

博士論文

イヌの遺伝的多様性を利用した法科学的研究

旭 愛

## 目次

略語一覧.....	3
第 1 章 総合緒言.....	4
1-1 イヌとヒトの関わり.....	5
1-2 イヌ DNA 型鑑定.....	5
1-3 市販キットと問題点.....	7
1-4 新検査法 DogFiler.....	8
1-5 日本の法科学鑑定.....	8
1-6 本研究の目的.....	9
第 2 章 客観性と再現性を確保するための個体識別法の条件設定.....	11
2-1 緒言.....	12
2-2 材料と方法.....	15
2-3 結果.....	17
2-4 考察.....	18
2-5 小括.....	21
第 3 章 ランダムサンプリング群解析による多型性の評価.....	27
3-1 緒言.....	28
3-2 材料と方法.....	30
3-3 結果.....	33
3-4 考察.....	35
3-5 小括.....	38
第 4 章 近親個体群解析による識別力の評価.....	46
4-1 緒言.....	47
4-2 材料と方法.....	49
4-3 結果.....	50
4-4 考察.....	52
4-5 小括.....	55
第 5 章 犬種別解析による 犬種間および犬種内の多型性の評価と犬種推定法の検討... ..	61
5-1 緒言.....	62

第1節	64
5.1-1 緒言	64
5.1-2 材料と方法	65
5.1-3 結果	67
5.1-4 考察	68
第2節	69
5.2-1 緒言	69
5.2-2 材料と方法	70
5.2-3 結果	72
5.2-4 考察	73
5-4 考察	75
5-5 小括	78
第六章 総合考察	95
6-1 結果の要約	96
6-2 法科学的観点からみた DogFiler	97
6-3 遺伝的背景と犬種推定	99
6-4 他分野への応用	100
総括	102
参考文献	106
謝辞	118

## 略語一覧

AKC	American Kennel Club	アメリカンケネルクラブ
AUC	area under the curve	曲線下面積
EDTA	ethylene-diamine-tetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
FCI	Fédération Cynologique Internationale	国際畜犬連盟
F <sub>IS</sub>	inbreeding coefficient (subpopulation)	分集団における近交度
F <sub>IT</sub>	inbreeding coefficient (total population)	全集団における近交度
F <sub>ST</sub>	fixiation index	遺伝的分化度
H <sub>E</sub>	expected heterozygosity	ヘテロ接合度の期待値
H <sub>O</sub>	observed heterozygosity	ヘテロ接合度の観測値
JGDA	Japan Guide Dog Association	公益財団法人日本盲導犬協会
JKC	Japan Kennel Club	一般社団法人ジャパンケネルクラブ
JPFA	Japan Pet Food Association	一般社団法人ペットフード協会
LR	likelihood ratio	尤度比
mtDNA	Mitochondrial DNA	ミトコンドリア DNA
n <sub>A</sub>	number of alleles	アレル数
NLR	nominal logistic regression	名義ロジスティック回帰
PD	power of discrimination	識別能
PIC	polymorphic information content	多型情報含有値
ROC	receiver operating characteristic	受信者操作特性
STR	short tandem repeat	縦列型反復配列
SWGDM	Scientific Working Group on DNA Analysis Methods	DNA 分析方法に関する技術作業部会
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane	トリスヒドロキシメチルアミノメタン

# 第 1 章

## 総合緒言

## 1-1 イヌとヒトの関わり

イヌは最も古くに家畜化された動物であると言われ、1万5000年以上前からヒトの生活に欠かせない存在として共存してきた (Shannon et al., 2015; Vila et al., 1997). 元来、夜間や留守中に住居の見張りをする番犬、山や森の中で獲物を探索し狩りを補助する狩猟犬、放牧された家畜を集める牧羊犬、雪国でそりをひく橇犬など様々な用途に合わせて改良が行われてきたが (Manwell and Baker, 1984), 近年、使役犬や愛玩犬としての需要が高まり、さらに人間社会に適応する犬種の積極的な作出や繁殖が行われている。その結果、現在では343犬種が国際畜犬連盟 (Federation Cynologique Internationale : FCI) に公認され、そのうちの194犬種がジャパンケネルクラブ (Japan Kennel Club : JKC) に登録されている。

イヌはネコと並んで世界的に人気のある愛玩動物であり、その飼育頭数は5億頭を超えている (Coren, 2012). 一般社団法人ペットフード協会 (Japan Pet Food Association : JPFA) の調査によると、日本国内の飼育頭数は約1千万頭と推計され、世帯飼育率は15.06%と実に7世帯に1世帯がイヌを飼育している (JPFA, 2015). イヌはヒトにとって極めて身近な動物であると言える。

## 1-2 イヌ DNA 型鑑定

日本国内において飼育されているイヌのうち、80.3%は純血種であるとされている (JPFA, 2015). 純血種は、成長後の容姿が予測できるだけでなく、ドッグショーなどへの参加資格が得られることや、多くの研究によって行動特性や気質が明らかになっていることから、雑種に比べて人気が高く、雑種よりも高値で売買される傾向にある。そのため、近年、血統証明書の偽装や不正使用が問題となっており、血統や親子関係の確認のためのDNA型鑑定の需要が高まっている。

イヌのDNA型鑑定は、一方で、犯罪捜査に大きく貢献することがある。世界で初めて動物のDNA型鑑定が刑事事件に導入されたのは1994年で、アメリカで血だらけのジャケットから採取されたネコの被毛が殺人事件の容疑者特定につながった (Menotti-Raymond et al., 1997). 以降、様々な動物種でDNAによる個体識別の研究が進められ、イヌの個体識別についてもミトコンドリアDNAと核DNAの両面から研究が行われてきた。ヒトがイヌと直接あるいは間接的に接触する機会は多く、被毛、だ液、糞尿などが身体や衣服に付着することも多い。そのため、犯罪現場にイヌ由来の生体試料が遺留されることも少なくな

く、イヌの DNA は、犯罪を立証する重要な証拠にもなりうるのである (Clarke and Vandenberg, 2010; Eichmann and Parson, 2007; Kanthaswamy, 2015; Kanthaswamy et al., 2009; Padar et al., 2001).

### ミトコンドリア DNA

ミトコンドリアは各細胞内に 100~1000 個存在し、それぞれに 2~10 コピーのミトコンドリア DNA (mtDNA) が含まれている (Nass, 1969). 微量のサンプルや劣化したサンプルからの検出率も高いため、法科学分野において注目されてきた (Wetton et al., 2003). 特に、HV-I 領域と HV-II 領域は多型性が高く、イヌにおいても、個体識別や血縁関係を証明するための研究が進められてきた (Angleby and Savolainen, 2005; Desmyter and Gijbsbers, 2012; Eichmann and Parson, 2007; Gundry et al., 2007; Halverson and Basten, 2005b; Savolainen and Lundeberg, 1999; Webb and Allard, 2009).

無意識のうちに衣服や家具に付着することも多いイヌの被毛から検出できるため、イヌの mtDNA が犯罪の証拠として採用された例もある (Halverson and Basten, 2005b; Savolainen and Lundeberg, 1999; Schneider et al., 1999). しかし一方で、母性遺伝によって母系血縁関係にある個体では同一の型となってしまうため (Sato and Sato, 2013), ハプロタイプ数は少なく、地域や集団、プライマー設計位置によって 45~143 と報告されている (Desmyter and Gijbsbers, 2012; Gundry et al., 2007; Sugiyama et al., 2013; Webb and Allard, 2009). その識別能は 0.86~0.95 程度と低く、個体識別の指標として有用であるケースは限られる (Angleby and Savolainen, 2005). また、ヘテロプラスミーによって個体内で多型が生じ、サンプルの採取部位や採取時期によって同一個体性や血縁関係が否定されてしまうこともある (Klüttsch et al., 2011; Spicer et al., 2014).

### マイクロサテライト多型

STR (Short Tandem Repeat) は、2~8 塩基程度の短い塩基配列をくり返しの単位として、ゲノム上に数個から数十個直列に並んでいるものを指す (巖佐 et al., 2013). この領域では突然変異が生じやすく、多様性に富むことから、集団遺伝学、育種学、法科学などさまざまな分野で研究が進められている.

イヌにおいても数多くの STR 多型が報告されており、犬種差や遺伝性疾患の解明、個体識別、親子鑑定などに用いられている (Arata et al., 2015; Berger et al., 2014; Eichmann et al., 2004; Kanthaswamy et al., 2009; Muller et al., 1999; Ogden et al., 2012; Radko

and Slota, 2009; van Asch et al., 2009). 犬種間の遺伝的分化を解析することで犬種の遺伝的な背景を推定したり，犬種内の遺伝的構造を解析したりすることで犬種内の分化を把握することもできる．たとえば，犬種の遺伝的背景を調べた Parker らの報告によると，シバイヌは他の犬種に比べてオオカミに近いことが示唆された (Parker et al., 2004)．また，プードルの犬種内分化を解析した Bjornerfeldt らの報告によると，FCI 公認の 4 種のプードル (スタンダード，ミディアム，ミニチュア，トイ) のうち，スタンダードのみが同一犬種とは思えないほど大きく分化していることが示された (Bjornerfeldt et al., 2008)．

法科学分野においては個体識別法として注目され，様々な PCR パネルが提案されている (Arata et al., 2015; Berger et al., 2014; Muller et al., 1999; Ogden et al., 2012; van Asch et al., 2009; Zenke et al., 2011)．しかし，簡便性，客観性，再現性などの観点から，いずれのパネルもヒトの DNA 型検査キットのように広く定着していないという現状がある．その理由の 1 つとして，これらのパネルに含まれている STR の多くが 2 塩基単位の反復配列であることが挙げられる．2 塩基単位の STR は，スタッターピークが多数検出され (Murray et al., 1993)，4 塩基単位のものと比べて検査結果の客観性や再現性が低くなることが知られており (Daniels et al., 1998; Phavaphutanon and Laopiem, 2013)，これらの座位を検査対象としない個体識別法の確立が必要である．

### 1-3 市販キットと問題点

イヌの DNA 型検査に関しては，市販されたキットも複数ある．しかし，ヒトの DNA 型検査キットと同等の高い完成度が求められるようになり，たとえば，Stockmarks® Canine I Kit および II Kit は，刑事裁判にも採用されたという実績があるものの，アレリックラダーマーカを用いないことや法科学的に十分な検討が行われていなかったことから，販売を中止した (Kanthaswamy et al., 2009)．現在販売されている代表的なキットとして，Thermo Fisher Scientific の Canine Genotypes Panel (Dayton et al., 2009; Kanthaswamy et al., 2009) があるが，1.1 Kit は，19 の検査座位のうち 17 座位が 2 塩基単位の STR であるためデータが安定せず，4 塩基以上の反復単位を有する STR を検査座位とする 2.1 Kit は，日本では販売されていない．



## 1-4 新検査法 DogFiler

2013年、アメリカ合衆国のカリフォルニア大学デービス校 (UC Davis) の研究チームによって DogFiler という新たなマルチプレックス PCR パネルが考案された (Wictum et al., 2013). この DogFiler は、プライマーを4種の蛍光色素 (6-FAM, NED, PET, VIC) で標識することで、15座位の STR 型と Y 染色体の有無 (SRY マーカー) をマルチプレックス PCR によって判定できるイヌの DNA 型検査法である。検査座位はいずれも4塩基単位の STR で、異なる染色体上に存在しており、一度の PCR とキャピラリー電気泳動で解析が可能となっている。用いられている蛍光色素は、日本の法科学鑑定に使用されている AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus Kit (Thermo Fisher) などと同じものであるため、ヒト DNA 型検査と同じ器材を用いることができる。DogFiler は、法科学鑑定における個体識別を目的として開発された検査手法であり、イヌの DNA 型検査法としては初めて DNA 科学解析手法作業部会 (SWGAM : Scientific Working Group on DNA Analysis Methods) の基準を満たすものとされている (Wictum et al., 2013).

## 1-5 日本の法科学鑑定

近年、科学的な手法による鑑定が重視され、なかでも DNA 型鑑定はその識別力や客観性の高さから、刑事裁判において極めて高い証拠価値を認められている。現在日本の科学捜査におけるヒト DNA 型鑑定では、主として AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Plus Kit (Thermo Fisher) が用いられている。日本人における理論上の偶然一致率は、最も高くて4兆7千億分の1と言われており、極めて高い精度で個人識別が可能である (警察庁, 2008).

DNA 型鑑定については、さまざまな指針や勧告が出されている。なかでも SWGDAM の指針は FBI に対して大きな影響力をもち、結果的にアメリカの検査機関に対して拘束力をもつため、DNA 型検査法や検査機器の研究、開発を行う際に重要視されている。日本では、1997年に日本 DNA 多型学会によって「DNA 鑑定についての指針」が出されており (2012年改定)、日本の法科学における DNA 型鑑定のあり方が示されている (日本 DNA 多型学会 DNA 鑑定についての指針(2012年) : <http://dnapol.umin.jp/contents/guideline-2012.pdf#search='DNA%E5%A4%9A%E5%9E%8B+%E6%8C%87%E9%87%9D'>). この指針は「主としてヒトの DNA を対象とするが、事件の内容によってはヒト以外の生物の DNA 検査が含まれることもある」としており、動植物の DNA 型検査法を構築する際にも参考にすべきものである。この指針のなかで、検査法については、国内外において広く検討されてい

ることや、日本においてアレルの出現頻度データが蓄積されていること、総合して十分な識別力が得られること、検出に適した条件を使用することなどが求められている。これらの点については、公判の場でも論点となる可能性があり、鑑定実務に導入する前に学術的検討を重ねることが必要となる。

## 1-6 本研究の目的

これまで述べてきたように、イヌの DNA 型鑑定は犯罪捜査に大きく貢献する有用なツールであるが、従来の手法ではその検査結果の客観性や再現性が乏しい現状にあり、日本の法科学鑑定には定着していない。一方アメリカでは、新検査法 **DogFiler** がすでに法科学鑑定に導入されており、公判においても証拠として採用されている (Wictum et al., 2013)。日本においてもイヌの個体識別法の確立が望まれており、**DogFiler** の導入が必要であると考えるが、日本の法科学分野においては、検査法の導入に際し国内での有効性について十分な学術的検討が求められている。

そこで本研究では、まず第 2 章で **DogFiler** を日本の法科学鑑定に適用できるよう条件設定を行い、客観性と再現性を確保した。つづいて第 3 章では、ランダムにサンプリングしたイヌを用いて日本国内における多型性を評価し、第 4 章では近親個体群における多型性や突然変異率を確認し、日本の法科学鑑定において有用かどうかを検討した。さらに第 5 章では、この検査法を応用し、分集団内における近交度の評価や犬種推定が可能かどうかを検討した。そして第 6 章では、得られた結果を総合的に考察した (図 1)。

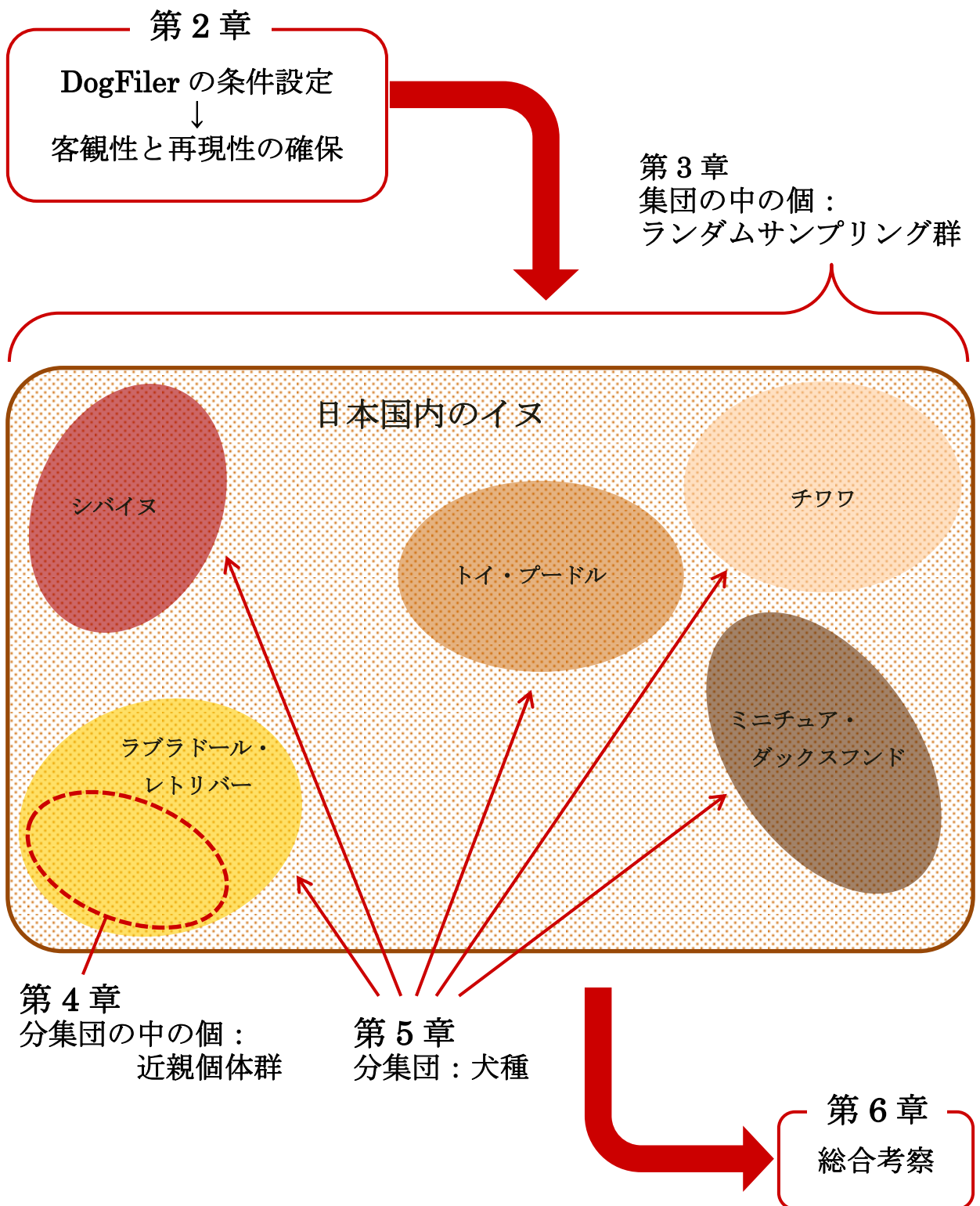


図 1 本研究の流れ

## 第 2 章

客観性と再現性を確保するための個体識別法の条件設定

## 2-1 緒言

### 2-1-1 ヒト DNA 型鑑定

犯罪捜査において被疑者や被害者を特定し、事件に結び付けることは極めて重要である。近年、科学的な手法による鑑定が重視され、指紋、血液型、歯型、顔画像などの解析が頻繁に行われており、なかでも DNA 型鑑定はその識別力や客観性の高さから、刑事裁判において極めて高い証拠価値を認められている。

DNA 型によるヒトの個人識別には、STR (Short Tandem Repeat) が用いられている。安定してデータを得られるキットを用いて世界中でデータベースが構築され、犯罪捜査に役立てられている (Butler, 2006)。現在、日本の科学捜査におけるヒト DNA 型鑑定では、AmpFlSTR® Identifiler® Plus Kit (Thermo Fisher) が主に用いられている。これはマルチプレックス PCR とキャピラリー電気泳動を行うことで、複数座位の STR 領域のくり返し多型 (STR 型) を検出するものである。日本人における理論上の偶然一致率は、最も高くても 4 兆 7 千億分の 1 とも言われ、極めて高い精度で個人識別が可能である (警察庁, 2008)。

### 2-1-2 DNA 型鑑定に関する指針

第一章でも述べたとおり、DNA 型鑑定については、さまざまな指針や勧告が出されている。なかでも SWGDAM の指針 (SWGDAM, 2004) は FBI に対して大きな影響力をもち、結果的にアメリカの検査機関に対して拘束力をもつため、DNA 型検査法や検査機器の研究、開発を行う際に重要視されている。

日本では、1997 年に日本 DNA 多型学会によって「DNA 鑑定についての指針 (1997 年)」が出されており、2012 年に改定されている。この指針の作成にあたっては「DNA 鑑定検討委員会」が発足し、科学警察研究所や日本弁護士会からも委員が参加し、様々な視点から議論が行われた (勝又, 2014)。そのため、法的拘束力を持たないものの、法科学鑑定において重視されている。この指針は、法医資料の鑑定における検査座位 (ローカス) の選択について、「国内外において広く検討され、法医学的応用に際しての有用性が認められていて、日本人集団におけるアレルの出現頻度データが蓄積されており、多くの機関で追試可能なローカス (例として CODIS の 13 STR ローカス) を選択し、総合して十分な識別力が得られる必要がある」と定めている。すなわち、他国で有用性が確認されているとしても、そのデータをそのまま日本で適用するのではなく、国内のアレル頻度データを新たに蓄積し、その識別力を検証する必要がある、というのが日本の法科学分野における DNA 型鑑定の基本方針である。

### 2-1-3 DogFiler の問題点

STR 型解析では、蛍光色素で標識されたプライマーを用いて PCR を行い、キャピラリー電気泳動によって PCR 産物を分離する。PCR 産物の鎖長に応じて生じる移動度をピークとして検出し、そのピークの位置によって反復回数を判定する。各検査座位における STR の反復回数をアレルとし、各アレルについて理論的な検出位置にビンを設定することで、ビンの中に現れたピークが判定される (図 2-1)。

DogFiler は SWGDAM の指針をすべてクリアし、アレル頻度データの蓄積や突然変異率の確認などの検討を十分におこない、アメリカではすでに鑑定実務に導入され、公判においても証拠として採用されている。プライマーの配列や染色体上の位置、各アレルの塩基配列なども公開され、イヌの DNA 型検査法として初めて法科学的に世界中で定着することが期待できるパネルである。しかし、プライマーの濃度や鋳型 DNA の量が曖昧であること、PCR 産物を電気泳動の前に希釈する必要があることなどから、検査の再現性や簡便性には改善の余地がある。また Wictum らの報告では、泳動装置として Applied Biosystems® 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) が使用されていたが、この装置には鑑定を行う上でいくつかの問題が指摘されており (Hitchcock et al., 2015)、法科学鑑定に導入するにあたっては、Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) の適用が望ましいと考えられる。

さらに、Wictum らの報告では解析ソフトとして GeneMapper® (Applied Biosystems) が使用されており、GeneMapper® では電気泳動の誤差を検査者が補正して判定する必要があるため、法科学鑑定においては客観性に欠けると考えられる。これに対し、法科学鑑定用に改良されたソフトウェアである GeneMapper® ID および ID-X には、サンプルとともにアレリックラダーマーカを泳動することで、ランごとにビンの位置を補正するビンオフセット機能がある。この機能を使うことで、アレルピークを確実にビンの中に入れることができ、自動的に型判定が行えるため、客観性が大きく向上する。ヒトの DNA 型検査キット (AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit, PowerPlex® Fusion, GlobalFiler™ Kit) は、GeneMapper ID または ID-X の使用を推奨しており、現在、科学警察研究所および全国の科学捜査研究所でも鑑定にこれらのソフトウェアを用いている。

本章では、DogFiler を日本の法科学鑑定に適用することを目的として、プライマーや PCR 条件の見直しを行うとともに、Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer および

GeneMapper® ID-X ソフトウェアに適合させることで客観性，再現性，簡便性を確保できるように検査の条件設定を行った。

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 サンプル

本検討には、一般家庭で飼育されているイヌ 104 頭の血液サンプルを用いた。24 犬種の純血種 94 頭と 10 頭の雑種が含まれており、性別は雌が 67 頭、雄が 37 頭であった (表 2-1)。血液サンプルは、千葉県市川市にある荻谷動物病院にて獣医師によって採取された血液検査残余血で、抗凝固剤として EDTA (ethylene-diamine-tetraacetic acid) が添加されていた。サンプルは飼い主の同意のもとに提供を受けた。

血液 50  $\mu\text{L}$  に Buffer G2 150  $\mu\text{L}$  を加え、EZ1<sup>®</sup> DNA Investigator Kit と EZ1<sup>®</sup> Advanced XL (QIAGEN) を用いて DNA を抽出、精製し、50  $\mu\text{L}$  の TE バッファー (Tris-EDTA buffer) で溶出した。定量には NanoVue (GE Healthcare) を用い、吸光度測定によって濃度を決定した。

### 2-2-2 PCR 条件設定

DogFiler のオリジナルプロトコル (Wictum et al., 2013) に従って 25  $\mu\text{L}$  の反応液で PCR 反応を行い、最適なプライマー濃度と鋳型 DNA 量を検討した。反応液の基本的な組成は、0.4 $\times$  Titanium Taq<sup>™</sup> polymerase (BD Biosciences), 1 $\times$  Titanium Taq<sup>™</sup> PCR Buffer (BD Biosciences), 200  $\mu\text{M}$  dNTPs (Invitrogen) で、ここに 16 組のプライマー (Applied Biosystems) と鋳型 DNA を様々な濃度で加え、最適な条件を模索した。PCR 反応には Veriti<sup>®</sup> Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用い、95  $^{\circ}\text{C}$  1 分間の activation step ののち、95  $^{\circ}\text{C}$  30 秒, 62  $^{\circ}\text{C}$  30 秒, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 分のサイクルを 31 回くり返し、72  $^{\circ}\text{C}$  の final extension を 30 分行った。

得られた PCR 産物 1  $\mu\text{L}$  と Gene Scan 600 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) 0.3  $\mu\text{L}$  を 10  $\mu\text{L}$  の Hi-Di<sup>™</sup> Formamide (Applied Biosystems) に加え、95  $^{\circ}\text{C}$  で 3 分加熱変性させたのちに急冷し、Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer を用いて電気泳動を行った。解析には GeneMapper<sup>®</sup> ID-X software v.1.4 (Applied Biosystems) を用い、UCSC *simpleRepeat* database (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) および GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) に登録されている塩基配列をもとに各アレルの PCR 産物の長さを計算し、バーチャルピン (図 2-1) を設定した。



### 2-2-3 プライマー

Wictum らの設計したプライマーは、すべてのフォワードプライマーが蛍光標識されており、特異性の向上と位置調整のため一部のリバースプライマーに PIG tail 配列 (Brownstein et al., 1996) と呼ばれる 7 bp (GTTTCTT) を付加していた。しかしこれらのプライマーを用いて解析を行ったところ、一部の座位に先端が 2 つに割れたように見える「スプリットピーク」が見られた。これは不完全なアデニン付加 (Smith et al., 1995; Magnuson et al., 1996) が原因であると考えられたため、スプリットピークが確認された VGL0760, VGL2409, VGL3008 および VGL3438 の 4 座位について、プライマーの改良を行った。

### 2-2-4 アレリックラダーマーカの作製

各アレルのホモ個体の塩基配列を決定し、くり返し回数を確認した。対象座位のフォワードおよびリバースプライマー 12.5  $\mu$ M, 2.5 U AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA polymerase (Applied Biosystems), 1 $\times$  AmpliTaq Gold<sup>®</sup> PCR Buffer (Applied Biosystems), 200  $\mu$ M dNTPs (Invitrogen), 1 ng の鋳型 DNA を含む 25  $\mu$ L の反応液中で PCR 増幅を行い、増幅産物を PCR purification Kit (Edge Bio) を用いて精製したのち、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてダイレクトシーケンシングを実施した。Sequence purification kit (Edge Bio) を用いて精製したのち、3130xl Genetic Analyzer で泳動し、Sequencher (Gene Codes Corporation) で解析して塩基配列を決定した。なお、プライマーは蛍光標識されていないものを用い、シーケンス反応はフォワードとリバースの両方について行い、配列が一致することを確認した。

配列を確認したのち、精製した PCR 産物 5  $\mu$ L を 1500  $\mu$ L の TE buffer (Invitrogen) で希釈し、各アレルのストック溶液とした。ストック溶液を混合し、アレル間のピークバランスを整えたのちに濃度調整を行い、改良した DogFiler で PCR 増幅したものをアレリックラダーマーカとした。

### 2-2-5 再現性の確認

データの再現性と安定性を確認するため、PCR 装置を GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700 (Applied Biosystems) に変更し、同じ条件で再度解析を行った。

## 2-3 結果

### 2-3-1 PCR 条件の設定と GeneMapper ID-X への適合

Wictum らのプライマー (Wictum et al., 2013) を用いて解析を行ったところ、ピークの先端が 2 つに割れたように見えるスプリットピークが 4 つの座位 (VGL0760, VGL2409, VGL3008 および VGL3438) に認められた。検査座位によっては 1 塩基違いのアレルが存在するため、スプリットピークは型判定の妨げとなることが想定される。そこで VGL0760 のリバースプライマーに PIG tail 配列 (GTTTCTT) を付加し、VGL3008, VGL3438 および VGL2409 の各プライマーペアの標識を逆にしたところ改善が見られたため、本研究ではこれらの改良プライマーを用いることとした。その他のプライマーはいずれも Wictum らの報告通りの修飾を施し、表 2-2 のとおり、各プライマーの最終濃度を 0.02~0.15  $\mu\text{M}$  に設定した。検討の結果、プライマー濃度は 0.02~0.15  $\mu\text{M}$ 、鋳型 DNA 量は 2.0 ng でデータを安定して得られるようになった。スタッター比は座位によって異なるが、いずれの座位においても 25 %未満であった。

104 頭のサンプルを解析した結果、VGL0760 の 10 アレル、VGL0910 の 5 アレル、VGL1063 の 8 アレル、VGL1165 の 7 アレル、VGL1541 の 6 アレル、VGL1606 の 6 アレル、VGL1828 の 7 アレル、VGL2009 の 4 アレル、VGL2136 の 7 アレル、VGL2409 の 6 アレル、VGL2918 の 7 アレル、VGL3008 の 7 アレル、VGL3112 の 5 アレル、VGL3235 の 8 アレル、VGL3438 の 9 アレルについてホモ接合の個体が認められた。これらのサンプルのホモ接合座位についてシーケンス解析を行い、塩基配列からくり返し回数を確認したのち、PCR 産物を希釈して各アレルのストック溶液とした。ストック溶液を混合して DogFiler で増幅し、アレリックラダーマーカを作製した (図 2-2)。アレリックラダーマーカに含まれないアレルについては、PCR 産物の鎖長から推定した検出位置とヘテロ接合体におけるピーク検出位置を参考に、バーチャルビンの位置を再調整した。これにより、バーチャルビンが多数存在する状態ではあるが、電気泳動の誤差をアレリックラダーマーカで自動補正する GeneMapper® ID-X の機能 (ビンのオフセット機能) を使用できる状態となった。解析結果の 1 例を図 2-3 に示す。

### 2-3-2 再現性

データの再現性と安定性を確認するため、PCR 装置を GeneAmp® PCR system 9700 に変更し、同じ条件で再度解析を行った。解析の結果、ピークバランスに若干の違いは認められたものの、すべてのサンプルについて同じ STR 型が検出された。

## 2-4 考察

DogFiler を日本の法科学鑑定に適用することを目的として、客観性、再現性、簡便性を確保できるよう、検査の条件設定を行った。DogFiler は、15 座位の STR 型と Y 染色体の有無を 16-plex PCR で解析するイヌの DNA 型検査法であり、検査座位がいずれも 4 塩基の反復配列で、一度の PCR と電気泳動で解析可能であり、PCR 産物の長さなどもヒトの DNA 型検査キットに類似している (Blackie et al., 2015)。しかし解析ソフトとして GeneMapper®を用いることや、プライマー濃度および鋳型量を固定しないこと、PCR 産物を希釈してキャピラリー電気泳動に供することなどが現在の日本の法科学分野で行われている DNA 型鑑定とは異なっており、Wictim らの報告のままでは鑑定実務に導入することが難しく、改良を加える必要があった。

そこでまず、法科学鑑定になじみやすいヒトの DNA 型鑑定手法を参考に、泳動に用いる PCR 産物を原液 1  $\mu$ L に変更し、泳動には 3130xl Genetic Analyzer を、解析には GeneMapper® ID-X software v.1.4 を用いることとして、それに合わせた PCR 組成の見直しを試みた。まず初めに、すべてのプライマーを同濃度で混合して様々な鋳型量で PCR を行い、理論値で設定したバーチャルビンを用いて解析し、そこからプライマー濃度を変更することですべての座位のピークが検出される条件を模索した。座位間のバランスを整えるべく、さらにプライマー濃度と鋳型量の調整を行い、表 2-2 に示すプライマー濃度で鋳型 DNA 量を 2.0 ng としたときに、最も安定してすべての STR 型を検出できた。

検討を進める中で、ピークの先端が 2 つに割れたように見える「スプリットピーク」が 4 つの座位に認められた。Taq ポリメラーゼの特性として、PCR 産物の 3'末端に非特異的な塩基 (主にアデニン) が 1 塩基付加される場合があることが知られている (Magnuson et al., 1996; Smith et al., 1995)。このアデニン付加が不完全であると、-A ピークと+A ピークの 2 つのピークが 1 塩基差の位置に検出され、スプリットピークとなる。アデニン付加の程度は、プライマーの塩基配列に影響されることが知られており、特に PIG tail 配列と呼ばれる GTTTCTT の 7 塩基はアデニン付加を促進することがわかっている (Brownstein et al., 1996)。そのため、DogFiler もリバースプライマーの多くに 5'末端修飾として PIG tail 配列を用いている (Wictim et al., 2013)。しかしいくつかのプライマーにはこの修飾が施されておらず、その原因として、座位間の検出位置の都合上 PIG tail 配列を付加できなかったことや、Wictim らの実験条件や検査機器ではスプリットピークが検出されなかった可能性が考えられる。そこで、修飾されていない VGL0760 のリバースプライマーに PIG tail を付加し、PIG tail が付加されているにも関わらずスプリットピークが検出された

VGL2409 および VGL3008, 検出位置の都合上 PIG tail 付加ができない VGL3438 の 3 組のプライマーについては, 蛍光標識をリバースプライマーに変更した (表 2-2 参照).

電気泳動の際には, PCR 産物とともにサイズマーカーを流し, 鎖長の目安とするのが一般的である. しかし, 電気泳動における DNA 断片の移動度は, 鎖長だけでなく塩基配列にも依存することがわかっており (Frank and Köster, 1979), STR 型を正確に検査するためには, 各断片の配列を反映したアレリックラダーマーカーを用いることが必要となる (Puers et al., 1993). 現在, 日本の科学警察研究所および科学捜査研究所では, 客観的な型判定を行うために, ビンオフセッティング機能を備えた GeneMapper® ID または ID-X を用いることとしている. ビンオフセッティング機能とは, 各アレルの増幅産物を混合したアレリックラダーマーカーをサンプルと並行して泳動し, そのアレリックラダーマーカーのピーク位置にビンを移動することで, 泳動間の誤差を補正するものである. 本研究では, 一般家庭で飼育されているイヌ 104 頭 (24 犬種と雑種) から抽出した DNA を用い, 各座位のホモ接合サンプルの配列をシーケンス法によって確認し, アレリックラダーマーカーの作製を行った. さらに, ヘテロ接合サンプルのピーク検出位置を参考にバーチャルビンを調整し, 本検討で検出されたすべてのアレルについてビンを設定した. GeneMapper® ID および ID-X においては, 各検査座位におけるアレリックラダーマーカーのピーク間の距離を補正に用いるため, 各座位に最低でも 2 つのアレルが求められる. SRY (Y 染色体検出座位) は, 本来 PCR 産物が 1 種類しか生じないためビン設定およびピーク検出が不可能であったが, PIG tail を付加した産物と付加していない産物の 2 種類をアレルとすることでこの機能に適合させた.

アレリックラダーマーカーには, すべてのアレルが含まれることが理想的である (Bar et al., 1997). しかし, 全アレルが含まれていなくても補正は可能であり, 市販のヒト DNA 型検査キット (AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit, PowerPlex® Fusion, GlobalFiler™ Kit) においても, バーチャルビンはある程度許容されている. 本研究で作製したアレリックラダーマーカーではいまだバーチャルビンが多数存在する状態ではあるが, ビンオフセッティング機能を使用できる状態となり安定したデータが得られるようになったため, 検査の客観性や再現性は向上した. また, ビンを手動で補正する必要がなくなったため, 簡便性は大きく向上した. ただし, 各検査座位における最短アレルと最長アレルはラダーマーカーに含まれることが望ましく, 今後アレリックラダーマーカーの拡充を図ることでさらなる客観性の向上が期待できる.

最適なプライマー濃度と鋳型 DNA 量を固定し、キャピラリー電気泳動に PCR 産物の原液を用い、泳動には 3130xl Genetic Analyzer を、解析には GeneMapper® ID-X software v.1.4 をそれぞれ用いることで、客観性、再現性、簡便性を向上させるとともに、現在の日本の法科学鑑定になじみやすくなり、実務導入の条件が整った。

## 2-5 小括

本章では、DogFiler を日本の法科学鑑定に適用することを目的として、客観性、再現性、簡便性を確保できるよう検査の条件設定を行った。検討には一般家庭で飼育されているイヌ 104 頭（24 犬種と雑種）から抽出した DNA を用い、2 ng を鋳型として全座位を解析できる条件を模索した。法科学鑑定になじみやすいようヒトの DNA 型鑑定手法を参考にして、泳動に用いる PCR 産物を原液 1  $\mu\text{L}$  に変更し、泳動には 3130xl Genetic Analyzer を、解析には GeneMapper<sup>®</sup> ID-X を用いることとして、それに合わせた PCR 組成の見直しを行った。また、プライマーの修飾および標識を変更し、スプリットピークを解消した。各座位のホモ接合サンプルの配列をシーケンス法によって確認し、アレリックラダーマーカを作製し、GeneMapper<sup>®</sup> ID-X に適合させ、電気泳動の誤差をアレリックラダーマーカで自動補正する客観的な判定を可能にした。バーチャルビンが多数存在する状態ではあるが、ビンオフセット機能を使用できる状態となり、安定したデータが得られ、再現性や簡便性が向上した。

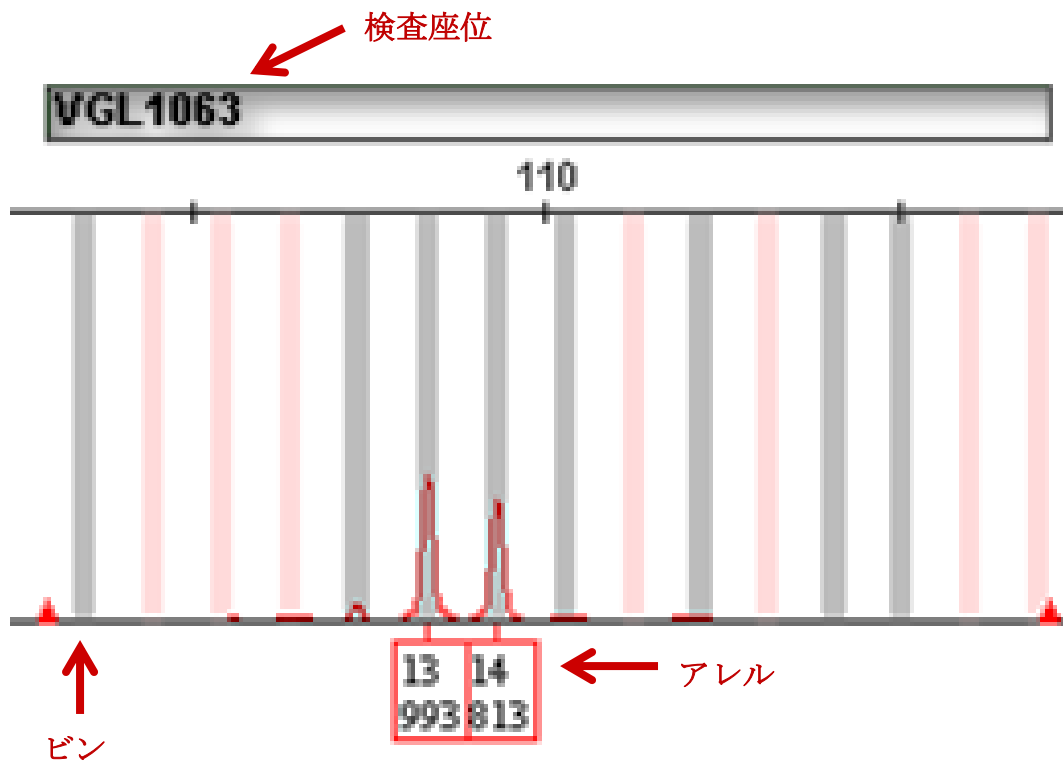


図 2-1 用語説明

各検査座位について、STR のくり返し回数をアレルとし、各アレルの理論上の検出位置にビンを設定することで、ビンの中に現れたピークが判定される。グレーのビンはアレリックラダーマーカーによって補正されているが、ピンクのビンはアレリックラダーマーカーに含まれていないアレルを定義している（バーチャルビン）。この例では、検出アレルは「13」および「14」であり、STR 型は「13, 14 型」となる。

表 2-1 検討に用いたイヌの内訳

犬種	頭数
ウェルシュ・コーギー	1
シェットランド・シープドッグ	1
ジャックラッセルテリア	1
ダックスフンド	1
ビアデッドコリー	1
ペキニーズ	1
ボーダー・コリー	1
キャバリア	2
グレートピレニーズ	2
ケアンテリア	2
バーニーズマウンテンドッグ	2
フレンチ・ブルドッグ	2
マルチーズ	2
ミニチュア・シュナウザー	2
ポメラニアン	3
シー・ズー	4
シバイヌ	5
パピヨン	5
ラブラドル・レトリバー	5
ビーグル	6
ヨークシャー・テリア	8
ミニチュア・ダックスフンド	9
トイ・プードル	13
チワワ	15
雑種	10

血統証明書の確認はしておらず、犬種の決定は飼い主の申告または獣医師の判断によって行われた。



表 2-2 プライマー一覧

検査座位	フォワードプライマー		リバースプライマー		最終濃度 ( $\mu\text{M}$ )
	5'末端修飾	配列	5'末端修飾	配列	
VGL0760	6-FAM	GCAGATTCAGGACAAAGACCA	<b>GTTTCTT</b>	GGCCCAGAAAAGGATAGGAG	0.03
VGL0910	NED	ACACTTGCTCCCACGTTCTT	GTTTCTT	ACCTTATGCCCAAAGCGTGT	0.03
VGL1063	PET	AGCCACAGAGCCTGAGAGTG	GTTTCTT	CAATCACCACCTTCCCTCCT	0.02
VGL1165	VIC	ATCTTCCTCTGGCACCACCT	GTTTCTT	GGCCCTAAATCCCATGACTG	0.15
VGL1541	6-FAM	GAGCTCCTGATGGAAGAGCTTA	GTTTCTT	CATCCTGTCCGTGACTTCAA	0.10
VGL1606	PET	AGCCTTCGGGGTCAGATGT	GTTTCTT	CCCACACTGAAGCTAAACTGC	0.04
VGL1828	NED	AGATTGCGCCTTTGGAAGT	GTTTCTT	CTTTTGGCTTCCTGCTCTGT	0.08
VGL2009	<b>GTTTCTT</b>	CCATTTACCAGAATTTGAAGCTG	<b>PET</b>	CCCGGGAAACTTTTCTGAAT	0.08
VGL2136	VIC	TGCCAACTGTTTTTAAAGGTAACA	untailed	GCATGGAGAAAAAGCAGGTG	0.13
VGL2409	NED	AAGCAGGTGCTTCAACCTCTG	GTTTCTT	AGGATAGACCTCCATAACTGACCA	0.08
VGL2918	PET	GATTCTTCCTGGATATGCTGCTTT	untailed	GGAAACATGTGTTTTCCCTTCA	0.09
VGL3008	<b>GTTTCTT</b>	AGAACACGGTTATTTGCTAGGC	<b>6-FAM</b>	AAGAGCCAACAGCAGCAGA	0.03
VGL3112	NED	AGCCAATAGAGCATTAAAGTAGAGCTG	GTTTCTT	TTGTGTAATGTGTGAATTTAAGGGAAT	0.08
VGL3235	VIC	GGCGACTCTTCTCCCTTTCTT	GTTTCTT	TCTGGACTGAGACAGTCTGAAAAT	0.05
VGL3438	<b>untailed</b>	ACGCTTGTGGGTGCTACACT	<b>VIC</b>	AGCAGTGATGAGCAGAGATGG	0.04
SRY	NED	GAACGCATTCTTGGTGTGGT	untailed	TGATCTCTGAGTTTTGCATTTGG	0.04

VGL0760, VGL2009, VGL3008 および VGL3438 の各プライマーの 5'末端修飾を変更した。改良点を赤で示した。

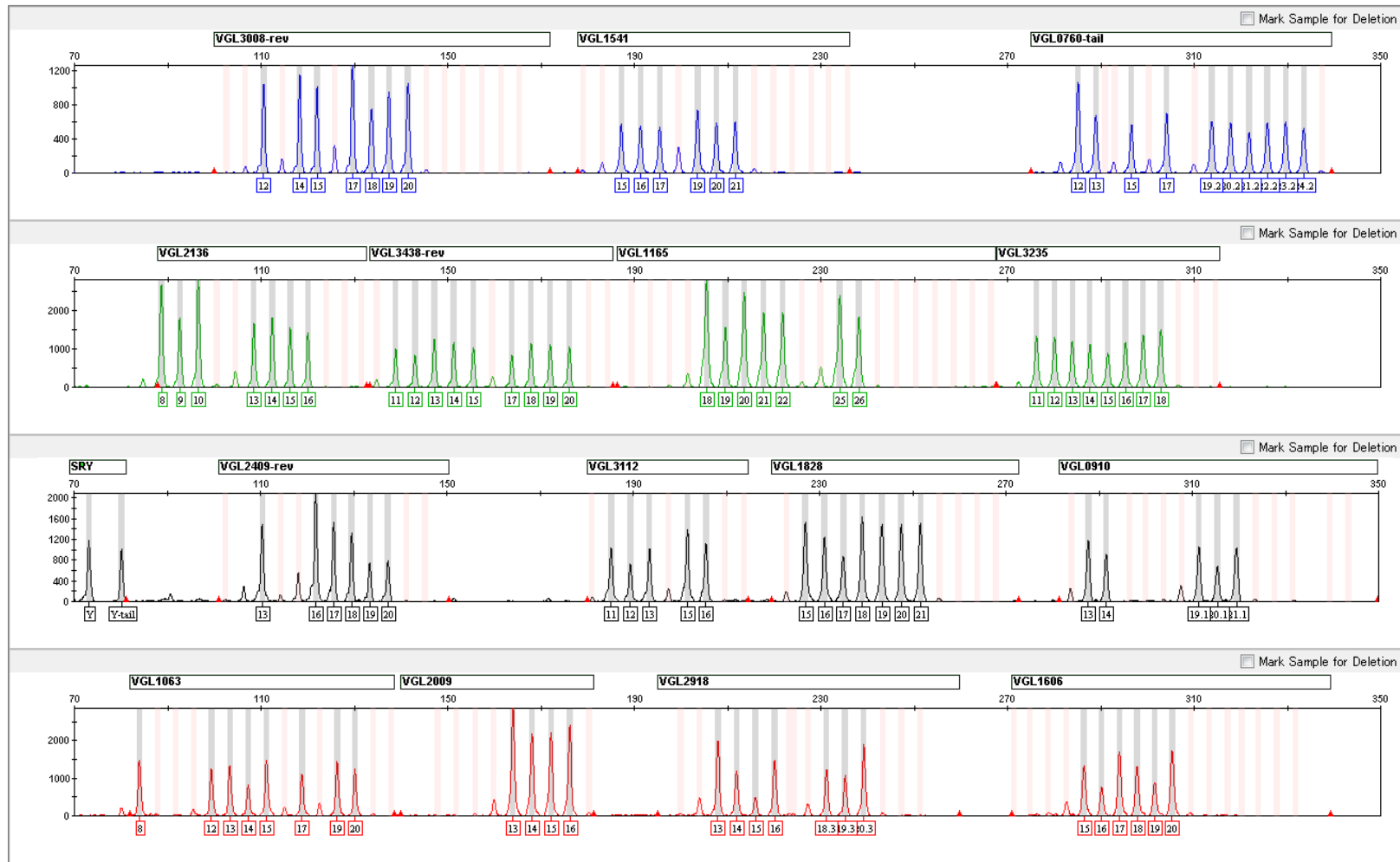


図 2-2 アレリックラダーマーカー

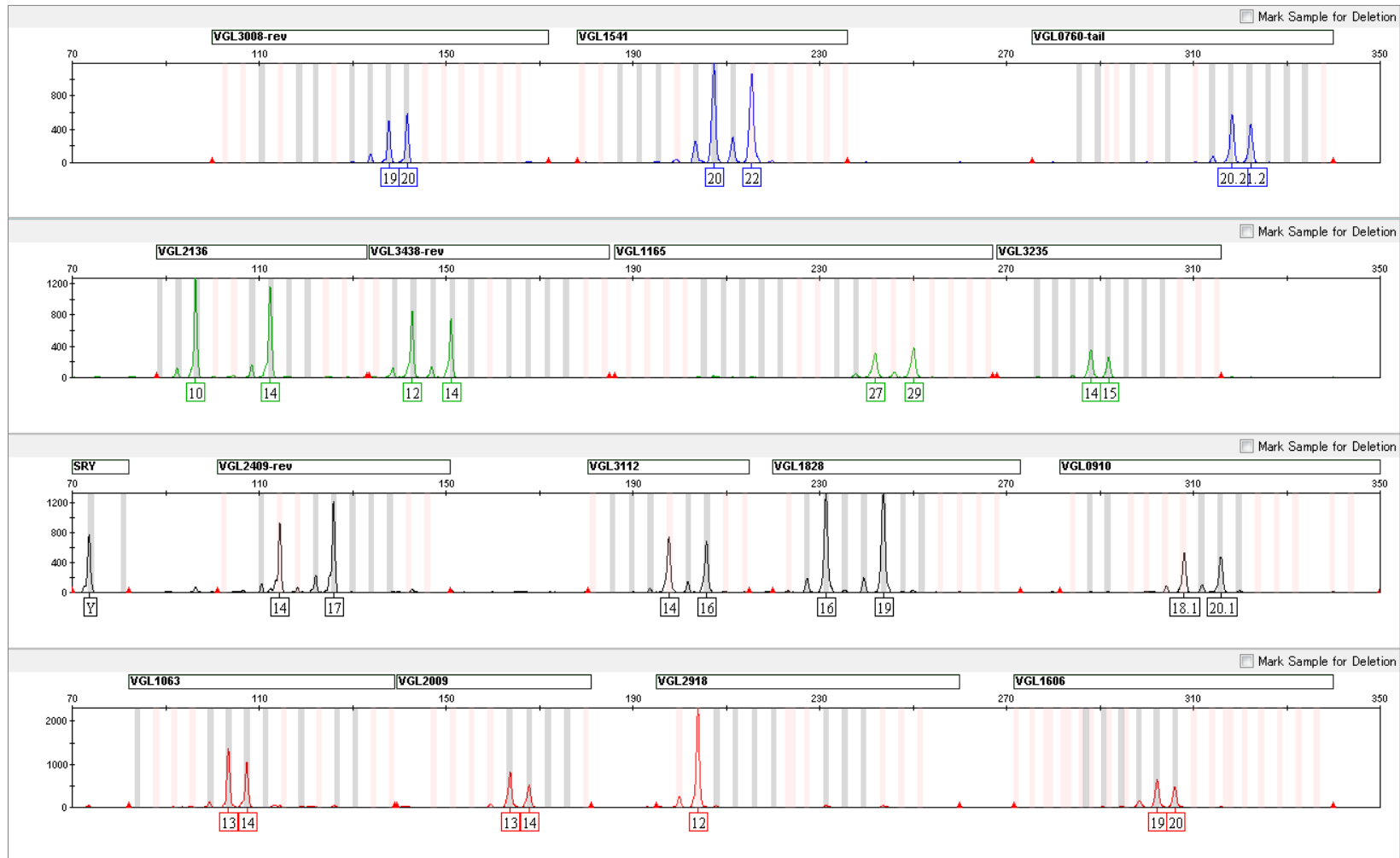


図 2-3 解析データの一例

## 第 3 章

### ランダムサンプリング群解析による多型性の評価

## 3-1 緒言

### 3-1-1 イヌの繁殖と血統管理

イヌが国境を越えるためには、様々な手続きが必要となる。たとえば日本に入国する場合、国際標準規格 (ISO) 11784 及び 11785 に適合するマイクロチップを埋め込み、狂犬病予防注射 (不活化ワクチンまたは組み換え型ワクチン) を 2 回接種し、狂犬病抗体検査を行い、180 日以上輸出前待機期間を経て検疫所へ事前に届出をし、輸出国の証明書を取得して輸出前検査および輸入検査を受ける必要がある (総務省「犬、猫を輸入するには」：<http://www.maff.go.jp/aqs/animal/dog/import-index.html>)。日本を含む狂犬病が根絶された国においては、特にイヌの出入国に関して規制が厳しい傾向にある。また航空会社によっては、高温多湿に弱く気道が狭い短頭種 (ブルドック、パグ、シー・ズーなど) の搭乗が制限されるなど、移動手段の面からもイヌの長距離移動は難しい。

イヌの繁殖は主にそれぞれの国や地域の中で行われており、繁殖に関する法規制や血統の管理もそれぞれの国で独自に行われている。血統証明書を発行する団体は数百に上り、国や団体によっては独自の犬種標準を設けているため、同じ犬種名であっても同じ基準で認定されているわけではない。さらに、文化、流行、住宅事情などによって人気犬種が異なるため、集団構造も大きく異なる。こうした事情から、イヌの遺伝的多様性には地域差が生じていると考えられる。

### 3-1-2 日本とアメリカにおける集団構造

法科学鑑定として DNA 型検査を行う場合、精度や多型性を評価するためには集団データ (population data) の蓄積が必要となる。DogFiler については、Wictum らがアメリカのイヌ 2,234 頭についてデータを公開しているが (Wictum et al., 2013), 日本とアメリカにおける人気犬種は大きく異なる (表 3-1)。2014 年の JKC (日本) の登録頭数 (JKC 犬種別犬籍登録頭数：[http://www.jkc.or.jp/modules/publicdata/index.php?content\\_id=17](http://www.jkc.or.jp/modules/publicdata/index.php?content_id=17)) によると、トイ・プードル 79991 頭、チワワ 53630 頭、ミニチュア・ダックスフンド 23533 頭と、小型犬種に人気が集まっているのに対し、AKC (アメリカ) の登録数 (Most Popular Dog Breeds in America : <http://www.akc.org/news/the-most-popular-dog-breeds-in-america/>) では、ラブラドル・レトリバー、ジャーマンシェパード、ゴールデン・レトリバーという大型犬種に人気が集まっている。また、アメリカでは人気の高いブルドッグやボクサーは、日本では登録数が少ない。このような犬種の集団構成の違いから考えると、日本とアメリカにおけるイヌの遺伝的多様性は異なることが予想される。

本章では，日本国内のイヌの多型性を評価することを目的とし，2000頭を目安にランダムサンプリングを行い，アレル頻度データを蓄積したのち統計学的な解析を行った．各種多型性指標を確認するとともに，WrightのF統計量も算出し，犬種間分化を確認した．

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 サンプル

本検討には一般家庭で飼育されているイヌ 1992 頭の血液サンプルを用いた。81 犬種の純血種 1847 頭と 145 頭の雑種が含まれており、性別は雌が 1057 頭、雄が 935 頭であった。血液サンプルは東大附属動物医療センター、麻布大学附属動物病院にて獣医師が採取した血液検査残余血で、抗凝固剤として EDTA が添加されていた。なお、サンプルは飼い主の同意のもとに麻布大学バイオバンクプロジェクトに提供されたものである。

DNA 全血キット L (KURABO) と QuickGene-610L (KURABO) を用い、プロトコールに従って血液 2 mL から DNA を抽出、精製し、500  $\mu$ L の TE バッファー (pH8.0) (Wako) で溶出した。定量には NanoVue を用い、吸光度測定によって DNA の濃度を決定した。

### 3-2-2 多型解析

第 2 章で改良した DogFiler を用いて、15 座位の STR 型および SRY のマルチプレックス PCR 増幅を行った。PCR 反応液量は 25  $\mu$ L とし、プライマー配列および PCR 条件は第 2 章のとおりである。得られた PCR 産物 1  $\mu$ L と Gene Scan 600 LIZ Size Standard 0.3  $\mu$ L を 10  $\mu$ L の Hi-Di™ Formamide に加え、95 °C で 3 分加熱変性させたのちに急冷し、Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer を用いて電気泳動を行った。なお、各ランに 1 ウェルずつアレリックラダーマーカールを入れ、同時に泳動した。解析は GeneMapper® ID-X software v.1.4 を用いて行った。

### 3-2-3 不偏性の確認

一般的に大学附属の動物病院は、二次医療施設として重症な患畜が集まる傾向にあるため、「国内のイヌ」という集団を正しく反映できていない可能性が考えられた。そこで、この「ランダムサンプリング群」に含まれていた大学附属病院にて採取したチワワ、トイ・プードル、シバイヌのサンプルと、全国の動物病院にて採取された同犬種のサンプルとを比較し、不偏性を確認した。

3 犬種それぞれについて 100 頭（大学附属病院採取個体および一般動物病院採取個体各 50 頭）の遺伝的距離を算出し、樹形図によって偏りを確認した。PHYMLIP version 3.695 (Felsenstein, 2013) を用い、遺伝的距離として各個体間の Nei's standard genetic distance (Nei, 1972) を算出したのち、近隣結合法 (Neighbor-Joining 法) により樹形図を作成し、MEGA6 (Tamura et al., 2013) で色分けの処理をした。

### 3-2-4 多型性指標

蓄積した集団データからアレル頻度を算出し、統計学的に解析して検査座位の有用性を検討した。DNA型検査における有用性の評価指標としてさまざまなものが提案されているが、本研究ではヘテロ接合度、識別能、偶然一致率、多型情報含有値を用いることとし、Cervus 3.0.7 (Kalinowski et al., 2007) を用いて算出した。

以下、 $p_i$ はある座位における  $i$  番目のアレルの出現頻度、 $n$ はその座位におけるアレル数とする。

#### ヘテロ接合度 (observed heterozygosity : $H_O$ , expected heterozygosity : $H_E$ )

ヘテロ接合度は異型接合度とも呼ばれ、検査座位の多型性を評価する尺度となる。ヘテロ接合度は検査した集団においてヘテロ接合体となる個体の割合であり、観測値と期待値を算出することによって集団の分化や偏りを解析することができる。観測値  $H_O$  はヘテロ接合体 (2つの異なるアレルをもつ) 個体数を全体数で割って計算する。期待値  $H_E$  は、理論的なヘテロ接合体の出現確率で、集団から無作為に選出した 2つのアレルが異なる確率として定義され、アレル頻度から次の式で計算される。

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

#### 識別能 (power of discrimination : PD)

識別能は、個体識別における検査座位の有用性を評価する尺度となる。遺伝子型頻度を 2乗したものの総和を 1 から引いて計算されるので、ホモ接合体とヘテロ接合体に分けて次の式で求める。

$$PD = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^4 - \sum_{j>i}^n 4(p_i p_j)^2$$

#### 偶然一致率 (combined match probability : MP)

偶然一致率はある座位または全検査座位を総合して、2つの別個体が同じ遺伝子型を示す確率である。本研究では 15 座位を総合した combined match probability を MP と表し、次の式によって計算する。

$$MP = \prod_{i=1}^n (1 - PD_i)$$



### 多型情報含有値 (polymorphic information contents : PIC)

多型情報含有値は、血縁関係の証明を行う際の有用性を評価する尺度となる。ある座位において、子がもっている 2 つのアレルがそれぞれどちらの親に由来するものかを判断できる確率である。次の式のように、子がホモ接合体である確率と、子と両親が同じヘテロ接合体である確率を 1 から引いて、求める。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{j>i}^n 2(p_i p_j)^2$$

### **3-2-5 Wright の F 統計量**

遺伝的分化の度合いを評価する指標として、Wright らによって提唱された F 統計量 (Wright, 1949) が用いられる。F 統計量には  $F_{ST}$ ,  $F_{IT}$ ,  $F_{IS}$  の 3 種がある。以下、 $H_T$  は全集団におけるヘテロ接合度期待値、 $H_S$  は分集団におけるヘテロ接合度期待値、 $H_I$  は分集団におけるヘテロ接合度観測値とする。

#### 固定指数 ( $F_{ST}$ )

全集団に対して、分集団間の遺伝的分化の程度を示す指標。1 に近いほど分集団間の分化が見られ、0 に近いほど分集団の構成が似ていることを表す。移入がなければ世代を経るごとに  $F_{ST}$  は増加する。特に分集団が小さいほど急速に分化しやすい。

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

#### 全集団における近交係数 ( $F_{IT}$ )

全集団における個体レベルでの近親交配の度合いを示す指標。近親交配によってヘテロ接合度が下がるほど 1 に近づく。

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

#### 分集団における近交係数 ( $F_{IS}$ )

分集団における個体レベルでの近親交配の度合いを示す指標。近親交配によってヘテロ接合度が下がるほど 1 に近づく。

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S}$$

### 3-3 結果

#### 3-3-1 ランダムサンプリング群の不偏性

チワワ、トイ・プードル、シバイヌについて、大学附属病院にて採取されたサンプル各 50 頭分と、全国の動物病院にて採取された同犬種のサンプル 50 頭分のデータを合わせ、それぞれ Nei's Standard Genetic Distance を算出して系統樹を作成した (図 3-1~3). 大学附属動物病院にて採取されたサンプルを赤色、一般動物病院で採取されたサンプルを茶色で示した. いずれの犬種においても大きな偏りは認められなかった.

各犬種内における 2 つの分集団の  $F_{ST}$  を算出したところ、チワワでは大学附属病院採取個体 0.006, 一般動物病院採取個体-0.005, トイ・プードルでは大学附属病院採取個体 0.015, 一般動物病院採取個体-0.017, シバイヌでは大学附属病院 0.003, 一般動物病院-0.004 であった. いずれも低い値を示し、顕著な遺伝的分化は認められなかった.

#### 3-3-2 多型性と識別能

一般家庭飼育個体 1992 頭について解析を行い、アレル頻度データを蓄積し、多型性指標を算出した. 各座位におけるアレルの頻度分布を、Wictum らのデータとともに図 3-4 に示した. 各座位の頻度分布はよく類似しているが、日本で検出率の高いアレル、アメリカで検出率の高いアレルがそれぞれいくつか見られた. 顕著な差が見られたのは VGL1165 と VGL3008 で、日本における VGL1165 の 19 型アレルの検出率がアメリカの 2.0 倍、VGL3008 の 18 型アレルの検出率がアメリカの 1.7 倍であった.

多型性指標を算出したところ、各座位のアレル数 ( $n_A$ ) は 9~28 (平均 17.1), ヘテロ接合度の観測値 ( $H_o$ ) は 0.62~0.75 (平均 0.71), ヘテロ接合度の期待値 ( $H_e$ ) は 0.79~0.91 (平均 0.85), 識別能は 0.93~0.99 (平均 0.96), 多型情報含有値は 0.76~0.91 (平均 0.83) であった. VGL0760, VGL0910, VGL1606 においては、4 塩基の反復配列に 1~3 塩基が付加された変則的なアレルが多数認められ、アメリカで報告されたアレルと合わせると  $n_A$  が 30 以上となった. なお、これらの付加された塩基は小数で表され、4 塩基単位の STR における長さが 57 であった場合 14.1 型と表記される (Bar et al., 1997). 一方 VGL3112 や VGL2009 においては、 $n_A$  がそれぞれ 9 および 10 と少なく、変則的なアレルは認められなかった. PD はいずれの座位においても 0.9 以上となり、多型性の高さが示された. 15 座位を総合した偶然一致率は  $3.73 \times 10^{-22}$  と極めて低く、十分な識別力が認められた.

検査した 15 座位のすべてで STR 型が一致する個体はなく、すべての個体を識別することが可能であった.

### 3-3-3 遺伝的分化

アレル頻度から計算されるヘテロ接合度の期待値が 0.79~0.91 (平均 0.85) であったのに対し、ヘテロ接合度の観測値は 0.62~0.75 (平均 0.71) といずれの座位においても低く、遺伝的な偏りが示唆された。そこで 1992 頭をイヌ集団全体とし、この群に 20 頭以上の個体が含まれていた 23 犬種 (n=23~319, 平均 70) を分集団として、分集団間の遺伝的分化の程度を示す指標である  $F_{ST}$  を算出した。その結果、最小値は 0.048 (チワワ, n=113), 最大値は 0.287 (ミニチュア・シュナウザー, n=49) で、23 犬種の平均は 0.163 となった。雑種 (n=145) の  $F_{ST}$  は 0.006 であり、いずれの犬種もこの値を上回ったため、遺伝的集団間分化によるアレルの偏りがあるものと考えられた。

### 3-4 考察

犬種の認定や繁殖の管理は各国のケネルクラブがそれぞれ独自に行っており、遺伝的多様性には地域差があると考えられている。そのため先にも述べた通り、DNA型検査法を法科学鑑定に適用する際には、国内における各アレルの出現頻度データを蓄積し、多型性や識別力を評価する必要がある。そこで本章では、一般家庭飼育個体 1992 頭 (81 犬種と雑種) を「ランダムサンプリング群」として解析し、DogFiler 検査座位におけるアレル頻度データの蓄積と多型性の評価を行った。

近年、純血種における近親交配とそれにとまなう遺伝性疾患の定着が問題視されている (Bellumori et al., 2013; Farrell et al., 2015)。遺伝性疾患の中には、最悪の場合死に至るほど重症化するものもあり、これらの疾患を抱えたイヌは二次医療施設へと紹介される可能性が高い。アレル頻度データの蓄積に際しては、その集団の多様性を偏りなく抽出するため、ランダムなサンプリングを行うことが求められるが (Banerjee and Chaudhury, 2010)、本解析に用いたサンプルは、二次医療施設にて採取されたものであり、「国内のイヌ」という集団の遺伝的多様性を正しく反映できていない可能性が考えられた。しかし、この「ランダムサンプリング群」のサンプルと全国の動物病院にて採取された同犬種のサンプルとを比較したところ、2 群間で遺伝的多様性に大きな差はなく、個体間の遺伝的距離にも偏りは見られなかった。ランダムサンプリング群は、正しく国内のイヌを反映していると考えられた。

DogFiler の検査座位はいずれも非コード領域に存在する STR であり、自然選択の影響を受けにくく、変異が生じやすく蓄積されやすいという性質がある。イヌの交配は主に外見的特徴や行動特性などの表現型依存的に行われるが、解析した検査座位はいずれも直接的に表現型には寄与していない。そのため、検査座位の STR が、選択の対象となった表現型を決定する遺伝子や犬種特異的な病弱性と関連のある遺伝子と独立して遺伝したものと推察された。

解析の結果、各座位のアレル数 ( $n_A$ ) は 9~28、ヘテロ接合度の期待値 ( $H_E$ ) は 0.79~0.91、識別能 (PD) は 0.93~0.99、多型情報含有値 (PIC) は 0.76~0.91 と算出された。(1-PD) の総乗によって求めた偶然一致率は  $3.73 \times 10^{-22}$  となり、国内のイヌの飼育頭数が約 1 千万 ( $10^7$ ) であることを考えると、識別力は極めて高いといえる。ヒトの DNA 型鑑定に用いられている AmpF $\ell$ STR $^{\text{®}}$  Identifiler $^{\text{®}}$  Kit における偶然一致率は  $1.8 \times 10^{-17}$  と報告されており (Yoshida et al., 2005)、十分な多型性が認められると言える。

しかし、アレル頻度から計算される  $H_E$  が 0.79~0.91 (平均 0.849) であったのに対し、ヘテロ接合度の観測値 ( $H_o$ ) は 0.62~0.75 (平均 0.706) といずれの座位においても低く、遺伝的な偏りが示唆された。そこで、このランダムサンプリング群の中に 20 頭以上の個体が含まれていた 23 犬種 ( $n=23\sim 319$ , 平均 70) を分集団とし、Wright の F 統計量の 1 つである  $F_{ST}$  を算出した。Wright の F 統計量には、固定指数  $F_{ST}$ 、全集団内近交係数  $F_{IT}$ 、分集団内近交係数  $F_{IS}$  の 3 種があり、いずれもアレルの頻度分布を反映する  $H_E$  と各個体の両親の近親度を反映する  $H_o$  を用いて計算される。 $F_{ST}$  は、全集団 (イヌ) の  $H_E$  と分集団 (各犬種) の  $H_E$  を比較することで、アレルの頻度分布の偏りを評価し、分集団間における遺伝的分化の度合を示す指標である。

解析の結果、 $F_{ST}$  の最小値は 0.048 (チワワ,  $n=113$ ), 最大値は 0.287 (ミニチュア・シュナウザー,  $n=49$ ) で 23 犬種の平均値は 0.163 となった。雑種 ( $n=145$ ) の  $F_{ST}$  を計算したところ 0.006 と算出され、純血種の  $F_{ST}$  の値はいずれも雑種の値を大きく上回っており、選択的な犬種内交配による遺伝的集団間分化によって、犬種間でアレルの偏りが生じたと考えられる。犬種を確立する際には、外見をもとに極端な形質をもった個体や他犬種個体との交配をくり返し、意図する形質をもった個体を選抜し、犬種としての特長を表現型で決定していく (Irion et al., 2003)。しかしひとたび犬種が確立されると、純血種の維持、管理には血統証明書が用いられ、血統 (血縁関係) が重視される。両親の犬種が同じであれば、それがそのまま子の犬種となり、犬種間交雑によって産まれたイヌの子孫は原則として純血種には戻れないため、血統証明書を得心するには犬種内での交配を続けていくことになる。そのため、世代を重ねるごとに犬種間の分化は進行すると考えられる。これまでも犬種間の分化は報告されており、検査座位はそれぞれ異なるが、Wictum らは 0.124, Halverson らは 0.123, Ogden らは 0.186 と報告しているほか、Irion らと Koskinen らはともに純血種における  $F_{ST}$  を 0.23 程度と算出している (Halverson and Basten, 2005a; Irion et al., 2003; Koskinen and Bredbacka, 2000; Wictum et al., 2013; Ogden et al., 2012)。

以上のことから、DogFiler で使用されている座位について、ランダムサンプリング群によるアレル頻度の蓄積を行い、国内のイヌにおいて高い多型性が確認されたが、一方で、犬種間での遺伝的分化が明らかとなり、同一もしくは近縁の犬種を扱う際には注意が必要であることが示唆された。

アレル頻度の地域差を検討するため、Wictum らの報告にあったアメリカにおけるアレルの頻度分布を図 3-4 に重ねて示した。頻度分布はよく類似しているが、日本で検出率の高いアレル、アメリカで検出率の高いアレルがそれぞれいくつか見られた。これらのアレルを

細かく見ていくと、日本で検出率の高かったアレルはミニチュア・ダックスフンドやトイ・プードルによく見られるものが多く、アメリカで検出率の高かったアレルは、大型犬やブルドッグによく見られるものであり、各集団の犬種構成のちがいを反映しているものと考えられた。表 3-1 に示した JKC および AKC の登録数による日本とアメリカの人気犬種を比べてみると、共通する犬種は少なく、好まれるイヌの傾向が大きく異なることがわかる。人気犬種のちがいには様々な要因が考えられるが、日本とアメリカの場合、住宅事情が大きく影響していると考えられる。総務省が発行している「世界の統計 2006」(総務省統計研究所, 2006) によると、一軒あたりの平均床面積は、アメリカで約 162 m<sup>2</sup>、日本で約 95 m<sup>2</sup> と、アメリカのほうが 1.5 倍ほど広い。そのためアメリカでは大型犬種、日本では小型犬種に人気が集まると考えられる。また、流涎の多さから日本では敬遠されがちなブルドッグやボクサーは、アメリカでは人気が高く、屋内でも土足で生活する文化のアメリカでは、流涎に対して寛容であると推察される。

多型性指標を比較してみると、本研究における  $H_E$  の平均が 0.849、 $H_O$  の平均が 0.706 であったのに対し、アメリカではそれぞれ 0.859、0.709 と報告されており、両国におけるイヌ全体の多型性は同程度であると言える (Wictum et al., 2013)。

### 3-5 小括

本章では、日本国内における多型性を確認するため、ランダムにサンプリングした一般家庭飼育個体について解析を行った。この解析には麻布大学バイオバンクプロジェクトに提供された DNA サンプルを用い、1992 頭 (81 犬種と雑種) のランダムサンプリング群としてアレル頻度データを蓄積し、統計学的な解析を行った。解析の結果、各座位のアレル数は 9~28、識別能は 0.93~0.99、多型情報含有値は 0.76~0.91 と算出され、多型性の高さが示された。偶然一致率は  $3.73 \times 10^{-22}$  となり、国内のイヌの飼育頭数が約一千万 ( $10^7$ ) であることを考えると、識別力は極めて高いと言える。しかし、アレル頻度から計算されるヘテロ接合度の期待値に対し、ヘテロ接合度の観測値はいずれの座位においても低く、遺伝的な偏りが示唆された。23 犬種を分集団とし、Wright の F 統計量を算出したところ、分集団間の遺伝的分化の程度を示す指標である  $F_{ST}$  は、純血種で雑種よりも高い値となり、選択的な犬種内交配による遺伝的集団間分化によって犬種間でアレルの偏りが生じたと考えられる。日本国内のイヌにおいても高い多型性が確認されたが、一方で、犬種間での遺伝的分化が明らかとなり、同一または近縁の犬種を扱う際には注意が必要であることが示唆された。

表 3-1 人気犬種比較

	日本	アメリカ
1位	プードル	ラブラドル・レトリバー
2位	チワワ	ジャーマンシェパード
3位	ダックスフンド	ゴールデン・レトリバー
4位	ポメラニアン	ブルドッグ
5位	シバイヌ	ビーグル
6位	ヨークシャー・テリア	ヨークシャー・テリア
7位	シー・ズー	プードル
8位	マルチーズ	ボクサー
9位	ミニチュア・シュナウザー	フレンチ・ブルドッグ
10位	フレンチ・ブルドッグ	ロットワイラー

日本の人気犬種：JKC 2014年登録数 アメリカの人気犬種：AKC 2014年登録数

日本におけるプードルの登録頭数のうち 98.9 %がトイ・プードルであり、同様にダックスフンドの登録数のうち 80.1 %がミニチュア・ダックスフンドである。



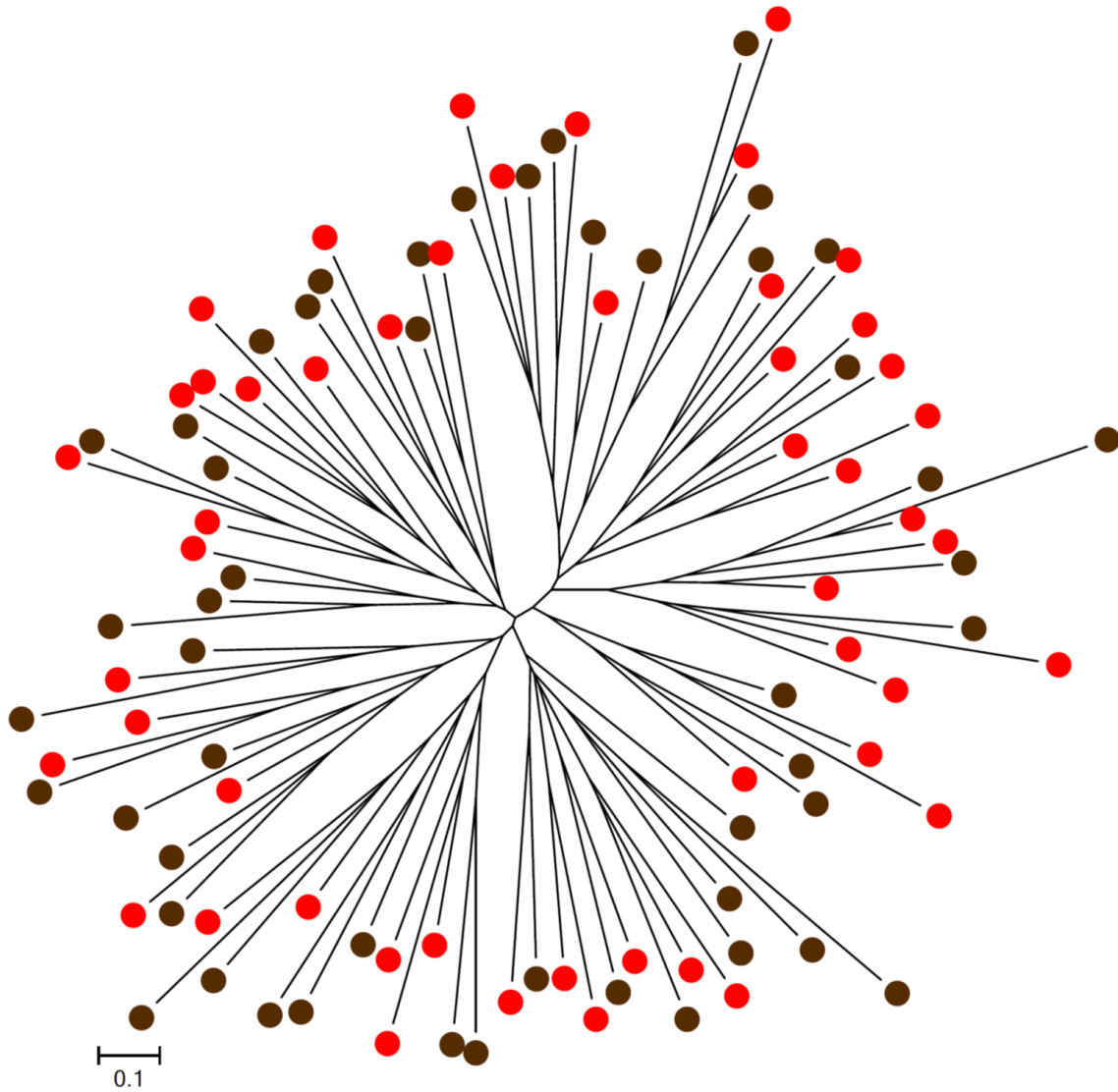


図 3-1 大学附属病院と一般病院のチワワ

赤：大学附属病院サンプル (n=50) 茶：一般病院サンプル (n=50)

Nei's standard genetic distance を算出し、近隣結合法によって樹形図を作成した。

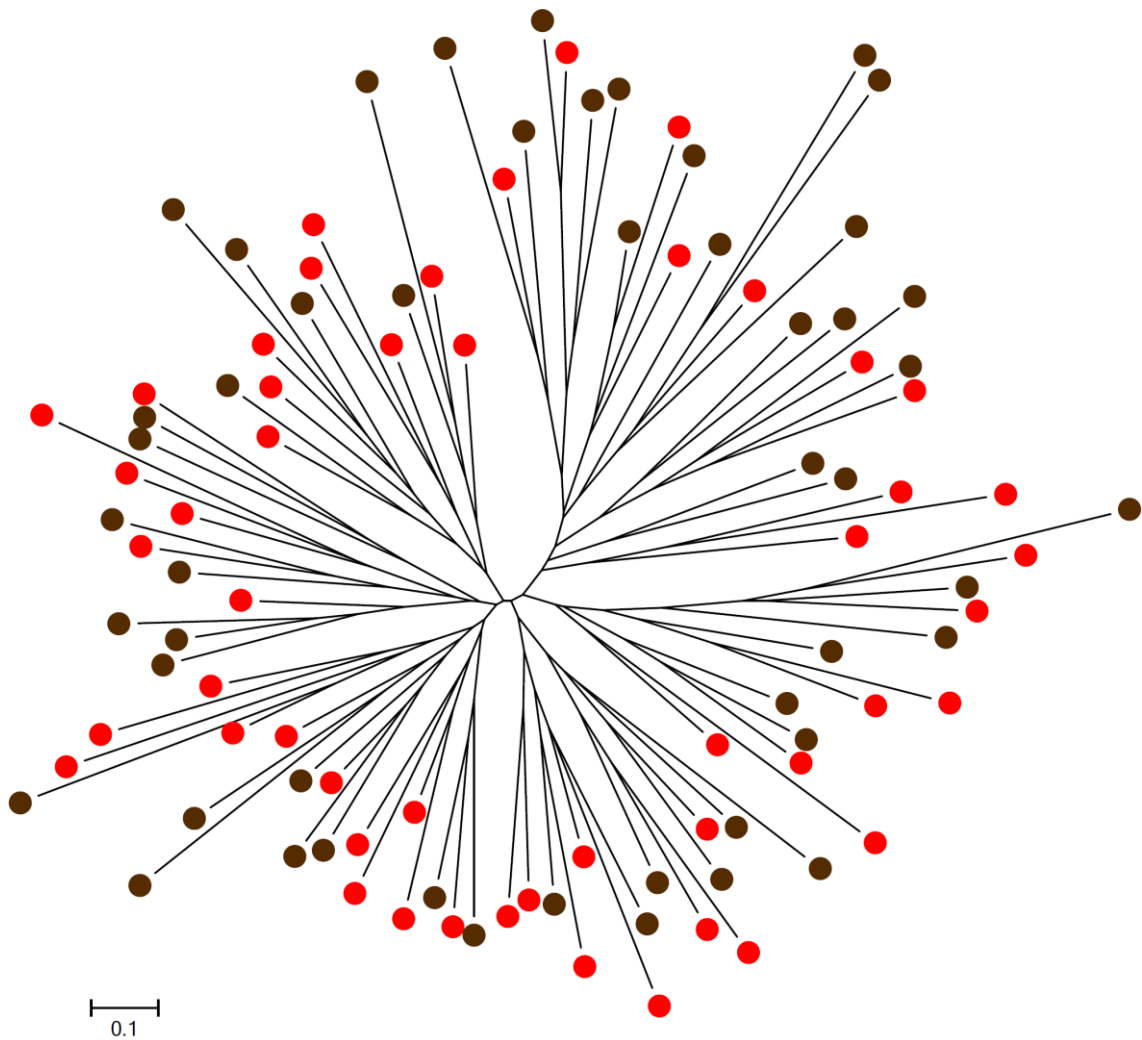


図 3-2 大学附属病院と一般病院のトイ・プードル

赤：大学附属病院サンプル (n=50) 茶：一般病院サンプル (n=50)

Nei's standard genetic distance を算出し，近隣結合法によって樹形図を作成した。

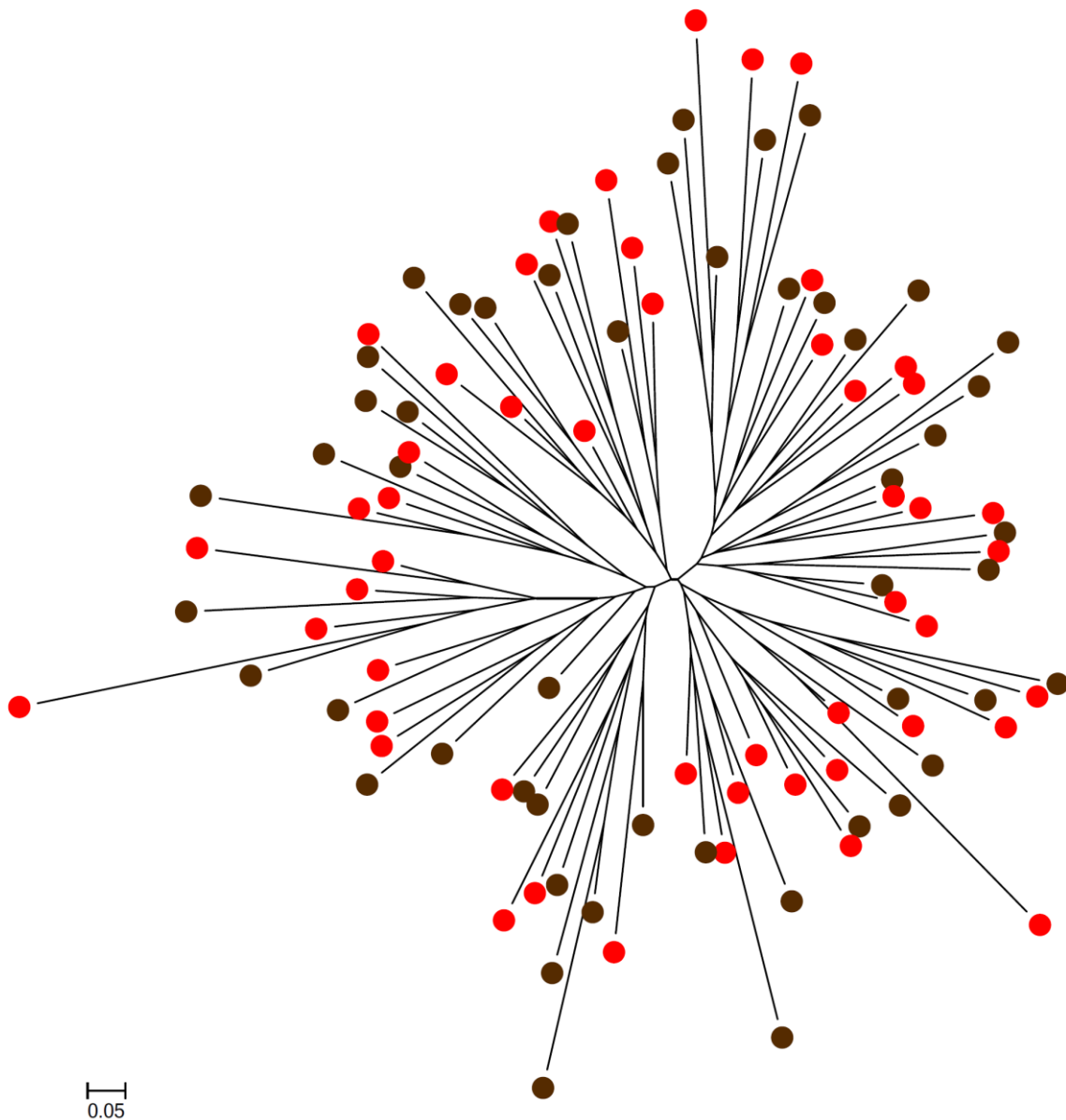


図 3-3 大学附属病院と一般病院のシバイヌ

赤：大学附属病院サンプル (n=50) 茶：一般病院サンプル (n=50)

Nei's standard genetic distance を算出し，近隣結合法によって樹形図を作成した。

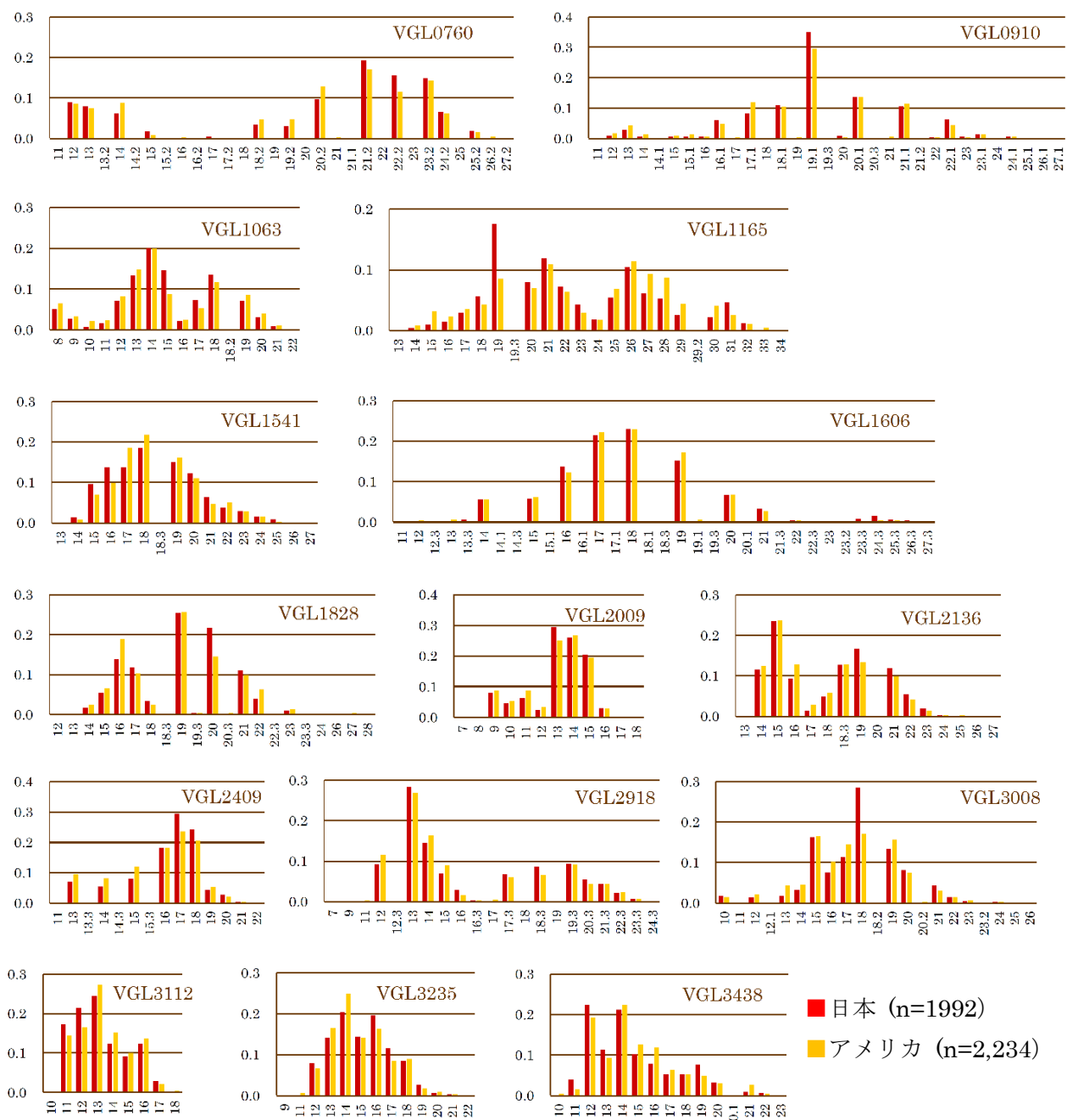


図 3-4 各座位におけるアレル頻度分布

本研究で得られた日本の頻度分布を赤で示し、参考データとしてアメリカの頻度分布 (Wictim et al., 2013) を黄で示す。

表 3-2 多型性評価

Locus	nA	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	PD	PIC	F <sub>ST</sub>
VGL0760	24	0.736	0.882	0.975	0.871	0.165
VGL0910	28	0.724	0.820	0.951	0.803	0.119
VGL1063	16	0.744	0.881	0.975	0.870	0.151
VGL1165	22	0.744	0.913	0.986	0.907	0.175
VGL1541	15	0.746	0.874	0.971	0.861	0.145
VGL1606	26	0.742	0.846	0.959	0.829	0.124
VGL1828	17	0.619	0.837	0.954	0.818	0.223
VGL2009	10	0.632	0.791	0.926	0.761	0.157
VGL2136	12	0.735	0.858	0.964	0.842	0.150
VGL2409	13	0.664	0.804	0.935	0.778	0.171
VGL2918	21	0.707	0.858	0.967	0.846	0.117
VGL3008	17	0.713	0.845	0.960	0.829	0.157
VGL3112	9	0.663	0.825	0.946	0.801	0.218
VGL3235	12	0.690	0.852	0.961	0.835	0.226
VGL3438	14	0.725	0.861	0.966	0.847	0.155

nA : アレル数 H<sub>O</sub> : ヘテロ接合度観測値 H<sub>E</sub> : ヘテロ接合度期待値 PD : 識別能  
 PIC : 多型情報含有値 F<sub>ST</sub> : イヌ集団 (n=1992) に対する分集団 (23 犬種) の分化度

表 3-3 犬種間分化

分集団	n	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>
イヌ全体	1992	0.705	0.850	-	0.171
雑種	145	0.801	0.845	0.006	0.052
アメリカン・コッカー・スパニエル	35	0.621	0.614	0.278	-0.012
ウェストハイランド・ホワイト・テリア	23	0.655	0.675	0.206	0.029
ウェルシュ・コーギー	64	0.656	0.680	0.199	0.036
キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル	34	0.631	0.612	0.280	-0.032
ゴールデン・レトリバー	55	0.657	0.695	0.182	0.055
シー・ズー	88	0.666	0.700	0.176	0.049
シェットランド・シープドッグ	40	0.642	0.656	0.228	0.022
ジャーマン・シェパード・ドッグ	35	0.690	0.677	0.204	-0.019
ジャックラッセルテリア	37	0.798	0.788	0.072	-0.012
ミニチュア・ダックスフンド	318	0.702	0.727	0.145	0.034
チワワ	113	0.801	0.809	0.048	0.010
トイ・プードル	178	0.738	0.780	0.082	0.054
バグ	40	0.615	0.624	0.265	0.015
パピヨン	58	0.775	0.765	0.100	-0.013
ビーグル	45	0.754	0.775	0.089	0.026
フレンチ・ブルドッグ	66	0.714	0.745	0.124	0.041
ボーダー・コリー	31	0.647	0.706	0.169	0.083
ポメラニアン	53	0.728	0.767	0.097	0.051
マルチーズ	31	0.688	0.741	0.128	0.072
ミニチュア・シュナウザー	49	0.593	0.606	0.287	0.021
ヨークシャー・テリア	73	0.776	0.793	0.067	0.021
ラブラドル・レトリバー	76	0.704	0.725	0.146	0.030
シバイヌ	74	0.656	0.692	0.186	0.053
23 犬種平均	70	0.692	0.711	0.163	0.027

H<sub>O</sub> : ヘテロ接合度観測値      H<sub>E</sub> : ヘテロ接合度期待値

F<sub>ST</sub> : イヌ集団 (n=1992)に対する分化度      F<sub>IS</sub> : 各個体における近交度

## 第 4 章

### 近親個体群解析による識別力の評価

## 4-1 緒言

### 4-1-1 親子鑑定

近年、ペットブームの影響により、乱繁殖や血統書偽装などの問題が取り沙汰されている。ペットショップでイヌを購入する人は46.5%に上り (JPFA, 2015)、親犬やブリーダーを知らないままイヌを購入、飼育する人も少なくない。イヌが成長するにつれて、血統証明書記載の犬種や血統に疑念を抱き、DNA型を調べる人も増えており、国内でも複数の業者がイヌの親子鑑定を行っている。

### 4-1-2 イヌの同胞数

イヌは多産動物であり、日本では古来より子宝・安産の象徴とされてきた。一度の出産で産まれる仔犬の数は全犬種を平均すると5頭程度であるとされ、犬種、両親の年齢、季節、産次、交配方法（自然/人工）などの要因に影響されると言われている (Borge et al., 2011; Gavrilovic et al., 2008; Leroy et al., 2015; Robinson, 1973)。特に犬種（大きさ）による影響は大きく、世界最小犬種であるチワワは、一度の出産頭数が平均3.2頭、最大7頭であるのに対し、大型犬であるラブラドル・レトリバーは、平均6.9頭、最大13頭と報告されている (Borge et al., 2011)。2005年には、ナポリタンマスティフが24頭の仔犬を出産し、世界最多記録を更新した (Guinness World Records, 2004)。

### 4-1-3 近親個体における多型性

両親と子のサンプルがそろっている親子鑑定を除き、ヒトの血縁関係の確認にはミトコンドリアDNAやY染色体上のマーカーが使われることが多い。ミトコンドリアDNAは母系遺伝であるため、母系の血縁関係を容易に証明することができ、同様にY染色体は父系血縁関係の証明に有用である。しかし一方で、血縁関係のある個体では同じDNA型が受け継がれてしまうため、これらのマーカーは同胞の多い動物種や血縁関係が複雑な個体群における検査には不適である。高い精度で特定の個体間の親子関係を肯定するためには、常染色体上のマーカーを調べることが不可欠である。また個体間の識別を目的とした検査では、ミトコンドリアDNAやY染色体上に存在するマーカーは使用できないため、検査結果を複数の目的に活用することができないというデメリットもあり、十分なヘテロ接合度と識別能が認められる常染色体上のマーカーを調べる必要がある (Irion et al., 2003)。

