

**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、Ⅰ.フグ毒検査法の検討、Ⅱ.フグ等の毒性評価、Ⅲ.遺伝子によるフグ類等の種判別、Ⅳ.フグ類の形態分類、Ⅴ.麻痺性貝毒 (PSP) 標準品の検討を行った。

**Ⅰ. フグ毒検査法の検討**では、低毒量のトラフグ肝臓を用い、「参考法」と「簡便法」で分析し両者の相関をみた結果、良好な正の相関があり、抽出比3以上では簡便法が1~2割高かった。参考法の値を真値とすると簡便法の真度は110~120%となり、性能の違いは許容範囲で、毒性の目安(10 MU/g)による判定への影響は少ないと考えられた。LC-MS/MSにおける試料由来マトリクスの影響について、テトロドトキシン (TTX) を添加した無毒養殖トラフグの組織抽出液で検討した。皮では抽出原液~4倍希釈液で、卵巣では原液で、測定値の大きな低下が見られた。天然マフグの組織抽出液をLC-MS/MSとHPLC-FLDで比較すると、肝臓と卵巣では原液、皮では原液~4倍希釈液でLC-MS/MSで低い値となった。組織に応じて適切に抽出液を希釈することでマトリクスの影響を除くことが可能と判断した。LC-QTOF/MSによるTTX分析法の性能を評価し、妥当性を確認した。また、同法の結果はマウス毒性試験法と高い相関があった。新規の抗TTXポリクローナル抗体を作製し、高感度かつ特異的なTTX関連成分のELISAキットを構築した。本キットでTTX、4-epiTTX、11-oxoTTXおよび5,6,11-trideoxyTTXが検出できることを確認した。

**Ⅱ. フグ等の毒性評価**では、瀬戸内海産コモンフグ(101個体)の筋肉は弱毒が1個体(14 MU/g)で他は無毒、皮は無毒が3個体、弱毒が79個体(11~97 MU/g)、強毒が18個体(101~712 MU/g)および猛毒(7491 MU/g)が1個体であった。愛知県沿岸産(6個体)はすべての筋肉と皮の3個体が無毒で皮の3検体が弱毒(13~29 MU/g)であった。また、凍結融解実験により、皮組織からのTTX漏出と筋肉への移行が確認された。日本沿岸産しらす加工品から、シロサバフグ、クサフグ、コモンフグ、シマフグ、ショウサイフグ、トラフグ、ナシフグ稚魚が確認された。分析した69検体中19検体からTTXが検出(0.06~3.3 µg/g)され、3検体が10MU/gを超えた。フグ稚魚の混入率および摂取量から、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。

**Ⅲ. 遺伝子によるフグ類等の種判別**では、

人工交雑種(トラマとマトラ)計11個体、単一系統トラフグ4個体およびマフグ4個体を用い、mtDNAの16S rRNAおよびシトクロム*b*各部分領域により母系種を判別した。また、トラフグとマフグを明確に区別しうる核DNAマイクロサテライト(MS)マーカーを選抜し、判別に適用可能な反復回数を決定した。有毒巻貝の種判別法として、mtDNA 16S rRNA部分領域のダイレクトシーケンス法をさらに改良し、高温高圧加熱処理によりDNAが断片化した加工品に対して適用できることを実証した。一部、対象領域の塩基配列が重複した種があり、他領域の検討が必要である。

**Ⅳ. フグ類の形態分類**では、日本周辺から採集されたフグ類標本の詳細な調査に基づき、フグ科の種に焦点を絞った同定ガイドを作成した。同定ガイドでは多くのカラー写真を使用して、各種の特徴を分かりやすく示し、魚類分類学の専門家でなくてもフグ類の同定ができるように配慮した。

**Ⅴ. PSP標準品の検討**ではdcSTXによる麻痺性貝毒検査法の標準化をはかるため、dcSTXの基準変換係数(CF値)は実施者による大きなばらつきは無く、安定していることが判明した。また、AOAC 959.08法とdcSTXにより有毒試料を分析した結果、同等の値が得られ、dcSTXがSTXの代替として有効であることが示された。

#### 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 教授
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 食品生産科学部門 准教授
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免疫学的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、I.フグ毒検査法の検討、II.フグ等の毒性評価、III.遺伝子によるフグ類等の種判別、IV.フグ類の形態分類、V.PSP標準品の検討を行った。とくに今年後は、I.フグ毒検査法の検討では、参考法と簡便法の比較を行い、簡便法の有効性について検討した。また、LC-QTOF/MSによるTTX分析の妥当性を確認し、マウス毒性試験法（MBA）との相関について確認した。さらに、新規の抗TTXポリクローナル抗体を作製し、本抗体を用いたELISAキットを構築し、TTXおよび関連成分の検出系としての評価を行った。II.フグ等の毒性評価では、引続きコモンフグの毒性調査と凍結解凍によるTTX移行について検討した。また、しらす加工品に混入したフグ稚魚の種同定と毒性についても調査した。さらに、フグのPSP蓄積能評価としてTTXおよびdcSTXの経口投与と各組織への取込についても検討した。III.遺伝子によるフグ類等の種判別では、人工交雑フグのmtDNAおよび各核種DNAマイクロサテライトマーカーの解析と有毒巻貝の種判別法の検討を行った。IV.フグ類の形態分類では、日本産フグ類の同定ガイド作成に必要な調査を実施し同ガイドを作成した。V.麻痺性貝毒（PSP）標準品の検討では、AOAC法で使用されるSTXの代替標準物質としてのdcSTXの評価を行った。

### B. 研究方法

#### I. 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）

トラフグ肝臓の有毒試料と無毒試料を混合した低毒量の試料を調製し、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) マトリクス効果の検証

無毒養殖トラフグの皮および卵巣につき、それぞれ上記簡便法（抽出比5）により抽出液を調製した。この抽出液を原液とし、純水で段階希釈して2、4、8、および16倍希釈液を調製した。原液および各希釈液に、終濃度が1.9 MU/mLになるよう TTX 標準液を添加し、LC-MS/MS に付して TTX を定量した。また、有毒天然マフグの肝臓、皮、および卵巣につき、同様に簡便法（抽出比3）で抽出液を調製した。この抽出液を原液として純水で2および4倍希釈液を調製後、それぞれ LC-MS/MS および HPLC-FLD に付して TTX を定量した。

### 3) LC-QTOF/MS による TTX 分析の妥当性

コモンフグ筋肉試料 (TTX: <1 MU/g) を混合、均質化して、ブランク試料を調製した。ブランク試料 5.0 g に対し、1 MU 相当 (1.1 μg)、10 MU 相当 (11 μg) をそれぞれ添加し、抽出精製したものを LC-QTOF/MS で分析した。分析者1名が2併行5日間実施し、真度、併行精度および室内精度を評価した。また、MBA の結果と比較することで相関性について評価した。

