

DNA 解析による親子鑑定

東京女子医科大学 医学部 法医学

オウ シュウレイ サワグチ トシコ
王 秀玲・澤口 聡子

(受理 平成 15年 12月 15日)

Analysis of DNA in Paternity Testing

Xiuling WANG and Toshiko SAWAGUCHI

Department of Legal Medicine, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine

The paternity testing (determination of parentage) is to judge existence related to a biological parent and child by a scientific method. The organism is continuing the life activity by telling the gene from parents to the child. It is the one that is called the main body of the inheritance material that puts the genetic code DNA (deoxyribonucleic acid), and it is sure to exist in almost all cells. The genetic code of DNA encrypts the array of the molecule of four kinds of bases of A (adenine), T (thymine), C (cytosine), and G (guanine), is told, and there is an individual variation in this array. Our having a different respectively feature has come from the difference of the genetic code of this DNA. A locus has two allelic genes in the human chromosome, and is a gene of the father origin and each mother origin. As for the DNA test, it divided into the paternity testing by a past blood type by the one to analyze the feature of the base sequence with this individual variation and the judgment with high accuracy that was able to be trusted was possible by an ultimate high technology.

Key words: DNA polymorphisms, paternity testing, probability of paternity

緒 言

近年 DNA (deoxyribonucleic acid) の塩基配列 (base sequence) を分離, 増幅, 解析する各種の強力な方法が開発されたことにより, 一つの科学分野が新たに作り出され, 生物学の基礎研究および応用開発などが目覚しく進展している. さまざまな分野で DNA を用いた遺伝子診断・治療, 医薬品の開発, 犯罪捜査, 親子鑑定, 個人識別などへの応用も広がっている¹⁾.

1985年に英国 Leicester 大学の Jeffreys らが発表した DNA フィンガープリント (DNA fingerprint) 法²⁾以来, 英国を中心とした世界で DNA 多型 (DNA polymorphism) を用いた親子鑑定 (paternity testing) や司法鑑定, 犯罪捜査に役立てようとする研究や実務例が非常に多く報告されている^{3)~6)}. DNA 鑑定とは刑事上および民事上の事件に関連した人体資料につき, DNA 多型を解析して個人識別を行うこと, または, メンデルの法則に従って個体の生物的血縁関係 (親子鑑定) の有無を判定する

ことである.

人は両親から受け継いだ 23 対 (46 本) の染色体 (chromosome), 3 万個前後の遺伝子と同じ遺伝子のコピーを持ち, 30 億の遺伝子 (ゲノム) 暗号, 約 60~100 兆個の細胞を持っていると言われる⁷⁾. 血縁関係のない二人の遺伝子暗号を比較すると約 500~1,000 個の遺伝子暗号につき 1 ヶ所違っていると推測されている. したがって一人一人は, 約 30 億の遺伝子暗号のうち, およそ 300 万~600 万ヶ所の遺伝子暗号の差があると推測される. このことより, 血縁関係のない二人の遺伝子暗号の合う確率はゼロに等しく遺伝子暗号を比較すれば確実に識別することが可能となる. 現実には, 遺伝子暗号をすべて識別することは費用と, 時間がかかりすぎるため遺伝子暗号のうち特に個性の顕著な部分を選び親子鑑定, 犯罪捜査等に利用している.

1. 親子鑑定の現状

親子鑑定は, 法律に基づいて法的判断の基礎となる事実を裁判所に提出するためのものである. 鑑定

人が受命する親子鑑定も多くは、家庭裁判所での調停民事事件である。日本における親子鑑定中最も多いのは、婚姻外で生まれた子が父と目される男性に、自分の子であることを認めよと要求する認知請求事件に関するものであり、次に多いのは、婚姻中に妻が妊娠して生んだ子を夫が自分の子でないと否認する嫡出否認請求事件に関するものである。

1) 親子鑑定の嘱託

(1) 家庭裁判所の嘱託

民事事件では原則として原告もしくは被告の申請に基づいて裁判所が法医学者などの学識経験者に鑑定を命ずることが多い（刑法第165条、民法第212条）。この場合、鑑定人は裁判所の出頭命令により裁判所で宣誓して鑑定命令を受ける。検査は関係者を研究室などへ呼び出して行い、結果は鑑定書を作成して裁判所へ提出する。

(2) 弁護士からの嘱託

民事事件の一部に、弁護士から鑑定人へ嘱託する鑑定がある。民事事件では原告側または被告側の弁護士から、刑事事件では検事ないし警察官、時には被告人弁護士から、直接に鑑定を嘱託されることがある。刑事事件での採血検査には裁判官が発行した鑑定処分許可状が鑑定人に、身体検査命令状が被検者に示される。結果は報告書を作成して、嘱託者へ提出する。

(3) 個人からの依頼

近年、業者がDNA鑑定を行うことが可能になり、個人から業者に直接依頼することもある。大学の法医学教室では、個人からの直接の依頼による親子鑑定は原則として受け入れていない。

2) 親子鑑定の種類

(1) 認知請求事件

婚姻外で生まれた子が、擬父（父と擬せられている男）に認知を請求する（民法第779～787条）。現実には認知請求事件が鑑定例の大多数を占める。

(2) 嫡出否認請求事件

嫡出子とされる子が実は妻の不貞で生まれた子だと夫が訴える（民法第772、774～778条）。

(3) 親子関係不存在確認請求事件

種々の事情で実子でない子を実子として届け、後で戸籍を訂正したいと訴える場合や、結婚届けから200日以内に生まれた子が実は父の子ではないと訴えることなどがある（戸籍法第113条）。

(4) 父を定める訴え

女は前婚の解消・取消の日から6ヵ月以上経過し

ないと再婚できない（民法第733条）。これに反して再婚して懐胎し、父を定められない時、裁判所が定める。

(5) 子の取り違い事件

産院などで子の取り違いが起こることがある。

(6) 嬰児殺

産婦が自分の新生児を殺す事件で、父親の関与や責任が問題となり、被害児の父を決める必要が生じることがある。

(7) 強姦事件

胎児の父を捜査する。

2. DNA多型による親子鑑定

親子鑑定とは、多型性（個人差）を示す遺伝形質（血液型、DNA多型）を検査して遺伝学的分析を行い、生物学的な血縁関係の存否を科学的方法で鑑定することである。従来はメンデルの法則に従って単純に遺伝する血液型（赤血球型、白血球型、赤血球酵素型、血清型）が応用されたが、近年ヒトゲノム（human genome）の解明に伴ってDNA多型分析法が導入され、さらに精度の高い科学的鑑定が可能となってきた。

生物は遺伝子を親から子へ伝えることで生命活動を継続している。その遺伝情報をのせた遺伝物質本体がDNAと呼ばれるもので、ほとんど全ての細胞に必ず存在している。DNAの遺伝情報はA（adenine）・T（thymine）・C（cytosine）・G（guanine）の4種類の塩基という分子の配列を暗号化して伝えられていて、この配列には個人差がある。

ヒトの染色体は1座位（locus）に2個の対立遺伝子（allele）があり、それぞれ父親由来と母親由来の遺伝子である。また、減数分裂時には2本の相同染色体が対をなし、相同な部位で切断、組換えが起こってキメラ（chimera）の染色体が子供へと受け継がれる。DNA多型による親子鑑定では、多型性のある塩基配列の特徴を利用すると相同染色体上、父親と母親由来の染色体を簡単に区別することができ、親子鑑定や血縁関係の推定などが可能である。

3. 親子鑑定に用いられるゲノム領域

ヒトゲノムは、全遺伝情報の99.9995%を占める複雑な核ゲノムと、残り0.0005%を占める単純なミトコンドリア（mitochondria）ゲノムの2つのゲノムから成り立っている（図1）。ヒトの染色体上にある約30億塩基対のゲノムDNA塩基配列のうち、蛋白質に翻訳される遺伝子領域（コード領域）はゲノムDNAのわずか3%程度を占めているに過ぎない。

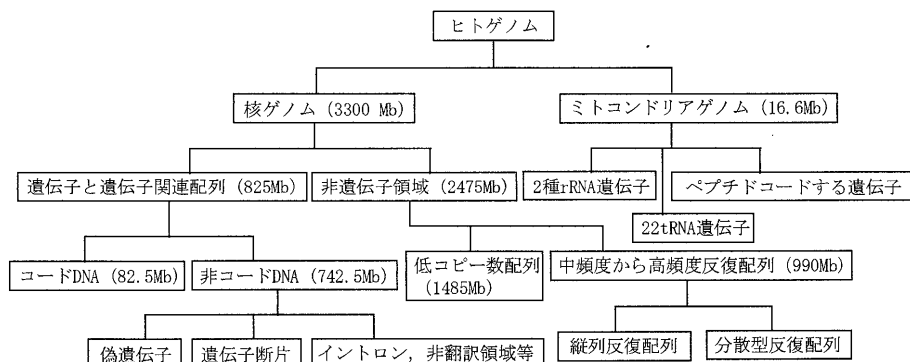


図1 ヒトゲノムの構成

残りの約97%のゲノムDNAは有意な遺伝情報を含まないスペーサー (spacer) またはイントロン (intron) と呼ばれる部分 (非コード領域) である⁸⁾。ところが、塩基配列の個人差は遺伝子以外の非コード領域に多く存在している。

染色体上には、異なったタイプのDNA多型性マーカーが多数見つかってきている。現在の親子鑑定に用いられているヒトゲノムの主なDNA多型性マーカーは、制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphisms; RFLPs), ミニサテライト (minisatellite) 多型 (variable numbers of tandem repeat; VNTR), マイクロサテライト (microsatellite) 多型 (short tandem repeat; STR), 一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms; SNPs), ミトコンドリアDNA多型 (mitochondria DNA; mtDNA) 等であり、多型マーカーの情報を表に示した。

RFLPsは、DNA配列の個人差を制限酵素で切断した場合のDNA断片長さの相違により検出する多型性マーカーであり、一卵性双生児と二卵性双生児の鑑別診断や同胞鑑定・半同胞鑑定などに利用されている。

VNTR多型は、ゲノム上に多数散在する5~50塩基の比較的長い反復単位を持つ多型性マーカーであり、親子鑑定などに広く応用されている。

STR多型は、ゲノム上に多数散在する2~5塩基の短い繰り返し単位を持つ高度の多型性マーカーである。ヒトハプロイド (haploid) ゲノム内に15万~30万個存在し、一般に蛋白質をコードしないイントロンと呼ばれる遺伝子領域に分布する。STR多型は個人によって繰り返し塩基配列の回数が異なり、ゲノム内で父型と母型由来の対立遺伝子間で高頻度に多型を示す。

個人のゲノムの違いは主にSNPsによるもので、

表 親子鑑定に用いられているDNA多型性マーカー

Locus designation	Chromosome location	Test method
33.6		Southern-probe
33.15		Southern-probe
MZ1.3		Southern-probe
pYNH24		VNTR-probe
pYNZ22		VNTR-probe
D1S80	1p36-p35	PCR-PAG 等
D3S1358	3p	Multiplex PCR
vWA	12p12-pter	Multiplex PCR
FGA	4q28	Multiplex PCR
TH01	11p15.5	Multiplex PCR
TPOX	2p23-2per	Multiplex PCR
CSF1PO	5q33.3-34	Multiplex PCR
D5S818	5q21-31	Multiplex PCR
D13S317	13q22-31	Multiplex PCR
D7S820	7q	Multiplex PCR
D21S1179	8	Multiplex PCR
D21S11	21	Multiplex PCR
D18S51	18q21.3	Multiplex PCR
D19S433	19q12-13.1	Multiplex PCR
D2S1338	2q35-37.1	Multiplex PCR
D16S539	16q24-qter	Multiplex PCR
F13B	1q31-q32.1	PCR-PAG 等
D3S1744	3q24	Multiplex PCR
D12S1090	12q12	Multiplex PCR
D18S849	18q12-21	Multiplex PCR
HLADQA	6p21.3	Hybridization 等
LDLR	19p13.1-13.3	Hybridization 等
GYP A	4q28-31	Hybridization 等
HBGG	11p15.5	Hybridization 等
D7S8	7q22-31.1	Hybridization 等
GC	4q11-13	Hybridization 等
ABO	6, 7 exon	APLE-PCR 等
D-loop	Mitochondria	Sequence 等
SNPs	1-23	PLACE-SSCP 等

