

201522031A

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

マリントキシンのリスク管理に関する研究

平成27年度 総括・分担研究報告書  
(H27-食品-一般-009)

研究代表者 長島裕二

平成28 (2016) 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

マリントキシンのリスク管理に関する研究

平成27年度 総括・分担研究報告書  
(H27-食品-一般-009)

研究代表者 長島裕二

平成28 (2016) 年5月

目 次

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| I. 総括研究報告                       |    |
| マリントキシンのリスク管理に関する研究             | 1  |
| 長島裕二                            |    |
| II. 分担研究報告                      |    |
| 1. コモンフグの毒性試験および食中毒調査           | 13 |
| 大城直雅                            |    |
| 2. 東北沿岸産フグ類の毒性                  | 18 |
| 佐藤 繁                            |    |
| 3. フグの毒性評価と有毒巻貝の種判別             | 22 |
| 長島裕二                            |    |
| 4. フグ毒検査法の見直しとパリトキシン様毒検出・定量法の開発 | 33 |
| 荒川 修                            |    |
| 5. フグ類の分類学的研究                   | 43 |
| 松浦啓一                            |    |
| 6. フグの分類に関する研究（遺伝子解析）           | 48 |
| 石崎松一郎                           |    |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表             | 54 |

## 研究要旨

マリントキシンのリスク管理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、Ⅱ. マリントキシン検査法に関する研究、Ⅲ. フグと有毒巻貝の分類に関する研究を実施した。

### Ⅰ. フグの毒性に関する調査研究

コモンフグが原因と疑われるフグ食中毒が発生したため、緊急課題として日本各地のコモンフグの毒性を調査した。サンプリングの都合上、凍結試料で測定した結果、筋肉の毒性が 10 MU/g を超えるものがみられた。しかし、これらの個体は皮の毒性が著しく高いこと、フグ毒は凍結・解凍によって組織間を移行することがあるので、この場合も、凍結・解凍によって毒が皮から筋肉に移行した可能性が考えられた。次年度は、活魚や鮮魚のコモンフグの毒性を調査するとともに、凍結・解凍による有毒部位から筋肉への毒の移行について検討する必要がある。また、皮の毒力が谷博士の「日本産フグの毒力表」を上回っていたため、コモンフグ皮の毒力を“猛毒”レベルに変更して、リスク管理を強化する必要がある。

2014 年に社会問題になったしらす加工品へのフグ稚魚の混入に関して、しらす加工品に混入したフグ稚魚の種と毒性を調べた。2014 年に収集した試料では、産地によらずシロサバフグの稚魚が主で、一部ナシフグ稚魚が混入していたが、TTX 含量は定量下限値 (30 ng/g) 未満であった。しらす加工品への混入率も考え合わせると、フグ稚魚が混入したしらす加工品による健康被害への影響はないと考えられた。しかし、しらす加工品の安全性確保のため、今後も継続して調査を続ける必要がある。

フグによる食中毒に特化した調査票（案）を作成した。倫理審査を経て厚生労働省や自治体等の関係機関の協力を得て、本調査票による食中毒調査についての試行を行い、情報の集積と解析を行う予定である。

### Ⅱ. マリントキシン検査法に関する研究

フグ毒とパリトキシン (PTX) 様毒の検査法について検討した。フグ毒検査は、現行のマウス検定法を機器分析やイムノクロマト検査法へ移行する必要がある、まず、フグ毒抽出法を参考法と簡便法で比較した。参考法では毒の抽出が十分ではなく、毒性を過小評価していることが懸念される。抽出操作を考慮すると、毒性調査には簡便法の方が適していると判断された。機器分析の際の問題点の一つとして、試料由来の夾雑物の影響があるが、LC-MS 分析においては、適切な抽出と希釈操作を行うことにより、試料由来マトリクス存在下でも十分な精度で TTX を分析可能であることが示された。

マウス検定法に代わるフグ毒検査法として、イムノクロマト法に基づく市販の TTX rapid test kit について、検出感度、反応特異性、マトリクスの影響ならびにコモンフグ抽出液に対する検査を実施し、評価を行った。TTX 標準品では、プロトコール通りの結果が得られたが、TTX 誘導体とも反応し、トラフグ組織抽出液中のマトリクスの影響が大きいいため、フグ毒検査には課題があることがわかった。より精度の高いフグ毒検査を行うには、抗体の特異性を改善する必要がある。

PTX/PTX 様毒検出・定量法の開発に関しては、特異性や安定性、感度の点で問題はあるものの、ラットの培養筋細胞を用い、培地に放出される酵素の活性を指標として PTX を検出・定量する系を確立することができた。本法は、さらに改良を加えていくことにより、PTX 様毒中毒の特徴である横紋筋融解を指標とした PTX 様毒検出・定量法の開発に発展する可能性がある。

### III. フグと有毒巻貝の分類に関する研究

フグ類の分類学的研究に関しては、日本およびインド・西太平洋のモヨウフグ属を詳細に研究した結果、新種を含む 14 種が分布していることが明らかになり、このうち日本から 12 種が記録されたことになり、日本近海のフグ類の多様性の高さが改めて明らかになった。今後、毒性調査を行い、モヨウフグ属のリスク評価をする必要がある。日本産トラフグ属の分類学的再検討によって、クサフグやコモンフグの分類学的問題があること、コモンダマシはコモンフグと同種であることが明らかになった。フグの分類は、フグ食の安全確保、フグ食中毒のリスク管理の基本となるので、さらに分類学的調査を進め、食用対象となるフグ類について整理していく必要がある。

#### 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 |
| 石崎松一郎 | 東京海洋大学大学院学術研究院・准教授     |
| 大城 直雅 | 国立医薬品食品衛生研究所・室長        |
| 佐藤 繁  | 北里大学海洋生命科学部・教授         |
| 松浦 啓一 | 国立科学博物館・名誉研究員          |

煩雑で効率が悪く、この点の改良と、より正確な機器分析あるいは簡便迅速なイムノクロマト検査法を検討する必要がある。

フグの毒性は種によって著しく異なるため、フグの種判別は食中毒防止の重要管理項目である。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。その上、近年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、正確なフグ判別の重要性和必要性がますます高くなっている。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、混獲量も少ない。交雑フグについては、前記厚生労働省通知の中で「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。

巻貝に関しては、フグ毒以外にも麻痺性貝による毒化やテトラミン中毒も食品安全確保に対するリスクとなっている。巻貝は魚類以上に外観などから形態分類が難しい上、むき身として調理加工された場合には判別が不可能で、食中毒の原因食品が特定できない。

こうした状況のもと、本研究では、マリントキシンのリスク管理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、II. マリントキシン検査法に関する研究、III. フグと有毒巻貝の分類に関する研究を行った。

#### A. 研究目的

食中毒を起こすフグ毒、シガテラ毒、貝毒等のマリントキシンは、人の健康危害因子として重要である。中でもフグ食中毒は、わが国の魚貝類による自然毒食中毒で最も多く発生し致死率が高い。このため、厚生労働省通知で食用可能なフグの種類、部位、漁獲海域を定め、都道府県条例等でフグ取り扱いの施設と人を制限してリスク管理しているが、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食中毒の発生、フグの高毒性化、フグ毒以外にも麻痺性貝毒やパリトキシン様毒によるフグ食中毒の発生、フグ稚仔魚の混入も食品安全にかかわる問題となっている。また、巻貝によるフグ毒中毒も散発的に発生し、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、見直す必要がある。しかしながら、その前提となるフグの毒性を調べるための現行の検査法、すなわち食品衛生検査指針理化学編に記載のマウス検定法（参考法）は、抽出操作が

## B. 研究方法

### I. フグの毒性に関する調査研究

#### 1) コモンフグの毒性調査

2015年10月～2016年1月に有明海で採取されたコモンフグ12個体、2015年6月に山口県で採取された14個体、2015年10月に京都府、石川県、東京湾でそれぞれ採取された6個体、5個体、7個体の合計44個体は、いずれも凍結してから毒性試験に用いた。これとは別に、2015年11月に東京湾で採取されたコモンフグ鮮魚10個体も用いた。これらは、マウス検定法で毒性試験を行った。マウス試験は、所属機関の実験動物委員会等の承認を受け、動物実験等取扱規則などを順守して実施した。

瀬戸内海産コモンフグ試料（凍結試料）49個体について、筋肉のテトロドトキシン（TTX）含量をLC-MS/MS法で定量した。

2015年5～11月に岩手県大船渡魚市場に水揚げされたコモンフグ40個体（凍結試料）はHPLC-蛍光検出法で分析し、抽出液中のテトロドトキシン関連成分（TTX、4-エピTTX、4,9-アンヒドロTTX）含量を求めた。

#### 2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

2014年7～9月に水揚げ、生産されたしらす加工品に混入し、現地加工場等において外観からフグと推定された稚魚を試料とした。同一の加工場等で同じ日に処理されたものを1つのロットとし、17ロットを実験に供した。ロット毎に、形態分類で同一種と判断されたフグ稚魚から1個体ずつ選抜し、ミトコンドリアDNA（mtDNA）による種判別を行った。

TTXの定量には、上記の種判別と同ロットに含まれる試料を用い、形態分類で同一種と判断されたフグ稚魚を複数個体合一して、TTX分析用試料とした。TTXの定量はLC-MS/MS法で行った。

#### 3) フグ食中毒事例の調査

現在、各自治体で使用されている食中毒調査票では、自然毒食中毒に特徴的な症状を取りこぼす可能性がある。また、原因物質に対するリスク管理が適切であるか判断するためにはリスク評価が必要である。そこで、フグ食中毒のリスク評価に適した調査票の作成について検討した。

### II. マリントキシン検査法に関する研究

#### 1) フグ毒抽出法の検討

トラフグ肝臓2個体を試料とし、それぞれ参考法と簡便法による測定値を比較した。参考法として、試料に2.5倍量の0.1%酢酸を添加して加熱抽出し、残渣を除いた抽出液と残渣の洗液を合わせ、最終的に試料の5倍量に定容して試験液とした。肝臓2個体中1個体については、試料に5倍量の0.1%酢酸を添加し、最終的に10倍量に定容する方法も実施した。一方、簡便法としては、試料に1、2、4および5倍量の0.1%酢酸を添加して加熱抽出後、混合液をそれぞれ2、3、5および6倍量に定容して遠心分離後の上清を試験液（それぞれ抽出比2、3、5および6）とした。いずれも連数3で調製し、HPLC-蛍光検出法でTTX量を測定した。

#### 2) LC-MSにおける試料由来マトリクスの影響

養殖トラフグの無毒肝臓を試料とした。試料重量1に対し、0.1%酢酸重量1、2、5倍量を添加して加熱抽出し、無毒の1:1抽出液、1:2抽出液、1:5抽出液を調製した。各抽出液に既知量のTTX標品を添加して標準添加法による標準溶液10MU/mLを調製し、表示濃度を10MU/mLとした。これを0.1%酢酸で5倍、10倍、20倍に段階希釈して、表示TTX濃度2、1、0.5MU/mLの希釈溶液を調製した。以上の標準溶液と希釈溶液（連数3）につき、TTX標品の0.1%酢酸溶液を外部標準としてLC-MSでTTX量を測定し、表示濃度に対する測定値の比率を求めて回収率とした。

#### 3) 市販TTX検査キットの評価

TTX検査キットにはTTX rapid test kit（Lot:20150716、Wuhan Unibiotest Co., Ltd.）を用い、TTX標準品は和光純薬製テトロドトキシンを用いた。テトロドトキシン（TTX）1mgを含むアンプルに0.1%酢酸溶液1mLを加えて溶解し、これをTTX標準原液とした。適宜希釈してTTX標準液を各種濃度に調製し、100μLをTTX rapid test kitに塗布した。

本キットの反応特異性を調べるため、キンシバイからTTX精製法に従って精製したoxoTTXとtrideoxyTTX、麻痺性貝毒は、National Research Council CanadaのCertified Reference Materials Programで提供されているCRM-GTX1&4-c、CRM-GTX2&3-c、CRM-dcGTX2&3-cを用いた。

マトリクスの影響を調べるため、無毒の養殖トラフグ（3歳魚、活魚）から、組織抽出液を調製し、

TTX 標準原液を組織抽出液で適宜希釈して TTX 溶液を調製した。

大船渡魚市場に水揚げされたコモフグの筋肉および肝臓の抽出液を用いて、TTX 検査キットに対する反応を検討した。

#### 4) パリトキシン (PTX) /PTX 様毒検出・定量法の開発

SD 系ラットの下肢より骨格筋を採取し、細切、酵素処理等を経て筋芽細胞を得た。さらに、筋芽細胞を筋管細胞へ分化・成長させ、拍動能をもたせた(以後、この状態の細胞を「筋細胞」と称す)。得られた筋細胞に 1~1000 ng/mL の PTX 標品を暴露し、6~48 時間インキュベート後、経時的に光学顕微鏡にて細胞形態を観察するとともに、臨床化学自動分析装置(アークレイ)および乳酸脱水素酵素(LDH)測定キット(TaKaRa)により、それぞれ培地中に放出されたクレアチンホスホキナーゼ(CPK)および LDH の活性を測定した。

一方、2009 年沖縄県西表島で採取したイワスナギンチャク *Palythoa tuberculosa* および 2011 年 3 月に宮崎県延岡市で発生したアオブダイ中毒の原因食品残品(肝臓および筋肉)から Noguchi ら(1987)の方法に準じて PTX/PTX 様毒試験液を調製し、PTX 標品と同様の方法で筋細胞への暴露試験を行った。

### III. フグと有毒巻貝の分類に関する研究

#### 1) フグ類の分類学的研究

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を調査するとともに、魚類研究者の協力を得て新たな標本を入手した。新たに得られた標本はカラー写真を撮影した後、10%ホルマリンで固定し、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体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を撮影した。

#### 2) 遺伝子解析によるフグ種判別

試料には人工交配フグ種(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、人工交雑種の両親、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマ

フグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 4 個体を用いた。

トラフグおよびマフグにおいて種特異的なマイクロサテライトマーカーを探索することを目的に、両親種が既知である人工交雑種およびトラマの両親を対象に、計 11 個のマイクロサテライト領域を標的として PCR を行い、トラフグおよびマフグの 2 種を明確に区別しうるマイクロサテライトの選抜を行った。その後、判別に適用可能なマイクロサテライトマーカーにおける PCR 条件の最適化の検討および PCR 産物の塩基配列解析に基づくマイクロサテライトの反復回数を決定したのち、最終的にトラフグ 26 個体およびマフグ 20 個体を用いて、再現性の検証を行った。さらに、自然交雑種を用いて本マイクロサテライトマーカーの有効性を検証した。

#### 3) 有毒巻貝の種判別

フグ毒またはテトラミンをもつ有毒巻貝を正確に同定するため、mtDNA 中の部分領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法で解析することとした。そのため、有毒巻貝を含む巻貝 7 科 41 種の mtDNA の 16S rRNA 領域の塩基配列情報を Gene Data Bank で調査した。塩基配列から、多くの巻貝に共通し、しかも種間の変異がみられる領域を選び、特異プライマーを設計し、PCR 条件を検討した。

試料には、エゾバイ科 9 種、テングニシ科 1 種、イトマキボラ科 1 種と市販加工品を用いた。筋肉から全ゲノム DNA を抽出し、それを鋳型にして、設計したプライマーと Ex Taq polymerase (タカラバイオ)を用いて PCR 増幅を行った。得られた増幅産物をアガロースゲル電気泳動に付し、目的のバンドを切り出し、それを遺伝子抽出カラムで精製して、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を解析した。

### C. 研究結果

#### I. フグの毒性に関する調査研究

##### 1) コモフグの毒性調査

有明海産コモフグ(凍結試料) 12 個体の毒性は、皮 84~2,398 MU/g、肝臓 3~2,402 MU/g、卵巣 48~1,644 MU/g と高く、いずれも最高毒性値は“猛毒”(1,000 MU/g 以上)レベルであった。一方、筋肉は 3~98 MU/g、精巣は 5~81 MU/g で“弱毒”レベルにとどまった。筋肉の有毒個体出現率

(ここでは 10 MU/g 以上を‘有毒’とする)は 58% (12 個体中 7 個体)であった。

山口県 (14 個体)、京都府 (6 個体)、石川県 (5 個体)、東京湾 (10 個体)で採取されたコモフグ (凍結試料)でも同様の結果が得られ、各組織の毒性値は、皮 8.0~2,290 MU/g、肝臓<5~1,270 MU/g、卵巣<5~977 MU/g、消化管<5~590 MU/g、筋肉<5~60.8 MU/g であった。筋肉の有毒個体出現率は 41% (32 個体中 13 個体)であった。精巣は 3 個体と検体数が少ないが、毒性は検出されなかった (10 MU/g 未満)。一方、凍結していない生鮮コモフグ (10 個体)の毒性は、卵巣 466~3,540 MU/g、肝臓 14.0~422 MU/g、皮 6.4~44.1 MU/g であったが、筋肉と精巣からは毒性は検出されなかった (5 MU/g 未満)。

瀬戸内海産コモフグ試料 (凍結試料) 49 個体の筋肉試料について LC-MS/MS による TTX 分析を実施した結果、<1~34 MU/g 相当の TTX が検出された。筋肉の有毒個体出現率は 8% (49 個体中 4 個体)であった。

岩手県大船渡魚市場に水揚げされたコモフグ (凍結試料) 40 個体の筋肉から最高値 230 MU/g (平均値±標準偏差 25.6±6.1 MU/g)相当の TTX 関連成分が検出され、筋肉の有毒個体出現率は 65% (40 個体中 26 個体)であった。

## 2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

mtDNA 16S rRNA 部分領域 (約 600 bp) の塩基配列解析の結果、15 個体はシロサバフグ *Lagocephalus spadiceus* (Accession No. AP009538) の塩基配列と 100%一致した。一方、トラフグ属と判別された 2 個体は、16S rRNA 部分領域とシトクロム b 部分領域 (約 500 bp) の塩基配列解析から、ナシフグ *Takifugu vermicularis* と判別した。

シロサバフグと判別された試料から TTX は検出されず (10 ng/g 未満)、ナシフグと判別された試料の TTX 含量は定量下限値 (30 ng/g) 未満であった。

## 3) フグ食中毒事例の調査

食中毒事例を基に最小毒性量 (LOAEL) を求め、急性参照用量 (ARfD) を推定し、現行のフグ毒性値 (10 MU/g) がリスク管理として適切であるかを評価するために必要な情報として、患者の体重、原因食品の摂取量、原因食品中の TTX の濃度等が挙げられる。フグ中毒に特有な症状を把握し、臨

床像を詳細に把握するために、これらの症状を質問項目として反映させた調査票 (案) を作成した。

## II. マリントキシン検査法に関する研究

### 1) フグ毒抽出法の検討

参考法で 138 MU/g と測定された肝臓については、簡便法の測定値 (参考法の測定値に対する相対値) は 0.98~1.20 で、抽出比が高いほど高かった。参考法で 184 MU/g と測定された肝臓の場合、138 MU/g の肝臓の場合、測定値は若干高かったものの、ほぼ同様の結果が得られた。この肝臓において、試料に 5 倍量の 0.1 %酢酸を添加し、最終的に 10 倍量に定容した場合の測定値は 1.16 であった。

### 2) LC-MS における試料由来マトリクスの影響

各希釈倍率における回収率は、1:1 抽出液では、標準溶液 (1 倍希釈) および 5、10、20 倍希釈溶液の回収率は、それぞれ 68.4、87.7、102、98.2%で、10 倍以上の希釈率ではほぼ 100%となった。1:2 抽出液でも概ね同様の結果が得られた。1:5 抽出液の場合、5 倍希釈溶液で回収率が低かったものの、その他の希釈倍率での回収率はほぼ 100%で、総じて表示濃度とおりの測定値が得られた。

### 3) 市販 TTX 検査キットの評価

TTX 標準液による検出限界の確認を行ったところ、目視による判断では 0.25 MU/mL あたりが検出限界であった。

次に、TTX 誘導体の反応特異性を調べたところ、oxoTTX と trideoxyTTX は、同濃度の TTX に比べ反応性は劣るが TTX 抗体と反応した。一方、麻痺性貝毒 (GTX1&4、GTX2&3、dcGTX2&3) とは反応しなかった。

次に、マトリクスの影響を無毒養殖トラフグの組織抽出液で調べた。筋肉と精巣の抽出液ではブランク (0.1%酢酸) と同様であったが、皮、卵巣、肝臓の抽出液は「TTX 有り」の偽陽性を与えた。筋肉抽出液に TTX 標準液を添加したとき、「TTX 有りとはならず」偽陰性を示した。

コモフグの筋肉および肝臓の抽出液を用いて、TTX 検査キットに対する反応を検討したが、毒性と検査キットの反応に相関がみられない例が多かった。

### 4) PTX/PTX 様毒検出・定量法の開発

筋細胞に PTX を暴露すると、濃度依存的な損傷が観察された。CPK については、暴露 6 時間後に濃



度依存的な上昇が認められたが、12 時間後以降は検出感度が低下し、濃度依存性も失われた。一方、LDH の場合、いずれの暴露時間でも濃度依存的な上昇が認められたが、低濃度 (100 ng PTX/mL 以下) の場合、暴露時間は 6 時間では不十分、48 時間では過剰であり、細胞試験には 12 または 24 時間が適切と判断した。PTX 濃度と LDH の間には高い正の相関がみられ、回帰式から PTX の定量が可能となった。

この回帰式からイワスナギンチャクの毒量を求めたところ、9.5  $\mu\text{g}$  PTXeq/g と計算され、LC-MS/MS で測定した PTX 量 (7.0  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) と概ね一致した。アオブダイ中毒を起こした食品残品の肝臓および筋肉の PTX 換算値は、それぞれ 103 および 2 ng PTXeq/g となった。

### III. フグと有毒巻貝の分類に関する研究

#### 1) フグ類の分類学的研究

日本およびインド・西太平洋に分布するモヨウフグ属の分類学的研究を行ったところ、新種を含む 14 種が分布することが明らかになった。また、宮崎県、鹿児島県および沖縄本島から 4 個体のモヨウフグ属を入手し、詳細に調べた結果、新種であることが明らかになった。新種はフィリピン、紅海及およびアフリカ東岸で観察されており、水中写真によって日本の個体と同種であることを確認した。

日本産トラフグ属全体の調査を進めているが、今年度はコモフグ、コモダマシおよびクサフグなどを重点的に調査した。その結果、コモフグの色彩にはかなり変異があることが明らかになった。

ロンドンの自然史博物館に保存されている *Tetrodon alboplumbeus* Richardson, 1845 のタイプ標本を調べた結果、本種がクサフグであることが明らかになった。従来、クサフグの学名は *Takifugu niphobles* (Jordan and Snyder, 1901) とされていたが、この学名は *Tetrodon alboplumbeus* のシノニムとなるためクサフグの学名は *Takifugu alboplumbeus* (Richardson, 1845) となる。さらに、オランダ国立自然史博物館に保管されている 10 個体のコモフグ *Takifugu poecilonotus* (Temminck and Schlegel, 1850) タイプ標本を調べたところ、2 個体はクサフグである

ことが明らかになった。Boeseman (1947) がクサフグの 2 個体の一つをコモフグの Lectotype (複数のタイプ標本の一つを基準標本すること) に指定したため、国際動物命名規約によって *Takifugu poecilonotus* (Temminck and Schlegel, 1850) はクサフグ *Takifugu alboplumbeus* (Richardson, 1845) のシノニムとなる。そのためコモフグは学名を失うことが判明した。

#### 2) 遺伝子解析によるフグ種判別

人工交配フグ種トラマ (トラフグ (♀) × マフグ (♂)) 3 個体およびマトラ (トラフグ (♂) × マフグ (♀)) 3 個体ならびに、人工交配種の両親である単一系統のトラフグおよびマフグ、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマフグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 4 個体につき、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、GAAAG 反復配列の解析においてのみ、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。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ことから、反復回数 5~9 回がマフグ由来、20~25 回はトラフグ由来であると推測された。そこで、トラフグとマフグ間の自然交雑種と推測された 4 個体を用いて本マイクロサテライトマーカーの有効性を検証したところ、本法が父系種判別に適用できることを明らかにした。

#### 3) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝特異プライマーを設計して、PCR 条件を種々検討した結果、巻貝から抽出した mtDNA 16S rRNA 部分領域 (約 350bp) を効率よく増幅する条件を決定した。その結果、巻貝生鮮品 11 種では、すべての試料で 350bp 付近に PCR 増幅が確認できた。しかし、一部の加工品では増幅されないものがあった。

塩基配列解析の結果、ほとんどは種判別が可能であったが、一部の巻貝では、データベースに登録されている塩基配列が同じであるため、判別ができないものがあることがわかった。

### D. 考察

## I. フグの毒性に関する調査研究

### 1) コモンフグの毒性調査

今回供試したコモンフグは、皮、肝臓および卵巣が“猛毒”、筋肉と精巣が“弱毒”で、筋肉と皮の毒力が谷博士の「日本産フグの毒力表」を上回っていた。特に、可食部位である筋肉で、有毒個体出現率、最高毒力ともに高かったことは食品衛生上問題であり、今後、さらに検体数を増やすとともに、凍結・解凍による有毒部位から筋肉への毒の移行についても検討する必要がある。

大船渡湾産のコモンフグとヒガンフグは取り扱いが禁止されていないものの、これら2種を含め同魚市場では現在、食の安全性を確保するためトラフグを除くフグ類はすべて廃棄されている。大船渡海域に限らず、東北地方沿岸各地における有毒フグ類の分布については、今後とも研究を継続する必要がある。

### 2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

しらすへのフグ稚魚混入の実態を調査するため、2014年7~9月に日本沿岸で水揚げ、製造されたしらす加工品に混入していたフグ稚魚の種判別とTTX分析を行った。産地に関係なく、15試料がシロサバフグで、2試料がナシフグと判別された。日本近海産のシロサバフグは無毒(10 MU/g未満)とされているが、ナシフグの成魚は卵巣、肝臓、皮が“猛毒”レベル(1,000 MU/g以上)の毒性をもつことが報告されている。しかし、今回調べたナシフグ稚魚では、TTXと推定される成分は検出されたものの、TTX含量は30 ng/g未満(0.15 MU/g未満)であった。

しらす加工品へのフグ稚魚の混入率と1回に食べるしらすの量を考えると、フグ稚魚が混入したしらすを食べた場合の健康への影響はないと考えられる。しかし、フグの毒性は魚種による差ならびに個体差が大きく、卵巣が有毒な種では仔稚魚からTTXが検出される可能性があるため、今後も実態調査を継続して、しらす加工品に混入するフグの種類、毒性ならびに毒成分分析を行う必要がある。

### 3) フグ食中毒事例の調査

フグ毒のリスク管理状況が適切であるか検証するために必要な情報を得られるよう、フグ食中毒に特化した調査票(案)を作成した。本調査票は食中毒残品の検査結果と合わせることで、

LOAELの推定等、リスク評価やリスク管理状況の有効性について判断する基礎データが得られるものと考えられる。

## II. マリントキシン検査法に関する研究

### 1) フグ毒抽出法の検討

簡便法による測定値は、抽出比3以上で、いずれも参考法より15~20%程度高い値となった。また、最終的に10倍量に定容した場合の参考法の測定値も、5倍量に定容する本来の参考法に比べ15%程度高いことから、本来の参考法の試料残渣にはTTXが残留していることが考えられる。したがって、参考法では、添加回収試験を行い、その回収率で補正しない限り、毒性が低く評価される恐れがある。一方、簡便法は、迅速に、かつ真の値により近い測定値が得られる方法と考えられる。

LC-MSにおける試料由来マトリクスの影響は、低抽出比の試料では大きく、可能な限り希釈した試料を分析することが望ましい。マトリクスの影響を避けるには、分析部位の性質、抽出比と質量分析計の検出感度に応じた希釈が必要であろう。

### 2) 市販TTX検査キットの評価

TTX標準品で得られる検出限界は0.25~0.5 MU/mL程度で、製造者が推奨する基準値(検出限界:1 MU/mL、陽性:1 MU/mL、陰性:0.25 MU/mL)を確認できた。本検査キットは、TTX誘導体のoxoTTXやtrideoxyTTXと反応したため、他のTTX誘導体との反応性も調べる必要があるが、各誘導体を単離することが難しい。フグ毒の検査において、広くTTX誘導体を検出できることは、安全性確保の観点からは有利であるが、5,6,11-trideoxyTTXのような毒性の低い成分が多量に混入している場合には、毒性を過大に評価してしまうことになる。

今回、実試料での測定を想定して、TTX標準液を無毒養殖トラフグの組織抽出液で希釈したところ、抽出液だけでTTX有りと判定される擬陽性、反対に、TTXが添加されているにもかかわらず、TTX無しと判定される擬陰性の現象が観察されたことから、抽出液中のマトリクスの影響が大きく、本TTX検査キットは、フグ毒検査の実用性に問題があることがわかった。

### 3) PTX/PTX様毒検出・定量法の開発

筋細胞の損傷に伴い培地中に放出される酵素の

活性を指標とした PTX の検出・定量法について検討した。その結果、PTX 濃度と CPK および LDH の活性の間には、高い正の相関がみられ、加えて PTX を含む実際の生物試料（イワスナギンチャク）から PTX を検出・定量することができた。特異性や安定性、感度等を考慮しながら、さらに改良を加えれば、ng レベルの PTX の検出・定量が可能になるものと思われる。

### Ⅲ. フグと有毒巻貝の分類に関する研究

#### 1) フグ類の分類学的研究

モヨウフグ属魚類の分類学的再検討の過程で新種が発見された。モヨウフグ属の形態的特徴を詳細に検討した結果、分類に最も有効な形質は体色であることが明らかになった。この結果に基づいてモヨウフグ属の同定を行うため検索表を作成した。

日本産トラフグ属の分類学的再検討によって、日本の沿岸でごく普通に見られるクサフグとコモフグには学名をめぐる問題点があることが明らかになった。この事実は、従来の分類学的研究には問題点が多く残っており、普通種であっても慎重に研究する必要があることを示すとともに、水産ならびに食品衛生の現場に混乱を与えないように、正確な情報の伝達と周知、啓蒙が必要となる。

#### 2) 遺伝子解析によるフグ種判別

今回、トラフグおよびマフグ間に焦点を絞り、GAAAG マーカーを用いた核 DNA による父系種同定法の構築を試みた結果、新たに核 DNA による GAAAG 反復配列の回数の差から父系種同定が可能であることが示された。このマイクロサテライト領域は、人工交配種すべてにおいて、トラフグ由来の 194～209 bp（反復回数 20～25 回）およびマフグ由来の 125～145 bp（反復回数 5～9 回）の PCR 産物が得られ、保存性が高く普遍的であることが確認された。また、市場に流通しているトラフグ 26 個体中 20 個体（77%）、マフグ 20 個体中 14 個体（70%）で、上述した分子量の PCR 産物が得られた。すなわち、流通しているトラフグおよびマフグが 100%ではなく、70～77%程度の再現性を示していたところから、市販されているフグの一部が必ずしも単一系統ではない可能性が考えられ、フグの自然交雑が広く進んでいるのかもしれない。今後、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か検証する必要がある。

#### 3) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝の生鮮品については、本研究で確立した PCR 条件で増幅できることが明らかになった。しかし、レトルトや缶詰製品の一部で PCR 増幅されないものがあった。これは殺菌加熱で、試料中の DNA が断片化したためと推測される。この対策としては、断片化した DNA でも PCR 増幅できるプライマーを設計する必要がある。また、今回目的とした 16S rRNA 領域の部分塩基配列が完全に一致する巻貝については、別の遺伝子領域を新たに検討する必要がある。

### E. 結論

#### I. フグの毒性に関する調査研究

フグ類の安全性の確保に資することを目的として、日本各地で採取されたコモフグの毒性を調査した。今年度は、サンプリングの都合上、主に凍結試料で測定したところ、筋肉が有毒（10 MU/g 以上）のものがみられた。また、皮の毒力が谷博士の「日本産フグの毒力表」を上回っていたため、皮の毒力を“猛毒”レベルに変更して、リスク管理を強化する必要がある。今後、さらに検体数を増やしてコモフグ毒性の実態調査を継続するとともに、凍結・解凍による有毒部位から筋肉への毒の移行についても検討する必要がある。

2014 年に社会問題になったしらす加工品へのフグ稚魚の混入に関して、しらす加工品に混入したフグ稚魚の種と毒性を調べた。2014 年に収集した試料では、産地によらずシロサバフグの稚魚が主で、これらシロサバフグ稚魚から TTX は検出されなかった（10 ng/g 未満）。一部ナシフグ稚魚が混入していたが、TTX 含量は定量下限値（30 ng/g）未満であった。しらす加工品への混入率も考え合わせると、フグ稚魚が混入したしらす加工品を食べた場合、健康被害への影響はないと考えられた。しかし、しらす加工品の安全性確保のため、今後も継続して調査を続ける必要がある。

フグによる食中毒に特化した調査票（案）を作成した。倫理審査を経て厚生労働省や自治体等の関係機関の協力を得て、本調査票による食中毒調査についての試行を行い情報の集積と解析を行う予定である。

## II. マリントキシン検査法に関する研究

フグ毒抽出法を検討した結果、参考法の試料残渣には TTX が残留しており、毒性が実際より低く評価される恐れがある。これに対し、簡便法は、迅速かつ真の値により近い測定値が得られる方法であり、リスク管理の前提となる毒性調査には、簡便法の方が適していると判断された。一方、生物試験から機器分析に移行する際の問題点の一つとして、試料由来の夾雑物の影響がある。しかしながら、LC-MS 分析においては、適切な抽出・希釈操作を行うことにより、試料由来マトリクス存在下でも十分な精度で TTX を分析可能であることが示された。

マウス検定法に代わるフグ毒検査法として、イムノクロマト法に基づく市販の TTX rapid test kit について、検出感度、反応特異性、マトリクスの影響ならびにコモンフグ抽出液に対する検査を実施し、評価を行った。TTX 標準品では、プロトコール通りの結果が得られたが、TTX 誘導体とも反応し、トラフグ組織抽出液中のマトリクスの影響が大きいため、フグ毒検査には課題があることがわかった。より精度の高いフグ毒検査を行うには、抗体の特異性を改善する必要がある。

PTX/PTX 様毒検出・定量法の開発に関しては、特異性や安定性、感度の点で問題はあるものの、ラットの培養筋細胞を用い、培地に放出される酵素の活性を指標として PTX を検出・定量する系を確立することができた。本法は、さらに改良を加えていくことにより、PTX 様毒中毒の特徴である横紋筋融解を指標とした PTX 様毒検出・定量法の開発に発展する可能性がある。

## III. フグと有毒巻貝の分類に関する研究

フグ類の分類学的研究に関しては、日本およびインド・西太平洋のモヨウフグ属を詳細に研究した結果、新種を含む 14 種が分布していることが明らかになった。14 種のうち日本から 12 種が記録されたことになり、日本近海のフグ類の多様性の高さが改めて明らかになった。日本産トラフグ属の分類学的再検討によって普通種のクサフグやコモンフグの分類学的問題が明らかとなった。さらに、コモンダマシはコモンフグと同種であることも明らかになった。フグの分類は、フグ食の安全確保、フグ食中毒のリスク管理の基本となるので、今後、

食用種を多く含むトラフグ属の分類学的調査を進める必要がある。

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。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。本 GAAAG マーカーが、その他の交雑種にも適用できるかどうか追試を行うとともに、他のマイクロサテライト領域の有用性も検討する必要がある。

わが国では、毎年巻貝による自然毒食中毒が発生しているため、食中毒原因食品の特定と食中毒防止のため、遺伝子による有毒巻貝の正確な種判別法の開発が望まれている。巻貝特異プライマーを設計し、PCR 条件を検討し、ダイレクトシーケンス法による種判別を試みた。試料に用いた 11 種巻貝の mtDNA 16SrRNA 部分領域は効率よく増幅し、ダイレクトシーケンス法で解析した塩基配列から種の判別が可能であった。しかし、加熱殺菌された製品では DNA が断片化しているため PCR 増幅できないものがあつた。さらに、一部の巻貝ではターゲットとした領域の塩基配列が完全に一致しているため、判別不能のものもあり、実用化するには改善の余地がある。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Biliary excretion of tetrodotoxin in the cultured pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. *Toxicon* 2015; 93: 98-102.
- 2) H. Lin, C. Zhang, J. Liao, F. Yang, S. Zhong, P. Jiang, X. Chen, Y. Nagashima: Neutralizing effect of hemolymph from the shore crab, *Thalamita crenata*, on paralytic shellfish toxins. *Toxicon* 2015; 99: 51-57.
- 3) 長島裕二: フグ肝臓におけるフグ毒蓄積タンパク質. *日本水産学会誌* 2015; 81: 736.

- 4) 佐藤 繁：麻痺性貝毒の生物化学的変換に基づいた簡易分析法の開発. 日本水産学会誌 2015; 81: 792-795.
- 5) 松浦啓一：1. 日本沿岸に見られるフグ類の分類. ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保-日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌 2016; 82: 166.
- 6) 高谷智裕, 荒川 修, 鈴木重則, 望岡典隆：2. 交雑フグの毒性. ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保-日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌 2016; 82: 167.
- 7) 大城直雅：3. 沖縄地区のフグの毒性. ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保-日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌 2016; 82: 168.
- 8) 佐藤 繁：4. 東北地区のフグの毒性. ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保-日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌 2016; 82: 169.
- 9) 大城直雅：下痢性貝毒（オカダ酸群）検査法. 食品衛生研究 2015; 65(4): 29-36.
- 10) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止（第8回）. モヨウフグ・ホシフグ. 食と健康 2015; 59(4): 30-31.
- 11) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止（第9回）. コクテンフグ・ケショウフグ. 食と健康 2015; 59(5): 28-29.
- 12) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止（第10回）. センニンフグ・カイユウセンニンフグ. 食と健康 2015; 59(6): 28-29.
- 13) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止（第11回）. キタマクラ・サザナミフグ. 食と健康 2015; 59(7): 28-29.
- 14) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止（第12回）. クロサバフグ・クマサカフグ. 食と健康 2015; 59(8): 28-29.
- 15) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止（第13回）. カスミフグ・スジモヨウフグ. 食と健康 2015; 59(9): 36-37.
- 16) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止（第14回）. カナフグ・ヨリトフグ. 食と健康 2015; 59(10): 28-29.
- 17) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止（第15回）. ミズレフグ・ワモンフグ. 食と健康 2015; 59(11): 28-29.
- 18) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止（第16回）. アラレフグ・ナガレモヨウフグ. 食と健康 2015; 59(12): 38-39.
- 19) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止（第17回）. シマキンチャクフグ・タキフグ. 食と健康 2016; 60(1): 48-49.
- 20) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止（第18回）. シッポウフグ・アマミホシゾラフグ. 食と健康 2016; 60(2): 30-31.
- 21) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止（第19回）. シボリキンチャクフグ・ナミダフグ. 食と健康 2016; 60(3): 30-31.
- 24) 桐明 絢, 太田 明, 岡山桜子, 松浦啓一, 石崎松一郎, 長島裕二：しらす加工品に混入したフグ稚魚の種判別と毒性. 食品衛生学雑誌 2016; 57:13-18.
- 25) K. Matsuura: A new pufferfish, *Arothron multilineatus* (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae), from the Indo-West Pacific. Ichthyological Research 2016; 63: in press.
- 26) E. Katayama, K. Matsuura: Fine structures of scales of ocean sunfishes (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Molidae): another morphological character supporting phylogenetic relationships of the molid genera. Bulletin of National Museum of Nature and Science, Ser. A 2016; 41: in press.

## 2. 書籍・総説

- 1) K. Matsuura: Tetraodontiformes. In: S. Kimura, A. Arshad, H. Imamura, M. A. Ghaffar (eds.), Fishes of the Northwestern Johor Strait, Peninsular Malaysia. University Putra Malaysia Press and Mie University, Japan, 2015; pp. 98-105.
- 2) 長島裕二：自然毒. 魚介の科学, 阿部宏喜編, 朝倉書店, 東京, 2015; pp. 185-196.
- 3) 長島裕二, 松本拓也：フグ毒テトロドトキシンの体内動態解析：トラフグを用いた毒化モデル実験. LABIO 21 2015; No. 62: 24-27.
- 4) 長島裕二：フグと食中毒. 中学保健体育科ニュ

- ース, 大修館書店, 2015; No. 4: 2-5.
- 5) 石崎松一郎, 臼井芽衣 (2016): フグの分類—最前線—. Sunatec e-Magazine 2016; 120 (1).
3. 学会発表
- 1) 桐明 絢, 太田 明, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性. 第 109 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 5 月, 東京都江東区.
- 2) 桐明 絢, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の種同定と毒性. 第 25 回西日本ふく研究会, 2015 年 5 月, 山口県下関市.
- 3) 桐明 絢, 塩見一雄, 長島裕二: アイゴ類刺毒の一次構造—アイゴの刺毒はカサゴ目魚類刺毒と共通の構造をもつ—. 第 29 回海洋生物活性談話会, 2015 年 5 月, 静岡県下田市.
- 4) 長島裕二: しらす干しフグ稚魚の混入. しらす干しフグ稚魚混入危機管理等における意見交換会, 2015 年 7 月, 東京都中央区.
- 5) 長島裕二: 海洋動物の毒. 第 37 回日本中毒学会総会・学術集会, 2015 年 7 月, 和歌山県和歌山市.
- 6) K. Okita, H. Satone, E. Tan, S. Kinoshita, S. Asakawa, H. Yamazaki, K. Sakiyama, T. Takatani, O. Arakawa, A. Hagiwara, Y. Sakakura: Transcriptome analysis of tetrodotoxin sensing and action of tetrodotoxin in the brain of tiger puffer *Takifugu rubripes* by next-generation sequencing. 145th Annual Meeting of American Fisheries Society, August 2015, Portland, USA.
- 7) A. Kiriake, Y. Nagashima, K. Shiomi: Primary structure of a proteinaceous toxin from rabbitfish *Siganus fuscescens*. Spgtember 2015, 18th Congress of the International Society on Toxinology, London, United Kingdom.
- 8) 松浦啓一: 日本沿岸に見られるフグの分類. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム フグ食の安全性確保—日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 2015 年 9 月, 宮城県仙台市.
- 9) 高谷智裕, 荒川 修, 鈴木重則, 望岡典隆: 交雑フグの毒性. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム フグ食の安全性確保—日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 2015 年 9 月, 宮城県仙台市.
- 10) 大城直雅: 沖縄地区のフグの毒性. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム フグ食の安全性確保—日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 2015 年 9 月, 宮城県仙台市.
- 11) 佐藤 繁: 東北地区のフグの毒性. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム フグ食の安全性確保—日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 2015 年 9 月, 宮城県仙台市.
- 12) 臼井芽衣, 石崎松一郎, 長島裕二: マイクロサテライト遺伝子座を用いた交雑フグ種の両親種同定. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会, 2015 年 9 月, 宮城県仙台市.
- 13) 桐明 絢, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の遺伝子による種判別. 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 10 月, 京都府京都市.
- 14) 岡山桜子, 桐明 絢, 永井 慎, 石崎松一郎, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬け製造工程における毒成分変化. 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 10 月, 京都府京都市.
- 15) C. Urata, S. Jiang, K. Kuwano, T. Takatani, O. Arakawa: Growth and kainic acid production of the red alga *Digenea simplex* cultured under monowavelength light irradiation. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, November 2015, Jeju, Korea.
- 18) Y. Kanahara, R. Tatsuno, K. Soyano, T. Takatani, O. Arakawa: Maturation-associated changes in the internal distribution of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu pardalis*. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, November 2015, Jeju, Korea.
- 19) W. Gao, R. Tatsuno, K. Yamaguchi, T. Takatani, O. Arakawa: Expression of PSTBP homologues in several pufferfish species. 10th International Workshop on the

Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, November 2015. Jeju, Korea.

- 20) 長島裕二：しらすへのフグ稚魚の混入。しらすへのフグ稚魚混入に関する講演会，2016年3月，東京都中央区。
- 21) 大木理恵子，石橋敏章，石崎松一郎，長島裕二：ボウシュウボラおよびキンシバイの毒性とフグ毒成分。平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区。
- 22) 桐明 絢，太田 明，岡山桜子，松浦啓一，石崎松一郎，長島裕二：しらすへのフグ稚魚の混入—種判別とフグ毒分析—。平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区。
- 23) 北島冴美，角川峻徳，松本拓也，長島裕二：次世代シーケンスアーカイブを用いたトラフグ肝臓薬物排泄トランスポーターのクローニング。平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区。
- 24) 角川峻徳，北島冴美，松本拓也，長島裕二：次世代シーケンスデータベースを用いたトラフグ肝臓有機イオントランスポーターのクローニングの試み。平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区。
- 25) 辰野竜平，識名美和子，古下 学，山口健一，高谷智裕，荒川 修：ツムギハゼ卵巣におけるTTX結合性物質の探索。平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区。
- 26) 金原葉子，辰野竜平，征矢野清，高谷智裕，荒川 修：ヒガンフグ体内TTX分布の性成熟に伴う変化。平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区。
- 27) 池北侑人，姜 珊瑚，市丸俊一，高増 剛，荒川 修，高谷智裕：長崎県九十九島におけるヒオウギガイの麻痺性貝毒による毒化。平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区。
- 28) 高 威，辰野竜平，山口健一，高谷智裕，荒川 修：数種フグにおけるPSTBP相同タンパク質アイソフォーム群の探索。平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 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）

## 「マリントキシンのリスク管理に関する研究」

## 平成 27 年度分担研究報告書

## コモングの毒性試験および食中毒調査

|       |         |                     |
|-------|---------|---------------------|
| 研究分担者 | 大城 直雅   | 国立医薬品食品衛生研究所        |
| 協力研究者 | 國吉 杏子   | 国立医薬品食品衛生研究所        |
| 協力研究者 | 堀田 彩乃   | 明治薬科大学              |
| 協力研究者 | 鈴木 貴文   | 明治薬科大学              |
| 協力研究者 | 松浦 啓一   | 国立科学博物館科学博物館        |
| 協力研究者 | 登田 美桜   | 国立医薬品食品衛生研究所        |
| 協力研究者 | 中島 安基江  | 広島県立総合技術研究所保健環境センター |
| 協力研究者 | 安西 洋一   | 広島市健康福祉局保健部食品保健課    |
| 協力研究者 | 佐久川 さつき | 沖縄県衛生環境研究所          |

## 研究要旨

コモング筋肉は食用部位とされているが、三陸の 3 海域については有毒個体があることが確認されており、食用不可となっている。その他の海域におけるコモングの毒性を調査し、現行のリスク管理が適切であるか評価することを目的とした。蒐集したコモング 102 個体について、外部形態による同定後、mtDNA の COI 領域の解析に供した。また、49 個体の筋肉試料について LC-MS/MS による TTX 分析を実施し、その結果 45 個体が無毒（10 MU/g 未満）であったが、4 個体が弱毒（13～34 MU/g）であった。これらの試料は鮮度が落ちていたものや、凍結融解後に腑分けを行ったもので、皮からの移行が考えられた。これらの要因については引続き検討する予定である。

フグ食中毒が発生した際に、特有な症状を正確に把握し、LOAEL を求め ARFD を推定するために必要な情報を集積することを目的とした、フグ食中毒調査票（案）を作成した。倫理審査を経たのちに本調査票の試行を行う予定である。

## A. 研究目的

フグによる食中毒の未然防止対策については、昭和 58 年（1983 年）に厚生省環境衛生局長（当時）が発出した「フグの衛生確保について」（環乳第 59 号，昭和 58 年 12 月 2 日）の通知（以下通知とする）の別表 1「処理などにより人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類及び部位」によってリスク管理がなされている。この別表 1 にはただし書きがあり、「岩手県越喜来湾及び釜石湾並びに宮城県雄勝湾で漁獲されるコモング及びヒガンフグについては適用しない」と記されており、これらの海域のコモングとヒガンフグは食用不可となっている。他の海域においても、コモングは筋肉だけが食用可能

で、その他の部位（皮、精巣、卵巣および、肝臓）は有毒部位として食用不可である。

フグによる食中毒事件の報告において、原因魚種が記載されていたものは約半数であるが、そのうち最も発生件数が多いのがコモングであった（登田ら，2012）。多くの事例において、コモングの有毒部位を喫食していると推定されるが、上記 3 海域以外で採取されたコモング（疑）の筋肉だけを喫食したことによる食中毒事例が発生した。そのため、コモングの毒性評価について緊急に対応する必要があるため、コモングの毒性調査を実施した。

上述のとおり、フグ毒のリスク管理については通知によりなされているが、この通知の基となっ



たのは「日本産フグの毒力表」(谷, 1945)であり、70年以上も経過している。現行のリスク管理が適切であるか評価するためには、実際に発生した食中毒事件を検証する必要がある。そのためにはまず、食中毒事件のデータを集積し、フグ毒の最小毒性量 (LOAEL) を求め、急性参照用量 (ARfD) を推定する必要がある。また、フグによる食中毒の臨床像を正確にとらえるために、これらの必要な情報を把握できる、食中毒調査票を作成し、実際の事例において活用する事を目的とした。

## B. 研究方法

### 1) コモンフグの毒性試験

#### ①供試試料

瀬戸内海産コモンフグ試料 102 個体について仲買業者を通じて蒐集した。試料は冷蔵で搬入され、試料の一部は国立科学博物館および鹿児島大学総合研究博物館に標本として保管された。試料搬入後、各個体の側面、背面、ヒレの部分をデジタルカメラで撮影し外部形態による同定を行った。

画像撮影した試料は、皮、肝臓、筋肉、その他内臓に腑分けし、分析に供するまで-30℃で保管した。またその際に、ミトコンドリア DNA

(mtDNA) 解析用として筋肉試料 50 mg 程度を採取し、-30℃で保存した。翌日までに処理できないものについては-30℃で保存し、流水中で融解した後、腑分けした。

#### ②TTX の LC-MS/MS 分析

筋肉試料について、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、試料 2 g に 0.1 % 酢酸 8 mL を加え、ホモジナイズ(11,000 rpm、1 秒×10 回)をした後に沸騰水浴中で 10 分間加熱した。放冷後、遠心分離 (13,400×g、15 分) し、上清を回収し、抽出液 (5 mL) とした。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。ろ液に、アセトニトリルが 50% になるようにアセトニトリルを加え攪拌後に PVDF 膜でろ過 (0.2 μm) したものを測定溶液とし、以下の条件で LC-MS/MS 分析した。

#### 【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

表 1. COI 領域の塩基配列解析に用いたプライマー

#### 増幅用プライマー

VF2\_t1: **TGTA AAAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC**

FishF2\_t1: **TGTA AAAACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC**

FishR2\_t1: **CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA**

FR1d\_t1: **CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA**

#### シーケンス用プライマー

M13 F **TGTA AAAACGACGGCCAGT**

M13R **CAGGAAACAGCTATGAC**

表 2. PCR 反応液の組成

|                   |      |    |
|-------------------|------|----|
| TaKaRa Premix Taq | 12.5 | μL |
| VF2_t1 (5 μM)     | 0.75 | μL |
| FishF2_t1 (5 μM)  | 0.75 | μL |
| FishR2_t1 (5 μM)  | 0.75 | μL |
| FR1d_t1 (5 μM)    | 0.75 | μL |
| テンプレート DNA        | 9.5  | μL |
| 合計                | 25   | μL |

表 3. サーマルサイクラーの設定

|     |       |           |
|-----|-------|-----------|
| 98℃ | 120 秒 | } 30 サイクル |
| 94℃ | 30 秒  |           |
| 55℃ | 40 秒  |           |
| 72℃ | 60 秒  |           |

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：N<sub>2</sub> (280 °C、12 L/min)、シースガス：N<sub>2</sub> (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：N<sub>2</sub> (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：N<sub>2</sub>、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。

定量分析の結果から得られた TTX 濃度に対し、TTX の毒性を 0.22 µg/MU として毒性換算し、以下のとおり評価した。

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 10 MU/g 未満：               | 無毒 |
| 10 MU/g 以上、100 MU/g 未満：   | 弱毒 |
| 100 MU/g 以上、1000 MU/g 未満： | 強毒 |
| 1000 MU/g 以上：             | 猛毒 |

#### ③mtDNA 解析

滅菌済みメスを用いて、細切した試料（筋肉）20～25 mg を、1.5 mL エッペンチューブに採取した。採取した試料からのテンプレート DNA の調製は、シカジーニアス DNA プレップキット（血液&組織用、関東化学）を用いて添付文書に従って処理した。

解析の対象領域は mtDNA の cytochrome c oxidase subunit I (COI) 領域とし、増幅用のプライマーセットとして、VF2\_t1、FishF2\_t1、FishR2\_t1 および、FR1d\_t1 を使用した（表 1）。PCR の反応液は表 2 に示した組成で調製し、表 3 の条件で PCR を行った。PCR 産物（650 bp 程度）はアガロースゲル（1%）電気泳動で確認した。PCR 産物 20 µL に ExoSAP-IT PCR Product Cleanup（Affymetrix/USB 社）4 µL を加え、37°C30 分間で酵素処理した後、85°C15 分間で酵素を不活化した後、4°Cで保存した。この PCR 産物 0.75 µL、シーケンス用のプライマーセット M13F および M13R を各 0.65 µL、水 12.61 µL の計 15 µL に調製したものを解析に供した。

#### 2) フグ食中毒事例の調査

現在、各自治体で使用されている食中毒調査票では、自然毒食中毒に特徴的な症状を取りこぼす可能性がある。また、原因物質に対するリスク管理が適切であるか判断するためにはリスク評価

が必要であり、そのために必要な情報を収集するためにフグ食中毒に特化した調査票の作成について検討した。

#### C. 研究結果

##### 1) コモンフグの毒性試験

蒐集したフグ試料は102個体で、画像を基に確認した外部形態はすべての個体がコモンフグの特徴を示していた（図 1）。そのうち、3個体を国立科学博物館、2個体を鹿児島大学総合研究博物館に送付し、標本として保管されている。

筋肉試料85個体について、COI領域の増幅とDNA塩基配列の解析が終了した。得られた配列の詳細な解析と種同定については、次年度実施する予定である。

蒐集したコモンフグ試料 102 個体のうち、49 個体筋肉試料について LC-MS/MS による TTX 分析を実施した。その結果、無毒が 45 個体、弱毒が 4 個体（13～34 MU/g）であった。無毒試料のうち、33 個体は 1 MU/g 未満で、12 個体が 1 MU/g 以上 10 MU/g 未満であった。

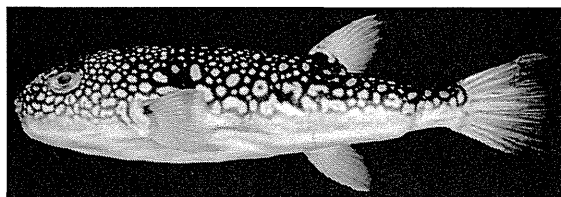


図 1. 分析に供したコモンフグ (NIHS-puf-150021、KAUMI80923、撮影：本村浩之 鹿児島大学教授)

##### 2) フグ食中毒事例の調査

現在、フグ毒のリスク管理としては 10 MU/g 未満を無毒と認識されている。谷（1945）はフグ毒による死亡事例が 10,000 MU 程度の摂取により発生していることから、10 MU/g 未満の場合は 1 kg 以上を喫食しなければ致死性は示さないと判断して 10 MU/g を無毒としている。

現行のフグ毒のリスク管理状況を評価するためにはまず、フグ毒のリスク評価が必要である。すなわち、実際の食中毒事例を基に LOAEL を求め、ARfD を推定し、現行のリスク管理（10 MU/g 未満）が適切であるか評価する。そのために必要な情報として、患者の体重、原因食品の摂食量、原因食品中の TTX の濃度等が挙げられる。また、フグ中毒に特有な症状を把握し、臨床像を詳細に把握するために、これらの症状を質問項目として

反映させた調査票（案）を作成した（別紙1）。

#### D. 考察

##### 1) コモンフグの毒性試験

コモンフグ筋肉試料 49 個体中、4 個体が弱毒（13～34 MU/g）であった。弱毒であった 4 個体のうち、34 MU/g と最も毒性が高かった 1 個体（NIHS-puf-150040、体重 300 g、標準体長 200 mm）は、鮮度が悪く標品の紋様がかすれ気味で、ヒレの一部が欠落していた。また、他の 3 個体（NIHS-puf-150051、150052、150054、13～16 MU/g）については、冷蔵状態で搬入後、ただちに腑分けができなかったため、-30℃で保存し、流水で解凍してから腑分けをした。

瀬戸内海産コモンフグ筋肉は、ほとんどの個体は無毒であり、その多くが 1 MU/g 未満であった。弱毒の TTX が検出された個体は、鮮度が落ちているものと腑分け前に凍結融解をしたものであった。コモンフグの皮は強毒（100 MU/g 以上 1,000 MU/g 未満）をもつことが知られており、食用不適とされている。このことから、鮮度の悪くなった個体や、腑分け前に凍結融解を行った個体において、TTX が皮から移行したことが考えられた。その可能性を検討するために、来年度は皮の TTX 分析を実施する予定である。また、凍結保存している弱毒個体の筋肉について、身体の上層部と中心部の TTX 分析を実施し、TTX 含量の違いについて確認を行う予定である。さらに、フグの毒性は地域変動、季節変動等があるため、引続きコモンフグの蒐集し、毒性について検討する予定である。

##### 2) フグ食中毒事例の調査

フグ毒のリスク管理状況が適切であるか検証するために必要な情報を得られるよう、フグの食中毒に特化した調査票（案）を作成した。本調査票は食中毒残品の検査結果と合わせることで、LOAEL の推定等、リスク評価やリスク管理状況の有効性について判断する基礎データが得られるものと考えられる。来年度は、倫理審査委員会での承認を得たのちに、自治体の協力を得て、

実証性について検討する予定である。

#### E. 結論

瀬戸内海産コモンフグ 102 個体を蒐集し、そのうち 49 個体の筋肉について、LC-MS/MS 法による TTX の定量分析を実施した。ほとんどの個体が無毒であったが、4 個体が弱毒であった。これら 4 個体については、皮からの移行の可能性が示唆されたため、その要因について引続き検討を行う予定である。

フグによる食中毒に特化した調査票（案）を作成した。倫理審査を経て厚生労働省監視安全課や自治体等の関係機関の協力を得て、本調査票による食中毒調査についての試行を行い情報の集積と解析について検討したい。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 著書、論文発表

- 1) 大城直雅: 下痢性貝毒（オカダ酸群）検査法. 食品衛生研究 65(4): 29-36, 2015.
- 2) 大城直雅: 3. 沖縄地区のフグの毒性. ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保—日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌, 82, 168 (2016).

##### 学会発表

- 1) 大城直雅: 沖縄地区のフグの毒性. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム「フグ食の安全性確保—日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し」, 宮城県仙台市, 平成 27 年 9 月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## フグ中毒調査票

|  |   |   |                            |       |   |   |                             |        |
|--|---|---|----------------------------|-------|---|---|-----------------------------|--------|
| 都道府県市町村  |   |   |                            |       | 調査票番号   |   |                             |        |
| 性別   | <input type="checkbox"/> 男  | <input type="checkbox"/> 女  | 年齢(歳)                      |       | 調査日   | 年   | 月                           | 日      |
| 喫食日時   | 年   | 月   | 日                          | 時     | 分   |   |                             |        |
| 発症日時   | 年   | 月   | 日                          | 時     | 分   | 身長(cm)  |                             | 体重(kg) |
| 初発症状   |   |   |                            |       | 現病歴   | <input type="checkbox"/> 腎機能疾患 <input type="checkbox"/> 糖尿病<br><input type="checkbox"/> その他 ( ) |                             |        |
| 入院   | <input type="checkbox"/> 有  | 日間  | <input type="checkbox"/> 無 | 血圧    | /   | 心拍数   |                             |        |
| ● 症状について   |   |   |                            |       |   |   |                             |        |
| 症状   |   |   |                            |       |   | 発症の有無   |                             | 発症の順番  |
| 【神経症状】   |   |   |                            |       |   |   |                             |        |
| 口唇、舌のしびれ、知覚障害  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 指先のしびれ、知覚障害  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 四肢の知覚障害  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 軽度の運動麻痺  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 全身の運動障害  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 深部腱反射消失  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 発声不能   |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 呼吸困難   |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 胸内苦悶   |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 呼吸筋麻痺  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 意識障害   |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 瞳孔散大   |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 対光反射の消失  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 呂律が廻らない  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 【消化器症状】  |   |   |                            |       |   |   |                             |        |
| 吐気   |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 嘔吐(重症度Ⅲ度) 「あり」と答えた場合：1日 _____ 回  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 下痢 「あり」と答えた場合： <input type="checkbox"/> 水様 <input type="checkbox"/> 粘液 <input type="checkbox"/> 混血 |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 【その他症状】  |   |   |                            |       |   |   |                             |        |
| 頭痛   |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 倦怠感  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 脱力感  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 震え   |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| チアノーゼ  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| 発熱 「あり」と答えた場合：最大 _____ °C  |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| その他 「あり」と答えた場合：( )   |   |   |                            |       |   | <input type="checkbox"/> あり   | <input type="checkbox"/> なし |        |
| ● 原因食品について   |   |   |                            |       |   |   |                             |        |
| 食品   | (魚種)  | <input type="checkbox"/> 魚種 ( ) <input type="checkbox"/> 不明   |                            |       |   |   |                             |        |
|  | (同定法)   | <input type="checkbox"/> 患者証言 <input type="checkbox"/> 外部形態 ( <input type="checkbox"/> 残品から <input type="checkbox"/> 写真から ) <input type="checkbox"/> 遺伝子解析<br><input type="checkbox"/> その他 ( ) 特記事項 ( ) |                            |       |   |   |                             |        |
|  | (大きさ)   | 体長(cm)<br>体重(g)   |                            |       |   |   |                             |        |
| 捕獲場所   |   |   |                            |       | 喫食場所  |   |                             |        |
| 入手方法   | <input type="checkbox"/> 購入( <input type="checkbox"/> 自分で <input type="checkbox"/> 家族が <input type="checkbox"/> 知人等が ) <input type="checkbox"/> 釣った( <input type="checkbox"/> 自分で <input type="checkbox"/> 家族が <input type="checkbox"/> 知人等が )<br><input type="checkbox"/> 飲食店で喫食 |   |                            |       |   |   |                             |        |
| 喫食量<br>(g、数量等)   |   |   | 購入等の場合、フグ取扱資格              |       | <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明 |   |                             |        |
|  | g   |   | 刺身の場合                      | 煮付等の肉 | 汁物の場合   |   |                             |        |
|  |   | 切れ  | 親指大 半身の /                  | 個     | 汁椀 杯<br>井 杯   |   |                             |        |
| 残品   | <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無   |   |                            |       |   |   |                             |        |
| 喫食部位 (複数可)   | <input type="checkbox"/> 頭部 <input type="checkbox"/> 身 <input type="checkbox"/> 皮 <input type="checkbox"/> 肝臓 <input type="checkbox"/> 卵巣 <input type="checkbox"/> 白子 <input type="checkbox"/> ヒレ<br><input type="checkbox"/> その他 ( ) <input type="checkbox"/> 不明                 |   |                            |       |   |   |                             |        |
| 調理方法 (複数可)   | <input type="checkbox"/> 刺身 <input type="checkbox"/> 鍋 <input type="checkbox"/> しゃぶしゃぶ <input type="checkbox"/> 唐揚 <input type="checkbox"/> その他 ( )   |   |                            |       |   |   |                             |        |
| その他、特記事項   |   |   |                            |       |   |   |                             |        |