

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

コモングの毒性およびフグ毒評価法の検討

研究分担者	大城 直雅	国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者	中島 安基江	広島県立総合技術研究所保健環境センター
協力研究者	長谷川 晶子	愛知県衛生研究所
協力研究者	松浦 啓一	国立科学博物館
協力研究者	井原 紗弥香	広島県立総合技術研究所保健環境センター
協力研究者	福原 亜美	広島県立総合技術研究所保健環境センター
協力研究者	安部 かおり	広島県立総合技術研究所保健環境センター
協力研究者	海野 明広	愛知県衛生研究所
協力研究者	柘植 康	愛知県衛生研究所

研究要旨

コモング筋肉は食用部位だが、三陸の 3 海域については有毒個体が確認されており食用不可となっている。その他の海域におけるコモングの毒性を調査し、現行のリスク管理が適切であるか評価することを目的とした。瀬戸内海産および、愛知県沿岸産コモングについて、外部形態による同定後、筋肉および皮の各試料について毒性を調査した。その結果、瀬戸内海産（101 個体）の筋肉は無毒が 100 個体、弱毒が 1 個体（14 MU/g）で、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。愛知県沿岸産は（6 個体）すべての筋肉および皮の 3 個体が無毒で皮の 3 検体が弱毒（13～29 MU/g）であった。トレース試料への TTX 添加（1 および 10 MU/g 相当量）実験により、LC-QTOF/MS による分析法の妥当性が確認され、また、コモング試料の分析結果はマウス毒性試験法と高い相関が認められた。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。

A. 研究目的

フグによる食中毒の未然防止対策については、昭和 58 年（1983 年）に厚生省環境衛生局長（当時）が発出した「フグの衛生確保について」（環乳第 59 号、昭和 58 年 12 月 2 日）の通知（以下通知とする）の別表 1「処理などにより人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類及び部位」によってリスク管理がなされている。この別表 1 にはただし書きがあり、「岩手県越喜来湾及び釜石湾並びに宮城県雄勝湾で漁獲されるコモング及びヒガンフグについては適用しない」と記されており、これらの海域のコモングとヒガンフグは食用不可となっている。他の海域においても、コモングは筋肉だけが食用可能で、その他の部位（皮、精巢、卵巣および、肝臓）は有毒部位として食用不可である。

フグによる食中毒事件の報告において、原因魚

種が記載されていたものは約半数であるが、そのうち最も発生件数が多いのがコモングであった（登田ら, 2012）。多くの事例において、コモングの有毒部位を喫食していると推定されるが、上記 3 海域以外で採取されたコモング（疑）の筋肉だけを喫食したことによる食中毒事例が発生した。そのため、コモングの毒性評価について緊急に対応する必要があるため、平成 27 年度よりコモングの毒性調査を実施した。平成 29 年度は引続き瀬戸内海および愛知県産試料について調査を実施し、試料の凍結融解による筋肉中の毒性の変化についても検討した。また、LC-QTOF/MS による TTX 分析の妥当性確認を実施し、さらに機器分析法とマウス毒性試験法（MBA）による分析結果の相関性について検討した。

B. 研究方法

1) 供試試料

コモンフグ試料は瀬戸内海(101 個体) および愛知県沿岸(6 個体) で漁獲され、冷蔵または氷詰め状態で研究室まで搬送した。試料搬入後、試料は冷蔵で搬入され、試料搬入後、体長と体重を計測し、外部形態に基づく種同定のために各個体の側面、背面、ヒレの部分をデジタルカメラで撮影し記録した。各個体は速やかに皮、筋肉、その他内臓に腑分けし、分析に供するまで -30°C で保管した。なお、一部の個体については、半身を皮がついた状態で -30°C で保管した。

