

30. フグ食中毒発生時の原因究明を目的とした遺伝子解析による高精度フグ種同定法の確立

○中村 麻子、中島 淳、更谷 有哉、飛石 和大、堀 就英
(福岡県保健環境研究所)

【研究目的】

フグによる食中毒は死に至る事例があるため、その原因究明は重要な課題である。フグ毒の有無はフグの種類および部位によって異なることから、食中毒発生時の適切な対応には原因となったフグ種の正確な同定が求められる。しかし、食中毒検体は主として切り身や喫食・調理残品であり、形態学的な同定は困難な場合が多いため、遺伝子解析法を用いたフグ種同定が期待される。そこで、フグ食中毒事件の原因究明に貢献することを目的として遺伝子解析法を用いた高精度なフグ種同定法を検討した。

【研究の必要性】

フグ食中毒疑い検査のため、2010 年度から 2024 年度の 15 年間に福岡県保健環境研究所へ検体が搬入された事例は福岡県域で 11 件であったが¹⁾、形態学的な同定では正確なフグ種同定ができなかった。このため遺伝子解析によるフグ種の同定が求められるが、厚生労働省の通知試験法²⁾で用いられている 16S rRNA 領域のみでは同定できない事例が報告されており³⁾、また相同性検索においてはデータベース汚染（誤同定された配列や誤った種名が登録されること）による誤同定の問題も指摘されている⁴⁾。これらの技術的課題を解決するためには、複数の遺伝子領域を用いた解析と、信頼性の高い参照配列に基づく系統樹解析を併用した、より高精度な同定法の確立が必要である。

【研究計画】

1. フグ検体の収集

市販フグ（生鮮フグ、加工品）、野外採集フグを収集し、2023 年に発生したフグ食中毒の食品残品を検体として用いた。

2. フグ検体の遺伝子配列決定およびフグ遺伝子解析

種同定の精度を向上させるため、ミトコンドリア遺伝子 3 領域（16S ribosomal RNA (16S rRNA)、cytochrome b (cyt b)、cytochrome c oxidase subunit I (cyt c)を対象とした多領域解析を行った。プライマーは村上らの方法⁵⁾に記載された PCR プライマーを用いた。また、遺伝子配列の相同性検索に加えて系統樹解析を併用した。系統樹解析のため、既知フグ種および福岡県近海のフグの参照配列を文献および米国国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information: NCBI）のデータベースから収集し、独自の参照配列データベースを作成した。

【実施内容・結果】

1. 検体および検体情報の収集

フグ 11 検体を収集した（表 1）。検体の内訳は市販フグ 9 検体（生鮮フグ 5 検体、加工品 4 検体）、野外採集フグ 1 検体および 2023 年に発生したフグ食中毒事件の喫食・調理残品 1 検体である。購入したフグについては、食品表示等からフグの種類を確認した。採取フグは形態学的な同定を行った。検体番号 F11 は食中毒発生時の喫食・調理残品であり、形態学的な種同定はできなかった。

表 1. 遺伝子解析に用いたフグ検体一覧と入手時の情報

検体番号	検体種別	入手時のフグ種情報			形態	遺伝子解析 使用部位
		入手元表示	形態学的同定	情報取得方法		
F1	トラフグ身欠き	トラフグ	未実施	商品表示	生鮮	ヒレ
F2	なめらフグ（真フグ）身欠き	マフグ	未実施	商品表示	生鮮	筋肉
F3	シロサバフグ（かなとフグ）身欠き	シロサバフグ	未実施	商品表示	生鮮	筋肉
F4	クロサバフグ（中国産）身欠き	クロサバフグ	未実施	商品表示	生鮮	筋肉
F5	カナトフグ（中国産）身欠き	カナトフグ	未実施	商品表示	生鮮	ヒレ
F6	トラフグ乾燥ヒレ	トラフグ	未実施	商品表示	加工品	ヒレ
F7	フグ天（トラフグ皮入り）	トラフグ	未実施	商品表示	加工品	筋肉・皮
F8	焼きフグ（シロサバフグ）	シロサバフグ	未実施	商品表示	加工品	ヒレ
F9	混ぜご飯の素	シロサバフグ、クロサバフグ	未実施	商品表示	加工品	筋肉
F10	野外採集フグ	なし	クサフグ	なし	丸体	ヒレ
F11	食中毒検体	不明	同定不能	なし	喫食・調理残品	筋肉

