

厚生労働行政推進調査事業費補助金
政策科学総合研究事業（政策科学推進研究事業）
分担研究報告書（令和5年度）

戦没者遺骨の身元特定に係るDNA鑑定精度向上に関する研究
研究分担者 眞鍋 翔 関西医科大学医学部法医学講座 助教

研究要旨：本研究では、厚生労働省の戦没者遺骨のDNA鑑定事業の効率的な遂行のために、「戦没者遺骨鑑定の標準プロトコルの作成」、「多数の遺骨・ご遺族から該当する血縁者をスクリーニングする専用ソフトウェアの開発」を行う。

A. 研究目的

厚生労働省の戦没者遺骨のDNA鑑定事業において、多数の遺骨・ご遺族から該当する血縁者をスクリーニングするのは手作業であり、多大な時間を要する。この課題を解決するために、私は多数の遺骨・ご遺族から該当する血縁者をスクリーニングする専用ソフトウェアの開発および検証を行った。令和5年度は、R言語のshinyパッケージの導入による視認性の向上、C++言語の導入による計算速度の向上を実現した。また、ソフトウェアの検証として、血縁関係毎の感度（真の血縁ペアを正しく血縁と判定できる確率）、特異度（非血縁ペアを正しく非血縁と判定できる確率）を調査した。

B. 研究方法

ソフトウェアの画面については、これまではR言語のtcltk、tcltk2パッケージを用いていたが、より視認性に優れたshinyパッケージを導入した。また、計算速度の向上のため、DNA型の解析を行うプログラムはC++言語で作成した。

続いて、ソフトウェアの検証のため、コンピュータ上で模擬のDNA型を作成した。まず、父-息子、母-娘、兄弟、姉妹、父方おじ-甥、母方おば-姪の血縁ペアのDNA型（常染色体STR型、Y-STR型、mtDNA型）をそれぞれ1000組ずつ作成した。STR型の作成にあたっては、日本人集団のDNA型調査データ、およびメンデルの分離の法則を基にした。Y-STR型、mtDNA型については、集団遺伝学モデルの1つであるWright-Fisher modelに基づいて作成した。2人のペアのうち1人を遺骨側、もう1人を遺族側に振り分け、血縁関係毎にソフトウェアで解析した（例えば、父-息子の場合は父を遺骨側、息子を遺族側とし、父1000人×息子1000人 = 全100万通りの組合せについて、血縁関係の有無を解析した）。この解析結果を基に、血縁関係毎の感度および特異度を調査した。血縁関係の判定基準は、常染色体STR型における尤度比を100以上、Y-STR型の不一致を2か所以内、mtDNA型の不一致を1か所以内とした。

さらに、実際のご遺骨ではDNAの状態が

悪く、DNA型の一部を検出できないことがあるが、この状況を想定するために、遺骨側のDNA型の50%が不検出である場合における感度・特異度についても同様に検討した。

C. 研究結果

shinyの導入によりインタラクティブな操作が可能となり、データの視認性に優れたツールとなった。また、遺体・遺族が各1000人ずつという膨大なデータであっても、数分程度で計算が完了した。

血縁関係毎の感度については、父-息子、母-娘で100%、兄弟、姉妹で約93%と高く、父方おじ-甥、母方おば-姪については遠縁のため約37%に留まった。一方、特異度は常染色体STR型のみではなくY-STR型あるいはmtDNA型を併用することで大幅に低下し、各々の血縁関係における偽陽性数は、全100万通りのうち数例に留まった。

さらに、遺骨側のDNA型の50%が不検出である場合における感度・特異度についても検討したところ、感度は父-息子、母-娘で

約75%、兄弟、姉妹で約65%、父方おじ-甥、母方おば-姪で約8%に低下した。しかし、特異度はY-STR型あるいはmtDNA型を併用することで非常に低い値となり、各々の血縁関係における偽陽性数は、全100万通りのうち数例から十数例に留まった。

D. 研究発表

1. 論文発表

該当無し

2. 学会発表

眞鍋 翔, 森本千恵, 橋谷田真樹, 大林将弘, 榎本祐子, 松本智寛, 赤根 敦. 常染色体STR型、Y-STR型、mtDNA型の併用による血縁鑑定の偽陽性率について. 日本DNA多型学会第33回学術集会. 講演要旨集. 2023; p76, 下関.

眞鍋 翔, 森本千恵, 橋谷田真樹, 赤根 敦. R/shinyを用いた大規模災害時の身元確認のための血縁者探索ツールの開発.

E. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

厚生労働行政推進調査事業費補助金
政策科学総合研究事業（政策科学推進研究事業）
分担研究報告書（令和5年度）

戦没者遺骨の身元特定に係るDNA鑑定の精度向上に関する研究
研究分担者 浅利 優 旭川医科大学医学部 准教授

研究要旨：本研究は、厚生労働省の戦没者遺骨のDNA鑑定事業において、1柱でも多くの戦没者遺骨からDNA型判定を成功させることで、正確かつ速やかに遺骨をご遺族のもとにお返しすることを最終目標とする。

A. 研究目的

戦没者遺骨からのDNAの回収率を向上させる方法、より多くのDNA型情報を得るために効果的な増幅条件を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

DNA抽出方法の改良として、検体の溶解液を従来のもよりも高濃度（10倍濃）として行い、Globalfilerを用いて型検出を行った。増幅条件を30サイクルから1～2サイクル増やして行い、型判定結果を比較した。Globalfilerで型検出が良好な検体で常染色体SNP型解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は旭川医科大学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

10倍濃の溶解液を用いた場合でも、検出された座位数は同程度かわずかな増加のみであった。Globalfilerの反応回数が30サイクルで型の検出が困難な遺骨検体

（24座位中5から18座位検出）では、1または2サイクル増やすことで平均3または6座位増加していた。特に検出された座位が少ない場合に再現性が低い結果となった。

さらにGlobalfilerなどを用いた型検出が良好な遺骨検体では、大規模なSNP型の検出も可能であることが確認できた。

D. 考察

DNA増幅の反応回数の増加は検出される型の増加に効果がある一方で、欠落や誤判定なども生じる可能性があるため、注意が必要と考えられた。

E. 結論

DNA増幅の反応回数のわずかな増加は検出率を上昇させたが、DNAの質が低く検出された座位が少ない場合では再現性が低い結果となった。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当無し

2. 学会発表	該当無し
該当無し	2. 実用新案登録
G. 知的財産権の出願・登録状況	該当なし
(予定を含む。)	3.その他
1. 特許取得	該当無し

厚生労働行政推進調査事業費補助金
政策科学総合研究事業（政策科学推進研究事業）
分担研究報告書（令和5年度）

戦没者遺骨の身元特定に係るDNA鑑定精度向上に関する研究

研究分担者 北川 美佐 大阪医科薬科大学法医学教室 技術員主幹

A. 研究目的

研究要旨：本研究は、厚生労働省の戦没者遺骨の DNA 鑑定事業において、1 柱でも多くの戦没者遺骨から DNA 型判定を成功させることで、正確かつ速やかに遺骨をご遺族のもとにお返しすることを最終目標とする。

当該研究は、戦没者慰霊事業の一環として、戦没者遺骨について DNA 鑑定によって身元の特定を行い、1 柱でも多くのご遺骨を速やかにご遺族のもとにお返しすることを目的とする。

B. 研究方法

令和3年度に実施されたアンケートより京都大学・福岡大学・大阪医科薬科大学の DNA 抽出方法のプロトコルの実証実験を行い、抽出された DNA の回収率及び質の比較検討。最終プロトコルの検討。

（倫理面への配慮）

鑑定試料（検体）については全て匿名化されている。

C. 研究結果

令和4年度に実施した京都大学・福岡大学・大阪医科薬科大学の DNA 抽出プロトコルの DNA 抽出の比較検討を行った結果を基に、令和5年度では各工程について、それぞれの機関の方法を組み合わせるなどの検討を行い、作業効率・回収率・品質について、より良い方法を取り入れ、また不

要な工程を削るなどの工夫により、現時点での最善の方法を検討することができた。

D. 考察

3機関の DNA 抽出プロトコルの検証を行うことにより、概ね令和4年度と同じような結果であったが、別機関の方法を検討することで、これまで行っていた自機関の抽出方法を見直すことができた。その結果、必要・不必要な工程が認識でき、これからの DNA 抽出に役立てることが推測される。

E. 結論

令和4年度の結果を基に3機関の DNA 抽出プロトコルの相違点の検証を行い、各機関での抽出結果の利点・欠点を認識することができ、現時点での最善の方法が検証できた。

検証方法・結果等については別途添付。

F. 健康危険情報

（分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入）

(予定を含む。)

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特になし

厚生労働行政推進調査事業費補助金
政策科学総合研究事業（政策科学推進研究事業）
分担研究報告書（令和5年度）

戦没者遺骨の身元特定に係るDNA鑑定の精度向上に関する研究

研究分担者 山田 良広 神奈川歯科大学歯学部 教授

A. 研究目的

研究要旨：本研究は、厚生労働省の戦没者遺骨の DNA 鑑定事業において、1 柱でも多くの戦没者遺骨から DNA 型判定を成功させることで、正確かつ速やかに遺骨をご遺族のもとにお返しすることを最終目標とする。

