

2008J7052A

別添1

厚生労働科学研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業

自然毒のリスクプロファイル作成を
目指した調査研究

平成20年度 総括・分担研究報告書
(H20-食品-一般-015)

研究代表者 塩見一雄

平成21(2009)年4月

別添 2

目 次

I. 総括研究報告書	
自然毒のリスクプロファイル作成を目指した調査研究	
塩見一雄	1
II. 分担研究報告書	
1. 日本沿岸で漁獲されたフグ科魚類の毒性	
長島裕二	8
2. 小型巻貝とハコフグ中毒残品の毒性調査および関連の文献検索	
荒川 修	11
3. テトラミン中毒患者の血中テトラミン濃度	
塩見一雄	23
4. スギヒラタケキノコ中の毒性成分検索	
近藤一成	27
5. アジサイ属植物の食中毒に関する調査・研究	
佐竹元吉	33
6. 自然毒のリスクプロファイルの作成	
塩見一雄、長島裕二、荒川 修、近藤一成、佐竹元吉	34
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	108
IV. 研究成果の刊行物・別刷	109

別添3

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「自然毒のリスクプロファイル作成を目指した調査研究」

総括研究報告書

研究代表者 塩見一雄 東京海洋大学食品生産科学科 教授

研究要旨

日本沿岸で漁獲されたフグ科魚類の毒性：日本沿岸で漁獲されるフグの毒性を再評価することを目的に、フグ科トラフグ属11種（シマフグ、トラフグ、カラス、クサフグ、ショウサイフグ、ナシフグ、マフグ、コモンフグ、ムシフグ、ヒガンフグ、アカメフグ）、モヨウフグ属2種（サザナミフグ、スジモヨウフグ）、サバフグ属4種（シロサバフグ、クロサバフグ、ドクサバフグ、カナフグ）の合計17種についてマウス試験法で毒性を測定した。ほとんどは従来の値を超えるものはなかったが、アカメフグ卵巣は「強毒」よりも強い「猛毒」レベルの毒性を示し、毒性評価を改めるべきと考えられる。ショウサイフグ精巢から毒性が検出されたことがあるので、緊急に毒性を再調査することが必要である。また、南方産とされていたドクサバフグが日本沿岸でも出現し、食中毒事件も発生した。宮崎県沿岸のフグ延縄でドクサバフグが漁獲され、筋肉から「強毒」レベルの毒性が検出されたことから、日本沿岸におけるドクサバフグの分布と毒性を調査し、食中毒防止に努める必要がある。

ハコフグ中毒残品および患者血清の毒性ないし溶血活性：2008年10月に長崎県で発生したハコフグ中毒につき、残品（未調理ハコフグ3個体の筋肉と肝臓）の毒性を調べたところ、いずれもマウスに対して遅延性致死活性を示した。さらにマウス赤血球に対する遅延性溶血活性試験では、供試3個体中1個体の筋肉と全個体の肝臓、ならびに中毒患者の血清は陰性であったが、2個体の筋肉が同活性陽性と判断された。

小型巻貝の毒性と毒成分：2007年9月～2009年1月に長崎県橘湾および熊本県宮野河内湾で採集した小型巻貝7種85個体につき、マウス試験で毒性を調べたところ、キンシバイは供試した41個体すべてが有毒であった。毒力は極めて高く、24個体の筋肉または内臓が1,000 MU/gを上回り、内臓では最高毒力が10,800 MU/gに達した。1個体当たりの総毒力をみると、41個体中28個体で筋肉が内臓よりも1.7～110倍高い値を示した。LC/MS分析により、毒の主成分はテトロドトキシン（TTX）であることが明らかとなり、加えて11-oxoTTXの存在が示唆された。一方、同時期同海域で採取したその他の巻貝については、毒性は全く認められなかった。

テトラミン中毒患者の血中テトラミン濃度：ヒメエゾボラの摂食によりテトラミン中毒を発症した患者の血液試料（血清および血漿）を入手したので、テトラミン濃度の測定をKawashima et al.のLC/ESI-MS法（Toxicol, 44, 185-191, 2004）に準じて試みた。血液試料を凍結乾燥後、メタノール抽出、n-ヘキサン脱脂によりLC/ESI-MS分析用試料を調製した。来院直後の患者血液試料のテトラミン濃度は約2 µg/mlで、病院での血液吸着治療、血液透析治療により減少傾向を示した。なお、添加回収実験では血液試料へ添加したテトラミンのほぼ100%が回収され、LC/ESI-MS法による血中テトラミン濃度の測定値は信頼性が高いと判断された。以上より、原因食品が残っていない場合でも、テトラミン中毒は患者の血中テトラミン濃度の測定により特定できることが示唆された。

スギヒラタケキノコ中の毒性成分検索：スギヒラ

タケ中の毒性物質を検索するため、スギヒラタケ抽出物を神経細胞株 (PC12、SH-SY5Y、NG108-15) を用いて細胞障害性を指標に分画精製を繰り返し行い、脂溶性分画から毒性を示す共役トリエン型脂肪酸を単離同定した。この脂肪酸は、HPLC によりスギヒラタケに特有で、産地を問わず含有されていた。さらに、細胞への影響を検討したところ、低濃度 ($IC_{50}=1 \mu\text{g}/\text{mL}$) で神経細胞をアポトーシスさせることが分かった。また、構造の類似した不飽和脂肪酸 (非共役型) の神経細胞への影響は認められず、共役型不飽和脂肪酸特異的な毒性と考えられた。アジサイ属植物の食中毒に関する調査・研究: 2008年6月、茨城県と大阪府で、相次いでアジサイの葉による食中毒が発生した。新聞報道では、原因は青酸配糖体とされたが、その後の調査で、青酸配糖体は検出されないという情報がある。そこで、アジサイを始め、アジサイ属植物を広範に採集し、それらに食中毒を引き起こすような毒成分が含まれているのかどうか、含まれているとすれば、どのような化合物なのかを特定すべく、調査・研究を開始した。リスクプロファイルの作成: 自然毒に関するリスクプロファイルの様式を検討し、有毒生物別に中毒発生状況、中毒症状、原因毒の本体とその毒性・化学的性状・分析方法、中毒対策などの項目に沿って整理することを決定した。また、一般消費者向けのリスクプロファイルの概要版も作成し、厚生労働省のホームページに掲載する方針も決定した。これらの方針を受けて、データが蓄積されていると思われる自然毒を中心に国内外の文献調査を実施し、フグ毒、麻痺性貝毒、下痢性貝毒、巻貝唾液腺毒および8種キノコ毒(ツキヨタケ、クサウラベニタケ、ニガクリタケ、カキシメジ、シロタマゴテングタケ、テングタケ、ドクササコ、ドクツルタケ)についてはリスクプロファイル(案)を作成した。また、ハコフグ毒、小型巻貝毒および6種キノコ毒(ツキヨタケ、クサウラベニタケ、ニガクリタケ、カキシメジ、ドクササコ、ドクツルタケ)については概要版(案)を作成した。

研究分担者

長島裕二 東京海洋大学食品生産科学科
教授
荒川 修 長崎大学水産学部教授
近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官
佐竹元吉 富山大学和漢医薬学総合研究所
特任教授

A. 研究目的

フグの毒性

フグの毒性評価は1945年に谷が著した「日本産フグの中毒学的研究」が基となっており、現在でも大方はこれに従う。しかし、ときどきこの基準を超える例がある。さらに、2008年には南方産と思われていたドクサバフグが九州や四国沿岸で釣り上げられ、ドクサバフグによる食中毒を起こす事例も発生した。本研究はこうした背景のもと、日本沿岸で漁獲されるフグの毒性を再評価

することを目的に、各種フグを集め毒性試験を行った。

ハコフグの毒性

これまでハコフグ、ウミスズメ等日本近海産のハコフグ科魚類は食品衛生上無毒種として扱われてきたが、近年、長崎県などでは同魚類の喫食によりTTX中毒やシガテラとは異なる特異な食中毒が散発し、死者も出ている。本中毒発症の時間経過や患者の主症状は、アオブダイ中毒に酷似している。すなわち、原因物質としてパリトキシン (PTX) 様毒が疑われ、ハコフグ類の毒性を再評価する必要がでてきた。

小型巻貝の毒性

2007年7月に長崎県長崎市で、2008年7月には熊本県天草市で、ムシロガイ科の腐肉食性小型巻貝キンシバイによる極めて重篤な食中毒が発生した。長崎市の事件発生直後に、残品としてキンシバイを含む4種の巻貝を入手し、毒性を調べたところ、キンシバイの筋肉と内臓から最高4,200 MU/gに達するテトロドトキシン (TTX) が

検出された。中国・台湾では以前より腐肉食性小型巻貝による中毒が頻発しており、ムシロガイ科巻貝 9 種に高濃度の TTX の存在が報告されている。そこで小型巻貝の毒性と毒成分を調査した。テトラミン中毒患者の血中テトラミン濃度

肉食性巻貝、特にエゾバイ科エゾボラ属の仲間の中には唾液腺にテトラミンを高濃度に含むものが多く、しばしば食中毒を引き起こしている。テトラミン中毒では原因食品が残されていないことも多いが、そのような場合は中毒患者の血中テトラミン濃度を測定することによりテトラミン中毒の特定ができると予想される。本研究では、テトラミン中毒患者の血液試料をたまたま入手することができたので、そのテトラミン濃度を測定した。

スギヒラタケの毒成分

スギヒラタケはキシメジ科スギヒラタケ属のキノコであり、2004 年～2005 年にかけて急性脳症による被害が報告されるまで食用に供されており、有毒成分を持つとは考えられていなかった。健康被害防止の観点からもその原因特定が望まれるところであるが、これまでにスギヒラタケ急性脳症の原因物質は特定されていない。そこでその毒性物質を網羅的に検索し、特定することを目的とした。

アジサイ属植物の毒成分

2008 年 6 月、茨城県と大阪府で、相次いでアジサイの葉による食中毒が発生した。アジサイを始めとするアジサイ属植物に、食中毒を引き起こすような毒成分が含まれているのかどうか、含まれているとすれば、どのような化合物なのかを特定することを目的とした。

自然毒のリスクプロファイルの作成

自然毒に関するリスクプロファイルの様式を決めるとともに、いくつかの重要な自然毒については国内外の文献調査に基づいてリスクプロファイル案を作成することを目的とした。

B. 研究方法

フグの毒性試験

試料には、フグ科トラフグ属 11 種(シマフグ、トラフグ、カラス、クサフグ、ショウサイフグ、ナシフグ、マフグ、コモンフグ、ムシフグ、ヒガンフグ、アカメフグ)、モヨウフグ属 2 種(サザナミフグ、スジモヨウフグ)、サバフグ属 4 種(シロサバフグ、クロサバフグ、ドクサバフグ、

カナフグ)の合計 17 種を用いた。各組織の毒性はフグの毒性は食品衛生検査指針理化学編に記載のフグ毒検査法に従い、マウス試験法で測定した。フグの毒性はマウスユニット (MU) で表示した。

ハコフグ中毒残品の毒性試験

2008 年 10 月に長崎市で発生した食中毒の残品である未調理のハコフグ 3 個体を試料とした。各試料を筋肉と肝臓に分け、粗抽出液を調製し、マウス毒性試験、ならびに PTX を対象とした溶血活性試験に供した。

ハコフグ中毒患者血清の溶血活性試験

2008 年 10 月に長崎市で発生したハコフグ中毒の患者血清につき、前項と同様の溶血活性試験を行った。

小型巻貝の毒性試験

試料には、2007 年 9 月～2009 年 1 月に長崎県橋湾および熊本県官野河内湾で採集したキンシバイ 41 個体、ミヤコボラ 11 個体、ピワガイ 10 個体、キヌガサガイ 8 個体、ヤツシロガイ 7 個体、テングニシ 4 個体、ウラシマガイ 4 個体の計 7 種 85 個体を用いた。いずれも筋肉と内臓に分け、フグ毒検査法にしたがって毒力を求めた。

小型巻貝の毒成分分析

前項で調製した試験液を試料とした。まず、各試料を LC/MS に供して TTX およびその関連成分を分析した。次いで、HPLC による麻痺性貝毒 (PSP) 成分の分析を行った。

テトラミン中毒患者の血中テトラミン濃度の測定方法

テトラミン中毒患者の血液検体(血清および血漿) 200 μ l を凍結乾燥し、1 ml のメタノールを加えて超音波で 5 min 磨砕した後、3500 \times g、15 min で遠心分離し上清を回収した。残った残渣に同様の操作を 2 回繰り返し、集めた上清をエバポレーターで乾固した。乾固した試料を 3 ml の MilliQ 水に懸濁し、3 ml の n-ヘキサンで 3 度洗浄して脱脂した。得られた水相を凍結乾燥し、400 μ l の MilliQ 水に溶かして 10 μ l を LC/ESI-MS に供した。LC/ESI-MS は Kawashima et al. の方法 (Toxicicon, 44, 185-191, 2004) に準じて行った。

スギヒラタケに含まれる神経細胞毒成分の単離

スギヒラタケを 1 時間熱水抽出後、溶媒分画 (ヘキサン、酢酸エチル、ブタノール、水) を行った。溶媒分画後の各分画について神経細胞株 (PC12, SH-SY5Y, NG108-15) を用いて細胞傷害

性(細胞死)を指標にして、*in vitro* アッセイを行った。細胞死が認められたヘキサノール酢酸エチル画分を合一し、さらに順相カラムクロマト、逆相 HPLC により毒成分を精製した。精製標品は高分解能 MS、NMR、UV スペクトルによる分析に供し、成分の同定を試みた。

アジサイ属植物の毒成分

食中毒を起こしたアジサイ属植物の毒成分を特定する前段階として、アジサイ属植物の毒成分に関するこれまでの文献を調査するとともに、できるだけ多くのアジサイ属植物を採集することとした。

自然毒のリスクプロファイルの作成

第1回班会議(平成20年5月23日)において、リスクプロファイルは有毒生物別に作成することとした。次いで、フグ毒、巻貝唾液腺毒、数種キノコ毒についてリスクプロファイルのたたき台を作成し、記載すべき必要項目を第2回班会議(11月17日)で検討した。その結果、中毒発生状況、中毒症状、原因毒の本体とその毒性・化学的性状・分析方法、中毒対策などの記載すべき必須項目を決めるとともに、すべての自然毒について様式を統一することは難しいかもしれないが、少なくとも魚貝毒、キノコ毒、植物毒のそれぞれにおいてはできるだけ統一することとした。以上の検討を踏まえ、知見が蓄積されていると思われる自然毒を中心に国内外の文献を調査し、いくつかの重要な自然毒についてはリスクプロファイル(案)および概要版(案)を作成した。

(倫理面への配慮)

本研究では実験動物としてマウスを使用した。マウス毒性試験やマウスの保管にあたっては「動物の愛護及び管理に関する法律」(法律第68号、平成17年6月22日)および「実験動物の飼育保管等に関する法律」(総理府告示第6号、昭和55年3月27日)に記載されている指針を遵守し、動物愛護に努めた。

C. 研究結果、考察、結論

1) フグの毒性

供試した17種フグの筋肉の毒性は、ドクサバフグ以外はすべて無毒(10 MU/g 未満)であった。谷の「日本産フグの中毒学的研究」に基づく日本産フグの最高毒力の表を上回る毒性を示したのは、アカメフグ卵巣で、これまで「強毒」とされていたが、今回1360 MU/g という「猛毒」レベ

ルの毒性が検出された。また、これまで報告がなかったカナフグの胆嚢と腎臓からそれぞれ14 MU/g と21 MU/g の「弱毒」レベルの毒性が、ムシフグの腸から「弱毒」レベルの毒性(21 MU/g)が検出された。今後さらに強い毒性が検出される可能性も考えられ、継続してデータの集積に努める必要がある。

ドクサバフグ5検体中3検体は筋肉が有毒(10 MU/g 以上)で、最高毒性値は135 MU/g に達した。肝臓では5検体中4検体が有毒で(最高毒性値は341 MU)、卵巣は4検体すべてが有毒(最高毒性値は1810 MU/g)であった。ドクサバフグは南方産と考えられているが、近年、日本沿岸でも漁獲されているので、フグ食中毒防止のためにドクサバフグの分布調査と毒性試験を行う必要がある。また、沿岸漁業者や釣り人に対してドクサバフグの判別法と食用の禁止を周知徹底させなければならない。

ハコフグの毒性

筋肉および肝臓の粗抽出液は、いずれもマウスに対して2 g 試料相当量/ml 以上の用量で毒性を示した。すなわち、痙攣や嗜眠、衰弱を誘起し、24時間ないし48時間でマウスを死亡させた。

他方、3個体中2個体の筋肉の粗抽出液(0.1 g 試料相当量/ml)は、インキュベーション1時間において、マウス赤血球に対する溶血率がそれぞれ18.5%および1.38%であったが、インキュベーション4時間ではともにほぼ100%を示し、遅延性溶血活性が確認された。また、1個体の筋肉の粗抽出液も同様にインキュベーション4時間でほぼ完全溶血したものの、インキュベーション1時間でも96.8%と高い値を示した。他方、肝臓の粗抽出液の溶血率はインキュベーション4時間においても最高で約30%と低かった。

