

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 29 年度 総括・分担研究報告書
(H27-食品-一般-009)

研究代表者 大城 直雅

平成30（2018）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 大城 直雅	1
II. 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 荒川 修	15
2. フグ毒検査キットの開発とフグの毒性評価 佐藤 繁	24
3. コモンフグの毒性およびフグ毒評価法の検討 大城 直雅	34
4. フグの毒性評価と有毒巻貝の種判別 長島 裕二	42
5. フグの分類に関する研究（遺伝子解析） 石崎 松一郎	46
6. フグ類の形態に基づく分類 松浦啓一	50
7. デカルバモイルサキシトキシンによる麻痺性貝毒検査法の標準化 大城直雅	55
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	61

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、Ⅰ.フグ毒検査法の検討、Ⅱ.フグ等の毒性評価、Ⅲ.遺伝子によるフグ類等の種判別、Ⅳ.フグ類の形態分類、Ⅴ.麻痺性貝毒（PSP）標準品の検討を行った。

Ⅰ. フグ毒検査法の検討では、低毒量のトラフグ肝臓を用い、「参考法」と「簡便法」で分析し両者の相関をみた結果、良好な正の相関があり、抽出比 3 以上では簡便法が 1～2 割高かった。参考法の値を真値とすると簡便法の真度は 110～120% となり、性能の違いは許容範囲で、毒性の目安（10 MU/g）による判定への影響は少ないと考えられた。LC-MS/MS における試料由来マトリクスの影響について、テトロドトキシン（TTX）を添加した無毒養殖トラフグの組織抽出液で検討した。皮では抽出原液～4 倍稀釈液で、卵巣では原液で、測定値の大きな低下が見られた。天然マフグの組織抽出液を LC-MS/MS と HPLC-FLD で比較すると、肝臓と卵巣では原液、皮では原液～4 倍稀釈液で LC-MS/MS で低い値となった。組織に応じて適切に抽出液を稀釈することでマトリクスの影響を除くことが可能と判断した。LC-QTOF/MS による TTX 分析法の性能を評価し、妥当性を確認した。また、同法の結果はマウス毒性試験法と高い相関があった。新規の抗 TTX ポリクローナル抗体を作製し、高感度かつ特異的な TTX 関連成分の ELISA キットを構築した。本キットで TTX、4-epiTTX、11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTX が検出できることを確認した。

Ⅱ. フグ等の毒性評価では、瀬戸内海産コモンフグ（101 個体）の筋肉は弱毒が 1 個体（14 MU/g）で他は無毒、皮は無毒が 3 個体、弱毒が 79 個体（11～97 MU/g）、強毒が 18 個体（101～712 MU/g）および猛毒（7491 MU/g）が 1 個体であった。愛知県沿岸産（6 個体）はすべての筋肉と皮の 3 個体が無毒で皮の 3 検体が弱毒（13～29 MU/g）であった。また、凍結融解実験により、皮組織からの TTX 漏出と筋肉への移行が確認された。日本沿岸産しらす加工品から、シロサバフグ、クサフグ、コモンフグ、シマフグ、ショウサイフグ、トラフグ、ナシフグ稚魚が確認された。分析した 69 検体中 19 検体から TTX が検出（0.06～3.3 μg/g）され、3 検体が 10MU/g を超えた。フグ稚魚の混入率および摂取量から、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。

Ⅲ. 遺伝子によるフグ類等の種判別では、

人工交雑種（トラマとマトラ）計 11 個体、単一系統トラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体を用い、mtDNA の 16S rRNA およびシトクロム *b* 各部分領域により母系種を判別した。また、トラフグとマフグを明確に区別しうる核 DNA マイクロサテライト（MS）マーカーを選抜し、判別に適用可能な反復回数を決定した。有毒巻貝の種判別法として、mtDNA 16S rRNA 部分領域のダイレクトシーケンス法をさらに改良し、高温高压加熱処理により DNA が断片化した加工品に対して適用できることを実証した。一部、対象領域の塩基配列が重複した種があり、他領域の検討が必要である。

Ⅳ. フグ類の形態分類では、日本周辺から採集されたフグ類標本の詳細な調査に基づき、フグ科の種に焦点を絞った同定ガイドを作成した。同定ガイドでは多くのカラー写真を使用して、各種の特徴を分かりやすく示し、魚類分類学の専門家でなくてもフグ類の同定ができるように配慮した。

Ⅴ. PSP 標準品の検討では dcSTX による麻痺性貝毒検査法の標準化をはかるため、dcSTX の基準変換係数（CF 値）は実施者による大きなばらつきは無く、安定していることが判明した。また、AOAC 959.08 法と dcSTX により有毒試料を分析した結果、同等の値が得られ、dcSTX が STX の代替として有効であることが示された。

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 教授
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 食品生産科学部門 准教授
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免疫学的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、Ⅰ.フグ毒検査法の検討、Ⅱ.フグ等の毒性評価、Ⅲ.遺伝子によるフグ類等の種判別、Ⅳ.フグ類の形態分類、Ⅴ.PSP標準品の検討を行った。とくに今年後は、Ⅰ.フグ毒検査法の検討では、参考法と簡便法の比較を行い、簡便法の有効性について検討した。また、LC-QTOF/MSによるTTX分析の妥当性を確認し、マウス毒性試験法（MBA）との相関について確認した。さらに、新規の抗TTXポリクローナル抗体を作製し、本抗体を用いたELISAキットを構築し、TTXおよび関連成分の検出系としての評価を行った。Ⅱ.フグ等の毒性評価では、引続きコモンフグの毒性調査と凍結解凍によるTTX移行について検討した。また、しらす加工品に混入したフグ稚魚の種同定と毒性についても調査した。さらに、フグのPSP蓄積能評価としてTTXおよびdcSTXの経口投与と各組織への取込についても検討した。Ⅲ.遺伝子によるフグ類等の種判別では、人工交雑フグのmtDNAおよび各核種DNAマイクロサテライトマーカーの解析と有毒巻貝の種判別法の検討を行った。Ⅳ.フグ類の形態分類では、日本産フグ類の同定ガイド作成に必要な調査を実施し同ガイドを作成した。Ⅴ.麻痺性貝毒（PSP）標準品の検討では、AOAC法で使用されるSTXの代替標準物質としてのdcSTXの評価を行った。

B. 研究方法

Ⅰ. 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）

トラフグ肝臓の有毒試料と無毒試料を混合した低毒量の試料を調製し、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) マトリクス効果の検証

無毒養殖トラフグの皮および卵巣につき、それぞれ上記簡便法（抽出比 5）により抽出液を調製した。この抽出液を原液とし、純水で段階希釈して 2、4、8、および 16 倍希釈液を調製した。原液および各希釈液に、終濃度が 1.9 MU/mL になるよう TTX 標準液を添加し、LC-MS/MS に付して TTX を定量した。また、有毒天然マフグの肝臓、皮、および卵巣につき、同様に簡便法（抽出比 3）で抽出液を調製した。この抽出液を原液として純水で 2 および 4 倍希釈液を調製後、それぞれ LC-MS/MS および HPLC-FLD に付して TTX を定量した。

3) LC-QTOF/MS による TTX 分析の妥当性

コモンフグ筋肉試料（TTX: <1 MU/g）を混合、均質化して、ブランク試料を調製した。ブランク試料 5.0 g に対し、1 MU 相当（1.1 µg）、10 MU 相当（11 µg）をそれぞれ添加し、抽出精製したものを LC-QTOF/MS で分析した。分析者 1 名が 2 併行 5 日間実施し、真度、併行精度および室内精度を評価した。また、MBA の結果と比較することで相関性について評価した。

4) フグ毒検査キットの開発

新規抗原による抗体作製のために、3 羽のニュージランドホワイト種のウサギに、FCA で乳化した KLH-EDT-TTX 抗原（毎回 0.3 mg/羽）を隔週で皮下接種した。採血して得た血清の一部（100µL）に等量の TTX 標品溶液（2~25µM）を混合し、抗体と結合した TTX を限外ろ過除去し、残った TTX を HPLC 蛍光法で定量分析した。同様に、4-epiTTX、4,9-anhTTX、11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTX を作製した抗体に吸着させて、残存する各成分を分析し、抗体に対する親和性を評価した。

得られた抗 TTX 抗体はさらに、DTT-TTX から作製したアフィニティーカラムで精製し、別途調製したビオチン標識化 TTX を用いて ELISA キットを構築した。TTX、4-epiTTX、11-oxoTTX および、5,6,11-trideoxyTTX の 1、3、10、30、100、300、1,000 nM 濃度の溶液を調製し、ELISA キットの性能を評価した。また、麻痺性貝毒の各成分の溶液を同様に調製し、交差性について検討した。キットの実証性については、コモンフグ 3 個体の皮、筋肉、肝臓、消化管、生殖腺（精巢）を用いて評価した。

II. フグ等の毒性評価

1) コモンフグの毒性調査

瀬戸内海（101 個体）および愛知県沿岸（6 個体）について、皮と筋肉の毒性を評価した。また、一

部試料については、凍結融解による皮から筋肉への TTX の移行を確認するために、皮がついた状態で保管し、凍結前と凍結融解後の毒性を比較した。なお、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

2014 年 12 月から 2017 年 10 月に日本沿岸で水揚げ、製造されたしらす加工品に混入し、現地加工場等によって選別されたフグ稚魚を試料とした。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。各個体は外部形態に基づき分類し、ロット内で同一種と判断されたものの中から 1 個体選抜し、DNA 解析による種判別を行った。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。

TTX の定量には、上記の種判別と同ロットに含まれる試料を用い、形態分類で同一種と判断されたフグ稚魚を複数個体合一して、TTX 分析用試料とした。TTX の抽出は、食品衛生検査指針 理化学編に記載の方法に準じた酢酸加熱法で行った。試料は乾燥品であるため、酢酸添加後、室温で 30 分間静置し、15 分間超音波処理した後、沸騰水浴中で 10 分間加熱した。冷却後、遠心分離して得られた上清を遠心限外ろ過（分画分子量 3000）し、ろ液を TTX 定量用試料とした。TTX の定量は LC-MS/MS 法で行った。

3) フグの PSP 蓄積能評価

無毒のヒガンフグ人工飼育個体（12 ヶ月齢魚 20 尾）を用い、毒投与試験を行った。試験魚を 10 尾ずつの 2 群に分け、それぞれ TTX、および dcSTX を 55 nmol/個体の用量で経口経管投与した。いずれも 72 時間後に取り上げて、各部位（筋肉、皮、肝臓、生殖腺、および消化管）の TTX 量および dcSTX 量をそれぞれ LC-MS/MS と HPLC-FLD で測定した。また、無毒の淡水フグ *P. suvattii* 人工飼育個体（15~18 ヶ月齢魚 8 尾）を用い、毒投与試験を行った。各個体に STX と TTX をともに 19.2 nmol/個体の用量になるよう混合して経口経管投与し、4 尾ずつ 24 および 48 時間後に取り上げて、①と同様に各部位の TTX 量と STX 量を測定した。さらに、*P. suvattii* 人工飼育個体から肝臓、皮、および消化管の組織切片を作成し、80 µM の TTX または

STX を含む培地で一定時間培養後、各切片の毒取り込み量を測定した。

Ⅲ. 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

試料に人工交配フグ種（トラフグ（♀）×マフグ（♂）3 個体およびトラフグ（♂）×マフグ（♀）8 個体）、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体を用いた。これらの筋肉もしくは鰭からキットを用いて全ゲノム DNA を抽出・精製した。全ゲノム DNA を用いて mtDNA 中の 16S rRNA およびシトクロム *b* 領域の各々約 620bp、390bp を含む部分領域を PCR 増幅した。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。つぎに、トラフグおよびマフグにおいて種特異的なマイクロサテライトマーカーを探索することを目的に、両親種が既知である人工交雑種および単一系統と推定されたトラフグ、マフグを対象に、計 8 個のマイクロサテライト領域を標的として PCR を行い、トラフグおよびマフグの 2 種を明確に区別しうるマイクロサテライトの選抜を行った。その後、判別に適用可能な MS マーカーにおける PCR 産物の塩基配列解析に基づく MS の反復回数を決定した。

2) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝の種判別に適するミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域を選択し、本領域（約 300 bp）を特異的に増幅する PCR 条件を検討した。生鮮品のみならず加工品についても種判別が可能であったが、レトルトまたは缶詰加工された巻貝では、加熱処理によって DNA が断片化され、PCR 増幅できないことがあった。そのため、短縮した 16S rRNA 部分領域（約 150 bp）で PCR 増幅を試みた。本法の実用性を確かめるため市販の巻貝加工品 29 品目について、PCR と塩基配列解析を行い、種判別を実施した。各試料の筋肉から全ゲノム DNA を抽出し、それを鋳型にして、昨年度作製した巻貝加工品に利用できる特異的プライマーを用いて 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シング法で塩基配列を解析した。

また、フグ毒中毒を起こしたボウシュウボラは、ミトコンドリア DNA 16S rRNA の塩基配列がデータベースに登録されていないため、16S rRNA の全塩基配列を解析した。ボウシュウボラの筋肉から全ゲノム DNA を抽出し、それを鋳型にして、NCBI のデータベースから、巻貝のミトコンドリア DNA の 12S rRNA および NADH1 を含む領域の保存性が高い部分でプライマーを設計し、PCR 増幅を行った。アガロース電気泳動で PCR 産物を確認し、サブクローニングを行い、塩基配列の解析を行った。

Ⅳ. 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。

Ⅴ. PSP 標準品の検討

1) デカルバモイルサキシトキシンによる麻痺性貝毒検査法の標準化

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 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。

さらに、有毒試料を用いてSTXおよびdcSTXを使用して得られた標準化毒値を比較し両者の値を比較した。

C. 研究結果

I. 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)

一昨年度から今年度にかけて得られたデータを合わせて、抽出比毎に簡便法と参考法の測定値(平均値)の相関を見たところ、いずれの抽出比においても良好な正の相関($r = 0.994 \sim 0.999$)が認められ、回帰式の傾きは抽出比2で1.1程度、抽出比3以上で概ね1.2前後(1.19~1.25)の値となった。しかしながら、y切片がいずれも負の値(-4.44~-0.80)であったため、100 MU/g未満の低毒量域のデータについて改めて相関を見たところ、回帰式の傾きは、抽出比2の0.95を除き、概ね1.1~1.2、y切片は、抽出比6の-0.7を除き、いずれも正の値(0.94~1.97)となった。

2) マトリクス効果の検証

無毒養殖トラフグ組織抽出液にTTXを添加後、LC-MS/MSで定量した結果を図3に示す。皮の場合、8倍および16倍希釈液では、相対TTX量(添加量に対する相対値)がほぼ100%となり問題なかったが、原液、2倍、および4倍希釈液では、60~70%程度と測定値の大きな低下が見られた。卵巣抽出液では、原液で66%と、皮と同様の測定値の低下が見られた。

天然マフグの組織抽出液をLC-MS/MSとHPLC-FLDに付し、両者の間でTTX定量値を比較したところ、いずれの組織においても、抽出原液ではLC-MS/MSの測定値がHPLC-FLDの測定値より低くなった。肝臓の場合、測定値の低下は僅かで、2倍および4倍希釈液ではLC-MS/MSとHPLC-FLDの分析値はほぼ一致した。卵巣でも、2倍および4倍希釈液では両分析値はほぼ一致したが、皮ではLC-MS/MSの測定値の低下(直線 $y = x$

からのずれ)が大きく、2倍および4倍希釈液でも低下が見られた。

3) LC-QTOF/MSによるTTX分析の妥当性

ブランク試料にTTXを1 MU/g (0.22 mg/kg)および10 MU/g (2.2 mg/kg)添加し、実施者1名で2併行、5日間分析した。その結果、1 MU/g添加時の真度84%、併行精度3.7 RSD%、室内精度12%で、10 MU/g添加時の真度73%、併行精度3.1 RSD%室内精度3.8 RSD%であった。

MBAによる毒性分析を実施した試料のうち、皮18試料および筋肉21試料について、LC-QTOF/MSによる分析を実施した。皮試料および筋肉試料の相関係数(R^2)はそれぞれ0.9762および0.9495であり、ともに良好な相関性が得られた。

4) フグ毒検査キットの開発

KLH-EDT-TTX抗原を免疫した5羽のウサギのうち、1羽は免疫開始4ヶ月後に死亡したが、残り4羽の抗体価(血清1 mLあたりのTTX吸収量)は、免疫化し6ヶ月半後の全採血の時点で4.0~24.5 nmolに達した。

TTX, 4-epiTTX, 4,9-anhTTX, 5,6,11-trideoxyTTX, および11-oxoTTXを、KLH-EDT-TTX抗原を免疫したウサギ(No.2)から得た血清と混合し交差性を調べたところ、4,9-anhTTXを除く各成分ともに、TTXと同程度の吸収が確認された。

ビオチン標識化TTXと精製した抗TTX抗体を調製し、ELISAキットを構築した。このキットは、添加したTTXの濃度が高くなるに従って、発色値が低下し、4-epiTTX、11-oxoTTXおよび5,6,11-trideoxyTTXも同様の結果を与えた。これら成分は3~100 nMの範囲で直線的に発色値が低下し、いずれも1,000 nMではBoのwellと同程度の、無色に近い発色であった。IC50値はTTXが30 nM付近、4-epiTTXが50 nM付近、11-oxoTTXが50 nM付近、5,6,11-trideoxyTTXが100 nM付近であった。これに対して、麻痺性貝毒関連成分の場合は、高濃度であっても発色値の変化は認められなかった。

コモンフグの皮や筋肉、肝臓、消化管、精巣では、ELISAで検出される毒含量が、HPLC 蛍光法で検出される毒含量を上回る傾向が認められた。これら試料には、5,6,11-trideoxyTTXなどのデオキシ体が多量に含まれていることをLC-QTOFMSで確認した。

II. フグ等の毒性評価

1) コモンフグの毒性

瀬戸内海産コモンフグ筋肉は弱毒1個体（14 MU/g）で他は無毒であった。皮は無毒3個体、弱毒79個体（11～97 MU/g）、強毒18個体（101～712 MU/g）および猛毒（7491 MU/g）1個体であった。愛知県沿岸産6個体の筋肉12試料（皮側および内臓側）はすべて無毒で、皮試料は6検体中、3検体が無毒、3検体が弱毒（13～29 MU/g）であった。

瀬戸内海産コモンフグの凍結融解後の筋肉では、皮側の毒性が凍結前より 2～20 倍高い値となったが、内臓側では凍結前よりも低い試料もあった。凍結前試料は無毒 14 試料、弱毒が 1 試料（11MU/g）であったが、凍結融解試料の筋肉（皮側）は、無毒 9 試料、弱毒 5 個体（11～97 MU/g）、強毒 1 個体（101～712 MU/g）となった。皮は凍結融解後に毒性が減少する試料が多かったが、顕著な違いが認められない個体もあった。愛知県沿岸産試料はすべて<5 MU/g 未満で、変化は認められなかった

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

① 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。

② 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。

2) フグの PSP 蓄積能評価

① ヒガンフグ

TTX 投与群では、卵巣や皮、肝臓への毒の移行・蓄積が見られた。雌の場合、卵巣の濃度が 4.8 nmol/g と最も高く、皮（3.3 nmol/g）、肝臓（1.0 nmol/g）がこれに次いだ。雄では、主に皮と肝臓から毒が検出された（それぞれ 1.4 および 0.7

nmol/g）。一方、dcSTX 投与群では、消化管から比較的高濃度（雌 3.6 nmol/g、雄 4.6 nmol/g）の毒が検出されたものの、それ以外の部位では生殖腺に僅かに毒の移行・蓄積が見られるのみであった。

② 淡水フグ *P. suvattii*

STX については、取り上げ時間に拘わらず、卵巣、皮、消化管への移行・蓄積が見られた。雌の場合、7～8 nmol/個体程度、すなわち投与量の 4 割前後の STX を体内に保持しており、その大部分が卵巣に分布していたのに対し、雄の保持量は 1～3 nmol/個体程度で、そのほとんどを皮が占めた。対照的に、TTX は投与 24、48 時間後ともに消化管内容物からわずかに検出されたのみで、体組織への移行・蓄積は見られなかった。

組織切片の取込み試験でも、STX と TTX の挙動には大きな差異があった。消化管では、STX は培養 20 分で 15 μ mol/g、60 分で 46 μ mol/g 取り込まれたのに対し、TTX の取り込み量は 20 分で 2.6 μ mol/g、60 分でも 5.3 μ mol/g と、STX の取り込み量の 1/6～1/9 程度に留まった。肝臓においても、培養時間によらず、STX の取り込み量（40～50 μ mol/g 程度）の方が TTX の取り込み量（20 μ mol/g 程度）より 2～3 倍多かった。皮の場合、培養 24 時間では両毒成分の取り込み量に差は見られなかったが、48 時間では STX の取り込み量が 94 μ mol/g に達し、TTX（39 μ mol/g）を大きく上回った。

III. 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

人工交配フグ種トラマ（トラフグ（♀）×マフグ（♂））3 個体およびマトラ（トラフグ（♂）×マフグ（♀））8 個体ならびに、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体につき、mtDNA 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結果、トラマおよびマトラはともにすべての個体で交配通りに母系種を同定することができた。形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグおよびマフグにおいても、母系種を同定することが可能であった。したがって、mtDNA 中の 16S rRNA およびシトクロム *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 CATC 反復配列、GCA 反復配列、AGC 反復配列、AATC 反復配列であったが、GCA 反復配列の解析においてのみ、トラフグおよびマフグ間で電気泳動距離が異なる反復配列を示すことが認められた。泳動距離から推定される PCR 産物の分子量は、トラフグおよびマフグでおよそ 370bp および 270bp であった。そこで、人工交配フグ種を対象に、GCA 反復回数の普遍性を確認したところ、両親種（トラフグとマフグ）の分子量の各位置にバンドが見られたことから、反復回数 6 回がマフグ由来、33~34 回がトラフグ由来であると推測された。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。

2) 有毒巻貝種判別法の開発

① 加工品の種判別

今回調べた巻貝加工品 29 種すべてで目的とする PCR 産物（約 150 bp）の増幅がみられた。生鮮品用のプライマーでは PCR 増幅しなかった試料 5 品目のうち、2 つはヨーロッパエゾバイと 100%（146/146 bp）および 98.0%（144/147 bp）の相同性を示し、2 つはアヤボラとの相同性がそれぞれ 99.3%（145/146 bp）、95.6%（130/136 bp）であった。アヤボラの後者は、相同性が低いため、他種である可能性が考えられる。残りの 1 つはエゾボラモドキおよびエゾボラと 100%（146/146 bp）一致した。エゾボラモドキとエゾボラは当該領域の塩基配列が同じであるため、この領域ではどちらの種か区別することはできない。

② ボウシュウボラのトコンドリア DNA 16SrRNA の遺伝子配列

16S rRNA を含む周辺領域 1916 bp を解析した。この結果をデータベースに登録されているフジツガイ科アヤボラおよびカコボラと塩基配列を比較したところ、各々相同性は 84.6% および 80.8% であった。

IV. フグ類の形態分類

1) 日本産フグ亜目（講義のフグ類）の分類

日本沿岸には 4 科 14 属 61 種類のフグ亜目魚類（広義のフグ類）が分布するが、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）。以下に科の特徴と属の特徴を簡潔に述べる。

ウチワフグ科はウチワフグのみから構成され

る。本科は上顎に 2 枚の歯板と下顎に 1 枚の歯板をもち、腰骨をもつことでフグ亜目の他の科から区別される。ウチワフグはインド・西太平洋の熱帯域に広く分布し、100m 以深に生息する。

フグ科は上顎と下顎にそれぞれ 2 枚（合計 4 枚）の歯板をもつこと、腹鰭を欠き、消化管に膨脹嚢をもつことで他のフグ亜目魚類から区別される。フグ科には 7 属が含まれるが、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。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。体色には個体変異が見られるが、種ごとに一定のパターンが見られるため、種の分類形質として極めて重要であることが判明した。

日本産フグ科魚類の中で食用として扱われているのはトラフグ属、サバフグ属およびヨリトフグ属の種である。トラフグ属は鼻器に二つの開口部をもつこと、体側腹縁に縦走する皮褶があること、そして、体側に銀白色の縦帯がないことによって、フグ科の他属から識別される。サバフグ属は鼻器に二つの開口部をもつこと、体側腹縁に縦走する皮褶があること、そして、体側に明瞭な銀白色の縦帯をもつことによって他のフグ科魚類から識別される。ヨリトフグ属の多くの種は大西洋と東部太平洋に分布し、日本にはヨリトフグのみが出現する。ヨリトフグは他の日本産フグ類から体表に小棘を欠くこと、背鰭条数が 8-9 と少ないこと、臀軟条数も 7-9 と少ないことによって識別される。

