

DNA 鑑定についての指針（2012年）

日本 DNA 多型学会
DNA 鑑定検討委員会

目次

1. はじめに
2. 定義および一般的注意
 - 1) 定義および分類
 - 2) 一般的注意
3. 法医資料の鑑定
 - 1) 資料の取り扱い
 - (1) 資料の由来および採取
 - (2) DNA 抽出部位の選別と再鑑定への配慮
 - 2) 検査の品質の保証
 - (1) DNA 抽出
 - (2) 検査ローカス
 - (2)-1 常染色体上のローカス
 - (2)-2 Y 染色体上のローカス
 - (2)-3 X 染色体上のローカス
 - (2)-4 ミトコンドリア DNA 多型
 - (2)-5 検査ローカスの選択について
 - 3) 検査手技
 - 4) 検査者の知識および技術の確認
 - 5) 型判定の基準
 - 6) 微量な資料、高度に変性した資料、PCR 阻害物質などへの配慮
 - 7) 混合資料への配慮
 - 8) 血縁者との比較による身元確認について
 - 9) 鑑定書の記載について
4. 血縁鑑定について
 - 1) 資料収集
 - 2) 検査ローカス、検査法について
 - 3) 血縁関係の判断について
5. 生物種の鑑定について
 - * 本指針内の使用法における用語の説明

平成 24 年 2 月 20 日

DNA 鑑定についての指針（2012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多型解析技術を用いた個人識別、血縁関係の推定に関する研究は、飛躍的な発展を遂げてきた。この間の研究の発展は、ヒトゲノムおよびDNA多型に関する知識の増加、検査用機器の開発、新しい検査法の開発、検査用キットの広がりなどによりなされてきたものである。DNA鑑定はこれらの成果のヒトの社会活動への応用であり、その適切な実施は、研究の進歩に応じて変わっていく必要がある。

日本DNA多型学会は、1997年にDNA鑑定の適切な実施に関するわが国における学会レベルの勧告として、「DNA鑑定についての指針」をまとめ発表した。この指針は、学問の進歩や社会の要請に応じて適切に改訂されるべきものとして、発表されたものである。

近年のヒトに対する一般的なDNA鑑定方法はキットの導入、実用化により、世界的にも一定の傾向をもって進められてきている。また、キットを用いない多型検査についても実際例に応用されている。

日本DNA多型学会では、現在わが国で様々な場面で多用されてきているヒトDNA鑑定の現状を踏まえ、本指針を現状に適したものに改訂することとした。なお、この指針も今後の学問の進歩と共に、適切に改訂されていくべきものである。

2. 定義および一般的注意

1) 定義および分類

この指針において、DNA鑑定とは、刑事事件あるいは民事事件に関連して、裁判所の命令、司法警察員・検察官、民間などからの依頼を受け、各種資料中に含有されるDNAを抽出し、一部の構造を解析して、ヒトの個人識別や血縁鑑定、性別や動植物種などの判定を行う鑑定業務を総称したものをよぶ。本指針は主としてヒトのDNAを対象とするが、事件の内容によってはヒト以外の生物のDNA検査が含まれることもある。

DNA鑑定の対象を、法医資料に代表される低分子化したDNAや微量なDNAを含む場合と、生体から直接採取し、検査に供される資料に代表される比較的高分子のDNAが回収できる場合とに分けると、その検査に際し特に注意を払いながら進めるべき点に違いがある。そこで、ここでは前者を法医資料の鑑定として取り扱い、後者は主として個人識別や血縁関係を知ることを目的に行われるため血縁鑑定として取り扱う。

2) 一般的注意

DNA鑑定の結果は、刑事事件であれば被告人の有罪無罪の判定に、民事の血縁鑑定であれば家族関係や検査対象者の人権などに影響する可能性が高い。したがって、鑑定人にDNA

鑑定が依頼される際には、適切な手続きをもって資料が提出される必要がある。

DNA 情報はその内容の如何に関わらず安全に管理され、個人情報 は 厳重に保護されなければならない。DNA 鑑定は、犯罪の捜査など法律手続きに基づく資料の他は、関係者の同意の下で実施されるべきものである。

3. 法医資料の鑑定

1) 資料の取り扱い

(1) 資料の由来および採取

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、鑑定人は資料の由来について直接責任を持つものではない。しかし、その検査および検査結果の評価に際しては、資料の由来、採取、保管状況などが DNA 鑑定に影響を与え得る点を確認する必要がある。

資料採取から検査に至るまでの過程で確認すべきことは、以下のような点が挙げられる。

- a. 資料採取時から、保管、さらに鑑定人に受け渡されるまでの検査資料の由来が明らかであること。
- b. 採取時の状況—特に、湿気のある状態、乾燥した状態、気温の高さなどが資料に与える影響を考慮すること。
- c. 採取後の保管状態—保管時の湿気の程度、保管温度、冷凍・冷蔵などの保存状態を変化させていた場合の、後の検査に与える影響を考慮すること。
- d. 汚染対策—採取時から、その後の保管に至るまでのヒトによる汚染に注意されていること。

これらの注意点は、鑑定人が検査に当たり確認すべき点であると同時に、資料を採取・保管・引渡しをする人間が注意しなければならない点にも当たる。

(2) DNA 抽出部位の選別と再鑑定への配慮

DNA 鑑定資料は、再度収集可能なものを除き、原則的に DNA 未抽出の資料につき再鑑定可能な量を残す。また、資料をすべて消費する必要があるときには、その必要性を説明し、鑑定結果として提示していない実験結果も求めがあれば開示できるようにしておく。

検査にかかる元のデータは鑑定資料の全量を消費するか否かにかかわらず、求めがあれば開示できるように保存する。また、特に斑痕などのように、物体に付着した資料からの DNA 検査においては、検査前と検査後の状態がわかるように写真を残すなどの配慮をし、残余資料は他の資料と混同しないよう適切に保管し、検査終了後に返却する。

2) 検査の品質の保証

DNA 鑑定を実施する機関は、鑑定当時の学問的背景に基づき、一般的に許容された検査法を鑑定に用いると共に、以下に述べる内容を考慮する必要がある。

(1) DNA 抽出

法医鑑定において、低分子化した DNA や微量な DNA が抽出されることが予想される資料を取り扱う際には、僅かな量のヒトに由来する汚染が大きな影響を及ぼす可能性がある。そのため、由来の不明な法医資料からの DNA 抽出は、鑑定作業において最も注意が必要な

過程であることを認識する。

DNA 抽出時の一般的注意としては、試薬の入ったものを含めた器具を素手で触れないこと、マスクを着用すること、クロスコンタミネーションを避けるため器具や作業場所を操作目的ごとに使い分けること等を配慮すると共に、全行程に渡り資料の取り違えの防止を念頭に作業を行う。

DNA 抽出用資料の準備を含めた DNA 抽出手順は、すべての検査で鑑定結果に記載または明示する。また DNA を定量する場合は、目的にあった適切な方法を選択する。

(2) 検査ローカス

ヒト DNA 鑑定に用いられるローカスは現状ではマイクロサテライト (STR) 多型が多い。また、塩基の違いに由来する多型も利用できる。多数のローカスの検査には、Multiplex PCR 法が応用されている。

(2)-1 常染色体上のローカス

常染色体上の多数のローカスを検査する際には、国内外において広く検討され、法医学的応用に際しての有用性が認められていて、日本人集団におけるアレルの出現頻度データが蓄積されており、多くの機関で追試可能なローカス（例として CODIS の 13 STR ローカス）を選択し、総合して十分な識別力が得られる必要がある。常染色体 STR については市販のキットが広く用いられているが、他のマイクロサテライト (STR)、ミニサテライト、塩基の違いによるローカスも、日本人において十分な検体数で一般集団頻度が調査されているものは、その研究の進展度合いに応じて同時に利用することが可能である。