2) 分析試料の調製

①機器分析用試料

筋肉および皮試料について、食品衛生検査指針・理化学編 2015 記載の抽出法を一部改変して抽出操作を行った。すなわち、細切粉碎した試料 5 g に 0.1% 酢酸 25 mL を加え、ホモジナイズした後に沸騰水浴中で 10 分間加熱した。放冷後、遠心分離(13,000 × g, 15 分間) し、上清を回収し 0.1% 酢酸で 25 mL に定容したものを抽出液とした。抽出液を 0.1% 酢酸: アセトニトリル(1:1) で適宜希釈し、その 0.5 mL を限外ろ過(10 kDa) し、さらに PVDF 膜(孔径 0.22 μm) でろ過したものを測定溶液とした。

②MBA 用試料

筋肉および皮試料について、食品衛生検査指針・理化学編 2015 に記載の抽出法を一部改変して試料調製を行い、分析に供した。すなわち、試料 5 g を採取し細切した後、0.1% 酢酸 20 mL を加え、ホモジナイズ(11,000 rpm, 1 秒×10 回) し、沸騰水浴中で 10 分間加熱した。放冷後、遠心分離(13,400×g, 15 分) し、上清を回収し抽出液とした。試料量が 5 g に満たないものは全量を用い、試料量の 4 倍の 0.1% 酢酸を加え、同様の処理を行った。抽出液は MBA に供するまで -30°C で保管した。

また、本抽出液を 0.1% 酢酸: アセトニトリル(1:1) で適宜希釈し、その 0.5 mL を限外ろ過(10 kDa) し、さらに PVDF 膜(孔径 0.22 μm) でろ過し、機器分析に供してえられた結果を MBA と比較した。

③凍結融解試験

皮がついたまま -30°C で保存していた試料の一部は、室温で 1 時間放置して解凍後、皮と筋肉(皮側および内部)に分け、機器分析に供した。また、

別の一部は、流水下で 1 時間解凍した後に筋肉(皮側および内部)に分け、MBA に供した。

3) LC-QTOF/MS による TTX 分析

①機器の設定

【LC 部】

装置: Agilent 1200 Series LC、分析カラム: Inertsil Amide (3 μm, 2.1 x 100 mm, GL Sciences 社)、移動相 A: 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B: 0.1% ギ酸含有アセトニトリル、A: B = 5: 95 (0.1 min 保持) - 6 min, 60: 40 (1min 保持) - 10 min, 15: 85 (3 min 保持) - 20min, 5: 95、カラム温度: 40°C 、流速: 0.2 mL/min、注入量: 2 μL。

【MS 部】

装置: Agilent 6540MS Q-TOF、イオン化: ESI (Positive)、ドライガス: N_2 (350°C , 10 L/min)、キャピラリー電圧: 3500 V、ネブライザー: N_2 (50 psi)、フラグメンター電圧: 200 V、スキャン範囲: m/z 50-950、リファレンスマス: m/z 121.050873 および m/z 922.009798、観測イオン: $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 320.1088 ± 0.005)。

定量分析の結果から得られた TTX 濃度に対し、TTX の毒性を 0.22 μg/MU として毒性換算した

②妥当性確認の方法

「下痢性貝毒(オカダ酸群)の検査について」(平成27年3月6日付け食安基発0306 第3号、食安監発0306 第1号厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知) および「食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドライン」(平成26 年12月22日付け食安発1222第7号厚生労働省医薬食品局食品安全部部長通知) に準じ実施した。

冷凍保存していたコモンフグ筋肉試料のうち、TTX が 1 MU/g 以下の試料(12 試料) 約 300g を混合し、均質化したものをブランク試料とした。ブランク試料 5.0 g に対し、1 MU 相当(標準溶液 1.1 μg/mL を 1 mL)、10 MU 相当(標準溶液 11 μg/mL を 1 mL) をそれぞれ添加して上述の方法で分析した。分析者 1 名が 2 併行 5 日間実施する計画とした。評価対象は真度、併行精度および室内精度とし、併行精度および室内精度は表計算ソフトにより、一元配置分散分析による解析を行い算出した。

