

市場流通形態の検体を用いた比内地鶏の DNA 識別手法の有効性の検証

力丸宗弘¹・高橋秀彰²

¹秋田県農林水産技術センター畜産試験場, 大仙市神宮寺 019-1701

²独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所, つくば市池の台 305-0901

比内地鶏の DNA 識別手法の有効性を検証するため, 5つのマイクロサテライト DNA マーカー (*ABR0241*, *ABR0311*, *ABR0633*, *ADL0250*, *ABR1003*) を用いて, 比内地鶏の各部位 15 検体 (もも肉, むね肉, ささみ, 心臓, 肝臓, 砂肝, 脾臓, 首肉, 手羽元, 手羽先, 尻 (ぼんじり), 心臓上部 (つなぎ), 軟骨, 皮, 脂), 加工品 32 検体 (ガラスープ, くんせい, みそ漬, しお漬, しょうゆ漬, チキンソーセージ), その他の肉用鶏 341 検体 (ブロイラー 95 検体, 銘柄鶏 9 種類 60 検体, 地鶏 33 種類 186 検体) の DNA 識別を行った。比内地鶏の各部位および加工品の識別では, 全ての検体において 5 マーカーの PCR 増幅が確認され, それぞれのマーカー型を判定できた。各検体が示す各マーカー型は, 比内地鶏と矛盾しなかった。また, ブロイラーおよび銘柄鶏は, 全検体, 比内地鶏ではないと否定することができた。地鶏 186 検体のうち, 14 検体 (7.5%) は, 比内地鶏が示すマーカー型と矛盾せず, 比内地鶏ではないと否定することができなかった。しかしながら, 特定の地鶏の全検体が, 本 DNA 識別手法をすり抜けるということとはなかった。以上の結果から, 市場に流通する部位肉, 内臓, 加工品全てに比内地鶏の DNA 識別手法を応用可能であること, および 5 マーカーの調査によって, ブロイラーおよび銘柄鶏は容易に比内地鶏と識別できることが示唆された。

キーワード: 比内地鶏, マイクロサテライト DNA マーカー, DNA 識別, 加工品, 市場流通

緒 言

食品分野では, これまで食品の衛生・安全性や品質の管理に取り組んできた。しかしながら, 近年, BSE の発生や偽装表示事件などにより, 消費者の食品に対する信頼が揺らぎ, 生産, 加工および流通の履歴を明確にできる食品の供給への消費者の要望が高まった。こうした中で, 食品のトレーサビリティ・システムの構築が喫緊の課題となっている。食品のトレーサビリティとは, 食品の取り扱いの記録を残すことにより, 食品の移動を把握できるようにする仕組みである (社団法人食品需給研究センター, 2003)。牛肉では 2003 年に牛肉のトレーサビリティに関する法律が施行され, 生産から流通に至る履歴を牛の個体番号によって管理するシステムが整備された (農林水産省, 2003)。また, 鶏肉においても, トレーサビリティ・システム導入の動きが広がっている (社団法人食品需給研究センター, 2008)。このような食品のトレーサビリティ・システムの効力を確実なものにするためには, 科学的根拠に基づいた検証が必要である。生産物の農場や品種の特定可能な DNA が明らかとなっている場合, その特徴を捉える DNA 識別手法を活用すれば, 生産, 加工および流通各段階で生

産物を確認できるため, トレーサビリティ・システムの検証方法として有効である。

比内地鶏は, 秋田県固有の地鶏である比内鶏の雄とロードアイランドレッド種の雌との一代交雑種としてコマース化された (畠山ら, 1978)。その出荷羽数は年々増加し, 平成 19 年には 75 万羽が出荷された。しかしながら, その年, 加工肉と卵を含む比内地鶏の偽装表示に関する事件が発覚し, 比内地鶏ブランド全体を揺るがす大問題となった。秋田県では, この問題を抜本的に解決するため, 比内地鶏のブランド認証制度 (秋田県, 2008) を整備し, 信頼回復に努めている。

