

## ひき逃げ車両のDNA鑑定

島田 亮\*  
多木 崇\*\* 町田光世\*\*\*

ひき逃げとは交通事故後に被害者の救済措置を取らない逃亡行為である。ひき逃げ車両には血液等の被害者由来の付着物が残されている場合があり、車両発見時に被害者と付着物からDNAを調べ、同一人物由来かDNA鑑定を行うことができる。本稿ではまず、DNA鑑定で広く利用されているSTR (Short Tandem Repeat) と呼ばれるDNA配列の特徴とDNA鑑定の流れを紹介する。続いてSTRの弱点を補い、実用化へ向け研究の盛んなSNP (Single Nucleotide Polymorphism) を利用した手法、さらに被害者絞り込みに利用可能なABO式血液型をDNAより調べる方法についても概説する。

### DNA Analysis of Tissue Taken from Suspected Vehicle Following Hit and Run Accident

Ryo SHIMADA\*  
Takashi TAKI\*\* Mitsuyo MACHIDA\*\*\*

Hit and run is an escape act not rather than offering assistance to the victim after a traffic accident. Trace material from a victim such as blood may be left on a hit-and-run vehicle. If so, it is possible to analyze DNA from both the victim and trace material on the vehicle to determine whether the DNA of the trace material originated from the victim. In this article, we first introduce a characteristic of the DNA sequence called short tandem repeat (STR) widely used for DNA analysis, and demonstrate how to perform the STR assay for an individual identification in the forensic field. Subsequently, we review the DNA analysis by detecting single nucleotide polymorphism (SNP), which is extensively studied in order to make up for a weak point of the STR method. Finally, we illustrate the method for determination of the ABO blood group gene, which could be used to narrow the possible victim identification.

#### 1. はじめに

ひき逃げとは交通事故を起こしても、被害者の救済措置を取らないまま逃げる行為を指す。道路交通法第72条には交通事故を起こした際に①ただちに車両の運転を中止する②負傷者を救護する③道路における危険を防止するなどの処置を講ずる義務がある

ことが記されている。さらに運転者は警察に連絡し、報告をする義務もある。

ひき逃げ事件の現状は『平成25年版 犯罪白書』に記載されているように、昭和63年から平成24年までのひき逃げ事件は、平成10年まで年間7,000件前後で推移し、平成11年の8,781件を境に増加し、平成16年の20,007件をピークにその後減少している。

\* 東京女子医科大学医学部法医学講座講師  
Lecturer, Department of Legal Medicine, School of Medicine, Tokyo Women's Medical University  
\*\* 東京女子医科大学医学部法医学講座准講師  
Associate Lecturer, Department of Legal Medicine, School of Medicine, Tokyo Women's Medical University

\*\*\* 東京女子医科大学医学部法医学講座特任助教  
Fixed Term Assistant Professor, Department of Legal Medicine, School of Medicine, Tokyo Women's Medical University  
原稿受付日 2015年1月26日  
掲載決定日 2015年3月2日

平成24年のひき逃げ事件は10,198件であり、まだ平成11年以前より多い状況である。一方、ひき逃げ事件のうち、重傷事故は年間1,000件前後、死亡事故は年間200件前後発生している。また、死亡事故の検挙率は90%前後となっている<sup>1)</sup>。

ひき逃げの動機・要因は例として平成25年度香川県の統計データ<sup>2)</sup>からみると、被害に対する軽い認識が最も多く、飲酒運転、処分・罰則への恐怖、事故への恐怖、無免許運転へと続く。その他、覚せい剤や危険ドラッグの使用も要因となっている。

ひき逃げの死亡事故では次のような事例があった。国道を徒歩で横断していた40歳代の男性に対し、交差進行してきた原付バイクが接触した<sup>3)</sup>。路上に倒れた男性はバイクに続いて走行してきた車3台に次々とはねられ現場で死亡が確認された。バイクと2台目の車は逃走しなかったが、男性をはねた車のうち1台目と3台目が現場から逃走した。その後、1台目と3台目の運転手は逮捕された。この事例は以下のように分析できる。

歩行中に車にはねられたときの損傷ができる過程には三段階あり、それぞれ一次損傷、二次損傷、三次損傷といわれる。一次損傷は平均して地面から70cmのところではねられ衝突することで大腿部の上部が出血し、筋肉が挫滅してできる損傷である。二次損傷は、フェンダーやボンネットの先端に衝突し、フロントガラスに頭部を衝突することで生じる脳挫傷である。三次損傷は、車体に衝突したのち地面に転倒した際の擦過傷となる。またこの三段階の損傷の他にも、三次損傷の後にひかれることで腹部臓器破裂を生じることもある。全体的には骨盤骨折、脊椎、腓骨の骨折が多く見られる<sup>4)</sup>。

歩行者の傷の種類は三つある。一つ目は衝突創で、体がバンパーやボンネットなど車体の一部に触れてできる傷である。特徴は車高と人の傷の部分の高さがほぼ一致し、形状と傷の形が合うことが挙げられる。車の車種や進行方向、スピード、ブレーキ状況を推定することが可能である。二つ目は転倒創で、一度車体に当たり、その拍子に道路やボンネットなどに衝突した二次的な傷である。三つ目は轢創(れきそう)となり、転倒した人が車体にひかれてできる傷である。人体にタイヤ痕跡が残るのが特徴で、どの方向からひかれたかも識別可能である<sup>4)</sup>。

