

第2節 人骨の同定・DNA分析

(株) 加速器分析研究所
パリノ・サーヴェイ株式会社

1 はじめに

西廻横穴墓群の5号横穴墓から出土した人骨について骨同定を実施し、性別・年齢等可能な限り情報を得ることにした。また、後述するように骨を観察したところ、少なくとも成人と小児の2個体が含まれることが明らかとなったため、親族関係等を調べるためにDNA分析を実施する。

2 試料

試料は、西廻横穴墓群の5号横穴墓の玄室から採取されたNo.238～298、骨片一括(掘削中)玄室、人骨一括玄室、北西部①玄室、骨下玄室の合計65試料である。乾燥状態にあり、中には土塊状のものがある。非常にろくなっているため、水洗は行われていない。DNA分析は、No.245(左上顎第2小白歯:小児)、No.252(左上顎第1小白歯:成人)の2点について実施する。試料の詳細は、結果とともに示す。

3 分析方法

(1) 骨同定

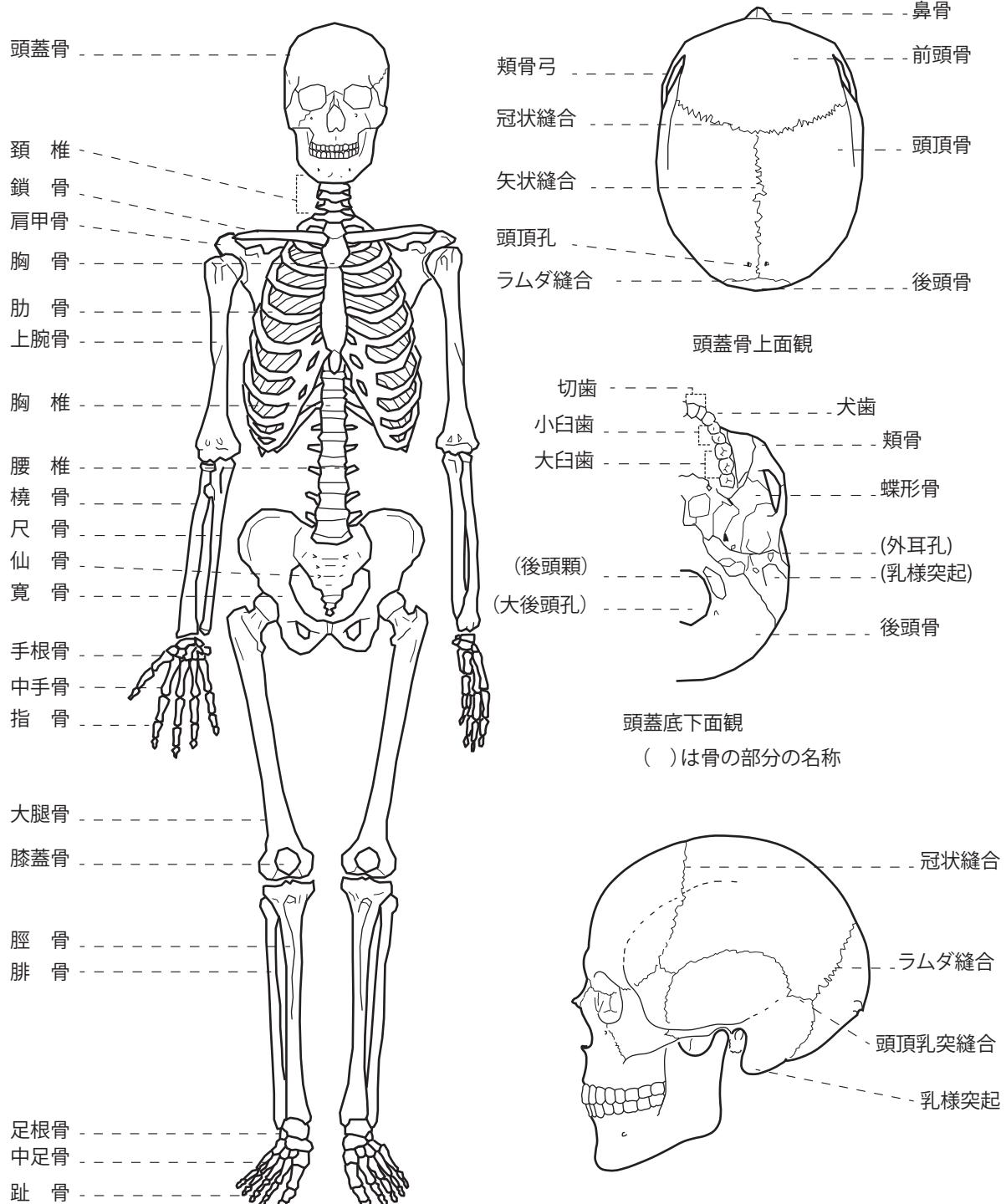
試料は、既に乾燥し、また保存状態は悪く、かなり分解が進んでいる。一部、粘土が固着した骨もみられるが、粘土分を除去すると崩壊する恐れが極めて高い。そこで、歯牙の一部のみクリーニングし、それ以外の骨は、クリーニングや接合等を行わず、そのままの状態で観察する。また、歯牙は、藤田(1949)に従って計測する。人体骨格各部の名称を図147に示す。なお、年齢に関しては、幼児が1～5歳程度、小児が6～15歳程度、成人が16歳程度以上、成年が16～20歳程度、壮年が20～39歳程度、熟年が40～59歳程度、老年が60歳以上を表す。

