

Fig. 5. Reactions of agaritine and agaritine-COOH with  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT). (A) Changes in the UV spectrum of agaritine during the enzymatic reaction. In the presence of sodium glyoxylate, agaritine was reacted with  $\gamma$ -GT and UV spectra were monitored at intervals. Sodium glyoxylate trapped the free hydrazine which was produced by the enzymatic reaction. (B) Changes in the UV spectrum of agaritine-COOH during the enzymatic reaction.

agaritine contents in blood fluids. The higher values of  $C_{max}$  and AUC in Walton's report may have been based on agaritine metabolites. Another possible explanation is that the differences may depend on mouse strains. We have measured intact agaritine in blood and urine and analyzed the pharmacokinetic parameters for the first time. Assuming that the volume of mouse blood is 2 ml, the absorption ratio of agaritine is 0.053%. Agaritine contents did not change in the absence and presence of glucuronidase, indicating that there was no conjugated agaritine in the blood and urine (data not shown).

We next investigated agaritine metabolites. Agaritine is believed to be metabolized to free hydrazine HMPH by  $\gamma$ -GT *in vitro*. However, HMPH was not detected in the plasma and urine. HPLC analysis of agaritine-fed mice

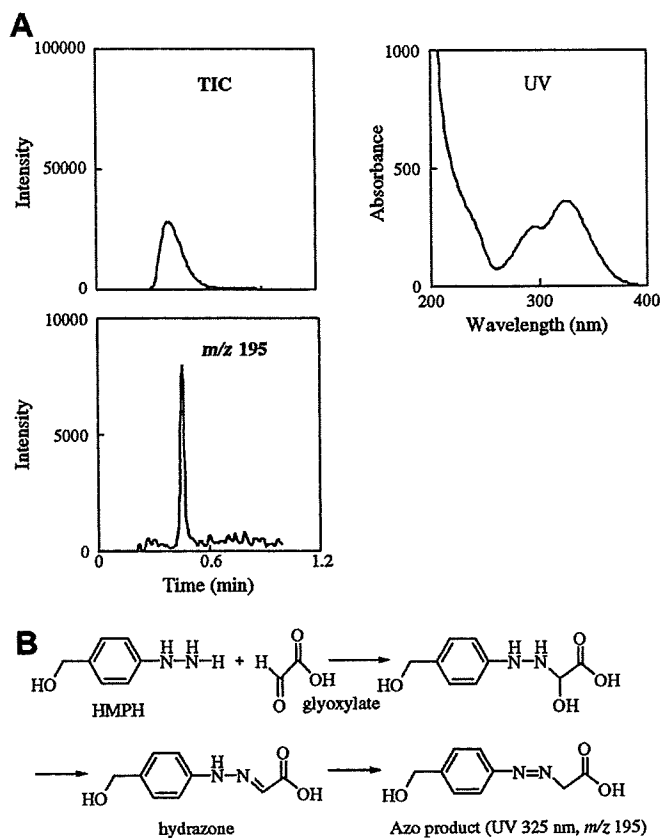


Fig. 6. Reaction product of agaritine with  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) in the presence of glyoxylate. Flow injection analysis was carried out. (A) TIC of reaction product (left), UV spectrum of the peak (right), and mass chromatogram at an  $m/z$  of 195 of reaction product (bottom). (B) Reaction scheme. HMPH was generated from agaritine by  $\gamma$ -GT and then trapped by glyoxylate to form hydrazone followed by an azo compound that showed UV absorption at 325 nm.

urine revealed that three unidentified metabolites formed, none of which was HMPH (Walton et al., 2000). In the presence of  $\gamma$ -GT, agaritine was thought to be metabolized to HMPH *in vitro*, which trapped by sodium glyoxylate. However, there is no evidence as to how agaritine is metabolized *in vivo* and what compounds are produced. We analyzed the plasma and urine samples taken from agaritine-administered mice using LC/MS/MS coupled with PDA, and found that only one metabolite of agaritine appeared in 20 min to 180 min in the plasma (Fig. 3C) and within 12 h in the urine (Fig. 3E) after administration. Both have the same UV spectra. Since they were only trace amounts of the product, a complete identification could not be made. However, typical  $^1\text{H}$  NMR signals related to benzene-ring ( $\delta$  6.7 and 7.0 ppm) disappeared. Even partial structures of agaritine would be no longer kept. Agaritine metabolites might tightly bind to DNA and induce DNA damage though free radical reactions and finally complicated products may be excreted.

Agaritine is a phenylhydrazine derivative that can produce free radicals. This compound may affect oxidative stress to mice administered with agaritine. Thus, the oxidative stress marker 8-OHdG was measured in the mouse urine.

Surprisingly, 8-OHdG levels in the urine of agaritine-fed mice nearly tripled in the 12 h after administration. After a transient drop in 8-OHdG to the basal level over the next 48 h, the 8-OHdG level increased again and stayed high for 11 days (Fig. 4). Although another marker MDA showed no difference between the control and agaritine-administration groups, a single administration of agaritine induced DNA damage through OH radicals for 11 days. Formation of 8-[4-(hydroxymethyl)phenyl]deoxyadenosine (8-HMP-dAdo) or 8-[4-(hydroxymethyl)phenyl]deoxyguanosine (8-HMP-dGuo) was reported in a simple *in vitro* system containing DNA bases and HMBD (Hiramoto et al., 1995). Therefore, we investigated these DNA adducts and was not able to detect 8-HMP-dAdo and 8-HMP-dGuo in mouse urine. Although phenyl radicals produced from HMBD might react with DNA base *in vivo*, concomitant OH radicals could mainly react with DNA base (Hiramoto et al., 1995; Gannett et al., 1997; Lawson et al., 1995).

Walton et al. reported that radioactivity was detected in mouse liver and kidney 120 h after a single administration of  $^{14}\text{C}$ -agaritine (25 mg/kg). Together with our results, this suggests that agaritine metabolites may play a role in oxidative damage to DNA.

Although the fate of agaritine after its administration *in vivo* remains unknown,  $\gamma$ -GT in *in vitro* is believed to convert agaritine into free hydrazine HMPH in an indirect manner. We confirmed that agaritine is degraded to a product that shows UV absorption at 325 nm in the presence of sodium glyoxylate, possibly an adduct of HMPH, within 180 min as mentioned previously elsewhere (Gigliotti and Levenberg, 1964; Ross et al., 1982; Walton et al., 2000). This UV absorption at 325 nm was not observed in  $\gamma$ -GT and sodium glyoxylate or in  $\gamma$ -GT and agaritine or in sodium glyoxylate and agaritine. In fact the absorption is attributable to agaritine. In addition, this low-molecular metabolite has two distinct absorption peaks at 292 and 325 nm. In a further study, we attempted to analyze this product using LC/MS and revealed that HMPH is indeed generated from agaritine. HMPH and/or HMBD converted from HMPH by liver drug-metabolizing enzymes may be potent carcinogens. Agaritine is a mutagenic compound. Kidney homogenates enhanced this mutagenicity, whereas liver microsomes alone did not, due to the low  $\gamma$ -GT activity of liver. On the other hand, the treatment of agaritine with kidney homogenate followed by liver homogenate strongly augmented its mutagenicity (Walton et al., 1997).

