

氏 名 (本 国 籍)	森 幾 啓 (岐阜県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 7 7 5 号
学 位 授 与 年 月 日	令和 4 年 3 月 1 4 日
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Studies on Forensic Species Identification by Fluorescent Multiplex PCR (蛍光マルチプレックス PCR による法科学的な動物種 識別に関する研究)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教 授 八代田 真 人 副査 岐阜大学 教 授 松 村 秀 一 副査 静岡大学 教 授 与 語 圭一郎

論 文 の 内 容 の 要 旨

DNA 試料に基づく動物種識別法は、犯罪捜査、野生生物の違法取引調査、法医昆虫学、食品認証などに広く利用されている。法科学分野では、ヒト個人識別について数多くの研究が進められ標準的な解析方法が確立されてきたが、哺乳類や鳥類一般の種識別に関しては標準的な手法が確立されていない。特に、複数種の DNA が混合した劣化試料から低コストで効率的に動物種識別を行う手法の確立が求められている。

論文は 4 章から構成される。第 1 章では、本研究の背景と目的をまとめた。第 2 章では、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の分析に基づくこれまでの手法を評価した。第 3 章では、新しいアッセイ法の開発およびその信頼性に対する詳細な評価を実施した。第 4 章では、本研究から得られる結論がまとめた。

第 2 章では、哺乳類の種判別に広く用いられてきた mtDNA に基づく手法を比較検討した。特に、複数種の DNA が混合した試料からの識別という観点で、それぞれの手法の信頼性および汎用性を評価した。現在最も広く用いられている mtDNA シーケンス解析が混合試料の分析においては脆弱であることを示した。その一方、近年技術的進歩が著しい次世代シーケンシング技術を用いた DNA メタバーコーディング解析は、混合試料の分析には強いものの、費用面と時間面で高コストであり、現場の法科学的検査機関が日常的に扱う手法としては適さないことを示した。これらの手法に対し、蛍光マルチプレックス PCR 法は低コストで混合試料中の動物種識別能力に優れており、今後も重要な役割を果たしうることを明らかにした。

第3章では、共通プライマーによる mtDNA の D-loop 領域の増幅と、種特異プライマーによる cyt b 領域の増幅とを組み合わせた蛍光マルチプレックス PCR に基づく種識別法を開発した。その結果、日本で日常的に出会う可能性のある動物種をほぼカバーする哺乳類 22 種および家禽 4 種の同時識別が可能となった。検出下限が mtDNA 100 コピーという高い検出感度を有し、混合 DNA 試料に関しても 50:1~1:1 までの様々な混合比で高い識別能力を有することを示した。さらに、Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) のガイドラインに基づいて、手法の信頼性等に関するバリデーションを実施した。

以上、本研究で開発したアッセイ法は低コストである一方で劣化した混合 DNA 試料にも対応可能であり、識別可能な種数も多い。したがって、日本の法科学分野における標準的な動物種識別法として広く使用されていくことが期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者 森 幾啓 は、法科学分野における標準的な動物種識別法を確立することを目指し、まず、mtDNA を用いた既存の各手法の信頼性および汎用性を評価した。その結果、法科学実務、特に混合 DNA 試料や劣化した試料を対象に検査を実施する上で、蛍光マルチプレックス PCR 法が果たしうる重要な役割を明らかにした。次に、混合 DNA 試料でも検査が可能な、哺乳類 22 種および家禽 4 種の同時識別アッセイ法を開発した。これは、mtDNA の D-loop 領域を増幅する共通プライマーと、cyt b 領域を増幅する種特異プライマーを組み合わせた、蛍光マルチプレックス PCR に基づく方法である。このアッセイ法は、これまでの手法よりも多くの動物種を対象に低コストで高感度の識別を可能にするものであり、今後日本の法科学分野における標準的な動物種識別法として使用されていくことが期待できる。

基礎となる学術論文

- 1) Mori, C., S. Matsumura: Current issues for mammalian species identification in forensic science: a review. *International Journal of Legal Medicine*, 135(1), 3-12, 2020.
- 2) Mori, C., S. Matsumura: Development and validation of simultaneous identification of 26 mammalian and poultry species by a multiplex assay. *International Journal of Legal Medicine*. (in press, but already published online: <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02711-y>)