



# 鑑 定 書

鑑定書番号 医歯大法医物体912  
鑑定命令 静岡地方裁判所  
鑑定事項 パラフィン包埋組織標本が竹下勇子由来である事の同定  
[原告] 竹下勇子  
[被告] 清水市他  
鑑定人 東京医科歯科大学医学部法医学教室・教授・支倉逸人



## 鑑 定 書 目 次

	頁
第1章 前文	1
第2章 鑑定主文	2
第3章 説明	
1. DNA多型について	3～4
2. 鑑定試料及び鑑定方法について	4～5
3. 検査成績	5～6
4. 結論	6

表紙共計5枚

## 第1章 前文

以下の手続きにより本鑑定を行った。

1. 鑑定番号 医歯大法医物体912.

2. 鑑定命令 平成11年8月31日

裁判所： 静岡地方裁判所. 裁判官・村主隆行

事件番号：静岡地方裁判所民事第二部合議係 平成八年（ワ）第102号

〔原告〕竹下勇子

原告代理人・弁護士・阿部浩基

〔被告〕清水市

〔被告〕小坂昭夫

被告兩名訴訟代理人・弁護士・高芝利仁

鑑定事項：平成3年12月27日摘出した原告の右胸のしこりのパラフィンブロックとして被告病院にて保管されてきて今回提出された鑑定標本は、被告の身体の一部か

鑑定人： 東京医科歯科大学・教授・医師・医学博士・支倉逸人。  
(東京都文京区湯島1-5-45 東京医科歯科大学法医学教室)。

3. 資料

(1) 原告・竹下勇子から採取した血液（以下、血液とよぶ）。

(2) パラフィン包埋組織標本の破片（以下、組織とよぶ）。

4. 検査 平成11年12月17日から平成12年3月31日まで

検査担当 教授・支倉逸人、講師・佐藤慶太、臨床検査技師・西牧裕子。

以上

## 第2章 鑑定主文

次のとおり鑑定する。

1. 提出されたパラフィン包埋組織から抽出したDNAは極めて微量で著しく変性（低分子化）していて、ほとんどのゲノムDNA型システムが型判定不能であったものの、ABO式血液型遺伝子システムのみは検査に成功し、BO型と判定され、血液から抽出したDNAによる型判定と一致した。
2. 染色体外遺伝子であるミトコンドリアDNA型については、血液から抽出したDNAと組織から抽出したDNA型のいずれも検査可能であり、3個所の塩基で異なった型を示した。
3. この成績からパラフィン包埋組織が原告から摘出された組織ではない可能性が疑われたが、ミトコンドリアDNAに突然変異が生じた可能性も否定できず、他のシステムによる否定も得られなかったため確定できなかった。

