

総 説

水産加工食品に含まれるトビウオ類の鑑定  
Studies on the Authentication of flying fish in processed fishery products

永瀬 光俊\*

トビウオ類（以下トビウオ）はダツ目に属し、世界中の亜熱帯から熱帯の海に生息しており、世界では9属50数種、日本近海に6属27種<sup>1)</sup>が確認されている。代表的な食用種としては、トビウオ *Cypselurus agoo*、ホソトビウオ *Cypselurus hiraii*、ツクシトビウオ *Cypselurus heterurus*、ハマトビウオ *Cypselurus pinnatibarbatus*、アヤトビウオ *Cypselurus poecilopterus*、ホソアオトビウオ *Hirundichthys oxycephalus* が挙げられ、全国で年間約8000トン<sup>2)</sup>が漁獲されて、鮮魚以外に各種かまぼこ、干物、だしの素、くさや、魚卵加工品などに用いられている。

日本海沿岸では、5月から7月にかけて産卵期を迎え、日本海を北上するトビウオが大量に漁獲されるが、鮮魚として処理できない余剰分は、加工用に廻される。そのため、日本海沿岸に位置する島根県東部地域では、主原料にトビウオを用いることで、水産練製品製造業が発達した。特にあご野焼は、他の地域に見られない特産品として有名であり、島根県の主要な食品産業の一つとなっている。

島根県では2000年より、あご野焼の価値を守ることを目的とし、高品質なあご野焼の品質保証制度を採用している。この制度では、トビウオを一定量以上用いる必要があるが、かまぼこの一種であるあご野焼は、原料魚の形態学的な特徴を残さないことから、トビウオ使用の有無や使用量は外見から判断不能で、書類上あるいは現地調査で確認するしかなかった。そのため、分子生物学的手法を応用することにより、あご野焼に使われるトビウオを定性的、定量的に分析する技術開発を行った。本総説では、ホソトビウオのミトコンドリアDNA全塩基配列の決定から始まり、ダイレクトPCRを用いたトビウオ類の定量法の確立に至った一連の研究について解説する。

1. はじめに

1.1 水産加工食品と鑑定

我が国で食用とする魚類の種類数は、外国産の輸入品を含めて約1,000種類もある。また、代表的な食品の成分を収載する五訂増補日本食品標準成分表<sup>3)</sup>でも、食品群中で魚介類の生物学的種が174種類で、野菜類他より最も多く、日本人は世界で最も多種類の水産物を食べるという国民性の一端がうかがえる(表1)。

一般に、脊椎動物である魚類の判別は、形態学的特徴により行われ、外見・鱗の配列や形状・鱗の形状・側線上の鱗の数等により分類される。しかしながら、市場に流通する魚種は極めて多く、その中には、一見では区別できないほど、似通った形態を持つ魚種が多数存在する。そして、魚種が変われば、品質や価格に大きな違いが出てくる場合が多数あることが知られている。例えば、マダイは、お祝いの席でも使われる高級魚といえるが、〇〇ダイというタイ類として包括することのできる名称の魚種は20種類以上あり、品質や価格が大きく異なる。そのため、価格が安い種を高い種と偽って販売する危険性が常に存在しており、

\*生物応用科

表1 食品群と使用される生物種数<sup>3)</sup>

食品群	原料となる生物種*	収載食品数
魚介類	174	388
野菜類	151	326
果実類	71	157
種実類	26	37
藻類	26	47
肉類	25	244
きのこ類	18	36
油脂類	16	22
いも及びでん粉類	13	40
穀類	12	138
豆類	11	73
卵類	3	20
砂糖及び甘味類	-	23
乳類	-	52
菓子類	-	120
嗜好飲料類	-	55
調味料及び香辛料類	-	84
調理加工食品類	-	16
合計	546	1,878

\*原料となる生物種が複数の食品群の場合はカウントしていない

実際に種を偽装する不正が毎年のように起こっている。一方、水産加工食品においては、加工すなわち、切り身化、すり身化することにより、本来の魚種の持つ形態学的な特徴が著しく損なわれ、原材料の魚種が形態からでは、判断できなくなる。このため、水産加工食品における魚種鑑定は、鮮魚に比べてはるかに困難となる。

### 1.2 水産練製品の原料魚を判別する意義

水産加工食品の一種であるかまぼこ等の水産練製品は、図1のように、魚のすり身を塩ずりして塩溶性タンパク質を溶出し、加熱によりゲル化させたゲル状食品であるため、魚本来の持つ形態学的な特徴は、完全に壊されている。水産練製品は、古来より地元の海で漁獲された魚を使い、地方ごとに独特の風味ある高価値の製品が作られていたが、1960年頃から冷凍すり身が使われるようになったことで、原料魚種の特性に由来する地方色が薄まり、地域の特産品としての価値が失われつつあるのが現状である。

1980年以降、かまぼこ消費量は毎年漸減しており、製品価格は二極分化する傾向にある。低価格なものは種名をほとんど問わないが、高価格なものは、昔から地元で獲れてきた魚種を使うことで、商品価値を高めている。2003年に行われた高知県の調査によれば、高知市内の量販店で購入したすまき7サンプルを調査したところ、単位グラムあたりの価格で、最も高いものは最安値の2.3倍であり、その主要な原料魚として、ゲル強度を出すために特に高知県で好んで使うエソが表示されていた<sup>4)</sup>。これは、原料魚の種類やその含量が品質の良し悪しに影響を与え、ひいては、価格に反映される一例といえる。

水産練製品の場合、味覚だけでなく、食感や見た目も重要になるために単独の魚種で製造されることはまれで、数種類を混合することが多いが、①原料魚の判別はおろか、②魚種の混合割合などは外見から判断することは不可能である。また、水産練製品の原料魚について科学的に鑑定する方法は見あたらないことから、表示の内容に誤りがあ

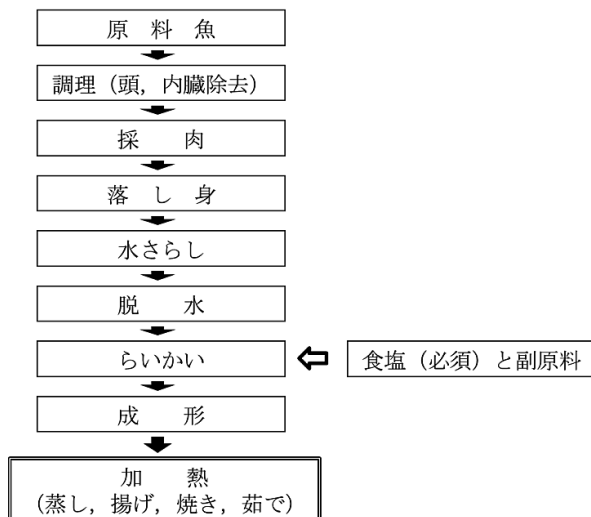


図1 かまぼこの製造工程

たり、偽りがあったとしても、確認できない。よって、消費者に正確な情報を伝え、公正で公平な流通を確保するためには、上記①、②について、科学的根拠に基づく客観的な鑑定データおよび鑑定技術開発が強く求められている。

### 1.3 水産加工食品の種判別

水産加工食品の種判別は、水産物の種類が極めて多いこともあり、基本的には種による価格差が出やすい産業的重要種について研究が進んでいる。解析には、ミトコンドリアDNA（以下文中ではmtDNAと表記）が用いられることが多い。mtDNAは、ひとつの細胞あたりのコピー数が多く、核遺伝子に比べて丈夫で変異蓄積量が大きいことで種判別に使いやすい利点がある。魚種としては、マグロ類<sup>5,6)</sup>、タラ類<sup>7)</sup>、コチ類<sup>8)</sup>、イワシ類<sup>9),10)</sup>、ヒラメ・カレイ類<sup>11),12)</sup>、サケ類<sup>13)</sup>、スズキ類<sup>14)</sup>、アジ類<sup>15)</sup>、サバ類<sup>16)</sup>、ウナギ類<sup>17),18)</sup>、タイ類<sup>19)</sup>、フグ類<sup>20)</sup>で種判別に関する報告が見られる。

また、加工品の種類としては、切り身<sup>5),15)</sup>、干物<sup>9),15)</sup>、蒲焼<sup>17),18)</sup>、塩蔵品<sup>21)</sup>、レトルト<sup>6)</sup>、魚卵<sup>7)</sup>に種判別の報告が見られ、すり身<sup>22),23)</sup>でも一部見られる。

### 1.4 Eマークについて

Eマーク制度は、1990年度から農林水産省総合食料局食品産業企画課が実施した「ふるさと認証食品品質表示推進事業」において始められ、地域特産品の生産振興と利用拡大を目的として、全国各地の優良な食品に「認証マーク」を付けるというものである。図2にその図柄を示す。認証は都道府県単位で行われ、「認証基準」については、原料、製造とも地元の産品を使うことや、地元の伝統的な製法を使うことが基本となっている。具体的な手続きとしては、各県は食品事業者からの申請に基づき、品目別の認証基準を作成し、その基準に適合するかどうか衛生、品質、表示等の確認を行う。そして、学識経験者、食品事業者代表、消費者代表、試験研究機関、関係行政機関等からなる委員会が設置され、その基準が審議される。認証されれば、各製品にEマークを貼付して出荷・販売が可能となる。Eマーク制度が始まった当初は、12県のみでの参加であったが、現在では全国20都府県で456品目の食品が、Eマーク食品と



図2 Eマーク（3個のEのシンボル部分は赤色）

して認証されている (2011年3月現在)。

島根県では、現在9品目の認証が行われており、このうちあご野焼は、最初に認証された品目であり、2000年から行われている。その目的は、特産品としてあご野焼の価値を守ることであり、申請のあった基準を満たすあご野焼の品質を保証することにある。この制度では、トビウオを70%以上用いる必要があるが、かまぼこは魚の形態学的な特徴を残さないことや、加熱等の食品製造工程を経ていることから、あご野焼に用いられる魚肉種を特定する技術開発が望まれていた。

## 2. ホソトビウオ *Cypselurus hiraii* ミトコンドリアゲノム全塩基配列の決定

### 2.1 緒言

生物が持つDNAは、生物体の設計図である遺伝情報が全て記録されている核DNAと細胞内器官であるミトコンドリアが持つmtDNAの2つに大別される。核DNAのコピー数は1つの細胞あたり2であるが、mtDNAは1000コピー以上ある。

また、mtDNAは、分子量が小さな閉環状分子であるため壊れにくく、核DNAに比べて5~10倍速い進化速度を持ち、母性遺伝をするなどの特徴を持っている。つまり、核遺伝子に比べて丈夫で変異蓄積量が大きいということであり、あご野焼のような加工食品をサンプルとして扱う場合は、検出感度の点からmtDNAが適している。そこで、mtDNAをターゲットとして鑑定技術の開発を目指すこととした。

一方、日本近海のトビウオ類は、20数種類いるとされるが、日本海を北上してくるトビウオ類は、ホソトビウオとツクシトビウオの2種類である。漁獲の9割方はホソトビウオであることから、かまぼこ原料に用いられるトビウオ類は、島根県の場合、ほとんどがホソトビウオと考えることができる。ところが、ホソトビウオのmtDNAに関する報告はこれまで全くなかった。そこで、トビウオ類を鑑定する際の基礎情報として、島根県で最も漁獲のあるホソトビウオのmtDNAとその遺伝子構成をPCRの手法を用いて決定した。

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 mtDNAの増幅と塩基配列決定

ホソトビウオの筋肉片から、全DNAを抽出し、まず下記の3つのプライマーセットによるPCRを行い、mtDNA全領域を網羅する3つの断片を増幅させた。なお、プライマーは既報を参考にし、以下のウナギ<sup>21)</sup>に使われたものを用いた。図3にその概要を示した。

L13562-ND5(5'-CTWAACGCCTGAGCCC-3')

H3058-16S(5'-TCCGGTCTGAACTCAGATCACGTA-3')

L1854-16S(5'-AAACCTCGTACCTTTTGCAT-3')

H8168-CO2(5'-CCGCAGATTTTCWGAGCATTG-3')

L7255-CO1(5'-GATGCCTACACMCTGTGAAA-3')

H15149ad(5'-GCNCCTCARAATGAYATTTGTCTCTCA-3')

次に、3つのPCR産物を鋳型として、ダイレクトシーケンスを行った。DNAシーケンスは、ABI PRISM™3100 Genetic analyzer (アプライドバイオシステムズ)を用い、メーカーの指示に従い、図3中に番号で示す相対位置に作用する60種類のプライマー<sup>25)</sup>を使用して、BigDye terminator™サイクルシーケンスキット (Ver3.1, アプライドバイオシステムズ)による伸長終了法を用いた。

#### 2.2.2 DNA塩基配列の解析

13のタンパク質をコードしている遺伝子の位置は、イダテントビウオ、マイワシ、ウナギ、そしてカタクチイワシのミトコンドリアゲノムの塩基配列かアミノ酸配列と比較することにより決定した<sup>24),26),27),28)</sup>。tRNAをコードすると推定される領域は、イダテントビウオの全ミトコンドリア配列 (DDBJ/EMBL/GenBank受付番号AP002933) とのシーケンスホモロジーによって同定した。解析したホソトビウオのシーケンスデータは、データベースに登録した。(DDBJ/EMBL/GenBank受付番号AB182653)

### 2.3 結果および考察

#### 2.3.1 ミトコンドリアゲノムの構造

ホソトビウオのミトコンドリアゲノムの全長は、16,528bp<sup>25)</sup>であった。図3および表2に詳細を示した。ミトコンドリアゲノムの構造は、2個のrRNA、22個のtRNA、13個のタンパク質をコードする遺伝子とcontrol regionを含み、他の脊椎動物と同様であった。一般的にミトコンドリアゲノムに並んでいる37遺伝子の配置は、魚類をはじめとして、哺乳類、爬虫類、両生類を含む脊椎動物では、いくつかの例外を除き、まったく同じ順で並び、非常によく保存されているが、ホソトビウオの結果は、これに沿うものであった。

なお、今回ホソトビウオは、5個体の筋肉片を混合し、全mtDNAを増幅するためのDNA抽出に供した。このようにして、5個体中で次の8つの塩基置換が検出された。3109 (C/T), 3880 (A/G), 4951 (C/T), 6680 (C/T), 7808 (C/T), 8732 (A/G), 11,036 (A/G) および12,051 (A/C)。但し、検出できていない塩基置換の存在、キメラ配列が含まれる可能性は否定できない。

#### 2.3.2 タンパク質コード遺伝子

13個のタンパク質コード遺伝子のうち、同じ側で3個のリーディングフレームの重なりがあった。ATPase 8と6は7塩基を、ND4LとND4は7塩基を、ATPase 6とCOⅢは1塩基をそれぞれ共有していた。他の硬骨魚類と同様、全てのミトコンドリアのタンパク質コード遺伝子はGTGでスタートするCOⅠを除き、ATG開始コドンで始まっていた (表2)。ホソトビウオのオープンリーディングフレー



ムはTAA (ND4L, ND5), TAG (ND1, CO I, ATPase 8, ND6), AGA (CO II) で終了し, 残りは不完全なストップコドン, TA- (ATPase6, CO III) もしくはT- (ND2, ND3, ND4, *cytb*), を有していた (表 2). なお, 2 個の遺伝子 (CO II と *cytb*) は, tRNA をコードする領域で重なっていた.

### 2.3.3 リボゾームRNA (rRNA) 遺伝子および

#### トランスファーRNA (tRNA) 遺伝子

ホソトビウオの2つのrRNA遺伝子は, イダテントビウオ<sup>28)</sup>の塩基配列とのシーケンスホモロジーによって同定した. 12Sと16SのrRNA遺伝子はそれぞれ943と1687塩基の長さであった. それらは, 他の脊椎動物と同様, tRNA<sup>A<sup>Phe</sup></sup>とtRNA<sup>Leu(UUR)</sup>遺伝子の間に位置し, tRNA<sup>Val</sup>遺伝子とは重なりがなく完全に分離していた. ホソトビウオのミトコンドリアゲノムは22個のtRNA遺伝子があり, rRNAとタンパク質コード遺伝子の間に点在している. (図3, 表2)そのうち21個は, イダテントビウオが持つミトコンドリアtRNA遺伝子<sup>28)</sup>の塩基配列とのシーケンスホモロジーによって同定した. しかしながら, tRNA<sup>Ser(AGY)</sup>遺伝子は, コンピュータプログラムでは検出できず, 目視で確認して, tRNA<sup>His</sup>遺伝子とtRNA<sup>Leu(CUN)</sup>遺伝子の間に同定された. tRNAのサイズの範囲は66から74塩基 (表2)であった.

### 2.3.4 非コード配列

ほとんどの脊椎動物と同様に, ホソトビウオのライトス

トランド複製開始点は5つのtRNA遺伝子クラスタで見られ (ウァンシー領域<sup>29)</sup>), 長さは38塩基であった. この領域は, ステムにおいて13bpとループにおいて12ntの着実なステムループ二次構造に折り重なる可能性を有している. 保存されたモチーフ (5'-GCCGG-3') はtRNA<sup>Cys</sup>遺伝子中のステムの塩基に見られた.

ホソトビウオmtDNAに見られる主要な非コード領域は, tRNA<sup>Pro</sup>とtRNA<sup>Phe</sup>遺伝子の間に位置している. この非コード配列 (868bp) は, control regionに相当して出現している. なぜなら, それはこの領域の特徴である保存シーケンスブロック (CSB) とターミネーションアソシエイツと推定される配列<sup>30,31)</sup>を持っているからである.

## 3. PCR-RFLPを用いた各種加工食品中のトビウオ類の定性的検出

### 3.1 緒言

水産分野では, PCRを用いた多型分析法が多数開発されている. PCRによるDNA多型分析法は, ゲノムDNA全体にわたる広範囲から多型を分析する場合と, 限られた狭い範囲から多型を分析する場合の2つに大別される.

PCR-RFLP (ポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型) 法は後者に属し, スケトウダラ<sup>32)</sup>, マグロ<sup>6)</sup>, 巻貝<sup>33)</sup>のような魚類鑑定に広く用いられている. この方法は, 狭い範囲を分析することから, あご野焼のような加熱工程に

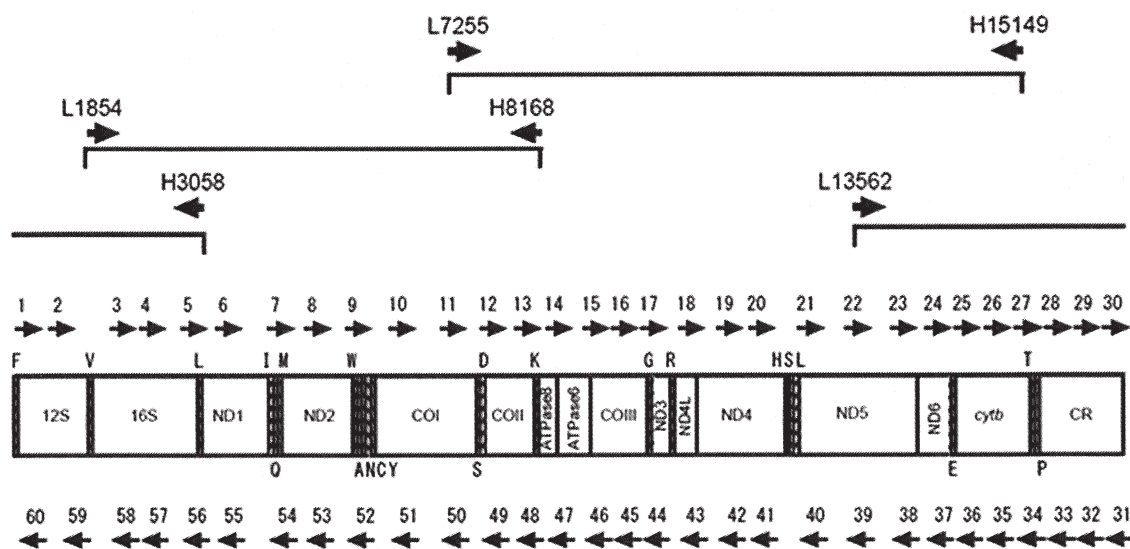


図3 ホソトビウオのミトコンドリアDNAのゲノム構造とシーケンス戦略

- ・ND 6 以外のすべてのタンパク質遺伝子はH鎖にコードされており, ND 6 遺伝子はL鎖にコードされている.
- ・tRNA遺伝子はアミノ酸コードの略号で示した. 遺伝子地図の上にH鎖にコードされているもの, 下にL鎖にコードされているものを示した.
- ・ミトコンドリアゲノムを全てカバーするDNA断片を増幅するPCRプライマーセット (L13562-ND5+H3058-16S, L1854-16S+H8168-CO2, L7255-CO1+H15149ad) の位置関係を地図にそれぞれ示した.
- ・その他の60種のプライマーの相対位置は, 数字と矢印で示した.
- ・12Sと16S, リボゾームRNA遺伝子; ND 1 ~ 6 と 4 L, NADH 脱水素酵素複合体のサブユニット; COI~III, チトクロムc 酸化酵素のサブユニット; ATPase 6 と 8, ATP 合成酵素のサブユニット; *cytb*, チトクロムb; CR, control region (Dループ領域)

よるDNAの変性があるサンプルにも有効であるが、トビウオ類あるいはトビウオ類を含む加工食品で検討した報告はなかった。そこで、前項で得られたホソトビウオ mtDNAの部分配列と、他のトビウオ類やあご野焼に使われる他のいくつかの魚種と比較し、PCR-RFLPによりあご野焼および各種トビウオ加工品からトビウオ類を定性的に検出することを試みた。

### 3.2 実験方法

ホソトビウオ<sup>25)</sup> (*C. hiraii*, DDBJ/EMBL/GenBank受付番号AB182653), マアジ<sup>34)</sup> (*T. japonicus*, 同AP003091), イダテントビウオ<sup>28)</sup> (*Exocoetus volitans*, 同AP002933), およびスケトウダラ<sup>35)</sup> (*T. chalcogramma*, 同AB182300)のDNA配列を比較することにより、ミトコンドリア16SrRNA遺伝子領域の3'末端側を増幅する下記のプライマーセットを設計した。

16S-F (5'-GTATCTTGACCGTGCGAAGGTAG-3')

16S-R (5'-GTCTGAACTCAGATCACGTAGGAC-3')

次に、このプライマーセットを用いて、表3と表4に示した様々な魚および加工食品から抽出した全DNAを鋳型にしてPCRを行い、増幅産物を得た。増幅産物は、制限酵素 *Afa* I と *Mfe* I (*Mun* I) で消化後、アガロースゲル電気泳動、染色後、UVライトで可視化して写真撮影した。また2.2.1と同様にして、増幅産物のシーケンスを行い、塩基配列を決定した。なお、*Mfe* I と *Mun* I は同一の制限酵素であるが、製造メーカーにより商品名が異なるので以下括弧書きを併記する。

### 3.3 結果および考察

#### 3.3.1 あご野焼に使う魚種の塩基配列

準備したユニバーサルプライマーセット16S-Fと16S-Rにより、日本で漁獲される7種類のトビウオや、また同様に

表2 ホソトビウオのミトコンドリアゲノムの位置関係

Features	Position number		Size (bp)	Codon	
	From	To		Start	Stop
tRNA <sup>Phe</sup>	1	69	69		
12S rRNA	70	1012	943		
tRNA <sup>Val</sup>	1013	1084	72		
16S rRNA	1085	2771	1687		
tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	2772	2845	74		
ND1	2846	3820	975	ATG	TAG
tRNA <sup>Ile</sup>	3825	3894	70	(L)	
tRNA <sup>Gln</sup>	3894	3964	71		
tRNA <sup>Met</sup>	3964	4033	70		
ND2	4034	5080	1047	ATG	T-
tRNA <sup>Trp</sup>	5081	5150	70	(L)	
tRNA <sup>Ala</sup>	5152	5220	69	(L)	
tRNA <sup>Asn</sup>	5222	5294	73	(L)	
tRNA <sup>Cys</sup>	5333	5398	66	(L)	
tRNA <sup>Tyr</sup>	5401	5466	66		
COI	5472	7025	1554	GTG	TAG
tRNA <sup>Ser(UCN)</sup>	7031	7101	71		
tRNA <sup>Asp</sup>	7105	7176	72		
COII	7182	7872	691	ATG	AGA
tRNA <sup>Lys</sup>	7873	7946	74		
ATPase8	7948	8112	165	ATG	TAG
ATPase6	8106	8789	684	ATG	TA-
COIII	8789	9573	785	ATG	TA-
tRNA <sup>Gly</sup>	9574	9644	71		
ND3	9645	9993	349	ATG	T-
tRNA <sup>Arg</sup>	9994	10062	69		
ND4L	10063	10359	297	ATG	TAA
ND4	10353	11733	1381	ATG	T-
tRNA <sup>His</sup>	11734	11802	69		
tRNA <sup>Ser(AGY)</sup>	11803	11870	68		
tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>	11875	11947	73		
ND5	11948	13786	1839	ATG	TAA
ND6	13783	14304	522	(L) ATG	TAG
tRNA <sup>Glu</sup>	14305	14372	68		
<i>cytb</i>	14377	15517	1141	ATG	T-
tRNA <sup>Thr</sup>	15518	15590	73	(L)	
tRNA <sup>Pro</sup>	15591	15661	71		
Control region	15662	16528	867		

あご野焼製造に用いられるマアジ、スケトウダラ、ミナミダラ、クラカケトラギスの計11種類の魚肉から、それぞれ約530bpのPCR産物を増幅することができた。PCR産物は、塩基配列を決定し、ホソトビウオ以外のトビウオ6種およびミナミダラ、クラカケトラギスについては、塩基配列を登録した。(DDBJ/EMBL/GenBank受付番号AB444858-AB444865)次に、11種類の塩基配列を比較して、PCR-RFLP解析でトビウオ類の同定が期待される制限酵素サイトを検索したところ、制限酵素*Afa*Iと*Mfe*I(*Mun*I)のサイト<sup>36)</sup>を認めた。*Afa*Iは4塩基認識、*Mfe*I(*Mun*I)は6塩基認識の酵素である。それぞれ、トビウオ類のPCR産物を203bpと326bpおよび217bpと312bpに切断するサイトであった。2つの制限酵素サイトは、トビウオ類以外の魚種にはなかった。ホソトビウオとツクシトビウオについて、それぞれの種ごとに5個体のミトコンドリア16SrDNAの配列多型を確認したところ、制限酵素サイトの変異はなかった。その他のトビウオ類は島根県沿岸では漁獲されないので、1個体のみ調べたが、全てのトビウオ類に2つの制限酵素サイトが保存されていた。

### 3.3.2 RFLP解析による種特異的検出

図4および表3にトビウオ類とその他魚種のPCR-RFLPについて示した。トビウオ類7種におけるミトコンドリア16SrDNA 3'末端側のRFLPパターンは、期待されたPCR産物プロファイルと一致し、それぞれ*Afa*Iによる消化で203bpと326bp、と*Mfe*I(*Mun*I)による消化で217bpと312bpのDNA断片が生成し、529bpのDNA断片はともに認められなかった。一方、トビウオ類ではない4種のPCR産物は、両制限酵素で消化されなかった。クラカケトラギス、スケトウダラ、ミナミダラでは530bp付近、マアジでは550bpの1つのDNA断片が認められた。その結果、この方法は、トビウオ類の特異的検出に有効であることが明らかになった。

次に、この方法を水産加工品に応用した。その結果を表

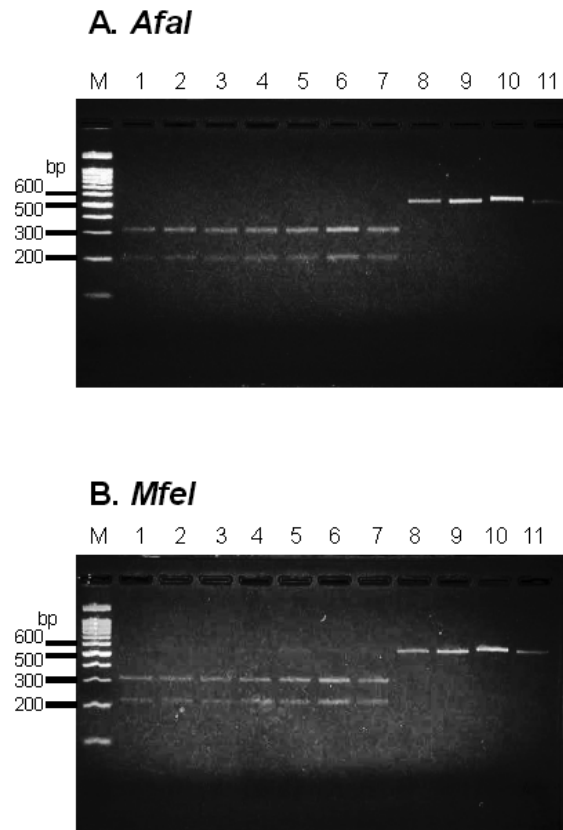


図4 制限酵素処理した各種DNA断片の電気泳動図

A, *Afa*I ; B, *Mfe*I

- lane M, 100-bp ladder marker ; 1, *C. hiraii* ;  
 2, *C. heterurus* ; 3, *C. agoo* ;  
 4, *C. pinnatibarbatus* ; 5, *C. poecilopterus* ;  
 6, *C. cyanopterus* ; 7, *C. antoncichi* ;  
 8, *T. chalcogramma* ; 9, *M. australis* ;  
 10, *T. japonicus* ; 11, *P. sexfasciata*.

4に示した。Eマーク認定されたあご野焼の15サンプル、トビウオ魚肉を含まない野焼の2サンプルおよび他のトビウオ加工品7種をPCR-RFLP解析に用いた。全DNAを抽

表3 供試魚とそのPCR-RFLP

Species	PCR-RFLP						Landing place	Sampling Year	Sampling Number
	<i>Afa</i> I			<i>Mfe</i> I					
	529	326	203	529	312	217			
<i>Cypselurus hiraii</i>	-	+	+	-	+	+	Tanegashima, Kagoshima, Japan	2005	5
<i>Cypselurus heterurus doederleini</i>	-	+	+	-	+	+	Ohshima, Tokyo, Japan	2005	5
<i>Cypselurus agoo agoo</i>	-	+	+	-	+	+	Shizuoka, Japan	2005	1
<i>Cypselurus pinnatibarbatus</i>	-	+	+	-	+	+	Kochi, Japan	2005	1
<i>Cypselurus poecilopterus</i>	-	+	+	-	+	+	Tanegashima, Kagoshima, Japan	2005	1
<i>Cypselurus cyanopterus</i>	-	+	+	-	+	+	Tanegashima, Kagoshima, Japan	2005	1
<i>Cypselurus antoncichi</i>	-	+	+	-	+	+	Tanegashima, Kagoshima, Japan	2005	1
<i>Trachurus japonicus</i>	+	-	-	+	-	-	Shimane, Japan	2004	1
<i>Parapercis sexfasciata</i>	+	-	-	+	-	-	Shimane, Japan	2004	1
<i>Theragra chalcogramma</i>	+	-	-	+	-	-	Frozen sample, Hokkaido, Japan	2001	1
<i>Micromesistius australis</i>	+	-	-	+	-	-	Frozen sample, Argentina	2001	1

出してから、ミトコンドリア16SrDNAの3'末端側を増幅させた。530bp付近のDNA断片は、製品の焼きと蒸しといった調理方法にかかわらず、全てのおご野焼および野焼で増幅された。以前に水産缶詰の鑑定が報告<sup>6)</sup>されているが、120bpもしくはそれ以下のPCR産物によるものであった。一般的に水産物は、缶詰に加工される場合、*Clostridium botulinum*や*Bacillus cereus*のような孢子形成菌を殺菌するために120℃近くで加熱される。すなわち、加工品鑑定に応用できる十分な大きさのPCR産物を得ることは、調理方法、すなわち調理温度や殺菌法に依存している。増幅産物を、*Afa* Iと*Mfe* I (*Mun* I)で消化させたところ、おご野焼、野焼、トビウオ加工品、のそれぞれ全てについて、3つのDNA断片、*Afa* Iでは203bp、326bp、529bpのうち3本もしくは一部のDNA断片、*Mfe* I (*Mun* I)では217bp、312bp、529bpのうち3本もしくは一部のDNA断片が確認できた。

具体的には、15種のおご野焼サンプル全てにおいて、*Afa* I、*Mfe* I (*Mun* I)による消化ともに3本のDNA断片全てが確認された。これに対して、トビウオ魚肉を含まない野焼の2サンプルについては、*Afa* I、*Mfe* I (*Mun* I)による消化ともに529bpの1本のDNA断片が確認され、他の2本のDNA断片は確認されなかった。またトビウオ加工品7種については、両酵素による消化ともに529bp以外の2本のDNA断片が確認されたが、他の魚肉も含んでいると想定されるアゴはんぺんのみでは、529bpを含む3本のDNA断片が確認された。以上のことから、*Afa* I、*Mfe* I (*Mun* I)の両酵素の消化により確認される、203bpと326bpおよび217bpと312bpの2つのDNA断片はトビウオ魚肉由来であり、529bpのDNA断片は他魚種の魚肉由来であると結論できる。これにより、全てのサンプルについ

てトビウオ魚肉を含む加工品か否か定性的に検出することができた。

おご野焼、野焼、アゴはんぺんについて、530bp付近のDNA断片はマアジを除くトビウオ以外の他魚種の未消化DNA断片に一致すると考えられる。なお、マアジの未消化DNA断片は確認できなかった。このことは、製造の際にトビウオとトビウオ以外の魚肉を混合していることを示唆している。PCR-RFLPによるこの方法は、最小限の実験手法のみで簡単、迅速に信頼のあるデータを得ることができる。食品検査は、日常調査に多数のサンプルを使うことから、時間とコストを抑える必要があるが、この点についても十分に対応できる。

#### 4. おご野焼中のトビウオ類の定量的検出

##### 4.1 緒言

3項において、各種加工食品からトビウオを定性的に検出できるPCR-RFLPの技術が確立され、サンプル中にあるトビウオの有無の確認が可能になった。しかしながら、島根県が認定するEマーク制度では、おご野焼中に含まれるトビウオの有無だけでなく、その含量を検出する必要がある。検査対象となるサンプルは加工履歴が不明の加工食品であり、DNAがどのくらい変性しているか全くわからない。よって、定量的検出の信頼性を上げるためには、複数の方法で検査することが望ましいと考えた。そこで、PCR-RFLPに加えて、新たに画像解析技術を組み合わせる方法、およびリアルタイムPCRを用いる方法で、おご野焼中のトビウオすり身の定量を試みた。

##### 4.2 画像解析を用いた加工食品中のトビウオ類の

##### 定量的検出

##### 4.2.1 実験方法

表4 トビウオ各種加工品のPCR-RFLP

Processed food of flying fish	Sample number	Product company	Label <sup>1</sup>	Purchased year	PCR-RFLP <sup>2</sup>					
					<i>Afa</i> I			<i>Mfe</i> I		
					529	326	203	529	312	217
<i>Ago-noyaki</i>	E1	A	+	2005	+	+	+	+	+	+
"	E2	B	+	"	+	+	+	+	+	+
"	E3	C	+	"	+	+	+	+	+	+
"	E4	D	+	"	+	+	+	+	+	+
"	E5	B	+	"	+	+	+	+	+	+
"	E6	E	+	2005	+	+	+	+	+	+
"	E7	F	+	"	+	+	+	+	+	+
"	E8	F	+	"	+	+	+	+	+	+
"	E9	G	+	"	+	+	+	+	+	+
"	E10	H	+	"	+	+	+	+	+	+
"	E11	I	+	2005	+	+	+	+	+	+
"	E12	J	+	"	+	+	+	+	+	+
"	E13	J	+	"	+	+	+	+	+	+
"	E14	J	+	"	+	+	+	+	+	+
"	E15	K	+	"	+	+	+	+	+	+
<i>Noyaki</i>	N1	H	-	"	+	-	-	+	-	-
"	N2	L	-	"	+	-	-	+	-	-
flying fish powder ( <i>Ago-Dashi</i> )	P1	M	+	2006	-	+	+	-	+	+
"	P2	N	+	"	-	+	+	-	+	+
flying fish chip ( <i>Ago-Niboshi</i> )	D1	M	+	"	-	+	+	-	+	+
"	D2	N	+	"	-	+	+	-	+	+
Smoked flying fish ( <i>Ago-Kunsei</i> )	S1	O	+	"	-	+	+	-	+	+
Steamed <i>kamaboko</i> ( <i>Ago-Hanpen</i> )	H1	A	+	"	+	+	+	+	+	+
Roe cooked with soy sauce ( <i>Tobiko</i> )	R1	P	+	"	-	+	+	-	+	+

