

別添 1

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

フグ等の安全性確保に関する総括的研究

平成25年度 総括・分担研究報告書
(H25-食品-一般-013)

研究代表者 長島裕二

平成26(2014)年5月

目 次

I . 総括研究報告 フグ等の安全性確保に関する総括的研究 長島裕二	1
. 分担研究報告	
1 . 日本沿岸産フグ類の毒性と麻痺性貝毒蓄積能 荒川 修	7
2 . フグの毒性試験と毒化能の検討 長島裕二	14
3 . フグの毒成分の同定と定量 佐藤 繁	20
4 . 亜熱帯産フグ等の毒性試および調査 大城直雅	24
5 . フグ類の形態に基づく分類 松浦啓一	33
6 . フグの分類に関する研究（遺伝子解析） 石崎松一郎	37
. 研究成果の刊行に関する一覧表	42
. 研究成果の刊行物・別刷	44

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）

「フグ等の安全性確保に関する総括的研究」

総括研究報告書

研究代表者 長島裕二 東京海洋大学大学院 海洋科学系

研究要旨

フグ等の安全性確保のため、 . フグの毒性に関する調査研究と . フグの分類に関する研究を行った。

. フグの毒性に関する調査研究

まず、これまで公表してきた各種フグ類の毒性データを整理し、谷の「日本産フグの毒力表」の毒性データと比較した。3種のフグ（トラフグ、マフグ、コモフグ）で、一部の部位の最高毒性が「日本産フグの毒力表」を上回るような既得毒性データ例があることがわかり、コモフグでは“強毒”（100～1000 MU/g）の皮から最高 2397 MU/g の毒性が検出された例がみられた。また、シロサバフグでは、“無毒”の範疇ながら肝臓から 2.2～7.9 MU/g の毒性が検出された。

フグの毒性実態調査として、2012年～2013年に三重県沿岸で漁獲されたフグ類3属13種26検体、2009年と2013年に岩手県釜石魚市場にそれぞれ水揚げされたコモフグ50検体とシロサバフグ46検体、さらに沖縄産クロサバフグ50検体、センニンフグ35検体およびヨリトフグ6検体の合計3属16種213検体の個体別、組織別毒性を測定した。その結果、各地域における各種フグ類の毒性は概ねこれまでの報告と一致していたが、ショウサイフグ精巢で11 MU/gの毒性が1例検出された。

各地におけるフグ食中毒の特徴を明らかにするため、平成22～23年度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「食品中の自然毒のリスク管理に関する研究」の成果として得られた、昭和35年～平成22年に発生した食中毒事件例のリストを用いて、各自治体別のフグによる食中毒事件一覧を作成した。

. フグの分類に関する研究

日本近海で漁獲される自然交雑フグの種判別を正確に行うため、日本産フグ類を形態学的に再検討するとともに、遺伝子による種判別法の開発に取り組んだ。形態分類では、サバフグ属の分類学的研究とトラフグ属の交雑種個体の研究に重点を置いた。その結果、クロサバフグ *Lagocephalus gloveri* はニュージーランドとオーストラリア東岸から知られていた *Lagocephalus cheesemanii* と同一であったため、クロサバフグの学名を変更すべきことが明らかとなった。トラフグ属の交雑種個体を検討した結果、ショウサイフグ、トラフグおよびマフグが関与していることが判明した。

これとは別の交雑フグ種10個体につき、ミトコンドリアDNA塩基配列に基づく雌親種の同定を行った結果、8個体は形態学的鑑別法による推定と一致したが、2個体（ショウサイフグ×コモフグおよびコモフグ×ムシフグ各1個体）については形態学的鑑別法による推定と異なり、外部形態から両親種を推定することが困難なものの、あるいは過去の類似事例の知見が適用できないものが存在することが明らかとなった。したがって、報告や事例の蓄積が十分とは言えない交雑種に関しては、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る。核DNAマイクロサテライト領域を対象にした父系魚種の同定に関しては、トラフグ属、サバフグ属で個別の領域設定が必要であることがわかり、マーカーとして有効と考えられる V1R、MC1R、MC4R、POMC、ITS1 および ITS2 領域のクローニングを個々の個体で確認中である。

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・教授
佐藤 繁	北里大学海洋生命科学部・准教授
大城 直雅	国立医薬品食品衛生研究所・室長
松浦 啓一	国立科学博物館・特任研究員
石崎松一郎	東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科・准教授

A. 研究目的

フグ食中毒の発生件数と患者数は食中毒全体の2%以下だが、死者数は全体の1/3を占め、致死率が高い極めて危険な食中毒である。フグ食中毒防止のため、わが国では厚生労働省通知で食用可能なフグの種類、部位、漁獲地域を定め、都道府県条例等でフグ取扱いの場所と人を制限してフグの安全性確保を担保している。通知に基づく食用可能なフグの種類と部位は、1945年に谷が報告した西日本および東シナ海で漁獲したフグ類の毒性調査がもとになっているが、その後、谷の「日本産フグの毒力表」を上回る毒力を示す例が散見され、フグ毒以外にも麻痺性貝毒やパリトキシン様毒によるフグ食中毒が発生している。また、平成19～20年にはキンシバイによるフグ毒中毒が続発した。このようにフグ食中毒およびフグ毒中毒は複雑化しており、フグ等の安全性確保における新たな問題点となっている。

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、近年温暖化のためか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、正確なフグの判別が必要になっている。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、前記の通知の中で「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。このような状況の下、本研究では、フグ食の安全性確保を目的として、フグの毒性に関する調査研究とフグの分類に関する研究を行った。

「フグの毒性に関する調査研究」では、既得毒性データを整理するとともに、各種フグ類の

毒性実態調査を実施した。また、各地におけるフグ食中毒の特徴を明らかにするため、食中毒事件として届出のあったフグによる食中毒事例を自治体別にまとめた。

「フグの分類に関する研究」では、日本産フグ類を形態学的に再検討するとともに、DNAによる交雑種フグの種判別法の開発に取り組んだ。

B. 研究方法

フグの毒性に関する調査研究

1) 各種フグの既得毒性データ

研究分担者(荒川)が関わった論文の毒性データと未発表データを整理し、谷の「日本産フグの毒力表」の毒性データと比較した。

2) フグの毒性実態調査

フグの毒性は同種のフグであっても漁獲海域によって異なるので、海域を定め、3つの地区で漁獲された各種フグの個体別、組織別毒性を詳細に調べた。

試料には、2012年6月～2013年4月に三重県沿岸で漁獲されたフグ科3属13種26検体(トラフグ属ヒガンフグ4個体、アカメフグ1個体、ショウサイフグ7個体、ナシフグ2個体、マフグ1個体、コモンフグ3個体、シマフグ1個体、ムシフグ1個体、クサフグ2個体、トラフグ1個体、モウヨフグ属ホシフグ1個体、サバフグ属クマサカフグ1個体、センニンフグ1個体)を用いた。毒性試験は、食品衛生検査指針のフグ毒検査法に従い、マウス試験法で行った。

東北地方太平洋沿岸の一部海域で漁獲されるヒガンフグやコモンフグでは、筋肉に高濃度の毒性が検出されることがある。そこで、2009年7月に岩手県釜石魚市場に水揚げされたトラフグ属コモンフグ50個体および同市場で2013年6月に水揚げされたサバフグ属シロサバフグ46個体を試料とした。これらについては、HPLC-蛍光検出法で分析し、テトロドトキシン(TTX)、4-*epi*-TTX、4,9-anhydroTTXを定量した。

前述の谷の「日本産フグの毒力表」には、奄美・沖縄を含めた熱帯・亜熱帯域のフグ種についてほとんど記載がない。また、九州地方では熱帯性のドクサバフグの水揚げと食中毒が発生していることから、熱帯・亜熱帯域のフグの毒性を調べるため、沖縄県衛生環境研究所にて採集・保管されて

いたサバフグ属クロサバフグ 50 個体、センニンフグ 35 個体およびヨリトフグ属ヨリトフグ 6 個体の筋肉について、LC-MS/MS 法で TTX を分析した。

3) 自治体によるフグの毒性検査結果等の収集

各地におけるフグ食中毒の特徴を明らかにするため、平成 22～23 年度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「食品中の自然毒のリスク管理に関する研究」(代表 長島裕二)の成果として得られた、昭和 35 年～平成 22 年に発生した食中毒事件例のリストを用いて、各自治体別のフグによる食中毒事件一覧を作成した。

・フグの分類に関する研究

1) 形態に基づく分類

国内外の自然史系博物館や大学に保管されている日本産フグ類を調査した。また、北海道、神奈川県、京都府、高知県、長崎県、沖縄県でフィールド調査も行った。新鮮な標本が得られた場合には、カラー写真を撮影して、分類学的な研究に使用した。形態形質を調査するため、入手した標本は 10%ホルマリンで固定後、70%アルコールに保存して、形態学的調査を行った。

2) 遺伝子による種判別

試料には日本各地から採集し外観からの形態学的判定で交雑フグ種と判断された 7 種(トラフグ×クサフグ、トラフグ×マフグ、トラフグ×シマフグ、ショウサイフグ×コモンフグ、コモンフグ×ムシフグ、ショウサイフグ×ゴマフグおよびショウサイフグ×マフグ) 10 個体を用い、これらの筋肉から全ゲノム DNA を抽出、精製した。次に、全ゲノム DNA を用いてミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域の各々約 620bp および 390bp を含む部分領域を PCR 増幅した。PCR 産物の塩基配列を決定し、公的データベースおよび研究室で新たに構築したフグ種専用データベースから雌親種の同定を行った。

また、サバフグ属交雑種の判別に資することを目的に、これまでミトコンドリア DNA 塩基配列情報が得られていなかったカイユウセンニンフグ *Lagocephalus suezensis* のミトコンドリア DNA 全塩基配列を、プライマーウォーキング法により決定した。

C. 研究結果

・フグの毒性に関する調査研究

1) 各種フグの既得毒性データ

3 種のフグで、一部の部位の最高毒力が「日本産フグの毒力表」を上回っていた。トラフグでは毒力表で“無毒”(< 10 マウスユニット (MU) /g) とされている皮と精巣で、それぞれ最高 14 および 20 MU/g の毒性を示す個体がみられた。同様に、マフグでは“無毒”の筋肉と精巣から、ともに最高 60 MU/g、コモンフグでは“強毒”(100～1000 MU/g) の皮から最高 2397 MU/g の毒性が検出された例がみられた。また、シロサバフグでは、“無毒”の範疇ながら肝臓から 2.2～7.9 MU/g の毒性が検出された。

2) フグの毒性試験

2012～2013 年に三重県沿岸で漁獲されたフグ 26 検体中 18 検体が有毒 (10 MU/g 以上) であった。このうち、毒性が最も高かったのは、マフグ卵巣の 1220 MU/g で、次いでショウサイフグ卵巣が 1120 MU/g を示し、これらは“猛毒”レベル (1000 MU/g 以上) であった。魚種別に最高毒性値を比較すると、マフグ、ショウサイフグ以下、クサフグ (卵巣 748 MU/g)、ナシフグ (皮 379 MU/g)、ムシフグ (卵巣 337 MU/g)、コモンフグ (皮 263 MU/g)、ヒガンフグ (卵巣 157 MU/g)、シマフグ (卵巣 50 MU/g) の順で、ナシフグとコモンフグ以外は卵巣が最高毒性部位であった。

2009 年 7 月に釜石魚市場に水揚げされたコモンフグの大部分の個体で、筋肉に 10 MU/g を超える TTX 群がみられた。一方、2013 年 6 月に釜石魚市場に水揚げされたシロサバフグの筋肉、皮、肝臓および生殖腺には 10 MU/g を超える TTX 群は確認されず、消化管の 2 個体のみで 20 MU/g 程度の TTX 群が検出された。

沖縄近海産のクロサバフグ 50 個体、センニンフグ 35 個体およびヨリトフグ 6 個体の筋肉について、LC-MS/MS で TTX を分析した結果、クロサバフグは全個体が検出限界 (0.11MU/g) 未満、ヨリトフグ筋肉は 1 個体だけ検出限界以上定量限界 (0.45MU/g) 未満の TTX が検出された。これに対し、筋肉が有毒とされているセンニンフグは 9 検体 (25%) が有毒 (10 MU/g 以上) で、毒性レベルは“弱毒”(10～99 MU/g) であった。

3) 自治体によるフグの毒性検査結果等の収集

各自治体において実施したフグの毒性調査を収

集するための基礎資料を作成した。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「食品中の自然毒のリスク管理に関する研究」」の成果として得られた、昭和35年～平成22年に発生した食中毒事件例のリスト（総数2,401件）をもとに、自治体別の食中毒事件を調べたところ、群馬県を除く46都道府県で発生があり、自治体数としては58におよんだ。最も件数が多かったのが広島県（256件）で、山口県（200件）、兵庫県（198件）、愛媛県（169件）、岡山県（151件）と続いた。

・フグの分類に関する研究

1) 形態に基づく分類

今年度はサバフグ属の分類学的研究とトラフグ属の交雑種個体の研究に重点を置いた。

サバフグ属の標本は国立科学博物館、北海道大学総合博物館、神奈川県立生命の星・地球博物館、京都大学総合博物館、高知大学理学部、西海区水産研究所および鹿児島大学総合研究博物館において行った。その結果、日本には以下の7種が出現することが明らかとなった：クロサバフグ *L. cheesemanii*、カナフグ *Lagocephalus inermis*、クマサカフグ *L. lagocephalus*、ドクサバフグ *L. lunaris*、シロサバフグ *L. spadiceus*、センニンフグ *L. scleratus*、カイユウセンニンフグ *L. suzezensis*。Abe and Tabeta (1982)によって静岡県等から得られた標本に基づいて新種 *Lagocephalus gloveri* として発表されたクロサバフグのタイプ標本は、オーストラリア博物館とニュージーランド博物館から借用した *L. cheesemanii* の標本と形態学的に相違がないことが明らかとなった。さらに、オーストラリア博物館とCSIROから *L. cheesemanii* の組織サンプルを入手して日本産のクロサバフグと遺伝子を比較したところまったく差が見られなかった。したがって、Abe and Tabeta (1982)が新種として発表した *L. gloveri* は *L. cheesemanii* のシノニムであり、クロサバフグの学名には *L. cheesemanii* を適用することとなる。

トラフグ属の交雑種8個体を調査した。8個体のうち、体色からシヨウサイフグの雑種と判断されるものが5個体あった。他の1個体（No. 6と仮称）はマフグの若魚に似た色彩をもつが、マフグに見られる胸鰭後方の大黒斑がない。別の1個体（No. 7と仮称）は背鰭前方の体背部と腹面に小棘をもつこと、胸鰭後方の大黒斑を含む体全体の色

彩によってトラフグの雑種と判断される。1個体（No. 8と仮称）は胸鰭後方に大黒斑に白い縁取りがあり、トラフグに似ているが、体の腹側面に1本の黄色縦線が走り、臀鰭が黄色であり、トラフグとは異なる。

2) 遺伝子による種判別

今回採集した交雑フグ種7種10個体につき、ミトコンドリアDNA塩基配列に基づく雌親種の同定を行った結果、形態学的鑑別法による推定どおりの結果であったものは5種8個体であり、2種（シヨウサイフグ×コモフグの1個体およびコモフグ×ムシフグの1個体）については形態学的鑑別法による推定と異なった。

カイユウセンニンフグのミトコンドリアDNA塩基配列を、すでに解析されている他のサバフグ種と比較した結果、ミトコンドリアDNAの塩基組成は他のサバフグ種と大きな差異は認められなかった。しかし、分子系統樹の結果から、サバフグ属フグ類はセンニンフグ、カイユウセンニンフグのグループとその他のグループで大きく分岐し、さらに、その後カイユウセンニンフグがある時点でセンニンフグから分岐したことがわかった。

D. 考察

・フグの毒性に関する調査研究

1) 各種フグの既得毒性データ

トラフグでは皮と精巢で“弱毒”（10～100 MU/g）を示す個体が見られた。本種は成長段階によって毒の体内動態が異なり、肝臓が未発達天然稚魚では、しばしば皮から微量のTTXが検出される。しかしながら、毒投与実験において肝臓が発達した個体では皮への移行毒量が僅少となること、皮は湯がいて食するため、その過程で毒が（もしあっても）かなり減少すると考えられること、1回の摂食量も筋肉よりはるかに少ないこと、これまでにトラフグの皮による中毒例がないこと、などから、現時点で問題視する必要はないものと考ええる。

一方、精巢が“弱毒”であった個体は、雌雄同体で、卵精巢と精巢を取り違えた可能性がある。他方、マフグでは、筋肉と精巢から“弱毒”が検出されたが、本種は皮が“強毒”、肝臓と卵巣が“猛毒”（> 1000 MU/g）であるため、凍結・解凍により、これらの部位から毒が筋肉や精巢に移行した可能性がある。

2) フグの毒性実態調査

三重県沿岸で漁獲されたフグ類 3 属 13 種 26 検体の毒性は概ね「日本産フグ類の毒力表」の範囲にとどまっていた。しかし、精巢は、10 個体中 1 個体（ショウサイフグ）から 11MU/g の毒性が検出された。ショウサイフグの精巢は食用可とされているので、フグ食の安全性確保のために、今後調査する必要がある。筋肉については 2 個体（ナシフグとムシフグ各 1 個体）から 10~11 MU/g の毒性が検出された。しかし、ナシフグは皮の毒性が高いため、凍結・解凍によってフグ毒が無毒の筋肉部に移行することが実験的に確かめられているので、その影響によるものと考えられる。ムシフグについても毒の移行が原因と推測されるが、ムシフグの毒性に関するデータが少ないため、筋肉が有毒か否かは不明である。したがって、安全性が確保できていないため食用が認められていない。