2. 遺伝子解析による種同定

フグ検体から DNA 抽出キット（Blood & Cell Culture DNA Mini Kit、QIAGEN）を用いキットの方法に従い DNA を抽出した。抽出時にはプロテアーゼ（Proteinase K）および RNase 処理を行った。抽出した DNA を鋳型とし、村上らの報告⁵⁾に記載された PCR プライマーおよび EmeraldAmp PCR Master Mix（タカラバイオ社）を用い、ミトコンドリア遺伝子 3 領域（16S rRNA、cyt b、cyt c）を増幅した。PCR 条件は 98°C10 秒、53°C30 秒、72°C60 秒を 35 サイクルとし、増幅産物はアガロースゲル電気泳動により確認し、16S rRNA 領域では 615 bp、cyt b 領域では 490 bp、cyt c 領域では 648 bp の単一バンドが得られたことを確認した。

PCR 産物を精製後、村上らの報告⁵⁾に記載されたシークエンスプライマーおよび BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems 社）によりシークエンス反応を行った。反応産物を精製し、ABI 3500 Genetic Analyzer（Applied Biosystems 社）により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は SEQUENCHER（日立ソフトウェアエンジニアリング社）により解析し、低品質領域のトリミング後、フォワードおよびリバース配列をアライメントしてコンセンサス配列を決定した。その結果、16S rRNA 領域では 11 検体中 10 検体、cyt b 領域では 10 検体、cyt c 領域では全 11 検体でコンセンサス配列が得られた。得られたコンセンサス配列を用いて NCBI が提供する BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) により相同性検索を実施したまた、文献および NCBI データベースから既知フグ種および福岡県近海のフグのリファレンス配列を収集し^{6,7)}、独自の参照配列データベースを作成した。これらの参照配列と得られたコンセンサス配列を用いて、分子系統解析ソフトウェア MEGA Ver.11 により近隣接合法による系統樹を作成した。系統樹の信頼性評価はブートストラップ法（1,000 回反復）により行った。

相同性検索の結果を表 2 に示した。配列が得られた領域における一致率は 98-100%であり、1 検体（検体番号 F3 の cyt b 領域）を除き通知試験法²⁾で規定されている 99%以上の基準を

満たした。いずれの領域においても 99.0%以上の相同性を示す種が複数確認された。3 領域すべてで同一種が最上位となったのは 6 検体（シロサバフグ 3 検体、クロサバフグ、クサフグ、シマフグ各 1 検体）であった。領域間で異なる種が最上位となったのは 4 検体であった。F1 および F6 では 16S rRNA と cyt c 領域でトラフグ、cyt b 領域でサンサイフグが最上位であった。F2 では 16S rRNA 領域でトラフグとメフグの雑種、cyt b 領域と cyt c 領域でマフグが最も高い相同性を示した。F7 では cyt b 領域でトラフグ、cyt c 領域でスケトウダラ（すり身成分）が検出された（16S rRNA 領域は配列取得不可）。

系統樹解析の結果を図 1 に示す（本報告では cyt b 領域のみ提示し、16S rRNA 領域および cyt c 領域の結果は省略する）。16S rRNA 領域における系統解析の結果、トラフグ属の検体は広範囲に分散する傾向を示し、近縁他種との明確な区別が困難となる検体が認められた。F1 および F6 の検体は相同性検索でトラフグが最上位に位置し、系統樹上でもトラフグ・カラスのクラスターに位置づけられた一方、F2（相同性検索でトラフグ×メフグが最上位に位置）はマフグのクラスターには分離されず、F11（相同性検索でシマフグが最上位に位置）もシマフグのクラスターに明確に分離されなかった。これに対し、サバフグ属では各検体が対応する種のリファレンス配列と近接して位置し、明確に種ごとに分離された。

cyt b 領域および cyt c 領域では、トラフグ属・サバフグ属ともに各検体が特定のフグ種のリファレンス配列と近接して位置した。F1 および F6 については、cyt b 領域の相同性検索ではサンサイフグ（99%）が最上位であったが、系統樹解析ではトラフグ・カラスのクラスターに位置した。一方、cyt c 領域では、相同性検索でトラフグ（100%）が最上位となり、系統樹解析でもトラフグ・カラスのクラスターに位置した。なお、両領域（cyt b および cyt c）の系統樹解析において、トラフグとカラスは同一のクラスターを形成し、両種は明確に分離されなかった。

表 2. 相同性検索による種同定結果

検体番号	16sRNA		cyt b		cyt c	
	一致塩基数/配列長 (%) *	標準和名 (アクセッション番号)	一致塩基数/配列長 (%)	標準和名 (アクセッション番号)	一致塩基数/配列長 (%)	標準和名 (アクセッション番号)
F1	553/554(99%)	トラフグ (OD909576)	483/487(99%)	サンサイフグ (NC 024199)	585/585(100%)	トラフグ (OQ700748)
F2	575/576(99%)	トラフグ×メフグ (NC 043900)	452/456(99%)	マフグ (NC 011628)	643/643(100%)	マフグ (NC 011628)
F3	533/533(100%)	シロサバフグ (NC 011637)	446/453(98%)	シロサバフグ (NC 011637)	584/584(100%)	シロサバフグ (OQ700399)
F4	570/572(99%)	クロサバフグ (GQ461748)	462/467(99%)	クロサバフグ (NC 059716)	642/642(100%)	クロサバフグ (OQ700345)
F5	571/571(100%)	シロサバフグ (NC 011637)	457/461(99%)	シロサバフグ (NC 011637)	647/647(100%)	シロサバフグ (OQ700415)
F6	535/536(99%)	トラフグ (OD909576)	485/489(99%)	サンサイフグ (NC 024199)	627/627(100%)	トラフグ (OQ700748)
F7	×	×	316/317(99%)	トラフグ (LC858315)	641/642(99%)	スケトウダラ (MH035590)
F8	537/537(100%)	シロサバフグ (NC 011637)	464/467(99%)	シロサバフグ (NC 011637)	644/649(99%)	シロサバフグ (OQ700415)
F9	581/584(99%)	クロサバフグ (GQ461748)	×	×	375/376(99%)	クロサバフグ (OQ700344)
F10	540/540(100%)	クサフグ (LC628657)	450/453(99%)	クサフグ (NC 011625)	638/638(100%)	クサフグ (KY514069)
F11	557/557(100%)	シマフグ (OM899644)	457/458(99%)	シマフグ (NC 011632)	633/633(100%)	シマフグ (HM180911)

* 最高スコア順の上位マッチを相同性と一致率（%）で表示。網掛け配列は99%未満の一致率を示す。

×：遺伝子配列が得られなかったもの

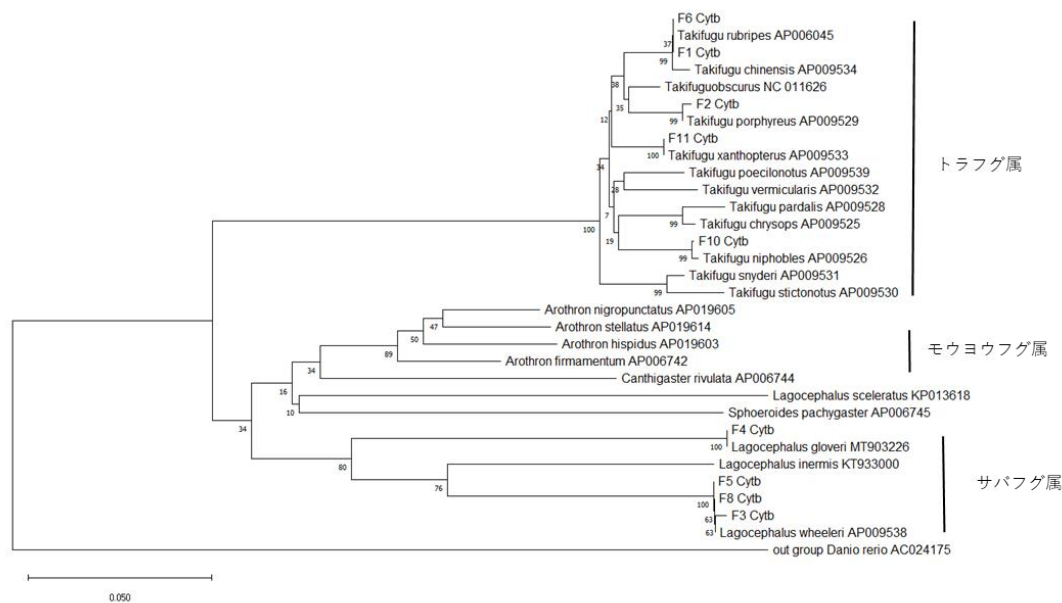


図 1. cyt b 領域の塩基配列に基づく近隣接合法による系統樹

【考察と今後の課題】

本研究では、ミトコンドリア遺伝子 3 領域(16S rRNA、cyt b、cyt c)の塩基配列解析に基づき、相同性検索と系統樹解析を併用したフグ種同定法を検討した。

遺伝子領域により同定精度に明確な差が認められた。16S rRNA 領域では、相同性検索において通知試験法²⁾の基準である 99.0%以上の相同性を示す種が複数確認され、系統樹解析でもトラフグ属では近縁種との分離が困難な検体が認められた。これに対し、cyt b 領域および cyt c 領域では、系統樹解析により多くのフグ種が明確なクラスターを形成し、16S rRNA 領域では困難であったトラフグ属の種の分離も可能となった。一方で、相同性検索の精度には課題も認められた。F1 および F6 は、cyt b 領域の相同性検索ではサンサイフグ (99%) が最上位であったが、系統樹解析では両領域 (cyt b、cyt c) とともにトラフグ・カラスのクラスターに位置づけられた。この不一致は、公共データベースにサンサイフグとして誤登録されたトラフグの配列が存在する可能性、または両種が極めて近縁であるため本領域では相同性検索のみでの同定が困難な可能性を示唆している。相同性検索でトラフグと同定された検体については、カラスが上位候補として検出されなかったにもかかわらず、系統樹解析でも両種は同一クラスターを形成し分離できなかった。この両種の同定が困難であることは先行研究⁸⁾でも報告されている。

厚生労働省の通知⁹⁾によれば、トラフグとカラスの可食部位 (筋肉と精巣) は同一とされている。ただし、通知では両種の間中絶的な個体出現する可能性も指摘されており、そのような個体については両種で共通して可食となっている部位のみを可食部位とすることが定められている。しかし、フグの毒性には個体差や地域差があることも知られており、種の同定が困難な場合には慎重な取り扱いが必要と考えられる。

本研究では、実際の食中毒検体 (湯がいたフグ刺し) や、フグ天 (練り物)、焼きフグおよび混ぜご飯の素といった加工度の高い検体も解析した。その結果、一部の領域で配列取

得が困難な場合があったものの、複数領域（少なくとも2領域以上）で配列を取得でき、種同定が可能であることが示唆された。

遺伝子解析による種同定では、公共データベースの汚染により誤同定が生じる可能性がある。本研究では、このリスクを軽減するため、査読済み文献^{6,7)}に記載された配列に加え、NCBI データベースから複数の研究で一致して報告されている配列や、形態学的同定が明確な標本由来の配列など、信頼性が高いと判断される配列を慎重に選択し、独自の参照配列データベースを構築した。このような信頼性の高い参照配列と系統樹解析を相同性検索と併用することで、相同性検索単独で生じやすい誤同定のリスクを軽減し、より精度の高い種同定が可能となることが示唆された。

本研究の結果、フグの種同定においては相同性検索と系統樹解析を併せて実施すること、また種の同定には cyt b 領域と cyt c 領域が特に有効であると考えられた。今後は、本研究で構築した参照配列データベースをさらに充実させるため、フグ標本を形態学的に同定し、その塩基配列情報を継続的に蓄積する必要がある。また、実際の食中毒事例での検証を重ねることで手法の標準化を進め、フグ食中毒の検査体制の強化と迅速な原因究明に貢献していきたい。

【参考文献】

1. 中村ら (2025) 2010 年度から 2024 年度にかけてのフグ食中毒（疑い）事例について、福岡県保健環境研究所年報, 52, 投稿中

2. 厚生労働省 (2011) 輸入魚類加工品のフグ種鑑別検査法について. 食安輸発 0906 第 1 号.

3. Kim & Kang (2023) Food Control, 147, 109574.

4. Liu et al. (2024) Ecology and Evolution, 14, e10944.

5. 村上ら (2011) フグ種同定のためのミトコンドリア遺伝子解析法, 食品衛生学雑誌, 52(6), 348-353.

6. Yamanoue et al. (2009) Mol. Biol. Evol., 26(3), 623-629.

7. Kato et al. (2005) BMC Physiology, 5, 18.

8. Takahashi et al. (2023) Aquaculture Reports, 31, 101650.

9. 厚生労働省 自然毒のリスクプロファイル：魚類：フグ毒
https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_01.html

【謝辞】

本研究を行うにあたりご協力いただきました保健所および生活衛生課関係者各位、並びに機器等を提供いただいたウイルス課の皆様に深謝いたします。最後になりましたが、研究助成をいただきました公益財団法人大同生命厚生事業団に心より感謝申し上げます。

【経費使途明細】

使 途	金 額
試薬・消耗品（オリゴ、PCR 関連試薬、シーケンス関連試薬、手袋）	279,678 円
検体収集費	15,922 円
ドライアイス	4,400 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円