

# 日本人集団におけるハーディ・ワインベルグ平衡の 検定法について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 日本法医学会 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 勝又, 義直, 水谷, 正樹, 野澤, 秀樹, 打樋, 利英子, 山本, 敏充, 玉木, 敬二 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1843">http://hdl.handle.net/10271/1843</a>

## 日本人集団におけるハーディ・ワインベルグ平衡の検定法について

勝又 義直<sup>1</sup>・水谷 正樹<sup>1</sup>・野澤 秀樹<sup>2</sup>・打樋利英子<sup>1</sup>・山本 敏充<sup>1</sup>・  
玉木 敬二<sup>3</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学大学院医学研究科社会生命科学講座 (法医・生命倫理学)

<sup>2</sup>浜松医科大学法医学教室

<sup>3</sup>レスター大学遺伝学教室

## Tests for Hardy-Weinberg equilibrium in Japanese population

Yoshinao KATSUMATA<sup>1</sup>, Masaki MIZUTANI<sup>1</sup>, Hideki NOZAWA<sup>2</sup>,

Rieko Uchihi<sup>1</sup>, Toshimichi YAMAMOTO<sup>1</sup>, Keiji TAMAKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Legal Medicine and Bioethics, Graduate School of Medicine, Nagoya University, Nagoya 466-8550, Japan

<sup>2</sup>Department of Legal Medicine, Hamamatsu Medical University, Hamamatsu 431-3192, Japan

<sup>3</sup>Department of Genetics, University of Leicester, Adrian Building, University Road, Leicester LE1 7RH, U. K.

(Received May 6, 1999, Accepted July 16, 1999)

**ABSTRACT** In population genetics, the absence of the departure from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) is usually tested when a population study of a certain DNA marker is performed to show the observed allele frequencies represent those of the whole population. The goodness-of-fit test ( $\chi^2$  test) assuming  $\chi^2$  approximation has frequently been used with classical blood type markers having a few alleles. However, new tests suitable for DNA markers having many alleles, such as homozygosity test, likelihood ratio test and Guo-Thompson's (G-T) exact test, have recently been devised. In the present study, appropriate tests for HWE was studied using population data of 206 Japanese individuals with 9 different short tandem repeat loci. Firstly, we found that the recommendation of NRC II for the treatment of rare allele frequencies (If a bin in the database contains fewer than five entries, it is pooled with adjacent bins so that no bin has fewer than five) is quite reasonable for personal identification in forensic sciences. Secondly, we proposed that homozygosity test, likelihood ratio test and G-T's exact test should be applied altogether and HWE of the sample population should be valid only when all of the three tests were cleared.

**Key words:** DNA polymorphism, Short tandem repeat, Hardy-Weinberg equilibrium,  $\chi^2$  test, Exact test

**摘要** 集団遺伝学では、ある観察集団において、あるDNAマーカーの頻度調査をした場合、その集団が母集団を代表していることを示すためにハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) の検定を行うのが一般的である。従来、アリアルが2ないし3程度の血液型についての検定では $\chi^2$  testが頻用されてきた。しかし、アリアルが多いDNAマーカーでは、homozygosity test, likelihood ratio test, Guo-Thompson's (G-T's) exact testが開発され、使われるようになってきた。本研究では、日本人206人についての9つのSTRローカスの頻度調査結果をもとに、HWEの望ましい検定法を検討した。まず、まれな頻度についての取り扱いについて検討し、米国のNRC IIの勧告にあるように最低出現数を5以上とすることが刑事鑑定における個人識別においては妥当とした。次いでHWEの検定では、homozygosity test, likelihood ratio test及びG-T's exact testを実施し、いずれにおいてもHWEが否定されないことを提案した。

## はじめに

1985年のJeffreysらによるDNA指紋法の論文<sup>1)</sup>の発表以来、DNA検査が個人識別や親子鑑定の領域に積極的に用いられるようになってきた。当初は識別能力の高いミニサテライトが用いられたが、現在は微量のDNAを増幅して型判定できるマイクロサテライトが簡便さもあって広く使われるようになってきている。マイクロサテライトはshort tandem repeat (STR)とも呼ばれ、2~5塩基のリピートが縦列に反復している。法医学領域ではアレルの識別が容易な4塩基のリピートのものが多く用いられている<sup>2)~4)</sup>。ただ、STRはミニサテライトに比し、アレル数が5~10程度と比較的少ないことが多く、個々のローカスでは識別能力はそれほど高くない。従って、いくつかのローカスを組み合わせて用い、識別能力を高めている。