遺骨からの DNA 型鑑定は本事業に携わる各鑑定機関が独自の試行錯誤で鑑定を実施しているため、知識や経験の共有がなく、標準的なプロトコル等も定まっていない。そこで本研究では、「戦没者遺骨鑑定の標準プロトコルの作成」を行い、効率的な鑑定作業を可能にする。

B. 研究方法

遺骨の DNA 鑑定の工程を大きく分けると抽出・増幅・電気泳動と PC ソフトによる型判定さらに、同様に行う遺族資料との比較照合である。

各手順は共同研究者が従来実施した戦没者遺骨の DNA 鑑定に関する経験・知識・情報を共有し、最も効率的な鑑定の手順(プロトコル)を作成する。

具体的には、骨・歯牙試料の処理方法、抽出試薬の選別、抽出方法、増幅に用いる DNA 量さらに型判定の基準である。

（倫理面への配慮）

遺骨からの DNA 型鑑定は、厚労省が戦没者遺骨を収集、遺族が提出した対照資料との身元確認のための DNA 鑑定である。これは、法に基づく一連の作業で研究ではない。従って厚労省が関与する部分は倫理審査の対象ではない。

C. 研究結果

年度前半でプロトコルの検証を終了し、その結果、歯からの DNA 抽出は多くの大学が取り入れている歯全体を砕く方法が抽出量・質ともに優れていた。PCR の回数は基本の 29 回から 3 回増やすことで増幅できる試料数が大幅に増えた。

さらに以前の(古い)鑑定結果の見直しを行ったところ、新たに多くの情報が得られた。

D. 考察

他大学のプロトコルを検証したことで、本学の従来の方法の欠点が明瞭になり、今後DNA抽出が量・質ともに改善できると思われる。また、PCRの回数を増やすことで検出できるアレル数は増えたが、誤判定の可能性があることも分かったので、回数を増やす場合より慎重な判定が必要であると思われた。

E. 結論

他大学のプロトコルの検証は本学の欠点を明瞭にするために非常に有意義であった。今後の鑑定に生かしていくとともに、これまでの鑑定結果を再度検討する必要性も感じられた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

特記事項なし。

厚生労働行政推進調査事業費補助金
政策科学総合研究事業（政策科学推進研究事業）
分担研究報告書（令和5年度）

戦没者遺骨の身元特定に係るDNA鑑定精度向上に関する研究
研究分担者 玉木 敬二 京都大学医学研究科 教授

研究要旨：本研究では、厚生労働省の戦没者遺骨のDNA鑑定事業の効率的な遂行のために、「戦没者遺骨鑑定の標準プロトコルの作成」、「多数の遺骨・ご遺族から該当する血縁者をスクリーニングする専用ソフトウェアの開発」を行う。

A. 研究目的

厚生労働省が行なっている戦没者遺骨の遺族への引き渡し事業では、身元確認のために遺骨および遺族のDNA型鑑定が必須となっている。特に重要なのが戦没者遺骨のDNA型判定であり、これを正確かつ速やかに成功させる事ができれば、1柱でも多くの遺骨をご遺族のもとにお返しすることが可能となる。そのため、最も効率的な解析プロトコルを作成することが本研究の目的である。本年度は前年度で骨試料においてDNA回収効率の高かった方法について、歯牙試料においても検討した。特にDNA抽出前の試料のEDTA含有洗浄過程におけるDNAの漏失に注目した。また、歯牙試料について、次亜塩素酸溶液に浸透する過程の有効性について検討した。さらに、多数の遺骨・遺族から該当する血縁者をスクリーニングする専用ソフトウェアが完成されたので試用した。

B. 研究方法

京都大学法医学講座で行われている遺骨からのDNA解析について、そのプロトコル

を基に抽出方法の有効性について検討した。

DNA抽出前の骨片の粉碎や脱灰までのプロセスを変えて実際の鑑定の余剰片を用いてその効果を検討した。

前年度検討したのは以下の4過程の組み合わせによるものであった。①コンタミ防止のため超音波洗浄②サーモミキサー37°C, 1,000 rpmによる攪拌③試料切片の粉碎に小金属球による破碎小金属球打撃による硬組織の破碎（マルチビーズショッカー法）④ローターによる緩い攪拌

これらの過程を組み合わせた4つの方法について有効性を比較したが、サーモミキサー37°Cの攪拌の後、ローターによる緩い攪拌の過程を2日間行う方法（IV法）が最も良好な検査結果が得られた。