岩手県釜石魚市場に水揚げされたコモンフグのうち、筋肉の 28%が“無毒”、62%が“弱毒”、10%が“強毒”であり、毒性レベルの傾向は Kodama et al. (1984) の結果とほとんど変わっていないことが明らかとなった。シロサバフグは、消化管のみが有毒で他の部位には 10 MU/g を超える TTX 群は検出されなかった。

沖縄産のクロサバフグとヨリトフグの筋肉から TTX はほとんど検出されず、本研究においても、クロサバフグとヨリトフグの筋肉は、通知による「処理等によりヒトの健康を損なう恐れがないと認められる」ことが再検証された。これに対し、センニンフグはリストへの掲載もなく、「食用不可」である。全体の 60%が“無毒”であるため、無毒種との誤認がおきる可能性がある。また、沖縄では、センニンフグの形態が一般的なフグとは異なるため、フグとの認識が無いまま食したことによる食中毒の記録がある。

3) 自治体によるフグの毒性検査結果等の収集

各自治体において実施したフグの毒性検査結果等を収集するための基礎データとして、自治体ごとの食中毒発生件数を調べた。本結果をもとに各地方衛研等へのアンケートを実施するための準備を行っている。特に件数の多い自治体等については、重点的に調査を進めたい。

・フグの分類に関する研究

1) 形態に基づく分類

サバフグ属の分類学的検討を通じて日本産フグ類の分類には再検討すべき点があることが明らかとなった。サバフグ類はインド・西太平洋に広く分布する種が多いため、今後、外国産の標本との比較を行い、サバフグ属全体の分類を確立する必要がある。

トラフグ属の交雑種と思われる標本を検討したところ、ショウサイフグ、マフグおよびトラフグが関与した雑種であると判断できた。標本調査を広げれば他の地域からも得られる可能性が高い。

2) 遺伝子による種判別

本研究で鑑別した交雑種のうち、トラフグとマフグの雑種やトラフグとシマフグの雑種のように、従来から存在が知られ、両親種の間隔的な特徴を明瞭に示すものは、外部形態による両親種の推定が可能であり、mtDNA 解析法によってその推定が支持されたが、ゴマフグとショウサイフグの雑種のような両親種の間隔的な特徴を示さないものや、外部形態から両親種を推定することが困難なもの、あるいは過去の類似事例の知見が適用できないものが存在することが明らかとなった。したがって、報告や事例の蓄積が十分とは言えない交雑種に関しては、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ると思われる。

E. 結論

・フグの毒性調査

既得の毒性データを整理したところ、3 種のフグで、一部の部位の最高毒力が「日本産フグの毒力表」を上回るような既得毒性データ例があることがわかった。

フグの毒性実態調査として、2012 年~2013 年に三重県沿岸で漁獲されたフグ類 3 属 13 種 26 検体、2009 年と 2013 年に岩手県釜石魚市場にそれぞれ水揚げされたコモンフグ 50 検体とシロサバフグ 46 検体、さらに沖縄産サバフグ属クロサバフグ 50 検体、センニンフグ 35 検体およびヨリトフグ属ヨリトフグ 6 検体の個体別、組織別毒性を測定した。その結果、各地域における各種フグ類の毒性は概ねこれまでの報告と一致していたが、ショウサイフグ精巢で 11 MU/g の毒性が 1 例検出されたため、今後調査が必要である。

食中毒統計から、フグ食中毒は西日本で多く発生していることがわかった。これら自治体におけるフグの毒性データと照合することにより、地域

におけるフグ中毒の特徴を明らかにする。

・フグの分類に関する研究

サバフグ属の分類学的研究を行った結果、クロサバフグ *Lagocephalus gloveri* は、ニュージーランドとオーストラリア東岸から知られていた *Lagocephalus cheesemanii* と同一であったため、クロサバフグの学名を変更すべきことが明らかとなった。

トラフグ属の雑種個体を検討した結果、ショウサイフグ、トラフグおよびマフグが関与していることが判明した。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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Feroudj, T. Matsumoto, Y. Kurosu, G. Kaneko, H. Ushio, K. Suzuki, H. Kondo, I. Hirono, Y. Nagashima, S. Akimoto, K. Usui, S. Kinoshita, S. Asakawa, M. Kodama, S. Watabe: DNA microarray analysis on gene candidates possibly related to tetrodotoxin accumulation in pufferfish. *Toxicon*, 77 巻, 68-72 (2014).
- 2) S. Sato, Y. Takata, S. Kondo, A. Kotoda, N. Hongo, M. Kodama: Quantitative ELISA kit for paralytic shellfish toxins coupled with sample pretreatment. *J. AOAC Int.*, 97 巻, in press (2013).
- 3) 荒川 修: フグ類が保有する毒の分布, 蓄積機構, および生理機能. *日本水産学会誌*, 79 巻, 311-314 (2013).
- 4) 谷口香織, 高尾秀樹, 新名真也, 山中祐二, 岡田幸長, 中島梨花, 王 俊杰, 辰野竜平, 阪倉良孝, 高谷智裕, 荒川 修, 野口玉雄: 天然トラフグ肝臓の毒性分布. *食品衛生雑誌*, 54 巻, 277-281 (2013).
- 5) 與儀健太郎, 大城直雅, 松田聖子, 佐久川さつき, 松尾敏明, 安元 健: 奄美大島・加計呂麻島におけるシガテラ原因魚の毒組成解析. *食品衛生学雑誌*, 54 巻, 385-391 (2013).
- 6) 長島裕二: 食品中の魚毒(フグ毒)による食中毒とその予防. *食品衛生研究*, 63 巻 2 号, 21-30 (2013).
- 7) 長島裕二, 松本拓也: フグ毒化機構解明に向けた最近の研究. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, 218 巻, 266-275 (2013).

2. 書籍

- 1) 齋藤昌義, 濱田友貴, 荒川 修: 第 7 章 食の安全を追求する科学, “農学の魅力”, 安田弘法, 中村宗一郎, 太田寛行, 橘 勝康, 生源寺真一 編, 養賢堂, 東京, pp. 169-195 (2013).
- 2) 長島裕二: コラム 5 魚介毒の化学成分と薬理作用. “フィールドベスト図鑑 vol. 17 危険・有毒生物”, 篠永 哲, 野口玉雄, 今泉忠明, 小川賢一 監修, 学研, 東京, p. 236 (2013).
- 3) 荒川 修: コラム 7 動物界におけるフグ毒の分布. “フィールドベスト図鑑 vol. 17 危険・有毒生物”, 篠永 哲, 野口玉雄, 今泉忠明, 小川賢一 監修, 学研, 東京, p. 238 (2013).

2. 学会発表

- 1) R. Tatsuno, T. Mine, Y. Yamanaka, T. Takatani, O. Arakawa: Growth-associated changes in internal tetrodotoxin distribution and skin structure in three species of pufferfish, 9th International Conference on the Marine Biodiversity and Environmental Fisheries Science of the East China Sea, Keelung, Sep. 2013.
- 2) 谷口香織, 高尾秀樹, 新名真也, 山中祐二, 岡田幸長, 中島梨花, 王 俊杰, 辰野竜平, 阪倉良孝, 高谷智裕, 荒川 修, 野口玉雄: 天然トラフグ肝臓の毒性分布. 第106回日本食品衛生学会学術講演会, 那覇, 2013年11月
- 3) 辰野竜平, 反町太樹, 谷山茂人, 大城直雅, 久保弘文, 高谷智裕, 荒川 修: テトロドトキシンを給餌した腐肉食性小型巻貝2種の毒性. 第106回日本食品衛生学会学術講演会, 那覇, 2013年11月
- 4) 山中祐二, 新名真也, 山下洋平, 辰野竜平, 高谷智裕, 荒川 修: 天然ヒガンフグの麻痺性貝毒蓄積能. 第106回日本食品衛生学会学術講演会, 那覇, 2013年11月
- 5) 辰野竜平, 井樋洸太郎, 沖田光玄, 山中祐二, 阪倉良孝, 高谷智裕, 荒川 修: トラフグに筋肉内投与した TTX の動態 -肝臓と皮の毒蓄積様式の相違-. 平成26年度日本水産学会春季大会, 函館, 2013年3月
- 6) 岩下裕子, 山下洋平, 市川 航, 荒川 修, 高谷智裕: 異なる波長の照射光下で培養した *Alexandrium catenella* の麻痺性貝毒産生. 平成26年度日本水産学会春季大会, 函館, 2013年3月

- 月
- 7) 沖田光玄, 平野 雪, 木下滋晴, 小島大輔, 山崎英樹, 崎山一孝, 高谷智裕, 荒川 修, 阪倉良孝: トラフグ稚魚のフグ毒感知, 摂取, および脳内蓄積に関連する遺伝子の発現. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 函館, 2013 年 3 月
 - 8) 糸井史朗, 吉川沙織, 朝比奈潔, 鈴木美和, 石塚健人, 瀧本成美, 光岡涼子, 横山直人, 出竹歩美, 高柳智江, 江口美帆, 小久保翔太, 高梨志保里, 三浦 愛, 河根三雄, 水藤勝喜, 辰野竜平, 高谷智裕, 荒川 修, 阪倉良孝, 杉田治男: フグの仔魚は母親由来の TTX によって守られている. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 函館, 2013 年 3 月
 - 9) 長島裕二, 佐藤康介: トラフグ体表粘液のプロテアーゼインヒビター. 第 27 回海洋生物生理活性談話会. 2013 年 5 月, 東京都港区.
 - 10) 桐明 絢, 長島裕二, 塩見一雄: カサゴ目魚類刺毒の性状および一次構造. 第 27 回海洋生物生理活性談話会. 2013 年 5 月, 東京都港区.
 - 11) 尹 顕哲, 石崎松一郎, 長島裕二: LC-MS によるフグ毒関連物質の検出. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会. 2013 年 9 月, 三重県津市.
 - 12) 尹 顕哲, 石崎松一郎, 長島裕二: ヒガンフグ卵巣におけるフグ毒の化学形態. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会. 2013 年 9 月, 三重県津市.
 - 13) 桐明 絢, 鈴木靖子, 長島裕二, 塩見一雄: アイゴ刺毒の一次構造およびカサゴ目魚類刺毒との構造比較. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会. 2013 年 9 月, 三重県津市.
 - 14) 太田 晶, 須賀恵美, 石崎松一郎, 土井啓行, 石橋敏章, 松本拓也, 長島裕二: 食用フグの肝臓におけるテトロドトキシンおよび麻痺性貝毒の蓄積. 106 回食品衛生学会学術講演会. 2013 年 11 月, 沖縄県宜野湾市.
 - 15) 桐明 絢, 石崎松一郎, 長島裕二: ミトコンドリア DNA を用いたテトラミン食中毒原因巻貝の種判別法. 106 回食品衛生学会学術講演会. 2013 年 11 月, 沖縄県宜野湾市.
 - 16) 長島裕二: 海洋動物の毒. 第 28 回日本中毒学会東日本地方会. 2014 年 1 月, 東京都港区.
 - 17) 松本拓也, 桐明 絢, 渡部終五, 長島裕二: トラフグ幼魚におけるフグ毒テトロドトキシンの胆汁中排泄機構の検討. 平成 26 年度日本水産学会春季大会. 2014 年 3 月, 北海道函館市.
 - 18) 與儀健太郎, 佐久川さつき, 大城直雅, 村田 龍, 池原 強, 安元 健: 魚類食中毒シガテラの原因物質シガトキシン類の LC-MS/MS 分析. 2013 年 7 月, 大阪府大阪市.
 - 19) 與儀健太郎, 佐久川さつき, 村田 龍, 大城直雅, 池原 強, 安元 健: LC-MS/MS によるシガトキシン類分析の検討. 第 50 回全国衛生化学協議会年会, 2013 年 11 月, 富山県富山市.
 - 20) 白石一陽, 村田 龍, 照屋菜津子, 佐久川さつき, 小島 尚, 大城直雅: HILIC-LC/MS による亜熱帯産フグの毒性分析. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 2013 年 11 月, 沖縄県宜野湾市.
 - 21) 村田 龍, 大城直雅: HILIC-LC/MS による麻痺性貝毒の一斉分析. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 2013 年 11 月, 沖縄県宜野湾市.
 - 22) 内田秀明, 平良洋介, 大城直雅, 安元 健: 渦鞭毛藻由来パリトキシン関連新奇化合物の LC/MS による探索と構造研究. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 2013 年 11 月, 沖縄県宜野湾市.
 - 23) 大城直雅, 佐久川さつき, 円谷 健, 藤井郁雄, 平間正博, 安元 健: 本州沿岸産の大型イシガキダイによるシガテラが疑われる 3 事例. 第 4 回日本中毒学会九州地方会. 2014 年 1 月, 沖縄県西原.
 - 24) 村田 龍, 大城直雅: LC-MS/MS による下痢貝毒分析の検討. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 2014 年 3 月, 北海道函館市.
 - 25) 松浦啓一: シッポウフグ属の分類学的検討と奄美大島の海底にミステリーサークルを作るシッポウフグ属の 1 未記載種. 2013 年度日本魚類学会年会, 2013 年 10 月, 宮崎県宮崎市.
 - 26) Acar Caner, 石崎松一郎, 長島裕二: Complete mtDNA sequences of common Turkish puffer fish species and comparison among species. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 2014 年 3 月, 北海道函館市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) エビ類検出用プライマーセット, 特許第 5483173 号, 2014 年 2 月 28 日.

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）

「フグ等の安全性確保に関する総括的研究」

平成 25 年度分担研究報告書

日本沿岸産フグ類の毒性と麻痺性貝毒蓄積能

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 辰野竜平 長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

研究要旨

フグ食の安全性確保に資することを目的とし、各種海産フグおよび交雑種フグの既得毒性データ、ならびにトラフグとヒガンフグの PSP 蓄積能について検討した。研究分担者が関わった既報および未発表の毒性データを整理し、谷博士の「日本産フグの毒力表」と比較したところ、3種のフグおよび2タイプの交雑種フグで、一部の部位の最高毒力が「日本産フグの毒力表」、もしくはそこに記載された両親種の毒力を上回っていることがわかった。一方、海産フグの PSP 蓄積能把握に資するため、トラフグおよび成熟段階が異なるヒガンフグへの PSP 投与実験を行った。その結果、トラフグの場合、毒投与 48 時間後にいずれの部位からも PSP は検出されず、少なくとも未成熟のトラフグには PSP 蓄積能はほとんどないものと推察された。ヒガンフグでは、未成熟群と成熟群で PSP の取り込みや部位間移行に違いがみられたが、総じて PSP 蓄積能は低く、卵巣以外の部位には PSP をほとんど蓄積しないことが示唆された。

A. 研究目的

古くから日本人はフグを貴重な食材として扱ってきた。しかしながら、フグは猛毒テトロドトキシン (TTX) をもつため、これを原因とした食中毒が起きている。フグ食中毒は、発生件数と患者数では食中毒全体の数%にも満たないが、死者数では最も多く、致死率が高いきわめて危険な食中毒である。その防止のため、わが国では「フグの衛生確保について」(厚生省環境衛生局長通知環乳第 59 号 昭和 58 年 12 月 2 日)で、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。前述の国の通知は、谷博士が西日本および東シナ海で漁獲したフグ類の毒性調査をまとめて 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、同表を上回る毒力を示すフグの例が散見されている。

一方、近年の温暖化のためか、種の異なるフグが交配した自然交雑種フグが各地で確認されるようになっている。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。交雑種フグについては、前記の通知の中で「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。

他方、淡水産のフグは、二枚貝の毒化に関わる麻痺性貝毒 (PSP) を保有するが、近年数種の海産フグからも PSP の検出例が報告されている。フグ食のリスク管理は、これまでフグの毒が TTX であることを前提として行われてきたが、食用可能なフグにおける PSP の蓄積状況や蓄積能に関する基礎的な知見は少なく、通知で定められたフグを中心に、この点の見直しが急務である。

このような状況の下、フグ類の毒性を見直し、フグ食の安全性確保に資するため、今年度は、まず各種海産フグ、ならびに日本各地で採取された交雑種フグについて既得毒性データを整理するとともに、トラフグとヒガンフグを用いて PSP 投与実験を行い、両種の PSP 蓄積能について検討した。

B. 研究方法

1) 各種フグおよび交雑種フグの既得毒性データ

研究分担者が関わった以下の論文の毒性データと未発表データを整理し、各種フグの既得毒性データとしてまとめた。

- 1) Itoi et al., *Toxicon* 60, 1000-1004 (2012)
- 2) Ikeda et al., *Toxicon* 55, 289-297 (2010)
- 3) 谷山ら, 長崎大学水産学部研究報告 91, 1-3 (2010)
- 4) Ngy et al., *Afr. J. Mar. Sci.* 31, 349-354 (2009)
- 5) Ngy et al., *J. Food Hyg. Soc. Japan* 49, 361-365 (2008)
- 6) Nakashima et al., *Toxicon* 43, 207-212 (2004)
- 7) Mahmud et al., *Toxicon* 41, 13-18 (2003)
- 8) Mahmud et al., *J. Natural Toxins* 10, 69-74 (2001)
- 9) 淵ら, 食衛誌 40, 80-89 (1999)
- 10) 淵, 長崎大学博士論文 (1999)

また、日本各地で採取し、DNA 塩基配列に基づいて両親種を同定した交雑種フグの未発表毒性データについても同様に整理した。これらの既得毒性データについて、谷博士の「日本産フグの毒力表」の毒性データと比較した。

