

研究要旨

マリントキシンのリスク管理を強化、改善することを目的として、**フグ毒検査法の検討**、**フグ等の毒性評価**、**遺伝子によるフグ類等の種判別**、**フグ類の形態分類**、**麻痺性貝毒（PSP）標準品の検討**を行った。

フグ毒検査法の検討では、検査用試験液調製のため、フグ毒抽出法を検討し、現行の参考法と、抽出液のろ過と最終段階でのメスアップを行わない簡便法を比較したところ、簡便法の精度が劣ることはなく、簡便法の毒性値が1.02~1.22倍高く、より真の値に近い測定値が得られるため、参考法の代替として適用可能と考えられる。添加回収試験により、HPLC-蛍光検出法は検出感度、精度ともに高く、食品の安全性を確認する方法として有用であることが示された。抗テトロドトキシン（TTX）ポリクローナル抗体作成では、TTX にエタンジチオールとキーホールリンペットヘモシアニンを架橋させた抗原がウサギに対して高い抗体価を示した。得られた抗体は TTX だけでなく、4-*epi*-TTX や 11-*oxo*-TTX などの TTX 類縁体とも抗原交差性を示すことから、TTX 関連化合物を一括検出するフグの潜在的な毒性評価に役立つと考えられる。

フグ等の毒性評価では、コモンフグ（凍結個体）の毒性を調べた結果、皮は全個体が有毒で、“猛毒”レベル（1000 MU/g 以上）のものが散見された。筋肉に“弱毒”レベル（10~99 MU/g）の毒性値をもつ個体があったが、皮の毒性値が高く、解凍しすぎたもので筋肉の毒性値が高い傾向がみられた。生鮮魚では、筋肉が有毒な個体が少なかった。生鮮魚を凍結・解凍すると筋肉が有毒化する現象が観察され、皮からフグ毒の移行が確かめられた。したがって、生鮮なうちに毒力の高い皮を除去することで、コモンフグ筋肉による食中毒リスクを低減できると考えられる。シラス加工品に混入したフグ稚魚として、コモンフグ、シマフグ、ナシフグ、ヒガンフグが同定され、複数の種が混在していることがあった。調べた 29 ロット中 1 ロットからごく微量（56 ng/g）の TTX が検出されたが、フグ毒の基準値（10MU/g、2.2 μ g TTX/g）をはるかに下回り、しらす加工品にフグ稚魚が混入していても安全性に問題ないことがわかった。

遺伝子によるフグ類等の種判別では、形態観察により自然交雑種と判断されたフグ 20 個体と形態分類で単一系統と判別されたマフグ 20 個体、シマフグ 10 個体について、ミトコンドリア DNA による母系種判別を行い、母系種同定の有用性を再確認した。父系種判別は核 DNA のマイクロサテライトを検討し、TATC 反復配列がマフグとシマフグ間交雑種の判別に有効であることが分かった。昨年度、テトラミン有毒巻貝の種判別として、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 部分領域のダイレクトシーケンス解析が有効であることを明らかにした。本法は、TTX 毒化巻貝類にも適用可能であることが確認された。巻貝加工品の一部で DNA が断片化され PCR 増幅しないものがあったため、より短い PCR 増幅産物（約 150bp）を得るための巻貝加工用プライマーを設計し、種判別が可能になった。

フグ類の形態分類では、フグ類標本の詳細な研究により、フグ科魚類の種レベルの識別には体色が重要であることが判明した。また、本研究により、コモンフグとクサフグに分類学上問題があることが明らかになり、コモンフグの学名は新しく *Takifugu flavipterus* と命名され、クサフグの正式な学名は *Takifugu alboplumbeus* となる。しかし、標準和名に変更はないので、フグのリスク管理に影響はない。これらを含め、日本産のフグ科魚類を中心に、図やイラスト、写真および表を用いたわかりやすい WEB 版分類ガイドを作成し、厚生労働省ホームページに掲載するための準

備を進めている。

・PSP標準品の検討では、毒化ホタテガイ中腸線からサキシトキシン（STX）にかわる標準品としてデカルバモイル STX（dcSTX）を精製する予定であったが、貝が毒化しなかったため、PSPを還元、脱カルバモイル化させてdcSTXを調製する方法を開発した。本法よれば、日本沿岸のPSP毒化二枚貝類の主要な毒成分であるゴニオトキシン群から、高収率で高純度のdcSTXが調製できる。dcSTXによる麻痺性貝毒検査法がAOAO法と同等であるか、基準変換係数（CF値）で評価した結果、dcSTXの基準CF値はSTXとほぼ等しいこと、そして、10週間のモニターで基準CF値の変動は小さいことが確認され、dcSTXは生物試験の標準化に使用できることが明らかになった。

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

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（PSP）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、正確なフグ種の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、混獲量も少なくない。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。

こうした背景のもと、マリントキシンのリスク管理を強化、改善するため、
・フグ毒検査法の検討、
・フグ等の毒性評価、
・遺伝子によるフグ類等の種判別、
・フグ類の形態分類、
・PSP標準品の検討を行った。とくに今年後は、
・フグ毒検査法の検討において、テトロドトキシン（TTX）のイムノクロマト法に基づいた検査キット開発のため、抗TTXポリクローナル抗体の作製を試みた。これは、昨年検討した海外製の市販TTX検査キットが、フグ毒に対する反応特異性に問題があったため、TTX抗体を作製することにした。また、
・フグ等の毒性評価では、昨年、緊急課題としてコモンフグの毒性調査を行ったところ、凍結解凍試料では筋肉から毒性が検出される例がみられた。また、皮の毒力がこれまでの報告を上回る個体が見られたため、試料検体数を増やすとともに、生鮮魚あるいは活魚を入手して、非凍結のコモンフグの組織別毒性値を調べるとともに、凍結解凍モデル実験を行った。さらに、今年度は新規項目と

して、PSP 標準品の検討を実施した。これは、貝毒のリスク管理において、特定物質である STX のかわりにデカルバモイル STX (dcSTX) を標準品とする PSP 検査法を確立する必要があり、dcSTX を大量調製し、dcSTX による検査法が AOAC 法と同等であることの確認と検討を行うためである。