### 4) フグ毒検査キットの開発

新規抗原による抗体作製のために、3羽のニュージランドホワイト種のウサギに、FCA で乳化した KLH-EDT-TTX 抗原(毎回 0.3 mg/羽)を隔週で皮下接種した。採血して得た血清の一部(100μL)に等量の TTX 標品溶液(2~25μM)を混合し、抗体と結合した TTX を限外ろ過除去し、残った TTX を HPLC 蛍光法で定量分析した。同様に、4-epiTTX、4,9-anhTTX、11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTX を作製した抗体に吸着させて、残存する各成分を分析し、抗体に対する親和性を評価した。

得られた抗 TTX 抗体はさらに、DTT-TTX から作製したアフィニティーカラムで精製し、別途調製したビオチン標識化 TTX を用いて ELISA キットを構築した。TTX、4-epiTTX、11-oxoTTX および、5,6,11-trideoxyTTX の 1、3、10、30、100、300、1,000 nM 濃度の溶液を調製し、ELISA キットの性能を評価した。また、麻痺性貝毒の各成分の溶液を同様に調製し、交差性について検討した。キットの実証性については、コモンフグ 3 個体の皮、筋肉、肝臓、消化管、生殖腺（精巢）を用いて評価した。

## II. フグ等の毒性評価

### 1) コモンフグの毒性調査

瀬戸内海 (101 個体) および愛知県沿岸 (6 個体) について、皮と筋肉の毒性を評価した。また、一

部試料については、凍結融解による皮から筋肉への TTX の移行を確認するために、皮がついた状態で保管し、凍結前と凍結融解後の毒性を比較した。なお、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

2014年12月から2017年10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、現地加工場等によって選別されたフグ稚魚を試料とした。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。各個体は外部形態に基づき分類し、ロット内で同一種と判断されたものの中から1個体選抜し、DNA 解析による種判別を行った。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。

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、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。

### 3) フグの PSP 蓄積能評価

無毒のヒガンフグ人工飼育個体(12ヶ月齢魚20尾)を用い、毒投与試験を行った。試験魚を10尾ずつの2群に分け、それぞれ TTX、および dcSTX を 55 nmol/個体の用量で経口経管投与した。いずれも72時間後に取り上げて、各部位(筋肉、皮、肝臓、生殖腺、および消化管)の TTX 量および dcSTX 量をそれぞれ LC-MS/MS と HPLC-FLD で測定した。また、無毒の淡水フグ *P. suvattii* 人工飼育個体(15~18ヶ月齢魚8尾)を用い、毒投与試験を行った。各個体に STX と TTX をともに 19.2 nmol/個体の用量になるよう混合して経口経管投与し、4尾ずつ24および48時間後に取り上げて、①と同様に各部位の TTX 量と STX 量を測定した。さらに、*P. suvattii* 人工飼育個体から肝臓、皮、および消化管の組織切片を作成し、80 μM の TTX または

STX を含む培地で一定時間培養後、各切片の毒取り込み量を測定した。

### Ⅲ. 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

試料に人工交配フグ種 (トラフグ (♀) ×マフグ (♂) 3 個体およびトラフグ (♂) ×マフグ (♀) 8 個体)、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体を用いた。これらの筋肉もしくは鱗からキットを用いて全ゲノム DNA を抽出・精製した。全ゲノム DNA を用いて mtDNA 中の 16S rRNA およびシトクロム *b* 領域の各々約 620bp、390bp を含む部分領域を PCR 増幅した。PCR 断片を template として、BigDye<sup>®</sup> 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。

つぎに、トラフグおよび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、両親種が既知である人工交雑種および単一系統と推定されたトラフグ、マフグを対象に、計 8 個のマイクロサテライト領域を標的として PCR を行い、トラフグおよびマフグの 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、判別に適用可能な MS マーカーにおける PCR 産物の塩基配列解析に基づく MS の反復回数を決定した。

#### 2) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝の種判別に適するミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域を選択し、本領域 (約 300 bp) を特異的に増幅する PCR 条件を検討した。生鮮品のみならず加工品についても種判別が可能であったが、レトルトまたは缶詰加工された巻貝では、加熱処理によって DNA が断片化され、PCR 増幅できないことがあった。そのため、短縮した 16S rRNA 部分領域 (約 150 bp) で PCR 増幅を試みた。本法の実用性を確かめるため市販の巻貝加工品 29 品目について、PCR と塩基配列解析を行い、種判別を実施した。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、昨年度作製した巻貝加工品に利用できる特異的プライマーを用いて 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シング法で塩基配列を解析した。

また、フグ毒中毒を起こしたボウシュウボラは、ミトコンドリア DNA 16S rRNA の塩基配列がデータベースに登録されていないため、16S rRNA の全塩基配列を解析した。ボウシュウボラの筋肉から全ゲノム DNA を抽出し、それを鋳型にして、NCBI のデータベースから、巻貝のミトコンドリア DNA の 12S rRNA および NADH1 を含む領域の保存性が高い部分でプライマーを設計し、PCR 増幅を行った。アガロース電気泳動で PCR 産物を確認し、サブクローニングを行い、塩基配列の解析を行った。

### Ⅳ. 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。鱗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。

### Ⅴ. PSP 標準品の検討

#### 1) デカルバモイルサキシトキシンによる麻痺性貝毒検査法の標準化

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 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。

さらに、有毒試料を用いて STX および dcSTX を使用して得られた標準化毒値を比較し両者の値を比較した。

## C. 研究結果

### I. 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)

一昨年度から今年度にかけて得られたデータを合わせて、抽出比毎に簡便法と参考法の測定値 (平均値) の相関を見たところ、いずれの抽出比においても良好な正の相関 ( $r = 0.994 \sim 0.999$ ) が認められ、回帰式の傾きは抽出比 2 で 1.1 程度、抽出比 3 以上で概ね 1.2 前後 (1.19~1.25) の値となった。しかしながら、y 切片がいずれも負の値 (-4.44~-0.80) であったため、100 MU/g 未満の低毒量域のデータについて改めて相関を見たところ、回帰式の傾きは、抽出比 2 の 0.95 を除き、概ね 1.1~1.2、y 切片は、抽出比 6 の -0.7 を除き、いずれも正の値 (0.94~1.97) となった。

#### 2) マトリクス効果の検証

無毒養殖トラフグ組織抽出液に TTX を添加後、LC-MS/MS で定量した結果を図 3 に示す。皮の場合、8 倍および 16 倍希釈液では、相対 TTX 量 (添加量に対する相対値) がほぼ 100% となり問題なかったが、原液、2 倍、および 4 倍希釈液では、60~70% 程度と測定値の大きな低下が見られた。卵巣抽出液では、原液で 66% と、皮と同様の測定値の低下が見られた。

