

- vironm Health Perspectives 114 : 1502~1507, 2006
- 17) 谷山茂人, 荒川 修, 高谷智裕他: アオブダイ中毒様食中毒. *New Food Industry* 45 : 55~61, 2003
- 18) 谷山茂人, 高谷智裕: 魚類の毒(2): パリトキシン. *食品衛生研究* 59(8) : 45~51, 2009
- 19) Nagashima Y, Matsumoto T, Kadoyama K et al : Toxicity and molecular identification of green toadfish *Lagocephalus lunaris* collected from Kyushu coast, Japan. *J Toxicol* 2011 : Article ID 801285, 2011
- 20) Nagashima Y, Matsumoto T, Kadoyama K et al : Tetrodotoxin poisoning due to smooth-backed blowfish *Lagocephalus inermis* and toxicity of *L. inermis* caught off the Kyushu coast, Japan. *Food Hyg Saf Sci* 53 : 85~90, 2012
- 21) 谷 巖: 日本産フグの中毒学的研究. 帝国書院, 東京, p.103, 1945

☆ ☆ ☆ ☆ ☆ ☆

食品衛生研究 63(2). 21-30(2013).

食品中の魚毒(フグ毒)による食中毒とその予防

Food Poisoning due to Marine Toxins, especially Pufferfish Toxin, and its Prevention

東京海洋大学大学院

長島裕二

Tokyo University of Marine Science
and Technology, Graduate School of
Marine Science and Technology

Yuji NAGASHIMA

I はじめに

このたび、日本食品衛生学会主催の「平成24年度厚生労働科学研究シンポジウム 食品の安全を考える」において、「食品中の魚毒による食中毒とその予防」について講演する機会を与えていただいた。本稿は、その講演内容の概要を紹介したものであり、わが国の魚毒による食中毒として、今なお発生件数と中毒症状の重篤さにおいて最も重要なフグ食中毒を中心に述べる。そして、フグ食中毒のおもな発生源となっている釣り人や無資格者に対するフグの飲食に起因する危害防止に役立つ取組みとして、昨年(2012年)10月1日に東京都が行った「東京都ふぐの取扱い規制条例」の一部改正(ふぐ加工製品の取扱い)と、茨城県が実施している「遊漁船上でのフグの除毒処理」についても触れる。

II わが国の食中毒発生状況

食物は長い間の経験によって選び出されたもの

なので、ヒトの健康に危害を与えることはないはずなのだが、飲食に起因する危害がしばしば発生し、社会問題になることがある。食品衛生上の危害として最も身近でかつ被害事例が多いのは食中毒で、経験者は少なくないであろう。筆者も、飲食が原因と思われる猛烈な腹痛や下痢、嘔吐、あるいは一過性のじん麻疹(たぶんヒスタミン中毒)を何回か経験している。

しかし、食品衛生法に従えば、筆者が経験した食^{しよく}中りは食中毒とはならない。なぜなら、食中毒として認められるには、患者が医師の診断を受け、医師が食中毒と判断し、これを保健所長に届け出るという一連の行為が必要だからである。飲食が原因でお腹をこわし2、3日家で療養したり、病院には行ったものの医師が様子を見ましようと言って食中毒と判断しなかったり、保健所長に届け出なかった場合には、“食中毒”とはならない。

厚生労働省が発表している“正真正銘”の食中毒の発生状況(2000～2011年)を表1に示す。2000～2011年の12年間を平均すると毎年約1,500

件の食中毒が発生し、3万人弱が患者となり、数名が死亡している¹⁾。2009年と2010年は2年間連続して食中毒死亡者ゼロであったが、翌2011年は焼肉店での事故などにより再び10名を超える方が死亡した。楽しいはずの食事で痛ましい悲劇が起こるのは食品衛生に携わるものとして残念なことである。

食中毒事例のうち、魚介類および魚介類加工品が原因食品となった事例は、件数(年平均141件)と患者数(年平均1,883人)はそれぞれ全体の1/10以下だが、死者数は1/3を占めている点が注目される。食中毒の分類方法はいろいろあるが、原因物質による分類は食中毒対策を講じるうえで重要かつ効果的である。大別すると、①細菌やウイルスが原因となる微生物性食中毒、②有害化学物質や有害金属などが原因となる化学性食中毒、③動物や植物のもつ自然毒が原因となる自然毒食中毒、の3つに分けることができる。そこで、表1の魚介類による食中毒を病因物質別に分けたのが図1である。図からわかるように、件数ではウイルス、自然毒、細菌の順に多く、患者数ではウイルスが過半を占め、次いで細菌が多く、化学物質、自然毒の順となった。これに対し、死者はすべて自然毒によるもので、魚介類を食べて食中毒になり死亡するのは魚介類の毒が原因ということになる。

Ⅲ 食中毒の原因となるマリントキシン

魚介類のなかに毒をもつものがあることはよく知られていることであり、わが国ではフグの毒がその代表と言える。フグの毒については後述するが、フグ毒以外の魚介類の毒(マリントキシン)による食中毒がときどき発生しており、おもなものを表2にまとめた。

シガテラは世界で最も多くのヒトを中毒させる

魚介類食中毒で、中毒患者数は世界中で毎年3万人とも5万人とも言われている²⁾。シガテラは南北の回帰線にはさまれた海域で発生し、カリブ海、太平洋、インド洋が三大発生地域である。日本では南西諸島がシガテラの発生海域に該当するため、沖縄県や南九州での中毒事例が多いが、近年は温暖化の影響のためか本州沿岸で漁獲された魚でもときどきシガテラが発生している³⁾。シガテラの原因毒素として、脂溶性のシガトキシンと水溶性のマイトトキシンが解明されており、これらの毒性はきわめて強く、マウスに対する半数致死量は、シガトキシン1Bで0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (腹腔内投与)、マイトトキシンで0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (腹腔内投与)となり、マイトトキシンは海洋生物最強の毒素として君臨している。不思議なことに、このような猛毒をもつ魚介類を食べて起こるシガテラはなぜか致死率が低い。中毒症状は消化器系、循環器系、神経系に及び、ドライアイスセンサーンと呼ばれる知覚異常が特徴的で水や冷たいものに触れたとき、ドライアイスに触ったときのように、あるいは電気ショックを受けたように感じるという。

パリトキシンによる中毒は世界的に見ても多くはないが、かつてパリトキシン中毒を起こしたことがある熱帯産のソウシハギが昨年(2012年)秋に日本各地の沿岸で漁獲され、大きく報道されたので記憶されている方もおられよう。幸いにもこのときソウシハギによるパリトキシン中毒はなかったようである。パリトキシンはシガトキシン1Bに匹敵する毒性を示し、マウスに対する半数致死量は0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (腹腔内投与)である。このため、パリトキシン中毒は致死率が高い。中毒症状は激しい筋肉痛と黒褐色の尿がでるミオグロビン尿症が特徴だが、いずれもパリトキシンによる横紋筋融解が原因である。わが国では、アオブグイやハコフグによる中毒がパリトキシンに特徴的