1, +, labeled as the product contains flying fish meal; -, not labeled  
2, +, digested; -, undigested



#### 4.2.1.1 スタンダードあご野焼の調製と市販製品

2種類の冷凍すり身を用いて、トビウオ含量を明らかにしたスタンダードあご野焼を作成した。用いたのは、ホソトビウオ *C. hiraii* の自家製冷凍すり身およびスケトウダラ *T. chalcogramma* (Alaska pollack) の冷凍すり身 (二級, 日水製) である。トビウオとスケトウダラすり身の水分含量は、最終的に77%であった。2種類の冷凍すり身は、3% (w/w) NaClを加えて塩ずりし、さらに適量の水道水を加えて適当なねばりが出るまで塩ずりした。水道水の総量は、トビウオで5% (w/w)、スケトウダラで30% (w/w) であった。その後、それぞれの塩ずり身を様々な割合<sup>37)</sup>で混合した。なお、相対的なトビウオすり身含量は、水道水を加水する前の最初の冷凍すり身重量に基づいた。混合した塩ずり身は40℃で30分坐らせ、ドライオープンで200℃、30分間焼いた後、急冷した。また、定量性判定のサンプルとした市販製品は、マーケットで購入した。スタンダードあご野焼と市販製品は半分に切り、かまぼこゲルの中心部 (加熱された表面の反対側) からサンプルを採取して実験に供した。

#### 4.2.1.2 RFLP分析と画像解析による定量

3.2に示した方法で、RFLP分析を行い、デジタル化された画像をソフトウェアを使い解析した。制限酵素 *Afa* I と *Mun* I (*Mfe* I) 処理を用いたRFLP法の結果に基づき、トビウオすり身含量を決定するのに、500bpまでのバンドの蛍光強度を調べた。500bpのバンドについて、制限酵素処理前の蛍光強度から処理後の蛍光強度を引き、さらに処理前の蛍光強度で割ることにより相対強度を求めた。

#### 4.2.2 結果および考察

##### 4.2.2.1 トビウオすり身含量と相対蛍光強度との関係

トビウオすり身のみPCR産物を制限酵素 *Afa* I と *Mun* I (*Mfe* I) で消化すると、どちらの酵素処理についても、トビウオすり身に特有な約200bpおよび約300bpの2本のDNA断片が認められ、約500bpの1本のDNA断片だけは消失した。また、トビウオすり身とスケトウダラすり身の混合物では、3本全てのDNA断片が認められたことから、制限酵素処理で残存する500bpのDNA断片の量は、サンプル中の非トビウオすり身の総量を示していることが示唆された。よって、消化前の500bp断片の蛍光強度から消化後の蛍光強度を引いた値は、トビウオすり身の相対量を反映していると考えられる。

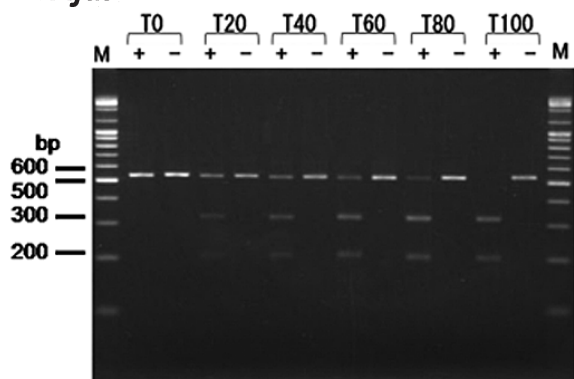
図5に、*Afa* I と *Mun* I (*Mfe* I) でPCR産物を消化させた時の代表的な結果について示した。これによると、トビウオすり身だけ含むT100サンプルでは、2本のDNA断片 (200bpと300bp) が認められた。また、トビウオすり身とスケトウダラすり身の両方を含むT20~T80サンプルでは、3本のDNA断片 (200b, 300bp, 500bp) が認められた。そして、スケトウダラすり身だけ含むT0サンプルでは、500bpのDNA断片のみが認められた。また、トビウ

オすり身の相対量が増加するに従って、500bp断片の蛍光強度は減少し、一方で200bpと300bpの断片は蛍光強度が増加した。この傾向は、*Afa* I および *Mun* I (*Mfe* I) で消化した両方のサンプルで認められた。結果の再現性については、それぞれのスタンダードサンプルについてDNA抽出およびPCRを繰り返し確認した (n=4)。その結果、切断したDNA断片の蛍光強度およびトビウオすり身量との関係を用いることにより、市販製品について定量分析をすることができた。

つまり、スタンダードサンプルに含まれる実際のトビウオすり身含有量との関係を決めるのに、まず画像解析を用いて、500bp断片の蛍光強度をそれぞれのスタンダードサンプルについて測定した。この際、画像解析については、データのバックグラウンド補正を行い、ゲル染色の影響を考慮した。図6に500bp断片の相対蛍光強度と実際のトビウオすり身含有量の間の関係を示す。相対蛍光強度は次のとおり計算した。

$$\text{Relative fluorescence intensity} = \frac{(\text{Intensity before digestion}) - (\text{Intensity after digestion})}{(\text{Intensity before digestion})} \quad (1)$$

#### A. *Afa*I



#### B. *Mun*I

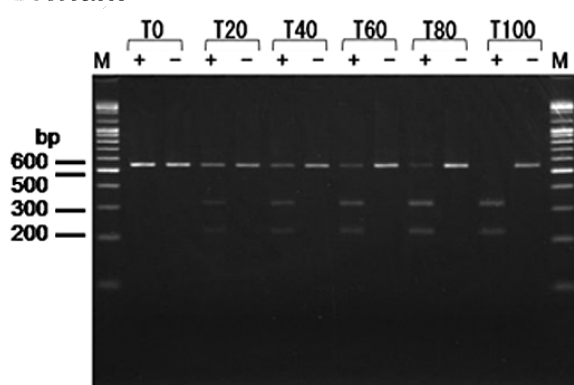


図5 制限酵素処理した各種スタンダードあご野焼DNA増幅断片の電気泳動図

A, *Afa*I; B, *Mun*I, (-), undigested; (+), digested lane M, 100-bp ladder marker



図6のデータ(n=4)の回帰式から、それぞれの制限酵素による切断につき、以下の検量線を得ることができた。

*Afa*I digestion:  $y = 0.0084x + 0.0757$ ,  $R^2 = 0.977$  (2)

*Mun*I digestion:  $y = 0.0091x + 0.0153$ ,  $R^2 = 0.974$  (3)

それぞれの決定係数は0.977と0.974であり、相対蛍光強度と実際のトビウオすり身含有量との間に高い相関を示していた。よって、それらの検量線を使えば、あご野焼中のトビウオすり身の相対量を評価できるはずである。(2)式および(3)式によれば、トビウオすり身含有量がEマーク制度の70%にあたる相対蛍光強度は、それぞれ*Afa*Iで0.66、*Mun*I (*Mfe*I)で0.65に対応している。

よって、期待される相対蛍光強度は、それぞれ0.66と0.65以上である。そこで、あご野焼のトビウオ含量について次のように考えることができる。まず、Eマークの付いた市販あご野焼を評価する場合、結果は3つのケースに分けることができる。第一に、Eマークの付いた市販あご野焼製品について切断されたDNA断片の相対蛍光強度が、それぞれの数値、すなわち*Afa*Iについて0.66、*Mun*I (*Mfe*I)について0.65の両方を下回る場合、その製品の表示は誤りとする。第二に、切断されたDNA断片の相対蛍光強度が、それぞれの数値、すなわち*Afa*Iについて0.66、*Mun*I (*Mfe*I)について0.65の両方を上回る場合、その

製品の表示は適正とする。そして第三に、*Afa*Iと*Mun*I (*Mfe*I)の結果が異なった場合であるが、その製品の表示は条件付きで適正であるとする。それは、酵素反応がうまくいかなかった可能性があるからである。

#### 4.2.2.2 市販あご野焼におけるトビウオすり身相対量の決定

スタンダードサンプルの結果を用いて、島根県によりEマーク認証がされている5個の市販あご野焼製品およびトビウオすり身含まずEマーク認証はされていない2個の野焼製品についてトビウオ含有量を評価した。結果を表5に示す。野焼製品(N1, N2)は、相対蛍光強度が0.15程度となり、トビウオすり身含まないか、もしくは含んでいても微量であると評価された。対照的に、4つのあご野焼製品(E1, E2, E3, E4)の相対蛍光強度は0.67から0.82の間であり、それらの製品は70%以上のトビウオすり身を含み、全ての製品について表示が適切であることを示していた。また、すり身中の原料魚由来DNA含有量に基づき、トビウオすり身含有量を計算することができた。

