

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390184

研究課題名(和文)法数学推計と実践的分析による限界的な微量混合試料における関与者同定法の確立

研究課題名(英文) Identification of contributors in the low-template and mixed samples by forensic mathematical estimation and experimental analysis

研究代表者

玉木 敬二 (Tamaki, Keiji)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90217175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：現代のDNA鑑定において、混合微量試料の分析は不可避であるため、混合試料を作成して常染色体上のSTRのタイピングシステムを再検討したところ、ヘテロ接合体のピークバランスが崩れることがわかった。また、混合人数が2人か3人の場合はアリルピーク値を用いない方法であっても関与者の推定に極めて有用であることが示された。

また、非関与者が関与者と判断されてしまう危険性が生じるが、多数のシミュレーションにより、特に第一度血縁の非関与者ではその危険性が高いことが示された。さらに、新たなSTRローカスのタイピングを行って頻度を求め識別力を検討した。最後に、混合試料解析の分析手順のフローチャートを作成した。

研究成果の概要(英文)：Analyzing mixed or/and low-template DNA samples is challenging but inevitable in current forensic DNA test. We reevaluated autosomal STR multiplex typing kit and found that allele peak imbalance of heterozygote occurred even in a single person sample. Therefore, the determination of the heterozygous combination is not always reliable and the binary method which does not use the allelic peak heights still showed very powerful in mixed samples from 2 or 3 individuals.

While it is often said that there is a risk that non-contributors cannot be excluded in a mixed sample, the simulated analysis using a large number of the mixed samples revealed that the first grade kin of the contributor is erroneously included as a contributor although its proportion is small. Moreover, 37 loci of autosomal STR were genotyped and the allele frequencies and the discriminating power were estimated in the Japanese population. Finally, the analytical procedure from mixed samples has been established.

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

1. 研究開始当初の背景

現代の DNA 分析技術の発展は、高感度な DNA 検査法を可能にし、鑑識捜査などに多大な貢献をした反面、複数のヒト DNA 混合試料や微量試料の分析をも要求される事態をもたらした。しかし、限界的試料である微量混合試料には、その分析方法と結果の解釈において多くの課題が残されており、わが国では全く手つかずの状態であり、欧米においても混沌とした状況に陥っている。我々は、これまでに混合試料における DNA 分析について、関与人数の分析などの高確度の推定法を検討してきており、実務応用に向けての一定の成果を得ているが、単なる混合試料を越えた Stochastic Effect (確率効果) を考慮するような微量試料の分析にも目を向けた混合試料分析の根本的なストラテジーの開発が求められてきている。

2. 研究目的

われわれは、この実験的な混合試料分析研究と法数学的推計を基盤とした解釈をもとに、微量混合試料の正確でわかりやすい分析法を示したいと考え、具体的には次のような研究目的を立てた。(1) 現行のマルチプレックス STR 検査の混合試料における有効性を再検討する。(2) 新たな STR ローカスを混合資料分析に応用する。(3) 混合試料解析における関与者の血縁者が識別できる。(4) わが国の現状に即した混合試料の解析手順を確立する。

DNA 鑑定の社会的信頼の回復と発展のために、わが国独自の混合試料、微量試料の分析方法のガイドライン作成は急務であるが、本研究はそれに多くの示唆を与えるだけでなく、わが国の実情に即した分析方法のプロトコルの確立に十分寄与できるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 混合資料におけるマルチプレックス STR 検査システムの識別力の検討

血縁関係のない 20 人の DNA 溶液を、吸光度法で 0.1 ng/μl 程度の濃度に希釈した後、Quantifiler キットにて濃度の精度を高めた。これらの資料について、二人の濃度比を 9 : 1 から等量比まで段階的に混合したものを試料とした。マルチプレックス STR システムとしてアイデンティファイラー・キットを用いて、これらの試料のタイピングを行い、検出されたエレクトロフェログラムのピーク値を測定した。ピーク値の変化はヘテロ接合体の 2 つのピークバランス (Hb) を算出して検討した。

(2) 新たな STR ローカスの DNA タイピング

京都大学医学研究科医の倫理委員会の承認を経て、法医学解剖で得られた匿名の 175 例の日本人 DNA について、4 つの市販のキットを用いて通常のプロトコルにて STR 型のタイピングを行った。