STRなどのDNA検査では、ある遺伝マーカーのアレルの頻度調査をした場合、調査された集団が母集団を代表している、いかにすれば調査された頻度が信頼できるかどうかは、ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) にあるかを検定することによって判断することが一般的である。HWEは突然変異や選択などが無い十分大きな集団では、遺伝子頻度と遺伝子型頻度は安定に保たれるという集団遺伝学上基本的な事象である。十分大きな母集団ではHWEが成立しているとみなしてよいので、サンプル集団でHWEが成立していれば、その集団はほぼ母集団を反映していると考えられ、アレル頻度から理論的に遺伝子型頻度を計算して求めることができる。従来の血液型でのHWEの検定には $\chi^2$ 検定が頻用されてきたが、 $\chi^2$ 検定はアレル数が数個以上と多くなるDNAマーカーには不向きとして、homozygosity test<sup>5)</sup>、likelihood ratio test<sup>6)</sup>あるいはGuoとThompsonのexact test (G-T's exact test)<sup>7)</sup>などが用いられるようになってきている。

本研究では、9ローカスのSTRを用いて $\chi^2$ 検定を含めたこれらのHWEの検定法を適用し、有用性を検討した。さらに、出現数の少ないまれなアレルの頻度の取り扱いを検討した。STRなどのDNA検査に用いるローカスでは、まれなアレルが時にみられ、その取り扱いが問題になっている。1996年に発表された全米科学アカデミーのDNA鑑定についての2番目の勧告であるNRC IIでは、FBIの考え方をもとに、刑事鑑定ではまれなアレルは最低出現数が5以上にな

るよう隣接したアレルと合してグループ化することを提唱している<sup>8)</sup>。本研究では、まれなアレルの出現数の分布を二項分布により検討した結果、NRC IIの勧告はまれなアレルの頻度を不当に低く評価しない上で有用であることを見出した。

## 材料と方法

### 1. DNA試料と型判定

血縁関係のない日本人206名について、9種類のSTRすなわちD3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSFIPO, D5S818, D13S317, D7S820をPEアプライドバイオシステムズ社のアンフルスター・プロファイラーキットを用いて型判定を行い作成したデータベース<sup>9)</sup>をもとに分析した。

### 2. $\chi^2$ 検定

あるローカスでのアレルを $A_i$  ( $i = 1, 2, \dots, a$ ) とすると、その母集団の $A_i$ の頻度を $P_i$ 、サンプル集団の $A_i$ の頻度を $\hat{P}_i$ とする。n人のサンプル集団での遺伝子型 $A_i A_j$ の人の人数を $x_{ij}$ とする。アレル $A_i$ を含むすべてのヘテロ接合体の数 $He$ は

$$He = \sum_{i > j} x_{ij}$$

で表わされる。このような記号を用いてあるローカスAのサンプル集団のアレルの分布がHWEにあるか否かの $\chi^2$ 検定を行う場合は、 $\chi^2$ 値を下記の式により計算し、(遺伝子型の数-アレル数)を自由度とする $\chi^2$ 分布にあてはめて理論的なアレル分布と観察されたアレル分布に差があるか否かを検定した。

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^a \frac{(x_{ii} - n\hat{p}_i^2)^2}{n\hat{p}_i^2} + \sum_{i=1}^{a-1} \sum_{j>i} \frac{(x_{ij} - 2n\hat{p}_i\hat{p}_j)^2}{2n\hat{p}_i\hat{p}_j} \dots \dots \dots (1)$$

但し、計算された $\chi^2$ 値が $\chi^2$ 分布に近似できることを経験的に保証している5の法則<sup>10)</sup>、すなわち、「1) 各遺伝子型の期待値が1以下にならない。2) 全体の2割以上の遺伝子型の期待値が5以下であってはならない。」を満たしていないときは、これを満たすよう隣接したアレルをまとめ、グループ化して新しいアレル群とした上で検定した。

### 3. homozygosity test

WeirはHWEの検定の一つとして、サンプル集団のすべてのホモ接合体の出現頻度 ( $H_0$ ) をHWEを仮定した場合のその集団の理論的なホモ接合体の出現頻

度 ( $h_0$ ) と比較することを提案した. この適合度試験での  $\chi^2$  値が自由度 1 の  $\chi^2$  分布になるための補正を加えて, Weir は下記の計算式を示している<sup>5)</sup>.

$$\chi^2 = \frac{n(H_0 - h_0)^2}{\sum_{i=1}^a p_i^2 - 2 \sum_{i=1}^a p_i^3 + \left(\sum_{i=1}^a p_i^2\right)^2} \dots\dots\dots (2)$$

$$H_0 = \sum_{i=1}^a \tilde{p}_{ii} \qquad h_0 = \sum_{i=1}^a \tilde{p}_i^2$$

この式により計算された  $\chi^2$  値は自由度 1 の  $\chi^2$  分布を示すため, サンプル集団のホモ接合体の出現頻度が理論値と適合しているかを検定することができる.