4) MBA

実験動物は、生後 4 週齢、体重 19~21 g の ddY 系雄マウスを用いた。予備試験として抽出液原液

1 mL をマウスの腹腔内に注射し、致死時間を計測した。フグ毒の致死時間-マウス単位 (MU) 換算表から抽出液原液 1 mL 中の毒量 (MU) を求め、この値からマウスが 10 分前後で死亡する濃度に蒸留水で希釈を行った。本試験では、希釈した希釈試験液をマウスに注射し、致死時間が 7 ~13 分の間に入ることを確認した後、計 3 尾のマウスより中央致死時間を求め、上記換算表によって毒量 (MU) を算出し、得られた MU に希釈倍率を乗じ、試料の毒力 (MU/g) を求めた。

5) 毒性の評価

得られた結果を基に、以下の 4 区分で評価した。なお、機器分析の結果については、TTX 0.22 µg あたり 1 MU として換算した。

- 無毒： 10 MU/g 未満
- 弱毒： 10 MU/g 以上、100 MU/g 未満
- 強毒： 100 MU/g 以上、1,000 MU/g 未満
- 猛毒： 1,000 MU/g 以上

C. 研究結果

1) コモンフグの毒性

①瀬戸内海産試料

瀬戸内海産試料は 101 個体で外部形態の特徴からすべてコモンフグと同定された (図 1)

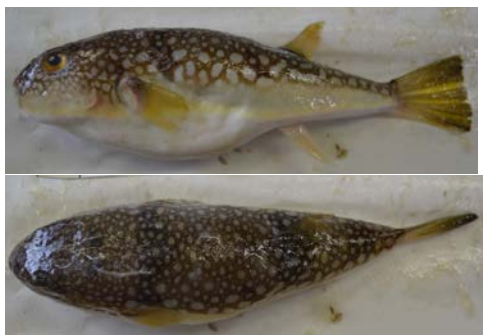


図 1. 瀬戸内海産コモンフグ (20170324-15)

筋肉は無毒が 100 個体、弱毒が 1 個体 (14 MU/g) であった。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 (表 1 ~3)。

②愛知県沿岸産試料

愛知県沿岸産 試料は 6 個体で、外部形態の特徴からすべてコモンフグと同定された (図 2)。

愛知県沿岸産 6 個体の筋肉 12 試料 (皮側および内臓側) はすべて無毒であった (表 4)。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 (表 5)。

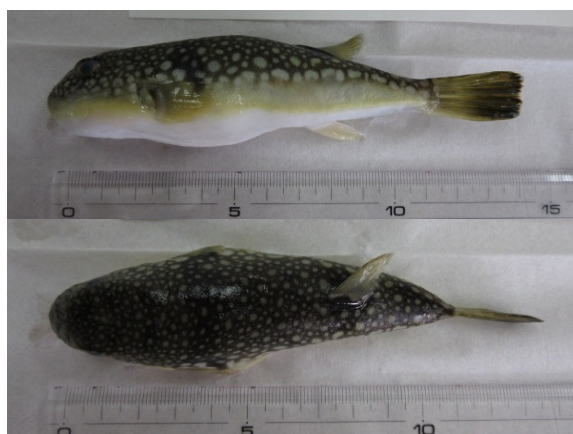


図 2. 愛知県沿岸産コモンフグ (A29006)

2) 凍結融解試料の毒性

①瀬戸内海産試料

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 (表 6)。凍結前試料は無毒 14 試料、弱毒が 1 試料 (11 MU/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 (表 7)。

TTX 標準溶液 (50 ng/mL)、筋肉試料および皮試料の LC-QTOF/MS による分析例を図 3 ~5 に示した。

②愛知県沿岸産試料

実験に供した 6 個体 12 試料の MBA の結果はすべて無毒であった。

3) LC-QTOF/MS による TTX 分析の妥当性確認

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 (表 8)。

4) MBA および機器分析法の分析値の比較

MBA による毒性分析を実施した愛知県産試料のうち、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。皮試料及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 (図 6)。

D. 考察

1) コモンフグの毒性

フグ試料を入手し、比較的鮮度の良い状態で速やかに腑分けを行い分析に供した。筋肉試料は、愛知県沿岸産試料 6 個体がすべて無毒で、瀬戸内海産試料は 101 個体中 1 個体だけが弱毒であった。無毒試料 100 個体中、5 MU/g を超えたのは 4 個体で、これまでよりも極めて低い割合となった。筋肉が弱毒であった個体の皮は 68 MU/g であり、処理時に皮から移行したと推定するには、低い値であった。そのため、コモンフグ筋肉の毒性について引続き調査をする必要があると考えられる。