(2)-2 Y 染色体上のローカス

男性を対象とした場合、Y 染色体上の非組み換え領域の多型は、多数のローカスの型の組み合わせ、すなわち個人のハプロタイプとして型判定できる。近年、Y 染色体 STR は市販のキットが広く用いられてきているが、他にも日本人において十分な一般集団頻度が調査されている多型は、その研究の進展度合いに応じた利用が可能である。Y 染色体多型のハプログループを表す一塩基多型を主体としたローカスも、同様な条件下で利用できる。

(2)-3 X 染色体上のローカス

X 染色体 STR 多型は男性と女性で遺伝子型が異なり、それぞれの特徴を生かした応用が可能である。現在までに多数のローカスの集団調査が報告されてきていると共に、一部のローカスには市販の X-STR 検査キットも適用されており、今後の研究の進展を考慮に入れながら、目的に合わせた応用が可能である。

(2)-4 ミトコンドリア DNA 多型

ミトコンドリア DNA 多型は HV1、HV2 領域のデータが中心であるが、全塩基配列情報も

増加してきており、日本人におけるそれぞれの現状の調査データの範囲内で利用可能である。ミトコンドリア DNA は 1 細胞当たりのコピー数が多く、核 DNA に比べて微量な資料や高度に変性した資料等からの検出成功率が高い。得られた型判定結果は、塩基配列の違いにハプログループを表す一定の特徴があることに注意しながらデータベースと比較し、検査データを確認する必要がある。

(2)-5 検査ローカスの選択について

その他のローカスの検査を必要とする場合は、そのローカスの構造が明らかにされ、日本人における出現頻度が調査され、公表されているものについて、その研究の進展度合いに応じた利用が可能である。

現在、法医学領域で DNA 鑑定に用いられている検査ローカスは、たんぱく質に翻訳されないいわゆる非コード領域にあるものが多く、遺伝性疾患との関連はほとんど認められていないものである。コード領域にあるローカスの検査は、その有用性と必要性がある場合には施行する。ただし、遺伝病や感染症に関連したローカスなど、その情報が社会的に個人の差別につながる可能性のある DNA 検査は、通常 of 鑑定には用いない。

3) 検査手技

検査手技については、検査ローカスの検出に適した条件を使用する必要がある。キットを用いる場合はプロトコールに準じるが、検出に影響を与え得る変更点は記載する。

キットなどによらず、鑑定人が必要性から独自で選択したローカスの検出については、同じ方法が追試可能な検査手順を記載する。また、用いる試薬や検出方法は十分に検討されたものであり、陽性対照や陰性対照を検査して試薬の品質を確認したものを使用する。

4) 検査者の知識および技術の確認

DNA 鑑定を実施する機関および鑑定人は、その検査に関する十分な知識を持ち、しかも検査法に熟達していなければならない。そして、法廷の求めがあれば検査内容についての根拠を提示、説明しなければならない。

5) 型判定の基準

法医資料から得られる DNA は、汚染ないし低分子化している場合も多いので、検査ではローカスごとに再現性のある結果が得られている必要がある。

現在、DNA 鑑定における検査ローカスは、主としてマイクロサテライト (STR) と塩基の違いによる多型に分けられる。

常染色体のマイクロサテライト (STR) 多型検査は、Multiplex PCR 産物をキャピラリー電気泳動装置を用いて電気泳動し、泳動像の解析結果から型判定される場合が一般的である。その際には、一定量のコントロール DNA を用いた一定回数の PCR で、ローカスごとに再現性のある安定した高さのピークが得られる PCR 条件を基準とする。その結果、確立された PCR 条件で、各ローカスのアレルのピークが十分な高さを持ち、ヘテロ個体のピークが均等に近い場合、PCR 条件に適した高分子 DNA が含まれていて正しい結果が得られたも

のと推定できる。法医資料はコントロール DNA と比較し変性の影響が表れ得るため、ピーク高およびスタターピークとの区別を考慮に入れ、再現性を含めて判定する。

塩基の違いによる多型の検出は、様々な方法が考案され実施されているため、それぞれの検出法に応じた型判定の基準がある。これらの方法については、型判定に際し、汚染、低分子化、PCR 阻害物質の影響などを考慮の上で法医資料に応用した実績があることが重要である。

6) 微量な資料、高度に変性した資料、PCR 阻害物質などへの配慮

資料の量が少なく繰り返し PCR を行うために十分な DNA が回収されていない場合、高度に変性して低分子化した DNA しか得られない場合、PCR 混合液に PCR 阻害物質の量が多い場合などに行った PCR 反応では、不安定な PCR 増幅を引き起こすことがある。

キャピラリー電気泳動によるマイクロサテライト (STR) 検査において、不安定な PCR 増幅とは、バランスの良いアリルピークを持った再現性のある結果が得られない場合の泳動像のことを示す。つまり、一部のローカスのアリルピークの高さが極度に不均衡になる、アリルドロップアウトが生じる、ローカスが増幅されない、スタターピークが高くなる、過剰なアリルが増幅されることなどが生じたり、これらの再現性が得られないことが起こり得る。特に資料の変性により、DNA の低分子化の程度が進むにつれ、僅かな汚染の影響も大きくなり得るため、過剰なアリルが増幅された場合は、ヒトの汚染による影響が加わった可能性も考える必要がでてくる。これらの現象は、すべてのケースに共通の統一された型判定基準は作りえないため、個々のケースで、再現性、アリルピークの高さ、スタターピークとの区別、テンプレートの状態などの情報を踏まえ、その型判定結果を考察する必要がある。

塩基の違いによる多型は、検出法により検査結果の表れ方は異なるが、微量な資料、高度に変性した資料、PCR 阻害物質の量が多い場合などは、2つのアリルが均等に PCR 増幅されない現象も起こり得ることも考慮のうえ、PCR 増幅結果の意味を考察する必要がある。

7) 混合資料への配慮

法医鑑定資料の採取に当たっては、資料採取時のみでなく採取後にも関係者による汚染を防ぐ必要があるが、検査の結果、関係者による汚染の可能性がある場合にはその対象者と区別するための対策が必要となる。さらに、状況によっては資料採取前から複数のヒト由来の細胞が混在した混合資料である可能性も考慮しなければならないこともある。

Multiplex PCR 法によるマイクロサテライト (STR) 多型の検出時に、非特異的な微弱ピークやスタターピークを除いても 1 ローカスに 3 本以上のピークが検出されるなど、混合資料であることが疑われた場合、検査結果のみから混合前の各資料の型を特定することは困難である。例えば、検査結果から被疑者の DNA に由来するピークが含まれる予想が説明できたとしても、それは数多くの組み合わせの中の一解釈であることを考察する必要がある。混合資料と考えられる場合の泳動像の解釈は、現状ではすべてのケースに共通する統一された基準は存在しないため、ケースごとに適切な表現をするよう努めなければならない。

8) 血縁者との比較による身元確認について

身元不明者の身元を確認する目的でDNA鑑定を行う際に、該当者と考えられる人物のDNAが回収できる資料が入手できない場合には、その血縁者との血縁関係を調べる必要が出てくる。その際は、次項の「血縁鑑定について」の指針に沿って、適切に資料の提供を受け、検査し、その結果を評価する。

9) 鑑定書の記載について

鑑定書の作成を求められる場合、鑑定の日時、場所、資料の性状、検査方法・経過、検査結果、考察、結論等を非専門家である関係者にも理解できるように、簡潔平明に記載するよう努力する。必要に応じて表現および記載項目を限定することも可能であるが、詳細な説明や検査記録の提供を求められれば適切に対処する。

