

201426026B

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

研究代表者 長島裕二

平成 27 (2015) 年 5 月

別添 1

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

研究代表者 長島裕二

平成 27 (2015) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告	
フグ等の安全性確保に関する総括的研究	1
長島裕二	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	50
III. 研究成果の刊行・別刷	53

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）
総合研究報告書

フグ等の安全性確保に関する総括的研究

研究代表者 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 教授

研究要旨

フグ食の安全性確保に資することを目的として、Ⅰ. フグの毒性に関する調査研究とⅡ. フグの分類に関する研究を行った。

Ⅰ. フグの毒性に関する調査研究

各種海産フグおよび交雑種フグについて、既得毒性データの整理と毒性調査を実施するとともに、フグの毒蓄積能について検討した。既報および未発表の毒性データの整理と天然フグの毒性調査を行ったところ、概ね谷（1945）の「日本産フグの毒力表」に示された毒力レベルであったが、一部のフグでそれを超える事例がみられた。本研究で毒性試験したトラフグに形態が類似した自然交雑種フグ 119 個体の有毒個体出現率は 10%以下で、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、一部の個体で推定される両親種の毒力を上回るものがみられた。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、これら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。

三陸沿岸で漁獲されるコモフグおよびヒガンフグの筋肉は高い毒性を示すことから、岩手県釜石湾、同越喜来湾ならびに宮城県雄勝湾産の両種のフグは、市場での取り扱いが禁止されている（Kodamaら、1984）。当時の調査から 30 年が経過した現時点での東北沿岸産フグ類の毒性を調べたところ、いまだに高い頻度で筋肉の毒性が基準値を大幅に超過していることを確認した。毒性が明確でない熱帯・亜熱帯産フグの毒性を調査するため、沖縄県産のフグ類 4 属 11 種 232 個体の筋肉の毒性試験を行った結果、クロサバフグ、ヨリトフグ、モヨウフグ、ケショウフグ、ホシフグおよびアラレフグは調べた全個体が無毒（<10 MU/g）であった。一方、コクテンフグとオキナワフグの筋肉では、「強毒」（100～999 MU/g）個体が認められた。

昭和 35 年（1960 年）～平成 22 年（2010 年）に発生したフグによる食中毒事件 2401 件の一覧を各自治体別にリストを作成し、検査に係る情報の提供を依頼した。その結果、該当する情報が確認できた地方衛生研究所 21 機関から、原因食品の残品または未調理品 124 事例（個体）、223 検体の検査情報を入手することができた。また、全国の地方衛生研究所の協力により、9 種 693 個体（うち 10 個体は種不明）のデータが提供された。これらのデータをもとにリスク管理およびリスク評価の観点からデータの解析をすすめ、行政的に活用できる科学的根拠データの作成に供することが可能である。

フグの毒化能を *in vitro* 肝組織培養実験で調べたところ、“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テトロドトキシン（TTX）を蓄積する能力がもつことがわかり、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。また、トラフグとヒガンフグに、TTX および麻痺性貝毒（PSP）を添加した飼料を経口経管投与したところ、PSP 蓄積能は種や成熟段階により異なるものの、総じて TTX 蓄積能より低いことが示唆された。

Ⅱ. フグの分類に関する研究

日本産フグ類の分類学的研究では、国内外のフグ類の標本約 300 個体を調査した。標本調査の結果、サバフグ属のクロサバフグの学名 *Lagocephalus gloveri* を変更すべきことが明らかとなった。ニュージーランドとオーストラリア東岸から知られていた *Lagocephalus cheesemani* はクロサバフグと同一であるため、今後、クロサバフグにはこの学名を適用すべきである。また、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。

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種両親種判別法について検討した。交雑種フグのミトコンドリア DNA の塩基配列から母系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、両親種の間隔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ミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびチトクローム *b* 遺伝子領域配列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ー (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。

研究分担者

荒川 修	長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科・教授
佐藤 繁	北里大学海洋生命科学部・教授
大城 直雅	国立医薬品食品衛生研究所・室長
松浦 啓一	国立科学博物館・名誉研究員
石崎松一郎	東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科・准教授

A. 研究目的

古くから日本人はフグを貴重な食材として扱ってきた。しかしながら、フグは猛毒テトロドトキシン (TTX) をもつため、これを原因とした食中毒が起きている。フグ食中毒は、発生件数と患者数では食中毒全体の数%にも満たないが、死者数では最も多く、致死率が高いきわめて危険な食中毒である。その防止のため、わが国では「フグの衛生確保について」(厚生省環境衛生局長通知環乳第 59 号 昭和 58 年 12 月 2 日) で、食用可能なフグの種類と部位、漁獲海域を定めるとともに、都道府県条例等でフグを取り扱うことができる場所と人を制限し、その安全性を確保している。前述の国の通知は、谷博士が西日本および東シナ海で漁獲したフグ類の毒性調査をまとめて 1945 年に発表した「日本産フグの毒力表」に基づいて策定されたものであるが、近年、同表を上回る毒力を示すフグの例が散見されている。

一方、近年の温暖化のためか、種の異なるフグが交配した自然交雑種フグが各地で確認されるようになってきている。特にトラフグとマフグの交雑と推定されるフグは古くから知られ、混獲量も少なくない。交雑種フグについては、前記の通知の中で「両親種ともに食べてもよい部位のみを可食部位とする」と定めているが、実際の毒性に関する

報告例は少なく、この規定が妥当かどうか明らかでない。

他方、淡水産のフグは、二枚貝の毒化に関わる麻痺性貝毒 (PSP) を保有するが、近年数種の海産フグからも PSP の検出例が報告されている。フグ食のリスク管理は、これまでフグの毒が TTX であることを前提として行われてきたが、食用可能なフグにおける PSP の蓄積状況や蓄積能に関する基礎的な知見は少なく、通知で定められたフグを中心に、この点の見直しが急務である。

フグの毒性は種によって著しく異なるため、フグの分類はフグ食のリスク管理において重要である。しかしながら、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。フグの分類は従来、色彩を含む形態学的特徴に依拠していたが、最近では遺伝子による種判別も行われるようになってきている。しかし、フグ類が水揚げされる魚市場や調査船等の現場においては、形態形質は依然として重要である。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、最近の研究によって、サバフグ属についてもシロサバフグの学名 *Lagocephalus wheeleri* Abe, Tabeta & Kitahama, 1984 は *L. spadiceus* (Richardson, 1845) のシノニムであることが明らかとなったことから、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が必要である。

交雑種フグの種判別は、交雑個体の両親種の組み合わせとその形態的特徴に関する報告は少なく、外観から正確な両親種を判断することは困難である。したがって、DNA 分析による両親種判別技術の確立が求められている。

このような状況の下、フグ類の毒性と分類を見直し、フグ食の安全性確保に資することを目的として、Ⅰ.フグの毒性に関する調査研究とⅡ.フグの分類に関する研究を行った。

B. 研究方法

Ⅰ.フグの毒性に関する調査研究

各種フグおよび交雑種フグの既得毒性データ

研究分担者が関わった以下の論文の毒性データと未発表データを整理し、各種フグの既得毒性データとしてまとめた。

- 1) Itoi et al., *Toxicon* 60, 1000-1004 (2012)
- 2) Ikeda et al., *Toxicon* 55, 289-297 (2010)
- 3) 谷山ら, 長崎大学水産学部研究報告 91, 1-3 (2010)
- 4) Ngy et al., *Afr. J. Mar. Sci.* 31, 349-354 (2009)
- 5) Ngy et al., *J. Food Hyg. Soc. Japan* 49, 361-365 (2008)
- 6) Nakashima et al., *Toxicon* 43, 207-212 (2004)
- 7) Mahmud et al., *Toxicon* 41, 13-18 (2003)
- 8) Mahmud et al., *J. Natural Toxins* 10, 69-74 (2001)
- 9) 渕ら, *食品衛生学雑誌* 40, 80-89 (1999)
- 10) 渕, 長崎大学博士論文 (1999)