4. likelihood ratio test

Weir の報告<sup>5)</sup> に従い, 下記の式により  $G^2$  値を計算した. この  $G^2$  値はサンプル数が大きい場合に  $\chi^2$  分布に近似できるとされているが,  $\chi^2$  検定における 5 の法則のような  $\chi^2$  分布に近似できるとの経験的法則がない. 従って, Chakraborty らは観察されたアレル頻度を固定した上で, 各遺伝子型のとりうる分布をシミュレーションにより直接求める方法を提案している<sup>6)</sup>. 我々は, 彼等の方法により, 乱数を発生させることによりシミュレーションを行い,  $G^2$  値の分布を求めた上で, 実際の観察集団の値がどこに位置するかを求め, 確率 (P 値) で表わした. なお, シミュレーションの回数を多くすれば P 値の信頼性が増すとされており, 我々は乱数を発生させることにより 10,000 回のシミュレーションを実施した.

$$G^2 = -2(\ln L_1 - \ln L_0) \dots\dots\dots (3)$$

$$L_1 \propto \prod_{i=1}^a \prod_{j \geq i} (\tilde{P}_{ij})^{x_{ij}} \qquad L_0 \propto 2He \prod_{i=1}^a (\tilde{P}_i)^{2n\tilde{p}_i}$$

5. G-T's exact test

Guo と Thompson は, DNA 型についての HWE 検定に exact test を応用することを提案した<sup>7)</sup>. この方法は下記の式によって与えられる Pr 値について, 前項と同様の方法でアレル頻度を固定した上でシミュレーションをするものである. 彼等はシミュレーションの方法としてモンテカルロ法とマルコフチェーン法を提案している. そして, 各遺伝子型のとりうる Pr 値の分布を求めた上で, 実際の観察集団の値がどこに位置するかを求め, 確率 (P 値) で表わした. 我々は, 実際にはモンテカルロ法により乱数を 10,000 回発生させてシミュレーション集団を 10,000 回発生させ, likelihood ratio test と G-T's exact test を同時に実施した.

$$Pr(f) = \frac{2^{He} n! \prod_{i=1}^a (2n\tilde{p}_i)!}{(2n)! \prod_{i=1}^a \prod_{j>i} x_{ij}!} \dots\dots\dots (4)$$

6. アレルのグループ化の方法

アレルのグループ化においては, 必ずしもまれなアレルを隣接したアレルとグループ化する必要はない. しかし,  $\chi^2$  検定において, 5 の法則を満たすためにそれぞれの分類ワクを合併する場合には, 多くの応用面で隣接したマスを合併するほうがよいことが実証されている<sup>10)</sup>. また, 現実には多くの組み合わせがありうる場合に, 対応を単純化するためにも, NRC II の勧告どおり原則として隣接したアレルを合併することとした<sup>8)</sup>. ただ, 両端にまれなアレルが存在する場合や, まれな不規則アレルが 4 塩基毎に出現する場合などでは適宜まれなアレル同士をまとめるなどの配慮をした. そして, 出現数を 5 以上としたり, HWE が否定できなくなるようにするなど目的が達成されるまでアレルをグループ化した. なお, 同じ数のアレル群で目的が達成された場合には, それぞれのアレル群で the power of discrimination (PD 値)<sup>10)</sup> により識別能力を評価し, 識別能力のより高いアレル群を採用することとした.

結 果

1. まれなアレルの取り扱いについて

STR はミニサテライトに比し, アレル数が少なく, 各アレルについてかなりの出現数が期待できる. ただ, 出現数が少ないまれなアレルも時にみられる. そのようなまれなアレルの小さい出現頻度は, 観察集団毎のばらつきが大きくなるので注意が必要とされている. 刑事鑑定についての勧告である NRC II では, 出現数が 5 未満のアレルは隣接したアレルとグループ化して少なくとも出現数を 5 以上にすることを勧告している.

そこで, 母集団からのランダムなサンプリングを前提として, 200 人の観察集団において, 少数の出現数が観察集団毎にどのようにばらつくかを二項分布により計算してみると, Fig.1 となった. 400 分の 1 の出現頻度の場合には, 0 の確率も高く, 95% の信頼限界で見ると上限は 3 となった (Fig.1a). 一方, 400 分の 5 の出現頻度の場合には, 0 の確率は極めて低くなり, 出現確率の分布はほぼ正規分布に近似できるようになった (Fig.1b). この結果はサンプル数を変えてもほ

