

表 11 地方衛生研究所で調査されたフグ（精巢）の毒性

種名	無毒	弱毒	強毒	猛毒	計
ナシフグ	84				84
トラフグ					0
ショウサイフグ					0
コモンフグ	1				1
マフグ					0
ヒガンフグ					0
シロサバフグ					0
クロサバフグ	2				2
不明					0
合計	87	0	0	0	87

「フグ等の安全性確保に関する総括的研究」

平成 26 年度分担研究報告書

フグ類の形態に基づく分類

研究分担者 松浦啓一 国立科学博物館 名誉研究員

研究要旨

フグ等の安全性確保に資するため、日本産フグ類の分類学的研究を行った。国内外のフグ類の標本約 170 個体を国立科学博物館、北海道大学総合博物館、神奈川県立生命の星・地球博物館、高知大学理学部、西海区水産研究所、鹿児島大学総合研究博物館、沖縄美ら島財団研究所において調査した。また、オーストラリア博物館およびニュージーランド博物館から標本を借用して調査を行った。その結果、日本の沿岸と排他的経済水域に 7 属 54 種が分布することが明らかになった（日本沿岸に分布する種は 7 属 47 種である）。

奄美大島からシッポウフグ属の新種を発見し、*Torquigener albomaculosus* Matsuura, 2014（和名：アマミホシゾラフグ）という学名をつけて発表した。トラフグ属の雑種個体を検討した結果、両親種の特徴が色彩や体表面の小棘の分布パターンに現れることが明らかとなり、形態的特徴によって少なくとも両親種の一方を特定できることを明らかにした。さらに、これまでに研究分担者が蓄積してきたフグ目魚類に関するデータと文献調査の結果を総説論文としてまとめ、全世界に 184 種のフグ科魚類が分布していることを明らかにした。世界的にも稀なウチワフグ（ウチワフグ科に含まれる唯一の種）の標本 28 個体を調査した結果、西部太平洋の個体には第 1 背鰭があるが、インド洋の個体には第 1 背鰭がないことを明らかにした。

A. 研究目的

フグ食中毒の発生件数と患者数は食中毒全体の 2% 以下だが、死者数は全体の 1/3 を占め、致死率が高い極めて危険な食中毒である。フグ食中毒防止のため、わが国では厚生労働省通知で食用可能なフグの種類、部位、漁獲地域を定め、都道府県条例等でフグ取り扱いの場所と人を制限してフグの安全性確保を担保している。しかし、フグは形態が酷似しており種を正確に判別することは難しい。これがフグ食中毒の一因となっている。その上、近年温暖化のためか南方産フグの出現や自然交雑フグが各地で確認されるようになり、正確なフグの判別がますます困難になっている。そこで本研究では、日本産フグ類の分類を再検討することとする。

フグ類全般の形態形質については、1950 年代に阿部が一連の研究を発表しているものの、大きな見直しは行われていない。また、トラフグ属の雑種と思われる個体がかんりの頻度で市場に水揚げされることがあり、雑種フグの分類学的研究も必要となっている。このため、本研究において

は日本産フグ類を形態学的に研究して、日本産および周辺海域のフグ類の分類学的再検討を行うことにする。

B. 研究方法

国内外の自然史系博物館や大学に保管されている日本産フグ類標本を調査すると同時に新たな標本を得るために鹿児島県奄美大島や高知県においてフィールド調査も行った。国内外のフグ類の標本約 170 個体を国立科学博物館、北海道大学総合博物館、神奈川県立生命の星・地球博物館、高知大学理学部、西海区水産研究所、鹿児島大学総合研究博物館、沖縄美ら島財団研究所において調査した。また、オーストラリア博物館およびニュージーランド博物館から標本を借用して調査を行った。新鮮な標本が得られた場合には、カラー写真を撮影して、分類学的な研究に使用した。形態形質を調査するため、入手した標本は 10% ホルマリンで固定した後、70% アルコールに保存して、形態学的調査を行った。

鰭条数の計数や体表面の小棘の観察は双眼実

態顕微鏡を用いて行った。内部骨格の観察が必要な場合には、軟 X 線撮影装置を用いて骨格系を撮影した。

C. 研究結果

1) 日本産フグ科魚類の分類学的再検討

日本産フグ類の多数の標本を国内の博物館、大学および水産研究所において形態学的に精査した結果、日本の沿岸と排他的経済水域に 7 属 54 種が分布することが明らかになった（日本沿岸に分布する種は 7 属 47 種である）。各属は体表面の側線の数や走り方、鼻器官の形態、体表面の小棘の分布、鰭条数および色彩によって識別できる。しかし、鼻器官や側線の特徴には属内で差がないため、属内の種を分類する際には役に立たない。また、種の識別に鰭条数は役立つ場合もあるが、多くの種においては、鰭条数の数値の範囲が重複する。このため、鰭条数は限られた種の識別にのみ有効であることが明らかになった。したがって、フグ科魚類の分類形質としては、色彩が最も有力であることが判明した。

また、これまでに蓄積してきたフグ目魚類に関するデータと詳細な文献調査の結果、全世界に生息するフグ科魚類は 27 属 184 種となることが判明した。その結果、日本沿岸と周辺には全世界のフグ類の 29% が分布していることが明らかとなった。日本に生息する魚類は約 4,200 種であり、全世界の魚類（32,000 種）の 13% である。したがって、日本のフグ類の多様性は極めて高いと言える。

2) サバフグ属の分類学的研究

サバフグ属は体の側面腹方が銀白色を呈するのでフグ科の他属から容易に識別できる。しかし、サバフグ属内の種はお互いに類似しているため、分類が困難な場合も多い。しかも、筋肉が無毒のシロサバフグと筋肉や内臓に毒性を有するドクサバフグは極めて類似しているため、サバフグ属の種を識別できる分類形質を明らかにすることは極めて重要である。多数の標本を調査した結果、体背面の小棘の分布、尾鰭や胸鰭の形態、体側面と背面の色彩および胸鰭と尾鰭の色彩によってサバフグ属の種を識別できることが明らかになった。

3) シッポウフグ属の分類学的研究

日本にはシッポウフグ *Torquigener brevipinnis*

とナミダフグ *T. hypselogeneion* が分布することが知られていたが、奄美大島におけるフィールド調査により新種を発見した。この新種の雄は約 1 週間かけて複雑な模様をもつ直径 2m の産卵巣を作る(図 1)。このように複雑な産卵巣を作る魚類はフグ類ばかりではなく、他の魚類からも知られていなかった。奄美大島の新種はシッポウフグ属の他種から色彩によって識別される。この新種には *Torquigener albomaculosus* (和名：アマミホシゾラフグ) という学名をつけて Ichthyological Research に発表した (図 2)。

4) トラフグ属の雑種個体の形態的研究

長崎県から得られた雑種と思われる個体は胸鰭後方に大黒斑を有する。このためトラフグが関係した雑種と考えられる。しかし、全体的な体色にはマフグを思わせる部分もあった。トラフグ属の雑種はかなりの頻度で漁獲されており、トラフグ、シマフグ、ショウサイフグ、コモンフグ、マフグなどの種が関与している場合が多い。今後、調査する雑種個体をさらに増やし、遺伝的な解析と平行しながら、雑種の色彩パターンや小棘の分布パターンを精査する必要がある。

5) ウチワフグの分類学的研究

世界的にも稀なウチワフグ(ウチワフグ科に含まれる唯一の種)の標本 28 個体を調査した結果、西部太平洋の 19 個体には第 1 背鰭があるが、インド洋の 9 個体には第 1 背鰭がないことが判明した。ウチワフグの第 1 背鰭は小さな 2 棘から構成されていて、極めて小さい。また、ウチワフグの標本が極めて稀であったため、第 1 背鰭の有無については、十分に研究されていなかった。本研究によって、ウチワフグのインド洋と西部太平洋の個体群に明瞭な差があることが判明した。

D. 考察

日本産フグ類の分類学的再検討によって、日本周辺に 7 属 54 種が分布することが明らかになった。しかし、シッポウフグ属から新種が発見されたように、日本産フグ類の全容が明らかにされたわけではない。まだ、入手した個体数が限られているため発表はしていないが、日本産モヨウフグ属にも新種の可能性があるフグがいる。

サバフグ属の分類学的再検討を多数の標本に基づいて行った結果、体背面の小棘の分布、尾鰭

や胸鰭の形態、体側面と背面の色彩および胸鰭と尾鰭の色彩によってサバフグ属の種を識別できることが明らかになった。

長崎県から得られたトラフグ属の雑種と思われる標本を検討したところ、トラフグが両新種の一方であることが判明したが、もう一方の親種はマフグである可能性が高いものの形態形質からは断定できなかった。トラフグ属の雑種は茨城県、宮城県、日本海等からも得られており、標本の調査地域を広げれば他の地域からも得られる可能性が高い。分担者の以前の研究では、有明海からシマフグとナシフグの雑種が採集されており、関東以南の地域の標本調査を強化する必要があると思われる。

E. 結論

日本の沿岸と排他的経済水域に7属54種のフグ類が分布することが明らかになった(日本沿岸に分布する種は7属47種である)。各属は体表面の側線の数や走り方、鼻器官の形態、体表面の小棘の分布、鰭条数及び色彩によって識別できる。

サバフグ属の分類学的再検討を多数の標本に基づいて行った結果、体背面の小棘の分布、尾鰭や胸鰭の形態、体側面と背面の色彩および胸鰭と尾鰭の色彩によってサバフグ属の種を識別できることが明らかになった。

奄美大島から得られた標本に基づいてシッポウフグ属の新種アマミホシゾラフグ *Torquigener albomaculosus* Matsuura, 2014 を発表した。新種の雄は約1週間かけて複雑な模様をもつ直径2mの産卵巣を作る。このように複雑な産卵巣を作る魚類はフグ類ばかりではなく、他の魚類からも知られていない。新種はシッポウフグ属の他種から色彩によって識別される。

長崎県から得られたトラフグ属の雑種個体を検討した結果、トラフグおよびマフグが関与している可能性が高いことが判明した。トラフグ属の雑種が各地からかなり得られているという情報があるため、さらに標本入手を図る必要がある。

世界的にも稀なウチワフグ(ウチワフグ科に含まれる唯一の種)の標本28個体を調査した結果、西部太平洋の19個体には第1背鰭があるが、インド洋の9個体には第1背鰭がないことが判明した。本研究によって、ウチワフグのインド洋と西部太平洋の個体群に明瞭な差があることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Matsuura: A new pufferfish of the genus *Torquigener* that builds “mystery circles” on sandy bottoms in the Ryukyu Islands, Japan (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae). *Ichthyological Research*, 62, 207-206 (2015).
- 2) K. Matsuura: Taxonomy and systematics of tetraodontiform fishes: a review focusing primarily on progress in the period from 1980 to 2014. *Ichthyological Research*, 62, 72-113 (2015).

2. 書籍等

- 1) 松浦啓一, 長島裕二(編著):「毒魚の自然史—毒の謎を追う」, 北海道大学出版会, 札幌, 2015. 312 pp.
- 2) 松浦啓一:「魚類分類学は人命を救う:フグ類の分類と毒性」, 産業技術総合研究所, つくば市, 2015. PEN, 5巻7号:3-8.

3. 学会発表

- 1) 松浦啓一, 金子篤史, 片山英里:腹部膜状部を開閉するフグ目の稀種ウチワフグの鱗に見られる特殊な構造. 2014年度日本魚類学会年会, 神奈川県小田原市, 2014年11月.
- 2) 園山貴之, 土井啓行, 石橋敏章, 松浦啓一:シッポウフグ属2種の育成. 2014年度日本魚類学会年会, 神奈川県小田原市, 2014年11月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

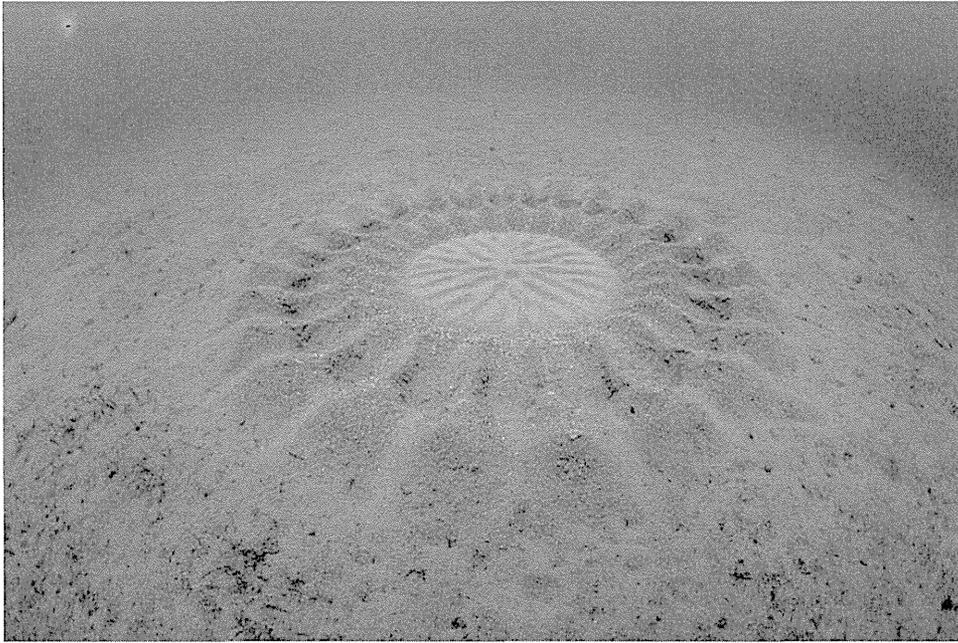


図1. *Torquigener albomaculosus* (アマミホシゾラフグ) の産卵巣 (写真: 大方洋二)

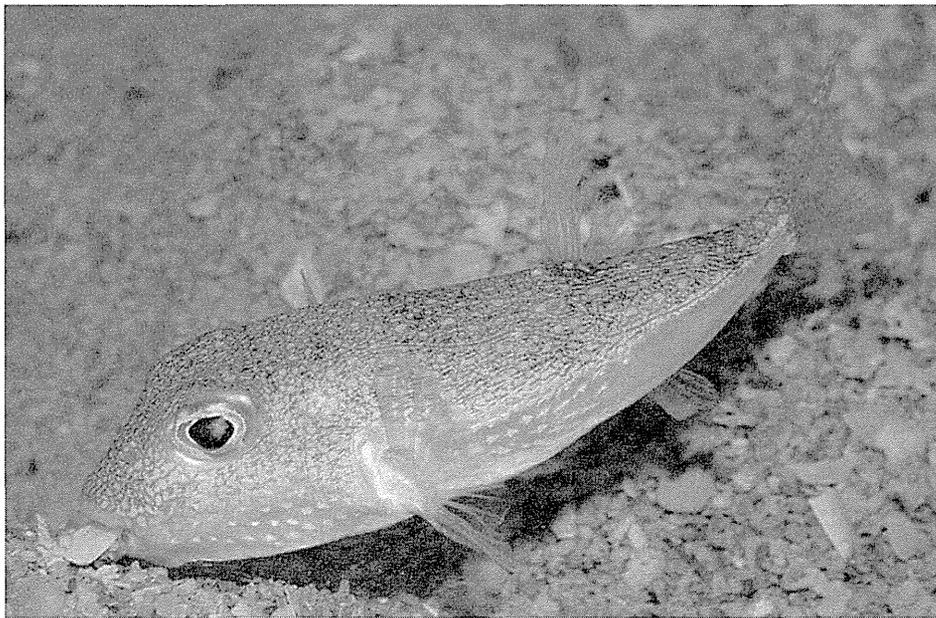


図2. *Torquigener albomaculosus* (アマミホシゾラフグ) の水中写真 (写真: 大方洋二)。

研究要旨

フグ食中毒は毎年発生しており重篤な場合には死に至ることから、今なお食品衛生上重大な問題である。近年熱帯・亜熱帯海域に生息するドクサバフグの日本沿岸での出現とそれによる食中毒の発生、フグの高毒性化、自然交雑種の頻出など新たな問題も指摘されていることから、フグによる食中毒とフグ毒による中毒に対するリスク管理を強化、見直すことを目的に、近年頻繁に捕獲されるようになった交雑種をターゲットとして、分子生物学的手法に基づく正確な交雑フグ種判別法について検討した。昨年度交雑フグ種のミトコンドリア DNA の塩基配列から、母系魚種を同定したところ、本研究で鑑別した交雑種のうち、トラフグとマフグの雑種のように、従来から存在が知られ、両親種の中間的な特徴を明瞭に示すものは、外部形態による両親種の推定と mtDNA 解析法による母系種の同定が合致した。一方、父系種の同定に用いた核 DNA マイクロサテライトマーカ（AGAT repeat）解析では、反復回数がトラフグおよびマフグでそれぞれ 33-40 回および 35 回であり、種間差が明瞭ではなかった。しかしながら、GAAAG repeat 解析ではトラフグおよびマフグで顕著な差が確認できたことから、父系種同定に使用可能であると判断された。

A. 研究目的

今年度は、長崎大学水産学部 荒川 修 教授から分与された父系および母系系統が既知の人工交配フグ種を対象に、それらの筋肉から抽出・精製した全ゲノム DNA を用いて、ミトコンドリア DNA 解析による母系魚種の同定および各種核 DNA マイクロサテライトマーカ解析による父系魚種の同定を試みた。

B. 研究方法

試料には長崎大学水産学部 荒川 修 教授から分与された人工交配フグ種（トラフグ（♀）×マフグ（♂）3 個体およびトラフグ（♂）×マフグ（♀）3 個体）ならびに、研究室保管のトラフグ、マフグ、カラスを用い、これらの筋肉から DNA 組織キット S および QuickGene-810（ともに和光純薬工業（株）製）を用いて全ゲノム DNA を抽出・精製した。次に、全ゲノム DNA を用いてミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域の各々約 620bp、390bp を含む部分領域を PCR 増幅した。PCR 増幅に用いたプライマーセットを表 1 に示した。PCR 増幅には TaKaRa EX Taq DNA ポリメラーゼを用い、PCR 反応液は、0.2mL PCR チューブ中に精製した鋳型 DNA 5.0 μ L、10×緩

衝液（TaKaRa）5.0 μ L、2.5 mM dNTP mix 4.0 μ L、20 μ M 各プライマー 0.75 μ L、TaKaRa EX Taq DNA ポリメラーゼ 0.4 μ L を加えた後、全量が 50 μ L となるように滅菌水を加えた。PCR の温度条件は、98°C で 10 秒、53°C で 30 秒、72°C で 60 秒のサイクルを 30 回行った。PCR 終了後、PCR 断片を template として、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（ABI）と自動 DNA シーケンサー（ABI 3130 ジェネティックアナライザ）を用いて得られた PCR 産物の塩基配列を決定し、公的データベースおよび研究室で新たに構築したフグ種専用データベースから母系種の同定を行った。一方、父系種同定に関しては、父系種同定に使用可能なマイクロサテライトマーカの選別を目的に、まずトラフグにおいて NCBI データベースに登録されている 244 個のマイクロサテライト遺伝子座のうち、トラフグ内で比較的多様性が低いと想定される遺伝子座を 2 種選択した。それらのマイクロサテライト領域を含むプライマーを設計し、トラフグ属 3 種および人工交配フグ個体の DNA を鋳型として PCR を行った（表 2）。PCR 産物を 4%アガロースゲル電気泳動により検出することで、多型の存否を確認した。なお、PCR は 25 μ L の反応系で行い、DNA 50 ng、TaKaRa EX Taq

DNA ポリメラーゼ 0.125 μ l、10 \times EX Taq buffer 2.5 μ l、dNTP mixture (2.5 mM each) 2 μ l、プライマーの終濃度は各 0.2 μ M とした。反応条件は、98 $^{\circ}$ C60 秒、各プライマーのアニーリング温度で 30 秒、72 $^{\circ}$ C60 秒のサイクルを 40 回とした。最終的に、塩基配列を決定し、マイクロサテライトの反復回数を測定した。

C. 研究結果

今回提供された人工交配フグ種(トラフグ(♀) \times マフグ(♂) 3 個体およびトラフグ(♂) \times マフグ(♀) 3 個体)の外観を図 1 に示す。トラフグを母系とする交配個体にはトラフグの特徴がより強く発現されており、一方マフグを母系とする交配個体にはマフグの特徴がより強く発現される傾向であることがわかった。そこで、まずこれらの人工交配フグ種につき、ミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域の塩基配列に基づいて母系種の同定を行った結果、すべての個体で交配通りに母系種を同定することができた(表 3)。

一方、父系種の同定に用いることができるマイクロサテライトマーカーの選抜を行った結果、アガロースゲル電気泳動距離に違いが見られたマイクロサテライト遺伝子座は ATAG 反復配列および GAAAG 反復配列であったことから、これら 2 種につき解析を行った。AGAT 解析の結果、反復回数は同一種においても異なり、トラフグ 3 個体では 33-40 回、カラス 6 個体では 18-47 回、マフグ 1 個体では 35 回だったことから、この 3 種において明瞭な ATAG 反復回数の違いを確認することはできなかった(表 4、図 2)。一方、GAAAG 反復配列の解析では、トラフグおよびマフグ間で電気泳動距離が異なる反復配列を示すことが認められた(図 3)。泳動距離から推定される PCR 産物の分子量は、トラフグおよびマフグでそれぞれ約 200 および 140bp であった。そこで、人工交配フグ種を対象に、GAAAG 反復回数の普遍性を確認したところ、両親種(トラフグとマフグ)の分子量の各位置に複数のバンドが見られた(図 4)ことから、トラフグ(♀) \times マフグ(♂) 1 個体におけるマイクロサテライト解析を行ったところ、反復回数は 8 回、9 回、23 回の 3 遺伝子型が存在し、そのうち 8 回または 9 回の反復回数がマフグ由来、23 回はトラフグ由来であると推測された。

D. 考察

長崎大学水産学部 荒川 修 教授から分与された人工交配フグ種(トラフグ(♀) \times マフグ(♂) 3 個体およびトラフグ(♂) \times マフグ(♀) 3 個体)は、体表の斑紋の形状、体側中央の白点および黄色縦帯の形状ならびに尻鰭の色から、トラフグおよびマフグ両種の特徴を有しており、典型的な交雑種であると推定された。しかしながら、トラフグを母系とする交配個体にはトラフグの特徴がより強く発現されており、一方マフグを母系とする交配個体にはマフグの特徴がより強く発現される傾向であることもわかった。

ミトコンドリア DNA 解析法により、トラフグ(♀) \times マフグ(♂) 個体およびトラフグ(♂) \times マフグ(♀) 個体の母系種はそれぞれトラフグおよびマフグと同定されたことから、形態学的鑑別法による種の推定は主として母系種の特徴が大きく反映されている可能性が示唆されるとともに、ミトコンドリア DNA 解析法は交雑種の母系種同定に極めて有効な判定法であることが確認された。

一方、父系種同定に用いることができる核 DNA マイクロサテライト領域の探索を行ったところ、トラフグおよびマフグ間の交雑種を対象にした場合において、GAAAG 反復配列の回数の差から父系種同定が可能である可能性が示唆された。すでに公開されているトラフグゲノムデータベースでは、今回標的にした GAAAG は 22 反復、推定 PCR 産物分子量は 190 bp であることが確認されている。マフグのゲノムデータが未だに提供されていない現状では、数多くのマフグ個体から GAAAG 反復の Repeat 範囲を調べ、マフグにおける GAAAG がトラフグで確認された反復回数とは明らかに異なった、明瞭でかつ普遍的である反復回数を示すことを明らかにする必要がある。さらに、他のトラフグ属あるいはサバフグ属においても GAAAG がマーカーとして有効であるかどうかを検証することが必要であると考えられる。

E. 結論

交雑フグ種の親種判別に関しては、外部形態のみで両親種を判別することには注意が必要であり、遺伝子による判別法を併用して慎重に判定する必要がある。母系種においては、今回確立したミトコンドリア DNA 法によって確実に同定できることが確認された。一方、父系種に関しては、

トラフグおよびマフグからなる交雑種においては GAAAG 反復配列から推定できる可能性が示唆されたが、他のマイクロサテライト領域も含め、さらなる追試が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) なし

2. 学会発表

1) Acar Caner, 石崎松一郎, 長島裕二: Analysis of three Lessepsian puffers' complete mitochondrial genomes with phylogenetic consideration. 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月, 東京都港区.

