—原著—

PowerPlex Fusion System による STR 型検査の法科学的評価

藤井宏治¹, 岩嶋泰樹^{1,2}, 北山哲史¹, 中原弘明¹, 水野なつ子¹, 関口和正¹¹科学警察研究所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1

²京都府警察本部刑事部科学捜査研究所

〒602-8550 京都府京都市上京区下立売通釜座東入藪ノ内町85-3, 85-4

Validation of STR typing method using a PowerPlex Fusion System for forensic purposesKoji Fujii¹, Yasuki Iwashima^{1,2}, Tetsushi Kitayama¹, Hiroaki Nakahara¹,
Natsuko Mizuno¹ and Kazumasa Sekiguchi¹¹*National Research Institute of Police Science*

6-3-1, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan

²*Forensic Science Laboratory, Kyoto Prefectural Police H.Q.*85-3, 85-4, Shimodachiuri-douri Kamanza-higashiiru Yabunoutityou,
Kamigyoku, Kyoto 602-8550, Japan

(Received 22 May 2014; accepted 6 October 2014;

Published online 7 November 2014 in J-STAGE DOI: 10.3408/jafst.683)

Because of its high usefulness and discrimination power, short tandem repeat (STR) analysis has been playing the most important role in forensic DNA examinations for more than 10 years. Recently, Promega has developed a PowerPlex Fusion system which genotypes 22 autosomal STR, Amelogenin and DYS391 loci. In this study, we validated the Fusion system for forensic purposes using the 3500 xL with a threshold value of 175 RFU and the 3130 xl with 150 RFU.

The PCR cycle was adjusted to 28 cycles to give an optimal peak height from 1 ng DNA. The reproducibility of the electrophoresis for the 3500 xL was improved by changing the run voltage from 15 kV to 13 kV. When 13 anomalous samples that tended to be designated as off ladder (OL) at D12S391 locus were injected at least 10 times, the 3500 xL with 15 kV gave the highest observation of OL, followed by the 3500 xL with 13 kV and the 3130 xl with 15 kV. Most of the spectral pull-up ratios were within 2.68% for the 3500 xL, and within 5.85% for the 3130 xl. The spectral pull-up from red (CXR-ET) to yellow (TMR-ET) was more obviously generated by the 3130 xl than by the 3500 xL. We also examined sensitivity, mixed DNA, base line noise in electrophoresis, peak height ratios, stutter ratios, 20% cut-off filter, aged bloodstains, animal DNAs, and tolerance to PCR inhibitors. We concluded that the

Fusion system could be used as a STR kit for forensic purposes. However, cautions should be taken, since 1) the inter locus and the intra color peak balances were slightly worse than those of the Identifier plus kit, 2) the loci of high molecular weight tended not to be detected in degraded samples, and 3) the OL designation was occasionally observed at the D12S391 locus especially when using the 3500 xL.

Key words: PowerPlex Fusion, Validation, 3500 xL, D12S391, STR

緒 言

STR (Short tandem repeat) は、その有用性と識別力の高さから、ここ10年以上、法科学資料からのDNA型検査法として最も重要な役割を果たしている¹⁾。日本警察では、15 STR座位およびアメロゲニン座位を検出する AmFISTR Identifier PCR amplification kit (当時、アプライドバイオシステムズ、以下「ID」)^{2,3)}が2006年から使用されており、さらに、そのキットよりも検出感度およびPCR阻害耐性を向上させた AmFISTR Identifier Plus PCR amplification kit (ライフテクノロジーズ、以下「IDP」)⁴⁻⁶⁾が2013年から使用されている。

STR型検査の結果 (STRプロファイル) は、DNAデータベースに登録・照会することで、より効果的な利用が可能となるため、各国や地域でDNAデータベースが構築・運用されており、その登録数は増加し続けている^{7,8)}。DNAデータベースの照会においては、異なる個人に由来するSTRプロファイルであっても、偶然一致する可能性がある。とりわけ、一部座位のみが検出されている現場試料のSTRプロファイルは、その登録数増加にともない、偶然一致を生じやすくすることが懸念される。偶然一致を減らすためには、登録座位の拡張が有効である。欧州の標準座位である ESS (European standard set of loci) については、もともとの7座位に5座位が追加され^{9,10)}、これらの座位を検出するキットは16座位または17座位のものが主流であるため¹¹⁻¹⁴⁾、実質的に17座位に拡張している。一方、米国の CODIS (Combined DNA Index System) については、その登録座位は、13座位から、必須20座位および推奨3座位の計23座位に拡張している^{15,16)}。CODISの登録座位拡張に対応して、最

近、PowerPlex Fusion system (プロメガ、以下「Fusion」)¹⁷⁾、Globalfiler PCR amplification kit (ライフテクノロジーズ、以下「GF」) および Globalfiler Express PCR amplification kit (ライフテクノロジーズ) が開発・市販されている。

STR型検査を含めたDNA型鑑定では、新たな検査キットや装置を導入する場合には、バリデーション (評価) を行い、その検査キットのもつ検出力などの性能を明らかにすることが重要である¹⁸⁾。著者らは、Fusionについて、日本人1,501名からなる集団データを作成し、その識別力を評価した¹⁹⁾。今回は、Fusionについて、法科学目的の検査キットとして、その性能を評価したので報告する。Fusionは、新型の3500 xL Genetic analyzer (ライフテクノロジーズ、以下「3500 xL」)、および現行の3130 xl Genetic analyzer (ライフテクノロジーズ、以下「3130 xl」) により電気泳動が可能である。今回検討した項目のうち、PCRサイクル数、検出感度、混合DNA、プルアップ比率、電気泳動のベースラインノイズ、ピーク高比率、スタター比率、スタター排除比率によるフィルターおよび20%フィルターを用いた型判定、電気泳動の再現性、ならびに陳旧血痕の検討については、Fusionの電気泳動に3500 xL および3130 xl を用いた。動物DNA およびPCR阻害耐性の検討については、泳動装置の差異は影響しないと考えられるので、Fusionの電気泳動に3500 xLのみを用いた。

材料および方法

1. 資料 DNA

ヒト資料の収集および研究は、科学警察研究所倫理審査委員会の承認を得て実施した。

1.1 ヒト DNA

成人日本人 3 名 (#01 : 男性, #02 : 女性, #03 : 男性) から採取した血液から, QIAamp DNA Investigator kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出した. 11 年および 17 年経過した 2 名分の陳旧血痕 (#01, #03)²⁰⁾ から, EZ1 DNA Investigator kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出した. 成人日本人 106 名 (男性 84 名, 女性 22 名) から採取した血液から, MagNA Pure LC (ロシュダイアグノスティックス) を用いて DNA を抽出した. 抽出 DNA は, Thermal cycler Dice real time system (タカラバイオ) を用いて, D17Z1 座位に存在する 207 bp の DNA 配列^{21,22)} を指標としたリアルタイム PCR 法により定量した. 陳旧血痕については, 207 bp を指標とした定量に加えて, 98 bp の DNA 配列²²⁾ を指標とした定量も行った. コントロール DNA として, Y-filer kit に付属の 9947A DNA (10 ng/ μ l, ライフテクノロジー), および GlobalFiler Express kit に付属の 007 DNA (2 ng/ μ l, ライフテクノロジー) を用いた.

1.2 動物 DNA

ウマ (*Equus caballus*), ヒツジ (*Ovis aries*), ウシ (*Bos taurus*), ブタ (*Sus scrofa domestica*), およびニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) の筋組織から QIAamp DNA Investigator kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出した. 抽出 DNA は, 紫外分光光度計 DU640 (ベックマン・コールター) を用いて定量した.

2. STR 型検査

2.1 PowerPlex Fusion system

Fusion を用いて, 常染色体 22 STR 座位, アメロゲニン座位および DYS391 座位を PCR 増幅した. PCR 増幅条件のうち, サイクル数については, マニュアル²³⁾に記載の条件は 30 サイクルであるが, 今回, 特に記載のない場合は, 28 サイクルで PCR 増幅を行った. これ以外の温度条件および反応時間, ならびに PCR 反応液の組成および液量 (25 μ l) は, マニュアル²³⁾にしたがった. PCR 増幅は, GeneAmp PCR system 9700 (ライフテクノロジー) を Max Mode で使用して実施した.

電気泳動には, 3500 xL および/または 3130 xl を

用いた. 両装置ともに, 蛍光色素の補正に必要なスペクトラルキャリブレーションには, PowerPlex 5-Dye Matrix Standards, 3100/3130 (プロメガ) を用いた. PCR 産物またはアレルックラダーマーカ (Fusion に付属) 1 μ l を, CC5 ILS500 (Fusion に付属) 1 μ l, および Hi-Di ホルムアミド 10 μ l (ライフテクノロジー) と混合し, 95°C で 3 分間加熱後, 冷却して電気泳動に用いた. 3500 xL による電気泳動では, マニュアル²³⁾に記載の条件のとおりに, PCR 産物を 1.2 kV で 24 秒間インジェクションした. 3500 xL の泳動電圧については, マニュアル²³⁾に記載の条件は 15 kV であるが, ライフテクノロジーの STR 型検査キットでは, 装置デフォルト値の 15 kV から 13 kV に変更することで, 電気泳動の再現性が向上すると報告されている²⁴⁾. 泳動電圧については, 以下, 特に記載がない場合には, 3500 xL の泳動電圧を 15 kV とし, 電気泳動の再現性の検討では, 泳動電圧として 13 kV および 15 kV を検討した. 3130 xl による電気泳動については, マニュアル²³⁾に記載の条件は, PCR 産物を 3 kV で 5 秒間インジェクションし, 15 kV で電気泳動するものであるが, 今回, インジェクション時間のみをライフテクノロジーの STR 型検査キットと同じ 10 秒に変更して, 電気泳動を行った.

データ解析には, GeneMapper ID-X software version 1.4 (以下「GM-IDX」) を用いた. 解析に必要なファイルのうち, パネルファイルについては, PowerPlex_Fusion_Panels_IDX_v1.0 に, アメロゲニクロスチェックの情報を付加したものを用いた. ビンファイルについては, PowerPlex_Fusion_Bins_IDX_v1.0 に, 日本人 1,501 名分の試料で観察されたオフラダーアレル¹⁹⁾に対応するバーチャルビンを追加するようにプロメガに依頼し, 作成されたものを用いた. また, 座位ごとのスタター排除比率 (Marker specific stutter ratio, 以下「MSSR」) を定義したスタターファイルについては, PowerPlex_Fusion_Stutter_IDX_v1.0 をもとに, 上記のパネルファイルおよびビンファイルに対応させたものを用いた. ピークの検出閾値として, マニュアル²³⁾には, 通常, 3130 xl では 50~150 RFU, 3500 xL では 175 RFU と記載されている. 3500 xL により得られ

た泳動ファイルは、特に記載がない限り、検出閾値をマニュアルに記載された175 RFUにより解析した。また、3130 xlにより得られ泳動ファイルは、特に記載がない限り、マニュアルに記載された検出閾値の範囲内にあり、かつIDやIDP^{5,6)}を3130 xLにより泳動した場合に用いてきた検出閾値である150 RFUにより解析した。3500 xLには、装置間、キャピラリー間およびインジェクション間でのシグナルのばらつきを補正するために、サイズスタンダードのピーク高を利用してサンプルのピーク高を補正するノーマライゼーションという機能がある²⁵⁾。しかし、ノーマライゼーションは、サイズスタンダードとしてGS600 LIZ v2 (ライフテクノロジーズ)を用いた場合にのみ有効であり、Fusionで採用されているCC5 ILS500では無効であるため、今回の検討ではノーマライゼーションを行わない条件で解析した。

2.2 Identifiler Plus kit

IDPによるPCR増幅は、マニュアル²⁶⁾にしたがい、GeneAmp PCR system 9700 (ライフテクノロジーズ)を9600 Emulation modeで使用し、反応液量25 μ lで行った。電気泳動は、3130 xlを用いて、マニュアル²⁶⁾にしたがって行った。GM-IDXによる解析では、検出閾値を150 RFUとした。

3. PCR サイクル数

2名分の抽出DNA (#02, #03)、ならびに2種類のコントロールDNA (9947A, 007)を用いた。計4種類のDNAについて、1 ngの鋳型DNAを用い、各1回ずつ28サイクル、29サイクルおよび30サイクルでFusionによりPCR増幅した。電気泳動は、3500 xLおよび3130 xlにより行った。

4. 検出感度

2名分の抽出DNA (#02, #03)、および2種類のコントロールDNA (9947A, 007)を用いた。計4種類のDNAについて、TE⁻⁴バッファー (ライフテクノロジーズ)を用いて希釈し、最終鋳型量が2 ng, 1 ng, 0.5 ng, 0.25 ng, 0.125 ng, 0.0625 ng, 0.03125 ngになるように希釈DNA溶液を10 μ l加えて、Fusionにより各5回ずつPCR増幅した。それぞれの鋳型量について、計20例のデータが得られることになる。電気泳動は、3500 xLおよび3130 xl

により行った。各鋳型量について、試料由来の全アレルが検出された例数を集計した。

5. 混合DNA

2名分の抽出DNA (#02, #03)を、混合比率100 : 0, 97.5 : 2.5, 95 : 5, 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50, 40 : 60, 30 : 70, 20 : 80, 10 : 90, 5 : 95, 2.5 : 97.5, 0 : 100で混合し、これら混合DNA溶液を総鋳型DNA量が1 ngになるように加えて、Fusionにより各3回ずつPCR増幅した。電気泳動は、3500 xLおよび3130 xlにより行った。2種類のコントロールDNA (9947A, 007)についても、同様の実験を行った。混合比率40 : 60, 30 : 70, 20 : 80, 10 : 90, 5 : 95, 2.5 : 97.5, 0 : 100の結果は、60 : 40, 70 : 30, 80 : 20, 90 : 10, 95 : 5, 97.5 : 2.5, 100 : 0の結果に統合した。それぞれの装置ごとに、各混合比率について、計12例のデータが得られることになる (ただし、50 : 50は計6例)。電気泳動は、3500 xLおよび3130 xlにより行った。混合比率50 : 50～97.5 : 2.5についてはメジャー成分およびマイナー成分の全アレルが検出された例数を、混合比率100 : 0についてはメジャー成分の全アレルが検出された例数を、それぞれ集計した。

6. プルアップ比率

プルアップピークは、光学的特性のために、その元となる親ピークから他色に生じるノイズピークである。一般的に、プルアップピークは、親ピークが高くなるにつれて生じやすくなる。また、プルアップピークの程度は、泳動装置の種類およびキットで採用されている蛍光色素の種類によっても異なる。

「4. 検出感度」の検討に用いたFusionのPCR産物を、3500 xLおよび3130 xlにより、それぞれ4回ずつインジェクションして電気泳動した。得られた泳動データは、GM-IDXを用いて、3500 xLについては50 RFU, 3130 xlについては20 RFUで解析し、Sizing TableをCSVファイルにエクスポートした。鋳型DNA量が2 ng, 1 ng, 0.5 ngの解析結果について、その試料が本来もつピーク (親ピーク)の前後 $\pm$ 1 bpに観察された他色ピークのうち、マイナスおよびプラススターの位置 (D1S1656座位ではさらに-2 bpの位置) にないピークをプルアップピークとした。ただし、親ピークが高すぎて光

学的に飽和している場合には、その親ピークの高さは、本来の高さよりもかなり低く検出されている可能性があり、このようなデータを用いると、正しいプルアップ比率は算出されなくなる。そこで、GM-**INDEX**において親ピークの座位がオフスケール (OS) していると認識され、かつ、親ピークの高さが、3500 xL では 24,000 RFU 以上、3130 xl では 6,000 RFU 以上の場合には、そのプルアップピークは、プルアップ比率の算出から除外した。プルアップピークについて、プルアップ比率 (プルアップピークの高さ÷親ピークの高さ) を算出した。

7. 電気泳動のベースラインノイズ

DNA を加えずに Fusion により PCR 増幅して得られた 8 個のネガティブコントロールを、3500 xL では 24 ウェルに配置して各 2 回ずつインジェクションし、3130 xl では 16 ウェルに配置して各 3 回ずつインジェクションして、それぞれ電気泳動した。得られた泳動データについて、閾値 1 RFU で GM-**INDEX** により解析し、Sizing Table を CSV ファイルにエクスポートした。CSV ファイルについて、蛍光色素ごとに、B : 80~477.9 bp, G : 73~461 bp, Y : 69~495 bp, および R : 72~472 bp にあるノイズピークのうち、サイズマーカーの CC5 ILS500 に含まれるピークの前後 ± 2 bp を除いたものを用いて、以下の 4 種類の方法²⁷⁻²⁹⁾で、検出閾値 (Analytical threshold, 以下「AT」) を算出した。

方法 1 : $AT_1 = Mean + 3 \times SD$

Mean : ノイズピークの高さの平均

SD : ノイズピークの高さの標準偏差

方法 2 : $AT_2 = Mean + t_{\alpha,v} \times SD / \sqrt{n}$

Mean : ノイズピークの高さの平均

$t_{\alpha,v}$: 有意水準 α , 自由度 v のスチューデント t 値 (片側)

SD : ノイズピークの高さの標準偏差

n : サンプル数

方法 3 : $AT_3 = 2 \times (Max - Min)$

Max : ノイズピークの高さの最大値

Min : ノイズピークの高さの最小値

方法 4 : $AT_4 = Mean + 10 \times SD$

Mean : ノイズピークの高さの平均

SD : ノイズピークの高さの標準偏差

8. 各ピーク高比率およびスタターなどのピーク比率

106 名分のうち、95 名分の抽出 DNA 1 ng を用いて、Fusion により PCR 増幅し、3500 xL および 3130 xl により電気泳動した。GM-**INDEX** による解析において、サンプルオフスケール (以下「SOS」) であると認識された泳動データは、光学系飽和のため、本来のピーク高よりも低く検出されている可能性がある。また、3500 xL と 3130 xl のデータ数が同じである方が、両者の比較が容易になる。そこで、3500 xL と 3130 xl のどちらか片方、または両方で SOS と認識された試料番号のデータについては、解析から除外した。以下の各項目について、対応ある t 検定により、3500 xL から得られた値と 3130 xl から得られた値の差を検定した。検定には、エクセル 2010 の分析ツールに含まれる「 t 検定：一対の標本による平均の検定」を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とし、複数 (n) の組合せを比較した場合には、有意水準をボンフェローニ補正 ($p < 0.05/n$) した。

8.1 ヘテロ接合体ピーク高比率

座位内のピークバランスを検討するため、ヘテロ接合体の試料について、ヘテロ接合体ピーク高比率 (座位内の低いピークの高さ÷座位内の高いピークの高さ) を算出した。

8.2 蛍光色素内ピーク高比率および座位間ピーク高比率

座位ごとにホモ接合体では 1 本のピーク高の半分 の値を、ヘテロ接合体では 2 本のピークの高さの平均値を算出して、補正ヘテロ接合体ピーク高とした。なお、DYS391 座位は、Y 染色体に存在し男性であれば通常 1 本のピークだけが検出されるが、そのコピー数は常染色体 STR 座位のヘテロ接合体のアレル 1 個分に相当すると考えられる。そこで、DYS391 座位では、検出された 1 本のピーク高を補正ヘテロ接合体ピーク高とした。

補正ヘテロ接合体ピーク高を用いて、蛍光色素 (Fluorescein, JOE, TMR-ET, CXR-ET) ごとに蛍光色素内ピーク高比率 (補正ヘテロ接合体ピーク高の最小値÷補正ヘテロ接合体ピーク高の最大値) を算出した。同様に、STR プロファイル全体で座位間ピーク高比率 (補正ヘテロピーク高の最小値÷補

正ヘテロ接合体ピーク高の最大値)を算出した。

8.3 スターなどのピーク比率

スターは、STR 座位を PCR 増幅したときに、繰り返し配列がずれて伸長することによって生じるアーティファクトピークである³⁰⁾。最も生じやすいスターは、その元となるアレルから 1 回繰り返し小さい PCR 産物 (以下「マイナススター」) である。しかし、マニュアル²³⁾には、Fusion に含まれる STR 座位では、マイナススター以外にも、1 回繰り返しが大きい PCR 産物 (以下「プラススター」) や、一部座位でアレルよりもそれぞれ、3 塩基短い PCR 産物 (以下「-3 bp ピーク」)、2 塩基短い PCR 産物 (以下「-2 bp ピーク」)、および 1 塩基短い PCR 産物 (以下「-1 bp ピーク」) が生じる可能性があると記載されている。今回の検討では、これらのスターなどのピーク比率 (スターなどのピーク高÷その元となるアレルのピーク高) を算出することとした。GM-IDX による解析は、MSSR によるフィルターを無効にし、検出閾値を、3500 xL では 50 RFU、3130 xl では 20 RFU として行った。なお、プルアップと思われるピークは、マイナススターの位置にある場合を除いて、GM-IDX において、そのラベルを手作動で削除した。

9. スター排除比率によるフィルターおよび20%フィルターを用いた型判定

上記「8. 各ピーク高比率およびスターなどのピーク比率」で得られた95例分の Fusion の電気泳動データについて、GM-IDX により、通常のスター排除比率によるフィルターを用いた条件 (以下「MSSR フィルター」)、ならびに Global cut off value および Amelogenin cut off value に 0.2 を用いた条件 (以下「20%フィルター」) により、それぞれ解析した。20%フィルターを用いた場合、座位ごとに最大高ピークの20%以下の高さのピークは排除されることになる。得られた型判定結果を、既報¹⁹⁾にて Fusion により型判定した結果と比較し、スターやプルアップなどのノイズピークを除去する効果を検討した。