B. 研究方法

1. フグ毒検査法の検討

1) フグ毒検査法の見直し (簡便法の有効性)

天然トラフグ肝臓を試料とし、それぞれ参考法と簡便法による測定値を比較した。参考法では、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。簡便法では、試料に 1、2、4、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、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、6 となる) とした。各試験液は、C18 カートリッジにより固相抽出し、メンブランフィルターでろ過した後、HPLC-蛍光検出法 (FLD) で TTX を定量した。

2) HPLC-FLD の妥当性 (添加回収試験)

養殖トラフグの無毒肝臓を試料とし、そのホモジネートに既知量の TTX 標品を添加して TTX 濃度 2、5、10、20 MU/g (それぞれ規制値の 1/5、1/2、1、2 倍濃度) の添加試料を調製した。添加試料に 0.1%酢酸を加えて加熱抽出し、遠心分離して脂質を除いた後、抽出液をそれぞれ 3 および 5 倍量に定容した (それぞれ抽出比 3 および 5 となる)。定容した各抽出液を遠心分離して上清を分取し、C18 カートリッジにより固相抽出し、メンブランフィルターでろ過後、HPLC-FLD で TTX、4-*epi*TTX および 4,9-anhydroTTX 量を測定し、添加 TTX 濃度に対する比率を求めて回収率とした。

3) フグ毒検査キットの開発

コモnfグ、マフグ、トラフグから酢酸でフグ毒を抽出し、活性炭、Bio-Gel P-2 および Bio-Rex 70 各カラムクロマトグラフィーで順次精製して TTX および 4,9-anhydroTTX を単離した。

抗原の作成は、4,9-anhydroTTX を (\pm)ジチオスレイトール(DTT)と反応させて、TTX と DTT の結合体(DTT-TTX)を調製し、二価性架橋試薬(GMBS)を導入した牛血清アルブミン(BSA)と反応させて、抗原溶液(BSA-DTT-TTX)とした。これとは別に、4,9-anhydroTTX を 1,2-エタンジチオール(EDT) と

反応させて、TTX と EDT の結合体(EDT-TTX)を調製し、GMBS で処理したスカシガイヘモシアニン(KLH) と反応させて、抗原溶液(KLH-EDT-TTX)とした

2 種の抗原(BSA-DTT-TTX と KLH-EDT-TTX)溶液をそれぞれ 2 羽のウサギに対して、隔週で約 7 ヶ月間皮下接種した。それぞれのウサギから採血して血清を作成し、抗体価を測定した。

2. フグ等の毒性評価

1) コモンフグの毒性調査

凍結試料魚には、瀬戸内海および九州産コモnfグ試料 97 個体の筋肉および皮を用いた。生鮮魚と活魚は東京湾で漁獲されたコモnfグ 30 個体を用いた。凍結解凍モデル実験には、活魚 10 個体を用いた。最初に、魚体右側尾部から皮と筋肉を取り分けた (これを“凍結前試料”とする)。残りを -25°C で 24 日間保管した。5 検体は凍ったまま魚体左側尾部から皮と筋肉を分離した (これを“凍結試料”とする)。他の 5 検体は、 4°C で 2 時間、さらに 20°C で 3 時間静置して緩慢解凍後、魚体左側尾部から皮と筋肉を分離した (これを“凍結解凍試料”とする)。このとき、筋肉は皮に接した外側部分 (外部筋肉) と、背骨に接した内側部分 (内部筋肉) から採取した。

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い、細切、磨砕した各組織から酢酸で加熱抽出し、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。

毒性試験は、凍結試料魚では LC-MS/MS 法で TTX を定量し、生鮮魚と活魚、ならびに凍結解凍モデル実験ではマウス検定法で行った。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。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

2015 年 6 月 ~ 8 月に広島県で水揚げ、製造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、種判別に供した。23 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 ポリメラーゼを用いて PCR 増幅を行った。PCR 産物塩基配列を DNA シーケンサーで解析し、塩基配列を nucleotide BLAST 検索に付し、種を決定した。

TTX の定量には、形態分類で同一種と判断されたフグ稚魚を複数個体合して、TTX 分析用試料とした。TTX の抽出は、酢酸加熱法で行った。フグ稚魚に 0.1% 酢酸を添加してホモジナイズし、超音波処理後、浴中で加熱した。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。

．遺伝子によるフグ類等の種判別

1) フグ類の分類に関する研究

試料には、自然交雑フグ種 20 個体ならびに形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体を用いた。これらの筋肉から全ゲノム DNA を抽出、精製し、全ゲノム DNA を用いてミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびシトクロム *b* 領域の約 620bp おおび約 390bp を含む部分領域を PCR 増幅した。PCR 条件は、16S rRNA 領域では 98 で 10 秒、53 で 30 秒、72 で 60 秒のサイクルを 30 回行い、シトクロム *b* 領域では 98 で 10 秒、55 で 30 秒、72 で 60 秒のサイクルを 30 回行った。PCR 終了後、PCR 断片を鋳型として、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) と自動 DNA シーケンサー (ABI 3130 ジェネティックアナライザ) を用いて得られた PCR 産物の塩基配列を決定し、研究室で新たに構築したフグ種専用データベースから母系種の同定を行った。

次に、マフグおよびシ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、自然交雑フグ種全 20 個体を対象に、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、マフグおよびシマフグの 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、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体を用いて、再現性の検証を行った。

2) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝試料には、フジツガイ科ボウシュウボラ、アキガイ科イボニシ、アカニシ、ムシロガイ科

ハナムシロ、キンシバイおよびエゾバイ科イソニナとバイの 7 種巻貝の生鮮品を用い、これらについては、昨年度設計した巻貝種特異的プライマーで PCR を行った。巻貝加工品については、新たにミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域から、巻貝加工品に利用できる特異的プライマーと PCR 条件を検討した。

各試料の筋肉から全ゲノム DNA を抽出、精製し、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。

．フグ類の形態分類

国内外の自然史系博物館や大学に保管されている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。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。

．PSP 標準品の検討

1) デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法の開発

毒化ホタテガイを希塩酸で熱浸抽出し、活性炭、Bio-Gel P-2 および Bio-Rex 70 による各カラムクロマトグラフィーを用いる常法で順次精製して GTX1 と GTX4、GTX2 と GTX3 の混合物を分離した。GTX1 と GTX4 の混合物は、ヘミン/アスコルビン酸中性水溶液中で処理して GTX2 と GTX3 の混合物に変換した。

