

食安輸発0906第1号
平成23年9月6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)

輸入魚類加工品のフグ種鑑別検査法について

標記については、平成21年3月30日付け食安輸発第0330003号により、検疫所において輸入魚類加工品を対象に実施するフグ混入有無の確認のための遺伝子鑑別検査法を示しているところです。

今般、上記通知の別紙に示されたコモンフグの16S rRNA遺伝子塩基配列が誤って記載されていたことが判明したため、上記通知に示す検査法を別添のとおり改めるので、御了知の上、関係業者への周知方よろしくをお願いします。

なお、変更箇所は参考の新旧対照表を参照のこと。

(別 添)

遺伝子解析法に基づいた魚類加工品のフグ種鑑別検査法

1. 試料調製

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、それらの個体の一部をまとめて粉砕機又はフードカッター等^{*1}で十分に破砕し、均質混和したものを調製試料とする。なお、試料調製のために一部を採取した各個体は、2.1.4.3.において陽性と認められた場合、続くフグ種同定試験（2.2.）に用いるため個々に保管しておく。

^{*1} 粉砕機及びフードカッターでは均質混合が不十分であると認められる場合は、滅菌済みメスなど均一性が確保される他の方法を用いて細切した試料片を混合してもよい。

1.2. 試料調製における注意点

検査に供する調製試料は、固体、液体の性状にかかわらず、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行う。

微量測定のため、粉砕機、フードカッター、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か、又は超音波洗浄機を用い、30分間の超音波処理を行う。

試料の調製及び検査は、区切られた空間で行い、コンタミネーションを防ぐ。

2. 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抽出を行い、得られたDNA試料液を用いて以下に示す定性PCRを行う。なお、DNA抽出は1調製試料につき2点並行で行い、それ以降PCR増幅産物の確認に至るまでの全操作は、この2点に対して独立並行で行う。

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水又は蒸留水をMilli-Q等で17 MΩ.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25 mgを1.5 mL滅菌済みサンプリングチューブに量り取り、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 180 µLとProteinase K溶液（QIAGEN社）40 µL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う。加温処理後、室温下で13,000×g以上の条件で15分間遠心分離し、上清を別の1.5 mL滅菌済みサンプリングチューブに移す。上清を移し替えたチューブにRNase A溶液（QIAGEN社）を4 µL加えた後、ボルテックスミ

キサーによる混合を行い、室温下で 2 分間放置する。その後、あらかじめ 55℃に加温しておいた Buffer AL 200 µL を加えボルテックスミキサーによる混合を行い、70℃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い。100%エタノールを 200 µL 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。次に、この溶解液全量を 2 mL collecting tube に設置した DNeasy Mini Spin column に充填し、室温下 13,000×g 以上の条件で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。別に用意した新しい 2 mL collecting tube に DNeasy Mini Spin column を移し替えたのち、Buffer AW1 を 500 µL 加え、室温下 13,000×g 以上の条件で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。次に、別に用意した新しい 2 mL collecting tube に再度 DNeasy Mini Spin column を再度移し替えたのち、Buffer AW2 を 500 µL 加え、室温下 18,000×g 以上の条件で 3 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。その後新しい 1.5 mL 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 µL 加え、室温下に 1 分間静置した後室温下 13,000×g 以上の条件で 1 分間遠心分離し DNA を溶出する。これを DNA 試料原液 (200 µL) 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、200～320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定する。この際 230 nm、260 nm 及び 280 nm の吸光度 (O.D. 230、O.D. 260 及び O.D. 280) を記録する。次いで 260 nm の吸光度の値 1 を 50 ng/µL 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、2.1.1.の方法で DNA 試料液は約 5 ng/µL 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/µL の濃度で調整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/µL 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するが、上記条件を満たした DNA が抽出されない場合には、原則の O.D. 260/O.D. 280 の吸光度比の範囲である 1.2～2.5 に最も近い値を示した DNA 試料原液を用いて DNA 試料溶液を調製し、PCR 増幅を行う。

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)^{*2}を行うことにより増幅し、その増幅産物の有無によってフグであるか否かを判定する。その後、陽性であった場合（本法では PCR 増幅バンドが認められた場合）、新たにフグ種同定用プライマーペアを用いた PCR 増幅を行い、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う。

*2 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。したがって、実際の実験操作及び日頃の実験環境の保全に当たっては、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 水又は蒸留水を Milli-Q 等で 17 MΩ.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。

2.1.3.1. PCR 増幅

検査は 1 調製試料より 2 点並行で抽出された各 DNA について行い、DNA を規定濃度に調整した後 PCR 法の鋳型 DNA として供する。PCR 増幅は、まず、動物 DNA 検出用プライマーセット^{*3}を用いて行い、その結果を 2.1.3.4.に記載のある判定例に照らして判定し、判定に準じた 2 度目の PCR 増幅をフグ種検出用プライマーセットを用いて行う。

^{*3} 動物 DNA 検出用のプライマーセット及び増幅バンド長^{*4}は以下のとおりである。

動物 DNA 検出用プライマーセット

F-primer-1 (mt16-997-S) : 5'- TGA CCG TGC GAA GGT AGC -3'

F-primer-2 (mt16-997ATT-S) : 5'- TAA CTG TGC TAA GGT AGC -3'

R-primer-1 (mt16-1439-AS) : 5'- CTT AAT TCA ACA TCG AGG TC -3'

増幅バンド長

約 370~470 bp

^{*4} 動物 DNA 検出用プライマーセットは、広く動物 DNA を検知することを目的として設計されている。そのため、標的遺伝子には動物界に広く分布し、高度に保存されている遺伝子を選定しているが、完全に保存されているものではなく、動物間で塩基配列の挿入や欠損が認められるものがある。このため、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が必要である。

2.1.3.2. DNA 試料液の品質確認のための PCR 増幅

まず、PCR 用反応チューブ (0.2 mL 容) を以下のように調製する。PCR 増幅は 25 μ L の反応液で行い、1 $\times$ PCR 緩衝液^{*5} (MgCl₂-free)、3 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dNTP、0.1 μ mol/L フォワード各プライマー^{*3}、0.2 μ mol/L リバースプライマー及び 0.625 units Taq DNA ポリメラーゼ^{*6}を含む反応液系に、5 ng/ μ L に調整した DNA 試料液 2.5 μ L (DNA として 12.5 ng) を加え、全量を 25 μ L とする。次に、その反応チューブを PCR 増幅装置^{*7}にセットする。反応条件は次のとおりである。95 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱後、95 $^{\circ}$ C で 30 秒、50 $^{\circ}$ C で 30 秒及び 72 $^{\circ}$ C で 30 秒を 1 サイクルとして、30 サイクルの PCR 増幅を行う。その後 72 $^{\circ}$ C で 7 分維持した後 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、必ずプライマーセットを加えないもの及び DNA 試料液を加えないもの、ポジティブコントロールとして、提供されるトラフグ DNA 及びクロサバフグ DNA^{*8}を加えたものについても同時に調製する。

^{*5} PCR 緩衝液

10 $\times$ EX Taq Buffer (20 mM Mg²⁺-free) (タカラバイオ社製) 又はこれと同等の結果が得られるものを用いる。

^{*6} 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) 又はこれと同等の結果が得られるものを用いる。

^{*7} プログラムコントロールシステム PC 801 (アステック社製)、PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient (タカラバイオ社製)、マスターサイクラー^{ep} グラジェント S (エッペンドルフ社製) 又はこれらと同等の結果が得られるものを用いる。

^{*8} ポジティブコントロールとしてのトラフグ DNA 及びクロサバフグ DNA は東京海洋大学から提供されたものを使用すること。

連絡先：〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7

東京海洋大学海洋科学部食品生産科学科生体物質化学研究室 石崎松一郎

Tel&Fax : 03-5463-0614、e-mail : ishizak@kaiyodai.ac.jp

2.1.3.3. 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。

2.1.3.3.1. 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^{*9}を加え、加熱してアガロースを溶解させる。次に、100 mL あたり 10 μ L の SYBR Safe DNA Gel Stain 10,000x concentrate in DMSO (インビトロジェン社製)^{*10}を加え、ゲルが 50°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^{*11}。ゲルは直ちに使用することが望ましいが、緩衝液に浸して数日間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。

*9 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。

*10 SYBR Safe DNA Gel Stain 10,000x concentrate in DMSO

毒性はないが、取り扱いの際には必ず手袋をはめること。なお、SYBR Safe DNA Gel Stain の代わりにエチジウムブロマイド溶液 (10 mg/mL) を用いてもよい。その場合は、TAE 緩衝液 100 mL あたり 1 μ L のエチジウムブロマイド溶液を加えること。エチジウムブロマイドは、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。

*11 前染色

この段階で SYBR Safe DNA Gel Stain 10,000x concentrate in DMSO を加えず、電気泳動終了後染色を行っても良い。(後染色) なお、SYBR Safe DNA Gel Stain の代わりにエチジウムブロマイド溶液 (10 mg/mL) を用いてもよい。

2.1.3.3.2. 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。次に、100 V 定電圧で電気泳動を行い、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。

2.1.3.3.3. ゲルの染色 (後染色)

前染色を行った場合は本項の操作は必要ない。

あらかじめ TAE 緩衝液 100 mL あたり 10 μ L の SYBR Safe DNA Gel Stain 10,000x concentrate in DMSO を加えたプラスチック容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に、アルミホイルでカバーするか又は暗所にてプラスチック容器を室温で振とう機に乗せて軽く振とうしながら 30 分程度染色する。なお、SYBR Safe DNA Gel Stain の代わりにエチジウムブロマイド溶液 (10 mg/mL)を用いてもよい。

2.1.3.3.4. 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^{*12}を置き、その上に電気泳動及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。なお、SYBR Safe DNA Gel Stain の蛍光最大波長は 530 nm であるため、エチジウムブロマイド用フィルターは不適である。したがって、最適なフィルターセットを選択すること。

*12 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。

2.1.3.4. 結果の判定

1 調製試料より 2 点並行で抽出した DNA を規定濃度に調整した後、鋳型 DNA として用い、PCR を実施する。動物 DNA 検出用プライマーセット*³を用いた PCR 増幅の結果、DNA 試料液 2 点のいずれを用いた場合でも共に 370～470 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合には（下記動物 DNA 検出用プライマーセット判定例試料番号 1）、両試料液において PCR 増幅に必要な品質を有する DNA が抽出されたと判断し、次いで、フグ種検出用プライマーセットを用いた PCR 増幅を各試料液に対し実施する。また、DNA 試料液 2 点のうちいずれかにおいて PCR 増幅バンドが検出されなかった場合（下記動物 DNA 検出用プライマーセット判定例試料番号 2 及び 3）には、当該試料液を用いた検査を中止し、PCR 増幅バンドが得られた試料液のみを鋳型として、フグ種検出用プライマーセットを用いた PCR 増幅を実施する。なお、下記動物 DNA 検出用プライマーセット判定例試料番号 4 にあるように、動物 DNA 検出用プライマーセットを用いた PCR 増幅の結果において、DNA 試料液 2 点ともに PCR 増幅バンドが検出されなかった場合、PCR 増幅に必要な品質を有する DNA が抽出されていないと判断し、2.1.1.に示されている先に用いた DNA 抽出法以外の抽出法を試みる。2.1.1.に示されている 2 種の DNA 抽出法を用いても同様の結果が得られる場合には、当該検査対象検体からの DNA 抽出が不可能であり、PCR 法による検知不能と判断する。以下に判定例を示す。

動物 DNA 検出用プライマーセット判定例

	試料番号			
	1	2	3	4
抽出 DNA 試料液 1	+	+	—	—
抽出 DNA 試料液 2	+	—	+	—
	事例 1	事例 2		事例 3

＋：増幅バンド検出、－：増幅バンド非検出。

事例 1： フグ種検出用プライマーセットを用いた PCR 増幅を DNA 試料液 2 点に対し行う。

事例 2： 増幅バンドの得られた DNA 試料液に対してのみ、フグ種検出用プライマーセットを用いた PCR 増幅を行う。

事例 3： 本法による DNA 抽出は困難であると判断し、DNA 抽出法の最適化を図る。2 種の DNA 抽出法を試みてなお、同じ結果のみ得られる場合には、当該検査対象検体からの DNA 抽出は不可能であり、PCR 法による検知不能と判断する。

