

遺伝子解析法を用いた動物毛の同定方法の検討

Identification of Animal Hair Using DNA Sequencing Analysis

増井 昭彦* 井川 聡*
Akihiko Masui Satoshi Ikawa

(2015年6月24日 受理)

To analyze animal hair found in products and manufacturing processes, we investigated DNA extraction and PCR amplification conditions from animal hair for DNA sequencing analysis. The amounts of DNA extraction from animal hair samples differed according to the kind of extraction kits. Extraction amounts decreased from the root part to the point part of hair. In fact, DNA extraction and PCR amplification were done for six months after the hair had fallen. The amount of DNA extraction was affected by the conditions after the hair had fallen. PCR amplification was investigated using various primer sets. Satisfactory amplification was possible in both human hair and animal (cat and dog) hair using the originally chosen primer set.

Key Words: animal hair, identification, DNA sequence, PCR, primer

1. はじめに

種々の製品あるいはその製造工程における異物(微生物, 動物毛等)の発生は, 生産管理上, 大きな問題である。このため, 原因となる微生物等の同定は, 異物混入の原因解明に必要不可欠である。

従来, 微生物の同定方法は, 微生物の形態観察や生理・生化学性状解析等を組み合わせる方法が広く用いられてきた。遺伝子解析技術の進展により, 現在は遺伝子解析による迅速な同定方法が可能となっている¹⁾。

動物毛(ヒト毛髪, 獣毛)異物についても, それらがヒト由来であるか動物由来であるかにより, トラブルの解決方法が異なってくることから, 同定等の対応が望まれている。

微生物の遺伝子解析手法による同定方法(Fig. 1)をもとにして, 動物毛(ヒト毛髪, 獣毛)についても, 同様に同定が可能であると考えられるが, 鋳型 DNA の調製(DNA の抽出), Polymerase Chain Reaction (PCR)

による増幅等については, 動物毛に適した方法で行う必要がある。

そこで, 本研究では, 遺伝子解析手法を用いて動物毛の同定を行うため, 動物毛(ヒト毛髪, 獣毛)からの鋳型 DNA の調製(DNA の抽出), PCR による増幅について検討を行った。

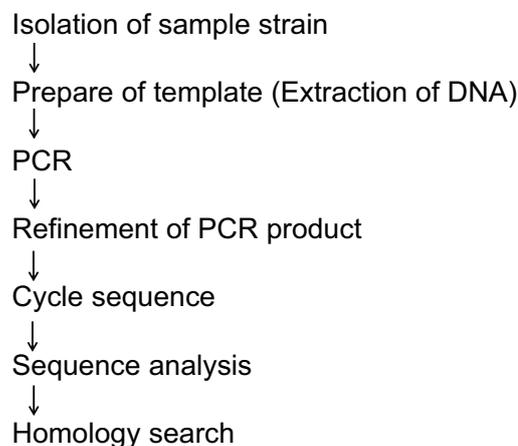


Fig. 1 Identification method by DNA sequence analysis of microorganism.

* 化学環境科

PCR mixture		PCR condition	
Template DNA	1 μ L	94°C	2 min.
2 \times PCR buffer	10 μ L	98°C	10sec.
dNTPs (2mM each)	4 μ L	58°C	30sec.
Primer-forward (10 μ M)	1 μ L	68°C	30sec.
Primer-reverse (10 μ M)	1 μ L	68°C	30sec.
KOD FX Neo	0.5 μ L		
D.W.	2.5 μ L		
Total	20μL		

} 35 cycles

Fig. 2 Experimental conditions of PCR

PCR mixture		PCR condition	
Template DNA	2.0 μ L	98°C	2 min.
2 \times KOD SYBR mix	5.0 μ L	98°C	10sec.
Primer-forward (10 μ M)	0.2 μ L	58°C	30sec.
Primer-reverse (10 μ M)	0.2 μ L	68°C	30sec.
D.W.	2.6 μ L		
Total	10μL		

} 45 cycles

Fig. 3 Experimental conditions of quantitative PCR
Primer set: VF0, VR2

2. 実験方法

2.1 試料

動物毛試料としては、ヒト毛髪、獣毛(ネコ、イヌ)を用い、それぞれエタノール洗浄を行ってDNAの調製に供した。

2.2 動物毛からのDNAの調製

市販のDNA抽出キット(プロテアーゼ処理タイプ2種類、アルカリ処理タイプ2種類)について、使用マニュアルに従って調製した。

2.3 プライマー

日本バーコードオブライフ・イニシアチブの動物のバーコーディングに記載されているプライマーセット(LCO, HCO)²⁾、及びミトコンドリア ctyb 領域より独自に選択した2種類のプライマーセット(VF0, VR2)、(VF2, VR3)を依頼合成(インビトロジェン社)し、使用した。

2.4 PCR

PCRは、DNAポリメラーゼとしてKOD FX Neo(東洋紡社)、DNAサーマルサイクラーとして2720 Thermal Cycler(アプライド バイオシステムズ社)、を用いて Fig. 2 に示した条件で行った。

2.5 定量PCR

リアルタイムサーマルサイクラーとして

PIKOREAL 96(サーモサイエンティフィック社)を用いて、Fig. 3 に示した条件で行った。

2.6 DNA増幅産物の検出

2 μ lのPCR反応溶液を1%アガロースゲルにより電気泳動を行い、ゲルをエチジウムブロマイドで染色した。その後、ゲル写真撮影装置 Printgraph(アトー社)を用いて写真撮影を行い、増幅されたDNA産物の検出を行った。

3. 結果と考察

3.1 試料からのDNAの抽出(抽出方法)

試料からの直接PCRではヒトの毛髪以外は増幅が十分ではなかった。そのため、DNA抽出キットを用いてDNAの抽出を行った。抽出されたDNAについて、PCRを行い増幅産物の検出を行ったところ(Fig. 4)、抽出キットCを用いた場合、ヒト毛髪の毛根部と毛幹部のいずれにおいても目的となる約600bpのバンドが増幅した。一方、抽出キットDでは、毛根部からの抽出試料のみ目的のバンドが増幅した。抽出キットAとBでは、毛根部と毛幹部のいずれにおいても増幅バンドが得られなかった。この結果から、抽出キットの種類により動物毛からのDNAの抽出効率に差があることがわかった。以後の実験においては、抽出キッ

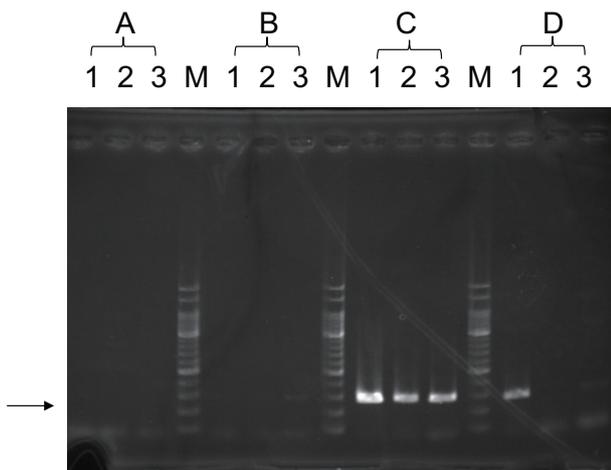


Fig. 4 Extraction of DNA from human hair.
 A,B,C,D : DNA extraction kit
 1: 0~3 cm from hair root
 2: 3~6 cm from hair root
 3: 6~9 cm from hair root
 M: Marker (200 bp ladder)
 Arrow: position of extracted DNA
 Primer set: VF2, VR3

ト C を用いて DNA の抽出を行った。

3.2 試料からの DNA の抽出 (試料の部位と DNA 量)

動物毛から DNA を抽出する場合、毛髪の一部によって得られる DNA 量に差があると予想される。そこで、全長 47.5 cm のヒト毛髪について、毛根部から 5 cm ずつに切り取り、それぞれについて DNA の抽出、PCR による増幅を行った。また、定量 PCR も行った。その結果、ヒト毛髪の先端部に行くに従って増幅量は減少し、毛根を含んだ部位と最先端部 (試料長 2.5 cm) を除くとほぼ直線的であることがわかった (Fig. 5, 6)。このことから、毛根部には毛幹部に比べて多量の DNA が含まれていること、毛幹部においては、先端部に行くに従って DNA 量が減少していることがわかった。そのため、実際の同定の際には、なるべく毛根部を含むか、毛根部に近い部位を用いて解析することが望ましいと考えられる。

3.3 試料からの DNA の抽出 (試料の時間経過と DNA 量)

