

遺伝子解析法を用いた動物毛の同定方法の検討

キーワード：同定、遺伝子解析法

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発生は、生産管理上、大きな問題です。特に、その異物が微生物による場合、原因となる微生物の同定が、異物混入の原因解明に必要な不可欠です(図1)。従来、微生物の同定は、形態観察や生理・生化学性状解析を組み合わせる方法が用いられてきましたが、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同定方法が可能となっています¹⁾。当所でも、依頼試験等での対応を行っています²⁾。

一方で、動物毛異物(ヒト毛髪、獣毛等)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ます。微生物の遺伝子解析手法による同定方法(図2)をもとにして、動物毛についても、同様に同定が可能であると考えられますが、鋳型DNAの調製、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ります。

そこで、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いました。

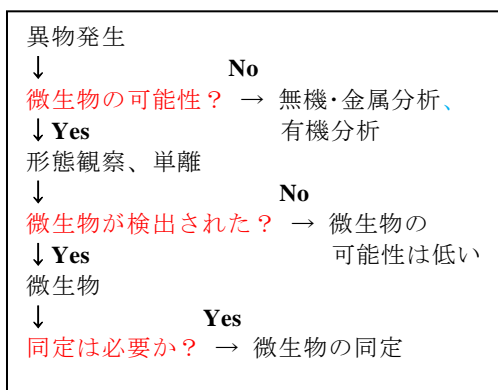


図1 微生物系異物の発生から同定まで

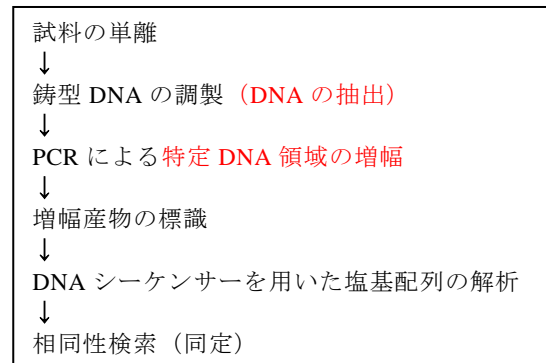


図2 遺伝子解析法による同定手順

試料からのDNAの抽出(試料部位とDNA量)

動物毛からDNAを抽出する場合、部位により得られるDNA量に差があると予想されます。そこで、全長47.5cmのヒト毛髪について、毛根部から5cmずつに切り取り、DNAの抽出と定量PCRを行いました。

その結果、先端部に行くに従って含まれるDNA量は減少し、毛根部と先端部(試料長2.5cm)を除くとほぼ直線的でした(図3)。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、毛幹部では、先端部に行くに従ってDNA量が減少していることがわかりました。そのため、実際の同定では、毛根部を含むか、毛根部に近い部位を用いることが望ましいと考えられます。

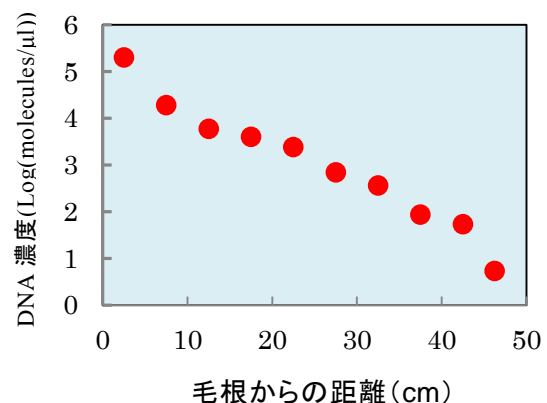


図3 ヒト毛髪からの抽出DNAの定量PCR

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もあります。そこで、損傷のモデルとして、ビ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℃、15 分）を行った後、DNA を抽出し、定量 PCR を行いました。

その結果、DNA 量は毛根部から毛幹部 30 cm にかけてほぼ一定で、図 3 と比較すると、毛根部から毛幹部 30 cm までの DNA 量が減少していることがわかりました（図 4）。これは、毛根部に近い部位は、毛表面部に多くの DNA が含まれていて、オートクレーブ処理が毛表面部の DNA に何らかの影響を及ぼしたと考えられます。一方、毛中心部の 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ます。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ます。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ります。

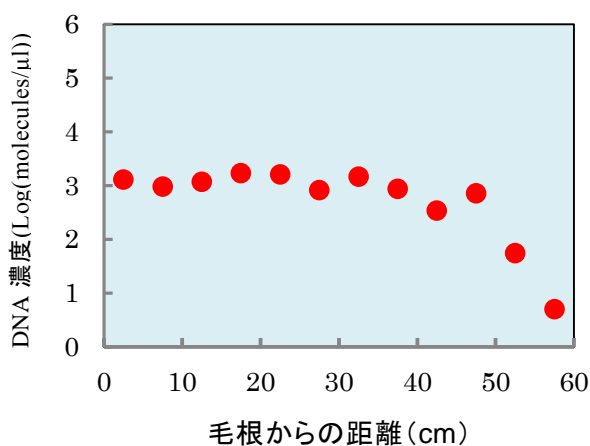


図 4 オートクレーブ処理後のヒト毛髪からの抽出 DNA の定量 PCR

PCR による増幅

既存の増幅プライマーセット（LCO,HCO）³⁾と当所で独自に選択した 2 種類のプライマーセット（VF0,VR2）、（VF2,VR3）を用いて、獣毛（イヌ）から抽出された DNA の PCR による増幅反応を行いました。

その結果、プライマーセット（VF2,VR3）を用いた場合、目的とするバンドが増幅されました（図 5）。また、増幅された DNA 断片を用いて塩基配列の決定とその解析を行ったところ、正しく動物種を同定できました。

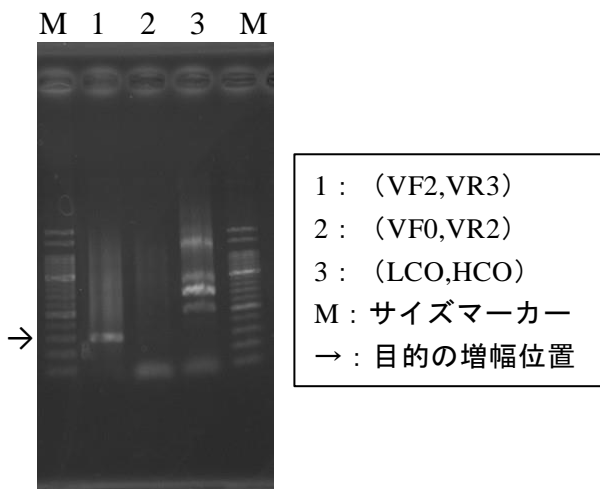


図 5 獣毛（イヌ）からの抽出 DNA の種々のプライマーを用いた PCR 増幅

おわりに

製品やその製造工程で混入する可能性のある動物毛（ヒト毛髪、獣毛）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いました。その結果、本稿で示した手法を用いて、ヒト、イヌ、ネコ等の動物種の同定に成功しました。

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ます。

参考文献

- 1) 第十七改正日本薬局方（2016）：遺伝子解析による微生物の迅速同定法
- 2) 増井昭彦：DNA シーケンサーを用いた微生物の菌種同定、ORIST テクニカルシート No.10004 (2010).
- 3) 日本バーコードオブライフ・イニシアチブ：<http://www.jboli.org/>