ハコフグ中毒患者血清の溶血活性

試料濃度2.5 μl 血清/ml における溶血率は、インキュベーション1時間および4時間ともに2%未満であった。

小型巻貝の毒性および毒成分

供試した7種の巻貝のうちキンシバイのみが有毒で、その他6種はすべて無毒(5 MU/g 未満)であった。橘湾産キンシバイの毒力は筋肉で48~2,370 MU/g、内臓で16~10,200 MU/g、宮野河内湾産キンシバイの毒力は筋肉で37~2,600 MU/g (819±779 MU/g)、内臓で9~10,800 MU/g であった。キンシバイ1個体当たりの総毒力をみ

ると、41 個体中 28 個体で筋肉が内臓よりも 1.7~110 倍高い値を示した。すなわち、これらの個体では毒の 63~99% が筋肉に偏在していたことになる。日本ではこれまで TTX を保有する巻貝はいずれも中腸腺に毒が局在していたが、台湾産マサメダマでは筋肉の毒力(最高毒力 720 MU/g)が中腸腺(同 12 MU/g)やその他の部位(同 28 MU/g)より高く、台湾産キンシバイでは 85% の個体で筋肉の毒力が中腸腺より 1.7~8.3 倍高いことが報告されている。日本産キンシバイの毒蓄積パターンは、これら台湾産巻貝類と酷似していた。いずれにしてもキンシバイは 1000 MU/g 以上の猛毒個体が多く、食品衛生上注意が必要である。

キンシバイの筋肉と内臓につき、LC/MS にて毒成分を分析したところ、 m/z 320 のクロマトグラムにおいてすべての個体から TTX 標品 ($[M+H]^+=320$) と保持時間の一致するピークが検出された。一方、供試したキンシバイ 41 個体のいずれからも PSP 成分は検出されなかった。橋湾産キンシバイでは総毒力の 6~7 割、宮野河内湾産では 2~6 割を TTX が占めると見積もられた。

一方、橋湾産キンシバイから m/z 336 の LC/MS クロマトグラムにおいて、既報の TTX に対する相対的な溶出位置から、11-oxoTTX ($[M+H]^+=336$) と推定されるピークが検出された。橋湾産キンシバイのマウス毒性は TTX と 11-oxoTTX でほぼ 100% 説明できると推定される。

テトラミン中毒患者の血中テトラミン濃度

患者血清および健常者血清を用いて添加回収実験を行ったところ、回収率はいずれもほぼ 100% となり、血中テトラミン濃度を LC/ESI-MS で高感度に測定できることが判明した。中毒患者の血中テトラミン濃度は、来院時がもっとも高く(約 2 $\mu\text{g/ml}$)、血液吸着療法、血液透析を行うことにより減少傾向を示した。治療によりテトラミンの体外排泄が促進されたと考えられる。いずれにしても本研究により、テトラミン中毒患者の血中テトラミン濃度を LC/ESI-MS 法で分析できることが示されたので、中毒原因食品が残っていないような場合でもテトラミン中毒を特定できるといえる。

スギヒラタケに含まれる神経細胞毒成分

スギヒラタケから神経細胞死を指標に毒成分を単離した。神経系細胞は毒性物質に対する感受

性が高いため、毒性評価には適切であると考えられる。単離した毒成分は、高分解能 MS 分析、NMR 測定、UV スペクトル比較などより天倉らによりすでに報告されている共役トリエン型脂肪酸である a-, b-*eleostearic acid* であることが判明した。この脂肪酸は他のキノコにはなく、スギヒラタケに特有である。次に、他の産地からのスギヒラタケにこの脂肪酸が含まれているか分析したところ、すべてのスギヒラタケから検出されたが、産地にばらつきがあった。さらに、各地から入手したスギヒラタケ抽出物について、NGF により神経様に分化させた PC12 細胞に添加したところ、いずれのサンプルにおいても神経様突起の消失、細胞萎縮、核の凝集が見られ、スギヒラタケ中の成分がアポトーシスを誘導することが示唆された。SH-SY5Y, NG108-15 細胞でも同様の結果であった。また、他の既知の脂肪酸にはこのような作用は認められなかった。最後に、これらの脂肪酸以外にはスギヒラタケ中には、神経細胞を用いたアッセイでは細胞毒性成分は見つからなかった。

アジサイ属植物の毒成分

文献調査により、アジサイには青酸配糖体が含まれるという記述がよく見られ(たとえば、「写真で見る家畜の有毒植物と中毒」畜産技術協会編)、なかば常識となっている。これは、1920 年アメリカでのアジサイによる馬・牛の中毒報告が根拠になっている。しかしその後、1963 年になって、そのような含窒素化合物の存在は否定されている。一方、ジョウザンアジサイ・アジサイには、強い嘔吐を引き起こすアルカロイド化合物 febrifugine が含まれているという報告がある。また、アジサイ類の毒成分の特定に向けて、アジサイ、ガクアジサイ、カシワバアジサイなど 10 種アジサイ属植物を採集するとともに、国内の薬用植物・植物毒の専門家を組織した。

自然毒のリスクプロファイルの作成

フグ毒、麻痺性貝毒、下痢性貝毒、巻貝唾液腺毒および 8 種キノコ毒(ツキヨタケ、クサウラベニタケ、ニガクリタケ、カキシメジ、シロタマゴテングタケ、テングタケ、ドクササコ、ドクツルタケ)についてはリスクプロファイル(案)を作成した。このうち、6 種キノコ毒(ツキヨタケ、クサウラベニタケ、ニガクリタケ、カキシメジ、ドクササコ、ドクツルタケ)については概要版(案)も作成した。また、ハコフグ毒および小型

巻貝毒については研究が進行中であるが、現時点でのリスクプロファイルの概要版(案)を作成した。リスクプロファイル(案)あるいは概要版(案)は、魚貝毒とキノコ毒では様式がやや異なっているが、それぞれの毒についてはほぼ統一されていると考える。次年度には他の自然毒についてもリスクプロファイルとその概要版を作成するので、様式についてはできるだけ早い時期に検討して最終結論を出す必要がある。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 谷山茂人, 諫見悠太, 松本拓也, 長島裕二, 高谷智裕, 荒川 修: 腐肉食性巻貝キンシバイ *Nassarius (Alectrion) glans* に認められたフグ毒の毒性と毒成分. 食衛誌 **50**, 22-28 (2009)
- 2) H.-P. Lin, K.-H. Run, C.-H. Ou, J.-S. Jiang, J.-H. Hung, C.-C. Hwang, T. Noguchi, O. Arakawa, D.-F. Hwang: Effect of acidic electrolyzed oxidizing water on growth and toxin production of toxic dinoflagellates. *J. Fish. Soc. Taiwan* **35**, 351-358 (2009)
- 3) K. Ikeda, Y. Murakami, Y. Emoto, L. Ngy, S. Taniyama, M. Yagi, T. Takatani, O. Arakawa: Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to non-toxic cultured specimens of the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Toxicon* **53**, 99-103 (2009)
- 4) L. Ngy, S. Taniyama, K. Shibano, C. F. Yu, T. Takatani, O. Arakawa: Distribution of tetrodotoxin in pufferfish collected from coastal waters of Sihanouk Ville, Cambodia. *J. Food. Hyg. Soc. Japan* **49**, 361-365 (2008)
- 5) 荒川 修, 野口玉雄: フグ毒による食中毒. 化学療法の領域 **24**, 92-101 (2008)
- 6) J.-K. Jeon, J.-S. Lee, W.-J. Shim, O. Arakawa, T. Takatani, S. Honda, T. Noguchi: Changes in activity of hepatic xenobiotic-metabolizing enzymes of tiger puffer (*Takifugu rubripes*) exposed to paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Environ. Biol.* **29**, 599-603 (2008)
- 7) T. Noguchi, O. Arakawa: Tetrodotoxin - distribution and accumulation in aquatic organisms,

and cases of human intoxication. *Marine Drugs* **6**, 220-242 (2008)

- 8) M. Yoshida, S. Sone, K. Shiomi: Purification and characterization of a proteinaceous toxin from the serum of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Protein J.* **27**, 450-454 (2008)
 - 9) A. Ueda, H. Nagai, M. Ishida, Y. Nagashima, K. Shiomi: Purification and molecular cloning of SE-cephalotoxin, a novel proteinaceous toxin from the posterior salivary gland of cuttlefish *Sepia esculenta*. *Toxicon* **52**, 574-581 (2008)
 - 10) K. Kondo, A. Watanabe, H. Akiyama, T. Maitani: The metabolisms of agaritine, a mushroom hydrazine in mice. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 854-862 (2008)
- ##### 2. 学会発表
- 1) 角南慶卓, 高谷智裕, 佐藤哲哉, 阪倉良孝, 中安純一, 山崎英樹, 崎山一孝, 谷山茂人, 荒川修: フグ毒のトラフグ稚魚に対する作用-1: フグ毒の組織内動態. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009 年 3 月
 - 2) 北田 稔, 池田光彦, 谷山茂人, 持田浩治, 高谷智裕, 荒川 修: 九州北西部におけるニホンイモリの TTX 保有量. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009 年 3 月
 - 3) 石川 希, 西見奈子, 桑野和可, 谷山茂人, 高谷智裕, 荒川 修: 紅藻 2 種の培養と駆虫性アミノ酸産生能. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009 年 3 月
 - 4) 大貫和恵, 野口玉雄, 荒川 修: 開放系循環水槽で養殖されたトラフグ 2 年魚 (2008 年産) 肝臓の無毒確認とフグ肝加工食品の栄養成分. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009 年 3 月
 - 5) 北田 稔, 古賀智隆, 持田浩治, 谷山茂人, 高谷智裕, 荒川 修: 有毒イモリ 2 種におけるテトロドトキシン保有量の地理的変異. 平成 20 年度日本水産学会九州支部大会, 長崎, 2009 年 1 月
 - 6) T. Takatani, Y. Fukumori, Y. Morotomi, S. Taniyama, O. Arakawa: Accumulation and elimination of PSP toxins in the short-necked clam fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 2008
 - 7) K. Ikeda, Y. Emoto, R. Tatsuno, M. Yagi, S. Taniyama, T. Takatani, O. Arakawa: Maturation-associated accumulation of tetrodotoxin in pufferfish ovary. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 2008
 - 8) N. Ishikawa, K. Kuwano, K. Ono, S. Taniyama, T. Takatani, O. Arakawa: Optimum culture condition anthelmintic amino acid productivity of two red

- algae, *Chondria armata* and *Digenea simplex*. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 2008
- 9) K. Onuki, T. Noguchi, O. Arakawa: Confirmation of non-toxicity and nutrient composition, of the livers of pufferfish reared in an aquarium for each two years during 2001-2007. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 2008
- 10) K. Onuki, T. Noguchi, O. Arakawa: Effective utilization of the liver of non-toxic pufferfish reared in the open system of circular aquarium as a food-stuff. 15th International Congress of Dietetics, Yokohama, Sep. 2008
- 11) 近藤一成, 太田小夜香, 穂山浩, 手島玲子: 各産地からのスギヒラタケ中の毒性物質について. 第45回全国衛生化学技術協議会年会, 佐賀, 2008年10月
- 12) K. Kondo, S. Ohta, R. Teshima: Detection of reactive oxygen species in cells using a fluorescent probe – application and limitation. 35th FACSS meeting (Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies), USA, Sept. 28 - Oct. 2, 2008

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

別添 4

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「自然毒のリスクプロファイル作成を目指した調査研究」

分担研究報告書

日本沿岸で漁獲されたフグ科魚類の毒性

研究分担者 長島裕二 東京海洋大学海洋科学部食品生産科学科

研究要旨

日本沿岸で漁獲されるフグの毒性を再評価することを目的に、フグ科トラフグ属 11 種（シマフグ、トラフグ、カラス、クサフグ、ショウサイフグ、ナシフグ、マフグ、コモンフグ、ムシフグ、ヒガンフグ、アカメフグ）、モヨウフグ属 2 種（サザナミフグ、スジモヨウフグ）、サバフグ属 4 種（シロサバフグ、クロサバフグ、ドクサバフグ、カナフグ）の合計 17 種についてマウス試験法で毒性を測定した。ほとんどは従来値を超えるものはなかったが、アカメフグ卵巣は「強毒」よりも強い「猛毒」レベルの毒性を示し、毒性評価を改めるべきと考えられる。ショウサイフグ精巢から毒性が検出されたことがあるので、緊急に毒性を再調査することが必要である。また、南方産とされていたドクサバフグが日本沿岸でも出現し、食中毒事件も発生した。宮崎県沿岸のフグ延縄でドクサバフグが漁獲され、筋肉から「強毒」レベルの毒性が検出されたことから、日本沿岸におけるドクサバフグの分布と毒性を調査し、食中毒防止に努める必要がある。

A. 研究目的

フグ科魚類は体内に強力な神経毒テトロドトキシン（tetrodotoxin、以下 TTX と略記）をもつため、これを食して食中毒を起こすことがある。わが国では、毎年約 30 件のフグ食中毒が発生し、約 50 人が中毒し、数名が死亡している。フグ食中毒件数と患者数は食中毒全体の中では少なくとも 1% 以下であるが、死亡者数は食中毒全体の 40% を占める。このように、フグ食中毒は致命率（患者数に対する死者数の割合）が高いのが特徴で、フグ食中毒が危険なゆえんである。

わが国では、厚生省(当時)の通知「フグの衛生確保について」により、「処理などにより人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類と部位」を定め、それに指定されているフグの種類と部位以外は食用が禁止されている。さらに、フグを取り扱うためには都道府県条例により特別な資格を必要とするなど、フグの安全確保への対策がとられている。

フグの毒性評価は 1945 年に谷が著した「日本産フグの中毒学的研究」が基となっており、現在でも大方はこれに従う。しかし、ときどきこの基準を超える例がある。さらに、2008 年には南方産と思われていたドクサバフグが九州や四国沿

岸で釣り上げられ、ドクサバフグによる食中毒を起こす事例も発生した。本研究はこうした背景のもと、フグの毒性はフグ食中毒防止の基礎データとなるので、日本沿岸で漁獲されるフグの毒性を再評価することを目的に、各種フグを集め毒性試験を行った。

B. 研究方法

1) 試料

試料には、フグ科トラフグ属 11 種（シマフグ、トラフグ、カラス、クサフグ、ショウサイフグ、ナシフグ、マフグ、コモンフグ、ムシフグ、ヒガンフグ、アカメフグ）、モヨウフグ属 2 種（サザナミフグ、スジモヨウフグ）、サバフグ属 4 種（シロサバフグ、クロサバフグ、ドクサバフグ、カナフグ）の合計 17 種を用いた。試料は鮮魚または貯蔵状態の良好な冷凍品であった。鮮魚の場合は直ちに、凍結された試料の場合は、フグをビニル袋に入れて流水で半解凍し、皮、筋肉、肝臓、消化管、生殖巣などに分離した。

2) 毒性試験

フグの毒性は食品衛生検査指針理化学編に記載のフグ毒検査法に従い、マウス試験法で測定した。フグの毒性はマウスユニット（MU）で表示

し、1MU は組織抽出液あるいはその希釈液 1ml を ddY 系雄、体重 20g のマウスに腹腔内投与したとき、マウスを 30 分間で死亡させるのに必要な毒量と定義される。

(倫理面への配慮)

本研究では実験動物としてマウスを使用した。マウス毒性試験やマウスの保管にあたっては「動物の愛護及び管理に関する法律」(法律第 68 号、平成 17 年 6 月 22 日) および「実験動物の飼育保管等に関する法律」(総理府告示第 6 号、昭和 55 年 3 月 27 日)に記載されている指針を遵守し、動物愛護に努めた。

C. 研究結果

1) フグ科魚類の毒性

筋肉の毒性は、ドクサバフグ以外すべて無毒(10MU/g 未満)であった(ドクサバフグの毒性については後述する)。谷の「日本産フグの中毒学的研究」に基づく日本産フグの最高毒力の表を上回る毒性を示したのは、アカメフグ卵巣で、これまで「強毒」とされていたが、今回 1360MU/g という「猛毒」レベルの毒性が検出された。

そして、これまで報告がなかったカナフグの胆嚢と腎臓からそれぞれ 14MU/g と 21MU/g の「弱毒」レベルの毒性が検出された。ムシフグの腸から「弱毒」レベルの毒性(21MU/g)がみられた。

2) ドクサバフグの毒性

今年度に入手してきたドクサバフグ 3 検体と 2001 年に測定したドクサバフグ 2 検体の毒性値を Table 1 にまとめた。これらはいずれも宮崎県で漁獲されたものである。5 検体中 3 検体は筋肉が有毒(10MU/g 以上)で、最高毒性値は 135MU/g に達し、これは「強毒」レベルに相当する。肝臓では 5 検体中 4 検体が有毒で最高毒性値は 341MU/g、卵巣は 4 検体すべてが有毒で最高毒性値は 1810MU/g となった。

D. 考察

日本沿岸で漁獲されたフグ科魚類 17 種の毒性を測定した結果、アカメフグ卵巣から 1360MU/g の毒性が検出され、毒性レベルは「猛毒」と認識される。また、これまで報告例のなかったカナフグの胆嚢、腎臓およびムシフグの腸からそれぞれ「弱毒」レベルの毒性が検出されたことから、今後さらに強い毒性が検出される可能性も考えられ、継続してデータの集積に努める必要がある。

以前、われわれは東京湾で漁獲したショウサイフグの精巣から「弱毒」レベル(39MU/g)の毒性を検出した。「日本産フグの最高毒力表」でショウサイフグ精巣は「無毒」とされ、食用可能な部位に指定されているので、この点について至急に精査する必要がある。

また、数は少ないものの宮崎県沿岸で行われたフグ延縄漁業でドクサバフグが漁獲され、筋肉に 100MU/g を超える「強毒」レベルの毒性をもつことがわかった。ドクサバフグによるフグ食中毒防止のため、宮崎県以外でもドクサバフグの分布調査と毒性試験を行う必要がある。そして、沿岸漁業者や釣り人に対してドクサバフグの判別法と食用の禁止を周知徹底させなければならない。

E. 結論

フグの毒性評価のもととなっている「日本産フグの最高毒力表」を見直すことを目的に、フグ科魚類 17 種の毒性試験を行った。ほとんどは表に記載の毒力を超えるものはなかったが、アカメフグ卵巣は「強毒」から「猛毒」へ改められるべきである。ショウサイフグ精巣から毒性が検出されたことがあるので、緊急に毒性を再調査することが必要である。

2008 年に鹿児島県、宮崎県、高知県でそれぞれドクサバフグによるフグ食中毒が発生しているが、宮崎県沿岸で確かにドクサバフグが漁獲され、筋肉は「強毒」レベルの毒性を示したことから、日本沿岸でもドクサバフグの出現と分布に十分注意を払う必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 ドクサバフグの毒性

漁獲年月	毒性値 (マウスユニット/g 組織)					
	筋肉	皮	肝臓	消化管	卵巣	精巣
2009年2月	<5	<5	<5	<5	29	
2008年11月	109	79	341	72	1810	
	15	26	143	7	302	
2001年3月	135	41	110	62	362	
	8.2	15	35	14		<5

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「自然毒のリスクプロファイル作成を目指した調査研究」

分担研究報告書

小型巻貝とハコフグ中毒残品の毒性調査および関連の文献検索

研究分担者 荒川 修 長崎大学水産学部
研究協力者 高谷智裕 長崎大学水産学部
研究協力者 谷山茂人 長崎大学大学院生産科学研究科

研究要旨

小型巻貝の毒性と毒成分：2007年9月～2009年1月に長崎県橘湾および熊本県宮野河内湾で採集した小型巻貝7種85個体につき、マウス試験で毒性を調べたところ、キンシバイは供試した41個体全てが有毒であった。毒力は極めて高く、24個体の筋肉または内臓が1,000 MU/gを上回り、内臓では最高毒力が10,800 MU/gに達した。1個体当たりの総毒力をみると、41個体中28個体が筋肉が内臓よりも1.7～110倍高い値を示した。LC/MS分析により、毒の主成分はテトロドトキシン（TTX）であることが明らかとなり、加えて11-oxoTTXの存在が示唆された。一方、同時期同海域で採取したその他の巻貝については、毒性は全く認められなかった。**ハコフグ中毒残品および患者血清の毒性ないし溶血活性**：2008年10月に長崎県で発生したハコフグ中毒につき、残品（未調理ハコフグ3個体の筋肉と肝臓）の毒性を調べたところ、いずれもマウスに対して遅延性致死活性を示した。さらにマウス赤血球に対する遅延性溶血活性試験では、供試3個体中1個体の筋肉と全個体の肝臓、ならびに中毒患者の血清は陰性であったが、2個体の筋肉が同活性陽性と判断された。**関連の文献検索**：小型巻貝の中毒や毒性に関する文献11報、ならびにハコフグ中毒に関する文献7報が得られた。これらにより、1) 中国や台湾では小型巻貝による食中毒が頻発していること、2) 原因種にはキンシバイも含まれていること、3) 中国では数種、台湾では13種の有毒小型巻貝が確認されていること、4) いずれも主要毒成分はTTXで、副成分として麻痺性貝毒を含む場合もあること、5) ハコフグ類を原因とする食中毒が日本と台湾で1993年から2008年にかけて少なくとも8件発生していること、6) 中毒患者には共通してアオブダイ中毒に典型的な横紋筋融解症（激しい筋肉痛）がみられること、などが明らかとなった。

A. 研究目的

2007年7月に長崎県長崎市で、2008年7月には熊本県天草市で、ムシロガイ科の腐肉食性小型巻貝キンシバイによる極めて重篤な食中毒が発生した。長崎市の事件発生直後に、残品としてキンシバイを含む4種の巻貝を入手し、毒性を調べたところ、キンシバイの筋肉と内臓から最高4,200 MU/gに達するテトロドトキシン（TTX）が検出された。中国・台湾では以前より腐肉食性小型巻貝による中毒が頻発しており、ムシロガイ科

巻貝9種に高濃度のTTXの存在が報告されている。しかしながら、日本で毒性が調査されている小型巻貝の種類は限られており、ハナムシロガイならびにアラレガイからTTXの検出例があるものの、いずれも毒力は低い。

一方、これまでハコフグ、ウミスズメ等日本近海産のハコフグ科魚類は食品衛生上無毒種として扱われてきたが、近年、長崎県などでは同魚類の喫食によりTTX中毒やシガテラとは異なる特異な食中毒が散発し、死者も出ている。本中毒発

症の時間経過や患者の主症状は、アオブダイ中毒に酷似している。すなわち、原因物質としてパリトキシン (PTX) 様毒が疑われ、ハコフグ類の毒性を再評価する必要がでてきた。

このような状況の下、本研究では自然毒のリスクプロファイル作成に資するため、小型巻貝とハコフグ中毒残品の毒性調査を実施するとともに、関連の文献検索を行った。

B. 研究方法

1) 小型巻貝の毒力の測定方法

試料には、2007年9月～2009年1月に長崎県橘湾および熊本県宮野河内湾で採集したキンシバイ *Nassarius (Alectrion) glans* 41個体、ミヤコボラ *Bufo rana* 11個体、ビワガイ *Ficus subintermedia* 10個体、キヌガサガイ *Stellaria (Onustus) exutus* 8個体、ヤツシロガイ *Tonna luteostoma* 7個体、テングニシ *Hemifusus tuba* 4個体、ウラシマガイ *Semicassis bisulcata persimilis* 4個体の計7種85個体を用いた。いずれも筋肉と内臓に分け、公定法 (食品衛生検査指針理化学編フグ毒検査法) に準拠して試験液を調製後、マウス毒性試験により毒力を求めた。

2) 小型巻貝の毒成分の分析方法

前項で調製した試験液を試料とした。まず、各試料をLC/MSに供してTTXおよびその関連成分を分析した。次いで、HPLCによる麻痺性貝毒 (PSP) 成分の分析を行った。

3) ハコフグ中毒残品の毒性試験の方法

2008年10月に長崎市で発生した食中毒の残品である未調理のハコフグ3個体を試料とした。各試料を筋肉と肝臓に分け、粗抽出液を調製し、マウス毒性試験、ならびにPTXを対象とした溶血活性試験に供した。後者については、まず、試料から得た分画分子量10,000以下の画分を0.5%マウス赤血球懸濁液に添加し、37℃で1時間および4時間インキュベーションした。次に、遠心分離後の上清につき、405 nmにおける吸光度を測定した。1%サポニン溶液の37℃、インキュベーション30分後の溶血率を完全溶血 (100%) とし、吸光度との比率から試料の溶血率を求めた。

4) ハコフグ中毒患者血清の溶血活性試験の方法

2008年10月に長崎市で発生したハコフグ中毒の患者血清につき、前項と同様の溶血活性試験を行った。

5) 小型巻貝の中毒と毒性に関する文献検索方法

長崎大学附属図書館の蔵書・文献検索システムを用いて、腐肉食性巻貝 (scavenging gastropod) キンシバイ (*Nassarius glans* もしくは *Alectrion glans*)、フグ毒中毒 (pufferfish toxin poisoning)、フグ毒 (pufferfish toxin)、テトロドトキシン (tetrodotoxin) 11-オキソテトロドトキシン (11-oxotetrodotoxin) をキーワードとする文献検索を行った。

6) ハコフグの中毒と毒性に関する文献検索方法

キーワードをハコフグ (*Ostracion cubicus* もしくは *boxfish*)、ウミスズメ (*Lactoria diaphana*)、ハコフグ毒中毒 (boxfish toxin poisoning)、ハコフグ毒 (boxfish toxin) パリトキシン (palytoxin)、横紋筋融解症 (rhabdomyolysis) とし、前項と同様の方法で文献検索を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では実験動物としてマウスを使用した。マウス毒性試験やマウスの保管にあたっては「動物の愛護及び管理に関する法律」(法律第68号、平成17年6月22日) および「実験動物の飼育保管等に関する法律」(総理府告示第6号、昭和55年3月27日)に記載されている指針を遵守し、動物愛護に努めた。

C. 研究結果

1) 小型巻貝の毒性

供試した7種の巻貝のうちキンシバイのみが有毒で、その他6種は全て無毒 (5 MU/g 未満) であった。キンシバイは全個体の筋肉と内臓に毒性が認められ、それらの毒力は総じて高かった。

橘湾産キンシバイの部位別毒力を表1に示す。筋肉の毒力は48～2,370 MU/g (平均毒力±標準偏差: 775±615 MU/g, 以下同様)、内臓は16～10,200 MU/g (1,490±2,530 MU/g) であった。特に2007年9月には供試10個体中8個体において、筋肉と内臓のどちらか一方、または両方が食品衛生上“猛毒”となる1,000 MU/gを上回り、最高毒力は筋肉で2,370 MU/g、内臓で10,200 MU/gに達した。また、同時期における筋肉の平均毒力は1,010 MU/gで採集期間を通じて最も高い値となり、その後は徐々に減少し、2008年1月に276 MU/gにまで低下した。一方、内臓の平均毒力は2007年9月に最高値2,450 MU/gを示した後、急激に減少し、2008年1月には65 MU/gとなった。

他方、宮野河内湾産キンシバイは、筋肉で37～2,600 MU/g (819±779 MU/g)、内臓で9～10,800

MU/g (1,090±2,480 MU/g) の毒力であった(表 2)。橋湾産キンシバイと同様に、供試 19 個体中 10 個体において、筋肉と内臓、またはそのいずれかが 1,000 MU/g 以上を示した。筋肉の平均毒力は、2008 年 9 月と 10 月では概ね 1,100 MU/g と極めて高かったが、2009 年 1 月には 119 MU/g と著しく低下した。一方、内臓の平均毒力は 2008 年 9 月に最高値 1,810 MU/g に達した後、同年 10 月に 515 MU/g と急激に減少し、2009 年 1 月には 345 MU/g となった。

2) 小型巻貝の毒成分

まず、キンシバイの筋肉と内臓につき、LC/MS にて毒成分を分析したところ、 m/z 320 のクロマトグラムにおいて全ての個体から TTX 標品 ($[M+H]^+=320$) と保持時間の一致するピークが検出された。図 1a および 1c にその一例を示す。一方、供試したキンシバイ 41 個体のいずれからも PSP 成分は検出されなかった。

次いで、橋湾産キンシバイにつき、LC/MS 分析から算出された TTX の毒力と「公定法で測定された毒力」の相関について検討したところ、筋肉と内臓における相関係数がそれぞれ 0.8354 および 0.9587 となり、ともに良好な正の相関を示すことがわかった(図 2)。両者の回帰直線は、それぞれ $y=0.6478x-93.45$ と $y=0.5955x+147.4$ で、平均的には筋肉で総毒力の約 65%、内臓では約 60% を TTX が占めると判断された。また、宮野河内湾産キンシバイも同様に、平均的には筋肉で総毒力の約 61%、内臓では約 23% が TTX であった(図 3)。

3) ハコフグ中毒残品の毒性

筋肉および肝臓の粗抽出液は、いずれもマウスに対して 2 g 試料相当量/ml 以上の用量で毒性を示した。すなわち、痙攣や嗜眠、衰弱を誘起し、24 時間ないし 48 時間でマウスを死亡させた。

他方、3 個体中 2 個体の筋肉の粗抽出液 (0.1 g 試料相当量/ml) は、インキュベーション 1 時間において、マウス赤血球に対する溶血率がそれぞれ 18.5% および 1.38% であったが、インキュベーション 4 時間ではともにほぼ 100% を示し、遅延性溶血活性が確認された(図 4)。また、1 個体の筋肉の粗抽出液も同様にインキュベーション 4 時間でほぼ完全溶血したものの、インキュベーション 1 時間でも 96.8% と高い値を示した。他方、肝臓の粗抽出液の溶血率はインキュベーション 4 時間においても最高で約 30% と低かった(図 4)。

4) ハコフグ中毒患者血清の溶血活性

試料濃度 2.5 μ l 血清/ml における溶血率は、インキュベーション 1 時間および 4 時間ともに 2% 未満であった。

5) 小型巻貝の中毒と毒性に関する文献

以下の 11 報の文献が見出された。

1. H. C. Jen, S. J. Lin, S. Y. Lin, Y. W. Huang, I. C. Liao, O. Arakawa, D. F. Hwang. Occurrence of tetrodotoxin and paralytic shellfish poisons in a gastropod implicated in food poisoning in southern Taiwan. *Food Add. Contam.* **24**, 902-909 (2007).
2. P. A. Hwang, Y. H. Tsai, S. J. Lin, D. F. Hwang. The gastropod possessing TTX and/or PSP. *Food Reviews International* **23**, 321-340 (2007).
3. P. A. Hwang, Y. H. Tsai, J. F. Deng, C. A. Cheng, P. H. Ho, D. F. Hwang. Identification of tetrodotoxin in a marine gastropod (*Nassarius glans*) responsible for human morbidity and mortality in Taiwan. *J. Food Prot.* **68**, 1696-1701 (2005).
4. 高谷智裕, 荒川 修, 野口玉雄. 中国で頻発している小型巻貝による食中毒について. *食衛誌* **46**, J-208-J-209 (2005).
5. F. M. Liu, Y. M. Fu, D. Y. C. Shih. Occurrence of tetrodotoxin poisoning in *Nassarius papillosus* Alectrion and *Nassarius gruneri* Nietha. *J. Food Drug Analysis* **12**, 189-192 (2004).
6. P. A. Hwang, Y. H. Tsai, Y. H. Lu, D. F. Hwang. Paralytic toxins in three new gastropod (Olividae) species implicated in food poisoning in southern Taiwan. *Toxicol* **41**, 529-533 (2003).
7. Y. C. Shiu, Y. H. Lu, Y. Tsai, S. K. Chen, D. F. Hwang. Occurrence of tetrodotoxin in the causative gastropod *Polinices didyma* and another gastropod *Natica lineate* collected from western Taiwan. *J. Food Drug Analysis* **11**, 159-163 (2003).
8. D. F. Hwang, Y. C. Shiu, P. A. Hwang, Y. H. Lu. Tetrodotoxin in gastropod (snails) implicated in food poisoning in northern Taiwan. *J. Food Prot.* **65**, 1341-1344 (2002).
9. L. M. Sui, K. Chen, P. A. Hwang, D. F. Hwang. Identification of tetrodotoxin in marine

gastropods implicated in food poisoning. J. Nat. Toxins 11, 213-220 (2002).

10. D. F. Hwang, C. A. Cheng, H. T. Tsai, D. Y. C. Shih, H. C. Ko, R. Z. Yang, S. S. Jeng. Identification of tetrodotoxin and paralytic shellfish toxins in marine gastropods implicated in food poisoning. Fish. Sci. 61, 657-679 (1995).
11. C. C. Yong, K. C. Han, T. J. Lin, W. J. Tsai, J. F. Deng. An outbreak of tetrodotoxin poisoning following gastropod mollusc consumption. Human and Experimental Toxicology 14, 446-450 (1995).

6) ハコフグの中毒と毒性に関する文献

以下の7報の文献が見出された。

1. 相良剛史. 中毒発生海域より分離した *Ostreopsis* sp. のパリティキシン様物質産生能. 日本水産学会誌 74, 913-914 (2008).
2. 谷山茂人. 本州で発生したパリティキシン様中毒とシガテラ. 日本水産学会誌 74, 917-918 (2008).
3. 楠原健一, 西浦亮介, 谷山茂人, 矢澤省吾, 工藤隆志, 山本展誉, 野口玉雄. “ハコフグ” 喫食により発症した横紋筋融解症の1例. 日本内科学会雑誌 94, 750-752 (2005).
4. 谷山茂人, 荒川 修, 高谷智裕, 野口玉雄. アオブダイ中毒様食中毒. ニューフードインダストリー 45, 55-61 (2003).
5. J. B. Chen, H. H. Pan, D. F. Hwang. Myoglobinuric acute renal failure following cardioversion in a boxfish poisoning patient. Nephrol Dial Transplant 16, 1700-1701 (2001).
6. 矢澤省吾, 川崎渉一郎, 田中 充, 佐々木規. ハコフグ摂食に続発したと考えられる急性横紋筋融解症の1症例. 宮崎医学会誌 24, 128-131 (2000).
7. 虎島保男. 遅発性フグ中毒. 長崎県医師会報 619, 57-58 (1997).

D. 考察

1) 小型巻貝の毒性

キンシバイ1個体当たりの総毒力をみると、41個体中28個体で筋肉が内臓よりも1.7~110倍高い値を示した(表1および2)。すなわち、これらの個体では毒の63~99%が筋肉に偏在していたことになる。日本ではこれまでTTXを保有する巻貝はいずれも中腸腺に毒が局在していたが、

台湾産マサメダマでは筋肉の毒力(最高毒力720 MU/g)が中腸腺(同12 MU/g)やその他の部位(同28 MU/g)より高く、台湾産キンシバイでは85%の個体で筋肉の毒力が中腸腺より1.7~8.3倍高いことが報告されている。日本産キンシバイの毒蓄積パターンは、これら台湾産巻貝類と酷似していた。

2) 小型巻貝の毒成分

LC/MS分析により、台湾産キンシバイでは総毒力の6~7割、宮野河内湾産では2~6割をTTXが占めることが明らかとなった。日本に生息するハナムシロガイやアラレガイの毒成分はTTXまたはその関連物質であることが知られているが、台湾では同種巻貝はTTXに加え、副成分としてPSP成分であるゴニオトキシン1~4およびネオサキシトキシンを保有するという。そこで、PSPを対象としたキンシバイのHPLC蛍光分析を行ったが、同成分は未検出であった。台湾産キンシバイも毒の主体はTTXであり、PSP成分は保有しない。

一方、台湾産キンシバイから m/z 336のLC/MSクロマトグラムにおいて、既報のTTXに対する相対的な溶出位置から、11-oxoTTX($[M+H]^+=336$)と推定されるピークが検出された(図1bおよび1d)。本成分につき、マウスに対する比毒性がTTXの2倍で、かつLC/MS分析における単位量当たりのイオン強度がTTXと同等と仮定して毒力を算出し、‘当該毒力とTTXの毒力の和’・‘公定法で測定された毒力’の相関について検討したところ、筋肉、内臓ともに極めて良好な正の相関が認められ(相関係数はそれぞれ0.9073および0.9763)、回帰直線はそれぞれ $y=1.060x+75.97$ および $y=0.9664x+176.8$ となった。従って、前述の仮定が正しければ、TTXと11-oxoTTXではほぼ100%台湾産キンシバイのマウス毒性を説明できることになる。宮野河内湾産キンシバイについては、現在、検討中である。いずれにしても、この点を明らかにするためには、11-oxoTTXを分離・同定・定量する必要がある。

3) ハコフグ中毒残品の毒性

ハコフグ中毒残品の粗抽出液は、いずれもマウスに対して遅延性致死活性を示した。その症状ならびに致死時間はTTXあるいはPSPといった麻痺性の毒とは明らかに異なり、PTXと類似していた。また、筋肉2個体の粗抽出液は、マウス赤血球に対してPTXと同様の遅延性溶血活性を呈

した。これらの結果は、ハコフグがアオブダイ同様 PTX 様毒を保有することを示唆するものである。本研究事業の先行事業（平成 17 年度～18 年度厚生労働科学研究費補助金「魚介類に含まれる食中毒原因物質の分析法に関する研究」）では、西日本産ハコフグの約 40% が有毒との結果も得られている。従って、今後は本種の毒性に関する本格的な再評価と有毒物質の特定が必要不可欠であると考えられる。

4) ハコフグ中毒患者血清の溶血活性

PTX は濃度 1 ng/ml 以上でマウス赤血球に対して遅延性溶血活性を呈すること、アオブダイなどが保有する PTX 様毒も同様の活性をもつことが知られているが、患者由来の血清はこのような溶血活性を示さなかった。TTX 中毒患者についても、体調や採血時期により血清からの TTX 検出は困難な場合が多い。今回の患者にはアオブダイ中毒に特徴的な激しい筋肉痛、ミオグロビン尿、ならびに血清 CPK 値の著しい上昇がみられており、原因物質が PTX 様毒であった可能性は高い。現行の PTX 検出法（マウス毒性試験や溶血活性試験、LC/MS などの機器分析法）は、特異性、感受性、検出感度などの面で未だ発展途上の段階にある。今後はこれらの点を大きく改善し、簡便で迅速、かつ高感度な PTX ないし PTX 様毒の検出・定量法を開発することが強く望まれる。

5) 小型巻貝の中毒と毒性に関する文献

台湾では 1994 年から 2006 年に、小型巻貝による食中毒が少なくとも 9 件発生している（患者数は 46 名で、うち 3 名が死亡）。特に、2004 年には、キンシバイによる深刻な事例が発生し、患者 6 名中 2 名が喫食後 30 分で死亡している。関連の調査では、中毒検体と同じ海域で採集したキンシバイから、筋肉で $1,170 \pm 557$ MU/g（最高 2,990 MU/g）、中腸腺で 538 ± 608 MU/g（最高 2,050 MU/g）と極めて高い毒力が検出された。台湾では 13 種の巻貝（ムシロガイ科 9 種、タマガイ科 1 種およびマクライガイ科 3 種）が有毒種とされているが、この中でもキンシバイの毒力は際だって高い。他方、中国大陸でもオオハナムシロなどのムシロガイ科巻貝による食中毒が頻発している。近年では、2001 年に *Z. scaniplacatus* により 31 名が中毒しており、中毒検体の可食部から 307 ± 192 MU/g（最高 688 MU/g）、中腸腺から 370 ± 118 MU/g（最高 532 MU/g）の高い毒力が検出されたと報告されている。

一方、日本では、1979 年に発生した肉食性大型巻貝ボウシュウボラによる食中毒を契機として、オオナルトボラ、ハナムシロガイ、アラレガイに TTX の存在が明らかとなった。ハナムシロガイとアラレガイは、キンシバイと同じ腐肉食性の小型巻貝であるが、それらの毒力は低く（それぞれ可食部で 3.4 MU/g、4～35 MU/g）、日本での食中毒事例はない。しかしながら、2007 年 7 月に長崎市で、2008 年 7 月には天草市でキンシバイによる食中毒が発生し、前者の中毒検体からは高濃度の TTX が検出された。これまで同地域ではキンシバイの食習慣はなかったものの、近年、その混獲が目立ち、水揚量も多かったことから、自家消費されていたという。今後、キンシバイによる食中毒の未然防止のため、これらの情報を広範囲に周知する必要がある。

6) ハコフグの中毒と毒性に関する文献

1993 年から 2008 年に、ハコフグ類の喫食による食中毒が少なくとも 7 件発生し、死者 1 名を含む 11 名が中毒した。平均発症時間は約 10 時間で、患者 11 名中 10 名は共通して血清クレアチンホスホキナーゼ（CPK）値の急激な上昇を伴う横紋筋融解症（激しい筋肉痛）を、半数以上の患者がミオグロビン尿症を呈した。患者 10 名の回復時間は数週間から数ヶ月で、1 名の患者は約 2 週間後に死亡した。これらの食中毒はいずれも疫学的特徴がアオブダイ中毒と酷似しており、原因物質として PTX 様毒が疑われているが、特定には至っていない。ハコフグ類による食中毒は散発的かつ局地的であるが、近年発生頻度は増加傾向にあり、食品衛生上大きな問題に発展することが懸念される。従って、これら食中毒の実態を早急に把握し、原因物質を特定することが急務であろう。

E. 結論

腐肉食性小型巻貝キンシバイは中腸腺のみならず筋肉にも“猛毒”に相当する TTX を保有し、食品衛生上極めて危険な種であることが明らかとなった。中国や台湾では、本種を含む十数種の小型巻貝から相当レベルの TTX が検出されており、これらによる食中毒も多発している。今後さらに小型巻貝の毒性あるいは毒化機構に関するデータ・情報を蓄積するとともに、それらを広く一般に周知する必要がある。

一方、ハコフグ中毒は、主症状や原因食品の喫食から発症、回復（もしくは致死）までの時間経

過がアオブダイ中毒と酷似しており、原因物質は同中毒同様 PTX 様毒と推定される。近年、本中毒の発生頻度は増加傾向にあり、原因毒の特定、検出・定量法の確立、ハコフグの毒化状況や毒化機構の把握が急がれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 谷山茂人, 諫見悠太, 松本拓也, 長島裕二, 高谷智裕, 荒川 修: 腐肉食性巻貝キンシバイ *Nassarius (Alectrion) glans* に認められたフグ毒の毒性と毒成分. 食衛誌 50, 22-28 (2009).
2. H.-P. Lin, K.-H. Run, C.-H. Ou, J.-S. Jiang, J.-H. Hung, C.-C. Hwang, T. Noguchi, O. Arakawa, D.-F. Hwang: Effect of acidic electrolyzed oxidizing water on growth and toxin production of toxic dinoflagellates. J. Fish. Soc. Taiwan 35, 351-358 (2009).
3. K. Ikeda, Y. Murakami, Y. Emoto, L. Ngy, S. Taniyama, M. Yagi, T. Takatani, O. Arakawa: Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to non-toxic cultured specimens of the pufferfish *Takifugu rubripes*. Toxicon 53, 99-103 (2009).
4. L. Ngy, S. Taniyama, K. Shibano, C. F. Yu, T. Takatani, O. Arakawa: Distribution of tetrodotoxin in pufferfish collected from coastal waters of Sihanouk Ville, Cambodia. J. Food. Hyg. Soc. Japan 49, 361-365 (2008).
5. 荒川 修, 野口玉雄: フグ毒による食中毒. 化学療法の領域 24, 92-101 (2008).
6. J.-K. Jeon, J.-S. Lee, W.-J. Shim, O. Arakawa, T. Takatani, S. Honda, T. Noguchi: Changes in activity of hepatic xenobiotic-metabolizing enzymes of tiger puffer (*Takifugu rubripes*) exposed to paralytic shellfish poisoning toxins. J. Environ. Biol., 29, 599-603 (2008).
7. T. Noguchi, O. Arakawa: Tetrodotoxin - distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. Marine Drugs 6, 220-242 (2008).

2. 学会発表

1. 角南慶卓, 高谷智裕, 佐藤哲哉, 阪倉良孝, 中安純一, 山崎英樹, 崎山一孝, 谷山茂人, 荒川 修: フグ毒のトラフグ稚魚に対する作用-1: フグ毒の組織内動態. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009 年 3 月.
2. 北田 稔, 池田光孝, 谷山茂人, 持田浩治, 高谷智裕, 荒川 修: 九州北西部におけるニホンイモリの TTX 保有量. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009 年 3 月.
3. 石川 希, 西 見奈子, 桑野和可, 谷山茂人, 高谷智裕, 荒川 修: 紅藻 2 種の培養と駆虫性アミノ酸産生能. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009 年 3 月.
4. 大貫和恵, 野口玉雄, 荒川 修: 開放系循環水槽で養殖されたトラフグ 2 年魚 (2008 年産) 肝臓の無毒確認とフグ肝加工食品の栄養成分. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009 年 3 月.
5. 北田 稔, 古賀智隆, 持田浩治, 谷山茂人, 高谷智裕, 荒川 修: 有毒イモリ 2 種におけるテトロドトキシン保有量の地理的変異. 平成 20 年度日本水産学会九州支部大会, 長崎, 2009 年 1 月.
6. T. Takatani, Y. Fukumori, Y. Morotomi, S. Taniyama, O. Arakawa: Accumulation and elimination of PSP toxins in the short-necked clam fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 2008.
7. K. Ikeda, Y. Emoto, R. Tatsuno, M. Yagi, S. Taniyama, T. Takatani, O. Arakawa: Maturation-associated accumulation of tetrodotoxin in pufferfish ovary. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 2008.
8. N. Ishikawa, K., Kuwano, K. Ono, S. Taniyama, T. Takatani, O. Arakawa: Optimum culture condition anthelmintic amino acid productivity of two red algae, *Chondria armata* and *Digenea simplex*. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 2008.
9. K. Onuki, T. Noguchi, O. Arakawa: Confirmation of non-toxicity and nutrient composition, of the livers of pufferfish reared in an aquarium for each two years during 2001-2007. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 2008.
10. K. Onuki, T. Noguchi, O. Arakawa: Effective utilization of the liver of non-toxic pufferfish reared in the open system of circular aquarium as a food-stuff. 15th International Congress of Dietetics, Yokohama, Sep. 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

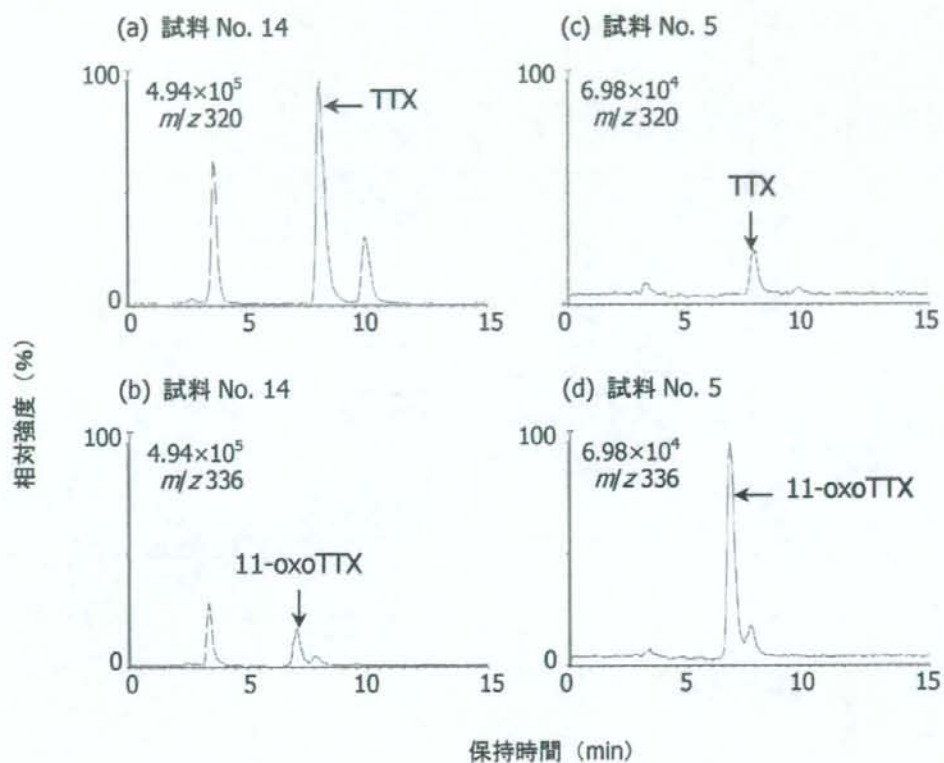


図1 キンシバイ粗抽出液のLC/MSクロマトグラム

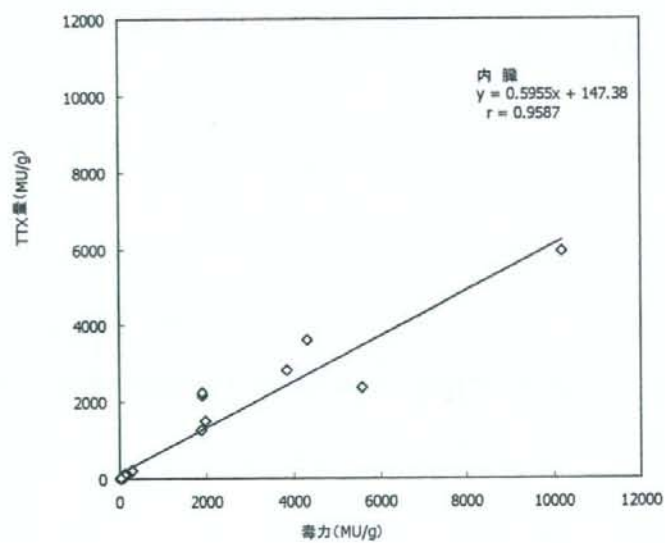
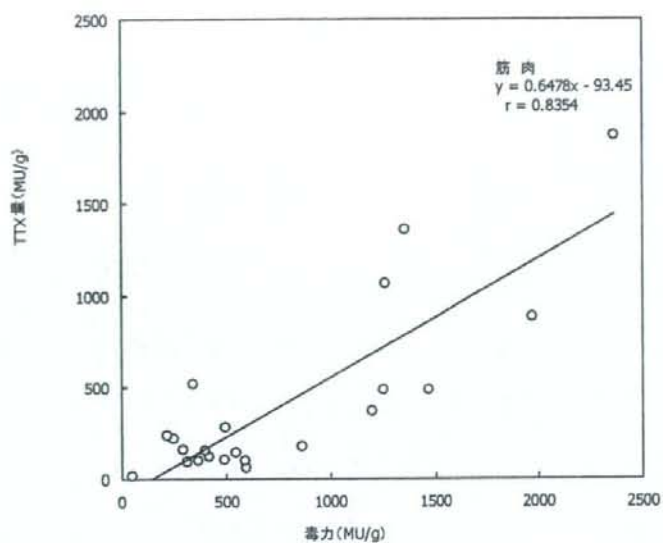


図2 長崎県橘湾産キンシバイの毒力と TTX 量の比較