また、日本各地で採取し、DNA塩基配列に基づいて両親種を同定した交雑種フグの未発表毒性データについても同様に整理した。これらの既得毒性データについて、谷(1945)の「日本産フグの毒力表」の毒性データと比較した。

アカメフグおよび天然交雑種フグの毒性試験

2007~2008年に南伊豆沿岸で採取したアカメフグ6個体(体長 20.4 ± 0.7 cm、体重 498 ± 83.4 g)、ならびに2013年4月に瀬戸内海で採取した天然交雑種フグ27個体(全長 27.9 ± 5.3 cm、体重 469 ± 254 g)を試料とした。いずれも、皮、筋肉、肝臓、消化管および生殖腺に腑分け後、食品衛生検査指針 理化学編に記載のマウス検定法に準じて、酢酸加熱法でTTXを抽出し、LC-MS分析にてTTX量を測定した。交雑種フグについては、外見的特徴から両親種の推定も行った。各部位のTTX量を毒力(MU)に換算し、谷(1945)の「日本産フグの毒力表」の毒性データと比較した。

人工交雑種フグへのTTX投与実験

マフグ(♀)とトラフグ(♂)を人工交配させ

て作出した人工交雑種フグ(マトラ)2ヶ月齢魚(体長 4.2 ± 0.5 cm、体重 2.4 ± 0.8 g)、および8ヶ月齢魚(15.1 ± 0.8 cm、 48.5 ± 7.8 g)に対してTTXを投与して、それらの毒蓄積能を調査した。まず、2ヶ月齢魚35尾に対して背部筋肉内へのTTX溶液(20 MU/尾)の注射投与を行った。投与1、8、24、72、96、および120時間後に5尾ずつ取り上げ、皮、筋肉、肝臓、およびその他内臓に腑分け後、酢酸加熱法でTTXを抽出し、LC-MS分析にてTTXを定量した。一方、8ヶ月齢魚12尾に対しては、TTX添加飼料(200 MU/尾)を経口経管投与した。投与8、24、72、および120時間後に3尾ずつ取り上げ、皮、筋肉、肝臓、および消化管(内容物を除く)に腑分け後、2ヶ月齢魚と同様にTTX量を測定した。

海産フグ2種へのPSP投与実験

養殖トラフグ(体長 19.3 ± 0.7 cm、体重 216 ± 16.4 g)につき、PSP投与区(n=3)およびTTX投与区(n=3)を設け、それぞれPSP(毒力%: neoSTX 76%、dcSTX 8%、STX 16%)およびTTX添加飼料を420 MU/尾の用量で経口経管投与した。両区ともに毒投与48時間後に取り上げ、蛍光HPLC分析にて各部位のPSP量を、LC-MS分析にて同TTX量を測定した。

次に、予めPSPが検出されないことを確認した長崎県大村湾産ヒガンフグ未成熟群(体長 7.3 ± 1.0 cm、体重 15.0 ± 4.4 g、生殖腺体指数 0.35 ± 0.13 、雌雄判別不能)および成熟群(体長 14.1 ± 1.6 cm、体重 105.8 ± 28.8 g、生殖腺体指数 12.41 ± 4.93 、すべて雌)につき、PSP(前記と同一組成)添加飼料をそれぞれ65および550 MU/尾の用量で経口経管投与し、4、8、12時間後に各群5尾ずつ取り上げ、蛍光HPLC分析にて各部位のPSP量を測定した。

三重県産フグ類の毒性試験

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、シヨウサイフグ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。これらの試料は三重県水産研究所から恵与されたものである。

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。食品衛生検査指針 理化学編に記載のマウス検定法に準じて、酢酸加熱法で各組織からフグ毒を抽出し、毒性試験は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。

交雑種フグの毒性試験と毒成分分析

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1-1）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。フグ毒の抽出ならびに毒性試験は上述の方法と同様である。

毒性試験で毒性が検出された試料については、LC-MS法でフグ毒成分分析を行った。

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、ハリセンボン、ヒトヅラハリセンボン、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（ $\phi 8\text{mm} \times$ 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、 $50\mu\text{M}$ TTXを含むtransport buffer 1mL 中で混合ガス（95% O_2 -5% CO_2 ）をバブリングしながら、 20°C 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。

河端法と簡易法による毒抽出量の比較

ベトナム北部 Catba 周辺で2011年8月に採取したドクサバフグ *Lagocephalus lunaris* 23個体（体重 $57.2 \pm 13.1\text{ g}$ 、全長 $140.7 \pm 11.0\text{ mm}$ ）を試料とした。凍結試料を解剖して皮と筋肉を取り出し、それぞれ部位ごとに合一してホモジナイズした。まず河端(1978)の方法に従って、筋肉のホモジネート 10g に 25mL の0.1%酢酸を加えて混合し、沸騰浴中で5分間加熱した。氷冷後、ホモジネートをろ紙上ろ過し、ろ液を得た。ろ紙上の残滓に0.1%酢酸を加えて洗浄し、上記のろ液と洗液と合わせて 50mL の抽出液を得た（河端法による抽出液）。これとは別に筋肉のホモジネート 10g に0.1%酢酸 30mL を混合して5分間加熱し、ホモジネートを氷冷後 50mL に定容して攪拌し、ろ紙上濾過して抽出液を作製した（簡易法による抽出液）。これらの検液を SepPak C18 plus カートリッジで処理した後、Yotsu ら(1989)の方法に従って HPLC 蛍光法で分析し、抽出液中の TTX 濃度を求めた。皮も同様に、河端法と簡易法の二通りで抽出し、HPLC 蛍光法で分析した。肉と皮につき、それぞれ同一のホモジネートから公定法による抽出液と簡易法による抽出液を4つずつ調製して分析した。また、マウス試験による毒性分析を実施して、上記2法による毒の回収率を比較した。

東北地区のフグの毒性試験

岩手県釜石魚市場で2009年7月に水揚げされたコモンフグ50個体（体重 $121 \pm 31\text{ g}$ 、全長 $187 \pm 15\text{ mm}$ ）および同市場で2013年6月に水揚げされたシロサバフグ46個体（体重 $50 \pm 14\text{ g}$ 、全長 $149 \pm 15\text{ mm}$ 、mean \pm SD）、2014年9月に入手した秋田県産ショウサイフグ24個体（体重 $211.3 \pm 53.1\text{ g}$ ；全長 $233.6 \pm 25.4\text{ mm}$ ）、2014年10月に岩手県大船渡魚市場と釜石魚市場で入手した三陸産ショウサイフグそれぞれ13個体（体重 $218.3 \pm 37.6\text{ g}$ ；全長 $187.5 \pm 13.7\text{ mm}$ ）、2014年10月～12月に大船渡魚市場と釜石魚市場で入手した三陸産コモンフグ計40個体（体重 $127.9 \pm 53.11\text{ g}$ ；全長 $79.2 \pm 22.0\text{ mm}$ ）、2014年10月～12月に大船渡魚市場と釜石魚市場で入手した三陸産ヒガンフグ計12個体（体重 $414.7 \pm 134.9\text{ g}$ ；全長 $249.1 \pm 23.0\text{ mm}$ ）を試料とした。

