

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 27 ~ 29 年度 総合研究報告書
(H27-食品-一般-009)

研究代表者 大城 直雅

平成30(2018)年 5月

別添 2

目 次

I . 総合研究報告 マリントキシンのリスク管理に関する研究 大城 直雅	1
. 研究成果の刊行に関する一覧表	5 0
別添資料 1 食中毒調査票	5 5
別添資料 2 日本産フグ同定ガイド	5 6

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「マリントキシンのリスク管理に関する研究」

総合研究報告書

研究代表者 大城 直雅 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

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

・**フグ毒検査法の検討**：フグ毒検査の公定法に準ずる方法として食品衛生検査指針に掲載されている参考法は、抽出操作が煩雑で効率が悪いうえ、試料残渣に TTX が残留し毒性が実際より低く評価される恐れがある。これに対し、簡便法は、迅速かつ真の値により近い測定値が得られる方法と考えられる。さらに、簡便法の測定値は参考法の測定値と相関があり、かつ参考法の測定値より 1~2 割程度高い。すなわち、参考法によって得られた値を真値と仮定した場合、簡便法による真度は 110~120% であると推定され、簡便法によって得られた値は妥当な範囲にあると考えられる。HPLC-FLD は感度、精度ともに高く、研究上のみならず、食品の安全性を確認する試験法としても有用であることが示された。今後コラボ試験等を実施するなど、室内および室間精度の評価を検討することが望ましい。LC-MS（LC-MS/MS）では、マトリクス効果により測定値の低下が確認され、抽出液の適切な希釈が必要となる。部位の中で最もマトリクス効果が大きい皮の場合でも、5 倍抽出液を 10 倍に希釈することで夾雑物の影響を低減できることを確認し、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、検査実施時に妥当性確認をすることが重要と思われる。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た。トレース試料に TTX が含まれていたため、1 MU/g 添加時の選択性は確認できなかったが、その他の性能は目標値の範囲内であった。選択制については分離条件や分析カラムを変更するなどすることで確認可能であるため毒性評価法としての妥当であると考えられた。マウス毒性試験法の代替法として、世界中の多くのグループが TTX 検出用 ELISA キットの開発に取り組んできたが、TTX 以外の関連成分はほとんど検出することはできない。その欠点を補い類縁体も含めた検出キットの開発を目指し、新たな視点による免疫抗原調製法を開発し、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。

・**フグ等の毒性評価**：コモンフグの皮の毒性は、採取海域や採取年による変動が大きいことが示唆され、中には 7,000 MU/g もの猛毒を持つ個体も確認された。これは、1.4 g 程度の摂取で人を死に至らしめる可能性があるため、特に高毒化海域におけるコモンフグを取扱う際には手袋を使用するなどの注意も必要と考えられた。凍結融解した試料では、皮側の筋肉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。マウス法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。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、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、シマフグなどもみられた。これらの一部から 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、健康被害への影響はないと考えられた。フグの PSP 蓄積能評価について、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。なお、フグ毒の健康影響評価を実施するにあたり必要となるヒトの中毒事例において、評価に必要な項目を収集し、科学的データを蓄積していくことを目的とした調査票を作成した。自治体等の関係者への配布と羞恥、活用推進が望まれる（添付資料1）。

・**遺伝子によるフグ類などの種判別：** 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。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。

・**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（別添資料2）。

・**PSP 標準品の検討：** わが国の麻痺性貝毒検査法の国際標準化を図るために、取扱いが著しく制限されている STX の代替として dcSTX を使用した検査法の実用化について検討した。廃棄処分となる毒化二枚貝の中腸腺を活用し、dcSTX を大量調製することに成功した。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、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。

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

明治薬科大学：堀田彩乃、鈴木貴文、杉田典子、
山田拓磨、山元繁秀
広島県立総合技術研究所保健環境センター：
中島安基江、安部かおり、井原
紗弥香、福原亜美、
広島市健康福祉局保部食品課：安西洋一
沖縄県衛生環境研究所：佐久川さつき
長崎大学院水産・環境科総合研究科：高谷智裕
株式会社萬坊：谷口香織
愛知県衛生研究所：長谷川晶子、早川大輔、柘
植康、海野明広
青森県環境保健センター：
山本明美、工藤志保、中谷実、増

協力研究者

東京海洋大学海洋科学部：桐明絢
国立医薬品食衛生研究所：國吉杏子、登田美桜

田幸保、木村淳子、柴田めぐみ
(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所：
鈴木達也、高坂典子
(国研) 水産研究・教育機構中央水産研究所：
渡邊龍一、鈴木俊之

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、フグ毒検査法の検

討、フグ等の毒性評価、遺伝子によるフグ類等の種判別、フグ類の形態分類、PSP標準品の検討を行った。

B. 研究方法

フグ毒検査法の検討

1) 簡便法の有効性(荒川、高谷、谷口)

比較的高毒量の天然トラフグ肝臓4個体(No. 1~4)および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調製した比較的低毒量の2種類の肝臓ホモジネートを試料とした。まず参考法として、試料に2.5倍量の0.1%酢酸を添加して加熱抽出し、残渣を除いた抽出液と残渣の洗液を合わせ、最終的に試料の5倍量に定容して試験液とした(1:5)。肝臓4個体中1個体(No. 1)については、試料に5倍量の0.1%酢酸を添加し、最終的に10倍量に定容する方法(1:10)も実施した。一方、簡便法として、試料に1、2、4、5倍量の0.1%酢酸を添加して加熱抽出後、混合液をそれぞれ2、3、5、6倍量に定容して遠心分離後の上清を試験液(それぞれ抽出比2、3、5、6)とした。いずれの試験液も、C18カートリッジにより固相抽出し、メンブランフィルターでろ過した後、HPLC-FLDでTTX量を測定した。

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

2) HPLC-FLDの性能評価(荒川、高谷、谷口)

養殖トラフグの無毒肝臓を試料とし、それらのホモジネートに既知量のTTX標品を添加してTTX濃度2、5、10、20 MU/g(それぞれ規制値の1/5、1/2、1、2倍濃度)の添加試料を調製した。2、5、10 MU/gの添加試料には、2および4倍量の0.1%酢酸を添加して加熱抽出し、遠心分離して脂質を除いた後、混合液をそれぞれ3および5倍量に定容した(それぞれ抽出比3および5)。20 MU/gの添加試料には、2倍量の0.1%酢酸を添加して加熱抽出し、遠心分離後、脂質を除いて3倍量に定容した(抽出比3)。各定容抽出液につき、遠心分離後の上清を分取し、C18カートリッジにより固相抽出した。さらにメンブランフィルターでろ過後、HPLC-FLDでTTX、4-epiTTX、および

4,9-anhydroTTX 量を測定し、添加 TTX 濃度に対する比率を求めて回収率とした。なお、4-*epi*TTX と 4,9-anhydroTTX は標品が無いため、TTX と各類縁体の蛍光強度を同等と仮定して定量した。

3) LC-MS におけるマトリックス効果の検証 (荒川、高谷、谷口)

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

次いで、無毒養殖トラフグの皮および卵巣につき、同様に 1:4 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 1:2 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。

4) LC-QTOF/MS による TTX 分析の妥当性 (大城、中島他)

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。

5) マウス毒性試験と機器分析の分析値の比較 (大城、中島他、長谷川他)

後述の愛知県沿岸産コモンフグのうち、皮 18 試料および筋肉 21 試料について、マウス毒性試験法による結果と LC-QTOF/MS による分析による結果の比較をした。

6) フグ毒検査キットの開発 (佐藤)

新規ハブテン抗原の作製

大船渡魚市場および新江ノ島水族館から入手したフグ科魚類の内臓を希酢酸で熱浸抽出し、以下、活性炭、Bio-Gel P-2、Bio-Rex 70 各カラムクロマトグラフィーを用いる常法で 4,9-anhTTX (18 μmol) を単離し凍結乾燥した。これを少量の 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) に溶解、(+)-ジチオスレイトール (DTT) 310 mg を添加混合し、同緩衝液を用いて 20 mL にメスアップした後、37°C で 30 分間インキュベートした。生じた DTT-TTX 結合体を Bio-Gel P-2 のカラムで分離した。これとは別に、4,9anh-TTX (25 μmol) を 0.05 M リン酸アンモニウム (pH 8.0) 20 mL に溶解し、これに 1,2-エタンジチオール (EDT) 260 μL と DMSO 10 mL の混合物を添加し混合し、37°C で 30 分間インキュベートした後、等量の酢酸エチルで 4 回抽出した。下層に溶存する EDT-TTX 結合体を Bio-Gel P-2 のカラム (φ1.5×10 cm) を用いて分離した。

いずれも 10 mg の牛血清アルブミン (BSA, RIA grade, Sigma) またはスカシガイヘモシアニン (KLH, GBiosciences) を 2 mL の 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) に溶解し、DMF 300 μL に溶解した GMBS (Dojindo) 10 mg を加えて混合した。30 分間静置した後、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) で充填した Sephadex G-25 のカラム (φ1.5×45 cm) に添加し、同緩衝液で溶出して BSA-GMBS および KLH-GMBS を分離した。

上記の操作で得た 2 種の結合体 (DTT-TTX および EDT-TTX) を少量の 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、それぞれ BSA-GMBS および KLH-GMBS 溶液と混合して 5 分で一晩、静置した。以下、希酢酸に対して 2 回、水に対して 3 回透析し、BSA-DTT-TTX 抗原および KLH-EDT-TTX 抗原を作成した。

新規抗原による抗体の作製

BSA-DTT-TTX 抗原溶液、および KLH-EDT-TTX 抗原溶液を、それぞれ 1 mL あたりキャリアタンパク質換算で 0.3 mg となるように 1.5 mL のマイクロチューブに小分けして凍結保存した。これら抗原を蛋白精製工業 (群馬県伊勢崎市) に送付して、ウサギ抗血清の作製を依頼した。すなわち、毎回 1 羽のウサギに対して 1 本 (0.3 mg) ずつ、1 mL の complete adjuvant freund で乳化したものをニュージーランドホワイト種のウサギに皮下接種した。BSA-DTT-TTX 抗原に対して 2 羽、KLH-EDT-TTX 抗原に対して 5 羽のウサギを使用した。いずれも免疫は隔週で行い、皮下接種を約 7 か月間継続し

た。隔週で 5 mL ずつ採血して得た抗血清の一部 (100 μ L) に、PBS で希釈した等量の TTX 標品溶液 (2 ~ 25 μ M) 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)を用いて得たる液中の 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。

抗血清の性能 (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)、4epi-TTX、4,9anh-TTX、11oxo-TTX および 5,6,11trideoxy-TTX 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 蛍光法および LC-QTOFMS (TripleTOF™ 5600+, ABSciex, positive TOFMS モード) で分析定量した。

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 (EZ-Link Maleimide-PEG2-Biotin, Thermo Scientific) 4 mg (7.6 μ mol) を添加して撹拌した後、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、一部を以下の条件により TripleTOF™ 5600+ (ABSciex) で分析した。

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

特異抗体の精製

水で洗浄した EAH-Sepharose 4B (GE-Health care) 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、ときどき撹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 から得た硫安沈殿物を 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。

TTX 分析用 ELISA キットの試作と性状確認

上記の操作で得た抗 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 Maxisorp™ 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 (DS Pharma Biomedical) 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、4epi-TTX、11oxo-TTX、5,6,11trideoxy-TTX) 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 ずつ分注して軽く撹拌した。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, 1 mg/mL, KPL)を各wellに100 µLずつ分注し、37 °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 µLずつ分注した。発色を確認しながら37 °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 µL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、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、これら麻痺性貝毒成分の交差性を検討した。

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、作製した ELISA キットで測定した。個体ごとに皮、筋肉、肝臓、消化管、生殖腺(全て精巣)の5部位に分け、シヨ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。これら抽出液を上述の 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。

7) 市販 TTX 検査キットの評価 (長島、桐明)

TTX 検査キットには TTX rapid test kit (Lot:20150716, Wuhan Unibiotest Co., Ltd.)を用い、TTX 標準品は和光純薬製テトロドトキシン(フグ由来、1 mg、細胞生物用、Lot SAJ2556)を用いた。TTX 1 mg を含むアンプルに0.1%酢酸溶液1 mLを加えて溶解し、これを TTX 標準原液とした。この TTX 濃度は1 mg/mL であり、毒性は5000 MU/mL とした。TTX 標準原液を付属のプロトコールに記載の“Sample diluent”[8g NaCl + 0.2g KCl + 1.44g

Na₂HPO₄ + 0.24g KH₂PO₄, dissolve in deionized water to 1 L] (pH 7.4) および0.1%酢酸溶液で希釈し、10、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 MU/mL の TTX 標準液を調製した。各濃度に調製した TTX 標準液100 µLを TTX rapid test kit に塗布した。

本 TTX 検査キットの TTX 検出限界の確認を行い、TTX 誘導体の反応性は、山口県産キンシバイから TTX 精製法に従って精製した 11-oxoTTX と 5,6,11-trideoxyTTX を用いて調べた。これらの標準品がないため、11-oxoTTX 精製品は毒性値から濃度を計算し、5,6,11-trideoxyTTX はほぼ無毒のため、5,6,11-trideoxyTTX 精製品の LC-MS におけるイオン強度を TTX 標準品と比較して濃度を求めた。両精製品は、0.1%酢酸で適宜希釈して所定の濃度に調製した。マトリクスの影響を調べるため、無毒の養殖トラフグ(3歳魚、活魚)から、筋肉、皮、肝臓、生殖巣を分離し、組織抽出液を調製した。組織抽出液で TTX 標準原液を適宜希釈して、TTX 溶液を調製した。また、2014 年 10 月および 2015 年 6 月に岩手県大船渡魚市場で採取したコモンフグ(凍結試料)の筋肉および肝臓の抽出液を用いて、TTX 検査キットに対する反応を検討し、TTX 検査キットの実用性を調べた。

8) PTX / PTX 様毒検出・定量法の開発 (荒川、高谷)

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

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

・フグ等の毒性評価

1) 瀬戸内海産コモングの毒性調査(大城、中島他、安西、國吉、堀田他、松浦、登田、佐久川)

1年目の調査

2015年10月～2016年1月(1年目)に漁獲された102個体を、仲買業者を通じて購入し、氷漬けの状態を実験室に搬入した。

画像撮影した試料は、皮、肝臓、筋肉、その他内蔵に腑分けし、分析に供するまで-30℃で保管した。翌日までに処理できないものについては-30℃で保存し、流水中で融解した後に腑分けした。

試料2gに0.1%酢酸8mLを加え、ホモジナイズ(11,000rpm、1秒×10回)をした後に沸騰水浴中で10分間加熱した。放冷後、遠心分離(13,400×g、15分)し、上清を回収、抽出液(5mL)とした。この0.1mLに0.1%酢酸0.9mLを加え攪拌し、その0.5mLを限外ろ過(10kDa)した。ろ液に、アセトニトリルが50%になるようにアセトニトリルを加え攪拌後にPVDF膜でろ過(0.2μm)したものを測定溶液とし、以下条件で分析した。

【LC部】

装置：Agilent 1290 Infinity、分析カラム：Inertsil-Amide(75×2.1mm、3μm)、移動相A：水(5mMギ酸アンモニウム、0.5mMギ酸)、移動相B：90%MeCN(5mMギ酸アンモニウム、0.5mMギ酸)、アイソクラティック分析A/B(25：75)、測定時間：7分間、カラム温度：45℃、流速：0.5mL/min、注入量：5μL。

【MS部】

装置：Agilent 6460 Triple Quad LC/MS、イオン化：ESI(AJS、Positive)、ドライガス：N₂(280℃、12L/min)、シースガス：N₂(350℃、11L/min)、キャピラリー電圧：3500V、ノズル電圧：500V、ネブライザー：N₂(55psi)、フラグメンター電圧：135V、コリジョンエネルギー：35eV、コリジョンガス：N₂、プリカーサーイオン：m/z 320.2、プロダクトイオン(定量用)：m/z 162.1、プロダクトイオン(確認用)：m/z 302。

定量分析の結果から得られたTTX濃度に対し、TTXの毒性を0.22μg/MUとして毒性換算し、以下のとおり評価した。

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

2～3年目の調査

2017年1月～2017年12月(2～3年目)に漁獲された101個体を、仲買業者を通じて購入した。

試料は冷蔵・氷詰めで搬入され、試料搬入後、各個体の側面、背面をデジタルカメラで撮影し外部形態による同定を行った。画像撮影した試料は、速やかに、皮、筋肉、その他内臓に腑分けし、分析に供するまで-30℃で保管した。また、重量の大きい15個体については半身を皮付きのまま-30℃で凍結保存した。

細切粉碎した試料5gに0.1%酢酸25mLを加え、ホモジナイズした後に沸騰水浴中で10分間加熱した。放冷後、遠心分離(13,000×g、15分間)し、上清を回収、0.1%酢酸で25mLに定容し、抽出液とした。抽出液を0.1%酢酸：アセトニトリル(1：1)で適宜希釈し、その0.5mLを限外ろ過(10kDa)し、さらにPVDF膜(孔径0.22μm)でろ過したものを測定溶液とし、以下の条件で分析した。

【LC部】

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

【MS部】

装置：Agilent 6540MS Q-TOF、イオン化：ESI(Positive)、ドライガス：N₂(350℃、10L/min)、キャピラリー電圧：3500V、ネブライザー：N₂(50psi)、フラグメンター電圧：200V、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)。

2) 愛知県沿岸産コモング(大城、長谷川他、松浦)

2016年7月～2018年2月に愛知県で捕獲されたコモング試料22個体について愛知県水産試験場漁業生産研究所および釣宿を通じて入手した。試料は冷蔵で搬入され、試料搬入後、体長と重量を測定し、外部形態による種同定を行った。その後、速やかに内臓を取り出し、脊椎に沿って半身を外し、外した半身は筋肉と皮に分離した。残り半身には頭部、鰭、脊椎を残した。内臓は生殖腺、肝臓、その他内蔵に腑分けし、全ての試料は分析に供するまで-30℃で保管した。凍結試料は流水中で1時間融解し、筋肉は皮側(外側)と内臓側(内側)に分けて検体とした。

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

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、致死時間よりフグ毒の致死時間 - マウス単位 (MU) 換算表を参照し、抽出液原液 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、予備試験により希釈した希釈試験液をマウスに注射し、致死時間が 7~13 分の間に入ることを確認した後、計 3 尾のマウスより中央致死時間を求め、上記換算表によって毒量 (MU) を算出し、得られた MU に希釈倍率を乗じ、検体の毒力 (MU/g) を求めた。

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。

3) 大船渡産フグ (佐藤)

2015 年 5~11 月ならびに 2017 年 6 月に岩手県大船渡魚市場に水揚げされたマフグ 36 個体 (BW: 430.7±47.3g、TL: 263.1±10.5 mm)、ゴマフグ 30 個体 (BW: 502.0±28.0 g、TL: 302.0±6.6 mm)、シヨウサイフグ 12 個体 (BW: 202.8±22.0 g、TL: 226.7±9.6 mm)、コモンフグ 43 個体 (BW: 160.0±10.9 g、TL: 195.4±5.6 mm) を試料とした。これら試料は個体ごとに梱包したのち凍結状態で相模原キャンパスに搬入し試験に供するまで -80 で凍結保存した。

試料のフグを半解凍状態で個体ごとに肉、皮、肝臓、消化管ならびに生殖腺の 5 部位に分け、4 倍量の 0.1%酢酸を加えてホモジナイズした後、沸騰浴中で 5 分間熱浸した。得た熱浸ホモジネートを氷冷し、0.1%酢酸で元試料の 5 倍量となるように定容して攪拌し、ろ紙上ろ過して検液を作製した。生殖腺は区別できるものは卵巣と精巣に分けて分析した。抽出液の一部を SepPak C18 plus カートリッジで処理した後、Yotsu et al.(1989)に従っ

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

4) 有明海産コモンフグの毒性 (荒川、高谷) 毒性調査

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

既得毒性データの整理

2003 年から 2004 年にかけて実施した有明海産コモンフグの毒性調査で得られた未発表データのうち、筋肉の毒性、ならびに凍結解凍による毒の部位間移行について検討したものを整理した。

2003 年 1 月~7 月、および同年 8 月~2004 年 10 月に有明海で漁獲されたコモンフグ、それぞれ凍結解凍魚 66 個体、および鮮魚 125 個体につき、簡便法 (抽出比 2) によって筋肉の試験液を調製し、マウス毒性試験で毒力を測定した。

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

5) その他海域産コモンフグ (長島、桐明)

凍結試料の毒性

2015 年 6 月に山口県で漁獲された 14 個体と 2015 年 10 月に京都府、石川県、東京湾でそれぞ

れ漁獲された6個体、5個体、7個体の合計32個体を用いた。これら試料魚は漁獲後に現地で凍結され、当研究室に輸送され、使用するまで-25に冷凍保存した。使用時に、試料をビニル袋に入れて流水で解凍した後、筋肉、皮、肝臓、消化管、生殖腺に分離した。解凍直後に解剖することを心がけたが、試料数が多い場合には、解凍しすぎてしまうものもあった。

活魚または生鮮試料の毒性

試料には、2016年1月と3月に東京湾で漁獲された活魚または生鮮魚30個体を用いた。試料魚は水揚げ後ただちに研究室に運搬し、筋肉、皮、肝臓、生殖腺に分離した。

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

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

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

毒性試験はマウス検定法で行い、マウスの致死

時間から「フグ毒の致死時間—マウス単位(MU)換算表」に基づいて毒力を算出した。注射後30分以上経過しても死亡しなかった試料を「無毒」とした。

6) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性(長島、松浦、石崎、桐明)

2014年7月から2017年10月に水揚げ、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、双眼実体顕微鏡下で観察して、体色を含む外部形態に基づき分類した。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、筋肉(約15mg)から全ゲノムDNAを抽出し、これを鋳型として、ミトコンドリアDNAの16S rRNA部分領域(約600bp)を増幅するプライマーまたはシトクロムb部分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産物をDNAシーケンサーを用いて塩基配列を解析した。解析した塩基配列をnucleotide BLAST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。

テトロドトキシン(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して、TTX分析用試料とした。TTXの抽出は、食品衛生検査指針理化学編に記載の方法に準じた酢酸加熱法で行った。試料は乾燥品であるため、酢酸添加後、室温で30分間静置し、15分間超音波処理した後、沸騰水浴中で10分間加熱した。冷却後、遠心分離して得られた上清を、遠心限外ろ過(分画分子量3000)したろ液をTTX定量用試料とした。TTXの定量はLC-MS/MS法で行った。TTX分析のコントロールとして、市販のしらす加工品(しらす干し)を用いた。

7) フグのPSP蓄積能評価(荒川、高谷)

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、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。

・ 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（石崎）

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、形態学的特徴からトラフグとマフグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 4 個体、東京都市場衛生検査所から分与された自然交雑フグ種 19 個体ならびに水産総合研究センターから分与された自然交雑フグ種 1 個体、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体を用いた。

これらの筋肉もしくは鱗から 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 B-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、マフグおよびシマフグにおいて種特異的な MS マーカーを探索することを目的に、両親種が既知である人工交雑種およびトラマの両親、自然交雑フグ全 20 個体を対象に、計 19 個の MS 領域を標的として PCR を行い、トラフグおよびマフグ、マフグおよびシマフグの 2 種を明確に区別しうる MS の選抜を行った。

その後、判別に適用可能な MS マーカーにおける PCR 条件の最適化の検討および PCR 産物の塩基配列解析に基づく MS の反復回数を決定したのち、再現性の検証を行った。

2) 有毒巻貝種判別法の開発（長島）

フグ毒またはテトラミンをもつ有毒巻貝を正確に同定するため、ミトコンドリア DNA の部分領域配列の塩基配列をダイレクトシーケンス法で解析することとした。そのため、有毒巻貝を含む巻貝 7 科 41 種のミトコンドリア DNA の 16S rRNA、シトクロム C オキシダーゼサブユニット（COI）、18S rRNA 領域の塩基配列情報を Gene Data Bank で調査し、これらの塩基配列から多くの巻貝に共通し、しかも種間の変異がみられる領域を選び、プライマーを設計し、PCR 条件を検討した。その結果、本研究では、ミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域を選択し、本領域（約 350 bp）を特異的に増幅する PCR 条件を検討することとした。

巻貝試料には、エゾバイ科ヒメエゾボラ、エゾボラモドキ、エゾボラ、コエゾボラモドキ、ミクリガイ、ヒメエゾボラ、エゾボラ、オオエッチュウバイ、ヨーロッパエゾバイ、テングニシ科テングニシおよびイトマキボラ科ナガニシの 11 種の生鮮品と市販加工品 29 品目を用いた。

各試料の筋肉から全ゲノム DNA を抽出し、それを鋳型にして、設計したプライマーと Ex Taq 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アガロースゲル電気泳動に供し、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。

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、増幅できないことがあったため、短縮した 16S rRNA 部分領域(約 150 bp)を PCR 増幅する特異的プライマーを作製し、PCR 条件を検討した。

この他、わが国でフグ毒中毒を起こしたボウシュウボラについては、ミトコンドリア DNA 16SrRNA 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。すなわち、ボウシュウボラ筋肉から全ゲノム 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 増幅産物を確認し、サブクロニングを行い、塩基配列を解析した。

・フグ類の形態分類(松浦)

国内外の自然史系博物館や大学に保管されているフグ類を調査するとともに、魚類研究者の協力を得て新たな標本を入手した。得られた標本はカラー写真を撮影した後、10%ホルマリンで固定し、70%アルコールに保存して、形態学的調査を行った。鰭条数の計数や体表面の小棘の観察は双眼実体顕微鏡を用いて行った。内部骨格の観察が必要な場合には、軟 X 線撮影装置を用いて骨格を撮影した。

・PSP 標準品の検討

1) デカルバモイルサキシトキシンの大量調製(大城、佐藤、國吉、渡邊、鈴木俊之)

2014年6月、および2015年7月に岩手県大船渡湾清水定点の試験筏で採取した毒化ホタテガイ(むき身20kg、冷凍保存)を希塩酸で熱浸抽出し、活性炭、Bio-Gel P-2 および Bio-Rex 70 各カラムクロマトグラフィーを用いる常法で順次精製して GTX1 と GTX4、GTX2 と GTX3 の混合物を分離した。GTX1 と GTX4 の混合物は Sato et al.(2014)に従ってヘミン/アスコルビン酸中性水溶液中で処理して GTX2 と GTX3 の混合物に変換し、再度 Bio-Gel P-2 で生成して GTX2,3 混合物を得た。上記の操作により GTX2,3 混合物計 450 μmol を得た。

凍結乾燥した GTX2,3 混合物(350 μmol)を 300

mL の 0.05 M リン酸アンモニウム緩衝液(pH 7.3)に溶解し、3 mL の 2-メルカプトエタノール(ME, Wako, > 95%)を添加混合して室温で一晩静置した。この ME-STX 結合体を含む反応混合物を Bio-Gel P-2 のカラムに添加し、カラムを水で洗浄後、希酢酸で溶出する画分を回収し、凍結乾燥して ME-STX 結合体(ca. 330 μmol)を得た。

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

得られた dcSTX 酢酸溶液の一部を凍結乾燥後、4% $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ に溶解し、マレイン酸を外標準として定量 NMR 法で濃度を決定した。

2) デカルバモイルサキシトキシによる麻痺性貝毒検査法の標準化(大城、山本他、鈴木達也)

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 $\mu\text{mol}/\text{L}$ dcSTX 酢酸溶液(STX 二塩酸塩に換算して 0.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を使用した。STX は、FDA より供与された 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 19~21 g)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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を、求めた毒力(MU/mL)で除して CF 値(FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$)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。なお、本実験は実施者 1 名によって行われた。

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。本試験は、平成 28 年度は基準 CF 値を実施した投与者 1 名が実施し、平成 29 年度は投与者による変動を確認するため前年度と同一の投与者を含む 4 名で実施した。

dcSTX 希釈液の安定性確認を確認するために、CF 値の変動を確認した dcSTX の 3 mmol/L 塩酸希釈液 (2.35 μ mol/L dcSTX 溶液 20 mL + 希釈溶液 12 mL) について、調製当日、3 日後、1 週間後、2 週間後、4 週間後、6 週間後に以下の条件で LC-MS/MS 分析した。また、同一希釈率の水希釈液 (2.35 μ mol/L dcSTX 溶液 10 mL + 水 6 mL) についても同一条件で LC-MS/MS 分析した。

【LC 部】

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

【MS 部】

装置：Waters Xevo TQ-S micro、イオン化：ESI (Positive)、Desolvation gas：N₂(600、1000 L/h)、Cone gas：N₂(150 L/h)、コリジョンガス：Ar、Source Temp：150、コーン電圧：5 V

【MRM 条件】保持時間：6.2 分

	Precursor Ion <i>m/z</i>	Product Ion <i>m/z</i>	Cone (V)	Collision (eV)
dcSTX	257	239	5	15
	257	222	5	20
	257	180	5	20

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

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

・フグ毒検査法の検討

1) 簡便法の有効性

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

トラフグ肝臓 4 個体 (No. 1~4) につき、参考法 (1:5) および簡便法の各抽出比で得られた測定値を図 1 に示す。肝臓 No. 2 (参考法による測定値 138 MU/g) と肝臓 No. 4 (同 72 MU/g) では簡便法の抽出比 2 の測定値が参考法と同程度、肝臓 No. 1 (同 184 MU/g) と肝臓 No. 3 (同 178 MU/g) では 15% 程度高い値となった。いずれの肝臓においても、抽出比が高いほど測定値は高く、両者の関係は累乗関数により近似することができた ($r = 0.57 \sim 0.82$)。

簡便法の各抽出比の測定値につき、参考法 (1:5) の測定値に対する相対値で表したものを図 2 に示す。相対測定値は、いずれも抽出比 3 以上で 1 より高く、回帰線から求めた抽出比 5 の相対測定値は、肝臓 No. 1~4 でそれぞれ 1.21、1.17、1.24、1.15 と、概ね 1.2 前後の値となった。なお、参考法 (1:10) による肝臓 No 1 の相対測定値は 1.16 であった。

以上のデータに肝臓ホモジネートで得たデータを加えて、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 3)。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 4)。

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

弱の値となった。

2) HPLC-FLD の性能評価

各設定濃度における回収率を表 C-2 に示す。TTX 本体の回収率は、2、5、10 MU/g において、抽出比 5 では 82.7、100、102%、抽出比 3 では、85.9、95.0、93.2%であった。また、20 MU/g における抽出比 3 の回収率は 74.5%であった。類縁体を加えた回収率は、5、10 MU/g の抽出比 5 で 117、120%、2、5、10 MU/g の抽出比 3 で 107、118、115%であった。また、20 MU/g の抽出比 3 で 92.9%であり、いずれの濃度、抽出比においても、類縁体を加えると TTX 本体のみの場合より 20%程度高い値となった。なお、2 MU/g の抽出比 5 においては、4-*epi*TTX および 4,9-anhydroTTX が不検出であったため、TTX 本体の回収率と同じ結果となった。ブランク試料においては、TTX、4-*epi*TTX、および 4,9-anhydroTTX 検出位置にピークは認められなかった。

3) LC-MS におけるマトリックス効果の検証

無毒養殖トラフグ肝臓抽出液に TTX を添加し、LC-MS で定量した際の回収率を図 5 に示す。1:1 抽出液では、標準溶液(1倍希釈) および 5、10、20 倍希釈溶液の回収率は、それぞれ 68.4、87.7、102、98.2%で、10 倍以上の希釈率でほぼ 100%となった。1:2 抽出液でも概ね同様の結果が得られた。1:5 抽出液の場合、5 倍希釈溶液で回収率が低かったものの、その他の希釈倍率での回収率はほぼ 100%で、総じて表示濃度どおりの測定値が得られた。

無毒養殖トラフグ皮および卵巣抽出液に TTX を添加後、LC-MS/MS で定量した結果を図 6 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 7)。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。

4) 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(表 C-3)。

5) マウス毒性試験と機器分析の分析値の比較

マウス毒性試験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(図 8)。

6) フグ毒検査キットの開発

新規に調製した抗原は、HPLC 蛍光法と 280nm の吸収から、キャリアタンパク質に対する TTX 結合量の質量比を算出したところ、BSA-DTT-TTX 抗原で 13.4%、KLH-EDT-TTX で 5.4%と多量の TTX が結合した抗原が生成したことを確認した。

BSA-DTT-TTX 抗原を接種した 2 羽のウサギから得た血清の抗体価は、14 回目(7 ヶ月後)に至るまで、2.5 (nmol TTX/mL 血清) 前後と、低いままで推移した。これに対して KLH-EDT-TTX 抗原を接種した 4 羽(1 羽は途中で死亡)の抗体価は、いずれも免疫開始 2 ヶ月後から大きく上昇し、最終日(全採血、14 回目)には 4.0~24.5 (nmol TTX/mL 血清) に達した(図 9)。

有毒フグから分離した TTX、4-*epi*-TTX、4,9-anh-TTX、5,6,11-trideoxy-TTX、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-*oxo*-TTX 溶液を、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-anh-TTX を除く各成分ともに、TTX とほぼ同程度 (4.6~6.7 nmol/mL 血清) の吸収が確認された(図 10)。

ビオチン標識 TTX は TOFMS 上で、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(図 11)。

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（Mw 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。

試作した ELISA キットは、添加した TTX 標品の濃度が高くなるに従って、発色値が低下した。4epi-TTX、11oxo-TTX および 5,6,11trideoxy-TTX 標品を添加した場合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、4epi-TTX が 50 nM 付近、11oxo-TTX が 50 nM 付近、5,6,11trideoxy-TTX が 100 nM 付近であった（図 12）。これに対して、麻痺性貝毒関連各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 13）。

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、LC-QTOFMS で 5,6,11trideoxy-TTX 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 14 および図 15）。

7) 市販 TTX 検査キットの評価

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

TTX 標準液による検出限界は、TTX 標準原液を“Sample diluent”と 0.1%酢酸で希釈して求めた。

“Sample diluent”を塗布したところ、C と T に 2 本の赤いバンドが出現した。次に、“Sample diluent”で希釈した TTX 標準液（0.0625 ~ 10 MU/mL）を塗

布してバンドの出現を観察した。10 MU/mL TTX 標準液では T のバンドはみられず C のバンドだけで、TTX の存在が確認された。しかし、1.0 MU/mL と 0.50 MU/mL では T のバンドは C のバンドに比べ明らかに薄くなったが検出された。0.25 MU/mL 以下では T のバンドが濃く見られたが、ブランク（緩衝液）よりは薄かった。主観的な判断になるが、0.5 MU/mL あたりが検出限界と思われる。

次に、0.1%酢酸溶液で調製した TTX 標準液（0.0625 ~ 4 MU/mL）を用いて、同様に実験した結果、主観的な判断ではあるが、0.25 MU/mL あたりが検出限界のように思われる。本結果ならびにフグ毒の抽出には 0.1%酢酸が用いられるため、以後の実験では、希釈液に 0.1%酢酸を用いることとする。

TTX 誘導体の反応性では、11-oxoTTX は TTX 標準品と同じ濃度（0.627 nmol/mL）のとき、TTX 標準品に比べると T バンドはやや色が濃かった。濃度を 2 倍（1.25 nmol/mL）、4 倍（2.51 nmol/mL）に増やすと T バンドの色が薄くなり、4 倍濃度の時、TTX 標準品とほぼ同じような色合いであった。5, 6, 11-trideoxyTTX は 2 段階の濃度（0.627 nmol/mL および 3.14 nmol/mL）で反応性を調べた。試料液をキットに付したところ、いずれも C バンドに比べて T バンドの色は明らかに薄く、3.14 nmol/mL 試料液の方が薄くなった。

以上の結果から、11-oxoTTX と 5,6,11-trideoxy TTX は、同濃度の TTX に比べ反応性は劣るが、TTX 抗体と反応することがわかった。

マトリクスの影響では、無毒養殖トラフグの組織抽出液は“無毒”なので、C と T に 2 本の赤いバンドが出現するはずである。筋肉と精巣の抽出液ではブランクの 0.1%酢酸と同様に C と T に 2 本の赤いバンドが検出されたが、皮の抽出液ではバンドは C にしかみられず、卵巣と肝臓の抽出液では T のバンドがきわめて薄く、擬陽性が疑われた。そこで、TTX 標準液を各組織抽出液で希釈して、0.25、1.0、4.0 MU/mL の 3 段階の濃度の TTX 溶液を調製した。筋肉抽出液で希釈した場合、4.0 MU/mL TTX でもバンドは 2 本見え、偽陰性を示した。これに対し、卵巣抽出液の場合、TTX がいない状態でも T のバンドが薄く（擬陽性）TTX 溶液 4.0 MU/mL のとき T のバンドはみえなかった。肝臓と皮の抽出液では、TTX を添加してもバンドの出現に変化はなく、TTX の検出はできなかった。

有毒コモンフグ抽出液で TTX 検査キットの実用

性を検討した。筋肉と肝臓がそろっている試料で、マウス試験において毒性を示した有毒試料抽出液（1 MU/mL 以上）および毒性を示さない無毒抽出液（1 MU/mL 未満）を用いた。筋肉抽出液では、有毒試料抽出液（5.32 MU/mL）を 0.1% 酢酸で 10 倍ずつ希釈して反応性を検討したところ、100 倍希釈液（0.053 MU/mL）で C と T に 2 本のバンドが検出されたが、有毒試料抽出液と無毒試料抽出液の区別が困難であった。

肝臓では、ブランクの抽出液でも、T バンドが薄くなるので、TTX 検出の判断がむずかしかった。有毒肝臓抽出液（449 MU/mL）を 0.1% 酢酸で 10 倍ずつ希釈して反応性を検討したところ、1,000 倍希釈液（0.45 MU/mL）までは T バンドが薄く検出され、10,000 倍希釈液（0.045 MU/mL）になって T バンドがクリアに見えた。

8) PTX / PTX 様毒検出・定量法の開発

筋細胞に PTX を暴露すると、濃度依存的な損傷が観察された。すなわち、10 ng/mL 以下の濃度では、筋管細胞のチューブ状の形態が維持されていたが、拍動が停止し、一部の細胞に損傷がみられたのに対し、100 ng/mL 以上の濃度では、細胞膜が顕著に薄くなり、丸く縮むように変化した（図 16）。

CPK については、暴露 6 時間後に濃度依存的な上昇が認められたが、12 時間後以降は検出感度が低下し、濃度依存性も失われた（図 17）。6 時間後の PTX 濃度（x）と CPK（y）の間には高い正の相関がみられ、以下の回帰式が得られた（図 18）。

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

一方、LDH の場合、いずれの暴露時間でも濃度依存的な上昇が認められたが、低濃度（100 ng/mL 以下）での値に基づき、暴露時間は 6 時間では不十分、48 時間では過剰であり、細胞試験には 12 または 24 時間が適切と判断した（図 19）。実験取扱いの利便性から、今回は 24 時間後の値を用いて検討したところ、PTX 濃度（x）と LDH（y）の間には高い正の相関がみられ、以下の回帰式が得られた（図 20）。

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

他方、筋細胞にイワスナギンチャク抽出液を暴露すると、いずれの濃度においても細胞損傷が観察され、0.1 g 試料/mL 以上の濃度で LDH の値（相対活性）がほぼ 100% に達した（図 21）。前述の回帰式から当該イワスナギンチャクの毒量を求めたところ、9.5 μ g PTX eq/g と計算され、LC-MS/MS で測定した PTX 量（7.0 μ g/g）と概ね一致した。ア

オブダイの抽出液の場合、肝臓、およびわずかながら筋肉で、丸く縮むような細胞損傷が確認された（図 22）。LDH の値は肝臓で約 70%、筋肉で約 30%、PTX 換算値は、それぞれ 103 および 2 ng PTX eq./g となった。

・フグ等の毒性評価

1) 瀬戸内海産コモンフグの毒性

1 年目の調査

瀬戸内海および福岡県で採取されたコモンフグ筋肉試料 97 個体を分析した結果、6 個体が有毒（12 ~ 33 MU/g）であった。そのうち 1 個体は鮮度が悪く、3 個体は凍結融解後に腑分けをした個体であったが、残り 2 個体は鮮度が良い状態で腑分けをしたものであった。また、各個体の筋肉から任意に採取した試料（n=3）の分析した結果のばらつきは、鮮度が悪かった個体を除いた 5 個体で高い傾向が認められた。半身を表皮側と内臓側に二分し、それぞれ均質したものを分析に供した結果、皮側の毒性が高くなる傾向が認められた。

皮はすべて有毒で、18 個体が猛毒（高値は 7,000 MU/g）、うち 2 個体は筋肉も有毒であった。また、皮の毒性に季節性は認められず、フグの採取海域によって大きく異なる可能性が示唆された。

2 ~ 3 年目の調査

試料 150 個体について筋肉および皮の TTX 分析を実施した。筋肉 2 個体が弱毒で残りはすべて無毒であった。皮は無毒が 3 個体、大部分が弱毒（108 個体）であり、強毒（37 個体）および猛毒（2 個体）もあった。最高毒力は 7,500 MU/g であった。

皮付きのまま半身を凍結融解試料では、表皮側の筋肉が凍結前より 2 ~ 20 倍高い値となった。

凍結前試料は無毒 14 試料、弱毒が 1 試料（11 MU/g）であったが、凍結融解試料の筋肉の毒性は皮側の筋肉について、無毒 9 試料、弱毒が 5 個体（11 ~ 97 MU/g）、強毒が 1 個体（110 MU/g）となった。

2) 愛知県沿岸産コモンフグの毒性

試料 22 個体の筋肉は、無毒が 17 個体、弱毒が 5 個体（14 ~ 49 MU/g）であった。皮は無毒が 5 個体、弱毒が 8 個体（12 ~ 59 MU/g）、強毒が 8 個体（100 ~ 630 MU/g）、猛毒が 1 個体（1,000 MU/g）であった。

2016 年度産の 14 個体では、皮を分離せず凍結融解した表皮側（内外を分離せず採取した 1 試料を含む）の毒力は、無毒が 5 検体、弱毒が 9 検体（21

~69 MU/g)であった。そのうち、5 MU/gを超えた10個体の内臓側筋肉は全て無毒であった。2017年度の12検体(1個体につき2検体採取)は凍結融解後もすべて無毒であった。

3) 大船渡産フグ

マフグ(36個体)

筋肉で 6.22 ± 1.78 MU/g(最高50 MU/g)のTTXsと 0.25 ± 0.08 MU/g(最高2.7 MU/g)のPSPsが確認された。精巢では 5.04 ± 0.96 MU/g(最高10 MU/g)のTTXsと 0.10 ± 0.06 MU/g(最高0.46 MU/g)のPSPsが検出された。その他の部位、すなわち皮、肝臓、消化管、卵巣から最高値でそれぞれ410、3,100、680、440 MU/gと、非常に高濃度のTTXsが検出され、いずれの部位からもTTXsに比較して20%未満のPSPsが検出された。

ゴマフグ(30個体)

筋肉で 1.23 ± 0.29 MU/g(最高4.6 MU/g)のTTXsおよび 0.17 ± 0.08 MU/g(最高2.0 MU/g)のPSPsが検出された。精巢には 2.05 ± 1.05 MU/g(最高11 MU/g)のTTXsと 1.00 ± 0.38 MU/g(最高3.7 MU/g)のPSPsが確認された。その他の部位すなわち皮、肝臓、消化管、卵巣から最高値でそれぞれ42、76、39、260 MU/gのTTXsが検出された。いずれの部位からもTTXsに比較してごく低濃度のPSPsが検出された。

シヨウサイフグ(12個体)

筋肉で 5.45 ± 2.66 MU/g(最高28 MU/g)のTTXsと 0.66 ± 0.28 MU/g(最高2.7 MU/g)のPSPsが検出された。精巢からは 15.88 ± 15.30 MU/g(最高46 MU/g)のTTXsと 6.50 ± 4.20 MU/g(最高14 MU/g)のPSPsが検出された。その他の部位すなわち皮、肝臓、消化管、卵巣から、最高値でそれぞれ32、250、80、960 MU/gのTTXsが検出された。いずれの部位からもTTXsに比してごく低濃度のPSPsが検出された。

コモンフグ(40個体)

筋肉で 25.61 ± 6.08 MU/g(最高230 MU/g)のTTXsおよび 0.73 ± 0.22 MU/g(最高2.7 MU/g)のPSPsが検出された。40個体中26個体が有毒であった。その他の部位すなわち皮、肝臓、消化管、卵巣および精巢から最高値でそれぞれ1,200、6,700、2,000、2,700、47 MU/gのTTXsが検出された。いずれの部位においても、大部分の個体からTTXsに比較して2~20%程度のPSPsが検出された。

4) 有明海産コモンフグの毒性

毒性調査

皮、肝臓、および卵巣は、いずれも猛毒(それぞれ、84~2,400 MU/g、<3~2,400 MU/g、48~1,600 MU/g)個体が認められ、皮と肝臓では2000 MU/gを超えるものが各2個体認められた。一方、筋肉と精巢は弱毒(<3~98 MU/gおよび5~81 MU/g)であったが、筋肉の有毒個体出現率は58%と高く、最高毒力は98 MU/gと強毒に近い値であった。

既得毒性データの整理

2003年1月~7月の凍結解凍魚(66個体)の筋肉については、22個体が無毒、42個体が弱毒、2個体が強毒で、最高毒力は120 MU/gであった。一方、2003年8月~2004年10月の125個体(鮮魚)の場合、5個体のみ弱毒(最高毒力28 MU/g)で、残りの120個体はいずれも無毒であった。