2.1.4. フグ種の検知を目的とした PCR 増幅

2.1.3.4.の結果をもとに、フグ種検出用プライマーセットを用いた PCR 増幅を行う。

2.1.4.1. PCR 増幅

検査は 2.1.3.4.で PCR 増幅バンドが検出された DNA 試料液について行い、DNA を規定濃度に調整した後 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（0.2 mL 容）を以下のように調製する。PCR 増幅は 25 μ L の反応液で行い、1 $\times$ PCR 緩衝液^{*13}（2 mM MgCl₂ 含有）、0.2 mmol/L dNTP、0.3 μ mol/L 各フォワード、0.6 μ mol/L リバースプライマー^{*14} 及び 1.0 units Taq DNA ポリメラーゼ^{*15} を含む反応液系に、5 ng/ μ L に調整した DNA 試料液 2.5 μ L（DNA として 12.5 ng）を加え、全量を 25 μ L とする。次に、その反応チューブを PCR 増幅装置^{*16} にセットする。反応条件は次のとおりである。98℃で 10 秒、57℃で 30 秒及び 72℃で 60 秒を 1 サイクルとして、30 サイクルの PCR 増幅を行う。その後 4℃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、必ずプライマーセットを加えないもの及び DNA 試料液を加えないもの、ポジティブコントロールとして、提供されるトラフグ DNA 及びクロサバフグ DNA^{*17} を加えたものについても同時に調製する。

*13 PCR 緩衝液

10 $\times$ EX Taq Buffer（20 mM Mg²⁺ plus）（タカラバイオ社製）又はこれと同等の結果が得られるものを用いる。

*14 16S rRNA 遺伝子部分領域用プライマーミックス及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

F-primer-1（TF16S-L2）：5'- CCT AGT GAM ACT GTT TTA ATG TC -3'

F-primer-2（LC16S-L2）：5'- GTA TTC TTT TAA AAA CAA GAG CCA CA -3'

R-primer-1（16sbrH）：5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T -3'

（M: A or C）

上記 3 種のプライマーのうち、フォワードプライマーについては等モル混合して使用すること。

なお、本プライマーのうちフォワードプライマーの使用については、官公庁などの公的検査機関において使用する場合に限り、検査法開発者が容認しているものであることから、それ以外の目的で本プライマーセットを使用する場合は、*8 に記載されている検査法開発者と別途協議が必要である。

増幅バンド長

トラフグ属：318 bp

サバフグ属：242 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）

*15 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）又はこれと同等の結果が得られるものを用いる。

*16 プログラムコントロールシステム PC 801（アステック社製）、PCR Thermal Cycler Dice® Gradient（タカラバイオ社製）、マスターサイクラー^{ep} グラジェント S（エッペンドルフ社製）又はこれらと同等の結果が得られるものを用いる。

*17 ポジティブコントロールとしてのトラフグ DNA 及びクロサバフグ DNA は東京海洋大学海洋科学部食品生産科学科生体物質化学研究室から提供されたものを使用すること。連絡先は上記と同様である。

2.1.4.2. 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。

2.1.4.2.1. 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^{*18}を加え、加熱してアガロースを溶解させる。次に、100 mL あたり 10 μ L の SYBR Safe DNA Gel Stain 10,000x concentrate in DMSO (インビトロジェン社製)^{*19}を加え、ゲルが 50°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^{*20}。ゲルは直ちに使用することが望ましいが、緩衝液に浸して数日間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。

***18 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。

***19 SYBR Safe DNA Gel Stain 10,000x concentrate in DMSO**

毒性はないが、取り扱いの際には必ず手袋をはめること。なお、SYBR Safe DNA Gel Stain の代わりにエチジウムブロマイド溶液 (10 mg/mL) を用いてもよい。

***20 前染色**

この段階で SYBR Safe DNA Gel Stain 10,000x concentrate in DMSO を加えず、電気泳動終了後染色を行っても良い (後染色)。なお、SYBR Safe DNA Gel Stain の代わりにエチジウムブロマイド溶液 (10 mg/mL) を用いてもよい。

2.1.4.2.2. 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。次に、100 V 定電圧で電気泳動を行い、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。

2.1.4.2.3. 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。

あらかじめ TAE 緩衝液 100 mL あたり 10 μ L の SYBR Safe DNA Gel Stain 10,000x concentrate in DMSO を加えたプラスチック容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に、アルミホイルでカバーするか、暗所にてプラスチック容器を室温で振とう機に乗せて軽く振とうしながら 30 分程度染色する。なお、SYBR Safe DNA Gel Stain の代わりにエチジウムブロマイド溶液 (10 mg/mL) を用いてもよい。

2.1.4.2.4. 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^{*21}を置き、その上に電気泳動及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 分子量標準マーカー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。なお、SYBR Safe DNA Gel Stain の蛍光最大波長は 530 nm であるため、エチジウムブロマイド用フィルターは不適である。したがって、最適なフィルターセットを選択すること。

***21 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。

2.1.4.3. 結果の判定

1 調製試料より 2 点並行で抽出した DNA を規定濃度に調整した後、鋳型 DNA として用い、PCR を実施する。フグ検出用プライマーセット^{*14}を用いた PCR 増幅の結果、DNA 試料液 2 点の両方又はいずれかにおいて 318 bp 又は 242 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体はフグ陽性と判定する（下記検出用プライマーセット判定例試料番号 1、2 及び 3）。一方、DNA 試料液 2 点ともに PCR 増幅バンドが検出されなかった場合、フグ陰性と判定する（下記検出用プライマーセット判定例試料番号 4）。

フグ種検出用プライマーセット判定例

	試料番号			
	1	2	3	4
抽出 DNA 試料液 1	+	+	—	—
抽出 DNA 試料液 2	+	—	+	—
判 定	陽 性	陽 性	陽 性	陰 性

＋：増幅バンド検出、－：増幅バンド非検出。

2.2. フグ種同定法

2.1.4.3.において陽性と判定された調製試料については、以下に示す方法によりフグ種の同定を行う。

2.2.1. フグ種同定用 PCR 増幅

1.2.において選定した試料調製用個体のうち、2.1.4.3.において陽性と判定された調製試料と同一の保管個体おのおのにつき、改めて 2.1.1.にしたがって個別に DNA 試料液を調製する。調製した検査は 1 調製試料より 2 点並行で行い、2.1.2.にしたがって DNA を規定濃度に調整した後 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（0.2 mL 容）を以下のように調製する。PCR 増幅は 25 µL の反応液で行い、1×PCR 緩衝液^{*22}（2 mM MgCl₂ 含有）、0.2 mmol/L dNTP、0.6 µmol/L フォワード及びリバーズ各プライマー^{*23}並びに 1.0 units Taq DNA ポリメラーゼ^{*24}を含む反応液系に、5 ng/µL に調整した DNA 試料液 2.5 µL（DNA として 12.5 ng）を加え、全量を 25 µL とする。次に、その反応チューブを PCR 増幅装置^{*25}にセットする。反応条件は次のとおりである。98℃で 10 秒、53℃で 30 秒及び 72℃で 60 秒を 1 サイクルとして、30 サイクルの PCR 増幅を行う。その後 4℃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及び DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する。

*22 PCR 緩衝液

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

*23 16S rRNA 遺伝子部分領域用プライマー対及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)

*24 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) 又はこれと同等の結果が得られるものを用いる。

*25 プログラムコントロールシステム PC 801 (アステック社製)、PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (タカラバイオ社製)、マスターサイクラー^{ep} グラジエント S (エッペンドルフ社製) 又はこれらと同等の結果が得られるものを用いる。

2.2.2. アガロースゲル電気泳動

2.1.4.2.にしたがってアガロースゲル電気泳動を行う。

2.2.3. DNA 直接塩基配列決定法

2.1.4.3.において陽性と判定された調製試料につき、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 µLにExoSAP-IT (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) 原液 4 µL^{*26}を加え、37℃で60分間酵素処理した後85℃で15分間加熱して酵素を不活性化させる。インキュベート終了後は4℃に保存する。次に、ExoSAP-IT 処理したPCR産物を鋳型としてラベリング反応^{*27}を行い、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^{*28}自動DNAシーケンサ^{*29}を用いて得られたPCR産物の塩基配列を決定する。

なお、DNA抽出からPCR増幅までの間1調製試料につき2点並行で行なっているが、2.2.2.の電気泳動によって最終的に目的とするバンドが両方で確認された場合には、塩基配列の決定は1試行でも良い。

*26 過剰なプライマー及びdNTPsの除去

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

*27 ラベリング反応

BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI社製) 又はこれらと同等の結果が得られるものを用いる。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℃で60秒加温後、96℃で10秒、50℃で5秒及び60℃で120秒を1サイクルとして、25サイクル行い、その後4℃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)、PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (タカラバイオ社製)、マスターサイクラー^{ep}グラジエントS (エッペンドルフ社製) 又はこれらと同等の結果が得られるものを用いる。なお、下記条件でラベリング反応が不十分である場合は、ABI社が推奨するプロトコールにしたがって再度ラベリング反応を行うこと。

フォー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 µL	滅菌蒸留水	3.0 µL
シーケンスキットプレミックス	1.0 µL	シーケンスキットプレミックス	1.0 µL
F-primer (2 µM)	1.0 µL	R-primer (2 µM)	1.0 µL
5x Sequencing Buffer	1.5 µL	5x Sequencing Buffer	1.5 µL
DNA	3.5 µL	DNA	3.5 µL