表 1 食中毒発生状況（2000～2011年）

年	総数			魚介類			魚介類加工品		
	件数	患者数	死者数	件数	患者数	死者数	件数	患者数	死者数
2000	2,247	43,307	4	189	2,887	0	15	345	0
2001	1,928	25,862	4	189	2,756	3	11	376	0
2002	1,850	27,629	18	174	2,407	6	10	405	0
2003	1,585	29,355	6	139	1,718	3	7	168	0
2004	1,666	28,175	5	147	1,334	2	9	143	0
2005	1,545	27,019	7	114	963	2	15	1,000	0
2006	1,491	39,026	6	80	772	1	8	164	0
2007	1,289	33,477	7	68	831	3	22	1,080	0
2008	1,369	24,303	4	106	925	3	15	194	0
2009	1,048	20,249	0	94	723	0	9	481	0
2010	1,254	25,972	0	128	1,430	0	8	71	0
2011	1,062	21,616	11	137	1,351	1	7	74	0
平均	1,528	28,833	6	130	1,508	2	11	375	0

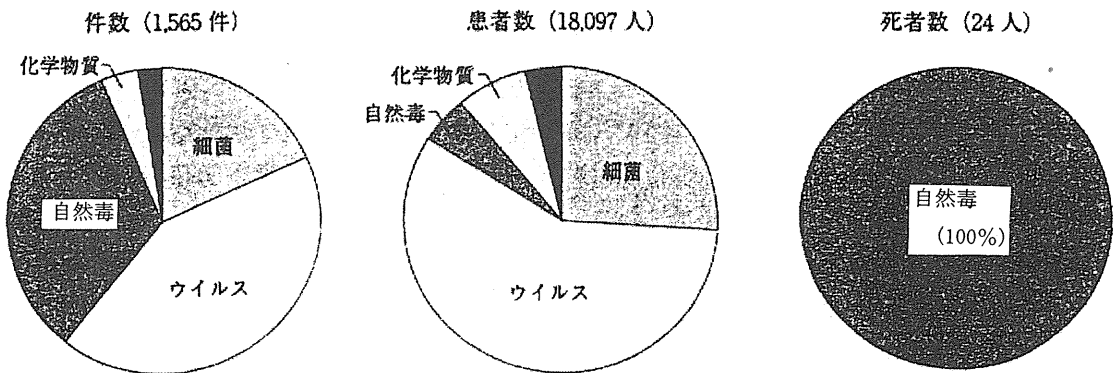


図 1 魚介類食中毒の病因物質（2000～2011年）

表 2 食中毒の原因となる魚類の毒

	毒素	毒生産者			おもな原因魚介類
		魚類	微細藻類	細菌	
フグ毒	テトロドトキシン			○ (?)	フグ科
シガテラ	シガトキシン		○		ドクカマス、バラフエダイ
	マイトトキシン		○		
バリトキシン			○		アオブダイ (?)
マヒ性貝毒	サキシトキシン		○		淡水フグ
	ゴニオトキシン		○		
魚卵毒	ジノグネリン	○			ナガズカ
胆のうの毒	5α-シプリノール	○			コイ
	硫酸エステル				

表3 フグ食中毒事例 (2000～2011年)

年	総数			家庭			飲食店+販売店		
	件数	患者数	死者数	件数	患者数	死者数	件数	患者数	死者数
2000	29	40	0	24	32	0	4	6	0
2001	31	52	3	19	28	3	8	17	0
2002	37	56	6	26	37	5	9	14	1
2003	38	50	3	31	40	2	5	7	1
2004	44	61	2	32	40	1	9	17	1
2005	40	49	2	33	40	2	4	5	0
2006	26	33	1	18	22	1	7	10	0
2007	29	44	3	20	24	3	8	19	0
2008	40	56	3	28	38	2	8	14	1
2009	24	50	0	16	20	0	8	30	0
2010	27	34	0	21	26	0	5	6	0
2011	17	21	1	13	15	0	4	6	1
平均	31.8	45.5	2.0	23.4	30.2	1.6	6.6	12.6	0.4

な中毒症状を呈したことから、バリトキシン様中毒と推定されているが、中毒魚体から原因毒素が単離されていないため、確定には至っていない^{4,5)}。

貝毒として古くから知られ、わが国をはじめ世界中で被害が多いマヒ性貝毒を魚がもつことがあり、とくに東南アジアやバングラデシュの汽水域や淡水に生息するフグ *Tetraodon suvatii*, *T. leiurus*, *T. culcutia*, *Chelonodon patoca* は毒の主成分がフグ毒ではなくマヒ性貝毒であった⁶⁾。また、フィリピンで漁獲された海産モヨウフグ *Arothron* 属はフグ毒とマヒ性貝毒を同時にもつことも報告されている⁷⁾。アメリカ合衆国フロリダで漁獲されたヨリトフグの仲間 (*Sphoeroides* 属) はマヒ性貝毒をもち、これによるフグ中毒が報告されている⁸⁾。

これらの毒素をもつ有毒魚をヒトが誤って食べると中毒を起こすほど危険だが、魚自身が毒を作っているのではない。シガテラ原因毒素のシガトキシンとマイトトキシンは底生渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus*, バリトキシンは渦鞭毛藻

Ostreopsis siamensis など、マヒ性貝毒のサキシトシンやゴニオトキシンは渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella*, *A. tamarense*, *Pyrodinium bahamense* などが産生し、おもに食物連鎖を介して高位の生物に濃縮される⁹⁾。これに対して、ナガスカカ卵巣のジノグネリンとコイ胆のうの5 α -シプリノール硫酸エステルは、いずれもそれらの常在成分あるいはその代謝産物と推定され、これらについてはナガスカカコイが産生していると考えられる^{10,11)}。

IV フグ食中毒

先に、魚介類による食中毒の死亡はすべて自然毒が原因と述べたが、その原因食品はフグ、原因毒素はフグ毒テトロドトキシンである。2000年から2011年におけるフグ食中毒事例を表3に示す。この12年間を平均すると、毎年約30件のフグ毒中毒が発生し、約50人が中毒し、そのうち2人が亡くなっている。フグ食中毒発生のおもな原因施設は家庭で、有毒フグの肝臓や卵巣などの内臓と皮を食べたの食中毒がほとんどである。す

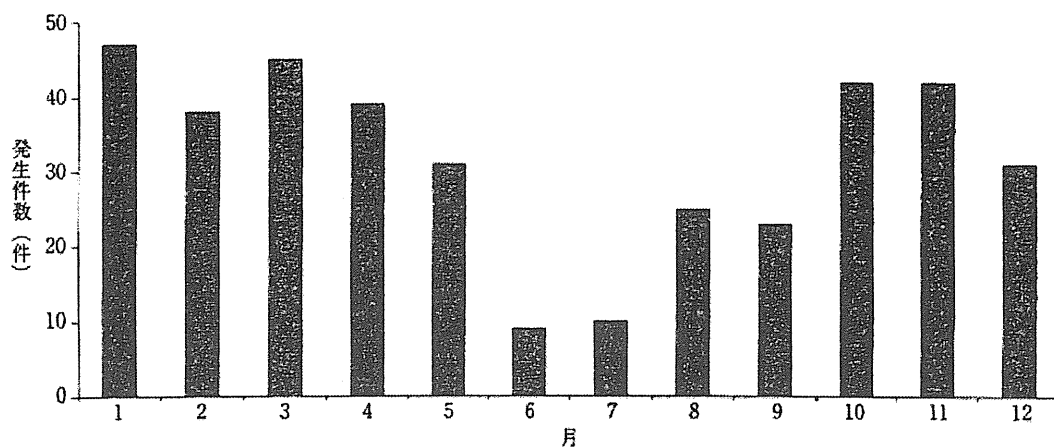


図2 フグ食中毒の月別発生件数 (2000～2011年)

