

## 三浦半島における大規模災害時の身元確認に備えた生前 DNA データ収集とデータベースの構築およびその有効性についての研究

宮 川 康 一

神奈川歯科大学大学院歯学研究科災害医療歯科学講座法医歯科学  
(受付：2017 年 8 月 18 日)

### 緒 言

2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災の際、多数の身元不明遺体が生じた経緯から、確実かつ迅速な身元確認を目的とした生前資料のデータベース化が急務となっている。身元確認の主な手段として、指紋、歯科的所見、DNA があげられる。指紋は最も強力な身元確認手段であるが、遺体の腐敗とともに採取が困難になることから、身元確認に使用できるのは、発災初期に限られる。歯科的所見にあたっては遺体の口腔内所見と比較対照する生前資料が不可欠であり、X 線画像やデンタルチャートの照合ソフトウェアを開発して身元確認の精度を高める動きも出てきている<sup>1)</sup>。しかし、生前資料は保存期間が終了したことによる破棄、津波・火災による喪失や消失によって、身元確認が不可能な場合がある。

DNA による身元確認は時間と手間がかかるため、通常は身元確認の最終手段とされている。しかし、指紋の採取が不可能あるいは生前の歯科資料がない場合でも、DNA による身元確認は可能である。DNA のデータベース化は多くの国や地域ですで行われているが、そのほとんどは遺伝子頻度の調査であり<sup>2-5)</sup>、身元不明遺体の特定<sup>6-8)</sup>を想定したものではなく、本研究のごとく生前の DNA データ収集およびデータベース構築の試みは国内外でも例がない。三浦半島は日本の中で大規模災害が起こりうる最もリスクの高い地域の一つである<sup>9)</sup>。大規模災害に備えて生前に DNA を登録しておけば、万が一災害に遭って亡くなった場合でも、登録 DNA 情報と遺体の DNA 情報を照合することで身元確認を確実かつ迅速に行うことが可能となる。

そこで本研究では、大規模災害時の身元確認に備えて生前資料としての DNA データ収集とデータベース構築を行い、DNA 分析を通じて遺伝子出現頻度を算出した。さらに、法医学解剖の遺体の身元確認に生前 DNA データベースを応用する機会を得たのでそのデータベース活用の有効性についても検討を行った。

### 材料および方法

#### 1. 生前 DNA データ収集

##### 1) 生前 DNA 登録対象者

平成 24 年 4 月から平成 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」を立ち上げ、神奈川歯科大学附属病院患者、防災訓練（横須賀市、三浦市、逗子市）参加者、生前 DNA 登録に関する講演会（歯科医師会、町内会等）参加者、市民まつり等のイベント来場者を対象に登録希望者を募った（表 1, 図 1）。男女および年齢を問わず、プロジェクトの趣旨を説明し登録の同意が得られた希望者のみを登録した。登録希望者は同意書に必要事項を記入し、その場で口腔粘膜細胞を採取した後、生前 DNA 登録済証を交付した。

本研究は、上記の全対象者 1,905 名のうち、三浦半島（横須賀市、三浦市、三浦郡葉山町、逗子市、鎌倉市）の居住者 1,254 名（0 歳～94 歳、男性 536 名、女性 718 名）のデータを対象とした（表 2）。また、神奈川歯科大学研究倫理審査委員会の許可（第 204 番）を受けて行われた。

##### 2) 材料

両頬の内側をオムニスワブ（GE Healthcare, 東京都）で数回こすり、口腔粘膜細胞を採取した。



表2. 三浦半島在住の生前DNA登録者数

Yokosuka City	705
Miura City	466
Zushi City	42
Hayama Town	22
Kamakura City	19
	1,254

(大平寛ら：犯罪誌，82(4)：89-95，2016のTable.1を許可を得て転載)

ルテックスミキサーで攪拌し，スピンドウンを行った。混液をQIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Spin Columnに移し，その後は口腔粘膜細胞と同様の処理をした。

