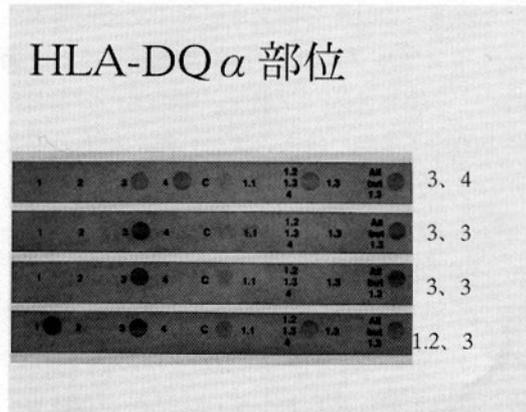


写真5 グラビア写真5参照

SSCP（Single Strand Conformation Polymorphism）法により検出し、既知のバンドと比較して型判定を行うことが可能となった。他の領域も同時に検査できればさらに識別能力を挙げる事が可能である<sup>8)9)</sup>。

#### IV DNA鑑定：ニコライ二世と自験例

個人識別の応用として、古い遺体や骨から抽出したDNAより生前の病気や本人の確認などを鑑定することが可能となっている（表1）。例としてロマノフ王朝最後の皇帝ニコライ二世一家の遺骨の鑑定について述べる<sup>8)10)</sup>。

表1 白骨からの性別判定

番号	名前	性別	死後経過時間	1. DXZ-1	2. DYZ-1	1.と2.による判定	3. Amelogenin	3.による判定	27H39
1	身元不詳	男?	20年?	+	+	男	-	判定不能	男(190bp)
2	身元不詳	女?	25年?	-	-	判定不能	-	判定不能	女
3	身元不詳	男?	20年?	+	-	女	-	判定不能	男(190bp)
4	平尾	女	8年?	+	-	女	-	判定不能	女
5	身元不詳	不明	不明	+	+	男	-	判定不能	女
6	身元不詳	男?	20年?	+	+	男	-	判定不能	男(186bp)
7	身元不詳	女?	不明	+	+	男	-	判定不能	男(194bp)
8	ニューギニア人	男?	数10年	+	-	女	-	判定不能	女
9	身元不詳	女?	6~7年	+	+	男	-	判定不能	女
10	縄文人	女?	1万年	+	-	女	-	判定不能	女

ロマノフ王朝はロシア革命の際ボルシェビキの虐殺により滅んだ王朝である。1918~1919年のこの事件について記した王朝派の歴史学者によると、ツァーのニコライ二世、皇后のアレクサンドラ、4人の皇女（オルガ、タチアナ、マリア、アナスタシア）、皇子のアレクセイ、3人の召使および1人の侍医は中央ロシアのウラル地方にあるエカテリンブルグのイパチェフ城に幽閉され、1918年6月16日の深夜地下室に集めら

れ、ボルシェビキの狙撃隊により射殺されたが、死に切れなかった一部は銃剣によって刺殺された。この後、死体は着衣を剥ぎ取られ、トラックに積み込まれてある炭鉱に投げ込まれる予定になっていたが、トラックが故障したため途中の路上に穴を掘り、死体を投げ込み、個人識別を不可能とするため濃硫酸をかけて埋められた、と記載されている。しかし、これを客観的に証明するものは何も無かった。

その後、1991年この文章にある記述と写真を元にエカテリンブルグ郊外で埋葬地があることが発見された。この埋葬遺体がツァー一家のものであるならば、歴史的、医学的にはもとより政治的にも共産社会主義者の残虐な行為の証明として重大なものとなる。

ロシア政府はロシア主任監察医に委託し、科学者グループによる個人識別を検討した。この結果、1メートルの深さに埋められていた遺骨はひどい損傷を受けてはいるものの、9体であることがわかった。すべての遺骨には生前加えられた暴行の痕跡が存在し、一部の遺骨には銃創、銃剣によるとみられる刺創が認められた。すべての顔面骨は損傷が著しく、これらと生前の顔写真を比較するスーパーインポーズ法は不可能であった。

その後、コンピューターによる頭蓋骨の整復法、法医学的検査による年齢推定および骨の性別分析が行われた。とくに歯は金、プラチナ、陶器による充填処理が施され、20世紀初頭の治療法から見て、貴族階級の死体であると推定された。これらの結果から科学者グループは、これらの遺体はツァー、アレクサンドラ、3人の皇女のもが含まれていると推定した（伝承によれば皇子のアレクセイと皇女のアナスタシアはこの時点では殺害されていなかった）。

この仮説のDNA分析による証明がイギリス内務省法医学研究所、ケンブリッジ大学考古生物学研究室、ロシアアカデミー分子生物学研究所の共同グループにより試みられた。

このような古い試料ではDNAの断片化が往々にして起こり、高分子DNAの存在が期待できない場合が多いが、性別や個人識別のターゲットとなるDNA領域をPCRで増幅すればよいので、解剖学的に区別された遺骨からそれぞれDNAの抽出を行い、これをPCR増幅させて検査すればよいわけである。