We also have data that completely degraded agaritine with heat in MilliQ water still retains weak mutagenicity and that *Agaricus blazei* Muril mushrooms show stronger mutagenicity than agaritine alone (unpublished data). Agaritine and unstable free hydrazines such as HMPH probably are degraded by heat. These results indicate that another mutagenic compound may be present in *Agaricus* mushrooms. One of which was agaritine-COOH present in *Agaricus* mushrooms (agaritine 1350  $\mu\text{g/g}$  dry), agaritine-COOH 24.8  $\mu\text{g/g}$  dry in our data vs. agaritine-COOH

42  $\mu\text{g/g}$  wet in (Chauhan et al., 1985). This compound also reacts with  $\gamma$ -GT as agaritine does as we already showed in the present study. Therefore, the mutagenicities of *Agaricus* mushrooms are attributed to agaritine and agaritine-COOH, both of which can produce free hydrazines, leading to the formation of free radicals.

In summary, agaritine was absorbed immediately after agaritine administration and disappeared in 100 min from mouse plasma. It was excreted within 12 h in urine. DNA damage occurred for 11 days after a single administration of agaritine. Our findings may assist with evaluating the carcinogenic effects of *Agaricus* mushrooms in humans.

### Acknowledgement

This work was supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

### References

- Chauhan, Y., Nagel, D., Gross, M., Cerny, R., Toth, B., 1985. Isolation of N2-[gamma-L-(+)-glutamyl]-4-carboxyphenylhydrazine in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Agric. Food Chem.* 33, 817–820.
- Ferrali, M., Signorini, C., Sugherini, L., Pompella, A., Lodovici, M., Caciotti, B., Ciccoli, L., Comporti, M., 1997. Release of free, redox-active iron in the liver and DNA oxidative damage following phenylhydrazine intoxication. *Biochem. Pharmacol.* 53, 1743–1751.
- Gannett, P.M., Shi, X., Lawson, T., Kolar, C., Toth, B., 1997. Aryl radical formation during the metabolism of arylhydrazines by microsomes. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1372–1377.
- Gigliotti, H.J., Levenberg, B., 1964. Isolation and structure of agaritine, a gamma-glutamyl-substituted arylhydrazine derivative from Agaricaceae. *J. Biol. Chem.* 239, 2267–2273.
- Hashida, C., Hayashi, K., Jie, L., Haga, S., Sakurai, M., Shimizu, H., 1990. Quantities of agaritine in mushrooms (*Agaricus bisporus*) and the carcinogenicity of mushroom methanol extracts on the mouse bladder epithelium. *Nippon. Koshu. Eisei. Zasshi.* 37, 400–405.
- Hiramoto, K., Kaku, M., Sueyoshi, A., Fujise, M., Kikugawa, K., 1995. DNA base and deoxyribose modification by the carbon-centered radicals generated from 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium salt, a carcinogen in mushroom. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 356–362.
- Hiramoto, K., Kaku, M., Kato, T., Kikugawa, K., 1995. DNA strand breaking by the carbon-centered radicals generated from 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium salt, a carcinogen in mushroom *Agaricus bisporus*. *Chemico-Biol. Interact.* 94, 21–36.
- Hoesch, L., Datta, S., 1987. Novel synthesis of agaritine, a 4-hydrazinobenzyl-alcohol derivatives occurring in Agaricaceae. *Helv. Chim. Acta.* 70, 1261–1267.
- Kelly, R.B., Daniels, E.G., Hinman, J.W., 1962. Agaritine: isolation, degradation, and synthesis. *J. Chem. Soc.* 27, 3229–3231.
- Kondo, K., Watanabe, A., Iwanaga, Y., Abe, I., Tanaka, H., Nagaoka, M.H., Akiyama, H., Maitani, T., 2006a. Analysis of agaritine in mushrooms and in agaritine-administered mice using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 834, 55–61.
- Kondo, K., Watanabe, A., Iwanaga, Y., Abe, I., Tanaka, H., Nagaoka, M.H., Akiyama, H., Maitani, T., 2006b. Determination of genotoxic phenylhydrazine agaritine in mushrooms using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 23, 1179–1186.
- Lawson, T., Gannett, P.M., Yau, W.-M., Dalal, N.S., Toth, B., 1995. Different patterns of mutagenicity of arenediazonium ions in V79 cells and *Salmonella typhimurium* TA102: evidence for different mechanisms of action. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2627–2635.

- Ross, A.E., Nagel, D.L., Toth, B., 1982. Evidence for the occurrence and formation of diazonium ions in the *Agaricus bisporus* mushroom and its extracts. *J. Agric. Food. Chem.* 30, 521–525.
- Ross, A.E., Nagel, D.L., Toth, B., 1982. Occurrence, stability and decomposition of beta-*N* [gamma-L(+)-glutamyl]-4-hydroxymethylphenylhydrazine (agaritine) from the mushroom *Agaricus bisporus*. *Food Chem. Toxicol.* 20, 903–907.
- Singh, R., Farmer, P.B., 2006. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis* 27, 178–196.
- Toth, B., Erickson, J., 1986. Cancer induction in mice by feeding of the uncooked cultivated mushroom of commerce *Agaricus bisporus*. *Cancer Res.* 46, 4007–4011.
- Toth, B., Nagel, D., 1981. Studies of the tumorigenic potential of 4-substituted phenylhydrazines by the subcutaneous route. *J. Toxicol. Environ. Health* 8, 1–9.
- Toth, B., Nagel, D., Patil, K., Erickson, J., Antonson, K., 1978. Tumor induction with the *N'*-acetyl derivative of 4-hydroxymethyl-phenylhydrazine, a metabolite of agaritine of *Agaricus bisporus*. *Cancer Res.* 38, 177–180.
- Toth, B., Patil, K., Jae, H.S., 1981. Carcinogenesis of 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium ion (tetrafluoroborate) of *Agaricus bisporus*. *Cancer Res.* 41, 2444–2449.
- Toth, B., Erickson, J., Gannett, P.M., Patil, K., 1997. Carcinogenesis by the cultivated baked *Agaricus bisporus* mushroom in mice. *Oncol. Rep.* 4, 913–936.
- Toth, B., Gannett, P., Visek, W.J., Patil, K., 1998. Carcinogenesis studies with the lyophilized mushroom *Agaricus bisporus* in mice. *In Vivo* 12, 239–244.
- von Wright, A., Knutinen, J., Lindroth, S., Pellinen, M., Winden, K.-G., Seppa, E.L., 1982. The mutagenicity of some edible mushrooms in the Ames test. *Food Chem. Toxicol.* 20, 265–267.
- Wallcave, R., Nagel, D.L., Raha, C.R., Hwan-Soo, J., Bronczyk, S., Kupper, R., Toth, B., 1979. An improved synthesis of agaritine. *J. Org. Chem.* 44, 3752–3755.
- Walton, K., Coombs, M.M., Walker, R., Ioannides, C., 1997. Bioactivation of mushroom hydrazines to mutagenic products by mammalian and fungal enzymes. *Mutat. Res.* 381, 131–139.
- Walton, K., Coombs, M.M., Catterall, F.S., Walker, R., Ioannides, C., 1997. Bioactivation of the mushroom hydrazine, agaritine, to intermediates that bind covalently to proteins and induce mutations in the Ames test. *Carcinogenesis* 18, 1603–1608.
- Walton, K., Coombs, M.M., King, L.J., Walker, R., Ioannides, C., 2000. Fate of the mushroom hydrazine agaritine in the rat and mouse. *Nutr. Cancer* 37, 55–64.

## ノート

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

(平成 20 年 8 月 22 日受理)

谷山茂人<sup>1</sup> 諫見悠太<sup>2</sup> 松本拓也<sup>3</sup> 長島裕二<sup>3</sup>  
高谷智裕<sup>2</sup> 荒川 修<sup>2,\*</sup>Toxicity and Toxin Profile of Tetrodotoxin Detected in the Scavenging  
Gastropod *Nassarius (Alectrion) glans* "Kinshibai"Shigeto TANIYAMA<sup>1</sup>, Yuta ISAMI<sup>2</sup>, Takuya MATSUMOTO<sup>3</sup>, Yuji NAGASHIMA<sup>3</sup>,  
Tomohiro TAKATANI<sup>2</sup>, and Osamu ARAKAWA<sup>2,\*</sup><sup>1</sup> Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University:  
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan;<sup>2</sup> Faculty of Fisheries, Nagasaki University: 1-14 Bunkyo-machi,  
Nagasaki 852-8521, Japan;<sup>3</sup> Department of Food Science and Technology, Tokyo University  
of Marine Science and Technology: 4-5-7 Konan,  
Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan; \*Corresponding author

From September 2007 to January 2008, a total of 66 specimens of 7 gastropod species, *Nassarius (Alectrion) glans* ( $n=22$ ), *Bufo rana* ( $n=11$ ), *Ficus subintermedia* ( $n=10$ ), *Stellaria (Onustus) exutus* ( $n=8$ ), *Tonna luteostoma* ( $n=7$ ), *Hemifusus tuba* ( $n=4$ ) and *Semicassis bisulcata persimilis* ( $n=4$ ), were collected from Tachibana Bay, Nagasaki Prefecture, Japan, and their toxicity was determined by mouse bioassay. Among the gastropods tested, all *N. glans* specimens were toxic, whereas no other species showed toxicity of more than 5 MU/g. The toxicity scores of *N. glans* were very high: 48–2,730 MU/g ( $775 \pm 615$  MU/g) in the muscle, and 16–10,200 MU/g ( $1,490 \pm 2,530$  MU/g) in the viscera, including digestive gland. Interestingly, toxin was localized in the muscle in 13 of 22 specimens, where the total toxicity of the muscle ( $725-9,860$  MU/individual) was 5.9–110 times higher than that of the viscera. LC/MS analysis demonstrated that the toxin of *N. glans* consisted mainly of TTX, which accounting for about 60–65% of the total toxicity. As for the remaining toxicity, participation of 11-oxoTTX was suggested. No paralytic shellfish poison was detected in HPLC-FLD analysis.

(Received August 22, 2008)

**Key words:** 腐肉食性巻貝 scavenging gastropod; キンシバイ *Nassarius (Alectrion) glans*; 食中毒 food poisoning; 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

## 緒 言

2007年7月下旬、長崎県長崎市において、同県橋湾産の小型巻貝を喫食した60歳の女性1名が舌のしびれ、四肢の麻痺、呼吸困難などを呈した後、一時呼吸停止に陥るという極めて重篤な食中毒が発生した<sup>\*1</sup>。事件発生直後に本中毒の残品である調理済みキンシバイ *Nassarius*

(*Alectrion) glans*, および未調理のアカニシ *Rapana venosa*, テングニシ *Hemifusus tuba*, ミガキボラ *Kelletia lischkei* を入手して毒性を調べたところ、キンシバイの筋肉と中腸腺から最高4,290 MU/g に達する強い麻痺毒性が検出された。さらにLC/MS分析により毒の本体が tetrodotoxin (TTX) であることが明らかとなり、本中毒はキンシバイを原因とする TTX 中毒であると断定された。

\* 連絡先

<sup>1</sup> 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<sup>2</sup> 長崎大学水産学部: 〒852-8521 長崎県長崎市文教町1-14<sup>3</sup> 東京海洋大学海洋科学部: 〒108-8477 東京都港区港南4-5-7

<sup>\*1</sup> 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知(平成19年8月16日, 食安監発第0816003号)「ムシロガイ科キンシバイ(巻貝)での食中毒の発生事例について」, 厚生労働省。

キンシバイは、ムシロガイ科の腐肉食性小型巻貝で、相模湾以南の潮間帯ないし水深 20 m の砂泥底に生息しているが<sup>1)</sup>、日本では食習慣がなく、食中毒や毒性に関する知見もほとんどない。このような状況の下、本研究では中毒検体が採捕された橋湾における小型巻貝類の毒化状況を把握し、中毒の未然防止に資することを目的として、キンシバイを中心に同湾産小型巻貝類の毒性と毒成分について検討した。

## 実験方法

### 1. 試料

2007年9月～11月および2008年1月に長崎県橋湾 (Fig. 1) で採集されたキンシバイ (Fig. 2) 22 個体、および

2007年9月と10月に同海域で採集されたミヤコボラ *Bufonaria 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 4 個体、ウラシマガイ *Semicassis bisulcata persimilis* 4 個体を試料とした。試料は採集後、直ちに氷蔵にて長崎大学水産学部水産食品衛生学研究室に持ち帰り、 $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。供試の際、試料を流水中で急速解凍し、筋肉と中腸腺を含む内臓に分けて用いた。

### 2. 毒性試験

毒性試験は、食品衛生検査指針理化学編フグ毒検査法<sup>2)</sup> (公定法) に準じて行った。

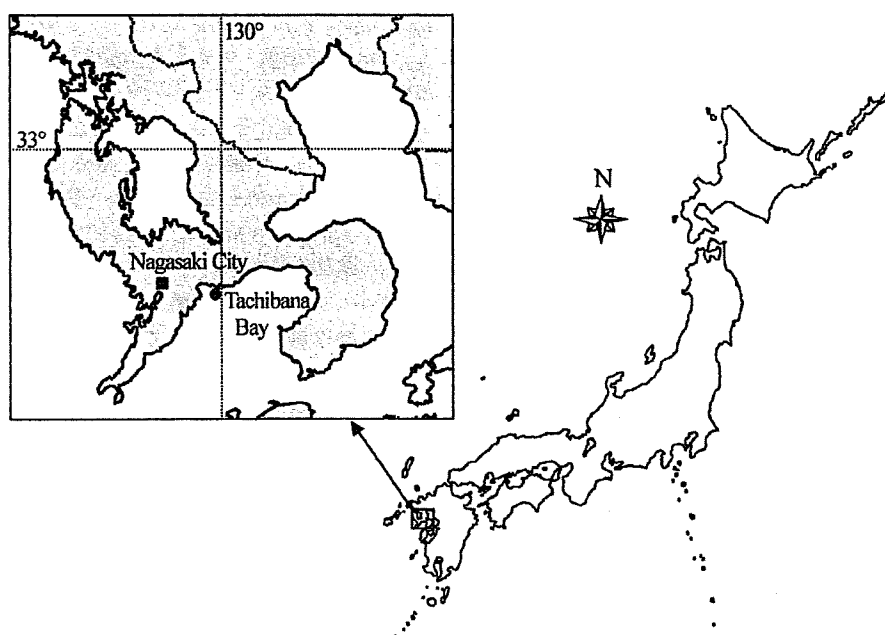


Fig. 1. Map showing Tachibana Bay (●) where gastropods specimens were collected.

