

PCR法による法医実務試料からの性別およびABO式血液型判定

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9164

PCR 法による法医実務試料からの性別および ABO 式血液型判定

金沢大学医学部法医学講座 (主任: 大島 徹教授)

林 子 清

法医学実務における検査試料は一般に微量であるうえに、試料が置かれた環境の物理的ないし化学的悪影響のため DNA が低分子化しやすく、そのため性別や ABO 式血液型判定に困難をきたす場合が少なくない。こうした問題を克服するため、筆者は PCR 法を用い、種々の法医学的試料について性別と ABO 式血液型の遺伝子型判定を総合的に検討した。まず、死後36時間を経過した剖検試料の脳、皮膚、骨格筋と血液を、乾燥と湿潤の両環境下で、各々 4℃、22℃と37℃にて4週間放置し、あるいは同一の剖検試料を100℃、150℃と200℃で各々、48、5および3時間加熱することで DNA を低分子化させた試料を実験的に作成し、温度、湿度および加熱の物理的条件が PCR 反応に与える影響を検討した。また、死後24時間以内にホルマリンで固定したり、ホルマリンで固定後パラフィンに包埋して室温保存した剖検試料の脳、肝、肺と脾臓の各組織についても同様に検討した。その結果、性別判定については、乾燥条件下に置かれた試料はいずれも4週間まで正確に判定可能であったが、湿潤条件下の試料は環境温度の上昇に伴って判定可能な期間も短縮した。加熱試料については、100℃加熱では脳は12時間、皮膚と骨格筋は24時間、血液は36時間まで、また150℃加熱では脳は2時間、骨格筋と血液は3時間、皮膚は4時間まで、さらに200℃加熱では脳と骨格筋は0.5時間、皮膚と血液は2時間まで性別判定が可能であり、ABO 式血液型の遺伝子型については、血液試料で100℃加熱では12時間、150℃加熱では1時間、200℃加熱では0.5時間まで正しく判定された。また、ホルマリン固定試料および固定後パラフィン包埋した試料では、いずれも性別は15年、ABO 式血液型の遺伝子型は3年まで判定できた。続いてスライドガラス上に作成した指紋では、1個指紋の1/4 (約 0.5×2.0cm) を用いても性別は正しく判定されたが、ABO 式血液型の遺伝子型判定は指紋1個を用いても不可能であった。また、アルミニウム粉末で同様に作成した指紋形態を検出後でも、PCR 法で性別は正確に判定された。これらの基礎的検討結果に基づき、法医鑑識で通常使用される血清学的方法では性別と ABO 式血液型判定が困難な白骨化死体や高度焼損死体などの剖検例10例についても、性別判定結果は身元判明後に確認された各々の性別と一致しており、また ABO 式血液型の遺伝子型についても、解離法による ABO 式血液型の表現型と矛盾しなかった。さらに中華人民共和国・新疆ウイグル自治区で発見された、1300年余を経過した9体のミイラ試料 (成人ミイラ8体と小児ミイラ1体) では、抽出した DNA 溶液中の不純物の影響で、そのままでは DNA 増幅反応が不可能であったため、メラニン除去するバイオゲル P₆₆ で DNA 溶液をさらに精製し、精製後、PCR 阻害因子の働きを抑制する目的でウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) を PCR 反応液に加えたところ、PCR 反応液 50μl 中に BSA 20~50μg を加えた場合に最良の DNA 増幅結果が得られた。続いて、この反応条件下で性別と ABO 式血液型の遺伝子型判定を行った結果、5体の成人ミイラの外表上の特徴に基づいた性別は、PCR による判定結果と一致していたが、残り1体の成人ミイラについては外表所見に基づく判定 (女性) を男性と訂正する結果を得た。また、死後損壊のため、外表上の特徴による性別判定が不可能な2体の成人ミイラと1体の小児ミイラについても、PCR 法でいずれも男性と判定した。さらに、ABO 式血液型の遺伝子型検査については9体とも BO 型と判定され、この結果は、各々のミイラの毛髪試料から解離法で得た ABO 式血液型の表現型 (B 型) と良く一致していた。すなわち本研究により、乾燥環境や湿潤環境のみならず、加熱、ホルマリン固定およびパラフィン包埋などの種々の悪条件によってすでに低分子化した DNA を用いても、PCR 法によって性別と ABO 式血液型判定が十分可能になることが示され、また、1300年余を経過した人類学的にみても貴重なミイラの性別と ABO 式血液型の遺伝子型についてもこの PCR 法で明らかにすることができた。

Key words 法医血清学, DNA 分析, PCR, 性別判定, ABO 式血液型判定

法医学実務では血痕、毛髪、指紋、骨などの証拠物件、特に微量な試料について、それが誰に由来したのかを明らかにするため (個人識別)、性別や血液型の正確な信頼に足る検査が要求されている。すなわち生体や死体の性別は、多くの場合、内・

外性器の検査で判定できるが、由来の明確でない血液、血痕、毛髪、指紋、体液、排泄物や組織片、あるいは死後の腐敗や損壊が著しく性器の形態学上の識別が不可能な死体の性別判定には、性差を示す細胞構成成分を分析する必要が生じてくる。ま

平成7年8月28日受付, 平成7年10月9日受理

Abbreviations: ab, absorption elution test; bp, base pair; BSA, bovine serum albumin; dNTP, deoxynucleoside triphosphate; DTT, dithiothreitol; TBE, tris-borate-ethylenediaminetetraacetic acid; TE, tris-ethylenediaminetetraacetic acid; TNE, tris-sodium-ethylenediaminetetraacetic acid.

た, 1900年に ABO 式血液型が Landsteiner¹⁾により発見されて以来, 輸血や移植などを中心にその重要性が認識されているが, これまでの検査法はほとんどが抗原抗体反応に基づく表現型の検査であり, 遺伝子型の直接的検査は不可能であった。

近年, 分子生物学の進歩によって直接遺伝子を検査できるようになり, 特に Saiki ら²⁾により試験管内で DNA を百万倍にも増幅することのできる PCR 法が実用化されてからは, 極く微量の DNA を用いて DNA の特定部位の検出が可能となっており, 考古学, 人類学や医学などの幅広い分野に応用されている^{3)~6)}。

法医学においては, 検査対象となる試料は多くの場合, 微量で量的な制約を強く受けるため, PCR 法はこの問題を克服する有力な手段として各種試料に応用されてきている^{7)~9)}。しかし, 試料となる組織の死後変化や種々の環境条件(腐敗や加熱など)の影響で, 検査前に DNA が既に低分子化され, 結果判定に困難をきたす場合が少なくない¹⁰⁾。

本論文において, 筆者は DNA 分析の方法を法医学実務試料へ確実に応用するため, 試料保存の温度, 湿度, 加熱, ホルマリン固定およびパラフィン包埋などの PCR 反応に対する物理的および化学的影響を基礎的に検討した。続いてそれに基づき, スライドガラス上の指紋の性別と ABO 式血液型の遺伝子型を実験的に判定し, 白骨化死体や焼死体などの剖検試料, 並びに 1300年以上を経過した 9 体のミイラ試料について, 性別判定と

ABO 式血液型の遺伝子型判定を行った。また, 同様の方法を用いて, 霊長類の性別および ABO 式血液型の遺伝子型の検索を試みた。

材料および方法

1. 材 料

1. 温度と湿度の影響についての検討

死後36時間を経過した男性(74歳, 死因は外傷性ショック)の剖検試料の脳, 皮膚, 骨格筋と血液を各々, 約 100g または 100ml 採取し, 密閉したプラスチック容器に入れ(湿潤環境下とする), 各々, 4℃, 22℃と37℃で保存し, 脳, 皮膚と骨格筋については, 1週間目, 2週間目, 3週間目と4週間目に肉眼的に最も良好な状態を保つ部分から 0.03g を, また血液については 0.03ml を DNA 抽出用試料として採取した。また, 上記の各臓器について, 蓋を開いたシャーレ上に置き(乾燥環境下とする), 上記の温度で保存して同様に試料採取した。

2. 加熱試料

上記 1. で用いた男性の剖検試料と同じ脳, 皮膚, 骨格筋各々 2g と血液 2ml を試験管に入れて密栓し, 恒温槽で 100℃で 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48時間, あるいは 150℃で 1, 2, 3, 4, 5時間, または 200℃で 15分, 30分, 1, 2, 3時間加熱し, その後, 脳, 皮膚と骨格筋については各々 0.03g を, 血液については, 加熱により血液が固体状態になるため, 同じく

Table 1. Profiles of medico-legal autopsy cases

Case profile	Cause of death	Time after death	Specimens
A corpse was found being hanged on a tree using a belt. The head and a lower part of the body were nearly skeletonized.	Hanging	3-4 months	Bone marrow
A corpse was found in the sea. The head and a lower part of body were nearly skeletonized.	Drowning	0.5-1 month	Bone marrow
An almost skeletonized corpse was found at the seaside.	Drowning	2-4 months	Bone marrow
An almost skeletonized corpse without the head was found at the seaside.	Drowning	0.5 month	Bone marrow
A skeletonized corpse was found in the sea.	Drowning	1-2 months	Bone marrow
A skeletonized corpse with only a lower part of the body was found in the sea.	Drowning	2-3 months	Bone marrow
A severely destructed corpse was found in a car which had been burned down by fire.	Death due to fire	2 days	Liver*
A severely destructed corpse was found in a car which had been burned down by fire.	Death due to fire	1 day	Liver*
A corpse was found in a carport, and the skin of the corpse was dried and mummified.	Undetermined	0.5 month	Hair, Skin
Putrefied human right foot was found at the seaside.	Undetermined	3-4 months	Bone marrow

* The specimens were collected from the carbonized surface layer, the layer right before carbonization, and the center portion with normal appearance of the liver, respectively.

