



表 1 主な生前 DNA 登録イベント

依頼先	件数	地域
防災訓練	6	横須賀市, 三浦市, 厚木市, 小田原市, 茅ヶ崎市, 寒川町
病院・施設等	5	鎌倉市, 三浦市, 鎌倉市
歯科医師会	4	横須賀市, 緑区, 金沢区, 港北区
町内会等	4	横須賀市, 鎌倉市
神奈川歯科大学	3	横須賀市
市主催のイベント	3	横須賀市, 三浦市
行政機関	2	綾瀬市, 大和市
消防局	1	横須賀市

平成 24 年 4 月～27 年 3 月にかけて行った「大規模災害時身元確認に備えた生前 DNA 登録プロジェクト」の開催場所、依頼機関の一覧

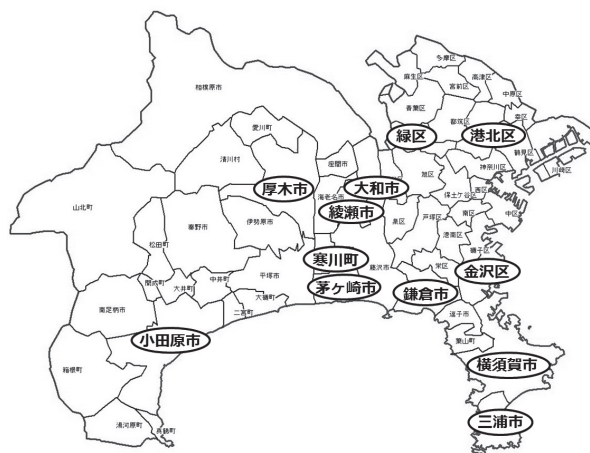


図 1 平成 24 年 4 月～27 年 3 月にかけて行った「大規模災害時身元確認に備えた生前 DNA 登録プロジェクト」の主な開催場所

<http://expo.minnade.jp/kanagawa.htm> 参照

る<sup>2)</sup>。そのため、神奈川歯科大学では平成 24 年 4 月から 27 年 3 月にかけて、大規模災害時身元確認に備えた生前 DNA 登録プロジェクトに取り組み<sup>3)</sup>、身元確認に使用する DNA ローカスの三浦半島での遺伝子頻度が判明、日本全国の遺伝子頻度と比較して三浦半島での身元不明死体の個人識別の確率計算に三浦半島での遺伝子頻度の有用性について検討を行った。その際に、登録された生前 DNA 情報が独居死体の身元確認に役立つ事例を経験したので報告する。

## 材料および方法

### 1. 概要と死体所見

某年 3 月、横須賀市で身元不明死体が発見され、本学で死因究明と身元確認のための司法解剖が行われた。

死体発見のいきさつは、市内の住宅で警察に近所の人から最近住んでいた男性の姿を見ないと安否確認の依頼があり、警察官が赴いたが施錠されており、救急隊を要請、梯子で 2 階の無施錠の窓から入室したところ、布団の上で死亡している男性を発見した。

検視では犯罪性は認めないものの、顔貌では身元が判明できないため、死因の確定と個人識別のため権限解剖を行うこととなった。

解剖時の所見は、外表は体表の皮は褐色から黒褐色で、腹部の軟部組織は屍蠟化、そのほかの皮膚は革皮様化しており、頭部は黒褐色、一部に白髪混じりの頭髪が残存、外傷等異常はなかった。左右眼窩部は原形を止めない僅かな軟部組織の残存があり、上下眼瞼は開口していた。鼻腔から口腔は大きく開口し、上下顎

骨と歯が確認された。残存する黒褐色の軟部組織に損傷等異常はなかった。前頸部には鶏卵大の実質欠損があり、頸部器官は一部露見していた。会陰部は陰茎、陰囊の原型はなく、僅かに黒褐色の蔓状のものが残存し、皮膚等の軟部組織は一部欠損していた。体背面には外傷等異常はなく、中央部は淡い褐色、革皮様化しており、その他は黒褐色、後頸部から左右側胸部、左右側腹部にかけて白色のカビが寄生していた。右下肢は膝関節を屈曲しており、その他上下肢各関節は伸展していた。部分的に小動物による蚕食を認めるが損傷はなかった。

解剖の結果、死因は不詳。死亡してから 4 か月ほど経過し、死亡時の年齢は 66 歳と推定された。

歯は残存していたが、生前歯科資料が存在しておらず、身元確認ができなかったため、DNA による身元確認を囑託された。

警察が遺族と思われる姉を探しあて、兄弟鑑定による身元確認のための DNA 資料の採取をお願いしたところ、女性は昨年、本学の生前 DNA 登録事業に参加登録をしたという申し出があったため、女性の承諾を得て登録済みの DNA データを用いて死体との弟姉鑑定を行った。

### 2. 生前 DNA 登録および方法

DNA による身元確認は通常、指紋や歯科所見と平行して行われる<sup>6-11)</sup>。DNA は生前の本人資料が存在しなくても血縁者から本人を特定できることが指紋、歯科所見にはない特徴である。しかし、血縁が遠い遺族との照合では鑑定精度が低くなるため、確実に身元確認を行うためには本人の生前 DNA データが必要とな

管理番号 \_\_\_\_\_

**同 意 書**

大規模災害時の身元確認のための生前 DNA データの登録に関する研究への協力の同意文書

研究責任者：所属 神奈川県立大学大学院災害医療歯科学講座歯医歯科学  
氏名 \_\_\_\_\_ 氏

私は「大規模災害時の身元確認のための生前 DNA データの登録に関する研究」について、説明文書を用いて説明を受け、十分理解しましたので、協力いたします。

説明を受け理解した項目（口の中に自分でレ点をつけて下さい）

- 研究の目的、意義
- 研究方法
- 研究に参加することにより期待される利益及び起り得る危険並びに必然的に伴う心身に對する不快な状態
- 当該研究に係る資金源、起り得る利害の衝突及び研究者等の関連組織との関わり
- 特許権等の帰属先
- 研究への参加は被験者の自由意思によるものである。被験者は研究への参加を随時に拒否または撤回することができる。また、拒否・撤回によって被験者が不利な扱いを受けることはないこと
- 研究成果が公表される場合、その他全ての機会において被験者の機密は保全されること
  - 資料等の保存及び使用方法並びに保存期間
  - 本研究のみ同意  本研究及び将来の研究利用にも同意
- 被験者に対する補償
- 研究責任者の職名、連絡先並びに分担研究者の氏名

平成 年 月 日  
ふりがな \_\_\_\_\_

署名および捺印： \_\_\_\_\_ ⑥（男、女） \_\_\_\_\_ 歳

住所： \_\_\_\_\_ 電話： \_\_\_\_\_

生年月日： T・S・H 年 月 日

家族等氏名： \_\_\_\_\_

続柄： \_\_\_\_\_ 連絡先： \_\_\_\_\_

説明者の所属および職名：神奈川県立大学大学院災害医療歯科学講座歯医歯科学

説明者の署名および捺印： \_\_\_\_\_

(注) 家族等とは、後見人、保佐人、親権者、配偶者、成人の兄弟等をいう。

図2 前DNA登録の際に使用した、同意書研究の内容を説明し、同意を得た上で記入してもらった。

そこで本学では、生前にDNAを登録し、データベース化しておくことで万が一の際に迅速かつ確実な身元確認を行う事が可能になると考えた。

そこで、平成24年4月から27年3月にかけて、「大規模災害時身元確認に備えた生前DNA登録プロジェクト」を行った。このプロジェクトは文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の一環として実施し、本学附属病院やイベント等で約3,000人の登録及び約2,000人分のデータベースが構築された。

生前DNA登録を行った場所は神奈川県内で、主に学内のイベントや防災訓練や歯科医師会、町内会など依頼のあった場所に出向いて行った(表1, 図1)。遺族と思われる姉は表中の1つのイベントでDNAを採取していた。

### 2-1. 口腔内細胞の採取

生前DNA登録は、まず希望者に対して説明を行い、同意の場合同意書に必要な事項を記入してもらう(図2)。その後オムニスワブ(GEヘルスケアライフサイエンス株式会社)にて頬粘膜から口腔粘膜細胞を採取し、登録証を交付した(図3)。その後オムニスワブを教室に持ち帰り保管した。

### 2-2. スワブからのDNA抽出

オムニスワブの先端を1.5mlの滅菌遠心チューブに入れ、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN社)を用



図3 口腔粘膜細胞を採取するための、オムニスワブ(GEヘルスケアライフサイエンス株式会社)左右の頬粘膜を10回ずつ擦って口腔粘膜細胞を採取する。

いて抽出した。つまり、スワブの入っているチューブにBuffer AL 450μl, Proteinase K 20μlを入れ攪拌、56℃の恒温槽に30分置く。その後攪拌、100%エタノール 450μl 入れ攪拌、この混液を全量 QIAamp DNA Mini Spin Colom に入れ、蓋を閉め8000rpmで1分間遠心かける。下に落ちたろ液を捨て、再びチューブに乗せてBuffer AW1 600μlをカラムに入れ8000rpmで1分間遠心かける。さらにそのろ液を捨て、Buffer AW2 600μlをカラムに入れ、8000rpm1分間遠心かける。ろ液を捨て、カラムを新しいチューブに乗せて14000rpmで3分間遠心分離をかける。カラムにBuffer AEを100μl入れ、5分放置後14000rpmで1分間遠心分離する。

### 2-3. 歯からのDNA抽出

鑑定資料は死体の歯を用いた。歯は縦断切片を作成し、TBONE EX KIT(株式会社DNAチップ研究所)を用いて脱灰・蛋白質分解処理・抽出を行った<sup>4,5)</sup>。つまり、歯の汚れをふき取り、ブロックに固定する。Isometにて1.5~2mmの厚さに切断し、切片を超音波洗浄する。滅菌超純水にて洗浄後、T-bone EX KITのSolution Aに切片を2~3枚入れ56℃の恒温槽に2~3日置く。その間1日に3~4回転倒混和を行う。その後Solution B 1.8mlを加え、56℃の恒温槽で3~4回転倒混和を行いながら2時間おく。切片を滅菌超純水にて洗浄し、新しい50ml滅菌チューブに移し、Solution C 400μlとProteinase K 50μlを添加し56℃の恒温槽で3~4回転倒混和を行いながら3時間置く。

その後混液を2ml滅菌チューブに移し、TE飽和フェノールを混液と同量添加、15回転倒混和後13000rpmで5分間遠心を行う。

DNA層を新しい2ml滅菌チューブに移し、同量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールを添加し、15回転倒混和後13000rpmで5分間遠心を行う。

DNA層を新しい2ml滅菌チューブに移し、同量のBuffer ALを添加し、15秒ボルテックスをかけ、その後スピンドウンし、そこにDNA層と同量の100%エ

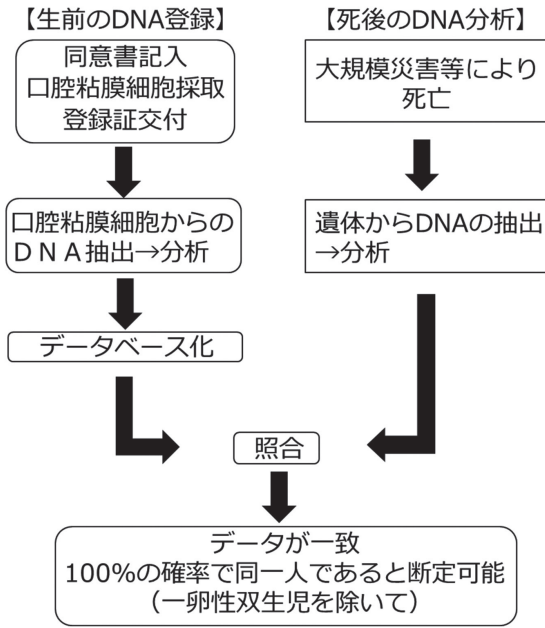


図4 生前DNA登録、保存方法と死後のDNA分析  
生前のDNA情報を登録しておくことで、大規模災害などにより死亡した場合でも、死後のDNA情報と完全に一致することから、迅速かつ確実な身元確認が可能となる。

	身元不明死体	姉(登録済DNA)
D8S1179	10,11	11
D21S11	29,30	29,30
D7S820	10,11	11,12
CSF1PO	10,11	11,12
D3S1358	15,16	15
TH01	6,7	6,7
D13S317	11,12	10,11
D16S539	9,10	9,10
D2S1338	19,22	19,26
D19S433	12,14.2	13,14.2
vWA	14,16	14,16
TPOX	9,11	8,11
D18S51	14,15	14,15
D5S818	10,11	8,10
FGA	21,23	19,23
Amelogenin	xy	xx

図5 分析結果

生前死後のSTRを比較し、共通する型の遺伝子頻度から弟と姉らしさ(尤度比)を算出した。その結果STRの尤度比は425、確率は99.765%であった。

タノールを添加、またボルテックスをかけ、スピンドウンを行う。

QIAamp Mini Spin Colum に 650 μl 移し、8000 rpm で1分間遠心をかける。

ろ液を捨て、残りの溶液をミニスピナカラムに移し、8000 rpm で1分間遠心をかける。Buffer AW1 600 μl をカラムに入れ8000 rpm で1分間遠心をかける。さらに Buffer AW2 600 μl をカラムに入れ、8000 rpm1分間遠心をかける。ろ液を捨て、カラムを新しいチューブに乗せて13000 rpm で1分間遠心をかける。カラムに Buffer AE を 100 μl 入れ、5分放置後14000 rpm で1分間遠心分離する。

2-4. 核 DNA 常染色体分析

核 DNA の STR は専用の分析キット (Amp FLSTR Identifiler (Applied Biosystems 社)) を用いた。DNA プライマーおよび PCR の条件はキット添付のマニュアルに従い行った。mtDNA の HV1 ローカスは、DNA プライマーの塩基配列および PCR の条件は学術雑誌に報告された文献を参考として発注合成したものを用いた。

