

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27年度 総括・分担研究報告書
(H27-食品-一般-009)

研究代表者 長島裕二

平成28(2016)年5月

目 次

I . 総括研究報告	
マリントキシンのリスク管理に関する研究	1
長島裕二	
. 分担研究報告	
1 . コモンフグの毒性試験および食中毒調査	13
大城直雅	
2 . 東北沿岸産フグ類の毒性	18
佐藤 繁	
3 . フグの毒性評価と有毒巻貝の種判別	22
長島裕二	
4 . フグ毒検査法の見直しとパリトキシン様毒検出・定量法の開発	33
荒川 修	
5 . フグ類の分類学的研究	43
松浦啓一	
6 . フグの分類に関する研究（遺伝子解析）	48
石崎松一郎	
. 研究成果の刊行に関する一覧表	54

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」

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 学術研究院

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として、
・フグの毒性に関する調査研究、
・マリントキシン検査法に関する研究、
・フグと有毒巻貝の分類に関する研究を実施した。

・フグの毒性に関する調査研究

コモンフグが原因と疑われるフグ食中毒が発生したため、緊急課題として日本各地のコモンフグの毒性を調査した。サンプリングの都合上、凍結試料で測定した結果、筋肉の毒性が 10 MU/g を超えるものがみられた。しかし、これらの個体は皮の毒性が著しく高いこと、フグ毒は凍結・解凍によって組織間を移行することがあるので、この場合も、凍結・解凍によって毒が皮から筋肉に移行した可能性が考えられた。次年度は、活魚や鮮魚のコモンフグの毒性を調査するとともに、凍結・解凍による有毒部位から筋肉への毒の移行について検討する必要がある。また、皮の毒力が谷博士の「日本産フグの毒力表」を上回っていたため、コモンフグ皮の毒力を“猛毒”レベルに変更して、リスク管理を強化する必要がある。

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、しらす加工品に混入したフグ稚魚の種と毒性を調べた。2014 年に収集した試料では、産地によらずシロサバフグの稚魚が主で、一部ナシフグ稚魚が混入していたが、TTX 含量は定量下限値 (30 ng/g) 未満であった。しらす加工品への混入率も考え合わせると、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。しかし、しらす加工品の安全性確保のため、今後も継続して調査を続ける必要がある。

フグによる食中毒に特化した調査票（案）を作成した。倫理審査を経て厚生労働省や自治体等の関係機関の協力を得て、本調査票による食中毒調査についての試行を行い、情報の集積と解析を行う予定である。

・マリントキシン検査法に関する研究

フグ毒とパリトキシン (PTX) 様毒の検査法について検討した。フグ毒検査は、現行のマウス検定法を機器分析やイムノクロマト検査法へ移行する必要がある、まず、フグ毒抽出法を参考法と簡便法で比較した。参考法では毒の抽出が十分ではなく、毒性を過小評価していることが懸念される。抽出操作を考慮すると、毒性調査には簡便法の方が適していると判断された。機器分析の際の問題点の一つとして、試料由来の夾雑物の影響があるが、LC-MS 分析においては、適切な抽出と希釈操作を行うことにより、試料由来マトリクス存在下でも十分な精度で TTX を分析可能であることが示された。

マウス検定法に代わるフグ毒検査法として、イムノクロマト法に基づく市販の TTX rapid test kit について、検出感度、反応特異性、マトリクスの影響ならびにコモンフグ抽出液に対する検査を実施し、評価を行った。TTX 標準品では、プロトコール通りの結果が得られたが、TTX 誘導体とも反応し、トラフグ組織抽出液中のマトリクスの影響が大きいいため、フグ毒検査には課題があることがわかった。より精度の高いフグ毒検査を行うには、抗体の特異性を改善する必要がある。

PTX / PTX 様毒検出・定量法の開発に関しては、特異性や安定性、感度の点で問題はあつたものの、ラットの培養筋細胞を用い、培地に放出される酵素の活性を指標として PTX を検出・定量する系を確立することができた。本法は、さらに改良を加えていくことにより、PTX 様毒中毒の特徴である横紋筋融解を指標とした PTX 様毒検出・定量法の開発に発展する可能性がある。

・フグと有毒巻貝の分類に関する研究

フグ類の分類学的研究に関しては、日本およびインド・西太平洋のモヨウフグ属を詳細に研究した結果、新種を含む 14 種が分布していることが明らかになり、このうち日本から 12 種が記録されたことになり、日本近海のフグ類の多様性の高さが改めて明らかになった。今後、毒性調査を行い、モヨウフグ属のリスク評価をする必要がある。日本産トラフグ属の分類学的再検討によって、クサフグやコモンフグの分類学的問題があること、コモンダマシはコモンフグと同種であることが明らかになった。フグの分類は、フグ食の安全確保、フグ食中毒のリスク管理の基本となるので、さらに分類学的調査を進め、食用対象となるフグ類について整理していく必要がある。

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
石崎松一郎 東京海洋大学大学院学術研究院・准教授
大城 直雅 国立医薬品食品衛生研究所・室長
佐藤 繁 北里大学海洋生命科学部・教授
松浦 啓一 国立科学博物館・名誉研究員

A. 研究目的

食中毒を起こすフグ毒、シガテラ毒、貝毒等のマリントキシンは、人の健康危害因子として重要である。中でもフグ食中毒は、わが国の魚貝類による自然毒食中毒で最も多く発生し致死率が高い。このため、厚生労働省通知で食用可能なフグの種類、部位、漁獲海域を定め、都道府県条例等でフグ取り扱いの施設と人を制限してリスク管理しているが、近年、熱帯・亜熱帯海域に生息するドクサバフグの日本沿岸での出現と食中毒の発生、フグの高毒性化、フグ毒以外にも麻痺性貝毒やパリトキシン様毒によるフグ食中毒の発生、フグ稚仔魚の混入も食品安全にかかわる問題となっている。また、巻貝によるフグ毒中毒も散発的に発生し、フグによる食中毒とフグ毒による中毒に対するリスク管理を強化、見直す必要がある。しかしながら、その前提となるフグの毒性を調べるための現行の検査法、すなわち食品衛生検査指針理化学編に記載のマウス検定法（参考法）は、抽出操作が

煩雑で効率が悪く、この点の改良と、より正確な機器分析あるいは簡便迅速なイムノクロマト検査法を検討する必要がある。

フグの毒性は種によって著しく異なるため、フグの種判別は食中毒防止の重要管理項目である。しかしながら、フグは形態が酷似しており種を正確に判別することは難しい。これがフグ食中毒の一因となっている。その上、近年南方産フグの出現や自然交雑フグが各地で確認されるようになり、正確なフグ判別の重要性和必要性がますます高くなっている。特に、トラフグとマフグの交雑と推定されるフグは古くから知られ、混獲量も少ない。交雑フグについては、前記厚生労働省通知の中で「両親種ともに食べてもよい部位のみを可食部位とする」と定めているが、実際の毒性に関する報告例は少なく、この規定が妥当かどうか明らかでない。

巻貝に関しては、フグ毒以外にも麻痺性貝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。巻貝は魚類以上に外観などから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。

こうした状況のもと、本研究では、マリントキシンのリスク管理に資することを目的として、フグの毒性に関する調査研究、マリントキシン検査法に関する研究、フグと有毒巻貝の分類に関する研究を行った。

B. 研究方法

. フグの毒性に関する調査研究

1) コモンフグの毒性調査

2015年10月～2016年1月に有明海で採取されたコモンフグ12個体、2015年6月に山口県で採取された14個体、2015年10月に京都府、石川県、東京湾でそれぞれ採取された6個体、5個体、7個体の合計44個体は、いずれも凍結してから毒性試験に用いた。これとは別に、2015年11月に東京湾で採取されたコモンフグ鮮魚10個体も用いた。これらは、マウス検定法で毒性試験を行った。マウス試験は、所属機関の実験動物委員会等の承認を受け、動物実験等取扱規則などを順守して実施した。

瀬戸内海産コモンフグ試料（凍結試料）49個体について、筋肉のテトロドトキシン（TTX）含量をLC-MS/MS法で定量した。

2015年5～11月に岩手県大船渡魚市場に水揚げされたコモンフグ40個体（凍結試料）はHPLC-蛍光検出法で分析し、抽出液中のテトロドトキシン関連成分（TTX、4-エピTTX、4,9-アンヒドロTTX）含量を求めた。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

2014年7～9月に水揚げ、生産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、17ロットを実験に供した。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、ミトコンドリアDNA（mtDNA）による種判別を行った。

TTXの定量には、上記の種判別と同ロットに含まれる試料を用い、形態分類で同一種と判断されたフグ稚魚を複数個体合一して、TTX分析用試料とした。TTXの定量はLC-MS/MS法で行った。

3) フグ食中毒事例の調査

現在、各自治体で使用されている食中毒調査票では、自然毒食中毒に特徴的な症状を取りこぼす可能性がある。また、原因物質に対するリスク管理が適切であるか判断するためにはリスク評価が必要である。そこで、フグ食中毒のリスク評価に適した調査票の作成について検討した。

. マリントキシン検査法に関する研究

1) フグ毒抽出法の検討

トラフグ肝臓2個体を試料とし、それぞれ参考法と簡便法による測定値を比較した。参考法として、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。肝臓2個体中1個体については、試料に5倍量の0.1%酢酸を添加し、最終的に10倍量に定容する方法も実施した。一方、簡便法としては、試料に1、2、4および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および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および6）とした。いずれも連数3で調製し、HPLC-蛍光検出法でTTX量を測定した。

2) LC-MSにおける試料由来マトリクスの影響

養殖トラフグの無毒肝臓を試料とした。試料重量1に対し、0.1%酢酸重量1、2、5倍量を添加して加熱抽出し、無毒の1:1抽出液、1:2抽出液、1:5抽出液を調製した。各抽出液に既知量のTTX標品を添加して標準添加法による標準溶液10MU/mLを調製し、表示濃度を10MU/mLとした。これを0.1%酢酸で5倍、10倍、20倍に段階希釈して、表示TTX濃度2、1、0.5MU/mLの希釈溶液を調製した。以上の標準溶液と希釈溶液（連数3）につき、TTX標品の0.1%酢酸溶液を外部標準としてLC-MSでTTX量を測定し、表示濃度に対する測定値の比率を求めて回収率とした。

3) 市販TTX検査キットの評価

TTX検査キットにはTTX rapid test kit（Lot:20150716、Wuhan Unibiotest Co., Ltd.）を用い、TTX標準品は和光純薬製テトロドトキシンを用いた。テトロドトキシン（TTX）1mgを含むアンプルに0.1%酢酸溶液1mLを加えて溶解し、これをTTX標準原液とした。適宜希釈してTTX標準液を各種濃度に調製し、100μLをTTX rapid test kitに塗布した。

本キットの反応特異性を調べるため、キンシバイからTTX精製法に従って精製したoxoTTXとtrideoxyTTX、麻痺性貝毒は、National Research Council CanadaのCertified Reference Materials Programで提供されているCRM-GTX1&4-c、CRM-GTX2&3-c、CRM-dcGTX2&3-cを用いた。

マトリクスの影響を調べるため、無毒の養殖トラフグ（3歳魚、活魚）から、組織抽出液を調製し、

TTX 標準原液を組織抽出液で適宜希釈して TTX 溶液を調製した。

大船渡魚市場に水揚げされたコモフグの筋肉および肝臓の抽出液を用いて、TTX 検査キットに対する反応を検討した。

4) パリトキシン (PTX) / PTX 様毒検出・定量法の開発

SD 系ラットの下肢より骨格筋を採取し、細切、酵素処理等を経て筋芽細胞を得た。さらに、筋芽細胞を筋管細胞へ分化・成長させ、拍動能をもたせた(以後、この状態の細胞を「筋細胞」と称す)。得られた筋細胞に 1~1000 ng/mL の PTX 標品を暴露し、6~48 時間インキュベート後、経時的に光学顕微鏡にて細胞形態を観察するとともに、臨床化学自動分析装置 (アークレイ) および 乳酸脱水素酵素 (LDH) 測定キット (TaKaRa) により、それぞれ培地中に放出されたクレアチンホスホキナーゼ (CPK) および LDH の活性を測定した。

一方、2009 年沖縄県西表島で採取したイワスナギンチャク *Palythoa tuberculosa* および 2011 年 3 月に宮崎県延岡市で発生したアオブダイ中毒の原因食品残品 (肝臓および筋肉) から Noguchi ら (1987) の方法に準じて PTX / PTX 様毒試験液を調製し、PTX 標品と同様の方法で筋細胞への暴露試験を行った。

・フグと有毒巻貝の分類に関する研究

1) フグ類の分類学的研究

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とともに、魚類研究者の協力を得て新たな標本を入手した。新たに得られた標本はカラー写真を撮影した後、10%ホルマリンで固定し、70%アルコールに保存して、形態学的調査を行った。

鰭条数の計数や体表面の小棘の観察は双眼実体顕微鏡を用いて行った。内部骨格の観察が必要な場合には、軟 X 線撮影装置を用いて骨格を撮影した。

2) 遺伝子解析によるフグ種判別

試料には人工交配フグ種 (トラフグ () × マフグ () 3 個体およびトラフグ () × マフグ () 3 個体) ならびに、人工交雑種の両親、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマ

フグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 4 個体を用いた。

トラフグおよびマフグにおいて種特異的なマイクロサテライトマーカを探索することを目的に、両親種が既知である人工交雑種およびトラマの両親を対象に、計 11 個のマイクロサテライト領域を標的として PCR を行い、トラフグおよびマフグの 2 種を明確に区別しうるマイクロサテライトの選抜を行った。その後、判別に適用可能なマイクロサテライトマーカにおける PCR 条件の最適化の検討および PCR 産物の塩基配列解析に基づくマイクロサテライトの反復回数を決定したのち、最終的にトラフグ 26 個体およびマフグ 20 個体を用いて、再現性の検証を行った。さらに、自然交雑種を用いて本マイクロサテライトマーカの有効性を検証した。

3) 有毒巻貝の種判別

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、mtDNA 中の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。そのため、有毒巻貝を含む巻貝 7 科 41 種の mtDNA の 16S rRNA 領域の塩基配列情報を Gene Data Bank で調査した。塩基配列から、多くの巻貝に共通し、しかも種間の変異がみられる領域を選び、特異プライマーを設計し、PCR 条件を検討した。

試料には、エゾバイ科 9 種、テングニシ科 1 種、イトマキボラ科 1 種と市販加工品を用いた。筋肉から全ゲノム DNA を抽出し、それを鋳型にして、設計したプライマーと Ex Taq polymerase (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。

C. 研究結果

・フグの毒性に関する調査研究

1) コモフグの毒性調査

有明海産コモフグ (凍結試料) 12 個体の毒性は、皮 84~2,398 MU/g、肝臓<3~2,402 MU/g、卵巣 48~1,644 MU/g と高く、いずれも最高毒性値は“猛毒”(1,000 MU/g 以上) レベルであった。一方、筋肉は<3~98 MU/g、精巣は 5~81 MU/g で“弱毒”レベルにとどまった。筋肉の有毒個体出現率

(ここでは 10 MU/g 以上を ' 有毒 ' とする) は 58% (12 個体中 7 個体) であった。

山口県 (14 個体)、京都府 (6 個体)、石川県 (5 個体)、東京湾 (10 個体) で採取されたコモング (凍結試料) でも同様の結果が得られ、各組織の毒性値は、皮 8.0 ~ 2,290 MU/g、肝臓 < 5 ~ 1,270 MU/g、卵巣 < 5 ~ 977 MU/g、消化管 < 5 ~ 590 MU/g、筋肉 < 5 ~ 60.8 MU/g であった。筋肉の有毒個体出現率は 41% (32 個体中 13 個体) であった。精巣は 3 個体と検体数が少ないが、毒性は検出されなかった (10 MU/g 未満)。一方、凍結していない生鮮コモング (10 個体) の毒性は、卵巣 466 ~ 3,540 MU/g、肝臓 14.0 ~ 422 MU/g、皮 6.4 ~ 44.1 MU/g であったが、筋肉と精巣からは毒性は検出されなかった (5 MU/g 未満)。

瀬戸内海産コモング試料 (凍結試料) 49 個体の筋肉試料について LC-MS/MS による TTX 分析を実施した結果、< 1 ~ 34 MU/g 相当の TTX が検出された。筋肉の有毒個体出現率は 8% (49 個体中 4 個体) であった。

岩手県大船渡魚市場に水揚げされたコモング (凍結試料) 40 個体の筋肉から最高値 230 MU/g (平均値 ± 標準偏差 25.6 ± 6.1 MU/g) 相当の TTX 関連成分が検出され、筋肉の有毒個体出現率は 65% (40 個体中 26 個体) であった。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

mtDNA 16S rRNA 部分領域 (約 600 bp) の塩基配列解析の結果、15 個体はシロサバフグ *Lagocephalus spadiceus* (Accession No. AP009538) の塩基配列と 100% 一致した。一方、トラフグ属と判別された 2 個体は、16S rRNA 部分領域とシトクロム b 部分領域 (約 500 bp) の塩基配列解析から、ナシフグ *Takifugu vermicularis* と判別した。

シロサバフグと判別された試料から TTX は検出されず (10 ng/g 未満)、ナシフグと判別された試料の TTX 含量は定量下限値 (30 ng/g) 未満であった。

3) フグ食中毒事例の調査

食中毒事例を基に最小毒性量 (LOAEL) を求め、急性参照用量 (ARfD) を推定し、現行のフグ毒性値 (10 MU/g) がリスク管理として適切であるかを評価するために必要な情報として、患者の体重、原因食品の摂食量、原因食品中の TTX の濃度等が挙げられる。フグ中毒に特有な症状を把握し、臨

床像を詳細に把握するために、これらの症状を質問項目として反映させた調査票 (案) を作成した。

マリントキシシン検査法に関する研究

1) フグ毒抽出法の検討

参考法で 138 MU/g と測定された肝臓については、簡便法の測定値 (参考法の測定値に対する相対値) は 0.98 ~ 1.20 で、抽出比が高いほど高かった。参考法で 184 MU/g と測定された肝臓の場合、138 MU/g の肝臓の場合、測定値は若干高かったものの、ほぼ同様の結果が得られた。この肝臓において、試料に 5 倍量の 0.1% 酢酸を添加し、最終的に 10 倍量に定容した場合の測定値は 1.16 であった。

2) LC-MS における試料由来マトリクスの影響

各希釈倍率における回収率は、1:1 抽出液では、標準溶液 (1 倍希釈) および 5、10、20 倍希釈溶液の回収率は、それぞれ 68.4、87.7、102、98.2% で、10 倍以上の希釈率でほぼ 100% となった。1:2 抽出液でも概ね同様の結果が得られた。1:5 抽出液の場合、5 倍希釈溶液で回収率が低かったものの、その他の希釈倍率での回収率はほぼ 100% で、総じて表示濃度どおりの測定値が得られた。

3) 市販 TTX 検査キットの評価

TTX 標準液による検出限界の確認を行ったところ、目視による判断では 0.25 MU/mL あたりが検出限界であった。

次に、TTX 誘導体の反応特異性を調べたところ、oxoTTX と trideoxyTTX は、同濃度の TTX に比べ反応性は劣るが TTX 抗体と反応した。一方、麻痺性貝毒 (GTX1&4、GTX2&3、dcGTX2&3) とは反応しなかった。

次に、マトリクスの影響を無毒養殖トラフグの組織抽出液で調べた。筋肉と精巣の抽出液ではブランク (0.1% 酢酸) と同様であったが、皮、卵巣、肝臓の抽出液は「TTX 有り」の偽陽性を与えた。筋肉抽出液に TTX 標準液を添加したとき、「TTX 有りとはならず」偽陰性を示した。

コモングの筋肉および肝臓の抽出液を用いて、TTX 検査キットに対する反応を検討したが、毒性と検査キットの反応に相関がみられない例が多かった。

4) PTX / PTX 様毒検出・定量法の開発

筋細胞に PTX を暴露すると、濃度依存的な損傷が観察された。CPK については、暴露 6 時間後に濃

度依存的な上昇が認められたが、12 時間後以降は検出感度が低下し、濃度依存性も失われた。一方、LDH の場合、いずれの暴露時間でも濃度依存的な上昇が認められたが、低濃度 (100 ng PTX/mL 以下) の場合、暴露時間は 6 時間では不十分、48 時間では過剰であり、細胞試験には 12 または 24 時間が適切と判断した。PTX 濃度と LDH の間には高い正の相関がみられ、回帰式から PTX の定量が可能となった。

この回帰式からイワスナギンチャクの毒量を求めたところ、9.5 μg PTXeq/g と計算され、LC-MS/MS で測定した PTX 量 (7.0 $\mu\text{g}/\text{g}$) と概ね一致した。アオブダイ中毒を起こした食品残品の肝臓および筋肉の PTX 換算値は、それぞれ 103 および 2 ng PTXeq/g となった。

フグと有毒巻貝の分類に関する研究

1) フグ類の分類学的研究

日本およびインド・西太平洋に分布するモヨウフグ属の分類学的研究を行ったところ、新種を含む 14 種が分布することが明らかになった。また、宮崎県、鹿児島県および沖縄本島から 4 個体のモヨウフグ属を入手し、詳細に調べた結果、新種であることが明らかになった。新種はフィリピン、紅海及およびアフリカ東岸で観察されており、水中写真によって日本の個体と同種であることを確認した。

日本産トラフグ属全体の調査を進めているが、今年度はコモフグ、コモダマシおよびクサフグなどを重点的に調査した。その結果、コモフグの色彩にはかなり変異があることが明らかになった。

ロンドンの自然史博物館に保存されている *Tetrodon alboluibeus* Richardson, 1845 のタイプ標本を調べた結果、本種がクサフグであることが明らかになった。従来、クサフグの学名は *Takifugu niphobles* (Jordan and Snyder, 1901) とされていたが、この学名は *Tetrodon alboluibeus* のシノニムとなるためクサフグの学名は *Takifugu alboluibeus* (Richardson, 1845) となる。さらに、オランダ国立自然史博物館に保管されている 10 個体のコモフグ *Takifugu poecilonotus* (Temminck and Schlegel, 1850) タイプ標本を調べたところ、2 個体はクサフグである

ことが明らかになった。Boeseman (1947) がクサフグの 2 個体の一つをコモフグの Lectotype (複数のタイプ標本の一つを基準標本すること) に指定したため、国際動物命名規約によって *Takifugu poecilonotus* (Temminck and Schlegel, 1850) はクサフグ *Takifugu alboluibeus* (Richardson, 1845) のシノニムとなる。そのためコモフグは学名を失うことが判明した。

2) 遺伝子解析によるフグ種判別

人工交配フグ種トラマ (トラフグ () × マフグ ()) 3 個体およびマトラ (トラフグ () × マフグ ()) 3 個体ならびに、人工交配種の両親である単一系統のトラフグおよびマフグ、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマフグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 4 個体につき、父系種の同定に用いることができるマイクロサテライトマーカーの選抜を行った結果、GAAAG 反復配列の解析においてのみ、トラフグおよびマフグ間で電気泳動距離が異なる反復配列を示すことが認められた。人工交配フグ種を対象に、GAAAG 反復回数の普遍性を確認したところ、両親種 (トラフグとマフグ) の分子量の各位置に複数のバンドが見られたことから、反復回数 5~9 回がマフグ由来、20~25 回はトラフグ由来であると推測された。そこで、トラフグとマフグ間の自然交雑種と推測された 4 個体を用いて本マイクロサテライトマーカーの有効性を検証したところ、本法が父系種判別に適用できることを明らかにした。

3) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝特異プライマーを設計して、PCR 条件を種々検討した結果、巻貝から抽出した mtDNA 16S rRNA 部分領域 (約 350bp) を効率よく増幅する条件を決定した。その結果、巻貝生鮮品 11 種では、すべての試料で 350bp 付近に PCR 増幅が確認できた。しかし、一部の加工品では増幅されないものがあった。

塩基配列解析の結果、ほとんどは種判別が可能であったが、一部の巻貝では、データベースに登録されている塩基配列が同じであるため、判別ができないものがあることがわかった。

D. 考察

・フグの毒性に関する調査研究

1) コモンフグの毒性調査

今回供試したコモンフグは、皮、肝臓および卵巣が“猛毒”、筋肉と精巣が“弱毒”で、筋肉と皮の毒力が谷博士の「日本産フグの毒力表」を上回っていた。特に、可食部位である筋肉で、有毒個体出現率、最高毒力ともが高かったことは食品衛生上問題であり、今後、さらに検体数を増やすとともに、凍結・解凍による有毒部位から筋肉への毒の移行についても検討する必要がある。

大船渡湾産のコモンフグとヒガンフグは取り扱いが禁止されていないものの、これら2種を含め同魚市場では現在、食の安全性を確保するためトラフグを除くフグ類はすべて廃棄されている。大船渡海域に限らず、東北地方沿岸各地における有毒フグ類の分布については、今後とも研究を継続する必要がある。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

しらすへのフグ稚魚混入の実態を調査するため、2014年7~9月に日本沿岸で水揚げ、製造されたしらす加工品に混入していたフグ稚魚の種判別とTTX分析を行った。産地に関係なく、15試料がシロサバフグで、2試料がナシフグと判別された。日本近海産のシロサバフグは無毒(10 MU/g未満)とされているが、ナシフグの成魚は卵巣、肝臓、皮が“猛毒”レベル(1,000 MU/g以上)の毒性をもつことが報告されている。しかし、今回調べたナシフグ稚魚では、TTXと推定される成分は検出されたものの、TTX含量は30 ng/g未満(0.15 MU/g未満)であった。

しらす加工品へのフグ稚魚の混入率と1回に食べるしらすの量を考えると、フグ稚魚が混入したしらすを食べた場合の健康への影響はないと考えられる。しかし、フグの毒性は魚種による差ならびに個体差が大きく、卵巣が有毒な種では仔稚魚からTTXが検出される可能性があるため、今後も実態調査を継続して、しらす加工品に混入するフグの種類、毒性ならびに毒成分分析を行う必要がある。

3) フグ食中毒事例の調査

フグ毒のリスク管理状況が適切であるか検証するために必要な情報を得られるよう、フグ食中毒に特化した調査票(案)を作成した。本調査票は食中毒残品の検査結果と合わせることで、

LOAELの推定等、リスク評価やリスク管理状況の有効性について判断する基礎データが得られるものと考えられる。

・マリントキシン検査法に関する研究

1) フグ毒抽出法の検討

簡便法による測定値は、抽出比3以上で、いずれも参考法より15~20%程度高い値となった。また、最終的に10倍量に定容した場合の参考法の測定値も、5倍量に定容する本来の参考法に比べ15%程度高いことから、本来の参考法の試料残渣にはTTXが残留していることが考えられる。したがって、参考法では、添加回収試験を行い、その回収率で補正しない限り、毒性が低く評価される恐れがある。一方、簡便法は、迅速に、かつ真の値により近い測定値が得られる方法と考えられる。

LC-MSにおける試料由来マトリクスの影響は、低抽出比の試料では大きく、可能な限り希釈した試料を分析することが望ましい。マトリクスの影響を避けるには、分析部位の性質、抽出比と質量分析計の検出感度に応じた希釈が必要であろう。

2) 市販 TTX 検査キットの評価

TTX標準品で得られる検出限界は0.25~0.5 MU/mL程度で、製造者が推奨する基準値(検出限界:1 MU/mL、陽性:1 MU/mL、陰性:0.25 MU/mL)を確認できた。本検査キットは、TTX誘導体のoxoTTXやtrideoxyTTXと反応したため、他のTTX誘導体との反応性も調べる必要があるが、各誘導体を単離することが難しい。フグ毒の検査において、広くTTX誘導体を検出できることは、安全性確保の観点からは有利であるが、5,6,11-trideoxyTTXのような毒性の低い成分が多量に混在している場合には、毒性を過大に評価してしまうことになる。

今回、実試料での測定を想定して、TTX標準液を無毒養殖トラフグの組織抽出液で希釈したところ、抽出液だけでTTX有りと判定される擬陽性、反対に、TTXが添加されているにもかかわらず、TTX無しと判定される擬陰性の現象が観察されたことから、抽出液中のマトリクスの影響が大きく、本TTX検査キットは、フグ毒検査の実用性に問題があることがわかった。

3) PTX / PTX 様毒検出・定量法の開発

筋細胞の損傷に伴い培地中に放出される酵素の

活性を指標とした PTX の検出・定量法について検討した。その結果、PTX 濃度と CPK および LDH の活性の間には、高い正の相関がみられ、加えて PTX を含む実際の生物試料（イワスナギンチャク）から PTX を検出・定量することができた。特異性や安定性、感度等を考慮しながら、さらに改良を加えれば、ng レベルの PTX の検出・定量が可能になるものと思われる。

・フグと有毒巻貝の分類に関する研究

1) フグ類の分類学的研究

モヨウフグ属魚類の分類学的再検討の過程で新種が発見された。モヨウフグ属の形態的特徴を詳細に検討した結果、分類に最も有効な形質は体色であることが明らかになった。この結果に基づいてモヨウフグ属の同定を行うため検索表を作成した。

日本産トラフグ属の分類学的再検討によって、日本の沿岸でごく普通に見られるクサフグとコモフグには学名をめぐる問題点があることが明らかになった。この事実は、従来の分類学的研究には問題点が多く残っており、普通種であっても慎重に研究する必要があることを示すとともに、水産ならびに食品衛生の現場に混乱を与えないように、正確な情報の伝達と周知、啓蒙が必要となる。

2) 遺伝子解析によるフグ種判別

今回、トラフグおよびマフグ間に焦点を絞り、GAAAG マーカーを用いた核 DNA による父系種同定法の構築を試みた結果、新たに核 DNA による GAAAG 反復配列の回数之差から父系種同定が可能であることが示された。このマイクロサテライト領域は、人工交配種すべてにおいて、トラフグ由来の 194 ~ 209 bp (反復回数 20 ~ 25 回) およびマフグ由来の 125 ~ 145 bp (反復回数 5 ~ 9 回) の PCR 産物が得られ、保存性が高く普遍的であることが確認された。また、市場に流通しているトラフグ 26 個体中 20 個体 (77%)、マフグ 20 個体中 14 個体 (70%) で、上述した分子量の PCR 産物が得られた。すなわち、流通しているトラフグおよびマフグが 100% ではなく、70 ~ 77% 程度の再現性を示していたころから、市販されているフグの一部が必ずしも単一系統ではない可能性が考えられ、フグの自然交雑が広く進んでいるのかもしれない。今後、他のトラフグ属あるいはサバフグ属においても GAAAG

がマーカーとして有効か検証する必要がある。

3) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝の生鮮品については、本研究で確立した PCR 条件で増幅できることが明らかになった。しかし、レトルトや缶詰製品の一部で PCR 増幅されないものがあった。これは殺菌加熱で、試料中の DNA が断片化したためと推測される。この対策としては、断片化した DNA でも PCR 増幅できるプライマーを設計する必要がある。また、今回目的とした 16S rRNA 領域の部分塩基配列が完全に一致する巻貝については、別の遺伝子領域を新たに検討する必要がある。

E. 結論

・フグの毒性に関する調査研究

フグ類の安全性の確保に資することを目的として、日本各地で採取されたコモフグの毒性を調査した。今年度は、サンプリングの都合上、主に凍結試料で測定したところ、筋肉が有毒 (10 MU/g 以上) のものがみられた。また、皮の毒力が谷博士の「日本産フグの毒力表」を上回っていたため、皮の毒力を「猛毒」レベルに変更して、リスク管理を強化する必要がある。今後、さらに検体数を増やしてコモフグ毒性の実態調査を継続するとともに、凍結・解凍による有毒部位から筋肉への毒の移行についても検討する必要がある。

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、しらす加工品に混入したフグ稚魚の種と毒性を調べた。2014 年に収集した試料では、産地によらずシロサバフグの稚魚が主で、これらシロサバフグ稚魚から TTX は検出されなかった (10 ng/g 未満)。一部ナシフグ稚魚が混入していたが、TTX 含量は定量下限値 (30 ng/g) 未満であった。しらす加工品への混入率も考え合わせると、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。しかし、しらす加工品の安全性確保のため、今後も継続して調査を続ける必要がある。

フグによる食中毒に特化した調査票 (案) を作成した。倫理審査を経て厚生労働省や自治体等の関係機関の協力を得て、本調査票による食中毒調査についての試行を行い情報の集積と解析を行う予定である。

・マリントキシン検査法に関する研究

フグ毒抽出法を検討した結果、参考法の試料残渣には TTX が残留しており、毒性が実際より低く評価される恐れがある。これに対し、簡便法は、迅速かつ真の値により近い測定値が得られる方法であり、リスク管理の前提となる毒性調査には、簡便法の方が適していると判断された。一方、生物試験から機器分析に移行する際の問題点の一つとして、試料由来の夾雑物の影響がある。しかしながら、LC-MS 分析においては、適切な抽出・希釈操作を行うことにより、試料由来マトリクス存在下でも十分な精度で TTX を分析可能であることが示された。

マウス検定法に代わるフグ毒検査法として、イムノクロマト法に基づく市販の TTX rapid test kit について、検出感度、反応特異性、マトリクスの影響ならびにコモンフグ抽出液に対する検査を実施し、評価を行った。TTX 標準品では、プロトコール通りの結果が得られたが、TTX 誘導体とも反応し、トラフグ組織抽出液中のマトリクスの影響が大きいため、フグ毒検査には課題があることがわかった。より精度の高いフグ毒検査を行うには、抗体の特異性を改善する必要がある。

PTX / PTX 様毒検出・定量法の開発に関しては、特異性や安定性、感度の点で問題はあつたものの、ラットの培養筋細胞を用い、培地に放出される酵素の活性を指標として PTX を検出・定量する系を確立することができた。本法は、さらに改良を加えていくことにより、PTX 様毒中毒の特徴である横紋筋融解を指標とした PTX 様毒検出・定量法の開発に発展する可能性がある。

・フグと有毒巻貝の分類に関する研究

フグ類の分類学的研究に関しては、日本およびインド・西太平洋のモヨウフグ属を詳細に研究した結果、新種を含む 14 種が分布していることが明らかになった。14 種のうち日本から 12 種が記録されたことになり、日本近海のフグ類の多様性の高さが改めて明らかになった。日本産トラフグ属の分類学的再検討によって普通種のクサフグやコモンフグの分類学的問題が明らかとなった。さらに、コモンダマシはコモンフグと同種であることも明らかになった。フグの分類は、フグ食の安全確保、フグ食中毒のリスク管理の基本となるので、今後、

食用種を多く含むトラフグ属の分類学的調査を進める必要がある。

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。父系種に関しては、トラフグおよびマフグからなる交雑種においては GAAAG 反復配列から推定できる可能性が示唆された。本 GAAAG マーカーが、その他の交雑種にも適用できるかどうか追試を行うとともに、他のマイクロサテライト領域の有用性も検討する必要がある。

わが国では、毎年巻貝による自然毒食中毒が発生しているため、食中毒原因食品の特定と食中毒防止のため、遺伝子による有毒巻貝の正確な種判別法の開発が望まれている。巻貝特異プライマーを設計し、PCR 条件を検討し、ダイレクトシーケンス法による種判別を試みた。試料に用いた 11 種巻貝の mtDNA 16SrRNA 部分領域は効率よく増幅し、ダイレクトシーケンス法で解析した塩基配列から種の判別が可能であった。しかし、加熱殺菌された製品では DNA が断片化しているため PCR 増幅できないものがあつた。さらに、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、実用化するには改善の余地がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Biliary excretion of tetrodotoxin in the cultured pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. *Toxicon* 2015; 93: 98-102.
- 2) H. Lin, C. Zhang, J. Liao, F. Yang, S. Zhong, P. Jiang, X. Chen, Y. Nagashima: Neutralizing effect of hemolymph from the shore crab, *Thalamita crenata*, on paralytic shellfish toxins. *Toxicon* 2015; 99: 51-57.
- 3) 長島裕二：フグ肝臓におけるフグ毒蓄積タンパク質 . 日本水産学会誌 2015; 81: 736.

- 4) 佐藤 繁：麻痺性貝毒の生物化学的変換に基づいた簡易分析法の開発. 日本水産学会誌 2015; 81: 792-795.
- 5) 松浦啓一：1. 日本沿岸に見られるフグ類の分類. ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保-日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌 2016; 82: 166.
- 6) 高谷智裕, 荒川 修, 鈴木重則, 望岡典隆：2. 交雑フグの毒性. ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保-日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌 2016; 82: 167.
- 7) 大城直雅：3. 沖縄地区のフグの毒性. ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保-日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌 2016; 82: 168.
- 8) 佐藤 繁：4. 東北地区のフグの毒性. ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保-日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌 2016; 82: 169.
- 9) 大城直雅：下痢性貝毒（オカダ酸群）検査法. 食品衛生研究 2015; 65(4): 29-36.
- 10) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止(第8回). モヨウフグ・ホシフグ. 食と健康 2015; 59(4): 30-31.
- 11) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止(第9回). コクテンフグ・ケショウフグ. 食と健康 2015; 59(5): 28-29.
- 12) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止(第10回). センニンフグ・カイユウセンニンフグ. 食と健康 2015; 59(6): 28-29.
- 13) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止(第11回). キタマクラ・サザナミフグ. 食と健康 2015; 59(7): 28-29.
- 14) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止(第12回). クロサバフグ・クマサカフグ. 食と健康 2015; 59(8): 28-29.
- 15) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止(第13回). カスミフグ・スジモヨウフグ. 食と健康 2015; 59(9): 36-37.
- 16) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止(第14回). カナフグ・ヨリトフグ. 食と健康 2015; 59(10): 28-29.
- 17) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止(第15回). ミゾレフグ・ワモンフグ. 食と健康 2015; 59(11): 28-29.
- 18) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止(第16回). アラレフグ・ナガレモヨウフグ. 食と健康 2015; 59(12): 38-39.
- 19) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止(第17回). シマキンチャクフグ・タキフグ. 食と健康 2016; 60(1): 48-49.
- 20) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止(第18回). シッポウフグ・アマミホシゾラフグ. 食と健康 2016; 60(2): 30-31.
- 21) 佐藤 繁, 松浦啓一：フグを知って中毒防止(第19回). シボリキンチャクフグ・ナミダフグ. 食と健康 2016; 60(3): 30-31.
- 24) 桐明 絢, 太田 明, 岡山桜子, 松浦啓一, 石崎松一郎, 長島裕二：しらす加工品に混入したフグ稚魚の種判別と毒性. 食品衛生学雑誌 2016; 57:13-18.
- 25) K. Matsuura: A new pufferfish, *Arothron multilineatus* (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae), from the Indo-West Pacific. Ichthyological Research 2016; 63: in press.
- 26) E. Katayama, K. Matsuura: Fine structures of scales of ocean sunfishes (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Molidae): another morphological character supporting phylogenetic relationships of the molid genera. Bulletin of National Museum of Nature and Science, Ser. A 2016; 41: in press.

2. 書籍・総説

- 1) K. Matsuura: Tetraodontiformes. In: S. Kimura, A. Arshad, H. Imamura, M. A. Ghaffar (eds.), Fishes of the Northwestern Johor Strait, Peninsular Malaysia. University Putra Malaysia Press and Mie University, Japan, 2015; pp. 98-105.
- 2) 長島裕二：自然毒. 魚介の科学, 阿部宏喜編, 朝倉書店, 東京, 2015; pp. 185-196.
- 3) 長島裕二, 松本拓也：フグ毒テトロドトキシンの体内動態解析：トラフグを用いた毒化モデル実験. LABIO 21 2015; No. 62: 24-27.
- 4) 長島裕二：フグと食中毒. 中学保健体育科ニュー

ース, 大修館書店, 2015; No.4: 2-5.

- 5) 石崎松一郎, 臼井芽衣 (2016): フグの分類 - 最前線 -. Sunatec e-Magazine 2016; 120 (1).

3. 学会発表

- 1) 桐明 絢, 太田 明, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性. 第 109 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 5 月, 東京都江東区.
- 2) 桐明 絢, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の種同定と毒性. 第 25 回西日本ふく研究会, 2015 年 5 月, 山口県下関市.
- 3) 桐明 絢, 塩見一雄, 長島裕二: アイゴ類刺毒の一次構造 アイゴの刺毒はカサゴ目魚類刺毒と共通の構造をもつ. 第 29 回海洋生物活性談話会, 2015 年 5 月, 静岡県下田市.
- 4) 長島裕二: しらす干しフグ稚魚の混入. しらす干しフグ稚魚混入危機管理等における意見交換会, 2015 年 7 月, 東京都中央区.
- 5) 長島裕二: 海洋動物の毒. 第 37 回日本中毒学会総会・学術集会, 2015 年 7 月, 和歌山県和歌山市.
- 6) K. Okita, H. Satone, E. Tan, S. Kinoshita, S. Asakawa, H. Yamazaki, K. Sakiyama, T. Takatani, O. Arakawa, A. Hagiwara, Y. Sakakura: Transcriptome analysis of tetrodotoxin sensing and action of tetrodotoxin in the brain of tiger puffer *Takifugu rubripes* by next-generation sequencing. 145th Annual Meeting of American Fisheries Society, August 2015, Portland, USA.
- 7) A. Kiriake, Y. Nagashima, K. Shiomi: Primary structure of a proteinaceous toxin from rabbitfish *Siganus fuscescens*. Spgtember 2015, 18th Congress of the International Society on Toxinology, London, United Kingdom.
- 8) 松浦啓一: 日本沿岸に見られるフグの分類. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム フグ食の安全性確保-日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 2015 年 9 月, 宮城県仙台市.
- 9) 高谷智裕, 荒川 修, 鈴木重則, 望岡典隆: 交

雑フグの毒性. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム フグ食の安全性確保 - 日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 2015 年 9 月, 宮城県仙台市.

- 10) 大城直雅: 沖縄地区のフグの毒性. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム フグ食の安全性確保 日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 2015 年 9 月, 宮城県仙台市.
- 11) 佐藤 繁: 東北地区のフグの毒性. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム フグ食の安全性確保 日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 2015 年 9 月, 宮城県仙台市.
- 12) 臼井芽衣, 石崎松一郎, 長島裕二: マイクロサテライト遺伝子座を用いた交雑フグ種の両親種同定. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会, 2015 年 9 月, 宮城県仙台市.
- 13) 桐明 絢, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の遺伝子による種判別. 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 10 月, 京都府京都市.
- 14) 岡山桜子, 桐明 絢, 永井 慎, 石崎松一郎, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬け製造工程における毒成分変化. 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 10 月, 京都府京都市.
- 15) C. Urata, S. Jiang, K. Kuwano, T. Takatani, O. Arakawa: Growth and kainic acid production of the red alga *Digenea simplex* cultured under monowavelength light irradiation. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, November 2015, Jeju, Korea.
- 18) Y. Kanahara, R. Tatsuno, K. Soyano, T. Takatani, O. Arakawa: Maturation-associated changes in the internal distribution of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu pardalis*. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, November 2015, Jeju, Korea.
- 19) W. Gao, R. Tatsuno, K. Yamaguchi, T. Takatani, O. Arakawa: Expression of PSTBP homologues in several pufferfish species. 10th International Workshop on the

Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, November 2015. Jeju, Korea.

