

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）
（総合）研究報告書

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 眞鍋 翔

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、「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

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。この目標を遂行する上で、解決すべき大きな課題が2つある。まず、本事業に携わる各鑑定機関は独自の試行錯誤により鑑定を実施してきているため、知識や経験が共有されておらず、標準的なプロトコル等も定まっていない。また、遺骨をご遺族にお返しするためには該当する遺骨とご遺族との間の血縁関係を推定する必要があるが、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。これらの課題を解決するために、本研究では「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」を行う。

B. 研究方法

ソフトウェアの構築には、主にプログラミング言語Rを用いたが、DNA型の解析に

関わる部分は計算速度の向上のためC++言語を用いた。また、ボタン1つで簡単に操作できるようにするため、視認性に優れたR言語のshinyパッケージを導入してgraphical user interface (GUI) 化した。ソフトウェアには、複数人分の遺骨および複数人分の遺族の常染色体STR型、Y-STR型、ミトコンドリアDNA型を入力できるようにし、遺骨と遺族の各ペアがどのような血縁関係にあるかを推定できるようにした。

作成したソフトウェアは、模擬のDNA型を用いて検証した。まず、模擬のDNA型として、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組ずつコンピュータ上で作成した。常染色体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(真の血縁ペアを正しく血縁と判定できる確率)および特異度(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。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

ソフトウェアの構築については、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. 多数の遺体・遺族の常染色体STR型データベースにおける血縁者探索ツールの開発と評価. 第106次日本法医学会学術全国集会. 講演要旨集. 2022; p56, 名古屋.

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）
（総合）研究報告書

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

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

戦没者遺骨からのDNA型解析における作業の効率化、DNAの回収率および型検出率を向上させる方法を検討する。

B. 研究方法

戦没者遺骨収集事業のDNA鑑定結果および分析方法の検討結果を用いた。DNA抽出の効率化は、フェノール抽出後のカラム精製法を検討した。また、DNA回収率の検討では試料の脱灰・溶解時間、TBONEキット使用の有無、溶解液濃度の影響および歯、大腿骨、錐体部の比較を行った。型検出の評価はGlobalfilerの結果を使用した。判定回数が2回と3回での比較、増幅条件を30サイクルから1または2サイクル増やして行い、判定結果を較した。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実施している。

C. 研究結果

カラム精製では試料溶解液と結合試薬をマニュアル通りに混合すると、カラムへの充填を6回以上必要であったが、混合比を変えた3回でもDNAの回収が可能であった。また、

脱灰は2～5日間、溶解は4～8時間でも回収量に違いは見られなかった。歯や錐体部は採取部位が変わるとDNAの回収率が向上する場合があった。TBONEキットの使用の有無では骨片の溶解度合が異なっているように思われたが、STR型の判定成功率において大きな差が見られなかった。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。さらに判定回数を2回から3回へ増やすことにより、STR型の判定成功率は約35から約50%へと上昇した。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。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

カラム精製はエタノール沈殿より短時間で可能であったが、作業工程が多く汚染のリスクも高まるため、カラム充填の回数を減らすことは有効と考えられた。錐体部では良好なDNAを回収できる場合があり、採取部位の切り出しを慎重に行う必要があると考えられた。

南方地域からの検体の場合ではDNAの回収率が極端に低い場合も多く、骨片がほとんど溶解されない場合もあり、効率的な抽出方法の検討には、試料の重量や切り出す大きさを考慮することも重要と考えられた。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、型の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。

該当無し

E. 結論

DNA抽出の作業効率化をカラム精製の充填回数を減らすことで実行した。また、試料の部位別の比較を行い、特に錐体部を用いることで有用な場合があることを確認した。判定回数や増幅の反応回数は型判定検出率に影響していたが、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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他

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）
（総合）研究報告書

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 北川 美佐

の状態によっては異なる方法の方が良い場合もあることが判明した。

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

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年度においては福岡大学の方法が総合的にDNAの回収率及び型判定の成績が良いという結果が得られた。令和5年度では、その結果をふまえたうえで、DNA抽出操作での各工程の方法及び用いる試薬・器具等を検証することにより、作業効率・回収率・品質において最も良い結果が得られる方法を検証し、方法を確立できた。DNA抽出方法の現時点での最善のプロトコルが確立できたといえる。

D. 考察

3機関の方法の検証結果からDNA抽出方法における総合的なプロトコルが確立できた。しかしながら、全ての検体（遺骨）において、特定の方法が最も良いとはいえず、遺骨

目的でもある「1柱でも多く、速やかに」を考慮し、作業効率・回収率・良質をふまえると、総合的に最善の方法を取り入れる方向が良いと思われる。他機関の方法に触れることで自己の方法の検討にも役立てた。

E. 結論

3機関のプロトコルを検証した結果、抽出困難な遺骨の場合、一概に統一したプロトコルを用いるのではなく、遺骨の状態に応じた方法に対応できる多くの経験や方法の模索が常に必要であると感じた。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし
（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

G. 知的所有権の取得状況

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

資料1) ヒト陳旧骨からの DNA の抽出方法の比較及び検討

目的

ヒトの骨から DNA を抽出するためには、洗浄、脱灰、DNA 抽出及び精製と様々な工程を経る必要がある。どの工程においても様々な方法があるため、鑑定機関ごとに独自の方法により DNA 抽出までの工程がなされている。そこで、3つの機関の方法を洗浄から脱灰までと DNA 抽出及び精製の過程をそれぞれ比較し、ヒト陳旧骨の DNA 抽出法の最適化を目指して検討を行った。

検証したプロトコル機関

- A. 大阪医科薬科大学（以下、「大阪」）
- B. 福岡大学（以下、「福岡」）
- C. 京都大学（以下、「京都」）

材料および方法

1. 骨片の調製

試料 1~7 の骨のそれぞれ一部を歯科用ダイヤモンドカッターで切り出し、各試料につき約 1 g かつ 0.5~1 mm 角の骨片を 3 セットずつ調製した。

2. 骨片の洗浄および脱灰

骨片の洗浄から脱灰までの工程は大阪と福岡ではほぼ同じ方法であるが、京都は他の 2 つと比べて異なっている。そこで大阪と福岡の方法を A 法、京都の方法を B 法とした。

A 法

試料 1~7 について約 10 mm 角程度の骨片 1 g を中性洗剤及び歯ブラシを用いて洗浄後、約 5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に約 5 分浸した。その後、骨片を精製水により洗浄、乾燥させた後、Multi-beads Shocker (YASUI KIKAI) にて細骨片または骨粉にした。50 mL チューブに調製した細骨片ま

たは骨粉及び 40 mL の 0.5 M EDTA (NIPPON GENE 製) を入れ、室温で 2 日間振とうすることにより脱灰を行った。なお、1 日ごとに EDTA の交換を行った。最後に試料から EDTA を除去し、約 40 mL の超純水 (NIPPON GENE 製) で 1 回洗浄した後、洗浄液の除去を行った。

B 法

試料 1~4 について 50 mL チューブに約 5 mm 角程度の骨片 1 g 及び 40 mL の 0.5 M EDTA (NIPPON GENE 製) を入れ、10 分間の超音波洗浄を 3 回行った。なお、洗浄の度に EDTA の交換を行った。その後、2 日間振とうすることによりプレ脱灰を行った後、EDTA を除去して、骨片の乾燥を行った。

次に Multi-beads Shocker (YASUI KIKAI 製) により骨片を骨粉にした。50 mL チューブに調製した骨粉及び 40 mL の 0.5 M EDTA を入れ、室温で 2 日間振とうすることにより脱灰を行った。なお、1 日ごとに EDTA の交換を行った。最後に試料から EDTA を除去し、約 40 mL の超純水 (NIPPON GENE 製) で 1 回洗浄した後、洗浄液の除去を行った。

3. DNA 抽出及び精製

各機関とも DNA 抽出及び精製方法が異なるため、それぞれを大阪法、福岡法、京都法とした。

大阪法

50 mL チューブ中の脱灰後の試料に DNA エキストラクター FM キット (Wako 製) の溶解液 190 μ l、20 μ l の Proteinase K 及び