2) コモンフグ凍結融解試料の毒性

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。

3) LC-QTOF/MS による TTX 分析の妥当性確認

ブランク試料を調製するために、1 MU/g 未満の筋肉試料を混合、均質化した。そのためブランク試料の TTX 含量が 0.74 MU/g となり、1 MU/g 相当量添加では選択性の確認ができなかった。しかしながら、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可能であることが示された。

4) MBA および機器分析法の分析値の比較

MBA と機器分析法による結果は、筋肉試料、皮試料ともに良好な相関性が得られた。機器分析による毒性評価によって、フグ毒のリスク管理が

可能であることが示された。加工試料や他種を含めた評価により、機器分析法の有効性を確認する必要がある。さらに、他の類縁体を含めた分析を実施し、ハザードとしてのフグ毒についての検討が必要と考えられる。

E. 結論

前年度に引続き、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。

LC-QTOF/MS による TTX 分析法は、毒性の目安となる 10 MU/g を添加した際の妥当性が確認され、1 MU/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。

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。

謝辞

愛知県沿岸産コモンフグの採集にご協力いただきました愛知県水産試験場漁業生産研究所の皆様へ深謝いたします。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 大城直雅, コモンフグ筋肉から検出されたテト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.
- 2) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 瀬戸内海産コモング筋肉の毒性

漁獲日	試料数	無毒	弱毒	強毒	猛毒
2017/3/24	43	43	0	0	0
2017/12/21	58	57	1	0	0
合計	49	100	1	0	0

表2 瀬戸内海産コモング皮の毒性

漁獲日	試料数	無毒	弱毒	強毒	猛毒
2017/3/24	43	1	33	9	0
2017/12/21	58	2	46	9	1
合計	101	3	79	18	1

表3 無毒個体（筋肉）の毒力

漁獲日	試料数	MU/g		
		1未満	1以上5未満	5以上
2016/12/22	43	3	38	2
2017/1/12	57	6	49	2
合計	100	9	87	4

表4 愛知県沿岸産コモング筋肉の毒性

漁獲日	個体数	検体数*	無毒	弱毒	強毒	猛毒
2017/4/13	3	6	6	0	0	0
2017/5/11	1	2	2	0	0	0
2017/5/23	1	2	2	0	0	0
2018/2/20	1	2	2	0	0	0
合計	6	12	12	0	0	0

* 検体数は筋肉を皮側（外側）と内臓側（内側）に分けて採材しているため個体数の2倍

表5 愛知県沿岸産コモング皮の毒性

漁獲日	試料数	検体数	無毒	弱毒	強毒	猛毒
2017/4/13	3	3	1	2	0	0
2017/5/11	1	1	0	1	0	0
2017/5/23	1	1	1	0	0	0
2018/2/20	1	1	1	0	0	0
合計	6	6	3	3	0	0

表 6 凍結融解試料（筋肉）の毒性(MU/g)

試料番号	凍結前 (A)	凍結融解後			
		内臓側 (B)	比 (B/A)	皮側 (C)	比 (C/A)
20161222-1	10.66	3.61	0.34	105.69	9.91
20161222-2	2.21	0.92	0.42	11.11	5.03
20161222-4	1.52	0.41	0.27	3.27	2.15
20161222-8	6.95	1.39	0.20	60.69	8.73
20161222-11	4.92	1.59	0.32	66.09	13.43
20170324-1	1.99	1.05	0.53	11.56	5.81
20170324-16	1.73	1.15	0.66	6.56	3.79
20170324-31	0.78	1.46	1.87	5.41	6.94
20170324-34	0.49	0.76	1.55	3.35	6.84
20170324-36	0.88	0.81	0.92	3.47	3.94
20170324-37	0.70	0.29	0.41	1.96	2.80
20170324-38	0.19	0.83	4.37	3.89	20.47
20170324-39	1.87	2.61	1.40	8.60	4.60
20170324-40	0.75	0.36	0.48	3.09	4.12
20170324-42	2.83	6.98	2.47	43.30	15.30

表 7 凍結融解試料（皮）の毒性(MU/g)

試料番号	凍結前 (A)	凍結融解後 (B)	比 (A/B)
20161222-1	1106.00	1072.23	0.97
20161222-2	105.14	76.95	0.73
20161222-4	57.64	23.89	0.41
20161222-8	1002.32	907.14	0.91
20161222-11	818.23	884.67	1.08
20170324-1	152.64	117.48	0.77
20170324-16	70.63	26.22	0.37
20170324-31	53.15	25.67	0.48
20170324-34	43.02	17.79	0.41
20170324-36	24.04	17.04	0.71
20170324-37	20.11	10.36	0.52
20170324-38	91.22	50.51	0.55
20170324-39	42.59	35.35	0.83
20170324-40	21.30	15.24	0.72
20170324-42	296.46	211.34	0.71

表 8 LC-QTOF/MS による TTX 分析法の性能 (2 併行、5 日間)

添加量	真度	併行精度	室内精度
1 MU/g (0.22 mg/kg)	83.7%	3.7 RSD%	11.9 RSD%
10 MU/g (2.2mg/kg)	73.0%	3.1 RSD%	3.3 RSD%

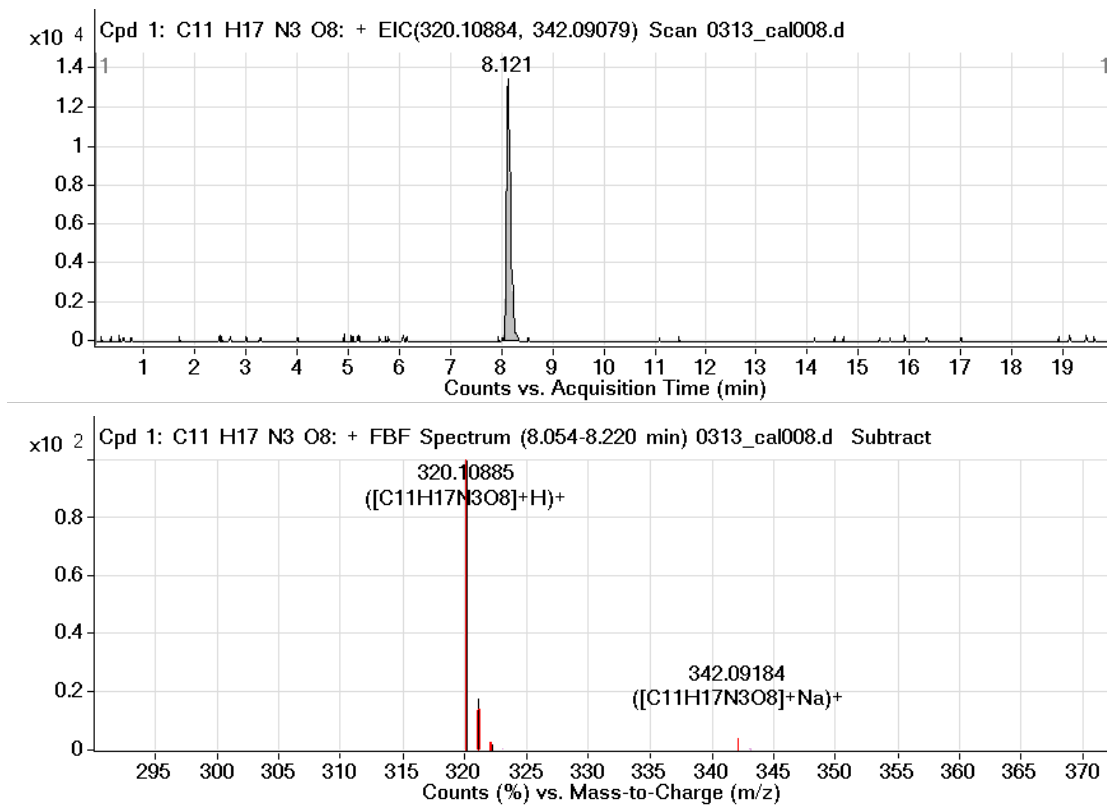


図3 TTX 標準溶液 (50ng/mL) の LC-QTOF/MS クロマトグラム (上) およびマススペクトル (下)

