

厚生労働省科学研究費補助金（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

東北沿岸産フグ類の毒性

研究分担者 佐藤 繁 北里大学海洋生命科学部応用生物化学講座

研究要旨

フグ類の消費は従来、西日本などに限られていたが、これまでフグ類を利用していなかった北日本沿岸部などでも近年、特産品として天然フグ類を商品化しようとする動きがある。いっぽう、Kodama et al. (1984) は、三陸沿岸で漁獲されるコモnfグやヒガンフグの肉が高い毒性を示すことを報告している。この報告に基づき現在、岩手県釜石湾、同越喜来湾ならびに宮城県雄勝湾産の上記2種のフグは、食用としての取り扱いが禁止されている。このようにフグ類の毒性は同種のものであっても産地によって大きく異なることから、食用可能とされてきたフグ類についても産地ごとに毒性を調べるのが急務となっている。本年度本研究では、これまでフグ類を利用してこなかった東北沿岸で漁獲されたマフグ、コモnfグ、ゴマフグ、ショウサイフグの4種のフグにつき、部位ごとの毒性を調査した。

A. 研究目的

谷(1945)は、フグ食を伝統とする西日本各地の沿岸を中心に、朝鮮半島や台湾を含む海域で漁獲されたフグ類の毒性を精力的に調査し、毒を高濃度に蓄積する部位が種ごとに異なることを明らかにした。現在、食品衛生法ならびに「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)により食用可能なフグの種類と部位が定められているが、これは主として谷(1945)の調査結果に基づくものである。

フグ類の毒性は産地によって大きな違いがあるものと考えられている。Kodama et al. (1984) は三陸沿岸で漁獲されるヒガンフグ *Takifugu pardalis* およびコモnfグ *T. poecilonotus* は、肉が 100 MU/g を超える高い毒性を示す個体が高頻度で出現することを報告している。この結果に基づき現在、岩手県釜石湾、同越喜来湾、宮城県雄勝湾産のコモnfグとヒガンフグは市場での取扱いが禁止されている。これまで東北地方の沿岸部で漁獲されたフグはほとんど利用されず、雑魚として廃棄されてきた。しかし近年、未利用資源の活用を目途として、東北の一部地域では地元産のフグ類を特産品として売り出そうとする動きがある。本研究は Kodama et al. (1984) の

調査から 30 年以上が経過した現時点での、三陸沿岸で漁獲されるフグ類の毒性を調査したものである。

B. 研究方法

(1) 試料

2015 年 5~11 月に岩手県大船渡魚市場に水揚げされたマフグ 36 個体(BW: 430.7±47.3g, TL: 263.1±10.5mm)、ゴマフグ 30 個体(BW: 502.0±28.0g, TL: 302.0±6.6mm)、ショウサイフグ 12 個体(BW: 202.8±22.0g, TL: 226.7±9.6mm)、コモnfグ 40 個体(BW: 163.0±10.5g, TL: 199.4±4.3mm)を試料とした。これら試料は個体ごとに梱包したのち凍結状態で相模原キャンパスに搬入し試験に供するまで-80℃で凍結保存した。

(2) 検液の調製

試料のフグを半解凍状態で肉、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。生殖腺は区別できるものは卵巣と精巣に分けて分析

した。

(3) 毒の分析

抽出液の一部を SepPak C18 plus カートリッジで処理した後、Yotsu et al. (1989) 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関連成分 (TTXs)、すなわちテトロドトキシン (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 et al. (2014) 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 1 g 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もっと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 1 g あたりの PSPs の毒性 (MU/g) として表示した。

C. 研究結果

(1) マフグ *Takifugu porphyreus*

1) 肉

6.22 ± 1.78 MU/g (max 49.58 MU/g) の TTXs と 0.25 ± 0.08 MU/g (max 2.72 MU/g) の PSPs が確認された。TTXs と PSPs の合計は 6.47 ± 1.80 MU/g (max 50.23 MU/g) であり、36 個体中 5 個体が安全基準値 (10 MU/g) を超過した。

2) 精巣

5.04 ± 0.96 MU/g (max 10.31 MU/g) の TTXs と 0.10 ± 0.06 MU/g (max 0.46 MU/g) の PSPs が検出された。TTXs と PSPs の合計は 5.14 ± 0.97 MU/g (Max 10.39 MU/g) であり、7 個体中 1 個体が安全基準値を超過した。

3) 可食部以外の部位

皮、肝臓、消化管、卵巣から最高値でそれぞれ 411.05、3116.15、681.53、4350.43 MU/g と、非常に高濃度の TTXs が検出された。各部位からは TTXs に対して 20%未満の PSPs が検出された。

(2) ゴマフグ *Takifugu stictonotus*

1) 肉

1.23 ± 0.29 MU/g (max 4.57 MU/g) の TTXs および 0.17 ± 0.08 MU/g (max 1.98 MU/g) の PSPs が検出された。TTXs と PSPs の合計は 1.40 ± 0.30 MU/g (max 4.57 MU/g) で、安全基準値を超過する個体は確認されなかった。

2) 精巣

2.05 ± 1.05 MU/g (max 10.58 MU/g) の TTXs と 1.00 ± 0.38 MU/g (max 3.66 MU/g) の PSPs が確認された。TTXs と PSPs の合計は 3.03 ± 1.44 MU/g (max 12.33 MU/g) であり、安全基準値を超過する個体が 13 検体中 2 検体確認された。

3) 可食部以外の部位

皮、肝臓、消化管、卵巣から最高値でそれぞれ 42.25、75.51、38.57、255.98 MU/g の TTXs が検出された。各部位から TTXs に比較して極低濃度の PSPs が検出された。

(3) ショウサイフグ *Takifugu snyderi*

1) 肉

5.45 ± 2.66 MU/g (max 28.25 MU/g) の TTXs と 0.66 ± 0.28 MU/g (max 2.71 MU/g) の PSPs が検出された。TTXs と PSPs の合計は 6.12 ± 2.71 MU/g (max 28.26 MU/g) であり、12 個体中 3 個体が安全基準値を超過した。

2) 精巣

15.88 ± 15.30 MU/g (max 46.47 MU/g) の TTXs と 6.50 ± 4.20 MU/g (max 14.39 MU/g) の PSPs が検出された。TTXs と PSPs の合計は 22.38 ± 15.26 MU/g (max 51.55 MU/g) であり、3 個体中 2 個体が安全基準値を超過した。

3) 可食部以外の部位

皮、肝臓、消化管、卵巣から最高値でそれぞれ 32.47、246.27、79.81、955.79 MU/g の TTXs が検出された。各部位から TTXs に比して極低濃度の PSPs が検出された。

(4) コモンフグ *Takifugu poecilonotus*

1) 肉

25.61 ± 6.08 MU/g (max 230.33 MU/g) の TTXs および 0.73 ± 0.22 MU/g (max 2.72 MU/g) の PSPs が検出された。TTXs と PSPs の合計は 26.34 ± 6.05 MU/g (max 230.40 MU/g) であり、40 個体中 26 個体が安全基準値を超過した。

2) 可食部以外の部位

皮、肝臓、消化管、卵巣および精巣から最高値でそれぞれ 1192.40、6727.33、2039.77、2691.54、

46.94 MU/g の TTXs が検出された。各部位から TTXs に比較して 2~20%程度の PSPs が検出された。

D. 考察

Kodama et al. (1984) は岩手県および宮城県で水揚げされたフグ類の毒性を調べ、これら海域で多獲されるコモングとヒガングは内臓部分だけでなく、肉の毒性も著しく高いことを報告している。この報告に基づき現在、岩手県の釜石湾と越喜来湾、および宮城県雄勝湾で漁獲される上記 2 種のフグ類は市場での取り扱いが禁止されている。Kodama et al. (1984) の調査から 30 年以上が経過し、2011 年 3 月の東日本大震災に伴う大津波で生息環境が大きく攪乱されたにも拘わらず、昨年度の調査により三陸沿岸で漁獲される上記 2 種のフグが依然として高い毒性を示すこと、肉に強毒レベルを示す個体が高頻度で出現していることが明らかとなった。本年度、大船渡湾海域で漁獲された 4 種のフグ (マフグ、ゴマフグ、シヨウサイフグおよびコモング) につき、部位別の毒性を調べたところ、コモング以外の 3 種のフグも可食部とされる皮、肉および精巢で安全基準値である 10 MU/g を超過する個体が確認された。大船渡湾産のコモングとヒガン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。大船渡湾に限らず、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と考えられる。

E. 結論

フグ類の安全性の確保に資することを目的として、2015 年に大船渡湾海域で水揚げされたマフグ、ゴマフグ、シヨウサイフグ、コモングの部位別毒性を個体ごとに調べたところ、4 種ともに肉を含む可食部で、安全基準値 (10 MU/g) を超過する毒性が高頻度で検出された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 佐藤 繁 (2015) 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. 平成 26 年度水産学技術賞. 日本水産学会誌 81(5)、792-795.

2) 佐藤 繁 (2016) 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 82(2)、169.

2. 著書・総説

- 1) 佐藤 繁・松浦啓一 (2015) 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 59(4)、pp. 30-31、日本食品衛生協会.
- 2) 佐藤 繁・松浦啓一 (2015) フグを知って中毒防止 (第 9 回). コクテンフグ・ケシヨウフグ. 食と健康 59(5)、pp. 28-29、日本食品衛生協会.
- 3) 佐藤 繁・松浦啓一 (2015) 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 59(6)、pp. 28-29、日本食品衛生協会.
- 4) 佐藤 繁・松浦啓一 (2015) 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 59(7)、pp. 28-29、日本食品衛生協会.
- 5) 佐藤 繁・松浦啓一 (2015) 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 59(8)、pp. 28-29、日本食品衛生協会.
- 6) 佐藤 繁・松浦啓一 (2015) 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 59(9)、pp. 36-37、日本食品衛生協会.
- 7) 佐藤 繁・松浦啓一 (2015) 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 59(10)、pp. 28-29、日本食品衛生協会.
- 8) 佐藤 繁・松浦啓一 (2015) 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 59(11)、pp. 28-29、日本食品衛生協会.
- 9) 佐藤 繁・松浦啓一 (2015) 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 59(12)、pp. 38-39、日本食品衛生協会.
- 10) 佐藤 繁・松浦啓一 (2016) 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 60(1)、pp. 48-49、日本

食品衛生協会.

- 11) 佐藤 繁・松浦啓一(2016) フグを知って中毒防止 (第 18 回). シッポウフグ・アマミホシジラフグ. 食と健康 60(1)、pp. 30-31、日本食品衛生協会.
- 12) 佐藤 繁・松浦啓一(2016) 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 60(3)、pp. 30-31、日本食品衛生協会.

3. 学会発表

- 1) 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」. 平成 27 年 9 月、宮城県仙台市.

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

フグの毒性評価と有毒巻貝の種判別

研究分担者 長島裕二 東京海洋大学 学術研究院 食品生産科学部門

研究協力者 桐明 絢 東京海洋大学 海洋科学部 食品生産科学科

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に、フグの毒性評価と有毒巻貝の種判別について検討した。さらに、追加項目として、マウス試験法にかわるフグ毒検査法を検討するため、TTX のイムノクロマト検査法の実用性と問題点について調べた。フグの毒性評価では、緊急課題として日本沿岸で漁獲されたコモンフグの毒性調査を行った。調べた凍結試料 32 個体中 13 個体の筋肉から 10 マウスユニット (MU) /g を超える毒性が検出されたが、皮の毒性が 1000 MU/g を超える例がみられ、凍結解凍によって毒が有毒の皮から無毒の筋肉に移行した可能性が考えられた。関連して、“強毒”レベルに分類されているコモンフグ皮は、“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と考えられる。しらす加工品へのフグ稚魚混入に関しては、2014 年に集めた試料では、産地によらずシロサバフグの稚魚が主で、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)。ナシフグ稚魚の混入も見られたが、TTX 含量は定量下限値 (30 ng/g) 未満で、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。

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、反応性特異性、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て、評価を行ったところ、トラフグ組織抽出液中のマトリクスが反応に大きな影響を与え、コモンフグ抽出液では毒性値を相関がみられない例が多く、実用化には課題があることがわかった。

遺伝子による有毒巻貝の種判別法として、ミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域を対象にしたダイレクトシーケンス法による種判別を試みた。加熱殺菌されて DNA が断片化した製品では PCR 増幅できないものがあつたが、それ以外では種判別が可能であつた。今後、他の遺伝子領域についても検討を加え、巻貝のリスク管理に役立てたい。

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。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ため、食品衛生上極めて重大な問題である。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、自然交雑種の頻出など新たな問題も指摘されている。さらに、フグ稚仔魚や幼魚の混入も問題となっている。また、巻貝キンシバイによるフグ毒中毒も発生し、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。巻貝に関しては、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。しかし、巻貝は外観などの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。

こうした背景のもと、今年度は、コモンフグの喫食によると疑われるフグ食中毒が発生したため、コモンフグの毒性調査を緊急課題として実施し、フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性評価も行った。また、有毒巻貝を正確に判別する遺伝子による種判別法の開発に取り組んだ。初年度は、ミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域を対象にした PCR 法の検討とダイレクトシーケンス法による種判別を試みた。さらに、リスク評価の基盤となるフグ毒検査がいまだにマウス試験法で行われているため、フグ毒検査法の検討が追加課題として要請された。簡便迅速なフグ毒検査法として有望な抗 TTX モノクロナル抗体を利用したイムノクロマト法

の実用性と実用化への問題点を、市販の TTX rapid test kit を用いて調べた。

B. 研究方法：

1) コモンフグの毒性調査

試料には、2015 年 6 月に山口県で漁獲された 14 個体と 2015 年 10 月に京都府、石川県、東京湾でそれぞれ漁獲された 6 個体、5 個体、7 個体の合計 32 個体を用いた。これら試料魚は漁獲後に現地で凍結され、当研究室に輸送されたもので、入手してから使用するまで -25°C に冷凍保存した。使用時に、試料をビニル袋に入れて流水で解凍した後、筋肉、皮、肝臓、消化管、生殖腺に分離した。解凍直後に解剖することを心がけたが、試料数が多い場合には、解凍しすぎてしまうものもあった。

凍結試料とは別に、2015 年 11 月に東京湾で漁獲されたコモンフグ鮮魚 10 個体も用いた。これについては、入手後直ちに解剖して、組織を取り出した。

フグ毒の抽出ならびに定量は食品衛生検査指針 理化編のフグ毒試験法に準じて行った。すなわち、各組織を細切、磨砕した後、ここから 2 g 取り、0.1%酢酸 8 mL を加えてよく混合し、超音波処理(15 分間)後、沸騰水浴中で 10 分間加熱してフグ毒を抽出した。抽出液を冷却後、遠心分離して得られた上清を毒性試験用検液とした。試料量が少なく、試料重量が 2 g に満たない場合は、試料重量の 9 倍量の 0.1%酢酸を添加して抽出した。

毒性試験はマウス検定法で行い、マウスの致死時間から「フグ毒の致死時間—マウス単位 (MU) 換算表」に基づいて毒力を算出した。注射後 30 分以上経過しても死亡しなかった試料を「無毒」とした。

2) 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、テトロドトキシン標準品は和光純薬製テトロドトキシン (フグ由来、1 mg、細胞生物用、Lot SAJ2556) を用いた。テトロドトキシン (TTX) 1 mg を含むアンブールに 0.1%酢酸溶液 1 mL を加えて溶解し、これを TTX 標準原液とした。この TTX 濃度は 1 mg/mL であり、毒性は 5000 マウスユニット (MU) /mL とした。TTX 標準原液を付属のプロトコールに記載の “Sample diluent” [8g NaCl+0.2g KCl+1.44g Na_2HPO_4 +0.24g KH_2PO_4 , dissolve in deionized water to 1 L] (pH 7.4) およ

び 0.1%酢酸溶液で希釈し、10、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL の TTX 標準液を調製した。各濃度に調製した TTX 標準液 100 μL を TTX rapid test kit に塗布した。

① TTX 標準液による検出限界の確認

本実験では、1 MU/mL を基準として、TTX 濃度を 2 段階ずつ増加 (2, 4 MU/mL) または減少 (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 MU/mL) させた。

② TTX 誘導体の反応性

TTX 類縁体には、山口県産キンシバイから TTX 精製法に従って精製した oxoTTX と trideoxyTTX を用いた。これらの標準品がないため正確な同定はできないが、LC-MS の挙動から、11-oxoTTX と 5, 6, 11-trideoxyTTX と推測される。11-oxoTTX 精製品は毒性値から濃度を計算し、5, 6, 11-trideoxyTTX はほぼ無毒のため、5, 6, 11-trideoxyTTX 精製品の LC-MS におけるイオン強度を TTX 標準品と比較して濃度を求めた。両精製品は、0.1%酢酸で適宜希釈して所定の濃度に調製した。

③ 麻痺性貝毒の反応性

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 (Lot#20080709 1008, GTX1 $60.4 \pm 3.1 \mu\text{mol/L}$, GTX4 $19.7 \pm 1.6 \mu\text{mol/L}$, GTX1+ GTX4 $80.0 \pm 2.2 \mu\text{mol/L}$), CRM-GTX2&3-c (Lot#20081203 1443, GTX2 $114.2 \pm 5.7 \mu\text{mol/L}$, GTX3 $43.4 \pm 2.2 \mu\text{mol/L}$, GTX2+ GTX3 $157.6 \pm 7.7 \mu\text{mol/L}$)、CRM-dcGTX2&3-c (Lot#20141203 0223, dcGTX2 $100.1 \pm 7.0 \mu\text{mol/L}$, dcGTX3 $29.4 \pm 2.1 \mu\text{mol/L}$, dcGTX2+ dcGTX3 $129.5 \pm 8.0 \mu\text{mol/L}$) を用いた。0.1%酢酸で適宜希釈して所定の濃度に調製した。

④ マトリクスの影響

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た。すなわち、養殖トラフグから筋肉、皮、肝臓、生殖巣を分離した後、ハサミで細切したもの (卵巣は乳鉢でよくすりつぶしたもの) 30 g をビーカーに入れ、0.1%酢酸 75 mL を加え、沸騰浴中で 10 分間加熱抽出した。冷却後、遠心分離を行い、上清を得た。残渣に再度 0.1%酢酸を加えて攪拌し、遠心分離を行った。得られた上清を先の抽出液と合一後、0.1%酢酸で 150 mL に定容した。無毒養殖トラフグからの抽出液調製は、研究分担者荒川氏が行った。

TTX 標準原液をトラフグの組織抽出液で適宜希釈し

て、4、1、0.25 MU/mL の TTX 溶液を調製した。

⑤ 有毒コモンフグ抽出液を用いた評価

コモン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。2014 年 10 月および 2015 年 6 月に岩手県大船渡魚市場で採取したコモンフグの凍結魚体を解剖し、筋肉と肝臓を取り、筋肉または肝臓のホモジネート 10g に 0.1%酢酸 40 mL を加えて混合し、沸騰浴中で 5 分間加熱した。氷冷したホモジネートに 0.1%酢酸を加えて 50 mL に定容した後、ろ紙 (No. 2) でろ過して検液を得、これを有毒コモンフグ抽出液とした。有毒コモンフグ抽出液の調製は、研究分担者佐藤氏が実施した。

3) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

2014 年 7 月から 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。TTX 分析のコントロールとして、市販のしらす加工品 (しらす干し) を用いた。

しらす加工業者があらかじめ選別したフグ稚魚試料を、双眼実体顕微鏡下で観察して、体色を含む外部形態に基づき分類した。形態分類は、研究分担者松浦氏が担当した。

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、種判別を行った。フグ稚魚の種判別は、厚生労働省医薬食品局食品安全部の「魚類乾製品等のフグ混入検査について」(平成 20 年) および「輸入魚類加工品のフグ種鑑別検査法について」(平成 23 年) に従った。すなわち、各ロットから 1 個体を選び、合計 17 個体 (静岡県 2 個体、兵庫県 2 個体、広島県 2 個体、愛媛県 5 個体、熊本県 2 個体、産地不明 4 個体) の筋肉 (約 15 mg) から全ゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 領域を増幅するプライマーまたはシトクロム b 領域を増幅するプライマーおよび TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を用いて PCR 増幅を行った。PCR 産物を DNA シークエンサーを用いて塩基配列を解析した。解析した塩基配列を nucleotide BLAST 検索に付し、種を決定した。

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 (約 0.1~0.3 g) 合一して、TTX 分析用試料とした。TTX の抽出は、食品衛生検査指針 理化学編

に記載の方法に準じた酢酸加熱法で行った。試料は乾燥品であるため、酢酸添加後、室温で 30 分間静置し、15 分間超音波処理した後、沸騰水浴中で 10 分間加熱した。冷却後、遠心分離して得られた上清を、遠心限外ろ過 (分画分子量 3000) したろ液を TTX 定量用試料とした。TTX の定量は LC-MS/MS 法で行った。

4) 有毒巻貝種判別法の開発

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、ミトコンドリア DNA の部分領域配列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 種のミトコンドリア DNA の 16S rRNA、シトクロム C オキシダーゼサブユニット I (COI)、18S rRNA 領域の塩基配列情報を Gene Data Bank で調査した。これら塩基配列から、なるべく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、プライマーを設計し、PCR 条件を検討した。今年度は、ミトコンドリア DNA 16S rRNA 領域とテトラミン保有巻貝を対象にして検討した。

巻貝試料には、エゾバイ科ヒメエゾボラ、エゾボラモドキ、エゾボラ、コエゾボラモドキ、ミクリガイ、ヒメエゾボラ、エゾボラ、オオエッチュウバイ、ヨーロッパエゾバイ、テングニシ科テングニシおよびイトマキボラ科ナガニシの 11 種の生鮮品と市販加工品を用いた。

各試料の筋肉から全ゲノム 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 1.2%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. 研究成果:

1) コモンフグの毒性調査

各地で漁獲されたコモンフグの毒性を表 1 にまとめた。調べたコモンフグすべてが有毒 (10 MU/g 以上) 個体であった。まず、凍結試料 32 個体についてみると、各組織における有毒個体出現率は、皮 96.7% (30 個体中 29 個体)、肝臓 86.7% (30 個体中 26 個体)、卵巣 81.0% (21 個体中 17 個体)、消化管 80.0% (30 個体中 24 個体)、筋肉 40.6% (32 個体中 13 個体) で、各組織の最高毒性値は、皮 2,290 MU/g、肝臓 1,270 MU/g、卵巣 977 MU/g、消化管 590 MU/g、筋肉 60.8 MU/g であった。皮と肝臓は“猛毒”レベル (1,000 MU/g 以上)、卵

巢はほぼ“猛毒”レベルに達する“強毒”レベル(100~999 MU/g)、消化管も“強毒”レベルで、筋肉は“弱毒”レベル(10~99 MU/g)であった。精巢は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ングは1地域の10個体しか測定していないが、卵巣は8個体すべてが有毒で、毒性値は466~3,540 MU/gと高かった。肝臓は有毒個体出現率100%(10個体中10個体)、毒性値14.0~422 MU/gであった。皮は10個体中8個体が有毒(10 MU/g以上)だったが、毒性値は6.4~44.1 MU/gと低く、最高でも“弱毒”レベルであった。筋肉と精巢からは毒性は検出されなかった(5 MU/g未満)。

2) 市販 TTX 検査キットの評価

本キットは、検液中に TTX がないとキットの C と T に 2 本の赤いバンドが出現するが、TTX があると T のバンドは消失し、C のみのバンドになる。このバンドの有無から、TTX の存否を検査するものである(図1)。

① TTX 標準液による検出限界の確認

最初に、プロトコールに従って“Sample diluent”を用いた。“Sample diluent”100 µL を塗布したところ、C と T に 2 本の赤いバンドが出現した(図1)。次に、“Sample diluent”で希釈した TTX 標準液(0.0625~10 MU/mL)をそれぞれ100 µL 塗布してバンドの出現を観察した。TTX 濃度を変化させてバンド出現の様子を検討したところ、10 MU/mL TTX 標準液では T のバンドはみられず C のバンドだけであった。1 MU/mL と 0.5 MU/mL では T のバンドは C のバンドに比べ明らかに薄くなったが検出され、0.25 MU/mL 以下では T のバンドが濃く見られた。しかし、ブランク(緩衝液)よりは薄い。主観的な判断になるが、0.5 MU/mL あたりが検出限界のように思われる。

次に、0.1%酢酸溶液で調製した TTX 標準液(0.0625~4 MU/mL)を用いて、同様に実験した。0.25 MU/mL までは 1 MU/mL のときと同じようで、0.125 MU/mL 以下では T のバンドがやや濃く見られた(図2)。しかし、ブランクの 0.1%酢酸溶液よりは薄い。主観的な判断ではあるが、0.25 MU/mL あたりが検出限界のように思われる。

フグ毒の抽出には 0.1%酢酸が用いられるため、これ以後の実験では、希釈液に 0.1%酢酸を用いることとする。

② TTX 誘導体の反応性

ブランクの 0.1%酢酸では T と C に赤いバンドが検出され、対照の TTX 標準品(1 MU/mL、0.627 nmol/mL)では T のバンドが薄くなった(図示せず)。これを基準にして 11-oxoTTX の反応性を調べた。TTX 標準品と同じ濃度(0.627 nmol/mL)のとき、TTX 標準品に比べると T バンドはやや赤い色が濃かった。濃度を 2 倍(1.25 nmol/mL)、4 倍(2.51 nmol/mL)に増やすと T バンドの色が薄くなり、4 倍濃度の時、TTX 標準品とはほぼ同じような色合いであった(図示せず)。

TrideoxyTTX は 2 段階の濃度(0.627 nmol/mL および 3.14 nmol/mL)で反応性を調べた。試料液をキットに付したところ、いずれも C バンドに比べて T バンドの色は明らかに薄く、3.14 nmol/mL 試料液の方が薄くなった(図示せず)。

すなわち、11-oxoTTX と 5,6,11-trideoxyTTX は、同濃度の TTX に比べ反応性は劣るが、TTX 抗体と反応することがわかった。

③ 麻痺性貝毒の反応性

麻痺性貝毒として、GTX1&4、GTX2&3、dcGTX2&3 を用いた。濃度はそれぞれ、6.27 nmol/mL と 0.627 nmol/mL の 2 段階調製した。いずれの混合液ならびに濃度においても、T と C に赤いバンドが検出され、麻痺性貝毒成分は TTX 抗体と反応しないことがわかった(図示せず)。

③ マトリクスの影響

無毒養殖トラフグの組織抽出液を検査キットに塗布した。各組織抽出液は“無毒”なので、C と T に 2 本の赤いバンドが出現するはずである。筋肉と精巢の抽出液ではブランクの 0.1%酢酸と同様に C と T に 2 本の赤いバンドが検出された。しかし、皮の抽出液ではバンドは C にしかみられず、卵巣と肝臓の抽出液では T のバンドがきわめて薄かった。確認のためもう一度繰り返したが、結果は同じだった。

次に、TTX 標準液を各組織抽出液で希釈して、4、1、0.25 MU/mL の 3 段階の濃度の TTX 溶液を調製した。0.1%酢酸で希釈した場合、TTX 濃度に依存して T のバンドが薄くなった(図示せず)。1 MU/mL でも若干 T にバンドが見えるが、4 MU/mL では C だけになった。今回用いた 5 つの組織抽出液の中で、0.1%酢酸を同じ結果を示したのは、精巢抽出液だけであった。筋肉の抽出液で希釈した場合、0.25 MU/mL で T のバンドが薄くなったが、4 MU/mL でもバンドは 2 本見えた。卵巣抽出液の場合、TTX がない状態でも T のバンドが薄く、TTX 溶液 4 MU/mL のとき T のバンドはみえな

った。肝臓と皮の抽出液では、TTX を添加しても変化はなかった。

④ 有毒コモンフグ抽出液を用いた評価

筋肉と肝臓がそろっている試料 (km3、km4、km5、km6、km13、km14、km30) と、毒性のない km16 と km18 の合計 18 抽出液を試験した。筋肉の抽出液では、km18 (0 MU/mL) と km30 (0.62 MU/mL) が T にやや薄いバンドがみられた。一方、毒性がないはずの km16 はごく薄く T にバンドがあるが、他の有毒抽出液と区別できない。km3 の筋肉抽出液 (5.32 MU/mL) を 0.1% 酢酸で 10 倍ずつ希釈して反応性を検討したところ、100 倍希釈液 (0.053 MU/mL) で C と T に 2 本のバンドが検出された (図示せず)。

肝臓では、ブランクの抽出液でも、T バンドは薄いので検出の判断がむずかしいが、km3、km13、km14、km30 にやや薄く T のバンドが見えた。Km3 肝臓抽出液 (449 MU/mL) を 0.1% 酢酸で 10 倍ずつ希釈して反応性を検討したところ、1,000 倍希釈液 (0.45 MU/mL) までは抽出液のときとほぼ同じで、10,000 倍希釈液 (0.045 MU/mL) になって T バンドがクリアに見えた (図示せず)。

毒性がないはずの抽出液の km16 と km18 についても、0.1% 酢酸で 10 倍希釈液と 100 倍希釈液をそれぞれ調製して反応性を検討したが、T バンドはあらわれなかった (図示せず)。

3) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

① 魚種判別

調べたフグ稚魚 17 個体のうち、15 個体は、体側に銀白色の縦帯があり、腹側は白色を呈し、体表には小棘が分布していたことから、サバフグ属と判別した。一方、2 個体は体表に小棘は見られず、体側に銀白色の縦帯も見られなかった。また、体側と背側が褐色を呈していたことから、両個体はトラフグ属と判別した。

ミトコンドリア DNA 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 個体のミトコンドリア DNA の 16S rRNA 部分領域の塩基配列はナシフグ (Accession No. AB741999) と 100% 一致したが、第 2 候補のシマフグ *Takifugu xanthopterus* (Accession No. AP009533) と 1 塩基しか違いがなかったため、シトクロム b 領域における PCR を行い、得られた増幅産物 (約 500 bp) の塩基配列解

析を nucleotide BLAST で検索した。その結果、両個体ともナシフグと判別した。

② 毒性試験

静岡県 (1 試料)、兵庫県 (1 試料)、愛媛県 (5 試料) 熊本県 (1 試料) および産地不明 (4 試料) の 12 試料について、LC-MS/MS で TTX 分析を行った。シロサバフグと判別された試料から TTX は検出されなかった (10 ng/g 未満)。一方、ナシフグと判別された試料から、TTX と推測されるわずかなピークが検出されたが、定量下限値 (30 ng/g) 未満であった。SIR (Selected Ion Recording) 法で TTX 関連物質の分析を行ったが検出されなかった (図示せず)。

4) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝特異プライマー設計して、PCR 条件を種々検討した結果、巻貝から抽出したミトコンドリア DNA 16SrRNA 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、「シライトマキバイ、クビレバイ、ヒモマキバイ」、「エゾボラモドキ、クリイロエゾボラ、ヒレエゾボラ」、「エッチュウバイ、アニワバイ」の 3 組については、それぞれ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。

D. 考察

1) コモンフグの毒性調査

コモンフグ凍結試料では、筋肉が有毒のものがみられた。その割合は 32 個体中 13 個体、有毒個体出現率 40.6% と低くない。そして、最高毒性値は 60.8 MU/g を示した。しかし、この試料魚は皮の毒性が 2,290 MU/g と極めて高かった上、解凍しすぎてしまい、皮から筋肉への毒の移行が考えられる。この点については、来年度、活魚または生鮮魚を入手して組織別に毒性を調べるとともに、凍結・解凍したときの毒の移行を検討する予定である。

日本産フグの毒力表 (谷, 1945) によれば、コモンフグの組織別毒力は、卵巣と肝臓が“猛毒”、皮、消化管、精巣は“強毒”、筋肉が“弱毒”とランクされている。しかしながら、本結果に従えば、皮はかなりの頻度 (40 個体中 6 個体) で、また、漁獲地によらず“猛毒”個体が検出されているので、“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。

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 (0.22 µg)。陽性: 1 MU/mL (0.22 µg)、陰性: 0.25 MU/mL (0.05 µg)) を確認できた。TTX 検査キットのフグ毒検出は抗体に依存するため、本検査キットは、麻痺性貝毒 (GTX1&4, GTX2&3, dcGTX2&3) とは反応しないが、TTX 誘導体の 11-oxoTTX や 5, 6, 11-trideoxyTTX と反応した。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は難しい。一般に、フグをはじめフグ毒保有毒物は、TTX 以外にも複数の TTX 誘導体をもっている。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。しかし、5, 6, 11-trideoxyTTX のような毒性の低い成分が多量に混在している場合には、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 T のバンドが消えたり (擬陽性)、TTX が添加されているにもかかわらず、T バンドの消失が起こらないなど (擬陰性) の現象が観察されたことから、抽出液中のマトリッ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) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

2014 年 7 月から 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 分析を行い、フグ稚魚混入の実態を調査した。しらす加工品に混入していたフグ稚魚のサイズは数 mm から 3 cm 程度であった。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 未満であった。TTX の比毒性 (5,000 MU/mg) から、これを毒性値に換算すると 0.15 MU/g 未満となる。

フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性を評価するには、フグの毒性値と摂食量を考慮しなければならない。しらす加工場等の選別作業において、しらす加工品へのフグ稚魚の混入率を調べたところ、33 ロット

8,245 kg からフグ稚魚 795 個体 27.2 g が検出された。この値から、しらす加工品 1 kg あたりのフグ稚魚の混入は 0.096 個体で、しらす加工品 10.4 kg にフグ稚魚 1 個体が混入したことになる。これを重量に換算すると、しらす加工品 1 kg あたりフグ稚魚 0.0033 g の混入となる。これらの値と、1 回に食べるしらすの量 (しらすおろしで約 10~20 g, しらす丼で約 60~80 g) 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。

4) 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つた。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「シライトマキバイ、クビレバイ、ヒモマキバイ」、「エゾボラモドキ、クリイロエゾボラ、ヒレエゾボラ」、「エッチェウバイ、アニウバイ」をそれぞれ正確に判別するには、別の遺伝子領域を新たに検討する必要がある。

E. 結論

コモンフグの喫食による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沿岸で漁獲されたコモンフグの毒性調査を行った。その結果、凍結試料 32 個体中 13 個体の筋肉から 10 MU/g を超える毒性が検出された。しかし、これらは皮の毒性が著しく高かったため、試料の凍結・解凍によって毒が有毒の皮から無毒の筋肉に移行した可能性が考えられた。今後、活魚または鮮魚のコモンフグの毒性調査を行うとともに、凍結解凍による毒の移行をモデル実験で調べる必要がある。

もう一つの緊急要請課題として、マウス検定法に代わるフグ毒検査法を検討した。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、マトリッ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と、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。

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年に集めた試料では、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。

わが国では、毎年巻貝による自然毒食中毒が起こっているため、遺伝子による有毒巻貝の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 種巻貝のミトコンドリア DNA 16S rRNA 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った。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) 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.
 - 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) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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
- ### 2. 書籍等
- 1) 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. 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, 山口県下関市, 2015 年 5 月.
 - 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) A. Kiriake, Y. Nagashima, K. Shiomi: Primary structure of a proteinaceous toxin from rabbitfish *Siganus fuscescens*. 2015 年 9 月, 18th Congress of the International Society on Toxinology, London, United Kingdom.
 - 7) 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.
 - 8) 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.

