

別添 5

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
相良剛史, 谷山茂人, 高谷智裕, 西堀尚良, 西尾幸郎, 野口玉雄, 荒川修	トカラ列島中之島産オウギガニ科カニ類の毒性と毒成分	食衛誌	50	237-242	2009
谷山茂人, 相良剛史, 西尾幸郎, 黒木亮一, 浅川学, 野口玉雄, 山崎脩平, 高谷智裕, 荒川修	ハコフグ類の喫食による食中毒の実態と同魚類の毒性調査	食衛誌	50	270-277	2009
S. Takasaki, T. Konta, K. Shiomi, I. Kubota	Neurologic symptoms in a dialysis patient after ingesting seafood	Am. J. Kidney Dis.	54	A37-A39	2009
K. Ikeda, Y. Emoto, R. Tatsuno, J. J. Wang, S. Taniyama, T. Takatani, O. Arakawa	Maturation-associated changes in toxicity of the pufferfish <i>Takifugu poecilonotus</i>	Toxicon	55	289-297	2010
O. Arakawa, D. F. Hwang, S. Taniyama, T. Takatani	Toxins of pufferfish that cause human intoxications	In: A. Ishimatsu, H. J. Lie (eds), Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea, Nagasaki University/TERRAPUB		227-244	2010
長島裕二, 松本拓也	魚類の毒 (1): フグ毒	食品衛生研究	59 (7)	43-51	2009
谷山茂人, 高谷智裕	魚類の毒 (2): パリトキシン様毒	食品衛生研究	59 (8)	45-51	2009
荒川修, 塩見一雄	巻貝の毒: テトラミンおよびテトロドトキシン	食品衛生研究	60 (2)	15-25	2010

報 文

トカラ列島中之島産オウギガニ科カニ類の毒性と毒成分

(平成 21 年 6 月 1 日受理)

相良剛史^{1,2} 谷山茂人² 高谷智裕³ 西堀尚良¹
西尾幸郎¹ 野口玉雄⁴ 荒川 修^{3,*}Toxicity and Toxin Profiles of Xanthid Crabs Collected around
Nakanoshima, the Tokara Islands, JapanTakefumi SAGARA^{1,2}, Shigeto TANIYAMA², Tomohiro TAKATANI³, Naoyoshi NISHIBORI¹,
Sachio NISHIO¹, Tamao NOGUCHI⁴ and Osamu ARAKAWA^{3,*}¹Department of Science for Living, Shikoku University, Junior College:
123-1 Ebisuno, Furukawa, Ohjin-cho, Tokushima 771-1192, Japan;²Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University:
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan;³Faculty of Fisheries, Nagasaki University: 1-14 Bunkyo-machi,
Nagasaki 852-8521, Japan; *Corresponding author⁴Faculty of Healthcare, Tokyo Health Care University: 3-11-3
Setagaya, Setagaya-ku, Tokyo 154-8568, Japan

A total of 36 specimens of 5 xanthid crab species, *Zosimus aeneus* ($n=16$), *Xanthias lividus* ($n=4$), *Leptodius sanguineus* ($n=3$), *Daira perlata* ($n=10$) and *Eriphia sebana* ($n=3$), were collected around Nakanoshima Island, which is located at the northeastern part of the Tokara Islands, Kagoshima Prefecture, Japan in May and July 2000, and their toxicity was determined by mouse bioassay. Nine of 16 *Z. aeneus* specimens and all of 4 *X. lividus* specimens showed lethal potency to mice (2.1–11 MU/g, 2.8–8.6 MU/g, respectively), whereas all the other species were non-toxic (less than 2.0 MU/g). LC/MS analyses indicated that the toxin of the *Z. aeneus* specimens was mainly composed of tetrodotoxin (41% of total toxicity), and 11-oxotetrodotoxin contributed to the remaining toxicity. The toxin of the *X. lividus* specimens, however, was apparently not tetrodotoxin. In HPLC-FLD analyses, no paralytic shellfish poison component was detected in either of the two toxic species.

(Received June 1, 2009)

Key words: オウギガニ科 xanthid crab; ウモレオウギガニ *Zosimus aeneus*; ムラサキヒメオウギガニ *Xanthias lividus*; テトロドトキシン tetrodotoxin; 11 オキシテトロドトキシン 11-oxotetrodotoxin; 麻痺性貝毒 paralytic shellfish poison; 食中毒 food poisoning; トカラ列島 the Tokara Islands

結 言

オウギガニ科の3種のカニ, ウモレオウギガニ *Zosimus aeneus*, スベスベマンジュウガニ *Atergatis floridus*, およびツブヒラアシオウギガニ *Platypodia granulosa* は, 体内に著量の麻痺毒を持つ^{1)~3)}. 毒性や毒組成は地域により大きく異なり, 一般に日本本土産のスベスベマ

ンジュウガニは毒性が低く, フグ毒 tetrodotoxin (TTX) を主要毒成分とするのに対し^{4), 5)}, 琉球諸島や奄美諸島では3種ともに毒性が高く, 麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poison; PSP) 主体の毒を持つ^{1)~3), 6)~8)}. 後者の地域では, 過去にこれらのカニによる食中毒が20例近く発生しており, 少なくとも29名が中毒し, 15名が死亡している⁹⁾.

一方, 種別に見ると, 3種中ウモレオウギガニが最も大型で毒性も強い. 特に, 沖縄県石垣島産同種の付属肢からは, PSP換算で1g当たり最高16,500 MUに達する毒性が検出されている⁶⁾. この毒力は, ヒトにおけるPSPの最小致死量(3,000 MU)⁹⁾をはるかに上回り, ほぼ5名分の致死量に匹敵する. 前記食中毒事例も, 多くがウモレオウ

* 連絡先

¹ 四国大学短期大学部生活科学科: 〒771-1192 徳島県徳島市
応神町古川戎子野 123-1

² 長崎大学大学院生産科学研究科: 〒852-8521 長崎県長崎市
文教町 1-14

³ 長崎大学水産学部: 〒852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

⁴ 東京医療保健大学医療保健学部: 〒154-8568 東京都世田谷
区世田谷 3-11-3

ギガニを原因としており、本カニは食品衛生上極めて危険な種といえる。

ウモレオウギガニは本来、奄美諸島以南の最低潮線近くのサンゴ礁に分布するとされており¹⁰⁾、これまでは鹿児島県奄美大島を北限として毒性調査が行われてきた¹¹⁾。しかしながら、著者らは毒ガニ中毒の調査の過程で、同島の北方に位置する鹿児島県トカラ列島中之島にもウモレオウギガニが生息しているとの情報を得た。そこで本研究では、中之島産オウギガニ科カニ類を対象として毒性スクリーニングを実施するとともに、有毒種の毒成分について若干の検討を加えた。

実験方法

1. 試料

2000年5月と6月に鹿児島県トカラ列島中之島の寄木地区および船倉地区 (Fig. 1) で採集したウモレオウギガニ (Fig. 2) 16個体、ムラサキヒメオウギガニ *Xanthias lividus* (Fig. 2) 4個体、ムツハオウギガニ *Leptodius sanguineus* 3個体、カノコオウギガニ *Daira perlata* 10個体、イワオウギガニ *Eriphia sebana* 3個体を試料とした。試料は採集後、直ちに現地に於いて個体ごとに冷凍して長崎大学水産学部水産食品衛生学研究室に持ち帰り、 -20°C で凍結保存した。供試の際、試料を流水中で急速解凍して用いた。

2. 毒性試験

各試料から付属肢の一部を取り、磨砕後、0.1% 酢酸を加えて加熱抽出し、遠心分離後の上清を試験液とした。毒性試験は、食品衛生検査指針理化学編フグ毒検査法¹²⁾ (公定法) に準じて行った。

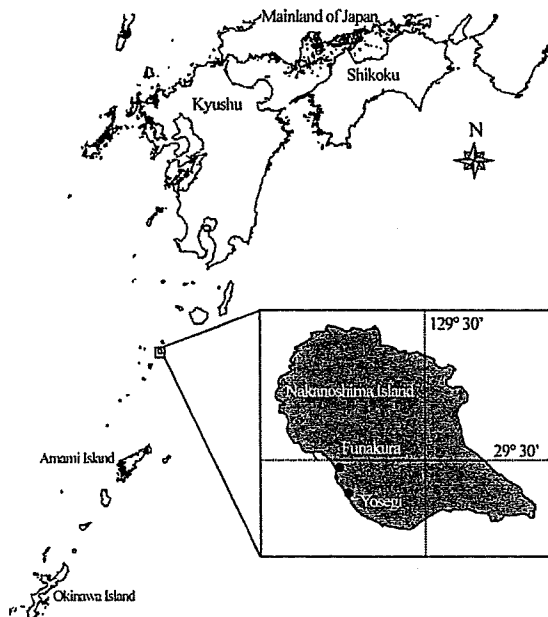


Fig. 1. Map showing Yosegi and Funakura (●) in Nakanoshima Island, Kagoshima Prefecture, where the xanthid crab specimens were collected.

3. ウモレオウギガニの毒の精製

寄木地区で採集したウモレオウギガニ 11 個体につき、付属肢の残余、および頭胸部の筋肉と外骨格 (計 154.5 g) を合一して磨砕後、1% 酢酸-80% メタノールで毒を抽出のうえ、既報の方法¹³⁾ に準じて脱脂、活性炭処理、Bio-Gel P-2 (Bio-Rad) カラム処理、Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィー、Bio-Rex 70 (Bio-Rad, H⁺ 型) カラムクロマトグラフィーを順次行い、最終的に部分精製毒 302 MU を得た。

4. 毒成分分析

TTX を対象とした分析は、既報の LC/MS 法¹⁴⁾ に準じ、Alliance LC/MS システム (Waters) で行った。カラムには Puresil C18 ($\phi 4.6 \times 250$ mm, Waters) を、移動相には 30 mmol/L ヘプタフルオロ酪酸を含む 1 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0) を用い、エレクトロスプレー法によりイオン化して ZsprayTM MS2000 で測定した。一方、PSP 成分の分析は HPLC 蛍光法^{13), 15)} に準拠して行った。カラムには LiChroCART Superspher RP-18 (e) ($\phi 4.6 \times 250$ mm, Merck) を、saxitoxin (STX) 群分析の移動相には 2 mmol/L ヘプタンスルホン酸を含む 4% アセトニトリル-30 mmol/L リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.3) を、gonyautoxin (GTX) 群分析には 2 mmol/L ヘプタンスルホン酸を含む 10 mmol/L リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.3) を、検出試薬には 50 mmol/L 過ヨウ素酸と 0.2 mol/L 水酸化カリウム-1 mmol/L ギ酸アンモニウム-50% ホルムアミドの混合液を用い、励起波長 336 nm、蛍光波長 392 nm で測定した。