天然マフグの組織抽出液を LC-MS/MS と HPLC-FLD に付し、両者の間で TTX 定量値を比較したところ、いずれの組織においても、抽出原液では LC-MS/MS の測定値が HPLC-FLD の測定値より低くなった。肝臓の場合、測定値の低下は僅かで、2 倍および 4 倍希釈液では LC-MS/MS と HPLC-FLD の分析値はほぼ一致した。卵巣でも、2 倍および 4 倍希釈液では両分析値はほぼ一致したが、皮では LC-MS/MS の測定値の低下 (直線  $y = x$

からのずれ) が大きく、2 倍および 4 倍希釈液でも低下が見られた。

#### 3) LC-QTOF/MS による TTX 分析の妥当性

ブランク試料に TTX を 1 MU/g (0.22 mg/kg) および 10 MU/g (2.2 mg/kg) 添加し、実施者 1 名で 2 併行、5 日間分析した。その結果、1 MU/g 添加時の真度 84%、併行精度 3.7 RSD%、室内精度 12% で、10 MU/g 添加時の真度 73%、併行精度 3.1 RSD% 室内精度 3.8 RSD% であった。

MBA による毒性分析を実施した試料のうち、皮 18 試料および筋肉 21 試料について、LC-QTOF/MS による分析を実施した。皮試料および筋肉試料の相関係数 ( $R^2$ ) はそれぞれ 0.9762 および 0.9495 であり、ともに良好な相関性が得られた。

#### 4) フグ毒検査キットの開発

KLH-EDT-TTX 抗原を免疫した 5 羽のウサギのうち、1 羽は免疫開始 4 ヶ月後に死亡したが、残り 4 羽の抗体価 (血清 1 mL あたりの TTX 吸収量) は、免疫化し 6 ヶ月半後の全採血の時点で 4.0~24.5 nmol に達した。

TTX, 4-epiTTX, 4,9-anhTTX, 5,6,11-trideoxyTTX, および 11-oxoTTX を、KLH-EDT-TTX 抗原を免疫したウサギ (No.2) から得た血清と混合し交差性を調べたところ、4,9-anhTTX を除く各成分ともに、TTX と同程度の吸収が確認された。

ビオチン標識化 TTX と精製した抗 TTX 抗体を調製し、ELISA キットを構築した。このキットは、添加した TTX の濃度が高くなるに従って、発色値が低下し、4-epiTTX、11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTX も同様の結果を与えた。これら成分は 3~100 nM の範囲で直線的に発色値が低下し、いずれも 1,000 nM では  $B_0$  の well と同程度の、無色に近い発色であった。IC50 値は TTX が 30 nM 付近、4-epiTTX が 50 nM 付近、11-oxoTTX が 50 nM 付近、5,6,11-trideoxyTTX が 100 nM 付近であった。これに対して、麻痺性貝毒関連成分の場合は、高濃度であっても発色値の変化は認められなかった。

コモンフグの皮や筋肉、肝臓、消化管、精巣では、ELISA で検出される毒含量が、HPLC 蛍光法で検出される毒含量を上回る傾向が認められた。これら試料には、5,6,11-trideoxyTTX などのデオキシ体が多量に含まれていることを LC-QTOFMS で確認した。

## II. フグ等の毒性評価

### 1) コモンフグの毒性

瀬戸内海産コモンフグ筋肉は弱毒1個体（14 MU/g）で他は無毒であった。皮は無毒3個体、弱毒79個体（11～97 MU/g）、強毒18個体（101～712 MU/g）および猛毒（7491 MU/g）1個体であった。愛知県沿岸産6個体の筋肉12試料（皮側および内臓側）はすべて無毒で、皮試料は6検体中、3検体が無毒、3検体が弱毒（13～29 MU/g）であった。

瀬戸内海産コモンフグの凍結融解後の筋肉では、皮側の毒性が凍結前より2～20倍高い値となったが、内臓側では凍結前よりも低い試料もあった。凍結前試料は無毒14試料、弱毒が1試料（11MU/g）であったが、凍結融解試料の筋肉（皮側）は、無毒9試料、弱毒5個体（11～97 MU/g）、強毒1個体（101～712 MU/g）となった。皮は凍結融解後に毒性が減少する試料が多かったが、顕著な違いが認められない個体もあった。愛知県沿岸産試料はすべて<5 MU/g未満で、変化は認められなかった

## 2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

### ① 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ンフグ *Takifugu poecilonotus* の塩基配列と同一性 99.8～100% で一致した。同様に、7 個体はシマフグ *Takifugu xanthopterus* と同一性 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% の同一性であった。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同一性 99.3～100% で一致した。

### ② 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。

## 2) フグの PSP 蓄積能評価

### ① ヒガンフグ

TTX 投与群では、卵巣や皮、肝臓への毒の移行・蓄積が見られた。雌の場合、卵巣の濃度が 4.8 nmol/g と最も高く、皮（3.3 nmol/g）、肝臓（1.0 nmol/g）がこれに次いだ。雄では、主に皮と肝臓から毒が検出された（それぞれ 1.4 および 0.7

nmol/g）。一方、dcSTX 投与群では、消化管から比較的高濃度（雌 3.6 nmol/g、雄 4.6 nmol/g）の毒が検出されたものの、それ以外の部位では生殖腺に僅かに毒の移行・蓄積が見られるのみであった。

### ② 淡水フグ *P. suvattii*

STX については、取り上げ時間に拘わらず、卵巣、皮、消化管への移行・蓄積が見られた。雌の場合、7～8 nmol/個体程度、すなわち投与量の 4 割前後の STX を体内に保持しており、その大部分が卵巣に分布していたのに対し、雄の保持量は 1～3 nmol/個体程度で、そのほとんどを皮が占めた。対照的に、TTX は投与 24、48 時間後ともに消化管内容物からわずかに検出されたのみで、体組織への移行・蓄積は見られなかった。

組織切片の取込み試験でも、STX と TTX の挙動には大きな差異があった。消化管では、STX は培養 20 分で 15  $\mu$ mol/g、60 分で 46  $\mu$ mol/g 取り込まれたのに対し、TTX の取り込み量は 20 分で 2.6  $\mu$ mol/g、60 分でも 5.3  $\mu$ mol/g と、STX の取り込み量の 1/6～1/9 程度に留まった。肝臓においても、培養時間によらず、STX の取り込み量（40～50  $\mu$ mol/g 程度）の方が TTX の取り込み量（20  $\mu$ mol/g 程度）より 2～3 倍多かった。皮の場合、培養 24 時間では両毒成分の取り込み量に差は見られなかったが、48 時間では STX の取り込み量が 94  $\mu$ mol/g に達し、TTX（39  $\mu$ mol/g）を大きく上回った。