最近, 我々は比内鶏の Z 染色体上のマイクロサテライト DNA マーカーを調査することによって, 比内地鶏と他の種鶏を識別する方法を開発した (Rikimaru and Takahashi, 2007)。この手法を基礎研究段階から実用段階に引き上げ, 比内地鶏のブランド認証制度をサポートするためには, 実際に市場に流通する検体を用いて DNA 識別手法の有効性を検証しておく必要がある。そこで, 本研究では, 比内地鶏の DNA 識別に有効である 5 つのマーカーを用いて, 比内地鶏の生肉および内臓の各部位, ガラスープ, くんせい等の加工品および実際に市場に流通しているブロイラー, 銘柄鶏, 地鶏を検査対象として比内地鶏の DNA 識別手法の有効性の検証を行った。

材 料 と 方 法

1. 供試材料

比内地鶏は, もも肉, むね肉などいわゆる「正肉」のほか, 心臓, 砂肝など焼き鳥を主な使用目的とする「部位肉」, 「内臓肉」

2009 年 8 月 25 日受付, 2009 年 10 月 28 日受理

連絡者: 力丸宗弘

〒019-0701 秋田県大仙市神宮寺字海草沼谷地 13-3

秋田県農林水産技術センター畜産試験場

Tel: 0187-72-3813

Fax: 0187-72-2807

E-mail: Rikimaru-Kazuhiro@pref.akita.lg.jp

が市場に流通している。また、「きりたんぼ鍋」用のガラスープのほか、くんせい、みそ漬けなど保存の利く加工品が出回っている。そこで、秋田県農林水産技術センター畜産試験場で生産した比内地鶏の各部位（もも肉、むね肉、ささみ、心臓、肝臓、砂肝、脾臓、首肉、手羽元、手羽先、尻（ぼんじり）、心臓上部（つなぎ）、軟骨、皮、脂（腹腔内脂肪））15 検体、および比内地鶏の加工商品 6 形態（ガラスープ、くんせい、みそ漬け、しお漬け、しょうゆ漬け、チキンソーセージ）32 検体の合計 47 検体（表 1）を用いて、市場流通形態の比内地鶏の DNA 識別手法の有効性の検討を行った。

次に比内地鶏ではない肉用鶏 341 検体（ブロイラー 95 検体、銘柄鶏 60 検体および地鶏 186 検体：表 2）を用いて、比内地鶏と他の肉用鶏を判定できるか検証を行った。銘柄鶏および地鶏は、「鶏肉表示のガイドライン」（社団法人日本食鳥協会，2008）の定義に従い分類した。「銘柄鶏」とは、両親が地鶏に比べ増体に優れた肉専用種といわれるもので、素びなの羽色が有色（褐色や黒色）のものと、通常ブロイラーと呼ばれる白い若どりの場合がある。本研究で用いた材料では、前者には中札内産赤どり、榛名百日鶏、プレノワール、三河赤鶏、みつせ鶏、古処鶏が、後者には、南部どり、森林どりが該当する。「地鶏」とは、在来種の純系によるもの、または在来種を素びなの生産の両親か片親に使ったもので在来種由来の血液百分率が 50% 以上の素びなから生産され、28 日齢以降平飼、定められた飼育密度で、80 日間以上飼育する（農林水産省，1999）。その多くは単鶏や各県所有の在来種と、商社系ブロイラー、白色プリマスロック、ロードアイランドレッド、横斑プリマスロックなどが複数交配されている。中には上州地鳥のように比内鶏を雄系種鶏作出に用いている事例もある。本研究では、「国産銘柄鶏ガイドブック 2007」（社団法人日本食鳥協会，2007）に掲載されている銘柄鶏および地鶏の交配様式を調べ、生産に関わる鶏種を可能な限り網羅するように銘柄鶏および地鶏肉を収集・調査した。なお、東京しゃもは、軍鶏とロードアイランドレッドを基にする在来種由来血液百分率 100% の素びなから生産されるが、ケージ飼育によって生産されるため「銘柄鶏」に分類した。

