

# 1 肉骨粉中のシカ由来 DNA の PCR による検出法の確立

奥村 寿章<sup>\*1</sup>, 井上 直<sup>\*2</sup>, 橋本 仁康<sup>\*2</sup>, 関口 好浩<sup>\*1</sup>, 橋本 亮<sup>\*1</sup>

## Development of Detection Method for Deer DNA in Meat and Bone Meal Using Polymerase Chain Reaction-based Method

Toshiaki OKUMURA<sup>\*1</sup>, Tadashi INOUE<sup>\*2</sup>,

Yoshiyasu HASHIMOTO<sup>\*2</sup>, Yoshihiro SEKIGUCHI<sup>\*1</sup> and Sayaka HASHIMOTO<sup>\*1</sup>

(\*<sup>1</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),

<sup>\*2</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Kobe Regional Center, FAMIC))

For detecting the deer DNA in meat and bone meal (MBM), an analytical method based on polymerase chain reaction (PCR) was developed.

The deer mitochondrial DNA in a sample was extracted using a kit (mtDNA Extractor CT Kit, Wako Pure Chemical Industries; Osaka, Japan). PCR amplification was performed in a reaction solution which contained the extracted DNA, primer pair for detecting deer DNA (Hokkaido System Science; Sapporo, Japan) and DNA polymerase (AmpliAq Gold, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) etc. PCR products were separated by electrophoresis through 2.5 w/v% agarose gel, and stained with ethidium bromide. After electrophoresis, the test results were judged by the presence of PCR amplification products with the identical size of the positive target deer DNA fragment.

The specificity of this PCR-based method which uses primer pair for detecting the deer DNA was examined in wild boar raw meat, wild boar meat meal and bear raw meat. At the result, those samples were detected deer negative. This indicates that the primer pair for detecting the deer DNA has a sufficient specificity.

The sensitivity of the PCR-based method in pork MBM and pork and poultry MBM containing deer meat meal (DMM) was examined at three levels (0.01 %, 0.05 % and 0.1 % DMM). All samples at all levels in pork MBM were identified deer positive. However, a part of samples at 0.01 % DMM in pork and poultry MBM was found deer negative. This means the sensitivity of this method for DMM contained in pork and poultry MBM was lower than that in pork MBM. The sensitivity at 0.01 %, 0.02 %, 0.05 % and 0.1 % DMM in pork and poultry MBM was 63 % (10 out of 16 samples), 80 % (8 out of 10 samples), 100 % (26 out of 26 samples) and 100 % (6 out of 6 samples) respectively.

A collaborative study was conducted in eight laboratories, which used pork and poultry MBM with DMM additive concentration of 0 %, 0.05 % and 0.1 % each as samples. The sensitivity and the false-negative rates of this method in all samples containing DMM were 100 % and 0 % respectively. This reveals that the LOD of this method is 0.05 % DMM in MBM. Besides, the specificity and the false-positive rates of this method in the blank sample (with no DMM) were 100 % and 0 % respectively. Those results demonstrate that this method fulfills requirements for a qualitative analytical method.

This method was thus validated and established for use in the inspection of deer protein in MBM, etc.

<sup>\*1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

<sup>\*2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 神戸センター

**Key words:** deer protein; polymerase chain reaction (PCR); mitochondrial DNA; meat and bone meal; collaborative study

キーワード：シカ由来たん白質；ポリメラーゼ連鎖反応；ミトコンドリア DNA；肉骨粉；共同試験

## 1 緒 言

我が国で牛海綿状脳症（BSE）の発生が確認されて以来，飼料原料として利用できる動物由来たん白質は制限されているところであるが<sup>1)</sup>，近年における野生鳥獣による農作物の被害拡大に伴い，イノシシの捕獲頭数が急増し，捕獲された個体の処理が緊急の課題となり，平成 28 年 9 月 20 日よりイノシシを豚と同等と見なし，飼料の原料として利用できるようになった<sup>2)</sup>。

