

食品関係等調査研究報告

第48号

令和7年

Research Report of Food Products

Vol.48

2025



独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
Food and Agricultural Materials Inspection Center
(Incorporated Administrative Agency)
Saitama, Japan

目 次

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, 平野 未佳, 高島 令王奈 1

国産魚介類の DNA データの集積及び登録について

山崎 実緒, 高嶋 康晴 10

【他紙掲載論文（抄録）】

大豆およびとうもろこし加工食品の遺伝子組換え DNA 検査における DNA 抽出精製方法の同等性
確認試験（ノート）

食品衛生学雑誌 第 65 巻 第 2 号 2024 年 6 月

江木智宏 高島令王奈 岸根雅宏 曾我慶介 吉場聡子 柴田識人 近藤一成 高嶋康晴
..... 15

Pretreatment method for oxygen stable isotope ratio analysis of the sugar-rich fraction in fruit juice via
isotope ratio mass spectrometry

Rapid Communications in Mass Spectrometry, **38**(22), e9906 (2024)

DOI: 10.1002/rcm.9906

Ayano WATANABE, Shoichi TERADA 16

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¹, 平野 未佳¹, 高島 令王奈²

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¹⁾、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²⁾。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³⁾。一方、タイセイヨウサバは大西洋に生息しており⁴⁾、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⁴⁾。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。

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

² 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⁵⁾。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)⁶⁾ 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)。

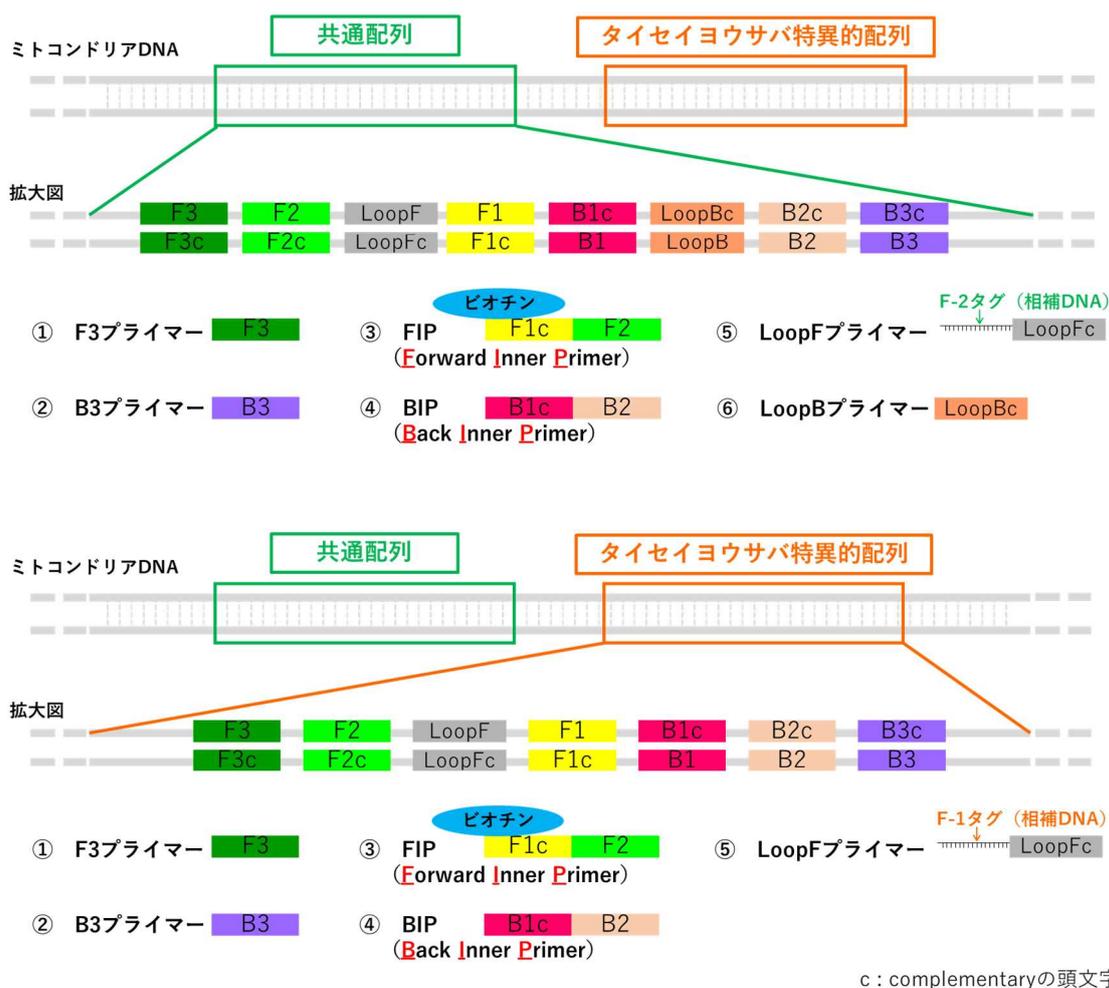


図1 LAMP プライマーの模式図

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	GCCTACCCCGTATTTACAACCTTGACTTGTGTAAGTCTCAG
	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	AGCCCCAAGCCCTA
タイセイヨウサバ 特異的配列	FIP	ビオチン TTCAAGAATAGATCATGTCACGTAGAGTTTTTGACGTCAATATCAGCCTTA
	BIP	TATGCATGCCGACCCCTACACTAGAATAATCATAGCGATGAGG
	F3プライマー	TGGAAGTGAATAAATACCCCTCA
	B3プライマー	AGTTGAAACATGTTGTTTGGCT
	LoopFプライマー	F-1タグ GTAAAAATAATCGAGTAGTGGTCA

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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 添加して全量 25 μL 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[®] 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 μL から 10 μL 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 反応用試薬に 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 μ L、クロマト展開液 (0 mmol/L) 5 μ L、クロマト展開液 (300 mmol/L) 5 μ L 及び滅菌水 10 μ L をチューブに混合した後、LAMP 反応液を 2 μ 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 μ L 添加し、全量は 10 μ 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 μ 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 μ L ずつ同じチューブに添加した。

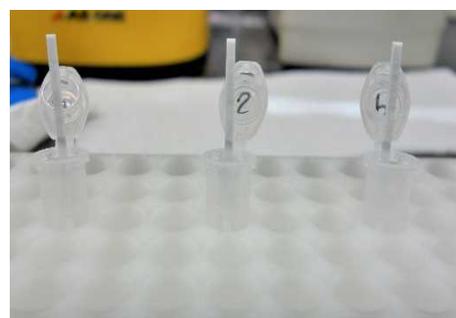
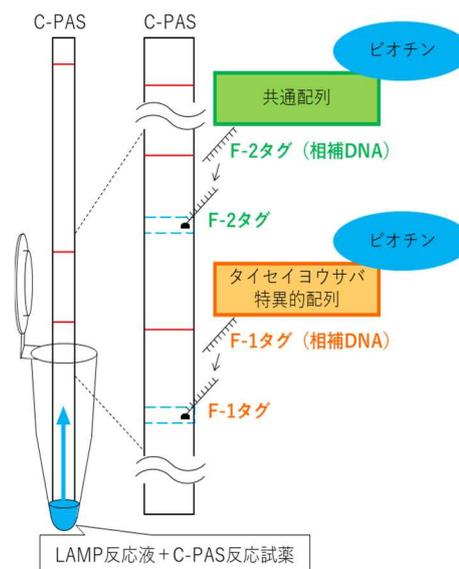


図 2 C-PAS 法の模式図
及び実施の様子

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 回繰り返して行った。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。