(2) DNA分析

分析は、①ヒト歯サンプルからのDNA抽出、②DNA抽出物からPCRによってミトコンドリアDNAのcontrol領域(HV1、HV2)を増幅、③増幅されたPCR産物の塩基配列を決定、④塩基配列をミトコンドリアDNAの国際標準配列であるrCRS(revised Cambridge Reference Sequence)配列と比較、⑤歯サンプルの変異した塩基配列の箇所の比較により血縁関係を判定、⑥抽出DNAを基にX染色体、Y染色体遺伝子をPCRで検出し性別を判定の順で行う。具体的な手法は、以下の通りである。

a) 血縁関係

坂平(2007)を参考に試料調製を行い、またプライマーの配列はButler(福島ほか訳:2009)を参照した。また、試薬及び器具は、TEバッファー(pH8.0):10mM Tris-HCl 1mM



手根骨：舟状骨,月状骨,有頭骨,有鉤骨,三角骨,大菱形骨,小菱形骨,豆状骨
 足根骨：距骨,踵骨,舟状骨,立方骨,内側楔状骨,中間楔状骨,外側楔状骨

図 147 人体骨格各部の名称

EDTA、DNA AWAY (MolecularBioProducts 製)、QIAamp DNA Investigator (QIAGEN 社 製)、QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN 社製)、QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN 社製)である。

試料調製として、50ml のチューブに DNA AWAY を適量取り、試料を 2 分間浸けた後、超純水で洗浄する。その後、試料を自然乾燥させた後、紫外線照射を片面につき 30 分間行い、試料をディスクカッター付きの電気ドリルで歯冠部と歯根部に切断して内部からスチールドリル付きの電気ドリルを用いて象牙質及び歯髄を採取する。なお、採取した粉末サンプルは、採取時における DNA のコンタミネーションを極力防止するために DNA AWAY に 2 分間浸けた後、数回超純水で洗浄する。

DNA 抽出は、QIAamp DNA Investigator を用いる。方法は添付プロトコールに従う。

TOYOB0 社製の PCR 用試薬キット『KOD Plus Neo』を用いて表 55 の反応組成と、表 56 のプライマーの組み合わせ、表 57 の PCR プログラムによって PCR を行う。また、2%アガロースゲルを用いて 100V、25 分間電気泳動を行い、増幅した PCR 産物の確認を行う。

PCR 産物の精製は、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社 製) または QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いる。なお、分析手法は製品添付の説明書に従う。精製

表 55 反応組成

試薬	組成量
10 × PCR Buffer	5 μ l (1 ×)
2mM dNTPs	5 μ l (0.2mM)
25mM MgSO ₄	3 μ l (1.5mM)
フォワードプライマー (2.5 μ M each)	6 μ l (0.3 μ M each)
リバースプライマー (2.5 μ M each)	6 μ l (0.3 μ M each)
テンプレート DNA	2 μ l
Taq Polymerase (1U/ μ l)	1 μ l
滅菌超純水	22 μ l
Total	50 μ l

カッコ内は最終反応濃度

表 56 プライマー組み合わせ

プライマーナンバー	プライマーリー配列 (5' → 3')	PCR 産物 (bp)	領域
①	F15989 C C C C A A G C T A A G A T T C T A A T	249	mtDNA
	R16237 T G T G T G A T A G T T G A G G G T T G		HV1
②	F16190 C C C C A T G C T T A C A A G C A A G T	221	mtDNA
	R16410 G A G G A T G G T G G T C A A G G G A C		HV1
③	F34 G G G A G C T C T C C A T G C A T T T G	207	mtDNA
	R240 T A T T A T T A T G T C C T A C A A G C		HV2
④	F151 C T A T T A T T A T C G C A C C T A C	227	mtDNA
	R377 G T G T T A G G G T T C T T T G T T T T		HV2

注 1) mtDNA ; ミトコンドリア DNA

表 57 PCR プログラム

反応名	反応温度、時間
Pre Denature	94°C ,2min.
Denature	98°C ,10sec.
Annealing	48°C ,30sec.
Extension	68°C ,30sec
Deanature,Annealing,Extension の Cycle 数	35or37

済みの PCR 産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定する。

その他、コンタミネーション有無の確認のため、1) 抽出時及び PCR 操作時のコンタミ確認のためネガティブコントロールを設定、2) 分析者の塩基配列も決定し、サンプルの塩基配列と分析者の塩基配列を比較しサンプルの塩基配列が分析者の配列かどうかの確認、のチェック事項を行う。

b) 性別判定

リアルタイム PCR 装置を用いた X 染色体アメロゲニン遺伝子、Y 染色体アメロゲニン遺伝子の検出により性別判定を行う。

抽出した DNA を鋳型として X 染色体アメロゲニン遺伝子、Y 染色体アメロゲニン遺伝子を標的にリアルタイム PCR を行う。リアルタイム PCR 装置として PikoReal Real-Time PCR System (Thermo electron 社製) を用いる。プライマーは表 58 に挙げたものを使用する。リアルタイム PCR 用試薬として THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO 社製) を用いる。反応組成はキットのプロトコールに従う。反応プログラムは表 59 に示したもの用いる。

表 58 プライマー組み合わせ

プライマー	プライマー配列 (5' → 3')	增幅長さ (bp)	增幅遺伝子
AmelX F	T C C C A G A T G T T T C T C A A G T G G	69	X 染色体
AmelX R	A T C A G A G C T T A A A C T G G G A A G		アメロゲニン
AmelY F	C A T C C C A A A T A A A G T G G T T T C	77	Y 染色体
AmelY R	A T C A G A G C T T A A A C T G G G A A G		アメロゲニン

※上記プライマー配列は Amanda Fazi et al (2014) より参照

表 59 リアルタイム PCR プログラム

反応名	反応温度、時間
Pre Denature	95°C, 1min.
Denature	95°C, 15sec.
Extension	60°C, 60sec
Deanature, Extension の Cycle 数	40

4 結果

(1) 骨同定

結果を表 60、図 148 に示す。出土した骨は、保存状態が著しく悪く、ほとんどが破片であり、完全な形質を留めるものはない。そのため、部位を特定できた骨は少ない。

確認できた部位は、左右側頭骨、後頭骨、左右上顎骨、左上顎犬歯、左上顎第 1 小臼歯、左上顎第 2 小臼歯、左上顎第 1 大臼歯、左右下顎第 1 大臼歯、下顎大臼歯、頭蓋骨、大腿骨である。この他、歯牙、頭蓋骨・肋骨・上腕骨・大腿骨・脛骨の可能性がある破片、四肢骨などがみられる。なお、確実にヒトとは判断できなかった骨は、表中でヒト?と表記しているが、これらもヒトに由来すると推定される。なお、歯牙の状況を表 61 にまとめ、表 62 に歯牙計測値を示す。

