

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 29 年度分担研究報告書

フグ毒検査法の見直しとフグの麻痺性貝毒蓄積能の評価

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 長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

研究要旨

フグ類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、フグの麻痺性貝毒（PSP）蓄積能について検討した。まず、低毒量のトラフグ肝臓ホモジネートを用い、「参考法」と「簡便法」で毒量測定値を取得後、27、28 年度のデータを加えて両者の相関を見た。その結果、簡便法と参考法の間には良好な正の相関が認められ、かつ抽出比 3 以上では参考法より簡便法の測定値の方が 1~2 割程度高くなることが示された。すなわち、参考法で得られた値を真値と仮定した場合の簡便法の真度は 110~120% となり、検査法としての性能の違いは許容範囲であり、10 MU/g を毒性の目安としたときの判定への影響は少ないものと考えられた。次に、LC-MS/MS における試料由来マトリックスの影響について検討した。無毒養殖トラフグの組織抽出液にテトロドトキシン（TTX）を添加後、LC-MS/MS で定量したところ、皮では抽出原液~4 倍稀釈液で、卵巣では原液で、測定値の大きな低下が見られた。一方、天然マフグの組織抽出液を LC-MS/MS と HPLC-FLD に付し、TTX 定量値を比較したところ、肝臓と卵巣では原液、皮では原液~4 倍稀釈液で LC-MS/MS の測定値が HPLC-FLD の測定値を下回った。マトリックスの影響を除くためには、組織に応じて適切に抽出液を稀釈（抽出比 5 の場合、少なくとも 10 倍程度）する必要がある。一方、ヒガンフグ人工飼育個体に TTX またはデカルバモイルサキントキシン（dcSTX）を経口経管投与したところ、TTX は皮や肝臓、卵巣に移行・蓄積したのに対し、dcSTX は生殖腺に僅かに移行したのみであった。対照的に、淡水フグ *Pao suvattii* の人工飼育個体に TTX とサキントキシン（STX）を混合投与したところ、STX は皮や卵巣に移行・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。同フグ組織切片を用いた毒取り込み試験でも、各組織で STX の取り込み量が TTX を上回った。ヒガンフグは TTX を、*P. suvattii* は PSP を選択的に吸収・蓄積する能力をもつものと推察された。

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、コモンフグ等、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、淡水フグや *Sphoeroides* 属、*Arothron* 属などの一部の海産フグは麻痺性貝毒（PSP）をもち、海外ではこれによる食中毒も発生しているが、フグ類の PSP 蓄積能については依然として不明の部分が多い。

このような状況の下、フグ類のリスク管理に資するため、フグ毒検査法の見直しとして、昨年度

に引き続き「参考法」の抽出操作を簡素化した「簡便法」の有効性について検討するとともに、今年度は LC-MS/MS における試料由来マトリックスの影響（マトリックス効果）についても調べてみた。また、海産のヒガンフグ、および淡水フグ *Pao suvattii* の無毒人工飼育個体を用い、*in vivo* の毒投与試験と *in vitro* の培養組織毒取り込み試験を行って、フグの PSP 蓄積能について検討を加えた。

B. 研究方法

1) フグ毒検査法の見直し

①簡便法の有効性

一昨年度・昨年度は、比較的高毒量の天然トラフグ肝臓（4 個体）を試料として、それぞれ参考法と簡便法による測定値を比較した。今年度は、低毒量の肝臓を用いて同様の実験を行う予定であったが、適切な毒量の肝臓が得られなかったため、有毒と無毒の肝臓それぞれ 1 個体をホモジナイズ後混合し、さらにホモジナイズして 2 種類の毒量の肝臓ホモジネート試料を調製した。

一昨年度・昨年度同様、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。

②マトリックス効果の検証

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。

一方、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。

2) フグの PSP 蓄積能評価

①ヒガンフグ

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。すなわち、試験魚を 10 尾ずつの 2 群に分け、それぞれ TTX、および PSP の一成分であるデカルバモイルサキシトキシン（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。