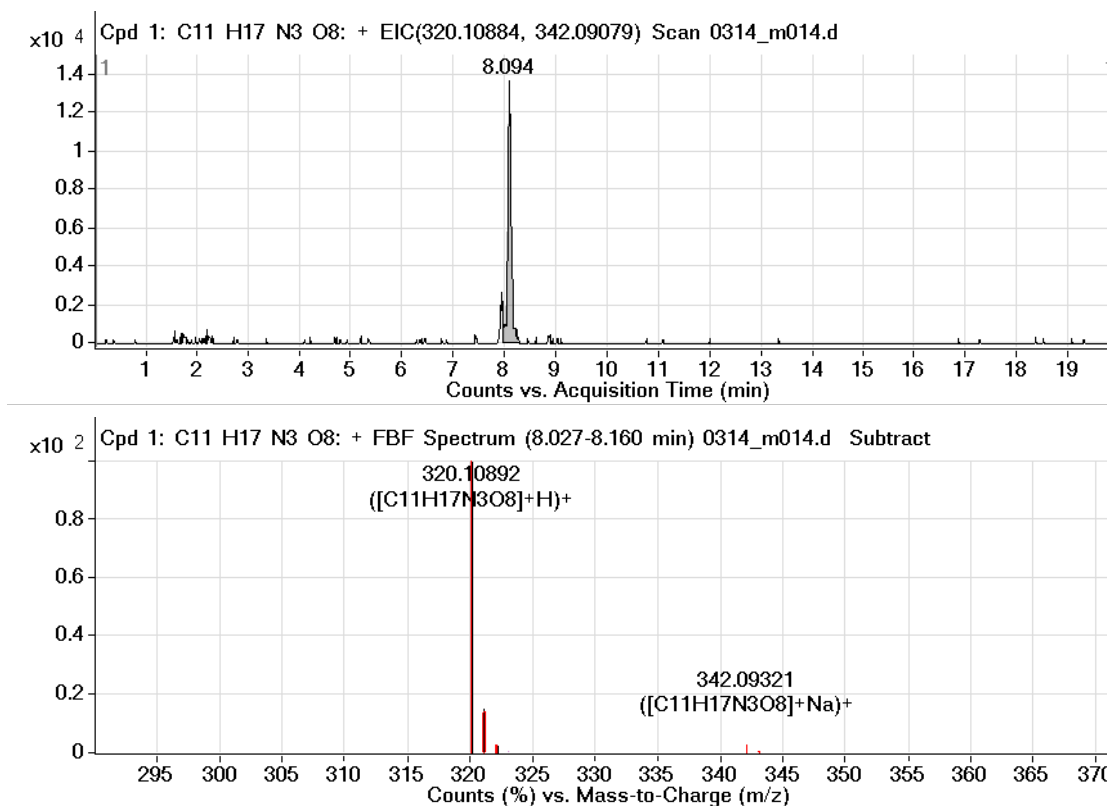


図4 筋肉試料溶液 (20161222-12) の LC-QTOF/MS クロマトグラム (上) およびマススペクトル (下)

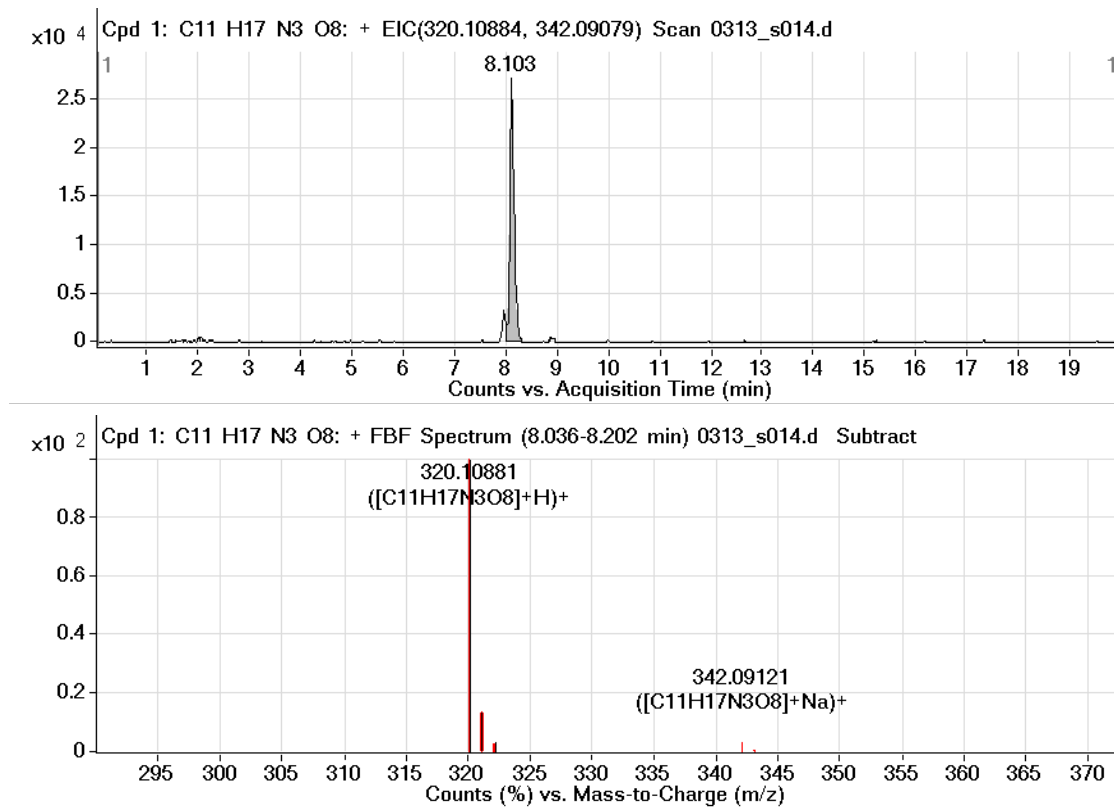


図5 皮試料溶液 (20161222-12) のLC-QTOF/MS クロマトグラム (上) およびマススペクトル (下)

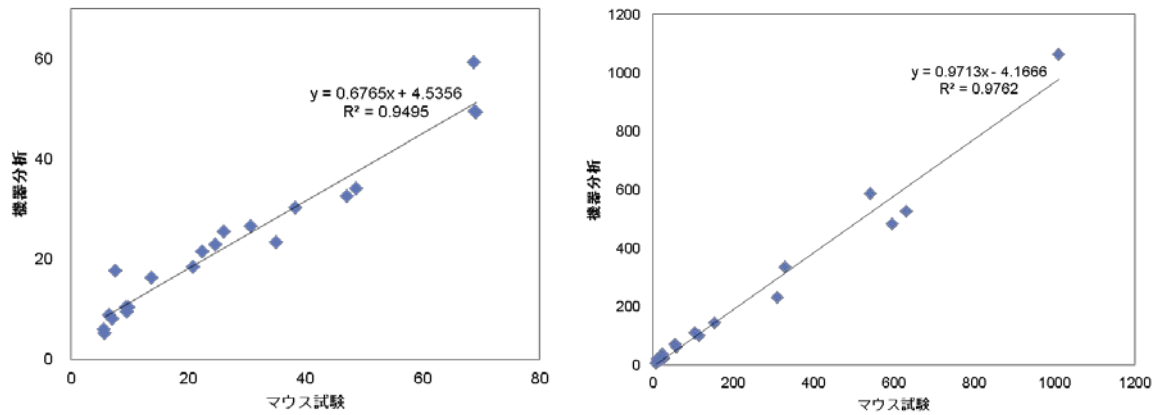


図6 マウス毒性試験法および機器分析法で得られた結果の相関 (左: 筋肉、右: 皮)