凍結乾燥した GTX2,3 混合物を 0.05 M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.3) に溶解し、これにメルカプトエタノール (ME) を添加混合して室温で一晩静置して、ME-STX 結合体を調製した。

ME-STX 結合体を超純水に溶解し、NaOH で pH 12.0 に調整した後、沸騰浴中で加熱した。氷冷後に、リン酸で pH 7.4 に中和し、過剰量の ME を加えて沸騰浴中で再度加熱して dcSTX を調製した。これを Bio-Gel P-2 カラムと Bio-Rex 70 カラムを用

いて順次精製し、dcSTX を分離した。調製した dcSTX は、トリプル四重極型 LC-MS/MS を用いて分析し、純度の確認を行った

2) デカルバモイルサキシトキシンによる麻痺性貝毒試験法の評価

試料の dcSTX は、(一財)食品薬品安全センター 秦野研究所において外部精度管理調査で使用している 2.35 $\mu\text{mol/L}$ dcSTX 酢酸溶液(STX 二塩酸塩に換算して 0.45 $\mu\text{g/mL}$)を使用した。STX は、FDA より供与された 100 $\mu\text{g/mL}$ STX 二塩酸塩の塩酸溶液を使用した。マウスは ICR 系雄マウス(4 週齢、体重 19~21g)を用いた。

STX および dcSTX について、基準変換係数 (Conversion Factor、CF 値)を、AOAC OM 959.08 に準じて測定した。1 日目に、検液 1 mL をマウスに腹腔内投与し、致死時間の中央値が 5~7 分になる希釈濃度を 2 濃度調製した。希釈液には 0.003 M 塩酸を使用し、各濃度について 1 群 10 匹のマウスに 1 mL ずつ腹腔内投与し、致死時間を測定し、致死時間の中央値から Sommer の表を用いて溶液の毒力 (MU/mL) を求めた。各希釈液の濃度 (FDA-STX $\mu\text{g/mL}$)を、求めた毒力 (MU/mL) で除して CF 値 (FDA-STX $\mu\text{g/MU}$) を求めた。

2 日目に、前日に調製した 2 濃度の希釈液を、各 10 匹のマウスに投与し、同様に CF 値を求めた。また、新たに前日と同濃度になるよう 2 濃度の希釈液を調製し、各 10 匹のマウスに投与し、同様に CF 値を求めた。dcSTX と STX に対して、それぞれ 6 回の測定から 6 個の CF 値の平均値を求め、これを基準 CF 値とした。

これとは別に、STX および dcSTX について 10 週間にわたり、毎週 1 群 5 匹のマウス 5 匹に腹腔内投与して、CF 値の変動を調べた。

C. 研究結果

1. フグ毒検査法の検討

1) フグ毒検査法の見直し (簡便法の有効性)

トラフグ肝臓につき、参考法および簡便法の各抽出比で得られた測定値を比較すると、肝臓 No. 2 (参考法による測定値 138 MU/g) と肝臓 No. 4 (同 72 MU/g) では簡便法の抽出比 2 の測定値が参考法と同程度、肝臓 No. 1 (同 184 MU/g) と肝臓 No. 3 (同 178 MU/g) では 15%程度高かった。いずれの肝臓においても、抽出比が高いほど測定値は高く、両者の関係は累乗関数により近似することができた ($r = 0.57\sim 0.82$)。

簡便法の各抽出比の測定値につき、参考法の測定値に対する相対値で評価すると、相対測定値は、抽出比 3 以上で 1 より高く、回帰線から求めた抽出比 5 の相対測定値は、肝臓 No. 1~4 でそれぞれ 1.21、1.17、1.24、1.15 と、概ね 1.2 前後の値となった。

2) HPLC-FLD の妥当性 (添加回収試験)

各設定濃度 (2、5、10、20 MU/g) における TTX の回収率は、2、5、10 MU/g において、抽出比 3 で 85.9、95.0、93.2%、抽出比 5 で 82.7、100、102% であった。4-*epi*-TTX と 4,9-anhydroTTX の TTX 類縁体を加えた回収率は、2、5、10 MU/g の抽出比 3 で 107、118、115%であり、5、10 MU/g の抽出比 5 で 117、120%であった。いずれの濃度、抽出比においても、類縁体を加えると TTX のみの場合より 20%程度高い値となった。

3) フグ毒検査キットの開発

BSA-DTT-TTX 抗原を免疫したウサギでは、抗体価は免疫開始後から徐々に上昇し、6 ヶ月後にそれぞれ 1.58 および 2.41 nmol に達した。一方、KLH-EDT-TTX 抗原を免疫したウサギでは、抗体価は免疫開始 2 ヶ月後から急激に上昇した。1 羽は 4 ヶ月後に死亡したが、残り 1 羽の抗体価は、6 ヶ月半の全採血の時点で 24.5 nmol に達した。

高い抗体価を示した KLH-EDT-TTX 抗原を免疫したウサギ抗血清の反応特異性を調べたところ、TTX、4-*epi*-TTX、11oxo-TTX、5,6,11-trideoxyTTX に対し、ほぼ同程度の反応性を示した。

2. フグ等の毒性評価

1) コモンフグの毒性

凍結されたコモンフグ 97 個体中 6 個体の筋肉から TTX が検出され、毒力に換算すると 12~36 MU/g 相当となる。有毒試料 6 個体のうち、1 個体は搬入時に鮮度が悪く、3 個体は凍結融解後に腑分けを行った個体であったが、残り 2 個体は鮮度も良好で、搬入後速やかに腑分けを行ったものであった。各個体の筋肉を内臓側と表皮側に分け、それぞれ分析に供した結果、表皮側の毒性が高くなる傾向が認められた。

コモンフグ 95 個体の皮はすべて有毒であった。そのうち、1000 MU/g を超える“猛毒”レベルのものが 18 個体あった。鮮度が良い状態で腑分けをしていたにもかかわらず筋肉が有毒であった 2 個体は、皮の毒力は“猛毒”レベルであった。