SNPsの位置ではヒトによって、ある塩基AだったりGだったり異なり、今後親子鑑定に応用されてくるものと思われる。さらに、母系遺伝するmtDNA

の分析も母子鑑定や血縁鑑定に利用される。

4. 親子鑑定に用いられる DNA 検査法

1) フィンガープリント法

親子鑑定に用いられる最初の実用的な DNA 検査法は、Jeffreys らの DNA フィンガープリント法 (RFLPs) である。本方法は、制限酵素を用いてゲノム DNA を切断する方法で、Southern によって開発された⁹⁾。その基本的な操作手順は、制限酵素で特定の塩基配列部分を切断し、切断された DNA 断片を電気泳動で長さの順に分離する。分離された DNA 断片は、プローブ (マルチローカスプローブ、シングルローカスプローブ) を用い、放射性同位素法あ

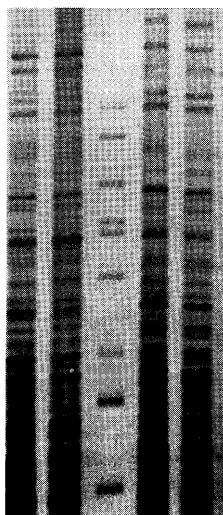


図2 フィンガープリントの検出

半同胞鑑定例における MZ1.3 プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによる DNA 検出。右端の 2 レーン：嫡出子，中間のレーン：サイズマーカー，左端の 2 レーン：非嫡出子。2 人のバンド共通率は 44% であった (親子孫の場合 59.9% で，半同胞の場合 35.3%，他人の場合 23.8%)。

るいは酵素標識ハイブリダイゼーション (hybridization) 法により目的の DNA 断片を検出する。半同胞鑑定における DNA フィンガープリントの検査例 (MZ1.3) を図 2 に示す。

2) PCR 増幅法

PCR (polymerase chain reaction) 法は、1985 年 Mullis らが発表したポリメラーゼ (polymerase) 連鎖反応で、数時間のうちに DNA を約 100 万倍に増幅する手法である¹⁰⁾。DNA は 2 本の鎖がねじれたようにできているが、摂氏 100 度近くまで暖めるとねじれが戻り、2 本の鎖はばらばらになる。それをゆっくり冷やすと分かれた塩基 (A, G, T, C) と同じ配列を持つ鎖を見つけ、DNA 鎖の伸長を行うことにより目的領域の DNA 鎖を何十万倍にも増幅することができる。

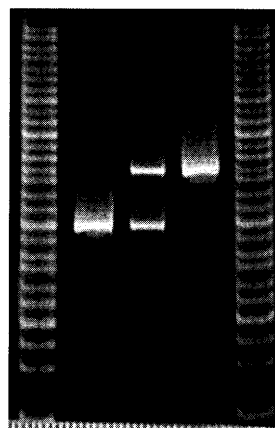


図3 D1S80 座位の DNA 型の検出

親子鑑定 (肯定例) における PCR-PAG 法による D1S80 の検出。父権肯定確率が 0.9132 すなわち 91.32% であった。L: アレリックラダーマーカー, M: 母親 24/24 型, K: 子 24/28 型, F: 擬父 28/28 型。

