

新規 X-STR (X-chromosomal
short tandem repeats) 部位の検出と
個人識別マルチプレックス法への応用

2014

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

西 健 喜

目次

第 1 章 緒言	1
1.1 DNA 型鑑定	1
1.1.1 DNA finger prints	2
1.1.2 Single locus VNTR 法	4
1.1.3 Multiplex STR 法	6
1.2 DNA 型鑑定の種類	8
1.3 本研究の目的	9
第 2 章 実験材料と方法	9
2.1 DNA 試料	10
2.2 X 染色体 STR locus の検索	11
2.3 Direct Sequencing 法	11
2.4 フラグメント解析	12
2.5 Multiplex PCR 法	12
2.5.1 STR locus の選択	13
2.5.2 Primer の作成	15
2.5.3 Multiplex PCR 条件の検討	16
2.6 統計学的解析	17
第 3 章 結果	17
3.1 X 染色体 q28 領域 CTTT 反復配列	17
3.1.1 CTTT 反復配列の構造	19
3.1.2 CTTT 人種別内部構造頻度	19
3.1.3 塩基長別発生頻度と統計	20

3.2 X 染色体 q28 領域 TGCC-TTCC 反復配列	21
3.2.1 TGCC-TTCC 反復配列の構造	21
3.2.2 人種別内部構造頻度	21
3.2.3 Allele 発生頻度	23
3.3 Multiplex PCR 法	25
3.3.1 Multiplex PCR の条件比較	25
3.3.2 Multiplex PCR 最適条件	27
3.3.3 検出限界の確認	28
3.3.4 Allele 発生頻度	30
第 4 章 考察	31
4.1 X 染色体 q28 領域 CTTT 反復配列	31
4.2 X 染色体 q28 領域 TGCC-TTCC 反復配列における人種間の差異	32
4.3 X 染色体 13 STR locus multiplex PCR	36
4.3.1 最適条件の検討	36
4.3.2 X 染色体 13 STR locus multiplex PCR の法医学的有用性の検討	38
第 5 章 結論	41
引用文献	42
図表	
謝辞	

第 1 章 緒言

1.1 DNA 型鑑定

1.1.1 DNA finger prints

DNA 型鑑定は 1985 年に英国の遺伝学者である Alec J Jeffery らにより発表された DNA finger prints (DNA 指紋法) により確立された手法である¹⁻⁴。Alec J Jeffery らは DNA の中に連続して繰り返す配列を発見し、またこの配列の反復回数が個人間で異なる事を見出した¹。それにより遺伝子の機能ではなく、個人を判定することができるか研究を行い、DNA の反復配列を検査する手法として DNA finger prints を開発した²⁻⁴。この手法が Nature に発表されることによりヒト DNA を個人識別や血縁関係の推定に用いる新しい分野が開拓されることとなる。当時の鑑定に用いられた DNA finger prints とは DNA 反復領域の中でも VNTR (Variabl Number of Tandem Repeat) と呼ばれる領域の周囲にある DNA を制限酵素により切断し、その断片を調べる方法であり、現在では RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 制限酵素断片長多型) と呼

ばれている⁵。切断された断片は個人間で長さが違うため電気泳動を行い分離することでバーコードのようなバンドが検出される。このバンドの組合せが個人間で異なることをから個人識別や血縁鑑定に利用する方法である。DNA finger prints は DNA 全体を用いる事からも高い多型性を持ち、一回の型判定においての識別能力は非常に高いものである。しかしながら高分子かつ多量の DNA が必要になる事から血液、精液などのサンプルの型判定であれば有用な手法であったが、微量なサンプルや分解や腐敗の進んだサンプルの判定においては適応が難しいものであった。

1.1.2 Single locus VNTR 法

1988年に耐熱性 Polymerase を使用した PCR(Polymerase Chain Reaction)法が発表され DNA 型鑑定に利用されることで微量な DNA から目的とする多型部位を増幅することが可能となった^{6,7}。これによりほぼ全ての生物学的資料から DNA の検出が行えることとなり DNA による個人識別の精度は飛躍的に向上

し、多型検索法も広がりを見せることとなる^{8,9}。RFLPを利用した型判定およびDNAプロファイルを作成する為には、高い専門性と技術を要求されたが、これに取って代わり主流となったのがPCRを用いてVNTRのSingle locusを増幅する事で型判定を行う方法である¹⁰⁻¹⁷。VNTRは数十塩基からなる長い反復配列で、実際に鑑定に用いられている代表的なVNTRにD1S80 (MCT118)が挙げられる¹⁸⁻²⁶。D1S80はヒト第一染色体に存在する16塩基を1単位とする反復配列であり、その繰り返し配列は16~41個の反復単位からなる高い多型性を持ち、個人識別を目的とした場合に非常に有効なLocusとして近年まで研究が行われていた²⁷⁻³¹。しかしながらVNTRのPCR産物の全長は300bpから900bpと幅が大きく、低分子化の進んだ資料や反復の多いAlleleでは増幅が困難な場合もあり、DNA finger printsと比較した場合には有用な方法ではあったが鑑定における信頼性には多少の疑問も残っている。

1.1.3 Multiplex STR 法

VNTR の問題を克服する為に用いられたのが TPOX, THO1, CSF1PO などの常染色体 STR (Short Tandem Repeat) である³²⁻³⁷. STR とは約 2~6 塩基の反復を 1 単位とした短い反復領域であり, その増幅サイズは 100~300bp と短くすることができ, 劣化したサンプルにおいても有用とされている³⁸⁻⁴⁰. しかしながら STR の多型性は VNTR と比べ低く, 単独の Locus では個人識別の制度が低いという欠点が挙げられていたが, その問題を解決する事となるのが Multiplex PCR の開発である^{41,42}. Multiplex PCR では一度の PCR 反応において複数の Locus を同時に増幅する事が可能であり, 貴重な鑑定資料の取り扱いが最小限で済み, 試薬や機材の節約による経済性や同時検出による迅速性などのメリットが挙げられる. この手法の開発により個人識別の精度は格段にあがることとなり⁴³⁻⁴⁶, 近年においては高い識別能力と高速解析が可能な最良の方法として複数の STR を利用した Multiplex 法が用いられている.

効率的な Multiplex PCR の開発をする上で重要になるのが primer の設計および反応液成分のバランスについての入念な計画であり, 数多くの試験と労力

が必要となる⁴⁷⁻⁴⁹.これは Primer を Multiplex PCR に適応させる必要性があり, PCR 産物の長さを重複させてはいけない事, Primer dimer を形成しないようにある程度の相補的な領域を避けること, Primer のアニーリング温度 (T_m 値) を揃える事などがあげられる⁵⁰. また Multiplex PCR を最適化するには増幅する複数の Locus における PCR 産物の間で良好なバランスを保つ必要性があるため, 通常大幅な最適化が必要となる. アニーリング温度, 伸長時間, ポリメラーゼの種類や使用量などの条件検討が必要であり⁵¹, 特に primer 濃度の最適化は各 PCR 産物の総取量を決定するため, Multiplex PCR を行う上で最も重要な要因の1つである⁵².

STR は型判定のみならず疾患遺伝子領域の研究にも用いられている. 特定遺伝子とその近傍に位置している STR の連鎖解析を行うことで疾患関連マーカーとして使用可能であり, また原因遺伝子が不明な遺伝性疾患においては, 健常群と疾患群間で多数の STR を比較することにより, 連鎖している疾患原因遺伝子の解明に使用できる. さらに STR の反復数の増加自体が発症に関与している疾患が存在しており, 新たな Locus の多型情報を調査する事は疾患遺

伝子領域においても有用だといえる^{53,54}.

1.2 DNA 型鑑定の種類

近年の法医学的領域における鑑定において、Multiplex PCR を利用した複数の STR 型判定は常染色体 STR^{55,56} と Y 染色体 STR⁵⁷⁻⁶² を用いた検査が主流となっている。STR 検査は両染色体における市販キットを用いた Multiplex PCR による検査が一般化される傾向であり、常染色体 STR Multiplex PCR キットである Identifiler (Applied Biosystems) や PowerPlex (Promega) による Population データの収集や⁶³⁻⁶⁸、Y 染色体 Multiplex PCR キットである YfilerSTR (Applied Biosystems) や PowerplexY (Promega) での Population データの収集⁶⁹⁻⁷⁷、キット間での比較検討など数多く調べられているが⁷⁸⁻⁸²、市販されているキットが高価である事、エキストラバンドの出現、増幅部位による検出感度の隔たりなど問題点も少なからず存在している。非常に劣化の進んだ Sample においてミトコンドリア DNA の配列を用いての鑑定も行われる場合がある。それは核 DNA

が細胞 1 つに 1 つしかないのに比べ，ミトコンドリア DNA は細胞 1 つに対して数十と存在しているため，核 DNA での型判定が行えない Sample であってもミトコンドリア DNA であれば検出できる事例が存在するからである^{83,84}。主に鑑定に用いられるのは D-Loop と呼ばれる領域で HV1～HV3 (Hyper Variable Region, 高度可変領域) の配列を調べる事で鑑定を行っており^{85,86}，多数の population 調査も行われている⁸⁷⁻⁹⁰。しかしながら領域全体に存在する SNP (Single Nucleotide Polymorphism, 一塩基多型) を複数読み取り比較する事で行うため，技術的・時間的な観点からも実用的要素は少ない。

一方で X 染色体 STR を用いた手法は片親不在における母子鑑定，特に父娘鑑定に適用可能である。また PCR 産物が男性では 1 つ，女性では 2 つである事から性別判定に利用できる事や，常染色体に比べ血縁鑑定の判定が比較的容易である等の利点があるにもかかわらず，マルチプレックスの確定した条件や，Allele の出現頻度の報告数は他の染色体と比較しても数少なく，市販のキットもようやく国内において提供がなされた状態である。近年においても内部構造の解析が報告されており^{91,92}，市販のキットを用いた Population の報告がよう

やく増えてきた現状である⁹³⁻⁹⁷.

1.3 本研究の目的

本研究では解析・検討の行われていない新規の X 染色体 STR の検出を行い、その多型性と内部構造の確認・統計による解析を行うと共に、社会的実用性のある Multiplex PCR 法へと適応させることを目的とした。

第 2 章 実験材料と方法

2.1 DNA 試料

X 染色体 STR Locus のデータベース作成試料として、司法解剖時に個人識別の検査の為に採取を行なった血縁関係の無い日本人 700 人（男性 440 人，女性 260 人）の血液より DNA を抽出し用いた．また検出限界の調査に陳旧化した大腿骨からの DNA を使用した．血液・骨からの DNA は技術的な濃度差が起こらないよう Maxwell 16 Instrument (Promega)を用いて抽出を行い，DNA 濃度の測定において DU Series 700 (Beckman 60 Coulter)を用いた．なお採取した血液は刑事起訴法第 129 条等に基づき，裁判所の令状により DNA の検査を含む解剖検査を依頼されたものであり，鑑定囑託した茨城県警本部の承認と遺族の承認書を得たものを使用している．また遺伝性の検討に日本人 30 家系（息子 18 人，娘 12 人）を用い，人種間の検討の為に，モンゴル人 105 人（男性 81 人，女性 24 人），コロンビアのネイティブアメリカン 160 人（男性 87 人，女性 93 人），アメリカ人（白人）の 88 人（男性 33 人，女性 55 人）を用いた．上記の資料

は筑波大学・医の倫理委員会にて平成 26 年 4 月 2 日付第 237 号「法医学関連遺伝子（ABO 式，XY 染色体遺伝子他）の集団における調査」として承認を経ている。

2.2 X 染色体 STR locus の検索

本研究では近年報告に上がっている X 染色体の連鎖解析群（Linkage group）との関連性も視野に入れ p22, Centromere, q12, q26, q28 領域から検索する領域の選択を行った。X 染色体の連鎖解析群は、主に Centromere 及び Telomere の付近に存在しているが、DXS10159, DXS10162, DXS10163, DXS10164, DXS10165 の 5 つの Locus は Centromere に近接して存在する Locus であるものの連鎖は見られなかった。また長腕の末端側において多くの連鎖解析群が見られることから Xq28 領域において反復配列の検索を行った^{91,92,98-103}。

多型検索には USCG(University of California Santa Cruz) Genome Browser (<http://www.genome.ucsc.edu/index.html>) を用いて q28 領域に存在する反復配列

を検索し、型判定に利用しやすい4塩基反復配列の選択を行うと共に、選択した反復配列の配列報告・研究報告の有無の確認、NCBI map viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) において配列を比較することで多型性の確認を行った。

2.3 Direct Sequencing 法

X染色体STRの配列解析にはPCR産物をクローニング無しに配列決定するDirect Sequencing法にて行った。X染色体は男性において1本しか存在しないことから主に男性検体を用い、女性検体においてはヘテロ接合体の塩基長が異なる物に対してAgarose S (ニッポンジーン)にてゲル上で電気泳動を行い分離した後に切り出して用いた。PCR反応にはAmpliTaq Gold® 360 PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用い、DNAシーケンシングにはBigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems)を使用した。泳動に3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いSequence Analysis5.3.1 (Applied

Biosystems)にて内部構造の解析を行った。

2.4 フラグメント解析

DNA 型鑑定では塩基長の解析による鑑定が主に用いられており，実用性の観点からも塩基長の解析と各 Allele（対立遺伝子：型鑑定において反復回数を示す）の指標の作成，人口統計調査は必要不可欠である．これは内部構造を解析した Sample から塩基長と Allele 数を対比させる事により，未知の Sample においても塩基長のみで Allele 数を算出する事が可能となる為である．

塩基長の解析には各々の Primer の片方に蛍光色素を付加し，Size Standard と共に Genetic Analyzer にて泳動を行う事で，誤差約±1塩基の精度で PCR 産物の塩基長の解析を行う事が出来る．使用する POPTM Polymer（Applied Biosystems)の種類により泳動誤差に多少の幅が出るが，内部構造の解析を行ったサンプルを Allele のマーカーとして用いる事で精度を向上させる事が可能である．

本研究では Primer に付加する蛍光色素に FAM, PET, VIC, NED を用い、Size Standard に GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems)を、泳動には 3130xl Genetic Analyzer を用い、Polymer には POP7 を使用した。Allele の算出は Gene Mapper IDv3.2(Applied Biosystems)を用いて塩基長を解析する事で行った。

2.5 Multiplex PCR 法

2.5.1 STR locus の選択

現在までに解析・統計的調査の行われている X 染色体 STR locus は 50 Locus 程度でしかなく他の染色体の研究に比べ遅れをとっているのは明らかである。Multiplex PCR に用いる Locus の選択は X 染色体上から幅広く行い、近接に存在し連鎖解析が扱われている DXS7132-DXS10074, DXS6809-DXS6789, DXS10134-DXS10147-DXS7423, を含む, DXS8378, DXS9902, DXS9898, GATA172D05, GATA31E08 の 12 の Locus に、新たに解析を行った新規の X 染

色体 STR locus を加えた。報告のあがっている X 染色体 STR locus と使用する locus を図 1 にて示す。また X 染色体 STR を用いる事で性別の判定を行う事が出来るが、非常に低確率ではあるが全ての Allele がホモ接合体となる可能性も考えられる。そのことから性別の確定診断のため X 染色体と Y 染色体に存在し塩基長の違う相同配列である Amelogenin を加え、X 染色体 13 STR locus 及び Amelogenin にて Multiplex PCR の作成を行った。

2.5.2 Primer の作成

Primer の作成にあたり DXS8378, DXS9902, DXS7132, DXS9898, DXS6809, GATA172D05, GATA31E08, DXS7423, Amelogenin は先行研究にて報告のある Primer を用い^{91,104,105}, DXS6789, DXS10074, DXS10134, DXS10147, は PRIMER3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>)にて設計を行った。Primer の設計に際しては多くの Primer を用いるため Tm 値が離れ過ぎないようにおおよそ 59-61 °C の間になるように設定した。また多種 Primer を同時に一度の PCR で

増幅することからも Primer dimer が作成される可能性が高く，相互間で干渉した場合には増幅しない場合，後の条件検討が複雑になる事が考えられ，新たな Primer を作成する上で他の Primer との dimer が作成されないかの予測を行うと同時に設計を行った．また各 Primer の増幅サイズは塩基長多型による差の幅を含め重複する事は型判定に用いた際にどちらの Locus の Allele か判断が不能になるため，おおよそ 100~150bp, 170~220bp, 240~290bp, 310~360bp に増幅サイズを設定し随時サイズの調節を行った．増幅サイズが重なる場合にはサイズが変更できるか Primer dimer の予測と共に検討し，変更できない場合には付加する蛍光色素の変更，または他の Locus との増幅サイズの変更により調節した．作成した Primer を表 1 に示す．