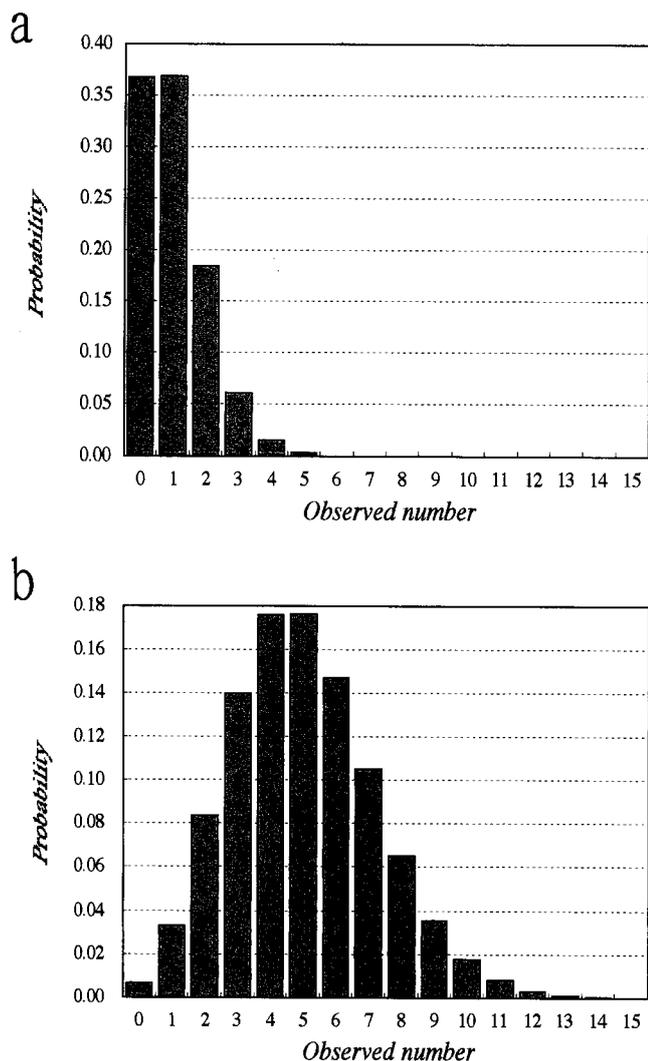


Fig. 1. a; Binominal distribution of the entry when the frequency is one out of 400. b; Binominal distribution of the entry when the frequency is five out of 400.

とんど変らなかった。従って、出現数が5となれば95%の信頼限界の上限と下限が十分に定まることとなり、上限はせいぜい2倍程度となった。

2. HWEの検定について

今回検討した9ローカスのSTRについて、そのままの場合と、アレルの最低出現数が5以上となるようまれなアレルをグループ化した場合について、homozygosity test, likelihood ratio test, G-T's exact testによる検定を行った。そして、それらのうち1つでもP値が5%未満となった場合にはすべてのテストのP値が5%以上となるまでまれなアレルを前記のグループ化の方法に従ってまとめた。なお、 $\chi^2$ 検定を実施する場合は5の法則を満たすようグループ化し<sup>10)</sup>、P値が5%未満であれば、5%以上となるようさらにグループ化した (Table 1)。

結局、今回検討した9個のSTRについての日本人頻度でみると、そのままHWEが成立していなかったのはvWA, TH01, CSF1POのみであった。この3つについては頻度の少ないアレルを原則として隣同士でまとめてグループ化し、検討したところ、Table 2に示すアレル群ではhomozygosity test, likelihood ratio test, G-T's exact testのいずれにおいてもHWEが否定されないことが示された。

なお、刑事鑑定に向けて、NRC IIの勧告に従い、最低出現数を5以上となるようにアレルをグループ化して用いる場合には、9ローカスのうち上記の3ローカスを除いたSTRの日本人頻度はTable 3に示すものがHWEにあるものといえる。Table 2に示された3ローカスは最低出現数がすべて5以上となっており、そのまま利用できる。

考 察

1. まれなアレルの扱い

法医学領域で用いられるDNAマーカーの頻度調査においては、出現数が1回や2回などのまれなアレルが時にみられる。このようなまれなアレルは調査によっては出現しないこともしばしば起こり、出現数の分布の下限値が定まらず、分布の正確な推定が困難である。このようなまれなアレルは否定には極めて有用であるが、調査毎に観察頻度のばらつきが大きいので、肯定の場合の確率計算でも採用したサンプル集団の頻度の影響を大きく受けることになる。このような頻度を刑事鑑定に用いると被告人や被疑者に不当に低い頻度を適用するおそれが生ずる。刑事鑑定における頻度の検討を中心とした米国科学アカデミーの2回目の勧告 (NRC II) では、この点についても触れており、前述の如く、出現数が5以上となるよう隣接したアレルと合わせグループ化することを勧告している。我々も二項分布の検討により、この勧告の有効性を認めた。出現数が5の場合、アレル数を400 (200人) とすれば出現頻度は2.5%となるが、アレル数を2,000 (1,000人) とすれば0.5%となる。すなわち、サンプル数を増やしていけばより低い頻度も用いることができる。逆にサンプル数が小さければ、高い頻度しか用いることができなくなることになる。このようにすれば、まれなアレルが出現した場合でも比較的安全に低い頻度を計算に用いることができる。ただ、このような配慮はあくまで刑事鑑定において、被告人や被疑者に不当に不利にならないための配慮といえ

Table 1. Grouping of alleles of nine STR loci required for HWE tests using 206 Japanese

Locus	Number of allele groups					
	Original <sup>a</sup>	HWE <sup>b</sup>	(Min 5) <sup>c</sup>	HWE (Min 5) <sup>d</sup>	Rule of 5 <sup>e</sup>	HWE ( $\chi^2$ ) <sup>f</sup>
D3S1358	6	6	5	5	4	4
vWA	7	4	7	4	5	4
FGA	15	15	11	11	6	6
TH01	6	5	5	5	3	3
TPOX	7	7	5	5	3	3
CSF1PO	8	3	6	3	3	3
D5S818	9	9	7	7	5	5
D13S317	7	7	6	6	5	5
D7S820	7	7	6	6	4	4

<sup>a</sup> Original : no grouping.

<sup>b</sup> HWE : grouping so that all probabilities of the homozygosity test, the likelihood ratio test and G-T's exact test indicate more than five %.

<sup>c</sup> Min 5 : alleles containing less than five entries are pooled basically with adjacent alleles so that no alleles have less than five entries.

<sup>d</sup> HWE (Min 5) : grouping so that all probabilities of the homozygosity test, the likelihood ratio test and G-T's exact test indicate more than five % after alleles less than five entries is pooled.

<sup>e</sup> Rule of 5 : grouping so that the expected values of all genotypes under HWE are more than one, and that the number of the genotypes of which the expected values are less than five should be less than 20%.

<sup>f</sup> HWE ( $\chi^2$ ) : grouping so that the goodness-of-fit test can verify each pooled allele frequency is under HWE.

Table 2. Grouped allele frequencies of vWA, TH01 and CSF1PO so that each loci is under HWE (n = 206).

vWA		TH01		CSF1PO	
Allele	Frequency	Allele	Frequency	Allele	Frequency
14, 15	0.209	6	0.187	7, 9, 10	0.248
16	0.175	7	0.240	11	0.211
17	0.262	8	0.046	12-15	0.541
18, 19, 20	0.354	9	0.485		
		9,3, 10	0.041		
homozygosity test p=0.0589		homozygosity test p=0.0521		homozygosity test p=0.1058	
likelihood ratio test p=0.0780		likelihood ratio test p=0.2027		likelihood ratio test p=0.2491	
exact test p=0.0633		exact test p=0.2868		exact test p=0.2920	

る。親子鑑定では、低値でもあくまで観察された頻度が中立的な値とみなしてよいと思われる。

なお、サンプル数を大きくしていけば、多くの場合にまれなアレルをグループ化する必要がなくなると考えられるので、グループ化の手法は比較的小規模のデータベースをより安全に用いるための便法と考えた方がよいかもしれない。また、同程度の規模の集団でもあるものはグループ化が必要となり、あるものは必

要がないなどのバラツキがでることも考えられる。ただ、前記のグループ化の方法に従い、PD値を指標にすれば特定の集団についてのグループ化はほぼ定ったものになる。

## 2. subpopulationについて

一つの国の中でいくつかの民族が共存していることの多い欧米では、DNA鑑定において、ある集団で観察されたアレル頻度を特定の遺伝子型頻度の推定に

Table 3. Grouped allele frequencies of six STR loci so that no alleles have less than five entries and that each loci is under HWE (n = 206).

D3S1358		FGA		TPOX		D5S818		D13S317		D7S820	
Allele	Frequency										
14	0.034	17, 27	0.015	8	0.490	7, 8	0.012	8	0.226	7, 13	0.051
15	0.415	18	0.022	9	0.070	9	0.083	9	0.114	8	0.090
16	0.291	19	0.073	10	0.041	10	0.214	10	0.146	9	0.051
17	0.199	20	0.121	11	0.354	11	0.252	11	0.238	10	0.216
18, 19	0.061	21	0.138	12-14	0.044	12	0.272	12	0.206	11	0.350
		22	0.216			13	0.146	13, 14	0.070	12	0.243
		23	0.163			14, 15	0.022				
		24	0.143								
		25	0.068								
		26	0.029								
		X, 2*	0.012								
homozygosity test p = 0.2002		homozygosity test p = 0.0842		homozygosity test p = 0.7673		homozygosity test p = 0.8125		homozygosity test p = 0.8548		homozygosity test p = 0.5626	
likelihood ratio test p = 0.8102		likelihood ratio test p = 0.8726		likelihood ratio test p = 0.1352		likelihood ratio test p = 0.5388		likelihood ratio test p = 0.2779		likelihood ratio test p = 0.4449	
exact test p = 0.6341		exact test p = 0.7618		exact test p = 0.0880		exact test p = 0.2727		exact test p = 0.2664		exact test p = 0.5631	