これらの結果より、Eマーク認証がされているあご野焼のうち、1個(E15)を除いた他の4個のEマーク付サンプル全てこのPCR-RFLP鑑定テストにパスしており、Eマークを証明する最初のスクリーニングとしてこの方法が適していることを示している。E15については、表5に示すように、相対蛍光強度は同一サンプルについて*Afa*Iでは0.66以上、*Mun*I (*Mfe*I)では0.65以下であり、一方のみ基準を満たした。この結果は、サンプル誤差あるいはロット誤差のどちらによるものか明確ではない。このような場合、その製品はPCR-RFLP鑑定テストに追試験の条件付きでパスしていると判定した。このサンプルは、違うロットを分析することにより、基準を満たすことが確認された。

つまり、Eマーク認証製品を検証するのに、PCR-RFLPを用いた画像解析法により、あご野焼製品からトビウオすり身含有量を定量することができた。分析時間については、約1日である。この方法は、正確性は改良する必要があるが簡単にできる。但し、この方法をあご野焼以外の加工食品に応用する場合は、その都度、新しい検量線を作る必要がある。

#### 4.3 リアルタイムPCRを用いた加工食品中のトビウオ類の定量的検出

##### 4.3.1 実験方法

##### 4.3.1.1 トビウオ類の種特異的プライマーおよびユニバーサルプライマーの設計

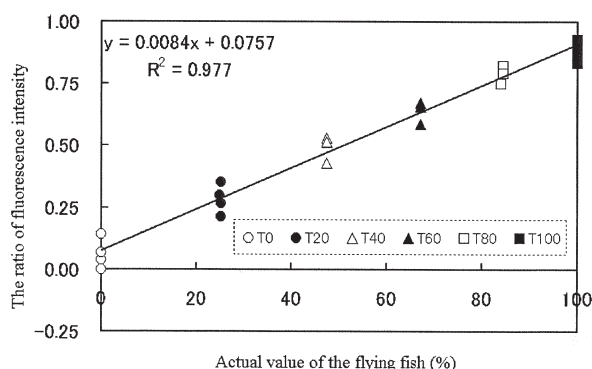
3.2で設計したプライマーセット

16S-F (5'-GTATCTTGACCGTGCGAAGGTAG-3')

16S-R (5'-GTCTGAACTCAGATCACGTAGGAC-3')

で増幅される、16SrRNA遺伝子領域の3'末端側の塩基配列のアライメント<sup>38)</sup>を行った。そして、トビウオ類に特徴的な塩基配列の保存領域に基づいて、下記のトビウオ類の

### A. *Afa*I



### B. *Mun*I

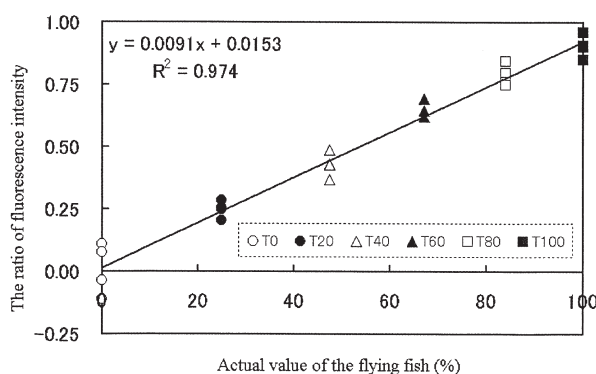


図6 スタンダードあご野焼のトビウオ含量と相対蛍光強度の関係

種特異的プライマーセットを設計した。

Tobi16SF3 (5'-CAGACCATGCTAATTAGACCT-3')  
 Tobi16SR (5'-TCTGGGAGAAAAGTTCTCTGCTC-3')  
 ここで用いたものは、ホソトビウオ<sup>25)</sup> (*C. hiraii*,  
 DDBJ/EMBL/GenBank受付番号AB182653), ツクシトビ  
 ウオ<sup>36)</sup> (*C. heterurus*, 同AB444858), トビウオ<sup>36)</sup> (*C.*  
*ago*, 同AB444859), ハマトビウオ<sup>36)</sup> (*C. pinnatibarbus*,  
 同AB444860), アヤトビウオ<sup>36)</sup> (*C. poecilopterus*, 同AB  
 444861), カラストビウオ<sup>36)</sup> (*C. cyanopterus*, 同AB4448  
 62), オオメナツトビ<sup>36)</sup> (*C. antoncichi*, 同AB444863) で  
 ある。次に、あご野焼製造に用いる全ての魚について、ト  
 ビウオ類と上記のトビウオ以外の魚にある塩基配列の保存  
 領域に基づいて、下記のユニバーサルプライマーセットを  
 設計した。

Univ16SF2 (5'-CTAGGGATAACAGCGCAATCC-3')  
 Univ16SR2 (5'-AATCGTTGAACAAACGAACCCT-3')。  
 ここで用いたものは、上記の7種類のトビウオ類および  
 スケトウダラ<sup>35)</sup> (*T. chalcogramma*, DDBJ/EMBL/GenB  
 ank受付番号AB182300), ミナミダラ<sup>36)</sup> (*M. australis*, 同  
 AB444864), マアジ<sup>34)</sup> (*T. japonicus*, 同AP003091), ク  
 ラカケトラギス<sup>36)</sup> (*P. sexfasciata*, 同AB444865) である。  
 また、定量PCRの標準曲線を作るのに、プライマーセット  
 16S-Fと16S-Rで鋳型DNAを増幅した。これらのプライマ  
 ーセットは、トビウオ類の特異的検出およびトビウオの  
 定量 (Tobi16SF3とTobi16SR) および全ての魚の定量  
 (Univ16SF2とUniv16SR2) に用いた。

#### 4.3.1.2 試料調製とリアルタイムPCR

スタンダードあご野焼は、4.2.1.1と同様に作成した。市  
 販製品は、マーケットで購入した。DNA抽出の際には、  
 サンプルを凍結乾燥し、サンプルミルで粉末化した。粉末  
 化したサンプルは、TE bufferに懸濁した後、沸騰水中  
 で加熱してその上清を、リアルタイムPCRのDNA鋳型と  
 して用いた。

リアルタイムPCRは、SYBR Greenとトビウオ特異的プ  
 ライマーセット (Tobi16SF3とTobi16SR) を用いて行っ  
 た。また、全ての魚肉を検出する  
 ポジティブコントロールとして、  
 ユニバーサルプライマーセット  
 (Univ16SF2とUniv16SR2) を用い  
 た。標準曲線は、ホソトビウオC.  
*hiraii*からプライマーセット (16S-  
 Fと16S-R) で増幅させたDNA断  
 片を段階希釈することで求めた。

#### 4.3.2 結果および考察

##### 4.3.2.1 プライマー設計と特異性

2つのプライマーセットは、あ  
 ご野焼に含まれるトビウオの相対  
 含量を評価するために、ミトコン

ドリア16SrDNAについてトビウオを特異的に増幅するも  
 のと全ての魚を増幅するものを設計した。そして、増幅産  
 物がトビウオ特異的であることを確認するために、7種の  
 トビウオおよび4種のトビウオ以外の魚種を鋳型として、  
 プライマーセット (Tobi16SF3/ Tobi16SRとUniv16SF2/  
 Univ16SR2) を用いてPCR増幅を行った。まず、それぞれ  
 の種に対して普遍的な反応性があることを確認するのに、  
 ユニバーサルプライマーセット (Univ16SF2とUniv16SR2)  
 を用いたところ、図7Aのとおり、全ての魚種で明確なバ  
 ンドが認められた。次に、トビウオプライマーセット (T  
 obi16SF3とTobi16SR) を用いた時は、図7Bのとおり、  
 トビウオ種のみで明確なバンドが認められた。すなわち、  
 設計したトビウオプライマーは、トビウオに種特異的であ  
 ることと、ユニバーサルプライマーは、あご野焼製造に使  
 う全ての魚種を増幅することを確認した。

##### 4.3.2.2 トビウオすり身含量と、スタンダードあご野焼 からリアルタイムPCRを用いて算出したトビウ オすり身実測値の関係の推論

トビウオすり身を100% (T100) から0% (T0) まで含  
 んでいるいくつかのスタンダードあご野焼について、リア  
 ルタイムPCRで測定した相対DNA量と実際のトビウオす  
 り身重量の間の関係を求めた。トビウオすり身含量とリア  
 ルタイムPCRで決定された魚の相対DNA量との相関関係を  
 図8に示す。なお、相対DNA量は以下のとおり計算し  
 た。

Relative DNA content (%)

$$= \frac{\text{Amount of flying fish DNA (ng)}}{\text{Amount of total fish DNA (ng)}} \times 100$$

図8のデータに基づき、以下の近似曲線を得た。

$$y = 1.08x - 3.20, R^2 = 0.977$$

トビウオの相対DNA量と実際のトビウオすり身含量の間  
 で、決定係数(R<sup>2</sup>=0.977)は高い相関関係を示した。よっ  
 て、この近似式をあご野焼製品におけるトビウオすり身の  
 相対重量を評価するのに用いた。

表5 トビウオすり身含量の定量

Sample/number	<i>Afal</i>		<i>Munl</i>		E-mark labeling
	Average of relative intensity	Standard deviation	Average of relative intensity	Standard deviation	
E1	0.82	0.038	0.73	0.111	OK
E2	0.73	0.046	0.70	0.058	OK
E3	0.71	0.086	0.67	0.076	OK
E4	0.82	0.032	0.78	0.056	OK
E15	0.71	0.029	0.64	0.074	OK
N1	0.15	0.060	-0.02	0.112	NO
N2	0.06	0.052	-0.05	0.075	NO

OK, passed the criteria for E-mark authentication; NO, did not pass the criteria for E-mark authentication.