- 20) 長島裕二：しらすへのフグ稚魚の混入．しらすへのフグ稚魚混入に関する講演会，2016年3月，東京都中央区．
- 21) 大木理恵子，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の毒性とフグ毒成分．平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区．
- 22) 桐明 絢，太田 明，岡山桜子，松浦啓一，石崎松一郎，長島裕二：しらすへのフグ稚魚の混入 種判別とフグ毒分析．平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区．
- 23) 北島冴美，角川峻徳，松本拓也，長島裕二：次世代シーケンスアーカイブを用いたトラフグ肝臓薬物排泄トランスポーターのクロニング．平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区．
- 24) 角川峻徳，北島冴美，松本拓也，長島裕二：次世代シーケンスデータベースを用いたトラフグ肝臓有機イオントランスポーターのクロニングの試み．平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区．
- 25) 辰野竜平，識名美和子，古下 学，山口健一，高谷智裕，荒川 修：ツムギハゼ卵巣におけるTTX結合性物質の探索．平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区．
- 26) 金原葉子，辰野竜平，征矢野清，高谷智裕，荒川 修：ヒガンフグ体内TTX分布の性成熟に伴う変化．平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区．
- 27) 池北侑人，姜 珊珊，市丸俊一，高増 剛，荒川 修，高谷智裕：長崎県九十九島におけるヒオウギガイの麻痺性貝毒による毒化．平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区．
- 28) 高 威，辰野竜平，山口健一，高谷智裕，荒川 修：数種フグにおけるPSTBP相同タンパク質アイソフォーム群の探索．平成28年度日本水産学会春季大会，2016年3月，東京都港区．

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 27 年度分担研究報告書

コモンフグの毒性試験および食中毒調査

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	國吉 杏子	国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者	堀田 彩乃	明治薬科大学
協力研究者	鈴木 貴文	明治薬科大学
協力研究者	松浦 啓一	国立科学博物館科学博物館
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	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	安西 洋一	広島市健康福祉局保健部食品保健課
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

コモンフグ筋肉は食用部位とされているが、三陸の 3 海域については有毒個体があることが確認されており、食用不可となっている。その他の海域におけるコモンフグの毒性を調査し、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。蒐集したコモンフグ 102 個体について、外部形態による同定後、mtDNA の COI 領域の解析に供した。また、49 個体の筋肉試料について LC-MS/MS による TTX 分析を実施し、その結果 45 個体が無毒（10 MU/g 未満）であったが、4 個体が弱毒（13～34 MU/g）であった。これらの試料は鮮度が落ちていたものや、凍結融解後に腑分けを行ったもので、皮からの移行が考えられた。これらの要因については引き続き検討する予定である。

フグ食中毒が発生した際に、特有な症状を正確に把握し、LOAEL を求め ARfD を推定するために必要な情報を集積することを目的とした、フグ食中毒調査票（案）を作成した。倫理審査を経たのちに本調査票の試行を行う予定である。

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フ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フ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、コモンフグは筋肉だけが食用可能

で、その他の部位（皮、精巣、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フグであった（登田ら、2012）。多くの事例において、コモンフ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フグ（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、コモンフグの毒性評価について緊急に対応する必要があるため、コモンフグの毒性調査を実施した。

上述のとおり、フグ毒のリスク管理については通知によりなされているが、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、70年以上も経過している。現行のリスク管理が適切であるか評価するためには、実際に発生した食中毒事件を検証する必要がある。そのためにはまず、食中毒事件のデータを集積し、フグ毒の最小毒性量 (LOAEL) を求め、急性参照用量 (ARfD) を推定する必要がある。また、フグによる食中毒の臨床像を正確にとらえるために、これらの必要な情報を把握できる、食中毒調査票を作成し、実際の事例において活用する事を目的とした。

B. 研究方法

1) コモンフグの毒性試験

供試試料

瀬戸内海産コモンフグ試料 102 個体について仲買業者を通じて蒐集した。試料は冷蔵で搬入され、試料の一部は国立科学博物館および鹿児島大学総合研究博物館に標本として保管された。試料搬入後、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外部形態による同定を行った。

画像撮影した試料は、皮、肝臓、筋肉、その他内臓に腑分けし、分析に供するまで-30 で保管した。またその際に、ミトコンドリア DNA

(mtDNA) 解析用として筋肉試料 50 mg 程度を採取し、-30 で保存した。翌日までに処理できないものについては-30 で保存し、流水中で融解した後、腑分けした。

TTX の LC-MS/MS 分析

筋肉試料について、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、試料 2 g に 0.1 % 酢酸 8 mL を加え、ホモジナイズ(11,000 rpm、1 秒×10 回)をした後に沸騰水浴中で 10 分間加熱した。放冷後、遠心分離(13,400 × g、15 分)し、上清を回収し、抽出液(5 mL)とした。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。ろ液に、アセトニトリルが 50% になるようにアセトニトリルを加え攪拌後に PVDF 膜でろ過(0.2 μm)したものを測定溶液とし、以下の条件で LC-MS/MS 分析した。

【LC 部】

装置 : Agilent 1290 Infinity、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)、移動相 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

表 1 . COI 領域の塩基配列解析に用いたプライマー

増幅用プライマー

VF2_t1: **TGTA AAAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC**
 FishF2_t1: **TGTA AAAACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC**
 FishR2_t1: **CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA**
 FR1d_t1: **CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA**

シーケンス用プライマー

M13 F **TGTA AAAACGACGGCCAGT**
 M13 R **CAGGAAACAGCTATGAC**

表 2 . PCR 反応液の組成

TaKaRa Premix Taq	12.5	μL
VF2_t1 (5 μM)	0.75	μL
FishF2_t1 (5 μM)	0.75	μL
FishR2_t1 (5 μM)	0.75	μL
FR1d_t1 (5 μM)	0.75	μL
テンプレート DNA	9.5	μL
合計	25	μL

表 3 . サーマルサイクラーの設定

98	120 秒	} 30 サイクル
94	30 秒	
55	40 秒	
72	60 秒	

温度：45℃、流速：0.5 mL/min、注入量：5 µL。

【MS 部】

装置：Agilent 6460 Triple Quad LC/MS、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。

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 とし毒性換算し、以下のとおり評価した。

10 MU/g 未満：	無毒
10 MU/g 以上、100 MU/g 未満：	弱毒
100 MU/g 以上、1000 MU/g 未満：	強毒
1000 MU/g 以上：	猛毒

mtDNA 解析

滅菌済みメスを用いて、細切した試料(筋肉) 20~25 mg を、1.5 mL エッペンチューブに採取した。採取した試料からのテンプレート DNA の調製は、シカジーニアス DNA プレップキット(血液&組織用、関東化学)を用いて添付文書に従って処理した。

解析の対象領域は mtDNA の cytochrome c oxidase subunit I (COI) 領域とし、増幅用のプライマーセットとして、VF2_t1、FishF2_t1、FishR2_t1 および、FR1d_t1 を使用した(表 1)。PCR の反応液は表 2 に示した組成で調製し、表 3 の条件で PCR を行った。PCR 産物(650 bp 程度)はアガロースゲル(1%)電気泳動で確認した。PCR 産物 20 µL に ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix/USB 社) 4 µL を加え、37℃ 30 分間で酵素処理した後、85℃ 15 分間で酵素を不活化した後、4℃ で保存した。この PCR 産物 0.75 µL、シーケンス用のプライマーセット M13F および M13R を各 0.65 µL、水 12.61 µL の計 15 µL に調製したものを解析に供した。

2) フグ食中毒事例の調査

現在、各自治体で使用されている食中毒調査票では、自然毒食中毒に特徴的な症状を取りこぼす可能性がある。また、原因物質に対するリスク管理が適切であるか判断するためにはリスク評価

が必要であり、そのために必要な情報を収集するためにフグ食中毒に特化した調査票の作成について検討した。

C. 研究結果

1) コモンフグの毒性試験

蒐集したフグ試料は102個体で、画像を基に確認した外部形態はすべての個体がコモンフグの特徴を示していた(図 1)。そのうち、3個体を国立科学博物館、2個体を鹿児島大学総合研究博物館に送付し、標本として保管されている。

筋肉試料85個体について、COI領域の増幅とDNA塩基配列の解析が終了した。得られた配列の詳細な解析と種同定については、次年度実施する予定である。

蒐集したコモンフグ試料 102 個体のうち、49 個体筋肉試料について LC-MS/MS による TTX 分析を実施した。その結果、無毒が 45 個体、弱毒が 4 個体(13~34 MU/g)であった。無毒試料のうち、33 個体は 1 MU/g 未満で、12 個体が 1 MU/g 以上 10 MU/g 未満であった。



図 1 .分析に供したコモンフグ(NIHS-puf-150021、KAUMI80923、撮影：本村浩之 鹿児島大学教授)

2) フグ食中毒事例の調査

現在、フグ毒のリスク管理としては 10 MU/g 未満を無毒と認識されている。谷(1945)はフグ毒による死亡事例が 10,000 MU 程度の摂取により発生していることから、10 MU/g 未満の場合は 1 kg 以上を喫食しなければ致死性は示さないとの判断で 10 MU/g を無毒としている。

現行のフグ毒のリスク管理状況を評価するためにはまず、フグ毒のリスク評価が必要である。すなわち、実際の食中毒事例を基に LOAEL を求め、ARfD を推定し、現行のリスク管理(10 MU/g 未満)が適切であるか評価する。そのために必要な情報として、患者の体重、原因食品の摂取量、原因食品中の TTX の濃度等が挙げられる。また、フグ中毒に特有な症状を把握し、臨床像を詳細に把握するために、これらの症状を質問項目として

反映させた調査票（案）を作成した（別紙 1）。

D. 考察

1) コモンフグの毒性試験

コモンフグ筋肉試料 49 個体中、4 個体が弱毒（13～34 MU/g）であった。弱毒であった 4 個体のうち、34 MU/g と最も毒性が高かった 1 個体（NIHS-puf-150040、体重 300 g、標準体長 200 mm）は、鮮度が悪く標品の紋様がかすれ気味で、ヒレの一部が欠落していた。また、他の 3 個体（NIHS-puf-150051、150052、150054、13～16 MU/g）については、冷蔵状態で搬入後、ただちに腑分けができなかったため、-30℃で保存し、流水で解凍してから腑分けをした。

瀬戸内海産コモンフグ筋肉は、ほとんどの個体は無毒であり、その多くが 1 MU/g 未満であった。弱毒の TTX が検出された個体は、鮮度が落ちているものと腑分け前に凍結融解をしたものであった。コモンフグの皮は強毒（100 MU/g 以上 1,000 MU/g 未満）をもつことが知られており、食用不適とされている。このことから、鮮度の悪くなった個体や、腑分け前に凍結融解を行った個体において、TTX が皮から移行したことが考えられた。その可能性を検討するために、来年度は皮の TTX 分析を実施する予定である。また、凍結保存している弱毒個体の筋肉について、身体の上層部と中心部の TTX 分析を実施し、TTX 含量の違いについて確認を行う予定である。さらに、フグの毒性は地域変動、季節変動等があるため、引き続きコモンフグの蒐集し、毒性について検討する予定である。

2) フグ食中毒事例の調査

フグ毒のリスク管理状況が適切であるか検証するために必要な情報を得られるよう、フグの食中毒に特化した調査票（案）を作成した。本調査票は食中毒残品の検査結果と合わせることで、LOAEL の推定等、リスク評価やリスク管理状況の有効性について判断する基礎データが得られるものと考えられる。来年度は、倫理審査委員会での承認を得たのちに、自治体の協力を得て、

実証性について検討する予定である。

E. 結論

瀬戸内海産コモンフグ 102 個体を蒐集し、そのうち 49 個体の筋肉について、LC-MS/MS 法による TTX の定量分析を実施した。ほとんどの個体が無毒であったが、4 個体が弱毒であった。これら 4 個体については、皮からの移行の可能性が示唆されたため、その要因について引き続き検討を行う予定である。

フグによる食中毒に特化した調査票（案）を作成した。倫理審査を経て厚生労働省監視安全課や自治体等の関係機関の協力を得て、本調査票による食中毒調査についての試行を行い情報の集積と解析について検討したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 著書、論文発表

- 1) 大城直雅: 下痢性貝毒（オカダ酸群）検査法. 食品衛生研究 65(4): 29-36, 2015.
- 2) 大城直雅: 3. 沖縄地区のフグの毒性. ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保 日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌, 82, 168 (2016).

学会発表

- 1) 大城直雅: 沖縄地区のフグの毒性. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム「フグ食の安全性確保 日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し」, 宮城県仙台市, 平成 27 年 9 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

フグ中毒調査票

都道府県 市町村				調査票 番号			
性別	<input type="checkbox"/> 男	<input type="checkbox"/> 女	年齢(歳)			調査日	年 月 日
喫食日時	年 月 日	時 分			身長(cm)		体重(kg)
発症日時	年 月 日	時 分			現病歴	<input type="checkbox"/> 腎機能疾患 <input type="checkbox"/> 糖尿病 <input type="checkbox"/> その他 ()	
初発症状				入院	<input type="checkbox"/> 有	日間	<input type="checkbox"/> 無
				血圧	/		心拍数
● 症状について							
症状				発症の有無		発症の順番	
【神経症状】							
口唇、舌のしびれ、知覚障害				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
指先のしびれ、知覚障害				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
四肢の知覚障害				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
軽度の運動麻痺				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
全身の運動障害				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
深部腱反射消失				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
発声不能				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
呼吸困難				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
胸内苦悶				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
呼吸筋麻痺				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
意識障害				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
瞳孔散大				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
対光反射の消失				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
呂律が廻らない				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
【消化器症状】							
吐気				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
嘔吐(重症度Ⅲ度) 「あり」と答えた場合：1日 _____ 回				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
下痢 「あり」と答えた場合： <input type="checkbox"/> 水様 <input type="checkbox"/> 粘液 <input type="checkbox"/> 混血				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
【その他症状】							
頭痛				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
倦怠感				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
脱力感				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
震え				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
チアノーゼ				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
発熱 「あり」と答えた場合： _____ 最大 _____ °C				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
その他 「あり」と答えた場合： ()				<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし			
● 原因食品について							
食品	(魚種)	<input type="checkbox"/> 魚種 () <input type="checkbox"/> 不明					
	(同定法)	<input type="checkbox"/> 患者証言 <input type="checkbox"/> 外部形態 (<input type="checkbox"/> 残品から <input type="checkbox"/> 写真から) <input type="checkbox"/> 遺伝子解析					
	(大きさ)	<input type="checkbox"/> その他 () 特記事項 ()					
捕獲場所		喫食場所					
入手方法		<input type="checkbox"/> 購入(<input type="checkbox"/> 自分で <input type="checkbox"/> 家族が <input type="checkbox"/> 知人等が) <input type="checkbox"/> 釣った(<input type="checkbox"/> 自分で <input type="checkbox"/> 家族が <input type="checkbox"/> 知人等が) <input type="checkbox"/> 飲食店で喫食 <input type="checkbox"/> 購入等の場合、フグ取扱資格 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 不明					
喫食量 (g、数量等)		g		刺身の場合 切れ	煮付等の肉 親指大 個 半身の /	汁物の場合 汁椀 杯 井 杯	
残品		<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無					
喫食部位 (複数可)		<input type="checkbox"/> 頭部 <input type="checkbox"/> 身 <input type="checkbox"/> 皮 <input type="checkbox"/> 肝臓 <input type="checkbox"/> 卵巣 <input type="checkbox"/> 白子 <input type="checkbox"/> ヒレ <input type="checkbox"/> その他 () <input type="checkbox"/> 不明					
調理方法 (複数可)		<input type="checkbox"/> 刺身 <input type="checkbox"/> 鍋 <input type="checkbox"/> しゃぶしゃぶ <input type="checkbox"/> 唐揚 <input type="checkbox"/> その他 ()					
その他、特記事項							

厚生労働省科学研究費補助金（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 27 年度分担研究報告書

東北沿岸産フグ類の毒性

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、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近年、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。いっぽう、Kodama et al. (1984)は、三陸沿岸で漁獲されるコモン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の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東北沿岸で漁獲されたマフグ、コモンフグ、ゴマフグ、ショウサイフグの 4 種のフグにつき、部位ごとの毒性を調査した。

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たフグ類の毒性を精力的に調査し、毒を高濃度に蓄積する部位が種ごとに異なることを明らかにした。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。

フグ類の毒性は産地によって大きな違いがあるものと考えられている。Kodama et al. (1984)は三陸沿岸で漁獲されるヒガンフグ *Takifugu pardalis* およびコモンフグ *T. poecilonotus* は、肉が 100 MU/g を超える高い毒性を示す個体が高頻度で出現することを報告している。この結果に基づき現在、岩手県釜石湾、同県越喜来湾、宮城県雄勝湾産のコモンフグとヒガンフグは市場での取扱いが禁止されている。これまで東北地方の沿岸部で漁獲されたフグはほとんど利用されず、雑魚として廃棄されてきた。しかし近年、未利用資源の活用を目的として、東北の一部地域では地元産のフグ類を特産品として売り出そうとする動きがある。本研究は Kodama et al. (1984)の

調査から 30 年以上が経過した現時点での、三陸沿岸で漁獲されるフグ類の毒性を調査したものである。

B. 研究方法

(1) 試料

2015 年 5~11 月に岩手県大船渡魚市場に水揚げされたマフグ 36 個体(BW: 430.7 ± 47.3g, TL: 263.1 ± 10.5mm)、ゴマフグ 30 個体(BW: 502.0 ± 28.0g, TL: 302.0 ± 6.6mm)、ショウサイフグ 12 個体(BW: 202.8 ± 22.0g, TL: 226.7 ± 9.6mm)、コモンフグ 40 個体(BW: 163.0 ± 10.5g, TL: 199.4 ± 4.3mm)を試料とした。これら試料は個体ごとに梱包したのち凍結状態で相模原キャンパスに搬入し試験に供するまで - 80 で凍結保存した。

(2) 検液の調製

試料のフグを半解凍状態で肉、皮、肝臓、消化管ならびに生殖腺の 5 部位に分け、4 倍量の 0.1% 酢酸を加えてホモジナイズした後、沸騰浴中で 5 分間熱浸した。得た熱浸ホモジネートを氷冷し、0.1%酢酸で元試料の 5 倍量となるように定容して攪拌し、ろ紙上ろ過して検液を作製した。生殖腺は区別できるものは卵巣と精巣に分けて分析

した。

(3) 毒の分析

抽出液の一部を 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、抽出液中のテトロドトキシン関連成分 (TTXs)、すなわちテトロドトキシン (TTX)、4-エピ-テトロドトキシン (4epiTTX) ならびに 4,9-アンヒドロテトロドトキシン (anhTTX) 含量を求めた。抽出液中の麻痺性貝毒 (PSPs) 含量を Sato et al. (2014) に従って ELISA (SKit, 新日本検定協会製) で分析した。HPLC 法で得た検液中の TTX、4epiTTX および anhTTX の濃度を、それぞれの比毒性 1.624 MU/nmol、0.229 MU/nmol、0.027 MU/nmol を用いてマウス毒性に換算し、元試料 1 g あたりの TTX 群 (TTXs) の毒性 (MU/g) として表示した。ELISA で得た PSP 群 (PSPs) の濃度は、フグ類に主要成分として認められもとも毒性の高いサキシトキシン (STX) に換算して 2.483 MU/nmol の比毒性を用いて換算し、元試料 1 g あたりの PSPs の毒性 (MU/g) として表示した。

C. 研究結果

(1) マフグ *Takifugu porphyreus*

1) 肉

6.22 ± 1.78 MU/g (max 49.58 MU/g) の TTXs と 0.25 ± 0.08 MU/g (max 2.72 MU/g) の PSPs が確認された。TTXs と PSPs の合計は 6.47 ± 1.80 MU/g (max 50.23 MU/g) であり、36 個体中 5 個体が安全基準値 (10 MU/g) を超過した。

2) 精巢

5.04 ± 0.96 MU/g (max 10.31 MU/g) の TTXs と 0.10 ± 0.06 MU/g (max 0.46 MU/g) の PSPs が検出された。TTXs と PSPs の合計は 5.14 ± 0.97 MU/g (Max 10.39 MU/g) であり、7 個体中 1 個体が安全基準値を超過した。

3) 可食部以外の部位

皮、肝臓、消化管、卵巣から最高値でそれぞれ 411.05、3116.15、681.53、4350.43 MU/g と、非常に高濃度の TTXs が検出された。各部位からは TTXs に対して 20%未満の PSPs が検出された。

(2) ゴマフグ *Takifugu stictonotus*

1) 肉

1.23 ± 0.29 MU/g (max 4.57 MU/g) の TTXs および 0.17 ± 0.08 MU/g (max 1.98 MU/g) の PSPs が検出された。TTXs と PSPs の合計は 1.40 ± 0.30 MU/g (max 4.57 MU/g) で、安全基準値を超過する個体は確認されなかった。

2) 精巢

2.05 ± 1.05 MU/g (max 10.58 MU/g) の TTXs と 1.00 ± 0.38 MU/g (max 3.66 MU/g) の PSPs が確認された。TTXs と PSPs の合計は 3.03 ± 1.44 MU/g (max 12.33 MU/g) であり、安全基準値を超過する個体が 13 検体中 2 検体確認された。

3) 可食部以外の部位

皮、肝臓、消化管、卵巣から最高値でそれぞれ 42.25、75.51、38.57、255.98 MU/g の TTXs が検出された。各部位から TTXs に比較して極低濃度の PSPs が検出された。

(3) ショウサイフグ *Takifugu snyderi*

1) 肉

5.45 ± 2.66 MU/g (max 28.25 MU/g) の TTXs と 0.66 ± 0.28 MU/g (max 2.71 MU/g) の PSPs が検出された。TTXs と PSPs の合計は 6.12 ± 2.71 MU/g (max 28.26 MU/g) であり、12 個体中 3 個体が安全基準値を超過した。

2) 精巢

15.88 ± 15.30 MU/g (max 46.47 MU/g) の TTXs と 6.50 ± 4.20 MU/g (max 14.39 MU/g) の PSPs が検出された。TTXs と PSPs の合計は 22.38 ± 15.26 MU/g (max 51.55 MU/g) であり、3 個体中 2 個体が安全基準値を超過した。

3) 可食部以外の部位

皮、肝臓、消化管、卵巣から最高値でそれぞれ 32.47、246.27、79.81、955.79 MU/g の TTXs が検出された。各部位から TTXs に比して極低濃度の PSPs が検出された。

(4) コモンフグ *Takifugu poecilonotus*

1) 肉

25.61 ± 6.08 MU/g (max 230.33 MU/g) の TTXs および 0.73 ± 0.22 MU/g (max 2.72 MU/g) の PSPs が検出された。TTXs と PSPs の合計は 26.34 ± 6.05 MU/g (max 230.40 MU/g) であり、40 個体中 26 個体が安全基準値を超過した。

2) 可食部以外の部位

皮、肝臓、消化管、卵巣および精巢から最高値でそれぞれ 1192.40、6727.33、2039.77、2691.54、

46.94 MU/g の TTXs が検出された。各部位から TTXs に比較して 2～20%程度の PSPs が検出された。

D. 考察

Kodama et al.(1984)は岩手県および宮城県で水揚げされたフグ類の毒性を調べ、これら海域で多獲されるコモフグとヒガンフグは内臓部分だけでなく、肉の毒性も著しく高いことを報告している。この報告に基づき現在、岩手県の釜石湾と越喜来湾、および宮城県雄勝湾で漁獲される上記2種のフグ類は市場での取り扱いが禁止されている。Kodama et al. (1984)の調査から30年以上が経過し、2011年3月の東日本大震災に伴う大津波で生息環境が大きく攪乱されたにも拘わらず、昨年度の調査により三陸沿岸で漁獲される上記2種のフグが依然として高い毒性を示すこと、肉に強毒レベルを示す個体が高頻度で出現していることが明らかとなった。本年度、大船渡湾海域で漁獲された4種のフグ(マフグ、ゴマフグ、ショウサイフグおよびコモフグ)につき、部位別の毒性を調べたところ、コモフグ以外の3種のフグも可食部とされる皮、肉および精巣で安全基準値である10 MU/gを超過する個体が確認された。大船渡湾産のコモフグとヒガンフグは取り扱いが禁止されていないものの、これら2種を含め同魚市場では現在、食の安全性を確保するためトラフグを除くフグ類はすべて廃棄されている。大船渡湾に限らず、東北地方沿岸各地における有毒フグ類の分布については、今後とも研究を継続する必要があると考えられる。

E. 結論

フグ類の安全性の確保に資することを目的として、2015年に大船渡湾海域で水揚げされたマフグ、ゴマフグ、ショウサイフグ、コモフグの部位別毒性を個体ごとに調べたところ、4種ともに肉を含む可食部で、安全基準値(10 MU/g)を超過する毒性が高頻度で検出された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 佐藤 繁(2015) 麻痺性貝毒の生物化学的変

換に基づいた簡易分析法の開発. 平成26年度水産学技術賞. 日本水産学会誌 81(5)、792-795.

