

資料

フグ中毒事案におけるフグ種の遺伝子鑑別

池田 周平, 中島 安基江, 井原 紗弥香, 重本 直樹, 高尾 信一

DNA-based Identification of the Puffer Fish Species in the Puffer Fish Poisoning

SYUHEI IKEDA, AKIE NAKASHIMA, SAYAKA IHARA, NAOKI SHIGEMOTO, and SHINICHI TAKAO

(Received October 1, 2015)

広島県において発生したフグ食中毒事案において、ミトコンドリアDNA中の16S rRNA, シトクローム*b*及びシトクローム*c*の3つの遺伝子領域を解析し、原因となったフグ種の鑑別を行った。単独の遺伝子領域の解析ではフグ種の特定ができない種もあったが、複数の遺伝子領域を比較することにより、フグ種を特定することが可能となった。

Key words : フグ中毒, 魚種鑑別, 16srRNA, シトクローム*b*, シトクローム*c*

緒 言

フグによる食中毒は、有毒部位に神経毒であるテトロドトキシン (TTX) を含むため、症状が重く、死亡率が高いことが特徴である。また、動物性自然毒による食中毒の発生件数としてもフグの喫食を原因とする食中毒は発生件数、患者数、死者数のいずれにおいても最も多く、全国では毎年30件前後の発生がある [1]。広島県において過去5年間だけを見ても、毎年発生しており、その原因は調理資格を有しない素人による家庭での調理が原因であることが多い [1]。

フグ食中毒においては、食品からのTTX検出に加え原因となったフグ種の同定も重要である。従来から、フグ種の鑑別については、体色 (皮の模様, 斑紋), ひれの色や棘の有無等の形態学的特徴による種別鑑別が一般的である。しかし、素人による調理を原因とする食中毒事案においては、原因となったフグは、切り身などが一部残っているだけの場合や、既に汁等に加熱・調理された残品しか残っていない場合も少なくない。一方遺伝子鑑別法では、残品からDNAを抽出し、ゲノム情報を読み取ることで種の判別が可能となることから、このような事例に対しても有効な鑑別法と思われる。

今回我々は、広島県内において平成26年度に発生した自家調理によるフグ食中毒の2事例 (うち1事例は、加熱調理されたフグ鍋の残品しか残っていなかった事例) について、遺伝子解析手法を用いてフグ種の鑑別を試み

た。また、併せてTTXの検出を行ったので、それらの概要を報告する。

材料および方法

1 試料

平成26年度に発生した2件のフグ食中毒事案で採取された検体を用いた。事案ごとの遺伝子解析及びTTX定量に用いた検体の種類等を表1に示した。なお、検体は冷凍された状態で保存されていた。

表1 フグ種鑑別のための遺伝子解析及びTTX定量に用いた試料

事案	遺伝子解析	TTX定量
1	筋肉組織: 4検体 ^{*1} 内 臓: 2検体 ^{*2}	筋肉組織, 内臓, 皮
2	筋肉組織 (加熱調理済みの残品)	筋肉組織 (加熱調理済みの残品)

※1 丸フグから身の部分が取り除かれた状態のものが4匹分あり、それぞれから残っている筋肉組織を取り出し4検体とした

※2 内臓が複数保存されていた中から2つの内臓を取り出し2検体とした

2 方法

(1) TTXの定量

フグ組織からのTTX抽出は、公定法 [2] 及び吉岡らの報告 [3] に準じた。細切・磨砕した試料5gに0.1%酢酸25 mLを加えて沸騰水浴中で10分間加熱抽出し

た。これを遠心分離した後、上清をろ過し、このろ液と残渣を0.1%酢酸で洗浄した洗液を併せて、50mLに定容した。この液の約2mLを取り、Oasis HLB ミニカラム (Waters社) を通過させた。最初の1mLを捨て、後の流出液を0.1%酢酸/アセトニトリル (1:1) で適度に希釈し、試料溶液とした。これをLC-QTOF/MS (Agilent LC-QTOF/MS6540) によりTTXのプロトン付加分子 [M+H]⁺ (m/z 320.1088±0.005) を観測し、定量を行った。また毒力は1MU (1MUは体重20gのマウスを30分で死亡させる毒量 [4]) = 0.22μg/gを使用した。

(2) フグ種の遺伝子鑑別法

試料からGenomic tip 100-G (QIAGEN) を用いてDNAを抽出し、これらを鋳型としてPCR法による遺伝子増幅を行った。用いたPCRプライマーは、厚生労働省通知 [5] の方法であるミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝子部分を増幅するプライマーに加え、村上らが報告した [6] シトクローム*b* (*cyt b*) 及びシトクローム*c* (*cyt c*) 遺伝子部分を増幅するプライマーを使用した。それらの3種類の遺伝子領域部分の増幅産物はダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した後、日本DNAデータベース (DDBJ) のBLASTソフトウェアによってデータベース (GenBank) に登録されている遺伝子配列と比較し、99.0%以上の相同性を有する配列を基にフグ種の鑑別を行った。

結 果

(1) TTX検出結果

TTXの定量値の結果を表2に示した。事案1では、筋肉組織、皮及び内臓からTTXが検出され、皮と内臓で高い値を示した。事案2では加熱調理済みの残品からもTTXが検出された。

表2 試料からのTTX定量値及び毒量換算値

事案	試料の種類	TTX(ug/g)	毒量(MU/g)*
1	筋肉	3	13.8
		3.9	17.6
		3.9	17.9
		6.0	27.2
		64.6	293.5
		71.9	326.6
	皮	132.0	599.8
		182.6	830.0
		70.6	321.1
2	筋肉 (加熱調理済みの残品)	3.7	16.7
		3.8	17.1
		4.5	20.4

*1MU=0.22μg of TTX

(2) 遺伝子鑑別法によるフグ種の同定

GenBankに登録されている塩基配列との相同性検索の結果を、表3及び4に示した。事案1の筋肉組織については、ミトコンドリア16S rRNAの配列がヒガンフグの配列と100%一致したが、他のフグ種においても99.0%以上の相同性を示した。一方、*cyt b*及び*cyt c*領域の相同性検索の結果から、それぞれヒガンフグとアカメフグ、ヒガンフグの配列と99.0%以上の相同性を示した。3つの遺伝子領域のいずれもが99.0%以上の相同性を示したのはヒガンフグのみであったことから、対象とした筋肉部分の試料、4検体はヒガンフグに由来するものと判定した。

内臓については、コモンフグが3遺伝子とも共通して高い相同性を示した。このことから、今回検査対象とした内臓試料については、筋肉部分の検査に用いたものとは別の、コモンフグに由来するものと判定した。

事案2の筋肉組織の3つの遺伝子領域の相同性検索結果を表4に示した。その結果、コモンフグが3遺伝子とも共通して99.0%以上の相同性を示したことから、対象とした試料はコモンフグに由来するものと判定した。

表3 事案1の試料における3遺伝子領域の相同性検索結果

試料	フグ種名	16S rRNA (572塩基)	<i>cyt b</i> (436塩基)	<i>cyt c</i> (652塩基)
筋肉組織	ヒガンフグ	100%	99.1-99.5%	99.8-100%
	アカメフグ	99.3%	98.6-99.1%	98.5-98.8%
	シマフグ	99.8%	96.1-96.6%	98.3-98.5%
	コモンフグ	99.5%	95.2-95.6%	97.5-97.7%
	コモンフグ	99.8-100%	100%	100%
	ムシフグ	99.8-100%	98.4%	99.5%
内臓	ショウサイフグ	99.0-99.1%	100%※	96.8%
	シマフグ	99.5-99.7%	97%	98.6%

■は塩基配列の相同性が99.0%以上の種類を示した。
※ショウサイフグについては402塩基比較の結果

表4 事案2の試料における3遺伝子領域の相同性検索結果

試料	フグ種名	16S rRNA (572塩基)	<i>cyt b</i> (436塩基)	<i>cyt c</i> (652塩基)
筋肉組織 (加熱調理済み)	コモンフグ	99.8%	100%	100%
	ムシフグ	99.8%	98.4%	99.7%
	ショウサイフグ	99.0%	100%	96.9%
	シマフグ	99.5%	97.0%	98.6%

■は塩基配列の相同性が99.0%以上の種類を示した。
※ショウサイフグについては402塩基比較の結果

考 察

今回の2事案は残品からいずれもTTXが検出され、フグによる食中毒事案であると断定された。事案1では、予想していたとおり皮と内臓で高い数値が得られた一方で、筋肉組織からも低い値であるがTTXが検出された。昭和58年の厚生労働省通知等 [1, 7] では、ヒガンフグの場合は筋肉部位には毒性がない (10MU以下) とさ

れている。今回、筋肉組織で検出されたことに関しては、通知〔7〕にあるように、検体を皮付きのまま冷凍及び解凍を繰り返したために有毒部位から筋肉部位へTTXが移行した可能性が考えられた。事案2では、加熱調理済みのフグ鍋残品であったが、TTXが検出された。

一方、フグ種を特定する遺伝子鑑別においては、平成23年の厚生労働省通知〔5〕にミトコンドリア16S rRNAの領域での解析が示されているが、この遺伝子領域のみでは、多くのフグ種で高い相同性を示したことから、種の鑑別又は絞り込みが困難であった。この点に関して村上ら〔6〕は、16S rRNAに加え、*cyt b*及び*cyt c*領域を併せて解析することで、フグ種の鑑別精度を高められることを報告しており、今回の2つの事案においても、ミトコンドリアの異なる3か所の領域を解析することで、初めてフグ種の鑑別が可能であった。

事案1では筋肉組織はヒガンフグ（残品の皮の模様もヒガンフグの模様に特徴が一致していた）、内臓についてはコモンフグであると判定されたことから、当該食中毒事案では、少なくとも2種類以上のフグが混在していたと考えられた。事案2では、原因種としてコモンフグと推定された。この事例では、検査対象とできた試料は、加熱調理済みのフグ鍋残品であった。村上ら〔6〕は、加熱調理された試料を用いた場合でも、遺伝子解析によるフグ種の鑑別可能であることを報告しており、事案2においても同様の結果が示された。

今回のフグ種鑑別ではミトコンドリアの遺伝子を用いた。複数の遺伝子領域を組み合わせることで高い精度でフグ種鑑別を行うことが可能であった。しかし、自然界では異なる種のフグが交配して生まれる交雑フグの存在も報告〔6, 8, 9〕されている。交雑フグに対しては、ミトコンドリアDNAを対象とした解析のみでは、母系を特定することしかできず父系を特定することができない。今後は、核DNAを対象とした遺伝子解析等を用いて交雑フグにも対応できる検査体制を確立していく必要がある。

謝 辞

検体の採取及び聞取り等の関連調査についてご尽力いただきました、広島県西部東保健所生活衛生課渡邊昭廣様、鎌倉道生様に感謝申し上げます。

文 献

- [1] 厚生労働省. 自然毒のリスクプロファイル：魚類：フグ毒 [Internet]. [cited 2015 Aug 10]. Available from: http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_det_01.html <http://www.asgt.org/>.
- [2] 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 理化学編，東京：日本食品衛生協会；2005:661-666.
- [3] 吉岡直樹，松岡智郁，秋山由美，三橋隆夫，押部智宏，近平雅嗣. フグに含まれるテトロドトキシンのLC/TOF-MSによる分析. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, 2010;1:34-37.
- [4] 日本薬学会編：衛生試験法・注解2005, 東京:金原出版；2005:278-285.
- [5] 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通知. 輸入魚類加工品のフグ種鑑別検査法について. 平成23年9月6日 食安輸発0906第1号
- [6] 村上太郎，昌山敦，紀雅美，山野哲夫，清水充. 遺伝子解析による魚種鑑別法のフグ中毒への応用. 食品衛生学雑誌 2011;52:348-353.
- [7] 厚生省環境衛生局長通知. フグの衛生確保について（一部改正）. 昭和58年12月2日 環乳第59号.
- [8] 横山浩治，浦山公治. 瀬戸内海から得られたナシフグとコモンフグの天然雑種. 魚類学雑誌；2000;47(1):67-73
- [9] 山口県. 中間種フグにご注意ください. [Internet]. 2014 Aug 5. [cited 2015 Aug 10]. Available from: <http://www.pref.yamaguchi.lg.jp/cms/al6500/121025risk/20130516001.html>