(3) 分析対象集団の STR 型作成

第 3 度血縁までの家族のある STR 型を 10 万家系分、また、非血縁集団における個人の STR 型を 30 万人分作成した。続いて、それぞれの STR 型を合わせることにより“混合試料”を作成し、混合試料の非関与者が関与者の候補から排除できるローカス数を集計した。

(4) シミュレーション解析や尤度比の算出

シミュレーションや尤度比の算出はプログラム言語 R を用いてスクリプト (プログラム) を作成して行った。また、一部の尤度比はマイクロソフトエクセルよりマクロを作成して算出し、表計算によって平均値などの統計値をだした。

4. 研究の成果

(1) マルチプレックス STR 検査システムの識別力の検討

驚くべきことに Hb は混合試料だけでなく、

対照試料として用いた一個人試料においても国際法遺伝学会などが示す基準を外れる場合があることがわかった。また、混合試料における含有 DNA 量の少ない方の関与者の DNA 量が減少するに従い、Hb は基準値(0.6 ~ 1.66)を外れる傾向にあることが明きらかとなったので、アリルピーク高の値から混合試料の関与者の持つ STR 型の組合せ(ヘテロ接合体)を推定して問題となる人の関与の有無を判別する方法(定量法)は、アイデンティファイラー検査では信頼性に疑問があると考えられた。このため、敢えてピーク値を考慮せず、検出されたアリルの数だけから関与人数を設定して、想定されるあらゆる遺伝子型の組み合わせを考慮して問題となる人の関与の有無を判別する方法(定性法)の有用性を検討した。作成した混合試料の STR 型 1 万例についてシミュレーションを行った結果、LR の最低値が 2 人混合試料の場合で 2.01×10^9 、3 人の場合でも 37,500 となり、刑事事件で尤度比の解釈のひとつの基準値といえる 1,000 を遥かに超える値が得られたので、定性法であっても、2 人または 3 人の場合であれば、関与者の推定に極めて有用であることが示唆された。

(2) 新たな STR ローカスの日本人頻度調査とその識別力の検討

175 例の日本人 DNA について市販の 4 つのキットを用いて通常のプロトコルにて STR 型のタイピングを行った。結果は概ねこれまで報告されたアリル頻度と同様の傾向を示したが、一部のローカスにおいてアリル番号が擦れており、アリル頻度が異なっていた。混乱を防ぐためのアリル名称の統一が必要と考えられた。また、FESPS と Penta E ローカスは連鎖が検出されたため、FESPS を除外した 36 ローカスについて総合一致確率(CMP)を算出したところ、 2.17×10^{-35} となり、現状のアイデンティファイラー検査や米国の CODIS ローカスのみの同様の値を遙

かに下回る高い識別力を有するシステムとなることが示された。さらに、FGA ローカスのアリル 21.1 や、D5S818 ローカスのアリル 6 などこれまでに日本人で報告されていなかった 4 つのアリルについて、その塩基配列を決定したところ、通常の変異部分の変化だけでなく、非変異部分の欠失などにより全長が決められて、便宜上のアリル番号となっており、アリル名は必ずしもリピート数を反映していないことが示された。

(3) 混合試料解析における関与者の血縁者の識別の検討

混合試料では 1 ローカスあたりの検出アリル数が一人分の DNA 試料と比較して多いため、関与者となれる STR 型の組合せは非常に増加することが予想される。このため、混合試料の非関与者が関与者と判断されてしまう危険性が生じる。特に、問題とする人物が関与者の血縁者である場合には関与者と類似した遺伝子型を有するため、その危険性はさらに増大する。そこで、他人や血縁者で作成された混合試料の場合で、その混合試料の関与者ではないが、試料の関与者の血縁者においてそのアリルが全て混合試料の型として検出されたため、誤って“関与者”とされてしまうような場合の発生率をシミュレーションし、関与者の血縁者が混合試料分析に与える影響を検討した。

その結果、非血縁者 2 人の混合試料では平均 9 ローカスで混合試料の型と矛盾を生じており、全ての家系において非血縁者を関与者の候補から排除できたほか、関与者の第三度血縁も同様に全て関与者から排除された。また、関与者の第二度血縁者では 10 万例中わずか 3 例が関与者として矛盾しない結果となったが、関与者との血縁関係が第二度血縁よりも薄い混合試料の非関与者が関与者と判断される可能性はまずないといえる。ところが、第一度血縁の非関与者では、関与者と判断してしまう場合が親子で 0.02%、同胞で

は約 0.1%認められた。

しかし、混合試料において問題となる人物（被疑者）以外の関与者（被害者）の型が既知の場合は、未知の場合と比較すると、混合試料の非関与者が排除できるローカス数は増加した。たとえば、問題となる人物以外の関与者と非血縁である人は、平均 12 ローカスで排除でき、また、その同胞であっても平均 8 ローカスで排除できた。一方、同胞 2 人の混合試料では他の関与者の型が未知の場合、関与者と非血縁である人は、平均 11 ローカスで関与者の候補から排除できたが、関与者の同胞では平均 4 ローカスで関与者の候補から排除できるとどまった。同胞 2 人の混合試料であればローカスあたりの検出アレル数は通常よりも少なくなるため、非血縁者が所有するアレルは検出されにくくなるので、関与者の候補から排除できるローカス数が増加した。しかし、非関与者である同胞や親の場合は排除できるローカス数は減少したため、親では約 0.7%、同胞であれば約 1.2%が誤って関与者と判断されてしまうことがわかった。

関与者が既知の場合は、未知の場合と比較すると、混合試料の非関与者が関与者の候補から排除できるローカス数が増加し、非血縁であれば平均 12 ローカスで排除され、同胞でも平均 7 ローカスで排除され、非関与者を関与者と判断してしまう場合は、同胞や親の場合にはそれぞれ 9 例に留まり、第二度血縁、第三度血縁、非血縁の場合では全ての非関与者は排除された。このため、被害者の型など一方の型が判明していれば、真の関与者（犯人）の血縁者である非関与者が誤って判断される可能性は低いが、関与者の型が分かっている場合には同胞や親、子などの第一度血縁の非関与者が関与者とされてしまう危険性があることに、留意しなくてはならないことが示された。

(4) (4) 混合試料解析のための前提条件と

解析方法のフローチャートの作成

これまでの検討により、現状のわが国のシステムにおける信頼性の高い混合試料解析を行うためには、次の 4 つの前提条件を満たさなくてはならないことがわかった。

- 1) 混合試料の関与人数は 3 人までである
- 2) 全てのアレルピーク高が有効ピーク閾値を超えている
- 3) 既知の関与者の全てのアレルが混合試料で検出されている
- 4) 関与者相互の血縁がない

混合試料の DNA プロファイルがこれらの前提条件を満たしている場合の、解析手順のフローチャートを作成した。具体的には、まず、既知の関与者の数を決め、次に既知の関与者にはないアレルが最も多いローカスの未知の関与者由来のアレル数をとる。そして、最小関与人数とそれより 1 人足した人数における関与者の STR 型の組合せで、混合試料の STR 型と同じになるような尤度を比較して、高い方を混合試料における関与人数とその組合せとした。このフローチャートを用いれば、混合試料を構成する確かな推定関与人数を推定でき、その状況下での問題となる人の試料の関与の有無についての尤度比を算出できるので、よりシステム化された正確な混合試料解析手順を示したものとなった。

今後の研究課題と展望

研究後半の過程で、微量試料において発生するアレルのドロップアウトやドロップインの原因となる確率効果の起こる閾値を設定するという考えを用いない Continuous system (CS) が発表された。既存のモデルがアレルピークの真偽、例えば、小さいピークが真のアレルピークであるか、ノイズかスターであるかを人が判断しているのに対し、CS 法ではコンピュータが計算過程で処理して判定するため、プロファイル判読における客観性が増す。われわれは、この CS 法

に注目して研究計画を若干変更して、CS 法に基づく混合試料解析のプログラム作成に着手した。さらに、既存のドロップアウトモデルといわれるソフトウェアの改良版が入手できたので、それらの実践的評価を加え、わが国の現状を踏まえた最も信頼性の高い混合試料、微量試料の分析方法の確立に向けて、研究を継続したいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

真鍋翔, 尾関宗孝, 川合千裕, 垣本由布, 木田佳枝, 鶴山竜昭, 玉木敬二. DNA 混合試料の濃度変化によるアリルピークの影響について. DNA 多型 2011;19:193-9.

