

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

コモンフ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

コモンフ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フグの毒性を調査し、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。蒐集したコモンフグ 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き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フ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フ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、コモンフグは筋肉だけが食用可能

で、その他の部位（皮、精巢、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フグであった（登田ら、2012）。多くの事例において、コモンフ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フグ（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、コモンフグの毒性評価について緊急に対応する必要があるため、コモンフ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

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。

TTX 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 AAAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAAGACATTGGCAC**
 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**
 M13 R **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℃、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℃、12 L/min)、シースガス：N₂(350℃、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。

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

mtDNA 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℃ 30 分間で酵素処理した後、85℃ 15 分間で酵素を不活化した後、4℃ 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の判断で 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、原因食品の摂取量、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、身体の表層部と中心部の 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、引き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き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