

肉骨粉等の分析法の比較

分析法	顕微鏡検査	エライザ法	エライザ法 (追加法)	PCR法
検出対象	肉骨粉(獣骨)	動物由来たん白質		動物由来DNA
適用できる飼料	・配合飼料 ・単体飼料 (魚粉等)	・単体飼料 (魚粉等)	・配合飼料 ・単体飼料 (魚粉等)	・配合飼料 ・単体飼料 (魚粉等)
識別範囲	・魚骨と獣骨の 識別	・動物種の識別 (牛、豚、鶏等)	・動物種の識別 (牛*、鶏**)	・動物種の識別 (ほ乳動物、 反すう動物、 牛、豚、鶏等)
検出感度 (含有率)	0.1~0.3%	1%以下	0.1%	0.01~0.1%
組織特異性	高い	中程度		ない
種特異性	低い又はない	中程度		高い
加熱処理の影響	少ない	影響あり		影響あり

*平成15年12月に分析法として追加

**平成16年12月に分析法として追加の予定

6 「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット」を用いた飼料中の牛由来たん白質の検出法

日比野 洋*

平成 13 年 9 月に国内で牛海綿状脳症 (BSE : Bovine Spongiform Encephalopathy) の感染が初めて確認されて以来、我が国においてはその原因とされる肉骨粉の取り扱い等、とりわけ牛用飼料に対する動物由来たん白質の混入防止対策の強化が進められており、混入の確認のための各種試験法の確立及び充実が求められている。

現在、飼料中の牛由来たん白質の混入を確認する方法としては、顕微鏡鑑定法¹⁾、PCR 試験法及び ELISA 試験法 (暫定法)²⁾ の 3 法が確立されており、各試験の結果を組み合わせる総合的に混入の判定を行っているが、そのうち ELISA 試験法については適用範囲が動物質性飼料原料に限られているため、牛用配合飼料への適用拡大が求められてきたところである。筆者は、(株) 森永生科学研究所で新たに開発された牛由来たん白質検出キットの実用化試験を実施し、感度、特異性、適用範囲及び再現精度の調査を行った結果、牛用配合飼料への適用が可能であることが確認されたのでその概要を報告する。

1 実験方法

1.1 ELISA キット : 「モリナガ 加熱処理牛由来タンパク質検出キット」(株) 森永生科学研究所製 構成

抗体固相化モジュール	(8 ウェル × 12 本)
標準品原液	(1.8mL × 1 本)
酵素標識抗体溶液	(12mL × 1 本)
酵素基質溶液	(13mL × 1 本)
反応停止液	(13mL × 1 本)
20 倍濃縮抽出液 (I 液)	(50mL × 1 本)
20 倍濃縮抽出液 (II 液)	(2.8mL × 1 本)
20 倍濃縮洗浄液	(50mL × 1 本)
陽性対照溶液	(1mL × 1 本)
陰性対照溶液	(1mL × 1 本)
モジュール用フレーム	(1 個)
モジュール用ふた	(1 枚)

* 肥飼料検査所本部

1.2 試薬等の調製

- 1) 抽出液：20 倍濃縮抽出液（I 液）50mL を蒸留水で 997.5mL に希釈し，20 倍濃縮抽出液（II 液）2.5mL を加えた。
- 2) 洗浄液：20 倍濃縮洗浄液を蒸留水で 20 倍に希釈した。
- 3) 標準溶液：標準品原液を抽出液で 2 倍希釈から 16 倍希釈までの 2 倍希釈段階の標準溶液を調製した。

標準溶液の調製方法：

標準原液希釈倍率	2	4	8	16	Blank	
標準品原液	400	400	400	400		(μ L)
抽出液	400	400	400	400	500	(μ L)

1.3 試験方法

1) 抽出

測定試料を粉砕し，試料 4g に対し抽出液 36mL を加えホモジナイズを 30 秒間ずつ 3 回行った後，約 100℃の水浴上で 10 分間加熱を行った。放冷後，800～1,000 \times g で 5 分間遠心分離を行った後，上澄み液をろ紙（5 種 A）でろ過を行い，ろ液を 3,000 \times g で 10 分間遠心分離を行い，上澄み液を試料溶液とした。試料溶液は直ちに ELISA 操作に供した。

2) ELISA 操作

抗体固相化モジュールを付属のモジュール用フレームにセットし，試料溶液，各標準溶液，陽性対照溶液，陰性対照溶液及び Blank 液（抽出液）各 100 μ L を目的のウェルに加え，常温で 2 時間反応させた後，ウェルの内容物を完全に除去し，各ウェルあたり 300 μ L ずつの洗浄液で 6 回洗浄を行った。次に酵素標識抗体溶液 100 μ L ずつを各ウェルに加え常温で 30 分間反応させた後，ウェルの内容物を完全に除去し，各ウェルあたり 300 μ L ずつの洗浄液で 6 回洗浄を行った。

次に酵素基質溶液 100 μ L ずつを各ウェルに加え，遮光し常温で 10 分間静置して反応させた。

反応停止液 50 μ L ずつを各ウェルに加え酵素反応を停止して，30 分以内にプレートリーダー（450 及び 620nm 波長）で各ウェルの吸光度測定を行った。まず 450nm で吸光度を測定，次に 620nm 波長で測定した吸光度を 450nm の値から引き，この値を測定値とした。

3) 判定

試験の成立条件

以下の条件を全て満たした場合とした。

- ・ 陽性対照溶液の吸光度の平均測定値が，標準原液の 8 倍希釈溶液の平均測定値以上であり，かつ標準原液の 2 倍希釈溶液の平均測定値以下である。
- ・ 陰性対照溶液の平均測定値が 0.1 以下である。
- ・ 各試験試料について反復測定された測定値の変動係数の値が，20%以下である。

結果の判定

- 1) 陰性対照溶液の平均測定値を求め，2 を乗じた値をカットオフ値とし，対象試料の平均測定値がカットオフ値以上であった場合，当該試料は陽性と判定し，平均測定値がカットオフ

値未満であった場合、当該試料は陰性と判定した。

- 2) 各検体につき 2 点平行で試験を実施し、2 点とも陽性の場合のみ陽性と判定し、いずれか一方が陽性の場合には再試験を行い再度判定した。再試験において、2 点とも陽性の場合のみ陽性とし、いずれか一方が陽性、もしくは 2 点とも陰性の場合には陰性と判定した。

試験フローシート

○ 抽出

- 試料 4.0g
- 抽出液 36mL
 - ホモジナイズ 30sec.×3
 - 約 100 °C 水浴, 10min 加熱
 - 遠心分離 (800 ~ 1,000×g, 5min.)
 - 上澄み液
 - ろ過 (5 種 A)
 - ろ液
 - 遠心分離 (3,000×g, 10min.)
 - 上澄み液

ELISA

○ ELISA 操作

抗体固相化モジュール (キット付属)

- 試料溶液, 各標準溶液, 陽性対照溶液, 陰性対照溶液及び Blank 液 (抽出液) 各 100μL
- 2hr.反応
- 洗浄 (6 回)
- 酵素標識抗体溶液 100μL 添加
- 30min.反応
- 洗浄 (6 回)
- 酵素基質溶液 100μL 添加
- 10min.反応 (遮光条件下)
- 反応停止液 50μL 添加

測定 (プレートリーダー, 450 及び 620nm 波長)

2 結果及び考察

2.1 原料調査について

表 1 に示す飼料原料 15 点について測定値を確認した。

その結果、各測定実施時の測定値を、陰性対照溶液の測定値と比較したところ、なたねで比較的強い反応が見られた。また、豚由来肉骨粉については弱い交差反応性が見られたものの、他の原料は全て陰性対照溶液と比較し問題ない値を示した。

なお、豚由来肉骨粉 (米国産) については原料そのものについて測定した測定値であり、また牛由来肉骨粉 (1,000 倍希釈) の反応強度とは大きな差があった。このため、実際の配合飼料や飼料原料に対する混入試験においては問題が生じないものと考えられた。

