

## 速報

## シカ糞の遺伝解析による個体識別は何日目のサンプルまで可能か？\*1

金谷整一\*2・大谷達也\*3

金谷整一・大谷達也：シカ糞の遺伝解析による個体識別は何日目のサンプルまで可能か？ 九州森林研究 75：141－143, 2022 ニホンジカによる森林・林業被害を低減させるには、適切な個体数管理が重要であり、そのためには対象地における個体数を把握する必要がある。近年、野生ニホンジカの糞表面から抽出したDNAを用いた遺伝解析による個体識別が可能となり、個体数推定に応用できるようになったが、DNAの劣化等により個体識別が困難な場合がある。本報告では、シカ2個体から採取した直腸糞を野外に放置し、10座の核マイクロサテライトマーカーを使用した個体識別（遺伝子型の決定）の可否を経時的に検討した。その結果、放置6日目まで遺伝子型をおおむね正確に決定できたが、プライマーによっては放置1日後から、正確に遺伝子型を決定できないサンプルが認められた。これらはヘテロの遺伝子型を示し、allelic dropout等が生じていると推察された。したがって、シカ糞由来のDNAを用いた遺伝解析では、プライマーによっては排泄からわずか1日後の採取でも個体識別を誤る可能性が示唆された。

キーワード：ニホンジカ、核マイクロサテライトマーカー、個体識別、直腸フン

## I. はじめに

現在、日本各地でニホンジカ (*Cervus nippon*; 以下、シカ) による林業被害や森林生態系への影響が大きな問題となっている。シカによる被害を低減させるには個体数の適切な管理が重要であり、そのためには対象地に生息するシカ個体数を把握することが必要である。近年、シカ糞の表面に付着している直腸組織のDNAを用いた個体識別が試みられており、シカ個体数推定への応用が期待されている（宮崎ら, 2001; Agetsuma-Yanagihara *et al.*, 2017; Yamashiro *et al.*, 2017）。

シカ類の個体識別には核マイクロサテライト (SSR) マーカーが使用されており、北米の *Odocoileus hemionus sikhensis* (シトカオグロジカ: Brinkman *et al.*, 2010 a) では7座、*O. virginianus* (オジロジカ: Goode *et al.*, 2014) では17座で解析している。シカでは、Yamashiro *et al.* (2017) が、徳島県西部に分布するシカ個体群において、10座で高い多型性を確認し、うち9座による遺伝解析で個体識別が可能であることを示している。

しかしながら、野外で採取した糞を用いた遺伝解析については、いくつかの問題点が指摘されている。すなわち、野外で採取したサンプルからDNAを抽出し遺伝解析する際、マイクロサテライト遺伝子座をPCR増幅する過程において、ヘテロ接合体の片方の対立遺伝子が増幅されずホモ接合体のようにみえる現象 (allelic dropout) や、ないはずの偽の対立遺伝子が判読される現象 (false allele) が生じることが知られている (湯浅・佐藤, 2008)。このことは、野外から採取されたサンプルでは、DNA量が少なかったり、時間の経過とともに降雨や紫外線といった環境要因によりDNAの損傷や断片化が進むためと推測されている (湯浅・佐藤, 2008; Brinkman *et al.*, 2010 b; Agetsuma-Yanagihara *et al.*,

2017)。例えば、Yamashiro *et al.* (2017) は、シカ糞由来のDNAを用いて個体識別を行った際、「新鮮」なサンプル（表面に粘液が付着していることが確認できる）に比べ、「やや鮮度の劣る」サンプル（表面に光沢がある、あるいは乾燥しているが分解の兆候はない）になると allelic dropout が生じる割合が増大することを指摘している。このように野外環境で劣化したサンプルを使って個体識別を行った場合、個体数の正確な推定ができない可能性がある。

Yamashiro *et al.* (2017) の手法は、今後のシカ被害対策へ活用されることが期待されるが、シカ糞サンプルが「新鮮」あるいは「鮮度の劣る」等と視覚的に4つに分類しているのみで、野外条件下で放置されたシカ糞由来のDNAが、何日後に個体識別が困難になるか示されていない。そこで本報告では、シカ糞由来のDNAを用いて Yamashiro *et al.* (2017) にしたがった遺伝解析による個体識別の正確性が、排泄後の日数経過にとまってどのように変化するか把握することを目的とし、直腸糞を野外に実験的に放置後何日目まで正確な個体識別（遺伝子型の決定）が可能か検討した。

## II. 材料と方法

## 1. 材料

今回の実験に供したシカ糞は、2021年1月12日に徳島県那賀町の野生シカ一時飼養施設において、屠殺されたオス・メス一頭ずつの直腸より採取した。あわせてリファレンスとなる遺伝子型を決定するため、各個体から筋肉および直腸の組織をそれぞれ4サンプルずつ採取した。

## 2. 調査方法

## 2-1. 野外放置試験

\*1 Kanetani, S. and Otani, T.: Temporal decrease in possibility of individual identification by genetic analysis using sika deer fecal samples exposed to field condition.