### 3. PCR増幅

#### 1) 核DNA

法医学領域における個人識別専用設計された世界標準のプライマーを含むキット (AmpF $\ell$  STR<sup>®</sup> Identifiler plus PCR Amplification Kit, Applied Biosystems, USA) を用いて，D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA の15ローカス (性別判定を含めると16ローカス) をPCR増幅した (GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700, Applied Biosystems)。DNAは各10 ngを用い，条件はキット付属のマニュアルに従った。

#### 2) ミトコンドリアDNA (mtDNA)

mtDNAのHV1ローカス，すなわちAndersonら<sup>12)</sup>の塩基番号で16,111～16,400位を占める約300 bp長を読み取り領域とするプライマーを用い，PCR増幅を行った (GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700, Applied Biosystems)。用いたプライマー配列は以下のとおりとした。

F: 5'-CACCCAAAGCTAAGATTCTA-3'

R: 5'-ATGGGCCCGGAGCGAG-3'

PCR増幅条件は，PCR混液25  $\mu$ l (プライマー各0.5  $\mu$ M; 2.5 mM dNTP; 1U Taq DNA polymerase (EX Taq HS, Takara, 志賀)) 中にTemplate DNAを各1  $\mu$ l加え，94 $^{\circ}$ C 4分間予備加熱後，94 $^{\circ}$ C 1分，55 $^{\circ}$ C 45秒，72 $^{\circ}$ C 45秒のサイクルで口腔粘膜細胞は26回，歯は35回繰り返す，最後に72 $^{\circ}$ C 3分間伸長反応を行った。PCR増幅後，増幅産物各2  $\mu$ lを濃度既知のDNAサイズマーカー (100 bp DNA Ladder, Takara, 滋賀) と共に2%アガロースゲル (Agarose S, Nippon Gene,

東京) を用いて100 V, 25分間電気泳動 (Mupid-2plus, (株) ミューピッド, 東京) 後，エチジウムブロマイド (和光純薬, 大阪) 染色を行い，E-Graph (ATTO, 東京) にて増幅を確認した。さらに，画像をコンピューターに取り込み，Image J (NIH, USA) を用いて各増幅産物の面積の積分値からそれぞれの濃度を測定した。その際，100 bp DNA Ladderの濃度を基準にした。

### 4. DNA分析

#### 1) Short Tandem Repeat (STR)

PCR増幅後電気泳動を行い (ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems)，キット付属のアレリックラダーを指標に型判定を行った (Genemapper<sup>®</sup> ID-X ver.1.4, Applied Biosystems)。

#### 2) mtDNA シークエンス

PCR増幅をアガロースゲル電気泳動で確認後，増幅産物の10 ngをサイクルシークエンス反応 (BigDye Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) に使用した。シークエンス反応終了後，エタノール沈殿法により精製した後，ABI Prism 310 (Applied Biosystems) を用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<sup>12)</sup>が報告したmtDNAの塩基配列 (基準配列) と比較し，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

### 1. 生前DNAデータ収集

三浦半島在住者1,254名の生前DNA登録が得られた。登録した家族数別の世帯数は，2名が125世帯，3名が56世帯，4名が25世帯，5名が9世帯，6名が2世帯，1名が679世帯であった (図2)。また，年齢別データを図3に示した。D2S1338アリルは全データベースでは29型が認められたが，非血縁者データベースでは認められなかった (表3)。

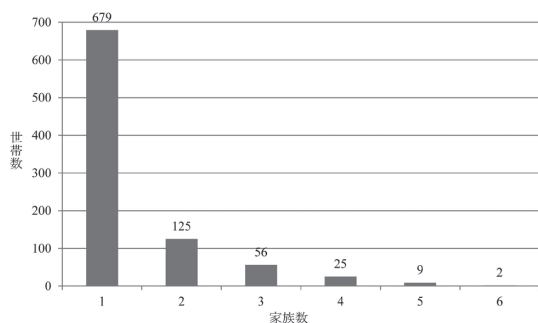


図2 生前DNAを登録した家族数別の世帯数 (n=1,254)  
(大平寛ら：犯罪誌, 82 (4) : 89-95, 2016のFig.2を許可を得て転載)

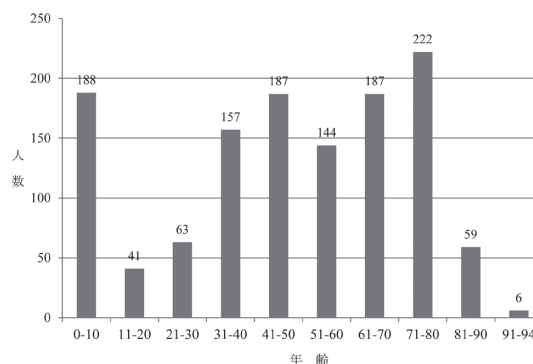


図3 生前DNA登録者の年齢構成 (n=1,254)  
(大平寛ら：犯罪誌, 82 (4) : 89-95, 2016のFig.3を許可を得て転載)

## 2. 身元確認事例

遺体の歯から抽出したDNA型 (STR型) と姉と思われる人物のDNA型を比較したところ、尤度比は425、弟-姉の肯定確率は99.765 (425/1+425) %であった。血縁関係を肯定する目安 (尤度比500、肯定確率99.8 (500/1+500) %よりも低い数値となったため、mtDNA分析を追加した。両者のmtDNA型は5塩基置換型で一致した。検出された塩基置換型 (16129A-16189C-16223T-16297C-16298C) は本学の1,200データ中21例検出されており、出現頻度は21/1200、出現頻度の逆数である尤度比は57と算出された。核DNAとmtDNAはそれぞれ独立したDNAであるため、両者の尤度比を掛け合わせた総合尤度比は24,225、確率は99.996%となり、血縁関係を肯定するに足る値を得た (表4)。

## 考 察

三浦半島在住者1,254名の生前DNAを分析検討したところ、D2S1338アリルに検出された29型は全国データ<sup>15)</sup>に認められない型で三浦半島地域に特異な型であると考えられた。このことから、身元の特定作業でD2S1338アリルに29型が認められた場合、三浦半島の出身あるいは血縁者が在住している可能性を示す有効なデータであることが示唆された。モンゴル人集団では、3地域において数個のローカスで有意差が認められるとする報告があり<sup>16)</sup>、地域に特異な型の存在を支持している。

DNA鑑定による本人の特定は、本人の生前DNAと遺体の歯や爪、骨から抽出したDNAと比較照合するが、本人の生前DNAを採取することが困難な場合が多く、血縁関係者から得られたDNA (主にスワブ

を照合することで行われてきた。東日本大震災では、津波により家族全員が死亡した例も伝えられた。照合されるDNAの血縁関係が遠い場合、確率計算で高い数値を得ることが難しいため鑑定が非常に困難になり精度が極端に低くなり<sup>13,14)</sup>、DNA鑑定をもってしても遺体を取り違える可能性がある。しかし、照合されるDNAが遺体本人のものである場合、DNA情報は100%一致する。すなわち、生前にDNAを登録しておくことで、災害で死亡したとしても同一人の照合となるため、確実なDNA鑑定が可能となる。さらに検査が遺体資料のみとなり対照資料を探したり分析したりする必要がなくなり、DNA鑑定の時間がかかる欠点を補うことが可能である。

今回の身元確認事例では親族 (姉) が生前にDNA登録を行っていたことにより、遺体由来DNAと比較すべき対照DNAが既に分析済みであったため、鑑定が迅速に実施できた。身元を特定する本人が登録していない場合でも、親族が登録しておくことで鑑定に要する時間を短縮できる可能性が示唆された。