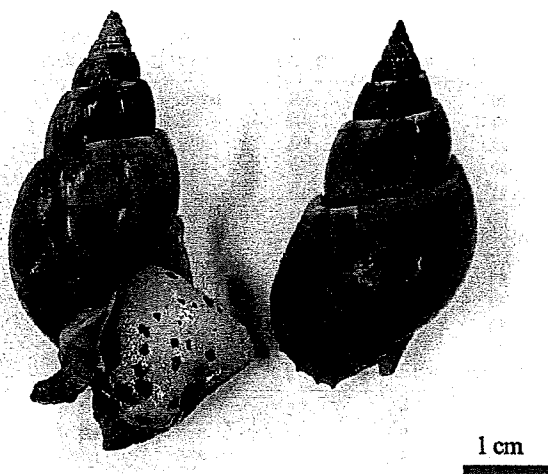


Fig. 2. *Nassarius (Alectrion) glans* "kinshibai"

### 3. 毒成分分析

毒成分の分析はTTX成分を対象としてNakashimaら<sup>3)</sup>のLC/MS法に準拠して行った。一方、麻痺性貝毒(paralytic shellfish poison; PSP)成分については、既報<sup>4),5)</sup>のHPLC蛍光分析法にて分析した。

#### 結果および考察

##### 1. 小型巻貝類の毒性

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種計44個体はいずれも無毒(5 MU/g未滿)であった。

キンシバイの部位別毒力をTable 1に示す。供試22個体の筋肉と内臓はいずれも有毒であった。毒力は総じて強く、筋肉で48~2,370 MU/g(平均毒力±標準偏差: 775±615 MU/g, 以下同様)、内臓で16~10,200 MU/g(1,490±2,530 MU/g)と測定された。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。これらの結果から、食中毒の発生した2007年7月から同年9月にかけて、橘湾ではキンシバイのみが毒化して高濃度の毒を筋肉および内臓に蓄積し、それらの毒力はその後しだいに減少したと考えられた。

日本では、1979年に静岡県静岡市で発生した肉食性巻貝ボウシュウボラ *Charonia saulia* による食中毒を契機として、同種や類似の巻貝オオナルトボラ *Tutufa lisso-stoma*、さらにはキンシバイと同じ腐肉食性巻貝であるハナムシロガイ *Zeuxis siquijorensis* やアラレガイ *Niotha clathrata* からTTXが検出された<sup>6)~9)</sup>。しかしながら、ハナムシロガイとアラレガイの毒力は低く(それぞれ可食部で3.4 MU/g, 4~35 MU/g)、日本ではこれらによる食中毒は発生していない。一方、台湾では小型巻貝による食中毒が1994年から2006年にかけて少なくとも9件発生し、46名が中毒、うち3名が死亡している<sup>10~18)</sup>。特に、2004年4月には、キンシバイにより患者6名中2名が喫食後30分で死亡するという深刻な事例が発生した<sup>16)</sup>。関連の調査では、中毒検体と同じ海域で採取したキンシバイから筋肉で1,170±557 MU/g(最高2,990 MU/g)、中腸腺で538±608 MU/g(最高2,050 MU/g)に及ぶ極めて高い毒力が検出された<sup>16)</sup>。これらの値は、台湾産有毒巻貝類(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)<sup>10~18)</sup>の中でも際立って高い。他方、中国

Table 1. Toxicity of *Nassarius (Alectrion) glans* specimens collected at Tachibana Bay, Nagasaki Prefecture

Month of collection	Specimen No.	Shell length (mm)	Shell width (mm)	Body weight (g)	Muscle			Viscera		
					Weight (g)	Toxicity*1 (MU/g)	Total toxicity*1,2 (MU/individual)	Weight (g)	Toxicity*1 (MU/g)	Total toxicity*1 (MU/individual)
Sept. 2007	1	44	20	9.8	3.9	360	1,420	1.6	5,580	9,150
	2	41	16	7.9	4.2	1,470	6,150	0.8	73	57
	3	40	21	6.7	3.1	494	1,540	1.4	36	50
	4	45	23	8.5	3.6	491	1,770	1.8	1,880	3,380
	5	43	21	8.8	4.8	591	2,860	1.4	1,980	2,830
	6	42	22	6.6	2.7	1,200	3,230	1.1	4,300	4,730
	7	42	17	8.1	4.0	1,970	7,880	1.4	285	410
	8	43	24	7.3	3.1	542	1,660	1.5	10,200	15,100
	9	40	21	7.7	4.2	2,370	9,860	1.1	119	133
	10	35	13	5.0	2.2	589	1,300	1.1	41	44
	Mean±SD	43±2.8	20±3.4	7.6±1.4	3.6±0.80	1,010±711	3,770±3,090	1.3±0.30	2,450±3,350	3,590±4,500
Oct. 2007	11	38	20	6.4	2.8	1,260	3,520	1.2	53	62
	12	38	21	6.5	2.8	48	132	1.4	154	216
	13	41	22	8.5	3.6	862	3,070	1.6	3,850	6,120
	14	35	20	5.3	3.0	245	725	0.8	72	57
	15	37	21	6.1	2.2	307	682	0.8	1,910	1,430
	16	36	22	6.0	2.7	416	1,180	1.1	61	68
	Mean±SD	38±1.9	21±0.89	6.5±1.1	2.8±0.43	523±451	1,540±1,400	1.1±0.33	1,020±1,570	1,330±2,410
Nov. 2007	17	38	23	7.0	3.2	1,250	3,980	1.4	28	38
	18	47	23	7.3	3.1	1,360	4,180	1.0	102	98
	19	41	23	8.4	3.7	288	1,070	1.6	1,890	3,080
	20	39	21	7.0	3.3	394	1,310	1.3	16	21
	Mean±SD	41±4.0	23±1.0	7.4±0.66	3.3±0.28	823±560	2,640±1,670	1.3±0.28	509±921	809±1,510
Jan. 2008	21	46	24	9.1	4.5	216	976	1.5	113	165
	22	41	22	8.1	3.9	336	1,320	1.3	17	22
	Mean	44	23	8.6	4.2	276	1,150	1.4	65	94

\*1. Toxicity scores were determined by mouse bioassay.

\*2. Bold numbers show the specimens in which total toxicity of the muscle was 5.9–110 times higher than that of viscera.