これらフグ試料は個体ごとに凍結して梱包し、北里大学海洋生命科学部に冷凍状態で搬入し、試験に供するまで -80°C で凍結保存した。

試料のフグを半解凍状態で筋肉、皮、肝臓、消化管ならびに生殖腺の5部位に分け、4倍量の0.1%酢酸を加えてホモジナイズした後、沸騰浴中で5分間熱浸した。得た熱浸ホモジネートを氷冷し、0.1%酢酸で元試料の5倍量となるように定容して攪拌し、ろ紙上ろ過して検液を作製した。調べた3種のフグ類は卵巣、精巣が未発達であったため、これらを区別せず生殖腺として一括して扱った。

抽出液の一部をSepPak C18 plusカートリッジで処理した後、Yotsuら(1989)の方法に従ってHPLC 蛍光法で分析し、抽出液中のテトロドトキシン(TTX)、4-エピ-テトロドトキシン(4epiTTX)ならびに4,9-アンヒドロテトロドトキシン(anhTTX)含量を求めた。抽出液中の麻痺性貝毒(PSPs)含量をSatoら(2014)の方法に従ってELISA (SKit, 新日本検定協会製)で分析した。HPLC法で得た検液中のTTX、4epiTTXおよびanhTTXの濃度を、それぞれの比毒性1.624 MU/nmol、0.229 MU/nmol、0.027 MU/nmolを用いてマウス毒性に換算し、元試料1gあたりのTTX群(TTXs)の毒性(MU/g)として表示した。ELISAで得たPSP群(PSPs)の濃度は、フグ類に主要成分として認められ最も毒性の高いサキシトキシン(STX)に換算して2.483 MU/nmolの比毒性を用いて換算し、元試料1gあたりのPSPsの毒性(MU/g)として表示した。

HILIC-MS/MSによるTTX分析法検討

HILIC系カラムによるTTX分析にあたり、分離と分析時間を考慮した上で、分析法を検討した。装置はAgilent Technologies社製のLC (Agilent 1290 Infinity) に接続されたAgilent 6460 Triple Quad LC/MSを、移動相にはLC-MSグレードのアセトニトリルおよびMiliQ水を使用した。

カラム、移動相等について検討を行い、予備試験であらかじめTTXを含有しないことを確認したクロサバフグ筋肉試料を用いて、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(平成22年12月24日付け食安発1224第1号)に従い、2併行5日間の繰返し実験により選択性、真度、併行精度および室内精度等の性能パラメーターにより、分析法としての妥当性を評価した。

沖縄産フグの毒性試験

沖縄県衛生環境研究所にて採集・保管されていた、サバフグ属のクロサバフグ50個体、センニンフグ35個体、ヨリトフグ属のヨリトフグ6個体、モヨウフグ属のサザナミフグ42個体、モヨウフグ27個体、スジモヨウフグ9個体、ケシヨウフグ12個体、コクテンフグ24個体、ホシフグ4個体、アラレフグ3個体および、オキナワフグ属のオキナワフグ20個体の筋肉を対象とした。

各試料について、食品衛生検査指針記載の抽出法を一部改変して試料調製を行い、分析に供した。すなわち、均質化した試料5gに0.1%酢酸12.5 mLを加えてホモジナイズし、沸騰水浴中で20分間加熱した。放冷後、遠心分離(10°C 、13,000 x g、15 min)し、上清を得た。残渣に0.1%酢酸10 mLを加え、ボルテックスで攪拌後、遠心分離後に得られた上清を合一し、25 mLに調製した。この0.1 mLに0.1%酢酸0.9 mLを加え攪拌した後に、その0.5 mLを限外ろ過(10 kDa)した。ろ液を、アセトニトリルが50%になるように水とアセトニトリルで希釈し、PVDF膜でろ過(0.2 μm)したものを試験溶液とした。

妥当性が確認されたクロサバフグ以外の種は、本分析に先だって、予備分析を実施した。充分量の無毒試料が確保できたサザナミフグおよびモヨウフグについては、3併行2日間の繰返し分析により、選択性、真度および、併行精度により適用性を評価した。添加したTTXの量は、有毒の目安である10 MU/g (2.2 $\mu\text{g/g}$)を参考にし、2 $\mu\text{g/g}$ および、0.2 $\mu\text{g/g}$ の2濃度とした。適応性の評価は、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(平成22年12月24日付食安発1224第1号)に従った。他の5種については、定量限界未満の試料がないか、十分な試料量が確保できなかったため、適用性の確認はせずに分析した。

自治体によるフグの毒性検査結果等の収集

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「食品中の自然毒のリスク管理に関する研究」の成果として得られた、昭和35年(1960年)～平成22年(2010年)に発生した食中毒事件例のリストを基に、全国の地方衛生研究所へ調査票を送付し、検査の実施状況を調査した。

全国の地方衛生研究所に対してフグの毒性に

関する調査研究の実施状況等についての調査票を送付し、返信された調査票に基づきデータを集計した。

なお、本調査は、地方衛生研究所全国協議会理化学部会（委員長：平田輝昭 福岡県保健環境研究所長）の協力により実施した。

II. フグの分類に関する研究

形態に基づく分類

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 300 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、横須賀市自然・人文博物館、京都大学総合博物館、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。

鱗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。

遺伝子解析による種判別

試料には日本各地から採集した外観からの形態学的判定に基づく交雑フグ種（トラフグ×クサフグ、トラフグ×マフグ、トラフグ×シマフグ、ショウサイフグ×コモンフグ、コモンフグ×ムシフグ、ショウサイフグ×ゴマフグおよびショウサイフグ×マフグ）計 7 種 10 個体を用い、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 2-1 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 \times 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 $^{\circ}$ C で 10 秒、53 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ 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。

次に、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) 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。これらの全ゲノム DNA を用いてまずはミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域の塩基配列から母系種の同定を行った後、父系種同定に使用可能なマイクロサテライトマーカーの選別を目的に、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 2-2)。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、多型の存非を確認した。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 $^{\circ}$ C 60 秒、各プライマーのアニーリング温度で 30 秒、72 $^{\circ}$ C 60 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

I. フグの毒性に関する調査研究

各種フグおよび交雑種フグの既得毒性データ

各種海産フグの既得毒性データを表 1-1 に示す。3 種のフグで、一部の部位の最高毒力が「日本産

フグの毒力表」を上回っていた。まず、トラフグでは毒力表で「無毒」(< 10 MU/g) とされている皮と精巣で、それぞれ最高 14 および 20 MU/g の毒力を示す個体がみられた。同様に、マフグでは「無毒」の筋肉と精巣から、ともに最高 60 MU/g、コモンフグでは「強毒」(100-1000 MU/g) の皮から最高 2397 MU/g の毒力が検出された例がみられた。また、シロサバフグでは、「無毒」の範疇ながら肝臓から 2.2-7.9 MU/g の毒力が検出された。

次に、交雑種フグの既得毒性データを表 1-2 に示す。2 タイプの交雑種フグで、一部の部位の毒力が「日本産フグの毒力表」に記載された両親種の毒力を上回っていた。すなわち、シマフグ×トラフグ(母系×父系; 以下同様) では、両親種ともに「無毒」の皮で最高 25 MU/g、マフグ×ゴマフグでは、同様に筋肉で最高 20 MU/g の毒が検出された。マフグ×トラフグおよびトラフグ×マフグでは、「無毒」の範疇ながら最高 2 MU/g の毒が筋肉から検出された。

