

# LAMP 法等によるさば加工品の原料原産地判別法の開発

江木 智宏<sup>1</sup>, 平野 未佳<sup>1</sup>, 高島 令王奈<sup>2</sup>

EGI Tomohiro, HIRANO Mika, TAKABATAKE Reona

## 要約

さば加工品について、DNA 分析による簡易迅速な原料原産地判別法を検討した。DNA の増幅には簡易な装置で実施可能な LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法を、DNA の検出には装置が不要な C-PAS (Chromatography Printed-Array Strip) 法を用いる判別法を設計した。設計した判別法を用いて生鮮さば及びさば加工品合計 52 点を判別した結果、陰性試料の正答率は 95.9 %、陽性試料の正答率は 100 %であった。また、7 試験室に未知試料を 12 点ずつ配付して共同試験を行った結果、試験操作が問題なく行われた 6 試験室が 12 点全てを正しく判別した。以上の結果から、さば加工品の簡易迅速な原料原産地判別法を開発できたと考えられた。

## 1. はじめに

さばは古くから日本人に食されている重要な水産資源であり、鮮魚のほか干物等の加工品としても需要がある。わが国におけるさば類の漁獲量は約 26 万トン<sup>1)</sup>、わが国に輸入されるさばの輸入量は約 8 万トンで、このうち約 99 %がヨーロッパからの輸入である<sup>2)</sup>。食品表示法 (平成 25 年法律第 70 号) に基づき定められた食品表示基準 (平成 27 年内閣府令第 10 号) では、輸入品を除く全ての加工食品に対して原料原産地表示を義務づけており、さば加工品に使用される原料さばについても、「国産品にあつては国産である旨を、輸入品にあつては原産国名を表示する。」と定められている。

国内で流通するサバ属の魚類は、マサバ (*Scomber japonicus*)、ゴマサバ (*S. australasicus*) 及びタイセイヨウサバ (*S. scombrus*) の 3 種が知られており、わが国ではマサバ又はゴマサバが漁獲される<sup>3)</sup>。一方、タイセイヨウサバは大西洋に生息しており<sup>4)</sup>、ヨーロッパから輸入されるサバの大部分はタイセイヨウサバであると考えられる。これら 3 種は形態的特徴により判別が可能であるが、加工品においては判別が困難な場合が多い。このため、さば加工品の原料原産地表示が適正であるかどうかを確認する手法が必要とされている。これまでに、PCR-RFLP 法によるさば加工品の原料原産地判別法 (以下「従来法」という。) が報告されている<sup>4)</sup>。従来法では、試料から抽出した DNA を鋳型として、サバ属魚類のミトコンドリア DNA の特定領域に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物を制限酵素で処理し、DNA 断片長パターンの違いにより魚種の判別及び原料原産地の推定を行う。従来法には、PCR で使用するサーマルサイクラー、電気泳動で使用する撮影装置等、DNA 分析専用の装置が必要であり、実施可能な試験室に限られる。また、試料からの DNA 抽出後に DNA の精製を行うため時間がかかる等の問題がある。

<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

<sup>2</sup> 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門

一方で、試料から簡易迅速に DNA を抽出可能な試薬が市販されている。また、PCR 法と異なり等温条件下で DNA 増幅が可能な LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法や、目視により DNA 増幅の有無を確認可能な C-PAS (Chromatography Printed-Array Strip) 法が報告されている<sup>5)</sup>。これらを利用して判別法を簡易迅速化できれば、検査の効率化が期待できる。

本研究では、簡易抽出法、LAMP 法及び C-PAS 法を組み合わせ、簡易迅速なさば加工品の原料原産地判別法を検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

市販の生鮮さば及びさば加工品 52 点 (表 1) について、従来法によりサバ属魚類のミトコンドリア DNA の tRNA-Leu (CUN) 遺伝子領域の一部から NADH dehydrogenase subunit5 (ND5) 遺伝子領域の一部にまたがる領域に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物の塩基配列を国際塩基配列データベース (the International Nucleotide Sequence Databases) の塩基配列と比較することで種を推定し、分析試料として用いた。

