

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「フグ等の安全性確保に関する総括的研究」

平成 25 年度分担研究報告書

フグの毒性試験と毒化能の検討

研究分担者 長島裕二 東京海洋大学大学院 海洋科学系

研究要旨

フグの安全性確保のため、フグの毒性調査とフグ肝臓の TTX 蓄積能について検討した。フグの毒性調査は、2012～2013 年に三重県沿岸で漁獲されたフグ科 3 属 13 種 26 検体を用いて個体別、部位別に毒性を測定した。調べた各種フグの毒性はこれまで分類されていた毒性レベルであったが、ショウサイフグ精巢で 11MU/g、ナシフグ筋肉で 11MU/g、ムシフグ筋肉で 10MU/g の毒性が検出された。ショウサイフグの精巢については、安全性確認のため、今後試験検体数を増やして毒性の実態調査をする必要がある。肝組織培養法によるフグ肝臓の TTX 蓄積能試験では、“無毒”種といわれているクロサバフグとシロサバフグの肝組織は、トラフグと同等の TTX 蓄積を示したことから、両種の肝臓は潜在的な TTX 蓄積能をもつことが明らかになり、クロサバフグとシロサバフグ肝臓食用は不適と判断された。一方、ハコフグとハリセンボン科のイシガキフグ、ハリセンボン、ヒトツラハリセンボン、ネズミフグの肝組織は TTX を蓄積しなかったことから、これらの肝臓は TTX による毒化は起こりにくいと考えられた。

A. 研究目的

フグの毒性は種によって大きく異なり、同一種であっても漁獲される海域、時期、個体によって著しく変動するため、これがフグ食中毒のなくなる一因となっている。これまで永年の毒性調査によって、日本沿岸で漁獲される主要なフグについては、有毒な種と部位が明らかにされている。その毒性調査結果に基づいて、昭和 58（1983）年 12 月に厚生省（当時）通知「フグの衛生確保について」（環乳第 59 号）により食用可能なフグの漁獲海域、種類、部位が定められ、それ以外のフグの食用は禁止された。さらに、フグの取扱いについては、各自治体の条例等により、フグの取扱者と施設に免許を与えてフグの安全性を確保している。

しかしながら、近年、これまでの報告を上回る毒性をもつフグが出現したり、これまで日本沿岸ではみられなかった南方産の有毒フグがみられ、西日本でドクサバフグによる中毒が発生した。こうした背景のもと、フグの安全性確保に資することを目的として、本研究では、フグの毒性試験と毒化能の検討を行った。前述のように、フグの毒性は漁獲海域によって異なるので、海域を定め、

そこで漁獲された各種フグの個体別、部位別毒性を詳細に調べた。また、フグの毒化機構解明のため、研究分担者らが構築した *in vitro* 組織培養法で、フグ毒テトロドトキシン（TTX）をもたないと言われている“無毒”種フグのクロサバフグ、シロサバフグ、ハコフグおよびハリセンボン類の肝組織における TTX 蓄積能を検討した。

B. 研究方法

1) フグの毒性試験

試料には、2012 年 6 月～2013 年 4 月に三重県沿岸で漁獲されたトラフグ属ヒガンフグ 4 個体、アカメフグ 1 個体、ショウサイフグ 7 個体、ナシフグ 2 個体、マフグ 1 個体、コモンフグ 3 個体、シマフグ 1 個体、ムシフグ 1 個体、クサフグ 2 個体、トラフグ 1 個体、モウヨウフグ属ホシフグ 1 個体、サバフグ属クマサカフグ 1 個体、センニンフグ 1 個体の 26 検体を用いた。

試料は、漁獲後直ちにラウンドで冷凍され、毒性試験に供するまで凍結保存した。凍結試料をビニール袋に入れ、流水で半解凍後、皮、筋肉、肝臓、消化管、腎臓、脾臓、生殖巣を分離した。各

組織から2gとり、これに0.1%酢酸8mLを添加して、ホモジナイズした後、沸騰水浴中で10分間加熱してフグ毒を抽出した。組織重量が2gに満たない場合は、組織重量の4倍または9倍量に相当する容量の0.1%酢酸を添加した。1gに満たない場合は重量によらず0.1%酢酸3mLを添加して、フグ毒を抽出した。毒性試験は食品衛生検査指針のフグ毒検査法に従い、マウス試験法で行った。