アカメフグおよび天然交雑種フグの毒性

アカメフグの毒性データを表 1-3 に示す。まず、一般的にフグ類で強い毒性を示す皮と肝臓では、それぞれ 14-84 MU/g、17-515 MU/g の TTX が検出され、最高値は「弱毒」(10-99 MU/g)、および「強毒」(100-999 MU/g) の範疇であった。また、卵巣の TTX 量は、最高 668 MU/g で、4 尾全てが「強毒」に相当した。一方、「無毒」(< 10 MU/g) とされる筋肉と精巣では、それぞれ 6 尾中 4 尾、2 個体中 2 個体から「弱毒」に相当する量の TTX が検出された。

次に、天然交雑種フグの毒性データを表 1-4 に示す。27 個体中 26 個体については、いずれの部位からも TTX が検出されなかった。外観的特徴から、これらはいずれもトラフグ×マフグまたはコモンフグと推定された。残り 1 個体に関しては、皮、筋肉、肝臓、消化管、および生殖腺から、それぞれ 43、5、449、264 および 273 MU/g の TTX が検出された。本個体は、マフグ×トラフグ、もしくはショウサイフグ×トラフグまたはマフグで、前記 26 個体とは異なる交雑種と推定された。

人工交雑種フグへの TTX 投与実験

マトラ 2 ヶ月齢魚における投与 120 時間後までの TTX 蓄積率の推移を図 1-2 に示す。投与 1 時

間後では全体の蓄積率は 14.2% であり、その半分程度 (6.9%) は肝臓に蓄積されていた。肝臓の蓄積率はその後減少し、投与 24 時間後以降 TTX は検出されなかった。一方、皮では投与 1 時間後から TTX の蓄積が認められ、試験終了まで次第に増加し、投与 120 時間後では皮のみに蓄積が認められた。他方、筋肉には投与 1、24 および 96 時間後に毒の残存がみられた。

マトラ 8 ヶ月齢魚における投与 120 時間後までの TTX 蓄積率の推移を図 1-3 に示す。投与 8 時間後では全体の蓄積率が 17.6% であり、その大半は肝臓に蓄積していた。しかし、投与 24 時間後では肝臓から毒は検出されなくなり、全体の蓄積率は 5.7% まで減少した。その後、皮の蓄積率の増加に伴い全体の蓄積率も上昇し、投与 120 時間後には 53.2% に達した。一方、前述の 2 ヶ月齢魚の結果とは異なり、いずれの取り上げ時間においても筋肉への毒の蓄積は認められなかった。

海産フグ 2 種への PSP 投与実験

養殖トラフグの場合、毒投与 48 時間後の両区の毒蓄積状況に顕著な差がみられた (図 1-4)。すなわち、TTX 投与区では、投与した毒の 29% が肝臓、17% が皮、1% が生殖腺に蓄積していたのに対し、PSP 投与区では、いずれの個体のいずれの部位からも PSP は検出されなかった。

天然ヒガンフグでは、未成熟群と成熟群の毒残存状況に顕著な差がみられた (図 1-5)。未成熟群の場合、投与 4 時間後では投与した毒の 82.1% が体内に残存していたが、そのほとんどを、内容物 (有毒飼料) を含む消化管が占め、皮と生殖腺の毒量は投与毒量の 2% 未満であった。その後、体内残存毒量は顕著に減少し、投与 8 時間後以降 20% 未満となったが、その際も毒量の大部分を消化管が占めていた。一方、成熟群では、毒投与 4 時間後に 28.3% の PSP が残存しており、その 5 割を肝臓、1~2 割を卵巣と皮が占めた。その後、残存毒量は減少し、毒投与 12 時間後では体内に残存した PSP のほとんどが卵巣に移行していた。また、残存 PSP の組成は部位により異なり (データ未記載)、成分によって取り込みないし排泄効率に差があるものと推察された。

三重県産フグ類の毒性

フグ 26 個体の毒性試験結果を表 1-5 に、魚種によらない部位別の最高毒性値を表 1-6 にそれぞれまとめた。26 個体中 18 個体が有毒 (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 1220 MU/g で、次いでショウサイフグ卵巣が 1120 MU/g を示し、これらは「猛毒」レベル (1000 MU/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、ショウサイフグ以下、クサフグ (卵巣 748 MU/g)、ナシフグ (皮 379 MU/g)、ムシフグ (卵巣 337 MU/g)、コモンフグ (皮 263 MU/g)、ヒガンフグ (卵巣 157 MU/g)、シマフグ (卵巣 50 MU/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 (157 MU/g) と肝臓 (18 MU/g) だけだった。

ショウサイフグは試験した 7 個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 379 MU/g および 356 MU/g と高く、筋肉 (11 MU/g) から毒性が検出された点が注意を要する。

マフグは、卵巣が 1220 MU/g と「猛毒」レベルを示し、消化管 (935 MU/g)、脾臓 (447 MU/g)、肝臓 (349 MU/g)、皮 (127 MU/g) はいずれも「強毒」レベルであったが、腎臓と筋肉は「無毒」 (< 10 MU/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 99~263 MU/g と高く、肝臓 (< 10~35 MU/g)、消化管 (< 10~20 MU/g) から毒性が検出された。

シマフグは、卵巣 (50 MU/g) と消化管 (11 MU/g) が毒性を示した。

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

クサフグは、卵巣 (748 MU/g)、肝臓 (79 MU/g)、皮 (47 MU/g)、消化管 (11 MU/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。

交雑種フグの毒性と毒成分

毒性試験の結果を表 1-7 に示す。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。組織別に有毒個体出現率と

最高毒性値をみると、肝臓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、最高毒性値は「強毒」レベルの 689 MU/g であった。

消化管では、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、有毒個体出現率は 1.8% (1/55) であった。

これに対し、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、18 個体中 2 個体 (試料 No. 4、28) が有毒で有毒個体出現率は 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、最高毒性値は 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) の筋肉試料から、毒性は検出されなかった (5 MU/g 未満)。

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) の毒成分分析した結果、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 1-6)。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 1-7)。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 1-8)。

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、インキュベーション 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 1-9)。TTX 蓄積量はインキュベーション時間に伴い増加し、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±159 ng TTX/mg protein、シロサバフグ 343±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。

河端法と簡易法による毒抽出量の比較

表 1-8 にドクサバフグの筋肉および皮のホモジネート、それぞれ河端法と簡易法で処理して得た検液中の TTX 含量およびマウス毒性を示す。HPLC 蛍光法で分析した筋肉の TTX 含量を除き、Brillantes et al. (2003)の簡易法で得た抽出液の TTX 含量と毒性は、河端法で得た抽出液のそれを若干上回り、簡易法でも高収率で毒が抽出液に回収されることを確認した。操作の簡便性ならびに毒の回収率を考え合わせ、以下の操作では Brillantes ら(2003)の簡易法を用いて、本研究に用いる分析用検液を調製することとした。

東北地区のフグの毒性

2014 年に採取した三陸産ヒガンフグ 12 個体の筋肉の大部分に、基準値を大幅に超える TTXs が認められた。筋肉には低濃度の PSPs (0.4 + 0.4 MU/g、max 1.1 MU/g) も検出された。皮、肝臓、消化管、生殖腺にはいずれも TTXs を主体とする高い毒性が確認された(表 1-9)。

2009 年に釜石魚市場で採取したコモンフグの部位別毒性を表 1-10 に示す。いずれも毒の主成分は TTXs であるが、5 MU/g を超える比較的高濃度の PSPs が高頻度で肉を含む各部位から ELISA で検出された。

2014 年に採取した三陸産コモンフグ 40 個体の筋肉の大部分に、基準値を超える TTXs が認められた。筋肉には顕著な濃度の PSPs (3.6 ± 7.4 MU/g、max 52.8 MU/g) も検出された。皮、肝臓、消化管、生殖腺には TTXs および PSPs からなる高い毒性が検出された(表 1-11)。

2014 年に採取した秋田県産シヨウサイフグ 24 個体中の筋肉には若干量の TTXs と PSPs が検出されたが、両者の合計で筋肉に基準値 10 MU/g を超える検体は認められなかった。筋肉以外の不可食部はいずれも高い毒性を示した(表 1-12)。毒の主成分は TTXs であるが、皮、肝臓、消化管および生殖腺にそれぞれ最大 39.3、272.6、55.1、291.4 MU/g の PSPs が検出された。

釜石魚市場ならびに大船渡魚市場で 2014 年に

採取したシヨウサイフグ計 13 個体中 5 個体の筋肉が、基準値を上回る毒性を示した(表 1-13)。また筋肉には 1.9 + 2.3 MU/g (max 13.2 MU/g) の PSPs が認められた。皮、肝臓、消化管および生殖腺は TTXs を主体とする高い毒性を示すが、それぞれの部位からは最高値で 60.4、51.6、31.2、44.9 MU/g の PSPs も合わせて検出された。

2013 年 6 月に釜石魚市場で採取したシロサバフグの筋肉、皮、肝臓および生殖腺には 10 MU/g を超える TTX 群は確認されず、消化管の 2 個体のみ 20 MU/g 程度の TTX 群が検出された(表 1-14)。一方、これら抽出液の一部を PSP 分析用の ELISA に付したところ、いずれの部位においても PSPs は検出されなかった。

HILIC-MS/MSによるTTX分析法検討

分析カラムおよび移動相条件等を検討した結果、以下のとおり条件を最適化し、妥当性評価を実施した。

【LC 部】

装置：Agilent 1290 Infinity、分析カラム：Inertsil-Amide (75×2.1 mm、3 μm)、移動相 A：水 (5mM ギ酸アンモニウム、0.5 mM ギ酸)、移動相 B：90%アセトニトリル (5mM ギ酸アンモニウム、0.5 mM ギ酸)、アイソクラティック分析 A/B (25 : 75)、測定時間：7 分間、カラム温度：45 °C、流速：0.5 mL/min、注入量：5 μL。

【MS 部】

装置：Agilent 6460 Triple Quad LC/MS、イオン化：ESI (AJS、Positive)、ドライガス：N₂ (280 °C、12 L/min)、シースガス：N₂ (350 °C、11 L/min)、キャピラリー電圧：3500 V、ノズル電圧：500 V、ネブライザー：N₂ (55 psi)、フラグメンター電圧：135 V、コリジョンエネルギー：35 eV、コリジョンガス：N₂、プリカーサーイオン：*m/z* 320.2、プロダクトイオン (定量用)：*m/z* 162.1、プロダクトイオン (確認用)：*m/z* 302。

本法の検出限界 (LOD) は 0.025 ng/g (0.11 MU/g)、定量限界は (LOQ) は 0.10 ng/g (0.45 MU/g) である。なお、TTX の 1 MU は 0.22 μg とした。

クロサバフグ筋肉の均質化試料に TTX 2 μg/g および 0.2 μg/g を添加し、2 併行 5 日間の繰返し分析をした。その結果、選択性、真度 (86% および 77%)、併行精度 (21% および 9.5%)、室内精度 (23% および 10%) の全性能パラメーターが、

目標値等に適合しており、妥当性が確認された(表 1-15)。

また、予備試験で無毒個体が確認され、十分な試料量が確保できたセンニンフグ、ヨリトフグ、サザナミフグおよびモヨウフグの筋肉に TTX 2 µg/g および 0.2 µg/g 添加した試料を 3 併行 2 日間繰返し分析した。サザナミフグの真度は 83% および 109%、併行精度は 3.6% および 4.3% で、ヨリトフグの真度は 74% および 92%、併行精度 12% および 4% であり、いずれも食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインに示された目標値を満たしていた(表 1-16)。

沖縄産フグの毒性

TTX 分析の結果、10 MU/g (2.2 µg/g) 未満を無毒、それ以上を有毒とした。無毒個体は、LOD (0.025 ng/g (0.11 MU/g)) 未満、LOD 以上 LOQ (0.10 ng/g (0.45 MU/g)) 未満、および LOQ 以上 10 MU/g (2.2 µg/g) に区分した。有毒試料は、10 MU/g (2.2 µg/g) 以上 100 MU/g (22 µg/g) 未満を弱毒、100 MU/g (22 µg/g) 以上 1000 MU/g (220 µg/g) 未満を強毒、1000 MU/g (220 µg/g) 以上を猛毒とし、結果を表 1-17 にまとめた。

クロサバフグ 50 個体すべてが LOD 未満であった。

ヨリトフグ 6 個体中 5 個体が LOD 未満で、1 個体が LOD 以上 LOQ 未満であり、すべて無毒であった。

センニンフグ 35 個体中、LOD 未満は 2 個体、LOD 以上 LOQ 未満が 3 個体で、全体の 60% にあたる 21 個体が LOQ 以上 10MU/g 未満であった。有毒は 9 個体 (26%) で、すべてが弱毒であった。

サザナミフグ 42 個体中、LOD 未満が 3 個体、LOD 以上 LOQ 未満が 8 個体であった。LOQ 以上は 31 個体で、そのうち 3 個体が 10 MU/g (2.2 µg/g) を超えたため、有毒率は 7.1% であった。有毒個体の毒力は 11~17 MU/g ですべて弱毒であった。

モヨウフグ 27 個体中、LOD 未満が 14 個体、LOD 以上 LOQ 未満が 7 個体であった。LOQ 以上の 6 個体はすべて 10 MU/g (2.2 µg/g) 未満であり本種は全個体が無毒であった。

スジモヨウフグ 9 個体すべてが LOD 以上であり、そのうち 1 個体が 37 MU/g (8.14 µg/g) と有毒であった。有毒率は 11% であった。

ケショウフグ 12 個体中 LOD 未満が 9 個体、残

り 3 個体は LOQ 未満であり、全個体が無毒であった。

コクテンフグ 24 検体すべてが LOQ 以上であった。そのうち、10 MU/g (2.2 µg/g) 未満の無毒が 9 個体、弱毒が 12 個体 (15~89 MU/g)、強毒が 3 個体 (106~141 MU/g) で、有毒率は 63% であった。

ホシフグ 4 個体すべてが LOD 以上 LOQ 未満であった。

アラレフグ 3 個体すべてが LOD 未満であり、TTX は検出されなかった。

オキナワフグ 20 個体すべてから TTX が検出された。LOD 以上 LOQ 未満が 2 個体、LOQ 以上の個体のうち 10 MU/g (2.2 µg/g) 未満の無毒が 4 個体 (1.3~8.6 MU/g)、弱毒が 12 個体 (12~85 MU/g)、強毒が 2 個体 (110、139 MU/g) で、有毒率は 70% であった。

自治体によるフグの毒性検査結果等の収集

① フグ食中毒事例の調査

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「食品中の自然毒のリスク管理に関する研究」の成果として得られた、昭和 35 年 (1960 年) ~平成 22 年 (2010 年) に発生した食中毒事件例のリスト (総数 2,401 件) をもとに、自治体別の食中毒事件一覧表とした。群馬県を除く 46 都道府県で発生があり、自治体数としては 58 におよんだ (表 1-18)。最も件数が多かったのが広島県 (256 件) で、山口県 (200 件)、兵庫県 (198 件)、愛媛県 (169 件) 岡山県 (151 件)、福岡県 (140 件)、香川県 (113 件) と続いた。政令市等では神戸市 (80 件)、北九州市 (29 件)、横浜市 (26 件) と続いた。

これらのデータをもとに自治体別にリストを作成し、検査に係る情報の提供を依頼した。その結果、該当する情報が確認できた地方衛生研究所 21 機関から、原因食品の残品または未調理品 124 事例 (個体)、223 検体の検査情報を入手することができた。なお、そのうち 3 事例については調査期間外 (平成 26 年) に発生したものであった。

検査法としてはマウス毒性試験法だけが 4 機関、マウス毒性試験法と LC-MS (LC-MS/MS) の併用が 10 機関あったが、そのうち 1 機関はマウス毒性試験法から LC-MS/MS に移行していた。また、1 機関では LC-FD (ポストカラム誘導体化 HPLC) での検査記録があった。LC-MS/MS だけ

は5機関で、1機関がイオンペア試薬を用いた逆相系1機関、HILIC系が3機関でイオンペアからHILICに移行したのが1機関あった。イオンペアによる検査は平成10年代に多く、平成20年以降はすべてHILICによる検査であった。

魚種(推定や疑いも含む)で多かったのはマフグ19個体29検体、コモンフグ15個体33検体、ヒガンフグ11個体24検体、ショウサイフグ5個体12検体、トラフグ3個体6検体、シロサバフグ6個体7検体、ドクサバフグ3個体8検体で、その他ゴマフグ、クロサバフグ、カナフグ、センニンフグ、モヨウフグ、シッポウフグ等があった。また、トラフグ属として報告のあったものが1個体2検体、魚種不明が41個体65検体あった(表1-19)。なお、種同定は残品等の形態に基づくものが多いが、ほとんどが同定法についての記載は無かった。1機関では等電点電気泳動、3機関でmtDNA解析による同定がされていた。なお、ショウサイフグ(推定)とシッポウフグ(患者証言による)の2検体については試料が保管されており、遺伝子解析による種の確認が可能である。

部位別では、筋肉79検体、肝臓38検体、皮と卵巣が各22検体であった(表1-20)。

原因食品に含まれていた、もしくは未調理品のフグ試料の毒力は、不検出～猛毒まで幅があった(表1-21)。フグ毒(マウス毒性試験法)もしくはTTX(機器分析)が検出されなかったのは57検体、10MU/g未満の「無毒」が24検体、「弱毒」が71検体、「強毒」が52検体、「猛毒」が14検体であった。これらの原因食品には複数の個体や部位が含まれていることもあり、精査が必要であるが、「弱毒」や「無毒」(不検出を含む)が67%を占めていた。

② 地方衛生研究所による毒性試験の成果

全国の地方衛生研究所の協力により、9種693個体(うち10個体は種不明)のデータが提供された(表1-22)。最も多いのがナシフグ526個体(76%)で、シロサバフグ51個体、トラフグ36個体、ショウサイフグ24個体、クロサバフグ24個体、コモンフグ12個体と続いた。

筋肉は575個体の検査結果が得られた。内訳は表1-23に示したとおりで、すべての個体が「無毒」であった。

皮はナシフグ、シロサバフグ、クロサバフグなど130個体の検査結果が得られた(表1-24)。ナ

シフグ214個体のうち「強毒」39個体、「弱毒」105個体で、「無毒」は70個体であった。トラフグ9個体、シロサバフグ30個体、クロサバフグ21個体はすべて「無毒」で、コモンフグ1個体が「弱毒」であった。

肝臓はシロサバフグ28個体、クロサバフグ21個体、コモンフグ1個体の計50個体で、すべて「無毒」であった(表1-25)。

卵巣はシロサバフグ28個体、クロサバフグ19個体、ナシフグ2個体、コモンフグ1個体種不明1個体の51個体の検査結果が得られた(表1-26)。コモンフグと種不明の各1個体が「強毒」、ナシフグ2個体とシロサバフグ1個体が「弱毒」で、シロサバフグ27個体とクロサバフグ全個体は「無毒」であった。

精巣はナシフグ84個体、コモンフグ1個体、クロサバフグ2個体の87個体の検査結果が得られ、すべてが「無毒」であった(表1-27)。

II. フグの分類に関する研究

形態に基づく分類

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、大学及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、鰭条数及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、役立つ。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事が判明した。

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%が分布している事が明らかとなった。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猛毒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及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。

この結果、日本には以下の7種が出現することが明らかとなった：クロサバフグ *L. cheesemanii*、カナフグ *Lagocephalus inermis*、クマサカフグ *L. lagocephalus*、ドクサバフグ *L. lunaris*、シロサバフグ *L. spadiceus*、センニンフグ *L. sceleratus*、カイユウセンニンフグ *L. suzensis*。

クロサバフグは Abe and Tabeta (1982) によって静岡県等から得られた標本に基づいて *Lagocephalus gloveri* という学名の下に新種として発表された。一方、ニュージーランドおよびオーストラリア東岸沖から *Lagocephalus cheesemanii* (Clarke, 1897) というサバフグ属のフグが知られている。オーストラリア博物館とニュージーランド博物館から *L. cheesemanii* の標本を借用して、*L. gloveri* のタイプ標本と比較したところ、形態学的に相違がないことが明らかとなった。さらに、オーストラリア博物館と CSIRO から *L. cheesemanii* の組織サンプルを入手して日本産のクロサバフグと遺伝子を比較したところまったく差が見られなかった。したがって、Abe and Tabeta (1982) が新種として発表した *L. gloveri* は *L. cheesemanii* のシノニムであり、クロサバフグの学名には *L. cheesemanii* を適用することとなる。

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2-1)。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 (Matsuura, 2015) に発表した(図2-2)。

④ トラフグ属の雑種個体の形態的研究

茨城県周辺、宮城県周辺、日本海および長崎県周辺から得られたトラフグ属の雑種を調査した。茨城県と宮城県から得られた個体は、体色からシウサイフグの雑種と判断された。シウサイフグでは臀鰭は白いが、今回調査した個体では臀鰭はすべて黄色であり、シウサイフグとは異なっていた。また、シウサイフグは体表に小棘がなく、滑らかであるが、宮城県の個体の体背部(胸鰭上方から両眼の間まで)には小棘があり、シウサイフグとは異なっていた。

宮城県から得られた他の個体はマフグの若魚に似た色彩をもつが、マフグに見られる胸鰭後方の大黒斑がない。また、体の模様が全体として不鮮明であり、雑種に見られる特徴が現れていない。

日本海から得られた個体は背鰭前方の体背部と腹面に小棘をもつこと、胸鰭後方の大黒斑を含む体全体の色彩によってトラフグの雑種と判断される。トラフグとマフグの雑種である可能性があるが、他の種との雑種の可能性もある。

日本海から得られた他の個体では胸鰭後方の大黒斑に白い縁取りがあり、トラフグに似ている。しかし、体の腹側面に1本の黄色縦線が走り、臀鰭が黄色であり、トラフグとは異なる。これらの色彩はマフグに見られるが、体の模様はマフグとは明らかに異なる。また、体背部と腹面に小棘を持つこともマフグとは異なる。トラフグとマフグの雑種である可能性が高いが、他の種との雑種という可能性も否定できない。

長崎県から得られた個体は胸鰭後方に大黒斑を有し、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。

遺伝子解析による種判別

交雑フグ種 7 種 10 個体につき、ミトコンドリア DNA 塩基配列に基づく母系種の同定を行った結果、形態学的鑑別法による推定どおりの結果であったものは 5 種 8 個体であり、2 種(ショウサイフグ×コモンフグの 1 個体およびコモンフグ×ムシフグの 1 個体)については形態学的鑑別法による推定と異なった(表 2-3)。

人工交配フグ種(トラフグ(♀)×マフグ(♂)およびトラフグ(♂)×マフグ(♀))の外観は、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、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った(図 2-3)。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 2-4)。

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 2-5、図 2-4)。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 2-5)。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 2-6)ことから、トラフグ(♀)×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

I. フグの毒性に関する調査研究

各種フグおよび交雑種フグの既得毒性データ

前述のとおり、トラフグでは皮と精巣で「弱毒」(10-100 MU/g)を示す個体がみられた。本種は成長段階によって毒の体内動態が異なり、肝臓が未発達の天然稚魚では、しばしば皮から微量の TTX が検出される。しかしながら、毒投与実験において肝臓が発達した個体では皮への移行毒量が僅少となること、皮は湯がいて食するため、その過程で毒が(もしあっても)かなり減少すると考えられること、1 回の摂食量も筋肉よりはるかに少ないこと、これまでにトラフグの皮による中毒例がないこと、などから、現時点で問題視する必要はないものとする。一方、精巣が「弱毒」であった個体は、雌雄同体で、卵精巣と精巣を取り違えた可能性がある。他方、マフグでは、筋肉と精巣から「弱毒」が検出された。本種は皮が「強毒」、肝臓と卵巣が「猛毒」(> 1000 MU/g)であるため、凍結・解凍により、これらの部位から毒が筋肉や精巣に移行した可能性がある。今後、そのような毒の部位間移行についても検討する必要がある。シロサバフグでは、肝臓から微量の毒が検出された。サバフグ類は形態が酷似しているため、今後は遺伝子型の確認を行った上で毒性を調査する必要があるかもしれない。

交雑種フグでは、シマフグ×トラフグの皮から「弱毒」が検出された。前述のとおり、トラフグは皮に微量の毒をもつ場合があり、それを反映したものと推察される。一方、マフグ×ゴマフグ、マフグ×トラフグおよびトラフグ×マフグでは、筋肉から毒が検出された。今回の試料はいずれも冷凍保存されていたものであり、マフグの場合同様、凍結・解凍による毒の部位間移行について検討する必要がある。

アカメフグおよび天然交雑種フグの毒性

前述のとおり、本実験に供したアカメフグは肝

臓、消化管、および卵巣が「強毒」、皮、筋肉、および精巣が「弱毒」の範疇であった。「日本産フグの毒力表」と比較すると、筋肉、消化管、および精巣の毒量が同毒力表を上回っており、特に「無毒」とされていた筋肉と精巣から「弱毒」に相当する毒が検出された点は注視に値する。今回の試料は、実験に用いるまで数年間凍結保存されていたこと、また肝臓や卵巣が「強毒」を示したことから、凍結・解凍により毒が高毒性部位から筋肉や精巣に移行した可能性がある。今後、この点についても検討する必要がある。

天然交雑種フグでは、1 個体のみで毒が検出され、26 個体はいずれの部位も検出限界未満であった。有毒個体は、外見的特徴からマフグ、トラフグ、シヨウサイフグのうちのいずれか 2 種が両親種である可能性が高い。いずれの部位の毒性も、これらのフグの範疇を超えることはなかったが、「無毒」ではあるものの筋肉から 5 MU/g の毒が検出されている点には注意すべきであろう。天然交雑種フグも、アカメフグ同様、冷凍保存した試料であることから、凍結・解凍による毒の移行について検討する必要がある。

人工交雑種フグへの TTX 投与実験

マトラ 2 ヶ月齢魚への TTX 注射投与実験において、試験魚は最高でも投与した毒の 20% 程度しか毒を蓄積していなかったにもかかわらず、投与 24 および 96 時間後に筋肉から毒が検出された。先行研究において、トラフグ 4 ヶ月齢魚への TTX 注射投与試験では、投与 4 時間後以降に筋肉から毒は検出されていない。また、マトラとは両親種の組み合わせが異なる人工交雑種フグ、トラマ 8 ヶ月齢魚への TTX 注射投与試験においても、投与 24 時間以降、筋肉に毒は検出されなかった。一方、天然マフグの筋肉に毒性が認められた例（未発表）もあり、マフグやマフグ交雑種フグの筋肉の毒蓄積能については、今後も検討していく必要がある。

マトラ 8 ヶ月齢魚への TTX 経口経管投与実験では、試験魚は最終的に投与した毒の約 50% を蓄積した。毒の移行については、トラフグ等への投与実験と同様に、肝臓の蓄積率が減少するのに伴って、皮の蓄積率が増加した。一方、先行研究で行ったトラマ 8 ヶ月齢魚への TTX 経口経管投与実験では、投与 120 時間後まで肝臓の蓄積率が 25% を下らず、また皮での蓄積が認められたのは

投与 72 時間後からであった。すなわち、両親種が入れ替わった交雑フグの間では、毒の体内動態や各部位の毒蓄積能が異なる可能性がある。他方、トラフグにおいて、成長段階の違いが体内における毒の分布に影響することが報告されている。実験に供したマトラと先行研究のトラマはいずれも 8 ヶ月齢ではあるものの、それぞれ 48.5 ± 7.8 g、 231 ± 28 g と体格に大きな相違がみられ、成長段階（あるいは成熟段階）が異なっていた可能性がある。今後はこの点についても考慮する必要がある。

海産フグ 2 種への PSP 投与実験

トラフグへの毒投与実験において、TTX 投与区では投与した毒の 50% 程度を体内に蓄積したのに対し、PSP 投与区ではいずれの部位からも PSP は検出されなかった。これまでに天然トラフグから PSP が検出された例はなく、少なくとも未成熟のトラフグには PSP 蓄積能はほとんどないものと推察された。

ヒガンフグの場合、未成熟群では実験期間を通して投与した PSP の大半が消化管に残存しており、PSP をほとんど体内に取り込まないことが示唆された。一方、成熟群では、PSP の一部を一旦体内、特に肝臓に取り込むが、短時間で排泄もしくは分解し、卵巣以外の部位にはほとんど蓄積しないものと推察された。また、肝臓や卵巣に取り込まれた毒のほとんどは STX であり、成分による取り込みの選択性が存在する可能性がある。

三重県産フグ類の毒性

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 1-6）、卵巣が 1220 MU/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（ >10 MU/g）で、有毒個体出現率は 85.7%、毒性分布は 29~1220 MU/g となり、毒性レベルで分けると、「猛毒」（ >1000 MU/g）2 個体、「強毒」（100~999 MU/g）7 個体、「弱毒」（10~99 MU/g）3 個体、「無毒」（ <10 MU/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 935 MU/g の毒性を示し、シヨウサイフグの 1 検体が 120 MU/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 11~27 MU/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 500 MU/g(ショウサイフグ)で、「強毒レベル」は 3 個体 (マフグ 349 MU/g、140 MU/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 (263 MU/g)、ショウサイフグ (159 MU/g)、マフグ (127 MU/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 447 MU/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 129 MU/g と 153 MU/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、ナシフグ、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 17 MU/g であった。

