

## DNA マーカーによるトレーサビリティーの確認

北海道立畜産試験場 藤川 朗

### 1. はじめに

国内初の BSE 牛の発生から 1 年余りが経過した。この 4 月以降も国内 4・5 頭目の BSE 牛が確認されたが、当初のような「牛肉回避パニック」は見られず、マスコミ・消費者の反応は比較的冷静なようである。しかし牛肉消費は徐々に回復してきているとはいえ、1 年たっても相場は依然として低レベルで推移しており、今回の BSE 騒動の打撃からわが国の肉牛産業が完全に立ち直るまでにはまだまだ相当の困難が予想される。

しかも BSE 牛の発生に続き牛肉の偽装工作や食肉の不正表示事件が次々と発覚し、食肉・畜産業界そのものに対する消費者の信頼は大きく揺らいでいる。これら消費者の信頼を取り戻すには、まず牛肉のトレーサビリティーを確立することが必要であるとの認識は多くの肉牛関係者に共通するものであろう。

BSE 対策によりすでに国の個体識別事業が大幅に前倒しされ、全国のほとんどの牛に個体識別用耳標の装着が完了しており、生産段階でのトレーサビリティーは整備されつつある。しかし販売段階については全国的には手つかずの状況であるため、一部の生産者団体や自治体は大手スーパーなどと連携して販売段階まで個体識別番号を何らかの形で流通させる独自の取り組みを開始している<sup>3)</sup>。

そのような生産・販売段階でのトレーサビリティーをチェックするシステムとして、現在 DNA 分析を利用した検証システムが注目を集めている。なぜならば、DNA は同じウシであればどの部位から取っても、いつ取っても同じであるし、扱いが容易で凍結保存ができ個体識別のための大量検体の分析に適しているからである。実際トレーサビリティーの確認に DNA 検査を取り入れるシステムはオーストラリアやアイルランドなどでもすでに商用ベースで採用されているという<sup>4)</sup>。

このような個体識別に非常に有用なのが DNA マーカー（マイクロサテライトマーカー）であるが、わが国ではすでに牛については（社）畜産技術協会附属動物遺伝研究所の研究によりその分析システムが確立されている<sup>1)</sup>。この DNA マーカーの分析システムは個体識別のためというよりは、むしろ有用な遺伝子を探索するための強力なツールとして同研究所と DNA 育種に関する共同研究を実施している全国の研究機関において日常的に利用されている。

北海道立畜産試験場もこの DNA 育種の共同研究に 5 年前から参加しているが、クローン子牛の遺伝的同一性の判定などにもこの DNA マーカーによる個体識別システムを利用してきており、その有効性を確認しているところである<sup>2)</sup>。北海道は牛肉の消費回復対策事業の一環として今年度はモデル的に 6,000 頭の規模で個体識別番号をブロック肉まで流通させる予定で、そのトレーサビリティーの確認に何らかの形で DNA 検査を取り入れていく方針である。そのような DNA 検査にあたっての課題を検討するために、今年 2 月に生産段階と販売段階での個体識別を DNA マーカーで確認するという一種のデモンストレーションを行ったのでその概要をここに紹介する。

## 2. 材料と方法

道立畜試で出生し肥育された黒毛和種去勢牛2頭からの「生産段階」と「販売段階」でのサンプルと対照として市販サーロイン牛肉からのサンプルを今回のデモに用いた。分析サンプルの概要は表1に示した。

表1 分析サンプルの概要

サンプル No.	サンプル属性	サンプル採取年月日	DNA 抽出年月日
431-1	431Jの血液	1999.3.13	2002.2.15
431-2	431Jのロース芯周囲の脂肪	2002.2.14	2002.2.16
467-1	467Jの血液	1999.4.27	2002.2.15
467-2	467Jのロース芯周囲の脂肪	2002.2.14	2002.2.16
559	市販国産牛肉サーロインの脂肪	2002.2.17	2002.2.17

これらの2頭の牛はどちらも生後2日目に血液を採取し凍結保存しているが(約3年前)、今回はこの子牛血液を「生産段階でのサンプル」とした(図1)。2頭の去勢牛は育成終了後、トウモロコシサイレージを利用して濃厚飼料を削減することを目的とした肥育試験に用い、どちらも約28ヶ月齢で昨年8月にと畜され枝肉調査を行った。このとき試験分析用に凍結保存していたロース芯を、今回は小売店のショーケースに並んでいるステーキ用ロースのつもりで「販売段階でのサンプル」とし、ロース芯の周囲から脂肪組織を少量切り取った(図2)。対照サンプルとして用いた牛肉は十勝管内のスーパーで購入した市販の国産サーロイン牛肉(半額セールで購入)であり、これも脂肪の厚いところから脂肪組織を少量切り取った(図3)。



図1 子牛血液の採取(サンプル431-1と467-1 1999年3~4月)

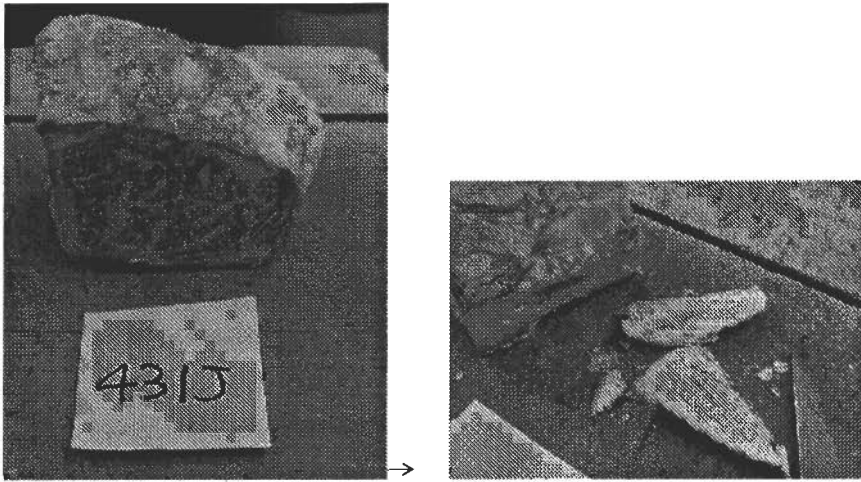


図2 ローソ芯周囲からの脂肪の採取（サンプル 431-2 と 467-2 2002年2月）

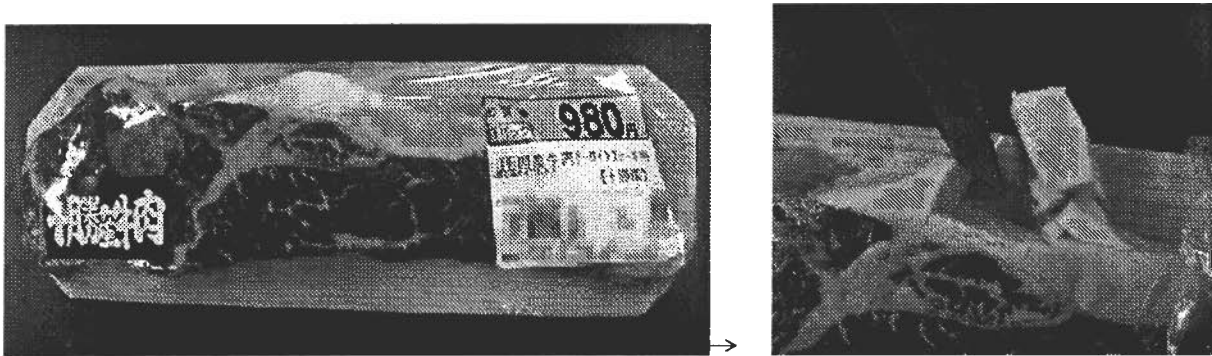


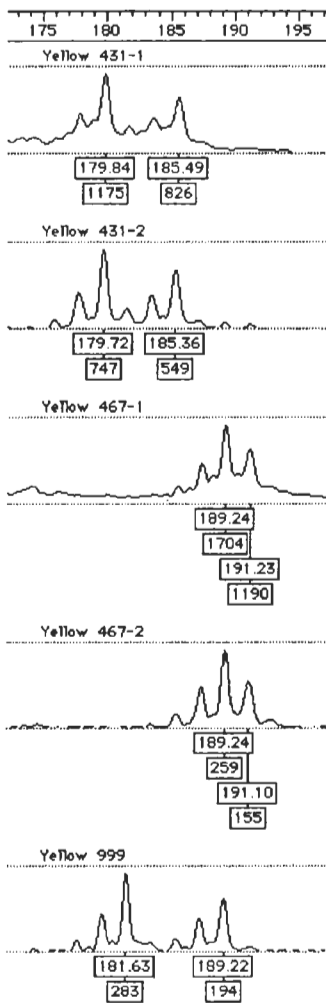
図3 市販ソーロインからの脂肪の採取（サンプル 999 2002年2月）

これらのサンプルから極めて簡易な方法でDNAを抽出し（約2時間）、10個のDNAマーカーについてPCR反応を行いマイクロサテライト領域を増幅した（約3時間）。この10個のマーカーは私たちが通常DNA育種研究で利用しているマーカーの中でもとくにアリル（対立遺伝子）の種類が多く（多型性が高い）、型判定が容易なものを選んだ。PCR産物はDNAシーケンサーを用いて電気泳動を行い（約3時間）、専用のソフトウェアを用いてそれぞれのDNAマーカーの型判定を行った。

### 3. 結果

DNAマーカーの判定結果は図4に示したように、各サンプルについてさまざまな山のかたちがグラフとなって出力されてくる。各サンプルのピークの数字が増幅したマイクロサテライト領域のDNAのサイズを示しており、その数字を丸めて（たとえば179.84→180）アリルの名前としている。明瞭なピークを二つ持てば、その個体はアリルを二つ持つヘテロの個体であり、ピークがひとつしかない時はその個体はアリルが一つしかないホモ個体ということになる。

表2には10個のDNAマーカーについて判定した遺伝子型をアリルの名前でそのまま示している。また表3にはそれらの遺伝子型のタイプを数字で（1～3）示しており、数字が同じものが同じ遺伝子型だということになる。



同一個体からのサンプルである431Jの血液とロース脂肪および467Jの血液とロース脂肪のDNAマーカーの遺伝子型はそれぞれにおいてすべて一致していた（もちろん、そうでないとたいへん困る）。また図4のDNAマーカー2のように431J、467Jおよび市販牛肉の全ての個体で遺伝子型の異なるマーカーが4個あった（DNAマーカー2、3、8および9）。また431Jと467Jでは遺伝子型が同一であるが市販牛肉のみ遺伝子型が異なるマーカーが3個あった（DNAマーカー5、7および10）。また、すべてのサンプルで遺伝子型が同一であり、別の個体との区別がつかないマーカーも3個あった（DNAマーカー1、4および6）。

図4 DNAマーカー2の型判定結果

表2 DNAマーカーの遺伝子型（生データ）

サンプル No.	DNA マーカー-1		DNA マーカー-2		DNA マーカー-3		DNA マーカー-4		DNA マーカー-5	
	アリル 1	アリル 2	アリル 1	アリル 2	アリル 1	アリル 2	アリル 1	アリル 2	アリル 1	アリル 2
431-1	211		180	185	162	178	110	120	121	149
431-2	211		180	185	162	178	110	120	121	149
467-1	211		189	191	162		110	120	121	149
467-2	211		189	191	162		110	120	121	149
999	211		182	189	170	178	110	120	121	

サンプル No.	DNA マーカー-6		DNA マーカー-7		DNA マーカー-8		DNA マーカー-9		DNA マーカー-10	
	アリル 1	アリル 2	アリル 1	アリル 2	アリル 1	アリル 2	アリル 1	アリル 2	アリル 1	アリル 2
431-1	211		100		157	159	168	172	110	
431-2	211		100		157	159	168	172	110	
467-1	211		100		157		162		110	
467-2	211		100		157		162		110	
999	211		98	102	142		156	170	90	110

表3 DNA マーカーの遺伝子型のタイプ（数字が同じものが同じ遺伝子型）

サンプル No.	DNA マーカー									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
431-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
431-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
467-1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1
467-2	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1
999	1	3	3	1	2	1	2	3	3	2

#### 4. まとめ

当然と言えば当然であるが、同一個体からのサンプルは全ての DNA マーカーで遺伝子型が一致していた。このように 10 個の DNA マーカー全ての遺伝子型が一致するということは、一卵性双子かクローン個体からサンプリングしたか同一個体から二つの DNA サンプルを取ったか、あるいは一つの DNA サンプルを単に二つに分けたか以外には考えにくい。なぜならば、全く別の個体が 10 個の DNA マーカーについて全ての遺伝子型がぴたりと偶然に一致する確率は理論的には 1 億分の 1 より小さくなるからである<sup>1)</sup>。

今回のデモでは、別の個体からのサンプル同士では遺伝子型の異なる DNA マーカーが 3 ~ 4 個あった。一つの DNA マーカーの遺伝子型が異なっているだけでも違う個体からのサンプルだと言えるので、多型性の高い DNA マーカーを用いれば今回のデモのように 10 個程度の判定でも生産段階と販売段階の個体識別が一致するか否かを確認することは充分可能であると考えられる。

さて、トレーサビリティの検証にこのような DNA 検査をどのような形で取り入れていったら良いのであろうか？まさか BSE のように「全頭検査」をするわけに行かないし、もし仮に全頭やったとしても 1 頭の枝肉につき精肉パックにして千数百個とも予想される商品の全品検査をできるはずがないので、あくまでも抜き取り検査でしかない。ちなみに、オーストラリアのシステムではランダムサンプリングで 1,500 個に 1 回程度の頻度で食肉製品と枝肉との DNA 検査を行うことになっているそうである<sup>4)</sup>。また、サンプリングの頻度が不明であるがアイルランドのシステムでは小売価格の最大 1 % 程度を DNA 検査の費用に要するそうであり、抜き取り検査としての有効性と費用・労力との兼ね合いが問題である。

ところで、このような抜き取り検査の結果は常に 100 点満点でなければならないが、もし万が一個体識別表示が間違っていた場合その原因を究明しシステムを改善するための対策が必要である。そして DNA 検査のためのサンプリングは恣意的なものではなく公正なものでなければならない。現在、長野県食肉消費対策協議会が進めている DNA 検査のためのサンプリングには消費者代表も加わるようになっており<sup>3)</sup>、これは公正さを確保するという点と消費者の理解を広げるといふ点で非常に賢明なやり方だと思われる。信頼性を高めるための DNA 検査に使うサンプルの採取には、まかり間違っても不正工作が入り込む余地の

ないものにしなければなるまい。

また、ホルスタインと黒毛和種といった品種を識別する DNA チップの研究開発も進められていると聞く。そのような技術が実用化されれば、DNA マーカーによるトレーサビリティの検証とは違った形で、牛肉の商品表示を監査する DNA 技術としての利用が期待される。

なおこれは私見であるが、生産段階で何らかの形で全ての牛の DNA サンプルを確保し一定期間（牛肉が消費されるのに充分なくらい）保管する体制を整備し、何か問題が起きた時にいつでも牛肉製品と DNA で照合できるのだというシステムにしておけば、実際には DNA での照合を全く行わなくても、販売段階での不正表示やミスを防止するための一種の抑止力として作用するのではないかと思う。

\*)本稿は肉用牛研究会報「DNA マーカーによるトレーサビリティの確認」(73:26-30 2002)に加筆修正したものである。

\*) DNA や育種・遺伝に関する用語については以下の WEB サイトを参考にいただきたい。「家畜 DNA 育種・用語解説」(北海道立畜産試験場・育種科の HP)

<http://www.agri.pref.hokkaido.jp/sintoku/beef/DNA%20terms/DNAtermindex.html>

#### 文献

- (1) M. Inoue et al. Individual Identification and Paternity Control of Japanese Black Cattle on Microsatellite Polymorphism. Anim. Sci. Technol. 68:443-449 1996
- (2) 藤川 朗: DNA はとっても便利. 北海道肉牛研究会報. 6:77-83 2002
- (3) 宮澤 隆:農場から食卓へ安心の贈り物-店頭での牛肉がわかるシステム-.日本の肉牛. 35:13-19 2002
- (4) 鈴木周一:と畜解体及び部分肉加工工程におけるトレーサビリティ. ミートジャーナル. 461:34-37 2002