4. 血縁鑑定について

本指針において血縁鑑定とは、複数の人物由来のDNAの検査結果を比較し、生物学的に期待される血縁関係を示すか否かを検討する方法をよぶ。常染色体多型であればメンデル遺伝の法則に合致するか否か、Y染色体多型、X染色体多型、ミトコンドリアDNA多型であればそれぞれの遺伝様式に合致するか否かを検討しその確率から血縁の有無を判定する。

血縁鑑定の場合、生体から直接採取した資料であれば高分子のDNAが得られると考えられるところから、法医資料の鑑定で示したようなPCR増幅の成否に関する問題点は基本的に考える必要はない。ただし、身元不明者の個人識別や死亡した人間との血縁鑑定など、遺体から得た資料を検査する場合、DNAの状態によっては、法医資料のPCR増幅における問題点に準じた注意が必要となる。

1) 資料収集

生体から資料を採取する場合は、検査の内容や目的について資料提供者に十分な説明を行い、文書でインフォームド・コンセントを得るなどの、適切な手続きをとる。15歳以下の未成年者に関しては、親権者等の同意を文書で得てから実施する。刑事事件で強制的に検査する必要がある場合は、裁判所が発付した身体検査令状や鑑定処分許可状を提示して行う。

生体からの鑑定資料採取は、血液資料のみでなく、口腔粘膜擦過資料等の生体にとって低侵襲性の収集方法でも、適切な取り扱いがなされていれば、多くの場合、前記「(2)検査ローカス」の項で示した一般的な多型検査が可能である。資料採取の際には、資料が提供者のものであることを証明できる状況を残す。

対象者が死亡していたり、行方がわからない場合、対象者に由来する在宅資料、組織標本など、保存されていた体の一部の細胞や組織も利用可能であるが、これらは変性によりDNAの低分子化が生じているため、法医資料の検査に準じたPCR増幅における注意が必要であることを考慮に入れる。

資料の取り扱いは、前項の法医資料の鑑定に準じて慎重に実施する。

2) 検査ローカス、検査法について

検査に用いるローカス、検査手技などは前項の法医資料の鑑定に準じ、常染色体上のローカス、性染色体上のローカス、ミトコンドリア DNA のいずれの多型も血縁関係の証明に利用できる。一般的な親子鑑定に代表される血縁鑑定および法医資料を対象とした血縁鑑定のいずれにおいても、現状ではミトコンドリア DNA 多型検査を除きマイクロサテライト (STR) 多型が利用されることが多いが、塩基の違いによる多型も必要に応じて利用が可能である。

常染色体上の多型は男女の区別無く親から子に遺伝するため、一般的には、多数の常染色体 STR 多型検査を基本に血縁関係を検討する。その中で、男性を介した系統の血縁関係の確認には Y 染色体 STR ハプロタイプが利用可能で、女性を介した系統の血縁関係の確認にはミトコンドリア DNA 多型が利用できる。多数のローカスの X 染色体 STR 多型は父から女兒には X 染色体の一部を除く、ほぼ全体がハプロタイプとして伝わり、母から子には相同染色体間の組み換えを考慮したハプロタイプが伝わる可能性があり、それぞれに合致するケースに応用できる。

これらの多型の検査法は、法医資料の鑑定の検査手技の項の記載に準じる。

3) 血縁関係の判断について

常染色体多型を用いた血縁関係の判定は、多数のローカスのそれぞれの検査結果がメンデル遺伝の法則に合致しているか否かを検討し、血縁関係の有無を評価する。

親子間で血縁関係に矛盾のある場合、真の親子間でありながらローカスの突然変異が生じた可能性もあるため、一般的に 1 ローカスでのアリル不一致 (孤立否定) で血縁関係は否定されない。このような場合には、突然変異率を考慮したり、検査ローカスを増やしたり、性染色体・ミトコンドリア DNA 多型の検査を併用するなどの対応を考慮する。これらの検討の結果、矛盾があれば血縁関係は否定される。現状で多用されている STR 多型の場合、ローカスごとの妥当な突然変異の出現率が示された際には、それらを加えて検討されていくことが望ましい。

