

タンパク質結合に飽和はみられず、TTX の約 80%は遊離型で存在することがわかった。また、TTX をもたないアイナメ血漿においても、トラフグの場合に比べ TTX 結合量少ないものの、TTX が血漿タンパク質に結合することがわかった。さらに興味深いのは、ウシ血漿由来の BSA と AGP にも TTX が結合したこと、そして、BSA と AGP に対する TTX 結合量はトラフグ血漿よりも多かった点である。

これらの結果から、TTX はフグ科魚類の血漿タンパク質以外にも非特異的に結合し、TTX 濃度 100~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲では約 80%が遊離型で存在することが明らかになり、血液による TTX の運搬、すなわち血漿タンパク質への TTX 結合はフグ毒化に必須ではなく、フグ毒化の支配要因ではないと考えられた。

2) 反転腸管法による TTX 吸収測定法の検討

トラフグやクサフグに TTX を含む餌を与えて飼育するとフグは肝臓や皮に TTX を蓄積するが、TTX をもたない魚では TTX を含む餌を与えて飼育しても TTX を蓄積しないことが明らかにされている。この違いはどこにあるのだろうか。一つの可能性として、フグは消化管で TTX を吸収するが、TTX 非保有魚の消化管では TTX は吸収されないことが推測される。この点を明らかにするため、本研究では *in vitro* 実験による TTX の消化管吸収測定法を検討した。

トラフグでは反転腸管法において、TTX の消化管吸収はインキュベーション時間および外液 TTX 濃度の増加に伴って増える傾向を示し、さらに、TTX は粘膜側から漿膜側への通過が反対向きよりも有意に高かったことから、トラフグ消化管における TTX 通過は単純拡散ではないことが示唆された。

これらの結果から、反転腸管法は TTX の消化管吸収測定に有用であることがわかった。消化管吸収がフグの毒化にどのような役割を果たしているかを明らかにするため、本方法を用いてフグとフグ以外の魚種について TTX の消化管吸収とそのメカニズムを比較検討する必要がある。

E. 結論

今年度は、フグの毒力を見直すため、2008~2009 年に西日本で中毒を起こしたドクサバフグ

について、毒性と毒成分分析を行い、DNA による正確な種判別を計画したが、サンプルが集まらず実施できなかった。そこで、フグのリスク管理の基礎研究としてフグの毒化機構解明を試みた。平衡透析法により、TTX は血漿タンパク質と非特異的に結合するが、ほとんどは遊離型で分布することがわかった。そして、TTX の腸管吸収を評価する方法として反転腸管法を開発した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

T. Matsumoto, D. Tanuma, K. Tsutsumi, J.-K. Jeon, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Plasma protein binding of tetrodotoxin in the marine puffer fish *Takifugu rubripes*. *Toxicon*, 55 巻, 415-420 (2010).

2. 学会発表

- 1) 長島裕二, 松本拓也, 門山敬介, 石崎松一郎, 寺山誠人, 谷山茂人, 高谷智裕, 荒川 修: サバフグ類の毒性とミトコンドリア DNA による種判別. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会, 2010 年 9 月, 京都.
- 2) 寺尾依咲, 松本拓也, 藤本健太, 石崎松一郎, 長島裕二: 反転腸管法によるトラフグ腸管のテトロドトキシン吸収評価. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会, 2010 年 9 月, 京都.
- 3) T. Matsumoto, D. Tanuma, K. Tsutsumi, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Plasma protein binding of tetrodotoxin in pufferfish *Takifugu rubripes*. 9th International Marine Biotechnology Conference (IMBC 2010), 2010 年 10 月, 中国青島市.
- 4) Y. Nagashima: Hepatic uptake mechanism of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu rubripes*. International conference on risk assessment of marine toxins in seafood. 2010 年 11 月, 中華民国基隆市.
- 5) 藤本健太, 石崎松一郎, 長島裕二: イソガニ体液中のテトロドトキシン結合タンパク質の精製. 平成 23 年度日本水産学会春季大会, 2011 年 3 月, 東京都港区.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