大陸では古くからムシロガイ科巻貝の食習慣があり、これに伴う食中毒も頻発している。2001年6月には、*Z. samiplicatus* の喫食により31名が中毒し、その中毒検体の可食部から  $307 \pm 192$  MU/g (最高 688 MU/g)、中腸腺から  $370 \pm 118$  MU/g (最高 532 MU/g) の毒力が検出されている<sup>19)</sup>。さらに最近では、オオハマムシロ *Z. siquijorensis* による同様の食中毒も相次いで発生しており、その可食部に数十 MU/g の毒性が認められたとの報告もある<sup>20)</sup>。

一方、今回調査したキンシバイ1個体当たりの総毒力を見ると、22個体中13個体で筋肉が内臓よりも5.9~110倍高い値を示した (Table 1)。すなわち、これらの個体では毒の86~99%が筋肉に偏在していたことになる。日本産の TTX 保有巻貝はいずれも中腸腺に毒が局在している<sup>6~9)</sup>。しかしながら、Hwangら<sup>21)</sup>は、台湾産マサメダマ *N. lineata* の部位別毒性を詳細に調べ、同一個体では筋肉の毒力 (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、筋肉に高濃度の TTX が含まれていたと報告している。さらに、台湾産キンシバイについても、85%の個体で筋肉の毒力が

中腸腺より1.7~8.3倍高かったと述べている<sup>16)</sup>。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る。

TTX 保有生物のうち、クサフグ *Takifugu niphobles* やナシフグ *T. vermicularis* では、いったん凍結後に緩慢解凍すると、有毒部位から毒が筋肉に移行することが知られているが、急速解凍ではこのような毒の移行はほとんど起こらない<sup>22~24)</sup>。今回調査したキンシバイについては、いずれも急速解凍のうえ毒性試験に供した。さらに、生きたキンシバイを用いた予備実験においても、今回と同様の毒分布 (筋肉あるいは内臓への毒の偏在) が認められている。したがって、本調査において、凍結解凍による部位間の毒の移行は、あっても無視しうるレベルと考えられた。

## 2. キンシバイの毒成分

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 ( $[M+H]^+ = 320$ ) 標品と保持時間の一致するピークが検出された。Fig. 3a および 3c にその一例を示す。また、 $m/z$  336のクロマトグラムにおいては、TTXに対する相対的な溶出位置から<sup>25), 26)</sup>、11-

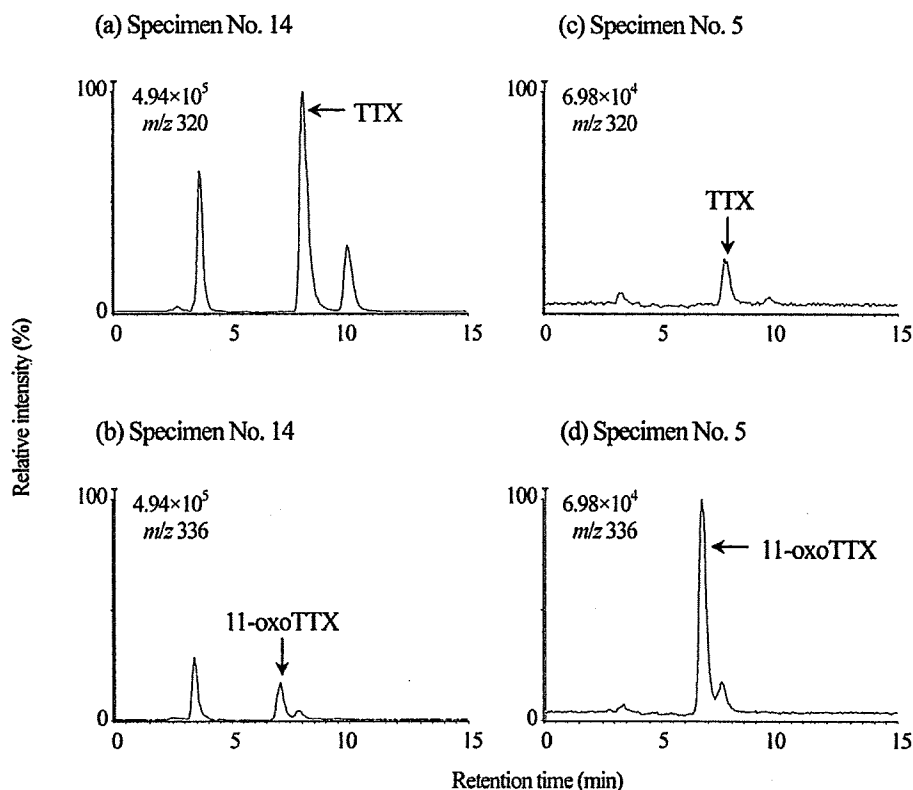


Fig. 3. LC/MS chromatograms at  $m/z$  320 (a, c) and 336 (b, d) obtained from muscles of specimen No. 14 (a, b) and No. 5 (c, d) (see Table 1 for specimen numbers).

LC/MS<sup>9)</sup> was carried out on an Alliance LC/MS system (Waters) equipped with a Zspray<sup>TM</sup> MS 2000 detector, using a reversed-phase column with 30 mmol/L heptafluorobutyric acid in 1 mmol/L ammonium acetate buffer (pH 5.0) as the mobile phase, and the flow rate was set at 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 MassLynx<sup>TM</sup> NT operating system.

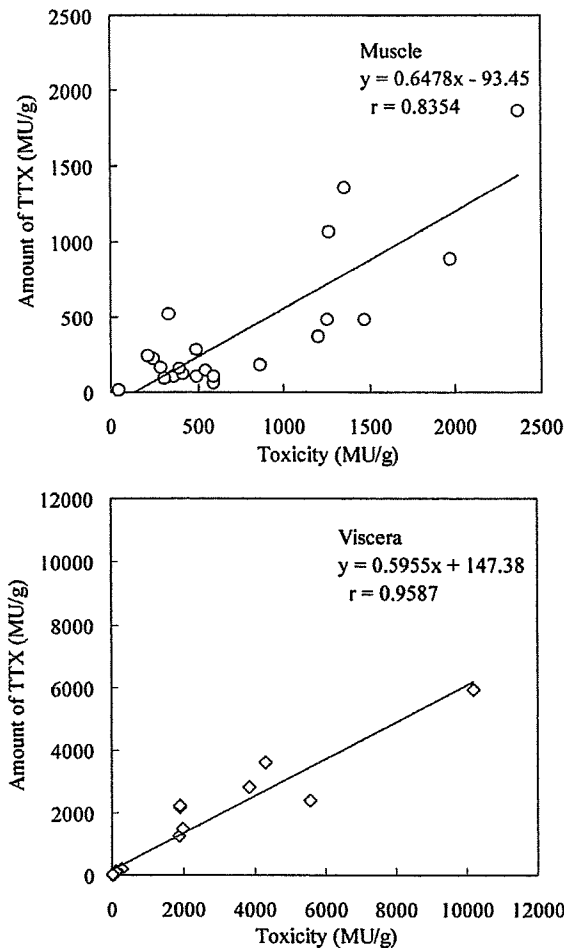


Fig. 4. Comparison between toxicity scores determined by mouse bioassay and amounts of TTX by LC/MS

oxoTTX([M+H]<sup>+</sup>=336)と推定されるピークが認められた (Fig. 3b および 3d).

‘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分かった (Fig. 4). 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。

一方、11-oxoTTXと推定される成分につき、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’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、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。したがって、前述の仮定が正しければ、TTXと11-

oxoTTXではほぼ100%マウス毒性を説明できることになる。11-oxoTTXは、ヨーロッパアカガエル *Rana temporaria* の骨格筋の細胞膜におけるNaチャンネル阻害作用がTTXの4~5倍強い<sup>27)</sup>。これに基づき、マウスに対する比毒性もTTXの4~5倍と仮定すると、TTXと11-oxoTTXの毒力の和がマウス毒性を大きく上回るという矛盾が生じるが、生物種による差や活性測定法の違いを考慮すれば、問題の比毒性がTTXの2倍以下である可能性は否定できないであろう。あるいは、2倍以上であったとしても、単位量当たりのイオン強度がTTXより十分に高ければ、当該矛盾は起こらない。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。

11-oxoTTXは、これまでコクテンフグ *Arothron nigropunctatus*、スベスベマンジュウガニ *Atergatis floridus*、プチモリ *Notopthalmus viridescens*、コガネガエル科カエル *Brachycephalus ephippium* から分離されているが<sup>25), 26), 28), 29)</sup>、巻貝からの検出例はない。したがって、キンシバイは、内臓のみならず筋肉に極めて高濃度の毒を保持することを含め、特異なTTX蓄積機構を備えているものと推察される。この点については、毒の起源や11-oxoTTXの分離・同定・定量、他のTTX関連成分の存否などと併せて現在検討中である。

ムシロガイ科巻貝のうち、日本産の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<sup>8), 9)</sup>、台湾に生息する同種の巻貝は、TTXに加え、副成分としてPSP成分である gonyautoxin 1~4 および neosaxitoxin を保有するという<sup>10)</sup>。キンシバイについても、PSPを対象としてHPLC蛍光分析を行ったが、同成分は全く検出されなかった。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<sup>16)</sup>。

#### まとめ

長崎県橋湾に生息する小型巻貝7種66個体につき、マウスに対する毒性を調べたところ、キンシバイ (22個体)のみが有毒であった。本種の毒力は、これまでに報告のある腐肉食性巻貝<sup>8)~21)</sup>の中で最も強く、内臓で10,000 MU/gを上回る個体も見られた。また、半数以上の個体で筋肉に毒が偏在しており、内臓を除去しても数個体の喫食でヒトの最小致死量 (10,000 MU)<sup>30)</sup>に達する可能性のあることが示された。一方、LC/MS分析により、キンシバイでは総毒力の6~7割をTTXが占めることが明らかとなり、さらに残余毒力の相当部分を11-oxoTTXが占めると推定された。以上の結果から、キンシバイは食品衛生上極めて危険な種であると結論した。

#### 謝 辞

本研究を行うにあたり、試料採集にご協力いただいた長崎市水産センター所長 八木基明博士ならびに長崎市たち



ばな漁業協同組合職員各位に謝意を表す。本研究は平成19年度国立大学法人長崎大学高度化推進経費ならびに平成20年度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) 土屋光太郎, 腹足綱・前鰓亜綱・新腹足綱・ムシロガイ科. 日本近海産貝類図鑑 (奥谷喬司編), 東海大学出版会 (2000), p. 439. (ISBN 4-486-01406-5)
- 2) 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.
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) Oshima, Y. Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. eds., Paris, France, UNESCO, 1995, p. 81-94.
- 6) Narita, H., Noguchi, T., Maruyama, J., Ueda, Y., Hashimoto, K., Watanabe, Y., Hida, K. Occurrence of tetrodotoxin in trumpet shellfish "boshubora" *Charonia sauliae*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**, 909-913 (1981).
- 7) Noguchi, T., Maruyama, T., Narita, H., Hashimoto, K. Occurrence of tetrodotoxin in the gastropod mollusk *Tutufa lissostoma* (frog shell). *Toxicon*, **22**, 219-226 (1984).
- 8) Narita, H., Noguchi, T., Maruyama, J., Nara, M., Hashimoto, K. Occurrence of tetrodotoxin-associated substances in gastropod "hanamushirogai" *Zeuxis siquijorensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 85-88 (1984).
- 9) Jeon, J. K., Narita, H., Nara, M., Noguchi, T., Maruyama, J., Hashimoto, K. Occurrence of tetrodotoxin in a gastropod mollusk, "araregai" *Niotha clathrata*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 2099-2102 (1984).
- 10) Hwang, D. F., Cheng, C. A., Tsai, H. T., Shih, D. Y. C., Ko, H. C., Yang, R. Z., Jeng, S. S. Identification of tetrodotoxin and paralytic shellfish toxins in marine gastropods implicated in food poisoning. *Fish. Sci.*, **61**, 657-679 (1995).
- 11) Yong, C. C., Han, K. C., Lin, T. J., Tsai, W. J., Deng, J. F. An outbreak of tetrodotoxin poisoning following gastropod mollusc consumption. *Human and Experimental Toxicology*, **14**, 446-450 (1995).
- 12) Shiu, Y. C., Lu, Y. H., Tsai, Y. Chen, S. K., Hwang, D. F. 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).
- 13) Hwang, D. F., Shiu, Y. C., Hwang, P. A., Lu, Y. H. Tetrodotoxin in gastropod (snails) implicated in food poisoning in northern Taiwan. *J. Food Prot.*, **65**, 1341-1344 (2002).
- 14) Hwang, P. A., Tsai, Y. H., Lu, Y. H., Hwang, D. F. Paralytic toxins in three new gastropod (Olividae) species implicated in food poisoning in southern Taiwan. *Toxicon*, **41**, 529-533 (2003).
- 15) Liu, F. M., Fu, Y. M., Shih, D. Y. C. Occurrence of tetrodotoxin poisoning in *Nassarius papillosus* Alectrion and *Nassarius gruneri* Niotha. *J. Food Drug Analysis*, **12**, 189-192 (2004).
- 16) Hwang, P. A., Tsai, Y. H., Deng, J. F., Cheng, C. A., Ho, P. H., Hwang, D. F. Identification of tetrodotoxin in a marine gastropod (*Nassarius glans*) responsible for human morbidity and mortality in Taiwan. *J. Food Prot.*, **68**, 1696-1701 (2005).
- 17) Jen, H. C., Lin, S. J., Lin, S. Y., Huang, Y. W., Liao, I. C., Arakawa, O., Hwang, D. F. Occurrence of tetrodotoxin and paralytic shellfish poisons in a gastropod implicated in food poisoning in southern Taiwan. *Food Addit. Contam.*, **24**, 902-909 (2007).
- 18) Hwang, P. A., Tsai, Y. H., Lin, S. J., Hwang, D. F. The gastropod possessing TTX and/or PSP. *Food Reviews International*, **23**, 321-340 (2007).
- 19) Sui, L. M., Chen, K., Hwang, P. A., Hwang, D. F. Identification of tetrodotoxin in marine gastropods implicated in food poisoning. *J. Nat. Toxins*, **11**, 213-220 (2002).
- 20) 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).
- 21) Hwang, D. F., Chueh, C. H., Jeng, S. S. Occurrence of tetrodotoxin in the gastropod mollusk *Natica lineate* (lined moon shell). *Toxicon*, **28**, 21-27 (1990).
- 22) Shiomi, K., Tanaka, E., Kumagai, S., Yamanaka, H., Kikuchi, T., Kawabata, T. Toxicification of muscle after thawing of frozen puffer fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 341-347 (1984).
- 23) Shiomi, K., Shibata, S., Yamanaka, H., Kikuchi, T. Some factors affecting the toxicification of muscle after thawing of frozen puffer fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 619-625 (1985).
- 24) Noguchi, T., Akaeda, H. Toxicity of puffer "nashifugu" *Takifugu vermicularis*. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, **38**, J-1-J-5 (1997).
- 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. 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).
- 27) Wu, B. Q., Yang, L., Kao, C. Y., Levinson, S. R., Yotsu-Yamashita, M., Yasumoto, T. 11-Oxo-tetrodotoxin and a specifically labelled <sup>3</sup>H-tetrodotoxin. *Toxicon*, **34**, 407-416 (1996).
- 28) Khora, S. S., Yasumoto, T. Isolation of 11-oxotetro-

- dotoxin from the puffer, *Arothron nigropunctatus*. Tetrahedron Lett., **30**, 4393-4394 (1989).
- 29) Arakawa, O., Noguchi, T., Shida, Y., Onoue, Y. Occurrence of 11-oxotetrodotoxin and 11-nortetrodotoxin-6(R)-ol in a xanthid crab *Atergatis floridus* collected at Kojima, Ishigaki Island. Fish. Sci., **60**, 769-771 (1994).
- 30) Noguchi, T., Ebesu, J. S. M. Puffer poisoning: Epidemiology and treatment. J. Toxicol.-Toxin Rev., **20**, 1-10 (2001).

## 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<sup>1,2</sup> 谷山 茂人<sup>2</sup> 高谷 智裕<sup>3</sup> 西堀 尚良<sup>1</sup>  
西尾 幸郎<sup>1</sup> 野口 玉雄<sup>4</sup> 荒川 修<sup>3,\*</sup>Toxicity and Toxin Profiles of Xanthid Crabs Collected around  
Nakanoshima, the Tokara Islands, JapanTakefumi SAGARA<sup>1,2</sup>, Shigeto TANIYAMA<sup>2</sup>, Tomohiro TAKATANI<sup>3</sup>, Naoyoshi NISHIBORI<sup>1</sup>,  
Sachio NISHIO<sup>1</sup>, Tamao NOGUCHI<sup>4</sup> and Osamu ARAKAWA<sup>3,\*</sup><sup>1</sup>Department of Science for Living, Shikoku University, Junior College:  
123-1 Ebisuno, Furukawa, Ohjin-cho, Tokushima 771-1192, Japan;<sup>2</sup>Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University:  
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan;<sup>3</sup>Faculty of Fisheries, Nagasaki University: 1-14 Bunkyo-machi,  
Nagasaki 852-8521, Japan; \*Corresponding author<sup>4</sup>Faculty 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 オキソテトロドトキシン 11-oxotetrodotoxin; 麻痺性貝毒 paralytic shellfish poison; 食中毒 food poisoning; トカラ列島 the Tokara Islands

## 緒 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<sup>1)~3)</sup>。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<sup>4),5)</sup>、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<sup>1)~3),6)~8)</sup>。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<sup>9)</sup>。

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<sup>9)</sup>。この毒力は、ヒトにおけるPSPの最小致死量(3,000 MU)<sup>9)</sup>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

<sup>1</sup> 四国大学短期大学部生活科学科: 〒771-1192 徳島県徳島市  
応神町古川戒子野 123-1

<sup>2</sup> 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

<sup>3</sup> 長崎大学水産学部: 〒852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

<sup>4</sup> 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<sup>10)</sup>、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<sup>11)</sup>。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、 $-20^{\circ}\text{C}$  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<sup>12)</sup> (公定法) に準じて行った。

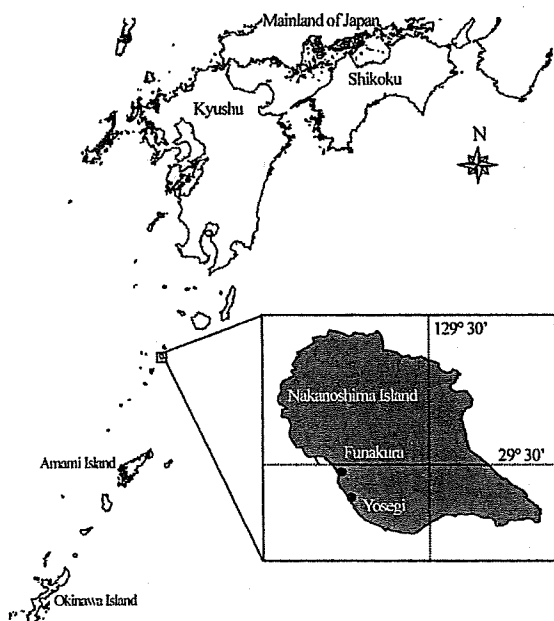


Fig. 1. Map showing Yosegi and Funakura (●) in Nakanoshima Island, Kagoshima Prefecture, where the xanthid crab specimens were collected.

### 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<sup>13)</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>14)</sup> 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 Zspray<sup>TM</sup> MS2000 で測定した。一方、PSP 成分の分析は HPLC 蛍光法<sup>13), 15)</sup> 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±標準偏差:  $3.6 \pm 2.8$  MU/g, 以下同様)、ムラサキヒメオウギガニで 2.8~8.6 MU/g ( $5.1 \pm 2.6$  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)<sup>16)</sup> よりはるかに低い値であった。

Koyama ら<sup>8)</sup> 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<sup>17)</sup>。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<sup>18)</sup>。

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<sup>19)~22)</sup>。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<sup>11)</sup>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えられており, 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<sup>23)~26)</sup>、それぞれ11-norTTX-6(R)-ol ( $[M+H]^+ = 290$ )、11-deoxyTTXと5-deoxyTTX (共に  $[M+H]^+ = 304$ )、4-*epi*TTX ( $[M+H]^+ = 320$ )、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<sup>27)</sup>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<sup>23)</sup>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<sup>1)~4), 6)</sup>。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<sup>5), 23), 28)</sup>。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<sup>19)~22)</sup>。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<sup>22)</sup>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<sup>1)~11), 13), 23), 28)</sup>、フグ同様<sup>29)</sup>、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<sup>17), 28)</sup>、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<sup>1)~4), 6)~11), 13), 23), 28)</sup>、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

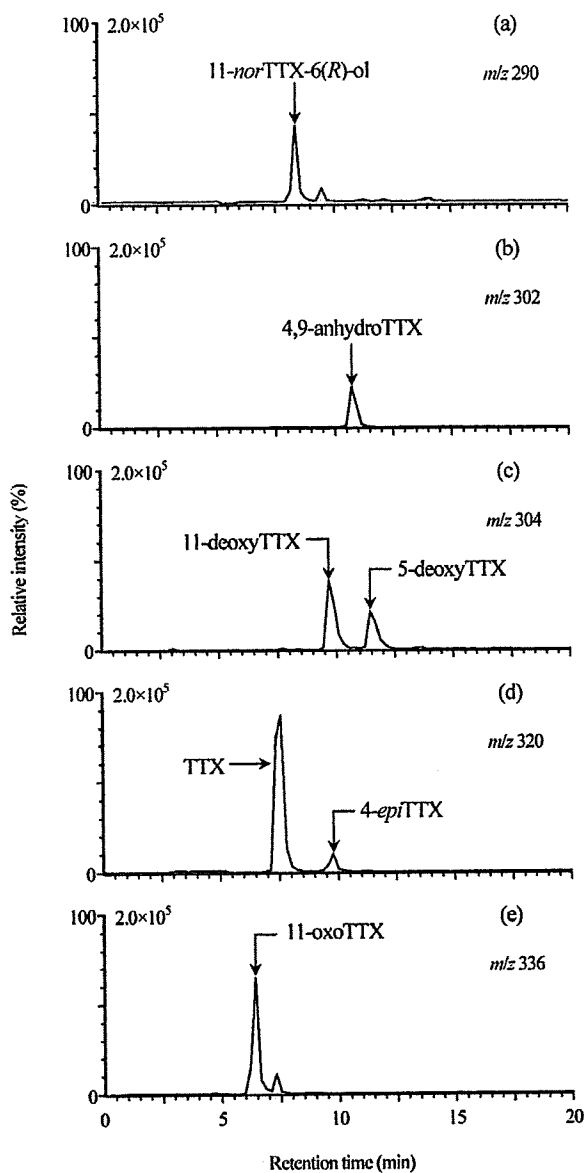


Fig. 3. Selected ion ( $m/z$  290, 302, 304, 320 and 336) mass chromatograms of partially purified toxin from *Z. aeneus*

LC/MS<sup>14</sup>) was carried out on an Alliance LC/MS system (Waters) equipped with a Zspray<sup>TM</sup> 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 MassLynx<sup>TM</sup> NT operating system.

い<sup>4), 5), 28)</sup>. 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<sup>30)</sup>やハコフグ科魚類<sup>31)</sup>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<sup>8), 11), 18)</sup>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., T. Analysis of paralytic shellfish toxins of xanthid crabs in Okinawa. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47, 957-959 (1981).
- 4) Noguchi, T., Koyama, K., Maruyama, 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-dependnet 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*. Hallegraeff, 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 *Demania 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., Oishi, 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<sup>1,\*</sup> 相良剛史<sup>2</sup> 西尾幸郎<sup>2</sup> 黒木亮一<sup>3</sup> 浅川 学<sup>3</sup>  
野口玉雄<sup>4</sup> 山崎脩平<sup>1</sup> 高谷智裕<sup>5</sup> 荒川 修<sup>5</sup>

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

Shigeto TANIYAMA<sup>1,\*</sup>, Takefumi SAGARA<sup>2</sup>, Sachio NISHIO<sup>2</sup>, Ryoichi KUROKI<sup>3</sup>, Manabu ASAKAWA<sup>3</sup>,  
Tamao NOGUCHI<sup>4</sup>, Shuhei YAMASAKI<sup>1</sup>, Tomohiro TAKATANI<sup>5</sup> and Osamu ARAKAWA<sup>5</sup>

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

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

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

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

<sup>5</sup> 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

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 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

<sup>3</sup> 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

<sup>4</sup> 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

<sup>5</sup> 長崎大学水産学部: 〒852-8521 長崎県長崎市文教町 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>、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”<sup>3)</sup>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<sup>4)</sup>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<sup>4)~9)</sup>。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<sup>9)</sup>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<sup>4)~9)</sup>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、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<sup>10)</sup>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<sup>11)</sup>に従ってテトロドトキシン(tetrodotoxin; 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0.5mL/minとした。毒成分の検出試薬に3mol/L水酸化ナトリウム溶液を用い、流速0.5mL/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381nm, 蛍光波長510nm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<sup>4)~9)</sup>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<sup>5), 9)</sup>と最も多く、その他、宮崎県で3件<sup>6), 8), 9)</sup>、鹿児島県<sup>4)</sup>と三重県<sup>7)</sup>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1<sup>4)</sup>と事例3<sup>6)</sup>ではハコフグと報告されており、事例2では虎島<sup>5)</sup>がハマフグ *Tetrosomus concatentatus* 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り残品(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<sup>5)~9)</sup>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<sup>5), 9)</sup>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<sup>4)~9)</sup>、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8<sup>9)</sup>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

\*1 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> ** "urnisuzume"	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> ** "urnisuzume"	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.

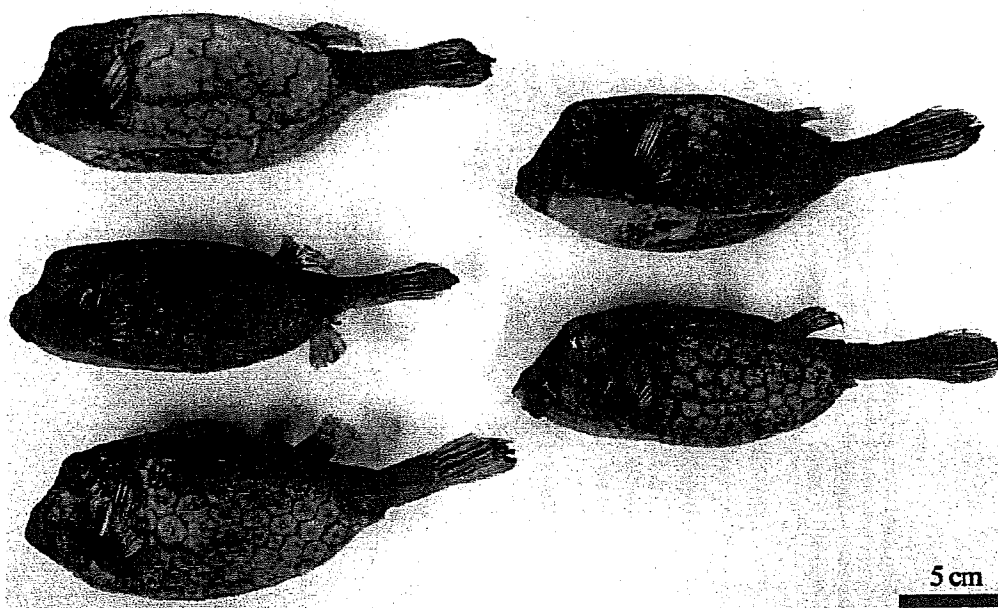
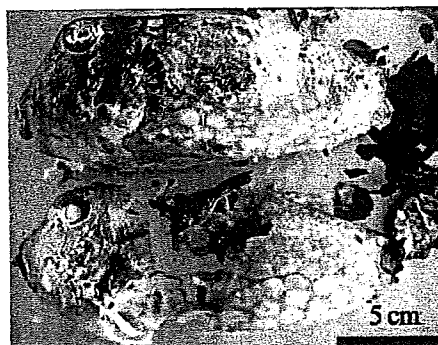


Fig. 1. Leftovers in Case 6 (upper) and Case 9 (lower), which were identified as *Ostracion immaculatus* "hakofugu".

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<sup>4), 6)~9)</sup>。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<sup>12)</sup>、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<sup>11)</sup>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<sup>13)~20)</sup>、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)<sup>14), 16)</sup>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理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<sup>21)</sup>、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<sup>22)</sup>。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-