三浦半島には活断層が多数存在するため、大規模災害時に多くの被災者が生じることが予想されている。我々は、生前DNA登録費用を無料で実施した2年間で2,800名を超える登録者を得、現在も自費での登録を勧めている。個人情報としてのDNA情報の保管手段や保管場所など技術的な問題の解決や法的整備も必要であると思われる。また、大規模災害のリスクが高い地域での生前DNA登録は非常に有益なものであり、日本のみならず海外においても大規模災害に備えた生前DNAデータ収集とデータベース構築の有用性の周知を図ることは非常に重要であると考えられる。



表3. 三浦半島におけるSTR15ローカスの出現頻度

	D8S1179		D21S11		D7S820		CSF1PO		D5S1328		TH01		D13S17		D16S539		D21S1338		D19S433		vWA		TPOX		D18S51		D8S818		FGA											
	All	unrelated	All	unrelated	All	unrelated	All	unrelated	All	unrelated	All	unrelated	All	unrelated	All	unrelated	All	unrelated	All	unrelated	All	unrelated	All	unrelated	All	unrelated	All	unrelated	All	unrelated										
5																																								
6																																								
7																																								
8																																								
8.3																																								
9																																								
9.2																																								
9.3																																								
10																																								
11																																								
12																																								
12.2																																								
13																																								
13.2																																								
14																																								
14.2																																								
15																																								
15.2																																								
16																																								
16.2																																								
17																																								
17.2																																								
18																																								
18.2																																								
19																																								
19.2																																								
20																																								
20.2																																								
21																																								
21.2																																								
22																																								
22.2																																								
23																																								
23.2																																								
24																																								
24.2																																								
25																																								
25.2																																								
26																																								
26.2																																								
27																																								
28																																								
28.2																																								
29																																								
29.2																																								
30																																								
30.2																																								
31																																								
31.2																																								
32																																								
32.2																																								
33																																								
33.2																																								
34																																								
34.2																																								
35.2																																								
OhH	0.8397	0.8561	0.7807	0.7755	0.7520	0.7531	0.7137	0.7154	0.7145	0.7222	0.7153	0.7270	0.8397	0.8422	0.7640	0.7696	0.8812	0.8800	0.7448	0.7448	0.8138	0.8045	0.6563	0.6544	0.8461	0.8335	0.8102	0.8064	0.8628	0.8606	0.8628	0.8606	0.8628	0.8606	0.8628	0.8606				
ExH	0.8348	0.8362	0.7849	0.7873	0.7705	0.7682	0.7397	0.7342	0.7074	0.7109	0.7129	0.7141	0.8055	0.8071	0.7576	0.7609	0.8760	0.8762	0.7736	0.7723	0.7971	0.7978	0.6572	0.6563	0.8542	0.8531	0.7921	0.7927	0.8584	0.8594	0.8584	0.8594	0.8584	0.8594	0.8584	0.8594				
PIC	0.8141	0.8156	0.7578	0.7606	0.7349	0.7323	0.7015	0.6954	0.6566	0.6610	0.6639	0.6653	0.7774	0.7794	0.7211	0.7249	0.8635	0.8638	0.7427	0.7409	0.7664	0.7674	0.5947	0.5931	0.8379	0.8366	0.7604	0.7609	0.8427	0.8438	0.8427	0.8438	0.8427	0.8438	0.8427	0.8438				
P	0.4946	0.1324	0.1122	0.1121	0.2605	0.2680	0.0077	0.0137	0.9901	0.9790	0.0013	0.0003	0.1974	0.2574	0.4954	0.1760	0.7896	0.6321	0.2627	0.5316	0.1098	0.2189	0.5475	0.5965	0.9898	0.8205	0.4080	0.3901	0.5202	0.5202	0.5202	0.5202	0.5202	0.5202	0.5202					

OhH: observed heterozygosity, Ex.H: expected heterozygosity (GeneDiversity)  
 PIC: Polymorphism information content (A closely related diversity measure is the polymorphism information content (PIC) (Bosstein et al. 1980).)  
 P: Exact p-value

大平寛ら：犯罪誌, 82(4)：89-95, 2016のTable 2を許可を得て転載

表 4. 身元確認事例における尤度比と肯定確率

	尤度比	確率	総合尤度比	総合確率
STR	425	99.765%	24,225	99.996%
mtDNA	57	-		

核DNA-STRのみで血縁関係を肯定するのが困難であったため、mtDNA分析を追加したところ、総合確率が99.996%となり、血縁関係を肯定するに足る値を得た。

### 謝 辞

研究の遂行にご協力頂きました神奈川歯科大学災害医療歯科学講座法医学歯科学、教授山田良広先生をはじめ教室員の各位に心からお礼申し上げます。

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 27 年）により行われた。

本学位申請まとめ論文は、大平寛ら：犯罪誌，82（4）：89-95，2016 の一部および伊藤多佳子ら：神奈川歯学第 51 巻第 2 号 p.91-95，2016 の一部をまとめたものである。

### 参考文献

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. Teresinha P, Elzemar RR, Ândrea RS, Sidney S. Fourteen short tandem repeat loci Y chromosome haplotypes. Genetic analysis in populations from northern Brazil. *Forensic Science Int* **6**: 413-418, 2012.
3. Kalpana D, Ghosh T, Mukerjee S, Mukherjee M, Sharma AK. Pentaplex typing of new European Standard Set (ESS) STR loci in Indian population. *Forensic Sci Int Genet* **6(3)**: e86-e89, 2012.
4. Park SJ, Woo KM, Oh HH, Pkim SH, Lee SH. Population Data of the 25 STR Loci in Koreans. *J Forensic Sci* **50**: 710-715, 2005.
5. Tokdemir M, Tunçez F T, Vicdanli N H. Population Genetic data for 15 Autosomal STR markers in Eastern Turkey. *Gene* **586**: 36-40, 2016.
6. Clayton TM, Whitaker JP, Maguire CN. Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Science Int* **76**: 7-15, 1995.
7. Clayton T.M, Whitaker JP, Fisher DL, Lee DA, Holland MM, Weedn VW, Maguire CN, DiZinno JA, Kimpton CP, Gill P. Further validation of a quadruplex STR DNA typing system: a collaborative effort to identify victims of a mass disaster. *Forensic Science Int* **76**: 17-25, 1995.
8. Chishti HM, Ansar M, Ajmal M, Hameed A. Application of Short Tandem Repeat markers in diagnosis of chromosomal aneuploidies and forensic DNA investigation in Pakistan Original. *Gene* **548**: 217-222, 2014.
9. Shimazaki K, Kim HY, Chiba T, Satake K. Geological evidence of recurrent great Kanto earthquakes at the Miura Peninsula, *Japan J Geophys Res* **116**, B12408: 1-16, 2011.
10. 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.
11. 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.
12. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465, 1981.
13. 勝又義直, 勝又 竜, 山本敏充, 玉木敬二. 親子鑑定における確率計算の実際と突然変異への対応 - STR キットを利用した DNA 鑑定の識別力の検証 -. 日法医誌 **55**: 205-216, 2001.
14. 高取健彦編. NEW エッセンシャル法医学 (第 5 版). 医歯薬出版, 東京, 373-377, 2014.
15. Yoshida K, Takahashi K, Kasai K. Allele Frequencies of 15 Loci using AmpFISTR Identifier Kit in Japanese Population. *J Forensic Sci* **50**: 718-719, 2005.
16. Minjuur T, 山本敏充, 打樋利英子, 吉本高士, 勝又義直. 3 地域のモンゴル人集団における 15 ローカスの STR 解析. *DNA 多型* **15**: 215-217, 2007.