0.03g を試料として採取した。

3. ホルマリン固定試料

当教室の剖検試料のうち10%非緩衝ホルマリン (pH 3.8) で0.5年, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15年間固定した剖検試料 (各々の固定期間について男性, 女性各1個体, 計24体) の脳, 肝臓, 肺と脾臓の各々0.03gを採取して試料とした。

4. パラフィン包埋試料

剖検試料を10%非緩衝ホルマリン (pH 3.8) で1カ月固定した後, パラフィンで包埋し, 0.5年, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15年間常温で保存された剖検試料 (各々の保存期間について男性, 女性各1個体, 計24体) の脳, 肝臓, 肺と脾臓包埋ブロックから各々0.03gを採取し, 試料とした。

5. 指紋

性別と ABO 式血液型が既知のヒトの指腹を, 清浄なスライドガラス面に圧着させて実験的に指紋を作成し, 試料とした。また, 同様に作成した後, アルミニウム粉末で形態を検出した指紋についても試料とした。

6. 高度の死後変化や死体損壊を伴う剖検試料

当教室で剖検した白骨化死体や高度焼損死体など, 常法では性別と ABO 式血液型判定が困難な剖検例計10例について試料を採取した (表1)。10例の内訳は白骨化死体6例, 高度焼損死体2例, ミイラ化死体1例, ヒト右足のみの試料1例であった。

7. ミイラ

ミイラは1912年に日本浄土真宗本願寺派の第二十二世法主である大谷光瑞探検隊が, 中国新疆ウイグル自治区のトルファンで古墳を発掘した際に発見したもので, 現在は中国遼寧省旅順博物館に所蔵されている。トルファン付近は年間降雨量が16mmと極めて少なく, 夏には気温40℃以上の日が3カ月以上も続く典型的な高温砂漠地帯である。発掘された古墳は, 石碑および墓内の副葬品などより中国唐代末期 (紀元7世紀) の高昌国のものと判定され, したがってミイラは今から1300年前の高昌国のヒトであろうと推定された。

これらのミイラは全部で9体であり, うち外表所見からみて8体が成人, 1体は小児であった。成人ミイラは黒色頭髪を有しており, 身体表面には衣服が付着し, また軟組織は高度に乾



Fig. 1. One of the mummies (No. 5) discovered at Taklamakan desert in Turfan in Hsinchiang Uyghur, China in 1912.

燥状で一部に破損が認められた (図1)。9体のうち6体の成人ミイラの性別は外表から観察された形態的特徴により推定されたが, 残りの2体の成人ミイラと1体の小児ミイラの性別は推定できなかった。各成人ミイラより毛髪, 骨格筋, 皮膚と骨を, 小児ミイラからは皮膚と肋骨を検査試料として採取した (図2)。また, 陽性対照試料として性別既知で, ABO 式血液型の遺伝子型が PCR 法で確認された現代人の毛髪, 骨格筋, 皮膚および肋骨を使用し, 陰性対照試料は生物試料を含まない DNA 抽出用の緩衝液を使用した。

8. 霊長類動物試料

京都大学霊長類研究所 (愛知県犬山市) から提供された11種計20頭の霊長類動物の血液から抽出された DNA を試料とした。内訳は, 類人猿 (チンパンジーおよびシロテテナガザル, 雌雄各1頭ずつ) 計4頭, 狭鼻猿類 [マントヒヒ, ニホンザル, カニクイザル, アカゲザルが雌雄各1頭ずつ, ミドリザル3頭 (性別不明)] 計11頭, 広鼻猿類 (フサオマキザル雌雄各1頭, ワタボウシタマリン雄1頭) 計3頭, 原猿類 [オオガラゴ (性別不明) およびコモモンツパイ (雌) 各1頭] 計2頭である。

II. 解離法¹¹⁾

検体である毛髪3本を十分に圧挫して髄質を十分に露呈させた後, 各々0.5mmの長さに切断し3本の試験管に1本ずつ入れた後, 抗A, 抗B血清と抗Hレクチンを各々の試験管に1滴ずつ加えて4℃で1晩感作し, 4℃の生理的食塩水で4回洗浄して非結合抗体を除去した。続いて, 生理的食塩水1滴を加え55℃で10分間, 毛髪に結合した抗体を熱解離した。検体である毛髪を除去後, 対応する指示赤血球の0.5%浮遊液を15μl加えて, 室温で20分間反応させ, 赤血球凝集の有無を観察した。

III. 試料からの DNA 抽出および精製

1. 試料の前処理

男性剖検組織試料とその加熱試料は特に前処理なく, 直接, DNA 抽出を行った。ホルマリン固定試料は水道水で1晩水洗後, DNA を抽出した。パラフィンブロック内試料はまず脱パラフィン後, 水道水で1晩水洗し, 次の操作に移った。スライドガラスに押捺された指紋は, 蒸留水で湿らせた綿球 (約1mm³) で拭き採って試料とした。白骨化死体や焼損死体から採取した試料は前処理せず, DNA 抽出を行った。各ミイラについては毛髪10本, 骨格筋0.03g, 皮膚0.5cm², 骨0.03gを採取し, 1%SDS, 50mM 塩化ナトリウムと10mM EDTAを含む10mMTris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) (Tris-sodium-EDTA, TNE) で10分間, 2回洗浄した。

2. DNA 抽出

1) 指紋

指紋試料については, DNA 抽出操作を行わずに直接 PCR 反

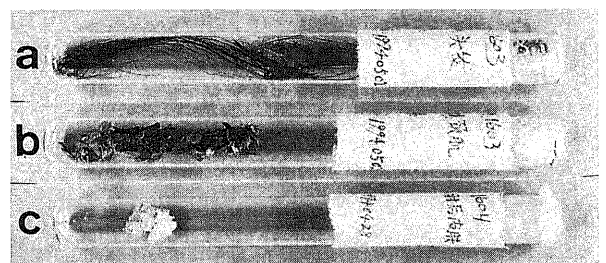


Fig. 2. The samples collected from mummy No. 5. a, hair; b, muscle; c, skin.

応液に加えて増幅する方法と、DNA 抽出液を PCR 反応液に加えて増幅する二つの異なる方法で実験を行った。

2) 具体的抽出法¹²⁾

各試料を細切後、2%SDS, 0.04M ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT) と 200 μ g/ml プロテナーゼ K (Boehringer, Mannheim, Germany) を含む TNE 緩衝液 0.5ml を加え、50℃の水浴中で20時間、試料のタンパク質を十分に分解し、通常のフェノールクロホルム法により DNA を抽出し、エタノールを加えて沈殿させた DNA を真空乾燥した後、1mM EDTA を含む 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) (Tris-EDTA, TE) に溶解して-80℃で保存した。

3. 抽出 DNA の精製

ミイラの毛髪、骨格筋、皮膚および骨から抽出した DNA 溶液は肉眼上、褐色あるいは黒褐色を呈したため、吉井ら¹³⁾が考案したスピнкаラムを用いて精製した。このスピнкаラムは新鮮な毛髪から抽出した DNA 溶液中に存在するメラニン色素を除去するために開発されたもので、メラニン分子中のインドールがカラム中のバイオゲル P₈₀ に対して強い親和性を有するこ

とを利用して、DNA 溶液中のメラニンを除去することができる。

IV. PCR 法

1. 使用プライマー

性別判定用のプライマーは Witt ら¹⁴⁾が報告した、X 染色体に特異的な130塩基対 (base pair, bp) の領域を増幅する X₁, X₂ プライマーペアと、Y 染色体に特異的な170bp の領域を増幅する Y₁₁, Y₂₂ プライマーペアを使用した。また ABO 式血液型判定用のプライマーは、佐々木ら¹⁵⁾が報告した、ABO 式血液型糖鎖抗原の糖転移酵素をコードする遺伝子 cDNA について、その258番目の塩基を含む 96bp の DNA 断片を増幅する 1f, 1r プライマーペアと、700番目の塩基を含む 181bp の DNA 断片を増幅する 3f, 3r プライマーペアを使用した。またミイラの検査では、ABO 式血液型の遺伝子型判定結果を確認するため、258番目の塩基を含む 139bp の DNA 断片を増幅する 1f, GA17 プライマーペア、並びに793番目の塩基を含む 124bp の DNA 断片を増幅する GA07, GA12 プライマーペアを使用した。各プライマー (宝酒造, 京都) の塩基配列は表 2 に示した。

Table 2. Primers and their indication in the PCR

Primer	Sequences	Denaturation	Annealing	Extension
X ₁ X ₂	5'-AATCATCAAATGGAGATTG-3' 5'-GTTTCAGCTCTGTGAGTGAAA-3'	94℃, 40sec	56℃, 30sec	72℃, 1min
Y ₁₁ Y ₂₂	5'-ATGATAGAAACGGAAATATG-3' 5'-AGTAGAATGCAAAGGGCTC-3'	94℃, 40sec	56℃, 30sec	72℃, 1min
1f 1r	5'-TGACACCGTGGAGGATGTCCTGGT-3' 5'-TGAAGTCTCGTTGAGGATGTCGA-3'	96℃, 24sec	62℃, 30sec	72℃, 1.5min
3f 3r	5'-CGCATGGAGATGATCAGTGACTTC-3' 5'-GCTCGTAGGTGAAGGCCTCCC-3'	96℃, 24sec	62℃, 30sec	72℃, 1.5min
1f GA17	5'-TGACACCGTGGAGGATGTCCTGGT-3' 5'-TGATGGCAAACACAGTTAACCC-3'	95℃, 24sec	61℃, 1min	72℃, 1min
GA07 GA12	5'-AGCCGGGAGGCCTTCACCTA-3' 5'-TGAGCCGCTGCACCTCTTGCA-3'	94℃, 1min	62℃, 1min	72℃, 2min

Table 3. Restriction enzymes used for the gene detection in ABO blood group system

Restriction enzyme	Recognition site	Conditions for optimum reaction		Gene	DNA fragment size (base pair) of productions of primers after digested by restriction enzymes			
		Time (hr)	Temperature (℃)		1f+1r	3f+3r	1f+GA17	GA07+GA12
Kpn-I	GGTAC C C CATG	1	37	O A, B	69, 27 96	-----* -----	110, 28 139	----- -----
Msp-I	C CGG GGC C	1	37	O, A B	----- -----	140, 22, 19 159, 22	----- -----	----- -----
Alu-I	AG CT AC GA	1	37	O, A B	----- -----	181 181, 140, 41	----- -----	----- -----
Bstp-I	G GTNACC CCANTGG	1	60	O A, B	96 69, 27	----- -----	138 110, 29	----- -----
Mva-I	CC $\begin{smallmatrix} A \\ T \end{smallmatrix}$ GG GG $\begin{smallmatrix} T \\ A \end{smallmatrix}$ CC	1	37	O, A B	----- -----	123, 58 123, 58	----- -----	45, 40, 39 84, 40

* The digestion by restriction enzyme was not performed.

