

RAPD-PCR 法によるトラフグ、ハコフグ、ウマヅラハギ およびアンコウの肝臓の判別

内山亜喜子・鶴田小百合・赤木浩一

福岡市保健環境研究所保健科学課

Discrimination of Liver of Japanese Pufferfish, Trunkfish, Black Scraper and Angler by RAPD-PCR Method

Akiko UCHIYAMA, Sayuri TSURUDA and Kouichi AKAKI

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

RAPD-PCR 法を用いて、トラフグ、ハコフグ、ウマヅラハギおよびアンコウの肝臓の判別法を検討した。市販のキットを用いて DNA の抽出および増幅を行い、複数プライマーによる DNA 増幅断片の電気泳動パターンを比較することでトラフグ、ハコフグ、ウマヅラハギおよびアンコウを判別し、形態では魚種の判別が困難である肝臓の検査が可能となった。

Key Words : トラフグ Japanese pufferfish, ハコフグ trunkfish, ウマヅラハギ black scraper, アンコウ angler, 肝臓 liver, RAPD-PCR 法 RAPD-PCR method

1 はじめに

食品衛生法により、有毒な、若しくは有害な物質が含まれ、若しくは付着し、またはこれらの疑いがあるものについては、販売等をしてはならないが、人の健康を損なうおそれがなく、厚生労働大臣が定める場合においてはこの限りでない。また、フグについては、厚生労働省通知「フグの衛生確保について」により、有毒部位の除去処理をおこなうことでフグの種類や有毒物質の程度および部位によって、その販売等が認められている。しかし近年、アンコウやカワハギの肝臓と偽ってフグの肝臓を提供する飲食店等が存在しており、食品衛生上の危害防止のため、肝臓での魚種判別が必要である。魚種の判別法としては、等電点電気泳動法やリアルタイム PCR 法等があるが、前者は筋肉組織が対象であり、後者は魚種ごとにプライマー設計が必要である。そこで、フグの鑑別を検討していた棚橋らの方法¹⁾および厚生労働省通知²⁾を準用し、RAPD-PCR 法による肝臓の簡便な判別法を検討したところ良好な結果を得たので報告する。

2 試験方法

2.1 試料

トラフグ肝臓、ハコフグ肝臓、ウマヅラハギ肝臓、アンコウ肝臓（アメリカ産）、アンコウ肝臓（長崎産）およびトラフグ精巢

2.2 使用機器

分光光度計：ND-1000, NanoDrop Technologies, Inc
DNA 増幅装置：iCycler, Bio-Rad Laboratories, Inc
電気泳動装置：Mupid[®]-2plus, 株式会社アドバンス
ゲルイメージ解析装置：MultiDoc-It Digital Imaging System, Ultra-Violet Products Ltd.

2.3 試薬

DNA 抽出キット：DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN 社
RAPD-PCR キット：Ready-To-Go RAPD Analysis Kit, Amersham Biosciences 社
Proteinase K および RNase A 溶液（100mg/mL）：QIAGEN

社

電気泳動ゲル：Agarose X，株式会社ニッポンジーン
10×TAE およびエチジウムブロマイド（10mg/mL）：
和光純薬株式会社
その他の試薬は特級試薬を用いた。

2.4 DNAの抽出および精製

DNeasy Blood & Tissue Kit を用い、キットに添付された操作方法に基づき、DNAの抽出および精製をおこなった。なお、肝臓は加温溶解しやすく油分を多く含むため、加温時間を2時間とし、直後の遠心分離後に油層を取り除いた上清のみをその後の操作に用いた。ここで得られた溶液をDNA試料原液とした。

分光光度計を用い、200-320nmの範囲でDNA試料原液の紫外吸収スペクトルを測定した。260nmの吸光度の値1を50ng/mL DNAとしてDNA濃度を算出した。また、230nm、260nmおよび280nmの吸光度（O.D.230、O.D.260およびO.D.280）から精製度（O.D.260/O.D.280）が1.2-2.5であることを確認した。なお、DNA試料原液を滅菌超純水で希釈し、10ng/μLの濃度に調製したものをDNA試料液とした。

2.5 RAPD-PCR

RAPD-PCRキット付属のReady-To-Go RAPD Analysis Beads入りチューブに滅菌超純水15μL、プライマー（5μM）5μLおよびDNA試料液（10ng/μL）5μLを加え、十分に攪拌した後、PCRチューブに25μL移した。RAPD-PCR反応は、95°Cで5分加温した後、45サイクル（95°C，1分→36°C，1分→72°C，2分）の条件でおこなった。なお、キット付属のプライマーはPrimer-1～Primer-6の6種類である。

2.6 電気泳動および解析

泳動ゲルには3%アガロースゲルを用い、電気泳動（100V，40分）をおこなった。1×TAE緩衝液100mLあたり1μLのエチジウムブロマイドを加えて調製した染色液に電気泳動後のゲルを浸し、30分程度染色した後、1×TAE緩衝液にて20分程度脱染色をおこなった。

ゲルイメージ解析装置を用い、紫外線（302nm）を照射し、電気泳動パターンを確認した。

3 結果および考察

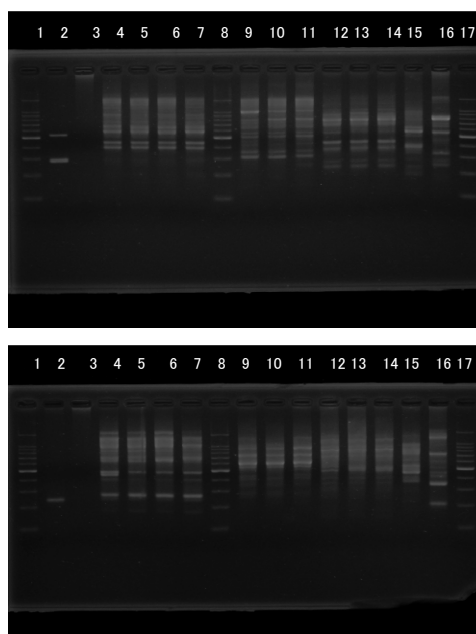
3.1 プライマー選択

RAPD-PCRキット付属プライマー6種類のうち、棚橋らの報告を参考に、Primer-1，4，5およびPrimer-6の4

種類を用いて電気泳動バンドを比較した。RAPD-PCR法では単一プライマーを用いるため、DNA増幅断片である電気泳動バンドは複数存在する。それぞれの試料がより特徴的な電気泳動バンドを示したのはPrimer-4およびPrimer-5であったため、この2種類のプライマーを使用することとした。DNA増幅断片の電気泳動結果を図1に示す。なお、同一種の検体を複数入手したものは個体差確認のため3検体並行試験をおこなった。

3.2 電気泳動パターン比較

複数の電気泳動バンドから構成される電気泳動パターンを総合的に判断することで、肝臓の判別をおこなった。トラフグ肝臓の電気泳動パターンと他の試料の電気泳動パターンを比較したところ、全ての試料においてトラフグ肝臓とは異なる電気泳動パターンを示した。Primer-4およびPrimer-5を用いた場合におけるそれぞれの特徴的なPCR産物を表1に示す。なお、トラフグ精巢はトラフグ肝臓と同一電気泳動パターンを示し、アンコウは産地によって異なる電気泳動パターンを示した。また、同一種の並行試験では個体差は見られなかった。



- | | |
|------------------------|---------------------|
| 1. 8. 17. マーカー (100bp) | 9. ハコフグ(肝臓)-① |
| 2. ネガティブコントロール | 10. ハコフグ(肝臓)-② |
| 3. ノンプライマー | 11. ハコフグ(肝臓)-③ |
| 4. トラフグ(精巢)-① | 12. ウマヅラハギ(肝臓)-① |
| 5. トラフグ(精巢)-② | 13. ウマヅラハギ(肝臓)-② |
| 6. トラフグ(精巢)-③ | 14. ウマヅラハギ(肝臓)-③ |
| 7. トラフグ(肝臓) | 15. アンコウ(肝臓)[アメリカ産] |
| | 16. アンコウ(肝臓)[長崎産] |

図1 RAPD-PCR産物の電気泳動結果
(上；Primer-4，下；Primer-5)

表1 電気泳動による特徴的な RAPD-PCR 産物の鎖長

プライマー	単位:bp				
	トラフグ (肝臓)	ハコフグ (肝臓)	ウマヅラ ハギ (肝臓)	アンコウ (肝臓) [アメリカ産]	アンコウ (肝臓) [長崎産]
Primer-4		1000			
		800	800		800
		650		600	
		580	510	550	550
		450		450	
		400	360	380	380
Primer-5		300	280		320
			250		250
		900			950
		750	850		720
		600			
		480		480	340
		280			210

4 まとめ

RAPD-PCR 法を用いて、トラフグ、ハコフグ、ウマヅラハギおよびアンコウの肝臓の判別法を検討した。2 種類のプライマーによる DNA 増幅断片の電気泳動パターンを比較したところ、魚種ごとにそれぞれ特徴的な電気泳動パターンを示し、形態だけでは判別が困難である肝臓の検査が可能となった。

文献

- 1) 棚橋高志, 他: フグ鑑別における RAPD 法応用の可能性, 食品衛生研究, Vol.55 No.4, 45-49, 2005
- 2) 厚生労働省通知食安輸発第 0425005 号: 魚類乾製品等のフグ混入検査について, 平成 20 年 4 月 25 日