

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450287

研究課題名(和文) 交雑フグと交雑起源種におけるフグ毒蓄積機構の究明

研究課題名(英文) Accumulation mechanisms of tetrodotoxin on hybrid pufferfish and its parental species

研究代表者

高谷 智裕 (TAKATANI, Tomohiro)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：90304972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：2015年に遠州灘で採取された17個体の自然交雑フグにつき、ミトコンドリアDNA解析および形態的特徴から両親種を推定し、それらの部位別毒性を求めた。17個体全てがマフグとトラフグの交雑種で、15個体に毒性がみられた。卵巣および肝臓で高い毒力が検出され、12個体の皮に弱毒が検出された。また、母親種がトラフグの個体に比べてマフグの方が高い毒性を示し、毒蓄積能が母親種の影響を強く受けることが推測された。人工交雑マトラへのTTX投与試験の結果、主として皮への蓄積がみられた。両親種であるマフグとトラフグの場合、TTX蓄積率は経月的に上昇し、両種ともに皮への蓄積割合が高かった。

研究成果の概要(英文)：17 natural hybrid pufferfish were collected from Enshu-nada, and their parent species were identified by analysis of those mitochondrial DNA, and those anatomical distributions of toxicity were analyzed by LC/MS analysis. Two species were contained in all specimens, and they were identified as "matora" (Takifugu porphyreus x T. rubripes), and "torama" (T. rubripes x T. porphyreus), respectively. 15 specimens were toxic, toxicity level of the ovary and liver were high, and the skin showed weakly toxic. Matora specimens indicated higher toxicity than torama specimens. In the TTX administration experiment to artificial matora hybrid puffer, these mainly accumulated TTX in the skin. In the TTX administration experiment to artificial T. rubripes and T. porphyreus as a parental species, the TTX accumulation rate of both species rose by their growth. It is supposed that the toxin accumulation mechanisms are hereditary from female parental species

研究分野：水圏生命科学

キーワード：TTX 交雑フグ 食品衛生

1. 研究開始当初の背景

トラフグ属魚類は、皮や内臓にフグ毒テトロドトキシン (TTX) を保有することが知られるが、その安全性から我が国近海に生息する 22 種のうち 13 種が食用可能とされている。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る。

一方、フグが持つ毒については、その毒蓄積部位や毒性は生息域や種によって大きく異なることから、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。このため、毒蓄積部位の異なるフグ同士の交配により出現した交雑フグの取扱いには特に注意が必要となる。

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や人工交雑フグ作出による安全性評価が必要である。

そこで我々は自然交雑フグの毒性に関する調査を行ってきた。この結果、5 種 20 個体の自然交雑フグについて解析を行うことができた。しかし、試料数不足から完全には交雑フグの毒蓄積機構やその遺伝的な関係解明には至っていない。また、人工交雑フグ作出によるフグ毒投与試験を試みた結果、両親種から形態学的特徴だけでなく毒蓄積部位についても遺伝的な関係が伺える結果が得られた。また、我々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。

2. 研究の目的

H23-26 の科学研究費補助金による人工交雑フグの毒化機構に関して基礎となりうるデータが集まりつつある状況であることから、本研究では継続して自然交雑フグの情報を集めることに加え、人工交雑フグ作出による毒化モデル試験により起源種との遺伝的な関係解明を行うことを目的とした。

日本沿岸で漁獲される自然交雑フグについて、これまで我々は自然交雑フグの交雑起源種について遺伝的解析により明らかにするとともに、部位別に蓄積毒性を評価してきたが、交雑種別の安全性評価を行うに至っていないことから、引き続き自然交雑フグの毒性調査と安全性の評価を行った。自然交雑フグの採集を継続して行い、その交雑起源種の父系および母系を遺伝学的解析により明らかにするとともに組織別の毒性について分析を行う。また交雑起源種にあたる純系フグ種についても毒性の評価を行うことにより、親魚 (父系/母系) との遺伝様式を評価できると考えた。一方、フグ類の毒性は個体差が大きく、自然交雑フグの毒性評価をより明確にし、毒蓄積機構や遺伝様式を詳細にするため、人為的に交雑起源となる種のフグを交配させて人工交雑フグの作出を行った。作出した人工交雑フグについて TTX の投与を行うことにより毒の各組織への移行・蓄積・代謝など TTX のフグ体内動態について調査した。

3. 研究の方法

本研究は、まず自然交雑フグ類の種同定と毒性評価として、平成 23-26 科研究費研究から取り組んできた調査研究に引き続き、日本沿岸で生息する自然交雑フグを収集し、交雑起源種 (両親魚種) の同定を行ったうえで、形態学的特徴および組織別毒性を調べ、海域別に自然交雑フグの出現種や出現頻度、毒性などの評価を行った。