2) 肝組織培養法によるフグ肝臓のTTX蓄積

試料にはフグ科のトラフグ(養殖)、シロサバフグ、クロサバフグ、ハコフグ科ハコフグ、ハリセンボン科のイシガキフグ、ハリセボン、ヒトツラハリセンボン、ネズミフグの3科8種のフグを用いた。それぞれ氷冷麻酔した試料魚から肝臓を摘出し、予め冷却したperfusion bufferで灌流後、スライサーと生検トレパンを用いて肝組織切片(8mm x 厚さ1mm)を調製した。肝組織切片をカルチャープレート(24ウェル)の各ウェルに入れ、50 μ M TTXを含むtransport buffer 1mL中で混合ガス(95% O₂-5% CO₂)をバブリングしながら、20 \pm 2で8時間培養した。経時的に肝組織切片を取り出し、氷冷したtransport bufferに1分間浸漬して肝組織切片表面を洗浄した後、キムタオルで水分を拭き取った。肝組織切片に0.1%酢酸を加えて、ホモジナイズし、一部はタンパク質定量に用い、残りは沸騰水浴中で10分間加熱してTTXを抽出した。TTX定量はLC-MSまたはLC-MS/MS法で、タンパク質定量はLowry法で行った。実験に先立ち、試料のフグ肝臓にはTTXは検出されないことをLC-MSまたはLC-MS/MS分析で確認した。

C. 研究結果

1) フグの毒性試験

フグ26検体の毒性試験結果を表1にまとめた。26検体中18検体が有毒(10マウスユニット(MU)/g以上)であった。このうち、毒性が最も高かったのは、マフグ卵巣の1220MU/gで、次いでシヨウサイフグ卵巣が1120MU/gを示し、これらは“猛毒”レベル(1000MU/g以上)であった。

魚種別に最高毒性値を比較すると、マフグ、シヨウサイフグ以下、クサフグ(卵巣748MU/g)、ナシフグ(皮379MU/g)、ムシフグ(卵巣337MU/g)、コモンフグ(皮263MU/g)、ヒガンフグ(卵巣157MU/g)、シマフグ(卵巣50MU/g)の順で、ナ

シフグとコモンフグ以外は卵巣が最高毒性部位であった。

ヒガンフグは、4個体中1個体しか毒性がみられず、有毒部位は卵巣(157MU/g)と肝臓(18MU/g)だけだった。

シヨウサイフグは試験した7検体すべてが有毒であった。しかし、筋肉からは毒性はみられなかった。

ナシフグは、皮と卵巣の毒性がそれぞれ379MU/gおよび356MU/gと高く、筋肉(11MU/g)から毒性が検出された点に注意を要する。これについては、「D.考察」で言及する。

マフグは、卵巣が1220MU/gと“猛毒”レベルを示し、消化管(935MU/g)、脾臓(447MU/g)、肝臓(349MU/g)、皮(127MU/g)はいずれも“強毒”レベルであったが、腎臓と筋肉は“無毒”(< 10MU/g)であった。

コモンフグは、他と違った毒性分布を示し、皮の毒性が99~263MU/gと高く、肝臓(<10~35MU/g)、消化管(<10~20MU/g)から毒性が検出された。

シマフグは、卵巣(50MU/g)と消化管(11MU/g)が毒性を示した。

ムシフグは、卵巣(337MU/g)の毒性が強く、皮(64MU/g)、消化管(27MU/g)、脾臓(17MU/g)、肝臓(13MU/g)、筋肉(10MU/g)から“弱毒”レベルの毒性が検出された。

