

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 28 年度分担研究報告書

フグ毒検査法の見直しとコモングの毒性調査

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) 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、コモングの毒性に関する既得毒性データを整理した。まず、天然トラフグ有毒肝臓とオキナワフグの筋肉・皮を用い、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、総じて簡便法の測定値の方が参考法の測定値より高かった。また、簡便法の測定値は抽出比が高いほど高くなったが、抽出比を大きくすると検出下限値が高くなるため、抽出比は 3~5 が望ましいと判断された。次に、HPLC-FLD の妥当性について検討した。すなわち、無毒養殖トラフグ肝臓を用いて TTX の添加回収試験を行ったところ、各添加濃度 (2、5、10、20 MU/g) における回収率は、ガイドライン目標値の 70~120% を満たし、相対標準偏差も 15% 以下となった。したがって、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された。一方、2003~2004 年に有明海産コモングを対象に行った毒性調査で得られた未発表データを整理したところ、凍結解凍魚の筋肉は 2/3 が有毒で、「強毒」個体もみられるのに対し、鮮魚の筋肉の場合、有毒個体の割合は全体の 4% で、毒力も 30 MU/g 未満であること、凍結解凍魚では、ナシフグ同様、凍結解凍により有毒部位 (主に皮) から筋肉への毒の移行が起こること、などが示された。

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。

本研究ではフグ毒のリスク管理に資するため、昨年度に引き続き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、および食品の安全性を確認する試験法としての HPLC-FLD の妥当性について検討した。また、緊急課題のコモング毒性調査に関しては、当該フグ試料を新たに入手することができなかつたため、研究分担者らの既得毒性データを整理した。

B. 研究方法**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 2 個体 (No. 3 および No. 4) 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。一方、簡便法として、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)とした。いずれの試験液も、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-FLD で TTX 量を測定した。

一方、オキナワフグの筋肉と皮につき、それぞれ 2 個体分ずつ合一し、各 2 種のホモジネート試料を調製後、参考法による試験液、および簡便法における抽出比 5 の試験液を調製した。いずれもメンブランフィルターでろ過後、HPLC-FLD で TTX 量を測定した。

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、それら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。2、5、10 MU/g の添加試料には、2 および 4 倍量の 0.1% 酢酸を添加して加熱抽出し、遠心分離して脂質を除いた後、混合液をそれぞれ 3 および 5 倍量に定容した (それぞれ抽出比 3 および 5)。20 MU/g の添加試料には、2 倍量の 0.1% 酢酸を添加して加熱抽出し、遠心分離後、脂質を除いて 3 倍量に定容した (抽出比 3)。各定容抽出液につき、遠心分離後の上清を分取し、C18 カートリッジにより固相抽出した。さらに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。なお、4-*epi*TTX と 4,9-anhydroTTX は標品が無いため、TTX と各類縁体の蛍光強度を同等と仮定して定量した。

2) コモンフグ既得毒性データ

研究分担者らは、2003 年から 2004 年にかけて、有明海産コモンフグの毒性調査を行った。ここでは、その際得られた未発表データのうち、筋肉の毒性、ならびに凍結解凍による毒の部位間移行について検討したものを整理した。

筋肉の毒性

2003 年 1 月～7 月、および同年 8 月～2004 年 10 月に有明海で漁獲されたコモンフグ、それぞ

れ凍結解凍魚 66 個体、および鮮魚 125 個体につき、簡便法 (抽出比 2) によって筋肉の試験液を調製し、マウス毒性試験で毒力を測定した。

凍結解凍による毒の移行

2004 年 10 月に有明海で漁獲されたコモンフグ 20 個体を試料とした。このうち、10 個体は鮮魚の状態、残り 10 個体は一旦凍結後、4 で緩慢解凍した後、各部位に分けた。この際、筋肉については、皮に接する部分を皮側、内臓に接する部分を内臓側、残りを中心部として区分した。各部位につき、と同様の方法で毒力を測定した。

C. 研究結果

1) フグ毒検査法の見直し

簡便法の有効性

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 (肝臓 No. 1 および No. 2 については、昨年度のデータ) を図 1 に示す。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% 程度高い値となった。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表したものを図 2 に示す。相対測定値は、いずれも抽出比 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。