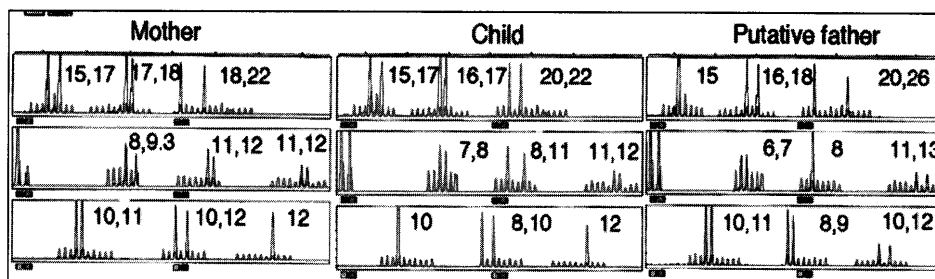


図4 9 座位の STR 型の検出

典型的な親子鑑定 (肯定例) における AmpFISTR Profiler Kit を用いた ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer による STR 型の検出。これらの 9 座位 (D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820) の STR 検査成績のみにより総合的な父権肯定確率が 0.9991 すなわち 99.91% であった。

(1) VNTR 多型の検査

VNTR 多型の検査の主な方法は、PCR で増幅した DNA 産物をゲル電気泳動 (gel electrophoresis) で分離し、塩基配列の繰り返し回数によって生じる泳動距離の相違により DNA 型の判定を行う。今までに、D1S80 座位の多型性マーカーが親子鑑定によく使われている。D1S80 座位は、16 塩基の繰り返し回数 (14~50) によって 36 種類の遺伝子が検出され、個人間で DNA の長さが異なる。日本人集団における D1S80 座位の個人識別確率は 0.987 であり、極めて DNA 鑑定能力が高い。D1S80 座位を用いた親子鑑定 (肯定事例) を図 3 に示した。

(2) STR 多型の検査

現在の親子鑑定では、増幅された DNA 断片が数塩基の繰り返し配列を有する STR が中心であり、変異が少なく、排除率の比較的高い座位が鑑定に使用される。検査方法は、従来の PCR で反応後、PAG 電気泳動法からマルチプレックス (multiplex) PCR で増幅し、自動分析に移行している。この自動分析法は多色蛍光色素を標識することで、短時間に複数の座位を一度に増幅し、遺伝子解析装置で自動分析するものである。図 4 のように 9 座位の STR 多型で親子関係か否かが簡単に判定できる。

(3) SNPs の検査

SNPs 解析は、マルチプレックス PCR によりテンプレート (template) DNA 増幅を行い、残存したプライマーと dNTP を SAP (shrimp alkaline phosphatase) および Exo I (Exonuclease I) により除去

する。得られた PCR 産物を鋳型にして SNP 部位の直前に 3'末端がくるように設定したプライマーと 4 色に蛍光標識した ddNTP を含む SnaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems) を加えてラベル用の PCR を行い、その産物を ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により分離し、付加された塩基の種類をその蛍光の色と移動度の違いで判定する。22 番染色体上の 8 座位 (ss4947490, ss5013903, ss6658727, ss4974799, ss2924060, ss4974729, ss4019224, ss4974915) の SNPs 解析により親子鑑定を行った (図 5)。

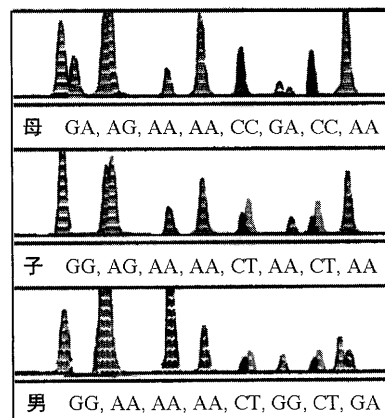


図 5 8 座位の SNPs の検出

親子鑑定 (否定例) における ABI PRISM™ SnaPshot Multiplex Kit を用いた ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer による SNPs の検出。

