

平成 9 年 1 2 月 5 日

DNA 鑑定についての指針 (1 9 9 7 年)

日本 DNA 多型学会
DNA 鑑定検討委員会

1. はじめに

1985 年、英国のジェフェリーズ博士の DNA 指紋法の発表以来、DNA 分析技術を個人鑑別や血縁関係の推定に用いる新しい研究分野が開拓された。DNA の分析結果はすでに DNA 鑑定として我が国でも法廷に提出され、実際の事件解明に用いられている。DNA 鑑定の適切な実施については、国際法医血液遺伝学会や米国科学アカデミーからいくつかの勧告が出されているが、我が国ではこれまで学会レベルの勧告が出されていなかった。1994 年に日本 DNA 多型学会 (当時は日本 DNA 多型研究会) に DNA 鑑定検討委員会が設けられ、DNA 鑑定の適切な実施について検討された。1995 年度にはさらにそれを母体とした文部省科学研究費総合 (B) 「DNA 鑑定に関する包括的研究」が実施され、DNA 多型学会第 4 回学術集会前日に公開シンポジウム「DNA 鑑定の日本の現状」も開催された。これらの活動を通じて、DNA 鑑定検討委員会は DNA 鑑定を適切に実施するための基本的事項について、学問的見地から指針をまとめることとした。もちろん、この指針は、学問の進歩や社会の要請に応えて適切に改訂されるべきものである。

2. 一般的注意

1) 用語

DNA 鑑定ではヒト DNA の多型を示す領域 (座) を用いるが、これをここでは“ローカス”と呼ぶ。ローカスの記載に当たっては、一般的に使用されている名称と共に、D セグメント番号のあるものについてはそれを付記することが望ましい。

一つのローカスで多型を示す DNA 領域の儘々の塩基配列を“アリアル”と呼ぶ。アリアルはある領域の塩基配列の塩基の一部が置換、挿入、欠失したものや、縦列反復配列による反復単位 (リピート) の数の違いによるもの、あるいはリピート内の変異による反復配列の内部構造の違いによるもの等がある。アリアルの名称は学会で使われるものを用いるべきであるが、縦列反復配列の場合には可能ならばリピート数を用いるのが望ましい。

2) DNA 情報の持つ意味

ヒトの DNA の全配列には、一卵性双生児の場合を除いて個人間で異なる領域 (ローカス) が極めて多数存在する。しかし、現在の DNA 多型の分析方法はこれらのローカスのごく一部の型を分析しているのみであり、実際の識別能力は用いられたローカスの数や性状、あるいは検査手法に依存している。そして、そのような個々のローカスの検

査手法の信頼性は、法廷の求めがあれば鑑定事例毎に証明されねばならない。

3) 資料の由来

DNA鑑定は、提出された資料について実施されるものであり、鑑定者は資料の由来について責任を持つものではない。しかし、鑑定者は資料の由来について無関心でよいわけではなく、資料の採取、受け渡し、保管等が適切に行われていることを確認する必要がある。

4) 検査の品質の保証と熟達度の保証

DNA鑑定を実施する機関は、学問的に確立され、一般に許容された検査法を鑑定に用いるべきであり、またその検査法に習熟していなければならない。そして、法廷の求めがあれば、それらについての根拠を提示しなければならない。

5) 再鑑定への配慮

繰り返し採取が可能な対照資料は別として、再度採取ができない資料の場合には、可能な限り再鑑定の可能性を考慮してDNA未抽出の資料の一部が保存されることが望ましい。資料の全量を消費する場合、鑑定人はそうせざるをえなかった状況を含め鑑定経過を詳細に記録するよう努めるべきである。すべての鑑定において、鑑定人は法廷の求めがあれば鑑定経過を詳細に記録した鑑定ノートを開示するべきであるが、資料の全量を用いた場合にはとりわけこのことがあてはまる。

6) 社会的問題

DNA情報はその内容の如何にかかわらずプライバシーとして保護されるべきである。また、DNA鑑定は犯罪の捜査など法律による手続に基づくもののほかは、関係者の同意のもとで実施されるべきものである。一般に法医学領域でのDNA鑑定に用いられるローカスはタンパク質に翻訳されないいわゆる非コード領域にあることが多く、遺伝性疾患との関連はほとんどないものである。しかし、たとえ非コード領域であっても、関係者の同意なしに不必要な開示はされるべきでない。また、遺伝病の原因遺伝子や特殊な感染症の病原体など社会的に個人が差別の対象になるおそれの強いローカスのDNA検査は鑑定に用いられるべきではない。

3. 親子鑑定について

親子鑑定では、一般に検査資料が関係者から採血した血液であり、不純物の少ない高分子DNAが容易に回収できる。また、必要があれば再度採血することで再鑑定も容易である。しかし、時に組織標本など陳旧な資料が検査対象になることもある。以下に親子鑑定における注意事項を述べる。

1) 手技上の注意

(1) 資料DNAの性状が明らかであるべきである。DNA量は適切な方法で定量され、検査法に適した量が用いられるべきである。新鮮な血液などの高分子DNAの含まれていることが明らかな資料からのDNAではどの定量法も利用できる。しかし、

DNAが低分子化している可能性がある資料やヒト以外のDNAが混在している可能性がある資料からのDNAでは、ヒトDNAを定量することが望ましい。一つの方法としてはヒトDNAの特異的配列であるD17S1を指標としたヒトDNA定量キットの利用がある。

(2) DNA鑑定に用いた手技に誤りがないことが示される必要がある。そのためには、常に陽性対照と陰性対照を同時に検証すべきである。DNA断片のサイズが問題の場合にはアリーのすべてをカバーするサイズマーカーあるいはアレリックラダーマスターを用いるべきである。また、できる限り duplicate ないし triplicate で分析を行うべきである。

(3) Polymerase chain reaction(PCR)法に対する特別な注意

PCR法でまず問題となるのは資料とは別に混在(コンタミネーション)したDNAを増幅してしまうことである。この点を確認するため、陽性対照と共に必ず陰性対照を同時に増幅すべきである。また、可能であれば資料からのDNA抽出の段階から再度検査し、再現性を確認することが望ましい。通常のPCR法では1ng程度以上のDNA量がないと十分な増幅産物が得られないので、無菌操作ないしそれに準じた操作を行う限りコンタミネーションの危険は少ない。なお、nested-PCRのような高感度PCR法はコンタミネーションが否定できる根拠を明らかにしなければならない。

コンタミネーションで最も注意すべきはPCR産物の混入である。200塩基程度のPCR産物は、1pgでも数百万コピー存在することになり、数μgのゲノム量に匹敵する。従って、増幅後の資料を扱う器具と増幅前の資料を扱う器具は厳重に分けなければならない。この種のコンタミネーションの最も確実な防御策はPCR前の資料を扱う場所とPCR後の資料を扱う場所を物理的に分離することである。

PCR法で次に問題になるのは一方のアリーが増幅されず、ヘテロ接合体であるにもかかわらず見かけ上ホモ接合体と判定される場合があることである。これは一方のアリーのプライマーの結合部位に変異があってプライマーが結合できない場合(アリードロップアウト)、あるいは一方のアリーが長くて増幅効率が低下した場合(アリーフェイドアウト)などに生ずる。これらの現象はアリーの頻度調査を歪めたり、真の親子関係を否定する原因にもなりうる。親子鑑定に用いるローカスはホモ接合体におけるデータ処理法が明確でPCRの増幅が容易なサイズを有するものが望ましい。

2) ローカスの選択

(1) DNA鑑定に用いられるローカスは、共同研究やデータ交換などにより多くの機関で有効性が確認されることが望ましい。

(2) ローカスの染色体上の位置や、同時に用いられる他のローカスとの連鎖関係が明らかになっているべきである。

(3) ローカスの各アリーの一般集団における出現頻度が明らかにされているべきである。また、家族関係の明確な家計についての調査により突然変異の出現頻度が示されることが望ましい。

3) 個々の検査法について

(1) multilocus Probes(MLPs)

MLP法は1つのプローブで20～30本のバンドを検出するが、このことは10～15のローカスを一度に分析していることとなり、情報量が多い。ただ、どのローカスを分析しているかは必ずしも明らかではない。品質管理を厳重に行えば、検査結果はほぼ安定していることは認められるが、ローカスが特定されていない点からはMLP法はDNA鑑定には必ずしも適しているとはいえない。ただ、片親ないし両親がいない場合に他の親族との血縁関係を推定する検査法としては現在最も信頼できるものである。

(2) single-locus probes(SLPs)

SLP法は一つの定まったローカスを分析するので、従来の血液型と同様に鑑定に用いることができる。但し、制限酵素で切断したバンドの断片長は通常数キロベース以上と長く、その長さの厳密な決定は困難である。従って電気泳動の誤差やゲル誤差を考慮しながら断片長のおよその値を算出してバンドの一致・不一致を判断したり、出現頻度を調査している。これらの評価法、バンドの一致・不一致の判定法、出現頻度の算出法、突然変異率の確認法等は学問的に確立されたものでなければならない。

(3) PCR増幅によるミニテラサイト及びマイクロサテライトのタイピング

これらはPCRによって増幅されるローカスが定まっており、また、アリーの検出法も明確であり、鑑定に用いることができる。ミニサテライトはリピート自身が十～数十塩基程度あり、全長が長いのでPCRに適していない。従って、例外的に全長の長いローカスのみが対象となる。一般にミニサテライトはアリーが長く識別能力は高いが、全長がやや長くなるのでアリーフェイドアウトの危険性も高くなる。一方、マイクロサテライトはリピートが数塩基程度で全長が短くPCRによるタイピングに適している。ただ、一般にマイクロサテライトはアリーが少ないので、識別能力を高めるにはいくつかのローカスを組み合わせて用いる必要がある。

アリーは増幅されたDNAの全長をサイズマーカーを用いて決定することによって決定できるが、アレリックラダーマーカーを用いれば、より正確な決定ができる。アレリックラダーマーカーと一致しない不規則なアリーが時にみられるが、そのような不規則アリーの出現頻度の小さいローカスを用いることが望ましい。なお、不規則アリーの出現は多数例の検索においては一般に不可避であり、その表示方法が明示されている必要がある。

(4) HLAタイピング

もともと白血球の血液型として抗体を用い型判定されたものである。DNA検査ではより多くのアリーが性格に型判定できるが、基本的には血液型を判定しているのと同

じであり、鑑定に用いることができる。PCR産物に制限酵素を作用させて判定する方法、塩基配列特異的プローブを用いるドットプロットハイブリダイゼーション法等があるが、いずれも利用できる。

(5) その他のPCRを用いる検査

従来の血液型検査等がDNAを用いてより詳細に実施できるようになってきている。たとえば、ABO式血液型等のDNAタイピングが報告され、遺伝子型が分析できるようになってきている。これらは前述の諸注意を守る限り使用できる。

ミトコンドリアDNAのDループ領域は個人個人で塩基配列が異なることが多く、利用可能であるが、母系遺伝するので、父子鑑定には適さない。

ミニサテライトのリピート内の変異をPCRによって分析するMVR-PCR法は有用だと思われる。しかし、検査の品質管理の方法が明示された後に利用されるべきである。

4. 刑事鑑定について

刑事鑑定の多くは体液斑やヒト組織片等について実施される。従って、DNAの低分子化、担体や混在物による影響などを常に考慮しなければならない。また、通常の親子鑑定の場合と異なり、一般に再度資料を採取することができないので、再鑑定について配慮しなければならない。以下に刑事鑑定で特に注意すべき点を挙げるが、親子鑑定の項で述べた注意事項は刑事鑑定にも共通に適用するものである。

- 1) 資料から抽出されたDNAの低分子化の程度が示されることが望ましい。そして、低分子化の程度を考慮してDNA検査に用いるDNA量を決めることが望ましい。
- 2) 担体の影響を確認する必要がある。担体によってはPCRを阻害したり電気泳動における移動度に影響を与える事がありうる。また、担体に別のDNAが付着してコンタミネーションを起こすこともありうる。
- 3) 性別を判定する場合には、Y染色体に特有の塩基配列を指標とするが、同等の増幅効率を保つX染色体の塩基配列も同じ資料で増幅し、資料のDNAの不足による偽陰性を排除する必要がある。また、既知の男性と女性の資料を同時に検査すべきである。
- 4) 鑑定書には、用いた手法の説明や詳細な鑑定経過が記載されるべきである。また、検査機関で用いている検査法の品質管理体制が示されることが望ましい。