

独立行政法人水産総合研究センター
水産技術交流プラザ

第 8 回 技 術 交 流 セ ミ ナ ー

「最新の検査・分析技術で高度な安心・安全を食卓に」

要 旨 集

○プログラム

14:00 開 会

(1) 「DNA鑑定等による魚介類の種判別」

中央水産研究所 利用加工部 食品バイオテクノロジー研究室
室長 山下 倫明

(2) 遺伝子解析によるアサリの種並びに産地判別

瀬戸内海区水産研究所 生産環境部 藻場・干潟環境研究室
室長 浜口 昌巳

(3) 貝毒検査体制の現状と新たな検査技術の開発

中央水産研究所 利用加工部 機能評価研究室
主任研究員 鈴木敏之

16:00 閉 会

2009年7月23日(木)

ジャパン・インターナショナル・シーフードショー会場内

セミナールームC

(東京国際展示場“ビッグサイト”東2・3ホール)

DNA鑑定等による魚介類の種判別

独立行政法人水産総合研究センター

中央水産研究所利用加工部 山下倫明

はじめに

水産加工品は、国内外で漁獲された生物種が利用される。漁獲された地域が異なれば、原料となる生物種やその品質が異なる例も多い。生物種名や漁獲された海域、輸入食品の場合は原産国を推定することができれば、食品表示に記載された内容を科学的に検証する技術として利用できる。養殖魚介類など水産物の場合、商業的に利用されている実用品種はニジマス、ニシキゴイやスサビノリなど一部に限られており、ほとんどの水産物は野生種に依存していることから、種判別の技術が重要である。

うなぎの例

国内のニホンウナギの生産は約2万トンであるが、さらに国内の需要を満たすため活魚や蒲焼き、白焼きなどの加工品が輸入されている。台湾からは活魚が、中国からは、活魚とともに蒲焼き、白焼き等の加工品が輸入される。

ウナギ養殖には、ニホンウナギ *Anguilla japonica* の天然のシラスが用いられる。また、中国では、大西洋に分布する近縁種のヨーロッパウナギ *Anguilla anguilla* のシラスがフランスから輸出され、養殖に用いられる。そのため、中国で生産され、蒲焼きとして輸入される加工品には、ニホンウナギだけでなく、ヨーロッパウナギが原料として使われている。中国産のウナギ加工品の原料原産地を検査するため、ヨーロッパウナギとニホンウナギとを識別するためのリアルタイムPCR法やPCR-RFLPが開発された。DNA分析によって蒲焼きのような加

熱した加工品であっても原料魚種の判別が可能である。

現在問題となっているのは、ニホンウナギを原料に用いた加工品の原料原産地の判別である。台湾産の活魚が輸入されたあと国内で加工され、国内産として流通した事例や中国産の加工品の品質表示を国内産に張り替えた事例が近年摘発された。そのため、外国産と国内産との違いを加工品で判別する技術開発が必要である。ニホンウナギの産卵場はマリアナ諸島付近であり、黒潮に乗って輸送された天然のシラスが養殖に使われているが、外国産でも国内産でも養殖のニホンウナギは、遺伝的な集団が分かれている訳ではないので、DNA分析による産地判別は困難である。そこで、養殖環境の差違に由来する微量元素組成やビタミンK異性体分析による原産地判別の手法が開発された。

微量元素分析とは、食品中の多数の金属元素を定量分析し、その組成比の差違から生育環境を推定しようとする手法である。産地が違えば、土壌由来の元素組成が異なることから、原産地を推定することが可能になる。すでに中国産のネギやシイタケなど農産物の判別に利用されている。魚類の筋肉や耳石、骨、貝類の貝殻などの元素組成は、環境水の水質、土壌および飼料の影響を強く受けるので、元素組成を比較することにより、原産地を推定する手法が研究された。

飼料添加物として養殖魚に投与されるビタミンK3は、代謝によってほとんどがメナキノン-3に変換されて組織中に蓄積される。そのため、

国内の養殖池で生産されたウナギの脂肪中にはメナキノン-3が検出される。一方、台湾や中国の多くの養殖場は露地池でウナギが飼育されているので、池に繁殖した植物プランクトンに由来するフィロキノンやそれが代謝された長鎖メナキノンが外国産のウナギに検出される。

あじの例

塩干品の原料には、国内産の原料だけでなく、冷凍原料が輸入され、国内産地で塩干品に加工されている。外見からも両者は区別がつくが、良く似ているのでDNA分析による種判別法も開発されている。国内産の原料と外国産のものとを判別するため、ミトコンドリアDNAの全塩基配列を決定し、塩基配列データに基づいて、魚種を判別する手法を開発した。加工品の筋肉部からDNAを抽出し、PCRによってミトコンドリアDNAの一部配列を増幅し、制限酵素で分解し、DNAの切断パターンから魚種を判別するPCR-RFLP法を開発した。マアジの近縁種は世界中に14種類が分布しているが、塩干品の原料として主に用いられているのが、マアジおよびニシマアジであることから、これら2種類の判別を行うため、DNA判別法が有用である。これと同様に国内産のマサバ・ゴマサバと大西洋のタイセイヨウサバとを判別する手法も開発された。

まぐろの例

マグロ類は日本近海で漁獲されるものだけでなく、遠洋漁業で漁獲された冷凍品や輸入品などさまざまな由来のものが流通している。太平洋産クロマグロ、大西洋産クロマグロ、ビンナガ、ミナミマグロ、メバチおよびキハダが重要な魚種であり、DNA分析法が確立されている。魚種や品質によって価格差が非常に大きい。地中海産の大西洋

産クロマグロと国内で水揚げされる太平洋産クロマグロは、ミトコンドリアDNAの塩基配列の差違から、両者をDNA分析によって同定することができる。今後さらに多数検体の分析を進めれば、マグロ類の海域毎の差も、DNAレベルで判別がつか可能性も考えられる。

タンパク質の構造解析によって生物種を同定する手法も開発されている。魚肉の主要なタンパク質であるミオグロビン、ミオシンなどのアミノ酸配列は生物種間で異なっている場合が多く、近縁関係にある生物種間ほど類似している。ミオシンは近縁のクロマグロ、メバチの種間でもアミノ酸配列に差違がみられた。魚肉タンパク質をトリプシンなどのプロテアーゼで消化してあと、種間で異なるペプチド断片を質量分析計で分析する。缶詰、鰹節、すり身、練り製品などの高度な加工品であっても原料魚種の判別が可能である。

今後の展開

当研究室では、公的機関から依頼によって、原料生物種、原産地、品質等の分析および鑑定を行ってきた。原料が未知の試料の場合、DNAを抽出してから、ミトコンドリアDNAのチトクロムb遺伝子、16S-rRNA遺伝子などの部分塩基配列を分析したのち、DDBJ/GenBank/EMBL国際DNAデータベースに公開されている塩基配列のデータと相同性検索によって類似性を解析し、生物種を同定している。種判別の基準となる塩基配列データが解析されていない生物種も多い。とくに水産物の分析・鑑定の目的のため、流通量の多い生物種に関するDNAデータを十分解析する必要がある。種特異的プライマーを用いるPCR法やPCR-RFLP法など簡便な種判別法を用いて、分析法の標準化を進める必要がある。これまで、専門の分析機関・研究機関だけが対応してきたが、簡易分析キットなどを開発することができ

ば、分析にかかるコストが低下するので、生産、流通、市場などにおける品質管理手法として、現場での調査・分析の手法として実用化が可能となる。

また、同一種内での異なる繁殖集団を分類する手法としてマイクロサテライトマーカー、SNP等のDNAマーカーが利用されているが、原産地判別の目的のためにも、家系分析、系群判別など集団解析の手法が活用できる。各産地、とくに外国産と国内産とを判別可能な遺伝子マーカーを開発することは、産地判別・品種判別の手法として今後

重要となる。

のり、わかめなどの加工品やマグロ類、ウニ類等の生鮮魚介類は、原産地によって、品質上の特性が大きく異なり場合があり、価格にも反映される。そのため、食品の品質や機能性成分、有害物質などを明らかにして、主要な産地の差違をデータベース化することにより、化学成分データを数値化して科学的に評価した「おいしさ」や「食べ頃」、「安全性リスク」などの品質に関する産地毎の情報を消費者に提供することができる。

遺伝子解析によるアサリの種並びに産地判別

独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所生産環境部
浜口昌巳 (はまぐちまさみ)

1.はじめに

アサリは潮干狩り等を通じて日本人にとってもっとも馴染みの深い二枚貝であり、和食・洋食いずれの食材として毎年10万トン程度消費されています。しかし、国内のアサリの生産量は1983年以降減少傾向にあり、1987年に10万トンを下回ってここ数年は3万トン程度にまで落ち込んでいます。そのため、消費量の不足分を補うために海外から輸入されていますが、その量は日本産アサリ生産量より多く、2006年の統計では国内のアサリ生産量が34984トンであるのに対し、輸入アサリの量は42095トンでした。その内訳は、中華人民共和国(中国)が86%、大韓民国(韓国)が12%、朝鮮民主主義人民共和国(北朝鮮)2%となっています。また、国内産とされているアサリの一部は輸入された外国産アサリを国内の干潟や漁場で養殖や蓄養したものも含まれると考えられますので、潜在的にも輸入アサリの影響は大きいと推測されます。近年、国民の食の安心・安全に対する意識の高まりから、改正JAS法による原材料並びに産地表示が義務付けられ、アサリも例外ではありません。しかし、様々な海産物で不正な産地表示が報告されていますので、アサリの産地表示に関する消費者の疑念も高まっています。そのせいか、この問題が顕在化して以降、アサリの消費量が減少し、アサリ漁業者にとっても深刻な問題となっています。

そこで、(独)水産総合研究センターではこのような切迫した状況に迅速かつ適切に対応するため、民間企業と共同で遺伝子解析による精度の高い輸入アサリの判別技術を開発するとともに、さらに高精度な産地判別技術やアサリ産地データベースを構築し、消費者のアサリに対する懸念材料となっている産地表示の適正化を目指して調査・研究を実施してきました。

2. ミトコンドリア DNA を用いた解析方法

動物にはミトコンドリアと細胞核内にそれぞれ特有のDNAが存在します。そこで、アサリの産地判別を行うために、まず、ミトコンドリアDNAの塩基配列の解析を行いました。ミトコンドリアは細胞内小器官のひとつであり、細胞の活動

に必要なエネルギーを生産していますが、そのDNAの塩基置換速度は細胞核内のDNAと比較して早いため、その特性を活用し、多くの生物で種判別、産地判別などに用いられています。産地比較をより正確に行うためにはより多くの塩基配列情報が必要ですので、今回ミトコンドリアDNAの全長解析を行って各産地間の比較を行いました。用いたアサリは、国内の主要産地の中から、まず、九州西岸と北海道東部産、これに輸入アサリの主要産地である中国(複数の産地)、韓国(朝鮮半島西岸、南岸、東岸)産のものを用いました。その結果、各産地間にはミトコンドリアの配列の複数の遺伝子領域で最大数%を越える塩基置換が認められ、さらに、個体識別も可能な領域がありました。また、中国、韓国、日本の複数の産地を比較することによって、アサリには少なくとも大きく3つの遺伝子型があることが分かりました。特に、中国産及び朝鮮半島西岸産アサリに見出された二つの遺伝子型は、日本産アサリとは大きく異なっており、種間に近い変異が認められました。一方、朝鮮半島南岸や東岸産のアサリは日本産アサリに極めて類似していました。そこで、まず、中国産アサリの二つの遺伝子型については、ミトコンドリアDNAの情報を基にPCRと制限酵素断片長解析(以下、RFLPとします)及び迅速な判別を可能とするリアルタイムPCRによる方法を以下の二点に配慮して開発しました。

そのひとつは、検査の対象が加工品にまで広がった場合を想定し、あらゆる加工品に適用可能であることに留意しました。加工品は調理に伴う加熱、加圧、調味料の添加等様々な処理が行われています。したがって、DNAもせん断されたり、損傷を受けていることがあり、しばしば解析が困難であることが知られています。

(独)水産総合研究センターでは、魚介類の加工品からDNAの抽出やPCRの検討を行っており、PCRの産物が300bp以下であれば、あらゆる加工品に適用可能であることを見出しましたので、今回のアサリの迅速判別法でもPCRの産物を300bp以下となるように設計しました。もうひとつは、加工品等ではアサリ以外の二枚貝が使用されていることがありましたので、アサリだけを検出するように設計しまし

た。このため、この方法ではアサリの種判別と最も輸入量の多い中国産アサリの識別が可能となりました。

3. マイクロサテライトマーカーを用いた解析方法

アサリのミトコンドリア DNA の情報だけでは特定できない産地の判別、あるいは中国産アサリ等が干潟に放流されて国産アサリと交雑の有無を調べるためには、より高度な変異を持つ細胞核内の DNA のマーカーが必要となります。そこで、まず産地判別をより正確に行うために、これまでに報告例の無かったアサリのマイクロサテライトマーカーの特定を行いました。その結果、アレル数 6-22 の 9 つのマーカーを開発しました。現在、産地判別をより高精度にするために、更に多くのマーカーを開発するとともに、これらのマーカーのいくつかを用いてミトコンドリア DNA では識別が困難であった朝鮮半島東岸産や国内の産地のアサリについて産地間の比較を行っています。その結果、これらの産地の特定も可能となり、例えば、九州産のアサリを東京湾で放流した場合でも識別可能となりました。さらに、外国産アサリを放流・蓄養している漁場や干潟で、放流されたアサリが再生産して国内産との交雑が生じていないかについても検討しています。

4. 産地判別マニュアルとその活用

(独) 水産総合研究センターでは、これまでに説明した方法についてそれぞれ特許出願を行いました。また、これらの技術を基に遺伝子解析によるアサリ産地判別マニュアルを作成しました。このマニュアルの一部は、改正 JAS 法に基づくアサリの産地表示の検査を行っている(独) 農林水産消費技術センター等の機関に技術移転し、アサリの産地表示が適正に行われているのかといった検査業務に使用されています。また、民間の検査会社との間でも実施契約を締結して検査業務に使用されています。

しかしながら、アサリの産地判別には様々な問題点があります。国内のアサリ漁業の現場では、以前から種貝を他海域から購入し、それを漁場に放流して生産していました。そのため、種貝のマーケットから外国産種苗と知らずに購入した事例もあり、すべてが意図的に外国種苗を使っているということではありません。また、国産と表示されているが外国産アサリを使用している場合は、必ずしも偽装とは言えません。というのも、蓄用や養殖に伴う産地の変更はありうるからです。

5. おわりに

今回の研究のきっかけは、アサリの産地表示をより厳格に行うための手法を開発するためでした。この技術開発により、ミトコンドリア DNA 及び細胞核 DNA の両方のマーカーが得られ、これらを使うことによってより正確な産地判別が可能となりました。しかし、そもそも外国産のアサリを干潟や漁場に放流するという事は、産地偽装問題だけでなく、海洋生態系保全の観点からの問題があると考えられます。例えば、輸入されたアサリに混入していたサキグロタマツメタガイが国内各地の漁場で繁殖し、アサリが採れなくなっている事例もあります。また、今回の結果でも明らかのように、外国産アサリの大部分は国産アサリと遺伝的には異なりますので、交雑により国内産アサリの特徴がなくなる可能性もあります。このように、わが国本来の沿岸生態系保全の観点からも外国産アサリの放流は好ましくないと考えられます。1996年に我が国が批准した新・国連海洋法条約では、意図的か非意図的かを問わず、地域または国に本来は生息していない種もしくは地方個体群の導入により生じる本来の生態系への悪影響の防止義務を定めています。また、生物多様性条約においては、侵略的な移入種(集団も含む)対策が課題とされており、水産業における安易な海外種苗の放流や養殖についても十分考慮されなければなりません。本技術を使うことによって放流された輸入アサリが産卵しているかどうかについても調べることができますので、国産アサリ資源の保全のためにも活用できます。

主要な参考文献他

- 浜口昌巳・安田仁奈・長井敏, 新たな調査手法開発によるメタ個体群動態解明. 月刊海洋, 37:98-107, 2005.
- 浜口昌巳, 国産アサリの復活を目指して. 農林水産技術会議研究ジャーナル, 27: 42-47, 2004.
- 浜口昌巳・大越健嗣, 輸入アサリの放流によって生じる問題について. 水環境学会誌, 28:608-613, 2005.
- 浜口昌巳, 二枚貝生産の場としての浅場の機能と保全・再生戦略. 瀬戸内海, 47:17-20, 2006.
- 浜口昌巳, 輸入アサリの迅速判別法を開発. 農林水産技術研究ジャーナル, 30:38-41, 2007.
- Yasuda, N., S. Nagai, A. Yamaguchi, C. L. Lian, M. Hamaguchi : Development of microsatellite markers for the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Molecular Ecology Notes, 7(1), 43-45, 2007.

アサリの産地判別法

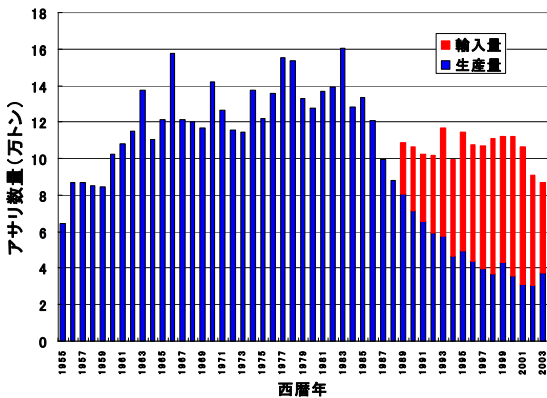
発明の名称: 「アサリの遺伝子変異検出方法」並びに
 「日本産アサリ検出用プライマーセット及びアサリの産地判別方法」
 発明者: (独)水産総合研究センター、(株)東和環境科学
 番号: 特願2009-81687、特願2007-56410

目的 ————— 解決すべき課題

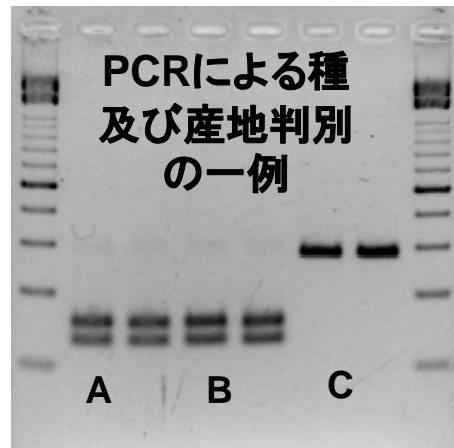
日本で流通しているアサリの半数以上は外国産もしくはそれを種苗として生産したアサリであるが正確には表示されていない。

⇒ 精度の高い産地判別方法が必要

発明のポイント



アサリの生産量(青)と
輸入量(赤)



A:中国産、B:韓国西岸産、C:国内産

3つの手法で高精度
で高速な産地判別が
可能!



アサリ

DNAの抽出

ミトコンドリアDNAの
データベースによる
種及び産地判別

マイクロサテライト
マーカーによる
高精度産地判別

リアルタイムPCR
による高速判別

安全・安心なアサリを食卓にお届けする!

貝毒検査体制の現状と新たな検査技術の開発

独立行政法人水産総合研究センター 中央水産研究所利用加工部

鈴木 敏之 (すずき としゆき)

1. 貝毒検査体制の現状

わが国で問題となっている貝毒は麻痺性貝毒 (図1) と下痢性貝毒 (図2) です。この2種類の貝毒については、毒生産プランクトン及び二枚貝の毒力のモニタリングが極めて効果的に機能しており、市場に流通した二枚貝による食中毒事例は皆無と言えます。貝毒規制のための公定法であるマウス毒性試験は (1) 測定精度や感度の悪さ, (2) 偽陽性・偽陰性反応 (毒に対する特異性の低さ), (3) 生きた動物を検査に利用するという倫理的な問題, など諸問題が指摘されている検査法です。しかし, わが国の貝毒による食中毒のリスクは, 毎年報告されている規制件数から推測して極めて高いにもかかわらず, 市場に流通した二枚貝による食中毒がほとんど発生していないことは, マウス毒性試験が食品衛生検査法として有効に機能していることを裏付けています。つまり, 精度等の分析化学上の諸問題は, マウス毒性試験が食品衛生検査法として利用できないことを意味しているものではありません。この点は貝毒行政に携わる研究者や検査者は混乱せずに整理しておく必要があります。マウス毒性試験は CODEX (FAO/WHO 合同食品規格計画) 等の国際機関も支持しているため, 当面, わが国も含めて世界的に利用され続けていく可能性が高いと思われます。

以上の点を踏まえた上で, 将来起こりうる貝毒検査体制の変化について述べたいと思います。2008年にノルウェー (トロンハイム) で開催された CODEX 第29回魚類・水産製品部会にお

いて, 各種貝毒の食品中の許容量が定められました (表1)。麻痺性貝毒は, 食品 1kg あたりの許容量がサキシトキシン (STX) で 0.8mg 以下であり, この値はわが国の許容量である 4 MU/g (可食部) とほぼ同じです。一方, 下痢性貝毒ではオカダ酸 (OA) 群の許容量が 0.16mg 以下と定められました。この値はわが国の許容量である 0.05MU/g (可食部) とほぼ同じですが, ペクテノトキシン (PTX) 群及びエツトキシン群 (YTX) については許容量が定められませんでした。このことは, これまで下痢性貝毒として規制対象となっていた PTX 群と YTX 群が規制の対象から外れたことを意味しています。PTX 群と YTX 群の国内基準値については, 今後, 各国の判断に委ねられることとなります。これまでの知見では, PTX, YTX 両群ともに動物に対する経口投与では, 下痢原性も含めて顕著な毒性が見られないことを示すデータが蓄積されています。したがって, この両群については, 今後, わが国でも規制対象外となるか, 規制値を定めるとしても, 現状よりもかなり高めに設定され, 規制緩和の方向に進む可能性が高いと思われます。わが国も含めて多くの国々で採用しているマウス毒性試験は, OA 群の他に PTX 群と YTX 群を同時に検出しているため, CODEX 等の国際機関による貝毒規制基準値の変更にともない, マウス毒性試験に替わり, OA 群のみを検出する検査法を採用すべき, とする意見が二枚貝生産者を中心に高まることが予想されます。こうした動きに備えるためにも, 貝毒関連の行政部局や試験研究機

関では、新たな検査法導入に向けた基盤整備を始める時期がきていると考えるべきでしょう。

2. 新たな貝毒検査技術の開発

2003年から2006年までの4年間で、(独)水産総合研究センターを中核機関として、先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「現場即応型貝毒検出技術と安全な貝毒モニタリング体制の開発」において、下痢性貝毒 OA 群, YTX 群, 麻痺性貝毒 STX 群の簡易測定キットが開発されました。OA 群の簡易測定キット(酵素阻害法)については、(株)トロピカルテクノセンターから市販品を購入することができます。麻痺性貝毒キット(ELISA 法)については、市販化を目指して国内及び海外のキットメーカーと調整中であり、近い将来、キットの販売が実現する可能性があります。その時期については未定です。ところで、これまでに国内外でも麻痺性貝毒や下痢性貝毒の簡易測定キットが開発され、一部市販品も供給されてきましたが、これらのキットが生産現場で貝毒規制のために利用されたという例はほとんどありません。マウス毒性試験が公定法と定められている限り、キットの利用はおのずと制限されるのですが、キットの用途が明確に示されてこなかったことが、利用者に支持されなかった原因と思われる。キットを普及させるためには、公定法前段

のスクリーニング試験として位置づけ、その利用範囲等について緻密なデータの集積をモニタリング海域ごとに実施する必要があります。当プロジェクト研究では、機器分析法による高精度な検査手法についても研究が行われました。その結果、麻痺性貝毒に対する蛍光 HPLC 法がマウス毒性試験に替わる検査法として利用可能であることが再確認されました。さらに、わが国の二枚貝から検出される主要下痢性貝毒を対象に LC-MS 法による一斉分析法が開発され、マウス毒性試験に替わる検査法として利用可能であることが実証されました。簡易測定法をスクリーニング検査に利用し、機器分析法を確定検査に利用すれば、動物試験に依存しない貝毒モニタリング体制を整備することも可能です。また、利用者の立場としては、これらの手法を貝毒検査のコスト削減や効率化のための技術として捉えるのではなく、二枚貝の安全性を向上させるための技術として捉えることも必要でしょう。

マウス毒性に替わる新たな検査法の精度や検出限界値等の特性を的確に捉え、緻密な研究を展開すれば、将来、動物試験に依存しない貝毒検査体制を構築し、二枚貝の安全性をより一層向上させ、水産物の安全性確保における世界的な規範とすることも可能でしょう。

表1 CODEX (FAO/WHO 合同食品規格計画) 第29回魚類・水産製品部会で定められた貝毒の許容量(規制基準値)

貝毒	貝の可食部 1kg あたりの許容量
麻痺性貝毒 サキシトキシン (STX) 群	0.8 mg
下痢性貝毒 オカダ酸 (OA) 群	0.16 mg
記憶喪失性貝毒 ドウモイ (DA) 酸群	20 mg
神経性貝毒 ブレバトキシン (BTX) 群	200 マウスユニット
アザスピロ酸 (AZA) 群	0.16 mg

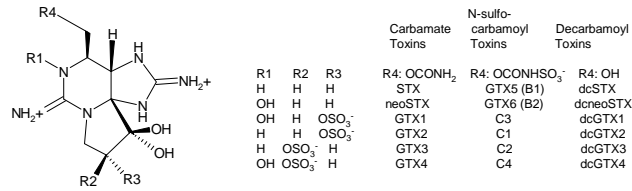


図1 麻痺性貝毒の化学構造

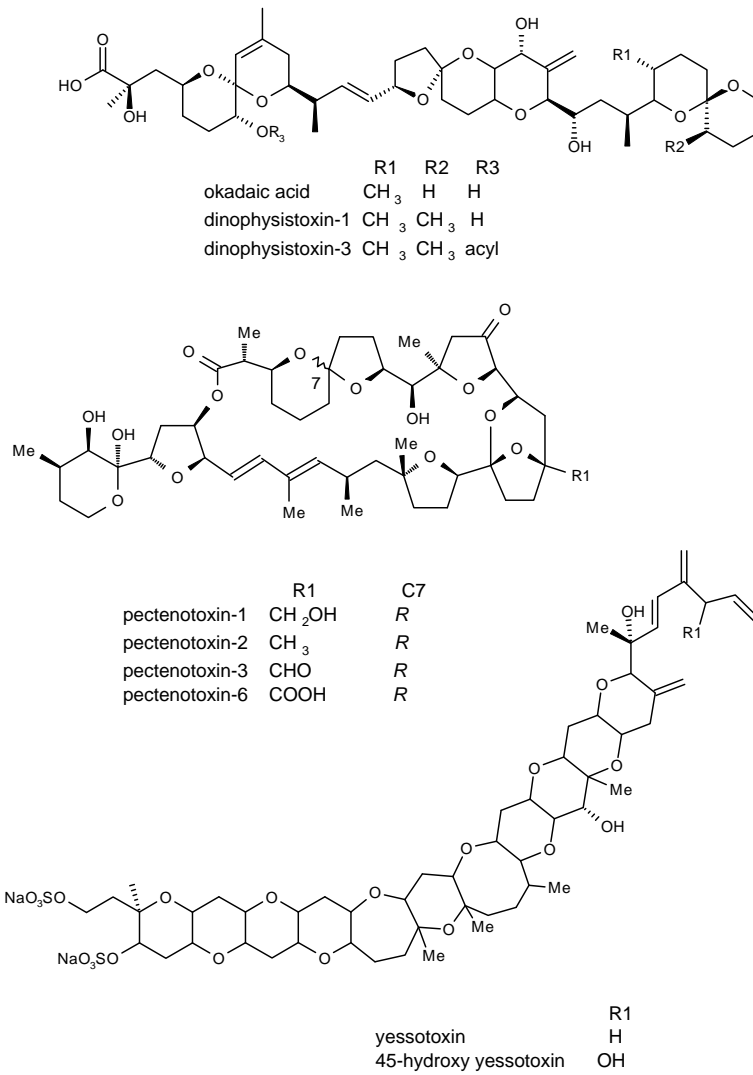


図2 下痢性貝毒の化学構造