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

5) その他海域産コモンフグ

凍結されたコモンフグ試料、計32個体の各部位における有毒個体出現率は、皮96.7%(30個体中29個体)、肝臓86.7%(30個体中26個体)、卵巣81.0%(21個体中17個体)、消化管80.0%(30個体中24個体)、筋肉40.6%(32個体中13個体)で、各組織の最高毒性値は、皮2,290 MU/g、肝臓1,270 MU/g、卵巣977 MU/g、消化管590 MU/g、筋肉60.8 MU/gであった。皮と肝臓は猛毒、卵巣はほぼ猛毒に達する強毒、消化管も強毒、筋肉は弱毒であった。精巢は検体数が3個体と少ないが、毒性は無毒であった。

生鮮魚20個体および活魚10個体の計30個体の各部位における有毒個体出現率は、皮と肝臓が100%で、卵巣も100%(28個体中28個体)であった。最高毒性値は、皮1,990 MU/g、肝臓422 MU/g、卵巣3,540 MU/gで、皮と卵巣は猛毒となり、肝臓は強毒であった。これに対し、筋肉(30個体)と精巢(2個体)は無毒であった。

コモンフグを凍結したときの毒の移行を調べるための予備実験として、同一個体の右側と左側で

皮と筋肉の毒性が等しいか調べた。その結果、筋肉では、左右にかかわらず毒性は検出されなかった。皮は 10 個体すべてが有毒で、尾部左側 (182 ~ 1,330 MU/g) と 同右側 (184 ~ 1,550 MU/g) で毒性値に大きな差はみられなかった。最高毒性値は 1,550 MU/g で猛毒であった。最少毒性値は 182 MU/g の強毒であった。

筋肉の毒性に及ぼす凍結・解凍の影響を調べた。凍結したが解凍させていない“凍結試料”では、内臓側筋肉は無毒であり、表皮側筋肉は < 5 ~ 11 MU/g であった。皮の毒性 (396 ~ 1,140 MU/g) は、凍結前試料の毒性 (451 ~ 1,270 MU/g) に比べて、多少変化がみられたが、その変化の割合は ± 15% 程度であり、マウス試験法が内包する誤差範囲 (± 20%) であった。“凍結解凍試料”の内部筋肉では 10 個体のうち、1 個体が 5 MU/g を示したが、それ以外は無毒であった。これに対し、皮と接していた外部筋肉はすべて毒性 (5 ~ 110 MU/g) を示した。とくに、高い毒性を示した試料 (110 MU/g および 84.9 MU/g) は皮の毒性 (1,120 MU/g および 1,990 MU/g) 著しく高かった。これに対し、皮の毒性が低い (186 MU/g) 試料では、表皮側筋肉の毒力は本マウス試験の検出限界の 5 MU/g であった。

6) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性種判別

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、111 個体中 69 個体はシロサバフグ *Lagocephalus spadiceus* (Accession No. AP009538) の塩基配列と一致した。シロサバフグ以外では、シマフグ *Takifugu xanthopterus* (17 個体)、ナシフグ *Takifugu vermicularis* (15 個体)、コモンフグ *Takifugu poecilonotus* (現在 *Takifugu flavipaterus*、13 個体)、ショウサイフグ *Takifugu snyderi* (3 個体)、ヒガンフグ *Takifugu pardalis* (2 個体)、クサフグ *Takifugu niphobles* (現在 *Takifugu alboplumbeus*、1 個体)、トラフグ *Takifugu rubripes* (1 個体) が同定された

毒性試験

LC-MS/MS 分析した 115 検体中 20 検体から TTX が検出され、シマフグ 10 検体から 0.31 ~ 3.0 µg TTX/g、コモンフグ 5 検体から 0.99 ~ 3.3 µg TTX/g、ショウサイフグ 3 検体から 0.064 ~ 1.1 µg TTX/g、トラフグ 1 検体から 1.6 µg TTX/g、ナシフグ 1 検体から 0.056 µg TTX/g が検出された。しかし、シロサバフグと同定された試料からは TTX は検出されなかった (0.010 µg TTX/g 未満)。

2) フグの PSP 蓄積能評価

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。

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 µmol/g、60 分で 46 µmol/g 取り込まれたのに対し、TTX の取り込み量は 20 分で 2.6 µmol/g、60 分でも 5.3 µmol/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 µmol/g 程度) の方が TTX の取り込み量 (20 µmol/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 µmol/g に達し、TTX (39 µmol/g) を大きく上回った。

・遺伝子によるフグ類などの種判別

1) フグ類の分類に関する研究

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、人工交配種の両親である単一系統のトラフグおよびマフグ、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマフグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 4 個体、自然交雑フグ種 20 個体、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体につき、mtDNA 中の 16S

rRNA およびシトクロム 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。人工交配種の両親である単一系統のトラフグおよびマフグ、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマフグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 4 個体、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体、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。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となった。

一方、父系種の同定に用いることができるマイクロサテライトマーカーの選抜を行った結果、トラフグおよびマフグにおいてアガロースゲル電気泳動距離に違いが見られたマイクロサテライト遺伝子座は ATAG 反復配列、GAAAG 反復配列、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、GAAAG 反復配列、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 23、24)。

泳動距離から推定される PCR 産物の分子量は、GAAAG 反復配列ではトラフグおよびマフグでそれぞれ 194~209 および 125~145bp であり、GCA 反復配列で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 23 中の No.15 および 16、図 24 中の Torafugu, Mafugu)。

そこで、人工交配フグ種を対象に、GAAAG 反復回数の普遍性を確認したところ、両親種 (トラフグとマフグ) の分子量の各位置に複数のバンドが見られたことから、反復回数 5~9 回がマフグ由来、20~25 回はトラフグ由来であると推測された。さらに、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。

また、マフグおよびシマフグにおいて父系種の同定に用いることができるマイクロサテライトマーカーの選抜を行った結果、アガロースゲル電気泳動距離に違いが見られたマイクロサテライト遺伝子座は TATC 反復配列、TGTA 反復配列、TAGA

反復配列および AAAG 反復配列であったが、TATC 反復配列の解析においてのみ、マフグおよびシマフグ間で電気泳動距離が異なる反復配列を示すことが認められた (図 25)。そこで、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグおよびシマフグを対象に、TATC 反復配列の普遍性を確認したところ、両親種 (マフグとシマフグ) の分子量の各位置に複数のバンドが見られたことから、分子量 350bp がマフグ由来、520bp はシマフグ由来であると推測された。

これらのことから、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

巻貝特異プライマーを設計して、PCR 条件を種々検討した結果、巻貝から抽出したミトコンドリア DNA 16S rRNA 部分領域 (約 350bp) を効率よく増幅する条件を決定した。本条件で PCR 増幅したところ、巻貝生鮮品 11 種すべての試料で 350 bp 付近に PCR 増幅が確認でき、加工品 29 品目中 5 品目を除いて PCR 増幅がみられ、塩基配列から種判別が可能であった。PCR 増幅できなかった製品は、レトルトまたは缶詰であり、これらについては、加工品用に特異的プライマーを作製して PCR を行ったところ、目的とする約 150 bp の増幅産物が得られた。

ボウシュウボラのミトコンドリア DNA 16S rRNA の塩基配列解析を行い、16S rRNA を含む周辺領域の塩基配列 1916 bp を解析した。これ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の塩基配列を比較したところ、相同性はそれぞれ 84.6% および 80.8% であった。

・フグ類の形態分類

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、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) モヨウフグ属の分類学的研究

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

また、宮崎県、鹿児島県および沖縄本島から 4 個体のモヨウフグ属を入手し、詳細に調べた結果、新種であることが明らかになった。この新種はフィリピン、紅海およびアフリカ東岸で観察され、水中写真が撮影されている。各国の研究者から水中写真を取り寄せたところ、フィリピンやインド洋西部に生息する個体は、日本の個体と同種であることが判明した。

この新種には *Arothron multilineatus* という学名を与えて発表した。本種は緑褐色の体に多数の白色縦線をもつ(図 26)。白色縦線は若魚では数が少ないが、成長によって縦線の幅が狭くなるとともに数が増加する。そして、大型の成魚になると縦線が複雑に入り組み、体側の一部で網目模様を形成する。このような体色は他の 13 種には見られない

4) トラフグ属の分類学的研究

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

さらに、オランダ国立自然史博物館に保管されている 10 個体のコモフグ *Takifugu poecilonotus* (Temminck and Schlegel, 1850)タイプ標本を調べたところ、2 個体はクサフグであることが明らかになった。Boeseman (1947)がクサフグの 2 個体の一つをコモフグの Lectotype (複数のタイプ標本の一つを基準標本すること)に指定したため、国際動物命名規約によって *Takifugu poecilonotus* (Temminck and Schlegel, 1850)はクサフグ *Takifugu alboplumbeus* (Richardson, 1845)のシノニムとなる。そのためコモフグは学名を失うことが判明した。

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

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

5) サバフグ属の分類学的研究

サバフグ属のクロサバフグの学名は従来 *Lagocephalus gloveri* (Abe and Tabeta, 1983)とされ

ていたが、正しい学名は *Lagocephalus cheesemanii* (Clarke, 1897)であることが明らかになったため、学術誌に論文を発表した。クロサバフグは日本周辺から南シナ海、インドネシアなどに分布し、さらに、南半球のタスマン海にも分布することが判明した。クロサバフグは体側に幅広い銀色の縦帯をもち、体全体が黒みを帯びる。背鰭、臀鰭および胸鰭も暗灰色を呈し、サバフグ属の他種とは異なる。さらに、尾鰭が二重湾入形であり、中央部が後方へ突出する。そして、尾鰭の大部分が暗褐色あるいは黒灰色を呈し、上後端と下後端が白い。このような特徴は日本周辺の個体にも南半球のタスマン海の個体にも見られるため、本種を他種から識別する有力な形質となる。

6) その他のフグ類

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)。

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

. PSP 標準品の検討

1) デカルバモイルサキシトキシンの大量調製

岩手県大船渡湾清水定点の試験筏で採取した毒化ホタテガイ(むき身 20 kg、冷凍保存)から抽出、精製、化学変換により得られた GTX2,3 混合物を 2-メルカプトエタノール(ME)と反応させ ME-STX 結合体を調製した。これを水に溶解後、pH 12.0 に調製して沸騰浴中で 17 分間加熱し、得られた反応物を精製した。すなわち、ME-dcSTX を含む中性水溶液に過剰の ME を加えて加熱することにより、ME が脱離して生じた dcSTX を精製し、268 μmol

の目的成分を得た。なお、TOF-による分析で ME-STX は完全に消失し ME-dcSTX に変換されたことを確認した。

定量 NMR 法により、得られた dcSTX 酢酸溶液の濃度は 0.077 mmol/L と決定した。

2) 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

STX および dcSTX で AOAC OM 959.08 に準じて求めた基準 CF 値の平均値はそれぞれ 0.187 $\mu\text{g}/\text{MU}$ (標準偏差 0.008) および 0.174 $\mu\text{g}/\text{MU}$ (標準偏差 0.008) であり、ほぼ同様な値となった。

マウスアッセイによる CF 値の変動は dcSTX、STX とともに、基準 CF 値と同等もしくは若干高い値となった。初年度は実施者 1 名、次年度は 4 名で行ったが、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 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 $\mu\text{g}/\text{MU}$) 範囲内に収まらず、新たに CF 値を決定することとなった。それでも CF 値の変動は dcSTX、STX とともに 10% 以内であった。

dcSTX 希釈液の安定性を確認するために、dcSTX の希釈液に 3 mmol/L 塩酸を使用し、マウス投与を行った。この溶液および同一希釈率の水希釈液を LC-MS/MS で定期的に分析した結果、4 週間後の結果が大きく異なっているが、6 週間後は大きな変動は認められなかった (図 27)

陽性管理試料分析による標準化毒値の比較をするために、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 AOAC 法に準じた dcSTX および STX 法、外部精度管理事業で採用されている dcSTX 法によって得られた基準 CF 値から求めた標準化毒値 (STX 換算値) を比較した。dcSTX の 2 方法で求めた基準 CF 値は近い値で、標準化毒値も同等であった。STX 法による基準 CF 値による標準化毒値と、ほぼ同等であったが、dcSTX 2 法の方が若干低い値を示した。

D. 考察

・フグ毒検査法の検討

1) フグ毒検査法の見直し (簡便法の有効性)

肝臓試料において、簡便法の測定値は総じて参考法の測定値より高く、リスク管理を前提とした

分析法として簡便法は参考法の代替法として適用可能であると考えられた。簡便法の測定値は、抽出比が高いほど高く、抽出比 5 以上でもさらに上昇する傾向が認められた。しかし、回帰線から推定した抽出比 10 の相対測定値は 1.27~1.31 で、抽出比 5 の値より 5~10% 程度高いに過ぎない。また、簡便法における抽出比 5 および 6 の測定値は、参考法 (1:10) (簡便法の抽出比 10 相当) の測定値を若干上回っており、抽出効率は抽出比 5 以上でほぼ平衡状態に達しているものと推察される。さらに、参考法の検出下限値は 5 MU/g であり、抽出比を大きくするとこの検出下限値が高くなり、検出感度が低下することから、抽出比は 5 が最も妥当であると判断した。抽出比 3 の相対測定値は抽出比 5 の値の 92~97% で、検出感度をさらに高めたい場合は、抽出比を 3 としても問題は少ない。

一方、簡便法の測定値と参考法の測定値の関係を見ると、良好な正の相関が認められた。回帰線の傾きから、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低い。

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、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。

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

2) HPLC-FLD の性能評価

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

3) LC-MSにおけるマトリックス効果の検証

肝臓抽出液のLC-MS分析において、低抽出比の場合、希釈倍率が高くなると回収率が100%に近づくことから、肝臓から抽出される夾雑成分がTTXのイオン化を阻害しているものと推察された。今回、1:2抽出液の5倍希釈以上、および1:5抽出液の標準溶液でも90%以上の回収率が得られたが、希釈しても十分な精度でTTXを分析できる場合は、可能な限り希釈した試料を分析することが望ましい。

一方、LC-MS/MSの場合、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。マトリックスの影響を避けるには、分析部位の性質、抽出比とMSの検出感度に応じた希釈が必要であろう。

4) LC-QTOF/MSによるTTX分析の妥当性

ブランク試料を調製するために、1MU/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0.74MU/gとなり、1MU/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10MU/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。

5) マウス毒性試験と機器分析の分析値の比較

マウス毒性試験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。

6) 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考案され市販されているTTX検出用のELISAキットは、TTX以外の関連成分に対してはほとんど交差を示さない。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のグアニジノ基をに対し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製されている。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、優れた性状を持つ抗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を新たに作製し、毒性が高いと考えられる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関連成分を検出できることを確認した。本キットは、フグ毒ならびにその関連成分を高感度かつ迅速に定量することでフグ毒のリスク管理手法として活用できるだけでなく、フグ等の有毒生物の蓄毒機構の解明に、極めて有用なツールとなるもの

と考えられる。

・フグ等の毒性評価

1) コモンフグの毒性調査

瀬戸内海産コモンフグは、2015年10月～2016年1月、2016年12月～3月、2017年12月の三期に渡って継続調査することができた。いずれの期間においてもほとんどの皮試料が有毒であった。毒性について顕著な季節変動は認められなかったが、海域差が大きく、年変動も大きい傾向が認められた。一方で、愛知県沿岸産の皮では無毒の割合が多くなる傾向にあり、海域により毒性が大きく異なることが示唆された。また、大船渡産、有明海産、東京湾産のいずれの試料においても有毒率が高く、猛毒個体も含まれていた。

筋肉の毒性については、生鮮個体から皮などの有毒部位を速やかに除去した個体ではほとんどが無毒であったが、皮が猛毒のもののうち、4,000 MU/g を超える個体の場合、15 MU/g 未満の弱毒が検出されたものがあった。そのため皮の筋肉が著しく高濃度の個体については、生鮮または活魚であっても取扱に注意を要する。なお、凍結融解後に皮を除去した個体では皮から筋肉への移行が確認された。皮が有毒の場合、急速解凍で半解凍状態での皮の除去が推奨されているが、筋肉の毒性は皮の毒性に大きく影響することが示唆された。

皮つきのまま凍結・融解した試料では、特に皮が強毒の試料で筋肉が有毒となる個体が確認された。また、筋肉の表皮側と内臓側では表皮側の毒性が高くなる傾向が認められ、皮からの移行によるものと判断された。

岩手県の釜石湾と越喜来湾、および宮城県雄勝湾で漁獲されるコモンフグとヒガンフグは内臓部分だけでなく、筋肉の毒性も著しく高いことから食品としての取り扱いが禁止されている。その根拠となった調査 (Kodama et al. 1984) から 30 年以上が経過し、2011 年 3 月の東日本大震災に伴う大津波で生息環境が大きく攪乱されたにも拘わらず、三陸沿岸で漁獲される上記 2 種が依然として高い毒性を示し、筋肉に強毒レベルを示す個体が高頻度で出現していることが明らかとなった。さらにマフグ、ゴマフグ、およびシヨウサイフグコモンフグの 3 種につき、部位別の毒性を調べたところ、これらのフグも可食部とされる皮、肉および精巢で 10 MU/g を超過する個体が確認された。ヒガンフグを含め、三陸沿岸産のこれらのフグ類はしばしば皮に高い毒性が認められており、魚体の凍

結・融解の過程で皮の毒の一部が肉に移行している可能性は否定できない。東北地方沿岸各地における有毒フグ類の分布や、食材として利用する際の処理方法について、今後とも研究を継続する必要があると考えられる。

2) しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性

2014 年 7 月から 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ていたフグ稚魚の種判別と TTX 分析を行い、フグ稚魚混入の実態を調査した。本調査によって、しらす加工品に混入していたフグ稚魚のサイズは数 mm から 3 cm 程度であること、多くはシロサバフグであったが、いろいろな種のフグが混入していたことが明らかになった。しかし、混入するフグ稚魚に漁獲の時期や場所による特徴は見受けられなかった。

日本近海産のシロサバフグは無毒 (10 MU/g 未満) とされているが、それ以外のトラフグ属フグの成魚は有毒種である。フグ稚魚が混入したしらす加工品の安全性を評価するには、フグの毒性値と摂食量を考慮しなければならない。しかし、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。

しらす加工場等の選別作業において、しらす加工品へのフグ稚魚の混入率を調べたところ、2015 年の調査では、33 ロット 8,245 kg からフグ稚魚 795 個体 27.2 g が検出された。この値から、しらす加工品 1 kg あたりのフグ稚魚の混入は 0.096 個体で、しらす加工品 10.4 kg にフグ稚魚 1 個体が混入したことになる。これを重量に換算すると、しらす加工品 1 kg あたりフグ稚魚 0.0033 g の混入となる。これらの値と、1 回に食べるしらすの量 (しらすおろしで約 10~20 g, しらす丼で約 60~80 g) を考えると、フグ稚魚が混入したしらすを食べた場合の健康への影響はないと考えられる。また、2017 年の調査例では、しらす 140 kg にフグ稚魚 35 匹 (468 mg) が混入していた。このとき、混入していたフグ稚魚の最高 TTX 含量は 3.0 $\mu\text{g/g}$ であったので、仮にこのフグ稚魚すべてを一度に喫食したとすると摂取する TTX 量は 1.4 μg となる。ヒトのフグ毒中毒量は不明だが、推定致死量は 2 mg とされているので、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* 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。

・ 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、マフグおよびシ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トラフグおよびマフグ間では GAAAG マーカー、GCA マーカー、マフグおよびシマフグ間では TATC マーカーを用いた核 DNA による父系種同定法の構築を試みた結果、従来通り、mtDNA 解析法による母系種同定の有効性が再確認されるとともに、新たに核 DNA による GAAAG 反復配列、GCA 反復配列の回数の差から父系種同定が可能であることが示された。

GAAAG 反復配列では、人工交配種すべてにおいて、トラフグ由来の 194~209 bp(反復回数 20-25 回)およびマフグ由来の 125~145 bp(反復回数 5-9 回)の PCR 産物が得られ、保存性が高く普遍的であることが確認された。また、一般的に流通している市販トラフグでは 26 個体中 20 個体(77%)、マフグでは 20 個体中 14 個体(70%)で上述した分子量の PCR 産物が得られた。なお、市販されて

いるトラフグおよびマフグにおいて 70~77%程度の再現性を示しているが、これはおそらく市販されているフグの一部が必ずしも単一系統ではない可能性があるものと考えている。

GCA 反復配列では、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。

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

TATC 反復配列では、電気泳動距離の違いから父系種同定に適用可能であることが示された。このマイクロサテライト領域は、マフグとシマフグ間交雑種と推定された個体において、マフグ由来の 350 bp およびシマフグ由来の 520 bp の PCR 産物が得られた。また、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグでは 20 個体中 13 個体(65%)、シマフグでは 10 個体中 8 個体(80%)で上述した分子量に近い PCR 産物が得られた(図示せず)。しかしながら、今回用いたマフグおよびシマフグにおいて、複数本のバンドを得た個体も存在した。これはマフグおよびシマフグの一部が必ずしも単一系統ではない可能性があるものと考えられる。

2) 有毒巻貝種判別法の開発

巻貝の生鮮品および加工品について、本研究で確立した PCR 条件で当該遺伝子を増幅できることが明らかになり、テトラミンだけでなくフグ毒をもつ有毒巻貝の種判別が可能になった。レトルトや缶詰製品の一部で、殺菌加熱により試料中の DNA が断片化された場合でも、巻貝加工品用に作製した別のプライマーを用いれば PCR 増幅が可能になった。しかし、増幅される遺伝子領域が短い分、「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」では、塩基配列が同一あるいは酷似するものがある。これらを正確に種判別する

には、別の遺伝子領域を検討する必要がある。重篤なフグ毒中毒を引き起こした有毒巻貝のポウシュウボラについて、ミトコンドリア DNA 16SrRNA の遺伝子配列が登録されていなかったため、この全塩基配列を決定した。これにより、今後はポウシュウボラの種判別を容易に行うことができる。

・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、本研究を通じて新種が発見され、記載された。また、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。

同定ガイドを作成する上で留意したことは、識別形質の示し方である。例えば、フグ類の種を識別するためには体表の小棘の有無や分布パターンが使われてきた。しかし、実際に現場でフグ類を扱っている人達にとっては小棘の有無を確認することは容易ではない。フグ類の小棘はしばしば体表の粘液に覆われていたり、皮膚からわずかしか

突出していないことがあったりするため、肉眼で観察するだけでは見分けることが難しい。本研究で作成した同定ガイドでは尾部から頭部に向かって体表を指の腹でなぞれば小棘の有無を判別できることを記した。このような事は実際に多数のフグ類を扱った経験がなければ分からないことであるため、従来出版物には記されていなかった。

また、フグ類の同定のためには体色が極めて重要であるが一見すると似た体色を示す種がいる。そのため種を識別するためには、体色のどの部分に留意する必要があるかを知っていなければならない。このフグ類同定ガイドの試供版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。

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

・PSP 標準品の検討

1) デカルバモイルサキシトキシンの大量調製

毒化貝や有毒微細藻に含まれる麻痺性貝毒の常成分 (C1, C2, GTX1~6, neoSTX, dcSTX, STX 等) は、8以上のpHで著しく不安定となり、酸化されて無毒の蛍光プリン体に分解される。いっぽう11位に硫酸エステルを持つGTX2、GTX3などの成分は、種々のチオール化合物と反応し、11β位に硫黄原子を介してチオールとの結合体を形成する (Sato et al., 2000)。筆者らは1,2-エタンジチオール(EDT)や2-メルカプトエタノール(ME)がGTX2,3に作用して生じる結合体は塩基性条件下で著しく安定であることを見出し、ME-STXを塩基性条件下で加熱することにより側鎖カーバモイル基を加水分解することにより、高収率でME-dcSTXが得られることを明らかにした(佐藤ら 2016、特開2016-204270)。前述のように現在のところdcSTX標品は、C1、C2をMEなどのチオールで処理して得られるGTX5を中性付近で煮沸する、あるいはC1、C2を中性付近で煮沸して得られるdcGTX2とdcGTX3の混合物をME

処理することにより調製されている。これらの方法では最終産物であるdcSTX標品に混入する微量のSTXをカラムクロマトグラフィーで完全に分離することは困難である。本研究で使用した、pH 12の水溶液中で15分以上煮沸する条件下では、収率は若干低下するもののME-STXのcarbamoyl側鎖を完全に加水分解・脱離してME-dcSTXのみを得ることが可能である。さらにME-dcSTXからはME処理により容易にdcSTXを回収することが出来ることを確認した。

2) 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

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

・フグ毒検査法の検討

参考法は抽出操作が煩雑で効率が悪いうえ、試料残渣にTTXが残留し、毒性が実際より低く評価される恐れがある。これに対し、簡便法は、迅速に、かつ真の値により近い測定値が得られる方法と考えられる。さらに、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割程度高い。すなわち、参考法によって得られた値を真値と仮定した場合、簡便法による真度は110~120%であると推定され、簡便法によって得られた値は妥当であると考えられる。

HPLC-FLDは感度、精度ともに高く、研究上のみならず、食品の安全性を確認する試験法としても有用であることが示された。今後さらに、室内および室間再現精度の妥当性についても検討することが望ましい。

LC-MSないし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。最も影響の大きい皮の場合、少なくとも5倍抽出液を10倍に希釈することで夾雑物の影響を低減できることが確認された。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。

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。

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。

・フグ等の毒性評価

1) コモンフグの毒性

コモンフグの皮の毒性は、採取海域や採取年による変動が大きいことが示唆され、中には7,000 MU/g もの猛毒を持つ個体も確認された。これは、1.4 g程度の摂取で人を死に至らしめる可能性がある濃度であるため、特に高毒化海域におけるコモンフグを摂取する際には手袋を使用するなどの注意も必要と考えられた。

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。

・ 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。

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。

・ 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。

・ PSP 標準品の検討

廃棄処分となる毒化二枚貝の中腸腺を活用し、dcSTX を大量調製することに成功した。

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、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) H. Lin, C. Zhang, J. Liao, F. Yang, S. Zhong, P. Jiang, X. Chen, Y. Nagashima: Neutralizing effect of hemolymph from the shore crab, *Thalamita crenata*, on paralytic shellfish toxins. *Toxicon* 2015; 99: 51-57.

- 2) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Biliary excretion of tetrodotoxin in the cultured pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. *Toxicon* 2015; 93: 98-102.
- 3) A. Kiriake, A. Ohta, E. Suga, T. Matsumoto, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Comparison of tetrodotoxin uptake and gene expression in the liver between juvenile and adult tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Toxicon* 2016; 111: 6-12.
- 4) C. Acar, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Toxicity of the Lessepsian pufferfish *Lagocephalus sceleratus* from eastern Mediterranean coasts of Turkey and species identification by rapid PCR amplification. *Eur. Food Res. Technol.* 2016; DOI 10.1007/s00217-016-2721-1.
- 5) 桐明絢, 太田明, 岡山桜子, 松浦啓一, 石崎松一郎, 長島裕二: しらす加工品に混入したフグ稚魚の種判別と毒性. *食品衛生学雑誌* 2016; 57: 13-18.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 荒川修: フグ毒の蓄積機構と生理機能. *アクアネット*, 222, 27-31 (2016).
- 10) S. Jiang, H. Iwashita, O. Arakawa and T. Takatani: Growth and PST production of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* cultured under monochromatic light. *Aquacult. Sci.*, 64, 379-390 (2016).
- 11) R. Tatsuno, W. Gao, K. Ibi, T. Mine, K. Okita, G. N. Nishihara, T. Takatani and O. Arakawa: Profile differences in tetrodotoxin transfer to skin and liver in the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Toxicon*, 130, 73-78 (2017).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) 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.
- 16) 佐藤繁(2015) 麻痺性貝毒の生物化学的変換に基づいた簡易分析法の開発. 平成 26 年度水産学技術賞. *日本水産学会誌* 81(5)、792-795.
- 17) 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 (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
- 18) S Watabe, MS 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
- 19) 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
- 20) 大城直雅, ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保 日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し 3. 沖縄地区のフグの毒性. 日本水産学会誌 82(2), 168, 2017
- 21) 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)
- 22) T Ikehara, K Kuniyoshi, N Oshiro, T Yasumoto, Biooxidation of Ciguatoxins Leads to Species-Specific Toxin Profiles. *Toxins* 9(7), 205, 2017
- 23) K. Matsuura: A new pufferfish, *Arothron multilineatus* (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae), from the Indo-West Pacific. *Ichthyological Research*, 63, 480-486 (2016).
- 24) E. Katayama, K. Matsuura: Fine structures of scales of ocean sunfishes (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Molidae): another morphological character supporting phylogenetic relationships of the molid genera. *Bulletin of National Museum of Nature and Science, Ser. A*, 41, 95-98 (2016).
- 25) 松浦啓一, ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保—日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し 1. 日本沿岸に見られるフグ類の分類, 日本水産学会誌, 82, 166 (2016).
- 26) Y. V. Dyldin, K. Matsuura, S. S. Makeev: Comments of puffers of the genus *Takifugu* from Russian waters with the first record of Yellowfin Puffer, *Takifugu xanthopterus* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) from Sakhalin Island. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series A*, 42, 133-141 (2016).
- 27) 19) K. Matsuura, T. P. Satoh: Redescription of *Lagocephalus cheesemanii* (Clarke, 1897), a senior synonym of *Lagocephalus gloveri* Abe and Tabeta, 1983 based on morphological and genetic comparisons (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae). *Ichthyological Research*, 64, 104-110 (2017).
- 28) K. Matsuura, A. Kaneko, E. Katayama: Underwater observations of the rare deep-sea fish *Triodon macropterus* (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Triodontidae) with comments on the fine structure of the scales. *Ichthyological Research, Ichthyological Research*, 64, 190-196 (2017).
- 29) K. Matsuura, I. Middleton: Discovery of a larva of the Aracanidae (Actinopterygii, Tetraodontiformes) from New Zealand. *Ichthyological Research*, 64, 151-154 (2017).
- 30) K. Matsuura: Taxonomic and nomenclatural comments on two puffers of the genus *Takifugu* with description of a new species, *Takifugu flavipterus*, from Japan (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Tetraodontidae). *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series A*, 43, 71-80 (2017).
- 31) Y. V. Dyldin, K. Matsuura, A. M. Orlov, V. I. 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*, 411-417, November 15-16, 2017 (2017).

2. 著書・総説

- 1) Y Nagashima, O Arakawa, Pufferfish poisoning and tetrodotoxin. P Gopalakrishnakone ed., *Marine and Freshwater Toxins*, Springer, Singapore, 2016, 259-284.
- 2) K. Matsuura: Tetraodontiformes. In: S. Kimura, A. Arshad, H. Imamura, M. A. Ghaffar (eds.), *Fishes of the Northwestern Johor Strait, Peninsular Malaysia*. University Putra Malaysia Press and Mie University, Japan, 2015, pp. 98-105.
- 3) 松浦啓一, 日本産フグ類図鑑, 東海大学出版部, 秦野, 2017, 127 pp.

- 4) 長島裕二：自然毒．魚介の科学，阿部宏喜編，朝倉書店，東京，2015；pp. 185-196.
- 5) 長島裕二：フグ肝臓におけるフグ毒蓄積タンパク質．日本水産学会誌 2015；81：736.
- 6) 長島裕二，松本拓也：フグ毒テトロドトキシンの体内動態解析：トラフグを用いた毒化モデル実験．LABIO 21 2015；No. 62：24-27.
- 7) 長島裕二：フグと食中毒．中学保健体育科ニュース，大修館書店，2015；No.4：2-5.
- 8) 長島裕二，桐明絢：海洋危険生物 食べて中毒；とくに魚について．中毒研究 2016；29：3-9．
- 9) 長島裕二，桐明絢：しらすへのフグ稚魚混入．全水卸 2016；356：8-11.
- 10) 長島裕二，桐明 絢：魚介類の毒とその特徴．アクアネット 2016；19(12)：22-26.
- 11) 荒川修：フグの毒テトロドトキシシン —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).
- 12) 佐藤 繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第8回)．モヨウフグ・ホシフグ．食と健康 59(4)，pp.30-31、日本食品衛生協会.
- 13) 佐藤繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第9回)．コクテンフグ・ケショウフグ．食と健康 59(5)，pp.28-29、日本食品衛生協会.
- 14) 佐藤繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第10回)．センニンフグ・カイユウセンニンフグ．食と健康 59(6)，pp.28-29、日本食品衛生協会.
- 15) 佐藤繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第11回)．キタマクラ・サザナミフグ．食と健康 59(7)，pp.28-29、日本食品衛生協会.
- 16) 佐藤繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第12回)．クロサバフグ・クマサカフグ．食と健康 59(8)，pp.28-29、日本食品衛生協会.
- 17) 佐藤繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第13回)．カスミフグ・スジモヨウフグ．食と健康 59(9)，pp.36-37、日本食品衛生協会.
- 18) 佐藤繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第14回)．カナフグ・ヨリトフグ．食と健康 59(10)，pp.28-29、日本食品衛生協会.
- 19) 佐藤繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第15回)．ミゾレフグ・ワモンフグ．食と健康 59(11)，pp.28-29、日本食品衛生協会.
- 20) 佐藤繁・松浦啓一(2015) フグを知って中毒防止(第16回)．アラレフグ・ナガレモヨウフグ．食と健康 59(12)，pp.38-39、日本食品衛生協会.
- 21) 佐藤繁・松浦啓一(2016) フグを知って中毒防止(第17回)．シマキンチャクフグ・タキフグ．食と健康 60(1)，pp.48-49、日本食品衛生協会.
- 22) 佐藤繁・松浦啓一(2016) フグを知って中毒防止(第17回)．シッポウフグ・アマミホシゾラフグ．食と健康 60(1)，pp.30-31、日本食品衛生協会.
- 23) 佐藤繁・松浦啓一(2016) フグを知って中毒防止(第19回)．シボリキンチャクフグ・ナミダフグ．食と健康 60(3)，pp.30-31、日本食品衛生協会.
- 24) 大城直雅，水産物(マリンバイオトキシシン)由来の食中毒．獣医公衆衛生研究 19(2)，4-9，2017
- 25) 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
- 26) 石崎松一郎，臼井芽衣(2016)：フグの分類 - 最前線 - ．Sunatec e-Magazine, vol. 120 (1)
- 27) 松浦啓一：フグ類の学名はなぜ変わったのか？日本水産学雑誌，83，718-721 (2017).
- 28) 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).
- 29) 26) 松浦啓一：動物分類学の基礎 - 2 ．食品衛生学雑誌，59 巻(2018 印刷中)．

3. 学会発表

- 1) 桐明絢，太田明，岡山桜子，石崎松一郎，長島裕二：しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性．第109回日本食品衛生学会学術講演会，2015年5月，東京都江東区．
- 2) 桐明絢，長島裕二：しらすに混入したフグ稚魚の種同定と毒性．第25回西日本ふく研究会，山口県下関市，2015年5月．
- 3) 桐明絢，塩見一雄，長島裕二：アイゴ類刺毒の一次構造 アイゴの刺毒はカサゴ目魚類刺毒と共通の構造をもつ—．第29回海洋生物活性談話会，2015年5月，静岡県下田市．
- 4) 長島裕二：しらす干しフグ稚魚の混入．しらす干しフグ稚魚混入危機管理等における意見交換会，2015年7月，東京都中央区．
- 5) 長島裕二：海洋動物の毒．第37回日本中毒学会総会・学術集会，2015年7月，和歌山県和歌山市．

- 6) A. Kiriake, Y. Nagashima, K. Shiomi: Primary structure of a proteinaceous toxin from rabbitfish *Siganus fuscescens*. September, 2015, 18th Congress of the International Society on Toxinology, London, United Kingdom.
- 7) 桐明絢, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の遺伝子による種判別. 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 10 月, 京都府京都市.
- 8) 岡山桜子, 桐明 絢, 永井 慎, 石崎松一郎, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬け製造工程における毒成分変化. 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 10 月, 京都府京都市.
- 9) 長島裕二: しらすへのフグ稚魚の混入. しらすへの フグ稚魚混入に関する講演会, 2016 年 3 月, 東京都中央区.
- 10) 大木理恵子, 石橋敏章, 石崎松一郎, 長島裕二: ボウシュウボラおよびキンシバイの毒性とフグ毒成分. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月, 東京都港区.
- 11) 桐明絢, 太田明, 岡山桜子, 松浦啓一, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすへのフグ稚魚の混入種判別とフグ毒分析. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月, 東京都港区.
- 12) 北島冴美, 角川峻徳, 松本拓也, 長島裕二: 次世代シケンサーアーカイブを用いたトラフグ肝臓薬物排泄トランスポーターのクローニング. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月, 東京都港区.
- 13) 角川峻徳, 北島冴美, 松本拓也, 長島裕二: 次世代シケンサーデータベースを用いたトラフグ肝臓有機イオントランスポーターのクローニングの試み. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月, 東京都港区.
- 14) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Pharmacokinetics and biliary excretion of tetrodotoxin in the marine pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. 7th World Fisheries Congress, May, 2016, Busan, Korea.
- 15) 長島裕二, 岡山桜子: ふぐ卵巣ぬか漬けの毒性低下のメカニズム. 第 26 回西日本ふぐ研究会, 平成 28 年 5 月, 山口県下関市.
- 16) 桐明絢, 石崎松一郎, 長島裕二, 塩見一雄: カサゴ目魚類刺毒の性状および構造解析. 第 63 回トキシンシンポジウム, 平成 28 年 7 月, 山形県天童市.
- 17) 永井慎, 岡山桜子, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬け工程での減毒に関する微生物探索に関する研究. 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 平成 28 年 9 月, 奈良県奈良市.
- 18) 徐超香, 太田晶, 岡山桜子, 崔浩, 石崎松一郎, 長島裕二: 食用フグの見直し - 日本沿岸ホシフグの安全性評価 -. 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 平成 28 年 10 月, 北海道函館市.
- 19) 岡山桜子, 永井慎, 石崎松一郎, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬けにおける減毒要因の検討. 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会. 平成 28 年 10 月, 北海道函館市.
- 20) 長島裕二: しらすへのフグ稚魚の混入について. 平成 28 年度水産利用関係者研究開発推進会議, 平成 28 年 11 月, 神奈川県横浜市.
- 21) 長島裕二: フグ食中毒とフグ毒中毒. 平成 28 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会 市民公開講座, 平成 29 年 2 月, 石川県金沢市.
- 22) 長島裕二: しらすへのフグ稚魚の混入について. 静岡県水産技術研究所第 62 回水産加工技術セミナー, 平成 29 年 3 月, 静岡県静岡市.
- 23) 長島裕二: 魚介類の毒素タンパク質. 平成 29 年度日本水産学会春季大会シンポジウム「水圏生物タンパク質科学の新展開」, 平成 29 年 3 月, 東京都港区.
- 24) 崔浩, 横塚峻介, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: 凍結解凍によるコモンフグ筋肉へのフグ毒の移行. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 平成 29 年 3 月, 東京都港区.
- 25) 大木理恵子, 松本拓也, 石崎松一郎, 長島裕二: 組織培養法によるパイのテトロドトキシン取り込み. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 平成 29 年 3 月, 東京都港区.
- 26) 松本拓也, 北島冴美, 青柳充, 三苦好治, 石崎松一郎, 長島裕二: トラフグ薬物排泄トランスポーターBcrp をコードする Abcg2 遺伝子のクローニング. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 平成 29 年 3 月, 東京都港区.
- 27) 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, 平成 29 年 5 月, 福井県福井市.
- 28) 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・シーフードショー 国際ふぐ協会セミナー, 平成 29 年 8 月, 東京都

- 江東区 .
- 29) 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, 平成 29 年 9 月, 東京都港区.
- 30) S. Yokozuka, Y. Kitani, N. Suzuki, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Bio-transformation of paralytic shellfish toxin by the hemolymph of shore crab *Gaeticte depressus*. 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム, 平成 29 年 9 月, 東京都港区.
- 31) 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, 平成 29 年 9 月, 東京都港区.
- 32) 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, 平成 29 年 10 月, 東京都江東区 .
- 33) 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 . 平成 29 年 11 月, 愛知県名古屋市 .
- 34) 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, 平成 30 年 3 月, 東京都港区 .
- 35) 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, 平成 30 年 3 月, 東京都港区 .
- 36) 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, 平成 30 年 3 月, 東京都港区 .
- 37) 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, 平成 30 年 3 月, 東京都港区 .
- 38) K. Okita, H. Satone, E. Tan, S. Kinoshita, S. Asakawa, H. Yamazaki, K. Sakiyama, T. Takatani, O. Arakawa, A. Hagiwara and Y. Sakakura: Transcriptome analysis of tetrodotoxin sensing and action of tetrodotoxin in the brain of tiger puffer *Takifugu rubripes* by next-generation sequencing. 145th Annual Meeting of American Fisheries Society, Portland, Aug. 2015.
- 39) 高谷智裕, 荒川 修, 鈴木重則, 望岡典隆: 交雑フグの毒性. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム「フグ食の安全性確保 – 日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し」, 仙台, 2015 年 9 月
- 40) C. Urata, S. Jiang, K. Kuwano, T. Takatani and O. Arakawa: Growth and kainic acid production of the red alga *Digenea simplex* cultured under monowavelength light irradiation. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, Jeju, Nov. 2015.
- 41) Y. Kanahara, R. Tatsuno, K. Soyano, T. Takatani and O. Arakawa: Maturation-associated changes in the internal distribution of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu pardalis*. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, Jeju, Nov. 2015.
- 42) W. Gao, R. Tatsuno, K. Yamaguchi, T. Takatani and O. Arakawa: Expression of PSTBP homologues in several pufferfish species. 10th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, Jeju, Nov. 2015.
- 43) 辰野竜平, 識名美和子, 古下 学, 山口健一, 高谷智裕, 荒川 修: ツムギハゼ卵巣における TTX 結合性物質の探索. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2016 年 3 月
- 44) 金原葉子, 辰野竜平, 征矢野清, 高谷智裕, 荒川 修: ヒガンフグ体内 TTX 分布の性成熟に伴う変化. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2016 年 3 月
- 45) 池北侑人, 姜 珊珊, 市丸俊一, 高増 剛, 荒川 修, 高谷智裕: 長崎県九十九島におけるヒオウギガイの麻痺性貝毒による毒化. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2016 年 3 月
- 46) 高威, 辰野竜平, 山口健一, 高谷智裕, 荒川 修: 数種フグにおける PSTBP 相同タンパク質

- アイソフォーム群の探索. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2016 年 3 月
- 47) S. Jiang, H. Iwashita, O. Arakawa and T. Takatani: Growth and PSP production of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* cultured under monowavelength light irradiation. The 7th World Fisheries Congress, Busan, May 2016.
- 48) K. Taniguchi, H. Takao, K. Onuki, Y. Sakakura, T. Takatani, O. Arakawa and T. Noguchi: Providing pufferfish liver for human consumption (1): Toxicity evaluation. The 7th World Fisheries Congress, Busan, May 2016.
- 49) O. Arakawa: Marine toxins responsible for food poisonings in Japan. 2016 International Conference on Food Safety Applications, Kaohsiung, September 2016.
- 50) M. J. Kim, O. Arakawa and T. Takatani: Toxicity of *Palythoa* zoanthids from Yakushima Island, Japan. The 15th Joint Symposium between Nagasaki University and Pukyong National University on Marine and Fisheries Sciences, Nagasaki, October 2016.
- 51) 福田 遼, 佐々木杜汰, 菅向志郎, 高谷智裕, 荒川 修: 遠州灘産交雑フグの毒性. 平成 28 年度日本水産学会九州支部大会, 長崎, 2016 年 12 月
- 52) 宗宮史樹, 高谷智裕, 青島 隆, 森井康宏, 荒川 修: 屋久島および石垣島産オウギガニ科カニ類の毒性プロファイル. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2017 年 3 月
- 53) 姜 珊珊, 桑野和可, Gregory N. Nishihara, 浦田千里, 下田隆介, 高谷智裕, 荒川 修: 窒素安定同位体を用いた紅藻マクリの培養. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2017 年 3 月
- 54) 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.
- 55) 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.
- 56) 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
- 57) 佐藤繁(2016) 東北地区のフグ類の毒性. ミニシンポジウム記録: フグ食の安全性確保—日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し. 日本水産学会誌 82(2)、169.
- 58) S Sato, H Kosugi, S Takaishi, S Kaga, Y Kaga, S Watanabe, K Naiki, A Kobiyama, MS Reza, Y Yamada, Y Ikeda, D Ikeda, N Mizusawa, T Kudo, S Watabe (2016) A new ELISA kit as a monitoring tool for paralytic shellfish toxins. Kitasato-KAUST Joint International Workshop “Marine Metagenomics: Comparative Study among Different Marine Resources”. 24–25 August 2016. Sanriku Education and Research Center for Marine Biosciences
- 59) S Takaishi, S Sato, K Yasumoto, A Kobiyama, Y Ikeda, T Kudo, S Watabe (2016) A new polyclonal antibody against tetrodotoxin. Kitasato-KAUST Joint International Workshop “Marine Metagenomics: Comparative Study among Different Marine Resources”. 24–25 August 2016. Sanriku Education and Research Center for Marine Biosciences
- 60) 佐藤繁・藤田沙和衣・森美貴・犬童優華・佐伯富貴・高石鈴香・大城直雅(2017) デカルバモイルサキシトキシンの大量調製法. 平成 29 年度日本水産学会春季大会講演要旨集 p 112 .
- 61) 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 .
- 62) 大城直雅, 下痢性貝毒(オカダ酸群)の新規制値と検査法. 第109回日本食品衛生学会学術講演会教育講演, 東京, 2015 年 5 月
- 63) N Oshiro, S Sakugawa, K Kuniyoshi, R Murata, K Tachihara, T Yasumoto, LC-MS analysis of ciguatoxins from fish and other marine organisms collected off the coast of Japan. Fifth Joint Symposium and AOAC Task Force Meeting, Marine & Freshwater Toxins Analysis, Baiona,

2015.06

- 64) 大城直雅, 沖縄地区のフグの毒性 平成27年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム「フグ食の安全性確保 日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し」, 仙台市, 2015年09月
- 65) 大城直雅, 國吉杏子, 堀田彩乃, 鈴木貴文, 杉田典子, 松浦啓一, 中島安基江, 安西洋一: コモンフグの毒性分析. 第53回全国衛生化学技術協議会年会, 青森県青森市, 2016年11月.
- 66) 大城直雅: コモンフグの毒性評価. 第33回マリントキシシン研究会, 東京, 2017年3月.
- 67) 大城直雅, コモンフグ筋肉から検出されたテトロドトキシシンの由来. 第113回食品衛生学会, 東京江戸川区, 2017年11月
- 68) 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
- 69) 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.

- 70) 松浦啓一: 日本沿岸に見られるフグの分類. 平成27年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム. 2015年9月, 宮城県仙台市.
- 71) 松浦啓一: クサフグの学名が変更され, コモンフグは未記載種となる. 2016年度日本魚類学会年会. 2016年9月, 岐阜県岐阜市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

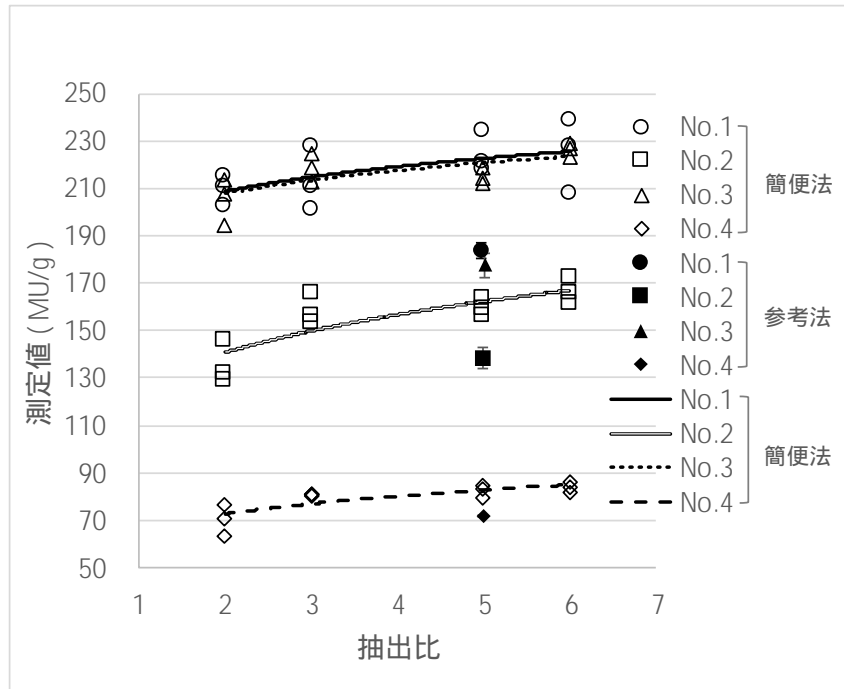


図1 参考法と簡便法の各抽出比で得られた測定値の比較（トラフグ肝臓）

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

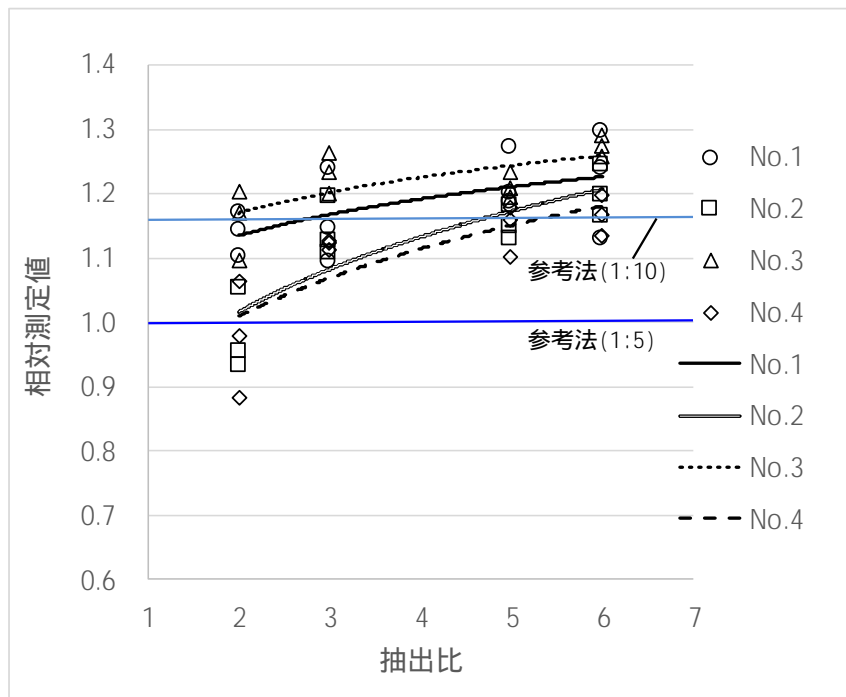


図2 簡便法測定値の参考法測定値に対する比率（相对測定値）と抽出比の関係

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

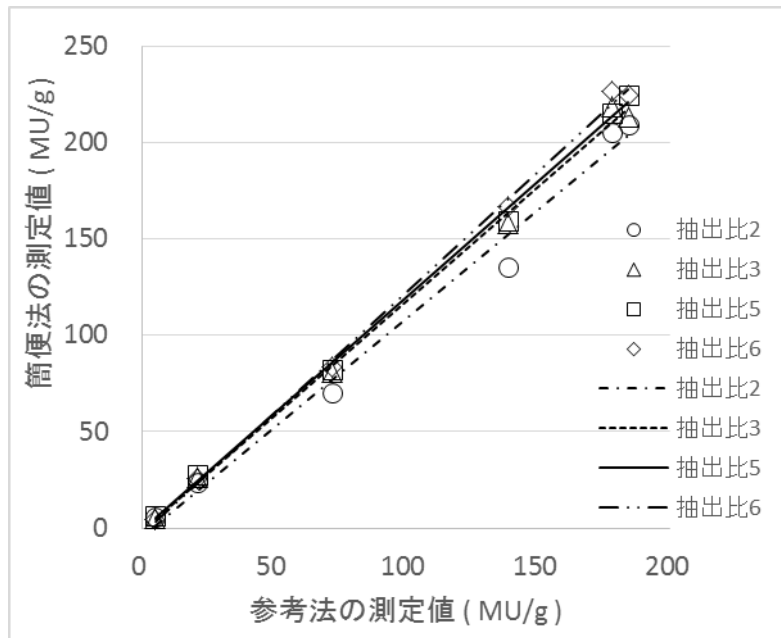


図3 各抽出比における簡便法と参考法の測定値（平均値, n = 6）の相関

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

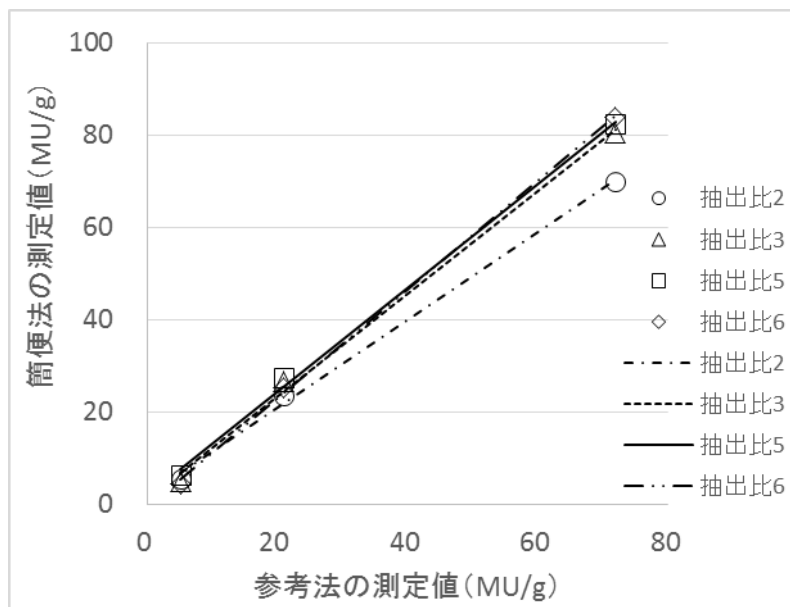


図4 低毒力域における簡便法と参考法の測定値（平均値, n = 3）の相関

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

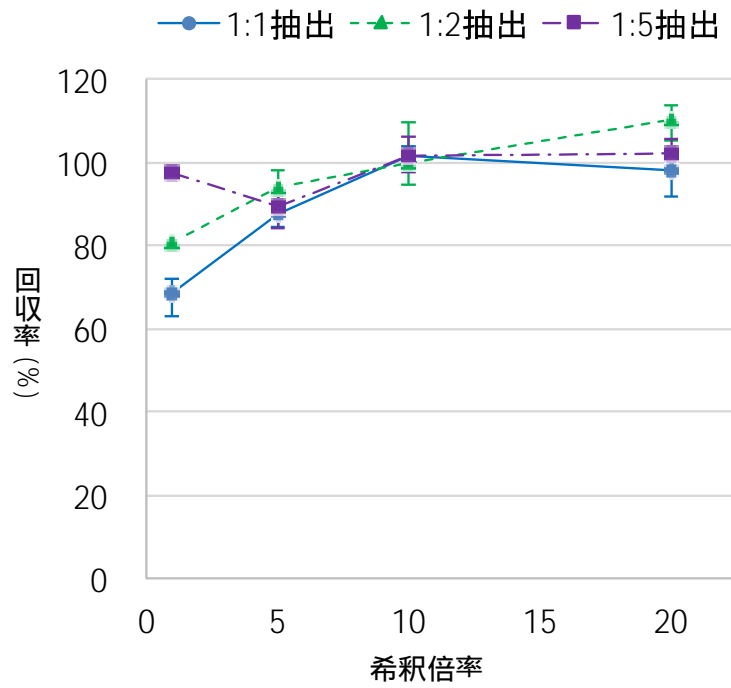


図5 LC-MS法におけるマトリックスの影響（トラフグ肝臓抽出液）

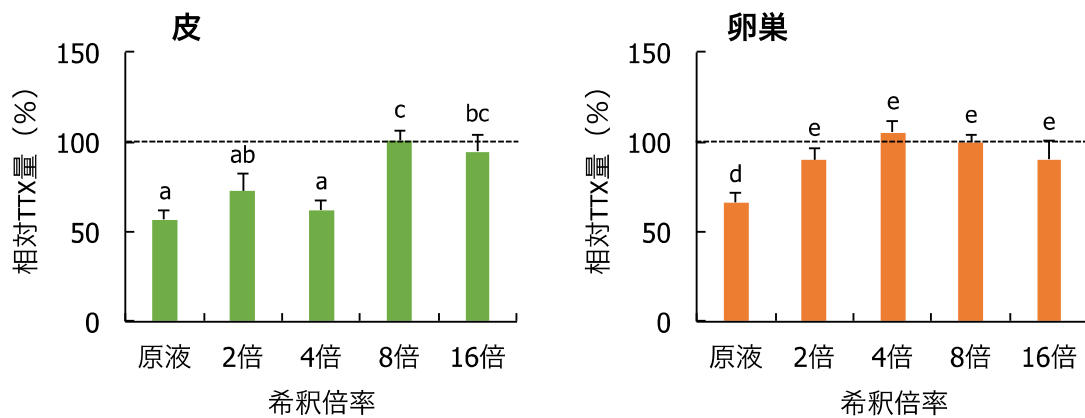


図6 無毒養殖トラフグ組織抽出液（原液および希釈液）に添加した TTX の LC-MS/MS による測定値（添加量に対する相対値）
 $a < b < c, d < e, p < 0.05$

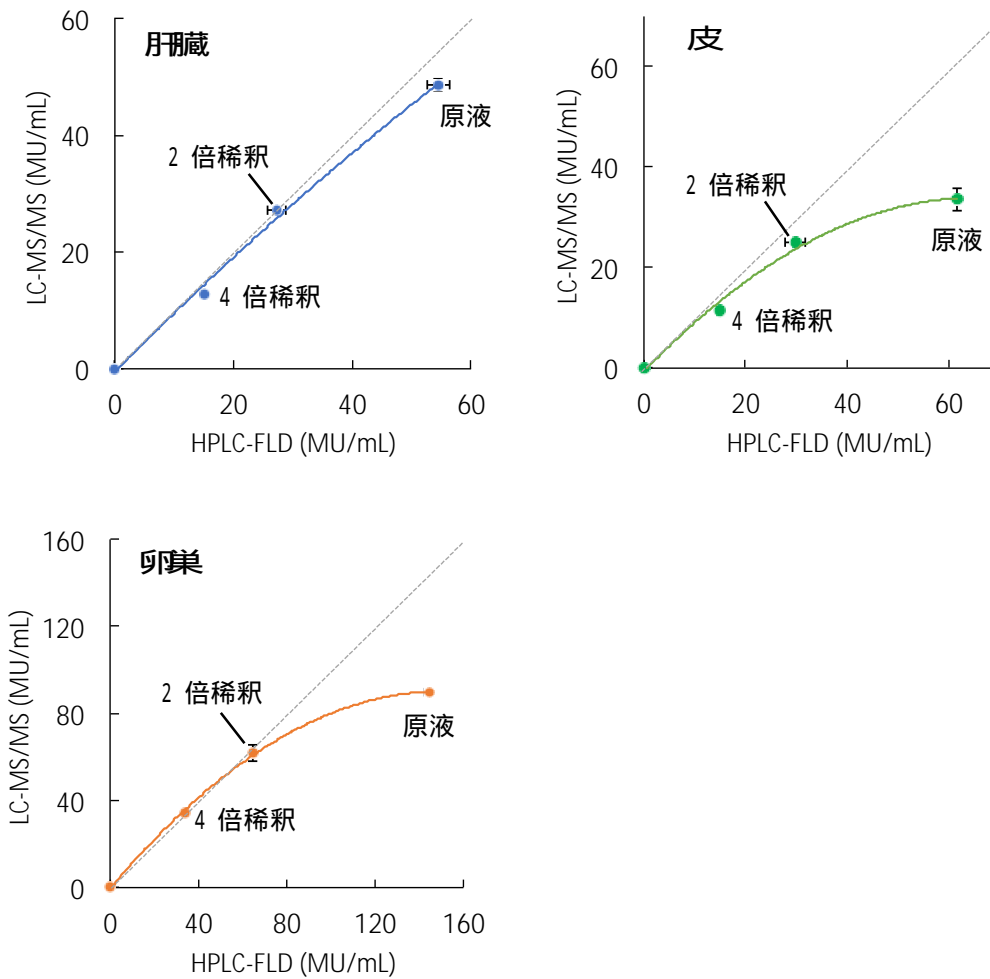


図7 LC-MS/MS および HPLC-FLD による天然マダガスカル組織抽出液（原液および希釈液）中の TTX 量測定値の相関

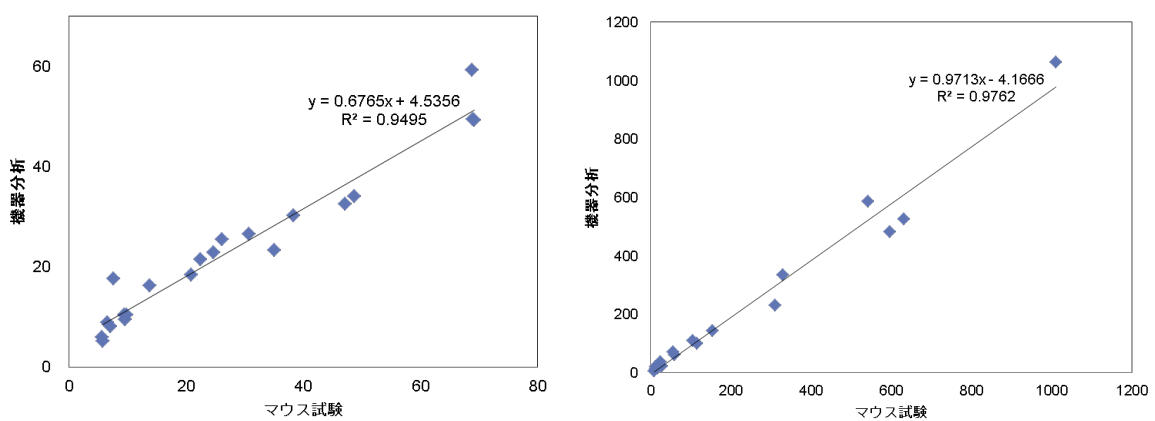


図8 マウス毒性試験法および機器分析法で得られた結果の相関（左：筋肉、右：皮）

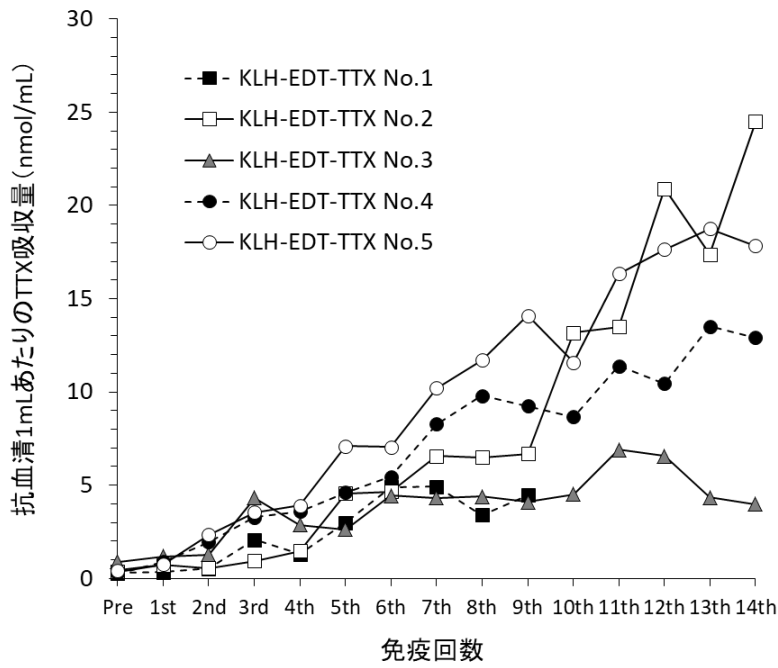


図9 KLH-EDT-TTX を免疫したウサギの血清の抗体価の推移

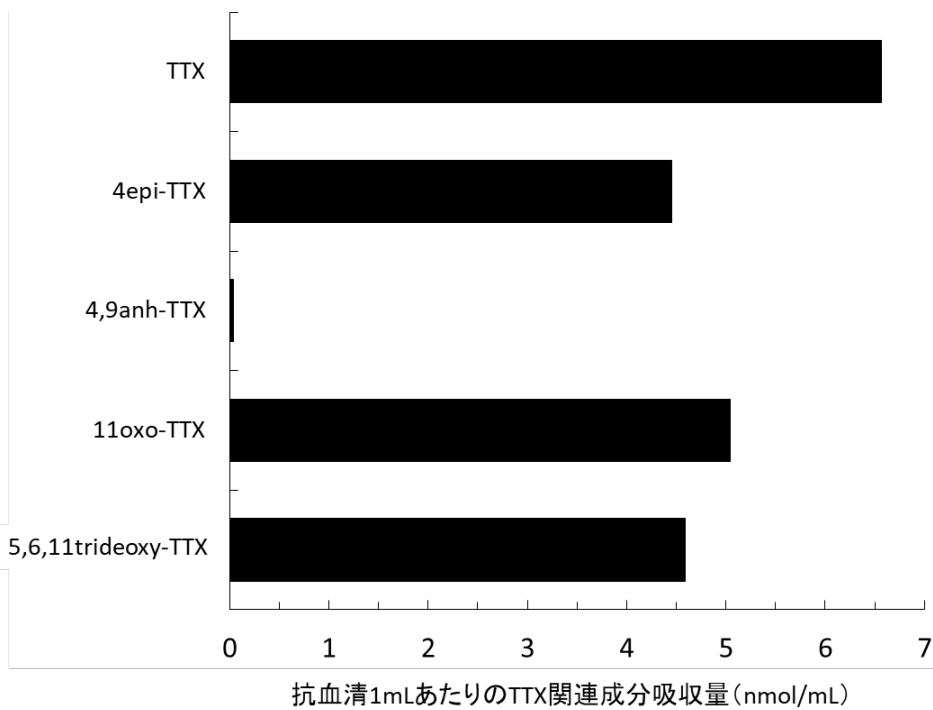
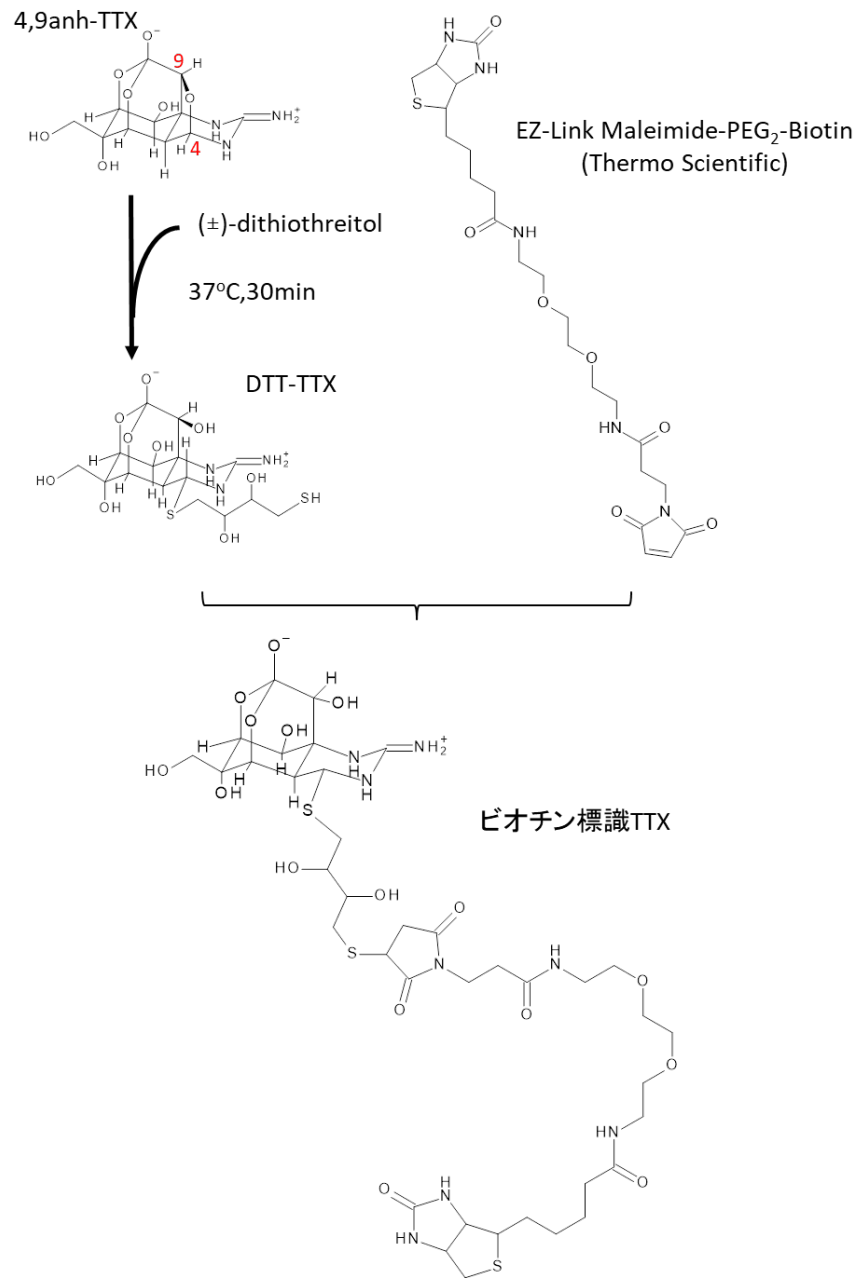


図10 TTX 関連成分の抗血清(KLH-EDT-TTX No.2, 14 週目)に対する親和性



$[M + 2H]^{++} : 491.1707$ (calcd: 491.1723)

$[M + H]^+ : 981.3337$ (calcd: 981.3368)

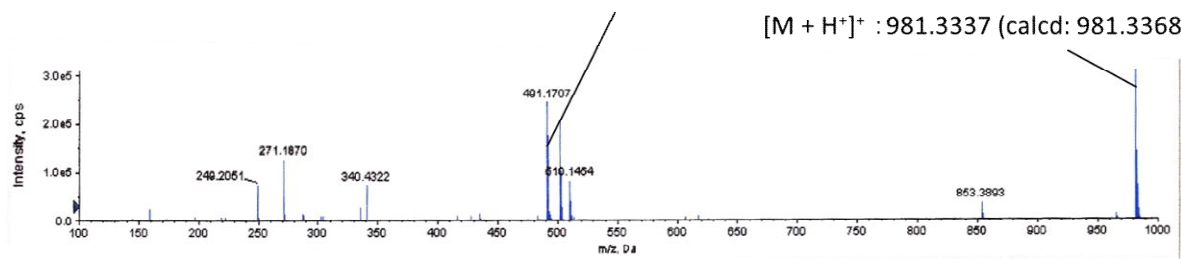


図 11 ビオチン標識 TTX の調製法 (上) および TOFMS スペクトル (下)

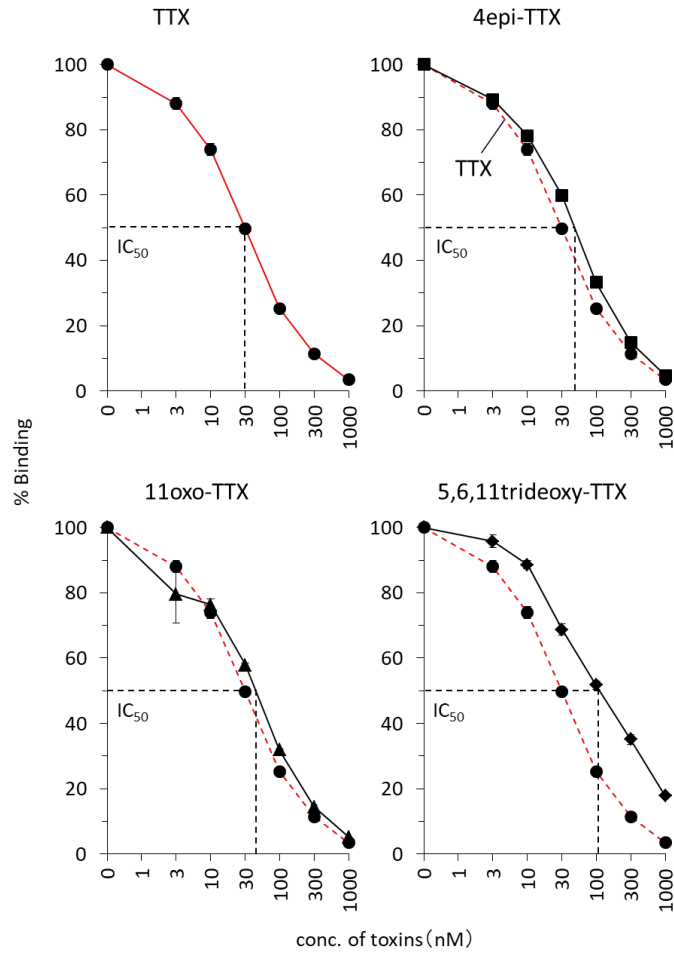


図 12 試作 ELISA キット上での TTX 関連成分各標品の分析

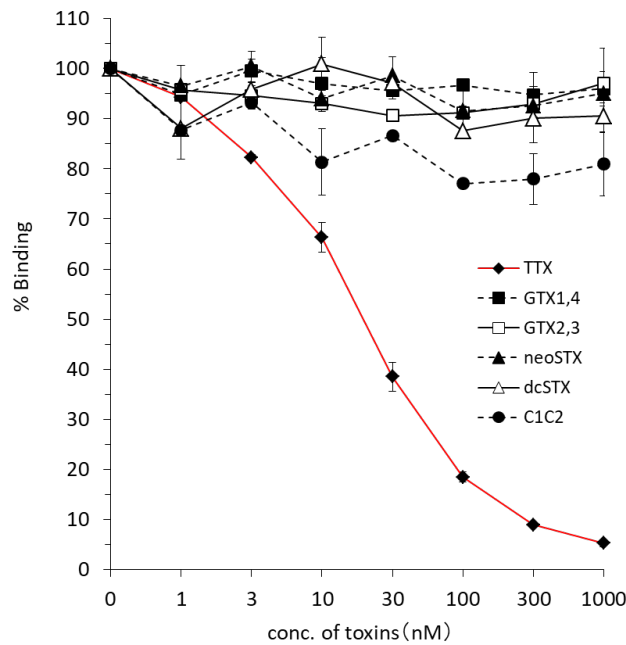


図 13 試作 ELISA キット上での麻痺性貝毒関連成分各標品の分析

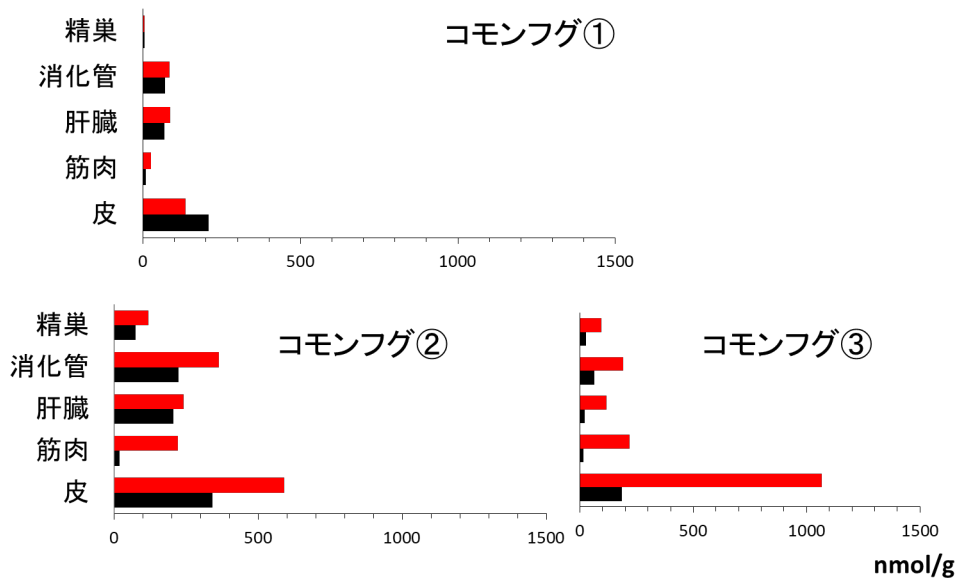


図 14 試作 ELISA キット (赤) および HPLC 蛍光法 (黒) で求めた
コモンフグ各部位の毒含量(nmol/g)

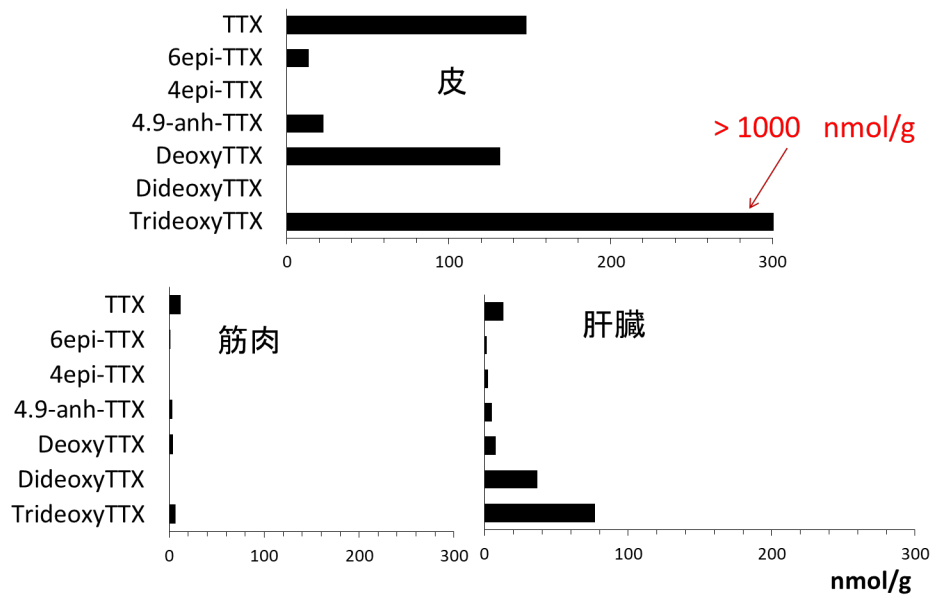


図 15 LC-QTOFMS によるコモンフグ (図 14) の TTX 関連成分

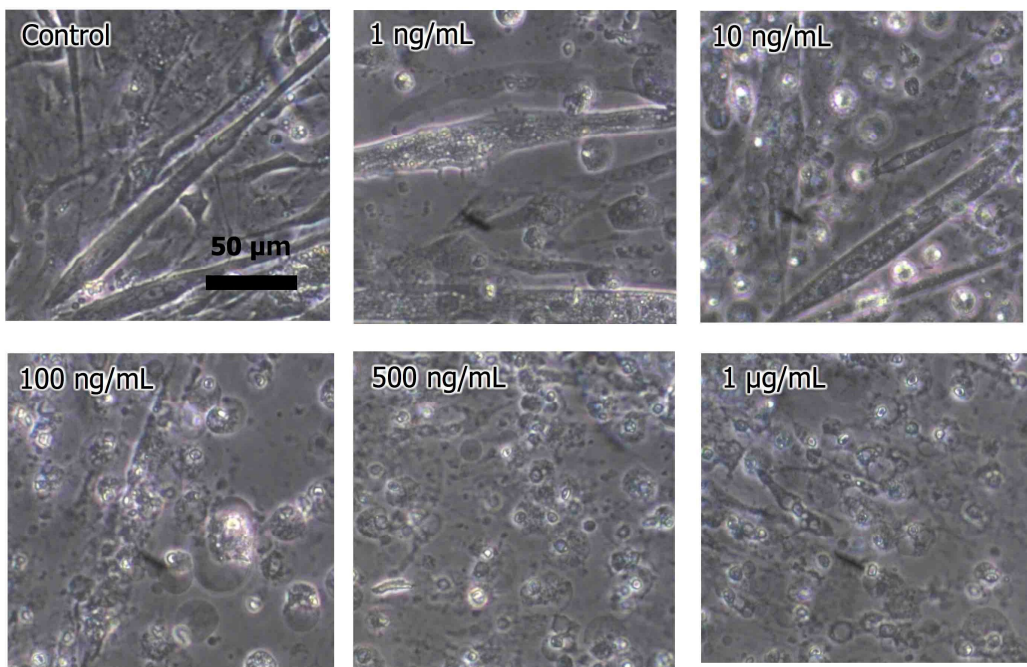


図 16 各濃度の PTX を暴露した筋細胞の形態変化

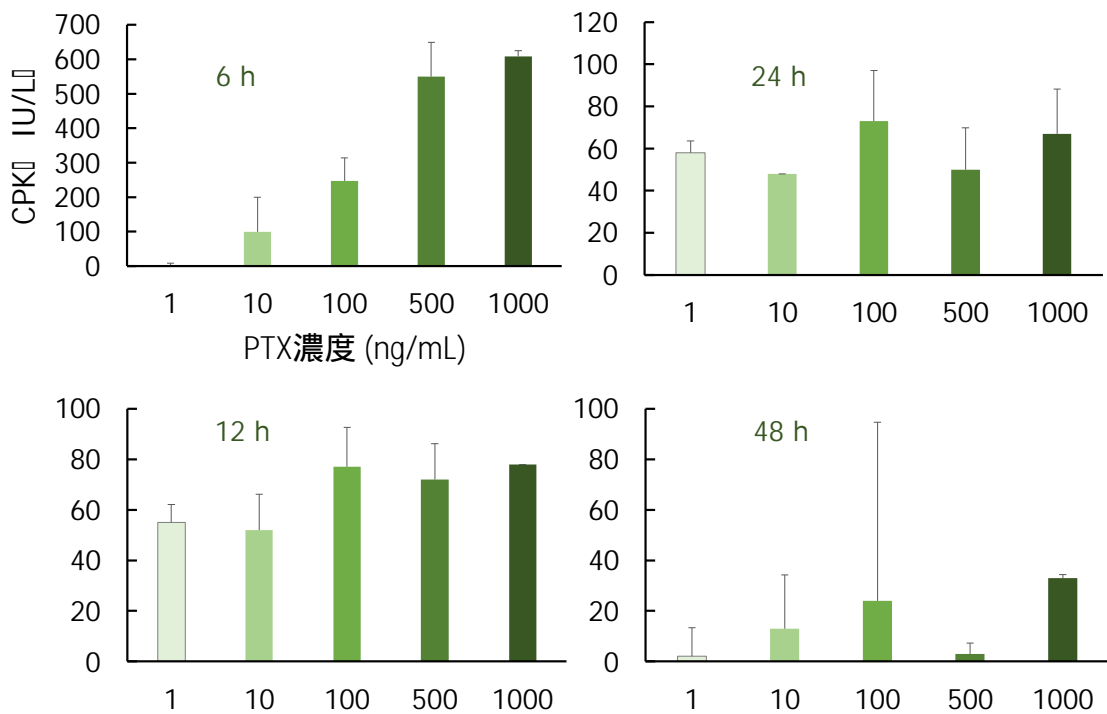


図 17 PTX を暴露した筋細胞培養液の CPK 値

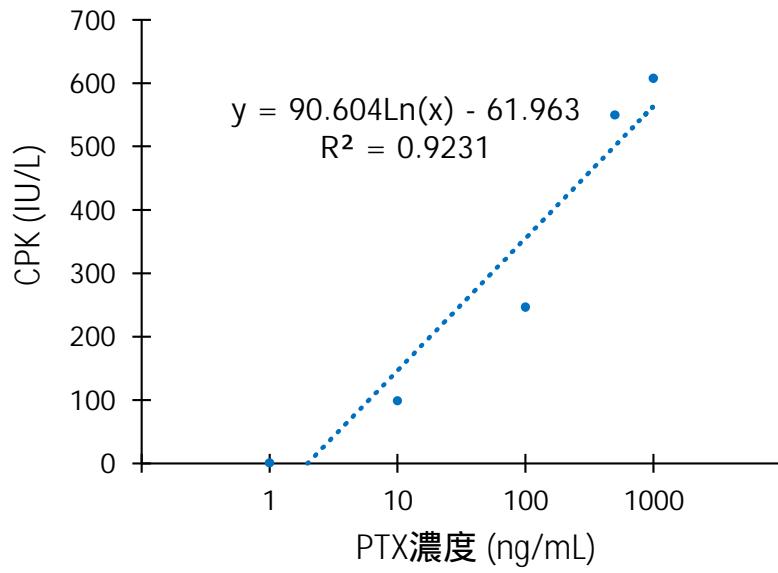


図 18 PTX 濃度と CPK 値の相関

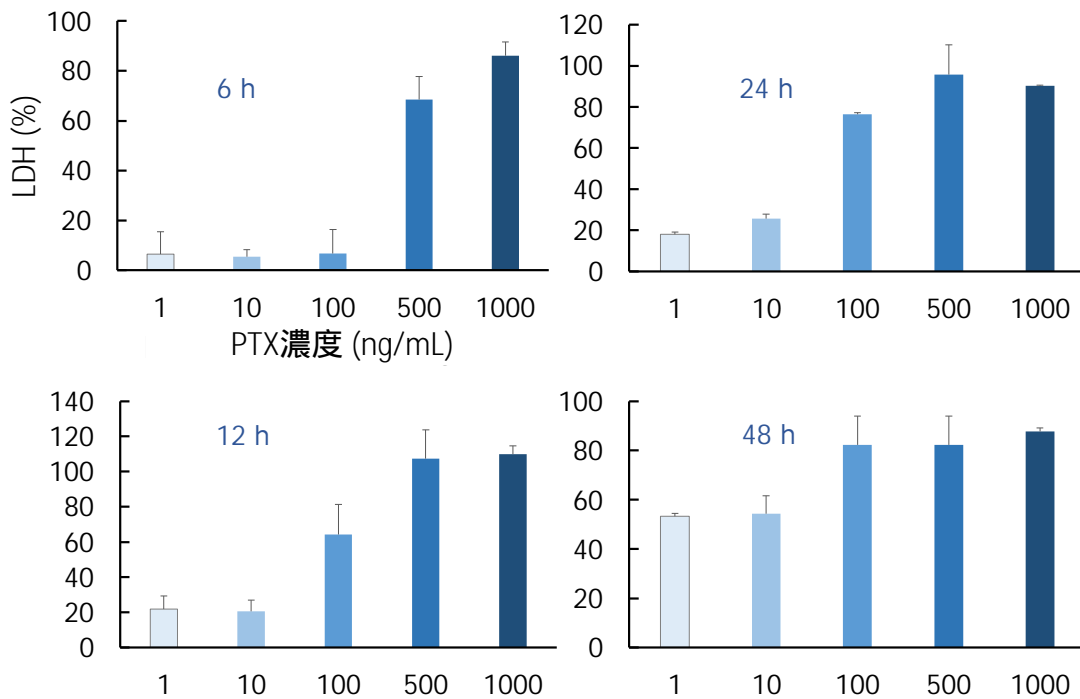


図 19 PTX を暴露した筋細胞培養液の LDH 値 (相対活性)

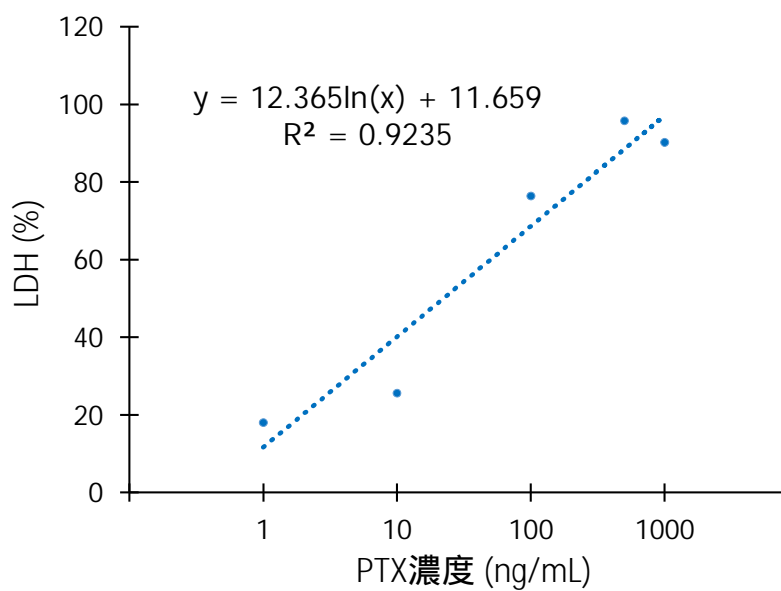


図 20 PTX 濃度と LDH 値の相関

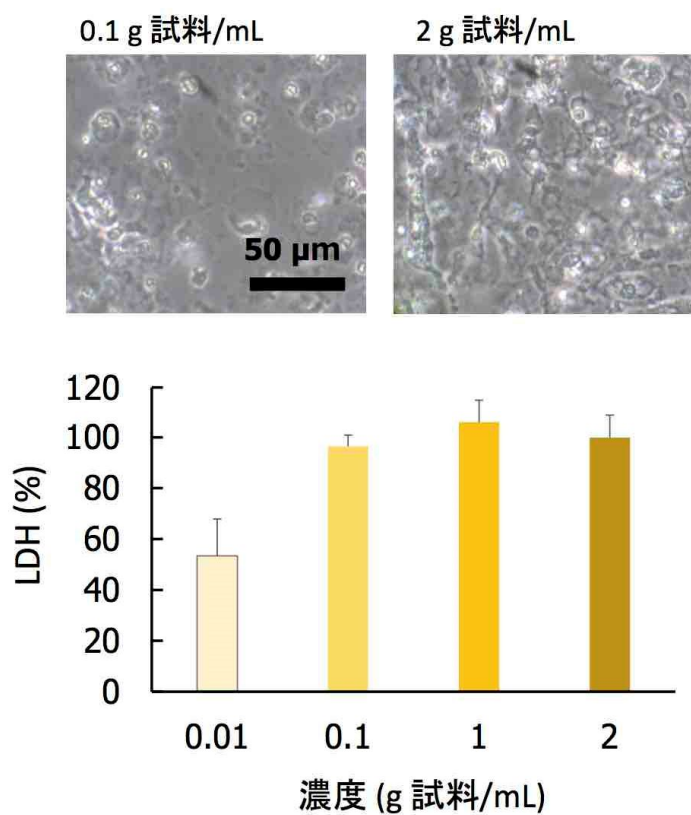


図 21 イワスナギンチャク抽出液暴露 24 時間後の筋細胞の形態変化と LDH 値

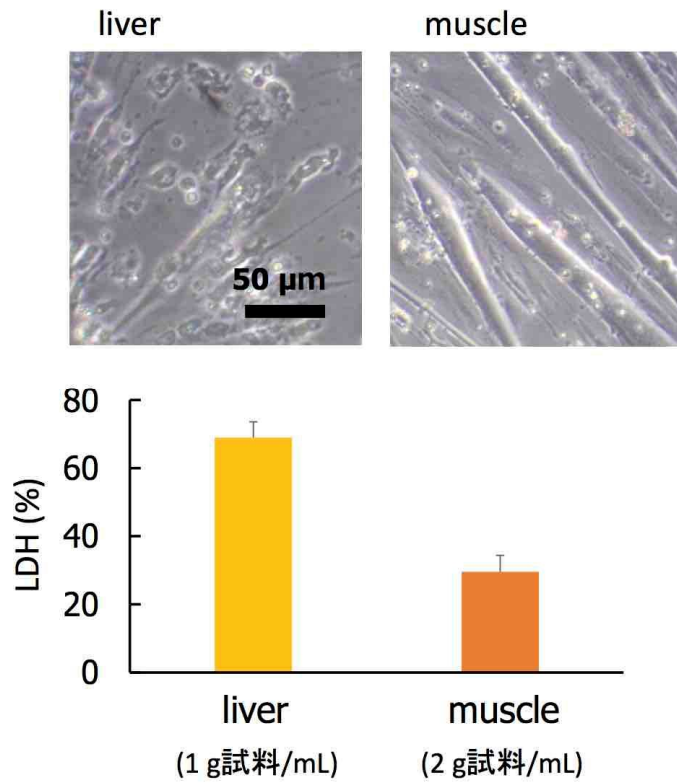


図 22 アオブダイ中毒検体抽出液暴露 24 時間後の筋細胞の形態変化と LDH 値

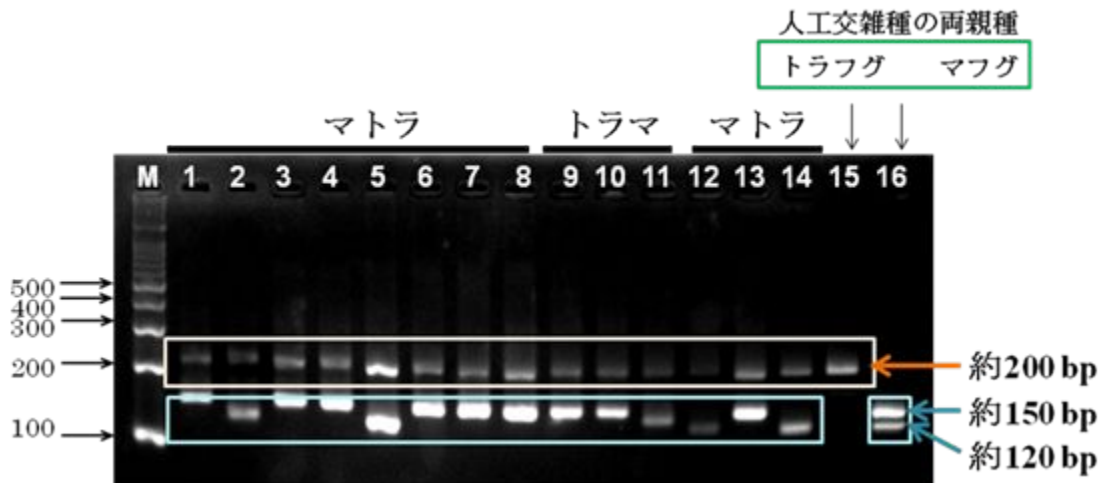


図 23 MS (GAAAG) マーカーの反復パターン

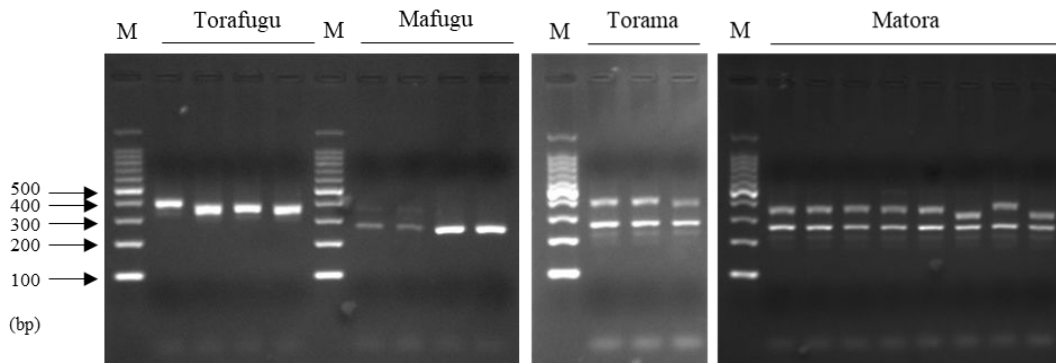


図 24 トラフグ、マフグおよび人工交雑種の GCA 反復配列における泳動パターン
 M ; マーカー , Torafugu ; 単一系統トラフグ , Mafugu ; 単一系統マフグ ,
 Torama; トラフグ - マフグ間人工交雑種 (トラ () × マ ()) , Matora;
 トラフグ - マフグ間人工交雑種 (トラ () × マ ())

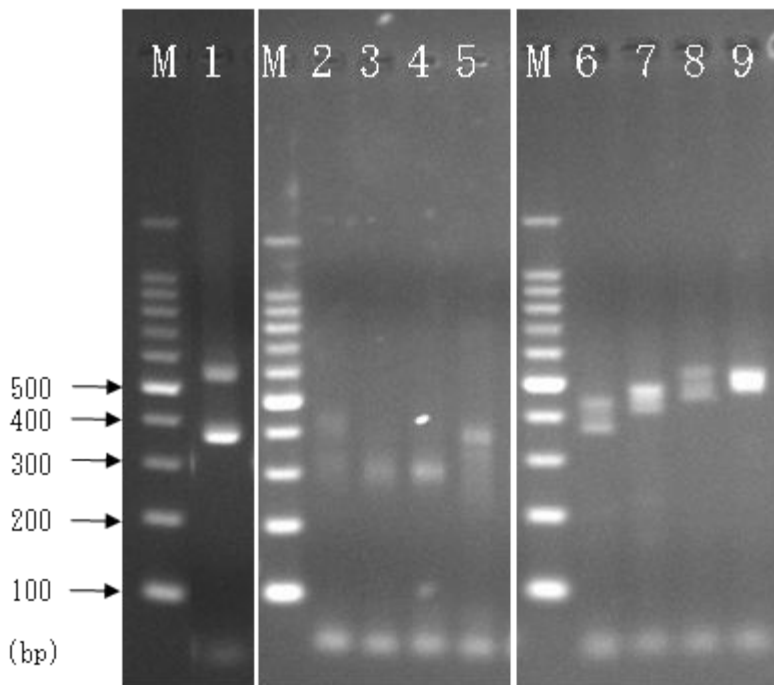


図 25 マフグおよびシマフグ間交雑種および単一系統種の泳動パターン
 M ; マーカー , 1 ; マフグ - シマフグ , 2-5 ; マフグ , 6-9 ; シマフグ



図 26 鹿児島県から採集されたモヨウフグ属の新種タスジフグ *Arothron multilineatus*

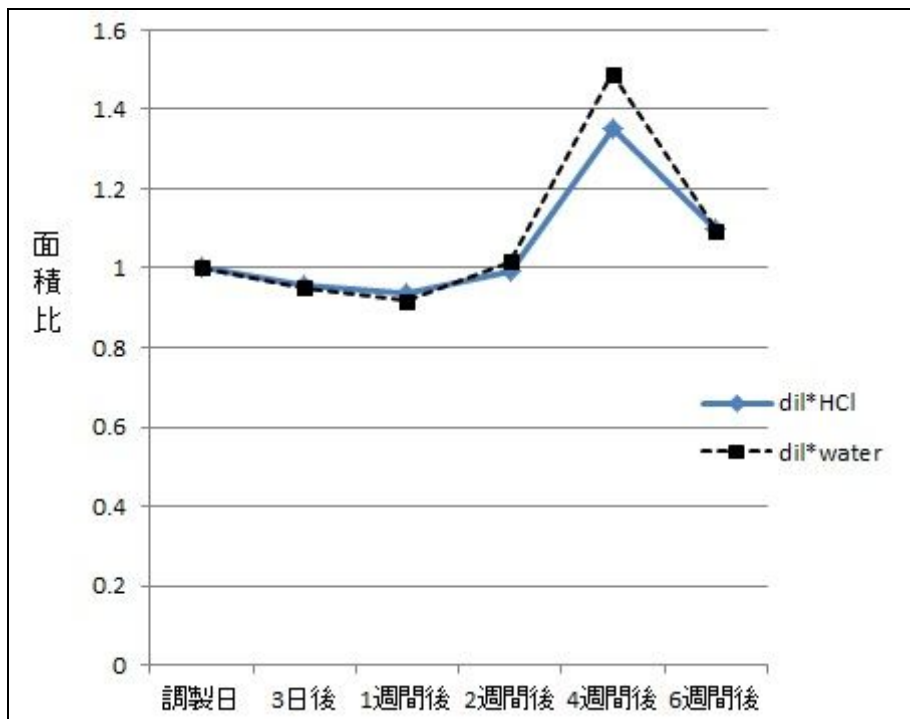


図 27 dcSTX 希釈液の LC-MS/MS 分析結果

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

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

表 C-2 添加回収試験（n=3）の結果

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

表 C-3 LC-QTOF/MS による TTX 分析法の妥当性評価試験結果（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%

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
長島裕二	6.3 自然毒	阿部宏喜	魚介の科学	朝倉書店	東京都	2015	185-196
K Matsuura	Tetraodontiformes	S. Kimura, A. Arshad, H. Imamura, M. A. Ghaffar	Fishes of the Northwestern Johor Strait, Peninsular Malaysia	University Putra Malaysia Press & Mie University, Japan	Selangor Darul Ehsan	2015	98-105
Y Nagashima, O Arakawa	Pufferfish poisoning and tetrodotoxin	P Gopalakrishna kone	Marine and Freshwater Toxins	Springer	シンガポール	2016	259-284
松浦啓一		松浦啓一	日本産フグ類図鑑	東海大学出版部	秦野	2017	127 pp.

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Matsumoto, A Kiriake, S Ishizaki, S Watabe, Y Nagashima	Biliary excretion of tetrodotoxin in the cultured pufferfish <i>Takifugu rubripes</i> juvenile after intramuscular administration	Toxicon	93	98-102	2015
H Lin, C Zhang, J Liao, F Yang, S Zhong, P Jiang, X Chen, Y Nagashima	Neutralizing effect of hemolymph from the shore crab, <i>Thalamita crenata</i> , on paralytic shellfish toxins	Toxicon	99	51-57	2015
長島裕二	フグ肝臓におけるフグ毒蓄積タンパク質	日本水産学会誌	81(4)	736	2015
長島裕二、松本拓也	フグ毒テトロドトキシンの体内動態解析：トラフグを用いた毒化モデル実験	LABIO 21	62号	24-27	2015
長島裕二	フグと食中毒	中学保健体育ニュース	No. 4	2-5	2015
佐藤繁	麻痺性貝毒の生物化学的変換に基づいた簡易分析法の開発. 平成 26 年度水産学技術賞.	日本水産学会誌	81(5)	792-795	2015
佐藤繁, 松浦啓一	フグを知って中毒防止(第8回). モヨウフグ・ホシフグ.	食と健康	59(4)	30-31	2015
佐藤繁, 松浦啓一	フグを知って中毒防止(第9回). コクテンフグ・ケショウフグ	食と健康	59(5)	28-29	2015

佐藤繁, 松浦啓一	フグを知って中毒防止(第10回) センニンフグ・カイユウセンニンフグ	食と健康	59(6)	28-29	2015
佐藤繁, 松浦啓一	フグを知って中毒防止(第11回) キタマクラ・サザナミフグ	食と健康	59(7)	28-29	2015
佐藤繁, 松浦啓一	フグを知って中毒防止(第12回) クロサバフグ・クマサカフグ	食と健康	59(8)	28-29	2015
佐藤繁, 松浦啓一	フグを知って中毒防止(第13回) カスミフグ・スジモヨウフグ	食と健康	59(9)	28-29	2015
佐藤繁, 松浦啓一	フグを知って中毒防止(第14回) カナフグ・ヨリトフグ	食と健康	59(10)	28-29	2015
佐藤繁, 松浦啓一	フグを知って中毒防止(第15回) ミゾレフグ・ワモンフグ	食と健康	59(11)	28-29	2015
佐藤繁, 松浦啓一	フグを知って中毒防止(第16回) アラレフグ・ナガレモヨウフグ	食と健康	59(12)	28-29	2015
K Matsuura	A new pufferfish, <i>Arothron multilineatus</i> (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae), from the Indo-West Pacific	Ichthyological Research	63	480-486	2016
A Kiriake, A Ohta, E Suga, T Matsumoto, S Ishizaki, Y Nagashima	Comparison of tetrodotoxin uptake and gene expression in the liver between juvenile and adult tiger pufferfish, <i>Takifugu rubripes</i>	Toxicon	111	6-12	2016
CAcar, S Ishizaki, Y Nagshima	Toxicity of the Lessepsian pufferfish <i>Lagocephalus sceleratus</i> from eastern Mediterranean coasts of Turkey and species identification by rapid PCR amplification	Eur. Food Res.	On line	DOI : 10.1007/s00217-016-2721-1	2016
桐明絢, 太田晶, 岡山桜子, 松浦啓一, 石崎松一郎, 長島裕二	しらす加工品に混入したフグ稚魚の種判別と毒性	食品衛生学雑誌	57(1)	13-18	2016
長島裕二, 桐明 絢	海洋危険生物 食べて中毒：とくに魚について	中毒研究	29(1)	3-9	2016
長島裕二, 桐明絢	しらすへのフグ稚魚混入	全水卸	356	8-11	2016
長島裕二, 桐明絢	魚介類の毒とその特徴	アクアネット	19(12)	22-26	2016
S. Jiang, H. Iwashita, O. Arakawa and T. Takatani	Growth and PST production of the dinoflagellate <i>Alexandrium catenella</i> cultured under monochromatic light	Aquacult. Sci.	64	379-390	2016
R Tatsuno, W Gao, K Ibi, T Mine, K Okita, GN Nishihara, T Takatani O Arakawa	Profile differences in tetrodotoxin transfer to skin and liver in the pufferfish <i>Takifugu rubripes</i>	Toxicon	130	73-78	2017

佐藤繁, 松浦啓一	フグを知って中毒防止(第17回) シマキンチャクフグ・タキフグ	食と健康	60(1)	48-49	2016
佐藤繁, 松浦啓一	フグを知って中毒防止(第18回) シッポウフグ・アマミホシゾラフグ	食と健康	60(2)	30-31	2016
佐藤繁, 松浦啓一	フグを知って中毒防止(第19回) シボリキンチャクフグ・ナミダフグ	食と健康	60(3)	30-31	2016
石崎松一郎, 臼井芽衣	フグの分類 - 最前線 -	Sunatec e-Magazine	120 (1)		2016
E Katayama, K Matsuura	Fine structures of scales of ocean sunfishes (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Molidae): another morphological character supporting phylogenetic relationships of the molid genera	Bulletin of National Museum of Nature and Science, Ser. A	41	95-98	2016
松浦啓一	ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保—日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し 1. 日本沿岸に見られるフグ類の分類	日本水産学会誌	82	166	2016
YV Dylidin, K Matsuura, SS Makeev	Comments of puffers of the genus <i>Takifugu</i> from Russian waters with the first record of Yellowfin Puffer, <i>Takifugu xanthopterus</i> (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) from Sakhalin Island	Bulletin of National Museum of Nature and Science, Ser. A	42	133-141	2016
K Matsuura	Taxonomic and nomenclatural comments on two puffers of the genus <i>Takifugu</i> with description of a new species, <i>Takifugu flavipterus</i> , from Japan (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Tetraodontidae)	Bulletin of National Museum of Nature and Science, Ser. A	43	71-80	2017
大城直雅	ミニシンポジウム記録 フグ食の安全性確保—日本沿岸フグ類の分類と毒性の見直し 3. 沖縄地区のフグの毒性	日本水産学会誌	82(2)	168	2017
大城直雅	水産物(マリンバイオトキシン)由来の食中毒	獣医公衆衛生研究	19(2)	4-9	2017
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 cheesemani</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 Gojibori	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	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

フグ中毒調査票

都道府県 市町村				調査票番号			
性別	<input type="checkbox"/> 男	<input type="checkbox"/> 女	年齢(歳)		調査日	年 月 日	
喫食日時	年	月	日	時 分			
発症日時	年	月	日	時 分	身長(cm)	体重(kg)	
初発症状					喫食時の飲酒	<input type="checkbox"/> 有	<input type="checkbox"/> 無
					現病歴	<input type="checkbox"/> 糖尿病 <input type="checkbox"/> 高血圧 <input type="checkbox"/> 心疾患 <input type="checkbox"/> その他 ()	
入院	<input type="checkbox"/> 有	日数:	日	<input type="checkbox"/> 無			
症状の継続期間	日数:	日			心拍数		
継続症状					瞳孔		
					血圧	/	

● 症状について

症状	発症の有無	発症の順番
1. 口唇、舌のしびれ、知覚障害(重症度Ⅰ度)	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
2. 指先のしびれ、知覚障害(重症度Ⅰ度)	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
3. 四肢の知覚障害(重症度Ⅱ度)	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
4. 軽度の運動麻痺(重症度Ⅱ度)	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
5. 全身の運動障害(重症度Ⅲ度)	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
6. 深部腱反射消失(重症度Ⅲ度)	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
7. 発声不能(重症度Ⅲ度)	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
8. 嘔吐(重症度Ⅲ度) 「あり」と答えた場合：1日 _____ 回	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
9. 呼吸困難(重症度Ⅲ度)	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
10. 胸内苦悶(重症度Ⅲ度)	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
11. 呼吸筋麻痺(重症度Ⅳ度)	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
12. 意識障害(重症度Ⅳ度)	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
13. 吐気	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
14. 下痢 「あり」と答えた場合： <input type="checkbox"/> 水様 <input type="checkbox"/> 粘液 <input type="checkbox"/> 混血	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
15. チアノーゼ	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
16. 瞳孔散大	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
17. 対光反射の消失	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
18. 頭痛	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
19. 倦怠感	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
20. 脱力感	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
21. 呂律が廻らない	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
22. 震え	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
23. 発熱 「あり」と答えた場合： 最大 _____ °C	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	
21. その他「あり」と答えた場合： ()	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	

● 原因食品について

食品	(種類)	<input type="checkbox"/> 魚 ()		<input type="checkbox"/> エビ・カニ ()	
		<input type="checkbox"/> 巻貝 ()		<input type="checkbox"/> イカ・タコ ()	
		<input type="checkbox"/> 二枚貝 ()		<input type="checkbox"/> その他 () <input type="checkbox"/> 不明	
	(大きさ)	体長 _____ cm	体重 _____ g		
捕獲場所					
入手方法	<input type="checkbox"/> 購入 <input type="checkbox"/> 自ら釣った <input type="checkbox"/> 知人が釣った魚をもらった <input type="checkbox"/> 知人が買った魚をもらっ				
喫食場所					
喫食量 (g、数量等)	g	刺身の場合 切れ	煮付等の肉 親指大 個 半身の1枚の /	汁物の場合 汁椀 井 杯	
残品	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無				
喫食部位 (複数可)	<input type="checkbox"/> 頭部 <input type="checkbox"/> 身 <input type="checkbox"/> 皮 <input type="checkbox"/> 肝臓 <input type="checkbox"/> 卵 <input type="checkbox"/> 白子 <input type="checkbox"/> ヒレ <input type="checkbox"/> その他 () <input type="checkbox"/> 不明				
原材料の保存方法 (複数可)	<input type="checkbox"/> 生 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> 塩蔵 <input type="checkbox"/> 乾物 <input type="checkbox"/> 燻製 <input type="checkbox"/> 酢漬け <input type="checkbox"/> その他 () <input type="checkbox"/> 不明				
喫食方法 (複数可)	<input type="checkbox"/> 刺身 <input type="checkbox"/> マリネ <input type="checkbox"/> 湯引き <input type="checkbox"/> 鍋 <input type="checkbox"/> しゃぶしゃぶ <input type="checkbox"/> 焼 <input type="checkbox"/> 煮 <input type="checkbox"/> 茹 <input type="checkbox"/> 蒸 <input type="checkbox"/> 揚 <input type="checkbox"/> その他 ()				

日本産フグ類同定ガイド

ここで取り扱うフグ類とは、腹部を膨らませるフグ科の魚である。フグ類には有毒な魚種が多い。このためフグ類を正確に同定することは、フグ中毒を防ぐために極めて重要である。以下に日本の沿岸に出現する主要なフグ類を紹介する。

フグ類の同定に役立つ特徴

体や鱗（ひれ）の色が重要な手がかりとなる。また、体の表面の小棘（小さなトゲ）の有無や分布パターンも重要な特徴となる。フグ類の尾鱗の形は、円形、湾入形、あるいは截形（後縁が直線状になる）であるが、種内でも変異を示すことがある。



フグ類の鱗と鰓孔

小棘（小さなトゲ）の調べ方

体の背面や腹面にトゲがあるフグとないフグがいる。トゲがあるかどうか調べる際には、指でフグの体表を押しつけながら、尾部から頭に向かって指でなぞるとよい。

写真撮影の方法

体や鱗の色は短時間で変化するため、カラー写真に記録するとよい。鱗を手で広げて、体の側面から撮影する。背面の写真もあれば同定に役立つ。フグ類を白い発泡スチロール板や黒い板などに置いて撮影する。発泡スチロール板などがなければコンクリートの床（赤や黄色などの原色の背景は避ける）に置いて撮影しても構わない。

収録魚種

日本産フグ類は以下の7属に分類されており、合計49種が日本から報告されている。

トラフグ属 *Takifugu*（日本に分布する14種を示す）

サバフグ属 *Lagocephalus*（日本に分布する7種を示す）

モヨウフグ属 *Arothron*（日本に12種分布するがモヨウフグのみを示す）

オキナワフグ属 *Chelonodontops* (日本にはオキナワフグのみが分布)

ヨリトフグ属 *Spherooides* (日本にはヨリトフグのみが分布)

シッポウフグ属 *Torquigener* (日本には3種分布するがシッポウフグのみを示す)

キタマクラ属 *Canthigaster* (日本には11種分布するがキタマクラのみを示す)

この中で水産重要種を含むのはトラフグ属とサバフグ属である。これら2属に重点を置いて識別方法を述べる。

ヨリトフグはフグ類の中では深海性であり、底曳網で漁獲される。魚市場に出回ることはあるが、商業価値は低い。その他のフグ類が魚市場に出回ることは少ないため、代表的な種を選んで解説する。

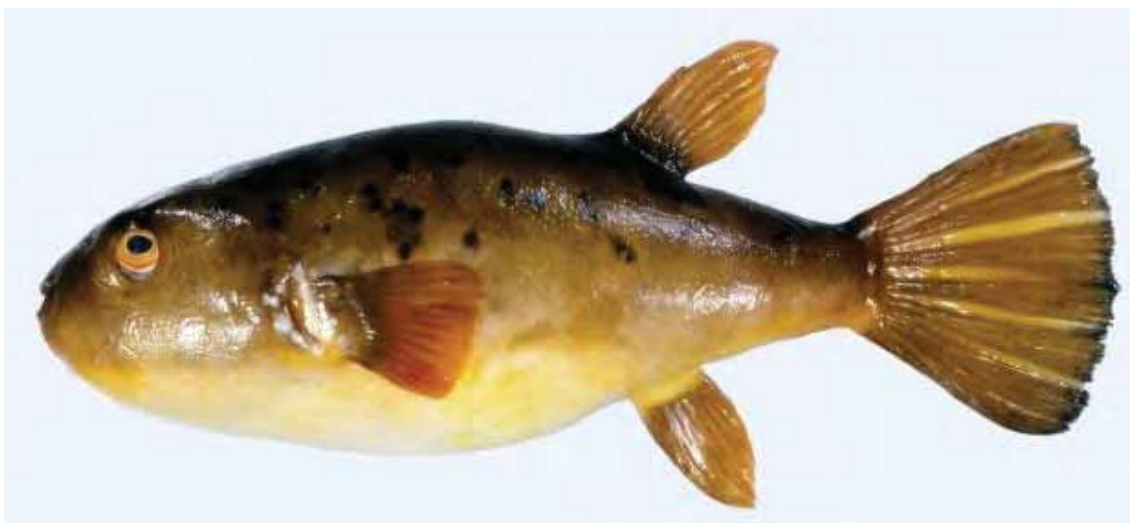
最初に食用となるフグ類を解説し、次に食用として認められていないフグ類について述べる。このため、同じ属に分類されるフグ類であっても、ある種は「食用となるフグ類」に収録され、別の種は「食用として認められていないフグ類」に収録されている場合がある。なお、「食用となるフグ類」と可食部位(表1)については、厚生労働省のウェブサイトに準拠した。

1. 食用となるフグ類（可食部位については表1を参照）

アカメフグ *Takifugu chrysops* (Hilgendorf, 1879)

特徴 (1) 体の側面と背面は橙色を帯びた褐色、(2) すべての鰭は橙色を帯びた褐色、(3) 体の背面と側面に暗褐色の点や不規則な線がある、(4) 頬に暗褐色の点や線はない、(5) 体の背面と腹面は小さなイボ状突起で覆われるが、トゲはない。ヒガンフグに似るが、ヒガンフグの頬には暗褐色の点がある。全長 30cm。

分布 福島県から土佐湾までの太平洋側に分布。下関沿岸から記録されたことがある。韓国にも分布する。



アカメフグ（頬に暗褐色点がない）写真：高知大学海洋生物学研究室

ヒガンフグ *Takifugu pardalis* (Temminck and Schlegel, 1850)

特徴 (1) 体の側面と背面は橙色を帯びた褐色、(2) 背鰭と胸鰭は褐色、(3) 臀鰭は橙色か褐色、(4) 尾鰭の鰭条は褐色、(5) 体の背面と側面に暗褐色の点がある、(6) 体側面の腹縁を前後方向に走る黄色帯がある、(7) 体の背面と腹面は小さなイボ状突起で覆われるが、トゲはない。全長 40cm。

分布 北海道南部から九州までの各地。韓国、渤海、黄海、東シナ海、ロシア極東域にも分布する。



ヒガンフグ：暗褐色点が大きい個体 写真：国立科学博物館魚類研究室



ヒガンフグ：暗褐色点が小さい個体 写真：国立科学博物館魚類研究室

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

カラス *Takifugu chinensis* (Abe, 1949)

特徴 (1) 体の側面と背面は黒色、(2) 背鰭、臀鰭、尾鰭は黒色、(3) 胸鰭の直後の体側に白く縁取られた大きな黒色紋がある、(4) 体の背面と腹面にトゲがある。全長 50cm。

分布 北海道から九州にかけて分布。韓国、中国、台湾、黄海、東シナ海にも分布する。



写真：下関市立しものせき水族館

トラフグ *Takifugu rubripes* (Temminck and Schlegel, 1850)

特徴 (1) 体の側面と背面は黒い、(2) 背鰭と尾鰭は黒色、(3) 臀鰭は白色、(4) 胸鰭の直後の体側面に白く縁取られた大きな黒色紋がある、(5) 体の背面と腹面にトゲがある。
全長 70cm。

分布 北海道から九州までの各地。北限はサハリン。韓国、中国、台湾、黄海、東シナ海にも分布する。



写真：国立科学博物館魚類研究室

シマフグ *Takifugu xanthopterus* (Temminck and Schlegel, 1850)

特徴 (1) 体の側面と背面は濃紺または黒色、(2) 体背面と側面に数本の白線が斜めに走る、(3) すべての鰭は鮮黄色、(4) 体の背面と腹面にトゲがある。全長 60cm。

分布 北海道から九州までの各地。北限はサハリン。韓国、中国、黄海、東シナ海にも分布する。



写真：国立科学博物館魚類研究室

シヨウサイフグ *Takifugu snyderi* (Abe, 1988)

特徴 (1) 体の側面と背面は褐色で、多数の白色点や不規則な短い線で覆われるため、網目状模様となる。胸鰭の直後の体側に暗褐色の紋があるように見える個体もいるが、白色線によって分割されていて、マフグやトラフグのような明瞭な紋にはなっていない。(2) 背鰭と胸鰭

の鰭条は黄褐色、(3) 臀鰭は白色、(4) 尾鰭の鰭条は褐色、(5) 体側面の腹縁を前後方向に走る黄色帯がある、(6) 体の表面は滑らかで、トゲはない。全長 36cm。

分布 北海道から九州までの各地。北限はロシア極東域のオルガ湾。韓国、東シナ海にも分布する。



ショウサイフグ 写真：鹿児島大学総合研究博物館



ショウサイフグ：胸鰭直後の褐色模様が紋のように見える個体 写真：田城文人

注意 精巢は「可食」とされているが、弱毒をもつ個体もいる。

ナシフグ *Takifugu vermicularis* (Temminck and Schlegel, 1850)

特徴 (1) 体の側面と背面は淡褐色、(2) 背鰭と胸鰭の鰭条は暗黄色、(3) 臀鰭は白色、(4) 尾鰭の大部分は黄色で、下部は白色、(5) 体の側面と背面は多数の白色点や不規則な短い線で覆われるため、網目状模様となる、(6) 胸鰭直後の体側が褐色になり、上下に長い楕円形の紋となり、この紋の周囲は不規則な白色線に囲まれる、(7) 体側面の腹縁を前後方向に走る黄色帯がある、(8) 体の表面は滑らかで、トゲはない。全長 25cm。

分布 太平洋側では静岡県以南、日本海側では佐渡島以南の各地。韓国、中国、渤海、黄海、東シナ海にも分布する。



写真：国立科学博物館魚類研究室

注意 ナシフグは原則食用不可。ただし、筋肉は、有明海、橘湾および岡山県の瀬戸内海で漁獲されたものに限り食用可。精巢は有明海および橘湾で漁獲され、長崎県が定める要領に基づき処理されたものに限り食用可。

ショウサイフグとナシフグはよく似ているが、胸鰭に覆われている体側の模様を見れば区別できる。ショウサイフグでは白色線によって分割された暗褐色の模様があり、ナシフグでは上下に長い楕円形の模様となっている。また、ナシフグの尾鰭下部は白いが、ショウサイフグでは白くない。



ショウサイフグ（左）とナシフグ（右）の胸鰭周囲の模様

マフグ *Takifugu porphyreus* (Temminck and Schlegel, 1850)

特徴 (1) 成魚の体の側面と背面は暗褐色であるが、若魚では網目模様となる、(2) 背鰭と尾鰭は黒色、(3) 臀鰭は黄色、(4) 胸鰭の直後の体側に大きな黒色紋がある、(4) 体側の腹縁を前後方向に走る黄色帯がある、(5) 体の表面は滑らかで、トゲはない。全長45cm。

分布 北海道から九州までの各地。北限はサハリン。韓国、中国、黄海、東シナ海にも分布する。



マフグの成魚 写真：国立科学博物館魚類研究室



マフグの若魚 写真：国立科学博物館魚類研究室

ゴマフグ *Takifugu stictonotus* (Temminck and Schlegel, 1850)

特徴 (1) 体の側面と背面の地色は濃紺または黒褐色で、多数の細い白色線で分割されるため、細かな濃紺または黒褐色の点で覆われるように見える、(2) 背鰭と胸鰭の鰭条は暗褐色、(3) 臀鰭は黄色、(4) 尾鰭の鰭条は暗褐色、(5) 体側面の腹縁を前後方向に走る黄色帯がある、(6) 体の背面と腹面にトゲがある。全長 40cm。

分布 北海道から九州までの各地に分布。北限はロシア極東域のオルガ湾。韓国、中国、黄海、東シナ海にも分布する。



写真：国立科学博物館魚類研究室

クサフグ *Takifugu albopumbeus* (Richardson, 1845)

特徴 (1) 体の側面と背面は暗緑色、(2) 背鰭と胸鰭の鰭条(鰭にある筋のような構造)は淡黄色、(3) 臀鰭は白色、(4) 尾鰭の鰭条は淡黄色か淡橙色、(5) 胸鰭直後の体側に大きな黒色紋がある、(6) 背鰭基部は黒色(7) 体の背面と腹面にトゲがある。全長 20cm。

分布 北海道から九州までの各地。韓国、中国、渤海、黄海、東シナ海にも分布する。



写真：鹿児島大学総合研究博物館

コモフグ *Takifugu flavipterus* Matsuura, 2017

特徴 (1) 体の側面と背面は褐色で白色点に覆われる、(2) 背鰭と胸鰭の鰭条は黄褐色、(3) 臀鰭は黄色、(4) 尾鰭の鰭条は黄褐色、(5) 体側面の腹縁を前後方向に走る黄色帯がある、(6) 体の背面と腹面にトゲがある。全長 25cm。

分布 北海道から九州までの各地。北限はサハリン南部。韓国、中国、台湾、東シナ海にも分布する。



コモフグ:体の側面と背面にある白色点が小さな個体 写真：鹿児島大学総合研究博物館



コモフグ:体の側面と背面にある白色点がやや大きな個体 写真：鹿児島大学総合研究博物館

カナフグ *Lagocephalus inermis* (Temminck and Schlegel, 1850)

特徴 (1) 体の背面と鰓孔より上方の側面は茶褐色から黒褐色、(2) 鰓孔より下方の側面は銀白色で、腹面は白色、(3) 背鰭と胸鰭は暗灰色、(4) 臀鰭は淡灰色、(5) 尾鰭は截形か円形で、茶褐色、(6) 体の背面は滑らかで、トゲはない、(7) 体の腹面にトゲはないが、多数の小さな皺と小さな円形の凹みがある。全長 63cm。

分布 東北以南の各地。東シナ海と南シナ海にも分布し、さらにアフリカ東岸からオーストラリア北部にかけて広く分布する。



写真：鹿児島大学総合研究博物館

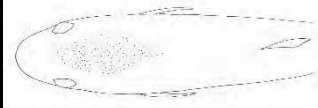
クロサバフグ *Lagocephalus cheesemanii* (Clarke, 1897)

特徴 (1) 体の背面と目より上方の側面は黒褐色、(2) 目より下方の側面は銀白色で、腹面は白色、(3) 背鰭、胸鰭、臀鰭は暗灰色、(4) 尾鰭の中央部は後方に突出する。尾鰭の大部分は黒褐色で、上葉と下葉の先端部は白色、(5) 頭部背面から背鰭前方の体背面はトゲに覆われるが、トゲに覆われる部分が背鰭に達することはない、(6) 体の腹面にトゲがある。全長 40cm。

分布 北海道南部から九州までの各地。東シナ海から南シナ海、インド洋東部からオーストラリア東部・ニュージーランドまで広く分布する。



写真：木村清志



体背面のトゲの分布

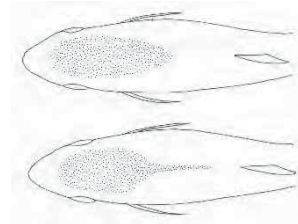
シロサバフグ *Lagocephalus spadiceus* (Richardson, 1845)

特徴 (1) 体の背面と目より上方の側面は淡褐色で、やや緑味を帯びる、(2) 目より下方の側面は銀白色で、腹面は白色、(3) 背鰭と胸鰭は淡黄色、(4) 臀鰭は白色、(5) 尾鰭は截形かわずかに湾入する。尾鰭の背部 3/4 は暗黄色で、腹部 1/4 は白色、(6) 頭部背面から背鰭前方の体背面はトゲに覆われる。トゲで覆われる部分は長楕円形を呈し、後方に向かって細くなる。トゲで覆われる部分の広さは個体によって異なるが、背鰭に達することはない、(7) 体の腹面にトゲがある。全長 43cm。

分布 北海道以南の各地。インド洋東部からオーストラリア北部にかけて広く分布する。



写真：鹿児島大学総合研究博物館

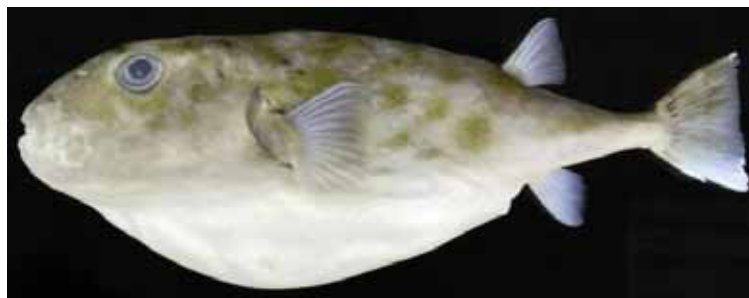


体背面のトゲの分布

ヨリトフグ *Spherooides pachygaster* (Müller and Troschel, 1848)

特徴 (1) 体の背面と側面は緑色を帯びた暗灰色で、多数の暗褐色斑に覆われる、(2) 体の腹面は白色、(3) 背鰭、臀鰭、胸鰭は淡灰色、(4) 尾鰭は暗灰色、(5) 体の表面は滑らかで、トゲはない。全長 48cm。

分布 北海道から九州までの各地。全世界の温帯と熱帯の海に広く分布する。



写真：神奈川県立生命の星・地球博物館 (瀬能 宏)

2. 食用として認められていないフグ類

アミメフグ *Takifugu reticularis* (Tien, Chen and Wang, 1975)

特徴 (1) 体の側面と背面の地色は黒灰色で、不規則な白色線が多数走り、網目状模様を形成する、(2) 背鰭の鰭条は暗灰色、(3) 胸鰭の鰭条は灰色、(4) 臀鰭は淡灰色、(5) 尾鰭の鰭条は黒灰色、(6) 胸鰭直後の体側に白く縁取られた大きな黒色紋がある、(7) 体側面の腹縁を前後方向に走る黄色帯がある、(8) 体の背面と腹面にトゲがある。全長 36cm。

分布 日本では三重県と京都府舞鶴で採集されている。韓国、中国、渤海、黄海、東シナ海にも分布する。



写真：木村清志

ムシフグ *Takifugu exascurus* (Jordan and Snyder, 1901)

特徴 (1) 体の側面と背面の地色は暗緑色で、多数の白色点や不規則な白色線に覆われる、(2) 背鰭と胸鰭の鰭条は黄色、(3) 臀鰭は黄色、(4) 尾鰭の鰭条は黄褐色で、後部は黒色、(5) 体側面の腹縁を前後方向に走る黄色帯がある、(6) 体の背面と腹面にトゲがある。全長 20cm。

分布 房総半島以南の太平洋側および日本海の飛島以南に分布。



写真：田城文人

タキフグ *Takifugu oblongus* (Bloch, 1786)

特徴 (1) 体の側面と背面の地色は褐色で、体背部から側面を横断する多数の白色線によって分割される、(2) 背鰭と胸鰭の鰭条は淡黄褐色、(3) 臀鰭は白色、(4) 尾鰭の背部 3/4 は淡黄褐色で、腹部 1/4 は白色。ただし、尾鰭全体が淡黄褐色の個体もいる、(5) 体の背面と腹面にトゲがある。全長 40cm。

分布 山口県の日本海側と鹿児島県薩摩半島西岸から採集された。インド洋と西部太平洋の熱帯域に広く分布する。



写真：鹿児島大学総合研究博物館

カイユウセンニンフグ *Lagocephalus suezensis* Clark and Gohar, 1953

特徴 (1) 体の背面と鰓孔より上方の側面は淡褐色で、多数の不規則な褐色線や褐色点に覆われる、(2) 鰓孔より下方の体の側面は銀白色で、腹面は白色、(3) 背鰭、胸鰭、臀鰭は白色、(4) 尾鰭は湾入する。尾鰭の上葉は黄色で下葉は白色。全長 20cm。

分布 相模湾以南の太平洋側から採集された。インド洋と西部太平洋の熱帯域に分布する。



写真：鹿児島大学総合研究博物館

クマサカフグ *Lasgocephalus lagocephalus* (Linnaeus, 1758)

特徴 (1) 体の背面は黒褐色、(2) 体の側面は銀白色で、腹面は白色、(3) 背鰭は暗灰色、(4) 胸鰭の上部は黒色で、下部 1/4 は白色、(5) 臀鰭は暗灰色、(6) 尾鰭下葉は後方へ突出し、上葉より長い。尾鰭は暗灰色、(7) 体の背面は滑らかで、トゲはない。体の腹面にトゲがある。全長 60cm 以上になる。

分布 北海道以南の各地。全世界の温帯と熱帯の海に広く分布する。



写真：高知大学海洋生物学研究室

センニンフグ *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789)

特徴 (1) 体の背面と鰓孔より上方の側面は褐色で、多数の黒色点に覆われる、(2) 鰓孔より下方の体の側面は銀白色で、腹面は白色、(3) 背鰭と胸鰭は暗灰色、(4) 臀鰭は白色、(5) 尾鰭は湾入し、中央部がわずかに後方へ突出する。尾鰭は暗灰色で、中央部は濁りのある黄色、(6) 体の背面と腹面にトゲがある。全長 97cm

分布 インド洋と西部太平洋の熱帯域に広く分布する。スエズ運河を通じて地中海に侵入している。日本では北海道以南から記録されている。



写真：鹿児島大学総合研究博物館

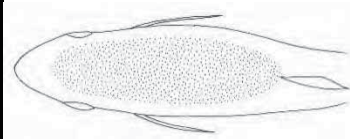
ドクサバフグ *Lagocephalus lunaris* (Bloch and Schneider, 1801)

特徴 (1) 体の背面と目より上方の側面は暗褐色、(2) 目より下方の側面は銀白色で、腹面は白色、(3) 背鰭基部は黒色で、背鰭は淡黄色、(4) 胸鰭は淡黄色、(5) 臀鰭は白色、(6) 尾鰭は湾入する。尾鰭の大部分は濁りのある黄色か黄褐色で、下部は白色、(7) 頭部背面から背鰭に至る体背面はトゲに覆われる、(8) 体の腹面にトゲがある。全長 50cm。

分布 主な生息域はインド洋と西部太平洋の熱帯域であるが、駿河湾以南の太平洋側で漁獲されているので注意が必要である。



写真：鹿児島大学総合研究博物館



体背面のトゲの分布

モヨウフグ *Arothron stellatus* (Anonymous, 1798)

特徴 (1) 体の地色は白色で、背面と側面は多数の黒色点に覆われる、(2) 体の腹面は白色、(3) 背鰭、臀鰭、尾鰭は淡灰色で、黒色点に覆われる、(4) 胸鰭は淡灰色、(5) 体はトゲに覆われる。全長 90cm。本州中部以南に分布。インド洋と西部太平洋の熱帯域に広く分布する。



写真：鹿児島大学総合研究博物館

オキナワフグ *Chelonodontops patoca* (Hamilton, 1822)

特徴 (1) 体の背面と側面の地色は淡緑褐色で、多数の小白色点に覆われる、(2) 体の腹面は白色、(3) 体側面の腹部を黄色帯が縦走する、(4) 背鰭、臀鰭、胸鰭は淡灰色、(5) 尾鰭は濁りのある淡黄色、(6) 体の背面と腹面にトゲがある。全長 33cm。

分布 琉球列島に分布。インド洋東部と西部太平洋の熱帯域に広く分布する。



写真：鹿児島大学総合研究博物館

シッポウフグ *Torquigener brevipinnis* (Regan, 1902)

特徴 (1) 体の背面と鰓孔より上方の側面は淡褐色で、多数の白色点に覆われる、(2) 体の腹面は白色、(3) 体の側面を1本の黄褐色線が縦走する、(4) 頭部側面に黄褐色の垂直の帯が5本ある、(6) 背鰭、臀鰭、胸鰭は淡灰色、(7) 尾鰭は濁りのある淡黄色、(8) 体の背面と腹面にトゲがある。全長 14cm。相模湾以南に分布。

分布 西部太平洋の熱帯域に広く分布する。



写真：鹿児島大学総合研究博物館

キタマクラ *Canthigaster rivulata* (Temminck and Schlegel, 1850)

特徴 (1) 吻はやや突出し、側面から見ると三角形に見える、(2) 体の背面と側面は淡褐色で、背面に不規則な多数の青色線が前後に走る、(3) 体側を2本の暗褐色帯が縦走し、前方で結合する。このため体側に細長い馬蹄形の模様が描かれる、(4) 体の腹面は白色、(5) 体の側面を1本の黄褐色線が縦走する、(6) 頭部側面に黄褐色の垂直の帯が5本ある、(7) 背鰭、臀鰭、胸鰭の鰭条は黄色、(8) 尾鰭には多くの黄色と青色の縦線がある、(9) 体はトゲに覆われる。全長 18cm。

分布 北海道南部以南に分布。インド洋と西部太平洋の熱帯域に広く分布する。



写真：鹿児島大学総合研究博物館

表1 日本産フグ類の可食部位。この表に掲載されていないフグ類は食用にしてはならない。ナシフグは原則食用不可だが、筋肉は、有明海、橘湾および岡山県の瀬戸内海で漁獲されたものに限って食用可。精巣は有明海および橘湾で漁獲され、長崎県が定める要領に基づき処理されたものに限って食用可。

科名	属の和名	種の和名	肝臓	卵巣	精巣	皮	筋肉	腸
フグ科	トラフグ属	アカメフグ	×	×	○	×	○	×
		ヒガンフグ	×	×	×	×	○	×
		カラス	×	×	○	○	○	×
		トラフグ	×	×	○	○	○	×
		シマフグ	×	×	○	○	○	×
		ショウサイフグ	×	×	○	×	○	×
		ナシフグ	×	×	×	×	×	×
		マフグ	×	×	○	×	○	×
		ゴマフグ	×	×	○	×	○	×
		クサフグ	×	×	×	×	○	×
	コモンフグ	×	×	×	×	○	×	
	サバフグ属	カナフグ	×	×	○	○	○	×
		クロサバフグ	×	×	○	○	○	×
		シロサバフグ	×	×	○	○	○	×
	ヨリトフグ属	ヨリトフグ	×	×	○	○	○	×

注意 岩手県越喜来湾および釜石湾ならびに宮城県雄勝湾のヒガンフグとコモンフグは食用不可。

参考資料

自然毒のリスクプロファイル：魚類：フグ毒（厚生労働省）

http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_det_01.html

松浦啓一．2017.日本産フグ類図鑑.東海大学出版部，平塚，xiv+127 pp.

松浦啓一・長島裕二（編著）．2015.魚毒の自然史－毒の謎を追う－．北海道大学出版会，札幌，312 pp.

塩見一雄・長島裕二．2013.新・海洋動物の毒－フグからイソギンチャクまで－．成山堂書店，東京，xi+254 pp.

（執筆：松浦啓一・国立科学博物館名誉研究員）