愛知県内で漁獲されたしらす加工品に混入したフグ稚魚の種判別および毒性評価

誌名	愛知県衛生研究所報
ISSN	05157803
著者名	山本,奈緒 長谷川,晶子 安井,善宏
発行元	愛知県衛生研究所
巻/号	74号
巻号補足	
掲載ページ	p. 17-24
発行年月	2024年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

愛知衛所報　No.74, 17-24, 2024

調　査　研　究

愛知県内で漁獲されたしらす加工品に混入したフグ稚魚の種判別および毒性評価

山本奈緒、長谷川晶子、安井善宏

要　旨

近年、しらす加工品にフグ稚魚が混入し食の安全性が問題となる事案が全国的に発生している。しかし、混入したフグ稚魚の種判別やその毒性についての報告は少なく、愛知県内で漁獲されたものについての調査データはない。しらす加工品の安全性評価の一助とすることを目的に、県内で2020年から2022年に加工されたしらす加工品に混入したフグ稚魚の種判別および毒性調査を行った。実体顕微鏡下での形態分類と16S rRNA遺伝子、cytochrome *b*遺伝子およびcytochrome *c*遺伝子の部分塩基配列を解析した結果、試料154個体のうち、シロサバフグ(146個体)、カナフグ(5個体)、クロサバフグ(1個体)、センニンフグ(1個体)、サザナミフグ(1個体)を同定した。LC-MS/MSを用いてシロサバフグ、カナフグ、クロサバフグ、センニンフグ、サザナミフグのテトロドトキシン（TTX）を測定したが、いずれの個体からもTTXの保持時間(10.8分)にピークは認められず、TTXは検出されなかった。

キーワード：しらす加工品、フグ、稚魚、テトロドトキシン、種判別

序　文

しらすはカタクチイワシ、マイワシ、イカナゴ、ウナギなどの稚魚の総称である。イワシ類の稚魚が主体であるしらす加工品は、船びき網漁法で捕獲するため、しらす以外の魚や甲殻類、頭足類およびその幼生が混入することが珍しくない[1)]。

厚生労働省は昭和58年(最終改正令和3年)通知の「フグの衛生確保について」で、通知で示された可食部位、漁獲海域以外のフグの販売等が認められないとしており[2)]、未処理のフグの販売は食品衛生法第6条第2号違反と判断される。また、全国で豆アジやしらす加工品にフグの稚魚が混入し回収する事例が報告されたことを受け、平成26年に同省は「フグによる食中毒防止の注意喚起について」の事務連絡を各自治体に発出し、フグ混入事例への対応強化を求めた[3)]。しらす加工品は製造過程でしらす以外の生物を除去する工程はあるものの、しらす加工品等にフグ稚魚が混入した場合は前述の通知により回収することとなり製造・販売業者の負担が大きい。しらす漁獲量が全国2位と上位である愛知県内でも混入事例が複数報告されている。

フグ毒テトロドトキシン(以下 TTX)は主にフグ科魚類が有し、骨格筋や神経の膜電位依存性ナトリウムイオンチャネルに結合し神経伝達を遮断する神経毒である。フグ毒による中毒症状は短時間でしびれや麻痺症状が現れ、重症の場合は呼吸困難で死亡することがある[4)]。フグの毒力はフグの種

類や臓器によって異なるほか、同一種類でも個体によって異なり、季節や漁獲海域によって異なる場合もある。一方、フグの毒力が 10 MU/g 以下の場合、食用に供してもヒトの健康を損なう恐れはないとされている[5]。一般に卵巣、肝臓は毒力が強いとされており、TTX を持つ有毒卵から孵化したフグ稚魚には卵の TTX が保持されているという報告もある[6]。しかし、しらす加工品に混入したフグの稚魚の種判別やその毒性についての報告は少なく、愛知県内で漁獲されたものについて報告された調査データはない。

本研究では、しらす加工品の安全性評価の一助とすることを目的に、県内で漁獲されたしらす加工品に混入したフグ稚魚の種判別および毒性調査を行った。

材料と方法

1. 試料

愛知県内で2020年から2022年に水揚げ、加工され、しらす加工品に混入したフグの稚魚と推定され愛知県水産試験場より供与されたものを試料とした。同一日に水揚げされたものを1つのロットとして、27ロット(No.1-27)154個体を実験に供した。試料は使用するまで−30℃で冷凍保存した。

2. 方法

1) 魚種判別

フグ稚魚と推定された試料 154 個体を形態学的に分類した。成書を参考に体色のパターン、背側および腹側の棘の有無や分布、尾鰭の色彩などの特徴を実体顕微鏡下で観察し、属レベルでの分類を行った[6,12]。

次に通知試験法および既報[7,9]に従って1個体ずつ DNA を抽出し、PCR(polymerase chain reaction)法を用いて遺伝子を増幅した。PCR 増幅産物は DNA 直接塩基配列決定法によりフグ稚魚の種判別を行った。すなわち、各個体の筋肉部分を 25 mg 採取し、DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen, Germany)によって DNA を抽出した。フグの稚魚が 25 mg に満たない場合は全量使用した。16S rRNA 遺伝子部分領域、cytochrome *b* (*cyt b*)遺伝子部分領域および cytochrome *c* (*cyt c*)遺伝子部分領域を増幅する 3 種類のプライマーを使用し、PCR 反応には TaKaRa Ex Taq (TaKaRa Bio, Japan) を用いた。反応条件は通知試験法および既報から変更し、遺伝子領域ごとに表1のように設定した。PCR 反応産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-up System(Promega, USA)を用いて精製した後、Big Dye Terminator Kit ver3.1 (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いたダイレクトシークエンス法にて塩基配列を決定した。得られた塩基配列を、nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)で検索し、通知に従い 99.0%以上の相同性を有する配列を基に種を決定した。

2) LC-MS/MS による TTX の測定

魚種判別から同一種と判断されたフグ稚魚を試料として食品衛生検査指針理化学編に準じた酢酸加熱法で TTX を抽出した。試料が少量のため、試料重量に合わせ抽出液量を減らした。得られた上清を遠心チューブ型限外ろ過膜(分画分子量 10,000 Ultrafree-MC, Millipore, USA)に通過させ、TTX 分析用試料として LC-MS/MS 法で行った。標準品は、富士フィルム和光純薬(株)製の TTX を使用した。

表1 PCR 反応条件

反応	16S rRNA	Cytochrome *b*	Cytochrome *c*	サイクル数
Initial denaturation	−	94℃ 5分	94℃ 5分	1
PCR 反応	98℃ 10秒	94℃ 30秒	94℃ 30秒	35
	55℃ 30秒	50℃ 1分	52℃ 40秒	
	72℃ 30秒	72℃ 1分	72℃ 1分	
Extension	−	72℃ 10分	72℃ 10分	1

分析装置は LC-MS/MS(ACQUITY UPLC-Class/TQD, Waters, USA)、分析カラムは Atlantis HILIC Silica(3 μm, 2.1×150 mm, Waters, USA)を使用した。移動相は A:アセトニトリル、B:0.1%ギ酸水溶液とし、初期値 A＝90%, 分析開始後 10 分で A＝40%リニアグラジエントの測定条件で分析した。移動相の流速は 0.2 mL/min とし、検体を 5 μL 注入した。TTX の検出はエレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード、MRM (Multiple Reaction Monitoring)モードを採用し、プレカーサーイオンとして m/z 320、プロダクトイオンとして m/z 162 を用いた[10]。

