

15. 中毒原因植物に関する遺伝子検索法の検討

大分家畜保健衛生所

○病鑑 人見徹

【目的】

植物中毒の診断は、臨床症状と併せ採食の確認、毒物の検出が必要だが、診断の第一歩となる採食の確認は、残飼の喪失や、胃内容が半消化状態のうえ夾雑物が混在するなど確認は容易とは言えない。植物種の遺伝子学的判別法として、植物種に保存性の高い遺伝子を共通プライマーで増幅しシーケンスで比較するバーコーディングが行われ、野生動物の糞便から食性調査などに応用されている。しかし、胃内容では複数種の植物が多量に混入しており、共通プライマーでは有毒植物の同定に有効な遺伝子増幅は困難な場合もあると考えられる。そこで、中毒植物の専用プライマーを設計し特異的遺伝子の検出、同定を試みた。

【材料および方法】

①プライマー作成：ワラビ、カタバミ、ウマノアシガタ、ギシギシ、スイバの5種の植物についてmatK領域の塩基配列から、primer-BLASTを使用してプライマーの塩基配列を設計、近縁植物の塩基配列と照合し特異性が高いと推察されたものを選択しプライマーを検討した。

②遺伝子検出試験：植物の葉を破碎後、市販の3種類の遺伝子抽出キット（A、B、C 3社）を用いて抽出を行った。各キットで抽出されたDNAを今回作成した5種の植物用プライマーおよび植物共通rbcL領域プライマー（松本ら）を用いてPCRを行なった。PCRの増幅産物は、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を確認した。

【結果】

①プライマー作成：ワラビ、カタバミ、ウマノアシガタおよびスイバは2種類、ギシギシは1種類のプライマーを作成した。

②遺伝子検出試験：ワラビは不検出、カタバミは3種類の抽出で2種類のプライマーともに検出、ウマノアシガタおよびギシギシはA社、B社の抽出で検出、スイバはB社の抽出法で2種類のプライマーともに検出された。共通のrbcLプライマーでは、ワラビを除く4種の植物遺伝子が検出された。作成プライマーで得られた各遺伝子断片はシーケンスにより目的植物の増幅が確認された。

【考察】

5種類の中毒植物に対する特異的プライマーを作成したところ、カタバミ、ウマノアシガタ、ギシギシ、スイバから遺伝子が検出された。作成された植物種特異的プライマーを用いた遺伝子増幅では目的植物の遺伝子が増幅されるため、共通プライマーを用いたバーコーディングに比較し夾雑物の多い胃内容からのサンプリングでは有効性が高いと考えられた。なお、ワラビはrbcLプライマーでも検出されなかったことから、DNA抽出法の検討が必要と考えた。