なわち、フグ食中毒の特徴は、釣り人や家庭での素人料理により、毒性の高い内臓や皮を食べて少人数規模（2001～2011年の平均として、フグ食中毒1件当たりの患者数1.5人）で中毒していることである¹²⁾。フグ料理の季節は秋の彼岸から春の彼岸までとされているが、フグは一年を通して漁獲されるため、フグ食中毒事件は秋から春にかけて多いものの一年中発生している（図2）。地域別でみると西日本で多く、瀬戸内海沿岸の広島県、兵庫県、山口県がフグ食中毒のトップ3である¹²⁾。

このように、毎年死者を出すほど危険なフグをなぜ私たちは食べることができるのだろうか。食品衛生法第6条で、腐敗した食品、有毒・有害物質を含む食品、病原微生物に汚染された食品および不潔、異物が混入した食品の販売等は禁止されており、フグは毒をもつのでこれに該当する。このため、フグの食用は原則として禁止されている。しかし、わが国では永年フグの食経験があり、適切な処理を施せばフグを安全に食することができる除毒方法が確立しているため、「ただし、人の健康を損なうおそれがない場合として厚生労働大臣が定める場合においては、その限りではな

い」というただし書きによって例外的にフグの食用が許可されているのである。予防のための方策については後述するが、フグ食中毒はフグに関する正しい知識をもたない素人が調理することにより発生していることを指摘しておきたい。

V フグの毒性とフグ食中毒の予防

フグがフグ毒をもつことはよく知られているが、すべての種類のフグがフグ毒をもつわけではない。フグと名のつく魚のなかでフグ毒テトロドキシンをもちるのはフグ科魚類に限られている⁹⁾。そして、フグの毒性は、フグの種類や部位（臓器）、漁獲海域、漁獲時期によって大きく異なり、さらに個体差が著しいため、同じ種類、同時期、同海域で獲れたフグであっても毒力に大きな差があり、これがフグ食中毒がなくなる一因となっている。

表4に日本沿岸で漁獲されたおもなフグの種類別、組織別毒力を示す⁹⁾。この表は、これまでに測定された試料魚のなかで最も高い毒力を表しており、すべての個体はそのレベルの毒力をもつことを表しているのではない。例えば、ドクサバフグ卵巣は“猛毒”に分類されているが、ドクサバ

表4 日本産フグ科魚類の組織別毒力

種別	卵巣	精巣	肝臓	胆のう	皮膚	腸	筋肉	血液
キタマクラ	×	—	○	—	◎	○	×	—
カワフグ(ヨリトフグ)	×	×	×	—	×	×	×	—
クマサカフグ	×	×	×	—	×	—	×	—
サバフグ	×	×	×	—	×	×	×	—
ドクサバフグ	●	◎	◎	—	◎	◎	◎	—
カナフグ	○	×	●	○	×	○	×	—
センニンフグ	●	—	◎	◎	○	◎	○	—
メフグ	●	×	◎	—	◎	◎	×	—
シマフグ	◎	×	◎	—	×	○	×	—
トラフグ	◎	×	◎	—	×	○	×	×
カラス	●	—	●	—	—	—	—	—
クサフグ	●	○	●	—	◎	●	○	—
ゴマフグ	●	○	●	◎	◎	×	○	—
ショウサイフグ	●	○	●	—	◎	◎	○	—
ナシフグ	●	○	◎	—	●	○	○	—
マフグ	●	×	●	—	◎	◎	×	—
コモンフグ	●	◎	●	—	◎	◎	○	—
ムシフグ	◎	×	◎	—	◎	○	×	—
ヒガンフグ	●	◎	●	●	◎	◎	◎	×
アカメフグ	●	×	◎	—	◎	○	×	×
サンサイフグ	◎	×	◎	—	○	◎	×	—
ナメラダマシ	◎	×	◎	—	○	○	×	—
ホシフグ	◎	×	×	—	○	○	×	—
シロアミフグ	●	—	○	○	×	×	×	—

●：猛毒。組織1gあたり1,000 MU(マウスユニット)以上の毒力，◎：強毒。組織1gあたり100～999 MUの毒力，○：弱毒。組織1gあたり10～99 MUの毒力，×：無毒。組織1gあたり10 MU未満の毒力，—：測定データなし。谷の「日本産フグの毒力表」にその後の知見を加えた。⁹⁾

フグの卵巣がすべて“猛毒”レベルの毒力をもつという意味ではなく、これまでに調査したドクサバフグ卵巣のなかで最も高い毒力を示したのが“猛毒”レベルに達したことを表している。したがって、シマフグやトラフグ卵巣では最高毒力が“強毒”レベル止まりで、1,000 マウスユニット/g^{*1}を超える“猛毒”レベルのものはこれまでに

なかったということである。

フグ食中毒予防のため、わが国では厚生労働省通知により、食用可能なフグの漁獲海域、種類および部位を定めている。表5に厚生労働省が定める【処理等により人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類及び部位】を示す。3科21種類のフグが食用可能なフグとして許可されて

*1 マウスユニット：フグ毒の毒力を表す単位。フグ毒の毒性試験はマウスに対する致死毒性で評価するためマウスユニットが用いられ、その値が大きいほど毒力は強い。例えば、1,000 マウスユニット/gとは、組織1g中にマウス1,000匹を殺すことのできる毒量をもつことを表す。ここで1マウスユニットとは、検液1mlを体重20gのマウスに腹腔内投与したときマウスを30分間で死亡させる毒量と定義される。

表5 処理等により人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類及び部位

科名	種類(種名)	部位		
		筋肉	皮	精巢
フグ科	クサフグ	○	—	—
	コモンフグ	○	—	—
	ヒガンフグ	○	—	—
	ショウサイフグ	○	—	○
	マフグ	○	—	○
	メフグ	○	—	○
	アカメフグ	○	—	○
	トラフグ	○	○	○
	カラス	○	○	○
	シマフグ	○	○	○
	ゴマフグ	○	—	○
	カナフグ	○	○	○
	シロサバフグ	○	○	○
	クロサバフグ	○	○	○
	ヨリトフグ	○	○	○
サンサイフグ	○	—	—	
ハリセンボン科	イシガキフグ	○	○	○
	ハリセンボン	○	○	○
	ヒトヅラハリセンボン	○	○	○
	ネズミフグ	○	○	○
ハコフグ科	ハコフグ	○	—	○

(注)

1. 本表は、有毒魚介類に関する検討委員会における検討結果に基づき作成したものであり、ここに掲載されていないフグであっても、今後、鑑別法及び毒性が明らかになれば追加することもある。
2. 本表は、日本の沿岸域、日本海、渤海、黄海及び東シナ海で漁獲されるフグに適用する。ただし、岩手県越喜来湾及び釜石湾並びに宮城県雄勝湾で漁獲されるコモンフグ及びヒガンフグについては適用しない。
3. ○は可食部位。
4. まれに、いわゆる両性フグといわれる雌雄同体のフグが見られることがあり、この場合の生殖巣はすべて有毒部位とする。
5. 筋肉には骨を、皮にはヒレを含む。
6. フグは、トラフグとカラスの中間種のような個体が出現することがあるので、これらのフグについては、両種とも○の部位のみを可食部位とする。

漁獲海域が限定されているもの

科名	種類(種名)	可食部位
フグ科	ナシフグ(有明海、橘湾、香川県及び岡山県の瀬戸内海域で漁獲されたものに限る)	筋肉(骨を含む)
	ナシフグ(有明海及び橘湾で漁獲され、長崎県が定める要領に基づき処理されたものに限る)	精巢

いるが、食用できる部位は筋肉、精巢、皮に限られており、それ以外の部位は食用が禁止されている。ここで注意が必要なのは、種によって可食部位が異なることである。①トラフグのように筋肉、皮、精巢の3部位が食用可能なもの、②ショウサイフグのように筋肉と精巢だけのもの、③ヒガンフグのように筋肉しか食用できないものがある。また、フグは外見上の形態がよく似ているので魚種判別が難しい。こうした状況からフグの取扱いに関しては、都道府県各自治体の条例等により、専門的な知識と高度な除毒技術をもつフグ取扱者と施設に免許と資格を与え、フグの安全性を確保している。それゆえ、フグ食中毒の確実な予防法は、都道府県条例等で定めたフグの取扱い資格を有した専門店で購入または摂食することである。

フグ加工品の取扱い

近年の食品流通の変化により、生産地や加工場で有毒部位の内臓と皮を除去した「身欠きふぐ」、刺身や鍋用に調理されたフグ加工品が通信販売などさまざまな形態で流通している。前述のように、都道府県条例等で有資格者以外のフグ取扱いを禁止しているが、2011年4月に京都府が、2012年10月に東京都が、有毒部位を確実に取り除いた加工製品にかぎり、一定の条件を満たせば有資格者以外でもフグの販売等ができるようになった。そこで、2012年10月に実施された東京都の例を紹介したい。その前に、本件は東京都の事例であり、他自治体ではこれまでどおりのフグの取扱い条例等によること、東京都においても未処理あるいは有毒部位を含むフグはこれまでどおり有資格者でなければ扱えないことを明確にしておきたい。

東京都は、「東京都ふぐの取扱い規制条例」において有資格者（東京都の場合、「ふぐ調理師」という）以外はフグの取扱いを禁止している。これを今回、表6に挙げた「ふぐ加工製品」につい

ては、①有毒部位が確実に除去され、条例で定める表示がされているものに限る（「身欠きふぐ」の表示例を図3に示す）。そして、②当該施設を保健所に届け出た（届け出た施設を「届出施設」という）場合、ふぐ調理師以外の人でも例外的に「ふぐ加工製品」だけ販売、調理・加工できるようになった。届出施設では東京都が発行する「ふぐ加工製品取扱届出済票」を店舗の見やすい場所に掲示して、そこでは除毒された「ふぐ加工製品」のみを取り扱い、未処理のフグを扱わないことを明示しなければならない¹³⁾。「ふぐ加工製品取扱届出済票」には、注意事項として「未処理のふぐを取り扱うことはできません。」と記載されている。また、フグ食中毒が発生した場合、すみやかに遡り調査が行えるように、仕入先等の記録を作成し1年間保管することが義務づけられている。そして、これらの義務事項が守られない場合や違反した場合には、行政処分、懲役、罰金などの厳しい処分が科される。

これまでフグ取扱有資格者が消費者に提供する最前線でフグの安全性確保に努めてきたが、フグ食中毒はフグの毒に関する正しい知識と除毒技術をもたない無資格者による事例がほとんどであることから、流通の上流に当たる生産地や加工場で、有資格者が確実に除毒した安全な「ふぐ加工製品」が流通することは、フグ食中毒防止の一助になると思われる。一方、釣り人によるフグ食中毒防止のため、茨城県は遊漁船上で除毒を行う「遊漁船フグ取扱者」の資格を2008年に制定した¹⁴⁾。遊漁船上での除毒とは、釣り客が釣ったフグの持ち帰りに際し、客の求めに応じて、釣り客が釣り上げたフグから内臓を除去し、皮とヒレを剥いだ身欠きふぐにする行為をいう。したがって、遊漁船以外の場所でのフグの取扱いや漁業者が自ら漁獲したフグを販売または調理する場合は、「遊漁船フグ取扱者」資格に該当しないので、

従来どおりのフグ取扱資格が必要となる。
 釣り人や無資格者によるフグの調理や販売がな
 くなれば、死者を伴う危険なフグ食中毒事故のほ

とんどが防止できるので、日本の食文化を代表す
 るフグ食が今後も、より安全に安心して続くよう
 これら新しい取組みに期待したい。

表6 東京都が定めるふぐ加工製品

身欠きふぐ	内臓を除去し、皮を剥いたもの
ふぐ精巢	精巣が食べられる部位とされている食用フグから分離し、有毒部位が付着していないもの
ふぐ刺身	
ふぐちり材料	
ふぐ塩蔵品	
ふぐ調味加工品	
ふぐそう菜 など	

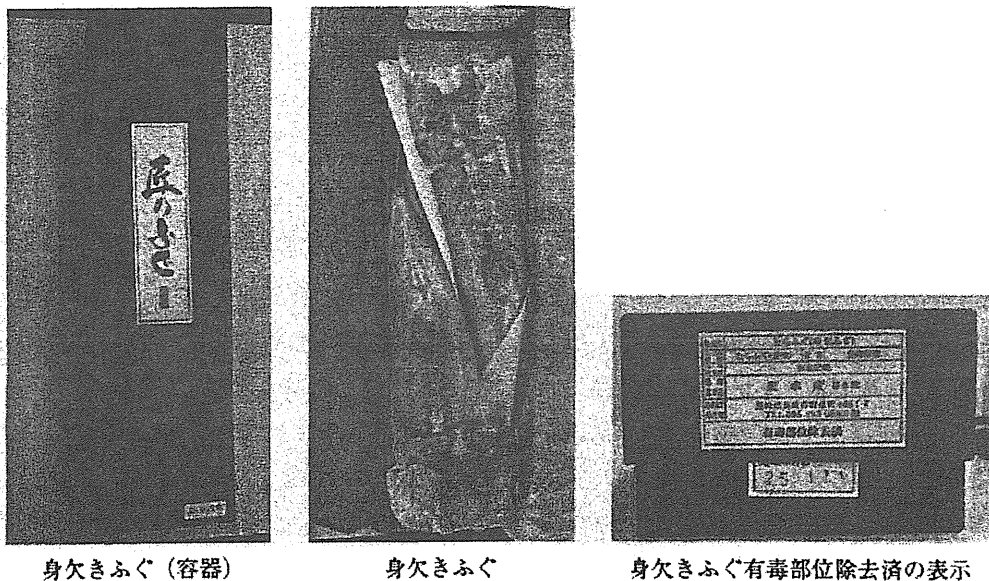


図3 ふぐ加工製品（身欠きふぐ）の容器と表示

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省：食中毒統計資料, <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html> 2013年1月7日アクセス.
- 2) Dickey R. W., Plakas S. M.: Ciguatera: A public health perspective, *Toxicon*, 56, 123-136, (2010)
- 3) 大城直雅：魚類の毒(4)：シガテラ, *食品衛生研究*, 61 (1), 37-45, (2010)
- 4) 谷山茂人, 荒川 修, 高谷智裕, 野口玉雄：アオブダイ中毒様食中毒, *New Food Industry*, 45, 55-61, (2003)
- 5) 谷山茂人, 高谷智裕：魚類の毒(2)：パリトキシン, *食品衛生研究*, 59 (8), 45 ~ 51, (2009)
- 6) 荒川修：麻ひ性貝毒をもつフグ, *化学と生物*, 36, 489-490, (1998)