オキナワフグの筋肉と皮につき、参考法と簡便法 (抽出比 5) により得られた測定値を表 1 に示す。肝臓同様、筋肉と皮においても、簡便法の測定値の方が参考法の測定値より高く、相対測定値は筋肉で平均 1.06、皮では平均 1.08 と、ともに 1.1 弱の値となった。

HPLC-FLD の妥当性 (添加回収試験)

各設定濃度における回収率を表 2 に示す。TTX 本体の回収率は、2、5、10 MU/g において、抽出比 5 では 82.7、100、102%、抽出比 3 では、85.9、95.0、93.2% であった。また、20 MU/g における抽出比 3 の回収率は 74.5% であった。類縁体を加えた回収率は、5、10 MU/g の抽出比 5 で 117、120%、2、5、10 MU/g の抽出比 3 で 107、118、115% であった。また、20 MU/g の抽出比 3 で 92.9% であ

り、いずれの濃度、抽出比においても、類縁体を加えると TTX 本体のみの場合より 20%程度高い値となった。なお、2 MU/g の抽出比 5 においては、4-*epi*TTX および 4,9-anhydroTTX が不検出であったため、TTX 本体の回収率と同じ結果となった。ブランク試料においては、TTX、4-*epi*TTX、および 4,9-anhydroTTX 検出位置にピークは認められなかった。

2) コモンフグ既得毒性データ

筋肉の毒性

コモンフグ筋肉の毒力を図 3 に示す。2003 年 1 月～7 月の 66 個体（凍結解凍魚）については、22 個体が‘無毒’（<10 MU/g）、42 個体が‘弱毒’（10～100 MU/g）、2 個体が‘強毒’（100～1000 MU/g）で、最高毒力は 121 MU/g であった。一方、2003 年 8 月～2004 年 10 月の 125 個体（鮮魚）の場合、5 個体のみ‘弱毒’（最高毒力 28 MU/g）で、残りの 120 個体はいずれも‘無毒’であった。

凍結解凍による毒の移行

鮮魚と凍結解凍魚の各部位の毒力を図 4 に示す。筋肉については、鮮魚の場合、皮側に若干（最高 7 MU/g）の毒性が検出されたものの、いずれも‘無毒’であったのに対し、凍結解凍魚は皮側で平均 58 MU/g、中心部で 34 MU/g、内臓側で 37 MU/g の毒力を示した。一方、筋肉以外の部位（皮、肝臓、および生殖腺）の毒力は、筋肉とは対照的に、いずれも凍結解凍魚より鮮魚の方が高かった。毒力の体内分布を図 5 に示す。鮮魚では皮の割合が最も高かったのに対し、凍結解凍魚では筋肉の割合が最も高くなった。

D. 考察

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。しかし、回歸線から推定した抽出比 10 の相対測定値は 1.27～1.31 で、抽出比 5 の値より 5～10%程度高いに過ぎない。また、昨年度に報告したデータを見ると、簡便法における抽出比 5 および 6 の測定値は、参考法において試料の 10 倍量に定容した試験液（抽出比 10 相当）の測定値を若干上回っており、抽出効率は抽出比 5 以上でほぼ平衡状態に

達しているものと推察される。さらに、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この検出下限値が高くなり、検出感度が低下することから、抽出比は 5 が最も妥当であると判断した。抽出比 3 の相対測定値は抽出比 5 の値の 92～97%で、検出感度をさらに高めたい場合は、抽出比を 3 としても問題は少ない。

筋肉と皮の場合、肝臓ほど大きな差ではないが、簡便法による測定値は参考法より 2～13%高い結果となった。これらの部位についても、簡便法は適用可能と考えられる。なお、皮については、ゼラチン質が多く、カラムに負荷がかかるため、抽出比は 5 以上が適切と考えられる。

HPLC-FLD の妥当性（添加回収試験）

全ての設定濃度における回収率は、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と考えられる。TTX 標品の測定では TTX のみを検出したが、回収試料の測定では 4-*epi*TTX および 4,9-anhydroTTX と推定されるピークが出現した。前述のとおり、類縁体を含めると回収率が 20%程度上がる傾向が確認され、肝臓試料中において一定量の TTX が類縁体に変換することが示唆された。

2) コモンフグ既得毒性データ

筋肉の毒性

凍結解凍魚では、供試個体の 2/3 が有毒で、‘強毒’個体も 2 個体みられた。したがって、凍結解凍したコモンフグの筋肉は、食用に適さないと判断された。これに対し、鮮魚の場合、有毒個体の割合は全体の 4%で、最高毒力も 28 MU/g と低かった。今回、低頻度ながら鮮魚の筋肉からも‘弱毒’が検出されたが、コモンフグは生体でも筋肉に毒をもつことがあるのか、あるいは鮮魚でも保存状態によっては毒の移行が起こりうるのか、今後さらに検討する必要がある。

凍結解凍による毒の移行

前述のように、鮮魚を凍結解凍すると、皮、肝臓、および生殖腺の毒力が顕著に低下し、鮮魚ではほとんど無毒であった筋肉が毒化した。このことは、ナシフグ同様、コモンフグでも凍結解凍により、有毒部位から筋肉への毒の移行が起こることを示している。また、凍結解凍魚の筋肉において皮側の毒力が中心部や内臓側より高かったこと、凍結解凍により、最も多量に毒が分布する部位が皮から筋肉に遷移したことから、皮が主要な毒供給部位であると推察された。

E. 結論

参考法は抽出操作が煩雑で効率が悪いうえ、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、添加回収試験により、HPLC-FLD は感度、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。今後さらに、室内および室間再現精度の妥当性についても検討することが望ましい。

コモンフグは、ナシフグ同様、凍結解凍により有毒部位（主に皮）から筋肉への毒の移行が起こることが示された。本種は本来、筋肉に毒をもつのかどうか、活魚ないし鮮魚であれば、特定の処理により筋肉は食用可能であるのかどうか、今後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) 荒川 修: フグ毒の蓄積機構と生理機能. アクアネット, 222, 27-31 (2016).
- 2) 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).
- 3) 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).

2. 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) O. Arakawa: Marine toxins responsible for food poisonings in Japan. 2016 International Conference on Food Safety Applications, Kaohsiung, September 2016.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

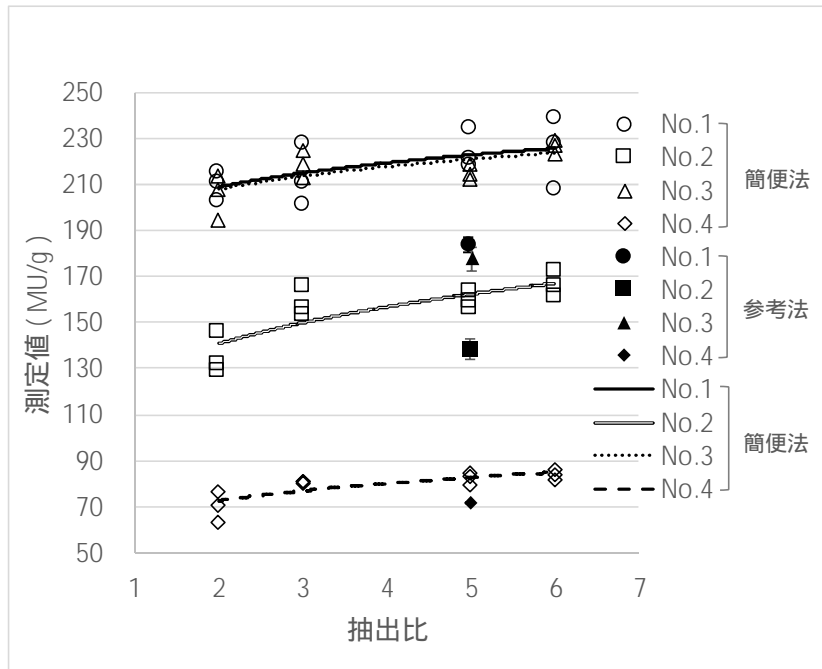


図1 参考法と簡便法の各抽出比で得られた測定値の比較（トラフグ肝臓）

回帰線：No. 1, $y = 198.91x^{0.0706}$; No. 2, $y = 126.21x^{0.1563}$;
 No. 3, $y = 198.55x^{0.0666}$; No. 4, $y = 65.627x^{0.1435}$

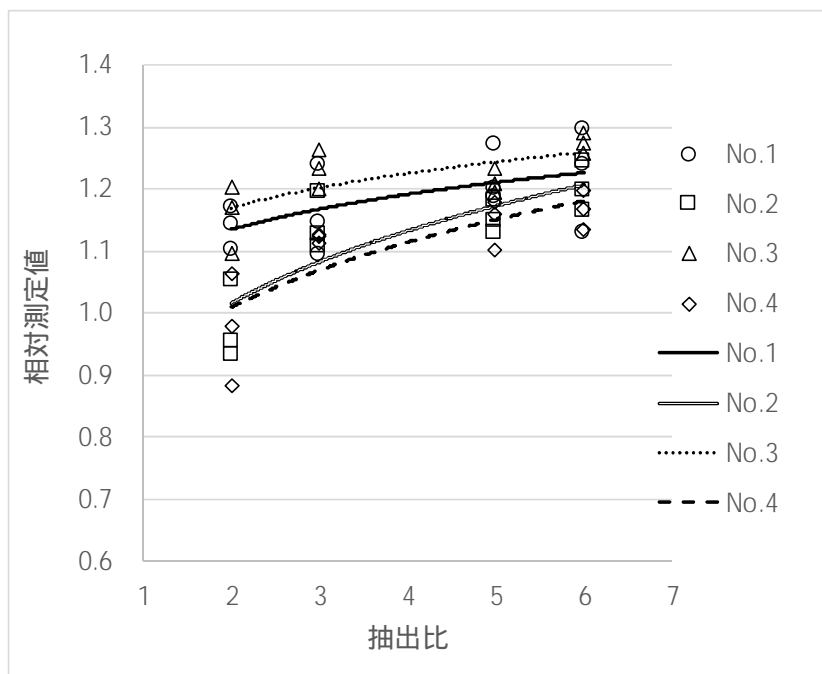


図2 簡便法測定値の参考法測定値に対する比率（相対測定値）と抽出比の関係

回帰線：No. 1, $y = 1.0807x^{0.0706}$; No. 2, $y = 0.9119x^{0.1563}$;
 No. 3, $y = 1.1174x^{0.0666}$; No. 4, $y = 0.9133x^{0.1435}$

表1 参考法と簡便法（抽出比5）による測定値の比較（オキナワフグ筋肉および皮）

部位	試料No.	参考法		簡便法		
		平均測定値 (MU/g)	RSD (%)	平均測定値 (MU/g)	RSD (%)	相対値 (対参考法)
筋肉	1	72.4	0.60	77.7	1.8	1.07
	2	60.3	3.4	63.1	4.0	1.05
皮	1	1063	6.9	1086	2.9	1.02
	2	220	7.7	250	11	1.13

表2 添加回収試験（n=3）の結果

設定濃度	抽出比	TTX本体		TTX本体 + 類縁体	
		平均回収率 (%)	RSD (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)
2 MU/g	5	82.7	11	82.7	11
	3	85.9	11	107	9.7
5 MU/g	5	100	1.9	117	2.1
	3	95.0	5.3	118	6.2
10 MU/g	5	102	0.21	120	0.95
	3	93.2	12	115	13
20 MU/g	3	74.5	8.5	92.9	6.6

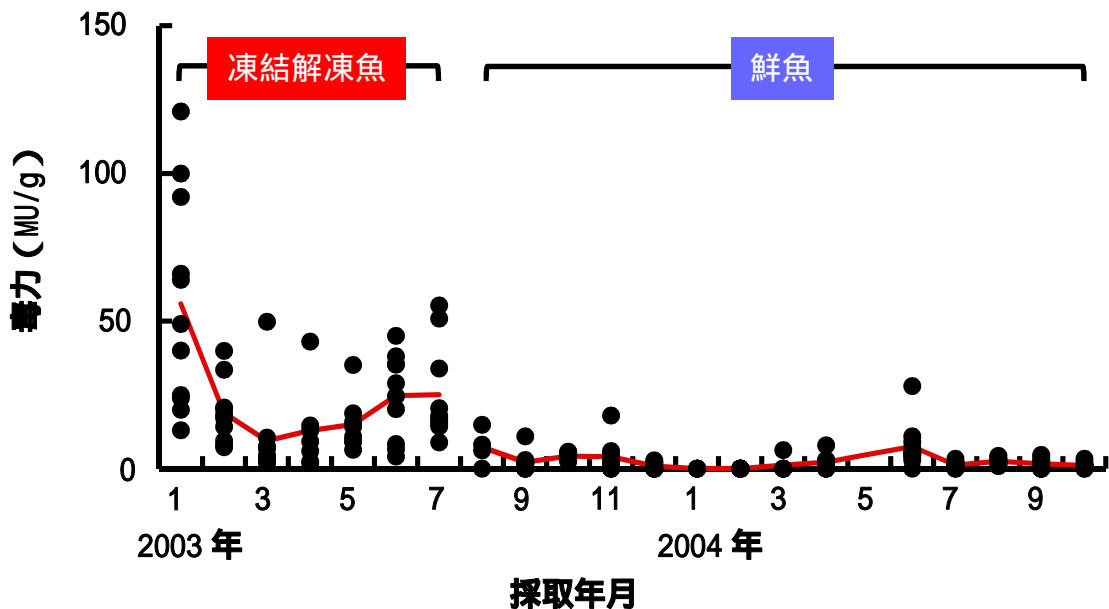


図3 有明海産コモンフグ筋肉の毒力は各個体の毒力、折れ線は月別平均毒力の推移を示す。

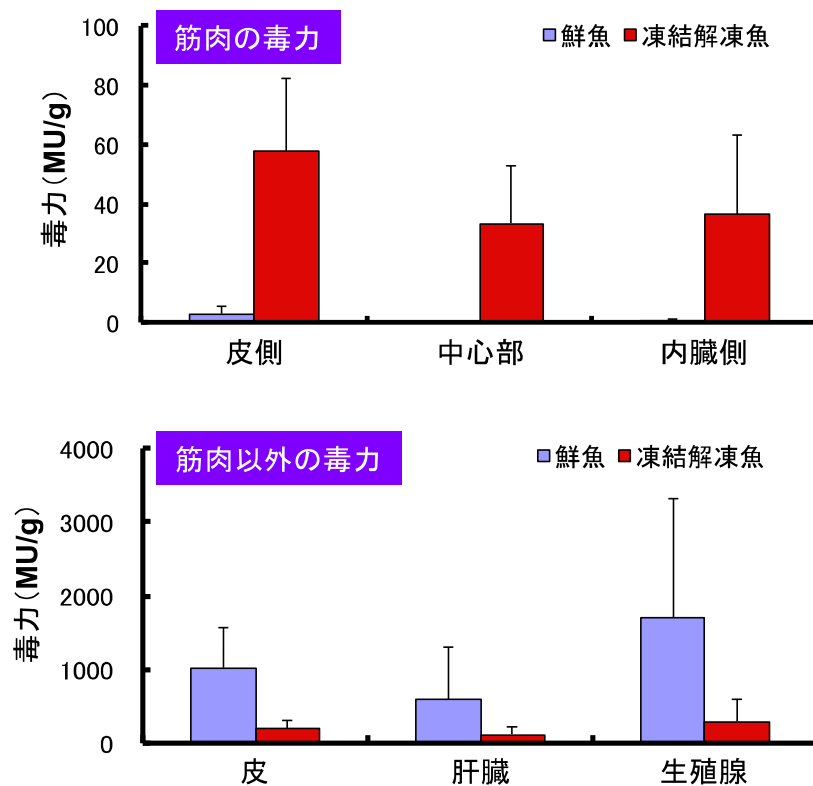


図4 鮮魚と凍結解凍魚の各部位の毒力

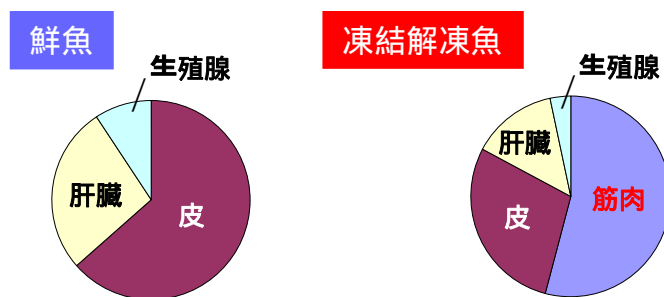


図5 鮮魚と凍結解凍魚における毒の体内分布