

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580283

研究課題名(和文) 交雑フグの毒蓄積能解析 - 毒化モデル試験による安全性評価

研究課題名(英文) Toxicity and food safety assessment of hybrid pufferfish

研究代表者

高谷 智裕 (TAKATANI, Tomohiro)

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・教授

研究者番号：90304972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：交雑フグ体内中の毒性およびTTXの移行/蓄積/代謝メカニズムと同様に毒蓄積能力と遺伝形質を明確にするために日本沿岸から20個体の自然交雑フグを集めて、それらのミトコンドリアおよび核DNAの分析によって親を識別し、それらの部位別毒性を求めた。その結果、今回の試料には、シマトラ、マゴマ、マトラ、トラゴマ、トラマの5種が存在し、皮や筋肉にも毒を保有する個体があることがわかった。また、人工交雑して得たトラマとトラクサでは、TTXを投与すると主としてまず肝臓へ移行し、次いで皮や卵巣にこれを運搬・蓄積した。一方、クサトラの雄ではTTXは精巣へも移行・蓄積した。

研究成果の概要(英文)：We examined to clarify the toxicity, toxin accumulation ability, and the inherited characteristics of hybrid pufferfish, as well as the transfer/accumulation/elimination mechanisms of TTX in the pufferfish body. 20 natural hybrid specimens were collected from coastal waters of Japan, and their parent species were identified by analysis of those mitochondrial and nuclear DNA. Moreover, anatomical distributions of toxicity were clarified by LC/MS analysis. Five hybrids species were contained in 20 specimens, and they were identified as "shimatora", "magoma", "matora", "toragoma" and "torama", respectively. When TTX was administrated to artificial hybrid "torama" and "torakusa", transferred first to the liver and then to the skin and ovary. On the other hand, TTX was transferred also to the testis in male "kusatora".

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：食品衛生 フグ毒(TTX) 交雑フグ

## 1. 研究開始当初の背景

フグ類は、我が国近海には約 40 種が生息することが知られている。その中には、外観から自然交雑種と判断されるものがしばしば出現している。我が国では、フグ食が古来、親しまれてきたことや、高級食材であることから重要な水産資源のひとつであり、自然交雑フグ類の取扱いには注意が必要であることから、自然交雑種の出現に関する調査も行われてきた（道津ら、1986）。フグはフグ毒（テトロドトキシン、TTX）を持つことが知られており、その毒蓄積部位や毒性は種によって異なることから、日本で食用とされるフグは「フグの衛生確保について」（1983 年厚生省環境衛生局長通知）により可食部位が定められている。しかし、自然交雑フグの毒性に関する調査研究はほとんどされておらず、食用フグと混獲されるものや輸入フグに混在するものなどに対する食品衛生上の安全性を確保するためにも交雑フグの毒性調査による安全性評価が必要である。また、流通の現場での混乱を回避するためにも、可食部の毒性が高いものについては遺伝学的解析による種同定を行い、危険性について啓蒙することも必要である。

我々の研究グループではフグの毒化機構解明に資するため、これまで天然フグの毒性調査を周年的に行うとともに、無毒の養殖トラフグを用いた TTX 投与試験により毒の体内動態について明らかにしてきた。また、種苗生産したフグを無毒化する方法についても明らかにしていることから、人工交雑フグについても交雑フグを作出した後無毒化することが可能であり、この技法を用いて TTX 投与試験に供するこ

とにより毒性や体内における毒蓄積分布について明らかにし、食用フグの安全性が確保出来ると考えた。

## 2. 研究の目的

トラフグ属フグ類は古くから、同属フグ類同士の自然交雑種が存在することが知られている。しかし、これまで交雑フグの TTX 保有に関する報告はほとんどない。近年、混獲により水揚げされる交雑フグの判別と安全性について一部で問題視されていることから、本研究では自然交雑フグの種同定を父系・母系の両起源種について遺伝的解析等により行うとともに、フグ毒の組織分布を調べ、交雑フグの毒蓄積分布と交雑起源種（両親魚種）の毒蓄積との遺伝的關係について明らかにすることを目的としている。さらに、無毒人工交雑フグを作出したうえで TTX 投与試験を行い、交雑フグのフグ毒蓄積能についても明らかにし、天然海域に出現する交雑フグの安全性について評価を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、主として以下の 2 項目について実験を進める計画を立てた。

）**自然交雑フグ類の種同定と毒性**：日本沿岸で行われているフグ漁において混獲される交雑フグについて交雑起源種（両親魚種）の同定を行ったうえで、組織別に毒性を調べ、交雑起源種（純系種）の毒性と比較する。

）**人工交雑フグの作出と毒化モデル試験**：トラフグを中心に他種フグ類と人工的に交雑させ、交雑フグを作出し、精製した TTX を投与し、経時的な毒の動態について試験を行う。

以下の試験について実施した。

#### 試験1 自然交雑フグの種同定と毒性評価

日本近海に生息する自然交雑フグを採集し、その毒性について組織別に分析を行った。また、交雑フグの起源種（親魚）の同定については連携研究者（望岡）が開発した方法により遺伝学的解析を行い、父系・母系について明らかにした。組織別毒性の分析は公定法であるマウス毒性試験法により試験を行うとともに高速液体クロマトグラフィー/質量分析装置（LC/MS;長崎大学現有）をもちいて TTX の定量を行うことにより、少量の組織についても毒の定量を行った。また、交雑フグの起源となった父系・母系のフグ種についても毒性を調べた。

#### 試験2 人工交雑フグの作出と毒化モデル試験

23年度内に入手しておいた2種の親フグ（トラフグ♀、マフグ♂）から人工交雑フグを作出した（連携研究者：鈴木）。作出した人工交雑フグ（トラマ）に対し TTX を経口投与し、経時的な体内における動態について解析した。TTX の投与方法として経口経管投与および筋肉注射投与の2系統の試験を行った。筋肉注射投与では精製 TTX をフグ筋肉中へ注射投与し、数日間の飼育により各組織への短期的な毒の移行・蓄積を調べた。一方、経口投与ではフグ用飼料に精製 TTX を添加した TTX 添加飼料を人工交雑フグに経口経管投与し、フグの毒化状況を確認した。各モデル試験では、一定時間ごとにサンプリングを行い組織別に腑分け後、冷凍保存し、長崎大学での TTX 分析に供した。

#### 試験3 人工交雑フグの作出と毒化モデル試験

試験2と同様に人工交雑フグを用いた

TTX 投与試験を別種で行った。本試験ではトラフグとクサフグの人工交雑フグにつき両親種（父母）を代えてそれぞれ作出（トラフグ♀×クサフグ♂=トラクサ；クサフグ♀×トラフグ♂=クサトラ）し、両種における TTX 蓄積機構の違いを比較した。

### 4. 研究成果

#### 試験1 自然交雑フグの種同定と毒性評価

入手した20個体の自然交雑フグについて遺伝的解析手法を用いて両親種の判定を行った。その結果、マフグ（♀）-トラフグ（♂）<4個体>、トラフグ（♀）-マフグ（♂）<2個体>、シマフグ（♀）-トラフグ（♂）<6個体>、マフグ（♀）-ゴマフグ（♂）<4個体>、トラフグ（♀）-ゴマフグ（♂）<4個体>の5種であると判定された。これまで形態的特徴で判別を行ってきたが、必ずしも正確な判別ができるわけではなく、本手法により全個体の父系種を同定することに成功した。

次に、各交雑フグの組織別毒量を見たところ、皮膚、筋肉、肝臓および卵巣から毒が検出され、各組織の毒力は皮膚で<2~130 MU/g、筋肉<2~20 MU/g、肝臓<2~2200 MU/g、卵巣<2~1600 MU/gであった（表1）。また、9個体の精巣は全て<2の無毒であった。全体的に雌個体の方の毒性が強く、その毒の組織分布は両親種のそれを遺伝している傾向が見られた。しかし、中にはトラフグでは無毒部位とされる筋肉や皮膚から規制値（10 MU/g）を超える毒性が見られる個体も見られ、今後さらに調査する必要があると思われる。

表1. 自然交雑フグの毒性

No.	試料(母系×父系)	性別	毒力(MU/g)			
			筋肉	皮膚	肝臓	生殖腺
1	シマフグ×トラフグ		<2	25	430	820
2			<2	<2	<2	<2
3			<2	<2	180	670
4			<2	<2	<2	<2
5			<2	5	620	540
6			<2	<2	140	430
7	トラフグ×マフグ		2	30	1200	1300
8			<2	4	70	<2
9	マフグ×ゴマフグ		20	130	2200	1600
10			4	50	720	280
11			<2	5	4	<2
12			<2	7	10	<2
13	トラフグ×ゴマフグ		<2	<2	<2	<2
14			<2	<2	6	<2
15			<2	3	50	<2
16			<2	<2	2	<2
17	マフグ×トラフグ		<2	30	1400	1000
18			<2	20	280	<2
19			<2	35	780	920
20			<2	<2	<2	<2

## 試験2 人工交雑フグの作出と毒化モデル試験

トラフグ♀とマフグ♂を人為的に交配し作出した人工交雑個体(トラマ)を用いてそのTTX移行・蓄積様式を検討した。経口経管投与されたTTXは、投与8時間後に血液を介してまず肝臓に移行した。肝臓に移行した毒は投与24時間後まで漸増し、その後、試験終了までに3.0 MU/gに減少した。一方、投与24時間後以降に皮へのTTXの移行が見られ、皮の毒量は試験終了時まで1.4 MU/gまで増加した。筋肉への毒の移行は見られなかった。生殖腺では、精巣への毒の移行はほとんど見られず、卵巣への毒の移行が際立っていた。一方、筋肉注射投与においては、経口経管投与と異なり、投与後1時間以内に血液を介して速やかに各組織へ移行した。マフグの特徴である皮膚にTTXが蓄積することや、両種とも無毒部位である筋肉や精巣には毒が移行しないことが確認された。

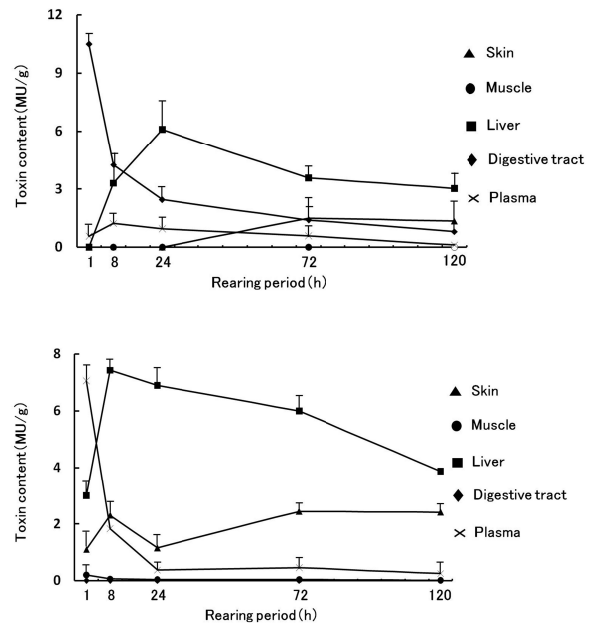


図1. トラフグ×マフグ人工交雑個体におけるTTXの各組織への移行(上: 経口経管投与; 下: 筋肉注射投与)

## 試験3 人工交雑フグの作出と毒化モデル試験

人工交雑個体のトラクサ(10カ月齢)およびクサトラ(10カ月齢)に対しTTX投与(筋肉注射投与)試験を行ったところ、両者の移行・蓄積プロファイルが異なった。トラクサでは肝臓や皮へTTXが蓄積した後、肝臓の毒は雌では卵巣へ移行したのに対し、雄では皮膚へ移行した。精巣への毒の移行・蓄積は確認されなかった。一方、クサトラでは卵巣、精巣ともにTTXの移行が確認され、卵巣で最大18 MU/g、精巣で7 MU/gとなったが、卵巣ではトラクサのような経時的なTTX蓄積量の増加は見られなかった。クサトラでは、トラクサでは見られなかった精巣へのTTX蓄積が見られたことから、クサフグの蓄積様式が遺伝されたことが推察された。

以上の成果から、遠州灘および天草灘産自然交雑フグには、少なくともシマトラ、マゴマ、マトラ、トラゴマ、トラマの5種が存在し、皮や筋肉にも毒を保有する個体があること、人工交雑して得たトラマとトラクサは、TTXを投与すると血液を介してまず肝臓、次いで卵巣や皮にこれを運搬・蓄積するが、両親種同様、筋肉や精巣には毒蓄積能がほとんどないか、あっても他の部位より遙かに低いこと、などを示すことができた。また、クサトラではトラフグでは本来蓄積しない精巣へのTTXの移行が確認されたことから、母系の毒蓄積様式が遺伝されていることが推察された。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計5件)

谷口香織, 高尾秀樹, 新名真也, 山中祐二, 岡田行長, 中島梨花, 王俊杰, 辰野竜平, 阪倉良孝, 高谷智裕, 荒川修, 野口玉雄: 天然トラフグ肝臓の毒性分布. 食品衛生学雑誌, 54, 128-133 (2013). (査読有)

S. Itoi, S. Yoshikawa, R. Tatsuno, M. Suzuki, K. Asahina, S. Yamamoto, S. Takanashi, T. Takatani, O. Arakawa, Y. Sakakura, H. Sugita: Difference in the localization of tetrodotoxin between the female and male pufferfish *Takifugu niphobles*, during spawning. *Toxicon*, 60, 1000-1004 (2012). (査読有)

Y. Nagashima, T. Matsumoto, K. Kadoyama, S. Ishizaki, S. Taniyama, T.

Takatani, O. Arakawa, M. Terayama: Tetrodotoxin Poisoning Due to Smooth-backed Blowfish *Lagocephalus inermis* and Toxicity of *L. inermis* Caught off the Kyushu Coast, Japan. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, 53, 85-90 (2012). (査読有)

J-J. Wang, T. Araki, R. Tatsuno, S. Nina, K. Ikeda, T. Takatani, O. Arakawa: Transfer Profile of Orally and Intramuscularly Administered Tetrodotoxin to Artificial Hybrid Specimens of the Pufferfish *Takifugu rubripes* and *Takifugu porphyreus*. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, 53, 33-38 (2012). (査読有)

J-J. Wang, T. Araki, R. Tatsuno, S. Nina, K. Ikeda, M. Hamasaki, Y. Sakakura, T. Takatani, O. Arakawa: Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to artificial hybrid specimens of pufferfish, *Takifugu rubripes* and *Takifugu niphobles*. *Toxicon*, 58, 565-569 (2011). (査読有)

##### [学会発表](計5件)

谷口香織, 高尾秀樹, 新名真也, 山中祐二, 岡田行長, 中島梨花, 王俊杰, 辰野竜平, 高谷智裕, 荒川修, 野口玉雄: 天然トラフグ肝臓の毒性分布. 日本食品衛生学会, 平成25年11月21-22日 沖縄コンベンションセンター, 沖縄

辰野竜平, 反町太樹, 谷山茂人, 大城直雅, 久保弘文, 高谷智裕, 荒川修: テトロドトキシンを給餌した腐肉食性小型巻貝2種の毒性. 日本食品衛生学会, 平成25年11月21-22日 沖縄コンベン

ションセンター，沖縄  
山中祐二，新名真也，山下洋平，辰野  
竜平，高谷智裕，荒川 修：天然ヒガ  
ンフグの麻痺性貝毒蓄積能．日本食品  
衛生学会，平成25年11月21-22日 沖縄  
コンベンションセンター，沖縄  
新名真也，荒木泰一郎，王俊杰，辰野  
竜平，濱崎将臣，山中祐二，高谷智裕，  
荒川 修：クサフグ×トラフグ人工交  
雑個体に筋肉内投与したテトロドトキ  
シンの動態．平成24年度日本水産学会  
春季大会，平成24年3月26-30日 東京  
海洋大学，東京  
王俊杰，荒木泰一郎，辰野竜平，新名  
真也，池田光壱，高谷智裕，荒川 修：  
トラフグ×マフグ人工交雑個体の消化  
管および筋肉内に投与したテトロドト  
キシンの動態．平成24年度日本水産学  
会春季大会，平成24年3月26-30日 東  
京海洋大学，東京

## 6．研究組織

### (1) 研究代表者

高谷 智裕 (TAKATANI TOMOHIRO)  
長崎大学・大学院水産・環境科学総  
合研究科・教授  
研究者番号：90304972

### (2) 研究分担者

荒川 修 (ARAKAWA OSAMU)  
長崎大学・大学院水産・環境科学総  
合研究科・教授  
研究者番号：40232037

### (3) 連携研究者

鈴木 重則 (SUZUKI SHIGENORI)

独立行政法人水産総合研究センタ  
ー・増養殖研究所・主任研究員  
研究者番号：60463105

### (4) 連携研究者

望岡 典隆 (MOCHIOKA NORITAKA)  
九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：40212261