

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460874

研究課題名(和文) X染色体多型マーカーの血縁鑑定における有用性の評価に関する研究

研究課題名(英文) A study on of X-chromosomal polymorphic markers for forensic kinship tests

研究代表者

青木 康博 (Aoki, Yasuhiro)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90202481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本在住者747名につき、X染色体上の短鎖縦列反復配列(X-STR)27座位のデータを収集し、多型指標および連鎖不平衡の状態につき検討した。このデータを用いて行ったシミュレーションにより、X-STRが父娘、および父由来アリルを共有する女性同胞(全同胞・父系半同胞)の鑑別に有用であることが示された。同胞尤度比算出のため、1) 遺伝的距離に基づく組み換え価を採用し、座位ごとに順次計算する、2) 連鎖不平衡が検出された座位はハプロタイプとして扱う、3) 遺伝型に矛盾が生じた場合のみ突然変異を考慮する、としたモデルを考案した。本法は少ない計算量で妥当な同胞尤度比が得られ、法医遺伝学的に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Japanese population data of 323 female and 424 male samples on 27 loci of X-chromosomal short tandem repeats (X-STRs) were collected and analysed. A simulation study using the population data elucidated that X-STRs are useful to confirm the father-daughter relationships and female sibships sharing the father, namely full sibships and paternal half sibships. For the calculation of the likelihood ratio of female sibship, a linkage model on the basis of identity by descent approach were presented. In this model, 1) the linkage disequilibrium was taken into account regarding a cluster as a haplotype, and 2) the mutation was considered only when there was an apparent contradiction. This computation method is less complicated and could obtain reasonable likelihood ratios, therefore, should be effective to evaluate the kinship with X chromosomal polymorphic markers.

研究分野：法医学

キーワード：DNA多型 X染色体 マイクロサテライト 集団調査 連鎖不平衡 血縁鑑定 個人識別 コンピュータ・シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 多型による法医学的個人識別においては、主として常染色体上の STR (short tandem repeat) が繁用されており、その他には母系および父系の異同について、それぞれミトコンドリア DNA および Y 染色体 STR の検査が併用されている。一方 X 染色体上にも多型性の高い STR が数多くあり、それぞれについてアレルの遺伝子頻度のデータが報告され、マルチプレックスの型判定用キットも開発・市販されている。しかし、X 染色体多型マーカーは、特に当事者の DNA 型の検査ができない、いわゆる欠落事例などにおいて有用であるとされてはいるものの、血縁関係を否定する場合に用いられるなど、その利用は限定的なものにとどまっている状況であった。これは男女で遺伝様式が異なり、非否定例において確率的評価を行う場合に、組換えが生ずる状況においては組換え価、すなわち連鎖の状態をある程度正確に推定する必要がある一方で、組換えのない状況においては、ハプロタイプとして扱うという、評価の困難さなし曖昧さに起因するものと考えられていた。

(2) 一方 DNA 型検査による血縁鑑定手法の確立という観点からは、X 染色体 (のみ) を検討対象から除外することは望ましいことではない。換言すると、現在定着しつつある DNA 多型による個人識別手法は、X 染色体上の多型マーカーの定量的評価の定着を以て一応の完成を見るといえる。

(3) 我々は常染色体および Y 染色体上の STR について、そのアレル分布の検討および血縁鑑定における評価法について検討を行ってきたが、X-STR の頻度データの蓄積が進んでいる状況であったことから、その血縁鑑定における評価基準について、ある程度のコンセンサスを形成する必要が生じていた。

2. 研究の目的

X 染色体上の多型マーカー、特に STR (X-STR) のポピュレーションデータを収集し、各多型指標値を得るとともに、連鎖不平衡の状態などについて検討し、その結果および従来の報告をもとに、X 染色体多型マーカーの血縁鑑定における確率的評価法を提示し、さらに複雑な事例における計算にも適用可能な汎用ファイルパッケージを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ポピュレーション・スタディ (集団調査)

日本在住の成人 747 名 (男性 424 名、女性 323 名) より書面でインフォームド・コンセントを得て、血液または口腔粘膜細胞を採取し DNA を抽出した。解析対象座位は X 染色体上の STR である、DXS6807, DXS9902, DXS6795,

DXS6810, DXS10076, DXS10077, DXS10078, DXS10162, DXS10163, DXS10164, DXS7132, DXS981, DXS6800, DXS6803, DXS6809, DXS6789, DXS6799, DXS7424, DXS101, DXS7133, GATA172D05, DXS10103, HPRTB, GATA31E08, DXS8377, DXS10147, DXS7423 の計 27 座位であり、X 染色体の全長をカバーし、かつ連鎖の影響を見るために十分に近接して存在する座位を含む座位を選択した。

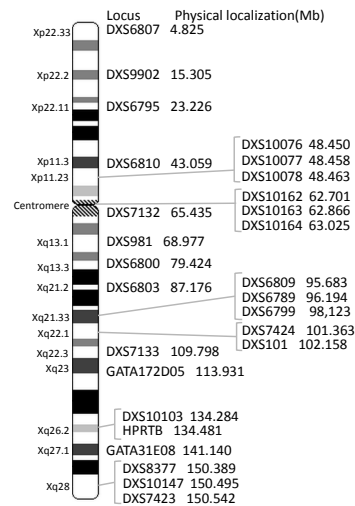


図 1. 調査対象座位とその局在。

蛍光標識プライマーを用いて PCR 増幅を行い、3130XL ジェネティック・アナライザー (Applied Biosystems 社) 上で電気泳動を行い、GeneMapper version 4.0 ソフトウェアを利用して型判定を行った。PCR は全座位を 2 群に分け、18 座位および 9 座位のマルチプレックスで増幅した。この際、未報告のアレル等が出現した場合は、シーケンシングを行って塩基配列を確認した。得られたデータより、各座位の遺伝型頻度およびアレル頻度を算出し、女性のデータにおけるハーディ・ワインバーク平衡からの乖離の有無、男女間のアレル頻度の際の有無を検討し、さらに各種の多型性および法医学的個人識別における有用性の指標、すなわち女性における異型接合度、男女別の識別能などを算出した。さらに座位間の連鎖不平衡の有無について検討を行った。

なおこの研究は名古屋市立大学大学院医学研究科倫理審査委員会の承認を得て実施した。

(2) コンピュータ・シミュレーションによる血縁鑑定における X 染色体 STR の有用性の検討

① 乱数を利用した家系の作成

得られたアレル頻度およびハプロタイプ頻度ををもとに、統計処理ソフトウェアである R 3.1.2 で乱数を使用して家系を発生させた。10 万組の両親、すなわち男女の組をアレル頻度ま

たはハプロタイプ頻度をもとに作成し、そこから娘を発生させる際には父親のアリルはそのまま継承させ、母由来の染色体は短腕遠位側から順次 Kosambi の式から算出した組み換え確率により組み換えを生じさせた後に継承させた。また父由来・母由来ともに 0.0015 の頻度で突然変異を起こさせた。なお突然変異は STR の繰り返し回数が 1 回増減するいわゆる one step mutation に限定した。同様にして全同胞姉妹、父系半同胞（異母）姉妹、母系半同胞（異父）姉妹、および対照として非血縁女性のペアをそれぞれ 10 万組作成した。

②各血縁鑑定における尤度比計算モデルの作成および検討

父娘対非血縁男女、全同胞姉妹対非血縁女性ペア、全同胞姉妹対母系半同胞姉妹、父系半同胞姉妹対非血縁女性ペアの 4 つの対仮説に基づく尤度比を算出した。X 染色体多型マーカーを用いる場合、父娘・全同胞・父系半同胞においては通常共有アリルを有し、共有アリルを有さない座位が一定数以上あれば血縁関係が否定されるが、今回の検討では矛盾が生じた座位もすべて突然変異の可能性を考慮し、突然変異率は 0.0015 として全例で尤度比を算出した。父娘関係の尤度は、隣接する座位との間で連鎖不平衡が検出されない座位はそれぞれ独立として扱い、連鎖不平衡が検出された座位同士はハプロタイプとし、その頻度を用いて計算した。

全同胞における尤度比は Wenk らの算出法をもとに連鎖および連鎖不平衡を考慮して計算を行った。全同胞関係が想定される 2 名の女性において、両者の同祖アリル（祖先を同一とする共有アリル: identity by descent (IBD)) 数が 0, 1, 2 のそれぞれである確率と、その IBD 数である場合に当該遺伝型になる確率との積の総和が当該血縁関係の尤度となる。X 染色体の場合、全同胞姉妹であれば父由来アリルは必ず IBD であるので IBD 数が 1 または 2 である確率がそれぞれ 0.5 である。短腕遠位側にある座位から順に尤度を計算していくこととし、1 座位目 (DXS6807) の IBD 数が 1 または 2 である確率を 0.5 とし、以後の座位の IBD 数は、組み換え確率 (r) と前の座位の IBD 数による関数として計算される。ここで r は遺伝的距離から Kosambi の式で算出したものを用いた。例えば前の座位の IBS 数が 1 であれば、次の座位では、IBD 数 1 である確率: $1 - r$, IBD 数 2 である確率: r となる。一方前の座位の共有アリル（同祖的であるか否かを問わない: identity by state (IBS) 数が 2 であった場合は、母がヘテロであれば IBD 数=2 と言え、母がホモであるなら確率 0.5 で IBD 数は 1 または 2 である。これにより、母由来アリルの頻度が p であった場合、前

の座位が IBD 数 1 の確率は、

$$(4 - 3p)/(4 - 4p)$$

であり、これを L とおくと IBD 数=2 の確率は $1 - L$ である。よって前の座位が IBS 数 2 であれば次の座位では、

$$\text{IBD 数 1 である確率: } Lr + (1 - L)(1 - r)$$

$$\text{IBD 数 2 である確率: } (1 - L)r + L(1 - r)$$

となる。一方、突然変異率 ($\mu = 0.015$) を組み入れるに当たり、今回のモデルにおいては IBS 数=1 であれば父由来アリルを共有しているとみなし、また母由来突然変異は検出不可能であることから、姉妹間で IBS 数 0 の場合のみ父由来の突然変異とみなすこととした。突然変異によって IBS 数 0 となった場合を便宜上 IBD 数 0 と記載すると、各確率は表 1a, b のごとくとなる。

表 1a. 1 座位目の各 IBD 数の確率

IBD 数	確率
0	μ
1	$0.5 - \mu$
2	0.5

表 1b. 2 座位目の各 IBD 数の確率

IBD 数	直近の座位の IBD 数	
	0 or 1	2
0	μ	μ
1	$1 - r - \mu$	$Lr + (1 - L)(1 - r - \mu)$
2	r	$(1 - L)r + L(1 - r - \mu)$

尤度は各 IBD 数である確率に、その際に当該遺伝型が生じる確率を乗じたものであり、尤度比はこれを当該遺伝型の頻度で割ったものとなる。なお、突然変異が生じた際の尤度比は突然変異率 μ を平均排除率（全同胞の場合はアリルを任意の 2 人が共有しない確率）で除したものを採用した。

連鎖不平衡が検出された座位ではハプロタイプ頻度を用い、考えうるすべての場合を計算した。すべての座位について尤度比を算出し、総積を総合尤度比とした。母系半同胞の場合も同様にして計算を行った。

また、これと並行して共有アリル総数 (Total number of IBS: TIBS) を父娘と非血縁男女間、および各姉妹と非血縁者ペアとの間で比較した。

4. 研究成果

(1) アリル頻度と諸指標

各座位の女性における識別能 (PD) は 0.423~0.984, 異型接合度 (Hz) は 0.249~0.907 であった。なお、X 染色体のマーカーにおいては、男性の識別能、および女性の多型情報含有値は、女

性の Hz に等しい。女性のデータにおいてハーディーワインバグ平衡からの顕著な乖離を示す座位はなく ($p > 0.01$), また男女間におけるアリル頻度の統計学的差異も認められなかった。このことから、男性のデータは集団をよく代表しているものと考え、以後の分析を行った。

男性のデータにおいて、互いに隣接する DXS10076-DXS10077 間, DXS10077-DXS10078 間, DXS10076-DXS10078 間, DXS10163-DXS10164 間, DXS7424-DXS101 間, および DXS10147-DXS7423 間の 6 ペア間で連鎖不平衡が観察されたため、以後これらの座位はハプロタイプとして扱うこととした。なおこの他に、隣接していない DXS6807-DXS6795 間, DXS10162-DXS7132 間および DXS7424-GATA172D05 でも統計的に有意な連鎖不平衡が認められたが、間に統計的に連鎖不平衡が認められない座位があることから、別個に扱うこととした。ハプロタイプとした場合の総合 PD は男性で $1 - 2.4 \times 10^{-15}$, 女性では $1 - 1.2 \times 10^{-26}$ となる。なお、全座位を独立とみなした場合の男性の PD は $1 - 1.5 \times 10^{-15}$, 女性のそれは $1 - 1.2 \times 10^{-26}$ とほとんど変わらないことから、個人識別においては各座位を独立とみなして確率計算を行っても大きな差異は生じないものと考えられた。

(2) コンピュータ・シミュレーションによる血縁鑑定における有用性の評価

今回のシミュレーションにおいて、10万人の娘における組換え回数は平均 1.61 回 (標準偏差 1.16, 最小 0 回, 最大 8 回) であり、突然変異は総計 8,121 回発生し、1 座位 7,488 人, 2 座位 303 人, 3 座位 9 人であった。この結果は、先行する家計調査の結果とも比較的良好に合致しており、本シミュレーションは血縁調査モデルとして、妥当なものであると考えられた。

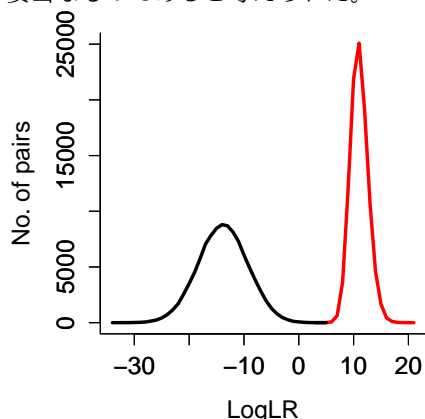


図 2. 父娘 (赤), 非血縁者 (黒) の対数尤度比の分布。

父娘間の鑑定では、真の父娘と非血縁者間では尤度比の分布が完全に分離しており、突然変異

を組み入れてもなお、両者は識別可能であると考えられた (図 2)。また、総 IBS 数においても同様に鑑別が可能であった (図 3)。

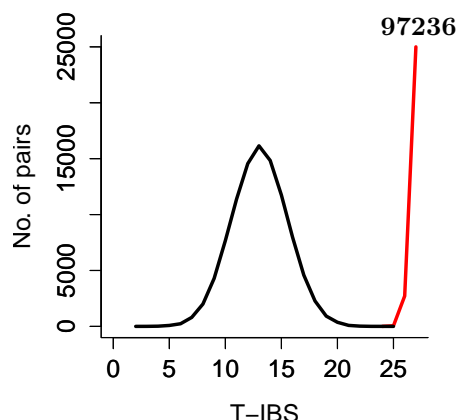


図 3. 父娘 (赤), 非血縁者 (黒) の総共有アリル数の分布。

同胞間、および非血縁者間の共有アリル数の分布を見たものが図 4 である。父親を共有する全同胞、父系半同胞と非血縁者との間では若干オーバーラップが見られるものの分離は比較的良好、最適カットオフ値を設定すると、誤判率は 0.4% 以下であった。一方、全同胞-母系半同胞間では、誤判率は 5.8% とやや高かった (図 4)。

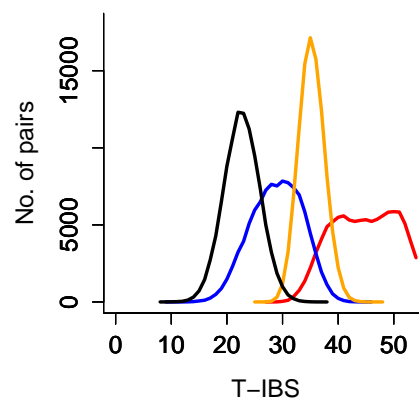


図 4. 全同胞 (赤), 父系半同胞 (橙), 母系半同胞 (青), 非血縁者 (黒) の総共有アリル数の分布。

尤度比を用いた場合、全同胞対非血縁者間では、98.6% の全同胞の尤度比が、非血縁者の全同胞尤度比の最大値を上回り、最適カットオフ値での誤判率は 0.02% (図 5), 父系同胞対非血縁者間では、98.0% の父系半同胞の尤度比が、非血縁者の父系半同胞尤度比の最大値を上回り、最適カットオフ値での誤判率は 0.03% (図 6) であった。

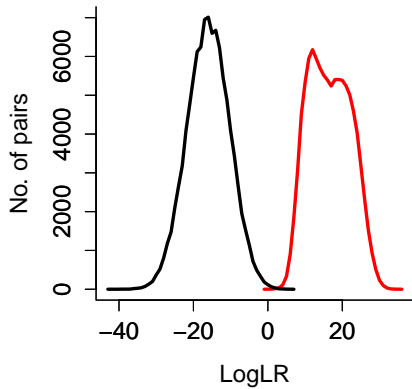


図 5. 全同胞尤度比の分布。赤：全同胞，黒：非血縁者。

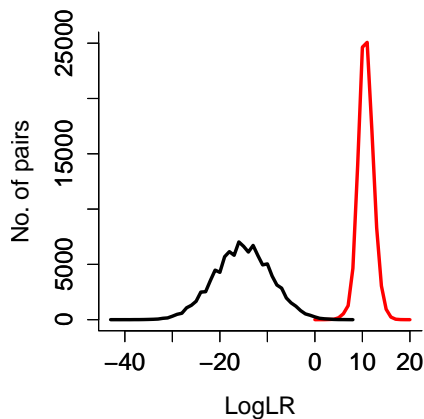


図 6. 父系半同胞尤度比の分布。赤：父系半同胞，黒：非血縁者。

これに対し、全同胞対母系半同胞間では、全同胞の半数以上が、母系半同胞の全同胞/半同胞尤度比の最大値を下回り、最適カットオフ値を採用しても、誤判率は 5.8% (図 7) に昇った。

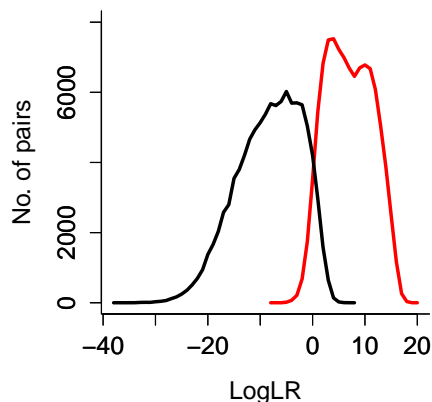


図 7. 全同胞/母系半同胞尤度比の分布。赤：全同胞，黒：母系半同胞。

X 染色体の多型マーカーは法医学的血縁鑑定を行う場合には注意を要する特徴を有するが、男

性のみがヘミ接合であることから、女性のデータをもとにハーディ・ワインバーグ平衡の検定を行えること、また十分量の男性のデータを収集すればハプロタイプについての検討も容易に行えるなどの利点がある。本研究においては、女性 323 名、男性 424 名、すなわち計 1,070 本の X 染色体について 27 座位のアリル頻度データを得て、これをもとに血縁鑑定を行うために必要なデータの算出および解析手法の開発を試みた。今回研究代表者らが考案・採用した統計的に連鎖不平衡が認められない座位間ではそれぞれ独立したものとしてアリル頻度を扱い、また組み換え価や突然変異率を尤度算出に組み込んだ方法は、少ない計算量で妥当な尤度比が得られることから、簡略化されたものであるとはいえ、現象によくフィットしたモデルであって、法医学遺伝学分野においてその有用性は高いものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 福田真未子, 加藤秀章, 青木康博. X 染色体 STR による血縁鑑定: シミュレーションによる検討. DNA 多型 (査読あり) 2016; 24: 印刷中.
- ② 福田真未子, 加藤秀章, 青木康博. ポピュレーションデータを用いた X 染色体 STR の連鎖不平衡の評価. DNA 多型 (査読あり) 2015; 23: 118-120.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 青木康博. 法医学的個人識別における定量的評価法に関する二・三のツール. —DNA 鑑定の確率的評価および骨盤骨の 3 次元計測による年齢・性別推定. 第 100 次日本法医学会学会学術全国集会. 第 100 次日本法医学会学会学術全国集会. 2016 年 6 月 16 日 品川区総合区民会館 (東京都品川区).
- ② 福田真未子, ガバラモハメド, 大瀧 純, 中村 昌美, 加藤秀章, 青木康博. A novel model for likelihood calculation to evaluate kinship using X chromosomal marker data. 第 100 次日本法医学会学会学術全国集会. 2016 年 6 月 17 日 品川区総合区民会館 (東京都品川区).
- ③ 福田真未子, 加藤秀章, 青木康博. X 染色体 STR による血縁鑑定: シミュレーションによる検討. 日本 DNA 多型学会第 24 回学術集会. 2015 年 11 月 18 日 岡山大学 (岡山市).
- ④ 福田真未子, 加藤秀章, 青木康博. ポピュレーションデータを用いた X 染色体 STR の連鎖不平衡の評価. 日本 DNA 多型学会第 23 回学術集会. 2014 年 11 月 27 日 愛知

- 県産業労働センター（愛知県名古屋市）。
- ⑤ 福田真未子, 伊藤利泰, 加藤明裕, 青木康博.
X 染色体 STR における連鎖不平衡の取扱いに関する一考察. 第 36 回日本法医学会
学術中部地方集会. 2014 年 10 月 18 日 藤
田保健衛生大学（愛知県豊明市）。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

[その他] (計 1 件)

- ① 青木康博, 福田真未子, 大瀧 純. DNA で
ヒトを見分ける. 名古屋市高大連携講座・
大学まるごと研究室体験. 2015 年 7 月 28・
29 日. 名古屋市立大学（名古屋市）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 康博 (AOKI YASUHIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 90202481

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究連携者

なし

(4) 研究協力者

福田 真未子 (FUKUTA MAMIKO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・大学院生