

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スナギンチャク中の 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

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。

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 10 MU/mL を調製し、表示濃度を 10 MU/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、0.5 MU/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 1~1000 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。

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

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 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、簡便法の測定値は 1.14~1.22 で、138 MU/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。

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、10 ng/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、100 ng/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 µgPTXeq/gと計算され、LC-MS/MSで測定したPTX量(7.0 µg/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

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。

LC-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つたものの、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 珊珊, 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

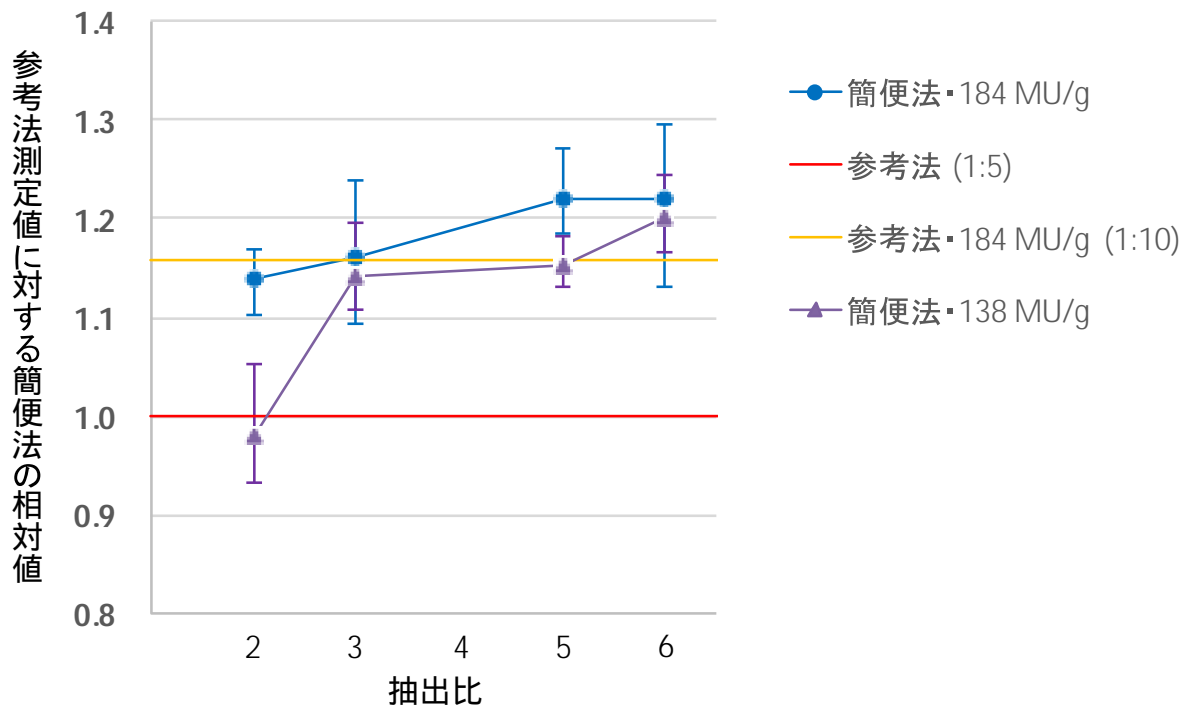


図1 参考法と簡便法の測定値の比較

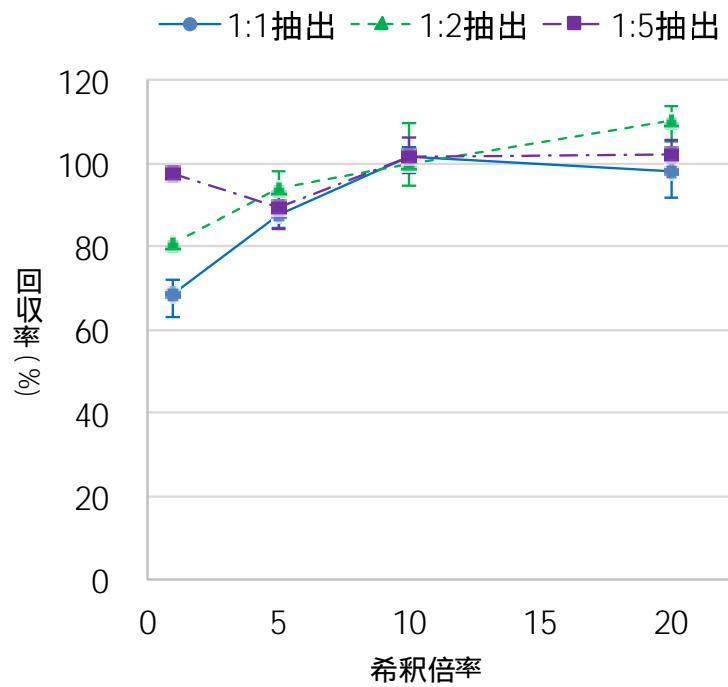


図2 LC-MS法におけるマトリクスの影響

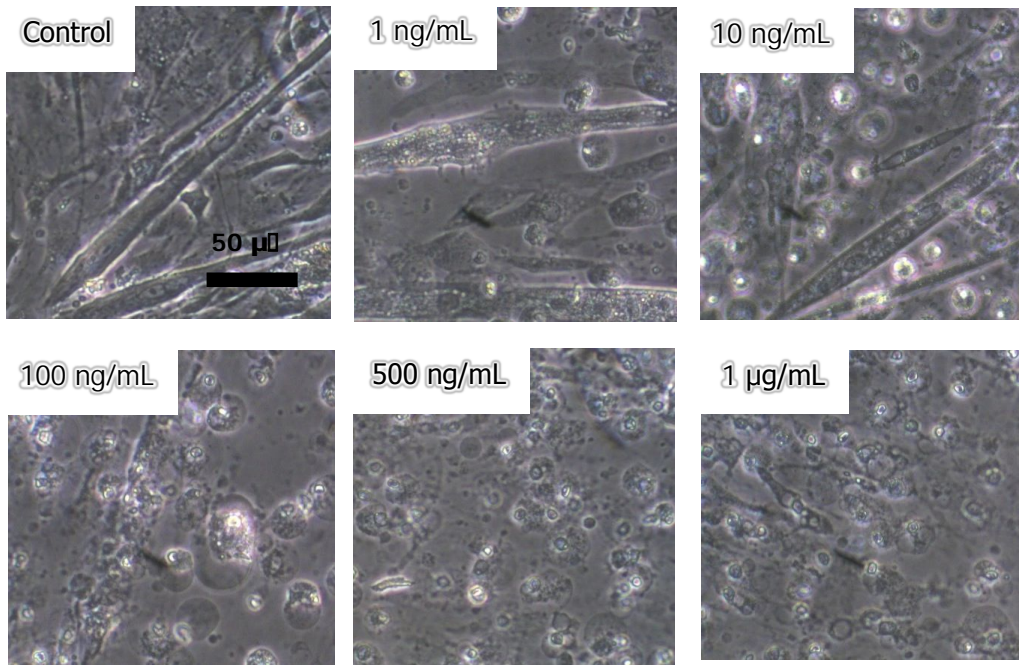


図3 各濃度の PTX を暴露した筋細胞の形態変化

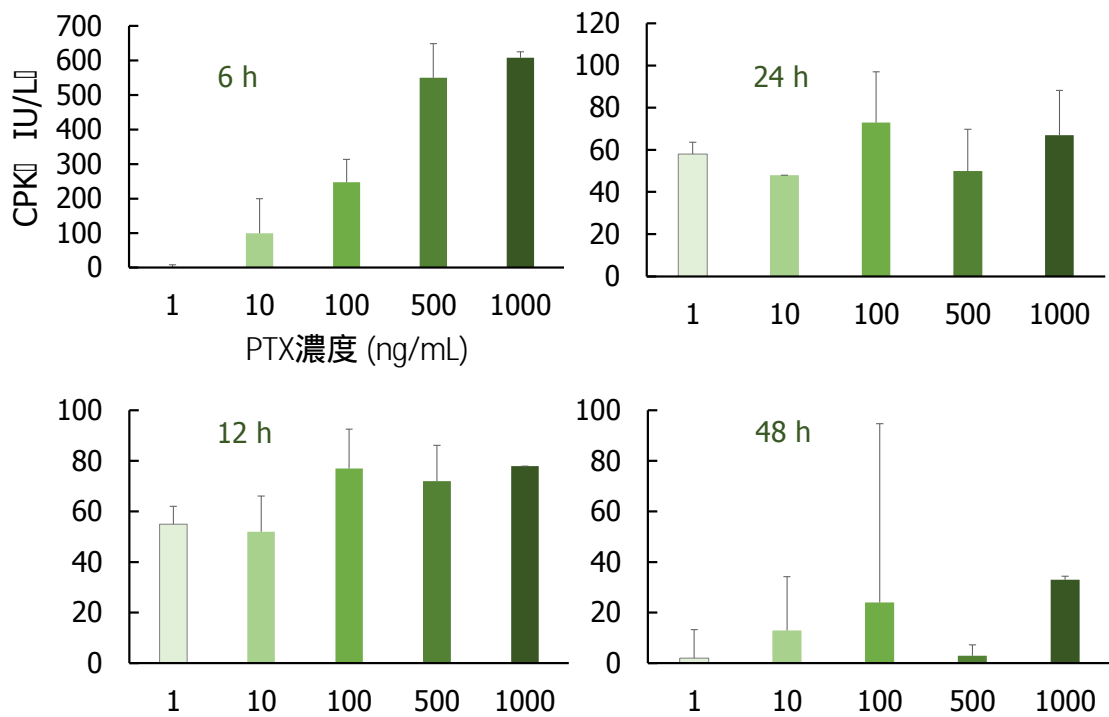


図4 PTX を暴露した筋細胞培養液の CPK 値

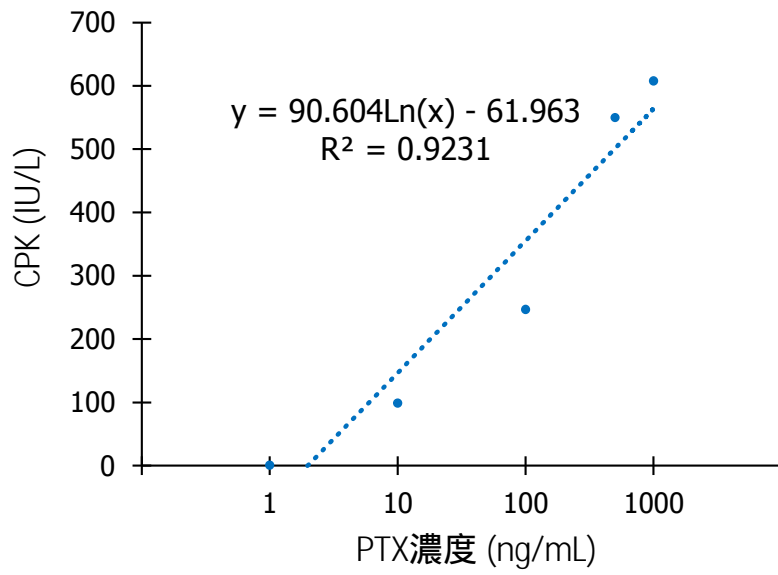


図5 PTX濃度とCPK値の相関

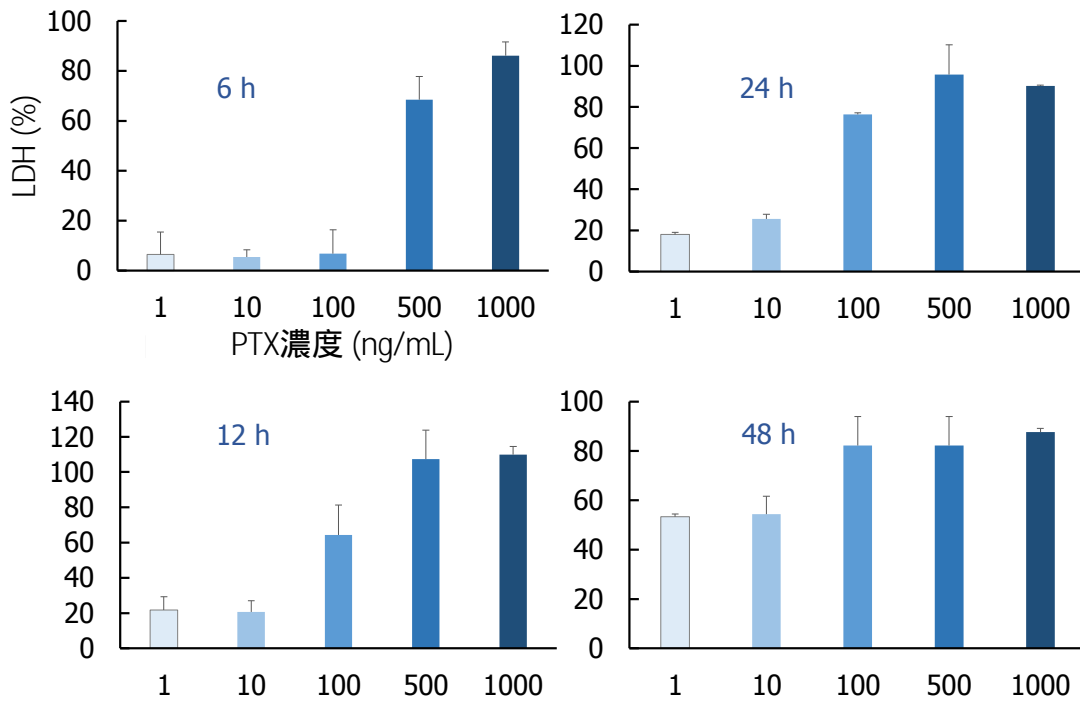


図6 PTXを暴露した筋細胞培養液のLDH値(相対活性)

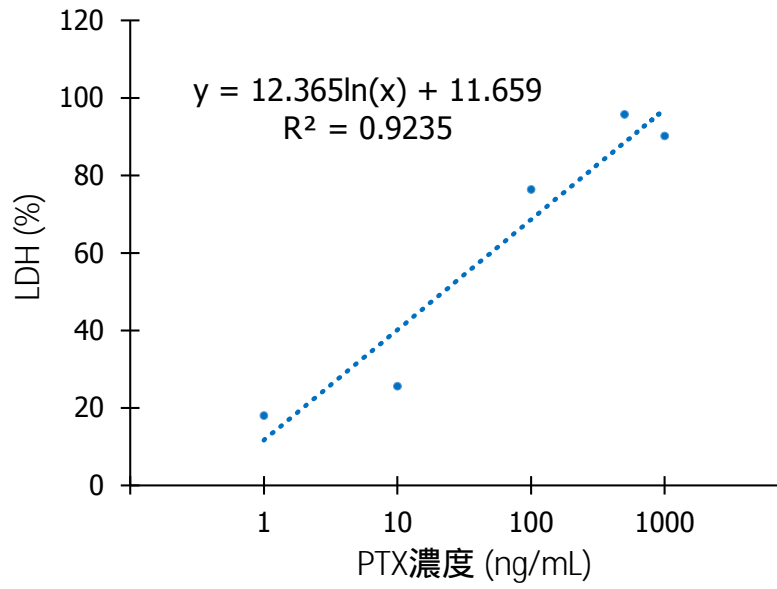


図6 PTX濃度とLDH値の相関

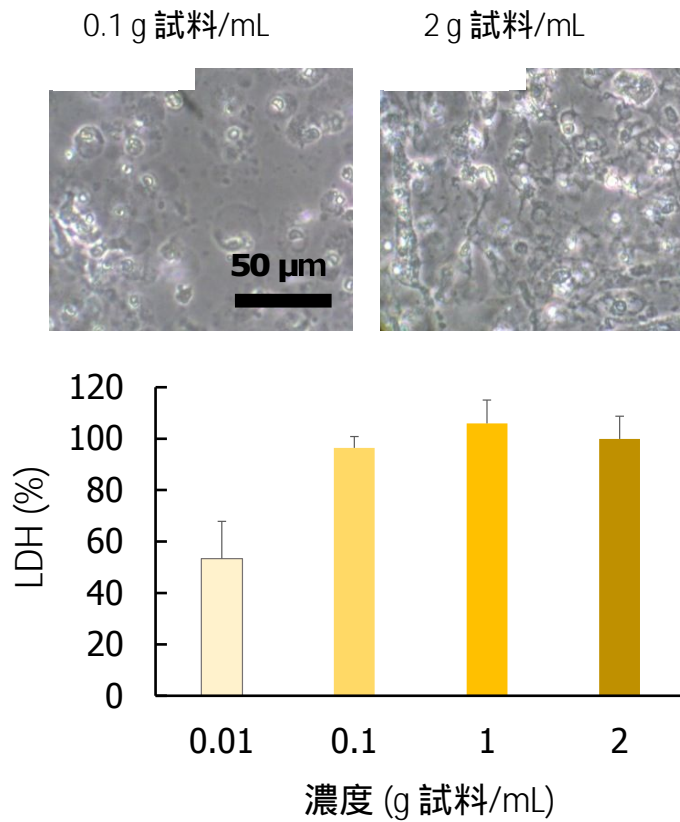


図7 イワスナギンチャク抽出液暴露 24 時間後の筋細胞の形態変化と LDH 値

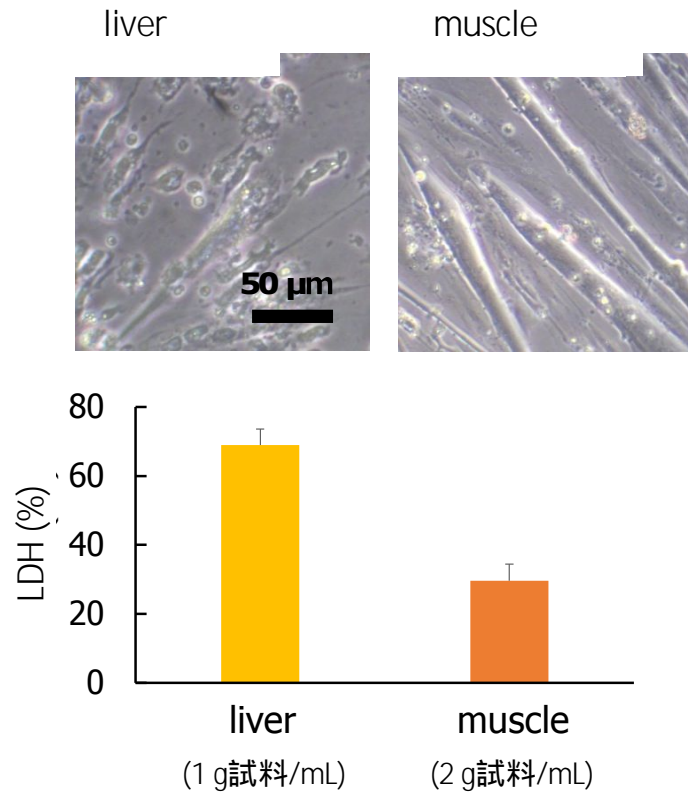


図8 アオブダイ中毒検体抽出液暴露 24 時間後の筋細胞の形態変化と LDH 値

表1 有明海産コモンフグの毒性

No.	性別	体長 (cm)	体重 (g)	毒力 (MU/g)			
				筋肉	皮	肝臓	生殖腺
1		15.0	97.3	< 3	84	24	319
2		15.0	98.3	32	218	295	48
3		15.4	96.5	45	1080	197	504
4		13.7	74.9	46	290	67	81
5		15.3	115.8	98	1614	2190	1363
6		23.4	369.5	13	1015	2402	945
7		19.6	235.1	19	2398	258	1465
8		21.2	285.1	3	119	< 3	170
9		21.2	275.2	12	2043	391	1644
10		19.3	248.4	6	288	519	5
11		13.4	88.3	< 3	284	39	594
12		18.6	240.1	< 3	192	6	608