②淡水フグ *P. suvattii*

無毒の *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。すなわち、各個体にサキシトキシン（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。

一方、Nagashima ら (*Toxicon* **41**, 569-574, 2003) の方法に従い、同様の *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 μ M 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。

C. 研究結果

1) フグ毒検査法の見直し

①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 ($r=0.994\sim0.999$) 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 (図 1)。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 (図 2)。

②マトリックス効果の検証

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。

一方、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 (図 4)。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。

2) フグの PSP 蓄積能評価

①ヒガンフグ

毒投与 72 時間後における試験魚各部位の毒濃度を図 5 に示す。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、卵巣の毒濃度が 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 (雌で 3.6 nmol/g、雄で 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*

毒投与試験における試験魚各部位の毒量を図 6 に示す。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。

一方、組織切片の取り込み試験でも、STX と TTX の挙動には大きな差異が見られた (図 7)。消化管では、STX は培養 20 分で 15 $\mu\text{mol/g}$ 、60 分で 46 $\mu\text{mol/g}$ 取り込まれたのに対し、TTX の取り込み量は 20 分で 2.6 $\mu\text{mol/g}$ 、60 分でも 5.3 $\mu\text{mol/g}$ 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 $\mu\text{mol/g}$ 程度) の方が TTX の取り込み量 (20 $\mu\text{mol/g}$ 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 $\mu\text{mol/g}$ に達し、TTX (39 $\mu\text{mol/g}$) を大きく上回った。

D. 考察

1) フグ毒検査法の見直し

①簡便法の有効性

前述のとおり、フグ肝臓試料において、簡便法の測定値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の測定値より抽出比 2 で 0~1 割、抽出比 3 以上で 1~2 割程度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、図 1 の直線回帰式では y 切片が負の値となったが、低毒量域に限定した回帰式 (図 2) では y 切片が 0 前後となった。従って、基準値 (10 MU/g) 未満の低毒力の試料であっても、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。

今回は、簡便法、参考法ともに平均値を用いて両者の相関をみたため、個々の測定値のばらつきは反映されていない。今後、この点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して、さらに踏み込んだ考察を行う予定である。

②マトリックス効果の検証

前述のとおり、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、特に十分な稀釈（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。

2) フグの PSP 蓄積能評価

①ヒガンフグ

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。

②淡水フグ *P. suvattii*

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。

一方、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。

E. 結論

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。一方、LC-MS/MS 分析では、マトリックス効果により測定値の低下が起るため、抽出液の適切な稀釈が必要となる。また、適切な最低稀釈倍率は、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。

一方、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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 荒川 修: フグの毒テトロドトキシン — 保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) 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).
- 3) 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).
- 4) 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.

2. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

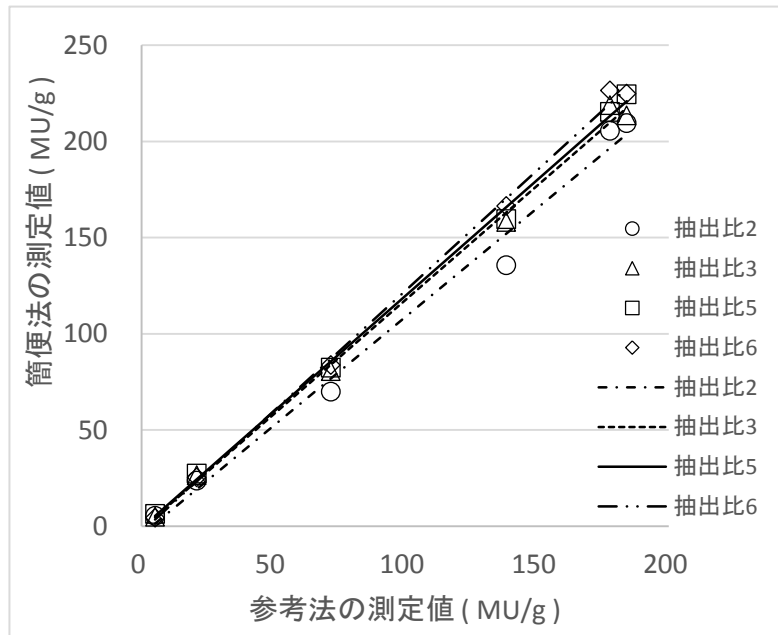


図1 各抽出比における簡便法と参考法の測定値（平均値, n = 6）の相関

回帰線：抽出比 2, $y = 1.1311x - 4.4410$ ($r = 0.994$);
 抽出比 3, $y = 1.1892x - 1.4388$ ($r = 0.998$);
 抽出比 5, $y = 1.2044x - 0.7984$ ($r = 0.999$);
 抽出比 6, $y = 1.2523x - 2.9332$ ($r = 0.999$)

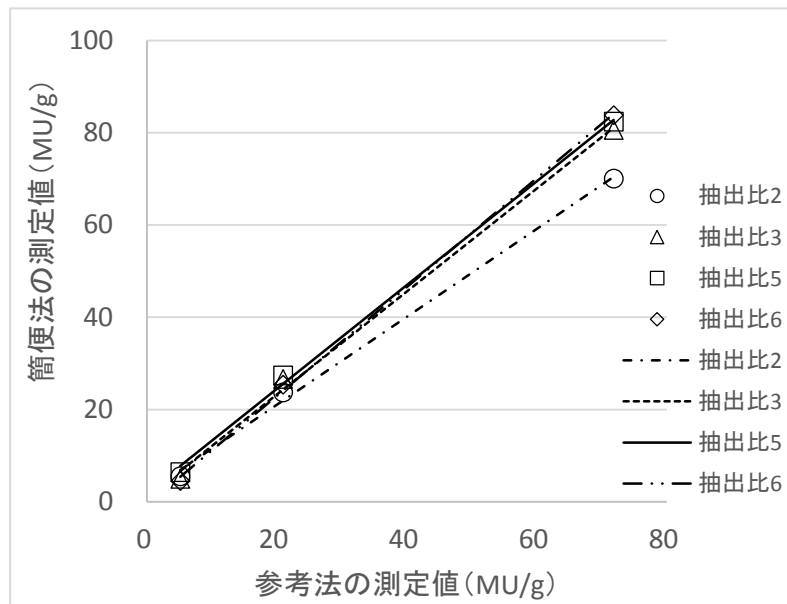


図2 低毒力域における簡便法と参考法の測定値（平均値, n = 3）の相関

回帰線：抽出比 2, $y = 0.9533x + 1.9473$ ($r = 0.999$);
 抽出比 3, $y = 1.1157x + 0.9387$ ($r = 0.999$);
 抽出比 5, $y = 1.1252x + 1.9681$ ($r = 0.999$);
 抽出比 6, $y = 1.1799x - 0.6600$ ($r = 0.999$)

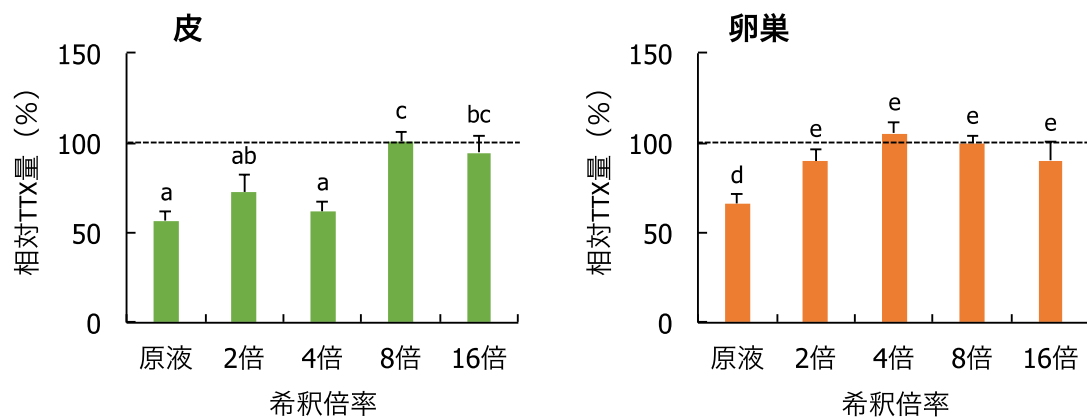


図3 無毒養殖トラフグ組織抽出液（原液および希釈液）に添加した TTX の LC-MS/MS による測定値（添加量に対する相対値）
 $a < b < c, d < e, p < 0.05$

