

PCR-RFLP法を用いた動物由来医薬品の原料動物種識別法 -胎盤由来製剤での検討-

三宅啓文*, 鈴木 淳**, 瀬戸隆子*, 長嶋真知子*,
高橋美佐子*, 安田一郎*

Species Identification for Animal Origin Drugs by PCR-RFLP Method -Placenta Drugs-

Hirofumi MIYAKE*, Jun SUZUKI**, Takako SETO*, Machiko NAGASHIMA*,
Misako TAKAHASHI* and Ichiro YASUDA*

The establishment of a method for species identification in medicinal products of animal origin has been desired, because usage of cattle-origin materials has been controlled since the bovine spongiform encephalopathy(BSE) problem occurred. We report here a simple method of molecular biological technique. DNA isolated from each animal specimens were used to polymerase chain reaction(PCR) and an approximately 360 bp fragments of the mitochondrial cytochrome *b* gene region were amplified. The following restriction fragment length polymorphism(RFLP) method discriminated animal species; human, bovine, porcine and ovine. This method also allowed the detection of human origin in drugs containing placenta which were formed into tablets and granules.

Keywords : ポリメラーゼ連鎖反応 polymerase chain reaction(PCR), 制限酵素処理断片電気泳動法 restriction fragment length polymorphism(RFLP), 種識別 species identification, 動物由来医薬品 animal origin drug, 胎盤 placenta, チトクロム *b* 遺伝子 cytochrome *b* gene

緒言

近年、牛海綿状脳症(bovine spongiform encephalopathy, BSE)の流行に伴いウシ由来の組織や臓器の医薬品への使用は規制がなされており、特に胎盤由来製剤についてはBSEの発生源産であるか否かを問わず原料としてのウシの使用が禁止されている¹⁾。そのため動物由来医薬品に用いられている原料動物種を識別する方法の確立、特に製品から識別する方法の確立が求められている。

本報では、各種の剤型を有する胎盤由来製剤より抽出したDNAを用い、ミトコンドリアチトクロム *b* 遺伝子に設けたターゲット領域をPCR (polymerase chain reaction)により増幅し、RFLP (restriction fragment length polymorphism)を行うことにより動物種の判定を行ったので報告する。

材料および方法

1. 試料

医療用または一般用として市販されている、ヒト胎盤由来成分を表示する医薬品製剤を試験に用いた。剤型は、1. 錠剤, 2. 顆粒剤, 3. ドリンク剤, 4. 注射剤の各1試料, 計4試料であり、いずれも成分として胎盤加水分解物、胎

盤乾燥微粉末の単独あるいは両方を表示していた。

2. 標準DNA抽出

ヒト由来標準DNAは、試験者自らの血液より抽出を行った。ウシ由来標準DNA、ブタ由来標準DNA、ヒツジ由来標準DNAは、それぞれ市販食用筋肉部位より抽出を行った。それぞれのDNA抽出は、次項に記載するDNeasy tissue kit (株式会社キアゲン)の操作法に従って行った。

3. 検体からのDNA抽出

(1). DNeasy tissue kit 法

DNeasy tissue kitの操作法に従って試料のプロテイナーゼK処理、スピニングカラムのメンブラン上へのDNAの吸着、洗浄、回収を行い、DNA抽出を行った。

(2). CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 法

JAS法^{2,3)}に準じて以下の操作を行った。試料に2mLのCTAB抽出液を加え、60分間インキュベーションを行った後、遠心し上清700μLを別のチューブに移した。この液に等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)混液を加え、2分間激しく振とうし、遠心した後上清を別のチューブに移した。この液に等量のクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)混液を加え、同様に2分間激しく振とうし、遠心した後上清を別のチューブ

* 東京都健康安全研究センター医薬品部医薬品研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

に移した。この液に等量のイソプロピルアルコールを加え、30 秒間転倒混和し、遠心した後上清を除いた。チューブに 800 μ L の 70% エタノールを加え、転倒混和し、3 分間静置後遠心し上清を除き、沈渣を乾燥させた後、TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) に溶解した。

4 . PCR

PCR は、ミトコンドリアシトクロム *b* 遺伝子中の約 360 bp の領域を標的とし、Meyer ら⁴⁾により報告されている Table 1 に塩基配列を示したプライマー-CYT b1 および CYT b2 を用いて増幅した。Table 2 に PCR 反応液組成を示す。反応条件は、94 1 分間の後、94 5 秒間、55 30 秒間、72 40 秒間を 35 サイクル繰り返し、その後 72 2 分間加熱した。反応後は 1.2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い増幅バンドを確認した。

Table 1. Sequences of Primers for PCR Amplification of cytochrome *b* Fragment

CYT b1	5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'
CYT b2	5'-GCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'

Table 2. Composition of PCR Solution

<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/ μ L)*	0.4 μ L
10 \times PCR buffer*	5.0 μ L
dNTP mixture (2.5 mM each)*	5.0 μ L
forward primer (10 μ M each)	2.5 μ L
reverse primer (10 μ M each)	2.5 μ L
template DNA	30-50 ng
distilled water	up to 50 μ L

* TaKaRa Bio Inc., Ohtu, Japan

Table 3. Composition of RFLP Solution

restriction enzyme (10 U/ μ L)*	0.2 μ L
10 \times reaction buffer*	2.0 μ L
PCR product	18.0 μ L

* TOYOBO, Tokyo, Japan

Table 4. Expected Size of Restricted Fragments

DNA	Fragments	
	Alu I	Hae III
human	359	232
		106
		21
bovine	190	285
		74
		74
porcine	244	153
		132
		74
ovine	359	159
		126
		74

* human: see ref. 5

bovine, porcine, ovine: see ref.6

5 . RFLP

制限酵素 Alu I, Hae III を用い、Table 3 に示す反応液組成により RFLP を行った。反応は 37 の水浴に 2 時

間以上加温することにより行った。反応後は 3.0% アガロースゲルを用いて電気泳動を行いバンドのサイズを確認した。Table 4 に Alu I, Hae III により出現が予想されるバンドのサイズ⁴⁾を示す。

結 果

ヒト由来、ウシ由来、ブタ由来およびヒツジ由来の標準 DNA 溶液を用いて PCR-RFLP を行ったところ、Fig. 1 に示す種特異的なサイズのバンドが確認でき、動物種別の鑑定が明瞭に行えた。

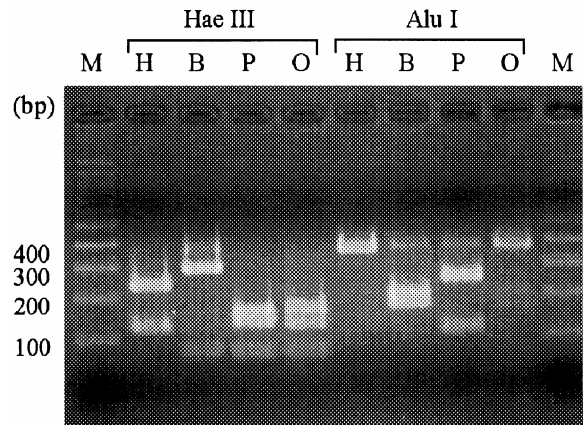


Fig. 1. RFLP Profiles of Each Animal Species
H: human, B: bovine, P: porcine, O: ovine
M: 100 bp marker

次に、成分として胎盤加水分解物、胎盤乾燥微粉末の含有を表示する市販の医薬品について DNA を抽出し、PCR を行ったところ、錠剤、顆粒剤でフラグメントの増幅が見られたが、ドリンク剤、注射剤は増幅フラグメントが見られなかった (Table 5)。錠剤、顆粒剤由来の増幅産物について RFLP を行った結果、Fig. 2 に示すようにヒト由来標準 DNA からのもと同じ位置にバンドが出現し、医薬品原料としてヒト由来の成分が使用されていることが示された。

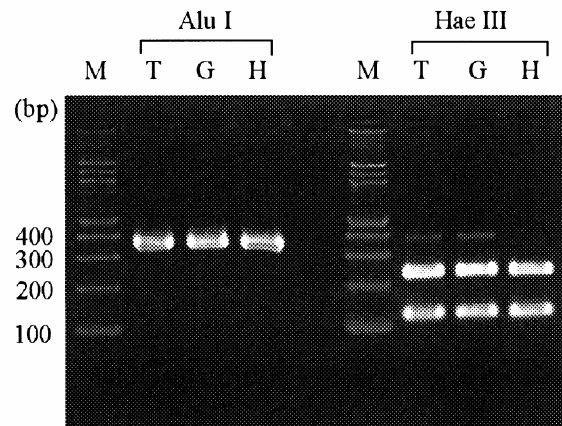


Fig. 2. RFLP Profiles of Drug Samples
T: tablet, G: granule (Each DNA were extracted by DNeasy tissue kit.)
H: human DNA, M: 100 bp marker

Table 5. Detection of PCR Amplified Fragment
From Drug Samples

sample	method for DNA extraction	
	DNeasy tissue kit	CTAB method
1. tablet	+	+
2. granule	+	+
3. liquid	-	-
4. injection	-	-

考 察

胎盤由来成分を表示する医薬品製剤に用いられている原料動物種を識別する方法について検討を行い、成分として胎盤加水分解物、胎盤乾燥微粉末を表示する錠剤および顆粒剤について、原料はヒト由来であるとの同定を行った。ドリンク剤、注射剤からは PCR による増幅フラグメントは検出されなかったが、これらについては今回の抽出法が最適なものでなかった可能性だけでなく、流通・保管中に DNA の分解が生じていた可能性や、PCR の鑄型となりうる DNA が製剤に元来含まれていない可能性が考えられ、今後さらに検討したいと考えている。

製剤から原料動物種を識別する本法は、市場に流通している製品について検査を行う薬事監視に有用な方法である。DNA 抽出操作にキットを用いる方法と CTAB 法とで両者の結果に差異は見られなかったが、とりわけキットを用いる方法は特別な手技を必要とせず迅速かつ簡便に行うこと

ができる。

PCR-RFLP は増幅部位や制限酵素の種類を変更することにより様々な目的に用いることが可能であり、動物由来成分を含む医薬品、医療用具、化粧品、生薬などの動物種の鑑定や品質管理に広く応用しうると考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬局長通知，医薬発第 1069 号，平成 13 年 10 月 2 日。
- 2) JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル改訂第 2 版 基本操作編，独立行政法人農林水産消費技術センター，(URL, <http://www.cfqlcs.go.jp/>)，平成 14 年 6 月。
- 3) JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル改訂第 2 版 分析試薬調製編，独立行政法人農林水産消費技術センター，(URL, <http://www.cfqlcs.go.jp/>)，平成 14 年 6 月。
- 4) Meyer, R., Hofelein, C., Luthy, J., *et al.*: *J. AOAC Int.*, **78**, 1542-1551, 1995.
- 5) Anderson, S., Bankier, A. T., Borel, B. G., *et al.*: *Nature*, **290**, 457-465, 1981.
- 6) Irwin, D. M., Kocher, T. D. and Wilson, A. C.: *J. Mol. Evol.*, **32**, 128-144, 1991.