

食安輸発第1017004号
平成19年10月17日

各検疫所長 殿

医薬食品局食品安全部監視安全課
輸入食品安全対策室長
(公印省略)

魚類乾製品へのフグ混入検査について

標記については、平成19年5月11日付け食安輸発第0511008号に基づき実施しているところですが、輸入食品・検疫検査センターにおいて行政検査が対応可能となったことから、今後は下記によりフグ混入の検査を実施することとしましたので対応方よろしくをお願いします。

なお、平成19年5月11日付け食安輸発第0511008号については、本日をもって廃止します。

記

1. 検査対象及び頻度

(1) 次の製造者が製造したカワハギ乾製品（調味品を含む。）については、輸入の都度、貨物を保留の上、検査を実施すること。

製造者名：LONGHAI JIARONG FOODS CO., LTD.

製造者住所：GANGWEI TOWN LONGHAI FUJIAN CHINA

(2) (1) 以外の製造者が製造したカワハギ乾製品（調味品を含む。）及びアンコウについては、平成19年3月30日付け食安輸発第0330005号（最終改正：平成19年9月21日付け食安輸発第0921001号）に基づき、検査の頻度を30%としてモニタリング検査を実施すること。

2. 検体採取方法及び検査方法

別添1により採取し、別添2の「遺伝子解析法に基づいたフグ加工品の鑑別検査方法」によりフグの混入の検査を行うこと。

3. 検体送付先

平成19年3月30日付け食安輸発第0330003号（最終改正：平成19年10月17日付け食安輸発第1017002号）の別紙3「フグ混入検査」の欄に基づき送付す

ること。

4. その他

別添2による検査の結果、フグのDNAを検出した場合にあっては、昭和59年3月3日付け環食第48号及び環乳第6号の「輸入フグ検査指針」において定められた形態で輸入されたものではないため、食品衛生法第6条違反として措置すること。

(別添1)

検体の採取方法

包装形態	ロットの大きさ (N)	検体採取のため の開梱数 (n)	検体採取量 (kg)	検体数
特定せず	≤ 150	3	1尾 (ピース) を1検体 として、各カートンよ り2尾を採取し、検査 に供する。	6
	151~1,200	5		10
	$1,201 \leq$	8		16

(別添2)

遺伝子解析法に基づいたフグ加工品の鑑別検査方法

1. 検査原則および試料調製法

1.1. 試料調製法

個別に採取した検体の可食部（筋肉部位）を試料として、個々に細切したものを各調製試料とする。

1.2. 注意点

- ・検査に供する調製試料は固体、液体の性状に関わらず、重量測定にて一定量を採取する。なお、検体が缶詰製品のように油と脂質を多量に含む場合は、あらかじめクロロホルム/メタノール/H₂O（1：2：0.8）溶液で1昼夜洗浄し、その後ろ過して採取する。
- ・試料調製を含む検査全般は、空気の動きがなく温度・湿度の変動が少ない場所で実施する。
- ・微量測定のため、細切器具、秤量用器具は中性洗剤等で洗浄後、アルカリ洗剤に一晩漬け置きする。あるいは超音波洗浄機を用い、30分間の超音波処理を行なう。
- ・試料の調製場所と検査場所は、区切られた空間で行ない、コンタミネーションを防ぐ。

2. 特定原材料等の検査方法

2.1. PCR検査法

食品からのDNA抽出精製法（2.1.1.）に従ってDNA抽出を行ない、得られたDNA試料液を用いて以下に示す定性PCRを行なう。なお、DNA抽出は各調製試料について行う。

2.1.1. DNA抽出精製法

DNA抽出精製法は、DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN社）を用いた方法で行なう。本法によりDNAが抽出されない調製試料については、Genomic-tip 20/G Kit（QIAGEN社）を用いたDNA抽出を試みる。なおDNAの抽出精製の際に用いる水は、特に断らない限りすべて逆浸透膜精製したRO水または蒸留水をMilli-Q等で17MΩ・cm（25℃）まで精製した超純水を121℃、20分間の条件でオートクレーブ滅菌したものとする。均質化した調製試料25mgを1.5mL滅菌済みサンプリングチューブに量り採り、同サンプリングチューブにあらかじめ55℃に加温しておいたBuffer ATL 180μLとProteinase K溶液（QIAGEN社）40μLを加える。その後、試料塊が残らないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、55℃で3時間加温する。その間、数回ボルテックスミキサーによる混合を行なう。加温処理後、室温下で20,000×gの条件で15分間遠心分離

し、上清を別の1.5mL滅菌済みサンプリングチューブに移す。上清を移しかえたチューブにRNase A溶液 (QIAGEN社) を4 μ L加えた後、ボルテックスミキサーによる混合を行ない、室温下で2分間放置する。その後、あらかじめ55°Cに加温しておいたBuffer AL 200 μ Lを加えボルテックスミキサーによる混合を行ない、70°Cで10分間加温する。加温処理後、ボルテックスミキサーによる混合を行ない、100%エタノールを200 μ L加え、10秒間再度ボルテックスミキサーで攪拌し、溶解液を得る。つぎに、この溶解液全量を2mL collecting tube に設置したDNeasy Mini Spin columnに充填し、室温下13,000 \times gの条件で1分間遠心分離し、溶出液を捨てる。別に用意した新しい2mL collecting tube にDNeasy Mini Spin columnを移しかえたのちBuffer AW1を500 μ L加え、室温下13,000 \times gの条件で1分間遠心分離し、溶出液を捨てる。つぎに、別に用意した新しい2mL collecting tube に再度DNeasy Mini Spin columnを再度移しかえたのちBuffer AW2を500 μ L加え、室温下18,000 \times gの条件で3分間遠心分離し、溶出液を捨てる。その後新しい1.5mL滅菌済みサンプリングチューブにDNeasy Mini Spin columnを移し、Buffer AEを200 μ L加え、室温下に1分間静置した後室温下20,000 \times gの条件で1分間遠心分離しDNAを溶出する。これをDNA試料原液 (200 μ L) とする。

2.1.2. DNAの精製度の確認と定量

抽出精製したDNA試料原液を一定量取り、200-320nmの範囲で紫外部吸収スペクトルを測定する。この際230nm、260nmおよび280nmの吸光度 (O. D. 230、O. D. 260およびO. D. 280) を記録する。次いで260nmの吸光度の値1を50ng/ μ L DNAとしてDNA濃度を算出する。また、O. D. 260/O. D. 280を計算し、この比が1.2-2.5であることを確認する。なお、2.1.2.の方法でDNA試料液は約5 ng/ μ Lの濃度で調製できるが、検査対象検体によってはDNAの抽出効率が悪く、5 ng/ μ Lの濃度で調製することができない場合が考えられる。そのような場合には、最も5 ng/ μ Lに近い濃度で調製し、DNA試料液とする。また、O. D. 260/O. D. 280の吸光度比に関しては、1.2-2.5の範囲であることを原則としてDNA試料溶液を調製し、PCR増幅を行なう。

2.1.3. 定性PCR法

定性PCR法においては、抽出されたDNAに含まれる目的塩基配列領域を、プライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドを用いてpolymerase chain reaction (PCR) ^{*1}を行なうことにより増幅し、その増幅産物の塩基配列を決定した後、目的とする種の塩基配列と比較することで種の判定を行なう。

2.1.3.1. PCR増幅

検査は各調製試料から抽出されたDNAについて行ない、DNAを規定濃度に調製した後PCR法の鋳型DNAとして供し、ミトコンドリアDNA中の16S rRNA遺伝子部分領域を増幅する。

まず、PCR用反応チューブ（0.2mL容）を以下のように調製する。PCR増幅は50 μ Lの反応液で行ない、1 \times PCR緩衝液^{*2}（2mM MgCl₂含有）、0.2mM dNTP、0.6 μ Mフォワード、リバース各プライマー^{*3}および2.0 units Taq DNAポリメラーゼ^{*4}を含む反応液系に、5 ng/ μ Lに調製したDNA試料液5 μ L（DNAとして25 ng）を加え、全量を50 μ Lとする。つぎに、その反応チューブをPCR増幅装置^{*5}にセットする。反応条件は次のとおりである。98 $^{\circ}$ Cで10秒、53 $^{\circ}$ Cで30秒および72 $^{\circ}$ Cで60秒を1サイクルとして、30サイクルのPCR増幅を行なう。その後4 $^{\circ}$ Cで保存し、得られた反応液をPCR増幅反応液とする。PCR反応のブランク反応液として、必ずプライマー対を加えないものならびにDNA試料液を加えないものについても同時に調製する。

上記に加え、チトクロームb遺伝子部分領域^{*6}についても必要とあれば実施する。この場合、反応条件は98 $^{\circ}$ Cで10秒、55 $^{\circ}$ Cで30秒および72 $^{\circ}$ Cで60秒を1サイクルとして、30サイクルのPCR増幅とする。

2.1.4. アガロースゲル電気泳動

PCR増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、DNA増幅バンドを確認する。

2.1.4.1 アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE緩衝液^{*7}を加え、加熱してアガロースを溶解させる。つぎに、100mLあたり1 μ Lのエチジウムブロマイド溶液（10 mg/mL）^{*8}を加え、ゲルが50 $^{\circ}$ C前後まで冷えたらゲルメーカーにゲルを流し込み、十分に室温で冷やし固めてゲルを作製する^{*9}。ゲルはすぐに使用することが望ましいが、緩衝液に浸して数日間は保存することが可能である。ゲルの濃度は2%が適当である。

