

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 26 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 食品生産科学部門

### 研究要旨

フグの安全性確保のため、これまで実態がわかっていなかった自然交雑種フグの毒性ならびに毒成分を明らかにすることを目的として、外部形態からトラフグ類似フグと判断された 92 個体について毒性試験と毒成分分析を行った。供試したトラフグ類似フグは、山口県沿岸で漁獲されたもので、全体的な外部形態はトラフグに似ているものの、トラフグにはみられない腹部の黄色い線と黄色い尻鰭をもつことから交雑種フグと判断した。毒性試験により、92 個体中 9 個体から毒性が検出され、毒性はトラフグと同程度またはそれ以下のものがほとんどであったが、トラフグでは食用可能とされている精巢から 32.6 MU/g の毒性が、皮から「強毒」レベル（220 MU/g）の毒性が検出された。さらに、1 個体の消化管から過去に報告されている最高毒力の「強毒」レベルを上回る 1070 MU/g の「猛毒」レベルの毒性が検出された。LC-MS での毒成分分析において、有毒サンプルからテトロドトキシン（TTX）と TTX 類縁体が検出され、主成分は TTX と trideoxyTTX であった。本研究で、トラフグ類似フグの毒性と毒成分を調べたが、交雑種フグの食用適否の判定を下すには、今後、両親種を判別した上で、この毒性評価結果と合わせ、交配による可食部位への影響を考察する必要がある。

### 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。今年度は、山口県沿岸で漁獲されたトラフグに類似した交雑種フグについて個体別、組織別に毒性を測定し、一部の有毒試料について、毒成分分析を行った。

### B. 研究方法

#### 1) フグの毒性試験

試料は、2012 年 10 月～2013 年 12 月に山口県沿岸で漁獲されたトラフグと外部形態が類似しているものの、トラフグにはみられない腹部の黄色い線と黄色い尻鰭をもつフグ（以下“トラフグ類似フグ”と仮称）（図 1）92 個体を用いた。これらは、すべて山口県水産研究センターが入手し、外部形態観察でトラフグ類似フグと判断されたもので、同センターから恵与されたものである。

試料は、漁獲後冷凍され、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、胆嚢、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。マウス試験は、東京海洋大学動物実験委員会の承認を受け、東京海洋大学動物実験等取扱規則などを順守して実施した。

本実験では、測定検体数が多いため、毒性が高いことが知られている肝臓と生殖巣（卵巣）、交雑種フグの親魚と推定されるトラフグでは「無毒」とされているのに対し、マフグでは有毒で「強毒」とされている皮、ならびに食用するうえで最

も重要な筋肉については、すべての個体で毒性試験を行い、毒性が検出された個体についてその他の組織に対して毒性を測定した。

## 2) フグ毒成分分析

試料には上記1)の毒性試験で毒性が検出されたトラフグ類似フグ9個体を用いた。

LC-MS 分析に先立ち、フグ組織抽出液をジクロロメタンで脱脂し、遠心限外濾過(分画分子量3000, Ultrafree-0.5, Millipore)(12000×g, 15min)で得られた濾液を分析用試料とした。

フグ毒の分析は、LC/ESI (Electrospray ionization) -MS 法で行った。分析カラムは TSKgelAmide-80 (2.0 mm I.D. × 15 cm, 3 μm particle size, 東ソー)を用い、移動相は 16 mM ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5): アセトニトリル (4:6, v/v)を用いて、流速 0.2 mL/min で分析を行った。TTX およびその類縁体の検出は SIR (Single Ion Recording) モードを採用し、oxoTTX ( $m/z$  366)、TTX および epiTTX ( $m/z$  320)、deoxyTTX ( $m/z$  304)、anhydroTTX ( $m/z$  302)、nor-TTX ( $m/z$  290)、dideoxyTTX ( $m/z$  288)、trideoxyTTX ( $m/z$  272) をモニターした。TTX 標準品との比較と Yotsu-Yamashita ら(2013)の報告から予測される出現順番から毒成分を推定した。

## C. 研究結果

### 1) トラフグ類似フグの毒性

毒性試験の結果を表1に示す。有毒の個体はその毒性値を、無毒のものは < 5 MU/g のように組織を酢酸抽出した際の希釈倍率未満として示した。試験した 92 個体中 9 個体から毒性が検出され、有毒個体出現率は 9.8%であった。

組織別の有毒個体出現率と最高毒性値を表2に示す。肝臓では、全体としての有毒個体出現率は 7.6%(試料 92 個体中 7 個体が有毒。以下、7/92 と記す)であった。雌雄別の同出現率では、雄が 5.5% (3/55)、雌が 9.1% (3/33) で、雌の方が高い傾向を示した。最高毒性値は雄が 689 MU/g (試料 No. 90)、雌が 550 MU/g (試料 No. 28) で、共に「強毒」であり、雌雄間で顕著な差は認められなかった。

消化管では、調査した 20 個体中 1 個体 (試料 No. 28) が有毒であり、有毒個体出現率は 5.0% で、その毒性値は 1070 MU/g で、「猛毒」レベルに達した。

精巣では、1 個体 (試料 No. 21) が 32.6 MU/g の「弱毒」を示したが、他の 54 個体では、毒性は検出されなかった。

卵巣は、有毒個体出現率が 15.2% (5/33) であ

った。その内、「強毒」のものが 2 個体 (試料 No. 28、88)、「弱毒」のものが 3 個体 (試料 No. 18、24、89) で、最高毒性値は 465 MU/g (試料 No. 28) であった。

胆嚢では、調査した 25 個体中 5 個体が有毒であり、有毒個体出現率は 20.0% で、最高毒性値は 552 MU/g (試料 No. 90) であった。胆嚢の毒性が高い試料個体は肝臓の毒性も高く、両組織の間には正の相関がみられた (相関係数  $r = 0.967$ )。

脾臓では、調査した 18 個体中 2 個体 (試料 No. 4、28) が有毒であり、有毒個体出現率は 11.1% で、最高毒性値は 595 MU/g (試料 No. 28) であった。

皮は、有毒個体出現率が 5.4% (5/92) であった。雌雄別の有毒個体出現率では、雄が 3.6% (2/55)、雌が 6.1% (2/33) で、最高毒性値は、雄で 69.0 MU/g (試料 No. 90)、雌で 220 MU/g (試料 No. 28) となった。

毒性が検出された有毒個体 (9 検体) を含めすべての筋肉試料から、毒性は検出されなかった (5 MU/g 未満)。

### 2) トラフグ類似フグの毒成分

トラフグ類似フグで毒性を示した試料について毒成分分析を行った。毒性試験した中で、最も高い毒性を示した試料 No. 90 の肝臓 (689 MU/g)、胆嚢 (552 MU/g) および皮 (69.0 MU/g) の毒成分を調べた結果、肝臓では、TTX (保持時間 13.63 分、以下時間のみ示す)、trideoxyTTX (6.44 分)、anhydroTTX (10.60 分) の他に dideoxyTTX (7.29 分)、norTTX (11.58 分) が検出された (図 2)。これらを合一した Total Ion Chromatogram (以下 TIC とする) にすると、肝臓のフグ毒成分は、trideoxyTTX と TTX が主成分であった (図 3)。同様に、胆嚢と皮も trideoxyTTX と TTX をフグ毒の主成分とすることがわかった (図 3)。

次に、毒性がみられたトラフグ類似フグの肝臓 (No. 21、28、84、88) の毒成分を個体別に比較した (図 4)。このうち、毒性値が「強毒」レベル (100 ~ 999 MU/g) を示した No. 28 (550 MU/g)、84 (292 MU/g)、88 (460 MU/g) は TTX と trideoxyTTX が主成分であった (図 4)。ただし、No. 88 は TTX と trideoxyTTX に加え norTTX と推定される成分も著量検出された (図 4)。毒性値が低かった No. 21 (11.9 MU/g) では全体的にピークが小さく、毒成分の同定には至らなかった (図 4)。図には示していないが、トラフグ類似フグの卵巣 (No. 18、24、28、88、89) と皮 (No. 28、84) では、いずれの個体においても trideoxyTTX と TTX が検出された。

## D. 考察

### 1) トラフグ類似フグの毒性

有毒個体の毒力と外部形態から推定される親魚を表 1 に示す。これまでの最高毒力の報告は、トラフグでは、肝臓と卵巣が「強毒」、消化管が「弱毒」、精巣と筋肉および皮は「無毒」であり、マフグは肝臓と卵巣は「猛毒」、消化管と皮は「強毒」、精巣と筋肉は「無毒」である。

トラフグ類似フグでは、外部形態からマフグとの交雑種と推定した 9 個体中の 4 個体 (No. 4、28、84、88) と、トラフグと何かのフグとの交雑種と推定される 1 個体 (No. 90) の皮から毒性が検出された。トラフグの皮は「無毒」とされているが、今回の結果から、上記 5 個体はマフグのような皮に毒をもつ個体との交雑種である可能性が考えられる。また、No. 21 は精巣から毒性 (32.6 MU/g) が検出されたが、トラフグとマフグはともに精巣は「無毒」とされている。昨年の本研究事業において、研究分担者の荒川は、トラフグの精巣から「弱毒」レベル (20 MU/g) の毒性を報告していることから、トラフグあるいはその交雑種フグの精巣の毒性については今後精査する必要がある。

No. 28 は消化管で 1070 MU/g の毒性が検出された。これは過去に報告された両種の最強毒力を上回っていたが、毒化の原因は交配によるものかわからない。交雑による影響よりは、フグの高毒化の影響を受けているのかもしれない。

今回の交雑種の親魚は外部形態による推定であり、種の判別は正確ではないため、遺伝子鑑別法を用いて両親魚を明確にした上で、毒性試験結果を評価する必要がある。

### 2) トラフグ類似フグの毒成分

今回の分析で、有毒個体の有毒組織試料から TTX と TTX 類縁体の trideoxyTTX と anhydroTTX が検出された。TTX は epiTTX と anhydroTTX と化学平衡にあるため、TTX の存在下では anhydroTTX も存在すると考えられる。trideoxyTTX はフグ毒の成分では一般的な TTX 類縁体である。

