

DNA を利用した混合肉の肉種判別

長尾 咲子*, 片山 貴之*, 藤村 徹*, 三枝 朋樹**

Species Identification of Mixed Meat using DNA Method

Sakiko NAGAO*, Takayuki KATAYAMA*, Toru FUJIMURA*, Tomoki SAEGUSA**

*Kobe Customs Laboratory

12-1, Shinko-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0041 Japan

**Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japann

Methods generally used to identify the species of meat include the base sequence analysis of DNA, amino acid composition analysis, fatty acid composition analysis and protein analysis. For the species identification of mixed meat, however, none of these methods works satisfactorily and analysis is almost impossible. Therefore, we studied to identify the species of mixed meat and quantify the composition ratio of mixed meat using PCR method. As a result, we could identify the species of mixed meat consists of beef, pork and chicken. By using an enzyme capable of reacting quickly with PCR, the time required for PCR was reduced to about 30 minutes. Furthermore the species of meat in mixture of five species (beef, pork, chicken, mutton and horse meat) and commercial meat products could be identified. As for the determination of composition ratios of mixed meat, a correlation was found between the weight ratios of meat in mixtures of two of beef, pork and chicken and the intensity ratios of band using electrophoresis method.

の定量を検討したので報告する。

1. 緒 言

2. 実 験

食肉のうち牛肉及び豚肉は、年間消費量の約半数を輸入に依存している。また、食生活の多様化により、肉は冷凍あるいはレトルト食品などに加工される割合が高くなっている。食肉加工品の生産は、原料肉の安定的な供給によるところが大きく、輸入に依存しなければならないという事情がある¹⁾。

肉は実行関税率表において、2類あるいは16類等に分類される。この中で鶏肉を調製したものは輸入数量が最も多い²⁾。また、鶏肉調製品のうち、牛肉または豚肉を含有するものも輸入数量が増加傾向にある。鶏肉調製品において、牛肉または豚肉を含有するか否かによって税率が異なり、牛肉または豚肉を含有するものは高税率が課される。

一般的な肉種の判別方法として、DNA の塩基配列の解析、肉中に含まれるアミノ酸、タンパク質、脂肪酸の解析など様々な方法が知られている。しかし、いずれの方法も混合された肉の肉種を判別することが困難である。そこで混合された肉種の判別を簡便に行える方法を検討した。

近年、DNA 解析技術の発達に伴い、DNA を用いた種判別法が多く開発されている。肉の種判別においては、マルチプレックス PCR 法を用いた方法が報告されている³⁾。この方法を用いて、牛、豚、鶏、羊、馬の 5 種類の混合肉の肉種判別及び肉種の混合割合

2. 1 試料及び試薬

- ・牛肉、豚肉、鶏肉、羊肉、馬肉（市販品）
- ・混合肉

3 種：牛・豚・鶏=1:1:1

5 種：牛・豚・鶏・羊・馬=1:1:1:1:1

2 種：(豚・鶏) (牛・豚) (牛・鶏)

=9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9

*各肉種をそれぞれの比に対応するように量り取り、ミキサーを用いて均質になるように混合したものを混合肉とした。

- ・調理済みの肉加工品（市販品）
- ・TAKARA Ex Taq（タカラバイオ）
- ・TAKARA SpeedSTAR HS DNA Polymerase（タカラバイオ）

2. 2 装置

DNA 増幅装置：GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystem 製）

塩基配列解析装置：3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystem 製）

画像解析装置：BIO-PROFILE System2（VILBER LOURMAT 製）

電気泳動装置：ミニサブマリン電気泳動装置（Bio Craft 製）

2. 3 実験方法

2. 3. 1 DNA 抽出

NP-40 buffer (140 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, 0.5 % NP-40, pH 8.5) を 70 μ l 加えた 1.5 ml エッペンドルフチューブに肉片 1 mm 角程度を移した後、滅菌処理した小型はさみで微小片にカットした。この試料溶液に Cell lysis SDS buffer (1.2 % SDS, 12 mM EDTA, 120 mM NaCl) を 500 μ l と 10 mg/ml の Proteinase K を 10 μ l 加えて、55℃で 2 時間反応させ、組織片を完全に分解し、消化した。この消化溶液をフェノール・クロロホルム溶液及びエタノール溶液で精製し、100 μ l の TE buffer に溶かし、DNA 試料液とした。

2. 3. 2 PCR 増幅産物の塩基配列の解読

単一肉種から抽出した template DNA を用いて、肉のミトコンドリア DNA の cytochrome b 遺伝子全体を含む領域について、PCR 法により増幅を行った。得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit により精製し、BigDye Cycle Sequencing Kit Ver3.1 を用いてサイクルシーケンス反応を行った後、エタノール沈殿により未反応色素を除去し、塩基配列解析装置により PCR 産物の塩基配列を決定した。

肉のミトコンドリア DNA の cytochrome b 領域の遺伝子情報を基に、種特異的かつ塩基長が異なるように設計されたプライマー³⁾を Table 1 に示す。これらのプライマーを用いて、単一肉種から上記と同様の操作により得られた PCR 産物について塩基配列を決定した。

Table 1 List of primers used in this study

Code	Direction	Sequences (from 5'to 3')
Forward	Forward	GACCTCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAA
Beef	Reverse	CTAGAAAAGTGTAAAGACCCGTAATATAAG
Pork	Reverse	GCTGATAGTAGATTGTGATGACCGTA
Chicken	Reverse	AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG
Mutton	Reverse	CTATGAATGCTGTGGCTATTGTCGCA
Horse	Reverse	CTCAGATTCACGACGAGGGTAGTA

2. 3. 3 PCR 法による混合肉の肉種判別

2. 3. 3 (1) 牛、豚及び鶏の単一肉、2 種混合肉及び 3 種混合肉

PCR 反応に用いるプライマーは、Table 1 に示すものを用いた。牛肉、豚肉、鶏肉の単一または混合肉の定性での PCR 反応溶液は、template DNA : 10~50 ng、Ex-Taq buffer : 5 μ l、dNTP mixture (25 mM each) : 4 μ l、フォワードプライマー : 15 pmol 及びリバースプライマー (beef : 15 pmol, pork : 3 pmol, chicken : 25 pmol)、Ex-Taq : 1.0 Units、滅菌水 (合計 50 μ l に調製) とした。PCR 反応は、94℃・5 分の初期加熱後、denature : 94℃・30 秒、annealing : 60℃・1 分、extension : 72℃・1 分を 1 サイクルとして 30 回繰り返し、72℃・5 分の条件で行った。得られた PCR 産物を 3 % TAE アガロースで電気泳動を行い、バンド長を確認した。

2. 3. 3 (2) 牛、豚、鶏、羊及び馬の 5 種混合肉

牛肉、豚肉、鶏肉、羊肉及び馬肉の 5 種混合肉の PCR 反応溶液におけるプライマー組成は、フォワードプライマー : 15 pmol

及びリバースプライマー (beef : 8 pmol, pork : 2 pmol, chicken : 16 pmol, mutton : 4 pmol, horse : 2 pmol) とした。プライマー以外の PCR 反応溶液組成及び反応条件は 2.3.3(1) と同様とした。

2. 3. 4 高速 PCR 反応用酵素を用いた PCR 法による牛、豚及び鶏の 3 種混合肉の肉種の判別

PCR 反応に用いるプライマーは、2.3.3 と同様のものを用いた。PCR 反応溶液は、template DNA : 10~50 ng、10×Fast Buffer I : 5 μ l、dNTP mixture (25 mM each) : 4 μ l、フォワードプライマー : 15 pmol 及びリバースプライマー (beef : 15 pmol, pork : 3 pmol, chicken : 25 pmol)、Speed STAR polymerase : 1.25 Units、滅菌水 (合計 50 μ l に調製) とした。PCR 反応は、94℃・1 分の初期加熱後、denature : 94℃・5 秒、annealing : 60℃・20 秒、extension : 72℃・5 秒を 1 サイクルとして 30 回繰り返す条件で行った。得られた PCR 産物を 3 % TAE アガロースで電気泳動を行い、バンド長を確認した。

2. 3. 5 牛、豚及び鶏の混合肉中に含まれる構成割合の定量

PCR 反応溶液は、template DNA : 10~50 ng、Ex-Taq buffer : 5 μ l、dNTP mixture (25 mM each) : 4 μ l、フォワードプライマー : 10 pmol 及びリバースプライマー (pork : 1.5 pmol, chicken : 30 pmol) または (beef : 15 pmol, pork : 1.5 pmol) または (beef : 6 pmol, chicken : 15 pmol)、Ex-Taq : 1.0 Units、滅菌水 (合計 50 μ l に調製) とした。PCR 反応は、94℃・5 分の初期加熱後、denature : 94℃・30 秒、annealing : 60℃・1 分、extension : 72℃・1 分を 1 サイクルとして 28 回繰り返し、72℃・5 分の条件で行った。得られた PCR 産物を 3 % TAE アガロースで電気泳動を行い、画像解析装置で各バンドの濃度を解析した。

3. 結果及び考察

3. 1 DNA 抽出

単一肉及び混合肉から、2.3.1 の方法により DNA を得た (data not shown)。この抽出 DNA を PCR の template DNA として用いることにした。

3. 2 PCR 増幅産物の塩基配列の解読

各肉種から得られた cytochrome b 遺伝子を含む領域の PCR 産物を用いて、各肉種の cytochrome b 遺伝子を決定した (data not shown)。決定した塩基配列を、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) データベースに登録されている各肉種の cytochrome b 遺伝子の塩基配列データと比較したところ、ほぼ一致した。このことから、今回用いた肉は種として単一のものであることを確認できた。

Table 1 のプライマーを用いて、各肉種から得られた PCR 産物の塩基配列を Fig.1 に示す。決定した塩基配列はいずれも cytochrome b 遺伝子中の部分領域であることを確認でき、牛、豚、鶏、羊、及び馬の塩基長は、それぞれ 274bp、398bp、227bp、331bp、439bp であった。

Table 1 のプライマーを用いての PCR 産物は、肉種ごとにバンド長が異なることから、バンド長によって肉種の判別が可能である。またこれらのプライマーは種特異的に PCR 法による増幅が可能であるため、1 回の PCR 反応で数種同時に増幅可能なマルチプ

レックス PCR 法に利用できると考えられる。以上のことから、マルチプレックス PCR 法を混合肉の定性・定量に用いることとした。

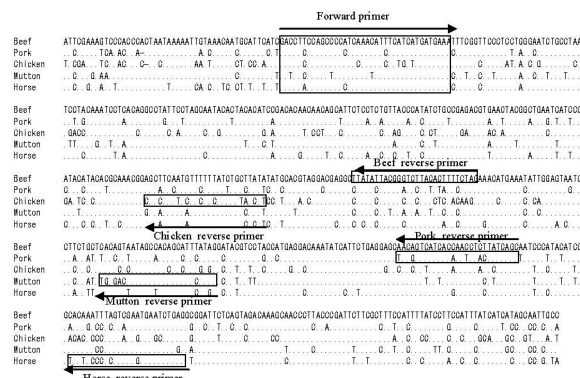


Fig. 1 Partial sequences of cytochrome b gene extracted from beef, pork, chicken, mutton and horse meat, respectively. Open boxes indicate locations of primers.

3. 3 PCR 法による混合肉の肉種判別

3. 3. 1 牛、豚及び鶏の単一肉、2 種混合肉及び 3 種混合肉

牛、豚及び鶏の単一、2 種混合及び 3 種混合肉について、マルチプレックス PCR 法による PCR 産物の電気泳動結果を Fig.2 に示す。単一肉種の場合は、牛、豚及び鶏に特有の単一のバンドが見られた。牛、豚、鶏の 2 種類の混合肉、3 種類の混合肉の場合には、混合した肉種に由来する 2 本あるいは 3 本のバンドが確認でき、肉種の判別が可能であった。PCR 反応溶液中のプライマーについては、それぞれの肉種由来のバンドの光強度が同程度になるように、濃度比をフォワードプライマーを 15 pmol、リバースプライマーを beef: 15 pmol, pork: 3 pmol, chicken: 25 pmol とした。

市販の調理済みの肉加工品（ミートボール、ハンバーグ、ロールキャベツ）を用いたマルチプレックス PCR 法による PCR 産物の電気泳動結果を Fig.3 に示す。商品の成分表示どおりに含有する肉種の判別が可能であった。

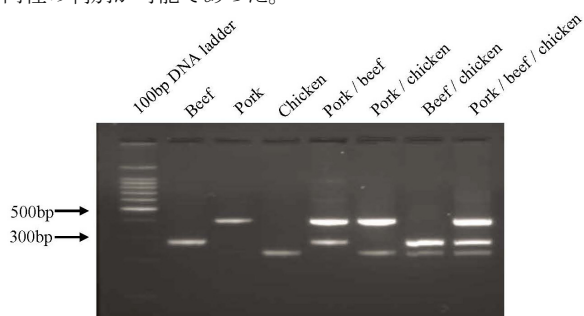


Fig. 2 3% agarose gel electrophoresis of PCR products stained with ethidium bromide.

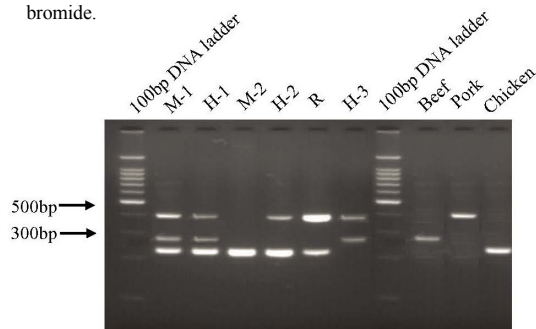


Fig. 3 3% agarose gel electrophoresis of PCR products of meat products stained with ethidium bromide. M: Meat ball, H: Hamburger, R: Roll cabbage.

3. 3. 2 牛、豚、鶏、羊及び馬の 5 種混合肉

牛、豚、鶏、羊及び馬の 5 種混合肉について、マルチプレックス PCR 法による PCR 産物の電気泳動結果を Fig.4 に示す。5 種混合肉についても 5 本のバンドを確認でき、5 種が混合されたものも判別可能であった。5 種混合肉における PCR 反応溶液中の最適なプライマーの濃度比は、フォワードプライマーを 15 pmol、リバースプライマーを beef: 8 pmol, pork: 2 pmol, chicken: 16 pmol, mutton: 4 pmol, horse: 2 pmol とした。しかし、5 本のプライマーを用いると、プライマーの Tm (melting temperature) の違い等が原因となり、非特異的なバンドの発生や、目的とする PCR 産物の増幅が阻害されることから、今後検討が必要である。

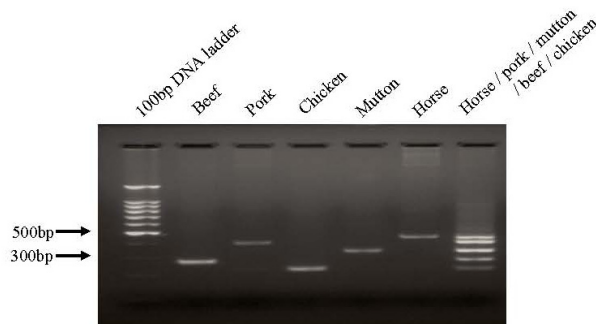


Fig. 4 3% agarose gel electrophoresis of PCR products stained with ethidium bromide.

3. 4 高速 PCR 反応用酵素を用いた PCR 法による牛、豚及び鶏の 3 種混合肉の肉種判別

高速 PCR 用に開発された SpeedSTAR HS DNA Polymerase (以下 SpeedSTAR と略す) を用いた PCR 法による、牛、豚及び鶏の 3 種混合肉についての電気泳動結果を Fig.5 に示す。通常の PCR 法で使用している Ex-Taq を用いた場合 (Fig.2) と比較すると、バンドが明瞭ではないものの、3 種の肉種由来のバンドを容易に区別でき、SpeedSTAR は 3 種混合肉の肉種判別に利用できることが確認できた。通常の PCR 法は、約 2 時間の反応時間を必要とするが、SpeedSTAR を用いることで 30 分に短縮することができ、迅速な分析に対応できると考えられる。

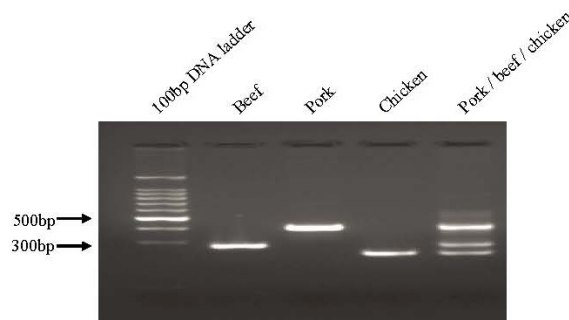


Fig. 5 3% agarose gel electrophoresis of PCR products amplified with SpeedSTAR HS DNA Polymerase.

3. 5 牛、豚及び鶏の混合肉中に含まれる構成割合の定量

Fig.6 に 9 種類の異なる混合割合に調製した混合肉 (豚・鶏) (牛・豚) (牛・鶏) についての PCR 産物の電気泳動結果を示す。混合

された肉の種類に特異的な2本のバンドがそれぞれ検出され、肉の割合が増加するにつれて、バンドの濃さが濃くなっていくことが確認された。

この電気泳動結果を基に、2本のバンドの光の強さを画像解析装置によって数値化した。横軸に2種類の肉の混合割合の重量比を、縦軸にバンドの光強度比をとり、グラフにしたものを Fig.7 に示す。当初は牛、豚及び鶏の3種類の混合肉の構成割合を同時に定量することを検討したが、肉の重量割合とバンドの光強度比に相関関係を見出すことが困難であったため、2種類毎の構成割合の定量を検討した。6:4、5:5、4:6の混合割合の場合は、3種類の割合間での光強度比の差が小さく、どちらの肉の割合が多いかを判断することが難しいと考えられるが、7:3、3:7以上の混合割合比では、混合割合の重量比とバンドの光強度比に良好な相関関係が得られ、混合割合を推定できると考えられる。

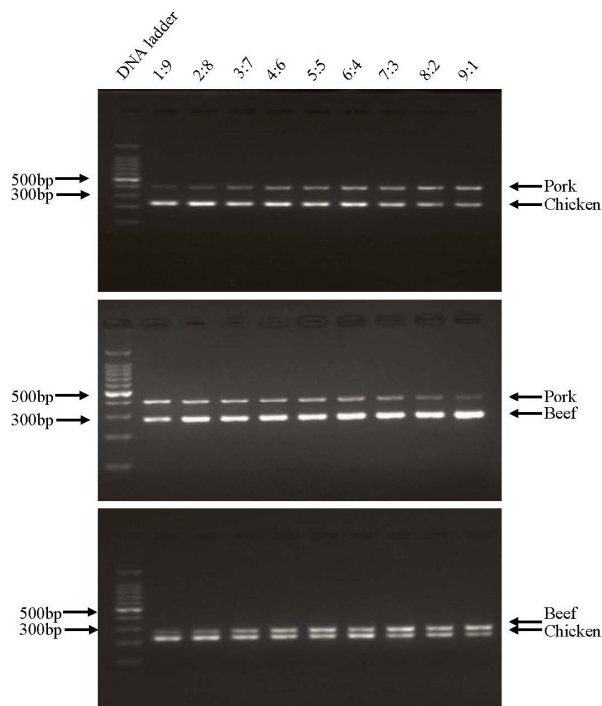


Fig. 6 3% agarose gel electrophoresis of PCR products of meat with 9 mixture ratios. The three pictures show mixed meat consisting of pork and chicken, pork and beef, and beef and chicken, respectively

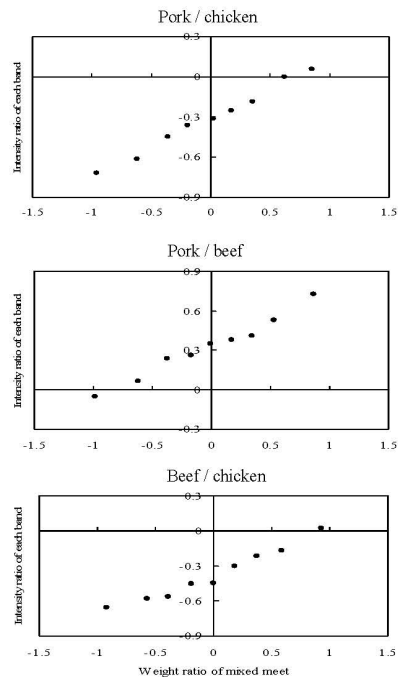


Fig. 7 Relationship between intensity ratio of each band and weight ratio of mixed meat. The three figures show mixed meat consisting of pork and chicken, pork and beef, and beef and chicken, respectively.

4. 要 約

混合肉の肉種を判別するために、ミトコンドリア DNA 中の cytochrome b 遺伝子の部分領域を用いてのマルチプレックス PCR 法を用いた判別法を検討した。PCR を行った結果、3 種混合肉について、種に特有の単一のバンド長による判別が可能であった。さらに牛、豚、鶏、羊及び馬の 5 種混合肉についても同様に PCR 法による判別が可能であった。また牛、豚及び鶏の 3 種混合肉について、高速 PCR 用ポリメラーゼ SpeedSTAR を用いて同様にを行った結果、肉種判別が可能であった。

次に牛、豚及び鶏の混合肉の構成割合の定量について検討したところ、2 種類の混合肉について、一種の含有割合が 7 割以上の割合については混合割合の推定が可能であると考えられる。

文 献

- 1) 中西武雄, 藤巻正生, 安藤則秀, 佐藤泰, 中村良: “畜産物利用学”, (1979), (朝倉書店)
- 2) 日本貿易統計 (2005)
- 3) 松永孝光, 柴田清弘, 山田順一, 新村裕: マルチプレックス PCR 法による食肉及び食肉製品の肉種鑑別, 日本食品科学工学会誌, 第 46 巻, 第 3 号, 187~194, (1999)