動物毛から回収できる DNA 量は、動物毛が抜けた後、時間経過とともに減少していく可能性が考えられる。そこで脱毛後、動物毛を冷蔵庫に保存しておいたものについて、DNA の抽出、PCR による増幅を行った。その結果、ヒト毛髪では、脱毛後 225 日経過した試料からも明確な DNA の増幅が確認できた (Fig. 7)。また、同様に獣毛 (イヌ) については 270 日経過した試料から目的となる DNA の増幅が認められた (Fig. 8)。このことから、ヒト毛髪、獣毛 (イヌ) について、抜けて

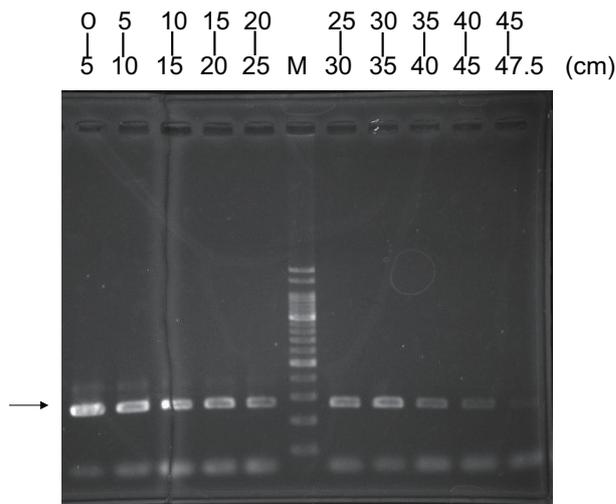


Fig. 5 Extraction of DNA from human hair.
 M: Marker (200 bp ladder)
 Arrow: position of extracted DNA
 Primer set: VF0, VR2

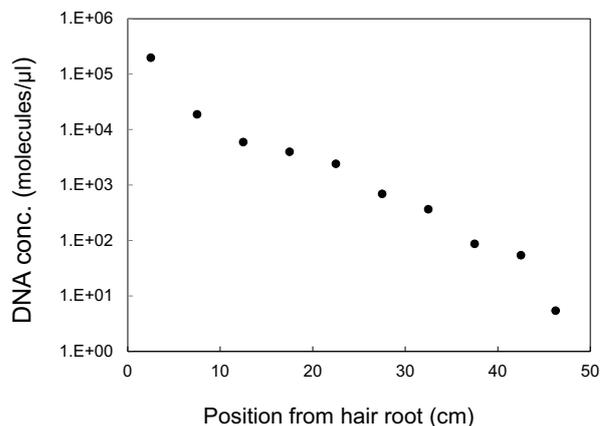


Fig. 6 Quantitative PCR of DNA extracted from human hair.

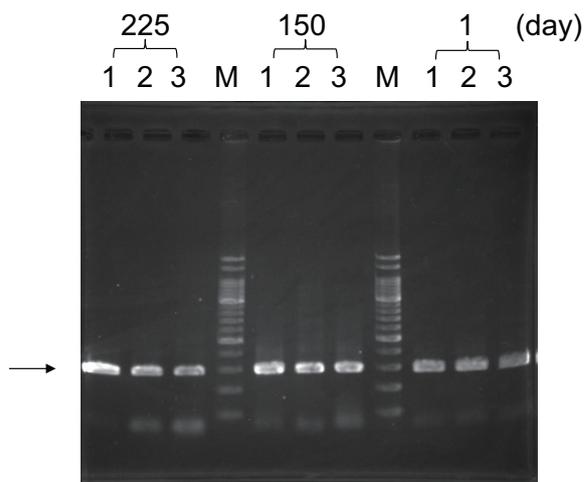


Fig. 7 Extraction of DNA from human hair.
 1: 0~3 cm from hair root
 2: 3~9 cm from hair root
 3: 9~15 cm from hair root
 M: Marker (200 bp ladder)
 Arrow: position of extracted DNA
 Primer set: VF2, VR3

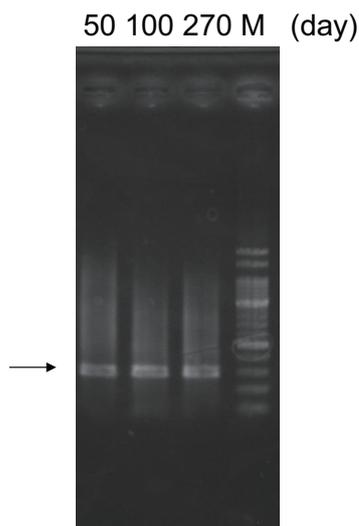


Fig. 8 Extraction of DNA from dog hair.
All hairs were used 0~3 cm from root
M: Marker (200 bp ladder)
Arrow: position of extracted DNA
Primer set: VF2, VR3