2) 佐藤 繁(2016) 東北地区のフグの毒性. ミニシンポジウム記録: フグ食の安全性確保-日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌 82(2)、169.

2. 著書・総説

- 1) 佐藤 繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第8回). モヨウフグ・ホシフグ. 食と健康 59(4)、pp.30-31、日本食品衛生協会.
- 2) 佐藤 繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第9回). コクテンフグ・ケショウフグ. 食と健康 59(5)、pp.28-29、日本食品衛生協会.
- 3) 佐藤 繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第10回). センニンフグ・カイユウセンニンフグ. 食と健康 59(6)、pp.28-29、日本食品衛生協会.
- 4) 佐藤 繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第11回). キタマクラ・サザナミフグ. 食と健康 59(7)、pp.28-29、日本食品衛生協会.
- 5) 佐藤 繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第12回). クロサバフグ・クマサカフグ. 食と健康 59(8)、pp.28-29、日本食品衛生協会.
- 6) 佐藤 繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第13回). カスミフグ・スジモヨウフグ. 食と健康 59(9)、pp.36-37、日本食品衛生協会.
- 7) 佐藤 繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第14回). カナフグ・ヨリトフグ. 食と健康 59(10)、pp.28-29、日本食品衛生協会.
- 8) 佐藤 繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第15回). ミゾレフグ・ワモンフグ. 食と健康 59(11)、pp.28-29、日本食品衛生協会.
- 9) 佐藤 繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第16回). アラレフグ・ナガレモヨウフグ. 食と健康 59(12)、pp.38-39、日本食品衛生協会.
- 10) 佐藤 繁・松浦啓一(2016) フグを知って中毒防止(第17回). シマキンチャクフグ・タキフグ. 食と健康 60(1)、pp.48-49、日本

食品衛生協会.

- 11) 佐藤 繁・松浦啓一(2016) フグを知って中毒防止(第18回). シッポウフグ・アマミホシゾラフグ. 食と健康 60(1)、pp.30-31、日本食品衛生協会.
- 12) 佐藤 繁・松浦啓一(2016) フグを知って中毒防止(第19回). シボリキンチャクフグ・ナミダフグ. 食と健康 60(3)、pp.30-31、日本食品衛生協会.

3. 学会発表

- 1) 佐藤 繁：東北地区のフグの毒性. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム「フグ食の安全性確保 日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し」. 平成 27 年 9 月、宮城県仙台市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 27 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

研究協力者 桐明 絢 東京海洋大学 海洋科学部 食品生産科学科

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、フグの毒性評価と有毒巻貝の種判別について検討した。さらに、追加項目として、マウス試験法にかわるフグ毒検査法を検討するため、TTX のイムノクロマト検査法の実用性と問題点について調べた。フグの毒性評価では、緊急課題として日本沿岸で漁獲されたコモンググの毒性調査を行った。調べた凍結試料 32 個体中 13 個体の筋肉から 10 マウスユニット (MU) /g を超える毒性が検出されたが、皮の毒性が 1000 MU/g を超える例がみられ、凍結解凍によって毒が有毒の皮から無毒の筋肉に移行した可能性が考えられた。関連して、“強毒”レベルに分類されているコモンググ皮は、“猛毒”レベルに変更してリスク管理を強化する必要があると考えられる。しらす加工品へのフグ稚魚混入に関しては、2014 年に集めた試料では、産地によらずシロサバフグの稚魚が主で、シロサバフグ稚魚から TTX は検出されなかった (10 ng/g 未満)、ナシフグ稚魚の混入も見られたが、TTX 含量は定量下限値 (30 ng/g) 未満で、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。

イムノクロマト法に基づく市販の TTX rapid test kit について、検出感度、反応性特異性、マトリクスの影響ならびにコモンググ抽出液に対する検査を実施して、評価を行ったところ、トラフグ組織抽出液中のマトリクスが反応に大きな影響を与え、コモンググ抽出液では毒性値を相関がみられない例が多く、実用化には課題があることがわかった。

遺伝子による有毒巻貝の種判別法として、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を試みた。加熱殺菌されて DNA が断片化した製品では PCR 増幅できないものがあったが、それ以外では種判別が可能であった。今後、他の遺伝子領域についても検討を加え、巻貝のリスク管理に役立てたい。

A. 研究目的

食中毒を起こすフグ毒、シガテラ毒、貝毒等のマリントキシンは、人の健康危害因子として重要である。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、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、コモンググの喫食によると疑われるフグ食中毒が発生したため、コモンググの毒性調査を緊急課題として実施し、フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性評価も行った。また、有毒巻貝を正確に判別する遺伝子による種判別法の開発に取り組んだ。初年度は、ミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域を対象にした PCR 法の検討とダイレクトシーケンス法による種判別を試みた。さらに、リスク評価の基盤となるフグ毒検査がいま

だにマウス試験法で行われているため、フグ毒検査法の検討が追加課題として要請された。簡便迅速なフグ毒検査法として有望な抗 TTX モノクロナル抗体を利用したイムノクロマト法の実用性と実用化への問題点を、市販の TTX rapid test kit を用いて調べた。

B. 研究方法:

1) コモンフグの毒性調査

試料には、2015 年 6 月に山口県で漁獲された 14 個体と 2015 年 10 月に京都府、石川県、東京湾でそれぞれ漁獲された 6 個体、5 個体、7 個体の合計 32 個体を用いた。これら試料魚は漁獲後に現地で凍結され、当研究室に輸送されたもので、入手してから使用するまで -25℃ に冷凍保存した。使用時に、試料をビニル袋に入れて流水で解凍した後、筋肉、皮、肝臓、消化管、生殖腺に分離した。解凍直後に解剖することを心がけたが、試料数が多い場合には、解凍しすぎてしまうものもあった。

凍結試料とは別に、2015 年 11 月に東京湾で漁獲されたコモンフグ鮮魚 10 個体も用いた。これについては、入手後直ちに解剖して、組織を取り出した。

フグ毒の抽出ならびに定量は食品衛生検査指針理化学編のフグ毒試験法に準じて行った。すなわち、各組織を細切、磨砕した後、ここから 2g 取り、0.1% 酢酸 8 mL を加えてよく混合し、超音波処理(15 分間)後、沸騰水浴中で 10 分間加熱してフグ毒を抽出した。抽出液を冷却後、遠心分離して得られた上清を毒性試験用検液とした。試料量が少なく、試料重量が 2g に満たない場合は、試料重量の 9 倍量の 0.1% 酢酸を添加して抽出した。

毒性試験はマウス検定法で行い、マウスの致死時間から「フグ毒の致死時間 マウス単位 (MU) 換算表」に基づいて毒力を算出した。注射後 30 分以上経過しても死亡しなかった試料を「無毒」とした。

2) 市販 TTX 検査キットの評価

TTX 検査キットには TTX rapid test kit (Lot:20150716、Wuhan Unibiotest Co., Ltd.) を用い、テトロドトキシン標準品は和光純薬製テトロドトキシン(フグ由来、1mg、細胞生物用、Lot SAJ2556) を用いた。テトロドトキシン (TTX) 1mg を含むアンプルの 0.1% 酢酸溶液 1 mL を加えて溶解し、これを TTX 標準原液とした。この TTX 濃度は 1mg/mL であり、

毒性は 5000 マウスユニット (MU) /mL とした。TTX 標準原液を付属のプロトコールに記載の “Sample diluent” [8g NaCl + 0.2g KCl + 1.44g Na₂HPO₄ + 0.24g KH₂PO₄, dissolve in deionized water to 1 L] (pH 7.4) および 0.1% 酢酸溶液で希釈し、10、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL の TTX 標準液を調製した。各濃度に調製した TTX 標準液 100 μL を TTX rapid test kit に塗布した。

TTX 標準液による検出限界の確認

本実験では、1 MU/mL を基準として、TTX 濃度を 2 段階ずつ増加(2、4 MU/mL)または減少(0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL)させた。

TTX 誘導体の反応性

TTX 類似体には、山口県産キンシバイから TTX 精製法に従って精製した oxoTTX と trideoxyTTX を用いた。これらの標準品がないため正確な同定はできないが、LC-MS の挙動から、11-oxoTTX と 5,6,11-trideoxyTTX と推測される。11-oxoTTX 精製品は毒性値から濃度を計算し、5,6,11-trideoxyTTX はほぼ無毒のため、5,6,11-trideoxyTTX 精製品の LC-MS におけるイオン強度を TTX 標準品と比較して濃度を求めた。両精製品は、0.1% 酢酸で適宜希釈して所定の濃度に調製した。

麻痺性貝毒の反応性

麻痺性貝毒は、National Research Council Canada の Certified Reference Materials Program で提供されている CRM-GTX1&4-c (Lot#20080709 1008, GTX1 60.4 ± 3.1 μmol/L, GTX4 19.7 ± 1.6 μmol/L, GTX1+GTX4 80.0 ± 2.2 μmol/L)、CRM-GTX2&3-c (Lot#20081203 1443, GTX2 114.2 ± 5.7 μmol/L, GTX3 43.4 ± 2.2 μmol/L, GTX2+GTX3 157.6 ± 7.7 μmol/L)、CRM-dcGTX2&3-c (lot#20141203 0223, dcGTX2 100.1 ± 7.0 μmol/L, dcGTX3 29.4 ± 2.1 μmol/L, dcGTX2+dcGTX3 129.5 ± 8.0 μmol/L) を用いた。0.1% 酢酸で適宜希釈して所定の濃度に調製した。

マトリクスの影響

マトリクスの影響を調べるため、無毒の養殖トラフグ(3 歳魚、活魚)から、組織抽出液を調製した。すなわち、養殖トラフグから筋肉、皮、肝臓、生殖巣を分離した後、ハサミで細切したもの(卵巣は乳鉢でよくすりつぶしたもの)30g をビーカーに入れ、0.1% 酢酸 75 mL を加え、沸騰浴中で 10 分間加熱抽出した。冷却後、遠心分離を行い上清を得た。残渣

に再度0.1%酢酸を加えて攪拌し、遠心分離を行った。得られた上清を先の抽出液と合一後、0.1%酢酸で150 mLに定容した。無毒養殖トラフグからの抽出液調製は、研究分担者荒川氏が行った。

TTX 標準原液をトラフグの組織抽出液で適宜希釈して、4、1、0.25 MU/mLのTTX 溶液を調製した。

有毒コモンフグ抽出液を用いた評価

コモンフグの筋肉および肝臓の抽出液を用いて、TTX 検査キットに対する反応を検討した。2014年10月および2015年6月に岩手県大船渡魚市場で採取したコモンフグの凍結魚体を解剖し、筋肉と肝臓を取り、筋肉または肝臓のホモジネート10gに0.1%酢酸40 mLを加えて混合し、沸騰浴中で5分間加熱した。氷冷したホモジネートに0.1%酢酸を加えて50 mLに定容した後、ろ紙(No.2)でろ過して検液を得、これを有毒コモンフグ抽出液とした。有毒コモンフグ抽出液の調製は、研究分担者佐藤氏が実施した。

3) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

2014年7月から9月に水揚げ、生産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、17ロットを実験に供した。TTX 分析のコントロールとして、市販のしらす加工品(しらす干し)を用いた。

しらす加工業者があらかじめ選別したフグ稚魚試料を、双眼実体顕微鏡下で観察して、体色を含む外部形態に基づき分類した。形態分類は、研究分担者松浦氏が担当した。

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17個体(静岡県2個体、兵庫県2個体、広島県2個体、愛媛県5個体、熊本県2個体、産地不明4個体)の筋肉(約15 mg)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 (タカラバイオ)を用いて PCR 増幅を行った。PCR 産物を DNA シークエンサーを用いて塩基配列を解析した。解析した塩基配列を nucleotide BLAST 検索に付し、

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(約0.1~0.3 g)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)したろ液をTTX 定量用試料とした。TTX の定量はLC-MS/MS 法で行った。

4) 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 の部分領域配列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。そのため、有毒巻貝を含む巻貝7科41種のミトコンドリア DNA の16S rRNA、シトクロム C オキシダーゼサブユニット (COI)、18S rRNA 領域の塩基配列情報を Gene Data Bank で調査した。これら塩基配列から、なるべく多くの巻貝に共通し、しかも種間の変異がみられる領域を選び、プライマーを設計し、PCR 条件を検討した。今年度は、ミトコンドリア DNA 16S rRNA 領域とテトラミン保有巻貝を対象にして検討した。

巻貝試料には、エゾバイ科ヒメエゾボラ、エゾボラモドキ、エゾボラ、コエゾボラモドキ、ミクリガイ、ヒメエゾボラ、エゾボラ、オオエッチウバイ、ヨーロッパエゾバイ、テングニシ科テングニシおよびイトマキボラ科ナガニシの11種の生鮮品と市販加工品を用いた。

各試料の筋肉から全ゲノム DNA を抽出し、それを鋳型にして、設計したプライマーと Ex Taq polymerase (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。

C. 研究成果:

1) コモンフグの毒性調査

各地で漁獲されたコモンフグの毒性を表1にまとめた。調べたコモンフグすべてが有毒(10 MU/g以上)個体であった。まず、凍結試料32個体についてみる

と、各組織における有毒個体出現率は、皮 96.7% (30 個体中 29 個体)、肝臓 86.7% (30 個体中 26 個体)、卵巣 81.0% (21 個体中 17 個体)、消化管 80.0% (30 個体中 24 個体)、筋肉 40.6% (32 個体中 13 個体) で、各組織の最高毒性値は、皮 2,290 MU/g、肝臓 1,270 MU/g、卵巣 977 MU/g、消化管 590 MU/g、筋肉 60.8 MU/g であった。皮と肝臓は“猛毒”レベル (1,000 MU/g 以上)、卵巣はほぼ“猛毒”レベルに達する“強毒”レベル (100~999 MU/g)、消化管も“強毒”レベルで、筋肉は“弱毒”レベル (10~99 MU/g) であった。精巢は 3 個体と検体数が少ないが、毒性は検出されなかった (10 MU/g 未満)。

一方、凍結していない生鮮コモングは 1 地域の 10 個体しか測定していないが、卵巣は 8 個体すべてが有毒で、毒性値は 466~3,540 MU/g と高かった。肝臓は有毒個体出現率 100% (10 個体中 10 個体)、毒性値 14.0~422 MU/g であった。皮は 10 個体中 8 個体が有毒 (10 MU/g 以上) だったが、毒性値は 6.4~44.1 MU/g と低く、最高でも“弱毒”レベルであった。筋肉と精巢からは毒性は検出されなかった (5 MU/g 未満)。

2) 市販 TTX 検査キットの評価

本キットは、検液中に TTX が無いとキットの C と T に 2 本の赤いバンドが出現するが、TTX があると T のバンドは消失し、C のみのバンドになる。このバンドの有無から、TTX の存否を検査するものである (図 1)。

TTX 標準液による検出限界の確認

最初に、プロトコールに従って“Sample diluent”を用いた。“Sample diluent”100 μ L を塗布したところ、C と T に 2 本の赤いバンドが出現した (図 1)。次に、“Sample diluent”で希釈した TTX 標準液 (0.0625~10 MU/mL) をそれぞれ 100 μ L 塗布してバンドの出現を観察した。TTX 濃度を変化させてバンド出現の様子を検討したところ、10 MU/mL TTX 標準液では T のバンドはみられず C のバンドだけであった。1 MU/mL と 0.5 MU/mL では T のバンドは C のバンドに比べ明らかに薄くなったが検出され、0.25 MU/mL 以下では T のバンドが濃く見られた。しかし、ブランク (緩衝液) よりも薄い。主観的な判断になるが、0.5 MU/mL あたりが検出限界のように思われる。

次に、0.1%酢酸溶液で調製した TTX 標準液 (0.0625~4 MU/mL) を用いて、同様に実験した。0.25 MU/mL

までは 1 MU/mL のときと同じよう、0.125 MU/mL 以下では T のバンドがやや濃く見られた (図 2)。しかし、ブランクの 0.1%酢酸溶液よりは薄い。主観的な判断ではあるが、0.25 MU/mL あたりが検出限界のように思われる。

フグ毒の抽出には 0.1%酢酸が用いられるため、これ以後の実験では、希釈液に 0.1%酢酸を用いることとする。

TTX 誘導体の反応性

ブランクの 0.1%酢酸では T と C に赤いバンドが検出され、対照の TTX 標準品 (1 MU/mL、0.627 nmol/mL) では T のバンドが薄くなった (図示せず)。これを基準にして 11-oxoTTX の反応性を調べた。TTX 標準品と同じ濃度 (0.627 nmol/mL) のとき、TTX 標準品に比べると T バンドはやや赤い色が濃かった。濃度を 2 倍 (1.25 nmol/mL)、4 倍 (2.51 nmol/mL) に増やすと T バンドの色が薄くなり、4 倍濃度の時、TTX 標準品とほぼ同じような色合いであった (図示せず)。

TrideoxyTTX は 2 段階の濃度 (0.627 nmol/mL および 3.14 nmol/mL) で反応性を調べた。試料液をキットに付したところ、いずれも C バンドに比べて T バンドの色は明らかに薄く、3.14 nmol/mL 試料液の方が薄くなった (図示せず)。

すなわち、11-oxoTTX と 5,6,11-trideoxyTTX は、同濃度の TTX に比べ反応性は劣るが、TTX 抗体と反応することがわかった。

麻痺性貝毒の反応性

麻痺性貝毒として、GTX1&4、GTX2&3、dcGTX2&3 を用いた。濃度はそれぞれ、6.27 nmol/mL と 0.627 nmol/mL の 2 段階調製した。いずれの混合液ならびに濃度においても、T と C に赤いバンドが検出され、麻痺性貝毒成分は TTX 抗体と反応しないことがわかった (図示せず)。

マトリクスの影響

無毒養殖トラフグの組織抽出液を検査キットに塗布した。各組織抽出液は“無毒”なので、C と T に 2 本の赤いバンドが出現するはずである。筋肉と精巢の抽出液ではブランクの 0.1%酢酸と同様に C と T に 2 本の赤いバンドが検出された。しかし、皮の抽出液ではバンドは C にしかみられず、卵巣と肝臓の抽出液では T のバンドがきわめて薄かった。確認のためもう一度繰り返したが、結果は同じだった。

次に、TTX 標準液を各組織抽出液で希釈して、4、1、

0.25 MU/mL の3段階の濃度の TTX 溶液を調製した。0.1%酢酸で希釈した場合、TTX 濃度に依存して T のバンドが薄くなった(図示せず)。1 MU/mL でも若干 T にバンドが見えるが、4 MU/mL では C だけになった。今回用いた5つの組織抽出液の中で、0.1%酢酸を同じ結果を示したのは、精巣抽出液だけであった。筋肉の抽出液で希釈した場合、0.25 MU/mL で T のバンドが薄くなったが、4 MU/mL でもバンドは2本見えた。卵巣抽出液の場合、TTX が無い状態でも T のバンドが薄く、TTX 溶液 4 MU/mL のとき T のバンドは見えなかった。肝臓と皮の抽出液では、TTX を添加しても変化はなかった。

有毒コモンフグ抽出液を用いた評価

筋肉と肝臓がそろっている試料(km3、km4、km5、km6、km13、km14、km30)と、毒性のない km16 と km18 の合計18抽出液を試験した。筋肉の抽出液では、km18 (0 MU/mL) と km30 (0.62 MU/mL) が T にやや薄いバンドがみられた。一方、毒性がないはずの km16 はごく薄く T にバンドがあるが、他の有毒抽出液と区別できない。km3 の筋肉抽出液(5.32 MU/mL)を0.1%酢酸で10倍ずつ希釈して反応性を検討したところ、100倍希釈液(0.053 MU/mL)で C と T に2本のバンドが検出された(図示せず)。

肝臓では、ブランクの抽出液でも、T バンドは薄いので検出の判断がむずかしいが、km3、km13、km14、km30 にやや薄く T のバンドが見えた。km3 肝臓抽出液(449 MU/mL)を0.1%酢酸で10倍ずつ希釈して反応性を検討したところ、1,000倍希釈液(0.45 MU/mL)までは抽出液のときとほぼ同じで、10,000倍希釈液(0.045 MU/mL)になって T バンドがクリアに見えた(図示せず)。

毒性がないはずの抽出液の km16 と km18 についても、0.1%酢酸で10倍希釈液と100倍希釈液をそれぞれ調製して反応性を検討したが、T バンドはあらわれなかった(図示せず)。

3) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性魚種判別

調べたフグ稚魚17個体のうち、15個体は、体側に銀白色の縦帯があり、腹側は白色を呈し、体表には小棘が分布していたことから、サバフグ属と判別した。一方、2個体は体表に小棘は見られず、体側に銀白色の縦帯も見られなかった。また、体側と背側が褐色を呈していたことから、両個体はトラフグ属と判別した。

ミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域(約600 bp)の塩基配列解析の結果、15個体はシロサバフグ *Lagocephalus spadiceus* (Accession No. AP009538)の塩基配列と100%一致した。一方、トラフグ属と判別された2個体のミトコンドリア DNA の16S rRNA 部分領域の塩基配列はナシフグ (Accession No. AB741999)と100%一致したが、第2候補のシマフグ *Takifugu xanthopterus* (Accession No. AP009533)と1塩基しか違いがなかったため、シトクロム b 領域における PCR を行い、得られた増幅産物(約500 bp)の塩基配列解析を nucleotide BLAST で検索した。その結果、両個体ともナシフグと判別した。

毒性試験

静岡県(1試料)、兵庫県(1試料)、愛媛県(5試料)、熊本県(1試料)および産地不明(4試料)の12試料について、LC-MS/MS で TTX 分析を行った。シロサバフグと判別された試料から TTX は検出されなかった(10 ng/g 未満)。一方、ナシフグと判別された試料から、TTX と推測されるわずかなピークが検出されたが、定量下限値(30 ng/g)未満であった。SIR (Selected Ion Recording)法で TTX 関連物質の分析を行ったが検出されなかった(図示せず)。

4) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝特異プライマー設計して、PCR 条件を種々検討した結果、巻貝から抽出したミトコンドリア DNA 16SrRNA 部分領域(約350bp)を効率よく増幅する条件を決定した。その結果、巻貝生鮮品11種では、すべての試料で350bp 付近に PCR 増幅が確認できた。しかし、一部の加工品では増幅されないものがあった。

塩基配列解析の結果、ほとんどは種判別が可能であったが、「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、クリイロエゾボラ、ヒレエゾボラ」、「エッチュウバイ、アニワバイ」の3組については、それぞれデータベースに登録されている塩基配列が同じであるため、判別ができない。

D. 考察

1) コモンフグの毒性調査

コモンフグ凍結試料では、筋肉が有毒のものがみられた。その割合は32個体中13個体、有毒個体出現率40.6%と低くない。そして、最高毒性値は60.8 MU/g を示した。しかし、この試料魚は皮の毒性が

2,290 MU/g と極めて高かった上、解凍しすぎてしまい、皮から筋肉への毒の移行が考えられる。この点については、来年度、活魚または生鮮魚を入手して組織別に毒性を調べるとともに、凍結・解凍したときの毒の移行を検討する予定である。

日本産フグの毒力表(谷、1945)によれば、コモンフグの組織別毒力は、卵巣と肝臓が“猛毒”、皮、消化管、精巣は“強毒”、筋肉が“弱毒”とランクされている。しかしながら、本結果に従えば、皮はかなりの頻度(40個体中6個体)で、また、漁獲地によらず“猛毒”個体が検出されているので、“猛毒”レベルに変更して、リスク管理を強化する必要がある。

2) 市販 TTX 検査キットの評価

TTX 標準品で得られる検出限界は 0.25 ~ 0.5 MU/mL 程度で、製造者が推奨する基準値(検出限界: 1 MU/mL (0.22 µg)、陽性: 1 MU/mL (0.22 µg)、陰性: 0.25 MU/mL (0.05 µg))を確認できた。TTX 検査キットのフグ毒検出は抗体に依存するため、本検査キットは、麻痺性貝毒(GTX1&4、GTX2&3、dcGTX2&3)とは反応しないが、TTX 誘導体の 11-oxoTTX や 5,6,11-trideoxyTTX と反応した。他の TTX 誘導体との反応性も調べる必要があるが、各誘導体を単離することは難しい。一般に、フグをはじめフグ毒保有毒物は、TTX 以外にも複数の TTX 誘導体をもっている。フグ毒の検査において、広く TTX 誘導体を検出できることは、安全性確保の観点からは有利である。しかし、5,6,11-trideoxyTTX のような毒性の低い成分が多量に混在している場合には、毒性を過大に評価してしまうことになる。

今回、実試料での測定を想定して、TTX 標準液を養殖トラフグの組織抽出液で希釈したところ、抽出液だけで T のバンドが消えたり(擬陽性) TTX が添加されているにもかかわらず、T バンドの消失が起こらないなど(擬陰性)の現象が観察されたことから、抽出液中のマトリックスの影響が大きく、本 TTX 検査キットは、フグ毒検査の実用性に問題があることがわかった。

3) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

2014 年 7 月から 9 月に日本沿岸で水揚げ、製造されたしらす加工品に混入していたフグ稚魚の種判別と TTX 分析を行い、フグ稚魚混入の実態を調査した。しらす加工品に混入していたフグ稚魚のサイズは数 mm から

3 cm 程度であった。産地に関係なく、15 試料がシロサバフグで、2 試料がナシフグと判別された。日本近海産のシロサバフグは無毒(10 MU/g 未満)とされているが、ナシフグの成魚は卵巣、肝臓、皮が“猛毒”レベル(1,000 MU/g 以上)の毒性をもつことが報告されている。しかし、今回調べたナシフグ稚魚では、TTX と推定される成分は検出されたものの、TTX 含量は 30 ng/g 未満であった。TTX の比毒性(5,000 MU/mg)から、これを毒性値に換算すると 0.15 MU/g 未満となる。

フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性を評価するには、フグの毒性値と摂食量を考慮しなければならない。しらす加工場等の選別作業において、しらす加工品へのフグ稚魚の混入率を調べたところ、33 ロット 8,245 kg からフグ稚魚 795 個体 27.2 g が検出された。この値から、しらす加工品 1 kg あたりのフグ稚魚の混入は 0.096 個体で、しらす加工品 10.4 kg にフグ稚魚 1 個体が混入したことになる。これを重量に換算すると、しらす加工品 1 kg あたりフグ稚魚 0.0033 g の混入となる。これらの値と、1 回に食べるしらすの量(しらすおろしで約 10 ~ 20 g、しらす丼で約 60 ~ 80 g)を考えると、フグ稚魚が混入したしらすを食べた場合の健康への影響はないと考えられる。しかし、フグの毒性は魚種による差ならびに個体差が大きく、卵巣が有毒な種では仔稚魚から TTX が検出される可能性があるため、今後も実態調査を継続して、しらす加工品に混入するフグの種類、毒性ならびに毒成分分析を行う必要がある。

4) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝の生鮮品については、本研究で確立した PCR 条件で増幅できることが明らかになった。しかし、レトルトや缶詰製品の一部で PCR 増幅されないものがあった。これは殺菌加熱で、試料中の DNA が断片化したためと推測される。この対策としては、断片化した DNA でも PCR 増幅できるプライマーを設計する必要がある。また、今回目的とした 16S rRNA 領域の部分塩基配列が完全に一致する「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、クリイロエゾボラ、ヒレエゾボラ」、「エッチュウバイ、アニワバイ」をそれぞれ正確に判別するには、別の遺伝子領域を新たに検討する必要がある。

E. 結論

コモンフグの喫食によると疑われるフグ食中毒が

発生したため、緊急課題として日本沿岸で漁獲されたコモンフグの毒性調査を行った。その結果、凍結試料 32 個体中 13 個体の筋肉から 10 MU/g を超える毒性が検出された。しかし、これらは皮の毒性が著しく高かったため、試料の凍結・解凍によって毒が有毒の皮から無毒の筋肉に移行した可能性が考えられた。今後、活魚または鮮魚のコモンフグの毒性調査を行うとともに、凍結解凍による毒の移行をモデル実験で調べる必要がある。

もう一つの緊急要請課題として、マウス検定法に代わるフグ毒検査法を検討した。イムノクロマト法に基づく市販の TTX rapid test kit について、検出感度、反応特異性、マトリクスの影響ならびにコモンフグ抽出液に対する検査を実施し、評価を行った。TTX 標準品では、プロトコール通りの結果が得られたが、TTX 誘導体とも反応し、トラフグ組織抽出液中のマトリクスの影響が大きいため、フグ毒検査には課題があることがわかった。より精度の高いフグ毒検査を行うには、抗体の特異性を改善する必要がある。

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、しらす加工品に混入したフグ稚魚の種と毒性を調べた。2014 年に集めた試料では、産地によらずシロサバフグの稚魚が主で、一部ナシフグ稚魚が混入していたが、TTX 含量は定量下限値 (30 ng/g) 未満であった。しらす加工品への混入率も考え合わせると、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。しかし、しらす加工品の安全性確保のため、今後も継続して調査を続ける必要がある。

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。巻貝特異プライマーを設計し、PCR 条件を検討し、ダイレクトシーケンス法による種判別を試みた。試料に用いた 11 種巻貝のミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域は効率よく増幅し、ダイレクトシーケンス法で解析した塩基配列から種の判別が可能であった。しかし、加熱殺菌された製品では DNA が断片化しているため PCR 増幅できないものがあつた。さらに、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、実用化するには改善の余地がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 桐明 絢, 太田 明, 岡山桜子, 松浦啓一, 石崎松一郎, 長島裕二: しらす加工品に混入したフグ稚魚の種判別と毒性. 食品衛生学雑誌 2016; 57:13-18.
- 2) H. Lin, C. Zhang, J. Liao, F. Yang, S. Zhong, P. Jiang, X. Chen, Y. Nagashima: Neutralizing effect of hemolymph from the shore crab, *Thalamita crenata*, on paralytic shellfish toxins. *Toxicon* 2015; 99: 51-57.
- 3) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Biliary excretion of tetrodotoxin in the cultured pufferfish *Taki fugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. *Toxicon* 2015; 93: 98-102.
- 4) 長島裕二: フグ肝臓におけるフグ毒蓄積タンパク質. 日本水産学会誌 2015; 81: 736.
- 5) 長島裕二, 松本拓也: フグ毒テトロドトキシンの体内動態解析: トラフグを用いた毒化モデル実験. *LABIO* 21 2015; No. 62: 24-27.
- 6) 長島裕二: フグと食中毒. 中学保健体育科ニュース, 大修館書店, 2015; No.4: 2-5

2. 書籍等

- 1) 長島裕二: 自然毒. 魚介の科学, 阿部宏喜編, 朝倉書店, 東京, 2015; pp. 185-196.

3. 学会発表

- 1) 桐明 絢, 太田 明, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性. 第 109 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 5 月, 東京都江東区.
- 2) 桐明 絢, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の種同定と毒性. 第 25 回西日本ふく研究会, 山口県下関市, 2015 年 5 月.
- 3) 桐明 絢, 塩見一雄, 長島裕二: アイゴ類刺毒の一次構造 アイゴの刺毒はカサゴ目魚類刺毒と共通の構造をもつ. 第 29 回海洋生物活性談話会, 2015 年 5 月, 静岡県下田市.
- 4) 長島裕二: しらす干しフグ稚魚の混入. しらす干しフグ稚魚混入危機管理等における意見交換会,

2015年7月,東京都中央区.

- 5) 長島裕二: 海洋動物の毒. 第37回日本中毒学会総会・学術集会, 2015年7月, 和歌山県和歌山市.
- 6) A. Kiriake, Y. Nagashima, K. Shiomi: Primary structure of a proteinaceous toxin from rabbitfish *Siganus fuscescens*. 2015年9月, 18th Congress of the International Society on Toxinology, London, United Kingdom.
- 7) 桐明 絢, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の遺伝子による種判別. 第110回日本食品衛生学会学術講演会, 2015年10月, 京都府京都市.
- 8) 岡山桜子, 桐明 絢, 永井 慎, 石崎松一郎, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬け製造工程における毒成分変化. 第110回日本食品衛生学会学術講演会, 2015年10月, 京都府京都市.
- 9) 長島裕二: しらすへのフグ稚魚の混入. しらすへのフグ稚魚混入に関する講演会, 2016年3月, 東京都中央区.
- 10) 大木理恵子, 石橋敏章, 石崎松一郎, 長島裕二: ポウシュウボラおよびキンシバイの毒性とフグ毒成分. 平成28年度日本水産学会春季大会, 2016年3月, 東京都港区.
- 11) 桐明 絢, 太田 明, 岡山桜子, 松浦啓一, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすへのフグ稚魚の混入種判別とフグ毒分析. 平成28年度日本水産学会春季大会, 2016年3月, 東京都港区.
- 12) 北島冴美, 角川峻徳, 松本拓也, 長島裕二: 次世代シーケンスアーカイブを用いたトラフグ肝臓薬物排泄トランスポーターのクローニング. 平成28年度日本水産学会春季大会, 2016年3月, 東京都港区.
- 13) 角川峻徳, 北島冴美, 松本拓也, 長島裕二: 次世代シーケンスデータベースを用いたトラフグ肝臓有機イオントランスポーターのクローニングの試み. 平成28年度日本水産学会春季大会, 2016年3月, 東京都港区.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 コモンフグの毒性(2015年)

漁獲地	漁獲年月	凍結/生鮮		筋肉	皮	肝臓	消化管	卵巣	精巢
山口県	2015年6月	凍結	有毒個体出現率	6/14	14/14	12/14	10/14	6/7	0/3
			毒性値	<5 ~ 60.8	126 ~ 2290	<5 ~ 1270	<5 ~ 82.2	<10 ~ 313	<10
京都府	2015年10月	凍結	有毒個体出現率	2/6	5/6	4/4	3/4	3/3	
			毒性値	<5 ~ 23.6	8.0 ~ 418	37.4 ~ 318	<5 ~ 90.6	58.1 ~ 258	
石川県	2015年10月	凍結	有毒個体出現率	0/5	3/3	3/5	4/5	3/4	
			毒性値	<5	27.5 ~ 57.6	<5 ~ 56.8	<5 ~ 34.1	9.9 ~ 257	
東京湾	2015年10月	凍結	有毒個体出現率	5/7	7/7	7/7	7/7	5/7	
			毒性値	<5 ~ 30.9	13.1 ~ 1880	58.1 ~ 739	21.9 ~ 590	<5 ~ 977	
凍結試料のまとめ			有毒個体出現率	13/32	29/30	26/30	24/30	17/21	0/3
			毒性値	<5 ~ 60.8	8.0 ~ 2290	<5 ~ 1270	<5 ~ 590	<5 ~ 977	<10
東京湾	2015年11月	生鮮	有毒個体出現率	0/10	8/10	10/10		8/8	0/2
			毒性値	<5	6.4 ~ 44.1	14.0 ~ 422		466 ~ 3540	<5

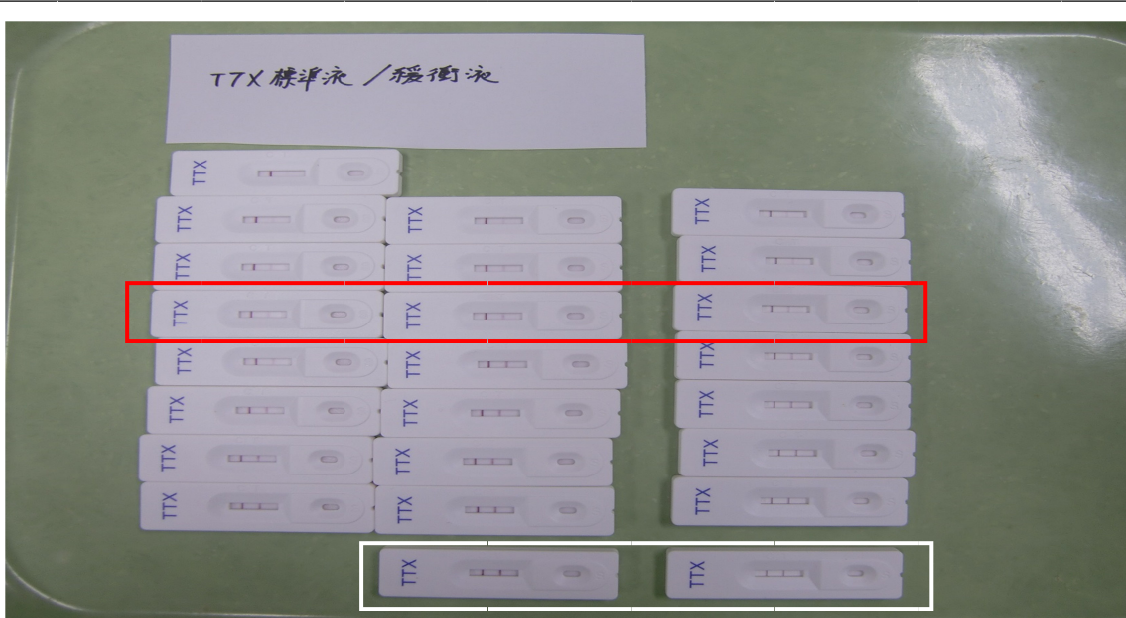


図1 TTX 標準液(緩衝液)の反応

左上段から、10、4、2、1(赤い枠)、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL、100µL 塗布。中上段から、4、2、1(赤い枠)、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL、ブランク(緩衝液)(白い枠)。100µL 塗布。右上段から、4、2、1(赤い枠)、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL、ブランク(緩衝液)(白い枠)。30µL 塗布

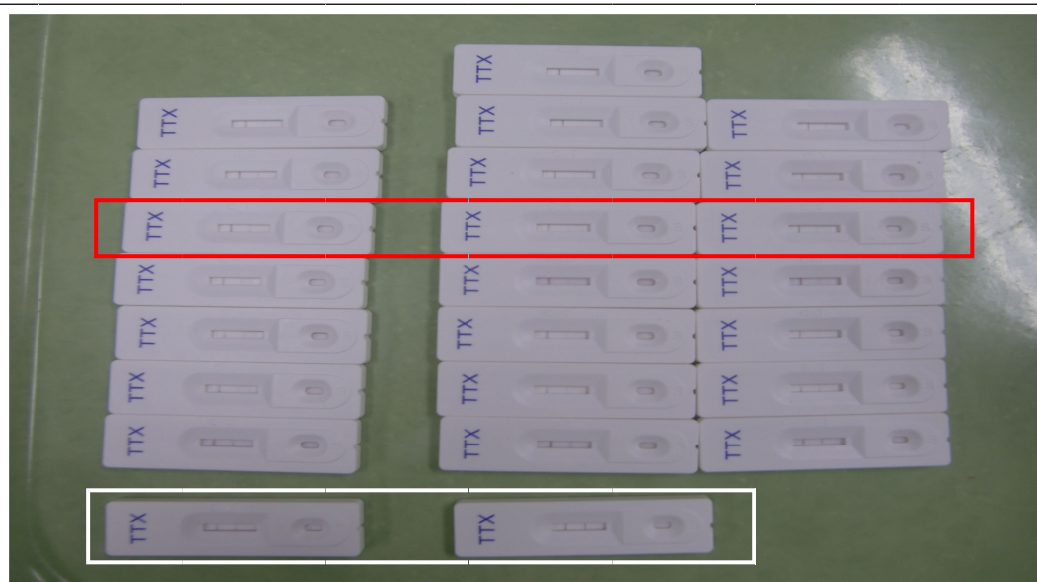


図2 TTX 標準品(0.1%酢酸)の反応

左上段から、4、2、1(赤い枠)、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL、ブランク(0.1%酢酸)(白い枠)。中上段から、10、4、2、1(赤い枠)、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL、ブランク(0.1%酢酸)(白い枠)。右上段から、4、2、1(赤い枠)、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL。

