

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グ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ググ皮は、“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グ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、コモング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ったが、それ以外では種判別が可能であった。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、コモンググの喫食によると疑われるフグ食中毒が発生したため、コモング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℃ 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学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 2g 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 2g 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、1mg、細胞生物用、Lot SAJ2556) を用いた。テトロドトキシン (TTX) 1mg を含むアンプルの 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 1mg/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 Na₂HPO₄ + 0.24g KH₂PO₄, 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。

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。

TTX 誘導体の反応性

TTX 類似体には、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。

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 ± 3.1 μmol/L, GTX4 19.7 ± 1.6 μmol/L, GTX1+GTX4 80.0 ± 2.2 μmol/L)、CRM-GTX2&3-c (Lot#20081203 1443, GTX2 114.2 ± 5.7 μmol/L, GTX3 43.4 ± 2.2 μmol/L, GTX2+GTX3 157.6 ± 7.7 μmol/L)、CRM-dcGTX2&3-c (lot#20141203 0223, dcGTX2 100.1 ± 7.0 μmol/L, dcGTX3 29.4 ± 2.1 μmol/L, dcGTX2+dcGTX3 129.5 ± 8.0 μmol/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。

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)30g 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。

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 (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)、卵巣はほぼ“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 が無いとキットの 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)。

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 μ L 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 μ L 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) よりも薄い。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、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。

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。

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)。

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、精巣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 が無い状態でも T のバンドが薄く、TTX 溶液 4 MU/mL のとき T のバンドはみえなかった。肝臓と皮の抽出液では、TTX を添加しても変化はなかった。

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。

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」¹⁾、「エゾボラモドキ、クリイロエゾボラ、ヒレエゾボラ」²⁾、「エッチュウバイ、アニワバイ」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。

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きているので、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) 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 *Taki fugu 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: ポ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.
- 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