コモンフグの生鮮魚および活魚では、各組織に

おける有毒個体出現率は、皮と肝臓が 100% (30 個体中 30 個体) で、卵巣も 100% (28 個体中 28 個体) であった。各組織の最高毒性値は、皮 1,990 MU/g、肝臓 422 MU/g、卵巣 3,540 MU/g で、皮と卵巣は“猛毒”レベル(1,000 MU/g 以上)となり、肝臓は“強毒”レベル(100~999 MU/g)であった。これに対し、筋肉(30 個体)と精巣(2 個体)からは毒性が検出されず、“無毒”(5MU/g 未満)であった。

次に、筋肉の毒性に及ぼす凍結・解凍の影響を調べた。凍結したが解凍させていない“凍結試料”(No.1~5)では、内部筋肉は無毒(5 MU/g 未満)であり、外部筋肉は<5~10.9 MU/g であった。凍結で毒性値が変化したのは試料 No.1 が 5.8 MU/g から 10.9 MU/g へ、試料 No.3 が 5 MU/g 未満から 5 MU/g へ増加し、試料 No.2 と No.4 はそれぞれ 9.8 MU/g から 8.1 MU/g、5.9 MU/g から 5 MU/g 未満へやや減少していた。

“凍結解凍試料”試料 (No.6~No.10) の毒力は、内部筋肉では 1 個体(試料 No.6)が 5 MU/g を示したが、それ以外は無毒(5 MU/g 未満)であった。これに対し、皮と接していた外部筋肉はすべて毒性(5~110 MU/g)を示した。とくに、高い毒力を示した試料 No.7 (110 MU/g) と No.6 (84.9 MU/g) は皮の毒力がそれぞれ 1,120 MU/g および 1,990 MU/g と著しく高かった。これに対し、皮の毒力が低かった(186 MU/g) 試料 No.10 では、外部筋肉の毒力は本マウス試験の検出限界(5 MU/g) と低かった。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性 魚種判別

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、調べたフグ稚魚 23 個体のうち、8 個体はデータベースに登録されているコモフグ *Takifugu poecilonotus* の塩基配列と相同性 99.8~100%で一致した。同様に、7 個体はシマフグ *Takifugu xanthopterus* と相同性 99.8~100%を示し、6 個体はナシフグ *Takifugu vermicularis* と 99.6~100%、2 個体はヒガンフグ *Takifugu pardalis* と 99.8~100%の相同性であった。確認のためシトクロム *b* 部分領域(約 400 bp)の塩基配列を解析した結果、いずれも当該のフグ種と相同性 99.3~100%で一致した。

毒性試験

LC-MS/MS 分析した 29 試料中 25 試料は TTX が検出されず(10 ng TTX/g 未満) 4 試料からクロマトグラム上、TTX に相当するピークが検出された。このうち、1 試料だけ 56 ng TTX/g と算出されたが、他の 3 試料は定量下限値(30 ng TTX/g) 未満であった。

・ 遺伝子によるフグ類などの種判別

1) フグ類の分類に関する研究

自然交雑フグ種 20 個体、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体につき、ミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびシトクロム *b* 領域の塩基配列に基づいて母系種の同定を行った。自然交雑フグ種 20 個体はすべての個体で母系種を同定することができた。形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体においても、母系種を確認した。

一方、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、アガロースゲル電気泳動距離に違いが見られたマイクロサテライト遺伝子座は TATC 反復配列、TGTA 反復配列、TAGA 反復配列および AAAG 反復配列であったが、TATC 反復配列の解析においてのみ、マフグおよびシ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。泳動距離から推定される PCR 産物の分子量は、マフグおよびシマフグでおおよそ 350bp および 520bp であった。そこで、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグおよびシマフグを対象に、TATC 反復配列の普遍性を確認したところ、両親種(マフグとシマフグ)の分子量の各位置に複数のバンドが見られたことから、分子量 350bp がマフグ由来、520bp はシマフグ由来であると推測された。

2) 有毒巻貝種判別法の開発

今回調べた巻貝 7 種すべてで目的とする PCR 産物(約 350 bp)の増幅がみられた。これら増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法で解析したところ、イボニシ、アカニシ、バイはデータベースの塩基配列と 100%一致した。ボウシュウボラとキンシバイについては、データベースに塩基配列が登録されていないため、当研究室で解析した別個体の結果と照合した結果、それぞれ相同性は 99.4%および 100%であった。ハナムシロとイソニナはデータベース上の種とそれぞれ 92%および

98%と、塩基配列の相同性がやや低かった。

上記で用いたプライマーで PCR 増幅されなかった加工品試料でも、加工品用に作製した特異的プライマーで、目的とする PCR 産物 (約 150 bp) の増幅がみられた。しかし、この領域内の塩基配列は、種によっては同一あるいは酷似していることがあり、「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」については、種が判別できない。

・ フグ類の形態分類

1) 日本産フグ類の分類

日本沿岸には 4 科 14 属 61 種のフグ類が分布することが明らかになった。その内訳は以下の通りである：ウチワフグ科 (1 属 1 種)、フグ科 (7 属 49 種)、ハリセンボン科 (3 属 7 種)、マンボウ科 (3 属 4 種)。

日本産フグ科の種構成を調べたところ、熱帯を分布の中心とするオキナワフグ属、キタマクラ属、サバフグ属、シッポウフグ属、モヨウフグ属、ヨリトフグ属の種が 35 種 (フグ科の 70%) を占めるが、その一方で日本および東アジアの温帯を分布の中心とするトラフグ属が 14 種に達することが明らかになった。

ハリセンボン科の 3 属は体表の棘の形態と棘の分布状態によって識別できること、マンボウ科の 3 属は体形や舵鱗の形態によって区別できることが明らかとなった。

2) トラフグ属の新種と学名変更を要する種

コモンフグの学名は従来 *Takifugu poecilonotus* (Temminck and Schlegel, 1850) とされていた。しかし、シタイプ (複数個体から構成されるタイプ標本) を調べたところ、クサフグとコモンフグが混じっていることが明らかになった。昨年度報告したように、過去にオランダの Boeseman がシタイプの中からレクトタイプに選んだ標本がクサフグであったため、コモンフグが学名を失うことになった。このため、コモンフグに *Takifugu flavipterus* という新たな学名を与え、新種として発表した。

