

## 魚介製品へのフグ種の混入事例について

村上太郎、鍋島靖信\*、川津健太郎\*\*、原田哲也\*\*、仲谷 正、紀 雅美、清水 充、木田一裕\*\*\*

## Case Studies on Fish Foods Mixed in with Puffer Fish

Taro MURAKAMI, Yasunobu NABESHIMA, Kentaro KAWATSU, Tetsuya HARADA,  
Tadashi NAKATANI, Masami KI, Mitsuru SHIMIZU and Kazuhiro KIDA

## Abstract

Small puffer fish were found mixed in the dried young sardines and the young horse mackerels in Osaka prefecture in 2012 and 2013. The combined use of three different mitochondrial DNA regions, 16S rRNA, cytochrome *b* and cytochrome *c* gene fragments, identified puffer fish species as *Takifugu vermicularis* and *Canthigaster rivulata*, respectively. The tetrodotoxin (TTX) contents in puffer fishes were determined by mouse bioassay, competitive enzyme immunoassay (EIA) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). It was demonstrated that lower concentrations of TTX could be determined quantitatively by the competitive EIA and LC-MS/MS, and subtoxic levels of TTX were found in both cases.

**Keywords:** puffer fish, fish identification, mitochondrial DNA, tetrodotoxin

## I 緒言

厚生労働省の統計によると、日本では 2000～2009 年の 10 年間に 440 件の動物性自然毒による食中毒事件が発生している[1]。動物性自然毒による食中毒の中では、フグによる食中毒が発生件数、患者数、死者数のいずれにおいても最も多い。

近年、カワハギの乾製品の輸入時にフグ種が混入する事例が確認されており、検疫所では輸入魚類加工品中のフグの混入についての検査[2]を実施している。

このようなフグ種の混入事例は日本だけでなく、米国においても確認されており、アンコウ加工食品に混入したドクサバフグによる食中毒が報告されている[3]。

本論文では 2012 年と 2013 年に大阪府内で確認された魚介製品へのフグ種の混入事例についての報告を行う。

## II 事例

## 1. 事例 1: ちりめんじゃこへのフグ種の混入事例

## 1.1 事例の概要

2012 年 7 月、大阪府内の水産卸業者から、ちりめんじゃこ中に数多く混入するイワシ以外の魚について、魚種鑑別の依頼があり、大阪府中央市場食品衛生検査所に試料が搬入された。試料については、形態による魚種鑑別を大阪府立環境農林水産総合研究所で、フグ毒の検査を大阪府立公衆衛生研究所で、遺伝子解析による魚種鑑別を大阪府立公衆衛生研究所および大阪市立環境科学研究所で実施した。

## 1.2 方法

## 1.2.1 ちりめんじゃこ中のフグ種の混入率の確認

5 kg のちりめんじゃこから 10 g ずつ 18 点の試料を採取し、それぞれの試料へのフグ種の混入数と混入重量を測定した。

大阪市立環境科学研究所、〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences  
8-4 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

\*地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所、〒583-0862 羽曳野市尺度 442  
Research Institute of Environment, Agriculture and Fisheries, Osaka Prefecture  
442 Shakudo, Habikino, Osaka 583-0862, Japan

\*\*大阪府立公衆衛生研究所、〒537-0025 大阪市東成区中道1-3-69  
Osaka Prefectural Institute of Public Health,  
1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

\*\*\*大阪府中央卸売市場食品衛生検査所、〒567-0853 大阪府茨木市宮島 1-1-1  
Osaka Prefectural Municipal Central Wholesale Market Food Sanitation Inspection Laboratory  
1-1-1 Miyajima, Ibaraki, Osaka 567-0853, Japan

### 1.2.2 形態によるフグ種鑑別

選別したフグ種を実体顕微鏡で拡大し、写真撮影を行った。写真と実物についての形態学的な特徴から魚種鑑別を行った。

### 1.2.3 遺伝子解析による魚種鑑別

選別したフグ種 5 試料から DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社製) によって DNA を抽出した。試料より抽出した DNA テンプレートについての遺伝子解析による魚種鑑別は通知法[2]と既報[4]に従い、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA、cytochrome *b* (*cyt b*) および、cytochrome *c* (*cyt c*) の 3 種の遺伝子部分領域についてダイレクトシーケンス法による塩基配列の解析を行った。決定した塩基配列は日本 DNA データバンク (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塩基配列との相同性の検索を行った。

### 1.2.4 マウス試験法及び酵素免疫測定法によるフグ毒の検査

ちりめんじゃこから選別したフグ種 10g (約 2000 個体) から 0.1% 酢酸抽出法[5]に従って、被検液を調製し、マウス試験法[5]及び酵素免疫測定法[6]によりフグ毒検査を実施した。フグ毒の毒量は体重 20g のマウスを 30 分間で死亡させる毒量を 1 マウスユニット (MU) として求めた[5]。

## 1.3 結果と考察

### 1.3.1 ちりめんじゃこ中のフグ種の混入率の確認

ちりめんじゃこ 10 g 中へのフグ種の混入割合の平均値は個体数として  $16.1 \pm 4.7$  個体、重量は  $79 \pm 24$  mg であった。ちりめんじゃこ 1 個体あたりの重量の平均値は  $5.0 \pm 0.1$  mg であった。ちりめんじゃこにはフグ種以外にもタコ、イカ、タチウオと推定される異物の混入が確認された。

### 1.3.2 形態による魚種鑑別

図 1 に示す写真について魚種の鑑別を行ったところ、

ちりめんじゃこ中に混入した魚はフグの稚魚であることが確認された。さらに、形態学的なフグ種の鑑別を試みたが、本試料は成魚における形態学的な特徴を示す前の稚魚であったため、フグ種の特定には至らなかった。また、鑑別を行った時点では採取した時期や海域などの情報が十分ではなく、フグ種の推定も困難であった。形態学的なフグ種の鑑別では体形、色彩、小棘の分布、鰭の位置や鰭条数などの外観の特徴から鑑別が行われるが、本事例のように成魚における形態学的な特徴を示す前の稚魚については、稚魚図鑑等を用いても鑑別が困難な場合もある。

### 1.3.3 遺伝子解析による魚種鑑別

試料より抽出した DNA テンプレートを用い、通知法のフグ種検出用プライマーによる PCR を実施したところ、318bp のトラフグ属に特異的な増幅産物が確認された。そこで、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA、*cyt b* および *cyt c* の 3 種の遺伝子部分領域の増幅を行い、塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した 5 試料については、いずれも同じ塩基配列を示した。

解析した塩基配列については、GenBank に登録されている塩基配列との相同性の検索を行った。検索結果を表 1 に示した。16S rRNA 遺伝子部分領域については *Takifugu vermicularis* (ナシフグ) および *T. xanthopterus* (シマフグ) と全く同じ塩基配列を示し、この結果のみではフグ種の特定には至らなかった。一方、*cyt b* および *cyt c* 遺伝子部分領域についてはいずれも *T. vermicularis* (ナシフグ) の遺伝子と最も高い相同性を示し、ちりめんじゃこに混入したフグはナシフグであると鑑別された。

本事例と同様に、既報[4]で遺伝子解析による魚種鑑別法の適用範囲の確認を行った際にも 1 遺伝子領域のみではトラフグ、コモフグ、ショウサイフグ、シロサバフグなどのフグ種では同じ塩基配列を示す魚種が確認され、フグ種の特定が困難であった。このため、遺伝子解析によるフグ種鑑別を実施する場合は、3 種の遺伝子部分領域を併行して解析することによって、高

表 1 事例 1 で混入したフグ種の 3 遺伝子部分領域の塩基配列の相同性検索結果

種名	和名	16S rRNA		Cytchrome <i>b</i>		Cytchrome <i>c</i>	
		Accession	Concordance rate	Accession	Concordance rate	Accession	Concordance rate
		No.	(相同性)	No.	(相同性)	No.	(相同性)
<i>T. vermicularis</i>	ナシフグ	AP009532	549/550 (99%)	AP009532	470/477 (98%) (98%)	AP009532	509/510 (99%)
<i>T. xanthopterus</i>	シマフグ	AP009533	549/550 (99%)	AP009533	456/477 (95%)	AP009533	495/507 (97%)

\* GenBank に登録されている配列で最も高い相同性が確認された魚種の塩基配列の一致率(相同性%)を示す

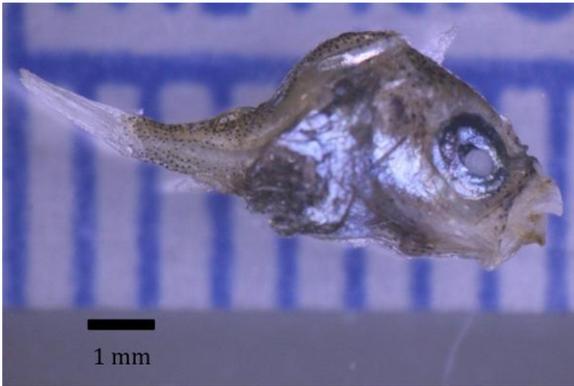


図1 ちりめんじゃこに混入したフグの稚魚

精度な鑑別が可能になると考える。本事例のように、形態による魚種鑑別が困難な場合には遺伝子解析による魚種鑑別法は有用な鑑別法である。

ナシフグは瀬戸内海、九州西岸、黄海、東シナ海などの海域に分布し、シマフグは相模湾以南の日本、東シナ海、黄海などに分布するフグ種である[7]。本事例では、ちりめんじゃこは瀬戸内海で採取されたとの情報の後日報告されており、この点からも混入したフグ種はナシフグであると考えられた。フグは魚種と部位によって、可食部位が個別に定められている。さらにナシフグについては漁獲海域が限定されており、長崎県の有明海、橘湾、香川県及び岡山県の瀬戸内海域で漁獲された筋肉と有明海及び橘湾で漁獲された精巣が可食部位と定められている[7]。

#### 1.3.4 マウス試験法及び酵素免疫測定法によるフグ毒の検査

マウス試験法では、ちりめんじゃこからフグ毒は検出されなかった(検出下限:5 MU/g)が、マウス試験法より検出感度が高い酵素免疫測定法(検出下限:0.5 MU/g)で検査した結果、3 MU/gのフグ毒が検出された。フグ毒については毒力が10 MU/g以下のものについては人の健康を損なうおそれがないと報告されている[7]。本事例で混入したナシフグは稚魚のため、皮などの有毒部位についてもフグ毒の蓄積は少なかったと考える。

#### 1.4 まとめ

ちりめんじゃこへ混入した魚種不明の異物については、形態学的な鑑別からフグの稚魚と確認された。遺伝子解析による魚種鑑別の結果、稚魚はナシフグであることが確認された。ナシフグからは酵素免疫測定法によって、フグ毒が検出された。このため、水産卸業者に対してはちりめんじゃこ中のフグと考えられる異物を除去した上で販売するように指導が行われた。

## 2. 事例 2: パック詰め豆アジへのフグ種の混入事例

### 2.1 事例の概要

2013年5月、大阪市内の量販店で販売されたパック詰めの豆アジ(鹿児島県産)にフグとみられる幼魚が混入しているという苦情があり、当該商品が回収された。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 試料

パック詰めの豆アジに混入していた試料は、形態からキタマクラと推定される幼魚であった(図2)。試料の体長は36 mm、重量876 mgであった。試料はDNA抽出用に尾鰭と尾鰭付近の皮を採取し、残りの部分をフグ毒分析用に使用した。

#### 2.2.2 遺伝子解析による魚種鑑別

尾鰭(4 mg)と尾鰭付近の皮(6 mg)から、それぞれDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN社製)によりDNAの抽出を行い、ちりめんじゃこ中のフグでの解析と同様の方法で解析を行った。

#### 2.2.3 LC-MS/MSによるテトロドトキシン(TTX)の検査

本事例では試料量が少なく、マウス試験法によるフグ毒の検査のために必要な試料が確保できなかったため、LC-MS/MSによるテトロドトキシン(TTX)の検出を行った。フグ毒分析用試料から0.1%酢酸抽出法[5]を一部改変した方法で、試料溶液の調製を行った。試料溶液の測定は、親水性相互作用クロマトグラフィーカラムを用いたLC/MS/MSにより測定した[8]。

### 2.3 結果と考察

#### 2.3.1 遺伝子解析による魚種鑑別

尾鰭と皮より抽出したDNAテンプレートをを用い、ミトコンドリアDNAの16S rRNA、*cyt b*および*cyt c*の3種の遺伝子部分領域の増幅を行い、塩基配列の解析を行った。解析した塩基配列の相同性の検索結果を表2に示す。16S rRNA 遺伝子部分領域については*Canthigaster rivulata*(キタマクラ)および*Canthigaster rostrata*(カリビアンシャープノーズパプファー)と全く同じ塩基配列を示し、この結果のみではフグ種の特定には至らなかった。一方、*cyt b*および*cyt c*遺伝子部分領



図2 豆アジに混入したフグの幼魚

表 2 事例 2 で混入したフグ種の 3 遺伝子部分領域の塩基配列の相同性検索結果

種名	和名	16S rRNA		Cytchrome <i>b</i>		Cytchrome <i>c</i>	
		Accession	Concordance rate	Accession	Concordance rate	Accession	Concordance rate
		No.	(相同性)	No.	(相同性)	No.	(相同性)
<i>C. rivulata</i>	キタマクラ	AP006744	460/460 (100%)	AP006744	367/369 (99%)	AP006744	490/490 (100%)
<i>C. rostrata</i>	カリビアン シャープノーズ パプァー	AY679665	460/460 (100%)	JQ681878	345/367 (94%)	JQ842806	481/490 (98%)

\* GenBank に登録されている配列で最も高い相同性が確認された魚種の塩基配列の一致率(相同性%)を示す

域についてはいずれも *C. rivulata* (キタマクラ)と最も高い相同性を示し、豆アジに混入していたフグの幼魚はキタマクラであることが確認された。キタマクラについては、筋肉は無毒であることが報告されているが、食用としては認められていない[7]。

### 2.3.2 LC-MS/MS によるテトロドトキシン(TTX)の検出

試料溶液を LC-MS/MS で測定した結果、TTX が検出された。試料溶液では試料中の夾雑物によるマトリクス効果が確認されたため、各試料溶液中に TTX 標準物質を添加し、標準添加法により試料中の TTX の濃度を求めた。試料中の TTX 濃度は 89 ng/g であった。また、1 MU = 220 ng として換算した試料中の毒力は 0.4 MU/g であった。本事例についても検出されたフグ毒は 10 MU/g 以下であり、幼魚のためフグ毒の蓄積が少なかったと考える。

### 2.4 まとめ

遺伝子解析の結果からパック詰め豆アジに混入していたフグの幼魚はキタマクラであることが確認された。当該試料中から 0.4 MU/g の TTX が検出された。キタマクラが混入した製品と同じ Lot で販売された製品については、販売者による自主回収が行われた。

## III まとめ

本報告では大阪府内で発生したフグ種の混入事例への対応を報告した。魚介製品へのフグ種の混入は全国で多数の報告事例があり、混入した試料量や混入の状況により個別の対応が必要となる。混入時には本事例のようにフグ毒の検査法と遺伝子解析による魚種鑑別法を併用することによって、迅速な対応が可能となる。さらに漁獲時や流通時におけるフグ種の混入についての監視は、有毒なフグおよび種類不明フグによる食中毒の防止のためにも重要である。

**謝辞** 本事例では、大阪府中央市場食品衛生検査所、大阪府立環境農林水産総合研究所、大阪府立公衆衛生研究所、大阪市立環境科学研究所の各研究機関で連携することによって、迅速な対応を行うことが可能であった。本事例にあたり、ご協力をいただきました方々に深謝いたします。

### 参考文献

- 1) 濱野米一. 魚介毒性食中毒における最近の動向と今後の課題. 食品衛生学雑誌 2010 ; 51 : 302-310.
- 2) 厚生労働省. 輸入魚類加工品中のフグの混入についての検査. 食安輸発第0330003号, 平成21年3月30日.
- 3) Cohen NJ, Deeds JR, Wong ES, Hanner RH, Yancy HF, and White KD, et al. Public health response to puffer fish (Tetrodotoxin) poisoning from mislabeled product. Journal of food protection 2009 ; 72 : 810-817.
- 4) 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.
- 5) 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頁.
- 6) Kawatsu K, Hamano Y, Yoda T, Terano Y, and Shibata T. Rapid and highly sensitive enzyme immunoassay for quantitative determination of tetrodotoxin. Japanese journal of medical science & biology 1997 ; 50(3) : 133-135.
- 7) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課編. 改訂 日本近海産のフグ類の鑑別と毒性. 東京 : 中央法規出版 ; 1994.
- 8) 尾崎麻子, 仲谷 正, 角谷直哉, 大島 詔, 清水 充. 大阪市における食品の異物・苦情事例(平成24年度). 大阪市立環境科学研究所報告調査・研究年報 2013 ; 75 : 30-34.