2.1.4.2. 電気泳動

TAE緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。PCR増幅反応液10 μ Lと2 μ Lのゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに全量を注入する。ウェルへの注入に時間がかかりすぎると、DNAが拡散し鮮明な結果が得られない場合があるので注意する。つぎに、100V定電圧で電気泳動を行ない、ゲルローディング緩衝液に含まれるBPBがゲルの2/3程度まで進行したところで電気泳動を終了する。

2.1.4.3. ゲルの染色（後染色）

前染色を行なった場合は本項の操作は必要ない。

ゲルが十分に浸る量のTAE緩衝液が入った容器に、泳動後のゲルを移し入れる。つぎに緩衝液100 mLあたり1 μ Lのエチジウムブロマイド溶液（10 mg/mL）を加え、容器を振とう機に乗せて軽く振とうしながら20分程度染色する。その後、TAE緩衝液のみが入った容器に染色済みのゲルを移し、20分程度軽く振とうしながら脱染色を行なう。

2.1.4.4. ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージに食品包装用ラップ^{*10}を置き、その上に電気泳動および染色操作を完了したゲルを乗せて紫外線（312 nm）を照射する。ゲルイメージ解析装置の画面で電気泳動パターンを確認する。DNA分子量標準マーカと比較して目的のバンドの有無を判定する。ブランク反応液で対応するPCR増幅バンドが検出された場合は、DNA抽出操作以降の結果を無効として、改めて実験をやり直す。泳動結果は画像データとして保存しておく。

2.1.2.に記載したDNA抽出法を行ない、PCR増幅を行なった結果、目的のバンドが検出されなかった場合は、再度2.1.2.に記載したDNA抽出操作をやり直す。さらに、再度DNA抽出を行なった場合でも目的のバンドが検出されなかった場合は、他の抽出法を用いて抽出操作を行なう。

2.1.5. DNA直接塩基配列決定法

PCR増幅後のDNA産物の塩基配列を決定するため、PCR産物の精製を行なう。すなわち、ダイレクトシーケンス用に精製するため、PCR産物 10 μ LにExoSAP-IT（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）原液 4 μ L^{*11}を加え、37°Cで60分間酵素処理した後85°Cで15分間加熱して酵素を不活性化させる。インキュベーション終了後は4°Cに保存する。つぎに、ExoSAP-IT 処理したPCR産物をtemplateとしてラベリング反応^{*12}を行ない、さらにAutoSeqTM G-50（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）で精製した後^{*13}自動DNAシーケンサ^{*14}を用いて得られたPCR産物の塩基配列を決定する。

2.1.6. 結果の判定

各調製試料より抽出したDNAを規定の濃度に調製した後、鋳型DNAとして用い、PCR法を実施する。その結果、DNA試料液から615 bp（チトクロームb遺伝子部分領域の場合は490 bp）のPCR増幅バンドが検出された場合には、塩基配列の決定を実施する。フグ種の塩基配列は別紙に従い、それぞれに対して99.0%以上の確率で配列相同性を有した場合のみ同一種と判定する^{*15}。

脚注

*1) PCRでは、鋳型DNAがごく微量でも存在していれば目的塩基配列領域が増幅され得る。従って、実際の実験操作並びに日頃の実験環境の保全にあたり、DNA（特にPCR増幅産物）の混入に充分注意を払う必要がある。また、DNAは人間の皮膚表面から分泌されているDNA分解酵素により分解されるため、本酵素の混入を防止しなければならない。これらの点を考慮し、使用するチューブ、チップは使用する直前に121℃、20分以上の条件でオートクレーブ滅菌したものを扱い、使い捨てとする。また、チップに関しては、滅菌済みフィルター付きチップを使い捨てで使用することも意図せざるDNAの混入防止に有効である。さらに、定性PCR法において用いる水は、特に断らない限りすべて逆浸透膜精製したRO水または蒸留水をMilli-Q等で17M Ω .cm (25℃) まで精製した超純水を121℃、20分間の条件でオートクレーブ滅菌したものとする。

*2) PCR緩衝液

10×EX Taq Buffer (20mM Mg²⁺ plus) (タカラバイオ社製) および同等の結果が得られるものを用いる。

*3) 16S rRNA遺伝子部分領域用プライマー対および増幅バンド長は以下のとおりである。

検出用プライマー対

F-primer (16SarL) : 5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'

R-primer (16SbrH) : 5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3'

増幅バンド長

615 bp (検査対象検体によっては、得られる増幅バンド長に若干の違いが認められる場合があるので注意すること)

*4) Taq DNAポリメラーゼ

EX Taq DNAポリメラーゼ (タカラバイオ社製) および同等の結果が得られるものを用いる。

*5) プログラムコントロールシステム PC 801 (アステック社製) および同等の結果が得られるものを用いる。

*6) チトクロームb遺伝子部分領域用プライマー対および増幅バンド長は以下のとおりである。

検出用プライマー対

F-primer (L14317Glu) : 5'-CAG GAT TTT AAC CAG GAC TAA TGG CTT GAA-3'

R-primer (H15149) : 5'-CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA-3'

増幅バンド長

490 bp (検査対象検体によっては、得られる増幅バンド長に若干の違いが認められる場合があるので注意すること)

*7) TAE緩衝液

各最終濃度が40 mM Tris-酢酸、1 mM EDTAとなるように蒸留水を用いて調製したものをTAE緩衝液とする。

*8) エチジウムブロマイド

強力な発ガン作用と毒性があるため、取り扱いの際には必ず手袋をはめ、マスクを着用すること。

*9) 前染色

この段階でエチジウムブロマイド溶液を加えず、電気泳動終了後染色を行っても良い。(後染色)

*10) 食品包装用ラップ

ポリ塩化ビニリデン製のフィルムを用いること。

*11) 過剰なプライマーおよびdNTPsの除去

PCR反応液からPCRプライマーおよびdNTPsを除去する目的で、PCR産物の2/5量(10 μ Lに4 μ L)のExoSAP-IT原液を加える。

*12) ラベリング反応

BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI社製) および同等の結果を得られるものを用いる。なお、ラベリング反応条件は以下のとおりとし、1つのPCR産物につきF-primerとR-primerの両方をラベリングする。反応は、96°Cで60秒加温後、96°Cで10秒、50°Cで5秒および60°Cで120秒を1サイクルとして、25サイクル行ない、その後4°Cで保存する。プログラムコントロールシステム PC 801 (アステック社製) および同等の結果が得られるものを用いる。

フォワード側シーケンス	分量	リバーズ側シーケンス	分量
滅菌蒸留水	3.0 μ L	滅菌蒸留水	3.0 μ L
シーケンスキットプレミックス	8.0 μ L	シーケンスキットプレミックス	8.0 μ L
F-primer (2 μ M)	2.0 μ L	R-primer (2 μ M)	2.0 μ L
DNA	7.0 μ L	DNA	7.0 μ L

*13) 過剰な色素の除去

未反応ダイターミネーターを除去する目的で、スピンカラム法による精製を行なう。なお、エタノール沈殿法を用いても良い。ただし、AutoSeq™ G-50を用いた場合は溶出液をそのままシーケンサにアプライして良いが、エタノール沈殿法を用いた場合は、15 μ Lの100%脱イオン化ホルムアミドを加えてボルテックスミキサーにより混合し、95°Cで3分間変性させた後シーケンサにアプライする。

*14) 自動DNAシーケンサ

ABI 310ジェネティックアナライザ、3130ジェネティックアナライザおよび同等の結果を得られるものを用いる。

*15) DNA配列情報の解析は、DNASIS Pro Version 2.0（日立ソフトウェア社製）および同等の結果を得られるものを用いる。

(別紙)

フグ種塩基配列

標準和名	学名	16S rRNA 遺伝子部分領域 塩基配列 (bp)
1 トラフグ	<i>Takifugu rubripes</i>	別途事務連絡による
2 カラス	<i>T. chinensis</i>	//
3 マフグ	<i>T. porphyreus</i>	//
4 アカメフグ	<i>T. chrysops</i>	//
5 シマフグ	<i>T. xanthopterus</i>	//
6 ナシフグ	<i>T. vermicularis</i>	//
7 ヒガンフグ	<i>T. pardalis</i>	//
8 ムシフグ	<i>T. exasurus</i>	//
9 ショウサイフグ	<i>T. snyderi</i>	//
10 クサフグ	<i>T. niphobles</i>	//
11 コモンフグ	<i>T. poecilonotus</i>	//
12 シロサバフグ	<i>Lagocephalus wheeleri</i>	//
13 クロサバフグ	<i>L. gloveri</i>	//
14 ドクサバフグ	<i>L. lunaris</i>	//
15 カナフグ	<i>L. inermis</i>	//
16 センニンフグ	<i>L. (Plueranacanthus) sceleratus</i>	//
17 クマサカフグ	<i>L. oceanicus</i>	//
18 モヨウフグ	<i>Arothron stellatus</i>	//
19 スジモヨウフグ	<i>A. manilensis</i>	//
20 サザナミフグ	<i>A. hispidus</i>	//
21 ケショウフグ	<i>A. mappa</i>	//
22 ヨゴレフグ	<i>A. nigropunctatus</i>	//
23 オキナワフグ	<i>Chelonodon patoca</i>	//
24 ヨリトフグ	<i>Sphoeroides pachygaster</i>	//
25 ハコフグ	<i>Ostracion immaculatus</i>	//
26 ウチワフグ	<i>Triodon macropterus</i>	//