- 9) 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。
- 10) 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。
- 11) 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一種判別とフグ毒分析一。平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区。
- 12) 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。
- 13) 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。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 コモンフグの毒性 (2015年)

漁獲地	漁獲年月	凍結/生鮮		筋肉	皮	肝臓	消化管	卵巣	精巣
山口県	2015年6月	凍結	有毒個体出現率	6/14	14/14	12/14	10/14	6/7	0/3
			毒性値	<5~60.8	126~2290	<5~1270	<5~82.2	<10~313	<10
京都府	2015年10月	凍結	有毒個体出現率	2/6	5/6	4/4	3/4	3/3	
			毒性値	<5~23.6	8.0~418	37.4~318	<5~90.6	58.1~258	
石川県	2015年10月	凍結	有毒個体出現率	0/5	3/3	3/5	4/5	3/4	
			毒性値	<5	27.5~57.6	<5~56.8	<5~34.1	9.9~257	
東京湾	2015年10月	凍結	有毒個体出現率	5/7	7/7	7/7	7/7	5/7	
			毒性値	<5~30.9	13.1~1880	58.1~739	21.9~590	<5~977	
凍結試料のまとめ			有毒個体出現率	13/32	29/30	26/30	24/30	17/21	0/3
			毒性値	<5~60.8	8.0~2290	<5~1270	<5~590	<5~977	<10
東京湾	2015年11月	生鮮	有毒個体出現率	0/10	8/10	10/10	—	8/8	0/2
			毒性値	<5	6.4~44.1	14.0~422	—	466~3540	<5

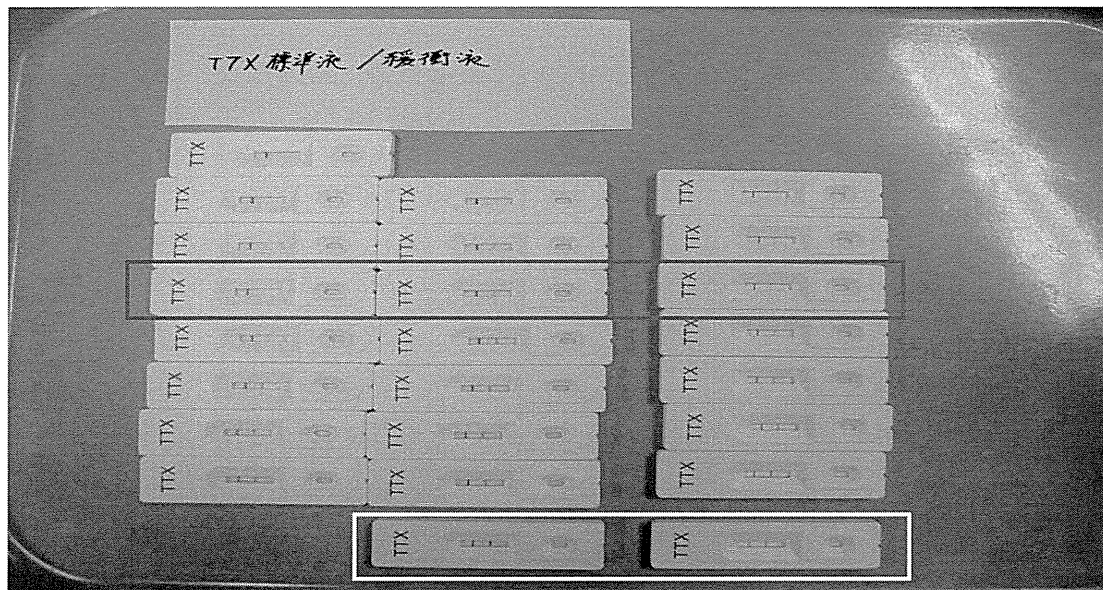


図1 TTX標準液(緩衝液)の反応

左上段から、10、4、2、1(赤い枠)、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL。100 μ L塗布。中上段から、4、2、1(赤い枠)、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL、ブランク(緩衝液)(白い枠)。100 μ L塗布。右上段から、4、2、1(赤い枠)、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL、ブランク(緩衝液)(白い枠)。30 μ L塗布

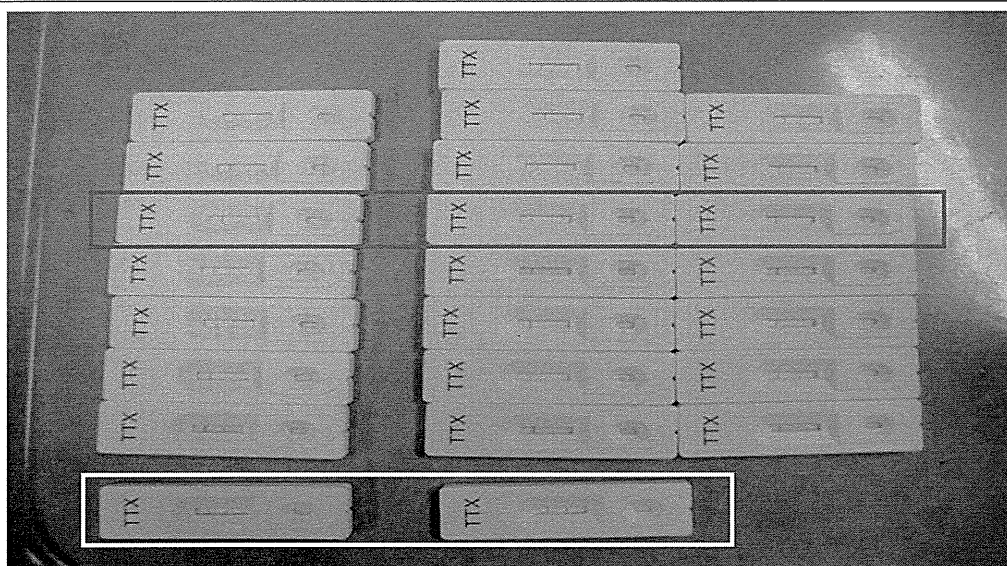


図2 TTX標準品(0.1%酢酸)の反応

左上段から、4、2、1(赤い枠)、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL、ブランク(0.1%酢酸)(白い枠)。中上段から、10、4、2、1(赤い枠)、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL、ブランク(0.1%酢酸)(白い枠)。右上段から、4、2、1(赤い枠)、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL。

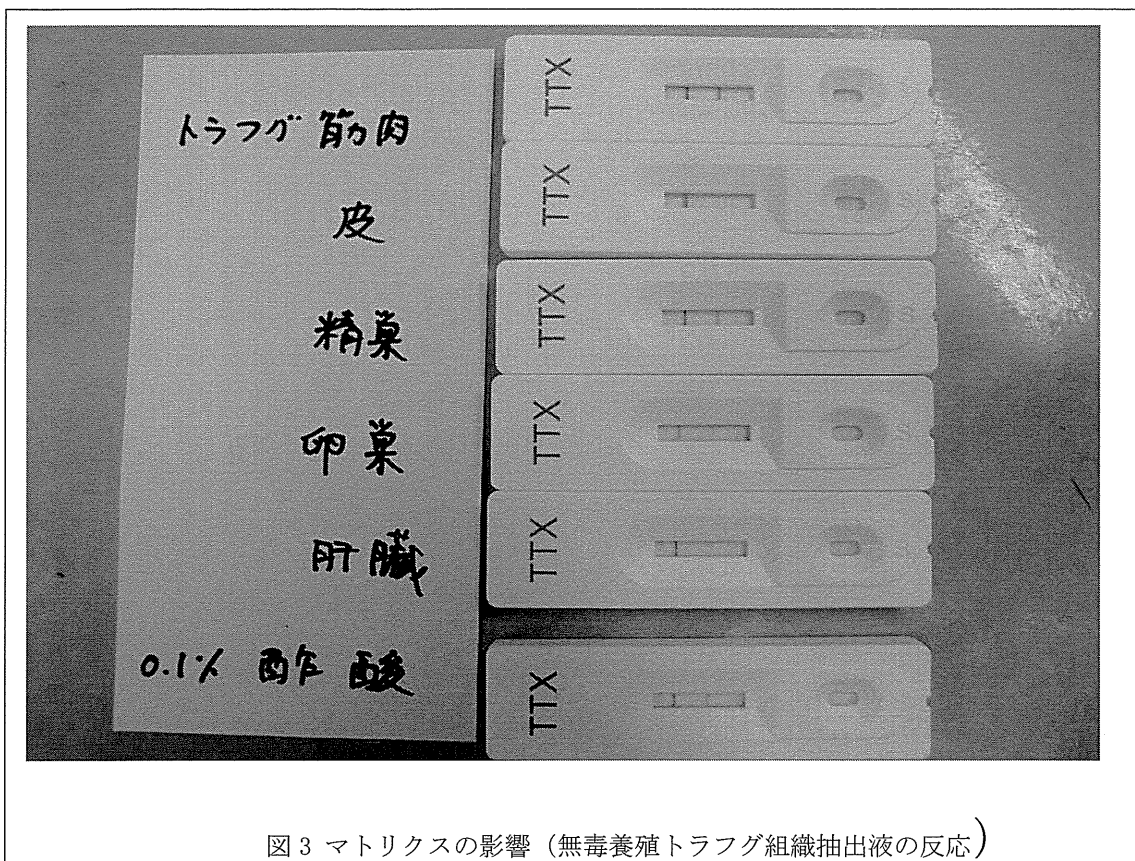


図3 マトリクスの影響（無毒養殖トラフグ組織抽出液の反応）

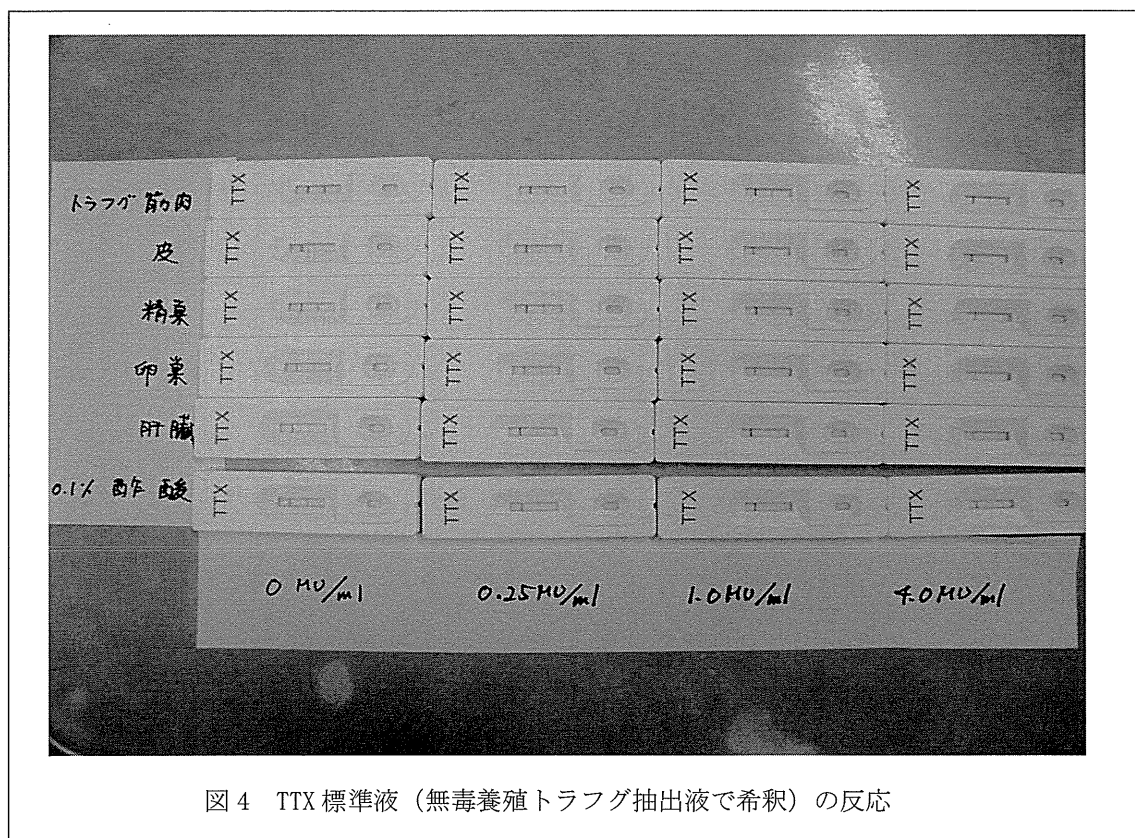


図4 TTX 標準液（無毒養殖トラフグ抽出液で希釈）の反応

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

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

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

研究協力者 高谷智裕 長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

研究協力者 谷口香織 株式会社 萬坊

研究要旨

フグ毒テトロドトキシン (TTX) およびパリトキシン (PTX) 様毒のリスク管理に資するため、現行のフグ毒検査法を見直すとともに、ラット骨格筋培養細胞を用いた PTX/PTX 様毒検出・定量法の開発を試み、併せて有明海産コモングの毒性を調査した。まず、トラフグ有毒肝臓を用い、食品衛生検査指針理化学編に記載の「参考法」とその抽出操作を簡素化した「簡便法」の毒量測定値を比較したところ、簡便法の測定値は抽出比が高いほど高く、抽出比 3 以上で参考法より 15~20 %程度高い値となることがわかった。次いで、LC-MS における試料由来マトリクスの影響について調べた。すなわち、無毒トラフグ肝臓の 1:1、1:2、および 1:5 抽出液に TTX 標品を添加し、適宜希釈後、LC-MS で TTX 量を測定したところ、いずれも 10 倍以上の希釈で 100%近い回収率が得られた。一方、培養筋細胞に 1~1000 ng/mL の PTX を暴露したところ、細胞の損傷に伴い、培地中にクレアチンホスホキナーゼ (CPK) および乳酸脱水素酵素 (LDH) が放出された。PTX 濃度と CPK/LDH 活性の間には高い正の相関がみられ、それらの回帰式からイワサナギンチャク中の PTX を定量することができた。アオブダイ中毒検体抽出液も筋細胞に毒性を示した。他方、凍結保存した有明海産コモング 12 個体の毒性を調べたところ、皮、肝臓、および卵巣は、‘猛毒’、筋肉と精巣は‘弱毒’であった。筋肉の有毒個体出現率は 58%と高く、最高毒力は 98 MU/g に達した。

A. 研究目的

魚貝類による自然毒食中毒の中で、日本ではフグ毒テトロドトキシン (TTX) によるものが最も多く、致死率も高い。そのため、厚生労働省は「フグの衛生確保について」の通知を出し、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。前述の通知は、谷博士が 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、コモング等、同表を上回る毒力を示すフグの例が散見される。また、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や自然交雑種の頻出など、新たな問題も浮上しており、今後、フグのリスク管理を強化、見直す必要が出てきた。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「参考法」

(マウス毒性試験法) は、抽出操作が煩雑で効率が悪く、この点の改良と機器分析への移行を検討する必要がある。

一方、近年、アオブダイに加え、ハコフグにより横紋筋融解症を主徴とする中毒が散発しているが、原因物質（生化学的性状がパリトキシン (PTX) に類似しているため PTX 様毒と仮称）については不明な点が多く、化学構造が特定されていないため、未だに有効な検出・定量法が確立されていない。

このような状況の下、フグ毒および PTX 様毒のリスク管理に資するため、今年度はまずフグ毒検査法の見直しとして、「参考法」の抽出操作を簡素化した「簡便法」の有効性、および機器分析 (LC-MS) における試料由来マトリクスの影響について検討するとともに、ラット骨格筋培養細胞を用いて新たな PTX/PTX 様毒検出・定量法の開発を試みた。併せて、少個体数ながら、有明海

産コモンフグの毒性を調べた。

B. 研究方法

1) フグ毒検査法の見直し

①簡便法の有効性

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。すなわち、まず参考法として、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。

②LC-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。

2) 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1~1000ng/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 tuberclosa* 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。

3) コモンフグの毒性調査

2015年10月~2016年1月に採取後、凍結保存しておいた有明海産コモンフグ12個体（体長 17.6 ± 3.2 cm、体重 185.4 ± 96.2 g）を試料とした。いずれも、流水中で急速解凍後、簡便法で組織別に毒を抽出し、マウス毒性試験にて毒力（MU）を測定した。

C. 研究結果

1) フグ毒検査法の見直し

①簡便法の有効性

参考法と簡便法の比較を図1に示す。参考法で138MU/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184MU/gと測定された肝臓の場合、簡便法の測定値は1.14~1.22で、138MU/gの肝臓の場合より総じて若干高かったものの、基本的には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。

②LC-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を図2を示す。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、総じて表示濃度どおりの測定値が得られた。

2) 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。すなわち、10ng/mL以下の濃度では、筋管細胞のチューブ状の形態が維持されていたが、拍動が停止し、一部の細胞に損傷がみられたのに対し、100ng/mL以上の濃度では、細胞膜が顕著に薄くなり、丸く縮むように変化した

(図 3)。

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 (図 2)。6 時間後の PTX 濃度 (x) と CPK (y) の間には高い正の相関がみられ、以下の回帰式が得られた (図 4)。

$$y = 90.604 \ln(x) - 61.963 \quad (R^2 = 0.9231)$$

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/mL 以下) での値に基づき、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 (図 5)。実験取扱いの利便性から、今回は 24 時間後の値を用いて検討したところ、PTX 濃度 (x) と LDH (y) の間には高い正の相関がみられ、以下の回帰式が得られた (図 6)。

$$y = 12.365 \ln(x) + 11.659 \quad (R^2 = 0.9235)$$

他方、筋細胞にイワスナギンチャク抽出液を暴露すると、いずれの濃度においても細胞損傷が観察され、0.1 g 試料/mL 以上の濃度で LDH の値 (相対活性) がほぼ 100% に達した (図 7)。前述の回帰式から当該イワスナギンチャクの毒量を求めたところ、9.5 μ gPTXeq/g と計算され、LC-MS/MS で測定した PTX 量 (7.0 μ g/g) と概ね一致した。アオブダイの抽出液の場合、肝臓、およびわずかながら筋肉で、丸く縮むような細胞損傷が確認された (図 8)。LDH の値は肝臓で約 70%、筋肉で約 30% で、PTX 換算値は、それぞれ 103 および 2 ng PTXeq/g となった。

3) コモンフグの毒性調査

有明海産コモンフグの毒性を表 1 に示す。皮、肝臓、および卵巣は、いずれも '猛毒' (それぞれ 84-2398 MU/g、<3~2402 MU/g、48~1644 MU/g) で、皮と肝臓では 2000 MU/g を超える個体も 2 個体ずつ見られた。一方、筋肉と精巣は '弱毒' (<3~98 MU/g および 5~81 MU/g) であったが、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% と高く、最高毒力は 98 MU/g と '強毒' に近い値であった。

D. 考察

1) フグ毒検査法の見直し

①簡便法の有効性

前述のように、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示唆される。従って、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。

今回、強毒の肝臓を用いたが、今後は弱毒の肝臓に加え、皮と筋肉についても検討する予定である。

②LC-MS における試料由来マトリクスの影響

低抽出比の試料では、希釈倍率が高くなると回収率が 100% に近づくことから、肝臓から抽出される夾雑成分が TTX のイオン化を阻害しているものと推察された。

今回、1:2 抽出液の 5 倍希釈以上、および 1:5 抽出液の標準溶液でも 90% 以上の回収率が得られたが、希釈しても十分な精度で TTX を分析できる場合は、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 MS の検出感度に応じた希釈が必要であろう。

2) PTX/PTX 様毒検出・定量法の開発

今回、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 (1~1000 ng/mL) 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、当該検出・定量法により ng レベルの PTX の検出・定量が可能になるものと思われる。

一方、アオブダイ中毒検体抽出液も筋細胞に毒性を示したが、特異性や横紋筋融解との関連については不明な点が多い。

今後は、筋細胞に対する横紋筋融解誘起物質の作用を詳細に調べ、横紋筋融解の特異的指標となるマーカーを見出す必要がある。

3) コモンフグの毒性調査

前述のとおり、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の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。

E. 結論

前述のとおり、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、迅速に、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、この方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。

一方、特異性や安定性、感度の点でまだ問題はあるものの、今回、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。本方法は、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。

今回供試したコモンフグでは、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。今後も慎重に調査を継続していく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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, 82, 167 (2016).

2. 学会発表

- 1) K. Okita, H. Satone, E. Tan, S. Kinoshita, S. Asakawa, H. Yamazaki, K. Sakiyama, T. Takatani, O. Arakawa, A. Hagiwara and 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, Portland, Aug. 2015.

- 2) 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」, 宮城県仙台市, 2015 年 9 月.
- 3) C. Urata, S. Jiang, K. Kuwano, T. Takatani and 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, Jeju, Nov. 2015.
- 4) Y. Kanahara, R. Tatsuno, K. Soyano, T. Takatani and 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, Jeju, Nov. 2015.
- 5) W. Gao, R. Tatsuno, K. Yamaguchi, T. Takatani and O. Arakawa: Expression of PSTBP homologues in several pufferfish species. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, Jeju, Nov. 2015.
- 6) 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, 東京, 2016 年 3 月
- 7) 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, 東京, 2016 年 3 月
- 8) 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, 東京, 2016 年 3 月
- 9) 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, 東京, 2016 年
3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし