資料研究報告

青森県尻労安部洞窟出土の2本の遊離歯についての 理化学的個人識別

安達 登^{1*}, 梅津 和夫², 米田 穰³, 鈴木 敏彦⁴, 奈良 貴史⁵

¹ 山梨大学大学院医学工学総合研究部法医学講座

² 山形大学医学部法医学講座

³ 東京大学総合研究博物館

⁴ 東北大学大学院歯学研究科歯科法医学情報学分野

⁵ 新潟医療福祉大学医療技術学部理学療法学科

(平成26年5月16日受付, 平成26年9月5日受理)

要 約

青森県尻労安部洞窟より出土した2本の遊離歯について、理化学分析に基づいた個人識別をおこなった。これら2本の歯は1つが下顎左第三あるいは第二大臼歯、もう1つが上顎右第二大臼歯と同定され、重複はなかった。これらの試料の炭素・窒素安定同位体比は非常に近似しており、同一人物に由来すると考えて矛盾しない結果であった。また、較正放射性炭素年代はそれぞれ4286–4080 calBP (68.2%) および 4280–4080 calBP (68.2%) と測定され、同時代のものと考えて矛盾しなかった。ミトコンドリア DNA (mtDNA) 解析の結果、これらの試料は解析した範囲で塩基配列が一致し、ハプログループは北海道縄文時代人およびアムール川下流域の先住民・ウリチにみられる D4h2 と判定された。mtDNA 解析の成功を踏まえて、より個人識別能力の高い核 DNA の Short Tandem Repeat (STR) 解析をおこなったところ、解析した座位の全てで正確な判定が可能であり、その判定結果は完全に一致した。上記の分析結果から、この2本の臼歯は同一人物に由来する可能性が極めて高いものと考えられた。本研究は、遺跡から解剖学的位置関係を保たずに出土した、相互に接合しない複数の縄文時代人骨試料が同一人物に由来することを、理化学分析によって証明した最初の事例である。

キーワード：ミトコンドリア DNA, Short Tandem Repeat (STR), 放射性炭素年代, 安定同位体分析, 縄文時代

Personal identification of the two molars excavated from the Shitsukari-Abe cave, Aomori, Japan

Noboru Adachi^{1*}, Kazuo Umetsu², Minoru Yoneda³, Toshihiko Suzuki⁴, and Takashi Nara⁵

*山梨大学医学部法医学講座
〒409-3898 山梨県中央市下河東 1110
E-mail: nadachi@yamanashi.ac.jp

Published online 16 October 2014
in J-STAGE (www.jstage.jst.go.jp) DOI: 10.1537/asj.140905

©2014 The Anthropological Society of Nippon

¹Department of Legal Medicine, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi

²Department of Forensic Medicine, Yamagata University school of Medicine

³The University Museum, The University of Tokyo

⁴Division of Dental and Digital Forensics, Tohoku University Graduate School of Dentistry

⁵Department of Physical Therapy, Niigata University of Health and Welfare

(Received 16 May 2014; accepted 5 September 2014)

Abstract

In the present study, we performed detailed personal identification of the two molars unearthed from the Shitsukari-Abe cave in Aomori, Japan. By morphological analysis, each molar was identified as left lower third or second molar and right upper second molar, respectively. Both of the molars were subjected to stable isotope ratio analysis, and their carbon and nitrogen isotopic ratios were very similar. Direct ¹⁴C dating of these samples resulted in 4286–4080 calBP (68.2%) and 4280–4080 calBP (68.2%), respectively. MtDNA sequences of the molars were identical, and were designated to haplogroup D4h2, which is observed in Hokkaido Jomon people and present-day Ulchi people inhabiting lower Amur region of Siberia. STR analyses could be successfully performed for both specimens in all regions examined, and the results were identical. By combining the results of the analyses described earlier, it is highly possible that these two molars were derived from the same individual. This is the first case in which Jomon skeletal materials that have lost their anatomical articulations were securely confirmed to be originated from the same individual.