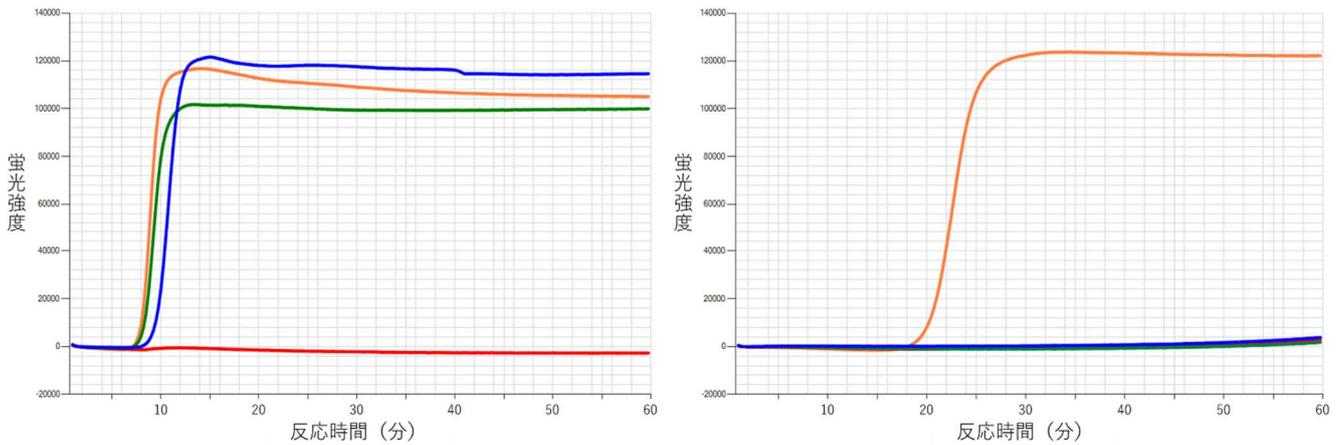


図 3 蛍光検出結果（サバ 3 種各 1 点）

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

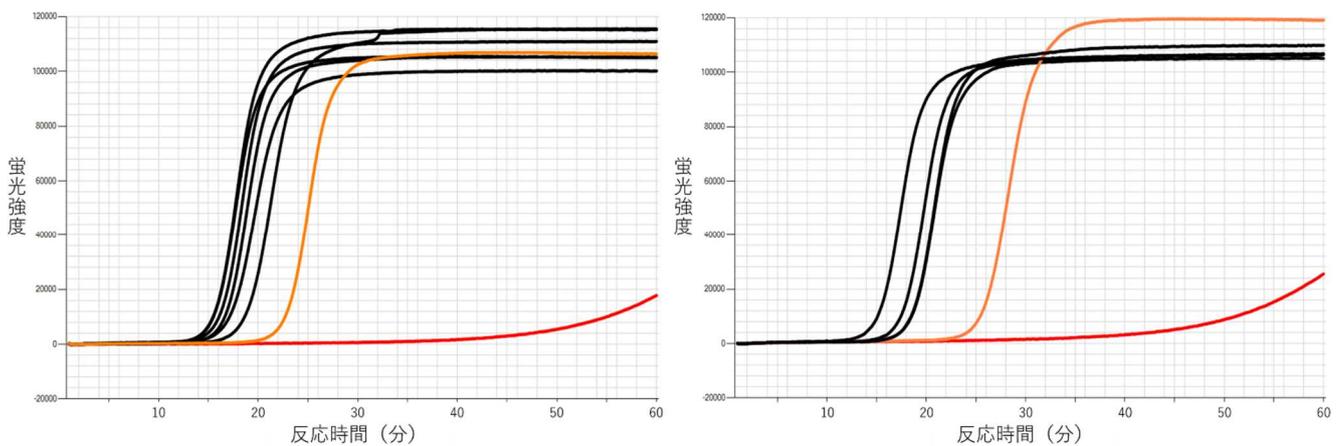


図 4 蛍光検出結果（タイセイヨウサバ試料 12 点）

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。

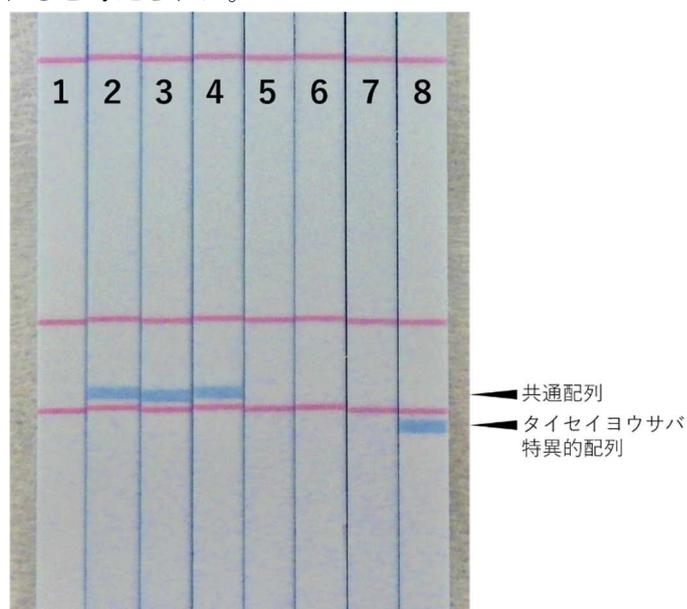


図 5 C-PAS 法による検出結果
(サバ 3 種各 1 点)

- 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

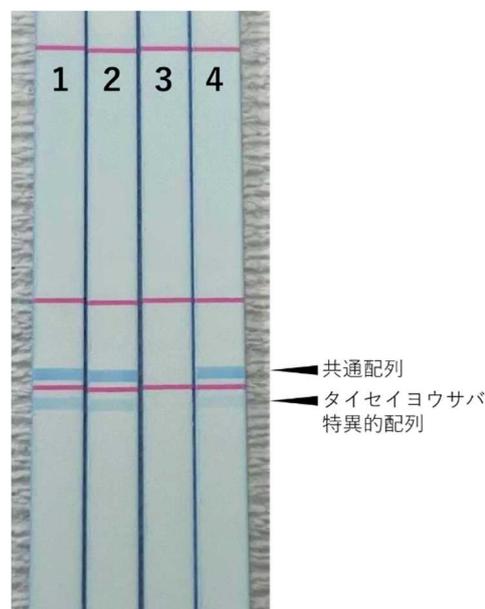


図 6 簡易法による検出結果
(タイセイヨウサバ試料 (干物) 2 点)

- 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 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 コントロール	ポジティブ コントロール	陰性試料				陽性試料			
			分析 試料数	判別結果		正答率	分析 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	問題あり	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>)

国産魚介類の DNA データの集積及び登録について

山崎 実緒¹, 高嶋 康晴¹

YAMAZAKI Mio, TAKASHIMA Yasuharu

要約

FAMIC ではこれまで 200 種以上の魚介類試料の DNA データを収集し、名称や産地表示の真正性の確認に活用している。新たに国産の食用魚介類 19 種の試料を収集し、ミトコンドリア DNA の特定遺伝子領域の一部の塩基配列を決定し、塩基配列データの集積及び国際的な塩基配列データベースへの登録を行った。

1. はじめに

一般向けに販売される食品は、食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）に基づく食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）において、生鮮食品にあつては「名称」及び「原産地」を、加工食品にあつては「名称」、「原材料名」等を表示することが義務付けられている¹⁾。魚介類の「名称」の表示は、「魚介類の名称のガイドライン」が示され、標準和名に準じて生物種名を記載する方法が推奨されている¹⁾。

魚介類には多くの生物種が含まれ、その生物種を推定することで「名称」だけでなく、その生物種の生息域から「原産地」の表示について検証できる場合がある。形態的な特徴から生物種を同定することは可能とされているが、高い熟練度を必要とする²⁻⁶⁾。

DNA は遺伝子を構成する物質で、4 種類の塩基（アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T））の組合せにより生物学的な情報を保存している。1990 年代以降、様々な生物種の塩基配列の特定遺伝子領域の配列について解析が行われるようになり、ミトコンドリア DNA の cytochrome *b* (Cytb)⁷⁾、cytochrome *c* oxidase subunit I (COI)⁸⁾、16S ribosomal RNA (16S rRNA)⁹⁾ 遺伝子領域の他、核 DNA の Internal Transcribed Spacer (ITS) 遺伝子領域¹⁰⁾ などの研究が進んでいる。これまでに多くの生物種について当該遺伝子領域の塩基配列が解析され、国際的な塩基配列データベース（the International Nucleotide Sequence Databases ; 以下「INSID」という。）に登録されることで、情報が共有されている。それに伴い、当該遺伝子領域の塩基配列の差異により生物種を推定することが可能であることが報告されている¹¹⁻¹³⁾。

FAMIC においても、これまでに 200 種以上の魚介類について特定の遺伝子領域の塩基配列を確認し、解析結果を用いた検査法の開発¹⁴⁻²⁰⁾ や生物種の推定に活用している。

今回、食用魚介類の中で新たに確認が必要な魚介類を中心に試料を収集し、特定の遺伝子領域の塩基配列の解析を行い、得られた塩基配列のデータについては、INSID のへの登録を行った。

2. 実験方法

2.1 試料

静岡県水産・海洋技術研究所から 2 種、北海道浜中漁業協同組合から 1 種、有限会社日本シジミ研究所からは 16 種の魚介類について、形態的な同定済み試料を入手した。

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

2.2 DNA 抽出

DNA 抽出は、筋肉組織 10~25 mg を採取し、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用い、製品プロトコールに従い DNA 抽出を行った。

2.3 DNA シークエンス法 (DNA 塩基配列解析)

各試料の DNA 塩基配列の決定は、ダイレクトシークエンス法によって行った。塩基配列の決定は、魚類については Cytb 遺伝子領域内の約 400 bp、魚類以外については COI 遺伝子領域内の約 700 bp を対象とした。PCR 反応液は、0.5 Units DNA ポリメラーゼ TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (以下「Ex Taq® HS」; タカラバイオ) を含み、最終濃度が 1× Ex Taq Buffer (Ex Taq® HS 添付試薬)、0.2 mmol/L dNTP Mixture (Ex Taq® HS 添付試薬)、各 0.25 μmol/L プライマー対 (表 2) となるように混合し、2.0 μL の抽出 DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 20 μL とした。PCR の温度条件は、最初の熱変性として 94 °C 1 分で保持後、熱変性 94 °C 20 秒、アニーリング 55 °C 20 秒、伸長反応 72 °C 40 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル後、最後の伸長反応を 72 °C 7 分を行った。

PCR 産物の精製には、illustra™ ExoProStar™ (Cytiva) を用いた。0.5 μL の Exonuclease I、0.5 μL の Alkaline Phosphatase 及び 1.5 μL の滅菌水を混合後に、PCR 後の反応液 2.5 μL を加え、37 °C で 15 分間処理した後、80 °C で 15 分間加熱し、酵素を不活性化した。

サイクルシークエンス反応には、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。反応液は、BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix 0.5 μL、BigDye™ sequencing buffer (5×) 2.0 μL に、最終濃度が 0.15 μmol/L となるようにプライマーを混合した。使用するプライマーは、魚類にあつてはプライマー L14735-Glu 及び H15149-CYB22²⁰⁾ を、魚類以外にあつては LCO1490 及び HCO2198 のプライマー対を用いた⁸⁾ (表 1)。これに魚類の場合は約 5 ng/μL、それ以外の魚介類の場合は約 10 ng/μL に調製した精製 PCR 産物各 1.0 μL を加え、滅菌水で全量を 10 μL とした。サイクルシークエンス反応の温度条件は、最初の熱変性として 96 °C 1 分で保持後、3 ステップの反応により行った。第 1 ステップでは、熱変性 96 °C 10 秒、アニーリング 50 °C 5 秒、伸長反応 60 °C 1 分 15 秒を 1 サイクルとして 15 サイクル、第 2 ステップでは、熱変性 96 °C 10 秒、アニーリング 50 °C 5 秒、伸長反応 60 °C 1 分 30 秒を 1 サイクルとして 5 サイクル、第 3 ステップでは、熱変性 96 °C 10 秒、アニーリング 50 °C 5 秒、伸長反応 60 °C 2 分を 1 サイクルとして 5 サイクル行った。サイクルシークエンス後の余剰な蛍光色素の除去は、エタノール沈殿により行った。シークエンス反応物を Hi-Di ホルムアミド (Thermo Fisher Scientific) に溶かし 95 °C 2 分間加熱後氷上又は 4 °C で処理し、DNA シークエンサーに供し、塩基配列を決定した。

PCR 及びサイクルシークエンス反応には、サーマルサイクラー ProFlex 及び VeritiPro (共に Thermo Fisher Scientific) を用い、DNA シークエンサーには、SeqStudio™ (Thermo Fisher Scientific) を用いた。得られた配列の並び替えには遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX Ver.15 (株式会社ゼネティックス) を使用した。得られた各種 DNA の配列情報について、INSD の一つである大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所が管理する日本 DNA データバンク (DNA Data Bank of Japan) (略称 DDBJ) による登録システムに従い、1 種につき 1 個体ずつ得られた塩基配列情報の登録を行った。

表 1 使用プライマー

プライマー名	配列(5'→3')	遺伝子領域	参考文献
L14735-Glu	AACCACCGTTGTTATTCAAC	tRNA ^{Glu}	21
H15149-CYB	GGTGGCKCCTCAGAAGGACATTTGKCCTCA	Cytb	
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	COI	8
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	COI	

K:G 及び T の混合配列

tRNA^{Glu}: glutamyl-transferRNA, Cytb: cytochrome *b*, COI: cytochrome *c* oxidase subunit I

3. 結果及び考察

3.1 塩基配列情報の決定

複数個体を解析した種について、種内各個体の塩基配列の差異を比較したところ、魚類 11 種中では、Cytb 遺伝子領域 402 塩基中 3 塩基の相違がみられたものが 1 種、2 塩基の相違がみられたものが 1 種あったが、それ以外の種では見られなかった。魚類以外の 4 種では、COI 遺伝子領域 658 塩基中 1 塩基の相違がみられたものが 2 種あった。今回解析を行った魚介類では、同一種内の個体間で塩基配列の相同性が 99.0 % 以下となる個体は見られなかった。

また、これまでに FAMIC で確認した魚介類（魚類 163 種、魚類以外 51 種）を含めて種間の相同性を確認したところ、今回塩基配列を決定した魚類 11 種及び魚類以外 8 種について、それぞれの塩基配列の相同性が 98.0 % 以上となる当該種以外の種は見られなかった。このため、塩基配列の相同性が種の推定の参考となると考えられた。

3.2 INSD への登録

各種についてそれぞれ 1 個体の塩基配列情報を INSD の一つである DDBJ の登録システムに従い申請を行い、各登録データについて識別番号（アクセッション番号）を得た。

4. まとめ

新たに国産の食用魚介類 19 種の試料を収集し、ミトコンドリア DNA の特定遺伝子領域の一部の塩基配列を決定し、塩基配列データの集積及び国際的な塩基配列データベースへの登録を行った。

謝辞

本研究を実施するにあたり、水産物の試料収集にご協力いただいた静岡県水産・海洋技術研究所、散布漁業協同組合、浜中漁業協同組合及び有限会社日本シジミ研究所に深く感謝いたします。

文献

- 1) 食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/food_labeling_act 令和 7 年 2 月現在
 食品表示基準 Q&A について（平成 27 年 3 月 30 日付け消食表第 140 号消費者庁通知）別添「魚介類の名称のガイドライン」
- 2) 中坊徹次 編 (2000). 「日本産 魚類検索 全種の同定 第二版」, 東海大学出版会, 神奈川.
- 3) 関口秀夫 (2014). イセエビ・セミエビ類の和名について. 日本動物分類学会誌, 37, 36-45.
- 4) 三宅貞祥 (1982). 「原色日本大型甲殻類図鑑 (I)」 保育社, 大阪.

- 5) 三宅貞祥 (1983). 「原色日本大型甲殻類図鑑 (Ⅱ)」保育社, 大阪.
- 6) 奥谷喬司 (2015). 「新編 世界イカ類図鑑」, 全国いか加工業協同組合, 東京.
- 7) Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 6196–6200
- 8) Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrate. *Mol. Biol. Biotechnol.*, **3**, 294–299.
- 9) Palumbi, S.R., Nucleic acids II: The Polymerase chain reaction. In “Molecular Systematics” (Hills, D.M., Morits, C., and Mable, B.K., Eds.), 2ed., 1996; 205–221. Sinauer, Sunderland, MA.
- 10) Angers-Loustau, A., Petrillo, M., Paracchini, V., Kagkli, D.M., Rischitor, P.E., and Gallardo, A.P. (2016). Towards plant species identification in complex samples: A bioinformatics pipeline for the identification of novel nuclear barcode candidates. *PLoS One.*, **11**(1).
- 11) Herbert, P.D.N., Ratnasingham, S., and deWaard, J.R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *The Royal Society.*, **270**, S96–S99.
- 12) 魚類乾製品等のフグ混入検査について (平成 20 年 4 月 25 日付け食安輸発第 0425005 号厚生労働省通知)
- 13) Katugin, O.N., Chichvarkhina, O.V., Zolotova, A.O., and Chichvarkhin, A.Y. (2017). DNA barcoding for squids of the family Gonatidae (Cephalopoda: Teuthida) from the boreal North Pacific. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.*, **28**(1), 41–49.
- 14) 榎智之, 小岩智宏, 今田敬子, 津村明宏, 杉村豊裕, 高嶋康晴, 森田貴己, 山下倫明(2004). ミトコンドリアチトクロム b 遺伝子の DNA 分析によるスズキ, タイリクスズキおよびナイルパーチの種判別. 日本食品科学工学会誌, **51** (9), 471–476.
- 15) 榎智之, 小岩智宏, 今田敬子, 津村明宏, 杉村豊裕, 高嶋康晴, 森田貴己, 山下倫明(2005). ミトコンドリアチトクロム b 遺伝子の DNA 分析によるタイ科魚類の魚種判別. 日本食品科学工学会誌, **52** (8), 366–372.
- 16) Sezaki, K., Itoi, S., and Watabe, S. (2005). A simple method to distinguish two commercially valuable eel species in Japan *Anguilla japonica* and *A. anguilla* using polymerase chain reaction strategy with a species-specific primer. *Fish. Sci.*, **71**, 414–421.
- 17) Iguchi, J., Isshiki, M., Takashima, Y., Yamashita, Y., and Yamashita, M., (2012). Species identification method for marine products of *Seriola* and related species. *Fish. Sci.*, **78**, 197–206.
- 18) 高嶋康晴, 井口潤(2014). にしん加工品(かずのこ等)の原料原産地判別法の検討. 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告. **38**, 23–29.
- 19) 足立静香, 西川加寿子, 中山祐輔, 藤原守, 松岡猛, 高嶋康晴(2018). ズワイガニ属 3 種のスクリーニング判別法の開発. 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, **42**, 24–31.
- 20) 足立静香, 豊田正俊, 高嶋康晴, 澤田桂子, 石原敏史, 若林敏江, 柳本卓(2020). DNA 分析によるスルメイカ判別法の開発及びその加工品における原料種判別の適用検討. 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, **44**, 26–34.
- 21) Miya, M., Nishida, M. (2000). Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: A tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Mol. Phylogent. Evol.*, **17**, 437–455.

【他紙掲載論文】

(抄録)

- 1 食品衛生学雑誌, **65**(2), 25-30 (2024)より抄録
大豆およびとうもろこし加工食品の遺伝子組換え DNA 検査における DNA 抽出精製方法の同等性
確認試験 (ノート)
江木智宏 高畠令王奈 岸根雅宏 曾我慶介 吉場聡子 柴田識人 近藤一成 高嶋康晴
- 2 Rapid Communications in Mass Spectrometry, **38**(22), e9906 (2024) より抄録
Pretreatment method for oxygen stable isotope ratio analysis of the sugar-rich fraction in fruit juice via
isotope ratio mass spectrometry
Ayano WATANABE, Shoichi TERADA

大豆およびとうもろこし加工食品の遺伝子組換えDNA検査におけるDNA抽出精製方法の同等性確認試験（ノート）

Comparison of DNA extraction methods for processed foods containing soybean or maize

江木智宏*,¹ 高島令王奈² 岸根雅宏² 曾我慶介³
吉場聡子³ 柴田識人³ 近藤一成³ 高嶋康晴¹

Tomohiro EGI*,¹, Reona TAKABATAKE², Masahiro KISHINE², Keisuke SOGA³,
Satoko YOSHIBA³, Norihito SHIBATA³, Kazunari KONDO³ and Yasuharu TAKASHIMA¹

- 1 独立行政法人農林水産消費安全技術センター
- 2 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
- 3 国立医薬品食品衛生研究所

わが国における食品に関する表示のうち、遺伝子組換え食品の表示については、大豆、とうもろこし等の農産物およびこれらを主な原材料とする加工食品が対象となっている。遺伝子組換え食品の表示が適正になされているかどうかを科学的に検証するために、リアルタイムPCRによるDNA検査法が公定法として定められている。大豆およびとうもろこし加工食品からのDNA抽出精製方法として、公定法には代表的なものが示されているが、これら以外の方法についても同等性を確認の上使用することが認められている。本研究では、大豆およびとうもろこし加工食品からのDNA抽出精製方法について、新たな方法と公定法に示されている既存の方法との同等性確認試験を行った。この結果、新たな方法は既存の方法と同等かそれ以上であると考えられた。

Processed foods containing soybean or maize are subject to labeling regulations pertinent to genetically modified (GM) foods in Japan. To confirm the reliability of the labeling procedure of GM foods, the Japanese standard analytical methods (standard methods) using real-time PCR technique have been established. Although certain DNA extraction protocols are stipulated as standard in these methods, the use of other protocols confirmed to be equivalent to the existing ones was permitted. In this study, the equivalence testing of the techniques employed for DNA extraction from processed foods containing soybean or corn was conducted. In this study, the equivalence testing of the techniques employed for DNA extraction from processed foods containing soybean or maize was conducted. The silica membrane-based DNA extraction kits, GM quicker 4 and DNeasy Plant Maxi Kit (Maxi Kit), as an existing method were compared. GM quicker 4 was considered to be equivalent to or better than Maxi Kit.

Pretreatment method for oxygen stable isotope ratio analysis of the sugar-rich fraction in fruit juice via isotope ratio mass spectrometry

Ayano WATANABE, Shoichi TERADA

Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

Rationale

The oxygen stable isotope ratio ($\delta^{18}\text{O}$) of the sugar-rich fraction of fruit juice is important as a tracer of the geographical origin of raw material. This study sought to minimize the inter-day variation of $\delta^{18}\text{O}$ attributable to the influence of water to accurately monitor geographical origin labeling.

Methods

Two drying devices (freeze dryer and vacuum oven) were compared. Then, two humidity levels (normal and low humidity) at which the samples were placed after drying were compared. The low-humidity environment was constructed using a glove bag and pure argon gas. $\delta^{18}\text{O}$ was measured using thermal conversion elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometry. Improvements were made to the measurement method based on aforementioned analyses results, and the performance of the initial and improved methods was compared.

Results

$\delta^{18}\text{O}$ of juice dried in a vacuum oven was 3.30‰ lower than that of juice dried in a freeze dryer. Moreover, $\delta^{18}\text{O}$ of juice samples exposed to normal humidity was 3.74‰ lower than that of samples exposed to low humidity. The combined inter-day and intra-day standard deviation was reduced from 1.20‰ in the initial method to 0.42‰ in the improved method.

Conclusions

This study describes a pretreatment method for $\delta^{18}\text{O}$ measurement in the sugar-rich fraction of fruit juice with less inter-day variation, and it will be useful for monitoring geographical origin labeling.

URL:

<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.9906>

**農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告
第48号**

令和7年3月発行

発行： 独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
〒 330-9731 埼玉県さいたま市中央区新都心 2 - 1
さいたま新都心合同庁舎検査棟
電話： 050 - 3797 - 1851
FAX： 048 - 600 - 2373

