



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1660号
学位記番号	第1180号
氏名	福田 真未子
授与年月日	平成30年5月31日
学位論文の題名	<p>A simple method for calculating the likelihood ratio in a kinship test using X-chromosomal markers incorporating linkage, linkage disequilibrium, and mutation (連鎖, 連鎖不平衡および突然変異を考慮した X 染色体マーカーを用いた血縁鑑定における尤度比計算法)</p> <p>Legal Medicine. Vol. 32: P.9-18, 2018</p>
論文審査担当者	主査: 鈴木 貞夫 副査: 齋藤 伸治, 青木 康博

論文内容の要旨

[目的] 法医学において遺伝多型マーカーを用いた個人識別および血縁鑑定は重要な役割を果たしている。X染色体マーカーは遺伝形式が男女で異なることから、検査対象者が限られている欠損事例などにおいて特に有用である。しかし同一染色体上の複数のマーカーを利用する場合には連鎖および連鎖不平衡 (LD) を考慮しなければならず、その確率計算法は確立されていない。既報の X染色体マーカーを用いた尤度比 (LR) 計算プログラムとして **FamlinkX** が公開されているが、遺伝形式や突然変異の場合分けが煩雑で実際の計算過程が不明であること、ハプロタイプ頻度推定におけるパラメータ設定法が不明確であることなどの問題点があった。本研究では X染色体マイクロサテライト (X-STR) を用いた血縁鑑定における新たな LR 計算法について提示する。初めに日本人の X-STR27 座位のポピュレーションデータを収集・解析し、LD が個人識別における確率的評価に与える影響について検討した。続いて収集したデータを用いてシミュレーションを行い、血縁鑑定における LR 計算法の有用性を確認した。

[方法] 同意を得て採取した日本人 748 人 (男性 425 人、女性 323 人) の DNA を用い X-STR27 座位をマルチプレックス PCR で増幅し、3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems) によるフラグメント解析にてアリル頻度を算出した。Genepop version 4.3 を用いてハーディ・ワインバーグ平衡 (HWE) 検定、頻度の男女差の検定、および LD 検定を行った。LD が個人識別に与える影響を検討するため、(1) 全座位を独立とみなす、(2) LD が検出された座位をハプロタイプ化する、(3) 遺伝的距離が 0.1cM 以下の座位をハプロタイプ化する、の 3 種の場合において、個人識別の指標値である識別能 (PD) を算出し比較した。

次に、得られた頻度データを用いて統計ソフトウェア R によるシミュレーションを行った。疑似乱数を用いて両親を生成し、遺伝的距離に基づく組み換え、および突然変異を確率的に生じさせ、10 万組の全同胞・半同胞姉妹、非血縁女性を生成した。各組において (A) 父娘か非血縁か、(B) 全同胞姉妹か非血縁か、(C) 全同胞姉妹か異父姉妹か、(D) 異母姉妹か非血縁かの 4 つの関係について LR を算出した。尤度は短腕側テロメア側座位から順に連鎖および突然変異を考慮して計算した。すなわち短腕側に隣接する座位の identical by state (IBS) 数をもとに当該座位の identical by descent (IBD) 数を確率的に推定し、それぞれの IBD 数であった場合に当該遺伝型になる確率を乗じて算出した。遺伝型と血縁関係に矛盾がある場合は、父由来アリルが変異したとみなし、突然変異率を算入した。LD が検出された座位では隣接座位のアリルを考慮した条件付き頻度を用いた。全座位の LR の総積を総合 LR とした。すべての R スクリプトファイルは Web 上に公開した。また同じサンプル 1000 組を用いて **FamlinkX** でも LR 計算を行い、結果を比較した。

[結果] すべての座位で HWE からの乖離およびアリル頻度の男女差を認めなかった ($p > 0.01$)。LD は 5 組の隣接した座位間で認めた ($p < 0.05 / 26$)。PD は男女いずれにおいても (1) - (3) の 3 種間での差はごく僅かであった。シミュレーションではそれぞれ (A) 100%、(B) 98.6%、(C) 60.5%、(D) 98.0%の真の血縁者の組の LR が対立仮説の組の LR を上回った。**FamlinkX** とは同等の過誤率をもって鑑別しえた。また **FamlinkX** では対数尤度比のカットオフ値がパラメータ設定値に大きく依存する一方で、本方法では 0 付近であった。

[考察] 個人識別においては LD が PD に与える影響は小さく、すべての座位を独立として扱っても差し支えないと考えられた。シミュレーション結果から本計算法は高い確率で鑑別が可能であり、対数尤度比のカットオフ値が判定の基準値となる 0 付近に一致したことは計算法の妥当性を示すと考えられた。本計算法では以下の点について単純化したモデルを採用したことが特徴であ

る。すなわち、隣接する座位の IBS 数から当該座位の IBD である確率を推定する、母由来アレルの突然変異は検出不可能であるため無視する、変異アレルを特定しないという点等である。得られた遺伝型情報から、あらゆる継承および突然変異パターンを推定するのではなく、基本的な要素のみを考慮した単純化モデルを採用しても妥当な鑑別ができることが示された。

論文審査の結果の要旨

1. 審査論文の要旨

【目的】 遺伝多型マーカーを用いた個人識別および血縁鑑定は法医学における重要課題である。X 染色体マーカーは遺伝形式が男女で異なることから、検査対象者が限られる欠損事例などにおいて特に有用であるが、同一染色体上の複数のマーカーを利用するため、確率計算法は確立されておらず、利用は限定的である。本研究では X 染色体マイクロサテライト (X-STR) 27 座位の日本人におけるポピュレーション・データを収集し、座位間の連鎖不平衡 (LD) の状態について確認し、LD が個人識別における確率的評価に与える影響について検討した。さらに血縁鑑定における新たな尤度比 (LR) 計算法を考案し、シミュレーションにより、その有用性について検証した。

【方法】 同意を得て採取した日本人 748 人 (男性 425 人, 女性 323 人) の DNA を用い X-STR27 座位を増幅し、フラグメント解析にてアレル頻度を算出した。LD が個人識別に与える影響を検討するため、全座位を独立とみなす場合と、LD が検出された座位をハプロタイプ化した場合での、個人識別の指標値である識別能 (PD) の差異を比較した。次いで、得られた頻度データをもとに疑似乱数を用いて両親を生成し、遺伝的距離に基づく組み換え、および突然変異を確率的に生じさせ、10 万組の全同胞・半同胞姉妹、非血縁女性を発生させた。各組において、父娘関係、全同胞姉妹関係、異父姉妹関係、異母姉妹関係の有無等について、LR を算出した。尤度算出の際には隣接する座位の遺伝型をもとに当該座位が当該遺伝型になる確率を算出し連鎖の影響を計算に組み入れた。また遺伝型と血縁関係に矛盾がある場合は、父由来アレルが変異したとみなし、突然変異率を算入した。さらに LD が検出された座位間では隣接座位のアレルを考慮した条件付き頻度を採用し、全座位の LR の総積を総合 LR とした。

【結果】 女性のポピュレーション・データではハーディ・ワインベルグ平衡からの乖離はいずれの座位でも認められず、またアレル頻度の男女差を認めなかった ($p > 0.01$)。LD は 5 組の隣接した座位間で認められた ($p < 0.05/26$) が、LD を考慮することによる PD の変化はごくわずかであった。シミュレーションでは父娘、全同胞、父系半同胞はそれぞれ 100%, 98.6%, 98.0% のペアで、無血縁者のペアの LR の最大値を上回った。全同胞ペアのうち母系同胞ペアの LR の最大値を上回ったペアは 60.5% にとどまった。なお、対数 LR のカットオフ値はいずれも 0 付近であった。

【考察】 個人識別においては LD が PD に与える影響は小さく、すべての座位を独立として扱っても差し支えないと考えられた。血縁鑑定の際、組み換えを考慮した遺伝型頻度の計算法、突然変異の扱い等につき単純化したモデルを採用し LR を算出したが、十分な精度で血縁関係を鑑別できることが示された。また対数 LR のカットオフ値が判定の基準値となる 0 付近に一致したことは計算法の妥当性を示すものと考えられた。

2. 審査内容の要旨

プレゼンテーション終了後、主査の鈴木から、尤度と確率の差異、LR とは何か、およびその値の評価、全同胞の LR 分布が二峰性を示す理由、および父系において突然変異が生じやすい理由等について計 7 項目の質問、第 1 副査の齋藤からは、DNA 鑑定の適応となる検体の質・量について、STR における LD に関する知見の有無、3~5 塩基の繰り返し配列が好まれる理由、SNP アレイと比較した場合の STR の優位性は何か等、計 7 項目の質問、第 2 副査の青木からは微量試料におけるコンタミネーション防止の原則、尤度比と肯定確率の関係、異型接合度などの集団遺伝学的指標の保つ意味、および専門領域に関連して、乳幼児突然死症候群の定義・分類など計 6 項目の質問がそれぞれなされた。これらの質問に対し、いずれも満足できる回答が得られ、申請者は学位論文の主旨を十分理解していると、法医学・法病理学に関する知識を有していると判断された。X 染色体 STR を用いた血縁鑑定における尤度比計算法については FamLinkX などが提唱されているが、本論文で示された方法は、比較的単純なモデルを用いて計算量を節約し、さらに実際のポピュレーション・データをもとにその有用性を検証している点で、価値があるといえる。以上より本論文の著者は博士 (医学) の称号を与えるにふさわしい学識を有するものと判断した。