イノシシをと殺，解体処理する獣肉処理施設（食品衛生法に基づく食肉処理業の許可を受けた施設）の大半は，シカのと殺，解体処理も行っていることから<sup>3)</sup>，イノシシ由来たん白質を飼料の原料として利用するに当たっては，農林水産大臣の確認手続<sup>4)</sup>の下で，伝達性海綿状脳症の発生の予防の観点から飼料の原料としての利用が禁止されているシカ残さとの分別管理を徹底することが重要となる。

この分別管理が適切に行われていることを確認するためには，イノシシを原料とする肉骨粉等にシカ由来たん白質が混入していないことを確認するための試験方法を確立する必要がある。その試験方法として，たん白質を検出する ELISA 法とポリメラーゼ連鎖反応（以下「PCR」という。）を利用し DNA を検出する試験方法が考えられた。

そこで，ここでは飼料分析基準<sup>5)</sup>に記載されている動物由来 DNA の検出法を基とする，シカ DNA 検出用合成 DNA<sup>6)</sup>を用いたシカ由来 DNA の検出法について，特異性及び感度を確認し，飼料分析基準への適用の可否を検討したので，その概要を報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

#### 1) シカ肉粉及びイノシシ肉粉

ホンシュウジカ及びイノシシのもも肉を精肉店より入手し，以下の方法で肉粉を調製した。

各生肉を 1~2 cm 角に切り，133 °C で 20 分間高圧蒸気滅菌し，105 °C で恒量になるまで乾燥した後，目開き 1 mm のふるいを通るまでミルサーで粉砕した。

#### 2) 豚肉骨粉，チキンミール及び原料混合肉骨粉

豚肉骨粉及びチキンミールは，国内の飼料製造業者より入手したものを目開き 1 mm のふるいを通るまでミルサーで粉砕したものをを用いた。原料混合肉骨粉は，粉砕した豚肉骨粉とチキンミールを等量混合して調製した。

#### 3) シカ肉粉添加試料

シカ肉粉とイノシシ肉粉を乳鉢で混合し，10 %シカ肉粉添加試料を調製した。10 %シカ肉粉添加試料を基に，豚肉骨粉及び原料混合肉骨粉でそれぞれ段階希釈し，0.01 %，0.02 %，0.05 %，0.1 %，0.5 %及び 1 %シカ肉粉添加試料を調製した。

#### 4) クマ生肉

ツキノワグマのもも赤身ブロックを精肉店より入手し，表面から 2 cm 程度を切除した側面の中心部分からくりぬいた肉を用いた。

## 2.2 試薬

- 1) ミトコンドリア DNA 抽出キット mtDNA エキストラクターCT キット 和光純薬工業製
- 2) 陽性対照 DNA シカ陽性対照は、ホンシュウジカ及びエゾシカ生肉約 100 mg からミトコンドリア DNA (以下, 「mtDNA」という.) 抽出キットを用いて抽出した mtDNA を TE 緩衝液で溶かし, 1 mL 中に DNA として 10 µg を含有するように調製したものをを用いた. なお, 3.1 特異性試験及び 3.2 感度試験の一部分にはホンシュウジカ由来 DNA を, それ以外の 3.2 感度試験にはエゾシカ由来 DNA を陽性対照に用いた.

DNA の抽出確認には, 豚ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール (BEX 製) 又は鶏ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール (BEX 製) を用いた.

- 3) プライマー シカ DNA 検出用合成 DNA (2 µmol/L) deer54, deer33<sup>6)</sup> 北海道システム・サイエンス製, 豚 DNA 検出用合成 DNA (2 µmol/L) pig5-6, pig3-6 BEX 製, 鶏 DNA 検出用合成 DNA (2 µmol/L) chick5-1, chick3-1 BEX 製
- 4) TE 緩衝液 pH8.0 ニッポンジーン製
- 5) PCR 緩衝液 10X PCR Gold buffer Applied Biosystems 製
- 6) 2 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 dNTP Mix Applied Biosystems 製
- 7) 25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液 MgCl<sub>2</sub> Applied Biosystems 製
- 8) 電気泳動用色素溶液 6×Loading Buffer タカラバイオ製
- 9) DNA 分子量マーカー 100 bp DNA Ladder タカラバイオ製
- 10) DNA ポリメラーゼ液 Ampli Taq Gold Applied Biosystems 製
- 11) 2-プロパノール 分子生物用 和光純薬製
- 12) Tris-acetate, EDTA (TAE) 緩衝液 50×TAE (ニッポンジーン製) を 50 倍に希釈したもの
- 13) アガロースゲル Agarose S Tablet ニッポンジーン製
- 14) ゲル染色液 EtBr Dropper Bottle (Apex 製) を臭化エチジウム濃度が 0.5 µg/mL になるように希釈したもの
- 15) 水 Direct-Q 3 UV (Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 min 以上) で処理したもの