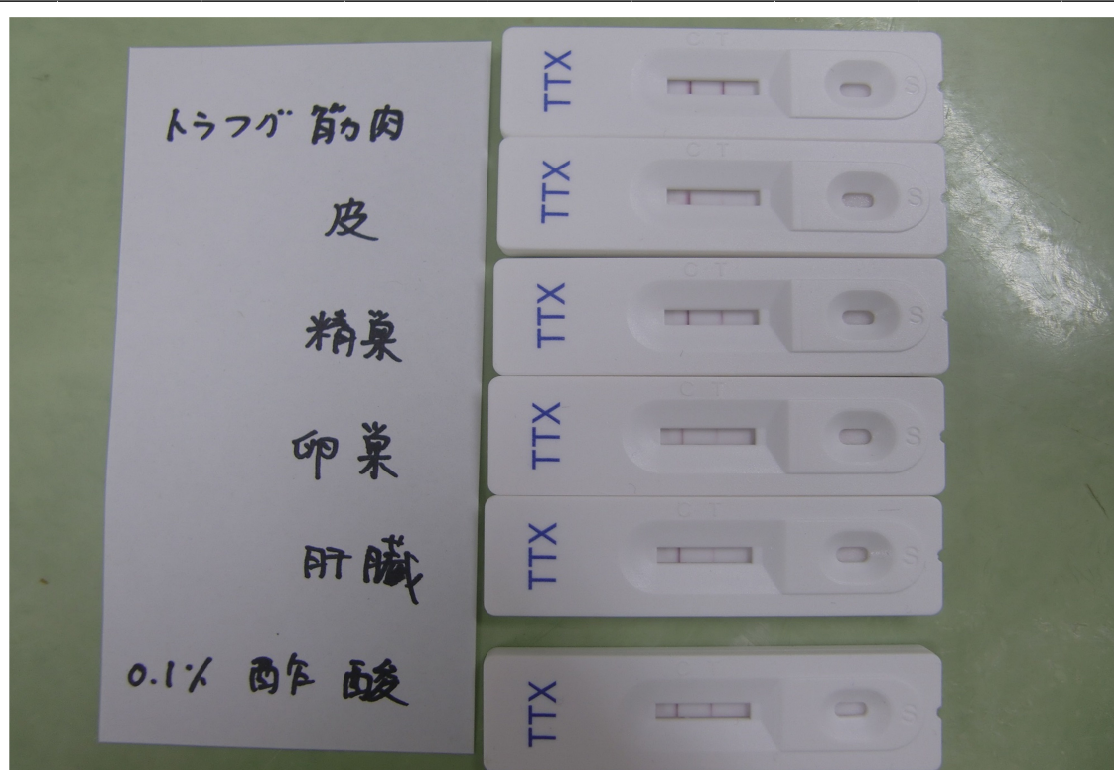


図3 マトリクスの影響（無毒養殖トラフグ組織抽出液の反応）

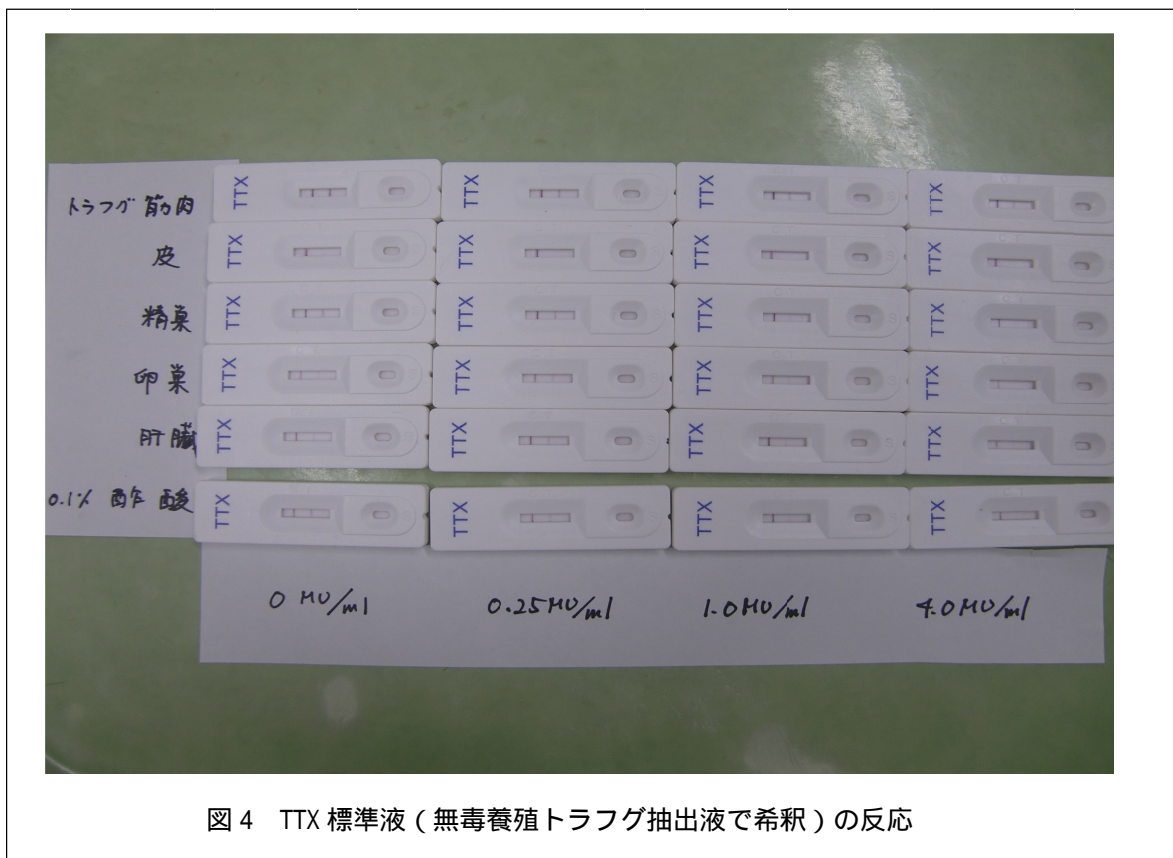


図4 TTX 標準液（無毒養殖トラフグ抽出液で希釈）の反応

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 27 年度分担研究報告書

フグ毒検査法の見直しとパリトキシン様毒検出・定量法の開発

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 株式会社 萬坊

研究要旨

フグ毒テトロドトキシン (TTX) およびパリトキシン (PTX) 様毒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、ラット骨格筋培養細胞を用いた PTX / PTX 様毒検出・定量法の開発を試み、併せて有明海産コモフグの毒性を調査した。まず、トラフグ有毒肝臓を用い、食品衛生検査指針理化学編に記載の「参考法」とその抽出操作を簡素化した「簡便法」の毒量測定値を比較したところ、簡便法の測定値は抽出比が高いほど高く、抽出比 3 以上で参考法より 15~20% 程度高い値となることがわかった。次いで、LC-MS における試料由来マトリクスの影響について調べた。すなわち、無毒トラフグ肝臓の 1:1、1:2、および 1:5 抽出液に TTX 標品を添加し、適宜希釈後、LC-MS で TTX 量を測定したところ、いずれも 10 倍以上の希釈で 100% 近い回収率が得られた。一方、培養筋細胞に 1~1000 ng/mL の PTX を暴露したところ、細胞の損傷に伴い、培地中にクレアチンホスホキナーゼ (CPK) および乳酸脱水素酵素 (LDH) が放出された。PTX 濃度と CPK/LDH 活性の間には高い正の相関がみられ、それらの回帰式からイワスナギンチャク中の PTX を定量することができた。アオブダイ中毒検体抽出液も筋細胞に毒性を示した。他方、凍結保存した有明海産コモフグ 12 個体の毒性を調べたところ、皮、肝臓、および卵巣は、'猛毒'、筋肉と精巣は '弱毒' であった。筋肉の有毒個体出現率は 58% と高く、最高毒力は 98 MU/g に達した。

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、近年、アオブダイに加え、ハコフグにより横紋筋融解症を主徴とする中毒が散発しているが、原因物質 (生化学的性状がパリトキシン (PTX) に類似しているため PTX 様毒と仮称) については不明な点が多く、化学構造が特定されていないため、未だに有効な検出・定量法が確立されていない。

このような状況の下、フグ毒および PTX 様毒のリスク管理に資するため、今年度はまずフグ毒検査法の見直しとして、「参考法」の抽出操作を簡素化した「簡便法」の有効性、および機器分析 (LC-MS) における試料由来マトリクスの影響について検討するとともに、ラット骨格筋培養細胞を用いて新たな PTX / PTX 様毒検出・定量法の開発を試みた。併せて、少個体数ながら、有明海

産コモンフグの毒性を調べた。

B. 研究方法

1) フグ毒検査法の見直し

簡便法の有効性

トラフグ肝臓 2 個体を試料とし、それぞれ参考法と簡便法による測定値を比較した。すなわち、まず参考法として、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。肝臓 2 個体中 1 個体については、試料に 5 倍量の 0.1 % 酢酸を添加し、最終的に 10 倍量に定容する方法も実施した。一方、簡便法としては、試料に 1、2、4 および 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 および 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 および 6）とした。いずれも連数 3 で調製し、HPLC-蛍光検出法で TTX 量を測定した。

LC-MS における試料由来マトリクスの影響

養殖トラフグの無毒肝臓を試料とした。試料重量 1 に対し、0.1 % 酢酸重量 1、2、5 倍量を添加して加熱抽出し、無毒の 1:1 抽出液、1:2 抽出液、1:5 抽出液を調製した。各抽出液に既知量の TTX 標品を添加して標準添加法による標準溶液 10 MU/mL を調製し、表示濃度を 10 MU/mL とした。これを 0.1 % 酢酸で 5 倍、10 倍、20 倍に段階希釈して、表示濃度 2、1、0.5 MU/mL の希釈溶液を調製した。以上の標準溶液と希釈溶液（連数 3）につき、TTX 標品の 0.1 % 酢酸溶液を外部標準として LC-MS で TTX 量を測定し、表示濃度に対する測定値の比率を求めて回収率とした。

2) PTX / PTX 様毒検出・定量法の開発

SD 系ラットの下肢より骨格筋を採取し、細切、酵素処理等を経て筋芽細胞を得た。さらに筋芽細胞を筋管細胞へ分化・成長させ、拍動能をもたせた（以後、この状態の細胞を「筋細胞」と称す）。得られた筋細胞に 1~1000 ng/mL の PTX 標品を暴露し、6~48 時間インキュベート後、経時的に光学顕微鏡にて細胞形態を観察するとともに、臨床化学自動分析装置（アークレイ）および 乳酸脱水素酵素（LDH）測定キット（TaKaRa）により、それぞれ培地中に放出されたクレアチンホスホキナーゼ（CPK）および LDH の活性を測定した。

一方、2009 年沖縄県西表島で採取したイワスナギンチャク *Palythoa tuberclosa* および 2011 年 3 月に宮崎県延岡市で発生したアオブダイ中毒の原因食品残品（肝臓および筋肉）から Noguchi ら（1987）の方法に準じて PTX / PTX 様毒試験液を調製し、PTX 標品と同様の方法で筋細胞への暴露試験を行った。

3) コモンフグの毒性調査

2015 年 10 月~2016 年 1 月に採取後、凍結保存しておいた有明海産コモンフグ 12 個体（体長 17.6 ± 3.2 cm、体重 185.4 ± 96.2 g）を試料とした。いずれも、流水中で急速解凍後、簡便法で組織別に毒を抽出し、マウス毒性試験にて毒力（MU）を測定した。

C. 研究結果

1) フグ毒検査法の見直し

簡便法の有効性

参考法と簡便法の比較を図 1 に示す。参考法で 138 MU/g と測定された肝臓については、簡便法の測定値（参考法の測定値に対する相対値）は 0.98~1.20 で、抽出比が高いほど高かった。参考法で 184 MU/g と測定された肝臓の場合、簡便法の測定値は 1.14~1.22 で、138 MU/g の肝臓の場合より総じて若干高かったものの、基本的にはほぼ同様の結果が得られた。この肝臓において、試料に 5 倍量の 0.1 % 酢酸を添加し、最終的に 10 倍量に定容した場合の測定値は 1.16 であった。

LC-MS における試料由来マトリクスの影響

各希釈倍率における回収率を図 2 を示す。1:1 抽出液では、標準溶液（1 倍希釈）および 5、10、20 倍希釈溶液の回収率は、それぞれ 68.4、87.7、102、98.2% で、10 倍以上の希釈率でほぼ 100% となった。1:2 抽出液でも概ね同様の結果が得られた。1:5 抽出液の場合、5 倍希釈溶液で回収率が低かったものの、その他の希釈倍率での回収率はほぼ 100% で、総じて表示濃度どおりの測定値が得られた。

2) PTX / PTX 様毒検出・定量法の開発

筋細胞に PTX を暴露すると、濃度依存的な損傷が観察された。すなわち、10 ng/mL 以下の濃度では、筋管細胞のチューブ状の形態が維持されていたが、拍動が停止し、一部の細胞に損傷がみられたのに対し、100 ng/mL 以上の濃度では、細

胞膜が顕著に薄くなり、丸く縮むように変化した(図3)。

CPKについては、暴露6時間後に濃度依存的な上昇が認められたが、12時間後以降は検出感度が低下し、濃度依存性も失われた(図2)。6時間後のPTX濃度(x)とCPK(y)の間には高い正の相関がみられ、以下の回帰式が得られた(図4)。

$$y = 90.604 \ln(x) - 61.963 \quad (R^2 = 0.9231)$$

一方、LDHの場合、いずれの暴露時間でも濃度依存的な上昇が認められたが、低濃度(100 ng/mL以下)での値に基づき、暴露時間は6時間では不十分、48時間では過剰であり、細胞試験には12または24時間が適切と判断した(図5)。

実験取扱いの利便性から、今回は24時間後の値を用いて検討したところ、PTX濃度(x)とLDH(y)の間には高い正の相関がみられ、以下の回帰式が得られた(図6)。

$$y = 12.365 \ln(x) + 11.659 \quad (R^2 = 0.9235)$$

他方、筋細胞にイワスナギンチャク抽出液を暴露すると、いずれの濃度においても細胞損傷が観察され、0.1 g 試料/mL以上の濃度でLDHの値(相対活性)がほぼ100%に達した(図7)。前述の回帰式から当該イワスナギンチャクの毒量を求めたところ、9.5 µgPTXeq/gと計算され、LC-MS/MSで測定したPTX量(7.0 µg/g)と概ね一致した。アオブダイの抽出液の場合、肝臓、およびわずかながら筋肉で、丸く縮むような細胞損傷が確認された(図8)。LDHの値は肝臓で約70%、筋肉で約30%で、PTX換算値は、それぞれ103および2 ng PTXeq/gとなった。

3) コモンフグの毒性調査

有明海産コモンフグの毒性を表1に示す。皮、肝臓、および卵巣は、いずれも‘猛毒’(それぞれ84-2398 MU/g、<3~2402 MU/g、48~1644 MU/g)で、皮と肝臓では2000 MU/gを超える個体も2個体ずつ見られた。一方、筋肉と精巣は‘弱毒’(<3~98 MU/gおよび5~81 MU/g)であったが、筋肉の有毒個体出現率(ここでは10 MU/g以上を‘有毒’とする)は58%と高く、最高毒力は98 MU/gと‘強毒’に近い値であった。

D. 考察

1) フグ毒検査法の見直し

簡便法の有効性

前述のように、簡便法による測定値は、抽出比3以上で、いずれも参考法より15~20%程度高い値となった。また、最終的に10倍量に定容した場合の参考法の測定値も、5倍量に定容する本来の参考法に比べ15%程度高いことから、本来の参考法の試料残渣にはTTXが残留していることが示唆される。従って、参考法では、添加回収試験を行い、その回収率で補正しない限り、毒性が低く評価される恐れがある。一方、簡便法は、迅速に、かつ真の値により近い測定値が得られる方法と考えられる。

今回、強毒の肝臓を用いたが、今後は弱毒の肝臓に加え、皮と筋肉についても検討する予定である。

LC-MSにおける試料由来マトリクスの影響

低抽出比の試料では、希釈倍率が高くなると回収率が100%に近づくことから、肝臓から抽出される夾雑成分がTTXのイオン化を阻害しているものと推察された。

今回、1:2抽出液の5倍希釈以上、および1:5抽出液の標準溶液でも90%以上の回収率が得られたが、希釈しても十分な精度でTTXを分析できる場合は、可能な限り希釈した試料を分析することが望ましい。マトリクスの影響を避けるには、分析部位の性質、抽出比とMSの検出感度に応じた希釈が必要であろう。

2) PTX/PTX 様毒検出・定量法の開発

今回、筋細胞の損傷に伴い培地中に放出される酵素の活性を指標としたPTXの検出・定量法について検討した。その結果、PTX濃度(1~1000 ng/mL)とCPKおよびLDHの活性の間には、高い正の相関がみられ、加えてPTXを含む実際の生物試料(イワスナギンチャク)からPTXを検出・定量することができた。特異性や安定性、感度等を考慮しながらさらに改良を加えれば、当該検出・定量法によりngレベルのPTXの検出・定量が可能になるものと思われる。

一方、アオブダイ中毒検体抽出液も筋細胞に毒性を示したが、特異性や横紋筋融解との関連については不明な点が多い。

今後は、筋細胞に対する横紋筋融解誘起物質の作用を詳細に調べ、横紋筋融解の特異的指標となるマーカーを見出す必要がある。

3) コモンフグの毒性調査

前述のとおり、今回供試したコモフグは、皮、肝臓、および卵巣が‘猛毒’、筋肉と精巣が‘弱毒’で、筋肉と皮の毒力が谷博士の「日本産フグの毒力表」を上回っていた。特に、可食部位である筋肉で、有毒個体出現率、最高毒力ともに高かったのは食品衛生上問題であり、今後、さらに検体数を増やすとともに、凍結解凍による有毒部位から筋肉への毒の移行についても検討する必要がある。

E. 結論

前述のとおり、参考法の試料残渣には TTX が残留しており、毒性が実際より低く評価される恐れがある。これに対し、簡便法は、迅速に、かつ真の値により近い測定値が得られる方法であり、リスク管理の前提となる毒性調査には、この方法の方が適していると判断された。一方、生物試験から機器分析に移行する際の問題点の一つとして、試料由来の夾雑物の影響がある。しかしながら、LC-MS 分析においては、適切な抽出・希釈操作を行うことにより、試料由来マトリクス存在下でも十分な精度で TTX を分析可能であることが示された。

一方、特異性や安定性、感度の点でまだ問題はあつたものの、今回、ラットの培養筋細胞を用い、培地に放出される酵素の活性を指標として PTX を検出・定量する系を確立することができた。本法は、さらに改良を加えていくことにより、PTX 様毒中毒の特徴である横紋筋融解を指標とした PTX 様毒検出・定量法の開発に発展する可能性がある。

今回供試したコモフグでは、筋肉と皮の毒力が谷博士の「日本産フグの毒力表」を上回っていた。今後も慎重に調査を継続していく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 高谷智裕, 荒川 修, 鈴木重則, 望岡典隆: 2. 交雑フグの毒性. ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保 日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌, 82, 167 (2016).

2. 学会発表

1) K. Okita, H. Satone, E. Tan, S. Kinoshita, S. Asakawa, H. Yamazaki, K. Sakiyama, T.

Takatani, O. Arakawa, A. Hagiwara and Y. Sakakura: Transcriptome analysis of tetrodotoxin sensing and action of tetrodotoxin in the brain of tiger puffer *Takifugu rubripes* by next-generation sequencing. 145th Annual Meeting of American Fisheries Society, Portland, Aug. 2015.

2) 高谷智裕, 荒川 修, 鈴木重則, 望岡典隆: 交雑フグの毒性. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム「フグ食の安全性確保 – 日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し」, 宮城県仙台市, 2015 年 9 月.

3) C. Urata, S. Jiang, K. Kuwano, T. Takatani and O. Arakawa: Growth and kainic acid production of the red alga *Digenea simplex* cultured under monowavelength light irradiation. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, Jeju, Nov. 2015.

4) Y. Kanahara, R. Tatsuno, K. Soyano, T. Takatani and O. Arakawa: Maturation-associated changes in the internal distribution of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu pardalis*. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, Jeju, Nov. 2015.

5) W. Gao, R. Tatsuno, K. Yamaguchi, T. Takatani and O. Arakawa: Expression of PSTBP homologues in several pufferfish species. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, Jeju, Nov. 2015.

6) 辰野竜平, 識名美和子, 古下 学, 山口健一, 高谷智裕, 荒川 修: ツムギハゼ卵巣における TTX 結合性物質の探索. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2016 年 3 月

7) 金原葉子, 辰野竜平, 征矢野清, 高谷智裕, 荒川 修: ヒガンフグ体内 TTX 分布の性成熟に伴う変化. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2016 年 3 月

8) 池北侑人, 姜 珊珊, 市丸俊一, 高増 剛, 荒川 修, 高谷智裕: 長崎県九十九島におけるヒオウギガイの麻痺性貝毒による毒化. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2016 年 3 月

9) 高威, 辰野竜平, 山口健一, 高谷智裕, 荒

川 修: 数種フグにおける PSTBP 相同タンパク質アイソフォーム群の探索. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2016 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

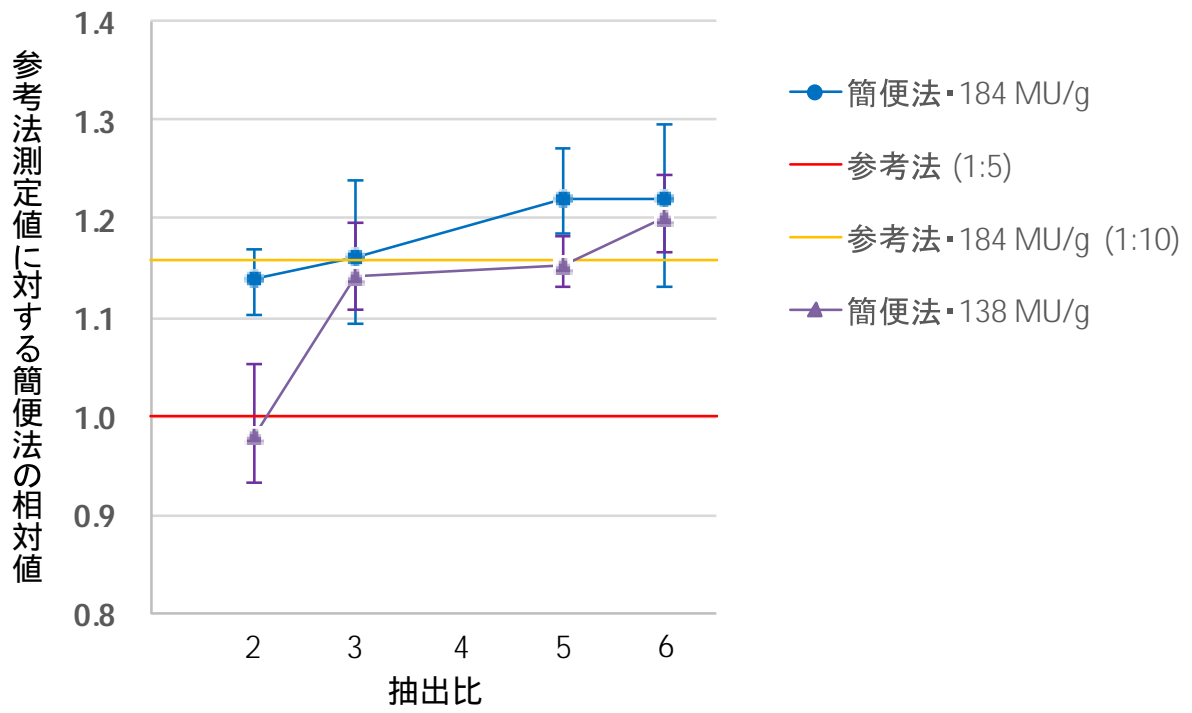


図1 参考法と簡便法の測定値の比較

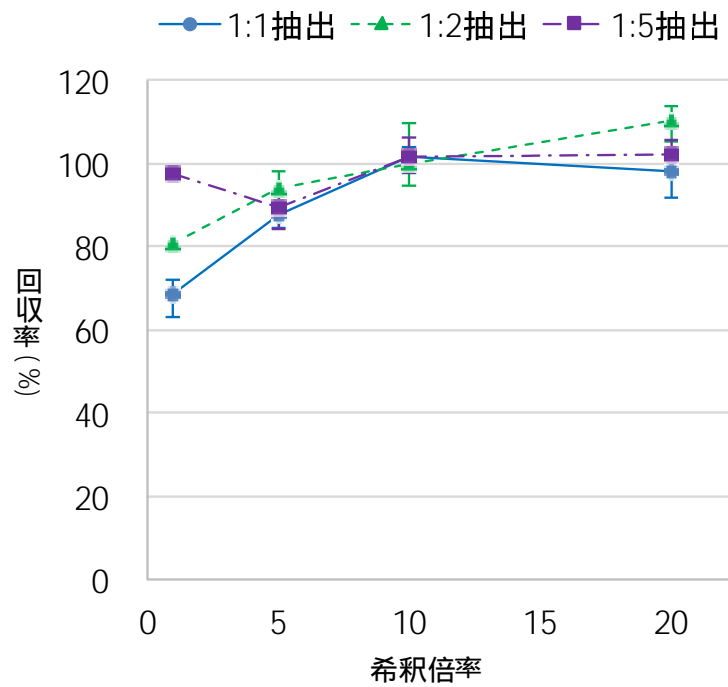


図2 LC-MS法におけるマトリクスの影響

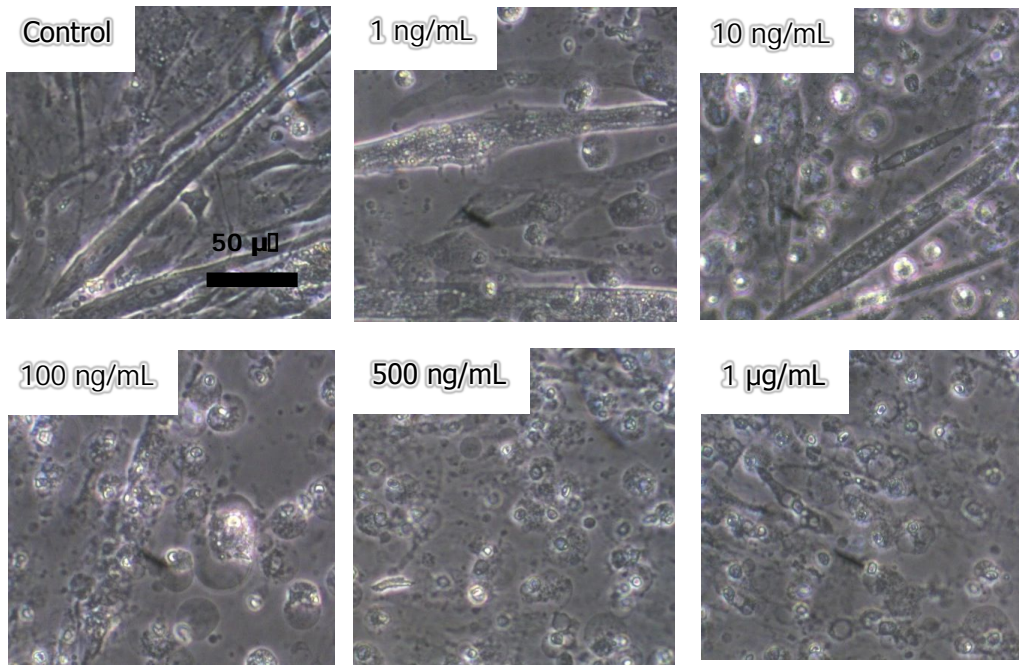


図3 各濃度の PTX を暴露した筋細胞の形態変化

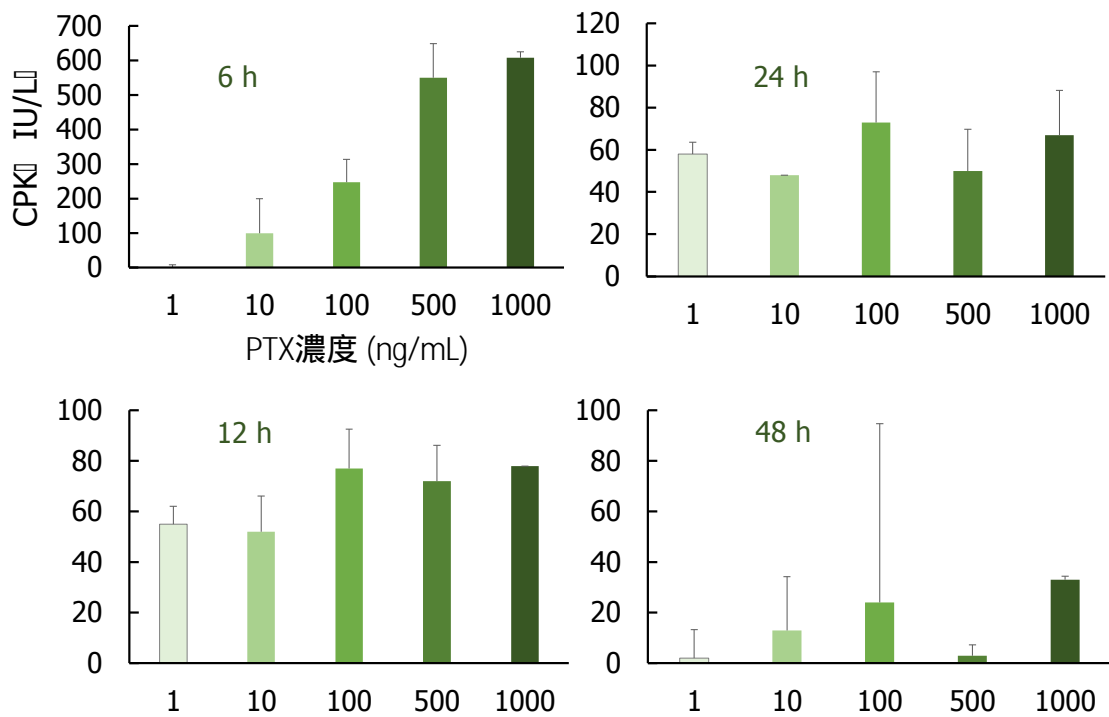


図4 PTX を暴露した筋細胞培養液の CPK 値

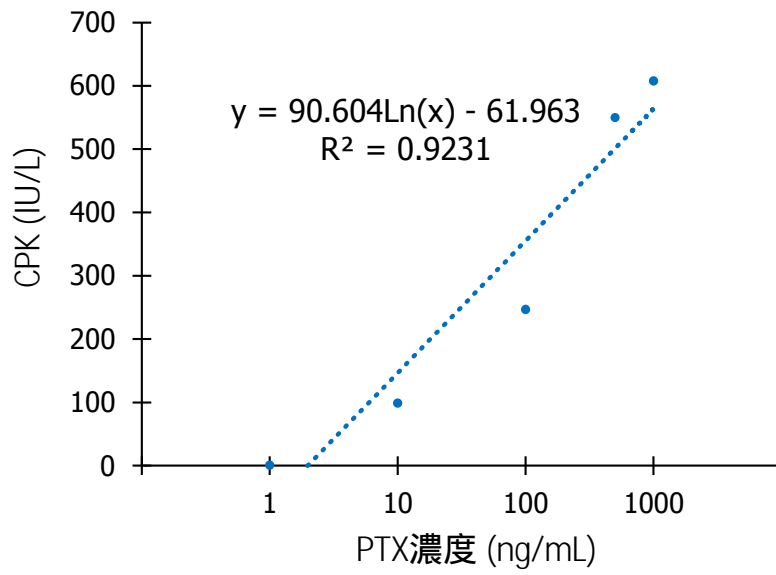


図5 PTX濃度とCPK値の相関

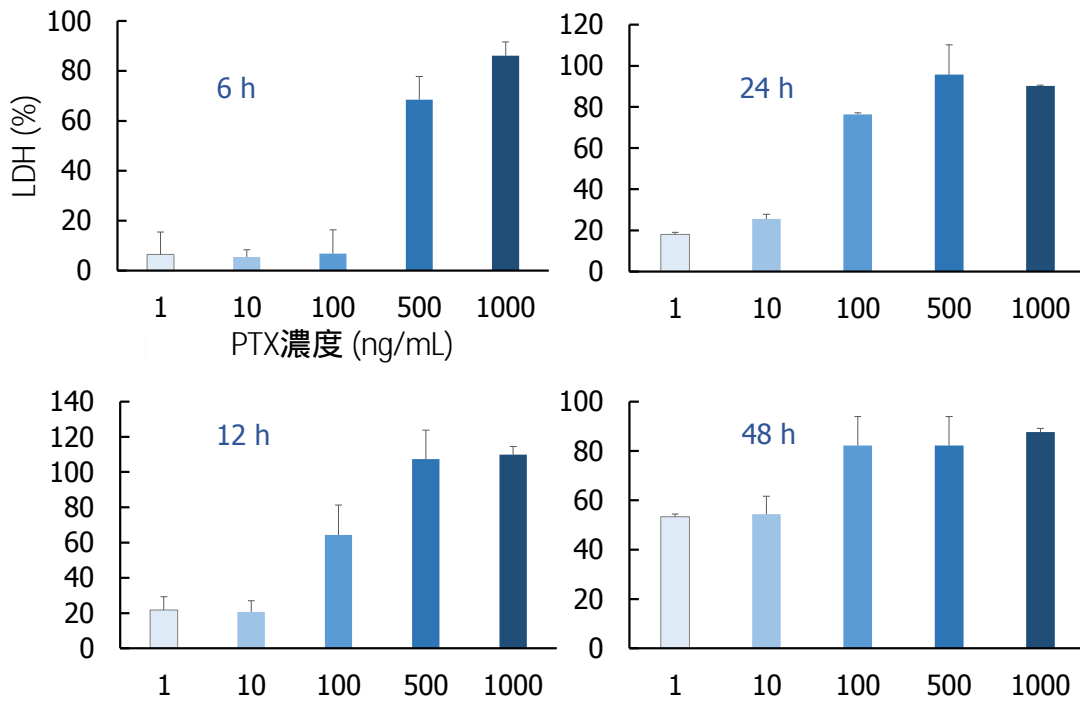


図6 PTXを暴露した筋細胞培養液のLDH値(相対活性)

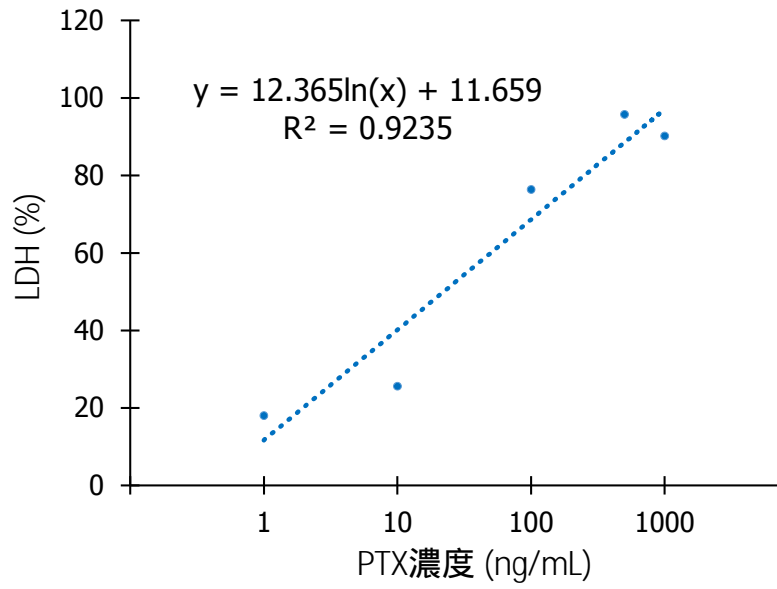


図6 PTX濃度とLDH値の相関

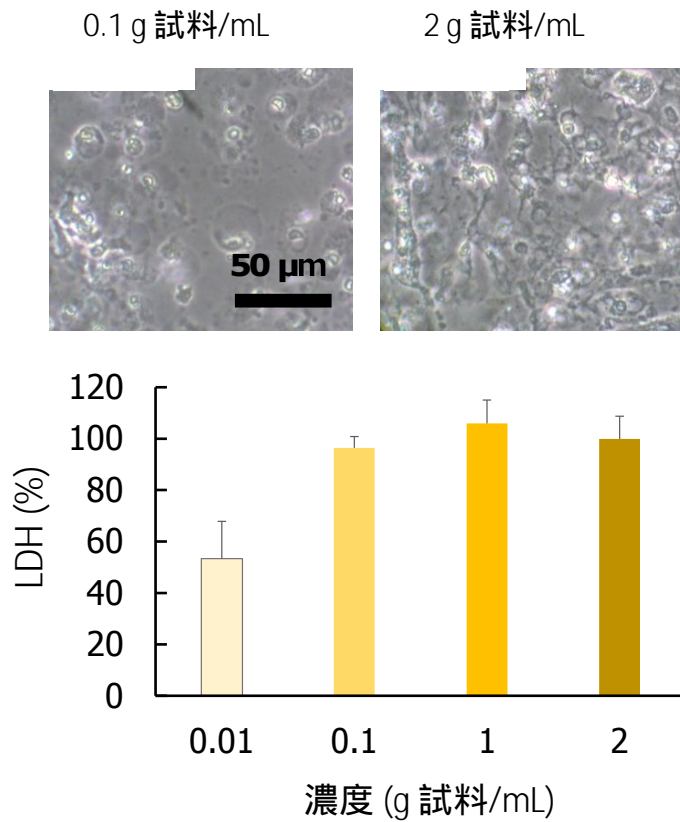


図7 イワスナギンチャク抽出液暴露24時間後の筋細胞の形態変化とLDH値

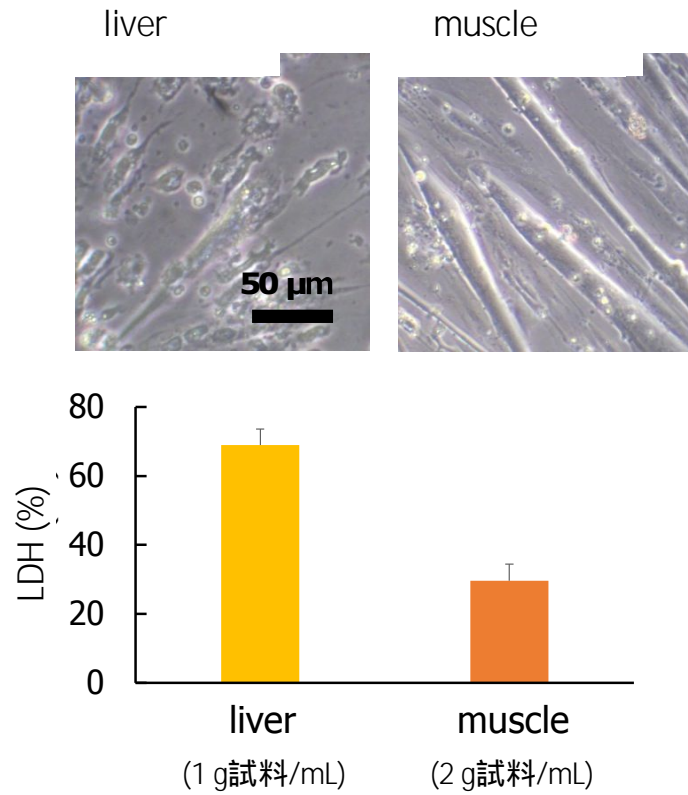


図 8 アオブダイ中毒検体抽出液暴露 24 時間後の筋細胞の形態変化と LDH 値

表 1 有明海産コモンフグの毒性

No.	性別	体長 (cm)	体重 (g)	毒力 (MU/g)			
				筋肉	皮	肝臓	生殖腺
1		15.0	97.3	< 3	84	24	319
2		15.0	98.3	32	218	295	48
3		15.4	96.5	45	1080	197	504
4		13.7	74.9	46	290	67	81
5		15.3	115.8	98	1614	2190	1363
6		23.4	369.5	13	1015	2402	945
7		19.6	235.1	19	2398	258	1465
8		21.2	285.1	3	119	< 3	170
9		21.2	275.2	12	2043	391	1644
10		19.3	248.4	6	288	519	5
11		13.4	88.3	< 3	284	39	594
12		18.6	240.1	< 3	192	6	608

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 27 年度分担研究報告書

フグ類の分類学的研究

研究分担者 松浦啓一 国立科学博物館 名誉研究員

研究要旨

今年度は日本産フグ類のトラフグ属とモヨウフグ属に重点を置いて研究を進めた。日本及び西部太平洋熱帯域から採集された 50 個体の標本を国立科学博物館、神奈川県立生命の星・地球博物館、鹿児島大学総合研究博物館、京都大学舞鶴水産実験所、三重大学水産実験所において調査した。また、ロンドンの自然史博物館とオランダ国立自然史博物館のタイプ標本の調査も行った。

モヨウフグ属の新種の標本を九州南部と沖縄から入手して、新種論文を *Ichthyological Research* に投稿した（63 巻 4 号, 2016 年に掲載）。トラフグ属についてはクサフグ、コモンフグ及びコモングダマシの分類学的地位の再検討を行った。その結果、クサフグの学名を変更する必要があること、コモンフグとコモングダマシには種レベルの相違はなく、同種であることが明らかになった。さらに、コモンフグの 7 個体のタイプ標本の中にクサフグとコモンフグが含まれていることが明らかになった。両者の国際動物命名規約上の地位を詳細に検討した結果、コモンフグは学名を失うため、新種として記載すべ事が明らかになり、現在、論文を作成中である。

A. 研究目的

フグの毒性は種によって大きく異なるためフグ類の種を正確に識別し、同定することは食品衛生の観点から極めて重要である。しかし、フグ類は形態がよく似ているため、種を識別するのは容易ではない。たとえば、多くの海産魚では鰭の条数や鱗の数を分類に用いているが、フグ類では多くの場合、鰭条数に相違が見られない。また、鱗が小棘に変化しているため、鱗を分類に用いることができない。フグ類の識別に最も役立つのは体色であるが、近似種の体色を見分けることは難しい。さらに、モヨウフグ属のように成長によって体色が大きく変化する場合もある。また、トラフグ属においては自然交雑種がかなりの頻度で出現している。このような理由によりフグ類の正確な判別が困難になっている。そこで、本研究では日本近海のフグ類の分類を再検討し、フグ類の同定に用いることができる同定ガイドを作成することを最終的な目的とする。

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とともに魚類研究者の協力を得て新たな標本を入手した。日本及び西部太平洋熱帯域から採集され 50 個体の標本を国立科学博物館、神奈川県立生命の星・地球博物館、鹿児島大学総合研究博物館、京都大学舞鶴水産実験所、三重大学水産実験所、西海区水産研究所において調査した。ロンドンの自然史博物館とオランダ国立自然史博物館においてタイプ標本の調査も行った。さらに、マンボウ科魚類の体表構造を電子顕微鏡によって詳細に調べた。

新たに得られた標本はカラー写真を撮影した後、10%ホルマリンで固定し、70%アルコールに保存して、形態学的調査を行った。

鰭条数の計数や体表面の小棘の観察は双眼実体顕微鏡を用いて行った。内部骨格の観察が必要な場合には、軟 X 線撮影装置を用いて骨格を撮影した。

C. 研究結果

1) モヨウフグ属の分類学的研究

日本及びインド・西太平洋に分布するモヨウフグ属の分類学的研究を行ったところ、新種を含む14種が分布することが明らかになった。モヨウフグ属のほとんどの種は鰭条数では区別できないが、ホシフグは鰭条数が他の13種より明らかに多いため、明瞭に区別できることが明らかになった(ホシフグの背鰭条数は13~15本、他種では9本~12本;臀鰭条数は13本~15本に対し9本~12本)。他の13種においては、鰭条数をはじめとする形態的特徴に明瞭な相違はないが、体色や色彩パターンに種固有の特徴があり、体色によって種を識別できることが判明した。

また、宮崎県、鹿児島県及び沖縄本島から4個体のモヨウフグ属を入手し、詳細に調べた結果、新種であることが明らかになった。新種はフィリピン、紅海及びアフリカ東岸で観察されており、水中写真によって日本の個体と同種であることを確認した。この新種は緑褐色の体に多数の白色縦線をもつ(図1)。このような体色は他の13種には見られない。新種の論文を *Ichthyological Research* に投稿し、3月上旬に受理された。新種論文は2016年に出版される *Ichthyological Research* 63(4)に掲載される。

2) トラフグ属の分類学的研究

日本産トラフグ属全体の調査を進めているが、今年度はコモンフグ、コモンダマシ及びクサフグなどを重点的に調査した。その結果、コモンフグの色彩にはかなり変異があることが明らかになった。コモンフグの体の地色は黄褐色で、多くの白色点に覆われる。しかし、体の地色がやや緑色を帯びる場合もある。さらに、白色点の大きさや数も個体によって異なる。白色点が小さい個体を背面から見ると、左右の胸鰭の間に20個弱の白色点がある。一方、白色点が大きな個体では、左右の胸鰭の間に約10個の白色点がある。このため白色点が大きい個体と小さな個体を比べると全体的な印象が大いに異なる(図2)。白色点の小さな個体の体色はショウサイフグやマフグの若魚に似ている。しかし、コモンフグには体表に小棘があり、小棘を欠くショウサイフグとマフグから明瞭に区別できる。また、白色点の大きさが異なる個体が同一地点から採集されているため、大小の差は個体変異であり、地域による違いではない。

ロンドンの自然史博物館に保存されている *Tetrodon alboplumbeus* Richardson, 1845のタイプ標本を調べた結果、本種がクサフグであることが明らかになった。従来、クサフグの学名は *Takifugu niphobles* (Jordan and Snyder, 1901)とされていたが、この学名は *Tetrodon alboplumbeus* のシノニムとなるためクサフグの学名は *Takifugu alboplumbeus* (Richardson, 1845)となる。

一方、中国の研究者や日本の一部の研究者は *Takifugu alboplumbeus* をコモンダマシとしていたが、前述したようにこの学名のフグの実態はクサフグである。また、コモンダマシとされているフグとコモンフグを詳細に比較した結果、種レベルの相違は見いだされなかった。このためコモンダマシはコモンフグの変異に過ぎない。

さらに、オランダ国立自然史博物館に保管されている10個体のコモンフグ *Takifugu poecilonotus* (Temminck and Schlegel, 1850)タイプ標本を調べたところ、2個体はクサフグであることが明らかになった。Boeseman (1947)がクサフグの2個体の一つをコモンフグの *Lectotype* (複数のタイプ標本の一つを基準標本すること)に指定したため、国際動物命名規約によって *Takifugu poecilonotus* (Temminck and Schlegel, 1850)はクサフグ *Takifugu alboplumbeus* (Richardson, 1845)のシノニムとなる。そのためコモンフグは学名を失うことが判明した。クサフグやコモンフグの分類学的地位については現在、論文を執筆中であり、2016年後半に学術誌に投稿する予定である。

3) マンボウ科の体表構造の形態学的研究

マンボウ科3属、すなわちクサビフグ属、マンボウ属およびヤリマンボウ属の体表構造を電子顕微鏡(SEM)によって観察した。その結果、マンボウ属とヤリマンボウ属の鱗には放射線状の構造があるが、クサビフグ属にはないことが明らかになった。さらに、クサビフグ属の鱗はマンボウ属やヤリマンボウ属と比較すると表面が平滑であることも判明した。

D. 考察

モヨウフグ属魚類の分類学的再検討の過程で新種が発見された。モヨウフグ属の形態的特徴を詳細に検討した結果、分類に最も有効な形質は体色であることが明らかになった。この結果に基づいてモヨウフグ属の同定を行うため検索表を作成した。今後、モヨウフグ属の中で種判別が困難

なため、多くの文献で混同されているサザナミフグとワモンフグの詳細な比較検討を行う必要がある。

日本産トラフグ属の分類学的再検討によって日本の沿岸でごく普通に見られるクサフグとコモフグには学名をめぐる問題点があることが明らかになった。この事実は従来の分類学的研究には問題点が多く残っており、普通種であっても慎重に研究する必要があることを示している。

マンボウ科3属の鱗をSEMによって観察した結果、マンボウ属とヤリマンボウ属の鱗に共通する構造が見られた。一方、クサビフグ属の鱗はこれら2属とは大きく異なることが判明した。この結果はマンボウ属とヤリマンボウ属が近縁であり、クサビフグ属は両属とは異なる系統に属することを示している。この結論は骨格形質を用いた系統研究やDNAを用いた系統解析結果と一致しており、鱗の微細構造は系統関係を支持する新たな特徴であることが明らかとなった。

E. 結論

日本及びインド・西太平洋のモヨウフグ属を詳細に研究した結果、新種を含む14種が分布していることが明らかになった。14種のうち日本から12種が記録されたことになり、日本近海のフグ類の多様性の高さが改めて明らかになった。日本産トラフグ属の分類学的再検討によって普通種のクサフグやコモフグの分類学的問題が明らかとなった。さらに、コモンドマシはコモフグと同種であることも明らかになった。今後、トラフグ属の分類学的調査を進める必要がある。マンボウ科3属の鱗のSEM観察によって、鱗の微細構造が系統関係を反映していることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 桐明 絢, 太田 晶, 岡山桜子, 松浦啓一, 石崎 松一郎, 長島 裕二: しらす加工品に混入したフグ稚魚の種判別と毒性. 食品衛生学雑誌, 57 巻, 13-18 (2016).
- 2) K. Matsuura: A new pufferfish, *Arothron multilineatus* (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae), from the Indo-West Pacific. Ichthyological Research, 63 巻 4 号, in press (2016).

- 3) E. Katayama, K. Matsuura: Fine structures of scales of ocean sunfishes (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Molidae): another morphological character supporting phylogenetic relationships of the molid genera. Bulletin of National Museum of Nature and Science, Ser. A, 41 巻 2 号, in press (2016).
- 4) 松浦啓一: 1. 日本沿岸に見られるフグ類の分類. ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保—日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌, 82 巻 2 号, 166 (2016).

2. 書籍

- 1) K. Matsuura: Tetraodontiformes. In: S. Kimura, A. Arshad, H. Imamura, M. A. Ghaffar (eds.), Fishes of the Northwestern Johor Strait, Peninsular Malaysia. University Putra Malaysia Press and Mie University, Japan, pp. 98-105.
- 2) 佐藤 繁・松浦啓一: フグを知って中毒防止. モヨウフグ・ホシフグ. 食と健康 通巻 700 号, 30-31 (2015).
- 3) 佐藤 繁・松浦啓一: フグを知って中毒防止. コクテンフグ・ケショウフグ. 食と健康 通巻 701 号, 28-29 (2015).
- 4) 佐藤 繁・松浦啓一: フグを知って中毒防止. センニンフグ・カイユウセンニンフグ. 食と健康 通巻 702 号, 28-29 (2015).
- 5) 佐藤 繁・松浦啓一: フグを知って中毒防止. キタマクラ・サザナミフグ. 食と健康 通巻 703 号, 28-29 (2015).
- 6) 佐藤 繁・松浦啓一: フグを知って中毒防止. クロサバフグ・クマサカフグ. 食と健康 通巻 704 号, 28-29 (2015).
- 7) 佐藤 繁・松浦啓一: フグを知って中毒防止. カスミフグ・スジモヨウフグ. 食と健康 通巻 705 号, 36-37 (2015).
- 8) 佐藤 繁・松浦啓一: フグを知って中毒防止. カナフグ・ヨリトフグ. 食と健康 通巻 706 号, 28-29 (2015).
- 10) 佐藤 繁・松浦啓一: フグを知って中毒防止. ミゾレフグ・ワモンフグ. 食と健康 通巻 707 号, 28-29 (2015).
- 11) 佐藤 繁・松浦啓一: フグを知って中毒防止. アラレフグ・ナガレモヨウフグ. 食と健康 通巻 708 号, 38-39 (2015).
- 12) 佐藤 繁・松浦啓一: フグを知って中毒防止. シマキンチャクフグ・タキフグ. 食と健康 通巻 709 号, 48-49 (2016).
- 13) 佐藤 繁・松浦啓一: フグを知って中毒防止.

シッポウフグ・アマミホシゾラフグ. 食と健康
通巻 710号, 30-31 (2016).

- 14) 佐藤 繁・松浦啓一: フグを知って中毒防止.
シボリキンチャクフグ・ナミダフグ. 食と健康
通巻 711号, 31-32 (2016).

3. 学会発表

- 1) 松浦啓一: 日本沿岸に見られるフグの分類. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム フグ食の安全性確保 日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 宮城県仙台市, 2015 年 9 月.



図1 鹿児島県から採集されたモヨウフグ属の新種



図2 山口県下関から採集された
コモンフグ。

上の個体：白色点が大きい、
下の個体：白色点が小さい

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 27 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における両親種判別法の開発を検討した。今年度は、まずトラフグとマフグ間の交雑種に焦点を絞り、人工交雑種（トラマおよびマトラ）計 14 個体、人工交雑種の両親、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマフグ間で自然交配したともの推定された交雑個体 4 個体を用い、mtDNA を鋳型として 16S rRNA およびシトクローム *b* の各部分領域による母系種の判別を行なうとともに、トラフグおよびマフグの 2 種を明確に区別しうる核 DNA マイクロサテライト (MS) マーカーの選抜を行った。その後、判別に適用可能な MS マーカーにおける PCR 条件の最適化の検討および PCR 産物の塩基配列解析に基づく MS の反復回数を決定したのち、最終的にトラフグ 26 個体およびマフグ 20 個体を用いて、再現性の検証を行った。さらに、自然交雑種を用いて本 MS マーカーの有効性を検証した。

A. 研究目的

今年度は、長崎大学水産学部荒川 修教授から分与された父系および母系系統が既知のトラフグおよびマフグ間の人工交配フグ種を対象に、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 (mtDNA) 解析による母系魚種の同定および各種核 DNA マイクロサテライトマーカー解析による父系魚種の同定を試みた。

B. 研究方法

1) フグ類の分類に関する研究

試料には長崎大学水産学部荒川 修教授から分与された人工交配フグ種（トラフグ（ ）×マフグ（ ）3 個体およびトラフグ（ ）×マフグ（ ）11 個体）ならびに、人工交雑種の両親、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマフグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 4 個体を用いた。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㈱製）を用いて全ゲノム DNA を抽出・精製した。つぎに、全ゲノム DNA を用いて

mtDNA 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 μL、10×緩衝液 (TaKaRa) 5.0 μL、2.5 mM dNTP mix 4.0 μL、20 μM 各プライマー 0.75 μL、TaKaRa EX Taq DNA ポリメラーゼ 0.4 μL を加えた後、全量が 50 μL 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母系種の同定を行った。

つぎに、トラフグおよびマフグにおいて種特異的な MS マーカーを探索することを目的に、両親種が既知である人工交雑種およびトラマの両親を対象に、計 11 個の MS 領域を標的として PCR を行い、トラフグおよびマフグの 2 種を明確に区

別しうる MS の選抜を行った。その後、判別に適用可能な MS マーカーにおける PCR 条件の最適化の検討および PCR 産物の塩基配列解析に基づく MS の反復回数を決定したのち、最終的にトラフグ 26 個体およびマフグ 20 個体を用いて、再現性の検証を行った。さらに、自然交雑種を用いて本 MS マーカーの有効性を検証した。

C. 研究結果

1) フグ類の分類に関する研究

今回人工交配フグ種トラマ(トラフグ() × マフグ())3 個体およびマトラ(トラフグ() × マフグ())3 個体ならびに、人工交配種の両親である単一系統のトラフグおよびマフグ、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマフグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 4 個体につき、mtDNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域の塩基配列に基づいて母系種の同定を行った結果、トラマおよびマトラはともにすべての個体で交配通りに母系種を同定することができた(表 2)。人工交配種の両親である単一系統のトラフグおよびマフグ、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマフグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 4 個体においても、母系種を同定することが可能であった(表 2)。したがって、mtDNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 部分塩基配列はフグ種における母系種判別に有効であることが明らかとなった。

一方、父系種の同定に用いることができるマイクロサテライトマーカーの選抜を行った結果、アガロースゲル電気泳動距離に違いが見られたマイクロサテライト遺伝子座は ATAG 反復配列および GAAAG 反復配列であったが、GAAAG 反復配列の解析においてのみ、トラフグおよびマフグ間で電気泳動距離が異なる反復配列を示すことが認められた(図 1)。泳動距離から推定される PCR 産物の分子量は、トラフグおよびマフグでそれぞれ 194 ~ 209 および 125 ~ 145bp であった(図 1 中の No.15 および 16)。そこで、人工交配フグ種を対象に、GAAAG 反復回数の普遍性を確認したところ、両親種(トラフグとマフグ)の分子量の各位置に複数のバンドが見られたことから、反復回数 5 ~ 9 回がマフグ由来、20 ~ 25 回はトラフグ由来で

あると推測された(表 3)。

そこで、形態学的にトラフグおよびマフグ間の自然交雑であろうと推定される交雑種 4 個体を用いて本 MS マーカーの有効性を検証したところ、トラフグ由来とマフグ由来の各 MS 反復回数が検出された(表 4)。このうち、2 個体は母系種がトラフグであることから父系種はマフグ、残りの 2 個体は母系種がマフグであることから父系種はトラフグであると判定でき、本法が両親種判別に適用できることを明らかにした。

D. 考察

1) フグ類の分類に関する研究

今回、トラフグおよびマフグ間に焦点を絞って、mtDNA 解析法による母系種の同定および GAAAG マーカーを用いた核 DNA による父系種同定法の構築を試みた結果、従来通り、mtDNA 解析法による母系種同定の有効性が再確認されるとともに、新たに核 DNA による GAAAG 反復配列の回数の差から父系種同定が可能であることが示された。この MS 領域は、人工交配種すべてにおいて、トラフグ由来の 194 ~ 209 bp (反復回数 20-25 回) およびマフグ由来の 125 ~ 145 bp (反復回数 5-9 回) の PCR 産物が得られ、保存性が高く普遍的であることが確認された。また、一般的に流通している市販トラフグでは 26 個体中 20 個体(77%)、マフグでは 20 個体中 14 個体(70%)で上述した分子量の PCR 産物が得られた(図示せず)。なお、市販されているトラフグおよびマフグにおいて 70 ~ 77% 程度の再現性を示しているが、これはおそらく市販されているフグの一部が必ずしも単一系統ではない可能性があるものと考えている。

マフグのゲノムデータが未だに提供されていない現状では、数多くのマフグ個体から GAAAG 反復の Repeat 範囲を調べ、マフグにおける GAAAG がトラフグで確認された反復回数とは明らかに異なった、明瞭かつ普遍的である反復回数を示すことを明らかにする必要がある。さらに、他のトラフグ属あるいはサバフグ属においても GAAAG がマーカーとして有効であるかどうかを検証することが必要であると考えられる。

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。母系種においては、mtDNA 法によって確実に同定できることが確認され、父系種に関しては、トラフグおよびマフグからなる交雑種においては GAAAG 反復配列から推定できる可能性が示唆された。しかしながら、その他の交雑種、例えばショウサイフグ、コモンフグ、ゴマフグなどからなる交雑種に本 GAAAG マーカーが適用できるかどうかは定かではない。他のマイクロサテライト領域も含め、次年度さらなる追試が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A. Kiriake, A. Ohta, E. Suga, T. Matsumoto, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Comparison of tetrodotoxin uptake and gene expression in the liver between juvenile and adult tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Toxicon* doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.12.007 (in press).
- 2) 桐明 絢, 太田 明, 岡山桜子, 松浦啓一, 石崎松一郎, 長島裕二: しらす加工品に混入したフグ稚魚の種判別と毒性. *食品衛生学雑誌* 2016; 57:13-18.
- 3) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Biliary excretion of tetrodotoxin in the cultured pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. *Toxicon* 2015; 93: 98-102.

2. 著書・総説

- 1) 石崎松一郎, 臼井芽衣 (2016): フグの分類 - 最前線 -. *Sunatec e-Magazine*, vol. 120 (1) (2016).

3. 学会発表

- 1) 桐明 絢, 太田 明, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性. 第 109 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 5 月, 東京都江東区.

- 2) 臼井芽衣, 石崎松一郎, 長島裕二: マイクロサテライト遺伝子座を用いた交雑フグ種の両親種同定. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会, 2015 年 9 月, 宮城県仙台市.
- 3) 桐明 絢, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の遺伝子による種判別. 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 10 月, 京都府京都市.
- 4) 岡山桜子, 桐明 絢, 永井 慎, 石崎松一郎, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬け製造工程における毒成分変化. 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 10 月, 京都府京都市.
- 5) 大木理恵子, 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の毒性とフグ毒成分. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月, 東京都港区.
- 6) 桐明 絢, 太田 明, 岡山桜子, 松浦啓一, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすへのフグ稚魚の混入 種判別とフグ毒分析. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月, 東京都港区.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) なし

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'-CAGGATTTTAACCAGACTAATGGCTTGAA-3'	53	390
	H15149 5'-CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'		

表2 トラフグおよびマフグ間の各種交雑種の塩基配列同一性から見た母系種の同定

個体名	母系種 × 父系種	16S rRNA 領域		シトクローム <i>b</i> 領域		母系種同定結果
		トラフグ	マフグ	トラフグ	マフグ	
トラマ	トラフグ × マフグ	572/572	570/572	435/436	423/436	トラフグ
マトラ	マフグ × トラフグ	562/564	563/564	424/436	436/436	マフグ
トラフグ	トラフグ × トラフグ	572/572	570/572	435/436	423/436	トラフグ
マフグ	マフグ × マフグ	562/564	563/564	424/436	436/436	マフグ
トラフグ	不明	571/572	570/572	435/436	423/436	トラフグ
マフグ	不明	562/564	563/564	424/436	436/436	マフグ
交雑 1	不明	571/572	570/572	435/436	423/436	トラフグ
交雑 2	不明	562/564	563/564	424/436	436/436	マフグ
交雑 3	不明	562/564	563/564	424/436	436/436	マフグ
交雑 4	不明	572/572	570/572	435/436	423/436	トラフグ

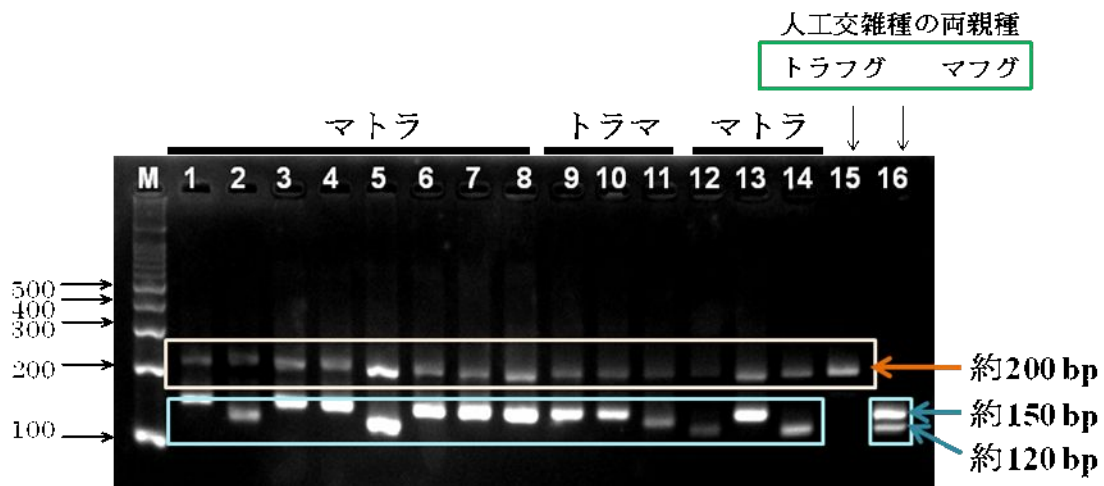


図1 MS (GAAAG) マーカーの反復パターン

表3 トラフグおよびマフグ間の人工交雑種における GAAAG 反復配列の回数

魚種	個体名	GAAAG 反復
トラマ	1	8,9/23
	2	6/23
	3	7/21,23
マトラ	1	9/21,25
	2	5/23
	3	9/23
	4	9/23
	5	5/23
	6	9/20
	7	9/20
	8	9/20
	9	5/23
	10	9/23
	11	7/23
トラフグ	1	23
マフグ	1	5,9

表4 自然交雑種におけるMS解析結果

個体名	母系種×父系種	GAAAG 反復回数	MS 解析による 種同定	母系種	父系種
交雑 1	トラフグ/不明	8/19	マフグ/トラフグ	トラフグ	マフグ
交雑 2	マフグ/不明	7,9/21	マフグ/トラフグ	マフグ	トラフグ
交雑 3	マフグ/不明	9/21	マフグ/トラフグ	マフグ	トラフグ
交雑 4	トラフグ/不明	8/22	マフグ/トラフグ	トラフグ	マフグ

なお、母系種は表2の結果に基づき判定されている。

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
K. Matsuura	Tetraodontiformes	S. Kimura, A. Ayshad, H. Imamura, M. A. Ghaffaer	Fishes of the Northwestern Johor Starair, Peninsular Malaysia	University Putra Malaysia Press and Mie University	Japan	2015	98-105
長島裕二	自然毒	阿部宏喜	魚介の科学	朝倉書店	東京	2015	185-196

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
T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima	Biliary excretion of tetrodotoxin in the cultured pufferfish <i>Takifugu rubripes</i> juvenile after intramuscular administration.	Toxicon	93 巻	98-102	2015
H. Lin, C. Zhang, J. Liao, F. Yang, S. Zhong, P. Jiang, X. Chen, Y. Nagashima	Neutralizing effect of hemolymph from the shore crab <i>Thalamita crenata</i> , on paralytic shellfish toxins	Toxicon	99 巻	51-57	2015
長島裕二	フグ肝臓におけるフグ毒蓄積タンパク質	日本水産学会誌	81 巻 4 号	736	2015
松浦啓一	日本沿岸にみられるフグの分類	日本水産学会誌	82 巻 2 号	166	2016
高谷智裕、荒川修、鈴木重則、望岡典隆	交雑フグの毒性	日本水産学会誌	82 巻 2 号	167	2016
大城直雅	沖縄地区のフグの毒性	日本水産学会誌	82 巻 2 号	168	2016
佐藤 繁	東北地区のフグの毒性	日本水産学会誌	82 巻 2 号	169	2016

大城直雅	下痢性貝毒（オカダ酸群）検査法	食品衛生研究	65巻 4号	29-36	2015
佐藤 繁・松浦啓一	フグを知って中毒防止（第8回）モヨウフグ・ホシフグ	食と健康	59巻 4号	30-31	2015
佐藤 繁、松浦啓一	フグを知って中毒防止（第9回）コクテンフグ・ケショウフグ	食と健康	59巻 5号	28-29	2015
佐藤 繁、松浦啓一	フグを知って中毒防止（第10回）センニンフグ。カイユウセンニンフグ	食と健康	59巻 6号	28-29	2015
佐藤 繁、松浦啓一	フグを知って中毒防止（第11回）キタマクラ・サザナミフグ	食と健康	59巻 7号	28-29	2015
佐藤 繁、松浦啓一	フグを知って中毒防止（第12回）クロサバフグ・クマサカフグ	食と健康	59巻 8号	28-29	2015
佐藤 繁、松浦啓一	フグを知って中毒防止（第13回）カスミフグ・スジモヨウフグ	食と健康	59巻 9号	36-37	2015
佐藤 繁、松浦啓一	フグを知って中毒防止（第14回）カナフグ・ヨリトフグ	食と健康	59巻 10号	28-29	2015
佐藤 繁・松浦啓一	フグを知って中毒防止（第15回）ミゾレフグ・ワモンフグ	食と健康	59巻 11号	28-29	2015
佐藤 繁、浦啓一	フグを知って中毒防止（第16回）アラレフグ・ナガレモヨウフグ	食と健康	59巻 12号	38-39	2015
佐藤 繁、松浦啓一	フグを知って中毒防止（第17回）シマキンチャクフグ・タキフグ	食と健康	60巻 1号	48-49	2016
佐藤 繁、松浦啓一	フグを知って中毒防止（第18回）シッポウフグ・アマミホシゾラフグ	食と健康	60巻 2号	30-31	2016
佐藤 繁、松浦啓一	フグを知って中毒防止（第19回）シボリキンチャクフグ・ナミダフグ	食と健康	60巻 3号	3 30-31	2016
長島裕二、松本拓也	フグ毒テトロドトキシンの体内動態解析：トラフグを用いた毒化モデル実験	LABIO 21	62号	24-27	2015
長島裕二	フグと食中毒	中学保健体育科ニュース	4号	2-5	2015
石崎松一郎、臼井芽衣	フグの分類 - 最前線 - .	Sunatec e-Magazine	120号	1-3	2016
桐明 絢、太田晶、岡山桜子、松浦恵一、石崎松一郎、長島裕二	しらす加工品に混入したフグ稚魚の種判別と毒性	食品衛生学雑誌	57巻 1号	13-18	2016

K. Matsuura	A new pufferfish, <i>Arothron multilineatus</i> (Actinopterygii: Tetraodoniformes: Tetraodontidae), from the Indo-West Pacific	Ichthyol. Res.	63 卷 4 号	印刷中	2016
E. Katayama, K. Matsuura	Fine structures of scales of ocean sunfishes (Actinopterygii, Tetraodoniformes, Molidae): another morphological character supporting phylogenetic relationships of the molid genera	Bull. National Museum Nature Sci.	82 卷 2 号	印刷中	2016