女	ATTATTTAAA	CTATTCTCTG	TTCTTTCATG	GGGAAGCAGT	TTTGGGTACC	ACCCAAGTAT
	TGACTCACCC	ATCAACAACC	GCTATGTATT	TCGTACATTA	CTGCCAGCCA	CCATGAATAT
	TGTACGGTAC	CATAAATACT	TGACCACCTG	TAGTACATAA	AAACCCAATC	CACATCAAAA
	CCCCCTCCCC	ATGCTTACAA	GCAAGCACAG	CAATCAACCT	TCAACTATCA	CACATCAACT
子 1	GCAACTCCAA	AGCCACCCCT	CACCCACTAG	GATACCAACA	AACCTACCCA	CCCTTAACAG
	TACATAGTAC	ATAAAGCCAT	CTACCGTACA	TAGCACATTA	CAGTCAAATC	CCTTCTCGTC
	ATTATTTAAA	CTATTCTCTG	TTCTTTCATG	GGGAAGCAGT	TTTGGGTACC	ACCCAAGTAT
	TGACTCACCC	ATCAACAACC	GCTATGTATT	TCGTACATTA	CTGCCAGCCA	CCATGAATAT
子 2	TGTACGGTAC	CATAAATACT	TGACCACCTG	TAGTACATAA	AAACCCAATC	CACATCAAAA
	CCCCCTCCCC	ATGCTTACAA	GCAAGCACAG	CAATCAACCT	TCAACTATCA	CACATCAACT
	GCAACTCCAA	AGCCACCCCT	CACCCACTAG	GATACCAACA	AACCTACCCA	CCCTTAACAG
	TACATAGTAC	ATAAAGCCAT	CTACCGTACA	TAGCACATTA	CAGTCAAATC	CCTTCTCGTC

図 6 HVR1 部位の mtDNA の検出

D-loop の HVR1 領域における ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer による母子鑑定。女と子 1 が母子関係で同様な塩基配列が認められ、女と子 2 が非母子関係で 6 ヶ所の塩基置換が認められた。

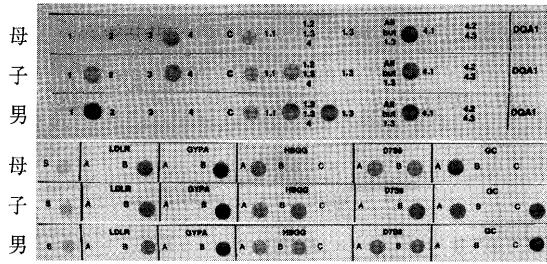


図7 HLADQA1 座位と PM 座位の DNA 型の検出
親子鑑定(肯定例)における Ampli Type HLADQA1 & PM PCR Amplification and Typing kit を用いたドット・ハイブリダイゼーションによる DNA 型の検出。これらの HLADQA1 座位と PM 座位の検査成績のみにより総合的な父権肯定確率が 0.9760 すなわち 97.60% であった。

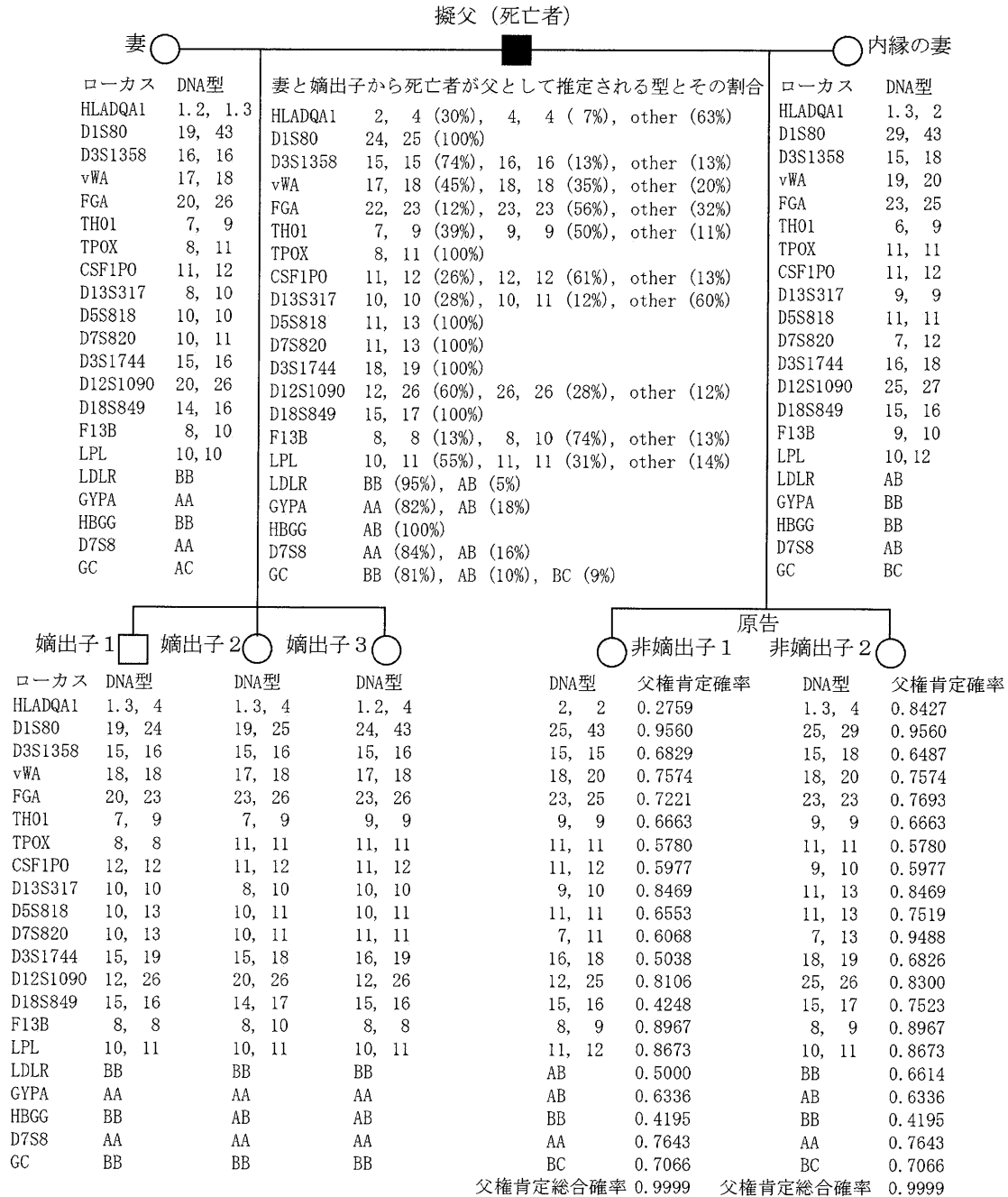


図8 父として疑われている男が死亡している場合の親子鑑定例

(4) mtDNA 多型の検査
mtDNA は核の DNA とは独立した 16,569 塩基対

からなる環状 2 本鎖 DNA であり、核の DNA に比べてその塩基置換速度が 5~10 倍程度大きく、個人

差がより大きい。また、mtDNA は母系遺伝を示し、母と子の塩基配列は基本的に同じである。これらのことから、PCR 法を用いたシーケンス (sequences) 解析法により mtDNA の塩基配列検査法は母子鑑定に極めて有用である。mtDNA の D-loop の HVR1 (hypervariable region I) 領域における ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer により母子鑑定の成績を図 6 に示した。

(5) その他の DNA 多型の検査

HLADQA1 座位および PM 座位 (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC) の DNA 多型は、Ampli Type HLADQA1 & PM PCR Amplification and Typing Kit (Applied Biosystems) を用いて精製した DNA を PCR 増幅し、ドット・ハイブリダイゼーション (dot hybridization) により検出する。6 座位の DNA 型は個人識別や親子鑑定などの法医実務に広く応用されている (図 7)。