2) 海産フグ 2 種への PSP 投与実験

まず、養殖トラフグ(体長 19.3 ± 0.7 cm、体重 216 ± 16.4 g)につき、PSP 投与区 (n=3) および TTX 投与区 (n=3) を設け、それぞれ PSP(毒力% : neoSTX 76%、dcSTX 8%、STX 16%) および TTX 添加飼料を 420 MU/尾の用量で経口経管投与した。両区ともに毒投与 48 時間後に取り上げ、蛍光 HPLC 分析にて各部位の PSP 量を、LC-MS 分析にて同 TTX 量を測定した。

次に、予め PSP が検出されないことを確認した長崎県大村湾産ヒガンフグ未成熟群(体長 7.3 ± 1.0 cm、体重 15.0 ± 4.4 g、生殖腺体指数 0.35 ± 0.13 、雌雄判別不能)および成熟群(14.1 ± 1.6 cm、 105.8 ± 28.8 g、 12.41 ± 4.93 、すべて雌)につき、PSP(前記と同一組成)添加飼料をそれぞれ 65 および 550 MU/尾の用量で経口経管投与し、4、8、12 時間後に各群 5 尾ずつ取り上げ、蛍光 HPLC 分析にて各部位の PSP 量を測定した。

C. 研究結果

1) 各種フグおよび交雑種フグの既得毒性データ

各種海産フグの既得毒性データを表 1 に示す。3 種のフグで、一部の部位の最高毒力が「日本産

フグの毒力表」を上回っていた。まず、トラフグでは毒力表で「無毒」(< 10 MU/g)とされている皮と精巣で、それぞれ最高 14 および 20 MU/g の毒力を示す個体がみられた。同様に、マフグでは「無毒」の筋肉と精巣から、ともに最高 60 MU/g、コモフグでは「強毒」(100-1000 MU/g)の皮から最高 2397 MU/g の毒力が検出された例がみられた。また、シロサバフグでは、「無毒」の範疇ながら肝臓から 2.2-7.9 MU/g の毒力が検出された。

次に、交雑種フグの既得毒性データを表 2 に示す。2 タイプの交雑種フグで、一部の部位の毒力が「日本産フグの毒力表」に記載された両親種の毒力を上回っていた。すなわち、シマフグ×トラフグ(母系×父系; 以下同様)では、両親種ともに「無毒」の皮で最高 25 MU/g、マフグ×ゴマフグでは、同様に筋肉で最高 20 MU/g の毒が検出された。マフグ×トラフグおよびトラフグ×マフグでは、「無毒」の範疇ながら最高 2 MU/g の毒が筋肉から検出された。

2) 海産フグ 2 種への PSP 投与実験

養殖トラフグの場合、毒投与 48 時間後の両区の毒蓄積状況に顕著な差がみられた(図 1)。すなわち、TTX 投与区では、投与した毒の 29% が肝臓、17% が皮、1% が生殖腺に蓄積していたのに対し、PSP 投与区では、いずれの個体のいずれの部位からも PSP は検出されなかった。

天然ヒガンフグでは、未成熟群と成熟群の毒残存状況に顕著な差がみられた(図 2)。未成熟群の場合、投与 4 時間後では投与した毒の 82.1% が体内に残存していたが、そのほとんどを、内容物(有毒飼料)を含む消化管が占め、皮と生殖腺の毒量は投与毒量の 2% 未満であった。その後、体内残存毒量は顕著に減少し、投与 8 時間後以降 20% 未満となったが、その際も毒量の大部分を消化管が占めていた。一方、成熟群では、毒投与 4 時間後に 28.3% の PSP が残存しており、その 5 割を肝臓、1~2 割を卵巣と皮が占めた。その後、残存毒量は減少し、毒投与 12 時間後では体内に残存した PSP のほとんどが卵巣に移行していた。また、残存 PSP の組成は部位により異なり(データ未記載) 成分によって取り込みないし排泄効率に差があるものと推察された。

D. 考察

1) 各種フグおよび交雑種フグの既得毒性データ

前述のとおり、トラフグでは皮と精巣で‘弱毒’ (10-100 MU/g) を示す個体が見られた。本種は成長段階によって毒の体内動態が異なり、肝臓が未発達の天然稚魚では、しばしば皮から微量の TTX が検出される。しかしながら、毒投与実験において肝臓が発達した個体では皮への移行毒量が僅少となること、皮は湯がいて食するため、その過程で毒が(もしあっても)かなり減少すると考えられること、1回の摂食量も筋肉よりはるかに少ないこと、これまでにトラフグの皮による中毒例がないこと、などから、現時点で問題視する必要はないものと考えられる。一方、精巣が‘弱毒’であった個体は、雌雄同体で、卵精巣と精巣を取り違えた可能性がある。他方、マフグでは、筋肉と精巣から‘弱毒’が検出された。本種は皮が‘強毒’、肝臓と卵巣が‘猛毒’(> 1000 MU/g)であるため、凍結・解凍により、これらの部位から毒が筋肉や精巣に移行した可能性がある。今後、そのような毒の部位間移行についても検討する必要がある。シロサバフグでは、肝臓から微量の毒が検出された。サバフグ類は形態が酷似しているため、今後は遺伝子型の確認を行った上で毒性を調査する必要があるかもしれない。

交雑種フグでは、シマフグ×トラフグの皮から‘弱毒’が検出された。前述のとおり、トラフグは皮に微量の毒をもつ場合があり、それを反映したものと推察される。一方、マフグ×ゴマフグ、マフグ×トラフグおよびトラフグ×マフグでは、筋肉から毒が検出された。今回の試料はいずれも冷凍保存されていたものであり、マフグの場合同様、凍結・解凍による毒の部位間移行について検討する必要がある。

2) 海産フグ2種へのPSP投与実験

トラフグへの毒投与実験において、TTX 投与区では投与した毒の50%程度を体内に蓄積したのに対し、PSP 投与区ではいずれの部位からもPSPは検出されなかった。これまでに天然トラフグからPSPが検出された例はなく、少なくとも未成熟のトラフグにはPSP蓄積能はほとんどないものと推察された。

ヒガンフグの場合、未成熟群では実験期間を通して投与したPSPの大半が消化管に残存しており、PSPをほとんど体内に取り込まないことが示唆された。一方、成熟群では、PSPの一部を一旦

体内、特に肝臓に取り込むが、短時間で排泄もしくは分解し、卵巣以外の部位にはほとんど蓄積しないものと推察された。また、肝臓や卵巣に取り込まれた毒のほとんどはSTXであり、成分による取り込みの選択性が存在する可能性がある。

E. 結論

以上、本研究により、3種のフグおよび2タイプの交雑種フグで、一部の部位の最高毒力が「日本産フグの毒力表」、もしくはそこに記載された両親種の毒力を上回るような既得毒性データ例があることがわかった。未発表データの場合、卵巣と精巣を取り違えた可能性、あるいは凍結・解凍により高毒力部位から他の部位に毒が移行した可能性のあるケースもあり、さらなる検証が必要と思われる。一方、トラフグとヒガンフグへのPSP投与実験では、トラフグ属フグのPSP蓄積能は、種や成熟段階により異なるものの、総じてTTX蓄積能より低いことが示唆された。他種のフグのPSP蓄積能や卵巣へのPSP蓄積について、引き続き検討する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 荒川 修: フグ類が保有する毒の分布、蓄積機構、および生理機能. 日水誌, 79, 311-314 (2013).
- 2) 荒川 修: コラム 7 動物界におけるフグ毒の分布, “フィールドベスト図鑑 vol. 17 危険・有毒生物”, 篠永 哲, 野口玉雄, 今泉忠明, 小川賢一 監修, 学研, 東京, p. 238 (2013).
- 3) 谷口香織, 高尾秀樹, 新名真也, 山中祐二, 岡田幸長, 中島梨花, 王 俊杰, 辰野竜平, 阪倉良孝, 高谷智裕, 荒川 修, 野口玉雄: 天然トラフグ肝臓の毒性分布. 食衛誌, 54, 277-281 (2013).
- 4) 齋藤昌義, 濱田友貴, 荒川 修: 第7章 食の安全を追求する科学, “農学の魅力”, 安田弘法, 中村宗一郎, 太田寛行, 橋 勝康, 生源寺真一 編, 養賢堂, 東京, pp. 169-195 (2013).

2. 学会発表

- 1) R. Tatsuno, T. Mine, Y. Yamanaka, T. Takatani and O. Arakawa: Growth-associated changes in internal tetrodotoxin distribution and skin

- structure in three species of pufferfish, 9th International Conference on the Marine Biodiversity and Environmental Fisheries Science of the East China Sea, Keelung, Sep. 2013.
- 2) 谷口香織, 高尾秀樹, 新名真也, 山中祐二, 岡田幸長, 中島梨花, 王 俊杰, 辰野竜平, 阪倉良孝, 高谷智裕, 荒川 修, 野口玉雄: 天然トラフグ肝臓の毒性分布. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 那覇, 2013 年 11 月
 - 3) 辰野竜平, 反町太樹, 谷山茂人, 大城直雅, 久保弘文, 高谷智裕, 荒川 修: テトロドトキシンを給餌した腐肉食性小型巻貝 2 種の毒性. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 那覇, 2013 年 11 月
 - 4) 山中祐二, 新名真也, 山下洋平, 辰野竜平, 高谷智裕, 荒川 修: 天然ヒガンフグの麻痺性貝毒蓄積能. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 那覇, 2013 年 11 月
 - 5) 辰野竜平, 井樋洸太郎, 沖田光玄, 山中祐二, 阪倉良孝, 高谷智裕, 荒川 修: トラフグに筋肉内投与した TTX の動態 -肝臓と皮の毒蓄積様式の相違-. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 函館, 2013 年 3 月
 - 6) 岩下裕子, 山下洋平, 市川 航, 荒川 修, 高谷智裕: 異なる波長の照射光下で培養した *Alexandrium catenella* の麻痺性貝毒産生. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 函館, 2013 年 3 月
 - 7) 沖田光玄, 平野 雪, 木下滋晴, 小島大輔, 山崎英樹, 崎山一孝, 高谷智裕, 荒川 修, 阪倉良孝: トラフグ稚魚のフグ毒感知, 摂取, および脳内蓄積に関連する遺伝子の発現. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 函館, 2013 年 3 月
 - 8) 糸井史朗, 吉川沙織, 朝比奈潔, 鈴木美和, 石塚健人, 瀧本成美, 光岡涼子, 横山直人, 出竹歩美, 高柳智江, 江口美帆, 小久保翔太, 高梨志保里, 三浦 愛, 河根三雄, 水藤勝喜, 辰野竜平, 高谷智裕, 荒川 修, 阪倉良孝, 杉田治男: フグの仔魚は母親由来の TTX によって守られている. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 函館, 2013 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 各種海産フグの既得毒性データ

種	毒力 (MU/g)				
	皮	筋肉	肝臓	精巣	卵巣
トラフグ	弱毒： <3-14	無毒： <3	強毒： <3-180	弱毒： <3-20	強毒： <3-250
マフグ	強毒： 10-310	弱毒： <3-60	猛毒： 110-3530	弱毒： 3-60	猛毒： 50-2530
ヒガンフグ	強毒： <3-500	強毒： <3-55	猛毒： <3-2200	強毒： <3-280	猛毒： <3-1300
ナシフグ	弱毒： 23-39	無毒： <2	無毒： 3 - 5	無毒： <2	強毒： 240-250
コモンフグ	猛毒： 3-2397	弱毒： <3-84	猛毒： 3-10749	強毒： <3-331	猛毒： 2-2093
クサフグ	強毒： 3-235	無毒： 0.5-8.3	猛毒： 0-1706	無毒： 0-0.6	猛毒： 72-3514
シロサバフグ	無毒： <2	無毒： <2	無毒： 2.2-7.9	無毒： <2	無毒： <2
タキフグ	無毒： <2-6	無毒： <2-5	弱毒： <2-17	無毒： <2-3	強毒： 10-132
オキナワフグ	猛毒： 608-11810	強毒： 2-390	強毒： 5-380	強毒： 45-550	強毒： 25-450
ホシフグ	弱毒： <3-30	無毒： <3	無毒： <3	無毒： <3	強毒： <3-740

表 2 交雑種フグの既得毒性データ

母系	父系	毒力 (MU/g)				
		皮	筋肉	肝臓	精巣	卵巣
シマフグ	トラフグ	弱毒： <2-25	無毒： <2	強毒： <2-620	無毒： <2	強毒： <2-820
マフグ	ゴマフグ	強毒： 5-130	弱毒： <2-20	猛毒： 4-2200	無毒： <2	猛毒： 280-1600
マフグ	トラフグ	弱毒： <2-35	無毒： <2-2	猛毒： <2-1400	無毒： <2	猛毒： <2-1000
トラフグ	ゴマフグ	無毒： <2-3	無毒： <2	弱毒： <2-50	無毒： <2	
トラフグ	マフグ	弱毒： 4-30	無毒： <2-2	猛毒： 70-1200	無毒： <2	猛毒： 1300

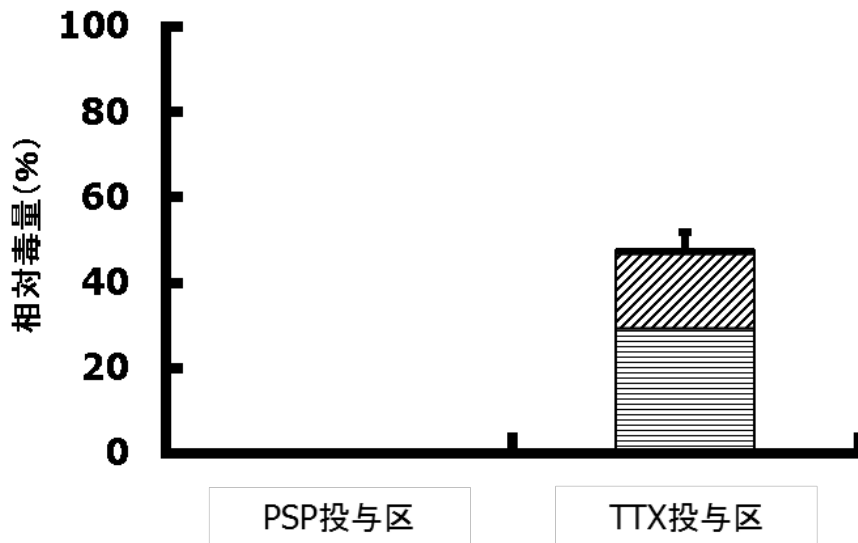


図1 トラフグにおける毒投与 48 時間後の各区の毒蓄積状況

▨ 皮 ▤ 肝臓 ■ 生殖腺 □ 筋肉

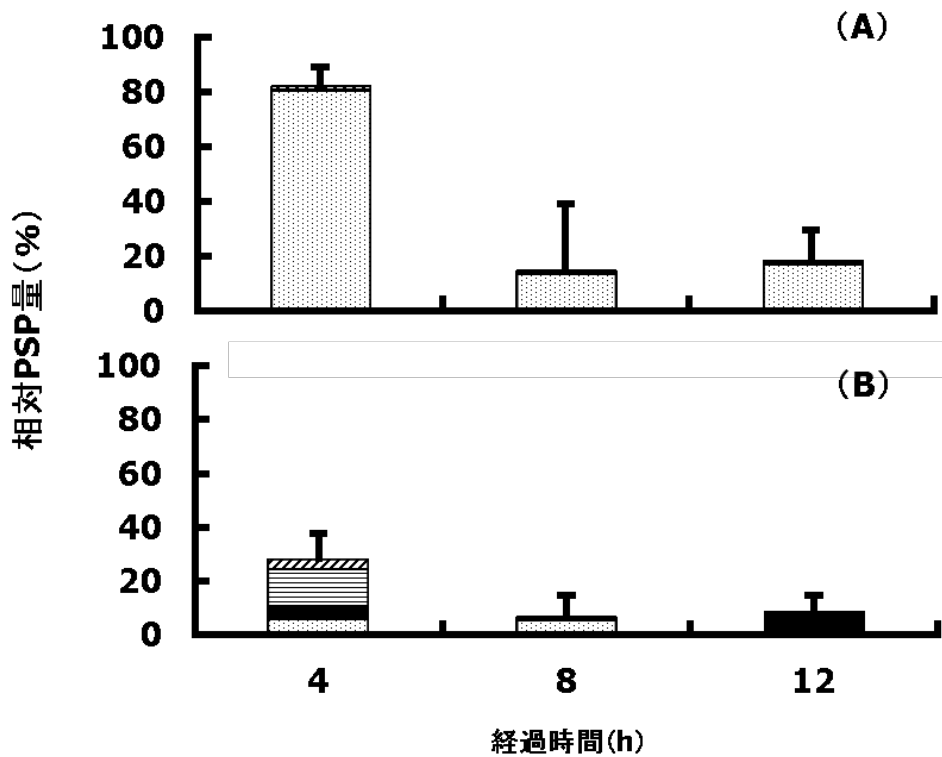


図2 ヒガンフグにおける体内残存毒量の経時的推移

(A): 未成熟群、(B): 成熟群

▨ 皮 ▤ 肝臓 ■ 生殖腺 ▤ 消化管

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）

「フグ等の安全性確保に関する総括的研究」

平成 25 年度分担研究報告書

フグの毒性試験と毒化能の検討

研究分担者 長島裕二 東京海洋大学大学院 海洋科学系

研究要旨

フグの安全性確保のため、フグの毒性調査とフグ肝臓の TTX 蓄積能について検討した。フグの毒性調査は、2012～2013 年に三重県沿岸で漁獲されたフグ科 3 属 13 種 26 検体を用いて個体別、部位別に毒性を測定した。調べた各種フグの毒性はこれまで分類されていた毒性レベルであったが、ショウサイフグ精巢で 11MU/g、ナシフグ筋肉で 11MU/g、ムシフグ筋肉で 10MU/g の毒性が検出された。ショウサイフグの精巢については、安全性確認のため、今後試験検体数を増やして毒性の実態調査をする必要がある。肝組織培養法によるフグ肝臓の TTX 蓄積能試験では、“無毒”種といわれているクロサバフグとシロサバフグの肝臓は、トラフグと同等の TTX 蓄積を示したことから、両種の肝臓は潜在的な TTX 蓄積能をもつことが明らかになり、クロサバフグとシロサバフグ肝臓食用は不適と判断された。一方、ハコフグとハリセンボン科のイシガキフグ、ハリセンボン、ヒトツラハリセンボン、ネズミフグの肝臓は TTX を蓄積しなかったことから、これらの肝臓は TTX による毒化は起こりにくいと考えられた。

