

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

フグの毒性評価と有毒巻貝の種判別

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

研究要旨

マリントキシンのリスク管理に資することを目的に、①フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性評価と、②有毒巻貝の種判別法の開発を実施した。しらす加工品へのフグ稚魚混入に関しては、実態調査によりさらなるデータの集積に努めた。日本の各地沿岸で水揚げ、製造されたしらす加工品から、シロサバフグの他、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が認められた。テトロドトキシン (TTX) 分析を行った69検体中19検体からTTXが検出され、TTX含量は0.06~3.3 µg/gであった。そのうち3検体がフグの食用規制値 (10 マウスユニット/g, 2.2 µg TTX/g 相当) を超えたが、フグ稚魚の混入率および摂取量から、フグ稚魚が混入した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。遺伝子による有毒巻貝の種判別法として、昨年開発したミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域を対象にしたダイレクトシーケンス法による種判別法をさらに改良し、高温高压加熱処理により DNA が断片化した製品に対しても、種判別できることを実証した。しかし、対象とした遺伝子領域の塩基配列が同じである種があり、これらについては、他の遺伝子領域で検討する必要がある。

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、ヒト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ため、食品衛生上極めて重大な問題である。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、自然交雑種の頻出など新たな問題も指摘されている。さらに、水産物や水産加工品へのフグ稚仔魚や幼魚の混入も問題となっている。また、巻貝キンシバイによるフグ毒中毒も発生し、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。巻貝に関しては、麻痺性貝毒による毒化やテトラミン中毒も食品安全確保に対するリスクとなっている。しかし、巻貝は外観などの形態分類が難しい上、むき身として調理加工された場合には判別が不可能で、食中毒の原因食品が特定できない。

こうした背景のもと、今年度は、昨年度に引き続き、①フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性評

価と、②有毒巻貝の遺伝子による種判別法開発を実施した。すなわち、①フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性評価では、実態調査を強化して種判別と毒性試験 (TTX 分析) を行い、リスク評価の基盤となるデータの集積に努めた。②有毒巻貝の遺伝子による種判別法開発では、一部の巻貝加工品で PCR 増幅されない場合があったため、加熱殺菌された加工品に適した PCR 法を設計し、実用化を検討した。さらに、わが国でフグ毒中毒を起こしたボウシュウボラのミトコンドリア DNA 16S rRNA の塩基配列が解明されていないので、本領域の全塩基配列を解析して、データベースの充実を図った。

B. 研究方法：

1) フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性評価

2014年12月から2017年10月に日本沿岸（静岡県、愛知県、大阪府、兵庫県、香川県、愛媛県、高知県、広島県、山口県、大分県、宮崎県、鹿児島県）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。

しらす加工業者があらかじめ選別したフグ稚魚試料

を観察して、体色を含む外部形態に基づき分類した。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、種判別を行った。フグ稚魚の種判別は、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。すなわち、各ロットから1個体を選び、合計71個体の筋肉(約15mg)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(タカラバイオ)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た。解析した塩基配列をnucleotide BLAST または当研究室で構築したデータベースと比較して、種を決定した。

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。

## 2) 有毒巻貝種判別法の開発

フグ毒またはテトラミンをもつ有毒巻貝を正確に同定するため、ミトコンドリアDNA 16S rRNA部分領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法で解析することとした。

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300bp)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150bp)でPCR増幅を試みた。今年度は、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。この他、わが国で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の遺伝子配

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。

巻貝加工品の種判別については、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とEx Taqポリメラーゼ(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。

ボウシュウボラのミトコンドリアDNA 16S rRNAの遺伝子配列については、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。

## C. 研究成果:

### 1) フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性評価

#### ① 魚種判別

ミトコンドリアDNA 16S rRNA部分領域(約600bp)およびシトクロム*b*領域(約500bp)の塩基配列解析の結果、調べたフグ稚魚71個体のうち、44個体がシロサバフグ *Lagocephalus spadiceus*、10個体がシマフグ *Takifugu xanthopterus*、7個体がナシフグ *Takifugu vermicularis*、5個体がコモンフグ *Takifugu poecilonotus*(現在 *Takifugu flavipterus*)、3個体がショウサイフグ *Takifugu snyderi* と同定され、クサフグ *Takifugu niphobles*(現在 *Takifugu alboplumbeus*) とトラフグ *Takifugu rubripes* がそれぞれ1個体ずつ同定された。

#### ② 毒性試験

LC-MS/MS分析した69検体中19検体からTTXが検出され、シマフグ10検体から0.314~3.00 µg TTX/g、コモンフグ5検体から0.988~3.32 µg TTX/g、ショウサイフグ3検体から0.064~1.08 µg TTX/g、トラフグ1検体から1.57 µg TTX/gが検出された。これらの検体からは、TTX以外にanhydroTTX、trideoxyTTX、anhydro-trideoxyTTXが共通して検出された。しかし、シロサバフグおよびナシフグと同定された試料からはTTXおよびTTX関連化合物は検出されなかった(0.01 µg TTX/g未満)。

## 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とそれぞれ 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。

## D. 考察

### 1) フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性評価

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)。

今回、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、推定致死量は約 2 mg とされているので、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。

### 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。

## E. 結論

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  $\mu\text{g}$  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。

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。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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

### 2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) S. Yokozuka, Y. Kitani, N. Suzuki, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Bio-transformation of paralytic shellfish toxin by the hemolymph of shore crab *Gaeticia*

*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.

- 5) T. Matsumoto, Y. Ishizaki, K. Mochizuki, 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.
- 6) 大木理恵子, 園山貴之, 石橋敏章, 石崎松一郎, 長島裕二: ボ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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) なし