

気質関連遺伝子の多型マーカーを用いた  
犬の行動特性予測に関する研究

平成 13 年度進学  
東京大学大学院農学生命科学研究科  
獣医学専攻 博士課程

橋爪 千恵

# 目次

第1章	総合緒言	1
第2章	犬における気質関連遺伝子の多型マーカー検索	
	緒言	9
	材料と方法	12
	結果	24
	考察	28
	小括	31
	図表	32
第3章	盲導犬候補個体の気質評価	
	緒言	48
	材料と方法	50
	結果	52
	考察	54
	小括	56
	図表	57
第4章	盲導犬候補個体における遺伝子多型解析	
	緒言	73
	材料と方法	74
	結果	76
	考察	77
	小括	79
	図表	80
第5章	重回帰分析による盲導犬候補個体の適性予測	
	緒言	90
	材料と方法	92
	結果	94
	考察	96
	小括	98
	図表	99
第6章	総合考察	107
	図表	116
	総括	119
	参考文献	122
	謝辞	131

## 第 1 章

### 総合緒言

## はじめに

犬は私たち人間と古くから行動を共にし、共生してきた。太古の昔、犬の祖先は、人間の祖先の暮らす住居の近くを徘徊し、人間の出した残飯を食糧として生活することで、住居の衛生状態を良好に保つという恩恵を人間の祖先に与えてきた。近年では文明の発展やライフスタイルの変化によって、そうした原始的な関係は解消されることとなったが、犬を生活の伴侶としている多くの人々は、彼らからさまざまな恩恵を受けていると感じているだろう。それは例えば、一緒に散歩することによる健康増進であったり、散歩中に出会う犬の飼い主とのコミュニケーションであったり、一緒に暮らす家族への話題提供であったりする。ただし、こうした恩恵は、ともに暮らしている犬との関係が良好である場合にのみ得られるものであり、飼い主の日常生活に支障をきたすような粗悪な関係である場合にはこうした恩恵も期待できない。

近年、日本では、飼い主が犬との関係を改善する目的で行動カウンセリングを受けたり、しつけ教室に参加したり、あるいは訓練施設に犬を預けたりすることが増えてきた。この一因には、生活様式の欧米化に伴い、犬を屋内で飼育する家庭が増えてきたことがあるだろう。犬を屋内で飼育する場合、屋外で飼育する場合に比べ、犬と接する時間が長く、より緊密な関係が築かれるからである。また、犬には家庭内のマナーをわきまえさせるためにいくつかのしつけをする必要が生じるからである。そして、飼い主と良好な関係が築けるか否かは、しつけの成否と犬の個性にかかっているといえる。つまり、飼い主が犬との関係を良好でないと感じる背景には、しつけがうまく行われていないことや犬の個性が理解できず誤った接し方をしていることが挙げられる。

個性とは、他の個体とは違った、その個体に特有の性格を指す。複数の犬を見知っている人なら気づいていると思われるが、われわれ人間のみならず犬においても個性があり、同じ状況におかれても、個体によって反応は様々である。そうした犬の個性を正しく把握することは、飼い主が犬と良好な関係を築き、犬との暮らしから恩恵を享受するために重要なことであるといえよう。

## 研究の背景

### 遺伝子多型と性格傾向の関連研究

人の精神医学分野では、脳内神経伝達物質の動態が個人の性格傾向に影響を及ぼすことが明らかにされつつある。中でもセロトニンが損害回避傾向に、ドーパミンが新奇探求傾向に、ノルエピネフリンが報酬依存傾向にかかわるという Cloninger の提唱を発端に、脳内モノアミンに関する研究が盛んに行なわれている [Cloninger, C. R. 1987]。こうした

分野では塩基配列の一部が個体によって異なる「遺伝子多型」を個性のマーカーとして用いる研究が進んでおり、例えば DRD4 遺伝子多型と新奇探求性[Benjamin, J. *et al.* 1996; Ebstein, R.P. *et al.* 1996]、あるいはセロトニントランスポーター遺伝子多型と不安傾向などに関連があるという報告[Lesch, K.P. *et al.* 1996]が相次いでいる。主な遺伝子多型と、関連する表現型について表 1 に示した。

“氏か育ちか”とは、人の個性が遺伝的要因によるのか、それとも生後の環境要因によるのかという古くからの疑問である。近年、人の精神遺伝学分野では、この遺伝要因と環境要因が対立する因子ではなく、相互作用を持っていると考えられるようになってきた。つまり、例えば遺伝的に不安傾向の高い親は、子にその遺伝子を伝えると共に、自らが遺伝子の影響を受けた行動様式により、育児行動の不安定化を引き起こし、子がさらに不安傾向を持ちやすい環境を作り与えてしまうかもしれない。あるいは遺伝子が行動特性に影響を与えることで、相対する個体に負の感情反応を惹起し、自らをよりストレスフルな環境へと暴露させてしまうことがあるだろう。モノアミンオキシダーゼ遺伝子多型の特定の変異を持つ個体では生後の環境が厳しい場合に精神疾患への脆弱性が高くなったという、環境要因に対する感受性の差異にも遺伝的要因が深く関わっていることを示す報告も最近なされている[Caspi, A. *et al.* 2002]。つまり、行動特性さらには気質という複雑な表現系を包括的に理解するには、まずその遺伝学的背景を解明していくことが重要であると思われる。

### これまでの行動特性の研究における課題

人では双生児・家族研究などに関連して行動特性に関連する遺伝子の検索を大規模に実施することが可能であるが、一貫した結果が得られていないのが現状である。その理由として、人では気質評価時の精神状態や社会的要因が研究結果に大きく影響を及ぼしてしまうことが考えられよう。他方、齧歯類のような小型実験動物の遺伝子を人為的に操作するという手法は、特定の遺伝子が特定の行動特性に与える影響を検討するにはきわめて有効であるが、こうした動物では評価の難しい個性や気質といった複雑な表現系に関連するような遺伝子情報を得ることは困難である。そのため行動評価および遺伝子解析が可能となる適切なモデルの選択が必要とされている。

### 研究の目的

犬は非常に古くに家畜化されたが、われわれと共存していく過程で人間の様々な需要に応えるために、その行動特性や体格を指標とした育種選抜を受けてきた。Scott と Fuller

が犬種の交雑や戻し交配といった手法を用いて、様々な行動テストの成績についての遺伝率を算出した[Scott, J. P. *et al.* 1965]結果、探索行動や逃避行動、遊び、訓練性能などにおいて犬種間に大きな差が認められ、それら行動特性の高い遺伝性が報告されている。また不安傾向なども遺伝する傾向にあることが示されている[Goddard, M. E. *et al.* 1982]。このように、犬種ごとに特徴的な強い遺伝的支配を受けている犬は、行動特性に関連する遺伝子研究において、客観的な性格評価を行うことができる有効な実験モデルとなりうるであろう。しかしながら、前述したように、犬の行動特性に関わる遺伝的要因の研究は観察評価を中心とした記述統計的研究であり、分子生物学的アプローチはまだなされていない。そこで本研究の目的として、犬を研究モデルとして、遺伝子多型を利用した分子生物学的アプローチによって行動特性の遺伝的背景を解き明かすこととした。気質およびその個体差の生物学的背景の理解は、脳神経科学の基礎的研究の発展に貢献するだけでなく、人と動物の適正な共存関係を模索していく上でも意義が大きいと考えられる。また、本研究では特に、需要がありながらも、育成率が驚くほどに低い、盲導犬育成（一頭あたり数百万円という多大な投資を要するものの、盲導犬育成の成功率は低く、現在は米国でも50%に満たず我が国では30%前後といわれている）に焦点を絞り、どのような行動特性が盲導犬としての合否判定に関与し、その行動特性は遺伝学的背景の解析によって早期に予測できるかについて検討した。盲導犬候補個体の行動特性を早期に予測することができるようになれば、個体の特性に応じた訓練を実施することが可能となるだけでなく、盲導犬としては適さないと予測される個体については早期に一般家庭へ譲渡することで個体に合わせた飼育環境を提供することが可能となり、動物福祉的観点からも本研究の意義は大きいと考えられよう。

具体的には、第2章では犬における気質関連遺伝子の候補として、行動の動機付けに関わるドーパミンを代謝分解するモノアミン水酸化酵素（MAO）遺伝子および、ドーパミンをノルアドレナリンへと生合成するドーパミンβ水酸化酵素（DBH）遺伝子を選定し、それぞれのアミノ酸をコードする領域（ORF）の塩基配列を決定した。次に、これら遺伝子の塩基配列を複数個体由来のDNAを用いて比較することによって、個体間での相違、すなわち遺伝子多型を検索した。同定された遺伝子多型については、国内の獣医科病院の協力を得て、5犬種（ラブラドルレトリバー、ゴールデンレトリバー、マルチーズ、ミニチュアシュナウザー、シバイヌ）から採材したDNAを解析し、犬種間での遺伝子多型出現頻度を比較検討した。第3章では米国カリフォルニア盲導犬訓練協会の協力により入手した、年間約300頭もの規模で繁殖・育成される盲導犬候補個体の遺伝情報と訓練時における行動の継時的記録、および最終適性審査の合否結果を調査した。そして、どのような行動特性が盲導犬の合否判定に関与するのかを精査する目的で、盲導犬訓練士によって訓練

期間を通じて毎週記録された評価コメントに着目し、各個体のデータを数値化して因子分析および主成分分析を行った。続く第4章では第2章で同定した遺伝子多型が、盲導犬候補個体の行動特性に及ぼす影響について検討するために、各遺伝子多型の遺伝子型別に候補個体をグループ化し、第3章にて集計・解析を行った行動評価スコアおよび主成分得点の平均値を算出し比較検討した。更に、盲導犬適性審査の合否別に各遺伝子多型のアレル出現頻度を比較し、それぞれの遺伝子多型が適性審査の結果に関連しているかについても検討した。そして第5章では、これまで個々に調査してきた遺伝子多型と行動特性の関係を、遺伝子多型の相互作用についても調査する目的で重回帰分析を行い、行動特性との関連を検討した。更に遺伝子多型マーカーを用いることで、盲導犬候補個体の最終審査合否結果が予測可能であるかについても検討した。

表 1 気質や精神疾患と関係が認められた多型のある遺伝子群

(文献は 1996～2000 年の MEDLINE データベースにて検索した)

標的遺伝子と関連気質および精神疾患*	文献
<b>セロトニントランスポーター</b>	
不安 (VNTR)	Science274: 1527-31, J. Hum. Genet. 44: 15-7
損害回避 (VNTR)	Psychiat. Genet. 8: 41-4, Arch. Gen. Psychiat. 55: 936-40, Psychiat. Genet. 8: 41-4
新奇探求性 (VNTR)	Biol. Psychiat. 43: 908-12
うつ病 (VNTR)	Am. J. Med. Genet. 81: 58-63, Psychol. Med. 29: 1249-54, Prog. Neuro-psychopharm. Biol. Psychiat. 23: 55-65
アルコール依存 (VNTR)	Biol. Psychiat. 43: 908-12, Biol. Psychiat. 45: 647-51
喫煙 (VNTR)	Cancer Epidemiol. 8: 831-3
<b>セロトニン 1B 受容体</b>	
反社会的アルコール依存 (SNP)	Arch. Gen. Psychiat. 55: 989-94
反社会的アルコール依存 (VNTR)	Arch. Gen. Psychiat. 55: 989-94
<b>セロトニン 2A 受容体</b>	
統合失調症 (SNP)	Lancet9011: 1294-6, J. Psychiat. Neurosci. 24: 141-6
統合失調症におけるクロザピン反応 (SNPa)	Neurosci. Lett. 217: 177-8, Neuropsychopharmacol. 19: 123-32
季節性うつ病 (SNP)	Mol. Psychiat. 4: 89-92, J. Affect. Disorders53: 203-10
神経性無食欲症 (SNP)	Neurosci. Lett. 277: 134-6
神経性大食症 (SNP)	Neurosci. Lett. 277: 134-6
<b>セロトニン 2C 受容体</b>	
双極性障害 (SNPa)	Neurosci. Lett. 212: 65-7
報酬依存 (SNPa)	Am. J. Med. Genet. 74: 65-2
<b>セロトニン 6 受容体</b>	
統合失調症におけるクロザピン反応 (SNP)	Neuroreport10: 1231-3
アルツハイマー病 (SNP)	Neurosci. Lett. 276: 138-9
<b>セロトニン 7 受容体</b>	
アルコール依存, 衝動性 (SNPa)	Psychiatr. Res. 77: 139-45
<b>ドーパミントランスポーター</b>	
注意欠陥/多動性障害 (VNTR)	Am. J. Med. Genet. 56: 993-8, Mol. Psychiat. 2: 311-3, Genomics52: 289-97
双極性障害 (VNTR)	Am. J. Med. Genet. 67: 533-40
新奇探求性 (VNTR)	Biol. Psychiat. 42: 1070-2, Health Psychol. 18: 7-13
統合失調症 (VNTR)	Eur. Neurol. 38(Suppl1)6-10
アルコール依存 (VNTR, SNP)	Psychiat. Genet. 7: 87-91, Mol. Psychiat. 4: 552-7
喫煙 (VNTR)	Health Psychol. 18: 7-13
<b>ドーパミン D2 受容体</b>	
アルコール依存 (RFLP)	Psychiat. Genet. 7: 87-91, Biol. Psychiat. 43: 40-51
新奇探求性 (RFLP)	Am. J. Med. Genet81: 257-67
報酬依存 (RFLP)	Am. J. Med. Genet81: 257-67
損害回避 (RFLP)	Am. J. Med. Genet81: 257-67
統合失調症 (RFLP, SNP)	Mol. Psychiat. 2: 239-46, Schizophrenia Res. 40: 31-6

次ページに続く



<b>ドーパミン D3 受容体</b>	
統合失調症 (RFLP)	J. Med. Genet. 29: 858-60, Am. J. Med. Genet. 67: 63-70, Genomics52: 289-97
双極性障害 (RFLP)	Genomics52: 289-97
新奇探求性 (RFLP)	Am. J. Med. Genet. 81: 192-4, Psychiat. Genet. 9: 17-21
<b>ドーパミン D4 受容体</b>	
新奇探求性 (VNTR)	Nature Genet. 12: 78-80, Am. J. Med. Genet. 74: 501-3, Am. J. Med. Genet. 81: 257-67
統合失調症 (VNTR)	Eur. Neurol. 38(Suppl1)6-10
注意欠陥／多動性障害 (VNTR)	Mol. Psychiat. 3: 38-41, Mol. Psychiat. 3: 419-26, Mol. Psychiat. 3: 427-30, Am. J. Psychiat. 156: 768-70
双極性障害 (VNTR)	Am. J. Med. Genet. 88: 486-91
損害回避 (VNTR)	Am. J. Med. Genet. 88: 634-41
<b>ドーパミン D5 受容体</b>	
自閉症 (SNPa)	Am. J. Med. Genet. 81:172-78
<b>GABA-A <math>\alpha 6</math> 受容体</b>	
アルコール依存 (SNPa)	Biol. Psychiat. 45: 647-51
<b>コレシストキニン受容体</b>	
アルコール依存 (SNP)	Alcohol Clin. Exp. Res. 22(Suppl3)93S-96S
<b>カテコール-O-メチル転移酵素 (COMT)</b>	
統合失調症 (SNPa)	Psychiat. Genet. 6: 131-3, Psychiat. Res. 69: 71-7, Neurosci. Lett. 243: 109-12
パーキンソン病 (SNPa)	Neurosci. Lett. 221: 202-4, J. Neural. Transmission104: 1313-7
強迫性障害 (SNPa)	Pro. Natl. Acad. Sci. USA94: 4572-5, Psychiat. Genet. 7: 97-101
双極性障害 (SNPa)	Psychiat. Genet. 7: 97-101, Pharmacogenetics7: 349-53, Mol. Psychiat. 3: 342-5, Mol. Psychiat. 3: 346-9
注意欠陥／多動性障害 (SNPa)	Am. J. Med. Genet. 88: 497-502
<b>ドーパミン <math>\beta</math> 水酸化酵素</b>	
薬物治療後の統合失調症 (Microsatellite)	Biol. Psychiat. 41: 762-7
統合失調症 (RFLP)	Schizophrenia Res. 22: 77-80
<b>モノアミン酸化酵素 A</b>	
衝動的攻撃 (SNP)	Science5133: 578-80
双極性障害 (Microsatellite)	Am. J. Hum. Genet. 54: 1122-4
パニック障害 (VNTR)	Hum. Mol. Genet. 8: 621-4
反社会的アルコール依存 (VNTR, RFLP)	Psychiat. Res. 86: 67-72, Genomics55: 290-5
<b>モノアミン酸化酵素 B</b>	
パーキンソン病 (Microsatellite, SNP)	Move. Disorder14: 219-24, Am. J. Med. Genet. 74: 154-6
<b>トリプトファン水酸化酵素</b>	
衝動的攻撃 (SNP)	Am. J. Med. Genet. 81: 13-7
双極性障害 (SNP)	Arc. Gen. Psychiat. 55: 33-7
自殺行動, 衝動性 (SNP)	Genomics52: 289-97, Arc. Gen. Psychiat. 55: 593-602
攻撃性, 怒りに関する気質 (SNP)	Biol. Psychiat. 45: 603-14
<b>チロシン水酸化酵素</b>	
双極性障害 (RFLP)	Am. J. Med. Genet. 74: 289-95, Am. J. Med. Genet. 81: 127-30
統合失調症 (VNTR)	Eur. Arch. Psychiat. Clin. Neurosci. 248: 61-3
慎重さ, 従順さ (VNTR)	Psychiat. Res. 95: 1-8

\* ; カッコ内に多型の様式を示す。RFLP ; 制限酵素切断断片長多型, VNTR ; 可変長タンデムリピート, Microsatellite ; 2-4 塩基のタンデムリピート, SNP ; 一塩基多型, SNPa ; アミノ酸置換を伴う一塩基多型

## 第 2 章

### 犬における気質関連遺伝子の多型マーカー検索

## 緒言

行動特性や性格傾向は、遺伝的要因と環境的要因の相互作用によって形成されることが知られており、現在では家族研究や双生児研究などから、人では性格の形成における遺伝的要因の占める割合は約 30～60%と推定されている[Plomin, R. 1990]。精神医学領域においても、躁鬱病や不安症の中には高発家系のものがあるため、糖尿病やハンチントン舞踏病といった遺伝性疾患と同様に、精神疾患にも遺伝的な背景が存在することが知られている。近年の脳神経科学分野は、人の精神状態や性格を、神経伝達物質やその情報を受け取る受容体といった分子を基盤に解析してきたが、性格の中でも遺伝的要因の影響を強く受ける気質 (temperament) に関しては、ドーパミン、セロトニン、ノルエピネフリンといった神経伝達物質の動態との関連が示唆されている[Cloninger, C.R. 1987]。さらに、分子生物学の発展は、遺伝子の大規模な解析を可能とし、遺伝子多型 [genetic polymorphism; 集団の中で 1%以上の多型性出現頻度を有する遺伝子座を指し、直列反復配列における反復回数の相違や一塩基置換などが含まれる] と特定精神疾患の罹患率や薬物反応との関連について様々な情報をもたらした[Brunner, H.G. *et al.* 1993; Lesch, K.P. *et al.* 1996]。心理学領域においても、新奇性追求とドーパミン D4 レセプター (DRD4) 遺伝子多型との関連[Benjamin, J. *et al.* 1996]をはじめとして様々な遺伝子と性格の関連についての研究が始まり、これらの遺伝子変異がどのような機序で性格に影響を及ぼし、それが顕在化するのか、大変興味を引かれる分野となっている。

本研究を始めるにあたり、遺伝子多型と精神疾患や気質との関連について解析した文献を検索したところ、人においては、ドーパミン D4 レセプター (DRD4) [Catalano, M. *et al.* 1993; Nothen, M.M. *et al.* 1994; Seeman, P. *et al.* 1994; Cichon, S. *et al.* 1995; Liu, I.S. *et al.* 1996]、セロトニントランスポーター[Di Bella, D. *et al.* 1996; Lesch, K.P. *et al.* 1996; Caspi, A. *et al.* 2003; Ozaki, N. *et al.* 2003]、セロトニン 2C レセプター[Gutierrez, B. *et al.* 1996; Ebstein, R.P. *et al.* 1997; Oruc, L. *et al.* 1997; Lappalainen, J. *et al.* 1999; Segman, R.H. *et al.* 2000]、ドーパミントランスポーター[Chen, C.K. *et al.* 2003; Kirley, A. *et al.* 2003]、ドーパミン D2 レセプター (DRD2) [Duan, J. *et al.* 2003; Tan, E.C. *et al.* 2003]、モノアミン酸化酵素 A (MAOA) [Brunner, H.G. *et al.* 1993; Sabol, S.Z. *et al.* 1998; Deckert, J. *et al.* 1999; Huang, Y.Y. *et al.* 2004]、カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ[Benjamin, J. *et al.* 2000; Egan, M.F. *et al.* 2001; Frisch, A. *et al.* 2001]、ドーパミン  $\beta$ -水酸化酵素 (DBH)

[Cubells, J.F. *et al.* 1998; Wood, J.G. *et al.* 2002; Smith, K.M. *et al.* 2003; Healy, D.G. *et al.* 2004]といった8種の遺伝子を中心に気質との関連が研究されていた(表1)。

### ドーパミン神経系

なかでも興味を引かれたのは、動物にとって根源的な報酬、食物に対する動機付けなどにかかわることが近年明らかとなってきた、ドーパミン神経系である。ドーパミン神経系には、パーキンソン病の変性部位であり運動機能に關与する中脳－黒質－線条体系、統合失調症などの情動失調との関連が示唆されている中脳－辺縁－皮質系、また下垂体ホルモンの分泌を調節する隆起－下垂体系などがある。ドーパミンはカテコラミン合成経路で作られる最初の神経伝達物質であり、前駆体であるチロシンからチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase, TH)、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC) による修飾を受けて生合成される。そして、ドーパミンはドーパミンβ-水酸化酵素 (dopamine beta-hydroxylase, DBH) によってノルアドレナリンへと転換される。また、ドーパミンはモノアミン酸化酵素 (monoamine oxidase, MAO) およびカテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (catechol O-methyltransferase, COMT) によって代謝分解される。

### モノアミン酸化酵素(MAO)

MAOは神経細胞の終末や星状膠細胞に存在するミトコンドリアの外膜に存在し、ドーパミンだけでなく、セロトニンやノルアドレナリンを代謝分解する[Shih, J.C. 1991]。MAOにはMAOAとMAOBの2種類のサブタイプがあり、それぞれ基質と阻害薬に特異的に反応する[Johnston, J.P. 1968; Knoll, J. *et al.* 1972]。人のMAOA遺伝子およびMAOB遺伝子は共にX染色体に存在し、隣り合っていることが分かっている。そのため、元来一つだった遺伝子が進化の過程で2種類のサブタイプに分化し、異なる基質特異性を獲得したと考えられている。人ではMAOAはセロトニンとノルアドレナリンに高い親和性を持ち、MAOBはドーパミンに高い親和性を持つことが明らかとなっている。また、MAOAおよびMAOBはともに、その代謝機能に重要な役割を果たす補酵素 flavin-adenine dinucleotide(FAD)が結合するアミノ酸配列(Ser-Gly-Gly-Cys-Tyr)を持っている[Minamiura, N. *et al.* 1978]。このアミノ酸配列は人以外に、牛およびラットにも存在している[Johnston, J.P. 1968; Minamiura, N. *et al.* 1978; Bach, A.W. *et al.* 1988; Cases, O. *et al.* 1995]。

近年の研究からMAOはいくつかの行動障害に關与していることが明らかとなってきた。MAOAノックアウトマウスは成長後に異常な攻撃性を示し[Cases, O. *et al.* 1995]、人のMAOA遺伝子突然変異家系では衝動的な攻撃性が認められている[Brunner, H.G. *et al.*

1993]。MAOA 遺伝子の翻訳開始コドン ATG より上流約 1400 bp には繰り返し配列があり [Zhu, Q. S. *et al.* 1992]、パニック障害の発症に関連しているという報告がある [Deckert, J. *et al.* 1999]。また、人の血小板に存在する MAOB の酵素活性が衝動的行動傾向に関連するという報告もある [Klinteberg, B. *et al.* 1987]。獣医学領域では、MAOB の選択的阻害薬である l-deprenyl の投与は、老齢犬の認知障害の改善に役立ち [Milgram, N. W. *et al.* 1993]、空間認知記憶をも増強すること [Ruehl, W. W. *et al.* 1995] が知られている。こうしたことから、MAO は情動や認知機能に重要な役割を演じている可能性が高く、MAO の機能障害は個体の行動様式に大きな影響を及ぼすものと考えられる。しかしながら、MAO サブタイプの主要な基質や発現部位は動物種によって異なっているため [Shih, J. C. 1991; Inoue, H. *et al.* 1999]、犬における MAO の発現部位を特定し、犬特有の発現パターンについて検討することは重要である。

### ドーパミン $\beta$ -水酸化酵素 (DBH)

DBH はドーパミンからノルアドレナリンを生合成する酵素であり、ノルアドレナリン、およびアドレナリン神経系のシナプス小胞に存在している。DBH はシグナルがシナプスに到達するとシナプス小胞から放出され、シナプス間隙からやがて脳室液 (CSF) 中や血漿中にも浸出する [Weinshilboum, R. M. *et al.* 1975; O'Connor, D. T. *et al.* 1983]。人の CSF 中および血漿中の DBH 活性は遺伝的要因に大きく影響を受けるようであり、DBH 遺伝子翻訳開始コドンから 444 番目のアミノ酸置換を伴わない一塩基多型と CSF や血漿中の DBH 活性に相関が見られたという報告は興味深い [Cubells, J. F. *et al.* 1998]。また、この一塩基多型とうつ病発症率に関連があるとの報告もあり [Wood, J. G. *et al.* 2002]、DBH 機能異常が情動反応に変化を及ぼす可能性が示唆されている。

こうした背景から、まず第 2 章においては、行動関連遺伝子の候補としてドーパミン生合成経路に関与する遺伝子としてモノアミン酸化酵素 (MAO) およびドーパミン  $\beta$  水酸化酵素 (DBH) に着目し、これらを司る遺伝子のアミノ酸をコードする領域である open reading frame (ORF) の塩基配列を決定し、これらの遺伝子における多型部位を検索した。MAOA 遺伝子ではプロモーター領域についても多型部位を検索した。さらに、Northern Blot 解析を行い、脳内における MAO 遺伝子の発現分布様式についても検討した。

## 材料と方法

### 犬の MAOA 遺伝子 cDNA 全長の塩基配列決定

#### *Total RNA の抽出と cDNA の合成*

ビーグル犬（東京大学農学部獣医学専修実習犬）を高用量の麻酔薬を用いて安楽死し、大脳辺縁系扁桃体を含む部位を採材した。本研究における全ての動物実験については、東京大学における動物実験実施マニュアルに従い実施した。Total RNA は TRIZOL® reagent (Gibco BRL, U. S. A.) を用いて抽出した。得られた 1µg の total RNA を鋳型とし Oligo d(T)<sub>16</sub> (Perkin-Elmer Co., U. S. A.) と GeneAmp® RNA PCR Kit Components (Perkin-Elmer Co., U. S. A.) を用いて mRNA を選択的に逆転写し 1 本鎖 cDNA を得た。

#### *cDNA 全長の塩基配列決定*

人[Hsu, Y. P. *et al.* 1988]、牛[Powell, J. F. *et al.* 1989]およびラット[Kuwahara, T. *et al.* 1990]の MAOA 遺伝子 cDNA 塩基配列間で相同性の高い部位を元に設計したプライマーを用いて 犬 cDNA を鋳型とした PCR を行った。反応液は cDNA 溶液 4 µl、dNTP 各 200 µM、10× Ex Taq Buffer 10 µl (Takara, Japan)、プライマー各 0.2 µM、TaKaRa Ex Taq (Takara, Japan) 2.5 unit として、最終液量が 100 µl となるよう調整した。反応はプログラムテンプコントロールシステム PC-701 (Astec, Japan) を用いた。使用したプライマーおよび PCR 条件を以下に示す。

Forward (F1): 5'-GGA CTA TCT GCT GCC AAA CT-3'

Reverse (R1): 5'-TGA GGC TCA GAG GTC ACA TT-3'

PCR 条件: 94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 1 分を 30 サイクル

反応後十分に冷却した PCR 産物をフェノール-クロロホルム処理後、2%アガロースゲル(BMA, U. S. A.) で電気泳動し目的の DNA バンドを切り出し、QIAquick gel extraction kit (Qiagen, U. S. A.) によって精製した。得られた DNA 溶液をエタノール沈殿によって濃縮し、うち 100ng をダイレクトシーケンシングに用いた。ダイレクトシーケンシングは、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Co., U. S. A.)

を用いて、ABI Prism 377 シーケンサ(Perkin-Elmer Co., U.S.A.)で行った。得られた塩基配列を解析ソフトウェア DNASIS-MAC v3.0 を用いて牛、人およびラットの MAOA 遺伝子 cDNA 塩基配列と比較すると、相同性がそれぞれ 88%、85%、80%と高い値であったので、同塩基配列を犬の MAOA cDNA の一部であると推察した。

次に、ビーグル犬大脑海馬部 mRNA の全塩基配列をインサートに持つ完全長 cDNA ライブラリー[Suzuki, Y. *et al.* 1997] (東京大学医科学研究所癌ウイルス研究部・鈴木穰先生より獣医実験動物学研究室を経由して供与いただく) を鋳型とした PCR によって犬 MAOA 遺伝子 cDNA 塩基配列における未読の 5' 領域および 3' 領域を特異的に増幅した。5' 領域増幅のために、ライブラリーベクター pME18S-FL3 (GenBank accession No.: AB009864) の塩基配列をもとにした forward プライマー(pME-fw)と犬 MAOA cDNA 一部配列をもとにした reverse プライマー(RV953)を用いて PCR を行った。また、3' 領域増幅のために犬 MAOA cDNA 一部配列をもとにした forward プライマー(FW 1357)と、ライブラリーベクター pME18S-FL3 の塩基配列をもとにした reverse プライマー (RV1857) を用いて PCR を行った。PCR 増幅には Extaq polymerase (Takara, Japan) を用いた。使用したプライマーおよび PCR 条件を以下に示す。

5' 領域 : Forward (pME-fw) : 5'-CTT CTG CTC TAA AAG CTG CG-3'

Reverse (RV953) : 5'-CGA CAT GTT CAT TCC TCA CG-3'

3' 領域 : Forward (FW1357) : 5'-GTG GTA TGT GAA GCA GTG CG-3'

Reverse (RV1857) : 5'-ATG TTT CAG GTT CAG GGG GA-3'

PCR 条件 : 94℃ 1 分、59℃ 1 分、72℃ 1 分を 30 サイクル

得られた DNA 溶液をフェノール-クロロホルム処理後エタノール沈殿により濃縮し、ダイレクトシーケンシングを行い、翻訳開始コドンから数えて 1 番目から 1095 番目までの配列を得た。さらに ORF 全長の配列を得るために、3' 領域についてはシーケンスウォーキングを行い、得られた塩基配列を既知の配列につなぎ合わせることで 1 番目から 1715 番目までの配列を得て (図 2-1)、これを牛 (GenBank: X15609)、人 (GenBank: M68840) およびマウス (GenBank: D00688) の MAOA cDNA 配列と解析ソフトウェア DNASIS-MAC v3.0 を用いて比較した。

## 犬の MAOA 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列決定

人の MAOA 遺伝子プロモーター領域の構造に関する報告[Grimsby, J. *et al.* 1991]をもとに、犬 MAOA 遺伝子プロモーター領域を Inverse PCR 法[小笠原, 1995]によって特異的に増幅した。鋳型 DNA は、犬のゲノム DNA を制限酵素 Bam H I にて切断し、T4 DNA Ligase (Promega, U.S.A.) によってセルフライゲーションしたものとした。反応液はゲノム DNA 1 µg、Ligase 10x Buffer 100µl、T4 DNA Ligase 10 µl とし、最終液量が 1000 µl となるよう調整し、16℃の恒温水槽で 14 時間反応を行った。得られた反応液を QIAquick PCR purification kit を用いて精製し、滅菌超純水 20 µl に溶かし、DNA 溶液とした。

次に、Inverse PCR 法による特異的増幅産物を確実に得るため、1st PCR 後の増幅産物を鋳型とした 2nd PCR を行う nested PCR 法を採用した。PCR 増幅には Extaq polymerase (Takara, Japan) を用いた。使用したプライマーおよび PCR 条件を以下に示す。

1st PCR : Forward (F32) : 5'-GCC ACA TGT TTG ACG TAG TC-3'

Reverse (R3) : 5'-CTC GTC TTC TCT CTA CTC GC-3'

2nd PCR : Forward (F41) : 5'-TTG ACG TAG TCG TGA TAG GA-3'

Reverse (R3) 1st PCR と同様

PCR 条件 : 95℃ 30 秒、57℃ 1 分、72℃ 5 分を 35 サイクル

得られた PCR 産物を Suprec-02 (Takara, Japan) を用いて精製し、pGEM-T Easy Vector (Promega, U.S.A.) に組み込み、JM109 competent cell (Takara, Japan) へ導入した。目的の PCR 産物が挿入されている大腸菌を選択し、LB-アンピシリン添加液体培地で培養後、QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, U.S.A.) によってプラスミド DNA を抽出し、シーケンシングに用いた。

## 犬の MAOB 遺伝子 cDNA 全長の塩基配列決定

### *Total RNA の抽出と cDNA の合成*

Total RNA は、ビーグル犬の脳辺縁系扁桃体を含む脳ブロックから TRIZOL® reagent (Gibco BRL, U.S.A.) を用いて抽出した。得られた 1µg の total RNA を鋳型とし Oligo d(T)<sub>16</sub> (Perkin-Elmer Co., U.S.A.) と GeneAmp® RNA PCR Kit Components (Perkin-Elmer



Co., U. S. A.) を用いて mRNA を選択的に逆転写し 1 本鎖 cDNA を得た。

### *cDNA 全長の塩基配列決定*

人 (GenBank: M69177)、およびラット (GenBank: M23601) の MAOB 遺伝子 cDNA 塩基配列間で相同性の高い部位を元に設計したプライマーを用いて 犬 cDNA を鋳型とした PCR を行った。PCR 増幅には Extaq polymerase (Takara, Japan) を用いた。使用したプライマーおよび PCR 条件を以下に示す。

Forward (F3) : 5'-CTC TGG GCA TGA AGA TTC AC-3'

Reverse (R3) : 5'-TTC ATC CTC TGG AAT CTT CC-3'

PCR 条件 : 94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 30 秒を 30 サイクル

得られた DNA 溶液をダイレクトシーケンシングに用いた。得られた塩基配列を解析ソフトウェア DNASIS-MAC v3.0 を用いて人およびラットの MAOB 遺伝子 cDNA 塩基配列と比較すると、相同性がそれぞれ 92% および 85% と高い値であったので、同塩基配列を犬の MAOB cDNA の一部であると推察した。

次に、MAOA 遺伝子と同様にビーグル犬大脳海馬部 mRNA の全塩基配列をインサートに持つ完全長 cDNA ライブラリーを鋳型とした PCR によって犬 MAOB 遺伝子 cDNA 塩基配列における未読の 5' 領域および 3' 領域を特異的に増幅した。PCR 増幅には Extaq polymerase (Takara, Japan) を用いた。使用したプライマーおよび PCR 条件を以下に示す。

5' 領域 : Forward (pME-fw) : 5'-CTT CTG CTC TAA AAG CTG CG-3'

Reverse (R635) : 5'-CGC ACC AGT TCT TCT CTT CG-3'

3' 領域 : Forward (F730) : 5'-AGA GAA GAA CTG GTG CGA GG-3'

Reverse (RV1857) : 5'-ATG TTT CAG GTT CAG GGG GA-3'

PCR 条件 : 95°C 30 秒、60°C 1 分、72°C 1 分を 30 サイクル

得られた DNA 溶液をフェノール-クロロホルム処理後エタノール沈殿により濃縮し、ダイレクトシーケンシングを行い、翻訳開始コドンから数えて 1 番目から 1709 番目までの配列を得た。さらに ORF 全長の配列を得るために、3' 領域についてはシーケンスウォーキングを行い、得られた塩基配列を既知の配列につなぎ合わせることで 1 番目から 2400 番目までの配列を得て (図 2-2)、これを人およびラットの MAOA cDNA 配列と解析ソフトウェア DNASIS-MAC v3.0 を用いて比較した。

## 犬の MAOA および MAOB 遺伝子の脳内における発現分布様式の解析

### *Total RNA の抽出*

2 頭のビーグル犬（東京大学農学部獣医学専修実習犬）を高用量の麻酔薬を用いて安楽死し、小脳、視床下部、海馬、扁桃体、前頭前野、側頭野、脳幹、線条体、および嗅球を採材した。それぞれの組織より TRIzol® reagent (Gibco BRL, U. S. A.) を用いて Total RNA を抽出し、使用するまで -80℃ にて保存した。

### *Northern Blot 解析のための cRNA probe 作成*

cRNA probe は MAO 遺伝子のサブタイプに特異的な塩基配列とするため、PCR によって特異的に増幅した産物を鋳型とし、in vitro transcription によって作成した。

まず犬 cDNA を鋳型として MAOA および MAOB 遺伝子を特異的に増幅した。対照実験として  $\beta$ -actin 遺伝子を採用し、同様に特異的に増幅した。PCR 増幅には Extaq polymerase (Takara, Japan) を用いた。使用したプライマーおよび PCR 条件を以下に示す。

MAOA : Forward (F32) : 5'-GCC ACA TGT TTG ACG TAG TC-3'

Reverse (R1030) : 5'-CAT CTG GCT TGG TGT CAT CC-3'

MAOB : Forward (F60) : 5'-ATG AGC GGC AAG TGC GAC-3'

Reverse (R865) : 5'-CCA GAG TAG GAG GAA TGG CA-3'

PCR 条件 : 95℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 45 秒を 35 サイクル

$\beta$ -actin : Forward (F25) : 5'-GTT GTA GAT AAC GGC TCC GG-3'

Reverse (R984) : 5'-CTT GAT CTT CAT CCT TGC TG-3'

PCR 条件 : 95℃ 30 秒、57℃ 1 分、72℃ 1 分を 40 サイクル

得られた PCR 産物を Suprec-PCR (Takara, Japan) を用いて精製し、pGEM-T Easy Vector (Promega, U. S. A.) に組み込み、JM109 competent cell (Takara, Japan) へ導入した。目的の PCR 産物が挿入されている大腸菌を選択し、LB-アンピシリン添加液体培地で培養後、QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, U. S. A.) によってプラスミド DNA を抽出し、シーケンシングにて確認した。得られたプラスミド DNA を鋳型として Northern Starter Kit (Roche Diagnostics KK, Japan) を用いて in vitro transcription により、DIG-11-UTP にラベルされた cRNA を調整した。

### *Northern Blot 解析*

Total RNA 3  $\mu$ g を 1% アガロース MOPS-ホルムアルデヒド含有ゲルに電気泳動し、ナイロンメンブレン (Biodyne, Poll Biosupport, Japan) に転写した。ナイロンメンブレンは 80°C、30 分間乾燥させ RNA をメンブレンに固着させた。次にメンブレンを以下の溶液中に 65°C、90 分間浸すことでブロッキングを行った。Hybridization solution (diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated 水にて調整): 5×standard saline citrate (SSC)、50% formamide、50 mM sodium phosphate buffer、7% SDS、2% DIG-blocking reagent (Roche Diagnostics KK, Japan)、0.1% N-laurylsarcosine、および 0.05 mg/ml salmon sperm DNA。引き続き DIG-11-UTP-labeled cRNA probe とのハイブリダイゼーションを 65°C、16 時間行った。ハイブリダイゼーション後、ナイロンメンブレンを 2×SSC / 0.1% SDS 溶液で 65°C、5 分間、溶液を換えて 2 回洗浄し、同様に 0.5×SSC / 0.1% SDS 溶液で 65°C、20 分間、溶液を換えて 2 回洗浄した。次にナイロンメンブレンを anti-DIG alkaline phosphatase-conjugated antibody (Roche Diagnostics KK, Japan) と 30 分間反応させ、CDP-Star (Roche Diagnostics KK, Japan) を用いて DIG の化学発光を励起し、X-ray film (Hyperfilm; ECL, Japan) に 15 分間暴露することによって発光を可視化した。

### 犬の DBH 遺伝子 cDNA 全長の塩基配列決定

#### *Total RNA の抽出と cDNA の合成*

Total RNA は、ビーグル犬の脳辺縁系扁桃体を含む脳ブロックから TRIZOL® reagent (Gibco BRL, U. S. A.) を用いて抽出した。得られた 1  $\mu$ g の total RNA を鋳型とし Oligo d(T)<sub>16</sub> (Perkin-Elmer Co., U. S. A.) と GeneAmp® RNA PCR Kit Components (Perkin-Elmer Co., U. S. A.) を用いて mRNA を選択的に逆転写し 1 本鎖 cDNA を得た。

#### *cDNA 全長の塩基配列決定*

人 (GenBank: Y00096)、牛 (GenBank: AF118638)、馬 (GenBank: AB029430)、マウス (GenBank: S50200)、およびラット (GenBank: L12407) の DBH 遺伝子 cDNA 塩基配列間で相同性の高い部位を元に設計したプライマーを用いて 犬 cDNA を鋳型とした PCR を行った。PCR 増幅には Extaq polymerase (Takara, Japan) を用いた。使用したプライマーおよび PCR 条件を以下に示す。

Forward (F23) : 5'-TCT TCC TGG TCA TCC TGG TG-3'

Reverse (R1411) : 5'-AGT TGA CGG ACA TCT CCT CC-3'

PCR 条件 : 95°C 30 秒、60°C 1 分、72°C 1 分を 35 サイクル

得られた DNA 溶液をダイレクトシーケンシングに用いた。得られた塩基配列を解析ソフトウェア DNASIS-MAC v3.0 を用いて既知の DBH 遺伝子 cDNA 塩基配列と比較すると、相同性が高い値であったので、同塩基配列を犬の DBH cDNA の一部であると推察した。

次に、ORF 全長の塩基配列を決定する目的で、効率的な遺伝子特異的配列の増幅が可能な RACE 法を用いた。5' RACE 法には、SMART RACE cDNA Amplification Kit (クロンテック) を用いた。50ng の totalRNA を鋳型として、逆転写により 5' 末端にプライミング部位としての SMART オリゴ (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3') を持つ cDNA を合成した。次に、forward primer には SMART オリゴ配列由来のプライマー (NUP および NUP2) を、reverse primer には上記で得られた犬 DBH 遺伝子 cDNA 配列由来のプライマー (R429 および R374) を用いて nested PCR を行った。PCR 増幅には Extaq polymerase (Takara, Japan) を用いた。使用したプライマーおよび PCR 条件を以下に示す。

1st PCR : Forward (NUP) : 5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'

Reverse (R429) : 5'-TGG CCT CTT GAA GAG TAG AC-3'

PCR 条件 : 95°C 30 秒、58°C 1 分、72°C 1 分を 35 サイクル

2nd PCR : Forward (NUP2) : 5'-TGG TAT CAA CGC AGA GTA C-3'

Reverse (R374) : 5'-TGG TAA TCC TGC TGG GAA TC-3'

PCR 条件 : 95°C 30 秒、60°C 1 分、72°C 45 秒を 35 サイクル

得られた PCR 産物をフェノール-クロロホルム処理後、1%アガロースゲル (BMA, U.S.A.) で電気泳動し目的の DNA バンドを切り出し、QIAquick gel extraction kit (Qiagen, U.S.A.) によって精製しダイレクトシーケンシングに用いた。

3' RACE 法には 3'-Full RACE Core Set (Takara, Japan) を用いた。Adaptor site 連結オリゴ dT プライマーを用いて、1  $\mu$ g のイヌ totalRNA を逆転写して cDNA を作製した。逆転写は 30°C 10 分、50°C 15 分、95°C 5 分、5°C 5 分で行った。作製した cDNA を鋳型として、3sites Adaptor primer と犬 DBH 遺伝子 cDNA 配列由来のプライマー (F1258 および F1357) を用いて nested PCR を行った。PCR 増幅には Extaq polymerase (Takara, Japan) を用いた。使用したプライマーおよび PCR 条件を以下に示す。

1st PCR: 3sites Adaptor primer: 5'-CTG ATC TAG AGG TAC CGG ATC C-3'

DBH F1258: 5'-GAT GGC CAA GAG ATA GAG ATC G-3'

PCR 条件: 95°C 30 秒、60°C 1 分、72°C 45 秒を 30 サイクル

2nd PCR: 3sites Adaptor primer: 配列は上記と同様

DBH F1357: 5'-GAC GTG CTC ATC ACT TCC TG-3'

得られた PCR 産物を同様にフェノール-クロロフォルム処理後、1%アガロースゲル(BMA, U. S. A.)で電気泳動し目的の DNA バンドを切り出し、QIAquick gel extraction kit (Qiagen, U. S. A.) によって精製しダイレクトシーケンシングに用いた。シーケンスによって得られた塩基配列を既知の配列につなぎ合わせることで翻訳開始コドンから数えて 1 番目から 2338 番目までの配列を得て (図 2-3)、これを人、牛、馬、マウス、およびラットの DBH cDNA 配列と解析ソフトウェア DNASIS-MAC v3.0 を用いて比較した。

## 犬 MAOA 遺伝子プロモーター領域における遺伝子多型検索

### ゲノム DNA の抽出

カリフォルニア盲導犬協会より提供された盲導犬候補個体血液試料のうち、ラブラドルレトリバー種からランダムに 10 頭を選択した。血液試料は個体の健康診断の際に末梢から抗凝固処理済みバキューティナ採血管 (Becton Dickinson, U. S. A.) を用いて採取された。ゲノム DNA の抽出は QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, U. S. A.) を用いて通常の方法で行い、得られたゲノム DNA は滅菌超純水に溶かし 4°C に保存した。

### MAOA 遺伝子プロモーター領域の塩基配列増幅と比較

人で翻訳開始コドンである ATG から約 1300bp 上流に 30bp の繰り返し配列が存在し、繰り返し数が異なる多型が報告されていること [Sabol, S. Z. *et al.* 1998] に基づいて、犬のプロモーター領域について十分上流であると思われる翻訳開始コドン ATG から上流約 1450bp と上流約 70bp の間の約 1380bp の部分について、ゲノム DNA を PCR によって特異的に増幅し、ダイレクトシーケンスによって決定した。PCR 増幅には Extaq polymerase (Takara, Japan) を用いた。使用したプライマーおよび PCR 条件を以下に示す。

Forward (F521) : 5'-ACT ATG AGC TCA CAC AAG CTC G-3'

Reverse (R10) : 5'-CTC GAT ACT CGT CTT CTC TC-3'

PCR 条件 : 95°C30 秒、62°C30 秒、72°C2 分を 35 サイクル

得られた PCR 産物を Suprec-02 (Takara, Japan) を用いて精製し、ダイレクトシーケンシングに用いた。得られた部分的プロモーター領域の塩基配列は解析ソフトウェア DNASIS-MAC v3.0 を用いてつなぎ合わせ、MAlign 1.0.2 を用いて比較することで多型部位を検索した。

## 犬の MAOA、MAOB、および DBH 遺伝子における遺伝子多型の検索

### *Total RNA の抽出と cDNA の合成*

血縁関係が無い 10 頭のビーグル犬 (東京大学農学部獣医学専修実習犬) を高用量の麻酔薬を用いて安楽死し、大脳辺縁系扁桃体を含む脳ブロックから TRIZOL® reagent (Gibco BRL, U.S.A.) を用いて抽出した。得られた 1µg の total RNA を鋳型とし Oligo d(T)<sub>16</sub> (Perkin-Elmer Co., U.S.A.) と GeneAmp® RNA PCR Kit Components (Perkin-Elmer Co., U.S.A.) を用いて mRNA を選択的に逆転写し 1 本鎖 cDNA を得た。

### *MAOA、MAOB、および DBH 遺伝子 ORF の塩基配列増幅との比較*

ORF 全長の塩基配列を得た遺伝子 3 種について、ORF における多型を検索する目的で、10 頭のビーグル犬より合成した cDNA を鋳型とした PCR およびダイレクトシーケンスを行った。MAOA 及び MAOB 遺伝子については 5' 及び 3' 非翻訳領域の配列を元に、ORF の全長を含む PCR プライマーを設計した。DBH 遺伝子については、ORF を前後半の 2 部位に分割してそれぞれの部位を増幅するプライマーを設計した。PCR 増幅には Extaq polymerase (Takara, Japan) を用いた。使用したプライマーおよび PCR 条件を以下に示す。

MAOA: Forward (F6) : 5'-TAC TGG AGT CTC TAC CAG AC-3'

Reverse (R1894): 5'-GGT TTC TGA TCA GCA CTT CA-3'

PCR 条件 : 95°C 30 秒、60°C 1 分、72°C 1 分を 30 サイクル

MAOB: Forward (F60) : 5'-ATG AGC GGC AAG TGC GAC-3'

Reverse (R2156): 5'-GTG GAC CTG TGT TCT AGT CCT CC-3'

PCR 条件：95℃ 30 秒、61℃ 30 秒、72℃ 1 分を 30 サイクル

DBH：前半 Forward (F23)：5'-TCT TCC TGG TCA TCC TGG TG-3'

Reverse (R1498)：5'-TAT GGC TCT TGC AGA GCT CC-3'

PCR 条件：95℃ 30 秒、54℃ 30 秒、72℃ 1 分を 35 サイクル

DBH：後半 Forward (F1258)：5'-GAT GGC CAA GAG ATA GAG ATC G-3'

Reverse (R2312)：5'-CAG CAC ACC AAC ACA GAT CG-3'

PCR 条件：95℃ 30 秒、65℃ 1 分、72℃ 1 分を 35 サイクル

得られた PCR 産物を Suprec-PCR (Takara, Japan) を用いて精製し、ダイレクトシーケンシングに用いた。得られた塩基配列は解析ソフトウェア DNASIS-MAC v3.0、および MAlign 1.0.2 を用いて比較することにより多型部位を検索した。

## 犬の MAOB、および DBH 遺伝子の多型出現頻度の調査

### 遺伝子多型の検索に供試するゲノム DNA の抽出

遺伝子解析のための血液採材は、獣医動物行動研究会 (<http://www.vma.u-tokyo.ac.jp/koudou/vbhHP/>) の一部のコアメンバー獣医師（五十嵐和恵；ベストフレンド・ペットの行動クリニック，井本史夫；井本動物病院，臼井玲子；臼井犬猫病院，内田恵子；苅谷動物病院・葛西橋通り，宇野哲安；宇野獣医科病院，柿沼綾子；柿沼ペット動物病院，小暮規夫；小暮動物病院，佐藤昭司；千里ニュータウン動物病院，武部正美；武部獣医科病院，立松誠；立松獣医科，村田香織；もみの木動物病院；五十音順，敬称略）の協力を得て，神奈川県，栃木県，東京都，愛知県，大阪府，兵庫県にて実施した。各担当獣医師には，飼い主に研究内容を説明して了承を得た上で主としてフィラリア検査時に出る剰余血液を採取して頂いた。まず末梢から抗凝固処理済みバキュティナ採血管（Becton Dickinson, U.S.A.）を用いて得られた犬全血は-20℃にて凍結保存した。ゲノム DNA の抽出は QIAamp DNA Blood Midi Kit（Qiagen, U.S.A.）を用いて通常の方法で行い、得られたゲノム DNA は滅菌超純水に溶かし 4℃に保存した。このようにして 5 犬種（ラブラドルレトリバー、ゴールデンレトリバー、マルチーズ、ミニチュアシュナウザー、シバイヌ）それぞれ 20 頭以上から採材したゲノム DNA を解析した。詳細な解析頭数については表 2-1 および 2-2 に示した。

## 5 犬種を対象とした遺伝子多型解析

前述の遺伝子多型検索により ORF 領域に認められた 2 遺伝子、3 個の遺伝子多型（一塩基多型）について遺伝子型出現頻度、およびアレル（allele; 対立遺伝子座）出現頻度の分析を行った。解析方法は、制限酵素切断断片鎖長分析法（Restriction enzyme Fragment Length Polymorphism method: RFLP）を用いた。本法は、制限酵素により認識される塩基配列の有無により、酵素処理後の DNA 鎖の電気泳動度が異なることを利用した、シーケンシングに比較して簡便な一塩基多型解析手法である。多型部位を PCR 増幅後、PCR 産物を酵素処理し電気泳動することで可視化できる。使用するプライマーと PCR 条件、RFLP 条件を以下に示す。PCR 増幅には Extaq polymerase (Takara, Japan) を用いた。

### <MAOB>

#### T199C （翻訳開始コドンより 199 番目のチミンからシトシンへの一塩基置換）

Forward (F224): 5'-TCC ATG GAT ACA CCT CAA GG-3'

Reverse (R332): 5'-TGA TGG ATG AGA CGC TCT AC-3'

PCR 条件: 95°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒を 35 サイクル

RFLP: (反応量: 50  $\mu$ l): PCR 産物を制限酵素 Hinf I (Takara, Japan) 8 units で 37°C、16 時間処理後、3% アガロース・ゲルを用いて電気泳動。T アレルの場合は Hinf I によって DNA 鎖が切断されず、258bp の PCR 産物が泳動されるのに対し、C アレルの場合は切断され、180bp と 77bp の 2 種の PCR 産物が泳動される。

### <DBH>

#### C789A （翻訳開始コドンより 789 番目のシトシンからアデニンへの一塩基置換）

Forward (F1) : 5'-GCT TCT GGC AGA TTC TGT GG-3'

Reverse (R862): 5'-GGC AGA CTT TGA GCT CTT GG-3'

PCR 条件: 95°C 1 分、60°C 30 秒、72°C 1 分を 33 サイクル

RFLP: (反応量: 50  $\mu$ l): PCR 産物を制限酵素 HpyCH<sub>4</sub> III enzyme (NEB, U.S.A.) 5 units で 37°C、16 時間処理後、3% アガロース・ゲルを用いて電気泳動。C アレルの場合は HpyCH<sub>4</sub> III によって DNA 鎖が切断されず、361bp の PCR 産物が泳動されるのに対し、A アレルの場合は切断され、290bp と 71bp の 2 種の PCR 産物が泳動される。

#### A1819G （翻訳開始コドンより 1819 番目のアデニンからグアニンへの一塩基置換）

Forward (F1747): 5'-GGT AAA TGG GAT CTG CAA CC-3'



Reverse (R1979): 5'-AGG CAG AGC TAT TCC ACA GG-3'

PCR 条件: 95°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒を 30 サイクル

RFLP: (反応量: 50  $\mu$ l): PCR 産物を制限酵素 Bgl I (TOYOBO, Japan) 9.6 units で 37°C、16 時間処理後、3% アガロース・ゲルを用いて電気泳動。A アレルの場合は Bgl I によって DNA 鎖が切断されず、236bp の PCR 産物が泳動されるのに対し、G アレルの場合は切断され、164bp と 72bp の 2 種の PCR 産物が泳動される。

## 結果

### 犬 MAOA 遺伝子の cDNA 全長の塩基配列決定

得られた塩基配列を人、牛、マウスの MAOA cDNA 配列と、解析ソフトウェア DNASIS-MAC v3.0 を用いて比較すると、それぞれ 86.80%、86.67%、81.56%と高い相同性が得られた（表 2-3）。アミノ酸配列では相同性はそれぞれ 89.75%、89.56%、85.57%であった（表 2-4）。アミノ酸配列の相同部位を図 2-4 に示した。本実験で得られた塩基配列はアミノ酸 527 個からなる ORF をもっており、人と牛の MAOA アミノ酸構成数と同数であったため、得られた塩基配列を犬 MAOA cDNA 全長とし、GenBank に登録した (Accession No. AB038563)。

### 犬 MAOA 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列決定

Inverse PCR 法により得られたゲノム DNA の塩基配列は犬 MAOA 遺伝子 exon1 を含んでいため、exon 1 の 5' 末端側をそれに隣接するプロモーター領域、3' 末端側を intron 1 の一部であると推察した。犬 MAOA 遺伝子プロモーター領域と推察された塩基配列は、解析ソフトウェア Basic BLAST (NCBI 提供; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて人 MAOA 遺伝子プロモーター領域[Grimsby, J. *et al.* 1991]と比較することによって、翻訳開始コドンである ATG から上流 202bp と 174bp の間にある 29bp の配列が GC signal 領域であることが示唆された。塩基配列と位置については図 2-5 に示した。また、人では翻訳開始コドンから上流 263bp と 212bp の間にある 52bp の塩基配列と、犬の翻訳開始コドンから上流 620bp と 569bp および同 530bp と 479bp の間にあるそれぞれ 52bp の配列がいずれも 86%の高い相同性を持っていた。それ以外の領域については 50%以上の相同性を認めなかった。

人で 30bp の繰り返し配列が 3 回から 5 回あるとされている翻訳開始コドンより上流約 1300bp の付近は犬では繰り返し配列を認めず、また人の塩基配列との相同部位もなかった。本実験で得られた犬のプロモーターの構造特徴として、翻訳開始コドンより上流 901bp に至る間において 50%以上の高い相同性をもつ 90bp の繰り返し配列が 10 回見られた。また、翻訳開始コドンより上流 991bp から 902bp までの 90 bp についても上述の繰り返し

配列と類似した配列であった。図 2-6 に 90 bp の繰り返し構造をなす塩基配列を 1 単位としたものを 11 単位示した。

### 犬の MAOB 遺伝子 cDNA 全長の塩基配列決定

得られた塩基配列を人、およびラットの MAOB cDNA 配列と、解析ソフトウェア DNASIS-MAC v3.0 を用いて比較すると、それぞれ 91.81%、および 85.28% と高い相同性が得られた (表 2-3)。アミノ酸配列では相同性はそれぞれ 95.00%、および 88.50% であった (表 2-4)。アミノ酸配列の相同部位を図 2-7 に示した。本実験で得られた塩基配列はアミノ酸 520 個からなる ORF をもっており、人とラットの MAOA アミノ酸構成数と同数であったため、得られた塩基配列を犬 MAOB cDNA 全長とし、GenBank に登録した (Accession No. AB070958)。

### 犬の MAOA および MAOB 遺伝子の脳内における発現分布様式の解析

Northern Blot 解析によって MAOA および MAOB 遺伝子の mRNA 発現分布様式を確認したところ、サブタイプによって発現様式に特徴が見出された。mRNA の分子量について MAOA 遺伝子 mRNA は約 4.8kb、一方 MAOB 遺伝子 mRNA は約 3kb と推定された (図 2-8)。また脳の各部位における発現パターンでは、MAOA 遺伝子 mRNA が嗅球と小脳を除いた 7 部位ではほとんど等量の発現量であったが、MAOB 遺伝子 mRNA は視床下部、海馬、脳幹、および嗅球に強い発現が認められ、扁桃体、前頭葉、側頭葉、および線条体でも発現が認められた。しかし小脳では発現が認められず、(図 2-9) 部位特異的な発現パターンを持っていることが明らかとなった。

### 犬の DBH 遺伝子 cDNA 全長の塩基配列決定

得られた塩基配列を人、牛、馬、マウス、およびラットの DBH cDNA 配列と、解析ソフトウェア DNASIS-MAC v3.0 を用いて比較すると、それぞれ 78.85%、79.20%、82.24%、74.03%、および 73.76% と高い相同性が得られた (表 2-3)。アミノ酸配列では相同性はそれぞれ 72.9%、73.2%、75.9%、68.7%、および 68.7% であった (表 2-4)。アミノ酸配列の相同部位を図 2-10 に示した。本実験で得られた塩基配列はアミノ酸 625 個からな

る ORF をもっており、既知の DBH アミノ酸配列と相同性が高かったため、得られた塩基配列を犬 DBH cDNA 全長とし、GenBank に登録した (Accession No. AB097057)。

### 犬 MAOA 遺伝子プロモーター領域における遺伝子多型部位の検索

得られた塩基配列 1221 bp について、解析ソフトウェア MAlign 1.0.2 を用いて相同部位を検索したところ、いずれの個体から得られたゲノム DNA も全く同じ配列であり、プロモーター領域において遺伝子多型は認められなかった。

### 犬の MAOA、MAOB、および DBH 遺伝子の多型部位検索

ビーグル 10 頭の脳由来 cDNA を用いた多型部位検索によって、MAOA 遺伝子 ORF には多型が認められなかったものの、MAOB 遺伝子 ORF では翻訳開始コドンより 199 番目のチミンからシトシンへの一塩基多型 (T199C) が、DBH 遺伝子 ORF では翻訳開始コドンより 789 番目のシトシンからアデニンへの一塩基多型 (C789A) と 1866 番目のアデニンからグアニンへの一塩基多型 (G1866A) が認められた。次に複数の犬種由来のゲノム DNA を用いて多型解析を行い、これらの一塩基多型が他の犬種においても認められるかを検討したところ、MAOB C199T および DBH C789A は検索に用いた 5 犬種全てに認められたものの、DBH G1866A はいずれの犬種においても認められなかった。しかしながら、同遺伝子多型を解析する過程で、その近傍である翻訳開始コドンから 1819 番目のアデニンが、グアニンに置換する一塩基多型を同定したため、同様に複数の犬種において発現頻度を調査した。その結果、DBH A1819G はシバイヌにのみ認められた。発現頻度等について以下に示す。

#### *MAOB T199C*

T199C は MAOB 遺伝子のアミノ酸配列においてシステイン (中性アミノ酸) からアルギニン (親水性アミノ酸) へのアミノ酸置換をもたらす一塩基多型であることが判明した。オスではヘテロの遺伝子型 (TC) を有する個体は認められなかった。犬種別の発現頻度解析ではオス、メス共にアレル頻度において有意な犬種差が認められた (male:  $\chi^2 = 38.9$ ,  $df = 4$ ,  $p < 0.0001$ ; female:  $\chi^2 = 39.9$ ,  $df = 4$ ,  $p < 0.0001$ )。ゴールデンレトリバーでは T アレルの頻度が 90% 以上であったのに対し、ミニチュアシュナウザーでは 17% 未満となっており、犬種間でのアレル頻度に大きな違いが認められた (表 2-1)。

### *DBH C789A*

C789A は DBH 遺伝子のアミノ酸配列においてアスパラギン（中性アミノ酸）からリジン（親水性アミノ酸）へのアミノ酸置換をもたらす一塩基多型であることが判明した。犬種別の発現頻度解析ではアレル頻度において有意な差が認められた（ $\chi^2 = 81.6$ ,  $df = 8$ ,  $p < 0.0001$ ）。ラブラドルレトリバーでは A アレルの頻度が 73%以上であったのに対し、シバイヌでは A アレルの頻度が 9%未満となっており、犬種間でのアレル頻度に大きな違いが認められた（表 2-2）。

### *DBH A1819G*

A1819G は DBH 遺伝子のアミノ酸配列においてセリン（中性アミノ酸）からグリシン（疎水性アミノ酸）へのアミノ酸置換をもたらす一塩基多型であることが判明した。犬種別の発現頻度解析では G アレルがシバイヌにのみ認められ、そのアレル頻度は 59%となっていた（表 2-2）。

## 考察

犬の MAOA および MAOB 遺伝子 cDNA の塩基配列は、これまでに報告されている他の動物種のもの [Hsu, Y.P. *et al.* 1988; Ito, A. *et al.* 1988; Powell, J.F. *et al.* 1989; Kuwahara, T. *et al.* 1990] と相同性が高いことが明らかとなり、MAO は哺乳類の進化の過程において変化することなく重要な役割を演じてきたことが考えられる。また補酵素 FAD が結合する部位のアミノ酸配列は動物種を超えて同一であったことから (図 2-4, 2-7)、FAD の重要性も推察される。犬の MAOA と MAOB 遺伝子のアミノ酸配列を比較すると、人の報告と同じく、かなり高い相同性を有していることが明らかとなった (>70%)。このことから、これら 2 つの遺伝子が同一の遺伝子から派生したものであることが示唆される。

