

フグ食中毒(疑)事例におけるミトコンドリア・シトクロム b 遺伝子による肝残品の魚種同定

下村 佳 古田 喜美 石村 勝之 吉野谷 進
 谷口 正昭 笠間 良雄 萱島 隆之 河本 秀一*
 松本 勝 荻野 武雄

はじめに

近年、水産、畜産分野を問わず、偽似食品の流通が多発して社会的な問題となり、その排除が求められているが、魚介類や家畜が処理、加工され、原型の失われた食品になると、形態学的な識別は非常に困難となる。一方、新たに動物の種の同定法として DNA を用いた技術が発展し、様々な手法が開発されてきた¹⁾。

平成 16 年 12 月 31 日に医療機関からフグ食中毒疑いの患者発生の届出があった。患者は飲食店から肝付のフグ刺を購入して家族 6 名と喫食した。肝を食べた患者のみが喫食 5~10 分後にふらつきや手足のしびれ等を訴えて受診したが、1 時間 30 分後には自然回復し、翌日退院した。

保健所の調査に対し、患者および飲食店営業者はともにフグ刺に付いていた肝はアンコウの肝だったと説明した。患者宅に残っていた肝残品からはフグ毒を検出しなかったが、魚種を同定するため、ミトコンドリア・シトクロム b 遺伝子部位 (Mt-Cytb) を用いた PCR-sequence 検査を実施した。

その結果、肝残品はアンコウではなくトラフグの肝と同定され、PCR-sequence 法の魚類の属種同定における有用性が示されたので報告する。

方 法

1 材料

(1) 供試検体

供試した検体は、肝残品、トラフグの肝(3 検体)、コモンフグの肝(3 検体)、およびアンコウの肝(3 検体)の計 10 検体を用いた。

(2) 使用機器

PCR 機として Gene Amp PCR System 2400-R (Perkin Elmer) を、塩基配列の解析には ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer(Perkin Elmer)を使用した。

(3) プライマー

Mt-Cytb 部位の PCR はユニバーサル・プライマーの L14724(5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCA

TCGTTG-3') および H15149(5'-AAACTGCAGCC CCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3') を用いて増幅を行った。

2 PCR 反応による Mt-Cytb 部位の増幅

各 DNA に含まれる Mt-Cytb 部位を増幅するため、各魚種の肝をペースト状にし、QIAamp® DNA Stool Mini Kit(QIAGEN)を用いて各検体の DNA を抽出した。

Mt-Cytb 部位の増幅は PCR キットの puReTaq Ready-To-Go PCR Beads(Amersham Biosciences)を使用し、表 1 に示す条件下で増幅した。増幅 DNA の確認は、PCR 増幅産物を 2% アガロースゲル上でエチジウムブロマイド加の 0.5 × TBE を泳動バッファーとして 100V、40 分間電気泳動した後、紫外線照射下で行った。

3 塩基配列解析

増幅した Mt-Cytb 部位の塩基配列を解析するため、ゲルから Mt-Cytb 部位の DNA バンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN)を用いて DNA を精製し、シーケンス反応を行った。

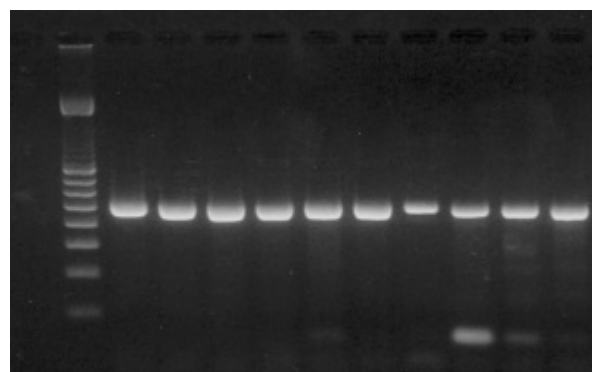
シーケンス反応には、BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystems)を用い、生成した蛍光標識 DNA は Auto Seq™ G-50(Amersham Biosciences)で精製した。

シーケンス反応後の産物は、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer(Perkin Elmer)で泳動し、Mt-Cytb 部位の塩基配列を解析した。得られた塩基配列から、解析ソフトの GENETYX-MAC(ソフトウェア開発)を用いて肝残品と各魚種との塩基配列相同性を求めた。

表 1 Mt-Cytb 部位増幅 PCR 条件

温度()	反応時間(分)	サイクル数
95	10:00	1
95	1:00	} 30
53	1:00	
72	2:00	
72	10:00	1

* : 現 社会局保健部食品保健課



M:100bp ladder, 1-3:トラフグ,
4-6:コモフグ, 7-9:アンコウ, 10:肝残品

図1 Mt-Cytb部位のPCR増幅

結 果

1 PCR反応

肝残品および3種の魚種のPCR産物全てにおいて500bp付近に明瞭な特異的増幅バンドを得ることができ、Mt-Cytb部位の増幅が示唆された(図1)。

2 塩基配列解析による相同性の比較

シーケンス反応後、各検体のMt-Cytb部位のDNA塩基配列を確認した。それらの塩基配列の相同性を比較すると、トラフグ3検体、コモフグ3検体およびアンコウ3検体ずつの各魚種内でのDNA塩基配列はそれぞれ全て一致し、100%の相同性であった。

次に、苦情者宅にあった肝残品のMt-Cytb部位の塩基配列はトラフグの塩基配列と全て一致し、100%の相同性であった。一方、肝残品とコモフグとは96.5%、アンコウとは75.8%の相同性であった。16種のフグに対するMt-Cytb部位を用いた解析で、塩基配列が100%一致するのは同一の種のみと報告されている³⁾ことから、肝残品はトラフグの肝と同定された。また、トラフグ(Takifugu属)の同属内において各フグ種との塩基配列相同性は96.1%~94.0%であるのに対し、他属間では78.7%~70.0%と報告されている³⁾。このことは今回実施したコモフグ、アンコウとの塩基配列相同性結果と合致しており、この同定手法の精度の高さが示された。

文 献

- 1) Brodmann P et al: Development and validation of species identification, J AOAC INT, 69~74 (2002)
- 2) Kocher T et al: Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers, Evolution, 86, 6196~6200(1989)
- 3) Hsieh Y et al: Molecular phylogenetic relationships of puffer fish inferred from partial sequences of cytochrome b gene and restriction fragment length polymorphism analysis, J Agric Food Chem, 52, 4159~4165(2004)