

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

マリントキシンのリスク管理に関する研究

平成28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29(2017)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 . フグ毒検査法の見直しとコモンフグの毒性調査	14
荒川 修	
2 . フグ毒検査キットの開発とフグの毒性評価	21
佐藤 繁	
3 . コモンフグの毒性試験調査	24
大城直雅	
4 . 瀬戸内海産コモンフグの毒性試験調査	28
大城直雅	
5 . 愛知県産コモンフグの毒性試験調査	32
大城直雅	
6 . フグの毒性評価と有毒巻貝の種判別	36
長島裕二	
7 . フグの分類に関する研究 (遺伝子解析)	44
石崎松一郎	
8 . フグ類の形態に基づく分類	51
松浦啓一	
9 . デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法の開発	55
大城直雅	
10 . デカルバモイルサキシトキシンの麻痺性貝毒試験法の評価	59
大城直雅	
. 研究成果の刊行に関する一覧表	64

研究要旨

マリントキシンのリスク管理を強化、改善することを目的として、**フグ毒検査法の検討**、**フグ等の毒性評価**、**遺伝子によるフグ類等の種判別**、**フグ類の形態分類**、**麻痺性貝毒（PSP）標準品の検討**を行った。

フグ毒検査法の検討では、検査用試験液調製のため、フグ毒抽出法を検討し、現行の参考法と、抽出液のろ過と最終段階でのメスアップを行わない簡便法を比較したところ、簡便法の精度が劣ることはなく、簡便法の毒性値が1.02～1.22倍高く、より真の値に近い測定値が得られるため、参考法の代替として適用可能と考えられる。添加回収試験により、HPLC-蛍光検出法は検出感度、精度ともに高く、食品の安全性を確認する方法として有用であることが示された。抗テトロドトキシン（TTX）ポリクローナル抗体作成では、TTX にエタンジチオールとキーホールリンペットヘモシアニンを架橋させた抗原がウサギに対して高い抗体価を示した。得られた抗体は TTX だけでなく、4-*epi*-TTX や 11-*oxo*-TTX などの TTX 類縁体とも抗原交差性を示すことから、TTX 関連化合物を一括検出するフグの潜在的な毒性評価に役立つと考えられる。

フグ等の毒性評価では、コモンフグ（凍結個体）の毒性を調べた結果、皮は全個体が有毒で、“猛毒”レベル（1000 MU/g 以上）のものが散見された。筋肉に“弱毒”レベル（10～99 MU/g）の毒性値をもつ個体があったが、皮の毒性値が高く、解凍しすぎたもので筋肉の毒性値が高い傾向がみられた。生鮮魚では、筋肉が有毒な個体が少なかった。生鮮魚を凍結・解凍すると筋肉が有毒化する現象が観察され、皮からフグ毒の移行が確かめられた。したがって、生鮮なうちに毒力の高い皮を除去することで、コモンフグ筋肉による食中毒リスクを低減できると考えられる。シラス加工品に混入したフグ稚魚として、コモンフグ、シマフグ、ナシフグ、ヒガンフグが同定され、複数の種が混在していることがあった。調べた 29 ロット中 1 ロットからごく微量（56 ng/g）の TTX が検出されたが、フグ毒の基準値（10MU/g、2.2μg TTX/g）をはるかに下回り、しらす加工品にフグ稚魚が混入していても安全性に問題ないことがわかった。

遺伝子によるフグ類等の種判別では、形態観察により自然交雑種と判断されたフグ 20 個体と形態分類で単一系統と判別されたマフグ 20 個体、シマフグ 10 個体について、ミトコンドリア DNA による母系種判別を行い、母系種同定の有用性を再確認した。父系種判別は核 DNA のマイクロサテライトを検討し、TATC 反復配列がマフグとシマフグ間交雑種の判別に有効であることが分かった。昨年度、テトラミン有毒巻貝の種判別として、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 部分領域のダイレクトシーケンス解析が有効であることを明らかにした。本法は、TTX 毒化巻貝類にも適用可能であることが確認された。巻貝加工品の一部で DNA が断片化され PCR 増幅しないものがあったため、より短い PCR 増幅産物（約 150bp）を得るための巻貝加工用プライマーを設計し、種判別が可能になった。

フグ類の形態分類では、フグ類標本の詳細な研究により、フグ科魚類の種レベルの識別には体色が重要であることが判明した。また、本研究により、コモンフグとクサフグに分類学上問題があることが明らかになり、コモンフグの学名は新しく *Takifugu flavipterus* と命名され、クサフグの正式な学名は *Takifugu alboplumbeus* となる。しかし、標準和名に変更はないので、フグのリスク管理に影響はない。これらを含め、日本産のフグ科魚類を中心に、図やイラスト、写真および表を用いたわかりやすい WEB 版分類ガイドを作成し、厚生労働省ホームページに掲載するための準

備を進めている。

・PSP 標準品の検討では、毒化ホタテガイ中腸線からサキシトキシン (STX) にかわる標準品としてデカルバモイル STX (dcSTX) を精製する予定であったが、貝が毒化しなかったため、PSP を還元、脱カルバモイル化させて dcSTX を調製する方法を開発した。本法よれば、日本沿岸の PSP 毒化二枚貝類の主要な毒成分であるゴニオトキシン群から、高収率で高純度の dcSTX が調製できる。dcSTX による麻痺性貝毒検査法が AOA 法と同等であるか、基準変換係数 (CF 値) で評価した結果、dcSTX の基準 CF 値は STX とほぼ等しいこと、そして、10 週間のモニターで基準 CF 値の変動は小さいことが確認され、dcSTX は生物試験の標準化に使用できることが明らかになった。

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 (PSP) 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、正確なフグ種の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、混獲量も少なくない。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。

こうした背景のもと、マリントキシンのリスク管理を強化、改善するため、
・フグ毒検査法の検討、
・フグ等の毒性評価、
・遺伝子によるフグ類等の種判別、
・フグ類の形態分類、
・PSP 標準品の検討を行った。とくに今年後は、
・フグ毒検査法の検討において、テトロドトキシン (TTX) のイムノクロマト法に基づいた検査キット開発のため、抗 TTX ポリクローナル抗体の作製を試みた。これは、昨年検討した海外製の市販 TTX 検査キットが、フグ毒に対する反応特異性に問題があったため、TTX 抗体を作製することにした。また、
・フグ等の毒性評価では、昨年、緊急課題としてコモンフグの毒性調査を行ったところ、凍結解凍試料では筋肉から毒性が検出される例がみられた。また、皮の毒性がこれまでの報告を上回る個体が見られたため、試料検体数を増やすとともに、生鮮魚あるいは活魚を入手して、非凍結のコモンフグの組織別毒性値を調べるとともに、凍結解凍モデル実験を行った。さらに、今年度は新規項目と

して、PSP 標準品の検討を実施した。これは、貝毒のリスク管理において、特定物質である STX のかわりにデカルバモイル STX (dcSTX) を標準品とする PSP 検査法を確立する必要がある、dcSTX を大量調製し、dcSTX による検査法が AOAC 法と同等であることの確認と検討を行うためである。

B. 研究方法

1. フグ毒検査法の検討

1) フグ毒検査法の見直し (簡便法の有効性)

天然トラフグ肝臓を試料とし、それぞれ参考法と簡便法による測定値を比較した。参考法では、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。簡便法では、試料に 1、2、4、5 倍量の 0.1%酢酸を添加して加熱抽出後、混合液をそれぞれ 2、3、5、6 倍量に定容して遠心分離後の上清を試験液 (それぞれ抽出比 2、3、5、6 となる) とした。各試験液は、C18 カートリッジにより固相抽出し、メンブランフィルターでろ過した後、HPLC-蛍光検出法 (FLD) で TTX を定量した。

2) HPLC-FLD の妥当性 (添加回収試験)

養殖トラフグの無毒肝臓を試料とし、そのホモジネートに既知量の TTX 標品を添加して TTX 濃度 2、5、10、20 MU/g (それぞれ規制値の 1/5、1/2、1、2 倍濃度) の添加試料を調製した。添加試料に 0.1%酢酸を加えて加熱抽出し、遠心分離して脂質を除いた後、抽出液をそれぞれ 3 および 5 倍量に定容した (それぞれ抽出比 3 および 5 となる)。定容した各抽出液を遠心分離して上清を分取し、C18 カートリッジにより固相抽出し、メンブランフィルターでろ過後、HPLC-FLD で TTX、4-*epi*TTX および 4,9-anhydroTTX 量を測定し、添加 TTX 濃度に対する比率を求めて回収率とした。

3) フグ毒検査キットの開発

コモフグ、マフグ、トラフグから酢酸でフグ毒を抽出し、活性炭、Bio-Gel P-2 および Bio-Rex 70 各カラムクロマトグラフィーで順次精製して TTX および 4,9-anhydroTTX を単離した。

抗原の作成は、4,9-anhydroTTX を (±)ジチオスレイトール (DTT) と反応させて、TTX と DTT の結合体 (DTT-TTX) を調製し、二価性架橋試薬 (GMBS) を導入した牛血清アルブミン (BSA) と反応させて、抗原溶液 (BSA-DTT-TTX) とした。これとは別に、4,9-anhydroTTX を 1,2-エタンジチオール (EDT) と

反応させて、TTX と EDT の結合体 (EDT-TTX) を調製し、GMBS で処理したスカシガイヘモシアニン (KLH) と反応させて、抗原溶液 (KLH-EDT-TTX) とした

2 種の抗原 (BSA-DTT-TTX と KLH-EDT-TTX) 溶液をそれぞれ 2 羽のウサギに対して、隔週で約 7 ヶ月間皮下接種した。それぞれのウサギから採血して血清を作成し、抗体価を測定した。

2. フグ等の毒性評価

1) コモフグの毒性調査

凍結試料魚には、瀬戸内海および九州産コモフグ試料 97 個体の筋肉および皮を用いた。生鮮魚と活魚は東京湾で漁獲されたコモフグ 30 個体を用いた。凍結解凍モデル実験には、活魚 10 個体を用いた。最初に、魚体右側尾部から皮と筋肉を取り分けた (これを“凍結前試料”とする)。残りを -25 で 24 日間保管した。5 検体は凍ったまま魚体左側尾部から皮と筋肉を分離した (これを“凍結試料”とする)。他の 5 検体は、4 で 2 時間、さらに 20 で 3 時間静置して緩慢解凍後、魚体左側尾部から皮と筋肉を分離した (これを“凍結解凍試料”とする)。このとき、筋肉は皮に接した外側部分 (外部筋肉) と、背骨に接した内側部分 (内部筋肉) から採取した。

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い、細切、磨砕した各組織から酢酸で加熱抽出し、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。

毒性試験は、凍結試料魚では LC-MS/MS 法で TTX を定量し、生鮮魚と活魚、ならびに凍結解凍モデル実験ではマウス検定法で行った。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。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

2015 年 6 月 ~ 8 月に広島県で水揚げ、製造されたしらす加工品に混入し、現地加工場等において外観からフグと推定された稚魚を試料とした。同一の加工場等で同じ日に処理されたものを 1 つのロットとした。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、種判別に供した。23 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 ポリメラーゼを用いて PCR 増幅を行った。PCR 産物塩基配列を DNA シーケンサーで解析し、塩基配列を nucleotide BLAST 検索に付し、種を決定した。

TTX の定量には、形態分類で同一種と判断されたフグ稚魚を複数個体合して、TTX 分析用試料とした。TTX の抽出は、酢酸加熱法で行った。フグ稚魚に 0.1% 酢酸を添加してホモジナイズし、超音波処理後、浴中で加熱した。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。

．遺伝子によるフグ類等の種判別

1) フグ類の分類に関する研究

試料には、自然交雑フグ種 20 個体ならびに形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体を用いた。これらの筋肉から全ゲノム DNA を抽出、精製し、全ゲノム DNA を用いてミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびシトクロム *b* 領域の約 620bp おおび約 390bp を含む部分領域を PCR 増幅した。PCR 条件は、16S rRNA 領域では 98 で 10 秒、53 で 30 秒、72 で 60 秒のサイクルを 30 回行い、シトクロム *b* 領域では 98 で 10 秒、55 で 30 秒、72 で 60 秒のサイクルを 30 回行った。PCR 終了後、PCR 断片を鋳型として、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、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。

次に、マフグおよびシマフグにおいて種特異的なマイクロサテライトマーカーを探索することを目的に、自然交雑フグ種全 20 個体を対象に、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、マフグおよびシマフグの 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、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体を用いて、再現性の検証を行った。

2) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝試料には、フジツガイ科ボウシュウボラ、アキガイ科イボニシ、アカニシ、ムシロガイ科

ハナムシロ、キンシバイおよびエゾバイ科イソニナとバイの 7 種巻貝の生鮮品を用い、これらについては、昨年度設計した巻貝種特異的プライマーで PCR を行った。巻貝加工品については、新たにミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域から、巻貝加工品に利用できる特異的プライマーと PCR 条件を検討した。

各試料の筋肉から全ゲノム DNA を抽出、精製し、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ズ法で塩基配列を解析した。

．フグ類の形態分類

国内外の自然史系博物館や大学に保管されている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。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。

．PSP 標準品の検討

1) デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法の開発

毒化ホタテガイを希塩酸で熱浸抽出し、活性炭、Bio-Gel P-2 および Bio-Rex 70 による各カラムクロマトグラフィーを用いる常法で順次精製して GTX1 と GTX4、GTX2 と GTX3 の混合物を分離した。GTX1 と GTX4 の混合物は、ヘミン/アスコルビン酸中性水溶液中で処理して GTX2 と GTX3 の混合物に変換した。

凍結乾燥した GTX2,3 混合物を 0.05 M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.3) に溶解し、これにメルカプトエタノール (ME) を添加混合して室温で一晩静置して、ME-STX 結合体を調製した。

ME-STX 結合体を超純水に溶解し、NaOH で pH 12.0 に調整した後、沸騰浴中で加熱した。氷冷後に、リン酸で pH 7.4 に中和し、過剰量の ME を加えて沸騰浴中で再度加熱して dcSTX を調製した。これを Bio-Gel P-2 カラムと Bio-Rex 70 カラムを用

いて順次精製し、dcSTX を分離した。調製した dcSTX は、トリプル四重極型 LC-MS/MS を用いて分析し、純度の確認を行った

2) デカルバモイルサキシトキシンによる麻痺性貝毒試験法の評価

試料の dcSTX は、(一財)食品薬品安全センター 秦野研究所において外部精度管理調査で使用している 2.35 $\mu\text{mol/L}$ dcSTX 酢酸溶液(STX 二塩酸塩に換算して 0.45 $\mu\text{g/mL}$)を使用した。STX は、FDA より供与された 100 $\mu\text{g/mL}$ STX 二塩酸塩の塩酸溶液を使用した。マウスは ICR 系雄マウス(4 週齢、体重 19~21g)を用いた。

STX および dcSTX について、基準変換係数 (Conversion Factor、CF 値)を、AOAC OM 959.08 に準じて測定した。1 日目に、検液 1 mL をマウスに腹腔内投与し、致死時間の中央値が 5~7 分になる希釈濃度を 2 濃度調製した。希釈液には 0.003 M 塩酸を使用し、各濃度について 1 群 10 匹のマウスに 1 mL ずつ腹腔内投与し、致死時間を測定し、致死時間の中央値から Sommer の表を用いて溶液の毒力 (MU/mL) を求めた。各希釈液の濃度 (FDA-STX $\mu\text{g/mL}$)を、求めた毒力 (MU/mL) で除して CF 値 (FDA-STX $\mu\text{g/MU}$) を求めた。

2 日目に、前日に調製した 2 濃度の希釈液を、各 10 匹のマウスに投与し、同様に CF 値を求めた。また、新たに前日と同濃度になるよう 2 濃度の希釈液を調製し、各 10 匹のマウスに投与し、同様に CF 値を求めた。dcSTX と STX に対して、それぞれ 6 回の測定から 6 個の CF 値の平均値を求め、これを基準 CF 値とした。

これとは別に、STX および dcSTX について 10 週間にわたり、毎週 1 群 5 匹のマウス 5 匹に腹腔内投与して、CF 値の変動を調べた。

C. 研究結果

1. フグ毒検査法の検討

1) フグ毒検査法の見直し (簡便法の有効性)

トラフグ肝臓につき、参考法および簡便法の各抽出比で得られた測定値を比較すると、肝臓 No. 2 (参考法による測定値 138 MU/g) と肝臓 No. 4 (同 72 MU/g) では簡便法の抽出比 2 の測定値が参考法と同程度、肝臓 No. 1 (同 184 MU/g) と肝臓 No. 3 (同 178 MU/g) では 15%程度高かった。いずれの肝臓においても、抽出比が高いほど測定値は高く、両者の関係は累乗関数により近似することができた ($r = 0.57\sim 0.82$)。

簡便法の各抽出比の測定値につき、参考法の測定値に対する相対値で評価すると、相対測定値は、抽出比 3 以上で 1 より高く、回帰線から求めた抽出比 5 の相対測定値は、肝臓 No. 1~4 でそれぞれ 1.21、1.17、1.24、1.15 と、概ね 1.2 前後の値となった。

2) HPLC-FLD の妥当性 (添加回収試験)

各設定濃度 (2、5、10、20 MU/g) における TTX の回収率は、2、5、10 MU/g において、抽出比 3 で 85.9、95.0、93.2%、抽出比 5 で 82.7、100、102% であった。4-*epi*-TTX と 4,9-anhydroTTX の TTX 類縁体を加えた回収率は、2、5、10 MU/g の抽出比 3 で 107、118、115%であり、5、10 MU/g の抽出比 5 で 117、120%であった。いずれの濃度、抽出比においても、類縁体を加えると TTX のみの場合より 20%程度高い値となった。

3) フグ毒検査キットの開発

BSA-DTT-TTX 抗原を免疫したウサギでは、抗体価は免疫開始後から徐々に上昇し、6 ヶ月後にそれぞれ 1.58 および 2.41 nmol に達した。一方、KLH-EDT-TTX 抗原を免疫したウサギでは、抗体価は免疫開始 2 ヶ月後から急激に上昇した。1 羽は 4 ヶ月後に死亡したが、残り 1 羽の抗体価は、6 ヶ月半の全採血の時点で 24.5 nmol に達した。

高い抗体価を示した KLH-EDT-TTX 抗原を免疫したウサギ抗血清の反応特異性を調べたところ、TTX、4-*epi*-TTX、11oxo-TTX、5,6,11-trideoxyTTX に対し、ほぼ同程度の反応性を示した。

2. フグ等の毒性評価

1) コモンフグの毒性

凍結されたコモンフグ 97 個体中 6 個体の筋肉から TTX が検出され、毒力に換算すると 12~36 MU/g 相当となる。有毒試料 6 個体のうち、1 個体は搬入時に鮮度が悪く、3 個体は凍結融解後に腑分けを行った個体であったが、残り 2 個体は鮮度も良好で、搬入後速やかに腑分けを行ったものであった。各個体の筋肉を内臓側と表皮側に分け、それぞれ分析に供した結果、表皮側の毒性が高くなる傾向が認められた。

コモンフグ 95 個体の皮はすべて有毒であった。そのうち、1000 MU/g を超える“猛毒”レベルのものが 18 個体あった。鮮度が良い状態で腑分けをしていたにもかかわらず筋肉が有毒であった 2 個体は、皮の毒力は“猛毒”レベルであった。

コモンフグの生鮮魚および活魚では、各組織に

おける有毒個体出現率は、皮と肝臓が 100% (30 個体中 30 個体) で、卵巣も 100% (28 個体中 28 個体) であった。各組織の最高毒性値は、皮 1,990 MU/g、肝臓 422 MU/g、卵巣 3,540 MU/g で、皮と卵巣は“猛毒”レベル(1,000 MU/g 以上)となり、肝臓は“強毒”レベル(100~999 MU/g)であった。これに対し、筋肉(30 個体)と精巣(2 個体)からは毒性が検出されず、“無毒”(5MU/g 未満)であった。

次に、筋肉の毒性に及ぼす凍結・解凍の影響を調べた。凍結したが解凍させていない“凍結試料”(No.1~5)では、内部筋肉は無毒(5 MU/g 未満)であり、外部筋肉は<5~10.9 MU/g であった。凍結で毒性値が変化したのは試料 No.1 が 5.8 MU/g から 10.9 MU/g へ、試料 No.3 が 5 MU/g 未満から 5 MU/g へ増加し、試料 No.2 と No.4 はそれぞれ 9.8 MU/g から 8.1 MU/g、5.9 MU/g から 5 MU/g 未満へやや減少していた。

“凍結解凍試料”試料 (No.6~No.10) の毒力は、内部筋肉では 1 個体(試料 No.6)が 5 MU/g を示したが、それ以外は無毒(5 MU/g 未満)であった。これに対し、皮と接していた外部筋肉はすべて毒性(5~110 MU/g)を示した。とくに、高い毒力を示した試料 No.7 (110 MU/g) と No.6 (84.9 MU/g) は皮の毒力がそれぞれ 1,120 MU/g および 1,990 MU/g と著しく高かった。これに対し、皮の毒力が低かった(186 MU/g) 試料 No.10 では、外部筋肉の毒力は本マウス試験の検出限界(5 MU/g) と低かった。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性魚種判別

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、調べたフグ稚魚 23 個体のうち、8 個体はデータベースに登録されているコモフグ *Takifugu poecilonotus* の塩基配列と相同性 99.8~100%で一致した。同様に、7 個体はシマフグ *Takifugu xanthopterus* と相同性 99.8~100%を示し、6 個体はナシフグ *Takifugu vermicularis* と 99.6~100%、2 個体はヒガンフグ *Takifugu pardalis* と 99.8~100%の相同性であった。確認のためシトクロム *b* 部分領域(約 400 bp)の塩基配列を解析した結果、いずれも当該のフグ種と相同性 99.3~100%で一致した。

毒性試験

LC-MS/MS 分析した 29 試料中 25 試料は TTX が検出されず(10 ng TTX/g 未満) 4 試料からクロマトグラム上、TTX に相当するピークが検出された。このうち、1 試料だけ 56 ng TTX/g と算出されたが、他の 3 試料は定量下限値(30 ng TTX/g) 未満であった。

・ 遺伝子によるフグ類などの種判別

1) フグ類の分類に関する研究

自然交雑フグ種 20 個体、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体につき、ミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびシトクロム *b* 領域の塩基配列に基づいて母系種の同定を行った。自然交雑フグ種 20 個体はすべての個体で母系種を同定することができた。形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体においても、母系種を確認した。

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 TATC 反復配列、TGTA 反復配列、TAGA 反復配列および AAAG 反復配列であったが、TATC 反復配列の解析においてのみ、マフグおよびシ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。泳動距離から推定される PCR 産物の分子量は、マフグおよびシマフグでおおよそ 350bp および 520bp であった。そこで、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグおよびシマフグを対象に、TATC 反復配列の普遍性を確認したところ、両親種(マフグとシマフグ)の分子量の各位置に複数のバンドが見られたことから、分子量 350bp がマフグ由来、520bp はシマフグ由来であると推測された。

2) 有毒巻貝種判別法の開発

今回調べた巻貝 7 種すべてで目的とする PCR 産物(約 350 bp)の増幅がみられた。これら増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法で解析したところ、イボニシ、アカニシ、バイはデータベースの塩基配列と 100%一致した。ボウシュウボラとキンシバイについては、データベースに塩基配列が登録されていないため、当研究室で解析した別個体の結果と照合した結果、それぞれ相同性は 99.4%および 100%であった。ハナムシロとイソニナはデータベース上の種とそれぞれ 92%および

98%と、塩基配列の相同性がやや低かった。

上記で用いたプライマーで PCR 増幅されなかった加工品試料でも、加工品用に作製した特異的プライマーで、目的とする PCR 産物 (約 150 bp) の増幅がみられた。しかし、この領域内の塩基配列は、種によっては同一あるいは酷似していることがあり、「シライトマキバイ、クビレバイ、ヒモマキバイ」、「エゾボラモドキ、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」については、種が判別できない。

・ フグ類の形態分類

1) 日本産フグ類の分類

日本沿岸には 4 科 14 属 61 種のフグ類が分布することが明らかになった。その内訳は以下の通りである：ウチワフグ科 (1 属 1 種)、フグ科 (7 属 49 種)、ハリセンボン科 (3 属 7 種)、マンボウ科 (3 属 4 種)。

日本産フグ科の種構成を調べたところ、熱帯を分布の中心とするオキナワフグ属、キタマクラ属、サバフグ属、シッポウフグ属、モヨウフグ属、ヨリトフグ属の種が 35 種 (フグ科の 70%) を占めるが、その一方で日本および東アジアの温帯を分布の中心とするトラフグ属が 14 種に達することが明らかになった。

ハリセンボン科の 3 属は体表の棘の形態と棘の分布状態によって識別できること、マンボウ科の 3 属は体形や舵鱗の形態によって区別できることが明らかとなった。

2) トラフグ属の新種と学名変更を要する種

コモンフグの学名は従来 *Takifugu poecilonotus* (Temminck and Schlegel, 1850) とされていた。しかし、シタイプ (複数個体から構成されるタイプ標本) を調べたところ、クサフグとコモンフグが混じっていることが明らかになった。昨年度報告したように、過去にオランダの Boeseman がシタイプの中からレクトタイプに選んだ標本がクサフグであったため、コモンフグが学名を失うことになった。このため、コモンフグに *Takifugu flavipterus* という新たな学名を与え、新種として発表した。

コモンフグやクサフグのタイプ標本調査の結果、クサフグの学名にも問題があることが判明した。クサフグの学名は、従来 *Takifugu niphobles* (Jordan and Snyder, 1901) とされていたが、正しい学名は *Takifugu alboplumbeus* (Richardson, 1845) であることが判明した。

また、サバフグ属のクロサバフグの学名は従来 *Lagocephalus gloveri* (Abe and Tabeta, 1983) とされていたが、正しい学名は *Lagocephalus cheesemanii* (Clarke, 1897) であることが明らかになった。

