

技術レポート
--------

## 7 コンピューター・プログラムを利用した、複数の動物を検出するプライマーの開発

篠田 直樹\*, 吉田 知太郎\*, 草間 豊子\*

### 1 緒 言

牛肉骨粉等の反すう動物由来たん白質の家畜用飼料への混入は、飼料安全法に基づく成分規格等省令<sup>1)</sup>により禁止されている。

反すう動物由来原料の飼料への混入の有無を確認する検査法には、顕微鏡鑑定法、ELISA 法及び PCR 法があり、このうち ELISA 法及び PCR 法は農林水産省生産局長通知<sup>2)</sup>に収載されていた。

PCR 法において、プライマーは特定の動物由来 DNA を高精度に検出し識別するための最も重要な試薬であり、これまで検出対象種ごとにそれぞれのプライマーが開発<sup>3), 4)</sup>され、検査分析に使用されてきた。しかしながら、反すう動物由来 DNA を検出するプライマー対 [rumicon52, rumicon32] は、判定のためアガロースゲルを用い電気泳動した際の PCR 増幅バンドが不鮮明であること、他の動物由来 DNA を検出するプライマーと PCR 反応条件が異なり同時に PCR 反応を行えないこと等の問題があり、これらについて改良が必要と考えられた。

我々は新たに開発したコンピューター・プログラムを利用して、複数の動物を検出するプライマーを効率的に開発する方法を確立し、実例として、反すう動物、ヒツジ、ヤギ及びブタ由来 DNA をそれぞれ特異的に検出する各種のプライマーを開発した。このうち、反すう動物由来 DNA 検出プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] については、その特異性、PCR 増幅バンドの状態及び検出感度を確認したところ、良好な成績が得られたので、その概要を報告する。

### 2 方 法

#### 2.1 試 料

市販の牛用配合飼料、飼料原料（ポークミール、ポークチキンミール、チキンミール、フェザーミール、とうもろこし、魚粉）及び牛肉骨粉をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎して用いた。

なお、検出下限の検討等に用いた配合飼料の配合割合を表 1 に示した。

表 1 試験に用いた配合飼料の配合割合

配合飼料の種類	原材料の区分	割合 (%)	原材料名
肉用牛肥育用 配合飼料	穀 類	39	加熱処理とうもろこし、マイロ、玄米
	そうこう類	43	コーングルテンフィード、米ぬか油かす、大豆油かす、ふすま
	植物性油かす	11	なたね油かす
	そ の 他	7	食塩、炭酸カルシウム、ビタミン、ミネラル

\* 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

## 2.2 試験方法

「PCR による飼料中の動物由来 DNA の検査法」<sup>2)</sup>に基づき、「mtDNA エキストラクターCT キット (和光純薬工業製)」を用いて抽出した DNA を鋳型として、以下の組成で PCR を行った。

表 2 PCR 反応液 (20  $\mu$ L/tube) の組成

滅菌超純水	4.7
PCR緩衝液 (PCR Gold buffer (Applied Biosystems製))	2.0
2 mmol/L dNTP mixture (Applied Biosystems製)	2.0
25 mmol/L 塩化マグネシウム (Applied Biosystems製)	1.2
2 $\mu$ mol/L 5'プライマー溶液	4.0
2 $\mu$ mol/L 3'プライマー溶液	4.0
DNA反応用酵素 AmpliTaq Gold (Applied Biosystems製)	0.1
鋳型DNA溶液	2.0
全量	20.0 ( $\mu$ L)

## 3 結果

### 3.1 コンピューター・プログラムによるプライマーの設計

我々の開発した GSPRIMER というプログラムは、PCR の原理上プライマーの 3'末端ほど増幅に寄与することを利用して、標的種間の相同性を 3'末端ほど高くすると共に、非標的種に対する特異性をスコアで表し、プライマー候補をリストアップするものである。例えば反すう動物由来 DNA 検出プライマーの候補は、反すう動物グループ (牛, めん羊, 山羊, 鹿等 20 種) とその他の動物種グループ (馬, 豚, 鶏, ヒト等 14 種) のミトコンドリア DNA の全配列を GSPRIMER で処理することによって得られた。PCR 反応条件については、通知<sup>2)</sup>に記載されている他のプライマー対 (ほ乳, 牛, 鶏, 魚及び植物) と同じ (95°C, 9 分間 → [92°C, 30 秒間 → 55°C, 30 秒間 → 72°C, 30 秒間] (45 サイクル) → 72°C, 5 分間) にした。プログラムの出力に基づき、反すう動物, ヒツジ, ヤギ及びブタ由来 DNA を特異的に検出するプライマーをそれぞれ選択した。プログラム本体, 使用方法及び使用例については別途報告する。

### 3.2 プライマーの特異性

3.1 で選定した各プライマー対について、ウシ (黒毛和種, 褐毛和種, ホルスタイン, アンガス), シカ, エゾシカ, ヒツジ, ヤギ, ヒト, ウマ, ブタ (LW・D 三元交雑種, ミニブタ, メキシカンヘアレスピッグ, バークシャ, 中ヨークシャ, デュロック及びランドレース), ウサギ, ラット, マウス, クジラ, ニワトリ, ウズラ, アイガモ, サケ, カレイ, アジ, タラ, サバ, サンマ, ニジマス, カツオ, マイワシ, カタクチイワシ, キハダマグロ, ケガニ, アサリ, エビ, イカ及びトウモロコシの抽出 DNA を用いて、特異性を確認した。

その結果、各プライマー対は標的動物の抽出 DNA を特異的に増幅し、それぞれ期待された位置に PCR 増幅バンドが検出された。また、標的動物以外の抽出 DNA では、検出を妨害する PCR 増幅バンドは見られなかった。開発したプライマーの試験結果の詳細については別途報告する。

### 3.3 反すう動物由来 DNA 検出プライマーについて

#### 1) 特異性

本研究で開発された反すう動物由来 DNA 検出プライマー [rumicon5D2, rumicon3D5] は、3.2 の動植物の中で、ウシ（黒毛和種、褐毛和種、ホルスタイン、アングス）、シカ、エゾシカ、ヒツジ及びヤギの抽出 DNA では 201 bp の位置に PCR 増幅バンドを示し、その他の抽出 DNA では PCR 増幅バンドが検出されなかった。

また、牛用配合飼料（6 種類）、チキンミール（1 種類）、フェザーミール（2 種類）、ポークチキンミール（3 種類）及び魚粉（6 種類）の市販飼料（反すう動物由来原料を含まないもの）について同様の確認をした結果、反すう動物由来 DNA の検出を妨害する非特異的な PCR 増幅バンドは検出されなかった。

#### 2) 検出下限

牛ミトコンドリア DNA 溶液を希釈し、PCR 反応液 20  $\mu$ L あたり 10.0, 1.0, 0.1, 0.01, 0.001 及び 0.0001 ng の牛ミトコンドリア DNA を含有するよう調製し、PCR 反応を行った。その結果、プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] は、PCR チューブあたり 0.0001 ng の DNA 量まで検出可能であった。

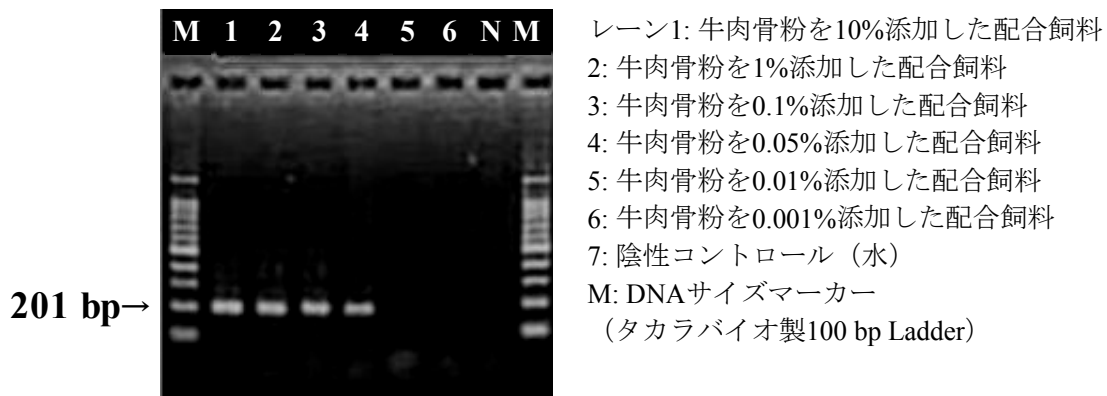
また、牛用配合飼料、豚肉骨粉、魚粉及びとうもろこしに牛肉骨粉をそれぞれ 1.0, 0.1, 0.05, 0.01 及び 0.001% 含有させた試料を用いて、それぞれ 2 点並行分析を行い、検出下限を確認した。その結果、プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] の検出下限は各飼料に添加した牛肉骨粉として 0.05~0.01% 程度であった。

#### 3) 共同試験

飼料中の反すう動物由来 DNA 検出法の再現精度を確認するため、共通試料を用いた共同試験を行った。

2.1 で示した牛用配合飼料及び豚肉骨粉中に、牛肉骨粉をそれぞれ 1% 及び 0.1% 添加した試料及び無添加の試料から抽出した DNA 溶液を鋳型として、プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] を用いた PCR を 5 試験室において 2 回行った。その結果、すべての試験室において、牛肉骨粉をそれぞれ 1% 及び 0.1% 添加した試料から抽出した DNA 溶液では 201 bp の位置に PCR 増幅バンドが検出され、牛肉骨粉を無添加の試料から抽出した DNA 溶液では PCR 増幅バンドは検出されなかった。

図 1 泳動写真例（反すう動物由来 DNA 検出プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5]）



#### 4 考 察

本研究では、複数の動物を検出するプライマーを効率的に開発する方法を確立した。平成 17 年 2 月の省令改正<sup>1)</sup>により豚肉骨粉等の飼料への使用が一部解禁になったように、今後も BSE のリスクが明らかになるにつれて規制される動物種は変更される可能性がある。我々の方法は、規制される種の変更に柔軟に対応し、迅速かつ効率的にスクリーニング用プライマーを開発するのに有用である。

#### 5 ま と め

- 1) 新たに開発したプログラム GSPRIMER を利用して、複数の動物を検出するプライマーを効率的に開発する方法を確立した。
- 2) 設計した反すう動物、ヒツジ、ヤギ及びブタ由来 DNA 検出プライマーについて 40 種の動植物に対する特異性を確認したところ、良好な結果が得られた。
- 3) 反すう動物由来 DNA 検出用プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] については、40 種の動植物に加えて牛用配合飼料及び各飼料原料に対する特異性を確認したところ、良好な結果が得られた。また、その検出下限は DNA で 0.1 pg, 牛肉骨粉で 0.05~0.01%であった。
- 4) プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] を用いた飼料中の反すう動物由来 DNA 検出法の再現精度を確認するため、5 試験室において共通試料を用いた共同試験を行った結果、良好な結果が得られた。

本研究で示した反すう動物由来 DNA 検出用プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] は平成 20 年 4 月 1 日付けで制定された飼料分析基準<sup>5)</sup>に収載された。また、同プライマーについては、平成 20 年 1 月に独立行政法人農業生物資源研究所と共同で国内特許<sup>6)</sup>を出願した。

#### 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).  
改正 農林水産省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令”，平成 17 年 2 月 28 日，農林省令第 15 号 (2005).
- 2) 農林水産省生産局長通知：“飼料中の動物由来たん白質等の検出法について”，平成 14 年 4 月 9 日，14 生畜第 181 号 (2002).  
改正 農林水産省消費・安全局長通知：“「飼料中の動物由来たん白質等の検出法について」の改正について”，平成 18 年 3 月 17 日，17 消安第 12305 号 (2006).  
廃止 平成 20 年 4 月 1 日付で飼料分析基準<sup>5)</sup>に収載され，本通知は廃止された。
- 3) T. Kusama, T. Nomura and K. Kadowaki: J. Food Prot., **67**, 1289 (2004).
- 4) 野村哲也，草間豊子；飼料研究報告，**30**，52 (2005).
- 5) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).  
改正 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：“動物由来 DNA 検出用プライマー配列”，平成 20 年 1 月 25 日，特願 2008-14900 (2008).