次いで、人工交雑フグを用いた毒化モデル試験による毒蓄積機構と遺伝様式の解明として、トラフグを中心に他種フグ類と人為的に交配させ、交雑フグを作出し、形態学的特

徴を調べるとともに TTX 投与試験により各組織への移行・蓄積・代謝など TTX の体内動態について調査し、交雑フグの毒蓄積能および両親種の毒蓄積との遺伝的關係について検討した。

以上の研究計画について、以下の(1)~(3)の試験を行った。

(1) 自然交雑フグの種同定

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。本研究では、2015年10月に愛知県と静岡県沖である遠州灘で漁獲された天然交雑フグと思われるフグ17個体(体長 28 ± 3 cm, 体重 735 ± 289 g)を用いた。また、交雑フグの起源種(親魚)の同定については形態的特徴から両親種の推定を行うとともに、ミトコンドリア DNA を用いた遺伝子解析を行い、母親種の同定を行い、形態的特徴と重ね合わせることで両親種の推定を行った。

(2) 自然交雑フグの毒性調査

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毒性試験を行うとともに、少量の組織については高速液体クロマトグラフィー/質量分析装置(LCMS; 長崎大学現有)を用いて TTX 量を定量した。

(3) 人工交雑フグおよび両親種フグに対する毒化モデル試験

種の異なる親フグ(マフグ♀, トラフグ♂)から人工交雑フグを作出した。作出した人工交雑フグ(マトラ)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。また今回は比較として、それぞれの両親種(トラフグ, マフグ)に関しても無毒個体を作成し、これらの孵化仔魚を人工飼育しながら経月的に TTX 投与試験を行った。TTX を筋肉内に注射投与し、投与5日後に供試魚を取り上げ各部位

の TTX 蓄積をみた。経月的(2.5~8.5 カ月)に TTX 投与試験を行い、成長に伴う TTX 蓄積能の推移について評価した。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。

4. 研究成果

(1) 自然交雑フグの種同定

形態的特徴による評価を行った結果、17個体全てで腹縁部の色は黄色で、17個体中15個体からトラフグの特徴である背側および腹側の体表の小棘、黒斑の白い縁取りが確認できた。尻鰭の色は黄色、白色、淡赤色のいずれかであったことから、この15個体はトラフグとマフグの交雑個体ではないかと推測された。体表の小棘が確認できなかった2個体に関してはマフグ純系種と非常に近い形態的特徴を示したことから、マフグ純系種と推測された。

遺伝子解析(16S rRNA)による母親種同定を行ったところ、トラフグ属は遺伝的に近縁であるため、99%以上の一致率を示す種が複数存在したが、漁獲海域や形態的特徴からトラフグとマフグの形態的特徴を併せ持つ15個体についてはトラフグとマフグの交雑種と推定し、母親種はトラフグが6個体、マフグが9個体と同定した。このうちトラフグと一致率100%の個体は2個体、一致率99%の個体は4個体であった。マフグでは、一致率100%の個体は3個体、一致率99%の個体は6個体であった。加えて、マフグ純系種と同様の形態的特徴を示した2個体については、ともに母親種はマフグと同定された(一致率99%)。結果より、母親種はトラフグとマフグしか確認することができず、2015年は遠州灘ではトラフグとマフグの交雑フグが多く発生したことが推測され、形態的特徴による推測と遺伝子解析による同定結果に差異はみられなかった。

(2) 自然交雑フグの毒性

推定した両親種と各部位の毒力 (MU/g) を表 1 に示す。試験に供した組織において 17 個体中 15 個体から毒が検出された。卵巣 (425 ~ 1950 MU/g) で最も高い毒力が検出され、次いで肝臓 (30 ~ 1845 MU/g) の毒力が高かった。一方、筋肉 (<3 ~ 9 MU/g) および精巢 (<3 MU/g) は食品衛生上 '無毒' であったが、皮 (7 ~ 93 MU/g) からは 10 MU/g 以上の '弱毒' に相当する毒力が検出された個体が 12 個体存在した。また、マフグとトラフグの特徴を併せ持つ個体では、母親種がトラフグの個体に比べて母親種がマフグの個体の方が高い毒性を示したことから、毒蓄積能については交雑親魚種のうち母親種の影響を強く受けるものと推測された。