3) WEB 版のフグ類同定ガイド

フグ類を簡便に識別できるようにするため、画像を多用した WEB 版のフグ類同定ガイドの作成を進め、トラフグ属とサバフグ属など主要な属の種に関する原稿を作成した。

・ PSP 標準品の検討

1) デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法の開発

ME-STX 結合体をアルカリ加水分解処理することにより ME-STX は完全に消失し、ME-dcSTX が生じることを確認した。ME-dcSTX を含む中性水溶液に過剰の ME を加えて加熱することにより、ME が脱離して生じた dcSTX を精製し、dcSTX を高収率で得ることに成功した。

2) デカルバモイルサキシトキシンの麻痺性貝毒試験法の評価

dcSTX の基準 CF 値は 0.171 (0.156 ~ 0.184) であり、STX の値 (0.185, 0.177 ~ 0.192) とほぼ同様であった。

dcSTX と STX の CF 値を 10 週間にわたって調べたところ、dcSTX では 0.168 ± 0.012 、STX で 0.180 ± 0.019 となり、それぞれの室内変動は 7.3% および 10.6% であり、今回実施した dcSTX の CF 値は、基準 CF 値の $\pm 20\%$ (0.136 ~ 0.205 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) 範囲内におさまった。

D. 考察

・ フグ毒検査法の検討

1) フグ毒検査法の見直し (簡便法の有効性)

肝臓試料において、簡便法の測定値は総じて参考法の測定値より高く、簡便法は参考法の代替法として適用可能であると考えられた。簡便法の測定値は、抽出比が高いほど高く、抽出比 5 以上でもさらに上昇する傾向が認められた。

参考法の検出下限値は 5 MU/g であり、抽出比を大きくすると検出下限値が高くなり、検出感度が低下するため、抽出比は 5 が妥当と判断した。抽出比 3 の相対測定値は抽出比 5 の値の 92~97% で、検出感度を高めたい場合は、抽出比を 3 としても問題は少ない。

2) HPLC-FLD の妥当性 (添加回収試験)

全ての設定濃度（2、5、10、20 MU/g）における回収率は、下痢性貝毒検査法の妥当性確認ガイドライン（平成 27 年 3 月 6 日付け食安基発 0306 第 4 号・食安監発 0306 第 2 号「下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について」）の目標値である 70～120%を満たしており、いずれの条件においても相対標準偏差は 15%以下となった。これより、簡便法（抽出比 3～5）による試験液の調製と HPLC-FLD による TTX 定量を組み合わせた方法は、食品の安全性を確認する試験法として妥当であると判断した。なお、相対標準偏差は抽出比 3 より抽出比 5 の方が小さくなった。HPLC-FLD による測定において、検出感度を上げるには抽出比 3 を採用し、精度を上げるには抽出比 5 を採用することが望ましい。

3) フグ毒検査キットの開発

2 種の抗原（BSA-DTT-TTX と KLH-EDT-TTX）をウサギに免疫したところ、血清の TTX に対する抗体価には大きな違いが認められた。KLH-EDT-TTX は、BSA-DTT-TTX に比較してキャリアタンパク分子に対する TTX 結合量は少ないものの抗体価は大きく上昇した。この違いが、結合に用いたジチオールによるものか、キャリアタンパク質の違いによるものかは不明である。

・フグ等の毒性評価

1) コモンフグの毒性

コモンフグ 97 個体中、筋肉が有毒であったのは 6 個体で、そのうち 1 個体は鮮度の低下、3 個体は腑分け前の凍結融解であった。残り 2 個体は凍結融解前に腑分けをして -30℃ で保管していたが、皮が“猛毒”であった。また、半身を表皮側と内臓側に分けて TTX を分析したところ、表皮側の毒性が高くなる傾向があり、皮からの移行が示唆された。

コモンフグ皮はすべて有毒であり、中には 7,000 MU/g もの猛毒を持つものが確認された。また、皮の毒性が高い個体においては、腑分け前に凍結解凍していない場合でも筋肉への移行があった。

活魚または生鮮魚では、皮の毒力が“猛毒”レベル（1,000 MU/g 以上）であっても、筋肉からは毒性は検出されなかった（5 MU/g 未満）。このことから、凍結解凍によって、皮中のフグ毒が筋肉に移行することが強く示唆されたので、生鮮のコモンフグ 10 個体を用いて、凍結・解凍モデル実験を行った。

凍結、解凍しても背骨に接した部分の筋肉（内

部筋肉）では 1 個体（5 MU/g）を除き、無毒（5 MU/g 未満）であったが、皮に接していた部分の筋肉（外部筋肉）の毒力は、“凍結試料”で <5～10.9 MU/g、“凍結解凍試料”で 5～110 MU/g になり、凍結とくに解凍によってフグ毒が移行することが明らかになった。また、凍結解凍後の皮の毒力を凍結前の値と比較すると、毒性値は明らかに減少しており、減少の割合は凍結前の 0.56～0.79 であった。

コモンフグの筋肉による食中毒のリスクを低減するために、鮮度の良いうちに有毒部位の皮を除去し、身欠きで流通することが重要と思われる。なお、除毒処理が適切になされない場合には、コモンフグの筋肉による食中毒が発生する可能性が示唆されるため、適切な工程管理法の構築と徹底が必要である。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

昨年度の調査により、瀬戸内海で漁獲、製造されたシラス加工品にナシフグ稚魚が混入しており、定量下限値（30 ng TTX/g）未満であったが TTX が検出されたため、今年度は、同海域でサンプリングされた試料について、フグ稚魚の種判別と TTX 分析を行った。

その結果、コモンフグ、シマフグ、ナシフグ、ヒガンフグの稚魚が混入していることが明らかになり、ロットによっては複数のフグ種が混在していた。ほとんどの試料では、TTX は検出されないが、検出されても定量下限値（30 ng TTX/g）未満であったが、1 試料だけ 56 ng TTX/g が検出された。しかし、TTX の比毒性（5,000 MU/mg）から、毒性値に換算すると 0.28 MU/g となり、フグ毒の基準値（10 MU/g、2.2 μg TTX/g）をはるかに下回っているので健康被害の問題となることはない。

・遺伝子によるフグ類などの種判別

1) フグ類の分類に関する研究

自然交雑フグ種 20 個体につきミトコンドリア DNA 解析法による母系種の同定を行い、マフグおよびシマフグ間に焦点を絞り、TATC 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。その結果、ミトコンドリア DNA 解析法による母系種同定の有効性が再確認され、新たに核 DNA による TATC 反復配列の電気泳動距離の違いから父系種同定に適用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、マフグとシマフグ間交雑種と推定された個体において、マフグ由来の 350bp

およびシマフグ由来の 520bp の PCR 産物が得られた。

また、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグでは 20 個体中 13 個体 (65%)、シマフグでは 10 個体中 8 個体 (80%) で上述した分子量に近い PCR 産物が得られた。しかしながら、今回用いたマフグおよびシマフグにおいて、複数本のバンドを得た個体も存在し、今回用いたマフグおよびシマフグ試料個体が必ずしも単一系統ではない可能性も考えられた。

2) 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り、テトラミンだけでなくフグ毒をもつ有毒巻貝の種判別が可能になった。また、レトルトや缶詰製品の一部で、殺菌加熱により試料中の DNA が断片化された場合でも、巻貝加工品用に作製したプライマーを用いれば PCR 増幅が可能になった。しかし、対象領域が短い分、塩基配列が同一あるいは酷似するものがある。その場合、種を正確に判別するには、別の遺伝子領域を検討する必要がある。

・フグ類の形態分類

日本産フグ類の中でフグ科魚類が最も多様性に富むことが明らかになった。また、フグ科魚類の種レベルの識別には体色が重要であることが判明した。体色は種によって特有のパターンをもっているが、ある程度の種内変異も示す。このため、種によって着目すべき体色パターンが異なる。種同定を正しく行うためには、体色をカラー写真で保存し、詳細な検討を行えるようにする必要がある。また、フグ類の種に特異的な体色パターンが背面に出現することもあるため、側面写真と背面写真の両方を撮影しておくことが望ましい。

本研究によって、日本の沿岸で最も普通に見られるコモンフグとクサフグに分類学的問題があることが明らかになった。この両種は形態が似ているばかりではなく、幼魚や若魚のときには体色もよく似ている。このためコモンフグのシタイプにクサフグが混入していたと考えられる。コモンフグを新種として発表し、クサフグの学名を変更する必要が生じた。フグ科魚類の分類は他の魚類と比べると困難なため、今後も類似の問題が発見される可能性がある。

以上の結果を含め、フグ類を鑑別するため、画像を多用した WEB 版のフグ類同定ガイドの作成

を進めている。

・PSP 標準品の検討

1) デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法の開発

現在のところ dcSTX 標品は、C1, C2 を ME などのチオールで処理して得られる GTX5 を中性付近で煮沸する、あるいは C1, C2 を中性付近で煮沸して得られる dcGTX2 と dcGTX3 の混合物を ME 処理することにより調製されている。これらの方法では、dcSTX に混入する微量の STX をカラムクロマトグラフィー等で完全に分離することは困難である。本研究で使用した、pH 12 の水溶液中で煮沸する条件下では、収率は若干低下するものの ME-STX の carbamoyl 側鎖を完全に加水分解・脱離して、ME-dcSTX に変換できる。そして、ME-dcSTX を ME 処理することで容易に dcSTX を回収することができ、高純度の dcSTX の大量調製が可能になる。

2) デカルバモイルサキシトキシンの麻痺性貝毒試験法の評価

dcSTX の基準 CF 値は STX のそれとほぼ同じであることが確認され、さらに、10 週間測定した CF 値の平均は、STX と dcSTX で同様であり、dcSTX は長期間使用しても再現性が得られる物質であることがわかった。また、CF 値の変動の幅は $\pm 16\%$ (0.143 ~ 0.198 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) と、AOAC OM 959.08 で示された基準 CF 値の $\pm 20\%$ 以下であった。

E. 結論

・フグ毒検査法の検討

1) フグ毒検査法の見直し

参考法は抽出操作が煩雑で効率が悪いという、試料残渣に TTX が残留し、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、迅速で、かつより真の値に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。

2) HPLC-FLD の妥当性 (添加回収試験)

添加回収試験により、HPLC-FLD は検出感度、精度ともに高く、研究上のみならず、食品の安全性を確認する試験法としても有用であることが示された。今後は、室内および室間再現精度の妥当性についても検討する必要がある。

3) フグ毒検査キットの開発

EDT を 4,9-anhydroTTX に作用させ、TTX と EDT

の結合体(EDT-TTX 結合体)を作成し、マレイミド基を導入したスカシガイヘモシアニンに導入して調製した抗原をウサギに隔週で14回免疫することにより、TTXに対する抗血清(ポリクローナル抗体)を得ることができた。同抗体はTTXだけでなく、11oxo-TTXや4epi-TTXなどのTTX類縁体とも抗原交差性を示すことが確認された。

・フグ等の毒性評価

1) コモンフグの毒性

凍結解凍されたコモンフグ97個体のほとんどの筋肉が無毒であったが、6個体からTTXが検出され、その毒力レベルは“弱毒”(10~99 MU/g)であった。これらについては、皮からの移行の可能性が示唆された。そこで、活魚または生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た。その結果、活魚または生鮮魚では、皮の毒力が“猛毒”レベルであっても筋肉から毒性は検出されなかった。凍結試料の筋肉が有毒であったのは、凍結解凍によって皮からフグ毒が移行したためと結論づけられた。コモンフグのみならず皮の毒力が強いフグでは、生鮮なうちに皮を剥ぐなどして、筋肉への毒の移行、汚染を防ぐ必要がある。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

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、データを集積するため、しらす加工品に混入したフグ稚魚の種と毒性を調べた。2015年に瀬戸内海で集めた試料から、有毒種であるコモンフグ、シマフグ、ナシフグ、ヒガンフグの稚魚の混入がみられた。一部の試料ではTTXが検出されたが、最大値で56 ng TTX/g (0.28 MU/g)であり、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予定である。

・遺伝子によるフグ類などの種判別

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、ミトコンドリアDNA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、昨年度トラフグおよびマフグからなる交雑種におけるGAAAG反復配列の有効性を明らかにし、今年度はマフグおよびシマフグからなる交雑種においてTATC反復配列から推定できる可能性を明らかにした。しかしながら、本TATCマーカーがその他の交雑種フグに適用できるか、また、他のマイクロサテライト領域についても今後引き続き検討する必要がある。

2) 有毒巻貝種判別法の開発

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急がれている。ミトコンドリアDNA 16S rRNA部分領域を対象にしたPCRを行い、ダイレクトシーケンス法による種判別を試みたところ、テトラミン中毒だけでなくフグ毒中毒のおそれのある巻貝の種判別が可能になった。さらに、高温で処理された加工品については、別の特異的プライマーを用いることでPCR増幅に成功し、種判別ができるようになった。しかし、一部の巻貝ではターゲットとした領域の塩基配列が完全に一致しているため、判別不能のものもあり、別の遺伝子領域を検討する必要がある。

・フグ類の形態分類

日本沿岸には4科14属61種のフグ類が分布し、熱帯性の種が70%を占め、温帯性の種は30%であることが明らかになった。フグ類の各科の内訳は以下の通りで、フグ科の多様性が最も高い：ウチワフグ科(1属1種)、フグ科(7属49種)、ハリセンボン科(3属7種)、マンボウ科(3属4種)、コモンフグが新種であることが明らかになったため、新たに*Takifugu flavipterus*という学名を与えた。また、クサフグとクロサバフグの学名について整理した。しかし、標準和名は変更ないので、フグのリスク管理には問題や混乱はない。

以上を含め、WEB版のフグ類同定ガイドの作成に取り組んでいる。

・PSP標準品の検討

1) デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法の開発

日本沿岸で毒化した貝類の主要成分であるGTX群にMEを作用させて得られるME-STX結合体を塩基性条件下で加水分解して、ME-dcSTX結合体を調製し、これを過剰のMEで処理することによ

り、高収率で dcSTX を得る方法を確立した。次年度は引き続き dcSTX の調製を継続し、qNMR による値付けを検討する予定である。

2) デカルバモイルサキシトキシシンによる麻痺性貝毒試験法の評価

AOAC OM 959.08 に準じて dcSTX により生物試験の標準化を行うことを検討した。今年度は、0.003 M 塩酸溶液で希釈したものについて基準 CF 値を求め、その後定期的にマウスアッセイを行ったが、dcSTX は STX と同様の挙動を示し、生物試験の標準化に使用できることが確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Jiang, H. Iwashita, O. Arakawa, T. Takatani: Growth and PST production of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* cultured under monochromatic light. *Aquacult. Sci.*, 64, 379-390 (2016).
- 2) 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* 2016; 111: 6-12.
- 3) C. Acar, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Toxicity of the Lessepsian pufferfish *Lagocephalus sceleratus* from eastern Mediterranean coasts of Turkey and species identification by rapid PCR amplification. *Eur. Food Res. Technol.* 2016; DOI 10.1007/s00217-016-2721-1.
- 4) K. Matsuura, I. Middleton: Discovery of a larva of the Aracanidae (Actinopterygii, Tetraodontiformes) from New Zealand. *Ichthyol. Res.*, 2016; doi: 10.1007/s10228-016-0533-8.
- 5) K. Matsuura, T. P. Satoh: Redescription of *Lagocephalus cheesemani* (Clarke, 1897), a senior synonym of *Lagocephalus gloveri* Abe and Tabeta, 1983 based on morphological and genetic comparisons (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae). *Ichthyol. Res.*, 2016; doi: 10.1007/s10228-016-0547-2.
- 6) K. Matsuura, A. Kaneko, E. Katayama: Underwater observations of the rare deep-sea fish *Triodon macropterus* (Actinopterygii,

Tetraodontiformes, Triodontidae) with comments on the fine structure of the scales. *Ichthyol. Res.*, 2016; doi: 10.1007/s10228-016-0555-2.

- 7) Y. V. Dyldin, K. Matsuura, S. S. Makeev: Comments of puffers of the genus *Takifugu* from Russian waters with the first record of yellowfin puffer, *Takifugu xanthopterus* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) from Sakhalin Island. *Bull. Nation. Mus. Nat. Sci., Ser. A*, 2016; 42: 133-141.
- 8) R. Tatsuno, W. Gao, K. Ibi, T. Mine, K. Okita, G. N. Nishihara, T. Takatani, O. Arakawa: Profile differences in tetrodotoxin transfer to skin and liver in the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Toxicon*, 130, 73-78 (2017).
- 9) K. Matsuura: Taxonomic and nomenclatural comments on two puffers of the genus *Takifugu* with description of a new species, *Takifugu flavipterus*, from Japan (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Tetraodontidae). *Bull. Nation. Mus. Nat. Sci., Ser. A*, 2017; 43: 71-80.
- 10) 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. 著書・総説

- 1) 松浦啓一, 日本産フグ類図鑑, 東海大学出版部, 秦野, 2017, 127 pp.
- 2) 長島裕二, 桐明 絢: 海洋危険生物 食べて中毒; とくに魚について. *中毒研究* 2016; 29: 3-9.
- 3) 長島裕二, 桐明 絢: 魚介類の毒とその特徴. *アクアネット* 2016; 19 (12): 22-26.
- 4) 荒川 修: フグ毒の蓄積機構と生理機能. *アクアネット*, 2016; 19 (12): 27-31.
- 5) 佐藤 繁, 松浦啓一: シマキンチャクフグ・タキフグ/フグを知って中毒防止, 食と健康 2016; 通巻 708: 48-49.
- 6) 佐藤 繁, 松浦啓一: シッポウフグ・アマミホシゾラフグ/フグを知って中毒防止, 食と健康 2016; 通巻 709: 30-31.
- 7) 佐藤 繁, 松浦啓一: シボリキンチャクフグ・ナミダフグ/フグを知って中毒防止, 食と健康 2016; 通巻 710: 30-31.
- 8) 長島裕二, 桐明 絢: しらすへのフグ稚魚混入. *全水卸* 2016; 356: 8-11.

3. 学会発表

- 1) S. Jiang, H. Iwashita, O. Arakawa, T. Takatani: Growth and PSP production of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* cultured under monowavelength light irradiation. The 7th World Fisheries Congress, Busan, May 2016.
- 2) K. Taniguchi, H. Takao, K. Onuki, Y. Sakakura, T. Takatani, O. Arakawa, T. Noguchi: Providing pufferfish liver for human consumption (1): Toxicity evaluation. The 7th World Fisheries Congress, Busan, May 2016.
- 3) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Pharmacokinetics and biliary excretion of tetrodotoxin in the marine pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. 7th World Fisheries Congress in Busan, Korea, May, 2016.
- 4) O. Arakawa: Marine toxins responsible for food poisonings in Japan. 2016 International Conference on Food Safety Applications, Kaohsiung, September 2016.
- 5) M. J. Kim, O. Arakawa, T. Takatani: Toxicity of *Palythoa* zoanthids from Yakushima Island, Japan. The 15th Joint Symposium between Nagasaki University and Pukyong National University on Marine and Fisheries Sciences, Nagasaki, October 2016.
- 6) 長島裕二, 岡山桜子: ふぐ卵巣ぬか漬けの毒性低下のメカニズム 第26回西日本ふぐ研究会, 山口県下関市, 平成28年5月.
- 7) 桐明 絢, 石崎松一郎, 長島裕二, 塩見一雄: カサゴ目魚類刺毒の性状および構造解析. 第63回トキシシンポジウム, 山形県天童市, 平成28年7月.
- 8) 松浦啓一: クサフグの学名が変更され, コモンフグは未記載種となる. 2016年度日本魚類学会年会. 2016年9月, 岐阜県岐阜市.
- 9) 永井 慎, 岡山桜子, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬け工程での減毒に関する微生物探索に関する研究. 平成28年度日本水産学会秋季大会, 奈良県奈良市, 平成28年9月.
- 10) 徐 超香, 太田 晶, 岡山桜子, 崔 浩, 石崎松一郎, 長島裕二: 食用フグの見直し - 日本沿岸ホシフグの安全性評価 - 第112回日本食品衛生学会学術講演会, 北海道函館市, 平成28年10月.
- 11) 岡山桜子, 永井 慎, 石崎松一郎, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬けにおける減毒要因の検討 第112回日本食品衛生学会学術講演会. 北海道函館市, 平成28年10月.
- 12) 長島裕二: しらすへのフグ稚魚の混入について. 平成28年度水産利用関係者研究開発推進会議, 神奈川県横浜市, 平成28年11月.
- 13) 大城直雅, 國吉杏子, 堀田彩乃, 鈴木貴文, 杉田典子, 松浦啓一, 中島安基江, 安西洋一: コモンフグの毒性分析. 第53回全国衛生化学技術協議会年会, 青森県青森市, 2016年11月.
- 14) 福田 遼, 佐々木杜汰, 菅向志郎, 高谷智裕, 荒川 修: 遠州灘産交雑フグの毒性. 平成28年度日本水産学会九州支部大会, 長崎, 2016年12月.
- 15) 8) 長島裕二: フグ食中毒とフグ毒中毒. 平成28年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会市民公開講座, 石川県金沢市, 平成29年2月.
- 16) 長島裕二: 魚介類の毒素タンパク質. 平成29年度日本水産学会春季大会シンポジウム「水圏生物タンパク質科学の新展開」, 東京都港区, 平成29年3月.
- 17) 宗宮史樹, 高谷智裕, 青島 隆, 森井康宏, 荒川 修: 屋久島および石垣島産オウギガニ科カニ類の毒性プロファイル. 平成29年度日本水産学会春季大会, 東京, 2017年3月.
- 18) 姜 珊珊, 桑野和可, Gregory N. Nishihara, 浦田千里, 下田隆介, 高谷智裕, 荒川 修: 窒素安定同位体を用いた紅藻マクリの培養. 平成29年度日本水産学会春季大会, 東京, 2017年3月.
- 19) 佐藤 繁, 藤田沙和衣, 森 美貴, 犬童優華, 佐伯富貴, 高石鈴香: デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法. 平成29年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成29年3月.
- 20) 高石鈴香, 小杉英信, 安元 剛, 小檜山篤志, 佐藤 繁: 新規抗原を用いて作製した抗フグ毒ポリクローナル抗体の性状. 平成29年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成29年3月.
- 21) 崔 浩, 横塚峻介, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: 凍結解凍によるコモンフグ筋肉へのフグ毒の移行. 平成29年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成29年3月.
- 22) 大木理恵子, 松本拓也, 石崎松一郎, 長島裕二: 組織培養法によるバイのテトロドトキシンの

取り込み．平成 29 年度日本水産学会春季大会，東京都港区，平成 29 年 3 月．

23) 松本拓也，北島冴美，青柳 充，三苫好治，石崎松一郎，長島裕二：トラフグ薬物排泄トランスporter-Bcrp をコードする Abcg2 遺伝子のクローニング．平成 29 年度日本水産学会春季大会，東京都港区，平成 29 年 3 月．

24) 大城直雅：コモンフグの毒性評価．第 33 回マリントキシン研究会，東京都港区，2017 年 3 月．

25) 長島裕二：しらすへのフグ稚魚の混入について．静岡県水産技術研究所第 62 回水産加工技術セミナー，静岡県静岡市，平成 29 年 3 月．

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 佐藤 繁，藤田紗和衣，森 美貴(発明者)：デカルバモイルサキシトキシン及びその類縁体の製造方法，特開 2016-204270，2016 年 12 月 8 日公開．

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 28 年度分担研究報告書

フグ毒検査法の見直しとコモングの毒性調査

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) 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、コモングの毒性に関する既得毒性データを整理した。まず、天然トラフグ有毒肝臓とオキナワフグの筋肉・皮を用い、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、総じて簡便法の測定値の方が参考法の測定値より高かった。また、簡便法の測定値は抽出比が高いほど高くなったが、抽出比を大きくすると検出下限値が高くなるため、抽出比は 3~5 が望ましいと判断された。次に、HPLC-FLD の妥当性について検討した。すなわち、無毒養殖トラフグ肝臓を用いて TTX の添加回収試験を行ったところ、各添加濃度 (2、5、10、20 MU/g) における回収率は、ガイドライン目標値の 70~120% を満たし、相対標準偏差も 15% 以下となった。したがって、簡便法 (抽出比 3~5) による試験液の調製と HPLC-FLD による TTX 定量を組み合わせた方法は、食品の安全性を確認する試験法として妥当であると判断された。一方、2003~2004 年に有明海産コモングを対象に行った毒性調査で得られた未発表データを整理したところ、凍結解凍魚の筋肉は 2/3 が有毒で、「強毒」個体もみられるのに対し、鮮魚の筋肉の場合、有毒個体の割合は全体の 4% で、毒力も 30 MU/g 未満であること、凍結解凍魚では、ナシフグ同様、凍結解凍により有毒部位 (主に皮) から筋肉への毒の移行が起こること、などが示された。

A. 研究目的

魚貝類による自然毒食中毒の中で、日本ではフグ毒テトロドトキシン (TTX) によるものが最も多く、致死率も高い。そのため、厚生労働省は「フグの衛生確保について」の通知を出し、食用可能なフグの種類と部位、漁獲海域を定めるとともに、都道府県条例等でフグを取り扱うことができる場所と人を制限し、その安全性を確保している。前述の通知は、谷博士が 1945 年に発表した「日本産フグの毒力表」に基づいて策定されたものであるが、近年、コモング等、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。

本研究ではフグ毒のリスク管理に資するため、昨年度に引き続き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、および食品の安全性を確認する試験法としての HPLC-FLD の妥当性について検討した。また、緊急課題のコモング毒性調査に関しては、当該フグ試料を新たに入手することができなかつたため、研究分担者らの既得毒性データを整理した。

B. 研究方法**1) フグ毒検査法の見直し**

簡便法の有効性

天然トラフグ肝臓 2 個体 (No. 3 および No. 4) 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。一方、簡便法として、試料に 1、2、4、5 倍量の 0.1% 酢酸を添加して加熱抽出後、混合液をそれぞれ 2、3、5、6 倍量に定容して遠心分離後の上清を試験液(それぞれ抽出比 2、3、5、6)とした。いずれの試験液も、C18 カートリッジにより固相抽出し、メンブランフィルターでろ過した後、HPLC-FLD で TTX 量を測定した。