10. 電気泳動の再現性

泳動電圧が Fusion の電気泳動の再現性に及ぼす

影響を検討するため、3500 xL については、泳動電圧 13 kV (以下「3500 xL_13 kV」) および 15 kV (以下「3500 xL_15 kV」) で電気泳動した。また、3130 xl については泳動電圧 15 kV (以下「3130 xl_15 kV」) で電気泳動した。

10.1 アレリックラダーマーカー

Fusion のアレリックラダーマーカーを、3500 xL では 24 ウェル、3130 xl では 16 ウェルに、それぞれ配置し、10 回ずつインジェクションして電気泳動した。得られたデータを用いて、アレリックラダーマーカーに含まれる 367 種類のアレルについて、1 回のインジェクションごとに塩基数の標準偏差を算出した。

10.2 D12S391 座位において OL 判定されやすいアレルを含む試料

既報¹⁹⁾にて日本人 1,501 名分の試料から 2 回ずつ型判定を行ったときに、D12S391 座位において 2 回ともオフラダー「以下 (OL)」が観察された 1 試料、および、どちらか 1 回で OL が観察された 10 試料、ならびに上記「9. スター排除比率によるフィルターおよび 20% フィルターを用いた型判定」の検討において、D12S391 座位で OL が観察された場合には、その試料を、それぞれ Fusion で PCR 増幅し、電気泳動した。電気泳動は複数回行い、それぞれの試料について、Sizing quality (SQ) などに問題がない泳動データを、10 個以上得た。それぞれのアレルの塩基数の平均と標準偏差を算出し、OL 判定された数を集計した。また、このときに得られたアレリックラダーマーカーについて、D12S391 座位に含まれる各アレルの塩基数の平均と標準偏差を算出した。

11. 陳旧血痕

11 年および 17 年経過した陳旧血痕から抽出した DNA について、D17Z1 領域の 98 bp の DNA 配列を指標とした定量値で 1 ng を用いて、Fusion および IDP により PCR 増幅した。Fusion の PCR 産物は 3500 xL および 3130 xl、ならびに IDP の PCR 産物は 3130 xl を用いて、それぞれ電気泳動した。

12. 動物 DNA

ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタ、およびニワトリの抽出 DNA 10 ng を用いて、Fusion および IDP によ

り PCR 増幅した。Fusion の PCR 産物は3500 xL, および IDP の PCR 産物は3130 xl を用いて, それぞれ電気泳動した。

13. PCR 阻害耐性

ヘマチン³¹⁾, フミン酸³²⁾およびデニム^{33,34)}は, 代表的な PCR 阻害物質であり, 現場試料から DNA 抽出をした場合に DNA 抽出液に混入する可能性があることから, これらの物質が Fusion の PCR 増幅に及ぼす影響を検討した。

13.1 ヘマチンおよびフミン酸

ヘマチン (シグマ・アルドリッチ) については, 0.1 N NaOH 水溶液に溶解し, 100 mM のストック溶液を作製した。このストック溶液を TE⁻⁴ バッファーで希釈し, PCR 反応液25 μ l 中での最終濃度が 0, 125, 250, 500, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 μ M となるような希釈系列を作製した。

フミン酸 (和光純薬) については, 0.1 N NaOH 水溶液に溶解し, 25 mg/ml のストック液を作製した。このストック溶液を TE⁻⁴ バッファーで希釈し, PCR 反応液25 μ l 中での最終濃度が 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 ng/ μ l となるような希釈系列を作製した。

各希釈液 1 μ l を PCR 反応液に加え, 鋳型として 9947A DNA 1 ng を, Fusion および IDP により PCR 増幅した。なお, NaOH が PCR 増幅に悪影響を及ぼさないことを確認するため, 0.1 N NaOH 1 μ l を PCR 反応液に加え, 鋳型として 9947A DNA 1 ng を, Fusion および IDP により PCR 増幅した。Fusion の PCR 産物は3500 xL, および IDP の PCR 産物は3130 xl を用いて, それぞれ電気泳動した。

13.2 デニム抽出液

大きさ約0.5 cm $\times$ 0.5 cm のデニム布を, Auto-Mate Express (ライフテクノロジーズ) および PrepFiler Express Forensic DNA Extraction kit (ライフテクノロジーズ)³⁵⁾を用いて抽出操作を行い, デニム抽出液を作製した。Fusion については, PCR 反応液に添加可能な液量は最大15 μ l であるため, デニム抽出液 0, 1, 2, 4, 8, 14 μ l を PCR 反応液に加え, 鋳型として 9947A DNA 1 ng を PCR 増幅した。IDP については, PCR 増幅に添加可能な液

量は最大10 μ l であるため, デニム抽出液 0, 1, 2, 4, 8 μ l を PCR 反応液に加え, 鋳型として 9947A DNA 1 ng を PCR 増幅した。Fusion の PCR 産物は3500 xL, および IDP の PCR 産物は3130 xl を用いて, それぞれ電気泳動した。

結 果

1. PCR サイクル数

標準的な鋳型量である 1 ng を用いて, 29 サイクルおよび30 サイクルで PCR 増幅し, 3500 xL および3130 xl により電気泳動したところ, 全体的にピークが高すぎて, いずれも 4 例中 4 例でブルアップなどのノイズピークが検出された。1 ng を28 サイクルで PCR 増幅した場合, 3500 xL により電気泳動した 4 例中 1 例で D21S11 座位に MSSR を超えたマイナススターが検出されたものの, それ以外にはノイズピークは観察されなかった。したがって, 本キットの PCR 増幅には, 28 サイクルが適していると考え, 以下の検討は28 サイクルで行った。

2. 検出感度

3500 xL については, 各20例のうち, 全アレルが検出されたのは, 0.125 ng では15例 (75%), 0.25 ng 以上ではいずれも20例 (100%) であり, 鋳型量が0.5 ng 以上の試料では, MSSR を超えたスターやブルアップに由来するノイズピークが検出された。一方, 3130 xl については, 各20例のうち, 全アレルが検出されたのは, 0.25 ng では18例 (90%), および0.5 ng 以上ではいずれも20例 (100%) であり, 鋳型量を 2 ng にした場合は, ノイズピークが検出された。検出限界は, 3500 xL では0.125 ng, 3130 xl では0.25 ng 程度であり, 3500 xL の方が高い検出感度を示した (Table 1)。これらの検出感度は, IDP の検出感度 (0.25 ng 程度)⁵⁾と比べて大きな差はなく, STR 型検査法としては適正なものである。

3. 混合 DNA

3500 xL については, 各12例のうち, マイナー成分固有の全アレルが検出されたのは, 混合比率70 : 30では12例 (100%), 80 : 20では10例 (83.3%), および90 : 10では4例 (33.3%) であり, 混合比率95 : 5 および97.5 : 2.5では, 各12例とも, マイナー

Table 1 Sensitivity of a PowerPlex Fusion system (n = 20).

DNA amount (ng)	Number of full profile(s)	
	3500xL	3130xl
2	20(19) ^{a)}	20(10) ^{a)}
1	20(2) ^{a)}	20
0.5	20(2) ^{a)}	20
0.25	20	18
0.125	15	0
0.0625	0	0
0.03125	0	0

^{a)} The number in the parenthesis is the number of full profiles with extra noise peak(s).

成分の一部アレルが検出されなかった. 3130 xl については, 各12例のうち, マイナー成分固有の全アレルが検出されたのは, 混合比率70 : 30では12例(100%), 80 : 20では7例(58.3%), および90 : 10では2例(16.7%)であり, 混合比率95 : 5では, 12例ともマイナー成分の一部アレルが検出されず, 混合比率97.5 : 2.5では, 9例(75%)でマイナー成分の一部アレルが検出されず, 残りの3例(25%)ではメジャー成分との共有アレルを除いて, マイナー成分のアレルはすべて検出されなかった. なお, 混合比率100 : 0では, 3500 xL および3130 xl ともに, 12例(100%)すべてから単独由来の全アレルが検出されたが, 3500 xL による3例(25%)では, ノイズピークも検出された. 混合DNAの検討においても, 3500 xL は3130 xl よりも, ノイズピークは検出されたものの, 高い検出能力を示した(Table 2).

4. プルアップ比率

計240例の泳動データを, 3500 xL では閾値50 RFU, および3130 xl では閾値20 RFU で解析し, 算出したプルアップ比率の度数分布図を Fig. 1 に示した. 3500 xL では, プルアップ比率は, 平均 $0.963 \pm 0.433\%$, 中央値0.890%であり, プルアップ比率が0.50~0.75%の範囲に最も多い968個のプルアップピークが観察された. 3500 xL で観察された全プルアップピーク3,808個のうち, 3,806個(99.95%)ではプルアップ比率が2.68%以下であり, 残りの2個は, プルアップ比率7.32%(B :

Table 2 The ability of a PowerPlex Fusion system to detect minor component from mixed DNA.

Mixture ratio	Number of mixed DNA	Number of profiles without allele drop-out ^{a)}	
		3500xL	3130xl
50 : 50	6	6(4) ^{b)}	6(1) ^{b)}
60 : 40	12	12(2) ^{b)}	12
70 : 30	12	12(5) ^{b)}	12
80 : 20	12	10(6) ^{b)}	7
90 : 10	12	4(1) ^{b)}	2
95 : 5	12	0	0
97.5 : 2.5	12	0	0
100 : 0	12	12(3) ^{c)}	12

The PCR amplification was performed from a total of 1 ng of the mixed DNA.

^{a)} The number of the profiles that showed all the peaks of the major and the minor DNA components.

^{b)} The number in the parenthesis is the number of the profiles that showed all the peaks of the major and the minor DNA components with extra noise peak(s).

^{c)} The number in the parenthesis is the number of the profiles that showed all the peaks of the major DNA component with extra noise peak(s).

Fluorescein から R : CXR-ET) および9.40%(Y : TMR-ET から G : JOE) のピークとして離散的に観察された. 3130 xl では, プルアップ比率は, 平均 $1.51 \pm 1.00\%$, 中央値1.22%であり, プルアップ比率0.50~0.75%の範囲に最も多い953個のプルアップピークが観察された. 3130 xl で観察されたプルアップピーク(全4,734個)は, その比率が最大5.85%(R : CXR-ET から Y : TMR-ET)であり, その分布は二峰性を示し, プルアップ比率3.75~4.00%の範囲で, 極大となる103個のプルアップピークが観察された. 3130 xl では, プルアップ比率3.00~6.00%の範囲に, 467個のプルアップピークが観察されたが, このうち, 465(99.6%)個は R (CXR-ET) から Y (TMR-ET) へのプルアップであった.

5. 電気泳動のベースラインノイズ

ネガティブコントロールで観察されたノイズピークのピーク高をもとにして, 4種類の方法で AT を算出したところ, 3500 xL および3130 xl ともに, 方

Fig. 1 Spectral pull – up ratio obtained by a PowerPlex Fusion system using the 3500 xL (a) and the 3130 xl (b). Two extracted DNAs (Individuals #02 and #03) and two control DNAs (9947A and 007) were amplified using 2 ng, 1 ng and 0.5 ng in five times. Each of the PCR products was electrophoresed on both the instruments four times to get a total of 240 run data for each instrument. The run data were analyzed with a threshold value of 50 RFU (relative fluoresce unit) for the 3500 xL and 20 RFU for the 3130 xl. The spectral pull-up ratio was calculated by dividing the peak heights of the pull-up peaks with those of their parent peaks.

法 3 (AT₃) が最も高い値を示した。ピークの検出閾値として、マニュアル²³⁾には、通常、3130 xl では 50～150 RFU、3500 xL では 175 RFU と記載されている。今回算出された AT は、いずれも 3500 xL では 175 RFU 未満、および 3130 xl では 50 RFU 未満であり、マニュアル²³⁾に記載された検出閾値よりも低いものであった (Table 3)。

6. 各ピーク高比率およびスタターなどのピーク比率

95 名分の抽出 DNA 1 ng を用いて PCR 増幅し、

3500 xL および 3130 xl により電気泳動した。3500 xL では 95 例すべてが SOS を示さなかったが、3130 xl では 6 例が SOS を示した。この 6 例を除いた 89 例について、両装置から得られたデータを解析した。

ヘテロ接合体ピーク比率については、両装置からほぼ同じ値が得られたため、3500 xL の結果のみを Table 4 に示した。座位ごとのヘテロ接合体ピーク比率の平均値は、3500 xL では 85.1～90.4% であり

Table 3 Analytical threshold estimated from a total of 48 injection data of negative controls of the PCR reactions with no addition of DNA template when using a PowerPlex Fusion system.

Instrument	Color (Dye)	Noise peak detected			Analytical threshold estimated (RFU)			
		N ^{a)}	Peak height (RFU)		AT ₁ ^{b)}	AT ₂ ^{c)}	AT ₃ ^{d)}	AT ₄ ^{e)}
			Mean	SD				
3500xL	B (Fluorescein)	9,046	3.57	3.67	15	5	90	41
	G (JOE)	9,878	6.16	2.40	14	7	124	31
	Y (TMR-ET)	10,773	8.39	3.07	18	10	86	40
	R (CXR-ET)	10,222	9.85	3.36	20	12	110	44
3130xl	B (Fluorescein)	12,109	3.00	1.72	9	4	46	21
	G (JOE)	11,965	2.68	1.44	7	4	46	18
	Y (TMR-ET)	13,869	4.24	1.57	9	5	36	20
	R (CXR-ET)	12,719	3.32	1.37	8	4	32	17

a) The number of noise peaks observed with a threshold value of 1 relative fluorescence unit (RFU).

b) $AT_1 = \text{Mean} + 3 \times \text{SD}$.

c) $AT_2 = \text{Mean} + t_{\alpha, v} \times \text{SD} / n^{1/2} = \text{Mean} + t_{0.05, 48-1} \times \text{SD} / 48^{1/2}$, where $t_{\alpha, v}$ is the student-t value with a given confidential value (α) and a degree of freedom (v).

d) $AT_3 = 2 \times (\text{Maximum peak height} - \text{Minimum peak height}) = 2 \times (\text{Maximum peak height} - 0)$.

e) $AT_4 = \text{Mean} + 10 \times \text{SD}$.

(Table 4), 3130 xl では84.5～90.4%あった。座位間ピーク高比率の平均値は、3500 xL では38.1%，3130 xl では50.5%であり、3500 xL の値は3130 xl よりも有意に低いものであった ($p < 0.001$, Fig. 2)。蛍光色素内ピーク高比率については、3500 xL および3130 xl から得られた平均値は、B (Fluorescein) では59.4%および67.8%，R (CXR-ET) では51.3%および59.1%であり、これらの色素については、3500 xL の方が有意に低い値を示した (いずれも $p < 0.001$)。G (JOE) および Y (TMR-ET) については、3500 xL と3130 xl の間で有意な差は観察されなかった (Fig. 2)。

スタターなどのピーク比率については、両装置からはほぼ同じ値が得られたため、3500 xL の結果のみを Table 5～Table 9 に示した。マイナススタターについては、その比率の最大値は、TH01 座位では4.9%，D19S433座位では11.8%，D22S1045座位では17.7%であり、これらは、プロメガ¹⁷⁾が設定している MSSR よりも高い値であった。それ以外の座位では、マイナススタターの最大値は、MSSR の範囲内であった (Table 5)。プラススタターについては、MSSR が8.6%に設定されている D22S1045座位では、105本のプラススタターが観察されたもの

の、その比率の最大値7.0%は、MSSR の範囲内であった。D22S1045以外の座位では、プラススタターの排除比率が設定されていないが、D10S1248座位を除いて、いずれの座位からも複数のプラススタターが観察され、その最大値はTPOX 座位で観察された5.8%であった (Table 6)。-3 bp ピークについては、TH01 座位、vWA 座位およびD12S391座位で、複数のピークが観察された (Table 7)。-2 bp ピークについては、MSSR が3.6%に設定されている D1S1656座位では、95本の-2 bp ピークが観察されたが、その比率の最大値2.7%はMSSR の範囲内であった。それ以外にも、D21S11座位、D8S1179座位およびD19S433座位から複数の-2 bp ピークが観察された (Table 8)。また、-1 bp ピークについては、アメロゲニン座位で17本が観察され、その比率の最大値は3.2%であった (Table 9)。Fusion で生じるアーティファクトピークとして、マニュアル²³⁾には、マイナススタターおよびプラススタターのほかに、-2 bp ピークおよび+2 bp ピークがD1S1656座位、D13S317座位、D18S51座位、D21S11座位、D7S820座位、D5S818座位、D12S391座位およびD19S433座位に、-1 bp ピークがアメロゲニン座位およびD2S441座位に、なら

Table 4 Heterozygote peak height ratio obtained from 89 samples using a PowerPlex Fusion system with the 3500xL.

Locus	N ^{b)}	Heterozygote peak height ratio ^{a)} (%)				
		Mean	Median	SD	Min	Max
AMEL	68	88.7	91.3	8.8	54.9	99.8
D3S1358	64	88.9	90.9	7.8	69.2	99.8
D1S1656	74	89.1	90.8	8.7	62.3	100.0
D2S441	67	89.2	91.3	8.8	60.5	99.7
D10S1248	72	88.8	90.1	8.0	64.1	99.8
D13S317	81	88.1	88.8	8.7	66.5	100.0
Penta E	82	87.0	87.5	8.4	62.3	99.8
D16S539	65	90.2	92.2	7.8	56.9	99.9
D18S51	76	86.7	87.0	7.5	67.1	99.7
D2S1338	79	86.7	88.8	9.4	63.5	99.6
CSF1PO	61	88.3	89.3	9.1	58.8	99.8
Penta D	72	89.6	91.5	8.5	57.7	99.5
TH01	58	89.5	90.8	8.1	65.9	99.9
vWA	69	90.4	91.2	7.5	66.9	100.0
D21S11	72	87.1	88.3	9.1	56.8	99.9
D7S820	68	88.4	87.9	8.2	66.8	99.6
D5S818	72	87.8	89.0	8.7	60.1	99.4
TPOX	51	87.5	88.3	8.9	67.5	99.9
D8S1179	76	88.0	89.2	8.1	63.1	99.7
D12S391	78	86.8	89.1	8.6	59.3	99.3
D19S433	70	88.1	89.6	9.8	53.0	100.0
FGA	78	88.7	91.0	8.7	62.0	99.6
D22S1045	69	85.1	86.4	10.6	52.8	100.0

The PCR amplification was performed from 1 ng of template DNA extracted from fresh blood liquid.

a) The peak height of the lower peak was divided by that of the higher peak.

b) The number of heterozygous samples at a given locus.

びに、-3 bp ピークが D12S391 座位に、それぞれ観察される可能性がある」と記載されている。今回の検討でスタターなどのアーティファクトピークが観察された座位は、マニュアルに記載された座位とおおむね一致した。

7. スタター排除比率によるフィルターおよび20%フィルターを用いた型判定

95名分の抽出 DNA 1 ng を用いて PCR 増幅し、3500 xL および 3130 xl により電気泳動した。本項目の検討には、3130 xl により SOS と判定された 6 例

Fig. 2 Inter locus balance and intra color balance that were obtained from 89 samples using a PowerPlex Fusion system with the 3500 xL (a) and with the 3130 xl (b). The PCR amplification was performed from 95 samples using 1 ng of template DNA; however, 6 samples were omitted due to sample off-scale when electrophoresed on a 3130 xl Genetic analyzer. The box shows the 25th and 75th percentile of the data, and the center line in the box shows the median. The whisker shows the range of the data. ILB: Inter locus balance. B, G, Y and R: Intra locus balance of each dye.

も含めた。通常条件である MSSR フィルターにより解析した場合には、スタターやプルアップなどのノイズピーク、および OL が検出されなかった例数は、3500 xL では63例 (66.3%)、3130 xl では88例 (92.6%) であった。20%フィルターにより解析した場合、ノイズや OL が検出されない例数は、3500 xL では94例 (98.9%)、3130 xl では93例 (97.9%) に向上した。このうち、3130 xl による 1 例では、20%フィルターを用いても排除されないプルアップピークが検出された。なお、D12S391 座位において、既報¹⁹⁾では18, 23型と判定された 1 試料 (試料 K) が、今回、3500 xL により18, OL 型と判定され、既報¹⁹⁾にて19, 20型と判定された 1 試料 (試料 A) が、今回、3130 xl により19, OL 型と判定された (Table 10)。

8. 電気泳動の再現性

アレリックラダーに含まれる各アレルについて1回のインジェクションごとに塩基数の標準偏差を算

Table 5 The ratio of the minus stutter peak obtained from 89 samples using a PowerPlex Fusion system with the 3500xL.

Locus	N ^{b)}	Peak height ratio of minus stutter ^{a)} (%)						MSSR ^{c)}
		Mean	Median	SD	Min	Max	Mean + 3SD	
D3S1358	108	7.0	6.7	1.1	4.4	10.9	10.3	11.9
D1S1656	141	8.2	8.2	1.9	3.9	13.0	13.8	14.2
D2S441	122	4.5	4.5	1.3	1.7	7.8	8.4	9.2
D10S1248	120	6.8	6.4	1.2	4.9	9.9	10.3	12.4
D13S317	114	4.1	4.5	1.8	1.0	8.9	9.6	9.8
Penta E	137	3.3	3.1	1.2	1.5	7.5	7.0	7.6
D16S539	130	4.8	4.4	1.3	3.0	8.1	8.7	10.2
D18S51	142	7.0	6.7	2.0	3.2	13.5	12.9	14.6
D2S1338	151	7.3	7.3	1.6	4.0	11.4	12.1	13.9
CSF1PO	121	5.0	4.9	1.3	2.0	8.7	8.9	9.5
Penta D	72	1.5	1.5	0.5	0.6	2.5	2.8	6.8
TH01	107	2.6	2.6	0.9	0.9	4.9	5.4	4.6
vWA	109	5.7	5.9	1.8	0.8	9.1	11.1	11.2
D21S11	137	7.3	7.2	1.2	4.0	11.2	10.7	11.6
D7S820	128	4.5	4.6	1.4	1.7	7.6	8.6	11.0
D5S818	132	4.3	4.1	1.6	1.3	9.3	9.1	9.5
TPOX	105	2.4	2.4	0.9	1.0	4.0	5.0	5.5
DYS391	68	5.1	4.9	0.8	2.9	7.2	7.4	8.7
D8S1179	137	6.5	6.4	1.3	4.1	10.9	10.3	10.9
D12S391	141	8.1	7.7	2.2	3.4	13.6	14.6	15.8
D19S433	127	5.9	5.6	1.3	4.1	11.8	9.8	11.0
FGA	149	6.3	6.2	1.6	3.2	10.5	11.0	12.1
D22S1045	131	8.0	8.3	3.5	2.4	17.7	18.5	16.4

The PCR amplification was performed from 1 ng of template DNA extracted from fresh blood liquid.

^{a)} The peak height of the minus stutter peak (one repeat unit shorter than the allele peak) was divided by that of the allele peak. The repeat unit is 3 bp for D22S1045 locus, 5 bp for Penta E and Penta D loci, and 4 bp for the remaining loci.

^{b)} The number of the minus stutter peaks observed using the 3500xL with a threshold value of 50 relative fluorescence unit (RFU).

^{c)} The marker specific stutter ratio provided by Promega.

出したところ、3500 xL_13 kV では0.088 bp 以下 (D2S1338座位の25型アレルが最大)、3500 xL_15 kV では0.072 bp 以下 (FGA 座位の18型アレルが最大値)、3130 xl_15 kV では0.078 bp 以下 (Penta D 座位の15型アレル) であった。これらの値は、これまで Fusion のアレリックラダーを3500 xL および 3130 xl により泳動して得られた標準偏差 (最大0.1 bp)¹⁷⁾ よりも少し小さいものであった。また、今回の検討で得られた標準偏差を3倍した値は、いずれも、再現性の指標となっている0.5 bp より小さいものであった。標準偏差の中央値は、3500 xL_15 kV、

3500 xl_13 kV、および3130 xl_15 kV の順に小さくなる傾向を示し、標準偏差の1/4分位数や3/4分位数が表す範囲についても、この順に狭くなる傾向を示した (Fig. 3)。

D12S391座位において OL 判定されやすいアレルを含む試料として、既報¹⁹⁾で報告した11試料、および今回、「7. スタター排除比率によるフィルターおよび20%フィルターを用いた型判定」の検討で OL 判定された2試料を、それぞれ1回ずつPCR増幅し、各試料について10個以上の泳動データを得た。D12S391座位について、アレリックラダーマー

Table 6 The ratio of the plus stutter peak obtained from 89 samples using a PowerPlex Fusion system with the 3500xL.

Locus	N ^{b)}	Peak height ratio of plus stutter ^{a)} (%)						MSSR ^{c)}
		Mean	Median	SD	Min	Max	Mean + 3SD	
D3S1358	4	1.0	0.8	0.4	0.6	1.6	2.3	
D1S1656	29	1.6	1.3	0.9	0.9	5.6	4.3	
D2S441	11	0.9	0.9	0.2	0.6	1.2	1.5	
D10S1248	0							
D13S317	5	1.8	1.8	0.8	0.8	2.6	4.1	
Penta E	4	2.5	2.5	1.1	1.5	3.5	5.8	
D16S539	26	1.0	0.9	0.9	0.4	5.4	3.8	
D18S51	20	1.5	1.2	1.2	0.4	5.2	5.0	
D2S1338	4	0.9	0.9	0.2	0.7	1.2	1.6	
CSF1PO	19	0.9	0.9	0.3	0.4	1.6	2.0	
Penta D	2	0.8	0.8	0.3	0.6	1.1	1.8	
TH01	6	2.2	2.0	1.1	0.9	3.9	5.4	
vWA	5	1.5	1.4	0.4	1.0	2.1	2.8	
D21S11	18	1.3	1.2	0.4	0.8	2.1	2.6	
D7S820	6	1.1	0.9	0.9	0.4	2.9	3.9	
D5S818	19	1.4	1.1	0.8	0.4	3.2	3.7	
TPOX	6	2.0	1.5	1.9	0.8	5.8	7.7	
DYS391	3	2.1	1.7	0.8	1.5	3.0	4.6	
D8S1179	61	1.0	0.9	0.4	0.4	2.7	2.2	
D12S391	16	1.7	1.3	0.9	0.7	4.2	4.2	
D19S433	2	1.3	1.3	0.8	0.7	1.8	3.6	
FGA	21	1.4	1.2	0.7	0.5	3.8	3.6	
D22S1045	105	3.9	4.1	1.5	1.3	7.0	8.3	8.6

The PCR amplification was performed from 1 ng of template DNA extracted from fresh blood liquid.

^{a)} The peak height of the plus stutter peak (one repeat unit longer than the allele peak) was divided by that of the allele peak. The repeat unit is 3 bp for D22S1045 locus, 5 bp for Penta E and Penta D loci, and 4 bp for the remaining loci.

^{b)} The number of the plus stutter peaks observed using the 3500xL with a threshold value of 50 relative fluorescence unit (RFU).

^{c)} The marker specific stutter ratio provided by Promega. The blanks in this columns mean that their values are not defined.

カーに含まれる各アレルの塩基数を Table 11 に示し、OL 判定されやすいアレルの塩基数および OL 判定数を Table 12 に示した。OL 判定された合計数は、3500 xL_15 k (56/151, 37.1%), 3500 xL_13 kV (23/151, 15.2%), および 3130 xL_15 kV (5/176, 2.8%) の順に小さくなる傾向を示した。また、OL 判定の割合は、試料により大きく異なっていた (Table 12)。OL 判定されやすいアレルの塩基数の平均値 (Table 12) は、アレリックラダーマーカーの対応アレルの塩基数の平均値 (Table 11) よりも、必

ず大きい値を示し、その平均値の差は最大値で、試料 L の 25 型アレルが 3500 xL_13 kV で示した +0.56 bp (180.65 bp–180.09 bp) であった。

9. 陳旧血痕

Fusion および IDP とともに、フラグメントサイズが、11 年経過血痕では約 250 bp を、17 年経過血痕 2 例では約 160 bp を、それぞれ超えると、ピークが低下してアレルが検出されにくくなる傾向を示した (Fig. 4)。正判定された座位数について、Fusion を 3500 xL および 3130 xL、ならびに IDP を 3130 xL で

Table 7 The ratio of the 3 bp shorter artifact peak for 23 loci obtained from 89 samples using a PowerPlex Fusion system with the 3500xL.

Locus ^{b)}	N ^{c)}	Peak height ratio of 3 bp shorter artifact peak ^{a)} (%)						MSSR ^{d)}
		Mean	Median	SD	Min	Max	Mean + 3SD	
AMEL	1	1.4	1.4	— ^{e)}	1.4	1.4	— ^{e)}	
TH01	3	0.7	0.6	0.3	0.5	1.0	1.6	
vWA	5	0.8	0.8	0.2	0.6	1.0	1.3	
D12S391	8	0.8	0.8	0.1	0.5	0.9	1.2	

The PCR amplification was performed from 1 ng of template DNA extracted from fresh blood liquid.

^{a)} The peak height of the 3 bp shorter artifact peak than the allele peak was divided by that of the allele peak.

^{b)} Only the loci with $N \geq 1$ are shown.

^{c)} The number of the artifact peaks observed using the 3500xL with a threshold value of 50 relative fluorescence unit (RFU).

^{d)} The marker specific stutter ratio provided by Promega. The values are not defined at all the loci.

^{e)} The standard deviation (SD) was not calculated since $N = 1$.

Table 8 The ratio of the 2 bp shorter artifact peak obtained from 89 samples using a PowerPlex Fusion system with the 3500xL.

Locus ^{b)}	N ^{c)}	Peak height ratio of 2 bp shorter artifact peak ^{a)} (%)						MSSR ^{d)}
		Mean	Median	SD	Min	Max	Mean + 3SD	
D1S1656	95	1.9	1.9	0.3	1.1	2.7	2.8	3.6
D21S11	16	1.7	1.6	0.8	0.6	3.1	3.9	
D7S820	1	1.3	1.3	— ^{e)}	1.3	1.3	— ^{e)}	
D5S818	1	0.9	0.9	— ^{e)}	0.9	0.9	— ^{e)}	
D8S1179	2	0.9	0.9	0.1	0.8	1.0	1.2	
D19S433	3	1.7	1.9	0.5	1.2	2.1	3.2	

The PCR amplification was performed from 1 ng of template DNA extracted from fresh blood liquid.

^{a)} The peak height of the 2 bp shorter artifact peak than the allele peak was divided by that of the allele peak.

^{b)} Only the loci with $N \geq 1$ are shown.

^{c)} The number of the artifact peaks observed using the 3500xL with a threshold value of 50 relative fluorescence unit (RFU).

^{d)} The marker specific stutter ratio provided by Promega. The blanks in this columns mean that their values are not defined.

^{e)} The standard deviation (SD) was not calculated since $N = 1$.

電気泳動した結果を比較した (Table 13). 陳旧血痕 4 例いずれについても, Fusion と 3500 xL の組合せにおいて, 正判定座位数が最大であった. また, 24座位中の正判定座位の割合は, 陳旧血痕 4 例のうち, Fusion と 3500 xL の組合せでは 3 例, IDP では 1 例で, それぞれ最大であった. 逆に, 正判定されなかった座位数は, 陳旧血痕 4 例いずれについても, Fusion と 3130 xl の組合せで最大であり, Fusion と 3500 xL の組合せ, IDP の順に少なくなった. なお, 3500 xL (検出閾値 175 RFU) は, 3130

xl (検出閾値 150 RFU) よりも検出感度が高いため, 陳旧血痕 4 例のいずれについても, Fusion を 3500 xL で電気泳動した方が, Fusion を 3130 xl で電気泳動した場合よりも, 高い正判定座位数を示した.

10. 動物 DNA

Fusion では, ヒトを除いたいずれの動物 DNA から, 3500 xL の検出閾値である 175 RFU 以上のピークは観察されなかった. なお, 検出閾値以下のピークとして, ブタでは, G : JOE に高さ 65 RFU, フラグメントサイズ 365.17 bp の低いピーク

Table 9 The ratio of the 1 bp shorter artifact peak obtained from 89 samples using a PowerPlex Fusion system with the 3500xL.

Locus ^{b)}	N ^{c)}	Peak height ratio of 1 bp shorter artifact peak ^{a)} (%)					
		Mean	Median	SD	Min	Max	MSSR ^{d)}
AMEL	17	1.3	1.1	0.6	0.7	3.2	3.1

The PCR amplification was performed from 1 ng of template DNA extracted from fresh blood liquid.

a) The peak height of the 1 bp shorter artifact peak than the allele peak was divided by that of the allele peak.

b) Only the locus with N $\geq$ 1 is shown.

c) The number of the artifact peaks observed at Amelogenin locus using the 3500xL with a threshold value of 50 relative fluorescence unit (RFU).

d) The marker specific stutter ratio provided by Promega. The values are not defined at all the loci including Amelogenin locus.

Table 10 Effect of two kinds of analysis filters on the typing results of 95 samples using a PowerPlex Fusion system.

Instrument	Filter	No noise ^{a)}	Noise ^{b)}	Off-ladder ^{c)}
3500xL	MSSR ^{d)}	63 (66.3%)	31 (32.6%)	1 (1.1%)
	20% ^{e)}	94 (98.9%)	0 (0.0%)	1 (1.1%)
3130xl	MSSR ^{d)}	88 (92.6%)	6 (6.3%)	1 (1.1%)
	20% ^{e)}	93 (97.9%)	1 (1.1%)	1 (1.1%)

The PCR amplification was performed from 1 ng of template DNA extracted from fresh blood liquid.

a) All the alleles in a profile were typed correctly without extra noise peak(s).

b) Extra noise peak(s) such as stutter peak(s) or spectral pull-up peak(s) was observed.

c) An off-ladder peak due to mobility shift was observed at D12S391 locus by the 3500xL in one sample and by the 3130xl in another sample.

d) The marker-specific stutter ratio provided by Promega was applied as a cut-off filter.

e) A 20% cut-off filter was applied. This filter removes minor peaks with heights less than or equal to 20% of the height of the highest peak at a given locus.

が観察され、このフラグメントサイズは、これまで報告されているもの (約365 bp)¹⁷⁾と一致した。

IDP では、これまで報告されているとおり、ウシ、ヒツジ、ウマ、およびブタから、アメロゲニン座位において、X 型アレルの低分子側にピーク^{6,36)}が観察された (Fig. 5)。

11. PCR 阻害耐性

11.1 ヘマチン

Fusion については、1,000 μ M までのヘマチン存在下では、PCR 阻害は観察されず、9947A DNA

に由来する全アレルが検出された。2,000 μ M 以上では PCR 阻害が観察され、2,000 μ M では9947 A の全アレルが検出されたもののピーク高の低下が観察され、3,000 μ M では一部アレルが、4,000 μ M では全アレルが、それぞれ検出されなかった。このことは、これまでの報告¹⁷⁾とおおむね一致した。一方、IDP では、1,000 μ M 以上で PCR 阻害が観察された。なお、ヘマチン、およびフミン酸の可溶化に用いた0.1 N NaOH 水溶液 1 μ l を、Fusion および IDP の PCR 反応液に添加しても、PCR 阻害によるピーク高の低下は観察されなかった (Fig. 6)。

11.2 フミン酸

Fusion については、200 ng/ μ l までのフミン酸存在下では、PCR 阻害は観察されず、9947A DNA に由来する全アレルが検出された。300 ng/ μ l 以上では PCR 阻害が観察され、300 ng/ μ l および400 ng/ μ l では9947A DNA の一部アレルが、500 ng/ μ l では全アレルが、それぞれ検出されなかった。このことは、これまでの報告¹⁷⁾とおおむね一致した。一方、IDP では、200 ng/ μ l 以上で PCR 阻害が観察された (Fig. 7)。

11.3 デニム抽出液

Fusion については、デニム抽出液の添加量が 4 μ l までは、ピーク高の大きな低下は観察されず、9947A DNA に由来する全アレルが検出された。また、Fusion では、添加量が 8 μ l および14 μ l になると、ピーク高の低下が観察され、8 μ l では全アレルが検出されたものの、14 μ l では全アレルが検出されなかった。一方、IDP では、添加量が 4 μ l 以上

Fig. 3 Reproducibility of electrophoresis using a PowerPlex Fusion system with the 3500 xL at 13 kV (a) and 15 kV (b) and with the 3130 xl at 15 kV (c). The allelic ladder was added to 24 wells in a plate for the 3500 xL and on 16 wells for the 3130 xl, and electrophoresed 10 times on both the instruments. The run voltage was set at 13 kV (a) and 15 kV (b) for the 3500 xl and at 15 kV (c) for the 3130 xl. Standard deviation was calculated for each allele of each locus within one injection. The box shows the 25th and 75th percentile of the data, and the center line in the box shows the median. The whisker shows the range of the data.

Table 11 The mobility of the allelic ladder of a PowerPlex Fusion system at D12S391 locus.

Allele in allelic ladder	3500_13 kV ^{a)}			3500_15 kV ^{a)}			3130_15 kV ^{a)}		
	N of ^{b)} runs	Size (bp)		N of ^{b)} runs	Size (bp)		N of ^{b)} runs	Size (bp)	
		Mean	SD		Mean	SD		Mean	SD
14	12	135.78	0.030	13	135.75	0.069	14	136.21	0.021
15	12	139.80	0.044	13	139.79	0.065	14	140.26	0.033
16	12	143.87	0.045	13	143.85	0.070	14	144.32	0.025
17	12	147.89	0.043	13	147.87	0.067	14	148.38	0.029
17.3	12	150.88	0.026	13	150.88	0.075	14	151.37	0.027
18	12	151.91	0.041	13	151.91	0.065	14	152.42	0.030
18.3	12	154.91	0.032	13	154.91	0.079	14	155.41	0.027
19	12	155.95	0.039	13	155.93	0.071	14	156.46	0.033
20	12	159.99	0.035	13	159.96	0.077	14	160.50	0.018
21	12	164.01	0.026	13	163.98	0.058	14	164.51	0.030
22	12	168.04	0.026	13	168.00	0.054	14	168.53	0.029
23	12	172.15	0.042	13	172.12	0.048	14	172.66	0.027
24	12	176.16	0.044	13	176.13	0.045	14	176.65	0.032
25	12	180.09	0.000	13	180.08	0.055	14	180.62	0.034
26	12	184.17	0.038	13	184.12	0.040	14	184.65	0.029
27	12	188.16	0.046	13	188.13	0.051	14	188.67	0.024

The runs of the allelic ladder in this table were used to designate the samples shown in the Table 12.

a) The run voltage was set at 13 kV and 15 kV for the 3500xL, and at 15 kV for the 3130xl.

b) The number of runs used for calculating the mean and the standard deviation of the measured fragment size is shown.

Table 12 The mobility of the alleles that tended to be designated as off-ladder at D12S391 locus using a PowerPlex Fusion system.

Sample ID	Allele type	3500xL_13 kV ^{a)}				3500xL_15 kV ^{a)}				3130xl_15 kV ^{a)}			
		N of ^{b)} runs	Size (bp)		N of ^{c)} OL	N of ^{b)} runs	Size (bp)		N of ^{c)} OL	N of ^{b)} runs	Size (bp)		N of ^{c)} OL
			Mean	SD			Mean	SD			Mean	SD	
A	20	12	160.31	0.047	0 (0.0%)	12	160.31	0.056	0 (0.0%)	14	160.76	0.038	0 (0.0%)
B	22	12	168.50	0.019	1 (8.3%)	13	168.49	0.072	7 (53.8%)	14	168.95	0.026	0 (0.0%)
C	22	10	168.50	0.021	1 (10.0%)	11	168.47	0.050	6 (54.5%)	13	168.94	0.030	0 (0.0%)
D	22	12	168.50	0.021	0 (0.0%)	11	168.49	0.046	4 (36.4%)	13	168.97	0.029	0 (0.0%)
E	22	12	168.50	0.023	1 (8.3%)	12	168.51	0.036	7 (58.3%)	14	168.94	0.022	0 (0.0%)
F	22	12	168.50	0.045	3 (25.0%)	12	168.48	0.058	4 (33.3%)	13	168.94	0.034	0 (0.0%)
G	22	12	168.50	0.047	1 (8.3%)	11	168.47	0.053	2 (18.2%)	13	168.94	0.024	0 (0.0%)
H	22	11	168.51	0.026	1 (9.1%)	13	168.48	0.045	6 (46.2%)	14	168.95	0.020	0 (0.0%)
I	22	12	168.51	0.032	1 (8.3%)	10	168.47	0.015	3 (30.0%)	13	168.95	0.023	0 (0.0%)
J	22	12	168.52	0.026	2 (16.7%)	11	168.49	0.053	5 (45.5%)	14	169.00	0.028	3 (21.4%)
K	23	12	172.41	0.031	0 (0.0%)	12	172.39	0.035	0 (0.0%)	14	172.83	0.031	0 (0.0%)
L	25	10	180.65	0.043	10 (100%)	12	180.62	0.046	9 (75.0%)	13	181.08	0.032	2 (15.4%)
M	26	12	184.61	0.032	2 (16.7%)	11	184.59	0.066	3 (27.3%)	14	185.06	0.026	0 (0.0%)

The PCR amplification was performed from 1 ng of template DNA extracted from fresh blood liquid.

a) The run voltage was set at 13 kV and 15 kV for the 3500xL, and at 15 kV for the 3130xl.

b) The number of runs used to calculate the mean and the standard deviation of the measured fragment size is shown.

c) The number of off-ladder designation is shown.

Fig. 4 Electropherograms of aged bloodstain (#01) obtained by a PowerPlex Fusion system (a, b) and by an AmpFISTR Identifiler plus kit (c). DNA was extracted from aged bloodstains (11Y; 11 years old and 17Y; 17 years old) using an EZ1 DNA Investigator kit. The DNA quantity was measured in a real time PCR assay using the 98 bp fragment of the D17Z1 locus. The PCR amplification was performed from 1 ng of each DNA. The PCR product was electrophoresed on the 3500 xL (a), or on the 3130 xl (b, c). The DNA extracted from fresh blood liquid (FB) was also amplified as a control.

になると、PCR 阻害が観察された (Fig. 8).

考 察

Fusion を法科学目的の検査キットとして使用するために、その検査条件の検討、および検出力などの性能の評価を行った。

PCR サイクル数については、マニュアル²³⁾には 30 サイクルと記載されており、メーカーの性能評価¹⁷⁾も 30 サイクルで行われている。しかし、今回、鋳型 1 ng を用いた場合にはピークが高すぎたために、適正なピーク高が得られる 28 サイクルが最適と考えられた。

3500 xL での泳動電圧については、装置のデフォルト値が 15 kV であるため、IDP³⁷⁾では 15 kV に設定されており、Fusion のマニュアル²³⁾にも 15 kV と記載されている。しかし、泳動電圧を下げることで移動度の再現性が向上するため²⁴⁾、新型キットの GF³⁸⁾では、3500 xL の泳動電圧は 13 kV に設定されている。今回の検討では、3500 xL の泳動電圧を 15 kV から 13 kV にすることで、アレリックラダーマーカーの移動度の再現性は向上し (Fig. 3, Table 11), D12S391 座位で OL 判定されやすいアレルを含む試料についても、その塩基数の標準偏差が小さくなり、数字で表される通常のアレルとして判定される割合が増加した (Table 12)。フラグメントサイズの範囲について、Fusion (69~495 bp) は、GF (75~444 bp) よりも、その最大サイズが約 50 bp 大きくなっている。一般的に、電気泳動では、フラグメントサイズが大きくなるにつれて、その再現性が少しずつ失われていく。今回、アレリックラダーマーカーを電気泳動した結果でも、フラグメントサイズが大きい座位では、塩基数の標準偏差が大きくなる傾向を示している (Fig. 3)。GF よりもフラグメントサイズが少し大きい Fusion を 3500 xL で泳動するためには、泳動電圧を 13 kV に設定し、GF と同様に移動度の再現性を向上させる必要があった。

キャピラリー電気泳動による STR 型検査では、PCR 産物を高度に変性させた状態で電気泳動しているため、塩基配列の違いは移動度に影響しないとされている³⁹⁾。しかし、最近、D12S391 座位では、

Table 13 The number of loci typed correctly from aged bloodstains using a PowerPlex Fusion system and an AmFISTR Identifiler plus kit (IDP).

Individual	Year	Number of loci typed correctly		
		Fusion		IDP
		3500xL	3130xl	3130xl
#01	17	10/24 (41.6%)	8/24 (33.3%)	4/16 (25.0%)
#03	17	9/24 (37.5%)	8/24 (33.3%)	5/16 (31.3%)
#01	11	15/24 (62.5%)	11/24 (45.8%)	12/16 (75.0%)
#03	11	14/24 (58.3%)	10/24 (41.7%)	9/16 (56.3%)

The PCR amplification was performed from 1 ng of template DNA quantified in a real time PCR assay using the 98 bp fragment of the D17Z1 locus.

Fig. 5 Electropherograms of animal DNA obtained by a PowerPlex Fusion system (a) and by an AmpFISTR Identifiler plus kit (b). DNA was extracted from the muscle tissue of each animal using a QIAamp DNA Investigator kit, and quantified with a UV spectrophotometer of a DU640. The PCR amplification was performed from 10 ng of each animal DNA, or 1 ng of a human DNA (9947A DNA). The PCR product was electrophoresed on the 3500 xL (a), or on the 3130 xl (b).

同鎖長アレルであっても，繰り返し単位の“AGAT”と“AGAC”の回数の組合せにより，電気泳動の移動度が異なると報告されている⁴⁰⁾．今回，OL判定されやすいアレルから算出された塩基数は，3500 xL および3130 xl のいずれで電気泳動し

た場合でも，アレリックラダーマーカの塩基数よりも，必ず大きい方にずれていた (Table 11～12)．D12S391座位でOL判定されやすいアレルでは，その塩基配列がアレリックラダーマーカと大きく異なる可能性があり，その原因解明には，塩基配列の

Fig. 6 Tolerance to hematin of the PCR amplification by a PowerPlex Fusion system (a) and by an AmpFISTR Identifier plus kit (b). One nanogram of 9947A control DNA was amplified with a series of hematin solution, i.e., 0, 500, 1,000, 2,000, 3,000 and 4,000 μM (final concentration in the PCR reaction mixture of 25 μl). The PCR product was electrophoresed on the 3500 xL (a), or on the 3130 xl (b). As a control, 1 μl of 0.1 M NaOH solution was added to the PCR reaction mixture with 1 ng of the 9947A DNA.

解析が必要である。また、D12S391座位でOL判定されやすいアレルでは、OL判定される場合と通常のアレルに判定される場合が生じるため (Table 12), 複数のSTR型プロファイル間でD12S391座位を比較する場合には、注意が必要である。

今回、4種類の方法^{28,29)}で検出閾値(AT)を算出したところ、それらの値は、いずれの方法でも、3500 xLでは175 RFU未満、3130 xlでは50 RFU未満であった (Table 3)。したがって、3500 xLについては、マニュアル²³⁾に記載されている検出閾値175 RFUでの使用は可能である。また、3130 xlについては、マニュアル²³⁾に記載されている50~150 RFUでの使用可能であり、これまでIDP^{5,6)}などのキットで用いてきた150 RFUをFusionに適応して

も、問題はないと考えられる。

MSSRフィルターによる解析では、MSSR以下のスターピークのみが排除される。FusionでMSSRが設定されているのは、マイナススターの全STR座位、プラススターのD22S1045座位、および-2 bpピークのD1S1656座位である。しかし、マニュアル²³⁾には、これら以外にも、プラススターが全STR座位、-3~-1 bpなどのアーティファクトピークが一部座位において、それぞれ生じる可能性があるとして記載されており、このことは、今回の検討においても確認された (Table 5~9)。また、プルアップについては、3500 xLでは検出感度が高いために検出されやすく、一方、3130 xlではR (CXR-ET) からY (TMR-ET) のプル

Fig. 7 Tolerance to fuming acid of the PCR amplification by a PowerPlex Fusion system (a) and by an AmpFISTR Identifiler plus kit (b). One nanogram of 9947A control DNA was amplified with a series of fuming acid solution, i.e., 0, 100, 200, 300, 400 and 500 ng/ μ l (final concentration in the PCR reaction mixture of 25 μ l). The PCR product was electrophoresed on the 3500 xL (a), or on the 3130 xl (b). As a control, 1 μ l of 0.1 M NaOH solution was added to the PCR reaction mixture with 1 ng of the 9947A DNA.

アップピーク（最大比率5.85%）が生じやすいことが、今回の検討で明らかとなった（Fig. 1）。さらに、3130 xlでは、マトリックススタンダードのロットによって、最大10%程度のプルアップを経験している（データは示していない）。Fusionを使用する場合には、排除されなかったスターピークや、プルアップピークなどが、ノイズピークとして検出されることが予想される。Fusionを検査に用いる際には、ノイズピークと判断されたものについては、必要に応じて、そのラベルを手作業で削除する必要がある。

20%フィルターによる解析では、座位ごとに最大ピークの20%以下の高さのピークは排除される。口腔内細胞などの対照試料は、単独試料と考えられる

ので、その一括処理には、MSSR フィルター適応後の手作業によるラベル削除にかわり、20%フィルターの使用が一般的になりつつある^{23,41-43}。今回、95名分のDNA試料を検査したところ、3500 xLでは検出感度が高いために、通常のMSSRフィルターによる解析では、スターピークやプルアップピークなどのノイズピークやOLが検出されない割合は、66.3%と低いものであった。同じ泳動データを20%フィルターで解析した場合、すべてのノイズピークは排除され、その割合は98.9%に向上した（Table 10）。したがって、20%フィルターによる解析条件は、今回のような単独試料には有効であると考えられる。ただし、ピークバランスの悪いヘテロ接合体や、3本目のピーク高の低いトリアルル試

Fig. 8 Tolerance to denim extract of the PCR amplification by a PowerPlex Fusion system (a) and by an AmpFISTR Identifier plus kit (b). Denim cloth was processed by an AutoMate Express and a PrepFiler Express forensic DNA extraction kit to get 50 μ l of the denim extract. One nanogram of 9947A control DNA was amplified with 0, 2, 4, 8 and 14 μ l of the denim extract for the Fusion kit and amplified with 0, 2, 4 and 8 μ l of that for the Identifier plus kit. The PCR product was electrophoresed on the 3500 xL (a), or on the 3130 xl (b).

料⁴⁴⁾に対して、20%フィルターを適応すると、低いピークが削除される可能性があるので注意が必要である。なお、20%フィルターは単独試料と考えられる対照試料に対してのみ適応すべきであり、現場試料には、混合試料の可能性を考慮して、通常のMSSRフィルターによる解析を行う必要がある。

Fusionを3500 xLで使用した場合の性能を、既報⁵⁾のIDPと比較すると、ヘテロ接合体ピーク比率の平均値(85.1~90.4%)は、IDPの値(83.8~87.8%)⁵⁾と同程度であったが、座位間ピーク高比率の平均値(38.1%)は、IDPの値(52.0%)⁵⁾より低く、また、蛍光色素内ピーク高比率の平均値(51.3%~75.4%)は、IDPの値(68.9%~85.3%)⁵⁾よりも低いものであった(Table 4, Fig. 2)。一方、PCR阻害耐性については、検討したヘマチン、フミン酸およびデニム抽出液のいずれに対しても、Fusion

はIDPよりも少し優れた結果を示した(Fig. 6~8)。陳旧血痕からの検出では、FusionはIDPよりも検出座位数が多くなる結果が得られたが(Fig. 4)、Fusionはフラグメントサイズが最大約495 bpと大きいために、不詳座位数も多くなりやすいので、注意が必要である。PCR増幅時間については、Fusion(約1時間30分)は、IDP(約2時間20分)よりも短い。Fusionは、前述のようにIDP⁵⁾と比較して、そのピークバランスが少し悪い傾向が認められることから、混合試料の可能性のある現場試料からの検出を行う場合には、注意する必要がある。とりわけ、Fusionは、3130 xlを用いた場合、プルアップピークが生じやすいことが示されたので、現場試料からの検出は慎重に行うべきと考える。

結 語

今回, Fusion について, その検出力などの性能を検討した. その結果, Fusion は, IDP⁵⁾と比べて, 座位間および蛍光色素内のピークバランスが少し悪いこと, 分解した DNA 試料からは高分子側の座位が検出されにくいこと, および D12S391座位で OL が検出されやすいことに注意すれば, 法科学目的の STR 型検査キットとして使用可能であると考えられた. Fusion は, IDP の16座位を含む24座位を検出するキットであり, Fusion で検出される常染色体22座位の Probability of Identity 値 (2.93×10^{-26}) は, ID に含まれる常染色体15座位による値 (1.8×10^{-17})¹⁹⁾よりも向上している. Fusion を効果的に用いることで, 鑑定結果の比較や, DNA データベースの照会において, 偶然一致の減少が期待される.