Key words: mitochondrial DNA, Short Tandem Repeat (STR) analysis, radio carbon dating, stable isotope analysis, Jomon

序 文

遺跡から出土した複数の人骨試料が同一人物に由来するか否かを明らかにしようとする場合、通常それらの試料が相互に矛盾なく接合するかが確認される。接合が確認出来ない場合、当該試料が部位的に重複しないこと、さらに同時代のものと考えて矛盾しないことを証明する必要がある。しかし、こうした条件を満たした場合でも、試料の解剖学的肢位が保たれていない場合や、断片化が進んでいる場合には、その由来を明らかにすることは容易ではない。

こうした場合、現代の法医学的鑑定では、核 DNA の Short Tandem Repeat (STR) 解析をおこなうのが一般的である。核 DNA 中には数塩基を 1 単位とした配列が繰り返される領域 (座位) があり、配列の繰り返し回数には個人差が大きい。この STR 座位における繰り返し回数を検出し、複数の座位の解析結果を組み合わせることで、極めて精度の高い個人識別をおこなうことが可能となる。具体的には、古人骨 DNA 解析で通常利用されるミトコンドリア DNA (mtDNA) 解析の場合、解析結果が一致したとしても、それは試料が母系の親族同士であ

ることを示しているに過ぎず、同一個体由来ということとはできない。これに対し、STR の結果が一致すれば、それらの試料は高い確率で同一個体由来であると判断できる。しかし STR の座位は、1 座位につき細胞 1 個あたり 1 コピーしか存在しないため、DNA が分解および変性している場合が多い古人骨に、STR 解析が適用された例はそれほど多くない (Kurosaki et al., 1993; Burger et al., 1999; Clisson et al., 2002; Haak et al., 2008; Baca et al., 2012; Oh et al., 2012 など)。

本研究では、青森県尻労安部洞窟から出土した 2 本の犬臼歯について、形態人類学的分析による歯種同定、安定同位体分析および年代測定、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 解析、STR 解析を組み合わせ、これらの試料が同一人物に由来するか否かを検討した。

試料および方法

1. 試料

尻労安部洞窟は、本州最北端の青森県下北半島北東端の尻屋崎から南へ約 5 km、桑畑山南東麓の標高 33 m の海岸部に位置し、太平洋に向かい開口している幅、高さ、奥行きとも 2 m 程の小規模な洞窟である (図 1)。発掘

図1 尻労安部洞窟の位置

図2 SA-Homo-001

調査は、慶應義塾大学民族学考古学研究室を中心とする発掘調査チームにより、更新世の石器や動物骨に伴う人骨の発見を目指し、2001年から2014年まで継続しておこなわれている。堆積層は旧石器時代から縄文時代まで確認され、更新世の同一層のほぼ同じ地点から、旧石器時代のナイフ型石器と大型哺乳類の他に、ウサギの歯が大量に出土し、日本列島における旧石器時代の文化を解明できる遺跡として注目を集めている。

本研究では、尻労安部洞窟より発掘されたヒト大臼歯2本（試料番号 SA-Homo-001（図2）および SA-Homo-002（図3））を試料として用いた。いずれの試料も、2008年の発掘調査において、縄文時代中期と推定された2層より出土した。発掘作業中に取り上げられた試料ではないため、出土地点の座標値は記録されていない。しかし、発掘区を1m四方のグリッドに分割して層序ごとに土壌を採取し、水洗による篩別作業をおこなった際に検出されたものであため、同一層位に包含されていたことは確実と考えられた。

2. 形態人類学的分析

歯種の同定は東北大学でおこなった。同定は熟練した観察者による肉眼的観察によっておこなわれた。なお、観察者のDNAによる汚染を回避するため、同定作業はディスポーザブルのマスクおよび手袋を着用しておこなった。

3. DNA 分析

1) 現代人 DNA による試料汚染への対策

実験は全て、古人骨DNA解析専用の部屋および実験器具を用いておこなった。実験者はディスポーザブルのガウン、帽子、手袋、マスクを装着し、試薬類、およびピペットチップやプラスチックチューブ等の実験消耗品類は全て DNase/RNase free grade で滅菌済みのものを使用した。ピペットチップについては、サンプル間でのクロスコンタミネーションの可能性を排除するため、エアロゾル防止フィルター付きのものを用いた。DNA抽出およびPCR反応の際にはそれぞれ陰性対象を設置し、

図3 SA-Homo-002

PCR 反応での両者の陰性を確認した。さらに、現代人 DNA による試料汚染を可及的に検出するため、本試料の発掘と整理、形態学的研究に主体的に関わった人員、並びに解析担当者、合計 5 名について、試料におこなったものと同様の mtDNA 解析をおこなって、試料の結果との不一致を確認した。

2) DNA 抽出

DNA 抽出は山梨大学でおこなった。DNA の抽出方法については Adachi et al. (2011) の方法に従っておこなった。即ち、試料を 13% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 15 分間浸漬後、DNase/RNase free water で洗浄し、紫外線照射下で乾燥させた。その後、試料の表面をデンタルドリルで削り落とし、再度上記の洗浄と乾燥をおこなった。さらに、歯根部を切除し、切断面からデンタルドリルを挿入して歯髄腔を研削し、試料の粉末を得た。この粉末約 0.4 g を 8 ml の 0.5 M EDTA (pH 8.0) で脱灰し、脱灰した試料から市販の DNA 抽出キット (FAST ID DNA extraction kit, Genetic ID, Fairfield, IA) を用いて DNA 溶液を得た。

3) mtDNA 解析

mtDNA 解析は山梨大学および山形大学でおこなった。得られた DNA 溶液を用いて、高多型領域 1 の塩基番号 15999 から 16366、高多型領域 2 の塩基番号 128 から 256、およびコーディング領域の塩基番号 10287 から 10425 (塩基番号はそれぞれ Andrews et al., 1999 に準拠) の 3 つの領域の塩基配列を、Adachi et al. (2013) の方法に基づいて PCR・ダイレクトシーケンス法により決定した。さらに、コーディング領域の一塩基多型を amplified product-length polymorphism (APLP) 法 (Umetsu et al., 2005) で検査した。これらの解析は 2 回以上おこない、結果の再現性を確認した。得られた結果をもとに、現代人のミトコンドリア DNA の系統樹 (Van Oven and Kayser, 2009) を参照して、各試料の mtDNA のハプログループを決定した。上記の解析結果のみではハプログループの決定が確実でない場合、解析結果から推定されたハプログループを決定する一塩基多型部位を、PCR・ダイレクトシーケンス法により解析した。

4) Short Tandem Repeat (STR) 解析

STR 解析は山形大学でおこなった。mtDNA 解析が成功した試料について、AmpF ℓ STR Identifiler Plus PCR Amplification Kit および AmpF ℓ STR MiniFiler PCR Amplification Kit (共に Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて、キットのマニュアルに従って核 DNA の 15 座位の STR、および性別判定用のアメロゲニン遺伝子を増幅し、

GeneMapper ID software (Applied Biosystems) を装備した ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて電気泳動およびフラグメント解析をおこなった。解析は Identifiler Plus Kit については計 3 回、MiniFiler kit については計 2 回おこない、各々のキットにおける結果を総合して各 STR 座位における結果を判定した。

4. 安定同位体分析および年代測定

1) コラーゲン抽出

安定同位体分析および年代測定は東京大学でおこなった。土壌埋没中の化学変化である続成作用の影響を受けないコラーゲンを、加熱によって水に可溶化するゼラチンとして抽出した (Yoneda et al., 2002)。まず、DNA 抽出後の各試料から歯冠側に残存した歯根をエナメル質象牙質境界付近までダイヤモンドカッターで切断した。切断した歯根約 0.25 g について、切断時に付着した表面付着物を超音波洗浄で除去した。さらに、0.2 mol/L の水酸化ナトリウム溶液に約 12 時間浸漬し、象牙質に浸潤している可能性があるフミン酸やフルボ酸などの土壌有機物を除去して、試料を凍結粉碎した。粉末試料をセルロース膜に封入して、1 mol/L 塩酸で骨無機分画 (ハイドロキシアパタイト) を溶解した。最後に残存した有機物を純水中で 90°C に加熱することでコラーゲンのみを可溶化し、ガラス濾紙で濾過することで精製した。

2) 炭素・窒素安定同位体比測定

抽出したゼラチンから約 0.25 mg を分取して、炭素・窒素安定同位体比分析に供した。同位体比測定には、元素分析計 (EA : Carlo Erba NA1500) で試料を燃焼し、生成された二酸化炭素および窒素を連続フロー型安定同位体比質量分析器 (IRMS : Finnigan MAT 252) で測定した。通常の測定精度は炭素同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$ 値) で約 0.1‰、窒素同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$ 値) で約 0.25‰ である。同時に炭素と窒素の含有量を測定して、炭素と窒素の含有量、C/N 比を基準とし、コラーゲンの保存状態と汚染状況を検討した。

3) 放射性炭素年代測定

抽出・精製されたコラーゲンを脱気した石英ガラス管に酸化銅および還元銅、銀箔とともに封印し、850°C で酸化させることで二酸化炭素を発生させた (Minagawa et al., 1984)。同時に発生する窒素および水と二酸化炭素を真空ラインで冷媒を用いて分離精製し、炭素 1 mg 相当の二酸化炭素、水素、触媒 (鉄粉) 1 mg を封管して 650°C に加熱することで、グラファイト状の固形炭素に還元した (Kitagawa et al., 1993)。このグラファイトと鉄触媒の