真鍋翔, 川合千裕, 尾関宗孝, 玉木敬二. Identifiler Kit を用いた DNA 鑑定におけるアリルピークの不安定性. DNA 多型 2012;20:178-82.

奈良原舞子, 玉木敬二, 山田亮. 継承ベクトルを用いた複雑な家系の血縁鑑定. DNA 多型 2012;20:278-85.

Ozeki M, Tamaki K. Allele frequencies of 37 short tandem repeat loci in a Japanese population. Leg Med. 2013;15(6):342-6.

Narahara M, Tamaki K, Yamada R. Application of permanents of square matrices for DNA identification in multiple-fatality cases. BMC Genet. 2013;14(1):72.

Nakamura Y, Samejima M, Tamaki K, Minaguchi K. Multiplex PCR for 18 X-chromosomal STRs in Japanese population. Leg Med (Tokyo). 2013;15(3):164-70.

Manabe S, Mori Y, Kawai C, Ozeki M, Tamaki K. Mixture interpretation: Experimental and simulated reevaluation of qualitative analysis. Leg Med (Tokyo). 2013;15(2):66-71.

Manabe S, Kawai C, Tamaki K. Simulated approach to estimate the number and combination of known/unknown contributors in mixed DNA samples using 15 short tandem repeat loci. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser 2013;4:154-5.

真鍋翔, 川合千裕, 宮尾昌, 石田季子, 小谷泰一, 玉木敬二. 混合試料における関与者に血縁者を想定する必要性について. DNA 多型 2013;21:204-8.

真鍋翔, 川合千裕, 畑野翔太郎, 垣本由布, 尾関宗孝, 玉木敬二. 父母由来を区別した真の突然変異率の推定. DNA 多型 2013;21:228-31.

〔学会発表〕(計 9 件)

Manabe S, Ozeki M, Kotani H, Tsuruyama T, Tamaki K. Alle peak instability in identifying genotype of DNA mixture. 第 95 次日本法医学会学術全国集会 . 日本法医学雑誌. 2011; 65: p99, 福島 .

真鍋翔, 川合千裕, 尾関宗孝, 玉木敬二 : Identifiler Kit を用いた DNA 鑑定におけるアリルピークの不安定性 . 日本 DNA 多型学会第 20 回学術集会 .DNA 多型学会第 20 回学術集会抄録集 . 2011; p63, 神奈川 .

真鍋翔, 尾関宗孝, 堀元英, 小谷泰一, 鶴山竜昭, 玉木敬二. 混合試料解析における関与者を推定する尤度比の有用性について. 第96次日本法医学会学術全国集会. 日本法医学雑誌. 2012; p64, 浜松.

真鍋翔, 川合千裕, 宮尾昌, 石田季子, 小谷泰一, 玉木敬二. 混合試料における関与者に血縁者を想定する必要性について. 日本 DNA 多型学会第 21 回学術集会. 講演要旨集. 2012; p73, 京都.

真鍋 翔, 川合千裕, 畑野翔太郎, 垣本由布, 尾関宗孝, 玉木敬二. 父母由来を区別した真の突然変異率の推定. 日本 DNA 多型学会第 21 回学術集会. 講演要旨集. 2012; p80, 京都.

玉木敬二 . 混合資料の DNA 鑑定結果

～ 諸外国での状況について～ .第 18 回日本法科学技術学会 法生物ミニシンポジウム . 講演要旨集 . 2012 ; p8 , 東京 .

Manabe S, Kawai C, Tamaki K. Simulated approach to estimate the numbers and combinations of known/unknown contributors in mixed DNA samples using 15 short tandem repeat loci. 25th Congress of the International Society for Forensic Genetics. Abstracts. 2013; p192, Melbourne, Australia.

真鍋翔, 川合千裕, 垣本由布, 石田季子, 宮尾昌, 玉木敬二. 被疑者の血縁者の関与を想定した尤度比計算のプログラミングとその評価. 日本 DNA 多型学会第 22 回学術集会. 講演要旨集. 2013; p62, 仙台.

玉木敬二. 微量混合試料分析 ～ 海外の動きと今後～ . 第 19 回日本法科学技術学会 法生物ミニシンポジウム . 講演要旨集 . 2013; p27, 東京.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

玉木 敬二 (TAMAKI , Keiji)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 9 0 2 1 7 1 7 5