精巢は、10 個体中 1 個体 (ショウサイフグ) から 11 MU/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巢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 10~11 MU/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。

交雑種フグの毒性と毒成分

トラフグ類似の交雑種フグでは、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、1 個体の精巢から毒性 (32.6 MU/g) が検出されたが、トラフグとマフグはともに精巢は「無毒」とされている。トラフグあるいはその交雑種フグの精巢の毒性については今後精査する必要がある。さら

に、消化管で 1070 MU/g の毒性が検出されたことは特筆すべき結果で、過去に報告された両種の最強毒力を上回った。この原因が交配によるものかわからないが、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、再度毒性試験結果を評価する必要がある。

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。

また、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。今回測定したトラフグ類似フグに関しては、毒成分組成に組織による差はないことがわかった。

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、ハリセボン、ヒトツラハリセンボン、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。

東北地区のフグの毒性

フグ毒の本体はテトロドトキシンとその誘導体 (TTXs) とされてきたが、フグの産地や種類によっては、麻痺性貝毒 (PSPs) を主要な毒成分とすることもある。フグに蓄積されるこれらの毒の来源は未だ完全には明らかにされていないものの、餌生物を含む生息海域の環境が大きく影響すると考えられる。

本研究ではまず、Kodama ら (1984) の調査から 25 年以上が経過した 2009 年に採取した三陸産のコモンフグが依然として高い毒性を有していることを明らかにした。加えて、2014 年に三陸沿

岸で採取したコモンフグとヒガンフグ、ならびにショウサイフグの3種の毒含量を調べ、高い頻度で筋肉の毒性が基準値を大幅に超過していることを確認した。すなわち、2011年の東日本大震災後も、これらフグ類の毒性は食用不可の高いレベルにとどまっており、大津波による海域の攪乱が、フグ類の毒性には変化をもたらしていないことが明らかとなった。一方、秋田県産ショウサイフグの筋肉には、調べた限りで基準値 10 MU/g を上回る毒性は検出されなかった。今後、日本海側で漁獲されるショウサイフグ以外のフグ類についても、調査を実施する必要がある。

HILIC-MS/MSによるTTXの分析法検討

HILIC系のカラムを用いることで、汎用性の高い分析法を確立できた。本法は、イオンペア試薬などの機器に影響を与えることもなく、15分以内の比較的短時間に分析することができる。そのため、繰り返し測定が可能になるなど、現実的に信頼性の高い分析が可能となる。

なお、本分析法は、クロサバフグ筋肉を対象とした添加実験で、妥当性が確認され、サザナミフグおよびヨリトフグ筋肉への添加実験で適用性が確認された。

沖縄産フグの毒性試験

クロサバフグとヨリトフグの筋肉は、通知により「処理等によりヒトの健康を損なう恐れがないと認められる」とされており、本研究においてもそれが再検証された。

センニンフグ、モヨウフグ属の各種およびオキナワフグはリストへの掲載もなく、「食用不可」である。オキナワフグ(70%)、コクテンフグ(63%)は有毒個体出現率が高く、「強毒」個体も確認されている。

一方、モヨウフグ、ケショウフグ、ホシフグおよびアラレフグは、全個体が「無毒」であった。特にモヨウフグは大型のフグで、沖縄県において“無毒フグ”として自家消費されているとの情報もあり、今後の調査研究により食用魚としての位置づけの可能性もありうる。ホシフグやアラレフグについては、供試個体数が少ないため、さらなる調査が必要と思われる。

II. フグの分類に関する研究

形態に基づく分類

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通じて、クロサバフグが南半球にも分布することが明らかになり、本種の学名には南半球の種に使用されていた *Lagocephalus cheesemanii* を適用すべき事が明らかになった。サバフグ類はインド・西太平洋に広く分布する種が多いため、今後、外国産の標本との比較を行い、サバフグ属全体の分類を確立する必要がある。

トラフグ属の雑種と思われる標本を検討したところ、ショウサイフグ、マフグおよびトラフグが関与した雑種であると判断できた。今後、遺伝子解析によって両親種を検討する必要がある。また、トラフグ属の雑種は茨城県、宮城県、日本海および長崎県から得られたので、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。

遺伝子解析による種判別

トラフグ×クサフグ1個体およびトラフグ×マフグの交雑種2個体は、体表の小棘や斑紋の形状、体側中央の白点および黄色縦帯の形状から、両親種をトラフグおよびクサフグあるいはマフグと推定した。ミトコンドリアDNA解析法によりトラフグ×クサフグ1個体およびトラフグ×マフグ2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推定が正しいことが確認された。

トラフグ×シマフグの交雑種1個体は、不規則な斜め模様と大黒斑がトラフグとシマフグの間を示し、白い臀鰭がトラフグの特徴を示していたため、両親種をトラフグおよびシマフグと推定した。ミトコンドリアDNA解析法では母系種がシマフグと同定され、本個体においても形態学的鑑別法による推定が正しいことが確認された。

ショウサイフグ×コモンフグの交雑種3個体は、背面および腹面の小棘はコモンフグ、体表の斑紋はショウサイフグ、黄白色の臀鰭は両者の中間をそれぞれ示していたため、両親種をショウサイ

イフグおよびコモンフグと推定したが、ミトコンドリア DNA 解析法によって母系種を同定した結果、1 個体はゴマフグ、2 個体はショウサイフグとの判定結果が示され、形態学的鑑別法と一部異なる結果となり、形態学的鑑別が必ずしも完全ではない場合があることが示唆された。

コモンフグ×ムシフグの交雑種 1 個体においても、体表における円形・虫食い状の模様からコモンフグとムシフグの中間雑種と推定したが、ミトコンドリア DNA 解析法による母系種がシマフグと同定され、形態学的鑑別法と異なる結果となった。

ショウサイフグ×ゴマフグおよびショウサイフグ×マフグの交雑種 2 個体は、小棘の分布および体表の斑紋によってショウサイフグとゴマフグあるいはショウサイフグとマフグの中間と推定されたため、それぞれショウサイフグ×ゴマフグおよびショウサイフグ×マフグの雑種と推定した。ミトコンドリア DNA 解析法ではそれぞれ母系種がゴマフグおよびショウサイフグと同定された。

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やトラフグとシマフグの雑種のように、従来から存在が知られ、両親種の間隔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が可能であり、ミトコンドリア DNA 解析法によってその推定が支持されたが、ゴマフグとショウサイフグの雑種のような両親種の間隔的な特徴を示さないものや、外部形態から両親種を推定することが困難なもの、あるいは過去の類似事例の知見が適用できないものが存在することが明らかとなった。したがって、報告や事例の蓄積が十分とは言えない交雑種に関しては、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ると思われる。

人工交配フグ種（トラフグ（♀）×マフグ（♂）およびトラフグ（♂）×マフグ（♀））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、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（♀）×マフグ（♂）個体およびト

ラフグ（♂）×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

I. フグの毒性に関する調査研究

各種フグならびに自然交雑種フグの毒性

本研究により、4 種のフグおよび 2 タイプの交雑種フグで、一部の部位の最高毒力が「日本産フグの毒力表」、もしくはそこに記載された両親種の毒力を上回るような毒性を示すことがわかった。また、有毒交雑種フグ 1 個体の筋肉から、「無毒」の範疇ではあるものの、5 MU/g 程度の毒が検出された。これらの毒性データについては、卵精巣と精巣を取り違えた可能性、あるいは凍結・解凍により高毒力部位から他の部位に毒が移行した可能性のあるケースもあり、さらなる検証が必要と思われる。

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