本試験に用いた比内地鶏の加工品、銘柄鶏および地鶏の検体は、秋田県農林水産技術センター畜産試験場が、生産・販売関係者に対し予め本研究目的を提示し、使用許諾を得た上で鶏肉を購入し、実験に用いた。

2. DNA 抽出

FTA クラシックカード（WB120205, GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK）を用いて、ゲノム DNA の抽出を行った。生肉および肉片を含む加工品からの DNA 抽出では、肉片 0.02~0.05 g を FTA クラシックカード上で圧片し、室温で一晩風乾させた。ガラスープについては、スープではなく表面に浮かぶ油を FTA クラシックカードに垂らし、同様に風乾させた。乾燥した部分から、専用の直径 1.2 mm のマイクロパンチ（WB 100028, GE Healthcare UK）を用いて、ディスクを 5 個打ち抜き、それを 0.2 ml のチューブに移した。チューブに 100 μ l の FTA 精製試薬（WB120204, GE Healthcare UK）を加え、ピペッティングで攪拌した後、20 分間静置した。上清を捨て、100 μ l の

DNAzol BD 溶液（10974-020, Invitrogen, Carlsbad, California, USA）を加え、ピペッティングで攪拌した後、20 分間静置した。上清を捨て、滅菌水 100 μ l で 3 回洗浄した。最後に、100 μ l の滅菌水を入れ、90°C で 10 分間熱処理した後、上清を回収し、以下に述べるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の鋳型の DNA 溶液として用いた。DNA 溶液は、PCR 直前まで、-30°C で冷凍保存した。

3. マイクロサテライト DNA 多型の検出

本研究では、4 つの ABR マーカー（*ABR0241*, *ABR0311*, *ABR0633* : Takahashi *et al.*, 2005 ; *ABR1003* : Rikimaru and Takahashi, 2007）と 1 つの ADL マーカー（*ADL0250* : Cheng *et al.*, 1995）を使用した。DNA は各 2.5 pmol のプライマー、200 μ M の dNTP、1.2 mM の MgSO₄、0.125 units KOD Plus ポリメラーゼ（KOD-201 ; 東洋紡，東京）、東洋紡から供給される 1×反応バッファー、上記の鋳型 DNA 溶液 2 μ を含む 6 μ l の反応液に調整し、サーマルサイクラー（GeneAmp™ System 9700 : アプライドバイオシステムズ, Foster City, CA, USA）を用いて PCR 増幅を行った。PCR サイクルは、94°C、2 分間の熱変性後、熱変性（94°C、15 秒）、アニーリング（58°C、30 秒）、伸長反応（68°C、30 秒）のサイクルを 40 回繰り返す、最後に 68°C で 9 分 30 秒伸長反応を行った。PCR 産物をサイズスタンダード（DN MW Standard Marker : タカラバイオ，大津，滋賀）と共に、DNA 自動シーケンサー（モデル 3100 : Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA）を用いて電気泳動した。DNA 断片の長さは GeneMapper ソフトウェア（Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA）を用いて、推定した。5 つのマーカーの PCR 増幅産物の長さに基づいて、マーカー型を判定した。

4. 比内地鶏の判定方法

我々は、秋田県農林水産技術センター畜産試験場で飼育、維持している比内鶏において、一つに固定したマーカー型を示す Z 染色体上のマイクロサテライト DNA マーカー 14 個を見出し、その活用によって理論上、比内地鶏とその他の鶏種を識別できると報告した（Rikimaru and Takahashi, 2007）。すなわち、比内鶏を父親とする F₁ の雌（性染色体の核型：ZW）の Z 染色体は、比内鶏のそれに由来するので、比内地鶏の雌は、比内鶏と全く同じマーカー型を示す。また、F₁ の雄（同：ZZ）においても一方の Z 染色体は比内鶏に由来するので、比内鶏で固定したマーカー型を示す。本研究では、14 個のマーカーのうち、他鶏種との識別率が相対的に高い 5 個のマーカーを選択し、全てのマーカーにおいて比内鶏由来のマーカー型が検出された場合、「比内地鶏と矛盾しない」と判定し、そうでない場合は「比内地鶏ではない」と判定した。

結果および考察

比内地鶏の各部位および加工品の判定結果を表 1 に示した。各検体・各マーカーが示すマーカー型は、全て比内地鶏と矛盾しなかった。くんせいでは、一つのマーカーあたり、2 つのピークを検出しているサンプルがあるが、原料となった個体が雄（性染色体の核型が ZZ）であったためと考えられる。

PCR 法は、本研究のように特定鶏種に由来する鶏肉の識別や、肉種識別のための DNA 検出に用いられているが、食肉の処理と

表 2. DNA 識別に用いた肉用鶏

分類	検体数	種類
ブロイラー	95	不明
銘柄鶏	60	中札内産赤どり、南部どり、東京しゃも、榛名百日鶏、プレノワール、三河赤鶏、森林どり、みつせ鶏、古処鶏 (9 種類)
地鶏	186	青森シャモロック、南部かしわ、やまがた地鶏、川俣シャモ、会津地鶏、上州地鳥、栃木しゃも、やさとしゃも、筑波地鶏、奥久慈しゃも、房総地どり、彩の国地鶏タマシャモ、駿河シャモ、にいがた地鶏、奥美濃古地鶏、名古屋コーチン、近江しゃも、京地どり、熊野地どり、大和肉鶏、播州地どり、丹波地どり、但馬地どり、媛っこ地鶏、道後地鶏、讃岐コーチン、土佐はちきん地鶏、土佐ジロー、天草大王、熊本コーチン、みやざき地頭鶏、さつま地鶏、烏骨鶏 (33 種類)

PCR の検出限界について検討した報告がいくつかある。たとえば、Matsunaga *et al.* (1999) は、ウシ、ブタ、ニワトリ、ヒツジ、ヤギおよびウマの種特異的なチトクローム b (*cytb*) 遺伝子を同時に検出するマルチプレックス PCR 法を開発した。その中で、120°C、30 分間熱処理した肉から DNA を抽出し、同法による種特異的な *cytb* の検出を試みた時、増幅サイズを 439 bp に設定したウマのサンプルでは PCR 増幅が認められず、それより増幅サイズが 398~157 bp と短い 5 畜種では、通常の PCR 増幅が認められたと報告した。そして、ウマにおいても、より短い DNA 断片を増幅するよう改善すれば、この問題は解決するであろうと考察した。Pascoal *et al.* (2005) は、BSE プリオンタンパク質の不活化処理 (133°C/300 kPa で 20 分間、および 121°C で 2 時間オートクレーブ) を施した牛肉から抽出した DNA からでも、増幅サイズを 115 bp に設定したウシの *cytb* の PCR 増幅が可能であると報告した。Arslan *et al.* (2006) は、肉の調理を想定して、煮沸した場合 (97.5°C で最長 230 分)、オートクレーブした場合 (120°C で最長 90 分)、オーブンで焼いた場合 (200°C で最長 150 分)、フライパンでソテーした場合 (45 分間、肉の内部温度 115°C、フライパンの油の温度 173°C) 等の処理をした牛肉からでも、271 bp の PCR 産物の増幅が可能であると報告した。一方、本研究で用いた加工品は、市販のものであり、どのような高温、高圧処理を施されたかは不明である。しかしながら、通常の加工品であれば、Pascoal *et al.* (2005) や Arslan *et al.* (2006) が検討したほど、厳しい条件で肉を処理することは想像できない。なぜならば、たとえば Arslan *et al.* (2006) の最もきびしい条件で肉を調理した場合、視覚的においしいと感じないほど、煮崩れていたり、焼けこげてしまったりしていることが容易に想像され、そのような加工商品は消費者に受け入れられないからである。また、5 つのマーカートの PCR 増幅サイズは、最も長いものでも ABR0633 の 261 bp と短く、このことも有利に働き、本研究では加工品においても、5 マーカーの PCR 増幅と型判定ができたものと推察される。