表 1 飼料原料の測定値

	測定値	各測定実施時の陰性 対照溶液の測定値
とうもろこし	0.015	0.023
乾燥醤油油かす	0.023	0.023
なたね	0.047	0.023
綿実	0.025	0.023
大豆油かす	0.028	0.023
ごま油かす	0.027	0.023
ふすま	0.017	0.023
豚由来肉骨粉	0.103	0.023
魚粉	0.042	0.051
魚粉	0.060	0.052
チキンミール	0.047	0.052
アルファルファミール	0.041	0.039
マイロ	0.045	0.039
コーングルテンミール	0.041	0.039
米ぬか	0.064	0.039
牛由来肉骨粉 (1,000倍希釈)	0.488	

各数値は 2 ウェル平均の測定値

2.2 判定の基準について

平成 14 年度モニタリング調査において、PCR 試験では乳動物及び牛で陽性を示した配合飼料 22 点について、PCR 試験との整合性及び判定の基準を設定するため、当キットを用いて試験を実施した。その結果、陰性対照溶液の 2 倍以上の値を示したものを陽性と判定することで妥当な結果が得られると考えられた。

2.3 添加試験

牛用配合飼料 2 点及び魚粉 1 点を用い添加試験を行った。

それぞれに牛由来肉骨粉（オーストラリア産，以下同様）を無添加，0.05 及び 0.1w/w% 添加し試験を実施したところ，表 2 の結果が得られた。

表 2 牛由来肉骨粉の添加試験

添加濃度	乳用牛飼育用	肉用牛肥育用	魚粉	陰性対照
無添加	0.054	0.042	0.043	0.028
0.05%	0.095	0.075	0.071	0.028
0.1%	0.104	0.089	0.103	0.028
Blank	0.038	0.036	0.036	0.021

各数値は 2 ウェル平均の測定値

その結果、各データを陰性対照溶液の測定値の 2 倍値 (=0.056) と比較すると、各試料とも 0.05% 添加で検出 (=陽性判定可) 可能であった。しかしながら、今後、Blank 値が試験ごとに若干上下することも考えられること、また、今回のように陰性対照の値がやや低めとなる可能性もあり、検出可能ラインは 0.1% 程度が妥当と考えられた。

2.4 ELISA Technologies 社の加工肉種判別キットとの比較

現在、動物質性飼料原料などの試験に使用している ELISA Technologies 社の ELISA-TEK 加工肉種判別キット^{2),3)} との比較試験を行った。

まず、魚粉及びチキンミール各 1 種類毎にそれぞれ牛由来肉骨粉を 0.1w/w% 添加した試料を用い両キットで試験を行った。

その結果は表 3-1 のとおりで、「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット」では両試料について牛由来たん白質を検出 (陽性判定) したが、「ELISA-TEK 加工肉種判別キット (BEEF 用)」では両試料ともに牛由来たん白質を検出しなかった (陰性判定)。

表 3-1 牛由来肉骨粉の添加試験 (魚粉及びチキンミール)

	魚粉		チキンミール	
	モリナガ キット	ELISA -TEK	モリナガ キット	ELISA -TEK
無添加	-	-	-	-
0.1% 添加	+	-	+	-

次に、牛用配合飼料 2 種類を用い、それぞれ牛由来肉骨粉を 0.1, 0.3 及び 1w/w% 添加した試料を用い両キットで試験を行った。

その結果は表 3-2 のとおりで、「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット」では両試料について 0.1w/w% 以上添加で牛由来たん白質を検出 (陽性判定) したが、「ELISA-TEK 加工肉種判別キット (BEEF 用)」では両試料ともに 1w/w% 添加の範囲まで牛由来たん白質を検出しなかった (陰性判定)。

表 3-2 牛由来肉骨粉の添加試験 (配合飼料)

添加濃度	配合飼料 A		配合飼料 B	
	モリナガ キット	ELISA -TEK	モリナガ キット	ELISA -TEK
無添加	-	-	-	-
0.1%	+	-	+	-
0.3%	+	-	+	-
1%	実施せず	-	実施せず	-

これらの結果により、「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット」は牛由来たん白質の検出において「ELISA-TEK 加工肉種判別キット (BEEF 用)」と同等又はそれ以上の性能を示すと考えられた。

2.5 共同試験

本キットによる試験法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

まず、市販の肉牛肥育用配合飼料、魚粉及びチキンミールに、牛由来肉骨粉（オーストラリア産）をそれぞれ 0.1w/w% 添加した試料を用いて、独立行政法人肥飼料検査所札幌事務所、仙台事務所、名古屋事務所、大阪事務所、福岡事務所及び本部（6 試験室）において本試験法に従って予備試験を実施した。その結果、何ら問題となる事項は認められなかったため、共通試料による共同試験を実施した。