A. 研究目的

フグの毒性は種によって大きく異なり、同一種であっても漁獲される海域、時期、個体によって著しく変動するため、これがフグ食中毒のなくなる一因となっている。これまで永年の毒性調査によって、日本沿岸で漁獲される主要なフグについては、有毒な種と部位が明らかにされている。その毒性調査結果に基づいて、昭和 58（1983）年 12 月に厚生省（当時）通知「フグの衛生確保について」（環乳第 59 号）により食用可能なフグの漁獲海域、種類、部位が定められ、それ以外のフグの食用は禁止された。さらに、フグの取扱いについては、各自治体の条例等により、フグの取扱者と施設に免許を与えてフグの安全性を確保している。

しかしながら、近年、これまでの報告を上回る毒性をもつフグが出現したり、これまで日本沿岸ではみられなかった南方産の有毒フグがみられ、西日本でドクサバフグによる中毒が発生した。こうした背景のもと、フグの安全性確保に資することを目的として、本研究では、フグの毒性試験と毒化能の検討を行った。前述のように、フグの毒性は漁獲海域によって異なるので、海域を定め、

そこで漁獲された各種フグの個体別、部位別毒性を詳細に調べた。また、フグの毒化機構解明のため、研究分担者らが構築した *in vitro* 組織培養法で、フグ毒テトロドトキシン（TTX）をもたないと言われている“無毒”種フグのクロサバフグ、シロサバフグ、ハコフグおよびハリセンボン類の肝臓における TTX 蓄積能を検討した。

B. 研究方法

1) フグの毒性試験

試料には、2012 年 6 月～2013 年 4 月に三重県沿岸で漁獲されたトラフグ属ヒガンフグ 4 個体、アカメフグ 1 個体、ショウサイフグ 7 個体、ナシフグ 2 個体、マフグ 1 個体、コモンフグ 3 個体、シマフグ 1 個体、ムシフグ 1 個体、クサフグ 2 個体、トラフグ 1 個体、モウヨウフグ属ホシフグ 1 個体、サバフグ属クマサカフグ 1 個体、センニンフグ 1 個体の 26 検体を用いた。

試料は、漁獲後直ちにラウンドで冷凍され、毒性試験に供するまで凍結保存した。凍結試料をビニール袋に入れ、流水で半解凍後、皮、筋肉、肝臓、消化管、腎臓、脾臓、生殖巣を分離した。各

組織から2gとり、これに0.1%酢酸8mLを添加して、ホモジナイズした後、沸騰水浴中で10分間加熱してフグ毒を抽出した。組織重量が2gに満たない場合は、組織重量の4倍または9倍量に相当する容量の0.1%酢酸を添加した。1gに満たない場合は重量によらず0.1%酢酸3mLを添加して、フグ毒を抽出した。毒性試験は食品衛生検査指針のフグ毒検査法に従い、マウス試験法で行った。

2) 肝組織培養法によるフグ肝臓のTTX蓄積

試料にはフグ科のトラフグ(養殖)、シロサバフグ、クロサバフグ、ハコフグ科ハコフグ、ハリセンボン科のイシガキフグ、ハリセボン、ヒトツラハリセンボン、ネズミフグの3科8種のフグを用いた。それぞれ氷冷麻酔した試料魚から肝臓を摘出し、予め冷却した perfusion buffer で灌流後、スライサーと生検トレパンを用いて肝組織切片(8mm x 厚さ1mm)を調製した。肝組織切片をカルチャープレート(24ウェル)の各ウェルに入れ、50 μ M TTXを含む transport buffer 1mL中で混合ガス(95% O₂-5% CO₂)をバブリングしながら、20 \pm 2で8時間培養した。経時的に肝組織切片を取り出し、氷冷した transport buffer に1分間浸漬して肝組織切片表面を洗浄した後、キムタオルで水分を拭き取った。肝組織切片に0.1%酢酸を加えて、ホモジナイズし、一部はタンパク質定量に用い、残りは沸騰水浴中で10分間加熱してTTXを抽出した。TTX定量はLC-MSまたはLC-MS/MS法で、タンパク質定量はLowry法で行った。実験に先立ち、試料のフグ肝臓にはTTXは検出されないことをLC-MSまたはLC-MS/MS分析で確認した。

C. 研究結果

1) フグの毒性試験

フグ26検体の毒性試験結果を表1にまとめた。26検体中18検体が有毒(10マウスユニット(MU)/g以上)であった。このうち、毒性が最も高かったのは、マフグ卵巣の1220MU/gで、次いでシヨウサイフグ卵巣が1120MU/gを示し、これらは“猛毒”レベル(1000MU/g以上)であった。

魚種別に最高毒性値を比較すると、マフグ、シヨウサイフグ以下、クサフグ(卵巣748MU/g)、ナシフグ(皮379MU/g)、ムシフグ(卵巣337MU/g)、コモンフグ(皮263MU/g)、ヒガンフグ(卵巣157MU/g)、シマフグ(卵巣50MU/g)の順で、ナ

シフグとコモンフグ以外は卵巣が最高毒性部位であった。

ヒガンフグは、4個体中1個体しか毒性がみられず、有毒部位は卵巣(157MU/g)と肝臓(18MU/g)だけだった。

シヨウサイフグは試験した7検体すべてが有毒であった。しかし、筋肉からは毒性はみられなかった。

ナシフグは、皮と卵巣の毒性がそれぞれ379MU/gおよび356MU/gと高く、筋肉(11MU/g)から毒性が検出された点に注意を要する。これについては、「D.考察」で言及する。

マフグは、卵巣が1220MU/gと“猛毒”レベルを示し、消化管(935MU/g)、脾臓(447MU/g)、肝臓(349MU/g)、皮(127MU/g)はいずれも“強毒”レベルであったが、腎臓と筋肉は“無毒”(< 10MU/g)であった。

コモンフグは、他と違った毒性分布を示し、皮の毒性が99~263MU/gと高く、肝臓(<10~35MU/g)、消化管(<10~20MU/g)から毒性が検出された。

シマフグは、卵巣(50MU/g)と消化管(11MU/g)が毒性を示した。

ムシフグは、卵巣(337MU/g)の毒性が強く、皮(64MU/g)、消化管(27MU/g)、脾臓(17MU/g)、肝臓(13MU/g)、筋肉(10MU/g)から“弱毒”レベルの毒性が検出された。

クサフグは、卵巣(748MU/g)、肝臓(79MU/g)、皮(47MU/g)、消化管(11MU/g)が有毒であった。

1個体ずつではあるが、今回毒性試験したアカメフグ、トラフグ、ホシフグ、クマサカフグおよびセンニンフグから毒性はみられなかった。

2) 肝組織培養法によるフグ肝臓のTTX蓄積

トラフグ肝組織切片を50 μ M TTXを含む transport buffer で培養したところ、インキュベート2時間後にTTXが検出され、TTX蓄積量(平均値 \pm 標準偏差)は104 \pm 39 ng TTX/mg proteinであった(図1)。TTX蓄積量はインキュベート時間に伴い増加し、8時間後には482 \pm 40 ng TTX/mg proteinに達した。クロサバフグとシロサバフグはトラフグと同様の増加傾向を示し、8時間後のTTX量はクロサバフグ457 \pm 159 ng TTX/mg protein、シロサバフグ343 \pm 114 ng TTX/mg proteinであった。これに対し、ハコフグとハリセンボン科フグ類の肝組織切片では、培養中TTX量に経

時的な増加はみられず、2～8時間まで10～50 ng TTX/mg protein 程度であった。

D. 考察

1) フグの毒性試験

毒性を調べた3属13種26検体のフグについて、魚種によらず、部位別の最高毒性値を比較すると(表2)、卵巣が1220MU/g(マフグ)と最も高く、試験した卵巣14個体中12個体が有毒(>10MU/g)で、有毒個体出現率は85.7%、毒性分布は29～1220MU/gとなり、毒性レベルで分けると、猛毒(>1000MU/g)2個体、強毒(100～999MU/g)7個体、弱毒(10～99MU/g)3個体、無毒(<10MU/g)2個体であった。

卵巣に次いで、最高毒性値が高かったのが消化管で、マフグが935MU/gの毒性を示し、ショウサイフグの1検体が120MU/gの“強毒”レベルを示したが、ナシフグ、コモンフグ、シマフグ、ムシフグ、クサフグの有毒個体は11～27MU/gと“弱毒”レベルが多かった。半数以上(53.8%)が有毒であった。

肝臓の有毒個体出現率も50%を超えたが、最高毒性値は500MU/g(ショウサイフグ)で、“強毒”レベルは3個体(マフグ349MU/g、140MU/g)に留まった。

皮も半数が有毒であり、最高毒性値は379MU/g(ナシフグ)で、“強毒”レベルがコモンフグ(263MU/g)、ショウサイフグ(159MU/g)、マフグ(127MU/g)でもみられた。

これまで報告例が少ない脾臓については、試験した個体の1/3以上、26個体中9個体が有毒で、最高毒性値も447MU/g(マフグ)に達した。これ以外にもショウサイフグ2個体が129MU/gと153MU/gの“強毒”レベルであった。なお、これらショウサイフグ試料では脾臓が部位の中で最高毒性値を示した点が注目される。

腎臓は、ショウサイフグ、ナイフグ、コモンフグの3個体が有毒で、有毒個体出現率は11.5%、最高毒性値は17MU/gであった。

精巣は、10個体中1個体(ショウサイフグ)から11MU/gの毒性が検出されたものの、概ね“無毒”と判断できるが、ショウサイフグの精巣は食用可とされているので、フグ食の安全確保のために、今後とも調査する必要がある。

最後に、筋肉について述べる。2個体(ナシフグとムシフグ各1個体)から10～11MU/gの毒性

が検出された。しかし、ナシフグは皮の毒性が高いため、凍結・解凍によってフグ毒が無毒の筋肉部に移行することが実験的に確かめられているので、その影響によるものと考えられる。ムシフグについても毒の移行が原因と推測されるが、ムシフグの毒性に関するデータが少ないため、筋肉が有毒か否かは不明である。したがって、安全性が確保できていないため食用が認められていない。

2) 肝組織培養法によるフグ肝臓のTTX蓄積

TTXで毒化するトラフグは、*in vitro*培養実験においても肝組織切片のTTX蓄積量が培養時間に伴って増加することが改めて確認された。フグ科サバフグ属のクロサバフグとシロサバフグは“無毒”種と言われているにもかかわらず、*in vitro*培養実験において、トラフグ肝臓と同程度にTTXを蓄積したことから、クロサバフグとシロサバフグの肝臓は潜在的にTTXを毒化する能力をもつことが初めて明らかになった。

一方、フグ科以外のハコフグ科ハコフグやハリセンボン科のイシガキフグ、ハリセンボン、ヒトヅラハリセンボン、ネズミフグでは、*in vitro*培養実験でも肝組織切片にTTXの蓄積はみられず、これらはTTXによる毒化は起こりにくいと考えられた。

E. 結論

フグの毒性実態調査として、2012年～2013年に三重県沿岸で漁獲されたフグ類3属13種26検体の毒性を個体別、部位別に毒性試験した。その結果は概ね既報の毒性レベルであったが、食用が認められているショウサイフグの精巣で11MU/gと、基準値(10MU/g)を超える例があった。また、ナシフグとムシフグ各1個体の筋肉で11MU/gおよび10MU/gの毒性がみられたが、これは皮からの毒の移行が影響しているものと推測された。

次年度に計画していたフグ毒蓄積能評価を一部先行して行い、*in vitro*培養実験において、“無毒”種と言われているクロサバフグとシロサバフグの肝臓はトラフグに匹敵するほどのTTXを蓄積する能力をもつことがわかり、クロサバフグとシロサバフグの肝臓は食用不適と判断された。一方、ハコフグ科とハリセンボン科のフグの肝臓はTTXを蓄積する能力が低いか欠いていると示唆

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) H. Feroudj, T. Matsumoto, Y. Kurosu, G. Kaneko, H. Ushio, K. Suzuki, H. Kondo, I. Hirono, Y. Nagashima, S. Akimoto, K. Usui, S. Kinoshita, S. Asakawa, M. Kodama, S. Watabe: DNA microarray analysis on gene candidates possibly related to tetrodotoxin accumulation in pufferfish. *Toxicon*, 77 巻, 68-72 (2014).
- 2) 長島裕二：食品中の魚毒（フグ毒）による食中毒とその予防. *食品衛生研究*, 63 巻 2 号, 21-30 (2013).
- 3) 長島裕二, 松本拓也: フグ毒化機構解明に向けた最近の研究. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, 218 巻, 266-275 (2013).

2. 書籍

- 1) 長島裕二：コラム 5 魚介毒の化学成分と薬理作用. 「フィールドベスト図鑑 Vol.17 危険・有毒生物」(篠永 哲, 野口玉雄, 今泉忠明, 小川賢一監修), 学研, 東京, 2013. p. 236.

3. 学会発表

- 1) 長島裕二, 佐藤康介: トラフグ体表粘液のプロテアーゼインヒビター. 第 27 回海洋生物生理活性談話会. 2013 年 5 月, 東京都港区.
- 2) 桐明 絢, 長島裕二, 塩見一雄: カサゴ目魚類刺毒の性状および一次構造. 第 27 回海洋生物生理活性談話会. 2013 年 5 月, 東京都港区.
- 3) 尹 顕哲, 石崎松一郎, 長島裕二: LC-MS によるフグ毒関連物質の検出. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会. 2013 年 9 月, 三重県津市.
- 4) 尹 顕哲, 石崎松一郎, 長島裕二: ヒガンフグ卵巣におけるフグ毒の化学形態. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会. 2013 年 9 月, 三重県津市.
- 5) 桐明 絢, 鈴木靖子, 長島裕二, 塩見一雄: アイゴ刺毒の一次構造およびカサゴ目魚類刺毒との構造比較. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会. 2013 年 9 月, 三重県津市.
- 6) 太田 晶, 須賀恵美, 石崎松一郎, 土井啓行, 石橋敏章, 松本拓也, 長島裕二: 食用フグの肝臓におけるテトロドトキシンおよび麻痺性貝毒の蓄積. 106 回食品衛生学会学術講演会. 2013 年 11 月, 沖縄県宜野湾市.

7) 桐明 絢, 石崎松一郎, 長島裕二: ミトコンドリア DNA を用いたテトラミン食中毒原因巻貝の種判別法. 106 回食品衛生学会学術講演会. 2013 年 11 月, 沖縄県宜野湾市.

8) 長島裕二: 海洋動物の毒. 第 28 回日本中毒学会東日本地方会. 2014 年 1 月, 東京都港区.

9) 松本拓也, 桐明 絢, 渡部終五, 長島裕二: トラフグ幼魚におけるフグ毒テトロドトキシンの胆汁中排泄機構の検討. 平成 26 年度日本水産学会春季大会. 2014 年 3 月, 北海道函館市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 三重県産フグの部位別毒性

魚種(個体数)	毒性値(マウスユニット/g)							
	筋肉	皮	肝臓	消化管	腎臓	脾臓	卵巣	精巣
トラフグ属								
ヒガンフグ(4)	<10	<10	<10- 18	<10	<10	<10	<5-157	<5
アカメフグ(1)	<5	<10	<10	<10	<10	<17		<5
シヨウサイフグ(7)	<5	<10-159	<10-500	12-120	<10-17	17-153	224-1120	6.5-11
ナシフグ(2)	<5-11	50-379	<10- 17	<10- 24	<10-11	<10	334- 356	
マフグ(1)	<5	127	349	935	<10	447	1220	
コモンフグ(3)	<5	99-263	<10- 35	<10- 20	<10-10	<39		<5
シマフグ(1)	<5	<10	<10	11	<10	<10	50	
ムシフグ(1)	10	64	13	27	<10	17	337	
クサフグ(2)	<5	45- 47	<10- 79	<10- 11	<10	<29	29-748	
トラフグ(1)	< 5	<10	<10	<10	<10	<5		<5
モヨウフグ属								
ホシフグ(1)	<5	<10	<10	<10	<10	<13		
サバフグ属								
クマサカフグ(1)	< 5	<10	<10	<10	<10	<10	<5	
センニンフグ(1)	< 5	<10	<10	<10	<10	<17		<5

- : 測定せず.

表2 部位別毒性

	試験個体	有毒個体	有毒個体 出現率(%)	最高毒性値 (MU/g)	毒性レベル*(個体数)				
					猛毒	強毒	弱毒	無毒	
皮	26	13	50.0	379	0	5	8	13	
筋肉	26	2	7.7	11	0	0	2	24	
肝臓	26	14	53.8	500	0	3	11	12	
消化管	26	14	53.8	935	0	2	12	12	
腎臓	26	3	11.5	17	0	0	3	23	
脾臓	26	9	34.6	447	0	3	6	17	
卵巣	14	12	85.7	1220	2	7	3	2	
精巣	10	1	10.0	11	0	0	1	9	

* 毒性レベル: 猛毒 >1000MU/g、強毒 100~999MU/g、弱毒 10~99MU/g、無毒 <10MU/g.

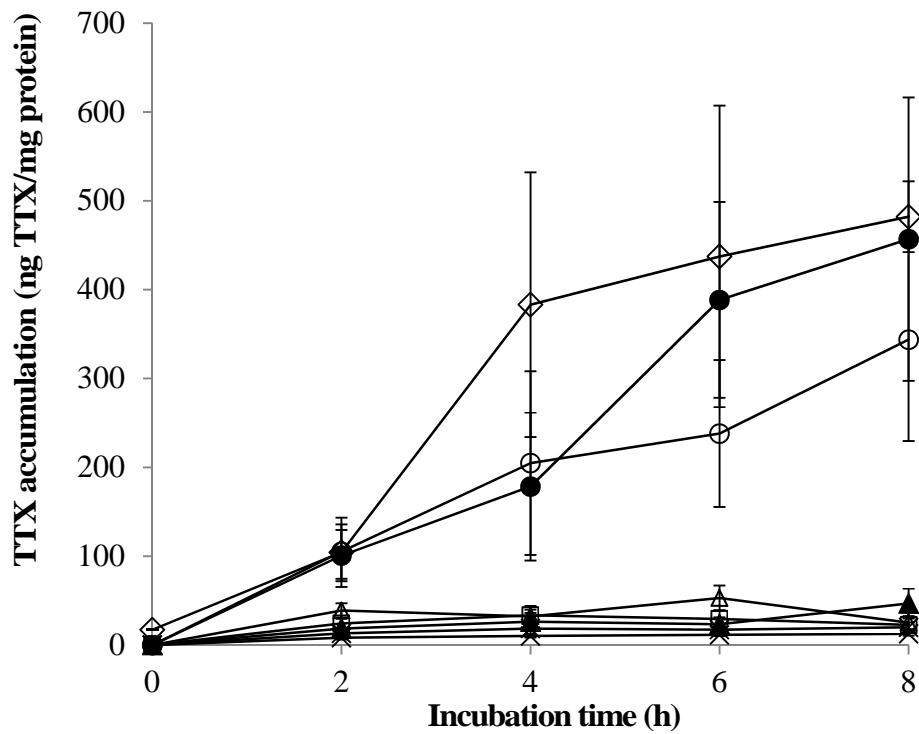


図1 フグ肝組織培養法による TTX 蓄積

トラフグ、 クロサバフグ、○ シロサバフグ、 ハコフグ、
 イシガキフグ、 ハリセンボン、 +ヒトヅラハリセンボン、 ×ネズミフグ

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）

「フグ等の安全性確保に関する総括的研究」

平成 25 年度分担研究報告書

フグの毒成分の同定と定量

研究分担者 佐藤 繁 北里大学海洋生命科学部応用生物化学講座

研究要旨

フグ類の消費は従来、西日本などに限られていたが、近年は全国的に消費されるようになってきた。これまでフグ類を利用していなかった北日本沿岸部などでも、特産品として天然フグ類を商品化しようとする動きがある。一方、Kodama et al.(1984)は、三陸沿岸で漁獲されるコモフグやヒガンフグの肉が高い毒性を示すことを報告している。この報告に基づき現在、岩手県釜石湾、同越喜来湾ならびに宮城県雄勝湾産の上記 2 種のフグは、食用としての取り扱いが禁止されている。このようにフグ類の毒性は同種のものであっても産地によっても大きく異なることから、食用可能とされてきたフグ類についても産地ごとに毒性を調べることが急務となっている。本年度本研究では、これまでフグ類を利用してこなかった三陸沿岸で漁獲されるフグ類につき調査を実施し、コモフグの肉に高い頻度で基準値を大幅に超えるフグ毒が含まれることを確認した。これまでフグ類の毒性分析には、食品衛生検査指針(1995)に記載の抽出法に従って調製した検液が使用されてきた。大学等の研究機関では最近、同法より操作が簡便で定量性が高いと考えられる簡易抽出法により検液を分析に供する報告例が多い。これら 2 種の抽出法による毒の回収量の異同についてあわせて検討したところ、前者に対して後者によるフグ毒の回収量が 30%程度上回る傾向にあることを確認した。

A. 研究目的

谷(1945)は、フグ食を伝統とする西日本各地の沿岸を中心に、朝鮮半島や台湾を含む海域で漁獲されるフグ類の毒性を精力的に調査し、これら海域で多獲されるトラフグ属 *Taki fugu* sp. やサバフグ属 *Lagocephalus* sp. の大部分では、肝臓や卵巣などの内臓部分が高い毒性を示すのに対して、肉はほぼ無毒であることを報告している。フグの毒性には大きな個体差があるため、谷(1945)は魚種ごとに多数の検体数を確保して個体別に毒含量を調べ、皮や肉などの食用部位で g あたり 200 単位(現在の 10 MU/g に相当)を超える個体が認められない場合には、喫食によりヒトの健康を損なうおそれがないものと推定し、これを食用可否の基準値として提案している。現在、食品衛生法ならびに「フグの衛生確保について」(厚生省環境衛生局長通知 環乳第 59 号)により食用可能なフグの種類と部位が定められているが、これは主として谷(1945)の調査結果に基づくものである。

河端(1978)は、フグ毒テトロドトキシン(TTX)の投与量と試験動物として用いるマウスの致死時間を検討し、毒の用量致死時間曲線を作製すると同時に、谷(1945)による試料の抽出法を改良した。これによりそれまで半定量的にしか表示できなかった毒含量が、マウス毒性で定量的に算出することが可能となった。河端(1978)の方法に従って 1980 年代に、各県の衛生研究所や大学等の研究機関が日本産フグ類の毒性の再調査を実施したところ、本州中部以南の沿岸域で漁獲されるフグ類の毒性は、おおむね谷(1945)の調査結果に合致するものの、東北太平洋沿岸の一部海域で漁獲されたヒガンフグ *T. pardalis* やコモフグ *T. poecilnotus* では、肉に基準値である 10 MU/g を大幅に超える個体が高頻度で出現することが明らかとなった(Kodama et al. 1984)。この結果は、谷(1945)により食用可能とされていたフグであっても、産地によっては食用不適なレベルまで高毒化していることを意味する。今年度本研究では、Kodama et al. により毒性が高いことが示

唆されている東北地方沿岸産のフグ類について、その毒性を部位ごとに調べることにした。

河端(1978)の方法では、皮や肉などの部位を2.5倍量(v/w)の希酢酸で熱浸抽出し、ろ過で得られた抽出液に、ろ紙上の残滓を再度希酢酸で洗浄して得た洗液を合わせ、原試料に対して5倍量の抽出液を調製し、これを分析用検液とする。同法では残滓中の毒が全て洗液に回収されることを前提としており、検液1 mLに原試料0.2 gに相当する毒が含まれるものとして原試料の毒性(MU/g)が算出されている。近年、大学等の研究機関では定量性の確保と操作の簡易化を図るべく、試料に対して5倍量の希酢酸熱浸ホモジネートを調製し、これから直接ろ液を調製し、検液として分析する例が多い(Brillantes et al. 2003 ほか)。本研究では上記2通りの抽出法による毒の抽出効率の異同についても、合わせて検討した。

B. 研究方法

1) 河端法と簡易法による毒抽出量の比較

ベトナム北部Catba周辺で2011年8月に採取したドクサバフグ *L. lunaris* 23 個体(BW 57 ± 13 g, TL 141 ± 11 mm)を試料とした。凍結試料を解剖して皮と肉を取り出し、それぞれ部位ごとに合してホモジナイズした。まず河端(1978)の方法に従って、肉のホモジネート10gに25mLの0.1%酢酸を加えて混合し、沸騰浴中で5分間加熱した。氷冷後、ホモジネートをろ紙上ろ過し、ろ液を得た。ろ紙上の残滓に0.1%酢酸を加えて洗浄し、上記のろ液と洗液と合わせて50mLの抽出液を得た(河端法による抽出液)。これとは別に肉のホモジネート10gに0.1%酢酸30mLを混合して5分間加熱し、ホモジネートを氷冷後50mLに定容して攪拌し、ろ紙上濾過して抽出液を作製した(簡易法による抽出液)。これらの検液をSepPak C18 plus カートリッジで処理した後、Yotsu et al. (1989)に従ってHPLC 蛍光法で分析し、抽出液中のTTX濃度を求めた。皮も同様に、河端法と簡易法の二通りで抽出し、HPLC 蛍光法で分析した。肉と皮につき、それぞれ同一のホモジネートから河端法による抽出液と簡易法による抽出液を4つずつ調製して分析し、結果を比較した。抽出液の一部を東京海洋大学長島裕二教授に送付し、マウス試験による毒性分析をあわせて実施した。

2) 三陸産フグ類の毒含量

岩手県釜石魚市場で2009年7月に水揚げされたコモンフグ *T. poecilonotus* 50 個体(BW 121 ± 31 g, TL 187 ± 15 mm)および同市場で2013年6月に水揚げされたシロサバフグ *L. spadiceus* 46 個体(BW 50 ± 14 g, TL 149 ± 15 mm)を試料とした。これらフグ試料をそれぞれ個体別に密封して-20℃で凍結し、使用するまで凍結状態で保存した。魚体を半解凍状態で解剖し、個体ごとに皮、肉、肝臓、消化管および生殖腺に分け、それぞれ前述の簡易抽出法で検液を調製した。SepPak C18 plus カートリッジで処理した検液をYotsu et al. (1989)に従ってHPLC 蛍光法で分析し、含まれるTTX、4epi-TTX、4,9anh-TTXを定量した。試料抽出液の一部を、ELISA キット(SKit, 新日本検定協会製)で分析し、PSP含量を求めた。

C. 研究結果

1) 河端法と簡易法による毒抽出量の比較

表1にドクサバフグの肉および皮のホモジネート、それぞれ河端法と簡易法で処理して得た検液中のTTX含量およびマウス毒性を示す。HPLC 蛍光法で分析した肉のTTX含量を除き、簡易法で得た抽出液のTTX含量と毒性は、河端法で得た抽出液のそれらとは有意に異なり、前者が後者を30%程度上回っていることを確認した。

2) 三陸産フグ類の毒含量

表2に示すように、2009年7月に釜石魚市場で採取したコモンフグの大部分の個体で、肉に基準値(10 MU/g)を超える毒性が認められた。一方、2013年6月に釜石魚市場で採取したシロサバフグの肉、皮、肝臓および生殖腺には10 MU/gを超えるTTX群は確認されず、消化管の2個体のみ20 MU/g程度のTTX群が検出された(表3)。これら抽出液の一部を筆者らが開発したPSP分析用のELISAに付したところ、コモンフグの皮や消化管で1gあたり5 nmolを超えるPSP成分が高頻度で検出された。

D. 考察

1) 河端法と簡易法による毒抽出量の比較

河端(1978)の抽出法では、試料の熱浸ホモジネートをろ過してろ液と残滓に分け、ろ紙上の残滓を再度希酢酸で洗浄して得られる洗液とろ液を合わせて試料重量に対して5倍容量の抽出液を調製し、これを毒分析用の検液として使用する。

検液 1 mL には原試料 0.2 g に相当する毒が含まれるものとして試料の毒性が算出される。前述のように、簡易法で調製した抽出検液の毒含量は河端法のそれを有意に上回っているが、この結果は河端法の洗浄工程では、残滓にかなりの毒が残存し、検液に回収しきれないことを意味する。処理の容易さ、ならびに定量性を考え合わせると、5 倍量の熱浸ホモジネートから直接検液を調製する簡易法がフグ毒の抽出法としてより適切であると考えられる。

2) 三陸産フグ類の毒含量

Kodama et al. (1984) は三陸産コモング 57 個体について毒性を調べ、肉の 29%が無毒(10 MU/g 未満)、63%が弱毒(10~100 MU/g)、8%が強毒(100 MU/g 以上)であることを報告している。今回用いたコモング試料は上記の調査から 25 年を経過した 2009 年に採取したものであるが、肉の 28%が無毒、62%が弱毒、10%が強毒であり、毒の強弱の傾向は Kodama et al. (1984) の結果とほとんど変わっていないことが明らかとなった。これに対してシロサバフグは、消化管のみが有毒で他の部位には基準値(10MU/g)を超える TTX は検出されなかった。このことは、シロサバフグが他のフグに比べ、体内に TTX を蓄積しにくいことを示すものなのかも知れない。シロサバフグ試料中の PSP の有無については、現在検討中である。

フグ類における毒の蓄積機構はまだ不明の点が多く残されている。フグの毒性には、同種のものであっても季節差や地域差があり、生息海域の何らかの環境条件が毒の蓄積に大きく影響しているものと考えられる。東日本大震災の津波に伴って、三陸沿岸の底泥が大きく攪乱されたことから、フグ類の毒性にも何らかの影響が生じている可能性がある。今後、コモングを中心に三陸沿岸でのフグ類の毒性を継続して調べていく必要がある。

E. 結論

フグ類の安全性の確保に資することを目的に、まず毒性分析用検液の調製法を検討した。その結果、肉や皮から定量的に毒を抽出するには、Brillantes et al. (2003) 等、研究機関で採用されている簡易法が、河端(1978)による従来法よりも適当であることを明らかにした。ついで 2009

年に釜石近海で漁獲されたコモングの部位別毒性を調べたところ、1984 年の Kodama et al. による調査と同様に、同種の肉や皮が高頻度で高い毒性を示すことを確認した。これに対して 2011 年 6 月に釜石魚市場に水揚げされたシロサバフグの肉や皮などの可食部には、規制値を超える毒性は確認されなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sato S., Y. Takata, S. Kondo, A. Kotoda, N. Hongo and M. Kodama (2013) Quantitative ELISA kit for paralytic shellfish toxins coupled with sample pretreatment. *J. AOAC Int.*, 97 (2) in press.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 河端法ならびに簡易法によって調製した抽出液中の TTX 含量

試料 No.	HPLC 蛍光法(μM)			マウス試験(MU/mL)		
	河端法	簡易法	危険率	河端法	簡易法	危険率
肉-1	1.25	1.45		2.15	2.87	
肉-2	1.76	1.36		2.03	2.12	
肉-3	1.81	3.40		1.75	2.39	
肉-4	1.58	1.74		1.68	2.28	
肉-5	1.27	1.95	P > 0.05	2.04	2.13	*0.01 < P < 0.05
皮-1	1.07	1.47		1.58	2.34	
皮-2	1.01	2.54		1.63	1.99	
皮-3	1.25	1.85		1.76	2.09	
皮-4	0.60	1.37		1.88	2.22	
皮-5	1.10	1.46	*0.01 < P < 0.05	1.76	2.37	**P < 0.01

表2 2009年7月に採取した三陸産コモフグの毒性

部位	N	毒性 (MU/g)		個体数			
		mean ± SD	最大値	無毒*	弱毒**	強毒***	猛毒****
肉	50	40.5 ± 56.8	305.2	14	31	5	0
皮	50	193.7 ± 221.8	1008.6	3	20	26	1
肝臓	50	123.8 ± 145.5	758.5	2	27	21	0
消化管	50	85.4 ± 111.5	524.7	4	32	14	0
生殖腺	50	98.2 ± 128.9	622.3	6	30	14	0

* 10 MU/g 未満, ** 10 ~ 100 MU/g, *** 100 ~ 1000 MU/g, **** 1000 MU/g 以上

表3 2013年6月に採取した三陸産シロサバフグの毒性

部位	N	毒性 (MU/g)		個体数	
		mean ± SD	最大値	無毒*	有毒**
肉	46	0.2 ± 0.3	1.5	46	0
皮	46	0.6 ± 1.3	7.1	46	0
肝臓	46	0.5 ± 1.1	5.5	46	0
消化管	46	1.2 ± 4.4	22.0	44	2
生殖腺	9	0.3 ± 0.6	2.0	46	0

* 10 MU/g 未満, ** 10 MU/g 以上

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）

「フグ等の安全性確保に関する総括的研究」

平成 25 年度分担研究報告書

亜熱帯産フグ等の毒性試験および調査

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	村田 龍	国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者	登田 美桜	国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者	小島 尚	帝京科学大学
協力研究者	白石 一陽	帝京科学大学
協力研究者	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
協力研究者	佐久川さつき	沖縄県衛生環境研究所

研究要旨

毒性が明確でない熱帯・亜熱帯産フグの毒性を調査するために、まず分析法についての検討を行った。フグ毒テトロドトキシン（TTX）の分析法はマウス法、ポストカラム蛍光 HPLC 法、逆相系の LC-MS（/MS）法等が使用されているが、それぞれ課題がある。広汎に使用できる分析法として HILIC（親水性相互作用クロマトグラフィー）系カラムを用いた LC-MS/MS 分析法を検討し、妥当性評価を行った。本法の定量限界（LOQ）は 0.2 ng/mL、検出限界（LOD）は 0.05 ng/mL で、それぞれ魚肉中の濃度として 0.45 MU/g、0.11 MU/g に相当する。また、0.2~25 ng/mL の範囲で作成した検量線は良好な直線性（ $R^2 = 0.9996$ ）を示した。

本法によって、クロサバフグ、センニンフグ、ヨリトフグ筋肉の毒性調査を行った結果、クロサバフグは全個体が検出限界未満、ヨリトフグ筋肉はすべてが定量限界未満（1 個体だけ検出限界以上）であった。センニンフグは 35 個体中 9 検体が弱毒（10~99 MU/g）で、60%にあたる 21 個体が 0.45 ~ 10MU/g であった。