結果および考察

1) 形態分類による魚種判別

試料として用いたフグ稚魚の水揚げ時期は 5 月から 11 月で、154 個体のうち 140 個体が 30 mm 以下の小型サイズであった。稚魚の体長は平均 17.7±8.1 mm で、重量は平均 152±0.2 mg であった。実体顕微鏡下で観察し、属レベルでの分類を行ったところ、153 個体は体側に銀白色の縦帯が見られ、腹側は白色を呈していたことから、サバフグ属と分類した。そのうち 148 個体は体表に小棘が分布していたが、5 個体(No. 10-1, 13-1, 14-1, 18-1, 26-16)は体表に小棘が見られなかった。残り 1 個体 (No. 1-1) は体側には銀白色の縦帯が見られず、体表には小棘が見られたため、サバフグ属以外のフグと推測された。尾鰭の色彩は色が退色しているものも多く、色彩で分類するのは困難であった (図 1)。しらす加工品に混入したフグ稚魚は、加熱乾燥の工程を経ていることや、成魚の特徴を有していない場合もあることから、形態分類が困難なことが多く、魚種判別には遺伝子検査が欠かせないと考えられた。

2) 遺伝子解析による魚種判別

抽出した DNA を鋳型として、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA, *cyt b* および *cyt c* 遺伝子領域を増幅するプライマーを用いて遺伝子増幅を行い、増幅産物を Nucleotide BLAST で検索した。通知試験法では 16S rRNA および *cyt b* 遺伝子領域のそれぞれに対して 99.0%以上の塩基配列の相同性を示す魚種をその魚種と判定するとされている[7]。本研究では、通知法で示された 2 領域に、多くの魚種の塩基配列の登録がすすめられている *cyt c* 遺伝子領域を加えた 3 領域の塩基配列を解析し、2 領域で同定できなかった場合、*cyt c* 遺伝子領域を追加判定に用いた。魚種の判定に利用した塩基配列の相同性を表 2-1, 2 に示した。

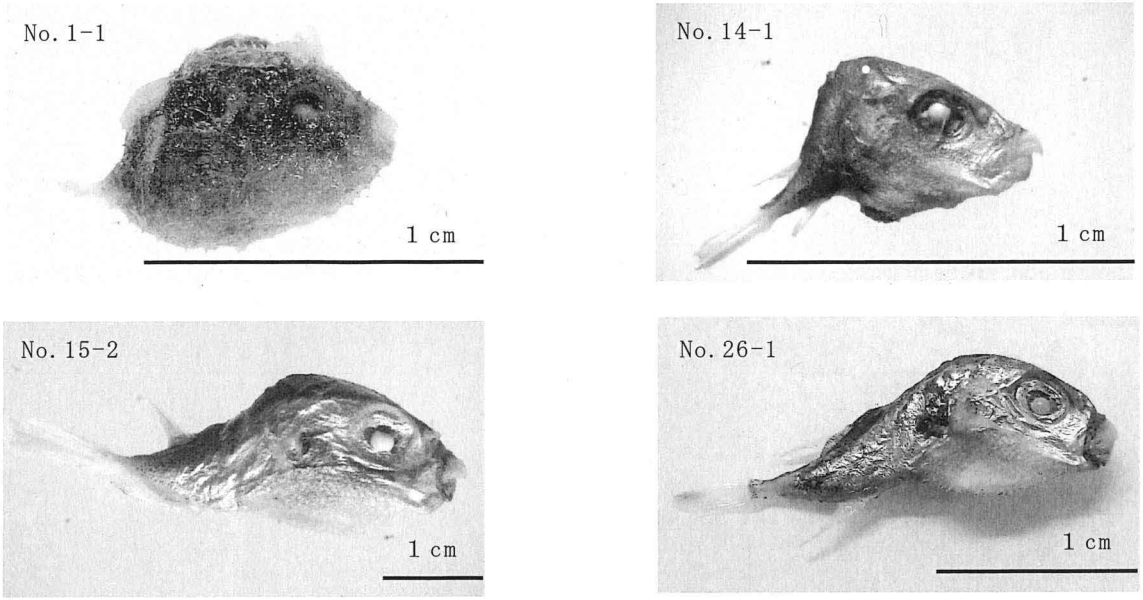

図 1　しらす加工品に混入したフグ稚魚
(No. 1-1:サザナミフグ、No. 14-1:カナフグ、No. 15-2:センニンフグ、No. 26-1:シロサバフグ；それぞれの名称は遺伝子解析に基づく)

