—技術報告—

法科学 STR 型検査におけるプルアップ低減機能の特性評価

井口奨太^{1,2}, 水野なつ子³, 関口和正³¹警察庁刑事局犯罪鑑識官

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1 警察庁柏分室

²警視庁科学捜査研究所

〒177-0045 東京都練馬区石神井台 3-35-21

³科学警察研究所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1

**Characterization of the pull-up reduction feature on Data collection 4
in forensic STR typing**Shota Inokuchi^{1,2}, Natsuko Mizuno³ and Kazumasa Sekiguchi³¹*Criminal Identification Division, Criminal Investigation Bureau National Police Agency
Kashiwa Satellite office 6-3-1 Kashiwanoha, Kashiwa-shi, Chiba 277-0882, Japan*²*Forensic Science Laboratory, Metropolitan Police Department
3-35-21 Shakujiidai, Nerima-ku, Tokyo 177-0045, Japan*³*National Research Institute of Police Science
6-3-1 Kashiwanoha, Kashiwa-shi, Chiba 277-0882, Japan**(Received 10 June 2020; accepted 22 July 2020;**Published online 17 September 2020 in J-STAGE DOI: 10.3408/jafst.787)*

Pull-up reduction feature (PUR) has been available since the update of the Data Collection Software version to 4. There is concern that data obtained from utilizing PUR might have some impact on the review and interpretation in STR typing by forensic biologists, because PUR changes the height of peaks under specific conditions. In this study, we first investigated the amount of reduction in peak height by PUR, then impact of PUR on remarkable peaks (e.g., an artifact comprised of a stutter peak and pull-up) was investigated. Fundamentally, the amount of reduction in peak height between PUR disable and enable showed a positive correlation with the parent peak height except for fluorescent dye red to purple. It was also confirmed that PUR functioned against the stutter peak shared with pull-up and irregular shape peak due to detected on the edge of an allele peak. For the mixture sample, the PUR impacted the minor contributor's allele peak which up to approximately 23.1% of the parent peak. Our data showed that the characteristics of PUR in reviewing artifacts and interpreting the STR typing should be taken into consideration.

Key words: Pull-up reduction feature, Data collection software v4, Forensic STR typing

緒 言

法科学分野のSTR型検査は、多色の蛍光色素を用いたマルチプレックスPCRおよびキャピラリー電気泳動を用いて実施され、それらの特性によりエレクトロフェログラム上にはプルアップなどのアーティファクトが観察される¹⁻³⁾。STR型検査で用いられる蛍光色素の発光波長は一部重なっているため、スペクトラルキャリブレーションによって作成されるデータを利用して蛍光補正し分離している。しかしながら、電気泳動ごとに装置の周辺温度や試薬の状態はわずかに異なるため、蛍光補正がうまくいかなる場合がある。プルアップは、この分離がうまくいかない場合にアレルピークなどのシグナルによって異なる蛍光色素の同塩基数の位置にピークが検出される現象であり、STR型検査の結果の解釈を複雑にしてしまう要因の一つとなっている^{4,5)}。

プルアップについては、Fujiiらが親ピークとのプルアップ比率や検出距離とその形状、評価法を報告している⁶⁾。最近では、プルアップなどのアーティファクトを機械学習や深層学習を用いて評価する試みも報告されている^{4,7,8)}。資機材の進歩という観点では、Applied Biosystems™ 3500xL Genetic Analyzer (以下「3500xL」、アプライドバイオシステムズ)を制御するApplied Biosystems™ Data Collection Software (以下「DC」)のv4において、プルアップ低減機能 (Pull-up reduction feature, 以下「PUR」)が新たに搭載され⁹⁾、筆者らはこの機能を利用して得られるデータの基本性能やプルアップの出現傾向について報告した¹⁰⁾。PURは特定の条件においてピークの高さを変える機能であるため、ピークの評価・判断や結果の解釈に影響を与えることが懸念され、STR型検査の証拠価値の維持・向上のためには、PURの詳細な科学的検証が必要である。

本検証では、PURが鑑定人によるピークの評価・判断や結果の解釈に与える影響について明らか

にすることを目的とした。最初に、プルアップと親ピークの高さの関係およびPURによるピーク高の低減量について調査した。次いで、特殊なピークに対するPURの影響について調査するため、スターピークとプルアップが重なったピーク、アレルピークの裾に検出されることで不規則な形状のプルアップ、混合試料においてマイナーコントリビュータのアレルピークとプルアップが重なったピークについて検証を行った。

材料および方法

1 試料

DNA型が既知である成人日本人男性3名から採取した血液からQIAamp DNA Investigator Kit (キアゲン)を用いて抽出・精製したDNAおよびAmpFISTR™ DNA Control 007 (以下「007」、アプライドバイオシステムズ)を用いた。DNA定量は、Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit (アプライドバイオシステムズ)およびQuantiStudio5 Real-Time PCR Systems (アプライドバイオシステムズ)を用いて製造元のユーザーガイドに従った方法で行い、Small autosomal human targetの値をDNA溶液の濃度とした^{11,12)}。本研究は、科学警察研究所ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て実施した (承認番号: 31-1 (68))。

2 STR型検査

PCR増幅は、GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (アプライドバイオシステムズ)を用いて製造元のユーザーガイドに従った方法²⁾で行い、PCRサイクル数は29回でProFlex™ PCR System (アプライドバイオシステムズ)を用いて行った。電気泳動は、PCR産物もしくはアレリックラダー1 µlをGeneScan™ 600 LIZ® dye Size Standard v2.0 (以下「600 LIZ」、アプライドバイオシステムズ) 0.4 µlとHi-di™ Formamide (以下「Hi-di」、アプライドバイオシステムズ) 9.6 µlの割合になるように混合したものの泳動ウェルに配置し、熱変性し、DC v4を搭載した3500xLを用いて行った。電気泳動の条

件については、インジェクション電圧・時間は1.2 kV・24秒で、泳動電圧は13 kVで行った。泳動データの解析は、GeneMapper® ID-Xソフトウェア v1.6（以下「GMIDX」、アプライドバイオシステムズ）を用いて行い、ピーク検出の閾値は50 RFU とし、その他の各パラメータはユーザーガイドに示された値を使用した²⁾。PUR を無効にする設定については、電気泳動前に DC の Customize Sample Info において該当のウェルの sample type を allelic ladder と指定することによって PUR による補正を回避させた。統計解析については、統計解析ソフトウェア R version 3.5.3を用いて行った¹³⁾。

3 PUR によるプルアップのピーク高の低減量の評価

PUR によるプルアップのピーク高の低減量の評価については、筆者らが既に報告した研究¹⁰⁾の感度検証で得られた泳動データを使用した（ポジティブコントロールも含む）。最初に、親ピークの高さからプルアップの高さを推測するために、親ピークとプルアップの高さの相関関係を調べた。次いで、PUR によるプルアップのピーク高の低減量を評価するため、親ピークの高さと PUR 有効・無効間におけるプルアップの高さの差を調べた。プルアップの同定については、007のアレルピークに対して、当該ピークとは異なる蛍光色素チャンネルにおいて ± 1 bp の範囲内で検出されたものをプルアップとし、アレルピークのマイナススタター（1 くり返し小さい位置に観察されるスタターピーク）に検出されたものおよびオフスケールしたアレルピークに由

来するものはデータから除外した。

4 ピークとプルアップが重なった場合の PUR の機能評価

4.1 ケース 1：スタターピークとプルアップが重なったピーク

PUR がスタターピークとプルアップが重なったピーク（Fig. 1A）に与える影響について検証するため、蛍光色素 Red の D22S1045の11型のピークによるプルアップが蛍光色素 Yellow の D2S411の14型のマイナススタターピークに重なる試料（D22S1045が11型のホモ接合体、D2S441に11, 14型のヘテロ接合体を持つ試料）について、鋳型量 2 ng および 1 ng で、それぞれ 2 反応ずつ同時に PCR 増幅した。PCR 増幅によるばらつきの影響を小さくするため、各鋳型量から得られた 2 反応分の PCR 産物と 600 LIZ と Hi-di を事前に必要量混合したものを、それぞれ46ウェルに配置し（それぞれ23ウェルにアレリックラダー 1 ウェルを追加）、PUR 有効・無効それぞれの設定で電気泳動を行った。スタターピークとプルアップが重なったピークに対する評価のために、スタター比率（スタターピークとプルアップが重なったピークの高さ÷スタターの親ピークの高さ）およびプルアップ比率（スタターピークとプルアップが重なったピークの高さ÷プルアップの親ピークの高さ）を算出した。

4.2 ケース 2：アレルピークの裾に検出されるプルアップ

PUR がアレルピークの裾に検出されることで不規則な形状のプルアップ（Fig. 1B）に与える影響

Fig. 1. The three cases investigated to determine whether the pull-up reduction feature impacts on the height of peaks.

について検証するため、Red の D5S818 の 11 型のピークによるプルアップが Yellow の D19S433 の 15 型のピークの中心より 1~2 bp 高分子側に検出される試料 (D5S818 に 11 型のホモ接合体, D19S433 に 14, 15 型のヘテロ接合体を持つ 007 試料) について、鋳型量 2 ng および 1 ng で、それぞれ 2 反応ずつ同時に PCR 増幅した。PCR 増幅によるばらつきの影響を小さくするため、各鋳型量から得られた 2 反応分の PCR 産物と 600 LIZ と Hi-di を事前に必要量混合したものを、それぞれ 46 ウェルに配置し (それぞれ 23 ウェルにアレリックラダー 1 ウェルを追加)、PUR 有効・無効それぞれの設定で電気泳動を行った。

4.3 ケース 3 : 混合資料においてアレリックとプルアップが重なったピーク

PUR が混合資料においてアレリックとプルアップが重なったピークに与える影響 (Fig. 1C) を検証するため、個人 A および個人 B の D22S1045 (Red) の 11 型のプルアップが個人 B の D2S441 (Yellow) の 13 型のピークに重なる混合試料 (個人 A : D2S441 に 10 型のホモ接合体, D22S1045 に 11 型のホモ接合体の試料, 個人 B : D2S441 に 12, 13 型のヘテロ接合体, D22S1045 に 11 型のホモ接合体を持つ試料) を作製した。個人 A, B どちらも D22S1045 は 11 型のホモ接合体であり、PCR 産物の混合比が変化しても当該アレリックのピーク高が大きく変わらずプルアップの影響が一定になるようにデザインした。PCR 増幅のばらつきの影響を小さくするため、個人 A, B の DNA を混合せずにそれぞれ鋳型量 1 ng で 4 反応分を同時に PCR 増幅し、1 本の 1.5 mL チューブにまとめ、PCR 産物を混合するようにして試料を作製した。個人 A と個人 B の PCR 産物を 1 : 1, 2 : 1, 4 : 1, 6 : 1, 9 : 1, 19 : 1, 39 : 1 の割合で混合したものを PUR 有効・無効用にそれぞれ 2 ウェルずつ配置し、同時に個人 B の PCR 産物を PUR 有効・無効用にそれぞれ 1 ウェルずつ配置し、アレリックラダーを 1 ウェルずつ追加して、PUR 有効・無効の設定でそれぞれ 2 回ずつ電気泳動を行った。なお、これ以降、混合 PCR 産物に占める割合が高い方をメジャーコントリビュータ、低い方をマイナーコントリ

ビュータと呼ぶ。PUR がマイナーコントリビュータのアレリックとプルアップが重なったピークに与える影響の評価のために、ピーク高比率 (マイナーコントリビュータの D2S441 の 12 型のピークの高さ ÷ 13 型のピークの高さ) およびプルアップ比率 (D2S441 の 13 型のピークの高さ ÷ D22S1045 の 11 型の高さ) を算出した。

結果および考察

1 PUR によるプルアップのピーク高の低減量の評価

親ピークの高さからプルアップの高さを推測するため、PUR 無効における鋳型量が 4~0.03125 ng のアレリック (親ピーク) とそのプルアップの高さを各蛍光色素別に Fig. 2 に示した。プルアップの観察数が 20 以上であった蛍光色素間には線形回帰直線を Fig. 2 に付した。観察数が十分にあった蛍光色素間については、親ピークの高さとプルアップの高さには正の相関が認められた。例として、Red から Yellow および Purple から Red へのプルアップでは、アレリックピークが 10000 RFU の時にそれぞれ 100, 150 RFU 程度のプルアップが観察されると推測できると考えられた。

次いで、PUR によるピーク高の低減量の評価するため、PUR 無効で検出されたプルアップについて PUR 有効・無効間のピーク高の差 (PUR 無効のプルアップの高さ - PUR 有効のプルアップの高さ) を Fig. 3 に示した。なお、PUR 無効において検出されたが PUR 有効ではピーク検出の閾値を下回ったことにより検出されなかったものについては、PUR 有効ではピーク検出の閾値まで減少したと仮定したピーク高の差を算出した。観察数が十分にあった蛍光色素間では、Red から Purple を除き、PUR によるピーク高の低減量と親ピークの高さの間に正の相関が認められ、親ピークの高さが高くなるにつれ PUR による低減量が多くなることが示唆された。Red から Purple については、PUR によるピーク高の低減量は 0 を中心に正負どちらにもばらついていた。これは、PUR によってプルアップの高さが増加したものがあることを示している。筆者らは先行研究¹⁰⁾において、Red から Purple に

Fig. 2. Each box shows the scatter plot of the parent allele peak height versus the pull-up height for each fluorescent dye, e.g., G->B: the case that parent peaks of green dye generate pull-up peaks of blue dye. Linear regression lines were displayed with solid lines only for the fluorescent dye in which number of observations are above 20. Abbreviation; B: blue dye, G: green dye, Y: yellow dye, R: red dye and P: purple dye

については、PUR 有効・無効間でプルアップピークとその親ピークの塩基数（ピークサイズ）の差（距離）の分布は異なるものの、検出されるプルアップのピーク数は変わらないことを報告しており、先行研究を支持する結果であった。

プルアップの出現状況は機器間、キャピラリーなどの消耗品のロット間、スペクトラルキャリブレーション間やラン間で異なるが、PUR によるピーク高の低減量については、一定のアルゴリズムで行われていることから、蛍光色素間の相関の傾向は大きくは変わらないと考えられる。

2 スターピークとプルアップが重なったピークに対する PUR の機能評価

スターピークにプルアップが重なる試料（ケース1）の“RAW”データ（GMIDXによって解析される前のデータ）を Fig. 4 に示した。最初に、スターピークにプルアップが重なる位置のスターピーク以外の蛍光色素について着目したところ、PUR 無効では Red による Green や Purple への明瞭なプルダウンが観察されたが、PUR 有効ではこれらのプルダウンは消失していた。次に、PUR がスターピークに与える影響を検証するため、各鋳型量におけるスター比率およびプルアップ比率の分布を Fig. 5 に示した。どちらの鋳型量

Fig. 3. Each box shows the scatter plot of the amount of reduction in peak height between PUR disable and enable versus the parent peak height, e.g., G->B: the case that parent peaks of green dye generate pull-up peaks of blue dye. Pull-up detected on both PUR disable and enable are shown in the red circles. Pull-up detected on PUR disable but not detected on PUR enable shown in green triangles. Abbreviation; B: blue dye, G: green dye, Y: yellow dye, R: red dye and P: purple dye

のスター比率およびプルアップ比率についても、PUR 有効・無効の間で有意な差が認められ ($p < 0.001$, paired t-test), スターピークに対しても PUR が作用していることが確認された。PUR によるピークの低減量 (平均値の差) については、2 ng で 108.5 RFU (親ピークの高さの平均値 10320 RFU), 1 ng で 46.3 RFU (親ピークの高さの平均値 5394 RFU) であり Fig. 3 で示した Red から Yellow へのプルアップのピーク高の低減量の評価の結果と同程度であった。

一般的に、同一の PCR 産物を複数回電気泳動した場合、ピークの高さは泳動毎にばらつくがスタ

ター比率などの各比率はほぼ一定である。しかしながら、今回の検証では同一の PCR 産物を電気泳動したにもかかわらず PUR によってスター比率が有意に低下したことから、スターの評価においては PUR の使用の有無を考慮した慎重な解釈が必要であると考えられた。

3 アレルピークの裾に検出されるプルアップピークに対する PUR の機能評価

アレルピークの裾にプルアップが重なる試料 (ケース 2) の “RAW” データを Fig. 6 に示した。Yellow のアレルピークの下流側の裾の位置について着目したところ、PUR 無効では Red による Pur-

Fig. 4. A stutter peak in the blue channel and high-signal allele peak in the red channel are overlapped and pull-down peaks were generated by the red allele peak. The “RAW” data was generated using the PCR product amplified with 2 ng DNA input.

Fig. 5. The box-plot of stutter ratio and pull-up ratio amplified with 1 ng and 2 ng DNA input. The box bounds the interquartile range (IQR) divided by the median, whiskers extend to a maximum of $1.5 \times \text{IQR}$ beyond the box (Tukey style), and each data are showed by black circles. The statistical test was performed by paired t-test.