まず、各抽出DNAについて性染色体上の相同遺伝子であるAmelogeninを増幅させ男女識別を行ったところ解剖学的に識別した結果と一致した。

続いて親子関係であるが、遺骨そのもののDNA、

生存している子孫のDNA、残っている遺物由来のDNAを比較し、これらの間の親子・血縁関係の存在の有無を調査している。いずれも染色体上のSTR多型とミトコンドリアDNA多型を調べている。

遺骨についてまず、染色体DNAの5種類のローカスを検査したところ、いずれも分析が可能であり、成人女性（アレクサンドラ？）と子供のDNAのすべてのローカスで母子関係として矛盾しない結果が得られた。次に子供のDNAから母親のDNA型を除いた型（父親：ニコライ二世？由来のDNA）と4名の成人男性のDNA型を比較すると、1名は親子関係を満たし、ほかの3名は矛盾するという結果が得られた。ミトコンドリアDNA型についてはアレクサンドラとみなされる女性の塩基配列は3人の子女と一致し、母子関係が存在していると考えられた。

次に、生存している子孫と遺骨の関係である。エジンバラ公フィリップ殿下（アレクサンドラの妹の孫娘にあたる）のミトコンドリアDNA型がアレクサンドラと思われる遺骨由来DNA型と完全に一致していた。さらに、ニコライ二世と思われる遺骨と、現存する母系の血縁者2名のミトコンドリアDNA型の比較によっても血縁関係が裏付けられた。

最後に遺物由来のDNAである。日本から明治24年（1891年）の天津事件（当時皇太子だったニコライ二世が来日中に斬りつけられた）の血染めのハンカチが提供され、この血痕由来のDNAと遺骨DNA間で型の

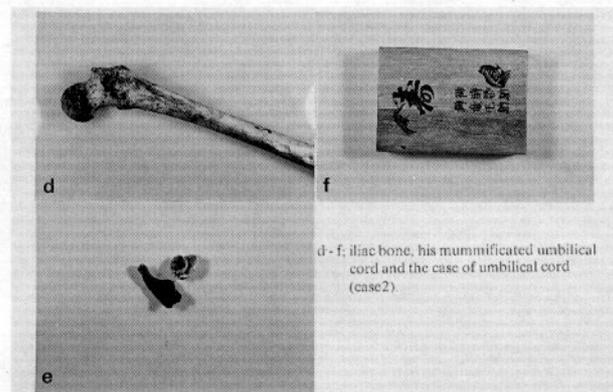


写真6 グラビア写真6参照

表2 事例のPCR法による多型と同一人としての肯定確率

	血液型	SE33	SDF-1	HUMARA	27H39	DIS80
大腿骨	BO	30, 20	234bp, 230bp	19	C	判定不能
臍帯	BO	30, 20	234bp, 230bp	19	C	判定不能

肯定確率 99.99982%

一致を見た。

次に自験例を示す<sup>11)</sup>。北海道富良野市の山中でほぼ1体分の白骨死体が発見され、所持品より神奈川県下の男性と推定された。この大腿骨と親より本人の「へその緒」を提出してもらいDNA鑑定を行ったところ一致し、白骨は両親が引き取ることとなった(写真6,表2)。

このように古い試料由来のDNAからも個人識別が可能である。最近、仙台藩主・伊達政宗親子3代の実子確認などが話題となるなど<sup>12)</sup>、DNA多型を調査することで、考古学、人類学、史学等において新たな調査や研究が展開しつつある。

## V 今後の問題点

個人識別において問題となるのは、検体によるPCR阻害物質の存在、保存状態による高分子DNAの破壊、また得られた結果に対する評価の問題等が挙げられる<sup>13)</sup>。

PCR阻害物質としては、検体が毛髪ならメラニン色素、血液であればヘモグロビン、骨であれば無機塩などが問題となるが、抽出段階での操作に工夫を凝らすことで改善をみており、また各社より簡便な専用抽出キットが販売されるなど、ある程度解決しているといえる。

一方、DNAの断片化の問題がある。著者らは、数年水没した車中にあった半白骨化した遺体の緻密骨を用いてDNA抽出を行い、幾つかの領域についてPCRをかけたところ百塩基程度の領域しか増幅されないという経験がある。抽出する検体の保存状態は新鮮なものか、むしろ木乃伊化した検体のほうが高分子のDNAの存在が期待できる。しかし、検体を検査者が選ぶことは不可能であり、短く断片化されたDNAでも検査可能な短い領域を選択する必要がある。このため、VNTR領域からより短いSTR領域が注目されるようになった。

さらに近年、新たなDNAマーカーとしてSNPs (Single nucleotide Polymorphisms : 1塩基多型) が注目を集めている。SNPsは平均五百~千塩基にひとつはあると考えられており、ヒトゲノム30億塩基では約300万個以上存在していることになる。このことから、従来のSTR (マイクロサテライト : 数万程度) 等より非常に高密度であり、また、ゲノムの構造ももっとも単純であるため、生殖細胞の減数分裂時にも安定していると考えられている。

SNPsは、Exon領域にあるcSNPs、転写調節部分にあるrSNPs、遺伝子領域でないところのgSNPsなどに分けられる。特にcSNPsは遺伝子の直接の情報であり、疾患原因遺伝子の検索、疾患感受性の判断といった診断の他、新薬の開発におけるターゲット分子とその遺伝子の検索や、個人の特定薬物における感受性の分析 (至適投薬量の判断やレスポンスの有無) などのゲノム創薬の分野で注目されつつあり、今後研究の進展が期待される分野である。

SNPsの検出にはこれまでDNA解析の手法として後いられてきたダイレクトシーケンス、PCR-SSCP法、PCR-ASPA法等をそのまま用いることが可能である。

法医学においてもSNPsは子孫に対する遺伝的安定性が高いことや、低分子化したDNAにおいてもプライマーの設計如何等により検出が可能であることから、DNA鑑定において、個人識別等に威力を発揮することが期待され、研究が進む領域と考えられている。

現在、法医学では個人識別において、従来の赤血球型や赤血球酵素型分析からDNA解析のほうに研究が進んでいる。一方で、個人識別法に用いる各種DNA多型のアレルの種類や出現頻度等などで日本人集団母数のデータが乏しいことや、VNTR/STRで述べたようにDNA鑑定が必ずしも100%ではないという要因を含んでいることから、今後も慎重な対応が必要である。

## 【参考文献】

- 1) 塩野 寛 : DNA多型を用いた個人識別—法医学試料の戸籍を探して—, 日法医誌, 50(5), 320-330, 1996
- 2) 佐々木雅弘, 塩野 寛, 清水恵子ほか : NaI法, PCR-RFLP法を用いた各種試料からのABO式血液型判定, 法医学の実際と研究, 38, 63-67, 1995
- 3) 石山昱夫, 吉井富夫 : DNA指紋法の応用と問題点, DNA鑑定入門, 1版, 南山堂, 41-60, 1998
- 4) 瀬田季茂, 赤坂はるか, 荒木直幸ほか : 日本人におけるMCT118の出現頻度, 科学警察研究所報告法科学編, 47(3), 110-115, 1994
- 5) 石山昱夫, 吉井富夫 : STRローカス, DNA鑑定入門, 1版, 南山堂, 100-101, 1998
- 6) 佐々木雅弘, 清水恵子, 福島 亨ほか : 性染色体上DNAマーカーの解析とその法医学的応用—法医試料からの性別判定と個人識別, 日法医誌, 49(2), 70-79, 1995
- 7) 石山昱夫, 吉井富夫 : ミトコンドリアDNA, DNA鑑定

- 入門、1版、南山堂、109-113、1998
- 8) 栗山孝夫：DNAで個人識別、DNAで何がわかるか、1版、講談社、163-175、1995
- 9) 石山昱夫、吉井富夫：STRローカス、DNA鑑定入門、1版、南山堂、100-101、1998
- 10) 石山昱夫、吉井富夫：史実とDNA鑑定、DNA鑑定入門、1版、南山堂、153-161、1998
- 11) 佐々木雅弘、福嶋 亨、清水恵子ほか：PCR-RFLP法を用いた各種法医試料からのABO式血液型判定、DNA多型、3、297-303、1995
- 12) Uchihi R, Yamamoto T, Nozawa H, et. al. : DNA Analysis of a Grandfather-Father-Son Relationship from 300-Year-Old Remains of the Date Clan in Japan, Jpn J Legal Med, 52(2)、157-62, 1998

---

## The Medico-Legal Aspect of DNA Polymorphism

Hajime MIZUKAMI Masatsugu YOSHIDA

Osamu SAITO Kento OGAWA

Takashi UEZONO Keiko SHIMIZU

Hiroshi SHIONO

---

### Summary

In forensic medicine, the personal identification is an essential item of evaluation. To determine whether the forensic remains (blood stain, hair, body fluid, etc.) in the criminal act were from suspect or a victim or to confirm identity from burned body, drowning or parts of corpse, it is performed. Recently, with the rapid progress of molecular biology, we were able to investigate more accurate personal identification employing DNA polymorphisms.

**key words**

forensic medicine, personal identification, DNA polymorphism,  
PCR (polymerase chain reaction)

---

\* Asahikawa Medical College Legal Medicine