一方、オキナワフグの筋肉と皮につき、それぞれ 2 個体分ずつ合一し、各 2 種のホモジネート試料を調製後、参考法による試験液、および簡便法における抽出比 5 の試験液を調製した。いずれもメンブランフィルターでろ過後、HPLC-FLD で TTX 量を測定した。

HPLC-FLD の妥当性 (添加回収試験)

養殖トラフグの無毒肝臓を試料とし、それらのホモジネートに既知量の TTX 標品を添加して TTX 濃度 2、5、10、20 MU/g (それぞれ規制値の 1/5、1/2、1、2 倍濃度) の添加試料を調製した。2、5、10 MU/g の添加試料には、2 および 4 倍量の 0.1% 酢酸を添加して加熱抽出し、遠心分離して脂質を除いた後、混合液をそれぞれ 3 および 5 倍量に定容した (それぞれ抽出比 3 および 5)。20 MU/g の添加試料には、2 倍量の 0.1% 酢酸を添加して加熱抽出し、遠心分離後、脂質を除いて 3 倍量に定容した (抽出比 3)。各定容抽出液につき、遠心分離後の上清を分取し、C18 カートリッジにより固相抽出した。さらにメンブランフィルターでろ過後、HPLC-FLD で TTX、4-*epi*TTX、および 4,9-anhydroTTX 量を測定し、添加 TTX 濃度に対する比率を求めて回収率とした。なお、4-*epi*TTX と 4,9-anhydroTTX は標品が無いため、TTX と各類縁体の蛍光強度を同等と仮定して定量した。

2) コモンフグ既得毒性データ

研究分担者らは、2003 年から 2004 年にかけて、有明海産コモンフグの毒性調査を行った。ここでは、その際得られた未発表データのうち、筋肉の毒性、ならびに凍結解凍による毒の部位間移行について検討したものを整理した。

筋肉の毒性

2003 年 1 月～7 月、および同年 8 月～2004 年 10 月に有明海で漁獲されたコモンフグ、それぞ

れ凍結解凍魚 66 個体、および鮮魚 125 個体につき、簡便法 (抽出比 2) によって筋肉の試験液を調製し、マウス毒性試験で毒力を測定した。

凍結解凍による毒の移行

2004 年 10 月に有明海で漁獲されたコモンフグ 20 個体を試料とした。このうち、10 個体は鮮魚の状態、残り 10 個体は一旦凍結後、4 で緩慢解凍した後、各部位に分けた。この際、筋肉については、皮に接する部分を皮側、内臓に接する部分を内臓側、残りを中心部として区分した。各部位につき、と同様の方法で毒力を測定した。

C. 研究結果

1) フグ毒検査法の見直し

簡便法の有効性

トラフグ肝臓につき、参考法、および簡便法の各抽出比で得られた測定値 (肝臓 No. 1 および No. 2 については、昨年度のデータ) を図 1 に示す。肝臓 No. 2 (参考法による測定値 138 MU/g) と肝臓 No. 4 (同 72 MU/g) では簡便法の抽出比 2 の測定値が参考法と同程度、肝臓 No. 1 (同 184 MU/g) と肝臓 No. 3 (同 178 MU/g) では 15% 程度高い値となった。いずれの肝臓においても、抽出比が高いほど測定値は高く、両者の関係は累乗関数により近似することができた ($r = 0.57 \sim 0.82$)。

簡便法の各抽出比の測定値につき、参考法の測定値に対する相対値で表したものを図 2 に示す。相対測定値は、いずれも抽出比 3 以上で 1 より高く、回帰線から求めた抽出比 5 の相対測定値は、肝臓 No. 1～4 でそれぞれ 1.21、1.17、1.24、1.15 と、概ね 1.2 前後の値となった。

オキナワフグの筋肉と皮につき、参考法と簡便法 (抽出比 5) により得られた測定値を表 1 に示す。肝臓同様、筋肉と皮においても、簡便法の測定値の方が参考法の測定値より高く、相対測定値は筋肉で平均 1.06、皮では平均 1.08 と、ともに 1.1 弱の値となった。

HPLC-FLD の妥当性 (添加回収試験)

各設定濃度における回収率を表 2 に示す。TTX 本体の回収率は、2、5、10 MU/g において、抽出比 5 では 82.7、100、102%、抽出比 3 では、85.9、95.0、93.2% であった。また、20 MU/g における抽出比 3 の回収率は 74.5% であった。類縁体を加えた回収率は、5、10 MU/g の抽出比 5 で 117、120%、2、5、10 MU/g の抽出比 3 で 107、118、115% であった。また、20 MU/g の抽出比 3 で 92.9% であ

り、いずれの濃度、抽出比においても、類縁体を加えると TTX 本体のみの場合より 20%程度高い値となった。なお、2 MU/g の抽出比 5 においては、4-*epi*TTX および 4,9-anhydroTTX が不検出であったため、TTX 本体の回収率と同じ結果となった。ブランク試料においては、TTX、4-*epi*TTX、および 4,9-anhydroTTX 検出位置にピークは認められなかった。

2) コモンフグ既得毒性データ

筋肉の毒性

コモンフグ筋肉の毒力を図 3 に示す。2003 年 1 月～7 月の 66 個体（凍結解凍魚）については、22 個体が‘無毒’（<10 MU/g）、42 個体が‘弱毒’（10～100 MU/g）、2 個体が‘強毒’（100～1000 MU/g）で、最高毒力は 121 MU/g であった。一方、2003 年 8 月～2004 年 10 月の 125 個体（鮮魚）の場合、5 個体のみ‘弱毒’（最高毒力 28 MU/g）で、残りの 120 個体はいずれも‘無毒’であった。

凍結解凍による毒の移行

鮮魚と凍結解凍魚の各部位の毒力を図 4 に示す。筋肉については、鮮魚の場合、皮側に若干（最高 7 MU/g）の毒性が検出されたものの、いずれも‘無毒’であったのに対し、凍結解凍魚は皮側で平均 58 MU/g、中心部で 34 MU/g、内臓側で 37 MU/g の毒力を示した。一方、筋肉以外の部位（皮、肝臓、および生殖腺）の毒力は、筋肉とは対照的に、いずれも凍結解凍魚より鮮魚の方が高かった。毒力の体内分布を図 5 に示す。鮮魚では皮の割合が最も高かったのに対し、凍結解凍魚では筋肉の割合が最も高くなった。

D. 考察

1) フグ毒検査法の見直し

簡便法の有効性

肝臓試料において、簡便法の測定値は総じて参考法の測定値より高く、簡便法は参考法の代替法として適用可能であると考えられた。簡便法の測定値は、抽出比が高いほど高く、抽出比 5 以上でもさらに上昇する傾向が認められた。しかし、回歸線から推定した抽出比 10 の相対測定値は 1.27～1.31 で、抽出比 5 の値より 5～10%程度高いに過ぎない。また、昨年度に報告したデータを見ると、簡便法における抽出比 5 および 6 の測定値は、参考法において試料の 10 倍量に定容した試験液（抽出比 10 相当）の測定値を若干上回っており、抽出効率は抽出比 5 以上でほぼ平衡状態に

達しているものと推察される。さらに、参考法の検出下限値は 5 MU/g であり、抽出比を大きくするとこの検出下限値が高くなり、検出感度が低下することから、抽出比は 5 が最も妥当であると判断した。抽出比 3 の相対測定値は抽出比 5 の値の 92～97%で、検出感度をさらに高めたい場合は、抽出比を 3 としても問題は少ない。

筋肉と皮の場合、肝臓ほど大きな差ではないが、簡便法による測定値は参考法より 2～13%高い結果となった。これらの部位についても、簡便法は適用可能と考えられる。なお、皮については、ゼラチン質が多く、カラムに負荷がかかるため、抽出比は 5 以上が適切と考えられる。

HPLC-FLD の妥当性（添加回収試験）

全ての設定濃度における回収率は、下痢性貝毒検査法の妥当性確認ガイドライン（平成 27 年 3 月 6 日付け食安基発 0306 第 4 号・食安監発 0306 第 2 号「下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について」）の目標値である 70～120%を満たしており、いずれの条件においても相対標準偏差は 15%以下となった。これより、簡便法（抽出比 3～5）による試験液の調製と HPLC-FLD による TTX 定量を組み合わせた方法は、食品の安全性を確認する試験法として妥当であると判断した。なお、相対標準偏差は抽出比 3 より抽出比 5 の方が小さくなった。HPLC-FLD による測定において、検出感度を上げるには抽出比 3 を採用し、精度を上げるには抽出比 5 を採用することが望ましいと考えられる。TTX 標品の測定では TTX のみを検出したが、回収試料の測定では 4-*epi*TTX および 4,9-anhydroTTX と推定されるピークが出現した。前述のとおり、類縁体を含めると回収率が 20%程度上がる傾向が確認され、肝臓試料中において一定量の TTX が類縁体に変換することが示唆された。

2) コモンフグ既得毒性データ

筋肉の毒性

凍結解凍魚では、供試個体の 2/3 が有毒で、‘強毒’個体も 2 個体みられた。したがって、凍結解凍したコモンフグの筋肉は、食用に適さないと判断された。これに対し、鮮魚の場合、有毒個体の割合は全体の 4%で、最高毒力も 28 MU/g と低かった。今回、低頻度ながら鮮魚の筋肉からも‘弱毒’が検出されたが、コモンフグは生体でも筋肉に毒をもつことがあるのか、あるいは鮮魚でも保存状態によっては毒の移行が起こりうるのか、今後さらに検討する必要がある。

凍結解凍による毒の移行

前述のように、鮮魚を凍結解凍すると、皮、肝臓、および生殖腺の毒力が顕著に低下し、鮮魚ではほとんど無毒であった筋肉が毒化した。このことは、ナシフグ同様、コモンフグでも凍結解凍により、有毒部位から筋肉への毒の移行が起こることを示している。また、凍結解凍魚の筋肉において皮側の毒力が中心部や内臓側より高かったこと、凍結解凍により、最も多量に毒が分布する部位が皮から筋肉に遷移したことから、皮が主要な毒供給部位であると推察された。

E. 結論

参考法は抽出操作が煩雑で効率が悪いうえ、試料残渣に TTX が残留し、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、添加回収試験により、HPLC-FLD は感度、精度ともに高く、研究上のみならず、食品の安全性を確認する試験法としても有用であることが示された。今後さらに、室内および室間再現精度の妥当性についても検討することが望ましい。

コモンフグは、ナシフグ同様、凍結解凍により有毒部位（主に皮）から筋肉への毒の移行が起こることが示された。本種は本来、筋肉に毒をもつのかどうか、活魚ないし鮮魚であれば、特定の処理により筋肉は食用可能であるのかどうか、今後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) 荒川 修: フグ毒の蓄積機構と生理機能. アクアネット, 222, 27-31 (2016).
- 2) S. Jiang, H. Iwashita, O. Arakawa, T. Takatani: Growth and PST production of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* cultured under monochromatic light. *Aquacult. Sci.*, 64, 379-390 (2016).
- 3) R. Tatsuno, W. Gao, K. Ibi, T. Mine, K. Okita, G. N. Nishihara, T. Takatani, O. Arakawa: Profile differences in tetrodotoxin transfer to skin and liver in the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Toxicon*, 130, 73-78 (2017).

2. 学会発表

- 1) S. Jiang, H. Iwashita, O. Arakawa, T. Takatani: Growth and PSP production of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* cultured under monowavelength light irradiation. The 7th World Fisheries Congress, Busan, May 2016.
- 2) K. Taniguchi, H. Takao, K. Onuki, Y. Sakakura, T. Takatani, O. Arakawa, T. Noguchi: Providing pufferfish liver for human consumption (1): Toxicity evaluation. The 7th World Fisheries Congress, Busan, May 2016.
- 3) O. Arakawa: Marine toxins responsible for food poisonings in Japan. 2016 International Conference on Food Safety Applications, Kaohsiung, September 2016.
- 4) M. J. Kim, O. Arakawa, T. Takatani: Toxicity of *Palythoa* zoanthids from Yakushima Island, Japan. The 15th Joint Symposium between Nagasaki University and Pukyong National University on Marine and Fisheries Sciences, Nagasaki, October 2016.
- 5) 福田 遼, 佐々木杜汰, 菅向志郎, 高谷智裕, 荒川 修: 遠州灘産交雑フグの毒性. 平成 28 年度日本水産学会九州支部大会, 長崎, 2016 年 12 月.
- 6) 宗宮史樹, 高谷智裕, 青島 隆, 森井康宏, 荒川 修: 屋久島および石垣島産オウギガニ科カニ類の毒性プロファイル. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2017 年 3 月.
- 7) 姜 珊珊, 桑野和可, Gregory N. Nishihara, 浦田千里, 下田隆介, 高谷智裕, 荒川 修: 窒素安定同位体を用いた紅藻マクリの培養. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2017 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

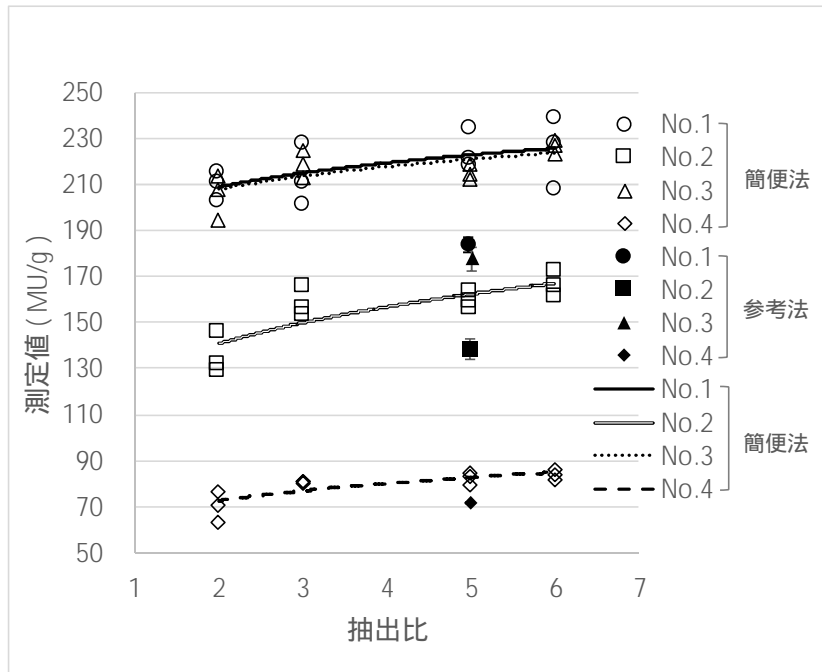


図1 参考法と簡便法の各抽出比で得られた測定値の比較（トラフグ肝臓）

回帰線：No. 1, $y = 198.91x^{0.0706}$; No. 2, $y = 126.21x^{0.1563}$;
 No. 3, $y = 198.55x^{0.0666}$; No. 4, $y = 65.627x^{0.1435}$

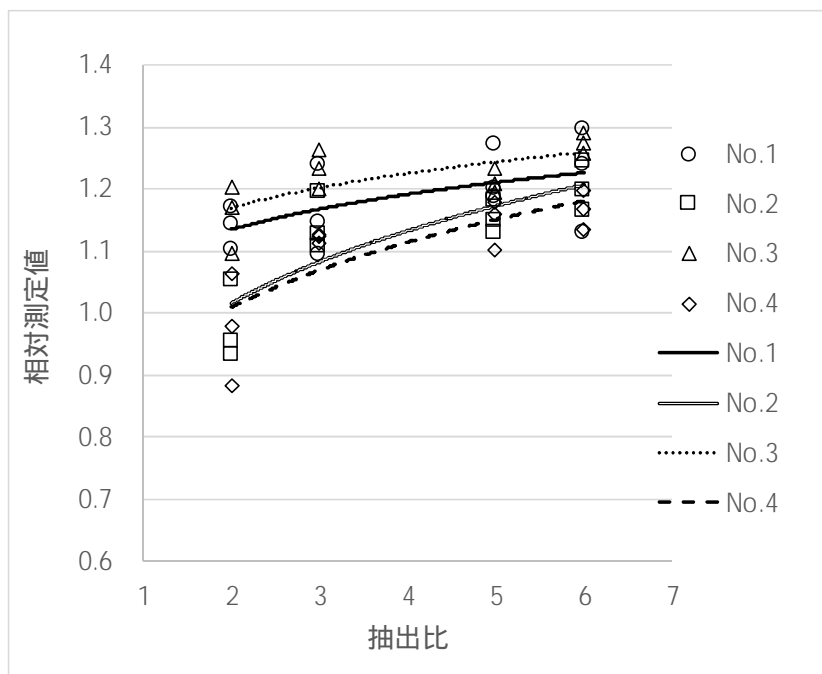


図2 簡便法測定値の参考法測定値に対する比率（相対測定値）と抽出比の関係

回帰線：No. 1, $y = 1.0807x^{0.0706}$; No. 2, $y = 0.9119x^{0.1563}$;
 No. 3, $y = 1.1174x^{0.0666}$; No. 4, $y = 0.9133x^{0.1435}$

表1 参考法と簡便法（抽出比5）による測定値の比較（オキナワフグ筋肉および皮）

部位	試料No.	参考法		簡便法		相対値 (対参考法)
		平均測定値 (MU/g)	RSD (%)	平均測定値 (MU/g)	RSD (%)	
筋肉	1	72.4	0.60	77.7	1.8	1.07
	2	60.3	3.4	63.1	4.0	1.05
皮	1	1063	6.9	1086	2.9	1.02
	2	220	7.7	250	11	1.13

表2 添加回収試験（n=3）の結果

設定濃度	抽出比	TTX本体		TTX本体 + 類縁体	
		平均回収率 (%)	RSD (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)
2 MU/g	5	82.7	11	82.7	11
	3	85.9	11	107	9.7
5 MU/g	5	100	1.9	117	2.1
	3	95.0	5.3	118	6.2
10 MU/g	5	102	0.21	120	0.95
	3	93.2	12	115	13
20 MU/g	3	74.5	8.5	92.9	6.6

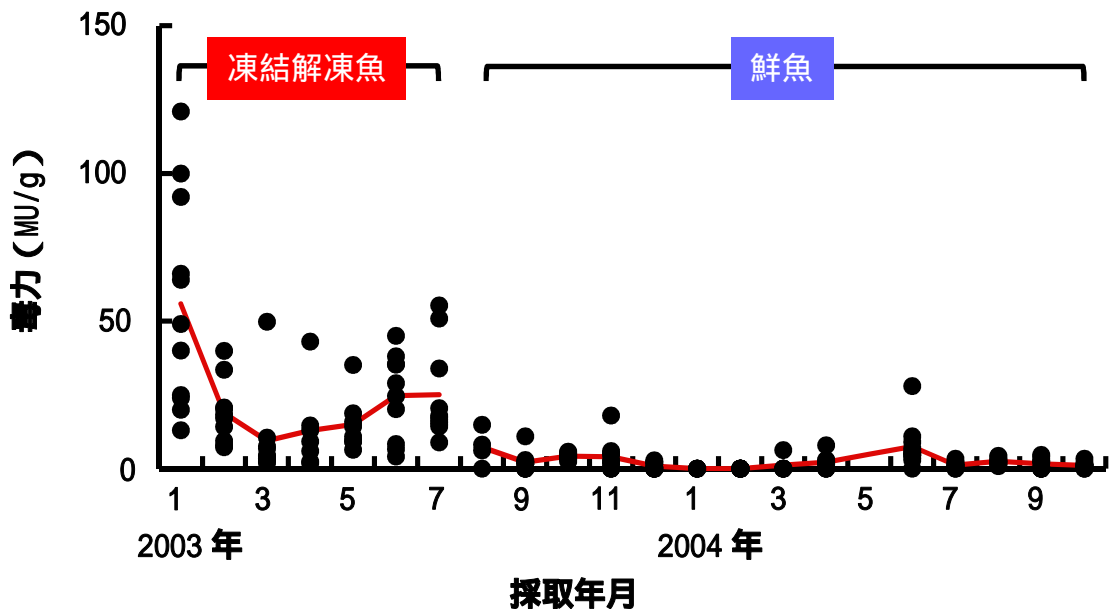


図3 有明海産コモンフグ筋肉の毒力は各個体の毒力、折れ線は月別平均毒力の推移を示す。

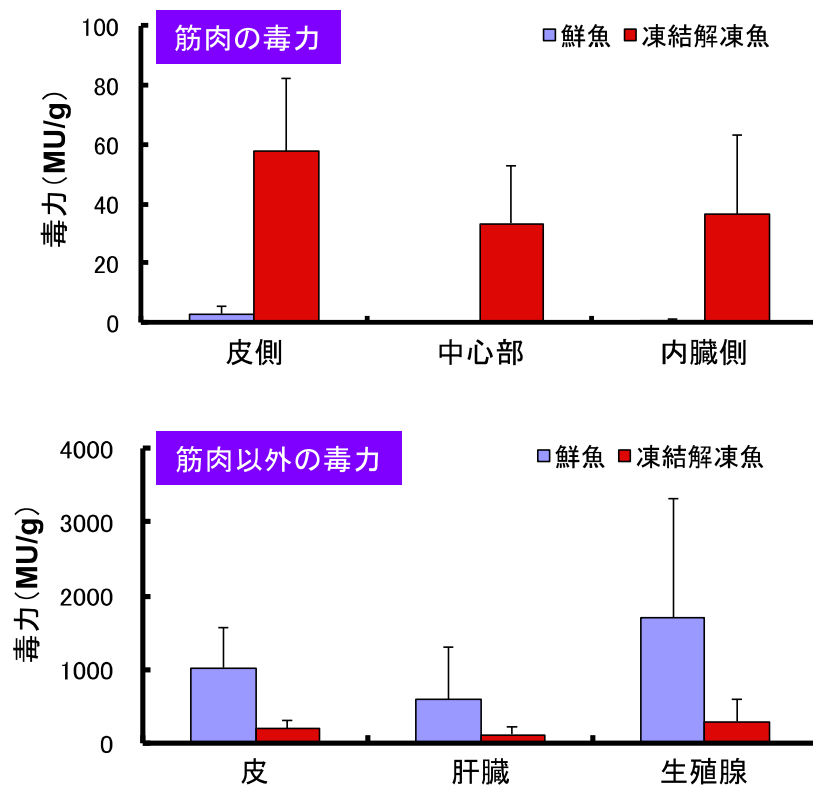


図4 鮮魚と凍結解凍魚の各部位の毒力

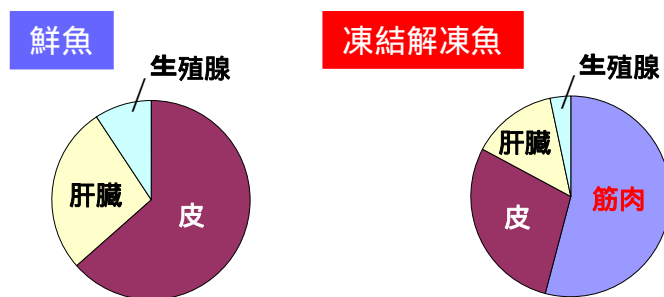


図5 鮮魚と凍結解凍魚における毒の体内分布

フグ毒検査キットの開発とフグの毒性評価

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フグやヒガンフグの筋肉が高い毒性を示すことを報告している。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。フグ毒は従来、マウス試験法や HPLC 蛍光法などで定量されてきたが、これらの方法では多数検体に対応することは困難である。本研究は、高感度かつ特異的にフグ毒テトロドトキシンとその関連成分を分析するための ELISA 法を開発するために、新規の抗ポリクローナル抗体を作成し、その性状を調べたものである。

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、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* およびコモフグ *T. poecilonotus* には、筋肉が 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。フグ毒は従来、マウス試験法や HPLC 蛍光法などで定量されてきたが、これらの方法では多数検体に対応することは困難である。本年度本研究では、高感度かつ特

異的にフグ毒テトロドトキシン(TTX)とその関連成分を分析するための ELISA 法を開発するために、新規の抗ポリクローナル抗体を作成し、その性状を調べたものである。

TTX に対する抗体はこれまで複数の研究の研究グループによって開発されてきた。これらの抗体はいずれも、Johnson et al. (1964) のサキシトキシン抗原の作成法を応用し、TTX のグアニジノ基をキャリアタンパク質のアミノ基とホルムアルデヒドを用いて架橋した抗原を用いて作成されている。この方法では、キャリアタンパク分子にごく少量の TTX しか導入できないため、TTX に特異的に親和性を示す抗体を生産する B 細胞を選択し、これを培養して得られるモノクローナル抗体が主として用いられてきた。フグ等の有毒生物には TTX の他、種々の関連成分が含まれており、11 位が酸化された 11-oxo 体などかなり毒性の高い成分も見いだされている。TTX に対するモノクローナル抗体は、TTX そのものには高い親和性を示すものの、これら関連成分にはほとんど交差反応を示さない。

Yotsu-Yamashita et al. (2005) は、TTX の関連成分である 4,9 アンヒドロテトロドトキシン

(4,9anh-TTX)が、システインなどの生物チオールと反応し、チオールの硫黄原子が TTX の 4 位に導入された結合体を形成することを報告している。予備的に調べたところ、システインだけでなく、様々なチオール化合物が、4,9anh-TTX と反応し、結合体を形成することを確認した。このことは、適当なチオール化合物を用いることにより、キャリアタンパク質に効率よく、多数の TTX 分子を導入できること、およびこれをウサギなどに免疫することにより、これまで作成が困難であった TTX に対するポリクローナル抗体を得ることが可能となったことを意味する。以下、4,9anh-TTX を出発物質とする TTX とキャリアタンパク質の結合体、およびこれを用いて得られたポリクローナル抗体の性状等について記載する。