1) IV法における洗浄回数の検討

ローターによる緩い攪拌（約5回転/分）におけるEDTA交換回数をこれまで5回行っていたものを原則1回とする。但し、透明度がかなり低いものに関しては2回行う。この試料につきDNA検査を行い、以前の結果と比較した。

2) 歯牙における次亜塩素酸の有効性検討
歯牙からの DNA 抽出における洗浄過程
で、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸透
する過程の有効性について検討した。
なお、DNA 抽出は市販のキット (QIAamp
DNA Investigator kit) を用いた。また、骨
からの DNA 抽出条件の良否は、DNA 型
検査 (常染色体 STR 検査 (GF)、Y 染色
体 STR 検査 (YF)、ミトコンドリア超可
変領域 (Mt) の判定結果により判断した。
スクリーニングソフトは主研究機関におい
て完成されたので、ソフトウェアを試用し
て評価し、ユーザーがより使いやすい工夫
について提言した。なお、本研究は京都大
学医の倫理委員会の承認を得て行ってい
る。

C. 研究結果・考察

本事業では最近になってどの抽出過程でも
DNA 損傷が生じうると考えられる南方や
沖縄など非常に脆い試料を扱う場合が増え
ている。このため、前年度の検討では室温
におけるローターによる試料と EDTA 溶液
の緩い攪拌による方法 (IV法) に換えて抽
出を行ったところ、Mt で完全には読めな
かった試料も全ての解析領域が読めたり、
GF も 2 アリルから 5 アリルが判定でき
た。

今年度は最も DNA 回収率の良好であった
IV法において、EDTA 溶液の交換回数を 5
回から 1、2 回に減らして、DNA 抽出し
た。この結果、前法では GF でアリルが殆
ど検出されなかった試料でも、ほぼ完全
にアリルを検出できたり、Mt の HV2 領域
の全ての配列が読めるようになったものも
みられた。このため、再鑑定となった 3 試
料について、この方法で DNA 抽出を行っ

たところ、全ての試料で前回の結果よりも格
段に良好な結果が得られた。

一方、歯牙からの DNA 抽出では、試料が
小さいため、骨試料における DNA 抽出法
のように、骨表面をグラインダーで削って
表面の夾雑物を除くことはできない。その
代用として、中性洗剤と歯ブラシで汚れを
取り除き、歯石取りで歯根部の歯石などを
除去した後、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶
液に 1 分間浸透する。しかし、この過程の
有効性についても検討したところ、浸透の
有無による結果の有意差は認めにくく、む
しろ、浸透による歯牙の崩壊が防げるの
で、浸透を行わないことによって、これま
では不可能であった非常に脆弱な歯牙の利
用も可能となった。

本事業において用いる歯牙や骨試料は硬組
織であっても、長い経年変化を来してお
り、DNA が断片化して変性していること
は避けられない。このため、特に南方試料
などでは GF など DNA 検査によって全く
アリルが検出されない試料も度々みられ
る。しかし、その原因は試料自体の変性だ
けでなく、DNA 抽出前の試料の洗浄や脱
灰過程において、ある程度の DNA の漏失
がみられることが明らかとなった。したが
って、本事業における硬組織からの DNA
抽出においては試料の質の問題だけでな
く、抽出過程における DNA のさらなる断
片化と DNA の洗浄液への漏失を最大限防
ぐ抽出方法を用いることが肝要であると考
えられる。

今後の本事業の継続においても、本研究で
得られた試料の洗浄過程における DNA の
漏失を防ぐだけでなく、回収段階における
抽出水量の設定などさらに良好な検査結果

が得られる検討を継続していく予定である。

なお、ソフトウェアに関しては、主研究者の機関で GF、YF、Mt の判定結果によるスクリーニングソフトウェアが完成した。分担研究者は、その試用を行ったところ、模擬家族データを模擬遺骨データベースに問い合わせることで候補の可能性のある遺骨をリストアップすることができた。このため、ソフトウェアが本事業に活用され、より効率的で有効なスクリーニングができることが期待される。

D. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

E. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働行政推進調査事業費補助金
政策科学総合研究事業（政策科学推進研究事業）
分担研究報告書（令和5年度）

戦没者遺骨の身元特定に係るDNA鑑定精度向上に関する研究
研究分担者 中村 安孝 東京歯科大学法歯学・法人類学講座法人類学講座 講師

研究要旨：本研究は、厚生労働省の戦没者遺骨の DNA 鑑定事業において、1 柱でも多くの戦没者遺骨から DNA 型判定を成功させることで、正確かつ速やかに遺骨を遺族のもとにお返しすることを最終目標とする。