事例では、3台目の車両は防犯カメラの映像の分析から特定され、運転者は書類送検された。1台目の車両も同様に防犯カメラ映像で絞り込みを続け、

車両の底部についていた血痕のDNA鑑定の結果から容疑者の逮捕へとつながった<sup>3)</sup>。

法医学において、DNA鑑定は、DNA配列で個人差があることが報告されている部位、言い換えるとDNA多型を有する部位を調べることによって行われる。現在はDNA多型の一つであるSTR (Short Tandem Repeat) 多型を用いた鑑定が行われている。たとえば、加害車両に付着した血液・血痕、毛髪、体液、皮膚片、筋肉片などから得たDNAからSTR多型を検査し、被害者から得たDNAのSTR多型と比較することで、付着物のDNAが被害者のDNAかどうか特定することができる。STR多型を検出するためにはSTRを含む数百塩基長のDNAが必要であるが、実際の犯罪現場等では、時間経過による腐敗などに伴って、短く断片化したDNAしか残されていない場合がある。そのような断片化DNAに対しては、SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 多型を利用したDNA鑑定の研究が盛んに行われている。また、ABO式血液型もDNAから調べることができ、犯罪捜査の際に補完的に利用することが可能である。以下ではSTR、SNP、ABO式血液型を利用したDNA鑑定について、その特徴、検査法などについて概説する。

## 2. STR多型によるDNA鑑定

### 2-1 STRの概要

ヒトのゲノムDNAは約30億の塩基の配列で構成されている。DNAの30億塩基のうち一部がRNAに転写されて、さらに転写されたRNAの一部は、イントロンと呼ばれる配列が除去されてmRNAとなる(mRNAに伝えられる配列をエクソンと呼ぶ)。最終的にmRNAの配列情報からタンパク質が合成され、タンパク質がヒトの細胞の生存に必要な機能を発揮している。ヒトのゲノムDNAの情報のうち、タンパク質の情報をコードしているエクソン配列は1.5%にすぎず、イントロン配列および遺伝子間の配列が約98.5%を占める<sup>5)</sup>。STR多型は染色体全領域にわたって分布するが、個人識別のためにDNA鑑定に用いられるSTR多型は、なるべく疾患や身体の特徴の情報を含まない領域が利用されている<sup>6)</sup>。

STRはShort Tandem Repeatの頭文字を取った略で、直訳すると、短鎖縦列反復配列となる。ゲノムDNA中には多くの反復配列が存在することが分かっているが、繰り返し単位配列の長さによって三つに分類され、数千塩基の繰り返しのサテライト

DNA、数十塩基の繰り返しのミニサテライトDNA、数塩基の繰り返しのマイクロサテライトDNAがある。この中のマイクロサテライトDNAがSTRである。STRの繰り返し単位配列の長さは2～5塩基のものが多く、繰り返し単位配列が2回から数十回並んでいる、繰り返し回数が個人によって異なることを利用し、個人識別に利用されている<sup>6)</sup>。例えば、D16S539と呼ばれるSTRを含むDNA配列はヒトの16番目の染色体の長腕に存在し、gataという繰り返し単位配列を持つ。繰り返し回数が個人によって異なるが、多くの人でその回数は5～15回の間となっている。

現在はSTRの繰り返し回数を調べる市販キットが複数販売されており、十数カ所のSTRを調べるものが主流になっている。STR一カ所を調べると、1/10～1/200程の確率で、同じ繰り返し回数のヒトが存在するが、複数箇所を調べることにより同一パターンが出現する確率を下げるができる<sup>6)</sup>。現在、世界で最も広く使われている検査キットの一つであるLife Technologies社製のキット（AmpFISTR Identifier PCR Amplification Kit<sup>7)</sup>を用いると、一回の実験で、15箇所STRと性別を同時に検出することができるが、同一パターンが出現する確率は $10^{-18}$ 以下となるので、同一人物ではないとパターンが一致する可能性は非常に低くなる<sup>6)</sup>。我々もそのキットを使ってDNA鑑定を行っている。

## 2-2 STR多型を検出する方法

DNA鑑定で利用できる試料として、毛髪、血痕、体液、組織片、唾液、血液、骨、歯、爪などがあげられる。STR多型を検出するためには、まず採取した試料からDNAを抽出することから始める。多数のメーカーから各種DNA抽出キットが市販されており、通常それらのキットを用いてDNAを抽出する<sup>8)</sup>。

抽出されたDNAは微量なことが多いが、DNA中のSTRの部分のみをPCR (Polymerase Chain Reaction) という方法で増幅する。PCR法は、1986年Kary Mullisらによって発明された方法で、DNAを増幅する際

に現在広く用いられている手法である<sup>8)</sup>。例えば前述D16S539のgataの繰り返し回数を調べる場合は、前後の配列に相補的な20塩基前後のプライマーと呼ばれる合成DNAを用意し、プライマーを挟んだ領域を増幅させる。この場合、もし繰り返し回数が15回の場合、332塩基長のDNAが得られ、繰り返し回数が12回の場合、320塩基長のPCR産物が得られる。

得られたPCR産物は電気泳動によって長さによる分離を行う。DNAは水溶液中で負電荷を帯びており、電流を流すと陽極に向かって移動するが、高分子ゲルの網目の中で電気泳動させると、抵抗の少ない短いDNAほど速く移動する<sup>9)</sup>。実際にはシーケンサーと呼ばれる、サイズ分解能の高い装置を用いて電気泳動を行うことが多い。結果はFig.1のような波形データとして得られ、短いDNAは左側に、長いDNAは右側にピークとして表示される。Fig.1の中央右寄りにはSTRの一つD5S818において、報告のあった繰り返し回数7～16回に対応する長さの合成DNAを電気泳動したものに、被害者DNAからD5S818をPCRで増幅したものを電気泳動した結果を重ねて示した。灰色のピークは合成DNAに由来するものであるが、繰り返し回数が11に相当する長さのピークに黒色の被害者のピークが重なっている。D5S818では被害者の繰り返し回数は11回であるということが分かる。またピークが1本しかないことより両親から同じ繰り返し回数のSTR配列が遺伝されたことも分かる。D5S818の右隣のSTR、FGAでは被害者DNA由来のピークが2本あり、両親から異なる繰り返し回数のSTR配列が遺伝されたことが分かる<sup>7)</sup>。

15箇所のSTRを調べる上記キットを用いて、車両から得られたDNAと被害者DNAのSTRの繰り返し回数が分かると、両者が同一人物DNA由来のものなのかを確率で示すことが可能になり、その際、排除率がしばしば用いられる。排除率 (Probability of exclusion: PE) とは他人であれば否定される可能性

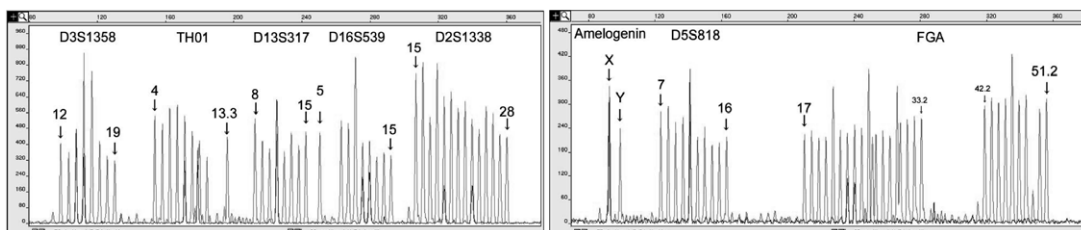


Fig. 1 STR解析結果の一例

を示す値で、1-PEにより他人であるのに否定されない、つまり、個人識別で他人であるのに型が偶然一致する確率が計算できる。PE= 1-[試料の型の遺伝子頻度]であるから、総合排除率 (APE) は連鎖のない複数の座位の検査結果から以下の式で算出できる<sup>10)</sup>。

$$APE = 1 - \prod_{k=1}^n P_k$$

(ただしPkは試料のk番目の座位の遺伝子型の頻度、nは検査した座位数)

遺伝子型頻度は大学や研究機関で調査され、権威のある国際雑誌で発表されたデータを用いる。遺伝子型頻度とは、ある集団における各々の対立遺伝子(対になった形質を支配する遺伝子。相同染色体上の同じ遺伝子座に位置する)の相対的頻度である。集団で交配が無作為に行われ、突然変異、自然淘汰、機会的浮動などが働かなければ遺伝子頻度は一定であるとしている<sup>11)</sup>。例えば、200個体の集団でAとBの二つの対立遺伝子が存在しAA、AB、BBの遺伝子型をもった個体がそれぞれ120、60、20個体存在した(つまりそれぞれの遺伝子型頻度が0.60、0.30、0.10)とすると、Aの遺伝子頻度は(2×120+60)/400=0.75、Bの遺伝子頻度は(60+2×20)/400=0.25である<sup>11)</sup>。

15種DNA領域のSTR多型と性別を検出するキットを用いて、検出された遺伝子型の頻度を式に入れ、排除率(APE)は $10^{-18}$ 以下の結果を得られた場合は被疑車両に付着したサンプルと被害者は同一人由来の検体であることを否定できないという判定となる<sup>6)</sup>。

被害者のサンプルのSTR多型と被疑車両に付着したサンプルの多型が一致すればひき逃げ車両の特定につながる。

### 3. SNP多型によるDNA鑑定

#### 3-1 SNP多型解析の必要性

法医学分野で扱われるサンプルは、一般に微量である上に、高温多湿や紫外線、微生物による分解等によって物理的あるいは化学的にDNAの断片化を生じてSTR解析が困難となり、実際の事件で採取された血液、毛髪、組織片の大部分はDNA型の判定が不可能とされている<sup>12)</sup>。

断片化DNAを解析する方法にはSTRの他にもMini-

STRやミトコンドリアDNA、SNP解析等が報告されている<sup>13)</sup>。SNPは、集団において1%以上の頻度で出現する単一DNA塩基の相互置換と定義される。例えば、SNP部位がアデニン(A)とグアニン(G)である場合、シーケンス解析によって判定されるSNP型はAホモ型(A/A)、AGヘテロ型(A/G)、Gホモ型(G/G)の3種類である(Fig.2)。1カ所のSNPとSTRを比較すると、SNPは多様性が低く、個人識別という点では不利である。しかしSNPは約1,000塩基に1個の割合で存在し、出現頻度はSTR多型と比較して数百倍と予想されるため<sup>14)</sup>、多くのSNP部位を解析することでSTRと同様、個人識別に役立つのではないかと考えられている。また、STRは繰り返し数が多い場合、数百塩基のDNAを調べる必要があるが、SNPはわずかに塩基の違いを調べるため、数十塩基の短いDNA断片でも解析可能で、分解の進んだ法医学サンプルを解析できる可能性が高まる。さらにSNPはアレイ技術による自動化に適していることから、STRと並ぶ多型解析の一つとして利用が期待されており、多くの研究がなされている。

#### 3-2 SNP多型解析までのプロセス

法医学におけるSNP多型解析には以下のような手順が必要となる。

1. データベースによる多型性の検索、決定
2. 多型性の検出法の開発
3. 集団内の多型性出現頻度の確認

SNP解析を行う際は、まずデータベース上でSNPの選択を行う必要がある。データベースには国際HapMap計画(▶<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>)、NCBI Variation Database (dbSNP、▶<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>)、1000 Genome Database (▶<http://www.1000genomes.org>)等、そして日本

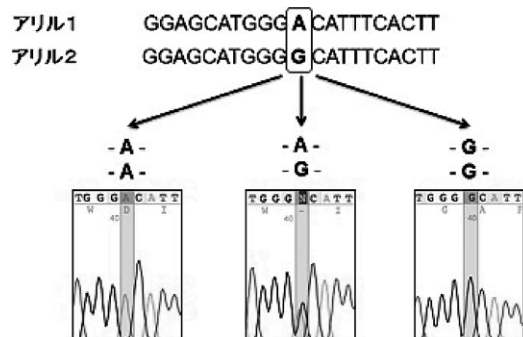


Fig. 2 シークエンス法によるSNP型判定

人特有のSNP多型に関してはJapanese SNP Database (JSNP、▶<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp>)がある。一般的なSNPの選択基準は、任意交配した個体集団であること、ヘテロ接合率やマイナーアレル頻度(MAF)が高いこと、SNP同士が連鎖していないことである(▶<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>)。法医学分野での個人識別は、身体的特徴や各個人の疾患や先天性異常等の疾患に関与するSNPやコピー数多型(Copy number variation)領域に存在するSNPを排除した部位での個体差に着目する必要があるため、上述した選択基準を満たし、なおかつ疾患に関与しないSNP部位を探索することが重要になる。これまでに数多くの検出法が報告されてきたが、方法によってはコストや解析処理時間等のスループットに大きく影響してしまうので目的に合った方法を見つける必要がある。最終的に、実際に用いるサンプルの多型性の有無を確認し、選択したSNPが個人識別に利用できるか否かを判断する。

### 3-3 SNP解析技術と現状

SNPの検出、同定法は多岐にわたり存在するが、一般的な方法としてはDNAシークエンスによる塩基配列決定である。しかしコストや時間がかかり、大量のサンプル処理が困難である。SNP解析では、STR解析のような汎用性の高いキットや信頼性の高い方法が確立していない<sup>15)</sup>。従って、精度、コスト、解析処理速度、操作性や自動化等の多くの問題を克服しなければならず、高速、高精度の開発法が望まれる。現在SNP解析のプラットフォームには、塩基配列解析の他に、SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) 法、SNP array法、TaqMan法、SNaPshot法、Invader assay法、質量分析法、次世代シークエンサーによる網羅的解析等がある。SNP解析において塩基配列解析やSSCPはSNPの同定収集には向いているが、大規模解析にはスループットの面から課題が残る。また、SNP arrayや次世代シークエンサー解析はスループットが良いが、コストがかかり更なる改良が必要である。以下に主要なSNP解析法として研究されている方法について簡単に説明する。

#### 1) SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism; 一本鎖高次構造多型) 法

熱変性させた一本鎖DNAは、常温に戻すと分子内水素結合により特異的な高次構造を形成する。DNA断片内にSNPが存在すると一本鎖DNAの高次構造が変化し、電気泳動の際は異なる移動度を示す。

PCR-SSCP法では、PCR産物を一本鎖とした後、非変性ポリアクリルアミドやキャピラリー電気泳動を行いDNAのバンドやピークの移動度の違いを対照サンプルと比較することで変異の有無を判定する<sup>8)</sup>。利点としては未知の変異部位についても容易にスクリーニングできることである。

#### 2) SNP array法

SNP array法は、DNA microarrayの一種であり、DNA microarrayとは数万から数十万に区切られたプラスチックやガラス、シリコン等の基盤上に10~25塩基のオリゴヌクレオチドやcDNAを高密度に配置して固定化したもので組織や細胞の遺伝子発現のモニタリング、遺伝子変異の検出、DNA多型分析に用いられる<sup>16)</sup>。SNP array法は、目的のSNP配列に対応した配列を持つプローブを設計し、非特異的な反応を抑制するためにプライマーを上流、下流に数塩基ずらしたプローブを用いて正確なSNP型を判定する。二本鎖DNAを制限酵素で処理後、アダプターを末端に付加してPCRを行い、PCR産物を断片化して末端を標識してアレイ基盤上に固定化されたSNP部位を含むプローブにハイブリダイズさせることによって目的の遺伝子情報を網羅的に検出できる<sup>15)</sup>。最近では、東芝と東北大学が共同で日本人に特徴的なSNPだけを集めたSNP arrayを開発し、日本人特有の疾患関連や薬物代謝関連のSNPが発見されるのではないかと期待されている<sup>17)</sup>。

#### 3) TaqMan法

PCR反応をリアルタイムで多検体同時に検出するシステムであり、目的のSNP領域を増幅するプライマーと、5'末端側にレポーターを、3'末端側に消光基で標識したSNPに特異的に結合するプローブ(TaqManプローブ)を作成する。TaqManプローブと、PCRプライマーを用いてPCRを行うと、SNP塩基が一致するプローブだけがゲノムDNAに結合する。5'側から加水分解された後、5'末端のレポーター色素が3'末端の消光基色素から離れ、蛍光強度が増加する。TaqManプローブが完全に結合しない場合は加水分解されないため、蛍光強度は増加しない<sup>18)</sup>。実際の検出には、例えばアデニン(A)のSNPに対応するTaqManプローブには緑、シトシン(C)のSNPに対応するTaqManプローブには赤の蛍光を発する2種類の異なる波長のTaqManプローブを用いるとSNPの検出が可能であり、緑のみの検出であればA/A、赤のみであればC/C、緑と赤の両方が検出されればA/CとSNP型が判定される。本法は

簡便であるが、コスト面での改良を期待したい。

#### 4) アリル特異的プライマー伸長法

3'末端（あるいはその付近）の位置にSNP部位を有し、SNP部位の直後に人為的ミスマッチを有する、各SNP型に特異的なプライマーを用いた特異的伸長反応である。正しいSNPを含むプライマーの場合はDNAポリメラーゼによる伸長反応が行われるが、ミスマッチの場合は伸長反応が起こらないため、正しいSNP型が判定される<sup>18)</sup>。本法の原理を応用したSNaPshot法も多数の研究報告がある<sup>18)</sup>。

#### 5) Invader assay法

二つのアリル特異的なレポータープローブ、InvasiveプローブとCleavaseと呼ばれるFlapエンドヌクレアーゼによる切断反応を利用する方法である。レポータープローブは、鋳型DNAに対しSNP部位から3'末端側に相補的な配列を持ち、さらにプローブの5'側にフラップと呼ばれる配列が存在する。Invasiveプローブは、鋳型DNA上のSNP部位に対し5'側に相補的な配列を持ち、二つのプローブを鋳型DNAと混ぜて二本鎖形成反応を行うと、レポータープローブと鋳型で形成される二本鎖のSNP部位にInvasiveプローブが一塩基侵入することになる。Cleavaseは、形成された三重構造を認識してレポータープローブの二本鎖を形成していないフラップ配列部分を切断し、フラップが結合すると、蛍光基を標識した一本鎖部分が切断され、FRETが解除されて蛍光が増大する。増大する蛍光波長から、どちらのアリルであるかが判定できる<sup>18)</sup>。本法は、一定温度で行うことが可能で、PCRが不要であることからコストが抑えられる一方で、サンプルDNAが大量に必要となる課題も残されている。近年ではマルチプレックスPCR（一つのPCR反応系に複数のプライマーセットを同時に使用すること）とInvader assay法を組み合わせ、より大量に高速化した大規模解析も開始されている<sup>19)</sup>。

#### 6) Pyrosequencing法

マイクロプレート上でシーケンスを行い、DNAポリメラーゼ反応中に生じるpyrophosphate (PPi)をsulfurylaseによりATPに変換した後ルシフェラーゼにより発色させて検出する方法である。dNTPを添加することで、鋳型DNAに相補的な塩基が取り込まれた場合は副産物としてPPiが生じる。PPiはATP sulfurylaseによりATPに変化し、最終的にはLuciferaseにより分解される。過剰なヌクレオチドはApyraseにより分解されるが、取り込まれないヌ

クレオチドは発光しないので、発光シグナルパターンから塩基配列を読み取ることができる。解析する鋳型DNAに同じ塩基が2個存在すれば発光シグナルは2倍になり、ヘテロの場合は発光強度が半分になるのでヘテロの識別も可能である<sup>18)</sup>。

#### 7) Mass array法

シリコンチップ上に固定した目的DNAにSNPを含むプライマーをハイブリダイズして酵素反応で伸長したものを質量分析法で測定・検出する方法であり、特徴として高い特異性と質量数の差に基づく正確なアリルの同定が可能である。DNA鎖をシリコン表面に固定化し、プライマー伸長をシリコン表面上で酵素反応により行い、次に伸長したプライマーをマトリックス支援のもとにレーザー脱離イオン化し、飛行時間型質量分析で測定して遺伝子型を決定する<sup>20)</sup>。

#### 8) 次世代シーケンサー法

次世代シーケンサー（NGS）は主にIllumina社のHiSeq、Miseq、Roche社のGS FLX plus、GS junior、Life Technology社の5500 SOLiD、Ion PGM、Ion Protonが普及している。各種シーケンスは、逐次合成によるシーケンス反応（Sequence By Synthesis；SBS）を基本原理としている。各シーケンサーは異なる検出方法を持ち、Illumina社は異なる蛍光物質が標識されたdNTPを検出し、Roche社はPyrosequencing法に基づいている<sup>21)</sup>。Lifetechnology社もPyrosequencing法に基づくピロリン酸が生産される時に生じる水素イオンをチップ上で検出する<sup>21)</sup>。新規SNPを探索する場合は、全ゲノムを制限酵素消化により様々なサイズに分画しリファレンスと比較して変異のある塩基を調べる。既知のSNPを調べる場合は、プライマーを設計してマルチプレックスPCRにより特定のSNP部位の判定を行う。例えば、NGSはSNPを含む同じ長さで配列が異なるアリルを検出することが可能だが、キャピラリー電気泳動では長さのみに基づいて分離しているためSNPを検出できない欠点がある。NGSでのSNP解析法は開始されたばかりであり今後の動向に期待したい。

### 3-4 SNP多型解析の法医学への応用

以上のように、法医学分野での利用をめざしさまざまなSNP解析技術の研究、開発が進められているが、個人識別や親子判定では依然としてSTR型を利用した方法がグローバルスタンダードとなっている。日本においても科学警察研究所で定められたDNA

鑑定ではSTRによる型判定の使用が義務づけられており、SNP解析の実務への応用はいまだなされていないが、近年STRとSNP解析を組み合わせたDNA鑑定を実務に用いた例が報告された<sup>22)</sup>。犯罪捜査において、従来のSTR法では部分的な型判定しかできなかったが、SNP解析では全てのSNP型で正確な判定が得られた<sup>22)</sup>。現時点ではSTR解析法と異なりSNP解析のプラットフォームの確立は発展途上である。今後、法医学分野でのNGSによるSNPの大規模な網羅的解析が進み、実務サンプルに有効なDNAマーカーを探索してSTRやSNP解析を組み合わせた強力なDNA鑑定技術が法医学実務に応用されることが期待される。

#### 4. ABO式血液型のDNA多型によるDNA鑑定

##### 4-1 ABO式血液型とDNA鑑定

ABO式血液型は輸血の際に重要な血液型として知られているが、ABO式血液型は染色体DNA上のABO遺伝子によって型が決まる。交通事故を含む犯罪現場にDNAを含む組織、体液が残されていた場合、STRやSNPと同様にDNAからABO式血液型を調べることが可能となる。以下、ABO式血液型を支配している遺伝子と赤血球表面においてABO式血液型を決定している糖鎖との関係、ABO式血液型を用いてDNA鑑定を行う方法の特徴、および実際にどのようにしてDNAから血液型を調べることについて概説する。

##### 4-2 ABO式血液型とABO遺伝子

ABO式血液型は、輸血の際に間違った血液を輸血すると引き起こされる輸血事故の主な原因として、Rh式血液型とともに良く知られている。血液中の赤血球表面には人の免疫系が認識し、免疫反応を引き起こす抗原が多数存在することが知られているが、ABO式血液型を決定する抗原もその中の一つである。赤血球表面の膜上にある糖脂質や糖タンパク質における糖鎖部分の構造によって抗原、すなわち血

液型が決定される。

ABO式血液型は数ある血液型の中でも一番始めに見つかった血液型で、1900年にオーストリア・ハンガリーのKarl Landsteinerによって発見された（彼は後の1940年にRh式血液型も発見している）。彼らのグループは血液を血清と血球に分け、ある人の血清が自己、他人の血球を凝集させるか否かによるグループ分けを行い、現在のA、B、O型に相当する分類を行った。翌年には別のグループが同様の実験を行い、AB型を発見している<sup>23)</sup>。

その後、1910年にvon DungernとHirschfeldはA、B型がメンデルの法則に従うことを明らかにし、1924年にはBernsteinが、ABO式血液型が三つの対立遺伝子（A、B、O）の存在を仮定することで、その遺伝様式を説明できることを明らかにした<sup>23)</sup>。

血液型を決定する抗原については1970年頃までに生化学的研究が進められ、抗原は糖鎖であることが分かった。赤血球は脂質二重膜からなる細胞膜で囲まれているが、脂質にN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、グルコース、フコースの5種類の単糖が結合することで糖鎖抗原が形成される。O型の糖鎖が、A、B型の糖鎖の基となる構造を有しており、N-アセチルガラクトサミンが付加されるとA型糖鎖に、ガラクトースが付加されるとB型糖鎖になる。A型糖鎖、B型糖鎖の両方を有する場合はAB型となる<sup>24)</sup> (Fig.3)。

1970年代には糖鎖を合成する糖転移酵素に関する研究が進み、糖鎖の生合成に関しては1980年代までにはほぼ全容が明らかにされた。ABO型の決定に重要なのは、O型糖鎖に最後の糖を付加する酵素で、A型の場合はN-アセチルガラクトサミン転移酵素（A転移酵素）、B型の場合はガラクトース転移酵素（B転移酵素）が働くことによってそれぞれA型糖鎖、B型糖鎖になる<sup>24)</sup>。

ABO式血液型の遺伝子は、1990年に日本人のYamamotoらのグループが糖転移酵素のアミノ酸配列よりcDNAをクローニングするという手法により、A転移酵素、B転移酵素の遺伝子（ABO遺伝子）が明らかにされた。ABO遺伝子はヒトの染色体の第9番目の染色体にあり、A転移酵素遺伝子がコードされている場合とB転移酵素遺伝子がコードされている場合では7カ所の塩基が異なっていて、そのうち4カ所では異なるアミノ酸が合成されることになる (Table 1)。O型の遺伝子がコードされている場合は、基本的にはA転移酵素遺伝子と同じ配列であ

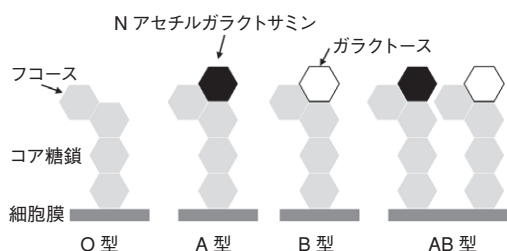


Fig. 3 ABO式血液型と糖鎖

Table 1 血液型で異なる塩基

エクソン	6		7						コードされるタンパク質
	CDS	261	297	526	657	703	796	803	
A型	G	A	C	C	G	C	G	G	アセチルガラクトサミン転移酵素
B型	G	G	G	T	A	A	C	A	ガラクトース転移酵素
O型	△	A	C	C	G	C	G	G	不完全なタンパク質

CDS：タンパク質に翻訳される塩基配列（の番号）

△：塩基が欠失していることを示す

る。しかし、261番目の塩基であるグアニンが欠失することにより、タンパク質合成の際に読まれる塩基配列がずれる（フレームシフト）。結果として短い不完全なタンパク質が合成されるが、このタンパク質は糖を転移する能力が失われている<sup>25, 26</sup>。ABO遺伝子の配列を調べれば、遺伝子からどのタンパク質（あるいは糖転移酵素）が合成されて、どの血液型になるかがわかることになる。

#### 4-3 ABO式血液型を用いたDNA鑑定の特徴

ABO式血液型はABO遺伝子がA転移酵素遺伝子、B転移酵素遺伝子、あるいはO遺伝子のうち、どの遺伝子をコードしているかによって決まる。人の染色体は2本が対になっているため、遺伝子の組み合わせとしては、AA、AO、BB、BO、OO、ABの6種類ということになる。ABO遺伝子にはA、B、Oで異なる8カ所の塩基の他にもさまざまな部位で点変異が見つかり、点変異を有する変異体が数十程報告されている<sup>27</sup>。変異体を含む遺伝子の種類は、日本人（あるいは世界全体の人）の数に比べて圧倒的に少ない。よって同じ遺伝子（の組み合わせ）を持つ人は多数いることが想定され、ABO式血液型の遺伝子のみから個人識別することは困難である。

ABO式血液型を利用した個人識別の弱点を述べたが、STR、SNPを利用した個人識別にはない特徴も持ち合わせている。ABO式血液型は少量の血液で比較的簡便に調べることができるため、Rh式血液型とともに既知であるケースが多い。最近では、出生直後のABO式血液型は抗原量が少なく、誤判定の恐れがあるとして行われていないが、以前は産科で新生児の血液検査がサービスの一環として行われていたため、多くの日本人にとって自身のABO、Rh式血液型は既知となっている。故にABO式血液型は個人識別の最も基礎的な情報として利用することが可能である。例えば、ひき逃げを含む交通事故で、被害者や加害者の可能性がある人由来で、血液以外のサンプルが得られた場合を想定してみる。サンプルからDNAを抽出して、ABO式血液型を調べ

ることによって、血液型が既知の被害者、加害者を絞り込む「スクリーニング」を行うことができる。現在個人識別で利用されているSTR、SNPは身体の特徴とは結びついておらず、DNAを調べて初めて「型」が分かるため、スクリーニングに用いることはできない。

日本以外の国では、ABO式血液型は輸血時に検査するが、他には検査する機会がないことが多く、韓国など一部の国を除いて自己のABO式血液型を知っている人の割合は多くない。例えばアメリカで2005年に行われた大規模社会調査の結果では、アメリカ人4,907人のうち、自己のABO式血液型を知っていると回答したのは3,108人（63%）にとどまっている<sup>28</sup>。諸外国においては、DNAからABO式血液型情報を調べても、個人識別に有力な手がかりとならない可能性がある。

#### 4-4 ABO式血液型のDNA鑑定

ABO遺伝子はA、B型で一塩基多型（SNP）、またO型では挿入欠失変異が観察される。よって検査法としては基本的にSNPの検査法に準じたものが適用できる（挿入欠失変異もSNPと同様の方法で調べることができる）。ABO遺伝子は通常の染色体DNAに含まれているので、ひき逃げ事件でDNAが含まれている細胞が採取できた場合、基本的にはDNA検査をすることが可能となる。ABO遺伝子のSNPを調べる方法であるが、A、B、Oの区別を付けるには最低1カ所のSNPとCDS261の挿入欠失変異を調べる必要がある。ABO遺伝子の塩基配列をシーケンサーで解読する方法の他、より簡便に識別する方法として、SNPの項で紹介したアリル特異的プライマー伸長法が広く用いられている。

最後に、ABO遺伝子を調べてスクリーニングを行う際の留意点がある。シーケンサーやアリル特異的プライマー伸長法を用いてSNPや挿入欠失変異を調べて、血液型の推定を行うことができるが、配列情報からのみでは血液型を100%確定させることはできない。調べた塩基以外の塩基配列に変異が生



じ、わずか塩基が一つ変化したり、抜け落ちてしまうだけで、糖転移酵素の酵素機能が失われたり、酵素が発現しないといった可能性があるためである。

## 5. おわりに

ひき逃げ事件の発生後、被害者、また場合によっては加害者の特定にも利用可能なDNA鑑定の概要を、方法や現在の研究状況を中心に手短かに紹介してきた。

新聞やニュースで、DNAを利用してひき逃げ事件の犯人を特定した等のニュースを目にする機会があるように、DNA鑑定は犯罪の解明の際に、重要な役割を果たすようになってきている。今後は、より微量の、あるいは劣化の著しいサンプルから、更に短時間で個人の識別が可能になり、より多くのひき逃げ事件でDNA鑑定が利用されるように、STRやSNPを含めた解析技術の向上が望まれる。DNA鑑定による犯罪解決件数が増え、現場に残されたわずかな生体サンプルからでも容疑者の逮捕に結びつくこと等が広く認知されるようになれば、対人自動車事故が起こった際に、逃亡行為自体の抑止にもつながる可能性がある。

## 参考文献

- 1) 法務省『平成25年版 犯罪白書』第1編 第3章 第1節 1 (3)、2013年 ▶[http://hakusyo1.moj.go.jp/jp/60/nfm/n\\_60\\_2\\_1\\_3\\_1\\_1.html](http://hakusyo1.moj.go.jp/jp/60/nfm/n_60_2_1_3_1_1.html)
- 2) 香川県警察「ひき逃げ事件の発生状況」2013年 ▶[http://www.pref.kagawa.jp/police/kenkei/toukei/pdf/koutsu/koutsu\\_47\\_hikinige.pdf](http://www.pref.kagawa.jp/police/kenkei/toukei/pdf/koutsu/koutsu_47_hikinige.pdf)
- 3) 石田真一「防犯カメラ映像と付着した血痕のDNA鑑定で特定、ひき逃げ容疑者を逮捕」Emerging media response 15th、2014年 ▶<http://response.jp/article/2014/03/08/218739.html>
- 4) 三澤章吾『死体監察医 法医学実験ファイル』竹書房新書、2013年
- 5) 中村桂子、松原謙一『THE CELL細胞の分子生物学 第4版』Newton Press、2004年
- 6) 勝又義直『DNA鑑定その能力と限界』名古屋大学出版会、2007年
- 7) Life Technologies : AmpFISTR Identifier, Applied Biosystems Press, 2010
- 8) 養王田正文『もっと知りたい！PCR実験』講談社、2010年
- 9) 日本電気泳動学会『電気泳動実験法』医歯薬出版、1999年
- 10) 青木康博「DNA鑑定による法医学的個人識別の確率・統計学的背景」『岩手医学雑誌』Vol. 54、pp.81-94、2002年
- 11) 加藤周一『世界大百科事典 第2版』平凡社、2007年 ▶<https://kotobank.jp/word/%E9%81%BA%E4%BC%9D%E5%AD%90%E9%A0%BB%E5%BA%A6-1146401>
- 12) Feire-Aradas A., Fondevila M., Kriegel A. K., et. al. : A new SNP assay for identification of highly degraded human DNA, Forensic Sci Int Genet, Vol.6, pp.341-349, 2012
- 13) Brettell T. A., Butler J. M., Almirall J. R. : Forensic science, Anal Chem, Vol.81, pp.4695-4711, 2009
- 14) Brookes A. J. : The essence of SNPs, Gene, Vol.234, pp.177-186, 1999
- 15) Cho S., Yu H. J., Han J., et al. : Forensic application of SNP-based resequencing array for individual identification, Forensic Sci Int Genet, Vol.13, pp.45-52, 2014
- 16) Irizarry R. A., Bolstad B. M., Collin F., et. al. : Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data, Nuc Acid Res, Vol.31, pp.1-8, 2003
- 17) TOSHIBA「日本人ゲノム解析ツール『ジャポニカアレイ®』を用いたゲノム解析サービスを開始」プレスリリース、2014年 ▶[http://www.toshiba.co.jp/about/press/2014\\_12/pr\\_j0101.htm](http://www.toshiba.co.jp/about/press/2014_12/pr_j0101.htm)
- 18) Sobrino B., Brion M., Carracedo A. : SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies, Forensic Sci Int, Vol.154, pp.181-194, 2005
- 19) Hosono N., Kubo M., Tsuchiya Y., et. al. : Multiplex PCR-Based Real-Time Invader Assay (mPCR-RETINA) : A Novel SNP-Based Method for Detecting Allelic Asymmetries Within Copy Number Variation Regions, Hum Mutat, Vol.29, pp.182-189, 2008
- 20) Gabriel S., Ziaugra L., Tabbaa D. : SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform, Curr Protoc Hum Genet, Chapter 2, 2009
- 21) Yang Y., Xie B., Yan J. : Application of next-

- generation sequencing technology in forensic science, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, Vol.12, pp.190-197, 2014
- 22) Hou G., Jiang X., Yang Y., et. al. : A 21-locus autosomal SNP multiplex and its application in forensic Science, *J Forensic Sci*, Vol.59, pp.5-14, 2014
- 23) 梶井英治『最新血液型学』南山堂、1998年
- 24) Yamamoto F. : ABO blood group system-ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABOgenes, *Immunohematology*, Vol.20, pp.3-22, 2004
- 25) Yamamoto F., Marken J., Tsuji T., White T., Clausen H., Hakomori S. : Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc alpha 1-2Gal alpha 1-3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA, *J Biol Chem*, Vol.265, pp.1146-1151, 1990
- 26) Yamamoto F., Clausen H., White T., Marken J., Hakomori S. : Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system, *Nature*, Vol.345, pp.229-233, 1990
- 27) Yip S. P. : Sequence variation at the human ABO locus, *Ann Hum Genet*, Vol.66, pp.1-27, 2002
- 28) 大阪大学21世紀COE、池田新介、大竹文雄（代表：筒井義郎）『選好パラメータアンケート調査（2004年度 アメリカ）』SRDQ事務局編（SRDQ：質問紙法にもとづく社会調査データベース）、2005年 ▶<http://srdq.hus.osaka-u.ac.jp>