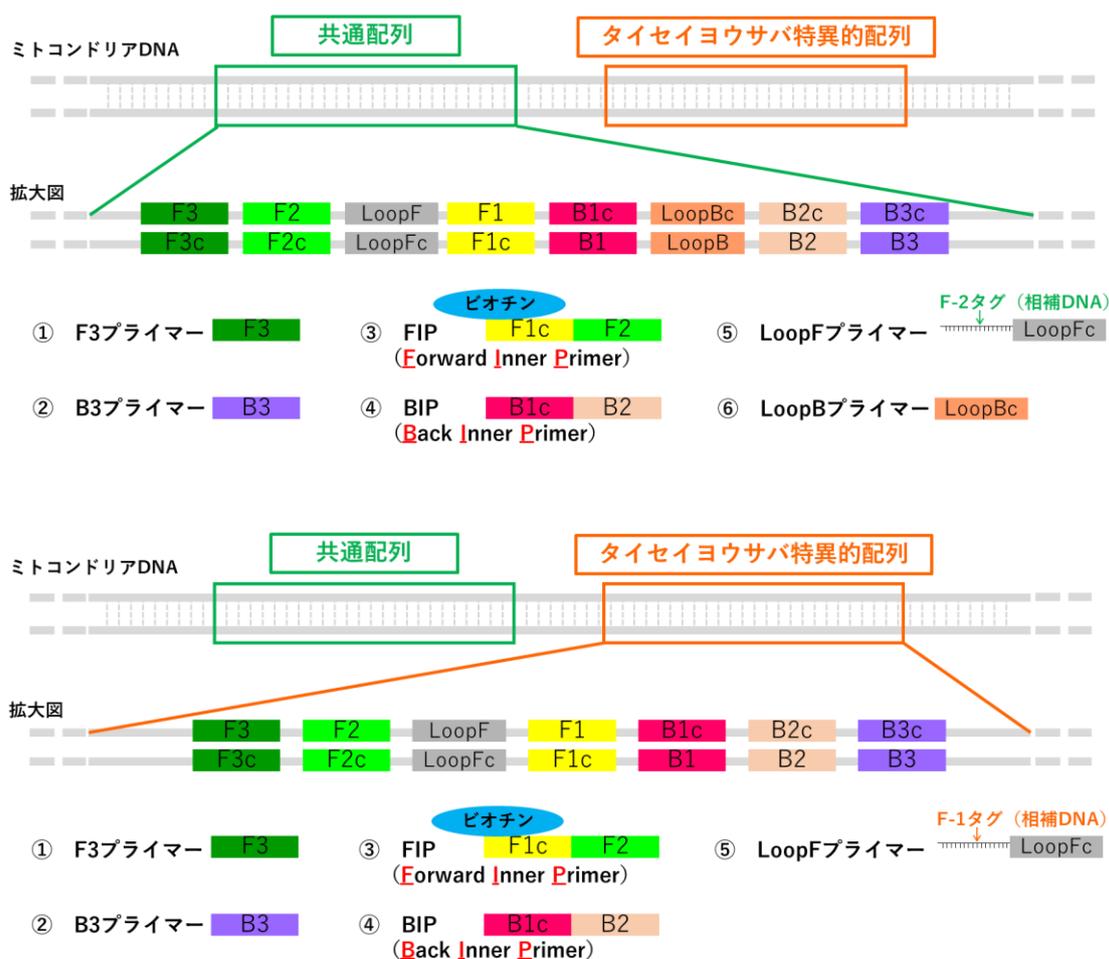
表 1 試料の内訳

|          | 生鮮 | 加工 |     |      |                        | 合計 |
|----------|----|----|-----|------|------------------------|----|
|          |    | 干物 | 塩さば | しめさば | その他                    |    |
| マサバ      | 0  | 6  | 9   | 5    | くん製×1、ぬか漬×1、煮魚(レトルト)×1 | 23 |
| ゴマサバ     | 7  | 1  | 1   | 3    | さば節×2                  | 14 |
| タイセイヨウサバ | 2  | 5  | 3   | 1    | 味噌煮×2、塩焼き×1、照焼き×1      | 15 |
| 合計       | 9  | 12 | 13  | 9    | 9                      | 52 |

### 2.2 新規判別法の検討

#### 2.2.1 LAMP プライマーの設計

本検討の目的は、さばの産地判別であることから、サバ属魚類 3 種について、タイセイヨウサバと他の 2 種を判別する方法を検討した。ミトコンドリア DNA のうち、サバ 3 種で同じ塩基配列を多く含む「共通配列」について、この配列中の 8 つの領域 (F1、F2、F3、B1、B2、B3、LoopF 及び LoopB) を基にプライマーを設計した (図 1)。また、3 種のうちタイセイヨウサバのみ異なる塩基配列を多く含む「タイセイヨウサバ特異的配列」について、この配列中の 7 つの領域 (F1、F2、F3、B1、B2、B3 及び LoopF) を基にプライマーを設計した (図 1)。プライマーの設計には LAMP プライマー設計ソフトウェア「PrimerExplorer V5」(富士通 Japan)<sup>6)</sup> を用いた。タイセイヨウサバ特異的配列のプライマー設計に当たっては、タイセイヨウサバのみ異なる塩基配列が、LAMP 反応で DNA 合成の起点となる F1 領域及び B1 領域と重なるようにした。また、C-PAS 法による検出のために FIP の 5' 末端にビオチンを、LoopF プライマーの 5' 末端にタグ DNA (F-1 又は F-2) を付加した。LAMP プライマーには逆相カラムで精製されたオリゴ DNA (5' 末端修飾なしの場合はファスマック、5' 末端修飾ありの場合は TBA) を用いた (表 2)。



c : complementaryの頭文字

図 1 LAMP プライマーの模式図

表 2 LAMP プライマーの配列

| プライマー名        | 5'末端修飾     | 配列 (5'→3')   |
|---------------|------------|--|
| 共通配列          | FIP        | ビオチン AGGGAGAAGATAATGATTAGGCTTGAATCCAAGTAGCAGCTAATGAC   |
|               | BIP        | GCCTACCCCGTATTTACAACCTTGACTTGTGTAACCTGCTCAG            |
|               | F3プライマー    | CTTAGGAACCCAGAACTCTTG                                  |
|               | B3プライマー    | AATGCCAGTTTAACCGCA                                     |
|               | LoopFプライマー | F-2タグ GTTATTGTTACGGAGGTGG                              |
|               | LoopBプライマー | AGCCCAAGCCCTA  |
| タイセイヨウサバ特異的配列 | FIP        | ビオチン TTCAAGAATAGATCATGTCACGTAGAGTTTTGACGTCAAATCAGCCTTA |
|               | BIP        | TATGCATGCCGACCCCTACACTAGAATAATCATAGCGATGAGG            |
|               | F3プライマー    | TGGAAGTGAATAAATACCCCTCA                                |
|               | B3プライマー    | AGTTGAAACATGTTGTTTGCT                                  |
|               | LoopFプライマー | F-1タグ GTAAAATAATCGAGTAGTGGTCA                          |

## 2.2.2 試料採取及びDNA抽出

さば肉片の表面を避けた内部の組織から 10~25 mg を採取した。DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いた従来法による DNA 抽出の場合は、試料を採取したチューブに Buffer ATL を 180 µL、Proteinase K 溶液を 20 µL 添加し、試料が溶解するまで 56 °C で加温した後、RNaseA 溶液 (QIAGEN) を 4 µL 添加して室温で 2 分間静置した。Buffer AL 及びエタノール (99.5) (富

士フィルム和光純薬) を 200  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、溶液全量を DNeasy Mini spin column に負荷して室温、6,000  $\times g$  で 1 分間遠心した。ろ液を廃棄し、Buffer AW1 を 500  $\mu\text{L}$  負荷して室温、6,000  $\times g$  で 1 分間遠心した。ろ液を廃棄し、Buffer AW2 を 500  $\mu\text{L}$  負荷して室温、20,000  $\times g$  で 3 分間遠心した。DNeasy Mini spin column を新しいチューブに設置し、Buffer AE を 200  $\mu\text{L}$  負荷して室温で 1 分間静置した後、室温、6,000  $\times g$  で 1 分間遠心した。再度 Buffer AE を 200  $\mu\text{L}$  負荷して室温で 1 分間静置した後、室温、6,000  $\times g$  で 1 分間遠心し、溶出液を DNA 抽出液とした。簡易 DNA 抽出試薬 Template Prepper for DNA (ニッポンジーン) を用いた DNA 抽出の場合は、試料を採取したチューブに Template Prepper A 及び Template Prepper B を 50  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、ブロック恒温槽を用いて 95  $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間加温し、氷上で 2 分間冷却した。卓上小型遠心機を用いて室温、5,000  $\times g$  で 5 分間遠心し、上清 50  $\mu\text{L}$  をチューブに採取し DNA 抽出液とした。

