

## 瑞聖寺伊達家墓域出土『胞衣桶』の胞衣組織の同定

勝又義直<sup>1)</sup>・山本敏充<sup>1)</sup>・打樋利英子<sup>1)</sup>・伊達泰宗<sup>2)</sup>・松本 健<sup>3)</sup>・増澤文武<sup>4)</sup>

### 1. はじめに

東京都港区瑞聖寺旧伊達家墓域内の第四代藩主綱村の長男、扇千代(1681-1685)の墓域から筒状毛彫銅容器が発見された。外容器に松竹、鶴亀の毛彫が、中の桶にも松竹、鶴亀と「縦三引両」(伊達家の家紋)が描かれ、その中に竹篋が2本、寛永通宝の文銭が120枚と3つの石などがあったことから『胞衣桶』と推定された(松本;1998)。そこで『胞衣桶』であることと家系的な手掛かりの可能性を鑑み、一部資料につき組織学的検査及びDNA分析を行ってヒト由来の組織の有無を検討した。

### 2. 材料と方法

#### 2-1 材 料

(財)元興寺文化財研究所保存科学センターにおいて、平成7年11月10日に『胞衣桶』を開封し、検査した。開封にあたっては、DNA分析に熟練した研究者(T.Y.)が立ち会い、資料の取り扱いについて助言にあたった。『胞衣桶』の内部には黒褐色の湿潤な組織が認められたので、その研究者が手袋やマスクを装着し、シャーレに採取した。採取にあたっては、エタノール消毒後ガスバーナーの火炎で滅菌した器具を用いた。シャーレからさらに分析のための資料を採取する際も、同じ研究者が同様の注意のもとで採取した。分析のために採取した資料は、黒褐色の湿潤な米粒大から大豆大のものであり、常温にて乾燥させたところ褐色となった。多くは粉状物であったが、一部に2層の膜状物に挟まれた薄い線維状の組織がみられたので、それを組織学的検査のための資料とした。残りは全て常温で乾燥して保存した。平成8年2月29日に前記センターにおいて、同様の性状を示す線維状の組織部位を再度追加して採取し、合わせて本研究の資料とした。

DNA分析や組織学的検査の対象となった資料は、合わせて6.5×5.5cmの不整形の薄い膜状のものであり、3分の1の部は黄緑色のカビに厚く覆われていた。カビの少ない部分の約半分にあたる

<sup>1)</sup> 名古屋大学医学部法医学教室：〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65

<sup>2)</sup> (財)瑞鳳殿資料館：〒980-0814 仙台市青葉区霊屋下23-2

<sup>3)</sup> 東京都港区教育委員会：〒108-0014 東京都港区芝5-28-4

<sup>4)</sup> (財)元興寺文化財研究所保存科学センター：〒630-0257 生駒市元町2-14-8

キーワード：胞衣桶 (placenta container), 伊達家 (Date clan), 胎盤 (placenta), ミトコンドリアDNA (mitochondrial DNA), ベルリンブルー染色 (Berlin blue staining)

2.5×2.5cm の部分を研究室のクリーンベンチ内で切り出し、DNA 分析を行った。また、残部の一部も同様に切り出し、組織学的検査を行った。残部は将来の検査に備えて保存された。この切り出しの作業も採取と同じ研究者 (T.Y.) が実施した。

## 2-2 方法

### 1) 組織学的検査

資料の一部をホルマリンで固定後、パラフィンに包埋し、薄切標本を作成した。これらの標本について、通常のヘマトキシリン・エオジン染色 (H・E 染色) を行い、さらに、線維成分を検出するアザン染色と銀染色、糖質を検出する PAS 染色、鉄分を検出するベルリンブルー染色の特殊染色を行った。

### 2) DNA 分析

#### a) DNA の抽出

資料の一部 (約 1 g) を液体窒素で凍結し、乳鉢内で粉砕した。この粉状物から通常の有機溶媒を用いる方法で DNA を抽出した (Gill et al.; 1985)。さらに、この DNA 抽出液について、Wizard™ DNA Clean-Up Systems (プロメガ) を用いたスピнкаラム吸着法による精製操作をプロトコールに従って行った。

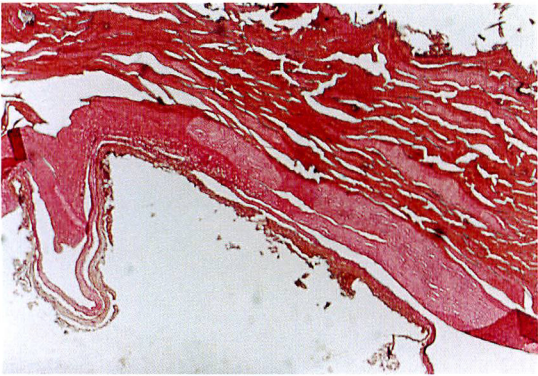
#### b) DNA の性状

抽出ないし精製した DNA について、蛍光法 (Labarca and Paigen; 1980) 及びヒト特異的プローブを用いるクオンティブロット法 (QuantiBlot™ キット, PE アプライドバイオシステムズ) により DNA を定量した。さらに、これらの DNA について、3% アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して DNA の分解の程度を検討した。

#### c) DNA の分析

抽出ないし精製した DNA について、HLA-DQA1 の第 2 エクソン領域 (242bp ないし 239bp) について polymerase chain reaction (PCR) を用いてタイピングする市販キット (AmpliType DQA1 キット, PE アプライドバイオシステムズ) により増幅することを試みた。同様に、3 種類のマイクロサテライト領域である LPL (105-133bp), vWA (139-167bp), F13B (169-185bp) を市販キット (GenePrint STR Systems, プロメガ) により増幅することを試みた。さらに、ヒトミトコンドリア DNA の D-loop 領域の一部 (161bp) の増幅も試み、増幅のみられた D-loop 領域については増幅産物をクローニングし、塩基配列を前報 (Yamamoto et al.; 1998) の如く決定した。なお、PCR についてはいずれも 1 回のみ行い、2 回増幅操作を繰り返したり、nested PCR のような高感度な増幅法は用いなかった。

a



b

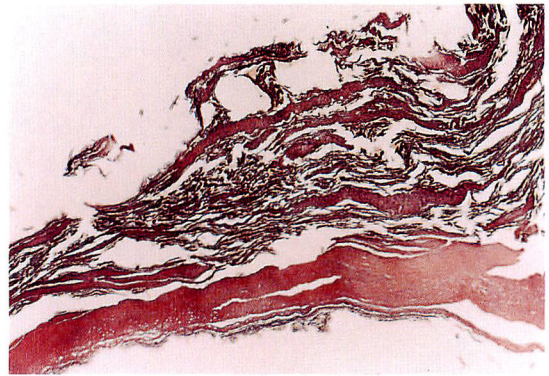


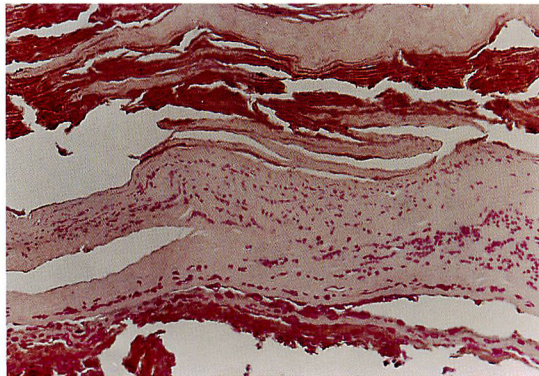
写真1 資料の組織学的検査 (40倍)

a : ヘマトキシリン・エオジン染色, b : 銀染色

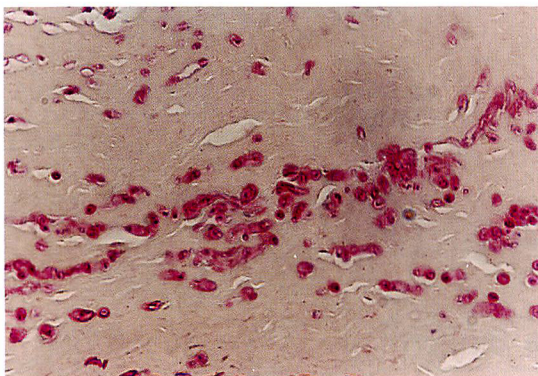
Photo 1 Histological examination of the remains (×40)

a : Hematoxylin-eosin staining, b : silver staining

a



b



c

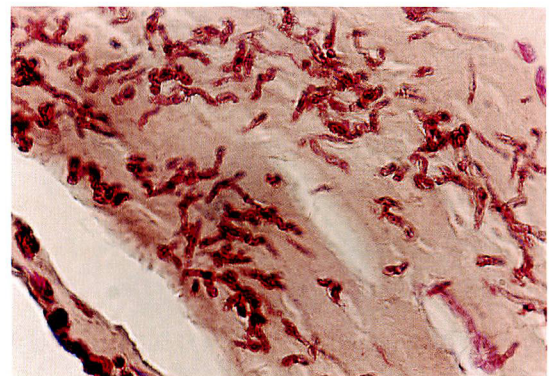


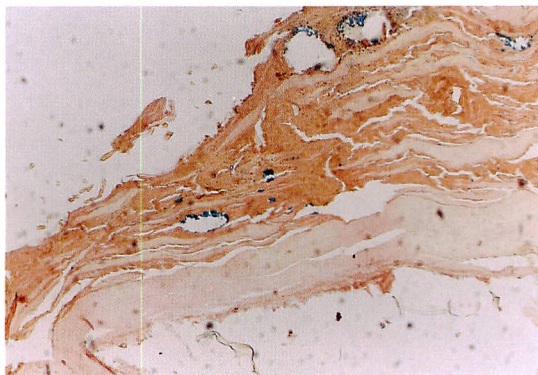
写真2 小顆粒状及び管状構造物 (PAS染色)

a : 100倍, b : 400倍, c : 400倍

Photo 2 Small globular and tubular structures (PAS staining)

a : ×100, b : ×400, c : ×400

a



b

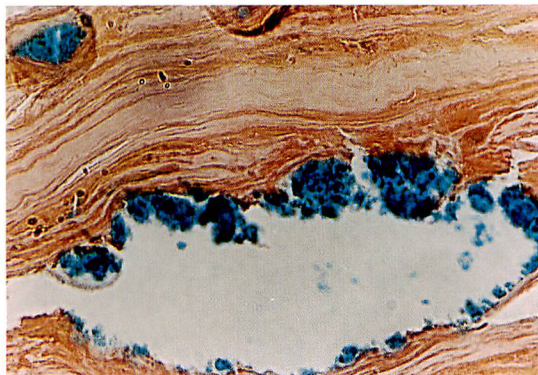


写真3 粒状構造を伴った空洞（ベルリンブルー染色）

a : 40 倍, b : 400 倍

Photo 3 Cavities with granular structures (berlin blue staining)

a :  $\times 40$ , b :  $\times 400$

### 3. 結果

#### 3-1 組織学的検査

H・E 染色, アザン染色, 銀染色により資料の組織構造を観察したところ, 薄い膜状の構造物に挟まれた線維性の結合組織を認めた。写真1に40倍で観察した資料のH・E染色像と銀染色像を示す。また, 線維性の結合組織の諸処には円形の小顆粒や管状構造物が集まった像が認められ, これらは糖質を検出するPAS染色でよく染色された(写真2a, b, c)。これらの構造物は特有の形状と染色像から真菌と判断された。さらに, 結合組織中には楕円状の空洞構造も散見された。そして, 鉄を染色するベルリンブルー染色によって観察すると, この楕円状の空洞構造の内壁に粒

状の青色染色物が認められた(写真3a)。強拡大(400倍)で観察すると, この青色の粒状染色物は変性し, 一部断片化した赤血球とみられる像を示した(写真3b)。

本資料は変性が強く, 明瞭な細胞構造までは認められず, 強靭な線維構造が残存しているものであるが, 2層の膜状物に挟まれた血管のある線維組織という本資料の組織構造は胎盤の特徴を示してお

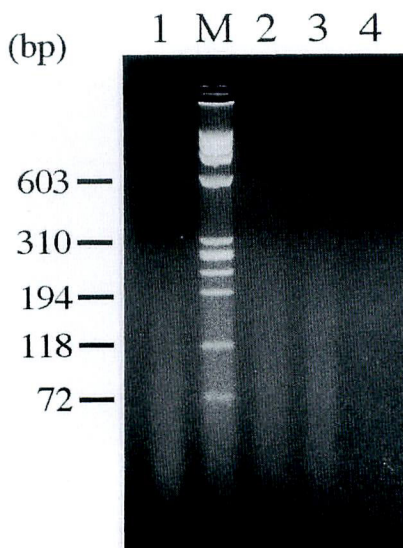


写真4 種々のDNA抽出液のアガロースゲル電気泳動像  
M : サイズマーカー, 1 : 粗抽出液, 2 : 1回精製液,  
3 : 2回精製液, 4 : 3回精製液

Photo 4 Agarose gel electrophoresis of various DNA extracts

M : size marker, 1 : crude extract, 2 : purified extract (once), 3 : purified extract (twice), 4 : purified extract (three times)

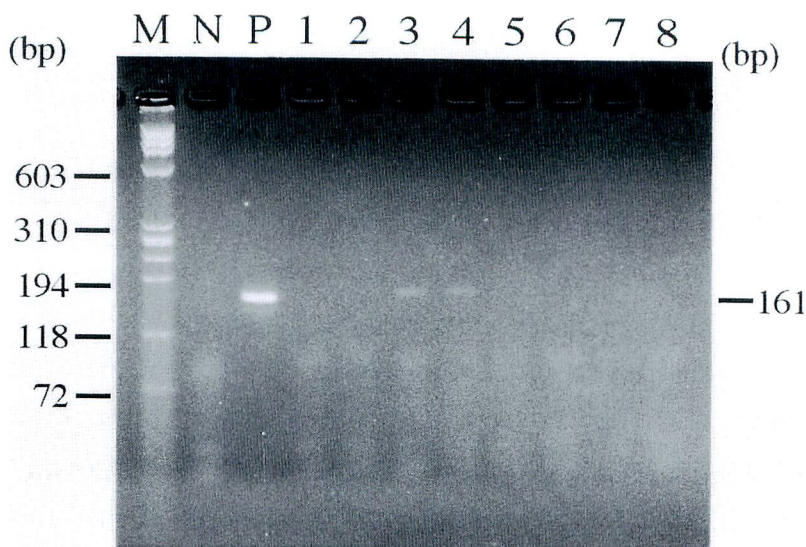


写真5 種々のDNA抽出液からのミトコンドリアDNAの増幅  
M: サイズマーカー, N: 陰性対照, P: 陽性対照, 1: 粗抽出液,  
2: 1回精製液, 3: 2回精製液, 4: 3回精製液, 5: 1の陰性対照,  
6: 2の陰性対照, 7: 3の陰性対照, 8: 4の陰性対照

Photo 5 Amplification of mitochondrial DNA with various DNA extracts  
M: size marker, N: negative control, P: positive control,  
1: crude extract, 2: purified extract (once), 3: purified extract (twice),  
4: purified extract (three times), 5: negative control of 1,  
6: negative control of 2, 7: negative control of 3,  
8: negative control of 4

り、本資料は胎盤と考えられた。但し、ヒトの胎盤かヒト以外の哺乳類の胎盤かは、構造のみからは判別できなかった。

### 3-2 DNA 分析

DNA抽出液は茶色を示したが、精製操作を1回行うと色調は薄くなり、2回ないし3回精製操作を行うことで完全に無色となった。DNA量は、蛍光法では1回精製液で6ng/ $\mu$ l, 2回及び3回精製液でいずれも2ng/ $\mu$ lであったが、ヒトDNAを検出するクオンティプロット法ではいずれの資料

表1 資料から得られたミトコンドリアDNAの塩基配列  
Table 1 Nucleotide sequences of the mitochondrial DNA obtained from the remains

クローン 番 号	(N)	特定部位の塩基置換							
		16209	16218	16223	16225	16231	16269	16311	16324
		T	C	C	C	T	A	T	T
1	(4)	C	—	T	—	—	—	—	C
2	(3)	C	T	T	—	—	—	—	C
3	(2)	—	—	—	—	—	G	—	—
4	(1)	—	—	T	—	C	—	C	—
5	(1)	C	A	T	A	—	—	—	C

も検出感度 (0.5ng/ $\mu$ l) 以下であった。抽出ないし精製された DNA の断片長を、アガロースゲル電気泳動法により検討したところ、いずれも 300bp 以下の低分子となっていることがわかった (写真 4)。

細胞の核 DNA に含まれる HLA-DQA1 及びマイクロサテライトの各領域はいずれも増幅されなかった。一方、一細胞に数千コピー存在しているといわれるミトコンドリア DNA の D-loop 領域は、2 回ないし 3 回精製液で増幅がみられた (写真 5)。これらの増幅産物をクローニングし、得られた 13 クローンについて塩基配列を決定した。ヒトミトコンドリアの塩基配列については、Anderson が初めて報告したもの (Anderson et al.; 1981) が標準のものとされ、それぞれの塩基位置が番号で示されている。資料から得られたクローンの塩基配列を標準の塩基配列と比較した結果を表 1 に示す。表には標準配列とは異なる塩基に置換されている部位のみを示しており、塩基配列を決定した 13 クローンのうち 10 ヶ所以上異なる 2 クローンは除かれている。表 1 に示すように、11 クローンのうち標準の塩基配列と 3 ヶ所違っているものが 4 クローンみられ、それらクローンの配列と 1 ヶ所違っているものが 3 クローンみられた。他の 4 クローンは互いにかなり異なった塩基配列を示した。これらのいずれも、資料の採取や DNA 分析を行った研究者 (T.Y.) のものとは 2~4 塩基違っていた。

#### 4. 考 察

組織学的検査では、資料は構造上の特徴や各種染色像から胎盤組織と考えられた。ただ、真菌が諸処にみられ、腐敗等の分解作用を強く受けていることが推定された。もちろん、組織学的検査のみではヒトの胎盤組織か他の哺乳類の胎盤組織かは区別できなかったが、DNA 分析でヒトのミトコンドリア DNA と考えられる塩基配列が得られており、この胎盤組織はヒトの胎盤組織とみて矛盾はなく、問題の胞衣桶にはヒトの胎盤が納められたとみてよいと思われる。

今回の資料についての DNA 分析では、核の DNA (ゲノム DNA) は検出できず、ミトコンドリア DNA のみが検出された。ゲノム DNA は 1 個のヒト細胞では父由来と母由来の各 1 個しか存在しないのに対し、ミトコンドリア DNA は数千個存在しているとされている。このことは 1 個の細胞には数百以上のミトコンドリアが含まれ、ミトコンドリア 1 個につき数個のミトコンドリア DNA が存在していることを反映している。従って、ゲノム DNA に比し、ミトコンドリア DNA ははるかに検出しやすいので、変性の著しい化石など考古学的資料でよく分析されている。今回の資料は、由来からみて 300 年以上経過している上、腐敗等変性が著しいので、ミトコンドリア DNA しか検出できなかったことは十分予想されたことといえる。

ミトコンドリア DNA の分析は、このように考古学的資料や腐敗資料など変性の著しい資料に適しているが、母系遺伝のため、父子鑑定には用いられない。すなわち、受精の際には精子は卵細胞に核のみを注入し、精子のミトコンドリアは入らないので、子のミトコンドリアは基本的にすべて母の卵細胞のものを受け継ぐことになる。従って、父と子の関係を分析したい場合にはミトコンドリア

DNA は用いることができず、ゲノム DNA を分析する必要がある。変性の著しい資料では特別の工夫によりゲノム DNA が分析できる場合があるが (Uchihi et al.; 1998), 一般に父子関係の証明は容易でない。今回は父子関係の証明を求められたものではなく、ヒトのミトコンドリア DNA の存在が認められたことで、ヒト組織の存在が推定でき、DNA 分析の目的をほぼ達成できたものである。

今回のミトコンドリア DNA の分析においては複数の異なった塩基配列のクローンが得られており、今回得られたクローンのいずれもが胎盤のミトコンドリア DNA の塩基配列でなく、混入した別のヒトミトコンドリア DNA である可能性を完全に否定することは困難である。ただ、今回は資料採取や DNA 分析にあたり、DNA 分析に熟達した研究者 (T.Y.) によりヒト細胞が混入しないよう十分注意されて取り扱われている。もちろん、検出された資料のミトコンドリア DNA の塩基配列は、この研究者の配列とは各クローンで 2~4 塩基違っていた。従って、出土以降にヒトミトコンドリア DNA が混入したことは考えにくい。胞衣桶埋葬前の混入は十分考えられるが、胎盤組織より多量のヒト組織の混入は考えにくく、胎盤組織のミトコンドリア DNA が多く検出されると考えてよいと思われる。そして、変性の著しい資料のミトコンドリア DNA 分析では、塩基配列のわずかに異なるクローンが出現しやすいことが示されていること (Klings et al.; 1997) を考え合わせると、表 1 のクローン番号 1 か 2 のいずれかが胎盤のミトコンドリア DNA の塩基配列と推定される。なお、ヒト以外の動物や植物等の DNA はヒトと塩基配列が大きく違っているので、それらの分析にはヒトの DNA が混入しても容易に識別でき、問題は少ない。