各自治体で実施したフグの毒性検査結果等を収集するための基礎データとして、昭和 35 年~平成 22 年に発生した食中毒事件例（2,401 件）のリストをもとに、自治体別の食中毒事件一覧表を作成した。

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）により、発生数が激減し、一定の効果が得られた。しかし、未だにフグによる食中毒は毎年発生し、全食中毒事件におけるフグによる死亡者は 39%と大きな割合を占め、食品衛生上の重要な課題として位置づけられている。

この通知の基となったのは「日本産フグの毒力表」（谷、1945）であり、50 年以上も経過している。この谷の報告は主に日本沿岸域のフグを対象としており、奄美・沖縄を含めた熱帯・亜熱帯域の種については記載がほとんどない。

また、通知については発出後 30 年が経過しており、その間の環境の変化、水産食品としてのフグの位置づけの変化等が考えられるため、その検証が必要な状況であるといえよう。

特に九州の海域では、熱帯性のドクサバフグの水揚げが確認されるなど、海水温の上昇に伴い、熱帯・亜熱帯域のフグ種の北上、定着が危惧されている。そのため、これらのフグ種について、毒性を調査することで食品衛生上の重要な知見が得られるものと考えられる

TTX の機器分析には従来、ポストカラム蛍光 HPLC 法や、イオンペア試薬を用いた LC-MS 法などが用いられてきた。ポストカラム法は蛍光体化するための反応槽部や、追加のポンプを必要とすること、また、反応性の高い試薬を使用するな

ど一般の検査機関等での普及は困難と思われる。一方、イオンペア試薬を用いた LC-MS 法は、イオンペア試薬による流路の汚染、質量検出系の汚染等があるため、これも専用の機器以外での使用は好ましくない。

最近、高極性物質の分析で多用される HILIC (親水性相互作用クロマトグラフィー)系のカラムが用いられるようになってきている。

本研究では、毒性が明らかでない、亜熱帯性フグの毒性について、HILIC 系カラムを用いた LC-MS/MS による分析法を確立し、沖縄産フグを中心に毒性について研究を行う。

また、食中毒事件として届出のあったフグによる食中毒事例について、リストアップし各自治体で実施した検査結果収集のための基礎資料とする。

B. 研究方法

1) HILIC-MS/MS による TTX の分析法検討

HILIC 系カラムによる TTX 分析にあたり、分離と分析時間を考慮した上で、分析法を検討した。

装置は Agilent Technologies 社製の LC (Agilent 1290 Infinity) に接続された Agilent 6460 Triple Quad LC/MS を、移動相には LC-MS グレードのアセトニトリルおよび MilliQ 水を使用した。

HILIC 系カラムとして以下のものを検討した。
シリカゲル系：

- Inertsil-Amide (3 μm, 50×2.1 mm)
- PC HILIC (2.7 μm, 50 × 2 mm)
- Unison UK-Amino (3 μm, 100 × 2 mm)
- ZIC-cHILIC (3 μm, 50 × 2.1 mm)
- ZIC-HILIC (3.5 μm, 50 × 2.1 mm)

マルチモード系：

- Schezo SM-C18 (3 μm, 50 × 2 mm)
- Schezo SS-C18 (3 μm, 50 × 2 mm)

コアシェル系：

- CAPCELL CORE PC (3 μm, 50 × 2.1 mm)

ポリマー系：

- ZIC-pHILIC (5 μm, 50 × 2.1)

これらのカラムについて、水-アセトニトリル系(ギ酸とギ酸アンモニウム添加)移動相で、ピークの分離や形状、保持時間等を比較検討した。

予備分析であらかじめ TTX を含有しないことを確認したクロサバフグ筋肉試料を用いて、厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイ

ドライン」(平成 22 年 12 月 24 日付け 食安発 1224 第 1 号)に基づき、5 日間 (n=2) の繰返し実験で、選択性、真度、併行精度、室内精度等の性能パラメーターにより、その妥当性を評価した。また、センニンフグおよびヨリトフグについては、2 日間 (n=2) の繰返し実験で、選択性および真度により適応性を評価した。なお、添加した TTX の量は、有毒の目安である 10 MU/g (2.2 μg/g) を参考にし、2 μg/g および、0.2 μg/g の 2 濃度とした。

2) フグ試料の分析

沖縄県衛生環境研究所にて採集・保管されていた、サバフグ属のクロサバフグ *Lagocephalus gloveri* (50 個体、表 1)、センニンフグ *Lagocephalus sceleratus* (35 個体、表 2) および、ヨリトフグ属のヨリトフグ *Sphoeroides pachygaster* (6 個体、表 3) の筋肉について、食品衛生検査指針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、均質化した試料 5 g に 0.1% 酢酸 12.5 mL を加えてホモジナイズし、沸騰水浴中で 20 分間加熱した。放冷後、遠心分離 (10、13,000 x g, 15 min) し、上清を得た。残渣に 0.1% 酢酸 10 mL を加え、ポルテックスで攪拌後、遠心分離後に得られた上清を合一し、25 mL に調製した。この 0.1 mL に 0.1% 酢酸 0.9 mL を加え攪拌した後に、その 0.5 mL を限外ろ過 (10 kDa) した。ろ液を、アセトニトリルが 50% になるように水とアセトニトリルで希釈し、PVDF 膜でろ過 (孔径 0.2 μm) したものを試験溶液とした。

各種条件について検討し、以下のとおり測定条件を最適化した。

【LC 条件】

分析カラム：Inertsil-Amide (75×2.1 mm, 3 μm) 移動相 A：水 (5mM ギ酸アンモニウム、0.5 mM ギ酸) B：90%アセトニトリル (5mM ギ酸アンモニウム、0.5 mM ギ酸) アイソクラティック分析 A/B (25：75) 測定時間：7 分間、カラム温度：45、流速：0.5 mL/min、注入量：5 μL。

【MS 条件】

イオン化：ESI (AJS、Positive)、ドライガス：N₂ (280、12 L/min) シースガス：N₂ (350、11 L/min) キャピラリー電圧：3500 V、ノズル電圧：500 V、ネブライザー：N₂ (55 psi) フラグメンター電圧：135 V、コリジョンエネルギー：

35 eV、コリジョンガス：N₂、プリカーサーイオン：*m/z* 320.2、プロダクトイオン（定量用）：*m/z* 162.1、プロダクトイオン（確認用）：*m/z* 302。

3) 自治体によるフグの毒性検査結果等の収集

各地におけるフグ食中毒の特徴を明らかにするため、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「食品中の自然毒のリスク管理に関する研究」の成果として得られた、昭和35年～平成22年に発生した食中毒事件例のリストを用いて、各自治体別のフグによる食中毒事件一覧を作成した。

C. 研究結果

1) HILIC-MS/MSによるTTXの分析法検討

各種分析カラムについて、必要に応じて移動相のグラジエント等を変更しながら比較を行った結果、Inertsil-Amide (3 μm, 50×2.1 mm)、PC HILIC (2.7 μm, 50×2 mm)、ZIC-HILIC (3.5 μm, 50×2.1 mm)、ZIC-cHILIC (3 μm, 50×2.1 mm) がTTXと4-*epi*TTXの分離が比較的良かった。中でもInertsil-Amide (3 μm, 50×2.1 mm) は保持時間が短く、システム圧力にも余裕があったため、カラム長を長くすることにより分離が向上することが考えられたため、カラム長75 mmに変更し、確認したところ、良好な分離が得られ、平衡化の時間を含めた分析時間が15分程度で収まった(図1)。本法における、定量限界(LOQ)は0.2 ng/mL (*S/N*=15)、検出限界(LOD)は0.05 ng/mL (*S/N*=3)で、それぞれ魚肉中の濃度として0.45 MU/g、0.11 MU/gに相当する。また、0.2~25 ng/mLの範囲で作成した検量線は良好な直線性($R^2 = 0.9996$)を示した(図2)。

あらかじめTTXがLOD未満であることを確認したクロサバフグ筋肉にTTXを2 μg/gおよび0.2 μg/g添加し、妥当性を評価した。無添加の試料においては妨害となるようなピークは確認されなかった。真度は76.5~82.6%、併行精度は9.53~20.6%、室内精度は8.44~22.5%であり、クロサバフグ筋肉についての分析法の妥当性が確認された。また、センニンフグ筋肉の選択性、真度(87.5~97.7%)、併行精度4.65~9.68%で、ヨリトフグ筋肉の真度87.5~97.7%、併行精度10.2~23.5%であり、それぞれ適応性が確認された。

2) フグ試料の分析

沖縄近海産のクロサバフグ筋肉(50個体)、センニンフグ(35個体)、ヨリトフグ(6個体)について、LC-MS/MS分析に供した。その結果、クロサバフグは全個体が検出限界未満であった(表1)、ヨリトフグ筋肉はすべてが10 MU/g未満であったが、1個体だけ検出限界以上定量限界未満のTTXが検出された(表4、図3)。センニンフグは9検体(25%)が有毒(10 MU/g以上)で、すべてが弱毒(10~99 MU/g)であった。無毒であった21個体のうちLOD未満は2個体、LOD以上LOQ未満が3個体で、全体の60%にあたる21個体が0.45~10 MU/gであった(表5、図4)。全体のまとめを表6に示した。また、一部個体において、保持時間3.5分にピークが検出されたものがあり、TTX類縁体の可能性が示唆される(図5)。

3) 自治体によるフグの毒性検査結果等の収集

各自治体において実施したフグの毒性調査を収集するための基礎資料を作成した。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「食品中の自然毒のリスク管理に関する研究」の成果として得られた、昭和35年～平成22年に発生した食中毒事件例のリスト(総数2,401件)をもとに、自治体別の食中毒事件一覧表とした。群馬県を除く46都道府県で発生があり、自治体数としては58におよんだ(表7)。最も件数が多かったのが広島県(256件)で、山口県(200件)、兵庫県(198件)、愛媛県(169件)、岡山県(151件)、福岡県(140件)、香川県(113件)と続いた。政令市等では神戸市(80件)、北九州市(29件)、横浜市(26件)と続いた。本リストの一例として沖縄県の一覧を表8に示した。

D. 考察

1) HILIC-MS/MSによるTTXの分析法検討

HILIC系のカラムを用いることで、登録検査機関も含め、汎用性の高い分析法を確立できた。本法は、イオンペア試薬などの機器に影響を与えることもなく、15分以内の比較的短時間に分析することができる。そのため、繰り返し測定が可能になるなど、現実的に信頼性の高い分析が可能となる。

2) フグ試料の分析

クロサバフグとヨリトフグの筋肉は、通知により「処理等によりヒトの健康を損なう恐れがない

と認められる」とされており、本研究においてもそれが再検証された。

クロサバフグについては、すべてが検出限界未満 (0.11 MU/g) であるため問題はないが、南シナ海産のものの筋肉は弱毒であるとの報告もある。そのため輸入国や我が国海域の環境変化に伴い、毒化する可能性が否定できないため、定期的なモニタリング等が必要と思われる。

ヨリトフグの1個体において検出限界 (0.11 MU/g) 以上、定量下限未満 (0.45 MU/g) の TTX が検出されたが、有毒の目安である 10 MU/g の 1/20 未満という極微量であるため、特に問題は無いと思われる。

センニンフグはリストへの掲載もなく、「食用不可」である。全体の 60% が無毒であるため、無毒種との誤認がおきる可能性がある。また、沖縄では、その形態が一般的なフグとは異なるため、フグとの認識が無いまま食したことによる食中毒の記録がある。

3) 自治体によるフグの毒性検査結果等の収集

各自治体において実施したフグの毒性検査結果等を収集するための基礎データとして、自治体ごとの食中毒一覧表を作成した。本一覧表をもとに各地方衛研等へのアンケートを実施するための準備を行っているところである。特に件数の多い自治体等については、重点的に調査を進めたい。当該リストは、各自治体におけるフグによる食中毒防止対策の基礎資料としての活用を含め検討をしていきたい。

E. 結論

広汎な利用を想定した、HILIC 系カラムを用いて短時間分析が可能な LC-MS/MS 法を検討し、妥当性評価を行った。本法により迅速かつマウス法によらないフグ毒テトロドトキシンによる汚染の安全性評価が可能となった。沖縄産クロサバフグ、ヨリトフグ、センニンフグの毒性を調査した結果、通知のリストに掲載されているクロサバフグとヨリトフグはすべて無毒であったが、掲載されていないセンニンフグでは弱毒個体が 25% であった。過去に発生した食中毒事件の一覧よりフグによる食中毒を抽出し、各自治体別のリストを作成した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 與儀健太郎, 大城直雅, 松田聖子, 佐久川さつき, 松尾敏明, 安元 健: 奄美大島・加計呂麻島におけるシガテラ原因魚の毒組成解析. 食品衛生学雑誌, 54 巻, 385-391 (2013).

2. 学会発表

- 1) 與儀健太郎, 佐久川さつき, 大城直雅, 村田 龍, 池原 強, 安元 健: 魚類食中毒シガテラの原因物質シガトキシン類の LC-MS/MS 分析. 2013 年 7 月, 大阪府大阪市.
- 2) 與儀健太郎, 佐久川さつき, 村田 龍, 大城直雅, 池原 強, 安元 健: LC-MS/MS によるシガトキシン類分析の検討. 第 50 回全国衛生化学協議会年会, 2013 年 11 月, 富山県富山市.
- 3) 白石一陽, 村田 龍, 照屋菜津子, 佐久川さつき, 小島 尚, 大城直雅: HILIC-LC/MS による亜熱帯産フグの毒性分析. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 2013 年 11 月, 沖縄県宜野湾市.
- 3) 村田 龍, 大城直雅: HILIC-LC/MS による麻痺性貝毒の一斉分析. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 2013 年 11 月, 沖縄県宜野湾市.
- 4) 内田秀明, 平良洋介, 大城直雅, 安元 健: 渦鞭毛藻由来パリトキシン関連新奇化合物の LC/MS による探索と構造研究. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 2013 年 11 月, 沖縄県宜野湾市.
- 5) 辰野竜平, 反町太樹, 谷山茂人, 大城直雅, 久保弘文, 高谷智裕, 荒川 修: テトロドトキシンを給餌した腐肉食性小型巻貝 2 種の毒性. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 2013 年 11 月, 沖縄県宜野湾市.
- 6) 大城直雅, 佐久川さつき, 円谷 健, 藤井郁雄, 平間正博, 安元 健: 本州沿岸産の大型イシガキダイによるシガテラが疑われる 3 事例. 第 4 回日本中毒学会九州地方会, 2014 年 1 月, 沖縄県西原.
- 7) 村田 龍, 大城直雅: LC-MS/MS による下痢性貝毒分析の検討. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 2014 年 3 月, 北海道函館市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

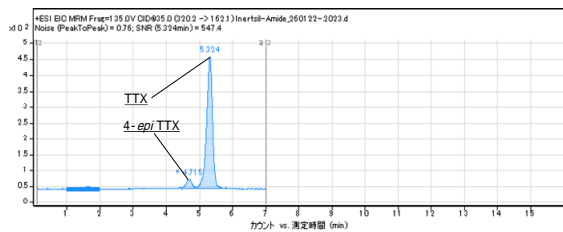


図 1. Inertsil-Amide (75 x 2.1 mm) の LC-MS/MS (MRM) クロマトグラム

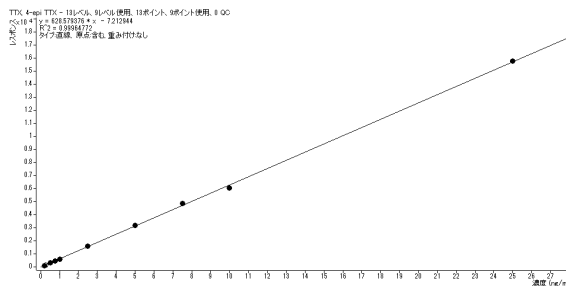


図 2. TTX の検量線 (0.2 ~ 25 ng/mL)

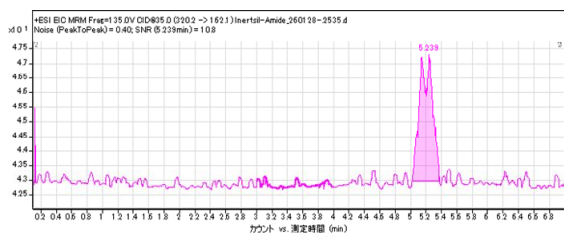


図 3. TTX (0.05 MU/g 以上 0.45MU/g 未満) が検出されたヨリトフグ (03puf-239) 筋肉の LC-MS/MS (MRM) クロマトグラム

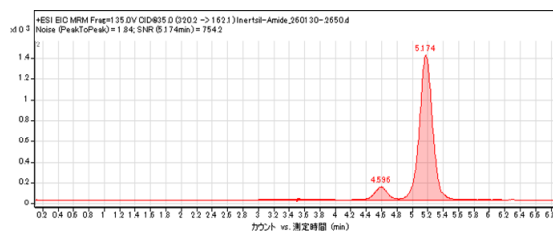


図 4. 弱毒 (60 MU/g) が検出されたセンニンフグ (03puf-006) 筋肉の LC-MS/MS (MRM) クロマトグラム

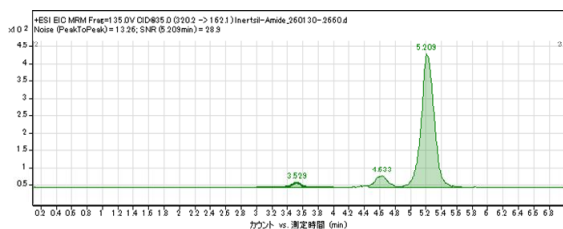


図 5. TTX 類縁体の可能性があるピーク (retention time: 3.5 min) が検出されたセンニンフグ (03puf-089) 筋肉の LC-MS/MS (MRM) クロマトグラム

表 1. 毒性分析に供したクロサバフグの試料

試料番号	体重 (kg)	体長 (cm)	雄雌
03-puf-152	0.62	32.5	
03-puf-153	0.8	36.5	
03-puf-154	0.8	35.0	
03-puf-155	0.96	38.0	
03-puf-156	0.74	34.0	
03-puf-157	0.78	33.5	
03-puf-158	0.96	39.0	
03-puf-176	1.02	36.5	
03-puf-184	0.78	36.0	
03-puf-185	0.68	33.5	
03-puf-186	0.72	36.0	
03-puf-187	1.00	37.5	
03-puf-188	0.48	30.0	
03-puf-189	0.72	35.0	
03-puf-208	0.92	36.5	
03-puf-209	0.82	35.5	
03-puf-210	1.04	37.0	
03-puf-211	1.00	37.0	
03-puf-212	0.90	37.5	
03-puf-213	0.72	33.0	
03-puf-214	0.78	34.5	
03-puf-215	0.74	34.0	
03-puf-216	0.80	35.5	
03-puf-217	0.58	33.0	
03-puf-218	0.78	34.5	

試料番号	体重 (kg)	体長 (cm)	雄雌
03-puf-219	0.70	32.5	
03-puf-220	0.78	34.0	
03-puf-221	0.98	37.0	
03-puf-222	1.22	40.0	
03-puf-223	0.92	35.0	
03-puf-224	0.74	34.0	
03-puf-225	0.60	30.5	
03-puf-226	1.04	37.0	
03-puf-227	0.62	33.5	
03-puf-228	0.80	33.5	
03-puf-229	0.76	33.0	
03-puf-230	0.80	33.5	
03-puf-231	0.92	35.5	
03-puf-232	1.08	37.5	
03-puf-233	0.58	31.0	
03-puf-234	0.78	33.0	
03-puf-235	0.58	31.0	
03-puf-236	0.84	35.0	
03-puf-237	0.72	34.0	
03-puf-238	0.84	36.0	
03-puf-239	1.00	37.5	
03-puf-240	0.86	36.0	
03-puf-241	0.90	35.0	
03-puf-242	0.84	35.0	
03-puf-243	0.62	32.0	

表 2. 毒性分析に使用したセンニンフグの試料

試料番号	体重 (kg)	体長 (cm)	雄雌
03-puf-001	3.1	55.5	
03-puf-002	3.3	65.0	
03-puf-003	3.9	65.0	
03-puf-004	3.8	63.0	
03-puf-005	6.4	74.5	
03-puf-006	1.2	45.5	
03-puf-007	3.9	64.0	
03-puf-008	2.8	59.5	
03-puf-009	3.7	66.0	
03-puf-020	1.94	55.5	
03-puf-027	5.5	74.0	
03-puf-029	2.0	54.5	
03-puf-033	1.60	51.5	
03-puf-034	2.00	55.0	
03-puf-035	4.20	66.0	
03-puf-036	4.60	68.0	
03-puf-037	1.50	49.0	
03-puf-038	1.70	51.0	
03-puf-051	4.22	66.5	
03-puf-078	1.90	57.0	
03-puf-079	3.30	61.0	
03-puf-080	3.20	66.0	
03-puf-081	2.40	59.5	
03-puf-082	2.20	59.5	
03-puf-083	2.10	61.0	

試料番号	体重 (kg)	体長 (cm)	雄雌
03-puf-084	3.20	60.0	
03-puf-088	3.50	64.5	
03-puf-089	5.20	75.0	
03-puf-141	0.08	18.5	
03-puf-159	4.44	74.5	
03-puf-179	2.34	59.0	
03-puf-181	0.56	37.0	不明
03-puf-182	0.24	28.5	不明
03-puf-196	5.58	75.0	
05-puf-019	1.78	53.0	無し

表 3. 毒性分析に供したヨリトフグの試料

試料番号	体重 (kg)	体長 (cm)	雄雌
03-puf-024	0.8	32.5	
03-puf-025	1.1	36.0	
03-puf-026	1.0	35.0	
03-puf-045	0.26	21.0	
03-puf-046	0.76	29.5	
03-puf-069	0.68	32.5	

表4. ヨリトフグ筋肉の分析結果

試料番号	TTX濃度			毒性
	ng/mL	μg/g(筋肉)	MU/g(筋肉)	
03-puf-024	< 0.05			無毒
03-puf-025	< 0.05			無毒
03-puf-026	< 0.05			無毒
03-puf-045	< 0.05			無毒
03-puf-046	< 0.05			無毒
03-puf-069	< 0.2			無毒

< 0.05: 検出限界未満

< 0.2: 検出限界以上、定量限界未満

表5 センニンフグ筋肉の分析結果

試料番号	TTX濃度			毒性
	ng/mL	μg/g(筋肉)	MU/g(筋肉)	
03-puf-001	5.96	2.98	13.6	弱毒
03-puf-002	4.48	2.24	10.2	弱毒
03-puf-003	< 0.05			無毒
03-puf-004	1.62	0.812	3.69	無毒
03-puf-005	6.16	3.08	14.0	弱毒
03-puf-006	26.3	13.2	59.8	弱毒
03-puf-007	< 0.05			無毒
03-puf-008	1.17	0.585	2.66	無毒
03-puf-009	1.86	0.928	4.22	無毒
03-puf-020	0.772	0.386	1.75	無毒
03-puf-027	0.944	0.472	2.14	無毒
03-puf-029	1.18	0.592	2.69	無毒
03-puf-033	12.1	6.07	27.6	弱毒
03-puf-034	2.22	1.11	5.04	無毒
03-puf-035	1.06	0.532	2.42	無毒
03-puf-036	< 0.2			無毒
03-puf-037	< 0.2			無毒
03-puf-038	7.66	3.83	17.4	弱毒
03-puf-051	1.24	0.622	2.83	無毒
03-puf-078	3.31	1.65	7.52	無毒
03-puf-079	0.953	0.477	2.17	無毒
03-puf-080	3.18	1.59	7.23	無毒
03-puf-081	0.401	0.201	0.912	無毒
03-puf-082	2.28	1.14	5.18	無毒
03-puf-083	5.21	2.60	11.8	弱毒
03-puf-084	1.72	0.858	3.90	無毒
03-puf-088	3.11	1.55	7.06	無毒
03-puf-089	7.16	3.58	16.3	弱毒
03-puf-141	1.87	0.933	4.24	無毒
03-puf-159	< 0.2			無毒
03-puf-179	5.40	2.70	12.3	弱毒
03-puf-181	0.651	0.326	1.48	無毒
03-puf-182	1.67	0.835	3.80	無毒
03-puf-196	0.466	0.233	1.06	無毒
05-puf-019	2.92	1.46	6.64	無毒

< 0.05: 検出限界未満

< 0.2: 検出限界以上、定量限界未満

表6. 各フグ筋肉の毒性

	検体数	検出限界未満 < 0.11 MU/g	定量限界未満 ~ 0.45 MU/g	無毒 ~ 10 MU/g	弱毒 ~ 99 MU/g
クロサバフグ	50	50	0	0	0
ヨリトフグ	6	5	1	0	0
センニンフグ	35	2	3	21	9

表7 自治体別フグによる食中毒の発生件数、患者数、死者数

自治体名	発生 件数	患者数	死者数	自治体名	発生 件数	患者数	死者数
北海道	26	44	7	京都府	5	10	0
札幌市	2	3	0	京都市	5	9	2
青森県	11	19	6	大阪府	66	100	20
岩手県	6	9	1	大阪市	68	117	40
宮城県	13	17	3	兵庫県	198	279	75
秋田県	11	20	2	神戸市	80	125	41
山形県	5	11	1	和歌山県	21	31	15
福島県	18	39	9	岡山県	151	208	82
茨城県	15	31	7	広島県	256	341	136
栃木県	1	1	0	広島市	3	6	0
千葉県	26	32	10	鳥取県	54	76	14
埼玉県	4	6	0	島根県	44	67	20
東京都	44	73	16	山口県	200	305	108
神奈川県	16	25	7	愛媛県	169	222	114
横浜市	26	46	12	香川県	113	170	74
川崎市	2	3	1	徳島県	33	40	22
新潟県	31	50	9	高知県	19	37	11
富山県	14	42	3	福岡県	140	243	63
福井県	7	11	2	福岡市	16	24	7
石川県	25	53	10	北九州市	29	41	16
山梨県	1	3	2	佐賀郡	2	3	1
長野県	3	7	1	佐賀県	34	59	13
静岡県	18	26	7	大分県	58	92	37
愛知県	63	104	33	大分市	1	2	0
名古屋市	23	31	10	長崎県	95	179	50
岐阜県	8	10	1	熊本県	43	61	20
三重県	38	47	25	宮崎県	18	28	5
滋賀県	2	4	0	鹿児島県	10	22	2
奈良県	3	4	1	沖縄県	8	38	0
				総計	2,401	3,706	1,174

表8 各自治体におけるフグの毒性調査を集約する資料として作成した食中毒一覧表の例（沖縄県）

自治体	発生日	発生場所	病因食品	魚種	部位	原因施設	摂食者数	患者数	死者数
沖縄県	1974年05月11日	具志川市喜屋武	魚介類（サシミ）			販売店	50	25	0
沖縄県	1983年11月23日	名護市	魚介類（ふぐ）			家庭	1	1	0
沖縄県	1990年12月28日	浦添市	ふぐ			飲食店	6	2	0
沖縄県	2010年12月01日	与那原町	魚介類（センニンフグ）	センニンフグ		事業場	4	1	0
沖縄県	2011年05月17日	宮古郡上野村	フグ			家庭	6	4	0
沖縄県	2009年03月27日	沖縄県	オキナワフグの天ぷら（3/27昼食）	オキナワフグ		家庭	1	1	0
沖縄県	2003年05月22日	沖縄県	モヨウフグ	モヨウフグ	卵巣	家庭	6	2	0
沖縄県	2008年04月14日	沖縄県	魚汁（センニンフグ）	センニンフグ	肝臓、精巣	家庭	2	2	0

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）

「フグ等の安全性確保に関する総括的研究」

平成 25 年度分担研究報告書

フグ類の形態に基づく分類

研究分担者 松浦啓一 国立科学博物館

研究要旨

フグ等の安全性確保に資するため、日本産フグ類の分類学的研究を行うため国内外のフグ類の標本 130 個体を調査した。今年度は北海道、神奈川、京都、高知、長崎、沖縄においてフグ類の調査を行うとともにオーストラリア博物館およびニュージーランド博物館から標本を借用して調査を行った。

サバフグ属の分類学的研究を行った結果、クロサバフグの学名を変更すべきことが明らかとなった。ニュージーランドとオーストラリア東岸から知られていた *Lagocephalus cheesemanii* はクロサバフグと同一であるため、今後、クロサバフグにはこの学名を適用すべきである。また、日本産サバフグ属には 7 種が含まれるが、本属の種の分布域が広いいため、外国産の標本と比較して分類学的な再検討を行う必要がある。

トラフグ属の雑種個体を検討した結果、ショウサイフグ、トラフおよびマフグが関与していることが判明した。トラフグ属の雑種が各地からかなり得られているという情報があるため、さらに標本入手を図る必要がある。

A. 研究目的

フグ食中毒の発生件数と患者数は食中毒全体の 2% 以下だが、死者数は全体の 1/3 を占め、致死率が高い極めて危険な食中毒である。フグ食中毒防止のため、わが国では厚生労働省通知で食用可能なフグの種類、部位、漁獲地域を定め、都道府県条例等でフグ取扱の場所と人を制限してフグの安全性確保を担保している。通知に基づく食用可能なフグの種類と部位は、谷（1945）が西日本および東シナ海で漁獲したフグ類の毒性調査がもとになっているが、その後、谷の「日本産フグの毒力表」を上回る毒力を示す例が散見され、フグ毒以外にも麻痺性貝毒やパリトキシン様毒によるフグ食中毒が発生している（谷山、高谷、2009）。また、平成 19～20 年にはキンシバイによるフグ毒中毒が続発した（谷山ら、2009）。このようにフグ食中毒およびフグ毒中毒は複雑化しており、フグ等の安全性確保における新たな問題点となっている。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最重要項目である。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、近年温暖化のためか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、正確なフグの判別がますます困難になっている。そこで本研究では、日本産フグ類の分類を再検討することとする。

フグの分類は従来、色彩を含む形態学的特徴に依拠していたが、最近は遺伝子による種判別も行われるようになってきている。しかし、フグ類が水揚げされる魚市場や調査船等の現場においては、形態形質は依然として重要である。フグ類全般の形態形質については、1950 年代に阿部が一連の研究を発表しているものの、大きな見直しは行われていない。また、サバフグ属についても阿部や共同研究者によってシロサバフグ *Lagocephalus wheeleri* とクロサバフグ *Lagocephalus gloveri* が新種として発表されたが、その後、本格的な再検討は行われていない。しかし、分担研究者による最近の研究 (Matsuura, 2010) によって *Lagocephalus wheeleri* Abe, Tabeta & Kitahama, 1984 は *L. spadiceus* (Richardson, 1845) のシノニムであることが明らかとなり、阿

部の研究には問題があることが判明しつつある。また、トラフグ属の雑種と思われる個体かなりの頻度で市場に水揚げされることがあり、雑種フグの分類学的研究も必要となっている。このため、本研究においては日本産フグ類を形態学的に再検討して、日本および周辺海域のフグ類の分類学的再検討を行うことにする。

B. 研究方法

国内外の自然史系博物館や大学に保管されている日本産フグ類を調査することを基本としつつ、新たな標本を得るためにフィールド調査も行った。今年度は北海道、神奈川、京都、高知、長崎、沖縄においてフグ類の調査を行うとともにオーストラリア博物館およびニュージーランド博物館から標本を借用して調査を行った。

新鮮な標本が得られた場合には、カラー写真を撮影して、分類学的な研究に使用した。形態形質を調査するため、入手した標本は10%ホルマリンで固定した後、70%アルコールに保存して、形態学的調査を行った。

鰭条数の計数や体表面の小棘の観察は双眼実態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系を撮影した。

C. 研究結果

フグ類の標本を130個体調査して以下の結果を得た。なお、今年度はサバフグ属の分類学的研究とトラフグ属の雑種個体の研究に重点を置いたが、併せてモヨウフグ属、オキナワフグ属、シッポウフグ属およびヨリトフグ属の形態形質の調査も行った。以下の報告は重点を置いたサバフグ属とトラフグ属の雑種研究に焦点を絞り、トラフグ属やモヨウフグ属等については、次年度に報告することとする。

1) サバフグ属の分類学的研究

サバフグ属の標本は国立科学博物館、北海道大学総合博物館、神奈川県立生命の星・地球博物館、京都大学総合博物館、高知大学理学部、西海区水産研究所及び鹿児島大学総合研究博物館において行った。その結果、日本には以下の7種が出現することが明らかとなった：クロサバフグ *L. cheesemanii*、カナフグ *Lagocephalus inermis*、クマサカフグ *L. lagocephalus*、ドクサバフグ *L. lunaris*、シロサバフグ *L. spadiceus*、センニン

フグ *L. sceleratus*、カイユウセンニンフグ *L. suzensis*。クロサバフグは Abe and Tabeta (1982) によって静岡県等から得られた標本に基づいて新種 *Lagocephalus gloveri* として発表された。一方、ニュージーランドおよびオーストラリア東岸沖から *Lagocephalus cheesemanii* (Clarke, 1897) というサバフグ属のフグが知られている。Abe and Tabeta (1982) は彼らの標本と *L. cheesemanii* を比較していなかったが、今回、オーストラリア博物館とニュージーランド博物館から *L. cheesemanii* の標本を借用して、*L. gloveri* のタイプ標本と比較したところ、形態学的に相違がないことが明らかとなった。さらに、オーストラリア博物館とCSIROから *L. cheesemanii* の組織サンプルを入手して日本産のクロサバフグと遺伝子を比較したところまったく差が見られなかった。したがって、Abe and Tabeta (1982) が新種として発表した *L. gloveri* は *L. cheesemanii* のシノニムであり、クロサバフグの学名には *L. cheesemanii* を適用することとなる。

2) トラフグ属の雑種個体の形態的研究

トラフグ属の雑種8個体を調査した。2個体は採集地不明であったが、茨城県、石川県および秋田県からそれぞれ1個体が採集され、宮城県から3個体が採集された。

8個体のうち、体色からシヨウサイフグの雑種と判断されるものが5個体（茨城県1個体、宮城県2個体、採集地不明2個体）あった。シヨウサイフグでは臀鰭は白いが、これら5個体のすべての臀鰭は黄色であり、シヨウサイフグとは異なる（図1A）。また、シヨウサイフグは体表に小棘がなく、滑らかであるが、宮城県の2個体の体背部（胸鰭上方から両眼の間まで）に小棘があり、シヨウサイフグとは異なっていた。これらの個体では体の他の部分には小棘は見当たらず、滑らかであった。また、採集地不明の1個体では、体背部に小棘があり、さらに体腹面にも小棘があった。また、茨城県の個体と採集地不明のもう1個体の体表面に小棘はなく、滑らかであった。

宮城県から得られた他の1個体はマフグの若魚に似た色彩をもつが、マフグに見られる胸鰭後方の大黒斑がない。また、体の模様が全体として不鮮明であり、雑種に見られる特徴が現れていた（図1B）。

秋田県から得られた 1 個体は背鰭前方の体背部と腹面に小棘をもつこと、胸鰭後方の大黒斑を含む体全体の色彩によってトラフグの雑種と判断される(図 1C)。トラフグとマフグの雑種である可能性があるが、他の種との雑種の可能性もある。

石川県から得られた 1 個体は胸鰭後方に大黒斑に白い縁取りがあり、トラフグに似ている(図 1D)。しかし、体の腹側面に 1 本の黄色縦線が走り、臀鰭が黄色であり、トラフグとは異なる。これらの色彩はマフグに見られるが、体の模様はマフグとは明らかに異なる。また、体背部と腹面に小棘を持つこともマフグとは異なる。トラフグとマフグの雑種である可能性が高いが、他の種との雑種という可能性も否定できない。

D. 考察

サバフグ属の分類学的検討を通じて日本産フグ類の分類には再検討すべき点があることが明らかとなった。サバフグ類はインド・西太平洋に広く分布する種が多いため、今後、外国産の標本との比較を行い、サバフグ属全体の分類を確立する必要がある。

トラフグ属の雑種と思われる標本を検討したところ、ショウサイフグ、マフグおよびトラフグが関与した雑種であると判断できた。今後、遺伝子解析によって両親種を検討する必要がある。また、トラフグ属の雑種は宮城県、秋田県、石川県および茨城県から得られたので、標本調査を広げれば他の地域からも得られる可能性が高い。分担者が共同研究者となった以前の研究では、有明海からシマフグとナシフグの雑種が採集されており、関東以南の地域の標本調査を強化する必要があると思われる。

E. 結論

サバフグ属の分類学的研究を行った結果、クロサバフグの学名を変更すべきことが明らかとなった。ニュージーランドとオーストラリア東岸から知られていた *Lagocephalus cheesemanii* はクロサバフグと同一であるため、今後、クロサバフグにはこの学名を適用すべきである。また、日本産サバフグ属には 7 種が含まれるが、本属の種の分布域が広いため、外国産の標本と比較して分類学的な再検討を行う必要がある。

トラフグ属の雑種個体を検討した結果、ショウ

サイフグ、トラフグ及およびマフグが関与していることが判明した。トラフグ属の雑種が各地からかなり得られているという情報があるため、さらに標本入手を図る必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし。

2. 学会発表

1) 松浦啓一：シッポウフグ属の分類学的検討と奄美大島の海底にミステリーサークルを作るシッポウフグ属の 1 未記載種. 2013 年度日本魚類学会年会, 2013 年 10 月, 宮崎県宮崎市 .

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



A. 宮城県から得られたショウサイフグの交雑種 NSMT-P 114904



B. 宮城県から得られたマフグの交雑種 NSMT-P 114907



C. 秋田県から得られたトラフグの交雑種

NSMT-P 114908



D. 石川県から得られたトラフグの交雑種 NSMT-P 114910

図1. トラフグ属の雑種

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）

「フグ等の安全性確保に関する総括的研究」

平成 25 年度分担研究報告書

フグの分類に関する研究（遺伝子解析）

研究分担者 石崎松一郎 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科食品生産科学部門

研究要旨

フグ食中毒は毎年発生しており重篤な場合には死に至ることから、今なお食品衛生上重大な問題である。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それによる食中毒の発生、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ことから、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、見直すことを目的に、近年頻繁に捕獲されるようになった交雑種をターゲットとして、形態学的手法と分子生物学的手法の両手法に基づく正確な交雑フグ種判別法について検討した。交雑フグ種のミトコンドリア DNA の塩基配列から、母系魚種を同定したところ、本研究で鑑別した交雑種のうち、トラフグとマフグの雑種やトラフグとシマフグの雑種のように、従来から存在が知られ、両親種の間隔的な特徴を明瞭に示すものは、外部形態による両親種の推定が可能であり、mtDNA 解析法によってその推定が支持されたが、ゴマフグとショウサイフグの雑種のような両親種の間隔的な特徴を示さないものや、外部形態から両親種を推定することが困難なもの、あるいは過去の類似事例の知見が適用できないものが存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

今年度は、漁獲時あるいは流通過程において確認されるあらゆる交雑フグ種を入手・保管し、それらの筋肉から抽出・精製した全ゲノム DNA を用いて、ミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域を対象とした PCR を行ない、検体の塩基配列を決定するとともに、母系魚種の同定を行った。次に、核 DNA マイクロサテライトマーカーとして V1R、MC1R、MC4R、POMC、ITS1 および ITS2 の各領域をクローニングし、それらの塩基配列から父系魚種の同定に適用可能なプライマーの設計を試みた。

B. 研究方法

1) フグ類の分類に関する研究

試料には日本各地から採集した外観からの形態学的判定に基づく交雑フグ種(トラフグ×クサフグ、トラフグ×マフグ、トラフグ×シマフグ、ショウサイフグ×コモンフグ、コモンフグ×ムシフグ、ショウサイフグ×ゴマフグおよびショウサイフグ×マフグ)計7種10個体を用い、これらの筋肉から DNA 組織キット S および QuickGene-810 (ともに和光純薬工業(株)製)を用

いて全ゲノム DNA を抽出・精製した。次に、全ゲノム DNA を用いてミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域の各々約 620bp、390bp を含む部分領域を PCR 増幅した。PCR 増幅に用いたプライマーセットを表 1 に示した。PCR 増幅には TaKaRa EX Taq DNA ポリメラーゼを用い、PCR 反応液は、0.2mL PCR チューブ中に精製した鋳型 DNA 5.0 μ L、10 \times 緩衝液 (TaKaRa) 5.0 μ L、2.5 mM dNTP mix 4.0 μ L、20 μ M 各プライマー 0.75 μ L、TaKaRa EX Taq DNA ポリメラーゼ 0.4 μ L を加えた後、全量が 50 μ L となるように滅菌水を加えた。PCR の温度条件は、98 で 10 秒、53 で 30 秒、72 で 60 秒のサイクルを 30 回行った。PCR 終了後、PCR 断片を template として、BigDye® 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、公的データベースおよび研究室で新たに構築したフグ種専用データベースから雌親種の同定を行った。

次に、サバフグ属 *L. suezensis* のミトコンドリア DNA 全塩基配列の決定を行った。サバフグ属においては、これまで *Lagocephalus suezensis*

(カイユウセンニンフグ)のミトコンドリア DNA 塩基配列情報が得られていなかった。今年度、トルコ地中海産ではあるが外観による判別によって *L. suezensis* と判断された標本が得られたため、サバフグ属交雑種の判別に資することを目的に、ミトコンドリア DNA 全塩基配列の決定を行った。すなわち、クロマグロ、マアジ、マダイ、カツオおよびマスノスケの塩基配列を基に設計されたおおよそ 20-30 bp のユニバーサルプライマーを 7 セット構築し、常法によって抽出した全ゲノム DNA を用いてプライマーウォーキング法により、ミトコンドリア DNA 全塩基配列を決定した。

C. 研究結果

1) フグ類の分類に関する研究

今回採集した交雑フグ種 7 種 10 個体につき、ミトコンドリア DNA 塩基配列に基づく雌親種の同定を行った結果、形態学的鑑別法による推定どおりの結果であったものは 5 種 8 個体であり、2 種(ショウサイフグ × コモンフグの 1 個体および コモンフグ × ムシフグの 1 個体)については形態学的鑑別法による推定と異なった(表 2)。

カイユウセンニンフグのミトコンドリア DNA 全塩基配列をすでに解析されている他のサバフグ種と比較した結果、ミトコンドリア DNA の塩基組成は他のサバフグ種と大きな差異は認められなかった(表 3)。しかしながら、分子系統樹の結果から、サバフグ種はセンニンフグ、カイユウセンニンフグのグループとその他のグループで大きく分岐し、さらにその後カイユウセンニンフグがある時点でセンニンフグから分岐したことがわかった(図 1)。

D. 考察

1) フグ類の分類に関する研究

トラフグ × クサフグ 1 個体およびトラフグ × マフグの交雑種 2 個体は、体表の小棘や斑紋の形状、体側中央の白点および黄色縦帯の形状から、両親種をトラフグおよびクサフグあるいはマフグと推定した。mtDNA 解析法によりトラフグ × クサフグ 1 個体およびトラフグ × マフグ 2 個体の母系魚種はそれぞれトラフグおよびマフグと同定されたことから、形態学的鑑別法による推定が正しいことが確認された。

トラフグ × シマフグの交雑種 1 個体は、不規則

な斜め模様と大黒斑がトラフグとシマフグの中間を示し、白い臀鰭がトラフグの特徴を示していたため、両親種をトラフグおよびシマフグと推定した。mtDNA 解析法では母系魚種がシマフグと同定され、本個体においても形態学的鑑別法による推定が正しいことが確認された。

ショウサイフグ × コモンフグの交雑種 3 個体は、背面および腹面の小棘はコモンフグ、体表の斑紋はショウサイフグ、黄白色の臀鰭は両者の中間をそれぞれ示していたため、両親種をショウサイフグおよびコモンフグと推定したが、mtDNA 解析法によって母系魚種を同定した結果、1 個体はゴマフグ、2 個体はショウサイフグとの判定結果が示され、形態学的鑑別法と一部異なる結果となり、形態学的鑑別法が必ずしも完全ではない場合があることが示唆された。

コモンフグ × ムシフグの交雑種 1 個体においても、体表における円形・虫食い状の模様からコモンフグとムシフグの中間雑種と推定したが、mtDNA 解析法による母系魚種がシマフグと同定され、形態学的鑑別法と異なる結果となった。

ショウサイフグ × ゴマフグおよびショウサイフグ × マフグの交雑種 2 個体は、小棘の分布および体表の斑紋によってショウサイフグとゴマフグあるいはショウサイフグとマフグの中間と推定されたため、それぞれショウサイフグ × ゴマフグおよびショウサイフグ × マフグの雑種と推定した。mtDNA 解析法ではそれぞれ母系魚種がゴマフグおよびショウサイフグと同定された。

本研究で鑑別した交雑種のうち、トラフグとマフグの雑種やトラフグとシマフグの雑種のように、従来から存在が知られ、両親種の中間的な特徴を明瞭に示すものは、外部形態による両親種の推定が可能であり、mtDNA 解析法によってその推定が支持されたが、ゴマフグとショウサイフグの雑種のような両親種の中間的な特徴を示さないものや、外部形態から両親種を推定することが困難なもの、あるいは過去の類似事例の知見が適用できないものが存在することが明らかとなった。

したがって、報告や事例の蓄積が十分とは言えない交雑種に関しては、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ると思われる。

一方、核 DNA マイクロサテライト領域を対象にした父系魚種の同定に関しては、トラフグ属、サバフグ属で個別の領域設定が必要であることがわかり、マーカーとして有効と考えられる V1R,

MC1R, MC4R, POMC, ITS1 および ITS2 領域のクローニングを個々の個体で確認中である。これらの情報を基に、父系魚種の同定に向けたプライマーの構築を行っていく計画である。

E. 結論

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と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) なし

2. 学会発表

1) Acar Caner, 石崎松一郎, 長島裕二: Complete mtDNA sequences of common Turkish puffer fish species and comparison among species. 平成26年度日本水産学会春季大会, 2014年3月, 北海道函館市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) エビ類検出用プライマーセット, 特許第5483173号, 2014年2月28日.

表1 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域の PCR 増幅に用いたプライマーセット

領域	プライマー配列	アニーリング温度 ()	増幅サイズ (bp)
16S rRNA	16SAR-L 5' -CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'	53	620
	16SBR-H 5' -CCGGTCTGAACTCAGATCACGT -3'		
シトクローム <i>b</i>	L14317Glu 5' -CAGGATTTTAACCAGGACTAATGGCTTGAA-3'	53	390
	H15149 5' -CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'		

表2 形態学的方法と遺伝子鑑別法による交雑フグ種の同定

形態学的方法	遺伝子鑑別法 (母方の遺伝情報)	例数
トラフグ×クサフグ	トラフグ	1
トラフグ×マフグ	マフグ	2
トラフグ×シマフグ	シマフグ	1
ショウサイフグ×コモンフグ	ショウサイフグ、ゴマフグ*1	3
コモンフグ×ムシフグ	シマフグ*1	1
ショウサイフグ×ゴマフグ	ゴマフグ	1
ショウサイフグ×マフグ	ショウサイフグ	1
合計		10

*1 形態学的方法による鑑別結果と遺伝子鑑別法 (母方の遺伝情報) が一致しない事例

表3 サバフグ属種間におけるミトコンドリア DNA 塩基配列の塩基組成

種	T %	C %	A %	G %
カイユウセンニンフグ <i>L. suezensis</i>	24.82	30.30	27.82	17.05
センニンフグ <i>L. sceleratus</i> (トルコ産)	23.84	31.43	27.52	17.19
センニンフグ <i>L. sceleratus</i> (日本産)	23.84	31.42	27.58	17.14
クマサカフグ <i>L. lagocephalus</i>	25.08	30.82	27.95	16.13
シロサバフグ <i>L. wheeleri</i>	24.85	31.05	27.58	16.50
シロカナフグ <i>L. laevigatus</i>	26.71	29.05	28.10	16.12
ドクサバフグ <i>L. Lunaris</i>	24.47	30.77	28.12	16.61

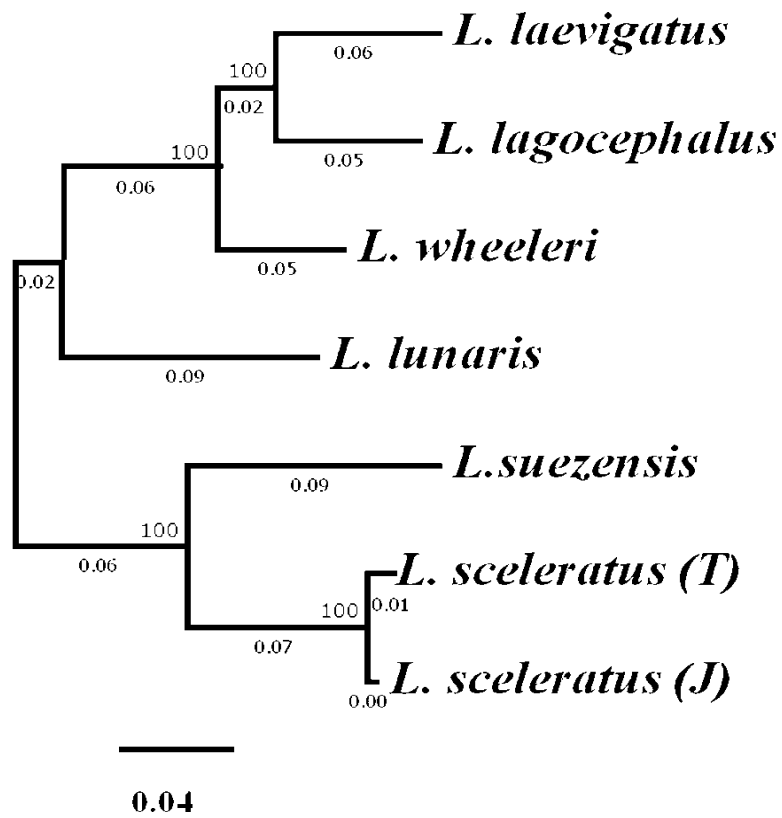


図1 近隣結合法を用いたサバフグ属ミトコンドリア DNA の分子生物学的系統樹

別添 5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
齋藤昌義, 濱田友貴, 荒川 修	第7章 食の安 全を追求する科 学	安田弘法, 中村宗一郎, 太田寛行, 橘 勝康, 生 源寺眞一 編	農学の魅力	養賢堂	東京	2013	169-195
長島裕二	コラム5 魚介毒 の化学成分と薬 理作用	篠永 哲, 野 口玉雄, 今 泉忠明, 小 川賢一 監 修	フィールド ベスト図鑑 vol. 17 危険・有毒 生物	学研	東京	2013	236
荒川 修	コラム7 動物界 におけるフグ毒 の分布	篠永 哲, 野 口玉雄, 今 泉忠明, 小 川賢一 監 修	フィールド ベスト図鑑 vol. 17 危険・有毒 生物	学研	東京	2013	238

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
H. Feroudj, T. Matsumoto, Y. Kurosu, G. Kaneko, H. Ushio, K. Suzuki, H. Kondo, I. Hirono, Y. Nagashima, S. Akimoto, K. Usui, S. Kinoshita, S. Asakawa, M. Kodama, S. Watabe	DNA microarray analysis on gene candidates possibly related to tetrodotoxin accumulation in pufferfish	Toxicon	77 巻	68-72	2013
S. Sato, Y. Takata, S. Kondo, A. Kotoda, N. Hongo, M. Kodama*	Quantitative ELISA kit for paralytic shellfish toxins coupled with sample pretreatment	<i>J. AOAC Int.</i>	97 巻	in press	2013

荒川 修	フグ類が保有する毒の分布，蓄積機構，および生理機能	日本水産学会誌	79 巻	311-314	2013
谷口香織，高尾秀樹，新名真也，山中祐二，岡田幸長，中島梨花，王 俊杰，辰野竜平，阪倉良孝，高谷智裕，荒川 修，野口玉雄	天然トラフグ肝臓の毒性分布	食品衛生雑誌	54 巻	385-391	2013
與儀健太郎，大城直雅，松田聖子，佐久川さつき，松尾敏明，安元 健	奄美大島・加計呂麻島におけるシガテラ原因魚の毒組成解析	食品衛生学雑誌	54 巻	385-391	2013
長島裕二	食品中の魚毒（フグ毒）による食中毒とその予防	食品衛生研究	63 巻 2 号	21-30	2013
長島裕二，松本拓也	フグ毒化機構解明に向けた最近の研究	Foods & Food Ingredients Journal of Japan	218 巻	266-275	2013

*印刷中のため、別刷を添付していない