STR は PCR 増幅産物をマニュアルに従い処理した

後、ABI Prism 3130XL (機器: Applied Biosystems) でキャピラリー電気泳動分析、Gene Mapper ID (ソフト: Applied Biosystems) でキット付属のアレリックラダーを指標に解析判定を行った。

2-5. ミトコンドリア DNA (mtDNA) 分析

PCR 法により核 DNA に存在する HV1 ローカス (16,111 ~ 16,400) は補助的に用いた。

mtDNA は PCR 増幅産物を確認後、サイクルシーケンス反応を行い、ABI Prism 310 (機器: Applied Biosystems) を使いキャピラリー電気泳動で分析、付属のソフトで解析を行った。型は基準とされる Anderson らが報告した mtDNA の塩基配列 (基準配列) と比較、塩基置換があった場合は置換した部位と置換数で型とした。

結 果

生前死後の照合判定

遺体の歯から抽出した DNA から検出された STR の結果と姉と思われる人物の STR を比較し、共通する型の遺伝子頻度から弟と姉らしさ(尤度比)を算出した。生前 DNA 登録と死後の DNA 分析の照合判定

の流れを図4に示す。

今回の結果では、日本人集団から検出した遺伝子頻度からSTRの尤度比は425、確率は99.765%であった(図5)。弟姉関係を肯定する目安は尤度比500確率が99.8%であることからやや低い値であった。

mtDNAは5塩基置換(16129A-16189C-16223T-16297C-16298C)で一致した。この塩基置換型は本学では1,200件中21例あり、出現頻度の逆数を尤度比とすると尤度比は57であった。

STRは核DNAに存在し、どちらも独立したDNAであるため、mtDNAの尤度比をかけ合わせたところ、総合尤度比は24,225、確率は99.996%となり、弟姉関係を肯定できる値となった。

子どもに存在する遺伝情報は両親から受け継いでいるため、核DNAの常染色体を分析することで、兄弟姉妹らしさを確率論から証明することができる。また、mtDNAは母親から子供に遺伝するため、母子鑑定や同一の母親から生まれた兄弟鑑定に利用される。

## 考 察

本事例では、身元不明死体の遺族が生前にDNA登録を行っていた。これにより比較すべきDNAのデータ化および鑑定に要する時間を短縮することができた。

身元不明死体が生前にDNAを登録していた場合は、そのDNA情報と死体のDNA情報は完全に一致することから、迅速かつ確実な身元確認が可能になると考えられた。今回、DNAが保管されていたことで必要に応じてmtDNAの分析も可能となることが証明され、DNAの保管も大切であることを再認識した。また、本事例により、本人が登録していない場合でも、親族が登録してあることで身元確認に有効であることが示唆された。

## 謝 辞

本研究は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業S1203004(平成24年~平成26年)により行われた。

## 文 献

1. 青木孝文, 小菅栄子. 歯科的個人識別におけるX線画像活用の最前線. *INNERVISION* **27**: 52-54, 2012.
2. 地震調査研究推進本部(HP). [www.jishin.go.jp/main/yokosukachizu/katsudanso/f037-miura-hanto.htm](http://www.jishin.go.jp/main/yokosukachizu/katsudanso/f037-miura-hanto.htm).
3. 大平 寛, 山田良広, 山本伊佐夫, 中川貴美子, 齊藤麻希. 大規模災害時の身元確認のための生前DNAデータ収集とデータベースの構築. *神奈川歯学* **50**-特: 170-172, 2015.
4. 株式会社DNAチップ研究所. TBONE EX KIT 硬組織(歯牙・骨)用DNA抽出キット 実験マニュアル; 第2版; 株式会社DNAチップ研究所, 横浜市, 9-15, 2012.
5. Kazuho Maeda, Chikako Murakami, Masaaki Hara, Wataru Irie, Momoko Oishi, Chizuko Sasaki, Shigeki Nakamura, Shirushi Takahashi, Aya Takada, Kazuyuki Saito. DNA identification of skeletal remains by using a new extraction kit. *Forensic Science International Genetics supplement Series* **4**: e242-e243, 2013.
6. 石山昱夫, 吉井富夫. DNA鑑定入門; 南山堂, 東京, 132-152, 1998.
7. John M. Butler. DNA鑑定とタイピング; 共立出版, 東京, 15-26, 2009.
8. 田村隆明. 生物・生化学・分子生物学; 南山堂, 東京, 213-219, 2011.
9. 石津日出雄, 高津光洋. 標準法医学・医事法; 医学書院, 東京, 287-295, 2006.
10. 高津光洋, 池田典昭, 鈴木廣一, 石津日出雄. 標準法医学; 医学書院, 東京, 230-250, 2012.
11. 高取健彦, 長尾正崇, 山内春夫, 中園一郎. *New エッセンシャル法医学*; 医歯薬出版, 東京, 379-389, 2012.