DNA は一般に安定であり、血痕や骨などでは長期間塩基配列が保存されることが知られている。また、酸素や光の作用も及びにくい状態の化石 (琥珀も松ヤニの化石) などでは数万年以上の古いものでも分析できた例は多く報告されている。ただ、DNA は腐敗に弱く、菌の分解酵素で分解されてしまうので、数日で分析不能となることも珍しくない。今回は腐敗等の分解作用が進んだ資料で、しかも 300 年以上経過しているという極めて条件の悪い資料であったが、ミトコンドリア DNA の検出ができた。従って、条件の良い資料はもとより条件の悪い資料にも、特に、歴史上明確な対照資料が存在している場合には積極的に DNA 分析を試みるべきであろう。 (1998. 11. 16 受理)

## 5. 参考文献

- 松本健 (1998) 瑞聖寺旧伊達家墓所出土「胞衣桶」の保存処理に伴う調査, 港区文化財調査収録第 4 集, 東京都港区教育委員会編, 1-16
- S. Anderson, A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H.L. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J. Smith, R. Staden, and I.G. Young (1981) Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome, *Nature*, 290, 457-465.
- P. Gill, A.J. Jeffreys, and D.J. Werrett (1985) Forensic Application of DNA "Fingerprints,"

Nature, 318, 577-579.

- M. Krings, A. Stone, R.W. Schmitz, H. Krainitzki, M. Stoneking, and S. Pääbo (1997) Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans, *Cell*, 90, 19-30.
- C. Labarca and K. Paigen (1980) A Simple, Rapid, and Sensitive DNA Assay Procedure, *Analytical Biochemistry*, 102, 344-352.
- R. Uchihi, T. Yamamoto, H. Nozawa, K. Tamaki, T. Ozawa, T. K. Yamada, and Y. Katsumata (1998) DNA Analysis of a Grandfather-Father-Son Relationship from 300-Year-Old Remains of the Date Clan in Japan, *Japanese Journal of Legal Medicine*, 52, 157-162.
- T. Yamamoto, R. Uchihi, T. Kojima, H. Nozawa, X-L. Huang, K. Tamaki, and Y. Katsumata (1998) Maternal Identification from Skeletal Remains of an Infant Kept by the Alleged Mother for 16 Years with DNA Typing, *Journal of Forensic Sciences*, 43, 701-705.



## Identification of the placenta in a “placenta container” found near the ruins of a Date clan’s tomb in Zuishoji

Yoshinao KATSUMATA <sup>1)</sup>, Toshimichi YAMAMOTO <sup>1)</sup>, Rieko UCHIHI <sup>1)</sup>,  
Yasumune DATE <sup>2)</sup>, Takeshi MATSUMOTO <sup>3)</sup> and Fumitake MASUZAWA <sup>4)</sup>

- 1) Department of Legal Medicine, Nagoya University School of Medicine : 65 Tsurumacho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan
- 2) Museum Zuihoden : 23-2 Otamayashita, Aoba-ku, Sendai 980-0814, Japan
- 3) Education Committee of the Minato City : 5-28-4 Shiba, Minato-ku, Tokyo 108-0014, Japan
- 4) Centre for Conservation Science, Gangoji Institute for Research of Cultural Property : 2-14-8 Motomachi, Ikoma City 630-0257, Japan

A cylindrical copper container was found near the ruins of a tomb of Senchiyo, the eldest son of the fourth lord Tsunamura Date, in Zuishoji, Tokyo. It contained degraded tissue as well as coins et al., and was supposed to be a placenta container. We tried to prove the presence of human placenta in it by histological examination and DNA analysis. Histological examination revealed that the tissue contained blood vessels and had the fibrous structure characteristic of the placenta, although it was severely degraded with the propagation of fungi. DNA analysis showed that the tissue contained human mitochondrial DNA. Present results indicate that the copper container in question was truly a placenta container in which a human placenta was preserved.