

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：23303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14739

研究課題名(和文)フグ卵巣はなぜ伝統的加工法で無毒化されるのか

研究課題名(英文)Why is puffer ovary detoxified by traditional processing method?

研究代表者

榎本 俊樹 (ENOMOTO, Toshiki)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：70203643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：フグ卵巣は塩漬け・糠漬けすることで毒性が低下した。また、これらのサンプルから TTX 及びその類縁体である 5,6,11-trideoxytetrotodxin(TDCTX) が検出された。TTX 及び TDCTX は糠漬けに伴い減少することから、TTX は分解されることで毒量が減少することが示唆された。フグ卵巣の糠漬けの菌叢について検討したところ、主要な乳酸菌は、*Tetragenococcus muriticus* と同定された。さらに、*Bacillus* 属及び *Clostridium* 属の細菌も主要な菌叢であった。これらの細菌の TTX 分解への関与については、今後の研究課題として残された。

研究成果の概要(英文)：The toxicity of puffer ovaries and its rice bran pickles was evaluated by mouse units and LC-TOF-MS. As a result, Toxicity of the ovaries was decreased during fermentation with salt or rice bran. Tetrodotoxin (TTX) and its analog, 5,6,11-trideoxytetrotodxin (TDCTX) were detected from these samples. Since TTX and TDCTX decrease during fermentation with rice bran, it was suggested that TTX decomposes to reduce the toxicity. When microflora was studied in puffer ovaries fermented with rice bran, *Tetragenococcus muriticus* was identified as a main lactic acid bacteria. *Bacillus* and *Clostridium* also occupied the major flora. The involvement of these bacteria in TTX degradation was left as a future study.

研究分野：食品化学

キーワード：フグ卵巣 フグ毒 発酵 無毒化 微生物 糠漬け 発酵食品

1. 研究開始当初の背景

(1) 石川県では、フグ卵巣の糠漬けが存在し、珍味として販売されている。本製品は、フグ卵巣を1年かけて塩蔵後、糠・魚醤・麹に2年間漬け込み、3年という長い期間を経て脱毒・熟成させることで食用可能となる。しかし、フグの卵巣の糠漬けにおける食品化学的研究及び微生物学的研究はほとんどなされていない。

(2) フグ卵巣糠漬け中のフグ毒(テトロドトキシン、TTX)の消去には微生物による分解作用は関与せず、長い期間にわたる糠中への滲出・希釈によるものであると報告されている(小林ら、日水誌、69、782-786(2003))。しかし、既報ではマウスユニットによる毒性評価のみしか行われておらず、糠中のTTX挙動や微生物の関与に関し検討がなされていない。従って、我々が本研究を実施するまではフグ卵巣の糠漬けにおけるフグ毒低減化メカニズムについてはほとんど解明できていない状況であった。

2. 研究の目的

(1) 石川県には魚介類を原料として用いる水産発酵食品が数多く存在し、その中でも特に類をみない存在が、加賀地方・美川地区や大野地区で仕込まれる「フグの卵巣の糠漬け」である。本食品は、「こんか漬け」と呼ばれる伝統的な魚介類を使用した糠漬けの一種であり、古くから同地域の食文化として根付いてきた。本食品の原料であるゴマフグは猛毒であるフグ毒(TTX)を持っており、中でも卵巣の部分にはこの毒が多く含まれている。このゴマフグの卵巣は糠に漬ける前に1年間、約30~40%の塩水で塩漬けされる。その後、塩漬けされたものを糠に漬け込み2~3年で「ふぐの卵巣の糠漬け」が完成し食用可能となる。この製造工程において、漬け込み中に何らかの要因による減毒が起きているものと考えられてきた。この減毒要因として、上述したように塩蔵中に卵巣より浸出

する液汁にフグ毒が移行すること、その後の糠漬け期間中にもフグ毒が卵巣から糠中に移行し、フグ毒の希釈と均一化が生じていること、糠漬け製造工程に由来する微生物がフグ毒を分解している可能性があることが報告されてきた。しかしながら、これらの減毒要因の可能性に明確な証拠はなく、多くの研究がなされているものの、未だそのメカニズムに関しては明らかになっていない。

(2) 本研究では、フグ卵巣(生)も用いて、マウス試験とLC-TOF-MS分析により、卵巣(生)および、その塩漬け・糠漬け時の毒性とTTX含量およびその類縁体を経時的に調べることで、フグ卵巣糠漬けによるフグ毒軽減メカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに微生物的傾向から本食品を俯瞰するために、pH・乳酸値測定により乳酸発酵の進行状況を評価するとともに、培養法による存在菌叢の同定を行った。また、詳細な単離菌株の性状を解析することで、フグ毒の消失と微生物叢との相関についても考察した。

3. 研究の方法

(1) フグ卵巣は、任孫商店から供与されたものを使用した。試料からのTTX及びその類縁体の調製は、マウス試験の公定法に基づき行った。マウス試験はddYマウス(4週齢、18~21gの雄)を用いて行った。TTX及びその類縁体の測定は、LC-TOF-MS(Agilent 1260/6530)、ELISAキット(REAGEN, LLC)を用いて行った。

(2) 培地中のpH測定には、突き刺し方pH計(ニッコー・ハンセン)、乳酸値測定には、Reflectometer RQflex10及びLactic Acid Test(メルク)を使用した。菌種の同定は、定期的にサンプルを採取し、MRS(乳酸菌)、GAM(一般嫌気性菌)、TSA(一般嫌気性菌)、0.01%クロラムフェニコール含有PDA(真菌)の4種の選択培地を使用し生菌数を測定した。なお、各培地について、NaCl非含有及び10%含有培地を調整した。次いで、生育したコロ

ニーの形状により分類を行い、各代表菌株について 16S リボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) 塩基配列によって菌種の同定を行った。

4. 研究成果

(1) フグ卵巣糠漬けによるフグ毒の毒性変化及び TTX 及びその類縁体の推移について検討を行った。フグ卵巣の糠漬け製造時の毒性の変化をマウス試験法、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) で評価するとともに、TTX 及びその類縁体の関係についても LC-TOF-MS により検討した。

50 匹のフグ卵巣 (生) の毒性試験をマウス試験法により行った結果、フグ卵巣 (生) の毒性は個体差が大きく、最も高い試料で 410.8 MU/g であったのに対し、1 MU/g 以下のものもいくつか存在した。フグにおける TTX の蓄積は、生物濃縮によりなされることが明らかとなっている。したがって、フグ卵巣に含まれる TTX の個体差は、生育する環境により生物濃縮により蓄積される TTX 含量が異なることによると思われる。また、報告されているマウスユニットを用いた卵巣の毒量においても同様に個体差が大きいことから、フグの持つ毒量は一般的に個体差があると考えられる。

マウスユニットによる毒量評価に用いた卵巣について LC-TOF-MS を用いて TTX 含量を測定した。その結果、マウスユニットが高い試料では TTX 含量が多い傾向となった。しかし、マウスユニットが高いにも関わらず、必ずしも TTX 含量が高くないものも存在した。このことより、フグ卵巣には、TTX のみならずその類縁体が存在する場合があります、TTX 類縁体にも毒性を有することが示唆された。次いで、LC-TOF-MS による TTX 類縁体を MS 及び MS/MS 分析により評価した結果、本実験で使用した卵巣 (生) にも TTX 類縁体である 5,6,11-trideoxytetrotodoxin が多く含まれているものが存在した。しかし、5,6,11-trideoxytetrotodoxin 以外の TTX 類

縁体について、標準品を入手できず同定には至らなかった。さらに、マウス試験の結果と LC-TOF-MS による TTX 及び 5,6,11-trideoxytetrotodoxin の分析結果から、5,6,11-trideoxytetrotodoxin は毒性を有するが、TTX のそれと比較すると低いことが示唆された。これらの結果から、フグ卵巣の糠漬けの毒性は TTX のみで評価することは困難でありかつ危険であることが示された。

次いで、フグ卵巣の糠漬け樽から採取した糠、塩汁及び糠汁中の TTX 及び 5,6,11-trideoxytetrotodoxin について LC-TOF-MS により分析した結果、フグ卵巣 (生) 同様に TTX 及び 5,6,11-trideoxytetrotodoxin が検出された。このことは、卵巣中の TTX 及び 5,6,11-trideoxytetrotodoxin は卵巣から糠、塩汁及び糠汁に移行することが考えられる。また、これらの糠、塩汁及び糠汁の TTX 及びその類縁体は、ある一定期間まで増え続けた後に減少することから、さらに異なる類縁体へと変換され、毒性が低減化していくことが示唆された。同様に、塩漬け、その後糠漬けされた卵巣の TTX 含量と 5,6,11-trideoxytetrotodoxin について検討を行った結果、糠、塩汁、糠汁の結果と同様、フグ卵巣 (生) を塩漬け、その後糠漬けすることで、まず TTX は減少、5,6,11-trideoxytetrotodoxin は増加し、その後 5,6,11-trideoxytetrotodoxin も減少することが明らかとなった (図 1)。フグ卵巣の糠漬け樽から採取した糠、塩汁及び糠汁中の TTX 及び 5,6,11-trideoxytetrotodoxin 濃度はフグ卵巣のそれと比べ顕著に低いことから、TTX からその類縁体への変化は、フグ卵巣中でも進行することが示唆された。

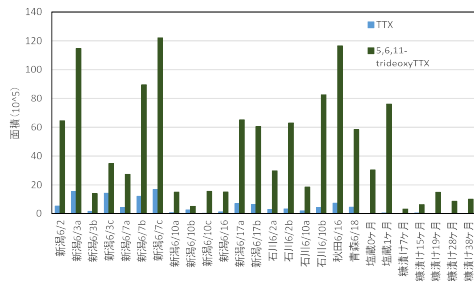


図1. LC-TOF-MSによるフグ卵巣(生・塩漬け・糠漬け)中の5,6,11-trideoxytetradotoxin

(2) pH・乳酸値測定による乳酸発酵の進行状況の評価の評価より、塩漬け時の卵巣と糠漬け時の卵巣を比較したところ、前者よりも後者において明らかに乳酸量が多く、乳酸発酵が糠漬け工程において顕著に進行したことが示唆された。pHは糠漬け終了時にはpH6から5程度まで下降したため、乳酸発酵が優先的に行われていることが伺われた。

生菌数は糠、浸出液、卵巣のサンプルのいずれにも共通して、10% NaCl 含有培地の方において、非含有の培地よりも全体的に多く、耐塩性の菌が多く生存していたと考えられた。

糠および浸出液、卵巣のサンプルから *Tetragenococcus muriaticus* が多く同定された。本菌は耐塩性をもつ乳酸菌であることが分かっており、フグの卵巣の糠漬けにおける乳酸の生成に関わっている可能性が高いことが示唆された。また、真菌である *Phialosimplex* 属の菌も同定され、フグの卵巣の糠漬け中の主要菌の1つである可能性が伺われた。糠サンプルからは、*Bacillus* 属細菌と *Clostridium* 属細菌が単離された。この2つの菌は、糠の中で孢子状態のまま休眠しており、生き残った芽胞が再び増殖に適した環境におかれたことで発芽したものと考えられた。*Clostridium* 属菌はタンパク質を分解し、硫化水素、スカトールなどの悪臭をもつ物質をつくることが報告されており、フグの卵巣の糠漬けのもつ独特の臭気は *Clostridium* 属菌のタンパク質分解によって

付与される可能性も考えられた。浸出液サンプルからは、特に塩漬け期において *Chromohalobacter* 属の菌が多数同定された。本菌種は中度好塩性菌であることが報告されており、フグの卵巣の糠漬けの常在菌であることが示唆された。

(3) フグ卵巣を塩漬け・糠漬けすると TTX の水酸基が分解され類縁体が生じていることが明らかになった。このことは、フグ卵巣の糠漬けによるフグ毒無毒化は、単に浸透圧による TTX の放出ではなく、糠漬け期間中に TTX 自身が分解されることで生じる可能性が高いことを示している。なお、これらの分解に微生物が関与するかについては、単離した微生物がフグ毒を分解するかどうかを、マウスユニット及び LC-TOF-MS により検討する必要がある。フグ卵巣の塩漬け・糠漬けによる TTX の分解メカニズムについては、微生物の産生する酵素も含めた微生物の関与が今後の課題として残された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

品川千迪、山田友香里、小柳 喬、笹木哲也、道島俊英、榎本俊樹・フグ卵巣糠漬けによるフグ毒権限メカニズムの解明。日本食品科学工学会第 64 回大会、2017 年 8 月 29 日、日本大学湘南キャンパス(神奈川県藤沢市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 俊樹 (ENOMOTO, Toshiaki)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授
研究者番号：70203643

(2)研究分担者

小柳 喬 (KOYANAGI, Takashi)
石川県立大学・生物資源環境学部・准教授
研究者番号：20535041

(3)連携研究者

無し