Fig. 6. A pull-up peak located at the edge of an allele peak in the yellow channel and high-signal allele peak in the red channel are overlapped (“RAW” data). The “RAW” data was generated using the PCR product amplified with 2 ng DNA input.

ple への明瞭なプルダウンが観察されたが、PUR 有効ではそのプルダウンの形状が変化していた。次いで、PUR が不規則な形状のプルアップに対して与える影響を検証するため、アレルピークの裾の位置に検出されたプルアップの高さの分布を Fig. 7 に示した。PUR 無効では、鋳型量 2 ng で平均 96 RFU、鋳型量 1 ng で平均 65 RFU のピークが全てのウェルで検出されたが、PUR 有効では、どちらの鋳型量においても全てのピークが検出されず、単純なプルアップとは形状が異なるピークに対して PUR が作用していることが確認された。

4 混合資料においてアレルピークとプルアップが重なったピークに対する PUR の機能評価

PUR が混合資料においてアレルピークとプルアップが重なったピーク（ケース 3）に与える影響については、ピーク高比率（マイナーコントリビュータの D2S441 の 12 型のピークの高さ ÷ 13 型のピークの高さ）およびプルアップ比率（D2S441 の 13 型のピークの高さ ÷ D22S1045 の 11 型の高さ）を用いて評価した。本検証では、D2S441 の 13 型のピークが D22S1045 の 11 型のピークによるプルアップの影響を受けるピークであり、各混合比率においてピーク高比率およびプルアップ比率を PUR 有効・無効間で比較することで PUR の影響を評価した。

Fig. 7. The box-plot of height of pull-up peaks located at the edge of an allele peak obtained from the PCR products amplified with 1 ng and 2 ng DNA input. The box bounds the interquartile range (IQR) divided by the median, whiskers extend to a maximum of $1.5 \times \text{IQR}$ beyond the box (Tukey style), and each data are showed by black circles.

ピーク高比率については、各混合比率におけるピーク高比率および基準ピーク高比率（個人 B のみの PCR 産物を電気泳動したもの：D2S441 の 13 型のピークが D22S1045 の 11 型のピークよりも高い状態のピーク高比率）の平均値を Fig. 8A に示した。PUR 無効では、いずれの混合比率においても基準ピーク高比率より低く、マイナーコントリビュータの混在比率が低下するに連れてより大きく低下していた。これは、D2S441 の 13 型のピークがプルアップの影響を受けて持ち上がったことによりピーク高比率が低くなったと考えられた。また、いずれの混合比率でも親ピークとなる D22S1045 の 11 型の高さは同程度であり、マイナーコントリビュータの混在比率が低下するに連れ、プルアップによるピーク高の持ち上がりの影響が大きくなり、より大きく低下したと考えられた。PUR 有効についても PUR 無効より低下の度合いは少ないが同様に低下する傾向を示したが、39 : 1 では基準ピーク高比率より増加していた。PUR 有効・無効間で比較すると、ピーク高比率は 1 : 1 では同程度であったが、2 : 1 ~ 39 : 1 ではいずれも PUR 有効の方が高かった。

同様に、各混合比率におけるプルアップ比率の平均値を Fig. 8B に示した。マイナーコントリビュータの混在比率が低下するに連れてプルアップ比率が低下することは、親ピークの高さは変わらずにマイ

ナーコントリビュータのピークの高さが低くなるためであるが、PUR 有効・無効間で比較すると、1 : 1 では同程度であったが、2 : 1 ~ 39 : 1 では PUR 有効の方が若干低かった。

ピーク高比率およびプルアップ比率の結果から、混合比率が 2 : 1 ~ 39 : 1 では、PUR によって D2S441 の 13 型のピークが引き下げられていることが示唆された。2 : 1 における PUR 無効の親ピークとマイナーコントリビュータの高さの比率の平均値は 23.1% であり、親ピークに対してこの程度の比率の高さのピークにおいても、PUR が機能しピーク高が引き下げられると考えられた。