2) 臼井芽衣, 徐 超香, 石崎松一郎, 長島裕二: ショウサイフグの交雑種と推定されるフグの種判別と毒性. 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月, 東京都港区.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) なし

表1 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域の PCR 増幅に用いたプライマーセット

領域	プライマー配列	アニーリング 温度 (°C)	増幅サイズ (bp)
16S rRNA	16SAR-L 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'	53	620
	16SBR-H 5'-CCGGTCTGAAGTCTGATCACGT-3'		
シトクローム <i>b</i>	L14317Glu 5'-CAGGATTTTAACCAGGACTAATGGCTTGAA-3'	53	390
	H15149 5'-CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'		

表2 選択したマイクロサテライト領域の PCR 増幅に用いたプライマーセット

マイクロサテラ イト領域	プライマー配列	GC 含量 (%)	塩基数	アニーリング 温度 (°C)
ATAG	fms06F 5'-GCCTAAAGTGATCTCTGCTCTGTGG-3'	52	25	62
	fms06R 5'-CAGCCTTCCCAACTATCTTC-3'	50	20	
GAAAG	fms09F 5'-TGTTAATTCATTGGGAGGAAGAATG-3'	36	25	62
	fms09R 5'-GTTGTGCAACTGCATCGTAT-3'	45	20	

表3 人工交配フグ種の塩基配列同一性から見た母系種の同定

個体名	母系種×父系種	16S rRNA 領域		シトクローム <i>b</i> 領域		母系種同定結果
		トラフグ	マフグ	トラフグ	マフグ	
141219-1		572/572	570/572	435/436	423/436	トラフグ
141219-2	トラフグ×マフグ	562/562	560/562	435/436	423/436	トラフグ
141219-3		572/572	570/572	435/436	423/436	トラフグ
141219-4		562/564	563/564	424/436	436/436	マフグ
141219-5	マフグ×トラフグ	565/566	565/566	424/436	436/436	マフグ
141219-6		563/565	564/565	424/436	436/436	マフグ

表4 トラフグ、カラスおよびマフグにおける ATAG 反復配列の回数

魚種	個体名	AGAT 反復	増幅サイズ (bp)
トラフグ	040525-1	36/40	197/309
	040525-2	34/35/36/37	189/193/209/225
	040525-3	33/34/38	197/201/217
カラス	020319-1	35/36	193/209
	020319-2	36/37	197/201
	020319-3	45/47	245/253
	020319-4	18/36	137/197
	020319-5	39/43	209/225
	020319-6	39	209
マフグ	020303-2	35/35	193/205

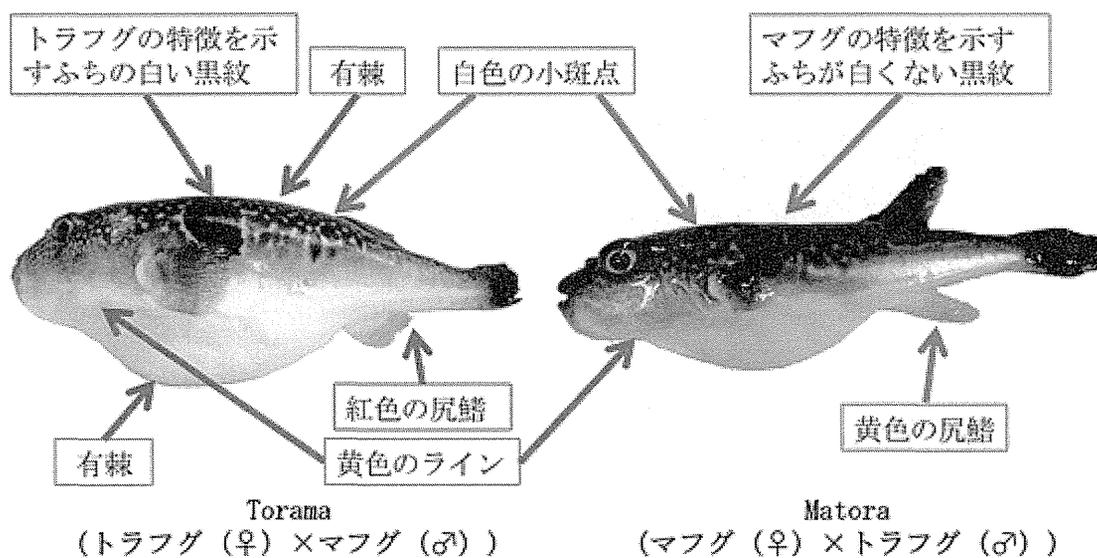


図1 長崎大学から提供された人工交配フグ種の外観