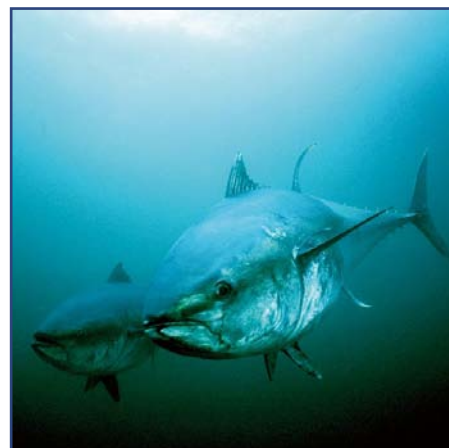




ミトコンドリアDNA分析による 蓄養クロマグロ製品の店頭表示検証

—大西洋クロマグロと太平洋クロマグロの種識別による—



ミ ト コ ン ド リ ア DNA 分 析 に よ る 蓄 養 ク ロ マ グ ロ 製 品 の 店 頭 表 示 検 証

—大西洋クロマグロと太平洋クロマグロの種識別による—

2009 年 10 月 発行

執筆者：山内 愛子（海洋科学博士・WWF ジャパン）

●出版元

© WWF ジャパン

〒105-0014 東京都港区芝 3-1-14

日本生命赤羽橋ビル 6 階

Tel : 03 3769 1713

Fax : 03 3769 1717

www.wwf.or.jp

© WWF Mediterranean Programme Office

Via Po 25/c

00198 Roma

Tel : +39 (06) 844 97227

Fax : +39 (06) 841 3866

www.panda.org/mediterranean

レイアウト：毛利 愛子（WWF ジャパン）

*本書より転載される際は、必ずWWF ジャパンまでご一報ください

表紙の写真

© Jorge BARTOLOME, Michel Gunther / WWF-Canon, Gilbert Van Ryckevorsel / WWF-Canada, Brian J. Skerry / National Geographic Stock / WWF

目 次

• 要旨（日本語）	
• Executive Summary（English）	
1. はじめに	1
2. 本レポートの背景	2
2-1. 地中海におけるクロマグロ生産状況	2
2-2. 日本への輸入状況	4
3. 本研究の目的	7
4. マグロ類の概要	7
5. 材料および方法	8
5-1. サンプルリング方法	8
5-2. PCR 法および mtDNA 調節領域および シトクロムオキシダーゼ 1 (cox1) の延期配列決定	10
5-3. 配列分析	11
6. 検証の結果と考察	12
7. 提言—透明性のあるトレーサビリティの確立—	13
• Appendix 1	16
• Appendix 2	20

ミトコンドリアDNA分析による蓄養クロマグロ製品の 店頭表示検証

—大西洋クロマグロと太平洋クロマグロの種識別による—

WWF ジャパン

山内 愛子

2009 年 10 月

要旨

本レポートは、日本の国内小売店で販売されている蓄養クロマグロ製品のDNA分析を行った結果をまとめたものである。

< 背景 >

1990年代後半以降、地中海沿岸国におけるクロマグロ蓄養業が急速に発展したことで、東大西洋、特に地中海におけるクロマグロ資源の枯渇が大きな問題となっている。しかし、現地では、違法操業や過剰漁獲といった問題が一向に解決されていない。主要マーケットである日本においても、クロマグロの流通構造は複雑で、実態を把握しにくいのが現状である。

< 目的 >

本レポートでは、

- 1 資源枯渇が深刻な大西洋クロマグロについて、世界有数の消費国である日本市場を対象として、透明性のある流通が実現されているかを検証し、
- 2 刺身向け生鮮製品では外見による種の区別が困難な大西洋クロマグロと太平洋クロマグロの2種について、DNA分析を用いた種識別の有効性を検討した。

< 方法 >

調査対象として、生鮮食品「クロマグロ」のうち、食品表示の名称が「クロマグロ」、原産地名が都道府県名や日本国内の水揚げした漁港名などの「国産地名」、そして「蓄養」あるいは「養殖」の表示のものを収集した。これらサンプルのDNA分析は、スペイン、ヒロナ（Girona）大学の Jordi Vinas de Puig 博士に委託した。

< 結果 >

分析を行ったサンプルの内、「国内産蓄養クロマグロ」と表示されている製品の約2%（1件）に大西洋クロマグロが混入していることが明らかとなった。また、DNA分析が2種のクロマグロの識別に有効であることが明らかとなった。

＜提言＞

本検証の結果から、大西洋クロマグロ流通において、より厳格な取扱いが必要であることが明らかとなった。そこで本レポートは、

- 1 **行政機関には、I U U由来の大西洋クロマグロを日本に輸入させないという強固な姿勢を生産国側に示すことを求める。**さらに日本市場において、本検証で使った手法による、定期的な製品表示検証を行うことを求める。また、誤表示が明らかになった場合には、消費者に広く情報を公開することを求める。
- 2 **大西洋クロマグロ輸入及び加工に携わる日本企業には、**管理状況や遵守状況が曖昧なクロマグロについては、日本国内に流通させない、国内で取扱いを行わないという、企業としての社会的責任を果たす公式の方針を明確に打ち出すことを求める。さらに、I U U由来のクロマグロを市場から排除するため、漁船から小売まで途切れることのない、かつ透明性のあるトレーサビリティを各企業の責任として確立することを求める。
- 3 **大西洋クロマグロを取り扱う小売企業には、**透明性があり、かつ生産国と生産者への遡及性が確保されている、トレーサビリティを有するクロマグロのみを取り扱うことを求める。また、大西洋クロマグロ製品については、J A S法に基づいて、ミ斯拉ベルのない適切なラベリングを行い、正しい情報を消費者に提供するように求める。
- 4 **大西洋クロマグロを購入する消費者には、**I U U由来の可能性があるクロマグロ製品の購入を避け、生産国と生産者が明らかな製品のみを購入することを推奨する。そのために、個々の消費者から資源状況や環境に配慮した製品のニーズを流通関係者に伝え、透明性のあるトレーサビリティの確立と違法性のないクロマグロの取扱いを小売企業及び外食企業に要求することを推奨する。

Executive Summary

Verification of Species by DNA Identification for Farmed Bluefin Tuna Sold in the Japanese Market

1 Background

Since late 1990s, ranches of the East Atlantic bluefin tuna (BFT), (*Thunnus thynnus*), have developed in the Mediterranean rapidly. Tuna farms in the Mediterranean are known to export majority of all their production to the Japanese market. On the other hand, as demonstrated by both WWF and the Standing Committee on Research and Statistics (SCRS) for the International Commission for Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT) in 2008, the real catches of BFT per year is estimated to be at least 60,000 tonnes. Most of this large amount of IUU catch above the agreed quota is thought to be sashimi-grade meat with destination to the Japanese market. Thus, it has been widely suspected that IUU BFT caught in Mediterranean is consumed in the Japanese market. However, this assumption has never been verified by means of documented proofs. Therefore, WWF Japan, WWF Mediterranean Programme Office established a joint project in order to test the validity of a methodology, which employs genetic analysis of

bluefin tuna tissue, and in order to prove the existence of potential laundering of IUU BFT in the Japanese market.

2 Objectives

The main objective of this study is the species identification by means of genetic technique of samples of shashimi-grade bluefin tuna in the Japanese market, which are labeled as Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, to assess the potential mislabeling of samples as Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. The second objective is to develop a suitable standard genetic analysis procedure to conduct identification at the species level of any sample of raw tissue from tunas (genes *Thunnus*) sashimi market.

3 Method

TRAFFIC East Asia-Japan carried out sampling of farmed bluefin tuna in Tokyo and Kanagawa prefecture in Japan. Samples (sashimi packet) of the bluefin tuna labeled as “farmed in Japan” were purchased from 60 stores between 21st of June and 3rd of August, in 2008. After sampling, a small specimen (size 1 × 1 cm) were taken from each samples and were preserved in the test tube with anhydrous ethanol (99.5%). 60 samples with anhydrous ethanol were transferred to WWF Mediterranean Programme

Office.

These 60 samples were analyzed by Dr Jordi Vinas, an experienced fish genetist at the University of Girona (Spain). Identification was based on DNA sequencing of D-loop, control region, of mtDNA. To fully confirm the results obtained with D-loop, a complementary DNA sequencing was conducted for another mtDNA marker, Cytochrome Oxidase 1 (COX1).

4 Results

Using mtDNA control region sequencing data, species identification of 48 samples were achieved. Of these, one sample (serial No. 39) was identified as Atlantic BFT, whereas all the other 47 samples were identified as Pacific BFT. Sample No. 39 was re-sequenced using mtDNA COX1, and its phylogenetic position as Atlantic BFT was confirmed. The result showed that the species information of sample No. 39 was in contradiction with the information provided on its label.

5 Discussions

The results of this study suggest that the amount of Pacific BFT disguised as Atlantic

BFT in the Japanese market may not be large. However, this study does indicate that traceability of Atlantic BFT in the Japanese market is still inadequate. In Japan, the JAS (Japan Agricultural Standard) law obliges all raw seafood to show information on origin country or region and species on its label.

This study has successfully identified different bluefin tuna species and proved the effectiveness of the employed DNA analysis methodology in detecting potential IUU bluefin tuna in the market.

6 Recommendations

1 Recommendations to Japan Fisheries Agency

In order to improve effectiveness of policies for elimination of IUU Atlantic BFT, WWF calls on the government of Japan to make a declaration of a policy that the Japanese government will strictly not allow any import of IUU Atlantic BFT and send a clear policy message to all the producer countries.

Furthermore, WWF recommends a periodic (for example, bimonthly) survey to detect mislabeled bluefin tuna in the Japanese market by the methodology described in this report. WWF will cooperate by sharing our technical resources for carrying out the analysis. The results of the survey should be made available to the public, so that the

Japanese consumer can make an informed choice of seafood, in this case tuna product.

2 Recommendations for Japanese fish processing and trade companies

In order to improve effectiveness of market mechanisms for elimination of IUU Atlantic BFT, WWF calls on Japanese fish processing and trade companies to lead other BFT industry in producer countries towards establishment of a complete (from fishers to consumers) and transparent traceability scheme as industry-lead voluntary actions.

3 Recommendations for Japanese retailers

In order to improve effectiveness of market mechanisms for elimination of IUU Atlantic BFT, WWF calls on Japanese retailers to introduce a complete (from fishers to consumers) and transparent traceability scheme as industry-lead voluntary actions.

WWF also calls on Japanese retailers to strictly follow the regulations on showing information on country of origin and species on the label as required by the JAS Law.

4 Recommendations for Japanese Consumers

In order to improve effectiveness of consumer choices in avoiding IUU Atlantic BFT, WWF calls on Japanese consumers to avoid purchase of produce suspected of sourced

from IUU and choose the produce with clear information on the country of origin and producers.

WWF also calls on the Japanese consumers to communicate the consumers' needs with the Japanese retailers for the BFT produce that are sourced from sustainable fishery with minimized ecosystem impacts. The needs for BFT produce with complete and transparent traceability should also be communicated with the Japanese retailers and restaurants.

ミトコンドリアDNA分析による蓄養クロマグロ製品の店頭表示検証

—大西洋クロマグロと太平洋クロマグロの種識別による—

1. はじめに

1990年代後半以降、地中海沿岸国におけるクロマグロ蓄養業が急速に発展したことで、東大西洋、特に地中海におけるクロマグロ資源の枯渇が問題となっている。しかし、当該海域のクロマグロ資源を管理する大西洋マグロ類保存国際委員会（International Commission for Conservation of Atlantic Tunas、以下ICCAT）は完全な機能不全に陥っており¹、持続可能な生産体制を実現するために必要な管理措置の合意に至らず、過剰な漁獲が毎年行われ続けている。これに加え、違法操業や漁獲量の虚偽報告が日常的に行われていることで、クロマグロ資源をめぐる状況は悪化の一途を辿っている²。地中海におけるIUU³漁業や過剰漁獲は深刻を極め、2008年にはICCATによって合意された漁獲可能量である3万2千トンをはるかに超える約6万トンが実際に漁獲されたとICCATの調査統計常任委員会（Standing Committee on Research & Statistics、以下SCRS）は推計した。

しかし、違法操業や割当量を超えた過剰な漁獲によって生産されたクロマグロについては、主要マーケットである日本においても、その流通構造は複雑で実態を把握しにくいのが現状である。さらに、刺身向けとして販売されるマグロ類は外見上、種を区別することが難しいため、クロマグロ刺身製品と製品に貼られているラベル表示とが一致しているかを確認することは難しい。

そこで、WWFジャパン、WWF地中海プログラムオフィスは、末端流通

¹ 詳しくは、WWFジャパン記者発表資料「ICCAT、持続可能な資源管理に再度失敗」を参照されたい。

<http://www.wwf.or.jp/activity/lib/press/2007/p07020101.htm>

² 違法操業の実態については、WWFの委託により独立系コンサルタント会社ATRTが調査・作成した「2004年、2005年の地中海と東部大西洋におけるクロマグロの違法漁業」を参照されたい。

報告書（和訳）：<http://www.wwf.or.jp/activity/marine/lib/20061013.pdf>

³ IUUとは、Illegal, Unreported, Unregulatedの略で違法、無報告、無規制な漁業を表す。

における地中海クロマグロの販売実態の一端を明らかにする目的で、国内量販店で販売されている蓄養クロマグロ製品を対象とし、主に産地表示と種表示が実際のマグロの種類と一致するかどうかについて検証を行った。

2. 本研究の背景

本研究の背景である、地中海クロマグロ生産の概要と日本への輸入状況について、簡単にまとめたい。

2-1. 地中海におけるクロマグロ生産状況

表1は地中海域におけるクロマグロの生産量の推移を示したものである。表より1980年には、全体で3千トン程度であった地中海域の生産量が、80年代半ばから急激に増加していることがわかる。特に増加が顕著なのが巻き網漁業による生産量で、1980年には2千トン程度であった生産量が90年代以降2万トン前後で推移しており、約10倍の伸びをみせている。他方、漁獲可能量の引き下げや日本漁船の減船、乱獲による資源状況の悪化が原因となり、かつてクロマグロ生産の主力であった延縄漁業の生産量は、95年以降減少傾向にある。1995年に6千トンを超えていた延縄漁業による生産量は、近年2千トンから3千トン程度と95年に比べ50%以下に低迷している。また、その他の漁業による生産は2005年以降1千トンを切っており、地中海沿岸国で伝統的にクロマグロを漁獲してきた小規模漁業では、生産量の激減から経営の維持が困難となっている例もある。

こうした地中海のクロマグロをめぐる生産構造変化の背景には、80年代半ばより規模を拡大してきた地中海沿岸での蓄養業の影響が大きい。地中海域の蓄養業は元々、産卵後痩せて色の悪くなったクロマグロを生簀に入れ給餌することで付加価値化を図る方法であったが、トロ嗜好の強い日本人の需要が見込めることから1990年代以降、一大産業として発展してきた。天然では生産が不安定なクロマグロを、量、時期、価格の面から安定的に日本市場へ送り出す供給源となることから、日本企業が畜養施設に積極的に資本を

投下し、産業開発を行った⁴。これら蓄養業へ種苗を供給しているのが巻き網漁業であり、蓄養業の発展が過去 20 年の劇的な生産量増加を促したといえよう⁵。

しかし、蓄養業の発展とそれにとまなう生産量の増加がクロマグロ資源に与えた影響は大きい。種苗生産を行う巻き網漁業は、クロマグロが産卵のため地中海に集まる習性を利用し、回遊してきたクロマグロを文字通り「一網打尽」に漁獲している。さらに近年は旗国が異なる船数隻で船団を形成するなど、より生産体制が複雑化している⁶。WWFが行った分析では、地中海における巻き網の漁獲クロマグロ平均サイズは小型化しており、現状のままの操業体制が続けば、最悪の場合、2012 年には産卵可能な個体がいなくなると警告している⁷。

一方、2008 年現在、ICCATに登録されている蓄養場は 69 件で、その収容力は 6 万トンを超えている（表 2 参照）。6 万トンはあくまでも、収容力を示す数字であるが、SCRSが勧告する持続可能な年間漁獲量「1 万 5 千トン以下」に照らし合わせれば、地中海における蓄養場の施設規模は明らかに過剰である。このような状況にもかかわらず、蓄養業は地中海沿岸国の基幹産業の一つとして位置づけられており、その規模縮小は容易ではない。加えて、蓄養生簀への活け込みは複数の国、または複数の巻き網漁船から直接曳航生

⁴小野征一郎編著「養殖マグロビジネスの経済分析」（成山堂書店、2008 年）を参照。

⁵ 巻き網漁業による過剰漁獲能力の問題については、WWF の委託により独立系コンサルタント会社 ATRT が調査・作成したものであり、地中海クロマグロ巻き網船団の漁獲能力実態を、初めて本格的に試算した報告書が出されている。日本語要約：

http://www.wwf.or.jp/activity/marine/lib/0811med_tuna_overcapacity.htm

報告書（英文）：

http://www.wwf.or.jp/activity/marine/lib/0811med_tuna_overcapacity.pdf

⁶ これら地中海における実態については、WWF の委託により独立系コンサルタント会社 ATRT が調査のうえ作成した「地中海の 2008 年クロマグロ漁期におけるイタリア漁船および蓄養場の管理ルール遵守に関する評価」によって詳しく報告されている。

日本語要約：

http://www.wwf.or.jp/activity/marine/lib/0811bluefin_tuna_italy.htm

報告書（英文）：

http://www.wwf.or.jp/activity/marine/lib/0811bluefin_tuna_italy.pdf

⁷ 詳しくは WWF ジャパンホームページを参照されたい。

<http://www.wwf.or.jp/activity/marine/news/2009/20090414.htm>

簀に移され、分別管理されていないことから、正確にクロマグロの収容状況や行使規則の遵守状況を確認することは困難となっている⁸。つまりは、違法な漁獲が生産段階で明らかになっても、店頭から排除するトレーサビリティがない。2008年SCRSの推計によりICCATで合意された漁獲可能量の約2倍のクロマグロが違法に生産されていることが明らかとなったが、地中海クロマグロの国際的な流通構造は複雑であり、公表されている統計の分析のみから実態を明らかにすることは困難である。

2-2. 日本への輸入状況

大西洋のクロマグロ資源の危機的状況の要因となった地中海のクロマグロ蓄養業であるが、収穫の約80%を消費しているのが日本である⁹。地中海からの蓄養クロマグロ輸入量の推移を見ると（表3）、1998年から2007年の10年で約4倍に増加している。日本の輸入量はクロマグロ資源の危機が国際的な共通問題となった後も増加傾向あり、2006年には過去最高の2万2千トン記録している。日本の輸入状況に蓄養種苗向けとなる地中海の巻き網生産量が2万トン強で推移していること考えあわせると、日本市場のクロマグロ需要の高さが、地中海におけるクロマグロ資源状況悪化を招き、その回復を妨げていることは否めない。

また、過去10年間の輸出国データをみると、地中海沿岸における蓄養クロマグロ生産国が増加し、最大輸出国がスペインからクロアチアに移るなど変化が激しい。この要因としては、蓄養先進国で一定の成功を収めた企業の経営体が、他国に進出することで経営を拡大していることが一因としてあげられる。こうした企業の経営体の中には、地中海の蓄養業者と日本企業の合同出資によるものも少なくなく¹⁰、生産から消費に至るまで、日本が幅広く責任を世界に問われる背景となっている。

⁸ 水産庁プレスリリースによると、2009年3月にバルセロナで開催されたICCAT遵守委員会中間会合では、巻き網の漁獲能力管理、漁獲統計証明制度、異なる国籍の巻き網船団による共同操業といった遵守上の問題が指摘された。

⁹ WWFジャパンによる推計。

<http://www.wwf.or.jp/activity/marine/sus-use/tuna/consumption/index.htm>

¹⁰ 生産国の拡大と日本企業の取り組みについては、小野征一郎編著「養殖マグロビジネスの経済分析」（成山堂書店、2008年）を参照。

表1 地中海漁場におけるクロマグロ生産量の推移 単位:トン
Table 1 Catch of BFT in Mediterranean Sea Area Unit:Tonnes

	延縄 Long Line	巻網 Purse Seine	その他 Others	全体 Total
1980	253	2,421	1,093	3,767
1985	1,166	6,697	2,141	10,004
1990	947	8,599	3,551	13,097
1995	6,372	19,975	4,231	30,578
1996	6,071	18,961	3,106	28,138
1997	4,052	17,110	2,902	24,064
1998	2,749	21,291	4,302	28,342
1999	2,463	14,910	5,455	22,828
2000	3,317	16,195	3,726	23,238
2001	3,750	17,174	3,595	24,519
2002	2,614	17,656	3,154	23,424
2003	2,236	15,392	3,762	21,390
2004	2,431	17,157	2,231	21,819
2005	3,060	21,758	939	25,757
2006	2,202	20,020	932	23,154
2007	2,622	21,691	913	25,226

ICCATデータベースより作成

Source:<http://www.iccat.int/en/accesingdb.htm>

表2 国別 ICCAT登録畜養場の概要(2008年度)

Table 2 BFT Farming Facilities Recorded by ICCAT (2008)

国名 Country	登録畜養場 数 Number of Facility	蓄用場 収容可能量(トン) Capacity(Tonnes)
イタリア Italy	15	13,000
スペイン Spain	14	11,852
トルコ Turkey	13	9,460
クロアチア Croatia	8	7,630
マルタ Malta	8	12,300
チュニジア Tunisia	4	2,400
キプロス Cyprus	3	2,000
ギリシャ*1 Greece	2	2,100
リビア Libya	1	1,000
モロッコ*2 Morocco	1	1,000
合計 Total	69	62,742

*1 ギリシャのキャパシティは、収穫時の最大可能量

*2 モロッコのキャパシティは、このうち300トンがクロマグロと記載
ICCATデータベースより作成

Source: <http://www.iccat.int/en/ffb.asp>

表3 地中海からの畜養クロマグロ輸入量の推移

単位: 千トン

Table 3 Mediterranean Farmed Blue Fin Tuna Import Amount (Japan)

Unit: 1000t

Table 3 Mediterranean Farmed Blue Fin Tuna Import Amount (Japan)									Unit: 1000t		
海域 (Region)		1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
EU	スペイン Spain	3.2	5	4.4	4.8	4.7	4.3	4.3	4.4	3.7	3.3
	マルタ Malta	0.2	0	0.3	0.6	1.1	0.7	1.7	2.2	4.5	2.2
	キプロス Cyprus	—	0	0	0	0	0	0.3	0.7	1.1	0.8
	イタリア Italy	1.1	1.3	1.4	0.8	0.9	1.2	0.6	1.1	2.7	2.8
	ギリシャ Greece	0.3	0.2	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1	0.4	0.8	0.4
	EU計 EU Total	4.8	6.5	—	6.5	8.8	6.3	7	8.8	12.8	9.5
トルコ Turkey		—	—	6.4	—	0.3	1.6	2.8	2.8	3.2	3.4
クロアチア Croatia		0.2	0.3	0.7	1	2.2	2.7	3.6	2.5	4.7	4
チュニジア Tunisia		0.7	0.5	0.5	0.5	0.3	0.5	0.7	1.3	1.7	1.8
パナマ*1 Panama		—	—	0.9	1.6	2.4	3.3	4	1.1	0.2	—
地中海計 Med Total		5.7	7.3	8.5	9.6	12	14.4	18.1	16.5	22.6	18.7

*1 パナマ船籍船舶において船上加工されたもの。原料は地中海産の畜養クロマグロと推定

水産庁資料より作成

Source: Japan Fisheries Agency

3. 本研究の目的

本稿では、まず、ICCAT が設定した漁獲枠を大幅に超過して生産された、IUU 漁業を供給源とする地中海クロマグロが、近年生産量が増加傾向にある国産蓄養クロマグロと表示され、流通している可能性があるとの仮説を立て、検証を行った。検証では、地中海で蓄養されたクロマグロと国内で蓄養されたクロマグロでは、種が違うことから、国産蓄養クロマグロ製品のミトコンドリア DNA を分析し、種の識別を行った。

2 点目に、本研究によりミトコンドリア DNA (以下、mtDNA) 分析を用いた刺身向け生鮮まぐろの種識別方法の有効性についても検討した。

4. マグロ類の概要¹¹

¹¹ 以下、第 4 章、第 5 章、第 6 章の一部文章は、Vinas (2009) の報告書の翻訳を引用した。引用報告書は Appendix 2 として本レポートに附した。

サバ科に属するマグロ属(*Thunnus*)には、一般にマグロとして知られる 8 つの種が含まれる。これらのうち、大西洋クロマグロ(ABFT; *Thunnus thynnus*)、太平洋クロマグロ(PFBT、*Thunnus orientalis*)、ミナミマグロ(SBT、*Thunnus maccoyii*)、メバチマグロ(BET、*Thunnus obesus*)、キハダマグロ(YFT、*Thunnus albacares*)、ビンナガマグロ(ALB、*Thunnus alalunga*)を含む複数の種が、国際的に広く取り引きされている。同様に商品として取引される同じ科のその他の種には、特にカツオ(*Katsuwonus pelamis*)、大西洋ハガツオ(*Sarda sarda*)がある。これらの種は、通常市場用に処理するか、えらおよび内臓を取り除くか、背部あるいは腹部肉に加工するなど多様な体裁で取引され、形態には生/冷蔵あるいは冷凍がある。このうち、特に大西洋クロマグロと太平洋クロマグロは形態学的によく似ている。魚全体としては、メバチマグロ、キハダマグロ、ビンナガマグロおよびカツオは、外部の特徴(体形およびひれの特徴などその他の形態)に基づきクロマグロと容易に識別可能であるが、体裁(すなわち、処理あるいは冷凍)のタイプによっては、識別は必ずしも容易であるとは限らない。背部あるいは腹部肉に加工されると、2 種のクロマグロ種、ミナミマグロ、メバチおよびキハダの製品段階での識別は、不可能ではないにしても、一般的には極めて困難である。

5. 材料および方法

5-1. サンプルング方法

サンプルング収集は、トラフィックイーストアジアジャパンが担当した。調査対象として、生鮮食品「クロマグロ」のうち、食品表示の名称が「クロマグロ」、原産地名が都道府県名や日本国内の水揚げした漁港名などの「国産地名」、そして「蓄養」あるいは「養殖」の表示のものを収集した。調査期間は、2008 年 6 月 21 日から 8 月 3 日であった。

一部神奈川県を含む東京都内の大手量販店やデパート、スーパーマーケットを対象に、調査対象となるクロマグロが店頭に置かれているかを電話インタビューまたは直接赴いて確認した。調査をおこなった店舗のうち、対象となるク

ロマグロを扱っていた 59 店舗に調査員が訪問し、店頭から刺身用のさくを購入した。このとき、試料の劣化を防ぐため、保冷剤で商品を冷却した。この結果、合計 60 サンプルを収集した¹²。

表 4 は、サンプルに表示された原産地名を示している。収集したサンプルのうち、鹿児島県産表示が 51 サンプルと最も多く、沖縄県産表示が 5 サンプル、長崎県産表示が 2 サンプル、三重県表示と新潟県産表示が 1 サンプルずつ、また都道府県名はなく「国産」と表示されたものが 1 サンプルであった。

表4 サンプルに表示された原産地名
Origins of farmed BFT labeled in
samples products

		単位	サンプル
鹿児島県 Kagoshima	「鹿児島県」のみ		40
	Kagoshima		
	東シナ海		7
	East China Sea		
	奄美(大島)		3
	Amami		
	太平洋産		1
	Pacific		
	小計		51
沖縄県 Okinawa			4
長崎県 Nagasaki			2
三重県 Mie			1
新潟県 Nigata			1
国産 Japan			1
合計 Total			60

購入したクロマグロには試料番号をつけ、購入店や食品表示内容を一覧に記録し、試料番号とサンプル、食品表示の写真撮影をおこなった。購入したクロマグロをサンプルごとに未使用の濾紙の上におき、新しい剃刀を使用して他のものに接触していない内部から、約 5mm 立方、約 5mm×15mm の 2 つの試料に切り取った。そして、約 5mm 立方の試料を他のサンプルと接触しないよう

¹² 購入した 60 サンプルの詳細については、巻末 Appendix 1 を参照。

消毒したピンセットを使い、1.5ml の試験管に入れて無水エタノールに保存した。DNA 解析を委託するため WWF 地中海プログラムオフィスへ、二回に分けて郵送した。ただし、二回目には、税関での手続きを簡略するため、無水エタノールに保存した試料（サンプリングナンバー 31～60）から無水エタノールを抜いた試料を郵送した。また、約 5mm×15mm に切り取った試料は、確認用にトラフィック イーストアジア ジャパンが保管している。

これらサンプルの DNA 抽出、PCR 増幅および配列決定は、Viñas らが説明したプロトコール(2004 年)に従った。簡潔に説明すると、ゲノム DNA 全体を、各試料の組織の小片(約 100mg)から分離した。組織を、TEN 緩衝液(0.05M トリス塩酸 pH8; 0.1M EDTA; 5M NaCl および 5M SDS)600 μ L およびプロテイナーゼ K(10mg/mL)80 μ L を含む 1.5mL マイクロ遠心分離チューブに入れ、37℃で一晩温浸した。フェノールにより 2 回およびクロロホルム・イソamil(24:1)により 1 回洗浄し、次いでエタノール沈殿を行い、全 DNA を抽出した。最後に、DNA をイオン交換水 100 μ L により再懸濁した。

5-2. PCR 法および mtDNA 調節領域およびシトクロムオキシダーゼ 1(cox1)の塩基配列決定

サンプル毎の組織の種を評価するため、すべての個体の調節領域を採取した。不確実な場合は、cox1 の配列を採取した。ミトコンドリアの調節領域の第 1(左)領域の約 450 塩基対(bp)を、L15998(5'-TAC CCC AAA CTC CCA AAG CTA-3')と e H-ストランドプライマー CSBDH(5'-TgA ATT AGG AAC CAG ATG CCA G-3')のプライマーを併用して確保した。増幅は、テンプレートとして分離した DNA 約 50ng(0.5 μ L)を用いて、容量 25 μ L で行った。さらに、各 PCR 反応は、1X Taq DNA ポリメラーゼ緩衝液(各 Taq DNA ポリメラーゼメーカーより供給)、1.5～2mM の MgCl₂、200mM の各 dNTP、10pM の各プライマーおよび 0.5U の Taq DNA ポリメラーゼ(プラチナ Taq DNA ポリメラーゼ、インビトロジェン社)を含んだ。交差汚染の発生がなかったことを確認するため、すべての PCR 法の実施には陰性対照が含まれた。

熱サイクルには、94℃で 5 分の最初の変性ステップ、その後 94℃で 45 秒の変性、50℃で 45 秒のアニーリングおよび 72℃で 1 分延長の 35 サイクルが含まれた。メーカーの推奨に従って、二本鎖産物を、Qiaquick PCR 精製キット(キアゲン社)により精製し、続いて ABI PRISM BigDye3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ社)により配列決定を行った。最後に、ABI Prism ABI 3130 Genetic Analyzer(アプライドバイオシステムズ社)により、配列を読み取った。シトクロムオキシダーゼ 1 の配列は、上述と同じ PCR 法プロファイルおよび配列決定方法を用い、Ward らが説明した(2005 年)一般的なプライマーの FishF1-5'TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3'および FishR1-5'TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA.-3'を併用して得られた。

5-3. 配列分析

mtDNA 調節領域配列の 60 サンプルを、BIOEDIT バージョン 5.0.9(Hall、1999 年)における eye により最適化した。Alvarado Bremer らの研究(2005 年)からの各マグロ種のオーソログ配列も含まれた。このデータセットは、Viñas らの研究(2004 年)からの 4 尾のビンナガマグロ、太平洋クロマグロに類似した遺伝子移入が起きた大西洋クロマグロ、大西洋クロマグロに類似した遺伝子移入が起きた太平洋クロマグロ、およびビンナガマグロと同一の配列を有する遺伝子移入された 8 尾の大西洋クロマグロ個体を含む各マグロ種の 3~8 配列から構成された。シトクロムオキシダーゼ 1 の配列は、Ward らの研究(2005 年)で得られた配列と比較した。我々の知る限り、この最後のデータセットは、遺伝子移入された mtDNA 配列を全く含んでおらず、ミトコンドリア調節領域の分析により、市場からの情報との不一致が示唆された場合に、種の帰属の検証のみに用いられた。

いずれの遺伝子マーカーについても、配列間の系統発生的関係を、Kimura 2-p distance(Kimura、1980 年)を用いた近隣結合法(NJ)(Saitou および Nei、1987 年)により、MEGA バージョン 4(Kumar ら、2001 年)で復元した。分岐点における統計的信頼度の判定は、1,000 回のノンパラメトリックブート

ストラップ反復(Felsenstein、1985 年)に基づいた。

6. 検証の結果と考察

mtDNA調節領域塩基配列データを用いて、48 のサンプルの加工した組織(分析個体の約 80%)が識別された¹³。さらに、Alvaradoらの研究(1997 年)からの太平洋クロマグロを用いて、不一致の結果が得られたため、5 尾の新しい太平洋クロマグロも分析に含めた。最終的なデータセットには、382bp 長の 123mtDNA調節領域の配列が含まれた。

この結果から、サンプル 39 番は、mtDNA の調整領域の解析により大西洋クロマグロと識別された。さらに mtDNA のシトクロムオキシターゼ 1 による再解析を行ったところ、分類上大西洋クロマグロであることが再度確認された。この製品は、小売での原産地表示が「三重県産 クロマグロ(養殖)」(サンプル 39 番)と記載されていた。

また本研究の結果、刺身向け生鮮マグロ類の種判別において、mtDNA 調節領域に基づく検証とシトクロムオキシターゼ 1 による再検証が有効な手法であることが明らかとなった。

今回行った DNA 分析の結果、誤表示の割合は約 2% 低かった。このことから、日本で販売されている国産クロマグロに地中海産クロマグロが大量に混入し、原産地表示が偽装され流通している可能性は低いと考えられる。

しかし、国産と表示されているクロマグロ商品の中に大西洋産クロマグロが混入している実態が確認されたことから、流通段階における透明性が不十分であることが指摘できる。また、JAS 法では、一般消費者に販売される輸入生鮮食品について、原産国名が義務表示すべき項目としてあげられていることから、国内法上違法である点も強調したい¹⁴。

さらに、本検証によって、刺身向け生マグロの大西洋クロマグロと太平洋

¹³ 詳細は、本稿巻末 Appendix 2 「Genetic Identification of Bluefin tuna Species of Processed Samples from the Japanese Market」 Vinas (2009)の分析結果におけるサンプル JPN01 から JPN60 を確認されたい。

¹⁴ 農林水産省は、2005 年に「マグロ」の表示に関する特別調査を行った結果、2.7%の商品について原産地の不適正表示が明らかとなった発表し、不適正表示を確認した事業者に対して、文書指導を行ったとしている。

クロマグロの識別に成功したことから、日本市場で I U U 漁業由来の可能性がある大西洋クロマグロを特定するうえで、mtDNA 分析が有効手法であることが示唆できる。

今回の検証に使用したサンプルは、夏の短期間に収集されたものであることから、同様の検証をマグロ消費の最盛期である年末、年始に行うこと、またより頻繁に今回採用した手法による検証を行うことが今後の検討課題としてあげられる。

7. 提言－透明性のあるトレーサビリティの確立－

I C C A T の管理体制のもと、漁獲統計証明制度によって生産から輸入まで記録、確認が義務づけられているにもかかわらず、大西洋クロマグロの I U U 漁業は根絶に至っていない。さらに、今回の検証によって、「国内産蓄養クロマグロ」と表示されている製品に大西洋クロマグロが混入していることが明らかとなったことから、国内における流通段階においても、大西洋クロマグロのより厳格な取扱いが必要であることが明らかとなった。

そこで、WWF ジャパン、WWF 地中海プログラムオフィスは、世界有数のクロマグロ消費国である日本が率先して、I U U 地中海クロマグロを速やかに国内市場から排除できるよう、市場に流通している大西洋産、特に地中海産クロマグロ全てを対象に、生産から消費まで一貫した、検証可能なトレーサビリティ制度を確立することを国内関係者に求める。

クロマグロトレーサビリティでは、漁獲物、蓄養種苗全てにおいて個体レベルで識別・管理がなされない限り、違法性のあるクロマグロが日本市場に流入するリスクを最小限に抑えることは難しい。そのためには、消費国側の要望として、生産国および生産業者に厳しく管理の徹底を訴えるべきである。同時に、消費国から責任ある調達方針を策定し、透明性の高いトレーサビリティを確立することで、I U U 由来のクロマグロが発見された際に、速やかに店頭から脱法的なクロマグロ製品を撤去し、断固たる態度を示すことが、水産物消費大国である日本の行政、流通業者、小売店、消費者に求められている。WWF ジャパン、WWF 地中海プログラムオフィス、は本研究の結果

をふまえ、具体的に以下のことを各関係者に求める。

- 1 行政機関には、I U U由来の大西洋クロマグロを日本に輸入させないという強固な姿勢を生産国側に示すことを求める。さらに日本市場において、本検証で使った手法による、定期的な製品表示検証を行うことを求める。また、誤表示が明らかになった場合には、消費者に広く、速やかに情報を公開することを求める。
- 2 大西洋クロマグロ輸入及び加工に携わる日本企業には、管理状況や遵守状況が曖昧なクロマグロについては、日本国内に流通させない、国内で取扱いを行わないという、企業としての社会的責任を果たす公式の方針を明確に打ち出すことを求める。さらに、I U U由来のクロマグロを市場から排除するため、漁船から小売まで途切れることのない、かつ透明性のあるトレーサビリティを各企業の責任として確立することを求める。
- 3 大西洋クロマグロを取り扱う小売企業には、透明性があり、かつ生産国と生産者への遡及性が確保されている、トレーサビリティを有するクロマグロのみを取り扱うことを求める。また、大西洋クロマグロ製品については、J A S法に基づいて、ミ斯拉ベルのない適切なラベリングを行い、正しい情報を消費者に提供するように求める。
- 4 大西洋クロマグロを購入する消費者に、I U U由来の可能性がある製品の購入を避け、生産国と生産者が明らかな製品のみを購入することを推奨する。そのために、個々の消費者から資源状況や環境に配慮したクロマグロ製品のニーズを流通関係者に伝え、透明性のあるトレーサビリティの確立と違法性のないクロマグロの取扱いを小売企業及び外食企業に要求することを推奨する。

DNA 分析協力：Dr Jordi Vinas de Puig (Universitat de Girona)

(ジョルディ・ヴィナス博士、ヒロナ大学)

調査協力：トラフィック イーストアジア ジャパン

謝辞

クロマグロ製品の店頭サンプル収集にあたり、ボランティアの方々のご協力を得ました。ここに感謝申し上げます。

Appendix1 蓄養クロマグロのサンプル一覧

Table Farmed Bluefin Tuna Sampled Bought

Appendix サンプル一覧

Samples list

サンプル番号 No.	原産地名 Origin	価格／100g JPY/100g	購入日 Survey Date
01	長崎県産 Nagasaki	1680	6月22日
02	鹿児島県産 Kagoshima	1780	6月24日
03	鹿児島県産 Kagoshima	1180	6月23日
04	奄美（鹿児島） Amami	942	6月24日
05	鹿児島県産 Kagoshima	1390	6月24日
06	鹿児島県産 Kagoshima	1680	7月2日
07	鹿児島県産 Kagoshima	2000	6月24日
08	鹿児島 国産 Kagoshima Japan	980	6月29日
09	国産 Japan	1380	6月29日
10	鹿児島県産 Kagoshima	880	7月6日
11	沖縄 国産 Okinawa Japan	1380	7月6日
12	鹿児島県産 Kagoshima	798	7月6日
13	鹿児島県産 Kagoshima	980	7月6日
14	鹿児島県産 Kagoshima	1280	7月6日
15	鹿児島県産	1190	7月6日

	Kagoshima		
16	鹿児島県産 Kagoshima	880	7月6日
17	鹿児島県産 Kagoshima	798	7月6日
18	鹿児島県産 Kagoshima	1380	7月6日
19	沖縄県 Okinawa	1480	7月6日
20	鹿児島県産 Kagoshima	1680	7月5日
21	太平洋産 鹿児島 Pacific Kagoshima	1480	7月5日
22	新潟 日本海 Nigata Japan Sea	399	7月5日
23	鹿児島県産 Kagoshima	980	7月6日
24	鹿児島 東シナ海 Kagoshima East China Sea	980	7月13日
25	鹿児島 東シナ海 Kagoshima East China Sea	980	7月13日
26	鹿児島県産 Kagoshima	1600	7月13日
27	鹿児島 東シナ海 Kagoshima East China Sea	1080	7月13日
28	鹿児島県産 Kagoshima	1080	7月13日
29	鹿児島県産 Kagoshima	1200	7月5日
30	鹿児島県産 Kagoshima	1780	7月5日
31	長崎県産	660	7月5日

	Nagasaki		
32	沖縄県 Okinawa	1180	7月5日
33	鹿児島県産 Kagoshima	1380	7月6日
34	鹿児島県産 Kagoshima	1280	7月6日
35	鹿児島県産 Kagoshima	980	7月5日
36	鹿児島 国産 Kagoshima Japan	1380	7月5日
37	鹿児島県産 Kagoshima	798	7月5日
38	鹿児島県産 Kagoshima	1390	7月5日
39	三重県産 Mie	1280	7月13日
40	鹿児島県産 Kagoshima	1580	7月30日
41	鹿児島 国産 Kagoshima Japan	1380	7月13日
42	鹿児島県産 Kagoshima	1780	6月21日
43	東シナ海・鹿児島 East China Sea Kagoshima	1380	7月19日
44	鹿児島県産 Kagoshima	1280	7月19日
45	鹿児島 奄美 Kagoshima Amami	1580	7月19日
46	鹿児島 東シナ海 Kagoshima East China Sea	980	7月19日
47	鹿児島県産 Kagoshima	1380	7月20日

48	鹿児島県産 Kagoshima	1400	7月20日
49	沖縄県 Okinawa	1380	7月20日
50	鹿児島県産 Kagoshima	798	7月20日
51	鹿児島県産 Kagoshima	1580	7月20日
52	鹿児島県産 Kagoshima	1480	7月20日
53	鹿児島 国産 Kagoshima Japan	980	7月20日
54	鹿児島県産 Kagoshima	1380	7月26日
55	鹿児島県産 Kagoshima	980	7月27日
56	東シナ海・鹿児島 East China Sea Kagoshima	1280	7月26日
57	奄美大島 Amami Oshima	1280	7月26日
58	鹿児島県産 Kagoshima	1390	7月26日
59	東シナ海・鹿児島 East China Sea Kagoshima	1280	7月26日
60	鹿児島県産 Kagoshima	1580	8月3日

Appendix2

GENETIC IDENTIFICATION OF BLUEFIN TUNA SPECIES OF PROCESSED SAMPLES FROM THE JAPANESE MARKET

Jordi Viñas de Puig

Email: jordi.vinas@udg.edu

Telf. +34 972418168

Departament de Biologia

Universitat de Girona

17071, Girona

Objective of the study

The main objective of this study is the species identification by means of genetic techniques of samples of sashimi-grade bluefin tuna from the Japanese market labeled as Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, to assess the potential mislabeling of samples as Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. A second objective is to develop a suitable standard genetic procedure to characterize at the species level any sample of raw tissue from the sashimi market belonging to genus *Thunnus*.