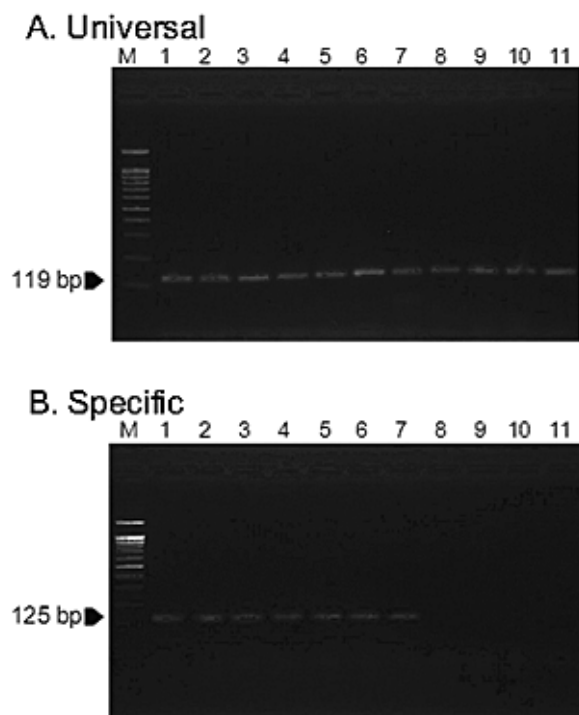


図7 あご野焼に用いるトビウオ類およびその他の魚種の16SrDNAのPCR増幅結果

A, DNA fragments amplified with universal primers Univ16SF2 and Univ16SR2.; B, DNA fragments amplified with flying fish specific primers Tobil6SF3 and Tobil6SF3.  
 lane M, 100-bp ladder marker; 1, *C. hiraii*; 2, *C. heterurus*; 3, *C. agoo*; 4, *C. pinnatibarbatu*; 5, *C. poecilopterus*; 6, *C. cyanopterus*; 7, *C. antonichii*; 8, *T. chalcogramma*; 9, *M. australis*; 10, *T. japonicus*; 11, *P. sexfasciata*.

表6 市販されている各種あご野焼に含まれるトビウオの定量

Sample name	Relative content (% ng DNA/ng DNA)	Standard deviation	Remarks
A	46	0.8	
B	45	6.4	
C	32	0.0	
D	32	0.0	
E	65	5.0	
F	74	6.9	E-marked
G	58	6.1	
H	76	2.1	E-marked
I	0	0.0	noyaki
J	0	0.0	itakamaboko

4.3.2.3 Eマーク認証を検証するためのあご野焼製品におけるトビウオすり身の相対含有量の決定  
 Eマーク認証されたあご野焼製品が、70%以上のトビウ

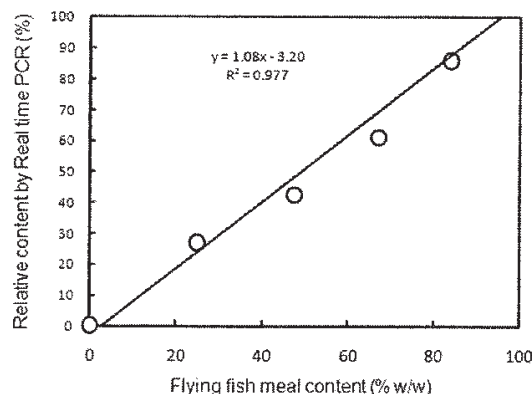


図8 リアルタイムPCRによる実際のすり身含量と相対DNA量との関係

オすり身を含むことを検証できる方法の開発を試みた。図8のスタンダードサンプルから得た結果から、8つの市販あご野焼製品におけるトビウオ含有量を評価した。これらの製品は、異なるメーカー製であり、いくつかは島根県からEマーク認証を受けていた。また、トビウオ使用の表示がない野焼と蒸し板かまぼこについても分析した。その結果を表6に示した。リアルタイムPCR分析によれば、相対DNA量が0%であったことから、あご野焼以外の製品はトビウオすり身を含まないことを確認し、一方でEマークの付いていない7つのあご野焼製品の相対DNA量は、32%から65%の間であった。対照的に、2つのEマーク付きのあご野焼製品は、74%と76%で、すなわち70%以上のトビウオすり身を含んでおり、これらの製品はEマークに適合していた。

リアルタイムPCRに用いる4.3.1.1の3組のプライマーセットは、短いDNA断片でも増幅できるように設計した。つまり、DNAがレトルト食品のような高温や高圧で加工したサンプルから増幅される時、短いDNA断片を増幅するプライマーが有利だからである。あご野焼の製造には、図9のとおり、いくつかの加工工程がある。加工をする際に、単位重量あたりのDNA含量は、加水量やその他の添加物量により各ステップで変動している。しかしながら、この方法では、単にすり身中に存在する総DNA量に基づいたトビウオすり身のDNA量の相対値から、トビウオすり身の含量を計算する。そのため、製造方法が違っていても正確な検出が可能である。

## 5. ま と め

我が国では、2000年代に、産地偽装、賞味期限改ざん、事故米不正転売など、食品関連業者が消費者を欺く事件が次々と起こったことから、水産物、農産物、畜産物およびその加工品など食品全般に関して、消費者の安全・安心の関心が高まった。このことにより、2009年9月からは、国により消費者庁が設置されている。一方、関係研究機関においては、様々な食品の科学的な鑑定を目的とした、研究、



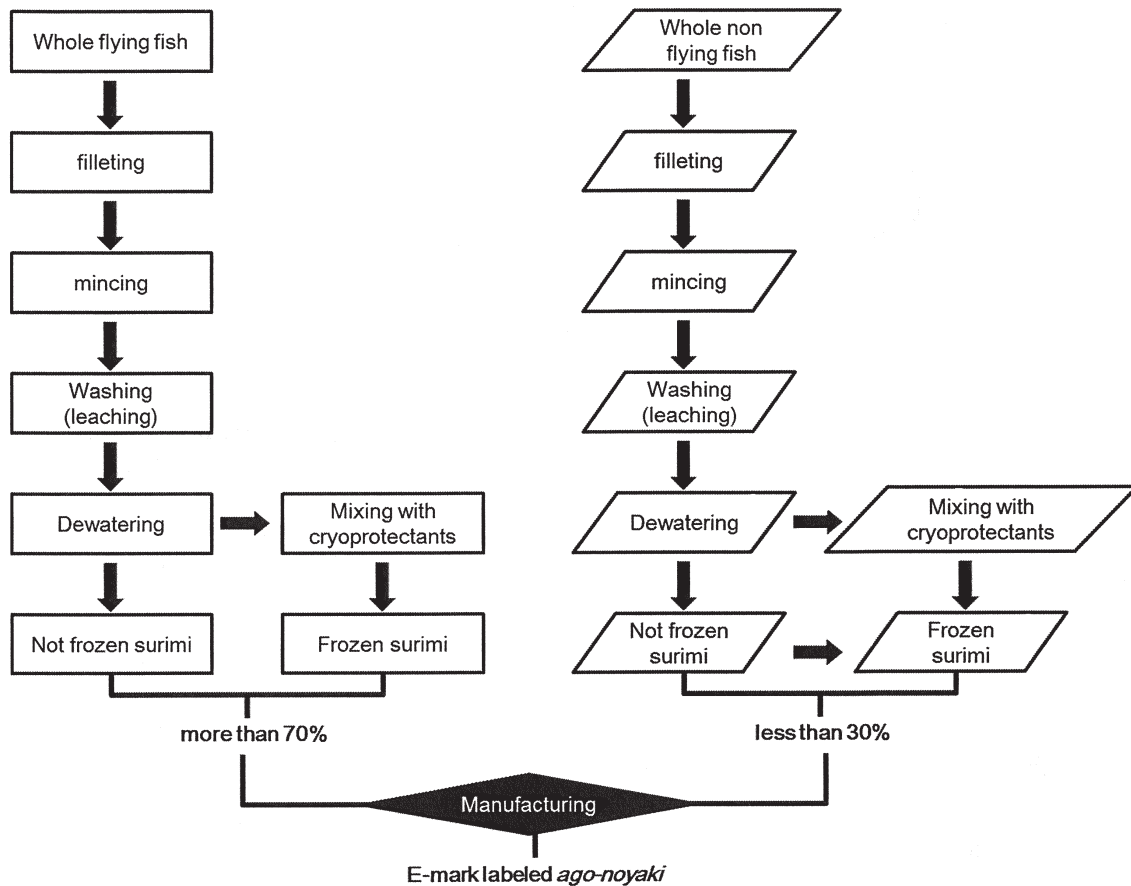


図9 あご野焼製造フローチャート

技術開発が盛んに行われるようになった。

本研究は、このような時代背景のもと行われ、島根県の特産品であるあご野焼に使用されるトビウオの定量が最終目的であった。研究の手順としては、主要なトビウオであるホソトビウオのミトコンドリア全塩基配列の決定を行い、それを元に、まずはPCR-RFLP法を用いたトビウオ類の定性的検出を試みた。次のステップとして、画像解析法とリアルタイムPCR法という二種類の方法で定量的検出を試みた。そして、トビウオ類に関して形態的な特徴がなくても、また加熱等の加工がされていても、定性的、定量的鑑定が可能になった。すなわち、あご野焼Eマーク基準の分析法を確立することができた。また、同時にトビウオ類を用いた製品全般に対しても鑑定が可能となった。今後は、地域食品ブランドや食の安全・安心に関する分析技術として活用が期待される。なお、この技術は島根県が出願人となり、特許<sup>39)</sup>を取得している。