市販の肉牛肥育用配合飼料に牛由来肉骨粉（オーストラリア産）を 0.1w/w% 添加した試料、及び市販の魚粉に牛由来肉骨粉（オーストラリア産）を 0.2w/w% 添加した試料を用いて、全国（農協連）飼料畜産中央研究所、協同飼料（株）中央分析センター、全国酪（農協連）分析センター、日本配合飼料（株）中央研究所、日本農産工業（株）研究開発センター、丸紅飼料（株）技術研究所、（財）日本食品分析センター、（財）日本穀物検定協会中央研究所、（社）日本海事検定協会理化学分析センター、（社）日本科学飼料協会及び農林水産省動物検疫所（11 試験室）において本試験法に従って共同試験を実施した。

結果は表 4（試験室 No.1～11）のとおりで、11 試験室中 2 試験室（No.6 及び 7）において牛由来肉骨粉無添加の肉牛肥育用配合飼料で偽陽性を示した。この原因の詳細については不明である。なお、後日同 2 試験室で同一方法で実施した再試験についても、同様の結果であった。

この結果を受けて、試験室数を増やしてさらに検証を行うため、共同試験の追加実施を行った。

前回と同一の試料を用いて、東京都家畜保健衛生所肥飼料検査センター、埼玉県中央家畜保健衛生所、（財）食品環境検査協会及び（財）日本冷凍食品検査協会横浜事業所（4 試験室）において本試験法に従って共同試験を実施した。

結果は表 4（試験室 No.12～15）のとおりで、No.15 の試験室で肉牛肥育用配合飼料において偽陰性と思われる結果を示した。この原因については、陰性対照溶液の測定値が通常より高く測定されたことが要因と考えられた。このため、本キットの試験の成立条件に、陰性対照溶液の平均測定値がブランク値の 2 倍未満となることを追加した。なお、後日再試験を実施した結果、当該試験室については添加試料について通常どおり陽性判定を示した。

表 4. 共同試験結果

試験室 No.	肉牛肥育用配合飼料		魚 粉	
	無添加	0.1%	無添加	0.2%
1	— (—)	+	—	+
2	—	+	—	+
3	—	+	—	+
4	—	+	—	+
5	—	+	—	+
6	+	+	—	+
7	+	+	—	+
8	—	+	—	+
9	—	+	—	+
10	—	+	—	+
11	—	+	—	+

12	—	+	—	+
13	—	(+)	(—)	+
14	—	+	—	+
15	—	—	—	—

2点平行実施のそれぞれの結果を示している（+は陽性判定，—は陰性判定を示す）

*（ ）内については，試験不成立（測定結果の変動係数が20%以上）のため参考結果

3 まとめ

以上の調査結果より，本試験法は牛用配合飼料中の牛由来たん白質の検出に十分適用可能であると考えられた。

謝 辞

共同試験の実施にご協力いただいた全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所，協同飼料株式会社中央分析センター，全国酪農業協同組合連合会分析センター，日本配合飼料株式会社中央研究所，日本農産工業株式会社研究開発センター，丸紅飼料株式会社技術研究所，財団法人日本食品分析センター，財団法人日本穀物検定協会中央研究所，財団法人食品環境検査協会，財団法人日本冷凍食品検査協会横浜事業所，社団法人日本海事検定協会理化学分析センター，社団法人日本科学飼料協会，東京都家畜保健衛生所肥飼料検査センター，埼玉県中央家畜保健衛生所及び農林水産省動物検疫所に感謝の意を表します。

PCR による飼料中の動物由来 DNA の検出

草間豊子*¹, 門脇光一*²

平成 13 年 9 月, 国内で初めて牛海綿状脳症 (BSE) が発生したことから, 牛用配合飼料への肉骨粉等動物由来たん白質の混入防止対策を強化することが緊急の課題とされ, 混入を確認するための検査手法の確立が求められた. 牛用配合飼料中の肉骨粉の検査は, 従来から顕微鏡鑑定により実施されてきたが, この方法では骨以外の組織の検出及び動物種の識別ができないこと等の問題があったことから, 顕微鏡鑑定を補完する手法として, PCR による動物由来 DNA の検出・動物種の識別法の開発を行った.

PCR による動物由来 DNA の検出法としては, Tartaglia ら¹⁾, 松永ら²⁾ 及び Wang ら³⁾ の報告があるが, Tartaglia ら及び Wang らの検出対象動物は牛のみであり, 松永らの報告は食肉等加工食品を対象とした肉種識別であった. そこで, 筆者らは, 配合飼料を対象としてほ乳動物及び反すう動物由来 DNA を効率的に検出するためのプライマーを開発⁴⁾ し, 配合飼料中の動物由来 DNA の抽出法について検討した.

今回, 配合飼料中の動物由来 DNA の抽出法について, ビーズ破碎後ミトコンドリア抽出キットを用いる方法で良好な成績が得られたので, その概要を報告する.

実験方法

1 試料

オーストラリア産の牛由来肉骨粉及び動物質性飼料を含まない市販の乳用牛肥育用配合飼料をそれぞれ 0.5mm の網ふるいを通すまで粉碎した後, この配合飼料に肉骨粉を添加混合して肉骨粉を 10, 1, 0.1, 0.01 及び 0.001 (w/w) % (現物重) 含む試料を調製した.

2 試薬

水は, Milli-Q 等で比抵抗値 17M Ω /cm まで精製した超純水を高圧蒸気滅菌 (121 $^{\circ}$ C, 15 分間) したものをを用い, 試薬は, 特記するもの以外は試薬特級を用いた.

1) 組織・細胞用ミトコンドリア DNA 抽出キット:

mtDNA エキストラクター CT キット (和光純薬)

2) 0.5M EDTA 溶液

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (Sigma) 18.6g を水 60mL に加え, 水酸化ナトリウム (粒状) 約 2g を加えて溶かし, pH8.0 に調整した後, 水を加えて 100mL とし, 121 $^{\circ}$ C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.

3) TAE 緩衝液

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 24.2g, 酢酸 5.7mL 及び 0.5M EDTA 溶液 10mL を水に溶かして 100mL とし, 50 倍濃度の TAE 緩衝液を調製し, 必要に応じて水で 50 倍に希釈して調製した.

4) TE 緩衝液 pH8.0 (日本ジーン)

*¹ 肥飼料検査所本部, *² 農業生物資源研究所

- 5) 2.5%及び1.0%アガロースゲル
高純度アガロース（電気泳動用）（株式会社テクノゾー）2.5g 又は 1.0g を TAE 緩衝液 100mL に加え、加熱して溶かし、50～60℃に冷却させた後、ゲルの厚さが3～4mmになるようゲル形成型に流し込み固化させた。
- 6) DNA サイズマーカー：100bp マーカー（宝酒造）及び λ Hind III（宝酒造）
- 7) 泳動用色素溶液：DNA サイズマーカーに添付
- 8) 臭化エチジウム溶液
臭化エチジウム（電気泳動用 sigma）10mg を水 1mL に溶かして臭化エチジウム原液を調製し、使用時にこの原液 5 μ L を TAE 緩衝液 100mL に溶かした。
- 9) ジルコニアビーズ
YTZ ボール（径 1.5mm, ニッカトー）を 121℃で 15 分間高圧蒸気滅菌した。
- 10) プライマー
当所配布のほ乳動物検出プライマー[anicon5, anicon3]（検出バンドサイズ 176bp）及び牛検出プライマー[cow52, cow31]（検出バンドサイズ 126bp）を用いた。
- 11) PCR 反応用酵素
Ampli Taq Gold (Applied Biosystems), PCR 用緩衝液は PCR Gold buffer (Applied Biosystems) を使用。
- 12) PCR 反応液
PCR チューブ（容量 200 μ L）1 本あたり、水 4.7 μ L, 10 \times PCR Gold buffer 2.0 μ L, 2mM dNTP mix 2.0 μ L, 25mM MgCl₂ 1.2 μ L, 2 μ M プライマー（3'及び5'）各 4.0 μ L 及び PCR 反応用酵素 0.1 μ L（0.5unit）となるよう混合し、18 μ L を分注した。
- 13) 牛由来 DNA 溶液
微粉碎した牛肉 100mg を用い、4 1) に従い牛由来 DNA を抽出した。

3 装置及び器具

- 1) サーマルサイクラー：Applied Biosystems 製 PE9700
- 2) ビーズ破碎装置：セントラル科学貿易製 BC-20
- 3) オートクレーブ：アルプ製 KT-2322
- 4) 電気泳動装置：コスモバイオ製 Mupid-2
- 5) 画像撮影装置：アトー製 AE-6911CX
- 6) 高速冷却遠心機：HITACHI 製 Himac CT13R
- 7) 微量遠心濃縮器：TOMY 製 Micro Vac MV-100
- 8) マイクロピペット：ギルソン製 P20, P100, P200, P1000 及びエッペンドルフ製 リファレンス 4910 クリスタル

4 試験方法

1) mtDNA 抽出キットによる DNA の抽出

試料 100mg をプラスチック製ねじロチューブ（容量 2mL）に採取し、ジルコニアビーズ 1.5g を入れ、抽出用緩衝液（mtDNA 抽出キットに添付）1mL を正確に加えて、ビーズ破碎装置を用いて、2,000rpm で 1 分間振とうした。1 分間静置した後、再度 2,000rpm で 1 分間振とうし、1,000 \times g で 2 分間遠心分離（4℃）した。この上清 1mL 程度を 1.5mL のプラスチック製遠心沈殿管に採取し、以下、キットの使用方法に従って DNA を抽出した。

抽出した DNA を、微量遠心濃縮器で減圧乾燥し、TE 緩衝液 20 μ L を加えて溶かして DNA 原液を調製し、冷凍保存した。この DNA 原液を、水で 10 倍に希釈し PCR に供する DNA 溶液を調製した。

2) フェノールクロロホルム法による DNA の抽出

試料 50mg を 1.5mL のプラスチック製遠心沈殿管に量り、抽出用溶解液²⁾ (100mM Tris-HCl (pH9.0), 10mM NaCl, 5mM EDTA, 1%SDS) 600 μ L を加えて 30 分間緩やかに振とうした後、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1) 600 μ L を加えて 20 分間振とうし、以下松永らの報告²⁾に従って、抽出した。

3) PCR

PCR 反応液 18 μ L を入れた PCR チューブに、それぞれ抽出 DNA 溶液 2 μ L, 牛由来 DNA 溶液 2 μ L 及び水 2 μ L を加え、PCR 反応用の試料液、陽性コントロール液及び陰性コントロール液を調製した。

これらの PCR チューブをサーマルサイクラーに入れ、95 $^{\circ}$ C 9 分間→[92 $^{\circ}$ C 30 秒間→55 $^{\circ}$ C 30 秒間→72 $^{\circ}$ C 30 秒間] (45 サイクル) →72 $^{\circ}$ C 5 分間の反応条件で PCR 反応を行った。

TAE 緩衝液を入れた電気泳動槽に 2.5%アガロースゲルを入れ、PCR 反応産物 5 μ L 及び DNA サイズマーカー 5 μ L をそれぞれ泳動用色素溶液 1 μ L と混合し、ゲルのスロットに注入し、100V 定電圧 20 分間程度電気泳動を行った。泳動後のゲルを臭化エチジウム溶液に約 30 分間浸し染色した後、画像撮影装置で泳動写真を撮影した。

結果及び考察

1 DNA 抽出方法の検討

PCR 法により配合飼料中の肉骨粉等動物質性飼料を検出するため、肉骨粉中の動物由来 DNA の抽出法について検討した。松永ら²⁾の報告では、フェノールクロロホルム法により加工食肉中の DNA 抽出が良好であったことから、肉骨粉及び肉骨粉を 10%、1%、及び 0.1%添加した配合飼料を用い、フェノールクロロホルム法により DNA を抽出した。

抽出した DNA について、サイズマーカーとして λ Hind III を用い、1%アガロースゲル電気泳動を行った。その結果は、Fig.1 のとおり、肉骨粉では、500bp 以下の短鎖 DNA が多く検出され、肉骨粉添加配合飼料では、植物由来と推測される 23kbp の長鎖 DNA が主に検出された。これは、肉骨粉では製造時の高温高压加熱処理により、DNA が切断されていることが一因と考えられた。

このことからフェノールクロロホルム法で肉骨粉添加配合飼料の DNA を抽出した場合、抽出 DNA に占める動物由来 DNA の割合は植物由来 DNA に比べて低いと推察された。

そこで、ミトコンドリア DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出した結果、長鎖の核ゲノム DNA が除去され、短鎖 DNA が多く抽出された。

さらに myDNA 抽出キット法の試料の前処理に、ビーズ破碎によるホモジナイズを実施した結果、配合飼料中の DNA の抽出率が向上した。

2 検出感度

肉骨粉を 10%、1%、0.1%、0.01%及び 0.001 %含む試料を用い、フェノールクロロホルム法及び mtDNA 抽出キット法によって DNA を抽出し、ほ乳動物検出プライマー及び牛検出プライマーを用いて PCR を行った。その結果、フェノールクロロホルム法の肉骨粉の検出感度は、1%であったのに対し、mtDNA 抽出キット法では 0.01 %と良好な検出感度が得られた。

肉骨粉添加配合飼料からの抽出DNA^{注)}

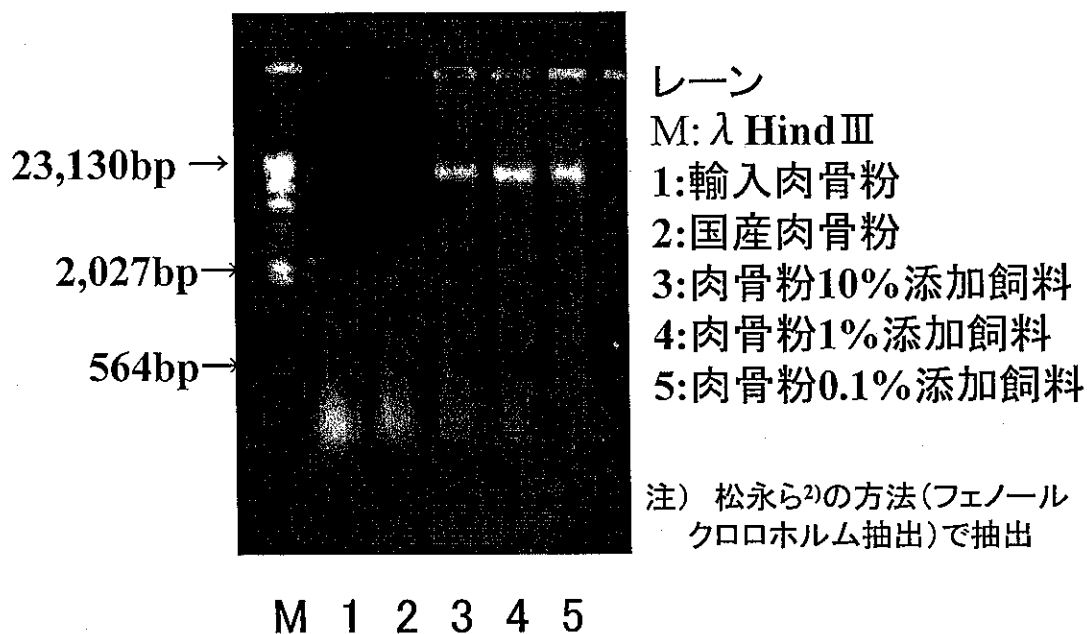


Fig.1 肉骨粉添加配合飼料から抽出したDNAの泳動写真

謝 辞

食肉のDNA抽出法について御指導いただきました農業技術研究機構畜産草地研究所 千国幸一室長に謝意を表します。

文 献

- 1) M. Tartaglia, E. Saulle, S. Pestalozza, L. Morelli, G. Antonucci, and P. A. Battaglia ; Journal of Food Protection 61 (5),513(1998)
- 2) T. Matsunaga, K. Chikuni, R. Tanabe, S. Muroya, K. Shibata, J. Yamada and Y. Shinmura ; Meat Science 51,143(1999)
- 3) R-F. Wang, M.J. Myers, W. Campbell, W-W. Cao, D. Paine and C.E. Cerniglia ; Molecular and Cellular Probes 14,1(2000)
- 4) 特許出願中