結果および考察

1. オウギガニ科カニ類の毒性

供試した 5 種のカニのうち、ウモレオウギガニおよびムラサキヒメオウギガニが有毒で、その他 3 種計 16 個体はいずれも無毒 (TTX 換算で 2.0 MU/g 未満) であった。

ウモレオウギガニとムラサキヒメオウギガニの毒力をそれぞれ Table 1 および 2 に示す。前者は供試 16 個体中 9 個体が、後者は 4 個体すべてが有毒であった。有毒個体の毒力はいずれも低く、ウモレオウギガニで 2.1~11 MU/g (平均毒力 \pm 標準偏差: 3.6 ± 2.8 MU/g, 以下同様)、ムラサキヒメオウギガニで 2.8~8.6 MU/g (5.1 ± 2.6 MU/g) と測定された (いずれも TTX 換算)。1 個体当たりの総毒力を見ると、ウモレオウギガニで最高 390 MU が認められたが、これはヒトにおける TTX の最小致死量 (10,000 MU)¹⁶⁾ よりはるかに低い値であった。

Koyama ら⁸⁾ は、沖縄県石垣島の 5 地点にてウモレオウギガニ ($n=102$) の毒性調査を行い、有毒個体の出現頻度は 99% で、地点ごとの平均毒力は 400~6,500 MU/g (PSP 換算) と極めて高かったと報告している。また、奄美諸島産ウモレオウギガニも概して毒性が高く、平均毒力は 350 MU/g (PSP 換算) との報告もある¹⁷⁾。一方、今回調査したウモレオウギガニの場合、有毒個体の出現頻度

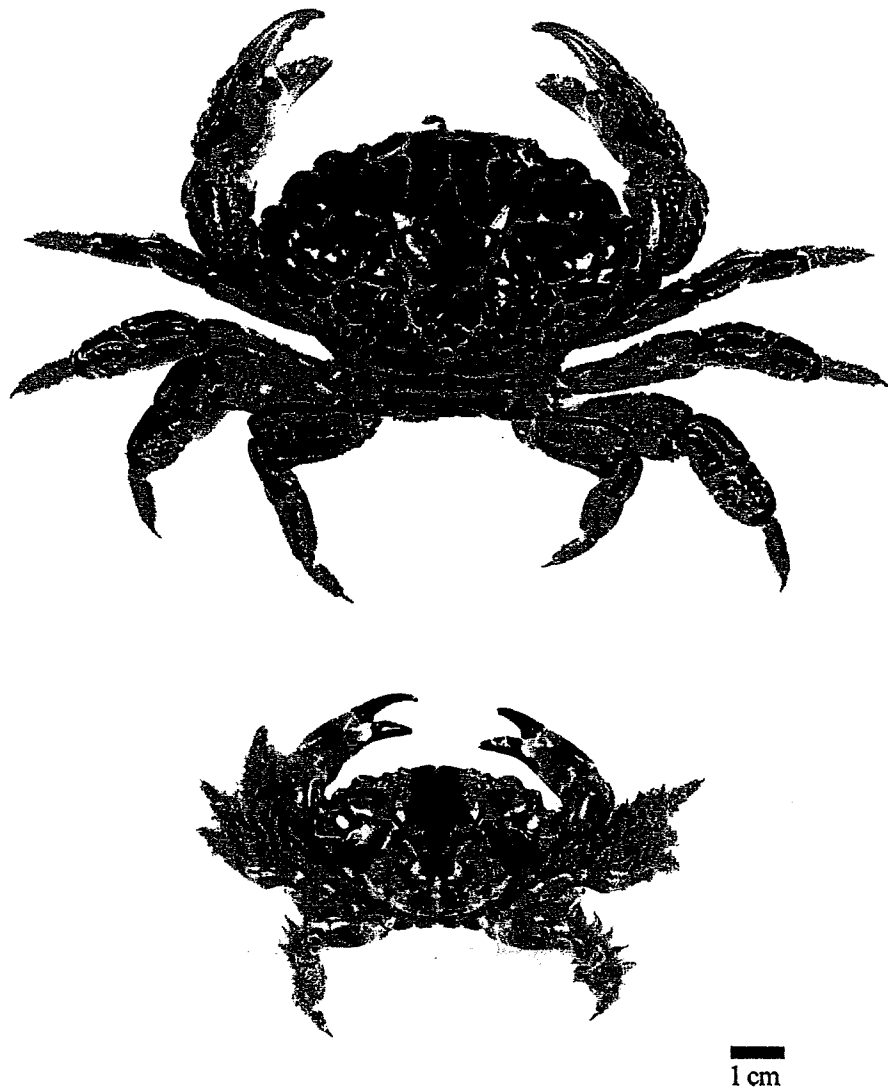


Fig. 2. Toxic species of xanthid crabs, *Zosimus aeneus* "umoreougigani" (upper) and *Xanthias lividus* "murasakihimeougigani" (lower), collected from Nakanoshima Island.

は56%, 平均毒力も3.5 MU/gと、前述の報告に比べて極端に低い。関連して、赤道以南のニューヘブリディーズ諸島およびサモア諸島のウモレオウギガニは全く毒性を示さないという¹⁸⁾。

台湾ではオウギガニ科カニ類5種の毒性が報告されており、この中でムラサキヒメオウギガニが有毒種とされている^{19)~22)}。その毒力は4~17 MU/g (TTX換算)と、今回調査したものと同レベルであった。かつて南西諸島において、Hashimotoら¹¹⁾により、8科72種、約1,000個体にも及ぶ大規模なカニの毒性調査が実施されているが、これにムラサキヒメオウギガニの毒性に関する知見は含まれておらず、その後も日本での報告はない。中之島での試料採集の際、島民を対象に聞き取り調査を行ったところ、イワオウギガニは有毒種と言いつけられており、ウモレオウギガニについては過去に食習慣があるものの、中毒は発生していないとのことであった。しかしながら、今回

の調査ではイワオウギガニは無毒であり、ウモレオウギガニならびにムラサキヒメオウギガニが有毒種であることが判明した。

2. 有毒ガニの毒成分

ウモレオウギガニから得た部分精製毒(302 MU)をLC/MSにて分析したところ、 m/z 302と320のクロマトグラムにおいて、4,9-anhydroTTX ($[M+H]^+ = 302$)およびTTX ($[M+H]^+ = 320$)の標品とそれぞれ保持時間が一致するピークが検出された (Fig. 3bおよび3d)。LC/MS分析から算出されたTTX量は124 MUで、総毒力の41%を占めていた。一方、 m/z 290, 304, 320, および336のクロマトグラムにおいて、TTXに対する相対的な溶出位置から^{23~26)}、それぞれ11-norTTX-6(R)-ol ($[M+H]^+ = 290$)、11-deoxyTTXと5-deoxyTTX (共に $[M+H]^+ = 304$)、4-epiTTX ($[M+H]^+ = 320$)、および11-oxoTTX ($[M+H]^+ = 336$)と推定されるピークが見いだされた (Fig.

Table 1. Toxicity of *Z. aeneus* specimens collected from Nakanoshima, the Tokara Islands

Specimen No.	Place of collection	Sex*1	Carapace width (mm)	Carapace length (mm)	Body weight (g)	Toxicity*2 (MU/g)	Total toxicity*2 (MU/individual)
1	Yosegi	F	51	36	36	11.0	390
2		M	45	33	26	3.3	86
3		M	46	31	26	2.7	69
4		F	45	32	26	2.7	70
5		M	45	30	22	2.6	57
6		M	40	30	20	2.1	42
7		M	47	34	29	<2.0	—
8		M	53	36	41	<2.0	—
9		M	49	34	35	<2.0	—
10		M	50	36	35	<2.0	—
11	Funakura	F	37	24	10	<2.0	—
12		M	45	31	25	2.8	70
13		M	45	32	22	2.6	56
14		M	60	45	64	2.3	148
15		F	62	43	64	<2.0	—
16		M	50	34	33	<2.0	—
Mean±SD			48±6.4	34±5.0	32±15	3.6±2.8*3	110±110*3

*1 M= male, F= female

*2 Calculated as TTX

*3 Mean±SD of toxic specimens

Table 2. Toxicity of *X. lividus* specimens collected at Funakura, Nakanoshima, the Tokara Islands

Specimen No.	Month of collection	Sex*1	Carapace width (mm)	Carapace length (mm)	Body weight (g)	Toxicity*2 (MU/g)	Total toxicity*2 (MU/individual)
1	May 2000	F	17	12	2.1	8.6	18
2		M	37	25	17.0	3.5	59
3	Jun. 2000	M	36	24	12.0	5.6	70
4		M	39	26	18.0	2.8	51
Mean±SD			32±10.2	22±6.6	12±7.3	5.1±2.6	50±22

*1 M= male, F= female

*2 Calculated as TTX

3a, 3c~3e). 11-oxoTTX と推定される成分を対象に、既報²⁷⁾の知見に基づき、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量を求めたところ、123 MU (総毒力の 41%) と計算された。すなわち、この仮定に基づけば、TTX と 11-oxoTTX でウモレオウギガニのマウス毒性の 80% 程度を説明できることになる。関連して、Arakawa ら²⁹⁾により石垣島小島産スベスベマンジュウガニからは TTX に加え、主要成分として 11-oxoTTX および 11-norTTX-6(R)-ol が分離されている。

これまで石垣島のリーフに生息する有毒ガニ 3 種の毒の本体は、STX を主成分とする PSP であることが知られている^{1)~4), 6)}。一方、先島諸島の一部や神奈川県三浦半島などに生息するスベスベマンジュウガニの毒の主成分は TTX とされている^{5), 23), 28)}。また、台湾産有毒ガニ 5 種の毒成分は、いずれも 80% 以上が TTX であり、副成分として 4,9-anhydroTTX や neoSTX, GTX1-4 をわずかに含むが、STX はほとんど検出されないという^{19)~22)}。今回のウモレオウギガニの毒についても、PSP を対象とした HPLC 蛍光分析を行ったが、同成分は全く検出されなかった。したがって、約 20% の残余毒力も TTX 関連成

分である可能性が高い。

他方、ムラサキヒメオウギガニ 4 個体の粗抽出液についても LC/MS 分析ならびに HPLC 蛍光分析を行ったが、TTX そのものや既知の PSP 成分は検出されなかった。Hwang ら²²⁾は、台湾産ムラサキヒメオウギガニの毒成分の 83% は TTX で、17% が GTX1-4 であると報告している。毒性試験におけるマウスの症状や致死時間から、今回供試したムラサキヒメオウギガニの毒も TTX ないし PSP 関連成分、もしくはそれらと活性がよく似た急性の麻痺毒と推察されたが、台湾産のものとは組成もしくは毒本体そのものが大きく異なる可能性がある。この点については、ウモレオウギガニが保有する TTX 関連微少成分の特定と併せて現在検討中である。

オウギガニ科有毒ガニは、毒性と毒組成の個体差や地域差が極めて大きいことなどから^{1)~11), 13), 23), 28)}、フグ同様²⁹⁾、食物連鎖を介して外的要因により毒化するものと推察されているが^{17), 28)}、毒の起源生物はいまだに特定されていない。これらのガニのうち、熱帯ないし亜熱帯のサンゴ礁域に生息するものは、PSP を毒の主体とし、極めて高毒性になるのに対し^{1)~4), 6)~11), 13), 23), 28)}、日本本土の岩礁域などに生息し、TTX 主体の毒を持つ場合は毒性が低

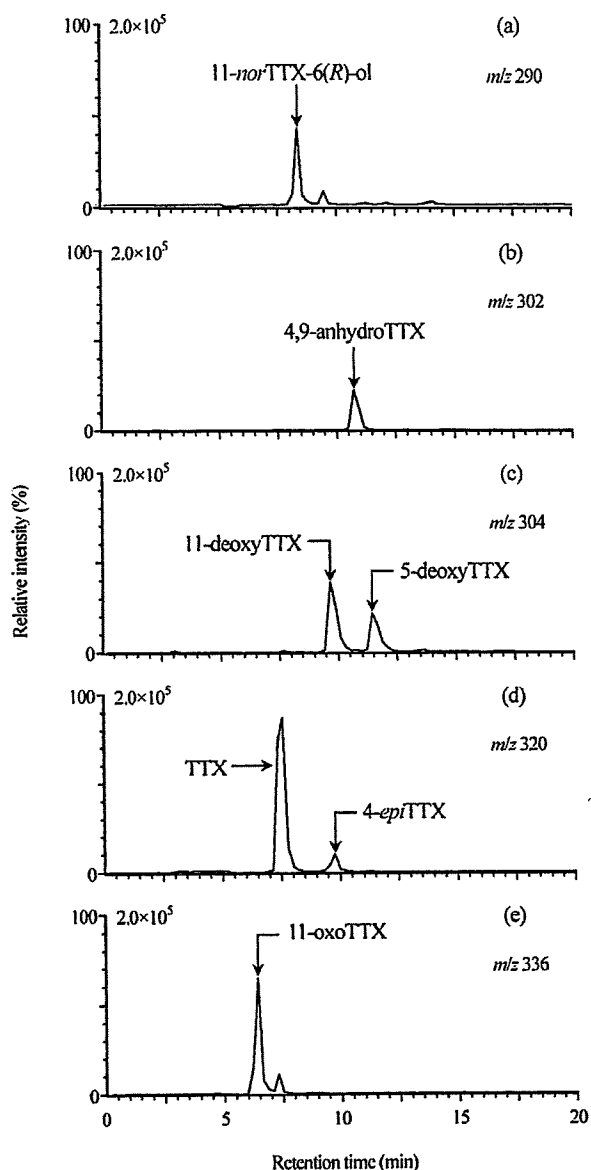


Fig. 3. Selected ion (m/z 290, 302, 304, 320 and 336) mass chromatograms of partially purified toxin from *Z. aeneus*

LC/MS¹⁴⁾ was carried out on an Alliance LC/MS system (Waters) equipped with a ZsprayTM MS 2000 detector, using a Puresil C18 (Waters) column with 30 mmol/L heptafluorobutyric acid in 1 mmol/L ammonium acetate buffer (pH 5.0) as the mobile phase (flow rate: 1.0 mL/min). As for MS conditions, about 20% of the eluate was introduced *via* a splitter into the ion source of MS, ionized by means of positive-mode electrospray ionization (ESI), and monitored through a MassLynxTM NT operating system.

い⁴⁾, 5), 28)

今回は調査個体数が少なく調査時季も限られているので、明確な結論を出すことはできないが、中之島産ウモレオウギガニについても、TTXのみを保有する限り食中毒を引き起こすレベルにまで毒化する可能性は低いも

のと思われる。しかしながら、シガテラ毒魚³⁰⁾やハコフグ科魚類³¹⁾で示唆されているように、海洋環境の変化で毒の起源生物の分布が変わると、それまで無毒であった生物が突然毒化することもありうる。すなわち、PSPの起源生物が中之島周辺海域にも出現した場合、同海域に生息するウモレオウギガニが高濃度のPSPを蓄積し、食中毒を引き起こす可能性を否定できない。オウギガニ科有毒ガニにおけるPSPの起源生物を早急に特定する必要がある。

まとめ

トカラ列島中之島に生息するオウギガニ科カニ類5種36個体のマウスに対する毒性を調査したところ、ウモレオウギガニおよびムラサキヒメオウギガニが有毒であった。前者の毒力は、これまでに南西諸島で報告のある同種カニ⁸⁾, 11), 18)の中で際立って低いものであった。一方、LC/MSならびにHPLC蛍光分析により、中之島産ウモレオウギガニにはPSP成分は含まれておらず、総毒力の約4割はTTXであることが明らかとなった。さらに、残余毒力のほとんどを11-oxoTTXが占めるものと推定された。他方、ムラサキヒメオウギガニも有毒種であることが判明した。以上の結果から、中之島産ウモレオウギガニならびにムラサキヒメオウギガニは、食品衛生上注意を要する種であると結論した。

謝辞

本研究を行うにあたり、試料の同定に有益なご助言をいただいた帝京平成大学現代ライフ学部教授 武田正倫 博士に謝意を表す。また、試料採集にご協力いただいた鹿児島県十島村 田中博幸 氏ならびに沖中猛則 氏、大喜旅館 西村賢治 氏をはじめとする中之島の住民各位に感謝する。本研究は厚生労働科学研究費補助金に基づく研究成果の一部であり、関係各位に深謝する。

文献

- 1) Noguchi, T., Konosu, S., Hashimoto, Y. Identity of the crab toxin with saxitoxin. *Toxicon*, 7, 325-326 (1969).
- 2) Koyama, K., Noguchi, T., Hashimoto, K. Occurrence of neosaxitoxin and other paralytic shellfish poison in toxic crabs belonging to the family Xanthidae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47, 965 (1981).
- 3) Yasumoto, T., Oshima, K., Kanta, T. Analysis of paralytic shellfish toxins of xanthid crabs in Okinawa. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47, 957-959 (1981).
- 4) Noguchi, T., Koyama, K., Maruyama, J., Uzu, A., Hashimoto, K. Local variation of toxicity and toxin composition in xanthid crab *Atergatis floridus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 49, 1883-1886 (1983).
- 5) Noguchi, T., Uzu, A., Koyama, K., Maruyama, J., Nagashima, Y., Hashimoto, K. Occurrence of tetrodotoxin as the major toxin in a xanthid crab *Atergatis floridus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 49, 1887-1892 (1983).

- 6) Daigo, K., Uzu, A., Arakawa, O., Noguchi, T., Seto, H., Hashimoto, K. Isolation and some properties neosaxitoxin from a xanthid crab *Zosimus aeneus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 309-313 (1985).
- 7) Arakawa, O., Noguchi, T., Shida, Y., Onoue, Y. Occurrence of carbamoyl-*N*-hydroxy derivatives of saxitoxin and neosaxitoxin in a xanthid crab *Zosimus aeneus*. *Toxicon*, **32**, 175-183 (1994).
- 8) Koyama, K., Noguchi, T., Uzu, A., Hashimoto, K. Individual, local, and size-dependent variations in toxicity of the xanthid crab *Zosimus aeneus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 1273-1279 (1983).
- 9) Hashimoto, K., Noguchi, T. Recent studies on paralytic shellfish poison in Japan. *Pure & Appl. Chem.*, **61**, 7-18 (1989).
- 10) Hashimoto, Y. *Marine Toxins*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1979), p. 63-74.
- 11) Hashimoto, Y., Konosu, S., Inoue, A., Saisho, T., Miyake, S. Screening of toxic crabs in the Ryukyu and Amami Island. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **35**, 83-87 (1969).
- 12) 安元 健 第5章自然毒・A動物毒・1. フグ毒. 食品衛生検査指針理化学編(厚生省監修), 日本食品衛生協会, 東京(1991), p. 296-300.
- 13) Arakawa, O., Noguchi, T., Onoue, Y. Paralytic shellfish toxin profiles of xanthid crabs *Zosimus aeneus* and *Atergatis floridus* collected on reefs of Ishigaki Island. *Fish. Sci.*, **61**, 659-662 (1995).
- 14) Nakashima, K., Arakawa, O., Taniyama, S., Nonaka, M., Takatani, T., Yamamori, K., Fuchi, Y., Noguchi, T. Occurrence of saxitoxins as a major toxin in the ovary of a marine puffer *Arothron firmamentum*. *Toxicon*, **43**, 207-212 (2004).
- 15) Oshima, Y. *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Hallegraef, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. eds., Paris, France, UNESCO, 1995, p. 81-94.
- 16) Noguchi, T., Ebesu, J. S. M. Puffer poisoning: Epidemiology and treatment. *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, **20**, 1-10 (2001).
- 17) 野口玉雄, 醍醐絹江, 橋本周久. 甲殻類の毒. *動物と自然*, **14**, 17-24 (1984).
- 18) Konosu, S., Noguchi, T., Hashimoto, Y. Toxicity of a xanthid crab, *Zosimus aeneus*, and several other species in the Pacific. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **36**, 715-719 (1970).
- 19) Tsai, Y. H., Hwang, D. F., Chai, T. J., Jeng, S. S. Occurrence of tetrodotoxin and paralytic shellfish poison in the Taiwanese crab *Lophozozymus pictor*. *Toxicon*, **33**, 1669-1673 (1995).
- 20) Hwang, D. F., Tsai, Y. H., Chai, T. J., Jeng, S. S. Occurrence of tetrodotoxin and paralytic shellfish poison in Taiwan crab *Zosimus aeneus*. *Fish. Sci.*, **62**, 500-501 (1996).
- 21) Tsai, Y. H., Hwang, D. F., Chai, T. J., Jeng, S. S. Toxicity and toxic components of two xanthid crabs, *Atergatis floridus* and *Demanita Reynaudi*, in Taiwan. *Toxicon*, **35**, 1327-1335 (1997).
- 22) Tsai, Y. H., Ho, P. H., Jeng S. S., Hwang, D. F. Paralytic toxins in Taiwanese crab *Xanthias lividus*. *Fish. Sci.*, **68**, 659-661 (2002).
- 23) Arakawa, O., Noguchi, T., Shida, Y., Onoue, Y. Occurrence of 11-oxotetrodotoxin and 11-nortetrodotoxin-6(R)-ol in xanthid crab *atergatis floridus* collected at Kojima, Ishigaki Island. *Fish. Sci.*, **60**, 769-771 (1994).
- 24) Pires, Jr. O. R., Sebben, A., Schwartz, E. F., Bloch, Jr. C., Morales, R. A. V., Schwartz, C. The occurrence of 11-oxotetrodotoxin, a rare tetrodotoxin analogue, in the brachycephalidae frog *Brachycephalus ephippium*. *Toxicon*, **42**, 563-566 (2003).
- 25) Yotsu-Yamashita, M., Mebs, D. Occurrence of 11-oxotetrodotoxin in the red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens*, and further studies on the levels of tetrodotoxin and its analogues in the newt's efts. *Toxicon*, **41**, 893-897 (2003).
- 26) Pires, Jr. O., Sebben, A., Schwartz, E. F., Morales, R. A. V., Bloch, Jr. Carlos, Schwartz, C. A. Further report of the occurrence of tetrodotoxin and new analogues in the Anuran family Brachycephalidae. *Toxicon*, **45**, 73-79 (2005).
- 27) Taniyama, S., Isami, Y., Matsumoto, T., Nagashima, Y., Takatani, T., Arakawa, O. Toxicity and toxin profile of tetrodotoxin detected in the scavenging gastropod *Nassarius (Alectrion) glans* "kinshibai". *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, **50**, 22-28 (2009).
- 28) Noguchi, T., Arakawa, O., Daigo, K., Hashimoto, K. Local differences in the toxin composition of a xanthid crab *Atergatis floridus* inhabiting Ishigaki Island, Okinawa. *Toxicon*, **24**, 705-711 (1986).
- 29) Miyazawa, K., Noguchi, T. Distribution and origin of tetrodotoxin. *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, **20**, 11-33 (2001).
- 30) Watanabe, S., Morioka, E., Ooishi, A., Mori, K., Sakurai, K., Miyamoto, M., Hashimoto, K., Naito, H. Fish poisoning caused by ingesting parrot fish, is it ciguatera? *Kyukyu Igaku*, **10**, 443-449 (1986).
- 31) Taniyama, S., Sagara, T., Nishio, S., Kuroki, R., Asakawa, M., Noguchi, T., Yamasaki, S., Takatani, T., Arakawa, O. Survey of food poisoning incidents due to ingestion of marine boxfish, along with their toxicity in Japan. *J. Food. Hyg. Soc. Japan* (submitted).

調査・資料

ハコフグ類の喫食による食中毒の実態と同魚類の毒性調査

(平成 21 年 5 月 18 日受理)

谷山茂人^{1,*} 相良剛史² 西尾幸郎² 黒木亮一³ 浅川 学³
野口玉雄⁴ 山崎脩平¹ 高谷智裕⁵ 荒川 修⁵

Survey of Food Poisoning Incidents in Japan Due to Ingestion of Marine Boxfish, along with Their Toxicity

Shigeto TANIYAMA^{1,*}, Takefumi SAGARA², Sachio NISHIO², Ryoichi KUROKI³, Manabu ASAKAWA³,
Tamao NOGUCHI⁴, Shuhei YAMASAKI¹, Tomohiro TAKATANI⁵ and Osamu ARAKAWA⁵

¹ Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University:
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan; * Corresponding author

² Department of Science of Living, Shikoku University Junior College:
123-1 Ebisuno, Furukawa, Ohjin-cho, Tokushima 771-1192, Japan;

³ Graduate School of Biosphere Science and Technology, Hiroshima University:
1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528, Japan;

⁴ Faculty of Healthcare, Tokyo Health Care University:
3-11-3 Setagaya, Setagaya-ku, Tokyo 154-8568, Japan;

⁵ Faculty of Fisheries, Nagasaki University: 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

From 1990 to 2008, 9 food poisoning incidents due to ingestion of marine boxfish occurred in Nagasaki, Miyazaki, Mie and Kagoshima Prefectures, Japan, and a total of 13 persons were poisoned. Their main symptom was severe muscle pain arising from rhabdomyolysis, which was usually accompanied by the discharge of black urine and abnormal elevation of serum creatine phosphokinase. Twelve out of the 13 victims recovered in a few days to two months, while one died after approximately 2 weeks. Since the symptoms were very similar to those caused by parrotfish "aobudai" *Scarus oviifrons* poisoning, the causative substance was considered to be parrotfish toxin, *i.e.*, a palytoxin-like substance. Epidemic surveys after the incidents in Miyazaki and Nagasaki identified the leftovers as "hakofugu" *Ostracion immaculatus*. During screening tests to clarify the toxicity of boxfish from Western Japan, 47 of 129 specimens (36.4%) of *O. immaculatus*, and 7 of 18 specimens (38.9%) of "umisuzume" *Lactoria diaphana* were found to show acute and/or delayed lethal activity to mice (0.5-2.0 mouse unit/g). Among the tissues tested, the frequency of toxicity was highest in the viscera excluding liver (28.6% in *O. cubicus*, 33.3% in *L. diaphana*), followed by muscle (10.9%, 5.6%) and liver (6.2%, 5.6%). From the above results, we conclude that *O. cubicus* and *L. diaphana* inhabiting the coast of Japan sometimes contain toxic substance(s), which can sporadically cause food poisonings very similar to parrotfish poisoning.

(Received May 18, 2009)

Key words: ハコフグ科魚類 Ostraciid fish; ハコフグ *Ostracion immaculatus*; ウミスズメ *Lactoria diaphana*; 食中毒 food poisoning; ハコフグ中毒 boxfish poisoning; アオブダイ中毒 parrotfish poisoning; 横紋筋融解症 rhabdomyolysis; ミオグロビン尿 discharge of black urine; クレアチンホスホキナーゼ creatine phosphokinase; パリトキシン palytoxin

* 連絡先

¹ 長崎大学大学院生産科学研究科: 〒852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

² 四国大学短期大学部生活科学科: 〒771-1192 徳島県徳島市応神町古川戎子野 123-1

³ 広島大学大学院生物圏科学研究科: 〒739-8528 広島県東広島市鏡山 1-4-4

⁴ 東京医療保健大学医療保健学部: 〒154-8568 東京都世田谷区世田谷 3-11-3

⁵ 長崎大学水産学部: 〒852-8521 長崎県長崎市長崎町 1-14

緒 言

ハコフグ科魚類は、強い魚毒性を示す毒パフトキシンを皮膚から分泌することが知られている¹⁾。また、ミナミハコフグ *Ostracion cubicus* の体表粘液からはタンパク質性の魚毒成分ボクシンが単離されているが²⁾、それ以外の毒性に関する知見は乏しく、谷が“日本産フグの中毒学的研究”³⁾の中でハコフグ *Ostracion immaculatus*、ウミスズメ *Lactoria diaphana* およびイトマキフグ *Kentrocapros aculeatus* をいずれも無毒と報告しているにすぎない。これらに基づき、厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知⁴⁾では、ハコフグの筋肉と精巢は食品衛生上可食部として取り扱われているが、1990年代から西日本を中心にハコフグ類の喫食による食中毒（以下、ハコフグ中毒）が相次いで発生している^{4)~9)}。その症状はアオブダイ *Sarus ovifrons* 中毒によく似ており、横紋筋融解症を主徴とする。長崎県や宮崎県では古くからハコフグ類を食する習慣があり、伝統的郷土料理の食材として、その商業的価値は高い。したがって、死亡者を伴う極めて重篤な中毒の発生⁹⁾は、食品衛生上のみならず地域水産業にとっても大きな問題となっている。このような状況の下、本研究では日本で発生したハコフグ中毒の実態を把握するとともに、その未然防止に資することを目的とし、中毒検体が採捕された海域を中心に日本近海産ハコフグ類の毒性評価を試みた。

調査方法

1. 中毒事例調査

ハコフグ中毒の症例報告など^{4)~9)}を参照するとともに、2001~2008年に発生した事例については、患者、担当医師、もしくは当該事例を扱った保健所の担当者からそれぞれの発生状況を聴取して取りまとめた。

2. 試料

2003~2006年にかけて、中毒発生地域近海、すなわち長崎県有川湾でハコフグ21個体、宮崎県島浦島沖でハコフグ20個体とウミスズメ14個体、徳島県牟岐町沖でハコフグ25個体とウミスズメ4個体を、中毒とは直接関連のない海域、すなわち山口県下関沖でハコフグ63個体を採集した。いずれも採集後、直ちに凍結し、-20℃で保存した。供試の際、試料を流水中で急速解凍して用いた。

3. 試験液の調製

試料を筋肉、肝臓、および肝臓を除く内臓に分け、各部位から酢酸酸性75%エタノール(pH 3.5)にて粗抽出液を調製し、ジエチルエーテルで脱脂後、得られた水画分を試験原液(2g試料相当量/mL)とした。

4. 毒性試験

本試験は食品衛生検査指針理化学編シガテラ検査法¹⁰⁾に準拠して行った。試験にはddY系の雄で体重が17~20gのマウスを用いた。まず試験原液1mLずつを3尾

のマウスに腹腔内投与した。次いで、試験原液を精製水で2, 4, 8倍に希釈したものにつき、同様にマウスに投与し、48時間以内に3尾中2尾もしくは3尾のマウスが死亡する最大希釈倍率を求めた。毒力は、検体1g当たりのマウス単位(mouse unit: MU)で表示し、最大希釈倍率が1(原液)、2, 4倍の場合をそれぞれ0.5, 1, 2 MU/gとした。

5. HPLC分析

一部の有毒試料につき、既報¹¹⁾に従ってテトロドトキシン(tetradotoxin; TTX)を対象としたHPLC分析を行った。

分析用カラムにはMyghtysil RP-18(φ4mm×250mm, 関東化学(株)製)、移動相には2mmol/Lヘプタンスルホン酸を含む10mmol/Lリン酸アンモニウム緩衝液(pH 7.3)を用い、その流速を0.5 mL/minとした。毒成分の検出試薬に3 mol/L水酸化ナトリウム溶液を用い、流速0.5 mL/minでカラム溶出液と混合させ、100℃で1.5分間加熱し、生成される蛍光物質を励起波長381 nm、蛍光波長510 nmで測定した。

結果および考察

1. 食中毒事例

ハコフグ中毒発生状況をTable 1に示す。1990年から2007年にかけて発生した8件の事例についてはすでに報告^{4)~9)}がある。2008年に新たに発生した1件(事例9)は、今回の聞き取り調査で詳細が明らかとなった。これら9事例の患者総数は13名で、うち1名が死亡していた。発生場所は、長崎県が4件^{5), 9)}と最も多く、その他、宮崎県で3件^{6), 8), 9)}、鹿児島県⁴⁾と三重県⁷⁾で各1件と、九州での発生が目立っている。原因魚種は、事例1⁴⁾と事例3⁶⁾ではハコフグと報告されており、事例2⁵⁾では虎島⁵⁾がハマフグ *Tetrosomus concatenatus* の可能性を指摘している。また、聞き取り調査から事例5および事例8はウミスズメ、事例7はハコフグと推定した。一方、事例6および事例9では患者を含む喫食者全員の食べ残し残品(それぞれ2個体と5個体)を入手し、残存していた胸鰭、背鰭、臀鰭の鰭条数などの形態学的特徴から、すべてハコフグと同定した(Fig. 1)。事例2~8^{5)~9)}および事例9の中毒検体は、いずれも発生場所に近い地元の沿岸で採捕されたものであった。特に長崎県での4事例^{5), 9)}は、すべて同県五島列島沿岸で捕獲されたハコフグ類に起因していた。患者のほとんどが筋肉と肝臓、または内臓を喫食しており^{4)~9)}、原因物質が特定の部位に局在しているのかどうかは明らかでない。

極めて重篤であった事例9⁹⁾につき、聞き取り調査で判明した詳細を以下に記す。

2007年8月25日に、長崎県福江島沿岸で漁獲したハコフグ類の筋肉と肝臓のみそ焼きを男性1名が喫食した。男性は約13時間の潜伏時間を経て腰痛とミオグロビン尿症を発症したが、共に軽症で、同27日には回復した。一方、同26日に漁獲したハコフグ類の筋肉と内臓を同様に

⁴⁾ 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知(昭和58年12月2日、環乳第59号)「フグの衛生確保について」、厚生省

Table 1. Epidemiological data on boxfish poisoning incidents in Japan

Case No.	Date of occurrence	Place of occurrence	Causative fish	Number of victims	Number of deaths	Ingested part	Latency period	Recovery period	Time to death	Main symptoms	Reference No.
1	30 Oct. 1990	Kagoshima Prefecture	<i>Ostracion immaculatus</i> * "hakofugu"	1	0	Unknown	5 hr	2 months	—	Rhabdomyolysis, discharge of black urine, disturbance of consciousness, acute renal failure	4)
2	5 Mar. 1993	Nagasaki Prefecture	<i>Kentrocapros aculeatus</i> * "hamafugu"	1	0	Unknown	19 hr	Unknown	—	Numbness of lower limbs, dyspnea	5)
3	27 Dec. 1999	Miyazaki Prefecture	<i>O. immaculatus</i> * "hakofugu"	1	0	Muscle Liver	6 hr	11 days	—	Rhabdomyolysis, discharge of black urine	6)
4	7 Nov. 2001	Mie Prefecture	Unknown	1	0	Viscera	8 hr	2 months	—	Rhabdomyolysis, discharge of black urine, dyspnea	7)
5	21 Feb. 2003	Miyazaki Prefecture	<i>Lactoria diaphana</i> ** "umisuzume"	1	0	Muscle Liver	11 hr	3 weeks	—	Rhabdomyolysis, discharge of black urine, dyspnea, acute renal failure	8)
6	23 Oct. 2003	Miyazaki Prefecture	<i>O. immaculatus</i> *** "hakofugu"	2	0	Muscle Liver	8-9.5 hr	2 months	—	Rhabdomyolysis, numbness	9)
7	13 Oct. 2004	Nagasaki Prefecture	<i>O. immaculatus</i> ** "hakofugu"	3	0	Muscle Liver	5-7.5 hr	1 month	—	Rhabdomyolysis, myositis	9)
8	26 Aug. 2007	Nagasaki Prefecture	<i>Lactoria diaphana</i> ** "umisuzume"	2	1	Muscle Liver	11-13 hr	2 days	16 days	Rhabdomyolysis, discharge of black urine, dyspnea, acute renal failure, heart failure	9)
9	31 Oct. 2008	Nagasaki Prefecture	<i>O. immaculatus</i> *** "hakofugu"	1	0	Muscle Liver	12 hr	Unknown	—	Rhabdomyolysis	Not reported

*. Estimated from the reference.

**. Estimated from the statement of victims.

***. Identified based on the morphologic observation of leftovers.

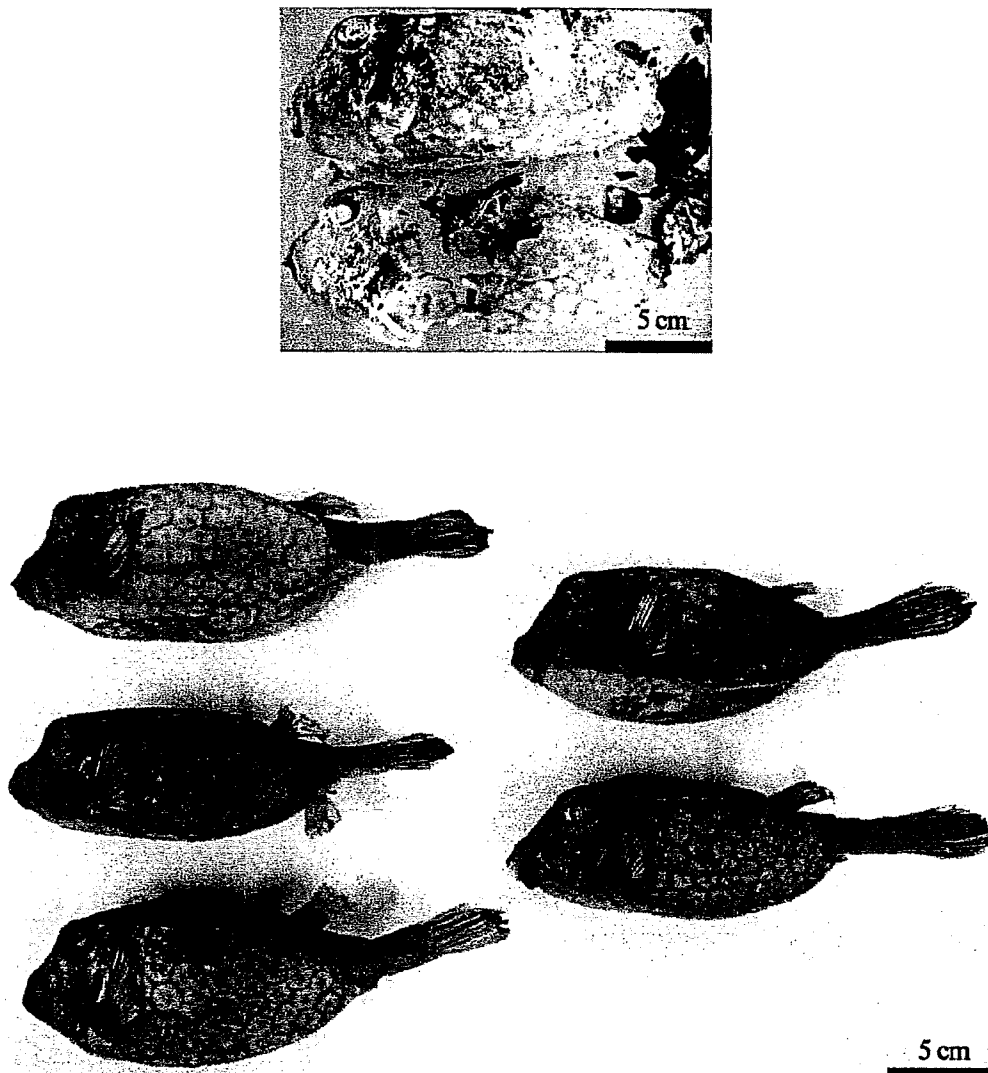


Fig. 1. Leftovers in Case 6 (upper) and Case 9 (lower), which were identified as *Ostracion immaculatus* "hakofugu".

喫食した男性1名も約11時間後に筋肉痛(横紋筋融解症)を呈し、起立困難となった後、呼吸困難やミオグロビン尿症を発症した。さらに、初期症状の発症から約48時間後に急性腎不全などを併発して容態が悪化し、心肺停止に陥り、意識不明のまま約2週間後に死亡した。中毒検体の残品は廃棄されていたが、患者やその家族の証言から、原因魚種はともにウミスズメと推定された。

ハコフグ中毒では、患者の9割が血清クレアチンホスホキナーゼ(CPK)の急激な上昇を伴う横紋筋融解症を、5割がミオグロビン尿症を発症していた^{4), 6)~9)}。一般的な海産フグ類(フグ科魚類)による中毒の場合、TTXが原因物質であり、主症状は痺れ、麻痺、嘔吐などで¹²⁾、横紋筋融解症やミオグロビン尿症の発症例は皆無である。また、TTX中毒の潜伏時間はおおむね10~45分、致死時間は6~24時間¹¹⁾であるのに対し、ハコフグ中毒の潜伏時間は5~19時間で致死時間も非常に長い。他方、西日本で

散発しているアオブダイ中毒の典型的な症状はミオグロビン尿を伴う横紋筋融解症で、発症後数日でCPKなどの筋原性逸脱酵素の急激な上昇が見られ、潜伏時間や致死時間も比較的長く^{13)~20)}、ハコフグ中毒と酷似している。さらに、アオブダイ中毒の発生地域や有毒アオブダイの生息海域(長崎県五島列島、宮崎県太平洋沿岸、三重県熊野灘など)^{14), 16)}は、ハコフグ中毒発生地や原因魚類採捕海域とほぼ一致する。したがって、ハコフグ中毒は、TTXを原因とする一般的なフグ中毒とは異なり、アオブダイ毒と同様の生体活性を持つ物質が横紋筋融解症を招来する特異な中毒であると考えられる。ハコフグ中毒は台湾でも1件報告されており²¹⁾、患者の症状や時間経過も日本の事例とよく似ている。またバングラデシュでは、*Tetraodon*属の淡水産フグにより、TTX中毒とは異なる致死率の高い食中毒が頻発している²²⁾。本中毒の原因魚類は、麻痺性貝毒(paralytic shellfish poison; PSP)とパリトキシン(paly-

Table 2. Anatomic distribution of toxicity in toxic specimens of *Ostracion immaculatus* "hakofugu" collected from Western Japan