B. 研究方法

(1) 試料

岩手県大船渡魚市場に水揚げされたコモングとマフグ、および神奈川県藤沢市新江ノ島水族館で展示飼育中に死亡したトラフグの凍結魚体(計 20 Kg)を、5 倍量の 0.1M 酢酸とともにホモジナイズし、沸騰浴中で 20 分間加熱した。熱浸ホモジネートを氷冷し、No.2 のろ紙で自然ろ過した。得たる液を 4M NaOH で pH 6.0 に調整し、活性炭、Bio-Gel P-2 および Bio-Rex 70 各カラムクロマトグラフィーで順次精製して TTX および 4,9anh-TTX を単離した。

(2) 抗原の作成

凍結乾燥した 4,9anh-TTX(30 μ mol)を、300 mg の(±)ジチオスレイトール(DTT)を含む 0.05 M リン酸カリウム緩衝液(pH 8.0)20mL に溶解し、37 で 30 分間静置した。反応混合液を Bio-Gel P-2 カラム(1.5 x 10 cm)に添加して、水 100ml でカラムを洗浄後、0.2 M 酢酸(AcOH)で溶出する画分を 10 mL ずつ捕集した。0.2 M AcOH 溶出画分に含まれる TTX と DTT の結合体(DTT-TTX)を集めて凍結乾燥し、Sato et al. (2014)の方法に従って市販の二価性架橋試薬(GMBS, Dojindo)を導入した牛血清アルブミン(BSA, 10 mg, Sigma, RIA grade)と合わせて 10 mL の 0.05 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)中で 2 時間、室温で静置した。反応混合液を 0.03 M AcOH 1 L に対して 3 回、次いで水 1 L に対して 3 回透析した。透析内液を PBS(-)で 30 mL に定容し、抗原溶液(BSA-DTT-TTX, 0.3 mg/mL)とした。

これとは別に、1,2-エタンジチオール(EDT, Aldrich, 90+%)300 μ L を 10 mL の DMSO に溶解し、これをさらに 40 mL の 0.05 M リン酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0)と混合した溶液に、凍結乾燥した 4,9anh-TTX 30 μ mol を溶解し、37 で 30 分間静置した。反応混合物に等量の酢酸エチルを加えて 3 回抽出し、水相(下層)を減圧濃縮した。これを Bio-Gel P-2 のカラムに添加して上記と同様に、生成した EDT と TTX の結合体(EDT-TTX)を分離した。これを GMBS で処理してマレイミド基を導入したスカシガイヘモシアニン(KLH, 10 mg, Bioscience, Immunological grade)と合わせて 10 mL の 0.05 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)中で 2 時間、室温で静置した。反応混合物を 0.03 M AcOH 1 L に対して 3 回、次いで水 1 L に対して 3 回透析した。透析内液を PBS(-)で 30 mL に定容し、抗原溶液(KLH-EDT-TTX, 0.3 mg/mL)とした。

(3) TTX 関連成分および TTX 結合体の分析

溶液中の TTX, 4,9anh-TTX は、Yotsu et al. (1989)の HPLC 蛍光法を用いて分析・定量した。2 種のチオールと TTX の結合体(DTT-TTX, EDT-TTX)および、抗原(BSA-DTT-TTX, KLH-EDT-TTX)中の結合 TTX 量は、上記の HPLC 蛍光法から分析用カラムを外し、反応液(4 M NaOH)と混合・加熱処理で得られる生成物の蛍光強度(Ex 365 nm, Em 510 nm)を TTX 標品のそれと比較することにより算出した。

(4) 免疫

2 種の抗原(BSA-DTT-TTX, KLH-EDT-TTX)溶液をそれぞれ 2 羽のウサギに対して毎回、1 羽につき 1 mL ずつ隔週で約 7 ヶ月間、皮下接種した。それぞれのウサギから約 10 mL ずつ採血して血清を作成し、抗体価を測定した。抗体価は次の手順で算出した。すなわち、血清 200 μ L と TTX 標品の PBS 溶液(TTX 濃度:2 ~ 25 μ M)200 μ L を混合して 30 分間静置した後、NMWL 10k の限外遠心デバイス(Nanosep 10k Omega, Pall Life Science)を用いて得たる液中の TTX 濃度を上述の HPLC 蛍光法で分析した。血清に替えて PBS を用いて同様に限外ろ液を調製し、TTX 濃度を算出した(CTRL)。血清の抗体価は、以下の通り算出した。

$$\begin{aligned} \text{抗体価(血清 1mL あたりの TTX 吸収量)} &= \\ &= [(CTRL \text{ ろ液中の TTX}) - (\text{血清} + \text{TTX ろ液中の TTX})] \times 2 (\mu\text{M}) \end{aligned}$$

C. 研究結果

(1) 新規抗原の性状

BSA-DTT-TTX 抗原では、キャリアタンパク質 (BSA) に対して TTX の結合量は重量比で約 14 %、KLH-EDT-TTX では KLH に対して TTX の結合量は重量比で約 6 %と算出された。

(2) 抗体価の推移

1) BSA-DTT-TTX 抗原

BSA-DTT-TTX 抗原を免疫したウサギでは、2羽いずれとも免疫開始前の抗体価 (血清 1 mL あたりの TTX 吸収量) は 0.34 nmol であった。抗体価は免疫開始後から徐々に上昇し、6ヶ月後にそれぞれ 1.58, 2.41 nmol に達した。

2) KLH-EDT-TTX 抗原

KLH-EDT-TTX 抗原を免疫した2羽では、免疫開始前の抗体価それぞれ 0.29, 0.36 nmol であった。抗体価は免疫開始2ヶ月後から急激に上昇した。1羽は4ヶ月後に死亡した。残り1羽の抗体価は、6ヶ月半の全採血の時点で 24.50 nmol に達した。

(3) TTX 関連成分に対する交差反応

有毒フグから分離した TTX, 4epi-TTX および 4,9anh-TTX、ならびに TTX 標品から Wu et al. (1996) に従って過酸化水素/硫酸第1鉄で TTX を処理して得られる 11oxo-TTX および三陸産コモンフグ卵巣から部分精製したデオキシ体 (5,6,11-trideoxyTTX) を、KLH-EDT-TTX を免疫したウサギから得た血清と混合したところ、4,9anh-TTX を除く各成分とも、TTX とほぼ同程度の吸収が確認された。

D. 考察

2種の抗原、BSA-DTT-TTX と KLH-EDT-TTX をウサギに免疫したところ、血清の TTX に対する抗体価には大きな違いが認められた。すなわち、KLH-EDT-TTX は、BSA-DTT-TTX に比較してキャリアタンパク分子に対する TTX 結合量は少ないものの抗体価は大きく上昇し、既報 (Sato et al., 2014) の抗麻痺性貝毒ポリクローナル抗体作成の際の抗体価と同程度の水準に達した。この違いが、結合に用いたジチオールによるものか、キャリアタンパク質の違いによるものかは不明である。得た抗 KLH-EDT-TTX ウサギ抗体を用いて、ELISA キットを試作中である。

E. 結論

1,2-エタンジチオール(EDT)を 4,9-アンヒド

ロテロドトキシシン(4,9anh-TTX)に作用させ、TTX と EDT の結合体を作成した。これを、マレイミド基を導入したスカシガイヘモシアニンに導入して調製した抗原をウサギに隔週で 14 回免疫することにより、TTX に対するポリクローナル抗体を得た。同抗体は TTX だけでなく、11oxo-TTX や 4epi-TTX などの関連成分にも親和性を示すことを確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 著書・総説

1) 佐藤 繁, 松浦啓一: シボリキンチャクフグ・ナミダフグ/フグを知って中毒防止, 食と健康 2016; 通巻 710: 30-31.

2) 佐藤 繁, 松浦啓一: シッポウフグ・アマミホシゾラフグ/フグを知って中毒防止, 食と健康 2016; 通巻 709: 30-31.

3) 佐藤 繁, 松浦啓一: シマキンチャクフグ・タキフグ/フグを知って中毒防止, 食と健康 2016; 通巻 709: 48-49.

3. 学会発表

1) 佐藤 繁, 藤田沙和衣, 森 美貴, 犬童優華, 佐伯富貴, 高石鈴香: デカルバモイルサキシトキシシンの大量調製法. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 29 年 3 月.

2) 高石鈴香, 小杉英信, 安元 剛, 小檜山篤志, 佐藤 繁: 新規抗原を用いて作製した抗フグ毒ポリクローナル抗体の性状. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 29 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 佐藤 繁, 藤田紗和衣, 森 美貴(発明者): デカルバモイルサキシトキシシン及びその類縁体の製造方法, 特開 2016-204270, 2016 年 12 月 8 日公開.

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 28 年度分担研究報告書

コモングの毒性試験調査

研究分担者	大城 直雅	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	國吉 杏子	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	杉田 典子	明治薬科大学
研究協力者	山田 拓磨	明治薬科大学
研究協力者	山元 繁秀	明治薬科大学
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	松浦 啓一	国立科学博物館

研究要旨

コモン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グの毒性を調査し、現行のリスク管理が適切であるか評価することを目的とした。瀬戸内海および九州産コモング 97 個体の筋肉試料について LC-MS/MS により TTX を分析した結果、6 個体が弱毒(12MU/g)であった。これらの試料は鮮度が悪いものや(1 個体)凍結融解後に腑分けをしたもの(3 個体)であったが、残り 2 個体は凍結融解前に腑分けをして-30 で保管していたが皮が猛毒であった。また、筋肉の表皮側と内臓側の毒性を比較したところ、表皮側が高くなる傾向が認められた。

これらのことより、コモングの筋肉による食中毒のリスクを低減するために、鮮度の良いうちに有毒部位の皮を除去し、身欠きで流通することが重要と思われる。なお、除毒処理が適切になされない場合には、コモングの筋肉による食中毒が発生する可能性が唆されるため、適切な工程管理法の構築と徹底が必要である。

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グ及びヒガンフグについては適用しない」と記されており、これらの海域のコモングとヒガンフグは食用不可となっている。他の海域においても、コモングは筋肉だけが食用可能で、その他の部位(皮、精巣、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グであった(登田ら, 2012)。多くの事例において、コモングの有毒部位を喫食していると推定されるが、上記 3 海域以外で採取されたコモング(疑)の筋肉だけを喫食したことによる食中毒事例が発生した。そのため、コモングの毒性評価について緊急に対応する必要があるため、コモングの毒性調査を実施した。昨年度の調査で、蒐集したコモング 102 個体のうち 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、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。今年度は引き続きコモンフグ筋肉に加えて、皮の分析を行い、筋肉の毒化機構について検討した。

B. 研究方法

1) 供試試料

昨年度、蒐集した瀬戸内海および九州産コモンフグ試料 97 個体の筋肉および皮を対象とした。

筋肉の毒性

腑分け後、-30 で保存されていた昨年度分析できなかった 48 個体について、任意の 3 か所から各 2 g を採取して分析に供した。

表皮側と内臓側の筋肉の毒性

腑分け後、-30 で保存されていた筋肉の半身を皮に近い部分(外側)と内臓に近い部分(内側)に分け、それぞれ均質化した後に分析に供した。

皮の毒性

腑分け後、-30 で保存されていた皮をハサミで細切したものを試料とした。

2) TTX の LC-MS/MS 分析

筋肉および皮試料について、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、アセトニトリルの終濃度が 50% になるようにアセトニトリルを加え攪拌後に PVDF 膜 (孔径 0.2 μm) でろ過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 : InertSustain-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% MeCN (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 (29 : 71) 測定時間 : 10 分間、カラム温度 : 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 として毒性換算し、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

3) TTX のリスク管理に関する情報収集

EU の情報収集

スペイン・バイヨナ (Baiona) で開催された First Workshop on Emerging Marine Biotoxins (第 1 回新興海産生物毒に関する学術集会) に参加し、わが国におけるリスク管理に関する情報提供を行うとともに、ヨーロッパをはじめとする各国の情報収集および意見交換を行った。

C. 研究結果

1) コモンフグ筋肉の毒性

昨年度実施した 49 個体を合せた供試試料 97 個体中、有毒なのは 6 個体で、すべて弱毒であった (表 1)。測定試料 (n=3) の最大値は 36 MU/g、各個体の平均値の最大は 33 MU/g であり、n=3 での分析値にばらつきが認められた (表 2)。これらのうち、1 個体は搬入時に鮮度が悪い個体、3 個体は凍結融解後に腑分けを行った個体であったが、残り 2 個体は鮮度も良好で、搬入後速やかに腑分けを行ったものであった。

表 1 コモンフグ筋肉の毒性 (n=3)

漁獲日	海域	試料数	有毒	備考
2015/10/30	A	6	0	
2015/11/05	B	8	0	
2015/11/17	C	15	1	痛んだ個体
2015/12/01	D	15	3	凍結保存
2015/12/07	E	6	0	
2015/12/15	F	30	0	
2016/01/20	G	17	2	
合計		97	6	

表2 有毒個体の分析結果

個体番号	n1	n2	n3	平均	標準偏差	c.v.
040	32	30	36	33	2.5	0.08
051	9.0	23	16	16	5.7	0.36
052	6.9	20	12	13	5.4	0.42
054	6.0	9.7	26	14	8.7	0.63
091	4.1	6.3	33	14	13	0.91
097	8.0	13	15	12	2.8	0.24

2) 表皮側と内臓側の筋肉の毒性

有毒個体において、分析結果にばらつきがあったため、各個体の筋肉を内臓側と表皮側に分け、それぞれ分析に供した結果、表皮側の毒性が高くなる傾向が認められた。また、個体ごとの平均値（n=3）が無毒であった個体中に表皮側が弱毒のものが認められた（表3）。

表3 表皮側と内臓側の筋肉の毒性

個体番号	試料区分	内臓側	表皮側
040	有毒	24	57
051	有毒	26	53
052	有毒	17	39
054	有毒	29	40
091	有毒	15	38
097	有毒	17	46
087	> 7.5 MU/g	7.3	7.3
094	> 7.5 MU/g	9.5	8.9
096	> 7.5 MU/g	4.2	8.4
098	> 7.5 MU/g	2.0	16
049	冷凍保存	0	3
053	冷凍保存	8	22
076	冷凍保存	1	2
078	冷凍保存	1	1
079	冷凍保存	0	0
080	冷凍保存	0	0
081	冷凍保存	0	1
083	冷凍保存	1	2
084	冷凍保存	1	1
085	冷凍保存	2	2
099	小型個体	3.4	7.9
100	小型個体	0.20	2.3
101	小型個体	0.60	2.2
102	小型個体	0.60	2.3

3) 皮の毒性

コモンフグ 95 個体の皮はすべて有毒であった。そのうち、猛毒のものが 18 個体あった。鮮度が良い状態で腑分けをしていたにもかかわらず筋肉が有毒であった 2 個体はいずれも猛毒であった。

4) TTX のリスク管理に関する情報収集

平成 28 年 9 月 5 日~7 日にスペインのバイヨナで開催された First Workshop on Emerging Toxins に出席した。本会議には会議にはヨーロッパ諸国、米国、ニュージーランド、日本から参加があり、テトロドトキシン、神経性貝毒（プレトキシシン）およびシガトキシンに対する各国の現状と取組について講演され、今後取り組むべき課題について全体で討議された。大城は最終日に日本における動物性自然毒の発生状況と、厚労省がとるリスク管理措置について講演した。フグ毒に関しては各国の関心が高く、わが国での食中毒症例における LOAEL や規制値設定について科学的根拠づくりが求められた。シガテラについては、輸入時に食衛法第 6 条第 2 号に該当するとした魚種のリストや、食中毒症例における LOAEL 等の算出を求められた。今回、欧米諸国を中心に、日本とニュージーランドを含めた各国の研究者が共同で新興の海産生物毒について調査・研究に取り組むことを確認した。

フグ食中毒調査票による食中毒事例の情報収集については、各自治体の食品衛生担当部局への配布方法について調整が取れなかったため、実施することができなかった。来年度は方法を変更し、各自治体に対し調査への協力を呼びかけ、協力が得られる自治体を対象にして調査を実施したい。

D. 考察

コモンフグ 97 個体中、筋肉が有毒であったのは 6 個体で、そのうち 1 個体は鮮度の低下、3 個体は腑分け前の凍結融解であった。残り 2 個体は凍結融解前に腑分けをして -30 で保管していたが、皮が猛毒であった。また、半身を表皮側と内臓側に分けて TTX を分析したところ、表皮側の毒性が高くなる傾向があり、皮からの移行が示唆された。

コモンフグ皮はすべて有毒であり、中には 7,000 MU/g もの猛毒を持つものが確認された。また、皮の毒性が高い個体においては、目視で鮮度がよく、腑分け前に凍結融解していない場合でも筋肉への移行があった。

コモンフグの筋肉による食中毒のリスクを低減するために、鮮度の良いうちに有毒部位の皮を除去し、身欠きで流通することが重要と思われる。なお、除毒処理が適切になされない場合には、コモンフグの筋肉による食中毒が発生する可能性が示唆されるため、適切な工程管理法の構築と徹底が必要である。

E. 結論

瀬戸内海および九州産コモンフグ 102 個体を蒐集し、筋肉および皮について、LC-MS/MS 法による TTX の定量分析を実施した。ほとんどの筋肉が無毒であったが、6 個体が弱毒であった。これらについては、皮からの移行の可能性が示唆された。コモンフグ筋肉による食中毒のリスクを低減するために、工程管理法の構築と徹底が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 大城直雅，國吉杏子，堀田彩乃，鈴木貴文，杉田典子，松浦啓一，中島安基江，安西洋一：コモンフグの毒性分析．第 53 回全国衛生化学技術協議会年会，青森県青森市，2016 年 11 月．
- 2) 大城直雅：コモンフグの毒性評価．第 33 回マリントキシン研究会，東京都港区，2017 年 3 月．

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 28 年度分担研究報告書

瀬戸内海産コモフグの毒性調査

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 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 安部 かおり 広島県立総合技術研究所保健環境センター

研究要旨

コモ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。平成 28 年度に蒐集したコモフグ 49 個体について、外部形態による同定後、筋肉および皮の各試料について LC-QTOF/MS による TTX 分析を実施した。その結果、筋肉においては無毒が 48 個体、弱毒が 1 個体(10MU/g)、皮においては弱毒が 29 個体(25～94MU/g)、強毒が 19 個体(120～890MU/g)および猛毒(1,100MU/g)が 1 個体であった。

A. 研究目的

フグによる食中毒の未然防止対策については、昭和 58 年(1983 年)に厚生省環境衛生局長(当時)が発出した「フグの衛生確保について」(環乳第 59 号、昭和 58 年 12 月 2 日)の通知(以下通知とする)の別表1「処理などにより人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類及び部位」によってリスク管理がなされている。この別表1にはただし書きがあり、「岩手県越喜来湾及び釜石湾並びに宮城県雄勝湾で漁獲されるコモ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フグであった(登田ら、2012)。多くの事例において、コモ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、平成 27 年度よりコモフグの毒性調査を実施した。平成 28 年度は引き続き瀬戸内海産試料について調査を実施し、季節変動や年変動の有

無について検討した。

B. 研究方法

1) 供試試料

瀬戸内海産コモフグ試料 49 個体について仲買業者を通じて蒐集した。試料は冷蔵・氷詰めで搬入され、試料搬入後、各個体の側面、背面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、速やかに、皮、筋肉、その他内臓に腑分けし、分析に供するまで-30 で保管した。また、重量の大きい個体については半身を皮付きのまま-30 で凍結保存した。

2) TTX の LC-QTOF/MS 分析

筋肉及び皮試料について、食品衛生検査指針記載の抽出法に準じて試料調製した。すなわち、細切粉碎した試料 5g に 0.1%酢酸 25mL を加え、ホモジナイズした後に沸騰水浴中で 10 分間加熱した。放冷後、遠心分離(13,000 × g, 15 分間)し、上清を回収し、0.1%酢酸で 25mL に定容し、抽出液とした。抽出液を 0.1%酢酸:アセトニトリル(1:1)で適宜希釈し、その 0.5mL を限外ろ過(10 kDa)し、さらに PVDF 膜(孔径 0.22 μm)でろ過したものを測定溶液とし、以下の条件で LC-QTOF/MS により TTX を分析した。

[LC 部]

装置: Agilent 1200 Series LC, 分析カラム:

Inertsil Amide (3 μ m, 2.1 x 100 mm, GL Sciences 社), 移動相 A:0.1%ギ酸水溶液, 移動相 B:0.1%ギ酸含有アセトニトリル, A:B=5:95 (0.1min 保持) - 6min, 60:40 (1min 保持) - 10min, 15:85 (3min 保持) - 20min, 5:95, カラム温度: 40, 流速: 0.2mL/min, 注入量: 1 μ L.

[MS 部]

装置: Agilent 6540MS Q-TOF, イオン化: ESI (Positive), ドライガス: N₂ (350, 10 L/min), キャピラリー電圧: 3500 V, ネブライザー: N₂ (50 psi), フラグメンター電圧: 200 V, スキャン範囲: m/z 50-950, リファレンスマス: m/z 121.050873 および 933.009798, 観測イオン: [M+H]⁺ (m/z 320.1088 \pm 0.005).

定量分析の結果から得られた TTX 濃度に対し, TTX の毒性を 0.22 μ g / MU として毒性換算し, 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, 1,000 MU/g 未満:	強毒
1,000 MU/g 以上:	猛毒

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49個体で, 画像を基に確認した外部形態はすべてコモンフグの特徴を示していた(図1)。

蒐集したコモンフグ試料すべての個体について筋肉および皮の TTX 分析を実施した。標準溶液, 筋肉および皮の試料溶液の代表的な LC-QTOF/MS クロマトグラムおよびスペクトルを示した(図 2, 3, 4)。その結果, 筋肉においては無毒が 48 個体, 弱毒が 1 個体 (10 MU/g), 皮においては弱毒が 29 個体 (25 ~ 94 MU/g), 強毒が 19 個体 (120 ~ 890 MU/g) および猛毒 (1,100 MU/g) が 1 個体であった(表 1, 2)。

D. 考察

1) コモンフグの毒性試験

フグ試料を入手し, 比較的鮮度の良い状態で速やかに腑分けを行い TTX の分析を行った。

今回分析を行った瀬戸内海産コモンフグ 49 個体の筋肉は, ほとんどが無毒であった。しかしながら, 無毒である個体のうち, 5 MU/g 以上は 8 個体 (17%) であった(表 3)。

今回入手したフグ試料のうち, 重量の大きい個体について半身を皮付きのまま凍結保存した。この凍結試料について, TTX 含有量の高い皮から筋肉への移行の可能性を検討する予定である。さらに, コモンフグの毒性について, 季節変動等の検討を引き続き行う予定である。

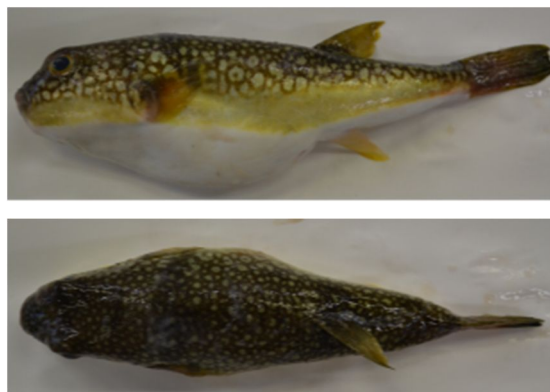


図1. 分析に供したコモンフグ (20161222-19)

E. 結論

瀬戸内海産コモンフグ 49 個体を蒐集し, すべての個体について, LC-QTOF/MS により筋肉及び皮の TTX 分析を実施した。筋肉においてはほとんどの個体が無毒であったが, 1 個体が弱毒であった。今後, コモンフグの毒性について, TTX 含有量の高い皮から筋肉への移行の可能性, 季節変動, 水揚げ海域等の要因について引続き検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 大城直雅: コモンフグの毒性評価. 第 33 回 マリントキシン研究会, 東京都港区, 2017 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 瀬戸内海産コモングの毒性(筋肉)

漁獲日	試料数	無毒	弱毒	強毒	猛毒
2016/12/22	19	18	1	0	0
2017/1/12	30	30	0	0	0
合計	49	48	1	0	0

表2 瀬戸内海産コモングの毒性(皮)

漁獲日	試料数	無毒	弱毒	強毒	猛毒
2016/12/22	19	0	5	13	1
2017/1/12	30	0	24	6	0
合計	49	0	29	19	1

表3 無毒個体(筋肉)の毒性

漁獲日	試料数	MU/g		
		1未満	1以上5未満	5以上
2016/12/22	18	0	12	6
2017/1/12	30	3	25	2
合計	48	3	37	8

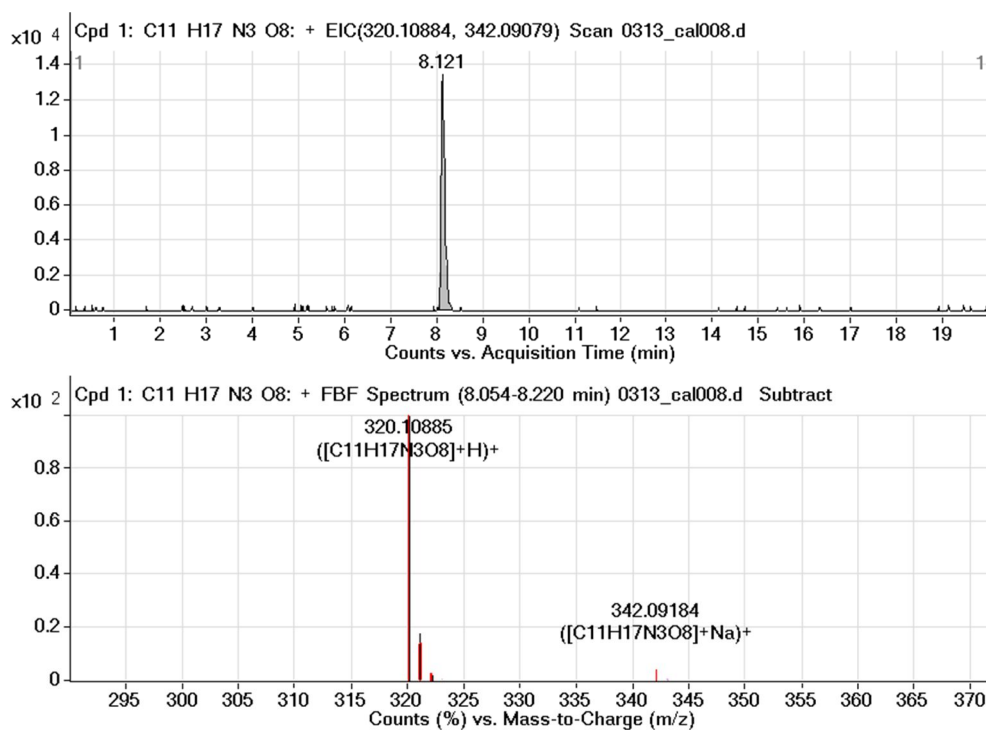


図2 . TTX 標準溶液(50ng/mL)の LC-QTOF/MS クロマトグラム(上)およびマススペクトル(下)