今回対象とした加工品の中で、比内地鶏のガラスープは、きりたんぼ鍋のスープの素として広く流通しているが、スープの本体部分からの DNA 抽出やマーカートの PCR 増幅は困難であった。

そこで、脂 (腹腔内脂肪) の DNA 識別が可能であったことをヒントに、スープに浮遊する油の中に DNA が含まれている可能性について検討した結果、ガラスープについてもマーカートの PCR 増幅と型判定ができた。我々は、先に、卵殻からの DNA 抽出方法を開発し、比内地鶏卵の DNA 識別が可能であることを報告した (Rikimaru and Takahashi, 2009)。これに本研究結果を加えることによって、比内地鶏を使用したほとんどの比内地鶏商品が、DNA 検査の対象となりうることを実証したことになる。しかしながら、加工品では原材料に比内地鶏肉を 100% 使っていないか、比内地鶏を何パーセント使用しているかといった具体的な表示義務がない。そのため、原材料に比内地鶏を 100% 使用していない加工品や、殻が付いていない卵の加工品の DNA 識別はできない。

比内地鶏とその他の肉用鶏の判定結果を表 3 に、またその他の肉用鶏における、比内地鶏との矛盾が検出されたマーカー数とサンプル数の内訳を表 4 に示した。調査したブロイラーおよび銘柄鶏は、全て「比内地鶏ではない」と否定できた。偽装表示として、生産コストが相対的に安いブロイラーを比内地鶏と偽るケースは想定されるため、本法は有効な識別法になると考えられる。一方、地鶏肉のうち、7.5% (186 検体中 14 検体) は、「比内地鶏ではない」と否定できなかった。しかしながら、本法では、比内地鶏を「比内地鶏ではない」と誤判定することはなかった (表 1)、調査した特定の地鶏の全検体が、この検査をすり抜けるということもなかった。また、偽装表示として、その他の地鶏を比内地鶏と偽るケースはほぼ想定外である。したがって、本研究で用いた 5 マーカーによる検査は、比内地鶏の DNA 識別法として、実効性が担保されているものと考えられる。一部比内地鶏ではないと否定できない地鶏肉のサンプルが見られたが、調査マーカー数を増やすことで対応可能と考えている。

以上の結果から、今回提示した 5 マーカーを調べることで、比内地鶏の各部位および加工品の DNA 識別が可能であること、特にスープの形態でも油が回収できれば DNA 識別が可能であることを示した。また、ブロイラーおよび銘柄鶏は、比内地鶏と容易に DNA 識別できることが示唆された。

力丸ら：比内地鶏の DNA 識別手法の有効性の検証

表 3. 肉用鶏での DNA 判定結果

種類	検体数	比内地鶏と矛盾しない	比内地鶏ではない
ブロイラー	95	0	95
銘柄鶏	1	8	0
—	2	8	0
—	3	8	0
—	4	8	0
—	5	4	0
—	6	8	0
—	7	4	0
—	8	4	0
—	9	8	0
銘柄鶏	小計	60	0
地鶏	1	8	3
—	2	4	0
—	3	2	1
—	4	8	0
—	5	8	1
—	6	4	2
—	7	4	0
—	8	8	1
—	9	4	0
—	10	8	0
—	11	8	0
—	12	8	0
—	13	4	0
—	14	4	1
—	15	4	0
—	16	4	0
—	17	5	0
—	18	4	0
—	19	4	0
—	20	8	1
—	21	8	1
—	22	8	0
—	23	4	1
—	24	4	1
—	25	3	0
—	26	8	0
—	27	8	1
—	28	4	0
—	29	8	0
—	30	8	0
—	31	4	0
—	32	4	0
—	33	4	0
地鶏	小計	186	14
			172

表 2 に示す銘柄鶏および地鶏の種類に、無作為に番号を振った後、降順に並び替えた。
表 2 と表 3 の対応関係は公表しない。

表 4. ブロイラー, 銘柄鶏および地鶏における, 比内地鶏との矛盾が検出されたマーカー数とサンプル数の内訳

	矛盾が検出されたマーカー数				合計
	0 個	1 個	2 個	3 個以上	
ブロイラー	0	2	14	79	95
銘柄鶏	0	3	10	47	60
地鶏	14	50	62	60	186