## 2.3 装置及び器具

- 1) ミルサー: IFM-300DG 岩谷産業製
- 2) ビーズ式細胞破碎機: BC-20 湘南産機製
- 3) 高速冷却遠心器: MX-307 トミー精工製
- 4) DNA 増幅装置: PE9700 型 Applied Biosystems 製
- 5) 電気泳動装置: Mupid-exu アドバンス製
- 6) 電気泳動パターン撮影システム: AE-6932GXES-U アトー製

## 2.4 試験方法

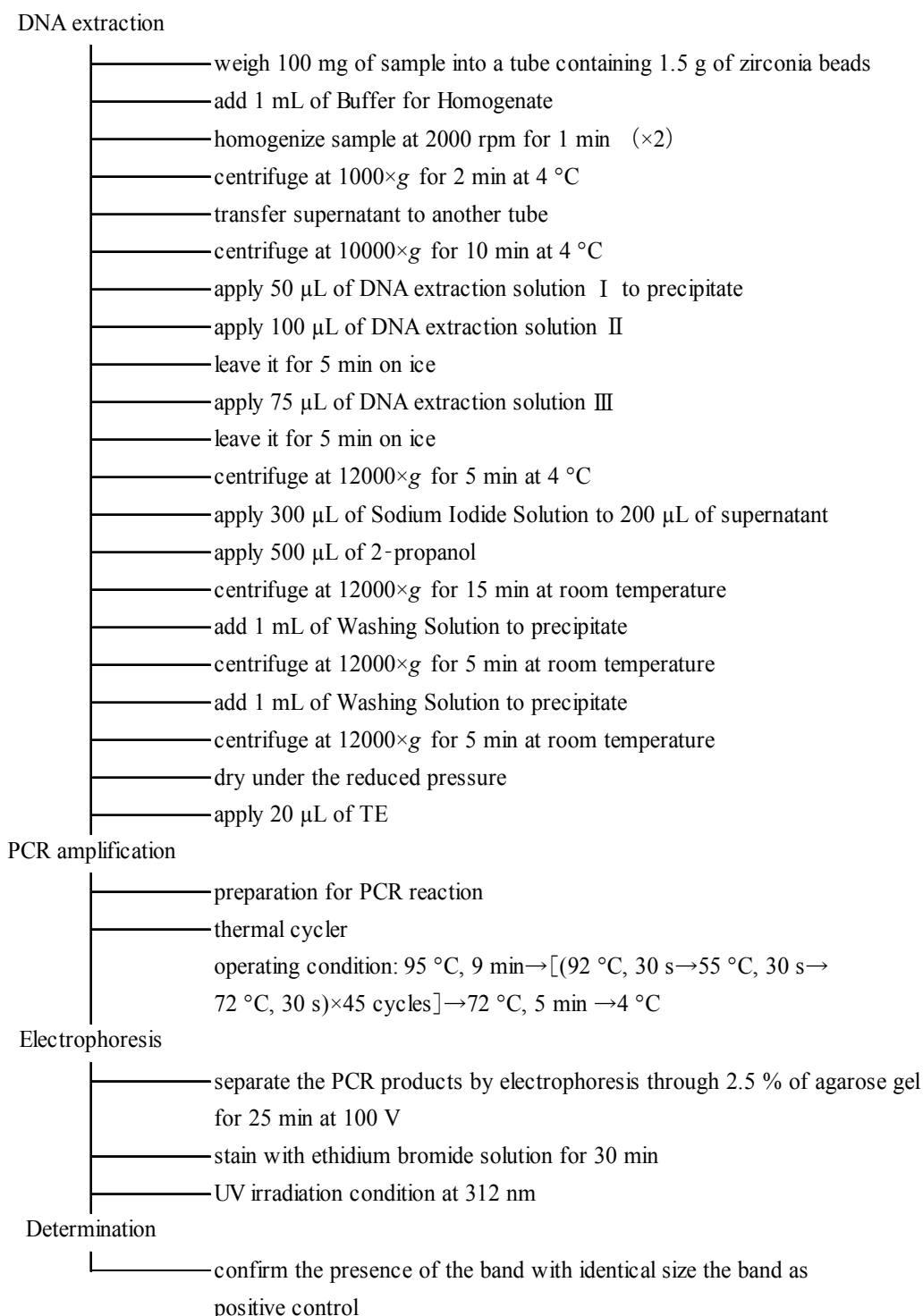
飼料分析基準第 16 章第 2 節の方法 (以下「本法」という.) に従って分析した. ただし, 陽性対照 DNA 及びプライマーはそれぞれ 2.2 の 2) 及び 3) のものをを用いた.

なお, 試験法の概要を Scheme 1 に示した.

## 2.5 判定方法

電気泳動の結果, 陽性対照と同一サイズの PCR 増幅産物の有無で陽性又は陰性と判定した.

なお、陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合及び試料溶液中で豚検出用の増幅産物が検出されなかった場合は PCR 操作から再分析することとした。



Scheme 1 Analytical procedure for detection of deer DNA in meat and bone meal (PCR-based method)

### 3 結果及び考察

#### 3.1 特異性試験

シカ由来 DNA 検出用合成 DNA (以下「シカ検出用プライマー」という.) の特異性については、これまでシカ (ホンシュウジカ, エゾシカ, アカシカ, トナカイ), ウシ (黒毛和種, 乳牛, アカウシ, アンガス種), ヒツジ及びヤギの反すう動物, ウマ, ブタ (ミニブタ, メキシカンヘアレス, バークシャー, 中ヨークシャー, デュロック, ランドレース), ウサギ, ラット, マウス及びクジラのは乳動物, 鳥類 (ニワトリ, ウズラ, アイガモ), 毛ガニ, アサリ, エビ, イカ, トウモロコシ, ヒト及び魚類 (10 品種) で確認されており, そのうちシカについてのみ検出することが報告されている<sup>6), 7)</sup>. 一方, シカと同じ施設で解体・食肉処理を行う可能性があるイノシシ及びクマについては確認されていない. そこで, イノシシの生肉と肉粉及びクマ生肉について, 本法により特異性試験を実施した. その結果, 全ての試料で陰性と判定され, シカ検出用プライマーの高い特異性が確認された (Table 1). なお, シカは反すう動物であるので, 飼料分析基準に規定されている反すう動物由来 DNA 検出用プライマー<sup>5)</sup>でも検出可能であるが, 動物種の特異性が困難なことから, シカ由来 DNA の PCR による検出法には, 既に開発されているシカ検出用プライマー<sup>6)</sup>を利用することとした.

Table 1 Specificity confirmation of the PCR method taken with primer pair for detecting deer DNA

Materials	Number of samples (Detected / Tested)
Wild boar raw meat	0/2
Wild boar meat meal	0/2
Bear raw meat	0/2
Poultry by-product meal	0/2
Pork MBM <sup>a)</sup>	0/2
Pork and poultry MBM <sup>b)</sup>	0/2

a) Meat and bone meal

b) Pork and poultry MBM was prepared by mixing equal amounts of pork MBM and poultry by-product meal.

#### 3.2 感度試験

##### 3.2.1 試料による感度比較

獣肉処理施設における不適切な分別管理によりシカの混入が起こりうる飼料原料である豚肉骨粉及び原料混合肉骨粉について, シカ肉粉の原物重量が 0.01 %, 0.05 %及び 0.1 %となるように添加した試料を用いて, 本法の感度を確認した. 試験の結果 (Table 2), 添加したシカ肉粉について, 豚肉骨粉は全ての添加濃度で陽性と判定された. 原料混合肉骨粉は, 0.05 %及び 0.1 %添加試料で全て陽性と判定されたが, 0.01 %添加試料の 6 検体中 2 検体で陰性 (感度 67 %) と判定された. この結果は原料混合肉骨粉に混合されているチキンミールに含まれる成分が DNA 増幅阻害等を引き起こしている可能性を示したことから, 更にチキンミールにシカ肉粉 0.05 %添加した試料を調製し, シカ DNA が検出できるか確認した. その結果, 検出率

は 100 % であり, 0.05 % の添加濃度において, チキンミールはシカ DNA の検出に影響を及ぼさないことを確認した.

感度試験の結果から, 豚肉骨粉は原料混合肉骨粉よりシカの検出率が高くなる可能性があり, シカの混入が起こりうる肉骨粉を代表する試料としては不適当と考え, 検出率が低かった原料混合肉骨粉を共同試験用試料とすることとした.

Table 2 Sensitivity of the PCR method taken with primer pair for detecting deer DNA in pork MBM<sup>a)</sup> and pork and poultry MBM<sup>b)</sup> containing DMM<sup>c)</sup> at different levels

Kind of samples	Spiked level	Number of samples (Detected / Tested)	Sensitivity (%)
Pork MBM	0.01 % DMM	6/6	100
	0.05 % DMM	6/6	100
	0.1 % DMM	6/6	100
Pork and poultry MBM	0.01 % DMM	4/6	67
	0.05 % DMM	6/6	100
	0.1 % DMM	6/6	100
Poultry by-product meal	0.05 % DMM	6/6	100

a) Meat and bone meal

b) Pork and poultry MBM was prepared by mixing equal amounts of pork MBM and poultry by-product meal.

c) Deer meat meal

### 3.2.2 検出下限の推定

シカ肉粉添加濃度の検出下限の推定を目的に, 0.01 %, 0.02 % 及び 0.05 % 添加試料を分析し, Table 2 の結果にデータを追加した (Table 3). 0.1 % 及び 0.05 % 添加試料は, 分析した全ての試料で陽性と判定された (感度 100 %). 一方, 0.01 % 添加試料は 16 検体中 10 検体が陽性と判断され (感度 63 %), 0.02 % 添加試料は 10 検体中 8 検体が陽性と判断された (感度 80 %).

定性分析法の性能指標について, EU では少なくとも 95 % の感度が要求されている<sup>8)</sup>. 試験の結果 (Table 3), この性能指標を満たすシカ肉粉添加濃度である 0.05 % を本法の検出下限と推定し, 共同試験試料に添加するシカ肉粉濃度を 0.05 % 及び 0.1 % と設定した.

**Table 3 Sensitivity of the PCR method taken with primer pair for detecting deer DNA in pork and poultry MBM<sup>a)</sup> containing DMM<sup>b)</sup> at different levels**

Kind of sample	DMM level	Number of samples (Detected / Tested)	Sensitivity (%)
Pork and poultry MBM	0.01 % DMM	10/16	63
	0.02 % DMM	8/10	80
	0.05 % DMM	26/26	100
	0.1 % DMM	6/ 6	100

a) Pork and poultry MBM (meat and bone meal) was prepared by mixing equal amounts of pork MBM and poultry by-product meal.

b) Deer meat meal

### 3.3 共同試験

本法の感度等を確認するため、非明示の6点反復で共通試料による共同試験を実施した。共通試料には、シカ肉粉を添加した原料混合肉骨粉（添加濃度：0.05 %，0.1 %及び無添加）を用いた。参加試験室は一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，同札幌センター，同仙台センター，同名古屋センター，同神戸センター及び同福岡センター（計8試験室）であった。

シカ由来 DNA の PCR による検出法における共同試験の結果を Table 4 に示した。シカ肉粉を添加した全ての試料（0.05 %，0.1 %）は，全ての参加試験室でシカ陽性と判定され，シカ肉粉無添加試料は，全ての試験室で陰性と判定された。従って，シカ肉粉を添加した全ての試料（0.05 %，0.1 %）における本法の感度は 100 %，偽陰性率は 0 %，シカ肉粉無添加試料における本法の特異性は 100 %，偽陽性率は 0 %であった。これらの結果から，本法における肉骨粉中のシカ肉粉としての検出下限は 0.05 %であることが示された。

共同試験に用いた機器及び電気泳動パターン撮影時に照射した紫外線波長を Table 5 に示した。今回用いられた紫外線波長は，7 試験室で 312 nm，1 試験室で 302 nm であり，この波長の違いによる試験結果への影響は見られなかった。

定性分析法の性能指標について，陽性であることが既知の試料において，規制値の合否を判定する定性法の感度は 95 %以上，偽陰性率は 5 %未満であることが要求されている<sup>8)</sup>。また，陰性であることが既知の試料において，定性法の特異性は 95 %以上，偽陽性率は 5 %未満であることが要求されている<sup>9)</sup>。今回の共同試験の結果，これらの要求事項を全て満たしていた。

Table 4 Collaborative study for DMM<sup>a)</sup> contained in MBM<sup>b)</sup>

Lab No.	Blind test <sup>c)</sup>																		Correct results <sup>d)</sup>
	Test samples (positives)												Test sample (negatives)						
	0.05 % DMM <sup>b)</sup>						0.1 % DMM						0 % DMM						
	Replicate number						Replicate number						Replicate number						
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	18
Sensitivity, %	100						100						-						
Specificity, %	-						-						100						
False-positive rates, %	-						-						0						
False-negative rates, %	0						0						-						

a) Deer meat meal

b) MBM (meat and bone meal) was prepared by mixing equal amounts of pork MBM and poultry by-product meal

c) +: positive, -: negative

d) Number of correct results in each laboratory

Table 5 Instruments and UV wavelength for producing color used in the collaborative study

Lab No.	Thermal cycler	Gel documentation system	
		Model of instrument	UV (nm)
1	GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems	AE-6932GXES-U, ATTO	312
2	GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems	WUV-M20, ATTO	312
3	Thermal Cycler Dice, TAKARA BIO	AE-6932GXES-US, ATTO	312
4	GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems	AE-6932GXES-U, ATTO	312
5	GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems	AE-6932GXES-U, ATTO	312
6	GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems	AE-6932GXES-U, ATTO	312
7	GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems	AE-6932GXES-U, ATTO	312
8	ProFlex PCR System, Thermo Fisher Scientific	Gel Doc XR, Bio-RAD	302

#### 4 まとめ

肉骨粉中のシカ由来 DNA の PCR による検出法について、共同試験等の実施により飼料分析基準への適用の可否を検討したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- シカ検出用プライマーによる特異性試験の結果、イノシシ及びクマに由来する全ての試料でシカ陰性と判定され、シカ検出用プライマーの高い特異性が確認された。
- 本法における肉骨粉中のシカ肉粉 (0.05 %, 0.1 %) としての感度は 100 %, 偽陰性率は 0 %, シカ肉粉無添加試料の特異性は 100 %, 偽陽性率は 0 %であった。



- 3) 本法における肉骨粉中のシカ肉粉としての検出下限は 0.05 %であった。

## 謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センターにおける関係者各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 2) 農林水産省令：飼料及び飼料添加物の成分規格に関する省令の一部を改正する省令，平成 28 年 9 月 20 日，農林水産省令第 60 号 (2016).
- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部監視安全課長通知：野生鳥獣肉の衛生管理等に関する実態調査の結果について，平成 28 年 9 月 21 日，生食監発 0921 第 1 号 (2016).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の規定に基づく動物由来たん白質及び動物性油脂の農林水産大臣の確認手続について，平成 17 年 3 月 11 日，消安第 9574 号 (2005).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 6) 特許登録：特許第 5682074 号，特許出願番号：特願 2013-185418，発明の名称 動物由来 DNA 検出用プライマー配列.
- 7) Naoki Shinoda: The studies on PCR for detection of animal derived materials in feed, Tokyo University, Ph.D. thesis (2011).
- 8) EU: Commission decision of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>, cited 15 Dec. 2017.
- 9) AOAC Int: AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002).