10 µl のキット付属の酵素活性剤を加え、56°C、O/N でインキュベートを行った。その後溶液を遠心し、上清を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL 製)を用いて製造元のプロトコルに従って DNA を精製し、50 µl の Low TE で溶出を行った。

福岡法

50 mL チューブ中の脱灰後の試料に DNA エキストラクター FM キット (Wako 製) の溶解液 400 µl 及び 100 µl の Proteinase K を加えし、37°C、O/N で溶解を行った。その後溶液を遠心し、上清を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 製) を用いて製造元のプロトコルに従って DNA を精製し、50 µl の Low TE で溶出を行った。なお、洗浄は 3 回行い、洗浄試薬、溶出試薬以外の量は同率に増量して抽出を行った。

京都法

50 mL チューブ中の脱灰後の試料に QIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN 製) の Buffer ATL を試料の容積の 2 倍程度添加し共洗いを行った後、3,500 rpm で 5 分間遠心し、Buffer ATL の除去を行った。その後、1,000 µl の Buffer ATL 及び 200 µl の Proteinase K を加え、56°C、1000 rpm、O/N でインキュベーションを行った。次に、3,500 rpm (遠心機の都合で 14,000 rpm から変更) で 5 分間遠心した後、上清を新しい 15ml チューブに移し、フェノールクロロホルムを等量添加後約 5 分間軽く攪拌を行った。さらに 3,500 rpm (遠心機の都合で 14,000 rpm から変更) で 5 分間遠心し、水層を新しい 50 ml チューブに移し、

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 製) を用いて製造元のプロトコルに従って DNA を精製し、50 µl の Low TE で溶出を行った。(Teknova DNA Suspension Buffer (T0223)から変更)

4. ヒト DNA の定量

ヒト DNA の定量は Quantifile HP DNA Quantification Kit (Applied Biosystems 製) 及び Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems 製) を用いて製造元のユーザーガイドに従った方法で行い、Small autosomal human target の値を DNA の濃度とした。

5. STR 型検査

25 µl の系を 15 µl の系に縮小し、各 DNA 溶液について、鋳型量を 0.6 ng それに満たない場合は最大体積の 9 µl として、GlobalFiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems 製) を用いて製造元のユーザーガイドに従った方法で PCR 増幅を行った。PCR サイクル数は GF は 29 回として ProFlex PCR System (Applied Biosystems 製) を用いて行った。電気泳動は、PCR 産物もしくはアレリックラダー 1 µl を GeneScan 600 LIZ dye Size Standard v2.0 (Applied Biosystems 製) 0.4 µl と Hi-di Formamide (Applied Biosystems 製) 9.6 µl の割合になるように混合したものを泳動ウェルに配置し、熱変性し、DCv3.0 を搭載した 3500xL (Applied Biosystems 製) を用いて行った。電気泳動の条件については、インジェクション電圧・時間は 1.2 kv・24 秒で、泳動電圧は 13 kv で行った。泳動データの解析は、GeneMapper ID-X ソフトウェア v1.6

(Applied Biosystems 製)を用いて行い、ピーク検出の閾値は 175 RFU とし、その他の各パラメータはユーザーガイドに示された値を使用した。なお、プルアップと判断できたピークおよびアーティファクトと判断できたピークは除外した。

結果と考察

洗浄及び脱灰の方法の比較について
洗浄及び脱灰の A 法（大阪、福岡）と B 法（京都）の違いがヒト DNA の定量及び STR 型検査結果にどのように影響するか検討するために、試料 1～4 について上記 2 つの洗浄及び脱灰方法に対して、各機関の DNA 抽出及び精製方法（大阪法、福岡法、京都法）をそれぞれ組み合わせて検討を行った。その結果、A 法を用いた場合、B 法よりも約 2 倍～30 倍高い定量値が得られた。B 法は洗浄及び脱灰の過程が多いため、試料のロスがより大きくなっていることがその要因として考えられた。

STR 型検査結果も定量の結果とほぼ同様の傾向が観察された。ほぼすべての試料において A 法を用いた場合は B 法よりも検出アレル数が多い傾向が観察された。大変興味深いことに試料 3 及び 4 では B 法による洗浄及び脱灰を行った後に京都法を用いて DNA の抽出及び精製を行った場合には、A 法を用いた場合よりヒト DNA の定量値は低くなるものの、分解指標は小さくなっていた。つまりヒト DNA の質の向上が認められた。このヒト DNA を用いて STR 型検査を行った結果、検出されるアレル数は A 法を用いた場合とほとんど変化はなかった。以上のことから洗浄及び脱灰において A 法を用いた場合は B 法よりも高収量のヒト

DNA を得やすい傾向にあるが、試料によっては B 法を用いる方がより質の良いヒト DNA を得られる可能性があることが示唆された。

DNA 抽出及び精製キットの比較について
DNA の抽出及び精製の方法の違いがヒト DNA の定量及び STR 型検査結果にどのように影響するか検討するために、試料 1～7 について試料ロスの少ないと考えられる洗浄及び脱灰方法の A 法（大阪、福岡）に対して、各機関の DNA 抽出及び精製方法（大阪法、福岡法、京都法）をそれぞれ組み合わせて検討を行った。その結果、試料 1～3 は全体的に多少のばらつきはあるものの得られる定量値に大きな差は観察されなかった。試料 4 及び 6 については京都法を用いた場合、他の方法より 2～3 倍大きなヒト DNA の定量値が得られた。試料 5 についてはいずれの方法を用いた場合もほとんどヒト DNA の定量値は得られなかった。

STR 型検査を行った結果、各機関の DNA 抽出及び精製方法によって、検出されるアレルの数にほとんど違いはなかった。

以上のことから、DNA 抽出及び精製キットがヒト DNA の定量及び STR 型検査結果に及ぼす影響は小さいと考えられた。

大阪法、福岡法、京都法の最初に添加する溶解液の体積は合計それぞれ 220 µl、500 µl、1,200 µl である。さらに仮にこれらと同等の抽出液を得られたと仮定するとそれぞれのカラムに通す直前の液量はそれぞれ 660 µl、30,00 µl、7,200 µl となり、1 回あたりにカラムに通す液量を 700 µl とすると全ての液量を処理するまでにそれぞれ 1 回、5 回、11 回の遠心と溶出液の除去を繰り返す必要

がある。実際は溶解液の体積は増加すると考えられるため、これらの操作を行う回数はさらに増加すると考えられる。1度に処理可能な試料の数を増やすためには、なるべく操作が簡便かつ効率的で高収量のヒトDNAが得られるDNA抽出及び精製法を選択する必要があると考えられた。

※3機関のDNA抽出方法のプロトコルによる比較実証実験の結果については、別添資料をご参照ください。

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）
（総合）研究報告書

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

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

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、厚生労働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

各機関の作業を再現し、効率的な手順は確立した。この手順を実際の鑑定資料に用いて鑑定作業を行っている段階である。

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、古今後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、誤判定の可能性もあることも分かったので、可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

コメントの追加 [田畑1]: p 13D.考察：様式 A 8（別添 4） p 11 D.考察に追記いただいた内容を参考に記載願います。

コメントの追加 [田畑2]: p 13E.結論：様式 A 8（別添 4） p 11 E.結論に追記いただいた内容を参考に記載願います。

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）
（総合）研究報告書

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

分担研究者 玉木 敬二

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」を行った。

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。このため、歯牙や骨切片など硬試料からのDNA抽出方法についてさらに詳細な検討を行った。また、分担研究者として多数の遺骨・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の監修を行った。

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骨の余剰片を用いてその効果を検討した。

1) 抽出方法の検討

これまでの抽出プロトコルでは①コンタミ防止のため超音波洗浄②サーモキサー37°C、1,000 rpmによる攪拌③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の4つがあるが、余剰骨について次の4法を用いた。

I 法 ①→①→③ （従来法）

II 法 ①→①

III 法 ②→②

IV 法 ②→④→④

2) 洗浄回数の検討

DNA回収率の良好で会ったサーモキサー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）におけるEDTA溶液の交換回数を5回の場合と1回または2回の場合にして、DNA抽出を行い、その検査結果を比較する。

3) 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。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に関しては、その構成、および仕様につき提言を行った。

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

歯牙や骨といった硬組織からの一般的なDNA抽出方法では、表面の超音波洗浄やマルチビーズショッカー法などが一般的に用いられている。一方、本事業の対象であるご遺骨は死後80年程度経過しており、経年変化によるDNAの断片化は避けられない。特に、東南アジア地域などの南方の遺骨試料では、死後置かれた環境が高温多湿である場合が多く、骨組織が非常に脆いものも多く経験する。このため、これまでの硬組織からのDNA抽出では検査に資するDNAを得られないため、独自のプロトコルの開発を余儀なくされた。

まず、一般的には骨切片を十分に粉碎することはDNA抽出において非常に重要な工程と考えられるが、マルチビーズショッカー法はDNA回収率を上げるかどうかについて検討したところ、本事業で扱うような経年変化の著しい骨ではこの粉碎によるDNA損失の方が顕著に現れた。また、骨試料自体の陳旧変性のため、マルチビーズショッカー法を用いずとも殆どが砂粒大の顆粒となった。

DNA回収率については、実際の試料自体が少量かつ貴重であるため、DNA定量だけに用いることはせず、GF、YF、Mtの判定結果によって総合評価した。この結果、DNA回収率は有意に下がるということはなく、むしろマルチビーズショッカーを用いない場合の方が、判定結果が向上するものもみられた。但し、資料の稀少性のため、同一骨での比較はできなかった。

また、EDTAの浸透した試料を超音波洗浄するが、この過程もDNA損失を起こすと考え、超音波洗浄せず、恒温槽(37°C)内で攪拌しながらEDTA溶液を定期的に交換して試料を洗浄する方法に変えたところ、判定結果により改善がみられた。しかし、本事業ではこの過程でもDNA損傷が生じうると考えられるような脆い試料も扱う。このため、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も前法では2アレルしか検出されない試料も5アレルが判定できた。

DNAの漏失は洗浄回数と相関することが予想できる。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でアレルが殆ど検出されなかった試料でも、ほぼ完全にアレルを検出できたり、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い。むしろ、浸透による歯牙の崩壊が防げるので、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。

総括すれば、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レ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の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で活用され、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）
（総合）研究報告書

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

分担研究者 中村 安孝

研究要旨：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 型判を最終目標とする。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

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 Ishika
wa,
Cementum is Sufficient for DNA
Profiling of Humans More Than 7
0 Years After
Death, Journal of Medical Science.
2024

2. 学会発表

第91回日本法医学会関東地方会.
2022
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))
(総合) 研究報告書

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 松末 綾

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。

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で溶解した。溶解液をQiagenのQIAquick PCR PurificationKitを用い、プロトコルを一部変更して抽出した。また、溶解液をQiagenのEZ1 Advanced XLを用い、プロトコルに従って抽出した。さらに、溶解時の温度を37°Cと56°Cに設定し、溶解温度の変化により抽出効率の違いを検討した。

(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

この抽出法により、北方で収集された遺骨は良好なDNA型が検出できた。南方で収集された遺骨は、全てのローカスを検出できた遺骨と、ほとんど検出できない遺骨があった。EZ1 Advanced XL を用いて抽出するより、QiagenのQIAquickR Kitを用いてプロトコルを一部変更して抽出する方法のほうが検出可能な座位が多かった。溶解時の温度を変更した場合、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

南方の遺骨は、試料の状態に応じて抽出法を変えた方がいいと考えられた。脱灰の時間や試薬など、さらなる条件の検討が必要である。

E. 結論

遺骨からのDNA抽出の方法を検討したが、南方の分解が進んだ試料の場合は、機械を用いるよりも手作業で丁寧に抽出したほうが抽出効率は良かった。しかし、断片化が進んだ検体からはDNA

型が検出されない場合もあったことから、より効率的な抽出法の検討が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当無し。
2. 学会発表
該当無し。

G. 知的所有権の取得状況

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。