表 60 骨同定結果

No.	番号	遺構名	種類	部位	左	右	状態	数量	備考
No.238	1695	5号横穴墓	ヒト	下顎大臼歯			破片	1 +	小児
No.239	1696	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	4 +	
No.240	1697	5号横穴墓	ヒト	下顎第1大臼歯	左		破片	1	成人
No.241	1698	5号横穴墓	ヒト	後頭骨			破片	1	小児
No.242	1699	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.243	1700	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨?			破片	1 +	
No.244	1701	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.245	1702	5号横穴墓	ヒト	上顎第2小白歯	左		歯根未形成	1	DNA分析, 小児
No.246	1703	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.247	1704	5号横穴墓	ヒト	脛骨?			破片	1	
No.248	1705	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.249	1706	5号横穴墓	ヒト	頭蓋骨			破片	4 +	土魂状, 小児
No.250	1707	5号横穴墓	ヒト	大腿骨?			破片	1 +	
No.251	1708	5号横穴墓	ヒト	側頭骨	左		錐体部	1	小児
No.252	1709	5号横穴墓	ヒト	上顎骨	左		破片	1 +	C植立, 成人
No.253	1710	5号横穴墓	ヒト	上顎第1小白歯	左		歯根破損	1	DNA分析, 成人
No.254	1711	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			右	1 +	P ² -M ¹ 植立, 成人
No.255	1712	5号横穴墓	ヒト	上顎第1大臼歯	左		破片	1	成人
No.256	1713	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.257	1714	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.258	1715	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	8 +	
No.259	1716	5号横穴墓	ヒト	側頭骨	右		錐体部	1	成人
No.260	1717	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	2 +	
No.261	1718	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.262	1719	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	1 +	
No.263	1720	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨?			破片	1 +	
No.264	1721	5号横穴墓	ヒト	頭蓋骨?			破片	9 +	
No.265	1722	5号横穴墓	ヒト	後頭骨			破片	1	成人
No.266	1723	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.267	1724	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.268	1725	5号横穴墓	ヒト	頭蓋骨			破片	5 +	小児
No.269	1726	5号横穴墓	ヒト	側頭骨	右		錐体部	1	小児
No.270	1727	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.271	1728	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.272	1729	5号横穴墓	ヒト	上腕骨?			破片	1 +	
No.273	1730	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.274	1731	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨?			破片	2	
No.275	1732	5号横穴墓	ヒト	大腿骨?			破片	1 +	
No.276	1733	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	土魂状
No.277	1734	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.278	1735	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	4 +	
No.279	1736	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	4 +	
No.280	1737	5号横穴墓	ヒト	大腿骨			破片	1	
No.281	1738	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	1 +	土魂状
No.282	1739	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨?			破片	1 +	土魂状
No.283	1740	5号横穴墓	ヒト?	脛骨?			破片	1	土魂状
No.284	1741	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.285	1742	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1	
No.286	1743	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	1	
No.287	1744	5号横穴墓	ヒト?	肋骨?			破片	2 +	
No.288	1745	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	5	
No.289	1746	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1	
No.290	1747	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨			破片	1 +	
No.291	1748	5号横穴墓	ヒト?	四肢骨?			破片	3 +	
No.292	1749	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	2 +	
No.293	1750	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	1 +	
No.294	1751	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	2 +	
No.295	1752	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	4 +	
No.296	1753	5号横穴墓	ヒト	上顎犬歯	左		破片	1	小児
No.297	1754	5号横穴墓	ヒト	下顎第1大臼歯	右		破片	1	成人
No.298	1755	5号横穴墓	ヒト	上顎第1小白歯	左		破片	1	小児
玄室 骨片一括	1756	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	多数	土魂状 (124.11g)
玄室 骨	1757	5号横穴墓	ヒト?	不明			破片	多数	土魂状 (29.03g)
玄室	1758	5号横穴墓	ヒト?	歯牙			破片	26	エナメル質
			種子				破片	3	
			残渣					0.01	g
玄室	1759	5号横穴墓	ヒト?	歯牙			破片	8 +	エナメル質

注) I: 切歯 C: 犬歯 P: 小臼歯 M: 大臼歯

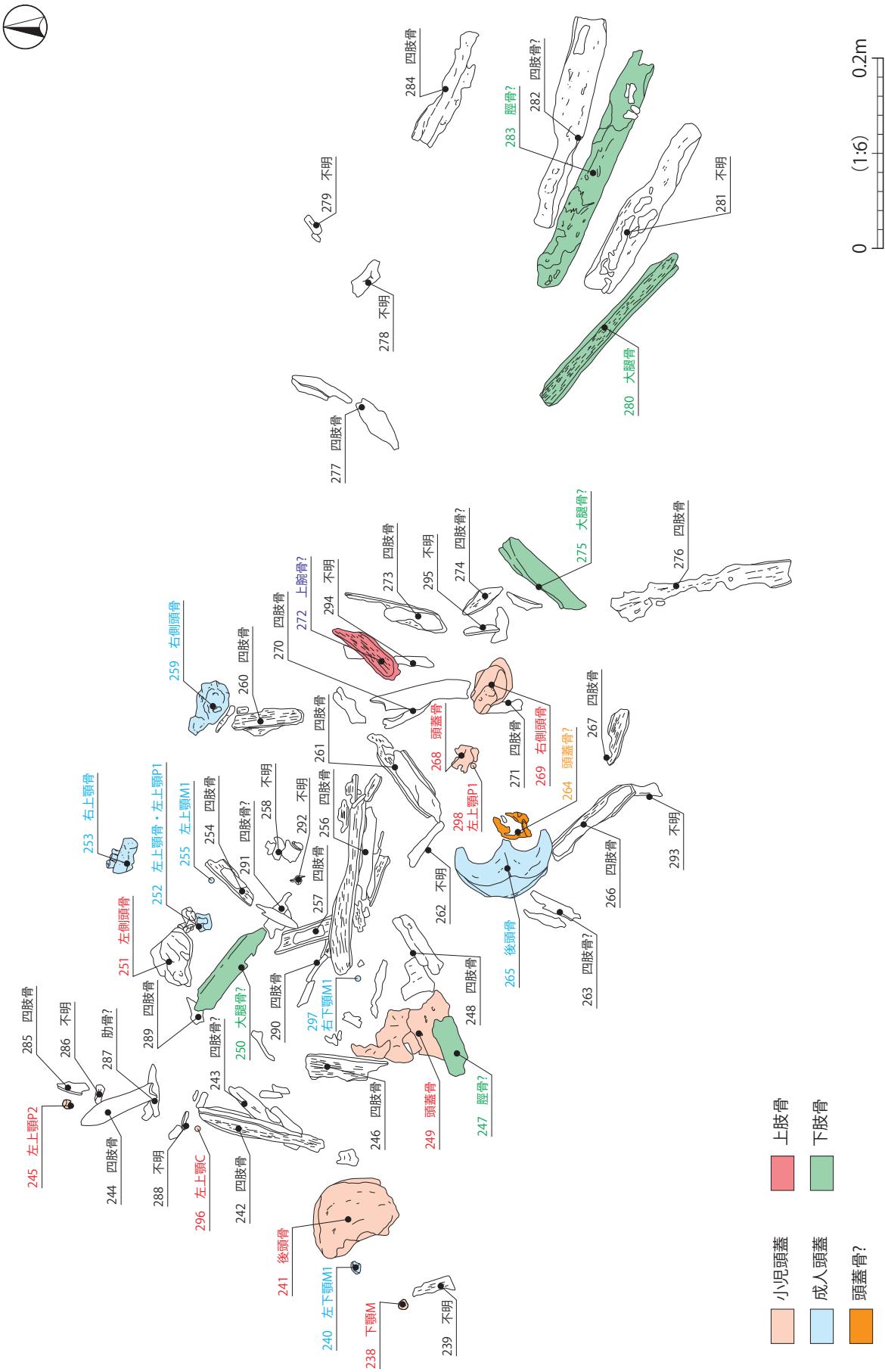


図 148 5号横穴墓出土人骨同定結果

表 61 齒式

5号 横穴墓	右								左								備考
	M3	M2	M1	P2	P1	C	I2	I1	I1	I2	C	P1	P2	M1	M2	M3	
小児	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3	4	5	/	/	/	他下顎臼歯
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
成人	/	/	⑥	⑤	/	/	/	/	/	/	③	4	/	6	/	/	
	/	/	6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6	/	/	

注) I: 切歯 C: 犬歯 P: 小臼歯 M: 大臼歯 ○数字: 植立歯牙 /: 未検出

表 62 齒牙計測値

5号横穴墓	歯冠幅				歯冠厚			
	小児		成人		小児		成人	
	左	右	左	右	左	右	左	右
上顎	I1							
	I2							
	C	8.19		7.84		-		8.66
	P1	8.08		7.54		10.37		9.73
	P2	7.66			6.89	10.22		9.81
	M1			11.64	11.01			11.92
	M2							
	M3							
下顎	I1							
	I2							
	C							
	P1							
	P2							
	M1			10.92	10.98			9.06
	M2							
	M3							

注) I: 切歯 C: 犬歯 P: 小臼歯 M: 大臼歯

これら検出された骨の中で、右側頭骨 (No.259・269)、後頭骨 (No.241・265)、左上顎犬歯 (No.252・296)、左上顎第1小白歯 (No.252・298) がそれぞれ2点みられることから、少なくとも2個体が埋葬されていたとみられる。

歯牙の状況をみると、咬耗がみられる歯牙、咬耗していない歯牙、歯根が形成されていない歯牙がみられ、小児と成人個体が存在することがわかる。

また、頭蓋骨については、骨の厚さ、大きさなどを基準として小児と成人個体を区別した。

(2) DNA 分析

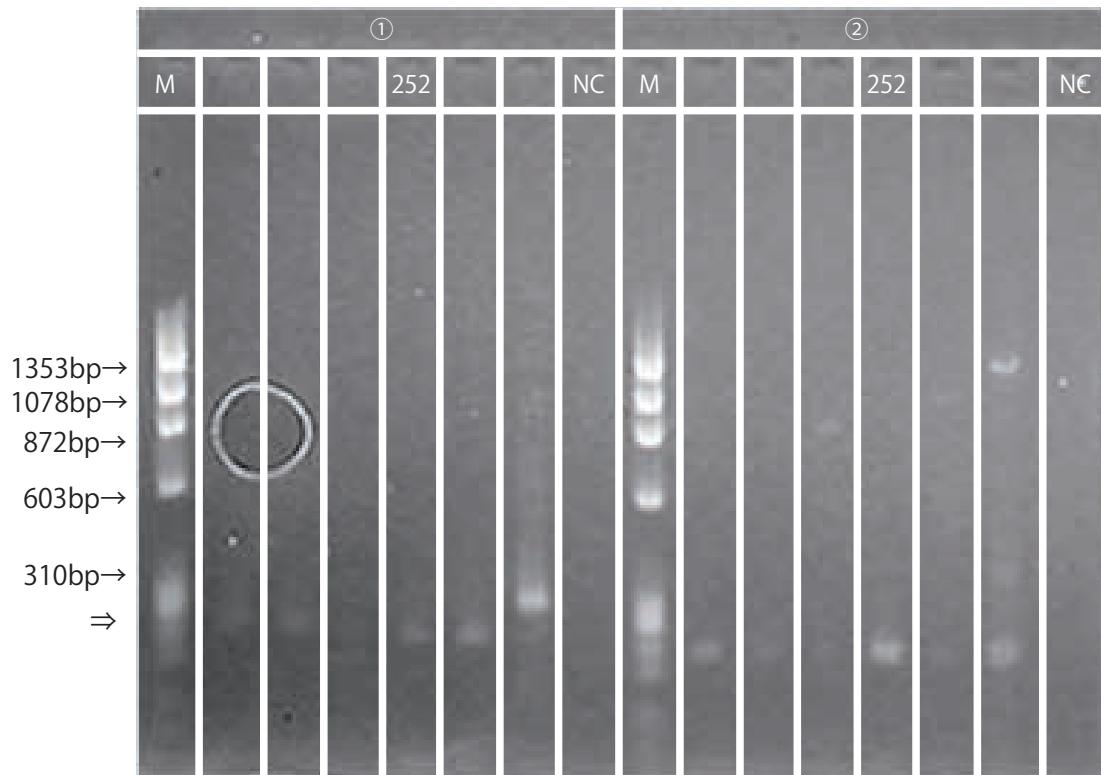
a) 血縁関係

PCR 増幅有無の結果を表 63 に、PCR 増幅の電気泳動結果を図 149 に示す。No.245 は PCR 増幅が全く認められない。No.252 は HV1 領域 (表 56 のプライマー組み合わせ①、②) のみ増幅が確認される。

No.252 の HV1 領域から部分的ではあるが塩基配列が正常に決定できた。図 150 に決定した塩基配列を示した。分析者とサンプルでは変異箇所が異なり、決定した塩基配列はサンプル由来のものであると推定される。

表 63 各プライマー組み合わせにより PCR 増幅有無結果一覧

No.	プライマー組み合わせ			
	①	②	③	④
No.245	無	無	無	無
No.252	有	有	無	無



※①: プライマー①組み合わせ、②: プライマー②組み合わせ

※M: Marker4 (ニッポンジーン社製)、252: No.252、NC: ネガティブコントロール

※矢印⇒: 増幅位置

図 149 サンプル DNA を鋳型とした mtDNA HV1 領域の PCR 増幅結果

塩基配列を決定できたのは No.252 のみであったので血縁関係の比較はできない。なお、参考までに表 64 に rCRS とサンプルと分析者の塩基配列の比較を示した。表には rCRS 配列から変異した箇所のみ示す。

b) 性別判定

リアルタイム PCR で X、Y 染色体のアメロゲニン遺伝子検出を試みたが、X、Y 染色体の増幅は認められなかった。染色体 DNA の分解により増幅できなかったと思われる。よって性別判定はできず、性別は不明である。

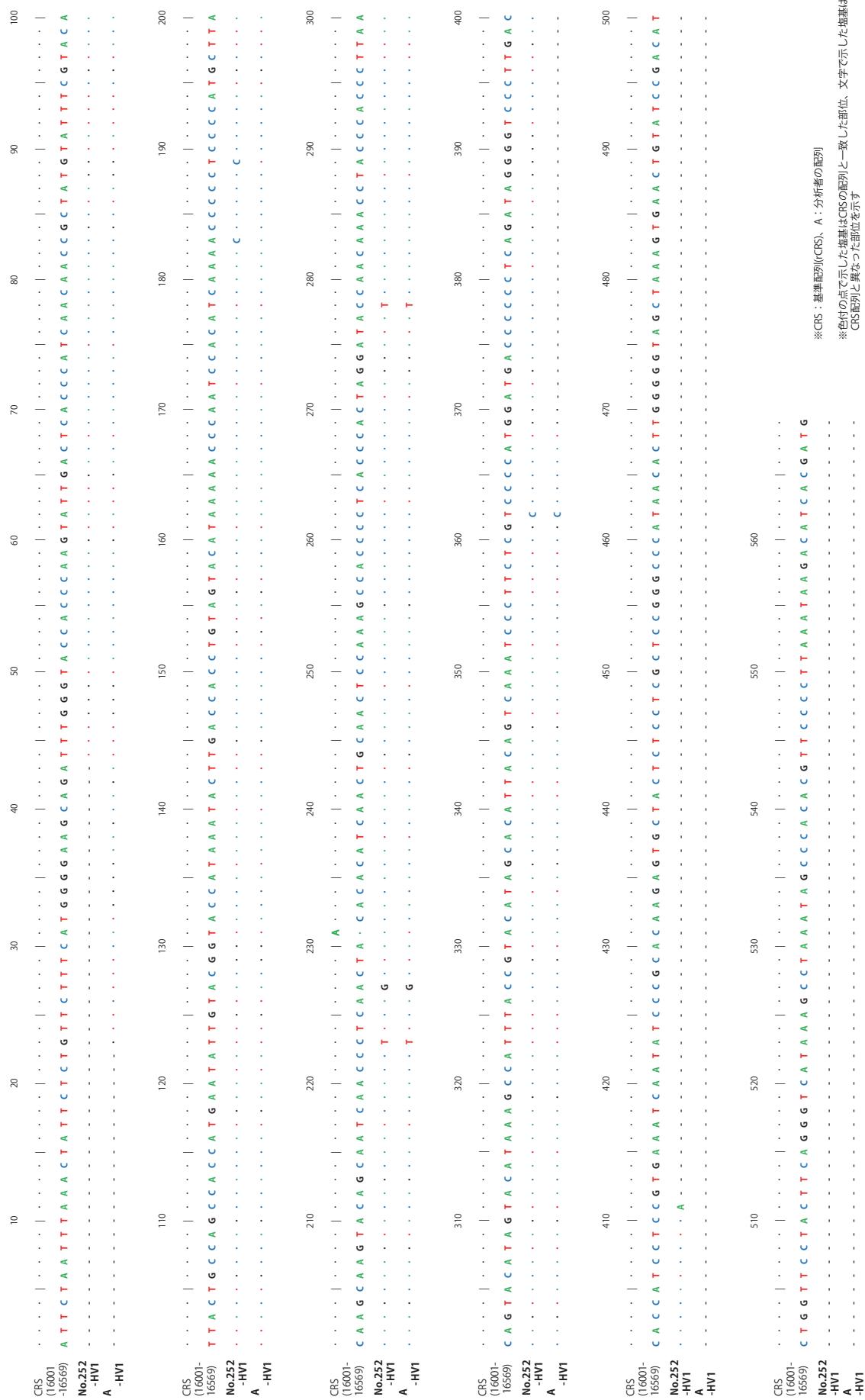


図 150 HV1 領域の塩基配列決定結果

表 64 サンプル塩基配列と rCRS 配列との比較

rCRS 配列 塩基番号	rCRS 配列	No.252	A
16183	A	C	A
16189	T	C	T
16223	C	T	T
16227	A	G	G
16278	C	T	T
16362	T	C	C
16411	C	A	-
mtDNA 配列 決定範囲	160001- 16569	16044- 16411	16001- 16370
ハプログループ※	-	D (16362 : C)	D (16362 : C)

※ ハプログループ：判定は John M. Butler (2009) を参考に判定した。

※ A：分析者

5 考察

結果にも示したように、少なくとも小児個体と成人個体の 2 個体が存在する。図 148 をみると、小児人骨の頭蓋は西側に多くみられ、成人人骨の頭蓋は中央部付近に多くみられる傾向があるが、解剖学的位置を保持しておらず散在する。一方、上肢骨と明らかに判断できる骨が少なかったが、下肢骨と判断されるものは東側に多い傾向にあり、西側にも少量分布する。ただし、No.280 大腿骨と No.283 脛骨？は原位置を保っている可能性もある。以上のことから、成人個体が玄室東側に足を向けて埋葬され、その西側に小児人骨が埋葬されていた可能性と、成人個体・小児個体とも骨の原位置が動かされた可能性が指摘される。以下、小児人骨と成人人骨に分けて述べる。

・小児人骨

No.238 の下顎大臼歯、No.245 の左上顎第 2 小臼歯、No.296 の左上顎犬歯、No.298 の左上顎第 1 小臼歯である。咬耗はみられず、特に No.245 の左上顎第 2 小臼歯は、歯根が形成されていない。

以上のことから、本人骨は、6～8 歳程度の小児前半と考えられる。骨の形質からは性別不明である。また、No.241 の後頭骨、No.249 の頭蓋骨、No.251 の左側頭骨、No.268 の頭蓋骨、No.269 の右側頭骨も大きさや骨の厚さからみて小児骨と判断される。

なお、本人骨では、左上顎第 2 小臼歯 (No.245) を用いて DNA の抽出を試みたが、塩基配列が正常に決定できなかった。また、X 染色体、Y 染色体の增幅が認めらなかった。それゆえ、性別を判定することも不可能である。また、同一横穴墓に埋葬されていたことから親族関係を考えたが、今回の結果ではそれを確かめることができなかった。

・成人人骨

No.240 の左下顎第 1 大臼歯、No.252・253 の左右上顎骨、No.255 の左上顎第 1 大臼歯、No.259 の右側頭骨、No.265 の後頭骨、No.297 の右下顎第 1 大臼歯である。下顎第 1 大臼歯の咬耗度は Broca II である。上顎第 1 大臼歯は粘土分が固着するため正確な咬耗度が不明であるが、嚙頭がかなりすり減っていることから Broca III 程度の可能性がある。また、No.259

の右側頭骨、No.265 の後頭骨も大きさや骨の厚さからみて成人骨と判断される。

以上のことから、本人骨は壮年後半以降、熟年の可能性がある。本人骨は、外後頭骨隆起が発達しておらず、歯牙計測値も權田（1959）に比較すると女性的である。また、左上顎第1 小臼歯（No.252）を用いて DNA の抽出を試み、部分的であるものの塩基配列を正常に決定できたが、X 染色体・Y 染色体の増幅が認められない。よって、形質的には女性的であるが、DNA 分析での性判定は不可能である。

文献

- Butler, J. M. (福島弘文・五條堀孝監訳 藤宮仁・玉田一生・福間義也・長華奈子訳), 2009, DNA 鑑定とタイピング—遺伝学・データベース・計測技術・データ検証・品質管理—. 共立出版株式会社, 590p.
- 藤田恒太郎, 1949, 歯の計測基準について. 人類学雑誌, 61, 27-32.
- 權田和良, 1959, 歯の大きさの性差について. 人類学雑誌, 67, 151-163.
- 坂平文博, 2007, 古代 DNA 分析による中世專業集落形成過程の検討 - 村松白根遺跡出土人骨のミトコンドリア DNA 分析. *Anthropological Science (Japanese Series)*, 115, 85-95.