混合物を、東京大学タンデム加速器研究施設 (MALT, 実験室コード MTC) で、加速器質量分析法 (AMS) を実施し、放射性炭素の存在比を測定した (Matsuzaki et al., 2007)。測定結果である放射線炭素年代に含まれる半減期のずれ、大気中放射性炭素濃度の変動などを校正するために、校正年代データセット IntCal13 および Marine13 を用いて、校正年代を計算した (Reimer et al., 2013)。校正年代の計算には OxCal4.2 を用いた (Bronk Ramsey, 2009)。

結 果

1. 形態人類学的分析

2 本の歯はいずれも咬耗が進行しており、裂溝の底を残して咬頭は平坦化しており、象牙質は面状に広く露出していた。SA-Homo-001 (図 2) は、やや角張った類長楕円形の咬合面外形を示す 4 咬頭性の単根歯であった。歯冠に対する歯根の大きさの割合が小さいこと、および遠心面に隣接面咬耗がみられないことから考えて下顎第三大臼歯である可能性が高かったが、咬合面溝が + 型であること、歯根の頬側面および舌側面にみられる縦溝により不完全な近心根と遠心根との分離傾向を示すことから、下顎第二大臼歯の可能性も否定できなかった。顎側は左と考えられた。

SA-Homo-002 (図 3) は不整形の咬合面外形を示す不完全 3 咬頭性の単根歯であった。歯根にみられる縦溝により 3 根への分離傾向が認められた。咬頭と歯根の配置から上顎大臼歯と判断され、咬合面の輪郭と歯根の癒合程度、また近心面と遠心面の双方に隣接面咬耗が確認できることから、歯種は上顎第二大臼歯と考えられた。顎側は右と考えられた。以上の結果から、2 本の歯の歯種は異なり、これらは同一個体に属するものと考えて矛盾しなかった。

2. 安定同位体分析および年代測定

歯根部からコラーゲンを抽出する前処理と元素分析、安定同位体比分析の結果を表 1 に示す。古人骨では長年にわたる堆積中にコラーゲンの分解・変性が進み、同位体比および放射性炭素年代に影響を与える場合がある。保存状態の良いコラーゲンを主成分とするゼラチンでは、C/N 比 (2.9 ~ 3.6 ; DeNiro 1985)、ゼラチン回収率 (>1%)、炭素含有率 (>30%)、窒素含有率 (>14%) で、一定の基準を満たしていた (van Klinken, 1999)。よって、これらの試料から回収されたゼラチンは、いずれも極めて保存状態のよいコラーゲンからなるものと考えられた。

次に、炭素・窒素安定同位体比をみると、これら試料の炭素・窒素同位体比は非常に近似しており、試料が同一人物に由来すると考えて矛盾しない結果であった。また、炭素同位体と窒素同位体のいずれもが比較的高い値を示したことから、試料中のコラーゲンは、いずれも海産物に由来するタンパク質の影響を強く受けていることが示唆された。コラーゲンでみられる約 4.5% の濃縮を補正し、陸上の食物の代表値として C3 植物の平均値 (-25.4‰)、海産物の代表値として海産魚類 (-18.2‰) の間で直線的に混合したと仮定して、海産物からの寄与率を計算すると、SA-Homo-001 で 71.7%、SA-Homo-002 で 70.2% と推定された。

放射性炭素年代測定の分析結果を表 2 に示す。本研究で解析した試料の放射性炭素年代 (未校正) は、SA-Homo-001 については 4048 ± 66 年前、SA-Homo-002 については 4044 ± 66 年前と測定され、極めて近い値を示した。古人骨の放射性炭素年代を決定する場合、海産物を摂取することによって受ける放射性炭素が減衰した海水の無機炭素の影響、すなわち海洋リザーバ効果を考慮する必要がある。そこで、上記の炭素同位体比から推定した海産物寄与率に基づいて、大気・陸上の校正曲線

表 1 試料の前処理、元素分析、安定同位体分析の結果

	未処理試料 (mg)	ゼラチン (mg)	回収率 (%)	炭素含有率 (%)	窒素含有率 (%)	C/N 比 (atomic)	炭素同位体比 (PDB, ‰)	窒素同位体比 (AIR, ‰)
SA-Homo-001	126.7	11.6	9.2	46.0	16.8	3.2	-15.7	13.7
SA-Homo-002	216.3	19.5	9.0	42.5	15.7	3.2	-15.8	13.1

表 2 放射性炭素年代測定の分析結果

	未校正年代 (BP)	$\delta^{13}\text{C}$ (AMS, ‰)	測定コード	校正年代 (68.2%, calBP)	校正年代 (95.4%, calBP)
SA-Homo-001	4048 ± 66	-15.7	MTC-13627	4286-4080	4381-3983
SA-Homo-002	4044 ± 66	-15.9	MTC-13628	4280-4080	4383-3985

表 3 尻労安部洞窟出土試料にみられたミトコンドリア DNA 多型

	ハプロ グループ	塩基配列解析 ¹⁾				APLP 解析 ²⁾		
		15999–16366 (16000+)	128–256	10287–10425 (10000+)	15181–15284 (15000+)	3010 (D4)	5178 (D)	9 bp (B)
SA-Homo-001	D4h2	223 325 362	CRS	398 400	236	A	A	2
SA-Homo-002	D4h2	223 325 362	CRS	398 400	236	A	A	2

¹⁾ 塩基置換部位の塩基番号は revised Cambridge reference sequence (Andrews et al., 1999) に準拠した。CRS は解析範囲に塩基置換がみられなかったことを示す。ハプログループの決定に用いた塩基置換は太字・斜体で強調してある。

²⁾ 塩基置換塩基置換部位の塩基番号は revised Cambridge reference sequence に準拠した。ハプログループの決定に用いた塩基置換は太字・斜体で強調してある。用いなかった部位については割愛した。

図 4 mtDNA の APLP 解析結果。各セットの右端に、そのセットによって解析されるハプログループの種類を示す。LM : 10 bp ラダーマーカー (Invitrogen), サンプル 1 : 現代人 DNA (ハプログループ D4a), サンプル 2 : SA-Homo-001, サンプル 3 : SA-Homo-002, サンプル 4 : 現代人 DNA (ハプログループ B4)。A set において、2つの古人骨試料はハプログループ D, およびそのサブタイプである D4 の解析部位に塩基置換を持ち、共にハプログループ D4 に分類された。

(IntCal13) と海水の校正曲線 (Marine13) を混合し、校正放射性炭素年代を計算した。津軽海峡の地域的な海洋リザーバ年代の補正值として、函館湾の 34 ± 42 ^{14}C 年も加えて計算した結果 (Yoneda et al., 2007), SA-Homo-001 は 4286–4080 calBP (68.2%), SA-Homo-002 は 4280–4080 calBP (68.2%) と極めてよい一致をみたことから、2点の試料は同時代のものと考えて矛盾しなかった。この年代は縄文時代中期末葉から後期初頭に相当し、発掘時に推定された縄文時代中期という出土層位の年代を裏付ける結果であった。

3. mtDNA 解析

mtDNA 解析の結果を表 3 および図 4 に示す。観察された塩基置換は全て一致していた。2点の試料は共に高多型領域で塩基番号 16325, 16362 番に塩基置換を持ち、コーディング領域では塩基番号 3010, 5178, 10400 番に塩基置換を持っていた。この塩基置換パターンから、これらの試料のハプログループは共に D4h2 に分類される

可能性が高いものと考えられた。そこで、D4h2 を規定する塩基置換の一つである 15236 番の塩基置換の有無を検査するため、新規のプライマーセット (表 4) を用いて、PCR・ダイレクトシーケンシング法により塩基番号 15181 から 15284 番までの塩基配列を決定した。その結果、2点の試料には共に塩基番号 15236 番に塩基置換が確認され、ハプログループ D4h2 に分類された。なお、DNA 抽出および PCR 反応の際に設置した陰性対象は、mtDNA 解析時の PCR 反応でいずれも陰性であった。さらに、試料の発掘と整理、形態学的研究に主体的に関わった人員、並びに解析担当者のハプログループは D4a が

表 4 塩基番号 15236 の多型を検出するためのプライマーセット

プライマー	プライマーのシーケンシス ¹⁾ (5'-3')
L15180	TCA TTC TgA ggg gCC ACA gT
H15285	AAg ggC AAg ATg AAg TgA AAg g

¹⁾ グアニン (G) については、シトシン (C) との誤認を避けるため、小文字で表記した。

表 5 尻労安部洞窟出土試料の STR 解析結果

座位	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	XY
SA-Homo-001																
総合判定 ¹⁾	15	30-32.2	12	7-12	17	7-9	11-13	10	19	14	14-17	9	14	12	19-23	X
ID-1 回目 ²⁾	15	30-32.2	12	7	17	7-9	11-13	10	—	14	14-17	9	14	12	19-23	X
ID-2 回目	15	30-32.2	12	7-12	17	7-9	11-13	10	19	14	14-17	9	14	12	19	X
ID-3 回目 ³⁾	15	30	12	7	17	7-9	11-13	10	19	13*-14	14-17	9	14	12	19-23	X
MF-1 回目 ⁴⁾		30-32.2	12	7-12			11-13	10	19				14		19-23	X
MF-2 回目		30-32.2	12	7-12			11-13	10	19				14		19-23	X
SA-Homo-002																
総合判定	15	30-32.2	12	7-12	17	7-9	11-13	10	19	14	14-17	9	14	12	19-23	X
ID-1 回目	15	30-32.2	12	7	17	7-9	11-13	10	19	14	14-17	9	14	12	19-23	X
ID-2 回目	15	30-32.2	12	—	17	9	11-13	10	19	14	14-17	9	14	12	19-23	X
ID-3 回目	15	30	12	—	17	7-9	—	10	19	14	14-17	—	14	12	19-23	X
MF-1 回目		—	12	7-12			11	10	19				14		19-23	X
MF-2 回目		30-32.2	—	7-12			11-13	10	19				14		19-23	X

¹⁾ Identifiler Plus kit および MiniFiler kit の結果を総合した判定結果

²⁾ Identifiler Plus kit の結果。判定結果中の (—) はその座位が判定不能であったことを示す。

³⁾ SA-Homo-001 の判定 3 回目, D19S433 における 13 は 14 のピークより低く, スタッターピークが強く出たものである可能性があるため, 特に 13* と表記した。

⁴⁾ MiniFiler kit の結果。判定結果中の (—) はその座位が判定不能であったことを示す。Identifiler Plus kit には含まれるが MiniFiler kit には含まれない座位については空欄にしてある。

2 名, D4b が 1 名, D4j が 1 名, N9b が 1 名であり, いずれも試料のそれとは異なっていた。これらの結果から, 現代人 DNA による試料の汚染はないものと考えられた。

4. STR 解析

STR 解析の結果を表 5 に示す。いずれの試料についても, Identifiler Plus および MiniFiler kit の結果を組み合わせ判定することで, 解析した全ての座位が判定可能であった。結果は全て一致し, 性別は女性と判定された。

表 5 の読み方であるが, 数字は父親あるいは母親から由来した 2 つの染色体上の, 数塩基を 1 単位とした塩基配列の繰り返し回数を示す。例えば TH01 を例にとると, この座位においては片方の染色体は [AATG]₇ (AATG の 4 塩基を 1 単位とする配列が 7 回反復), もう一方の染色体においては [AATG]₉ という塩基配列を持ち, 結果として 7-9 型と表記される。D8S1179 の判定結果には 15 という数字 1 つしか記載されていないが, これは, この座位において 2 つの染色体がいずれも [TCTA]₁₁[TCTG]₁₁[TCTA]₁₃ という塩基配列で一致しているためで, こうした場合, 15-15 ではなく 15 型と表記される。D21S11 型においては 30-32.2 型と, 小数点を含んだ記載がされているが, これはこの座位の塩基配列が単純な繰り返し配列でないためである。具体的には, D21S11 型における 30 とは, [TCTA]₆[TCTG]₅[TCTA]₃TA[TCTA]₃TCA[TCTA]₂TCCA TA[TCTA]₁₁ という塩基配列を示す。繰り返し配列の合計は 30 回であるが, 反復配列でない配列が内部に含まれている。32.2 であるが, 通常の 32 が [TCTA]₆[TCTG]₅

[TCTA]₃TA[TCTA]₃TCA[TCTA]₂TCCA TA[TCTA]₁₃ という配列なのに対し, 32.2 は, [TCTA]₅[TCTG]₆[TCTA]₃TA[TCTA]₃TCA[TCTA]₂TCCA TA[TCTA]₁₂TA TCTA という塩基配列を示し, 2 塩基分鎖長が長くなっている。

考 察

上述の如く, 形態的に 2 つの歯は明らかに歯種が異なること, また咬耗の進行状況がほぼ等しいことから, 同一人物の歯として矛盾はなかった。また, 炭素・窒素同位体比も非常に近似しており, かつ, 年代測定の結果, これらの試料は同時代のものと考えて矛盾しなかったことから, やはり 2 点の試料は同一個体由来と考えて矛盾しなかった。加えて, mtDNA 解析, および核 DNA の STR 解析の結果は, 2 点の試料で完全に一致した。現代日本人集団において, 今回解析した全 15 座位の STR の判定結果が, 任意の 2 人の間で偶然一致する確率は 1.8×10^{-17} と報告されている (Yoshida et al., 2005)。ただし, この値は現代日本人集団における計算値であり, STR の各座位における遺伝子型の出現頻度が現代日本人と縄文時代人では異なる可能性があることから, この値が縄文時代人集団にそのまま当てはまるか否かは不明とせざるを得ない。また, 今回解析した 2 つの試料は同一遺跡出土の同時期のものであることから, 両者の間に血縁関係が存在する可能性は低くはなく, その点からも上記の計算値を今回の事例にそのまま用いるのは困難である。加えて, mtDNA 解析にせよ STR 解析にせよ, 現代人を対象にした解析においてさえ, 複数の試料が別人

由来であることは断定できても、同一人物由来であることを 100% 保証することはできず、同一人物である可能性を確率論的に示すに留まる。しかし、これらの制約があるとはいえ、上記の結果は、2 点の試料が同一人物に由来することを強く示唆するのは間違いない。よって、今回解析した 2 点の試料は同一人物に由来する可能性が極めて高いものと考えられた。

本研究で解析した試料のように、解剖学的位置関係を保たず、かつ破片断面の一致が確認出来ない人骨試料が、同一人物に由来するか否かを証明することは形態学的解析では困難であり、年代測定の結果、試料の同時代性が否定されないことを踏まえた上で、DNA 鑑定をおこなうことが最も確実な手段といえる。本研究はこの手順に則り、確実性の高い個人識別をなし得た事例であり、STR 解析が可能であった事例としては本邦最古である。また、現代人の DNA による試料汚染を低減するため、本研究では同位体分析および年代測定を DNA 分析の後におこなっているが、DNA 分析時の前処理である次亜塩素酸ナトリウム溶液への試料の浸漬が、同位体分析や年代測定に影響を与えなかったことも重要な知見である。

今回解析した試料の mtDNA のハプログループは D4h2 であった。このハプログループは、アムール川下流域の先住民・ウリチに約 2.5% (Sukernik et al., 2012)、北海道縄文時代人に約 16.7% (Adachi et al., 2011) にみられる他は報告例のない稀な遺伝子型である。下北半島の北端部という遺跡の立地を考えれば、この結果は、北海道と本州最北端の人類集団が遺伝的にかなり近縁であったことを示している可能性がある。ある人物の遺伝的特徴を詳細に明らかにしようとすれば、大規模な核 DNA 解析をおこなう必要がある。しかし、核 DNA は 1 細胞あたり 1 コピーしか存在しないため、古人骨試料において信頼性の高い解析結果を得ることは難しい。ところが本試料では、増幅産物の長さが Identifiler Plus kit で 300 塩基対を越える STR 座位 (D2S1338, D18S51, FGA) まで正確に判定されていることから、試料中の DNA の状態は古人骨としては例外的に良好であると考えられる。今後、本試料を用いた次世代シーケンサー解析により、縄文時代人の遺伝的情報を詳細に明らかにすることができると期待される。

謝 辞

試料の利用を快諾頂いた、慶應義塾大学民族考古学専攻・阿部祥人先生以下、尻労安部洞窟発掘隊メンバーに改めて厚く御礼申し上げます。本研究は日本学術振興会科学研究費補助金 (課題番号 23570280; 研究代表者・安達達), お

よび日本学術振興会研究拠点形成事業 (北方圏における人類生態史総合研究拠点; 研究代表者・加藤博文) の補助を得ておこなった。

引用文献

- Adachi N., Shinoda K., Umetsu K., Kitano T., Matsumura H., Fujiyama R., Sawada J., and Tanaka M. (2011) Mitochondrial DNA analysis of Hokkaido Jomon skeletons: Remnants of archaic maternal lineages at the southwestern edge of former Beringia. *American Journal of Physical Anthropology*, 146: 346–360.
- Adachi N., Sawada J., Yoneda M., Kobayashi K., and Itoh S. (2013) Mitochondrial DNA analysis of the human skeleton of the initial Jomon phase excavated at the Yugura cave site, Nagano, Japan. *Anthropological Science*, 121: 137–143.
- Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., and Howell N. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23: 147.
- Baca M., Doan K., Sobczyk M., and Węgleński P. (2012) Ancient DNA reveals kinship burial patterns of a pre-Columbian Andean community. *BMC Genetics*, 13: 30. <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/13/1/30>
- Bronk Ramsey, C. (2009) Bayesian analysis of radiocarbon dates. *Radiocarbon*, 51: 337–360.
- Burger J., Hummel S., Herrman B., and Henke W. (1999) DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis*, 20: 1722–1728.
- Clisson I., Keyser C., Francfort H.P., Crubezy E., Samashev Z., and Ludes B. (2002) Genetic analysis of human remains from a double inhumation in a frozen Kurgan in Kazakhstan (Berel site, early 3rd century BC). *International Journal of Legal Medicine*, 116: 304–308.
- DeNiro, M.J. (1985) Postmortem Preservation and Alteration of In vivo Bone-Collagen Isotope Ratios in Relation to Paleodietary Reconstruction. *Nature*, 317: 806–809.
- Haak W., Brandt G., De Jong H.N., Meyer C., Ganslmeier R., Heyd V., Hawkesworth C., Pike A.W.G., Meller H., and Alt K.W. (2008) Ancient DNA, Strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the later Stone Age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105: 18226–18231.
- Kitagawa H., Masuzawa T., Nakamura T., and Matsumoto E. (1993) A Batch Preparation Method for Graphite Targets with Low-Background for AMS C-14 Measurements. *Radiocarbon*, 35: 295–300.
- Kurosaki K., Matsushita T., and Ueda S. (1993) Individual DNA identification from ancient human remains. *American Journal of Human Genetics*, 53: 638–643.
- Matsuzaki H., Nakano C., Tsuchiya Y.S., Kato K., Maejima Y., Miyairi Y., Wakasa S., and Aze T. (2007) Multi-nuclides AMS performances at MALT. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B259: 36–40.
- Minagwa M., Winter D.A., and Kaplan I.R. (1984) Comparison of Kjeldahl and combustion methods for measurement of nitrogen isotope ratios in organic matter. *Analytical Chemistry*, 59: 1859–1861.
- Oh S.C., Lee S.J., Park J.B., Lee S.D., Seo S.B., Kim H.Y., Kim J., Kim Y.S., and Shin D.H. (2012) Autosomal short tandem

- repeat analysis of ancient DNA by coupled use of mini- and conventional STR kits. *Journal of Forensic Sciences*, 57: 820–825.
- Reimer P.J., Bard E., Bayliss A., Beck J.W., Blackwell P.G., Bronk Ramsey C., Buck C.E., Cheng H., Edwards R.L., Friedrich M., Grootes P.M., Guilderson T.P., Hafflidason I., Hajdas H., Hatté C., Heaton T.J., Hoffmann D.L., Hogg A.G., Hughen K.A., Kaiser K.F., Kromer B., Manning S.W., Niu M., Reimer R.W., Richards D.A., Scott E.M., Southon J.R., Staff R.A., Turney C.S.M., and Van der Plicht J. (2013) IntCal13 and Marine13 radiocarbon age calibration curves 0–50,000 years cal BP. *Radiocarbon*, 55: 1869–1887.
- Sukernik R.I., Volodko N.V., Mazunin I.O., Eltsov N.P., Dryomov S.V., and Starikovskaya E.B. (2012) Mitochondrial genome diversity in the Tubalar, Even, and Ulchi: Contribution to pre-history of Native Siberians and their affinities to Native Americans. *American Journal of Physical Anthropology*, 148: 123–138.
- Umetsu K., Tanaka M., Yuasa I., Adachi N., Miyoshi A., Kashimura S., Park K.S., Wei Y.H., Watanabe G., and Osawa M. (2005) Multiplex amplified product-length polymorphism analysis of 36 mitochondrial single-nucleotide polymorphisms for haplogrouping of East Asian populations. *Electrophoresis*, 26: 91–98.
- Van Klinken, G.J. (1999) Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *Journal of Archaeological Science*, 26: 687–695.
- Van Oven M. and Kayser M. (2009) Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*, 30: E386–E394. <http://www.phylotree.org>
- Yoneda M., Hirota M., Uchida M., Tanaka A., Shibata Y., Morita M., and Akazawa T. (2002) Radiocarbon and stable isotope analyses on the Earliest Jomon skeletons from the Tochibara rockshelter, Nagano, Japan. *Radiocarbon*, 44: 549–557.
- Yoneda M., Uno H., Shibata Y., Suzuki R., Kumamoto Y., Yoshida K., Sasaki T., Suzuki A., and Kawahata H. (2007) Radiocarbon marine reservoir ages in the western Pacific estimated by pre-bomb molluscan shells. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B259: 432–437.
- Yoshida K., Takahashi K.-I., and Kasai K. (2005) Allele frequencies of 15 loci using AmpFℓSTR Identifiler Kit in Japanese population. *Journal of Forensic Sciences*, 50: 718–719.