表 1 自然交雑フグの毒性

No.	両親種 (母系x父系)	雌雄	毒力(MU/g)				
			筋肉	皮	肝臓	卵巣	精巢
1			<3	6	40	180	-
2			<3	6	106	-	<3
3	トラフグxマフグ		<3	0	4	123	-
4			<3	9	88	-	<3
5			<3	<3	<3	-	<3
6			<3	12	485	587	-
1			<3	87	515	775	-
2			<3	53	940	425	-
3			4	89	610	1250	-
4			<3	80	560	910	-
5	マフグxトラフグ		4	48	1845	1950	-
6			<3	8	215	-	<3
7			<3	72	974	-	<3
8			<3	7	30	-	<3
9			<3	<3	<3	-	<3
1	マフグ		<3	130	450	-	<3
2			3	76	930	1180	-

(3) 人工交雑フグおよび両親種フグに対する毒化モデル試験

マトラ2ヵ月齢魚の背部筋肉中に TTX を注射投与したところ、投与 1 時間後は肝臓から最も高い TTX 量が検出されたが、経時的に減少していき、投与 24 時間以降では皮の TTX 量を下回った。投与 120 時間後での主な蓄積

部位は皮であった (図 1)。

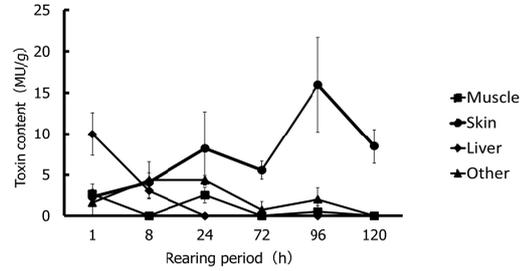


図 1. マトラ2ヵ月齢魚における各組織中の TTX の経時変化

先行研究にて行ったトラフグやマトラと両親種を入れ替えたトラマにおいても2ヵ月齢魚の時には肝臓の TTX 蓄積能が低く、一旦肝臓に TTX を蓄積するが、TTX 量は時間経過に伴い大きく減少していた。マトラ8ヵ月齢魚では TTX 添加飼料を経口経管投与した。投与8時間後では肝臓の値が最も高かったが、投与24時間以降は肝臓からほとんど検出されなかった。一方、皮では投与72時間以降に TTX 量が増加していき、投与120時間後に最大となった。TTX の移行は2ヵ月齢魚と同様の傾向を示し、皮が主な TTX 蓄積部位であった (図 2)。

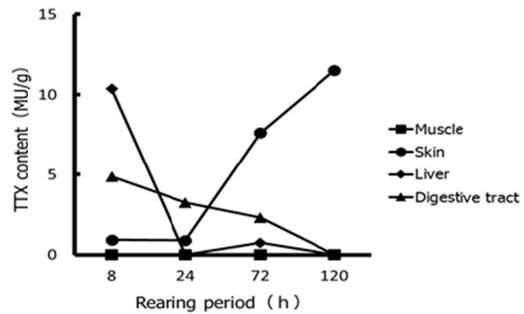


図 2. マトラ8ヵ月齢魚における各組織中の TTX の経時変化

一方、親種である純系マフグおよびトラフグに対する TTX 投与試験の結果、マフグの TTX 蓄積率 (投与 TTX 量に対する体内に蓄積した総 TTX 量の割合) は、4ヵ月齢まで 10% 台であったが、その後大きく増加し、8.5ヵ月齢で最大 (43.5%) となった (図 3)。

また、各部位の相対 TTX 量 (体内総 TTX 量に対する各部位の TTX 量の割合) をみると、両種ともに皮の占める割合が 58.2 ~ 92.6% と最も高く、かつその割合は月齢が進むにつれ漸増した。マフグの皮には、5.5ヵ月齢ですでに

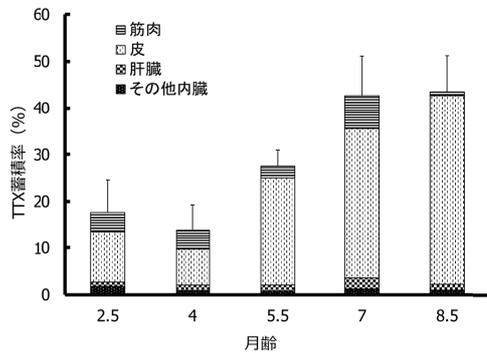


図3. マフグ各月齢におけるTTXの組織分布と蓄積率

腺組織が観察され、TTXは当該腺組織および基底細胞に偏在していた。

次に、トラフグに対するTTX投与試験を行った結果、TTX蓄積率は、3ヵ月齢で25.6%、4ヵ月齢で35.4%となり、成長に伴うTTX蓄積率の増加を示した(図4)。相対TTX量については、主に蓄積した皮では、3ヵ月齢で63.9%、4ヵ月齢で74.3%となった。

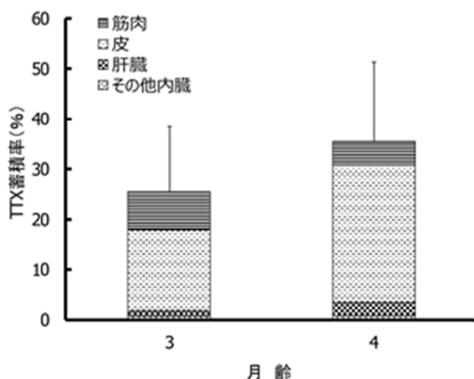


図4. トラフグ各月齢におけるTTXの組織分布と蓄積率

今回の実験に用いた養殖トラフグの主な蓄積部位は皮であり、本結果は過去の報告と一致していた。

以上のことから、トラフグとマフグの交雑個体に関しては両親種の間隔的な特徴を示し、毒性は母親種の影響が強いことが判明した。しかし、他の交雑フグでは成長速度が父親種に近い場合もあり、今回の結果はあくまで交雑フグの一例に過ぎない。そのため、交雑フグの毒蓄積能を明らかにするために、今後も自然交雑個体の毒性等を調査し、父親種の遺伝子解析法を確立するとともに、様々な種による交雑フグを作出して毒化機構の遺伝様式

を解明することが必要である。

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)

K. Okita, E. Tan, H. Satone, S. Kinoshita, S. Asakawa, D. Ojima, H. Yamazaki, K. Sakiyama, T. Takatani, O. Arakawa, A. Hagiwara, Y. Sakakura. Transcriptome analysis of tetrodotoxin sensing and action of tetrodotoxin in central nervous system of tiger puffer *Takifugu rubripes* juveniles. *Fisheries Science*, 83, 401-412 (2017) (査読有)

Y. Sakakura, T. Takatani, J. Nakayasu, H. Yamazaki, K. Sakiyama. Administration of tetrodotoxin protects artificially-raised juvenile tiger puffer *Takifugu rubripes* from predators. *Fisheries Science*, 83(2), 191-198 (2017). (査読有)

S. Jiang, H. Iwashita, O. Arakawa, T. Takatani. Growth and paralytic shellfish toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium catenella* cultured under monochromatic light. *Aquacult. Sci.*, 64(4), 379-390 (2016). (査読有)

S. Jiang, K. Kuwano, N. Ishikawa, M. Yano, T. Takatani, O. Arakawa. Production of domoic acid by laboratory culture of the red alga *Chondria armata*. *Toxicon*, 92, 1-5. (2014). (査読有)

S. Itoi, S. Yoshikawa, K. Asahina, M. Suzuki, K. Ishizuka, N. Takimoto, R. Mitsuoka, N. Yokoyama, A. Detake, C. Takayanagi, M. Eguchi, R. Tatsuno, M.

Kawane, S. Kokubo, S. Takanashi, A. Miura, K. Suitoh, T. Takatani, O. Arakawa, Y. Sakakura, H. Sugita. Larval pufferfish protected by maternal tetrodotoxin. *Toxicon*, 78, 35-40 (2014). (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

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, 東京海洋大学(東京都港区), 2017年3月28日

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, 東京海洋大学(東京都港区), 2017年3月28日

Jiang, S., Iwashita, H., Arakawa, O., Takatani, T., Growth and PSP Production of the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella* Cultured under Monowavelength Light Irradiation. 7th World Fisheries Congress in Busan, Busan (Korea), 23-27 May 2016.

Taniguchi, K., Takao, H., Onuki, K., Tatsuno, R., Sakakura, Y., Takatani, T., Arakawa, O., Noguchi, T. Providing pufferfish liver for human consumption (1): Toxicity evaluation. 7th World Fisheries Congress in Busan, Busan (Korea), 23-27 May 2016.

沖田光玄, 佐藤根妃奈, 陳盈光, 木下滋晴, 浅川修一, 山崎英樹, 崎山一孝, 高谷智裕, 荒川修, 阪倉良孝, 萩原篤志:

フグ毒を投与したトラフグ人工種苗の嗅上皮および脳のトランスクリプトーム解析, 平成26年度日本水産学会秋季大会, 三重大学(三重県津市), 2014年9月21日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高谷 智裕 (TAKATANI, Tomohiro)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科
(水産)・教授
研究者番号: 90304972

(2) 研究分担者

荒川 修 (ARAKAWA, Osamu)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科
(水産)・教授
研究者番号: 40232037

(3) 連携研究者(2名)

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

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