食用として扱われていない種を含むのは、オキナワフグ属、キタマクラ属、シッポウフグ属およびモヨウフグ属である。これらの属は側線の数や走り方、下顎の形態、鼻器の形態などの特徴によって他の日本産フグ類から識別される。

ハリセンボン科は体表に強大な棘をもつことでフグ亜目の他の科から識別される。ハリセンボン科にはイシガキフグ属、メイタイシガキフグ属およびハリセンボン属の 3 属が含まれるが、各属は棘の形態と分布状態によって識別される。イシガキフグ属とメイタイシガキフグの棘は短くて立てることができないが、ハリセンボン属の棘は長く立てることができる。イシガキフグ属の尾柄背面には小棘が 1 本あるが、メイタイシガキフグ属

には小棘がない。それぞれの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、体表面や鰭の小黒色点の分布状態などを挙げるができる。

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。ヤリマンボウ属は体形が細長く、舵鰭の後端が直線状であるが、マンボウ属とヤリマンボウ属では体が楕円形で舵鰭の後端は円い。ヤリマンボウ属では舵鰭の中央部が後方に突出するが、マンボウ属では突出せず、円い。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。日本にはマンボウとウシマンボウが分布することが明らかになった。

2) 日本産フグ類の同定ガイド

魚市場や食品衛生の現場でフグ類を扱う人達にとってフグ類を同定することは容易なことではない。多くのフグ類の体形は似ており、しかも他の多くの魚類の分類で使用されている分類学的特徴(鰭条数や鱗数など)がフグ類では使えない。このため、フグ類の分類は極めて難しい。ところが、既往の図鑑を見てみると、フグ類の特徴についても、他の多くの魚類と同じ扱いとなっている。したがって、現場でフグ類を同定しようとする、既往の出版物は実際には使い物にならない場合が多い。

このような点を考慮して、日本産フグ類の中で食用として扱われているトラフグ属やサバフグ属に重点を置いて、各種の写真や図を多用し、種の識別点を明示するとともに、分類に役立つ情報を解説文に収録した。そして、識別が特に難しい近似種については、種の識別形質となる色彩パターンや斑紋の状態を明瞭に示した拡大図を作成した。

3) 沖縄から得られた *Tylerius spinosissimus*

沖縄島南東部の中城から得られた 7 個体の *Tylerius spinosissimus* (Regan, 1908)を調査した。本種はインド洋西部や西太平洋の熱帯域から知られていたが、採集例は多くなかった。そこで、沖縄から得られた標本と南シナ海から採集された標本を比較検討して、本種の特徴を詳細に検討した。その結果、本種は他の日本産フグ類から以下の特徴によって識別できることが明らかになった。本種の体の横断面はやや角張り(他種では円い)、体表面に発達した小棘が密に分布する(他種では小棘が極めて小さいか、小棘を欠く)。

V. PSP 標準品の検討

1) 基準 CF 値の比較

STXおよびdcSTXで AOAC 959.08 に準じて基準 CF 値を求めた結果、昨年度とほぼ同等の値であった。

昨年度の実施者を含む 4 名による CF 値の変動については、dcSTX、STX とも、基準 CF 値より若干高い値となった。「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、dcSTX の CF 値は、基準 CF 値の $\pm 20\%$ (0.140 ~ 0.210 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) 範囲内に収まった。一方、STX は 5 匹投与で基準 CF 値の $\pm 20\%$ (0.150 ~ 0.225 $\mu\text{g}/\text{MU}$) 範囲内に収まらず、新たに CF 値を決定することとなった。

3) 陽性管理試料の標準化毒値の比較

自家製の陽性管理試料(STXによる値付け値: 639 μg STX当量/kg)を1回/月分析し、その結果と3つの基準CF値から求めた標準化毒値(STX換算値)を比較した。2つの方法でdcSTXにより求めた基準CF値は近い値であったことから、STX換算した標準化毒値はほぼ同等であった。STX基準CF値による標準化毒値と比較すると、ほぼ同等であったがdcSTXにより求めた標準化毒値のほうが若干低い値を示した。なお、外部精度管理法では19 ~ 21 gでも体重補正を行ったが、補正の有無は結果に影響しなかった。

D. 考察

I. 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)

フグ肝臓試料において、簡便法と参考法の測定値の間には良好な正の相関が認められた。さらに、簡便法の測定値の方が参考法より抽出比 2 で 0 ~ 1 割、抽出比 3 以上で 1 ~ 2 割高くなることが示された。従って、簡便法により、参考法よりも毒性が低く見積もられる可能性はきわめて低く、簡便法は参考法の代替法として十分に適用可能であると考えられた。毒量の高い試料ほど、参考法に対する簡便法の相対測定値がより高くなる傾向があったため、直線回帰式では y 切片が負の値となったが、低毒量域に限定した回帰式では y 切片が 0 前後となった。従って、低毒力(10 MU/g 未満)試料でも、簡便法を適用して問題はないと考える。

抽出比に関しては、低毒領域を含めて 3 以上ではほぼ同様の回帰線が得られた。従って、抽出比 2 では、他の抽出比に比べて 1 割程度毒量が低く見

積もられるものの、抽出比 3 以上であれば、いずれの抽出比を用いても大きな問題はないものと思われる。は反映されていない。今後、個々の測定値のばらつきを考慮した統計解析を行い、回帰線の信頼区間等を明らかにする必要がある。

2) マトリックス効果の検証

無毒養殖トラフグの皮では抽出原液、2 倍、および 4 倍希釈液で、卵巣では原液で、測定値の大きな低下、すなわちマトリックス効果によるものと推定される TTX イオン化の抑制が見られた。天然マフグを用いた実験でも、肝臓では原液で僅かに、皮では原液、2 倍、および 4 倍希釈液で、卵巣では原液で、同様のマトリックス効果が認められた。すなわち、マトリックス効果は組織により異なり、皮で最も強く、従って皮を LC-MS ないし LC-MS/MS で分析する場合には、特に十分な希釈（抽出比 5 の場合、少なくとも 10 倍程度）が必要であることが示唆された。

3) LC-QTOF/MS による TTX 分析の妥当性

ブランク試料を 1 MU/g 未満の筋肉試料を混合、均質化し調製したため TTX 含量が 0.74 MU/g となり、1 MU/g 相当量添加では選択性を確認できなかった。しかし、真度、併行精度および室内精度については通知に示された目標値を満たした。一方、毒性の目安となる 10 MU/g 相当量添加時の選択性、真度、併行精度および室内精度の全てが目標値を満たしており、LC-QTOF/MS による TTX 分析法の妥当性が確認され、コモンフグ筋肉を対象とした分析への適用が可能であることが示された。

4) フグ毒検査キットの開発

本研究で作成した抗 TTX ポリクローナル抗体および、これを用いて作製した ELISA キットは様々な TTX 関連成分を検出可能である（図 9）。試作した ELISA キットは、TTX に匹敵する活性を持ち、キンシバイ等に高濃度で見いだされている 11-oxoTTX や、TTX の前駆体として想定されている 5,6,11-trideoxyTTX も検出できる。すなわち本抗体は、マウス試験法に替わる毒の簡易分析法としてだけでなく、TTX 関連成分による生物の毒化機構を解明するための、極めて有用なツールとなるものと考えられる。

II. フグ等の毒性評価

1) コモンフグの毒性

凍結融解による皮から筋肉への移行について検討するために、コモンフグの半身を凍結融解した

後に皮と筋肉に分けて分析に供した。愛知県沿岸産試料 6 個体については、凍結融解による皮から筋肉への毒の移行は確認できなかった。これは、皮試料の毒性が低かったためと考えられた。

瀬戸内海産試料では、凍結融解後の皮側の筋肉は 2~20 倍に増加していた。また、皮の毒性が猛毒および強毒の個体では、凍結前に無毒であった筋肉が、凍結融解した筋肉（皮側）で無毒から弱毒及び強毒へと変化した。一方、内側の筋肉は凍結前と比べ 0.2~4 倍変動したが、全ての試料で無毒であった。皮の毒性は凍結前後においてほとんど変化は認められなかったが、一部で減少が確認された。これらに結果より、凍結融解により、皮組織から TTX の漏出および皮への移行が起きているものと推定された。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

2015 年度および 2016 年度の調査により、日本沿岸で水揚げ、製造されたしらす加工品に混入したフグ稚魚は、ほとんどがシロサバフグであったが、コモンフグ、シマフグ、ナシフグ、ヒガンフグの稚魚も混入していることが明らかになり、ロットによっては複数のフグ種が混在していた。毒性に関しては、1 試料だけ 0.056 µg TTX/g が検出され、それ以外の試料では、TTX は検出されなかった（0.01 µg TTX/g 未満 TTX/g）。

調査対象地域を広げ、試料数を増やした結果、新たにクサフグとトラフグの稚魚が確認され、さまざまな種のフグがしらす加工品に混入していることが明らかになった。しかし、漁獲の時期や場所による特徴は見受けられなかった。

毒性においては、一部 TTX 含量が高いものがあり、69 検体中 3 検体でフグの食用規制値（10 MU/g、2.2 µg TTX/g 相当）を超える TTX が検出された。しかしながら、しらす加工品に混入するフグ稚魚の割合は極めて低く、摂取するフグ稚魚由来の TTX 量は少ない。一例を示すと、今回調べた中で、最も混入率が高かったもので、しらす水揚げ物 140 kg からフグ稚魚 35 匹（468 mg）が混入していた。これに最大 TTX 含量（3.32µg TTX/g）を乗じると TTX 量は 1.6 µg となる。ヒトのフグ毒中毒量は不明だが致死量は約 2 mg と推定されているので、仮にこのフグ稚魚すべてを一度に喫食しても、TTX 量は微量であり中毒症状は起こらないといえる。

3) フグの PSP 蓄積能評価

ヒガンフグへの毒投与試験において、TTX は消

化管にはほとんど残存しておらず、主に皮と肝臓、雌では卵巣に移行・蓄積していた。これに対し、dcSTX は生殖腺、特に卵巣に僅かに移行・蓄積したのみで、皮や肝臓からは検出されなかった。また、消化管内に残存が見られたことから、TTX は消化管から体内に取り込まれて、特定の部位に輸送・蓄積されるのに対し、dcSTX は消化管に留まり、一部は生殖腺に運搬されるが、大半は体外に排出されることが示唆された。

淡水フグ *P. suvattii* への毒投与試験では、ヒガンフグとは対照的な結果となった。すなわち、STX は体内に取り込まれて皮や卵巣に移行・蓄積したのに対し、TTX はいずれの部位からもほとんど検出されなかった。ヒガンフグは TTX を、*P. suvattii* は STX を選択的に吸収・蓄積する能力をもつものと推察される。

さらに、組織切片の取り込み試験でも、これを支持する結果が得られた。すなわち、消化管、皮、肝臓のいずれにおいても STX の取り込み量が TTX を上回った。特に消化管では TTX はほとんど取り込まれず、STX 取り込み量との差が最も顕著となった。従って、*P. suvattii* では消化管が関門となり、STX は選択的に取り込まれて卵巣や皮に蓄積するが、TTX はほとんど取り込まれず、そのまま排出されるものと推察された。

III. 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

トラフグおよびマフグ間に焦点を絞り、mtDNA 解析法による母系種の同定および GCA 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 GCA 反復配列の回数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、人工交配種において、トラフグ由来の 344-347 bp (反復回数 33-34 回) およびマフグ由来の 262 bp (反復回数 6 回) 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トラフグおよびマフグで上述した分子量に近い PCR 産物が得られた (図 1 中の Torafugu, Mafugu)。本マイクロサテライトマーカーはトラフグおよびマフグにおいて有効であると考えられる。今後は、他のトラフグ属あるいはサバフグ属においても GCA がマーカーとして有効であるかどうかやトラフグおよびマフグにおけ

る GCA の再現性を確認する必要がある。

2) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝の種判別については、本研究で確立した PCR 条件を用いれば、加工品でも種判別が可能であることが明らかになった。ただし、加工品を対象とした遺伝子領域は約 150 bp と短いため、この領域内の塩基配列は種によっては同一あるいは酷似していることがあり、「シライトマキバイ、クビレバイ、ヒモマキバイ」、「エゾボラモドキ、エゾボラ」、「エチュウバイ、アニワバイ」はそれぞれカッコ内の貝の種が判別できない。

IV. フグ類の形態分類

フグ科魚類はフグ目の中で最も種の多様性が高く、全世界に約 190 種が生息している。日本沿岸にも 49 種が分布していることが明らかになり、日本産フグ類の中でも飛び抜けて多様性が高いことが判明した。フグ科魚類には未知種が多く存在することが推測されているが、日本沿岸からも近年、3 新種が発見され、記載された。今年度の研究においても新種ではないが、日本から正式に報告されていなかった *Tylerius spinosissimus* (Regan, 1908) が沖縄島に分布することが明らかになった。このようにフグ科魚類には依然として未知種や日本未記録種がいる可能性が高いため、今後も引き続き分類学的調査を継続する必要がある。

フグ科魚類は日本をはじめとして世界各地で分類の難しい分類群として悪名が高い。フグ科魚類は他の多くの魚類と異なり、分類学的特徴に乏しいため、種の識別が困難である。そのため同定に役立つ適切な出版物がほとんどない。フグ科魚類の分類に最も役立つ特徴は色彩であるが、フグ類に馴染みのない研究者や一般の人達 (市場関係者や食品衛生関係者を含む) にとっては、フグ類の体色のどの部分が種を識別する有用な特徴となるかを判断するのは困難である。

そこで、写真と図を主にした「日本産フグ類同定ガイド」を作成した。この同定ガイドでは、分類学的な専門用語の使用を極力少なくして、各種の特徴を簡潔に解説した。また、特に識別が困難な種については、識別点となる部分の拡大図を作成し、魚市場などの現場で速やかにフグ類を同定できるようにした。このフグ類同定ガイドを食品衛生関係者に閲覧してもらい、意見を求めたところ、好評であり、改善するためのコメントが寄せられた。これらの意見に基づいて、改訂版を作成したので、

報告書に添付する。

沖縄島から得られた *Tylerius spinosissimus* は浅海性の体長 8cm 以下の小型のフグである。これまでに南シナ海北部で採集されたことはあったが、日本から正式に報告されたことはなかった。本種の体表には発達した小棘が分布しているため、日本産フグ類の他種から容易に識別できる。

V. PSP 標準品の検討

基準CF値と 1 回/週で11週間実施したCF値の平均は、STXで0.201 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$ (基準CF値の1.07倍:変動範囲94.7%-120.7%)、dcSTXで0.185 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$ (基準CF値の1.06倍:変動範囲90.9%-118.9%)であり、ともに基準CF値より高い傾向となった。実施者が4名であることも一因と考えられたが、変動係数はSTXで7.8%、dcSTXで8.8%であり、複数人で実施してもばらつき無く使用できることが示唆された。

また、dcSTXのAOAC 959.08により求めた基準CF値と外部精度管理法により求めた基準CF値はほぼ同等であった。dcSTXによる標準化毒値は、STXによるものに比較して若干低い傾向はあるが値付け値(639 μg STX当量/kg)の86.4%~105.2%と良好であった。

E. 結論

I. 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)

簡便法の測定値は参考法の測定値とよく相関しており、かつ参考法の測定値より1~2割程度高かった。従って、毒性検査の抽出法としては、操作が煩雑で効率の悪い参考法に代え、簡便法を適用することが望ましいと判断された

2) マトリックス効果の検証

TTXのLC-MS/MS分析では、マトリックス効果により測定値の低下が起るため、抽出液の適切な希釈が必要となる。また、適切な最低希釈倍率は、組織の種類等、試料により大きく異なることが示唆された。この点を明確にするためには、今後、さらにデータを集積する必要がある。なお、抽出比5の場合、10倍希釈以上でマトリックスの影響が除けることが示唆された。

3) LC-QTOF/MSによるTTX分析の妥当性確認

LC-QTOF/MSによるTTX分析法は、毒性の目安となる10 MU/g を添加した際の妥当性が確認され、1 MU/g 添加時の選択性は確認できなかったが、そ

の他の性能については目標値の範囲内であり、毒性評価法としての妥当性が確認された。

3) フグ毒検査キットの開発

これまで複数の研究グループによって開発が試みられてきたTTX検出用のELISAキットは、TTX以外の関連成分はほとんど検出することはできない。これらキットに使用されている抗TTX抗体は、TTXなど関連成分のグアニジノ基をアルデヒドを用いてキャリアタンパク分子のアミノ基と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結合するTTX分子の数は極めて限られており、優れた抗TTXポリクローナル抗体を得ることはできなかった。本研究は、Yotsu-Yamashita et al. (2005) および Sato et al. (2014) の知見をもとに、キャリアタンパク分子に多数のTTX分子が結合したハプテン抗原作成法を新たに開発し、毒性が高い11-oxoTTXを含む、様々なTTX関連成分に反応する新規の抗TTXポリクローナル抗体を作製した。この抗体を使用して構築したELISAキットは、TTX、4-epiTTX、11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTXなどのTTX関連成分を特異的に検出できることを確認した。

II. フグ等の毒性評価

1) コモンフグの毒性

前年度に引続き、コモンフグの毒性について調査した。今年度の試料は全体的に毒性が低く、年変動が大きいことが示唆された。

凍結融解した試料を分析し、凍結前の値と比較した結果、筋肉の皮側で含量の上昇が確認された。皮試料の中には減少したものもあり、皮組織からの漏出と筋肉への移行が示唆された。

MBAと機器分析法による分析結果は、高い相関が認められ、リスク管理のための毒性調査に機器分析が有用と考えられた。

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、リスク評価に必要な基礎データを集積するため、しらす加工品に混入したフグ稚魚の種と毒性を調べた。今回集めた71検体のうち、多くはシロサバフグであったが、成魚が有毒種であるクサフグ、コモンフグ、シマフグ、ショウサイフグ、トラフグ、ナシフグ稚魚の混入もみられた。これら有毒フグ種の一部の試料ではTTXが検出され、3検体でフグの食用規制値(10

MU/g、2.2 µg TTX/g 相当) を超える TTX が検出されたが、しらす加工品への混入率と摂取量を考慮すると、フグ稚魚が混入したしらす加工品を食べても健康被害への影響はないと考えられた。

3) フグの PSP 蓄積能評価

天然で TTX 主体の毒をもつ海産フグは TTX を、PSP 主体の毒をもつ淡水フグは PSP を選択的に吸収・蓄積する能力をもつことが示唆された。食用フグの PSP 蓄積能や蓄積機構については、今後さらに検討する必要があるだろう。

III. 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、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、GCA 反復配列から推定できる可能性が示唆された。しかしながら、現在マイクロサテライトの反復回数は未決定の個体が多いため、本 GCA 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、例えばショウサイフグ、コモnfグ、ゴマフグなどからなる交雑種に本 GCA マーカーが適用できるかどうかは定かでない。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。

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こっているため、遺伝子による有毒巻貝の種判別法の開発が望まれている。ミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域を対象にした PCR を行い、ダイレクトシーケンス法による種判別を行ったところ、テトラミン中毒だけでなくフグ毒中毒のおそれのある巻貝の種判別が可能になった。しかし、一部の巻貝ではターゲットとした領域の塩基配列が完全に一致しているため、判別不能のものもあり、別の遺伝子領域を検討する必要がある。さらに、重篤なフグ毒中毒を引き起こした有毒巻貝のボウシュウボラについては、ミトコンドリア DNA 16SrRNA の遺伝子配列が登録されていないので、この全塩基配列を決定した。これにより、今後はボウシュウボラの種判別を正確に行うことができる。

IV. フグ類の形態分類

フグ科魚類はフグ目の中で最も種の多様性が高く、全世界に約 190 種が生息している。日本沿岸にも 49 種が分布していることが明らかになり、日本産フグ類の中でも飛び抜けて多様性が高いことが判明した。これらのフグ種の特徴を整理し、写真と図を主にした現場で使える「日本産フグ類同定ガイド」を作成した。

V. PSP 標準品の検討

AOAC 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。今年度は昨年度と同様の試験を 4 名で実施し、複数人の投与者によるばらつき幅を検討したが、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。

Codex 規格における麻痺性貝毒の許容量は 800 µg STX 当量/kg である。有毒検体である自家製陽性管理試料を分析した結果、dcSTX による試験法は AOAC 959.08 と同等であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) O. Arakawa, T. Takatani, S. Taniyama and R. Tatsuno: Toxins of pufferfish - distribution, accumulation mechanism, and physiologic functions. Aqua-BioScience Monographs, 10, 41-80 (2017).
- 2) S. Jiang, K. Kuwano, G. N. Nishihara, C. Urata, R. Shimoda, T. Takatani and O. Arakawa: Uptake of nitrogen and production of kainic acid by laboratory culture of the red alga *Digenea simplex*. Phycol. Res., 66, 68-75 (2018).
- 3) W. Gao, Y. Kanahara, R. Tatsuno, K. Soyano, G. N. Nishihara, C. Urata, T. Takatani and O. Arakawa: Maturation-associated changes in internal distribution and intra-ovarian microdistribution of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu pardalis*. Fish. Sci., in press.
- 4) S. Takaishi, K. Yasumoto, A. Kobiyama, S. Sato (2017) Haptenic properties of tetrodotoxin conjugated to carrier proteins by using dithiol reagents. Proceedings in: International Symposium "Fisheries Science for Future Generations", No.

11001.

http://www.jsfs.jp/office/annual_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html

- 5) M. S. Reza, A. Kobiyama, T. Kudo, J. Rashid, K. Ikeo, Y. Ikeda, Y. Yamada, D. Ikeda, N. Mizusawa, S. Sato, T. Ogata, M. Jimbo, S. Kaga, S. Watanabe, K. Naiki, Y. Kaga, S. Segawa, K. Mineda, V. Bajic, T. Gojibori, S. Watabe (2017) The implication of the datasets obtained from periodic surveys on the microbial community by metagenomic analysis in evaluating the marine ecosystem. Proceedings in: International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, No.08002.
http://www.jsfs.jp/office/annual_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html
- 6) S. Watabe, M. S. Reza, A. Kobiyama, K. Ikeo, J. Rashid, Y. Ikeda, Y. Yamada, D. Ikeda, N. Mizusawa, S. Sato, T. Ogata, M. Jimbo, T. Kudo, S. Kaga, S. Watanabe, K. Naiki, Y. Kaga, S. Segawa, K. Mineta, V. Bajic, T. Gojibori (2017) Periodic survey by metagenomic analysis on the marine microbial communities in an enclosed bay locating at Sanriku coast off northern Japan in the Pacific Ocean. Proceedings in: International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, No.08003.
http://www.jsfs.jp/office/annual_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html

2. 著書・総説

- 1) 荒川修: フグの毒テロドトキシン —保有生物やフグ食文化との興味深い関わり合い—. 化学と教育, 65, 224-227 (2017).
- 2) 松浦啓一: フグ類の学名はなぜ変わったのか? 日水誌 2017; 83: 718-721.
- 3) 松浦啓一: 動物分類学の基礎—1. 食衛誌 2017; 58: J-111-J115.
- 4) 松浦啓一: 動物分類学の基礎—2. 食衛誌 2018; 59 (印刷中) .

3. 学会発表

- 1) W. Gao, Y. Kanahara, R. Tatsuno, H. Yoshikawa, K. Soyano, T. Takatani and O. Arakawa: Tetrodotoxin-specific toxin uptake and maturation-associated toxin accumulation in the pufferfish *Takifugu pardalis*. International Symposium “Fisheries Science for Future

Generations”, Tokyo, September 2017.

- 2) R. Tatsuno, W. Gao, H. Yoshikawa, H. Takahashi, T. Fukuda, M. Furushita, G. N. Nishihara, T. Takatani and O. Arakawa: Tetrodotoxin dynamics in the pufferfish *Takifugu rubripes* changes depending of its liver development. International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, Tokyo, September 2017.
- 3) 佐々木杜汰, 寺島武寿, 沖田光玄, 平井慈恵, 高谷智裕, 荒川修: トラフグ初期発育段階におけるフグ毒の獲得. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2018 年 3 月
- 4) 大城直雅, コモンフグ筋肉から検出されたテロドトキシンの由来. 第 113 回食品衛生学会, 東京江戸川区, 2017 年 11 月
- 5) 長谷川晶子, 柘植康, 大城直雅, 愛知県産コモンフグの毒性分析調査. 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会, 奈良県奈良市, 2017.11
- 6) 中谷実・山本明美・工藤志保・増田幸保・木村淳子・大城直雅・鈴木達也・高坂典子 (2017) 麻痺性貝毒試験における代替標準品に係る比較試験. 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会.
- 7) X. Yin, A. Kiriake, A. Ohta, Y. Kitani, S. Ishizaki, Y. Nagashima: A novel function of vitellogenin subdomain, vWF type D, as a toxin-binding protein in the pufferfish *Takifugu pardalis* ovary. *Toxicon* 2017; 136: 56-66.
- 8) T. Matsumoto, Y. Ishizaki, K. Mochizuki, M. Aoyagi, Y. Mitoma, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Urinary excretion of tetrodotoxin modeled in a porcine renal proximal tubule epithelial cell line, LLC-PK1. *Mar. Drugs* 2017; 15: Doi: 10.3390/md15070225.
- 9) Y. Nagashima, A. Ohta, X. Yin, S. Ishizaki, T. Matsumoto, H. Doi, T. Ishibashi: Difference in uptake of tetrodotoxin and saxitoxins into liver tissue slices among pufferfish, boxfish and porcupinefish. *Mar. Drugs* 2018; 15: Doi: 10.3390/md16010017
- 10) 土井啓行, 岡山桜子, 徐 超香, 長島裕二: 日本海西部沿岸より採取されたカニ類の毒性. 日本海甲殻類研究会第 16 回発表会, 福井県福井市, 平成 29 年 5 月.
- 11) 長島裕二: フグの毒とフグ食の安全性. ジャパン・インターナショナル・シーフードショウ 国際ふぐ協会セミナー, 東京都江東区, 平成 29

年 8 月.

- 12) R. Ohki, T. Matsumoto, S. Ishizaki, Y. Nagashima: In vitro uptake of tetrodotoxin into marine gastropods by tissue culture. 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム, 東京都港区, 平成 29 年 9 月.
- 13) S. Yokozuka, Y. Kitani, N. Suzuki, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Bio-transformation of paralytic shellfish toxin by the hemolymph of shore crab *Gaetice depressus*. 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム, 東京都港区, 平成 29 年 9 月.
- 14) T. Matsumoto, Y. Ishizaki, K. Mochizuku, M. Aoyagi, Y. Mitoma, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Carrier-mediated transport of tetrodotoxin in porcine renal proximal tubule epithelial cell line LLC-PK1 monolayer. 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム, 東京都港区, 平成 29 年 9 月.
- 15) 大木理恵子, 園山貴之, 石橋敏章, 石崎松一郎, 長島裕二: ポウシュウボラおよびキンシバイによるフグ毒中毒リスク評価. 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会, 東京都江東区, 平成 29 年 10 月.
- 16) 長島裕二: 魚貝類の毒 マリントキシン. 平成 29 年度第 1 回愛知県衛生研究所技術研修会. 愛知県名古屋市, 平成 29 年 11 月.
- 17) 辰野竜平, 梅枝真人, 宮田祐実, 出口梨々子, 福田翼, 古下学, 高橋 洋, 長島裕二: 熊野灘産ムシフグの毒性. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 30 年 3 月.
- 18) 大木理恵子, 松本拓也, 石崎松一郎, 長島裕二: 組織培養法による巻貝のテトロドトキシン取り込みと排出. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 30 年 3 月.
- 19) 横塚峻介, 木谷洋一郎, 鈴木信雄, 林華娟, 石崎松一郎, 長島裕二: ヒライソガニ体液に含まれる麻痺性貝毒変換物質の性状解明. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 30 年 3 月.
- 20) 松本拓也, 高橋晶子, 青柳 充, 大竹才人, 三苦好治, 石崎松一郎, 長島裕二: トラフグのカルニチントランスポーターoctn2 をコードするslc22a5 遺伝子のクローニング. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 30 年 3 月.
- 21) N. Koyama, M. Usui, S. Ishizaki, T. Yanagimoto, Y. Nagashima: Species identification of hybrid pufferfish between *Takifugu rubripes* and *Takifugu porphyreus*. International Symposium on Pufferfish in Bodrum, Turkey, 2017. 13-14 October, 2017.

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 29 年度分担研究報告書

フグ毒検査法の見直しとフグの麻痺性貝毒蓄積能の評価

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 長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

研究要旨

フグ類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、フグの麻痺性貝毒（PSP）蓄積能について検討した。まず、低毒量のトラフグ肝臓ホモジネートを用い、「参考法」と「簡便法」で毒量測定値を取得後、27、28 年度のデータを加えて両者の相関を見た。その結果、簡便法と参考法の間には良好な正の相関が認められ、かつ抽出比 3 以上では参考法より簡便法の測定値の方が 1～2 割程度高くなることが示された。すなわち、参考法で得られた値を真値と仮定した場合の簡便法の真度は 110～120% となり、検査法としての性能の違いは許容範囲であり、10 MU/g を毒性の目安としたときの判定への影響は少ないものと考えられた。次に、LC-MS/MS における試料由来マトリックスの影響について検討した。無毒養殖トラフグの組織抽出液にテトロドトキシン（TTX）を添加後、LC-MS/MS で定量したところ、皮では抽出原液～4 倍稀釈液で、卵巣では原液で、測定値の大きな低下が見られた。一方、天然マフグの組織抽出液を LC-MS/MS と HPLC-FLD に付し、TTX 定量値を比較したところ、肝臓と卵巣では原液、皮では原液～4 倍稀釈液で LC-MS/MS の測定値が HPLC-FLD の測定値を下回った。マトリックスの影響を除くためには、組織に応じて適切に抽出液を稀釈（抽出比 5 の場合、少なくとも 10 倍程度）する必要がある。一方、ヒガンフグ人工飼育個体に TTX またはデカルバモイルサキシトキシン（dcSTX）を経口経管投与したところ、TTX は皮や肝臓、卵巣に移行・蓄積したのに対し、dcSTX は生殖腺に僅かに移行したのみであった。対照的に、淡水フグ *Pao suvattii* の人工飼育個体に TTX とサキシトキシン（STX）を混合投与したところ、STX は皮や卵巣に移行・蓄積したのに対し、TTX はいずれの部位からもほとんど検出されなかった。同フグ組織切片を用いた毒取り込み試験でも、各組織で STX の取り込み量が TTX を上回った。ヒガンフグは TTX を、*P. suvattii* は PSP を選択的に吸収・蓄積する能力をもつものと推察された。

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、コモンフグ等、同表を上回る毒力を示すフグの例が散見される。また、熱帯・亜熱帯海域に生息するドクサバフグの日本沿岸での出現や自然交雑種の頻出など、新たな問題も浮上

しており、今後、フグのリスク管理を強化、見直す必要が出てきた。しかしながら、その前提となるフグの毒性を調べるための現行の検査法、すなわち食品衛生検査指針理化学編に記載の「参考法」（マウス毒性試験法）は、抽出操作が煩雑で効率が悪く、この点の改良と機器分析への移行を検討する必要がある。

一方、淡水フグや *Sphoeroides* 属、*Arothron* 属などの一部の海産フグは麻痺性貝毒（PSP）をもち、海外ではこれによる食中毒も発生しているが、フグ類の PSP 蓄積能については依然として不明の部分が多い。

このような状況の下、フグ類のリスク管理に資するため、フグ毒検査法の見直しとして、昨年度

に引き続き「参考法」の抽出操作を簡素化した「簡便法」の有効性について検討するとともに、今年度は LC-MS/MS における試料由来マトリックスの影響（マトリックス効果）についても調べてみた。また、海産のヒガンフグ、および淡水フグ *Pao suvattii* の無毒人工飼育個体を用い、*in vivo* の毒投与試験と *in vitro* の培養組織毒取り込み試験を行って、フグの PSP 蓄積能について検討を加えた。

B. 研究方法

1) フグ毒検査法の見直し

①簡便法の有効性

一昨年度・昨年度は、比較的高毒量の天然トラフグ肝臓（4 個体）を試料として、それぞれ参考法と簡便法による測定値を比較した。今年度は、低毒量の肝臓を用いて同様の実験を行う予定であったが、適切な毒量の肝臓が得られなかったため、有毒と無毒の肝臓それぞれ 1 個体をホモジナイズ後混合し、さらにホモジナイズして 2 種類の毒量の肝臓ホモジネート試料を調製した。

一昨年度・昨年度同様、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。

②マトリックス効果の検証

無毒養殖トラフグの皮および卵巣につき、それぞれ上記簡便法（抽出比 5）により抽出液を調製した。この抽出液を原液とし、純水で段階希釈して 2、4、8、および 16 倍希釈液を調製した。原液および各希釈液に、終濃度が 1.9 MU/mL になるよう TTX 標準液を添加し、LC-MS/MS に付して TTX を定量した。

一方、有毒天然マフグの肝臓、皮、および卵巣につき、同様に簡便法（抽出比 3）で抽出液を調製した。この抽出液を原液として純水で 2 および 4 倍希釈液を調製後、それぞれ LC-MS/MS および HPLC-FLD に付して TTX を定量した。

2) フグの PSP 蓄積能評価

①ヒガンフグ

無毒のヒガンフグ人工飼育個体（12 ヶ月齢魚 20 尾）を用い、毒投与試験を行った。すなわち、試験魚を 10 尾ずつの 2 群に分け、それぞれ TTX、および PSP の一成分であるデカルバモイルサキシトキシン（dcSTX）を 55 nmol/個体の用量で経口経管投与した。いずれも 72 時間後に取り上げて、各部位（筋肉、皮、肝臓、生殖腺、および消化管）の TTX 量および dcSTX 量をそれぞれ LC-MS/MS と HPLC-FLD で測定した。

②淡水フグ *P. suvattii*

無毒の *P. suvattii* 人工飼育個体（15～18 ヶ月齢魚 8 尾）を用い、毒投与試験を行った。すなわち、各個体にサキシトキシン（STX）と TTX をともに 19.2 nmol/個体の用量になるよう混合して経口経管投与し、4 尾ずつ 24 および 48 時間後に取り上げて、①と同様に各部位の TTX 量と STX 量を測定した。

一方、Nagashima ら（*Toxicon* **41**, 569-574, 2003）の方法に従い、同様の *P. suvattii* 人工飼育個体から肝臓、皮、および消化管の組織切片を作成し、80 μ M の TTX または STX を含む培地で一定時間培養後、各切片の毒取り込み量を測定した。

C. 研究結果

1) フグ毒検査法の見直し

①簡便法の有効性

一昨年度から今年度にかけて得られたデータを合わせて、抽出比毎に簡便法と参考法の測定値（平均値）の相関を見たところ、いずれの抽出比においても良好な正の相関（ $r = 0.994 \sim 0.999$ ）が認められ、回帰式の傾きは抽出比 2 で 1.1 程度、抽出比 3 以上で概ね 1.2 前後（1.19～1.25）の値となった（図 1）。しかしながら、y 切片がいずれも負の値（-4.44～-0.80）であったため、100 MU/g 未満の低毒量域のデータについて改めて相関を見たところ、回帰式の傾きは、抽出比 2 の 0.95 を除き、概ね 1.1～1.2、y 切片は、抽出比 6 の -0.7 を除き、いずれも正の値（0.94～1.97）となった（図 2）。

②マトリックス効果の検証

無毒養殖トラフグ組織抽出液に TTX を添加後、LC-MS/MS で定量した結果を図 3 に示す。皮の場合、8 倍および 16 倍希釈液では、相対 TTX 量（添加量に対する相対値）がほぼ 100%となり問題な

かったが、原液、2 倍、および 4 倍希釈液では、60~70%程度と測定値の大きな低下が見られた。卵巣抽出液では、原液で 66%と、皮と同様の測定値の低下が見られた。

一方、天然マフグの組織抽出液を LC-MS/MS と HPLC-FLD に付し、両者の間で TTX 定量値を比較したところ、いずれの組織においても、抽出原液では LC-MS/MS の測定値が HPLC-FLD の測定値より低くなった (図 4)。肝臓の場合、測定値の低下は僅かで、2 倍および 4 倍希釈液では LC-MS/MS と HPLC-FLD の分析値はほぼ一致した。卵巣でも、2 倍および 4 倍希釈液では両分析値はほぼ一致したが、皮では LC-MS/MS の測定値の低下 (直線 $y = x$ からのずれ) が大きく、2 倍および 4 倍希釈液でも低下が見られた。

2) フグの PSP 蓄積能評価

①ヒガンフグ

毒投与 72 時間後における試験魚各部位の毒濃度を図 5 に示す。TTX 投与群では、卵巣や皮、肝臓への毒の移行・蓄積が見られた。雌の場合、卵巣の毒濃度が 4.8 nmol/g と最も高く、皮 (3.3 nmol/g)、肝臓 (1.0 nmol/g) がこれに次いだ。雄では、主に皮と肝臓から毒が検出された (それぞれ 1.4 および 0.7 nmol/g)。一方、dcSTX 投与群では、消化管から比較的高濃度 (雌で 3.6 nmol/g、雄で 4.6 nmol/g) の毒が検出されたものの、それ以外の部位では生殖腺に僅かに毒の移行・蓄積が見られるのみであった。

②淡水フグ *P. suvattii*

毒投与試験における試験魚各部位の毒量を図 6 に示す。STX については、取り上げ時間に拘わらず、卵巣、皮、消化管への移行・蓄積が見られた。雌の場合、7~8 nmol/個体程度、すなわち投与量の 4 割前後の STX を体内に保持しており、その大部分が卵巣に分布していたのに対し、雄の保持量は 1~3 nmol/個体程度で、そのほとんどを皮が占めた。対照的に、TTX は投与 24、48 時間後ともに消化管内容物からわずかに検出されたのみで、体組織への移行・蓄積は見られなかった。

一方、組織切片の取り込み試験でも、STX と TTX の挙動には大きな差異が見られた (図 7)。消化管では、STX は培養 20 分で 15 $\mu\text{mol/g}$ 、60 分で 46 $\mu\text{mol/g}$ 取り込まれたのに対し、TTX の取り込み量は 20 分で 2.6 $\mu\text{mol/g}$ 、60 分でも 5.3 $\mu\text{mol/g}$ と、STX の取り込み量の 1/6~1/9 程度に

留まった。肝臓においても、培養時間によらず、STX の取り込み量 (40~50 $\mu\text{mol/g}$ 程度) の方が TTX の取り込み量 (20 $\mu\text{mol/g}$ 程度) より 2~3 倍多かった。皮の場合、培養 24 時間では両毒成分の取り込み量に差は見られなかったが、48 時間では STX の取り込み量が 94 $\mu\text{mol/g}$ に達し、TTX (39 $\mu\text{mol/g}$) を大きく上回った。

D. 考察

1) フグ毒検査法の見直し

①簡便法の有効性

前述のとおり、フグ肝臓試料において、簡便法の測定値と参考法の測定値の間には良好な正の相関が認められた。さらに、簡便法の測定値の方が参考法の測定値より抽出比 2 で 0~1 割、抽出比 3 以上で 1~2 割程度高くなることが示された。従って、簡便法により、参考法よりも毒性が低く見積もられる可能性はきわめて低く、簡便法は参考法の代替法として十分に適用可能であると考えられた。

毒量の高い試料ほど、参考法に対する簡便法の相対測定値がより高くなる傾向があったため、図 1 の直線回帰式では y 切片が負の値となったが、低毒量域に限定した回帰式 (図 2) では y 切片が 0 前後となった。従って、基準値 (10 MU/g) 未満の低毒力の試料であっても、簡便法を適用して問題はないと考える。

抽出比に関しては、低毒領域を含めて 3 以上でほぼ同様の回帰線が得られた。従って、抽出比 2 では、他の抽出比に比べて 1 割程度毒量が低く見積もられるものの、抽出比 3 以上であれば、いずれの抽出比を用いても大きな問題はないものと思われる。

今回は、簡便法、参考法ともに平均値を用いて両者の相関をみたため、個々の測定値のばらつきは反映されていない。今後、この点を考慮した統計解析を行い、回帰線の信頼区間等を明らかにして、さらに踏み込んだ考察を行う予定である。

②マトリックス効果の検証

前述のとおり、無毒養殖トラフグの皮では抽出原液、2 倍、および 4 倍希釈液で、卵巣では原液で、測定値の大きな低下、すなわちマトリックス効果によるものと推定される TTX イオン化の抑制が見られた。天然マフグを用いた実験でも、肝臓では原液で僅かに、皮では原液、2 倍、および 4 倍希釈液で、卵巣では原液で、同様のマトリッ

クス効果が認められた。すなわち、マトリックス効果は組織により異なり、皮で最も強く、従って皮を LC-MS ないし LC-MS/MS で分析する場合には、特に十分な稀釈（抽出比 5 の場合、少なくとも 10 倍程度）が必要であることが示唆された。

2) フグの PSP 蓄積能評価

①ヒガンフグ

毒投与試験において、TTX は消化管にはほとんど残存しておらず、主に皮と肝臓、雌では卵巣に移行・蓄積していた。これに対し、dcSTX は生殖腺、特に卵巣に僅かに移行・蓄積したのみで、皮や肝臓からは検出されなかった。また、消化管内に残存が見られたことから、TTX は消化管から体内に取り込まれて、特定の部位に輸送・蓄積されるのに対し、dcSTX は消化管に留まり、一部は生殖腺に運搬されるが、大半は体外に排出されることが示唆された。

②淡水フグ *P. suvattii*

毒投与試験では、ヒガンフグとは対照的な結果となった。すなわち、STX は体内に取り込まれて皮や卵巣に移行・蓄積したのに対し、TTX はいずれの部位からもほとんど検出されなかった。ヒガンフグは TTX を、*P. suvattii* は STX を選択的に吸収・蓄積する能力をもつものと推察される。

一方、組織切片の取り込み試験でも、これを支持する結果が得られた。すなわち、消化管、皮、肝臓のいずれにおいても STX の取り込み量が TTX を上回った。特に消化管では TTX はほとんど取り込まれず、STX 取り込み量との差が最も顕著となった。従って、*P. suvattii* では消化管が関門となり、STX は選択的に取り込まれて卵巣や皮に蓄積するが、TTX はほとんど取り込まれず、そのまま排出されるものと推察された。

E. 結論

簡便法の測定値は参考法の測定値とよく相関しており、かつ参考法の測定値より 1~2 割程度高かった。従って、毒性検査の抽出法としては、操作が煩雑で効率の悪い参考法に代え、簡便法を適用することが望ましいと判断された。一方、LC-MS/MS 分析では、マトリックス効果により測定値の低下が起こるため、抽出液の適切な稀釈が必要となる。また、適切な最低稀釈倍率は、組織の種類等、試料により大きく異なることが示唆された。この点を明確にするためには、今後、さら

にデータを集積する必要がある。

一方、天然で TTX 主体の毒をもつ海産フグは TTX を、PSP 主体の毒をもつ淡水フグは PSP を選択的に吸収・蓄積する能力をもつことが示唆された。食用フグの PSP 蓄積能や蓄積機構については、今後さらに検討する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 荒川 修: フグの毒テトロドトキシン — 保有生物やフグ食文化との興味深い関わり合い —. 化学と教育, 65, 224-227 (2017).
- 2) O. Arakawa, T. Takatani, S. Taniyama and R. Tatsuno: Toxins of pufferfish - distribution, accumulation mechanism, and physiologic functions. Aqua-BioScience Monographs, 10, 41-80 (2017).
- 3) S. Jiang, K. Kuwano, G. N. Nishihara, C. Urata, R. Shimoda, T. Takatani and O. Arakawa: Uptake of nitrogen and production of kainic acid by laboratory culture of the red alga *Digenea simplex*. Phycol. Res., 66, 68-75 (2018).
- 4) W. Gao, Y. Kanahara, R. Tatsuno, K. Soyano, G. N. Nishihara, C. Urata, T. Takatani and O. Arakawa: Maturation-associated changes in internal distribution and intra-ovarian microdistribution of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu pardalis*. Fish. Sci., in press.

2. 学会発表

- 1) W. Gao, Y. Kanahara, R. Tatsuno, H. Yoshikawa, K. Soyano, T. Takatani and O. Arakawa: Tetrodotoxin-specific toxin uptake and maturation-associated toxin accumulation in the pufferfish *Takifugu pardalis*. International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, Tokyo, September 2017.
- 2) R. Tatsuno, W. Gao, H. Yoshikawa, H. Takahashi, T. Fukuda, M. Furushita, G. N. Nishihara, T. Takatani and O. Arakawa: Tetrodotoxin dynamics in the pufferfish *Takifugu rubripes* changes depending of its liver development. International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, Tokyo, September 2017.
- 3) 佐々木杜汰, 寺島武寿, 沖田光玄, 平井慈恵, 高谷智裕, 荒川 修: トラフグ初期発育段階

におけるフグ毒の獲得. 平成 30 年度日本水
産学会春季大会, 東京, 2018 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

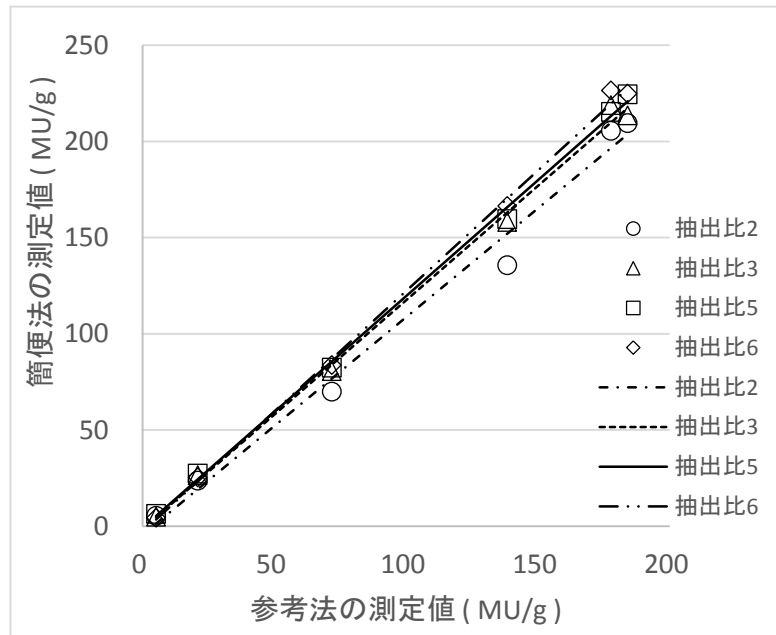


図 1 各抽出比における簡便法と参考法の測定値（平均値, $n = 6$ ）の相関

回帰線：抽出比 2, $y = 1.1311x - 4.4410$ ($r = 0.994$);

抽出比 3, $y = 1.1892x - 1.4388$ ($r = 0.998$);

抽出比 5, $y = 1.2044x - 0.7984$ ($r = 0.999$);

抽出比 6, $y = 1.2523x - 2.9332$ ($r = 0.999$)

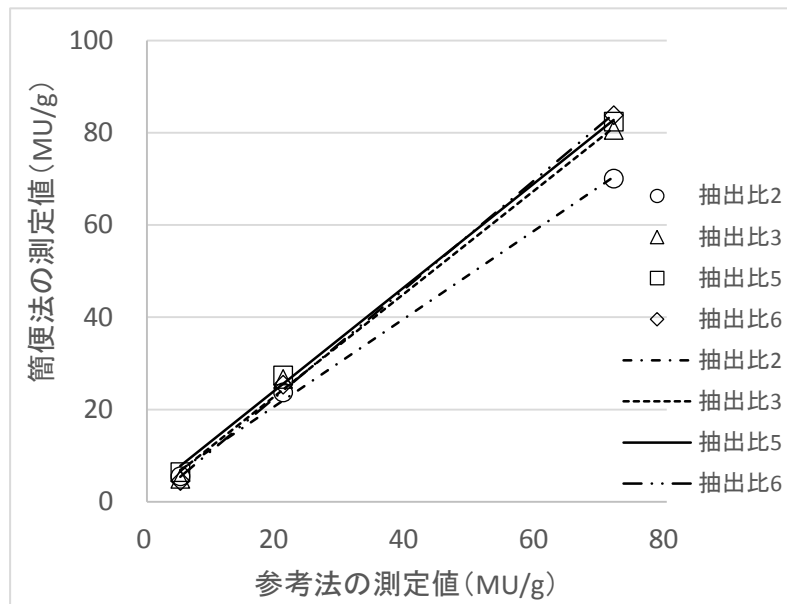


図 2 低毒力域における簡便法と参考法の測定値（平均値, $n = 3$ ）の相関

回帰線：抽出比 2, $y = 0.9533x + 1.9473$ ($r = 0.999$);

抽出比 3, $y = 1.1157x + 0.9387$ ($r = 0.999$);

抽出比 5, $y = 1.1252x + 1.9681$ ($r = 0.999$);

抽出比 6, $y = 1.1799x - 0.6600$ ($r = 0.999$)