謝 辞

本研究を遂行するにあたり, 本研究目的にご理解をいただき, 鶏肉の購入にご賛同いただきました各県の肉用鶏生産, 販売関係者の方々に深甚の謝意を表します。

引用文献

- 秋田県における認証制度に対応した比内地鶏飼養管理マニュアル. 秋田県. 秋田. 2008.
- Arslan A, Ilhak I and Calicioglu M. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Science*, 72 : 326-330. 2006.
- Cheng HH, Levin I, Vallejo RL, Khatib H, Dodgson JB, Crittenden LB and Hillel J. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poultry Science* 74 : 1855-1874. 1995.
- 畠山義祝・勝浦 勉・赤川淳美. 比内鶏の利用に関する試験—比内鶏の交雑利用 (第 3 報). 昭和 52 年度秋田県畜産試験場試験

- 研究成績報告書 : 81-89. 1978.
- 地鶏肉の日本農林規格. 農林水産省. 東京. 1999.
- 国産銘柄鶏ガイドブック 2007. 社団法人日本食鳥協会. 東京. 2007.
- Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J and Shinmura Y. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51 : 143-148. 1999.
- Pascoal A, Prado M, Calo P, Cepeda A and Barros-Velázquez J. Detection of bovine DNA in raw and heat-processed food-stuffs, commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. *European Food Research and Technology*, 220 : 444-450. 2005.
- Rikimaru K and Takahashi H. A method for discriminating a Japanese brand of chicken, the Hinai-jidori, using microsatellite markers. *Poultry Science*, 86 : 1881-1886. 2007.
- Rikimaru K and Takahashi H. A simple and efficient method for extraction of PCR-amplifiable DNA from chicken eggshells. *Animal Science Journal*, 80 : 220-223. 2009.
- 食品トレーサビリティ・システム導入の手引き. 社団法人食品需給研究センター. 東京. 2003.
- Takahashi H, Tsudzuki M, Sasaki O, Niikura J, Inoue-Murayama M, Minezawa M. A chicken linkage map based on microsatellite markers genotyped on a Japanese Large Game and White Leghorn cross. *Animal Genetics* 36 : 463-467. 2005.
- 鶏肉トレーサビリティシステム導入の手引き. 社団法人食品需給研究センター. 東京. 2008.
- 牛の個体識別のための情報の管理及び伝達に関する特別措置法. 農林水産省. 東京. 2003.

Verification of Effectiveness of a Method for Identifying the Hinai-jidori Chicken, by Analyzing the Product's form Represented in the Market

Kazuhiro Rikimaru¹ and Hideaki Takahashi²

¹ Livestock Experiment Station, Akita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center, Daisen, Akita 019-1701, Japan

² Animal Breeding and Reproduction Research Team, National Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba 305-0901, Japan

We previously reported a method for identifying a Japanese brand of chicken, the Hinai-jidori, using microsatellite markers. To verify the effectiveness of the method, part's and processed meat of the Hinai-jidori chicken, and other meat-type chickens bought in the market were analyzed using five of the markers. PCR amplification of the five markers was confirmed in all the samples, and the marker types could be determined. In part's and processed meat of the Hinai-jidori chicken, marker types were corresponding to these of the Hinai-jidori chicken. In other meat-type chickens, samples originated from imported breeds of chicken could be judged that they were not the Hinai-jidori chicken. It was not observed that all samples of specific Jidori-brand chicken passed the DNA inspection, although 14 of 186 samples of Jidori-brand chicken could not be distinguished from the Hinai-jidori chicken by the marker types. These data suggest that the DNA inspection is practically effective enough to check the validity of labeling of the Hinai-jidori chicken including part's and processed meat, because it is suspected that broilers are being falsely labeled as Hinai-jidori.

(Japanese Journal of Poultry Science, 47 : J1-J7, 2010)

Key words : commercial scene, DNA inspection, Hinaijidori chicken, microsatellite marker, processed meat