5. DNA 解析による親子鑑定の留意点

DNA による親子鑑定では、型が偶然一致する可能性を排除するため、できるだけ多数の遺伝子座位を検査することが必要である。一つの遺伝子座位による孤立否定の場合には、沈黙遺伝子や突然変異などを考慮しなければならない。さらに、検査種類あるいは遺伝子座位を増やすことが望ましい。

6. DNA 解析による親子鑑定の実際

親子鑑定において父 (擬せられる男) と母と子の 3 人の当事者で、嫡出子の認知あるいは否認を請求されるのが普通である。近年、親子鑑定において認知を請求されている男が既に死亡しているという死後認知請求事件が増加している。

本事例 (図 8) では、父として疑われている男 (死亡) とその妻との間に 3 人の嫡出子があり、それらの血縁者の DNA 遺伝子型から、Bayes の定理¹¹⁾に基づき、死亡者の遺伝子型を推定し、同時に 2 人の原告 (非嫡出子 1, 非嫡出子 2) とその母の DNA 型を調べ、Essen-Möller の計算方法¹²⁾により、父権確率 (probability of paternity) を算出した。21 座位の DNA 型の検査結果では、死亡している男が非嫡出子 1 と非嫡出子 2 の父である可能性を直接遺伝学的に否定するような遺伝子型は検出されなかった。総合的な父権肯定確率は非嫡出子 1 と非嫡出子 2 とも 0.9999 (99.99%) 以上であった。この値は Hummel の解釈に従うと「父と判定してよい」という範疇に

入る値であった¹³⁾。

おわりに

近年、多色蛍光色素を標識する技術および自動遺伝子解析装置の開発により、複数遺伝子座位を同時に解析することが可能となった。従来のゲル電気泳動法より操作が簡便かつ有効であり、親子鑑定や個人識別において有用な高い評価が得られた。

今後、新しい DNA 多型性マーカーの開発、データベースの充実、分析の簡便化・自動化などの技術の進歩とともに、DNA 鑑定の精度を向上するための研究が進められることを期待する。

文 献

- 1) Wyman AR, White R: A highly polymorphic locus in human DNA. Proc Natl Acad Sci USA **77**: 6754-6759, 1980
- 2) Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL: Hyperirritable minisatellite regions in human. Nature **314**: 67-73, 1985
- 3) Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL: Individual specific "fingerprints". Nature **316**: 76-79, 1995
- 4) Wang X, Sawaguchi T, Sawaguchi A: Application of electrophoresis technology to DNA analysis. Electrophoresis **21**: 334-337, 2000
- 5) 王 秀玲, 澤口聡子, 山下ケサ子ほか: 日本人における 3 種 STR 多型の検出とその親子鑑定への応用. DNA 多型 **6**: 50-55, 1998
- 6) 王 秀玲, 澤口聡子, 山下ケサ子ほか: ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer を用いた STR 多型の解析—擬父死亡例における父子鑑定—. DNA 多型 **7**: 52-54, 1999
- 7) IHGSC (International Human Genome Sequencing Consortium): Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature **409**: 860-921, 2001
- 8) Venter JC, Adams MD, Myers EW et al: The sequence of the human genome. Science **291**: 1304-1351, 2001
- 9) Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol **98**: 503-517, 1975
- 10) Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al: Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science **230**: 1350-1354, 1985
- 11) 小松勇作: 血液型による父権の判定について. 犯罪誌 **13**: 485-495, 1939
- 12) Essen-Möller E, Quensel CE: Zur Theorie des Vaterschaftsnachweises auf Grund von Ähnlichkeitsbefunden. Deut Z Ges Gerichl Med **31**: 70-96, 1939
- 13) Hummel K: Biostatistische Abstammung-begutachtung mit Blutgruppenbefunden, Tabellenband I, G. Fischer, Stuttgart (1971)