最後に、2 : 1 ~ 39 : 1 のデータを用いて PUR によるピーク高の低減量について検証したところ、親ピークとなる D22S1045 の 11 型の PUR 無効におけるピーク高の平均値は 2 : 1, 4 : 1, 6 : 1, 9 : 1, 19 : 1, 39 : 1 の順で 11656, 11742, 11733, 12480, 13480, 13765 RFU であった。D2S441 の 13 型のピーク高の平均値の PUR 有効・無効間の差は、同順で 134, 161, 78, 138, 69, 148, 69.3 RFU であり、Fig. 3 で示した PUR 有効の Red から Yellow へのプルアップのピーク高の低減量の評価の結果と同程度であった。以上のことから、混合資料のマイナーコントリビュータのアレルピークに対する PUR による低減量は、マイナーコントリビュータのアレル分の高さ

Fig. 8. Average of peak height ratio (A) and pull-up ratio (B) in various mixture ratio. PUR disable and enable data are shown in circles with dashed lines and triangles with solid lines, respectively. Note that the y-axis of pull-up ratio showed by logarithmic scale.

の影響は受けずに、親ピークの高さの影響を受けていることが示唆された。また、混合比率が2:1~19:1におけるPUR有効のピーク高比率が基準ピーク高比率より低かったことから、プルアップによって嵩上げされる量よりもPURによる低減量の方が少ないと考えられた。39:1のような低いピークについては、PURによる低減量のばらつきの影響が大きくなることで過剰に低減されることがあり、プルアップ位置にある絶対的または相対的に低いピークについて考察する場合はより慎重な解釈が求められると考えられた。

今回の検証では、STR型検査におけるPURの特性評価を行った。PURがスタターなどのアーティファクトの評価や検査結果の解釈に影響を与えることを明らかにした。鑑定人がPURの特性を考慮してピークの評価・判断や結果の解釈を行うことで、より堅牢で信頼性の高い科学的知見を捜査や法廷に提供できると考えられた。

文 献

- 1) Butler J. M., Data Interpretation, in: Advanced Topic in Forensic DNA Typing: Interpretation. pp. 3-212,. 2020th-1st-29th ed. Academic Press, San Diego, 2015.
- 2) Thermo Fisher Scientific, User Guide: GlobalFiler™ and GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kits. available from [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4477604.pdf], accessed Dec 24, 2019.
- 3) Thermo Fisher Scientific, User Guide: Applied Biosystems™ 3500/3500xL Genetic Analyzer with 3500 Series Data Collection Software 3.1. available from [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/100031809_3500_3500xL_Software_v3_1_UG.pdf], Published 2012.
- 4) Taylor D. and Powers D., Teaching artificial intelligence to read electropherograms. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **25**, 10-18, 2016.
- 5) 真鍋 翔, 玉木敬二, Continuous modelに基づくDNA混合試料の解析, 日本法科学技術学会誌, **25**(1), 1-14, 2020.
- 6) Fujii K., Fukagawa T., Watahiki H., Mita Y., Kitayama T. and Mizuno N., Ratios and distances of pull-up peaks observed in GlobalFiler kit data. *Leg. Med.*, **34**, 58-63, 2018.
- 7) Marciano M. A. and Adelman J. D., Developmental validation of PACE™: Automated artifact identification and contributor estimation for use with GlobalFiler™ and PowerPlex® fusion 6c generated data. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **43** (July), 102140, 2019.
- 8) Taylor D., Harrison A. and Powers D., An artificial neural network system to identify alleles in reference electropherograms. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **30**, 114-126, 2017.
- 9) Thermo Fisher Scientific, User Bulletin: 3500 Series Data Collection Software 4 for HID New Features and Developmental Validation. available from [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/100075298_3500v4HID_UB.pdf], accessed Sep 2, 2019.
- 10) 井口奨太, 水野なつ子, 関口和正, STR型検査におけるApplied Biosystems™ 3500 Series Data Collection Software version 4の新機能の評価, 日本法科学技術学会誌, **25**, 171-183, 2020.
- 11) Holt A., Wootton S. C., Mulero J. J., Brzoska P. M., Langit E. and Green R. L., Developmental validation of the Quantifiler® HP and Trio Kits for human DNA quantification in forensic samples. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **21**, 145-157, 2016.
- 12) Thermo Fisher Scientific, HID Real-Time PCR Analysis Software Version 1.3. available from [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0009819_HID_PCRAnalysis_Software_UG.pdf], accessed Sep 2, 2019.
- 13) R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2019.