

教育講演

産婦人科における DNA 指紋の応用

大阪大学講師 佐 治 文 隆

Application of DNA Fingerprinting to Obstetrics and Gynecology

Fumitaka SAJI

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka University Medical School, Osaka

はじめに

「十人十色」という言葉であらわされるように、個人は他人と異なる多くの特徴を有しているのが通常であるが、その外観や性癖だけでは個々を確実に比較識別することは困難である。近年、分子生物学の発達とともに遺伝子を利用した画期的な個人識別法が開発され、DNA 指紋と命名された。本講演では、まず個人識別法について述べ、次に DNA 指紋について解説し、最後に DNA 指紋の応用について産婦人科領域を中心に実例を提示する。

個体の識別法

個体の識別は、(1) 顔貌・体型・性別・指紋など外観による方法、(2) 筆跡・声紋など個人の性癖による方法、(3) 血液型・HLA タイピングなど免疫学的方法、さらに、(4) DNA 指紋で代表される分子生物学的識別法がある。これらの識別法の中でも指紋は犯罪捜査をはじめとして個人の同定に一般的に使用されているが、血液型・HLA タイピング・DNA 指紋も高い識別能を有する。

日本人の任意の二人が同一の血液型をもつ確率は 5 種類の血液型検査、ABO, MN, P, Le, Rh では理論上、92分の 1 となる。もっと多数の血液型検査、例えば Kidd, Duffy, Diego, Hp, Gm を加えると一致する確率はさらに小さくなり 6,200 分の 1 になるが、必要とする検体量が増加する。

HLA タイピングも免疫学的個人識別法の一つで、本法では HLA-A, B, C のクラス I 抗原及び HLA-DR, DQ, DP などのクラス II 抗原のタイピングを行うが、これらのタイピングの一致する確率は骨髄移植を例にとると、日本人の場合 100 分の 1 といわれる。

各種個人識別法の特徴を比較すると、DNA 指紋は他の方法に比べ、識別能が 1 兆分の 1 ときわめて高く、所要時間もそれほど長くなく、また費用についても臨床検査施設に依頼した場合でも他の検査法とあまり変わらない。

DNA 指紋とは

DNA はデオキシリボ核酸の略称で、細胞の核に存在する染色体を構成する。染色体を拡大すると最終的に 4 種類の塩基（アデニン、グアニン、シトシン、チミン）が二重鎖を形成し、直線的につながった DNA に到達する。この DNA 配列が遺伝情報である。

すなわち個体のもつすべての特質は遺伝子によって規定されており、遺伝子の実体は DNA であるといえる。

DNA のもつ特徴は次のようにまとめることができる。

- ① 4 種類の塩基の直線的配列である。
- ② 互いに相補的な 2 本の配列が螺旋構造をとる。
- ③ 同一個体内ではすべて同じ配列である。
- ④ 個体間で配列が異なる。
- ⑤ DNA 配列は親から子へ受け継がれ、子にある遺伝子は必ず親にある。
- ⑥ 相同染色体の同じ位置には同じ内容の遺伝子がある。

染色体遺伝子はそのままでは非常に大きな分子なので、その解析にあたってはこれを適当な長さに切断する必要がある。DNA の切断には Eco RI や Pst I などの制限酵素が用いられ、短い特定の塩基配列を認識して二本鎖 DNA を切断する。

DNA を制限酵素で切断したとき、ヒトにより

その切断片の長さが異なる現象を制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) という。図1に示すように A と B の2本の近似した DNA があり、制限酵素の切断部位が A に4カ所、B には3カ所の場合、切断片の長さに DNA 配列の違いが反映される。

DNA 配列の中でも約9割が遺伝的意味をもたないイントロンと呼ばれる部分であるが、このイントロン中に人類が共通にもつ短い配列が、これを単位として連続的につながっている部分がある。これを繰り返し配列 (tandem repeat) というが、繰り返しの単位は共通でも回数がヒトにより異なり、個人が特定可能となる。すなわち図2のように繰り返し配列の外側を切断する制限酵素を使用してさきほどの制限酵素断片長多型を利用する。

DNA 指紋の検出法は基本的にはサザン・ブロットと呼ばれる手法を用いている。血液・体液・組織などをサンプルとして、サンプル中に含まれる細胞の核から DNA を抽出する。抽出した高分

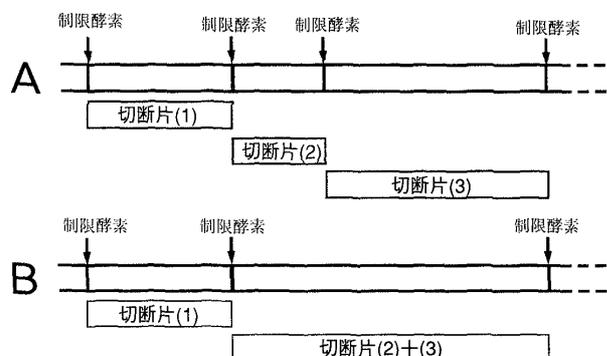


図1 RFLP (制限酵素断片長多型)

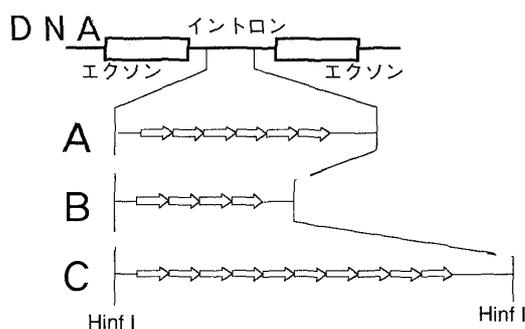


図2 Tandem Repeat

子 DNA を制限酵素で切断後、アガロースゲルに電気泳動する。電気泳動後のアガロースゲルをアルカリ処理し、ゲル内の DNA 片の水素結合を切断して一本鎖 DNA とし、これをニトロセルロース膜上に移す、いわゆるサザン・ブロットを行う。ニトロセルロース膜上の DNA 断片と³²P で標識された DNA 指紋検出用プローブとの結合—ハイブリダイゼーション—を起こさせ、オートラジオグラフィーによって明瞭なバンドとして観察する。

個体の制限酵素断片長多型を認識する DNA プローブは現在までに1,000種を超えて報告されているが、理論上指紋に匹敵するほど高い個人識別能を有するプローブとしては1985年イギリスの Alec J Jeffreys が開発したミニサテライト・プローブが有名である。この DNA プローブはミオグロビン遺伝子のイントロン中に存在する DNA 繰り返し配列から得られたもので、①全人類が共通にもち、しかも、②各個人により異なるという個人識別の条件を満たしている。我々はこの DNA プローブを入手して DNA 指紋の解析を行っている。以下に示す DNA 指紋の実例としては主としてこの Jeffreys のミニサテライト・プローブを用いている。

図3にはこのようにして検出した日本人12人の DNA 指紋を示す。各個人は20本から40本のバンドを示すが、そのうち上の方の大きなバンド10ないし20本に関しては個人特異的なバンドのパター

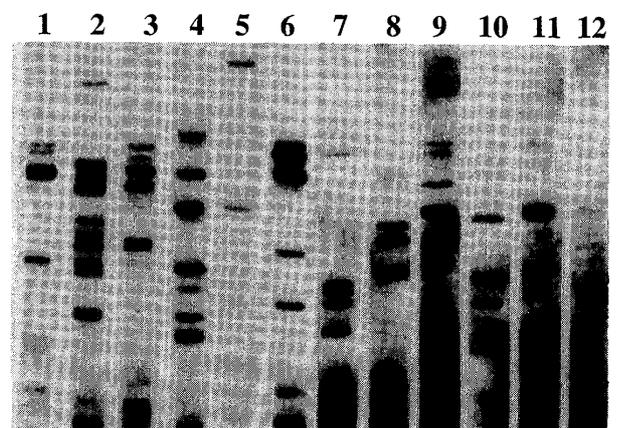


図3 DNA 指紋による識別
RFLPs バンドによって個人が識別される。

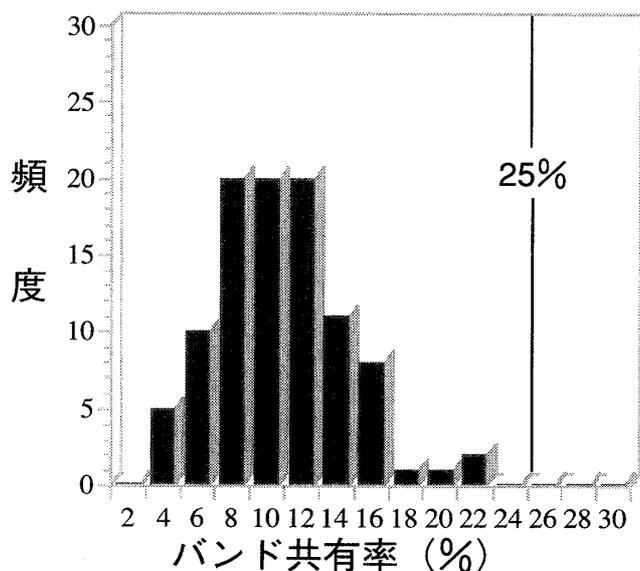


図4 非血縁者間でのバンド共有率
 $(0.25)^{20} = 10^{-12} = 1$ 兆分の 1

ンを示している。

このような非血縁者間で共通なバンドの割合とその頻度の関係を検討すると、図4に示すようにある人の全バンドのうちの平均して10%強(11%)が他人と同じ位置に出ることが判明した。また、たとえどんなに多くのバンドを共有したとしても25%を超えることはなかった。言い換えると1本のバンドあたり、このバンドの最大共有率は25%になり、仮に他人同士で20本のバンドが一致したとすると、その確率は $(0.25)^{20} = 10^{-12} = 1$ 兆分の1になる。

さらにDNA指紋でみられる各々のバンドはメンデルの法則に従って両親のいずれかから受け継がれている。すなわち子にあるバンドはすべて両親のいずれかのバンドと一致することになる(図5)。

以上DNA指紋の特徴をまとめてみると、

- ① 判定確率がきわめて高い
 - ② 多様なサンプルから検出可能である
 - ③ 分析時間が約1週間と比較的短い
- ということが出来る。

DNA指紋の応用

DNA指紋を応用すると、

- ① 親子や血縁関係の解析
- ② 犯罪捜査

母 子₁ 子₂ 父

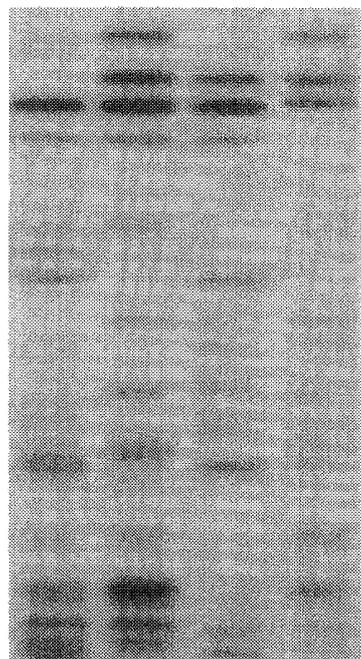


図5 親子のDNA fingerprintの実例
 子供に存在するバンドはすべて母親又は父親に帰属されている。

- ③ 多胎の卵性診断
- ④ 胞状奇胎の診断
- ⑤ 婦人科腫瘍の研究

などが可能になる。

例えば2名の男性のどちらが子供の父親であるのかを鑑定した症例においては子供の母親は既に死亡し、2名の男性は互いに兄弟であった。通常の血液型による鑑定では判定不能であったが、DNA指紋を行うと子のバンドのうち男(兄)と一致しないバンドでも男(弟)とは一致するものがいくつか認められ、この子の父親が男(弟)であることが判明した。

また、子供が既に死亡した男性の子であるか否かを、亡き男性の母親の血液を用いて鑑定した症例では2種類のDNAプローブを用いて、より正確を期している。本症例で得られた子のバンド47本のうち、母のバンドと一致しなかった22本が父由来と考えられた。この22本のうち12本は亡男の母と一致した。非血縁者間のバンドの一致率を25%とし、12本のバンドが一致する確率を求めて

みると約1,700万分の1となった。したがって子と亡男の母とは第2度血縁者であり、子の父は亡男であると判断された。

犯罪捜査でも現場に残されたサンプルと被疑者のサンプルを比較することによって犯人の特定が可能になる。DNA指紋はアメリカ、イギリス、ドイツなどの裁判所で証拠採用されているが、日本でも刑事例や民事例で採用されるようになってきている。

産婦人科領域においてもDNA指紋は臨床面や研究面で広く応用できる。排卵誘発剤の使用で近年増加した多胎妊娠には一卵性、多卵性あるいは両者の複合によるものが存在するが、その卵性診断に使用できる。従来の形態学的診断や血液型などの遺伝形質の比較では確定し得ない場合でもDNA指紋を用いると一卵性多胎であればそのバンドパターンの一致が確認される。

DNA指紋を表現するDNAの多型性は減数分裂→受精→胚発生の過程できわめて安定である。正常妊娠では受精後、卵由来の核と精子由来の核が融合して受精卵の核が形成される。これに対し胞状奇胎では脱核した卵に一精子が受精後、精子染色体が2倍体化するか、あるいは二精子が受精し、精子成分のみよりなる核が形成され、胞状奇胎が発生すると考えられている。したがって、雄核発生あるいは雄性発生(*androgenesis*)といわれる胞状奇胎のDNA指紋は精子由来となり患者自身とは全く異なるパターンを示す。すなわち胞状奇胎のDNA指紋は正常胎盤のそれと異なり、すべてのバンドが父親由来となる(図6)。

この現象を応用すると形態学的に胞状奇胎ときわめて類似している胎盤絨毛の水腫様変性の鑑別診断が可能になる。病理組織診で鑑別困難な両者においても、DNA指紋を用いると容易に鑑別が可能になる。正常絨毛のDNA指紋はたとえ水腫様変性を起こしていても両親のバンドが混在してみられ、決して父親だけのバンドを示すことはない。

DNA指紋は妊娠と関連する疾患だけでなく、婦人科腫瘍の発生病理の研究にも応用される。ヒト卵巣胚細胞系腫瘍(*germ cell tumor*)の発生過

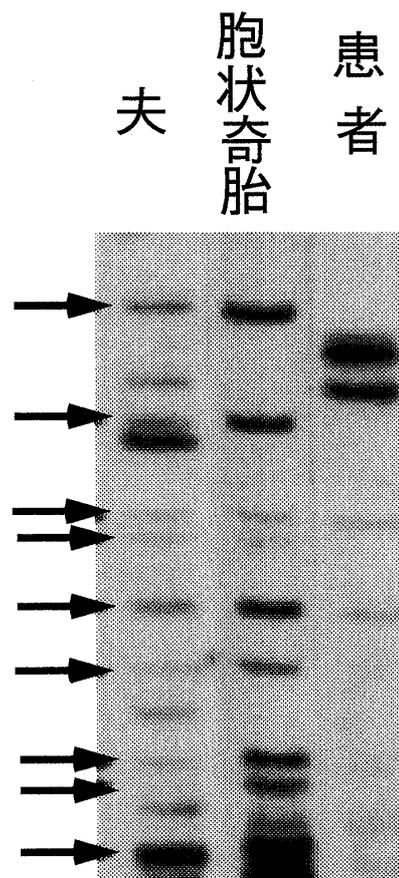


図6 胞状奇胎と *androgenesis*

胞状奇胎のバンドはすべて患者の夫のみに帰属し、染色体DNAは父性由来と判断される。

程を検討する際、DNA指紋は有効な研究手段になる。ヒト胚細胞は生殖の前に必ず減数分裂を起こす。第1減数分裂と第2減数分裂によって染色体数もDNA量も体細胞の半分になる。胚細胞系腫瘍の組織からDNA指紋を検出し、これを患者正常細胞のDNA指紋と比較することにより胚細胞系腫瘍組織の発生が第1減数分裂の前か後かが判明することになる。図7、図8は皮様嚢腫のDNA指紋をその宿主DNAと比較したものである。この場合2種類のDNA指紋検出プローブ(33.15と33.6)を用いて正確を期しているが、図7の症例では腫瘍と宿主のバンド・パターンが一致しており腫瘍が第1減数分裂前に発生したことを示している。一方、図8の症例では矢印で示した宿主にみられるバンドが腫瘍では欠如しており、腫瘍が第1減数分裂後に発生したと推察された。

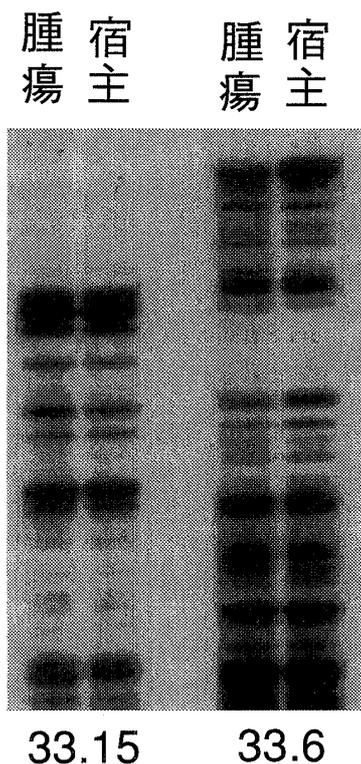


図7 胚細胞系腫瘍の発生病理 (1)

腫瘍のバンドはすべて宿主に一致し、第1減数分裂前の発生と考えられる。

胚細胞系腫瘍20症例のDNA指紋をこのように検討した結果、皮様嚢腫は第1減数分裂前後いずれの時期からも発生すると考えられた。一方、検討したかぎりにおいて未熟奇形腫は第1減数分裂後の発生、胚細胞腫は第1減数分裂前に発生すると考えられた。また興味深いことに皮様嚢腫の悪性変化例はいずれも第1減数分裂後の状態での発生が認められた。

腫瘍の研究に培養腫瘍細胞株は欠かすことのできない材料の一つである。実験室で各種培養細胞株を使用する場合、細胞株の取り違いや混入の可能性がないとはいえない。細胞株の同定・識別にもDNA指紋を応用することができる。図9は絨毛癌細胞株GCH 1, HCCM 5, JEG 3, BeWo, SCH, ENAMIのDNA指紋を示している。GCH 1, HCCM 5, JEG 3, SCHのバンド・パターンは互いに異なっているが、JEG 3とBeWo, SCHとENAMIはそれぞれ同じバンド・パターンを示した。JEG 3とBeWoは同一の絨毛癌組織から確立された培養細胞であるのでDNA指紋が同一で

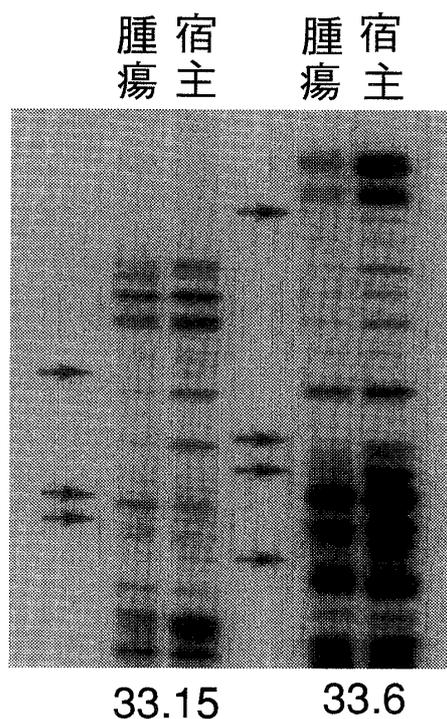


図8 胚細胞系腫瘍の発生病理 (2)

宿主のバンドの一部(→)は腫瘍では観察されず、減数分裂後の発生と考えられる。

あっても不思議ではない。しかしSCHとENAMIは起源が異なり、同一バンドを示す可能性が少ないため、オリジナルの細胞株を用いて比較検討したところ、ENAMI株がSCH株と取り違えられていたことがわかった。このように、形態学的に鑑別が困難な細胞株でもDNA指紋によって識別が可能になる。

その他の応用として骨髄移植における移植片の生着性の確認がある。ドナーの骨髄細胞のDNA指紋は、レシピエントのDNA指紋とは異なるはずであるから、骨髄移植後の患者白血球細胞と患者本来の体細胞のDNA指紋を比較すれば、移植成功例ではレシピエントの末梢白血球細胞のDNA指紋が体細胞のDNA指紋とは一致せずむしろドナーのDNA指紋に一致する。

また、今回一連の検討に用いられたJeffreysのDNAプローブはヒトだけでなく他の動物種のDNAの制限酵素断片長多型も認識するため、ウシやウマあるいはトリなどの血統・系統を明らかにすることも可能である。

以上、要約すると、

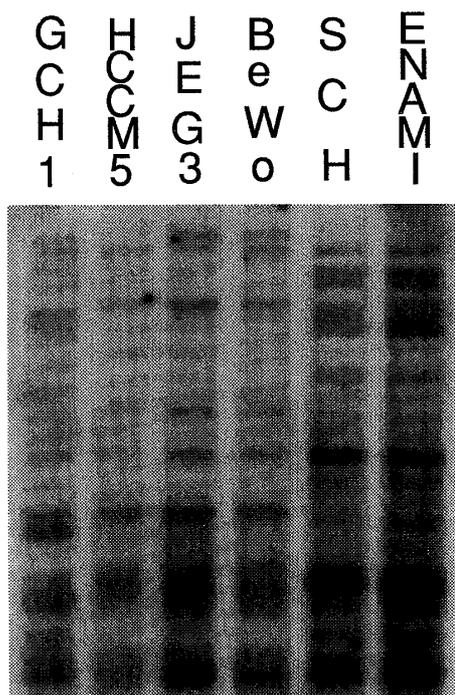


図9 絨毛癌細胞株の fingerprinting

JEG 3と BeWo は同一の患者より樹立されたものである。SCH と ENAMI は継代中にコンタミネーションしたことが判明した。

① 個体特異的な DNA 繰り返し配列を検出する方法を DNA 指紋という。

② DNA 指紋はきわめて高い個人識別能を有している。

③ DNA 指紋は親子鑑定、多胎の卵性診断、胎状奇胎の鑑別診などの臨床応用や卵巣腫瘍の発生病理などの研究に利用可能である。

謝 辞

本講演の機会を与えていただきました谷澤 修会長ならびに座長の労をおとりいただきました佐藤和雄教授に深く感謝致します。

なお、本講演にあたって以下の先生方にご協力をいただきました。

東 千尋、古山将康、大橋一友、上浦祥司、信永敏克、木村 正、徳川吉弘、脇本昭憲、井上正樹（大阪大学産科婦人科学教室）、Alec J Jeffreys (University of Leicester)、森村 豊（寿泉堂総合病院）、樋口十啓（帝人バイオ・ラボラトリー）（敬称略）

文 献

1. Azuma C, Kamiura S, Nobunaga T, Negoro T, Saji F, Tanizawa O. Zygosity determination of multiple pregnancy by DNA fingerprinting. *Am J Obstet Gynec* 1989; 160: 734-736
2. Azuma C, Saji F, Nobunaga T, Kamiura S, Kimura T, Tokugawa Y, Koyama M, Tanizawa O. Studies on the pathogenesis of choriocarcinoma by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *Cancer Res* 1990; 50: 488-491
3. Azuma C, Saji F, Tokugawa Y, Kimura T, Nobunaga T, Takemura M, Kameda T, Tanizawa O. Application of gene amplification by polymerase chain reaction (PCR) to genetic analysis of molar mitochondrial DNA; the detection of anuclear empty ovum as the cause of complete mole. *Gynecol Oncol* 1991; 40: 29-33
4. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature (Lond)* 1985; 314: 67-73
5. Inoue M, Fujita M, Azuma C, Saji F, Tanizawa O. Histogenetic analysis of ovarian germ cell tumors by DNA fingerprinting. *Cancer Res* 1992; 52: 1-4
6. Jeffreys AJ, MacLeod A, Tamaki K, Neil DL, Monckton DG. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature* 1991; 354: 204-209
7. Matsumura Y, Tarin D. DNA fingerprinting survey of various human tumors and their metastases. *Cancer Res* 1992; 52: 2174-2179
8. Nobunaga T, Azuma C, Kimura T, Tokugawa Y, Takemura M, Kamiura S, Saji F, Tanizawa O. Differential diagnosis between complete mole and hydropic abortus by deoxyribonucleic acid fingerprints. *Am J Obstet Gynec* 1990; 163: 634-638
9. Saito J, Inoue M, Azuma C, Saji F, Tanizawa O. Histogenetic analysis of ovarian teratomas by DNA fingerprinting. *Eur J Cancer* 1991; 27: 813
10. Saji F, Tokugawa Y, Kimura T, Kamiura S, Nobunaga T, Azuma C, Tanizawa O. A new approach using DNA fingerprinting for the determination of androgenesis as a cause of hydatidiform mole. *Placenta* 1989; 10: 399-406

Synopsis

Restriction fragment length polymorphisms (RFLP) are variations in the size of restriction fragments of genomic DNA that hybridize to specific probes. They are the consequence of changes in primary DNA sequences, most of which result from small-scale changes in DNA. Recently minisatellite DNA probes that detect many regions of great variability within the human genome have been described. Minisatellite probes consist of multiple repeated copies of a common 10-15 base pair core sequence. On hybridization to restriction enzyme digests of human DNA, they simultaneously detect many highly polymorphic minisatellites at different loci in the genome, and produce band patterns that are individual specific. The band patterns are called "DNA fingerprints" or "DNA barcode" which can be used for individual identification on forensic and legal medicine.

In addition to forensic and legal medicine, DNA fingerprinting can be used in both basic research and clinical examination of obstetrics and gynecology. The RFLP bands in DNA fingerprinting are inherited as single Mendelian co-dominants and we can use such minisatellite DNA probe for the determination of zygosity in multiple pregnancy. This probe can be used for the determination of androgenesis as a cause of complete hydatidiform mole. Each polymorphic band in molar tissues could be identified as being of paternal but not maternal origin. Some polymorphic bands of paternal origin were not observed in molar tissues, indicating that endoreduplication of a normal haploid sperm or fertilization by dispermy to an anuclear oocyte with no effective genome could be the cause of complete hydatidiform mole (androgenesis). Accordingly, this method is used to obtain the differential diagnosis between complete mole and hydropic change of placental villi in hydropic abortus. In the hydropic abortus, the polymorphic fragment can be traced back to its parents.

In the gynecologic oncology field, DNA fingerprinting can be used for histogenetic analysis of ovarian germ cell tumors. DNA fingerprints of ovarian germ cell tumors was investigated and their band patterns were compared with their host's patterns. The results suggest that mature cystic teratomas of the ovary arise from germ cells arrested at various stages of meiosis, while immature teratomas are derived from postmeiotic germ cells. Malignant transformation may occur exclusively in the mature teratoma arising from post-meiotic germ cells. Dysgerminomas develop from premeiotic oogonia.

One of the chief problem in tissue culture studies is the question of unequivocal identity of the cultured cells used and the very real possibility of their being contaminated by cells of a similar morphological appearance. DNA fingerprinting can be applied to genotypic analysis of cultured human cells, and we could find contamination of trophoblastic tumor cell line to our cultured cell bank.

DNA fingerprinting has provided a useful technique not only for the individual identification but also for human genomic analysis.