A. 研究目的

戦没者遺骨の個人識別において、歯牙からの DNA 型判定は欠かすことのできない柱である。今日、同じく歯牙を検査対象とした安定同位体を用いた検査が始まり、歯牙の全量消費による DNA 抽出に代わる DNA 型判定法の検証が急務となった。本研究は、有細胞セメント質のみでの DNA 型判定の検討を目的としている。

B. 研究方法

試料は、半年以内に歯科治療により抜去された歯牙 90 本および戦没者遺骨の歯牙 90 本である。有細胞セメント質を削合し、この有細胞セメント質のみから、TBone EX Kit (DNA チップ研究所,日本)により DNA 抽出を行った (A 法)。一方で有細胞セメント質剥離後の歯牙を全量消費し、TBone EX Kit による DNA 抽出も行った (B 法)。これらを STR 型判定試薬 Identifiler Plus Kit (Thermo Fisher Scientific,アメリカ) で増幅し、核酸濃度ならびに核酸純度を測定、16 座位の型判定を行い、両者を比較検討する

事によって、有細胞セメント質のみからの DNA 型検査の信頼性を検討した。

(倫理面への配慮)

研究に用いた歯牙は匿名化がなされている。本実験は東京歯科大学にて倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

Fresh teeth を用いた A 法の平均 STR 型判定率は $97 \pm 11\%$ 、B 法では $95 \pm 11\%$ であった。それに対し、Stale teeth を用いた A 法の STR 型判定率は $89 \pm 14\%$ 、B 法では $83 \pm 15\%$ であった。

Fresh teeth では、A 法と B 法の両者に有意差は認められなかったものの、Stale teeth では B 法と比較し A 法で有意に高い型判定率を示した ($p < 0.05$)。

D. 考察

歯科治療抜歯群と戦没者遺骨歯牙群双方において、A法とB法のDNA型判定能力は同等程度であると考えられる。

E. 結論

セメント質のみを消費するDNA型判定法には十分な個人識別能力があり、歯科治療により歯髓組織が取り除かれた歯牙にも有用な検査となる。また、歯牙を用いた検査において、DNA型検査と他の破壊的検査との併用を可能にするものである。

F. 健康危険情報

健行危険情報は認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Y Miura, Y Nakamura, N Ishikawa,
Cementum is Sufficient for DNA Profiling
of Humans More Than 70 Years After
Death, Journal of Medical Science. 2024

2. 学会発表

第92回日本法医学会関東地方会. 2023

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当無し
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他 該当無し

厚生労働行政推進調査事業費補助金
政策科学総合研究事業（政策科学推進研究事業）
分担研究報告書（令和5年度）

戦没者遺骨の身元特定に係るDNA鑑定精度向上に関する研究
研究分担者 松末 綾 福岡大学医学部 講師

研究要旨：本研究は、厚生労働省の戦没者遺骨の DNA 鑑定事業において、1 柱でも多くの戦没者遺骨から DNA 型判定を成功させることで、正確かつ速やかに遺骨をご遺族のもとにお返しすることを最終目標とする。

A. 研究目的

南方で収集された遺骨は保存状態が悪く DNA の断片化が進み鑑定が難しいケースも多い。本研究では、遺骨からの DNA 抽出方法の検討を行い、より多くの DNA 型を検出することを目的とした。

B. 研究方法

骨片を切り出し洗浄後、細骨片を作成した。1 日半かけて脱灰後、溶解液とプロテイナーゼ K を加え 37°C と 56°C で溶解し、溶解液を従来の方法で抽出した。

（倫理面への配慮）

本研究は、福岡大学の医に関する倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

37°C と 56°C で溶解したが、37°C で溶解したほうが良好に検出できた試料と、56°C で溶解したほうが良好に検出できた試料が認められた。

D. 考察

南方の試料は状態が悪い場合が多く、溶解の温度が高いとさらに分解が進む可能性も考えられたが、56°C で溶解したほうが検出が良かった試料も認められた。

同人物の同部位の骨試料でも採取部位で DNA の量や質が異なるため、正確な比較ができなかった可能性があるが、試料の状態に応じて温度や時間を細かく変更して検討する必要があると考えられた。

E. 結論

遺骨からの DNA 抽出の方法を検討したが、試料の状態によって最適な溶解温度と溶解時間を検討した方が良いと考えられた。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当無し。

2. 学会発表

該当無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当無し。

2. 実用新案登録

該当無し。

3. その他

該当無し。