

しいクサウラベニタケのより確実な判別法を検討することが必要であると考えられた。今後の課題としてい。

次に、スギヒラタケが原因と考えられる急性脳症の原因物質特定のための研究結果について述べる。

いくつかの研究グループが原因解明に取り組んでいるが、科学的な実験結果に基づいて原因候補物質であると考えられるものはほとんどない。シアンまたはシアン配糖体が一つの候補との報告もあるが、健康な人に中毒事例報告が一人もないこと、キノコ中毒で見られる下痢や嘔吐の消化器症状を示した人がいないなど、その特異な点から見てスギヒラタケ中毒の原因物質がシアンであると考えするには矛盾点が多い。そのため、別の角度から検討を行ってきた。これまでに、スギヒラタケより毒性スクリーニングを行い、毒性を示す脂肪酸として α -、 β -ESA を単離しいくつかの検討を行い、これらの脂肪酸が神経細胞およびオリゴデンドロサイト細胞に対して 2-5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で毒性を示すことを明らかにしてきた。今回はオリゴデンドロサイトへの影響について詳しく検討するとともに、神経細胞との共培養系においてその効果を検討した。なお、オリゴデンドロサイトが完全に分化したことは、成熟オリゴデンドロサイトのマーカーである塩基性ミエリンタンパク(MBP)に対する抗体で染色して確認した。

オリゴデンドロサイト細胞 FBD-102b は、ESA 5 $\mu\text{g/ml}$ で処理すると数時間で樹状のネットワークが後退して、数本の直線状の突起になったことから、ESA は FBD-102b の分化を阻害するものと考えられた。ESA で overnight 処理すると、ほぼすべての細胞が死滅した(図 5)。一方、PC12 と FBD-102b との共培養を行うと、ESA 5 $\mu\text{g/ml}$ と先の実験と同一濃度で処理しても FBD-102b 細胞の樹状のネットワークにはほとんど影響することなく、先に PC12 細胞の神経突起が後退し、死滅していった(図 6)。このことから、ESA は、オリゴデンドロサイト細胞である FBD-102b よりも神経細胞である PC12 に積極的に取り込まれて作用することが示唆された。スギヒラタケが原因と考えら

れる脳症との関連はまだ明らかではないが、脂溶性が高い脂肪酸である ESA は脳への移行も容易であると考えられることから、有力な候補物質の一つと考えられる。

D. 考察

今年度は、例年にも増してキノコによる中毒事例が多く、特にクサウラベニタケの被害が多かった。判別が専門家でも難しいとされる食用のウラベニホテイシメジとの判別が困難であることが原因であると考えられた。このことから、両者を明確にかつできるだけ容易に判別できる方法の検討が求められる。

スギヒラタケが原因と考えられる急性脳症の原因候補物質として ESA を見出した。ESA は天然にはアブラギリやゴーヤの種子にトリグリセリドのエステル体として含まれていることが報告されている。我々のこれまでの研究から ESA のエステル体は毒性を示さないことを確認している。ESA がフリー体(非エステル体、すなわちカルボン酸)として含有されているのはスギヒラタケが初めてであり、それが毒性を示したものと考えられ、容易な脳への移行性と合わせて有力な原因物質としてさらに検討して、原因解明に繋げる必要がある。

ESA のようなトリエン脂肪酸と類似した構造の化合物がどのような毒性を持つかデータベース検索した。その結果、共役トリエン構造を持つ脂肪酸は、2重結合の E 体、Z 体に関わらず数 10 $\mu\text{g/ml}$ で細胞毒性が報告されていることが分かった(図 7)。しかし、低濃度で神経細胞に作用するという報告は今回が初めてである。

E. 結論

今年度のキノコによる中毒事例の急激な増加は、気候の変化がキノコの発生と生育に最適であったために従来よりも大きく成長したことが、判別が難しいクサウラベニタケとウラベニホテイシメジの見分けをさらに困難にした原因と考えられた。

スギヒラタケ中より単離した共役型トリエン不飽和脂肪酸である α -eleostearic acid は、単独培養条件では、

培養神経細胞およびオリゴデンドロサイト細胞の両方において細胞をアポトーシスに導く。一方、両者の共培養条件では神経細胞に優先的に取り込まれて細胞死を、その後にオリゴデンドロサイト細胞を細胞死へ導くことが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Kondo, S. Obitsu, S. Ohta, K. Matsunami, H. Otsuka, R. Teshima: Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)-1-independent apoptosis-inducing factor (AIF) release and cell death are induced by eleostearic acid and blocked by alpha-tocopherol and MEK inhibition. *J. Biol. Chem.* 285, 13079-13091 (2010).
2. Y. Ueguchi, K. Matsunami, H. Otsuka, K. Kondo: Constituents of cultivated *Agaricus blazei*. *J. Nat Med.* 65, 307-312 (2011).
3. K. Kondo, S. Obitsu, R. Teshima: α -Synuclein aggregation and transmission are enhanced by leucine-rich repeat kinase 2. *Biol. Pharm. Bull.* accepted (2011).

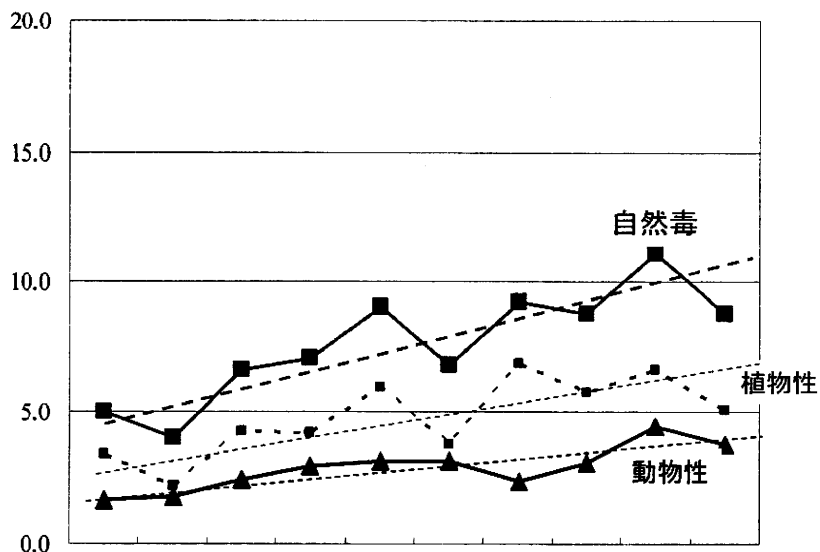
2. 学会発表

1. 近藤一成, 小櫃冨未, 手島玲子: LRRK2 共存下での synuclein タンパクの細胞間輸送と細胞毒性. 第131回日本薬学会年会, 2011年, 静岡市.

2. 近藤一成, 小櫃冨未, 太田小夜香, 手島玲子: 培養神経細胞を用いたHDAC阻害剤によるエレオステアリン酸刺激による細胞死の抑制効果と解析. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学学会大会合同大会, 2010年, 神戸市.
3. 小櫃冨未, 近藤一成, 手島玲子: PARP-1やカスパーゼを経由しないエレオステアリン酸刺激による細胞死におけるAIFの解析. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学学会大会合同大会, 2010年, 神戸市.

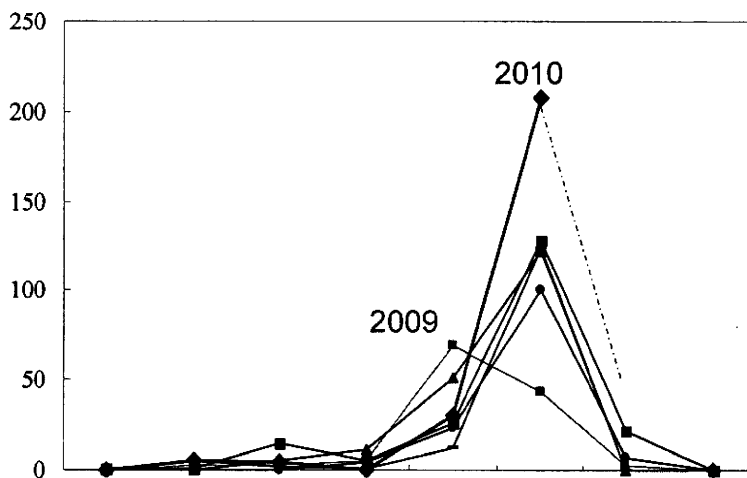
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



年	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
自然毒	5.0	4.0	6.6	7.1	9.1	6.9	9.3	8.8	11.1	8.8
植物性(高等植物,きのこ)	3.4	2.2	4.3	4.2	5.9	3.8	6.9	5.7	6.6	5.1
動物性(ふぐ,貝など)	1.6	1.8	2.4	2.9	3.1	3.1	2.3	3.0	4.5	3.7

図1 過去10年の年次別自然毒発生状況(厚生労働省発表)



月別患者数	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
2010(速報値)	0	5	4	0	30	208	>1	
2009	0	3	3	5	69	43	3	0
2008	0	0	5	11	51	122	0	0
2007	1	1	15	5	26	128	22	0
2006	0	5	2	1	12	124	0	0
2005	0	0	0	4	23	100	7	0

図2 過去6年の月別きのこ毒発生状況(厚生労働省発表)

平成22年度(2010年)のキノコによる中毒被害報告数

キノコの種類 (推定を含む)	事件数	患者数	死者数
クサウラベニタケ	31	94	0
ツキヨタケ	26	88	0
ニガクリタケ	4	4	0
カキシメジ	3	4	0
その他	13	32	0
種類不明	8	25	0
合計	85	247	0

キノコの種類	2000-2009年の10年間の平均		
	事件数	患者数	死者
クサウラベニタケ	8.0	29.8	0.0
ツキヨタケ	18.5	79.2	0.0

図3 キノコ中毒事例数の2010年とそれまでの過去10年の平均との比較

傘は、灰色で傘の中心から放射上にシミのあるもの(左), 黄土色(左から2番目), やや大型の黄土色で傘の周囲が波打って上に反っている(左から3番目), 茶色(右)のタイプなどがある。

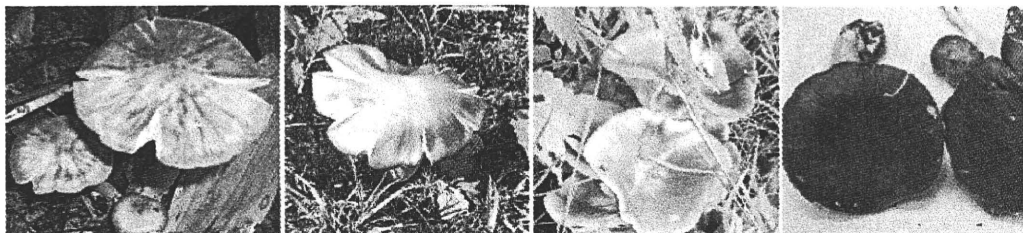


図4 クサウラベニタケのさまざまな形態

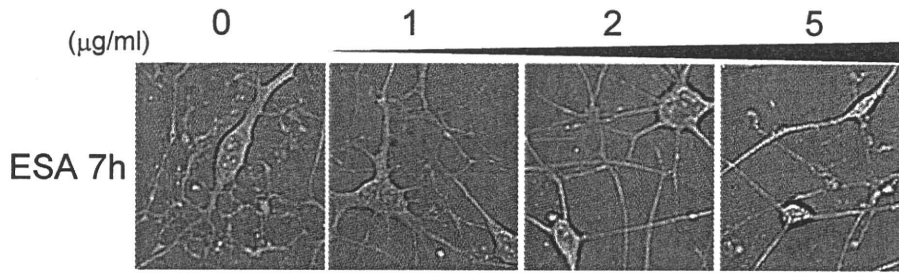
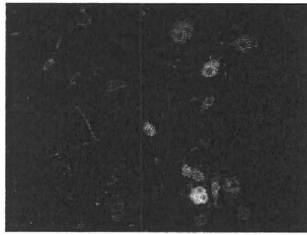


図5 ESA 処理した FBD-102b 細胞における樹状ネットワークの後退



(上の図は、PC12 が緑、FBD-102bが赤で染め分けて区別)

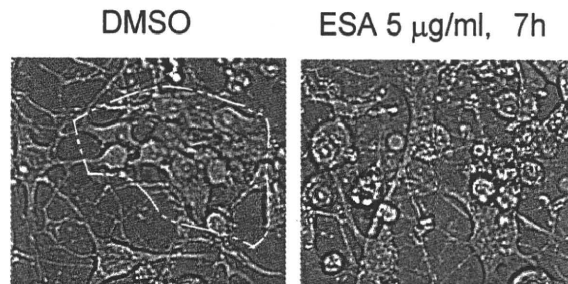


図6 ESA 処理した PC12 および FBD-102b 細胞

PC12 細胞が先に死滅していく。

白く囲んだ領域は神経細胞，それ以外はオリゴデンドロサイト細胞(長い突起あり)

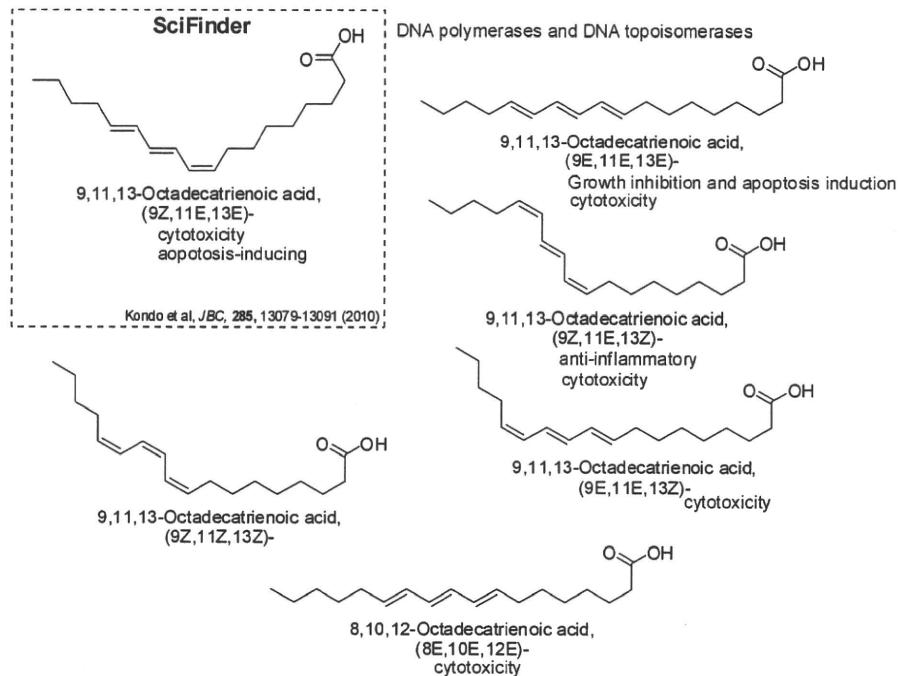


図7 ESA と類似構造を持つ脂肪酸の毒性(データベースより)

植物中毒の情報収集と植物の同定

研究分担者 佐竹元吉 富山大学和漢医薬学総合研究所

研究要旨

「自然毒のリスクプロファイル」を発展させ、国内に生育する有毒植物の情報を徹底的に調査・収集し、単行本として出版するため、薬用植物・植物毒の専門家 23 名を集めて研究会を組織した。分担して 70 科 180 種の有毒植物情報を調査・収集し、「日本の有毒植物」として学研から発刊するため、編集作業を進めている。

A. 研究目的

「自然毒のリスクプロファイル」を発展させ、国内に生育する有毒植物の情報を徹底的に調査・収集し、単行本を出版して一般に啓蒙・注意喚起し、中毒防止対策の一助とする。

B. 研究方法・結果

1) 専門家による研究会の組織化

できるだけ多くの有毒植物情報を調査・収集するため、国内の薬用植物・植物毒の専門家に呼びかけ「植物毒研究会」を組織した。メンバーリストによって日常的に連絡をとりながら、分担して有毒植物の調査・情報収集を行った。構成員、以下の通り。

吉田尚利(北海道医療大薬草園)
磯田 進(昭和大薬用植物園)
平井康昭(昭和大薬用植物園)
渥美聡孝(昭和大薬)
中根孝久(昭和大薬大)
高野昭人(昭和大薬大)
淵野裕之(医薬基盤研薬用植物資源)
朝比奈はるか(お茶の水女子大生環研)
佐竹元吉(富山大和漢研)
紺野勝弘(富山大和漢研)
数馬恒平(富山大和漢研)
中田政司(富山県立中央植物園)
御影雅幸(金沢大薬)
佐々木陽平(金沢大薬)
酒井英二(岐阜薬大薬草園)
権守邦夫(浜松医大法医学)

後藤勝実(京都薬大薬用植物園)
月岡淳子(京都薬大薬用植物園)
神田博史(安田女子大薬用植物園)
奈女良 昭(広島大法医学)
関田節子(徳島文理大香川薬)
矢原正治(熊本大薬用植物園)
杉村康司(医薬基盤研薬用植物資源・種子島)

2) 「日本の有毒植物」発刊に向けた調査・編集

学研、図鑑・百科 科学部が趣旨に賛同し、「フィールドベスト図鑑 vol. 14 日本の有毒植物」として編集・出版することになった。そこで、学研の担当者も交えて「植物毒研究会」打合せ会を2回開催し、編集作業等を検討した。最終的に、70 科 180 種の有毒植物情報を網羅することになり、それぞれが 5-10 種ずつ担当して、写真・分布・毒性成分などの情報を収集し原稿を作成した。現在、5 月末の発刊に向けて編集作業が進行中。

C. 考察

「自然毒のリスクプロファイル」には、過去数年間で実際中毒の起こった有毒植物 21 種を掲載した。しかし、中毒予防の観点から、より多くの、できれば国内の全有毒植物について情報収集し発信するべきと考え、単行本にまとめることを企画した。そのためには、より多くの専門家の協力が必要になる。リスクプロファイル作成時は「植物毒研究会」は 14 名で、各自 1-2 種ずつ担当したが、今回はほぼ倍増に近い 23 名で、5-10 種ずつ担当した。本企画が順調に進んだのは、呼びかけに快く応じ、惜しみなく協力し

てくれた「植物毒研究会」の専門家たちの力が大きい。

この本の趣旨について、学研 図鑑・百科 科学部が賛同し、編集を担ってくれたことも大きな意義がある。学研では、フィールドベスト図鑑として、「日本の薬草」「日本の毒きのこ」など、すでに 13 巻を刊行している。いわゆるポケット図鑑で、一般の植物・動物愛好者が山野で持ち歩くのに便利な小型判ではあるが、それぞれの分野の専門家が執筆し、内容・レベルは非常に高い。このシリーズに加えられることは、一般への啓蒙・中毒予防という点からも、非常に有利になるものと考えられる。

D. 結論

全国の薬用植物・植物毒の専門家に呼びかけて 23 名の「植物毒研究会」を組織した。分担して国内の有毒植物 70 科 180 種を調査・情報収集し、それをまとめて「日本の有毒植物」として学研から出版するため、編集作業を進めた。発刊は、本年 5 月末を予定している。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

紺野勝弘, 佐竹元吉: アジサイによる中毒と原因毒: 食品衛生学雑誌, 2010, 51, J-6-J-9.

2. 学会発表

宮永 賢、数馬恒平、紺野勝弘、佐竹元吉: アジサイ属植物由来食中毒成分の検討: 日本生薬学会第 57 回年会, 2010 年 9 月, 徳島市.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

植物毒の毒性評価と毒成分分析

研究分担者 紺野勝弘 富山大学和漢医薬学総合研究所

研究要旨

アジサイ属植物の有毒成分解明のため、化学分析および試飲テストを行った。アジサイには青酸配糖体が含まれると古くから言われているが、我々のシアン化合物分析では検出できなかった。一方、アジサイ中毒は、嘔吐性アルカロイド febrifugine によるとの指摘があるので、アジサイ葉抽出物について成分分析し、febrifugine が含まれていることを確認した。しかし、これが中毒本体であるかどうかはまだ確定的ではなく、今後の研究課題である。アマチャについては、苦味成分を検索し、いくつかの強い苦味を示す化合物を得た。また、種々濃度を変えてアマチャの試飲テストを行い、薄く透明なアマチャは問題ないが、濃く濁ったものでは、吐き気・悪心を催す

A. 研究目的

2008年6月、大阪と筑波で、相次いでアジサイによる食中毒が発生した。また、2008年および2009年4月の灌仏会（花祭り）において、やはりアマチャによる中毒が報告された。

そこで、本研究では、これらアジサイ属植物に、食中毒を引き起こすような毒成分が含まれているのかどうか、含まれているとすれば、どのような化合物なのかを特定することを目的に成分分析を行う。

B. 研究方法・結果

1) アジサイの成分分析

アジサイには青酸配糖体が含まれていると古くから言われていたが、文献調査の結果、そのような報告は見当たらなかった。京都薬大の吉川らは、中国四川省産のアジサイから新規青酸配糖体を分離・構造決定したが（Nakamura et al., Tetrahedron Lett. 2009, 50, 4639-4642）、これらは京都産のアジサイには含まれず、品種・生育地によって成分変異が大きいとの見解を示している。実際、各地から寄せられたアジサイのシアン検出結果は、陽性・陰性さまざまであった（私信による）。我々も、富山産のアジサイ葉抽出物

について、シアンテストワコー（和光純薬）を用いてシアン化合物の検出を試みたが、まったく検出されなかった。

一方、アジサイには嘔吐性アルカロイドとして知られる febrifugine が含まれるとの報告があり（Ishii et al., J. Nat. Med. 2007, 61, 213-216）、これが中毒本体との指摘もある（指田豊, 公衆衛生, 2009, 73, 341-344）。febrifugine は、もともとジョウザンアジサイを基源とする生薬ジョウザンの抗マラリア成分として単離されたが、嘔吐性も強いいため、抗マラリア薬としては使われていない。

以上のことから、アジサイ葉中の febrifugine の検出・同定を試みた。材料のアジサイとして、つくば市の飲食店に植えられていた実際中毒を起こしたアジサイを採集・栽培し、その葉を用いた。メタノール抽出物から定法通りアルカロイド分画を得て、それを逆相 HPLC を用いた LC-MS にて分析した。対照として、市販の生薬ジョウザンを同様処理して、febrifugine のピークと比較検討した。その結果、たしかにアジサイ抽出物にも febrifugine が含まれていることが確認できた。今後、正確に定量し、中毒を起こすに十分な量かどうか検討する予定である。

2) アマチャの試飲テスト

アマチャは、昔から4月8日の灌仏会(花祭り)の甘茶供養に用いられているが、その花祭りで2009～2010年、相次いで中毒が発生した。いずれも、子供数十人が甘茶を飲んで嘔吐症状を訴えたが、幸い重篤には至らなかった。アマチャはまた、生薬の甘味剤として日本薬局方にも収載され、これまで有毒成分の報告はまったくない。前述のシアンテストワコーにより、約6 ng/gのシアン化合物が検出されたが、この量は、ヒトに中毒を引き起こすほどではないというのが、法医学の専門家の見解であった。

成分分析に先立って、まず試飲テストを行った。中毒時のアマチャが苦かった、濃かったという情報があるので、濃度を種々変えたアマチャを作り、成人5名で試飲した。その結果、濃度と苦味が重要なことがわかった。購入したアマチャには、作り方として、2～3グラムを1リットルの水で煮出すとある。そこで、これを標準(1倍)として、その2倍、5倍、10倍、20倍の濃さのアマチャをつくり、味を試してみた。1～2倍まではアマチャ独特の甘味があり、まったく問題なく飲むことができた。しかし、5倍以上の場合、苦味・渋みを強く感じ、被験者の約8割が30分～1時間後に悪心・吐き気を催した。また、1～2倍では透明な黄～茶褐色であるが、5倍以上になると濁りを生じる。濁っている場合でも、お湯で薄めて透明にすると、1～2倍と同様問題なく飲めるようになる。したがって、濃く濁ったアマチャは避けること、濃い場合はお湯で透明になるまで薄めることで、問題なく飲めることがわかった。

3) アマチャの苦味成分の分析

試飲テストの結果、アマチャ抽出物中には、苦味や嘔吐・悪心を起こす成分があることがわかったので、この成分特定を目的として成分分析を行った。アマチャ熱水抽出物を酢酸エチル-水で振り分けると、苦味は水溶性部に残る。そこで、これをSephadex G-25のクロマトグラフィーにかけ、12分画に分離した。各分画の一部をなめてみると、数分画に苦味を感じた。現在、これら苦味画分をHPLCにて分離・精製し、得られた成分の構造決定を検討している。

C. 考察

1) アジサイの成分分析

アジサイは、品種・産地によって成分変異があると考えられるので、今回は、実際中毒を起こしたつくば市の飲食店に植えられていたアジサイを採集・栽培し、その葉を用いて成分分析を行った。嘔吐性アルカロイドのfebrifugineが中毒本体との指摘があるので、このアルカロイドに注目し、LC-MSを用いて検討した。過去の報告にあるように、たしかにfebrifugineが含まれていることが確認できた。しかし、これが中毒本体かどうかは、今後さらに検討を要する。febrifugineの定量法を確立した上で、正確に含量を定量し、ヒトに中毒を起こすに十分な量かどうか検討する予定である。

2) アマチャの試飲テスト

アマチャは、江戸時代から飲まれ親しまれているものなので、いわゆる毒性成分が含まれていることは考えにくい。実際これまで、有毒成分の報告はない。中毒が起こった時には、苦く濃かったという情報にヒントを得て、濃度を種々変えたアマチャで試飲テストを行った。その結果、薄く入れたお茶では問題がなく、濃い場合には非常に苦く、吐き気・悪心を催すことがわかった。濃い場合でも、お湯で薄めることで、問題なく飲めることもわかった。この結果は、厚労省ホームページの「自然毒のリスクプロファイル」に追加掲載し、一般に注意喚起する予定である。

3) アマチャの苦味成分の分析

吐き気・悪心を催す苦味成分を特定するため、成分分析を進めている。クロマトグラフィーで単一に精製できた成分もあるので、それらの構造決定を検討している。

D. 結論

アジサイには、嘔吐性アルカロイドのfebrifugineが含まれていることが確認された。今後、それが中毒本体かどうか検討する。

アマチャは、濃く入れた場合強い苦味を感じ、吐き気・悪心を催すことがわかった。この苦味成分の特定(単離・構造決定)を進めている。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

紺野勝弘, 佐竹元吉: アジサイによる中毒と原因毒: 食品衛生学雑誌, 2010, 51, J-6-J-9.

2. 学会発表

宮永 賢、数馬恒平、紺野勝弘、佐竹元吉: アジサイ属植物由来食中毒成分の検討: 日本生薬学会第57回年会, 2010年9月, 徳島市.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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
T. Matsumoto, D. Tanuma, K. Tsutsumi, J.-K. Jeon, S. Ishizaki, Y. Nagashima	Plasma protein binding of tetrodotoxin in the marine puffer fish <i>Takifugu rubripes</i> .	Toxicon	55巻	415-420	2010
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 <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> と毒化ムラサキイガイの毒性と毒成分	食品衛生学雑誌	51	170-177	2010
荒川 修	無毒フグの養殖	Biophilia	7	26-30	2011
K. Kondo, S. Obitsu, S. Ohta, K. Matsunami, H. Otsuka, R. Teshima	Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)-1-independent apoptosis-inducing factor (AIF) release and cell death are induced by eleostearic acid and blocked by alpha-tocopherol and MEK inhibition	J. Biol. Chem.	285	13079-13091	2010
Y. Ueguchi, K. Matsunami, H. Otsuka, K. Kondo	Constituents of cultivated <i>Agaricus blazei</i>	J. Nat Med.	65	307-312	2011
K. Kondo, S. Obitsu, R. Teshima	α -Synuclein aggregation and transmission are enhanced by leucine-rich repeat kinase 2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells	Biol. Pharm. Bull.	34	In press	2011
紺野勝弘, 佐竹元吉	アジサイによる中毒と原因毒	食品衛生学雑誌	51	J-6-J-8	2010



Plasma protein binding of tetrodotoxin in the marine puffer fish *Takifugu rubripes*

Takuya Matsumoto^a, Daisuke Tanuma^a, Kazuma Tsutsumi^a, Joong-Kyun Jeon^b,
Shoichiro Ishizaki^a, Yuji Nagashima^{a,*}

^a Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Konan 4-5-7, Minato, Tokyo 108-8477, Japan

^b Division of Marine Bioscience and Technology, Kangnung-Wonju National University, Jibyeon, Gangneung 210-702, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2009

Received in revised form

31 August 2009

Accepted 15 September 2009

Available online 22 September 2009

Keywords:

Tetrodotoxin

Plasma protein binding

Equilibrium dialysis

Marine puffer fish *Takifugu rubripes*

Greenling *Hexagrammos otakii*

Bovine serum albumin

Bovine alpha-1-acid glycoprotein

Pharmacokinetics

ABSTRACT

To elucidate the involvement of plasma protein binding in the disposition of tetrodotoxin (TTX) in puffer fish, we used equilibrium dialysis to measure protein binding of TTX in the plasma of the marine puffer fish *Takifugu rubripes* and the non-toxic greenling *Hexagrammos otakii*, and in solutions of bovine serum albumin (BSA) and bovine alpha-1-acid glycoprotein (AGP). TTX (100–1000 µg/mL) bound to protein in *T. rubripes* plasma with low affinity in a non-saturable manner. The amount of bound TTX increased linearly with the TTX concentration, reaching 3.92 ± 0.42 µg TTX/mg protein at 1000 µg TTX/mL. Approximately 80% of the TTX in the plasma of *T. rubripes* was unbound in the concentration range of TTX examined, indicating that TTX exists predominantly in the unbound form in the circulating blood of *T. rubripes* at a wide range of TTX concentrations. TTX also bound non-specifically to *H. otakii* plasma proteins, BSA, and bovine AGP. The amount of the bound TTX in the plasma of *H. otakii* and BSA, respectively, was 1.86 ± 0.36 and 4.65 ± 0.70 µg TTX/mg protein at 1000 µg TTX/mL, and that in the bovine AGP was 8.78 ± 0.25 µg TTX/mg protein at 200 µg TTX/mL.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Marine puffer fish, the family Tetraodontidae, generally contain a potent neurotoxin, tetrodotoxin (TTX), which is a voltage-gated sodium channel blocker, in specific tissues such as liver, ovary, and skin (Halstead, 1988; Soong and Venkatesh, 2006; Lee and Ruben, 2008). There is somewhat general agreement that marine puffer fish accumulate TTX by bioaccumulation via the marine food chain (Noguchi and Arakawa, 2008), based on the findings that cultured marine puffer fish are not toxic (Matsui et al., 1981, 1982; Lin et al., 1998; Noguchi et al., 2006) and non-toxic cultured puffer fish become toxic by feeding on artificial TTX-containing diets (Matsui et al., 1981; Yamamori et al., 2004;

Honda et al., 2005; Kono et al., 2008). Marine puffer fish seem to have a unique competence to accumulate TTX in the body. We previously demonstrated in the marine puffer fish *Takifugu rubripes* that TTX is well absorbed into the systemic circulation from the gastrointestinal tract and accumulates in the liver after a single administration (Matsumoto et al., 2008a). Pharmacokinetic studies of TTX in *T. rubripes* have led to the classification of three groups of tissues: (1) the central compartment, including kidney and spleen, in which the TTX concentration is instantaneously proportional to the blood concentration; (2) the peripheral compartment, including the liver, in which the TTX concentration increases even as the blood concentration decreases; and (3) the peripheral compartment, including muscle and skin, in which the TTX concentration is independent of the blood concentration (Matsumoto et al., 2008b). TTX transport via the circulating blood is deeply involved in the disposition of TTX in the puffer fish body.

* Corresponding author. Tel./fax: +81 3 5463 0604.

E-mail address: yujicd@kaiyodai.ac.jp (Y. Nagashima).

Recent progress in studies of the plasma protein binding of TTX in marine puffer fish has revealed some interesting findings. The puffer fish saxitoxin (STX) and TTX-binding protein (PSTBP) was first purified from the plasma of the marine puffer fish *Takifugu niphobles* as a possible TTX-carrier protein (Matsui et al., 2000). Yotsu-Yamashita et al. (2001) also purified PSTBP from the plasma of other species of the marine puffer fish *Takifugu pardalis* and examined its binding property. The TTX affinity to *T. pardalis* PSTBP is much lower than that of STX, because the IC₅₀ value of tritium-labeled STX binding to *T. pardalis* PSTBP for TTX is 1400 times larger than that for STX, although TTX and STX share the same binding site on *T. pardalis* PSTBP (Yotsu-Yamashita et al., 2001, 2002). These findings suggest that PSTBP has an important role in the plasma protein binding of TTX and STX in the Tetraodontidae family of marine puffer fish. The actual abundance of PSTBP in the puffer fish plasma, however, is still unknown, and it is unclear whether other plasma proteins affect the protein binding of TTX in puffer fish plasma.

We previously demonstrated plasma protein binding of TTX in the marine puffer fish *T. rubripes* and revealed that the percentage of the unbound form against the total TTX concentration in the plasma was approximately 60% at concentrations ranging from 1.4 to 22.5 µg TTX/mL (Matsumoto et al., 2008a). Based on these findings, we predict that TTX has a low affinity to the total plasma protein of *T. rubripes*. In the present study, to elucidate the involvement of plasma protein binding in the disposition of TTX in puffer fish, we used equilibrium dialysis to measure protein binding of TTX in the plasma of the marine puffer fish *T. rubripes* and the non-toxic marine greenling *Hexagrammos otakii*, and in solutions of bovine serum albumin (BSA) and bovine alpha-1-acid glycoprotein (AGP).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Marine puffer fish *T. rubripes* specimens ($n = 6$, 720–1210 g body weight) and the non-toxic marine greenling *H. otakii* specimens ($n = 5$, 1060–1290 g body weight) were obtained live from a Tokyo central wholesale market and transported to our laboratory. TTX used in the protein binding assay was purified from the ovaries of *T. pardalis* by a combination of ultrafiltration and a series of column chromatographic separations, as reported previously (Matsumoto et al., 2007). Crystalline TTX (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) was used as a standard for the liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI-MS) analysis. BSA and bovine AGP (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used in the protein binding assay. BSA was used as a standard for the protein determination. All other chemicals were reagent grade.

2.2. Equilibrium dialysis

Protein binding of TTX was determined using an equilibrium dialysis unit (Sanplatec Co., Tokyo, Japan), as described previously (Matsumoto et al., 2008a). Approximately 25 mL blood/kg body weight was collected from

T. rubripes or *H. otakii* using a heparinized disposable syringe. The blood was centrifuged at $1200 \times g$ for 10 min at 4 °C and the plasma was collected and stored on ice until use. The dialysis membrane (MWCO 3500, Spectrum Laboratories, Compton, CA, USA) was rinsed twice in milliQ water, soaked in modified Hank's balanced salt solution (pH 7.4) for 30 min, and placed into the equilibrium dialysis unit between the two compartments of the dialysis chamber. A 950 µL aliquot of fish plasma was then mixed with a 50 µL aliquot of TTX solution (0–1000 µg TTX/50 µL), and a 950 µL aliquot of this mixture (1000 µL) was introduced into one side of the chamber (termed the plasma sample). Then, a 950 µL aliquot of modified Hank's balanced salt solution (pH 7.4) was placed into the counter side (termed the buffer sample) of the dialysis chamber. Plasma protein binding of TTX was assessed after incubation at 20 °C for 48 h. Plasma and buffer samples were withdrawn from each side of the chamber. Another series of experiments were performed using solutions of BSA and bovine AGP, in which BSA and bovine AGP were dissolved in modified Hank's balanced salt solution (pH 7.4) at a concentration of 60 mg BSA/mL and 4 mg AGP/mL, respectively.

2.3. Sample preparation and TTX determination

After the sampling, the plasma sample was mixed with a methanol/acetic acid solution, and purified by ultrafiltration (MWCO 5000). The filtrate was lyophilized, and dissolved in the mobile phase of LC/ESI-MS. The amount of TTX in the sample solution was determined by the LC/ESI-MS analysis, as described previously (Matsumoto et al., 2008a).

2.4. Determination of protein amount

Protein determination was performed by the method of Lowry et al. (1951) with BSA as the standard.

2.5. Statistics

The determination was performed in triplicate in individual experiments. Data are expressed as mean \pm standard error (SE). Tukey's test and Student's *t*-test were used to analyze the significance of differences among means at the 5% significance level in the examination of the time to achieve equilibrium.

3. Results

The plasma from the marine puffer fish *T. rubripes* and the non-toxic marine fish *H. otakii* used in this study initially did not contain detectable amounts of TTX (<10 ng TTX/mL plasma).

3.1. The time to equilibrium

The time to achieve equilibrium was examined with the plasma of marine puffer fish *T. rubripes*. The total protein concentration in the plasma was 49.1 ± 9.5 mg protein/mL ($n = 3$). The mixture of *T. rubripes* plasma and the TTX solution was incubated against an equal volume of the

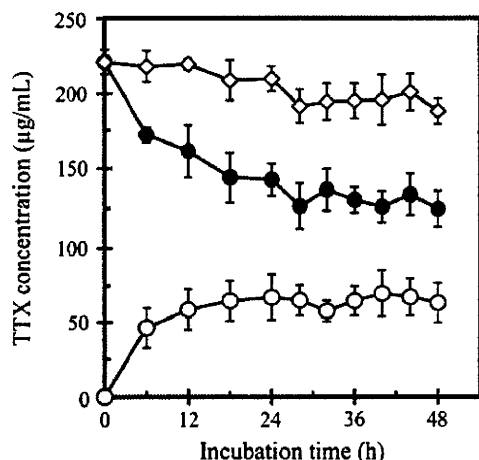


Fig. 1. Time course of the TTX concentration in the equilibrium dialysis chamber. The time to achieve equilibrium was examined with the plasma of marine puffer fish *Takifugu rubripes*. The protein concentration in *T. rubripes* plasma was 49.1 ± 9.5 mg protein/mL ($n = 3$). TTX concentrations in both the plasma chamber (●) and the buffer chamber (○) were determined at several time-points. The total concentration of TTX (◇) indicates the sum of both TTX concentrations. Values are presented as the mean \pm SE of three individual experiments performed in triplicate.

modified Hank's balanced salt solution (pH 7.4; Fig. 1). The TTX concentration in the plasma sample was 221 ± 8 μ g TTX/mL before incubation, and gradually decreased to 161 ± 17 and 143 ± 10 μ g TTX/mL at 12 and 24 h after incubation, respectively. At 28 h after incubation or later, there were no significant changes in the TTX concentration in the plasma samples, ranging from 125 ± 11 to 137 ± 13 μ g TTX/mL ($p > 0.05$). In contrast, the TTX concentration in the buffer sample gradually increased to 59 ± 14 and 67 ± 16 μ g TTX/mL at 12 and 24 h after incubation, respectively. At 28 h after incubation or later, there were no significant changes in the TTX concentration in the buffer samples, ranging from 58 ± 7 to 70 ± 16 μ g TTX/mL ($p > 0.05$). This finding agreed with those obtained in the cases of the plasma of greenling *H. otakii*, BSA, and bovine

AGP (data not shown). Based on the above findings, we set the incubation time of 48 h for the equilibrium dialysis method.

3.2. Binding of TTX to the plasma protein of *T. rubripes* and *H. otakii*

Plasma protein binding of TTX was determined with the plasma of the marine puffer fish *T. rubripes*. The total protein concentration in the plasma was 55.4 ± 0.5 mg protein/mL ($n = 3$). The concentrations of TTX in the chambers were determined at 48 h after incubation. The TTX concentration of the bound form was obtained by subtracting the TTX concentration in the buffer chamber from the total concentration in the plasma chamber, as previously described (Matsumoto et al., 2008a). Saturation of the plasma protein binding of TTX was not observed at concentrations ranging from 100 to 1000 μ g TTX/mL (Fig. 2A). The amount of bound TTX in the plasma of *T. rubripes* was 0.47 ± 0.16 μ g TTX/mg protein at 100 μ g TTX/mL, and increased linearly with the TTX concentration, reaching 3.92 ± 0.42 μ g TTX/mg protein at 1000 μ g TTX/mL (Fig. 2B). The percentage of the unbound fraction of TTX in the plasma of *T. rubripes* was almost constant at approximately 80% in the concentration range of TTX examined (Fig. 3).

In the next experiment, the greenling *H. otakii* was used as a non-toxic species, because it was confirmed to have no detectable TTX and accumulates little toxin in the liver tissue slices by *in vitro* incubation with TTX, unlike puffer fish *T. rubripes* (Nagashima et al., 2003). The total protein concentration in the plasma of *H. otakii* was 49.9 ± 1.5 mg protein/mL ($n = 5$). Saturation of the plasma protein binding of TTX was not observed in the concentration range of 100–1000 μ g TTX/mL (Fig. 4A), as in the case of the marine puffer fish *T. rubripes*. The amount of the bound TTX in the plasma of *H. otakii* was 0.35 ± 0.05 μ g TTX/mg protein at 100 μ g TTX/mL, and increased linearly with the TTX concentration, reaching

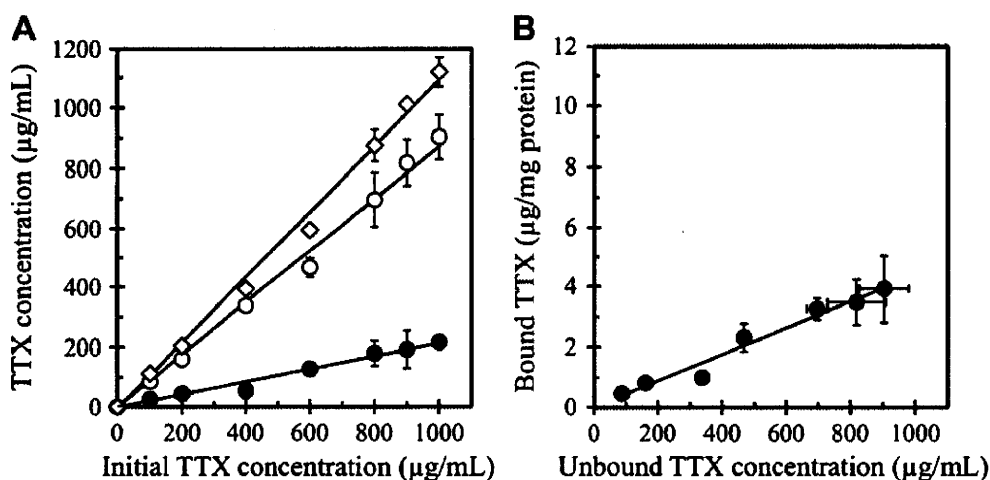


Fig. 2. Binding property of TTX to the plasma protein of the marine puffer fish *Takifugu rubripes* by equilibrium dialysis. (A) TTX concentration of the bound form (●), the unbound form (○), and the total (◇) as a function of the initial TTX concentration. TTX concentrations were estimated after incubating at 20 °C for 48 h. The protein concentration in *T. rubripes* plasma was 55.4 ± 0.5 mg protein/mL ($n = 3$). (B) The amount of bound TTX to the plasma proteins as a function of the unbound TTX concentration. Values are presented as the mean \pm SE of three individual experiments performed in triplicate.

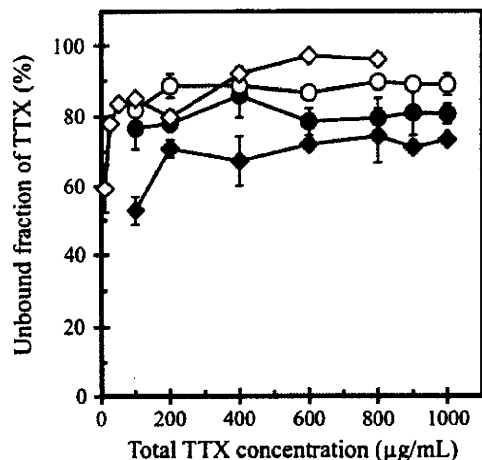


Fig. 3. Percentage of the unbound fraction of TTX in the plasma of the marine puffer fish *Takifugu rubripes* (●) and the non-toxic marine greenling *Hexagrammos otakii* (○), and in solutions of BSA (◆) and bovine AGP (◇). Values are presented as the mean \pm SE of each individual in at least three experiments performed in triplicate.

$1.86 \pm 0.36 \mu\text{g TTX/mg protein}$ at $1000 \mu\text{g TTX/mL}$ (Fig. 4B). The percentage of the unbound fraction of TTX in the plasma of *H. otakii* was approximately 90% in the concentration range of TTX examined (Fig. 3).

3.3. Binding property of TTX to the BSA and bovine AGP solutions

Protein binding of TTX was determined with a solution of BSA instead of fish plasma, because albumin is a major protein in plasma and non-specifically traps many drugs (Vallner, 1977; Ascoli et al., 2006). The concentration of BSA was prepared at 60 mg BSA/mL by reference to the total protein concentration in the plasma of *T. rubripes*. Saturation of the binding was not observed, as in the cases of *T. rubripes* and *H. otakii* (Fig. 5A). The amount of bound TTX in the BSA solution was determined to be $0.82 \pm 0.13 \mu\text{g TTX/}$

mg BSA at $100 \mu\text{g TTX/mL}$, and increased linearly with the TTX concentration, reaching $4.65 \pm 0.70 \mu\text{g TTX/mg BSA}$ at $1000 \mu\text{g TTX/mL}$ (Fig. 5B). The percentage of the unbound fraction of TTX in the BSA solution was approximately 70% in the concentrations ranging from 200 to $1000 \mu\text{g TTX/mL}$ (Fig. 3).

Then, protein binding assay of TTX was also performed with a solution of bovine AGP, because AGP is an important binding protein to basic compounds in plasma, and TTX is weakly basic (amphoteric) in neutral condition (Goto et al., 1965). The concentration of bovine AGP was prepared at 4 mg AGP/mL in consideration of the analytical precision and AGP level in mammalian plasma, since there is no available information on the plasma AGP concentration in *T. rubripes* to our knowledge. Accordingly, the initial concentration of TTX was reduced at 10, 25, 50, 100, 200, 400, 600, and $800 \mu\text{g TTX/mL}$. TTX bound to bovine AGP in a saturable manner (Fig. 6). The amount of the bound TTX in the AGP solution was $3.53 \pm 0.25 \mu\text{g TTX/mg AGP}$ at $100 \mu\text{g TTX/mL}$, and steady at approximately $8 \mu\text{g TTX/mg AGP}$ at the TTX concentrations ranging from 200 to $800 \mu\text{g TTX/mL}$ (Fig. 6B). The percentage of the unbound fraction of TTX in the AGP solution reached more than 80% at the TTX concentrations ranging from 50 to $800 \mu\text{g TTX/mL}$ (Fig. 3).

4. Discussion

The data in the present study revealed that TTX–plasma protein binding in the marine puffer fish *T. rubripes* and the non-toxic marine greenling *H. otakii* is non-saturable at TTX concentrations ranging from 100 to $1000 \mu\text{g TTX/mL}$ by an equilibrium dialysis method. The percentage of the unbound fraction of TTX was approximately 80% in *T. rubripes* plasma, and 90% in *H. otakii* plasma with the concentration range of TTX examined, indicating that TTX binds to fish plasma proteins with a low affinity at a high concentration of TTX. In contrast, Matsui et al. (2000) examined the protein binding of TTX in the plasma of the

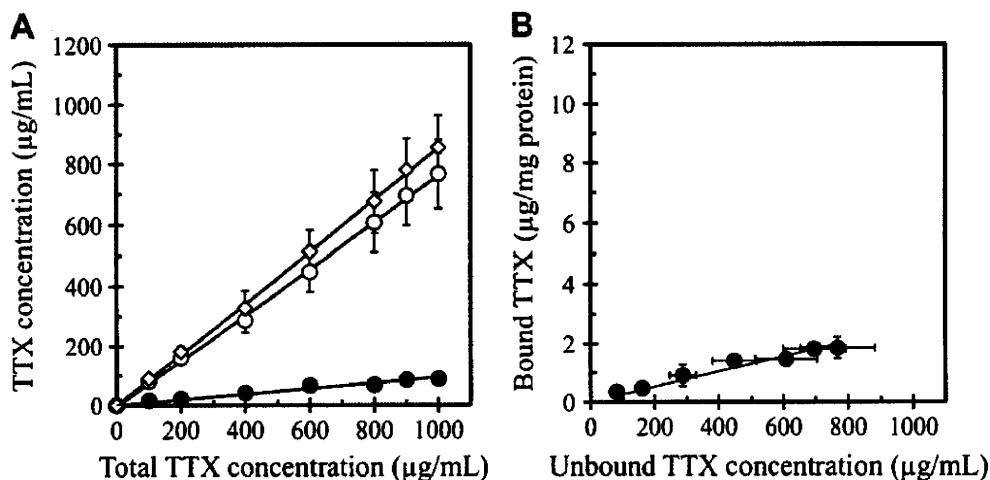


Fig. 4. Binding property of TTX to the plasma protein of the non-toxic marine greenling *Hexagrammos otakii* by equilibrium dialysis. (A) TTX concentration of the bound form (●), the unbound form (○), and the total (◇) as a function of the initial TTX concentration. TTX concentrations were estimated after the incubation at 20°C for 48 h. The protein concentration in *H. otakii* plasma was $49.9 \pm 1.5 \text{ mg protein/mL}$ ($n = 5$). (B) The amount of bound TTX to the plasma proteins as a function of the unbound TTX concentration. Values are presented as the mean \pm SE of individual five experiments performed in triplicate.

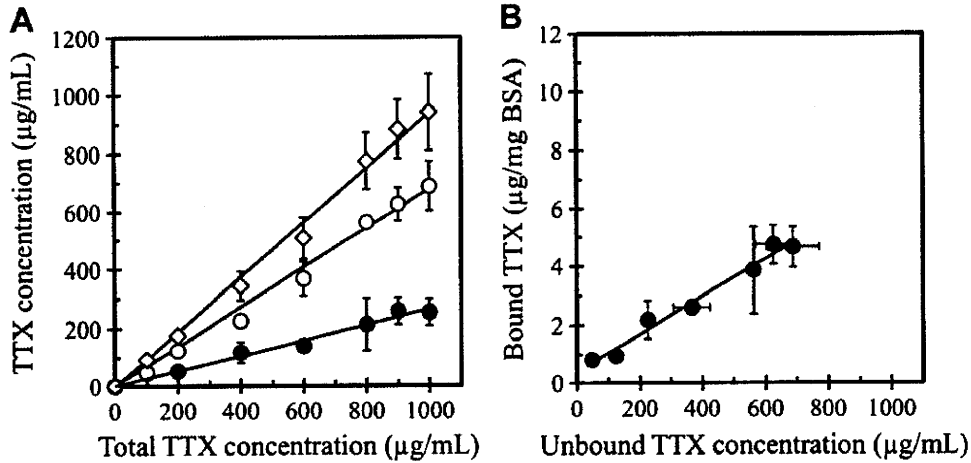


Fig. 5. Binding property of TTX to the BSA solution by equilibrium dialysis. (A) TTX concentration of the bound form (●), the unbound form (○), and the total (◇) as a function of the initial TTX concentration. TTX concentrations were estimated after incubation at 20 °C for 48 h. The protein concentration in BSA solution was 60 mg BSA/mL. (B) The amount of bound TTX to BSA as a function of the unbound TTX concentration. Values are presented as the mean ± SE of three individual experiments performed in triplicate.

other non-toxic marine fish, including the red seabream *Pagrus major*, yellowtail *Seriola quinqueradiata*, filefish *Stephanolepis cirrhifer*, and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* by the ultrafiltration method. They reported no or negligible binding of TTX to these plasma proteins at a total TTX concentration of 2.5 nmol/mL (equivalent to 0.80 µg TTX/mL), despite the finding that there is distinct TTX binding (the binding ratios of 36–92%) to the plasma proteins of several species of marine puffer fish, genus *Takifugu*.

We substituted BSA and bovine AGP for fish plasma proteins to examine whether TTX binds to other plasma proteins. It is generally accepted that serum albumin, lipoproteins, and AGP are the most important drug binding proteins in plasma. Albumin is the most abundant blood plasma protein that acts as a protein storage component and adsorbs many compounds in a non-specific, low

affinity, and non-saturable manner (Wright et al., 1996). AGP is a small amount of plasma protein that mainly binds basic and neutral compounds from endogenous as well as exogenous origins (Fournier et al., 2000). The present study demonstrated that TTX bound non-specifically to not only the fish plasma proteins but also BSA and bovine AGP. The TTX-binding ability of BSA and bovine AGP is comparable to that of the *T. rubripes* plasma proteins. The amounts of bound TTX in solutions of BSA and bovine AGP, respectively, were 4.65 ± 0.70 µg TTX/mg BSA at 1000 µg TTX/mL and 8.78 ± 0.25 µg TTX/mg AGP at 200 µg TTX/mL, which are equivalent to a 1:1 stoichiometry TTX/protein based on the molecular weight of TTX (319 Da), BSA (66 kDa), and bovine AGP (33.8 kDa). Intriguingly, the STX- and TTX-binding protein PSTBP in the plasma of marine puffer fish *T. pardalis* was characterized as an acidic glycoprotein that covalently binds to a dimer consisting of 104 kDa subunits with an

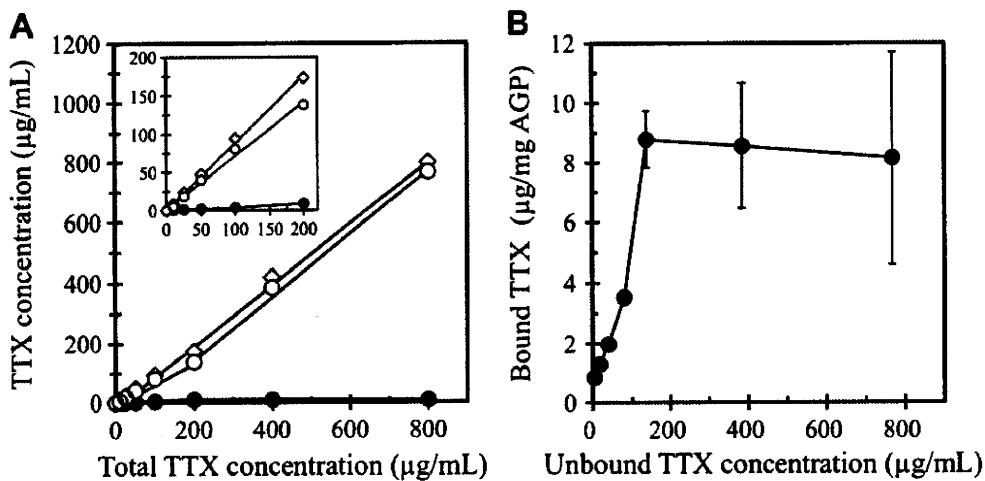


Fig. 6. Binding property of TTX to the bovine AGP solution by equilibrium dialysis. (A) TTX concentration of the bound form (●), the unbound form (○), and the total (◇) as a function of the initial TTX concentration. TTX concentrations were estimated after incubation at 20 °C for 48 h. The protein concentration in bovine AGP solution was 4 mg AGP/mL. Inset, the expanded figure for the binding property of TTX until 200 µg TTX/mL. (B) The amount of bound TTX to bovine AGP as a function of the unbound TTX concentration. Values are presented as the mean ± SE of three individual experiments performed in triplicate.

isoelectric point of 5.0 (Yotsu-Yamashita, et al., 2001). Oba et al. (2007) recently reported that the tributyltin-binding protein type 2 in the blood of Japanese flounder *P. olivaceus* belongs to the lipocalin superfamily, which includes AGP, and shows highly identity to PSTBP of *T. pardalis*. These results suggest that PSTBP plays a function like AGP in the marine puffer fish plasma. Moreover, Yotsu-Yamashita et al. (2001) reported that the binding dissociation constant (K_d) for ^3H -STX to *T. pardalis* PSTBP is 14.6 ± 0.33 nM, as determined by an equilibrium binding assay, and the binding of ^3H -STX to dimeric PSTBP of *T. pardalis* has a 1:1 stoichiometry (B_{max} of 10.6 ± 0.97 nmol/mg protein). They also demonstrated that the affinity of TTX to *T. pardalis* PSTBP was much lower than that of STX (Yotsu-Yamashita, et al., 2001). These results reveal that TTX binds to plasma proteins including albumin and AGP with low affinity.

We previously reported that the percentage of unbound form of TTX against the total TTX concentration in the plasma of the marine puffer fish *T. rubripes* was approximately 60% at concentrations ranging from 1.4 to 22.5 μg TTX/mL (Matsumoto et al., 2008a). In the present study, we demonstrated that the percentage of unbound fraction of TTX was approximately 80% at concentrations of 100–1000 μg TTX/mL in the plasma of *T. rubripes*. These data indicate that TTX exists mainly in the unbound form in the circulating blood of the marine puffer fish *T. rubripes* at a wide range of TTX concentrations. The unbound fraction of TTX in the plasma of *T. rubripes* might elevate the total body clearance of TTX, because only the unbound form of TTX is crossing the vessel wall and more specifically absorbed and bound by organ tissues like that of liver and ovaries. The analyses of the plasma protein composition and the ligand binding property of plasma proteins are needed to clarify the differences in the ligand protein binding capacity among fish species.

Acknowledgements

This study was partly supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from Japan Society for the Promotion of Science and a Grant-in-Aid for Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Ascoli, G.A., Domenici, E., Bertucci, C., 2006. Drug binding to human serum albumin: abridged review of results obtained with high-performance liquid chromatography and circular dichroism. *Chirality* 18, 667–679.
- Fournier, T., Medjoubi, N.N., Porquet, D., 2000. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 157–171.
- Goto, T., Kishi, Y., Takahashi, S., Hirata, Y., 1965. Tetrodotoxin. *Tetrahedron* 21, 2059–2088.
- Halstead, B.W., 1988. *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World*, second ed. The Darwin Press Inc., Princeton, pp. 525–644.
- Honda, S., Arakawa, O., Takatani, T., Tachibana, K., Yagi, M., Tanigawa, A., Noguchi, T., 2005. Toxication of cultured puffer fish *Takifugu rubripes* by feeding on tetrodotoxin-containing diet. *Nippon Suisan Gakkaishi* 71, 815–820.
- Kono, M., Matsui, T., Furukawa, K., Yotsu-Yamashita, M., Yamamori, K., 2008. Accumulation of tetrodotoxin and 4,9-anhydrotetrodotoxin in cultured juvenile kusahugu *Fugu niphobles* by dietary administration of natural toxic komonfugu *Fugu poecilonotus* liver. *Toxicol* 51, 1269–1273.
- Lee, C.H., Ruben, P.C., 2008. Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels (Austin)* 2, 407–412.
- Lin, S.J., Chai, T.J., Jeng, S.S., Hwang, D.F., 1998. Toxicity of the puffer *Takifugu rubripes* cultured in northern Taiwan. *Fish. Sci.* 64, 766–770.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Matsui, T., Hamada, S., Konosu, S., 1981. Difference in accumulation of puffer fish toxin and crystalline tetrodotoxin in the puffer fish, *Fugu rubripes rubripes*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 47, 535–537.
- Matsui, T., Sato, H., Hamada, S., Shimizu, C., 1982. Comparison of toxicity of the cultured and wild puffer fish *Fugu niphobles*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 48, 253.
- Matsui, T., Yamamori, K., Furukawa, K., Kono, M., 2000. Purification and some properties of a tetrodotoxin binding protein from the blood plasma of kusahugu, *Takifugu niphobles*. *Toxicol* 38, 463–468.
- Matsumoto, T., Nagashima, Y., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., Ishizaki, S., Shimakura, K., Shiomi, K., 2007. Involvement of carrier-mediated transport system in uptake of tetrodotoxin into liver tissue slices of puffer fish *Takifugu rubripes*. *Toxicol* 50, 173–179.
- Matsumoto, T., Nagashima, Y., Kusuhara, H., Ishizaki, S., Shimakura, K., Shiomi, K., 2008a. Pharmacokinetics of tetrodotoxin in puffer fish *Takifugu rubripes* by a single administration technique. *Toxicol* 51, 1051–1059.
- Matsumoto, T., Nagashima, Y., Kusuhara, H., Ishizaki, S., Shimakura, K., Shiomi, K., 2008b. Evaluation of hepatic uptake clearance of tetrodotoxin in the puffer fish *Takifugu rubripes*. *Toxicol* 52, 369–374.
- Nagashima, Y., Toyoda, M., Hasobe, M., Shimakura, K., Shiomi, K., 2003. In vitro accumulation of tetrodotoxin in pufferfish liver tissue slices. *Toxicol* 41, 569–574.
- Noguchi, T., Arakawa, O., Takatani, T., 2006. TTX accumulation in puffer-fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part D* 1, 145–152.
- Noguchi, T., Arakawa, O., 2008. Tetrodotoxin – distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Mar. Drugs* 28, 220–242.
- Oba, Y., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Satone, H., Kitano, T., Nakao, M., Kawabata, S., Honjo, T., 2007. Purification and characterization of tributyltin-binding protein type 2 from plasma of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Biochem.* 142, 229–238.
- Soong, T.W., Venkatesh, B., 2006. Adaptive evolution of tetrodotoxin resistance in animals. *Trends Genet.* 22, 621–626.
- Vallner, J.J., 1977. Binding of drugs by albumin and plasma protein. *J. Pharm. Sci.* 66, 447–465.
- Wright, J.D., Boudinot, F.D., Ujhelyi, M.R., 1996. Measurement and analysis of unbound drug concentrations. *Clin. Pharmacokinet.* 30, 445–462.
- Yamamori, K., Kono, M., Furukawa, K., Matsui, T., 2004. The toxication of juvenile cultured kusahugu *Takifugu niphobles* by oral administration of crystalline tetrodotoxin. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 45, 73–75.
- Yotsu-Yamashita, M., Sugimoto, A., Terakawa, T., Shoji, Y., Miyazawa, T., Yasumoto, T., 2001. Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel soluble saxitoxin and tetrodotoxin binding protein from plasma of the puffer fish, *Fugu pardalis*. *Eur. J. Biochem.* 268, 5937–5946.
- Yotsu-Yamashita, M., Shoji, Y., Terakawa, T., Yamada, S., Miyazawa, T., Yasumoto, T., 2002. Mutual binding inhibition of tetrodotoxin and saxitoxin to their binding protein from the plasma of the puffer fish, *Fugu pardalis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2520–2524.

報 文

瀬戸内海播磨灘で発生した有毒渦鞭毛藻
Alexandrium tamiyavanichii と
 毒化ムラサキイガイの毒性と毒成分

(平成 22 年 3 月 26 日受理)

相良 剛史^{1,2} 谷山 茂人³ 吉松 定昭⁴ 高谷 智裕³
 橋本 多美子⁵ 西堀 尚良¹ 西尾 幸郎¹ 荒川 修^{3,*}

Toxicity and Toxin Profile of the Dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* and
 Toxic Mussels in Harima-Nada of Seto Inland Sea, Japan

Takefumi SAGARA^{1,2}, Shigeto TANIYAMA³, Sadaaki YOSHIMATSU⁴, Tomohiro TAKATANI³,
 Tamiko HASHIMOTO⁵, Naoyoshi NISHIBORI¹, Sachio NISHIO¹ 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;

⁴Akashiwo Research Institute of Kagawa Prefecture: 75-5 Yashimahigashi-machi,
 Takamatsu, Kagawa 761-0111, Japan;

⁵Department of Dietary Life and Food Sciences, Junior College Division, Mukogawa
 Women's University; 6-46 Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan;

*Corresponding author

From October to November 2004, the paralytic shellfish poison (PSP)-producing dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* was observed at Harima-Nada, Seto Inland Sea at a maximum cell density of 4.960 cells/L. The wild cells of the dinoflagellate collected from the same seawaters, and cultured cells derived from them showed toxicity scores of $6.25\text{--}15.4 \times 10^{-4}$ and $2.7\text{--}3.5 \times 10^{-4}$ MU/cell, respectively, both of which were much higher than those of previously reported strains. PSP of the wild cells was mainly composed of gonyautoxin (GTX) 5 (40.6–52.4 mol%) and GTX4 (15.6–24.8 mol%), showing a unique composition that was greatly different from those of the previously reported strains, or of the cultured cells, whose main toxin component was GTX3 (average 37.6 mol%). The mussel *Mytilus galloprovincialis* collected from the same area in the same period accumulated a relatively high level of PSP (13–28 MU/g), suggesting a risk that *A. tamiyavanichii* may induce high-level PSP contamination of bivalves even at a cell density as low as around 5,000 cells/L.

(Received March 26, 2010)

Key words: 有毒渦鞭毛藻 toxic dinoflagellate; *Alexandrium tamiyavanichii*; ムラサキイガイ mussel; *Mytilus galloprovincialis*; 麻痺性貝毒 paralytic shellfish poison; サキシトキシン saxitoxin; ゴニオトキシン gonyautoxin

* 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 香川県赤潮研究所: 〒761-0111 香川県高松市屋島東町 75-5

⁵ 武庫川女子大学短期大学部食生活学科: 〒663-8558 兵庫県
 西宮市池開町 6-46

緒 言

日本沿岸では、しばしば麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poison; PSP) を産生する有毒渦鞭毛藻の発生により食用二枚貝が毒化し^{1),2)}、水産上および食品衛生上大きな問題となっている。特に瀬戸内海では、1992年に広島湾において *Alexandrium tamarense* を原因として養殖マガキ *Crassostrea gigas* が毒化して以来、毎年のように同種渦鞭毛藻が発生し、関連産業の脅威となっている^{3)~5)}。当

初より問題となっていた有毒種は *A. tamarensis* および *A. catenella* で、前者は 5,000~10,000 cells/L、後者は 50,000~100,000 cells/L といずれも高密度の発生により二枚貝の毒化を引き起こしてきたが^{6)~8)}、1999 年以降、これらに加えて新たに *A. tamiyavanichii* が出現するようになった^{6), 7), 9)~15)}。本種は以前、*Protogonyaulax cohorticula* と呼ばれ^{16)~18)}、熱帯ないし亜熱帯性の有毒種とされていたが^{18)~21)}、1988 年に相模湾で分布が確認され²²⁾、さらに 1999 年 12 月に瀬戸内海南東部海域で大量発生し、養殖アカガイ *Anadara broughtonii* などの毒化を引き起こした^{9), 10)}。その後 4 年間、同海域では毎年 *A. tamiyavanichii* が出現し、それに起因する二枚貝の毒化も見られたが^{11)~14)}、毒力が出荷規制値 (4 MU/g) を超えることはなかった。しかしながら、当研究室が独自に行っているモニターリングにおいて、2004 年に瀬戸内海播磨灘にて、*A. tamiyavanichii* 以外の既知の PSP 産生渦鞭毛藻が全く観察されないにもかかわらず、二枚貝から規制値を上回る毒性が検出された。*A. tamarensis* や *A. catenella* 同様、*A. tamiyavanichii* も二枚貝の高毒性化を招来するのであれば、水産上および食品衛生上新たな脅威をもたらす種として注視する必要がある。そこで本研究では、瀬戸内海播磨灘で二枚貝が規制値を超えて毒化した原因を明らかにするため、同海域における *A. tamiyavanichii* の出現状況を調べるとともに、本種の天然藻体と培養藻体、ならびに毒化ムラサキイガイの毒性と毒成分について検討した。

実験方法

1. 試料

2004 年 10 月 16 日~11 月 4 日に徳島県鳴門市撫養町、同市鳴門町、同市瀬戸町、同市北灘町、香川県東かがわ市引田の沿岸および引田沖 (以下、それぞれ St. 1~6 とする) (Fig. 1, Table 1) の水深 0 または 0.5 m にて海水を 5 L ずつ採水した。いずれも 100 μ m 孔および 20 μ m 孔のふるいでろ過し、後者のふるい上から回収された微細藻類に含まれる *A. tamiyavanichii* を試料とした。試料は採取後、生かしたまま研究室に持ち帰り、速やかに各試験に供した。本研究では、10 月 16 日に St. 1~5、10 月 19 日に St. 1~4、11 月 4 日に St. 6 で採取した *A. tamiyavanichii* 天然藻体をそれぞれ At1~5, At1'~4', および At6 (Table 1) とした。

一方、2004 年 10 月 17 日に St. 4、10 月 21 日に St. 2 でそれぞれ約 100 個体のムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* を採集して試料 (それぞれ Mg4 および Mg2) とし、氷蔵にて研究室に持ち帰り、直ちに試験に供した。

2. *A. tamiyavanichii* の細胞数の計測

天然藻体 At1~At5, At1'~At4', および At6 につき、光学顕微鏡下で細胞数を計測した。

3. *A. tamiyavanichii* の培養

At6 から単離後、予備培養したクローン株を 4 群 (At6-c1~At6-c4) に分け、いずれも ESM 培地^{23), 24)}を用い、培養温度を 20°C、光強度を 40 μ mol photon/m²/s¹、明暗周期を 12 hr/12 hr とし 30 日間培養した。得られた培養藻体 At6-c1: 2.0×10^7 cells, At6-c2: 2.0×10^7 cells, At

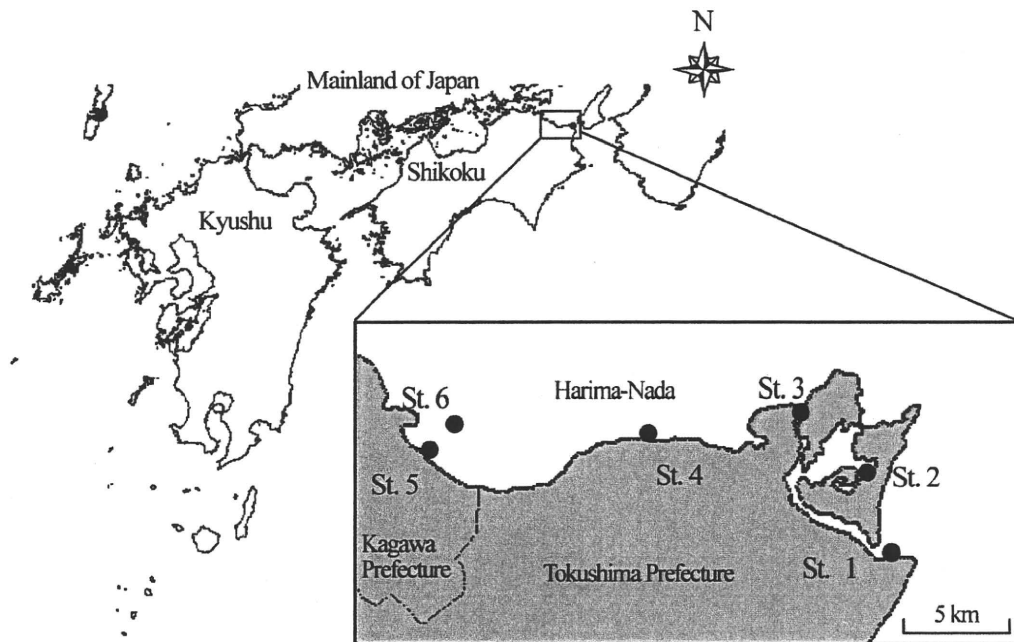


Fig. 1. Map showing sampling stations (●) in Harima-Nada where *A. tamiyavanichii* and/or mussel *M. galloprovincialis* specimens were collected.

Table 1. Cell density and toxicity of *A. tamiyavanichii* at Harima-Nada in 2004, along with toxicity of mussel *M. galloprovincialis*

Species	Date of collection	Place of collection*	Sample code	Cell density (cells/L)	Number of assayed cells	Toxicity (MU/cell or MU/g)**		
						Mouse assay	HPLC	
<i>A. tamiyavanichii</i>	Oct. 16	St. 1	At1	388	19×10^3	$< 25.7 \times 10^{-4}$	—	
		St. 2	At2	1930	97×10^3	15.4×10^{-4}	21.5×10^{-1}	
		St. 3	At3	395	20×10^3	$< 25.3 \times 10^{-4}$	—	
		St. 4	At4	4960	250×10^3	6.25×10^{-4}	8.7×10^{-4}	
		St. 5	At5	96	5×10^3	$< 104 \times 10^{-4}$	—	
	Oct. 19	St. 1	At1'	0.3	—	—	—	
		St. 2	At2'	0.5	—	—	—	
		St. 3	At3'	16	—	—	—	
		St. 4	At4'	0	—	—	—	
	Nov. 4	St. 6	(Cultured cells)	At6	350	—	—	—
				At6-c1	—	20×10^6	2.7×10^{-4}	3.8×10^{-1}
				At6-c2	—	20×10^6	3.5×10^{-4}	3.5×10^{-4}
				At6-c3	—	25×10^6	3.4×10^{-4}	2.9×10^{-4}
				At6-c4	—	35×10^6	2.7×10^{-4}	2.8×10^{-4}
	<i>M. galloprovincialis</i>	Oct. 17	St. 4	Mg4	—	—	28	50
Oct. 21		St. 2	Mg2	—	—	13	—	

* See Fig. 1 for the locations of St. 1-6.

** Toxicity of *A. tamiyavanichii* is expressed in MU/cell, and that of *M. galloprovincialis* in MU/g.

—: not designated or not assayed.

6-c3: 2.5×10^7 cells, At6-c4: 3.5×10^7 cells (Table 1) を以下の試験に供した。

4. 試験液の調製

天然藻体 At1~5 および培養藻体 At6-c1~c4 につき、0.5 mol/L 酢酸溶液を加えて超音波破碎して毒を抽出後、遠心分離 (2,000×g, 20 分間) して得られた上清を試験液とした。

一方、ムラサキガイ Mg4 と Mg2 については、食品衛生検査指針理化学編麻痺性貝毒検査法²⁵⁾に準じて毒の抽出を行った。それぞれ剥き身 100 g を合一し、ホモジナイズ後、10 g を分取して 0.1 M 塩酸で毒を加熱抽出し、遠心分離 (10,000×g, 20 分間) 後の上清を試験液とした。

5. 毒性試験

At1~5, At6-c1~c4, Mg4 および Mg2 につき、食品衛生検査指針理化学編麻痺性貝毒検査法²⁵⁾ (公定法) に準じて各試験液をマウス毒性試験に供し、藻体では 1 細胞当たり、ムラサキガイでは 1 g 当たりの毒力 (マウスユニット; MU) を測定した。ここで 1 MU とは、体重 20 g の ddY 系雄マウスを 15 分で死亡させる毒力と定義する。本試験の実施にあたっては、文部省 (現 文部科学省) 学術国際局長通知 “大学等における動物実験について” (文学情第一四一号) に準じた配慮を行った。

6. 毒成分分析

1) HPLC 分析

毒性試験で検出限界以上の毒力を示した At2, At4, At6-c1~c4, ならびに比較的毒力が強かった Mg4 を対象に毒成分の分析を行った。すなわち、藻体試料については試験液を限外ろ過 (10,000 Da) したものを HPLC

分析に供した。一方、STX 群の分析は、カラムに Develosil C-8 (φ4.6×250 mm, Nomura Chemical 社製)、移動相に 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) を用いて、同様の条件で分析した。

本分析は、従来の HPLC 蛍光法^{26), 27)}に加え、Hashimoto らが開発した方法^{9), 28)}に準拠して行った。すなわち、ゴニオトキシン (GTX) 群とプロトゴニオトキシン (PX) 群 (C 群) については一括して分析を行い、サキシトキシン (STX) 群のみ別に分析した。GTX/PX 群の分析では、カラムに HG3013N (φ4.6×50 mm, Hitachi) と Develosil C-30 UG-5 (φ4.6×250 mm, Nomura Chemical 社製) を用い、前者の温度を 50°C、後者を 25°C に加温制御した。移動相 A: 5 mmol/L ヘプタフルオロ酪酸を含む 10 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.8) および移動相 B: 10 mmol/L ヘプタフルオロ酪酸を含む 10% アセトニトリル-30 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.1) を用い、分析時間 0~25 分を移動相 A, 25~45 分を移動相 B, 45~70 分を移動相 A として、流速を 0.6 mL/min に設定した。カラムからの溶離液に 7 mmol/L 過ヨウ素酸を含む 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 10.0) を混合し、65°C で加熱して蛍光化後、0.5 mol/L 酢酸で蛍光強度を増幅し、励起波長 340 nm, 蛍光波長 410 nm で測定した。

2) LC/MS 分析

Mg4 の試験液を限外ろ過 (10,000 Da) 後、既報¹⁹⁾に準