

## 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<sup>1)</sup>。当所でも、依頼試験等での対応を行っています<sup>2)</sup>。

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。

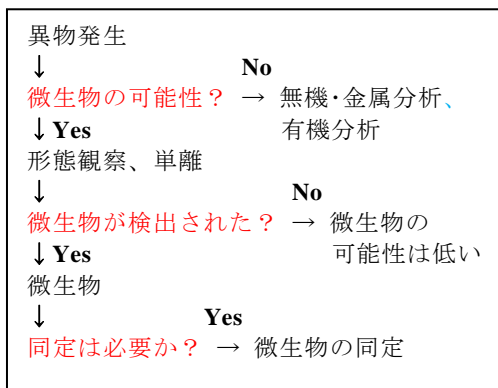


図1 微生物系異物の発生から同定まで

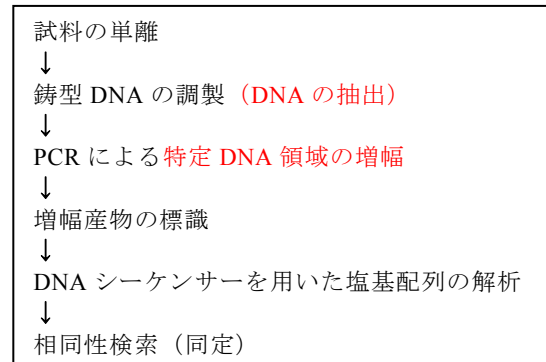


図2 遺伝子解析法による同定手順

### 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 47.5 cm のヒト毛髪について、毛根部から 5 cm ずつに切り取り、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 2.5 cm)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。

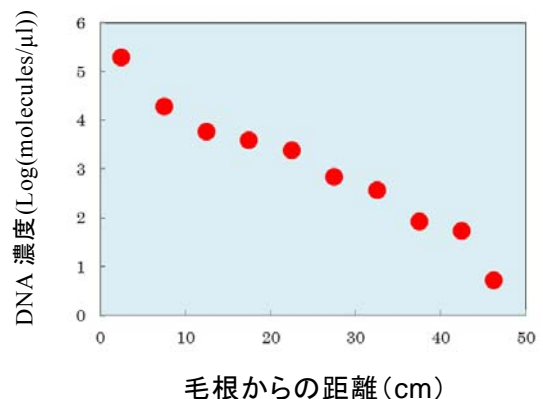


図3 ヒト毛髪からの抽出 DNA の定量 PCR

### 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、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℃、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30cm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30cm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。

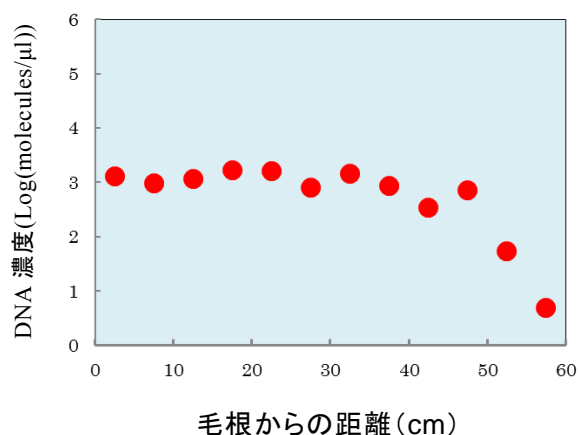


図4 オートクレーブ処理後のヒト毛髪からの抽出DNAの定量PCR

### PCRによる増幅

既存の増幅プライマーセット（LCO,HCO）<sup>3)</sup>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。

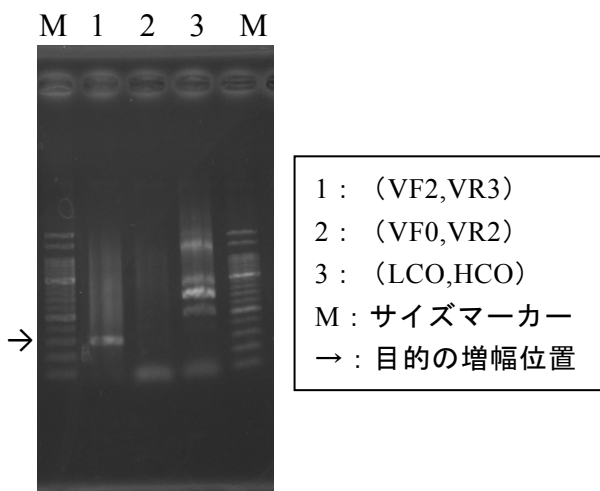


図5 獣毛（イヌ）からの抽出DNAの種々のプライマーを用いたPCR増幅

### 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、大阪府立産業技術総合研究所 Technical Sheet, 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/>