Introduction

The genus *Thunnus*, which belongs to the family scombridae, comprises the eight species of the commonly known as tunas. Of these, several species are widely traded at the international level, including Atlantic bluefin tuna (ABFT; *Thunnus thynnus*), Pacific bluefin tuna (PFBT, *Thunnus orientalis*), Southern bluefin tuna (SBT, *Thunnus maccoyii*) bigeye tuna, (BET, *Thunnus obesus*), yellowfin tuna (YFT, *Thunnus albacares*), albacore (ALB, *Thunnus alalunga*). Other species of the same family that are also trade as a commercial commodity are the skipjack (*Katsuwonus pelamis*), the Atlantic bonito, (*Sarda sarda*) among others. Trade on these species involve different kinds of presentations, typically dressed, gilled and gutted or transformed into loins or belly meat, and form might be fresh/chilled or frozen. Morphologically, all 3 bluefin tuna species look very similar, particularly Atlantic and Pacific bluefin tuna. As whole fish, bigeye, yellowfin, albacore and skipjack are easily identifiable from bluefins based on external attributes (body shape and other morphometrics, characteristics of the fins, etc.), but

depending on the type of presentation (i.e. dressed, or deep frozen) this might not always be easy. As transformed into loins or belly meat, the 3 bluefin species, bigeye and yellowfin are very difficult, if not impossible, to distinguish from each other.

Over the recent years several protocols for fish species identification of marine products have been described based on different technologies such as isoelectric focusing, high performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis, enzymelinked immunosorbent assay, starch gel electrophoresis (reviewed in Rasmussen and Morrissey, 2008). Among them, DNA-based methodologies are one the most promising approaches since they provide very precise tools because its robustness, it can be applicable throughout all life stages of the individual, and, in addition, it can be used over almost any kind of samples including whole individuals, fin clips, canned and dried tissue (Rasmussen and Morrissey, 2008, Lenstra, 2003). In most of the cases, the methodology was based on the Polymerase Chain Reaction, which targets a specific genetic marker susceptible to discriminate species. Some of the methodologies described up to date are focused in the reduction of the protocol steps and avoiding DNA sequencing. Several examples are multiplex PCR (Bottero *et al.*, 2007, Infante *et al.*, 2006) or PCR-RFLP (Lin and Hwang, 2007, Lin *et al.*, 2005, McDowell and Graves, 2002, Smith *et al.*, 2001) that allows to differentiation several types of species in a single reaction. Other approaches have been based on magnetids beads that in some conditions can be performed at the sampling place (Takeyama *et al.*, 2000). However, in insecure cases the final assignation should be always validated afterwards by DNA sequencing.

Genetic identification of tuna species can be realized using several genetic markers that have been used in species relationships studies (Alvarado Bremer *et al.*, 1997, Chow and Kishino, 1995, Chow *et al.*, 2006, Ward *et al.*, 2005, Block *et al.*, 1993, Terol *et al.*, 2002). However, species misidentification can be obtained if the genetic marker is not appropriate. For instance, species identification based on nuclear genes marker cannot distinguish between Atlantic and Pacific bluefin tuna (Chow *et al.*, 2006). Another problem associated with nuclear markers is the low genetic distance among the species belonging to the Neothunnus tribe (*T. albacares*, *T. atlanticus*, *T. tonggol*) and, in consequence, these markers provide very low resolution to distinguish any of these species. Therefore, tuna species identification based on nuclear marker should be discarded. On the other hand, mitochondrial DNA (mtDNA) based methodology results in a better specificity and resolution since this kind of markers can fully distinguish any species of the eight species of the genus *Thunnus* (Alvarado Bremer *et al.*, 1997, Ward *et al.*,

2005). Although recently have been published several procedures to identify tuna species using mitochondrial genes and without sequencing the gene marker (Bottero *et al.*, 2007, Altringham and Block, 1997, Lin and Hwang, 2007, Lin *et al.*, 2005, Lockley and Bardsley, 2000, Michelini *et al.*, 2007, Paine *et al.*, 2007, Paine *et al.*, 2008, Smith *et al.*, 2001, Takeyama *et al.*, 2001, Takeyama *et al.*, 2000) several premises should be considered before to attempt the identification of tuna species using mitochondrial genetic markers. The neothunnus tribe has very low genetic distance among species. Another consideration is that some of the albacore and Pacific bluefin tuna are so close phylogenetically (Alvarado Bremer *et al.*, 1997, Chow and Kishino, 1995) that depending of the methodology used (i.e., RFLP-PCR of the Cyt b, Chow Chow and Kishino, 1995) cannot distinguish these two species. Furthermore, using a highly polymorphic maker such as the mtDNA control region it has been described introgression between several tuna species. For instance, about 2-3% of Atlantic bluefin tuna individuals are extremely similar (less 5% divergent) to Pacific bluefin tuna (though in this case the resultant lineages can be separated from those of proper *T. thynnus* specimens). The same situation occurs in vice versa, with about 2-3% of the Pacific bluefin tuna individuals have mtDNA extremely similar to the Atlantic bluefin tuna (about 4.5% using mtDNA control region sequencing data) (Alvarado Bremer *et al.*, 2005). In the same study, it has also been described introgression between Albacore and Atlantic bluefin tuna, with about 2-3% of the Atlantic bluefin tuna individuals with an identical sequence of some Albacore. Although several one-step protocols based on mitochondrial DNA have been validated for tuna species identification, to our knowledge any of the protocols can distinguish all the tuna species in a single reaction, and none of them takes in account the possibility of having mtDNA introgression in some of the individuals analyzed. Therefore, the best methodology available to indentify tuna species from processed tissue should be based on sequencing a highly polymorphic mtDNA fragment such as the control region. This is the unique genetic marker available to discriminate among all the cases described above. This procedure will allow discriminating at about 97% of reliability all eight *Thunnus* species and, potentially, any specimen belonging to the scombridae family. The use of this methodology will also identify the individuals with mtDNA introgression between Atlantic bluefin tuna and Pacific bluefin tuna. The 3% remaining individuals would correspond the Atlantic bluefin tuna individuals with introgressed albacore mtDNA. These individuals can be identified by an alternative mitochondrial marker such as *cox1* (Ward *et al.*, 2005) although this identification should be validated by a nuclear marker.

Materials and Methods

Eight-seven samples of processed tissue of tuna labeled as Pacific bluefin tuna (both wild-caught and from capture-based farming) and one control sample of tuna labeled as Atlantic bluefin tuna caught in the Atlantic by a Japanese vessel were recollected during the June 22 and July 20 of 2008 from several marketing places in Japan, and preserved in 96% of alcohol until analyzed at the laboratory. Furthermore, five Pacific bluefin tuna captured august 2008 at California (31°46'N, 116°52'W) were also included in the study to validate the methodology.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing followed the protocol described in Viñas *et al.*, (2004). Briefly, total genomic DNA was isolated from each specimen from a small piece of tissue (approximately 100 mg). Tissue was digested overnight at 37 °C in a 1.5 ml micro centrifuge tube containing 600 µl of TENS buffer (0.05 M Tris-HCl pH 8; 0.1 M EDTA; 5 M NaCl and 5 M SDS) and 80 µl of Proteinase K (10 mg/ml). Total DNA was extracted with two washes of phenol and one of chloroform isoamyl (24:1) followed by ethanol precipitation. Finally, the DNA was resuspended with 100 µl of deionized water.

PCR and sequencing of mtDNA control region and cytochrome oxidase 1 (cox1).

To assess the species of each tissue the control region of all individuals was obtained. In unsecure cases the sequence of *cox1* was also obtained. Approximately, 450 base pairs (bp) of the first (left) domain of the mitochondrial control region was obtained using the primer combination of L15998 (5'-TAC CCC AAA CTC CCA AAG CTA-3'), with e H-strand primer CSBDH (5'-TgA ATT AGG AAC CAG ATG CCA G-3'). The amplification was carried out in 25 µl volumes using approximately 50 ng (0.5 µl) of the isolated DNA as a template. In addition, each PCR reaction contained 1X Taq DNA polymerase buffer (supplied by the respective Taq DNA polymerase manufacturer), 1.5–2 mM of MgCl₂, 200 mM of each dNTP, 10 pMols of each primer and 0.5 U of Taq DNA polymerase (Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen). Negative controls were included in all PCR runs to ascertain that no cross-contamination took place. Thermal cycles involved an initial denaturing step of 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of denaturing at 94°C for 45 s, annealing at 50°C for 45 s and extension at 72°C for 1 min. Double-stranded products were purified with the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) and subsequently sequenced with the ABI PRISM BigDye3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's recommendations. Finally, sequences were read by an ABI Prism ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Cytochrome oxidase 1 sequences were obtained using the primer combination of universal primers FishF1-5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3' and FishR1-5' TAG ACT

TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA.-3' described in Ward *et al.*, (2005) with the same PCR profiles and sequencing procedure that the ones described above.

Sequence analysis

mtDNA control region sequences 88 samples were optimized by eye in BIOEDIT, version 5.0.9 (Hall, 1999). An orthologous sequence of each tuna species from the studies of Alvarado Bremer *et al.* (2005) were also included. This data set was comprised between 3-8 sequences of each tuna species, including four albacore from the study of Viñas *et al.* (2004), introgressed Atlantic bluefin tuna similar to Pacific bluefin tuna, introgressed Pacific bluefin tuna similar to Atlantic bluefin tuna and eight individuals of introgressed Atlantic bluefin tuna with a sequence identical to albacore. Cytochrome oxidase I sequences were compared to the sequences drawn for the study of Ward *et al.* (2005). To our knowledge this last data set didn't include any of the introgressed mtDNA sequences and was only used for validating species attribution when the analysis of the mitochondrial control region suggested discrepancies with information from the market.

For both genetic markers, the phylogenetic relatedness among sequences was reconstructed in MEGA, version 4 (Kumar *et al.* 2001), with neighbor-joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987) using Kimura 2-p distance (Kimura, 1980). Evaluation of statistical confidence in nodes was based on 1,000 non-parametric bootstrap replicates (Felsenstein, 1985).

Results and Discussion

Using mtDNA control region sequencing data we have obtained the identification of 78 processed tissues (approximately 90% of the individuals analyzed) (Figure 1; Table 1). Additionally, five new Pacific bluefin tuna were also included in the analysis since incongruent results were obtained using the Pacific bluefin tuna from the study of Alvarado *et al.*, (1997). The final data set comprised 123 mtDNA control region sequences of 382 bp long.

Species assignation of all 78 individuals was unambiguously achieved. Of these only 2 individuals were classified as Atlantic bluefin tuna (individuals 39 and 221) whereas the 76 remaining individuals were classified as Pacific bluefin tuna (Figure 1; Table 1). The two Atlantic bluefin tuna individuals were re-sequenced using the mtDNA *Cox1*, and their phylogenetic position as Atlantic bluefin tuna was confirmed. Only individual 39 can be considered mislabeled, since market information for individual 221 (control sample) clearly specified it was caught in the Atlantic Ocean by a Japanese vessel. It should be noted that all samples were obtained in a

short period of time, from the end of June to begging of August, long after the peak period when the bulk of Atlantic bluefin tuna production reaches the Japanese market (from November to February).

This study also demonstrates that use of phylogenetic trees based on mtDNA control region sequences, validated when appropriate through Cytochrome oxidase I sequencing, constitutes a powerful methodology to identify any species of the genus *Thunnus* from processed raw samples from the sashimi market .

References

- ALTRINGHAM, J. D. and BLOCK, B. A. 1997. Why do tuna maintain elevated slow muscle temperatures? Power output of muscle isolated from endothermic and ectothermic fish. *Journal of Experimental Biology*, 200: 2617-2627.
- ALVARADO BREMER, J. R., NASERI, I. and ELY, B. 1997. Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial control region. *Journal of Fish Biology*, 50: 540-554.
- ALVARADO BREMER, J. R., VINAS, J., MEJUTO, J., ELY, B. and PLA, C. 2005. Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36: 169-187.
- BLOCK, B. A., FINNERTY, J. R., STEWART, A. F. and KIDD, J. 1993. Evolution of endothermy in fish: mapping physiological traits on a molecular phylogeny. *Science*, 260: 210-214.
- BOTTERO, M. T., DALMASSO, A., CAPPELLETTI, M., SECCHI, C. and CIVERA, T. 2007. Differentiation of five tuna species by a multiplex primer-extension assay. *Journal of Biotechnology*, 129: 575-580.
- CHOW, S. and KISHINO, H. 1995. Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 741-748.
- CHOW, S., NAKAGAWA, T., SUZUKI, N., TAKEYAMA, H. and MATSUNAGA, T. 2006. Phylogenetic relationships among *Thunnus* species inferred from rDNA ITS1 sequence. *Journal of Fish Biology*, 68: 24-35.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.

- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser., 41: 95-98.
- INFANTE, C., CRESPO, A., ZUASTI, E., PONCE, M., PEREZ, L., FUNES, V., CATANESE, G., et al. 2006. PCR-based methodology for the authentication of the Atlantic mackerel *Scomber scombrus* in commercial canned products. Food Research International, 39: 1023-1028.
- KIMURA, M. 1980 A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16: 111-120.
- LENSTRA, J. A. 2003. DNA methods for identifying plant and animal species in food. *In* Food authenticity and traceability, pp. 34–53. Ed. by L. M. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, U.K. .
- LIN, W. F. and HWANG, D. F. 2007. Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. Food Control, 18: 1050-1057.
- LIN, W. F., SHIAU, C. Y. and HWANG, D. F. 2005. Identification of four *Thunnus* tuna species using mitochondrial cytochrome b gene sequence and PCR-RFLP analysis. Journal of Food and Drug Analysis, 13: 382-387.
- LOCKLEY, A. K. and BARDSLEY, R. G. 2000. Novel method for the discrimination of tuna (*Thunnus thynnus*) and bonito (*Sarda sarda*) DNA. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 4463-4468.
- MCDOWELL, J. R. and GRAVES, J. E. 2002. Nuclear and mitochondrial DNA markers for specific identification of istiophorid and xiphiid billfishes. Fishery Bulletin, 100: 537-544.
- MICHELINI, E., CEVENINI, L., MEZZANOTTE, L., SIMONI, P., BARALDINI, M., DE LAUDE, L. and RODA, A. 2007. One-step triplex-polymerase chain reaction assay for the authentication of YeHowfin (*Thunnus albacares*), bigeye (*Thunnus obesus*), and skipjack (*Katsulwonus pelamis*) tuna DNA from fresh, frozen, and canned tuna samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 7638-7647.
- PAINE, M. A., MCDOWELL, J. R. and GRAVES, J. E. 2007. Specific identification of western Atlantic Ocean scombrids using mitochondrial DNA cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene region sequences. Bulletin of Marine Science, 80: 353-367.
- PAINE, M. A., MCDOWELL, J. R. and GRAVES, J. E. 2008. Specific identification using COI sequence analysis of scombrid larvae collected off the Kona coast of Hawaii Island. Ichthyological Research, 55: 7-16.

- RASMUSSEN, R. S. and MORRISSEY, M. T. 2008. DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7: 280-295.
- SAITOU, N. and NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- SMITH, P. J., GRIGGS, L. and CHOW, S. 2001. DNA identification of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) in the New Zealand fishery. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 35: 843-850.
- TAKEYAMA, H., CHOW, S., TSUZUKI, H. and MATSUNAGA, T. 2001. Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its application to species identification. *Journal of Fish Biology*, 58: 1646-1657.
- TAKEYAMA, H., TSUZUKI, H., CHOW, S., NAKAYAMA, H. and MATSUNAGA, T. 2000. Discrimination between Atlantic and Pacific Subspecies of Northern Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*) by Magnetic-Capture Hybridization Using Bacterial Magnetic Particles. *Marine Biotechnology*, 2: 309-313.
- TEROL, J., MASCARELL, R., FERNANDEZ-PEDROSA, V. and PEREZ-ALONSO, M. 2002. Statistical validation of the identification of tuna species: bootstrap analysis of mitochondrial DNA sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 963-969.
- VIÑAS, J., ALVARADO BREMER, J. R. and PLA, C. 2004. Inter-oceanic genetic differentiation among albacore (*Thunnus alalunga*) populations. *Marine Biology*, 145: 225-232.
- WARD, R. D., ZEMLAK, T. S., INNES, B. H., LAST, P. R. and HEBERT, P. D. N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360: 1847-1857.

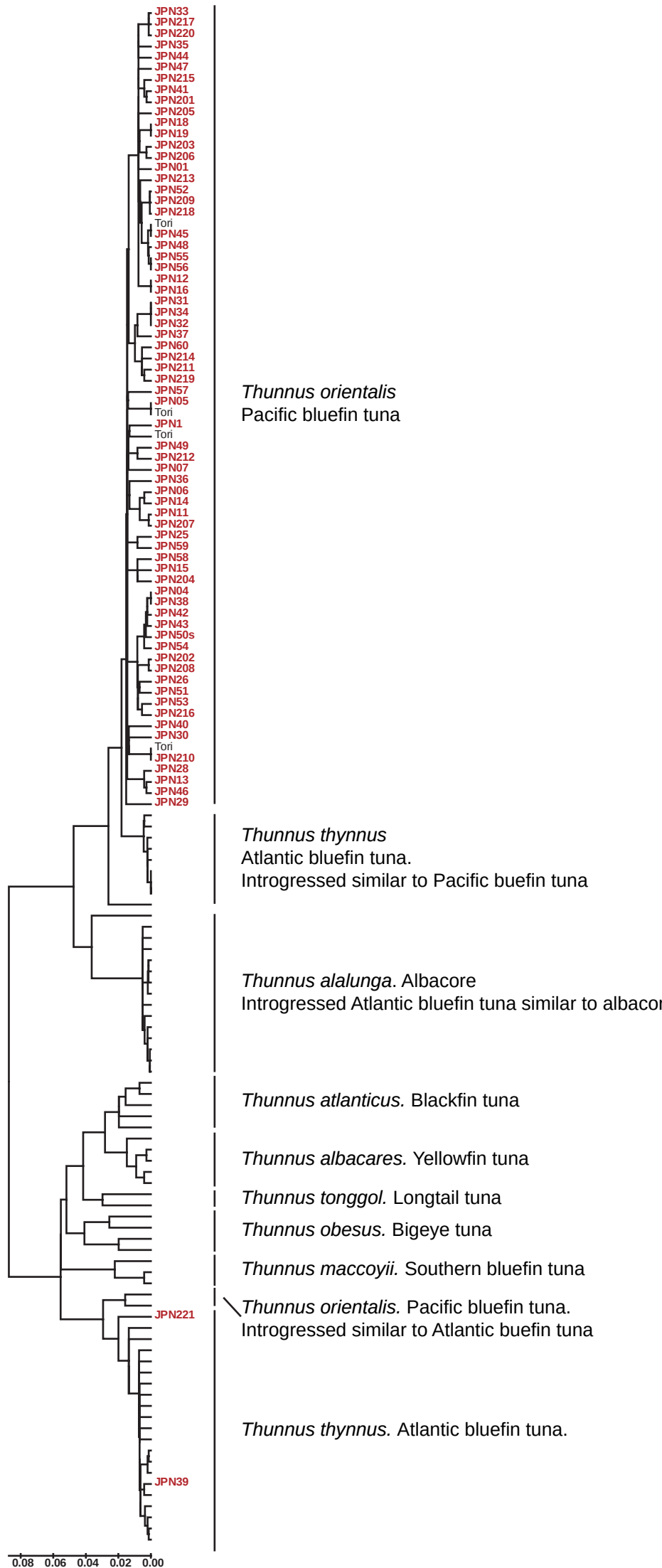
Table 1. Description of samples analyzed and species assignation using the mtDNA control region genetic marker. The samples without species assignation failed during the protocol.

	<i>Species in label</i>	<i>Source in label</i>	<i>date of purchase (2008)</i>	<i>Control Region</i>
01	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	June 22	<i>Thunnus orientalis</i>
02	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	June 24	
03	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	June 23	
04	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	June 24	<i>Thunnus orientalis</i>
05	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	June 24	<i>Thunnus orientalis</i>
06	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 2	<i>Thunnus orientalis</i>
07	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	June 24	<i>Thunnus orientalis</i>
08	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	June 29	
09	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	June 29	
10	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 6	
11	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 6	<i>Thunnus orientalis</i>
12	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 6	<i>Thunnus orientalis</i>
13	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 6	<i>Thunnus orientalis</i>
14	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 6	<i>Thunnus orientalis</i>
15	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 6	<i>Thunnus orientalis</i>
16	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 6	<i>Thunnus orientalis</i>
17	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 6	
18	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 6	<i>Thunnus orientalis</i>
19	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 6	<i>Thunnus orientalis</i>
20	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 5	
21	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 5	
22	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 5	
23	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 6	
24	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 13	
25	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 13	<i>Thunnus orientalis</i>
26	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 13	<i>Thunnus orientalis</i>
27	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 13	
28	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 13	<i>Thunnus orientalis</i>
29	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 5	<i>Thunnus orientalis</i>
30	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 5	<i>Thunnus orientalis</i>
31	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 5	<i>Thunnus orientalis</i>
32	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 5	<i>Thunnus orientalis</i>
33	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 6	<i>Thunnus orientalis</i>

34	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 6	<i>Thunnus orientalis</i>
35	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 5	<i>Thunnus orientalis</i>
36	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 5	<i>Thunnus orientalis</i>
37	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 5	<i>Thunnus orientalis</i>
38	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 5	<i>Thunnus orientalis</i>
39	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 13	<i>Thunnus thynnus</i>
40	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	June 30	<i>Thunnus orientalis</i>
41	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 13	<i>Thunnus orientalis</i>
42	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	June 21	<i>Thunnus orientalis</i>
43	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 19	<i>Thunnus orientalis</i>
44	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 19	<i>Thunnus orientalis</i>
45	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 19	<i>Thunnus orientalis</i>
46	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 19	<i>Thunnus orientalis</i>
47	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 20	<i>Thunnus orientalis</i>
48	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 20	<i>Thunnus orientalis</i>
49	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 20	<i>Thunnus orientalis</i>
50	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 20	<i>Thunnus orientalis</i>
51	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 20	<i>Thunnus orientalis</i>
52	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 20	<i>Thunnus orientalis</i>
53	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 20	<i>Thunnus orientalis</i>
54	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 26	<i>Thunnus orientalis</i>
55	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 27	<i>Thunnus orientalis</i>
56	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 26	<i>Thunnus orientalis</i>
57	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 26	<i>Thunnus orientalis</i>
58	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 26	<i>Thunnus orientalis</i>
59	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	July 26	<i>Thunnus orientalis</i>
60	Bluefin Tuna/Pacific	farmed	August 3	<i>Thunnus orientalis</i>
201	Bluefin Tuna/Pacific	wild	June 24	<i>Thunnus orientalis</i>
202	Bluefin Tuna/Pacific	wild	June 24	<i>Thunnus orientalis</i>
203	Bluefin Tuna/Pacific	wild	June 24	<i>Thunnus orientalis</i>
204	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 13	<i>Thunnus orientalis</i>
205	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 19	<i>Thunnus orientalis</i>
206	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 19	<i>Thunnus orientalis</i>
207	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 19	<i>Thunnus orientalis</i>
208	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 19	<i>Thunnus orientalis</i>
209	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 19	<i>Thunnus orientalis</i>
210	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 20	<i>Thunnus orientalis</i>

211	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 20	<i>Thunnus orientalis</i>
212	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 20	<i>Thunnus orientalis</i>
213	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 20	<i>Thunnus orientalis</i>
214	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 20	<i>Thunnus orientalis</i>
215	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 26	<i>Thunnus orientalis</i>
216	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 21	<i>Thunnus orientalis</i>
218	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 21	<i>Thunnus orientalis</i>
219	Bluefin Tuna/Pacific	wild	June 30	<i>Thunnus orientalis</i>
220	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 13	<i>Thunnus orientalis</i>
221	Bluefin Tuna/Atlantic	wild	July 19	<i>Thunnus thynnus</i>
222	Bluefin Tuna/Pacific	wild	July 19	<i>Thunnus orientalis</i>

Figure 1. Evolutionary relationships of 123 mtDNA control region sequences corresponding to the eight species and the samples analyzed (in bold). The tree is linearized assuming equal evolutionary rates in all lineages.. The two arrows points the individuals identified as Atlantic bluefin tuna. PBFT, Pacific bluefin tuna; ABFT, Atlantic bluefin tuna; ALB, albacore; SBT, southern bluefin tuna; BET, bigeye tuna; LOT, Longtail tuna; BLF, blackfin tuna; YFT, yellowfin tuna.



WWFは、約 100 カ国で活動している環境保全団体です。地球上の生物多様性を
守り、人の暮らしが自然環境や野生生物に与える負荷を小さくすることによって、
人と自然が調和して生きられる未来をめざしています。



for a living planet®