\*: 21.2, 22.2, 24.2, 25.2

そのまま用いてよいか盛んに論じられてきた<sup>13)~17)</sup>。同一の民族内ではHWEがほぼ成立していても、異った民族間での交配が少ない場合には、それぞれのsubpopulationを生ずることになる。仮りに母集団からのサンプリングがランダムにおこなわれたとしても、subpopulationが存在していれば、ホモ接合体を増やすことになり、homozygosityの観察値 ( $p_{ii}$ ) が期待値 ( $p_i^2$ ) よりも大きくなる。これはウォーランド効果<sup>18)</sup>として知られており、従来から集団遺伝学では  $p_{ii}$  が  $p_i^2$  に比しかなり大きい場合は注意を要するとされている。subpopulationがあると、ある民族の集団では高い頻度で存在しているアリアルが全体では低い頻度となってしまう、実際のDNA鑑定では被疑者にとって不当に低い頻度として扱われることになる。

このsubpopulationの検出については、米国科学アカデミーの第1回目の勧告 (NRC I) でも触れている<sup>19)</sup>。そこでは、 $\chi^2$ 検定は検出力が弱いので、 $\chi^2$ 検定でHWEが否定されなくてもsubpopulationの問題は残るとされており、ceiling principleによるアリアル頻度の補正を提案した<sup>18)</sup>。

米国科学アカデミーは、しかしながら別のメンバーによる検討の結果、4年後の1996年にNRC IIを発表し、それまでのデータベースの蓄積を前提にしてceiling principleは必要ないとした。そして、HWEにあ

るのはあくまで理想集団であり、実際の集団は多かれ少なかれHWEからずれているとし、観察集団における期待値からのずれを $\bar{\theta}$ 値 (近交係数と同義とされている) として計算し、ホモ接合体頻度を補正することを提案している<sup>20)</sup>。 $\bar{\theta}$ 値は下記の式により計算できるが、

$$\theta = (f_s - f_T) / (1 - f_T) \dots \dots \dots (5)$$

$f_s$ : The average value of the sum of the exact expected homozygote frequencies for each populations

$f_T$ : The sum of the exact expected homozygote frequencies for the pooled data

実際には、それまでのデータベースの分布から $\bar{\theta}$ 値として一律に0.01を用いればよいとしている。ただ、データベースの累積が当時まだ少なかったPCRを用いる検査では0.03を用いることとしている。すなわち、一般にはホモ接合体頻度を下記の式により計算し、理論値を補正する。

$$P_{ii} = P_i^2 + P_i(1 + p)\bar{\theta} \dots \dots \dots (6)$$

ヘテロ接合体は観察値が期待値より高くなっているはずであるので、 $\bar{\theta}$ 値で補正せずそのままの値を用いるというものである。

一方、英国のEvettsら<sup>21)</sup>らは、当該のアリール頻度を実際の条件で観察したアリールを加えて補正した上で、さらに $\bar{\theta}$ 値で補正することを提案している。いずれにしても、subpopulationの問題をかかえている場合には、観察集団がHWEにあることを厳密に検定するのではなく、観察された遺伝子頻度を $\bar{\theta}$ 値で補正して用いようとする考えは同じである。

一般に集団遺伝学における頻度調査では、限られた範囲で収集された観察集団が対象となるので、母集団からのランダムなサンプリングを前提としている統計学の検定法の適用には一定の限界がある。しかしながら、ほぼ単一民族であり、狭い国土に多数の人口を抱えて、しかも交通機関の発達で人の交流が盛んとなっている我が国では、少なくとも日本人集団のsubpopulationの問題は少ないと考えられる。従って、一般的には頻度調査においてHWEの検定を行うことは、DNA鑑定信頼性を高める上で有用と考えられる。

### 3. $\chi^2$ 検定について

集団遺伝学の頻度調査におけるHWEの検定としては、これまで $\chi^2$ 検定が頻用されてきた。しかし、この方法はサンプル数が大きい場合に変量である $\chi^2$ 値が(遺伝子型数-アリール数)の自由度を持つ $\chi^2$ 分布に近似的に従うことを根拠に $\chi^2$ 分布からP値を得ていることに注意しなければならない。過去の経験と理論から、5の法則を満たせば一般に近似は十分であることが知られている。逆にいえば、5の法則を満たしていないとするならば、 $\chi^2$ 値が $\chi^2$ 分布に近似的に従うことが保証されないことになり、P値の算出根拠が失われる。ただ、この5の法則を厳密に適用すると、数百例という一般的なサンプル集団では、STRでもアリールをかなりグループ化しなければならず、識別能力を大きく低下させることになる。

### 4. 新しいHWEの検定法について

アリールの多いDNA型に適した検査法として提唱されてきたのが、本研究で用いたhomozygosity test, likelihood ratio test及びG-T's exact testである。

homozygosity testは集団内のsubpopulationの検出に基本的な手技であり、検出力は強くないが欠かせない方法と考えられる。ただ、前述のWeirの論文<sup>5)</sup>では、homozygosity testの $\chi^2$ 値として次式が導かれているものの、

$$\chi^2 = n(H_0 - h_0) / h_0(1 - h_0) \dots \dots \dots (7)$$

この式では平均値が理論上1未満となるので、平均値が1であるべき自由度1の $\chi^2$ 分布に乗らない。従って、(7)式の平均値で除して $\chi^2$ 分布に近似できるように補正した前述の(2)式を用いるべきとしている。Budowle等の論文<sup>22)</sup>では、数値からみるとhomozygosity testとして(7)式が用いられているが、理論上は(2)式が用いられるべきである。

一方、likelihood ratio testは統計学の標準法であるが、やはりサンプル数が大きい場合に $\chi^2$ 分布に近似するという性質を用いて計算するのが一般的である。遺伝子型数が多いDNA型について少ない標本数で検定する場合には、前述したシミュレーションを行って実際にとりうる遺伝子型分布の傾向を直接求めた上で観察集団の遺伝子型分布の出現確率を算出するか、あるいは少数例に適しているとされるexact testを行うことになる。正確なexact testの計算は極めて複雑なので、GuoとThompsonは前述したPr値を比較するシミュレーション法を提唱している。本研究では彼等の方法に従って乱数によるシミュレーションを行い、これらのG<sup>2</sup>値またはPr値を観察集団の値と比較して、likelihood ratio testとG-T's exact testのP値を同時に算出している。この二つの検定法のうち、いずれを実施するか、あるいは両者共実施するかは今後の検討課題である。MaisteとWeirは、この二者を含むいくつかの検定法を比較し、G-T's exact testが最もすぐれているとしているが<sup>23)</sup>、根拠は必ずしも明らかではない。現段階ではG-T's exact testをベースに用いていくとしても、少なくとも少数例では、とりあえず両者を実施し、いずれにおいてもHWEが否定されないとの結果を得ていくことが望ましいと思われる。なお、 $\chi^2$ 値はlikelihood ratio testから近似値として導かれることが証明されており<sup>24)</sup>、 $\chi^2$ -testはlikelihood ratio testの簡便なものともみなすことができる。

ある母集団の遺伝マーカーのアリール頻度を推定するためには、なるべく多数例で頻度調査を行うことが望ましいのはいうまでもない。ただ、ほぼ単一民族である我が国では、比較的少数例での頻度調査においても、本研究で示したようにHWEが成立するよう、アリールをさらに大きなグループにまとめなければならないローカスは多くないと考えられる。従って、HWEが成立した大規模なデータベースが構築されていない段階では、本研究で示したように、刑事鑑定では最低出現数を5となるようにアリールをグループ化

した上でHWEが成立するよう適宜アリアルをグループ化した頻度 (Table 2, 3) を用いることが望まれる。また、親子鑑定では、3ローカスについてはTable 2に示す頻度、その他の6ローカスについては既報の頻度<sup>9)</sup>をそのまま用いることで、信頼性のある結果を得ることができると考えられる。

#### 5. 確率計算の信頼性について

DNA鑑定による個人識別や親子鑑定は、従来のABO式血液型などの古典的血液型による検査に比し格段に精度が高まっている。この精度は問題となった集団における特定のアリアル出現頻度から計算される確率で示される。集団におけるアリアル出現頻度はその集団から無作為に選んだ人から提供された試料についての検査から得られる。

実際の集団は遺伝的に均一とは限らず、また無作為に選んでも母集団を反映した試料になるとは限らないので、確率計算の結果は絶対的なものではない。そのため、DNA鑑定においても否定にのみ用い、確率計算をすべきでないとの論がとくに刑事鑑定で散見される。しかしながら、これまでの集団遺伝学の研究の積み重ねにより、適切な配慮のもとで計算された確率は十分信頼に足るものとなっている。もちろん、刑事鑑定においては被告人に不当に不利になりうる確率計算を実施することは避けるべきである。例えば少なくとも日本人集団が問題であれば、まれなアリアルをまとめ、さらにHWEが否定されない頻度分布を確認したローカスのみを頻度計算に用いるなどの慎重な対応が望まれる。

我が国においても、外国人とりわけ極東アジア、東南アジアあるいは南米からの旅行者や移住者が増えており、日本人との混血もまれではなくなっている。これらの人について犯罪捜査や親子鑑定等でのDNA鑑定が必要になる場合が増えてくることも考えられる。その場合の頻度計算をどうすればよいかについては今後の課題である。それぞれの民族の頻度調査によるデータベースを用いるのが望ましいが、それが整備されていない場合にはceiling principleに従うのも一つの方法であろう。いずれにしても、集団遺伝学の面から学問的に十分検討し、妥当な方法を求めることが望まれる。

謝辞：稿を終えるにあたり、貴重な御助言をいただいた名古屋大学大学院多元数理研究科尾畑伸明助教授、大澤研二助教授及び宮尾 克教授に感謝申し上げます。また、本研究の一部は文部省科学研究費から助成を受けたので、こ

に謝意を表します。

#### 文 献

- 1) Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 1985 ; 314 : 67—73.
- 2) Urquhart A, Kimpton C P, Gill P. Sequence variability of the tetranucleotide repeat of the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2) locus. *Hum Genet* 1993 ; 92 : 637—8.
- 3) Moller A, Ineyer E, Brinkmann B. Different types of structure variation in STRs : Hum FES/FPS, Hum VWA, and Hum D21S11. *Int J Leg Med* 1993 ; 106 : 319—23.
- 4) Urquhart A, Kimpton C P, Downes T J, Gill P. Variation in short tandem repeat sequences - a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Leg Med* 1994 ; 107 : 13—20.
- 5) Weir BS. Independence of VNTR alleles defined by fixed bins. *Genetics* 1992 ; 130 : 873—87.
- 6) Chakraborty R, Pornage M, Guegue R, Boeuwinkle E. Population genetics of hypervariable loci : Analysis of PCR based VNTR polymorphisms within population. In : Burk T, Dolf G, Jeffreys AJ, Wolff R. editors. *DNA fingerprinting : Approaches and applications* ; Berlin : Birkhauser Verlag ; 1991 pp.127—43.
- 7) Guo S W, Thompson E A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg Proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992 ; 48 : 361—72.
- 8) Committee on DNA Forensic Science : An Update National Research Council. *The Evaluation of Forensic DNA Evidence*. Washington D C : National Academy Press. 1996 ; p.148.
- 9) Yamamoto T, Uchihi R, Nozawa H, Huang X-L, Leong Y-K, Tanaka M, Mizutani M, Tamaki K, Katsumata Y. Allele distribution at nine STR loci - D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317 and D7S820 - in the Japanese population by multiplex PCR and capillary electrophoresis. *J Forensic Sci* 1999 ; 44 : 167—70.
- 10) Cochran W G. Some methods for strengthening the common  $\chi^2$  test. *Biometrics*. 1954 ; 110 : 417—51.
- 11) PG ホーエル著, 浅井 晃, 村上正康共訳. 入門数理統計学. 東京 : 培風館. 1978 ; p.227.
- 12) Fisher RA. Standard calculations for evaluating a blood-group system. *Heredity* 1951 ; 5 : 95—102.

- 13) Lewontin RC, Hartl DL. Population genetics in forensic DNA typing. *Science* 1991 ; 254 : 1745—50.
- 14) Devlin B, Risch N, Roeder K. Statistical evaluation of DNA fingerprinting : A critique of the NRC's report. *Science* 1993 ; 259 : 748—50.
- 15) Balding DJ, Donnelly P. How convincing is DNA evidence? *Nature* 1994 ; 368 : 285—6.
- 16) Weir B S. Population genetics in the forensic DNA database. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 ; 89 : 11654—11659.
- 17) Lander ES, Budowle B. DNA fingerprinting dispute laid to rest. *Nature* 1994 ; 8 : 371—735.
- 18) 野澤 謙. 動物集団の遺伝学. 名古屋 : 名古屋大学出版会, 1994 ; pp.36—7.
- 19) Committee on DNA Technology in Forensic Science : Board of Biology : Commission on Life Sciences : National Research Council. DNA Technology in forensic Science. Washington DC ; National Academy Press. 1992 ; pp. 74—96.
- 20) Committee on Forensic Science : An Update Commission on DNA Forensic Science : An Update National Research Council. The Evaluation of Forensic DNA Evidence. Washington DC ; National Academy Press. 1996 ; pp. 89—124.
- 21) Evett I W, Gill P, Lambert J A. Statistical analysis of data for three British ethnic groups from a new STR multiplex. *Int J Legal Med* 1997 ; 110 : 5—9.
- 22) Budowle B, Lindsey JA, JA DeCou, Koons BW, Giusti AM, Comey CT. Validation and population studies of the loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, and Gc (PM loci), and HLA-DQ  $\alpha$  using a multiplex amplification and typing procedure. *J Forensic Sci* 1995 ; 54 : 40—45.
- 23) Maiste PJ, Weir BS. A comparison of tests for independence in the FBI RFLP data bases. *Genetica* 1995 ; 38 : 96—125.
- 24) PG ホーエル著, 浅井 晃, 村上正康 共訳. 入門数理統計学. 東京 : 培風館, 1978 ; pp.358—60.