また、イヌの MAOA 遺伝子プロモーター領域の塩基配列はヒト MAOA 遺伝子プロモーター領域 [Zhu, Q.S. *et al.* 1992] と同様に TATA Box を持たず、ATG より上流 991bp から 50% 以上の相同性をもつ 90bp の繰り返し配列が 11 回続くことが、明らかとなった (図 2-6)。ヒト MAOA 遺伝子プロモーターにおいても 90bp と 48bp の配列が ATG より上流 819 bp から 11 回の繰り返されることが知られており [Zhu, Q.S. *et al.* 1992]、ヒトとイヌでプロモーター領域において類似した構造が存在すると言える。繰り返し配列を構成する塩基配列に相同性は認められないものの、繰り返し配列は基本パターンが進化の過程で増幅してきたものだとすると [Zhu, Q.S. *et al.* 1992]、11 回という繰り返しには何らかの進化的な意味が存在するのかもしれない。

Northern Blot 解析によって MAOA 遺伝子 mRNA は海馬、前頭葉、および小脳に強く発現していた (図 2-8)。しかし人では海馬および小脳ではほとんど発現していない [Shih, J.C. *et al.* 1990]。また、犬の MAOB 遺伝子 mRNA の脳内発現分布様式も人とは大きく異なっていた。犬では海馬および脳幹部で mRNA の発現が強く認められ、小脳では認められなかったが (図 2-9)、人では海馬では認められないが、小脳では認められている [Shih, J.C. 1991]。これらの結果より、MAO 遺伝子の mRNA は脳内において動物種特異的な発現パターンが見られることが示唆された。人では MAOA はセロトニンとノルアドレナリンに高い親和性を持ち、MAOB はドーパミンに高い親和性を持つことが明らかとなっている [Shih, J.C. 1991] が、犬では脳内のモノアミンが MAO のサブタイプのどちらがどのような代謝を担っているのかはいまだ明らかにされておらず、本実験で明らかとなった脳内における発現分布様式の動物種特異性からも検討の余地がある。しかし、MAOB によるドーパミンの脱ア

ミノ化を阻害することでドーパミンを増加させて効果を発揮すると考えられている l-deprenyl (不可逆的 MAOB 阻害薬)を用いて認知障害様の症状を呈していた老齢犬を治療したところ症状が飛躍的に軽減したという報告がある [Milgram, N.W. *et al.* 1993]。近年の猿を用いた研究などから、認知障害は前頭葉のドーパミン欠乏が原因であることが明らかとなっていることから [Arnsten, A.F. 1993]、犬でも MAOB はドーパミンに高い親和性を持つことが考えられる。犬の MAOB mRNA は特に視床下部、海馬、および縫線核と青斑核を含む脳幹において強く発現していたことから (図 2-9)、これらのうちいずれかの領域におけるドーパミン欠乏が、老齢犬の認知障害に関連しているのかもしれない。

本実験における MAOA 遺伝子 ORF とプロモーター領域、および MAOB 遺伝子 ORF の多型部位検索では、MAOB 遺伝子のみにアミノ酸置換を伴う一塩基多型が 1 箇所認められた。この T199C 多型は、MAOB が代謝酵素として役割を演ずるのに重要な補酵素 FAD の核酸認識領域であると考えられること [Gottowik, J. *et al.* 1995] から、モノアミン代謝能、中でもおそらくドーパミン代謝に重要な影響を及ぼすことが考えられた。また、ヘテロの遺伝子型 (TC) を有するオスの個体は認められなかった。MAOB 遺伝子の犬における染色体位置は明らかでないものの、人の MAOB 遺伝子が X 染色体上に存在していることや、近年の犬と人の比較染色体地図情報から、犬の MAOB 遺伝子も X 染色体に存在している可能性が高い。このため、オスの個体においてヘテロ型が認められなかったと考えられる。

この T199C 多型の出現頻度を、5 犬種 (ラブラドルレトリバー、ゴールデンレトリバー、マルチーズ、ミニチュアシュナウザー、シバイヌ) を用いて比較することで明らかな犬種差が認められた。特に、ゴールデンレトリバーではアレル T が 90%以上の個体に認められたのに対し、ミニチュアシュナウザーではわずか 17%の個体に認められるにとどまっていた (表 2-5)。このような多型出現頻度の偏りは、犬の DRD4 遺伝子反復配列多型でも報告されている [Niimi, Y. *et al.* 2001]。ゴールデンレトリバーとミニチュアシュナウザーは周知のように、非常に異なった体格と被毛色を有している。のみならず獣医師へのアンケートを用いて、犬種ごとの行動特性について検討した研究からは両極端な行動特性も有している。つまりゴールデンレトリバーはおとなしく、人に友好的な行動特性を持っているのに対し、ミニチュアシュナウザーは興奮しやすく時には攻撃的に振舞うこともあるという行動特性を持っている [Hart, B.L. *et al.* 1985]。犬の攻撃性の発現にはドーパミン代謝の低下が関与しているようであり、犬で異常な衝動的攻撃性 (impulsive aggression) を示す個体では、ドーパミンの代謝産物であるホモバニリン酸 (homovanillic acid; HVA) の濃度が、脳室液において低レベルになっていることが明らかとなっている [Reisner, I.R. *et al.* 1996]。MAOB の SNP と犬種間の行動特性の差異については、更な

る検証が必要であるが、本実験から MAOB の T199C 多型によって、ドーパミン代謝が変化し、攻撃性などの情動の犬種差が生み出される可能性が考えられた。T199C 多型がアレル T の場合はドーパミンの代謝が低下しにくく、攻撃性が抑えられているのかもしれない。

本実験で得られた犬の DBH 遺伝子 cDNA の塩基配列は、これまでに報告されている他の動物種のものと相溶性が高いことが明らかとなり、DBH は哺乳類の進化の過程において変化することなく重要な役割を演じてきたことが考えられる。本実験で同定された DBH の一塩基置換は翻訳開始コドンから 789 番目と 1819 番目にあり、前者は ORF の中盤、後者は ORF の終盤に位置していた (図 2-10)。DBH 遺伝子 ORF において、活性に重要な影響を及ぼすと思われる糖鎖の結合部位と想定されている部位は 4 箇所あり、翻訳開始コドンから数えてそれぞれ 148、508、988、および 1654 番目とされている [Kobayashi, K. *et al.* 1989]。人の報告と比較すると犬の遺伝子多型部位は糖鎖結合部位とは幾分離れており、塩基置換が糖鎖結合部位に及ぼす影響は少ないと推察される。

DBH 遺伝子 C789A 多型ではアスパラギン (中性アミノ酸) がリジン (親水性アミノ酸) へと置換するが、同部位における他の動物種のアミノ酸性質を比較すると、牛、馬およびマウスがアラニン (疎水性アミノ酸) であり、ラットがアスパラギンとなっており (図 2-10)、C789A 多型においてアレル A を持つことで、他の動物種にも見られないアミノ酸性質へと変化すると考えられる。同様に、A1819G 多型ではセリン (中性アミノ酸) がグリシン (疎水性アミノ酸) へと置換するが、他の動物種では牛、馬、および人がセリンであり、マウスおよびラットがアルギニン (親水性アミノ酸) となっており (図 2-10)、A1819G 多型においてアレル G を持つことで他の動物種にも見られないアミノ酸性質へと変化すると考えられる。また、アミノ酸の立体構造を Web 上 (独立行政法人 産業技術総合研究所 生命情報科学センター提供、PAPIA システム) で部分的に推定してみると、C789A および A1819G によって  $\alpha$  ヘリックス構造が変化することが明らかとなった。これらのことから、犬の DBH の一塩基置換では DBH 蛋白構造の変化によって、DBH 活性が変化する可能性が考えられた。

DBH はドーパミンをノルアドレナリンへと変換する酵素として知られており、DBH の活性が変化することはドーパミンとノルアドレナリンの生体内バランスが変化することにつながると考えられる。C789A 多型や A1819G 多型によって DBH 活性が変化することになれば、そうしたバランス変化が起こり、情動反応が変化する可能性がある。これらの DBH C789A および A1819G のアレル出現頻度について 5 犬種を用いて比較すると顕著な犬種差が認められた (表 2-6)。従って、犬種育種の際に取捨された行動特性の中には、これらの遺伝子多型によって影響を受ける情動反応が含まれていたのかもしれない。



## 小括

第2章においては、行動関連遺伝子の候補としてドーパミン代謝経路に関与する遺伝子であるモノアミン酸化酵素（MAO）およびドーパミンβ水酸化酵素（DBH）に着目し、同遺伝子の塩基配列を決定し、遺伝子多型部位を検索した。MAO 遺伝子については、Northern Blot 解析を行い脳内における遺伝子の発現分布様式についても検討したところ、2種のサブタイプは共に、情動に関与すると考えられている中脳辺縁系において発現が認められた。さらに、MAO サブタイプ A（MAOA）遺伝子の全翻訳領域（ORF）およびプロモーター領域、MAO サブタイプ B（MAOB）遺伝子の ORF、および DBH 遺伝子の ORF の塩基配列について、遺伝的背景の異なる複数のビーグル犬から採取した遺伝子配列を比較することによって多型部位を検索した。MAOA 遺伝子については多型部位が認められなかったが、MAOB 遺伝子ではアミノ酸置換を伴う一塩基多型（SNP）が1箇所見出され、DBH 遺伝子では2箇所のアミノ酸置換を伴う SNP が認められた。アミノ酸置換が起これば、蛋白構造が変化し、MAOB および DBH の酵素としての機能が変化することにつながる可能性が高い。犬の MAOB はドーパミンの代謝分解に、DBH はノルアドレナリン生合成に関わる酵素であることを勘案すると、本実験によって同定された遺伝子多型が、犬の行動特性を変化させる遺伝子マーカーとなり得ると考えられた。

これらアミノ酸置換を伴う SNP の出現頻度について犬種差の有無を検討するため、国内 11 獣医科病院の協力を得て、各病院に来院した 5 犬種（ラブラドルレトリバー、ゴールデンレトリバー、マルチーズ、ミニチュアシュナウザー、シバイヌ）それぞれ 20 頭以上から採材したゲノム DNA を解析した。その結果、多型出現頻度は、5 犬種全体では MAOB 遺伝子 T199C 多型については、C アレルが 40.1%、DBH 遺伝子 C789A 多型については A アレルが 38.9%、また同 A1819G 多型はシバイヌにおいてのみ G アレルが認められ、その頻度は 59.0%であった。これら全ての多型出現頻度について犬種差が認められたことから、こうした遺伝子多型が犬種の育種選抜の際に取捨されるような犬種特徴に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

## 第 2 章 図表

```

1  tggcctactggagtctctaccagaccATGGCGAGTAGAGAGAAGACGAGTATCGAGGGCCACATGTTTGACGTAGTCGTATAGGAGGCGGCATCTCAGG 100
    M A S R E K T S I E G H M F D V V V I G G G I S G
101 ATTGTCTGCTGCCAACTCTTAGCCGAACATGAAGTTGATGCTTAGTTTGAAGCACGAGATAGAGTTGGAGGAAGAACATACACCGTGAGGAATGAA 200
    L S A A K L L A E H E V D V L V L E A R D R V G G R T Y T V R N E
201 CATGTCGATTACGTAGATGTTGGTGGGGCTTATGAGGACCAACTCAGAACAGAATCTTACGACTATCTAAGGAGCTGGGTCTAGAGACTTACAAAGTGA 300
    H V D Y V D V G G A Y V G P T Q N R I L R L S K E L G L E T Y K V
301 ACGTAAATGAGCGTCTTGACAGTATGTCAAGGGGAAAACCTTACCCATTCCGAGGAGCCTTTCTCCGGTATGGAATCCTATCGCATATTTGGATTACAA 400
    N V N E R L V Q Y V K G K T Y P F R G A F P P V W N P I A Y L D Y N
401 CAACCTGTGGCGGACAATGGATAACATGGGAAGGAGATTCCAGCAGATGCACCATGGGAGGCCACATGCCGAGGAATGGGACAAGATGACTATGAAG 500
    N L W R T M D N M G K E I P A D A P W E A P H A E E W D K M T M K
501 GATCTTATCGATAAAATCTGCTGGACAAAGACTGCTAGGAGGTTTGCATCCCTCTTTGTAATATCAATGTGACCTCTGAGCCCCACGAGGTGTCTGCGC 600
    D L I D K I C W T K T A R R F A S L F V N I N V T S E P H E V S A
601 TCTGGTCTCTGTTGATGTGAAGCAGTCCGAGGTACCACTCGGATATTCTCGGTGACCAATGGAGGCCAGGAACGGAAGTTTGGGAGGATCCGGTCA 700
    L W F L W Y V K Q C G G T T R I F S V T N G G Q E R K F V G G S G Q
701 AGTGAGTGAACGGATAATGGAGCGCCTTGGGACAGAGTCAAGCTGAAGCGCCCTGTACCTATGTTGACCACTCAGATGACAACATCATATAGAGACA 800
    V S E R I M E R L G D R V K L K R P V T Y V D Q S D D N I I E T
801 CTGAATCATGAACCTTTATGAGTGCAAAATACGTGATTAGTGCCATCCCTCCAACCTTGACTGCCAAGATCCACTTCAGACCAGAGCTTCCATCAGAGAGAA 900
    L N H E L Y E C K Y V I S A I P P T L T A K I H F R P E L P S E R
901 ATCAGTTAATTCAGCGTCTTCCAATGGGAGCTATCATCAAGTGTATGATGATTACAAGGAGGCCCTTTGGAAGAAGAAGGATTACTGTGGCTGTATGAT 1000
    N Q L I Q R L P M G A I I K C M M Y Y K E A F W K K K D Y C G C M I
1001 CATTGAAGACGAGGAAGCTCAATTTCAATAACCTGGATGACCAAGCCAGATGGATCACTGCCCGCTATCATGGGCTTCATACTTGCCAGAAAAGCT 1100
    I E D E E A P I S I T L D D T K P D G S L P A I M G F I L A R K A
1101 GACCGACTTGCCAAGCTCCATAAAGAAATAAGGAAGAGGAAAATCTGTAGCTCTATGCCAAAGTGCTAGGATCCCAAGAAGCTTTACAACCCGTACACT 1200
    D R L A K L H K E I R K R K I C E L Y A K V L G S Q E A L Q P V H
1201 ATGAAGAGAAGAACTGGTGGGAGGAGCACTACTCGGGGGCTGCTATACCGCTACTTCCCCCTGGGATCATGACTCACTACGGAAGGGTGATCCGCCA 1300
    Y E E K N W C E E Q Y S G G C Y T A Y F P P G I M T H Y G R V I R Q
1301 GCCATTTGGCAGGATTTACTTTGCTGGCACTGAGACGGCAACACACTGGAGCGGTTATATGGAAGGAGCTGTAGAGGCTGGGGAACGGACAGCTAGAGAG 1400
    P F G R I Y F A G T E T A T H W S G Y M E G A V E A G E R T A R E
1401 GTCTTAAATGCTCTCGGAGGGTGGCAGAGAAGACCTGAAGACCCAGGAACCTGAATCAAAGGATGTTCCAGCTATGGAAATACCCACACCTTCTGGG 1500
    V L N A L G R V A E K D L K T Q E P E S K D V P A M E I T H T F W
1501 AGAGGAACCTGCCATCGGTGACAGGCTGCTGAAGCTCATTGGATTTACCACATCAGTAACTGCCCTGTGGATTGTGGCGTACAAATTCAGGCTGCTGAG 1600
    E R N L P S V T G L L K L I G F T T S V T A L W I V A Y K F R L L R
1601 ACGATCCTGAgtcttcagccccacactctctgttactcttcccagcaccatcaaaagcaaaatgtcgacaaggctgtgtcattggaccatctttaa 1700
    R S *
1701 tgcactgatttaagtttagtctcagtcagtgatcataagtaaaatcaacccaagaatcacctcattaattcaataagatcaagctccatcatgttattt 1800
1801 gcctgggttagactaacttgattgtgtgtagaataaaacctgtgattaagtccttgattccaagatgtctaatgaagtgtgatcagaacccaaaaa 1900
1901 aaaaaaaaaaaaaa 1914

```

図2-1 犬のMAOA遺伝子cDNA全長の塩基配列

Polyadenylation signal をアンダーラインで示した。





表2-1 MAOB遺伝子多型の犬種差

T199C 例数		遺伝子型					アレル頻度	
		雄			雌			
犬種	n	C	T	CC	TC	TT	C	T
GLD	46	1	22	0	4	19	5	64
LAB	40	5	10	5	11	9	26	39
MLT	40	12	12	3	6	7	24	32
MS	26	14	1	7	4	0	32	5
SHIBA	37	13	9	2	8	5	25	27
総計	189	45	54	17	33	40	112	167

GLD はゴールデンレトリバー、LAB はラブラドルレトリバー、MLT はマルチーズ、MS はミニチュアシュナウザー、および SHIBA はシバイヌを示す。

表2-2 DBH遺伝子多型の犬種差

犬種	例数	遺伝子型			アレル頻度	
<b>C789A</b>	n	AA	CA	CC	A	C
GLD	45	18	17	10	53	37
LAB	40	24	11	5	59	21
MLT	38	1	15	22	17	59
MS	23	1	5	17	7	39
SHIBA	38	0	7	31	7	69
総計	184	44	55	85	143	225
<b>A1819G</b>	n	AA	GA	GG	A	G
GLD	20	20	0	0	40	0
LAB	20	20	0	0	40	0
MLT	20	20	0	0	40	0
MS	20	20	0	0	40	0
SHIBA	39	10	12	17	32	46
総計	119	90	12	17	192	46

GLD はゴールデンレトリバー、LAB はラブラドルレトリバー、MLT はマルチーズ、MS はミニチュアシュナウザー、および SHIBA はシバイヌを示す。

表2-3 犬の各遺伝子と他種動物遺伝子との相同性 (核酸；%)

	ヒト	マウス	ラット	ウシ	ウマ
MAOA	86.80	81.56		86.67	
MAOB	91.81		85.28		
DBH	78.85	74.03	73.76	79.20	82.24



表2-4 犬の遺伝子と他種動物遺伝子との相同性 (アミノ酸；%)

	ヒト	マウス	ラット	ウシ	ウマ
MAOA	89.75	85.57		89.56	
MAOB	95.00		88.50		
DBH	72.90	68.70	68.70	73.20	75.90



```

tattgatttt ctcacctact tgcctcgttt gggtaagca cctcagctcg gacaaacccc acncgaggac caacaatggg ccaaagtagg ccccaagtgg -1801
gggtccacac ttaccccgcc ctctcccag ggggggggto cgcggctcgc cagacctctc cgggcccctc gtgacgtcac aaaggagcct accgttgtgt -1701
ggcgtggccc tgtgacctg ccggcccggt cccttcagta cccgttcct cggccacctg gctcagtcct ctgtcagtta aggcaggggc tgaaccccc -1601
acgcggccgc cactcggggt aggcgaagta ggcggagcca agctgcggto aaccggggct cccggggggc gttgggagcg cgtcggggcc cgaccgggtg -1501
aggctgggag gggcgagcgt aggcagtcac ctgacgcccc ccggcgtgga gaactatgag ctacacaaag ctgggnttg agccgggcca ggcagggcc -1401
ggcgaaagg cggcgaggcg gagcttgccc ctggagcagg gggcacagct tccggatct cggaccgcca ctccaacttg ggcgcggcca cattctccgc -1301
gtccgggtcc agcatccatt cagagtggcg caccttgtcc agtcggttt ccagcttcca gtcaaatgca tccgtagagg actcgggaaca ccagaagagc -1201
tccagcgtgc cggcccaact cggctacatt ccgaccgga ggaactaacac agactctaag atcgccctt ggggctttgg cggccacct ggccagaacc -1101
accagatctc catgtctgcc accgcccgc ccaccgcca gggggccgt cggccctcca acccgagcg cgacctccc ggggtccggg tacaaggatc -1001
tgtccacccc tcaggctccc ccgagtgtc gacagctgac tccacccat ccgagggtc cgagtacccc cgagtagcag taccaggagc tctacaacc -901
accaactctt ccggagagtc agcgcaaggg tctgtccgc ccacgggtcc cgacttctc cgggtatcga tggcagcacc acctccacc agtaaacatt -801
cccagttgtc agcacacggg ttcccgctgc tctcagtgat cggctcccc ccgagctcgg tgaaggacc acctacacc aataactccc ccctagtgtc -701
actgaaggg tcccgagcgt tctcagtcac cggctcctcc cgactatcag tgcacggatc ggccttgccc tccgactcct ccgagtgtc gataccaggg -601
tccgccccgc cctcgtgct cagctccgc cggagttcgc tgtcaggatc tgcacctcc tcagagtact ccgagtgtc gatacaaggg tccgccccac -501
cctcgtgct cagctccgc cggattcgc tgtcaggacc tgcacctcc tcagagtact ccaagtgtg ggtgaaggg tcccgcgagc cctcagaggt -401
cagctccctc caagttcgc ctcaaggatc ggtcctgctc tcaagctcct ccggagcgtc gggaaaaggg tccatcctgc cctcaatgtc cggcttcccc -301
tgggattcgg taaaaaata tcttacgtt ctgaactcct ccaagtgc acaagagtc acccagccct cagtccagg tccccccaa acatccg gg -201
aaggatcggc tccgccccg ggcctccc tg gagaagcagt accagggacc gccccccct ccgtccggg ctcgcccggg gtgtggacgg aagaatcagc -101
tccgccccg gactcccc cagagtctgt agaagggtcc gccccccct tggccgcto cactcctgta cctacgcca gcgagagtc ctaccagacc -1
ATGCGAGTA GAGAGAAGAC GAGTATCGAG GGCCACATGT TTGACGTAGT CGTGATAGGA GGCGGCATCT CAGGTCAGTG TGGACCGTAG TGGCAACCTG 100

```

GC signal

図2-5 MAOA遺伝子プロモーター領域の塩基配列

プロモーター領域は小文字で表示し、エクソン領域は大文字で表示した。  
翻訳開始コドンはアンダーラインで示した。

```

-991 1: CCTCAGGCTCCCCCGAGTGTGACAGCTGACTCCACCCCATCCGCAGGGCTCGAGTACCCCGAGTAGCAGTACCAGGACGTCTACAA
-901 1: CCACCAACTCTCCGGAGAGTCAGCGCAAGGGTCTGTCCGCCCCACGGTGCCCGACTTCCTCCGGGTATCGATGCCAGCACCACTCCAC
-811 1: CCAGTAACACTTCCCAGTTGTCAGCACACGGGTTCCGCCGTGCTCTCAGTGATCGGCTCCCCCGAGCTCGGTGCAAGGACCACCTACAC
-721 1: CCAATAACTCCCCCTAGTGTCACTGCAAGGGTCCCGGCAGTTCTCAGTACCCGGCTCCTCCCGACTATCAGTGCACGGATCGGCCCTGC
-631 1: CCTCGGACTCCTCCCGAGTGTGATACCAGGGTCCGCCCGCCCTCCGTGCTCAGCTCCGCCCGGAGTTCGCTGTCAGGATCTGCACCCT
-541 1: CCTCAGAGTACTCCCGAGTGTGATACAAGGGTCCGCCCAACCCTCCGTGCTCAGCTCCGCCCGGAATTCGCTGTCAGGACCTGCACCTT
-451 1: CCTCAGAGTACTCCCAAGTGTGGGTGCAAGGGTCCGCCGAGCCCTCAGAGGTGAGCTCCCTCCAAGGTTCCGCTCAAGGATCGGTCTTGC
-361 1: TCTCAAGCTCCTCCGGAGCGTCGGGAAAAGGGTCCATCCTGCCCTCAATGTCCGGCTTCCCCTGGGATTCCGTACAAAAATATCTTACGC
-271 1: CTGAACTCCTTCCCAAGTGACACAAGAGTCCACCCAGCCCTCAGTGCCAGGTACCCCCAAACATCCGTGAAGGATCGGCTCCGCCCCCG
-181 1: GGCTCCCTGGAGAAGCAGTACCAGGGACCGCCCCGCCCTCCGTCCGGGGCTCCGCCGGGTGTGGACGGAAGAATCAGCTCCGCCCCCG
-91 1: GACTCCCCCAGAGTCTGTAGAAGGGTCCGCCCGCCCTTGGCCGCCTCCACTCCTGTACCTACGCCAGCGAGAGTCTCTACCAGACCATG

```

## 図2-6 犬のMAOA遺伝子プロモーター領域の繰り返し配列

相同性の高い部位を . で示した。  
 数値は翻訳開始コドンからの塩基数を示す。

T199C; C: システイン→R: アルギニン

```

Dog. gpt      1: MSGKCDVVVGGG|SGMAAAKLLHDFGLNVVLEARDRVGGRTYT|RNQKVKYDLGGSYVGPTQNC|LRLAKELGLEYKVNVERL|HHVKGSYPFR 100
Bovine. gpt   1: MSNKCDVVVGGG|SGMAAAKLLHDSGLNV|LEARDRVGGRTYTLRNQKVKYVDLGGSYVGPTQNH|LRLSKELGLEYKVNVERL|HHTKGSYPFR 100
Human. gpt    1: MSNKCDVVVGGG|SGMAAAKLLHDSGLNVVLEARDRVGGRTYTLRNQKVKYVDLGGSYVGPTQNR|LRLAKELGLEYKVNVERL|HHVKGSYPFR 100
Rat. gpt      1: MSNKCDV|VVGGG|SGMAAAKLLHDCGLSVVLEARDCVGGRTYT|RNKNVKYVDLGGSYVGPTQNR|LRLAKELGLEYKVNVERL|HFVKGSYAFR 100
               ** ,***, ***** ** ,* ,*****, ***** ** ,***, ***** ***** ,***** ,**

Dog. gpt      101: GPFPPVWNP|AYLDHNNLWRTMDDMGRE|PSDAPWKAPLAEWDHMTMKELLDK|CWTESAKQLATLFVNLCVTAETHEVSALWFLWYVKQCGGTTR|IS 200
Bovine. gpt   101: GSFPVWNP|TYLDHNNLWRTMDDMGRE|PSDAPWKAPLAEQWDLMTMKELLDK|CWTESKQLAILFVNLCVTAETHEVSALWFLWYVKQCGGTTR|IFS 200
Human. gpt    101: GPFPPVWNP|TYLDHNNFWRTMDDMGRE|PSDAPWKAPLAEWDNMTMKELLDK|CWTESAKQLATLFVNLCVTAETHEVSALWFLWYVKQCGGTTR|IS 200
Rat. gpt      101: GPFPPVWNP|TYLDYNNLWRTMDEMGE|PSDAPWKAPLAEWDYMTMKELLDK|CWTNSTKQ|ATLFVNLCVTAETHEVSALWFLWYVKQCGGTTR|IS 200
               * ,** ,***** ,** ,* ,***** ,** ***** ,** ,* ,* ,***** ,***** ,***** ,*

Dog. gpt      201: TTNGGQERKFVGGSGQVSR|MDLLGDRVKLERPVTH|IDGTGENVLVETLNHEVYEAQYV|SA|PPTLG|GMK|HFNPP|LPM|MRNQL|ITRVPLG|SVIK|IVY 300
Bovine. gpt   201: TSNGGQERKFVGGSGQVSR|MDLLGDRVKLERPV|H|IDGTGENVLVETLNHELYEAQYV|SAVPPVL|GMK|HFNPP|LPM|MRNQL|ITRVPLG|SVIK|IVY 300
Human. gpt    201: TTNGGQERKFVGGSGQVSR|MDLLGDRVKLERPV|Y|IDGTRENVLVETLNHEMYEAQYV|SA|PPTLG|GMK|HFNPP|LPM|MRNQM|ITRVPLG|SVIK|IVY 300
Rat. gpt      201: TTNGGQERKF|GGSGQVSR|KD|ILGDRVKLERPV|H|IDGTGENVVVKT|LNHE|YEAQYV|SA|PPVL|GMK|HHSPL|P|ILRNQL|ITRVPLG|SVIK|CMVY 300
               * ,***** ,***** ,* ,** ,***** ,**** ,** ,* ,***** ,***** ,** ***** ,**** ,*** ,***** ,**

Dog. gpt      301: YKEPFWRKKDYCGTM|IEGEEAP|AYTLDDTKPDGNYAA|MGF|LAHKARKLARLTKDERMKKLC|ELYAKVLGSQ|EALOPVHYE|EKNWCEEQ|SGGCYTT 400
Bovine. gpt   301: YKEPFWRNM|DYCGSM|IEGEEAPVAYALDDTKPDGSYPA|I|GF|LAHKARKLARLTK|EERLKKL|CDLYAKVLGSQ|EALHPVHYE|EKNWCEEQ|SGGCYTS 400
Human. gpt    301: YKEPFWRKKDYCGTM|IDGEEAPVAYTLDDTKPEGNYAA|MGF|LAHKARKLARLTK|EERLKKL|CELYAKVLGS|LEALEPVHYE|EKNWCEEQ|SGGCYTT 400
Rat. gpt      301: YKEPFWRKKDFCGTMV|IEGEEAP|AYTLDDTKPDAGCAA|MGF|LAHKARKLVRLTK|EERLKKL|CELYAKVLNSQ|EALOPVHYE|EKNWCEEQ|SGGCYTA 400
               ***** ,* ,** ,* ,***** ** ,***** ,.. ** ,***** ,**** ,** ,* ,***** ,* ,** *****

Dog. gpt      401: YFPPG|IMTOYGRVLROPVGR|YFAGTETATHWSGYMEGAVEAGERAARE|LHAMGK|IPEDE|IWQSEPE|SDVPAQP|ITTTFLERH|LPSV|PGLLR|L|GLTA 500
Bovine. gpt   401: YFPPG|IMTOYGRVLROPVGR|YFAGTETATHWSGYMEGAVEAGERAARE|LHAMGK|IPEDE|IWLPEPE|SDVPAKP|ITTTFLQRH|LPSV|PGLKL|L|GLTT 500
Human. gpt    401: YFPPG|ILTOYGRVLROPVDR|YFAGTETATHWSGYMEGAVEAGERAARE|LHAMGK|IPEDE|IWQSEPE|SDVPAQP|ITTTFLERH|LPSV|PGLLR|L|GLTT 500
Rat. gpt      401: YFPPG|ILTOYGRVLROPVGK|FFAGTETASHWSGYMEGAVEAGERAARE|LHA|IGK|IPEDE|IWQPEPE|SDVPA|P|ITNTFLERH|LPSV|PGLKL|L|GLTT 500
               ***** ,***** ,***** ,***** ,***** ,***** ,***** ,** ,** ,***** ,* ,** ,

Dog. gpt      501: IFSATALGVL|AHKRGL|LVRV 520
Bovine. gpt   501: IFSATALGFL|AHKRGL|LVRV 520
Human. gpt    501: IFSATALGFL|AHKRGL|LVRV 520
Rat. gpt      501: ILSATALGFL|AHKKGL|FVRF 520
               * ,***** ,*** ,** ,** ,

```

FAD 結合部位

## 図2-7 MAOB遺伝子 アミノ酸配列

MAOB 遺伝子アミノ酸変換後のマーライン結果。多型部位は□で示した。  
\*は相同部位を示す。

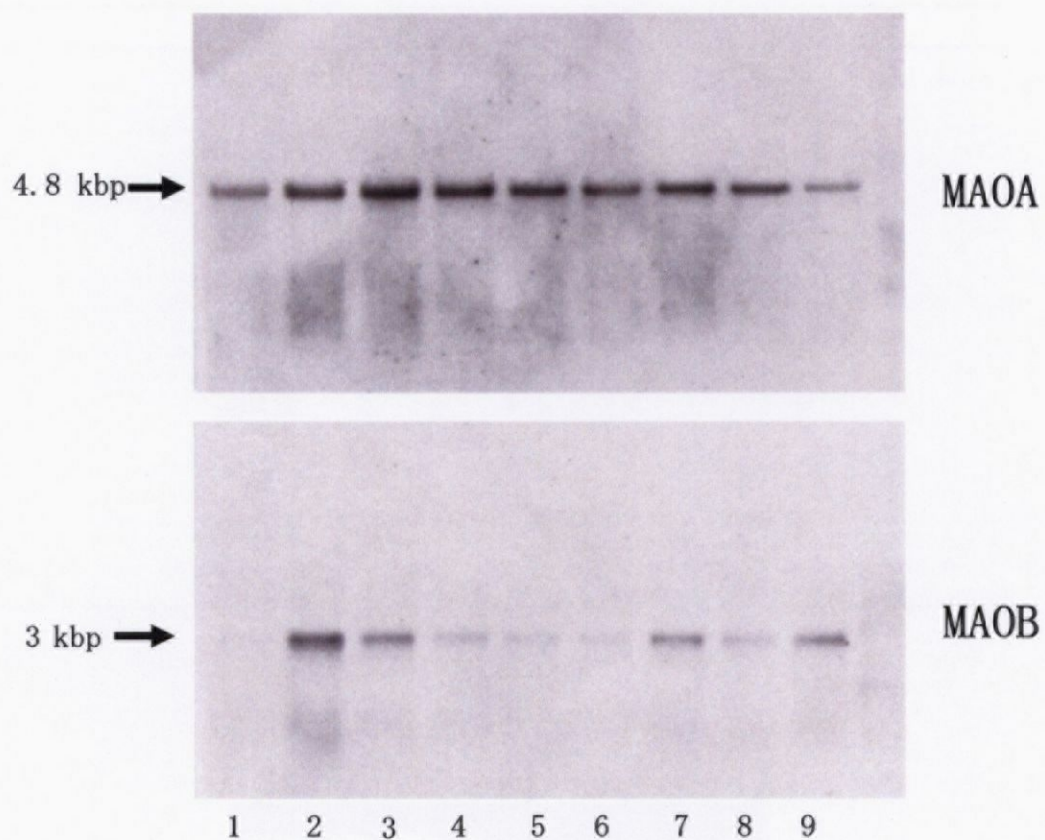


図2-8 MAO遺伝子mRNAのNorthern blot 解析

イヌ脳各部位の totalRNA を各  $3\mu\text{g}$  用いた。

1. cerebellum, 2. hypothalamus, 3. hippocampus, 4. amygdala, 5. frontal cortex,  
6. temporal cortex, 7. brain stem, 8. corpus striatum, 9. olfactory bulb

脳部位	MAOA	MAOB
小脳	+	—
視床下部	++	++
海馬	++	++
扁桃体	++	+
前頭葉	++	+
側頭葉	++	+
脳幹	++	++
線条体	++	+
嗅球	+	++

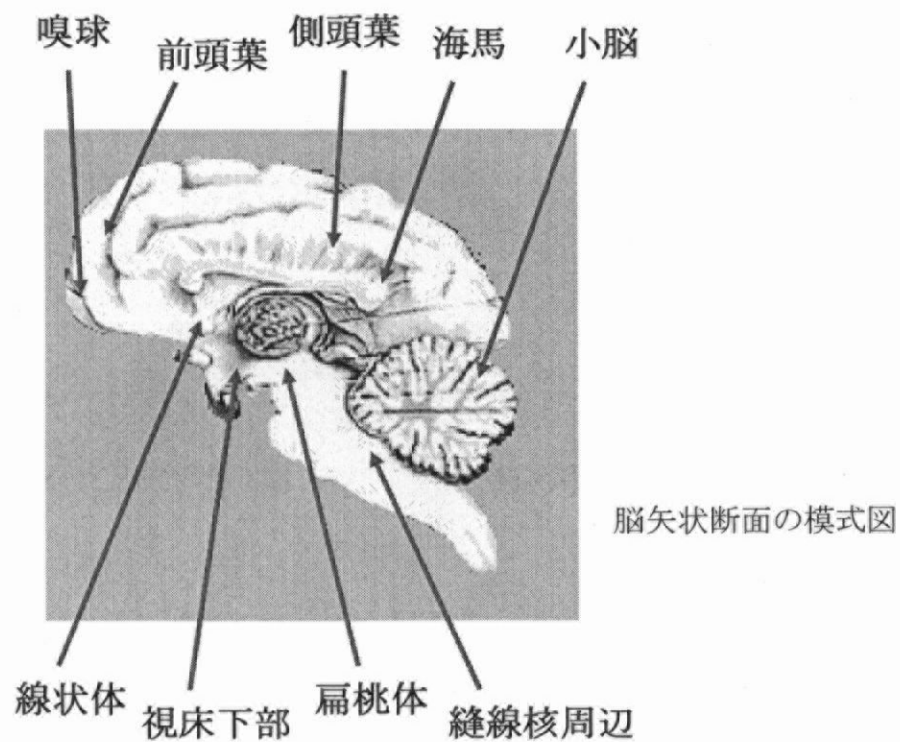


図2-9 MAOAおよびMAOBの脳各部位における発現パターン





## 第 3 章

### 盲導犬候補個体の気質評価

## 緒言

盲導犬は目の不自由な人にとって、日常の行動範囲を広げてくれるという恩恵をもたらす存在である。盲導犬を育成している多くの施設は、盲導犬を必要としている人々に、こうしたすばらしい伴侶を効率良く、安全に提供するためにさまざまな育成プログラムを作成し、工夫を重ねてきた。その育成プログラムとして、盲導犬育成施設の多くは、パピーウォーキングプログラム (Puppy Walking Program) を採用している [Goddard, M. E. *et al.* 1984; Wilsson, E. *et al.* 1997]。盲導犬の候補個体はまず、生後 2~3 ヶ月齢の段階で、ボランティアのパピーウォーカーと呼ばれる一般家庭に引き取られ、生後 1 年までの 9~10 ヶ月間を家庭犬として飼育される。その後育成施設に戻され、約半年から 1 年をかけて、盲導犬となるべくさまざまな訓練をうける。そして最終的に盲導犬適性審査を受け、合格した個体のみが盲導犬として活動できる。このように、盲導犬育成には約 2 年もの月日がかかる上、候補個体は多くのタスクを学ばなければならないが、多くの犬は盲導犬不適格として訓練を全うすることができず、その結果、盲導犬育成には多大なコストがかかっている。

これまでの盲導犬育成施設からの報告によると、犬が盲導犬不適格となる理由としては、犬が求められていることを理解、学習できなかっただけでなく、犬が盲導犬としての活動に支障をきたす行動特性を持っているという点が指摘されてきた [Goddard, M. E. *et al.* 1983]。こうした背景から、主に行動テストによって、どのような行動特性を持つ個体が盲導犬不適格となりやすいかという研究が行われてきたが、不安傾向を持つと評価された個体が盲導犬不適格になりやすいことが明らかとなってきた。不安傾向は 12 週齢の時の行動テストにおいて認められるものが将来の不安傾向と相関することが報告されている [Goddard, M. E. *et al.* 1984]。パピーウォーカーでの暮らしぶりが成長後の不安傾向に影響を及ぼさないことも報告されており [Goddard, M. E. *et al.* 1985]、不安傾向はかなりの割合で遺伝的な支配を受けているようである。また 1944 年に Throne らがバセットハウンドの行動遺伝学的研究で、極端に臆病な性格が優性遺伝するという報告を出しており [Thorne, F. C. 1944]、このことも、臆病な気質が遺伝するということを支持している。

近年では Serpell らが、従来の行動テストではなく、パピーウォーカーへのアンケートによって、1 歳齢となった候補個体の行動特性を評価したが、その報告によると、アンケート結果より抽出された因子（見知らぬ人に対する恐怖性/攻撃性）の高い個体は、盲導犬訓練士によって「人に対して慎重」および「人に対して攻撃的/防護的」と評価されて、

盲導犬不適格となりやすいことが明らかとなった[Serpell, J.A. *et al.* 2001]。この研究から、盲導犬候補個体の適性評価として、テスト自体が子犬へ負荷をかけてしまう行動テストを用いなくとも、アンケートなどからも正確な評価が得られる可能性が示唆された。

そこで、本研究では、どのような気質が盲導犬の合否判定に関与するのかを更に精査する目的で、盲導犬訓練士によって訓練期間を通じて毎週記録された評価コメントから、各個体の行動特性に関するコメントデータを数値化して因子分析および主成分分析を行った。

## 材料と方法

### 盲導犬候補個体の行動評価

#### *供試動物*

本研究では米国サンフランシスコ郊外にあるカリフォルニア盲導犬協会で育成されている盲導犬候補個体を供試した。同協会ではラブラドル種、ゴールデンレトリバー種、これら2種の1代交雑種、ジャーマンシェパード種の計4犬種が年間300頭近く候補個体として育成されている。同協会にて繁殖された盲導犬候補個体は通常、生後約2〜3ヶ月齢の時点でパピーウォーカーに預けられ、半年〜1年後訓練センターに戻される。それから約半年〜1年間かけて盲導犬となるための訓練を受け、盲導犬としての適性を審査されている(訓練内容の概要は図3-1に示した)。本研究では、1999年6月から11月に訓練を開始した候補犬197個体(ラブラドルレトリバー種;130, ゴールデンレトリバー種;25, 前2種1代交雑種;20, ジャーマンシェパード種;22)の中から、詳細な行動解析を行う目的で、ラブラドルレトリバー種(盲導犬適性審査合格群42頭、不合格群40頭)を選択した。なお、疾患が原因で適性審査に不合格とされた個体については除外した。

#### *行動評価の方法*

行動評価は、訓練士が個体の行動や反応について記した訓練記録より、攻撃性および不安傾向を示唆する内容のコメント数を行動評価スコア(ポイント)におきかえて集計した。訓練士による訓練記録は、候補個体が1歳齢になりパピーウォーカー宅から戻されてきたところから始まる。記録開始となるPhase#1では、総合的な身体検査が行われ、食餌や散歩セッションの様子が記録されている。こうした記録は候補個体が最終的な適性審査を受けるまで、あるいは盲導犬として不適格と判断されて訓練プログラムから除外されるまでの毎週1回続けられている。本研究では、訓練開始から終了までのすべての訓練記録をデータ化した。取り扱った候補個体の訓練記録は最長19週、最短1週であり、その平均は12.3週(SD: 4.61)と比較的短期間であった。

行動評価は、候補個体の訓練の進捗状況によって、実施する訓練のコマ数が異なるため、訓練上達が迅速であるかそうでないかという別要因によって、コメント数が変動してしまい、正確な行動評価が難しくなると考えられたため、訓練終了までのコメント数を訓練の

コマ数で除した、コメント出現率を行動評価スコアとしたため、最大値が 1、最小値が 0 となっている。コメントカテゴリーは、オーストラリアの盲導犬協会が盲導犬候補個体を訓練プログラムから除外する理由として“Dog Distraction”や“Aggressiveness”など 10 の行動傾向を報告していたこと[Goddard, M.E. *et al.* 1982]を参考に訓練記録を精査し、“Willing”などの良い行動傾向も含めた 15 の行動特性を選択した。カテゴリーの詳細は表に示した（表 3-1）。

## 多変量解析

行動評価スコアが多変量解析には因子分析、主成分分析を用いた。解析には、ソフトウェア；エクセル統計 2000 for Windows（㈱社会情報サービス）を用いた。因子分析では得られた評価スコアが幾つの行動因子（ファクター）に分かれ、それぞれがどの程度寄与しているのかについて解析することを目的とした。一方主成分分析では得られた評価スコアを総合し、盲導犬適性度といった総合評価について解析することを目的とした。つまり、因子分析では評価スコアを構成している因子への分解に、主成分分析では評価スコアの相関から総合的な成分や概念を導き出すことを目的とした。

因子分析では、固有値が 1 以上となる因子を抽出した。主成分分析では、累積寄与率が 60% 以上となる主成分を抽出した。次に、抽出された各因子および主成分について、適性審査の結果との関連を Mann-Whitney の U 検定を用いて検討した。

## 多重検定における有意値

一つの独立変数に対して関連のある事項を複数の従属変数より見いだそうとする、すなわち多重検定を行う際に注意すべき点として、有意とは本来認められないにもかかわらず有意であると判断してしまう、いわゆる第一種の過誤（type I error）に陥ってしまう危険性がある。この場合、多重検定に適合した有意水準を設定する必要があり、統計学的には厳しい有意水準で検定を行う Bonferroni 補正を行うか、再試を行い同様な傾向を確認し、再現性を認めることでデータの正当性を示すといったことが不可欠となる。しかしながら、本研究のように従属変数が多い解析では Bonferroni 補正により本来有意であるものを有意でないと判断してしまう、いわゆる第二種の過誤（type II error）に陥る危険性も生じてしまう。そこで本論文では、できるだけ P 値をそのまま表示するよう心掛けるとともに、Bonferroni 補正後の有意値を各図表の下部に明記することとした。基本的に全ての有意水準は 0.05% に設定した。

## 結果

### 行動評価スコア

行動評価スコア間の相関をそれぞれ検討したところ、“Bite” - “Hackle”、“Bite” - “Barking”、“Bite” - “Nervous” および “Dog Distraction” - “Non Dog Distraction” にそれぞれ有意な相関が認められた（相関係数；0.444、0.427、0.422、および 0.457、 $p < 0.0001$ ）（表 3-2）。他のカテゴリーには相関が認められず、おおむね良好なカテゴリー設定であったことが示された。

行動評価スコアには雌雄差が認められなかった（図 3-2）。合否群に分けたところ、行動評価スコアの平均値は“Hackle”と“Barking”の2カテゴリーにおいて両群間に有意差が認められた（ $p = 0.0001$ 、および 0.0007、Mann-Whitney の U 検定）（図 3-3）。

### 因子分析

行動評価スコアの因子分析結果を表に示した（表 3-3）。本分析手法では因子としての抽出基準となる固有値 1 以上となるのは因子 3 までであり、因子 3 までの累積寄与率は 30%に満たなかった。なお 8 因子まで抽出しても、累積寄与率が 52.2%にしか満たなかった。

因子の抽出にあたり、因子負荷量の絶対値が 0.4 以上のものとして選択したところ、“Inconsistent”を除く 14 項目が全 8 因子のいずれかに属することが判明した。なお、因子 1 には“Hackle”、“Nervous”、および“Bite”の 3 項目が、因子 2 には“Dog Distraction”、“Non Dog Distraction”、および“Willing”の 3 項目が、因子 3 には“Barking”、因子 4 には“Sensitive”、因子 5 には“Defecation”、因子 6 には“Calm”、および“Active”の 2 項目が、因子 7 には“Willing”、および“Confident Type”の 2 項目が、そして因子 8 には“Animated”、および“Responsive”の 2 項目が属していた（表 3-3）。そこで、各因子に含まれる個々の行動評価カテゴリーが内的整合性を持つかを検証する、クロンバック  $\alpha$  信頼性係数を算出した。通常クロンバック  $\alpha$  は 0.8 以上をもって妥当な尺度とみなされている。しかしながら、本分析では因子 1 で 0.6438、因子 2 で 0.5848 となっており、ク

ロンバック  $\alpha$  が 0.8 以上となった因子は存在しなかった。

## 主成分分析

行動評価スコアの主成分分析結果を表に示した(表 3-4)。累積寄与率が 60%以上となる主成分 5 までを抽出し、以降の解析に用いた。各主成分に属する行動評価カテゴリーとして、主成分負荷量の絶対値が 0.4 以上となるものを抽出したところ、主成分 1 には “Dog Distraction”、“Non Dog Distraction”、“Willing”、“Nervous”、および “Active”、主成分 2 には “Hackle”、“Barking”、“Sensitive”、“Bite”、および “Active”、主成分 3 には “Willing”、“Hackle”、“Nervous”、および “Sensitive”、主成分 4 には “Animated”、“Willing”、および “Active”、主成分 5 には “Willing” が属していた(表 3-4)。各主成分中の行動評価カテゴリーのウェイトを示す固有ベクトルそして寄与率、および絶対値の大きな固有ベクトルから類推した各主成分の名称を示した(表 3-5)。

候補個体の主成分得点の雌雄別および合否別平均値を図に示した。雌雄間では主成分得点に有意な差が認められなかった(図 3-4)。合否群間では主成分 2 に有意な差が認められ ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney の U 検定)、主成分 5 に差が認められた ( $p=0.0413$ , Mann-Whitney の U 検定)(図 3-5)。主成分を構成する固有ベクトル値から主成分 2 を「攻撃的反応性」の成分(図 3-6)、主成分 5 を「集中力」の成分(図 3-7)と類推したところ、攻撃的反応性が低く、集中力の高い個体が盲導犬として適性があると判断されていると考えられた。

## 考察

行動傾向の雌雄差について、行動評価スコアの平均値を比較することで検討したところ、有意な差は認められなかった。しかし、Goddard らの報告ではオス犬のほうが犬に対する興味が過度により強く、メス犬のほうが不安傾向や易興奮性がより高く、そのために盲導犬不適格となることが多いことを報告している[Goddard, M.E. *et al.* 1982]。今回差が認められなかった理由として、解析に用いた個体数が少なかったことや、飼育方法の違いなどが考えられる。カリフォルニア盲導犬協会では、訓練開始直後に去勢・避妊手術を施しているため、性ホルモンの影響を受けた行動特性が消失していた可能性も考えられる。あるいは、1982 年の報告以来、オス犬のほうが犬に対する過度の興味がより強く、メス犬のほうが不安傾向や易興奮性がより高いということが、訓練士の間で通念となっており、訓練記録に特筆される程度にならなかったのかもしれない。いずれにせよ、行動傾向には雌雄差が認められなかったことから、以降の解析は雌雄を混合した形で行った。

盲導犬適性審査において合格となった群とそうでなかった群について、行動評価スコアの平均値を比較検討したところ、“Hackle（背中の毛を逆立てながら唸ること）”および“Barking”において差が認められ、不合格となった個体群では有意にこうした傾向が高いことが明らかとなった（図 3-3）。“Hackle”の評価スコアは、合格群では 0.02 であったのに対し、不合格群では 0.19 となっていた。評価スコアがコメントの出現率であるということを勘案すると、不合格となった群の平均値が 0.2 に満たない小さな値であるということは、訓練期間中にほんの数回 Hackle するだけで、その個体が盲導犬として不適格とみなされるという事実を反映しているといえる。

行動評価スコアの因子分析では、固有値が 1 以上となる因子を抽出したところ、累積寄与率が 60%に満たず、主要因子内の内的整合性を示すクロンバック  $\alpha$  値も 0.8 に満たない結果となり、解析を行うことができなかった。このことは、解析に使用したカテゴリーがお互いに独立しており、相互相関が低かったことに起因していると考えられた。

一方、主成分分析では主成分 5 までを抽出することで、累積寄与率が 60%を超えて有意義な分析を行うことができた。候補個体の主成分得点について、合否別平均値を比較したところ、主成分 2 に差が認められ、合格群では有意に攻撃的反応性が低いことが明らかとなった。また、主成分 5 にも差が認められ、合格群では集中力が高い傾向にあることも示唆された。これら二つの主成分得点を X 軸および Y 軸にとり、合格群と不合格群に分けてプロットしたところ、合格群は攻撃的反応性が低く、集中力が高い傾向にある個体が多い



のに対し、不合格群は攻撃的反応性が高い、あるいは集中力が低い傾向にあり、主成分得点がばらついていることが明らかとなった（図 3-8）。盲導犬育成施設での調査を行った Goddard らは、候補個体が盲導犬として不適格とみなされる大きな理由として、不安傾向の高いこと、犬に対する興味が過度であることに加えて本研究でも示唆された、攻撃的に振舞うことの 3 つを報告している[Goddard, M.E. *et al.* 1982]。また、Scott らは 5 犬種を用いた大規模な交雑試験を行うことによって、使役犬としての適性は、「優秀な行動力があり自信にあふれている」－「見知らぬ状況や人間に対して臆病」軸に集約されていることを報告している[Scott, J.P. *et al.* 1965]。本章の解析で得られた結果はこうした過去の報告に類似するものとなり、これらのことから、盲導犬訓練士による評価コメントの主成分分析は盲導犬候補個体の適性評価に有用であり、盲導犬に必要な気質としては、攻撃的反応性の低さと集中力の高さであることが考えられた。

## 小括

第 3 章においては、遺伝的環境や飼育環境が比較的均一であり、かつ一定の基準をもって行動評価が実施されている盲導犬候補個体を研究対象として選択し、米国・カリフォルニア盲導犬訓練協会の協力を得て、同協会で繁殖・育成中の盲導犬候補個体の血液サンプルと遺伝情報、そして盲導犬訓練士による各個体の行動評価記録を入手した。試料を供与された犬の内訳は、盲導犬適性審査に最終的に合格した合格群 84 頭（42%）、不合格群 78 頭（40%）および白内障や股関節異形成などの疾患により訓練を中止した脱落群 35 頭（18%）であったが、このうちラブラドルレトリバー 82 頭（合格群 42 頭、不合格群 40 頭）について詳細な解析を行った。行動評価としては、訓練期間を通じ毎週記録された訓練士の評価コメントをもとに、攻撃性や不安傾向等について各個体のコメント数を数値化した。こうして数値化した行動評価データをもとに、因子分析および主成分分析を行って合否判定に関与する要因を検索した。その結果、因子分析では累積寄与率が 60%に満たず、有意義な解析を行うことができなかった。一方主成分分析では 5 つの主成分が抽出され、そのうち攻撃的反応性および集中力に関連する主成分が合否判定に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

### 第 3 章 図表

訓練は犬の進歩程度に合わせて 10 段階（phase）に分けられている。

（協会 Website ; <http://www.guidedogs.com> より抜粋）

#### Phase #1

訓練前の身体検査および去勢/避妊手術、（繁殖用個体として残す可能性のある個体については評価途中であるため行わない）、X 線撮影、眼科検診を行う。リード装着での歩行。犬舎での環境や日常スケジュールへの馴致。インストラクターとの協会敷地内でのリラックスした散歩および遊びセッション。日常的ケアと一般的グルーミング。

#### Phase #2

ハーネスとオビディエンス（服従）の予備訓練。注意散漫となる対象物（おもちゃ、食べ物、他の犬、猫など）への馴致開始。「BEST」方法を用いた協会敷地内でのハーネスの訓練（ハーネスで前進するなど）、および「前へ（Forward）」、「止まれ（Halt）」、「飛び乗れ（Hopp up）」、「落ち着いて（Steady）」などガイドワーク（誘導歩行）固有の号令の訓練。協会敷地内にある障害物コースをリード装着で歩行訓練。

#### Phase #3

協会敷地外の静かな住宅地でのハーネス歩行訓練。訓練用車両への馴致。Phase #2 で学習した号令に加えて、新たなガイドワーク号令（「右（Right）」、「左（Left）」、「こちらへ（Over here）」などの訓練。曲がり角での注意歩行や通りの横断への馴致。協会敷地内の障害物コースの上達訓練。オビディエンスの訓練。ショッピングモール内歩行への馴致と犬同士の社交セッション。繁殖用個体として評価対象になっていた個体で、繁殖用とならなかった個体の去勢/避妊手術。

#### Phase #4

市街地のにぎやかな区画の歩道を使ったガイドワーク上達訓練。様々なパターンの曲がり角や通りの横断への馴致。訓練犬は次第に前方障害物への注意が払えるようになり、障害物コースでインストラクターを誘導歩行し始める。オビディエンスの予備評価およびヘッドカラー（head collar）に対する反応を評価。

#### Phase #5

目隠しをしたインストラクターによるガイドワークの予備審査を行う。身体検査記録の総評価。ガイドワーク訓練が行われる環境が更に難易度の高いものになる（他の歩行者がいる歩道、階段、さまざまな材質の床の歩行など）。

### 図3-1-1 カリフォルニア盲導犬協会訓練内容

#### Phase #6

ガイドワーク訓練を行うコースが更に難易度の高い環境になる。多くの歩行者と車両が行きかう道路や大きな横断歩道、人々の熱気にあふれた区画など。歩道のない道路や、丸くカーブを描いている角への馴致。さまざまな物、音や匂いにあふれたショッピングモールや商店、建物内でのガイドワーク訓練。動きながら方向を転換するといった高度なガイドワーク技術の習得。また、たとえ号令が出ていてもそうすることが危険である場合に、その号令に従わないという「賢い不服従 (intelligent disobedience)」を学習する。オビエディエンス上達訓練。

#### Phase #7

都会の中心地などの最も困難な状況でのガイドワーク訓練へと移行。バス、電車および地下鉄への乗車やプラットフォームでの歩行訓練。頭上が低くなっている通路への馴致や、リード無しでの高度な服従訓練。

#### Phase #8

ガイドワークとオビエディエンスの上達訓練の継続。混雑した状況や滑りやすい床での歩行、およびエスカレーターへの乗降などショッピングモールでの難易度の高い訓練。歩道が無く、障害物がある道路での歩行訓練。

#### Phase #9

インストラクターが目隠しをした状態や、リード無しでのオビエディエンス最終審査、および注意散漫となりがちな対象物への反応テスト。見知らぬハンドラーや初心者インストラクターとの訓練も行う。また、目隠しした状態のインストラクターと実生活に準じた交通機関における最終歩行審査も行う。

#### Phase #10

最終ガイドワーク審査。目隠しした状態のインストラクターと共に市街地を約 40-50 分間ガイドワークするもの。審査に使われるコースには日常的な障害物(曲がり角、横断歩道、階段、建物、歩行者の多い歩道、交通機関など)が含まれており、コース途中ではオビエディエンス審査も行われる。さらに屋内最終ガイドワーク審査を行う。目隠しした状態のインストラクターとショッピングモールや商店など建物の中を歩行し、エスカレーターやエレベーターの乗降、階段の昇降などを行う。

### 図3-1-2 カリフォルニア盲導犬協会訓練内容

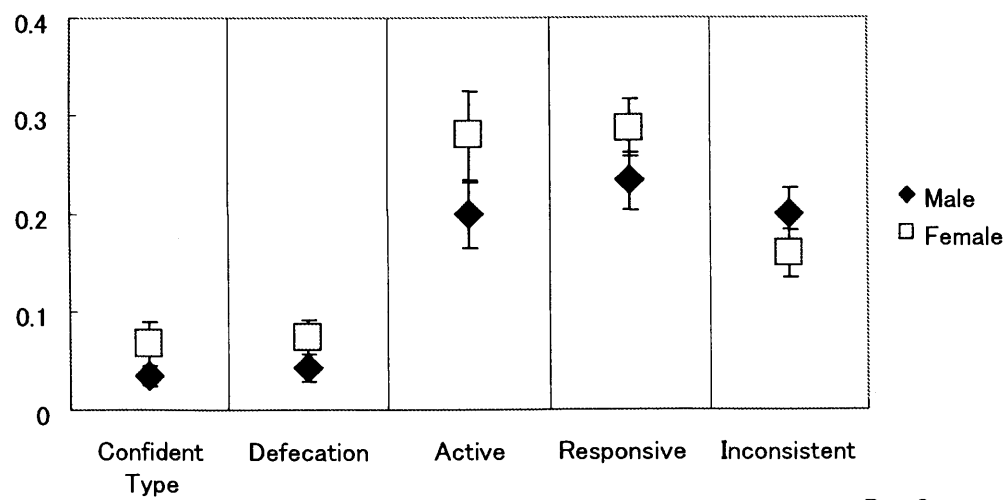
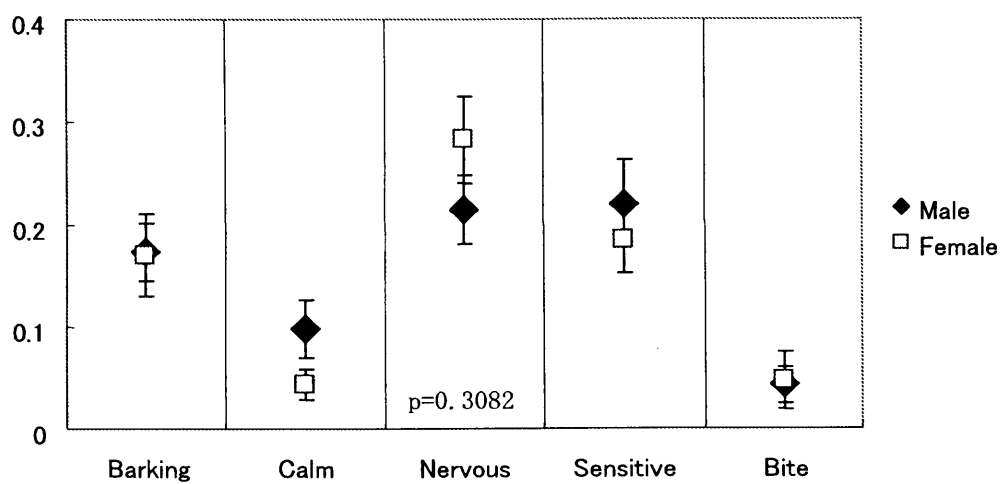
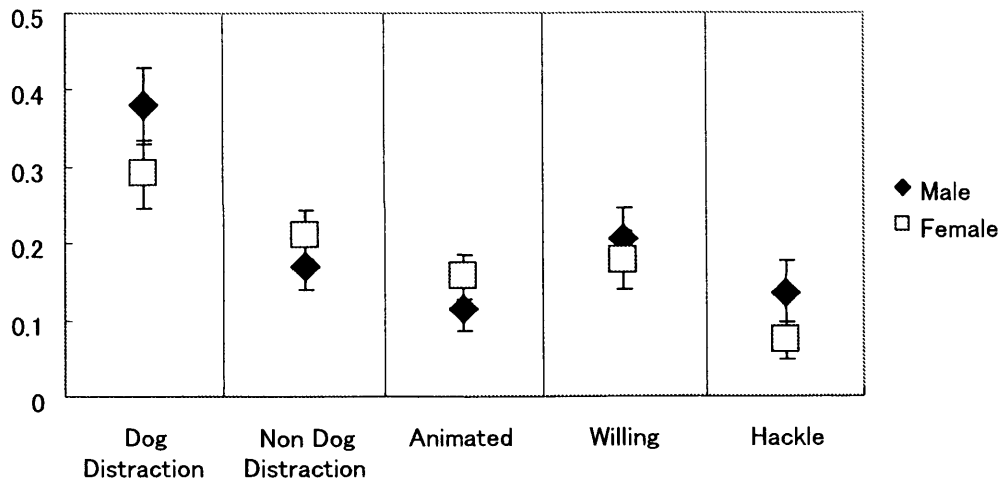
表 3-1 訓練記録から抽出した行動特性に関するコメントカテゴリー

Comment	category	comments
	Dog Distraction	dog distraction
	Non Dog Distraction	to animal, to odor, to food, to human
	Animated	animated
	Willing	willing
	Hackle	hackle, woof, growl
	Barking	barking, vocal
	Calm	calm
	Nervous	nervous, uneasy, startle, antsy, hesitant, tense, insecure
	Sensitive	sensitive to noise, body sensitive
	Bite	bite, mouthy, snap
	Confident type	confident type, confidently
	Defecation	defecation, defecate
	Active	active, exuberant, brisk, actively, energetic, rough, rampy
	Responsive	responsive, good response
	Inconsistent	inconsistent, lack of confidence, lack of focus, lack of initiative

表3-2 行動評価スコアの相関係数

相関係数	Dog		Non Dog		Willing	Hackle	Barking	Calm	Nervous	Sensitive	Bite	Confident				
	Distraction	Non Dog Distraction	Animated									Type	Defecation	Active	Responsive	Inconsistent
Dog Distraction	1.000															
Non Dog Distraction	<b>0.457</b>	1.000														
Animated	0.052	-0.009	1.000													
Willing	0.305	0.223	0.238	1.000												
Hackle	0.032	-0.047	0.025	-0.084	1.000											
Barking	0.009	-0.005	0.016	0.015	0.286	1.000										
Calm	0.062	-0.087	-0.078	-0.102	-0.079	-0.076	1.000									
Nervous	-0.210	-0.106	0.227	-0.083	0.355	0.116	-0.092	1.000								
Sensitive	-0.026	-0.028	0.138	0.185	-0.096	-0.246	0.070	0.183	1.000							
Bite	-0.227	-0.037	0.183	-0.117	<b>0.444</b>	<b>0.427</b>	-0.105	<b>0.422</b>	-0.150	1.000						
Confident Type	0.280	0.117	-0.032	-0.089	-0.085	-0.076	-0.071	-0.157	-0.003	-0.075	1.000					
Defecation	0.061	0.240	0.054	-0.017	-0.145	0.048	-0.086	0.083	-0.031	0.014	0.040	1.000				
Active	0.104	0.216	0.130	0.128	-0.171	0.282	-0.254	-0.193	-0.150	-0.042	0.224	0.056	1.000			
Responsive	-0.031	-0.135	0.195	0.031	-0.015	-0.034	0.037	0.065	0.073	0.066	0.071	-0.221	0.045	1.000		
Inconsistent	0.109	0.130	-0.134	-0.083	-0.080	-0.027	0.021	-0.177	0.010	-0.102	0.130	0.040	0.083	-0.027	1.000	

有意な相関は太字で示した。(p< 0.0001)

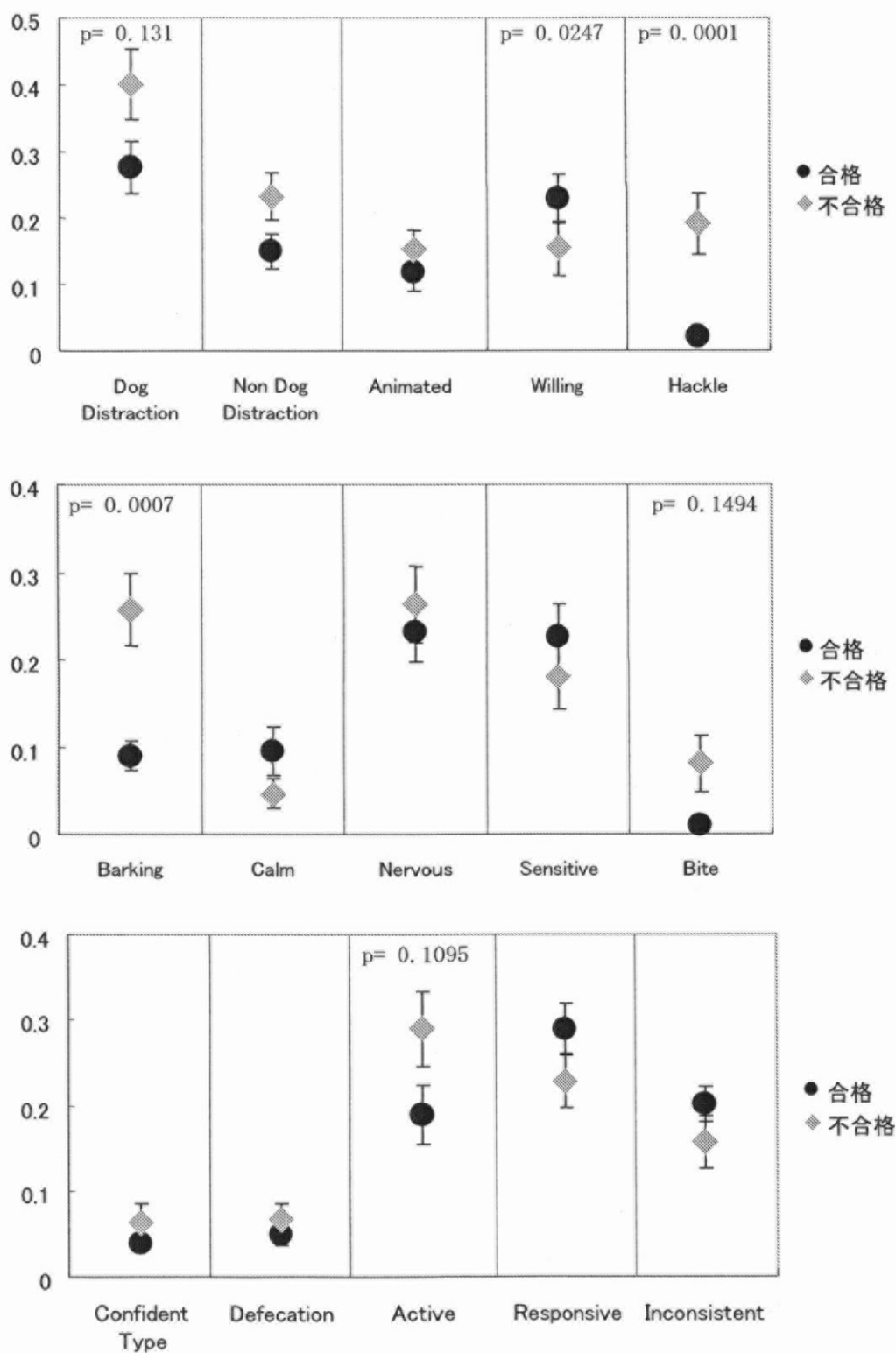


Bonferroni 補正後の  
有意値:  $p < 0.0033$

図3-2 行動評価スコアの雌雄差

◆および□は評価スコアの平均値を、エラーバーは標準誤差を示す。





Bonferroni 補正後の  
有意値:  $p < 0.0033$

図3-3 合格群および不合格群の行動評価スコア

◆および□は評価スコアの平均値を、エラーバーは標準誤差を示す。  
有意差が認められたカテゴリーは太字で示した。  
p 値は Mann-Whitney の U 検定による。

表3-3 因子分析 因子負荷量と累積寄与率

因子負荷量：回転後（バリマックス法）								
変数名	因子 1	因子 2	因子 3	因子 4	因子 5	因子 6	因子 7	因子 8
Dog Distraction	-0.050	<u>0.957</u>	0.014	-0.052	-0.005	-0.157	0.282	0.047
Non Dog Distraction	-0.045	<u>0.480</u>	-0.001	0.000	0.237	0.214	0.111	-0.110
Animated	0.112	0.094	0.004	0.094	0.089	0.134	-0.151	<u>0.610</u>
Willing	-0.192	<u>0.480</u>	0.048	0.206	-0.072	0.243	<u>-0.420</u>	0.175
Hackle	<u>0.705</u>	0.082	0.092	-0.074	-0.188	0.004	-0.065	-0.094
Barking	0.269	0.023	<u>0.896</u>	-0.140	0.023	0.088	-0.053	-0.029
Calm	-0.115	-0.012	0.006	0.028	-0.060	<u>-0.473</u>	-0.006	-0.012
Nervous	<u>0.608</u>	-0.157	-0.025	0.197	0.157	0.004	-0.153	0.210
Sensitive	-0.024	0.008	-0.126	<u>0.843</u>	-0.014	-0.082	-0.009	0.109
Bite	<u>0.626</u>	-0.150	0.254	-0.121	0.055	0.099	-0.072	0.157
Confident Type	-0.078	0.142	-0.044	-0.016	-0.009	0.109	<u>0.504</u>	0.069
Defecation	-0.017	0.075	0.021	-0.005	<u>0.764</u>	0.071	0.032	-0.049
Active	-0.262	0.094	0.330	-0.098	0.011	<u>0.582</u>	0.270	0.170
Responsive	0.006	-0.076	-0.002	0.038	-0.249	-0.038	0.087	<u>0.402</u>
Inconsistent	-0.120	0.060	0.021	0.027	0.021	0.009	0.261	-0.156
固有値	1.488	1.485	1.007	0.856	0.782	0.753	0.730	0.729
累積寄与率	9.92%	19.82%	26.53%	32.24%	37.45%	42.47%	47.34%	52.20%

因子負荷量の絶対値が 0.4 以上のものをアンダーラインで示した。

表3-4 主成分分析 主成分負荷量と累積寄与率

主成分負荷量	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5
Dog Distraction	<u>0.836</u>	0.062	0.308	-0.357	-0.117
Non Dog Distraction	<u>0.593</u>	0.124	0.139	-0.083	-0.267
Animated	0.045	0.068	0.391	<u>0.431</u>	0.005
Willing	<u>0.518</u>	-0.115	<u>0.417</u>	<u>0.415</u>	<u>0.560</u>
Hackle	-0.267	<u>0.507</u>	<u>0.495</u>	-0.337	0.054
Barking	-0.022	<u>0.762</u>	0.064	0.125	0.107
Calm	-0.030	-0.251	-0.021	-0.274	0.047
Nervous	<u>-0.514</u>	0.202	<u>0.643</u>	0.099	-0.260
Sensitive	-0.051	<u>-0.608</u>	<u>0.468</u>	0.328	-0.331
Bite	-0.392	<u>0.547</u>	0.296	0.032	0.016
Confident Type	0.290	0.025	-0.111	-0.048	-0.336
Defecation	0.097	0.058	0.000	0.011	-0.175
Active	<u>0.417</u>	<u>0.455</u>	-0.323	<u>0.602</u>	-0.286
Responsive	-0.061	-0.044	0.106	0.254	-0.032
Inconsistent	0.180	-0.044	-0.190	-0.113	-0.303
累積寄与率	20.54%	34.47%	47.95%	58.95%	65.90%

主成分負荷量の絶対値が 0.4 以上のものをアンダーラインで示した。

表3-5 主成分分析 固有ベクトルと寄与率

固有ベクトル	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5
Dog Distraction	<u>0.698</u>	0.063	<u>0.317</u>	<u>-0.407</u>	-0.169
Non Dog Distraction	<u>0.329</u>	0.084	0.095	-0.063	-0.255
Animated	0.023	0.041	0.241	0.295	0.004
Willing	<u>0.355</u>	-0.096	<u>0.354</u>	<u>0.389</u>	<u>0.660</u>
Hackle	-0.166	<u>0.382</u>	<u>0.380</u>	-0.286	0.058
Barking	-0.013	<u>0.554</u>	0.047	0.103	0.110
Calm	-0.012	-0.122	-0.010	-0.150	0.033
Nervous	<u>-0.346</u>	0.165	<u>0.535</u>	0.091	<u>-0.301</u>
Sensitive	-0.035	<u>-0.503</u>	<u>0.393</u>	<u>0.305</u>	<u>-0.387</u>
Bite	-0.162	0.275	0.152	0.018	0.012
Confident Type	0.087	0.009	-0.041	-0.020	-0.174
Defecation	0.027	0.020	0.000	0.004	-0.084
Active	0.294	<u>0.390</u>	-0.281	<u>0.580</u>	<u>-0.347</u>
Responsive	-0.032	-0.028	0.069	0.183	-0.029
Inconsistent	0.081	-0.024	-0.106	-0.069	-0.234
寄与率	20.54%	13.93%	13.48%	11.00%	6.95%
類推名称	外向性	攻撃的反応性	不安傾向	機敏性	集中力

固有ベクトルの絶対値が 0.3 以上のものをアンダーラインで示した。

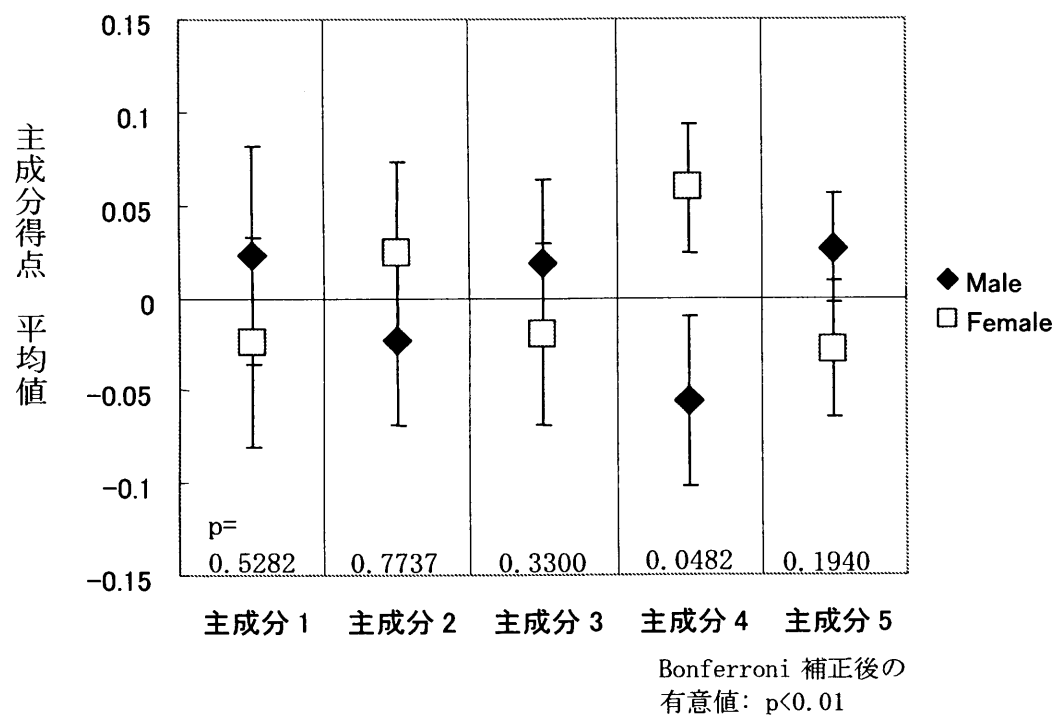


図3-4 主成分分析 雌雄別の主成分得点平均値

p 値は Mann-Whitney の U 検定により算出した。

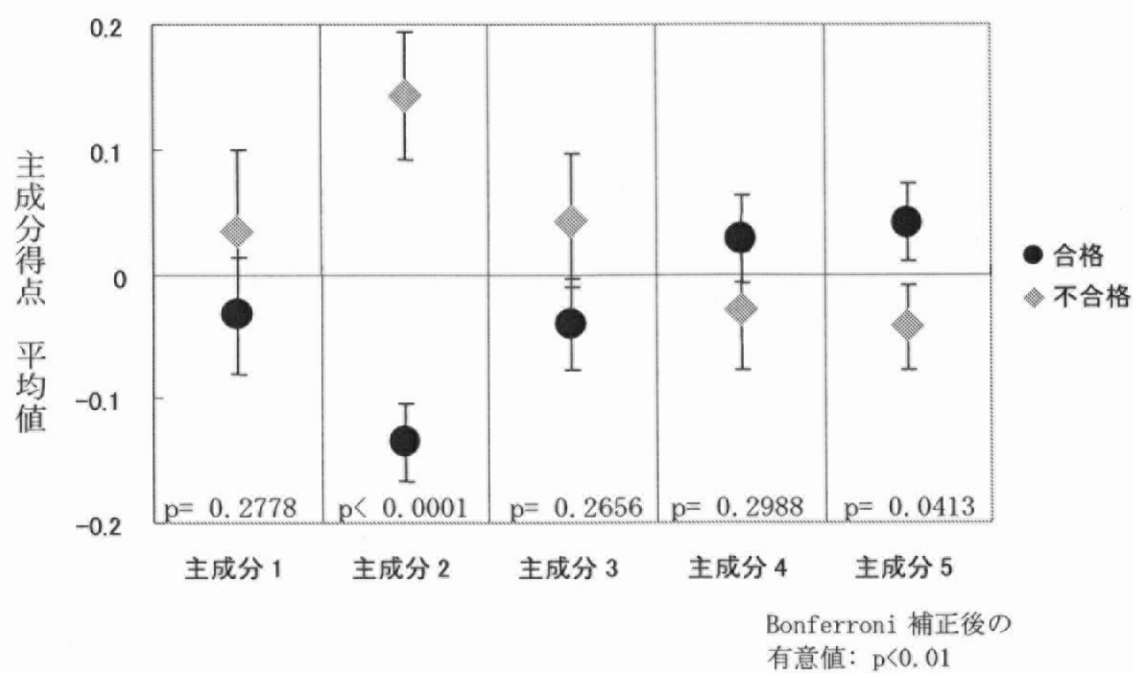


図3-5 主成分分析 合否群別の主成分得点平均値

p 値は Mann-Whitney の U 検定により算出した。

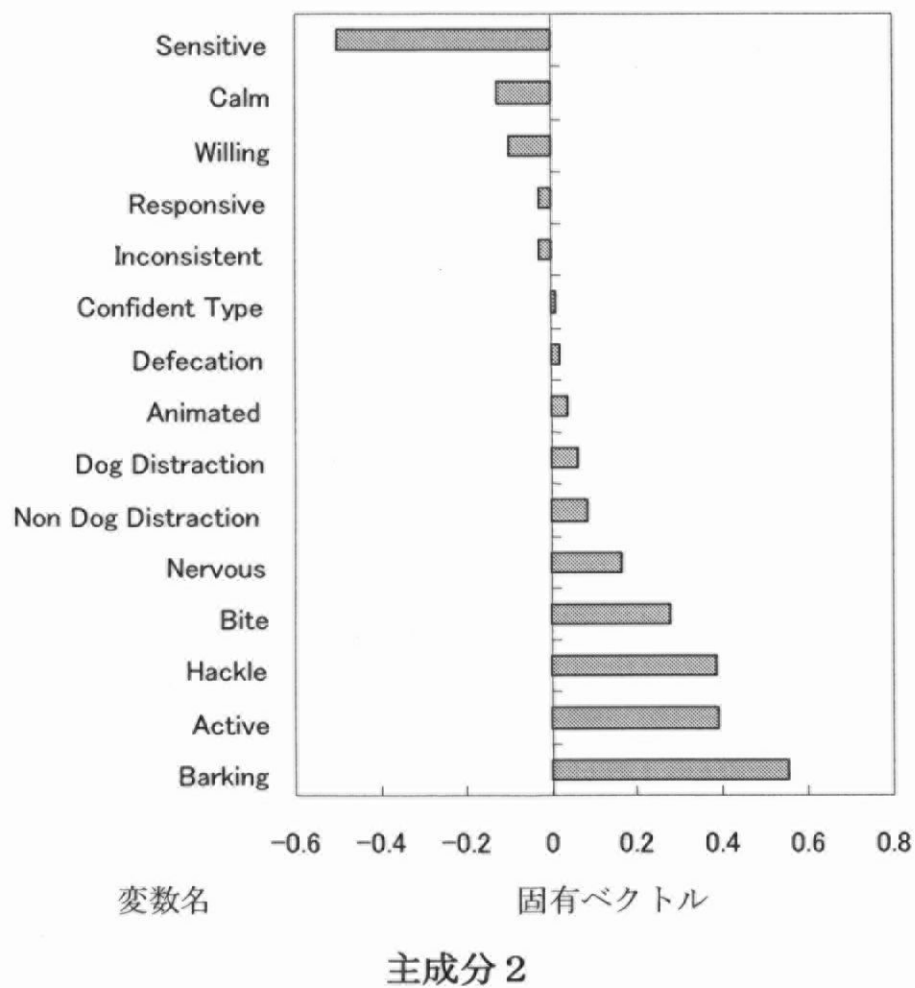
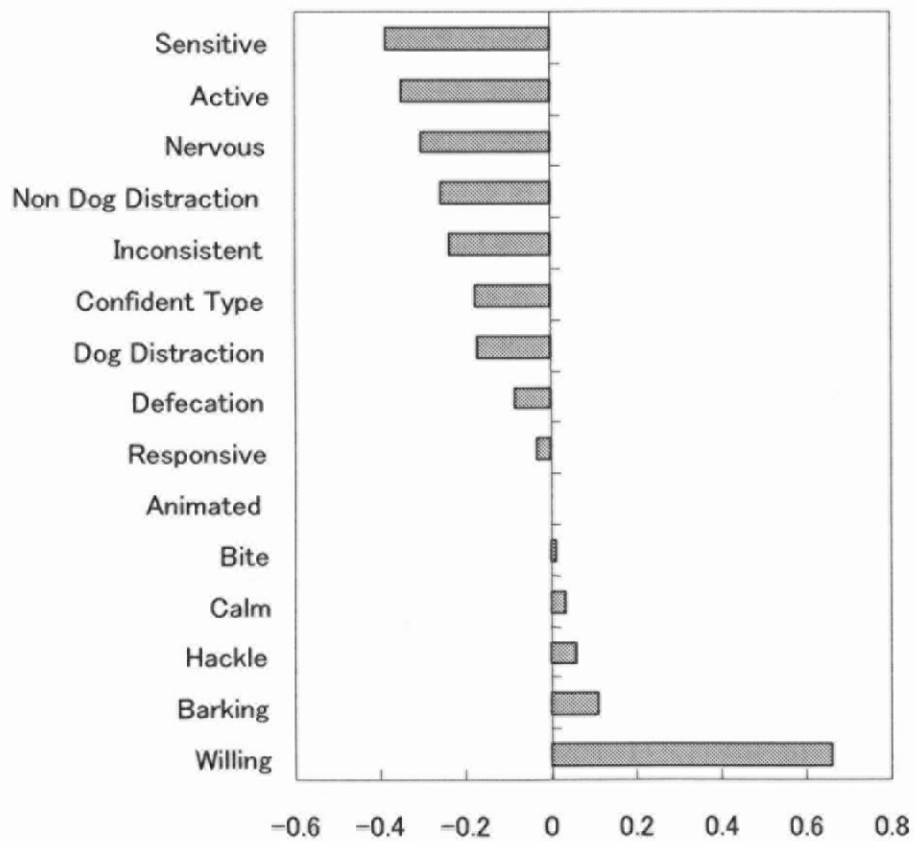


図3-6 主成分分析 主成分2を構成する変数とその固有ベクトル



変数名

固有ベクトル

主成分 5

図3-7 主成分分析 主成分 5 を構成する変数とその固有ベクトル



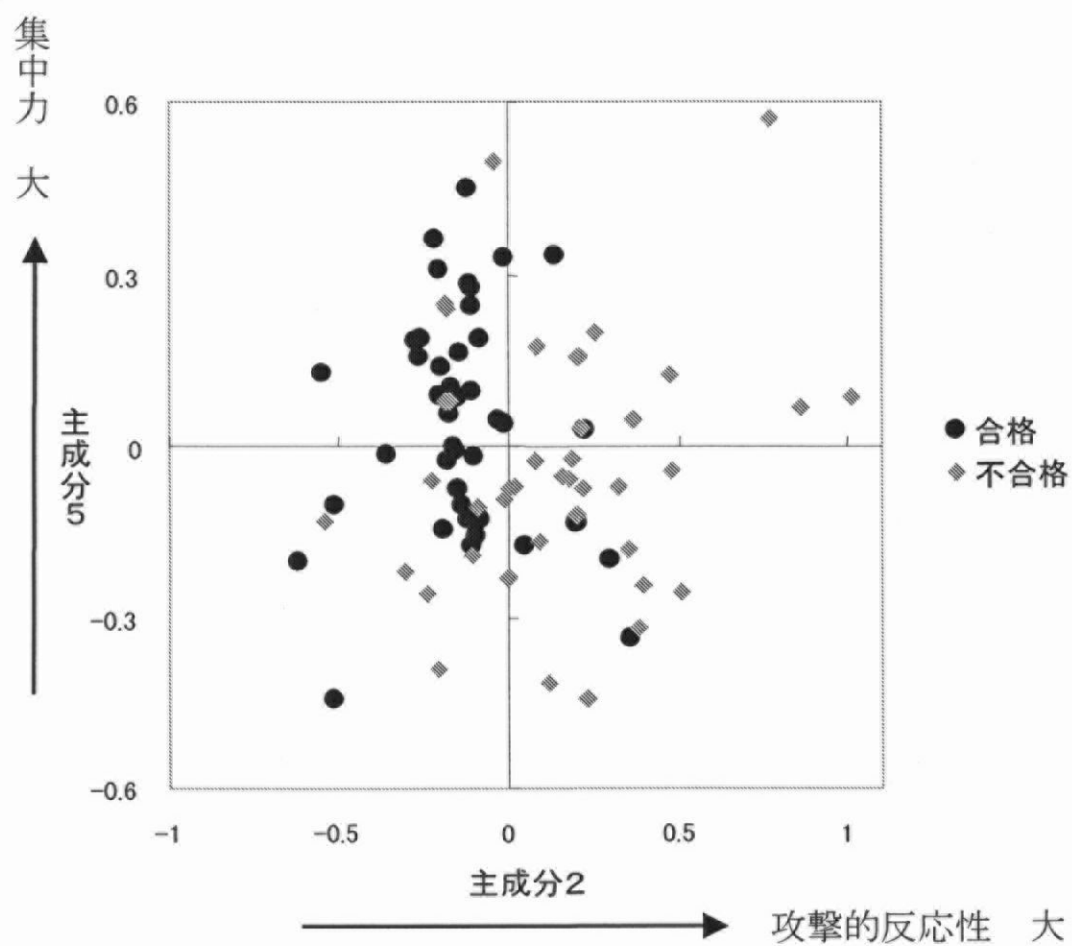


図3-8 主成分分析 合否群別の主成分得点の散布図

X 軸に主成分 2、Y 軸に主成分 5 の得点をプロットした。

## 第 4 章

### 盲導犬候補個体における遺伝子多型解析

## 緒言

人の心理学・精神医学分野では、脳内モノアミン動態に関与する遺伝子を中心として、それらに認められる遺伝子多型と情動および精神疾患の関連が数多く報告されている。これらの報告では、被験者へのアンケートから、その人の気質や精神疾患への脆弱性などを調査すると同時に、DNA 解析を行うことによって遺伝子多型の出現頻度も調査し、遺伝子多型と情動および精神疾患の関連を検討している。そこで第4章では、第3章において詳細な行動評価を行った盲導犬候補個体を対象に、第2章で同定した MAOB および DBH の遺伝子多型、さらに既に報告されているドーパミン D2 レセプター (DRD2) 遺伝子多型およびドーパミン D4 レセプター (DRD4) 遺伝子多型との関連を検討した。

本章で新たに解析に加えた、ドーパミンレセプターには5つのサブタイプがあり、アデニル酸シクラーゼを活性化する D1 レセプターファミリー (D1, D5) と、その活性を抑制する D2 レセプターファミリー (D2, D3, D4) に大別される。中でも DRD2 および DRD4 は向精神薬に対する親和性が高いこともあり、情動や精神疾患との関連が注目されている。人の脳内では DRD2 は主に中脳－黒質－線条体系に発現しており、DRD2 阻害薬が抗精神病薬として臨床的に有用視されていること [Goldstein, M. *et al.* 1992] から、統合失調症の発症に関与していると考えられている。また、DRD2 遺伝子の 3' 未翻訳領域にある一塩基置換とアルコール依存症発症率の関連も報告されている [Blum, K. *et al.* 1990]。一方、人の DRD4 は行動の動機付けに関連すると考えられている前頭葉、海馬、および扁桃体に発現しており、人の DRD4 遺伝子の exon3 部位にみられる反復配列多型がアルコール依存症 [George, S.R. *et al.* 1993] や性格傾向の一つである新奇性追求傾向 [Benjamin, J. *et al.* 1996; Ebstein, R.P. *et al.* 1996] に関連している。しかしながら、本研究で解析に加えた犬の DRD2 および DRD4 遺伝子多型、すなわち DRD2 遺伝子塩基配列挿入・欠失多型 [Myeong, H. *et al.* 2000]、犬の DRD4 遺伝子 exon1 部位の塩基配列挿入・欠失多型 [Ito, H. *et al.* 2004]、および同遺伝子 exon3 部位の反復配列多型 [Niimi, Y. *et al.* 2001] と犬の気質との関連は未だ明らかにされていない。

解析を行った計4遺伝子5種の遺伝子多型が、盲導犬候補個体の行動特性に及ぼす影響について検討するために、各遺伝子多型の遺伝子型別に候補個体をグループ化し、第3章にて集計・解析を行った行動評価スコアおよび主成分得点の平均値を算出し比較検討した。更に、盲導犬適性審査の可否別に各遺伝子多型のアレル出現頻度を比較し、それぞれの遺伝子多型が適性審査の結果に関連しているかについても検討した。

## 材料と方法

### 供試動物

第3章にて詳細な行動評価を行った、盲導犬候補個体（ラブラドルレトリバー種、合格群 n= 42、不合格群 n= 39）を供試した。個体の健康診断の際に末梢から抗凝固処理済みバキュエイト採血管（Becton Dickinson, U.S.A.）を用いて得られた犬全血は、ゲノム DNA 抽出を行うまで-20℃にて凍結保存した。ゲノム DNA の抽出は QIAamp DNA Blood Midi Kit（Qiagen, U.S.A.）を用いて通常の方法で行い、得られたゲノム DNA は滅菌超純水に溶かし 4℃に保存した。

### 遺伝子多型マーカーの多型出現頻度の解析

#### *MAO T199C 多型および DBH C789A 多型*

第2章で遺伝子型を判定するのに用いた手法と同様の手法で行った。

#### *DRD2 遺伝子多型*

犬の DRD2 遺伝子の intron3 部位に塩基配列の挿入、欠失があるという報告[Myeong, H. *et al.* 2000]を参考に PCR-電気泳動法を用いて遺伝子型を判定した。PCR 増幅には Extaq polymerase（TaKaRa）を用いた。使用したプライマーおよび PCR 条件を以下に示す。

Forward (SINE F) : 5'-TGT GAG CTT GAG ATA CCA TA-3'

Reverse (SINE R) : 5'-CGG TAT GGA GGC GTT GTG AG-3'

PCR 条件 : 95℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 30 秒を 30 サイクル

得られた PCR 産物を 1.5% アガロース・ゲルを用いて電気泳動し、泳動度の違いによって遺伝子型を判定した。塩基数が多いアレルを DRD2 S アレルとし、少ないアレルを DRD2 N アレルとした。詳細な塩基配列については図 4-1 に示した。

#### *DRD4 遺伝子多型*

DRD4 遺伝子多型は人の性格（新奇性追求）への影響が報告された exon3 領域[Benjamin,

J. *et al.* 1996; Ebstein, R.P. *et al.* 1996]について、犬での多様性を調査した岐阜大学村山博士ら[Niimi, Y. *et al.* 2001; Ito, H. *et al.* 2004]の協力によって、遺伝子型を同定した。更に、村山博士らが同定した exon1 部位における 24bp の塩基配列挿入・欠失多型[Ito, H. *et al.* 2004]についても同様に協力を頂き遺伝子型を同定した。

### 遺伝子多型と行動評価スコア、および主成分得点の関連解析

遺伝子型がホモ型 2 種とヘテロ型 1 種の計 3 グループとなる MAOB T199C 多型、DBH C789A 多型および DRD4 exon1 多型については Kruskal-Wallis の検定を、片方のホモ型が検出されず遺伝子型が 2 グループとなる DRD2 多型および DRD4 exon3 多型については Mann-Whitney の U 検定を行った。解析ソフトウェアは StatView ver.5.0 を用いた。

### 遺伝子多型と盲導犬適性審査の合否との関連解析

$\chi^2$  検定により合格群と不合格群間におけるアレル出現頻度の相違を検討した。

## 結果

解析を行った遺伝子多型のアレル出現頻度は、MAOB 遺伝子 T199C 多型については C アレルが 11.7% (表 4-1)、DBH 遺伝子 C789A 多型については A アレルが 42.0% (表 4-2)、DRD2 遺伝子多型については N アレルが 9.9% (表 4-3)、DRD4 exon1 遺伝子多型については L アレルが 38.3% (表 4-4)、および DRD4 遺伝子 exon3 反復配列多型については S アレルが 12.5% (表 4-4) であった。このことから、この 5 遺伝子マーカーは検索した個体群に普遍的に存在していることが明らかとなった。

第 3 章で得られた行動評価結果との関連では、DBH 遺伝子 C789A 多型と、“Defecation” (訓練ルート上で排便をすること) スコアに有意な相関 ( $p=0.0018$ , Kruskal-Wallis の検定) が認められ (表 4-5)、遺伝子型が AA である個体が CA および CC である個体に比べて排便する傾向が高いことが明らかとなった (図 4-2)。

また、DRD4 exon1 多型と、主成分 2 (攻撃的反応性) の主成分得点に有意な相関 ( $p=0.0004$ , Kruskal-Wallis の検定) が認められ (表 4-5)、遺伝子型が LL である個体が SS および SL である個体に比べ攻撃的反応性が高いことが明らかとなった (図 4-3)。

また有意値の Bonferroni 補正を行うと有意ではないものの、DRD4 exon1 多型と、“Sensitive” (敏感) および “Active” (活発) スコアの相関傾向が認められ ( $p=0.0064$  および  $p=0.0054$ , とともに Kruskal-Wallis の検定) (表 4-5)、遺伝子型が LL である個体が SS および SL である個体に比べ鈍感で活動性が高い傾向にあることが明らかとなった (図 4-3)。

$\chi^2$  検定により合格群と不合格群間におけるアレル出現頻度の相違を検討したところ、いずれの遺伝子多型においても、合格群と不合格群の間に有意な相違が見られなかった。

## 考察

MAOB 遺伝子 T199C 多型では、遺伝子型で CC をもつ個体が存在しなかった。総計のアレル出現頻度でもアレル C は 11.7% と非常に少ないことから、盲導犬候補個体の MAOB 遺伝子 T199C 多型における遺伝的多様性は小さいと言える。しかし、日本国内のラブラドルレトリバーでは、アレル C の出現頻度が 40% もあり、盲導犬候補群とは大きく異なっていた。もちろん、今回解析に供試した盲導犬候補個体には、疾患によって不適格となった個体が除外されており、純粋な盲導犬候補群のアレル出現頻度を反映していない。しかし、このように出現頻度に大きな差が認められたということは、これまでの盲導犬育成の育種選抜の過程で、MAOB 遺伝子 T199C 多型のアレル C が積極的に排除されてきたことを示唆しているとも考えられる。

第 3 章で得られた行動評価結果との関連では、DBH 遺伝子 C789A 多型と、“Defecation”（訓練ルート上で排便をすること）スコアに有意な相関（ $p=0.0018$ , Kruskal-Wallis の検定）が認められ（表 4-5）、遺伝子型が AA である個体が CA および CC である個体に比べて排便する傾向が高いことが明らかとなった（図 4-2）。このことから DBH 遺伝子 C789A 多型では C アレルの有無が排便傾向に関連しているようである。もし実際の盲導犬活動中に排便すれば、目の不自由なユーザーはそれに気がつくことが困難であり、往来の頻繁な路上では危険な状況に陥る可能性もある。そのため盲導犬候補個体は訓練ルート上に排便することが無いように、訓練開始直前に排便すべき場所（トイレ）で排便を済ませるようにトレーニングされる。DBH はドーパミンからノルアドレナリンを生合成する酵素である。そのためドーパミンあるいはノルアドレナリンが排泄場所の学習に関与する可能性が示唆されたことは興味深い。

また、DRD4 exon1 多型と、主成分 2（攻撃的反応性）の主成分得点に有意な相関（ $p=0.0004$ , Kruskal-Wallis の検定）が認められ（表 4-5）、遺伝子型が LL である個体が SS および SL である個体に比べ攻撃的反応性が高いことが明らかとなった（図 4-3）。人の DRD4 は行動の動機付けや、新奇性追究傾向に関わることが知られているが、攻撃性との関連は報告が無い。犬における攻撃的反応性が人のそうした行動特性に一致するのかについては今後の検討課題としたい。第 3 章において盲導犬不適格となる個体は主成分 2 の主成分得点が高い傾向にあることが示されたため、DRD4 exon1 多型が盲導犬適性審査の結果に関与する可能性が考えられた。しかし、合否群間に遺伝子型出現頻度およびアレル出現頻度の相違が認められず、DRD4 exon1 多型の直接的な関与は実証されなかった。

こうした解析によって、それぞれの遺伝子多型が盲導犬候補個体の行動特性に及ぼしている影響について新たな知見を得ることができた。犬の行動遺伝学において、遺伝子多型を用いた行動特性の解析という新たな試みは、交雑試験、戻し交配などコストのかかる試験より簡便であり、今後の強力な解析ツールとなる可能性が考えられた。



## 小括

第4章では、第3章において詳細な行動評価を行った盲導犬候補個体を対象に、第2章で同定した MAOB および DBH の遺伝子多型、さらに既に報告されているドーパミン D2 レセプター (DRD2) 遺伝子多型およびドーパミン D4 レセプター (DRD4) 遺伝子多型の計 4 遺伝子 5 種の遺伝子多型が、盲導犬候補個体の行動特性に及ぼす影響について検討するために、各遺伝子多型の遺伝子型別に候補個体をグループ化し、行動評価スコアおよび主成分得点の平均値を算出し比較検討した。更に、盲導犬適性審査の可否別に各遺伝子多型のアレル出現頻度を比較し、それぞれの遺伝子多型が適性審査の結果に関連しているかについても検討した。その結果、DBH 遺伝子 C789A 多型と、“Defecation” (訓練ルート上で排便をすること) スコアに有意な相関 ( $p=0.0018$ , Kruskal-Wallis の検定) が認められ、C アレルの有無が排便傾向に関連していることが明らかとなった。また、DRD4 exon1 多型と、主成分 2 (攻撃的反応性) の主成分得点に有意な相関が認められ、遺伝子型が LL である個体が SS および SL である個体に比べ攻撃的反応性が高いことが明らかとなった。第3章では盲導犬不適格となる個体は主成分 2 の主成分得点が高い傾向にあることが示されたため、DRD4 exon1 多型が盲導犬適性審査の結果に関与する可能性が考えられた。

## 第 4 章 図表

```

S allele. gnu 1:TCCTAAGCAAGTCACTTTCTCTCTGAAGTCCCTCAGCAGCAGATTAGCTCTCAGGGTTGTTTGTGTGGTCAAAGGTTTACAAAGGTGAAAGAAAGC 100
N allele. gnu 1:TCCTAAGCAAGTCACTTTCTCTCTGAAGTCCCTCAGCAGCAGATTAGCTCTCAGGGTTGTTTGTGTGGTCAAAGGTTTACAAAGGTGAAAGAAAGC 100
*****

S allele. gnu 101:ATTTCTAAAGGGCAAAGCGGTGCACACAGCCAAGTGTATCAGGGTGGTTTGTGTTGAGGAGTGGGAAATTCAGTTCACCCAGCTCAACCAAGGCC 200
N allele. gnu 101:ATTTCTAAAGGGCAAAGCGGTGCACACAGCCAAGTGTATCAGGGTGGTTTGTGTTGAGGAGTGGGAAATTCAGTTCACCCAGCTCAACCAAGGCC 200
*****

S allele. gnu 201:CCGTGGGACCAGAGCTGTGAATAGAGAAACAGGGCTGGGAGGGGGTCCCTCTGGAGGAGGGTGTGTCTCCATCAGCCAGCCAAGGCTTTNGAATAAAAG 300
N allele. gnu 201:CCGTGGGACCAGAGCTGGGAACAGAGAAACAGGGCTGGGAGGGGGTCCCTCTGGAGGAGGGTGTGTCTCCATCAGCCAGCCAAGGCTTTNGAATAAAAG 300
*****

S allele. gnu 301:TCTCTAGAAAACAGGACTGGGGATCCTGGGTGGCGCAGCGTTTGGCGCTGCCTTTGGCCAGGGCGCGATCCTGGAGACCCGGGATCGAATCCCA 400
N allele. gnu 301:TCTCTAGAAAACAGGACTGGAG-TCTGGGTGGCGCAGCGTTTGGCGCTGCCTTTGGCCAGGGCGCGATCCTGGAGACCCGGGATCGAATCCCA 326
*****

S allele. gnu 401:CGTCGGGCTCCCGGTGCATGGGGCTGCTTCTCCCTCGGCTGTGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTGTGACTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 500
N allele. gnu 326:
*****

S allele. gnu 501:AAAAAAAAAAAAAGAAAACAGGACTGGAGTCAAAACACAAGGCTGGGCTGACGTGGGTGGTGGGCACAGGAGGGGCTGCTGTGACTCTCCCTGCCCT 600
N allele. gnu 327:
*****

S allele. gnu 601:CTAGCACCAGGTCTCATGGGACACCCTGCCACACTCACCATCCCCTTGGGCTCCACCAATCCTGTGATGTGAGTGGGACAGGTGTTACCTCCCTGCT 700
N allele. gnu 393:CTAGCACCAGGTCTCATGGGACACCCTGCCACACTCACCATCCCCTTGGGCTCCACCAATCCTGTGATGTGAGTGGGACAGGTGTTACCTCCCTGCT 492
*****

S allele. gnu 701:TTTGTGAATGCATGCA 716
N allele. gnu 493:TTTGTGAATGCATGCA 508
*****

```

## 図4-1 DRD2遺伝子の多型部位

□内は塩基配列の挿入・欠失部位を示す。

表4-1 MAOB遺伝子多型の遺伝子型およびアレル出現頻度

分類	例数	遺伝子型					アレル頻度	
		Male		Female				
T199C	n	C	T	CC	TC	TT	C	T
合格	42	2	16	0	7	17	11	73
不合格	39	1	23	0	6	9	8	70
総計	81	3	39	0	13	26	19	143

表4-2 DBH遺伝子多型の遺伝子型およびアレル出現頻度

分類	例数	遺伝子型			アレル頻度	
C789A	n	AA	CA	CC	A	C
合格	42	6	20	16	32	52
不合格	39	9	18	12	36	42
総計	81	15	38	28	68	94

表4-3 DRD2遺伝子多型の遺伝子型およびアレル出現頻度

分類	例数 n	遺伝子型			アレル頻度	
		NN	SN	SS	N	S
合格	42	0	6	36	6	78
不合格	39	0	10	29	10	68
総計	81	0	16	65	16	146

表4-4 DRD4遺伝子多型の遺伝子型およびアレル出現頻度

分類	例数	遺伝子型			アレル頻度	
Exon1	n	LL	SL	SS	L	S
合格		5	19	18	29	55
不合格		11	11	17	33	45
総計	81	16	30	35	62	100

分類	例数	遺伝子型			アレル頻度	
Exon 3	n	435/435	435/447a	447a/447a	435	447a
合格	42	0	5	37	5	79
不合格	38	0	5	33	5	71
総計	80	0	10	70	10	150

表4-5 多型遺伝子型と行動評価スコア、主成分得点の関係

	MAOB	T199C	DBH C789A	DRD2	DRD4 exon1	DRD4 exon3
<b>行動評価スコア</b>						
Dog Distraction	0.4608		0.3972	0.6601	0.4712	0.6672
Non Dog Distraction	0.3707		0.6705	0.7138	0.0667	0.3963
Animated	0.4337		0.1729	0.9949	0.6451	0.5012
Willing	0.7131		0.5402	0.8398	0.9739	0.4535
Hackle	0.8978		0.9269	0.3634	0.3074	0.5671
Barking	0.884		0.3939	0.0708	0.0406	0.7182
Calm	0.2894		0.6024	0.7058	0.1092	0.1159
Nervous	0.9744		0.9077	0.8717	0.2072	0.548
Sensitive	0.4489		0.1619	0.8237	0.0064 <sup>b</sup>	0.1985
Bite	0.3771		0.6247	0.1617	0.3204	0.0114
Confident Type	0.9959		0.7032	0.5765	0.0739	0.4728
Defecation	0.0118		0.0018 <sup>a</sup>	0.0399	0.2485	0.5303
Active	0.7069		0.6397	0.0777	0.0054 <sup>b</sup>	0.8709
Responsive	0.7850		0.2505	0.3855	0.4664	0.6724
Inconsistent	0.5768		0.3771	0.509	0.0797	0.2112
<b>主成分得点</b>						
主成分1(外向性)	0.9495		0.6301	0.6867	0.0692	>.9999
主成分2(攻撃的反応性)	0.623		0.7679	0.0968	0.0004 <sup>a</sup>	0.2504
主成分3(不安傾向)	0.5905		0.1136	0.3426	0.6548	0.7052
主成分4(機敏性)	0.6721		0.6900	0.4477	0.5219	0.8843
主成分5(集中力)	0.6854		0.8565	0.0944	0.6722	0.8273

数値はp値を示す。(Kruskal-Wallisの検定; MAOB T199C, DBH C789A, DRD4 exon1, Mann-WhitneyのU検定; DRD2, DRD4 exon3)

Bonferroni 補正後の有意値は  $p < 0.0033$  (行動評価スコア) および  $p < 0.01$  (主成分得点) とした。有意レベルに達したものに a を、有意レベルに近いものに b を付した。



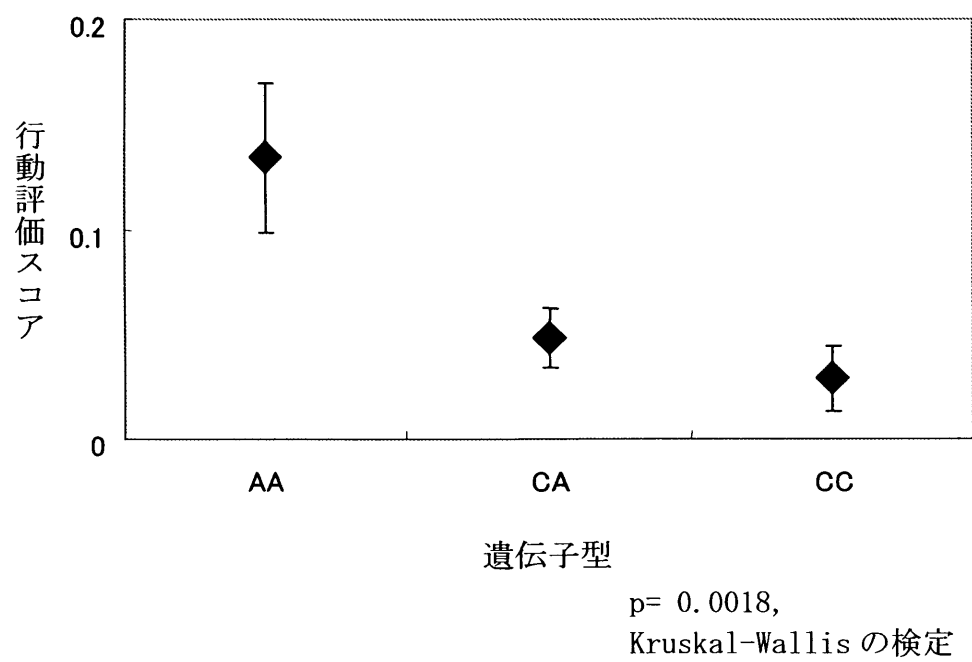


図4-2 DBH C789A多型の遺伝子型とDefecationスコアの関係

◆には行動評価スコアの平均値を、エラーバーは標準誤差を示す。  
( ) 内の数値は個体数を示す。

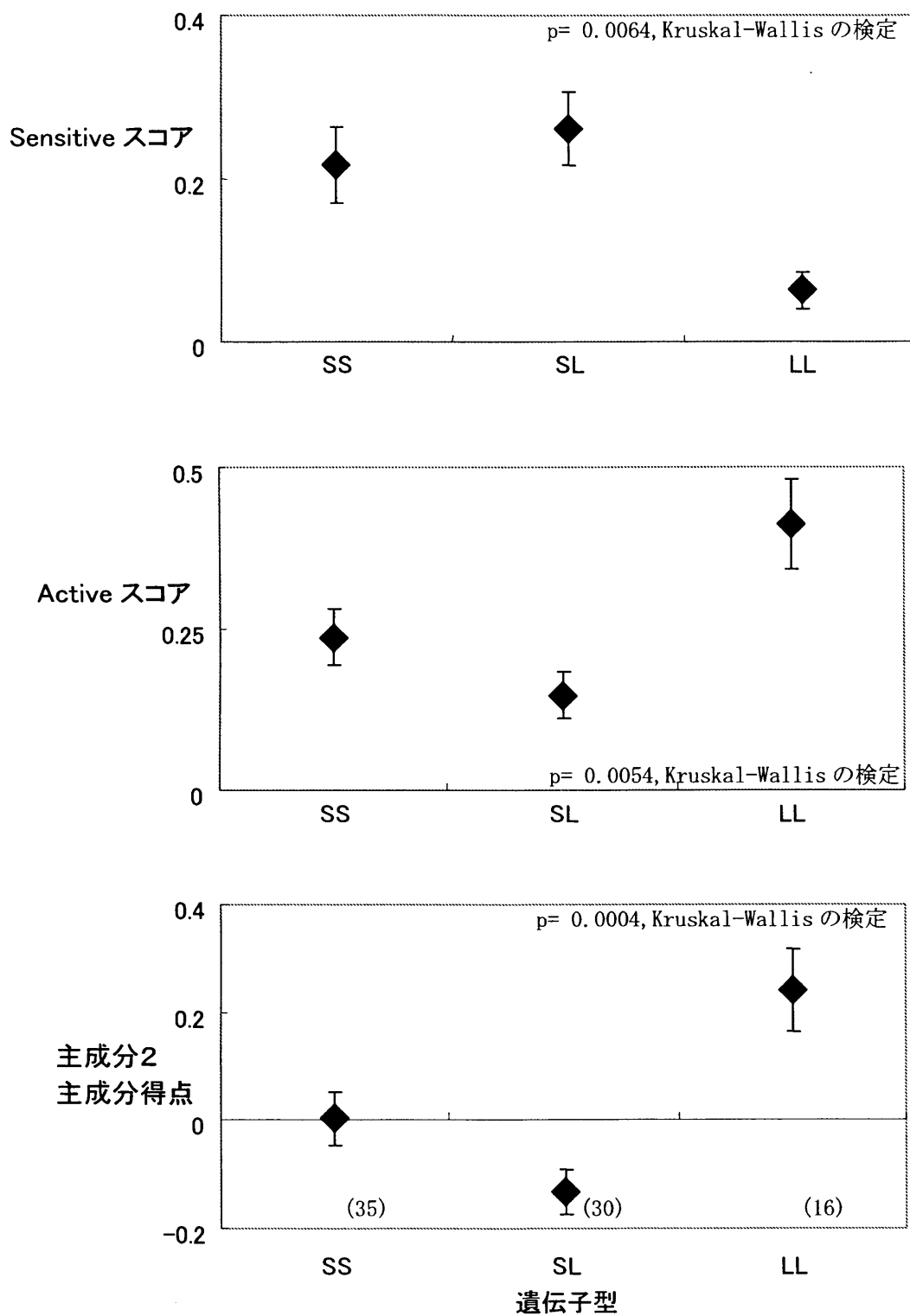


図4-3 DRD4 exon1多型の遺伝子型と行動評価スコアおよび主成分得点の関係

◆には行動評価スコアの平均値を、エラーバーは標準誤差を示す。  
 () 内の数値は個体数を示す。

## 第 5 章

### 重回帰分析による盲導犬候補個体の適性予測

## 緒言

個体の行動特性には、大きく分けて行動の駆動系、抑制系および両者のバランス維持系の3つがある。人の精神医学分野では、それぞれ駆動系にはドーパミン神経系、抑制系にはセロトニン神経系、そしてバランス維持系にはノルアドレナリン神経系が関わりとされている[Cloninger, C. R. 1987]。しかし、たった一つ「攻撃性」という行動特性を取り上げてみても、その特性を支配している脳部位は前頭葉や扁桃体、海馬などさまざまな部位に渡っており、関与している神経伝達物質や受容体は複数にわたると考えられる。近年、人の遺伝学分野では、複数の遺伝子多型を用いて、一つの行動特性や精神疾患への脆弱性との関連を調査する試みが始まっている。Noble らは DRD2 遺伝子多型と DRD4 遺伝子多型を組み合わせることで、新奇性追究傾向とこの2遺伝子多型の相互作用が関連していることを報告した[Noble, E. P. *et al.* 1998]。彼らは複数の遺伝子型を統合して解析するためにハプロタイプ解析とよばれる解析手法を使用した。この解析手法は、例えば A 遺伝子多型が AA、aa の2タイプに、B 遺伝子多型が BB、Bb、bb の3タイプに分かれる場合、ハプロタイプは AABB、AABb、AAbb、aaBB、aaBb、および aabb の  $2 \times 3 = 6$  タイプとなり、6タイプのハプロタイプに分類されたサンプルについて比較解析を行う手法である。しかしながら、解析する遺伝子が増加するに従いハプロタイプも増加するため、それぞれのタイプに属する個体数が統計的必要数を満たすためには、大規模な例数が必要となる。本研究においても複数の遺伝子多型とそれぞれの行動特性との関連を見出す目的でハプロタイプ解析の実施を検討したが、各ハプロタイプの例数が統計的に充分でないことから、実施できなかった。そこで、複数のデータを統合し、一つの結果を説明することを可能とする重回帰分析に着目し、複数の遺伝子多型の相互作用と行動特性の関連について検討した。

重回帰分析とは  $p$  個の説明変数（独立変数）とある目的変数（従属変数）の間に式をあてはめ、目的変数の変動が説明変数の変動によってどの程度影響されるかを分析する手法を指す。重回帰分析では

- 1、予測/潜在能力/評価
- 2、説明変数の目的変数に及ぼす影響度
- 3、説明変数の大事さランキング

が明らかにできる。

あてはめる式は重回帰式と呼ばれ、最小二乗法により求められる。

重回帰式;

$$Y(\text{目的変数}) = \alpha_1 X_1 (\text{説明変数 1}) + \alpha_2 X_2 (\text{説明変数 2}) + \dots + \alpha_p X_p (\text{説明変数 P}) + (\text{定数項})$$

本研究では、まず第 4 章で解析を行った 5 つの遺伝子多型が盲導犬としての適性にどの程度関与しているかについて検討するために、第 3 章で得られた第 2 主成分「攻撃的反応性」の主成分得点を盲導犬候補個体の適性に関する基準、つまり目的変数とし、5 遺伝子マーカーを説明変数として重回帰分析を行い、盲導犬の適性を予測する計算式を導いた。また、これら 5 種の遺伝子多型が他の主成分として抽出された行動特性にどの程度関与しているかについても検討した。さらに解析の精度を向上させる目的で、候補個体の性別、訓練開始時の日齢、訓練士の初回訓練時の第一印象を攻撃性および不安傾向にスコア化したデータを説明変数に加えた重回帰分析も行った。最後に盲導犬候補個体の最終審査可否結果が、これら 5 種の遺伝子多型から予測可能であるかについて判別分析によって検討した。

## 材料と方法

### 重回帰分析

重回帰式;

$$Y(\text{目的変数}) = \alpha_1 X_1 (\text{説明変数 1}) + \alpha_2 X_2 (\text{説明変数 2}) + \dots + \alpha_p X_p (\text{説明変数 P}) + (\text{定数項})$$

### 説明変数と目的変数

本研究では目的変数を主成分得点（主成分 1 から 5）とし、説明変数を 5 遺伝子マーカー、性別、訓練開始時の日齢、および訓練士の第一印象と設定した。訓練士の第一印象は、盲導犬候補個体の訓練開始週における訓練記録から、攻撃性あるいは不安傾向が認められたことを示すコメントの有無によって判断した。説明変数の数値化に際し、遺伝子マーカーについては表 5-1 のように数値化を行い、性別は雄を 1、雌を 2、第一印象については攻撃性を示すコメント（1st agg）が無かった場合を 1、あった場合を 2、同様に不安傾向を示すコメント（1st fear）が無かった場合を 1、あった場合を 2 として算出した（表 5-1）。

### 偏回帰係数と標準偏回帰係数

重回帰式に使用される  $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_p$  は偏回帰係数とよばれ、各説明変数の単位が 1 つ変動するごとに目的変数に与える影響を示す。ただし目的変数として使用するデータは単位がそれぞれ異なるため、それぞれ説明変数の目的変数に及ぼす影響力については、偏回帰係数の値を直接比較することができない。それぞれの説明変数が目的変数に及ぼす影響について比較する場合は、データ単位を同一にして重回帰分析を行うことによって算出できる、標準偏回帰係数を用いる。本解析では、説明変数の影響力について比較することを目的として、重回帰式の偏回帰係数とともに標準偏回帰係数を算出し併記することにした。

### 分析の精度と決定係数 ( $R^2$ )

説明変数の全変動のうち、回帰によって説明できる割合（寄与率）は重相関係数の 2 乗 ( $R^2$ ; 決定係数) に等しくなる。しかし説明変数を増やしてゆけば、寄与率はだんだんと 1 に近付くので、寄与率が高くなったのが追加された説明変数の効果なのかがわか

らなくなる。このため、自由度調整済みの重相関係数の2乗 ( $R^2$ ) が定義される。分析の精度については、統計的基準はなく、分析者の経験的な判断に基づいて決定されるものである。一般的には、決定係数が0.8以上で、分析の精度が非常に良く、0.5以上でややよい、0.5未満でよくないと判断されている。この決定係数の検定は分散分析によって実施するものである。

また、分析の精度を高め、過誤の無い重回帰式を作成するに当たり、説明変数を適切に増減する必要がある。説明変数は

- 1、目的変数と相関の高い変数であること。
- 2、説明変数相互で相関が高いものは、いずれかの変数を除外すること。

であるべきで、あらかじめ変数同士の相関について勘案し、適切に変数を増減することが重要である。そのため本研究では変数増減法を適用し、最適な重回帰式の算出を目指した。目的変数の取捨には分散分析F値2.0を上回ることを基準とした。

## 判別分析

判別分析とはサンプルが持っている諸特性から、そのサンプルがどの群（グループ）に属するかを判別する手法を指す。この手法では、群（グループ）で表されるカテゴリーデータを目的変数にとり、数量データで表されるP個の諸特性を説明変数にとることで、線形判別関数式を導く。

本研究では合否判定結果を目的変数とし、5つの遺伝子マーカーを説明変数とした。

線形判別関数式;

$$Z(\text{目的変数}) = \beta_1 X_1 (\text{説明変数 1}) + \beta_2 X_2 (\text{説明変数 2}) + \dots + \beta_p X_p (\text{説明変数 P}) + (\text{定数項})$$

この時の $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p$ を判別係数といい、各説明変数の単位が1つ変動するごとに目的変数に与える影響を示す。ただし偏回帰係数と同様に説明変数の単位が異なるために判別係数をそのまま比較することはできない。

この式の右辺で求められる値（判別得点）によって、分析に用いたサンプルがどの群に属するかを推定し、実際の群との対応を調べることによって、分析の精度を調べることができる。本研究では判別得点が正の値となる個体は合格群となり、負の値となる個体は不合格群として推定される。分析の精度を、判別的中率によって求めた。

判別的中率 =  $100 \times \text{推定群と実際群が一致したサンプル数} / \text{分析対象全サンプル}$

## 結果

### 重回帰分析

表に重回帰分析結果をまとめるとともに、各主成分の重回帰式に用いられた偏重回帰係数および標準偏回帰係数を示した。5 種すべての遺伝子多型を説明変数として使用する全数法（表 5-2）と、遺伝子多型を最適に取捨する増減法（表 5-3）にて解析を行ったが、盲導犬適性度の評価基準とした主成分 2、および他の主成分のいずれを目的変数としても、有意水準 95%を満たす説明変数は存在せず、行動特性におよぼす遺伝子相互作用について有意な結果は得られなかった。ただし増減法では主成分 2 を目的変数とした場合において、修正済み重相関係数が 0.172、分散分析による P 値 0.068、F 値 3.415 と予測精度は高くないものの、DRD4 exon1 の塩基配列挿入・欠失多型が説明変数として採用された次の重回帰式が得られた。

$$\text{主成分 2} = 0.081 \times (\text{DRD4 exon1 多型}) - 0.140$$

主成分 1 を目的変数とした場合は、修正済み重相関係数が 0.135、分散分析による P 値 0.121、F 値 2.461 と予測精度は低い、DRD4 exon1 の塩基配列挿入・欠失多型が説明変数として採用された次の重回帰式が得られた。

$$\text{主成分 1} = 0.083 \times (\text{DRD4 exon1 多型}) - 0.139$$

主成分 5 を目的変数とした場合は、修正済み重相関係数が 0.133、分散分析による P 値 0.123、F 値 2.430 と予測精度は低い、DRD2 の塩基配列挿入・欠失多型が説明変数として採用された次の重回帰式が得られた。

$$\text{主成分 5} = 0.092 \times (\text{DRD2 多型}) - 0.166$$

次に、解析の精度を向上させる目的で、候補個体の性別と訓練士の初回訓練時の第一印象を攻撃性および不安傾向にスコア化したデータを説明変数に加えて重回帰分析を行ったところ、修正済み重相関係数が 0.597、分散分析による P 値 0.0001 以下、F 値 5.863 と



なる以下の重回帰式が導き出された。

$$\begin{aligned} \text{主成分 2} = & 0.017 \times (\text{MAOB 多型}) - 0.004 \times (\text{DBH 多型}) - 0.019 \times (\text{DRD2 多型}) - 0.005 \\ & \times (\text{DRD4 exon1 多型}) - 0.037 \times (\text{DRD4 exon3 多型}) + 0.096 \times (\text{Sex}) + 0.0002 \times (\text{日齢}) \\ & + 0.504 \times (\text{1st agg}) - 0.052 \times (\text{1st fear}) - 0.518 \end{aligned}$$

また、増減法においても第一印象の攻撃性が説明変数として採用された以下の重回帰式が導き出され、修正済み重相関係数が 0.623、分散分析による P 値 0.0001 以下、F 値 51.002 という分析結果が得られた（表 5-4）。

$$\text{主成分 2} = 0.497 \times (\text{1st agg}) - 0.581$$

## 判別分析

判別分析の結果を表および次に示す（表 5-5）。

$$\begin{aligned} \text{判別得点} = & -0.379 \times (\text{MAOB 多型}) + 0.440 \times (\text{DBH 多型}) + 0.876 \times (\text{DRD2 多型}) - 0.403 \\ & \times (\text{DRD4 exon1 多型}) + 0.115 \times (\text{DRD4 exon3 多型}) + 0.945 \times (\text{Sex}) - 2.367 \end{aligned}$$

この線形判別式によって求められた判別得点の分布を図に示した（図 5-1）。個体の分布を視覚的に捕らえやすいように、X 軸には階級値を用いた。判別得点階級値は、判別得点が 1 以上のものを 1 とし、0 以上 1 未満のものを 0、-1 以上 0 未満のものを -1、-1 未満のものを -2 とした。また、導き出された判別式を用いて求めた判別率の中率は 66.3%となった。（表 5-6）。

## 考察

### 重回帰分析

主成分 2 を目的変数とした変数増減法において、修正済み重相関係数が 0.172、分散分析による P 値 0.068、F 値 3.415 と予測精度は高くないものの、DRD4 exon1 の塩基配列挿入・欠失多型が説明変数として採用された次の重回帰式が得られた。

$$\text{主成分 2} = 0.081 \times (\text{DRD4 exon1 多型}) - 0.140$$

この重回帰式の偏回帰係数が 0.081 と正の値であるため、DRD4 exon1 多型において SS アレルおよび SL アレルに対し LL アレルを持った個体のほうが攻撃的反応性が高くなる傾向があると解釈できる。

主成分 1 を目的変数とした場合は、修正済み重相関係数が 0.135、分散分析による P 値 0.121、F 値 2.461 と予測精度は低いが、DRD4 exon1 の塩基配列挿入・欠失多型が説明変数として採用された次の重回帰式が得られた。

$$\text{主成分 1} = 0.083 \times (\text{DRD4 exon1 多型}) - 0.139$$

偏回帰係数が 0.083 と正の値であるため、DRD4 exon1 多型において SS アレルおよび SL アレルに対し LL アレルを持った個体のほうが外向性が高くなる傾向があると解釈できる。ドーパミン神経系は情動の駆動系と推察されており、DRD4 遺伝子多型が新奇性追求傾向に関連があることを示した人での報告例などを勘案すると、DRD4 exon1 に関わる遺伝子多型が攻撃的反応性や外向性に関わるという結果は妥当なものと考えられよう。また、第 4 章においても、DRD4 exon1 多型が“Sensitive”および“Active”と関連するという結果が得られており、本章での結果に合致すると考えられる。

主成分 5 を目的変数とした場合は、修正済み重相関係数が 0.133、分散分析による P 値 0.123、F 値 2.430 と予測精度は低いが、DRD2 の塩基配列挿入・欠失多型が説明変数として採用された次の重回帰式が得られた。

$$\text{主成分 5} = 0.092 \times (\text{DRD2 多型}) - 0.166$$

偏回帰係数が正の値であるため、DRD2 多型において SN アレルを持つ個体に対し、SS アレルを持つ個体のほうが集中力が高くなる傾向があると解釈できる。DRD2 に関わる遺伝子多型が集中力に関わるという結果は、げっ歯類の DRD2 が学習に関わるという報告例 [Wise, R. A. 2004]などを考え合わせると DRD2 の果たす役割について新たな解釈が興味深い。

次に、解析の精度を向上させる目的で、候補個体の性別と訓練士の初回訓練時の第一印象を攻撃性および不安傾向にスコア化したデータを説明変数に加えて重回帰分析を行ったところ、修正済み重相関係数が 0.597、分散分析による P 値 0.0001 以下、F 値 5.863 となる以下の重回帰式が導き出された。

$$\text{主成分 2} = 0.017 \times (\text{MAOB 多型}) - 0.004 \times (\text{DBH 多型}) - 0.019 \times (\text{DRD2 多型}) - 0.005 \times (\text{DRD4 exon1 多型}) - 0.037 \times (\text{DRD4 exon3 多型}) + 0.096 \times (\text{Sex}) + 0.0002 \times (\text{日齢}) + 0.504 \times (\text{1st agg}) - 0.052 \times (\text{1st fear}) - 0.518$$

標準偏回帰係数の値から、攻撃的反応性に最も大きな影響を及ぼしている説明変数が第一印象の攻撃性であることが判明した（表 5-4）。また、増減法においても第一印象の攻撃性が説明変数として採用された以下の重回帰式が導き出され、修正済み重相関係数が 0.623、分散分析による P 値 0.0001 以下、F 値 51.002 という分析結果が得られた（表 5-4）。

$$\text{主成分 2} = 0.497 \times (\text{1st agg}) - 0.581$$

本研究では、複数の遺伝子多型のみの相互作用では犬の行動特性に及ぼす影響について分析できなかったが、訓練士の第一印象などの他の説明変数を補うことで、主成分 2「攻撃的反応性」についての各説明変数の相互作用を明らかにすることが可能となった。また、1st agg（訓練士の第一印象として攻撃性が認められること）が、説明変数の重要度を示す標準偏回帰係数の値において最も大きい結果となったことから、第 3 章で明らかとなった盲導犬の合否判定において重視されている攻撃的反応性が、既に初回訓練時に認められる傾向にあることが判明した。

## 判別分析

判別分析では、5 遺伝子マーカーと性別を用いて線形判別式を作成した。得られた線形判別式によって求められた判別得点の分布を図に示した（図 5-1）。図によると合格群、不合格群ともそれぞれ正規分布を描いているものの、合格群の中には判別得点が負の値になっている個体や不合格群の中には判別得点が正の値になっている個体も存在しており、本分析で得られた判別関数式ではすべての個体について正確に判別することができず、分析の限界が認められた。また、導き出された判別式を用いて求めた判別の中率は 66.3% となった。（表 5-6）。判別の中率は慣例により 75% 以上をもって判別分析の精度が良いと判断することから、本研究の結果は分析の精度が良くないと言える。しかし、5 遺伝子マーカーと性別を用いるだけで約 60% の個体について合否予測を行うことができることが判明したことにより、更なる遺伝子マーカーの蓄積によって合否予測が高精度で行うことができるようになる可能性があるといえるだろう。

## 小括

第5章では、犬の行動特性に複数の遺伝子多型の相互作用が影響しているのか、さらには盲導犬としての適性が複数の遺伝子多型の相互作用によって説明可能であるのかについて検討する目的で、第4章で解析を行った4遺伝子5種の遺伝子多型を説明変数とし、第3章で集計・算出した主成分得点を目的変数とした重回帰分析を行い、遺伝子多型と行動特性の関連を調査した。その結果、複数の遺伝子多型のみの相互作用では犬の行動特性に及ぼす影響について分析できなかったが、訓練士の第一印象などの他の説明変数を補うことで、主成分2「攻撃的反応性」についての以下のような重回帰式が導き出され、各説明変数の相互作用を明らかにすることが可能となった。

主成分2 =  $0.017 \times (\text{MAOB 多型}) - 0.004 \times (\text{DBH 多型}) - 0.019 \times (\text{DRD2 多型}) - 0.005 \times (\text{DRD4 exon1 多型}) - 0.037 \times (\text{DRD4 exon3 多型}) + 0.096 \times (\text{Sex}) + 0.0002 \times (\text{日齢}) + 0.504 \times (\text{1st agg}) - 0.052 \times (\text{1st fear}) - 0.518$

また、遺伝子マーカーと性別を用いた盲導犬適性審査合否判別分析では、60%以上の判別率を得ることができた。

## 第 5 章 図表

表5-1 重回帰分析 各データの数値化

	1	2	3
MAOB T199C	C/CC	TC	T/TT
DBH C789A	AA	CA	CC
DRD2	SN	SS	
DRD4 exon1	SS	SL	LL
DRD4 exon3	435/447a	447a/447a	
Sex	male	female	
1st agg	コメント無し	コメント有り	
1st fear	コメント無し	コメント有り	

1st agg は訓練士の第一印象において攻撃性を表す。

1st fear は訓練士の第一印象において不安傾向を表す。

表5-2 各主成分における重回帰式の偏回帰係数、精度および分散分析結果（全数法）

目的変数 重回帰式 説明変数名	主成分1 外向性		主成分2 攻撃的反応性		主成分3 不安傾向		主成分4 機敏性		主成分5 集中力	
	偏回帰 係数	標準偏回帰 係数	偏回帰 係数	標準偏回帰 係数	偏回帰 係数	標準偏回帰 係数	偏回帰 係数	標準偏回帰 係数	偏回帰 係数	標準偏回帰 係数
MAOB T199C	0.032	0.045	-0.051	-0.086	0.072	0.124	-0.028	-0.052	0.007	0.016
DBH C789A	0.040	0.079	0.017	0.041	-0.052	-0.126	-0.012	-0.033	-0.029	-0.099
DRD2	-0.025	-0.027	-0.111	-0.148	0.052	0.071	-0.045	-0.067	0.092	0.173
DRD4 exon1	0.104	0.219	0.080	0.204	-0.040	-0.104	0.017	0.050	-0.027	-0.098
DRD4 exon3	0.049	0.044	0.0001	0.0002	-0.030	-0.034	0.036	0.045	-0.030	-0.047
定数項	-0.398		0.165		-0.052		0.086		-0.015	
<b>精度</b>										
決定係数	0.044		0.070		0.035		0.012		0.045	
修正済決定係数			0.007							
重相関係数	0.210		0.265		0.187		0.110		0.213	
修正済重相関係数			0.085							
<b>分散分析</b>										
F 値	0.683		1.114		0.538		0.181		0.704	
P 値	0.638		0.360		0.747		0.969		0.622	
判定										

\*\*：1%有意 \*：5%有意

表5-3 各主成分における重回帰式の偏回帰係数、精度および分散分析結果（増減法）

目的変数	主成分 1		主成分 2		主成分 3	主成分 4	主成分 5	
	外向性	標準偏回帰係数	攻撃的反応性	標準偏回帰係数	不安傾向	機敏性	偏回帰係数	標準偏回帰係数
重回帰式	偏回帰係数		偏回帰係数					
説明変数名								
MAOB T199C								
DBH C789A								
DRD2					該当する	該当する		
DRD4 exon1	0.083	0.175	0.081	0.205	目的変数無し	目的変数無し	0.092	0.174
DRD4 exon3								
定数項	-0.139		-0.140				-0.166	
精度								
決定係数	0.031		0.042				0.030	
修正済決定係数	0.018		0.030				0.018	
重相関係数	0.175		0.205				0.174	
修正済重相関係数	0.135		0.172				0.133	
分散分析								
F 値	2.461		3.415				2.430	
P 値	0.121		0.068				0.123	
判定								

\*\*：1%有意 \*：5%有意



表5-4 説明変数に性別、日齢および第一印象を加えた場合の重回帰分析結果

目的変数		主成分 2 攻撃的反応性			
		全数法		増減法	
変数選択法 重回帰式	変数名	偏回帰係数	標準偏回帰係数	偏回帰係数	標準偏回帰係数
	MAOB T199C	0.017	0.029		
	DBH C789A	-0.004	-0.010		
	DRD2	-0.019	-0.026		
	DRD4 exon1	-0.005	-0.014		
	DRD4 exon3	-0.037	-0.041		
	Sex	0.096	0.159		
	日齢	0.0002	-0.011		
	1st agg	0.504	0.638	0.497	0.629
	1st fear	-0.052	-0.084		
	定数項	-0.518		-0.581	
<i>精度</i>					
	決定係数	0.430		0.395	
	修正済決定係数	0.357		0.388	
	重相関係数	0.656		0.629	
	修正済重相関係数	0.597		0.623	
<i>分散分析</i>					
	F 値	5.863		51.002	
	P 値	<0.0001		<0.0001	
	判 定	**		**	

\*\* : 1%有意 \* : 5%有意

表5-5 判別分析の結果

判別関数式	
変数名	判別係数
MAOB T199C	-0.379
DBH C789A	0.440
DRD2	0.876
DRD4 exon1	-0.403
DRD4 exon3	0.115
Sex	0.945
定数項	-2.367
F 値	1.398
自由度 1	6
自由度 2	73
P 値	0.227

表5-6 判別得点によって合否を推定した結果および判別的中率

判別の結果 真の群	判別された群	
	合格	不合格
合格	26	16
不合格	11	27
判別的中率	66.3%	

判別の中率

=100×推定群と実際群が一致したサンプル数/分析対象全サンプル

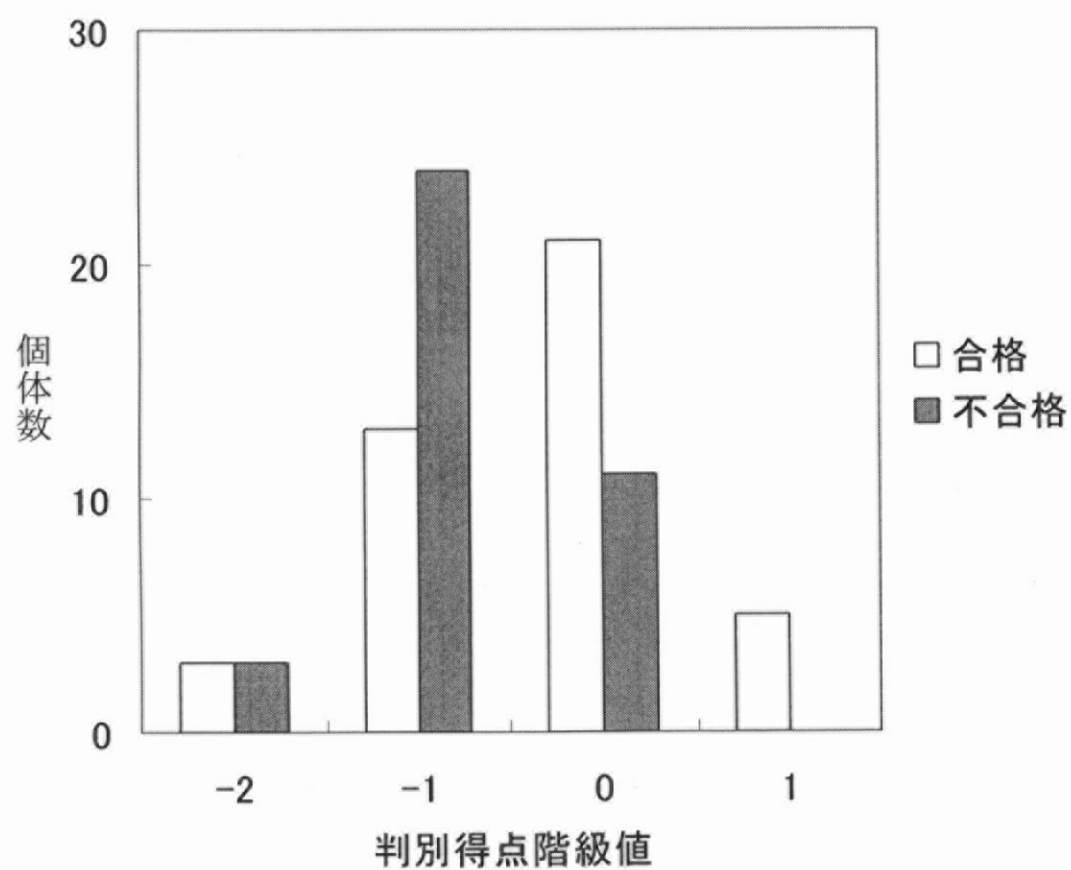


図5-1 判別分析 判別得点の分布

判別得点階級値は、判別得点が1以上のものを1とし、0以上1未満のものを0、-1以上0未満のものを-1、-1未満のものを-2とした。

## 第 6 章

### 総合考察

人の精神医学分野では、脳内神経伝達物質の動態が個人の性格傾向に影響を及ぼすことが明らかにされつつある。精神遺伝学分野では塩基配列の一部が個体によって異なる「遺伝子多型」を個性のマーカーとして用いる研究が進んでおり[Benjamin, J. *et al.* 1996; Ebstein, R.P. *et al.* 1996; Noble, E.P. *et al.* 1998; Caspi, A. *et al.* 2002]、個性が遺伝的要因から影響を受ける割合が 40～60%にも及ぶと考えられている[Plomin, R. 1990]。犬はその長い家畜化の歴史において、その見かけだけでなく行動特性をも指標とした育種選抜を受けてきた。しかしながら、犬の行動特性に関わる遺伝的要因の研究は観察評価を中心とした記述統計的研究であり、分子生物学的アプローチは端についたばかりである。そこで本研究では、犬を研究モデルとして、遺伝子多型を利用した分子生物学的アプローチによって行動特性の遺伝的背景を解き明かすことを目的とした。

## 研究結果の概要

本研究ではまず第2章において、行動関連遺伝子の候補としてドーパミン代謝経路に関与する遺伝子であるモノアミン酸化酵素 (MAO) およびドーパミンβ水酸化酵素 (DBH) に着目し、同遺伝子の塩基配列を決定し、遺伝子多型部位を検索した。MAO 遺伝子については、Northern Blot 解析を行い脳内における遺伝子の発現分布様式についても検討したところ、2種のサブタイプは共に、情動に関与すると考えられている中脳辺縁系において発現が認められた。さらに、MAO サブタイプ A (MAOA) 遺伝子の全翻訳領域 (ORF) およびプロモーター領域、MAO サブタイプ B (MAOB) 遺伝子の ORF、および DBH 遺伝子の ORF の塩基配列について、遺伝的背景の異なる複数のビーグル犬から採取した遺伝子配列を比較することによって多型部位を検索した。MAOA 遺伝子については多型部位が認められなかったが、MAOB 遺伝子ではアミノ酸置換を伴う一塩基多型 (SNP) が1箇所見出され、DBH 遺伝子では2箇所のアミノ酸置換を伴う SNP が認められた。アミノ酸置換が起こると、蛋白構造が変化し、MAOB および DBH の酵素としての機能が変化することにつながる可能性が高い。犬の MAOB はドーパミンの代謝分解に、DBH はノルアドレナリン生合成に関わる酵素であることを勘案すると、本実験によって同定された遺伝子多型が、犬の行動特性を変化させる遺伝子マーカーとなり得ると考えられた。

これらアミノ酸置換を伴う SNP の出現頻度について犬種差の有無を検討するため、国内 11 箇所の獣医科病院の協力を得て、各病院に来院した 5 犬種 (ラブラドルレトリバー、ゴールデンレトリバー、マルチーズ、ミニチュアシュナウザー、シバイヌ) それぞれ 20 頭以上から採材したゲノム DNA を解析した。その結果、多型出現頻度は、MAOB 遺伝子 T199C 多型については、C アレルが 40.1%、DBH 遺伝子 C789A 多型については A アレルが 38.9%、

また同 A1819G 多型はシバイヌにおいてのみ G アレルが認められ、その頻度は 59.0%であった。これら全ての多型出現頻度について犬種差が認められたことから、こうした遺伝子多型が犬種の育種選抜の際に取捨されるような犬種特徴に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

第 3 章においては、遺伝的環境や飼育環境が比較的均一であり、かつ一定の基準をもって行動評価が実施されている盲導犬候補個体を研究対象として選択し、米国・カリフォルニア盲導犬訓練協会の協力を得て、同協会で繁殖・育成中の盲導犬候補個体の血液サンプルと遺伝情報、そして盲導犬訓練士による各個体の行動評価記録を入手した。このうちラブラドルレトリバー 82 頭（合格群 42 頭、不合格群 40 頭）を研究対象として、どのような行動特性が盲導犬の合否判定に関与するのかを精査する目的で、盲導犬訓練士によって訓練期間を通じて毎週記録された評価コメントに着目し、攻撃性や不安傾向等 15 種のカテゴリーについて各個体のデータを数値化して因子分析および主成分分析を行った。その結果、因子分析では累積寄与率が 60%に満たず、有意な解析を行うことができなかった。一方主成分分析では 5 つの主成分が抽出され、そのうち攻撃的反応性および集中力に関連する主成分が合否判定に関与していた。したがって盲導犬に必要な気質としては、攻撃的反応性の低さと集中力の高さであることが考えられた。

第 4 章では、第 3 章において詳細な行動評価を行った盲導犬候補個体を対象に、第 2 章で同定した MAOB および DBH の遺伝子多型、さらに既に報告されているドーパミン D2 レセプター (DRD2) 遺伝子多型およびドーパミン D4 レセプター (DRD4) 遺伝子多型の計 4 遺伝子 5 種の遺伝子多型が、盲導犬候補個体の行動特性に及ぼす影響について検討するために、各遺伝子多型の遺伝子型別に候補個体をグループ化し、行動評価スコアおよび主成分得点の平均値を算出し比較検討した。更に、盲導犬適性審査の合否別に各遺伝子多型のアレル出現頻度を比較し、それぞれの遺伝子多型が適性審査の結果に関連しているかについても検討した。その結果、DBH 遺伝子 C789A 多型と、“Defecation”（訓練ルート上で排便をすること）スコアに有意な相関 ( $p=0.0018$ , Kruskal-Wallis の検定) が認められ、C アレルの有無が排便傾向に関連していることが明らかとなった。また、DRD4 exon1 多型と、主成分 2（攻撃的反応性）の主成分得点に有意な相関が認められ、遺伝子型が LL である個体が SS および SL である個体に比べ攻撃的反応性が高いことが明らかとなった。第 3 章では盲導犬不適格となる個体は主成分 2 の主成分得点が高い傾向にあることが示されたため、DRD4 exon1 多型が盲導犬適性審査の結果に関与する可能性が考えられた。

第 5 章では、犬の行動特性に複数の遺伝子多型の相互作用が影響しているのか、さらには盲導犬としての適性が複数の遺伝子多型の相互作用によって説明可能であるのかについて検討する目的で、第 4 章で解析を行った 4 遺伝子 5 種の遺伝子多型を説明変数とし、

第3章で集計・算出した主成分得点を目的変数とした重回帰分析を行い、遺伝子多型と行動特性の関連を調査した。その結果、複数の遺伝子多型のみの相互作用では犬の行動特性に及ぼす影響について分析できなかったが、訓練士の第一印象などの他の説明変数を補うことで、主成分2「攻撃的反応性」についての重回帰式が導き出され、各説明変数の相互作用を明らかにすることが可能となった。また、遺伝子マーカーと性別を用いた盲導犬適性審査可否判別分析では、60%以上の判別率を得ることができた。

### 犬種による遺伝子多型出現頻度の違い

#### MAOB 遺伝子 T199C 多型

MAOB 遺伝子 T199C 多型のアレル出現頻度は5犬種間で大きく異なっていた。特に、ゴールデンレトリバーではアレル T が90%以上の個体に認められたのに対し、ミニチュアシュナウザーではわずか17%の個体に認められるにとどまっていた（表2-1）。このように出現頻度に偏りが見られることは、犬の DRD4 遺伝子反復配列多型でも報告されているが[Niimi, Y. *et al.* 2001]、同様に犬種創出の際の人為的選択淘汰の結果なのかもしれない。ゴールデンレトリバーとミニチュアシュナウザーは周知のように、体格、被毛色および行動特性について非常に異なった特徴を有している。獣医師へのアンケートを用いて、犬種ごとの行動特性について検討した研究では、ゴールデンレトリバーはおとなしく、人に友好的な特性を持っているのに対し、ミニチュアシュナウザーは興奮しやすく時には攻撃的に振舞うこともあるという特性であることが明らかとなっている[Hart, B.L. *et al.* 1985]。本実験において MAOB mRNA の Northern blot 解析を行った結果では、犬の MAOB が視床下部や海馬に多く発現していることが確認された（図2-9）。これらの脳部位では攻撃性を含む様々な情動の発現調節が行われていると考えられている[Krotewicz, M. *et al.* 1995]。また、犬で異常な衝動的攻撃性（impulsive aggression）を示す個体では、ドーパミンの代謝産物であるホモバニリン酸（homovanillic acid; HVA）の濃度が、脳室液中において低レベルになっていることが明らかとなっている[Reisner, I.R. *et al.* 1996]。こうした事象より、本実験で認められた MAOB の SNP がドーパミン代謝を変化させ、その結果、攻撃的な行動特性の個体差を生みだしていると考えられる。MAOB の SNP を組み込んだ細胞生物学的研究あるいは MAOB 阻害薬などを用いた臨床実験などによって更に検証していくことで、MAOB 遺伝子 T199C 多型と行動特性との関連について新たな知見が得られるであろう。



## DBH 遺伝子 C789A 多型

DBH 遺伝子 C789A 多型のアレル出現頻度も MA0B 遺伝子 T199C 多型と同様に、5 犬種間で大きく異なっていた。特に、ラブラドルレトリバーではアレル A が 70%以上の個体に認められたのに対し、ミニチュアシュナウザーではわずか 15%の個体に、シバイヌでは 9%の個体に認められるにとどまっていた（表 2-2）。1999 年に田名部らが、日本国内の獣医師に対し外国産犬種 13 品種と日本犬種 6 品種の犬の行動特性についてアンケート調査した報告によると、シバイヌは領土防衛傾向が高く、人にあまりなつかない傾向にあるのに対し、ラブラドルレトリバーは領土防衛傾向がなく、人なつこい傾向にあることが判明した[Tanabe, Y. *et al.* 1999]。DBH はドーパミンからノルアドレナリンを生合成する酵素である。健常男性を対象とした性格調査において、ノルアドレナリンの末梢血中濃度が高い人は新奇性追究傾向も高くなることが明らかとなった。ノルアドレナリンは内分泌器官でテストステロンやプロラクチンの分泌を促進する因子として働いているため、こうした物質が新奇性追究傾向を作り出しているのかもしれないと考えられている[Gerra, G. *et al.* 1999]。DBH 遺伝子 C789A 多型ではアミノ酸置換を伴うことが判明しており、アレル C がコードするアミノ酸はアスパラギン（中性アミノ酸）であるのに対し、アレル A がコードするアミノ酸がリジン（親水性アミノ酸）となっている。C789A 多型においてアレル A を持つことは、DBH のアミノ酸配列が変化し、蛋白構造が変化することに繋がる。つまり、シバイヌに比べて人なつこい性格を持つとされるラブラドルレトリバーにおいて、多く見られるアレル A の遺伝子型では、アレル C を持つ他の犬と異なり、ノルアドレナリンの生合成が高まり、新奇性追究傾向が高くなっている可能性がある。犬の末梢血中ノルアドレナリンと DBH 遺伝子 C789A に関連が見られるか、臨床的な検討によって明らかにすることができるであろう。

## DBH 遺伝子 A1819G 多型

DBH 遺伝子 A1819G 多型ではセリン（中性アミノ酸）がグリシン（疎水性アミノ酸）へと置換するが、これまで解析を行った犬種のうちシバイヌ以外でアレル G は見つかっていない。本論文では扱わなかったが、開業獣医師から提供された秋田犬サンプル 9 頭においてもアレル G は認められなかった。ただし秋田犬は戦後すぐに洋犬をミックスして品種改良が行われたり、軍用犬として使役されたため個体数が激減し、現在の個体の先祖はほんの数頭の繁殖犬由来であるという説もあり、秋田犬が純粋な日本古来犬由来であるかは疑わしい。シバイヌの由来については諸説あるものの、日本古来の犬種であることは明白であるため、A1819G が日本古来の他の紀州犬や甲斐犬などにも普遍的に存在するものであるのか、それともシバイヌ固有のものであるのかについて、犬種の由来と犬種特徴を踏まえ

て解析することで、日本古来犬種の特徴とされる「主人以外にはなつこうとしない気高さ」といった特性と DBH 遺伝子 A1819G 多型の関連が明らかになるかもしれない。

### 盲導犬候補個体の気質と遺伝子多型

主成分分析では主成分 1「外向性」、主成分 2「攻撃的反応性」、主成分 3「不安傾向」、主成分 4「機敏性」、および主成分 5「集中力」の 5 つの主成分が抽出された。候補個体の主成分得点について、盲導犬適性審査の合否別に平均値を比較したところ、主成分 2 に差が認められ、合格群では有意に攻撃的反応性が低いことが明らかとなった。また、主成分 5 にも差が認められ、合格群では集中力が高い傾向にあることも示唆された。これら二つの主成分得点を X 軸および Y 軸にとり、合格群と不合格群に分けてプロットしたところ、合格群は攻撃的反応性が低く、集中力が高い傾向にある個体が多いのに対し、不合格群は攻撃的反応性が高い、あるいは集中力が低い傾向にあり、主成分得点がばらついていることが明らかとなった（図 3-8）。つまり、盲導犬として必要とされているのは、攻撃的反応性が低いと同時に集中力が高い個体であるといえよう。

盲導犬候補個体を対象に遺伝子多型解析を行った結果、DRD4 exon1 多型と、主成分 2（攻撃的反応性）の主成分得点に有意な相関が認められ、遺伝子型が LL である個体が SS および SL である個体に比べ攻撃的反応性が高いことが明らかとなった。DRD4 exon1 多型は、5 犬種（ゴールデンレトリバー、ラブラドルレトリバー、マルチーズ、ミニチュアシュナウザー、およびシバイヌ）での多型出現頻度を比較した場合、アレル出現頻度において、有意な差が認められている（ $p < 0.0001$ ,  $\chi^2$ 検定）（表 6-1）。アレル S の出現頻度は、ラブラドルレトリバーでは 43%にも達しているのに対し、ゴールデンレトリバーでは 24%、ミニチュアシュナウザーでは 17% 足らず、シバイヌでは 0%であった。ゴールデンレトリバーにおいてアレル S が 24%程度にとどまったことは解釈が難しいが、犬種による出現頻度の差と犬種特性の関連を勘案すると、アレル S の存在が攻撃的反応性を低下させる要因であるという結果は妥当なものと考えられる。人の DRD4 遺伝子 exon3 多型では、遺伝子型が長いアレルを持つ人は新奇性追求傾向が高いという報告がある。DRD4 は G 蛋白と供役してアデニル酸シクラーゼを抑制するが、この多型領域が長いとシグナル伝達効率が悪く、ドーパミン神経の興奮が持続すると推定されている [Ebstein, R.P. *et al.* 1996]。従って、本研究の行動特性との関連結果より、犬の DRD4 exon1 多型においてアレル S の個体は、シグナル伝達が素早く、ドーパミン神経の興奮が速やかにおさまリ、穏やかな性格となることが推測される。

## 複数の遺伝子マーカーを用いた盲導犬の適性予測

人の精神遺伝学分野では、ある精神疾患への脆弱性や性格傾向など表現型は一つであっても、それに影響を及ぼす遺伝子は複数あると考えられており (poly-gene)、複数の候補遺伝子の多型の組み合わせや相互作用について検討する必要がある。盲導犬の適性については、Goddard らが、候補個体が盲導犬として不適格とみなされる大きな理由として、不安傾向の高いこと、犬に対する興味が過度であることに加えて本研究でも示唆された、攻撃的に振舞うことの 3 つを報告している [Goddard, M. E. *et al.* 1982]。また、Scott らは 5 犬種を用いた大規模な交雑試験を行うことによって、使役犬としての適性は、「行動力があり自信にあふれている」－「見知らぬ状況や人間に対して臆病」軸に集約されていることを報告している [Scott, J. P. *et al.* 1965]。つまり、盲導犬の適性には複数の表現型が関わっており、複数の遺伝子の影響を受けていると考えることができる。第 4 章で DRD4 遺伝子 exon1 多型が「攻撃的反応性」に関連する結果となったように、攻撃性や行動力を支配するモノアミンがドーパミンであるとするなら、不安傾向を支配するモノアミンはセロトニンである [Cloninger, C. R. 1987]。本研究ではドーパミン代謝とノルアドレナリン生合成に関わる酵素の活性に影響を及ぼす可能性のある一塩基多型と、ドーパミンの D2 レセプターファミリーの DRD2 遺伝子および DRD4 遺伝子の塩基配列多型の計 4 遺伝子 5 多型をマーカーとして使用し、線形判別式によって合否を判別したところ、66%の判別的中率であった。残りの 34% はセロトニン関連の遺伝子および環境要因であろう。今後はさらに遺伝子多型のマーカーをセロトニン関連の遺伝子へと増やすことで、盲導犬の適性についてより精度の高い予測式を導くことが可能となるであろう。

## 盲導犬育成への発展的応用

本研究により、盲導犬不適格となる個体は「攻撃的反応性」が高く、その行動特性は、5 つの遺伝子多型マーカーおよび盲導犬訓練士の第一印象によってある程度予測することが可能となった。

盲導犬候補個体が生後 2 ヶ月から 1 歳齢までの約 10 ヶ月間の生活を共にするパピーウォーカーとの関係についてパピーウォーカー宅での行動観察を行った研究では、子犬は生後 6 ヶ月前後を境に、体への強い当たりなどを行う “Fighting” が減少し、代わりにパピーウォーカーと一つのおもちゃで一緒に遊んだりする “Possessing Together” が増加し、パピーウォーカーと適切な距離感を持って接することができるようになることが分かった [Koda, N. 2001]。6 ヶ月齢で遊び形態が変化することについて Koda は、体格が成犬近くなり、以前のように乱暴な遊びを続けることが危険であるとパピーウォーカーが判断し、

遊びの内容を変更したためではないかと考察している。従って、6ヶ月齢前後のパピーウォーカーの接し方が、その後の子犬の「攻撃性」を左右する可能性が考えられる。こうしたことから、本研究で得られた重回帰式を、この時期の子犬に適用することで、「攻撃的反応性」が高いと予測された個体については、パピーウォーカー宅での飼育方法を変化させる、トレーニング開始時期を変化させるなど、環境要因を変化させ、それが合格率に及ぼす影響を検討したい。さらに、遺伝子多型マーカーを増加させ、やがて遺伝子多型の解析によって、盲導犬候補個体の行動特性を早期に、かつ高精度に予測することができるようになれば、個体の特性に応じた訓練を実施することが可能となるだけでなく、盲導犬としては適さないと予測される個体については早期に一般家庭へ譲渡することで個体に合わせた飼育環境を提供することが可能となり、個体のQOLの上昇にも繋がるであろう。

### 犬の行動カウンセリングへの応用

近年増加しつつある犬の問題行動に対する診断・治療方法への、本研究の発展応用の可能性について考えてみたい。犬の問題行動は、攻撃性や不安が背景に存在するものが中心となっているが、診断の際には、こうした気質的な特性に関する情報を得るために、長時間にわたる詳しいカウンセリングや、詳細な観察が必要とされる。また問題行動の治療は長期にわたることが多く、実際に治療を実践することになる飼い主にとっては物理的にも精神的にも非常に大きな負担が強えられる事になることから正確な診断と予後判定を期する必要がある。本研究を発展させることにより、行動特性に影響を与えうる遺伝子多型が発見されれば、カウンセリングや観察に加えて、より客観的な診断基準を利用することが可能となり、適切な行動修正療法の選択と治療効果の改善が期待されよう。

### おわりに

筆者は、約半年前に、雄の子犬を飼い始めた。引き取る以前にブリーダーが行ったパピーテスト（子犬の性格テスト；「デキのいい犬、わるい犬」S. コレン著 を参照したもの）では同腹の兄弟8頭のうち、最も不安傾向が高いという結果になった。その結果を受けて、引き取った当日から散歩に連れ出し、見知らぬ犬との接触、自動車、子供など様々な刺激に積極的に暴露していった。当初は怖がって家の玄関さえ自力で通ることができず、抱きかかえていたが、2週間もすると通れるようになり、1ヶ月もすると散歩を楽しむようになった。もし、この犬が「大変な怖がりである」とブリーダーからあらかじめ言われていなかったら、こんなにも積極的に周辺環境への社会化を行おうとしたか疑わしい。今では、積極的な社会化の過程を経たことにより、日常生活に支障なく暮らすことができるまでになり、飼い犬への信頼感や愛着が生まれ、精神的な絆がしっかりと育まれてきて

いるのを実感できるようになった。

既に問題行動が顕在化し、行動修正が必要な状態に陥っている飼い主と飼い犬に適切なカウンセリングをし、良好な関係へと修復の手伝いをするこゝも、臨床獣医師として重要な課題であると思われるが、更に重要なのは、やはり問題行動の予防であろう。あたらしゝく迎える子犬が実はどんな個性を持っているのか、現段階では、飼ってから毎日の触れ合ゝいの中で模索していくしかない。「こんな性格だと分かっていれば」という飼い主も少ないであろう。もし、あらかじめ子犬の個性についてヒントを得ることができていれば、その個性に見合った接し方やしつけ方を、発達段階のタイミングを逃すことなく実践していくことができるであろう。本研究で得られた知見や、アプローチ方法を応用することによって、そうした子犬の個性を簡便に予測することも可能となり、早期の発達段階から子犬の個性に合わせた飼ゝい方が提案できるようになるだろう。そして、飼い主が適切な飼ゝい方を実践することで、飼い主と飼い犬がより良い絆で結ばれることにつながると考えられる。望んで一緒に暮らす伴侶だからこそ、素晴らしい関係を築き、そこから生まれる恩恵を少しでも多く授かりたいものである。