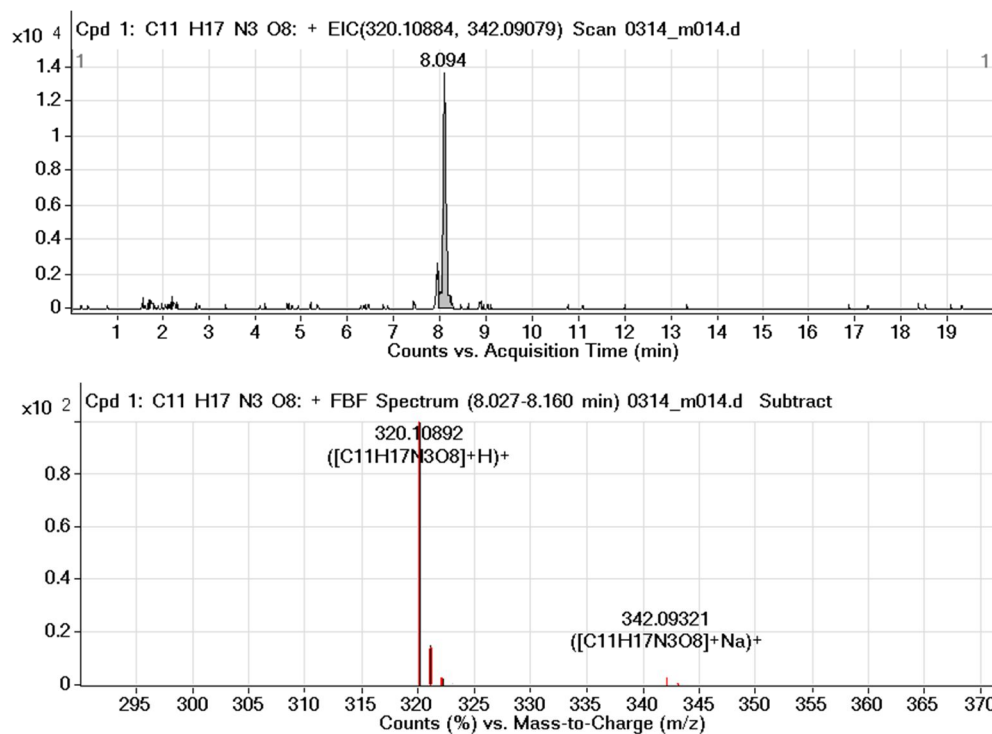


図 3. 試料溶液 (筋肉: 20161222-12, 10 倍希釈) の LC-QTOF/MS クロマトグラム(上)およびマススペクトル(下)

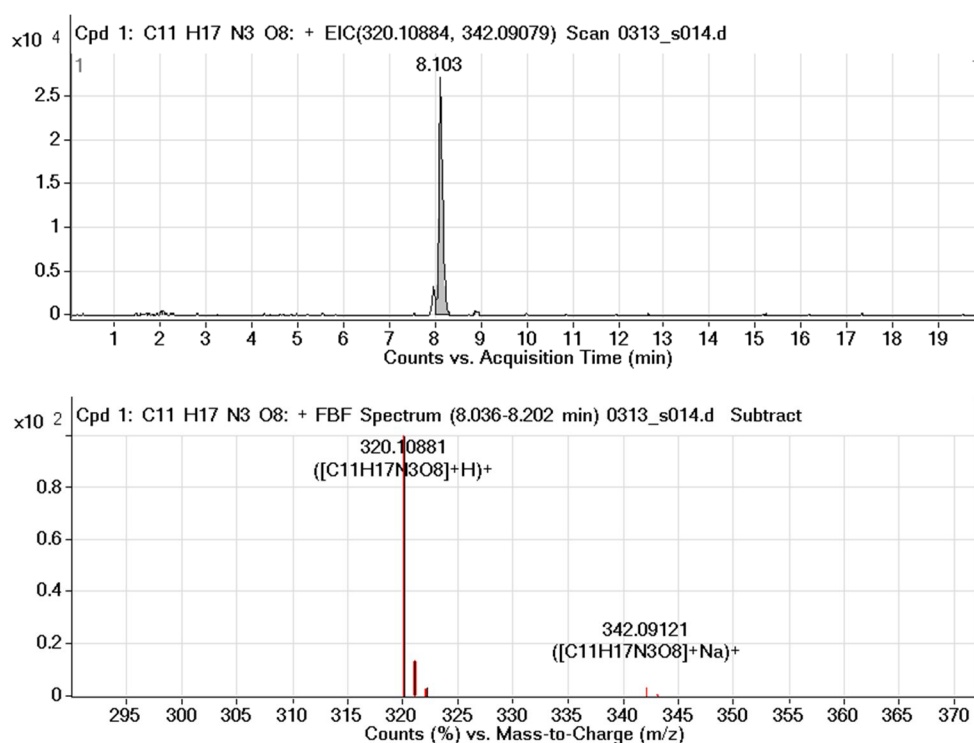


図 4. 試料溶液(皮: 20161222-12, 200 倍希釈)の LC-QTOF/MS クロマトグラム(上)およびマススペクトル(下)

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 28 年度分担研究報告書

愛知県産コモングの毒性試験調査

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	長谷川晶子	愛知県衛生研究所
協力研究者	早川 大輔	愛知県衛生研究所
協力研究者	柘植 康	愛知県衛生研究所

研究要旨

コモング筋肉は、食用部位とされているが、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。フグの毒性は、同種であっても産地や季節等によって大きく異なることが知られており、地域ごとに毒性を調査し、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、愛知県産コモングの毒性試験調査を実施した。蒐集したコモング 16 個体（鮮魚）について、外部形態による同定後、筋肉および皮について、マウス検定法による毒性試験を実施した。また、本研究班の平成 27 年度のコモング毒性調査において、凍結融解工程を要因とする皮から筋肉への毒の移行についての検討の必要性が明らかになったため、同一個体で凍結融解処理の有無による筋肉の毒性比較を行った。鮮魚の筋肉試料では 16 検体中 5 検体が弱毒（10 MU/g 以上 100 MU/g 未満）、11 検体が無毒（10 MU/g 未満）、皮試料では 16 検体中 5 検体が弱毒、8 検が強毒（100 MU/g 以上 1,000 MU/g 未満）、1 検体が猛毒（1,000 MU/g 以上）、2 検体が無毒（10 MU/g 未満）であった。筋肉の 31%が有毒であり、コモングの毒性は地域差があること及びコモングの筋肉を原因とする健康被害が発生する可能性が懸念された。

凍結融解筋肉の皮側（外側）試料では、14 検体中 9 検体が弱毒であった。凍結融解工程で筋肉の毒量が増加したことから、凍結融解工程を経たコモングの筋肉を原因とする健康被害が発生する可能性が強く示唆された。

A. 研究目的

フグによる食中毒の未然防止対策については、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（通知）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。コモングについては通知で、「筋肉」が食用部位とされているが、「岩手県越喜来湾及び釜石湾並びに宮城県雄勝湾で漁獲されるコモング及びヒガンフグについては適用しない」と記されており、これらの海域のコモングは食用不可となっている。しかしながら、上記 3 海域以外で採取されたコモング（疑い）の筋肉を喫食したことによる食中毒事例が発生した。加えて、フグを原因とする食中毒事件報告において原因

魚種の記載のあったもののうち、最も発生件数が多いのがコモングである（登田ら，2012）。そのため、コモングの毒性の再評価が検討された。フグの毒性は、同種であっても産地や季節等によって大きく異なることが知られており、地域ごとに毒性を調査し、現行のリスク管理が適切であるか評価するため、愛知県産コモングの毒性試験調査を実施した。

また、本研究班の平成 27 年度のコモング毒性調査において、凍結融解魚に鮮魚と比較して毒性が高い傾向が認められ、凍結融解工程を要因とする皮から筋肉への毒の移行について検討の必要性が生じた。このことから、凍結融解工程による皮から筋肉への毒の移行影響を明らかにすることを目的とし、同一個体における凍結融解処理の有無による筋肉の毒性比較を行った。

B. 研究方法

1) コモンフグの毒性試験

供試試料

2016年7月から2017年1月に愛知県で捕獲されたコモンフグ試料16個体を愛知県水産試験場漁業生産研究所および釣宿を通じて蒐集した。試料は冷蔵で搬入され、試料搬入後、体長と重量を測定し、外部形態による種同定を行った。また、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、写真データを松浦啓一博士(国立科学博物館)に送付し、種同定の確認を依頼した。

試料は種同定後に速やかに内臓を取り出し、脊椎に沿って半身を外し、外した半身は筋肉と皮に分離した。残り半身には頭部、鱗、脊椎を残した。内臓は生殖腺、肝臓、その他内臓に腑分けし、全ての試料は分析に供するまで-30℃で保管した。

毒性試験

【試料調製】

筋肉および皮試料について、食品衛生検査指針・理化学編2015に記載の抽出法を一部改変して試料調製を行い、分析に供した。すなわち、試料5gを採取し細切した後、0.1%酢酸20mLを加え、ホモジナイズ(11,000rpm、1秒×10回)し、沸騰水浴中で10分間加熱した。放冷後、遠心分離(13,400×g、15分)し、上清を回収し抽出液とした。

一部試料量が5gに満たないものでは全量を用い、試料量の4倍の0.1%酢酸を加え、同様の処理を行った。抽出液はマウス試験法を実施するまで-30℃で保管した。

【マウス検定法】

実験動物は、生後4週齢、体重19~21gのddY系雄マウスを用いた。予備試験として、抽出液原液1mLをマウスの腹腔内に注射し、致死時間からフグ毒の致死時間-マウス単位(MU)換算表を参照し、抽出液原液1mL中の毒量(MU)を求め、この値からマウスが10分前後で死亡する濃度に蒸留水で希釈を行った。本試験では、予備試験により希釈した希釈試験液をマウスに注射し、致死時間が7~13分の間に入ることを確認した後、計3尾のマウスより中央致死時間を求め、上記換算表によって毒量(MU)を算出し、得られたMUに希釈倍率を乗じ、検体の毒力(MU/g)を求めた。

2)凍結融解によるコモンフグの皮から筋肉への毒の移行調査

皮試料で弱毒以上の毒が検出された14個体について、頭部、鱗、脊椎と共に残した半身を流水中で1時間融解した後、筋肉と皮に分離し、13個体は筋肉を皮側(外側)と内臓側(内側)に分けて採取し試料とした。1個体は、個体が小さく皮側(外側)と内臓側(内側)に分離できなかったため分離せず試料とし毒性試験を行った。

C. 研究結果

1) コモンフグの毒性試験

蒐集したフグ試料16個体は、当所における種同定および松浦啓一博士(国立科学博物館)に依頼し、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)。

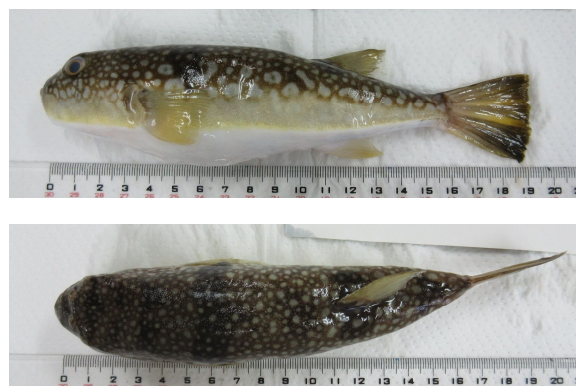


図1. 分析に供したコモンフグ (A28001)

16個体全ての筋肉と皮試料について毒性試験を実施し、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、1,000 MU/g 未満:	強毒
1,000 MU/g 以上:	猛毒

その結果、筋肉では、無毒が11検体、弱毒が5検体(14~49 MU/g)であった(表1)。

皮では、無毒が2検体、弱毒が5検体(12~59 MU/g)、強毒が8検体(100~630 MU/g)、猛毒が1検体(1,000 MU/g)であった(表2)。

2)凍結融解によるコモンフグの皮から筋肉への毒の移行調査

皮試料で弱毒以上の毒が検出された14個体の凍結融解筋肉を、皮側(外側)と内臓側(内側)に分けて採取した13試料および分離せず採取した1試料について毒性試験を実施した。

その結果、内外を分離せず採取した1試料を含めた凍結融解筋肉の皮側(外側)では、無毒が5検体、弱毒が9検体(21~69 MU/g)であった。

次に、凍結融解筋肉の皮側(外側)試料で5 MU/gを超えた10個体の内臓側(内側)試料の毒性試験を実施した。その結果、凍結融解筋肉の内臓側(内側)試料では、全ての検体が無毒であった(表3)。

D. 考察

1) コモンフグの毒性試験

コモンフグ筋肉試料16検体中5検体(31%)が弱毒で、最も毒力が高いものは49 MU/gであった。今回の調査においては、検体は全て鮮魚で、水揚げ後速やかに検体が搬送されており、凍結融解等の皮から筋肉へ毒が移行する要因がない中、検体数は少ないものの筋肉の31%が有毒であった。昨年度の本研究班の報告は凍結融解検体が多く、単純比較は難しいが、フグの毒性は地域差があることが示唆された。現在、通知では、岩手県越喜来湾および釜石湾ならびに宮城県雄勝湾で漁獲されるコモンフグは除外されているが、その他の海域で漁獲されるコモンフグの筋肉は食用可である。今回の調査で、通知の除外海域以外で漁獲されたコモンフグの内31%の筋肉が10 MU/g以上の有毒個体であったことから、適切なリスク管理のために引き続きデータを集積し、本通知の見直しを含めた検討が必要であると考えられた。

2) 凍結融解によるコモンフグの皮から筋肉への毒の移行調査

フグの筋肉部の毒は、皮から移行することが知られており、皮の毒性が高いフグにおいては、皮から筋肉への毒の移行が問題となる。コモンフグの皮は毒性が高いことが報告されており、今回の調査結果でも強毒が8検体と半数を占め、1検体は1,000 MU/gの猛毒であった。皮試料で弱毒以上の毒が検出された個体の凍結融解筋肉の皮側(外側:以下皮側)試料14検体中(内外を分離せず採取した1試料を含む)9検体(64%)が10 MU/g以上100 MU/g未満の弱毒で、最も毒力が高いものは69 MU/gであった。同一個体の生鮮筋肉と凍結融解筋肉の皮側試料を比較すると、11個体は凍結融解筋肉が凍結融解前筋肉よりも毒力

が高く、毒力比は最大で5倍であった。3検体はマウス検定法の検出限界である5 MU/g以下であったため、毒力の変化は確認できなかった。これらについては今後、機器分析での解析を実施予定である。

同一個体で凍結融解工程後の筋肉試料が凍結融解前よりも毒力が高く、毒力比が最大であったことから、コモンフグは凍結融解工程で皮から筋肉に毒が移行し、筋肉の毒力が大きく上昇することが明らかになった。

凍結融解筋肉の皮側試料で5 MU/gを超えた個体の内臓側(内側:以下内臓側)試料10検体は全て10 MU/g未満の無毒であった。また、同一個体の皮側と内臓側筋肉試料の毒力を比較すると、すべての試料で皮側が内臓側よりも毒力が高かった。同一個体で皮側が内臓側より毒力が高いことから、フグの筋肉部の毒は、皮から移行することが確認できた。

今回の調査では、鮮魚の筋肉試料調製の際に筋肉を皮側と内臓側に分けて採取していないため、凍結前筋肉の部位別の毒力の差は明らかでなく、筋肉の内側と外側の毒量変化に凍結融解工程がどの程度影響しているかは明らかではない。筋肉の部位による毒力の差については次年度に検討する予定である。

E. 結論

愛知県産コモンフグ16個体を蒐集し、その筋肉と皮および凍結融解処理筋肉について、マウス検定法による毒性試験を実施した。筋肉試料では16検体中5検体が弱毒、11検体が無毒であった。皮試料では16検体中5検体が弱毒、8検体が強毒、1検体が猛毒、2検体が無毒であった。すなわち、筋肉の31%が有毒であり、他の地域の調査結果と比較して高く、コモンフグの毒性は地域差があることが示唆された。

凍結融解筋肉の皮側試料14検体中9検体が弱毒であった。凍結融解工程で筋肉の毒力が増加していることから、凍結融解工程で皮から筋肉に毒が移行し、毒力が大きく上昇することが明らかになり、凍結融解工程を経ることでコモンフグの筋肉による健康被害のリスクが増大する可能性が懸念された。

謝辞

今回の調査で、検体採集にご協力いただきました

た愛知県水産試験場漁業生産研究所の皆様、愛知県衛生研究所猪飼誉友博士、コモンフグ試料の同定をしていただいた国立科学博物館松浦啓一博士に深謝いたします。

2. 学会発表

- 1) 大城直雅，コモンフグの毒性評価．第 33 回 マリントキシン研究会，東京都港区，2017.03

F. 健康危険情報

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

表 1 愛知県産コモンフグの毒性（筋肉）

漁獲日	試料数	無毒	弱毒	強毒	猛毒
2016/7/7	2	2	0	0	0
2016/7/21	1	1	0	0	0
2016/7/22	3	0	3	0	0
2016/7/27	1	1	0	0	0
2016/8/8	3	3	0	0	0
2016/8/17	2	2	0	0	0
2016/12/13	1	0	1	0	0
2017/1/6	3	2	1	0	0
合計	16	11	5	0	0

表 2 愛知県産コモンフグの毒性（皮）

漁獲日	試料数	無毒	弱毒	強毒	猛毒
2016/7/7	2	1	1	0	0
2016/7/21	1	0	0	1	0
2016/7/22	3	0	0	3	0
2016/7/27	1	0	1	0	0
2016/8/8	3	1	2	0	0
2016/8/17	2	0	0	2	0
2016/12/13	1	0	0	0	1
2017/1/6	3	0	1	2	0
合計	16	2	5	8	1

表 3 凍結融解筋肉の皮側（外側）・内臓側（内側）の毒性比較

採取場所	試料数	無毒	弱毒	強毒	猛毒
皮側（外側）	14	5	9	0	0
内臓側（内側）	10	10	0	0	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）

「マリントキシンのリスク管理に関する研究」

平成 28 年度分担研究報告書

フグの毒性評価と有毒巻貝の種判別

研究分担者 長島裕二 東京海洋大学 学術研究院 食品生産科学部門

研究要旨

マリントキシンのリスク管理に資することを目的に、フグの毒性評価と有毒巻貝の種判別について検討した。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フグの毒性調査を行っている。昨年度調べた凍結試料では、一部試料の筋肉から 10 マウスユニット(MU)/g を超える毒性が検出された。これは、皮の毒性が 1000 MU/g を超えたことから、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。そこで今年度は、活魚または生鮮魚について毒性試験したところ、皮が“猛毒”レベルであっても、筋肉から毒性は検出されなかった。さらに、凍結解凍モデル実験で、凍結とくに解凍によって皮の毒が筋肉に移行することを確認した。しらす加工品へのフグ稚魚混入に関しては、実態調査を続けてデータの集積に努めた。瀬戸内海産のしらす加工品にコモフグ、シマフグ、ナシフグ、ヒガンフグ稚魚の混入が認められた。これらの成魚は有毒種であり、調べた 29 検体中 1 検体からテトロドトキシン (TTX) が検出されたが、その含量は 56 ng/g (0.28 MU/g) と少なく、フグ稚魚が混入したしらす加工品による健康被害への影響はないと考えられた。遺伝子による有毒巻貝の種判別法として、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開発した。本法により、フグ毒中毒が懸念される有毒巻貝も種判別できることがわかった。昨年度の課題となった加熱殺菌された DNA が断片化した製品の種判別については、加工品用に別途特異的プライマーを作製し、種判別が可能になった。しかし、対象とした遺伝子領域の塩基配列が同じである種があり、これらについては、他の遺伝子領域で検討する必要がある。

A. 研究目的

食中毒を起こすフグ毒、シガテラ毒、貝毒等のマリントキシンは、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、フグ稚魚や幼魚の混入も問題となっている。また、巻貝キンシバイによるフグ毒中毒も発生し、フグによる食中毒とフグ毒による中毒に対するリスク管理を強化、見直す必要がある。巻貝に関しては、麻痺性貝毒による毒化やテトラミン中毒も食品安全確保に対するリスクとなっている。しかし、巻貝は外観などの形態分類が難しい上、むき身として調理加工された場合には判別が不可能で、食中毒の原因

食品が特定できない。

こうした背景のもと、今年度は、コモフグの毒性調査、フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性評価、有毒巻貝の遺伝子による種判別法開発を実施した。すなわち、コモフグの毒性調査では、凍結試料で筋肉の毒性が 10 MU/g を超える例がみられたため、活魚あるいは生鮮魚の毒性を調べるとともに、凍結解凍による毒性への影響について検討した。フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性評価では、種判別と毒性試験 (TTX 分析) を行い、データの集積に努めた。

有毒巻貝の遺伝子による種判別法開発では、フグ毒中毒のおそれがある巻貝類 (ポウシュウボラ、キンシバイ、バイなど) の種判別を検討した。昨年度の研究において、一部の巻貝加工品で PCR 増幅されないものがあつたため、加熱殺菌された加工品に適した PCR 法を新たに検討した。

B. 研究方法：

1) コモフグの毒性調査

試料には、2016年に東京湾で漁獲された活魚または生鮮魚のコモンフグ30個体を用いた。試料魚は水揚げ後ただちに研究室に運搬し、筋肉、皮、肝臓、生殖腺に分離した。

凍結解凍モデル実験では、凍結前に半身から皮と筋肉を採取し、残りを凍結して、反対側から皮と筋肉を採取する。このとき、同一個体から採取する場所で、皮と筋肉の毒性が等しいことが前提となる。そこで、生鮮なコモンフグを用いて、皮と筋肉の毒性が左右で差がないことの確認を行った。すなわち、コモンフグ10個体を用意し、各個体の尾部の右側と左側からそれぞれ皮と筋肉を分離して試料とした。筋肉は、皮からの毒の混入を避けるため、背骨に接している部分から採取した。

凍結・解凍によるフグ毒の移行は、活魚10個体を用いて調べた。最初に、魚体右側尾部から皮と筋肉を取り分けた。これを“凍結前試料”とする。残りを-25で24日間保管した。5検体は凍ったまま魚体左側尾部から皮と筋肉を分離した。これを“凍結試料”とする。他の5検体は、4で2時間、さらに20で3時間静置して緩慢解凍後、魚体左側尾部から皮と筋肉を分離した。これを“凍結解凍試料”とする。このとき、筋肉は皮に接した外側部分（外部筋肉）と、背骨に接した内側部分（内部筋肉）から採取した。

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8mL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。

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。投与後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) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

2015年6月~8月に広島県で水揚げ、製造されたしらす加工品に混入し、現地加工場等において外観からフグと推定された稚魚を試料とした。同一の加工場等で同じ日に処理されたものを1つのロットとした。

しらす加工業者があらかじめ選別したフグ稚魚試料を観察して、体色を含む外部形態に基づき分類した。ロット毎に、形態分類で同一種と判断されたフグ稚魚から1個体ずつ選抜し、種判別を行った。フグ稚魚の種

判別は、厚生労働省医薬食品局食品安全部の「魚類乾製品等のフグ混入検査について」(平成20年)および「輸入魚類加工品のフグ種鑑別検査法について」(平成23年)に従った。すなわち、各ロットから1個体を選び、合計23個体の筋肉(約15mg)から全ゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型として、ミトコンドリアDNAの16S rRNA領域を増幅するプライマーまたはシトクロム*b*領域を増幅するプライマーおよびTaKaRa Ex Taq(タカラバイオ)を用いてPCR増幅を行った。PCR産物塩基配列をDNAシーケンサーで解析した。解析した塩基配列をnucleotide BLAST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を合一して、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)したる液をTTX定量用試料とした。TTXの定量はLC-MS/MS法で行った。

3) 有毒巻貝種判別法の開発

フグ毒またはテトラミンをもつ有毒巻貝を正確に同定するため、ミトコンドリアDNA 16S rRNA部分領域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。

巻貝試料には、フジツガイ科ボウシュウボラ、アケキガイ科イボニシ、アカニシ、ムシロガイ科ハナムシロ、キンシバイおよびエゾバイ科イソニナとバイの7種巻貝の生鮮品を用い、これらについては、昨年度設計した巻貝種特異的プライマーでPCRを行った。

巻貝加工品については、新たにミトコンドリアDNA 16S rRNA部分領域から、巻貝加工品に利用できる特異的プライマーの作製とPCR条件を検討した。

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

コモンフグの生鮮魚および活魚の毒性

コモンフグの生鮮魚 20 個体および活魚 10 個体の毒力を表 1 にまとめた。

各組織における有毒個体出現率は、皮と肝臓が 100% (30 個体中 30 個体) で、卵巣も 100% (28 個体中 28 個体) であった。各組織の最高毒性値は、皮 1,990 MU/g、肝臓 422 MU/g、卵巣 3,540 MU/g で、皮と卵巣は“猛毒”レベル(1,000 MU/g 以上)となり、肝臓は“強毒”レベル(100~999 MU/g) であった。これに対し、筋肉(30 個体)と精巣(2 個体)からは毒性が検出されず、“無毒”(5MU/g 未満)であった。

同一個体の左右による毒性の比較

本実験は、コモンフグを凍結したときの毒の移行を調べるための予備実験として、同一個体の右側と左側で皮と筋肉の毒性が等しいか調べた。その結果、筋肉では、左右にかかわらず毒性は検出されなかった(5 MU/g 未満)(表 2)。

皮は、10 個体すべてが有毒であったが、尾部左側 182~1,330 MU/g) と同右側(184~1,550 MU/g) で毒性値に大きな差はみられなかった(表 2)。最高毒性値は試料 No.1(右側)の 1,550 MU/g で、“猛毒”レベル(1,000 MU/g 以上)を示した。最少毒性値は 182 MU/g(試料 No.10 左側)であったが、“強毒”レベル(100~999 MU/g)を示していた。

筋肉の毒性に及ぼす凍結・解凍の影響

凍結したが解凍させていない“凍結試料”(No.1~5)では、内部筋肉は無毒(5 MU/g 未満)であり、外部筋肉は<5~10.9 MU/g であった。凍結で毒性値が変化したのは試料 No.1 が 5.8 MU/g から 10.9 MU/g へ、試料 No.3 が 5 MU/g 未満から 5 MU/g へ増加し、試料 No.2 と No.4 はそれぞれ 9.8 MU/g から 8.1 MU/g、5.9 MU/g から 5 MU/g 未満へやや減少していた(表 3)。

“凍結試料”の皮(試料 No.1~No.5)の毒性は、凍結前試料に比べて、多少変化がみられたが、その変化の割合は±15%程度であり、マウス試験法が内包する誤差範囲(±20%)におさまっていた(表 3)。

次に、“凍結解凍試料”試料 No.6~No.10)の毒力は、内部筋肉では 1 個体(試料 No.6)が 5 MU/g を示したが、それ以外は無毒(5 MU/g 未満)であった。これに対し、皮と接していた外部筋肉はすべて毒性(5~110 MU/g)を示した(表 3)。とくに、高い毒力を示した試

料 No.7 (110 MU/g) と No.6 (84.9 MU/g) は皮の毒力がそれぞれ 1,120 MU/g および 1,990 MU/g と著しく高かった。これに対し、皮の毒力が低かった(186 MU/g) 試料 No.10 では、外部筋肉の毒力は本マウス試験の検出限界(5 MU/g)であった(表 3)。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性 魚種判別

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、調べたフグ稚魚 23 個体のうち、8 個体はデータベースに登録されているコモンフグ *Takifugu poecilonotus* の塩基配列と相同性 99.8~100% で一致した。同様に、7 個体はシマフグ *Takifugu xanthopterus* と相同性 99.8~100% を示し、6 個体はナシフグ *Takifugu vermicularis* と 99.6~100%、2 個体はヒガンフグ *Takifugu pardalis* と 99.8~100% の相同性であった。確認のためシトクロム *b* 部分領域(約 400 bp)の塩基配列を解析した結果、いずれも当該のフグ種と相同性 99.3~100% で一致した。

毒性試験

LC-MS/MS 分析した 29 試料中 25 試料は TTX が検出されず(10 ng TTX/g 未満) 4 試料からクロマトグラム上、TTX に相当するピークが検出された(図示せず)。このうち、1 試料だけ 56 ng TTX/g と算出されたが、他の 3 試料は定量下限値(30 ng TTX/g) 未満であった。

3) 有毒巻貝種判別法の開発

生鮮品の種判別

今回調べた巻貝 7 種すべてで目的とする PCR 産物(約 350 bp)の増幅がみられた。これら増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法で解析したところ、イボニシ、アカニシ、パイはデータベースの塩基配列と 100% 一致した。ボウシュウボラとキンシバイについては、データベースに塩基配列が登録されていないため、当研究室で解析した別個体の結果と照合した結果、それぞれ相同性は 99.4% および 100% であった。ハナムシロとイソニナはデータベース上の種とそれぞれ 92% および 98% と、塩基配列の相同性がやや低かった。

加工品の種判別

上記 で用いたプライマーで PCR 増幅されなかった加工品試料でも、加工品用に作製した特異的プライマーで、目的とする PCR 産物(約 150 bp)の増幅がみられた。しかし、この領域内の塩基配列は、種によっては同一あるいは酷似していることがあり、「シライトマキバイ、クビレバイ、ヒモマキバイ」、「エゾボラモドキ、

クリイロエソボラ、ヒレエソボラ、「エッチュウバイ、アニワバイ」については、種が判別できない。

D. 考察

1) コモンフグの毒性調査

昨年度、毒性を調べたコモンフグ凍結試料では、筋肉が有毒のものがみられ、その割合は32個体中13個体、有毒個体出現率40.6%で、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力が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た。そこで、今年度は、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した。

活魚または生鮮魚では、皮の毒力が“猛毒”レベル(1,000 MU/g以上)であっても、筋肉からは毒性は検出されなかった(5 MU/g未満)。このことから、凍結解凍によって、皮中のフグ毒が筋肉に移行することが強く示唆されたので、生鮮のコモンフグ10個体を用いて、凍結・解凍モデル実験を行った。

凍結、解凍しても背骨に接した部分の筋肉(内部筋肉)では1個体(5 MU/g)を除き、無毒(5 MU/g未満)であったが、皮に接していた部分の筋肉(外部筋肉)の毒力は、“凍結試料”で $<5\sim 10.9$ MU/g、“凍結解凍試料”で $5\sim 110$ MU/gになり、凍結とくに解凍によってフグ毒が移行することが明らかになった。また、凍結解凍後の皮の毒力を凍結前の値と比較すると、毒性値は明らかに減少しており、減少の割合は凍結前の0.56~0.79と顕著であった。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

昨年度の調査により、瀬戸内海で漁獲、製造されたしらす加工品にナシフグ稚魚が混入しており、定量下限値(30 ng TTX/g)未満であったがTTXが検出されたため、今年度は、同海域でサンプリングされた試料について、フグ稚魚の種判別とTTX分析を行った。

その結果、コモンフグ、シマフグ、ナシフグ、ヒガンフグの稚魚が混入していることが明らかになり、ロットによっては複数のフグ種が混在していた。ほとんどの試料では、TTXは検出されないか、検出されても定量下限値(30 ng TTX/g)未満であったが、1試料だけ56 ng TTX/gが検出された。しかし、TTXの比毒性(5,000 MU/mg)から、毒性値に換算すると0.28 MU/gとなり、フグ毒の基準値(10 MU/g、2.2 μ g TTX/g)をはるかに下回っているため健康被害の問題となることはない。

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、9,130 kgからフグ稚魚126個体34.1g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0.014個体で、しらす加工品71.4 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0.0037 gの混入となる。これらの値と、1回に食べるしらすの量(しらすおろして約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。

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り、テトラミンだけでなくフグ毒をもつ有毒巻貝の種判別が可能になった。また、レトルトや缶詰製品の一部で、殺菌加熱により試料中のDNAが断片化された場合でも、巻貝加工品用に作製したプライマーを用いればPCR増幅が可能になった。しかし、領域が短い分、塩基配列が同一あるいは酷似するものがあり、その場合には、種を正確に判別するには、別の遺伝子領域を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、昨年度、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。そこで今年度は、活魚または生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た。その結果、活魚または生鮮魚では、皮の毒力が猛毒レベルであっても筋肉から毒性は検出されなかった。しかし、凍結・解凍すると、筋肉から毒性が検出されたことから、昨年度、凍結試料の筋肉が有毒であったのは、凍結解凍によって皮からフグ毒が移行したためと結論づけられた。コモンフグのみならず皮の毒力が強いフグでは、生鮮のうち皮を剥ぐなどして、筋肉への毒の移行、汚染を防ぐ必要がある。

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、データを集積するため、しらす加工品に混入したフグ稚魚の種と毒性を調べた。2015年に瀬戸内海で集めた試料から、有毒種であるコモンフグ、シマフグ、ナシフグ、ヒガンフグの稚魚の混入がみられた一部の試料ではTTXが検出されたが、最大値で56 ng TTX/g(0.28 MU/g)であり、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予定である。

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。ミトコンドリアDNA 16S rRNA部分領域を対象にしたPCRを行い、ダイレクトシーケンス法による種判別を試みたところ、テトラミン中毒だけでなくフグ毒中毒のおそれのある巻貝の種判別が可能になった。さらに、高温で処理された加工品については、別の特異的プライマーを用いることでPCR増幅に成功し、種判別ができるようになった。しかし、一部の巻貝ではターゲットとした領域の塩基配列が完全に一致しているため、判別不能のものもあり、別の遺伝子領域を検討する必要がある。さらに、ポウシュウボラやキンシバイなどこれまでに重篤なフグ毒中毒を引き起こした有毒巻貝の塩基配列がデータベースに登録されていないため、これらについては、早急に塩基配列を明らかにしてデータベースの充実を図る必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 2016; 111: 6-12.
- 2) C. Acar, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Toxicity of the Lessepsian pufferfish *Lagocephalus sceleratus* from eastern Mediterranean coasts of

Turkey and species identification by rapid PCR amplification. *Eur. Food Res. Technol.* 2016; DOI 10.1007/s00217-016-2721-1.

- 3) 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. 著書・総説

- 1) 長島裕二, 桐明 絢: 海洋危険生物 食べて中毒; とくに魚について. *中毒研究* 2016; 29: 3-9.
- 2) 長島裕二, 桐明 絢: しらすへのフグ稚魚混入. *全水卸* 2016; 356: 8-11.
- 3) 長島裕二, 桐明 絢: 魚介類の毒とその特徴. *アクアネット* 2016; 19 (12): 22-26.

3. 学会発表

- 1) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Pharmacokinetics and biliary excretion of tetrodotoxin in the marine pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. 7th World Fisheries Congress in Busan, Korea, May, 2016.
- 2) 長島裕二, 岡山桜子: ふく卵巣ぬか漬の毒性低下のメカニズム. 第26回西日本ふく研究会, 山口県下関市, 平成28年5月.
- 3) 桐明 絢, 石崎松一郎, 長島裕二, 塩見一雄: カサゴ目魚類刺毒の性状および構造解析. 第63回トキシシンポジウム, 山形県天童市, 平成28年7月.
- 4) 永井 慎, 岡山桜子, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬工程での減毒に関する微生物探索に関する研究. 平成28年度日本水産学会秋季大会, 奈良県奈良市, 平成28年9月.
- 5) 徐 超香, 太田 晶, 岡山桜子, 崔 浩, 石崎松一郎, 長島裕二: 食用フグの見直し - 日本沿岸ホシフグの安全性評価 -. 第112回日本食品衛生学会学術講演会, 北海道函館市, 平成28年10月.
- 6) 岡山桜子, 永井 慎, 石崎松一郎, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬における減毒要因の検討. 第112回日本

- 食品衛生学会学術講演会・北海道函館市，平成 28 年 10 月．
- 7) 長島裕二：しらすへのフグ稚魚の混入について．平成 28 年度水産利用関係者研究開発推進会議，神奈川県横浜市，平成 28 年 11 月．
- 8) 長島裕二：フグ食中毒とフグ毒中毒．平成 28 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会 市民公開講座，石川県金沢市，平成 29 年 2 月．
- 9) 長島裕二：しらすへのフグ稚魚の混入について．静岡県水産技術研究所第 62 回水産加工技術セミナー，静岡県静岡市，平成 29 年 3 月．
- 10) 長島裕二：魚介類の毒素タンパク質．平成 29 年度日本水産学会春季大会シンポジウム「水圏生物タンパク質科学の新展開」，東京都港区，平成 29 年 3 月．
- 11) 崔 浩，横塚俊介，岡山桜子，石崎松一郎，長島裕二：凍結解凍によるコモンフグ筋肉へのフグ毒の移行．平成 29 年度日本水産学会春季大会，東京都港区，平成 29 年 3 月．
- 12) 大木理恵子，松本拓也，石崎松一郎，長島裕二：組織培養法によるバイのテロドトキシン取り込み．平成 29 年度日本水産学会春季大会，東京都港区，平成 29 年 3 月．
- 13) 松本拓也，北島冴美，青柳 充，三苦好治，石崎松一郎，長島裕二：トラフグ薬物排泄トランスポーター Bcrp をコードする Abcg2 遺伝子のクローニング．平成 29 年度日本水産学会春季大会，東京都港区，平成 29 年 3 月．

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) なし

表1 活魚または生鮮コモンフグの毒力

漁獲年月			筋肉	皮	肝臓	卵巣	精巣
2016年1月	鮮魚	有毒個体出現率	0/10	10/10	10/10	8/8	0/2
		毒性値 (MU/g)	< 5	6.4 ~ 44.1	14.0 ~ 422	466 ~ 3540	< 5
2016年3月	鮮魚	有毒個体出現率	0/10	10/10	10/10	10/10	
		毒性値 (MU/g)	< 5	184 ~ 1550	11.2 ~ 330	365 ~ 1400	
2016年3月	活魚	有毒個体出現率	0/10	10/10	10/10	10/10	
		毒性値 (MU/g)	< 5	186 ~ 1990	16.2 ~ 398	209 ~ 1280	
全体		有毒個体出現率	0/30	30/30	30/30	28/28	0/2
		毒性値 (MU/g)	< 5	6.4 ~ 1990	11.2 ~ 422	209 ~ 3540	< 5

表2 生鮮コモンフグ同一個体の左右による毒性比較

試料 No.	体長 (cm)	体重 (g)	性別	毒力 (MU/g)			
				筋肉		皮	
				左側	右側	左側	右側
1	22.0	224	雌	< 5	< 5	1330	1550
2	19.5	187	雌	< 5	< 5	690	787
3	20.0	163	雌	< 5	< 5	678	784
4	17.5	138	雌	< 5	< 5	544	649
5	19.0	147	雌	< 5	< 5	483	582
6	22.5	279	雌	< 5	< 5	453	420
7	20.0	167	雌	< 5	< 5	348	364
8	17.0	133	雌	< 5	< 5	314	280
9	20.0	155	雌	< 5	< 5	310	300
10	24.5	310	雌	< 5	< 5	182	184

表3 凍結および凍結・解凍後のコモンフグ筋肉と皮の毒性

試料 No.	筋肉 (MU/g)						皮 (MU/g)		
	凍結前		凍結後		凍結・解凍後		凍結前	凍結後	凍結・解凍後
	内部	外部	内部	外部	内部	外部			
1	< 5	5.8	< 5	10.9			1270	1070	
2	< 5	9.8	< 5	8.1			1180	1140	
3	< 5	< 5	< 5	5			714	811	
4	< 5	5.9	< 5	< 5			492	534	
5	< 5	< 5	< 5	< 5			451	396	
6	< 5	13.2			5	84.9	1990		1120
7	< 5	7.8			< 5	110	1120		758
8	< 5	6.7			< 5	21.8	467		369
9	< 5	< 5			< 5	28.1	448		327
10	< 5	< 5			< 5	5	186		127

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 28 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 東京海洋大学学術研究院食品生産科学部門

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フグ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、まずマフグとシマフグ間の交雑種に焦点を絞り、自然交雑種 20 個体（うちマフグとシマフグ間で自然交配したものと推定された 1 個体）、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 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うとともに、マフグおよびシマフグの 2 種を明確に区別しうる核 DNA マイクロサテライトマーカーの選抜を行った。その後、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体を用いて、再現性の検証を行った。

A. 研究目的

今年度は、東京都市場衛生検査所および水産総合研究センターから分与された父系および母系系統が未知の個体を含むトラフグ属自然交雑フグ種を対象に、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を行い、形態学的特徴からマフグとシマフグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 1 個体を対象に、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

試料には東京都市場衛生検査所から分与された自然交雑フグ種 19 個体ならびに水産総合研究センターから分与された自然交雑フグ種 1 個体、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体を用いた。今回用いた自然交雑種を表 1 に示した。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(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 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 2 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 50ng、10× 緩衝液 (TaKaRa) 5.0 μ L、2.5mM dNTP mix 4.0 μ L、10 μ M 各プライマー 1.0 μ L、TaKaRa Ex Taq DNA ポリメラーゼ 0.25 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 16S rRNA 領域では、98 で 10 秒、53 で 30 秒、72 で 60 秒のサイクルを 30 回行い、シトクローム *b* 領域では 98 で 10 秒、55 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、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。

次に、マフグおよびシマフグにおいて種特異的なマイクロサテライトマーカーを探索することを目的に、自然交雑フグ種全 20 個体を対象に、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、マフグおよびシマフグの 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、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体を用いて、再現性の検証を行った。

C. 研究結果

1) フグ類の分類に関する研究

今回自然交雑フグ種 20 個体、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 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、自然交雑フグ種 20 個体はすべての個体で母系種を同定することができた(表 3)。形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 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 4)。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になった。

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 TATC 反復配列、TGTA 反復配列、TAGA 反復配列および AAAG 反復配列であったが、TATC 反復配列の解析においてのみ、マフグおよびシ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、マフグおよびシマフグでおよそ 350bp および 520bp であった(図 1 中の No.1)。そこで、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグおよびシマフグを対象に、TATC 反復配列の普遍性を確認したところ、両親種(マフグとシマフグ)の分子量の各位置に複数のバンドが見られたことから、分子量 350bp がマフグ由来、520bp はシマフグ由来であると推測された(図 1 中の No.2-5, No.6-9)。このことから、本法が両親種判別に適用できる可能性が極めて高い。

D. 考察

1) フグ類の分類に関する研究

今回、自然交雑フグ種 20 個体につき mtDNA 解析法による母系種の同定を行い、マフグおよびシマフグ間に焦点を絞り、TATC 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。その結果、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 TATC 反復配列の電気泳動距離の違いから父系種同定に適用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、マフグとシマフグ間交雑種と推定された個体(Hybrid No.2)において、マフグ由来の 350bp およびシマフグ由来の 520bp の PCR 産物が得られた。また、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグでは 20 個体中 13 個体(65%)、シマフグでは 10 個体中 8 個体(80%)で上述した分子量に近い PCR 産物が得られた(図示せず)。しかしながら、今回用いたマフグおよびシマフグにおいて、複数本のバンドを得た個体も存在した。これはマフグおよびシマ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、昨年度トラフグおよびマフグからなる交雑種における GAAAG 反復配列の有効性を明らかにし、今年度はマフグおよびシマフグからなる交雑種において TATC 反復配列から推定できる可能性を明らかにした。しかしながら、現在マイクロサテライトの反復回数は未決定であるため、本 TATC マーカーが適用できるかどうかは定かではない。さらに、その他の交雑種、例えばシヨウサイフグ、コモンフグ、ゴマフグなどからなる交雑種に本 TATC マーカーが適用できるかどうかも定かでない。他のマイクロサテライト領域も含め、次年度も引き続き、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* 2016; 111: 6-12.
- 2) C. Acar, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Toxicity

of the Lessepsian pufferfish *Lagocephalus sceleratus* from eastern Mediterranean coasts of Turkey and species identification by rapid PCR amplification. Eur. Food Res. Technol. 2016; DOI 10.1007/s00217-016-2721-1.

1) なし

- 3) 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. 著書・総説

1) なし

3. 学会発表

- 1) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Pharmacokinetics and biliary excretion of tetrodotoxin in the marine pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. 7th World Fisheries Congress in Busan, Korea, May, 2016.
- 2) 徐 超香, 太田 晶, 岡山桜子, 崔 浩, 石崎松一郎, 長島裕二: 食用フグの見直し - 日本沿岸ホシフグの安全性評価 - .第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 北海道函館市, 平成 28 年 10 月.
- 3) 岡山桜子, 永井 慎, 石崎松一郎, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬けにおける減毒要因の検討 .第 112 回日本食品衛生学会学術講演会 .北海道函館市, 平成 28 年 10 月.
- 4) 松本拓也, 北島冴美, 青柳 充, 三苦好治, 石崎松一郎, 長島裕二: トラフグ薬物排泄トランスporter-Bcrp をコードする Abcg2 遺伝子のクローニング. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 29 年 3 月.
- 5) 大木理恵子, 松本拓也, 石崎松一郎, 長島裕二: 組織培養法によるパイのテトロドトキシン取り込み .平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 29 年 3 月.
- 6) 崔 浩, 横塚峻介, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: 凍結解凍によるコモフグ筋肉へのフグ毒の移行. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 29 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

表1 用いた自然交雑種の一覧

Natural hybrid No.	産地	形態学的特徴から推定された種
1	長崎県	Torafugu, unknown
2	不明	Torafugu, Shimafugu
3	三重県	Torafugu, Higanfugu or Akamefugu
4		
5		
6		
7	神奈川県	Torafugu, unknown
8		
9		
10		
11		
12	静岡県	Mafugu, unknown
13	新潟県	Gomafugu, unknown
14	不明	Shosai fugu, unknown
15	宮城県	Shosai fugu, Gomafugu
16	神奈川県	Torafugu, Mafugu or Shosai fugu
17	千葉県	Torafugu, Mafugu or Shosai fugu
18	愛知県	Mushifugu, unknown
19	神奈川県	Shosai fugu, unknown
20		

表2 母系種の判別に用いたプライマー

プライマー	配列
16Sar-L	5' -CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'
16Sbr-H	5' -CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'
L14317Glu	5' -CAGGATTTTAACCAGGACTAATGGCTTGAA-3'
H15149	5' -CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'

表3 自然交雑種の母系種判別結果

Sample	16S rRNA		cyt <i>b</i>		
	Species	Identify (bp)	Species	Identify (bp)	
Natural	1	Torafugu	396/396	Torafugu , Karasu	385/385
hybrid	2	Mafugu , Mefugu	500/501	Mafugu	419/419
	3	Torafugu	482/482	Torafugu , Karasu	329/329
	4	Torafugu	485/485	Torafugu , Karasu	390/390
	5	Torafugu	479/479	Torafugu , Karasu	342/342
	6	Torafugu	453/453	Torafugu , Karasu	416/416
	7	Torafugu	466/466	Torafugu , Karasu	390/391
	8	Torafugu	471/471	Torafugu , Karasu	407/408
	9	Torafugu	459/459	Torafugu , Karasu	416/416
	10	Torafugu	456/456	Torafugu , Karasu	403/403
	11	Torafugu	522/523	Torafugu , Karasu	412/412
	12	Mafugu , Mefugu	516/517	Mafugu	377/378
	13	Gomafugu	522/522	Gomafugu	371/371
	14	Gomafugu	410/410	Gomafugu	363/363
	15	Shosai fugu	513/513	Shosai fugu	388/388
	16	Torafugu	526/526	Torafugu , Karasu	404/404
	17	Mafugu , Mefugu	527/528	Mafugu	392/393
	18	Torafugu	531/531	Torafugu , Karasu	404/404
	19	Mafugu , Mefugu	528/528	Mafugu	406/406
	20	Mafugu , Mefugu	522/522	Mafugu	397/399

表 4 単一系統と推定された個体の母系種判別結果

Sample	16S rRNA		cyt <i>b</i>		
	Species	Identify (bp)	Species	Identify (bp)	
Non- hybrid	7	Shimafugu	391/391	Shimafugu	373/373
	8	Shimafugu	406/406	Shimafugu	377/377
	9	Shimafugu	436/436	Shimafugu	373/373
	10	Shimafugu	402/402	Shimafugu	354/354
	11	Shimafugu	388/388	Shimafugu	310/310
	12	Shimafugu	393/393	Shimafugu	380/380
	25	Shimafugu	374/374	Shimafugu	342/343
	26	Shimafugu	477/477	Shimafugu	383/383
	27	Shimafugu	434/435	Shimafugu	372/372
	28	Shimafugu	484/484	Shimafugu	370/370
	34	Mafugu, Mefugu	523/524	Mafugu	362/362
	35	Mafugu, Mefugu	415/415	Mafugu	374/374
	36	Mafugu, Mefugu	362/362	Mafugu	343/343
	37	Mafugu, Mefugu	403/404	Mafugu	343/343
	38	Mafugu, Mefugu	479/479	Mafugu	372/373
	39	Mafugu, Mefugu	339/339	Mafugu	366/366
	40	Mafugu, Mefugu	383/384	Mafugu	346/346
	41	Mafugu, Mefugu	431/432	Mafugu	366/366
	42	Mafugu, Mefugu	447/448	Mafugu	351/351
	52	Mafugu, Mefugu	429/430	Mafugu	365/365
	53	Mafugu, Mefugu	386/386	Mafugu	372/375
	54	Mafugu, Mefugu	414/414	Mafugu	351/353
	55	Mafugu, Mefugu	504/504	Mafugu	362/365
	56	Mafugu, Mefugu	331/332	Mafugu	382/383
	57	Mafugu, Mefugu	424/424	Mafugu	316/319
	58	Mafugu, Mefugu	316/317	Mafugu	392/392
	59	Mafugu, Mefugu	441/441	Mafugu	368/369
	60	Mafugu, Mefugu	478/478	Mafugu	378/379
	61	Mafugu, Mefugu	372/374	Mafugu	366/366
	62	Mafugu, Mefugu	421/421	Mafugu	395/395