コモンフグやクサフグのタイプ標本調査の結果、クサフグの学名にも問題があることが判明した。クサフグの学名は、従来 *Takifugu niphobles* (Jordan and Snyder, 1901) とされていたが、正しい学名は *Takifugu alboplumbeus* (Richardson, 1845) であることが判明した。

また、サバフグ属のクロサバフグの学名は従来 *Lagocephalus gloveri* (Abe and Tabeta, 1983) とされていたが、正しい学名は *Lagocephalus cheesemanii* (Clarke, 1897) であることが明らかになった。

3) WEB 版のフグ類同定ガイド

フグ類を簡便に識別できるようにするため、画像を多用した WEB 版のフグ類同定ガイドの作成を進め、トラフグ属とサバフグ属など主要な属の種に関する原稿を作成した。

・ PSP 標準品の検討

1) デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法の開発

ME-STX 結合体をアルカリ加水分解処理することにより ME-STX は完全に消失し、ME-dcSTX が生じることを確認した。ME-dcSTX を含む中性水溶液に過剰の ME を加えて加熱することにより、ME が脱離して生じた dcSTX を精製し、dcSTX を高収率で得ることに成功した。

2) デカルバモイルサキシトキシンの麻痺性貝毒試験法の評価

dcSTX の基準 CF 値は 0.171 (0.156 ~ 0.184) であり、STX の値 (0.185, 0.177 ~ 0.192) とほぼ同様であった。

dcSTX と STX の CF 値を 10 週間にわたって調べたところ、dcSTX では 0.168 ± 0.012 、STX で 0.180 ± 0.019 となり、それぞれの室内変動は 7.3% および 10.6% であり、今回実施した dcSTX の CF 値は、基準 CF 値の $\pm 20\%$ (0.136 ~ 0.205 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) 範囲内におさまった。

D. 考察

・ フグ毒検査法の検討

1) フグ毒検査法の見直し (簡便法の有効性)

肝臓試料において、簡便法の測定値は総じて参考法の測定値より高く、簡便法は参考法の代替法として適用可能であると考えられた。簡便法の測定値は、抽出比が高いほど高く、抽出比 5 以上でもさらに上昇する傾向が認められた。

参考法の検出下限値は 5 MU/g であり、抽出比を大きくすると検出下限値が高くなり、検出感度が低下するため、抽出比は 5 が妥当と判断した。抽出比 3 の相対測定値は抽出比 5 の値の 92~97% で、検出感度を高めたい場合は、抽出比を 3 としても問題は少ない。

2) HPLC-FLD の妥当性 (添加回収試験)

全ての設定濃度（2、5、10、20 MU/g）における回収率は、下痢性貝毒検査法の妥当性確認ガイドライン（平成 27 年 3 月 6 日付け食安基発 0306 第 4 号・食安監発 0306 第 2 号「下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について」）の目標値である 70～120%を満たしており、いずれの条件においても相対標準偏差は 15%以下となった。これより、簡便法（抽出比 3～5）による試験液の調製と HPLC-FLD による TTX 定量を組み合わせた方法は、食品の安全性を確認する試験法として妥当であると判断した。なお、相対標準偏差は抽出比 3 より抽出比 5 の方が小さくなった。HPLC-FLD による測定において、検出感度を上げるには抽出比 3 を採用し、精度を上げるには抽出比 5 を採用することが望ましい。

3) フグ毒検査キットの開発

2 種の抗原（BSA-DTT-TTX と KLH-EDT-TTX）をウサギに免疫したところ、血清の TTX に対する抗体価には大きな違いが認められた。KLH-EDT-TTX は、BSA-DTT-TTX に比較してキャリアタンパク分子に対する TTX 結合量は少ないものの抗体価は大きく上昇した。この違いが、結合に用いたジチオールによるものか、キャリアタンパク質の違いによるものかは不明である。

・フグ等の毒性評価

1) コモンフグの毒性

コモンフグ 97 個体中、筋肉が有毒であったのは 6 個体で、そのうち 1 個体は鮮度の低下、3 個体は腑分け前の凍結融解であった。残り 2 個体は凍結融解前に腑分けをして -30℃ で保管していたが、皮が“猛毒”であった。また、半身を表皮側と内臓側に分けて TTX を分析したところ、表皮側の毒性が高くなる傾向があり、皮からの移行が示唆された。

コモンフグ皮はすべて有毒であり、中には 7,000 MU/g もの猛毒を持つものが確認された。また、皮の毒性が高い個体においては、腑分け前に凍結解凍していない場合でも筋肉への移行があった。

活魚または生鮮魚では、皮の毒力が“猛毒”レベル（1,000 MU/g 以上）であっても、筋肉からは毒性は検出されなかった（5 MU/g 未満）。このことから、凍結解凍によって、皮中のフグ毒が筋肉に移行することが強く示唆されたので、生鮮のコモンフグ 10 個体を用いて、凍結・解凍モデル実験を行った。

凍結、解凍しても背骨に接した部分の筋肉（内

部筋肉）では 1 個体（5 MU/g）を除き、無毒（5 MU/g 未満）であったが、皮に接していた部分の筋肉（外部筋肉）の毒力は、“凍結試料”で <5～10.9 MU/g、“凍結解凍試料”で 5～110 MU/g になり、凍結とくに解凍によってフグ毒が移行することが明らかになった。また、凍結解凍後の皮の毒力を凍結前の値と比較すると、毒性値は明らかに減少しており、減少の割合は凍結前の 0.56～0.79 であった。

コモンフグの筋肉による食中毒のリスクを低減するために、鮮度の良いうちに有毒部位の皮を除去し、身欠きで流通することが重要と思われる。なお、除毒処理が適切になされない場合には、コモンフグの筋肉による食中毒が発生する可能性が示唆されるため、適切な工程管理法の構築と徹底が必要である。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

昨年度の調査により、瀬戸内海で漁獲、製造されたシラス加工品にナシフグ稚魚が混入しており、定量下限値（30 ng TTX/g）未満であったが TTX が検出されたため、今年度は、同海域でサンプリングされた試料について、フグ稚魚の種判別と TTX 分析を行った。

その結果、コモンフグ、シマフグ、ナシフグ、ヒガンフグの稚魚が混入していることが明らかになり、ロットによっては複数のフグ種が混在していた。ほとんどの試料では、TTX は検出されないが、検出されても定量下限値（30 ng TTX/g）未満であったが、1 試料だけ 56 ng TTX/g が検出された。しかし、TTX の比毒性（5,000 MU/mg）から、毒性値に換算すると 0.28 MU/g となり、フグ毒の基準値（10 MU/g、2.2 μg TTX/g）をはるかに下回っているため健康被害の問題となることはない。

・遺伝子によるフグ類などの種判別

1) フグ類の分類に関する研究

自然交雑フグ種 20 個体につきミトコンドリア DNA 解析法による母系種の同定を行い、マフグおよびシマフグ間に焦点を絞り、TATC 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。その結果、ミトコンドリア DNA 解析法による母系種同定の有効性が再確認され、新たに核 DNA による TATC 反復配列の電気泳動距離の違いから父系種同定に適用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、マフグとシマフグ間交雑種と推定された個体において、マフグ由来の 350bp

およびシマフグ由来の 520bp の PCR 産物が得られた。

また、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグでは 20 個体中 13 個体 (65%)、シマフグでは 10 個体中 8 個体 (80%) で上述した分子量に近い PCR 産物が得られた。しかしながら、今回用いたマフグおよびシマフグにおいて、複数本のバンドを得た個体も存在し、今回用いたマフグおよびシマフグ試料個体が必ずしも単一系統ではない可能性も考えられた。

2) 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り、テトラミンだけでなくフグ毒をもつ有毒巻貝の種判別が可能になった。また、レトルトや缶詰製品の一部で、殺菌加熱により試料中の DNA が断片化された場合でも、巻貝加工品用に作製したプライマーを用いれば PCR 増幅が可能になった。しかし、対象領域が短い分、塩基配列が同一あるいは酷似するものがある。その場合、種を正確に判別するには、別の遺伝子領域を検討する必要がある。

・フグ類の形態分類

日本産フグ類の中でフグ科魚類が最も多様性に富むことが明らかになった。また、フグ科魚類の種レベルの識別には体色が重要であることが判明した。体色は種によって特有のパターンをもっているが、ある程度の種内変異も示す。このため、種によって着目すべき体色パターンが異なる。種同定を正しく行うためには、体色をカラー写真で保存し、詳細な検討を行えるようにする必要がある。また、フグ類の種に特異的な体色パターンが背面に出現することもあるため、側面写真と背面写真の両方を撮影しておくことが望ましい。

本研究によって、日本の沿岸で最も普通に見られるコモンフグとクサフグに分類学的問題があることが明らかになった。この両種は形態が似ているばかりではなく、幼魚や若魚のときには体色もよく似ている。このためコモンフグのシタイプにクサフグが混入していたと考えられる。コモンフグを新種として発表し、クサフグの学名を変更する必要が生じた。フグ科魚類の分類は他の魚類と比べると困難なため、今後も類似の問題が発見される可能性がある。

以上の結果を含め、フグ類を鑑別するため、画像を多用した WEB 版のフグ類同定ガイドの作成

を進めている。

・PSP 標準品の検討

1) デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法の開発

現在のところ dcSTX 標品は、C1, C2 を ME などのチオールで処理して得られる GTX5 を中性付近で煮沸する、あるいは C1, C2 を中性付近で煮沸して得られる dcGTX2 と dcGTX3 の混合物を ME 処理することにより調製されている。これらの方法では、dcSTX に混入する微量の STX をカラムクロマトグラフィー等で完全に分離することは困難である。本研究で使用した、pH 12 の水溶液中で煮沸する条件下では、収率は若干低下するものの ME-STX の carbamoyl 側鎖を完全に加水分解・脱離して、ME-dcSTX に変換できる。そして、ME-dcSTX を ME 処理することで容易に dcSTX を回収することができ、高純度の dcSTX の大量調製が可能になる。

2) デカルバモイルサキシトキシンの麻痺性貝毒試験法の評価

dcSTX の基準 CF 値は STX のそれとほぼ同じであることが確認され、さらに、10 週間測定した CF 値の平均は、STX と dcSTX で同様であり、dcSTX は長期間使用しても再現性が得られる物質であることがわかった。また、CF 値の変動の幅は $\pm 16\%$ (0.143 ~ 0.198 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) と、AOAC OM 959.08 で示された基準 CF 値の $\pm 20\%$ 以下であった。

E. 結論

・フグ毒検査法の検討

1) フグ毒検査法の見直し

参考法は抽出操作が煩雑で効率が悪いという、試料残渣に TTX が残留し、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、迅速で、かつより真の値に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。

2) HPLC-FLD の妥当性 (添加回収試験)

添加回収試験により、HPLC-FLD は検出感度、精度ともに高く、研究上のみならず、食品の安全性を確認する試験法としても有用であることが示された。今後は、室内および室間再現精度の妥当性についても検討する必要がある。

3) フグ毒検査キットの開発

EDT を 4,9-anhydroTTX に作用させ、TTX と EDT

の結合体(EDT-TTX 結合体)を作成し、マレイミド基を導入したスカシガイヘモシアニンに導入して調製した抗原をウサギに隔週で14回免疫することにより、TTXに対する抗血清(ポリクローナル抗体)を得ることができた。同抗体はTTXだけでなく、11oxo-TTXや4epi-TTXなどのTTX類縁体とも抗原交差性を示すことが確認された。

・フグ等の毒性評価

1) コモンフグの毒性

凍結解凍されたコモンフグ97個体のほとんどの筋肉が無毒であったが、6個体からTTXが検出され、その毒力レベルは“弱毒”(10~99 MU/g)であった。これらについては、皮からの移行の可能性が示唆された。そこで、活魚または生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た。その結果、活魚または生鮮魚では、皮の毒力が“猛毒”レベルであっても筋肉から毒性は検出されなかった。凍結試料の筋肉が有毒であったのは、凍結解凍によって皮からフグ毒が移行したためと結論づけられた。コモンフグのみならず皮の毒力が強いフグでは、生鮮なうちに皮を剥ぐなどして、筋肉への毒の移行、汚染を防ぐ必要がある。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

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、データを集積するため、しらす加工品に混入したフグ稚魚の種と毒性を調べた。2015年に瀬戸内海で集めた試料から、有毒種であるコモンフグ、シマフグ、ナシフグ、ヒガンフグの稚魚の混入がみられた。一部の試料ではTTXが検出されたが、最大値で56 ng TTX/g (0.28 MU/g)であり、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予定である。

・遺伝子によるフグ類などの種判別

1) フグ類の分類に関する研究

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。母系種においては、ミトコンドリアDNA法によって確実に同定できることが確認され、

父系種に関しては、昨年度トラフグおよびマフグからなる交雑種におけるGAAAG反復配列の有効性を明らかにし、今年度はマフグおよびシマフグからなる交雑種においてTATC反復配列から推定できる可能性を明らかにした。しかしながら、本TATCマーカーがその他の交雑種フグに適用できるか、また、他のマイクロサテライト領域についても今後引き続き検討する必要がある。

2) 有毒巻貝種判別法の開発

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急がれている。ミトコンドリアDNA 16S rRNA部分領域を対象にしたPCRを行い、ダイレクトシーケンス法による種判別を試みたところ、テトラミン中毒だけでなくフグ毒中毒のおそれのある巻貝の種判別が可能になった。さらに、高温で処理された加工品については、別の特異的プライマーを用いることでPCR増幅に成功し、種判別ができるようになった。しかし、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、別の遺伝子領域を検討する必要がある。

・フグ類の形態分類

日本沿岸には4科14属61種のフグ類が分布し、熱帯性の種が70%を占め、温帯性の種は30%であることが明らかになった。フグ類の各科の内訳は以下の通りで、フグ科の多様性が最も高い：ウチワフグ科(1属1種)、フグ科(7属49種)、ハリセンボン科(3属7種)、マンボウ科(3属4種)、コモンフグが新種であることが明らかになったため、新たに*Takifugu flavipterus*という学名を与えた。また、クサフグとクロサバフグの学名について整理した。しかし、標準和名は変更ないので、フグのリスク管理には問題や混乱はない。

以上を含め、WEB版のフグ類同定ガイドの作成に取り組んでいる。

・PSP標準品の検討

1) デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法の開発

日本沿岸で毒化した貝類の主要成分であるGTX群にMEを作用させて得られるME-STX結合体を塩基性条件下で加水分解して、ME-dcSTX結合体を調製し、これを過剰のMEで処理することによ

り、高収率で dcSTX を得る方法を確立した。次年度は引き続き dcSTX の調製を継続し、qNMR による値付けを検討する予定である。

2) デカルバモイルサキシトキシシンによる麻痺性貝毒試験法の評価

AOAC OM 959.08 に準じて dcSTX により生物試験の標準化を行うことを検討した。今年度は、0.003 M 塩酸溶液で希釈したものについて基準 CF 値を求め、その後定期的にマウスアッセイを行ったが、dcSTX は STX と同様の挙動を示し、生物試験の標準化に使用できることが確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Jiang, H. Iwashita, O. Arakawa, T. Takatani: Growth and PST production of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* cultured under monochromatic light. *Aquacult. Sci.*, 64, 379-390 (2016).
- 2) A. Kiriake, A. Ohta, E. Suga, T. Matsumoto, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Comparison of tetrodotoxin uptake and gene expression in the liver between juvenile and adult tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Toxicon* 2016; 111: 6-12.
- 3) C. Acar, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Toxicity of the Lessepsian pufferfish *Lagocephalus sceleratus* from eastern Mediterranean coasts of Turkey and species identification by rapid PCR amplification. *Eur. Food Res. Technol.* 2016; DOI 10.1007/s00217-016-2721-1.
- 4) K. Matsuura, I. Middleton: Discovery of a larva of the Aracanidae (Actinopterygii, Tetraodontiformes) from New Zealand. *Ichthyol. Res.*, 2016; doi: 10.1007/s10228-016-0533-8.
- 5) K. Matsuura, T. P. Satoh: Redescription of *Lagocephalus cheesemani* (Clarke, 1897), a senior synonym of *Lagocephalus gloveri* Abe and Tabeta, 1983 based on morphological and genetic comparisons (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae). *Ichthyol. Res.*, 2016; doi: 10.1007/s10228-016-0547-2.
- 6) K. Matsuura, A. Kaneko, E. Katayama: Underwater observations of the rare deep-sea fish *Triodon macropterus* (Actynopterygii,

Tetraodontiformes, Triodontidae) with comments on the fine structure of the scales. *Ichthyol. Res.*, 2016; doi: 10.1007/s10228-016-0555-2.

- 7) Y. V. Dyldin, K. Matsuura, S. S. Makeev: Comments of puffers of the genus *Takifugu* from Russian waters with the first record of yellowfin puffer, *Takifugu xanthopterus* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) from Sakhalin Island. *Bull. Nation. Mus. Nat. Sci., Ser. A*, 2016; 42: 133-141.
- 8) R. Tatsuno, W. Gao, K. Ibi, T. Mine, K. Okita, G. N. Nishihara, T. Takatani, O. Arakawa: Profile differences in tetrodotoxin transfer to skin and liver in the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Toxicon*, 130, 73-78 (2017).
- 9) K. Matsuura: Taxonomic and nomenclatural comments on two puffers of the genus *Takifugu* with description of a new species, *Takifugu flavipterus*, from Japan (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Tetraodontidae). *Bull. Nation. Mus. Nat. Sci., Ser. A*, 2017; 43: 71-80.
- 10) 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. 著書・総説

- 1) 松浦啓一, 日本産フグ類図鑑, 東海大学出版部, 秦野, 2017, 127 pp.
- 2) 長島裕二, 桐明 絢: 海洋危険生物 食べて中毒; とくに魚について. *中毒研究* 2016; 29: 3-9.
- 3) 長島裕二, 桐明 絢: 魚介類の毒とその特徴. *アクアネット* 2016; 19 (12): 22-26.
- 4) 荒川 修: フグ毒の蓄積機構と生理機能. *アクアネット*, 2016; 19 (12): 27-31.
- 5) 佐藤 繁, 松浦啓一: シマキンチャクフグ・タキフグ/フグを知って中毒防止, 食と健康 2016; 通巻 708: 48-49.
- 6) 佐藤 繁, 松浦啓一: シッポウフグ・アマミホシゾラフグ/フグを知って中毒防止, 食と健康 2016; 通巻 709: 30-31.
- 7) 佐藤 繁, 松浦啓一: シボリキンチャクフグ・ナミダフグ/フグを知って中毒防止, 食と健康 2016; 通巻 710: 30-31.
- 8) 長島裕二, 桐明 絢: しらすへのフグ稚魚混入. *全水卸* 2016; 356: 8-11.

3. 学会発表

- 1) S. Jiang, H. Iwashita, O. Arakawa, T. Takatani: Growth and PSP production of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* cultured under monowavelength light irradiation. The 7th World Fisheries Congress, Busan, May 2016.
- 2) K. Taniguchi, H. Takao, K. Onuki, Y. Sakakura, T. Takatani, O. Arakawa, T. Noguchi: Providing pufferfish liver for human consumption (1): Toxicity evaluation. The 7th World Fisheries Congress, Busan, May 2016.
- 3) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Pharmacokinetics and biliary excretion of tetrodotoxin in the marine pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. 7th World Fisheries Congress in Busan, Korea, May, 2016.
- 4) O. Arakawa: Marine toxins responsible for food poisonings in Japan. 2016 International Conference on Food Safety Applications, Kaohsiung, September 2016.
- 5) M. J. Kim, O. Arakawa, T. Takatani: Toxicity of *Palythoa* zoanthids from Yakushima Island, Japan. The 15th Joint Symposium between Nagasaki University and Pukyong National University on Marine and Fisheries Sciences, Nagasaki, October 2016.
- 6) 長島裕二, 岡山桜子: ふぐ卵巣ぬか漬けの毒性低下のメカニズム 第26回西日本ふぐ研究会, 山口県下関市, 平成28年5月.
- 7) 桐明 絢, 石崎松一郎, 長島裕二, 塩見一雄: カサゴ目魚類刺毒の性状および構造解析. 第63回トキシシンポジウム, 山形県天童市, 平成28年7月.
- 8) 松浦啓一: クサフグの学名が変更され, コモンフグは未記載種となる. 2016年度日本魚類学会年会. 2016年9月, 岐阜県岐阜市.
- 9) 永井 慎, 岡山桜子, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬け工程での減毒に関する微生物探索に関する研究. 平成28年度日本水産学会秋季大会, 奈良県奈良市, 平成28年9月.
- 10) 徐 超香, 太田 晶, 岡山桜子, 崔 浩, 石崎松一郎, 長島裕二: 食用フグの見直し - 日本沿岸ホシフグの安全性評価 - 第112回日本食品衛生学会学術講演会, 北海道函館市, 平成28年10月.
- 11) 岡山桜子, 永井 慎, 石崎松一郎, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬けにおける減毒要因の検討 第112回日本食品衛生学会学術講演会. 北海道函館市, 平成28年10月.
- 12) 長島裕二: しらすへのフグ稚魚の混入について. 平成28年度水産利用関係者研究開発推進会議, 神奈川県横浜市, 平成28年11月.
- 13) 大城直雅, 國吉杏子, 堀田彩乃, 鈴木貴文, 杉田典子, 松浦啓一, 中島安基江, 安西洋一: コモンフグの毒性分析. 第53回全国衛生化学技術協議会年会, 青森県青森市, 2016年11月.
- 14) 福田 遼, 佐々木杜汰, 菅向志郎, 高谷智裕, 荒川 修: 遠州灘産交雑フグの毒性. 平成28年度日本水産学会九州支部大会, 長崎, 2016年12月.
- 15) 8) 長島裕二: フグ食中毒とフグ毒中毒. 平成28年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会市民公開講座, 石川県金沢市, 平成29年2月.
- 16) 長島裕二: 魚介類の毒素タンパク質. 平成29年度日本水産学会春季大会シンポジウム「水圏生物タンパク質科学の新展開」, 東京都港区, 平成29年3月.
- 17) 宗宮史樹, 高谷智裕, 青島 隆, 森井康宏, 荒川 修: 屋久島および石垣島産オウギガニ科カニ類の毒性プロファイル. 平成29年度日本水産学会春季大会, 東京, 2017年3月.
- 18) 姜 珊珊, 桑野和可, Gregory N. Nishihara, 浦田千里, 下田隆介, 高谷智裕, 荒川 修: 窒素安定同位体を用いた紅藻マクリの培養. 平成29年度日本水産学会春季大会, 東京, 2017年3月.
- 19) 佐藤 繁, 藤田沙和衣, 森 美貴, 犬童優華, 佐伯富貴, 高石鈴香: デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法. 平成29年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成29年3月.
- 20) 高石鈴香, 小杉英信, 安元 剛, 小檜山篤志, 佐藤 繁: 新規抗原を用いて作製した抗フグ毒ポリクローナル抗体の性状. 平成29年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成29年3月.
- 21) 崔 浩, 横塚峻介, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: 凍結解凍によるコモンフグ筋肉へのフグ毒の移行. 平成29年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成29年3月.
- 22) 大木理恵子, 松本拓也, 石崎松一郎, 長島裕二: 組織培養法によるバイのテトロドトキシンの

取り込み．平成 29 年度日本水産学会春季大会，東京都港区，平成 29 年 3 月．

23) 松本拓也，北島冴美，青柳 充，三苫好治，石崎松一郎，長島裕二：トラフグ薬物排泄トランスporter-Bcrp をコードする Abcg2 遺伝子のクローニング．平成 29 年度日本水産学会春季大会，東京都港区，平成 29 年 3 月．

24) 大城直雅：コモンフグの毒性評価．第 33 回マリントキシン研究会，東京都港区，2017 年 3 月．

25) 長島裕二：しらすへのフグ稚魚の混入について．静岡県水産技術研究所第 62 回水産加工技術セミナー，静岡県静岡市，平成 29 年 3 月．

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 佐藤 繁，藤田紗和衣，森 美貴(発明者)：デカルバモイルサキシトキシン及びその類縁体の製造方法，特開 2016-204270，2016 年 12 月 8 日公開．