

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
研究代表者 橋谷田真樹 関西医科大学医学部法医学講座 准教授

研究総括要旨：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。

研究分担者：

眞鍋 翔（関西医科大学医学部法医学講座・助教）
浅利 優（旭川医科大学医学部・准教授）
北川 美佐（大阪医科薬科大学医学部法医学教室・技術員主幹）
玉木 敬二（京都大学医学研究科法医学講座・教授）
中村 安孝（東京歯科大学法歯学・法人類学講座・講師）
松末 綾（福岡大学医学部法医学教室・講師）
山田 良広（神奈川歯科大学歯学部・教授）

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「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。

B. 研究方法

「戦没者遺骨鑑定の標準プロトコルの作

成」については、これまで各鑑定人が独自の工夫をこらして行なってきた様々なDNA鑑定方法に対し、最も効率がよく統一したプロトコルを作成するのが目的である。遺骨のDNA鑑定の工程は、「①DNAの抽出」、「②DNAの増幅」、「③電気泳動による型判定」、「④ご遺族（血縁候補者）とのマッチング」となる。これらの工程のうち「②DNAの増幅」、「③電気泳動による型判定」は使用する試薬・機器が世界的に統一されており、また、「④ご遺族（血縁候補者）とのマッチング」も専用のソフトウェアを使用するので鑑定人による違いはない。人によって大きく異なるのが「①DNAの抽出」部分である。ここで効率よく良好なDNAを得ることができれば、必然とDNA型判定も良い結果となる。当プロジェクトに参加している7機関から遺骨鑑定に関するプロトコルのアンケートを行なったところ、それぞれ独自の抽出方法を行なっていることが判明した。具体的には、抽出の工程、つまり、鑑定試料となる骨を洗浄・乾燥させ、その後の脱灰、試料の溶解、DNAの回収の流れは同一である。しかしながら、脱灰および溶解を容易にするために骨試料を「骨粉」化する、または小さな「骨片」として作業を進めるといった違いが見られた。さらに、骨の溶解液からDNAを抽出するのに使用する市販のキットも様々であった。そこで、実際に使用されている5通りの抽出方法について、同じ骨試料を用いて実証実験を行なった。その結果、骨片を脱灰した後、DNAエキストラクターFMキットを用いて試料を溶解し、フェノール・クロロホルム処理後の上清をNucleoSpin Gel and PCR

Clean-upにて抽出する方法がその後のSTR解析の結果が良い方法であった。

続いて、「② 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」について示す。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・考察

実証実験により、最も有効的なDNA抽出法が決定したところで、次のような骨からのDNA解析に関するプロトコルを作成した。

- i 歯科用ドリルを用いて適度な大きさ（数 cm 四方）の骨試料を切り出す
- ii 試料を中性洗剤等で洗浄する
- iii 次亜塩素酸に浸透後、風乾する
- iv 歯科用ドリルを用いて、骨試料の表面を削る
- v マルチピースショッカー (YSUIKIKAI) を用いて 5 mm 四方程度の骨片を作成する
(同時産出される骨粉も回収し、以下同様にして DNA 抽出)
- vi 試料を EDTA (ニッポンジーン) に浸透し、36°C (または室温) で二日間脱灰する
- vii DNA エキストラクター-FM キット (FUJIFILM) を用いて 56°C で一晩試料を溶解させる
- viii 溶解液を TE 飽和フェノール (NIPPON GENE)、およびフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) (NIPPON GENE) で処理する
- ix 上清を NucleoSpin Gel and PCR

Clean-up(TaKaRa)を用いて精製し、DNAを抽出する

- x 得られた DNA を用いて、Globalfiler PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific) や Yfiler Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific) による STR 型の解析や、ミトコンドリア DNA の塩基配列の決定を行う

ただし、これは研究代表者の橋谷田が 1 人で行なった結果であることに留意しなければならない。他の研究者による再現実験が行われることでプロトコルの信頼性は大きく向上することになるであろう。

続いて、「② 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」について示す。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. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

特になし

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.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし