

# リアルタイム PCR による食肉加工品の肉種鑑別

本田己喜子・鶴田小百合・赤木浩一

福岡市保健環境研究所保健科学課

## Differentiation of Meat Species in Processed Meat products by Real-Time PCR

Mikiko HONDA, Sayuri TSURUDA and Kouichi AKAKI

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

### 要約

福岡市内で市販された食肉加工品 56 検体について、リアルタイム PCR による肉種鑑別を行った。54 検体からは食品表示に記載された肉種が検出されたが、2 検体からは表示に記載された肉種が検出されなかった。36 検体からは、表示に記載されていない肉種が検出され、特に腸詰めソーセージでは、15 検体からヒツジ mtDNA が検出されたが、その多くはケーシングに使用した羊腸由来と考えられた。また、この 36 検体中 11 検体から、ウシとトリの mtDNA がそれぞれ検出されたが、結着材料由来と考えられた。

**Key Words** : リアルタイム PCR Real-Time PCR , 肉種鑑別 differentiation of meat species ,  
ブタ pork , ウシ beef , トリ chicken , ヒツジ mutton , ウマ horseflesh

### 1 はじめに

2007 年 6 月に発覚したミンチ肉偽装事件を契機に、全国的に食の安全・安心の確保が叫ばれ、適正な食品表示や偽造防止のニーズが広がっている。

食品偽装を見抜くための肉種鑑別には、古くからゲル内拡散法が用いられてきたが、感度が悪く熟練した技術が必要であり、現在では試薬の入手も困難となった。このため、食品などの鑑別には、ミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) を PCR 法により検出する手法が用いられているが、さらに高感度で迅速な検査を行うため、二重蛍光標識プローブを用いた Real-Time PCR 法が普及してきている。Real-Time PCR 法を用いた肉種 (ブタ・ウシ・トリ・ヒツジ・ウマ) の迅速鑑別については、国立医薬品食品衛生研究所を中心とするチームが開発しており<sup>1)</sup>、本法は重篤なアレルギー症状を示す特定原材料の検出にも応用することが可能である。

今回、本法を用いて食肉加工品中の肉種鑑別を行ったので、その結果を報告する。

### 2 実験方法

#### 2.1 試料

供試した試料は福岡市内で市販されていた食肉加工品 56 検体 (粉末スープ: 3 検体, 缶詰: 5 検体, 牛内臓: 4 検体, 半製品: 4 検体, ミンチ肉: 5 検体, 食肉製品: 35 検体) を用いた。

#### 2.2 mtDNA の抽出

粉末スープは試料 0.25 g を採取し mtDNA 抽出キット (mtDNA Extractor CT Kit: 和光純薬工業株式会社製) を用いて mtDNA を抽出した。粉末スープ以外は試料をフードカッターで粉碎し 2 g を 50 mL 容量のファルコンチューブに採り、粗抽出用溶液 (0.25 M スクロース溶液, 1 mM EDTA 10 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.4)) 20 mL を加えてホモジナイズし、1,000 G で 1 分間遠心処理後、上澄み液 1 mL を分取し抽出キットを用いて mtDNA を抽出した。抽出した mtDNA は TE バッファーで希釈し、10 ng/μL 溶液 (Abs.<sub>260nm</sub>=0.2) に調整した。

### 2.3 各肉種のサンプル試料の作成

市販の食肉（ブタ・ウシ・トリ・ヒツジ・ウマ）からそれぞれ、上記2.2に示した方法により mtDNA を抽出した。これを原液とし、TE バッファーで 10 ng/μL 溶液（Abs.260nm=0.2）に調整した。この溶液を試料換算で 100 % とし、さらに TE バッファーで、10 倍段階希釈を行い 0.001 % までのサンプル試料を作成した。

### 2.4 リアルタイムPCR条件

リアルタイム PCR 反応液の組成を表 1 に示す。ブタ・ウシ・トリ・ヒツジ・ウマの肉種鑑別用プライマーとプローブならびに内在性コントロールは、市販品（Applied Biosystems 社製）を使用した。リアルタイム PCR 反応は、ABI PRISM 7900HT を用いて、50 °C 2 分間の uracil N-glycosylase 処理 95 °C 10 分 45 サイクルのシャトル PCR（95 °C 15 秒 60 °C 1 分）を行い、得られたデータは SDS2.1 ソフトウェアで解析した。

表 1 PCR 反応液の組成

	液量 (μL)
2 x TaqMan Universal PCR Master Mix	12.5
10 μM フォワードプライマー	0.75
10 μM リバースプライマー	0.75
10 μM TaqMan MGB プローブ (FAM 標識)	0.5
18S rRNA 内在性コントロール Mix (VIC 標識)	1.25
滅菌蒸留水	6.75
DNA サンプル (10 ng/μL に調製したもの)	2.5
計	25.0

## 3 結果及び考察

ブタ・ウシ・トリ・ヒツジ・ウマのサンプル試料のリアルタイム PCR の結果を表 2 に示す。0.001% の低濃度のサンプル試料で得られた Threshold cycle 数 (Ct 値) は 37 ~ 39 であり、mtDNA は高感度に検出された。PCR 効率は 84.8 ~ 101.8% と優れており、 $r^2$  値もほぼ 1.0 と直線性をもつ検量線が得られた。なお、サンプル試料(ウシ)の増幅曲線と検量線を、図 1 および図 2 に示す。

表 3 に、食肉加工品 56 検体の検査結果を示す。食品表示に記載された肉種が検出されたものは 54 検体 (96.4 %) で、ほとんどの検体から食品表示に記載された肉種が検出された。一方、No.3 の粉末スープと No.14 の食肉半製品の 2 検体については、食品表示に記載された肉種が検出されなかった。No.14 は未加熱の食肉加工品(メンチカツ)であり、原材料にブタ・トリ(一部)、肉工

キスとしてブタ・ウシの表示があったが、原材料のブタのみが検出された。No.14 の検体は、パン粉の付着割合が非常に多く、また主原材料である豚肉以外の鶏肉や肉エキスとの混合・添加量が非常に少なかったことから、ブタ mtDNA だけが検出されたものと思われるが、単に表示ミスの可能性も考えられた。

56 検体中 36 検体 (72.0 %) から、食品表示に記載されていない肉種が検出された。特に腸詰めソーセージでは、19 検体中 15 検体 (78.9 %) からヒツジ mtDNA が検出された。これは、ソーセージのケーシングに羊腸を使用してもその表示が不要であることが主な理由と考えられるが、ミンチ肉から食品表示以外の肉種が検出されることが横浜市や静岡市からも報告されており<sup>2)3)</sup>、原材料であるミンチ肉を作製する際のミキサーによるコンタミネーションに起因することも疑われた。一方、食品表示に記載されていない肉種が検出された 36 検体中 11 検体から、ウシ mtDNA (3 検体)、トリ mtDNA (1 検体)、およびウシ mtDNA とトリ mtDNA (7 検体) が検出された。これらの検体はベーコン、ロースハム、焼き豚およびソーセージであり、その食品表示には、結着材料(つなぎ)として使用される乳タンパクと卵タンパクの記載があった。

今回の調査において、上記の食品表示にないウシとトリが陽性となった検体の確認試験として、牛乳、卵黄、卵白を用いて、それぞれの肉種鑑別を実施した。その結果、牛乳からはウシ mtDNA が、卵黄からトリ mtDNA が検出された。しかし、卵白からはトリ mtDNA が検出されなかった。したがって、今回実施した Real-Time PCR 法は、食肉以外の牛乳や卵黄の mtDNA も検出可能であり、結着材料に肉種由来の mtDNA が含まれれば検出されることが明らかとなった。

表 2 サンプル試料のリアルタイム PCR 結果

サンプル試料	ブタ	ウシ	トリ	ヒツジ	ウマ	
100 %	19	19	20	21	21	
10 %	25	23	24	24	25	
Ct 値	1 %	28	27	28	28	29
	0.1 %	32	30	31	31	33
	0.01 %	35	33	34	35	36
	0.001 %	38	37	37	38	39
PCR 効率 (%)	91.3	93.1	93.4	84.8	101.8	
$r^2$ 値	0.99	1.00	0.99	0.98	0.99	

表3 食肉加工品 56 検体の検査結果

No	試料	ブタ mtDNA	ウシ mtDNA	トリ mtDNA	ヒツジ mtDNA	ウマ mtDNA
1	粉末スープ(鶏ガラ)	ND	ND	+	ND	ND
2	"(ビーフ)	ND	+	ND	ND	ND
3	"(チキン)	ND	ND	ND *1	ND	ND
4	缶詰(ランチョンミート)	+	ND	+	ND	ND
5	"(牛すじ)	ND	+	ND	ND	ND
6	"(焼き鳥)	ND	ND	+	ND	ND
7	"(コーンビーフ)	ND	+	+ *2	ND	ND
8	"(ニューコーンミート)	ND	+	ND	ND	+
9	牛内臓(牛アキレスポイル)	ND	+	ND	ND	ND
10	"(牛すじポイル)	ND	+	ND	ND	ND
11	"(牛すじポイル)	ND	+	ND	ND	ND
12	"(牛腸生)	ND	+	ND	ND	ND
13	食肉半製品(生ハンバーグ)	+	+	+ *2	ND	ND
14	"(黒豚メンチカツ)	+	ND *1	ND *1	ND	ND
15	"(手作りハンバーグ)	+	+	+ *2	ND	ND
16	"(水ギョウザ)	+	+	ND	ND	ND
17	ミンチ肉(牛)	+ *2	+	+ *2	ND	ND
18	"(牛・豚)	+	+	+ *2	ND	ND
19	"(牛・豚)	+	+	+ *2	ND	ND
20	"(豚)	+	+ *2	+ *2	ND	ND
21	"(豚)	+	+	+ *2	ND	ND
22	食肉製品(ベーコン)	+	ND	+ *2	ND	ND
23	"(ベーコン)	+	+ *3	+ *3	ND	ND
24	"(ベーコン)	+	+ *3	+ *3	ND	ND
25	食肉製品(ロースハム)	+	ND	+ *2	ND	ND
26	"(ロースハム)	+	ND	ND	ND	ND
27	"(ロースハム)	+	ND	+ *2	ND	ND
28	"(ロースハム)	+	+ *3	ND	ND	ND
29	"(ロースハム)	+	+ *3	+ *3	ND	ND
30	"(焼き豚)	+	ND	+ *3	ND	ND
31	"(サラミソーセージ)	+	ND	+ *2	ND	ND
32	"(ハンバーグ)	+	+	+	ND	ND
33	"(生ハム)	+	ND	ND	ND	ND
34	食肉製品(チキンハム)	+ *2	ND	+	ND	ND
35	"(チキンハム)	+ *2	ND	+	ND	ND
36	"(カモスモークハム)	ND	ND	+	ND	ND
37	"(チキンハム)	+ *2	ND	+	ND	ND
38	食肉製品(腸詰めソーセージ)	+	ND	+	+ *2	ND
39	"(腸詰めソーセージ)	+	ND	ND	ND	ND
40	"(腸詰めソーセージ)	+	+	+ *2	ND	ND
41	"(腸詰めソーセージ)	+	ND	+	ND	ND
42	"(腸詰めソーセージ)	+	+ *3	+ *3	+ *2	ND
43	"(腸詰めソーセージ)	+	+ *2	+	+ *2	+ *2
44	"(腸詰めソーセージ)	+	+ *3	+ *3	+ *2	ND
45	"(腸詰めソーセージ)	+	ND	ND	+ *2	ND
46	"(腸詰めソーセージ)	+	+ *3	+ *3	+ *2	ND
47	"(腸詰めソーセージ)	+	ND	+	ND	+
48	"(腸詰めソーセージ)	+	ND	+ *2	+ *2	ND
49	"(腸詰めソーセージ)	+	+ *3	+	+ *2	ND
50	"(腸詰めソーセージ)	+	ND	+ *2	+ *2	ND
51	"(腸詰めソーセージ)	+	+ *2	+	+ *2	+ *2
52	"(腸詰めソーセージ)	+	ND	+ *2	+ *2	ND
53	"(腸詰めソーセージ)	+	+ *2	+	+ *2	ND
54	"(腸詰めソーセージ)	+	+ *3	+ *3	+ *2	ND
55	"(腸詰めソーセージ)	+	ND	+ *2	+ *2	ND
56	"(腸詰めソーセージ)	+	+ *3	+	+ *2	ND

ND: 不検出, ND \*1: 食品表示に記載された肉種が不検出,

+ \*2: 食品表示に記載されていない肉種を検出,

+ \*3: 食品表示に記載されていない肉種を検出したが, 結着材料由来と判断されたもの.

トリの表示がない 17 検体からトリ mtDNA が検出されたが、これらの検体は卵の食品表示がなかった。これらの 8 検体について ELISA 法<sup>4)</sup>により卵の特定原材料の検査を行った結果、7 検体からは卵タンパクが検出されず、低レベルの含有量と考えられ、本 Real-Time PCR 法は ELISA 法と比べると、検出感度が高いことが示された。残りの 1 検体 (No. 27) については ELISA が陽性 (350 ppm) であり、確認検査のウエスタンブロット法でも陽性を示した。なお、後日の調査で、この検体は、原材料に鶏肉と卵黄の使用はなかったが、使用した塩漬剤は高濃度 (150,000 ppm) の卵タンパクを含有していたことがわかった。

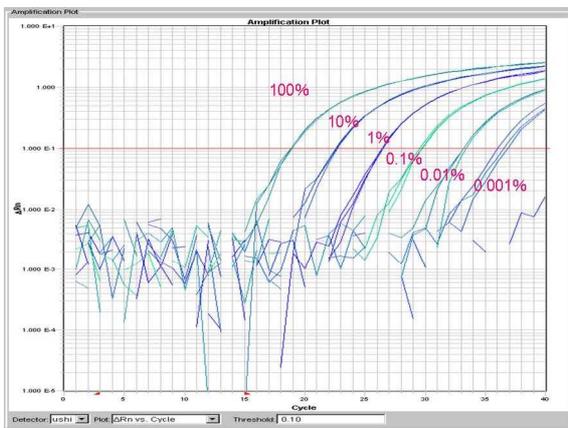


図 1 標準試料 (ウシ) の増幅曲線

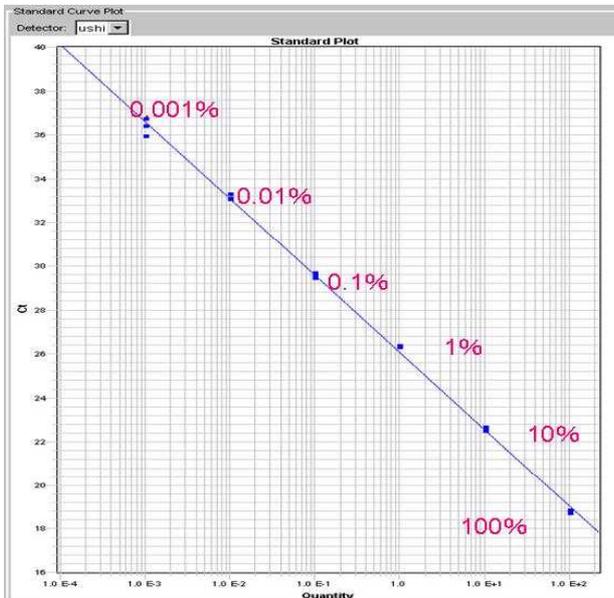


図 2 標準試料 (ウシ) の検量線

## 4 まとめ

福岡市内で市販されていた食肉加工品 56 検体について、リアルタイム PCR によるブタ・ウシ・トリ・ヒツジ・ウマの肉種鑑別を行った。54 検体からは食品表示に記載された肉種が検出されたが、食肉半製品の 2 検体では食品表示に記載された肉種が検出されなかった。

56 検体中 36 検体から、食品表示に記載されていない肉種が検出された。特に腸詰めソーセージでは、15 検体からヒツジ mtDNA が検出されたが、その多くはケーシングに使用した羊腸由来と考えられた。また、この 36 検体中 11 検体から、ウシ mtDNA、トリ mtDNA、およびウシ mtDNA とトリ mtDNA が検出されたが、結着材料として使用される乳タンパクと卵タンパク由来と考えられた。

## 文献

- 1) Soichi TANABE et al. : Real-Time Quantitative PCR Detection Method for Pork, Chicken, Beef, Mutton and Horseflesh in Foods, Biosci. Biotechnol. Biochem, 71(12), 3133-3135, 2007 .
- 2) 山口正樹ら：食肉及び食肉製品の肉種鑑別法の一考察, 静岡県環境保健研究所年報, 23, 36 ~ 37, 2007 .
- 3) 池野恵美ら：横浜市における食肉の DNA 鑑定検査法について, 第 45 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 115 ~ 116, 2008 .
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部長：アレルギー物質を含む食品の検査方法について, 平成 14 年 11 月 6 日, 食発第 1106001 号, 2002.