2.5.3 Multiplex PCR 条件の検討

Primer の濃度調節を基準に Taq ポリメラーゼの選択，アニーリング温度の調節，サイクル数の調節，最適な DNA 濃度の検討，検出限界の確認を行った．

試薬には AmpliTaq Gold® 360 PCR Master Mix および Multiplex PCR Plus Kit (QIAGEN) の 2 種を用いた。各 Primer の濃度は最終濃度 0.25 μ M を基準に至適濃度の調節を行い、アニーリング温度を 1 $^{\circ}$ C 刻みに 58-62 での調節を、サイクル数は 28-32 にて検討を行った。至適 DNA 濃度の検討及び検出限界の確認にはコントロール Sample である K562 (Promega), 9948 (Promega) にて 5 ng/ μ l, 1 ng/ μ l, 0.5 ng/ μ l, 0.1 ng/ μ l, 0.05ng/ μ l の濃度のサンプルを作成し比較を行った。また検出限界の確認においては検出が極めて困難である陳旧化した骨 Sample より抽出した DNA を用いて検討を行った。使用したサーマルサイクラーは 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)及び Veriti(Applied Biosystems)である。増幅の確認には 3130xl Genetic Analyzer を用いて泳動を行い、Gene Mapper IDv3.2(Applied Biosystems)にて蛍光色素のシグナル強度を確認する事で行った。蛍光強度の最低検出値は Gene Mapper IDv3.2 の初期設定値である 50 RFU を基準とした。

2.6 統計学的解析

X 染色体 STR locus の統計には各 Allele の出現頻度を用いて計算される。一般的多型の指標としては異型接合度 (Heterozygosity: HET), 多型情報含有値 (polymorphic information contents: PIC) などが用いられている。HET は集団においてヘテロ接合体を有する者の割合を示しており, 集団から任意の 2 つの Allele を取りだした場合に, その 2 つが異なる確率を示している。PIC は血縁鑑定に対する有用性の指標と理解されており, 子の由来を判定できる確率を表している。この他に DNA 型鑑定における統計手法として識別能 (power of discrimination: PD) や, 親子鑑定における平均排除率 (mean exclusion chance: MEC) があげられる。PD は 2 者が異なる遺伝子型を有する確率を示すものであり, X 染色体 STR においては男性と女性で染色体数が異なることから PD female, PD male で分け算出を行う。MEC とは定型的な親子鑑定の間において, 子または母子の型から母権・父権を否定できる確率を言う。MEC の計算方法は様々提案されており本研究においては Krüger ら, Kishida ら, Desmarais の算出を用いた¹⁰⁶⁻¹¹⁰。

第 3 章 結果

3.1 X 染色体 q28 領域 CTTT 反復配列

3.1.1 CTTT 反復配列の構造

NCBI genome view Annotation Release 106 X-chromosomal 151,285,800bp (Build37.2-150,454,000bp)近傍にて CTTT を基本とする STR の存在を確認した。この STR は CTTT の 4 塩基反復配列をベースに CT の 2 塩基反復配列を持つ複雑な構造をとるものであった。その反復構造は P1:(CTTT)₂-(CTTT)₄-(CTTT)₂-(CT)₂-(CTTT)_n, P2:(CTTT)₃-(CTTT)₄-(CTTT)₂-(CT)₃-(CTTT)_n, P3:(CTTT)₃-(CTTT)₃-(CTTT)₃-CC-(CTTT)₂-(CT)₂₋₄-(CTTT)₂₋₃-(CT)₂₋₆-(CTTT)_n と 3 つの形に大別することができた (図 2)。P1 の形は反復が少なく、その増幅サイズは 300bp 以下と他に比べると非常に短い形である。増幅サイズ 281bp で (CTTT)₁₇ を見せた型は全ての型の中で最多頻度を示したが、P1 は 3 つの形の中では 0.105 と 1 割程度の頻度の少ない構造であった。P2 の形は全体の内 0.54 の頻度を示しており、3 つの形の中で最多頻度を示す構造であった。1 塩基の

挿入が見られる特異的な形も見られたがほとんどが基本を維持した構造で、その増幅サイズは約 320~400bp と長く、幅広い構造を示した。P3 は他の構造 (CTTT)_n の前に CC-(CTTT)₂-(CT)₂₋₄-(CTTT)₂₋₃-(CT)₂₋₆ の挿入を持つ形である。1 塩基の挿入や CT 反復配列の欠損など特異的な形を示すものが多い型であった。内部構造の頻度は日本人 124 人中 54 通りを示し、最も多い形でも 0.0645 と低い値を示した。1 塩基の変異が 2 検体と僅かに見られ、1 塩基の挿入は 6 検体に見られ、これらの特異的な構造は塩基長の長い構造で現れる傾向が見受けられた。全体の多くは 4 塩基を基本とした構造をとっていたが、P2 では 2 検体、P3 では 3 検体において 2 塩基反復による差異が見られたためにより複雑な構造を呈する事となった。日本人検体における内部構造を表 2 に示す。各構造は DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録済みである。(AB767191~AB767244)

3.1.2 CTTT 人種別内部構造頻度

モンゴル人 (n=50) と, アメリカ人 (n=28) の内部構造別出現頻度を表 3 に示す. モンゴル人の内部構造の比率は P2 頻度 0.6, P3 頻度 0.36 とほぼ日本人と変わりはないが, P1 の構造の出現が日本人よりもさらに少なく P1 頻度 0.04 とわずかであり, また P3 における最後の CT 塩基の反復配列が日本人において CT6 反復出現率 0.410 に対してモンゴル人では 0.166 と少ない値であった. アメリカ人における内部構造の比率は日本人, モンゴル人とは異なり, P1 頻度 0.321, P2 頻度 0.250, P3 頻度 0.429 であり, 日本人・モンゴル人で多い塩基長の長い P2 ではなく, 塩基長の短い P1 の頻度が多いと言う結果であった.

3.1.3 塩基長別発生頻度と統計

フラグメント解析 (図 3) (図 4) による塩基長別発生頻度は日本人 124 人中 34 通りの形を示した. 塩基長 351bp において最も高い出現確立である 0.0887 という値を示した. 最高出現頻度の塩基長でさえも 1 割を切る結果であること

から識別能の高さが確認できる。多型情報含有値を表す値は $PIC=0.9507$ 、女性におけるヘテロの出現割合を示す異型接合度は $HET=0.9528$ と非常に高い値を示した。識別能力は $PD\ female(PDf)=0.9957$ 、 $PD\ male(PDm)=0.9528$ であり、この Locus 単独による型判定においても女性で 5/1000 人、男性で 5/100 人に識別する事ができると値である（表 5）。通常の X 染色体 STR locus における塩基長出現頻度別の統計数値はおよそ $HET\ 0.5\sim 0.8$ 、 $PIC\ 0.4\sim 0.8$ 、 $PDm\ 0.5\sim 0.8$ 、 $PDf\ 0.7\sim 0.9$ であることから、その値の高さがうかがえる。この値の高さは 2 塩基多型が含まれる事や 1 塩基の挿入が見られる事などが要因としてあげられる。このような内部構造の複雑な Locus では Mutation Rate が高い事が多く見られ、本 Locus においても家族間 Sample を用いて確認を行ったが、血縁関係に矛盾点は見られなかった。

3.2 X 染色体 q28 領域 TGCC-TTCC 反復配列

3.2.1 TGCC-TTCC 反復配列の構造

NCBI genome view Annotation Release 106 X-chromosomal 151,866,400bp (Build37.2 151,034,800bp) 近傍, DXS10011 の約 100Kbp 上流において 2 塩基などの挿入がない 4 塩基の反復配列を持つ STR locus を確認した (図 5) . その内部の構造は TGCC と TTCC の 2 種類の 4 塩基多型が連続した構造であり, TGCC は 5~9 の反復を, TTCC では 11~21 の反復を見せた (表 6) .

3.2.2 人種別内部構造頻度

日本人の男性 100 人, モンゴル人の男性 80 人, 女性 12 人, アメリカ人の男性 33 人, 女性 55 人, コロンビア人の男性 87 人, 女性 93 人において内部構造の解析を行った (表 7) .

TGCC においては日本人では見られなかった Allele 5 がモンゴル人, アメリカ人, コロンビア人で確認され, Allele 9 がアメリカ人, コロンビア人で確認された. 出現頻度を比較したところ全人種で Allele 8 が最も多い形を示した.

Allele 6 と Allele 7 について日本人, アメリカ人, コロンビア人 TGCC の Allele の出現頻度は平均して約 Allele 6 =0.3, Allele 7 =0.2, Allele 8 =0.5 の割合であったが, モンゴル人においてのみ Allele 6 =0.2095, Allele 7 =0.2857 と Allele 7 が Allele 6 を上回る形であった.

TTCC の出現頻度においては日本人, モンゴル人, アメリカ人ともに Allele 15 の発生頻度が高く約 0.5 を示し, 次いで Allele14 が約 0.2 という頻度を示したが, コロンビア人では Allele14 = 0.4249, Allele15 =0.3479 と出現頻度が大きく異なる結果となった. また日本人・モンゴル人の Allele は 10-21 と幅広く存在するのに対し, アメリカ人では 10-18 と狭く, コロンビア人は 12-16 の 5 つの Allele しか存在しない結果であった.

TGCC と TTCC の連鎖解析を行った所 (表 8), 日本人では TGCC-TTCC 8-15=0.27 が最も高く, 次いで 8-14=0.14, 6-15=0.12, 7-15=0.11, モンゴル人では 8-15=0.2308, 8-14=0.146, 7-15=0.1154 であった. 日本人と各々の Allele 出現頻度にはほとんど差異の無かったアメリカ人においては 8-15=0.2448 が最も頻度高く, 6-15=0.1259, 6-14=0.0839, 7-14=0.0839 と続く結果であり, TGCC

で最高頻度を示す Allele8 と TTCC で 2 番目の頻度である Allele14 の 8-14 の組合せが 0.0559 と少なく, TGCC の Allele6 と Allele7 に TTCC Allele 14 が分散して存在している結果であった. そしてコロンビア人であるが 6-14=0.2454, 8-15=0.2344, 8-14=0.1392 と, TGCC と TTCC の個別では最高頻度を示した 8-14 よりも 6-14, 8-15 の方が約 1.8 倍もの出現頻度を示した. また TGCC と TTCC の各々において 2 番目の出現頻度を示した 6-15 は 0.018 と僅かにしか存在しなかった. これらの事からも 2 つの配列には連鎖した関係性が存在すると考える.

3.2.3 Allele 出現頻度

フラグメント解析 (図 6) による塩基長別発生頻度を全ての人種を含め表 9 に示す. 人種間内部構造の違いから塩基長の出現頻度にも違いが現れる結果となった (図 7). 日本人とモンゴル人の間には比較的差が少ないが, 両人種共に最高頻度を示す Allele 23 がモンゴル人では 0.3048, 日本人では 0.4167 と日本人の頻度が高くなっており, 他の Allele の出現頻度が相対的に低くなっている.

る事により若干の差を生じている。アメリカ人では日本人とモンゴル人とは異なる出現頻度を示しており、その形は Allele21 と Allele23 の 2 Allele で出現頻度が高い二峰性を示した。これはアメリカ人の内部構造の特徴にあげられた TTCC の Allele 14 と TGCC の組合せにおいて 8-14 (Allele22)が少なく、6-14 (Allele20), 7-14 (Allele21)に分散していることが関与している。2番目に多い組合せであった 6-15 (Allele21) に 7-14 (Allele21)が加わることで Allele21 が高い頻度となり、最も高い頻度の 8-15 (Allele23)と並び二峰性としてあらわれている。コロンビア人においてもその出現頻度は Allele20 が最も高く、次いで Allele22, Allele23 とアメリカ人とも違う二峰性を示した。Allele23 は他と同様に TGCC-TTCC が 8-15 の組合せによるものであるが、Allele20 で高頻度を示した事はコロンビア人に 6-14 が特徴的に見られた事があらわれている。Allele22 はコロンビア人において TTGC, TTCC 各々での最高頻度を示す組合せである 8-14 から表れたものだと考えられる。統計学的数値は平均して PIC=0.7505, HET=0.7809, PD female=0.9210, PD male=0.7809 であり型判定に用いることに遜色ない値を示した。また塩基挿入や 2塩基反復配列などが含まれていないシ

ンプルな 4 塩基の反復配列から型判定に用いやすく法医学的に有用な Locus であると考えられる。

家族間サンプルにおいて Mutation は見られず，血縁関係における矛盾点は見られなかったが，母 21/34，息子 34(6/28)と他と比較しても非常に長い塩基長であるサンプルがみられた。血縁関係のあるサンプルとして人口統計計算には含んでいないが，Allele が 34 にまで及ぶ可能性に加え，親子間での特徴・疾患遺伝子マーカーとなり得る可能性を検討する余地があると感じられた。

3.3 Multiplex PCR 法

3.3.1 Multiplex PCR の条件比較

Multiplex PCR に導入する新規 Locus は，シンプルな四塩基配列を持ち，型判定にも使いやすい TGCC-TTCC 反復配列の適応を検討することとした。

Multiplex PCR を検討するにあたり，初めに Primer 相互間での干渉，Taq ポリメラーゼの種類による増幅，アニーリング温度での増幅度の差を検討する為，

Multiplex PCR Plus Kit 及び AmpliTaq Gold® 360 PCR Master Mix を用いて、全ての Primer 最終濃度を 0.5 μ M に均一にし、K562 と 9948 のコントロールサンプル 1ng を 95 $^{\circ}$ C 5min の加熱後、95 $^{\circ}$ C 30sec, 58 $^{\circ}$ C ~ 62 $^{\circ}$ C 90sec, 72 $^{\circ}$ C 60sec を 30Cycle 行い、最後に 72 $^{\circ}$ C 10 分間の伸長反応を行うことで確認した (図 8)。

Multiplex PCR Plus Kit では DXS8378, GATA172D での検出が弱いなどの差はあるもののすべての Primer においてその増幅を確認することが出来た。

AmpliTaq Gold® 360 PCR Master Mix では増幅の差が大きく、DXS8378 においてはほとんど増幅が確認できず、GATA172D, DXS6789, DXS9902 の Locus においては増幅が型判定を行えない程に弱い状態であった。このことから主に Multiplex PCR Plus Kit を用いて検討を行う事とするが、AmpliTaq Gold® 360 PCR Master Mix においても最適条件の検討は行うこととした。両方共に PCR 増幅の少ない Locus は 58-60 $^{\circ}$ C のアニーリング温度にて増幅は確認できており、増幅効率の高い Locus は 60-62 $^{\circ}$ C において更に増幅が大きくなっていくことから 59-60 $^{\circ}$ C において Primer 濃度を調節すると共に検討を行った。

3.3.2 Multiplex PCR 最適条件

Multiplex PCR Plus Kit では 2 倍希釈を要する試薬 5 μ l に DNA 1ng, 各 Primer の最終濃度を DXS8378=1.1 μ M, DXS9898=0.7 μ M, DXS10147=0.75 μ M, GATA31E=0.35 μ M, GATA172D=1.25 μ M, DXS7423=0.3 μ M, DXS6809=0.25 μ M, DXS10134=0.3 μ M, DXS7132=0.4 μ M, DXS9902=0.65 μ M, DXS6789=0.35 μ M, DXS10074=0.6 μ M, Amelogenin=0.7 μ M, New locus X151=0.85 μ M となるように入れた後, Nuclease Free Water にて 10 μ l に調節, PCR 条件は 95 $^{\circ}$ C を 5min, 95 $^{\circ}$ C 30sec, 60 $^{\circ}$ C 90sec, 72 $^{\circ}$ C 90sec を 30Cycle, 72 $^{\circ}$ C 10 分にて行ったものが最適だと考えられた. 上記条件による泳動結果を図 9 左に示す.

AmpliTaq Gold® 360 PCR Master Mix でも同様に 2 倍希釈を要する試薬 5 μ l に DNA 0.5ng を用いた. 各 Primer の最終濃度を DXS8378=1.25 μ M, DXS9898=0.5 μ M, DXS10147=0.5 μ M, GATA31E=0.5 μ M, GATA172D=1.15 μ M, DXS7423=0.3 μ M, DXS6809=0.75 μ M, DXS10134=0.5 μ M, DXS7132=0.3 μ M, DXS9902=0.75 μ M, DXS6789=0.5 μ M, DXS10074=0.75 μ M, Amelogenin=0.25 μ M, New locus X151=0.75 μ M となるように調節し, Nuclease Free Water にて 10 μ l に

した後, PCR 条件は 95°C を 5min, 95°C 30sec, 60°C 90sec, 72°C 90sec を 30Cycle, 72°C 30 分にて行ったものが最適だと考えられた. 上記条件による泳動結果を図 9 右に示す.

3.3.3 検出限界の確認

微量サンプルからの型判定の想定として 9947A と骨から抽出した DNA を用いて検出の最低限界量・対処方法の検討を行った. 9947A は 0.1ng/μl に調整されており, 常染色体のキット等でも 1ng(10μl)使用しコントロール DNA として用いられる. 検討では 9947A を 0.1ng をそのまま用い PCR を行うこととした. その結果 Gene Mapper での解析像において型判定が出来る程度の増幅を確認するもそのピークは小さく, 信頼性が得られるほどの大きさとは言えないものであった (図 10 左上). DNA 量調節を行い型判定可能である最低必要量を検討したところ, 最低必要量は 0.2ng (200pg) と考えられた (図 10 右下). 男性では Allele の検出が 1 本のため, それ以下の量でも検出されると考えられるが, 性別のわからないサンプルに用いられる場合を想定し, 女性サンプルにて検出

限界量の決定とした。またサイクル数を 34 サイクルに増やす事でも型判定を行う事が可能であり、元の量が少ない貴重なサンプルなどではサイクル数の増加による対処が可能である（図 10 右上）。DNA 量が少ない事に加え、劣化の進んだサンプル例として骨を用いての検討を行った。抽出において手技的な差異が生じないようにする為、Proteinase K による処理を行ったのち Maxwell を用いて抽出を行い、DNA の濃度を測定した。DNA 濃度は 0.5ng であったが劣化の進んだ DNA を含んでいることから良好な増幅を得られない可能性を含んでいる。最適条件での結果を図 11 左上に示す。増幅は見られるもののその大きさは非常に小さく、型を判定する事は可能であるが、信頼性においては十分な結果が得られる状態ではないと言える。特に増幅サイズの大きい Locus において良好な増幅が得られない事からも、劣化が高度に進んでいる事が推測される。前述したようにこのような検体では DNA 自体が貴重である事も考えられ、対処法としてサイクル数の増加によって対応することを検討し、結果として 35 サイクルにおいて若干の非特異的増幅も見られるが型判定をするに十分な増幅量を確認した（図 11 右上）。

3.3.4 Allele 出現頻度

Multiplex PCR に含む 13 Locus の日本人 450 人(男性=290, 女性=160)における各 Allele 出現頻度と統計を新規 Locus X151 と共に表 10 に示す. Multiplex PCR における識別能力は含まれる Locus の PD をすべて合わせたものであり, $1 - (1 - PD) \times (1 - PD) \times \dots$ と算出される. 女性における Total PD は 0.99999999999824, 男性における Total PD は 0.999999948 となり, 統計上で血縁関係にない場合において女性では 10^{-12} , 男性では 10^{-8} の確率で 13Locus における同じ組合せの型が現れるとの結果であった. 近年において X 染色体 STR においては近接部位における連鎖解析が行われており, DXS7132-DXS10074, DXS6809-DXS6789, DXS10134-DXS10147-DXS7423, の組合せが含まれている. 日本人男性において分類したところ DXS7132-DXS10074 においては 30 通りに分類され最も多い組合せで 0.175 の頻度を示し, DXS6809-DXS6789 においては 45 通りの最高頻度 0.0795, DXS10134-DXS10147-DXS7423 においては 58 通りの最高頻度 0.125 であった. 各組み合わせにおける出現頻度を表 11 に示す.

第 4 章 考察

4.1 X 染色体 q28 領域 CTTT 反復配列

X 染色体 p28 領域において新たに検出された Xq28CTTT 反復配列は、その多型性の高さから単独の Locus でも十分な識別能力を有することが確認された。その内部構造は複雑で 2 塩基の反復を内部に含む構造であることが多型性や識別能力の高さに関与していると考えられる。しかしながら DXS10134 (Japanese PIC=0.8098) や DXS10101 (Japanese PIC=0.885) のように 2 塩基多型を内部構造に持つ X 染色体 STR locus は他にも存在しており¹¹¹、それらと比較しても PIC=0.9507 は非常に高値を示している。

この配列に似た構造を持つ STR としては 6 番染色体に存在する ACTBP2(SE33) が型判定に用いられた初期より近年までその内部構造の複雑さが問題として取り上げられていた^{112,113}。その高度の多型性から個人の型判定には有用であるとされるが、型判定の行われていた当初においてはゲル泳動によるバンド判定が主流であったために 2 塩基の反復による判読の難しさから問題が生じていた。現在ではキャピラリー泳動によって判読される為、この Locus において、

そのような問題は起こりにくいと言えるが、増幅バンドの大きさだけで型を判定することにはなお限界があると考えられる。また ACTBP2 は Mutation rates が 0.89% と高く、血縁関係の鑑定に用いる事にも問題があげられていた¹¹⁴。

本研究における Locus は 30 家系において親子間の Mutation を見られなかったが、高度な多型領域であることから変異が発生する可能性は否定できず、個人の型判定を行う上では非常に有用な領域としても血縁鑑定には突然変異を考慮した判断が要求されると考えられる。一方、変異率が高い高度多型領域は疾患関連マーカーとして、特に腫瘍におけるマーカーとして用いられることが逆に長所として上げられる。通常の STR マーカーはその領域の近傍に存在する遺伝子との連関を示唆するものであり、特定 Allele を持つことで遺伝疾患のリスクの上昇を判定し、疾患遺伝子そのものとの強い関連性を有している可能性を検出するものである。高度多型領域における疾患関連マーカーとは、その領域が不安定であるとの考えに基づき、癌細胞において高頻度での変異が発生するという報告があげられている¹¹⁵⁻¹¹⁷。本 Locus は個人識別に有用であるのみならず、特定の疾患群のデータ収集と解析へ研究を拡大することにより、

X 染色体と連鎖した疾患関連マーカー，腫瘍マーカーとしても有用になる可能性があるのであるのではないかと考える．

4.2 X 染色体 q28 領域 TGCC-TTCC 反復配列における人種間の差異

X 染色体 q28 領域に存在する TGCC-TTCC 反復配列はシンプルな 4 塩基の反復配列でありながらも，内部の構造が 2 つの配列から構成されている事からも多形性が高く，型判定に用いる上では非常に有用で利用しやすいと考えられる．人種間においての内部構造が非常にユニークであり，TGCC と TTCC を単独で見ただけでは TGCC において全ての人種で Allele8 が多く，日本人，アメリカ人，コロンビア人では 2 番目に Allele6 が，モンゴル人では Allele7 の頻度が高くなっている．TTCC においては日本人，モンゴル人，アメリカ人では Allele15 が，コロンビア人では Allele14 の頻度が高く，次いで日本人，モンゴル人，アメリカ人では Allele14 が，コロンビア人では Allele15 が高い頻度で見られた．ここでの大きな差はモンゴル人において TGCC 7 が，コロンビア人において

TTCC 14 が他とくらべて頻度が高い事である。しかしながら両方の 4 塩基反復配列を合わせた塩基長での Allele 頻度を見ると (図 7), 各々の頻度ではほとんど同じであった日本人とアメリカ人においてその Allele 出現頻度に大きな違いが見られる事となる。これは内部での TGCC-TTCC の組合せの頻度に大きな違いを生じており, この組合せが人種において連関して遺伝していることで差異を生じる事になったと考えられる。TGCC - TTCC の両 Locus を合わせた発生頻度を見ていくと, 日本人・モンゴル人においては, TGCC と TTCC での各々の発生頻度が多い Allele の順で組合せも多くみられており特に偏りが強くみられる事はない。アメリカ人においては 7-14, 6-14 が多くみられ, 8-14 の発生頻度が少ない傾向が見られ, コロンビア人では個別頻度が TGCC で 8, TTCC で 14 が多いにもかかわらず最も多い組合せは $6-14=0.2454$, 次いで $8-15=0.2344$, その次に $8-14=0.1392$ と偏りが強くみられる結果となっている。このように並んでいる存在する配列が別の組合せに組み替わる事はほとんどないとされており, 人種においての特徴が色濃く残っているのではないかと考えられた。形態人類学上でアメリカ人(白人)はコーカソイドとして分類され,

モンゴル人は新モンゴロイド、日本人は新旧モンゴロイドの混血が多く、ネイティブアメリカンであるコロンビア人もモンゴロイドとされている¹¹⁸。コーカソイドにおいては 7-14, 6-14 が多く存在していたと推測されるが、ネイティブアメリカンであるコロンビア人がモンゴロイドであるにもかかわらずモンゴル人・日本人と大きく異なり 6-14 が高頻度で存在するのは第一に大陸を移動し南米に移住したのち多人種との交わりが少ないなど、遺伝的に隔離されていた事が考えられ、TTCC の Allele が他の人種に比べ広がりを見せなかった事からも頷ける。しかしながら同じモンゴロイドであってもそもそも派生が異なっている可能性も少なからず考えられた。また全体を通じて 8-15 がすべての人種間において高い頻度で見られることから、人として共通する配列の組合せは、このような反復配列にも存在しており、単に無意味であるとするにはやや不合理であると考えられ、人として共通の表現型に関わっている可能性は否定できない。以上のことから、人としての種の起源とも考えられているアフリカ系の黒人では 8-15 が高頻度で見られるのではないかと予測され、調査する必要がある。このような人種間の違いが色濃く残された配列が STR だけでな

く，その内部配列の解析も含めた SNP におけるハプロタイプグループとして多く研究される事で DNA 型判定において人種を予測できる可能性があるのではないかと考えられる．

4.3 X 染色体 13 STR locus multiplex PCR

4.3.1 至適条件の検討

Multiplex PCR を作成するにあたり 2 種の試薬系を用い標準的な増幅条件で検討したところ，その増幅は大きく異なる結果であった．両試薬ともに Multiplex PCR に対しての一般的な適応を持っているとのことであったが，Multiplex PCR kit での増幅が AmpliTaq Gold よりもピークバランスにおいて良い結果であった．しかしながら各 Locus 別に見ると増幅が不良であった 3 つの Locus を除き，AmpliTaq Gold の方がむしろ増幅効率の良い Locus が多くみられた．このことから Primer の相補性による Prime dimer の形成等で増幅の減少が生じているわけではなく，アニーリングしやすい Primer Pair が優先的に増幅されているよ

うに考えられる。また両者の組成を比較すると Multiplex PCR kit の粘性が高く設定されており、そのことにより反応系における流動性が低く保たれた結果、各 Primer による安定した増幅がなされている可能性も示唆された。また Primer 濃度の調節にあたっては単純に濃度を高くする事では増幅が上がらず、増幅の高い Primer の濃度を下げる事で他の Primer の増幅が見られた。Primer dimer が形成されていた場合には両 Locus 共に増幅が少なくなることから Primer dimer 形成の可能性は低く、また優先的に増幅されるローカスにおいて Primer Pair の濃度を抑制する事がバランスの良い増幅を得る事に繋がると考えられた。DNA 濃度による検出限界の検討において理論的にはサイクル数を 1 サイクル上げる事で二乗となるはずであるが、0.1ng で 34 サイクルの PCR を行ったものと、0.2ng で 30 サイクル行ったものの増幅効率が増幅率としては類似しており、最後の 4 サイクルでは計算通りの結果が得られずにプラトー効果が認められる。またサイクルをあげた場合にはピークバランスが若干崩れる傾向がみられ、各 Primer における増幅効率が異なるために発生していると考えられた。

4.3.2 X 染色体 13 STR locus multiplex PCR の法医学的有用性の検討

本研究で開発した X 染色体における Multiplex PCR kit は、その性能として十分な Locus 数が確保されていると考えられる。現在市販されている Kit は X 染色体 12Locus を含む Multiplex PCR kit となっており、本研究においては Amelogenin を除いても 13Locus が含まれる Multiplex PCR kit であり市販の検出ローカス数を上回っている。X 染色体上で利用される STR Locus 自体の数が少ないため、5 つの同じ Locus を用いる事となるが GATA172D05, GATA31E08, DXS10147, DXS6809, DXS7132, DXS9902, DXS6789, DXS10147 の Locus は市販 kit においては使用されておらず、多型解析においての有用性が伺える。近年において近接したローカスを Link したグループとして連鎖解析が行われており、本研究においては DXS7132-DXS10074(2Mbp), DXS10134-DXS10147-DXS7423(50kbp), DXS6809-DXS6789(50kbp)の近接した組合せが含まれている。各組み合わせにおいて 30 通り、45 通り、58 通りの組合せがみられるが、X 染色体は男性において XY と 1 本になるため、ほとんど相同組換えが起こらず、親族間ではこの組合せが変わることなく遺伝している事

が多い。その為、両親が不在となった場合においても親族間での判定が可能となることは大きな利点である。このような判定を行える事は常染色体 STR や Y 染色体 STR を利用した鑑定には見られず、X 染色体 STR における特徴として法医学的に非常に有用であると考えられる。また X 染色体 STR を用いた鑑定は親子鑑定においてもその特徴があげられる。常染色体では親子共に 2 本の Allele が見られる為にその組合せが膨大になってしまい親子間の排除率の算出が非常に複雑になってしまう。Y 染色体 STR に関しては男性にのみしか適応できない。しかしながら X 染色体 STR では男性で 1 本、女性で 2 本である為、父娘間あるいは母息子間（片親のみからの親子鑑定）では、常染色体検査と比較して高度の親子関係の肯定確率が得られるという長所がある。前者では父親側の X 染色体を娘側で確実に含むこと、後者では母親側の X 染色体の一つを息子が確実に含むことがその理由である。なお本研究で作成されたキットは増幅感度が良く、骨のみで発見された劣化が進んでいるサンプルにおいても良好な結果が得られた。陳旧化した骨から DNA 型を判定することは陳旧化 Sample の中でも極めて困難であり、これによりほとんどの陳旧サンプルにおいて増幅

が見込めると予測される。他で作成された MultiplexPCR と比較すると近年の報告に上がっている 12X 染色体 MultiplexPCR ではトータルの女性 PD が 0.99999999995 であり本キットの PD が勝っている¹¹⁹。また連鎖解析を含めての作成としているが、その染色体上の距離は 11Mbp におよんでおり各 Locus が実際に連鎖しているかには疑問が残る。最も新たに報告に上がっている X 染色体 MultiplexPCR kit は 12Locus を含むキットでありトータル女性 PD は 0.999999999987 とこれも本キットが勝る結果であった¹²⁰。さらに連鎖解析を含んでおらず親族鑑定に使用できるという特徴が生かし切れていないものである。以上のことから本研究で開発された X 染色体 13 STR locus Multiplex PCR kit は法医学的に非常に有用なツールになると考えられる。

第 5 章 結論

X 染色体上に存在する新しい STR locus の検出および解析を行った結果，2 ヶ所において新たな X 染色体 STR locus を確認した．非常に高度の多型領域であり 1 Locus だけでもスクリーニングに用いる事が出来る程の高い多型性をもつ Locus と，シンプルな 4 塩基の反復配列ながらも 2 つの反復配列が接続された構造から人種における違いが色濃く残る非常にユニークな Locus である．各 Locus は型判定，人類学的多型性の研究，X 染色体と連鎖した疾患関連マーカーや腫瘍マーカーへと応用できる可能性を含む有用な Locus と言える．

新たな Locus を含む MultiplexPCR kit は高い識別能を持ち，個人識別および親子鑑定はもちろん，近接に Link した 3 つのグループを含むことから親族鑑定に有用であり，法医学的に有力なツールとなると考えられる．

引用文献

- [1] A.J. Jeffreys, V. Wilson, S.L. Thein, Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA, *Nature*. 314 (1985) 67-73.
- [2] A.J. Jeffreys, J.F. Brookfield, R. Semeonoff, Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints, *Nature*. 317 (1985) 818-819.
- [3] A.J. Jeffreys, V. Wilson, S.L. Thein, Individual-specific 'fingerprints' of human DNA, *Nature*. 316 (1985) 76-79.
- [4] P. Gill, A.J. Jeffreys, D.J. Werrett, Forensic application of DNA 'fingerprints', *Nature*. 318 (1985) 577-579.
- [5] C. Puers, P. Wiegand, B. Brinkmann, Some technical parameters influencing the precision and accuracy of fragment size determination for RFLP's, *Int.J.Legal Med.* 105 (1992) 31-34.
- [6] R.K. Saiki, C.A. Chang, C.H. Levenson, T.C. Warren, C.D. Boehm, H.H. Kazazian Jr, et al., Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide

probes, *N.Engl.J.Med.* 319 (1988) 537-541.

[7] R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, et al.,

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site

analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science.* 230 (1985) 1350-1354.

[8] R. Reynolds, G. Sensabaugh, E. Blake, Analysis of genetic markers in forensic

DNA samples using the polymerase chain reaction, *Anal.Chem.* 63 (1991) 2-15.

[9] B. Brinkmann, S. Rand, T. Bajanowski, Forensic identification of urine samples,

Int.J.Legal Med. 105 (1992) 59-61.

[10] B. Budowle, A.M. Giusti, J.S. Wayne, F.S. Baechtel, R.M. Fourney, D.E. Adams,

et al., Fixed-bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of

allelic data from VNTR loci, for use in forensic comparisons, *Am.J.Hum.Genet.* 48

(1991) 841-855.

[11] C. Buffery, F. Burrige, M. Greenhalgh, S. Jones, G. Willott, Allele frequency

distributions of four variable number tandem repeat (VNTR) loci in the London area,

Forensic Sci.Int. 52 (1991) 53-64.

- [12] R. Chakraborty, S.P. Daiger, Polymorphisms at VNTR loci suggest homogeneity of the white population of Utah, *Hum.Biol.* 63 (1991) 571-587.
- [13] R. Chakraborty, M. Fornage, R. Gueguen, E. Boerwinkle, Population genetics of hypervariable loci: analysis of PCR based VNTR polymorphism within a population, *EXS.* 58 (1991) 127-143.
- [14] R. Wolff, Y. Nakamura, S. Odelberg, R. Shiang, R. White, Generation of variability at VNTR loci in human DNA, *EXS.* 58 (1991) 20-38.
- [15] R. Decorte, J.J. Cassiman, Detection of amplified VNTR alleles by direct chemiluminescence: application to the genetic identification of biological samples in forensic cases, *EXS.* 58 (1991) 371-390.
- [16] R. Deka, S. De Croo, L.M. Yu, R.E. Ferrell, Variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism at locus D17S5 (YNZ22) in four ethnically defined human populations, *Hum.Genet.* 90 (1992) 86-90.
- [17] R. Giorgetti, A. Tagliabracci, A. Agostini, M. Cingolani, S.D. Ferrara, Suitability of PCR methods for forensic investigation. Analysis of the 3'apob

VNTR system in an Italian population sample, *Int.J.Legal Med.* 104 (1991) 243-246.

[18] R. Deka, S. DeCroo, L. Jin, S.T. McGarvey, F. Rothhammer, R.E. Ferrell, et al., Population genetic characteristics of the D1S80 locus in seven human populations, *Hum.Genet.* 94 (1994) 252-258.

[19] K. Kasai, Y. Nakamura, R. White, Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science, *J.Forensic Sci.* 35 (1990) 1196-1200.

[20] K.E. al-Nassar, J. Mathew, N. Thomas, H.R. Fatania, Analysis of the D1S80 (pMCT118) VNTR locus polymorphism in a native Kuwaiti population by the polymerase chain reaction, *Forensic Sci.Int.* 78 (1996) 131-138.

[21] A. Alonso, P. Martin, C. Albarran, M. Sancho, Amplified fragment length polymorphism analysis of the VNTR locus D1S80 in central Spain, *Int.J.Legal Med.* 105 (1993) 311-314.

[22] J. Woller, S. Furedi, Z. Padar, AMPFLP analysis of the VNTR loci D1S80 and

ApoB in Hungary, *Int.J.Legal Med.* 107 (1995) 273-274.

[23] K. Skowasch, P. Wiegand, B. Brinkmann, pMCT 118 (D1S80): a new allelic ladder and an improved electrophoretic separation lead to the demonstration of 28 alleles, *Int.J.Legal Med.* 105 (1992) 165-168.

[24] B. Turowska, M. Sanak, D1S80 VNTR locus genotypes in population of south Poland; meta-analysis pointer to genetic disequilibrium of human populations, *Forensic Sci.Int.* 75 (1995) 207-216.

[25] A.D. Kloosterman, B. Budowle, P. Daselaar, PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis, *Int.J.Legal Med.* 105 (1993) 257-264.

[26] A. Nagai, S. Yamada, Y. Bunai, I. Ohya, Analysis of the VNTR locus D1S80 in a Japanese population, *Int.J.Legal Med.* 106 (1994) 268-270.

[27] S.A. Limborska, A.V. Khrunin, O.V. Flegontova, V.A. Tasitz, D.A. Verbenko, Specificity of genetic diversity in D1S80 revealed by SNP-VNTR haplotyping, *Ann.Hum.Biol.* 38 (2011) 564-569.

- [28] F. Kallel, R. Mrad, M. Refai, M. Chaabouni, H. Chaabouni, Allele frequency distribution of the D1S80 VNTR locus in a Tunisian population, *J.Forensic Sci.* 50 (2005) 1237-1238.
- [29] S.J. Walsh, C. Eckhoff, Australian Aboriginal population genetics at the D1S80 VNTR locus, *Ann.Hum.Biol.* 34 (2007) 557-565.
- [30] G. Sciacca, A. Grillo, G. Paravizzini, M. Barchitta, M. Libra, G. Emmanuele, et al., D1S80 VNTR locus genotypes in a population of Southeastern Sicily: distribution and genetic disequilibrium, *Am.J.Hum.Biol.* 16 (2004) 91-94.
- [31] A. Koseler, O. Ozturk, A. Atalay, E.O. Atalay, Allele frequency of VNTR locus D1S80 observed in Hb D-Los Angeles carriers, *Mol.Biol.Rep.* 39 (2012) 10747-10750.
- [32] K. Yoshida, K. Sekiguchi, K. Kasai, H. Sato, S. Seta, G.F. Sensabaugh, Evaluation of new primers for CSF1PO, *Int.J.Legal Med.* 110 (1997) 36-38.
- [33] H. Yamaguchi, H. Takizawa, C. Shimasaki, Frequency of the three STR loci (TPOX, CSF1PO, TH01), in a Japanese population determined using a Gene Print

STR multiplex kit, *Nihon Hoigaku Zasshi*. 50 (1996) 163-167.

[34] R.A. Bayoumi, L.I. al-Gazali, U. Jaffer, M.S. Nur-E-Kamal, A. Dawodu, A.

Bener, et al., United Arab Emirates population data on three DNA tetrameric short

tandem repeat loci: HUMTHO1, TPOX and CSF1PO--derived using multiplex

polymerase chain reaction and manual typing, *Electrophoresis*. 18 (1997)

1637-1640.

[35] B. Budowle, L.T. Nhari, T.R. Moretti, S.B. Kanoyangwa, E. Masuka, D.A.

Defenbaugh, et al., Zimbabwe black population data on the six short tandem repeat

loci--CSF1PO, TPOX, THO1, D3S1358, VWA and FGA, *Forensic Sci.Int.* 90 (1997)

215-221.

[36] M. Gene, A. Carracedo, E. Huguet, A. Perez-Perez, P. Moreno, Population

genetics of the D12S391, CSF1PO and TPOX loci in Catalonia (Northeast Spain),

Int.J.Legal Med. 111 (1998) 52-54.

[37] S.M. Santos, B. Budowle, J.B. Smerick, K.M. Keys, T.R. Moretti, Portuguese

population data on the six short tandem repeat loci--CSF1PO, TPOX, THO1,

D3S1358, VWA and FGA, *Forensic Sci.Int.* 83 (1996) 229-235.

[38] B. Brinkmann, A. Sajantila, H.W. Goedde, H. Matsumoto, K. Nishi, P. Wiegand, Population genetic comparisons among eight populations using allele frequency and sequence data from three microsatellite loci, *Eur.J.Hum.Genet.* 4 (1996) 175-182.

[39] C.A. Crouse, J. Schumm, Investigation of species specificity using nine PCR-based human STR systems, *J.Forensic Sci.* 40 (1995) 952-956.

[40] M.V. Lareu, C. Pestoni, M. Schurenkamp, S. Rand, B. Brinkmann, A. Carracedo, A highly variable STR at the D12S391 locus, *Int.J.Legal Med.* 109 (1996) 134-138.

[41] J.S. Chamberlain, R.A. Gibbs, J.E. Ranier, P.N. Nguyen, C.T. Caskey, Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 11141-11156.

[42] M.C. Edwards, R.A. Gibbs, Multiplex PCR: advantages, development, and applications, *PCR Methods Appl.* 3 (1994) S65-75.

[43] B. Budowle, T.R. Moretti, K.M. Keys, B.W. Koons, J.B. Smerick, Validation

studies of the CTT STR multiplex system, *J.Forensic Sci.* 42 (1997) 701-707.

[44] G. Tully, K.M. Sullivan, P. Gill, Analysis of 6 VNTR loci by 'multiplex' PCR and automated fluorescent detection, *Hum.Genet.* 92 (1993) 554-562.

[45] N. Morral, X. Estivill, Multiplex PCR amplification of three microsatellites within the CFTR gene, *Genomics.* 13 (1992) 1362-1364.

[46] E. Ambach, W. Parson, H. Niederstatter, B. Budowle, Austrian Caucasian population data for the quadruplex plus amelogenin: refined mutation rate for HumvWFA31/A, *J.Forensic Sci.* 42 (1997) 1136-1139.

[47] O. Henegariu, N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance, P.H. Vogt, Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol, *BioTechniques.* 23 (1997) 504-511.

[48] A.P. Shuber, V.J. Grondin, K.W. Klinger, A simplified procedure for developing multiplex PCRs, *Genome Res.* 5 (1995) 488-493.

[49] P. Markoulatos, N. Siafakas, M. Moncany, Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach, *J.Clin.Lab.Anal.* 16 (2002) 47-51.

[50] J.M. Butler, J.M. Devaney, M.A. Marino, P.M. Vallone, Quality control of PCR primers used in multiplex STR amplification reactions, *Forensic Sci.Int.* 119 (2001) 87-96.

[51] C.P. Kimpton, N.J. Oldroyd, S.K. Watson, R.R. Frazier, P.E. Johnson, E.S. Millican, et al., Validation of highly discriminating multiplex short tandem repeat amplification systems for individual identification, *Electrophoresis.* 17 (1996) 1283-1293.

[52] R. Schoske, P.M. Vallone, C.M. Ruitberg, J.M. Butler, Multiplex PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10 Y chromosome short tandem repeat (STR) loci, *Anal.Bioanal Chem.* 375 (2003) 333-343.

[53] D. Pei, Y.J. Huang, C.H. Hsieh, S.W. Kuo, Y.H. Liou, L.S. Wu, The genetic background difference between diabetic patients with and without nephropathy in a Taiwanese population by linkage disequilibrium mapping using 382 autosomal STR markers, *Genet.Test.Mol.Biomarkers.* 14 (2010) 433-438.

[54] L.M. Hsu, Y.S. Huang, S.Y. Yang, F.Y. Chang, S.D. Lee, Polymorphism of

T-cell receptor gamma short tandem repeats as a susceptibility risk factor of hepatocellular carcinoma, *Anticancer Res.* 26 (2006) 3787-3791.

[55] K. Bender, P.M. Schneider, Validation and casework testing of the BioPlex-11 for STR typing of telogen hair roots, *Forensic Sci.Int.* 161 (2006) 52-59.

[56] N. Sarkar, V.K. Kashyap, Genetic diversity at two pentanucleotide STR and thirteen tetranucleotide STR loci by multiplex PCR in four predominant population groups of central India, *Forensic Sci.Int.* 128 (2002) 196-201.

[57] C.L. Johnson, R.C. Giles, J.H. Warren, J.I. Floyd, R.W. Staub, Analysis of non-suspect samples lacking visually identifiable sperm using a Y-STR 10-plex, *J.Forensic Sci.* 50 (2005) 1116-1118.

[58] A. Hall, J. Ballantyne, The development of an 18-locus Y-STR system for forensic casework, *Anal.Bioanal Chem.* 376 (2003) 1234-1246.

[59] R. Schoske, P.M. Vallone, M.C. Kline, J.W. Redman, J.M. Butler, High-throughput Y-STR typing of U.S. populations with 27 regions of the Y chromosome using two multiplex PCR assays, *Forensic Sci.Int.* 139 (2004) 107-121.

- [60] B.W. Ying, Y.P. Hou, J.P. Tang, Distributions of haplotypes for three Y-STR loci in a Tibetan ethnic group of Chinese population by using Y-STR multiplexes, *Fa Yi Xue Za Zhi*. 19 (2003) 193-195.
- [61] M. Prinz, A. Ishii, A. Coleman, H.J. Baum, R.C. Shaler, Validation and casework application of a Y chromosome specific STR multiplex, *Forensic Sci.Int.* 120 (2001) 177-188.
- [62] M.T. Zarrabeitia, J.A. Riancho, L. Gusmao, M.V. Lareu, C. Sanudo, A. Amorim, et al., Spanish population data and forensic usefulness of a novel Y-STR set (DYS437, DYS438, DYS439, DYS460, DYS461, GATA A10, GATA C4, GATA H4), *Int.J.Legal Med.* 117 (2003) 306-311.
- [63] I. Ali, A. Rasheed, M.M. Saleem, A. Saeed, H. Rasheed, A. Nasih, et al., Allele frequencies of 15 STR loci using AmpF/STR Identifiler kit in the Maldivian population, *Forensic.Sci.Int.Genet.* 6 (2012) e136.
- [64] V. Lopes, A. Serra, J. Gamero, L. Sampaio, F. Balsa, C. Oliveira, et al., Allelic frequency distribution of 17 STRs from Identifiler and PowerPlex-16 in

Central Portugal area and the Azores archipelago, *Forensic.Sci.Int.Genet.* 4 (2009)

e1-7.

[65] T. Novkovic, B. Panic, A. Banjac, T.K. Dekic, I. Tomisic-Kosic, A.

Vucetic-Dragovic, et al., Genetic polymorphisms of 15 AmpF1STR Identifiler loci

in a Serbian population, *Forensic.Sci.Int.Genet.* 4 (2010) e149-50.

[66] O. Rocabado, P. Taboada, F.J. Inda, I. Yurrebaso, O. Garcia, Population genetic

data for 15 STR loci (Identifiler kit) in Bolivia, *Leg.Med.(Tokyo).* 11 (2009)

302-304.

[67] R. Vargas-Diaz, C.N. Talavera-Lopez, G. Carmody, J.A. Huete-Perez, A genetic

study of the Identifiler()System 15 STR loci in the general population of Nicaragua,

Central America, *Leg.Med.(Tokyo).* 13 (2011) 213-214.

[68] M.M. Melo, M. Carvalho, V. Lopes, M.J. Anjos, A. Serra, D.N. Vieira, et al.,

Genetic study of 15 STRs loci of Identifiler system in Angola population,

Forensic.Sci.Int.Genet. 4 (2010) e153-7.

[69] L. Bing, W. Liang, J. Pi, D. Zhang, D. Yong, H. Luo, et al., Population genetics

for 17 Y-STR loci(AmpFISTR(R)Y-filer™) in Luzhou Han ethnic group,

Forensic.Sci.Int.Genet. 7 (2013) e23-6.

[70] S. Flores, J. Sun, J. King, A. Eisenberg, B. Budowle, Allele frequencies for 15

autosomal STR loci and haplotype data for 17 Y-STR loci in a population from

Belize, Int.J.Legal Med. (2014).

[71] Y. Liu, L. Liao, M. Gu, Y. Ye, Population genetics for 17 Y-STR loci in a

Chinese Han population sample from Mudanjiang city, Northeast China,

Forensic.Sci.Int.Genet. (2014).

[72] G.E. Rego, S.M. Monte, R.S. De Moura-Neto, N.F. De Oliveira, Allele

frequencies and population data for 17 Y-STR loci in Paraiba population, Brazil,

Forensic.Sci.Int.Genet. (2014).

[73] K. Terali, T. Zorlu, O. Bulbul, C. Gurkan, Population genetics of 17 Y-STR

markers in Turkish Cypriots from Cyprus, Forensic.Sci.Int.Genet. 10 (2014) e1-3.

[74] S. Triki-Fendri, P. Sanchez-Diz, D. Rey-Gonzalez, I. Ayadi, S. Alfadhli, A.

Rebai, et al., Population genetics of 17 Y-STR markers in West Libya (Tripoli

region), *Forensic.Sci.Int.Genet.* 7 (2013) e59-61.

[75] S. Turrina, S. Caratti, M. Ferriani, D. De Leo, Haplotype data and mutation rates for the 23 Y-STR loci of PowerPlex(R) Y 23 System in a Northeast Italian population sample, *Int.J.Legal Med.* (2014).

[76] Y. Yang, W. Yuan, F. Guo, X. Jiang, Population data of 17 Y-STR loci in Nanyang Han population from Henan Province, Central China, *Forensic.Sci.Int.Genet.* 13C (2014) 145-146.

[77] H. Xu, C.C. Wang, R. Shrestha, L.X. Wang, M. Zhang, Y. He, et al., Inferring population structure and demographic history using Y-STR data from worldwide populations, *Mol.Genet.Genomics.* (2014).

[78] A.M. Gross, P. Berdos, J. Ballantyne, Y-STR concordance study between Y-Plex5, Y-Plex6, Y-Plex12, PowerplexY, Y-Filer, MPI, and MP11, *J.Forensic Sci.* 51 (2006) 1423-1428.

[79] I. Yurrebaso, J.A. Ajuriagerra, A. Alday, I. Lezama, J.A. Perez, E. Romon, et al., Allele frequencies and concordance study between the Identifiler and the

PowerPlex ESX17 systems in the Basque Country population,

Forensic.Sci.Int.Genet. 5 (2011) e79-80.

[80] A.A. Westen, H. Haned, L.J. Grol, J. Hartevelde, K.J. van der Gaag, P. de Knijff, et al., Combining results of forensic STR kits: HDplex validation including allelic association and linkage testing with NGM and Identifiler loci, Int.J.Legal Med. 126 (2012) 781-789.

[81] O. Garcia, J. Alonso, J.A. Cano, R. Garcia, G.M. Luque, P. Martin, et al., Population genetic data and concordance study for the kits Identifiler, NGM, PowerPlex ESX 17 System and Investigator ESSplex in Spain, Forensic.Sci.Int.Genet. 6 (2012) e78-9.

[82] N. Laurin, E. Milot, Population genetic data of the AmpFISTR(R) Identifiler(R) Plus and PowerPlex(R) 16 HS STR loci in four Canadian populations, Int.J.Legal Med. 128 (2014) 277-278.

[83] M.M. Holland, D.L. Fisher, L.G. Mitchell, W.C. Rodriguez, J.J. Canik, C.R. Merrill, et al., Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains:

identification of remains from the Vietnam War, *J.Forensic Sci.* 38 (1993) 542-553.

[84] T.D. Anderson, J.P. Ross, R.K. Roby, D.A. Lee, M.M. Holland, A validation study for the extraction and analysis of DNA from human nail material and its application to forensic casework, *J.Forensic Sci.* 44 (1999) 1053-1056.

[85] R. Kristinsson, S.E. Lewis, P.B. Danielson, Comparative analysis of the HV1 and HV2 regions of human mitochondrial DNA by denaturing high-performance liquid chromatography, *J.Forensic Sci.* 54 (2009) 28-36.

[86] H. Wittig, C. Augustin, A. Baasner, U. Bulnheim, N. Dimo-Simonin, J. Edelmann, et al., Mitochondrial DNA in the Central European population. Human identification with the help of the forensic mt-DNA D-loop-base database, *Forensic Sci.Int.* 113 (2000) 113-118.

[87] T. Vanecek, F. Vorel, M. Sip, Mitochondrial DNA D-loop hypervariable regions: Czech population data, *Int.J.Legal Med.* 118 (2004) 14-18.

[88] C. Fridman, R.S. Gonzalez, A.C. Pereira, M.M. Cardena, Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region in a population of southeastern Brazil,

Int.J.Legal Med. 128 (2014) 589-593.

[89] M. Mikkelsen, E. Sorensen, E.M. Rasmussen, N. Morling, Mitochondrial DNA HV1 and HV2 variation in Danes, *Forensic.Sci.Int.Genet.* 4 (2010) e87-8.

[90] I. Lehocky, M. Baldovic, L. Kadasi, E. Metspalu, A database of mitochondrial DNA hypervariable regions I and II sequences of individuals from Slovakia, *Forensic.Sci.Int.Genet.* 2 (2008) e53-9.

[91] J. Edelmann, S. Hering, C. Augustin, R. Szibor, Characterisation of the STR markers DXS10146, DXS10134 and DXS10147 located within a 79.1 kb region at Xq28, *Forensic.Sci.Int.Genet.* 2 (2008) 41-46.

[92] J. Edelmann, S. Hering, C. Augustin, S. Kalis, R. Szibor, Validation of six closely linked STRs located in the chromosome X centromere region, *Int.J.Legal Med.* 124 (2010) 83-87.

[93] S. Elakkary, S. Hoffmeister-Ullerich, C. Schulze, E. Seif, A. Sheta, S. Hering, et al., Genetic polymorphisms of twelve X-STRs of the investigator Argus X-12 kit and additional six X-STR centromere region loci in an Egyptian population sample,

Forensic.Sci.Int.Genet. 11 (2014) 26-30.

[94] M. Samejima, Y. Nakamura, P. Nambiar, K. Minaguchi, Genetic study of 12 X-STRs in Malay population living in and around Kuala Lumpur using Investigator Argus X-12 kit, Int.J.Legal Med. 126 (2012) 677-683.

[95] C. Tomas, V. Pereira, N. Morling, Analysis of 12 X-STRs in Greenlanders, Danes and Somalis using Argus X-12, Int.J.Legal Med. 126 (2012) 121-128.

[96] S.H. Zhang, R.X. Zhu, L. Li, C.T. Li, Forensic application of investigator Argus X-12 kit in Han population from East China, Fa Yi Xue Za Zhi. 27 (2011) 365-368.

[97] A. Zidkova, P. Capek, A. Horinek, P. Coufalova, Investigator(R) Argus X-12 study on the population of Czech Republic: comparison of linked and unlinked X-STRs for kinship analysis, Electrophoresis. 35 (2014) 1989-1992.

[98] T. Hundertmark, S. Hering, J. Edelmann, C. Augustin, I. Plate, R. Szibor, The STR cluster DXS10148-DXS8378-DXS10135 provides a powerful tool for X-chromosomal haplotyping at Xp22, Int.J.Legal Med. 122 (2008) 489-492.

[99] R. Szibor, J. Edelmann, M.T. Zarrabeitia, J.A. Riancho, Sequence structure and population data of the X-linked markers DXS7423 and DXS8377--clarification of conflicting statements published by two working groups, *Forensic Sci.Int.* 134 (2003) 72-73.

[100] R. Szibor, M. Krawczak, S. Hering, J. Edelmann, E. Kuhlisch, D. Krause, Use of X-linked markers for forensic purposes, *Int.J.Legal Med.* 117 (2003) 67-74.

[101] J. Edelmann, S. Hering, E. Kuhlisch, R. Szibor, Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X-chromosome, *Forensic Sci.Int.* 125 (2002) 217-222.

[102] J. Edelmann, R. Szibor, The X-linked STRs DXS7130 and DXS6803, *Forensic Sci.Int.* 136 (2003) 73-75.

[103] S. Hering, C. Augustin, J. Edelmann, M. Heidel, J. Dressler, H. Rodig, et al., DXS10079, DXS10074 and DXS10075 are STRs located within a 280-kb region of Xq12 and provide stable haplotypes useful for complex kinship cases, *Int.J.Legal Med.* 120 (2006) 337-345.

- [104] J. Edelmann, D. Deichsel, S. Hering, I. Plate, R. Szibor, Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS9895, DXS8378, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172D05, DXS7423 and DXS8377, *Forensic Sci.Int.* 129 (2002) 99-103.
- [105] S. Zhang, H. Tian, J. Wu, S. Zhao, C. Li, A new multiplex assay of 17 autosomal STRs and Amelogenin for forensic application, *PLoS One.* 8 (2013) e57471.
- [106] D. Botstein, R.L. White, M. Skolnick, R.W. Davis, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am.J.Hum.Genet.* 32 (1980) 314-331.
- [107] D. Desmarais, Y. Zhong, R. Chakraborty, C. Perreault, L. Busque, Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA), *J.Forensic Sci.* 43 (1998) 1046-1049.
- [108] T. Kishida, W. Wang, M. Fukuda, Y. Tamaki, Duplex PCR of the Y-27H39 and

HPRT loci with reference to Japanese population data on the HPRT locus, Nihon Hoigaku Zasshi. 51 (1997) 67-69.

[109] J. Kruger, W. Fuhrmann, K.H. Lichte, C. Steffens, On the utilization of erythrocyte acid phosphatase polymorphism in paternity evaluation,

Dtsch.Z.Gesamte Gerichtl.Med. 64 (1968) 127-146.

[110] M. Nei, A.K. Roychoudhury, Sampling variances of heterozygosity and genetic distance, Genetics. 76 (1974) 379-390.

DXS10101 population

[111] A. Tamura, H. Tsutsumi, M. Hara, A. Takada, K. Saito, K. Suzuki, et al.,

Genetic studies of eight X-STRs in a Japanese population, Leg.Med.(Tokyo). 11 Suppl 1 (2009) S451-2.

[112] A. Ghosh, M. Seshadri, Allelic variation at ACTBP2 microsatellite for two Indian tribal groups, J.Forensic Sci. 51 (2006) 947-948.

[113] T. Lederer, G. Braunschweiger, B. Dunkelmann, P. Betz, Characterization of two unusual allele variants at the STR locus ACTBP2 (SE33),

Forensic.Sci.Med.Pathol. 4 (2008) 164-166.

[114] M. Muller, U. Sibbing, C. Hohoff, B. Brinkmann, Haplotype-assisted characterization of germline mutations at short tandem repeat loci, *Int.J.Legal Med.* 124 (2010) 177-182.

[115] M. Kozulic, X.Q. Chen, F. Bonilla, J. Silva, Loss of heterozygosity at the ACTBP2 locus in lung cancer detected on Elchrom precast Spreadex gels, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 906 (2000) 83-86.

[116] M. Roupret, V. Hupertan, D.R. Yates, E. Comperat, J.W. Catto, M. Meuth, et al., A comparison of the performance of microsatellite and methylation urine analysis for predicting the recurrence of urothelial cell carcinoma, and definition of a set of markers by Bayesian network analysis, *BJU Int.* 101 (2008) 1448-1453.

[117] S. Temam, O. Casiraghi, J.B. Lahaye, J. Bosq, X. Zhou, M. Julieron, et al., Tetranucleotide microsatellite instability in surgical margins for prediction of local recurrence of head and neck squamous cell carcinoma, *Clin.Cancer Res.* 10 (2004) 4022-4028.

[118] J.Z. Li, D.M. Absher, H. Tang, A.M. Southwick, A.M. Casto, S.

Ramachandran, et al., Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation, *Science*. 319 (2008) 1100-1104.

[119] Q.L. Liu, H. Zhao, J.D. Chen, X.G. Wang, D.J. Lu, L. Quan, Development and population study of the 12 X-STR loci multiplexes PCR systems, *Int.J.Legal Med.* 126 (2012) 665-670.

[120] M. Israr, A.A. Shahid, Z. Rahman, M.S. Zar, M.S. Shahzad, T. Husnain, et al., Development and characterization of a new 12-plex ChrX miniSTR system, *Int.J.Legal Med.* 128 (2014) 595-598.

表 1. Primer sequence

Locus	Label	Primer sequence	Size	Allele
DXS8378	PET	TTAGGCAACCCGGTGGTCC ACAAGAACGAAACTCCAAC	107~131	8~14
DXS9898	PET	CGAGCACACCTACAAAGCTG TAGGCTCACCTCACTGAGCA	144~176	7~15
DXS10147	PET	CTGGGCGACAGAGTGAGATT GGGAAGCTGAAGGCAGATAA	186~204	5~10
GATA31E08	PET	GCAAGGGGAGAAGGCTAGAA TCAGCTGACAGAGCACAGAGA	232~271	9~15
GATA172D05	VIC	TAGTGGTGATGGTTGCACAG ATAATTGAAAGCCCGGATTC	101~129	6~13
DXS7423	VIC	GTCTTCCTGTCATCTCCCAAC TAGCTTAGCGCCTGGCACATA	174~198	12~18
DXS6809	VIC	TCCATCTTTCTCTGAACCTTCC TGCTTTAGGCTGATGTGAGG	223~271	26~38
DXS10134	VIC	GAGGTTGAAGCTGCAGTGAG TAACTGGTTGAGCCCCTGCT	284~340	31~44.3
DXS7132	NED	TCCCCTCTCATCTATCTGACTG CACTCCTGGTGCCAAACTCT	119~147	11~18
DXS9902	NED	CTGGGTGAAGAGAAGCAGGA GGCAATACACATTCATATCAGGA	170~190	9~14
DXS6789	NED	TCGAAAAGATAGCCAATCACTG CCTCGTGATCATGTAAGTTGGT	220~264	14~25
DXS10074	NED	TGCCATTTGTTGTGATCTCC TGTGTGAATGTCTCCTCTGCT	286~334	7~19
New X151	PET	AAGGAGTTCACCTTTCATCACGTC TCTGACTACAGCACTTATCAAAGACA	276~332	15~29
Amelogenin	6-FAM	ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAG	102~108	XY

表2. CT/TT反復配列の日本人における内部構造別出現頻度

Size	Allele	Sequence structure										Japanese					
		(CTTT) _n	CT	(CCTT) ₅	N37	(CTTT) _n	CT	N15	(CTTT) _n	CT	(CTTT) ₂	(CT) _n	(CTTT) _n	specific	n=124 frequencies		
									CC	(CT) _n	(CTTT) _n	(CT) _n	(CTTT) _n				
P1	273	23	(CTTT) ₂				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₂	(CTTT) ₁₅	1	0.0081	
	277	24	(CTTT) ₂				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₂	(CTTT) ₁₆	2	0.0161	
	281	25	(CTTT) ₂				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₂	(CTTT) ₁₇	8	0.0645	
	285	26	(CTTT) ₂				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₂	(CTTT) ₁₈	2	0.0161	
P2	323	35.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₂₆	1	0.0081	
	327	36.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₂₇	3	0.0242	
	331	37.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₂₈	3	0.0242	
	335	38.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₂₉	5	0.0403	
	339	39.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₃₀	1	0.0081	
	341	40	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₂	(CTTT) ₃₁	1	0.0081	
	343	40.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₃	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₃₀	1	0.0081	
	343	40.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₃₁	6	0.0484	
	347	41.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₃₂	7	0.0565	
	351	42.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₃₃	7	0.0565	
	351	42.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₁	(CTTT) ₃₄	1	0.0081	
	351	42.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₃₄	*a	2	0.0161
	353	43	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₆	(CTTT) ₃₂	1	0.0081	
	355	43.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₃₄	4	0.0323	
	359	44.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₃₅	3	0.0242	
	360	44.3	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) _{35+T}	1	0.0081	
	363	45.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₃₆	2	0.0161	
	364	45.3	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) _{36+T}	1	0.0081	
	367	46.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₃₇	4	0.0323	
	368	46.3	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) _{37+T}	1	0.0081	
	371	47.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₃₈	4	0.0323	
375	48.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₃₉	2	0.0161		
379	49.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₄₀	3	0.0242		
387	51.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₄₂	1	0.0081		
391	52.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₃	(CTTT) ₄₃	1	0.0081		
395	53.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₂	-	-	-	(CT) ₁	(CTTT) ₄₅	1	0.0081		
P3	307	31.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₆	(CTTT) ₁₃	1	0.0081	
	311	32.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₆	(CTTT) ₁₄	2	0.0161	
	315	33.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₆	(CTTT) ₁₅	6	0.0484	
	319	34.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₆	(CTTT) ₁₆	1	0.0081	
	323	35.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₂	(CT) ₆	(CTTT) ₁₇	4	0.0323	
	323	35.2	(CTTT) ₃	(CCTT) ₄			(CTTT) ₄		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₂	(CT) ₆	(CTTT) ₁₈	1	0.0081	
	327	36.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₂	(CT) ₆	(CTTT) ₁₈	2	0.0161	
	327	36.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₄	(CTTT) ₁₉	1	0.0081	
	329	37	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₃	(CTTT) ₂₀	1	0.0081	
	331	37.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₆	(CTTT) ₁₈	1	0.0081	
	331	37.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₄	(CTTT) ₂₀	4	0.0323	
	335	38.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₄	(CTTT) ₂₁	2	0.0161	
	341	40	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₂	(CT) ₅	(CTTT) ₂₂	1	0.0081	
	341	40	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₃	(CTTT) ₂₃	3	0.0242	
	343	40.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₄	(CTTT) ₂₃	2	0.0161	
	351	42.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₄	(CTTT) ₂₅	1	0.0081	
355	43.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₄	(CTTT) ₂₆	1	0.0081		
359	44.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₄	(CTTT) ₂₇	1	0.0081		
360	44.3	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₂	(CTTT) ₃	(CT) ₄	(CTTT) _{28+T}	*b	1	0.0081	
363	45.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₄	(CTTT) ₂₈	2	0.0161		
371	47.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₄	(CTTT) ₃₀	3	0.0242		
372	47.3	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₃	CC	-	(CTTT) ₂	(CT) ₄	(CTTT) _{34+T}	1	0.0081		
375	48.2	(CTTT) ₃				(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₄	(CTTT) ₃₁	1	0.0081		
380	49.3	(CTTT) ₃				(CTTT) ₄		(CTTT) ₃	CC	-	(CTTT) ₂	(CT) ₄	(CTTT) _{36+T}	1	0.0081		
K562 reference sample			(CTTT) ₃			(CTTT) ₃		(CTTT) ₃	CC	(CT) ₄	(CTTT) ₃	(CT) ₄	(CTTT) ₂₀				

The consensus sequences of N37 is 5'-CCTTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCT-3'.

a. The tenth of DNA repeat of last CT/TT was CTAT. b. The 24th of DNA repeat of last CT/TT was CTAT.

表 4. TTCC配列日本人塩基長別出現頻度

Size(bp)	n=124	frequencies
273	1	0.0081
277	2	0.0161
281	8	0.0645
285	2	0.0161
307	1	0.0081
311	2	0.0161
315	6	0.0484
319	1	0.0081
323	6	0.0484
327	6	0.0484
329	1	0.0081
331	8	0.0645
335	7	0.0565
339	1	0.0081
341	5	0.0403
343	9	0.0726
347	7	0.0565
351	11	0.0887
353	1	0.0081
355	5	0.0403
359	4	0.0323
360	2	0.0161
363	4	0.0323
364	1	0.0081
367	4	0.0323
368	1	0.0081
371	7	0.0565
372	1	0.0081
375	3	0.0242
379	3	0.0242
380	1	0.0081
387	1	0.0081
391	1	0.0081
395	1	0.0081

表 5. TTCC塩基長別統計データ

General	
Polymorphism information content (PIC)	0.9507
Homozygotie (h):	0.0472
Heterozygotie (HET):	0.9528
Power of Exclusion (PE):	0.9040
Paternity Index (PI):	0.0236

Power of Discrimination	
PD female:	0.9957
PD male:	0.9528

Mean paternity exclusion change	
MEC Krüger:	0.9009
MEC Kishida:	0.9471
MEC Desmarais:	0.9507
MEC Desmarais Duo:	0.9083

表 6. TGCC-TTCC構造別頻度

<u>(TGCC)</u>	<u>(TTCC)</u>	<u>Frequency</u>
6	11	0.01
6	12	0.01
6	13	0.01
6	14	0.04
6	15	0.12
6	16	0.03
6	17	0.01
6	20	0.04
6	21	0.01
7	14	0.02
7	15	0.11
7	16	0.04
7	19	0.01
8	12	0.01
8	13	0.02
8	14	0.14
8	15	0.27
8	16	0.09

表 7. TGCC-TTCC 人種間構造別 Allele frequency

	Japanese	Mongolian	American	Columbian
TGCC allele				
5		0.0381	0.0140	0.0037
6	0.2800	0.2095	0.2867	0.3150
7	0.1800	0.2857	0.1818	0.1685
8	0.5400	0.4667	0.4895	0.4835
9			0.0280	0.0293
TTCC allele				
10		0.0095	0.0070	
11	0.0100		0.0140	
12	0.0200	0.0095	0.0280	0.0110
13	0.0300	0.0190	0.0769	0.0879
14	0.2000	0.2571	0.2098	0.4249
15	0.5000	0.4381	0.4615	0.3480
16	0.1600	0.1714	0.1259	0.1209
17	0.0200	0.0095	0.0559	
18		0.0095	0.0210	
19	0.0100	0.0190		
20	0.0400	0.0381		
21	0.0100	0.0190		

表 8. 人種別TGCC-TTCC内部構造頻度

Japanese			Mongolian			American			Columbian		
(TGCC)	(TTCC)	Frequency	(TGCC)	(TTCC)	Frequency	(TGCC)	(TTCC)	Frequency	(TGCC)	(TTCC)	Frequency
6	11	0.01	5	15	0.0288	5	15	0.0070	5	14	0.0037
6	12	0.01	5	16	0.0096	5	16	0.0070	6	13	0.0220
6	13	0.01	6	12	0.0096	6	13	0.0070	6	14	0.2454
6	14	0.04	6	13	0.0096	6	14	0.0839	6	15	0.0183
6	15	0.12	6	14	0.0385	6	15	0.1259	6	16	0.0256
6	16	0.03	6	15	0.0673	6	16	0.0559	6	20	0.0037
6	17	0.01	6	16	0.0192	6	17	0.0070	7	12	0.0110
6	20	0.04	6	19	0.0096	7	10	0.0070	7	13	0.0513
6	21	0.01	6	20	0.0385	7	11	0.0140	7	14	0.0183
7	14	0.02	6	21	0.0096	7	12	0.0070	7	15	0.0842
7	15	0.11	7	10	0.0096	7	13	0.0140	7	16	0.0037
7	16	0.04	7	14	0.0865	7	14	0.0839	7	14	0.0330
7	19	0.01	7	15	0.1154	7	15	0.0699	8	13	0.0147
8	12	0.01	7	16	0.0769	7	16	0.0070	8	14	0.1392
8	13	0.02	8	13	0.0096	7	17	0.0070	8	15	0.2344
8	14	0.14	8	14	0.1346	8	12	0.0210	8	16	0.0916
8	15	0.27	8	15	0.2308	8	13	0.0490	8	18	0.0037
8	16	0.09	8	16	0.0673	8	14	0.0559	9	14	0.0183
			8	17	0.0096	8	15	0.2448	9	15	0.0110
			8	18	0.0096	8	16	0.0559			
			8	19	0.0096	8	17	0.0420			
						8	18	0.0210			
						9	14	0.0140			
						9	15	0.0140			

表 9. TGCC-TTCC 人種別Allele出現頻度

Alleles	Japanese			Mongolian			American			Columbian		
	male	female	all	male	female	all	male	female	all	male	female	all
16												
17	0.0067		0.0029	0.0123		0.0095		0.0091	0.0070			
18	0.0267	0.0100	0.0172		0.0417	0.0095		0.0182	0.0140			
19				0.0123		0.0095		0.0273	0.0210	0.0460	0.0323	0.0366
20	0.0667	0.0700	0.0690	0.0617	0.0833	0.0667	0.0909	0.1273	0.1189	0.3103	0.2903	0.2967
21	0.1067	0.0950	0.1006	0.1728	0.1667	0.1714	0.2727	0.2273	0.2378	0.0345	0.0591	0.0513
22	0.2000	0.2200	0.2126	0.2593	0.2917	0.2667	0.1212	0.2000	0.1818	0.1839	0.2796	0.2491
23	0.4133	0.4150	0.4167	0.2963	0.3333	0.3048	0.3333	0.2545	0.2727	0.3448	0.2151	0.2564
24	0.1267	0.1450	0.1379	0.0864		0.0667	0.0909	0.0727	0.0769	0.0805	0.1129	0.1026
25	0.0067	0.0050	0.0057	0.0123	0.0417	0.0190	0.0606	0.0364	0.0420			
26	0.0333		0.0316	0.0617		0.0476		0.0182	0.0140		0.0108	0.0073
27	0.0133		0.0057	0.0247	0.0417	0.0286						
28												
Polymorphism information content (PIC):			0.7148			0.7661			0.7886			0.7326
Homozygotie (h):			0.2534			0.2060			0.1867			0.2304
Heterozygotie (HET):			0.7466			0.7940			0.8133			0.7696
Power of Exclusion (PE):			0.5040			0.5879			0.6240			0.5439
Paternity Index (PI):			0.1267			0.1030			0.0933			0.1152
PD female:			0.9040			0.9297			0.9404			0.9099
PD male:			0.7466			0.7940			0.8133			0.7696
MEC Krüger:			0.5414			0.6057			0.6196			0.5530
MEC Kishida:			0.7148			0.7661			0.7726			0.7326
MEC Desmarais:			0.7148			0.7661			0.7886			0.7326
MEC Desmarais Duo:			0.5787			0.6410			0.6686			0.5989

表 10. Multiplex PCRを含むLocusの日本人統計

Alleles	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS10134	DXS7132	DXS9902	DXS6789	DXS10074	DXS8378	DXS9898	DXS10147	GATA31E08<151	New locus
5													0.1197
6	0.0770												0.2016
7						0.0016							0.0967 0.0885
8	0.1115												0.5541 0.0262
8.3											0.0328		
9	0.0607					0.0082			0.0066		0.0279		0.1869
10	0.4016					0.4344			0.5738	0.0033			0.2574
11	0.2770				0.0033	0.3984		0.0016	0.2738	0.0525			0.3131
12	0.0705				0.0672	0.1525		0.0016	0.1361	0.5902			0.1066
13	0.0016	0.0016			0.1574	0.0049			0.0066	0.2148			0.0213
14		0.3164			0.3066		0.0082	0.0033	0.0033	0.0820			
15		0.6164			0.3656		0.1787	0.0787		0.0230			
16		0.0639			0.0721		0.3148	0.1721		0.0016			
17		0.0016			0.0262		0.0213	0.3213					0.0029
18					0.0016		0.0049	0.2525					0.0172
19							0.0262	0.1410					
20							0.1541	0.0197					0.0690
21							0.1852	0.0066					0.1006
22							0.0820	0.0016					0.2126
23							0.0180						0.4167
24							0.0066						0.1379
25													0.0057
26													0.0316
27			0.0016										0.0057
28													
29			0.0049										
30			0.0115										
31			0.1656										
32			0.1721	0.0164									
33			0.3016	0.0131									
34			0.1918	0.0836									
35			0.0934	0.1607									
36			0.0344	0.2230									
37			0.0197	0.2443									
37.3				0.0098									
38			0.0033	0.1525									
38.3				0.0180									
39				0.0492									
40				0.0115									
40.3				0.0066									
41.3				0.0016									
42.3				0.0082									
43.3				0.0016									
HZ	0.7349	0.5159	0.8047	0.8311	0.7372	0.6292	0.8026	0.7769	0.5772	0.5945	0.6279	0.7805	0.7466
PIC	0.6968	0.4359	0.7779	0.8098	0.6955	0.5531	0.7763	0.7431	0.5128	0.5536	0.5856	0.7477	0.7148
PDm	0.7516	0.5174	0.8095	0.8331	0.7365	0.6298	0.8099	0.7629	0.5858	0.5989	0.6297	0.8004	0.7466
PDf	0.8772	0.6800	0.9325	0.9480	0.8890	0.7846	0.9209	0.9239	0.7490	0.7906	0.8175	0.9037	0.9040

表 11. 連鎖解析による出現頻度

DXS7132	DXS10074	(freq)	DXS10147	DXS7423	(freq)	DXS10134	DXS7423	(freq)	DXS10147	DXS10134	(freq)
12	15	0.0057	5	14	0.0341	14	33	0.0057	5	34	0.0057
12	16	0.0284	5	15	0.0511	14	34	0.0227	5	35	0.0170
12	17	0.0170	5	16	0.0227	14	35	0.0625	5	36	0.0227
12	19	0.0057	6	14	0.0625	14	36	0.0341	5	37	0.0227
13	15	0.0057	6	15	0.1136	14	37	0.0852	5	38	0.0398
13	16	0.0284	6	16	0.0114	14	38	0.0455	6	33	0.0114
13	17	0.0568	6	15	0.0284	14	38.3	0.0114	6	34	0.0398
13	18	0.0341	7	14	0.0227	14	39	0.0398	6	35	0.0568
13	19	0.0057	7	14	0.0284	15	32	0.0057	6	36	0.0511
13	20	0.0057	7	15	0.0341	15	33	0.0057	6	37	0.0170
14	15	0.0284	7	16	0.0114	15	34	0.0568	6	38	0.0170
14	16	0.0511	7	17	0.0057	15	35	0.1307	6	39	0.0227
14	17	0.0909	8	14	0.1364	15	36	0.1136	7	35	0.0227
14	18	0.1023	8	15	0.3750	15	37	0.1477	7	35	0.0114
14	19	0.0341	8	16	0.0227	15	37.2	0.0057	7	36	0.0227
14	22	0.0057	9	14	0.0227	15	38	0.1080	7	37	0.0170
15	15	0.0057	9	15	0.0114	15	38.3	0.0057	7	38	0.0170
15	16	0.0625	9	16	0.0057	15	39	0.0284	7	38.3	0.0057
15	17	0.1705				15	40	0.0057	7	40.3	0.0057
15	18	0.0909				16	35	0.0170	8	32	0.0057
15	19	0.0398				16	36	0.0398	8	34	0.0341
15	20	0.0057				16	37	0.0170	8	35	0.0795
16	15	0.0170				17	40.3	0.0057	8	36	0.0795
16	16	0.0114							8	36	0.0114
16	17	0.0227							8	37	0.1875
16	18	0.0284							8	37.2	0.0057
16	19	0.0170							8	38	0.0739
16	20	0.0057							8	38.3	0.0057
17	17	0.0114							8	39	0.0455
17	18	0.0057							8	40	0.0057
									9	35	0.0227
									9	37	0.0057
									9	38	0.0057
									9	38.3	0.0057

DXS6809	DXS6789	(freq)	DXS10147	DXS7423	DXS10134	(freq)	DXS10147	DXS7423	DXS10134	(freq)
27	16	0.0057	5	14	36	0.0057	8	15	37	0.1250
31	15	0.0341	5	14	37	0.0170	8	15	37.2	0.0057
31	16	0.0625	5	14	38	0.0114	8	15	38	0.0568
31	19	0.0057	5	15	34	0.0057	8	15	38.3	0.0057
31	20	0.0114	5	15	35	0.0057	8	15	39	0.0227
31	21	0.0284	5	15	36	0.0057	8	15	40	0.0057
31	22	0.0170	5	15	37	0.0057	8	16	37	0.0114
33	23	0.0057	5	15	38	0.0284	9	14	35	0.0170
32	15	0.0114	5	16	35	0.0114	9	14	38.3	0.0057
32	16	0.0625	5	16	36	0.0114	9	15	35	0.0057
32	17	0.0057	6	14	33	0.0057	9	16	37	0.0057
32	19	0.0227	6	14	34	0.0170	9	15	38	0.0057
32	20	0.0284	6	14	35	0.0114				
32	21	0.0227	6	14	37	0.0114				
32	22	0.0227	6	14	39	0.0170				
32	23	0.0057	6	15	33	0.0057				
33	15	0.0398	6	15	34	0.0227				
33	16	0.0795	6	15	35	0.0455				
33	17	0.0057	6	15	36	0.0398				
33	18	0.0114	6	16	36	0.0114				
33	20	0.0625	6	15	37	0.0057				
33	21	0.0568	6	15	38	0.0170				
33	22	0.0170	6	15	39	0.0057				
33	23	0.0114	7	14	35	0.0114				
34	15	0.0170	7	14	36	0.0114				
34	16	0.0455	7	14	37	0.0057				
34	17	0.0114	7	14	38	0.0170				
34	20	0.0284	7	14	38	0.0057				
34	21	0.0625	7	15	35	0.0114				
34	22	0.0114	7	15	35	0.0057				
34	24	0.0057	7	15	36	0.0057				
35	15	0.0114	7	15	37	0.0114				
35	16	0.0284	7	16	35	0.0057				
35	19	0.0057	7	16	36	0.0057				
35	20	0.0170	7	17	40	0.0057				
35	21	0.0284	8	14	34	0.0057				
35	20	0.0057	8	14	35	0.0227				
35	22	0.0114	8	14	36	0.0170				
36	15	0.0057	8	14	37	0.0511				
36	16	0.0114	8	14	38	0.0170				
36	21	0.0114	8	14	39	0.0227				
36	22	0.0057	8	15	32	0.0057				
37	15	0.0170	8	15	34	0.0284				
37	16	0.0114	8	15	35	0.0568				
37	20	0.0057	8	15	36	0.0625				
37	22	0.0057	8	16	36	0.0114				

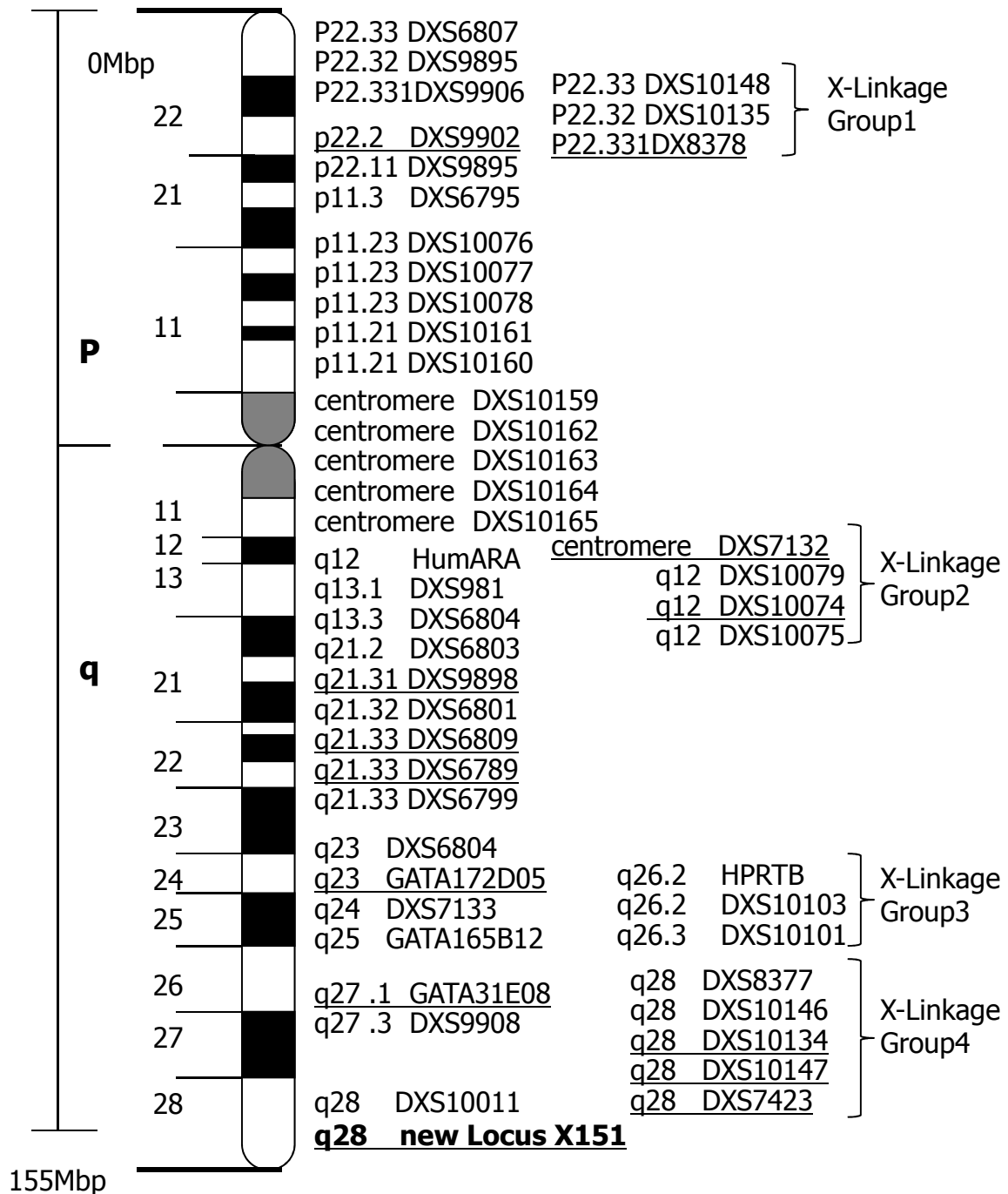


図 1. X染色体上のSTR

X染色体上において多型性の解析が行われているLocusである。本研究において解析の行ったLocusの場所を太文字にて、Multiplex PCRに含むLocusを下線にて示す。

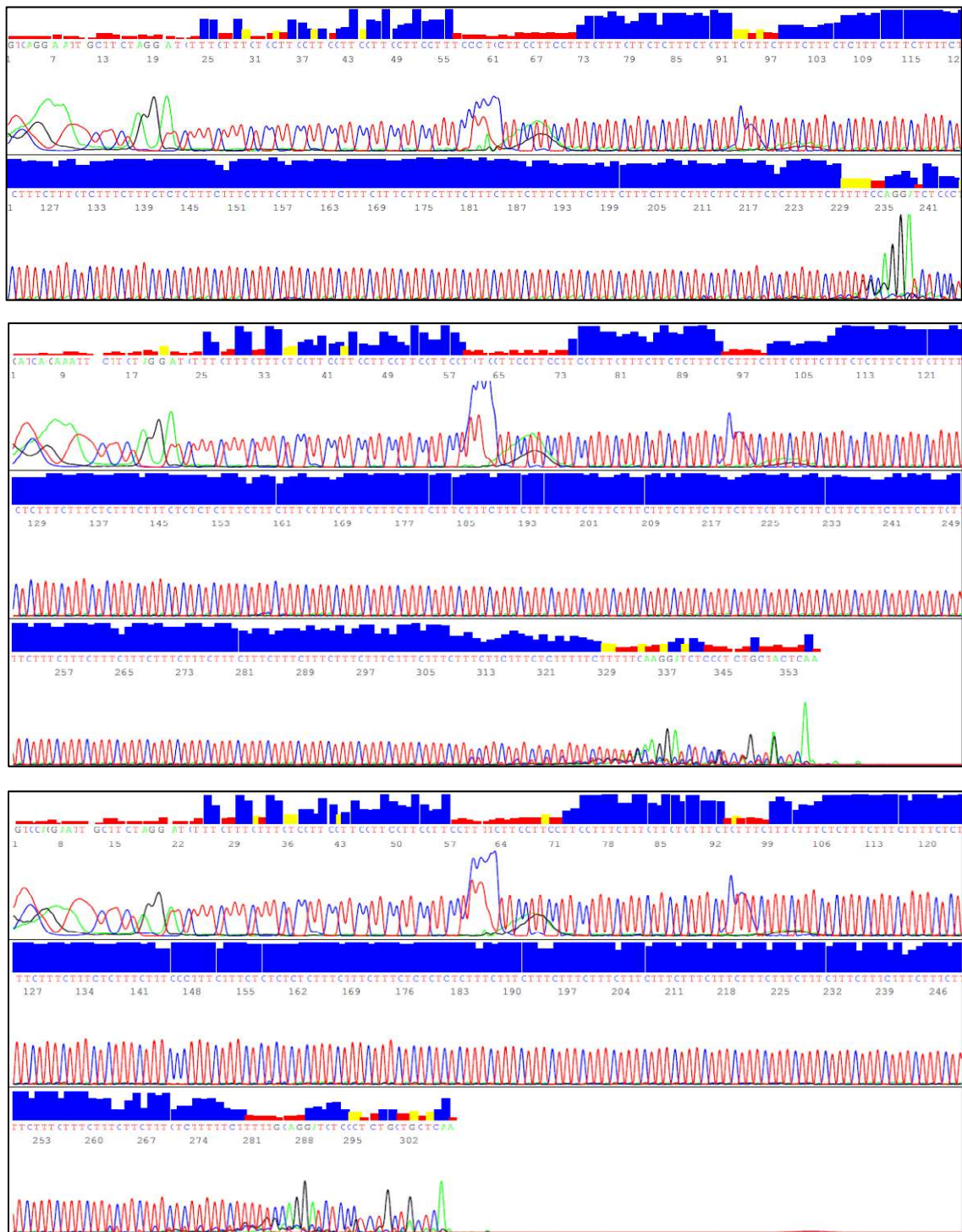


図 2. CTTT 反復配列の構造

上からP1, P2, P3の配列解析画像を示す. P1とP2の違いは23~33付近にみられるCTTTがP1では2反復, P2(及びP3)では3反復を見せ, またP1では後半に長く続くCTTTがP2に比べ非常に短いのが特徴である. P3配列の148付近にみられるCCCの連続配列がP3における特徴塩基配列の挿入が見られる場所である.

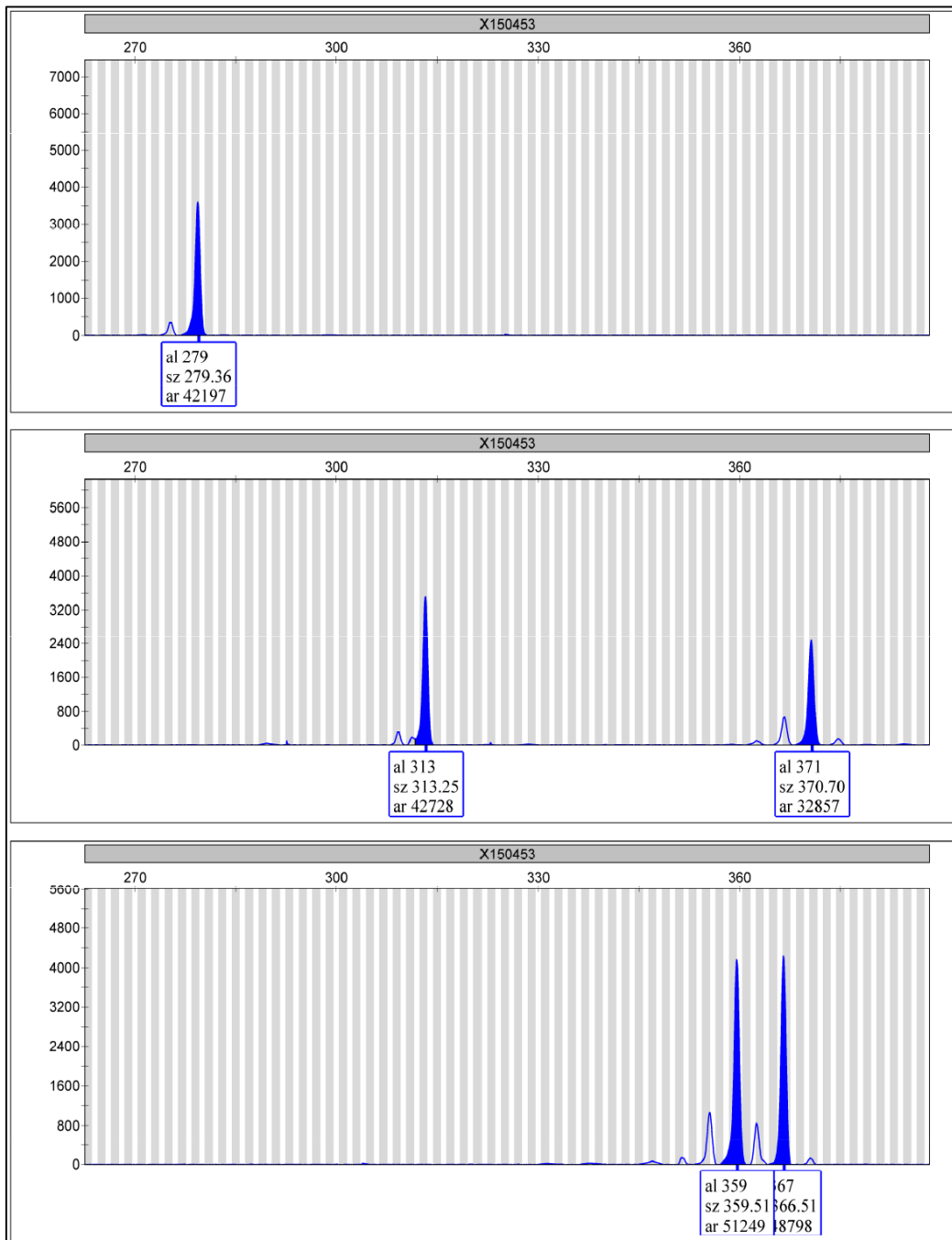


図 3. TCCC反復配列のフラグメント解析像

上が男性のDNAを用いた泳動像, 中・下が女性のDNAを用いた泳動像である.
 上図を比較することで3サンプルが本人および血縁関係にないことが見て取れる.
 男性では1本しか検出されないことから性別の判定にも有用である.

Xq28 CTTT塩基長別発生頻度

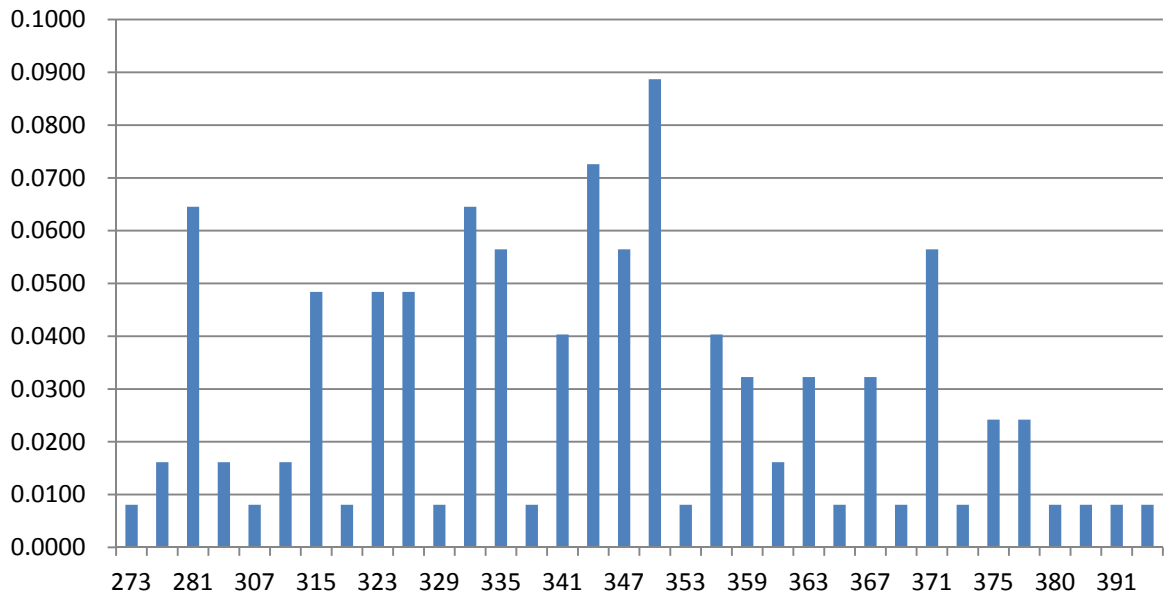


図 4. TCCC反復配列塩基長別頻度グラフ

273bp～395bpと非常に幅広いサイズの多型であることが見て取れる。最も発生頻度が高いものでも351bpの0.0887(100人中8人)にしか見られない結果であり、識別能力に優れた多型であることが分かる。

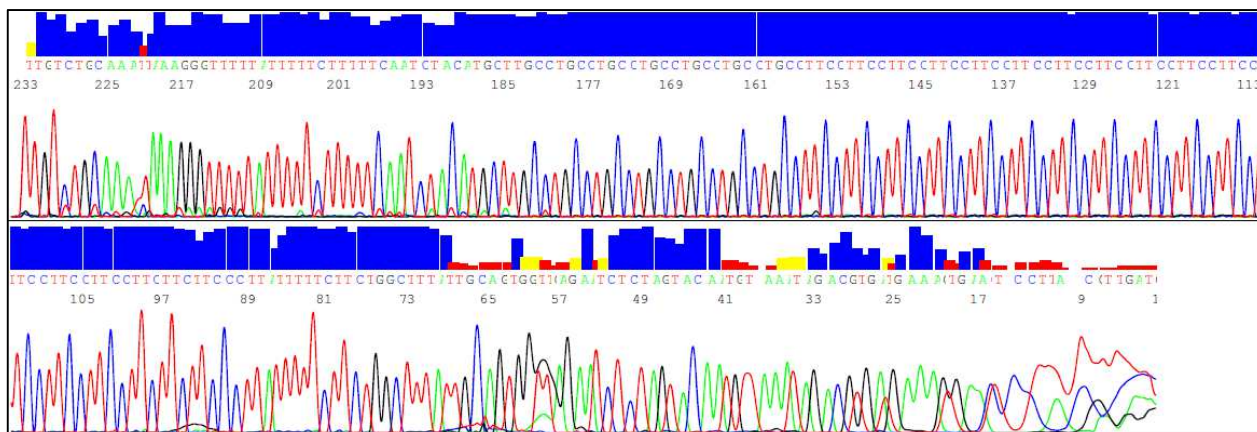


図 5. TGCC-TTCC反復配列の構造

186～155付近に見られる配列がTGCCの反復配列であり、155～100付近にまで続く配列がTTCCの反復配列である。上図ではTGCCが7反復、TTCCが13反復を見せており、塩基長別型判定では2つをトータルした20の反復配列を検出する事となる。

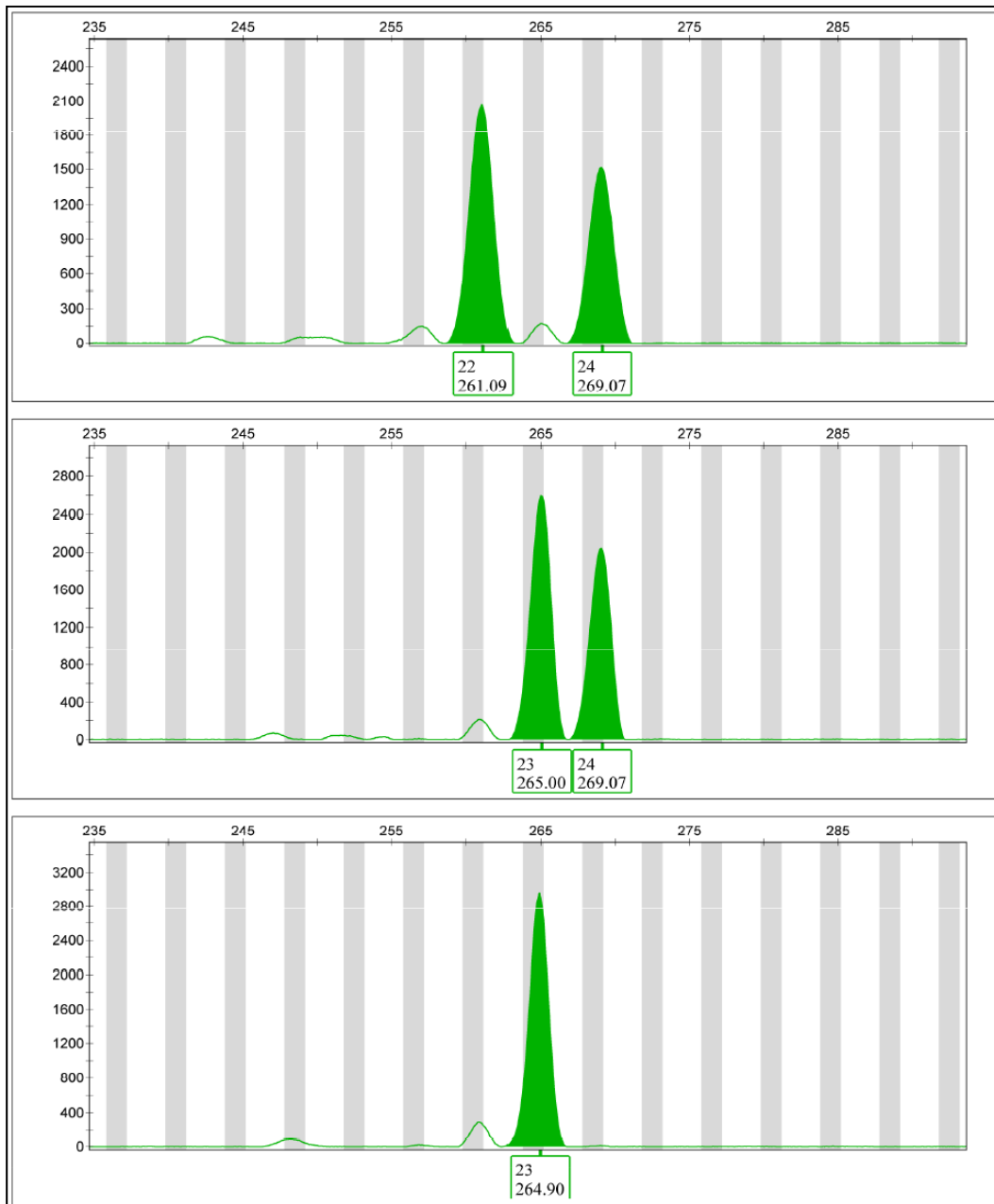


図6. TGCC-TTCC 反復配列のフラグメント解析像

TGCCとTTCCの反復合計数によって型鑑定を行う。図下23であればTGCCとTTCCの4塩基の反復配列が各々では判読できないが合計では23回繰り返されたこととなる。上図は家族間サンプルによる泳動像で上:母, 中:娘, 下:父である。母22/24, 娘 23/24, 父 23である事から母の24, 父の23が娘23/24に遺伝しており, 矛盾点は生じない。

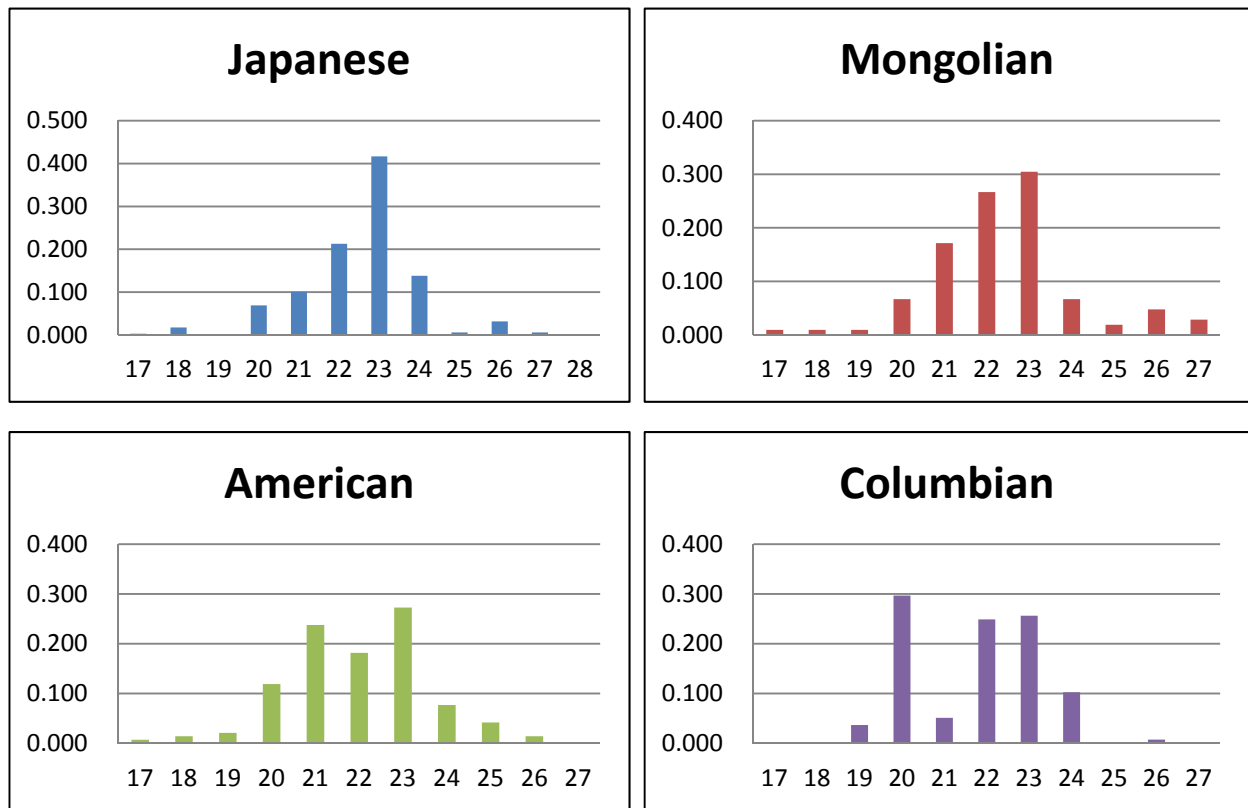


図 7. TGCC-TTCC反復配列の人種別頻度グラフ

日本人とモンゴル人は発生頻度に若干の違いはあるも一峰性の形を見せ、アメリカ人とコロンビア人は発生頻度も大きく異なる二峰性の形を示した。

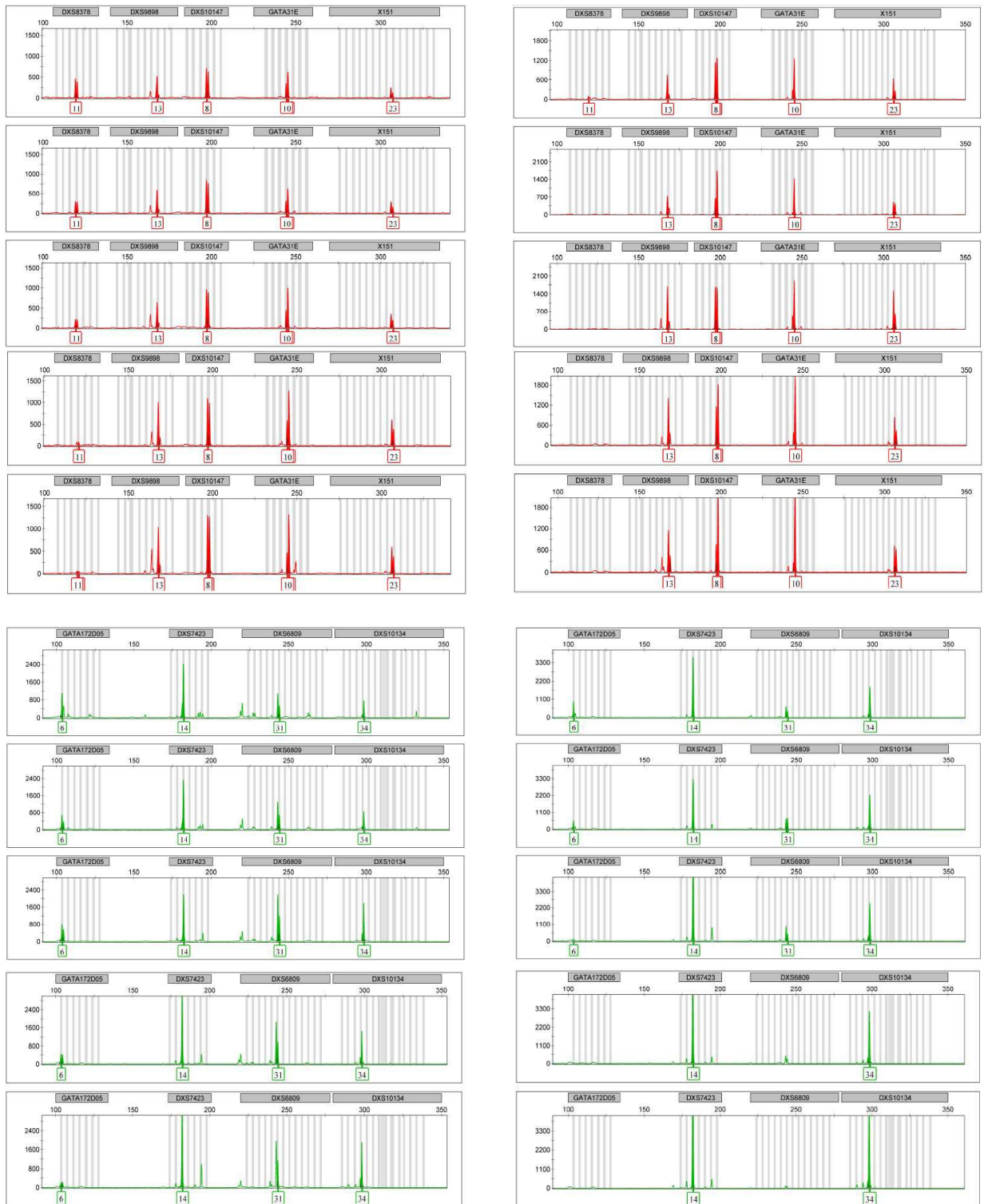


図 8. Taqポリメラーゼ及びアニーリング温度による増幅の違い

Multiplex PCR Plus Kitを用いた泳動が図左, AmpliTaq Goldを用いた泳動が図右となる. 図上がPETを付加したPrimer, 図下がVICを付加したPrimerの泳動になる. 各上下に5つに分かれているうち一番上から一番下にかけてアニーリング58°C~62°CにてPCRを行ったものとなる.

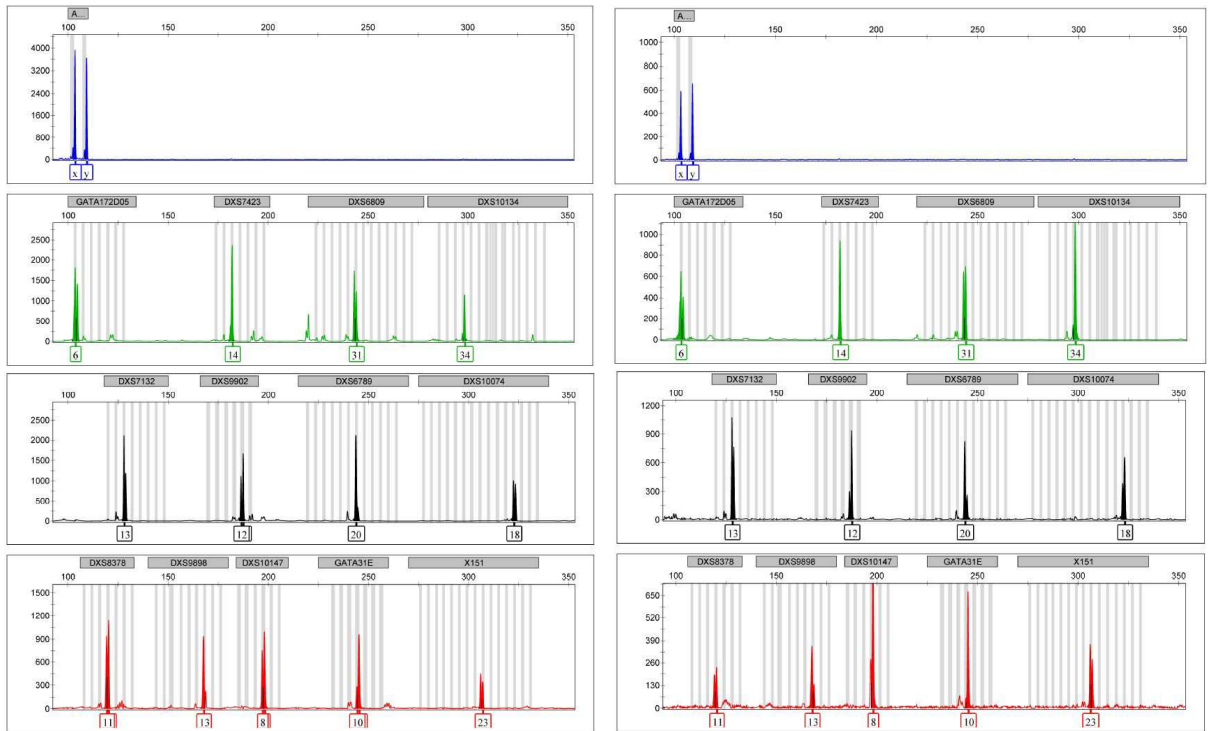


図 9. Gene Mapper 解析像

Primer濃度・PCR条件を検討した最適条件にて増幅し、Gene Mapperにて解析を行った泳動像である。PCR Multiplex PCR Plus Kitを用い調節したものが図左、AmpliTaq Goldを用いて調節したものが図右となる。

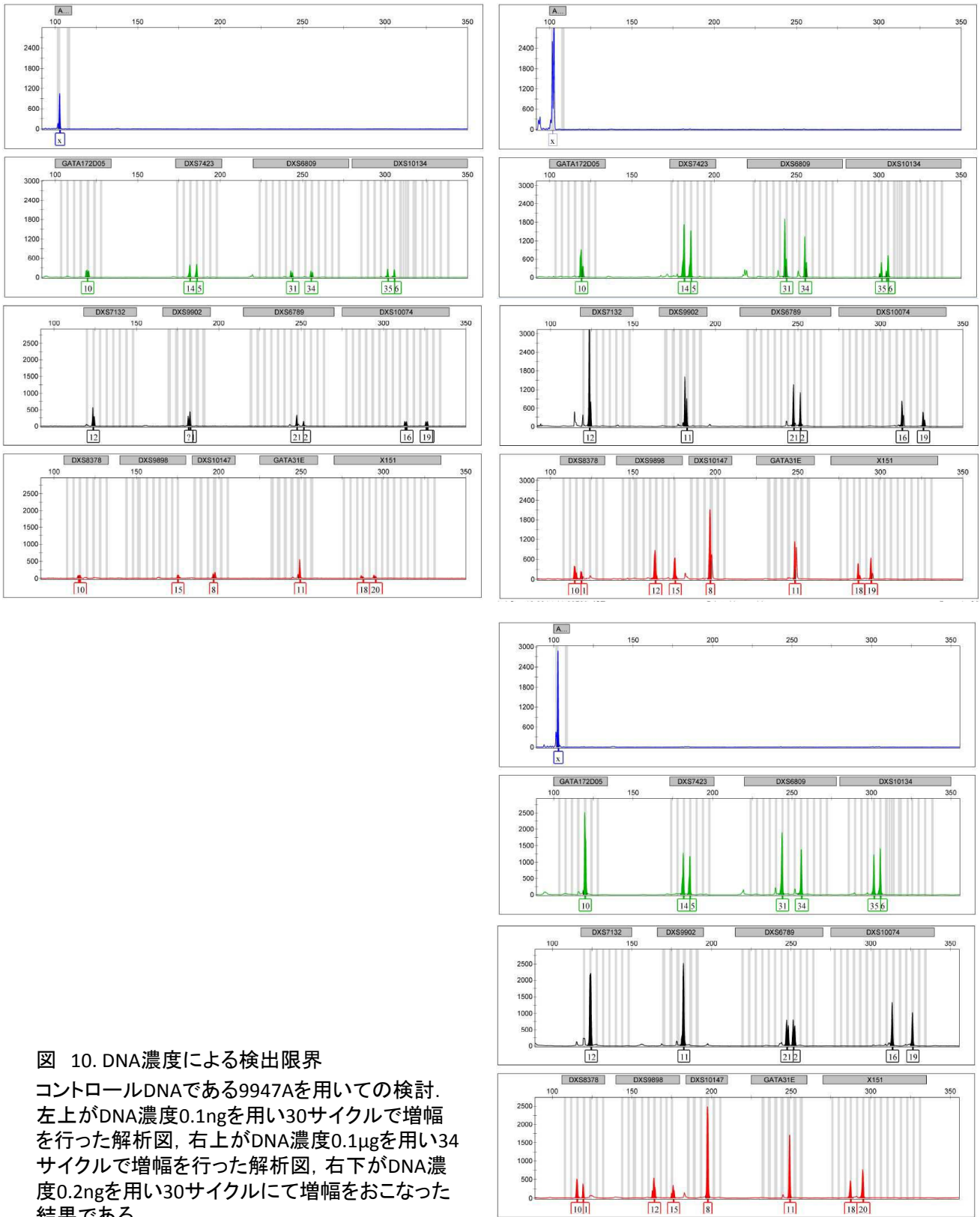


図 10. DNA濃度による検出限界
 コントロールDNAである9947Aを用いての検討。
 左上がDNA濃度0.1ngを用い30サイクルで増幅
 を行った解析図, 右上がDNA濃度0.1μgを用い34
 サイクルで増幅を行った解析図, 右下がDNA濃
 度0.2ngを用い30サイクルにて増幅をおこなった
 結果である。

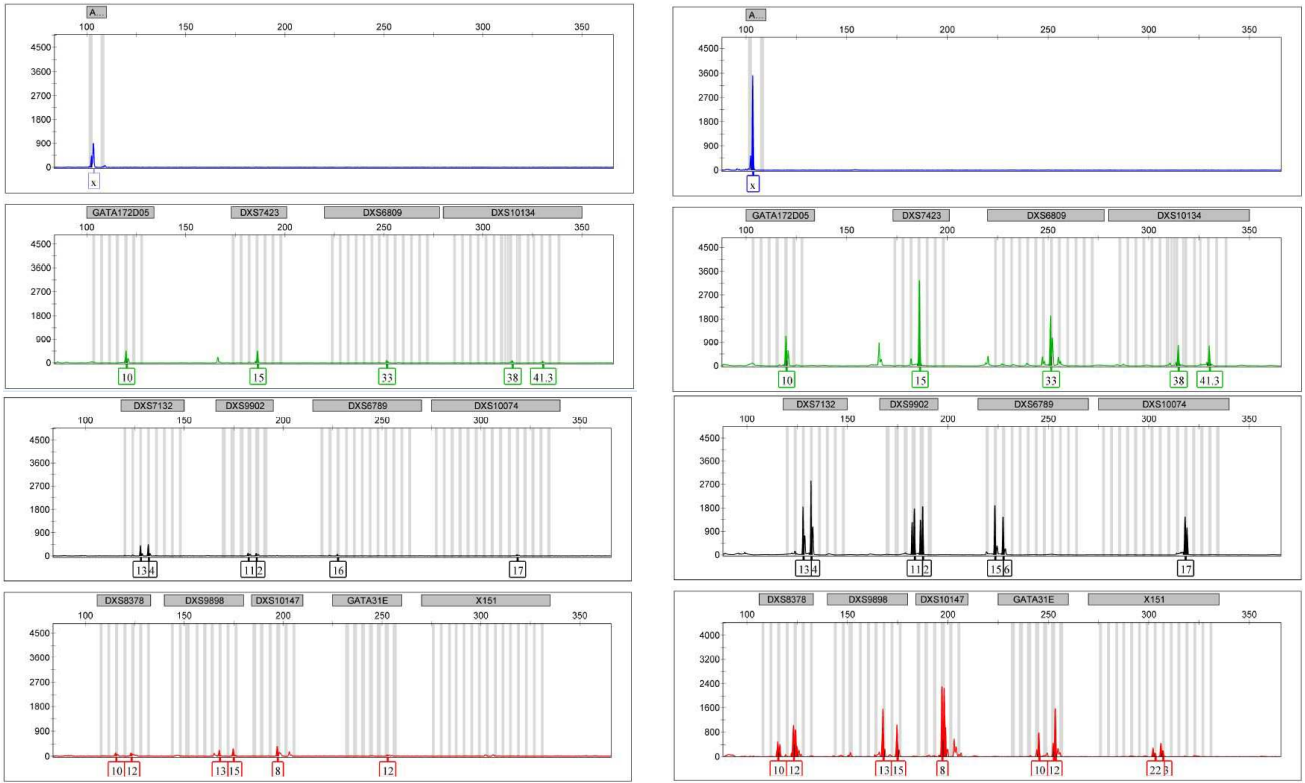


図 11. 低分子サンプルにおける検出

骨検体から抽出したDNAをもちいて行った。左図が通常条件でPCRを行ったもの、右図がサイクル数35にてPCRを行ったものになる。

謝辞

本研究を終えるにあたり、様々な御指導・ご教授を賜りました筑波大学人間総合科学研究科生命システム医学専攻法医学分野の本田克也先生、また日常の議論を通じ多くの知識や示唆を頂きました法医学研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。