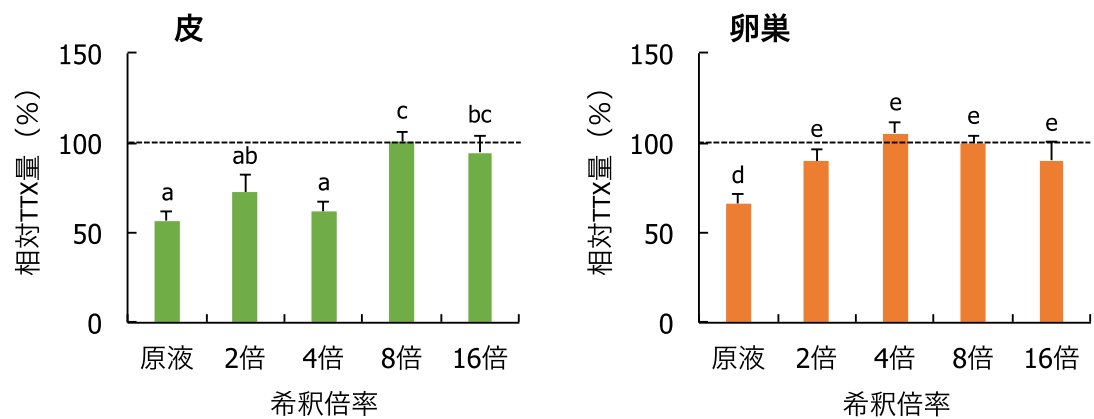


図3 無毒養殖トラフグ組織抽出液（原液および希釈液）に添加した TTX の LC-MS/MS による測定値（添加量に対する相対値）
 $a < b < c, d < e, p < 0.05$

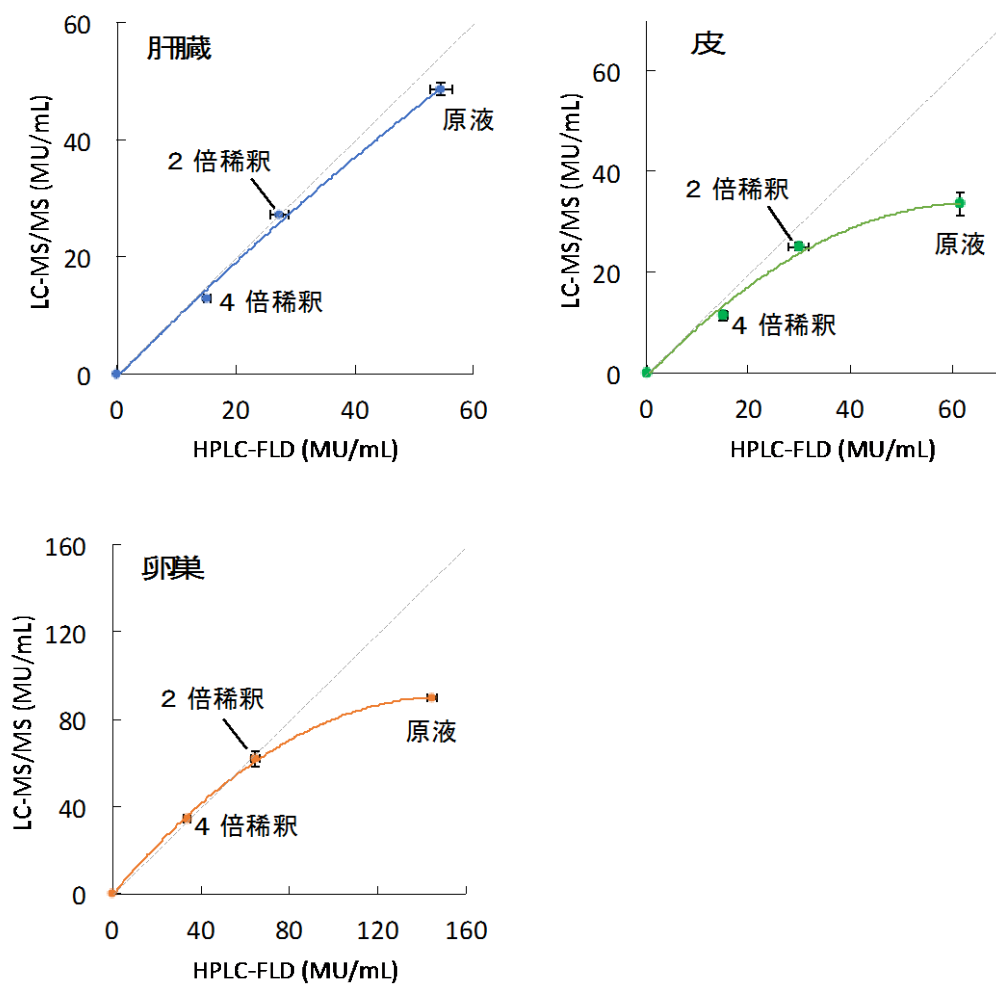


図4 LC-MS/MS および HPLC-FLD による天然マフグ組織抽出液（原液および希釈液）中の TTX 量測定値の相関

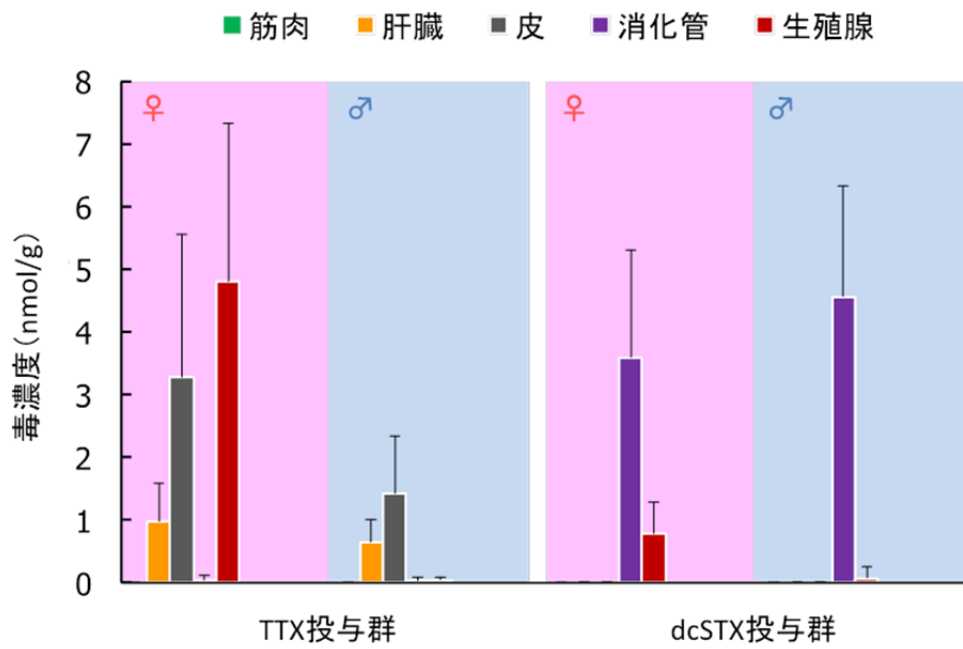


図5 ヒガンフグへの毒投与試験における毒移行プロファイル

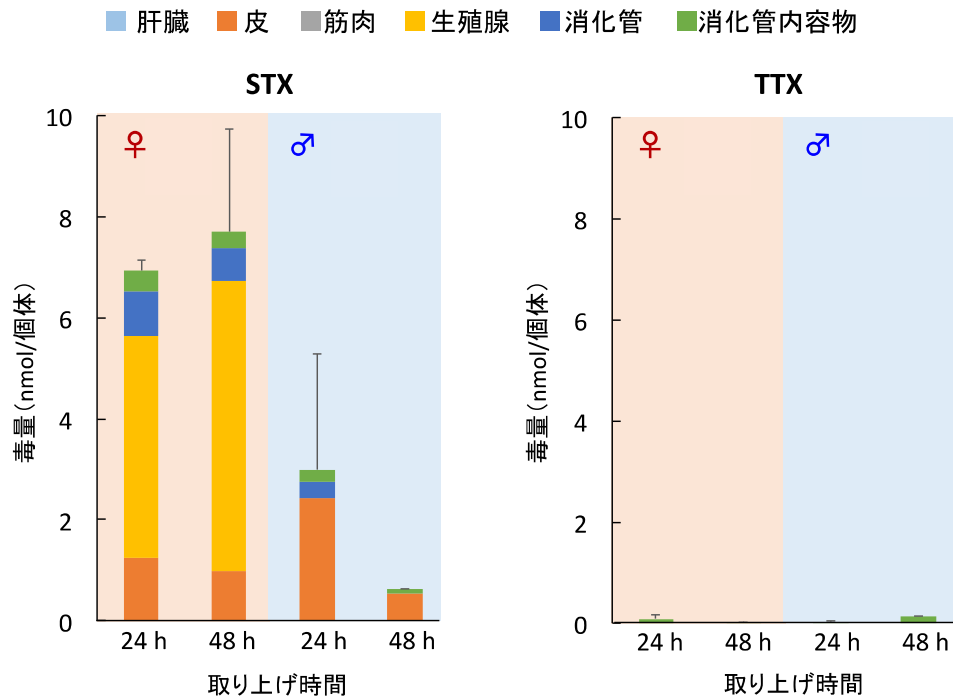


図6 *P. suvattii* への STX・TTX 混合投与試験における毒移行プロファイル

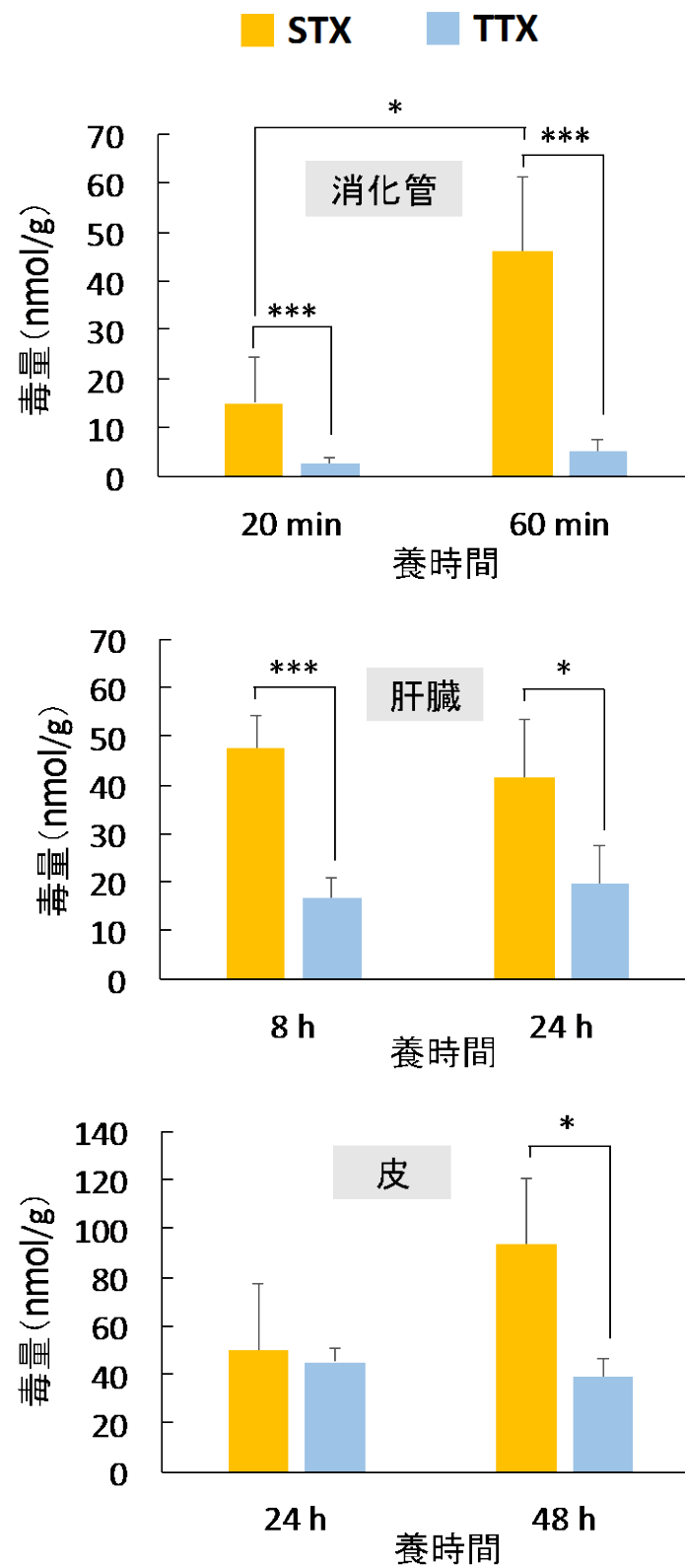


図7 *P. suvattii* 各組織における STX/TTX 取り込み量

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「マリントキシンのリスク管理に関する研究」
平成 29 年度分担研究報告書

フグ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

新規の抗テトロドトキシン (TTX) ポリクローナル抗体を作製し、これを用いて高感度かつ特異的にフグ毒 TTX とその関連成分を分析可能な ELISA キットを作製した。昨年度、1,2-エタンジチオール(EDT)を用いてスカシガイヘモシアニン(KLH)に TTX を導入したハプテン抗原 (KLH-EDT-TTX) をウサギに免疫することにより、高い抗体価を持つ抗血清が得られることを確認した。本年度は追加したウサギに同抗原を接種し、多量の抗血清を確保するとともに、抗血清から得た抗 TTX ポリクローナルと、新たに調整したビオチン標識 TTX を用いて ELISA キットを作製した。同キットで各 TTX 関連成分(TTX, 4-epiTTX, 11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTX)標品を分析したところ、本キットがこれら種々の TTX 関連成分を検出できることを確認した。加えて、コモンフグ各部位の抽出液を本キットで分析し、HPLC 蛍光法の結果との相関についても検討した。

A. 研究目的

フグ毒テトロドトキシン(TTX)に対する抗体が、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 しか導入できず、優良な抗 TTX ポリクローナル抗体を得ることはできない。現在市販されている TTX 検出用の ELISA キットには、上記のような抗原をマウスに摂取し、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、これを培養することにより得られるモノクローナル抗体が用いられている。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-oxoTTX 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。

昨年度、1,2-エタンジチオール(EDT)を用いてスカシガイヘモシアニン(KLH)に TTX を導入したハプテン抗原 (KLH-EDT-TTX) をウサギに免疫することにより、高い抗体価を持つ抗血清が得られることを確認した。本年度はさらに免疫するウサギを追加し多量の抗血清を確保するとともに、抗血清から得た抗 TTX ポリクローナル抗体と、新たに調整したビオチン標識 TTX を用いて TTX 分析用の ELISA キットを作製し、本キット上での種々の TTX 関連成分の挙動を調べた。加えて、同キットを用いて三陸産コモンフグの抽出液の毒含量を調べ、その性状を確認した。

B. 研究方法

(1)新規抗原のウサギへの免疫と抗体価の測定

昨年度の 2 羽に加え、新たに 3 羽のニュージーランドホワイト種のウサギ(KLH-EDT-TTX No.3 ~No.5)に、FCA で乳化した KLH-EDT-TTX 抗原 (毎回 0.3mg/羽)を隔週で皮下接種した。隔週で 5mL ずつ採血して得た血清の一部(100μL)に PBS で希釈した等量の TTX 標品溶液(2~25μM)を混合し 30 分間静置した後、NMWL 10K の限外遠心

デバイス(Nanosep Omega, Pall Life Science)を用いて得たろ液中の TTX を、HPLC 蛍光法(Yotsu et al.,1989)で分析定量した。抗体価は血清 1mL あたりの TTX 吸収量として算出した。

(2) 抗血清の TTX 関連成分に対する親和性

KLH-EDT-TTX No.2 のウサギから、免疫 7 回目（免疫開始約 4 か月後）に採血して得た抗血清 100 μ L に、いずれも PBS に対して 10 μ M に調製した TTX 標品 (Wako)、4-epiTTX、4,9-anhTTX、11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTX 溶液それぞれ 100 μ L を混合した。これらとは別に、同濃度の TTX 関連成分の PBS 溶液 100 μ L を、等量の PBS と混合して対照区とした。これらを室温で 30 分間静置した後、Nanosep 10K OMEGA (PALL Life Sciences) を用いて限外ろ過し、ろ液中の上記成分の濃度を HPLC 蛍光法で分析・定量した。

5,6,11-trideoxyTTX は HPLC 蛍光法でピークが得られないため、LC-QTOFMS (TripleTOFTM5600+、ABSciex) で本成分の準親イオンピーク (m/z 272.124) の増減を観測することにより定量し、抗血清のそれぞれの関連成分に対する親和性を検討した。HPLC 蛍光法ならびに LC-QTOFMS の分析条件を以下に記す。

HPLC 蛍光法 (Yotsu et al.,1989、一部改変)

蛍光検出系： FP-2020 Plus (Jasco)

Ex 365 nm / Em 510 nm

移動相ポンプ： PU-2080 Plus (Jasco)、0.4 mL/min

反応液ポンプ： PU-2080 Plus (Jasco)、0.4 mL/min

HPLC カラム： J-Pak Symphonica C18(Jasco)、5 μ m、4.6 $\times$ 150 mm

反応コイル：ステンレス製、 ϕ 0.5 mm $\times$ 2 m、120 $^{\circ}$ C

インジェクター：P/N 7725i (Rheodine)、loop vol20 μ L

移動相：0.06M HFBA/0.05M 酢酸アンモニウム (pH 5.0)

反応液： 4 M NaOH

比較標準： TTX (15.2 μ M)、6-epiTTX (9.5 μ M)、4-epiTTX (12.8 μ M)、4,9-anhTTX (11.1 μ M) の混合液/0.03 M 酢酸

注入量： 10 μ L、over load injection

LC-QTOFMS

カラム： Atlantis HILIC (Waters)、3 μ m、2.1 $\times$ 150 mm

移動相 A：アセトニトリル

移動相 B：10 mM ギ酸アンモニウム (pH 4.0)

流速： 0.2 mL/min

注入量： 5 μ L

CE： 30 $\pm$ 10

Gradient：0 min (B：20%) $\rightarrow$ 15 min (B：60%)
 $\rightarrow$ 16 min (B：60%) $\rightarrow$ 16.1 min (B：20%) $\rightarrow$ 19 min (B：20%)

測定モード： positive TOF-MS

(3) ビオチン標識 TTX の作成

(+)-ジチオスレイトール(DTT)と TTX の結合体の凍結乾燥物 (3.4 μ mol) を、2 mL の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、これに上述のビオチンラベル化剤 4 mg (7.6 μ mol) を添加して攪拌した後、室温で 2 時間静置した。反応混合液を水で充填した Bio-Gel P-2 のカラム (1.5 $\times$ 12 cm)に供し、カラムを水 100 mL で洗浄した後、0.2 M AcOH で溶出する画分を 10 mL ずつ 50 本分取した。0.2 M AcOH 溶出画分を直結方式の HPLC 蛍光法で分析し、蛍光ピークを与える画分を合一して凍結乾燥した。凍結乾燥粉末を秤量した後、0.1 % AcOH に溶解し、一部を TripleTOFTM5600+ (ABSciex)で分析した。分析の諸条件を以下に記す。

溶媒 (流速)： 水 (0.2 mL/min)

注入量： 5 μ L

測定モード： positive TOF-MS モード

(4) 特異抗体の精製

水で洗浄した EAH-Sepharose 4B (GE-Healthcare)10 mL に、PBS 10 mL と GMBS(二価性架橋試薬、Dojindo)56 mg を溶解した DMSO 2.5 mL との混合液を添加し懸濁した。室温で 20 分間静置した後、懸濁物を ϕ 25 $\times$ 100 mm のガラスカラムに洗いこみ、50 mL の水で 4 回洗浄した後、PBS 50 mL を流して未反応の GMBS を除去した。このカラムに、DTT-TTX 凍結乾燥物 (14 μ mol) を PBS 30 mL に溶解して添加混合し、室温で 1 時間、ときどき攪拌しながら静置した。カラムに水 100 mL を流した後、容積比で 1 % のメルカプトエタノールを含む PBS 100 mL を流して未反応のマレイミド基をマスクし、次いで水 100 mL と PBS100mL を順次流して TTX をリガンドとするアフィニティークロマトグラフ用樹脂を作製した。樹脂を直径 10mm のガラスカラムに 30mL まで充てんし、KLH-EDT-TTX No.3 ウサギ抗血清

(14 回目、全採血) 7.5 mL から得た硫酸沈殿物を PBS7.5mL に溶解して添加した。60 mL の PBS でカラムを洗浄した後、0.1 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.7) で溶出する画分を 2 mL ずつ 30 本分取した。溶出液は、あらかじめ 1.0 M Tris を 400 μ L ずつ分注した試験管に捕集した。分光光度計 (Jasco、V-550) を用いて各画分の 280 nm の吸光度を測定し、TTX に対する特異抗体を分離した。分離した抗体は合一して PBS を加えて 17 mL とし、ProClin 300 を 6 μ L 添加混合して 5 $^{\circ}$ C で保存した。

(5) TTX 分析用 ELISA キットの試作と性状確認

作製した抗 TTX 精製抗体を、0.9 % NaCl/0.01 M Tris-HCl (pH 8.2) を用いて 100 倍に希釈し、96 穴の ELISA プレート (F96 MaxisorpTM Thermo Scientific) の各 well に 100 μ L ずつ分注した。プレートを 5 $^{\circ}$ C で一晩静置した後、PBS で well を 1 回洗浄した。水で 1 % 濃度 (w/w) に希釈したブロックエースを各 well に 350 μ L ずつ分注し、さらに 5 $^{\circ}$ C で一晩静置した後、各 well を 0.05 % (w/v) の界面活性剤 (Tween 20) を添加した PBS (以下 PBST) で 2 回洗浄した。

TTX 関連成分 (TTX、4-epiTTX、11-oxoTTX、5,6,11-trideoxyTTX) 各標品をそれぞれ 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) で希釈して 1、3、10、30、100、300、1,000 nM 濃度の溶液を調製した。これら TTX 関連成分の希釈液を 50 μ L ずつ各 well に分注し、次いで 2 nM に希釈したビオチン標識 TTX を 50 μ L ずつ分注して軽く攪拌した。これらに加えて TTX 関連成分を含まない 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 50 μ L と 2 nM ビオチン標識 TTX 50 μ L を添加した well (Bound 100 % = B100)、およびビオチン標識 TTX の代わりに 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) を添加した well (Bound 0 % = Bo) を作製した。プレートを 37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした後、well 内の溶液を捨て、プレートを PBST で 1 回洗浄した。これに PBS で 2,000 倍に希釈した HRP-streptavidin (Molecular Biology Grade, 1mg/mL, KPL) を各 well に 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした。well 内の溶液を捨て、プレートを PBST で 3 回洗浄した後、水 10 mL に溶解した Sigma-Fast tablets (OPD-H₂O₂, Sigma) を各 well に 100 μ L ずつ分注した。発色を確認しながら 37 $^{\circ}$ C で 5 ないし 10 分間インキュベートした後、

2 M HCl を各 well に 100 μ L ずつ分注して反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad、iMark) を用いて 490 nm の吸収を測定した。以上の操作は、各成分の各濃度ごとに 3 連で行い、各濃度の 490 nm の吸光度の平均値を求めて対数軸横軸の濃度に対して吸光度平均値を縦軸にとり、阻害曲線を作製した。

TTX 関連成分に加え、当研究室で毒化貝から単離して凍結保存している麻痺性貝毒成分ゴニオトキシン (GTX) 1,4 (GTX1 と GTX4 の平衡混合物)、GTX2,3 (GTX2 と GTX3 の平衡混合物)、ネオサキシトキシン (neoSTX)、デカルバモイルサキシトキシン (dcSTX) および C1C2 (C1 と C2 の平衡混合物) 各標品をそれぞれ、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) を用いて 1、3、10、30、100、300、1,000 nM となるように希釈した。以下、前述の手順で作製した抗 TTX 抗体を固相化したプレート上で同様に、麻痺性貝毒成分の交差性を検討した。

(6) 試作キット上での有毒フグ抽出液の分析

2017 年 10 月に大船渡市魚市場で入手したコモンフグ 3 個体を試料とした。個体ごとに皮、筋肉、肝臓、消化管、生殖腺 (全て精巢) の 5 部位に分け、ショウサイフグは個体ごとに肝臓を取り出し、それぞれ食品衛生検査指針 (2015) に従ってフグ毒検査用の希酢酸熱浸抽出液を調製した。これら抽出液を上記の HPLC 蛍光法および LC-QTOFMS で分析した。さらに 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) で 1000 倍に希釈した検液を、上記の ELISA キットで分析した。

C. 研究結果

(1) 抗体価の推移

KLH-EDT-TTX 抗原を免疫した 5 羽のウサギから得た抗血清の抗体価の推移を図 1 に示した。1 羽は免疫開始 4 ヶ月後に死亡したが、残り 4 羽の抗体価 (血清 1mL あたりの TTX 吸収量) は、免疫化し 6 ヶ月半後の全採血の時点で 4.0~24.5 nmol に達した。

(2) TTX 関連成分に対する交差反応

有毒フグから分離した TTX、4-epiTTX、4,9-anhTTX、5,6,11-trideoxyTTX、ならびに TTX を Wu et al. (1996) に従って過酸化水素/硫酸第 1 鉄で処理して作成した 11-oxoTTX を、KLH-EDT-

TTX 抗原を免疫したウサギ (No.2) から 7 回目の採血で得た血清と混合し交差性を調べたところ、4,9-anhTTX を除く各成分ともに、TTX とほぼ同程度の吸収が確認された (図 2)。

(3) ビオチン標識 TTX

図 3 にビオチン標識 TTX 溶液を Triple TOFTM 5600+ で分析した際のスペクトルを示した。計算値の m/z : 491.1723 および 981.3368 によく一致する分子イオンピーク $[M+2H]^{++}$: 491.1707 および $[M+H]^+$: 981.3337 が観測された。

(4) 精製抗体の作成

図 4 に、TTX 結合セファロースカラムによる抗血清の分離を示した。グリシン塩酸緩衝液により Nos. 34 ~40 の画分に、TTX に対する特異抗体と思われる成分が溶出した。用いた KLH-EDT-TTX No.3 ウサギの全採血 (14 回目) で得た抗血清の、1 mL あたりの TTX 吸収量は 3.97 nmol であり、アフィニティーカラム処理前には全量で 14.9 nmol の TTX に対する特異抗体 (M_w 160,000 の IgG と想定) が含まれていたことになる。一方、アフィニティーカラムからグリシン塩酸緩衝液で溶出して得た溶液の、280 nm の吸光度は 0.235 であった。すなわち精製抗体溶液 1 mL あたり 1.05 nmol、全量 17 mL 中には 17.9 nmol の IgG が含まれており、抗血清 7.5 mL 中に含まれていた抗体量 (14.9 nmol) とよく一致した。精製抗体溶液の一部に対して TTX 標品の吸収試験を実施したところ、溶液 1 mL あたり 0.56 nmol の TTX に対する特異抗体が含まれているという結果を得た。すなわちグリシン塩酸緩衝液の酸性 (pH 2.7) により、特異抗体のおよそ 50 % が変性せずに回収されていることを確認した。

(5) 試作した ELISA キットの性状

図 5 に TTX 関連成分の抗体固相化プレート上での阻害曲線を示した。添加した TTX の濃度が高くなるに従って、発色値が低下した。4-epiTTX、11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTX も同様の結果を与えた。これら成分は 3~100 nM の範囲で直線的に発色値が低下し、いずれも 1,000 nM を添加した well は、Bo の well と同程度の、無色に近い発色値を示した。IC50 値は TTX が 30 nM 付近、4-epiTTX が 50 nM 付近、11-oxoTTX が 50 nM 付近、5,6,11-trideoxyTTX が 100 nM 付近であった。

これに対して、麻痺性貝毒関連成分を添加した場合には、高濃度であっても発色値の低下は見られなかった (図 6)。

(6) 試作キット上での有毒フグ抽出液の分析

コモフグの皮や筋肉、肝臓、消化管、精巣では、ELISA で検出される毒含量が、HPLC 蛍光法で検出される毒含量を上回る傾向が認められた。これら試料には、LC-QTOFMS で 5,6,11-trideoxyTTX などのデオキシ体が多量に含まれていることを確認した (図 7 および図 8)。

D. 考察

本研究で作成した抗 TTX ポリクローナル抗体および、これを用いて作製した ELISA キットは様々な TTX 関連成分を検出可能である (図 9)。試作した ELISA キットは、TTX に匹敵する活性を持ち、キンシバイ等に高濃度で見いだされている 11-oxoTTX や、TTX の前駆体として想定されている 5,6,11-trideoxyTTX も検出できる。すなわち本抗体は、マウス試験法に替わる毒の簡易分析法としてだけでなく、TTX 関連成分による生物の毒化機構を解明するための、極めて有用なツールとなるものと考ええる。

引用文献

Sato S, Takata Y, Kondo S, Kotoda A, Hongo N, Kodama M (2014): Quantitative ELISA kit for paralytic shellfish toxins coupled with sample pretreatment. *J AOAC Int.* 97:339-44.

Yotsu M, Endo A and Yasumoto T (1989): An improved tetrodotoxin analyzer. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 893-895.

Wu BQ, Yang L, Kao CY, Levinson SR, Yotsu-Yamashita M and Yasumoto T (1996): 11-oxo-tetrodotoxin and a specifically labelled 3H-tetrodotoxin. *Toxicon*, 34, 407-416.

E. 結論

これまで複数の研究グループによって開発が試みられてきた TTX 検出用の ELISA キットは、TTX 以外の関連成分はほとんど検出することはできない。これらキットに使用されている抗 TTX 抗体は、Johnson et al. (1964) の方法に従っ

て、TTX など関連成分のグアニジノ基をアルデヒドを用いてキャリアタンパク分子のアミノ基と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結合する TTX 分子の数は極めて限られており、優れた抗 TTX ポリクローナル抗体を得ることはできなかった。本研究は、Yotsu-Yamashita et al. (2005) および Sato et al. (2014) の知見をもとに、新たにキャリアタンパク分子に多数の TTX 分子が結合したハプテン抗原を作製し、毒性が高い 11-oxoTTX を含む、様々な TTX 関連成分に反応する新規の抗 TTX ポリクローナル抗体を開発した。さらにこれを用いて組み立てた ELISA キットが TTX、4-epiTTX、11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTX などの TTX 関連成分を特異的に検出できることを確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Suzuka Takaishi, Ko Yasumoto, Atsushi Kobiyama and shigeru Sato (2017) Haptenic properties of tetrodotoxin conjugated to carrier proteins by using dithiol reagents. Proceedings in: International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, No. 11001.

http://www.jsfs.jp/office/annual_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html

2) Md Shaheed Reza, Atsushi Kobiyama, Toshiaki Kudo, Janaira Rashid, Kazuho Ikeo, Yuri Ikeda, Yuichiro Yamada, Daisuke Ikeda, Nanami Mizusawa, Shigeru Sato, Takehiko Ogata, Mitsuru Jimbo, Shinnosuke Kaga, Shiho Watanabe, Kimiaki Naiki, Yoshimasa Kaga, Satoshi Segawa, Katsuhiko Mineda, Vladimir Bajic, Takashi Gojibori and Shugo Watabe (2017) The implication of the datasets obtained from periodic surveys on the microbial community by

metagenomic analysis in evaluating the marine ecosystem. Proceedings in: International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, No.08002.

http://www.jsfs.jp/office/annual_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html

3) Shugo Watabe, Md Shaheed Reza, Atsushi Kobiyama, Kazuho Ikeo, Janaira Rashid, Yuri Ikeda, Yuichiro Yamada, Daisuke Ikeda, Nanami Mizusawa, Shigeru Sato, Takehiko Ogata, Mitsuru Jimbo, Toshiaki Kudo, Shinnosuke Kaga, Shiho Watanabe, Kimiaki Naiki, Yoshimasa Kaga, Satoshi Segawa, Katsuhiko Mineta, Vladimir Bajic and Takashi Gojibori (2017) Periodic survey by metagenomic analysis on the marine microbial communities in an enclosed bay locating at Sanriku coast off northern Japan in the Pacific Ocean. Proceedings in: International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, No.08003.

http://www.jsfs.jp/office/annual_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html

2. 著書・総説

なし

3. 学会発表

高石鈴香・小杉英信・安元 剛・小檜山篤志・佐藤 繁 (2017) 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講演要旨集 p 113, 口頭発表.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

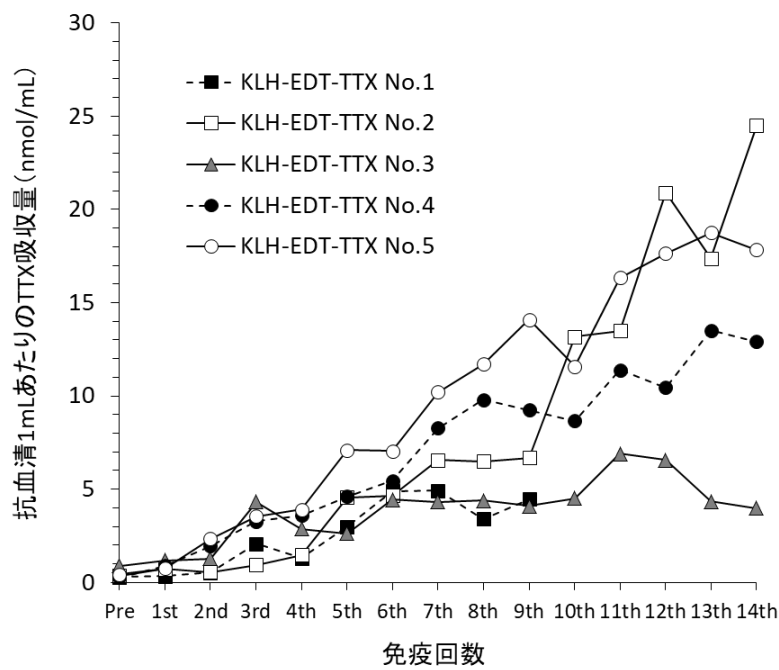


図 1 KLH-EDT-TTX を免疫したウサギの血清の抗体価の推移

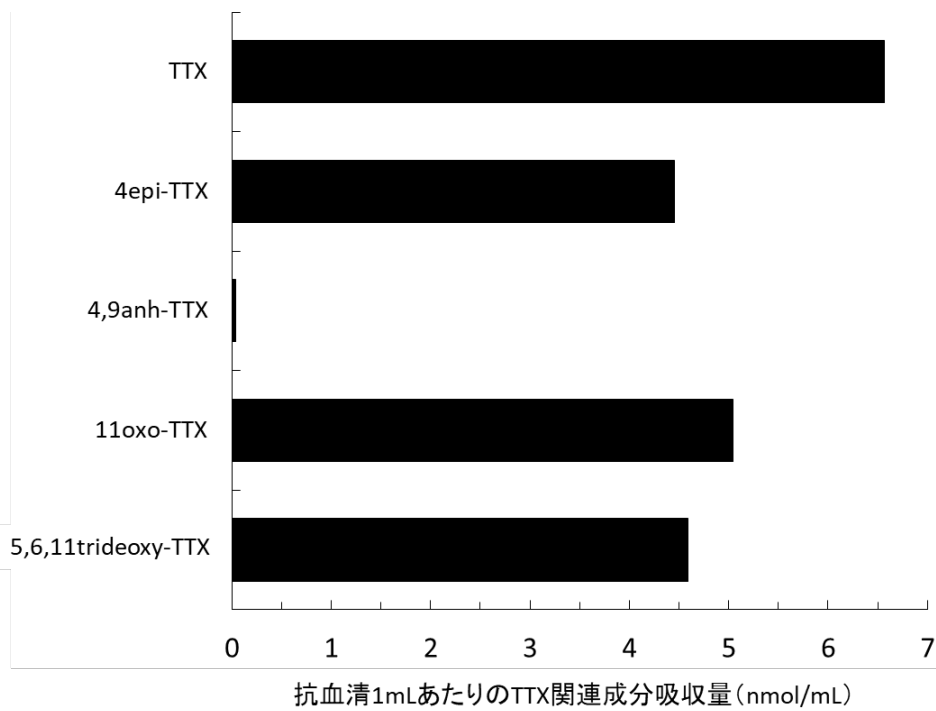


図 2 TTX 関連成分の抗血清(KLH-EDT-TTX No.2, 14 週目)に対する親和性

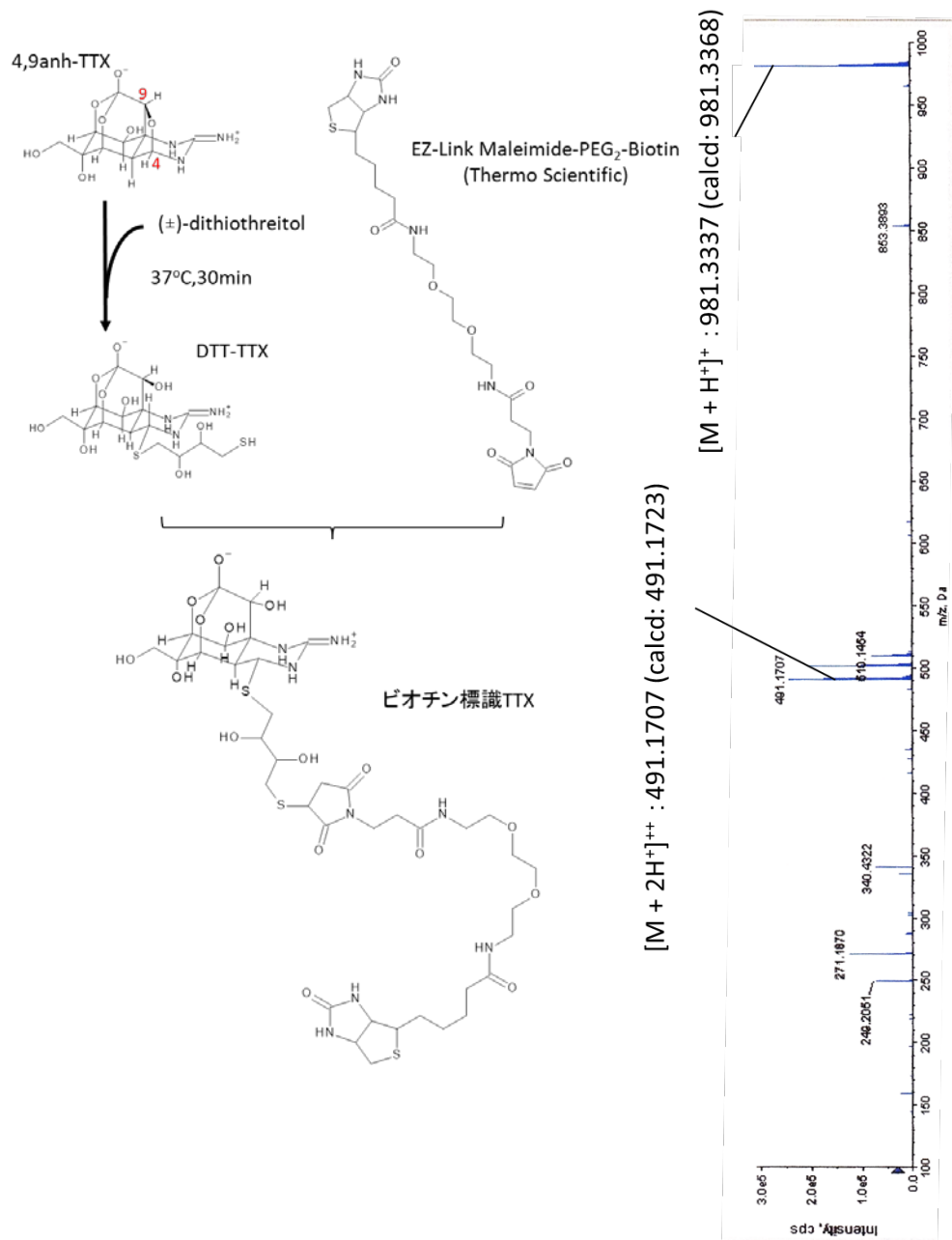


図3 ビオチン標識 TTX の調製法 (左) および TOFMS スペクトル (右)

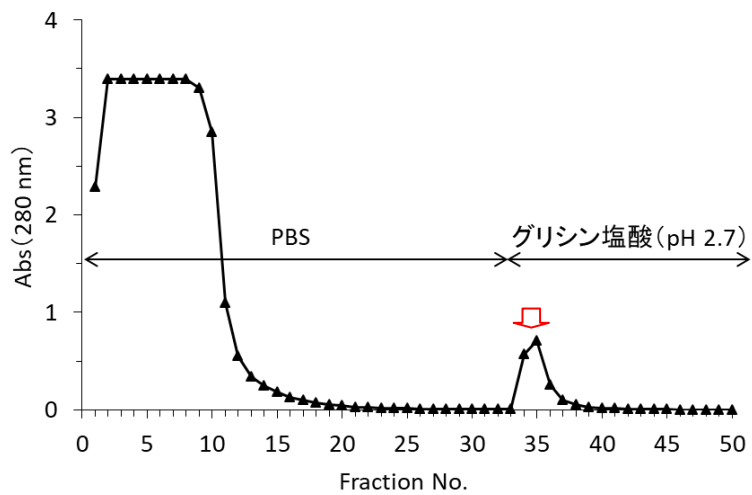


図4 TTX 結合セファロースカラムによる特異抗体の精製

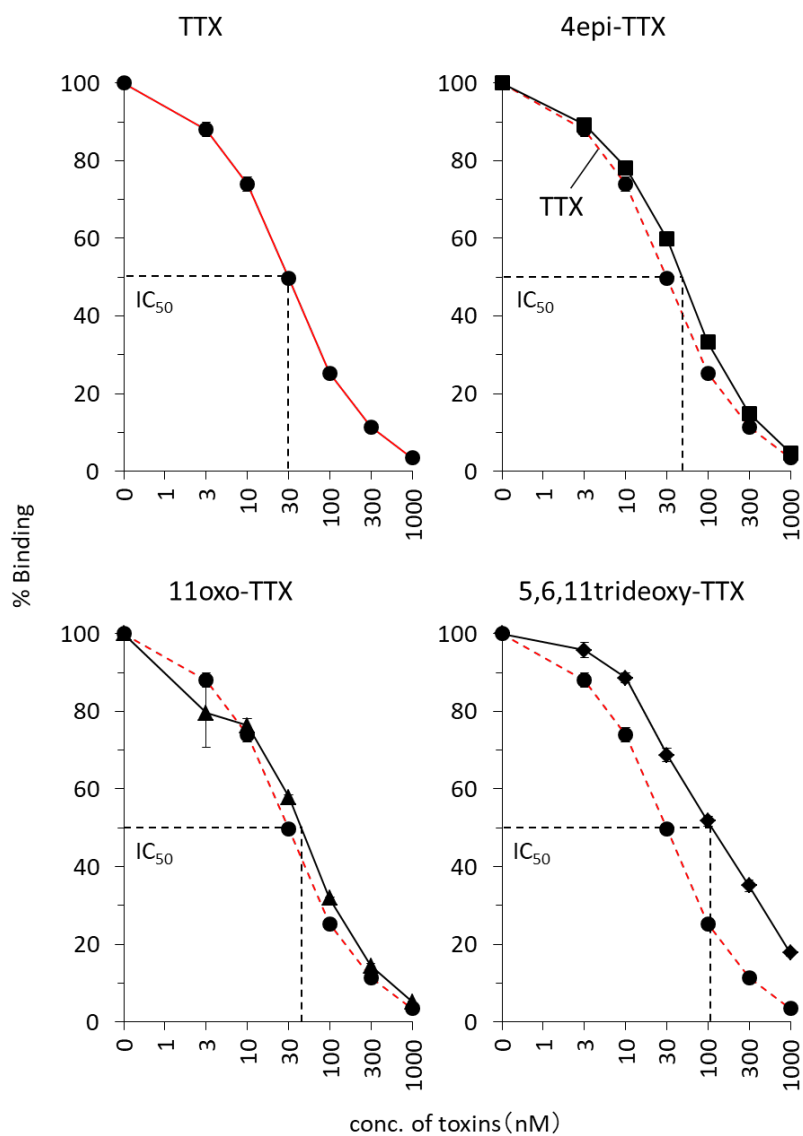


図5 試作キット上での TTX 関連成分各標品の分析

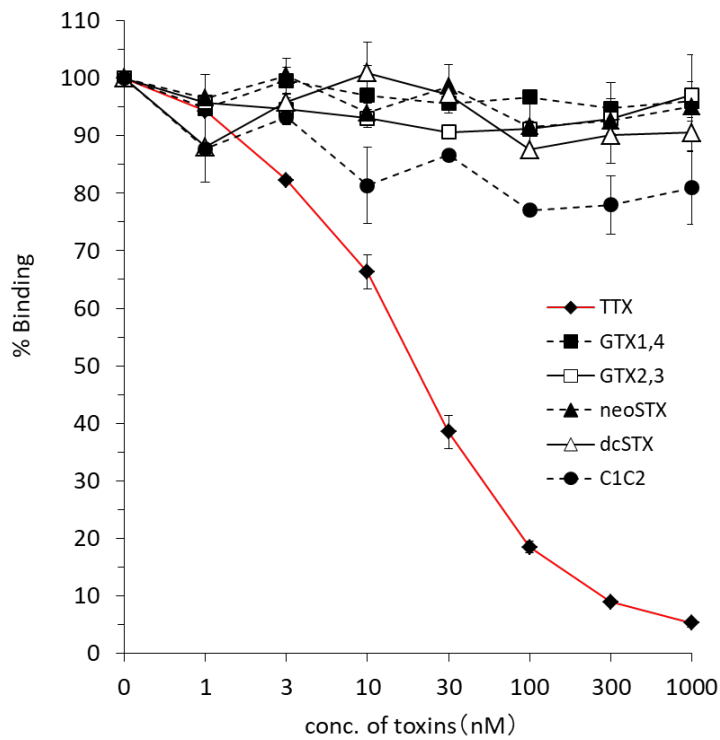


図6 試作キット上での麻痺性貝毒標品の分析

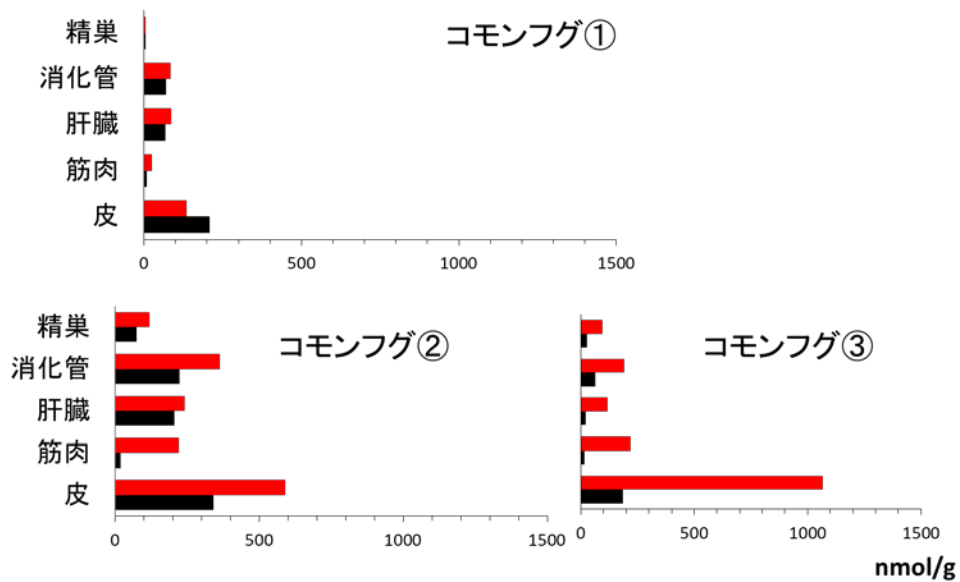


図7 コモンフグ各部位の毒含量(nmol/g)

赤: ELISA 法、黒: HPLC 蛍光法

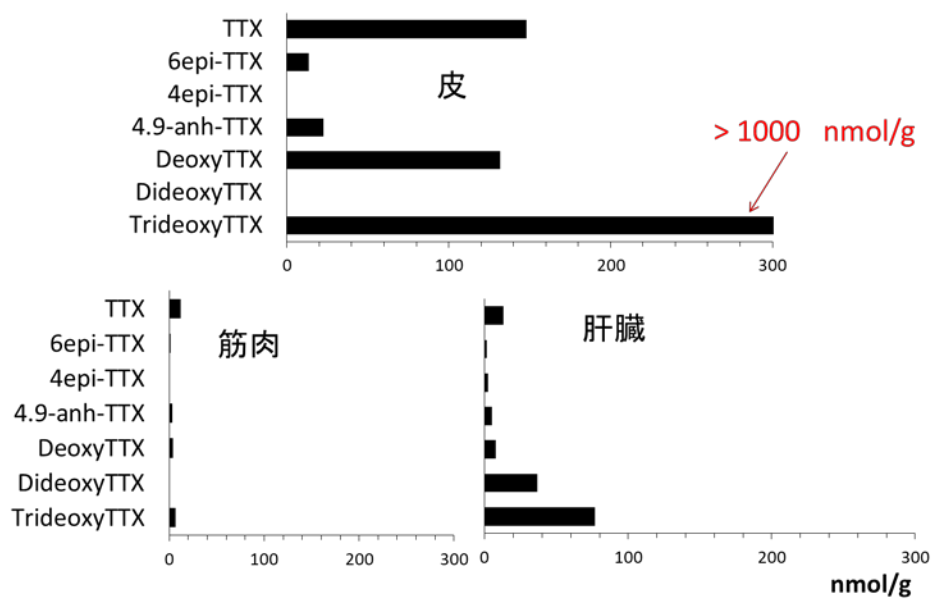


図 8 コモンブグ③の TTX 関連成分の LC-QTOFMS による分析

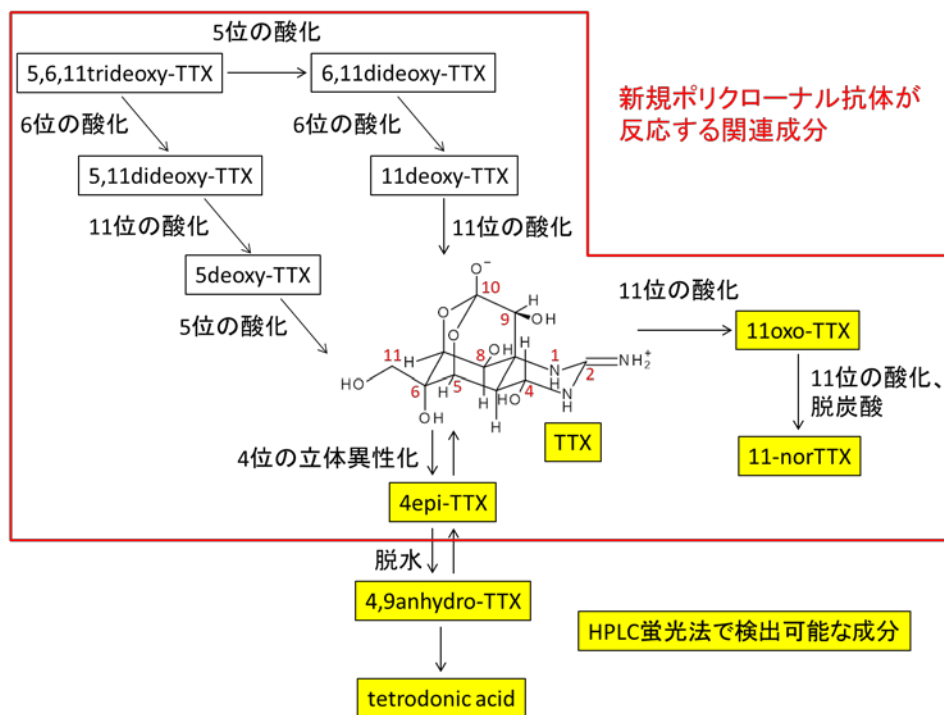


図 9 新規ポリクローナル抗体が反応すると考えられる TTX 関連成分 (赤枠内)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「マリントキシンのリスク管理に関する研究」

平成 29 年度分担研究報告書

コモnfグの毒性およびフグ毒評価法の検討

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

研究要旨

コモnfグ筋肉は食用部位だが、三陸の 3 海域については有毒個体が確認されており食用不可となっている。その他の海域におけるコモnfグの毒性を調査し、現行のリスク管理が適切であるか評価することを目的とした。瀬戸内海産および、愛知県沿岸産コモnfグについて、外部形態による同定後、筋肉および皮の各試料について毒性を調査した。その結果、瀬戸内海産（101 個体）の筋肉は無毒が 100 個体、弱毒が 1 個体（14 MU/g）で、皮は無毒が 3 個体、弱毒が 79 個体（11～97 MU/g）、強毒が 18 個体（101～712 MU/g）および猛毒（7491 MU/g）が 1 個体であった。愛知県沿岸産は（6 個体）すべての筋肉および皮の 3 個体が無毒で皮の 3 検体が弱毒（13～29 MU/g）であった。トレース試料への TTX 添加（1 および 10 MU/g 相当量）実験により、LC-QTOF/MS による分析法の妥当性が確認され、また、コモnfグ試料の分析結果はマウス毒性試験法と高い相関が認められた。凍結融解実験により、皮組織からの TTX 漏出と筋肉への移行が確認された。

A. 研究目的

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

フグによる食中毒事件の報告において、原因魚

種が記載されていたものは約半数であるが、そのうち最も発生件数が多いのがコモnfグであった（登田ら, 2012）。多くの事例において、コモnf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nf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nf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nfグの毒性調査を実施した。平成 29 年度は引続き瀬戸内海および愛知県産試料について調査を実施し、試料の凍結融解による筋肉中の毒性の変化についても検討した。また、LC-QTOF/MS による TTX 分析の妥当性確認を実施し、さらに機器分析法とマウス毒性試験法（MBA）による分析結果の相関性について検討した。

B. 研究方法

1) 供試試料

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

2) 分析試料の調製

①機器分析用試料

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

②MBA 用試料

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

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

③凍結融解試験

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

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

3) LC-QTOF/MS による TTX 分析

①機器の設定

【LC 部】

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

【MS 部】

装置：Agilent 6540MS Q-TOF、イオン化：ESI (Positive)、ドライガス：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 *m/z* 922.009798、観測イオン： $[M+H]^+$ (*m/z* 320.1088 ± 0.005)。

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

②妥当性確認の方法

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

(平成26 年12月22日付け食安発1222第7号厚生労働省医薬食品局食品安全部部長通知)に準じ実施した。

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

4) MBA

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

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

5) 毒性の評価

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

無毒： 10 MU/g 未満

弱毒： 10 MU/g 以上、100 MU/g 未満

強毒： 100 MU/g 以上、1,000 MU/g 未満

猛毒： 1,000 MU/g 以上

C. 研究結果

1) コモンフグの毒性

①瀬戸内海産試料

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

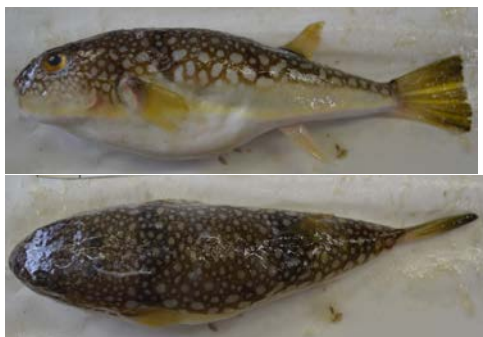


図 1. 瀬戸内海産コモンフグ (20170324-15)

筋肉は無毒が 100 個体、弱毒が 1 個体 (14 MU/g) であった。皮は無毒が 3 個体、弱毒が 79 個体 (11 ～97 MU/g)、強毒が 18 個体 (101～712 MU/g) および猛毒 (7491 MU/g) が 1 個体であった (表 1～3)。

②愛知県沿岸産試料

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

愛知県沿岸産 6 個体の筋肉 12 試料 (皮側および内臓側) はすべて無毒であった (表 4)。皮試料は 6 検体中、3 検体が無毒、3 検体が弱毒 (13 ～29 MU/g) であった (表 5)。

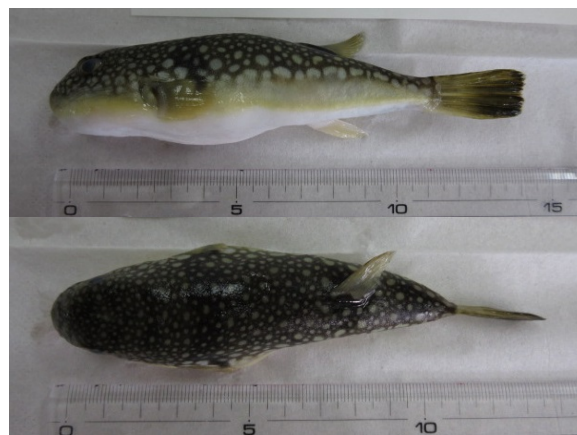


図2. 愛知県沿岸産コモンフグ (A29006)

2) 凍結融解試料の毒性

①瀬戸内海産試料

凍結融解後の筋肉では、皮側の毒性が凍結前より 2～20 倍高い値となったが、内臓側では凍結前よりも低い試料もあった (表 6)。凍結前試料は無毒 14 試料、弱毒が 1 試料 (11MU/g) であったが、凍結融解試料の筋肉 (皮側) は、無毒 9 試料、弱毒 5 個体 (11～97 MU/g)、強毒 1 個体 (101～712 MU/g) となった。

皮は凍結融解後に毒性が減少する試料が多かったが、顕著な違いが認められない個体もあった (表 7)。

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

⑧愛知県沿岸産試料

実験に供した 6 個体 12 試料の MBA の結果はすべて無毒であった。

3) LC-QTOF/MS による TTX 分析の妥当性確認

ブランク試料に TTX を 1 MU/g (0.22 mg/kg) および 10 MU/g (2.2 mg/kg) 添加し、実施者 1 名で 2 併行、5 日間分析した。その結果、1 MU/g 添加時の真度 84%、併行精度 3.7 RSD%、室内精度 12%で、10 MU/g 添加時の真度 73%、併行精度 3.1 RSD%室内精度 3.8 RSD%であった (表 8)。

4) MBA および機器分析法の分析値の比較

MBA による毒性分析を実施した愛知県産試料のうち、皮 18 試料および筋肉 21 試料について、LC-QTOF/MS による分析を実施した。皮試料及び筋肉試料の相関係数 (R^2) はそれぞれ 0.9762 および 0.9495 であり、ともに良好な相関性が得られた (図 6)。

D. 考察

1) コモンフグの毒性

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

2) コモンフグ凍結融解試料の毒性

凍結融解による皮から筋肉への移行について検討するために、コモンフグの半身を凍結融解した後皮と筋肉に分けて分析に供した。愛知県沿岸産試料 6 個体については、凍結融解による皮から筋肉への毒の移行は確認できなかった。これは、皮試料の毒性が低かったためと考えられた。

瀬戸内海産試料では、凍結融解後の皮側の筋肉は 2~20 倍に増加していた。また、皮の毒性が猛毒および強毒の個体では、凍結前に無毒であった筋肉が、凍結融解した筋肉（皮側）で無毒から弱毒及び強毒へと変化した。一方、内側の筋肉は凍結前と比べ 0.2~4 倍変動したが、全ての試料で無毒であった。皮の毒性は凍結前後においてほとんど変化は認められなかったが、一部で減少が確認された。これらに結果より、凍結融解により、皮組織から TTX の漏出および皮への移行が起きているものと推定された。

3) LC-QTOF/MS による TTX 分析の妥当性確認

ブランク試料を調製するために、1 MU/g 未満の筋肉試料を混合、均質化した。そのためブランク試料の TTX 含量が 0.74 MU/g となり、1 MU/g 相当量添加では選択性の確認ができなかった。しかしながら、真度、併行精度および室内精度については通知に示された目標値を満たした。一方、毒性の目安となる 10 MU/g 相当量添加時の選択性、真度、併行精度および室内精度の全てが目標値を満たしており、LC-QTOF/MS による TTX 分析法の妥当性が確認され、コモンフグ筋肉を対象とした分析への適用可能であることが示された。

4) MBA および機器分析法の分析値の比較

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

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

E. 結論

前年度に引続き、コモンフグの毒性について調査した。今年度の試料は全体的に毒性が低く、年変動が大きいことが示唆された。

凍結融解した試料を分析し、凍結前の値と比較した結果、筋肉の皮側で含量の上昇が確認された。皮試料の中には減少したものもあり、皮組織からの漏出と筋肉への移行が示唆された。

LC-QTOF/MS による TTX 分析法は、毒性の目安となる 10 MU/g を添加した際の妥当性が確認され、1 MU/g 添加時の選択性は確認できなかったが、その他の性能については目標値の範囲内であり、毒性評価法としての妥当性が確認された。

MBA と機器分析法による分析結果は、高い相関が認められ、リスク管理のための毒性調査に機器分析が有用と考えられた。

謝辞

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

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 大城直雅, コモンフグ筋肉から検出されたテトロドキシンの由来. 第 113 回食品衛生学会, 東京江戸川区, 2017 年 11 月.
- 2) 長谷川晶子、柘植康、大城直雅, 愛知県産コモンフグの毒性分析調査. 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会, 奈良県奈良市, 2017.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 瀬戸内海産コモング筋肉の毒性

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

表 2 瀬戸内海産コモング皮の毒性

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

表 3 無毒個体（筋肉）の毒力

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

表 4 愛知県沿岸産コモング筋肉の毒性

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

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

表 5 愛知県沿岸産コモング皮の毒性

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

表 6 凍結融解試料（筋肉）の毒性(MU/g)

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

表 7 凍結融解試料（皮）の毒性(MU/g)

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

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

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

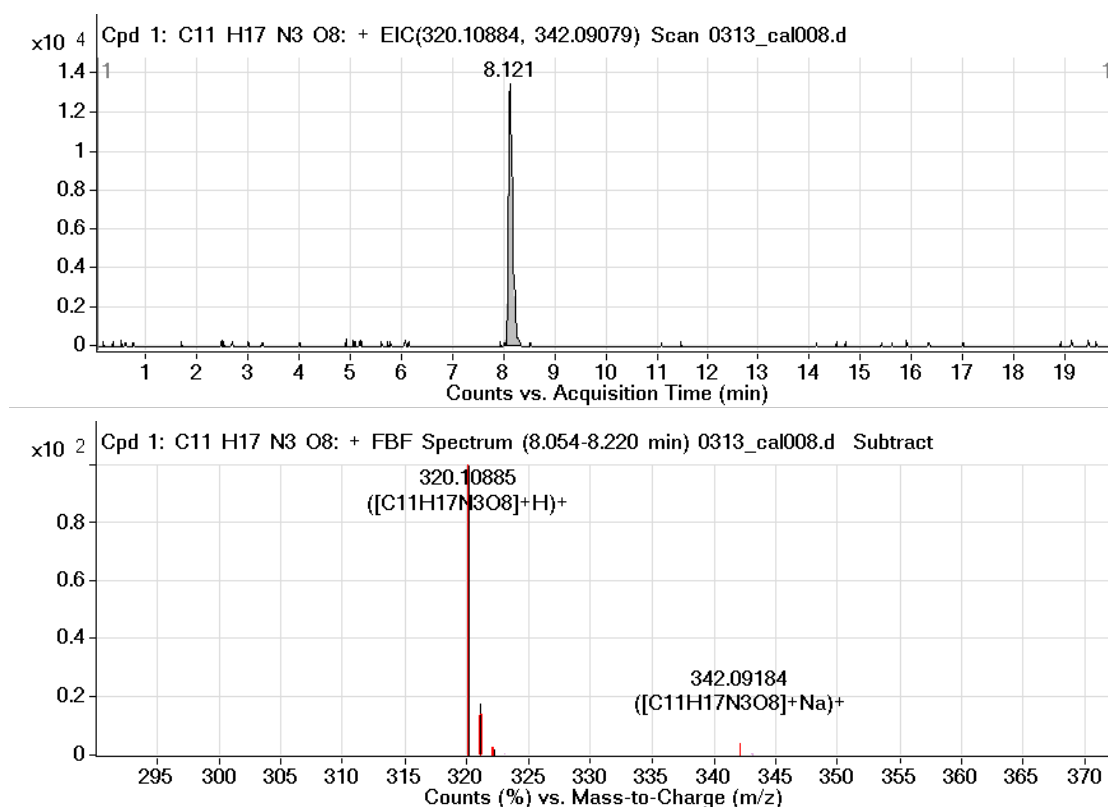


図3 TTX 標準溶液 (50ng/mL) の LC-QTOF/MS クロマトグラム (上) およびマススペクトル (下)

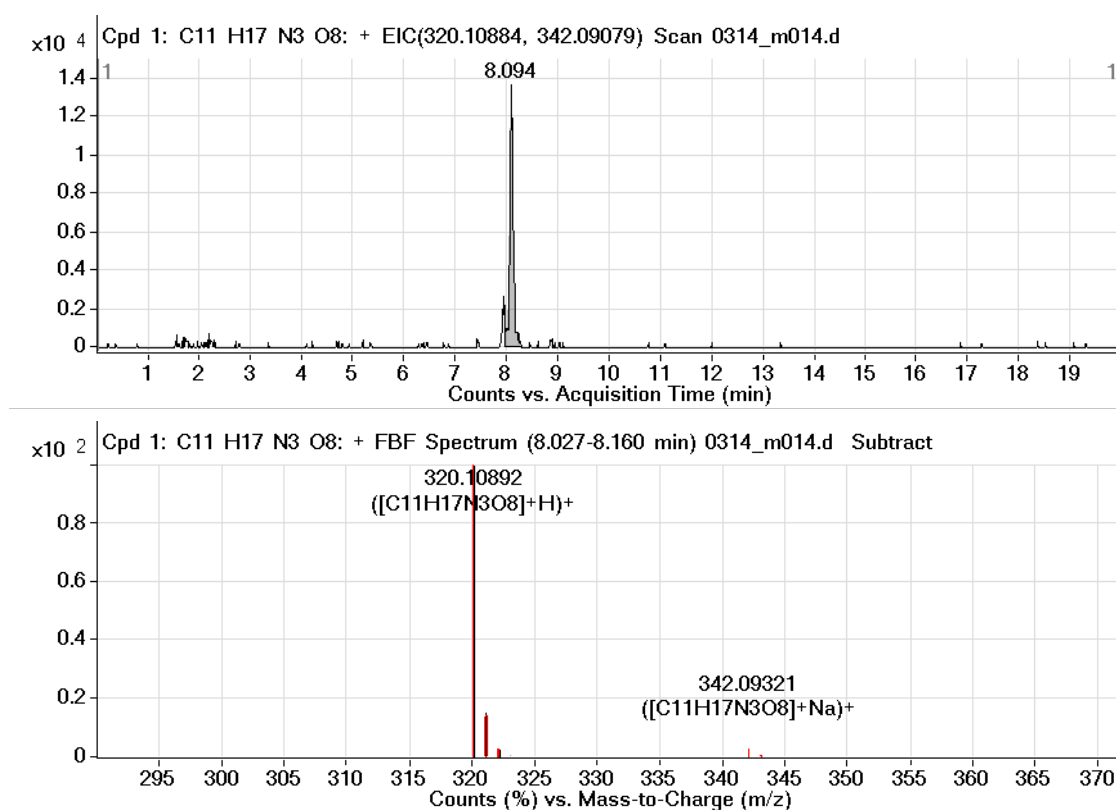


図4 筋肉試料溶液 (20161222-12) の LC-QTOF/MS クロマトグラム (上) およびマススペクトル (下)

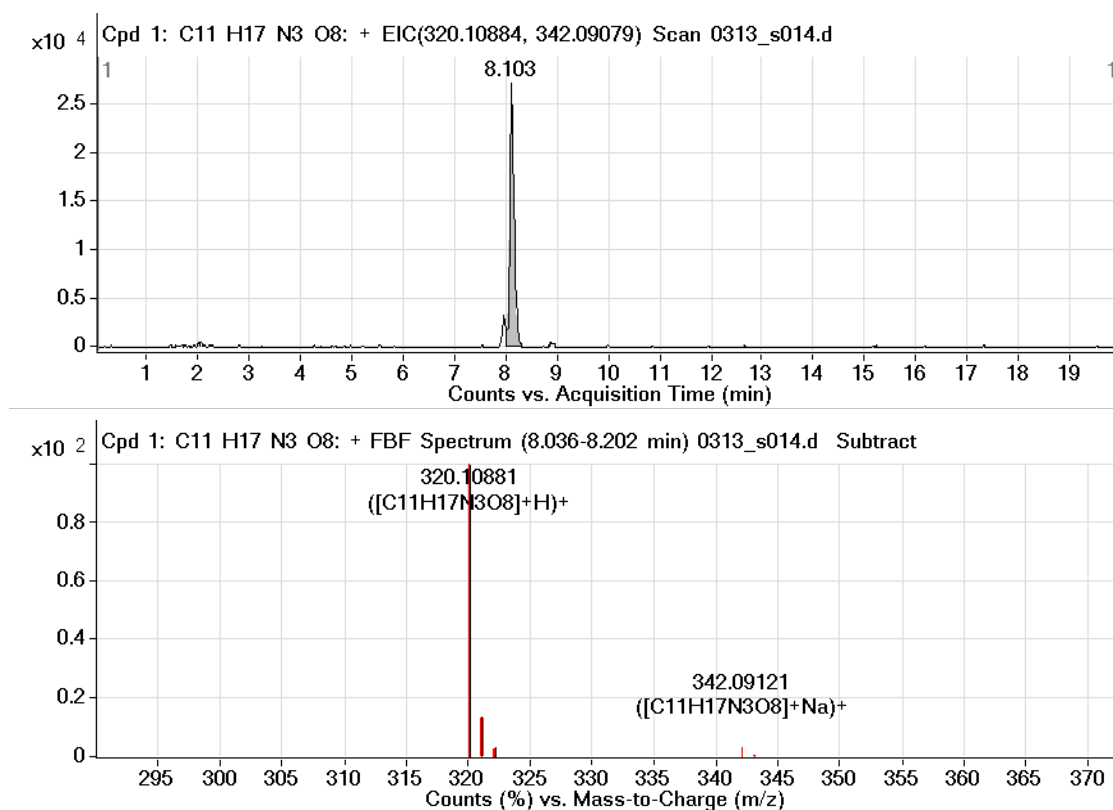


図5 皮試料溶液（20161222-12）のLC-QTOF/MSクロマトグラム（上）およびマススペクトル（下）

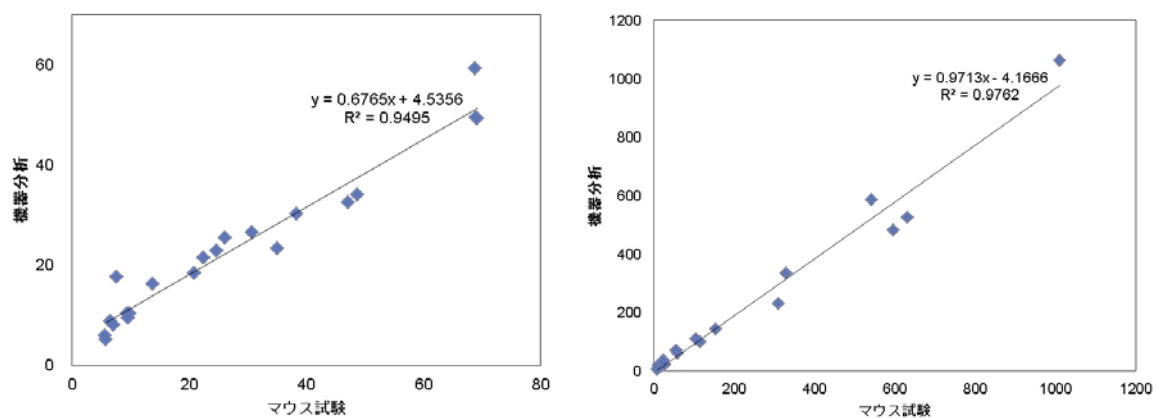


図6 マウス毒性試験法および機器分析法で得られた結果の相関（左：筋肉、右：皮）

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「マリントキシンのリスク管理に関する研究」

平成 29 年度分担研究報告書

フグの毒性評価と有毒巻貝の種判別

研究分担者 長島裕二 東京海洋大学 学術研究院 食品生産科学部門

研究要旨

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

A. 研究目的

食中毒を起こすフグ毒、シガテラ毒、貝毒等のマリントキシンは、ヒトの健康危害因子として重要である。中でもフグ食中毒は、わが国の魚貝類による自然毒食中毒で最も多く発生し致死率が高いため、食品衛生上極めて重大な問題である。このため、厚生労働省通知で食用可能なフグの種類、部位、漁獲海域を定め、都道府県条例等でフグ取り扱いの施設と人を制限してリスク管理しているが、近年、熱帯・亜熱帯海域に生息するドクサバフグの日本沿岸での出現と食中毒の発生、フグの高毒性化、自然交雑種の頻出など新たな問題も指摘されている。さらに、水産物や水産加工品へのフグ稚仔魚や幼魚の混入も問題となっている。また、巻貝キンシバイによるフグ毒中毒も発生し、フグによる食中毒とフグ毒による中毒に対するリスク管理を強化、見直す必要がある。巻貝に関しては、麻痺性貝毒による毒化やテトラミン中毒も食品安全確保に対するリスクとなっている。しかし、巻貝は外観などの形態分類が難しい上、むき身として調理加工された場合には判別が不可能で、食中毒の原因食品が特定できない。

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

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

B. 研究方法：

1) フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性評価

2014 年 12 月から 2017 年 10 月に日本沿岸（静岡県、愛知県、大阪府、兵庫県、香川県、愛媛県、高知県、広島県、山口県、大分県、宮崎県、鹿児島県）で水揚げ、製造されたしらす加工品に混入し、現地加工場等において外観からフグと推定された稚魚を試料とした。同一の加工場等で同じ日に処理されたものを 1 つのロットとした。

しらす加工業者があらかじめ選別したフグ稚魚試料

を観察して、体色を含む外部形態に基づき分類した。ロット毎に、形態分類で同一種と判断されたフグ稚魚から1個体ずつ選抜し、種判別を行った。フグ稚魚の種判別は、厚生労働省医薬食品局食品安全部の「魚類乾製品等のフグ混入検査について」（平成20年）および「輸入魚類加工品のフグ種鑑別検査法について」（平成23年）に従った。すなわち、各ロットから1個体を選び、合計71個体の筋肉（約15mg）から全ゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型として、ミトコンドリアDNAの16S rRNA領域を増幅するプライマーまたはシトクロム *b* 領域を増幅するプライマーおよび TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ（タカラバイオ）を用いてPCR増幅を行った。PCR産物塩基配列をDNAシーケンサーで解析した。解析した塩基配列を nucleotide BLAST または当研究室で構築したデータベースと比較して、種を決定した。

TTXの定量には、上記の種判別と同ロットに含まれる試料を用い、形態分類で同一種と判断されたフグ稚魚を複数個体合一して、TTX分析用試料とした。TTXの抽出は、食品衛生検査指針 理化学編に記載の方法に準じた酢酸加熱法で行った。試料は乾燥品であるため、酢酸添加後、室温で30分間静置し、15分間超音波処理した後、沸騰水浴中で10分間加熱した。冷却後、遠心分離して得られた上清を遠心限外ろ過（分画分子量3000）し、ろ液をTTX定量用試料とした。TTXの定量はLC-MS/MS法で行った。

2) 有毒巻貝種判別法の開発

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

巻貝の種判別に適するミトコンドリアDNA 16S rRNA部分領域を選別し、本領域（約300bp）を特異的に増幅するPCR条件を検討した。生鮮品のみならず加工品についても種判別が可能であったが、レトルトまたは缶詰加工された巻貝では、加熱処理によってDNAが断片化され、PCR増幅できないことがあった。そのため、短縮した16S rRNA部分領域（約150bp）でPCR増幅を試みた。今年度は、本法の実用性を確かめるため市販の巻貝加工品29品目について、PCRと塩基配列解析を行い、種判別を実施した。この他、わが国でフグ毒中毒を起こしたボウシュウボラは、ミトコンドリアDNA 16S rRNAの遺伝子配

列がデータベースに登録されていないため、16S rRNAの全塩基配列を解析した。

巻貝加工品の種判別については、各試料の筋肉から全ゲノムDNAを抽出し、それを鋳型にして、昨年度作製した巻貝加工品に利用できる特異的プライマーとEx Taqポリメラーゼ（タカラバイオ）を用いてPCR増幅を行った。得られた増幅産物を1.2%アガロースゲル電気泳動に付し、目的のバンドを切り出し、それを遺伝子抽出カラムで精製して、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を解析した。

ボウシュウボラのミトコンドリアDNA 16S rRNAの遺伝子配列については、筋肉から全ゲノムDNAを抽出し、それを鋳型にして、NCBIのデータベースから、巻貝のミトコンドリアDNAの12S rRNAおよびNADH1を含む領域の保存性が高い部分でプライマーを設計し、PCR増幅を行った。アガロース電気泳動でPCR産物を確認し、サブクローニングを行い、塩基配列の解析を行った。

C. 研究成果：

1) フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性評価

① 魚種判別

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

② 毒性試験

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

2) 有毒巻貝種判別法の開発

① 加工品の種判別

今回調べた巻貝加工品 29 種すべてで目的とする PCR 産物 (約 150 bp) の増幅がみられた。生鮮品用のプライマーでは PCR 増幅しなかった試料 5 品目のうち、2 つはヨーロッパエゾバイと 100% (146/146 bp) および 98.0% (144/147 bp) の相同性を示し、2 つはアヤボラとの相同性とそれぞれ 99.3% (145/146 bp)、95.6% (130/136 bp) であった。アヤボラの後者は、相同性が低いと、他種である可能性が考えられる。残りの 1 つはエゾボラモドキおよびエゾボラと 100% (146/146 bp) 一致した。エゾボラモドキとエゾボラは当該領域の塩基配列が同じであるため、この領域ではどちらの種か区別することはできない。

② ボウシュウボラのトコンドリア DNA 16S rRNA の遺伝子配列

16S rRNA を含む周辺領域 1916 bp を解析した。この結果をデータベースに登録されているフジツガイ科アヤボラおよびカコボラと塩基配列を比較したところ、各々相同性は 84.6% および 80.8% であった。

D. 考察

1) フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性評価

2015 年度および 2016 年度の調査により、日本沿岸で水揚げ、製造されたしらす加工品に混入したフグ稚魚は、ほとんどがシロサバフグであったが、コモンフグ、シマフグ、ナシフグ、ヒガンフグの稚魚も混入していることが明らかになり、ロットによっては複数のフグ種が混在していた。毒性に関しては、1 試料だけ 0.056 μg TTX/g が検出され、それ以外の試料では、TTX は検出されなかった (0.01 μg TTX/g 未満 TTX/g)。

今回、調査対象地域を広げ、試料数を増やした結果、新たにクサフグとトラフグの稚魚が確認され、さまざまな種のフグがしらす加工品に混入していることが明らかになった。しかし、漁獲の時期や場所による特徴は見受けられなかった。

毒性においては、一部 TTX 含量が高いものがあり、69 検体中 3 検体でフグの食用規制値 (10 MU/g、2.2 μg TTX/g 相当) を超える TTX が検出された。しかしながら、しらす加工品に混入するフグ稚魚の割合は極めて低く、摂取するフグ稚魚由来の TTX 量は少ない。一例を示すと、今回調べた中で、最も混入率が高かったもので、しらす水揚げ物 140 kg からフグ稚魚 35 匹 (468 mg)

が混入していた。これに最大 TTX 含量 (3.32 μg TTX/g) を乗じると TTX 量は 1.6 μg となる。ヒトのフグ毒中毒量は不明だが、推定致死量は約 2 mg とされているので、仮にこのフグ稚魚すべてを一度に喫食しても、TTX 量は微量であり中毒症状は起こらないといえる。

2) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝の種判別については、本研究で確立した PCR 条件を用いれば、加工品でも種判別が可能であることが明らかになった。ただし、加工品を対象とした遺伝子領域は約 150 bp と短いため、この領域内の塩基配列は種によっては同一あるいは酷似していることがあり、「シライトマキバイ、クビレバイ、ヒモマキバイ」、「エゾボラモドキ、エゾボラ」、「エチュウバイ、アニワバイ」はそれぞれカッコ内の貝の種が判別できない。

E. 結論

2014 年に社会問題になったしらす加工品へのフグ稚魚の混入に関して、リスク評価に必要な基礎データを集積するため、しらす加工品に混入したフグ稚魚の種と毒性を調べた。今回集めた 71 検体のうち、多くはシロサバフグであったが、成魚が有毒種であるクサフグ、コモンフグ、シマフグ、ショウサイフグ、トラフグ、ナシフグ稚魚の混入もみられた。これら有毒フグ種の一部の試料では TTX が検出され、3 検体でフグの食用規制値 (10 MU/g、2.2 μg TTX/g 相当) を超える TTX が検出されたが、しらす加工品への混入率と摂取量を考え合わせると、フグ稚魚が混入したしらす加工品を食べた場合、健康被害への影響はないと考えられた。

わが国では、毎年巻貝による自然毒食中毒が起きているので、遺伝子による有毒巻貝の種判別法の開発が望まれている。ミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域を対象にした PCR を行い、ダイレクトシーケンス法による種判別を行ったところ、テトラミン中毒だけでなくフグ毒中毒のおそれのある巻貝の種判別が可能になった。しかし、一部の巻貝ではターゲットとした領域の塩基配列が完全に一致しているため、判別不能のものもあり、別の遺伝子領域を検討する必要がある。さらに、重篤なフグ毒中毒を引き起こした有毒巻貝のボウシュウボラについては、ミトコンドリア DNA 16S rRNA の遺伝子配列が登録されていないので、この全塩基配列を決定し

た。これにより、今後はボウシュウボラの種判別を正確に行うことができる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) X. Yin, A. Kiriake, A. Ohta, Y. Kitani, S. Ishizaki, Y. Nagashima: A novel function of vitellogenin subdomain, vWF type D, as a toxin-binding protein in the pufferfish *Takifugu pardalis* ovary. *Toxicon* 2017; 136: 56-66.
- 2) T. Matsumoto, Y. Ishizaki, K. Mochizuki, M. Aoyagi, Y. Mitoma, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Urinary excretion of tetrodotoxin modeled in a porcine renal proximal tubule epithelial cell line, LLC-PK1. *Mar. Drugs* 2017; 15: Doi: 10.3390/md15070225.
- 3) Y. Nagashima, A. Ohta, X. Yin, S. Ishizaki, T. Matsumoto, H. Doi, T. Ishibashi: Difference in uptake of tetrodotoxin and saxitoxins into liver tissue slices among pufferfish, boxfish and porcupinefish. *Mar. Drugs* 2018; 15: Doi: 10.3390/md16010017

2. 学会発表

- 1) 土井啓行, 岡山桜子, 徐 超香, 長島裕二: 日本海西部沿岸より採取されたカニ類の毒性. 日本海甲殻類研究会第 16 回発表会, 福井県福井市, 平成 29 年 5 月.
- 2) 長島裕二: フグの毒とフグ食の安全性. ジャパン・インターナショナル・シーフードショウ 国際ふぐ協会セミナー, 東京都江東区, 平成 29 年 8 月.
- 3) R. Ohki, T. Matsumoto, S. Ishizaki, Y. Nagashima: *In vitro* uptake of tetrodotoxin into marine gastropods by tissue culture. 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム, 東京都港区, 平成 29 年 9 月.
- 4) S. Yokozuka, Y. Kitani, N. Suzuki, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Bio-transformation of paralytic shellfish toxin by the hemolymph of shore crab *Gaetice*

depressus. 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム, 東京都港区, 平成 29 年 9 月.

- 5) T. Matsumoto, Y. Ishizaki, K. Mochizuki, M. Aoyagi, Y. Mitoma, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Carrier-mediated transport of tetrodotoxin in porcine renal proximal tubule epithelial cell line LLC-PK1 monolayer. 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム, 東京都港区, 平成 29 年 9 月.
- 6) 大木理恵子, 園山貴之, 石橋敏章, 石崎松一郎, 長島裕二: ボウシュウボラおよびキンシバイによるフグ毒中毒リスク評価. 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会, 東京都江東区, 平成 29 年 10 月.
- 7) 長島裕二: 魚貝類の毒 マリントキシン. 平成 29 年度第 1 回愛知県衛生研究所技術研修会. 愛知県名古屋市長, 平成 29 年 11 月.
- 8) 辰野竜平, 梅枝真人, 宮田祐実, 出口梨々子, 福田翼, 古下 学, 高橋 洋, 長島裕二: 熊野灘産ムシフグの毒性. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 30 年 3 月.
- 9) 大木理恵子, 松本拓也, 石崎松一郎, 長島裕二: 組織培養法による巻貝のテトロドトキシン取り込みと排出. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 30 年 3 月.
- 10) 横塚峻介, 木谷洋一郎, 鈴木信雄, 林 華娟, 石崎松一郎, 長島裕二: ヒライソガニ体液に含まれる麻痺性貝毒変換物質の性状解明. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 30 年 3 月.
- 11) 松本拓也, 高橋晶子, 青柳 充, 大竹才人, 三苫好治, 石崎松一郎, 長島裕二: トラフグのカルニチントランスポーターoctn2 をコードする slc22a5 遺伝子のクローニング. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 30 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「フグ等の安全性確保に関する総括的研究」

平成 29 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交雑種における両親種判別法の開発を検討した。今年度は、まずトラフグとマフグ間の交雑種に焦点を絞り、人工交雑種（トラマおよびマトラ）計 11 個体、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体を用い、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、トラフグおよびマフグの 2 種を明確に区別しうる核 DNA マイクロサテライト（MS）マーカーの選抜を行った。その後、マイクロサテライトマーカーを併用したより正確な両親種の判別を目指し、判別に適用可能な MS マーカーにおける PCR 産物の塩基配列解析に基づく MS の反復回数を決定した。

A. 研究目的

今年度は、長崎大学水産学部荒川修教授、高谷智裕教授、水産総合研究センター柳本卓博士から分与された父系および母系系統が既知のトラフグおよびマフグ間の人工交配フグ種を対象に、それらの筋肉もしくは鰭から抽出・精製した全ゲノム DNA を用いて、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 解析による母系魚種の同定および各種核 DNA マイクロサテライトマーカー解析による父系魚種の同定を試みた。

B. 研究方法

1) フグ類の分類に関する研究

試料には長崎大学から分与された人工交配フグ種（トラフグ（♀）×マフグ（♂）3 個体およびトラフグ（♂）×マフグ（♀）3 個体）、水産総合研究センターから分与された人工交配フグ種（トラフグ（♂）×マフグ（♀）5 個体）ならびに、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体を用いた。これらの筋肉もしくは鰭から DNA 組織キット S および QuickGene-810（ともに和光純薬工業㈱製）を用いて全ゲノム DNA を抽出・精製した。つぎに、全ゲノム DNA を用いて mtDNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域の各々約 620bp、390bp を含む部分領域を PCR 増幅した。PCR 増幅に用

いたプライマーセットを表 1 に示した。PCR 増幅には TaKaRa Ex Taq DNA ポリメラーゼを用い、PCR 反応液は、0.2mL PCR チューブ中に精製した鋳型 DNA 50ng、10×緩衝液（TaKaRa）5.0μL、2.5mM dNTP mix 4.0μL、10μM 各プライマー 1.0μL、TaKaRa Ex Taq DNA ポリメラーゼ 0.25μL を加えた後、全量が 50μL 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。

つぎに、トラフグおよびマフグにおいて種特異的なマイクロサテライトマーカーを探索することを目的に、両親種が既知である人工交雑種および単一系統と推定されたトラフグ、マフグを対象に、計 8 個のマイクロサテライト領域を標的として PCR を行い、トラフグおよびマフグの 2 種を明確に区別しうるマイクロサテライトの選抜を行った。その後、判別に適用可能な MS マーカー

における PCR 産物の塩基配列解析に基づく MS の反復回数を決定した。

C. 研究結果

1) フグ類の分類に関する研究

今回人工交配フグ種トラマ (トラフグ (♀) × マフグ (♂)) 3 個体およびマトラ (トラフグ (♂) × マフグ (♀)) 8 個体ならびに、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体につき、mtDNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域の塩基配列に基づいて母系種の同定を行った結果、トラマおよびマトラはともにすべての個体で交配通りに母系種を同定することができた (表 2)。形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体においても、母系種を同定することが可能であった (表 2)。したがって、mtDNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 部分塩基配列はフグ種における母系種判別に有効であることが明らかになった。

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 CATC 反復配列、GCA 反復配列、AGC 反復配列、AATC 反復配列であったが、GCA 反復配列の解析においてのみ、トラフグおよびマフグ間で電気泳動距離が異なる反復配列を示すことが認められた (図 1)。泳動距離から推定される PCR 産物の分子量は、トラフグおよびマフグでおよそ 370bp および 270bp であった (図 1 中の Torafugu, Mafugu)。そこで、人工交配フグ種を対象に、GCA 反復回数の普遍性を確認したところ、両親種 (トラフグとマフグ) の分子量の各位置にバンドが見られたことから、反復回数 6 回がマフグ由来、33~34 回がトラフグ由来であると推測された (表 3)。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、トラフグおよびマフグ間に焦点を絞り、mtDNA 解析法による母系種の同定および GCA 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 GCA 反復配列の回数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、人工交配種において、トラフグ由来の 344-347 bp (反復回数 33-34 回) およびマフグ由来の 262 bp (反復回数 6 回) 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トラフグおよびマフグで上述した分子量に近い PCR 産物が得られた (図 1 中の Torafugu, Mafugu)。本マイクロサテライトマーカーはトラフグおよびマフグにおいて有効であると考えられる。今後は、他のトラフグ属あるいはサバフグ属においても GCA がマーカーとして有効であるかどうかやトラフグおよびマフグにおける GCA の再現性を確認する必要がある。

E. 結論

1) フグ類の分類に関する研究

交雑フグ種の親種判別に関しては、外部形態のみで両親種を判別することには注意が必要であり、遺伝子による判別法を併用して慎重に判定する必要がある。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、GCA 反復配列から推定できる可能性が示唆された。しかしながら、現在マイクロサテライトの反復回数は未決定の個体が多いため、本 GCA 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、例えばショウサイフグ、コモンフグ、ゴマフグなどからなる交雑種に本 GCA 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

なし

2. 著書・総説

なし

3. 学会発表

1) N. Koyama, M. Usui, S. Ishizaki, T. Yanagimoto, Y.

Nagashima: Species identification of hybrid pufferfish between *Takifugu rubripes* and *Takifugu porphyreus*. International Symposium on Pufferfish in Bodrum, Turkey, 2017. 13-14 October, 2017.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 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2 人工交雑種および単一系統種の母系種判別結果

Sample	16S rRNA		cyt <i>b</i>	
	Species	Identify (bp)	Species	Identify (bp)
Torama	1 Torafugu	516/516	Torafugu , Karasu	396/396
	2 Torafugu	457/457	Torafugu , Karasu	392/392
	3 Torafugu	522/522	Torafugu , Karasu	388/388
Matora	1 Mafugu , Mefugu	502/503	Mafugu	408/408
	2 Mafugu , Mefugu	500/501	Mafugu	404/404
	3 Mafugu , Mefugu	502/503	Mafugu	405/405
	4 Mafugu , Mefugu	460/461	Mafugu	401/401
	5 Mafugu , Mefugu	499/500	Mafugu	401/401
	6 Mafugu , Mefugu	505/506	Mafugu	406/406
	7 Mafugu , Mefugu	501/503	Mafugu	412/412
	8 Mafugu , Mefugu	500/501	Mafugu	407/407
Torafugu	1 Torafugu	511/511	Torafugu , Karasu	410/411
	2 Torafugu	521/521	Torafugu , Karasu	418/418
	3 Torafugu	500/500	Torafugu , Karasu	390/390
	4 Torafugu	495/495	Torafugu , Karasu	390/392
Mafugu	1 Mafugu , Mefugu	434/434	Mafugu	343/343
	2 Mafugu , Mefugu	479/479	Mafugu	372/373
	3 Mafugu , Mefugu	498/499	Mafugu	400/400
	4 Mafugu , Mefugu	508/508	Mafugu	412/413

表 3 人工交雑種におけるマイクロサテライト解析結果

Sample		GCA repeat	Molecular weight (bp)
Torama	1	6/-	262/-
Matora	1	6/-	262/-
	3	-/34	-/347
	4	6/33	262/344

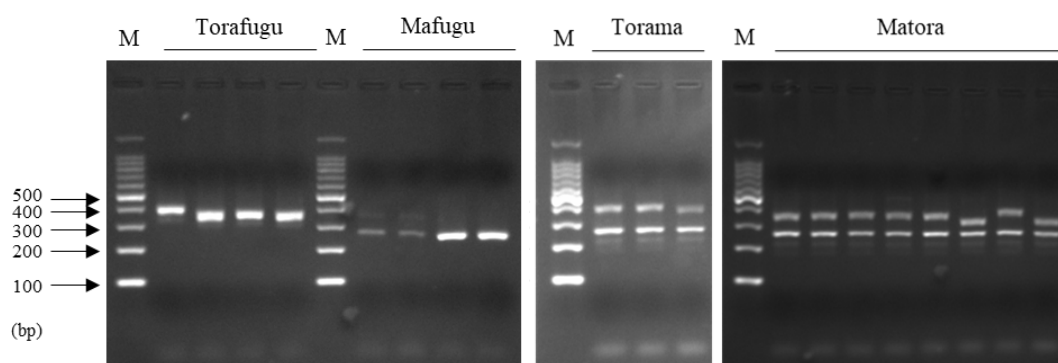


図 1 トラフグ、マフグおよび人工交雑種の GCA 反復配列における泳動パターン

M; マーカ、Torafugu; 単一系統トラフグ, Mafugu; 単一系統マフグ, Torama; トラフグー
マフグ間人工交雑種 (トラ (♀) × マ (♂)), Matora; トラフグーマフグ間人工交雑種 (ト
ラ (♂) × マ (♀))

「マリントキシンのリスク管理に関する研究」

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、日本産フグ類の同定ガイドを作成することに重点を置いて研究を進めた。そのため、日本周辺から採集されたフグ類の標本を国立科学博物館、北海道大学総合博物館およびしものせき水族館において調査した。

本研究によって、日本沿岸にはフグ亜目（広義のフグ類）に属する 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。この中で水産重要種と有毒種を含むのはフグ科（狭義のフグ類）である。そこで、フグ科の種に焦点を絞って同定ガイドを作成した。同定ガイドでは多くのカラー写真を使用して、各種の特徴を分かりやすく示し、魚類分類学の専門家でなくてもフグ類の同定ができるように配慮した。

本研究を推進する過程で、日本から正式な報告がなかったフグ科の *Tylerius spinosissimus* の 7 個体の標本（沖縄島から採集）を調査する機会を得た。これらの標本の形態的特徴を詳細に調査して、日本産フグ科の他種との識別点を明らかにした。

A. 研究目的

フグ科魚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。既往の論文や図鑑にフグ類の特徴は述べられているが、各種の識別的特徴が分かりやすく示されていない。このためフグ類の分類は魚類分類学の専門家にとっても容易なことではない。したがって、市場関係者や食品衛生関係者にとってフグ類の分類は極めて難しいことが多い。

今年度は日本産フグ類の同定に資するため「日本産フグ類の同定ガイド」を作成することを主目的として研究を行う。なお、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。

沖縄島の中城沿岸からこれまで日本から正式な報告がなかった *Tylerius spinosissimus* と思われ

るフグが採集されたため、このフグの分類学的研究を進め、形態的特徴を明らかにする。

B. 研究方法

自然史系博物館や大学に保管されているフグ類の標本を調査するとともに魚類研究者の協力を得て新たに標本を入手した。今年度は国立科学博物館、北海道大学総合博物館およびしものせき水族館においてフグ類の標本を調査した。*Tylerius spinosissimus* については、沖縄美ら島財団総合研究センターから標本を借用して調査した。

また、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た後、70%アルコールに保存して、形態学的調査を行った。

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

C. 研究結果

1) 日本産フグ亜目（広義のフグ類）の分類

日本沿岸には4科14属61種類のフグ亜目魚類（広義のフグ類）が分布するが、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）。以下に科の特徴と属の特徴を簡潔に述べる。

ウチワフグ科はウチワフグのみから構成される。本科は上顎に2枚の歯板と下顎に1枚の歯板をもち、腰骨をもつことでフグ亜目の他の科から区別される。ウチワフグはインド・西太平洋の熱帯域に広く分布し、100m以深に生息する。

フグ科は上顎と下顎にそれぞれ2枚（合計4枚）の歯板をもつこと、腹鰭を欠き、消化管に膨脹囊をもつことで他のフグ亜目魚類から区別される。フグ科には7属が含まれるが、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。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。体色には個体変異が見られるが、種ごとに一定のパターンが見られるため、種の分類形質として極めて重要であることが判明した。

日本産フグ科魚類の中で食用として扱われているのはトラフグ属、サバフグ属およびヨリトフグ属の種である。トラフグ属は鼻器に二つの開口部をもつこと、体側腹縁に縦走する皮褶があること、そして、体側に銀白色の縦帯がないことによって、フグ科の他属から識別される。サバフグ属は鼻器に二つの開口部をもつこと、体側腹縁に縦走する皮褶があること、そして、体側に明瞭な銀白色の縦帯をもつことによって他のフグ科魚類から識別される。ヨリトフグ属の多くの種は大西洋と東部太平洋に分布し、日本にはヨリトフグのみが出現する。ヨリトフグは他の日本産フグ類から体表に小棘を欠くこと、背鰭条数が8-9と少ないこと、臀軟条数も7-9と少ないことによって識別される。

食用として扱われていない種を含むのは、オキナワフグ属、キタマクラ属、シッポウフグ属およびモヨウフグ属である。これらの属は側線の数や走り方、下顎の形態、鼻器の形態などの特徴によ

って他の日本産フグ類から識別される。

ハリセンボン科は体表に強大な棘をもつことでフグ亜目の他の科から識別される。ハリセンボン科にはイシガキフグ属、メイトイシガキフグ属およびハリセンボン属の3属が含まれるが、各属は棘の形態と分布状態によって識別される。イシガキフグ属とメイトイシガキフグの棘は短くて立てることができないが、ハリセンボン属の棘は長く立てることができる。イシガキフグ属の尾柄背面には小棘が1本あるが、メイトイシガキフグ属には小棘がない。それぞれの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、体表面や鰭の小黒色点の分布状態などを挙げるができる。

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。ヤリマンボウ属は体形が細長く、舵鰭の後端が直線状であるが、マンボウ属とヤリマンボウ属では体が楕円形で舵鰭の後端は円い。ヤリマンボウ属では舵鰭の中央部が後方に突出するが、マンボウ属では突出せず、円い。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。日本にはマンボウとウシマンボウが分布することが明らかになった。

2) 日本産フグ類の同定ガイド

魚市場や食品衛生の現場でフグ類を扱う人達にとってフグ類を同定することは容易なことではない。多くのフグ類の体形は似ており、しかも他の多くの魚類の分類で使用されている分類学的特徴（鰭条数や鱗数など）がフグ類では使えない。このため、フグ類の分類は極めて難しい。ところが、既往の図鑑を見てみると、フグ類の特徴についても、他の多くの魚類と同じ扱いとなっている。したがって、現場でフグ類を同定しようとすると、既往の出版物は実際には使い物にならない場合が多い。

このような点を考慮して、日本産フグ類の中で食用として扱われているトラフグ属やサバフグ属に重点を置いて、各種の写真や図を多用し、種の識別点を明示するとともに、分類に役立つ情報を解説文に収録した。そして、識別が特に難しい近似種については、種の識別形質となる色彩パターンや斑紋の状態を明瞭に示した拡大図を作成した（図1）。

3) 沖縄から得られた *Tylerius spinosissimus*

沖縄島南東部の中城から得られた7個体の

Tylerius spinosissimus (Regan, 1908)を調査した。本種はインド洋西部や西太平洋の熱帯域から知られていたが、採集例は多くなかった。そこで、沖縄から得られた標本と南シナ海から採集された標本を比較検討して、本種の特徴を詳細に検討した。その結果、本種は他の日本産フグ類から以下の特徴によって識別できることが明らかになった。本種の体の横断面はやや角張り（他種では円い）、体表面に発達した小棘が密に分布する（他種では小棘が極めて小さいか、小棘を欠く）（図2, 3）。

D. 考察

フグ科魚類はフグ目の中で最も種の多様性が高く、全世界に約 190 種が生息している。日本沿岸にも 49 種が分布していることが明らかになり、日本産フグ類の中でも飛び抜けて多様性が高いことが判明した。フグ科魚類には未知種が多く存在することが推測されているが、報告者によって日本沿岸からも近年、3 新種が発見され、記載された。今年度の研究においても新種ではないが、日本から正式に報告されていなかった *Tylerius spinosissimus* (Regan, 1908)が沖縄島に分布することが明らかになった。このようにフグ科魚類には依然として未知種や日本未記録種がいる可能性が高いため、今後も引き続き分類学的調査を継続する必要がある。

フグ科魚類は日本をはじめとして世界各地で分類の難しい分類群として悪名が高い。フグ科魚類は他の多くの魚類と異なり、分類学的特徴に乏しいため、種の識別が困難である。そのため同定に役立つ適切な出版物がほとんどない。フグ科魚類の分類に最も役立つ特徴は色彩であるが、フグ類に馴染みのない研究者や一般の人達（市場関係者や食品衛生関係者を含む）にとっては、フグ類の体色のどの部分が種を識別する有用な特徴となるかを判断するのは困難である。

そこで、写真と図を主にした「日本産フグ類同定ガイド」を作成した。この同定ガイドでは、分類学的な専門用語の使用を極力少なくして、各種の特徴を簡潔に解説した。また、特に識別が困難な種については、識別点となる部分の拡大図を作成し、魚市場などの現場で速やかにフグ類を同定できるようにした。このフグ類同定ガイドを食品衛生関係者に閲覧してもらい、意見を求めたところ、好評であり、改善するためのコメントが寄せ

られた。これらの意見に基づいて、改訂版を作成したので、報告書に添付する。

沖縄島から得られた *Tylerius spinosissimus* は浅海性の体長 8cm 以下の小型のフグである。これまでに南シナ海北部で採集されたことはあったが、日本から正式に報告されたことはなかった。本種の体表には発達した小棘が分布しているため、日本産フグ類の他種から容易に識別できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 松浦啓一:フグ類の学名はなぜ変わったのか? 日水誌 2017; 83: 718-721.
- 2) 松浦啓一:動物分類学の基礎－1. 食衛誌 2017; 58: J-111-J115.
- 3) 松浦啓一:動物分類学の基礎－2. 食衛誌 2018; 59 (印刷中) .

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

アカメフグとヒガンフグはよく似ているが、頬の模様を見れば区別できる。アカメフグの頬には暗褐色点がないが、ヒガンフグにはある。



左：アカメフグ;右：ヒガンフグ 写真：国立科学博物館魚類研究室

図1 「日本産フグ類同定ガイド」のサンプルページ。アカメフグとヒガンフグの識別点を示した部分。



図1 沖縄島から採集された *Tylerius spinosissimus*

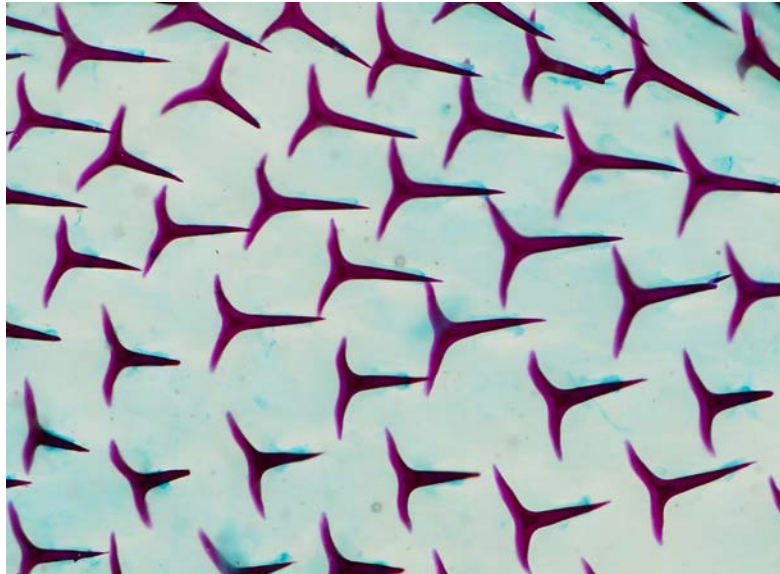


図 2 *Tylerius spinosissimus* の体表の小棘の拡大写真

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「マリントキシンのリスク管理に関する研究」

平成 29 年度分担研究報告書

デカルバモイルサキシトキシンによる麻痺性貝毒検査法の標準化

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
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	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
研究協力者	中谷 実	青森県環境保健センター
研究協力者	柴田めぐみ	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
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)とその関連成分の総称で、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。STX は「化学兵器禁止法」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。Codex 規格（CODEX STAN 234-1999）では、STX 群の化学分析法の性能基準が設定され、麻痺性貝毒の毒性評価法として、マウス毒性試験法（AOAC 959.08）とレセプターバインディング法（AOAC 2011.27）がタイプⅣとして示されている。いずれの方法も STX を比較標準物質として使用しているため、日本での導入は困難な状況にある。その代替標準毒として有望なデカルバモイルサキシトキシン（dcSTX）を大量調製し、わが国の麻痺性貝毒試験法の標準化について検討した。dcSTX の基準変換係数（Conversion Factor、CF 値）を求め、定期的にマウスに投与し、実施者によるばらつきを検討したところ、STX、dcSTX とも大きなばらつきは無く、安定した CF 値が得られた。また、AOAC 959.08 法と dcSTX により有毒試料を分析した結果、同等の値が得られ、dcSTX が STX の代替として有効であることが示された。

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。STX は「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。

Codex 規格（CODEX STAN 234-1999）では、STX 群の化学分析法の性能基準が設定され、麻

痺性貝毒の毒性評価法として、マウス毒性試験法（AOAC 959.08）とレセプターバインディング法（AOAC 2011.27）がタイプⅣとして示されている。いずれの方法も STX を比較標準物質として使用しているため、日本での導入は困難な状況にある。

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)。

また、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法が AOAC 959.08 の代替として使用可能か評価するために、同一施設、同一条件下で検討した。前年度は実施者を 1 名としたが、今年度は実施者 4 名で行った。

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) 試料

dcSTX は、(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 (以下、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、群の中に 19 g 未満のマウスがいる場合はその群すべて体重補正を行った。21 g 以上のマウスは使用していない。

2) 基準 CF 値の比較

基準 CF 値とは通常試験をチェックする際の標準点となるもので、この値を用いて STX 換算値を算出する。AOAC 959.08 に準じて、STX および dcSTX について以下のようにして基準 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 3 mmol/L 塩酸を使用した。各濃

度について 10 匹のマウス群に 1 mL ずつ腹腔内投与し、体重・致死時間を測定し、その中央値から 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 (dcSTX の場合は STX 二塩酸塩に換算した濃度、以下 FDA-STX $\mu\text{g/mL}$) を、求めた毒力 (MU/mL) で割って CF 値 (dcSTX の場合は STX 二塩酸塩に換算した毒力、以下 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 匹のマウス群に投与し、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 匹のマウス群に投与し、同様に CF 値を求めた。

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。本試験は、昨年度と同一の投与者 1 名が実施した。

3) CF 値の変動確認

AOAC 959.08 ではマウス感受性変動等を確認するため、定期的に CF 値のチェックを行うこととなっている。それに準じて、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 5 匹のマウス群に投与した。

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) で割って CF 値 (FDA-STX $\mu\text{g/MU}$) を求め、その変動を確認した。

昨年度は 1 名で実施したが、今年度は投与者による変動を確認するため、昨年度と同一の投与者を含む 4 名で実施した。

4) 陽性管理試料の標準化毒値の比較

自家調製し値付けした陽性管理試料 (ホタテガイ有毒検体) 分析を 1 回/月分析し、その結果から求めた STX および dcSTX による基準 CF 値ならびに秦野研究所が実施している外部精度管理 (以下、外部精度管理法) における dcSTX を使用した基準 CF 値を掛けて STX 換算した標準化毒値を求め、値を比較した。

外部精度管理法における基準 CF 値は、秦野研究所のプロトコルに従い dcSTX により求めた。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 3 濃度調製した。①1 日で実施、②希釈液に水を使用、③各 10 匹のマウス群に投与し、計 30 匹から得られた 3 個の CF 値の平均値を基準 CF 値とする 3 点が当センターで実施している AOAC 959.08 と異なる点である。なお、実施日には STX についても 5 匹のマウス群に投与し CF 値を確認した。

陽性管理試料はホタテガイむき身全体の均質化試料であり、その 100 g に同量の 0.1 mol/L 塩酸を加え加熱抽出した上澄み液を試験原液とした。試験原液を 5 匹のマウス群に 1 mL ずつ腹腔内投与し、体重・致死時間を測定し、その中央値から Sommer の表を用いて溶液の毒力 (MU/mL) を求め、各基準 CF 値より STX 換算した標準化毒値を求めた。

C. 研究結果

1) 基準 CF 値の比較

STX および dcSTX で AOAC 959.08 に準じて基準 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、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。その結果、昨年度とほぼ同等の値であった。

2) 実施者の違いによる CF 値の変動

昨年度と同一の投与者を含む 4 名によるマウスアッセイから得られた CF 値の変動を表 2 に示す。dcSTX、STX とともに、平成 29 年 11 月および平成 30 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、表 1 に示した基準 CF 値より若干高い値となった。

また、STX を使用した AOAC 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。本年度は 4 名で実施したため手技によりばらつきが大きくなることは想定されたが、dcSTX の CF 値は、基準 CF 値の $\pm 20\%$ (0.140 ~ 0.210 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$) 範囲内に収まった。一方、STX の CF 値は 1 月実施時に 5 匹投与で基準 CF 値の $\pm 20\%$ (0.150 ~ 0.225 $\mu\text{g/MU}$) 範囲内に収まらず、新たに CF 値を決定することとなった。

3) 陽性管理試料の標準化毒値の比較

自家製の陽性管理試料 (STX による値付け値: 639 μg STX 当量/kg) を 1 回/月分析し、その結果と 3 つの基準 CF 値から求めた標準化毒値 (STX 換算値) を比較した結果を表 3 に示す。dcSTX による基準 CF 値は、両者とも 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 つの方法で dcSTX により求めた基準 CF 値は近い値であったことから、STX 換算した標準化毒値はほぼ同等であった。STX 基準 CF 値による標準化毒値と比較すると、ほぼ同等であったが dcSTX により求めた標準化毒値のほうが若干低い値を示した。なお、外部精度管理法のマウスアッセイにおいては、19 ~ 21 g についても体重補正を行ったが、補正の有無で結果に影響はなかった。

D. 考察

基準 CF 値と 1 回/週で 11 週間実施した CF 値の平均は、STX で 0.201 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$ (基準 CF 値の 1.07 倍: 変動範囲 94.7 % - 120.7 %)、dcSTX で 0.185 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$ (基準 CF 値の 1.06 倍: 変動範囲 90.9 % - 118.9 %) であり、ともに基準 CF 値より高い傾向となった。これは接種者が 4 名で実施していることも一因として考えられたが、その変動係数は STX で 7.8 %、dcSTX で 8.8 % であり、複数人で実施してもばらつき無く使用できることが示唆された。

また、dcSTX の AOAC OM 959.08 により求めた基準 CF 値と外部精度管理法により求めた基準 CF 値はほぼ同等の値であった。dcSTX の基準 CF 値による標準化毒値は、STX の基準 CF 値による標準化毒値と比べると若干低い傾向はあるもののその値は値付け値 (639 μg STX 当量/kg) の 86.4 % ~ 105.2 % の値であった。

E. 結論

AOAC 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。今年度は昨年度と同様の試験を 4 名で実施し、複数人の投与者によるばらつき幅を検討したが、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。

Codex 規格における麻痺性貝毒の許容量は 800 μg STX 当量/kg である。有毒検体である自家製陽性管理試料を分析した結果、dcSTX による試験法

は AOAC 959.08 と同等であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

中谷実・山本明美・工藤志保・増田幸保・木村淳子・大城直雅・鈴木達也・高坂典子（2017）麻痺性貝毒試験における代替標準品に係る比較試験. 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 AOAC 959.08 による STX と dcSTX の基準 CF 値比較（平成 29 年度）（投与者：A）

			STX				dcSTX			
溶液調製日	マウス 投与日		STX 濃度	中央 致死 時間	毒値の 中央値 (MU/mL)	CF 値 ($\mu\text{g}/\text{MU}$)	STX 換算濃度 (FDA-STX $\mu\text{g}/\text{mL}$)	中央 致死 時間	毒値の 中央値 (MU/mL)	CF 値 (FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$)
			($\mu\text{g}/\text{mL}$)							
2017/11/9	2017/11/9		0.312	5'48"	1.652	0.188	0.281	5'51"	1.636	0.171
2017/11/9	2017/11/9		0.322	5'25"	1.770	0.181	0.290	6'08"	1.568	0.184
2017/11/9	2017/11/10		0.312	5'33"	1.725	0.180	0.281	5'50"	1.640	0.171
2017/11/9	2017/11/10		0.322	5'59"	1.604	0.200	0.290	5'59"	1.604	0.180
2017/11/10	2017/11/10		0.312	5'28"	1.752	0.178	0.281	5'53"	1.628	0.172
2017/11/10	2017/11/10		0.322	6'00"	1.600	0.201	0.290	5'49"	1.646	0.176
基準 CF 値（CF 値の平均値）			($\mu\text{g}/\text{MU}$)				0.188			
							0.175			

表2 マウスアッセイによる CF 値の変動（平成 29 年度）（STX と dcSTX は同日投与）

			STX				dcSTX			
マウス 投与日	投 与 者		STX 濃度	中央 致死 時間	毒値の 中央値 (MU/mL)	CF 値 ($\mu\text{g}/\text{MU}$)	STX 換算濃度 (FDA-STX $\mu\text{g}/\text{mL}$)	中央 致死 時間	毒値の 中央値 (MU/mL)	CF 値 (FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$)
			($\mu\text{g}/\text{mL}$)							
1	2017/11/16	B	0.322	6'09"	1.564	0.205	0.290	6'14"	1.544	0.187
2	2018/1/11	C	0.312	5'43"	1.678	0.185	0.281	5'50"	1.640	0.171
3	2018/1/18	D	0.322		※	0.201	0.290	6'58"	1.395	0.207
4	2018/1/25	A	0.322	5'46"	1.664	0.193	0.281	6'46"	1.427	0.196
5	2018/2/1	C	0.322	5'32"	1.730	0.186	0.290	5'24"	1.776	0.163
6	2018/2/8	A	0.312	5'28"	1.752	0.178	0.290	5'57"	1.612	0.179
7	2018/2/15	D	0.312	6'47"	1.425	0.218	0.290	6'19"	1.524	0.190
8	2018/2/22	C	0.312	6'03"	1.588	0.196	0.281	6'20"	1.520	0.184
9	2018/3/1	A	0.312	7'06"	1.374	0.227	0.281	6'01"	1.596	0.176
10	2018/3/8	D	0.322	6'00"	1.600	0.201	0.281	7'17"	1.345	0.208
11	2018/3/15	C	0.322	6'00"	1.600	0.201	0.281	5'27"	1.758	0.159
12	2018/3/22	D	0.322	6'49"	1.419	0.226	0.281	6'51"	1.389	0.202
CF 値の平均値（ $\mu\text{g}/\text{MU}$ ）			0.201				0.185			
CF 値の標準偏差（ $\mu\text{g}/\text{MU}$ ）			0.016				0.016			
CF 値の室内変動（%）			7.8				8.8			
最小 CF 値（ $\mu\text{g}/\text{MU}$ ）			0.178				0.159			
最大 CF 値（ $\mu\text{g}/\text{MU}$ ）			0.227				0.208			

※5 匹投与で基準 CF 値の $\pm 20\%$ （0.150～0.225 $\mu\text{g}/\text{MU}$ ）範囲内に収まらず、AOAC 959.08 に従い CF 値を決定した。

表 3 各基準 CF 値から求めた STX 換算標準化毒値の比較

				AOAC 959.08						外部精度管理法	
				STX			dcSTX			dcSTX	
マウス 投与日	投 与 者	中央 致死 時間	毒値の 中央値 MU/mL	基準 CF 値	<参考> 当日 CF 値	標準化 毒値	基準 CF 値	<参考> 当日 CF 値	標準化 毒値	基準 CF 値	標準化 毒値
				μg/MU	μg/MU	STX μg /kg	FDA- STX μg/MU	FDA- STX μg/MU	FDA-STX μg /kg	FDA- STX μg/MU	FDA-STX μg/kg
2017/1/12	A	5'56"	1.616	0.185	0.172	597	0.171	0.198	552	0.180	581
2017/2/9	A	5'41"	1.686	0.185	0.187	623	0.171	0.167	576	0.180	606
2017/3/9	A	5'47"	1.658	0.185	0.221	613	0.171	0.171	567	0.180	596
2017/11/16	B	5'27"	1.758	0.188	0.205	661	0.175	0.187	615	0.173	608
2018/1/11	C	5'00"	1.920	0.188	0.185	721	0.175	0.171	672	0.173	664
2018/2/8	A	5'55"	1.620	0.201	0.178	651	0.175	0.179	567	0.173	560
2018/3/8	D	5'31"	1.735	0.201	0.201	697	0.175	0.208	607	0.173	600
標準化毒値の平均値 (STX μg/kg)				652			594			602	
標準化毒値の標準偏差 (STX μg/kg)				45			41			32	
標準化毒値の室内変動 (%)				6.9			7.0			5.3	
最小値 (μg/MU)				597			552			560	
最大値 (μg/MU)				721			672			664	

秦野研究所実施 外部精度管理

2016/10/20 実施 投与者：D 基準 CF 値：0.180 FDA-STXμg/MU (同日実施 STX の CF 値：0.185μg/MU)

2017/10/19 実施 投与者：C 基準 CF 値：0.173 FDA-STXμg/MU (同日実施 STX の CF 値：0.175μg/MU)

※標準化毒値は基準 CF 値を用いて算出した。当日の CF 値は参考として示した。

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	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

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
X Yin, A Kiriake, A Ohta, Y Kitani, S Ishizaki, Y Nagashima	A novel function of vitellogenin subdomain, vWF type D, as a toxin-binding protein in the pufferfish <i>Takifugu pardalis</i> ovary	Toxicon	136	56-66	2017
A Kiriake, S Ishizaki, Y Nagashima, K Shiomi	Occurrence of a stonefish-toxin-like toxin in the venom of the rabbitfish <i>Siganus fuscescens</i>	Toxicon	140	139-146	2017
T Matsumoto, Y Ishizaki, K Mochizuki, M Aoyagi, Y Mitoma, S Ishizaki, Y Nagashima	Urinary excretion of tetrodotoxin modeled in a porcine renal proximal tubule epithelial cell line, LLC-PK1	Mar. Drugs	15	Doi:10.3390/md15070225	2017
Y Nagashima, A Ohta, X Yin, S Ishizaki, T Matsumoto, H Doi, T Ishibashi	Difference in uptake of tetrodotoxin and saxitoxins into liver tissue slices among pufferfish, boxfish and porcupinefish	Mar. Drugs	17	Doi:10.3390/md16010017	2018
荒川修	フグの毒テトロドトキシン —保有生物やフグ食文化との興味深い関わり合い—	化学と教育	65	224-227	2017
O Arakawa, T Takatani, S Taniyama, R Tatsuno	Toxins of pufferfish - distribution, accumulation mechanism, and physiologic functions	Aqua-BioScience Monographs	10	41-80	2017
S Jiang, K Kuwano, GN Nishihara, C Urata, R Shimoda, T Takatani, O Arakawa	Uptake of nitrogen and production of kainic acid by laboratory culture of the red alga <i>Digenea simplex</i>	Phycol. Res.	66	68-75	2018
W Gao, Y Kanahara, R Tatsuno, K Soyano, GN Nishihara, C Urata, T Takatani, O Arakawa	Maturation-associated changes in internal distribution and intra-ovarian microdistribution of tetrodotoxin in the pufferfish <i>Takifugu pardalis</i>	Fish. Sci.		印刷中	2018

K Matsuura, TP Satoh	Redescription of <i>Lagocephalus cheesemanii</i> (Clarke, 1897), a senior synonym of <i>Lagocephalus gloveri</i> Abe and Tabeta, 1983 based on morphological and genetic comparisons (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae)	Ichthyological Research	64	104-110	2017
K Matsuura, A Kaneko, E Katayama	Underwater observations of the rare deep-sea fish <i>Triodon macropterus</i> (Actynopterygii, Tetraodontiformes, Triodontidae) with comments on the fine structure of the scales	Ichthyological Research	64	190-196	2017
K Matsuura, I Middleton	Discovery of a larva of the Aracanidae (Actinopterygii, Tetraodontiformes) from New Zealand	Ichthyological Research	64	151-154	2017
松浦啓一	フグ類の学名はなぜ変わったのか？	日本水産学会誌	83	718-721	2017
松浦啓一	動物分類学の基礎－ 1	食品衛生学雑誌	58	J-111-J115	2017
YV Dyldin, K Matsuura, AM Orlov, VI Romanov	New information about tetraodontiform fishes (Actinopterygii, Tetraodontiformes) of Sakhalin Island and adjacent waters	Proceedings of XVIII International Scientific Conference on Conservation of Biodiversity of Kamchatka and Coastal Waters, Petropavlovsk-Kamchatsky	Nov. 15-16, 2017	411-417	2017
池原強, 木下翼, 黒川純花, 中島志穂子, 前川公彦, 大城直雅, 安元健	タンパク質脱リン酸化酵素 2A (PP2A) を利用した下痢性貝毒簡易検査法の評価	日本水産学会誌	83(3)	367-372	2017
T Ikehara, K Kuniyoshi, N Oshiro, T Yasumoto	Biooxidation of Ciguatoxins Leads to Species-Specific Toxin Profiles	Toxins	9(7)	205	2017
大城直雅	貝毒の機器分析法における現状及び今後の見通し	JSM Mycotoxins	68(1)	49-53	2018
MS Reza, A Kobiyama, T Kudo, J Rashid, K Ikeo, Y Ikeda, Y Yamada, D Ikeda, N Mizusawa, S Sato, T Ogata, M Jimbo, S Kaga, S Watanabe, K Naiki, Y Kaga, S Segawa, K Mineda, V Bajic, T Gojibori, S Watabe	The implication of the datasets obtained from periodic surveys on the microbial community by metagenomic analysis in evaluating the marine ecosystem.	Proceedings in: International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”		No.08002	2017

S Watabe, M S Reza, A Kobiyama, K Ikeo, J Rashid, Y Ikeda, Y Yamada, D Ikeda, N Mizusawa, S Sato, T Ogata, M Jimbo, T Kudo, S Kaga, S Watanabe, K Naiki, Y Kaga, S Segawa, K Mineta, V Bajic, T Gojobori	Periodic survey by metagenomic analysis on the marine microbial communities in an enclosed bay located at Sanriku coast off northern Japan in the Pacific Ocean.	Proceedings in: International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”		No.08003	2017
S Takaishi, K Yasumoto, A Kobiyama, S Sato	Haptenic properties of tetrodotoxin conjugated to carrier proteins by using dithiol reagents.	Proceedings in: International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”		No.11001	2017