トラフグ類似フグでは、同個体の各組織間で毒性値は異なるにも関わらず、毒成分組成が類似していた。また、同組織の各個体間でも毒性値にかかわらず TTX と trideoxyTTX が主成分であった。これらの結果から、今回測定したトラフグ類似フグに関しては、個体や組織が違っても毒成分組成はよく似ており、毒成分組成に個体差や組織による差はないことがわかった。

## E. 結論

これまで実態がよくわかっていなかった自然交雑種フグの毒性ならびに毒成分を明らかにすることを目的として、外部形態からトラフグ類似フグと判断された 92 個体について毒性試験と毒成分分析を行った。

今回試験したトラフグ類似フグは、外部形態からトラフグの特徴 (周りが白い黒紋があり、背部と腹部に小棘) とトラフグにみられない特徴 (腹部の黄色い線と黄色い尻鰭) をもつ個体であり、その毒性に関する知見はほとんどなかった。本研究の毒性試験により、トラフグ類似フグ 92 個体中 9 個体から毒性が検出され、毒性はトラフグと同程度またはそれ以下のものがほとんどであった。しかし、一部で、トラフグでは食用可能とされている精巣から 32.6 MU/g の毒性が検出され、皮からも 1 個体で 220 MU/g と「強毒」レベルの毒性、4 個体で「弱毒」レベルの毒性が検出された。さらに、1 個体の消化管から過去に報告されている最強毒力「強毒」レベルを上回る 1070 MU/g の「猛毒」レベルの毒性が検出された。

毒成分分析では、トラフグ類似フグの有毒サンプルから TTX と TTX 類縁体が検出され、主成分は TTX と trideoxyTTX であった。trideoxyTTX は日本沿岸のフグに共通してみられる一般的な TTX 類縁体であり、トラフグに類似した交雑種フグが特別なフグ毒成分組成を有しているわけではないようである。

交雑種フグの毒性および食用適否の判定を下すには、今後両親種を判別した上で、この毒性評価結果と合わせ、交配による可食部位への影響を考察する必要がある。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) T. Matsumoto, H. Feroudj, R. Kikuchi, Y. Kawana, H. Kondo, I. Hirono, T. Mochizuki, Y. Nagashima, G. Kaneko, H. Ushio, M. Kodama, S. Watabe: DNA microarray analysis on the genes differentially expressed in the liver of the pufferfish *Takifugu rubripes*, following an intramuscular administration of tetrodotoxin. *Microarrays* 3 巻, 226-244 (2014).
- 2) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Biliary excretion of tetrodotoxin in the cultured pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. *Toxicon* 93 巻,

## 2. 書籍

- 1) 長島裕二, 松本拓也: フグ毒. 「別冊日本臨牀新領域別症候群シリーズ No. 30 神経症候群(第2版)」. 日本臨牀社, 大阪, 2014, pp. 680-683.
- 2) 長島裕二, 荒川 修, 佐藤 繁: 第2章 フグ毒. 「毒魚の自然史」(松浦啓一, 長島裕二 編著). 北海道大学出版会, 北海道, 2015. pp. 33-103.

## 3. 学会発表

- 1) 太田 晶, 石崎松一郎, 長島裕二: 組織培養したトラフグ肝臓におけるフグ毒の分布と存在形態. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会. 2014 年 9 月, 福岡県福岡市.
- 2) 桐明 絢, 松本拓也, 石崎松一郎, 長島裕二: 養殖トラフグ稚魚と成魚の肝臓発現遺伝子の比較. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会. 2014 年 9 月, 福岡県福岡市.
- 3) 長島裕二: フグ肝臓と卵巣におけるフグ毒蓄積タンパク質. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会シンポジウム 魚類における新しいタンパク質 Calycin 研究の最前線. 2014 年 9 月, 福岡県福岡市.
- 4) 岡山桜子, 太田 晶, 石崎松一郎, 長島裕二: ゴマフグ卵巣と卵巣糠漬けのフグ毒成分分析. 第 108 回日本食品衛生学会学術講演会. 2014 年 12 月, 石川県金沢市.
- 5) 長島裕二: フグの安全性. 平成 26 年度神奈川県ふぐ包丁師衛生講習会. 2015 年 3 月, 神奈川県横浜市.
- 6) 尹 顕哲, 桐明 絢, 太田 晶, 石崎松一郎, 長島裕二: ヒガンフグ卵巣から単離したフグ毒結合タンパク質の同定. 平成 27 年度日本水産学会春季大会. 2015 年 3 月, 東京都港区.
- 7) 永井 慎, 長島裕二: トラフグ肝臓におけるテトロドトキシン投与後の三次元分布に関する研究. 平成 27 年度日本水産学会春季大会. 2015 年 3 月, 東京都港区.
- 8) 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測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.
- 9) 桐明 絢, 布施 遥, 石崎松一郎, 長島裕二: 16S rRNA 領域におけるテトラミン食中毒原因巻貝の種判別. 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

なし