

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）
総括研究報告書（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」を行う。

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。これまでに、各分担研究者に対し、遺骨試料のDNA型鑑定方法に関するアンケートを行い、聞き取り調査を行った。その結果、鑑定試料となる骨を洗浄・乾燥させるところに大きな違いはなく、その後の脱灰、試料の溶解、DNAの回収の流れも同一である。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。そこで、骨試料を骨粉化した後、3種の市販されているDNA抽出キットを使用してDNA抽出を行う方法と、骨片をある市販の試薬で溶解させた後、2種の市販のDNA精製キットでDNAの回収を行うという、計5通りの抽出方法について、同じ骨資料を用いて実証実験を行なった。

i. 骨粉化して抽出

歯科用ドリルを用いて洗浄・乾燥後の骨を5～7mm角の骨片にした後、その2～3個をマルチビーズショッカー (YSUI KIKAI) により、骨粉化した。その約168～408mg(平均311mg)を15mlのチューブに入れ、EDTA pH8.0を用いて2日間、36°Cでゆっくり回転させながら脱灰を行なった。脱灰後の試料を(1)NucleoSpin DNA Forensic (TaKaRa)、(2) QIAamp DNA Investigator Kit(QIAGEN)、(3)TBONE EX KIT(株式会社DNAチップ研究所)の3種のキット用い、それぞれのプロトコルに従って抽出を行なった。なお、全ての試薬量は試料の量に合わせて同率増量している。

ii. 骨片化のまま抽出

洗浄・乾燥後の5～7mm角の骨片数個を、EDTAと共に15mlまたは50mlのチューブに入れ、浸透しながら36°Cにて2日間脱灰を行なった。DNAエキストラクターFMキット(FUJIFILM)を用いて試料を溶解させた後、(4)フェノール・クロロホルム処理し、上清からNucleoSpin Gel and PCR Clean-up(TaKaRa)にてDNAを抽出した。または(5)溶解液からQIAamp DNA Investigator Kit(QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。抽出後のDNA溶液は、Quantifiler Trio DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific)にてDNAの定量を行い、GlobalFiler PCR Amplification Kit(Thermo Fisher Scientific)とSeqStudio ジェネティックアナライザーによるSTR解析を行なった。

「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」については、プログラミング言語のRを用いソフトウェア構築した。R言語のパッケージshinyを導入することで直感的な操作が可能となり、データの視認性にも優れたツールとなった。これまでの常染色体short tandem repeat (STR)に加えて、Y染色体上STR、さらにはミトコンドリアDNA(mtDNA)のデータを入力して、血縁関係の尤度比を計算できるようにした。

C. 研究結果・考察

最も有効的なDNA抽出の検証に関しては、10種の骨試料全てにおいて上記(1)～(5)の抽出方法を試み、それぞれ抽出したDNAを定量したところ、0.0006 ng/ μ l～0.0177 ng/ μ lの範囲でヒトDNAが得られた。

極めて微量な値である。GlobalFiler PCR Amplification Kitのプロトコルには、結果を得るための必要DNA量は0.5ngと記されており、それに遠く及ばない。当然、骨試料自体にも依存しており、得られるDNA量にはばらつきが見られるが、いずれにせよきちんとSTRの結果が得られるほどのDNA量を抽出するのが困難なことが確認された。また、5種の抽出方法を試してみたが、方法によって得られるDNA量に優位差が見られるほどの違いはなく、どの方法を用いても同じような値しか得られなかった。GlobalFiler PCR Amplification Kitは、通常であれば24座位の情報を得ることができるが、上記のような非常に希薄なDNA溶液でもいくつかの座位の情報を得ることは可能である。STR解析の結果、最も情報を得ることができたのは、(4)の方法、つまり、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にて抽出する方法であった。

「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」については、様々な模擬データベースを用いて動作確認を行ったところ、常染色体STR型・Y-STR型・mtDNA型の組合せ、およびDNA型の不検出について問題なく解析できることが確認でき、遺骨・遺族が各1000人（「遺骨一遺族」ペア数は100万）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。また、常染色体STR型に加えてY-STR型およびmtDNA型も同時に解析することで、偽陽性率（実際には血縁関係はないが誤って血縁者と判定してしまう確率）は大幅に減少することが明らかとなった。例えば、互いに非血縁の「遺骨一遺族」ペア100万例について、叔父-甥の関係を想定して解析を行うと、常染色体STR型のみだと誤って血縁者と判定されてしまう例数（偽陽性数）は約1000例であった。しかし、Y-STR型を追加することで、偽陽性数は数例程度に留まった。同様に叔母-姪の関係を想定して解析を行うと、常染色体STR型のみだと偽陽性数が約1000例だったのに対し、mtDNA型を追加することで、偽陽性数は約10例に留まった。さらに、DNA型の一部が検出されていなかったとしても、真の血縁者をリストアップできる可能性は十分に認められた。

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
特になし

F. 知的財産権の出願・登録状況
特になし