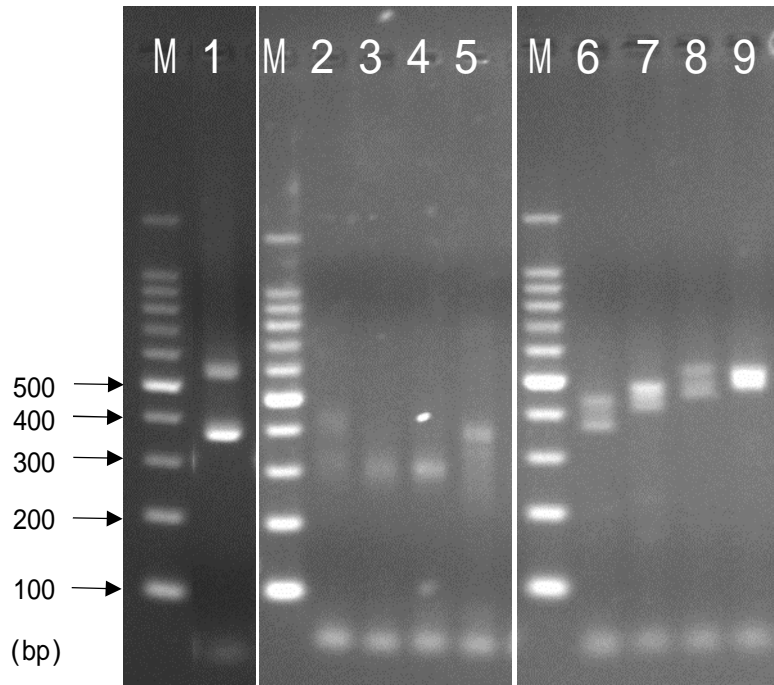


図1. マフグおよびシマフグ間交雑種および単一系統種の泳動パターン
M; マーカー, 1; マフグ - シマフグ, 2-5; マフグ, 6-9; シマフグ

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）

「マリントキシンのリスク管理に関する研究」

平成 28 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 名誉研究員

研究要旨

フグ類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進めた。今年度は日本産フグ類に関する分類学的情報を取りまとめることに重点を置いて研究を進めた。そのため、日本および西太平洋から採集された 60 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、高知大学理学部において調査した。

これまでの研究によって、日本沿岸には 4 科 14 属 61 種のフグ類が分布することが明らかになった。その内訳は以下の通りである：ウチワフグ科（1 属 1 種）、フグ科（7 属 49 種）、ハリセンボン科（3 属 7 種）、マンボウ科（3 属 4 種）。また、トラフグ属のコモンフグが新種となることやクサフグの学名を変更する必要があることを明らかにして論文を出版した。さらに、サハリン周辺のトラフグ属についてロシアの研究者と協同研究を行い、シマフグ、トラフグおよびコモンフグがサハリンまで分布することを明らかにした。サバフグ属についてはクロサバフグの学名変更に関する論文を出版した。WEB に掲載するフグ類の簡便な同定ガイドの準備を進め、トラフグ属とサバフグ属の原稿を完成した。

A. 研究目的

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。今年度は、日本産フグ類の同定に資するため「日本産フグ類図鑑」を作成するとともにWEB版の簡便なフグ類同定ガイドの作成を目指す。フグ類同定ガイドを作成する際に、現場でフグ類を適切に識別できるようにするため、識別形質を画像で分かりやすく示すことにする。

全国各地に分布し、沿岸で普通に見られるコモンフグが新種であることが明らかになったため、新たな学名を正式に発表する。コモンフグの学名と連動して、クサフグの学名変更が必要になった。さらに、サバフグ属のクロサバフグも学名を変更する必要があることが判明した。このためクサフグとクロサバフグに適用すべき正しい学名を学術誌に発表する。

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。日本および西太平

洋熱帯域から採集され 60 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、高知大学理学部において調査した。また、カラフトのフグ類についてはロシアの研究者の協力を得て調査した。南半球のクロサバフグについてはニュージーランドの研究者の協力によって標本を調査した。

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。

C. 研究結果

1) 日本産フグ類の分類

日本沿岸には 4 科 14 属 61 種のフグ類が分布することが明らかになった。その内訳は以下の通りである：ウチワフグ科（1 属 1 種）、フグ科（7 属 49 種）、ハリセンボン科（3 属 7 種）、マンボウ科（3 属 4 種）。

フグ科の7属は、体の横断面の形、吻の形態(延長するか否か)、鼻器の開口部の数、鼻器の形態、側面から見た下顎の形態、尾鰭の形態、側線の走り方などの特徴によって識別できることが明らかになった。属内の種レベルの分類形質としては、体表面の小棘の分布状態、体側面の腹縁における皮褶の有無、鰭の形態、体色(体側の黒色紋の有無や色彩パターン)が重要であることが判明した。体色は個体変異があるため、種の特徴として扱うことに慎重な意見も従来見られたが、多数の個体を調査した結果、種に特有の体色パターンがあることが判明した。ただし、モヨウフグ属のサザナミフグとワモンフグのように類似した体色パターンを示す場合もあるが、そのような場合でも、腹部の暗色横帯や眼の周囲の模様を観察すれば両者を識別できることが明らかになった。

日本沿岸のフグ科魚類の種数は全世界の25%を占め、極めて多様である。日本産フグ科の種構成を調べたところ、熱帯を分布の中心とするオキナワフグ属、キタマクラ属、サバフグ属、シッポウフグ属、モヨウフグ属、ヨリトフグ属の種が35種(フグ科の70%)を占めるが、その一方で日本および東アジアの温帯を分布の中心とするトラフグ属が14種に達することが明らかになった。このように熱帯性と温帯性のフグ類の両方が多数分布する海域は日本以外にない。

ハリセンボン科の3属は体表の棘の形態と棘の分布状態によって識別できることが明らかになった。属内の種の識別形質としては、尾柄部における棘の分布状態、体表面の褐色斑紋の有無や形、体表面や鰭に小黒色点が分布するか否かなどが重要であることが明らかになった。

マンボウ科の3属は体形や舵鰭の形態によって区別できることが明らかとなった。マンボウ属の種レベルの分類には問題があったが、頭部背面の形態や体高と体長の比によって識別できることが判明した。

2) トラフグ属の新種と学名変更を要する種

コモンフグの学名は従来 *Takifugu poecilonotus* (Temminck and Schlegel, 1850)とされていた。しかし、シタイプ(複数個体から構成されるタイプ標本)を調べたところ、クサフグとコモンフグが混じっていることが明らかになった。昨年度報告したように、過去にオランダの Boeseman がシタイプの中からレクトタイプに選んだ標本がクサフグであったためコモンフグが学名を失うこ

とになった。このためコモンフグに *Takifugu flavipterus* という新たな学名を与え、新種として発表した。

コモンフグやクサフグのタイプ標本調査の結果、クサフグの学名にも問題があることが判明した。クサフグの学名は従来 *Takifugu niphobles* (Jordan and Snyder, 1901)とされていたが、正しい学名は *Takifugu alboplumbeus* (Richardson, 1845)であることが判明したため、学術誌に論文を発表した。

また、サバフグ属のクロサバフグの学名は従来 *Lagocephalus gloveri* (Abe and Tabeta, 1983)とされていたが、正しい学名は *Lagocephalus cheesemanii* (Clarke, 1897)であることが明らかになったため、学術誌に論文を発表した。

3) WEB版のフグ類同定ガイド

フグ類を簡便に識別できるようにするため、画像を多用したWEB版のフグ類同定ガイドの作成を進め、トラフグ属とサバフグ属など主要な属の種に関する原稿を作成した。

3) ロシア極東域のトラフグ属魚類

ロシア極東域のトラフグ属魚類を研究した結果、8種が分布することが明らかになった。また、カラフトからシマフグが初めて採集された。従来、カラフトからクサフグとして報告されていたフグはコモンフグであったことが明らかになった。

D. 考察

日本産フグ類の中でフグ科魚類が最も多様性に富むことが明らかになった。また、フグ科魚類の種レベルの識別には体色が重要であることが判明した。体色は種によって特有のパターンを持っているが、ある程度の種内変異も示す。このため、種によって着目すべき体色パターンが異なることになる。従来、種レベルの同定を誤っているのは種に特有の体色パターンを正しく認識できていなかったためと考えられる。種同定を正しく行うためには、体色をカラー写真で保存し、詳細な検討を行えるようにする必要がある。また、フグ類の種に特異的な体色パターンが背面に出現することもあるため、側面写真と背面写真の両方を撮影しておくことが望ましい。体色は固定標本になるとほとんど消失してしまうため、標本が新鮮な内にカラー写真を撮影することはフグ類の同定において欠かすことができない。

本研究によって、日本の沿岸で最も普通に見ら

れるコモンフグとクサフグに分類学的問題があることが明らかになった。この両種は形態が似ているばかりではなく、幼魚や若魚のときには体色もよく似ている。このためコモンフグのシントタイプにクサフグが混入していたと考えられる。この事実を従来の研究者が見落としていたため、コモンフグを新種として発表し、クサフグの学名を変更する必要性が生じた。フグ科魚類の分類は他の魚類と比べると困難なため、今後も類似の問題が発見される可能性がある。

E. 結論

日本沿岸には4科14属61種のフグ類が分布し、熱帯性の種が70%を占め、温帯性の種は30%であることが明らかになった。フグ類の各科の内訳は以下の通りで、フグ科の多様性が最も高い：ウチワフグ科（1属1種）、フグ科（7属49種）、ハリセンボン科（3属7種）、マンボウ科（3属4種）。コモンフグが新種であることが明らかになったため、新たに *Takifugu flavipterus* という学名を与えた。クサフグとクロサバフグに従来使用されていた学名は誤りであったため、正しい学名に関する論文を発表した。ロシア極東域にトラフグ属が8種分布することを明らかにし、シマフグが初めてカラフトから採集されたため、ロシアの研究者と共著論文として発表した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Matsuura, A. Kaneko, E. Katayama: Underwater observations of the rare deep-sea fish *Triodon macropterus* (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Triodontidae) with comments on the fine structure of the scales. *Ichthyol. Res.*, 2016; doi: 10.1007/s10228-016-0555-2.
- 2) K. Matsuura, T. P. Satoh: Redescription of *Lagocephalus cheesemanii* (Clarke, 1897), a senior synonym of *Lagocephalus gloveri* Abe and Tabet, 1983 based on morphological and genetic comparisons (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae). *Ichthyol. Res.*, 2016; doi: 10.1007/s10228-016-0547-2.
- 3) K. Matsuura, I. Middleton: Discovery of a larva of the Aracanidae (Actinopterygii, Tetraodontiformes) from New Zealand. *Ichthyol. Res.*, 2016; doi: 10.1007/s10228-016-0533-8.
- 4) Y. V. Dyldin, K. Matsuura, S. S. Makeev: Comments of puffers of the genus *Takifugu* from Russian waters with the first record of yellowfin puffer, *Takifugu xanthopterus* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) from Sakhalin Island. *Bull. Nation. Mus. Nat. Sci., Ser. A*, 2016; 42: 133-141.
- 5) K. Matsuura: Taxonomic and nomenclatural comments on two puffers of the genus *Takifugu* with description of a new species, *Takifugu flavipterus*, from Japan (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Tetraodontidae). *Bull. Nation. Mus. Nat. Sci., Ser. A*, 2017; 43: 71-80.

2. 書籍

- 1) 松浦啓一, 日本産フグ類図鑑, 東海大学出版部, 秦野, 2017, 127 pp.

3. 学会発表

- 1) 松浦啓一: クサフグの学名が変更され、コモンフグは未記載種となる. 2016年度日本魚類学会年会. 2016年9月, 岐阜県岐阜市.

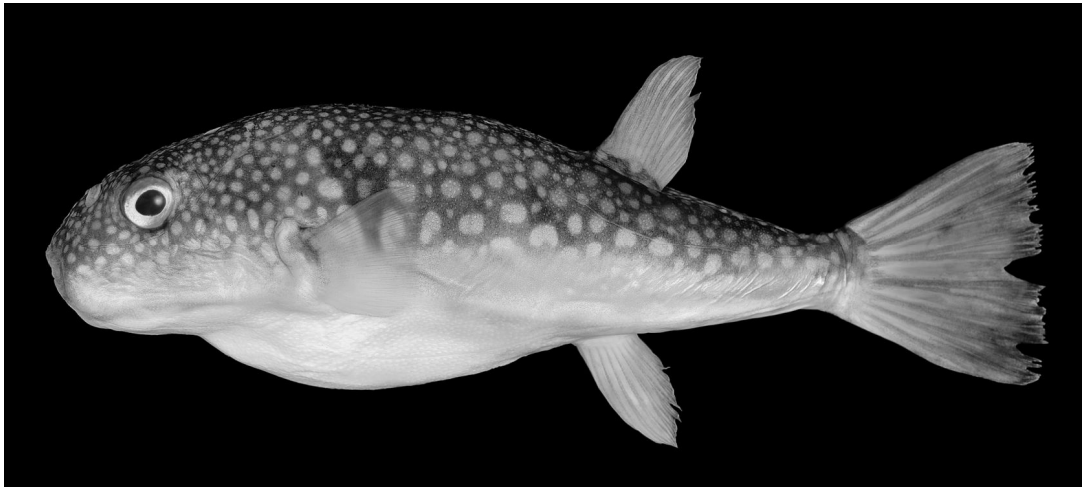


図1 新種となったコモンフグ *Takifugu flavipterus* (Matsuura, 2017)のホロタイプ
(写真提供：国立科学博物館)

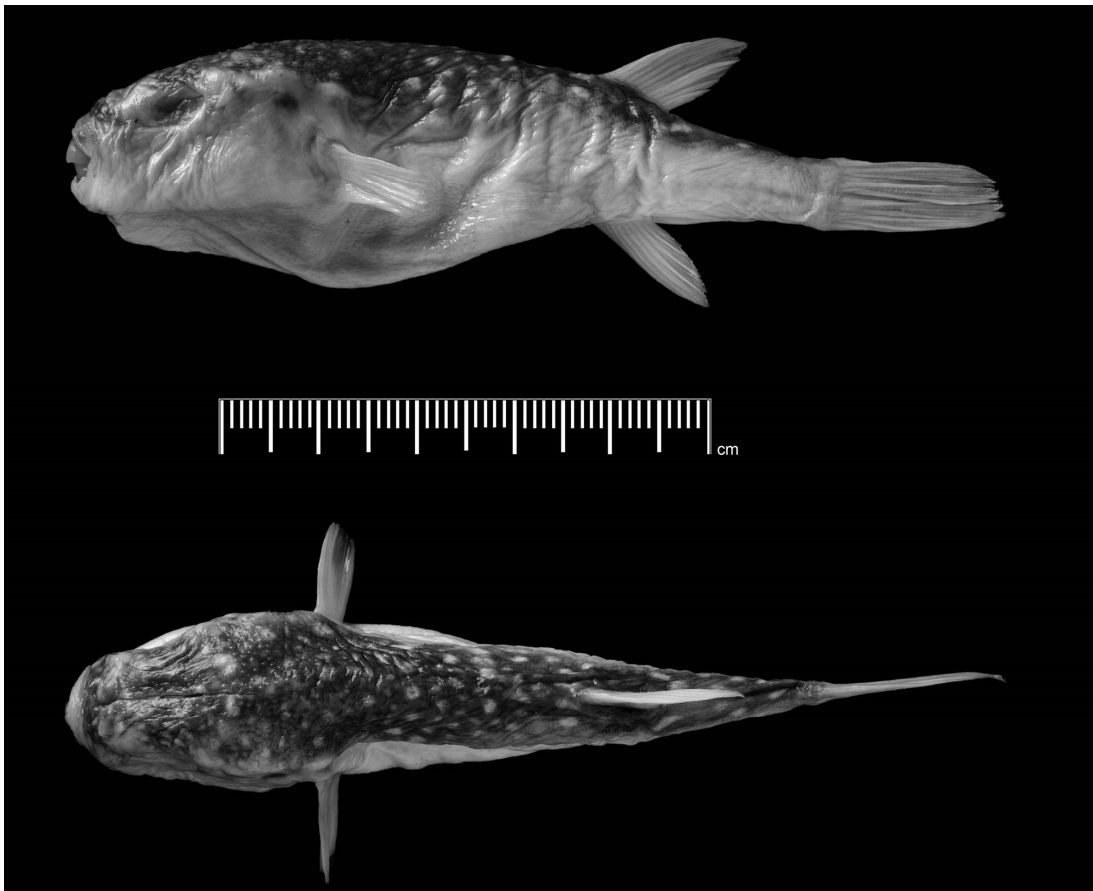


図2 大英自然史博物館に保管されているクサフグのホロタイプ (写真提供：大英自然史博物館)

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 28 年度分担研究報告書

デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法の開発

研究分担者 大城 直雅 国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者 佐藤 繁 北里大学海洋生命科学部応用生物化学講座
協力研究者 國吉 杏子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

麻痺性貝毒はサキシトキシン(STX)とその誘導体の総称である。これまでに毒化貝や原因微細藻から 20 を超える関連成分が分離されている。代表的な成分である STX は、現在、「化学兵器の開発、生産、貯蔵及び使用の禁止並びに廃棄に関する条約」(通称「化学兵器禁止条約」)の国内実施法である「化学兵器禁止法」(平成 7 年 4 月 5 日法律第 65 号)に規定される特定物質であり、その製造、使用は著しく困難な状況にある。デカルバモイルサキシトキシン(dcSTX)は STX と同様、化学的に安定で比毒性が高く、STX の代替標準毒の第一候補とされているが、毒化貝や原因微細藻にはほとんど含まれておらず、その確保が急務となっている。我々は 11 位に硫酸エステルをもつゴニオトキシン(GTX)群麻痺性貝毒成分が 2-メルカプトエタノールと塩基性条件下で安定な結合体を形成することを応用し、日本沿岸で発生する麻痺性貝毒の主成分であり毒化した二枚貝から多量に確保できるゴニオトキシン(GTX)群を出発物質として、高収率で大量の dcSTX を調製する方法を確立した。

A. 研究目的

麻痺性貝毒(paralytic shellfish poisons, PSP)はサキシトキシン(STX)とその関連成分の総称である。これまでに毒化した貝や産生微細藻から 20 を超える関連成分が分離され、その構造が決定されている。PSP の代表的な成分である STX は、長年マウス毒性試験法(Sommer and Mayer, 1937)や ELISA など、種々の PSP 検査法の比較標準毒として使用されてきた。STX は現在、「化学兵器の開発、生産、貯蔵及び使用の禁止並びに廃棄に関する条約」(通称「化学兵器禁止条約」)の国内実施法である「化学兵器禁止法」(平成 7 年 4 月 5 日法律第 65 号)に規定される特定物質であり、その製造、使用は著しく困難な状況にある。デカルバモイルサキシトキシン(dcSTX)は STX と同様、化学的に安定で比毒性が高く、STX の代替標準毒の第一候補とされているが、毒化貝や原因微細藻にはほとんど含まれておらず、その確保が急務となっている。現在のところ dcSTX は有毒ラン藻を培養して得られる C1、C2 を、数段階の反応を経て変換することにより調製され

ている(Watanabe et al., 2011)。この方法では、dcSTX のほか、ゴニオトキシン(GTX)2、GTX3 および GTX5 などの様々な成分の HPLC 分析用標準毒が得られる反面、マウス毒性試験用などで必要となる dcSTX を多量に確保するには不向きである。我々は、日本沿岸で発生する PSP の主成分であり毒化した二枚貝から多量に確保できる GTX 群を出発物質とし、GTX 群が 2-メルカプトエタノール(ME)と塩基性条件下で安定な結合体を形成することを応用して(Sato et al., 2000)、高収率で大量の dcSTX を調製する方法を開発した(佐藤ら 2016、特開 2016-204270)。以下、この方法に従って dcSTX を大量調製する手順について報告する。

B. 研究方法

1) 試料

2015 年 7 月、および 2014 年 6 月に岩手県大船渡湾清水定点の試験筏で採取した毒化ホタテガイ(むき身 20 kg、冷凍保存)を希塩酸で熱浸抽出し、活性炭、Bio-Gel P-2 および Bio-Rex 70 に

よる各カラムクロマトグラフィーを用いる常法で順次精製して GTX1 と GTX4、GTX2 と GTX3 の混合物を分離した。GTX1 と GTX4 の混合物は Sato et al. (2014) の方法に従ってヘミン/アスコルビン酸中性水溶液中で処理して GTX2 と GTX3 の混合物に変換し、再度 Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーで精製して GTX2、3 混合物 (約 450 μmol) を得た。

2) ME-STX 結合体の調製

凍結乾燥した GTX2,3 混合物 (350 μmol) を 0.05 M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.3) 300 mL に溶解し、これに ME (和光純薬工業社製, >95%) 3 mL を添加混合して室温で一晩静置した。この ME-STX 結合体を含む反応混合物を Bio-Gel P-2 のカラムに負荷し、カラムを超純水で洗浄後、希酢酸で溶出する画分を回収し、凍結乾燥して ME-STX 結合体 (約 330 μmol) を得た。

3) ME-STX 結合体のアルカリ加水分解

ME-STX 結合体 (330 μmol) を超純水 300 mL に溶解し、5 M NaOH を滴下して pH を 12.0 に調整した。これを沸騰浴中で 17 分間加熱した後に氷冷し、500 mM リン酸を滴下して pH 7.4 に調整した。反応混合液に ME 30 mL を加えて沸騰浴中で 10 分間加熱後、Bio-Gel P-2 カラム、次いで Bio-Rex 70 カラムを用いて順次精製した。画分中の ME-STX、ME-dcSTX および dcSTX の検出には、TOF-MS (Triple TOF 5600, ABSciex) を使用した。

4) 純度の確認

調製した dcSTX の純度を確認するために、トリプル四重極型 LC-MS/MS を用いて分析した。調製された dcSTX 溶液を超純水で希釈し、以下の条件で dcSTX および関連物質の分析を行った。

【HPLC】分析カラム: InertSustain Amide (2.1×75 mm、粒径 3 μm)、カラム温度: 30、移動相: 2 mM ギ酸アンモニウム-3.5 mM ギ酸溶液 (A) と、95% アセトニトリル含有 2 mM ギ酸アンモニウム-3.5 mM ギ酸溶液 (B) グラジエント: 0 min (70% B) - 2 min (70% B) - 18 min (40% B) - 23 min (40% B)、流速: 0.2 mL/min、注入量: 2 μL 。

【MS】ESI (Positive)、ドライガス: N_2 (300、5 L/min)、シースガス: N_2 (380、11 L/min)、測定モード: SIM モード (モニターイオン (フラグメンター電圧) は以下のとおり。dcSTX: m/z 257.2 (100V)、STX: m/z 300.2 (100V)、C1、

C2、GTX3: m/z 396.2 (100V)、GTX1: m/z 332.2 (125V)、GTX2: m/z 316.2 (65V)、GTX4: m/z 412.2 (125V)、dcGTX2: m/z 396.2 (100V))

C. 研究結果

ME-STX 結合体をアルカリ加水分解処理することにより ME-STX は完全に消失し、ME-dcSTX が生じることを確認した。ME-dcSTX を含む中性水溶液に過剰の ME を加えて加熱することにより、ME が脱離して生じた dcSTX を精製し、268 μmol の目的成分を得た。

精製された dcSTX 溶液は約 40 $\mu\text{g/mL}$ と LC-MS で測定するには高濃度であったため、超純水で 5,000 倍 (8 ng/mL 程度) および 10,000 倍 (4 ng/mL 程度) に希釈して LC-MS 分析に供した。その結果、両希釈用液とも SIM クロマトグラムにおいて dcSTX (m/z 257) の単一ピークが確認され、STX をはじめとする他の PSP 関連成分は検出されなかった (図 1~3)。

D. 考察

毒化二枚貝や有毒微細藻に含まれる麻痺性貝毒の常在成分 (C1, C2, GTX1~6, neoSTX, dcSTX, STX 等) は、pH 8 以上で著しく不安定となり、酸化されて無毒の蛍光プリン体に分解される。一方、11 位に硫酸エステルを持つ GTX2 や GTX3 などの成分は、種々のチオール化合物と反応し、11 位に硫黄原子を介してチオールとの結合体を形成する (Sato et al., 2000)。

我々は 1,2-エタンジチオール (EDT) や 2-メルカプトエタノール (ME) が GTX2、3 に作用して生じる結合体は塩基性条件下で著しく安定であることを見出し、ME-STX を塩基性条件下で加熱し、側鎖カーバモイル基を加水分解することにより、高収率で ME-dcSTX が得られることを明らかにした (佐藤ら 2016、特開 2016-204270)。

前述のように現在のところ dcSTX 標品は、C1、C2 を ME などのチオールで処理して得られる GTX5 を中性付近で煮沸する、あるいは C1、C2 を中性付近で煮沸して得られる dcGTX2 と dcGTX3 の混合物を ME 処理することにより調製されている。これらの方法では最終産物である dcSTX 標品に混入する微量の STX をカラムクロマトグラフィーで完全に分離することは困難である。本研究で使用した、pH 12 の水溶液中で 15 分以上煮沸する条件下では、収率は若干低下する

ものの ME-STX の carbamoyl 側鎖を完全に加水分解・脱離して、ME-dcSTX のみを得ることが可能である。さらに ME-dcSTX からは ME 処理により容易に dcSTX を回収することが出来ることを確認した。

調製された dcSTX は LC-MS (SIM) 分析によって、PSP 関連物質が含まれていないことが確認された。次年度は qNMR により純度の検定と値付けについて検討する予定である。

E. 結論

日本沿岸で毒化した貝類の主要成分である GTX 群に ME を作用させて得られる ME-STX 結合体を塩基性条件下で加水分解して、ME-dcSTX 結合体を調製し、これを過剰の ME で処理することにより、高収率で dcSTX を得る方法を確立した。次年度は引き続き dcSTX の調製を継続しつつ、qNMR による値付けを検討する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 佐藤 繁, 藤田沙和衣, 森 美貴, 犬童優華, 佐伯富貴, 高石鈴香: デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 2017 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 佐藤 繁, 藤田沙和衣, 森 美貴(発明者): デカルバモイルサキシトキシンの製造方法. 特開 2016-204270 (P2016-204270A), 学校法人北里研究所(出願人).