***28 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нкаラム法による精製を行う。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 µLの100%脱イオン化ホルムアミドを加えてボルテックスし、95℃で3分間変性させた後シーケンサにアプライする。

***29 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又はこれらと同等の結果が得られるものを用いる。

2.2.4. 結果の判定

1 調製試料より 2 点並行で抽出した DNA を規定の濃度に調整した後、鋳型 DNA として用い、PCR 法を実施する。その結果、DNA 試料液 2 点のいずれを用いた場合もともに 615 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合には、両試料液において PCR 増幅に必要な品質を有する DNA が抽出されたと判断し、DNA 試料液どちらか 1 点につき塩基配列の決定を実施する。

フグ種の塩基配列は、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^{*30}。

***30** DNA 配列情報の解析は、DNASIS® Taxon for Fugu（日立ソフトウェア社製）又はこれと同等の結果が得られるものを用いて行う。なお、解析に用いる塩基配列は別紙のとおりとする。

2.5.5. 同定フグ種の制限

本法は主として輸入食品を対象としているため、下記 12 種のフグを同定対象とするが、下記 12 種以外のフグ種が想定される場合は、*8 に記載された連絡先に個別に問い合わせ、対処すること。

フグ種^{*31}

	標準和名	学 名
1	トラフグ	<i>Takifugu rubripes</i>
2	マフグ	<i>T. porphyreus</i>
3	アカメフグ	<i>T. chrysops</i>
4	ナシフグ	<i>T. vermicularis</i>
5	ヒガンフグ	<i>T. pardalis</i>
6	ショウサイフグ	<i>T. snyderi</i>
7	クサフグ	<i>T. niphobles</i>
8	コモンフグ	<i>T. poecilonotus</i>
9	シロサバフグ	<i>Lagocephalus wheeleri</i>
10	クロサバフグ	<i>L. gloveri</i>
11	ドクサバフグ	<i>L. lunaris</i>
12	カナフグ	<i>L. inermis</i>

***31** フグ種 16S rRNA 塩基配列については、現在 GenBank/EMBL/DDBJ データライブラリーに公表されて

いないものも含まれている。したがって、これらの塩基配列の情報保護等に関する取り扱いには細心の注意を要すること。

<別紙> フグ種 16S rRNA 塩基配列（取扱注意）

>トラフグ

CGCCTCTTGCTTCAGTGAATAAGAGGTCACGCCTGCCCTGTGACTATATGTTTAACGGCCGCGGTATTT
TGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGTGGACCTGTATGAATGGCATAACGAGGGC
TTAGCTGTCTCCTTTCTCAAGTCAATGAACTTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATAAAACCATAAGA
CGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACAAAAAACAGCCCCTGTCAATAAACCCCTAAATAAAGGGAATAAA
CCTAGTGAACCTGTTTTAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGTAACAAAAAACCCCATGTGGAAT
GAAAACACCCTTTTTAAACCCAAGAGTCACCACTCTAGGATACAGAACATCTGACCAATAATGATCCGGC
TAAAGCCGATTAACGAACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGTCCATATCGAC
AAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAAGGTTTCGTTT
GTTCAACGATTAAAGTCCT

>マフグ

CGCCTCTTGCTTCAGTGAATAAGAGGTCACGCCTGCCCTGTGACTATATGTTTAACGGCCGCGGTATTT
TGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGTGGACCTGTATGAATGGCATAACGAGGGC
TTAGCTGTCTCCTTTCTCAAGTCAATGAACTTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATAAAACCATAAGA
CGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACAAAAAACAGCCCCTGTCAATAAACCCCTAAATAAAGGAAATAAAC
CTAGTGAACCTGTTTTAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGTAACAAAAAACCCCATGTGGAATG
AAAACACCCTTTTTAAACCCAAGAGTCACCACTCTAGGATACAGAACATCTGACCAATAATGATCCGGCT
AAAGCCGATTAACGAACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGTCCATATCGACA
AGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAAGGTTTCGTTG
TTCAACGATTAAAGTCCT