文 献

- 1) Butler J. M., Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J. Forensic Sci.*, **51**, 253–265, 2006.
- 2) Collins P. J., Hennessy L. K., Leibelt C. S., Roby R. K., Reeder D. J. and Foxall P. A., Developmental validation of a single-tube amplification of the 13 CODIS STR loci, D2S1338, D19S433, and amelogenin: the AmpFISTR Identifier PCR Amplification Kit. *J. Forensic Sci.*, **49**, 1265–1277, 2004.
- 3) 吉田日南子, 高橋健一, 笠井賢太郎, AmpFISTR Identifier PCR amplification kit の法科学試料への応用に関する検討. 科学警察研究所報告, **57**, 49–56, 2006.
- 4) Wang D. Y., Chang C.-W., Lagacé R. E., Calandro L. M. and Hennessy L. K., Developmental validation of the AmpFISTR Identifier Plus PCR Amplification Kit: an established multiplex assay with improved performance. *J. Forensic Sci.*, **57**, 453–465, 2012.
- 5) 井口奨太, 北山哲史, 藤井宏治, 中原弘明, 水野なつ子, 関口和正, AmpFISTR Identifier Plus Kit の法科学的資料への応用に関する評価. 日本法科学技術学会誌, **17**, 1–14, 2012.
- 6) 井口奨太, 北山哲史, 藤井宏治, 中原弘明, 水野なつ子, 笠井賢太郎, 関口和正, AmpFISTR Identifier Plus PCR Amplification Kit と AmpFISTR Identifier PCR Amplification Kit の法科学的資料に対する特性の比較. 日本法科学技術学会誌, **18**, 45–56, 2013.
- 7) European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) DNA working group, ENFSI survey on DNA databases in Europe. 2014, available from [http://www.enfsi.eu/sites/default/files/documents/enfsi_survey_on_dna_databases_in_europe_december_2013_1.pdf] accessed Apr 30, 2014.
- 8) Federal Bureau of Investigation (FBI), CODIS–NDIS statistics. 2014, available from [<http://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/ndis-statistics>] accessed Apr 30, 2014.
- 9) Gill P., Fereday L., Morling N. and Schneider P. M., The evolution of DNA databases – recommendations for new European STR loci. *Forensic Sci. Int.*, **156**, 242–244, 2006.
- 10) Gill P., Fereday L., Morling N. and Schneider P. M., New multiplexes for Europe-amendments and clarification of strategic development. *Forensic Sci. Int.*, **163**, 155–157, 2006.
- 11) Barbaro A., Cormaci P. and Agostino A., Validation of AmpFLSTR NGM Select™ PCR amplification kit on forensic samples. *Forensic Sci. Int. Genet. Supplement Series*, **3**, e67–e68, 2011.
- 12) Tucker V. C., Hopwood A. J., Sprecher C. J., McLaren R. S., Rabbach D. R., Ensenberger M. G., Thompson J. M. and Storts D. R., Developmental validation of the PowerPlex ESI 16 and PowerPlex ESI 17 Systems: STR multiplexes for the new European standard. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **5**, 436–448, 2011.
- 13) Tucker V. C., Hopwood A. J., Sprecher C. J., McLaren R. S., Rabbach D. R., Ensenberger M.

- G., Thompson J. M. and Storts D. R., Developmental validation of the PowerPlex® ESX 16 and PowerPlex® ESX 17 Systems. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **6**, 124–131, 2012.
- 14) Green R. L., Lagacé R. E., Oldroyd N. J., Hennessy L. K. and Mulero J. J., Developmental validation of the AmpFℓSTR® NGM Select™ PCR Amplification Kit: a next-generation STR multiplex with the SE33 locus. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **7**, 41–51, 2013.
- 15) Hares D. R., Expanding the CODIS core loci in the United States. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **6**, e52–e54, 2012.
- 16) Hares D. R., Addendum to expanding the CODIS core loci in the United States. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **6**, e135, 2012.
- 17) Oostdik K., Lenz K., Nye J., Schelling K., Yet D., Bruski S., Strong J., Buchanan C., Sutton J., Linner J., Frazier N., Young H., Matthies L., Sage A., Hahn J., Wells R., Williams N., Price M., Koehler J., Staples M., Swango K. L., Hill C., Oyerly K., Duke W., Katzilierakis L., Ensenberger M. G., Bourdeau J. M., Sprecher C. J., Krenke B. and Storts D. R., Developmental validation of the PowerPlex® Fusion System for analysis of casework and reference samples: a 24-locus multiplex for new database standards. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **12**, 69–76, 2014.
- 18) Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM), Revised validation guidelines. *Forensic Science Communications*, 2004, available from [http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2004/standards/2004_03_standards02.htm/] accessed Apr 10, 2014.
- 19) Fujii K., Iwashima Y., Kitayama T., Nakahara H., Mizuno N. and Sekiguchi K., Allele frequencies for 22 autosomal short tandem repeat loci obtained by PowerPlex Fusion in a sample of 1501 individuals from the Japanese population. *Leg. Med. (Tokyo)*, **16**, 234–237, 2014.
- 20) Fujii K., Inokuchi S., Kitayama T., Nakahara H., Mizuno N. and Sekiguchi K., A comparison of DNA extraction using AutoMate Express™ and EZ1 Advanced XL from liquid blood, bloodstains, and semen stains. *J. Forensic Sci.*, **58**, 981–988, 2013.
- 21) 中原弘明, 藤井宏治, 水野なつ子, 吉田日南子, 笠井賢太郎, 法生物学的試料由来のDNAに対する定量法の検証. 日本法科学技術学会誌, **12**, 13–26, 2007.
- 22) Kitayama T., Fujii K., Nakahara H., Mizuno N., Kasai K., Yonezawa N. and Sekiguchi K., Estimation of the detection rate in STR analysis by determining the DNA degradation ratio using quantitative PCR. *Leg. Med. (Tokyo)*, **15**, 1–6, 2013.
- 23) Promega, Technical manual: PowerPlex® Fusion System (Revised in October, 2012). 2012, available from [<http://www.promega.ca/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/101/PowerPlex%20Fusion%20System%20Protocol.pdf>] accessed Dec 10, 2013.
- 24) LifeTechnologies, Technical note: Advanced topics: Optional alternate running conditions for 3500 Genetic Analyzers in the human identification (HID) laboratory. 2014.
- 25) LifeTechnologies, User guide: Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer (Rev. C). 2010, available from [<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/4401661.pdf>] accessed Aug 1, 2014.
- 26) LifeTechnologies, User guide: AmpFℓSTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit guide (Rev. D). 2012, available from [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_076395.pdf] accessed Feb 25, 2014.
- 27) Gilder J. R., Doom T. E., Inman K. and Krane D. E., Run-Specific Limits of Detection and Quantitation for STR-based DNA Testing. *J. Forensic Sci.*, **52**, 97–101, 2007.
- 28) Scientific Working Group on DNA Analysis

- Methods (SWGDAM), SWGDAM interpretation guidelines for autosomal STR typing by forensic DNA testing laboratories. 2010, available from [<http://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/swgdam-interpretation-guidelines>] accessed Apr 14, 2014.
- 29) Bregu J., Conklin D., Coronado E., Terrill M., Cotton R. W. and Grgicak C. M., Analytical thresholds and sensitivity: establishing RFU thresholds for forensic DNA analysis. *J. Forensic Sci.*, **58**, 120–129, 2013.
- 30) Walsh P. S., Fildes N. J. and Reynolds R., Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2807–2812, 1996.
- 31) Akane A., Matsubara K., Nakamura H., Takahashi S. and Kimura K., Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Forensic Sci.*, **39**, 362–372, 1994.
- 32) Seo S. B., Lee H. Y., Zhang A. H., Kim H. Y., Shin D. H. and Lee S. D., Effects of humic acid on DNA quantification with Quantifiler (R) Human DNA Quantification kit and short tandem repeat amplification efficiency. *Int. J. Legal. Med.*, **126**, 961–968, 2012.
- 33) Del Rio S. A., Marino M. A. and Belgrader P., PCR-based human leukocyte antigen (HLA) DQ alpha typing of blood stained light and dark blue denim fabric. *J. Forensic Sci.*, **41**, 490–492, 1996.
- 34) Larkin A. and Harbison S., An improved method for STR analysis of bloodstained denim. *Int. J. Legal. Med.*, **112**, 388–390, 1999.
- 35) 藤井宏治, 井口槌太, 北山哲史, 中原弘明, 水野なつ子, 関口和正, 各種自動抽出装置による法科学試料からの DNA 抽出について. 日本法科学技術学会誌, **17**, 15–26, 2012.
- 36) LaFountain M., Schwartz M., Cormier J. and Buel E., Validation of capillary electrophoresis for analysis of the X-Y homologous amelogenin gene. *J. Forensic Sci.*, **43**, 1188–1194, 1998.
- 37) LifeTechnologies, User bulletin: Protocols for the analysis of AmpFISTR® PCR Amplification Kit PCR products and validation summary. 2011, available from [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/generaldocuments/cms_096535.pdf] accessed April 11, 2014.
- 38) LifeTechnologies, User guide: GlobalFiler™ PCR Amplification Kit user guide (Rev. A). 2013, available from [<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/4477604.pdf>] accessed Apr 11, 2014.
- 39) Lazaruk K., Walsh P. S., Oaks F., Gilbert D., Rosenblum B. B., Menchen S., Scheibler D., Wenz H. M., Holt C. and Wallin J., Genotyping of forensic short tandem repeat (STR) systems based on sizing precision in a capillary electrophoresis instrument. *Electrophoresis*, **19**, 86–93, 1998.
- 40) Dalsgaard S., Rockenbauer E., Buchard A., Mogensen H. S., Frank-Hansen R., Børsting C. and Morling N., Non-uniform phenotyping of D12S391 resolved by second generation sequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **8**, 195–199, 2014.
- 41) LifeTechnologies, Technical focus: Being direct: Development and optimization of a direct amplification workflow for single-source samples. 2012, available from [<http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/migration/us-media-library/product---services/services/pdf.par.76954.file.dat/forensic-news-2013.pdf>] accessed Mar 4, 2014.
- 42) LifeTechnologies, User guide: GlobalFiler™ Express PCR Amplification Kit (Rev. B). 2013, available from [<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/4477672.pdf>] accessed Apr 11, 2014.
- 43) Flores S., Sun J., King J. and Budowle B., Internal validation of the GlobalFiler™ Express PCR Amplification Kit for the direct amplification of reference DNA samples on a high-throughput

- automated workflow. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **10**, 33–39, 2014.
- 44) Clayton T. M., Guest J. L., Urquhart A. J. and Gill P. D., A genetic basis for anomalous band patterns encountered during DNA STR profiling. *J. Forensic Sci.*, **49**, 1207–1214, 2004.