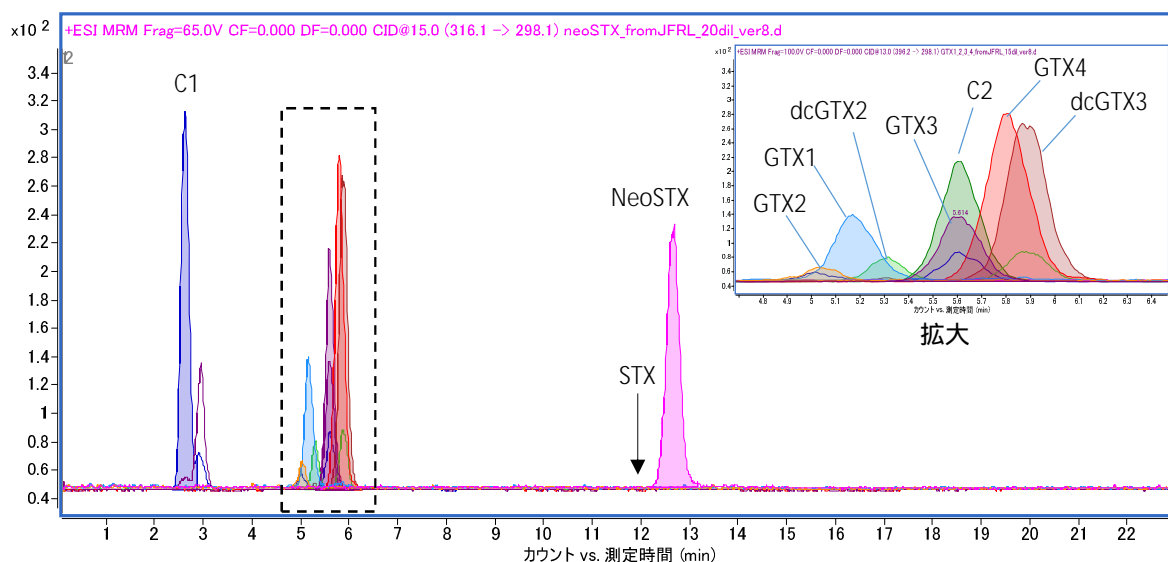


図 1. PSP 標準品の LC-MS (SIM) クロマトグラム。STX (m/z 300.2) の予想溶出位置は、文献等を参考に矢印 () で示した。

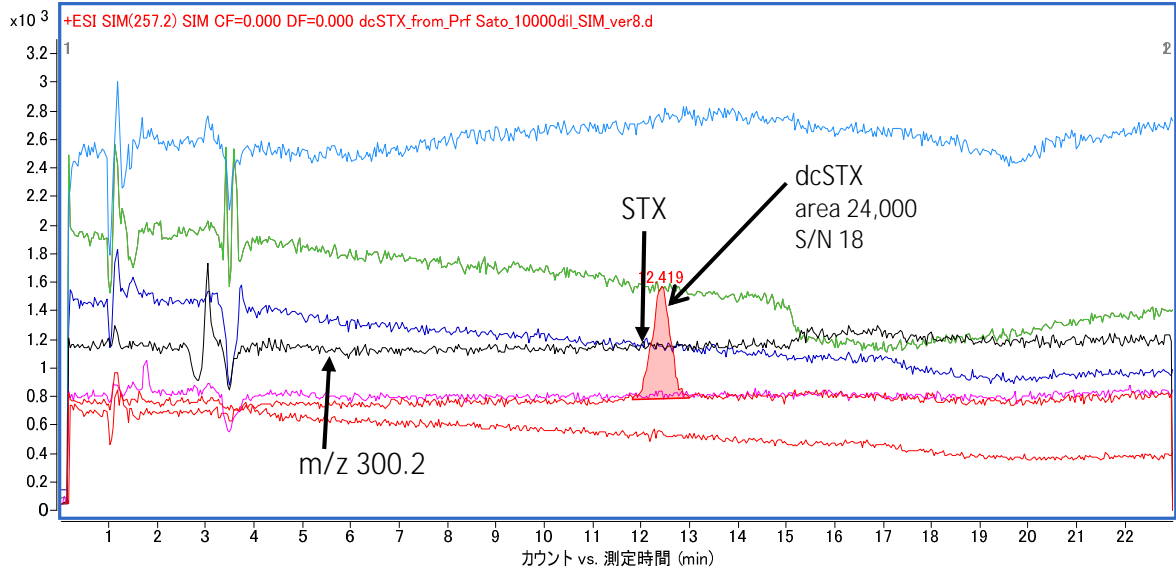


図 2 . dcSTX 調製溶液 (10,000 倍) の LC-MS (SIM) クロマトグラム。STX (m/z 300.2) の予想溶出位置は文献等を参考に示した。

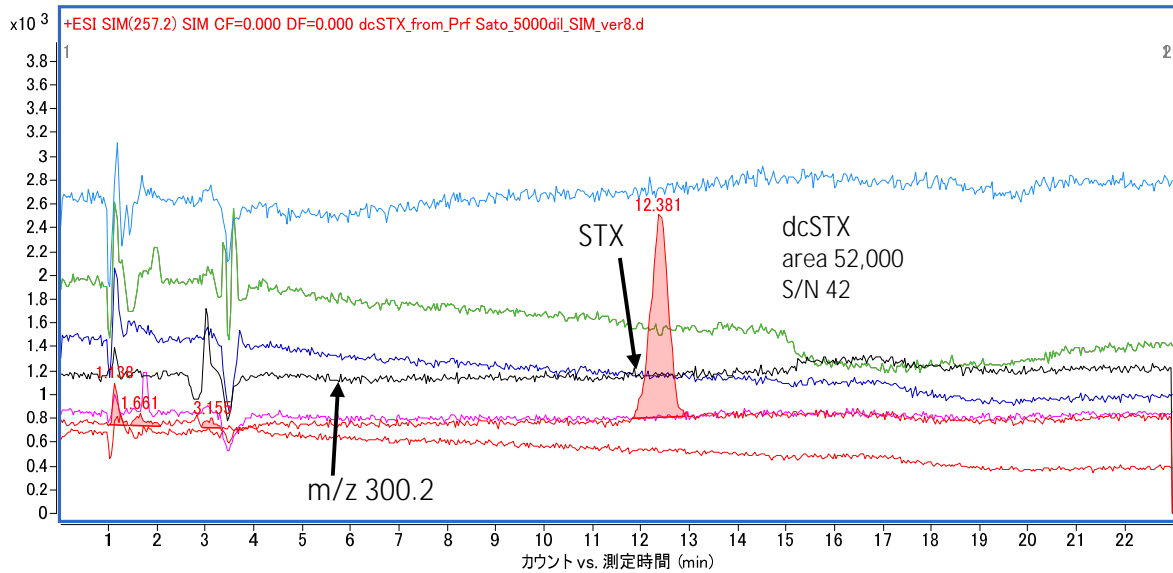


図 3 . dcSTX 調製溶液 (5,000 倍、8 ng/mL 程度) の LC-MS (SIM) クロマトグラム。STX (m/z 300.2) の予想溶出位置は文献等を参考に示した。

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）

「マリントキシンのリスク管理に関する研究」

平成 28 年度分担研究報告書

デカルバモイルサキシトキシンによる麻痺性貝毒試験法の評価

研究分担者	大城 直雅	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	山本 明美	青森県環境保健センター
研究協力者	工藤 志保	青森県環境保健センター
研究協力者	中谷 実	青森県環境保健センター
研究協力者	増田 幸保	青森県環境保健センター
研究協力者	木村 淳子	青森県環境保健センター
研究協力者	鈴木 達也	(一財)食品薬品安全センター秦野研究所
研究協力者	高坂 典子	(一財)食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

麻痺性貝毒検査として国際的に実施されている方法に AOAC OM 959.08 があり、これはサキシトキシン (STX) を生物試験標準化のための標準品として用いる方法である。わが国では、STX は「化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律」に規定された特定物質であり、所持等に制限があるため、試験法としての普及が困難である。そこで、規制対象外であるデカルバモイルサキシトキシン (dcSTX) を STX の代替標準品として使用可能か評価することを目的とした。dcSTX と STX について、同一施設・同一条件で併行してマウスアッセイを実施し、その毒性を比較することにより、同等性を確認した。

平成 28 年度は STX と併行して dcSTX で基準変換係数 (Conversion Factor、CF 値) を求め、その後定期的にマウス 5 匹に投与し、CF 値の変動を調査したところ、STX と同様に dcSTX も安定した CF 値が得られた。さらに、dcSTX を塩酸で希釈しマウス投与を実施し、同溶液についての安定性を LC-MS/MS で確認した。

A. 研究目的

麻痺性貝毒検査として CODEX 委員会では、AOAC OM 959.08 をタイプ 1 に位置づけている。これはサキシトキシン (STX) 標準溶液により生物試験の標準化を行うもので、毒性を STX 当量で評価する。既知濃度の STX 溶液を繰り返し投与することにより、マウス単位 (MU) から STX 当量を算出するための変換係数 (Conversion Factor、CF 値) を求める。すなわち、CF 値は 1 MU に相当する STX 量 (μg) を意味する。わが国では、STX は「化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律」に規定された特定物質であり、所持等に制限があるため、標準的試験法として普及することは困難である。そこで、規制対象外であるデカルバモイルサキシトキシン (dcSTX) を用いた麻痺性貝毒試験方法が、AOAC OM 959.08

の代替として使用可能か評価するために、同一施設、同一条件下で dcSTX による試験法について検討した。

なお、青森県環境保健センターは STX の使用許可を得ている施設であり、STX を用いた実験等はすべて、同センターにおいて実施した。

B. 研究方法

1. 供試試料

dcSTX は、(一財)食品薬品安全センター秦野研究所において外部精度管理調査で使用している $2.35 \mu\text{mol/L}$ dcSTX 酢酸溶液 (STX 二塩酸塩に換算して $0.45 \mu\text{g/mL}$) を使用した。

STX は、FDA より供与された $100 \mu\text{g/mL}$ STX 二塩酸塩 塩酸溶液を使用した。

マウスは日本 SLC 株式会社より購入した 4 週

齢の ICR 系雄マウスを 2 日間順化して使用した。マウスの体重は 19~21 g のものを概ね使用し、マウス体重が 19 g 未満の場合は体重補正を行った。体重 21 g 以上のマウスは使用していない。

2 . 基準 CF 値の比較

AOAC OM 959.08 に準じて、STX および dcSTX について基準 CF 値を求めた。

1 日目に 1 mL の腹腔内投与による致死時間の中央値が 5~7 分に入る希釈濃度を 2 濃度調製した。希釈液には 0.003 M 塩酸を使用した。各濃度について 10 匹のマウス群に 1mL ずつ腹腔内投与し、体重と致死時間を測定し、致死時間の中央値から Sommer の表を用いて溶液の毒力 (MU/mL) を求めた。各希釈液の濃度 (FDA-STX $\mu\text{g/mL}$) を、求めた毒力 (MU/mL) で除して CF 値 (FDA-STX $\mu\text{g/MU}$) を求めた。

2 日目に、前日に調製した 2 濃度の希釈液を、各 10 匹のマウスに投与し、同様に CF 値を求めた。

また、新たに前日と同濃度になるよう 2 濃度の希釈液を調製し、各 10 匹のマウスに投与し、同様に CF 値を求めた。

STX と dcSTX について、各 60 匹のマウスを使用し、得られた 6 個の CF 値の平均値を求め、これを基準 CF 値とした。

数値の取扱いについては、Sommer の表の補間値は四捨五入により小数第 3 位まで求めた値を使用した。他の計算値は小数第 4 位を切り捨て第 3 位までとした。

3 . マウスアッセイによる CF 値の変動確認

AOAC OM 959.08 に準じて、1 mL の腹腔内投与による致死時間の中央値が 5~7 分に入る希釈濃度 (1 濃度) について、1 回 / 週の頻度でマウス 5 匹に投与した。

検液 1 mL ずつ腹腔内投与し、溶液の毒力 (MU/mL) を求めた。希釈液の濃度 (FDA-STX $\mu\text{g/mL}$) を、求めた毒力 (MU/mL) で除して CF 値 (FDA-STX $\mu\text{g/MU}$) を求め、その変動を確認した。

4 . dcSTX 希釈液の安定性確認

マウスアッセイによる CF 値の変動を確認した dcSTX の塩酸希釈液 (2.35 $\mu\text{mol/L}$ dcSTX 溶液 20 mL + 希釈溶液 12 mL) について、調製当日、3

日後、1 週間後、2 週間後、4 週間後、6 週間後に以下の条件で LC-MS/MS 分析した。

また、同一希釈率の水希釈液 (2.35 $\mu\text{mol/L}$ dcSTX 溶液 10 mL + 水 6 mL) についても同一条件で LC-MS/MS 分析した。

【LC 部】

装置 : waters ACQUITY UPLC I-Class、分析カラム : waters ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1 \times 100 mm、粒径 1.7 μm)、移動相 A : 2.0 mM ギ酸アンモニウム-3.6 mM ギ酸、移動相 B : 95% MeCN 含有 2.0 mM ギ酸アンモニウム-3.6 mM ギ酸、グラジエント分析 : A% (min) 10 % (0 min) 30 % (2 min) 60 % (9 min) 10 % (9-12min)、測定時間 : 12 分間、カラム温度 : 40、流速 : 0.2 mL/min、注入量 : 2 μL

【MS 部】

装置 : Waters Xevo TQ-S micro、イオン化 : ESI (Positive)、Desolvation gas : N_2 (600、1000 L/hr)、Cone gas : N_2 (150 L/hr)、コリジョンガス : Ar、Source Temp. : 150、コーン電圧 : 5 V

【MRM 条件】保持時間 : 6.2 分

	Precursor ion	Product ion	Cone (V)	Collision (eV)
dcSTX	257	239	5	15
	257	222	5	20
	257	180	5	20

分析は n=3 で実施し、 m/z 239 を定量イオンとした定量分析の面積値を求め、その平均面積値で評価した。

C. 研究結果

1 . 基準 CF 値の比較

dcSTX および STX で基準 CF 値を求めた結果を表 1 に示す。dcSTX の濃度については、STX 換算濃度 (FDA-STX $\mu\text{g/mL}$) で示した。これは、(一財) 食品薬品安全センター 秦野研究所の dcSTX 酢酸溶液に示された STX 二塩酸塩換算濃度 (0.45 $\mu\text{g/mL}$) より換算した値である。

2 . マウスアッセイによる CF 値の変動

マウスアッセイによる CF 値の変動結果を表 2 に示す。dcSTX、STX とともに、平成 29 年 1 月から 3 月にかけて 1 回 / 週で実施した CF 値の平均は 0.168 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$ および 0.180 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$ となり、表 1 に示した基準 CF 値 (dcSTX 0.171

FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$ 、STX 0.185 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) とほぼ同等であった。

また、STXを使用したAOAC OM 959.08では「求めたCF値は基準CF値の $\pm 20\%$ におさまらなければならない。20%を超える変動はマウス感度または手技の明瞭な変動を示している。」とされているが、今回実施したdcSTXのCF値は0.150~0.198 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$ (平均値0.168 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) となり、基準CF値 (0.171 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) の $\pm 20\%$ (0.136 ~ 0.205 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) 範囲内におさまった。

3 . dcSTX 希釈液の安定性

dcSTXの希釈液に0.003 M塩酸を使用し、マウス投与を行った。この溶液および同一希釈率の水希釈液をLC-MS/MSで定期的に分析した結果を表3に示す。溶液調製日の平均面積値を1とし、その比で増減を確認した(図1)。

LC-MS/MSはHPLCに比べると面積値の再現性は悪いことが知られている。4週間後の結果が他と比べて大きく異なっているが、これは本分析に使用したLC-MS/MSが専用機ではなく、残留農薬等の分析も行っているため、機器の状態により感度変動がみられたためと考えられる。

なお、マウス投与に使用する溶液量を勘案し、溶液調製3日後および1週間後のマウス投与は実施していない。

D. 考察

基準CF値と平成29年1月から3月に1回/週で11週間実施したCF値の平均は、STXとdcSTXで同様であり、dcSTXは長期間使用しても再現性が得られる物質であることが確認できた。また、CF値の変動の幅もAOAC OM 959.08で示された基準CF値の $\pm 20\%$ より狭い、 $\pm 16\%$ (0.143 ~ 0.198 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) 範囲内におさまった。

LC-MS/MS分析によるdcSTX希釈液の安定性確認は、4週間後の値を除くと塩酸希釈では0.991~1.099であり、水希釈では0.916~1.094であった。よって、少なくとも6週間の保管では塩酸希釈でも水希釈でも分解による損失はないと考えられる。この溶液の安定性については、引き続き検討する予定である。

E. 結論

AOAC OM 959.08 に準じて dcSTX により生物試験の標準化を行うことを検討した。今年度は、0.003 M 塩酸溶液で希釈したものについて基準CF 値を求め、その後定期的にマウスアッセイを行ったが、dcSTX は STX と同様の挙動を示し、生物試験の標準化に使用できることが示唆された。

国際的には麻痺性貝毒の許容量は 800 μg STX eq/kg と規定されており、今後は、有毒検体を用いて dcSTX による試験法と AOAC OM 959.08 の同等性を検討する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 dcSTX と STX の基準 CF 値比較

		dcSTX				STX			
溶液調製日	マウス 投与日	STX 換算濃度 (FDA-STX μg/mL)	中央 致死 時間	毒力の 中央値 (MU/mL)	CF 値 (FDA-STX μg/MU)	STX 濃度 (μg/mL)	中央 致死 時間	毒力の 中央値 (MU/mL)	CF 値 (μg/MU)
2016/12/15	2016/12/15	0.281	5'53"	1.63	0.172	0.312	5'43"	1.68	0.185
2016/12/15	2016/12/15	0.290	5'32"	1.73	0.167	0.322	5'18"	1.81	0.177
2016/12/15	2016/12/16	0.281	5'20"	1.80	0.156	0.312	5'54"	1.62	0.192
2016/12/15	2016/12/16	0.290	5'45"	1.67	0.173	0.322	5'32"	1.73	0.186
2016/12/16	2016/12/16	0.281	6'20"	1.52	0.184	0.312	5'37"	1.71	0.182
2016/12/16	2016/12/16	0.290	5'56"	1.62	0.179	0.322	5'36"	1.71	0.188
基準 CF 値 (CF 値の平均値) (μg/MU)					0.171				0.185

表2 マウスアッセイによる CF 値の変動

		dcSTX				同日実施 STX			
マウス 投与日		STX 換算濃度 (FDA-STX μg/mL)	中央 致死 時間	毒力の 中央値 (MU/mL)	CF 値 (FDA-STX μg/MU)	STX 濃度 (μg/mL)	中央 致死 時間	毒力の 中央値 (MU/mL)	CF 値 (μg/MU)
1	2017/1/12	0.281	6'51"	1.41	0.198	0.312	5'19"	1.81	0.172
2	2017/1/19	0.281	5'54"	1.62	0.173	0.312	5'08"	1.87	0.166
3	2017/1/26	0.281	5'45"	1.67	0.168	0.312	5'30"	1.74	0.179
4	2017/2/2	0.290	5'43"	1.68	0.172	0.312	5'04"	1.90	0.164
5	2017/2/9	0.281	5'44"	1.67	0.167	0.312	5'46"	1.66	0.187
6	2017/2/16	0.290	5'41"	1.69	0.172	0.312	5'04"	1.90	0.164
7	2017/2/23	0.281	5'08"	1.87	0.150	0.303	5'02"	1.91	0.158
8	2017/3/2	0.281	5'20"	1.80	0.156	0.303	5'37"	1.71	0.177
9	2017/3/9	0.281	5'51"	1.64	0.171	0.303	7'09"	1.37	0.221
10	2017/3/16	0.281	5'40"	1.69	0.166	0.303	6'03"	1.59	0.190
11	2017/3/23	0.281	5'27"	1.76	0.159	0.303	6'30"	1.48	0.204
CF 値の平均値 (μg/MU)					0.168				0.180
CF 値の標準偏差 (μg/MU)					0.012				0.019
CF 値の室内変動 (%)					7.3				10.6
最小 CF 値 (μg/MU)					0.150				0.158
最大 CF 値 (μg/MU)					0.198				0.221

表3 dcSTX 塩酸希釈液および水希釈液の安定性 (LC-MS/MS 分析結果)

STX 換算濃度 (FDA-STX μg/mL)	dcSTX 塩酸希釈液				dcSTX 水希釈液		
	マウス投与日	CF 値 (FDA-STX μg/MU)	平均 面積値	面積比	平均 面積値	面積比	
溶液調製日	0.281	2017/2/9	0.167	1150417	1	1099934	1
3日後	0.281			1099984	0.956	1046680	0.952
1週間後	0.281			1075719	0.935	1008048	0.916
2週間後	0.281	2017/2/23	0.150	1140338	0.991	1116907	1.015
4週間後	0.281	2017/3/9	0.171	1554083	1.351	1638696	1.490
6週間後	0.281	2017/3/23	0.159	1264043	1.099	1203122	1.094

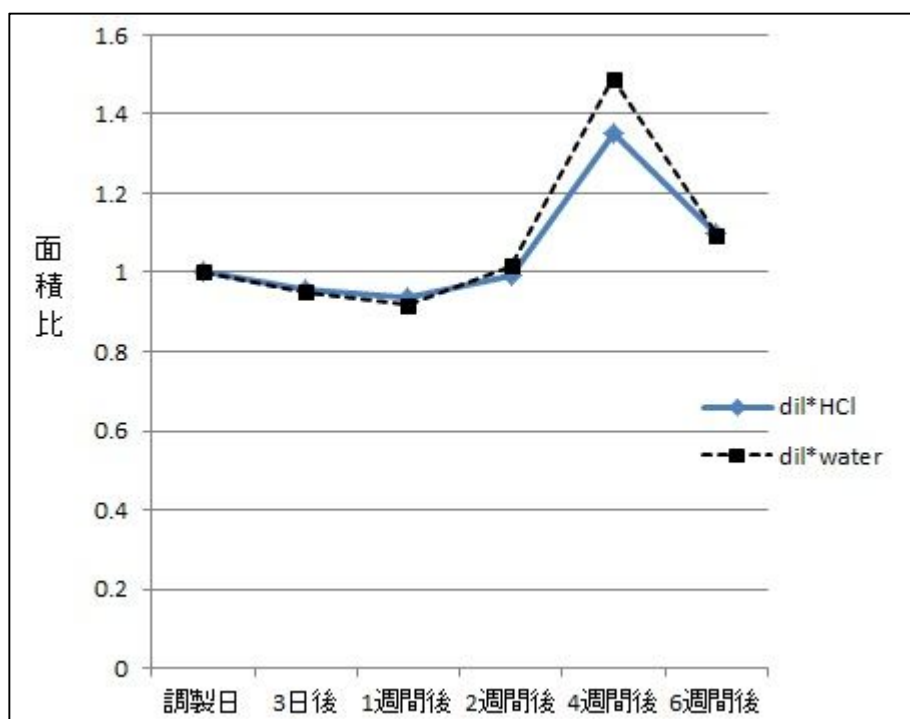


図1 dcSTX 希釈液の安定性

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
松浦啓一		松浦啓一	日本産フグ類図鑑	東海大学出版部	神奈川県	2017	1-127

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
S. Jiang, H. Iwashita, O. Arakawa, T. Takatani	Growth and PST production of the dinoflagellate <i>Alexandrium catenella</i> cultured under monochromatic light	Aquacult. Sci.	64 巻	379-390	2016
C. Acar, S. Ishizaki, Y. Nagashima	Toxicity of the Lessepsian pufferfish <i>Lagocephalus sceleratus</i> from eastern Mediterranean coasts of Turkey and species identification by rapid PCR amplification	Eur. Food Res. Technol.		doi10.1007/s00217-016-2721-1	2016
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, <i>Takifugu rubripes</i>	Toxicon	111 巻	6-12	2016
R. Tatsuno, W. Gao, K. Ibi, T. Mine, K. Okita, G. N. Nishihara, T. Takatani, O. Arakawa	Profile differences in tetrodotoxin transfer to skin and liver in the pufferfish <i>Takifugu rubripes</i>	Toxicon	130 巻	73-78	2017
K. Matsuura, I. Middleton	Discovery of a larva of the Aracanidae (Actinopterygii, Tetraodontiformes) from New Zealand	Ichthyol. Res.		doi:10.1007/s10228-016-0533-8	2016
K. Matsuura, T. P. Satoh	Redescription of <i>Lagocephalus cheesemani</i> (Clarke, 1897), a senior synonym of <i>Lagocephalus gloveri</i> Abe and Tabeta, 1983 based on	Ichthyoi. Res.		doi: 10.1007/s10228-016-0547-2	2016

	morphological and genetic comparisons (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae)				
K. Matsuura, A. Kaneko, E. Katayama	Underwater observations of the rare deep-sea fish <i>Triodon macropterus</i> (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Triodontidae) with comments on the fine structure of the scales	Ichthyol. Res.		doi: 10.1007/ s10228- 016-0555-2	2016
Y. V. Dyldin, K. Matsuura, S. S. Makeev	Comments of puffers of the genus <i>Takifugu</i> from Russian waters with the first record of yellowfin puffer, <i>Takifugu xanthopterus</i> (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) from Sakhalin Island	Bull. Nation. Mus. Nat. Sci., Ser. A	42 卷	133-141	2016
K. Matsuura	Taxonomic and nomenclatural comments on two puffers of the genus <i>Takifugu</i> with description of a new species, <i>Takifugu flavipterus</i> , from Japan (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Tetraodontidae)	Bull. Nation. Mus. Nat. Sci., Ser. A	43 卷	71-80	2017
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	57 卷	13-18	2016
長島裕二, 桐明 絢	海洋危険生物 食べて中毒; とくに 魚について	中毒研究	29 卷	3-9	2016
長島裕二, 桐明 絢	魚介類の毒とその特徴	アクアネッ ト	19 卷 12 号	22-26	2016
荒川 修	フグ毒の蓄積機構と生理機能	アクアネッ ト	19 卷 12 号	27-31	2016
長島裕二, 桐明 絢	しらすへのフグ稚魚混入	全水卸	356 卷	8-11	2016
佐藤 繁, 松浦啓一	シマキンチャクフグ・タキフグ/フグ を知って中毒防止	食と健康	通巻 708 巻	48-49	2016
佐藤 繁, 松浦啓一	シッポウフグ・アマミホシゾラフグ/ フグを知って中毒防止	食と健康	通巻 709 巻	30-31	2016

佐藤 繁、 松浦啓一	シボリキンチャクフグ・ナミダフグ/ フグを知って中毒防止	食と健康	通巻 710 巻	30-31	2016
---------------	---------------------------------	------	----------------	-------	------