\*2 国立研究開発法人森林研究・整備機構 森林総合研究所九州支所 Kyushu Res. Ctr., For. & Forest Prod. Res. Inst., Kumamoto 860-0862, Japan

\*3 国立研究開発法人森林研究・整備機構 森林総合研究所四国支所 Shikoku Res. Ctr., For. & Forest Prod. Res. Inst., Kochi 780-8077, Japan

2021年1月12日18時に森林総合研究所四国支所構内（高知市朝倉西町、海拔35m）において、地上高30cmに設置したトレイに人工芝を敷き、その上に直腸糞をのせた（図-1）。糞の回収は、1月13日（放置1日目、以下同）、14日（2日目）、15日（3日目）および18日（6日目）の18時に実施した。各回収日には、オス・メスそれぞれ糞1粒だけを3サンプル、糞4粒をまとめた1サンプルの合計4サンプルを回収した。なお放置試験期間中、高知市では開始当日に多少の降雨はあったが、おおむね晴天であった（表-1、気象庁2021）。



図-1. シカ糞の野外放置試験の様子

## 2-2. 遺伝解析

筋肉と直腸組織にはDNeasy Blood & Tissue Kit、シカ糞にはQIAamp DNA Stool Mini Kit（ともにQIAGEN社）を用い、添付のプロトコールに従ってDNAを抽出した。

遺伝子型の決定には、ウシヤカモシカ等で開発されYamashiro *et al.* (2017) で使われた10座の核マイクロサテライトマーカー、すなわちBM 203, BM 888, BM 3628, BM 4107, BM 6506（以上、Bishop *et al.*, 1994）、CSSM 019（Moore *et al.*, 1994）、IDVGA 55（Mezzelani *et al.*, 1995）、ILSTS 030（Kemp *et al.*, 1995）、MM 12（Mommens *et al.*, 1994）およびOarFCB 193（Buchanan and Crawford, 1993）を用いた（表-2）。

PCR反応液は、Yamashiro *et al.* (2017) を参考にQiagen Type-it Microsatellite PCR Kit（QIAGEN社）を用いて調整した。すなわち、抽出したDNAを1.5  $\mu$ l、Type-it Microsatellite PCR Master Mixを2.5  $\mu$ l、Q solutionを0.5  $\mu$ l、0.2  $\mu$ Mに調整したForwardおよびReverseのプライマーをそれぞれ0.25  $\mu$ lの

計5.0  $\mu$ lの反応液とした。遺伝子の増幅は、事前の予備実験でYamashiro *et al.* (2017) にしたがって実施したが、増幅が確認されないサンプルがみられたことから、タッチダウンPCR（Done *et al.*, 1991）としC1000 Touch Thermal Cycler（BioRad社）を用いて行った。すなわちPCR反応は、95℃で5分間熱変性させた後、95℃で30秒、62℃で180秒、72℃30秒を1サイクルとし、このサイクルをアニーリング温度の59℃まで1℃ずつ下げて実施した。その後、95℃で30秒、58℃で180秒、72℃で30秒のステップを30から32サイクル繰返し、最後に60℃で30分間の伸長反応を行った。PCR産物はApplied Biosystems 3500 Genetic Analyzer（Thermo Fisher Scientific社）を用いて電気泳動し、GeneMapper Software 5（Thermo Fisher Scientific社）を用いて遺伝子型を決定した。なお電気泳動の際、プライマーによってPCR産物を1~50倍に希釈して用いた。

同時に回収した4サンプルのうち、筋肉・直腸組織の遺伝子型と一致するサンプル数の変化を回収日ごとに検討した。

## III. 結果および考察

オス・メスともに、筋肉および直腸組織から採取したDNAによる遺伝解析では、10座すべてのプライマーおよびすべてのサンプル間でそれぞれ遺伝子型が一致した（表-2）。

放置試験に供したシカ糞において、オスでは1つのプライマー（BM 4107）の3日目の1サンプルを除き、すべてのプライマーとサンプルで6日目まで遺伝子型を正確に決定することができた（表-2）。一方メスでは、おおむね6日目まで遺伝子型を決定できたが、プライマー（BM 203, BM 888, BM 4107, IDVGA 55 および OarFCB 193）によっては3日目あるいは6日目に遺伝子型を決定できるサンプルが減少した（表-2）。また、4座のプライマー（BM 203, IDVGA 55, ILSTS 030 および OarFCB 193）では、放置日数が増えるにつれ、正確に遺伝子型を決定できない可能性があるサンプル数が増えた（表-2）。

オス・メスの違いで、遺伝子型の決定できないサンプル数が異なった結果については（表-2）、オスのサンプルはやや軟便であったため、腸粘膜組織が通常よりも多く含まれており、メスより多くのサンプルで遺伝子型を決定できたのかも知れない。今回の報告では、オス・メス一頭ずつしか供試していないため検討できなかったが、今後は、性の違いや糞の硬軟等によって、DNAの抽出および遺伝子型の決定に差異が生じるか検証していく必要

表-1. シカ糞の野外放置試験期間中（2021年1月）における気象状況

月日	野外放置経過日数	降水量 (mm)	気温 (°C)			湿度 (%)		風速 (m/s)			日照時間 (h)	天気概況	
			平均	最高	最低	平均	最小	平均	最大	瞬間最大		昼 (06:00~18:00)	夜 (18:00~翌日06:00)
1月の平年値		59.1	6.7	12.2	2.1	61	--	1.8	--	--	6.2	--	--
2021年													
1月12日	0日目	4.5	4.6	10.0	1.4	77	43	1.5	3.4	6.6	2.3	曇時々みぞれ後晴一時雨	晴後一時曇
1月13日	1日目	--	5.4	12.2	-0.4	69	39	1.3	3.3	6.8	8.9	晴	晴一時曇
1月14日	2日目	--	8.3	16.4	1.5	70	41	1.2	2.3	4.5	9.1	晴	晴
1月15日	3日目	--	9.9	16.5	4.8	77	57	1.5	2.7	5.1	5.1	晴時々曇	晴後時々曇
1月16日	4日目	0.5	11.8	19.2	7.8	64	22	1.8	5.9	10.5	7.0	晴一時雨	曇一時晴
1月17日	5日目	--	7.4	12.1	2.3	42	24	1.6	5.1	12.1	8.1	晴一時曇	晴後一時曇
1月18日	6日目	0.0	5.1	10.4	-0.7	53	29	1.8	5.7	10.7	8.1	晴後一時曇	雨時々曇後晴

\*高知地方気象台（高知市比島町：N33o34.0', E133o32.9', 海拔：1.0m）

--：該当現象、または該当現象による量等がない

がある。

なお、日数の経過にともなう遺伝子型の決定の可否について、DNA抽出に供するシカ糞の粒数の違いに明瞭な傾向は認められなかった。

今回の放置実験期間は、紫外線が弱い冬期であり降雨もほとんど記録されず(表-1)、また糞を地表面に置かずに行った実験であったことから(図-1)、実際に野外で採取する糞よりもDNAの状態は良好であり放置6日目まで遺伝子型を決定できたのかも知れない(表-2)。*O. hemionus sitkensis*では、糞を野外の地表面に設置した雨除けの箱内に置いた状態で、28日目まで allelic dropout および false allele, PCRの増幅失敗を合計した割合は1座あたり10%未満であった(Brinkman *et al.*, 2010 b)。このように、DNAが劣化しにくい条件であれば、より長期間にわたって遺伝子型を決定できる可能性があると考えられる。

表-2. シカ糞由来のDNAを用いた遺伝解析の結果

プライマー	アレル	オス					
		0日目	1日目	2日目	3日目	6日目	
BM203	220 / 220	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	
BM888	204 / 204	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	
BM3628	200 / 206	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	
BM4107	161 / 165	○○○○	○○○○	○○○○	○○○▲	○○○○	
BM6506	194 / 194	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	
CSSM019	144 / 150	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	
IDVGA55	215 / 215	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	
ILSTS030	154 / 156	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	
MM12	80 / 84	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	
OarFCB193	127 / 131	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	

  

プライマー	アレル	メス					
		0日目	1日目	2日目	3日目	6日目	
BM203	216 / 220	○○○○	○○○○	○○○○	○○○-	○○▲-	
BM888	196 / 198	○○○○	○○○○	○○○○	○○○-	○○--	
BM3628	204 / 204	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	
BM4107	173 / 173	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	
BM6506	202 / 202	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	
CSSM019	144 / 144	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	
IDVGA55	211 / 213	○○○○	○○○○	○○○○	○○○▲	○○○-	
ILSTS030	154 / 156	○○○○	○○○○	○○○▲	○○▲▲	○○○○	
MM12	84 / 84	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	
OarFCB193	129 / 131	○○○○	○○▲▲	○○▲▲	○○▲▲	▲▲--	

