

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 25 年度博士課程入学

氏 名:旭 愛

指導教員名:武内 ゆかり

論文題目 イヌの遺伝的多様性を利用した法科学的研究

日本国内におけるイヌの飼育頭数は一千万頭以上と推計され、犯罪現場にイヌの体液や被毛が遺留されることも少なくない。動物虐待や血統書偽装などイヌが直接関わる事件だけでなく、殺人や強盗、強姦などの事件において、関係者を介してイヌの DNA が遺留されることもあり、多岐にわたって重要な証拠となりうる。現在、イヌの DNA 型鑑定は、いくつかの機関が独自の STR (Short Tandem Repeat) 検査パネルを考案して行っているが、いずれも複数パネルを用いているため簡便性に欠け、di-repeat 座位を用いているため客観性や再現性が不安視されている。海外では既成キットも販売されているが日本では入手できず、国内において簡便で学術的に信頼し得るイヌの個体識別法の確立が望まれている。

法科学分野においては、近年、世界的に検査の客観性、識別力、再現性などに厳しい目が向けられており、検査方法について十分な学術的検討が行われることが求められている。DNA 型鑑定に用いる STR 座位に関して、日本 DNA 多型学会が策定した「DNA 型鑑定についての指針」では、国内外において広く検討されていることや、法科学的に有用性が認められていること、アレルの出現頻度データが蓄積されていること、追試可能であることなどを挙げ、「総合して十分な識別力が得られる必要がある」とされている。本研究では、2013 年にアメリカで考案された DogFiler について、国内で飼育されているイヌを用いて検討し、日本の法科学鑑定への適用を試みた。

本論文は6章から構成され、第1章において背景と目的を論じた後、第2章から第5章では本研究で実施した実験について記述し、第6章において本研究で得られた成果をもとに総合的な考察を行った。

第2章では、DogFilerを日本の法科学鑑定に適用させることを目的として、客観性、再現性、簡便性を確保できるよう検査の条件設定を行った。DogFilerは15座位のSTR型とY染色体の有無をマルチプレックスPCRで解析するイヌのDNA型検査法である。検査座位はいずれもtetra-repeatのSTRで、異なる染色体上に存在しており、一回のPCRと電気泳動で解析が可能とされる。残念ながらDogFilerでは、プライマー配列やPCR条件は開示されていたものの、詳細な条件が記されておらず、解析ソフトとして電気泳動の誤差を検査者が補正して判定するGeneMapper[®]が使用されていた。そこで本章では、詳細な条件設定を行うとともに、電気泳動の誤差をアレリックラダーで自動補正する機能を備えたGeneMapper[®] ID-Xを使用することで、客観性、再現性、簡便性の確保を試みた。検討には一般家庭で飼育されているイヌ114頭(24犬種と雑種)から抽出したDNAを用い、2ngをテンプレートとして全座位を解析できる条件を模索した。さらに、各座位のホモ接合サンプルの配列をシーケンス法によって確認したうえでアレリックラダーを作製し、これをスタンダードとして適宜用いることで、簡便で再現性が高く、検査者に依存しない客観的な判定が可能となった。

第3章では、日本国内における多型性を確認するため、ランダムにサンプリングした一般家庭飼育個体のSTRについて解析を行った。犬種の認定や繁殖の管理は各国のケネルクラブがそれぞれ独自に行っており、遺伝的多様度には地域性があると考えられている。そのため、DNA型検査法を法科学鑑定に適用する際には、国内におけるアレルの出現頻度データを蓄積し、多型性や識別力を評価する必要がある。本解析には麻布大学バイオバンクプロジェクトに提供されたDNAサンプルを用い、1992頭(81犬種と雑種)のアレル頻度データを蓄積し、統計学的な解析を行った。その結果、各座位のアレル数(nA)は9~28、識別能(PD)は0.93~0.99、多型情報含有率(PIC)は0.76~0.91と算出され、多型性の高さが示された。偶然一致率(1-PDの総乗)は 3.73×10^{-22} となり、国内のイヌの飼育頭数が約一千万(10^7)頭であることを考えると、識別力は極めて高いと判断された。しかしながら、いずれの座位においてもヘテロ接合度の期待値(H_E)が観測値(H_O)よりも低く、遺伝的な偏りが示唆された。そこで、このランダムサンプリング群の中に20頭以上の個体が含まれていた23犬種を分集団とし、WrightのF統計量を算出したところ、分集団間の遺伝的分化

の程度を示す指標である F_{ST} は純血種において 0.048~0.287 であった。雑種の F_{ST} が 0.006 であったことから、選択的な犬種内交配による遺伝的集団間分化によって犬種間でアレルの偏りが生じたものと推察され、同一もしくは近縁の犬種を扱う際には注意が必要であることが示唆された。

第 4 章では、近親個体群の解析を行った。イヌは多産動物であるため血縁関係にある個体が多く、近親個体を識別できることは極めて重要である。そこで、日本盲導犬協会において飼育されている血縁関係のあるラブラドル・レトリバー 393 頭を近親個体群として解析し、アレル頻度データの蓄積と多型性の評価を行った。その結果、 nA は 4~12 と少なく、 H_E (0.38~0.82) および H_O (0.39~0.86) も低い値となったが、偶然一致率は 2.17×10^{-14} と低く、十分な識別力があると判断された。実際、同一犬種近親個体群であるにも関わらず、解析した 393 頭すべての個体を識別することが可能であった。ただし、本群は F_{ST} の平均値が 0.15 と遺伝的分化を示した一方で、近親交配作用の程度を示す F_{IS} の平均値が -0.03 であったことから、背景に作為的な交配と遺伝子流入があることが示唆され、完全な閉鎖集団ではなく、他の近親個体群と比べて高い多型性が維持されていると推察された。

イヌの DNA 型鑑定においては、親子や同胞関係の証明が求められるケースも想定されるため、多型性と突然変異率のバランスも重要である。この群に含まれていたラブラドル・レトリバー 49 胎のべ 264 組の親子と、ラブラドル・レトリバーとゴールデン・レトリバーの一代交雑種 9 胎のべ 60 頭の親子を用いて、親子・同胞間の識別や突然変異率についても確認し、親子・同胞鑑定への適用性を検討した。その結果、最大 11 頭の同胞をすべて識別することができ、親子・同胞間であっても識別が可能であった。本解析では 56 例の突然変異が確認され、突然変異率は 0.6% と算出された。また 1 個体に 2 座位で変異が見られた例もあったため、孤立否定 (1 座位の不一致では血縁関係を否定しないという原則) では対応できない可能性があり、今後親子判定について基準を明確に定める必要があると考えられた。

第 5 章では、「分集団」すなわち犬種に焦点をあて、本手法の応用を試みた。

第 1 節では、各犬種を分集団として遺伝的多様性や近交度を解析し、犬種の維持、管理への応用について検討した。日本で数多く飼育されているチワワ、トイ・プードル、ミニチュア・ダックスフンド、シバイヌ、ラブラドル・レトリバーの 5 犬種に日本盲導犬協会のラブラドル・レトリバーを使役犬コロニー群として加え、それぞれの分集団における遺伝的距離や多型性を調べ、犬種間の比較を行った。その結果、 F_{ST} の値 (0.040~0.171) から 5 犬種の犬種間分化は顕著であるものの、いずれの犬種においても F_{IS} は低く (0.014~0.046)、各犬種内で血縁関係に配慮した作為交配が行わ

れていることが示された。使役犬コロニー群においては、遺伝的距離が小さくなったにも関わらず近交度を表す F_{IS} が低く、親子や同胞個体が含まれていることや遺伝子流入があるということが正しく反映されることが明らかとなった。よって本手法が集団における遺伝的多様度を評価する方法として有用であることが示された。

第2節では、犬種推定法の確立を試みた。第1節で解析した5犬種のアレル頻度データと、第3章で解析したランダムサンプリング群のアレル頻度データをもとに、名義ロジスティック回帰分析と尤度比解析を行い、15座位のSTR型から犬種推定が可能であるかについて検討した。その結果、アレル頻度から各犬種であると仮定した場合の尤度比を算出することで、99%以上の高い的中率で犬種を推定できることが明らかとなり、カットオフポイントを感度と特異度をそれぞれ重視した2点に設定することで、最大の効果を得られることが示された。今後はさらにアレル頻度データを蓄積することで、他犬種についても推定が可能となろう。

第6章では、総合考察を行った。本研究より、(1)DogFilerを改良することで客観性、再現性、簡便性が確保され、日本の法科学鑑定に適用可能であること、(2)日本国内においても検査座位は多型性が高く、識別力が極めて高いこと、(3)近親個体間であっても十分な識別力が認められるものの、突然変異率が高く、血縁関係の証明には注意が必要であること、が明らかとなった。さらに、本研究を応用することで(4)犬種や使役犬コロニーなどの特定の集団内における近交度の評価や(5)未知の試料からの犬種推定が可能となることが示された。今後はアレックラダーの拡充や、他の犬種における解析など、実務導入に向けてさらなるデータの蓄積と検討が必要ではあるものの、本研究成果が国内における法科学的なイヌの個体識別や親子鑑定、犬種推定だけでなく、イヌの育種や管理へも応用されることが期待される。