### 2.2.3 LAMP 反応及び蛍光検出

設計したプライマーでタイセイヨウサバを判別可能かどうか確認するために、マサバ、ゴマサバ及びタイセイヨウサバの試料を 1 点ずつ供試した。LAMP 反応には 2 $\times$  LAMP MASTER (ニッポンジーン) を用いた。LAMP 溶液は、最終濃度が 1 $\times$  LAMP MASTER、FIP 及び BIP については 1.6  $\mu\text{mol/L}$ 、F3 及び B3 については 0.2  $\mu\text{mol/L}$ 、LoopF 及び LoopB については 0.8  $\mu\text{mol/L}$  となるように混合し、これに DNeasy Blood & Tissue Kit による DNA 抽出液を 2  $\mu\text{L}$  添加して全量 25  $\mu\text{L}$  とした。共通配列とタイセイヨウサバ特異的配列の LAMP 溶液は別々に調製した。等温増幅蛍光測定装置 Genie<sup>®</sup> III (OptiGene) (右写真) を用いて 65  $^{\circ}\text{C}$  で 60 分間の LAMP 反応を行い、続いて 80  $^{\circ}\text{C}$  以上で 5 分間加温して反応を停止させた。解析ソフトウェア上で蛍光検出の有無を確認した。次に、他の加工品でもタイセイヨウサバ特異的配列が検出されるかどうかを確認するために、タイセイヨウサバ試料を 12 点追加分析した。



写真 等温増幅装置

### 2.2.4 簡易法の検討

より多くの試験室で実施可能な判別法にするために、判別法の簡易化を検討した。DNeasy Blood & Tissue Kit による DNA 抽出は操作が煩雑であるため、DNA の簡易抽出法を検討した。また、試薬コスト削減のため、LAMP 反応液の量を 25  $\mu\text{L}$  から 10  $\mu\text{L}$  に変更した。さらに、LAMP 反応の増幅産物を蛍光検出する場合は等温増幅蛍光測定装置が必要であることから、装置が不要な方法 (ブロック恒温槽 (右写真) による LAMP 反応及び C-PAS 法による検出) を検討した。C-PAS は DNA 検出用の試験紙で、あらかじめタグ DNA (F-1 及び F-2) が固定されている。LAMP プライマーにタグ DNA と相補的な配列 (相補 DNA) を付加して LAMP 反応を行うと、増幅産物に相補 DNA が取り込まれる。青色色素を含む C-PAS 反应用試薬に LAMP の増幅産物を添加して C-PAS 上に展開すると、タグ DNA と相補 DNA が結合し、青いラインが検出される (図 2)。



写真 ブロック恒温槽

まず、2.2.3 で用いたマサバ、ゴマサバ及びタイセイヨウサバの試料各 1 点について、C-PAS 法による検出が可能かどうかを確認した。C-PAS 反応にはラテックス液、クロマト展開液 (0 mmol/L 及び 300 mmol/L) 及び C-PAS (TBA) を用いた。試料 1 点につきラテックス液 1  $\mu$ L、クロマト展開液 (0 mmol/L) 5  $\mu$ L、クロマト展開液 (300 mmol/L) 5  $\mu$ L 及び滅菌水 10  $\mu$ L をチューブに混合した後、LAMP 反応液を 2  $\mu$ L 添加し、これに C-PAS を浸して 10 分間静置した。C-PAS を取り出して室温で 30 分間乾燥させ、青いラインの有無を確認した。

次に、判別法を簡易化すると増幅効率や検出感度が悪くなると予想されたため、簡易法の検討では、タイセイヨウサバの試料が全て検出されるよう、2.2.3 で検出が遅かったタイセイヨウサバ試料 2 点 (干物) を供試した。LAMP 溶液の各試薬の最終濃度は 2.2.3 と同じとした。ただし、DNA 抽出液として Template Prepper for DNA による DNA 抽出液を 1  $\mu$ L 添加し、全量は 10  $\mu$ L とした。LAMP 反応中に反応液が蒸発するのを防止するために、ミネラルオイル (富士フィルム和光純薬) を 20  $\mu$ L 重層し、ブロック恒温槽 MD-MINI (アズワン) を用いて 65  $^{\circ}$ C で 60 分間の LAMP 反応を行い、続いて 80  $^{\circ}$ C 以上で 5 分間加温して反応を停止させた。次に、上述の手順で C-PAS 法による検出を行った。ただし、共通配列及びタイセイヨウサバ特異的配列の LAMP 反応液を 2  $\mu$ L ずつ同じチューブに添加した。

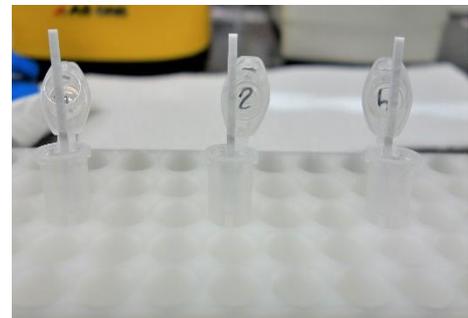
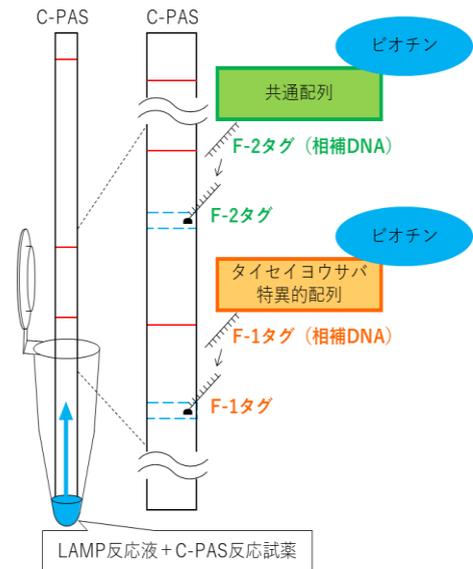


図 2 C-PAS 法の模式図及び実施の様子

### 2.3 新規判別法の性能評価

全試料 52 点について、簡易法により試料採取から判別までを 2 回繰り返し行った。共通配列のラインが検出された場合に試験成立とし、さらにタイセイヨウサバ特異的配列のラインが検出された場合は「タイセイヨウサバ」、タイセイヨウサバ特異的配列のラインが検出されなかった場合は「マサバ又はゴマサバ」と判別した。得られた判別結果から新規判別法の正答率を算出した。

### 2.4 複数試験室による共同試験

7 試験室による共同試験を実施した。陰性試料 (マサバ試料) 6 点及び陽性試料 (タイセイヨウサバ試料) 6 点にランダムな試料番号を付け、各試験室に配付した。各試験室は、配付された試料 12 点を用いて簡易法により DNA 抽出から判別までを行った。なお、LAMP 反応においてはネガティブコントロール (DNA 抽出液の代わりに滅菌水を添加したもの) 及びポジティブコントロール (筆者らが配付したタイセイヨウサバの DNA 抽出液を添加したもの) を 1 点ずつ実施した。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 新規判別法の検討

##### 3.1.1 LAMP 反応及び蛍光検出

マサバ、ゴマサバ及びタイセイヨウサバ試料各 1 点の蛍光検出結果を図 3 に示す。共通配列については、3 種とも LAMP 反応開始後 10 分程度で検出された。タイセイヨウサバ特異的配列については、マサバ及びゴマサバでは検出されず、タイセイヨウサバでは LAMP 反応開始後 20 分程度で検出された。この結果から、設計したプライマーを用いればタイセイヨウサバを判別可能であることが示唆された。また、共通配列の方がタイセイヨウサバ特異的配列より早く検出されたことから、増幅効率が良いと考えられた。

タイセイヨウサバの追加試料 12 点の結果を図 4 に示す。12 点のうち 2 点（干物）については、検出されるまでに 20 分以上を要したが、12 点全てが LAMP 反応開始後 30 分以内に検出された。この結果から、新規判別法は加工品にも適用可能であることが示唆された。

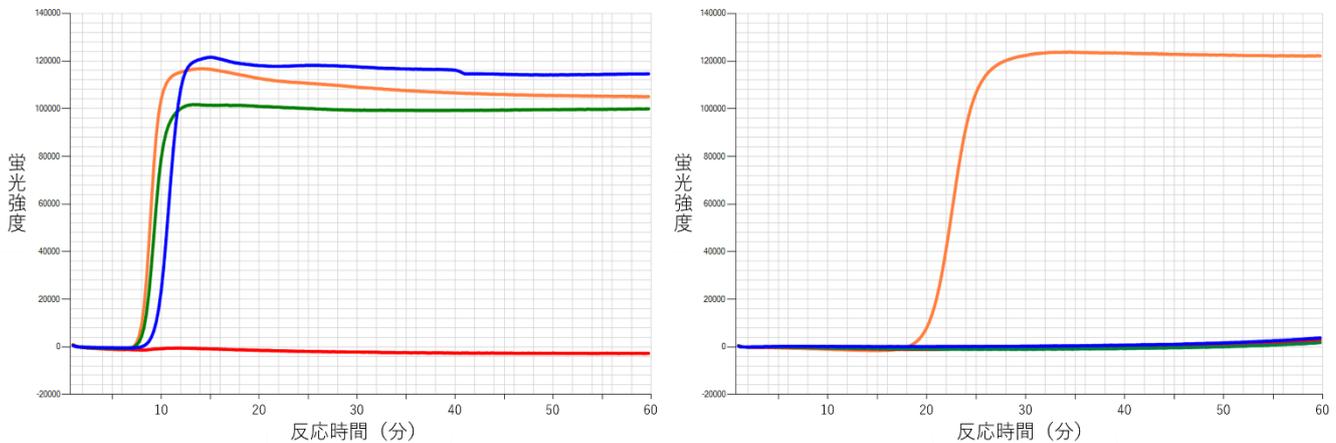


図 3 蛍光検出結果（サバ 3 種各 1 点）

左のグラフ：共通配列の検出結果

右のグラフ：タイセイヨウサバ特異的配列の検出結果

赤：ネガティブコントロール、青：マサバ、緑：ゴマサバ、オレンジ：タイセイヨウサバ

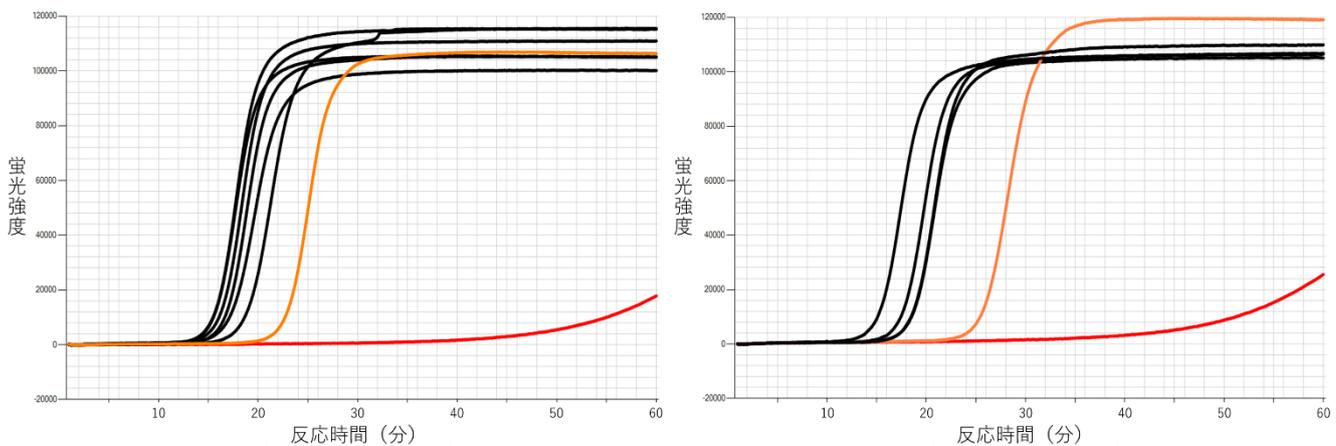


図 4 蛍光検出結果（タイセイヨウサバ試料 12 点）

試料 12 点全てを同時に実施できないため、2 回に分けて実施した。12 点中 2 点（干物）

については検出されるまでに 20 分以上を要した（オレンジの増幅曲線）。

赤：ネガティブコントロール、黒及びオレンジ：タイセイヨウサバ

### 3.1.2 簡易法の検討

2.2.3 で用いたマサバ、ゴマサバ及びタイセイヨウサバの試料各 1 点について C-PAS 法による検出を行った結果を図 5 に示す。共通配列については、3 試料ともラインが検出された。タイセイヨウサバ特異的配列については、タイセイヨウサバのみラインが検出され、マサバ及びゴマサバではラインが検出されなかった。この結果から、C-PAS 法による検出は可能であることが示唆された。

3.1.1 において検出が遅かったタイセイヨウサバ試料 2 点について、簡易法により分析した結果を図 6 に示す。2 点とも共通配列及びタイセイヨウサバ特異的配列の両方のラインが検出された。この結果から、3.1.1 においてこれらの試料よりも早く検出された試料についても簡易法で検出されると考えられた。

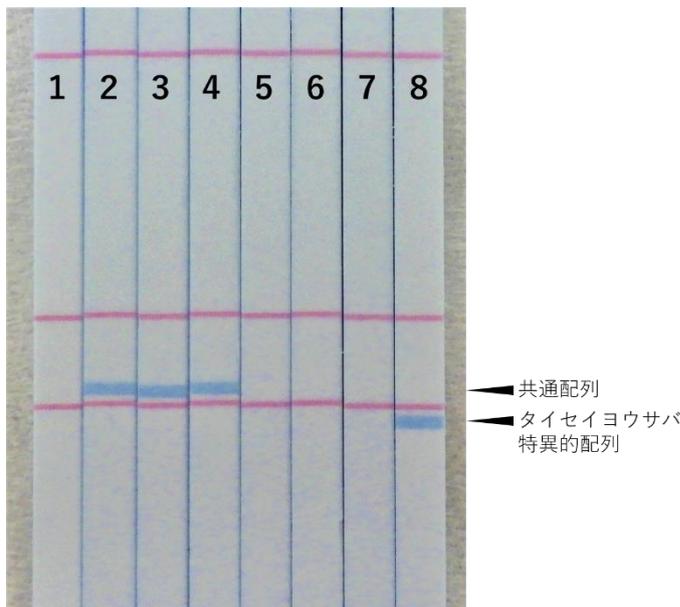


図 5 C-PAS 法による検出結果  
(サバ 3 種各 1 点)

- 1~4: 共通配列の検出結果  
5~8: タイセイヨウサバ特異的配列の検出結果  
1 及び 5: ネガティブコントロール  
2 及び 6: マサバ  
3 及び 7: ゴマサバ  
4 及び 8: タイセイヨウサバ

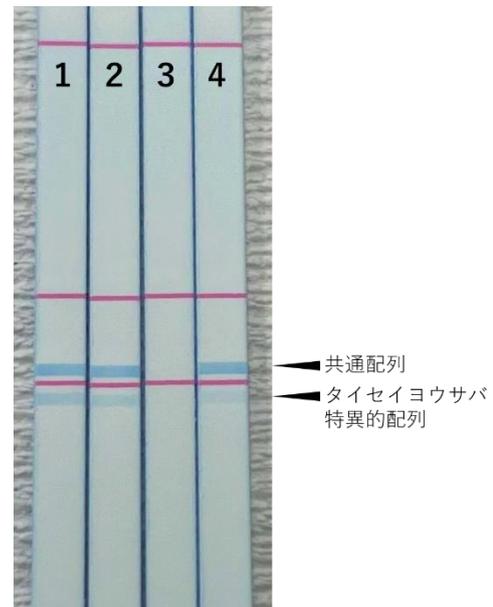


図 6 簡易法による検出結果  
(タイセイヨウサバ試料 (干物) 2 点)

- 1: タイセイヨウサバ試料 a  
2: タイセイヨウサバ試料 b  
3: ネガティブコントロール  
4: ポジティブコントロール

### 3.2 新規判別法の性能評価

試料 52 点の判別を 2 回繰り返した結果を表 3 に示す。マサバ試料 23 点について、1 回目は 23 点中 1 点 (干物) を、2 回目は 23 点中 2 点 (干物及び塩さば) を「タイセイヨウサバ」と誤判別した。ゴマサバ試料については 14 点全てを「マサバ又はゴマサバ」と判別した。この結果から、陰性試料の正答率は 95.9 % であった。タイセイヨウサバ試料については 15 点全てを「タイセイヨウサバ」と判別し、陽性試料の正答率は 100 % であった。これらの結果から、新規判別法は良好な性能を有すると考えられた。

表 3 さば加工品 52 点の判別結果 (2 回繰り返し実施)

| 試料       | 分析回数 | 分析点数 | 判別結果          |          | 正答率   | 備考              |
|----------|------|------|---------------|----------|-------|-----------------|
|          |      |      | マサバ又は<br>ゴマサバ | タイセイヨウサバ |       |                 |
| マサバ      | 1回目  | 23   | 22            | 1        | 95.9% | 干物 1 点を誤判別      |
|          | 2回目  | 23   | 21            | 2        |       | 干物、塩さば各 1 点を誤判別 |
| ゴマサバ     | 1回目  | 14   | 14            | 0        |       |                 |
|          | 2回目  | 14   | 14            | 0        |       |                 |
| 合計       |      | 74   | 71            | 3        |       |                 |
| タイセイヨウサバ | 1回目  | 15   | 0             | 15       | 100%  |                 |
|          | 2回目  | 15   | 0             | 15       |       |                 |
| 合計       |      | 30   | 0             | 30       |       |                 |

### 3.3 複数試験室による共同試験

試験の結果は表 4 のとおりであった。7 試験室中 6 試験室については、ネガティブコントロール及びポジティブコントロールに問題がなく、陰性試料及び陽性試料を全て正しく判別した。この結果から、新規判別法は異なる試験室においても結果の再現性があると考えられた。1 試験室については、ネガティブコントロールでラインが検出された。再試験を行ったが同様の結果であったため、増幅産物等のコンタミネーションが生じたと考え、試験不成立として共同試験の結果解析から除外した。

表 4 共同試験の結果

| 試験室 | ネガティブ<br>コントロール | ポジティブ<br>コントロール | 陰性試料      |      |    |       | 陽性試料      |      |    |          |
|-----|-----------------|-----------------|-----------|------|----|-------|-----------|------|----|----------|
|     |                 |                 | 分析<br>試料数 | 判別結果 |    | 正答率   | 分析<br>試料数 | 判別結果 |    | 正答率      |
|     |                 |                 |           | 陰性   | 陽性 |       |           | 陰性   | 陽性 |          |
| A   | 問題なし            | 問題なし            | 6         | 6    | 0  | 100 % | 6         | 0    | 6  | 100 %    |
| B   | 問題なし            | 問題なし            | 6         | 6    | 0  | 100 % | 6         | 0    | 6  | 100 %    |
| C   | 問題なし            | 問題なし            | 6         | 6    | 0  | 100 % | 6         | 0    | 6  | 100 %    |
| D   | 問題なし            | 問題なし            | 6         | 6    | 0  | 100 % | 6         | 0    | 6  | 100 %    |
| E   | 問題なし            | 問題なし            | 6         | 6    | 0  | 100 % | 6         | 0    | 6  | 100 %    |
| F   | 問題なし            | 問題なし            | 6         | 6    | 0  | 100 % | 6         | 0    | 6  | 100 %    |
| G   | <b>問題あり</b>     | 問題なし            |           |      |    |       |           |      |    | 結果解析から除外 |
| 合計  |                 |                 | 36        | 36   | 0  | 100 % | 36        | 0    | 36 | 100 %    |

## 4. まとめ

本研究では、さば加工品について、DNA 分析による簡易迅速な原料原産地判別法を検討した。DNA の増幅には簡易な装置で実施可能な LAMP 法を、DNA の検出には装置が不要な C-PAS 法を用いる判別法を設計した。設計した判別法を用いて生鮮さば及びさば加工品合計 52 点を判別した結果、陰性試料の正答率は 95.9 %、陽性試料の正答率は 100 %であった。また、7 試験室に未知試料を 12 点ずつ配付して共同試験を行った結果、試験が成立した 6 試験室において 12 点全てが正しく判別された。以上の結果から、さば加工品の簡易迅速な原料原産地判別法を開発できたと考えられた。ただし、共同試験において試験不成立となった試験室があったことから、増幅産物の取扱い等に関する十分な教育訓練が必要と考えられた。

## 文献

- 1) 漁業・養殖業生産統計, 農林水産省 (令和 5 年)
- 2) 農林水産物品目別実績 (輸入), 農林水産省 (令和 5 年)
- 3) 中央水産研究所, 水産庁水産業関係試験研究推進会議マサバ・ゴマサバ判別マニュアル作成ワーキンググループ (1999). 「マサバ・ゴマサバ判別マニュアル」.
- 4) 高嶋康晴, 井口潤, 浪越充司, 山下由美子, 山下倫明 (2014). 魚介類の「名称」及び「原産地」表示の検証のためのDNA分析技術, *分析化学*, **63**, 797–807.
- 5) Takabatake, R., Kagiya, Y., Minegishi, Y., Futo, S., Soga, K., Nakamura, K., Kondo, K., Mano, J., and Kitta, K. (2018). Rapid Screening Detection of Genetically Modified Crops by Loop-Mediated Isothermal Amplification with a Lateral Flow Dipstick, *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 29, 7839–7845
- 6) LAMP法プライマー設計支援ソフトウェア「PrimerExplorer V5」  
(<https://primerexplorer.jp/lampv5/index.html>)