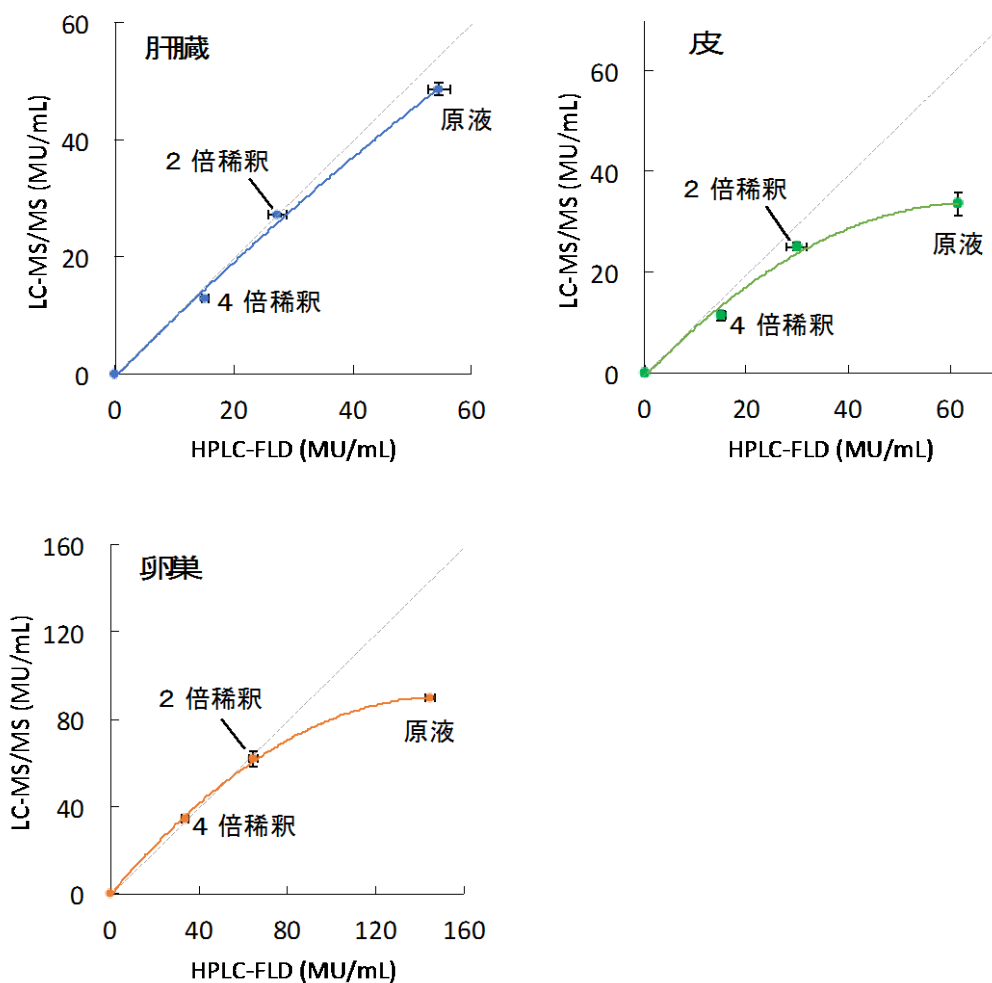


図4 LC-MS/MS および HPLC-FLD による天然マフグ組織抽出液（原液および希釈液）中の TTX 量測定値の相関

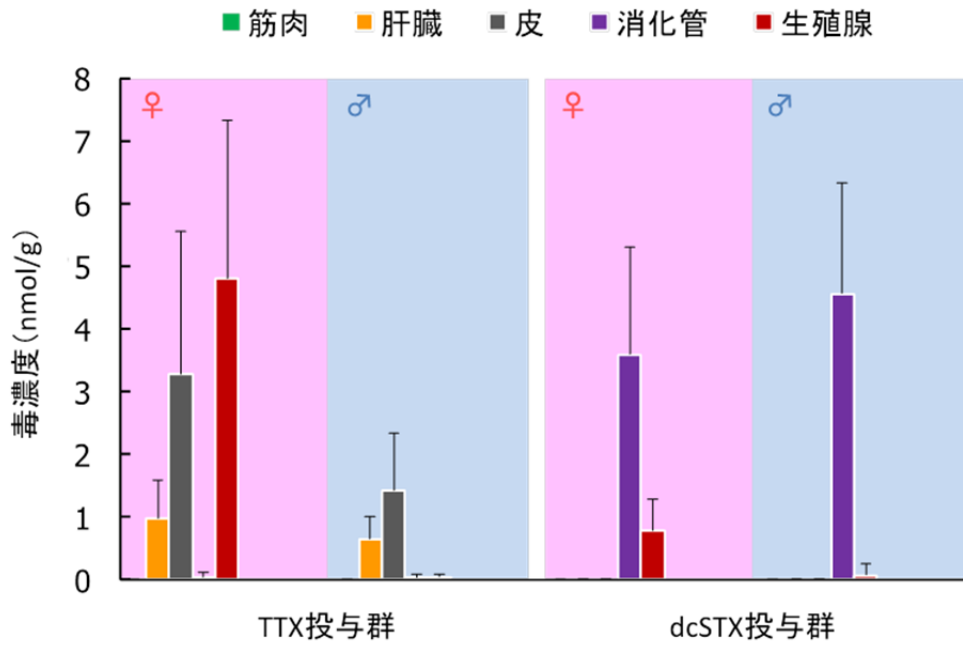


図5 ヒガンフグへの毒投与試験における毒移行プロファイル

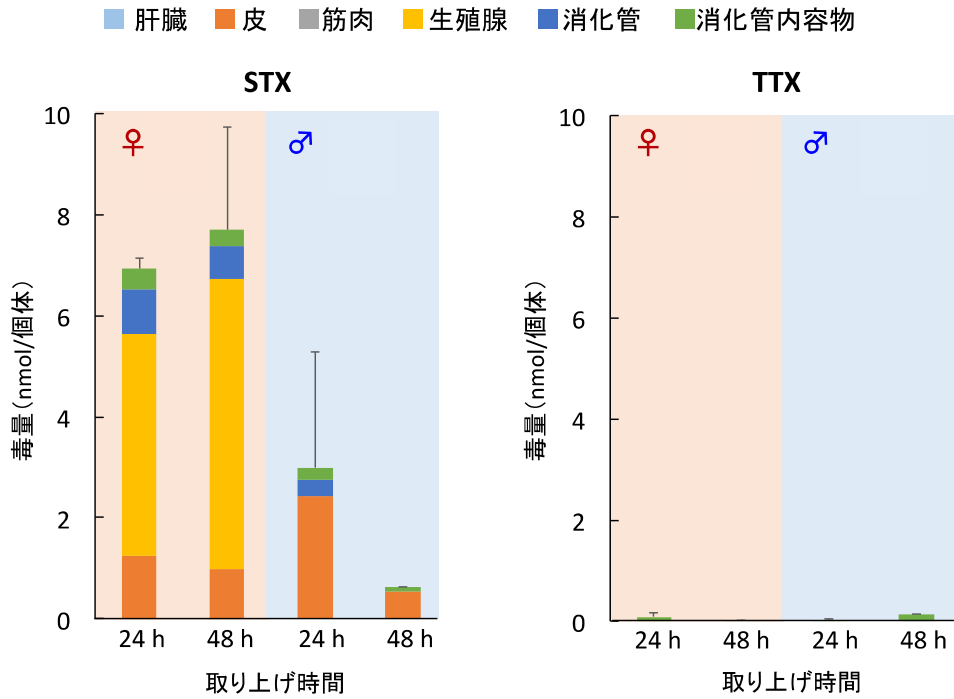


図6 *P. suvattii* への STX・TTX 混合投与試験における毒移行プロファイル

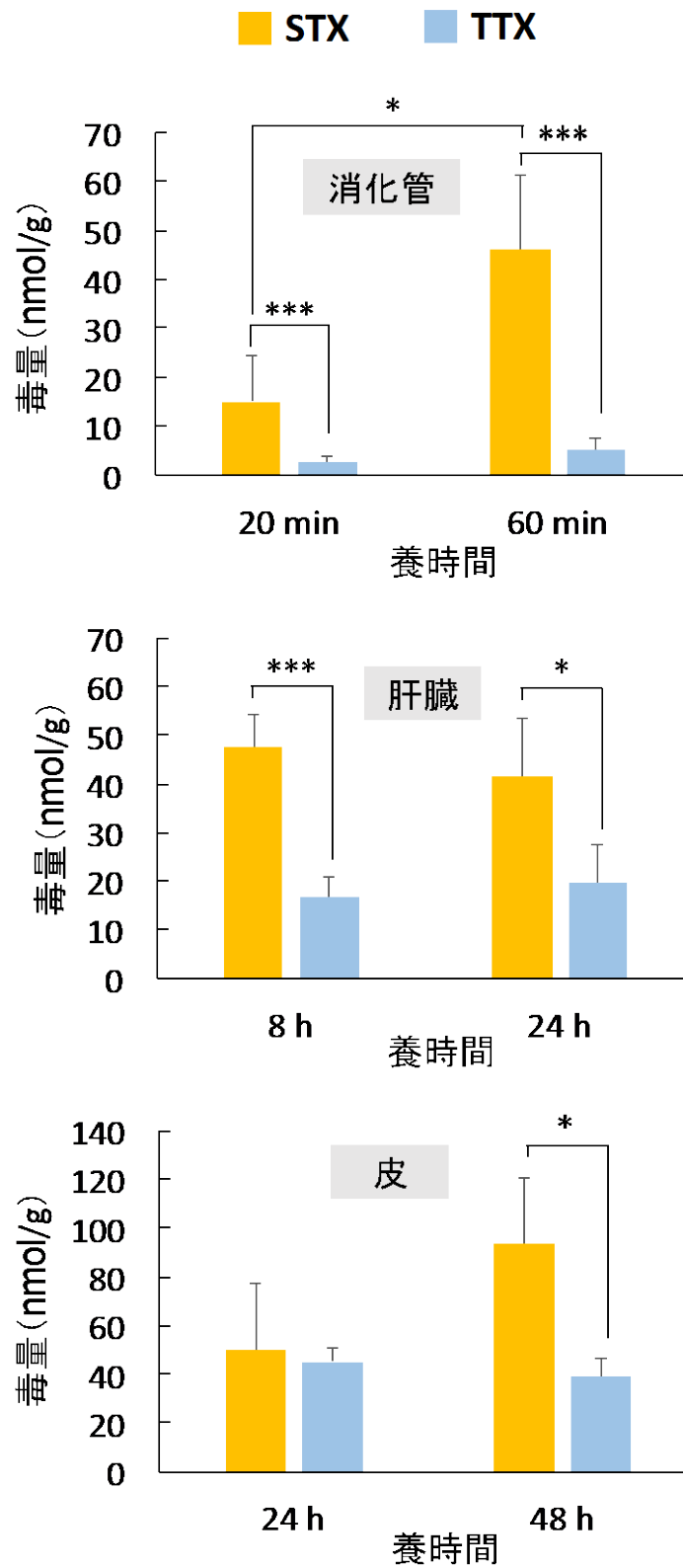


図7 *P. suvattii* 各組織における STX/TTX 取り込み量
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$