### 謝 辞

本研究を遂行するにあたりご指導とご鞭撻を賜りました県立広島大学教授 森永力博士をはじめ関係各位に深甚なる謝意を表します。

### 文 献

- 1) 阿部宗明. 原色魚類大圖鑑. 北隆館. 1987, 1029p.
- 2) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. Production of fishery and aquaculture. MAFF (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries). Tokyo, Japan. 2006, (in Japanese).
- 3) 文部科学省科学技術学術審議会資源調査分科会. 五訂増補日本食品標準成分表. 2008, 508p.
- 4) 高知県立消費生活センター. 商品テスト報告No. 40. 2003, 12p.
- 5) Chow S.; Nohara K.; Tanabe T.; Itoh T.; Tsuji S.; Nshikawa Y.; Uyeyanagi S.; Uchikawa K. Genetic and morphological identification of larval and small juvenile tunas (Pisces: Scombridae) caught by a mid-water trawl in the western Pacific. Bulletin of Fisheries Research Agency. 2003, vol. 8, p. 1-14.
- 6) Ram J.L.; Ram M.L.; Baidoun F.F. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1996, vol. 44, p. 2460-2467.
- 7) Namikoshi A.; Takashima Y.; Iguchi J.; Yanagimoto T.; Yamashita M. Species identification of Alaska pollock, *Gadus* spp., and *Micromesistius* spp. in cod roe products using a PCR-based method. Fisheries Science. 2011, vol. 77, p. 671-678.

- 8) 長富潔, 濃添多恵子, 常本和伸, 原研治, 市ノ木健, 田北徹, 石原忠. PCR-RFLP分析によるマゴチとヨシノゴチの種判別. 日本水産学会誌. 2001, vol. 67, p. 503-504.
- 9) 赤崎哲也, 猿渡敏郎, 片山貴之, 朝長洋祐. ミトコンドリアDNA (シトクローム b) を利用した「ちりめんじゃこ」の原料魚種推定について. 関税中央分析所報. 2005, 第45号, p. 5-9.
- 10) 桂弘毅, 八木潤, 石川順一, 村上孝之, 寺内豊, 松崎隆一. DNA解析によるイワシの種判別. 関税中央分析所報. 2009, 第49号, p. 5-9.
- 11) Coimbra M.R.M.; Kobayashi K.; Koretsugu S.; Ohara E.; Okamoto N.; Hasegawa O. Twenty microsatellite markers from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science. 2001, vol. 67, p. 358-360.
- 12) Comesana A.; Abella P.; Sanjuan A. Molecular identification of five commercial flatfish species by PCR-RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2003, vol. 83, p. 752-759.
- 13) Rasmussen Rosalee S.; Morrissey Michael T.; Walsh Jessica. Application of a PCR-RFLP Method to Identify Salmon Species in U.S. Commercial Products. Journal of Aquatic Food Product Technology. 2010, vol. 19, p. 3-15.
- 14) 槇智之, 小岩智宏, 今田敬子, 津村明宏, 杉村豊裕, 高嶋康晴, 森田貴己, 山下倫明. ミトコンドリアチトクロムb遺伝子のDNA分析によるスズキ, タイリクスズキおよびナイルパーチの種判別. 日本食品科学工学会誌. 2004, vol. 51, p. 471-476.
- 15) Takashima Y.; Morita T.; Yamashita M. Complete mitochondrial DNA sequence of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* and molecular identification of two commercially important species *T. trachurus* and *T. japonicus* using PCR-RFLP. Fisheries Science. 2006, vol. 72, p. 1054-1065.
- 16) 瀬崎啓次郎, 久保島康子, 三谷勇, 福井篤, 渡部終五. ミトコンドリア・シトクロームb遺伝子によるマサバおよびゴマサバの種判別とホルマリン固定浮遊卵同定への応用. 日本水産学会誌. 2001, vol. 67, p. 17-22.
- 17) 若尾卓成, 疋田雄一, 常吉俊宏, 梶 眞壽, 久保田裕明, 久保田隆之. 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. 1999, vol. 65, p. 391-399.
- 18) Itoi S.; Nakaya M.; Kaneko G.; Kondo H.; Sezaki K.; Watabe S. Rapid identification of eels *Anguilla japonica* and *A. Anguilla* by polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphism-based specific probes. Fisheries Science. 2005, vol. 71, p. 414-421.
- 19) 槇智之, 小岩智宏, 今田敬子, 豊田正俊, 杉村豊裕, 池田達哉, 矢野博. ミトコンドリアチトクロムb遺伝子のDNA分析によるタイ科魚類の魚種判別. 日本食品科学工学会誌. 2005, vol. 52, p. 366-372.
- 20) 片山貴之, 三浦徹, 三枝朋樹. PCR-RFLP法によるフグ目の属判別. 関税中央分析所報. 2009, 第49号, p. 21-27.
- 21) 若林敏江, 柳本卓, 酒井光夫, 一井太郎, 三木克弘, 小林敬典. mtDNA COI領域を用いたイカ加工製品の原料種判別. DNA多型. 2009, vol. 17, p. 144-146.
- 22) Pepe T.; Trotta M.; Di Marco I.; Anastasio A.; Bautista J.M.; Cortesi M.L. Fish Species Identification in Surimi-Based Products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2007, vol. 55, p. 3681-3685.
- 23) Rea S.; Storani G.; Mascaro N.; Stocchi R.; Loschi A.R. Species identification in anchovy pastes from the market by PCR-RFLP technique. Food Control. 2009, vol. 20, p. 515-520.
- 24) Inoue J.G.; Miya M.; Aoyama J.; Ishikawa S.; Tsukamoto K.; Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fisheries Science. 2001, vol. 67, p. 118-125.
- 25) Nagase M.; Aimi T.; Suganaka K.; Kitamoto Y.; Morinaga T. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese flying fish *Cypselurushiraii*. Fisheries Science. 2005, vol. 71, p. 914-923.
- 26) Inoue J.G.; Miya M.; Tsukamoto K.; Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese sardine, *Sardinops melanostictus*. Fisheries Science. 2000, vol. 66, p. 924-932.
- 27) Inoue J.G.; Miya M.; Tsukamoto K.; Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*. Fisheries Science. 2001, vol. 67, p. 828-835.
- 28) Miya M.; Kawaguchi A.; Nishida M. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderatescale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. Molecular Biology and Evolution. 2001, vol. 18, p. 1993-2009.
- 29) Seutin G.; Lang B.F.; Mindell D.P.; Morais R. Evolution of the WANCY Region in Amniote Mitochondrial DNA. Molecular Biology and Evolution. 1994, vol. 11, p. 329-340.
- 30) Doda J.N.; Wright C.T.; Clayton D.A. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. Proceedings of the National Academy of Science of United States of America. 1981, vol. 78, p. 6116-6120.
- 31) Walberg M.W.; Clayton D.A. Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. Nucleic Acids Research. 1981, vol. 9, p. 5411-5421.
- 32) Aranishi F.; Okimoto T.; Izumi S. Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by PCR-RFLP analysis. Journal of Applied Genetics. 2005, vol. 46, p. 69-73.
- 33) Borgo R.; Souty-Grosset C.; Boucho D.; Gomot L. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. Journal of Food Science. 1996, vol. 61, p. 1-4.
- 34) Mabuchi K.; Miya M.; Azuma Y.; Nishida M. Independent evolution of the specialized pharyngeal jaw apparatus in cichlid and labrid fishes. BMC Evolutionary Biology. 2007, 7:10, doi10.1186/1471-2148-7-10.
- 35) Yanagimoto T.; Kitamura T.; Kobayashi T. Complete nucleotide sequence and variation of mitochondrial DNA from 10 individuals of walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. Fisheries Science. 2004, vol. 70, p. 885-895.
- 36) Nagase M.; Maeta K.; Aimi T.; Suganaka K.; Morinaga T. Authentication of flying fish meal content of processed

- food using PCR-RFLP. Fisheries Science. 2009, vol.75, p. 811-816.
- 37) Nagase M.; Maeta K.; Aimi T.; Suginaka K.; Morinaga T. Analytical method for quantification of relative flying fish paste content in the processed seafood. Food Science and Technology Research. 2010, vol. 16, p. 403-408.
- 38) Nagase M.; Ruirong Yi; Hidaka F.; Maeta K.; Aimi T.; Yamaguchi T.; Suginaka K.; Morinaga T. Quantification of relative flying fish paste content in the processed seafood *ago-noyaki* using real-time PCR. Fisheries Science. 2010, vol. 76, p. 885-892.
- 39) 島根県. トビウオ類の特異的検出法. 特許第5388049号. 2013-10-18.