親子間で血縁関係に矛盾がない場合は、排除率や尤度比・肯定確率を計算し、その結果から血縁の存在の確実性を評価する。評価の方法には Hummel の解釈が広く知られているが、これは DNA 多型を想定していない時期に提唱された父権肯定確率の評価法であり、現状で行われている多数のローカスを用いた STR 検査では、Hummel の最高度の確率よりはるかに高い値が得られるため、今後適切な判断基準が示されていくことが望ましい。肯定確率や尤度比による評価で、理論上、血縁関係を 100% 肯定することは不可能なので鑑定結果の表現には配慮する。

同胞や半同胞、隔世代の血縁鑑定の場合、常染色体多型の検査で十分に高い尤度比・肯定確率が得られた場合、適切な表現で評価する。十分に高い値が得られなかった場合、性染色体の多型やミトコンドリア DNA 多型検査を併用し、その結果から考察する。

血縁鑑定で性染色体上のローカスおよびミトコンドリア DNA を検査した場合、現状のデータベースの出現頻度を示す必要があるが、その判断は常染色体多型検査による尤度比・

肯定確率と区別して評価する。

5. 生物種の鑑定について

本指針において生物種の鑑定とは、ヒト DNA 鑑定においてヒト以外の生物との区別や生物種を知ることが必要と想定した場合を意味する。ヒト以外の動植物等の識別を主目的にした DNA 鑑定については、目的に適した指針が作成されることが望ましいが、いずれの場合も現状で種が判明した場合、可能であれば標準和名に学名を併記するなど、種の同定などに際し関連学会や研究機関に照会し、研究の進展に即した表現にすることが望ましい。

*本指針内の使用法における用語の説明

クロスコンタミネーション：DNA 抽出時の外来の DNA による汚染。

ローカス：Locus。染色体上の特定の座。

Multiplex PCR 法：多数ローカスの同時 PCR 増幅法。

STR：Short Tandem Repeat。マイクロサテライトと同義。法医学では主として 3-5 塩基の直列反復配列のこと。

CODIS の 13 ローカス：Combined DNA Index System。CODIS とはアメリカ連邦捜査局 (FBI) ににより管理されている、DNA プロファイルとして検索可能な DNA データベースシステム。コアになる 13 の常染色体上の STR ローカスが提唱され、世界的に広く応用されている。

ミニサテライト：十数塩基～数十塩基の直列反復配列のこと。MCT118 (D1S80) は代表例。

アリル：Allele。対立遺伝子。

ハプロタイプ：Haplotype。1 本の染色体上の複数のローカスの型を組み合わせで表した型。

ハプログループ；Haplogroup。共通する多型を持つものをグループ化したもの。Y 染色体多型の場合は共通する一塩基多型を主体とした特定のマーカーを持つことでグループ化されており、ミトコンドリア DNA 多型は共通する塩基置換の組み合わせでハプログループが推定できる。

HV1、HV2：Hypervariable region 1、Hypervariable region 2。ミトコンドリア DNA の配列のうち遺伝子をコードせず、個人的変異が大きい領域につけられた名称。16569 塩基からなるミトコンドリア DNA のうち、HV1 は 16025 番目から 16400 番目付近を含む領域を呼び、HV2 は概ね 73 番目から 315 番目の間を含む領域を呼ぶことが多い。

核 DNA：細胞核の中にある染色体の DNA。

スタターピーク：Stutter peak。STR の本来のアリルピークの通常 1 リピート前に現れる小さなピークで、本来のアリルの副産物。