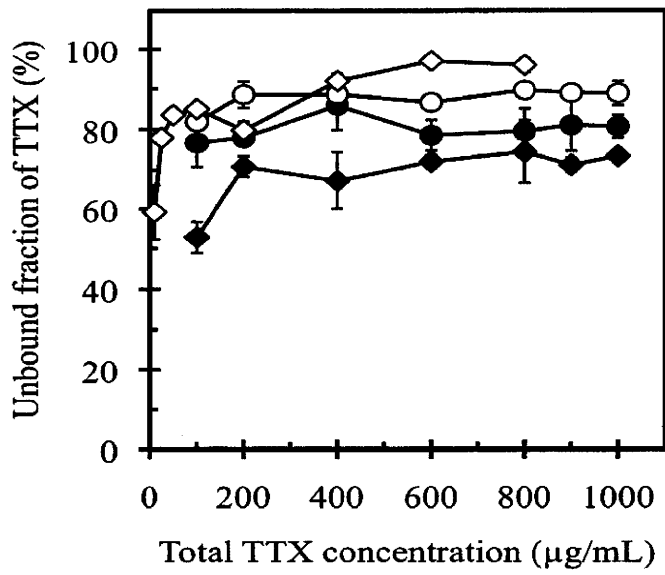


図1 魚類血漿およびタンパク質溶液に対するテトロドトキシシン非結合分率
 ●：トラフグ血漿、○アイナメ血漿、◆ウシ血清アルブミン、◇ウシα1-酸性糖タンパク質

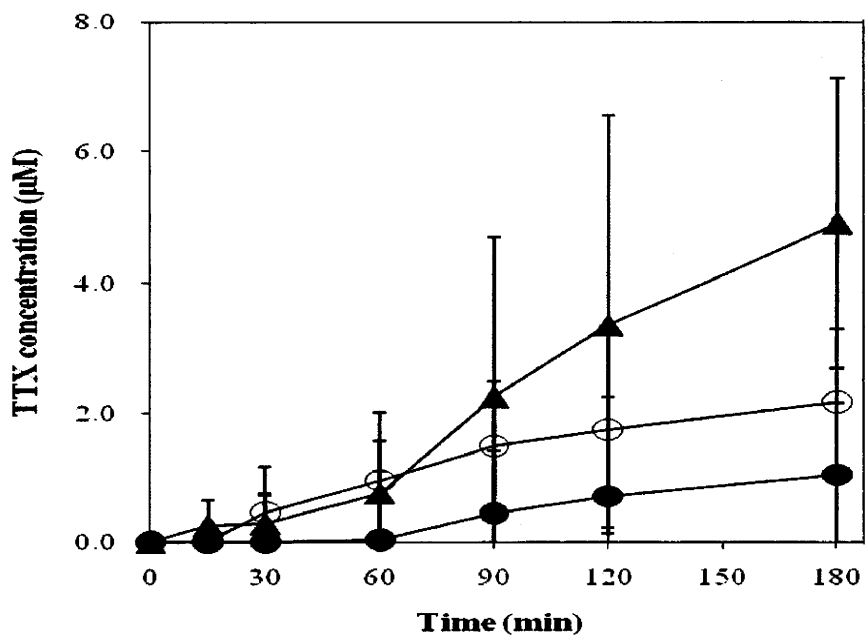


図2 トラフグ消化管反転囊内のテトロドトキシシン濃度
 ●：50μM TTX、○：100μM TTX、▲：200μM TTX

分担研究報告書

ハコフグ類と巻貝類のリスク管理

研究分担者 荒川 修 長崎大学水産学部
研究協力者 高谷智裕 長崎大学水産学部
研究協力者 谷山茂人 長崎大学水産学部
研究協力者 相良剛史 四国大学短期大学部

研究要旨

本研究では、ハコフグ類と小型巻貝類のリスク管理に資するため、それらの基礎となる情報と研究データの収集、ならびに国際的な情報共有ネットワーク構築へのアプローチを試みた。ハコフグのパリトキシン (PTX) 抵抗性と PTX の細胞毒性：天然ハコフグと養殖トラフグに PTX を筋肉内投与したところ、トラフグは 0.5 µg/個体以上の用量で死亡率 100%を示したのに対し、ハコフグでは 85 µg/個体の高用量でのみ死亡率が 100%に達した。従って、ハコフグはトラフグより PTX に対する抵抗性が高く、PTX をより多く蓄積しうる可能性がある。一方、PC12 細胞を PTX に暴露したところ、インキュベーション時間にかかわらず、PTX 濃度 0.1~10 nM の間で生残率が濃度依存的に減少した。生残率より感度の高い指標もしくは PC12 細胞より高感度の細胞を見出すことができれば、既存の溶血活性試験より効果的な PTX 検出・定量法を開発することが可能であろう。小型巻貝のテトロドトキシン (TTX) 含量と毒化モデル実験：2010 年 6 月に沖縄県西表島で採集した小型巻貝 11 種 37 個体につき、LC/MS にて TTX 含量を調べたところ、新たにコブムシロとチャイロヨフバイから 0.78~4.84 MU/g の TTX が検出された。コブムシロをモデル生物として、有毒フグ卵巣を 30 日間給餌したところ、元来保有していた TTX を含めて筋肉で最高 0.870 MU/g、内臓で最高 104 MU/g の TTX を蓄積した。さらに無給餌で 30 日間飼育したところ、内臓の毒量は減少したが、筋肉の毒量は大きく上昇したことから、コブムシロの毒化は食物連鎖由来の外因性であり、餌を介して体内に取り込まれた TTX は、まず内臓に蓄積し、その後、一部が筋肉に移行するものと推察された。情報共有ネットワークの構築：国立台湾海洋大学 黄登福教授と魚介毒に関する国際的な情報共有ネットワークの構築について協議した結果、黄教授らが現在作成中の「魚介毒のリスクプロファイル」につき、完成後は厚生労働省の「自然毒のリスクプロファイル」とリンクを形成する方向で、互いに検討する旨の同意を得た。

A. 研究目的

1990 年以降、ハコフグ類の喫食による中毒が西日本で少なくとも 9 件発生し、13 名が罹患、1 名が死亡している。患者には共通して横紋筋融解症が見られることから、原因物質はアオブダイ中毒同様パリトキシン (PTX) 様毒と推定されるが、本毒の化学的/生化学的性状については不明確な部分が多く、標準的な検出・定量法も確立されていない。

一方、キンシバイやムシロガイ科の巻貝類は極めて高濃度のフグ毒テトロドトキシン (TTX) を保有し、日本や中国、台湾で時に食中毒を起こし

てきた。これら腐肉食性巻貝類の毒性については、台湾海洋大学 黄登福教授ら、ならびに研究分担者らにより、これまでかなりの情報が集積されてきたが、未だに毒性評価の行われていない種もあり、有毒種の毒化機構についても不明な点が多い。

このような状況の下、本研究ではハコフグ類と小型巻貝類を対象として、それらのリスク管理の基礎となる情報、および研究データの収集を試みた。すなわち、ハコフグに関しては、PTX 蓄積の前提となる PTX 抵抗性を調べるとともに、細胞毒性を指標とする PTX の検出法について検討した。一方、巻貝類に関しては、沖縄県西表島産

試料の TTX 含量を測定し、その蓄積機構に若干の検討を加えた。さらに、台湾海洋大学を訪れ、魚介毒に関する国際的な情報共有ネットワークの構築について協議した。

B. 研究方法

1) ハコフグの PTX 抵抗性試験

試料には天然ハコフグ 24 個体、ならびに比較のため養殖トラフグ 40 個体を用いた。PTX 標準品 (和光純薬工業) を生理的食塩水に溶解し、ハコフグでは 5、8、10、20、85 $\mu\text{g}/\text{個体}$ 、トラフグでは 0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、8、10 $\mu\text{g}/\text{個体}$ の用量で、1 用量当たり 3 または 5 個体に筋肉内投与後、24 時間観察した。この間、死亡した個体については致死時間を記録した。

2) PTX の細胞毒性試験

本試験では、神経細胞の分化モデルとして一般に用いられている PC12 細胞を使用した。同細胞につき、10% 熱失活牛血清、5% 馬血清、100 unit/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンフォテリシン、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中、 5×10^4 cells/ml/well の密度で 72 時間培養後、0.5% 牛血清、100 unit/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンフォテリシン、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシンを含む DMEM に移し、24 時間培養した。このものに PTX 標準品 (和光純薬工業) を 0.01、0.1、1、10、100 nM の濃度で添加後、24、48 および 72 時間インキュベーションした。さらに、培地を 2% のニュートラルレッド (NR) を含む DMEM に交換して 2 時間静置後、細胞から NR を 1% 酢酸-50% エタノールで抽出し、540 nm における吸光度を測定して生残率を求めた。

3) 小型巻貝の TTX 含量測定

試料には、2010 年 6 月に沖縄県西表島で採集したレイシガイ *Thais bronni* 1 個体、マルアマオブネ *Nerita squamulata* 2 個体、イボウミニナ *Batillaria zonalis* 1 個体、コゲツノブエ *Ceritium corallium* 6 個体、ミツカドカニモリ *Clypeomorus pellucida* 5 個体、カンギク *Turbo coronatus coronatus* 1 個体、ホウシュノタマ *Natica gualteriana* 4 個体、ヘナタリ *Cerithidea cingulata* 3 個体、イガムシロ *Hebra horrida* 5 個体、コブムシロ *Pliarcularia globosus* 8 個体、チャイロヨフバイ *Nassarius (Zeuxis) micans* 1 個体の計 11 種 37 個

体を用いた (表 1)。各試料の剥き身につき、そのまま、もしくは筋肉と内臓に分けたうえ試験液を調製し、LC/MS に供して TTX 含量を測定した。

4) 小型巻貝への有毒フグ卵巣給餌試験

試料には 2010 年沖縄県西表島で採集したコブムシロ 60 個体を用いた。これらを天然海水の入ったプラスチック製の容器に入れ、天然トラフグ *Takifugu rubripes* の卵巣片 (平均毒力 170 MU/g) 各 1 g を容器中 5 箇所において給餌した。給餌は 1 日 1 回、1 時間かけて 30 日間毎日行い、給餌前 (給餌 0 日)、および給餌開始 5、10、20、30 日後に 10 個体ずつ試料を取り上げた。残りの 10 個体については、さらに 30 日間無給餌で飼育した。試料はいずれも筋肉と内臓に分け、同日取り上げの 10 個体分を部位毎に合一のうえ、前項と同様に LC/MS にて TTX 含量を測定した。

5) 国際的な情報共有ネットワーク構築へのアプローチ

2010 年 11 月に、本研究課題の主任研究者である長島裕二 東京海洋大学教授とともに研究分担者が国立台湾海洋大学を訪問し、同大学 黄登 福教授と魚介毒に関する国際的な情報共有ネットワークの構築について協議した。

C. 研究結果

1) ハコフグの PTX 抵抗性

抵抗性試験の結果を表 2 に示す。PTX を筋肉内投与した際の死亡率は、ハコフグの場合、用量 85 $\mu\text{g}/\text{個体}$ で 100% に達したが、20 $\mu\text{g}/\text{個体}$ 以下では 20~60% であった。一方、トラフグでは、0.5 $\mu\text{g}/\text{個体}$ 以上のいずれの用量でも 100% となった。

2) PTX の細胞毒性

細胞毒性試験の結果を図 3 に示す。いずれのインキュベーション時間においても、PC12 細胞の生残率は、PTX 濃度 0.1 nM 以下では 86.0~141% と高かったが、0.1 nM から 10 nM にかけて濃度依存的に急激に減少し、10 nM 以上では、12.5~42.7% となった。