## III. 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

人工交配フグ種トラマ（トラフグ（♀）×マフグ（♂））3 個体およびマトラ（トラフグ（♂）×マフグ（♀））8 個体ならびに、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体につき、mtDNA 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結果、トラマおよびマトラはともにすべての個体で交配通りに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トラフグおよびマフグにおいても、母系種を同定することが可能であった。したがって、mtDNA 中の 16S rRNA およびシトクロム *b* 部分塩基配列はフグ種における母系種判別に有効であることが明らかになった。

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 CATC 反復配列、GCA 反復配列、AGC 反復配列、AATC 反復配列であったが、GCA 反復配列の解析においてのみ、トラフグおよび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、トラフグおよびマフグでおよそ 370bp および 270bp であった。そこで、人工交配フグ種を対象に、GCA 反復回数の普遍性を確認したところ、両親種（トラフグとマフグ）の分子量の各位置にバンドが見られたことから、反復回数 6 回がマフグ由来、33~34 回がトラフグ由来であると推測された。このことから、本法が両親種判別に適用できる可能性が極めて高い。

## 2) 有毒巻貝種判別法の開発

### ① 加工品の種判別

今回調べた巻貝加工品 29 種すべてで目的とする PCR 産物（約 150 bp）の増幅がみられた。生鮮品用のプライマーでは PCR 増幅しなかった試料 5 品目のうち、2 つはヨーロッパエゾバイと 100%（146/146 bp）および 98.0%（144/147 bp）の相同性を示し、2 つはアヤボラとの相同性がそれぞれ 99.3%（145/146 bp）、95.6%（130/136 bp）であった。アヤボラの後者は、相同性が低いため、他種である可能性が考えられる。残りの 1 つはエゾボラモドキおよびエゾボラと 100%（146/146 bp）一致した。エゾボラモドキとエゾボラは当該領域の塩基配列が同じであるため、この領域ではどちらの種か区別することはできない。

### ② ボウシュウボラのトコンドリア DNA 16SrRNA の遺伝子配列

16S rRNA を含む周辺領域 1916 bp を解析した。この結果をデータベースに登録されているフジツガイ科アヤボラおよびカコボラと塩基配列を比較したところ、各々相同性は 84.6% および 80.8% であった。

## IV. フグ類の形態分類

### 1) 日本産フグ亜目（講義のフグ類）の分類

日本沿岸には 4 科 14 属 61 種類のフグ亜目魚類（広義のフグ類）が分布するが、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）。以下に科の特徴と属の特徴を簡潔に述べる。

ウチワフグ科はウチワフグのみから構成され

る。本科は上顎に 2 枚の歯板と下顎に 1 枚の歯板をもち、腰骨をもつことでフグ亜目の他の科から区別される。ウチワフグはインド・西太平洋の熱帯域に広く分布し、100m 以深に生息する。

フグ科は上顎と下顎にそれぞれ 2 枚（合計 4 枚）の歯板をもつこと、腹鰭を欠き、消化管に膨脹嚢をもつことで他のフグ亜目魚類から区別される。フグ科には 7 属が含まれるが、体の横断面の形、吻の形態（延長するか否か）、鼻器の開口部の数、鼻器の形態、側面から見た下顎の形態、尾鰭の形態、側線の走り方などの特徴によって識別できる。属内の種レベルの分類形質としては、体表面の小棘の分布状態、体側面の腹縁における皮褶の有無、鰭の形態、体色（体側の黒色紋の有無や色彩パターン）が重要であることが判明した。体色には個体変異が見られるが、種ごとに一定のパターンが見られるため、種の分類形質として極めて重要であることが判明した。

日本産フグ科魚類の中で食用として扱われているのはトラフグ属、サバフグ属およびヨリトフグ属の種である。トラフグ属は鼻器に二つの開口部をもつこと、体側腹縁に縦走する皮褶があること、そして、体側に銀白色の縦帯がないことによって、フグ科の他属から識別される。サバフグ属は鼻器に二つの開口部をもつこと、体側腹縁に縦走する皮褶があること、そして、体側に明瞭な銀白色の縦帯をもつことによって他のフグ科魚類から識別される。ヨリトフグ属の多くの種は大西洋と東部太平洋に分布し、日本にはヨリトフグのみが出現する。ヨリトフグは他の日本産フグ類から体表に小棘を欠くこと、背鰭条数が 8-9 と少ないこと、臀軟条数も 7-9 と少ないことによって識別される。

食用として扱われていない種を含むのは、オキナワフグ属、キタマクラ属、シッポウフグ属およびモヨウフグ属である。これらの属は側線の数や走り方、下顎の形態、鼻器の形態などの特徴によって他の日本産フグ類から識別される。

ハリセンボン科は体表に強大な棘をもつことでフグ亜目の他の科から識別される。ハリセンボン科にはイシガキフグ属、メイトイシガキフグ属およびハリセンボン属の 3 属が含まれるが、各属は棘の形態と分布状態によって識別される。イシガキフグ属とメイトイシガキフグの棘は短くて立てることができないが、ハリセンボン属の棘は長く立てることができる。イシガキフグ属の尾柄背面には小棘が 1 本あるが、メイトイシガキフグ属

には小棘がない。それぞれの属内の種の識別形質としては、尾柄部における棘の分布状態、体表面の褐色斑紋の有無や形、体表面や鰭の小黒色点の分布状態などを挙げる事ができる。

マンボウ科の3属は体形や舵鰭の形態によって区別できる。ヤリマンボウ属は体形が細長く、舵鰭の後端が直線状であるが、マンボウ属とヤリマンボウ属では体が楕円形で舵鰭の後端は円い。ヤリマンボウ属では舵鰭の中央部が後方に突出するが、マンボウ属では突出せず、円い。マンボウ属の種レベルの分類には問題があったが、頭部背面の形態や体高と体長の比によって識別できる。日本にはマンボウとウシマンボウが分布することが明らかになった。

## 2) 日本産フグ類の同定ガイド

魚市場や食品衛生の現場でフグ類を扱う人達にとってフグ類を同定することは容易なことではない。多くのフグ類の体形は似ており、しかも他の多くの魚類の分類で使用されている分類学的特徴(鰭条数や鱗数など)がフグ類では使えない。このため、フグ類の分類は極めて難しい。ところが、既往の図鑑を見てみると、フグ類の特徴についても、他の多くの魚類と同じ扱いとなっている。したがって、現場でフグ類を同定しようとする、既往の出版物は実際には使い物にならない場合が多い。

このような点を考慮して、日本産フグ類の中で食用として扱われているトラフグ属やサバフグ属に重点を置いて、各種の写真や図を多用し、種の識別点を明示するとともに、分類に役立つ情報を解説文に収録した。そして、識別が特に難しい近似種については、種の識別形質となる色彩パターンや斑紋の状態を明瞭に示した拡大図を作成した。