イヌの繁殖に際しては、犬種標準に近い個体やチャンピオン犬などが何度もくり返し用いられることがあり、「優秀な個体」は多数の子孫を残すことになる (Altet et al., 2001)。



そのため、同胞や半同胞が多数存在することも少なくない。近親個体においては、アレルを共有する可能性も高くなり、またヘテロ接合度が低下するため、検査法の有効性を検討する際には、近親個体群における多型性を確認する必要がある (Altet et al., 2001)。現在、イヌの親子鑑定には複数のマルチプレックス PCR パネルが考案されている。それぞれが特定の地域や犬種を対象としており、比較や評価は難しいものの、多型性や有用性が検討されている (Ichikawa et al., 2001; Kang et al., 2009; Ogden et al., 2012; Zajc et al., 1994)。

#### 4-1-4 突然変異

STR 座位には高い確率で突然変異が発生することがわかっており、複製のスリップまたは DNA 複製異常の修復が起こっていると考えられている (Ellegren, 2004; Nadir et al., 1996)。

STR 座位では、減数分裂を 1000 回行うごとに 1~4 回ほどの頻度 (0.1~0.4 %) で変異が起こる (Butler, 2005)。ヒトでは、DNA 型鑑定に用いられている検査座位はおおむね 0.2 % 程度の突然変異率であり、この頻度であれば、親子鑑定において不適合が 2 つみつかるとはあまりない (Gunn et al., 1997; Nutini et al., 2003)。前述の「DNA 鑑定についての指針」においても、「親子間で血縁関係に矛盾のある場合、真の親子間でありながらローカスの突然変異が生じた可能性もあるため、一般的に 1 ローカスでのアレル不一致 (孤立否定) で血縁関係は否定されない」と定められている。この孤立否定の原則は two-exclusion rule (2 排除ルール) とも呼ばれ、親子鑑定を行う研究機関では広く普及している (Butler, 2005)。しかし検査座位の突然変異率が高い場合、この原則を適用する事で誤判定 (偽陰性) の確率が高まるため、突然変異率の確認は必要不可欠である。

本章では、近親個体における個体識別鑑定と親子鑑定の有効性を確認することを目的とし、近親個体群を用いた解析を行った。多型性の低下が想定される近親個体群における各種多型性指標の確認と、親子間における突然変異率の確認を行った。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 サンプル

本検討には、公益財団法人日本盲導犬協会（以下、日本盲導犬協会）所属個体 457 頭の血液サンプルを用いた。457 頭のうち、393 頭はラブラドル・レトリバー、4 頭はゴールデン・レトリバー、60 頭はラブラドル・レトリバーとゴールデン・レトリバーの一代交雑種（以下、F1 レトリバー）であった。血液サンプルは獣医師によって採取された血液検査残余血で、抗凝固剤として EDTA が添加されていた。

血液 50  $\mu$ L に Buffer G2 150  $\mu$ L を加え、EZ1<sup>®</sup> DNA Investigator Kit と EZ1<sup>®</sup> Advanced XL (QIAGEN) を用いて DNA を抽出、精製し、50  $\mu$ L の TE バッファーで溶出した。定量には NanoVue (GE Healthcare) を用い、吸光度測定によって濃度を決定した。

### 4-2-2 多型解析

第 2 章で改良した DogFiler を用い、15 座位の STR 型および SRY マーカーのマルチプレックス PCR 増幅を行った。PCR 反応液量は 25  $\mu$ L とし、プライマー配列および PCR 条件は第 2 章のとおりである。得られた PCR 産物 1  $\mu$ L と Gene Scan 600LIZ Size Standard 0.3  $\mu$ L を 10  $\mu$ L の Hi-Di<sup>™</sup> Formamide に加え、95 °C で 3 分加熱変性させたのちに急冷し、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer を用いて電気泳動を行った。なお、各ランに 1 ウェルずつアレルックラダーマーカーを入れ、同時に泳動した。解析は GeneMapper<sup>®</sup> ID-X software v.1.4 を用いて行った。

### 4-2-3 親子解析

両親と子のサンプルがそろっている親子のペア 324 組（表 4-1）について、親子解析を行った。ラブラドル・レトリバーのうち 264 頭（49 胎）と F1 の 60 頭（9 胎）を子としてそれぞれの両親と STR 型を比較し、子のアレルが各親から引き継がれていない場合、変異アレルとみなした。各座位の突然変異率（Mutation Rate : MR）は、以下の式を用いて算出した。

$$MR = \frac{\text{変異アレル数}}{\text{子の数} \times 2}$$

## 4-3 結果

### 4-3-1 近親個体群における多型性

日本盲導犬協会所属のラブラドル・レトリバー393頭について解析を行ったところ、表4-2に示す結果を得た。15座位のnAは4~12(平均7.2)とランダムサンプリング群(平均17.1)と比べて低下し、それにもなつてヘテロ接合度の期待値も0.38~0.82(平均0.70)と低下した。識別能(平均0.85)や多型情報含有値(平均0.66)もランダムサンプリング群の値(識別能0.96, 多型情報含有値0.83)と比べて大幅に低い値を示したが、それでも偶然一致率は $2.17 \times 10^{-14}$ と低い値を示し、十分な識別力が認められた。ランダムサンプリング群(n=1992)をイヌ集団全体として $F_{ST}$ を算出したところ、15座位の平均は0.15とやや高い値を示したのに対し、 $F_{IS}$ の値は平均-0.03と0に近い値を示し、分化は進んでいるが近親交配は行われていないという結果になった。

F1レトリバー60頭についても同様に解析を行い、表4-3に示す結果を得た。15座位のアレル数は4~9(平均5.33)とさらに低い値を示し、ヘテロ接合度の期待値も0.32~0.85(平均0.67)と低下したが、識別能(平均0.82)や多型情報含有値(平均0.62)には大きな差が見られなかった。 $F_{ST}$ を算出したところ、15座位の平均値は0.21となり、高い値を示したが、 $F_{IS}$ は-0.17となり、0を大きく下回る値を示した。このF1レトリバー群においては、VGL1165とVGL1541ではすべての個体がヘテロ接合であり、他の座位でもヘテロ接合度の観測値が高く、平均0.79と期待値を大きく上回っていたため、 $F_{IS}$ がマイナスへ大きく傾いた。

イヌの繁殖に際しては、優秀な個体を繁殖犬として何度も交配させ、多数の同胞および半同胞個体が産み出される。本解析に用いた近親個体群には、最大15頭の同胞が含まれていたほか、1頭の雄を父親とする半同胞が最大74頭含まれていた。しかし本解析に用いた個体の中にDNA型が一致する個体は認められず、すべての個体を識別することが可能であった。

### 4-3-2 親子間変異

ラブラドル・レトリバーの親子(父・母・子)のべ264組のSTR型を調べたところ、49組の親子に50例の突然変異が見られた。同様に、F1レトリバーの親子60組のSTR型を調べたところ、6組の親子に6例の突然変異が見られた(表4-4)。

座位ごとの突然変異率は0.2%(VGL2136およびVGL2409)~1.5%(VGL1541)で、15座位の平均突然変異率は0.6%となった。STR型から突然変異の由来を推定したところ、

父由来の突然変異が 25 例，母由来の突然変異が 18 例，由来不詳が 13 例であった．ラブラドル・レトリバーにおいて由来を推定できた突然変異は 50 例中 38 例あり，多型情報含有値 0.65 を上回る結果となった．

#### 4-4 考察

イヌは多産動物であるため血縁関係にある個体が多く、近親個体を識別できることは極めて重要である。しかし、近親個体間では高い確率でアレルが共有されていることが想定され、識別ができない可能性がある。そこで近親個体群を用いて解析を行い、その多型性を評価した。本検討に用いた個体群は、日本盲導犬協会において飼育されている 393 頭のラブラドル・レトリバー、4 頭のゴールデン・レトリバー、60 頭の F1 レトリバー、計 457 頭のイヌである。

まず、393 頭のラブラドル・レトリバーを用い、アレル頻度データの蓄積と多型性の評価を行った。解析の結果、 $n_A$  は 5~12 と少なく、 $H_E$  (0.38~0.82) および  $H_O$  (0.42~0.86) も低い値となったが、それでも偶然一致率は  $2.17 \times 10^{-14}$  となり、十分な識別力があることが明らかとなった。実際に、同一犬種近親個体群であるにも関わらず、解析した 393 頭すべての個体を識別することが可能であった。

しかし、ランダムサンプリング群 ( $n=1992$ ) をイヌ集団全体として Wright の  $F$  統計量を算出したところ、15 座位の  $F_{ST}$  の平均値が 0.18 と遺伝的分化を示した一方で、近親交配作用の程度を示す  $F_{IS}$  の平均値は -0.03 となった。 $F_{ST}$  は、全集団 (イヌ) の  $H_E$  と分集団 (各犬種) の  $H_E$  を比較することでアレルの頻度分布の偏りを評価し、分集団の遺伝的分化の度合を示す指標である。全集団の多型性をそのまま反映した分集団では  $F_{ST}$  の値は 0 になるが、分集団内での交配が行われ分化が進むほど 0 から遠ざかっていく。一方  $F_{IS}$  は、分集団内のアレルの頻度分布を反映する  $H_E$  と各個体の両親の近親度を反映する  $H_O$  を比較することで、分集団内における近親交配の度合いを示す指標である (Keller and Waller, 2002)。大きな集団の中で任意交配が行われると  $F_{IS}$  の値は 0 になるが、近親交配が行われるほど正の値に傾く。また、集団が小さい場合には世代を重ねるごとに  $H_O$  が低くなっていくため、高い値を示すと考えられる。このラブラドル・レトリバー群では、 $F_{ST}$  の値が高く、分集団として分化が進んでいることが示されたが、一方で  $F_{IS}$  の値が負であったことから、異系交配が行われたことが示された。よってこの群では選択的交配と遺伝子流入があることが示唆され、閉鎖集団ではなく、他の近親個体群と比べて高い多型性が維持されていると推察された。

F1 レトリバーについても同様に解析を行ったところ、 $n_A$  は 4~9 とさらに低い値を示し、 $H_E$  (0.32~0.85) も低下したが、識別能 (平均 0.82) や多型情報含有値 (平均 0.62) に大きな差は見られなかった。 $F_{ST}$  と  $F_{IS}$  を算出したところ、平均値はそれぞれ 0.21 と -0.17 となり、いずれも 0 からやや遠い値を示した。

近親個体群ではアレル数が大幅に低下し、ヘテロ接合度にも低下が認められた。実際、解析した親子の中には、両親がホモ接合となり、その座位について同胞個体がすべて同じ STR 型を示すという例が多数見られた。しかし解析に用いた個体の中に DNA 型が一致する個体は認められず、親子、同胞を含めすべての個体を識別することが可能であった。他の検査法では同胞個体と同じ型を示す例もあり (Altet et al., 2001)、近親個体における本検査法の識別力の高さが示された。これまでイヌにおいては一卵性双生仔の報告がなく、本研究においてもすべての同胞は多卵性多胎仔であった。

近年、遺伝的多様性に関する研究が様々な種を用いて行われている。たとえば、極度のボトルネックを経たオオカミの群において、1頭の異系個体の合流により、ヘテロ接合度が 0.49 から 0.62 へと上昇し、近交度の低下が認められたという報告がある (Vila et al., 2003)。一世代でヘテロ接合度の上昇や近交度の低下が期待できるため、遺伝的多様度が低下した集団においては、異系交配や異種交雑は有効な手段であると考えられている。本解析で用いた F1 個体群においては、VGL1165 と VGL1541 ですべての個体がヘテロ接合であり、他の座位でもヘテロ接合度の観測値が高く、平均 0.79 と期待値を大きく上回っていたため、 $F_{IS}$  がマイナスへ大きく傾いた。他犬種との交雑を行うことによって、一世代で近交度の低減を図ることが可能であることが示され、遺伝的多様性の維持における交雑の効果を裏付ける結果となった。

イヌの DNA 型鑑定においては、親子や同胞関係の証明が求められるケースも想定されるため、多型性と突然変異率のバランスも重要である。この群に含まれていた 58 胎のべ 324 組の親子を用いて親子間の突然変異を確認したところ、56 例の突然変異が確認され、その内訳は、父由来変異が 25 例、母由来変異が 18 例、由来不詳が 13 例と推察された。Wictum らの報告では、母由来突然変異が多く認められており、異なる結果となった。しかし、雄では生殖細胞における細胞分裂の回数が多いため (Sharma et al., 2015)、多くの動物で父親由来の突然変異の方が多いということが報告されており (Asicioglu et al., 2004; Crow, 2006; Sun et al., 2014; Zhao et al., 2015)、本研究でも同様の結果となった。突然変異率の検討に際してはサンプル数の確保が困難であり、安定した結果を得ることが難しい。Wictum らの研究では検査対象とした親子が 181 組と少なく、本研究では犬種をラブラドル・レトリバーと F1 レトリバーに限定したため、今後さらなるデータの蓄積と解析を行う必要があると考えられた。

本研究における突然変異率は 0.6 % と算出された。突然変異率は座位によって異なっており、0.15 % (VGL2409) ~ 1.54 % (VGL1541) であった。STR における突然変異率は 0.1 ~

0.4 %程度とされ (Brinkmann et al., 1998), ヒトの DNA 型鑑定に用いられている座位においても平均 0.2 %程度であると報告されている (Asicioglu et al., 2004). また, Wictim らの報告によれば DogFiler の検査座位の平均突然変異率も 0.2 %程度とされている (Wictim et al., 2013). 突然変異率は, 低いと多様性が出にくく識別力が低くなり, 高くなるほど親子間での矛盾が生じ, 血縁関係の証明力が低くなる. 0.6 %の突然変異率はやや高い値であり, 本研究で解析した親子の中には, 1 個体に 2 座位で変異がみられた例も確認された. 現在, 親子鑑定を行う多くの機関では, 1 座位の不一致では血縁関係を否定しないという孤立否定の原則 (two-exclusion rule)を採用しており, 2 座位で変異が認められると親子関係が否定されてしまう. DogFiler を親子鑑定に用いる場合には, 各座位の突然変異率を考慮し, 判定基準を慎重に設定する必要があることが示唆された. しかしながら, イヌの中でも出産頭数の多いラブラドル・レトリバーにおいて, 同胞間に十分な識別力が認められたという点は評価すべきところであり, 本検査法の親子・同胞鑑定への適用性は高いと考えられた.

#### 4-5 小括

本章では、近親個体群を用いて解析を行った。日本盲導犬協会において飼育されている血縁関係のあるラブラドル・レトリバー393頭を近親個体群として解析し、アレル頻度データの蓄積と多型性の評価を行った。解析の結果、 $n_A$ は5~12と少なく、 $H_E$  (0.38~0.82) および  $H_o$  (0.42~0.86) も低い値となったが、それでも偶然一致率は  $2.17 \times 10^{-14}$  となり、十分な識別力があることが明らかとなった。実際に、同一犬種近親個体群であるにも関わらず、解析した393頭すべての個体を識別することが可能であった。しかし、ランダムサンプリング群 ( $n=1992$ ) をイヌ集団全体として Wright の  $F$  統計量を算出したところ、15座位の  $F_{ST}$  の平均値が 0.18 と遺伝的分化を示した一方で、近親交配作用の程度を示す  $F_{IS}$  の平均値は -0.03 となった。このラブラドル・レトリバー群では、 $F_{ST}$  の値が高く  $F_{IS}$  の値が負であったことから、選択的交配と遺伝子流入があることが示唆され、この群は他の近親個体群と比べて高い多型性が維持されていると推察される。同協会所属の F1 レトリバー 60 頭についても同様に解析を行ったところ、 $n_A$  は 4~9 とさらに低い値を示したが、2 座位ですべての個体がヘテロとなり、偶然一致率は  $1.94 \times 10^{-13}$  と低かった。 $F_{ST}$  と  $F_{IS}$  を算出したところ、平均値はそれぞれ 0.21 と -0.17 となり、 $F_{ST}$  の値は高いまま  $F_{IS}$  が大幅に低下した。他犬種との交雑を行うことによって、一世代では遺伝的偏りの解消は難しいものの、近交度の低減を図ることが可能であることが示された。

つづいて、この群に含まれていたラブラドル・レトリバー49胎のべ264組の親子と、F1 レトリバー9胎のべ60頭の親子を用いて、親子・同胞間の識別や突然変異率についても確認し、親子・同胞鑑定への適用性を検討した。その結果、56例の突然変異が確認され、突然変異率は 0.6 % と算出された。1 個体に 2 座位で変異が見られた例もあったため、孤立否定 (1 座位の不一致では血縁関係を否定しないという原則) では対応できない可能性があり、今後親子判定について基準を明確に定める必要があると考えられる。しかしながら、最大 11 頭の同胞をすべて識別することができ、イヌの中でも出産頭数の多いラブラドル・レトリバーにおいて、同胞間に十分な識別力が認められたという点は評価すべきところであり、本検査法の個体識別への適用性は高いと考えられた。



表 4-1a

胎	頭数	母犬	父犬	犬種
R1	2	リオ	ディア	L
S1	2	エミリー	ディア	L
V1	4	ワッフル	ワッガ	L
C2	6	ハロ	エルトン	L
D2	5	エブリ	ハンセン	L
I2	4	リオ	エルトン	L
K2	2	チャチャ	オリバー(G)	F1
L2	4	ハロ	エルトン	L
N2	8	ディーナ	オリバー(G)	F1
R2	3	ライカ	エルトン	L
V2	2	ルル	ジャンボ	L
C3	2	エブリ	ジャスパー	L
F3	7	リシアン	エルトン	L
H3	7	ボニー	ディア	L
I3	5	ハナ	エルトン	L
L3	5	チャチャ	ハンセン	L
M3	8	ジル	ハンセン	L
O3	7	ディーナ	オリバー(G)	F1
S3	11	ルル	ハント	L
Y3	2	エミリー	ジャンボ	L
B4	6	ヴィラ	オリバー(G)	F1
C4	8	ヴェリー	ハンセン	L
E4	8	ユキ	ハント	L
H4	7	ユリー	オリバー(G)	F1
I4	8	オリビア	ハンセン	L
M4	2	ディーナ	ハンセン	L
O4	8	ボニー	ハンセン	L
R4	6	ブランブル	ハンセン	L
S4	4	ハナ	クリス(G)	F1

L : ラブラドル・レトリバー      F1 : F1 レトリバー

表 4-1b

胎	頭数	母犬	父犬	犬種
D5	12	ボニー	タナー(G)	F1
E5	4	ハナ	ハンセン	L
f5	3	ヴィッキー	ジャスパー	L
G5	6	メロ	ハント	L
H5	6	チャチャ	クリス(G)	F1
I5	3	リシアン	ジャスパー	L
N5	8	ワンダー	ピップ(G)	F1
O5	7	シエル	ジャスパー	L
S5	5	ディーナ	ハンセン	L
A6	4	メロ	ジャッキー	L
B6	8	ピュア	ジャンプ	L
F6	8	ブランブル	ジャスパー	L
O6	9	ボニー	ブライヤー	L
P6	7	リシアン	ハンセン	L
R6	5	ヴィッキー	ジャッキー	L
S6	3	チャチャ	ジャンプ	L
T6	3	ハナ	ジャッキー	L
A7	9	ミル	ブライヤー	L
E7	4	メロ	ジャンプ	L
I7	6	ハピネス	ブライヤー	L
J7	8	ブランブル	ハンセン	L
M8	3	チャチャ	ケイニー	L
D10	7	ジニー	ロビン	L
G10	5	ハピネス	ケイニー	L
N10	2	メロ	ウィング	L
R10	7	ウィンキー	ロビン	L
B11	5	ウィリー	ウィング	L
K11	8	ピュア	ケイニー	L
R11	6	レミー	ラルゴ	L

L : ラブラドル・レトリバー      F1 : F1 レトリバー

表 4-2 ラブラドル・レトリバー近親個体群における多型性

Locus	nA	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	PD	PIC	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>
VGL0760	6	0.812	0.754	0.897	0.712	0.145	-0.077
VGL0910	5	0.782	0.750	0.896	0.709	0.085	-0.042
VGL1063	8	0.716	0.762	0.917	0.736	0.136	0.059
VGL1165	9	0.759	0.704	0.884	0.675	0.230	-0.078
VGL1541	11	0.785	0.773	0.917	0.742	0.116	-0.016
VGL1606	6	0.739	0.697	0.859	0.647	0.177	-0.061
VGL1828	10	0.789	0.783	0.924	0.754	0.065	-0.008
VGL2009	5	0.659	0.653	0.820	0.593	0.174	-0.009
VGL2136	8	0.701	0.686	0.858	0.643	0.200	-0.022
VGL2409	5	0.724	0.698	0.857	0.647	0.131	-0.037
VGL2918	7	0.789	0.817	0.941	0.791	0.048	0.034
VGL3008	9	0.847	0.825	0.946	0.801	0.023	-0.026
VGL3112	5	0.464	0.453	0.661	0.414	0.451	-0.024
VGL3235	7	0.759	0.694	0.850	0.638	0.185	-0.093
VGL3438	4	0.406	0.406	0.590	0.349	0.529	-0.001

nA : アレル数      H<sub>O</sub> : ヘテロ接合度観測値      H<sub>E</sub> : ヘテロ接合度期待値

PD : 識別能      PIC : 多型情報含有値      F<sub>ST</sub> : イヌ集団 (n=1992) における分化度

F<sub>IS</sub> : JGDA-L 群 (n=393) 内における近交度

表 4-3 F1 レトリバー近親個体群における多型性

Locus	nA	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	PD	PIC	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>
VGL0760	5	0.717	0.639	0.825	0.593	0.276	-0.122
VGL0910	5	0.983	0.705	0.855	0.644	0.140	-0.394
VGL1063	6	0.967	0.773	0.908	0.729	0.123	-0.251
VGL1165	9	1.000	0.854	0.959	0.829	0.065	-0.171
VGL1541	8	1.000	0.852	0.958	0.827	0.026	-0.174
VGL1606	4	0.633	0.556	0.752	0.505	0.343	-0.138
VGL1828	8	0.950	0.820	0.940	0.788	0.021	-0.159
VGL2009	4	0.767	0.594	0.775	0.533	0.249	-0.291
VGL2136	4	0.700	0.558	0.707	0.460	0.350	-0.254
VGL2409	4	0.783	0.711	0.856	0.648	0.116	-0.101
VGL2918	4	0.517	0.616	0.780	0.542	0.282	0.161
VGL3008	9	0.917	0.787	0.930	0.758	0.068	-0.165
VGL3112	4	0.867	0.617	0.784	0.547	0.252	-0.405
VGL3235	4	0.817	0.646	0.800	0.569	0.242	-0.265
VGL3438	2	0.267	0.323	0.486	0.269	0.625	0.173

nA : アレル数      H<sub>O</sub> : ヘテロ接合度観測値      H<sub>E</sub> : ヘテロ接合度期待値

PD : 識別能      PIC : 多型情報含有値      F<sub>ST</sub> : イヌ集団 (n=1992) における分化度

F<sub>IS</sub> : JGDA-F1 群 (n=60) 内における近交度

表 4-4 近親個体群における突然変異

	ラブラドール・レトリバー			F1 レトリバー		
	父由来	母由来	由来不詳	父由来	母由来	由来不詳
VGL0760	2		1			
VGL0910	1	5				
VGL1063	1	1	1			
VGL1165	3	1			1	
VGL1541	6	2		1		1
VGL1606	3	2	3	1		
VGL1828		2	1		1	
VGL2009	1					
VGL2136	1					
VGL2409			1			
VGL2918	3					
VGL3008		1	1	1		
VGL3112		1	1			
VGL3235	1	1	1			
VGL3438			2			
total	22	16	12	3	2	1

ラブラドール・レトリバー49胎のべ264組の親子とF1レトリバー9胎のべ60組の親子で観察された突然変異の内訳.

## 第 5 章

### 犬種別解析による

### 犬種間および犬種内の多型性の評価と犬種推定法の検討

## 5-1 緒言

### 5-1-1 DogFiler の応用

DogFiler は、もともと法科学的な個体識別を目的として開発された検査法であり、本研究においても、DogFiler の法科学鑑定への適用性や国内のイヌにおける多型性などを評価し、その有用性を検討してきた。その結果、DogFiler の検査座位はいずれも国内での多型性が高く、「集団」の中の「個」を扱う検査法として有用であることが明らかとなったことから、法科学鑑定や親子鑑定における活用が期待される。本章では「分集団」である犬種に焦点をあて、検査法の応用について検討する。

### 5-1-2 分集団

ヒトの DNA 型鑑定における検査座位については、1 集団につき 100~200 人のデータを蓄積すれば、アレル頻度を正確に反映できるとされている (Chakraborty, 1992; Evett and Gill, 1991; Foreman and Evett, 2001)。しかしイヌでは、ボトルネックによる遺伝的偏りや多数の同胞個体の存在により、アレル頻度の偏りが想定されるため、より大きなサンプルサイズが必要であると考えられる。そこで、各分集団につき 250 頭のサンプルを集めることとした。

### 5-1-3 対象犬種

本章では、日本で多く飼育されているトップ 3 犬種であるチワワ、トイ・プードル、ミニチュア・ダックスフンド、大型犬で最も飼育頭数の多いラブラドル・レトリバー、日本犬で最も飼育頭数の多いシバイヌの 5 犬種を対象とした。

#### チワワ

メキシコのチワワ地域原産の世界最小犬種である。かつては野生に生息し、トルテカ文明時代に家畜化されたと考えられている。スムースコートとロングコートの 2 種類の被毛があり、ロングコートはパピヨンやポメラニアンを交配させて作り出されたと言われている。カラーバリエーションが豊富で、JKC でもマールカラー以外のすべての毛色が認められている。

#### トイ・プードル

プードルは古くからヨーロッパ各地に存在し、原産地は不明である。スタンダード、ミディアム、ミニチュア、トイの4種のサイズがあり、ミニチュアプードルやトイ・プードルは16世紀のフランスで作出された。JKCでは体高24～28 cmと規定されている。本来犬種名は「プードル」であり、「トイ」は犬種内のサイズ規定にすぎないが、「トイ・プードル」は分類として広く認知されており、本研究では「トイ・プードル」を犬種名として扱う。

#### ミニチュア・ダックスフンド

ダックスフンドはドイツ原産の犬種で、獲物を藪や穴から追い出したりするために、短脚に改良された狩猟犬である。スタンダード、ミニチュア、カニンヘンの3種のサイズがあるが、各国の協会によって規定が異なっている。また、血統証明書への記載はあくまで両親のサイズによるものであるため、成長後のサイズは規定とは異なる場合がある。JKCでは、胸囲30～35 cmと規定されている。本来の犬種名は「ダックスフンド」であり、「ミニチュア」は犬種内のサイズ規定にすぎないが、「ミニチュア・ダックスフンド」は分類として広く認知されており、本研究では「ミニチュア・ダックスフンド」を犬種名として扱う。

#### ラブラドル・レトリバー

沿革は明らかになっていないが、元はセント・ジョーンズ・レトリバーやレッサー・ニューファンドランドと呼ばれていた犬種で、1903年にイギリス、1917年にアメリカで正式に犬種として公認された。知的で従順であることから世界中で愛されており、使役犬としても活躍している。日本では個人的な飼育は少ないものの、盲導犬、介助犬、探知犬、救護犬などに用いられている。

#### シバイヌ

日本古来の土着犬で、日本犬種の中では最も飼育頭数が多く、海外でも Shiba Inu として認知度が高まり、飼育頭数も増えている。異種交配の流行や第2次世界大戦によって一時数が激減したが、その後天然記念物にも指定され、積極的な繁殖と改良が行われた。遺伝的にオオカミに最も近い犬種とされ、注目を集めている。

本章では「分集団」に焦点をあて、この検査法の応用について検討した。まず第1節で、分集団内における遺伝的多様性や遺伝的距離の評価に本手法が応用可能か検討し、次に第2節で本手法によって犬種推定が可能かを検討した。



## 第1節

### 5.1-1 緒言

本節では、各犬種を分集団とし、DogFiler で遺伝的多様性や近交度を解析し、犬種の維持、管理への応用について検討した。犬種は、人が理想とする表現型をもつように、作為的な交配を行った結果生み出されたものである。犬種が確立され広く認知されると、生み出された身体的特徴を維持するために、それぞれの犬種内での交配が積極的に行われる。公認犬種にはそれぞれ「犬種基準」が定められ、その基準に合った形質を固定するために近親交配が行われた結果、犬種内で遺伝的多様性が低下した (Calboli et al., 2008; Farrell et al., 2015; Johansson and Rendel, 1968; Leroy, 2011; Ostrander and Wayne, 2005)。犬種を存続させるためには、遺伝的多様性を維持し、遺伝性疾患が定着するのを防ぐ必要がある。そのためにはまず、分集団の遺伝的多様性がどの程度かを把握する必要がある。そこで本節では、分集団における遺伝的多様性の確認に DogFiler が応用できるかどうかを検討した。

## 5.1-2 材料と方法

### 5.1-2-1 サンプル

本検討には、ランダムにサンプリングした犬種群として5犬種のDNAと、使役犬コロニー群として日本盲導犬協会所属のラブラドル・レトリバーのDNAを用いた。

犬種別群サンプルとして、チワワ、トイ・プードル、ミニチュア・ダックスフンド、シバイヌの4犬種各250頭のDNAと、ラブラドル・レトリバー200頭のDNAを用いた。チワワとトイ・プードルのDNAは、複数の動物病院にて採取された血液検査残余血から、EZ1® DNA Blood 200 Kit および EZ1® Advanced XL (QIAGEN) を用いて抽出した。ミニチュア・ダックスフンドのDNAは、第3章にて解析したサンプルの中から250頭分を無作為に選んで用いた。ラブラドル・レトリバーのDNAは、第3章にて解析したサンプルに、複数の動物病院にて採取されたサンプルを加え、合わせて200頭分とした。シバイヌのDNAは、複数の動物病院にて採取された血液検査残余血からEZ1® DNA Blood 200 Kit および EZ1® Advanced (QIAGEN) を用いて抽出した。

使役犬コロニー群として、第4章の日本盲導犬協会所属ラブラドル・レトリバーのデータから、ランダムに250頭分を選んで用いた。

### 5.1-2-2 多型解析

第2章で改良したDogFilerを用いて、15座位のSTR型およびSRYのマルチプレックスPCR増幅を行った。PCR反応液量は25 µLとし、プライマー配列およびPCR条件は第2章のとおりである。得られたPCR産物1 µLとGene Scan 600 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) 0.3 µLを10 µLのHi-Di™ Formamide (Applied Biosystems)に加え、95 °Cで3分加熱変性させたのちに急冷し、3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて電気泳動を行った。なお、各ランに1ウェルずつアレリックラダーマーカ―を入れ、同時に泳動した。解析はGeneMapper® ID-X software v.1.4を用いて行った。

### 5.1-2-3 分集団内多様性解析

DogFilerの多型情報をもとに、犬種ごとの多型性と、各個体間の遺伝的距離の確認を行った。各座位におけるアレル数(nA)、異型接合度の観測値(H<sub>o</sub>)および期待値(H<sub>E</sub>)、識別能(PD)、多型情報含有値(PIC)を計算した。また、第3章で解析した集団を「イヌ全体」とし、各犬種を分集団としてF<sub>ST</sub>およびF<sub>IS</sub>を算出した。さらに、使役犬コロニー群と

して日本盲導犬協会所属個体 250 頭についても同様に解析し、遺伝的多様度の評価を行った。

多型性指標（異型接合度期待値，識別能，多型情報含有値）は，Cervus 3.0.7 (Kalinowski et al., 2007) を用いて算出した。遺伝的距離の算出には PHYLIP version 3.695 (Felsenstein, 2013) を用い，各個体間の Nei's standard genetic distance (Nei, 1972) を算出した。

### 5.1-3 結果

#### 5.1-3-1 犬種群

5 犬種について解析を行い、図 5-1~5 に示す結果を得た。D の平均値±標準偏差は 0.836 ±0.231 (シバイヌ) ~1.225±0.320 (チワワ), nA は 9.2±1.935 (ラブラドル・レトリバー) ~11.8±3.321 (トイ・プードル), H<sub>O</sub> は 0.669±0.109 (シバイヌ) ~0.796±0.042 (チワワ), H<sub>E</sub> は 0.704±0.104 (シバイヌ) ~0.815±0.040 (チワワ) であった。ANOVA 解析の結果、いずれの項目においても 5 犬種の間には有意な差は認められなかった。F<sub>ST</sub> は第 3 章と同様の高い値を示したが、一方で F<sub>IS</sub> は低く、最大でも 0.046 (シバイヌ) であった。

#### 5.1-3-2 使役犬コロニー群

日本盲導犬協会飼育個体群について同様に解析を行い、図 5-6 に示す結果を得た。D の平均値±標準偏差は 0.779±0.234, nA は 7.07±1.792, H<sub>O</sub> は 0.709±0.138, H<sub>E</sub> は 0.697±0.133 であった。図 5-7 に、各項目の平均値を上記犬種解析群の結果とともに示した。

#### 5.1-4 考察

本節では、分集団における遺伝的多様性の評価に DogFiler が応用可能であるかを検討した。イヌの分集団として、チワワ、トイ・プードル、ミニチュア・ダックスフンド、シバ イヌ、ラブラドル・レトリバーの 5 犬種と、使役犬コロニー群として日本盲導犬協会のラブラドル・レトリバーを加え、それぞれの分集団における遺伝的距離や多型性を調べ、犬種間の比較を行った。5 犬種を解析した結果、 $F_{ST}$  の値から犬種間分化が示されたものの、いずれの犬種においても近交度を示す  $F_{IS}$  の値が低いことが明らかとなった。

近年、近親交配による遺伝的多様性の低下やそれにもなう遺伝性疾患の定着が取り沙汰され、JKC の血統証明書交付に際しても、近親交配を行う際には事前申請が必要となっており（「健康な犬を繁殖するには」：[http://www.jkc.or.jp/modules/breedinginfo/index.php?content\\_id=18](http://www.jkc.or.jp/modules/breedinginfo/index.php?content_id=18)）、繁殖者、飼育者ともに近親交配に対する意識は変化してきている。本解析結果から、犬種内交配で分化は進行したが、一方で近親交配を避けた選択的交配が行われたことで、犬種内の多様性が維持されている傾向がうかがえる。この結果は上述の近年の世相と合っており、DogFiler での評価が妥当であることを示唆している。

使役犬コロニー群では、 $F_{ST}$  の値はラブラドル・レトリバー群よりさらに大きくなり、より顕著に分化した分集団であった。しかし、遺伝的距離が小さくなったにも関わらず近交度を表す  $F_{IS}$  は負の値となり、遺伝的には近いが近親交配は行なわれておらず、多様性が増す傾向にあることが示された。本使役犬コロニー群には親子・同胞個体が多数含まれているが、日本盲導犬協会では、繁殖犬の購入や他団体からの譲渡によって異系統の個体を導入している（平成 26 年度事業報告書 [https://www.moudouken.net/about/pdf/H26\\_hokokusho.pdf](https://www.moudouken.net/about/pdf/H26_hokokusho.pdf)）。解析結果では、血縁関係にある個体が含まれていることや遺伝子流入があることが示されており、上述の状況を正しく反映していることが明らかとなった。

以上のように、本解析法がイヌの分集団における遺伝的多様度を評価する方法として有用であることが示された。これまで遺伝的な多様性は、特定の遺伝子を直接解析することに関連する形質や疾患に特異的に検討されてきた。本解析法では、複数の染色体の non-coding 領域を解析対象としているため、表現型ではなく、各個体の遺伝的背景という意味での本来の遺伝的多様性を評価できると考えられた。

## 第2節

### 5.2-1 緒言

犯罪現場に残されたイヌの DNA は、ときに犯罪の立証に役立つ。これまでイヌの DNA 型鑑定は、事件に関係があると思われる個体との同一性の確認のために行われてきた。しかし、現場に残された DNA から該当個体の外見を推定して探し出すことができれば、警察活動にさらに貢献することが期待できる。

これまでイヌの色や大きさ、足の長さなどの外観的特徴については研究が行われ、関連遺伝子が報告されてきた。しかしこれらの報告は、一つないし少数の特徴に着目して直接的な原因遺伝子を探索しており、特定された原因遺伝子も複雑に相互作用しているため、法科学分野への応用には不向きである。そこで本節では、個々の形態的特徴ではなく、総合的な外見とも言える「犬種」の推定法の確立を試みた。解析手法として、名義ロジスティック回帰分析と尤度比解析を検討した。

名義ロジスティック回帰 (Nomial Logistic Regression) は多変量解析法の1つで、各変数に対して偏回帰係数を設定し、一般線形モデルとして表すものである。本検討では、各アレルのくり返し回数を説明変数として各犬種のロジスティック回帰式を作成し、犬種ごとの肯定確率を計算した。

尤度 (Likelihood) はある事象が起こる確率のことであり、2つの排反事象が起きる確率の比をとった尤度比 (Likelihood Ratio : LR) は一方の仮説の優越性を示す指標となる(青木, 2002)。本検討では、ある犬種と仮定した場合の DNA 型の出現確率と、それ以外の犬種または雑種である場合の出現確率の比を表したものを各犬種の LR とし、カットオフポイントの設定により犬種を推定できるかどうかを検討した。

## 5.2-2 材料と方法

### 5.2-2-1 サンプル

犬種推定法の検討には、第1節で用いた5犬種の犬種特異群1200頭のデータを用い、検査法の評価には、第3章のランダムサンプリング群のデータを用いた。いずれの群についても血統証明書の確認はしておらず、犬種の決定は飼い主の申告または獣医師の判断によって行われた。

### 5.2-2-2 犬種推定法

#### 名義ロジスティック回帰 (Nominal logistic regression)

各座位におけるアレル（くり返し回数）を説明変数とし、犬種を目的変数として名義ロジスティック回帰分析を行った。この解析方法では、2つのアレルを並列に扱うことができないため、短いアレルをA、長いアレルをBとし、2つの方法で解析した。まず、1つは各個体のDNA型を15座位のアレルAのみまたはアレルBのみで表し、説明変数を15座位、サンプル数を倍の500（ラブラドル・レトリバーは400）として解析する方法である。もう1つは、アレルAとアレルBを別の変数として扱い、説明変数を30座位、サンプル数を250（ラブラドル・レトリバーは200）として解析する方法である。以下、前者を「NLR-15」、後者を「NLR-30」とする。

各アレルのくり返し回数を説明変数とし、犬種を目的変数として、ロジスティック回帰式を求めた。解析にはJMP® Pro 11 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いた。

#### 尤度比 (Likelihood ratio)

各座位におけるアレルの出現頻度をもとに、各犬種のLRを計算した。比較するデータとして、ランダムサンプリング群のアレル頻度データからそれぞれの犬種のデータを抜いたものを作成した。検査対象個体の座位kにおけるSTR型について、ある犬種xにおける出現頻度を $X_k$ 、犬種x以外のイヌにおける出現頻度を $Y_k$ とし、次の式で算出した。

$$LR_x = \prod_{k=1}^{15} \frac{X_k}{Y_k}$$

### 5.2-2-3 有用性評価

判定は、最尤項目を選択するかカットオフポイントを設定することで行われ、判定結果は次の4つに分類される。

**真陽性**：犬種xであると推定されたイヌが実際に犬種xである

**偽陽性**：犬種 x であると推定されたイヌが本当は犬種 x ではない

**偽陰性**：犬種 x ではないと推定されたイヌが本当は犬種 x である

**真陰性**：犬種 x ではないと推定されたイヌが、実際に犬種 x ではない

さらに、これらの判定結果をもとに感度、特異度、的中率が算出される。

**感度**：犬種 x であるイヌが犬種 x であると判定される割合  $\text{真陽性}/(\text{真陽性}+\text{偽陰性})$

**特異度**：犬種 x でないイヌが犬種 x でないと判定される割合  $\text{真陰性}/(\text{真陰性}+\text{偽陽性})$

**的中率**：正しい判定がなされる割合  $(\text{真陽性}+\text{真陰性})/\text{全個体数}$

本節では、まず ROC 曲線の AUC の算出と最尤犬種的中率によって 3 つの犬種推定法を比較し、その結果有用であると判断された手法についてカットオフポイントの設定を行った。さらに、第 3 章のランダムサンプリング群のデータを用いて的中率を確認した。

### ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線

ROC 曲線は、横軸に 1-特異度、縦軸に感度を取り、カットオフポイントを変動させながらプロットしたもので、検査精度の評価や検査法の比較に用いられる。ROC 曲線下の面積 (Area Under the Curve: AUC) は解析手法の有用性を表し、完全な推定が可能なときは 1、結果が推定不能 (ランダム) である場合は 0.5 となる。3 種の犬種推定法の有用性を比較するために ROC 曲線を作成し、各推定法について平均 AUC を算出して比較を行った。解析には JMP® Pro 11 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。

### 最尤犬種の中率

各推定法の設定に用いた 5 犬種 1200 頭分のデータを、導かれたモデルにそれぞれ代入し、NLR-15 および NLR-30 による犬種肯定確率と、LR 法による犬種尤度比を算出した。それぞれ最尤犬種を判定結果とし、5 犬種の平均的中率を計算して比較を行った。

### カットオフポイントの設定

肯定確率や尤度比を用いて解析を行う場合、カットオフポイントを設定し、その値を超えるか否かで判定を行う方法が一般的である。本検討では、10, 100, 1000, 10000 にカットオフポイントを設定し、感度、特異度および的中率を検討した。



## 5.2-3 結果

### 5.2-3-1 犬種推定法の有用性の比較

NLR-15, NLR-30, LR 法の 3 種の犬種推定法について, 5 犬種それぞれの ROC 曲線を作成し, AUC を求めた (図 5-8 および表 5-1). 各手法における 5 犬種の平均 AUC は, NLR-15 で 0.9376, NLR-30 で 0.9867, LR 法で 0.9981 であった.

各推定法の設定に用いた 5 犬種 1200 頭分のデータを, 導かれたモデルにそれぞれ代入し, NLR-15 および NLR-30 による犬種肯定確率と LR 法による犬種尤度比を算出した. 各個体の中で各推定法から得られた 5 つの値をそれぞれ比較し, 最も高い値を返した犬種を最尤犬種としての的中率を計算した (表 5-2). 的中率は NLR-15 で 0.749, NLR-30 で 0.902, LR 法で 0.995 であった.

### 5.2-3-2 LR 法のカットオフポイントの検討

AUC および的中率を比較したところ, LR 法が最も有用性が高いことが示唆された. そこでカットオフポイントを 10, 100, 1000, 10000 として, それを越える値を返した犬種を推定犬種とし, 感度, 特異度, 的中率を計算した (表 5-3). カットオフポイントを 10 とすると感度は 0.981 と高いが, 100 とすると 0.962 に低下し, 偽陰性が倍増した. しかし特異度はカットオフポイントを 10 とすると 0.997 であったのに対し, 100 以上とすると 0.999 と極めて高い値を示した.

そこでカットオフポイントには, 感度および的中率が高くなる 10 と, 感度が 90 %程度に保たれつつも特異度が極めて高くなる 1000 の 2 つを設定し, ランダムサンプリング群のうち, この解析に関与していない個体 1641 頭を用いて感度, 特異度, 的中率を求めた. 表 5-4 に各犬種 10 頭ずつについて結果を示し, 全体の結果を表 5-5 にまとめた. 純血種における感度は, カットオフポイントを 10 に設定すると 0.941 となり, 1000 に設定するよりも高くなったが, カットオフポイントを 1000 に設定すると純血種, 雑種ともに特異度が向上した. 純血種と雑種を総合すると, カットオフポイントを 10 に設定すると特異度は 0.985, 的中率は 0.983, カットオフポイントを 1000 とすると, 特異度は 0.995, 的中率は 0.985 となった.

#### 5.2-4 考察

本節では、総合的な外見とも言える「犬種」の推定を 3 種の方法で試みた。まず、各座位におけるアレルを説明変数とし、犬種を目的変数として名義ロジスティック回帰分析を行った。この解析方法では 2 つのアレルを並列に扱うことができないため、短いアレルを A、長いアレルを B とし、2 つの方法 (NLR-15 および NLR-30) で解析した。NLR-15 では、各個体の DNA 型を 15 座位のアレル A のみまたはアレル B のみで表し、説明変数を 15 座位、サンプル数を倍の 500 (ラブラドル・レトリバーは 400) として解析した。NLR-30 では、アレル A とアレル B を別の変数として扱い、サンプル数は 250 (ラブラドル・レトリバーは 200) のまま、説明変数を倍の 30 座位として解析した。NLR-15 と NLR-30 では、各犬種の犬種肯定確率を求めた。つづいて 3 つ目の方法として、尤度比を算出する LR 法を検討した。LR 法では各座位におけるアレル頻度をもとに、各犬種における出現確率とその他のイヌにおける出現確率の比をとり、その犬種らしさを尤度比として表した。

3 種の推定法の有用性を比較するために ROC 曲線を作成し、AUC を算出するとともに、用いた 1200 頭のデータをモデルに代入し、最尤犬種の的中率を確認した。AUC および的中率はどちらも LR 法、NLR-30、NLR-15 の順に高く、LR 法が最も有用であると考えられた。名義ロジスティック回帰では、各座位の 2 つのアレルを別物として扱い、NLR-15 ではすべての座位の短いアレルを 1 サンプル、長いアレルを 1 サンプルとしてそれぞれまとめ、NLR-30 では各座位の短いアレルと長いアレルを別座位として扱った。特に NLR-15 では説明変数間の独立性が損なわれた可能性が考えられた。的中率を比較したところ、NLR-15 は 74.9% で、NLR-30 の 90.2% および LR 法の 99.5% と比べて大幅に低い値となり、特にダックスフンドとチワワの間で誤判定が多かった。

LR 法の有用性が高いことが示されたので、つづいて LR 法におけるカットオフポイントを検討した。カットオフポイントを 10, 100, 1000, 10000 とし、それを超える値を返した犬種を推定犬種とし、感度、特異度、的中率を計算した。感度はカットオフポイントを 10 とすると 0.981 と高いが、100 とすると 0.962 に低下し、特異度はカットオフ値を 10 とすると 0.997 であったのに対し、100 とすると 0.999 と高い値を示し、10000 では 1.0 に極めて近い値となった。的中率はカットオフポイントを 10 としたときに 0.994 で最も高く、100~10000 では偽陰性の増加にともなって低下した。感度や的中率を見ると、カットオフポイントを 10 に設定すべきであるように思われるが、法科学鑑定においては信頼性維持のため、偽陽性を少なくすることが極めて重要であり、特異度の高さが重要視される。よってカットオフポイントには、感度と的中率が高くなる 10 と、感度が 90% 程度に保たれつ

つも特異度が高くなる 1000 の 2 つを設定し、10 以上で「犬種  $x$ らしい（犬種  $x$ である可能性が高い）」、1000 以上で「極めて犬種  $x$ らしい（犬種  $x$ である可能性が極めて高い）」という 2 段階で判定を行うのが妥当であると考えられた。

そこで、ランダムサンプリング群のうち、この解析に関与していない個体 1641 頭を用い、カットオフポイントを 10 および 1000 に設定し、純血種と雑種に分けて感度、特異度、的中率を求めた。表 5-4 に各犬種 10 頭ずつについて LR の値を示し、全頭の結果を表 5-5 にまとめた。純血種における的中率は、カットオフポイントを 10 に設定すると 1000 に設定するよりも高かった。しかし、カットオフポイントを 1000 に設定すると純血種、雑種ともに特異度が向上し、全体としての特異度は 0.985 から 0.995 へ、的中率は 0.983 から 0.985 へと上昇した。純血種のみを対象とすると、カットオフポイントを 10 に設定したほうが的中率は高くなったが、雑種を含めると、カットオフポイントを 1000 に設定したほうが的中率は高くなった。

以上のことから、LR 法を用いることで犬種推定は可能であり、カットオフポイントは感度と、特異度をそれぞれ重視した 2 点（10 および 1000）に設定すべきであると考えられた。

## 5-4 考察

本章では、イヌの分集団に焦点をあて、DogFiler のさらなる活用が可能かどうかを検討した。まず第 1 節で、分集団内における遺伝的多様性や遺伝的距離の評価に本手法が応用可能かを検討し、次に第 2 節で、本手法によって犬種推定が可能かを検討した。

まず、犬種群としてチワワ、トイ・プードル、ミニチュア・ダックスフンド、シバイヌ、ラブラドル・レトリバーの 5 犬種と、使役犬コロニー群として日本盲導犬協会所属のラブラドル・レトリバー、計 6 群を解析し、分集団における遺伝的多様性の評価に DogFiler を応用できるかを検討した。5 犬種を解析した結果、 $F_{ST}$  の値から犬種間分化が示されたものの、いずれの犬種においても近交度を示す  $F_{IS}$  の値が低いことが明らかとなった。純血種においては、近年、近親交配による遺伝的多様性の低下にともなって、犬種特有の遺伝性疾患が定着することが問題となっている (Asher et al., 2009)。犬種標準に定義されている形質と関連が認められる疾患も多く、犬種標準の改定や他犬種との交雑によって遺伝的多様性を確保する動きがあり、系統の管理と計画的な繁殖が求められている。本解析結果では、犬種内交配を行うことで分化は顕著になるが、近親交配を避けた選択的交配により犬種内の多様性が維持されている、という実情が反映されていると考えられる。使役犬コロニー群においては、 $F_{ST}$  の値はラブラドル・レトリバー群よりさらに大きくなり、より顕著に分化した分集団であることが示された。本使役犬コロニー群には、第 4 章で解析した親子・同胞個体が多数含まれており、遺伝的距離は犬種群と比べてやや低い値となった。しかし  $H_O$  が  $H_E$  よりも高く、近交度を表す  $F_{IS}$  は負の値となり、多様性は増していることが明らかとなった。日本盲導犬協会では、他団体との繁殖犬の貸借による異系交配を行うことで、遺伝的多様性の維持に努めている。解析結果には、血縁関係にある個体が含まれていることや、他の分集団からの遺伝子流入があることが正しく反映されたと考えられる。

つづいて、犬種推定法について 3 種の方法を検討した。各座位におけるアレルを説明変数とし、犬種を目的変数とした名義ロジスティック回帰分析 (NLR-15 および NLR-30) と、各犬種における出現確率とその他のイヌにおける出現確率の比をとり、その犬種らしさを尤度比として表した LR 法を検討した。ROC 曲線を作成して AUC を算出するとともに、用いた 1200 頭のデータをモデルに代入し、最尤犬種の的中率を確認したところ、どちらも LR 法、NLR-30、NLR-15 の順に高く、LR 法が最も有用であると考えられた。

LR 法の有用性が高いことが示されたので、LR 法を採用してカットオフポイントを検討した。法科学鑑定では信頼性維持のため、偽陽性を少なくすることが極めて重要であり、特異度の高さが重要視される。法科学鑑定では被疑者ないし被告が不当に不利な扱いを受

けないために、特に偽陽性を排除することが重要であり、カットオフポイントの設定は慎重に行わなければならない (Tanaka, 2013; 勝又, 2014)。しかし、カットオフポイントを高く設定すると感度が低下し、偽陰性の頻度が高くなる。そのため、親子鑑定における肯定確率の判定などにはカットオフポイントを複数設定し、カットオフポイントによって判定の文言に差をつける方法がとられている。たとえば父子検定の代表的な判定方法である Hummel の評価基準 (Hummel, 1971) では、父と判定してよい、極めて父らしい、非常に父らしい、父らしい、父かどうかわからない、父らしくない、非常に父らしくない、極めて父らしくない、父でないと判定してよい、の 9 段階で判定が行われる。

本解析法では、カットオフポイントとして、感度が高くなる 10 と感度が 90 %程度に保たれつつも特異度が高くなる 1000 の 2 つを設定し、10 以上で「犬種 x らしい (犬種 x である可能性が高い)」、1000 以上で「極めて犬種 x らしい (犬種 x である可能性が極めて高い)」という 2 段階で判定を行うのが妥当であると考えた。

このカットオフポイントを用いて、ランダムサンプリング群で、この解析に関与していない個体を純血種と雑種に分け、感度、特異度、的中率を求め、その妥当性を検討した。純血種においては、カットオフポイントを 10 に設定すると感度が高くなり、それとともに的中率も高い値となった。しかし、雑種では本来の結果はすべて陰性であるため、感度という概念はなく、特異度のみが算出される。そのため、カットオフポイントを 1000 に設定することで特異度だけでなく、的中率も向上する結果となった。よって純血種と雑種を総合した全体としての的中率をみるとカットオフポイント 10 のときに 0.983、1000 のときに 0.985 と大きな差はないものの、カットオフポイントを 1000 に設定したほうが的中率はわずかに高くなる結果となった。以上のことから、LR 法を用いることで犬種推定は可能であり、カットオフポイントは感度と、特異度をそれぞれ重視した 2 点 (10 および 1000) に設定すべきであると考えられた。

プードルとダックスフンドには、犬種内にサイズによる分類が存在する (表 5-6)。犬種別アレル頻度データを蓄積する際には、サイズを日本で最も飼育頭数の多いトイ・プードルとミニチュア・ダックスフンドに限定したため、正式な犬種名ではないものの、判定犬種は「トイ・プードル」と「ミニチュア・ダックスフンド」とした。ランダムサンプリング群に含まれていたスタンダード・プードル 3 頭、スタンダード・ダックスフンド 1 頭およびカニーンヘン・ダックスフンド 6 頭を解析したところ、スタンダード・プードルは、いずれの犬種判定も陰性であったが、スタンダード・ダックスフンドとカニーンヘン・ダックスフンドは「ミニチュア・ダックスフンド」と判定された。

プードルとダックスフンドのサイズ違いについては、過去に興味深い報告がある。2008年、プードルの4つのサイズについて27座位のSTRマーカーを解析したところ、スタンダード・プードルのみが別犬種と思われるほど分化していたという報告がある(Bjornerfeldt et al., 2008)。Bjornerfeldtらは、スタンダード・プードルが使役犬として確立されたのに対して他の3つのサイズは愛玩犬として作出されたため、早い段階で繁殖系統が分かれたのではないかと考察しており、同一犬種であっても外見や用途によって分離した集団となれば、大きく分化する可能性があるという指摘している。一方ダックスフンドに関しては、サイズのちがいによる分化は小さいという報告がある(Přibáňová et al., 2009)。この報告では、毛質(スムース、ロング、ワイヤー)とサイズ(スタンダード、ミニチュア)でダックスフンドを6タイプに分類して遺伝的分化度を調べた結果、毛質による分化は顕著であったが、サイズのちがいによる影響は小さかったとしている。本研究の結果もこれらの報告を支持するものであり、ダックスフンドのサイズはプードルほど大きな差がなく、サイズ間での交配が禁止されたのも最近であるため、このような差がうまれたものと考えられる。

「日本で飼育されているイヌ」という集団においても分化や多様化は進んでおり、現在JKCに登録されているものだけでも198犬種が存在している。このプードルの例のように、今後犬種内での分化が発生する可能性もあり、アレル頻度データは随時更新していく必要がある。LR法最大の利点は、データの更新や追加が容易であるという点である。尤度比算出の計算式をそのままに、アレル頻度データの更新や新たな犬種の追加が可能であるため、実用性が高く、また他地域における活用や他の動物種への応用も可能である。

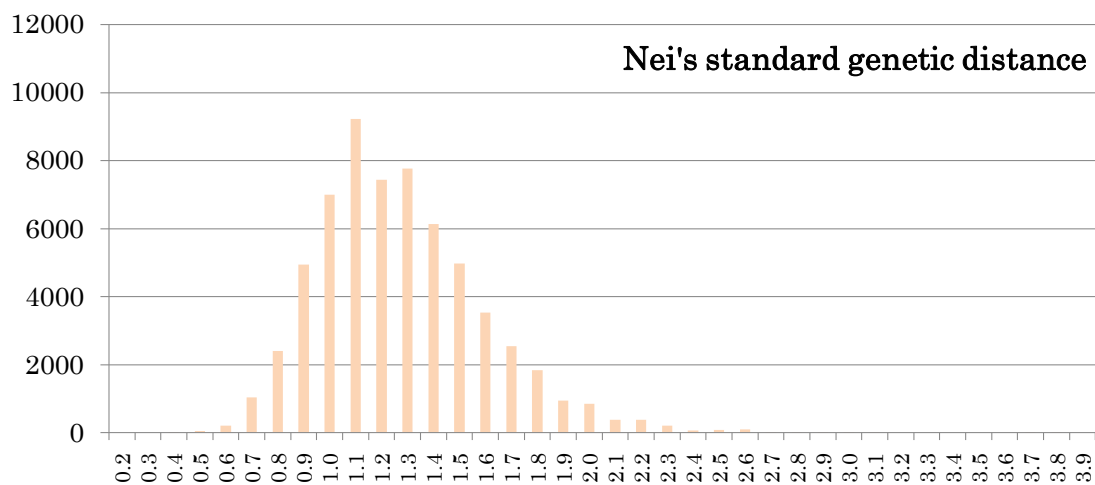
これまで法科学分野におけるイヌのDNA型鑑定は、個体との同一性の確認のために行われてきたため、識別力や多型性が重視されてきた。しかし、現場に残されたDNAから該当個体の総合的な外見とも言える「犬種」を推定することができれば、警察活動にさらに貢献することが期待できる。今後アレル頻度データを蓄積することで、他の犬種についても推定が可能であると考えられ、本解析法の法科学分野における活用が期待される。

## 5-5 小括

本章では、「分集団」に焦点をあて、DogFiler の応用が可能かを検討した。まず第 1 節で、分集団内における遺伝的多様性や遺伝的距離の評価に本手法が応用可能かを検討し、次に第 2 節で本手法によって犬種推定が可能かを検討した。

まず第 1 節では、各犬種を分集団として遺伝的多様性や近交度を解析し、犬種の維持、管理への応用について検討した。日本で数多く飼育されているチワワ、トイ・プードル、ミニチュア・ダックスフンド、シバイヌ、ラブラドル・レトリバーの 5 犬種に日本盲導犬協会のラブラドル・レトリバーを使役犬コロニー群として加え、それぞれの分集団における遺伝的距離や多型性を調べ、犬種間の比較を行った。その結果、 $F_{ST}$  は第 3 章と同様の高い値を示したが、一方で  $F_{IS}$  は低く、犬種間分化は顕著であるものの、各犬種内で血縁関係に配慮した作為交配が行われていることが示された。使役犬コロニー群においては、遺伝的距離が小さくなったにも関わらず近交度を表す  $F_{IS}$  が低く、親子や同胞個体が含まれていることや、遺伝子流入があることが正しく反映された結果となった。よって本手法は、集団における遺伝的多様度を評価する方法として有用であると考えられた。

第 2 節では、犬種推定法の確立を試みた。第 1 節で解析した 5 犬種のアレル頻度データと、第 3 章で解析したランダムサンプリング群のアレル頻度データをもとに、名義ロジスティック回帰分析と尤度比解析を行い、15 座位の STR 型から犬種推定が可能であるかを検討した。その結果、アレル頻度から各犬種であると仮定した場合の尤度比を算出することで、99 %以上の高い的中率で犬種を推定できることが明らかとなり、カットオフポイントを感度と特異度をそれぞれ重視した 2 点 (10 および 1000) に設定することで、最大の効果を得られることが示された。

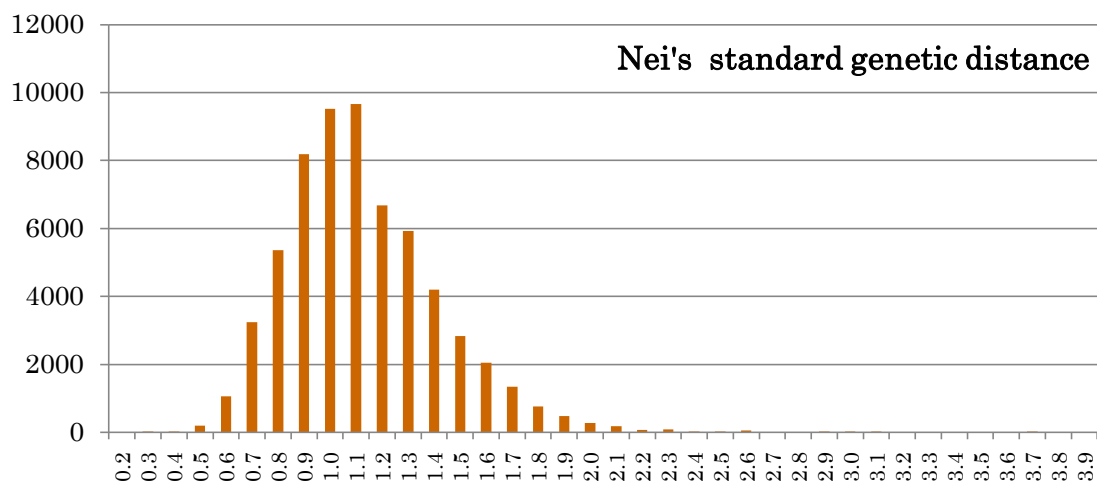


Locus	nA	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>	HW
VGL3008	12	0.852	0.833	0.014	-0.023	NS
VGL1541	13	0.824	0.840	0.039	0.019	NS
VGL0760	12	0.800	0.833	0.056	0.040	NS
VGL2136	10	0.828	0.856	0.002	0.033	NS
VGL3438	9	0.756	0.761	0.116	0.007	NS
VGL1165	17	0.816	0.867	0.051	0.059	NS
VGL3235	10	0.808	0.773	0.093	-0.045	NS
VGL2409	8	0.796	0.799	0.006	0.004	NS
VGL3112	7	0.748	0.790	0.042	0.053	NS
VGL1828	11	0.824	0.843	-0.007	0.023	NS
VGL0910	14	0.832	0.876	-0.068	0.050	NS
VGL1063	14	0.796	0.809	0.082	0.016	NS
VGL2009	9	0.780	0.798	-0.009	0.023	NS
VGL2918	11	0.680	0.738	0.140	0.079	NS
VGL1606	14	0.800	0.813	0.039	0.016	NS
Average	11.4	0.796	0.815	0.040	0.023	

図 5-1 チワワの解析結果

nA : アレル数    H<sub>O</sub> : ヘテロ接合度観測値    H<sub>E</sub> : ヘテロ接合度期待値  
 F<sub>ST</sub> : イヌ集団 (n=1992) における分化度    F<sub>IS</sub> : 犬種群 (n=50) 内における近交度  
 HW : ハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱 (NS : not significant, \* : p<0.003)

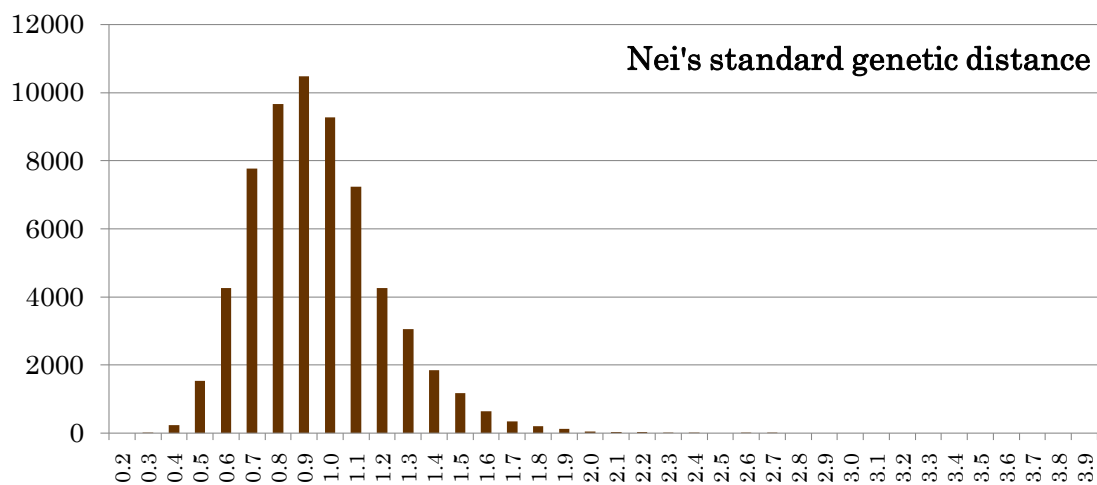




Locus	nA	H <sub>o</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>	HW
VGL3008	11	0.76	0.80	0.06	0.04	NS
VGL1541	13	0.64	0.65	0.26	0.01	NS
VGL0760	16	0.79	0.81	0.08	0.03	NS
VGL2136	9	0.82	0.82	0.04	0.01	NS
VGL3438	10	0.83	0.82	0.04	-0.01	NS
VGL1165	20	0.83	0.86	0.06	0.04	NS
VGL3235	8	0.77	0.81	0.05	0.04	NS
VGL2409	10	0.61	0.64	0.21	0.05	NS
VGL3112	8	0.77	0.80	0.03	0.04	NS
VGL1828	11	0.76	0.74	0.12	-0.03	NS
VGL0910	14	0.80	0.82	0.00	0.02	NS
VGL1063	13	0.87	0.87	0.01	0.00	NS
VGL2009	8	0.58	0.60	0.24	0.04	NS
VGL2918	13	0.87	0.88	-0.02	0.01	NS
VGL1606	13	0.79	0.82	0.03	0.04	NS
Average	11.8	0.766	0.782	0.081	0.020	

図 5-2 トイ・プードルの解析結果

nA : アレル数      H<sub>o</sub> : ヘテロ接合度観測値      H<sub>E</sub> : ヘテロ接合度期待値  
 F<sub>ST</sub> : イヌ集団 (n=1992) における分化度      F<sub>IS</sub> : 犬種群 (n=50) 内における近交度  
 HW : ハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱 (NS : not significant, \* : p<0.003)



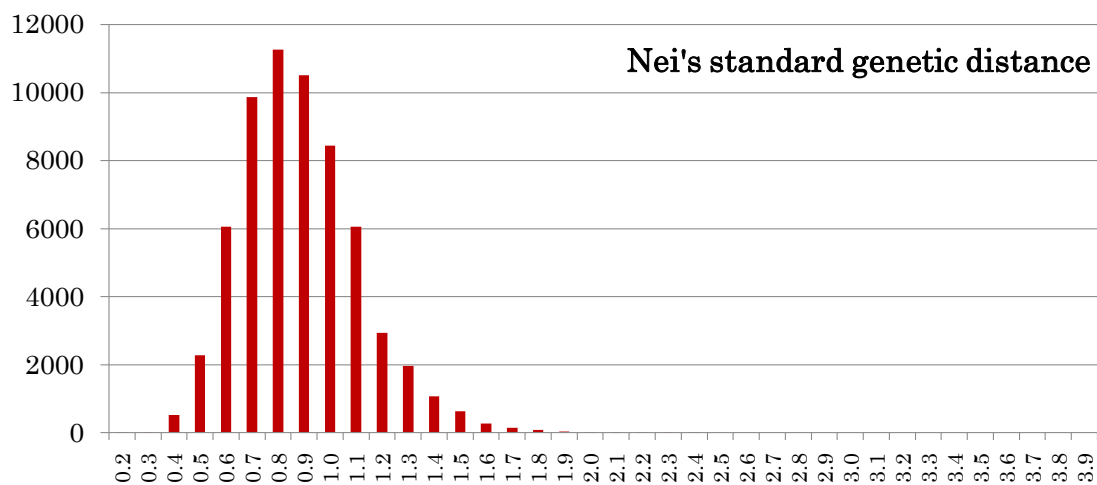
Locus	nA	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>	HW
VGL3008	8	0.70	0.70	0.18	-0.01	NS
VGL1541	9	0.82	0.84	0.04	0.02	NS
VGL0760	15	0.74	0.73	0.18	-0.01	NS
VGL2136	10	0.78	0.80	0.07	0.02	NS
VGL3438	9	0.78	0.81	0.06	0.03	NS
VGL1165	15	0.76	0.83	0.09	0.09	NS
VGL3235	9	0.75	0.78	0.09	0.03	NS
VGL2409	9	0.70	0.72	0.11	0.02	NS
VGL3112	8	0.65	0.70	0.16	0.06	NS
VGL1828	8	0.47	0.49	0.42	0.04	NS
VGL0910	9	0.73	0.76	0.08	0.04	NS
VGL1063	13	0.75	0.78	0.12	0.04	NS
VGL2009	7	0.58	0.61	0.22	0.06	NS
VGL2918	12	0.70	0.73	0.14	0.05	NS
VGL1606	14	0.70	0.69	0.18	-0.01	NS
Average	10.3	0.707	0.730	0.142	0.031	

図 5-3 ミニチュア・ダックスフンドの解析結果

nA : アレル数    H<sub>O</sub> : ヘテロ接合度観測値    H<sub>E</sub> : ヘテロ接合度期待値

F<sub>ST</sub> : イヌ集団 (n=1992) における分化度    F<sub>IS</sub> : 犬種群 (n=50) 内における近交度

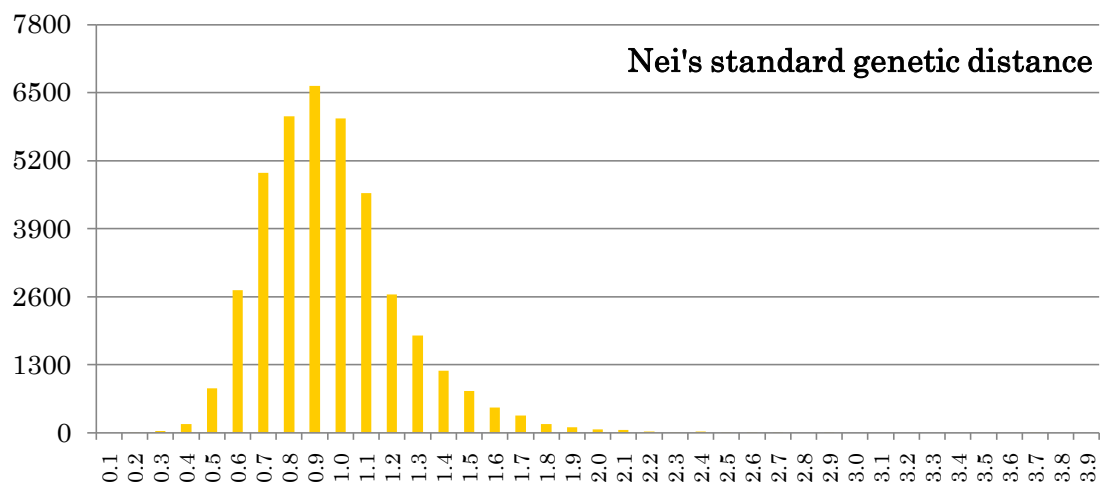
HW : ハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱 (NS : not significant, \* : p<0.003)



Locus	nA	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>	HW
VGL3008	10	0.71	0.74	0.13	0.04	NS
VGL1541	9	0.77	0.79	0.10	0.03	NS
VGL0760	13	0.61	0.60	0.32	-0.02	NS
VGL2136	10	0.69	0.70	0.18	0.02	NS
VGL3438	9	0.74	0.76	0.12	0.02	NS
VGL1165	13	0.68	0.71	0.23	0.04	NS
VGL3235	9	0.80	0.81	0.05	0.01	NS
VGL2409	10	0.71	0.74	0.08	0.04	NS
VGL3112	6	0.67	0.64	0.22	-0.04	NS
VGL1828	12	0.78	0.78	0.07	0.00	NS
VGL0910	6	0.57	0.61	0.25	0.07	NS
VGL1063	10	0.49	0.50	0.43	0.02	NS
VGL2009	5	0.52	0.53	0.33	0.02	NS
VGL2918	13	0.49	0.81	0.06	0.40	*
VGL1606	15	0.82	0.84	0.00	0.03	NS
Average	10.0	0.669	0.704	0.171	0.046	

図 5-4 シバイヌの解析結果

nA : アレル数    H<sub>O</sub> : ヘテロ接合度観測値    H<sub>E</sub> : ヘテロ接合度期待値  
 F<sub>ST</sub> : イヌ集団 (n=1992) における分化度    F<sub>IS</sub> : 犬種群 (n=50) 内における近交度  
 HW : ハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱 (NS : not significant, \* : p<0.003)



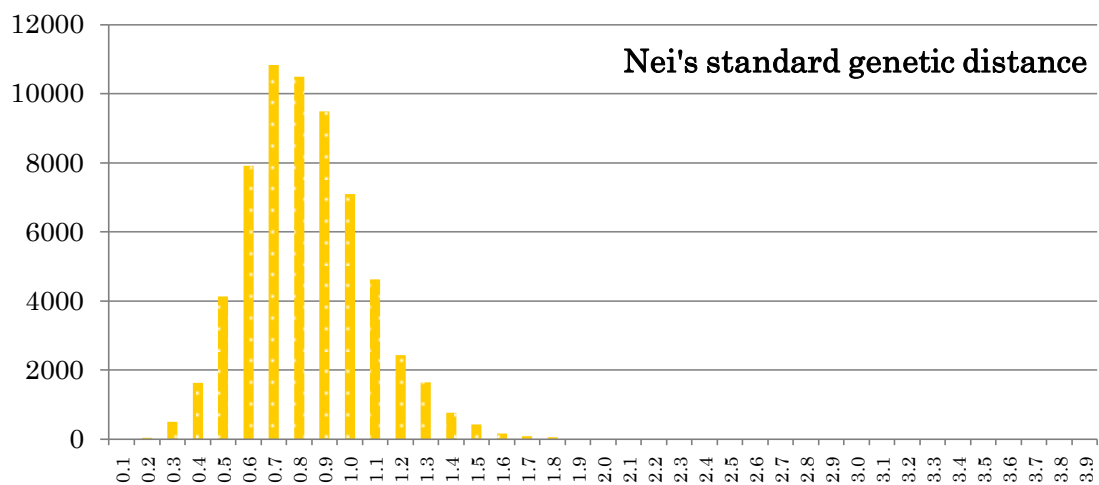
Locus	nA	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>	HW
VGL3008	12	0.85	0.84	0.01	-0.01	NS
VGL1541	12	0.85	0.83	0.05	-0.01	NS
VGL0760	9	0.69	0.75	0.15	0.08	NS
VGL2136	11	0.71	0.74	0.13	0.05	NS
VGL3438	8	0.52	0.51	0.41	-0.03	NS
VGL1165	11	0.73	0.78	0.15	0.07	NS
VGL3235	8	0.81	0.77	0.10	-0.05	NS
VGL2409	8	0.68	0.71	0.12	0.05	NS
VGL3112	7	0.60	0.60	0.28	0.00	NS
VGL1828	10	0.78	0.80	0.04	0.03	NS
VGL0910	8	0.74	0.76	0.07	0.04	NS
VGL1063	9	0.72	0.76	0.14	0.05	NS
VGL2009	5	0.65	0.60	0.24	-0.08	NS
VGL2918	10	0.76	0.81	0.06	0.06	NS
VGL1606	10	0.80	0.77	0.09	-0.04	NS
Average	9.2	0.723	0.735	0.136	0.014	

図 5-5 ラブラドル・レトリバーの解析結果

nA : アレル数    H<sub>O</sub> : ヘテロ接合度観測値    H<sub>E</sub> : ヘテロ接合度期待値

F<sub>ST</sub> : イヌ集団 (n=1992) における分化度    F<sub>IS</sub> : 犬種群 (n=50) 内における近交度

HW : ハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱 (NS : not significant, \* : p<0.003)



Locus	nA	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>	HW
VGL3008	8	0.84	0.82	0.03	-0.03	NS
VGL1541	11	0.82	0.80	0.09	-0.04	NS
VGL0760	6	0.73	0.75	0.15	0.02	NS
VGL2136	8	0.76	0.72	0.17	-0.06	NS
VGL3438	4	0.36	0.37	0.57	0.01	NS
VGL1165	8	0.74	0.71	0.23	-0.05	NS
VGL3235	8	0.74	0.71	0.17	-0.05	NS
VGL2409	6	0.74	0.71	0.12	-0.04	NS
VGL3112	6	0.43	0.42	0.49	-0.02	NS
VGL1828	9	0.78	0.79	0.06	0.01	NS
VGL0910	5	0.77	0.74	0.10	-0.04	NS
VGL1063	8	0.74	0.75	0.15	0.01	NS
VGL2009	5	0.61	0.64	0.19	0.05	NS
VGL2918	7	0.80	0.82	0.04	0.02	NS
VGL1606	7	0.76	0.72	0.15	-0.05	NS
Average	7.1	0.709	0.697	0.180	-0.017	

図 5-6 日本盲導犬協会個体群 (n=250) の解析結果

nA : アレル数    H<sub>O</sub> : ヘテロ接合度観測値    H<sub>E</sub> : ヘテロ接合度期待値

F<sub>ST</sub> : イヌ集団 (n=1992) における分化度    F<sub>IS</sub> : 犬種群 (n=50) 内における近交度

HW : ハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱 (NS : not significant, \* : p<0.003)

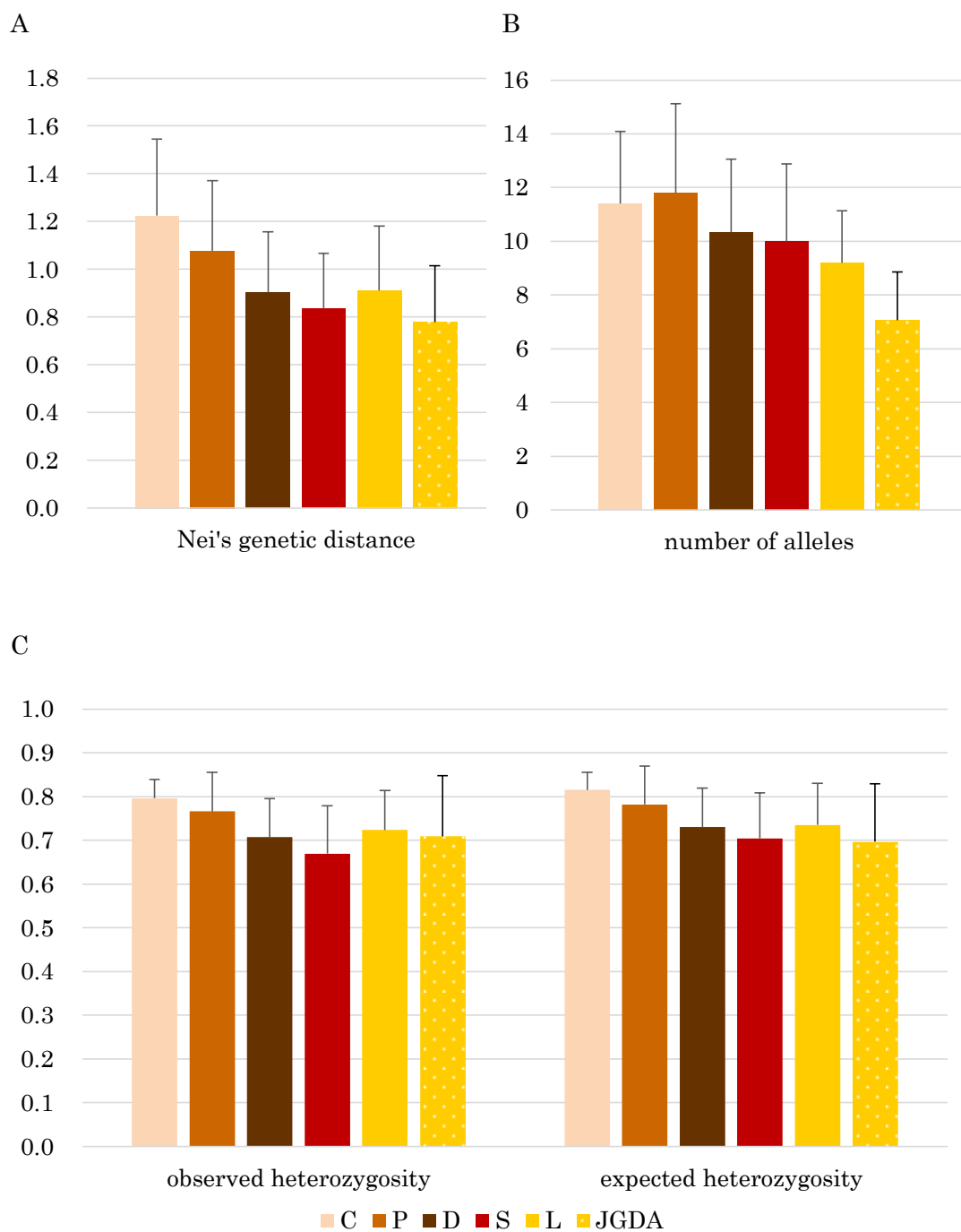


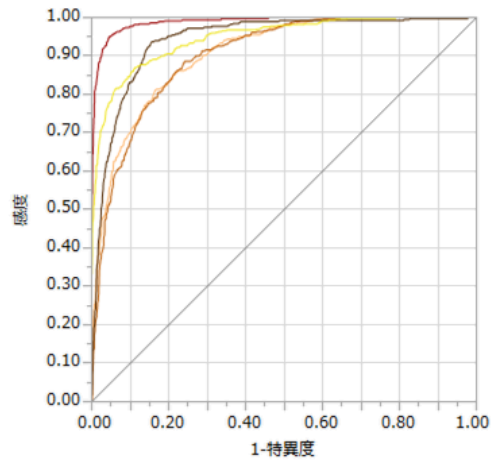
図 5-7 各犬種集団の多様性

図 5-1～5-6 より, Nei's standard genetic distance,  $n_A$ ,  $H_O$ ,  $H_E$  (Average+SD)

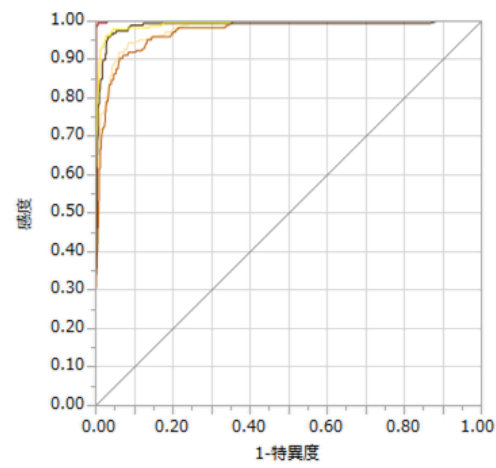
C : チワワ P : トイ・プードル D : ミニチュア・ダックスフンド S : シバイヌ

L : ラブラドル・レトリバー JGDA : 日本盲導犬協会個体群

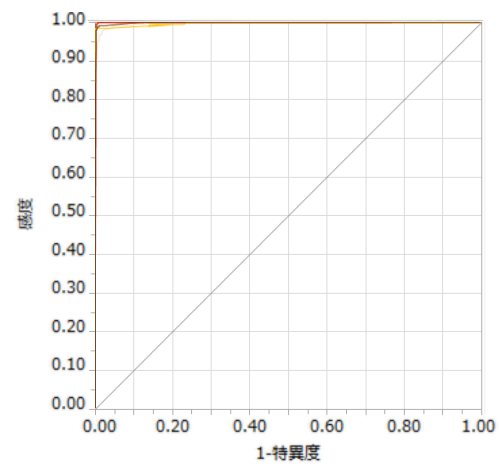
A



B



C



■ C ■ P ■ D ■ S ■ L

図 5-8 各手法における ROC 曲線

A : NLR-15, B : NLR-30, C : LR 法

C : チワワ P : トイ・プードル D : ミニチュア・ダックスフンド

S : シバイヌ L : ラブラドル・レトリバー

表 5-1 各手法における AUC の比較

犬種	NLR-15	NLR-30	LR
C	0.9070	0.9793	0.9980
T	0.9475	0.9933	0.9999
D	0.9019	0.9733	0.9955
S	0.9890	0.9994	0.9994
L	0.9425	0.9883	0.9976
平均	0.9376	0.9867	0.9981

C: チワワ P: トイ・プードル D: ミニチュア・ダックスフンド  
 S: シバイヌ L: ラブラドル・レトリバー



表 5-2 各手法における最尤犬種（推定犬種）的中率の比較

実犬種	推定犬種	NLR-15		NLR-30		LR 法	
<b>C</b>	C	338	(67.6)	213	(85.2)	249	(99.6)
	P	26	(5.2)	0		0	(0.0)
	D	77	(15.4)	24	(9.6)	1	(0.4)
	S	7	(1.4)	4	(1.6)	0	(0.0)
	L	52	(10.4)	9	(3.6)	0	(0.0)
<b>P</b>	P	394	(78.8)	232	(92.8)	250	(100.0)
	C	12	(2.4)	4	(1.6)	0	(0.0)
	D	42	(8.4)	9	(3.6)	0	(0.0)
	S	27	(5.4)	3	(1.2)	0	(0.0)
	L	25	(5.0)	2	(0.8)	0	(0.0)
<b>D</b>	D	333	(66.6)	210	(84.0)	249	(99.6)
	C	81	(16.2)	25	(10.0)	1	(0.4)
	P	43	(8.6)	8	(3.2)	0	(0.0)
	S	6	(1.2)	0	(0.0)	0	(0.0)
	L	37	(7.4)	7	(2.8)	0	(0.0)
<b>S</b>	S	454	(90.8)	248	(99.2)	249	(99.6)
	C	8	(1.6)	1	(0.4)	0	(0.0)
	P	21	(4.2)	1	(0.4)	1	(0.4)
	D	11	(2.2)	0	(0.0)	0	(0.0)
	L	6	(1.2)	0	(0.0)	0	(0.0)
<b>L</b>	L	279	(69.8)	179	(89.5)	197	(98.5)
	C	51	(12.8)	10	(5.0)	0	(0.0)
	P	23	(5.8)	4	(2.0)	1	(0.5)
	D	37	(9.3)	6	(3.0)	1	(0.5)
	S	10	(2.5)	1	(0.5)	1	(0.5)
<b>的中率</b>		0.749		0.902		0.995	

括弧内に各犬種における比率（%）を示した

C：チワワ P：トイ・プードル D：ミニチュア・ダックスフンド

S：シバイヌ L：ラブラドル・レトリバー

表 5-3 尤度法におけるカットオフポイントの設定 (>10, 100, 1000, 10000 の比較)

	犬種	判定	カットオフ ポイント			
			>10	>100	>1000	>10000
<b>LR<sub>C</sub></b>	C	真陽性	238	221	175	114
		偽陰性	12	29	75	136
	PDSL	真陰性	942	949	950	950
		偽陽性	8	1	0	0
<b>LR<sub>P</sub></b>	P	真陽性	248	244	229	207
		偽陰性	2	6	21	43
	CDSL	真陰性	945	949	949	950
		偽陽性	5	1	1	0
<b>LR<sub>D</sub></b>	D	真陽性	245	245	232	206
		偽陰性	5	5	18	44
	CPSL	真陰性	949	949	949	950
		偽陽性	1	1	1	0
<b>LR<sub>S</sub></b>	S	真陽性	249	249	248	246
		偽陰性	1	1	2	4
	CPDL	真陰性	949	949	949	949
		偽陽性	1	1	1	1
<b>LR<sub>L</sub></b>	L	真陽性	197	195	187	183
		偽陰性	3	5	13	17
	CPDS	真陰性	999	1000	1000	1000
		偽陽性	1	0	0	0
<b>5 犬種合計</b>		真陽性	1177	1154	1071	956
		偽陰性	23	46	129	244
		真陰性	4784	4796	4797	4799
		偽陽性	16	4	3	1
<b>感度</b>			0.981	0.962	0.893	0.797
<b>特異度</b>			0.997	0.999	0.999	1.000
<b>的中率</b>			0.994	0.992	0.978	0.959

C: チワワ P: トイ・プードル D: ミニチュア・ダックスフンド

S: シバイヌ L: ラブラドル・レトリバー

犬種	LR	個体 1	個体 2	個体 3	個体 4	個体 5	個体 6	個体 7	個体 8	個体 9	個体 10
アメリカン・コッカー・ スパニエル	LR <sub>C</sub>	1.6E-06	4.4E-05	1.9E-04	1.4E-03	1.5E-05	2.7E-04	1.3E-04	4.3E-04	6.1E-04	2.8E-06
	LR <sub>P</sub>	1.3E-06	3.0E-06	7.9E-07	5.8E-05	3.4E-03	5.7E-09	4.3E-10	2.5E-06	2.5E-06	1.9E-08
	LR <sub>D</sub>	9.6E-07	3.7E-06	3.1E-07	1.3E-08	1.7E-09	5.2E-06	2.3E-07	5.3E-08	2.0E-07	5.5E-09
	LR <sub>S</sub>	6.5E-12	1.3E-11	5.5E-09	9.1E-15	6.3E-02	3.0E-08	1.1E-13	6.8E-14	8.1E-08	6.3E-16
	LR <sub>L</sub>	9.8E-12	9.7E-12	5.6E-09	2.4E-11	9.9E-09	7.2E-11	4.7E-06	3.9E-09	9.2E-12	1.8E-05
ウェスト・ハイランド・ ホワイト・テリア	LR <sub>C</sub>	8.0E+00	1.1E+00	8.4E-02	2.4E+00	2.7E-03	5.2E-03	4.8E-02	<b>1.0E+01</b>	5.9E-03	5.4E+00
	LR <sub>P</sub>	5.6E+00	2.3E-04	5.3E+00	2.4E-06	1.1E+00	7.1E-03	<b>6.1E+01</b>	3.0E-04	2.1E-07	8.8E-02
	LR <sub>D</sub>	4.9E-15	1.5E-10	5.6E-08	4.2E-16	8.5E-10	3.7E-10	3.9E-07	2.7E-13	4.5E-13	1.2E-16
	LR <sub>S</sub>	7.3E-10	7.9E-18	1.6E-17	7.2E-09	9.1E-15	1.9E-17	7.5E-15	1.2E-13	4.2E-15	1.3E-12
	LR <sub>L</sub>	1.3E-09	1.0E-02	6.7E-13	4.2E-09	2.1E-11	1.0E-06	9.1E-13	2.5E-10	1.5E-08	6.1E-09
ウェルシュ・コーギー	LR <sub>C</sub>	8.4E-06	2.8E-02	6.8E-01	7.3E-02	1.7E-02	3.7E-06	4.1E-03	2.1E-03	3.8E-03	2.5E-03
	LR <sub>P</sub>	1.4E-05	1.5E-08	2.4E-06	5.5E-04	2.1E-09	4.3E-09	1.4E-07	3.1E-08	1.4E-05	3.2E-04
	LR <sub>D</sub>	1.2E-07	1.6E-08	2.5E-11	3.2E-12	1.4E-08	4.4E-07	9.9E-09	3.9E-12	3.3E-08	2.3E-10
	LR <sub>S</sub>	2.2E-08	5.0E-13	3.5E-13	5.2E-10	1.1E-08	2.4E-13	1.7E-01	5.8E-10	4.5E-09	1.1E-07
	LR <sub>L</sub>	1.8E-11	1.4E-08	1.8E-03	6.7E-12	6.2E-09	3.1E-10	2.2E-05	1.1E-07	1.2E-08	3.1E-06
キャバリア・ キングチャールズ・ スパニエル	LR <sub>C</sub>	1.6E-03	1.2E-04	7.0E-05	7.2E+00	1.9E-03	9.5E-06	8.4E-07	2.5E-05	6.5E-02	1.3E-01
	LR <sub>P</sub>	4.1E+00	4.6E-03	1.1E-03	2.0E-07	2.1E-05	1.4E-05	1.2E-03	1.3E-05	2.0E-03	5.7E-05
	LR <sub>D</sub>	9.2E-08	1.6E-08	5.0E-08	5.1E-03	2.9E-06	2.2E-07	1.1E-02	6.9E-03	1.4E-06	1.2E+00
	LR <sub>S</sub>	1.1E-15	4.4E-14	1.8E-09	6.0E-14	2.9E-13	6.4E-12	1.3E-13	3.7E-09	1.5E-15	4.3E-11
	LR <sub>L</sub>	2.5E-08	5.6E-06	8.5E-02	2.6E-05	2.4E-03	1.8E-02	3.0E-03	2.4E-05	5.7E-05	7.8E-05
ゴールデン・ レトリバー	LR <sub>C</sub>	9.3E-05	5.5E-03	8.1E-05	3.5E-01	1.1E-02	8.0E-02	2.3E-03	2.0E-06	1.7E-06	8.1E-06
	LR <sub>P</sub>	9.7E-06	1.6E-04	3.9E-06	1.0E-08	5.1E-08	8.0E-05	1.4E-04	5.8E-04	1.7E-04	5.1E-08
	LR <sub>D</sub>	2.7E-03	6.5E-12	3.1E-08	2.1E-12	5.2E-09	8.8E-05	4.5E-11	4.4E-07	1.2E-09	8.7E-13
	LR <sub>S</sub>	1.0E-10	1.2E-06	9.6E-13	9.3E-09	1.6E-08	5.2E-15	1.9E-10	9.1E-06	1.0E-04	7.8E-06
	LR <sub>L</sub>	7.5E-03	<b>2.5E+02</b>	6.5E-02	<b>6.4E+02</b>	5.1E-04	8.9E-04	3.4E-01	<b>9.3E+01</b>	<b>2.4E+02</b>	1.4E-02
シー・ズー	LR <sub>C</sub>	4.7E-06	1.2E-06	3.7E-08	1.4E-03	8.7E-04	8.5E-03	4.9E-05	1.2E-06	8.6E-03	1.5E-05
	LR <sub>P</sub>	9.3E-06	2.6E-02	5.0E-07	1.3E-07	1.7E-03	8.7E-07	8.2E-08	5.0E-05	5.4E-06	1.4E-05
	LR <sub>D</sub>	2.6E-07	1.6E-07	6.7E-08	2.9E-07	4.4E-07	2.8E-06	5.6E-09	1.7E-08	5.1E-08	8.8E-11
	LR <sub>S</sub>	5.5E-18	6.9E-10	9.1E-20	7.5E-15	2.1E-11	7.0E-12	3.5E-17	1.2E-16	5.3E-11	9.6E-16
	LR <sub>L</sub>	4.6E-09	4.0E-07	1.4E-08	1.2E-03	6.1E-05	8.8E-07	2.6E-11	6.1E-13	1.4E-09	5.6E-09
シェットランド・ シープドッグ	LR <sub>C</sub>	3.2E-03	3.4E-04	3.2E-03	2.7E-05	1.1E-03	2.7E-02	9.2E-02	1.6E-02	7.8E-05	1.4E-01
	LR <sub>P</sub>	7.5E-07	8.9E-06	6.5E-10	1.6E-02	2.1E-06	7.0E-08	5.7E-06	8.8E-07	1.6E-04	5.5E-04
	LR <sub>D</sub>	2.6E-06	2.0E-03	8.8E-05	1.4E-03	5.8E-06	3.1E-03	1.2E-05	8.0E-06	2.5E-08	5.9E-07
	LR <sub>S</sub>	2.4E-09	6.3E-14	2.9E-07	2.0E-13	2.2E-13	4.0E-16	4.4E-15	2.1E-12	2.1E-08	2.8E-11
	LR <sub>L</sub>	2.1E-03	4.5E-10	1.5E-06	1.2E-09	9.5E-06	5.0E-09	4.1E-09	1.4E-06	2.7E-09	8.5E-08
ジャーマン・ シェパード・ドッグ	LR <sub>C</sub>	3.2E-04	1.5E-04	5.0E-01	7.1E-04	7.3E-01	5.3E-01	5.1E-02	1.5E-02	4.7E-01	9.2E-07
	LR <sub>P</sub>	2.1E-06	2.7E-06	2.5E-06	3.1E-08	1.7E-06	6.3E-05	1.1E-05	1.6E-06	6.1E-06	5.0E-06
	LR <sub>D</sub>	1.3E-10	2.3E-12	6.0E-11	1.3E-10	1.0E-09	2.0E-11	2.4E-08	4.9E-11	3.4E-10	6.8E-08
	LR <sub>S</sub>	1.1E-08	9.2E-15	5.4E-11	1.7E-09	6.8E-07	1.2E-12	8.1E-12	1.3E-09	2.3E-11	4.0E-04
	LR <sub>L</sub>	5.1E-06	6.2E-08	1.9E-02	5.0E-12	1.3E-09	8.0E-10	4.9E-06	6.9E-10	1.5E-08	1.1E-05
ジャックラッセル・ テリア	LR <sub>C</sub>	2.4E-02	2.1E-01	3.0E-03	2.8E-04	7.4E-04	3.2E-04	9.6E-03	2.8E-04	2.3E-02	1.0E-02
	LR <sub>P</sub>	5.3E-06	8.9E-06	4.5E-07	5.5E-02	3.0E-03	1.3E-04	2.9E-03	1.5E-03	3.0E-05	4.2E-07
	LR <sub>D</sub>	9.2E-08	5.5E-10	3.4E-09	5.2E-11	1.3E-07	4.9E-13	8.4E-08	8.8E-10	1.2E-10	1.4E-08
	LR <sub>S</sub>	2.4E-18	6.3E-15	4.2E-16	2.4E-17	2.5E-13	5.0E-16	4.5E-10	3.5E-15	3.3E-10	1.2E-17
	LR <sub>L</sub>	8.2E-08	4.2E-11	1.3E-08	2.3E-10	1.9E-09	1.7E-08	4.3E-05	3.2E-05	9.5E-08	3.9E-06

表 5-4a LR 法による犬種推定

カットオフポイントを>10 (茶色) および>1000 (赤色) の 2 点に設定した

C: チワワ P: トイ・プードル D: ミニチュア・ダックスフンド

S: シバイヌ L: ラブラドル・レトリバー

表 5-4b LR 法による犬種推定

犬種	LR	個体 1	個体 2	個体 3	個体 4	個体 5	個体 6	個体 7	個体 8	個体 9	個体 10
パグ	LR <sub>C</sub>	3.0E-06	4.6E-06	2.6E-06	1.0E-07	8.8E-06	4.2E-08	3.8E-06	5.3E-08	5.0E-05	2.1E-06
	LR <sub>P</sub>	1.2E-01	9.0E-08	1.4E-03	3.4E-02	6.1E-07	5.3E-02	3.7E-05	7.3E-01	7.0E-05	1.2E-07
	LR <sub>D</sub>	1.1E-04	3.4E-08	3.9E-08	3.0E-07	1.2E-05	4.9E-07	4.1E-03	8.8E-09	2.4E-05	3.2E-06
	LR <sub>S</sub>	6.0E-13	6.6E-13	1.0E-11	1.7E-12	7.6E-16	1.5E-14	2.1E-12	1.7E-06	7.1E-14	3.8E-13
	LR <sub>L</sub>	4.1E-10	9.8E-11	8.4E-10	3.1E-14	1.2E-09	4.6E-14	3.9E-09	3.0E-13	7.0E-12	2.8E-11
パピヨン	LR <sub>C</sub>	3.4E-04	6.1E-04	3.9E-04	8.9E-02	1.2E-03	4.9E-02	7.9E-04	1.5E-04	9.3E-04	8.7E-02
	LR <sub>P</sub>	2.7E-07	8.5E-04	6.9E-06	1.3E-04	1.8E-02	5.8E-05	9.4E-04	1.3E-06	2.2E-05	1.4E-01
	LR <sub>D</sub>	4.2E-08	8.2E-05	3.0E-07	6.6E-06	5.0E-07	6.6E-05	5.5E-06	3.6E-03	7.8E-06	6.6E-04
	LR <sub>S</sub>	8.5E-05	2.3E-13	2.9E-10	3.1E-14	5.7E-12	1.6E-16	1.7E-15	5.2E-16	6.4E-14	2.8E-17
	LR <sub>L</sub>	7.2E-06	3.5E-09	1.5E-06	8.5E-05	1.5E-10	1.4E-08	3.9E-11	1.7E-09	1.4E-07	1.2E-08
ビーグル	LR <sub>C</sub>	4.7E-02	3.1E-07	1.9E-05	2.1E-05	8.0E-02	4.3E-04	9.9E-07	2.7E-01	2.3E-06	1.2E-05
	LR <sub>P</sub>	1.2E-04	5.1E-01	9.8E-03	6.9E-04	7.1E-03	4.5E-03	6.0E-05	2.7E-08	5.8E-09	2.8E-05
	LR <sub>D</sub>	6.3E-09	1.3E-10	2.1E-07	8.5E-10	1.1E-09	1.3E-05	3.8E-09	2.1E-11	6.5E-14	2.1E-07
	LR <sub>S</sub>	9.2E-09	1.3E-08	3.7E-15	4.1E-10	2.0E-11	3.9E-02	8.3E-02	3.7E-13	8.6E-12	5.7E-10
	LR <sub>L</sub>	3.5E-02	4.9E-07	5.5E-06	1.8E-09	4.7E-05	6.1E-10	3.6E-05	2.4E-06	1.1E-08	9.9E-07
フレンチ・ブルドッグ	LR <sub>C</sub>	1.6E-02	5.3E-07	6.5E-04	1.8E-03	5.4E-03	2.7E-03	3.7E-04	2.0E-07	1.2E-02	4.3E-05
	LR <sub>P</sub>	2.4E-06	2.7E-08	1.2E-04	1.6E-07	3.8E-07	4.2E-06	8.8E-10	1.0E-06	6.3E-06	4.5E-09
	LR <sub>D</sub>	8.3E-10	9.0E-07	3.7E-04	8.0E-07	4.4E-08	3.8E-07	3.2E-04	1.5E-08	2.8E-05	3.7E-04
	LR <sub>S</sub>	6.8E-14	2.2E-15	5.8E-12	2.3E-19	4.3E-12	2.3E-14	5.0E-13	7.9E-14	9.4E-18	1.4E-12
	LR <sub>L</sub>	7.2E-07	8.2E-11	4.1E-09	1.4E-09	9.6E-09	3.0E-08	4.7E-10	7.9E-15	2.5E-08	2.7E-09
ボーダー・コリー	LR <sub>C</sub>	7.6E-02	8.1E-05	8.1E-03	1.0E-03	7.5E-02	8.1E-07	3.4E-03	6.7E-02	4.7E-03	8.9E-02
	LR <sub>P</sub>	7.4E-11	2.4E-04	7.1E-06	1.7E-01	5.0E-06	1.1E-06	4.2E-08	3.5E-07	1.4E-06	4.1E-07
	LR <sub>D</sub>	3.7E-03	2.8E-11	7.3E-09	3.9E-14	5.2E-11	1.6E-08	3.8E-06	4.0E-06	8.8E-03	1.0E-04
	LR <sub>S</sub>	6.4E-12	1.2E-17	6.2E-15	6.3E-17	1.7E-19	8.4E-11	1.6E-13	9.6E-10	2.0E-11	1.5E-16
	LR <sub>L</sub>	4.2E-09	1.6E-07	6.2E-07	3.3E-10	4.1E-05	1.7E-09	8.6E-07	1.7E-06	1.7E-07	1.1E-06
ポメラニアン	LR <sub>C</sub>	5.7E-03	8.0E-03	3.1E-01	1.4E-02	1.3E-01	1.5E-04	1.4E-01	1.3E-02	2.6E-01	7.3E-05
	LR <sub>P</sub>	3.5E-06	1.4E-04	1.2E-03	1.0E+00	4.7E-07	4.3E-04	5.5E-08	1.1E-05	3.8E-02	4.3E-02
	LR <sub>D</sub>	6.1E-09	9.6E-09	1.0E-04	5.9E-08	3.8E-11	1.3E-13	8.9E-06	4.9E-13	1.2E-05	2.0E-08
	LR <sub>S</sub>	3.0E-09	2.8E-04	4.8E-14	2.1E-09	2.6E-13	5.0E+00	2.6E-09	7.2E-01	6.2E-08	1.9E-07
	LR <sub>L</sub>	6.8E-08	7.2E-08	1.3E-03	1.7E-07	4.6E-02	6.5E-08	8.4E-08	1.4E-10	1.5E-01	4.1E-11
マルチーズ	LR <sub>C</sub>	3.1E-02	5.6E-03	3.3E-01	3.4E-02	7.5E-03	3.1E-04	7.5E-07	7.8E-01	<b>2.4E+01</b>	2.8E-04
	LR <sub>P</sub>	3.7E-06	1.9E-07	3.0E-08	4.7E-07	6.7E+00	1.2E-01	2.1E-01	1.1E-02	8.7E-07	7.3E-02
	LR <sub>D</sub>	4.9E-08	7.5E-01	8.0E-06	2.4E-03	3.6E-12	1.3E-06	2.1E-11	4.4E-04	2.2E-02	9.7E-07
	LR <sub>S</sub>	1.4E-09	3.1E-06	3.8E-13	3.4E-04	1.2E-11	2.2E-13	1.7E-02	1.0E-15	5.6E-13	1.4E-08
	LR <sub>L</sub>	1.6E-08	9.0E-07	2.1E-05	5.6E-01	6.1E-01	8.2E-09	1.1E-05	1.3E-08	6.5E-02	9.7E-02
ミニチュア・シュナウザー	LR <sub>C</sub>	1.7E-04	6.9E-06	1.9E-04	2.7E-04	3.7E-07	1.6E-04	1.0E-02	1.7E-05	8.1E-08	1.2E-04
	LR <sub>P</sub>	4.7E-06	1.6E-07	2.4E-05	6.2E-09	1.7E-04	5.2E-03	3.9E-09	1.8E-04	5.6E-06	7.4E-06
	LR <sub>D</sub>	5.0E-09	2.1E-03	1.6E-05	3.9E-13	2.0E-06	1.4E-10	3.0E-07	3.4E-08	2.8E-04	1.3E-09
	LR <sub>S</sub>	3.4E-16	4.7E-12	1.5E-11	3.4E-11	1.1E-17	9.9E-17	1.6E-16	2.5E-15	1.6E-12	2.8E-13
	LR <sub>L</sub>	1.7E-12	2.8E-10	1.9E-10	1.8E-12	4.8E-13	3.1E-05	4.3E-11	1.7E-12	1.6E-09	5.0E-09
ヨークシャー・テリア	LR <sub>C</sub>	3.7E-04	5.1E-02	2.6E-04	4.7E-04	4.1E-03	3.0E-03	5.4E-01	1.9E-05	6.2E-04	7.5E-02
	LR <sub>P</sub>	1.5E-05	1.5E-08	1.2E-09	6.0E-05	8.1E-07	8.6E-07	1.2E-05	2.9E-03	7.4E-07	8.1E-08
	LR <sub>D</sub>	4.6E-07	5.4E-05	9.0E-05	1.2E-09	1.7E-07	5.1E-09	7.4E-07	1.4E-06	6.5E-02	2.9E-05
	LR <sub>S</sub>	4.8E-14	1.5E-17	2.6E-16	1.3E-13	3.1E-15	3.7E-15	5.9E-14	3.3E-11	2.0E-12	3.2E-10
	LR <sub>L</sub>	4.1E-04	1.8E-02	4.1E-08	3.1E-09	1.9E-06	3.3E-01	2.2E-02	3.1E-09	7.2E-08	2.8E-04

カットオフポイントを>10(茶色) および>1000(赤色) の2点に設定した

C:チワワ P:トイ・プードル D:ミニチュア・ダックスフンド

S:シバイヌ L:ラブラドル・レトリバー

表 5-4c LR 法による犬種推定

犬種	LR	個体 1	個体 2	個体 3	個体 4	個体 5	個体 6	個体 7	個体 8	個体 9	個体 10
チワワ	LR <sub>C</sub>	<b>5.8E+02</b>	<b>1.3E+03</b>	<b>1.6E+01</b>	<b>8.7E+01</b>	<b>3.8E+05</b>	<b>1.2E+06</b>	<b>1.7E+04</b>	<b>1.4E+03</b>	<b>9.9E+03</b>	<b>9.1E+03</b>
	LR <sub>P</sub>	1.5E-09	6.9E-08	1.4E-01	1.0E-08	8.0E-08	4.8E-06	1.1E-06	1.3E-03	3.3E-09	7.0E-04
	LR <sub>D</sub>	6.9E-08	7.9E-07	7.8E-10	2.4E-07	1.6E-05	1.0E-10	4.8E-07	5.5E-08	1.5E-02	1.4E-08
	LR <sub>S</sub>	2.9E-13	1.1E-14	2.4E-17	3.1E-14	1.3E-10	7.1E-13	1.1E-12	2.5E-14	8.0E-13	1.3E-14
	LR <sub>L</sub>	1.9E-01	1.5E-05	4.4E-09	2.3E-08	7.9E-07	1.1E-10	4.5E-09	3.7E-10	2.8E-05	2.6E-07
トイ・プードル	LR <sub>C</sub>	7.6E-02	3.1E-04	3.3E-04	2.0E-04	2.7E-03	1.5E-05	6.4E-07	5.3E-05	1.4E-06	1.2E-07
	LR <sub>P</sub>	<b>7.9E+01</b>	<b>1.0E+08</b>	<b>1.3E+04</b>	<b>3.9E+05</b>	<b>2.6E+03</b>	<b>4.1E+04</b>	<b>2.9E+06</b>	<b>7.7E+06</b>	<b>1.1E+03</b>	<b>1.1E+05</b>
	LR <sub>D</sub>	2.2E-02	4.6E-15	2.5E-04	3.2E-08	1.1E-05	1.5E-06	4.1E-05	1.8E-11	9.6E-11	4.8E-11
	LR <sub>S</sub>	1.6E-12	8.9E-15	1.1E-06	5.6E-10	1.6E-08	1.8E-15	1.2E-13	2.5E-10	6.8E-14	1.6E-12
	LR <sub>L</sub>	1.1E-05	1.2E-13	2.9E-11	1.1E-12	1.1E-10	7.8E-07	5.6E-08	5.8E-10	5.9E-03	1.4E-10
ミニチュア・ダックスフンド	LR <sub>C</sub>	3.2E-05	1.3E-04	7.6E-05	1.2E-04	1.6E-07	1.4E-04	1.0E-01	4.4E-05	5.9E-05	2.0E-06
	LR <sub>P</sub>	6.3E-08	1.6E-06	2.4E-05	3.8E-08	2.8E-07	5.2E-06	6.0E-04	5.4E-09	4.1E-07	1.4E-08
	LR <sub>D</sub>	<b>7.0E+10</b>	<b>2.2E+05</b>	<b>5.0E+05</b>	<b>1.2E+08</b>	<b>8.5E+06</b>	<b>4.9E+07</b>	<b>1.1E+06</b>	<b>2.8E+07</b>	<b>1.0E+07</b>	<b>5.7E+08</b>
	LR <sub>S</sub>	8.5E-16	1.5E-08	5.7E-13	1.6E-16	4.2E-14	2.0E-13	1.4E-12	1.7E-09	5.7E-13	5.1E-11
	LR <sub>L</sub>	1.2E-10	2.6E-08	1.3E-08	5.9E-11	1.1E-04	9.3E-08	1.6E-11	5.8E-11	1.9E-10	2.7E-07
ラブラドール・レトリバー	LR <sub>C</sub>	5.3E-02	3.4E-04	7.2E-05	2.0E-02	1.2E-03	3.7E-01	3.4E-04	3.6E-02	2.5E-01	1.1E-02
	LR <sub>P</sub>	4.4E-06	1.7E-04	1.3E-04	1.2E-05	8.8E-08	1.9E-06	4.9E-06	2.2E-06	3.4E-05	1.1E-06
	LR <sub>D</sub>	3.2E-06	1.5E-06	1.4E-03	3.0E-08	9.1E-07	5.6E-07	1.4E-09	4.9E-07	6.7E-08	6.0E-07
	LR <sub>S</sub>	2.8E-19	1.6E-13	2.5E-09	1.8E-06	1.3E-10	3.4E-10	4.4E-14	4.2E-09	5.5E-16	1.1E-11
	LR <sub>L</sub>	<b>4.6E+09</b>	<b>1.1E+08</b>	<b>1.5E+06</b>	<b>2.8E+07</b>	<b>3.8E+06</b>	<b>8.9E+06</b>	<b>9.9E+08</b>	<b>2.2E+07</b>	<b>5.7E+05</b>	<b>8.8E+04</b>
シバイヌ	LR <sub>C</sub>	4.1E-07	7.4E-06	2.1E-06	1.1E-05	8.5E-05	3.4E-04	4.5E-05	1.3E-08	4.1E-06	1.0E-01
	LR <sub>P</sub>	1.7E-05	1.5E-09	1.5E-03	8.9E-06	8.0E-02	3.1E-08	3.9E-11	2.5E-04	2.6E-06	2.7E-04
	LR <sub>D</sub>	1.6E-11	8.4E-10	6.8E-09	4.5E-10	2.0E-15	1.1E-08	2.4E-07	4.7E-13	2.0E-08	1.1E-12
	LR <sub>S</sub>	<b>1.8E+11</b>	<b>5.8E+10</b>	<b>1.8E+10</b>	<b>7.8E+12</b>	<b>5.3E+14</b>	<b>1.2E+06</b>	<b>4.3E+09</b>	<b>4.4E+13</b>	<b>1.4E+11</b>	<b>6.3E+11</b>
	LR <sub>L</sub>	5.9E-07	1.3E-08	7.8E-09	1.1E-07	1.8E-05	5.0E-06	4.5E-05	1.3E-14	1.1E-05	1.2E-05
雑種	LR <sub>C</sub>	6.2E-05	<b>7.2E+01</b>	9.4E-02	6.9E-02	2.2E-02	2.7E-03	2.3E-02	1.1E-03	5.4E-03	1.0E-04
	LR <sub>P</sub>	2.1E-09	7.2E-06	1.7E-09	1.2E+00	<b>1.2E+01</b>	1.5E-03	1.0E-06	1.1E-02	7.3E-03	2.0E-04
	LR <sub>D</sub>	1.4E-02	4.0E-08	7.6E-13	1.8E-07	8.2E-04	1.0E-06	1.8E-05	9.9E-08	2.4E-05	6.4E-10
	LR <sub>S</sub>	1.8E-07	1.2E-16	8.7E-01	4.0E-11	1.2E-08	6.8E-01	2.9E-10	2.6E-07	6.6E-15	5.6E-08
	LR <sub>L</sub>	1.6E-13	4.7E-05	2.0E-05	5.7E-06	1.2E-04	1.8E-11	2.8E-03	5.2E-08	1.4E-04	3.6E-10

カットオフポイントを>10 (茶色) および>1000 (赤色) の 2 点に設定した

C : チワワ P : トイ・プードル D : ミニチュア・ダックスフンド

S : シバイヌ L : ラブラドル・レトリバー

表 5-5 LR 法による犬種推定

	純血種	カットオフ ポイント		雑種	カットオフ ポイント	
		>10	>1000		>10	>1000
<b>LR<sub>C</sub></b>	真陽性	103	68			
	偽陰性	10	45			
	真陰性	1353	1382	真陰性	138	143
	偽陽性	30	1	偽陽性	7	2
<b>LR<sub>P</sub></b>	真陽性	172	157			
	偽陰性	9	24			
	真陰性	1304	1311	真陰性	139	144
	偽陽性	11	4	偽陽性	6	1
<b>LR<sub>D</sub></b>	真陽性	73	68			
	偽陰性	4	9			
	真陰性	1410	1414	真陰性	143	145
	偽陽性	9	5	偽陽性	2	0
<b>LR<sub>S</sub></b>	真陽性	50	50			
	偽陰性	2	2			
	真陰性	1443	1443	真陰性	142	144
	偽陽性	1	1	偽陽性	3	1
<b>LR<sub>L</sub></b>	真陽性	0	0			
	偽陰性	0	0			
	真陰性	1478	1494	真陰性	119	121
	偽陽性	18	2	偽陽性	26	24
<b>5 犬種合計</b>	真陽性	398	343			
	偽陰性	25	80			
	真陰性	6988	7044		681	697
	偽陽性	69	13		44	28
<b>感度</b>		0.941	0.811			
<b>特異度</b>		0.990	0.998		0.939	0.961
<b>的中率</b>		0.987	0.988		0.939	0.961

(純血種 1496 頭, 雑種 145 頭)

**表 5-6a プードルのサイズ (JKC 犬種標準)**

	体高(cm)
スタンダード	45-60
ミディアム	35-45
ミニチュア	28-35
トイ	24-28

**表 5-6b ダックスフンドのサイズ (JKC 犬種標準)**

	胸囲(cm)
スタンダード	>35
ミニチュア	30-35
カニーンヘン	<30

## 第六章

### 総合考察



## 6-1 結果の要約

本研究では、DogFiler の法科学的活用を目的とし、客観性や再現性を確保するための条件設定を行い、日本国内のイヌにおける多型性や近親個体群における多型性、突然変異率の検討を行った。さらに本検査法を応用し、分集団内における近交度の評価や、犬種推定の活用可能性についても検討した。研究成果は以下の3点に要約される。

(1) DogFiler を日本の法科学鑑定に適用することを目的とし、客観性、再現性、簡便性を確保できるような条件設定を行った。PCR 時の鋳型 DNA 量を 2ng、泳動に用いる PCR 産物は希釈せず、原液 1 $\mu$ L に変更し、泳動に 3130xl Genetic Analyzer を用いることに加え、PCR 組成の見直しとプライマーの修飾および標識の変更を行った結果、安定したデータを得られるようになった。また、アレリックラダーマーカーを作製して GeneMapper® ID-X に適合させることで、電気泳動の誤差をアレリックラダーマーカーで自動補正する客観的な判定を可能にし、再現性や簡便性が向上した。

(2) 日本国内における多型性を確認するために、ランダムにサンプリングした一般家庭飼育個体で解析を行ったところ、多型性の高さが示され、偶然一致率は  $3.73 \times 10^{-22}$  となり識別力の高さが明らかとなった。日本国内のイヌにおいて高い多型性が確認されたが、一方で犬種間での遺伝的分化が明らかとなり、同一または近縁の犬種を扱う際には注意が必要であることが示唆された。そこで、近親個体群を用いて解析を行ったところ、予想通り多型性は低下したが、それでも偶然一致率は  $2.17 \times 10^{-14}$  となり、十分な識別力があることが明らかとなった。さらに F1 レトリバーについても同様に解析を行ったところ、一世代では他犬種との交雑を行うことによる遺伝的偏りの解消は難しいものの、近交度の低減を図ることが可能であることが示された。突然変異率は 0.6% と算出され、1 個体に 2 座位で変異が見られた例もあったため、今後親子判定について基準を明確に定める必要があると考えられた。

(3) 各犬種を分集団として遺伝的多様性や近交度を解析し、犬種の維持、管理への応用について検討した。日本で数多く飼育されているチワワ、トイ・プードル、ミニチュア・ダックスフンド、シバイヌ、ラブラドル・レトリバーの 5 犬種に、日本盲導犬協会のラブラドル・レトリバーを使役犬コロニー群として加え、それぞれの分集団における遺伝的距離や多型性を調べ、犬種間の比較を行った。その結果、純血種における繁殖事情や、使

役犬コロニー群における血縁関係および遺伝子流入の実態が数値に反映され、本手法が、集団における遺伝的多様度を評価する方法として有用であることが示された。また、5犬種のアレル頻度データと、第3章で解析したランダムサンプリング群のアレル頻度データをもとに、15座位のSTR型から犬種推定が可能であるかを検討した。その結果、アレル頻度から各犬種であると仮定した場合の尤度比を算出することで、高い的中率で犬種を推定できることが明らかとなった。また、カットオフポイントを、感度および的中率と、特異度をそれぞれ重視した2点に設定することで、最大の効果を得られることが示された。

## 6-2 本検査法の法科学的有用性

ヒトがイヌと直接あるいは間接的に接触する機会は多く、被毛、だ液、糞尿などが身体や衣服に付着することも多い。そのためイヌのDNAは、動物虐待や血統証明書偽装などイヌが直接関わる事件だけでなく、殺人や強盗、強姦などの事件で、関係者を介して間接的に遺留されることもあり、多岐にわたって重要な証拠となりうる。海外ではイヌのDNA型検査キットも販売されているが、日本では入手することができず、簡便で学術的に信頼し得るイヌの個体識別法の確立が望まれてきた。

欧米では動物のDNA型鑑定結果が重要な証拠として採用され、さまざまな事件で犯罪の証明に用いられてきた (Clarke and Vandenberg, 2010; Eichmann and Parson, 2007; Frosch et al., 2011; Iyengar and Hadi, 2014; Kanthaswamy, 2015; Kanthaswamy et al., 2009; Menotti-Raymond et al., 1997; Padar et al., 2001)。しかし、動物については、ヒトのDNA型検査法のように世界的に定着し、データベースの整備などが行われたパネルや市販キットはなく、各研究機関が独自に開発した検査法を用いて鑑定が実施されてきた。このような状況の中、2013年にアメリカで考案されたのが本研究で検討を行なったDogFilerである。DogFilerは、検査座位がいずれも4塩基の反復配列で、日本の法科学鑑定に使用されているAmpF $\ell$ STR $^{\text{®}}$  Identifiler $^{\text{®}}$  Plus Kitなどと同じ4種の蛍光色素 (6-FAM, NED, PET, VIC) でプライマーを標識し、ヒトDNA型検査と同じ器材を用いることができる。従来の検査法と比べて簡便性が高く、SWGAMの基準をクリアしていることから、今後世界的に浸透することが期待される検査法である。本研究の結果、このDogFilerを改良することで客観性や再現性が確保できたことから、日本の法科学鑑定においても活用が期待できる。

DNA型検査法を法科学鑑定に適用する際には、国内におけるアレルの出現頻度データを蓄積し、多型性や識別力を評価する必要がある。解析の結果、ランダムサンプリング群で

は、多型性の高さが示されたとともに、偶然一致率 (1-PD の総乗) が  $3.73 \times 10^{-22}$  であり、国内のイヌの飼育頭数が約一千万 (10<sup>7</sup>) 頭であることから、識別力の高さも明らかとなった。解析に用いた個体の中に DNA 型が一致する個体は認められず、すべての個体を識別することが可能であった。他の検査法では、van Ash らが  $1.63 \times 10^{-10}$  と報告しているように偶然一致率が高く、識別のために検査座位を追加した事例もあるが、本検査法では、近親個体群においても偶然一致率は  $2.17 \times 10^{-14}$  と低く、十分な識別力があると判断された。

DNA 型鑑定に用いる検査座位には、多型性と突然変異率のバランスも求められる。STR における突然変異率は 0.1~0.4 %程度とされ、ヒトの DNA 型鑑定に用いられている座位においても平均 0.2 %程度であると報告されているが (Asicioglu et al., 2004; Brinkmann et al., 1998; Qian et al., 2015; Sun et al., 2014; Weber and Wong, 1993), 本研究では突然変異率は 0.6 %と算出された。突然変異率を算出するにあたっては、両親と子のサンプルを用いたトリオ解析を行う必要がある。しかし、一般家庭で飼育されているイヌでは両親と子が一緒に飼われることは稀で、特にペットショップで購入されたイヌでは親子の DNA を入手することは極めて困難である。そのため、ヒトの突然変異率が数千から数万組の親子から算出されているのに対し (Brinkmann et al., 1998; Qian et al., 2015; Sun et al., 2014; Zhao et al., 2015), 本研究における親子は 324 組であり、DogFiler を考案した Wictum らの研究では 181 組とさらに少ない。今後さらにデータを蓄積し、より正確な変異率を調べる必要がある。

法科学鑑定においては、さまざまな生体試料が検査対象となることが想定される。イヌが虐待や拉致の被害にあう場合や、血統証明書の偽装などの詐欺事件に関わる場合には血液、他のイヌやヒトに危害を加える傷害事件の被疑個体となった場合にはだ液が試料となり、検査に十分な量の DNA が得られる可能性が高く、本検査法は極めて有用であろう。しかしイヌの DNA が犯罪の証明に役立つのは、イヌが直接関わる事件だけではない。イヌの被毛は飼い主の衣服や他の証拠物件に付着し、イヌ自体が事件に関わってなくても、関係者や犯罪現場から採取されることがある (Blackie et al., 2015; Halverson and Basten, 2005b)。イヌの被毛は、個体内でも多様性が大きく毛根の大きさも異なるため、DNA の含有量も大きくばらつくと考えられるが、イヌの自然脱落毛からは平均で 0.58 ng の核 DNA を抽出できると報告されており (Pfeiffer et al., 2004), 1 本の被毛から抽出した DNA を用いて DogFiler の型判定が行なえた事例も報告されている (Blackie et al., 2015)。本検査法を法科学鑑定に導入する事で、警察活動に大きく貢献することが期待される。

### 6-3 本検査法の応用

第3章でも述べたとおり、純血種の維持、管理には血統証明書が用いられ、記載される両親の犬種が同じであれば、それがそのまま子の犬種となる。犬種間交雑によって生まれたイヌの子孫は、原則として純血種には戻れないため、血統証明書を得るには犬種内での交配を続けていくことになる。そのため、世代を重ねるごとに犬種間の分化は進行すると考えられ、第3章のランダムサンプリング群においても遺伝的分化が示された。

日本でペットとして飼育されているイヌの80.3%は純血種であるとされており、登録されている犬種数は189にのぼる。もともと犬種は人が理想とする表現型をもつように、作為的な交雑をくり返した結果生み出されたものである。ひとたび犬種が確立されると、理想とされる身体的特長が「犬種標準」として定義され、その特徴を固定するために、目的とする形質をもつ個体同士の交配が積極的に行われる。そのため、純血種を維持するためにはある程度の近親交配が必要であり、近親交配がなければ今日の多様な犬種は生まれなかった。しかし近年、先天性の疾患に関する研究が進み、近親交配による遺伝的多様性の低下にともなう犬種特有の遺伝性疾患が定着することが問題視されてきた。犬種標準に定義されている形質と関連が認められる疾患も多く、犬種標準の改定を行ったり、他犬種との交雑によって遺伝的多様性を確保したりする動きもあり、系統の管理と計画的な繁殖が求められている。しかし、原因遺伝子が特定されていない遺伝性疾患や複数の遺伝子が関係する疾患も多く存在するため、劣性遺伝子がホモにならないよう集団の中で多様性を保ち、遺伝性疾患の蔓延を回避することが必要となる。第5章第1節の結果から、本検査法は分集団の解析にも適しており、多型性や個体間の遺伝的距離、分化の度合い、他の分集団との交流などを評価可能であることが明らかとなった。本手法を用いて分集団における遺伝的多様性を評価することで、こうしたイヌの育種や管理にも役立てることができると考えられた。

本検査法のさらなる応用として、尤度比(LR)の算出によって、高い的中率で犬種推定が可能であることも示された。これまでイヌのDNA型鑑定は、2つ以上のサンプル間の比較による同一個体性や血縁関係の証明が目的とされてきた。すなわち、犯罪現場からイヌのDNAが採取されても、被疑個体が浮上するまでは有用性を発揮することができないのである。イヌの容姿を決定する遺伝子についてはこれまでもさまざま研究が行われ、体の大きさ(Sutter et al., 2007)や毛の色(Cadieu et al., 2009)などに関わる遺伝子が明らかとなっているが、表現型の決定には複数の遺伝子が関連している場合もあり、法科学分野における表現型の推定は行われてこなかった。しかし本研究によって、現場に残されたイヌ

の DNA から、該当個体の「総合的な外見」とも言える犬種を推定できることが示された。本研究では飼育頭数の多い 5 犬種を対象としたが、データの更新や追加が可能という LR 法の利点を活かし、対象犬種を増やすことで、法科学鑑定における実用化が期待できる。

しかし、「犬種」は扱いが難しく、不安定な分類であるということには留意しなければならない。犬種は外見をもとに作り出されたものであり、理想とされる容姿である「犬種標準」が定められているが、ドッグショーなどにおける審査基準となる以外、法的拘束力はない。また、血統証明書はいわゆる「血統主義」によって発行されているため、犬種標準を満たしていなくても純血種として登録される仕組みであり、遺伝的背景と外見が必ずしも一致するとは限らない。さらに、犬種間で交雑が行われた場合、どちらの親からどの形質を受け継ぐかは予測困難であり、どちらとも似ていないケースもあるため、たとえ両親が純血種であってもその犬種を推定することは極めて難しい(Scott and Fuller, 1965)。

2009 年、アメリカで保護されたイヌの犬種について、見た目を基準とした職員の犬種推定結果と DNA による犬種推定キットの結果の整合性を確認した研究がある(Voith et al., 2009)。この報告では、職員の判定と DNA による判定が一致した個体はわずか 25 % であり、その原因をどちらも判定基準が不安定であるためだと考察している。イヌを扱う専門家であっても、容姿から犬種を推定することは難しく(Olson et al., 2015)、雑種では遺伝的背景と容姿の関連性はさらに乏しくなり、判定は極めて困難である。

血統証明書は、同一犬種の父母によって生まれた子犬に対して発行される「戸籍」のようなもので、「純血であること」と「数世代の血統」を証明し「犬種標準に育つ可能性が高い」ということを明文化しているにすぎない。すなわち、血統証明書があっても、犬種標準を満たす形質を兼ね備えているとは限らないし、雑種のイヌが犬種標準を満たす容姿に成長しても、純血種と認められるわけでもない。以上のことから、血統証明書に記載されている犬種と、実際の容姿が合致しない可能性も十分考えられるため、犬種推定法はあくまで犬種を「推定」するもので、「断定」はできないという点は留意しなければならない。

#### 6-4 今後の展望

これまで国内では、法科学的有用性が示されたイヌの STR 型検査法は存在しなかった。しかし、イヌの DNA 型鑑定の需要は高く、法科学分野への導入が強く望まれてきた。本研究によって改良された DogFiler は、客観性、再現性、簡便性が確保され、検査座位の多型性や近親個体における識別力も高く、日本の法科学鑑定に適用可能であることが明らかとなった。犯罪現場にイヌの体液や被毛が遺留されることも少なくない。特に、犯罪に際し

て手袋やマスクが着用され、ヒトの指紋や体液、顔画像などの個人識別情報が得られない場合、関係者を介して遺されたイヌの DNA が重要な証拠となることが想定される。犯罪現場で採取された DNA と被害個体、被疑個体、あるいは関係者の飼育個体との異同識別を行うことができれば、犯罪の証明に寄与することが期待される。さらに、現場資料からの犬種推定が可能となれば、早期に該当個体を探索することができ、警察活動に大いに貢献することとなる。

また本検査法は、他分野へ応用可能であることも示された。日本では「スピッツブーム」「シベリアンハスキーブーム」「チワワブーム」「ミックス犬ブーム」など、テレビや漫画の影響を受けて突発的な流行が起こり、それに合わせた繁殖や販売が行われてきた。人気犬種は高値で売買され、その陰で血統証明書の偽装や遺伝性疾患の定着などの問題も生じ、近年、遺伝的多様性の維持や血統管理は重要な課題となっている。世界的にも、BBC で 2008 年に放送された番組「Pedigree Dogs Exposed」が、純血種の病弱化を題材としてブリーダーやケネルクラブを痛烈に批判し、世界中の人々に大きな衝撃を与えた。この番組をきっかけに犬種標準の見直しや繁殖に関する議論が行われ、以降、遺伝性疾患や犬種内多様性に関するさまざまな研究が進められている (Nicholas, 2011; Rooney, 2009)。今日の多様な犬種を維持していくためには、形態的特徴を固定するための近親交配と、遺伝的多様性を維持するための異系交配を計画的にバランスよく行うことが重要であり、DNA による血統の管理や多様性の評価が役立つものと考えられる。本検査法は、こうしたイヌの育種や管理を含め、さまざまな分野での活用が期待される。

## 総括

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

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

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

第 2 章では、DogFiler を日本の法科学鑑定に適用させることを目的として、客観性、再現性、簡便性を確保できるよう検査の条件設定を行った。DogFiler は 15 座位の STR 型と Y 染色体の有無をマルチプレックス PCR で解析するイヌの DNA 型検査法である。検査座位はいずれも tetra-repeat の STR で、異なる染色体上に存在しており、一回の PCR と電気泳動で解析が可能とされる。残念ながら DogFiler では、プライマー配列や PCR 条件は開示されていたものの、詳細な条件が記されておらず、解析ソフトとして電気泳動の誤差を検査者が補正して判定する GeneMapper<sup>®</sup>が使用されていた。そこで本章では、詳細な条件設定を行うとともに、電気泳動の誤差をアレリックラダーマーカーで自動補正する機能を備えた GeneMapper<sup>®</sup> ID-X を使用することで、客観性、再現性、簡便性の確保を試みた。検討には一般家庭で飼育されているイヌ 104 頭 (24 犬種と雑種) から抽出した DNA を用い、2 ng を鋳型として全座位を解析できる条件を模索した。さらに、各座位のホモ接合サンプルの配列をシーケンス法によって確認したうえでアレリック

クラダマーカ―を作製し、これをスタンダードとして適宜用いることで、簡便で再現性が高く、検査者に依存しない客観的な判定が可能となった。

第3章では、日本国内における多型性を確認するため、ランダムにサンプリングした一般家庭飼育個体のSTRについて解析を行った。犬種の認定や繁殖の管理は各国のケネルクラブがそれぞれ独自に行っており、遺伝的多様度には地域性があると考えられている。そのため、DNA型検査法を法科学鑑定に適用する際には、国内におけるアレルの出現頻度データを蓄積し、多型性や識別力を評価する必要がある。本解析には麻布大学バイオバンクプロジェクトに提供されたDNAサンプルを用い、1992頭(81犬種と雑種)のアレル頻度データを蓄積し、統計学的な解析を行った。その結果、各座位のアレル数( $n_A$ )は9~28、識別能(PD)は0.93~0.99、多型情報含有率(PIC)は0.76~0.91と算出され、多型性の高さが示された。偶然一致率( $1-PD$ の総乗)は $3.73 \times 10^{-22}$ となり、国内のイヌの飼育頭数が約一千万( $10^7$ )頭であることを考えると、識別力は極めて高いと判断された。しかしながら、いずれの座位においてもヘテロ接合度の期待値( $H_E$ )が観測値( $H_o$ )よりも低く、遺伝的な偏りが示唆された。そこで、このランダムサンプリング群の中に20頭以上の個体が含まれていた23犬種を分集団とし、WrightのF統計量を算出したところ、分集団間の遺伝的分化の程度を示す指標である $F_{ST}$ は純血種において0.048~0.287であった。雑種の $F_{ST}$ が0.006であったことから、選択的な犬種内交配による遺伝的集団間分化によって犬種間でアレルの偏りが生じたものと推察され、同一もしくは近縁の犬種を扱う際には注意が必要であることが示唆された。

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

イヌのDNA型鑑定においては、親子や同胞関係の証明が求められるケースも想定されるため、



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

第5章では、「分集団」すなわち犬種に焦点をあて、本手法の応用を試みた。

第1節では、各犬種を分集団として遺伝的多様性や近交度を解析し、犬種の維持、管理への応用について検討した。日本で数多く飼育されているチワワ、トイ・プードル、ミニチュア・ダックスフンド、シバイヌ、ラブラドル・レトリバーの5犬種に日本盲導犬協会のラブラドル・レトリバーを使役犬コロニー群として加え、それぞれの分集団における遺伝的距離や多型性を調べ、犬種間の比較を行った。その結果、 $F_{ST}$ の値（0.040～0.171）から5犬種の犬種間分化は顕著であるものの、いずれの犬種においても $F_{IS}$ は低く（0.014～0.046）、各犬種内で血縁関係に配慮した作為交配が行われていることが示された。使役犬コロニー群においては、遺伝的距離が小さくなったにも関わらず近交度を表す $F_{IS}$ が低く、親子や同胞個体が含まれていることや遺伝子流入があるということが正しく反映されることが明らかとなった。よって本手法が集団における遺伝的多様度を評価する方法として有用であることが示された。

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

第6章では、総合考察を行った。本研究より、(1) DogFilerを改良することで客観性、再現性、簡便性が確保され、日本の法科学鑑定に適用可能であること、(2)日本国内においても検査座位は多型性が高く、識別力が極めて高いこと、(3)近親個体間であっても十分な識別力が認められる

ものの、突然変異率が高く、血縁関係の証明には注意が必要であること、が明らかとなった。さらに、本研究を応用することで(4)犬種や使役犬コロニーなどの特定の集団内における近交度の評価や(5)未知のサンプルからの犬種推定が可能となることが示された。今後はアレリックラダーマーカーの拡充や、他の犬種における解析など、実務導入に向けてさらなるデータの蓄積と検討が必要ではあるものの、本研究成果が国内における法科学的なイヌの個体識別や親子鑑定、犬種推定だけでなく、イヌの育種や管理へも応用されることが期待される。

## 参考文献

- Altet L., O. Francino, A. Sanchez. 2001. Microsatellite polymorphism in closely related dogs. *J Hered* 92 (3):276-279.
- Angleby H., P. Savolainen. 2005. Forensic informativity of domestic dog mtDNA control region sequences. *Forensic Sci Int* 154 (2-3):99-110.
- Arata S., A. Asahi, Y. Takeuchi, Y. Mori. 2015. Microsatellite loci analysis for individual identification in Shiba Inu. *J Vet Med Sci*.
- Asher L., G. Diesel, J.F. Summers, P.D. McGreevy, L.M. Collins. 2009. Inherited defects in pedigree dogs. Part 1: Disorders related to breed standards. *Vet J* 182 (3):402-411.
- Ascioglu F., F. Oguz-Savran, U. Ozbek. 2004. Mutation rate at commonly used forensic STR loci: paternity testing experience. *Dis Markers* 20 (6):313-315.
- Banerjee A., S. Chaudhury. 2010. Statistics without tears: Populations and samples. *Ind Psy J* 19 (1):60-65.
- Bar W., B. Brinkmann, B. Budowle, A. Carracedo, P. Gill, P. Lincoln, W. Mayr, B. Olaisen. 1997. DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. International Society for Forensic Haemogenetics. *Int J Legal Med* 110 (4):175-176.
- Bellumori T.P., T.R. Famula, D.L. Bannasch, J.M. Belanger, A.M. Oberbauer. 2013. Prevalence of inherited disorders among mixed-breed and purebred dogs: 27,254 cases (1995-2010). *J Am Vet Med Assoc* 242 (11):1549-1555.
- Berger B., C. Berger, W. Hecht, A. Hellmann, U. Rohleder, U. Schleenbecker, W. Parson. 2014. Validation of two canine STR multiplex-assays following the ISFG recommendations for non-human DNA analysis. *Forensic Sci Int Genet* 8 (1):90-100.
- Bjornerfeldt S., F. Hailer, M. Nord, C. Vila. 2008. Assortative mating and fragmentation within dog breeds. *BMC Evol Biol* 8:28.

- Blackie R., D. Taylor, A. Linacre. 2015. Successful direct amplification of nuclear markers from single dog hairs using DogFiler multiplex. *Electrophoresis* 36 (17):2082-2085.
- Borge K.S., R. Tønnessen, A. Nødtvedt, A. Indrebø. 2011. Litter size at birth in purebred dogs—A retrospective study of 224 breeds. *Theriogenology* 75 (5):911-919.
- Brinkmann B., M. Klintschar, F. Neuhuber, J. Huhne, B. Rolf. 1998. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* 62 (6):1408-1415.
- Brownstein M.J., J.D. Carpten, J.R. Smith. 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques* 20 (6):1004-1006, 1008-1010.
- Butler J.M. 2005. *Forensic DNA typing : biology, technology, and genetics of STR markers*. 2nd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.
- . 2006. Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing. *J Forensic Sci* 51 (2):253-265.
- Cadiou E., M.W. Neff, P. Quignon, K. Walsh, K. Chase, H.G. Parker, B.M. VonHoldt, A. Rhue, A. Boyko, A. Byers, A. Wong, D.S. Mosher, A.G. Elkahloun, T.C. Spady, C. André, K.G. Lark, M. Cargill, C.D. Bustamante, R.K. Wayne, E.A. Ostrander. 2009. Coat Variation in the Domestic Dog Is Governed by Variants in Three Genes. *Science* 326 (5949):150-153.
- Calboli F.C., J. Sampson, N. Fretwell, D.J. Balding. 2008. Population structure and inbreeding from pedigree analysis of purebred dogs. *Genetics* 179 (1):593-601.
- Chakraborty R. 1992. Sample size requirements for addressing the population genetic issues of forensic use of DNA typing. *Hum Biol* 64 (2):141-159.
- Clarke M., N. Vandenberg. 2010. Dog attack: the application of canine DNA profiling in forensic casework. *Forensic Sci Med Pathol* 6 (3):151-157.

- Coren S. 2012. *Do dogs dream? : nearly everything your dog wants you to know*. 1st ed. New York: W. W. Norton & Co.
- Crow J.F. 2006. Age and sex effects on human mutation rates: an old problem with new complexities. *J Radiat Res* 47 Suppl B:B75-82.
- Daniels J., P. Holmans, N. Williams, D. Turic, P. McGuffin, R. Plomin, M.J. Owen. 1998. A Simple Method for Analyzing Microsatellite Allele Image Patterns Generated from DNA Pools and Its Application to Allelic Association Studies. *Am J Hum Genet* 62 (5):1189-1197.
- Dayton M., M.T. Koskinen, B.K. Tom, A.M. Mattila, E. Johnston, J. Halverson, D. Fantin, S. DeNise, B. Budowle, D.G. Smith, S. Kanthaswamy. 2009. Developmental validation of short tandem repeat reagent kit for forensic DNA profiling of canine biological material. *Croat Med J* 50 (3):268-285.
- Desmyter S., L. Gijbbers. 2012. Belgian canine population and purebred study for forensics by improved mitochondrial DNA sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 6 (1):113-120.
- Eichmann C., B. Berger, W. Parson. 2004. A proposed nomenclature for 15 canine-specific polymorphic STR loci for forensic purposes. *Int J Legal Med* 118 (5):249-266.
- Eichmann C., W. Parson. 2007. Molecular characterization of the canine mitochondrial DNA control region for forensic applications. *Int J Legal Med* 121 (5):411-416.
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5 (6):435-445.
- Evett I.W., P. Gill. 1991. A discussion of the robustness of methods for assessing the evidential value of DNA single locus profiles in crime investigations. *Electrophoresis* 12 (2-3):226-230.
- Farrell L.L., J.J. Schoenebeck, P. Wiener, D.N. Clements, K.M. Summers. 2015. The challenges of pedigree dog health: approaches to combating inherited disease. *Canine Genet Epidemiol* 2:3.

- Felsenstein J., PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.695, *Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.*
- Foreman L.A., I.W. Evett. 2001. Statistical analyses to support forensic interpretation for a new ten-locus STR profiling system. *Int J Legal Med* 114 (3):147-155.
- Frank R., H. Köster. 1979. DNA chain length markers and the influence of base composition on electrophoretic mobility of oligodeoxyribonucleotides in polyacrylamide-gels. *Nucleic Acids Res* 6 (6):2069-2087.
- Frosch C., A. Dutsov, G. Georgiev, C. Nowak. 2011. Case report of a fatal bear attack documented by forensic wildlife genetics. *Forensic Sci Int Genet* 5 (4):342-344.
- Gavrilovic B.B., K. Andersson, C. Linde Forsberg. 2008. Reproductive patterns in the domestic dog—A retrospective study of the Drever breed. *Theriogenology* 70 (5):783-794.
- Guinness World Records. 2004.
- Gundry R.L., M.W. Allard, T.R. Moretti, R.L. Honeycutt, M.R. Wilson, K.L. Monson, D.R. Foran. 2007. Mitochondrial DNA analysis of the domestic dog: control region variation within and among breeds. *J Forensic Sci* 52 (3):562-572.
- Gunn P.R., K. Trueman, P. Stapleton, D.B. Klarkowski. 1997. DNA analysis in disputed parentage: the occurrence of two apparently false exclusions of paternity, both at short tandem repeat (STR) loci, in the one child. *Electrophoresis* 18 (9):1650-1652.
- Halverson J., C. Basten. 2005a. A PCR multiplex and database for forensic DNA identification of dogs. *J Forensic Sci* 50 (2):352-363.
- Halverson J.L., C. Basten. 2005b. Forensic DNA identification of animal-derived trace evidence: tools for linking victims and suspects. *Croat Med J* 46 (4):598-605.

- Hitchcock C., J. Glover, V. Kamilic, S. Neville. 2015. Low-level signal interference between samples separated on the 3500xL capillary electrophoresis platform. *Aust J Forensic Sci*:1-8.
- Hummel K. 1971. [Calculation of the plausibility of paternity, using the results of blood grouping tests in cases in which the fatherhood of a man to twins and siblings is disputed. I. Base of the calculation procedure; practical use of the tests; examples of calculation]. *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol* 142 (2):191-203.
- Ichikawa Y., K. Takagi, S. Tsumagari, K. Ishihama, M. Morita, M. Kanemaki, M. Takeishi, H. Takahashi. 2001. Canine parentage testing based on microsatellite polymorphisms. *J Vet Med Sci* 63 (11):1209-1213.
- Irion D.N., A.L. Schaffer, T.R. Famula, M.L. Eggleston, S.S. Hughes, N.C. Pedersen. 2003. Analysis of genetic variation in 28 dog breed populations with 100 microsatellite markers. *J Hered* 94 (1):81-87.
- Iyengar A., S. Hadi. 2014. Use of non-human DNA analysis in forensic science: A mini review. *Med Sci Law* 54 (1):41-50.
- Johansson I., J. Rendel. 1968. *Genetics and animal breeding*. Edinburgh, London,: Oliver & Boyd.
- JPFA. 2015. 平成 26 年 全国犬猫飼育実態調査 2015 [cited 2015]  
<http://www.petfood.or.jp/data/chart2014/index.html>.
- Kalinowski S.T., M.L. Taper, T.C. Marshall. 2007. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16 (5):1099-1106.
- Kang B.T., K.S. Kim, M.S. Min, Y.J. Chae, J.W. Kang, J. Yoon, J. Choi, J.K. Seong, H.C. Park, J. An, M.H. Lee, H.M. Park, H. Lee. 2009. Microsatellite loci analysis for the genetic variability and the parentage test of five dog breeds in South Korea. *Genes Genet Syst* 84 (3):245-251.
- Kanthaswamy S. 2015. Review: domestic animal forensic genetics – biological evidence, genetic markers, analytical approaches and challenges. *Anim Genet* 46 (5):473-484.



- Kanthaswamy S., B.K. Tom, A.M. Mattila, E. Johnston, M. Dayton, J. Kinaga, B.J. Erickson, J. Halverson, D. Fantin, S. DeNise, A. Kou, V. Malladi, J. Satkoski, B. Budowle, D.G. Smith, M.T. Koskinen. 2009. Canine population data generated from a multiplex STR kit for use in forensic casework. *J Forensic Sci* 54 (4):829-840.
- Keller L.F., D.M. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol Evol* 17 (5):230-241.
- Klütsch C.F.C., E.H. Seppälä, M. Uhlén, H. Lohi, P. Savolainen. 2011. Segregation of point mutation heteroplasmy in the control region of dog mtDNA studied systematically in deep generation pedigrees. *Int J Legal Med* 125 (4):527-535.
- Koskinen M.T., P. Bredbacka. 2000. Assessment of the population structure of five Finnish dog breeds with microsatellites. *Anim Genet* 31 (5):310-317.
- Leroy G. 2011. Genetic diversity, inbreeding and breeding practices in dogs: Results from pedigree analyses. *Vet J* 189 (2):177-182.
- Leroy G., F. Phocas, B. Hedan, E. Verrier, X. Rognon. 2015. Inbreeding impact on litter size and survival in selected canine breeds. *Vet J* 203 (1):74-78.
- Magnuson V.L., D.S. Ally, S.J. Nylund, Z.E. Karanjawala, J.B. Rayman, J.I. Knapp, A.L. Lowe, S. Ghosh, F.S. Collins. 1996. Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: implications for PCR-based genotyping and cloning. *Biotechniques* 21 (4):700-709.
- Manwell C., C.M.A. Baker. 1984. Domestication of the dog: hunter, food, bed-warmer, or emotional object? *Z Tierz Züchtungsbio* 101 (1-5):241-256.
- Menotti-Raymond M.A., V.A. David, S.J. O'Brien. 1997. Pet cat hair implicates murder suspect. *Nature* 386 (6627):774.
- Muller S., G. Flekna, M. Muller, G. Brem. 1999. Use of canine microsatellite polymorphisms in forensic examinations. *J Hered* 90 (1):55-56.

- Murray V., C. Monchawin, P.R. England. 1993. The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. *Nucleic Acids Res* 21 (10):2395-2398.
- Nadir E., H. Margalit, T. Gallily, S.A. Ben-Sasson. 1996. Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (13):6470-6475.
- Nass M.M.K. 1969. Mitochondrial DNA. *J Mol Biol* 42 (3):521-528.
- Nei M. 1972. Genetic Distance between Populations. *Am Nat* 106 (949):283-292.
- Nicholas F.W. 2011. Response to the documentary Pedigree Dogs Exposed: Three reports and their recommendations. *Vet J* 189 (2):126-128.
- Nutini A.L., A. Mariottini, L. Giunti, F. Torricelli, U. Ricci. 2003. Double incompatibility at human alpha fibrinogen and penta E loci in paternity testing. *Croat Med J* 44 (3):342-346.
- Ogden R., R.J. Mellanby, D. Clements, A.G. Gow, R. Powell, R. McEwing. 2012. Genetic data from 15 STR loci for forensic individual identification and parentage analyses in UK domestic dogs (*Canis lupus familiaris*). *Forensic Sci Int Genet* 6 (2):e63-e65.
- Olson K.R., J.K. Levy, B. Norby, M.M. Crandall, J.E. Broadhurst, S. Jacks, R.C. Barton, M.S. Zimmerman. 2015. Inconsistent identification of pit bull-type dogs by shelter staff. *Vet J* 206 (2):197-202.
- Ostrander E.A., R.K. Wayne. 2005. The canine genome. *Genome Res* 15 (12):1706-1716.
- Padar Z., M. Angyal, B. Egyed, S. Furedi, J. Woller, L. Zoldag, S. Fekete. 2001. Canine microsatellite polymorphisms as the resolution of an illegal animal death case in a Hungarian zoological gardens. *Int J Legal Med* 115 (2):79-81.
- Parker H.G., L.V. Kim, N.B. Sutter, S. Carlson, T.D. Lorentzen, T.B. Malek, G.S. Johnson, H.B. DeFrance, E.A. Ostrander, L. Kruglyak. 2004. Genetic Structure of the Purebred Domestic Dog. *Science* 304 (5674):1160-1164.

- Pfeiffer I., I. Völkel, H. Täubert, B. Brenig. 2004. Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. *Forensic Sci Int Genet* 141 (2–3):149-151.
- Phavaphutanon J., S. Laopiem. 2013. Evaluation of Microsatellite Polymorphism and Genetic Variability in Thai Ridgeback and Bangkaew Dogs. *Thai J Vet Med* 41 (3):10.
- Přibáňová M., P. Horák, D. Schröffelová, T. Urban, R. Bechyňová, L. Musilová. 2009. Analysis of genetic variability in the Czech Dachshund population using microsatellite markers. *J Anim Breed Genet* 126 (4):311-318.
- Puers C., H.A. Hammond, L. Jin, C.T. Caskey, J.W. Schumm. 1993. Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01[AATG]<sub>n</sub> and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder. *Am J Hum Genet* 53 (4):953-958.
- Qian X.-Q., C.-Y. Yin, Q. Ji, K. Li, H.-T. Fan, Y.-F. Yu, F.-L. Bu, L.-L. Hu, J.-W. Wang, H.-F. Mu, S. Haigh, F. Chen. 2015. Mutation rate analysis at 19 autosomal microsatellites. *Electrophoresis* 36 (14):1633-1639.
- Radko A., E. Slota. 2009. Application of 19 microsatellite DNA markers for parentage control in Borzoi dogs. *Pol J Vet Sci* 12 (1):113-117.
- Robinson R. 1973. Relationship between litter size and weight of dam in the dog. *Vet Rec* 92 (9):221-223.
- Rooney N.J. 2009. The welfare of pedigree dogs: Cause for concern. *J Vet Behav Clin App Res* 4 (5):180-186.
- Sato M., K. Sato. 2013. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta* 1833 (8):1979-1984.
- Savolainen P., J. Lundeberg. 1999. Forensic evidence based on mtDNA from dog and wolf hairs. *J Forensic Sci* 44 (1):77-81.

- Schneider P.M., Y. Seo, C. Rittner. 1999. Forensic mtDNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident. *Int J Legal Med* 112 (5):315-316.
- Scott J.P., J.L. Fuller. 1965. *Genetics and the social behavior of the dog*. Chicago: University of Chicago Press.
- Shannon L.M., R.H. Boyko, M. Castelhano, E. Corey, J.J. Hayward, C. McLean, M.E. White, M. Abi Said, B.A. Anita, N.I. Bondjengo, J. Calero, A. Galov, M. Hedimbi, B. Imam, R. Khalap, D. Lally, A. Masta, K.C. Oliveira, L. Perez, J. Randall, N.M. Tam, F.J. Trujillo-Cornejo, C. Valeriano, N.B. Sutter, R.J. Todhunter, C.D. Bustamante, A.R. Boyko. 2015. Genetic structure in village dogs reveals a Central Asian domestication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (44):13639-13644.
- Sharma R., A. Agarwal, V.K. Rohra, M. Assidi, M. Abu-Elmagd, R.F. Turki. 2015. Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reprod Biol Endocrinol* 13:35.
- Smith J.R., J.D. Carpten, M.J. Brownstein, S. Ghosh, V.L. Magnuson, D.A. Gilbert, J.M. Trent, F.S. Collins. 1995. Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by Taq DNA polymerase. *Genome Res* 5 (3):312-317.
- Spicer A.M., T.J. Kun, B.N. Sacks, E.J. Wictum. 2014. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy levels in domestic dog hair. *Forensic Sci Int Genet* 11:7-12.
- Sugiyama S., Y.H. Chong, M. Shito, M. Kasuga, T. Kawakami, C. Udagawa, H. Aoki, M. Bonkobara, S. Tsuchida, A. Sakamoto, H. Okuda, A. Nagai, T. Omi. 2013. Analysis of mitochondrial DNA HVR1 haplotype of pure-bred domestic dogs in Japan. *Leg Med* 15 (6):303-309.
- Sun H., S. Liu, Y. Zhang, M.R. Whittle. 2014. Comparison of southern Chinese Han and Brazilian Caucasian mutation rates at autosomal short tandem repeat loci used in human forensic genetics. *Int J Legal Med* 128 (1):1-9.
- Sutter N.B., C.D. Bustamante, K. Chase, M.M. Gray, K. Zhao, L. Zhu, B. Padhukasahasram, E. Karlins, S. Davis, P.G. Jones, P. Quignon, G.S. Johnson, H.G. Parker, N. Fretwell, D.S. Mosher, D.F. Lawler, E. Satyaraj, M. Nordborg, K.G. Lark, R.K. Wayne, E.A. Ostrander. 2007. A single IGF1

- allele is a major determinant of small size in dogs. *Science* 316 (5821):112-115.
- SWGDM. 2004. Revised validation guidelines. *Forensic Sci Commun* 6.
- Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. FilipSKI, S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30 (12):2725-2729.
- Tanaka K. 2013. Significance and Technique of Statistical Evidence in the U.S. : Another Legal Informatics (in Honor of Professor Yoshiharu MATSUURA). *Nagoya J Law Polit* 250:347-371.
- van Asch B., C. Alves, L. Gusmao, V. Pereira, F. Pereira, A. Amorim. 2009. A new autosomal STR nineplex for canine identification and parentage testing. *Electrophoresis* 30 (2):417-423.
- Vila C., P. Savolainen, J.E. Maldonado, I.R. Amorim, J.E. Rice, R.L. Honeycutt, K.A. Crandall, J. Lundeberg, R.K. Wayne. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* 276 (5319):1687-1689.
- Vila C., A.K. Sundqvist, O. Flagstad, J. Seddon, S. Bjornerfeldt, I. Kojola, A. Casulli, H. Sand, P. Wabakken, H. Ellegren. 2003. Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proc Biol Sci* 270 (1510):91-97.
- Voith V.L., E. Ingram, K. Mitsouras, K. Irizarry. 2009. Comparison of adoption agency breed identification and DNA breed identification of dogs. *J Appl Anim Welf Sci* 12 (3):253-262.
- Webb K.M., M.W. Allard. 2009. Identification of Forensically Informative SNPs in the Domestic Dog Mitochondrial Control Region\*. *J Forensic Sci* 54 (2):289-304.
- Weber J.L., C. Wong. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 2 (8):1123-1128.
- Wetton J.H., J.E. Higgs, A.C. Spriggs, C.A. Roney, C.S. Tsang, A.P. Foster. 2003. Mitochondrial profiling of dog hairs. *Forensic Sci Int* 133 (3):235-241.

- Wictum E., T. Kun, C. Lindquist, J. Malvick, D. Vankan, B. Sacks. 2013. Developmental validation of DogFiler, a novel multiplex for canine DNA profiling in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet* 7 (1):82-91.
- Wright S. 1949. Population structure in evolution. *Proc Am Philos Soc* 93 (6):471-478.
- Yoshida K., K. Takahashi, K. Kasai. 2005. Allele frequencies of 15 loci using AmpFI STR Identifiler Kit in Japanese population. *J Forensic Sci* 50 (3):718-719.
- Zajc I., C. Mellersh, E.P. Kelly, J. Sampson. 1994. A new method of paternity testing for dogs, based on microsatellite sequences. *Vet Rec* 135 (23):545-547.
- Zenke P., B. Egyed, L. Zoldag, Z. Padar. 2011. Population genetic study in Hungarian canine populations using forensically informative STR loci. *Forensic Sci Int Genet* 5 (1):e31-36.
- Zhao Z., J. Zhang, H. Wang, Z.-P. Liu, M. Liu, Y. Zhang, L. Sun, H. Zhang. 2015. Mutation rate estimation for 15 autosomal STR loci in a large population from Mainland China. *Meta Gene* 5:150-156.
- 巖佐 庸., 滋. 倉谷, 成. 斎藤, 裕. 塚谷. 2013. *岩波生物学辞典*. 東京: 岩波書店.
- 警察庁. 2008. *警察白書 (特集: 変革を続ける刑事警察)*. Vol. 平成 20 年版. 東京: ぎょうせい.
- 勝又 義. 2014. *最新 DNA 鑑定: その能力と限界*. 名古屋: 名古屋大学出版会.
- 青木 康. 2002. DNA 鑑定による法医学的個人識別の確率・統計学的背景. *岩手医学雑誌* 54 (2):81-94.
- 総務省統計研修所. 2006. *世界の統計*. 東京: 日本統計協会.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり，多くの方々のご指導，ご協力を賜りました．ここに感謝の意を表します．

森裕司教授には，本研究の遂行にあたり，たくさんのご助言をいただきました．心より感謝申し上げます．

武内ゆかり准教授には，本研究の遂行および本論文の執筆にあたり，終始ご指導をいただきました．先生の丁寧なご助言と叱咤激励のおかげでここまで研究を進めることができました．心から感謝申し上げます．本当にありがとうございました．

清川泰志助教には，多岐にわたってご指導をいただきました．荒田明香特任助教には，統計解析などに関するご助言をいただきました．深く感謝申し上げます．

麻布大学微生物第一研究室 阪口雅弘教授と岡本憲明氏には，共同研究者として，多大なるご助言とご協力をいただきました．深く感謝いたします．

科学警察研究所 笠井賢太郎氏，宮坂祥夫氏，松田秀明氏には，社会人博士として職務と学業を両立するにあたり，多大なるご配慮とご協力をいただきました．関口和正氏をはじめとする生物第四研究室の方々には，実験に際し，ご指導とご助言をいただきました．深く感謝いたします．

研究室の皆様にはあたたかいご支援をいただきました．

特に，村田夏子氏，菊池亜都子氏，西坂由梨氏，山木博文氏，大塚幸一郎氏，蒔田莉菜氏，小佐々大熙氏には，いつもあたたかい言葉をかけていただきました．イヌチームのおかげで，3年間頑張ることができました．心から感謝いたします．

また，南翔太氏には，統計解析に際して多大なるご助言とご支援をいただきました．本当にありがとうございました．

最後になりますが，社会人博士として3年間を過ごすにあたり，支え続けてくれた夫に心から感謝いたします．