>アカメフグ

CGCCTCTTGCTTCAGTGAATAAGAGGTCACGCCTGCCCTGTGACTATATGTTTAACGGCCGCGGTATTT
TGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGTGGACCTGTATGAATGGCATAACGAGGGC
TTAGCTGTCTCCTTTCTCAAGTCAATGAACTTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATAAAACCATAAGA
CGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACAAAAAACAGCCCCTGTCAATAAACCCCTAAATAAAGGAAATAAAC
CTAGGGACCCTGTTTTAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGTAACAAAAAACCCCATGTGGAAT
GAAGACACCCTCTCTAAAACCAAGAGTCACCACTCTAAGTTACAGAACATCTGACCAATAATGATCCGG
CTAAAGCCGATTAACGAACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGTCCATATCGA
CAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGCAGCCGCTATTAAAGGTTTCGTT
TGTTCAACGATTAAAGTCCT

>ナシフグ

CGCCTCTTGCTTCAGTGAATAAGAGGTCACGCCTGCCCTGTGACTATATGTTTAACGGCCGCGGTATTT
TGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGTGGACCTGTATGAATGGCATAACGAGGGC
TTAGCTGTCTCCTTTCTCAAGTCAATGAACTTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATAAAACCATAAGA
CGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACAAAAAACAGCCCCTGTCAATAAACCCCTAAATAAAGGAAATAAAC
CTAGTGAACCTGTTTTAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGTAACAAAAAACCCCATGTGGAATG
AAAACACCCTTTTTAAACCCAAGAGTCACCACTCTAAGTTACAGAACATCTGACCAATTAATGATCCGGC
TAAAGCCGATTAACGAACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGTCCATATCGAC
AAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGCAGCCGCTATTAAAGGTTTCGTTT
GTTCAACGATTAAAGTCCT

> ヒガンフグ

CGCCTCTTGCTTCAGTGAATAAGAGGTCACGCCTGCCCTGTGACTATATGTTTAACGGCCGCGGTATTT
TGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGTGGACCTGTATGAATGGCATAACGAGGGC
TTAGCTGTCTCCTTTCTCAAGTCAATGAACTTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATAAAACCATAAGA
CGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACAAAAAACAGCCCCTGTCAATAAACCCCTAAATAAAGGAAATAAAC
CTAGTGACCCTGTTTTAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGTAACAAAAAACCCCATGTGGAATG
AAAACACCCTTTTTTAAAACCAAGAGTCACCACTCTAAGTTACAGAACATCTGACCAATAATGATCCGGCT
AAAGCCGATTAACGAACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGTCCATATCGACA
AGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGCAGCCGCTATTAAAGGTTTCGTTTG
TTCAACGATTAAAGTCCT

> ショウサイフグ

CGCCTCTTGCTCAATGAATAAGAGGTCACGCCTGCCCTGTGACTATATGTTTAACGGCCGCGGTATTT
TGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGTGGACCTGTATGAATGGCATAACGAGGGC
TTAGCTGTCTCCTTTCTCAAGTCAATGAACTTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATAAAACCATAAGA
CGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACAAAAAACAGCCCCTGTCAATAAACCCCAAATAAAGGAAATAAA
CCTAGTGAACTGTTTTAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGTAACAAAAAACCCCATGTGGAAT
GAAAACACCCTTTTTTAAAACCAAGAGTCACCACTCTAAGTTACAGAACATCTGACCAATAATGATCCGGC
TAAAGCCGATTAACGAACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGTCCATATCGAC
AAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGCAGCCGCTATTAAAGGTTTCGTTT
GTTCAACGATTAAAGTCCT

> クサフグ

CGCCTCTTGCTTCAATGAATAAGAGGTCACGCCTGCCCTGTGACTATATGTTTAACGGCCCGCGGTAT
TTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGTGGACCTGTATGAATGGCATAACGAGG
GCTTAGCTGTCTCCTTTCTCCAGTCAATGAACTTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATAAAACCATAA
GACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACAAAAAACAGCCCCTGTCAATAAACCCCTAAACAAAGGAAATA
AACCTAGTGAACTGTTTTAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGTAACAAAAAACCCCATGTGGA
ATGAAAACACCCTTTTTTAAAACCAAGAGTCACCACTCTAAGTTACAGAACATCTGACCAATAATGATCCG
GCTTAAAGCCGATTAACGAACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGTCCATATC
GACAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGCAGCCGCTATTAAAGGTTTCG
TTTGTTC AACGATTAAAGTCCT

> コモンフグ

CGCCTCTTGCTTCAGTGAATAAGAGGTCACGCCTGCCCTGTGACTATATGTTTAACGGCCGCGGTATTTT
GACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGTGGACCTGTATGAATGGCATAACGAGGGCTT
AGCTGTCTCCTTTCTCAAGTCAATGAACTTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATAAAACCATAAGACGA
GAAGACCCTATGGAGCTTTAGACAAAAAACAGCCCCTGTCAATAAACCCCTAAATAAAGGAAATAAACCTAG
TGAACCTGTTTTAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGTAACAAAAAACCCCATGTGGAATGAAAA
CACCTTTTTTAAAACCAAGAGTCACCACTCTAAGTTACAGAACATCTGACCAGTAATGATCCGGCTTAAGC
CGATTAACGAACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGTCCATATCGACAAGAGGG
TTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGCAGCCGCTATTAAAGGTTTCGTTTGTTC AACG
ATTAAAGTCCT

> シロサバフグ

CGCCTCTTGTAACCAAAATAAGAGGTCCCGCCTGCCCTGTGACTATGGGTTCAACGGCCGCGGTATT
TTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCCTTTAAATGAGGACCTGTATGAAAGGCATCACGAGGG
CTTAGCTGTCTCCTTTTTCAAGTCAATGAAATTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATTAGAACATAAGA
CGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGATACAAGACAGATCATGTTAAGCACCTCATATAAAAGAGCAAATA
AATGGAACCTGTCTTAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGCAACAAAAAGCCCCCATGAGGAATA
AAAGTACTCTTTCAAAAACAAGAGCCACAGCTCTAATGAGCAGAACATCTGACCTACCAGATCCGGCAT
AGCCGATCAACGAACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTTAGAGCCCCTATCGACAAG
GGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAACCGCTATTAAGGGTTCGTTTGT
CAACGATTAAAGTCCT

> クロサバフグ

CGCCTCTTGTAACCTACAAATAAGAGGTCCCGCCTGCCCTGTGACTATGGGTTTAACGGCCGCGGTATT
TTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCCTTTAAATGAGGACCTGTATGAAAGGCATCACGAGGG
CTTAGCTGTCTCCTTTTTCAAGTCGATGAAATTGATCCCCCGTGCAGAAGCGGGGATTAGAACATAAG
ACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGATACAAGACAGATCATGTTAAGCACCTTAAATAAAAAAGCAAAT
AAGTGAACCTGTCTTAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGCAACAAAAAGCCCCCATGAGGAAT
AAAAGTATTCTTTCAAAAACAAGAGCCACAGCTCTAATGAACAGAACATCTGACCTACCAGATCCGGCAT
AGCCGATCAACGAACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTTAGAGCCCCTATCGACAAG
GGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGTAACCGCTATTAAGGGTTCGTTTGT
CAACGATTAAAGTCCT

> ドクサバフグ

CGCCTCTTGTAATTCACAAATAAGAGGTCCCGCCTGCCCGGTGACCATGTGTTCAACGGCCGCGGTATT
TTAACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGCCCTTTAAATGAGGACCTGTATGAACGGCACAACGAGGG
CTTAGCTGTCTCCTTTTTCAGGTCAATGAAATTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATTAAACATAAGA
CGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGATATAAGACAGATCACGTCAAACACCCTTAAATAAAAGAACAACT
AAATGGAACCTGTCTAAATGTCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGCAACAAAAAAGCCCCCATGTGGAATA
AAAGTATTCTTTTAAAAACAAGAGCCACAGCTCTAATAAACAGAACATCTGACCAGCCAGATCCGGCCTA
GCCGATCAACGAACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTTAGAGCCCCTATCGACAAGG
GGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGACCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTTC
AACGATTAAAGTCCT

> カナフグ

CGCCTCTTGTAATCACATATAAGAGGTCCCGCCTGCCCTGTGACCATGTGTTCAACGGCCGCGGTATT
TTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCCTTTAAATGGGGACCTGTATGAAAGGCATAACGAGGG
CTTAGCTGTCTCCTTTTTCGAGTCAATGAAATTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATTAGAACATAAGA
CGAGAAGACCCTATGGAGCTTCAGATACAAGACAGACCATGTCAGACACCTTCAGATAAAAGACCAAAC
TAAGTGAACCTGCCTTAATATCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGCAACAAAAAGCCCCCATGTGGAA
TAAAAGTATTCTTTTAAAAACAAGAGCCACAGCTCTAATAAACAGAACATCTGACCCACCAGATCCGGCA
CAGCCGATCAACGAACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTTAGAGTCCCTATCGACAA
GGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGTAACCGCTATTAAGGGTTCGTTTGT
TCAACGATTAAAGTCCT