## 3) 沖縄から得られた *Tylerius spinosissimus*

沖縄島南東部の中城から得られた7個体の *Tylerius spinosissimus* (Regan, 1908)を調査した。本種はインド洋西部や西太平洋の熱帯域から知られていたが、採集例は多くなかった。そこで、沖縄から得られた標本と南シナ海から採集された標本を比較検討して、本種の特徴を詳細に検討した。その結果、本種は他の日本産フグ類から以下の特徴によって識別できることが明らかになった。本種の体の横断面はやや角張り(他種では円い)、体表面に発達した小棘が密に分布する(他種では小棘が極めて小さいか、小棘を欠く)。

## V. PSP 標準品の検討

### 1) 基準 CF 値の比較

STXおよびdcSTXでAOAC 959.08に準じて基準CF値を求めた結果、昨年度とほぼ同等の値であった。

昨年度の実施者を含む4名によるCF値の変動については、dcSTX、STXとも、基準CF値より若干高い値となった。「求めたCF値は基準CF値の±20%におさまらなければならない。20%を超える変動はマウス感度または手技の明瞭な変動を示している。」とされているが、dcSTXのCF値は、基準CF値の±20% (0.140~0.210 FDA-STX µg/MU) 範囲内に収まった。一方、STXは5匹投与で基準CF値の±20% (0.150~0.225 µg/MU) 範囲内に収まらず、新たにCF値を決定することとなった。

### 3) 陽性管理試料の標準化毒値の比較

自家製の陽性管理試料(STXによる値付け値: 639 µg STX当量/kg)を1回/月分析し、その結果と3つの基準CF値から求めた標準化毒値(STX換算値)を比較した。2つの方法でdcSTXにより求めた基準CF値に近い値であったことから、STX換算した標準化毒値はほぼ同等であった。STX基準CF値による標準化毒値と比較すると、ほぼ同等であったがdcSTXにより求めた標準化毒値のほうが若干低い値を示した。なお、外部精度管理法では19~21 gでも体重補正を行ったが、補正の有無は結果に影響しなかった。

## D. 考察

### I. 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)

フグ肝臓試料において、簡便法と参考法の測定値の間には良好な正の相関が認められた。さらに、簡便法の測定値の方が参考法より抽出比2で0~1割、抽出比3以上で1~2割高くなることが示された。従って、簡便法により、参考法よりも毒性が低く見積もられる可能性はきわめて低く、簡便法は参考法の代替法として十分に適用可能であると考えられた。毒量の高い試料ほど、参考法に対する簡便法の相対測定値がより高くなる傾向があったため、直線回帰式ではy切片が負の値となったが、低毒量域に限定した回帰式ではy切片が0前後となった。従って、低毒力(10 MU/g未滿)試料でも、簡便法を適用して問題はないと考える。

抽出比に関しては、低毒領域を含めて3以上ではほぼ同様の回帰線が得られた。従って、抽出比2では、他の抽出比に比べて1割程度毒量が低く見



積もられるものの、抽出比 3 以上であれば、いずれの抽出比を用いても大きな問題はないものと思われる。は反映されていない。今後、個々の測定値のばらつきを考慮した統計解析を行い、回帰線の信頼区間等を明らかにする必要がある。

## 2) マトリックス効果の検証

無毒養殖トラフグの皮では抽出原液、2 倍、および 4 倍希釈液で、卵巣では原液で、測定値の大きな低下、すなわちマトリックス効果によるものと推定される TTX イオン化の抑制が見られた。天然マフグを用いた実験でも、肝臓では原液で僅かに、皮では原液、2 倍、および 4 倍希釈液で、卵巣では原液で、同様のマトリックス効果が認められた。すなわち、マトリックス効果は組織により異なり、皮で最も強く、従って皮を LC-MS ないし LC-MS/MS で分析する場合には、特に十分な希釈（抽出比 5 の場合、少なくとも 10 倍程度）が必要であることが示唆された。

## 3) LC-QTOF/MS による TTX 分析の妥当性

ブランク試料を 1 MU/g 未満の筋肉試料を混合、均質化し調製したため TTX 含量が 0.74 MU/g となり、1 MU/g 相当量添加では選択性を確認できなかった。しかし、真度、併行精度および室内精度については通知に示された目標値を満たした。一方、毒性の目安となる 10 MU/g 相当量添加時の選択性、真度、併行精度および室内精度の全てが目標値を満たしており、LC-QTOF/MS による TTX 分析法の妥当性が確認され、コモンフグ筋肉を対象とした分析への適用が可能であることが示された。

## 4) フグ毒検査キットの開発

本研究で作成した抗 TTX ポリクローナル抗体および、これを用いて作製した ELISA キットは様々な TTX 関連成分を検出可能である（図 9）。試作した ELISA キットは、TTX に匹敵する活性を持ち、キンシバイ等に高濃度で見いだされている 11-oxoTTX や、TTX の前駆体として想定されている 5,6,11-trideoxyTTX も検出できる。すなわち本抗体は、マウス試験法に替わる毒の簡易分析法としてだけでなく、TTX 関連成分による生物の毒化機構を解明するための、極めて有用なツールとなるものと考えられる。

## II. フグ等の毒性評価

### 1) コモンフグの毒性

凍結融解による皮から筋肉への移行について検討するために、コモンフグの半身を凍結融解した

後に皮と筋肉に分けて分析に供した。愛知県沿岸産試料 6 個体については、凍結融解による皮から筋肉への毒の移行は確認できなかった。これは、皮試料の毒性が低かったためと考えられた。

瀬戸内海産試料では、凍結融解後の皮側の筋肉は 2~20 倍に増加していた。また、皮の毒性が猛毒および強毒の個体では、凍結前に無毒であった筋肉が、凍結融解した筋肉（皮側）で無毒から弱毒及び強毒へと変化した。一方、内側の筋肉は凍結前と比べ 0.2~4 倍変動したが、全ての試料で無毒であった。皮の毒性は凍結前後においてほとんど変化は認められなかったが、一部で減少が確認された。これらに結果より、凍結融解により、皮組織から TTX の漏出および皮への移行が起きているものと推定された。

### 2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

2015 年度および 2016 年度の調査により、日本沿岸で水揚げ、製造されたしらす加工品に混入したフグ稚魚は、ほとんどがシロサバフグであったが、コモンフグ、シマフグ、ナシフグ、ヒガンフグの稚魚も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。毒性に関しては、1 試料だけ 0.056  $\mu\text{g}$  TTX/g が検出され、それ以外の試料では、TTX は検出されなかった（0.01  $\mu\text{g}$  TTX/g 未満 TTX/g）。

調査対象地域を広げ、試料数を増やした結果、新たにクサフグとトラフグの稚魚が確認され、さまざまな種のフグがしらす加工品に混入していることが明らかになった。しかし、漁獲の時期や場所による特徴は見受けられなかった。