3) 小型巻貝の TTX 含量

供試した 11 種の巻貝のうち、コブムシロ 8 個体の筋肉と内臓をそれぞれ合一したもの、ならびにチャイロヨフバイ 1 個体の剥き身から、 m/z 320 の LC/MS クロマトグラムにおいて TTX 標準品 ($[\text{M}+\text{H}]^+=320$) と保持時間の一致するピークが検出された (図 1)。マウス毒性 (MU) に換算した TTX 含量は、コブムシロの筋肉で 0.78 MU/g、

内臓で 4.48 MU/g、チャイロヨフパイの剥き身で 4.84 MU/g であった。その他の巻貝については、TTX は全く検出されなかった。

4) 有毒フグ卵巣を給餌した小型巻貝の TTX 蓄積量

給餌試験の結果を図 2 に示す。内臓の TTX 含量は、10 日後から急激に増加し、20 日後に最高値 104 MU/g に達したが、その後減少し、30 日間の無給餌飼育後には 13.0 MU/g になった。一方、筋肉の TTX 含量は、20 日後から若干増加して 30 日後には 0.870 MU/g になり、さらに無給餌飼育後に大きく増加して 3.91 MU/g に達した。

5) 国際的な情報共有ネットワーク構築へのアプローチ

黄教授らは、現在、台湾衛生省の要請に基づき、台湾・中国における魚介毒のリスクプロファイルを作成中で、完成後はこれを同省と台湾海洋大学のホームページに掲載する予定であるという。その際、厚生労働省の「自然毒のリスクプロファイル」とリンクを形成する方向で、互いに検討する旨の同意を得た。

D. 考察

1) ハコフグの PTX 抵抗性

今回用いたハコフグ試料の体重は、トラフグ試料の概ね 4~5 倍であった。一方、PTX を投与した際の死亡率は、トラフグでは 0.5 µg/個体以上の用量で 100% を示したのに対し、ハコフグでは、その 10 倍 (5 µg/個体) でも 60% で、85 µg/個体の高用量ではじめて 100% となった。従って、体重差を考慮しても、ハコフグはトラフグより PTX に対する抵抗性が高く、PTX をより多く蓄積しうる可能性がある。現在、統計学的手法を用い、半数致死用量や用量と致死時間の関係について検討中である。

2) PTX の細胞毒性

PC12 細胞の生残率は、インキュベーション時間にかかわらず、PTX 濃度 0.1~10 nM の間で濃度依存的に減少した。従って本細胞を用いれば、当該濃度領域を適用範囲とする新たな PTX 検出・定量法の構築が可能であろう。しかしながら、生残率を指標とした場合、PTX に対する PC12 細胞の感受性はそれほど高くなく、既存の溶血活性試験より効果的な PTX 検出・定量法を開発するためには、ミトコンドリアの膜電位等、さらに高感度の指標、もしくは細胞種を見出すことが必

要である。

3) 小型巻貝の TTX 含量

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安心・安全確保推進研究事業)「自然毒のリスクプロファイル作成を目指した調査研究」において、沖縄県産小型巻貝ではキンシバイ、サツマビナ、ヘコミマクラ、イボヨフパイ、カゲロウヨフパイが有毒であることを明らかにした。この際、コブムシロからは毒性は検出されなかったが、今回新たに、コブムシロとチャイロヨフパイも TTX を保持しうる事が判明した。これらの有毒小型巻貝はいずれも腐肉食性であり、TTX の起源の一つとして有毒フグの死骸が想定される。

4) 有毒フグ卵巣を給餌した小型巻貝の TTX 蓄積量

前述の想定に基づき、コブムシロに天然有毒フグの卵巣を与えたところ、コブムシロはこれを好んで摂取し、最高 104 MU/g に達する高濃度で TTX を内臓に蓄積した。筋肉の TTX 蓄積量は総じて低く、内臓より 10 日ほど遅れて上昇し始め、無給餌飼育後に大きく増加した。従って、コブムシロの毒化は食物連鎖由来の外因性であり、餌を介して体内に取り込まれた TTX は、まず内臓に蓄積し、その後、一部が筋肉に移行するものと推察された。

5) 国際的な情報共有ネットワーク構築へのアプローチ

黄教授らが作成中のリスクプロファイルは、台湾のみならず中国のかなりの部分をカバーし、両者の研究者リストも含むという。日本のリスクプロファイルとのリンクが実現すれば、情報共有ネットワーク構築の第一歩として極めて意義深いものとなる。日台のリスクプロファイルは、ともに母国語版のみであるが、国際的な情報共有のためには、英語版の作成が強く望まれる。この点については、韓国とのネットワーク構築や恒常的な情報の更新と併せて、今後の大きな課題である。

E. 結論

ハコフグはトラフグより高い PTX 抵抗性を示した。従って、トラフグより高い PTX 蓄積能を有する可能性がある。また、PTX は PC12 細胞に毒性を示したが、このような活性を PTX の検出・定量に応用するためには、生残率より感度の高い指標、もしくはより高感度の細胞種を見出す必要がある。

一方、沖縄県沿岸に生息する小型巻貝中、新たに2種に TTX の保有が認められた。そのうち1種をモデル生物として有毒フグ卵巣の給餌試験を行ったところ、TTX を効率よく蓄積したことから、小型巻貝の毒化も食物連鎖を解する外因性のものと判断された。

他方、魚介毒に関する国際的な情報共有ネットワーク構築の第一歩として、日台のリスクプロファイル間でリンク形成を目指すこととなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 相良剛史, 谷山茂人, 吉松定昭, 高谷智裕, 橋本多美子, 西堀尚良, 西尾幸郎, 荒川 修: 瀬戸内海播磨灘で発生した有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamiyavanichii* と毒化ムラサキガイの毒性と毒成分. 食品衛生学雑誌, 51, 170-177 (2010).
- 2) 荒川 修: 無毒フグの養殖. *Biophilia*, 7, 26-30 (Mar., 2011).

2. 学会発表

- 1) 山崎脩平, Gregory N. Nishihara, 谷山茂人, 橋勝康, 原口亮介, 高谷智裕, 荒川 修: 海産フグ2種のパリトキシン抵抗性, 第99回日本食品衛生学会学術講演会, 東京, 2010年5月.
- 2) A.F. Villa, D. Chataigner, O. Arakawa, P. Guegueniat, D. Hommel, L. De Haro and R. Garnier: Familial tetrodotoxin poisoning in French Guiana, European Congress of Clinical Toxicologists and Poison Centres, Bordeaux, May 2010.
- 3) 反町太樹, 谷山茂人, 橋勝康, 久保弘文, 大城直雅, 高谷智裕, 荒川 修: 沖縄県産小型巻貝の毒性, 第100回日本食品衛生学会学術講演会, 熊本, 2010年9月.
- 4) 相良剛史, 谷山茂人, 高谷智裕, 宮内のどか, 橋本多美子, 西堀尚良, 西尾幸郎, 荒川 修: 先島諸島におけるオウギガニ科有毒ガニの毒性と毒組成. 第100回日本食品衛生学会学術講演会, 熊本, 2010年9月.
- 5) 相良剛史, 谷山茂人, 西堀尚良, 橋本多美子, 高谷智裕, 浅川 学, 荒川 修, 西尾幸郎:

軟体動物ウミフクロウからの麻痺毒の検出, 第100回日本食品衛生学会学術講演会, 熊本, 2010年9月.

- 6) 西尾幸郎, 相良剛史, 西堀尚良, 山本圭吾, 岡部 愛, 橋本多美子, 高谷智裕, 谷山茂人, 荒川 修: 大阪湾にて *Alexandrium tamarensis* により毒化した二枚貝とフジツボの毒性, 第100回日本食品衛生学会学術講演会, 熊本, 2010年9月.
- 7) 長島裕二, 松本拓也, 門山敬介, 石崎松一郎, 寺山誠人, 谷山茂人, 高谷智裕, 荒川 修: サバフグ類の毒性とミトコンドリア DNA による種判別, 平成22年度日本水産学会秋季大会, 京都, 2010年9月.
- 8) S. Yamasaki, S. Taniyama, G. N. Nishihara, K. Tachibana, J. D. Reimer, T. Sagara, T. Takatani and O. Arakawa: Toxicity of *Palythoa tuberculosa* inhabiting the Nansei Islands of Japan, The 11th Joint International Symposium between Pukyong National University and Nagasaki University, Nagasaki, Oct. 2010.
- 9) T. Sorimachi, S. Taniyama, K. Tachibana, H. Kubo, N. Oshiro, T. Sagara, T. Takatani and O. Arakawa: Toxicity of gastropods from the coastal water of Okinawa Prefecture, Japan, The 11th Joint International Symposium between Pukyong National University and Nagasaki University, Nagasaki, Oct. 2010.
- 10) S. Yamasaki, S. Taniyama, G.N. Nishihara, K. Tachibana, J.D. Reimer, T. Sagara, T. Takatani and O. Arakawa: Toxicity and toxin profile of *Palythoa tuberculosa* inhabiting the Nansei Islands of Japan, Joint International Symposium on Marine Science and Technology, Jeju, Oct. 2010.
- 11) T. Sorimachi, S. Taniyama, K. Tachibana, H. Kubo, N. Oshiro, T. Sagara, T. Takatani and O. Arakawa: Toxicity and toxin profile of gastropods inhabiting Okinawa Prefecture, Japan, Joint International Symposium on Marine Science and Technology, Jeju, Oct. 2010.
- 12) T. Noguchi, K. Onuki and O. Arakawa: Risk assessment of marine toxins in the seafood in Japan, International Conference on Risk Assessment of Marine Toxins in Seafood, Keelung, Nov. 2010.

- 13) 王 俊杰, 荒木泰一朗, 辰野竜平, 池田光彦, 濱崎将臣, 新名信也, 高谷智裕, 荒川 修: トラフグ×クサフグ人工交雑個体に筋肉投与したテトロドトキシンの体内移行プロファイル, 平成23年度日本水産学会春季大会, 東京, 2011年3月.
- 14) 荒木泰一朗, 王 俊杰, 新名信也, 鈴木重則, 岩崎正裕, 吉良沙織, 小早川みどり, 望岡典隆, 高谷智裕, 荒川 修: 遠州灘および天草灘で漁獲された自然交雑フグの毒性, 平成23年度日本水産学会春季大会, 東京, 2011年3月.
- 15) 沖田光弘, 中安純一, 山崎秀樹, 崎山一孝, 田中幸太郎, 高谷智裕, 荒川 修, 阪倉良孝: トラフグ天然稚魚とフグ毒投与人工種苗の組織内でのフグ毒蓄積部位の比較, 平成23年度日本水産学会春季大会, 東京, 2011年3月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

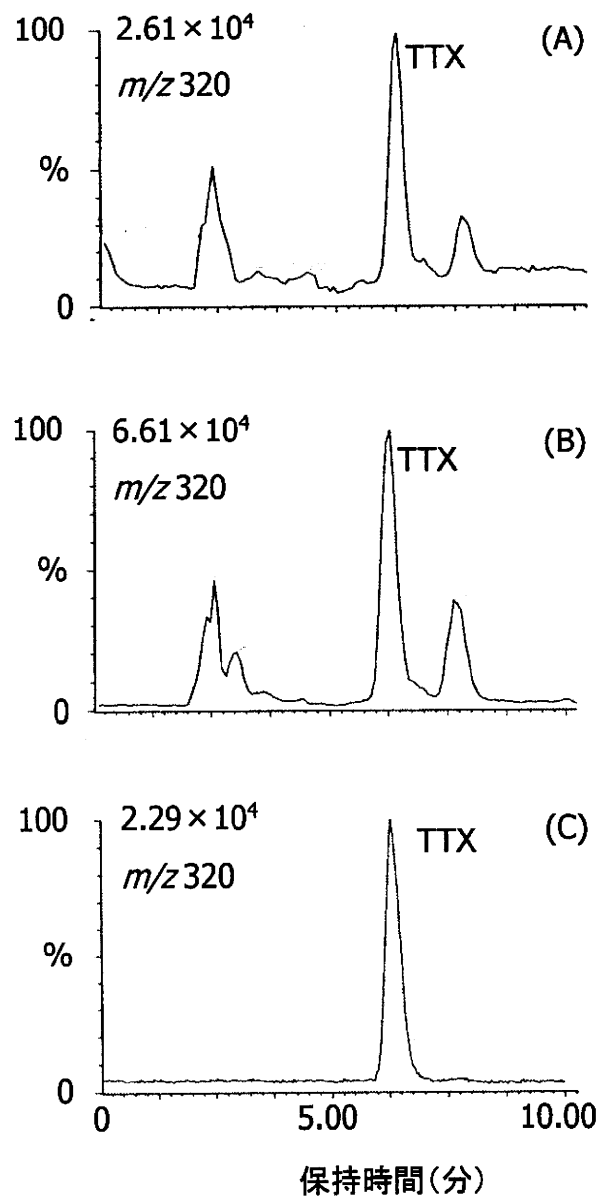


図 1 LC/MS クロマトグラム
 (A): コブムシロ; (B): チャイロヨフバイ; (C): TTX 標準品

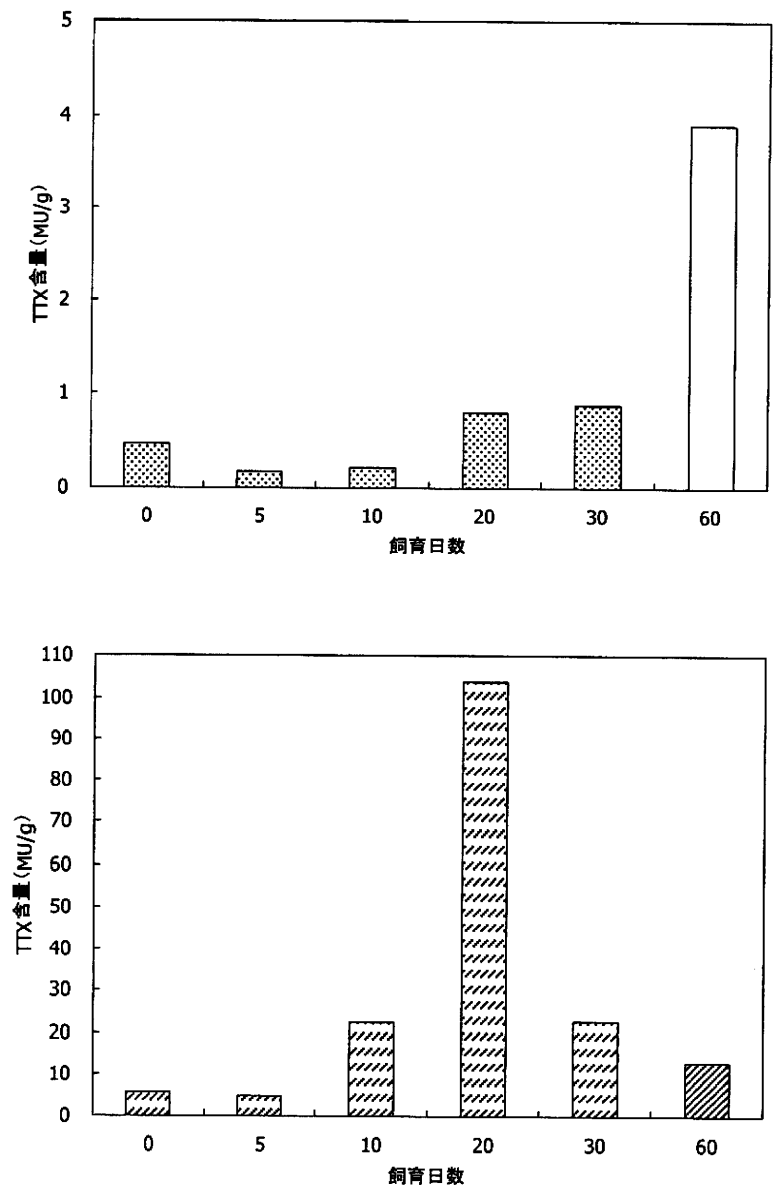


図2 有毒フグ卵巣給餌試験におけるコブムシロの TTX 含量の推移
(上): 筋肉; (下): 内臓

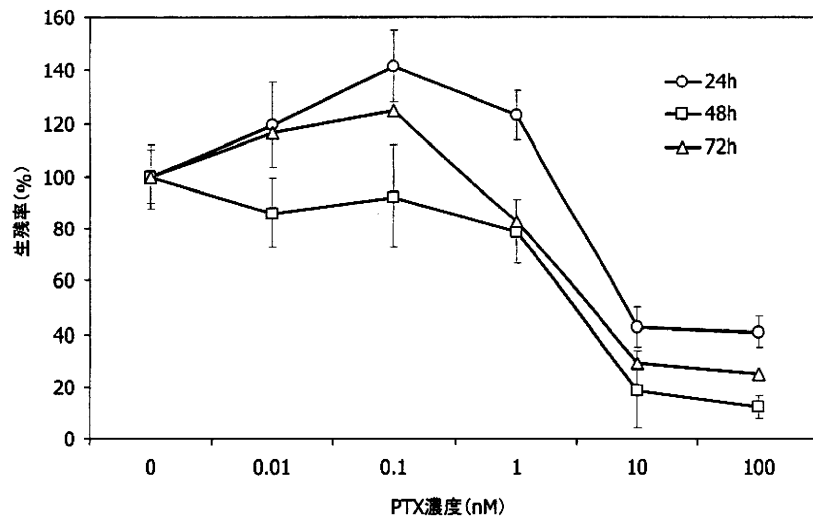


図 3 PTX に暴露した PC12 細胞の生残率

表1 供試した沖縄県産小型巻貝

種名	科名	学名	殻長(mm)	殻幅(mm)	総重量(g)	食性	個体数
レイシガイ	アッキガイ科	<i>Thais (Reishia) bronni</i>	30.0	19.5	5.12	肉食性	1
マルアマオブネ	アマオブネガイ科	<i>Nerita (Thelostyla) squamulata</i>	13.5	13.5	1.10	藻食性	2
イボウミニナ	ウミニナ科	<i>Batillaria zonalis</i>	34.5	11.0	2.31	デトリタス	1
コゲツノブエ	オニツノガイ科	<i>Ceritium coralium</i>	23.8±3.25	9.92±0.66	1.34±0.24	デトリタス	6
ミツカドカニモリ	オニツノガイ科	<i>Clypeomorus pellucida</i>	21.3±1.20	10.7±0.67	1.47±0.09	デトリタス	5
カンギク	サザエ科	<i>Turbo (Lunella) coronatus coronatus</i>	21.0	28.0	9.51	藻食性	1
ホウシユノタマ	タマガイ科	<i>Natica qualteriana</i>	7.5±1.35	9.0±1.08	0.37±0.17	貝食性	4
ヘナタリ	フトヘナタリ科	<i>Cerithidea (Cerithideopsis) cingulata</i>	23.8±1.04	10.0±0.00	1.32±0.11	デトリタス	3
イガムシロ	ムシロガイ科	<i>Hebra horrida</i>	16.3±0.97	10.0±0.70	1.03±0.11	腐肉食性	5
コブムシロ	ムシロガイ科	<i>Pliarcularia globosus</i>	9.7±1.16	7.06±0.94	0.35±0.14	腐肉食性	8
チャイロヨフバイ	ムシロガイ科	<i>Nassarius (Zeuxis) micans</i>	22.0	9.00	1.09	腐肉食性	1

表2 PTXを筋肉内投与したハコフグとトラフグの死亡率

魚種	用量 ($\mu\text{g}/\text{個体}$)	体重 (g)	供試個体数	死亡個体数	死亡率 (%)
ハコフグ (天然)	5	226 \pm 35.0	5	3	60
	8	254 \pm 81.0	5	1	20
	10	179 \pm 60.6	5	3	60
	20	199 \pm 25.4	3	1	33
	85	165 \pm 36.0	3	3	100
トラフグ (養殖)	0.1	58.0 \pm 3.70	5	0	0
	0.25	50.5 \pm 5.87	5	0	0
	0.5	48.9 \pm 9.81	5	5	100
	1	50.3 \pm 18.2	5	5	100
	2.5	47.6 \pm 12.7	5	5	100
	5	48.8 \pm 12.7	5	5	100
	8	61.0 \pm 11.4	5	5	100
	10	53.9 \pm 4.98	5	5	100

研究要旨

フィリピンから輸入されたソデボラ科巻貝のマガキガイ *Strombus luhuanus* (ボイル済み殻つき試料) について、大阪検疫所で麻痺性貝毒検査を行ったところ、麻痺性貝毒は陰性であったがマウスに喀血を引き起こして死亡させる新しい毒成分が検出された。本研究ではまず、フィリピン産マガキガイの8部位（筋肉、中腸腺、生殖腺、唾液腺、直腸、style sac、外套膜、鰓下腺）から PBS (phosphate buffered saline) 抽出液を調製してマウス毒性試験に供し、鰓下腺のみが有毒であることを明らかにした。沖縄産マガキガイについても部位別毒性試験を行い、鰓下腺のみが有毒であることを確認した。鰓下腺重量の4倍量の溶媒を用いて調製した抽出液の場合、マウス致死活性は静脈投与では titer 64 または 128 (抽出液を段階的に2倍希釈し、致死活性が陽性と判断された最高希釈倍率の逆数を titer と定義) と非常に強く、腹腔内投与でも titer 16 とかなり強かったが、経口投与では陰性であったので食品衛生上の問題はないと考えられた。毒成分は、PBS、PB (phosphate buffer)、水または0.1%酢酸を溶媒として非加熱あるいは加熱により抽出可能であったが、メタノールでは抽出されず、既報のアクキガイ科巻貝の鰓下腺毒 (コリンエステル) とは異なると思われる。かなり過酷な条件でも毒成分は抽出されたが、透析、限外ろ過およびゲルろ過 HPLC における挙動は高分子であることを示唆した。

A. 研究目的

巻貝の中には毒成分をもつものが知られている。古くから有名な毒成分は、ヒメエゾボラやエゾボラモドキなどのエゾバイ科エゾボラ属 *Neptunea* の中間の唾液腺に高濃度に含まれているテトラミン (テトラメチルアンモニウムイオン) ($(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$) で、しばしば食中毒の原因となっている。テトラミンのような低分子毒以外に、フジツガイ科のカコボラの唾液腺には強い致死活性と溶血活性を示す 23 kDa のタンパク毒 (echotoxin) の存在が確認され、その全一次構造も明らかにされている。唾液腺ではなく鰓下腺に毒成分を含む巻貝も知られている。その代表はイボニシやレイシガイなどのアクキガイ科巻貝で、鰓下腺にムレキシ (ウロカニルコリン)、アクリルコリン、チグロイルコリンなどのコリンエステル毒が見いだされている。唾液腺毒や鰓下腺毒は常成分であるが、ボウシュウボラ、キンシバイなどの中腸腺や筋肉に検出されたテトロドトキシ、セイヨウトコブシ、ヨーロッパエゾバイ

などの中腸腺や筋肉に検出された麻痺性貝毒のように、外因性 (餌由来) と考えられる毒成分もある。

2010年8月にフィリピンからボイル済みのマガキガイ *Strombus luhuanus* (殻つき試料と殻から取り出して内臓や膜などを除去した筋肉のむき身試料の2種類) が輸入された。大阪検疫所において麻痺性貝毒の検査を実施したところ、筋肉のむき身試料は無毒であったが、殻つき試料から集めたむき身 (内臓や膜なども含めた軟体部全体) の抽出液はマウスを死亡させた。ただし、麻痺性貝毒によるマウスの致死時間は15分以内であるが、マウスの致死時間はそれよりかなり長く (数時間～一夜)、さらに、死亡したマウスには喀血という特異な症状がみられた (東京農工大学獣医病理学研究室の三森国敏教授によって死亡したマウスの病理学的検査が行われ、肺動脈、肺胞毛細血管、肺静脈の広範囲にわたる破綻性出血が確認されている)。これらの結果から、輸入マガキガイの筋肉を除く部位 (内臓や膜など) には麻痺

性貝毒とは異なる新しいタイプの毒成分が存在すると判断された。

マガキガイ (図 1) は殻高 5~6 cm のソデボラ科の巻貝で、房総半島以南~熱帯太平洋の潮間帯~水深 20 m 程度の岩礁域に生息する。殻口内は全体に橙紅色で内唇は明瞭に黒くなっている。殻口外側の殻底に近い部分が半円形に切れこんで外側へめくれているが、これはストロンボイドノッチ (Stromboid-notch) と呼ばれるソデボラ類に特有の形質である。一見、猛毒巻貝として有名なイモガイ類に似ているが、ストロンボイドノッチがあることによりイモガイ類とは区別される。マガキガイは日本各地で食用として流通しており、トネリ (静岡県)、ピンピングイ (三重県)、チャンバラガイ (高知県)、ティラジャー (沖縄県) などの地方名がある。

フィリピンからの輸入マガキガイは有毒であることが判明したが、有毒部位は特定されていないし、毒成分の性状も不明である。また、日本沿岸のマガキガイは食用にされており食中毒事例もないが、本当に無毒であるかどうかを検証しておく必要がある。そこで本研究では、フィリピン産マガキガイの毒性および毒成分の性状を明らかにするとともに、国内産マガキガイの毒性も調べ、食品衛生上の安全性を評価することを目的とした。

B. 研究方法

試料

フィリピンから輸入されたマガキガイ (ボイル済みの殻つき試料) および那覇市の小売店で購入した沖縄産マガキガイ (生の殻つき試料) を試料として用いた。試料はいずれも殻つきのまま使用するまで -20 °C に保存した。なお、これら試料は、東京海洋大学海洋環境学科無脊椎動物学研究室の土屋光太郎准教授により間違いなくマガキガイであることが確認されている。

部位別毒性試験用抽出液の調製

フィリピン産マガキガイ: 当初、有毒部位は中腸腺または唾液腺と予想されたので、まず予備実験として、フィリピン産の 10 検体の殻つき試料から筋肉 (14.3 g)、中腸腺 (1.0 g)、唾液腺 (0.03 g) およびその他の部位 (1.5 g) の 4 部位を集めた。筋肉および中腸腺には 4 倍量、唾液腺には 40 倍量、その他の部位には 9 倍量の PBS (phosphate buffered saline; 0.15 M NaCl-0.01 M

リン酸緩衝液, pH 7.0) を加えてホモジナイズ後、遠心分離 (18,800 g, 30 min) により得られた上清を抽出液とした。次に 5 個体から筋肉 (11.1 g)、中腸腺 (2.3 g)、生殖腺 (1.0 g)、唾液腺 (0.05 g)、直腸 (1.0 g)、style sac (0.2 g)、外套膜 (2.2 g) および鰓下腺 (2.0 g) の 8 部位を集めた (部位については図 2 を参照)。各部位から、それぞれ重量の 4 倍量 (唾液腺のみ 40 倍量) の PBS を用いて同様に抽出液を調製した。

沖縄産マガキガイ: 10 個体の殻つき生試料を沸騰浴中で 10 min 加熱後、筋肉 (唾液腺を含む、16.9 g)、内臓 (中腸腺+生殖腺、2.7 g)、外套膜 (直腸および style sac を含む、3.0 g) および鰓下腺 (2.7 g) の 4 部位にわけ、各部位から PBS 抽出液を調製した。

鰓下腺からの毒性試験用抽出液の調製

以下の抽出においては、すべてフィリピン産マガキガイの鰓下腺を用いた。

PBS および PB 抽出: 12 個体から集めた鰓下腺 (4.8 g) のうち、2.0 g は 4 倍量の PBS で、残りは 4 倍量の PB (phosphate buffer; 0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.0) で抽出液を調製した。

水抽出: 5 個体から集めた鰓下腺 (3.3 g) を 2 分し、一方は 4 倍量の水 (本研究では水はすべて MilliQ 水を用いた) で抽出液 (非加熱水抽出液) を調製した。もう一方は 4 倍量の水とホモジナイズ後、ホモジネートを沸騰浴中で 30 min 加熱し、遠心分離 (18,800 g, 30 min) により得られた上清を加熱水抽出液とした。非加熱水抽出液は 6 個体から集めた鰓下腺 (2.5 g)、加熱水抽出液は 8 個体から集めた鰓下腺 (3.0 g)、5 個体から集めた鰓下腺 (2.1 g) からも調製した。

酢酸加熱抽出: 5 個体から集めた鰓下腺 (2.4 g) を 4 倍量の 0.1% 酢酸とホモジナイズし、上記と同様に沸騰浴中での 30 min 加熱、遠心分離により加熱酢酸抽出液を調製した。

メタノール抽出: 5 個体から集めた鰓下腺 (2.7 g) を 10 倍量のメタノールで 3 回抽出した。抽出液を減圧乾固後、残留物を 20 ml の水に懸濁し、等量の n-ヘキサンで 3 回脱脂した。水層と n-ヘキサン層をそれぞれ減圧乾固し、水層は鰓下腺重量の 5 倍量の水に、n-ヘキサン層は鰓下腺重量の 5 倍量の Tween 20 に懸濁し、毒性試験に用いた。

マウス毒性試験

毒性試験には ddY 系の雄マウス (4 週令、体重約 20 g) を用いた。抽出液 (またはその段階的 2

倍希釈液)を1群2尾のマウスに静脈投与し(投与液量:10 µl/g マウス体重)、最大24 h 観察した。一部抽出液については、静脈投与の他に腹腔内投与(投与液量:1 ml/マウス)および経口投与(投与液量:10 µl/g マウス体重)も行い、同様に24 h 観察した。1群2尾のマウスが両方とも死亡した時を致死活性陽性とし、陽性と判断された最高希釈倍率の逆数を titer で表示した。

透析

加熱水抽出液1 mlをMWCO 3000の透析膜に入れ、100 mlの水に対して4°Cで24 h透析した。透析終了後、透析内液はそのまま、透析外液は減圧乾固して2 mlの水に溶解後、マウス致死活性(静脈投与)を調べた。

限外ろ過

加熱水抽出液を水で8倍希釈し、Vivaspin 20 (MWCO 10,000; Sartorius Stedium Japan)を用いて遠心濃縮した。フィルターの下相(フィルター通過液)はそのまま、上相は水で元の液量にあわせ、マウス致死活性(静脈投与)を調べた。

ゲルろ過 HPLC

PBSで8倍希釈した加熱水抽出液0.5 mlをSuperdex 75 10/300 GL カラム(1 x 30 cm; GE-Healthcare)またはSuperdex 200 10/300 GL カラム(1 x 30 cm; GE-Healthcare)にインジェクションした。カラムの溶出にはPBSを用い、流速は0.5 ml/minに設定した。溶出液は220 nmの吸光度をUV検出器で測定するとともに、2分ごとに分取し、マウス致死活性(静脈投与)を調べた。(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

部位別毒性

当初、マガキガイの有毒部位は中腸腺または唾液腺と予想されたので、まずフィリピン産試料の筋肉、中腸腺、唾液腺およびその他の部位の4部位についてマウス致死活性を調べた。その結果、予想に反してその他の部位のみが有毒であった

(表1の実験1)。静脈投与ではtiter 32と強い致死活性を示し、腹腔内投与でもtiter 4の致死活性を示したが、経口投与では致死活性はみられなかった。有毒部位を特定するために、次に8部位において毒性を調べたところ、鰓下腺に静脈投与でtiter 128、腹腔内投与でtiter 16という致死活性が認められた(表1の実験2)。この場合も経口投与ではやはり致死活性を示さなかった。

沖縄産試料についても筋肉、内臓、外套膜および鰓下腺の4部位について毒性を調べたが、フィリピン産試料の場合と同様に鰓下腺が有毒であることが判明した(表2)。

鰓下腺の毒性と抽出方法との関係

フィリピン産マガキガイの鰓下腺から、PBS、PB、水または0.1%酢酸を溶媒として非加熱あるいは加熱により抽出液を調製したが、いずれも静脈投与により強いマウス致死活性を示した(titer 64または128; 表3)。しかし、メタノール抽出後に調製した水層およびn-ヘキサン層のいずれにもマウス致死活性はみられなかった。

鰓下腺に含まれる毒成分の性状

強いマウス致死活性を示した鰓下腺抽出液は、いずれも粘度が非常に高かった。これら抽出液を加温すると粘度は下がるが、低温ではほぼ完全にゲル化した。粘質物を除去する目的で抽出液に液量の10%、50%、100%に相当するアセトンを添加して遠心分離により上清と沈殿にわけたが、マウス致死活性は沈殿にのみ回収された。また、これら抽出液を凍結貯蔵後に解凍すると粘性の高い不溶物がみられ、遠心分離により上清と沈殿に分けるとマウス致死活性の大部分は沈殿に回収され、上清の致死活性はわずか1/8~1/16程度であった。

MWCO 3,000の透析膜を用いた透析では、マウス致死活性は透析内液にのみ検出された。MWCO 10,000のフィルターを用いた限外ろ過においては、マウス致死活性は上層(フィルターを通過しない画分)にのみ確認された。ゲルろ過HPLCでは、毒成分はSuperdex 75カラムの場合はvoid volumeに、Superdex 200カラムの場合はvoid volumeからわずかに遅れて溶出された(図3)。

D. 考察

マガキガイは岩に付着している微細藻類(藍藻類など)を餌にしているため、フィリピン産試料

は南方海域に生息している有毒微細藻類から毒成分を取り込み、主として中腸腺に蓄積したと予想された。しかし、細かく部位別にマウス致死活性を調べた結果、有毒部位は鰓下腺のみであることが明らかになった。さらに、フィリピン産試料だけでなく、食用として流通している沖縄産試料も同様に鰓下腺のみが有毒であることが判明した。これらの結果から、マガキガイの鰓下腺毒は外因性ではなく内因性の常成分であると考えられる。

フィリピン産試料および沖縄産試料のいずれも、鰓下腺抽出液のマウス致死活性は静脈投与では titer 64 または 128 と非常に強く、腹腔内投与でも titer 16 とかなりの強さであった。しかし、鰓下腺抽出液は経口投与では致死活性は示さないこと、軟体部に占める鰓下腺の重量割合は 10% に満たないこと、マガキガイはこれまで長年の食経験があるにもかかわらず中毒事例はないことを考慮すると、マガキガイの鰓下腺毒は食品衛生上の問題はないと思われる。

巻貝の鰓下腺毒としては、アクキガイ科巻貝の鰓下腺に含まれている低分子の各種コリンエステル(ムレキシシ、アクリリルコリン、チグロイルコリンなど)が古くから有名である。これらコリンエステルはメタノールで容易に抽出されるが、マガキガイの毒成分はメタノールでは抽出されないため、既知のコリンエステル系の毒成分ではないと考えられる。しかし、大阪検疫所ではかなり過酷な麻痺性貝毒の抽出方法(0.1 N 塩酸を用いる加熱抽出)によって毒成分を検出しているし、本研究においても 0.1% 酢酸を用いた加熱抽出でも毒性の低下なしに抽出可能であることが認められた。これらの結果は毒成分が水溶性の低分子化合物であることを示唆しているかもしれないが、一方、透析、限外ろ過ならびにゲルろ過 HPLC の結果は非常に高分子であることを示唆している。いずれにしても非常に粘度の高い物質と挙動をともし、毒成分の性状を調べる際に粘性が大きな障害になっている。今後、毒成分は粘質物そのものである、粘質物と結合している低分子化合物である、という両方の可能性を視野に入れつつ各種クロマトグラフィーでの挙動を明らかにし、精製・同定に努めたい。

E. 結論

産地によらずマガキガイは、マウス致死作用を

示す毒成分を鰓下腺に含む。鰓下腺毒は静脈投与および腹腔内投与ではマウスを死亡させるが、経口投与では毒性を示さないため、食品衛生上の問題は無いと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

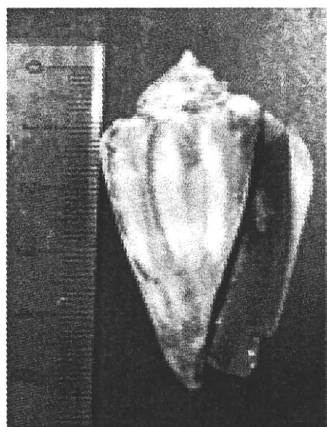
なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



ストロンボイドノッチ

図1 マガキガイ *Strombus luhuanus* の写真

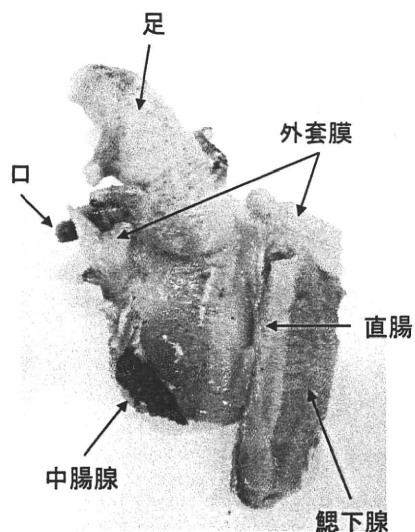


図2 ボイル試料の解剖図

(注) 外套膜を切り開いている。また、中腸腺の大部分と生殖腺は欠けている。

表1 フィリピン産マガキガイの部位別毒性

実験	部位	部位重量と 溶媒量の比	マウス致死活性 (titer)		
			静脈投与	腹腔内投与	経口投与
1	筋肉	1:4	<1		
	中腸腺	1:4	<1		
	唾液腺	1:40	<1		
	その他	1:9	32	4	<1
2	筋肉	1:4	<1		
	中腸腺	1:4	<1		
	生殖腺	1:4	<1		
	唾液腺	1:4	<1		
	直腸	1:4	<1		
	Style sac	1:4	<1		
	外套膜	1:4	<1		
	鰓下腺	1:4	128	16	<1

表2 沖縄産マガキガイの部位別毒性

部位	部位重量と 溶媒量の比	マウス致死活性 (titer)		
		静脈投与	腹腔内投与	経口投与
筋肉 (唾液腺を含む)	1:4	<1		
内蔵 (中腸腺+生殖腺)	1:4	<1		
外套膜 (style sac を含む)	1:4	<1		
鰓下腺	1:4	64	16	<1

表3 フィリピン産マガキガイの鰓下腺の毒性および抽出方法の影響

試料	抽出溶媒	加熱の有無	静脈投与によるマウス致死活性 (titer)
1	PBS	-	64
	PB	-	64
2	水	-	128
	水	+	128
3	水	-	128
4	水	+	128
5	水	+	128
6	0.1%酢酸	+	64
7	メタノール	-	
	水層		<1
	n-ヘキサン層		<1

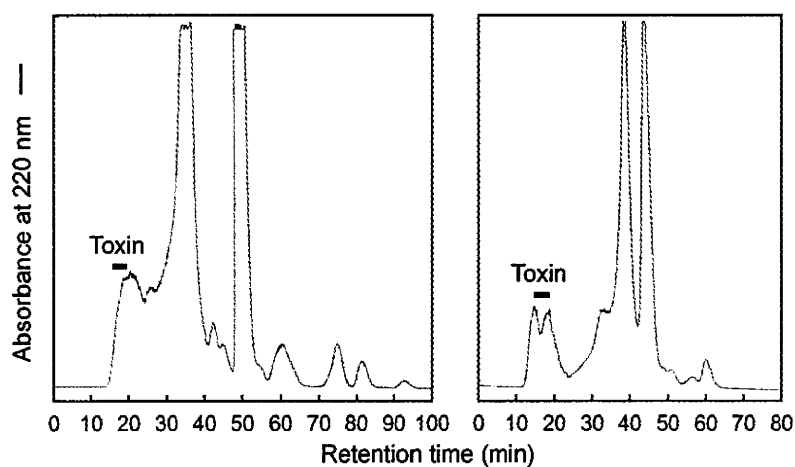


図3 マガキガイ唾液腺毒のゲルろ過 HPLC(左: Superdex 75、右: Superdex 200)における挙動

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「食品中の自然毒のリスク管理に関する研究」

分担研究報告書

キノコによる食中毒実態調査および

スギヒラタケキノコより単離した脂肪酸の培養神経細胞およびグリア細胞に与える影響

分担研究者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所

今年度の、ツキヨタケ、クサウラベニタケを中心とするキノコ中毒事例の急激な増加に対してその原因を調査した。過去 10 年に比べてツキヨタケの事例数、患者数は変化がないもののクサウラベニタケは事例数、患者数ともに約 3 倍に大きく増加した。例年より大きく成長したことに加え、傘の色形が異なるタイプが複数見られることが原因と考えられた。スギヒラタケの中毒原因物質を特定するために、単離したトリエン脂肪酸であるエレオステアリン酸(ESA)の細胞毒性について神経細胞、オリゴデンドロサイト細胞、およびそれらの共培養で検討した。単独培養では ESA 1-2 $\mu\text{g/ml}$ で樹状突起の後退を伴い細胞毒性を示した。一方、共培養下では神経細胞が先に死滅し、その間オリゴデンドロサイト細胞樹状突起も含めて正常であった。神経細胞が死滅した後に、オリゴデンドロサイト細胞も死滅した。この結果から、ESA は神経細胞に選択的に働くことが示唆された。

A. 研究目的

毎年、夏から秋にかけてキノコの誤食によると思われる食中毒事例が多く報告される。そして、食中毒事例が報告されるキノコの 8 割以上はツキヨタケとクサウラベニタケであり、例年同じ傾向である。食用のキノコと間違えて摂取することによるもので、誤食防止のための情報提供が行われているが中毒事例数は減少していない。平成22年度はこれまでになく中毒事例が多く報告される事態となった。そこで、今年度の中毒実態を調査、分析することにした。また、中毒事例数が減少しない原因についてキノコ採取をしている人たちより情報を得て調査分析することが必要と考えられた。中毒事例数の統計(厚生労働省発表)を調査分析した。各地よりクサウラベニタケをはじめとして多くのキノコを採取、収集し、比較した。

次に、食習慣のあるキノコはその成分もほとんど研究されていないことが多い。このことは、ごく少量の毒性物質が含まれている可能性もあり、摂取量が通常より極端に増加した場合の安全性が検討されていないことを意味する。スギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*)は、キシメジ科スギヒラタケ属のキノコであ

り、2004 年～2005 年にかけて急性脳症による被害が報告されるまで食用と考えられていた。しかしながら、未だ原因物質の特定はされていない。原因候補物質を早急に見出し、スギヒラタケによる健康被害の原因究明を通じて、今後他のキノコが原因で起きる健康被害が発生した場合の原因特定につながる具体的検討方法を考えることは、健康被害防止の観点から極めて重要である。これまでに、スギヒラタケキノコ由来の脂肪酸として α -eleostearic acid (α -ESA)を分離して主に培養神経細胞や一部オリゴデンドロサイト細胞に与える影響について報告してきた。オリゴデンドロサイト細胞は、神経細胞の軸索に巻きつくように髄鞘を形成し、神経伝達および保護に働いていると考えられている。スギヒラタケが原因で発症した脳症患者にも髄鞘の脱落(脱髄)の病理所見が報告されていることから、神経細胞およびオリゴデンドロサイト細胞の両面からの研究が望まれる。そこで、オリゴデンドロサイト細胞に対する影響についてさらに詳しく検討するとともに、神経細胞との共培養系での α -ESA の効果についても検討した。さらに、ESA と共通のトリエン構造を持つ脂肪酸類を化学物質データベース SciFinder で構造検索したところいくつか

の脂肪酸が検索できた。

以上について報告する。

B. 研究方法

平成 22 年度は、これまでになくキノコが原因と考えられる食中毒が多く発生した。その原因を考察するため、今年も含めて例年中毒事例が多いキノコのであるクサウラベニタケとツキヨタケについて各地より採取・収集してその形態について傘、柄、ヒダなどの形態、色などを比較検討した。一部のキノコについて、凍結乾燥して柄を開いて柄内部の中実度を比較した。

スギヒラタケ由来 α -ESA は、既知物質であったため標準品を入手し、両者ともに同じ細胞毒性を示すこと確認したため、実験は高純度の市販 α -ESA を用いて行った。

細胞には、培養神経細胞 PC12, SH-SY5Y, オリゴデンドロサイト細胞には p53 ノックアウトマウス脳より樹立されたオリゴデンドロサイトの前駆細胞 FBD-102b (国立生育医療センター 山内淳司 博士より供与) を、血清枯渇下にポリリジンコートされたディッシュ状に播種し、3 日以上培養することで成熟オリゴデンドロサイトへと分化させた細胞を実験に用いた。また、細胞毒性は WST-8 アッセイにより、またアポトーシスの観察には細胞を核染色 (Hoechst33342 による核染色) した後に蛍光顕微鏡を用いて行った。

細胞毒性評価は、 0.25×10^5 cells/well になるようにポリリジンコートした 24 well 培養フラスコに播き、ESA または各種阻害剤で処理後、WST-8 アッセイを行い cell viability を求めた。免疫染色は、細胞を 0.1×10^5 cells/well になるようにポリリジンコートした 8 well ガラススライドチャンバーに播き、サンプル処理後パラホルムアルデヒドで固定し、Triton X-100 で細胞膜透過性処理した。これを、2%BSA でブロッキングした後、各抗体および Hoechst で染色した。染色後、PBS, Milli Q で洗浄した後、Prolong gold でマウントしたものを蛍光顕微鏡で観察した。

培養神経細胞 PC12 とオリゴデンドロサイト FBD-102b との共培養は血清枯渇下に NGF 存在下で行った。また、両者を区別するために一方を GFP または MitotrackerRed で標識した。ESA の細胞毒性は顕微鏡を用いて形態変化を比べた。

C. 研究結果

最初に、今年度のキノコによる食中毒被害事例について調べた。厚生労働省発表の統計を整理してみると、自然毒による中毒被害事例数は、食中毒全体で見ると 10% 程度であるがこの 10 年増加傾向であるとともに(図1)、致死率が高い。そして、平成 22 年度は、夏の高温とその後秋の急激な気温低下と多雨により、キノコの生育に最適な条件がそろったため豊作で、大きく成長したものが多かった。その結果、多くのキノコ採取者が採取したこともあり過去 10 年でも最多の中毒事例が報告された(図2)。中毒が報告されたキノコを調べると例年通りツキヨタケとクサウラベニタケが主であった。しかし、ツキヨタケの中毒事例数は過去 10 年とそれほど変化はなかったが、クサウラベニタケは事例数(8 から 31 件)、患者数(29.8 から 94 人)ともに今年大きく増加した。この原因について調査したところ、以下の点について明らかになった。

1. クサウラベニタケはウラベニホテイシメジよりも華奢で小さめである。残暑のためクサウラベニタケの発生が遅れたため、例年先に発生するクサウラベニタケの発生がウラベニホテイシメジの時期となり、さらにキノコ自体も大きく生育したためウラベニホテイシメジと間違えた。
2. クサウラベニタケには、傘の色、形においてもいくつか異なるものがあるため、大きくまた量も多く生育した今年度はウラベニホテイシメジとの判別が難しかった。
3. キノコの豊作であったため、普段キノコに興味のない人が多く採取した。

このうち、3 については注意喚起、情報提供を一層行うことが必要である。1, 2 に関しては、見分けが難