## 第 6 章 図表

表 6-1 DRD4 遺伝子 exon1 多型の犬種差

例数		遺伝子型			アレル頻度			
犬種	n	LL	SL	SS	L	S	HZ	HW
GLD	47	28	15	4	71	23	0.37	ns
LAB	41	13	20	8	46	36	0.50	ns
MLT	40	25	11	4	61	19	0.37	ns
MS	26	17	9	0	43	9	0.29	ns
SHIBA	39	39	0	0	78	0	—	
総計	193	122	55	16	299	87	0.35	<0.05

岐阜大村山博士らの協力により作成

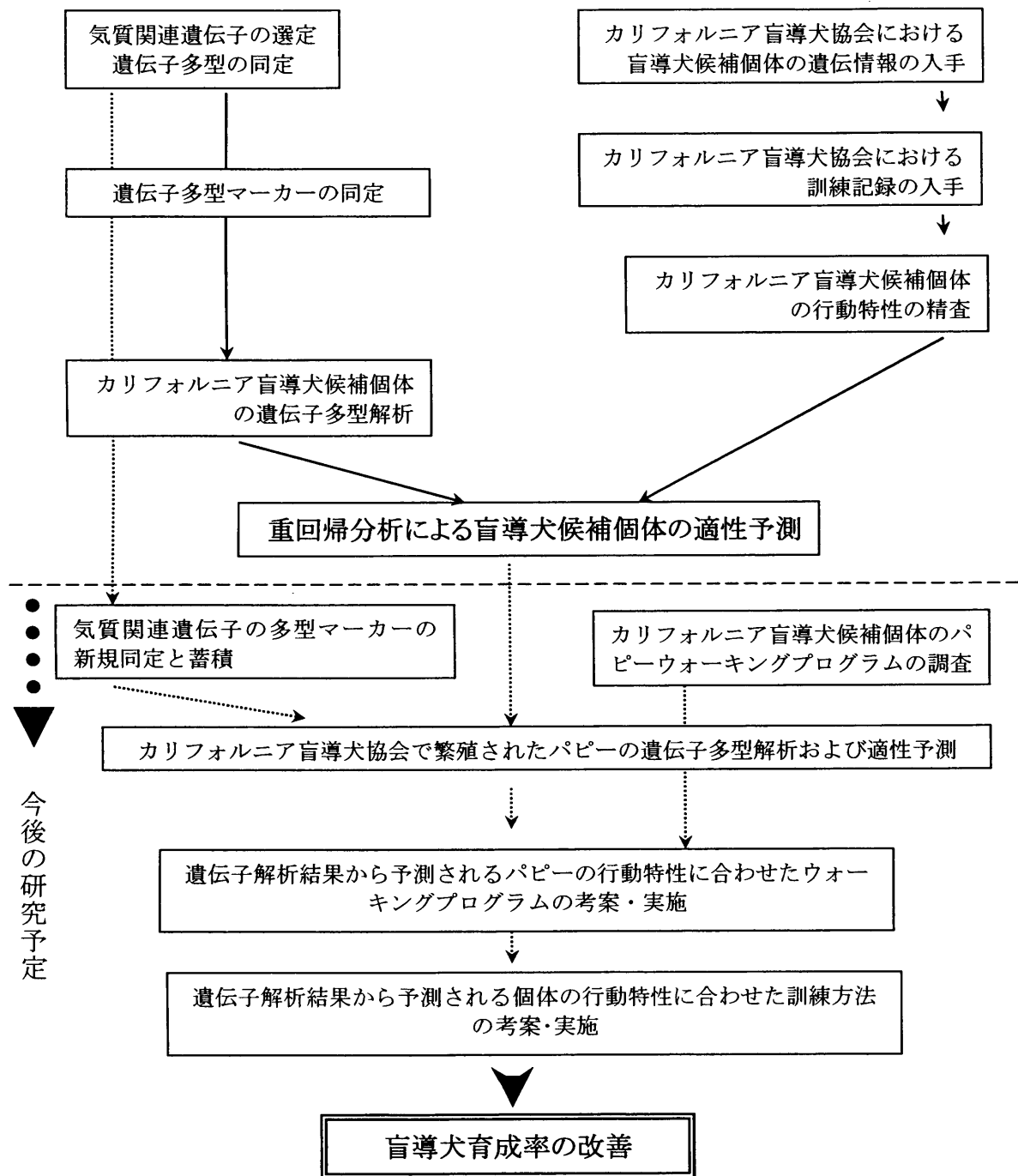


図 6-1 本研究のまとめ



## 総括

人の精神医学分野では、脳内神経伝達物質の動態が個人の性格傾向に影響を及ぼすことが明らかにされつつある。中でもセロトニンが損害回避傾向に、ドーパミンが新奇探求傾向に、またノルエピネフリンが報酬依存傾向に関わるという Cloninger の仮説を発端に、脳内モノアミンに関する研究が盛んに行なわれている。こうした研究分野では、塩基配列の一部が個体によって異なる「遺伝子多型」を個性のマーカーとして用いようとする研究が進んでおり、ドーパミン D4 受容体 (DRD4) 遺伝子多型と新奇探求性、あるいはセロトニントランスポーター遺伝子多型と不安傾向などに関連があるという報告が相次いでいる。人では双生児研究や家族研究などに関連して遺伝学的研究を大規模に実施することが可能である一方、社会的・文化的要因の性格形成に対する影響が大きいことなどもあって、これまでに一貫した結果が得られていないのが現状である。

犬は最も早い時期に家畜化された動物であり、人の様々な需要に応えるため育種選抜を受け、様々な品種が作られてきた。犬の行動特性もまた遺伝的要因と環境的要因の相互作用によって形成されると考えられるが、犬種ごとに特徴的な強い遺伝的支配を受けることも知られており、また盲導犬を対象とした調査では不安傾向など特定の行動特性が遺伝する傾向にあることが示されている。しかしながら、これまでに行われた調査研究のほとんどは観察評価を中心とした記述統計学的研究の枠を超えるものではない。

本研究は、個性の基盤となるメカニズムを探る行動遺伝学的研究のモデル動物として犬を取り上げ、気質に関わる遺伝子多型と行動特性との関連を解析する事により、犬の気質およびその個体差の生物学的背景について理解を深めることを目的としたものである。本論文は 6 章から構成され、第 1 章において本研究の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調査と実験について記述し、最後の第 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。

まず第 2 章においては、行動関連遺伝子の候補としてカテコラミン生合成経路に関与する遺伝子に着目し、モノアミン酸化酵素 (MAO) およびドーパミン  $\beta$  水酸化酵素 (DBH) の塩基配列を決定し、これらの遺伝子における多型部位を検索した。MAO 遺伝子については、Northern Blot 解析を行い脳内における遺伝子の発現分布様式についても検討したところ、2 種のサブタイプは共に、情動に関与すると考えられている中脳辺縁系において発現が認められた。さらに、MAO サブタイプ A (MAOA) 遺伝子の全翻訳領域 (ORF) およびプロモーター領域、MAO サブタイプ B (MAOB) 遺伝子の ORF、および DBH 遺伝子の ORF の塩基配列について、遺伝的背景の異なる複数のビーグル犬から採取した遺伝子配列を比較す

ることによって多型部位を検索した。MAOA 遺伝子については多型部位が認められなかったが、MAOB 遺伝子ではアミノ酸置換を伴う一塩基多型 (SNP) が 1 箇所、DBH 遺伝子では 2 箇所のアミノ酸置換を伴う SNP がそれぞれ認められた。これらアミノ酸置換を伴う SNP の出現頻度について犬種差の有無を検討するため、国内 11 獣医科病院の協力を得て、各病院に来院した 5 犬種 (ラブラドルレトリバー、ゴールデンレトリバー、マルチーズ、ミニチュアシュナウザー、シバイヌ) それぞれ 20 頭以上から採材したゲノム DNA を解析した。その結果、多型出現頻度は、5 犬種全体では MAOB 遺伝子 T199C 多型については、C アレルが 40.1%、DBH 遺伝子 C789A 多型については A アレルが 38.9%、また同 A1819G 多型はシバイヌにおいてのみ G アレルが認められ、その頻度は 59.0%であった。これら全ての多型について犬種差が認められたことから、こうした遺伝子多型が犬種特徴に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

次の第 3 章においては、遺伝的環境や飼育環境が比較的均一であり、かつ一定の基準をもって行動評価が実施されている盲導犬候補個体を研究対象として選択し、米国・カリフォルニア盲導犬訓練協会の協力を得て、同協会で繁殖・育成中の盲導犬候補個体の血液サンプルと遺伝情報、そして盲導犬訓練士による各個体の行動評価記録を入手した。試料を供与された犬の内訳は、盲導犬適性審査に最終的に合格した合格群 84 頭 (42%)、不合格群 78 頭 (40%) および白内障や股関節異形成などの疾患により訓練を中止した脱落群 35 頭 (18%) であったが、このうちデータが完備していたラブラドルレトリバー 82 頭 (合格群 42 頭、不合格群 40 頭) について詳細な解析を行った。行動評価としては、訓練期間を通じ毎週記録された訓練士の評価コメントをもとに、攻撃性や不安傾向等について各個体のデータを数値化した。こうして数値化した行動評価データをもとに、主成分分析を行って合否判定に関与する要因を検索した。その結果、5 つの主成分が抽出され、そのうち攻撃的な行動に関連する主成分が合否判定に影響を及ぼしていることが明らかとなった。このことから訓練士は一般に攻撃的な行動が盲導犬としての適性を著しく損なうと評価していることが示唆された。

続く第 4 章においては、第 3 章において行動評価を行った盲導犬候補個体群について遺伝子多型の出現頻度を検討した。解析した遺伝子多型は、第 2 章で同定した MAOB 遺伝子および DBH 遺伝子の一塩基多型に加え、DRD4 遺伝子 exon1 の塩基配列挿入・欠失多型、exon3 の反復配列多型、および統合失調症との関連が示唆されているドーパミン D2 受容体 (DRD2) 遺伝子の塩基配列挿入・欠失多型の計 4 遺伝子における 5 遺伝子マーカーである。それぞれの多型の出現頻度は、MAOB 遺伝子 T199C 多型については、C アレルが 11.7%、DBH 遺伝子 C789A 多型については A アレルが 42.0%、DRD4 exon1 遺伝子多型については L アレルが 38.3%、DRD4 遺伝子反復配列多型については S アレルが 12.5%、および DRD2 遺

伝子多型についてはNアレルが9.9%であった。このことから、この5遺伝子マーカーは検索した個体群に普遍的に存在していることが明らかとなった。また、DRD4 exon1 多型と、主成分2の主成分得点に有意な相関が認められ、遺伝子型がLLである個体がSSおよびSLである個体に比べ攻撃的反応性が高いことが明らかとなった。第3章では盲導犬不適格となる個体は主成分2の主成分得点が高い傾向にあることが示されたため、DRD4 exon1 多型が盲導犬適性審査の結果に関与する可能性が考えられた。

第5章では、犬の行動特性に複数の遺伝子多型の相互作用が影響しているのか、さらには盲導犬としての適性が複数の遺伝子多型の相互作用によって説明可能であるのかについて検討する目的で、第4章で解析を行った4遺伝子5種の遺伝子多型を説明変数とし、第3章で集計・算出した主成分得点を目的変数とした重回帰分析を行い、遺伝子多型と行動特性の関連を調査した。その結果、複数の遺伝子多型のみの相互作用では犬の行動特性に及ぼす影響について分析できなかったが、訓練士の第一印象などの他の説明変数を補うことで、主成分2「攻撃的反応性」について、修正済み重相関係数が0.597、分散分析によるP値0.001以下、F値5.863となる重回帰式が導き出された。このことから、盲導犬の合否判定においては攻撃性が重視されていること、その攻撃性は初回訓練時に既に認められていることが明らかとなった。また、遺伝子マーカーと性別を用いた盲導犬適性審査合否判別分析では、66.3%の判別の中率を得ることができた。

以上、本研究ではまず犬のMAOB遺伝子およびDBH遺伝子の塩基配列を決定するとともにこれら遺伝子上の多型部位を同定し、遺伝子多型の発現頻度が犬種によって異なること、あるいは特定の犬種にのみ発現していることを明らかにした。次に、遺伝子多型が犬種特異的な行動特性に及ぼす影響について検討する目的で、盲導犬候補個体群を対象とした行動解析と遺伝子マーカーを用いた適性予測解析を行った。その結果、盲導犬の適性として攻撃性が少ないことが重要視されていることが見出された。本研究で得られた知見は遺伝子マーカーを犬の行動特性の予測に適用するための基盤となることが期待され、今後こうした研究が進展すれば、ヒトを含む動物の個性形成のメカニズムという基礎生物学的課題に対する理解が深まるだけでなく、多大な投資を要する補助犬の育成効率の改善にもつながるであろうし、また家庭犬においても個性に応じた飼育訓練方法を開発し問題行動の発生を予防するといった応用面でも少なからぬ恩恵がもたらされるであろうと予測される。

## 参考文献

- Arnsten, A.F. (1993) Catecholamine mechanisms in age-related cognitive decline. *Neurobiol Aging* 14: 639-641.
- Bach, A.W., Lan, N.C., Johnson, D.L., Abell, C.W., Bembenek, M.E., Kwan, S.W., Seeburg, P.H. and Shih, J.C. (1988) cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4934-8.
- Benjamin, J., Li, L., Patterson, C., Greenberg, B.D., Murphy, D.L. and Hamer, D.H. (1996) Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking. *Nature Genetics* 12: 81-4.
- Benjamin, J., Osher, Y., Lichtenberg, P., Bachner-Melman, R., Gritsenko, I., Kotler, M., Belmaker, R.H., Valsky, V., Drendel, M. and Ebstein, R.P. (2000) An interaction between the catechol O-methyltransferase and serotonin transporter promoter region polymorphisms contributes to tridimensional personality questionnaire persistence scores in normal subjects. *Neuropsychobiology* 41: 48-53.
- Blum, K., Noble, E.P. and Sheridan, P.J. (1990) Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *JAMA* 263: 2055-60.
- Brunner, H.G., Nelen, M., Breakefield, X.O., Ropers, H.H. and van Oost, B.A. (1993) Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 262: 578-80.
- Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Muller, U., Aguet, M., Babinet, C., Shih, J.C. and et al. (1995) Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 268: 1763-6.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A. and Poulton, R. (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301: 386-9.
- Catalano, M., Nobile, M., Novelli, E., Nothen, M.M. and Smeraldi, E. (1993) Distribution of a novel mutation in the first exon of the human dopamine D4 receptor gene in psychotic patients. *Biol Psychiatry* 34: 459-64.
- Chen, C.K., Chen, S.L., Mill, J., Huang, Y.S., Lin, S.K., Curran, S., Purcell, S., Sham, P. and Asherson, P. (2003) The dopamine transporter gene is associated with attention deficit hyperactivity disorder in a Taiwanese sample. *Molecular*

- Psychiatry* 8: 393-6.
- Cichon, S., Nothen, M.M., Catalano, M., Di Bella, D., Maier, W., Lichtermann, D., Minges, J., Albus, M., Borrmann, M., Franze, E. and et al. (1995) Identification of two novel polymorphisms and a rare deletion variant in the human dopamine D4 receptor gene. *Psychiatr Genet* 5: 97-103.
- Cloninger, C.R. (1987) A systematic method for clinical description and classification of personality variants. A proposal. *Arch Gen Psychiatry* 44: 573-88.
- Cubells, J.F., van Kammen, D.P., Kelley, M.E., Anderson, G.M., O'Connor, D.T., Price, L.H., Malison, R., Rao, P.A., Kobayashi, K., Nagatsu, T. and Gelernter, J. (1998) Dopamine beta-hydroxylase: two polymorphisms in linkage disequilibrium at the structural gene DBH associate with biochemical phenotypic variation. *Hum Genet* 102: 533-40.
- Deckert, J., Catalano, M., Syagailo, Y.V., Bosi, M., Okladnova, O., Di Bella, D., Nothen, M.M., Maffei, P., Franke, P., Fritze, J., Maier, W., Propping, P., Beckmann, H., Bellodi, L. and Lesch, K.P. (1999) Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet* 8: 621-24.
- Di Bella, D., Catalano, M., Balling, U., Smeraldi, E. and Lesch, K.P. (1996) Systematic screening for mutations in the coding region of the human serotonin transporter (5-HTT) gene using PCR and DGGE. *Am J Med Genet* 67: 541-5.
- Duan, J., Wainwright, M.S., Comeron, J.M., Saitou, N., Sanders, A.R., Gelernter, J. and Gejman, P.V. (2003) Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Human Molecular Genetics* 12: 205-16.
- Ebstein, R.P., Novick, O., Umansky, R., Priel, B., Osher, Y., Blaine, D., Bennett, E.R., Nemanov, L., Katz, M. and Belmaker, R.H. (1996) Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nature Genetics* 12: 78-80.
- Ebstein, R.P., Segman, R., Benjamin, J., Osher, Y., Nemanov, L. and Belmaker, R.H. (1997) 5-HT2C (HTR2C) serotonin receptor gene polymorphism associated with the human personality trait of reward dependence: interaction with dopamine D4 receptor (D4DR) and dopamine D3 receptor (D3DR) polymorphisms. *American Journal of Medical Genetics* 74: 65-72.
- Egan, M.F., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Callicott, J.H., Mazzanti,

- C.M., Straub, R.E., Goldman, D. and Weinberger, D.R. (2001) Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 6917-22.
- Frisch, A., Laufer, N., Danziger, Y., Michaelovsky, E., Leor, S., Carel, C., Stein, D., Fenig, S., Mimouni, M., Apter, A. and Weizman, A. (2001) Association of anorexia nervosa with the high activity allele of the COMT gene: a family-based study in Israeli patients. *Molecular Psychiatry* 6: 243-5.
- George, S.R., Cheng, R. and Nguyen, T. (1993) Polymorphisms of the D4 dopamine receptor alleles in chronic alcoholism. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 107-114.
- Goddard, M.E. and Beilharz, R.G. (1982) Genetic and environmental factors affecting the suitability of dogs as guide dogs for the blind. *Theoretical and Applied Genetics* 62: 97-102.
- Goddard, M.E. and Beilharz, R.G. (1983) Genetics of traits which determine the suitability of dogs as guide-dogs for the blind. *Appl. Anim. Ethol.* 9: 299-315.
- Goddard, M.E. and Beilharz, R.G. (1984) A factor analysis of fearfulness in potential guide dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 12: 253-265.
- Goddard, M.E. and Beilharz, R.G. (1985) A multivariate analysis of the genetics of fearfulness in potential guide dogs. *Behavior Genetics* 15: 69-89.
- Goldstein, M. and Deutch, A.Y. (1992) Dopaminergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia. *FASEB J.* 6: 2413-21.
- Gottowik, J., Malherbe, P., Lang, G., Da Prada, M. and Cesura, A.M. (1995) Structure/function relationships of mitochondrial monoamine oxidase A and B chimeric forms. *Eur J Biochem* 230: 934-42.
- Grimsby, J., Chen, K., Wang, L.J., Lan, N.C. and Shih, J.C. (1991) Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 3637-41.
- Gutierrez, B., Fananas, L., Arranz, M.J., Valles, V., Guillamat, R., van Os, J. and Collier, D. (1996) Allelic association analysis of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene in bipolar affective disorder. *Neuroscience Letters* 212: 65-7.
- Hart, B.L. and Miller, M.F. (1985) Behavioral profiles of dog breeds. *J Am Vet Med Assoc* 186: 1175-80.
- Healy, D.G., Abou-Sleiman, P.M., Ozawa, T., Lees, A.J., Bhatia, K.,

- Ahmadi, K.R., Wullner, U., Berciano, J., Moller, J.C., Kamm, C., Burk, K., Barone, P., Tolosa, E., Quinn, N., Goldstein, D.B., Wood, N.W. and Barrone, P. (2004) A functional polymorphism regulating dopamine beta-hydroxylase influences against Parkinson's disease. [erratum appears in Ann Neurol. 2004 Aug;56(2):311 Note: Barrone P [corrected to Barone P]]. *Annals of Neurology* 55: 443-6.
- Hsu, Y.P., Weyler, W., Chen, S., Sims, K.B., Rinehart, W.B., Utterback, M.C., Powell, J.F. and Breakefield, X.O. (1988) Structural features of human monoamine oxidase A elucidated from cDNA and peptide sequences. *J Neurochem* 51: 1321-4.
- Huang, Y.Y., Cate, S.P., Battistuzzi, C., Oquendo, M.A., Brent, D. and Mann, J.J. (2004) An association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase a gene promoter, impulsive traits and early abuse experiences. *Neuropsychopharmacology* 29: 1498-505.
- Inoue, H., Castagnoli, K., Van Der Schyf, C., Mabic, S., Igarashi, K. and Castagnoli, N., Jr. (1999) Species-dependent differences in monoamine oxidase A and B-catalyzed oxidation of various C4 substituted 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6- tetrahydropyridinyl derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 856-64.
- Ito, A., Kuwahara, T., Inadome, S. and Sagara, Y. (1988) Molecular cloning of a cDNA for rat liver monoamine oxidase B. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 970-6.
- Ito, H., Nara, H., Inoue-Murayama, M., Shimada, M.K., Koshimura, A., Ueda, Y., Kitagawa, H., Takeuchi, Y., Mori, Y., Murayama, Y., Morita, M., Iwasaki, T., Ota, K., Tanabe, Y. and Ito, S. (2004) Allele Frequency Distribution of the Canine Dopamine Receptor D4 Gene Exon III and I in 23 Breeds. *J Vet Med Sci* 66: 815-820.
- Johnston, J.P. (1968) Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem Pharmacol* 17: 1285-97.
- Kirley, A., Lowe, N., Hawi, Z., Mullins, C., Daly, G., Waldman, I., McCarron, M., O'Donnell, D., Fitzgerald, M. and Gill, M. (2003) Association of the 480 bp DAT1 allele with methylphenidate response in a sample of Irish children with ADHD. *American Journal of Medical Genetics* 121B: 50-4.
- Klenteberg, B., Levander, S.E., Orelund, L., Asberg, M. and Schalling, D. (1987) Neuropsychological correlates of platelet monoamine oxidase (MAO) activity in female and male subjects. *Biol Psychol* 24: 237-52.



- Knoll, J. and Magyar, K. (1972) Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. *Adv Biochem Psychopharmacol* 5: 393-408.
- Kobayashi, K., Kurosawa, Y., Fujita, K. and Nagatsu, T. (1989) Related Articles, Links Free in PMC Human dopamine beta-hydroxylase gene: two mRNA types having different 3'-terminal regions are produced through alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res.* 17: 1089-1102.
- Kuwahara, T., Takamoto, S. and Ito, A. (1990) Primary structure of rat monoamine oxidase A deduced from cDNA and its expression in rat tissues. *Agric Biol Chem* 54: 253-7.
- Lappalainen, J., Long, J.C., Virkkunen, M., Ozaki, N., Goldman, D. and Linnoila, M. (1999) HTR2C Cys23Ser polymorphism in relation to CSF monoamine metabolite concentrations and DSM-III-R psychiatric diagnoses. *Biological Psychiatry* 46: 821-6.
- Lesch, K.P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S.Z., Greenberg, B.D., Petri, S., Benjamin, J., Muller, C.R., Hamer, D.H. and Murphy, D.L. (1996) Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274: 1527-31.
- Liu, I.S., Seeman, P., Sanyal, S., Ulpian, C., Rodgers-Johnson, P.E., Serjeant, G.R. and Van Tol, H.H. (1996) Dopamine D4 receptor variant in Africans, D4valine194glycine, is insensitive to dopamine and clozapine: report of a homozygous individual. *Am J Med Genet* 61: 277-82.
- Milgram, N.W., Ivy, G.O., Head, E., Murphy, M.P., Wu, P.H., Ruehl, W.W., Yu, P.H., Durden, D.A., Davis, B.A., Paterson, I.A. and et al. (1993) The effect of L-deprenyl on behavior, cognitive function, and biogenic amines in the dog. *Neurochem Res* 18: 1211-9.
- Minamiura, N. and Yasunobu, K.T. (1978) Bovine liver monoamine oxidase. A modified purification procedure and preliminary evidence for two subunits and one FAD. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 189: 481-9.
- Myeong, H., Jeoung, D., Kim, H.K., Lee, Y.S., Kim, K.H., Ha, J.H., Park, C. and Kaang, B.K. (2000) Genomic analysis and functional expression of canine dopamine D2 receptor. *Gene* 257: 99-107.
- Niimi, Y., Inoue-Murayama, M., Kato, K., Matsuura, N., Murayama, Y., Ito, S., Momoi, Y., Konno, K. and Iwasaki, T. (2001) Breed differences in allele frequency of the dopamine receptor D4 gene in dogs. *J Hered* 92: 433-6.
- Noble, E.P., Ozkaragoz, T.Z., Ritchie, T.L., Zhang, X., Belin, T.R.

- and Sparkes, R.S. (1998) D2 and D4 dopamine receptor polymorphisms and personality. *Am J Med Genet* 81: 257-67.
- Nothen, M.M., Cichon, S., Hemmer, S., Hebebrand, J., Remschmidt, H., Lehmkuhl, G., Poustka, F., Schmidt, M., Catalano, M., Fimmers, R. and et al. (1994) Human dopamine D4 receptor gene: frequent occurrence of a null allele and observation of homozygosity. *Hum Mol Genet* 3: 2207-12.
- O'Connor, D.T., Levine, G.L. and Frigon, R.P. (1983) Homologous radio-immunoassay of human plasma dopamine  $\beta$ -hydroxylase: analysis of homospecific activity, circulating plasma pool and intergroup differences based upon race, blood pressure and cardiac function. *J Hypertension* 1: 227-233.
- Oruc, L., Verheyen, G.R., Furac, I., Jakovljevi, M., Ivezi, S., Raeymaekers, P. and Van Broeckhoven, C. (1997) Association analysis of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor and 5-HT transporter genes in bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics* 74: 504-6.
- Ozaki, N., Goldman, D., Kaye, W.H., Plotnicov, K., Greenberg, B.D., Lappalainen, J., Rudnick, G. and Murphy, D.L. (2003) Serotonin transporter missense mutation associated with a complex neuropsychiatric phenotype. *Mol Psychiatry* 8: 895, 933-6.
- Plomin, R. (1990) The role of inheritance in behavior. *Science* 248: 183-8.
- Powell, J.F., Hsu, Y.P., Weyler, W., Chen, S.A., Salach, J., Andrikopoulos, K., Mallet, J. and Breakefield, X.O. (1989) The primary structure of bovine monoamine oxidase type A. Comparison with peptide sequences of bovine monoamine oxidase type B and other flavoenzymes. *Biochem J* 259: 407-13.
- Reisner, I.R., Mann, J.J., Stanley, M., Huang, Y.Y. and Houpt, K.A. (1996) Comparison of cerebrospinal fluid monoamine metabolite levels in dominant-aggressive and non-aggressive dogs. *Brain Res* 714: 57-64.
- Ruehl, W.W., Bruyette, D.S., DePaoli, A., Cotman, C.W., Head, E., Milgram, N.W. and Cummings, B.J. (1995) Canine cognitive dysfunction as a model for human age-related cognitive decline, dementia and Alzheimer's disease: clinical presentation, cognitive testing, pathology and response to 1-deprenyl therapy. *Prog Brain Res* 106: 217-25.
- Sabol, S.Z., Hu, S. and Hamer, D. (1998) A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet* 103: 273-9.
- Scott, J.P. and Fuller, J.L. (1965) Dog behavior - The genetic basis.

*The University of Chicago Press, Chicago.*

- Seeman, P., Ulpian, C., Chouinard, G., Van Tol, H.H., Dwosh, H., Lieberman, J.A., Siminovitch, K., Liu, I.S., Wayne, J., Voruganti, P. and et al. (1994) Dopamine D4 receptor variant, D4GLYCINE194, in Africans, but not in Caucasians: no association with schizophrenia. *Am J Med Genet* 54: 384-90.
- Segman, R.H., Heresco-Levy, U., Finkel, B., Inbar, R., Neeman, T., Schlafman, M., Dorevitch, A., Yakir, A., Lerner, A., Goltser, T., Shelevoy, A. and Lerer, B. (2000) Association between the serotonin 2C receptor gene and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia: additive contribution of 5-HT2Cser and DRD3gly alleles to susceptibility. *Psychopharmacologia* 152: 408-13.
- Serpell, J.A. and Hsu, Y. (2001) Development and validation of a novel method for evaluating behavior and temperament in guide dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 72: 347-364.
- Shih, J.C. (1991) Molecular basis of human MAO A and B. *Neuropsychopharmacology* 4: 1-7.
- Shih, J.C., Grimsby, J. and Chen, K. (1990) The expression of human MAO-A and B genes. *J Neural Transm Suppl* 32: 41-7.
- Smith, K.M., Daly, M., Fischer, M., Yiannoutsos, C.T., Bauer, L., Barkley, R. and Navia, B.A. (2003) Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. *American Journal of Medical Genetics* 119B: 77-85.
- Suzuki, Y., Yoshitomo-Nakagawa, K., Maruyama, K., Suyama, A. and Sugano, S. (1997) Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. *Gene* 200: 149-56.
- Tan, E.C., Chong, S.A., Teo, Y.Y. and Mythily, S. (2003) No evidence of molecular heterosis at the dopamine D2 receptor gene locus for smoking in schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics* 120B: 40-1.
- Thorne, F.C. (1944) The inheritance of shyness in dogs. *Journal of Genetical Psychology* 65: 275-9.
- Weinshilboum, R.M., Schrott, H.G., Raymond, F.A., Weidman, W.H. and Elveback, L.R. (1975) Inheritance of very low serum DBH activity. *Am J Hum Genet* 27: 573-585.
- Wilsson, E. and Sundgren, P.E. (1997) The use of behavior test for the selection of dogs for service and breeding, 1: Method of testing and evaluating test results in adult dogs, demands on different kinds of service dogs, sex and breed differences. *Appl. Anim.*

- Behav. Sci.* 53: 279-95.
- Wise, R. A. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 1-12.
- Wood, J. G., Joyce, P. R., Miller, A. L., Mulder, R. T. and Kennedy, M. A. (2002) A polymorphism in the dopamine beta-hydroxylase gene is associated with "paranoid ideation" in patients with major depression. *Biol Psychiatry* 51: 365-9.
- Zhu, Q. S., Grimsby, J., Chen, K. and Shih, J. C. (1992) Promoter organization and activity of human monoamine oxidase (MAO) A and B genes. *J Neurosci* 12: 4437-46.
- 小笠原直毅 (1995) Inverse PCR 細胞工学 14, 591-3

## 謝辞

本研究に着想、遂行するにあたり、御懇意なる指導を賜りました、森裕司教授に深く感謝いたします。先生の先鋭な洞察力と創造力、そして温かみあふれる御提言は、常に私を導き、励ましてくださいました。

本研究を遂行するにあたり、常に具体的な御指導を賜りました、武内ゆかり助教授に心からの謝意を表します。先生の親身になった御指導は、公私にわたり私を励まし、支えてくださいました。

菊水健史助手には、本研究遂行に当たり、貴重な御助言、実験手技の御指導を賜りました。深く感謝いたします。先生のバイタリティーあふれる研究姿勢からも多くの事を学ぶことができました。

また、貴重な御助言、実験手技の御指導を賜りました、元・獣医生理学研究室助手 鈴木正寿氏に感謝いたします。

イヌの脳 cDNA ライブラリーを提供してくださいました、本学医科学研究所癌ウイルス研究部・鈴木穰氏に感謝いたします。

盲導犬候補個体における DRD4 遺伝子多型解析にご尽力くださいました、岐阜大学遺伝資源学研究室の村山美穂助教授および研究室の方々に感謝いたします。

また、本学新領域創生科学研究科の佐藤均助教授には FISH 法を教わりました。結果を得るに至らず残念でしたが、先生の懇切な御指導に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、惜しみないご協力をいただきました増田宏司氏、桃沢幸秀氏、尾形庭子氏、旭大輔氏に感謝いたします。桃沢幸秀氏、尾形庭子氏にはまた、良き友人として励ましていただき、研究生活を楽しいものとすることができました。

獣医動物行動学研究室の皆様方には絶え間なく暖かい御支援をいただきました。ここに感謝の意を表します。

両親には、これまでの学生生活全般にわたり、多大なる支援を惜しみなく与えていただきました。父と母の深い理解なくして、本研究の完遂は成し得ませんでした。ここに深く感謝の意を表します。

茂木一孝氏には、夫として、良きパートナーとして、本研究の遂行を見守り、常に温かく励ましていただきました。ここに心からの感謝を表します。