### 第3章 説明

#### 1 DNA多型について

近年、ヒト遺伝子の本体であるDNAの多型が非常に有用な遺伝標識として個人識別や親子鑑定に実用化されている。DNA多型とは、DNAに遺伝的個体差があり、その特徴によってヒトを他の動物から識別したり、ヒトとヒトとを型分けすることができることをいう。これまでに数多くのDNA多型システムが報告されているが、現在、一般的に用いられているのはVNTR (Variable Number of Tandem Repeat: 長鎖縦列繰り返し配列多型) やSTR (Short Tandem Repeat Polymorphism: 短鎖縦列配列多型)、さらにRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: 制限酵素切断断片長多型) などの種類がある。VNTR及びSTRの特徴は、まず特定の染色体上に遺伝子座を有する染色体遺伝子であり、その遺伝子のイントロン (蛋白質生成に関わらない部分) 上に、数個あるいは十数個の特定の塩基の配列を1単位として多数の単位が繰り返し連なっている構造を有している。この繰り返しの数が個々の遺伝子によって異なり、一人のヒトは両親から1個ずつの遺伝子を受けて二つで一組の型を持つ。これによりヒトを数十から数百の型に分ける事ができる。RFLPの特徴は、繰り返し構造を持たない特定の遺伝子領域を、DNAを特定配列部で切断する制限酵素によって処理し、その切断されたDNA鎖長によって型判定するものである。一方、染色体外 (細胞核外) 遺伝子としては細胞質内に存在するミトコンドリアDNAがある。ミトコンドリアDNAは母系遺伝を呈し、そのD-ループと呼ばれる領域の塩基配列は母子で共通している。しかし、ミトコンドリアDNAはヒト固有の染色体DNAではなく、又しばしば点突然変異を起すことから、法医学実務においては積極的には用いられない。ただ、資料の保存状態が悪い場合や微量であった場合は、染色体DNAを対象とした検査よりもミトコンドリアDNAを対象とした場合の方が検査成績が良好な事が多い。一般に微量のDNA資料からDNA多型の検査をする場合、PCR (Polymerase Chain Reaction: 複製連鎖反応)法を用いてDNA増幅を行う。PCR法は、2種のプライマー (複製開始を命令するDNA断片) を用いて、DNA合成酵素による鋳型特異的なDNA合成反応を繰り返す事によって、目的とする遺伝子領域の特定の塩基配列を持ったDNA断片を数十万倍に増幅する反応である。通常、染色体遺伝子の場合は子は父及び母から同種の相同染色体を一本ずつ貰うので、PCR法によって二つのDNA鎖が増幅される事になる。続いてこの反応生成物を電気泳動分離すると、ヘテロ接合体 (増幅された遺伝子の分子量が異なる異型接合体) の場合は増幅された遺伝子は2本のバンドとして確認できるが、ホモ接合体 (増幅された遺伝子の分子量が同一の同型接合体) の場合は一本のバンドとなる。ミトコンドリアDNAの場合は染色体外遺伝子であるため、増幅される遺伝子領域は一種類となり、電気泳動分離によっても一本のバンドとして確認される。今回の鑑定ではMCT118型、TH01型、vWA型、TPOX型、CSF1PO型、HGHP型、D11S488型、D21S11型、ABO遺伝子型、RhEe型の染色体DNA型と、ミトコンドリア

DNA型を検査した。

## 2 鑑定資料及び鑑定方法について

### 資料

竹下勇子より採血した静脈血及び提出されたパラフィン包埋組織標本の破片。

### DNAの抽出

(1)血液は白血球を採取してからProteinase-k（蛋白分解酵素）処理後、フェノール/クロロフォルム抽出を施し、エタノール沈殿法にてDNAを回収した（以下、血液DNAとよぶ）。

(2)パラフィン包埋組織は切片をキシレンで脱パラフィン後、エタノール処理を施し、組織沈殿を得た。続いてProteinase-k処理後、フェノール/クロロフォルム抽出、エタノール沈殿法にてDNAを回収した（以下、組織DNAとよぶ）。

### PCR増幅

一般にパラフィン包埋組織から抽出したDNAは著しく低分子化している事が予想されるので、組織DNAについて各DNA型システムのPCR反応を試み、増幅が確認されたシステムのみ血液DNAについても同反応を行った。TH01型、vWA型、TPOX型、CSF1PO型、はGene print™ STR systems kit (Promega社) を用いて、MCT118型、HGH型、D11S488型、D21S11型、ABO遺伝子型、RhEe型、ミトコンドリアDNA型はそれぞれプライマー合成してPCR反応を行った。

### 電気泳動による型判定

得られたPCR産物はvWA型、TH01型、TPOX型各システムに関しては6%変性ポリアクリルアミドゲル（29：1、20cm×40cm×0.35mm）、CSF1PO型に関しては4%変性ポリアクリルアミドゲル（29：1、20×40×0.35mm）、HGH型に関しては10%ポリアクリルアミドゲル（29：1、20cm×40cm×0.35mm）、D11S488、D21S11、MCT118型に関しては5%ポリアクリルアミドゲル（29：1、20cm×40cm×0.35mm）に添加し、0.5×TBE buffer、1500V、2時間電気泳動後、銀染色法によってバンドを検出した。この際、型判定のためにAllelic Marker（各型標準DNA断片の混合物）をサンプルと同時に添加した。一方、ABO、RhEe

型については10%ポリアクリルアミドゲル (29 : 1, 11cm×6cm×0.5cm), ミトコンドリアDNA型については8%ポリアクリルアミドゲル (29 : 1, 11cm×6cm×0.5cm)に添加し, 0.5×TBE buffer, 100V, 1時間電気泳動後, エチジウム・ブロマイド法によってバンドを検出した。

### 3 検査成績

組織DNAを対象とした各DNA型システムのPCR反応では, TH01型, vWA型, TPOX型, CSF1PO型, MCT118型, HGH型, D11S488型, D21S11型, RhEe型は増幅バンドを検出できなかった。一方, ABO遺伝子型及びミトコンドリア型は増幅バンドが確認されたため, 血液試料についてもPCR反応を行い, 増幅確認後に検査を続けた。増幅が確認できなかったシステムに関してはランダムプライマー (不特定配列DNA増幅用DNA断片) を用いたプライマーエクステンション反応を繰り返して行うPEP法 (Primer Extension Pre-amplification) を行い, 鋳型DNAの全領域の増幅を試みた後, 各DNAシステムのPCR合成を行った。その結果, 試みた全てのシステムでやはり増幅が困難であった。増幅が確認されたABO遺伝子型とミトコンドリアDNA型については以下の検査を続けて行った。

#### (1) RFLP法によるABO遺伝子型の型判定。

血液DNA及び組織DNAを対象とした2組4種のプライマーで増幅された産物の内, O遺伝子支配領域の増幅産物は制限酵素Kpn I, B遺伝子支配領域の増幅産物は制限酵素Alu I によって消化し, 電気泳動後 (PCR後の電気泳動と同様の条件), ゲルに銀染色を施してバンドを検出し, その切断断片長によって型判定した。その結果, O遺伝子支配領域の産物に関しては両試料において171bpと28bpでバンドが確認され, O遺伝子の存在が認められた。一方, 遺伝子支配領域の産物に関しては両試料において88bpと40bpのバンドが確認され, B遺伝子の存在が認められた。よってABO遺伝子型は両試料共にBO型と判定された。

#### (2) ミトコンドリアDNA HV I 領域のダイレクト・シーケンス解析。

増幅が確認された血液DNAとパラフィン組織DNAのミトコンドリアPCR産物の一部を鋳型にして, FITC (蛍光色素) 標識したプライマーによって正逆両方向からHV I 領域ダイレクト・シーケンス反応を行い, その反応産物をA.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia) によって解析した。その結果, 血液では16,130番目の塩基がA (アデニン) なのに対し, パラフィンではG (グアニン) を示した。同様に16,224番目でも血液ではT (チミン) なのに対し, 血液ではC (シトシン) を示した。又16,246番目では血液はC

(シトシン)であったが、パラフィンではT (チミン) とC (シトシン) の両ピークを検出し、この個所に関しては判定保留とした。

#### 4 結論

組織DNAからは殆どのDNA多型システムで遺伝子検出が不可能で型判定ができなかった。これは組織DNAがパラフィン包埋過程において低分子化の影響を受け、そのために通常のPCR増幅反応が困難となったと思われる。しかし、ABO遺伝子及びミトコンドリアDNAは他のシステムに比べて遺伝子のコピー数が多い事等から型判定が可能になったと思われる。ABO遺伝子型システムでは血液DNAと組織DNAの両方でBO型が検出され、パラフィン包埋組織が竹下勇子の体組織由来である事は否定されなかった。一方でミトコンドリアDNA型は血液DNAと組織DNAで異なる塩基配列を示した。先にも述べたが、ミトコンドリアDNAはヒトの固有遺伝子ではなく、突然変異を引き起こしやすい点からも法医学実務ではあまり重視されていない。今回は組織DNAが著しく低分子化して他のDNA型システムは検査困難だったため、保存性が良く型判定できる可能性の高い本システムを検査したが、本結果からただちにパラフィン包埋組織が竹下勇子の体組織由来ではないと結論することはできない。

一般に個人識別や親子鑑定においては、肯定する場合にはたとえば99%以上の高い肯定確率を出すこと、否定する場合には型が適合しない複数のシステムを出すことが必要であり、いずれでもない場合には検査不十分と考えて、さらに検査項目を追加しなければならないとされている。今回の鑑定では、ABO遺伝子型ではBO型と一致したが、肯定確率84%で90%よりも低く、一方ミトコンドリアDNA型システムのみで型が適合しないという結果だったので、肯定、否定、いずれの結論も得られず、検査不十分だったことになる。

以上

鑑定に要した期間、平成11年12月17日から平成12年3月31日まで。

平成12年3月31日

113-8519 東京都文京区湯島1-5-45  
東京医科歯科大学医学部法医学教室

鑑定人 名誉教授 支倉逸人  
(自宅電話： )

支倉逸人



共同鑑定人 講師 佐藤慶太  
(研究室電話： )

佐藤慶太





