

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390195

研究課題名（和文） 限界的血縁関係である第3度近親を識別する高多型縦列反復配列複合システムの構築

研究課題名（英文） Devising a multiplex DNA typing system to identify the third-degree kinship

研究代表者 玉木 敬二 (TAMAKI KEIJI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90217175

研究成果の概要（和文）：

二者間におけるいとこなど第3度血縁鑑定においては、アレルの共有のないことが75%起こるため、アレル数が多くヘテロ接合度の高いミニサテライトローカスにおけるアレルの共有があれば、最も効果的に尤度比を上げて肯否の判断が可能となる。我々は高多型縦列反復配列のひとつであるD1S8 (MS32)を、アレル特異的MVR-PCRにてアレルの内部構造をマッピングして分析した。MS32は日本人だけでなくタイ人や中国人においても膨大な多型性を示し、高い識別力を有することが示されただけでなく、そのアレル内に集団特異的といえるリピート配列が認められた。そこで、第3度血縁を扱う前段階として、同胞の血縁関係の検査における縦列反復配列の有用性について検討をおこない、ともに複数の同胞を有する2つのグループが二者における第3度血縁関係を判定するため、高多型ミニサテライトを用いて検討を行う方法を、実際例にて試験的に判定してみた。しかし、2つのローカスにおいては、双方のグループ間ではアレルの共有はなく判定不能であった。また、現在鑑識捜査などで、世界中で用いられているマイクロサテライトの15ローカス検出キットの有用性について、2万例の同胞ペアをシミュレーションで作成して検討したが、参照する同胞の数を増やしたところ、尤度比は向上しほぼ間違いなく決定できた。しかし、従兄弟である第3度血縁関係の場合は、シミュレーションでは、このシステムでは殆ど判定できないことが予想された。実際に第3度血縁関係にあるボランティアより血液を提供してもらい、マイクロサテライトの型判定を行って、第3度血縁関係の有無について尤度比を算出したが、その値は1を下まわる結果となった。このため、ミニサテライト数ローカスの一致に頼るのではなく、ゲノム内の多数領域のマイクロサテライトをマッピングすることにより、二者間で染色体のどの程度を共有しているかを推定することにより、その共有程度の多少によって、血縁関係の判断が可能かどうかを検討した。ヒト常染色体22本にほぼ均等に分布する382ローカスのCAリピートの多型をマッピングしたデータを用いて、実際のいとこや他人、親子などでどのくらいのハプロタイプの共有があるかを検討した。現在データを解析中である。

研究成果の概要（英文）：

Arriving at a conclusion that two individuals are third degree relatives (e.g. cousin) via DNA analysis is a difficult task as the purported individuals have only a 25% chance of sharing common alleles at any given locus. In order to increase the certainty of the relationship, experts often resort to hypervariable minisatellite loci because a pair of individuals can demonstrate high likelihood ratios (LRs) in the event that they share rare alleles. We firstly investigated the comparison of allele structures in Thai, Han Chinese, and Japanese populations. The great majority of alignable Asian alleles showed their closest structural relative in Asia. This rapidly evolving minisatellite can therefore serve as a lineage marker for exploring recent events in human population history and dissecting population structure at the fine-scale level, as well as being an extremely informative DNA marker for personal identification. we then examined third degree relatives from two groups of siblings using two hypervariable minisatellite loci. Relationships were not established because no alleles were shared between the two groups; albeit sharing of alleles within each group was noted in moderation. We also estimated the distribution of LR's in a variety of kinships (parent-child, siblings, two siblings etc.) using a commercially available typing kit which simultaneously amplifies 15 STR loci. Although the STR system

is extremely useful in establishing individual identification when both parents, or two or more children (or siblings) are available for comparison it is highly unlikely that the system will be effective in third degree kinship analyses. This postulation is based on our study of samples obtained from known third degree relatives in which we attempted a microsatellite-based approach to establishing kinship. However, unfortunately with microsatellites alone the calculated LR was less than 1, which is insufficient for positive identification. Consequently, a more effective method such that estimates the proportion of chromosomal sharing would be more advantageous in comparison to attempting to demonstrate allelic hypervariability at several loci. To date we have analyzed 382 dinucleotide loci distributed throughout the human genome in order to estimate the length proportion of shared haplotypes between two individuals in varying modes of kinship. The initial data we have obtained is promising and is currently being carefully analyzed.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 6,000,000  | 1,800,000 | 7,800,000  |
| 2009年度 | 4,100,000  | 1,230,000 | 5,330,000  |
| 2010年度 | 3,800,000  | 1,140,000 | 4,940,000  |
| 総計     | 13,900,000 | 4,170,000 | 18,070,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：DNA多型医学・親子鑑定・ミニサテライト・第3度血縁・マイクロサテライト

#### 1. 研究開始当初の背景

近年の社会構造や家族関係の変化により、親子や血縁関係の諸問題はわが国でも年々増加している。90年代半ばまでは、ほとんど大学の法医学教室が行ってきたが、現在は民間会社が主体となってきている。全米では年間35万件といわれる親子鑑定は、わが国ではまだ3千件ほどと推定されているが、今後その需要が高まると予想される。

親子鑑定の主流は婚姻外の子を認知する認知請求で、父と疑われた男（擬父）の父子鑑定であるが、DNA検査の時代となった現代では、遺産相続など様々な必要性から、同胞（兄弟）鑑定や叔父と甥など、遺伝形質を4分の1ずつ共有している関係である第2度近親の鑑定なども漸増している。一方で、少子化により検査できる対象者が限定される状況が進んでいる。例えば、当事者二人だけの同胞鑑定では、双方が真の同胞関係であっても、両親の型と受け継ぐ相同染色体によっては、アレルを全く共有しないことが見られるので、アレルの型の共有がないからといって否定はできない。同様の理由で半同胞や叔父と姪などにおいては殆ど結論が得られない。

血液型を用いた血清学的検査による親子鑑定の頃に比べ、DNA検査は飛躍的な精度向上をもたらしたが、それでも、現在主流をなしているマイクロサテライト（STR）を用い

た親子鑑定法には限界があると考えられる。例えば、世界標準となっている最も普及した市販の15ローカス判定のキットを用いた場合、日本人において父子鑑定はほぼ問題なく行えるが、同胞鑑定では肯定に足る十分な尤度比が得られない可能性がある。

この場合、Y-STRやミトコンドリアDNAの多型を検索するが、ハプロタイプ頻度、ヘテロプラスミーの問題は避けられず、半同胞では用いられない場合もある。また、他に検査するSTRローカスを増やしても、累積尤度比は意外にあがらない。これは、当事者同士にアレルの共有がないために、その尤度比は1を下回り、累積尤度比を一挙にさげしてしまうからである。従って、最大アレル頻度は33%以下のローカスを使用しなければ判定に苦慮する。例えば15ローカスのキットでも、報告された日本人頻度（Yoshida K: J. Forensic Sci. 2005）では半分の7ローカスがこの基準を下まわる。

第3度近親の識別は①当事者二者間では否定ができない、②当事者同士のアレルの共有が少ない、③アレルの共有があっても、そのアレル頻度が高ければ、非血縁者間の偶然の共有も多いため尤度比は下がる、④Y-STRやミトコンドリアDNAも家系図や性の条件により利用できない場合が多い、などの制限が多く、殆ど不可能に近いのが現状である。例えば、二者間において、いとこ同士か非血縁かを探るための尤度比（LR）を求めるとき、双

方が同じアレルPのホモ接合体であった場合に、 $LR=(1+3p)/4p$  (pは集団におけるPの頻度)となり、一番高い尤度比が得られるが、それでも、従来の血液型では1を僅かに越える程度である。

## 2. 研究の目的

我々が研究を続けているミニサテライトはヒトにおいて大変多型性に富むため、法医DNA検査の幕開けを果たす重要な役割を果たしたが、現在の法医鑑識実務では簡便で扱い易いSTRが主流になっている。しかし、高多型ミニサテライトはSTRとは比較にならない多くのアレルを有する。特に、リピート内変異をマッピングするMVR-PCR法(JeffreysらNature, 1991)の考案によって、内部構造の違いによりアレルをさらに識別できることになり、集団のアレル数は飛躍的に増大した。このようにMVR-PCR分析のできるローカスは、現在MS32の他、MS31AやMS205など10ローカスほど報告されている。

このような高多型ミニサテライトを数ローカス組み合わせでアレル判定すれば、現行のSTRでは到達できない限界的血縁関係といえる第3度近親判定が可能となる。今までのミニサテライト研究成果と予備的推計により、実務応用を目指したシステムの構築が可能であると考えられた。

例えば、第3度近親の当事者間で高多型ローカスのアレルの共有は殆ど1個になるから、二者だけの鑑定の場合、その尤度比は $(1+12p)/16p$ で求められる(Brennerによる)。この値はアレル数が数千以上ある高多型ミニサテライトで肯定確率を飛躍的に上げる。もうひとつの問題は、アレルの共有である。第3度近親の定義のとおり、血縁は8分の1であるため、あるローカスにおいて“いとこ”同士にアレルの共有があるのは4分の1しかない。しかし、高多型ローカスにおいては、両親は通常アレルの共有のないヘテロであるので、4分の1の割合でひとつのアレルの共有がおこる。このため、例えば、高多型ローカスのアレル数が2,300のものを8ローカス用いれば、真の第3度近親の90%以上の事例で、95%以上の肯定確率を得られることになる。

このため、本研究は、法医学の血縁鑑定の発展に貢献するものと期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 尤度比の推計値のシミュレーション予備的に検討した高多型ローカスの組み合わせについて、さらに精度の高いシミュレーションを行い検討する。例えばMS32では、

日本人のアレル検索でとPoisson分布からの推定で、少なくとも2千以上のアレルがあることが推定され(玉木:DNA多型1995)、タイ人でも1,400アレル以上の推定値が算出されている。

第3度近親の判定において最も困難な事例は、①当事者二者のみしか試料として利用できない場合であろう。本研究では、このような事例でもほぼ可能なように8ローカスの組み合わせを当面の目標として設定した。この組み合わせで、仮に、今回初めて分析したローカスのアレル数があまり多くなく1,000であった場合でも、件の二者だけのいとこ同士鑑定において、2ローカス以上の共有があれば、その尤度比は700を越え、肯定確率は父子鑑定におけるHummelの基準を準用すれば肯定基準の99.8%を越える(事前確率50%とする)ので、十分肯定される。

この①以外にも、②二者以外に片方の親(つまり、他方の伯父又は伯母となる)を用いる場合、③二者以外に片方の同胞を用いる場合など、より実際の鑑定条件に近い状況を想定した条件で、尤度比分布の変化を探る。例えば、②の場合は、①に比べて明らかに高い尤度比を示す場合が多くなるが、その分布はアレル頻度にも左右されるので、さらに綿密な検討が必要になる。

### (2) 高多型ミニサテライトローカスのMVRマッピング

我々はミニサテライトMS32やMS31Aの日本人のアレルについては、すでに多くの分析を行ってきたので、初年度は、報告はあるが性状の詳細が不明な高多型ローカスに焦点をあてて解析をはじめ。日本人でアレルをほとんど分析していないMS205、g3、YNH24の3つのローカスについて、非血縁者から250個程度のアレル分析を行う。必要に応じて日本人におけるアレル近傍のSNPsの発見も行うが、まずは既報のSNPsを用いたアレル特異的MVR-PCR法を用いてアレルのマッピングを行い、データベースの構築を行う。

(3) 多型性の評価とアレル類似性の検討マッピングしたアレルについて、コンピュータにより、同一アレルの検索やドット・マトリクス分析によりアレル間の類似性を検討する。これは、パソコンにソフトウェアを構築したので分析できる。これにより、最大アレル頻度から集団におけるアレル数の推定や類似アレルのグループ分けによりアレルのターンオーバー(進化の速さの目安)が推定できる。

(4) 実際例を用いた試験的判定と検討予め第3度血縁と判明しているボランティア数組に協力してもらい、実際に対象ローカ

スのアリルタイピングを行い、尤度比を算出して判定を試みる。その場合、前述の如く第3度近親ペアのみでなく、その片親の型を加えた場合などを追加して検討する。これにより、実際の鑑定において尤度比が上がらず判定に迷った場合に、どの血縁関係の資料を追加すると効果的かがわかるので、将来の実務利用に関しての有用な参考データとなる。

(5) 高変異ミニサテライトローカス以外の方法の模索

ミニサテライトローカスの膨大な多型性の利用は二者における第3度血縁鑑定の成否に重要な鍵となるが、これまで述べてきたようにアリルの共有が大前提となる。したがって、複数ローカスの利用が基本となる。しかしながら、アリルの共有のない場合にはいずれの結論を導くことはできなくなる。そこで、ゲノム内の高識別度のミニサテライトローカスのポイント的なアリルの共有という観点ではなく、むしろ染色体のどの程度を共有するかというやや俯瞰的な観点からの分析について検討する。

(6) 海外共同研究者との検討

研究の遂行にあたっては選択したミニサテライトの詳細なアリル性状解析や精緻な尤度比シミュレーションなどの良否が研究成果を左右することとなる。研究代表者、研究分担者はいずれもミニサテライトの十分な知識と経験を備えている。しかし、万全を期すためには、ミニサテライト生物学の専門家や卓越した法数学者との実験結果の解釈や検討が不可欠である。研究代表者の玉木は、長年にわたりミニサテライト生物学の創始者であり世界的権威である英国レスター大学の Sir Alec Jeffreys 教授と共同研究を展開しているが、今回も渡航したところ、多型性を生じる根源である germline における組み換えホットスポットに関する重要な知見を得ることができ、本研究の多型性利用におけるミニサテライトの扱いについて注意が喚起された。また、高多型ミニサテライトを用いて血縁鑑定を行う際、突然変異アリルの問題は考慮の対象となる。そのため、CEB1 などミニサテライトの突然変異様式に詳しいフランス人類遺伝学研究所の J. Buard 博士のもとを訪ねたところ、ミニサテライトのターンオーバーに関する重要な遺伝子 prdm9 の詳細な実験データの解説をしていただき、まさに膨大な多型性を有する高変異ミニサテライトのターンオーバーの成り立ちがはっきり見えてきたといえる。さらに、本研究において血縁鑑定の決め手となるのは尤度比計算である。これは Bayes の定理をもとにした推計値であるが、従来の血清学的遺伝マーカーは多型性がかなり低い

ため、長年、わが国だけでなく、世界でも Essen-Möller の式など父子鑑定においてのみ利用されていた。しかし、DNA 検査の開発に伴い、尤度比の利用ははだいに広まった。なかでも、カリフォルニアの Charles Brenner 博士は、法数学 (forensic mathematics) という分野を提唱し、ベイズの定理と尤度比を解釈の主軸にして、DNA 鑑定の諸問題について、コンピュータ・ソフトウェアを開発して多くの解決策をもたらしている。例えば、2001 年のニューヨークの世界貿易センタービル爆破事件における犠牲者の身元確認やスイス航空機事故犠牲者など、大量死亡者の身元確認作業において彼の活躍は顕著であった。玉木は Brenner 博士とミニサテライトの突然変異機構のシミュレーションについて共同研究を行っているが (Tamaki K: Forensic Sci. Int. 2000)、今回も尤度比の計算方法や判断基準の考え方など多くの有用な助言をいただいた。

4. 研究成果

高多型縦列反復配列のひとつである D1S8 (MS32) を、アリル特異的 MVR-PCR にてアリルの内部構造をマッピングして分析した。これまで、イギリス人やジンバブエの黒人などで、識別力が非常に高い反面共通するリピート配列を有する場合があることが報告されていたが、タイ人、中国人のアリルで分析し、日本人と比較した。MS32 はタイ人や中国人においても膨大な多型性を示し、高い識別力を有することが示されただけでなく、そのアリル内に集団特異的といえるリピート配列が認められた。さらに、その類似性は、タイ人や中国人においては、欧米白人よりも日本人に近縁であることが示された (下表参照)。

Table 2 Characteristics of Thai, Chinese, and Japanese allelic similarity by pairwise comparison with worldwide alleles

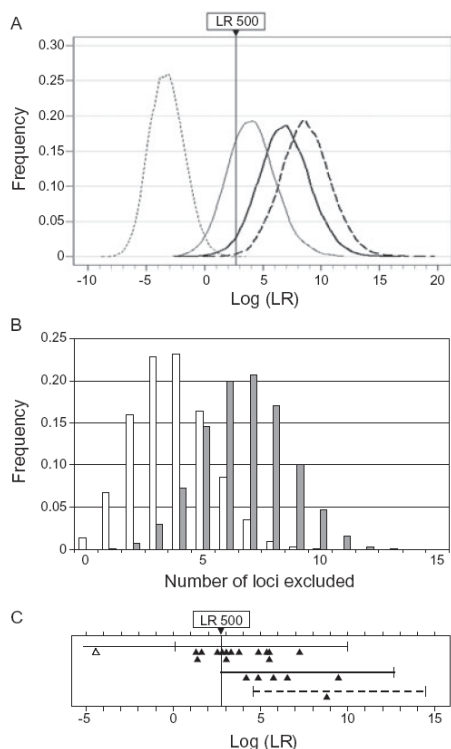
|  | Thai | Chinese | Japanese |
|--|------|---------|----------|
| Total no. of alleles                           | 119  | 73      | 325      |
| Showed a match (score $\geq 22$ )              | 95   | 67      | 276      |
| Similarity confirmed by eye                    | 63   | 43      | 221      |
| Greatest allelic similarity to Same population | 22   | 6       | 165      |
| Same population plus other Asian populations   | 15   | 15      | 29       |
| Other Asian populations only                   | 19   | 17      | 10       |
| North Europeans                                | 4    | 1       | 2        |
| Africans                                       | 0    | 0       | 1        |

<Yuan, QH et al J. Mol. Evol. 2009 >

また、同胞の血縁関係の検査における縦列反復の有用性について検討をおこなった。同胞は第1度近親であるが、問題となる2人の個



人だけで、他に調査する対象がない場合には、平均4分の1の確率で全くアレルの共有がなく、血縁関係の言及ができない場合がある。我々は、現在鑑識捜査などで、世界中で用いられているマイクロサテライトの15ローカス検出キットの有用性について、2万例の同胞ペアをシミュレーションで作成して検討したが、約16%の例で同胞と肯定できない尤度比を示した。参照する同胞の数を増やしたところ、尤度比は向上し、ほぼ間違いなく決定できた。実際の身元不明死体21例の身元確認のために、同胞検査を応用したところ、1例においては、明らかに同胞関係が否定されたが、残りの事例では高い値を示した（下図参照）。



**Fig. 2. LR and number of excluded loci in sibship comparison.** (A) Distribution of LR deduced from 20,000 simulated cases. Each curve is estimated when the party in question has full sibship of the AS (—), of two ASs (---), and of three ASs (---). Full sibship among the ASs are established. Distribution of LR between two unrelated persons is also indicated (-.-) for reference. Note that when only one AS is available for comparison, the LR falls below 500 [i.e.,  $\text{Log}(\text{LR}) = 2.70$ ] in 26.2 percent of the cases. (B) Distribution of numbers of excluded loci in 15 STR loci when a party in question has no relation to the two ASs (□) and three ASs (■). (C) LR distribution in actual case-work involving sibship comparison. Three line variants show the 95 percent confidence intervals of LR in 20,000 simulated cases: AS (—), two ASs (---), and three ASs (-.-). The LRs in 21 cases (▲) are plotted below the lines in each set of simulation. One case involving a UP and one AS was practically excluded because of the low LR value ( $4.07 \times 10^{-9}$ ).

<Tamaki, K et al. Transfusion, 2009>

しかし、従兄弟である第3度血縁関係の場合は、シミュレーションでは、このシステムでは殆ど判定できないことがわかった。実際に第3度血縁関係にあるボランティアより血

液を提供してもらい、マイクロサテライトの型判定を行って、第3度血縁関係の有無について肯定の尤度比を算出したが、その値は1を下まわる結果となった。

二者間におけるいところなど第3度血縁鑑定においては、アレルの共有のないことが75%起こるため、アレル数が多くヘテロ接合度の高いミニサテライトローカスにおけるアレルの共有があれば、最も効果的に尤度比を上げて肯否の判断が可能となる。第3度血縁を扱う前段階として、同胞の血縁関係の検査における縦列反復配列の有用性について検討したが、単に二者における第3度血縁の鑑定ではなく、ともに複数の同胞を有する2つのグループにおける第3度血縁関係の有無を判定するため、高多型ミニサテライトを用いた方法によって、実際例にて試験的に判定してみた。しかし、2つのローカスにおいては、双方のグループ間ではアレルの共有はなく血縁の有無については判定不能であった。このため、ミニサテライト数ローカスの一致に頼るのではなく、むしろ個々の識別力は高くなくても、ゲノム内の多数の領域のマイクロサテライトをマッピングして、二者間で染色体のどの程度を共有しているかを総合的に分析する方が、血縁関係の判断には効果的ではないかという推論に達した。ヒト常染色体にはほぼ均等に分布する382ローカスのCAリピートの多型をマッピングしたデータや実際のいところや他人、親子などをマッピングして、どのくらいのハプロタイプの共有があるかを検討した。現在データを解析中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Yoshida K, Tamaki, K. et al. Efficacy of extended kinship analyses utilizing commercial STR kit in establishing personal identification. Legal Med, 2011 印刷中

2. Yuan, QH, Tamaki K, et al. Minisatellite MS32 alleles show population specificity among Thai, Chinese, and Japanese. J. Mol. Evol. 2009, 68:126-33

3. Tamaki, K et al. Likelihood evaluation using 15 common short tandem repeat loci: a practical and simulated approach to establishing personal identification via sibling/parental assessments. Transfusion, 2009, 49:578-84.

〔学会発表〕（計2件）

1. 玉木敬二. ヒトDNA鑑定の現状と課題  
日本DNA鑑定学会第3回総会 基調講演  
平成22年12月2日 東京都港区

2. 玉木敬二 他. 身元確認におけるSTR15 ローカスタイピングを用いた同胞検査の有用性  
第92次日本法医学会総会 平成20年4月24日 長崎

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

玉木 敬二 (TAMAKI KEIJI)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：90217175

### (2) 研究分担者

山本 敏充 (YAMAMOTO TOSHIMICHI)  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：50260592

### (3) 連携研究者

鶴山 竜昭 (TSURUYAMA TATSUAKI)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：00303842

飯野 守男 (IINO MORIO)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：80362466

奥野 知子 (OKUNO TOMOKO)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：30288386