から半年以上経過した試料でも、DNAの抽出、PCRによる増幅は可能であることがわかった。

3.4 試料からのDNAの抽出(試料の損傷度)

製品や製造工程から検出される動物毛異物は、脱毛後、熱などによる損傷を受けている可能性が考えられる。そこで、損傷のモデルとして、ピーカーにヒト毛髪と滅菌水を入れ、オートクレーブ処理(121°C, 15分)を行った後、DNAの抽出、定量PCRを行った。その結果(Fig. 9), Fig. 6と比較すると、毛根部から毛幹部30 cmまでは増幅されたDNA量が全体的に減少し、毛根部から毛幹部50 cmにかけてほぼ一定であった。これは、毛根部に近い部位は、表面部に多くのDNAが含まれていて、オートクレーブ処理が表面部のDNAに何らかの影響を及ぼしたと考えられる。一方、中心部のDNAは、本実験のオートクレーブ処理条件ではダメージを受けていないと考えられる。このことから、毛根部を含んだ動物毛異物が得られた場合でも、試料の損傷度(履歴)によって得られるDNA量は異なると考えられる。そのため、DNAの抽出に際しては、試料の履歴を考慮する必要がある。

3.5 PCRによる増幅(プライマー、増幅条件)

3種類のプライマーセット(LCO, CO), (VF0, VR2), (VF2, VR3)を用いて、ヒト毛髪及び獣毛(ネコ, イヌ)から抽出されたDNAのPCRによる増幅反応を行った。その結果、プライマーセット(VF2, VR3)を用いた場合は、ヒト毛髪、獣毛(ネコ, イヌ)いずれについても目的のバンドが増幅された(Fig. 10~12)。また、

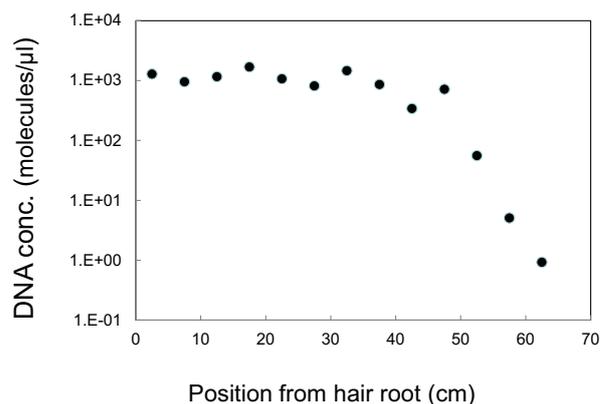


Fig. 9 Quantitative PCR of DNA extracted from damaged human hair.

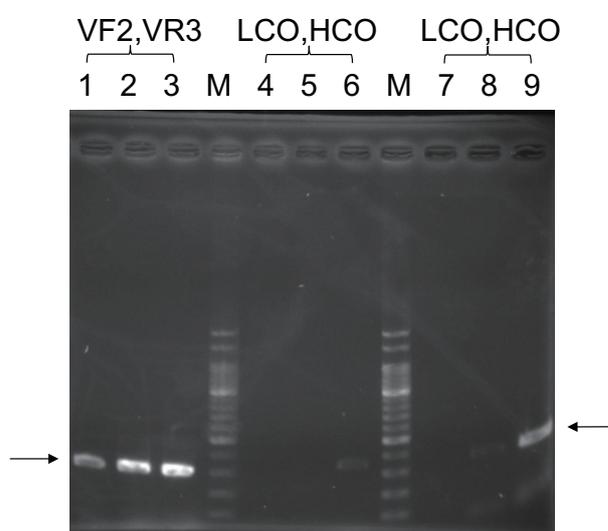


Fig. 10 PCR amplification of human DNA
Amplification cycle: 30 cycle (No. 1, 4, 7),
35 (No. 2, 5, 8), 40 (No. 3, 6, 9)
Annealing temperature: 58°C (No. 1~6),
55°C (No. 7~9)
M: Marker (200 bp ladder)
Arrow: position of extracted DNA

増幅されたDNA断片を用いて塩基配列の決定、塩基配列の解析³⁾を行ったところ、いずれも正しく動物種を同定できた。プライマーセット(VF0, VR2)を用いた場合、ヒト毛髪では増幅したが(Fig. 5), 獣毛(ネコ, イヌ)では増幅しなかった(Fig. 11, 12)。一方、プライマーセット(LCO, HCO)を用いた場合、ヒト毛髪と獣毛(ネコ)では、アニーリング反応温度を58°Cから55°Cに下げ反応サイクルを増やしたところ、増幅バンドが得られたが(Fig. 10, 11), 同条件では、獣毛(イヌ)では目的のバンドが得られなかった(Fig. 12)。さらに、プライマーセット(LCO, HCO)について、種々の増幅条件を検討したが、検討した範囲ではヒト毛髪、獣毛(ネコ, イヌ)で共通してバンドが増幅するPCRの反応条件は見出せなかった。

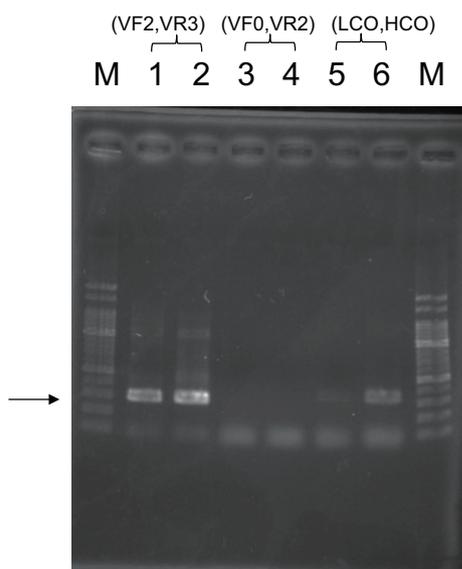


Fig. 11 PCR amplification of cat DNA
 Amplification cycle: 35 cycle (No. 1, 3),
 40 (No. 2, 4, 5), 45 (No. 6)
 Annealing temperature: 58°C (No. 1~4),
 55°C (No. 5, 6)
 M: Marker (200 bp ladder)
 Arrow: position of extracted DNA

4. まとめ

製品やその製造工程で発生する可能性のある動物毛（ヒト毛髪，獣毛）異物について，遺伝子解析法を用いた同定を行うため，動物毛（ヒト毛髪，獣毛）からの鋳型 DNA の調製（DNA の抽出），PCR による増幅について検討を行った。

試料からの DNA の抽出方法では，抽出キットの種類によって増幅量に差が見られた。試料の DNA 量については，毛根部から先端部に行くに従って減少していた。また，動物毛が抜けてから時間が経過（7~9 ヶ月）した試料についても，DNA の抽出，PCR による増幅は可能であることがわかった。しかしながら，抜けてからの履歴によっては，得られる DNA 量が減少している可能性があるため，考慮が必要であることがわかった。

PCR による増幅については，既知及び独自に選択

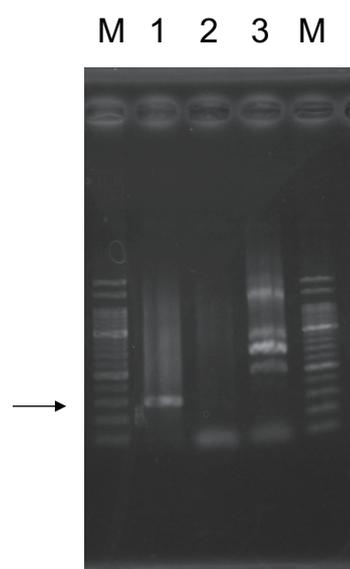


Fig. 12 PCR amplification of dog DNA
 1: VF2, VR3 (primer)
 2: VF0, VR2 (primer)
 3: LCO, HCO (primer)
 Amplification cycle: 35 cycle (No. 1, 2),
 45 (No. 3)
 Annealing temperature: 58°C (No. 1, 2),
 55°C (No. 3)
 M : Marker (200 bp ladder)
 Arrow : position of extracted DNA

したプライマーセットについて検討したところ，独自に選択したプライマーセット（VF2, VR3）を用いた場合，ヒト毛髪，獣毛（ネコ，イヌ）いずれにおいても，良好な増幅結果を示した。

今後，より多くの動物毛を用いて検討することにより，実際の動物毛異物の同定手法の1つとして活用できると考えられる。

参考文献

- 1) 第十六改正日本薬局方 (2011) : 遺伝子解析による微生物の迅速同定法
- 2) 日本バーコードオプライフ・イニシアチブ : <http://www.jboli.org/>
- 3) NCBI Blast: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
 DDBJ: <http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>