\*各欄には、遺伝解析に供した4サンプルの結果を記している。

○：筋肉サンプルと同じ遺伝子型を示したサンプル。

▲：ヘテロの遺伝子型で、前のピークが低かったサンプル。

-：遺伝子型を決定できなかったサンプル。

一方で、野外放置後、正確に遺伝子型を決定できないサンプルがみられた最短の日数は、OarFCB193の1日目であった(表-2)。今回の解析でOarFCB193は、ヘテロの遺伝子型を示したが、正確に遺伝子型を決定できなかったサンプルでは、2つあるアレルのうち1番目(フラグメントサイズが小さい)が2番目(フラグメントサイズが大きい)よりピークが低かった。OarFCB193については、他のプライマーと比較して、サンプルが「新鮮」だと allelic dropout の生じる割合(0.015)は低い傾向にあるが、「やや鮮度が劣る」とその割合(0.333)は最も高いと報告されている(Yamashiro *et al.*, 2017)。これまでに、糞表面から抽出したDNAを用いた解析で、シカでは野外に放置して3日目に(Agetsuma-Yanagihara *et al.*, 2017)、*O. hemionus sitkensis*では野外の地表面に放置して2日目に、地表面に設置した雨除けの箱内で7日目に(Brinkman *et al.*, 2010 b), allelic

dropout および false allele が生じることが報告されている。このことから、今回の解析に用いたOarFCB193では、既存の報告より早く野外放置後1日目より、allelic dropout が生じ始めていたと推察される。

今回分析に供したシカ糞は、放置後1日目には、表面にぬめりがあり「新鮮」であると判断されたが、6日目になると表面は乾燥して光沢はなく「鮮度が劣る」状態であった。つまり、今回の結果は、見た目が「鮮度が劣る」と判断されるシカ糞を用いて遺伝解析を実施しても個体識別(遺伝子型の決定)ができる一方で、見た目が「新鮮」なサンプルを採取しても、OarFCB193のように野外放置後わずか1日で識別を誤る可能性があることを示唆する。

以上のことから、今後、野外で採取したシカ糞を用いた遺伝解析による個体識別(遺伝子型の決定)を行うには、新鮮なサンプルを使用することはもちろんであるが、湯浅・佐藤(2008)が提案しているように、allelic dropout および false allele が生じていないことを確認するため、同じサンプルおよびプライマーで複数回の遺伝解析を行うことが不可欠であり、OarFCB193のように結果が一定しないプライマーの使用は控え、適切なプライマーを選択して解析に用いることが重要である。さらには宮崎ら(2001)の指摘のように、個体識別のミス減らすために、今後はニホンジカ用のプライマーを開発することも必要であろう。

## 謝 辞

森林総合研究所九州支所の野宮治人氏、宮崎和弘博士、木下晃彦博士および秋庭満輝博士には、実験に際し有益なご助言をいただいた。本報告は、森林総合研究所交付金プロジェクト「九州・四国地域の若齢造林地におけるシカ被害対策の高度化(#201703, 2017~2020年度)」により実施された。ここに謝意を表する。

## 引用文献

- Agetsuma-Yanagihara Y *et al.* (2017) Mamm Res 62: 201-207  
 Bishop MD *et al.* (1994) Genetics 136: 619-639  
 Brinkman TJ *et al.* (2010 a) Conserv Genet Resour 2: 115-118  
 Brinkman TJ *et al.* (2010 b) Conserv Genet 11: 1547-1552  
 Buchanan FC and Crawford AM (1993) Anim Genet 24: 145  
 Done RH *et al.* (1991) Nucleic Acids Res 19: 4008  
 Goode MJ *et al.* (2014) Wildl Biol 20: 270-278  
 Kemp SJ *et al.* (1995) Anim Genet 26: 299-306  
 気象庁 (2021) 過去の気象データ検索. URL: <https://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php> (2021年10月18日閲覧)  
 Mezzelani A *et al.* (1995) Mamm Genome 6: 629-635  
 宮崎幸司ら (2001) 日本野生動物医学会誌 6: 1-6  
 Mommens G *et al.* (1994) Anim Genet 25: 368-36  
 Moore SS *et al.* (1994) Mamm Genome 5: 84-90  
 Yamashiro A *et al.* (2017) Conserv Genet Resour 9: 333-338  
 湯浅 卓・佐藤喜和 (2008) 哺乳類科学 48: 109-118  
 (2021年11月18日受付; 2021年12月24日受理)