表 2-1　遺伝子解析による魚種判別

Lot No.	16S rRNA	Cytochrome *b* Concordance rate Identity(%)	Cytochrome *c*	Fish species Scientific name Japanese common name
1-1	572/574 99.7%	431/435 99%	644/648 99.4%	*Arothron hispidus* サザナミフグ
10-1 13-1	570/570 100%	430/435# 434/435# 98.9-99.8%	646/649# 648/649# 99.7-99.9%	*Lagocephalus inermis* カナフグ
14-1 18-1 26-16	570/570 100%	410/423# 414/423# 96.9-97.9%		*Takifugu vermicularis* ナシフグ
5 個体	567/570 99.5%	408/423# 412/423# 96.5-97.4%		*Lagocephalus lagocephalus* クマサカフグ
11-1	569/569 100%	435/435 100%	652/652 100%	*Lagocephalus cheesemanii* クロサバフグ
	568/569 99.8%	422/423 99.8%		*Takifugu oblongus* タキフグ
15-2	572/572 100%	※	652/652 100%	*Lagocephalus sceleratus* センニンフグ
			649/652 99.5%	*Lagocephalus lunaris* ドクサバフグ

サンプルと 95.0%以上の塩基配列の相同性を示した魚種のみを記載した。
空欄はサンプルとの相同性が 95.0%未満を示している。
同定した魚種を表中にハイライトで示した。
※: 塩基配列の解析ができなかった。
#: 相同性が異なる個体がある場合を示す。

表 2-2　遺伝子解析による魚種判別

Lot No.	16S rRNA	Cytochrome *b* Concordance rate Identity(%)	Cytochrome *c*	Fish species Scientific name Japanese common name
1-2～ 27-1 146 個体	542/542# 100% 546/546# 100% 545/548# 99.4% 548/549# 99.8% 565/568# 99.5% 566/569# 99.4% 567/569# 99.7% 569/569# 100%	415/415 100%	645/647 99.7%	*Lagocephalus spadiceus* シロサバフグ
	566/569 99.5%			*Lagocephalus inermis* カナフグ
		414/415 99.7%		*Takifugu rubripes* トラフグ
	556/569 97%	402/402 100%	645/647 99.7%	*Lagocephalus cheesemanii* クロサバフグ

cyt b および *cyt c* 遺伝子領域の塩基配列は 4 個体のみ解析した。
サンプルと 95.0%以上の塩基配列の相同性を示した魚種のみを記載した。
空欄はサンプルとの相同性が 95.0%未満を示している。
同定した魚種を表中にハイライトで示した。
#: 相同性が異なる個体がある場合を示す。

形態分類でサバフグ属以外のフグと推察したNo.1-1は、16S rRNA遺伝子領域、*cyt b*遺伝子領域のいずれの領域でもサザナミフグ（Accession No. AB742006, Accession No. AP019603）と99.0%以上の塩基配列の相同性を示し、他のフグ種では同等の相同性が認められなかったため(データ非表示)、サザナミフグ*Arothron hispidus*と判別した。

サバフグ属と分類し、体表に小棘が見られなかった5個体(No.10-1,13-1,14-1,18-1,26-16)は16S rRNA遺伝子領域でカナフグ（Accession No. KT718800)、ナシフグ（Accession No. KT718812）およびクマサカフグ(Accession No. KT718801)の塩基配列と99.0%以上の相同性を示した。*cyt b*遺伝子領域ではカナフグ（Accession No. KT933000）と99.0%以上の相同性を示し、ナシフグ（Accession No. KT696365)、クマサカフグ（Accession No. KT696356）とは99.0%以下の相同性だった。しかし、カナフグとの比較において99.0%以下の塩基配列の相同性を示す個体もみられたため、*cyt c*遺伝子領域の塩基配列を比較した。カナフグ（Accession No. KP266776）と99.0%以上の相同性を示し、他は99.0%未満であったため、カナフグ*Lagocephalus inermis*と判別した。

サバフグ属と分類し、体表に小棘が見られた148個体中2個体（No.11-1とNo.15-2）は他の146個体と16S rRNAの相同性が異なっていたため別に示す。No.11-1は16S rRNAおよび*cyt b*遺伝子領域で、クロサバフグ(2領域ともにAccession No. MT903226)と100%一致したが、第2候補のタキフグ（Accession No. KT718808、Accession No. KT696361）と1塩基しか異なっていなかったため、*cyt c*遺伝子領域の塩基配列を比較した。クロサバフグ(Accession No. OQ700360)と99.0%以上の相同性を示したため、クロサバフグ*Lagocephalus cheesemanii*と判別した。No.15-2は16S rRNA遺伝子領域でセンニンフグ（Accession No. MH550879）と100%一致したが、*cyt b*遺伝子領域では塩基配列の解析ができず、判定基準を満たさなかった。そこで、*cyt c*遺伝子領域の塩基配列を解析した結果、センニンフグ（Accession No. MH550879）と100%一致した。第2候補のドクサバフグ(Accession No.KF489625)とは3塩基異なること、16S rRNAおよび*cyt b*遺伝子領域で99.0%以上の相同性を示す魚種がないことから、センニンフグ*Lagocephalus sceleratus*と判別した。

サバフグ属と分類した残る146個体(No.1-2～27-1)は16S rRNA遺伝子領域でシロサバフグ（Accession No. OM899632）の塩基配列と99.4～100%の相同性を示し、4個体のみ解析した*cyt b*遺伝子領域では、シロサバフグ（Accession No. AP009538）の塩基配列と100%一致した。16S rRNAおよび*cyt b*遺伝子領域の両領域共に99.0%以上の相同性を示す他のフグ種はみられなかったことから、146個体全てをシロサバフグ*Lagocephalus spadiceus*と判別した。

試料としたフグ稚魚154個体のうち、シロサバフグ(146個体)、カナフグ(5個体)、クロサバフグ(1個体)、センニンフグ(1個体)、サザナミフグ(1個体)の5種類のフグ稚魚が同定された。日本近海産のシロサバフグは無毒(毒性値10 MU/g未満)とされており[5,13]、愛知県内で漁獲されたしらすに混入したフグ稚魚は94%がシロサバフグであったため、これらが混入したしらすを食べた場合の健康被害は極めて低いと考えられる。

*cyt c*遺伝子領域の塩基配列は、全世界の生物種を塩基配列の解析によってデータベース化するDNA barcoding法という計画で利用され、より多くの魚種の塩基配列の登録がすすめられており、同領域がフグの魚種判別に適用可能であるとする報告がある[9]。本研究においても16S rRNAおよび*cyt b*の2遺伝子領域では判別できず、*cyt c*遺伝子領域の塩基配列を用いて判別可能になった個体がみられたことから、通知の方法では種判別できないフグ種が存在し、3遺伝子領域を組み合わせて解析することで、より高精度な魚種判別が可能になると考えられた。

また、*cyt b*および*cyt c*遺伝子領域は通知法および既報のPCR温度条件ではフグ種

以外の魚種(カタクチイワシ)が検出されたため、表1の温度条件を検討することでフグ種を選択的に増幅することができた。試料としたフグ稚魚は大量のカタクチイワシに混入しているものであるため、しらすを加工品にする際の製造過程でカタクチイワシのDNAが混入したことにより、通知法の条件では塩基配列を解析できなかった可能性が考えられた。

3)LC-MS/MSによるTTXの検出

魚種判別を行ったフグ稚魚のうち、サザナミフグ(1個体1検体)、カナフグ(2個体1検体)、クロサバフグ(1個体1検体)、センニンフグ(1個体1検体)、シロサバフグ(5個体5検体)の試料についてLC-MS/MSを用いてTTX分析を行った。シロサバフグは30 mm以上の個体を抽出し測定した。いずれの試料からもTTXの保持時間(10.8分)にピークは認められず、TTXは検出されなかった。代表例として、TTX標準品とセンニンフグのマスクロマトグラムを示した(図2)。

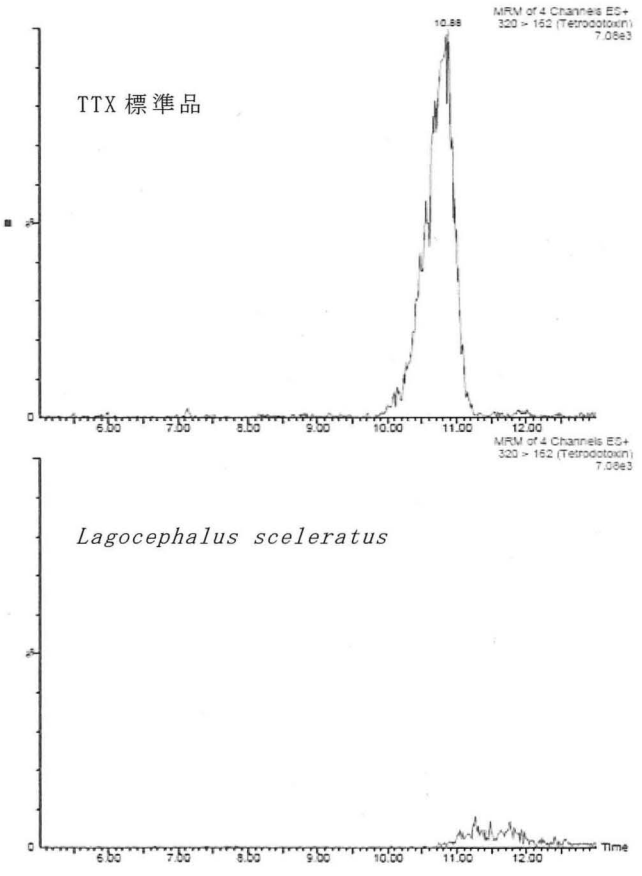

図2　テトロドトキシン標準品とセンニンフグのLC-MS/MSクロマトグラム

今回魚種判別しTTXを測定したフグ稚魚のうち、シロサバフグ、クロサバフグ、カナフグは食用フグとされている。センニンフグの筋肉および皮膚は弱毒(10-99 MU/g)、サザナミフグの筋肉は弱毒、皮膚は強毒レベル(100-999 MU/g)の毒性を持つことが報告されている、いわゆる「毒フグ」とされる食用不可のフグである[11、14]。本研究では愛知県内で漁獲されたフグ稚魚からTTXは検出されなかったが、今後しらす加工品の安全性を評価するためには、TTXの毒性値と共に、混入したフグ稚魚の割合およびしらすの摂食量について検討する必要がある。

まとめ

現在は、しらすにフグ稚魚が混入した場合、食品衛生法に基づき、回収措置がとられることが多く、製造・販売業者の負担が大きい。報告数は少ないものの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極めて低いとする報告があり[1)]、本研究においても同様の結果であった。しかしながら、有毒の卵巣から孵化した稚魚はTTXを保有する報告もあることから[6)]、今後もフグ稚魚の魚種判別および毒性評価の継続的な調査を行う必要がある。本研究がしらす加工品に混入したフグ稚魚に関する安全性評価の一助となり、今後フグ稚魚の毒性評価データが蓄積され、健康被害が低いと判断された折には販売規制の緩和につながることを期待する。

謝　辞

本研究を実施するにあたり、ご指導およびご協力いただきました、愛知県水産試験場の皆様に深謝いたします。試料をご恵与いただきました、かじや水産およびテルニ商店の皆様に深謝いたします。また、LC-MS/MSをご貸与いただき、TTX分析についてご教授くださいました衛生化学部棚橋高志部長はじめ職員の皆様に深謝いたします。

参考文献

1)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.
2)厚生労働省: 昭和 58 年 12 月 2 日環乳第 59 号 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知 (2023 年 11 月 30 日現在) : https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000786717.pdf
3)厚生労働省: 平成 26 年 9 月 8 日事務連絡 (2023 年 11 月 30 日現在) :https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenbu/0000057173.pdf
4)新・海洋動物の毒(塩見一雄, 長島裕二編): 1-16, 2013, 成山堂書店、東京.
5)山口県衛生部環境衛生課監修: ふぐ (改訂版) . 山口県食品衛生協会、1986.
6)Nagashima Y, Mataki I, Toyoda M, Nakajima H, Tsumoto K, Shimakura K, Shiomi K : Changes in Tetrodotoxin Content of the Puffer Fish *Takifugu rubripes* during Seed Production from Fertilized Eggs to juveniles. Food hygiene and safety science 51(1):48-51, 2010.
7)厚生労働省: 平成 20 年 4 月 25 日食安輸発第 0425005 号(2023 年 11 月 30 日現在): https://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/hassyutu/dl/374.pdf
8)厚生労働省監修: 食品衛生検査指針理化学編. 661-666, 2005, 日本食品衛生協会、東京.
9)村上太郎, 昌山 敦, 紀 雅美, 山野哲夫, 清水 充: 遺伝子解析による魚種鑑別法のフグ中毒への応用. 食品衛生学雑誌 52(6):348-353, 2011.
10)長谷川晶子,中村瑞那,奥村正直,秦 眞美, 山下照夫, 皆川洋子: 培養細胞を用いたテトロドトキシン検査法の検討. 愛知県衛生研究所報 64:23-31, 2014.
11)フグの分類と毒性(原田禎顕, 阿部宗明編): 1994, 恒星社厚生閣、東京.
12)日本産稚魚図鑑 (沖山宗雄編): 979-989, 2014, 東京大学出版、東京.
13)谷山茂人, 柴野啓輔, ニーライミトナ, 篠原 充, 高谷智裕, 荒川 修: 萩市近海産シロサバフグ肝臓の毒性. 長崎大学水産学部研究報告 91:1-3, 2010.

Species Identification and Toxicity Evaluation of Pufferfish Juveniles Contaminating Whitebait Products caught in Aichi Prefecture, Japan.

Nao Yamamoto, Akiko Hasegawa, Yoshihiro Yasui

In recent years, there have been incidents nationwide of processed whitebait products being contaminated with pufferfish juveniles, which has become a food safety concern. However, there are few reports on the species identification and toxicity of pufferfish juveniles, and there is no survey data on pufferfish juveniles caught in Aichi Prefecture, Japan. In order to evaluate the food safety of whitebait products contaminated with pufferfish juveniles, we determined the species and toxicity of pufferfish juveniles contaminating whitebait products processed between 2020 and 2022 in the prefecture.

Morphological classification using a stereomicroscope and partial sequence analysis of the 16S rRNA gene, the cytochrome *b* gene or cytochrome *c* gene identified 154 pufferfish samples, including146 *Lagocephalus spadiceus*, 5 *Lagocephalus inermis*, 1 *Lagocephalus cheesemanii*, 1 *Lagocephalus sceleratus*, and 1 *Arothron hispidus*.

We measured Tetrodotoxin (TTX) in the identified pufferfish juveniles using liquid chromatography-tandem mass, but no peak was observed at the TTX retention time (10.8 min) from any of the specimens.

Keywords: whitebait products, pufferfish, juvenile, tetrodotoxin, species identification