毒性においては、一部 TTX 含量が高いものがあり、69 検体中 3 検体でフグの食用規制値（10 MU/g、2.2  $\mu\text{g}$  TTX/g 相当）を超える TTX が検出された。しかしながら、しらす加工品に混入するフグ稚魚の割合は極めて低く、摂取するフグ稚魚由来の TTX 量は少ない。一例を示すと、今回調べた中で、最も混入率が高かったもので、しらす水揚げ物 140 kg からフグ稚魚 35 匹（468 mg）が混入していた。これに最大 TTX 含量（3.32  $\mu\text{g}$  TTX/g）を乗じると TTX 量は 1.6  $\mu\text{g}$  となる。ヒトのフグ毒中毒量は不明だが致死量は約 2 mg と推定されているので、仮にこのフグ稚魚すべてを一度に喫食しても、TTX 量は微量であり中毒症状は起こらないといえる。

### 3) フグの PSP 蓄積能評価

ヒガンフグへの毒投与試験において、TTX は消

化管にはほとんど残存しておらず、主に皮と肝臓、雌では卵巣に移行・蓄積していた。これに対し、dcSTX は生殖腺、特に卵巣に僅かに移行・蓄積したのみで、皮や肝臓からは検出されなかった。また、消化管内に残存が見られたことから、TTX は消化管から体内に取り込まれて、特定の部位に輸送・蓄積されるのに対し、dcSTX は消化管に留まり、一部は生殖腺に運搬されるが、大半は体外に排出されることが示唆された。

淡水フグ *P. suvattii* への毒投与試験では、ヒガンフグとは対照的な結果となった。すなわち、STX は体内に取り込まれて皮や卵巣に移行・蓄積したのに対し、TTX はいずれの部位からもほとんど検出されなかった。ヒガンフグは TTX を、*P. suvattii* は STX を選択的に吸収・蓄積する能力をもつものと推察される。

さらに、組織切片の取り込み試験でも、これを支持する結果が得られた。すなわち、消化管、皮、肝臓のいずれにおいても STX の取り込み量が TTX を上回った。特に消化管では TTX はほとんど取り込まれず、STX 取り込み量との差が最も顕著となった。従って、*P. suvattii* では消化管が関門となり、STX は選択的に取り込まれて卵巣や皮に蓄積するが、TTX はほとんど取り込まれず、そのまま排出されるものと推察された。

### III. 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

トラフグおよびマフグ間に焦点を絞って、mtDNA 解析法による母系種の同定および GCA 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、従来通り、mtDNA 解析法による母系種同定の有効性が再確認されるとともに、新たに核 DNA による GCA 反復配列の回数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、人工交配種において、トラフグ由来の 344-347 bp (反復回数 33-34 回) およびマフグ由来の 262 bp (反復回数 6 回) 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トラフグおよびマフグで上述した分子量に近い PCR 産物が得られた (図 1 中の Torafugu, Mafugu)。本マイクロサテライトマーカーはトラフグおよびマフグにおいて有効であると考えられる。今後は、他のトラフグ属あるいはサバフグ属においても GCA がマーカーとして有効であるかどうかやトラフグおよびマフグにお

ける GCA の再現性を確認する必要がある。

#### 2) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝の種判別については、本研究で確立した PCR 条件を用いれば、加工品でも種判別が可能であることが明らかになった。ただし、加工品を対象とした遺伝子領域は約 150 bp と短いため、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、エゾボラ」、「エチュウバイ、アニワバイ」はそれぞれカッコ内の貝の種が判別できない。

### IV. フグ類の形態分類

フグ科魚類はフグ目の中で最も種の多様性が高く、全世界に約 190 種が生息している。日本沿岸にも 49 種が分布していることが明らかになり、日本産フグ類の中でも飛び抜けて多様性が高いことが判明した。フグ科魚類には未知種が多く存在することが推測されているが、日本沿岸からも近年、3 新種が発見され、記載された。今年度の研究においても新種ではないが、日本から正式に報告されていなかった *Tylerius spinosissimus* (Regan, 1908) が沖縄島に分布することが明らかになった。このようにフグ科魚類には依然として未知種や日本未記録種がいる可能性が高いため、今後も引き続き分類学的調査を継続する必要がある。

フグ科魚類は日本をはじめとして世界各地で分類の難しい分類群として悪名が高い。フグ科魚類は他の多くの魚類と異なり、分類学的特徴に乏しいため、種の識別が困難である。そのため同定に役立つ適切な出版物がほとんどない。フグ科魚類の分類に最も役立つ特徴は色彩であるが、フグ類に馴染みのない研究者や一般の人達 (市場関係者や食品衛生関係者を含む) にとっては、フグ類の体色のどの部分が種を識別する有用な特徴となるかを判断するのは困難である。

そこで、写真と図を主にした「日本産フグ類同定ガイド」を作成した。この同定ガイドでは、分類学的な専門用語の使用を極力少なくして、各種の特徴を簡潔に解説した。また、特に識別が困難な種については、識別点となる部分の拡大図を作成し、魚市場などの現場で速やかにフグ類を同定できるようにした。このフグ類同定ガイドを食品衛生関係者に閲覧してもらい、意見を求めたところ、好評であり、改善するためのコメントが寄せられた。これらの意見に基づいて、改訂版を作成したので、

報告書に添付する。

沖縄島から得られた *Tylerius spinosissimus* は浅海性の体長 8cm 以下の小型のフグである。これまでに南シナ海北部で採集されたことはあったが、日本から正式に報告されたことはなかった。本種の体表には発達した小棘が分布しているため、日本産フグ類の他種から容易に識別できる。

## V. PSP 標準品の検討

基準CF値と 1 回/週で11週間実施したCF値の平均は、STXで0.201 FDA-STX  $\mu\text{g}/\text{MU}$  (基準CF値の1.07倍:変動範囲94.7%-120.7%)、dcSTXで0.185 FDA-STX  $\mu\text{g}/\text{MU}$  (基準CF値の1.06倍:変動範囲90.9%-118.9%)であり、ともに基準CF値より高い傾向となった。実施者が4名であることも一因と考えられたが、変動係数はSTXで7.8%、dcSTXで8.8%であり、複数人で実施してもばらつき無く使用できることが示唆された。

また、dcSTXのAOAC 959.08により求めた基準CF値と外部精度管理法により求めた基準CF値はほぼ同等であった。dcSTXによる標準化毒値は、STXによるものに比較して若干低い傾向はあるが値付け値 (639  $\mu\text{g}$  STX当量/kg) の86.4%~105.2%と良好であった。

## E. 結論

### I. 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)

簡便法の測定値は参考法の測定値とよく相関しており、かつ参考法の測定値より1~2割程度高かった。従って、毒性検査の抽出法としては、操作が煩雑で効率の悪い参考法に代え、簡便法を適用することが望ましいと判断された

#### 2) マトリクス効果の検証

TTXのLC-MS/MS分析では、マトリクス効果により測定値の低下が起るため、抽出液の適切な希釈が必要となる。また、適切な最低希釈倍率は、組織の種類等、試料により大きく異なることが示唆された。この点を明確にするためには、今後、さらにデータを集積する必要がある。なお、抽出比5の場合、10倍希釈以上でマトリクスの影響が除けることが示唆された。

#### 3) LC-QTOF/MSによるTTX分析の妥当性確認

LC-QTOF/MSによるTTX分析法は、毒性の目安となる10  $\text{MU}/\text{g}$ を添加した際の妥当性が確認され、1  $\text{MU}/\text{g}$ 添加時の選択性は確認できなかったが、そ

の他の性能については目標値の範囲内であり、毒性評価法としての妥当性が確認された。

### 3) フグ毒検査キットの開発

これまで複数の研究グループによって開発が試みられてきたTTX検出用のELISAキットは、TTX以外の関連成分はほとんど検出することはできない。これらキットに使用されている抗TTX抗体は、TTXなど関連成分のグアニジノ基をアルデヒドを用いてキャリアタンパク分子のアミノ基と架橋した抗原を用いて作成されている。この方法ではキャリアタンパク分子に結合するTTX分子の数は極めて限られており、優れた抗TTXポリクローナル抗体を得ることはできなかった。本研究は、Yotsu-Yamashita et al. (2005) および Sato et al. (2014) の知見をもとに、キャリアタンパク分子に多数のTTX分子が結合したハプテン抗原作成法を新たに開発し、毒性が高い11-oxoTTXを含む、様々なTTX関連成分に反応する新規の抗TTXポリクローナル抗体を作製した。この抗体を使用して構築したELISAキットは、TTX、4-epiTTX、11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTXなどのTTX関連成分を特異的に検出できることを確認した。

## II. フグ等の毒性評価

### 1) コモンフグの毒性

前年度に引き続き、コモンフグの毒性について調査した。今年度の試料は全体的に毒性が低く、年変動が大きいことが示唆された。

凍結融解した試料を分析し、凍結前の値と比較した結果、筋肉の皮側で含量の上昇が確認された。皮試料の中には減少したものもあり、皮組織からの漏出と筋肉への移行が示唆された。

MBAと機器分析法による分析結果は、高い相関が認められ、リスク管理のための毒性調査に機器分析が有用と考えられた。

### 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、リスク評価に必要な基礎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。今回集めた71検体のうち、多くはシロサバフグであったが、成魚が有毒種であるクサフグ、コモンフグ、シマフグ、ショウサイフグ、トラフグ、ナシフグ稚魚の混入もみられた。これら有毒フグ種の一部の試料ではTTXが検出され、3検体でフグの食用規制値(10

MU/g、2.2 µg TTX/g 相当) を超える TTX が検出されたが、しらす加工品への混入率と摂取量を考慮すると、フグ稚魚が混入したしらす加工品を食べても健康被害への影響はないと考えられた。

### 3) フグの PSP 蓄積能評価

天然で TTX 主体の毒をもつ海産フグは TTX を、PSP 主体の毒をもつ淡水フグは PSP を選択的に吸収・蓄積する能力をもつことが示唆された。食用フグの PSP 蓄積能や蓄積機構については、今後さらに検討する必要がある。

## III. 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、mtDNA 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、GCA 反復配列から推定できる可能性が示唆された。しかしながら、現在マイクロサテライトの反復回数は未決定の個体が多いため、本 GCA マーカーが適用できるかどうかは定かではない。さらに、その他の交雑種、例えばショウサイフグ、コモフグ、ゴマフグなどからなる交雑種に本 GCA マーカーが適用できるかどうかは定かでない。他のマイクロサテライト領域も含め、次年度も引き続き、さらなる追試が必要であると考えられた。

### 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こっているため、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。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行ったところ、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。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。さらに、重篤なフグ毒中毒を引き起こした有毒巻貝のボウシュウボラについては、ミトコンドリア DNA 16SrRNA の遺伝子配列が登録されていないので、この全塩基配列を決定した。これにより、今後はボウシュウボラの種判別を正確に行うことができる。

## IV. フグ類の形態分類

フグ科魚類はフグ目の中で最も種の多様性が高く、全世界に約 190 種が生息している。日本沿岸にも 49 種が分布していることが明らかになり、日本産フグ類の中でも飛び抜けて多様性が高いことが判明した。これらのフグ種の特徴を整理し、写真と図を主にした現場で使える「日本産フグ類同定ガイド」を作成した。

## V. PSP 標準品の検討

AOAC 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。今年度は昨年度と同様の試験を 4 名で実施し、複数人の投与者によるばらつき幅を検討したが、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示唆された。

Codex 規格における麻痺性貝毒の許容量は 800 µg STX 当量/kg である。有毒検体である自家製陽性管理試料を分析した結果、dcSTX による試験法は AOAC 959.08 と同等であることが示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) O. Arakawa, T. Takatani, S. Taniyama and R. Tatsuno: Toxins of pufferfish - distribution, accumulation mechanism, and physiologic functions. Aqua-BioScience Monographs, 10, 41-80 (2017).
- 2) S. Jiang, K. Kuwano, G. N. Nishihara, C. Urata, R. Shimoda, T. Takatani and O. Arakawa: Uptake of nitrogen and production of kainic acid by laboratory culture of the red alga *Digenea simplex*. Phycol. Res., 66, 68-75 (2018).
- 3) W. Gao, Y. Kanahara, R. Tatsuno, K. Soyano, G. N. Nishihara, C. Urata, T. Takatani and O. Arakawa: Maturation-associated changes in internal distribution and intra-ovarian microdistribution of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu pardalis*. Fish. Sci., in press.
- 4) S. Takaishi, K. Yasumoto, A. Kobiyama, S. Sato (2017) Haptenic properties of tetrodotoxin conjugated to carrier proteins by using dithiol reagents. Proceedings in: International Symposium "Fisheries Science for Future Generations", No.

11001.