2. PCR の条件

ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Ortho diagnostic systems, Raritan, USA) がミイラ試料の PCR に与える影響を検討するため, PCR 反応液に BSA を各々, 1) 無添加, 2) 10 μ g, 3) 20 μ g, 4) 50 μ g, 5) 100 μ g, 6) 200 μ g 加えて増幅反応を行った. PCR 反応液は, 10mM トリス-塩酸 pH 8.0, 50mM 塩化カリウム, 1.5mM 塩化マグネシウム, 各 100 μ M デオキシヌクレオチド三リン酸 (deoxynucleotide-triphosphate, dNTP), 20 μ g の BSA, 0.01% トリトン X-100, 2.5単位 Taq (Thermus aquaticus) DNA ポリメラーゼ (宝酒造), 各 1.0 μ M のプライマーからなり, さらに各々の PCR 用チューブに, 各試料から抽出した DNA 溶液 5 μ l (ただし, ミイラの毛髪試料のみは 10 μ l) を加えて, 蒸留水で最終容量を 50 μ l に調整した. 各プライマーの塩基配列および反応条件は表 2 に示した.

V. 増幅産物の検出

1. 性別検査

PCR 反応後の溶液の 10 μ l を検体とし, 50mM Tris-HCl (pH 8.2), 50mM ホウ酸, 1mM EDTA 電気泳動緩衝液 (Tris-Boric acid-EDTA, TBE) を用い, 8% ポリアクリルアミドゲルで定電圧 300V, 40分間電気泳動した. その後, 0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイドを含む TBE 緩衝液で, ゲルを40分間染色し, 染色後, 紫外線ランプ下で泳動パターンを観察した.

2. ABO 式血液型検査

表 3 に示したように, プライマー 1f, 1r を用いた場合の増幅産物 10 μ l に 5 単位の制限酵素 Kpn-1 または Bst-1 を加えて, Kpn-1 の場合は 37 $^{\circ}$ C, Bst-1 では 60 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた. 一方, プライマー 3f, 3r の増幅産物 10 μ l には 5 単位の Msp-1 あるいは Alu-1 を加えて, 37 $^{\circ}$ C で 1 時間, 反応させた. 続いて反応後の溶液を 15 μ l とり, TBE 緩衝液を用い, 12% ポ

リアクリルアミドゲルで定電圧 350V 下で 1 時間, 電気泳動した. 泳動後, 銀染色を施し泳動パターンを観察した.

3. 銀染色¹⁰⁾

電気泳動後のゲルを 50% エタノール/12% 酢酸の水溶液で 10 分間固定し, 続いて 10% エタノール/5% 酢酸の水溶液で 10 分間, 3 回洗浄した. 洗浄後, 3.4mM 重クロム酸/3.2mM 硝酸で 5 分間, さらに 12mM 硝酸銀水溶液で 30 分間染色した後, 蒸留水で 2 分間, 3 回洗浄し, 0.28M 炭酸ナトリウム/0.018% 中性ホルマリンの水溶液に浸して発色させた.

VI. 結果判定

1. 性別判定

性別判定の基準として, 各々の試料についてプライマー X₁, X₂ の産物から 130bp のバンドと, プライマー Y₁₁, Y₂₂ から 170bp のバンドの両方が検出された場合に男性, X₁, X₂ の産物から 130bp のバンドのみが検出され, しかも Y₁₁, Y₂₂ の産物からバンドが検出されない場合に女性と判定した.

2. ABO 式血液型の遺伝子型判定

表 3 に示したように, プライマー 1f, 1r の増幅産物については, Kpn-1 と Bst-1 による切断パターンに基づいて O 遺伝子の有無を調べ, また, プライマー 3f, 3r の増幅産物の Msp-1 と Alu-1 による切断パターンに基づいて, B 遺伝子の有無を検討した. すなわち, これら二つのプライマーペア産物の切断パターンの組み合わせに基づき, ABO 式血液型の遺伝子型が判定された (表 4). さらに判定をより確実にするため, プライマー 1f, GA17 の産物の Kpn-1 による切断パターンに基づいて O 遺伝子の有無を検討し, 続いてプライマー GA07, GA12 の増幅産物の Mva-1 による切断パターンに基づいて B 遺伝子の有無を調べ, これら切断パターンの組み合わせによっても ABO 式血液型の遺伝子型が表 4 のように判定された.

Table 4. The criterions for ABO blood genotyping

Primer pair	Restriction enzyme	Base pair	Determination of genotyping					
			BB	BO	AB	AA	AO	OO
1f+1r	Kpn-1	96	+	+	+	+	+	
		69		+			+	+
		27		+			+	+
	Bst-1	96		+			+	+
		69	+	+	+	+	+	
		27	+	+	+	+	+	
3f+3r	Msp-1	159	+	+	+			
		140		+	+	+	+	+
		22	+	+	+	+	+	+
		19		+	+	+	+	+
	Alu-1	181		+	+	+	+	+
		140	+	+	+			
1f+GA17	Kpn-1	41	+	+	+			
		139	+	+	+	+	+	
		110		+			+	+
GA07+GA12	Mva-1	29		+			+	+
		84	+	+	+			
		45		+	+	+	+	+
		40	+	+	+	+	+	+
		39		+	+	+	+	+

+, expected band after digest by restriction enzymes.

成 績

I. 性別判定に対する温度と湿度の影響

各試料の検査結果を表 5 に示した。湿潤環境下に放置された臓器については、4℃に置かれた脳、皮膚、骨格筋および血液

はいずれも 4 週まで性別が判定できたが、22℃に置かれた脳は 1 週まで、皮膚、骨格筋および血液は 2 週まで判定できた。一方、37℃に置かれた皮膚は 2 週まで、骨格筋および血液は 1 週まで性別判定が可能であったが、脳は 1 週目ですでに判定不可能であった。

Table 5. Effect of temperature and humidity to sex determination on human specimens by PCR

Organ tissue	Temp. (°C)	Primer	Sex determination							
			Humid condition for				Dry condition for			
			1w	2w	3w	4w	1w	2w	3w	4w
Brain	37	X	—	—	—	—	+	+	+	+
		Y	—	—	—	—	+	+	+	+
	22	X	+	—	—	—	+	+	+	+
		Y	+	—	—	—	+	+	+	+
	4	X	+	+	+	+	+	+	+	+
		Y	+	+	+	+	+	+	+	+
Skin	37	X	+	+	—	—	+	+	+	+
		Y	+	+	—	—	+	+	+	+
	22	X	+	+	—	—	+	+	+	+
		Y	+	+	—	—	+	+	+	+
	4	X	+	+	+	+	+	+	+	+
		Y	+	+	+	+	+	+	+	+
Muscle	37	X	+	+/-	—	—	+	+	+	+
		Y	+	+/-	—	—	+	+	+	+
	22	X	+	+	—	—	+	+	+	+
		Y	+	+	—	—	+	+	+	+
	4	X	+	+	+	+	+	+	+	+
		Y	+	+	+	+	+	+	+	+
Blood	37	X	+	+/-	—	—	+	+	+	+
		Y	+	+/-	—	—	+	+	+	+
	22	X	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+
		Y	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+
	4	X	+	+	+	+	+	+	+	+
		Y	+	+	+	+	+	+	+	+

+, correctly detected; —, not detected; +/-, a constant result was not obtained; w, week (s).

Table 6. Sex determination on human specimens by PCR at 100°C

Organ tissue	Primer	Sex determination							
		Heating time (hr)							
		1	2	3	6	12	24	36	48
Brain	X	+	+	+	+	+	+/-	—	—
	Y	+	+	+	+	+	—	—	—
Skin	X	+	+	+	+	+	+	+/-	—
	Y	+	+	+	+	+	+	—	—
Muscle	X	+	+	+	+	+	+	+/-	—
	Y	+	+	+	+	+	+	—	—
Blood	X	+	+	+	+	+	+	+	—
	Y	+	+	+	+	+	+	+	—

+, correctly detected; —, not detected; +/-, a constant result was not obtained.

乾燥環境に置かれた脳、皮膚、骨格筋および血液は温度とは関係なく、いずれも4週まで性別判定が可能であった。

II. 加熱試料の検査

表6, 表7および表8に示したように, 100℃加熱時, 脳は12時間, 皮膚と骨格筋は24時間, 血液は36時間まで性別判定ができ, 150℃加熱では脳は2時間, 皮膚は4時間, 骨格筋と血液は3時間まで判定が可能であった。200℃加熱では, 脳と骨格筋は0.5時間, 皮膚と血液は2時間まで判定しえた。

また, 200℃加熱時の骨格筋を除いて, 全体的にX染色体特異バンドの検出はY染色体特異バンドの検出に比べて, 加熱による影響を受けにくかった。

ABO式血液型の遺伝子型検査については, 血液試料から抽出したDNAを対象とした場合, 100℃加熱では12時間, 150℃加熱では1時間, 200℃加熱では30分間まで遺伝子型が検出された。

III. ホルマリン固定試料の検査

ホルマリン固定時間が長くなるにつれてDNAは低分子化し, 1年以上固定したものは高分子DNA断片を認めず, DNAのほとんどが200bp以下の低分子断片になっていた。しかしながら, この低分子化したDNAを使用して性別判定を行ったところ, 0.5年, 1~10年および15年間固定した脳, 肝臓, 肺および脾臓のいずれからも正確に判定しえた。一方, ABO式血液型の遺伝子型は固定3年間以下の試料からは判定可能であり, 4と5年の試料からはわずかに増幅が認められたが, 6年以上固定した試料からは判定不能であった。

IV. パラフィン包埋試料の検査

15年を経過した組織を除き, 0.5年, 1, 5および10年経過したパラフィン包埋試料にはいずれも少量の比較的長いDNA断片が残されていた。抽出DNAをPCRで増幅した結果, 15年間保存した脳, 肝臓, 肺および脾臓のいずれからも正しい性別判定が可能であったが, 一方, ABO式血液型の遺伝子型は3年間保存までの試料でのみ判定しえた。

V. 指紋に対する検査

性別判定の場合では, 一個指紋の全部(約2.0×2.0cm), 1/2(約1.0×2.0cm)および1/4(約0.5×2.0cm)を拭き採り, これを一回分の検査試料としてPCR法を用いて検査すると, いずれ

の試料でも, 男性ではXとYのバンド, 女性ではXのバンドのみが認められた。スライドガラス上の指紋をアルミニウム粉末で検出して, 形態を観察した後, 前述のように一個の指紋の全部, 1/2または1/4を拭きとり, PCR法でDNAを増幅した結果, いずれの場合でも男性ではXとY, 女性ではXのバンドが特異的に検出された(図3)。

ABO式血液型の遺伝子型判定の場合では, 一個指紋を一回分の試料として検査したところ, 全試料について, プライマー1f, 1rの産物からは96bpのDNA断片の増幅が, またプライマー3f, 3rの産物からは181bpのDNA断片の増幅が確認された。プライマー1f, 1rの産物を制限酵素Kpn-1により切断処理すると, 遺伝子型がAO型, BO型の指紋由来のDNA増幅産物では96bpと69bpの2本のバンドが確認されたが, OO型, BB型とAB型の指紋由来のDNA増幅産物でも96bpと69bpの2本のバンドが認められた。プライマー3f, 3rの産物を制限酵素Msp-1により切断処理すると, 遺伝子型がAB型, BO型の指紋由来のDNA増幅産物では159bpと140bpの2本のバンドが確認されたが, OO型, AA型, AO型の指紋由来のDNA増幅産物でも159bpと140bpの2本のバンドが認

Table 8. Sex determination on human specimens by PCR at 200℃

Organ tissue	Primer	Sex determination				
		Heating time (hr)				
		0.25	0.5	1	2	3
Brain	X	+	+	+/-	-	-
	Y	+	+	-	-	-
Skin	X	+	+	+	+	+/-
	Y	+	+	+	+	+/-
Muscle	X	+	+	+	-	-
	Y	+	+	-	-	-
Blood	X	+	+	+	+	+/-
	Y	+	+	+	+	-

+, correctly detected; -, not detected; +/-, a constant result was not obtained.

Table 7. Sex determination on human specimens by PCR at 150℃

Organ tissue	Primer	Sex determination				
		Heating time (hr)				
		1	2	3	4	5
Brain	X	+	+	-	-	-
	Y	+	+	-	-	-
Skin	X	+	+	+	+	-
	Y	+	+	+	+	-
Muscle	X	+	+	+	+/-	-
	Y	+	+	+	-	-
Blood	X	+	+	+	+/-	-
	Y	+	+	+	-	-

+, correctly detected; -, not detected; +/-, a constant result was not obtained.

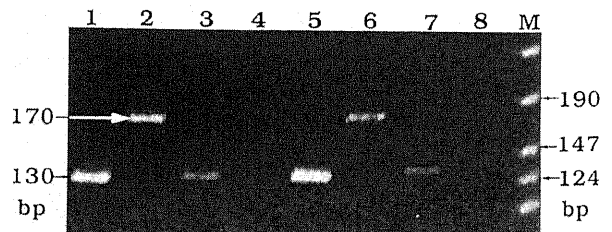


Fig. 3. The results of sex determination from fingerprints. In the photograph, the odd lanes are PCR products amplified using X₁ and X₂ primers, and even lanes are PCR products amplified using Y₁₁ and Y₂₂ primers. Lanes 1 and 2, amplification using the 1/2 of one fingerprint from male; lanes 3 and 4, amplification using the 1/2 of one fingerprint from female; lanes 5 and 6, amplification using the 1/4 of one fingerprint from male; lanes 7 and 8, amplification using the 1/4 of one fingerprint from female; lane M, DNA molecular size marker; bp, base pairs.

Table 9. Sex determination and ABO blood grouping on the specimens from medico-legal autopsy cases by PCR

Case profile	Sex*	Sample tested	Determination by PCR		Phenotype by Ab. method
			Sex	ABO-genotype	
Skeletonized	Male	Bone marrow	Male	AB	AB
Skeletonized	Male	Bone marrow	Male	AO	A
Skeletonized	Male	Bone marrow	Male	BO	B
Skeletonized	Male	Bone marrow	Male	AO	A
Skeletonized	Male	Bone marrow	Male	OO	O
Skeletonized	Male	Bone marrow	Male	AO	A
Burned	Male	Liver	Male	BO	B
Burned	Male	Liver	Male	AB	AB
Mummified	Male	Hair, Skin	Male	BO	B
Right foot	Female	Bone marrow	Female	AO	A

* Sex was determined by external appearance; Ab., absorption-elution test.

Table 10. Effect of BSA on PCR amplification in hair samples of four mummies

Mummy number	PCR amplification					
	Amount of BSA ($\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ r.m.)					
	0	10	20	50	100	200
1	—	—	+	+	+	—
2	+	+	+	+	—	—
5	+	+	+	+	+	—
6	+	+	+	+	+	—

+, amplified; —, not amplified; r.m., PCR reaction mixture.

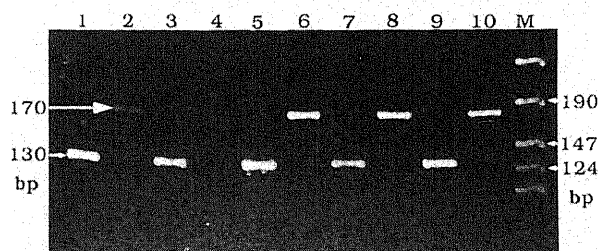
Fig. 4. The results of sex determination from the skin specimens for three mummies whose sexes have not been judged only from their external appearance. In the photograph, the odd lanes are PCR products amplified using X_1 and X_2 primers, and even lanes are PCR products amplified using Y_{11} and Y_{22} primers. Lanes 1 and 2, control male DNA; lanes 3 and 4, control female DNA; lanes 5 and 6, No. 7 mummy; lanes 7 and 8, mummy No. 8; lanes 9 and 10, mummy No. 9; lane M, DNA molecular size marker; bp, base pairs.

Table 11. Sex determination on nine mummies by PCR

Mummy number	External appearance	Sex determination			
		Sample			
		Hair	Muscle	Skin	Bone
1	M	M	M	M	N.S.
2	M	M	M	M	N.S.
3	M	M	M	M	N.S.
4	F	F	F	N.S.	N.S.
5	F	F	F	F	N.S.
6	(F)	M*	M*	N.S.	M*
7	U	M	N.S.	M	N.S.
8	U	M	M	M	N.S.
9	U**	N.S.	N.S.	M	M

*, inconsistent with the sex by external appearance; **, child mummy; N.S., no sample; M, male; F, female; U, unknown.

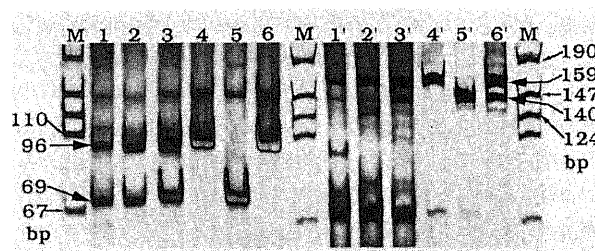


Fig. 5. The electrophoresis patterns of digested DNA amplified by PCR for ABO genotyping from the skin specimens for mummies, and the restriction enzyme Kpn-I and Msp-I were used for digesting the amplified DNA. In the photograph, lanes 1 to 6 are PCR products amplified using 1f and 1r primers, followed by the digestion with Kpn-I, and lanes 1' to 6' are PCR products amplified using 3f and 3r primers, followed by the digestion with Msp-I. Lanes 1 and 1', mummy No. 1; lanes 2 and 2', mummy No. 5; lanes 3 and 3', mummy No. 9; lanes 4 and 4', BB genotype control; lanes 5 and 5', OO genotype control; lanes 6 and 6', AB genotype control; lane M, DNA molecular size marker; bp, base pairs.

められた。したがって、本実験条件では、PCR 法を用いた指紋からの ABO 式血液型の遺伝子型判定はできなかった。

VI. 高度の死後変化や死体損壊を伴う剖検試料

表 9 に示したように、10 例の剖検試料のうち男性は 9 例、女性 1 例と判定され、全例、身元判明後の該当者の性別と一致した。また、ABO 式血液型については、PCR 法により判定した全ての遺伝子型が毛髪または骨を試料とした分離法で得られ

た表現型と矛盾しなかった。

VII. ミイラの検査

1. 抽出 DNA の性状と PCR 法による増幅

ミイラの毛髪、骨格筋、皮膚および骨からの DNA 抽出液は肉眼上、褐色ないしは黒色に着色していた。この DNA 抽出液を PCR 反応液に直接加えて増幅反応を行った場合、DNA の増幅は認められなかった。この着色した DNA 抽出液をスピンカ

Table 12. ABO blood genotyping on nine mummies by PCR

Mummy number	Sex determined by PCR	ABO blood genotyping				Phenotype by Ab. method***
		Skin	Muscle	Hair	Bone	
1	M	BO	BO	BO	BO	B
2	M	BO	BO	BO	N.S.	B
3	M	N.D.	N.D.	BO	N.S.	B
4	F	BO	BO	BO	BO	B
5	F	BO	N.D.	BO	BO	B
6	M*	N.S.	N.D.	BO	BO	B
7	M**	BO	N.S.	BO	N.S.	B
8	M**	BO	BO	BO	BO	B
9	M**	BO	N.S.	N.S.	BO	N.S.

*, The sex determination was inconsistent with the sex by external appearance; **, The sex can not be estimated by external appearance; ***, absorption-elution test; N.D., ABO blood genotype was not determined; N.S., no sample.

Table 13. Amplification results of primate DNA using human sex- or ABO blood- specific primers by PCR

Vernacular name	Sex*	DNA fragment amplified		DNA fragment amplified*** (base pair)			
				1f+1r**		3f+3r**	
		X	Y	Kpn-1	Alu-1	Msp-1	Mva-1
Pongid							
Hominidae							
Chimpanzee	♂	+	+	96	181	159, 22	82, 58, 41
Hylobatidae	♀	+	+	96	181	159, 22	82, 58, 41
White-hand gibbon	♂	+	+	96, 69	140, 41	159, 22	123, 58
	♀	+	+	96, 69	140, 41	159, 22	123, 58
Catarrhini							
Hamadryas baboon	♂	+	+	96, 69	181	159, 22	123, 58
	♀	+	+	96, 69	181	159, 22	123, 58
Japanese monkey	♂	+	+	96, 69	181	159, 22	123, 58
	♀	+	+	96, 69	181	159, 22	123, 58
Crab-eating monkey	♂	+	+	96, 69	181	159, 22	123, 58
	♀	+	+	96, 69	181	159, 22	123, 58
Rhesus monkey	♂	+	—	96, 69	181	159, 22	123, 58
	♀	—	—	96, 69	181	159, 22	123, 58
Green monkey (1)	U	—	—	96, 69	181	159, 22	73, 58, 50
	(2)	U	—	96, 69	181	159, 22	73, 58, 50
	(3)	U	—	96, 69	181	159, 22	73, 58, 50
Platyrrhini							
Tufted capuchin monkey	♂	—	—	96, 69	181	159, 22	123, 58
	♀	—	—	96, 69	181	159, 22	123, 58
Cotton-headed tamarin	♂	—	—	96, 69	181	159, 22	123, 58
Prosimiae							
Grand galago	U	—	—	96, 69	181	159, 22	123, 58
Common tupaia	♀	—	—	96, 69	181	159, 22	123, 58

*, The sex was determined by external appearance; **, primers and restriction enzymes for ABO genotyping of human (Ref. Table 3); ***, length of DNA fragment of amplification production after digested by restriction; U, unknown; +, Specific amplification was obtained; —, Specific amplification was not obtained.

ラムに通して、不純物を除去したところ、カラム中のバイオゲル P₆₆ は褐色ないし黒色に変化し、カラムを通過した DNA 抽出液は無色ないし極く薄い褐色になった。この DNA 溶液を増幅したところ、大部分の試料からは目的とする DNA 断片が増幅された。

しかしながら、スピナラムで精製した DNA 溶液でも目的とする DNA 断片が増幅されない例 (ミイラ No. 1 の毛髪試料) があった。そこで、DNA 溶液中の不純物 (PCR 反応を阻止する因子) の作用を抑えるため、PCR 反応液中に BSA を加えて検討した。表10に示したように、50 μ l の反応液に BSA を20あるいは 50 μ g を加えると、いずれも目的とする DNA 断片が増幅された。

2. ミイラの性別判定

各ミイラの性別判定の結果を表11に示した。9体のうち性別が外表上の形態学的特徴により推定された6体において、No. 1~5 (男性3体と女性2体) については DNA による判定結果と外表上の推定が一致した。しかし、No. 6 は外表上女性と推定されたが、毛髪、骨格筋や骨から抽出された DNA を用いた検査結果では、男性特異的なバンドが検出され、男性と判定した。一方、性別が外表からは推定できなかった3体のミイラは、いずれも各試料とも X 染色体特異的なバンドと Y 染色体特異的なバンドの両方が検出され、3体とも男性と判定した (図4)。

3. ミイラの ABO 式血液型の遺伝子型検査

9体のミイラについて、各々の毛髪、骨格筋、皮膚と骨試料を用いて検査した。プライマー 1f, 1r を用いて増幅した結果、全試料で 96bp の DNA 断片の増幅が確認された。プライマー 3f, 3r の産物では、全試料で 181bp の DNA 断片の増幅が認められた。プライマー 1f, 1r の産物を Kpn-1 により切断すると、9体のミイラ由来のすべての DNA 増幅産物で 96bp と 69bp の2本のバンドが検出された。プライマー 3f, 3r の産物を Msp-1 により切断すると、9体すべての増幅産物で 159bp と 140bp の2本のバンドが検出された (図5)。このことから、9

体のミイラの ABO 式血液型の遺伝子型は全例 BO 型であると判定した。また9体のミイラの試料では、全例、プライマー 1f, GA17 の産物を Kpn-1 で切断すると 110bp と 28bp、プライマー GA07, GA12 の産物を Mva-1 で切断すると、84bp, 45bp, 40bp と 39bp のバンドが認められ、同じく BO 型であると判定した。また9体のうち、毛髪試料を採取しえた8体のミイラについて、解離法で ABO 式血液型の表現型を検査したところ、いずれも B 型であり、遺伝子型と矛盾しなかった (表12)。

VII. 霊長類動物の検査結果 (表13)

チンパンジーからニホンザルまでの進化程度の比較的高い動物の DNA 試料において、性別特異的な DNA 断片が増幅されたものの、雌雄の別に関係なく、プライマー X₁, X₂ による 130bp のバンドと、プライマー Y₁₁, Y₂₂ による 170bp のバンドの両者の増幅が認められたため、性別判定はできなかった。カンクイザル以下の霊長類では、前述の性別判定用プライマーに特異的な DNA 断片は増幅されなかった。

一方、11種計20頭の全動物では、プライマー 1f, 1r とプライマー 3f, 3r の産物である ABO 式血液型に特異的な DNA 断片が増幅された。プライマー 1f, 1r の産物を Kpn-1 で切断すると、2頭のチンパンジーとも 96bp の1本のバンドが、他の霊長類では 96bp と 69bp の2本のバンドが検出された。プライマー 3f, 3r の産物を Msp-1 で切断すると、いずれの霊長類でも 159bp と 22bp の2本のバンドが検出され、Alu-1 で切断すると2頭のシロテテナガザルとも 140bp のバンド、チンパンジーと他の霊長類では 181bp が検出された。また、プライマー 3f, 3r の産物を Mva-1 で切断すると、2頭のチンパンジーとも 82bp, 58bp と 41bp の3本のバンドが、3頭のミドリザルでは 73bp, 58bp と 50bp の3本のバンドが認められ、ヒトと他の動物では 123bp と 58bp の2本のバンドが検出された (図6)。したがって、DNA 断片の切断パターンのみから言えば、試料とした2頭のチンパンジーの ABO 式血液型の遺伝子型はヒトの AA 型に類似し、2頭のシロテテナガザルの ABO 式血液型の遺伝子型はヒトの AO 型に類似していた。また、他の霊長類については判定不能であった。

考 察

性別判定は法医学、考古学、人類学などにおける重要な検討事項の一つになっている。すなわち、法医学においては個人識別の中で重要な役割を果たしており、考古学では発掘したヒト身体部分の性別判定が研究の端緒や問題解決の鍵になる場合が多い。さらに人類学においても、研究試料の性別が不明の場合には、人類の起源・進化との関連で試料の持つ意味を十分には判断できない。このような理由から各種の性別判定法¹⁷⁾¹⁸⁾が開発されてきたが、特に PCR 法に基づく性別判定法は極めて微量な試料も検査可能とし、1989年に報告されて¹⁹⁾以来、盛んに各種試料への応用が試みられている^{19)~22)}。

さらに最近、アメロゲンと呼ばれる遺伝子が発見され、性別判定に応用されてきている^{23)~25)}。アメロゲン遺伝子は X 染色体と Y 染色体の両方に存在する遺伝子で、Y 染色体上のは X 染色体上のそれよりも短く、PCR 法により長い X 染色体由来の DNA 断片と短い Y 染色体由来の DNA 断片を同時に増幅することができる。この方法は一組のプライマーを使用することで男女の別なく、X 染色体上の特異的部位があたかも内部標準のように増幅され、さらに男性試料ではこれ以外に Y 染色

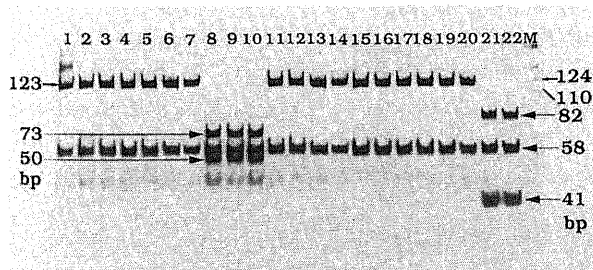


Fig. 6. The electrophoresis patterns of the PCR amplified products of primate DNA using human specific primer 3f, 3r after the digestion with Mva-1. The Chimpanzee and Green monkey showed different patterns from those of human and other primates. Lanes 1 and 2, Human; lane 3, Common tupaia; lane 4, Grand galago; lane 5, Cotton-headed tamarin; lanes 6 and 7, Tufted capuchin monkey; lanes 8, 9 and 10, Green monkey; lanes 11 and 12, Rhesus monkey; lanes 13 and 14, Crab-eating monkey; lanes 15 and 16, Japanese monkey; lanes 17 and 18, Hamadryas baboon; lanes 19 and 20, White-hand gibbon; lanes 21 and 22, Chimpanzee; lane M, DNA molecular size marker; bp, base pairs.

体の特異的部位も増幅されるもので、これを用いることにより性別判定の信頼性を一層向上させることができる。

本研究で使用した方法は、Y染色体に特異的な遺伝子座位DYZ3とX染色体に特異的な遺伝子座位を増幅するものである。DYZ3はY染色体の原動体部分にあり、約100コピーの反復配列が集まって1つのファミリーを形成しているもので、X染色体の特異的部位も約5000コピーの反復配列が1つのファミリーを形成している¹⁴⁾。一般に複数個存在する反復配列を増幅することは、アメロゲニンのような単一配列の遺伝子部位に比べて増幅しやすく、低分子化したDNAの増幅にも適用可能と思われる。また、Xのバンドが男女とも常に検出されるため、実験操作の拙劣さのために対象とするDNAが失われてしまうなどの手技上の問題や、PCR反応液中の阻止因子の存在によって増幅反応が阻害されるなどの問題が、このXのバンドの存在によって解消される。すなわち、XとYの両バンドが存在するならば男性、Xのみならば女性、両方とも認められなければ実験操作上の問題かDNA自体の問題ということになり、単にYの有無だけに基いて判定する方法に比べて信頼度が向上する。特に法医学領域では、試料中のDNAの存在そのものが確実でない場合が少なくないので、この反復配列の部位を標的とする方法は法医学の各種試料の検索に有用と考える⁷⁾。

一方、ABO式血液型は遺伝様式が単純で型物質が安定し、しかも体液や組織中にも広く分布しているため、医学や人類学などにおいて幅広く応用されており、血液型物質の構成や生物系統での進化、抗原物質の検出方法などについて数多くの報告がなされている^{20)~28)}。しかし、ABO式血液型糖鎖抗原を形成する糖転移酵素[$\alpha 1 \rightarrow 3$ Nアセチルガラクトサミン転移酵素(A転移酵素)と $\alpha 1 \rightarrow 3$ ガラクトース転移酵素(B転移酵素)]の精製・単一化が容易でないため、ABO式血液型の遺伝子レベルでの研究は、その重要性にもかかわらずこれまで比較的、困難であった。

1990年、Clausenら²⁹⁾およびYamamotoら³⁰⁾³¹⁾は糖鎖抗原を形成する糖転移酵素のcDNAをクローニングし、その塩基配列を明らかにした。それにより、A転移酵素をコードする遺伝子(A遺伝子)のcDNAの塩基配列がB転移酵素をコードする遺伝子(B遺伝子)のcDNAの塩基配列と7個所の塩基で相違し、ポリペプチドのアミノ酸残基第176、235、266と268番目に相違が生じていることが解明された。また、O遺伝子のcDNAはA遺伝子のcDNAとはほぼ同一の構造を有するものの、第258番目の1塩基が欠損しているためフレームシフト変異をきたし、糖鎖抗原を形成する糖転移酵素の産生ができなくなっていることが明らかになった。

この結果に基づき、Leeら³²⁾はPCR法を用いてA遺伝子cDNAの第258番塩基を挟んだ領域の遺伝子を増幅し、その産物をKpn-Iで切断してO遺伝子の有無を判断した。また、A遺伝子cDNAの塩基とB遺伝子のそれは第700番目の塩基が互いに異なり(A遺伝子はグアニン、B遺伝子はアデニン)、この第700番目の塩基を挟む領域の遺伝子を増幅し、Alu-Iによる切断の有無でB遺伝子の存在を判断した。これを機に、以後ABO式血液型の遺伝子型に関する研究が報告されてきている¹⁵⁾³³⁾³⁴⁾。

しかしながら、ABO式血液型遺伝子は単一コピーであるため、PCR法で増幅する場合、一個の細胞内にはテンプレートが一つしか存在しないことになり、すでに低分子化してしまったDNAをPCR法で増幅するには、高効率の増幅を可能にするプ

ライマーと高感度の検出方法が要求される。DNAが低分子化した場合、PCR法では短い断片の方が増幅しやすいとの報告があるため³⁵⁾、筆者はABO式血液型の遺伝子の検査には佐々木ら¹⁵⁾が報告した96bpと181bpを増幅するプライマーを使用し、これに加えてエチジウムブロマイド染色より感度の高い銀染色³⁶⁾を用いる方法を採用した。

筆者は低分子化したDNAの試料を実験的に作成し、試料の変化によるPCR増幅への影響を検討したが、温度および湿度の影響については、乾燥環境に置かれた組織は温度の影響を受けにくい、湿潤環境に保存した同様の組織は温度が高くなるに従い、PCRによる増幅可能な期間が短くなった。また、加熱試料では加えた熱の温度が高くなるにつれDNAが増幅可能な期間も短くなった。また組織別にみると、検索した4種類の組織では、皮膚のDNAがより長く保存されたと考えられた。一方、ホルマリン固定の試料については、安積ら²⁹⁾は中性緩衝10%ホルマリン溶液で剖検試料を3カ月間固定し、未包埋試料、あるいはパラフィン包埋試料を用いて、室温で2年間保存した試料から正しい性別判定を行った。また高田ら²⁰⁾は筆者と異なるプライマーを用い、10%ホルマリン溶液で10年間固定した試料からABO式血液型の遺伝子型が判定可能であると報告しているが、筆者の検討では、長期間のホルマリンの影響でDNAはほとんど低分子化したものの、性別判定については何ら支障はなく、15年間固定したものについても正しく判定できた。しかしながら、ABO式血液型の遺伝子型については固定が3年以内の試料のみにおいて判定可能であり、4ないし5年間固定のものは試料によって判定可能な場合もあったが、6年以上の固定では判定不可能であった。これは筆者が用いたホルマリン固定液が非緩衝であったため、あるいはプライマーが高田らと異なっていたためと考えられる。また、ホルマリン固定後パラフィン包埋した試料では、15年間常温保存の試料についても性別判定が可能であったが、ABO式血液型の遺伝子型判定は3年間保存の試料まで正しく判定された。

山本ら³⁷⁾はスライドガラス上の1個の指紋を用いた性別判定を報告しているが、筆者は指紋の1/2のみを用いて性別判定が可能であることを示し、指紋から性別判定以外に他の個人識別のための検査も同時に行う可能性を示した。さらに、アルミニウム粉末で検出した指紋からも性別判定が可能であり、このことから、従来どおり指紋の形態を判定し、引き続いて指紋の性別判定を行うことにより、通常の鑑識業務に支障を来すことなく、しかも犯罪捜査上重要な手がかりを提供する可能性が示され、指紋を用いた個人識別の信頼性もより向上するものと考えられる。

佐々木ら¹⁵⁾はPCR法で指紋についてABO式血液型の遺伝子型が判定可能であると報告している。筆者は彼らと同一の方法で繰り返し追試を試みたものの、OO型ヒトの指紋をAO型やBO型に、またAB型ヒトの指紋をAO型やBO型に誤判定する例を認めた。これは指紋中のDNAが極く微量で、しかもABO式血液型遺伝子は単一配列の遺伝子である³¹⁾ので、PCRのテンプレートとして使用できるDNAの絶対量が少ないために基づく誤判定と考えられる。すなわちPCR法でDNAを増幅するとき、平均 2×10^{-4} の頻度でミスマッチが起こる³⁸⁾ので、テンプレートDNA量が少ないとミスマッチによる産物量が相対的に多くなり、誤って判定されるようになるものと考えられる。

続いて以上の基本的検討に基づき、実際の剖検試料への応用について検討した。対象とした10例中、腐敗のため死体が完全ないし高度に白骨化したのは6例あり、これらの死体では軟組織がすでに消失あるいは高度に軟化・泥状化しているため、一般の臓器由来の DNA についての検査は不可能であるものの、腐敗の進み方の遅い骨髄を採取し性別と ABO 式血液型の遺伝子型を検査したところ、いずれの個体についても正確に判定しえた。このことは、高度腐敗の死体であっても、骨髄のような相対的に密閉保存されて腐敗の影響が弱い組織を用いることで、DNA 分析による検査が可能であることを示している。また2例の高度焼損死体では、肝組織の表層組織(炭化部分)から得た DNA は増幅されず、中間層(変色、熱凝固部分)と深層(肉眼的には正常な部分)から得た DNA は PCR 法で増幅された。Tsuiji ら³⁹⁾によれば、表層の推定温度は215℃、中層は135℃、深層は100℃であり、この結果は、実験的に作成した加熱試料を対象とした DNA 増幅結果と一致している。

さらに、筆者は1300年以上を経過したミイラの性別と ABO 式血液型の遺伝子型の判定を試みた。ミイラ試料から抽出した DNA は不純物を含み、常法では PCR 反応は阻止されてしまった。このような場合、Pääbo ら⁴⁰⁾は高濃度の Taq DNA ポリメラーゼ(12.5単位)を用いたが、非特異的な産物が多量に増幅されるという欠点が指摘されている⁴⁰⁾。このため、筆者はスピнкаラムを用いて DNA を精製したが、ほとんどの DNA 溶液から目的とする DNA 断片が特異的に増幅されていることより、古い試料から抽出した DNA 溶液の精製には、スピнкаラムは操作が簡単で有効な一方法であると思われる。

一方、スピнкаラムで精製してもミイラ No. 1 の毛髪試料由来の DNA では増幅反応が起こらなかったが、この場合、反応液に BSA を加えることで DNA が増幅された。ただし、BSA の量が多すぎると増幅反応が阻止される場合もあるので、各サンプルについて加える BSA の量を適正化する必要があると考えられる。筆者の実験では、50μl の PCR 反応液に20あるいは 50μg の BSA を加えると良い結果が得られた。

ミイラの性別判定では、外表上の形態学的特徴により性別が推定された6体(男性3体と女性3体)のうち、1体(No. 6)の PCR 法による検討結果は外表上の推定結果とは一致しなかった。この理由として、この6体のミイラ試料についての外表からの性別判定自体が、元来、十分確かなものではなく、特にこの例については外表所見を記載した考古学者自身も確かな判定とは考えていなかったもので、PCR 法による性別判定の方が正しく、信頼に足るものとする。すなわち、No. 6 については、毛髪、骨格筋、骨の3つの試料とも PCR 法で男性と判定されたことから、女性とした外表からの判断が誤っているものと思われる。

ミイラの ABO 式血液型の遺伝子型判定では、信頼性をより高めるために258番目の塩基を含む部位の増幅用として、二種類の異なるプライマーペアを用いた。制限酵素についても、258番目の塩基を含む部位の増幅産物には Kpn-I と Bstp-I、700番目の塩基を含む部位の増幅産物には Alu-I と Msp-I、すなわち、同一 PCR 産物に対して二種類の切断部位の異なる制限酵素を使用して検査したところ、いずれも互いに矛盾する結果は得られず、同一の結論を得た。また、同一個体の毛髪を検体とする解離法の結果ともすべて一致しているので、ミイラについての ABO 式血液型の遺伝子型判定結果は十分に信頼でき

るものと思われる。

最後に、法医学上、人獣鑑別は重要な位置を占めるが、従来の方法を用いる限り、生物進化の中でヒトに最も近縁である類人猿、特にチンパンジーはヒトとの鑑別が困難であった⁴¹⁾⁴²⁾。筆者はヒトの性染色体及び ABO 式血液型抗原に特異的なプライマーを用いて各種霊長類 DNA の増幅を試みたが、類人猿ではいずれでもプライマーに特異的な部位の DNA が増幅された(雌性の類人猿でも Y 染色体特異的なバンドが認められた)ものの、チンパンジーとヒトでは、血液型のプライマー 3f と 3r の増幅産物の Mva-I による切断パターンが異なっていた。このパターンはチンパンジーの ABO 式血液型抗原を規定する糖転移酵素遺伝子 cDNA の塩基配列⁴³⁾⁴⁴⁾から予想されるパターンと矛盾しなかったため、この結果に基づく遺伝子レベルでのヒトとチンパンジーの鑑別の可能性を示唆している。

結 論

1. DNA 分析によって性別判定を行う場合は、湿潤環境に比べて乾燥環境に置かれた試料の方がより適していた。ただし、湿潤環境でも低温環境(4℃)に保存された試料は、4週間まで十分に性別判定が可能であった。

2. 100℃で12時間、150℃で2時間、200℃で30分間の条件下で加熱された試料については、PCR 法によるヒト性別判定に用いる DNA 領域の増幅が可能であった。

3. 長期間ホルマリン固定やホルマリン固定後パラフィン包埋する操作により DNA は低分子化したため、DNA 分析による性別判定については両者とも15年まで、ABO 式血液型の遺伝子型判定は両者とも3年まで可能であった。

4. DNA 分析の方法を用いて、法医学実務上の試料、たとえば白骨化死体や高度焼損死体などにおけるすでに低分子化した試料や極く微量の試料についても、性別と ABO 式血液型の遺伝子型が確実に判定された。

5. スピнкаラムは古い試料から抽出した DNA 溶液中に含まれる不純物を除去することに有用であり、多量のメラニンを含む毛髪と皮膚試料だけではなく、メラニンをほとんど含んでいない骨格筋と骨試料より抽出した DNA 溶液中の不純物を除去する際にも有効であった。また、BSA は DNA 溶液中の PCR 阻止因子の作用を抑える働きがあるが、使用時に各々の試料に対する BSA の至適濃度を探索が必要であった。

6. PCR 法を使用することにより、1300年以上を経過した古いミイラ試料についても、性別判定と ABO 式血液型の遺伝子型判定に成功した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を承りました恩師大島 徹教授に深甚なる謝意を表します。また金沢での研究の機会を賜りました金沢大学名誉教授、科学警察研究所所長永野耐造先生に深謝致します。また、御指導、御助言を頂きました金沢大学医学部法医学講座の高安達典助教授、近藤稔和講師並びに西上 潤助手に深く感謝致します。最後に本実験を遂行するにあたり、御協力賜りました南野友義文部技官に感謝の意を表します。

なお、貴重なミイラ試料を提供していただいた中華人民共和国・大連医科大学解剖学教室主任孫 爾玉教授と中国遼寧省旅順博物館の方々、並びに貴重な霊長類動物試料を提供していただいた京都大学霊長類研究所の竹中 修教授に深く感謝致します。

本研究は財団法人日中医学協会からの1995年度調査研究助成(研究代表者:大島 徹)を受けた。ここに記して謝意を表します。

本論文の要旨の一部は第78次日本法医学会総会(群馬, 1994), 第3回DNA多型研究会集會(東京, 1994), 第79次日本法医学会総会(山形, 1995)並びに16th International Congress of International Society for Forensic Haemogenetics(スペイン, 1995)において発表された。

文 献

- 1) Landsteiner, K.: Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zentralbl. Bakteriol.*, 27, 357-362 (1900).
- 2) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354 (1985).
- 3) 宝来 聡, 村山久美子: 考古学および古生物学への応用. *実験医学*, 8, 1206-1209 (1990).
- 4) 植田信太郎: 人類遺伝学とマイクロサテライト. *DNA 多型*, 2, 20-22 (1994).
- 5) Young, D., Lathigra, R., Hendrix, R., Sweetser, D. & Young, R. A.: Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 4267-4270 (1988).
- 6) Jeffreys, A. J., Allen, M. J., Hagelberg, E. & Sonnberg, A.: Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Sci. Int.*, 56, 65-76 (1992).
- 7) 石津日出雄: 法医学生物試料からの性別判定の研究. *日法医誌*, 47, 423-434 (1993).
- 8) 山田光子, 兼 正晃, 山本好男, 福永龍繁, 西 克治: DNA 試料を用いての ABO 式血液型判定. *医学のあゆみ*, 161, 997-998 (1992).
- 9) 林 子清, 近藤稔和, 高安達典, 大辻雅彦, 西上 潤, 大島 徹: PCR 法を用いた指紋に関する法医学鑑識学的研究. *日法医誌*, 48 (補冊号), 238 (1994).
- 10) 辻 彰子, 小島原将直, 武市早苗, 池田典昭: 死後変化に伴った種々条件下の死体における DNA 分析. *DNA 多型*, 2, 212-215 (1994).
- 11) 永野耐造, 四宮孝昭: 血痕, 体液, 体液斑, 組織片の血液型検査. 現代の法医学 (四方一郎, 永野耐造編), 第2版, 342-348 頁, 金原出版, 東京, 1988.
- 12) 坂井活子, 吉田日南子, 向山明孝: 法科学的試料からの精製法. ヒト DNA Polymorphism (原田勝二編), 第1版, 39-59 頁, 東洋書店, 東京, 1991.
- 13) 吉井富夫, 田村一雄, 谷口高広, 秋山勝則, 石山豊夫: 水溶性メラニンの PCR 阻害活性とその簡便除去法. *日法医誌*, 47, 323-329 (1993).
- 14) Witt, M. & Erickson, R. P.: A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction. *Hum. Genet.*, 82, 271-274 (1989).
- 15) 佐々木雅弘, 福島 亨, 塩野 寛: PCR-RFLP 法を用いた指紋からの ABO 式血液型判定. *日法医誌*, 48, 428-432 (1994).
- 16) Goldman, D. & Merrill, C. R.: Silver staining of DNA in polyacrylamide gels: Linearity and effect of fragment size. *Electrophoresis*, 3, 24-26 (1982).
- 17) Song, H., Lin, Z. & Jia, J.: Sex diagnosis of Chinese skulls using multiple step wise discriminant function analysis. *Forensic Sci. Int.*, 54, 135-140 (1992).
- 18) Nakahori, Y., Tamura, T., Nagafuchi, S., Fujieda, K., Minowada, S., Fukutani, K., Fuse, H., Hayashi, K., Kuroki, Y., Fukushima, Y., Agematsu, K., Kuno, T., Kaneko, S., Yamada, K., Kitagawa, T., Nonomura, M., Fukuda, S., Kusano, M., Onigata, S., Hibi, I. & Nakagome, Y.: Molecular cloning and mapping of 10 new probes on the human Y chromosome. *Genomics*, 9, 765-769 (1991).
- 19) 塩野 寛, 赤根 敦: DNA 分析による法医学試料の性別判定. *最新医学*, 46, 2278-2289 (1991).
- 20) 高田雄三, 向田政博, 小林 賢: PCR 法によるホルマリン固定臓器からの遺伝子型判定の試み. *DNA 多型*, 1, 23-26 (1993).
- 21) 安積順一, 舟山真人, 森田匡彦: PCR 法による熱凝固した血液からの DNA 分析. *DNA 多型*, 2, 216-222 (1994).
- 22) 安積順一, 池田卓也, 穴沢龍治, 森田匡彦: パラフィン包埋組織を用いた性別判定に関する研究. *DNA 多型*, 1, 17-22 (1993).
- 23) Nakahori, Y., Takenaka, O. & Nakagome, Y.: A human X-Y homologous region encodes "amelogenin". *Genomics*, 9, 264-269 (1991).
- 24) Mannucci, A., Sullivan, K. M., Ivanov, P. L. & Gill, P.: Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int. J. Legal Med.*, 106, 190-193 (1994).
- 25) Pfitzinger, H., Ludes, B. & Mangin, P.: Sex determination of forensic samples: co-amplification and simultaneous detection of a Y-specific and an X-specific DNA sequence. *Int. J. Legal Med.*, 105, 213-216 (1993).
- 26) Kohler, G. & Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497 (1975).
- 27) 大島 徹, 高安達典, 前田 均, 永野耐造: 各種霊長類の組織・細胞内 ABO 式および Lewis 式血液型活性に関する免疫組織学的研究. *日法医誌*, 42, 13-20 (1988).
- 28) 林 子清, 大島 徹, 高安達典, 永野耐造, 賈静濤: 免疫組織化学的方法を用いた指紋からの ABO 式血液型判定. *日法医誌*, 47, 98-107 (1993).
- 29) Clausen, H., White, T., Takio, K., Titani, K., Stroud, M., Holmes, E., Karkov, J., Thim, L. & Hakomori, S.: Isolation to homogeneity and partial characterization of a histo-blood group a defined Fucal $\rightarrow$ 2Galal $\rightarrow$ 3-N-acetyl-galactosaminyltransferase from human lung tissue. *J. Biol. Chem.*, 265, 1139-1145 (1990).
- 30) Yamamoto, F., Marken, J., Tsuji, T., White, T., Clausen, H. & Hakomori, S.: Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fucal $\rightarrow$ 2-Galal $\rightarrow$ 3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J. Biol. Chem.*, 265, 1146-1151 (1990).

- 31) Yamamoto, F., Clausen, H., White, T., Marken, J. & Hakomori, S.: Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*, 345, 229-233 (1990).
- 32) Lee, C. I. & Chang, J. G.: ABO genotyping by polymerase chain reaction. *J. Forensic Sci.*, 37, 1269-1275 (1992).
- 33) 橋本良明, 中西祥徳: ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法による ABO 式血液型の遺伝子型判定とその親子鑑定への適用. *日法医誌*, 47, 481-485 (1993).
- 34) Fukumori, Y., Ohnoki, S., Shibata, H., Yamaguchi, H. & Nishimukai, H.: Genotyping of ABO blood groups by PCR and RFLP analysis of 5 nucleotide positions. *Int. J. Legal Med.*, 107, 179-182 (1995).
- 35) Paabo, S., Higuchi, R. G. & Wilson, A. C.: Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.*, 264, 9709-9712 (1989).
- 36) 山崎健一, 今本文男: アガロースゲル内の DNA と RNA の高感度銀染色法. *蛋白質核酸酵素*, 27, 1277 (1982).
- 37) 山本雄二, 守屋文夫, 宮石 智, 石津日出雄: Polymerase chain reaction を用いた指紋の性別判定法. *医学のあゆみ*, 160, 481-482 (1992).
- 38) Krawczak, M., Reiss, J., Schmidtke, J. & Rösler, U.: Polymerase chain reaction: replication errors and reliability of gene diagnosis. *Nucleic Acid Res.*, 17, 2197-2201 (1989).
- 39) Tsuji, T., Tanaka, N. & Nagano, T.: Destruction of dead body by fire. In T. Nagano (ed), *Burned Bodies*, p13-48, Hokkoku Shimbun Inc., Kanazawa, 1991.
- 40) Paabo, S., Gifford J. A. & Wilson, A. C.: Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acid Res.*, 16, 9775-9787 (1988).
- 41) 大島 徹: 顕微鏡下における血液型判定に関する研究. II. 単繊維レベルでの血痕からの人血証明と血液型判定. *十全医会誌*, 95, 7-18 (1986).
- 42) 原 三郎, 井上徳治, 津田亮一, 秋山和子, 福山 武, 梶岐裕志: ヒト赤血球に対する特異抗血清の作製 —人・獣鑑別に関する法医免疫学的研究 (第一報)—. *日法医誌*, 34, 119-124 (1980).
- 43) Kominato, Y., McNeill, P. D., Yamamoto, M., Russell, M., Hakomori, S. & Yamamoto, F.: Animal histo-blood group ABO genes. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 189, 154-164 (1992).
- 44) Martinko, J. M., Vincek, V., Klein, D. & Klein, J.: Primate ABO glycosyltransferases: evidence for trans-species evolution. *Immunogenetics*, 37, 274-278 (1993).

Sex and ABO Blood Group Determination on Medico-Legally Practical Specimens by Polymerase Chain Reaction (PCR) Lin Ziqing, Department of Legal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 104, 622—636 (1995)

Key words forensic serology, DNA analysis, polymerase chain reaction, sex determination, ABO blood grouping

Abstract

Medico-legally practical specimens are generally very small in amount and adversely affected by different physical and/or chemical conditions, thus meaning that the DNA extracted from these specimens is minute and has already become fragmentary to low molecular weight DNA. Therefore, there are not a few cases in which the determination of sex and/or ABO blood group by DNA analysis has become rather difficult. To overcome these problems in forensic practice, the author systematically investigated sex determination and ABO genotyping using the polymerase chain reaction (PCR) method on different forensic specimens. First of all, the effect of such physical conditions as temperature, humidity and heating on PCR was examined with experimentally prepared samples. The samples (brain, skin, skeletal muscle and blood), which had been collected from a male cadaver (postmortem interval: 36 hours) of known ABO type, were experimentally left in dried or humid condition at each constant temperature (4, 22 and 37°C) for 4 weeks, or heated at 100, 150, and 200°C for 48, 5 and 3 hours, respectively, for DNA fragmentation. Moreover, the effect of formalin-fixation and paraffin-embedding on PCR was examined using the extracted DNA from the organ tissue samples (brain, liver, lung and pancreas) fixed with formalin (within 24 hours after death) and also from the paraffin-embedded tissue samples stored at room temperature. Although sex was correctly determined within 4 weeks for each sample under the dried condition, the sex detectable period for each sample under the humid condition became shorter as the temperature rose. On the heated samples at 100°C, sex could be determined using the brain tissue heated for 12 hours, the skin and skeletal muscle for 24 hours, and the blood for 36 hours. As for the samples heated at 150°C, sex could be determined using the brain tissue heated for 2 hours, the skeletal muscle and blood for 3 hours, and the skin for 4 hours. The sex of the heated samples at 200°C was determined even using the brain tissue and skeletal muscle for 0.5 hour, the skin and blood for 2 hours. ABO genotype was correctly determined just using the blood heated for 12 hours at 100°C, 1 hour at 150°C and 0.5 hour at 200°C, respectively. With the organ tissue, both after formalin-fixation and after paraffin-embedding, the sex and ABO genotype could be determined in them even after 15 years and 3

years, respectively. Sex was detectable on 1/4 part (ca. 0.5×2.0 cm) of a single fingerprint experimentally made on a slide glass, although ABO genotyping, however, could not be performed even using a whole single fingerprint. Sex was also correctly detected by PCR after the morphological detection of a finger print with aluminum powder. Based on these fundamental results, the author attempted sex determination and ABO genotyping using PCR in 10 such autopsy cases as skeletonized or severely burned cadavers with the difficulties of sex- and ABO genotype- determination by using conventional methods, and the results were that the sex of each case, using PCR, was consistent with that after personal identification and that none of the ABO genotypes was inconsistent with ABO phenotype by absorption-elution test. In addition, sex determination and ABO genotyping were performed by PCR on 9 mummies of 8 adults and 1 child who had been buried in Hsinchiang Uyghur, China, for more than 1300 years. Since some impurities in the DNA extracted from the mummies' specimens interfered with DNA amplification by PCR, spin-column (Bio-Gel P₆₀) to remove melanin was used for further DNA purification. After this purification of DNA solution, bovine serum albumin (BSA) was added to the PCR reaction mixture to further suppress some inhibitors. Addition of 20-50 μ g BSA to 50 μ l PCR reaction mixture gave the best result for DNA amplification. The investigation under these conditions disclosed that the sex of 5 adult mummies determined by external appearance was consistent with that by PCR and that the other 1 adult mummy having incorrectly appeared to be female was determined to be male according to the definite PCR data. Furthermore, all the other three mummies (2 adults and 1 child), whose sex could not be estimated on the external appearance due to postmortem destruction, were determined to be males according to the PCR results. Furthermore, ABO genotype could be determined as *BO* for all 9 mummies, and these results obtained were well consistent with ABO phenotyping (B) by absorption-elution test using the hair specimens. The results of the present study demonstrate that sex determination and ABO genotyping by PCR are possible using fragmented DNA, being obtained from those specimens that had been adversely affected with such different conditions as heating, formalin-fixation and paraffin-embedding as well as dried or humid condition. And, ABO genotype of anthropologically valuable mummies of more than 1300-year-old could be definitely determined by this PCR method.