No.	Place of collection	Month of collection	Body weight (g)	Body length (mm)	Lethal potency (MU/g)		
					Muscle	Liver	Viscera excluding liver
1	Arikawa Bay, Nagasaki Prefecture	Nov.-Dec. 2003	563	227	0.5*	ND	ND
2			575	206	0.5*	ND	ND
3			494	239	0.5**	ND	ND
4		Nov.-Dec. 2004	220	153	0.5*	0.5*	1.0*
5			115	145	0.5**	0.5*	1.0*
6			270	160	ND	0.5*	0.5*
7			130	152	ND	0.5*	0.5*
8			358	188	0.5*	ND	ND
9			634	235	0.5**	ND	ND
10			205	153	ND	ND	0.5*
11			455	195	ND	ND	0.5*
12			410	187	NE	NE	0.5*
13			279	178	ND	ND	0.5**
14	Shimauro Island, Miyazaki Prefecture	May 2004	300	133	0.5*	ND	ND
15			191	145	ND	ND	1.0**
16	Offshore of Mugi, Tokushima Prefecture	Nov. 2004	267	158	ND	ND	0.5*
17		Jun. 2005	237	160	ND	ND	1.0*
18			259	160	ND	ND	0.5*
19			315	183	ND	ND	0.5**
20			190	146	ND	ND	0.5**
21	Offshore of Shimonoseki, Yamaguchi Prefecture	Dec. 2004	317	168	ND	ND	0.5**
22			235	155	ND	ND	0.5**
23		Apr. 2005	603	216	ND	ND	0.5**
24			554	202	ND	ND	0.5**
25		Jun. 2005	224	142	0.5*	ND	0.5*
26			627	209	0.5*	ND	0.5**
27			395	180	ND	ND	0.5**
28		Jul. 2005	82.5	101	0.5*	ND	0.5*
29			153	127	ND	0.5**	0.5*
30			336	172	ND	ND	0.5*
31	117		123	ND	ND	0.5**	
32	106		110	ND	ND	0.5**	
33	208		142	ND	ND	0.5**	
34	Aug. 2005		411	203	ND	ND	0.5*
35		405	179	ND	ND	0.5**	
36	Oct. 2005	302	159	0.5**	ND	0.5*	
37		552	204	0.5*	ND	ND	
38		861	215	0.5**	ND	ND	
39		469	187	ND	0.5*	ND	
40		288	174	ND	ND	0.5**	
41		Nov. 2005	535	192	ND	0.5*	0.5*
42	89.2		110	ND	ND	0.5**	
43	777		206	ND	ND	0.5**	
44	Dec. 2005	668	198	ND	ND	0.5*	
45	May 2006	458	178	ND	0.5*	ND	
46		750	208	ND	ND	0.5**	
47		458	184	ND	ND	0.5**	

ND: Not detected (<0.5 MU/g).

NE: Not examined.

*: Delayed lethal potency to mice

** : Acute lethal potency to mice

Table 3. Anatomic distribution of toxicity in toxic specimens of *Lactoria diaphana* "umisuzume" collected from Western Japan

No.	Place of collection	Month of collection	Body weight (g)	Body length (mm)	Lethal potency (MU/g)		
					Muscle	Liver	Viscera excluding liver
1			391	163	0.5**	ND	ND
2	Shimaura Island, Miyazaki Prefecture	May 2004	711	240	ND	ND	0.5**
3			541	237	ND	ND	0.5**
4			272	190	ND	ND	0.5*
5	Offshore of Mugi, Tokushima Prefecture	Jun. 2005	439	235	ND	0.5**	2.0*
6		Mar. 2006	NE	133	ND	ND	1.0**
7			NE	178	ND	NE	1.0**

ND: Not detected (<0.5 MU/g).

NE: Not examined.

*: Delayed lethal potency to mice

** : Acute lethal potency to mice

toxin; PTX) 様物質を同時に保有するが、前者の保有量はわずかで、主たる原因物質は後者であることが示唆されている²³⁾。主な中毒症状や発症/回復/致死時間はアオブダイ中毒やハコフグ中毒に酷似していることから²²⁾、これら3者の中毒は、いずれもPTX様の活性を持つ物質に起因するものと推察される。

2. ハコフグとウミスズメの毒性

供試した2種のハコフグ科魚類のうち、ハコフグでは129個体中47個体(36.4%)、ウミスズメでは18個体中7個体(38.9%)がマウスに対して急性もしくは遅延性の毒性を示した。急性毒性の場合、試験液を投与されたマウスは、数分で激しく疾走または跳躍後、しだいに運動性を失い、呼吸停止により死亡した。症状から、原因物質にTTXなどの麻痺毒が疑われたが、希釈倍率が異なる試験液を投与した場合の用量と致死時間の関係は、TTXやPSPの一種であるサキシトキシン(STX)の用量致死時間曲線^{24), 25)}には当てはまらず、HPLC分析においてもTTXやその関連成分は検出されなかった。一方、遅延性毒性の場合、マウスに対して長時間にわたり痙攣や嗜眠、衰弱を誘起し、おおむね18~36時間で死亡させた。

マウス毒性を示したハコフグ47個体の部位別毒力をTable 2に示す。5個体の筋肉、1個体の肝臓および19個体の肝臓を除く内臓に0.5~1.0 MU/gの急性毒性が検出された。また、9個体の筋肉、7個体の肝臓、18個体の肝臓を除く内臓は、遅延性毒性(0.5~1.0 MU/g)を示した。供試したハコフグ129個体のうち、肝臓を除く内臓からの毒性の検出率が28.7%と最も高く、次いで筋肉(10.9%)、肝臓(6.2%)の順であった。同様に、ウミスズメ1個体の筋肉と肝臓、および4個体の肝臓を除く内臓に急性毒性(0.5~1.0 MU/g)が、2個体の肝臓を除く内臓に遅延性毒性(0.5~2.0 MU/g)認められた(Table 3)。筋肉、肝臓、肝臓を除く内臓からの毒性の検出率は、それぞれ5.6%、5.6%、33.3%で、ハコフグのパターンと類似していた。一方、両種ともに各部位の毒性に明瞭な地域差や季節変動は認められず、中毒が発生していない下関沖産でも

多くの個体が有毒であった。

事例5~7の原因魚と同時期同海域で採捕されハコフグ(それぞれ島裏島産8個体、同9個体、有川湾産16個体)の毒性調査では、有川湾産8個体(Table 2の試料番号4~8および10~12)が0.5~1.0 MU/gと低いながらも遅延性毒性を示した。アオブダイ中毒では、中毒検体からの遅延性毒の検出例があるが¹⁶⁾、毒力は0.6~0.9 MU/gと低く、また中毒に関連して行われたアオブダイの毒性スクリーニングでも、有毒個体の毒力は総じて低かった^{14), 16), 20)}。Noguchiら¹⁶⁾はアオブダイ中毒検体から遅延性の毒としてPTX様物質を分離し、このものがアオブダイ中毒の原因物質であると推定しているが、ハコフグ中毒の症例やハコフグ抽出液の毒力を考慮すると、ハコフグの遅延性毒性の本体も本物質もしくはその類縁体である可能性が高いと思われる。

九州ではハコフグの食習慣が半世紀以上あるにもかかわらず、中毒の発生は2000年以降に偏っており、本魚類は近年になって毒化し始めたものと推察される。この点は、海洋環境の変化に伴い無毒の魚類が突然毒化して起こるシガテラ¹⁵⁾に類似している。また、ハコフグ、ウミスズメともにすべての個体が毒を保有しているわけではない。したがって、ハコフグ科魚類の毒化は、シガテラ毒魚¹⁵⁾やアオブダイ²⁰⁾、TTXを持つ一般的なフグ²⁶⁾同様、食物連鎖を介する外因性のものと推察される。毒の起源生物としては、アオブダイの場合、PTX類縁体を産生する*Ostreopsis*属渦鞭毛藻が疑われている²⁰⁾。本藻は本来、熱帯ないし亜熱帯性の種で、日本では南西諸島での分布が確認されていたものであるが^{27), 28)}、近年、毒産生能を有する株が徳島県をはじめ長崎県や宮崎県沿岸にも分布することが分かってきた^{20), 29)}。したがって、ハコフグ類の毒化にも本藻の関与が疑われるが、この点については、ハコフグ類の毒本体の解明と併せて現在検討中である。

まとめ

ハコフグ中毒の実態調査を行ったところ、1990年から

2008年にかけて、長崎県^{2), 8), 9)}、宮崎県^{6), 8), 9)}、鹿児島県⁴⁾、および三重県⁷⁾で、聞き取り調査から新たに判明した1件を含め、計9事例の発生が確認された。中毒患者は計13名で、うち1名が死亡していた^{4)~9)}。2事例については、中毒検体の形態的な特徴から原因魚種をハコフグと同定した。さらに、聞き取り調査の過程でウミスズメも原因魚種となる可能性が示唆された。一方、既報⁶⁾ではハマフグでの中毒が推察されている。いずれの事例においても、中毒症状や、喫食から発症、回復または死に至るまでの時間経過はTTXによる一般的なフグ中毒¹²⁾とは異なり、アオブダイ中毒^{13)~20)}に酷似していた。他方、西日本近海に生息するハコフグ129個体およびウミスズメ18個体の毒性を調査したところ、両種共に約4割が有毒で、喫食頻度の高い筋肉や肝臓にも毒性が認められた。その毒力は総じて低いものの、アオブダイ中毒の中毒検体¹⁶⁾と同レベルであった。以上の結果から、日本近海産ハコフグ類、特にハコフグとウミスズメは食中毒の原因となりうる食品衛生上重要警戒種であると結論した。

謝 辞

本研究を行うにあたり、聞き取り調査ならびに試料採集にご協力いただいた長崎大学名誉教授 多部田 修 博士、九州大学大学院農学研究院准教授 望岡典隆 博士、下関市立しものせき水族館海響館 土井啓行 氏、長崎県離島医療圏組合上五島病院、同五島病院、宮崎県立延岡病院、紀南病院組合立紀南病院、長崎県県民生活部、同上五島保健所、長崎市保健所、宮崎県福祉保健部、同延岡保健所、長崎県上五島水産業普及指導センター、新魚目町漁業協同組合、島浦町漁業協同組合、牟岐町業協同組合の関係者各位に謝意を表す。本研究は独立行政法人日本学術振興会科学研究費ならびに厚生労働科学研究費補助金に基づく研究成果の一部であり、関係各位に深謝する。

文 献

- 1) Boylan, D. B., Scheure, P. J. Palytoxin: A fish poison. *Science*, 155, 52-56 (1967).
- 2) Kalmazon, E., Aknin-Herrman, R., Rahamim, Y., Carmeli, S., Barenholz, Y., Zlotkin, E. Cooperative cocktail in a chemical defence mechanism of trunkfish. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 6, 971-984 (2001).
- 3) 谷 巖. "日本産フグの中毒学的研究" 帝国図書, 東京, 1945, p. 1-103.
- 4) Ueyama, S., Uchida, Y., Yamaguchi, H., Matsuda, M., Arimura, T., Fukumoto, M., Yamashita, W., Harada, R. A case of acute renal failure probably caused by boxfish poison intoxication. *Nippon Rinsho Naika Ikai Kaiho*, 7, 281-283 (1992).
- 5) 虎島保男. 遅発性フグ中毒. *長崎県医師会報*, 619, 57-58 (1997).
- 6) 矢澤省吾, 川崎沙一郎, 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例. *宮崎医学会誌*, 24, 128-131 (2000).
- 7) 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).
- 8) Kusuvara, K., Nishiura, R., Yazawa, S., Taniyama, S., Noguchi, T., Yamamoto, N., Kudou, T. Rhabdomyolysis induced by ostraciid fish poisoning. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*, 94, 750-752 (2005).
- 9) Taniyam, S. The occurrence of palytoxin-like poisoning and ciguatera in part of the main land of Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 74, 917-918 (2008).
- 10) 佐竹真幸. "第7章自然毒・A動物毒・6. シガテラ" 食品衛生検査指針理化学編 (厚生労働省監修), 日本食品衛生協会, 2005, p. 691-695.
- 11) Asakawa, M., Toyoshima, T., Ito, K., Bessho, K., Yamaguchi, C., Tsunetsugu, S., Shida, Y., Kajihara, H., Mawatari, S. F., Noguchi, T., Miyazawa, K. Paralytic toxicity in the ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertea) in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan and the isolation of tetrodotoxin as a main component of its toxin. *Toxicon*, 41, 747-753 (2003).
- 12) Noguchi, T., Ebesu, J. S. M. Puffer poisoning: Epidemiology and treatment. *J. Toxicol-Toxin Rev.*, 20, 1-10 (2001).
- 13) 天野昌彦, 今村諒道, 川西令子, 横野浩一, 菊池 悟, 水野信彦, 佐伯 進, 花房英機, 日下孝明, 老初宗忠, 大江勝, 馬場茂明, 鹿住 敏, 藤田 博, 松木幸夫. アオブダイ肝毒によると思われる集団食中毒. *内科*, 36, 662-666 (1975).
- 14) Fusetani, N., Sato, S., Hashimoto, K. Occurrence of a water soluble toxin in a parrotfish (*Ypsiscarus ovisfrons*) which is probably responsible for parrotfish liver poisoning. *Toxicon*, 23, 105-112 (1985).
- 15) Watanabe, S., Morioka, E., Ooishi, A., Mori, K., Sakurai, K., Miyamoto, M., Hashimoto, K., Naito, H. Fish poisoning caused by ingesting parrot fish, is it ciguatera?. *Kyukyū Igaku*, 10, 443-449 (1986).
- 16) Noguchi, T., Hwang, D. F., Arakawa, O., Daigo, K., Sato, S., Ozaki, H., Kawai, N., Ito, M., Hashimoto, K. Palytoxin as the causative agent in the parrotfish poisoning. *Progress in Venom and Toxin Research*. Gopalakrishnakone, P., Tan, C. K. eds., National University of Singapore, Kent Ridge, Singapore, 1987, p. 325-335.
- 17) Ichida, S., Tawada, E., Watanabe, Y., Minami, S., Horiba, M. Two case of rhabdomyolysis induced by parrotfish liver poisoning. *Jin to Toseki*, 25, 541-544 (1988).
- 18) Okano, H., Masuoka, H., Kamei, S., Seko, T., Koyabu, S., Tsuneoka, K., Tamai, T., Ueda, K., Nakazawa, S., Sugawa, M., Suzuki, H., Watanabe, M., Yatani, R., Nakano, T. Rhabdomyolysis and myocardial damage induced by palytoxin, a toxin of blue humphead parrotfish. *Internal Medicine*, 37, 330-333 (1998).
- 19) Yoshimine, K., S. Orita, Okada, S., Sonoda, K. Two case of parrotfish poisoning with rhabdomyolysis. *J. Jap. Soc. Int. Med.*, 90, 1339-1341 (2001).
- 20) Taniyama, S., Arakawa, O., Terada, M., Nishio, S., Takatani, T., Mahmud, Y., Noguchi, T. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovisfrons*. *Toxicon*, 42, 29-33 (2003).

- 21) Chen, J. B., Pan, H. H., Hwang, D. F. Myoglobinuric acute renal failure following cardioversion in a boxfish poisoning patient. *Nephrol Dial Transplant*, 16, 1700-1701 (2001).
- 22) Muhmud, Y., Arakawa, O., Noguchi, T. An epidemic survey on freshwater puffer poisoning in Bangladesh. *J. Natural Toxins*, 9, 319-326 (2000).
- 23) Taniyama, S., Mahmud, Y., Tanu, M. B., Takatani, T., Arakawa, O., Noguchi, T. Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer *Tetraodon* sp. *Toxicon*, 39, 725-727 (2001).
- 24) 児玉正昭, 佐藤 繁. “第7章自然毒・A 動物毒・1. フグ毒” 食品衛生検査指針理化学編 (厚生労働省監修), 日本食品衛生協会, 2005, p. 661-666.
- 25) 大島泰克. “第7章自然毒・A 動物毒・3. 麻痺性貝毒” 食品衛生検査指針理化学編 (厚生労働省監修), 日本食品衛生協会, 2005, p. 673-680.
- 26) Miyazawa, K., Noguchi, T. Distribution and origin of tetrodotoxin. *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, 20, 11-33 (2001).
- 27) Fukuyo, Y. Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 47, 967-978 (1981).
- 28) Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kan, Y., Yasumoto, T. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 5389-5390 (1995).
- 29) Sagara, T. Profiles of palytoxin-like compounds from the dinoflagellate *Ostreopsis* sp. isolated from the areas where poisonous fishes were collected. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 74, 913-914 (2008).

Neurologic Symptoms in a Dialysis Patient After Ingesting Seafood

CLINICAL PRESENTATION

A 60-year-old man with end-stage renal disease caused by diabetic nephropathy treated with hemodialysis for 14 months was admitted to our hospital reporting neurologic symptoms. The prior evening, he ingested 8 gastropods (whelks) harvested from the sea of northern Japan (Fig 1) that were cooked in their own shells. He went to bed as usual, but awoke 6 hours later with nausea, drowsiness, dyspnea, limb weakness, facial palsy, and diplopia. He could not raise his head or get out of bed. His medications include antiplatelet and anticoagulant agents, isosorbide mononitrate for angina pectoris, and 1α -hydroxyvitamin D_3 for secondary hyperparathyroidism. On presentation, he was afebrile with blood pressure of 149/92 mm Hg and pulse rate of 70 beats/min. Barre and Mingazzini signs were positive, and his mouth opened only 15 mm. There was no neck stiffness, muscle atrophy, or involuntary movements, and Babinski reflex was not observed. Deep tendon reflexes were diminished in the lower extremities. Blood work showed the following values: creatine kinase, 116 U/L; C-reactive protein, 0.10 mg/dL (1.0 mg/L); and white blood cell count, $6.2 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($6.2 \times 10^9/\text{L}$). Computed tomography and magnetic resonance imaging of the head showed only chronic small ischemic changes. Although his friends who did not have end-stage renal disease had ingested the same gastropods, they did not experience similar symptoms.

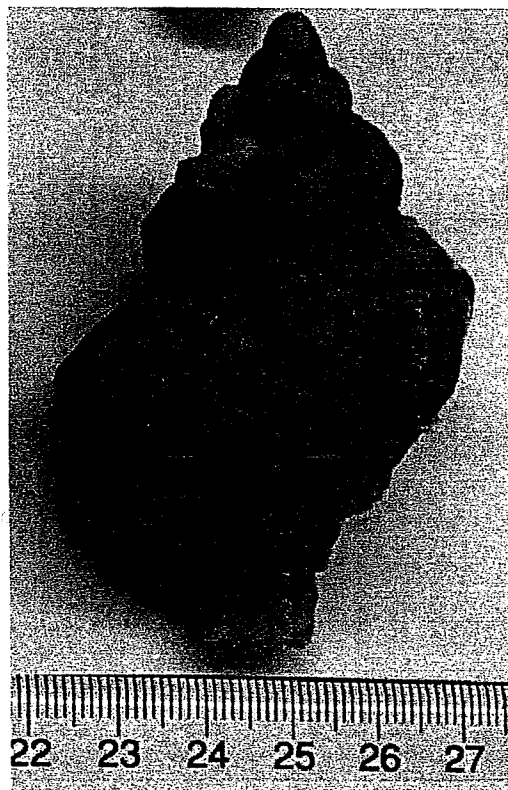


Figure 1. *Neptunea arthritica*. The gastropod in this photograph was purchased at the same time as the gastropods that the patient ingested.

- What is the most likely diagnosis?
- How might the diagnosis be confirmed?
- What treatment might be initiated?

DISCUSSION

■ What is the most likely diagnosis?

After ingesting gastropods 16 hours before, tetramine poisoning was suspected. Tetramine (tetramethylammonium ion) is a natural neurotoxin that exists in the salivary gland of gastropods of the family Buccinidae, *Neptunea arthritica* and *Neptunea inter-sculpta*, living in cold temperate seas.¹ It is a quaternary ammonium compound that has an acetylcholine-like structure that stimulates both nicotinic and muscarinic receptors.² Tetramine poisoning occurs by consumption of these gastropods without removal of the salivary gland. A variety of symptoms, such as headache, dizziness, seasickness, visual impairment, and, in severe cases, motor paralysis and respiratory arrest, are observed. Symptoms of tetramine poisoning typically appear within 30 minutes of gastropod ingestion. However, in this case, symptoms of poisoning were not observed until 12 hours after gastropod ingestion (Fig 2). Tetramine absorption may have been delayed because of diabetic gastroparesis, resulting in the increased time between ingestion and the appearance of toxicity.

■ How might the diagnosis be confirmed?

Although measurement of plasma tetramine has not been reported previously, we applied the method of Kawashima et al³ for determining tetramine concentration in gas-

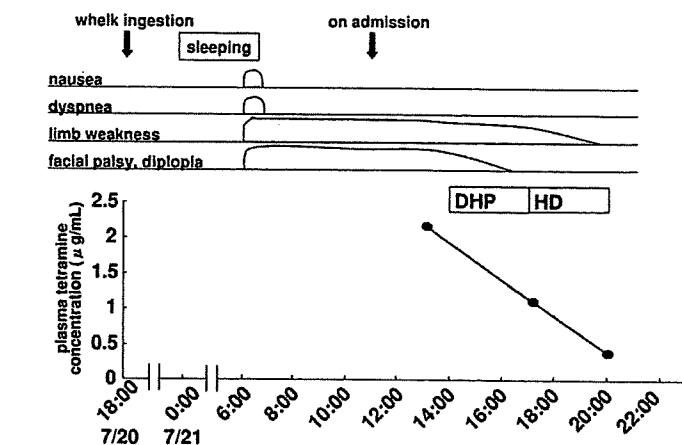


Figure 2. Plasma tetramine concentration and clinical course of the patient.

tropod tissues. When the patient arrived at the hospital, plasma tetramine concentration was 2.16 µg/mL. Measurement of plasma tetramine is feasible and useful for the diagnosis of tetramine poisoning.

■ What treatment might be initiated?

Without definitively identifying the toxic agent on presentation, hemoperfusion using an activated charcoal column was performed, followed by hemodialysis (Fig 2). After hemoperfusion, dysarthria improved and the patient was able to maintain a sitting position. After hemodialysis, he was able to stand without assistance.

There is no specific therapy for tetramine poisoning. In a healthy individual, tetramine is excreted rapidly in urine and symptoms commonly disappear within a few hours.² Excretion of tetramine may be delayed, and symptoms of tetramine poisoning sometimes may be serious and prolonged in

patients with decreased kidney function because more than 95% of this poison is excreted through the kidney.⁴ Kidney failure in our patient resulted in severe limb weakness and diplopia for 8 hours until hemoperfusion was started. Intensive hemodialysis may promote rapid improvement of tetramine poisoning symptoms.

When the patient arrived at the hospital, plasma tetramine concentration was 2.16 µg/mL. After direct hemoperfusion and hemodialysis, plasma tetramine concentration had decreased to 1.11 µg/mL and 0.38 µg/mL, respectively. Tetramethylammonium ion has a molecular weight of 74 Da and thus low plasma protein binding,⁵ indicating that plasma tetramine could be removed sufficiently by means of hemodialysis. In anuric patients, emergent hemodialysis may be essential.

FINAL DIAGNOSIS

Tetramine poisoning.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Yusuke Mashima, MD, Masato Hoshikawa, MD, Hitoshi Sato, MD, Kazunobu Ichikawa, MD, and Ami Ikeda, MD, as colleagues of clinical practice.

REFERENCES

1. Koyama K, Yamashita M, Kato I, Takaiwa K, Naito H, Hashimoto K: Case report of *Neptunea* poisoning [Japanese]. *Jpn J Acute Med* 10:371-375, 1986
2. Anthoni U, Bohlin L, Larsen C, et al: Tetramine: Occurrence in marine organisms and pharmacology. *Toxicol* 27:707-716, 1989
3. Kawashima Y, Nagashima Y, Shiomi K: Determination of tetramine in marine gastropods by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *Toxicol* 44:185-191, 2004
4. Neef C, Oosting R, Meijer DK: Structure-pharmacokinetics relationship of quaternary ammonium compounds. Elimination and distribution characteristics. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 328:103-110, 1984
5. Neef C, Meijer DK: Structure-pharmacokinetics relationship of quaternary ammonium compounds. Correlation of physicochemical and pharmacokinetic parameters. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 328:111-118, 1984

CASE PROVIDED AND AUTHORED BY
Satoshi Takasaki, MD,¹ Tsuneo Konta, MD,¹ Kazuo Shiomi, PhD,² and Isao Kubota, MD,¹ ¹Depart-

ment of Cardiology, Pulmonology, and Nephrology, Yamagata University School of Medicine, Yamagata; and ²Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan.

Address correspondence to Satoshi Takasaki, MD, Department of Cardiology, Pulmonology, and Nephrology, Yamagata University School of Medicine, Yamagata, 2-2-2 Iida-Nishi, Yamagata 990-9585, Japan. E-mail: stakasak@med.id.yamagata-u.ac.jp

© 2009 by the National Kidney Foundation, Inc.

doi:10.1053/j.ajkd.2009.05.021

SUPPORT: None.

FINANCIAL DISCLOSURE: None.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicol

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol

Maturation-associated changes in toxicity of the pufferfish *Takifugu poecilonotus*

Koichi Ikeda^a, Yu Emoto^a, Ryuhei Tatsuno^a, Jun Jie Wang^a, Laymithuna Ngy^c, Shigeto Taniyama^a, Tomohiro Takatani^b, Osamu Arakawa^{b,*}

^a Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, Japan

^b Faculty of Fisheries, Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, Japan

^c Department of Environmental Impact Assessment, Ministry of Environment, Phnom Penh, Cambodia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 May 2009

Received in revised form 4 August 2009

Accepted 4 August 2009

Available online 11 August 2009

Keywords:

Pufferfish

Takifugu poecilonotus

Tetrodotoxin

Enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA)

Gonadosomatic index (GSI)

Maturation

ABSTRACT

From October 2006 to December 2007, wild specimens of the pufferfish *Takifugu poecilonotus* (93 females, 45 males) were collected from the Ariake Sea. Tissue toxicity was examined by mouse bioassay, and tetrodotoxin (TTX) content in the blood plasma by enzyme-linked immunosorbent assay. The relationship between toxicity and maturation was investigated based on changes in the gonadosomatic index: December–March in females and November–March in males, the 'maturation period'; April, 'just after spawning'; and the other months, the 'ordinary period'. Toxicity of both sexes was high throughout the year, but sharply declined in April. In all tissues examined (skin, liver, and ovary) other than testis, toxicity exceeded 1000 MU/g or 10,000 MU/individual in many individuals. Seasonal profiles of tissue toxicity differed markedly between sexes. In females, liver toxicity was high during the ordinary period, and ovary toxicity was high during the maturation period. In males, little maturation-associated change in the toxin distribution was observed. Plasma TTX levels were similar between the sexes (1.59–15.1 MU/ml), and fluctuated largely throughout the year without corresponding changes in tissue toxicity. The percentage of TTX binding to high molecular-weight substances in the plasma varied in association with maturation; the binding ratio fluctuated at relatively low levels during the ordinary period, and stabilized at a high level during the maturation period.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Many marine pufferfish of the family Tetraodontidae possess a potent neurotoxin, tetrodotoxin (TTX). In toxic species inhabiting Japanese coastal waters, the liver and ovary usually have strong toxicity, whereas the muscle and testis are weakly toxic or non-toxic (Noguchi and Arakawa, 2008), indicating sexual differences in pufferfish toxicity, and that maturation may affect toxin kinetics in the pufferfish body. TTX is originally produced by marine bacteria and distributes over a wide variety of animals,

including pufferfish, gobies, blue-ringed octopuses, carnivorous gastropods, starfish, toxic crabs, horseshoe crabs, flat worms, and ribbon worms (Miyazawa and Noguchi, 2001). TTX is exogenous in pufferfish and is derived from the food chain that consists of these TTX-bearers (Noguchi and Arakawa, 2008). The transfer, accumulation, and elimination mechanisms of TTX taken up into the pufferfish body via food organisms remain unclear. Various types of toxin administration experiments performed with pufferfish have revealed important information on uptake and inter-tissue transfer of TTX in the pufferfish body (Matsui et al., 1981, Watabe et al., 1987, Yamamori et al., 2004, Honda et al., 2005, Kono et al., 2008, Ikeda et al., 2009). In these experiments, however, non-matured, non-toxic cultured fish were used,

* Corresponding author. Tel./fax: +81 95 819 2844.

E-mail address: arakawa@nagasaki-u.ac.jp (O. Arakawa).

and the influence of aging or maturation was not considered. Although TTX-binding proteins have been found in the blood plasma of toxic pufferfish (Matsui et al., 2000; Yotsu-Yamashita et al., 2001), and may be involved in the transportation mechanism, little information is available on their distribution, seasonal variation, or functions other than TTX binding. In our studies to clarify the roles of TTX-binding high molecular-weight substances in the accumulation mechanisms of TTX in pufferfish and the effect of maturation, we collected the pufferfish *Takifugu poecilonotus* periodically from the Ariake Sea and investigated maturation-associated changes in tissue toxicity, as well as the amount and forms of TTX in the blood plasma.

2. Materials and methods

2.1. Pufferfish specimens

From October 2006 to December 2007, wild specimens of the pufferfish *T. poecilonotus* (93 females and 45 males) (Table 1) were collected from the Ariake Sea (off Minamishimabara, Nagasaki Prefecture, Japan), and transported live to the laboratory of Nagasaki University. After blood was withdrawn from the portal vein using a syringe pre-coated with sodium heparin, each fish was dissected to obtain the skin, liver, and gonads (ovary/testis), which were then extracted with 0.1% acetic acid according to the official guidelines of the Japan Food Hygiene Association (2005), and analyzed with a toxicity assay using mice.

2.2. Assessment of gonadosomatic index (GSI)

GSI (%) of each fish was calculated from its gonad weight (GW) and body weight (BW) using the following equation: $GSI = 100 \times GW/BW$.

Table 1
Specification of *T. poecilonotus* specimens.

Collection month	Sex	Number of specimens	Mean body weight (g)	Mean tissue weight		
				Skin (g)	Liver (g)	Gonad (g)
2006 Oct	♀	1	198	24	12	2.0
	♂	3	211	24	10	2.2
Nov	♀	3	273	30	16	4.0
	♂	3	227	26	14	13
Dec	♀	2	176	21	9.2	4.8
	♂	3	210	21	9.4	21
2007 Jan	♀	8	278	31	16	19
	♂	3	248	25	8.8	31
Feb	♀	10	267	29	13	31
	♂	6	280	32	15	34
Mar	♀	8	243	22	9.2	39
	♂	3	126	14	3.9	13
Apr	♀	12	121	15	4.1	3.3
	♂	5	113	16	3.4	4.1
Jun	♀	17	124	15	6.2	1.1
	♂	2	143	18	4.5	1.4
Aug	♀	7	156	17	6.5	1.2
	♂	3	155	19	4.7	0.9
Sep	♀	8	121	13	4.4	0.9
	♂	4	116	13	6.5	0.5
Oct	♀	11	146	16	8.7	1.4
	♂	5	123	15	6.6	1.3
Dec	♀	6	194	22	8.9	3.7
	♂	5	166	18	5.3	8.5

2.3. Toxicity assay

Toxicity of each tissue extract from *T. poecilonotus* was determined by a mouse bioassay according to the official guidelines of the Japan Food Hygiene Association (2005). Lethal potency was expressed in mouse units (MU), where 1 MU was defined as the amount of toxin required to kill a 20-g male ddY strain mouse within 30 min after intraperitoneal administration.

2.4. Quantification of TTX in blood plasma

The blood collected from each fish was centrifuged at 6000 g for 7 min (4 °C), and the blood plasma obtained (200 µl) was ultrafiltered through a Microcon YM-50 membrane (cut-off 50,000 Da, Amicon). Phosphate buffered saline (10 mM, 200 µl) was added to the residue, and the mixture was ultrafiltered again through the same membrane. The operation was repeated one more time. The combined supernatant (low molecular-weight fraction) and the residue (high molecular-weight fraction) contain free TTX molecules (designated f-TTX) and the TTX molecules binding to high molecular-weight substances (designated b-TTX), respectively (Matsui et al., 2000). The low molecular-weight fraction was directly submitted to an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the amount of f-TTX. To cut the binding between TTX and high molecular-weight substances, 0.1% acetic acid (400 µl) was added to the high molecular-weight fraction (Yamamoto, 2002), and then the mixture was submitted to ELISA to quantify the amount of b-TTX. Preliminary experiments demonstrated that 0.1% acetic acid or TTX-binding substances in the high molecular-weight fraction did not affect the ELISA results (data not shown).