[http://www.jsfs.jp/office/annual\\_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html](http://www.jsfs.jp/office/annual_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html)

- 5) M. S. Reza, A. Kobiyama, T. Kudo, J. Rashid, K. Ikeo, Y. Ikeda, Y. Yamada, D. Ikeda, N. Mizusawa, S. Sato, T. Ogata, M. Jimbo, S. Kaga, S. Watanabe, K. Naiki, Y. Kaga, S. Segawa, K. Mineda, V. Bajic, T. Gojibori, S. Watabe (2017) The implication of the datasets obtained from periodic surveys on the microbial community by metagenomic analysis in evaluating the marine ecosystem. Proceedings in: International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, No.08002.  
[http://www.jsfs.jp/office/annual\\_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html](http://www.jsfs.jp/office/annual_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html)
- 6) S. Watabe, M. S. Reza, A. Kobiyama, K. Ikeo, J. Rashid, Y. Ikeda, Y. Yamada, D. Ikeda, N. Mizusawa, S. Sato, T. Ogata, M. Jimbo, T. Kudo, S. Kaga, S. Watanabe, K. Naiki, Y. Kaga, S. Segawa, K. Mineta, V. Bajic, T. Gojibori (2017) Periodic survey by metagenomic analysis on the marine microbial communities in an enclosed bay locating at Sanriku coast off northern Japan in the Pacific Ocean. Proceedings in: International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, No.08003.  
[http://www.jsfs.jp/office/annual\\_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html](http://www.jsfs.jp/office/annual_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html)

## 2. 著書・総説

- 1) 荒川修: フグの毒テロドトキシン —保有生物やフグ食文化との興味深い関わり合い—. 化学と教育, 65, 224-227 (2017).
- 2) 松浦啓一: フグ類の学名はなぜ変わったのか? 日水誌 2017; 83: 718-721.
- 3) 松浦啓一: 動物分類学の基礎 - 1. 食衛誌 2017; 58: J-111-J115.
- 4) 松浦啓一: 動物分類学の基礎 - 2. 食衛誌 2018; 59 (印刷中).

## 3. 学会発表

- 1) W. Gao, Y. Kanahara, R. Tatsuno, H. Yoshikawa, K. Soyano, T. Takatani and O. Arakawa: Tetrodotoxin-specific toxin uptake and maturation-associated toxin accumulation in the pufferfish *Takifugu pardalis*. International Symposium “Fisheries Science for Future

Generations”, Tokyo, September 2017.

- 2) R. Tatsuno, W. Gao, H. Yoshikawa, H. Takahashi, T. Fukuda, M. Furushita, G. N. Nishihara, T. Takatani and O. Arakawa: Tetrodotoxin dynamics in the pufferfish *Takifugu rubripes* changes depending of its liver development. International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, Tokyo, September 2017.
- 3) 佐々木杜汰, 寺島武寿, 沖田光玄, 平井慈恵, 高谷智裕, 荒川修: トラフグ初期発育段階におけるフグ毒の獲得. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2018 年 3 月
- 4) 大城直雅, コモンフグ筋肉から検出されたテロドトキシンの由来. 第 113 回食品衛生学会, 東京江戸川区, 2017 年 11 月
- 5) 長谷川晶子, 柘植康, 大城直雅, 愛知県産コモンフグの毒性分析調査. 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会, 奈良県奈良市, 2017.11
- 6) 中谷実・山本明美・工藤志保・増田幸保・木村淳子・大城直雅・鈴木達也・高坂典子 (2017) 麻痺性貝毒試験における代替標準品に係る比較試験. 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会.
- 7) X. Yin, A. Kiriake, A. Ohta, Y. Kitani, S. Ishizaki, Y. Nagashima: A novel function of vitellogenin subdomain, vWF type D, as a toxin-binding protein in the pufferfish *Takifugu pardalis* ovary. *Toxicon* 2017; 136: 56-66.
- 8) T. Matsumoto, Y. Ishizaki, K. Mochizuki, M. Aoyagi, Y. Mitoma, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Urinary excretion of tetrodotoxin modeled in a porcine renal proximal tubule epithelial cell line, LLC-PK1. *Mar. Drugs* 2017; 15: Doi: 10.3390/md15070225.
- 9) Y. Nagashima, A. Ohta, X. Yin, S. Ishizaki, T. Matsumoto, H. Doi, T. Ishibashi: Difference in uptake of tetrodotoxin and saxitoxins into liver tissue slices among pufferfish, boxfish and porcupinefish. *Mar. Drugs* 2018; 15: Doi: 10.3390/md16010017
- 10) 土井啓行, 岡山桜子, 徐 超香, 長島裕二: 日本海西部沿岸より採取されたカニ類の毒性. 日本海甲殻類研究会第 16 回発表会, 福井県福井市, 平成 29 年 5 月.
- 11) 長島裕二: フグの毒とフグ食の安全性. ジャパン・インターナショナル・シーフードショウ 国際ふぐ協会セミナー, 東京都江東区, 平成 29

- 年 8 月.
- 12) R. Ohki, T. Matsumoto, S. Ishizaki, Y. Nagashima: In vitro uptake of tetrodotoxin into marine gastropods by tissue culture. 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム, 東京都港区, 平成 29 年 9 月.
  - 13) S. Yokozuka, Y. Kitani, N. Suzuki, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Bio-transformation of paralytic shellfish toxin by the hemolymph of shore crab *Gaetice depressus*. 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム, 東京都港区, 平成 29 年 9 月.
  - 14) T. Matsumoto, Y. Ishizaki, K. Mochizuku, M. Aoyagi, Y. Mitoma, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Carrier-mediated transport of tetrodotoxin in porcine renal proximal tubule epithelial cell line LLC-PK1 monolayer. 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム, 東京都港区, 平成 29 年 9 月.
  - 15) 大木理恵子, 園山貴之, 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によるフグ毒中毒リスク評価. 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会, 東京都江東区, 平成 29 年 10 月.
  - 16) 長島裕二: 魚貝類の毒 マリントキシン. 平成 29 年度第 1 回愛知県衛生研究所技術研修会. 愛知県名古屋市, 平成 29 年 11 月.
  - 17) 辰野竜平, 梅枝真人, 宮田祐実, 出口梨々子, 福田翼, 古下学, 高橋 洋, 長島裕二: 熊野灘産ムシフグの毒性. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 30 年 3 月.
  - 18) 大木理恵子, 松本拓也, 石崎松一郎, 長島裕二: 組織培養法による巻貝のテトロドトキシン取り込みと排出. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 30 年 3 月.
  - 19) 横塚峻介, 木谷洋一郎, 鈴木信雄, 林華娟, 石崎松一郎, 長島裕二: ヒライソガニ体液に含まれる麻痺性貝毒変換物質の性状解明. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 30 年 3 月.
  - 20) 松本拓也, 高橋晶子, 青柳 充, 大竹才人, 三苦好治, 石崎松一郎, 長島裕二: トラフグのカルニチントランスポーターoctn2 をコードするslc22a5 遺伝子のクローニング. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 30 年 3 月.
  - 21) N. Koyama, M. Usui, S. Ishizaki, T. Yanagimoto, Y. Nagashima: Species identification of hybrid pufferfish between *Takifugu rubripes* and *Takifugu porphyreus*. International Symposium on Pufferfish in Bodrum, Turkey, 2017. 13-14 October, 2017.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし