

## PCR-制限酵素断片長多型法を用いたウナギ加工食品の原料の魚種判定

角田 香澄, 松元 圭太郎

## 要 約

食品の産地や品種の偽装問題が後を絶たず、食の安全性は社会問題となっている。産地偽装が度々報告され、食資源の枯渇が懸念されているウナギの加工食品について、学生実験（食品衛生学実験・食品学実験）の中でPCR-制限酵素断片長多型（PCR-RFLP）法を用いて原料の魚種判定を行った。薩摩川内市内の食料品店および飲食店で入手したウナギ加工食品（11試料）のうち、4試料が日本などのアジア原産の *Anguilla japonica*（ジャポニカ種）であり、5試料がヨーロッパ原産の *Anguilla anguilla*（アンギラ種）であると判定され、残り2試料については判定が出来なかった。中国産と表示・販売されていた3試料はすべてアンギラ種であり、国産と表示・販売されていた3試料のうち2試料はジャポニカ種であり、1試料は判定不能であった。以上の結果、PCR-RFLP法によるウナギの魚種判定は、学生実験レベルの技術でも実施できる簡便な科学的判定法であること、さらに国内で流通するウナギのアンギラ種が占める割合が高くなっていることが確認された。

キーワード：うなぎ、魚種判定、PCR-制限酵素断片長多型法

## 諸 言

日本の夏の風物詩として食卓に欠かせないものに土用の丑の日のウナギの蒲焼きがある。ウナギは多種類のビタミンと良質な脂肪を含み、滋養強壯の食べ物としてわが国に留まらず世界各地で食され、その調理法は蒲焼きをはじめとして煮込み料理、ゼリー寄せ、オイル漬け等多岐にわたる。

現在わが国で消費されているウナギの99.5%以上は養殖のウナギである。世界で養殖されているウナギは一般にニホンウナギ (*Anguilla japonica*: ジャポニカ種) とヨーロッパウナギ (*Anguilla anguilla*: アンギラ種) の2種とされているが、日本国内で養殖されているウナギはほとんどがジャポニカ種である。しかし、近年養殖の際の種苗となるシラスウナギ (ジャポニカ種) の漁獲量の激減<sup>1)</sup> とそれに伴う価格の高騰により国産の養殖ウナギ供給量が急激に減少し、中国および台湾産の安価な養殖ウナギが多く輸入されている。日本国内でもシラスウナギの安定供給の為にアンギラ種の養殖が試みられたが、アンギラ種の冷水性で成長が遅く病気に弱い性質上、ほとんど養殖されていないのが現状である<sup>2)</sup>。一方、中国ではジャポニカ種だけでなくアンギラ種も養殖されており、アンギラ種の比率が2007年では5割強を占めている<sup>3)</sup>。このように国産ウナギの供給量が激減した結果、中国産ウナギを国産として販売する産地偽装<sup>4)</sup> や中国産ウナギからの発がん性を持つ抗菌剤マラカイトグリーン<sup>5)</sup> の検出<sup>5)</sup> といった、食の安全性に関わる問題が起こっ

ている。

食の安全性に関わる問題は、食のプロである管理栄養士の育成上でも重要な課題である。そこで、食品の品種および産地偽装問題への対応策としての遺伝子検査 [PCR-制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) 法] について学ぶ目的で、本学健康栄養学科2年生の学生実験 (食品衛生学実験および食品学実験) でウナギ加工食品の原料の魚種判定を実施した結果を報告する。

## 方 法

ウナギ加工食品の原料の魚種判定は、独立行政法人水産総合研究センターおよび独立行政法人農林水産消費安全技術センターにより作成された「うなぎ加工品の原料魚種判別マニュアル (ジャポニカ種及びアンギラ種)」<sup>2)</sup> に基づいて実施した。概要としては、うなぎ加工品より抽出したDNAを鋳型として、ミトコンドリアDNAの16s rRNA 遺伝子の特定領域 (ジャポニカ種 560bp, アンギラ種 562bp) をPCR法により増幅させ、得られたPCR産物を制限酵素処理し、制限酵素による切断パターンの違いによりジャポニカ種とアンギラ種の判定を行った。

ウナギ加工食品の試料は薩摩川内市の食料品店および飲食店から購入し、実験当日まで-80℃で保存した (表1)。Quiagen社のDNeasy Tissue KitおよびRNaseA (1,500U) を用いてウナギ試料 (約25mg) よりDNAを抽出した<sup>1)</sup>。表2の組成になるようにDNA溶液 (200ng), dNTP混合液 (Takara Ex Taq™・タカラバイオ社), プライマー溶液等を混合し、表3の条件でPCRを行った (iCycler・BIORAD社)。フォーワードプライマーとして5'

-GCCTAGTTATAGCTGGTTGC-3' (20bp) を、リバースプライマーとして 5' -ATGTTTTGGTAAACAGGCG-3' (20 bp) を用いた<sup>5)</sup>。なお、両プライマーはライフテクノロジーズジャパン社にて合成したものを使用した。PCRにて増幅したウナギ加工食品抽出 DNA は、それぞれを *Hha* I および *Apa* I (タカラバイオ社) にて制限酵素処理を行った後に、アガロースゲル (3%) で電気泳動を行い、制限酵素による切断パターンの違いを調べた。*Hha* I では切断されず (560bp のバンド)、*Apa* I では切断される (213, 200, 147bp のバンド) パターンを示したものをジャポニカ種とし、*Hha* I で切断され (308, 254bp のバンド)、*Apa* I では切断されない (562bp のバンド) パターンを示したものをアンギラ種と判定した。なお、実験に用いたその他の試薬は全て市販の特級品を用いた。

**結果および考察**

各試料の PCR 産物を制限酵素 *Hha* I および *Apa* I で

処理した結果を図 1 に示した。PCR 産物を *Hha* I で処理した結果、試料 1~4 と 6 では 308bp と 254bp に切断されたバンドがみられ、試料 5 と 7~11 では DNA の切断はみられなかった (図 1-A)。また、PCR 産物を *Apa* I で処理した結果、試料 1~4 と 6 では DNA の切断はみられず、試料 7~10 では切断された 200/213bp と 147bp のバンドがみられた。試料 5 と 11 では複数本のバンドがみられた (図 1-B)。上記の結果から、試料 7~10 の 4 つはジャポニカ種であり、試料 1~4 と 6 の 5 つはアンギラ種であることが判明した (表 1)。試料 5 と 11 は *Apa* I による切断パターンがジャポニカ種と異なり、魚種の判定ができなかった。しかし *Hha* I 処理後の電気泳動の結果により、試料 5, 11 とともに 560bp の特定領域の DNA の増幅自体はうまくいっていることが確認された。もし試料 5 および 11 がジャポニカ種であれば *Apa* I により、562bp の特定領域がさらに 200/213bp と 147bp に切断されることになるが、制限酵素の切断効

表 1 : ウナギ加工食品サンプル一覧

No.	購入場所	加工食品	産地表示	<i>Hha</i> I による切断	<i>Apa</i> I による切断	結果
1	回転寿司屋 A	寿司ネタ	なし	○	×	アンギラ種
2	回転寿司屋 B	寿司ネタ	なし	○	×	アンギラ種
3	食料品店 A	蒲焼き	中国産	○	×	アンギラ種
4	食料品店 A	蒲焼き	中国産	○	×	アンギラ種
5	食料品店 A	蒲焼き	国産	×	複数バンド	魚種判別不能
6	食料品店 A	蒲焼き	中国産	○	×	アンギラ種
7	食料品店 B	蒲焼き	国産	×	○	ジャポニカ種
8	食料品店 B	蒲焼き	国産	×	○	ジャポニカ種
9	弁当屋 A	蒲焼き	なし	×	○	ジャポニカ種
10	弁当屋 A	蒲焼き	なし	×	○	ジャポニカ種
11	食料品店 C	寿司ネタ	なし	×	複数バンド	魚種判別不能

表 2 : PCR 反応溶液の組成

	液量 (μL/tube)	終濃度
フォワードプライマー	2.5	0.25μM
リバースプライマー	2.5	0.25μM
dNTP 混合液 (2.5mM)	4	それぞれ 200μM
Ex Taq 緩衝液 (10 倍)	5	-
TaKaRa Ex TaqTM	0.25	1.25U
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3	1.5mM
鋳型 DNA	X	200ng
無菌脱塩蒸留水	50 - X	全量で 50μL に調製
全量	50.0	

表 3 : PCR 反応溶液の組成

段階	反応	温度 (°C)	時間	サイクル数
第一段階	熱変性 (解離)	94	9 分	1
第二段階	熱変性 (解離)	94	20 秒	35
	アニーリング	60	20 秒	
	伸長反応	72	40 秒	
第三段階	最終伸長反応	72	3 分	1
	冷却	4	∞	

率は、DNAの精製度によっても異なり、試料5および11では、十分な反応が起こらず、複数本のバンドがみられたと考えられる。もしくは、中国では従来のジャポニカ種およびアンギラ種のほかにアメリカウナギ (*Anguilla rostrata*: ロストラータ種)の養殖を開始していることを考慮すると、ジャポニカ種およびアンギラ種以外の品種である可能性が考えられた。チトクロムc遺伝子上流領域のPCR産物を制限酵素 (*Hinf* I および *Mbo* II + *Rsa* I) 処理するPCR-RFLP法も報告されており<sup>7)</sup>、今後これらの方法で改めて品種判定を行うことを考えている。