クサフグは、卵巣(748MU/g)、肝臓(79MU/g)、皮(47MU/g)、消化管(11MU/g)が有毒であった。

1個体ずつではあるが、今回毒性試験したアカメフグ、トラフグ、ホシフグ、クマサカフグおよびセンニンフグから毒性はみられなかった。

2) 肝組織培養法によるフグ肝臓のTTX蓄積

トラフグ肝組織切片を50 μ M TTXを含むtransport bufferで培養したところ、インキュベート2時間後にTTXが検出され、TTX蓄積量(平均値 \pm 標準偏差)は104 \pm 39 ng TTX/mg proteinであった(図1)。TTX蓄積量はインキュベート時間に伴い増加し、8時間後には482 \pm 40 ng TTX/mg proteinに達した。クロサバフグとシロサバフグはトラフグと同様の増加傾向を示し、8時間後のTTX量はクロサバフグ457 \pm 159 ng TTX/mg protein、シロサバフグ343 \pm 114 ng TTX/mg proteinであった。これに対し、ハコフグとハリセンボン科フグ類の肝組織切片では、培養中TTX量に経

時的な増加はみられず、2～8時間まで10～50 ng TTX/mg protein 程度であった。

D. 考察

1) フグの毒性試験

毒性を調べた3属13種26検体のフグについて、魚種によらず、部位別の最高毒性値を比較すると(表2)、卵巣が1220MU/g(マフグ)と最も高く、試験した卵巣14個体中12個体が有毒(>10MU/g)で、有毒個体出現率は85.7%、毒性分布は29～1220MU/gとなり、毒性レベルで分けると、猛毒(>1000MU/g)2個体、強毒(100～999MU/g)7個体、弱毒(10～99MU/g)3個体、無毒(<10MU/g)2個体であった。

卵巣に次いで、最高毒性値が高かったのが消化管で、マフグが935MU/gの毒性を示し、ショウサイフグの1検体が120MU/gの“強毒”レベルを示したが、ナシフグ、コモンフグ、シマフグ、ムシフグ、クサフグの有毒個体は11～27MU/gと“弱毒”レベルが多かった。半数以上(53.8%)が有毒であった。

肝臓の有毒個体出現率も50%を超えたが、最高毒性値は500MU/g(ショウサイフグ)で、“強毒”レベルは3個体(マフグ349MU/g、140MU/g)に留まった。

皮も半数が有毒であり、最高毒性値は379MU/g(ナシフグ)で、“強毒”レベルがコモンフグ(263MU/g)、ショウサイフグ(159MU/g)、マフグ(127MU/g)でもみられた。

これまで報告例が少ない脾臓については、試験した個体の1/3以上、26個体中9個体が有毒で、最高毒性値も447MU/g(マフグ)に達した。これ以外にもショウサイフグ2個体が129MU/gと153MU/gの“強毒”レベルであった。なお、これらショウサイフグ試料では脾臓が部位の中で最高毒性値を示した点が注目される。

腎臓は、ショウサイフグ、ナイフグ、コモンフグの3個体が有毒で、有毒個体出現率は11.5%、最高毒性値は17MU/gであった。

精巣は、10個体中1個体(ショウサイフグ)から11MU/gの毒性が検出されたものの、概ね“無毒”と判断できるが、ショウサイフグの精巣は食用可とされているので、フグ食の安全確保のために、今後とも調査する必要がある。

最後に、筋肉について述べる。2個体(ナシフグとムシフグ各1個体)から10～11MU/gの毒性

が検出された。しかし、ナシフグは皮の毒性が高いため、凍結・解凍によってフグ毒が無毒の筋肉部に移行することが実験的に確かめられているので、その影響によるものと考えられる。ムシフグについても毒の移行が原因と推測されるが、ムシフグの毒性に関するデータが少ないため、筋肉が有毒か否かは不明である。したがって、安全性が確保できていないため食用が認められていない。

2) 肝組織培養法によるフグ肝臓のTTX蓄積

TTXで毒化するトラフグは、*in vitro*培養実験においても肝組織切片のTTX蓄積量が培養時間に伴って増加することが改めて確認された。フグ科サバフグ属のクロサバフグとシロサバフグは“無毒”種と言われているにもかかわらず、*in vitro*培養実験において、トラフグ肝臓と同程度にTTXを蓄積したことから、クロサバフグとシロサバフグの肝臓は潜在的にTTXを毒化する能力をもつことが初めて明らかになった。

一方、フグ科以外のハコフグ科ハコフグやハリセンボン科のイシガキフグ、ハリセンボン、ヒトヅラハリセンボン、ネズミフグでは、*in vitro*培養実験でも肝組織切片にTTXの蓄積はみられず、これらはTTXによる毒化は起こりにくいと考えられた。

E. 結論

フグの毒性実態調査として、2012年～2013年に三重県沿岸で漁獲されたフグ類3属13種26検体の毒性を個体別、部位別に毒性試験した。その結果は概ね既報の毒性レベルであったが、食用が認められているショウサイフグの精巣で11MU/gと、基準値(10MU/g)を超える例があった。また、ナシフグとムシフグ各1個体の筋肉で11MU/gおよび10MU/gの毒性がみられたが、これは皮からの毒の移行が影響しているものと推測された。

次年度に計画していたフグ毒蓄積能評価を一部先行して行い、*in vitro*培養実験において、“無毒”種と言われているクロサバフグとシロサバフグの肝臓はトラフグに匹敵するほどのTTXを蓄積する能力をもつことがわかり、クロサバフグとシロサバフグの肝臓は食用不適と判断された。一方、ハコフグ科とハリセンボン科のフグの肝臓はTTXを蓄積する能力が低いか欠いていると示唆

された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Feroudj, T. Matsumoto, Y. Kurosu, G. Kaneko, H. Ushio, K. Suzuki, H. Kondo, I. Hirono, Y. Nagashima, S. Akimoto, K. Usui, S. Kinoshita, S. Asakawa, M. Kodama, S. Watabe: DNA microarray analysis on gene candidates possibly related to tetrodotoxin accumulation in pufferfish. *Toxicon*, 77 巻, 68-72 (2014).
- 2) 長島裕二：食品中の魚毒（フグ毒）による食中毒とその予防. *食品衛生研究*, 63 巻 2 号, 21-30 (2013).
- 3) 長島裕二, 松本拓也: フグ毒化機構解明に向けた最近の研究. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, 218 巻, 266-275 (2013).

2. 書籍

- 1) 長島裕二：コラム 5 魚介毒の化学成分と薬理作用. 「フィールドベスト図鑑 Vol.17 危険・有毒生物」(篠永 哲, 野口玉雄, 今泉忠明, 小川賢一監修), 学研, 東京, 2013. p. 236.

3. 学会発表

- 1) 長島裕二, 佐藤康介: トラフグ体表粘液のプロテアーゼインヒビター. 第 27 回海洋生物生理活性談話会. 2013 年 5 月, 東京都港区.
- 2) 桐明 絢, 長島裕二, 塩見一雄: カサゴ目魚類刺毒の性状および一次構造. 第 27 回海洋生物生理活性談話会. 2013 年 5 月, 東京都港区.
- 3) 尹 顕哲, 石崎松一郎, 長島裕二: LC-MS によるフグ毒関連物質の検出. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会. 2013 年 9 月, 三重県津市.
- 4) 尹 顕哲, 石崎松一郎, 長島裕二: ヒガンフグ卵巣におけるフグ毒の化学形態. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会. 2013 年 9 月, 三重県津市.
- 5) 桐明 絢, 鈴木靖子, 長島裕二, 塩見一雄: アイゴ刺毒の一次構造およびカサゴ目魚類刺毒との構造比較. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会. 2013 年 9 月, 三重県津市.
- 6) 太田 晶, 須賀恵美, 石崎松一郎, 土井啓行, 石橋敏章, 松本拓也, 長島裕二: 食用フグの肝臓におけるテトロドトキシンおよび麻痺性貝毒の蓄積. 106 回食品衛生学会学術講演会. 2013 年 11 月, 沖縄県宜野湾市.

7) 桐明 絢, 石崎松一郎, 長島裕二: ミトコンドリア DNA を用いたテトラミン食中毒原因巻貝の種判別法. 106 回食品衛生学会学術講演会. 2013 年 11 月, 沖縄県宜野湾市.

8) 長島裕二: 海洋動物の毒. 第 28 回日本中毒学会東日本地方会. 2014 年 1 月, 東京都港区.

9) 松本拓也, 桐明 絢, 渡部終五, 長島裕二: トラフグ幼魚におけるフグ毒テトロドトキシンの胆汁中排泄機構の検討. 平成 26 年度日本水産学会春季大会. 2014 年 3 月, 北海道函館市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし