

家庭動物を対象としたマルチローカス STR 解析による 身元証明（個体識別）技術に関する研究

Dog population data generated from a multiplex STR kit for forensic DNA profiling

日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医保健看護学科 近江 俊徳
Toshinori Omi, Nippon Veterinary and Life science University

キーワード：家庭動物、DNA、個体識別、法科学

Key Words: house animal, DNA, identification, forensic Science

1. 目的

動物の飼い主の責任（動物愛護管理法第7条）では、1）動物の種類や習性などに応じて適正に飼い、動物の健康と安全を守るよう努めること。2）動物が人に危害を加えたり迷惑を及ぼすことが無いよう努めること。3）感染症などの病気の知識を持って、予防に注意するよう努めること。4）自分が所有していることを明らかにするために、標識をつけるよう努めること等が定められている。しかし、現実的には、1）身元不明動物の遺棄 2）迷子や地震などの災害、盗難あるいは事故等による飼い主との離別 3）ヒトによる家庭動物の殺傷事例 4）家庭動物によるヒトへの殺傷事例など（平成21年度 動物の遺棄虐待事例等調査報告等 環境省）、ヒトと動物の共生が進む中、動物を取りまく社会的問題も存在する。特に所有者明示における個体識別（身元証明）は重要であり、現在はマイクロチップ装着等が定められているが、マイクロチップの普及率は0.5%程度と低く（マイクロチップ普及推進モデル事業、自然環境局総務課動物愛護管理室、平成20年度）、技術は確立されているものの実用的な個体識別法としては十分とは言い難い。

近年、欧米では法医学者、FBI、動物遺伝学者などが積極的に家庭動物のDNA個体識別に

注目されてる¹⁻³⁾。そこで、本研究では、家庭動物のDNA個体識別に不可欠な短鎖縦列反復配列（Short tandem repeat ; STR）マーカーの遺伝子型頻度からイヌ遺伝子型判定キットの個体識別能を評価することで、DNA個体識別の実用性を調査した。

2. 材料および方法

イヌゲノムDNAは日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科臨床病理学教室から分与されたGolden Retriever 40検体の血液を用い、常法に抽出した。

次に、身元証明（個体識別）技術に関する調査研究として、我が国では市販されたばかりのCanine Genotypes Panel 1.1 Kit(Finnzymes, フィンランド)を選択し、PCR法により18のイヌSTR遺伝子座位とAmelogenin遺伝子座の計19遺伝子座を同時にマルチプレックスPCR増幅した。次に、各遺伝子座の型判定を行うため、eneScan™ 500[LIZ]Size Standard(ABI, アメリカ)とともにABI PRISM 310 Genetic Analyzer (ABI, アメリカ)にてキャピラリー電気泳動を行いPCR産物を分離後、Gene Mapper v.4.0 (ABI, アメリカ)で各アレルの同定を行った。なお、

以上の条件は添付の指示書に準じて実施した。

Golden Retriever 40 検体の 18STR 座位および *Amelogenin* 遺伝子座すべての遺伝子型データをもとに本キットの個体識別能を評価するためヘテロ接合度観察値、ヘテロ接合度期待値、多型情報含有値識別能、総合識別能力、父権否定確率、総合父権否定確率および最もよく見られる確率が高い個体の遺伝子型頻度を Microsoft Excel (Microsoft Corporation, アメリカ) と Cervus ver.3.0.3 ソフトウェア (Tristan Marshall) ⁴⁾ を用いて算出した。また、ハーディー・ワインベルグ平衡検定の有意確率、集団内での近交係数は GENEPOP version 4.0.10. (http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op1.html) ⁵⁾ を用いた。さらに GENEPOP version 4.0.10.を用いて集団内における近交係数を算出した。

3. 結果

Golden Retriever 40 検体 (♂23 検体、♀17 検体) を用いたフラグメント解析の結果、18 STR 遺伝子座と *Amelogenin* 遺伝子座、計 19 遺伝子座全てにおいてピークが検出され、遺伝子型判定が可能であった。

表 1 Golden Retriever 40 検体で検出された 18 STR 遺伝子座の解析結果

| 遺伝子座 | アレルサイズ範囲 | アレル | アレル数 | ヘテロ接合体 | ホモ接合体 | アレル頻度 |
|-----------|----------|-----|------|--------|-------|--------|
| AHTb211 | 85-93 | 85 | 8 | 6 | 1 | 0.1000 |
| | | 87 | 9 | 9 | 0 | 0.1125 |
| | | 89 | 54 | 18 | 18 | 0.6750 |
| | | 93 | 9 | 9 | 0 | 0.1125 |
| | | 113 | 24 | 10 | 7 | 0.3000 |
| CXX279 | 113-122 | 113 | 38 | 14 | 12 | 0.4750 |
| | | 117 | 3 | 3 | 0 | 0.0375 |
| | | 120 | 2 | 2 | 0 | 0.0250 |
| | | 122 | 13 | 11 | 1 | 0.1625 |
| | | 160 | 34 | 22 | 6 | 0.4250 |
| REN169O18 | 157-166 | 164 | 8 | 8 | 0 | 0.1000 |
| | | 166 | 14 | 12 | 1 | 0.1750 |
| | | 197 | 13 | 9 | 2 | 0.1625 |
| | | 201 | 38 | 22 | 8 | 0.4750 |
| | | 203 | 12 | 12 | 0 | 0.1500 |
| REN54P11 | 222-240 | 205 | 17 | 15 | 1 | 0.2125 |
| | | 222 | 2 | 2 | 0 | 0.0250 |
| | | 226 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| | | 230 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| | | 234 | 23 | 11 | 6 | 0.2875 |
| INR.A21 | 82-98 | 236 | 42 | 18 | 12 | 0.5250 |
| | | 238 | 6 | 6 | 0 | 0.0750 |
| | | 240 | 5 | 5 | 0 | 0.0625 |
| | | 82 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| | | 85 | 16 | 10 | 3 | 0.2000 |
| AHT137 | 128-150 | 89 | 10 | 6 | 2 | 0.1250 |
| | | 91 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| | | 93 | 3 | 3 | 0 | 0.0375 |
| | | 95 | 23 | 15 | 4 | 0.2875 |
| | | 98 | 26 | 14 | 6 | 0.3250 |
| | | 128 | 21 | 17 | 2 | 0.2625 |
| | | 130 | 9 | 9 | 0 | 0.1125 |
| | | 132 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| | | 134 | 14 | 8 | 3 | 0.1750 |
| | | 140 | 9 | 7 | 1 | 0.1125 |
| | | 142 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| 144 | 4 | 4 | 0 | 0.0500 | | |
| 146 | 10 | 8 | 1 | 0.1250 | | |
| 148 | 9 | 9 | 0 | 0.1125 | | |
| 150 | 2 | 0 | 1 | 0.0250 | | |

| 遺伝子座 | アレルサイズ範囲 | アレル | アレル数 | ヘテロ接合体 | ホモ接合体 | アレル頻度 |
|-----------|----------|-----|------|--------|-------|--------|
| REN169D01 | 197-216 | 197 | 22 | 16 | 3 | 0.2750 |
| | | 207 | 12 | 10 | 1 | 0.1500 |
| | | 212 | 36 | 20 | 8 | 0.4500 |
| | | 214 | 8 | 8 | 0 | 0.1000 |
| | | 216 | 2 | 2 | 0 | 0.0250 |
| AHTb260 | 240-252 | 240 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| | | 242 | 14 | 10 | 2 | 0.1750 |
| | | 244 | 51 | 17 | 17 | 0.6375 |
| | | 246 | 10 | 8 | 1 | 0.1250 |
| | | 248 | 2 | 2 | 0 | 0.0250 |
| | | 250 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| | | 252 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| AHTb253 | 287-293 | 287 | 35 | 21 | 7 | 0.4375 |
| | | 289 | 24 | 18 | 3 | 0.3000 |
| | | 293 | 21 | 15 | 3 | 0.2625 |
| | | 109 | 8 | 6 | 1 | 0.1000 |
| INU005 | 109-126 | 122 | 7 | 7 | 0 | 0.0875 |
| | | 124 | 57 | 17 | 20 | 0.7125 |
| | | 126 | 8 | 8 | 0 | 0.1000 |
| | | 141 | 33 | 21 | 6 | 0.4125 |
| INU030 | 141-149 | 147 | 43 | 25 | 9 | 0.5375 |
| | | 149 | 4 | 4 | 0 | 0.0500 |
| | | 230 | 5 | 5 | 0 | 0.0625 |
| | | 232 | 10 | 10 | 0 | 0.1250 |
| FH2848 | 230-239 | 234 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| | | 237 | 27 | 19 | 4 | 0.3375 |
| | | 239 | 37 | 19 | 9 | 0.4625 |
| | | 97 | 17 | 11 | 3 | 0.2125 |
| | | 103 | 43 | 13 | 15 | 0.5375 |
| AHT121 | 97-107 | 105 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| | | 107 | 19 | 9 | 5 | 0.2375 |
| | | 147 | 21 | 19 | 1 | 0.2625 |
| | | 151 | 2 | 2 | 0 | 0.0250 |
| | | 155 | 19 | 17 | 1 | 0.2375 |
| FH2054 | 147-171 | 159 | 5 | 3 | 1 | 0.0625 |
| | | 163 | 2 | 2 | 0 | 0.0250 |
| | | 167 | 18 | 12 | 3 | 0.2250 |
| | | 171 | 13 | 11 | 1 | 0.1625 |
| | | 200 | 7 | 3 | 2 | 0.0875 |
| REN163C04 | 200-206 | 202 | 22 | 18 | 2 | 0.2750 |
| | | 204 | 27 | 19 | 4 | 0.3375 |
| | | 206 | 24 | 16 | 4 | 0.3000 |
| | | 219 | 52 | 18 | 17 | 0.6500 |
| | | 223 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| AHTb171 | 219-238 | 225 | 17 | 13 | 2 | 0.2125 |
| | | 227 | 5 | 5 | 0 | 0.0625 |
| | | 234 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| | | 238 | 4 | 4 | 0 | 0.0500 |
| | | 270 | 41 | 23 | 9 | 0.5125 |
| REN247M23 | 270-279 | 272 | 4 | 2 | 1 | 0.0500 |
| | | 274 | 10 | 8 | 1 | 0.1250 |
| | | 279 | 25 | 15 | 5 | 0.3125 |
| | | 219 | 52 | 18 | 17 | 0.6500 |
| | | 223 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| AHTb171 | 219-238 | 225 | 17 | 13 | 2 | 0.2125 |
| | | 227 | 5 | 5 | 0 | 0.0625 |
| | | 234 | 1 | 1 | 0 | 0.0125 |
| | | 238 | 4 | 4 | 0 | 0.0500 |
| | | 270 | 41 | 23 | 9 | 0.5125 |
| REN247M23 | 270-279 | 272 | 4 | 2 | 1 | 0.0500 |
| | | 274 | 10 | 8 | 1 | 0.1250 |
| | | 279 | 25 | 15 | 5 | 0.3125 |

Amelogenin 遺伝子型による性別判定は、雄検体ではヘテロ型[179-215]、雌検体ではホモ型[215-215]を示し、個体情報の性別と *Amelogenin* 遺伝子型判定による性別判定は 40 検体全てにおいて一致した。

次に、フラグメント解析により Golden Retriever 40 検体で検出された *Amelogenin* 遺伝子座を除く 18 STR 遺伝子座の遺伝子型からアレルサイズ範囲、アレル、アレル数、ヘテロ接合体、ホモ接合体、アレル頻度を算出した

その結果、アレルの種類は最少で 3 種類、最多で AHT137 の 10 種類の範囲でアレルに多型が見られ、平均すると 1 遺伝子座につき 5.17 のアレルが検出された。また、各遺伝子座のアレルごとに検出されたアレル数からアレル頻度を算出した結果、最もアレル頻度が低かったのは REN54P11 のアレル 226,320、INRA21 のアレル 82,91、AHT137 のアレル 132,142、

AHTh260 のアリル 240,250,252、FH2848 のアリル 234、AHT121 のアリル 105、AHTh171 のアリル 223,234 の 0.0125 で、最もアリル頻度が高かったのは INU005 のアリル 142 の 0.7125 であった (表 1)。

次に、各 STR の遺伝的多様性や個体識別能力、親子鑑定能力を評価するために、STR 遺伝子座で検出されたヘテロ接合体数、ホモ接合体数、アリル頻度から、ヘテロ接合度観察値 (H_o)、ヘテロ接合度期待値 (H_e)、ハーディー・ワインベルグ平衡検定における有意確率 (P-Value)、集団内での近交係数 (F_{is})、多型情報含有値 (PIC)、識別能 (PD)、父権否定確率 (PE)、総合識別能力 (APD) および総合父権否定確率 (APE) を算出した。

その結果、検出されたヘテロ接合体数から算出されたヘテロ接合度観察値 (H_o) は AHT121 の 0.4250 から FH2054 の 0.8250 の範囲の値を示し、遺伝子座によって差が見られ、ヘテロ接合度観察値 (H_o) は、FH2054、AHT137、REN169O18、INU055、REN169D01、REN162C04、AHTk253、FH2848、INRA21、INU030、REN247M23、REN54P11、AHTk211、AHTh171、CXX279、AHTh260、INU005、AHT121 の順にヘテロ接合度観察値が高い遺伝子座となり、18 遺伝子座のヘテロ接合度観察値の平均値は 0.6236 であった。アリル頻度から算出されたヘテロ接合度期待値 (H_e) は INU005 の 0.4706 から AHT137 の 0.8541 の範囲の値を示し、遺伝子座によって差が見られ、AHT137、FH2054、INRA21、REN162C04、REN169O18、REN169D01、INU055、CXX279、FH2848、AHTk253、REN54P11、REN247M23、AHT121、AHTh260、INU030、AHTh171、AHTk211、INU005 の順でヘテロ接合度期待値が高い遺伝子座となり、18 遺伝子座のヘテロ接合度期待値の平均値は 0.6507 であった。 H_o と H_e から算出したハーディー・ワインベルグ平衡検定の有意確率 (P-Value) は REN247M23 の 0.0332 から AHTk253 の 0.9580 の範囲の値を示し、遺伝子座によって差が見られ、18 遺伝子座のハーディー・ワインベルグ平衡検定の有意確率の平均値は 0.4105 であった。P<0.05 の値を示した遺伝子座は AHT121 (0.0378) と REN247M23 (0.0332) の 2 遺伝子座であった。集団内での近交係数 (F_{is}) は INU030 の -0.1481 から AHT121 の 0.3140 の範囲の値を示

し遺伝子座によって差が見られ、18 遺伝子座の近交係数の平均値は 0.0399 であった。アリル頻度から算出した多型情報含有値 (PIC) は INU005 の 0.4361 から AHT137 の 0.8253 の範囲の値を示し、遺伝子座によって差が見られ、AHT137、FH2054、INRA21、REN169D01、REN169O18、INU055、CXX279、FH2848、REN54P11、AHTk253、REN247M23、AHT121、AHTh260、AHTh171、AHTk211、REN162C04、INU030、INU005 の順で多型情報含有値が高い遺伝子座となり、18 遺伝子座の多型情報含有値の平均値は 0.5914 であった。アリル頻度から算出した識別能 (PD) は INU005 の 0.6849 から AHT137 の 0.9574 の範囲の値を示し、遺伝子座によって差が見られ、AHT137、FH2054、INRA21、REN162C04、REN169D01、INU055、REN169O18、CXX279、FH2848、REN54P11、AHTk253、REN247M23、AHT121、AHTh260、AHTh171、AHTk211、INU030、INU005 の順で識別能が高い遺伝子座となり、18 遺伝子座の識別能の平均値は 0.8116 であった。また、18 遺伝子座の識別能から算出した総合識別能力 (APD) は $1 - 1.4337 \times 10^{-14}$ ($=0.999999999999986$) となり、この 18 STR 遺伝子座の遺伝子型を用いた総合的な識別能力つまり任意の 2 人が異なる遺伝子型を持つ確率は、99.9999999999986% (1000 兆頭中 999 兆 9999 億 9999 万 9986 頭が異なる遺伝子型を持ち識別できる確率) となった。また、父権否定確率 (PE) は INU030 の 0.2432 から AHT137 の 0.6900 の範囲の値を示し、遺伝子座によって差が見られ、AHT137、FH2054、INRA21、REN162C04、REN169D01、INU055、REN169O18、CXX279、FH2848、REN54P11、AHTk253、REN247M23、AHT121、AHTh260、AHTh171、AHTk211、INU005、INU030 の順で父権否定確率が高い遺伝子座となり、18 遺伝子座の父権否定確率の平均値は 0.4021 であった。18 遺伝子座の父権否定確率から算出した総合父権否定確率 (APE) は 0.999934 となり、母子関係が分かっている場合に正しくない父親を検出する確率は 99.9934% (100 万頭の父親候補から 99 万 9934 頭を除外できる確率) となった。

次に、Golden Retriever 40 検体から検出したアリル頻度を用いて最も見られる確率が高い個体の遺伝子型を算出した。各 STR 遺伝子座

位の遺伝子型頻度は、最もアレル頻度が高かったアレルと2番目にアレル頻度が高かったアレルのヘテロ接合体を遺伝子型頻度とした⁶⁾。各STR 遺伝子座位で算出した遺伝子型頻度をその結果、18 STR 遺伝子座で最も見られる確率が高い遺伝子型を持つ個体の割合は約5300億頭に1頭という確率となった。

4. 考察

国際畜犬連盟の統計によると世界のイヌの頭数は141,456,939とされており⁷⁾、国際畜犬連盟が把握していない頭数も含めると、世界に約4億頭のイヌがいると推測されている。また、日本においては6,880,844頭のイヌが登録されており、登録されていない頭数を含めると約1200万頭の犬が飼育されていると推測されている。本調査研究で明らかとなった、総合識別能力 (APD) : $1 - 1.4337 \times 10^{-14}$ および、最も一般的な個体の遺伝子型頻度 : 1.88383×10^{-12} (約5300億頭に1頭)の結果は、理論的には地球上の全部のイヌを検査しても同じ個体は見つからないということの意味し、G.R という一品種から導き出された結果ではあるが、本キットによるイヌ DNA 個体識別は可能であることが示唆された。また、多型情報含有値⁸⁾、親子鑑定能力の指標となる多型情報含有値 (PIC) の平均値は G.R で 0.5914、であった。G.R どちらにおいても平均して1遺伝子座につき50%以上の確率でアレルの由来を判定できる数値を示したことから、日本国内で飼育されているG.Rにおいて本キットは親子鑑定にも有用であることが示唆された。

以上、本調査により我が国におけるイヌ DNA 個体識別が技術的に可能であることが示唆され、身元不明犬の身元証明、動物虐待、遺棄の抑止力など家庭動物の適正飼育管理への応用が期待される。

謝辞

本調査研究は、平成22年度 公益社団法人 日本愛玩動物協会 家庭動物の適正飼養管理に関する調査研究助成により実施した。助成頂いた日本愛玩動物協会関係者の皆様に深謝致します。また、本調査研究で個体識別の検討を主として実施した日本獣医生命科学大学 獣医保健看護学専攻博士課程前期2年生 河上剛氏、血液サンプルを分与頂いた同大学 臨床病理学教室 鷲巢月見教授、盆子原 誠准教授、

常時研究補助をして頂いた本学研究室 (獣医保健看護学基礎部門比較遺伝学研究分野) の学生に感謝致します。

引用および参考文献

1. Shutler GG, Gagnon P, Verret G, Kalyn H, Korkosh S, Johnston E, Halverson J. Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case. *J Forensic Sci.* 1999. 44(3):623-6.
2. Brauner P, Reshef A, Gorski A. DNA profiling of trace evidence--mitigating evidence in a dog biting case. *J Forensic Sci.* 2001. 46(5):1232-4.
3. Zenke P, Egyed B, Zöldág L, Pádár Z. Population genetic study in Hungarian canine populations using forensically informative STR loci. *Forensic Sci Int Genet.* 2011. 5(1):e31-6.
4. Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L., and Pemberton, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 1998. 7, 639-55.
5. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J. Hered* 1995. 86:248-9.
6. Entrala C, Lorente M, Lorente JA, Alvarez JC, Moretti T, Budowle B, Villanueva E. Fluorescent multiplex analysis of nine STR loci: Spanish population data. *Forensic Sci Int* 1998. 98(3):179-83.
7. Federation Cynologique Internationale For Dogs Worldwide. Statistics (2010) (<http://www.fci.be/stats.aspx>)
8. John M. Butler. 福島弘文・五條掘孝監訳. DNA 鑑定とタイピング 遺伝学・データベース・計測技術・データ検証・品質管理. 2009 共立出版.