11試料のうち中国産と表示・販売されていた3試料はすべてアンギラ種であり、国産と表示・販売されていた3試料のうち2試料はジャポニカ種であり、1試料は判別不能であった。以前に比べて、中国で養殖されているアンギラ種の比率が高まっている可能性が示唆された。近年、ジャポニカ種のシラスウナギの不漁が深刻化している<sup>2)</sup>ことで、日本、中国および台湾の養鰻業者間でのジャポニカ種のシラスウナギの争奪戦が激化しているため、中国産のアンギラ種の比率が高まっているものと推察された。しかし、アンギラ種のシラスウナギはヨーロッパ諸国の自主規制により2012年から輸出が止まっているため、中国ではアメリカからロストラータ種のシラスウナギの輸入が増加していると言われている。このため、今後は日本国内に流通しているウナギの品種判定は、ジャポニカ種やアンギラ種だけでなくロストラータ種などについても品種判別できる方法を用いなければならない。また、ニホンウナギは2013年2月に環境省により絶滅危惧種に指定され<sup>8)</sup>、さらに、アメリカではアメリカウナギに限定せず全ての品種のウナギについてワシントン条約による国際取引の規制の導入が検討されており、ウナギの保護が世界的な社会問題となっている。このため、食品の安全性とは別に食資源の保護の

観点からも、日本国内で流通するウナギの品種について今後の推移を見守ることは重要である。

#### 引用文献

- 1) 井村雅晴：ウナギをめぐる情勢変化とわが国への影響．農中総研・調査と研究5：6-7，2008
- 2) 独立行政法人 水産総合研究センター，独立行政法人 農林水産消費安全技術センター：うなぎ加工品の原料魚種判別マニュアル（ジャポニカ種及びアンギラ種）．農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告34：1-10，2010
- 3) 農林水産省：架空会社による一色産うなぎ蒲焼きの産地偽装等に対する措置について．<http://www.affrc.go.jp/j/press/syouan/kansa/080625.html>，2008
- 4) 厚生労働省食品安全部監視安全課：中国産養殖鰻の馬拉イトグリーン検出について．<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2005/08/h0804-2.html>，2005
- 5) Sezaki K, Itoi S, Watabe S: A simple method to distinguish two commercially valuable eel species in Japan *Anguilla japonica* and *A. anguilla* using polymerase chain reaction strategy with a species-specific primer. *Fish Sci* 71: 414-421, 2005
- 6) 若尾卓成，疋田雄一，常吉俊弘，他：PCR-制限断片多型法を用いたウナギ種簡易DNA鑑定．日本水産学会誌65：391-399，1999
- 7) 独立行政法人水産総合研究センター ウナギ総合プロジェクトチーム：ニホンウナギの資源状態について．[http://www.fra.affrc.go.jp/unagi/unagi\\_shigen.pdf](http://www.fra.affrc.go.jp/unagi/unagi_shigen.pdf)，2012
- 8) 環境省：第4次レッドリストの公表について（汽水・淡水魚類）（お知らせ）．<http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=16264&mode=print>，2013

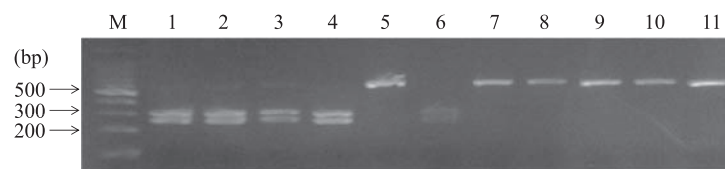


図1-A: *Hha* I で処理したウナギ DNA 断片の電気泳動パターン

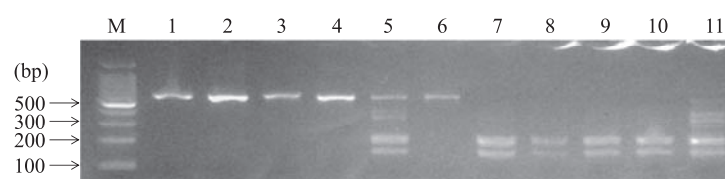


図1-B: *Apa* I で処理したウナギ DNA 断片の電気泳動パターン

## Species identification of the raw materials of eel processed foods using a polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method

Kasumi Tsunoda, Keitaro Matsumoto

Department of Health and Nutrition, Faculty of Nursing and Nutrition, Kagoshima Immaculate Heart University

Key words: eel, species identification, PCR-RFLP method

### Abstract

It becomes the social problem of the food safety that the issue of camouflage about place of production and species in foods occurs in sequence. There are many camouflages about place of production in eel processed foods. The exhaustion of food resources of the eel has been more serious. It was conducted species identification of the raw materials of the eel processed foods using a polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method in practice of our department (food hygienics and food science experiments). The eleven samples of eel processed foods were obtained at supermarkets and restaurants in Satsuma-Sendai city. Four samples were identified as Japanese eel (*Anguilla japonica*), and five samples were identified as European eel (*Anguilla anguilla*), and two samples were not possible to identify the species. All three samples produced in China were *Anguilla anguilla*. In three samples produced in Japan, two samples were *Anguilla japonica* and one sample was not possible to identify the species. It was confirmed that it was possible to identify species of raw materials of the eel processed foods by the technique of student experiment level. Furthermore, it was confirmed that there was the deflection in species of cultivated eel (*Anguilla anguilla* and *Anguilla japonica*) between Japan and China.

---