- 7) Sato S, Ogata T, Borja V, Gonzales C, Fukuyo Y, Kodama M: Frequent occurrence of paralytic shellfish poisoning toxins as dominant toxins in marine puffer from tropical water, *Toxicon*, 38, 1101-1109, (2000)
- 8) Landsberg J. H., Hall S., Johannessen J. N., White K. D., Conrad S. M., Abbott J. P., Flewelling L. J., Richardson R. W., Dickey R. W., Jester E. L. E., Etheridge S. M., Benner J. A., Rogers P. L., Scott P. S., Kawabata K., Wolny J. L., Steidinger K. A.: Saxitoxin puffer fish poisoning in the United States, with the first report of *Pyrodinium bahamense* as the putative toxin source. *Environm. Health Perspectives*, 114, 1502-1507, (2006)
- 9) 塩見一雄, 長島裕二: 新・海洋動物の毒. pp.254, 成山堂書店, 東京, (2013)
- 10) Matsunaga S., Takahashi N., Fusetani N.: Dinogunellins A-D: Putative ichthyootoxic phospholipids of northern blenny *Stichaeus grigorjewi* eggs. *Pure Appl. Chem.*, 81, 1001-1008, (2009)
- 11) 浅川 学, 野口玉雄: コイの喫食による特異的食中毒について, *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, 217, 304-309, (2012)
- 12) 登田美桜, 畝山智香子, 豊福 肇, 森川 馨: わが国における自然毒による食中毒事例の傾向 (平成元年～22年), *食品衛生学雑誌*, 53, 105～120, (2012)
- 13) 東京都福祉保健局: ふぐ加工製品の取扱いについて
<http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/hugu/index2.html> 2013年1月7日アクセス.
- 14) 茨城県保健福祉部: 遊漁船上でのフグの除毒処理について—いばらき食の安全情報.
http://www.shoku.pref.ibaraki.jp/shiken_menkyo/fugu/yugyosen.html 2013年1月7日アクセス.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicon

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

Maturation-associated changes in the internal distribution of tetrodotoxin in the female goby *Yongeichthys criniger*

Ryohei Tatsuno^a, Miwako Shikina^a, Kiyoshi Soyano^b, Koichi Ikeda^c, Tomohiro Takatani^d, Osamu Arakawa^{d,*}

^a Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

^b Institute for East China Sea Research, Nagasaki University, 1551-7 Taira-machi, Nagasaki 851-2213, Japan

^c Admission Center, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

^d Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2012

Received in revised form 31 August 2012

Accepted 6 November 2012

Available online 24 November 2012

Keywords:

Tetrodotoxin (TTX)

Goby

Yongeichthys criniger

Gonadosomatic index (GSI)

Reproductive cycle

Maturation stage

ABSTRACT

Maturation-associated changes in the internal distribution of tetrodotoxin (TTX) in the goby *Yongeichthys criniger* were investigated in 29 and 40 female specimens collected from Okinawa, Japan, from August 2008 to June 2009 (Group I), and from November 2009 to August 2010 (Group II), respectively. In Group I, based on changes in the gonadosomatic index (GSI) and histologic observation of the ovary, the period from October 2008 through January 2009 was estimated to be the 'previtellic-forming period', February through March 2009 the 'vitelline-forming period', April through June 2009 the 'spawning period', and August 2008 the 'end of spawning period' of the preceding year. The TTX content (mouse unit [MU] per gram tissue) of each *Y. criniger* tissue (skin, muscle, liver, and ovary) quantified by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) was generally high during the spawning period and continued to rise until the end of spawning period, especially in the ovary. Total TTX per individual increased considerably during the spawning period, most of which located in the ovary, indicating that *Y. criniger* obtains a high amount of TTX during the spawning period, and accumulates most of it in the ovary. In contrast, the TTX content of the skin was highest at the end of spawning period, and most of the total TTX located in the skin during this period as well as during the previtellic-forming period. In Group II, the maturation stage of the ovaries of all specimens was determined, and the specimens were grouped accordingly. In the perinucleolus stage, yolk vesicle stage, and yolk globule stage I, most of the TTX was localized in the skin, but the TTX in the ovary greatly increased as the maturation stage advanced from yolk globule stage I to yolk globule stage III.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The pufferfish toxin, tetrodotoxin (TTX), is a highly potent neurotoxin, and was once believed to distribute only through pufferfish. Since Mosher et al. (1964) isolated tarchatoxin from the eggs of the California newt and

identified it as TTX in 1964, however, TTX has been detected in many organisms of different phyla, including frogs, octopuses, gastropods, starfish, crabs, flatworms, ribbon worms, and marine bacteria (Miyazawa and Noguchi, 2001). Among fish, the goby *Yongeichthys (Gobius) criniger*, as well as pufferfish, possess TTX (Noguchi and Hashimoto, 1973). *Y. criniger* are widely distributed over the Indo-Pacific Oceans, African east coast, China, and Taiwan, and often appear in coastal waters of the Southwest Islands in Japan, especially estuarine areas where

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

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

mangrove forests develop (Shibuno et al., 2008). Gobies accumulate TTX not only in the skin, liver, intestine, and ovary, but also in the muscle and testis, which are usually non-toxic tissues in toxic marine pufferfish (Noguchi et al., 1971). In general, TTX is believed to be exogenous in TTX-bearing organisms, and derived from the food chain (Noguchi and Arakawa, 2008), but there are only a few cases in which the toxic food organisms involved in their intoxication are fully elucidated. Although Saito and Kishimoto (2003) investigated the food organisms of *Y. criniger*, they could not specify the organisms involved in the intoxication.

Ikedo et al. (2010) recently investigated seasonal changes in the toxicity of the pufferfish *Takifugu poecilonotus*, and indicated that ovary toxicity rises with an increase in the gonadosomatic index (GSI). Although Lin et al. (2000) examined seasonal variations in toxicity in the Taiwanese *Y. criniger*, it is not clear whether the same phenomena occur, because they did not distinguish between male and female specimens. In our studies to clarify the accumulation mechanism of TTX, and the effect of maturation on the accumulation in TTX-bearing fish, we investigated changes in the internal distribution of TTX as the ovaries matured in female specimens of *Y. criniger* inhabiting Okinawa, Japan.

2. Materials and methods

2.1. Goby specimens

From August 2008 to August 2010, wild specimens of *Y. criniger* were collected from the Okukubi River, Okinawa Prefecture, Japan, which were frozen immediately after collection, and kept below -30°C while being transported to the laboratory at Nagasaki University. Each specimen was partially thawed, and the skin, muscle, liver, and gonads were dissected out. Sex was determined by observing the gonad section under a light microscope, and 29 females collected from August 2008 to June 2009 (Group I) and 40 females collected from November 2009 to August 2010 (Group II) were used in the experiments as described below.

2.2. Gonadosomatic index (GSI)

The GSI of each specimen was calculated from its gonad weight (GW) and body weight (BW) using the following equation: $\text{GSI} = 100 \times \text{GW}/\text{BW}$.

2.3. Histologic observation of the ovary

Ovary sections were prepared according to conventional histologic procedures. Briefly, tiny blocks from the ovaries of representative specimens of Group I and all specimens of Group II fixed in Bouin's fluid were dehydrated through an ascending series of ethanol (70–100%), lucidified in xylene, and embedded in paraffin. The embedded ovaries were sectioned with a microtome at a thickness of 3–5 μm , and each section was deparaffinized in xylene, rehydrated through a descending ethanol series (100%–70%), and then rinsed with water. The sections were stained with hematoxylin–eosin, and observed under a light microscope.

2.4. TTX quantification

Skin, muscle, liver, and ovary of each specimen were extracted with 0.1% acetic acid (Japan Food Hygiene Association, 2005). Each tissue extract was filtered through an HLC-DISK membrane filter (0.45 μm ; Kanto Chemical Co., Inc., Japan) and then liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) analysis for TTX was performed according to the method of Nakashima et al. (2004). A TTX standard, purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan (purity >90%), was calibrated using a mouse bioassay (Japan Food Hygiene Association, 2005), and the amount of TTX was expressed in mouse units (MU), where 1 MU (equivalent to ~ 220 ng TTX) was defined as the amount of toxin required to kill a 20-g male ddY strain mouse within 30 min after intraperitoneal administration. A preliminary experiment revealed that the *Y. criniger* toxin comprised mainly TTX, therefore TTX derivatives were not analyzed in the present study.

2.5. Immunohistochemical observation of the skin

A part of the skin of the goby specimen was immunohistochemically observed under a light microscope according to the previously reported method (Tanu et al., 2002; Mahmud et al., 2003a,b) using the anti-TTX antibody.

3. Results

3.1. Estimation of the reproductive cycle and ovarian maturation stage

Changes in GSI are shown in Fig. 1. The GSI of Group I was low (0.13–0.48) from August 2008 through January 2009, but began to increase in February 2009, and remained high (0.94–9.31) until June. Changes in GSI were similar between Groups I and II. Namely, except for one individual (1.02) from December 2009, the GSI was low (0.11–0.62) until January 2010, began to increase in February, remained high (0.71–9.00) until June, and then greatly decreased (0.23–0.45) thereafter.

Light microscopic observations of ovarian sections from Group I are shown in Fig. 2. The oocytes were immature and in the perinucleolus stage (hematoxylin positive; basophilic) from October 2008 through January 2009 (Fig. 2-b), after which vitelline began to accumulate, and oocytes in the yolk vesicle stage, yolk globule stage I, and/or yolk globule stage II (eosin positive; acidophilic) were observed from February through March 2009 (Fig. 2-c). During the period from April through June 2009, we observed oocytes that reached the yolk globule stage III (Fig. 2-d). On the other hand, atretic follicles, in which fragmentation of the nucleus occurred, were observed in addition to the oocytes in the yolk globule stage II in August 2008 (Fig. 2-a).

Based on the above observations, for Group I, we considered the period from October 2008 through January 2009, when the GSI was low and the perinucleolus stage oocytes were observed, to be the 'previtelline-forming period'; February through March 2009, when GSI began to increase and oocytes in the yolk vesicle to yolk globule stage II were observed, the 'vitelline-forming period'; April

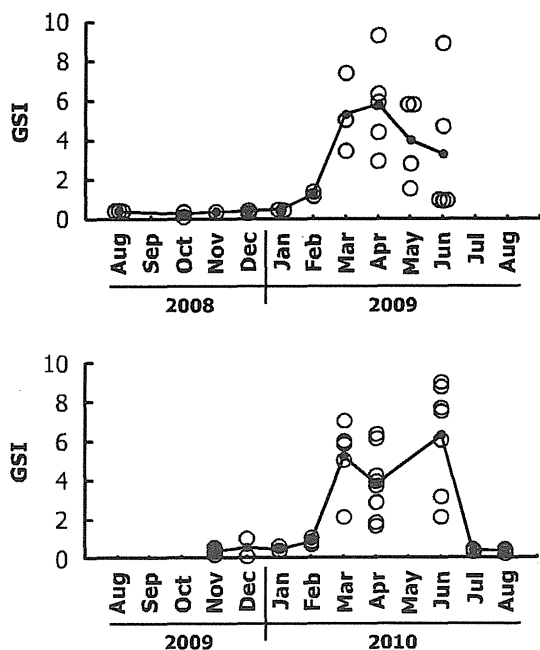


Fig. 1. Seasonal changes in the gonadosomatic index (GSI) of Group I (upper) and Group II (lower). Data are shown as individual values (open circles) and mean of each month (filled circles on the solid line).

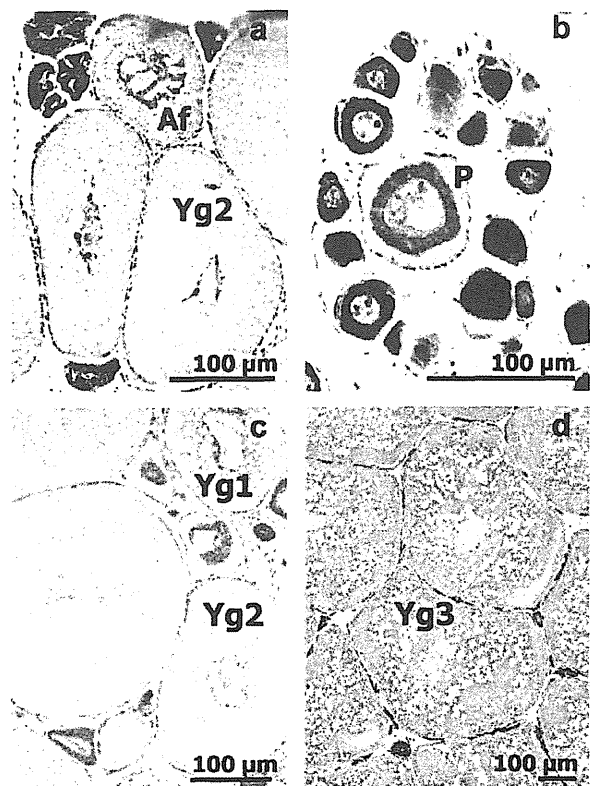


Fig. 2. Light micrographs of a representative ovarian section from the *Y. criniger* specimens collected in August 2008 (a), October 2008–January 2009 (b), February–March 2009 (c), and April–June 2009 (d). P, Yg1–3, and Af indicate the oocytes in the perinucleolus stage, yolk globule stage I–III, and atretic follicle, respectively.

through June 2009, when GSI was high and oocytes in the yolk globule stages II and III were observed, the ‘spawning period’; and August 2008, when GSI was low and the atretic follicles were observed, the ‘end of spawning period’ of the preceding year.

In Group II, although no atretic follicle was found, oocytes in the perinucleolus stage, yolk vesicle stage, and yolk globule stages I to III were observed as in Group I (data not shown). Because a mix of different maturation stages of oocytes could be observed in the same individual, the maturation stage of the individual was expressed as the most advanced maturation stage observed. From November 2009 to January 2010 (corresponding to the previtellic-forming period in Group I), 10 of 11 individuals, and from July to August 2010 (end of spawning period), 4 of 5 individuals were in the perinucleolus or yolk vesicle stage, while from February to March 2010 (vitelline-forming period), 7 of 9 individuals were in yolk globule stage I or yolk globule stage II, and from April to June 2010 (spawning period), all 15 individuals were in yolk globule stage II or yolk globule stage III (Table 1).

3.2. Internal distribution of TTX

Changes in TTX content (MU/g) of the skin, muscle, liver, and ovary in Group I are shown in Fig. 3. The TTX content of each tissue was generally high at the end of spawning period, and in April and June during the spawning period, while it was low in the other periods, especially during the vitelline-forming period. The skin had the highest TTX content (mean 311 MU/g) at the end of spawning period, whereas the other tissues showed the highest content in April and June of the spawning period. The ovary had an extremely high TTX content during this period, with the maximum score reaching 4050 MU/g.

The TTX tissue distribution of each reproductive period in Group I is shown in Fig. 4. The columns are stacked bars representing the TTX amount of each tissue, and the pie graph shows the percent contribution of each tissue to the total TTX amount for each reproductive period. In the previtellic-forming period, total TTX was 261 MU/individual, of which 77% was in the skin, followed by 18% in the muscle. In the vitelline-forming period, the TTX distribution greatly changed with the total TTX decreasing to 117 MU/individual; with the ovary containing 45% of the total TTX, and the skin containing only 43%. In the spawning period, total TTX increased about 8-fold (922 MU/individual) from that in the vitelline-forming period, during which 73% of the TTX was in the ovary. At the end of spawning period, total TTX (855 MU/individual) was almost equivalent to that in the spawning period, but the TTX distribution was differed considerably; the skin had 81%, the muscle 14%, and the ovary approximately 2%. This pattern was rather similar to that in the previtellic-forming period. The ratio of liver TTX to total TTX was very low, and, like that in muscle, remained almost unchanged throughout the entire reproductive cycle.

The TTX tissue distribution of each maturation stage (% contribution of each tissue to the total TTX amount) in Group II is shown in Fig. 5. In the individuals in the perinucleolus stage, yolk vesicle stage, and yolk globule stage I,

Table 1
Change in the number of individuals in each maturation stage during the putative reproductive cycle in Group II.

Maturation stage	Number of individuals			
	Previtelline-forming period (Nov 2009–Jan 2010)	Vitelline-forming period (Feb–Mar 2010)	Spawning period (Apr–Jun 2010)	End of spawning period (Jul–Aug 2010)
Perinucleolus	5	0	0	2
Yolk vesicle	5	2	0	2
Yolk globule stage I	0	1	0	1
Yolk globule stage II	1	6	13	0
Yolk globule stage III	0	0	2	0

70%–77% of the total TTX was in the skin, followed by 18%–27% in the muscle. The TTX in the ovary, however, greatly increased as the maturation stage advanced from yolk globule stage I to yolk globule stage III, and exceeded 50% in yolk globule stage III. As in Group I, the ratios of muscle and liver TTX to total TTX remained almost unchanged, irrespective of the maturation stage.

3.3. Microdistribution of TTX in the skin

In *Y. criniger* skin, TTX distributed almost equally over the entire epidermis layer comprising basal cells, malpighian cells, and sacciform cells (Fig. 6).

4. Discussion

In Group I, the period from October 2008 through January 2009 was considered the previtelline-forming period, February through March 2009 the vitelline-forming period, April through June 2009 the spawning period, and August 2008 the end of spawning period, based on changes in the GSI and histologic observations of the ovary. *Y. criniger* specimens were grouped according to the reproductive cycle, and the amount of TTX was evaluated. From March through June 2009, the GSI variability was great, and individual variations in the maturation stage of the ovaries (oocytes) were observed. Particularly during the spawning period, many oocytes were in the yolk globule stage III just before spawning in the specimens obtained in April and June, while no such oocytes were observed in the specimens obtained in May. As *Y. criniger* spawns multiple

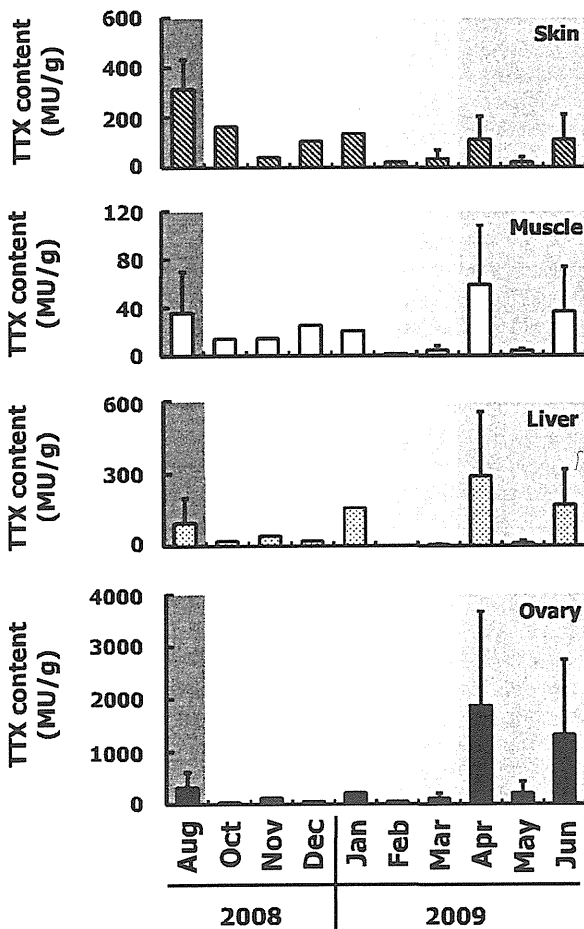


Fig. 3. Seasonal changes in the TTX content (MU/g) of each tissue in Group I. Data are shown as the mean (column) and SD (error bar) of each month. White, light gray, gray, and dark gray zones indicate 'previtelline-forming period', 'vitelline-forming period', 'spawning period', and 'end of spawning period' of the preceding year, respectively.

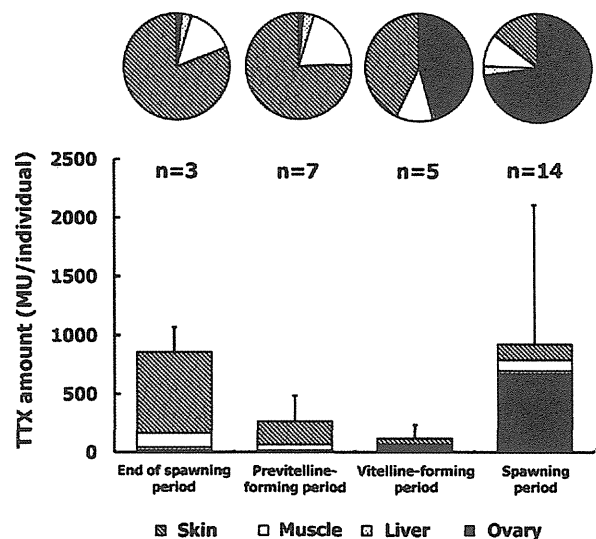


Fig. 4. Reproductive cycle-associated changes in TTX amount (MU/individual; column graph) and relative TTX amount (% of total TTX amount; pie chart) of each part in Group I. Total TTX amounts are shown by mean (stacked column) and SD (error bar).

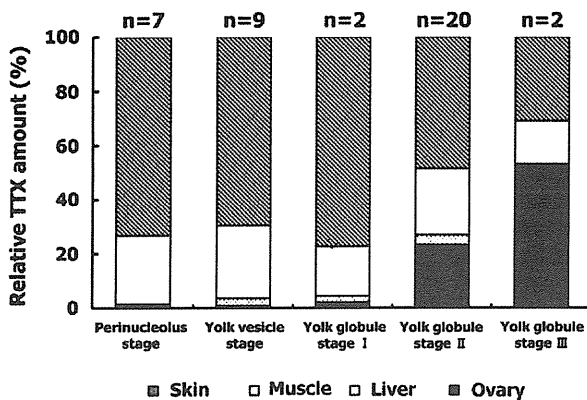


Fig. 5. Maturation stage-associated changes in the relative TTX amount (% of total TTX amount) of each part of the specimens from Group II.

times with an interval of 15–20 d (Saito et al., 2002; Tanaka et al., 2005), we presumed that specimens obtained in May were in the gap between spawning periods. In Group I, histologic observations were performed using only some of the specimens representing each period, but in Group II, to investigate the influence of maturation more precisely, the maturation stage of the ovaries of all specimens was determined, and the specimens grouped accordingly. As seen in Table 1, advances of ovarian maturation corresponded well with the putative reproductive cycle.

The TTX content of each *Y. criniger* tissue in Group I was generally high during the spawning period and at the end

of spawning period (Fig. 3). The TTX content of the ovary increased considerably during the spawning period. Ikeda et al. (2010) investigated seasonal changes in the toxicity of *T. poecilonotus* tissues, and reported that ovary toxicity greatly increases with maturation of the ovary during development. Like pufferfish, *Y. criniger* also accumulate high concentrations of TTX in the ovaries as they mature. In the case of *T. poecilonotus*, the toxicity of all tissues declines sharply just after spawning. In *Y. criniger*, the TTX content of each tissue also decreased once in May, possibly because a lot of toxin was discharged with the eggs during spawning. The TTX content, however, greatly increased again in June, possibly because the goby is polytelic. Saito et al. (2002) reported that when *Y. criniger* are reared with non-toxic food after spawning, the eggs contain no toxin at the next spawning. These findings suggest that *Y. criniger* ingests large amounts of toxic food organisms when entering the spawning period, and thus obtain a great amount of TTX.

The TTX content of the liver and muscle showed essentially similar changes to those in the ovary. In *T. poecilonotus*, ovary toxicity is high during the maturation period, but that of the liver is high during the ordinary period, suggesting that toxin turnover occurs between the liver and ovary (Ikeda et al., 2010). Such phenomena were not observed in *Y. criniger*, suggesting that unlike pufferfish, the *Y. criniger* liver has little TTX storage function during the previtellic-forming period.

In Group I, total TTX per individual considerably increased during the spawning period, most of which was in the ovary (Fig. 4). Moreover in Group II, the ratio of ovary TTX to total TTX was greatly increased as the maturation stage advanced from yolk globule stage I to yolk globule stage III (Fig. 5), supporting the hypothesis that *Y. criniger* take up large amounts of TTX during the spawning period, and transport and accumulate most of it into the ovary according to the maturation of oocytes. Although the specific toxin accumulation in the ovary seems to start in the vitelline-forming period, the reason for the low TTX content during this period in Group I is not clear. *Y. criniger* might ingest few toxic food organisms during this period.

In Group I, the TTX content of the skin was highest at the end of spawning period (Fig. 3), and, as in the previtellic-forming period, most of the total TTX accumulated in the skin (Fig. 4). It is possible that when eggs that remain to be ovulated at the final spawning were involuted and absorbed, a high concentration of accumulated TTX was taken up with the vitellary substances into the body and then transferred to the skin. Because even TTX-bearing organisms die if they ingest huge amounts of TTX at once (Saito et al., 1984; Noguchi and Arakawa, 2008), the skin might have a role in eliminating excess TTX taken up from the atretic follicles. The fact that unlike pufferfish, the TTX-accumulating ability of the liver is low in *Y. criniger* might contribute to the high TTX content in the skin at the end of spawning period and previtellic-forming period in Group I, or in the perinucleolus stage, yolk vesicle stage, and yolk globule stage I in Group II (Fig. 5). On the other hand, pufferfish and newts have TTX-bearing glands or secretory cells (sacciform cells) in their skin (Tanu et al., 2002; Tsuruda et al., 2002; Mahmud et al., 2003a,b), and secrete

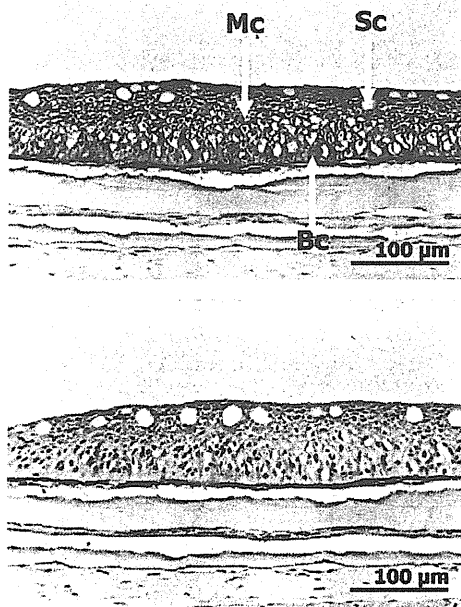


Fig. 6. Immunohistologic observation of the skin section of goby (upper). TTX, visualized as a brown color, was found in basal cells (Bc), malpighian cells (Mc), and sacciform cells (Sc). No TTX was observed in negative control sections (lower).

TTX in response to external stimuli (Kodama et al., 1985; Saito et al., 1985; Tsuruda et al., 2002). Because such TTX-bearing secretory cells were also observed in *Y. criniger* skin (Fig. 6), the TTX content of the skin might be high so that the toxin fulfills a biophylactic function, as in pufferfish and newts.

In the present study, we could not collect enough specimens each month for statistical analyses, partly because we focused only on females. In addition, wide variations in the maturation stage and TTX content during the spawning period, due particularly to the polytelic characteristic, were observed in Group I. Therefore, although our results indicated that the TTX content was significantly higher in the ovary than in the other tissues during the spawning period (Tukey's test, $p < 0.05$), additional statistical analyses could not be performed. This was the case in Group II as well, in which only 2 individuals each corresponded to yolk globule stages I and III.

Although TTX-binding proteins are found in the blood plasma of toxic marine pufferfish (Matsui et al., 2000; Yotsu-Yamashita et al., 2001, 2010; Tatsuno et al., 2012) and may be involved in toxin transportation, it is unclear whether *Y. criniger* possesses similar proteins. This, along with the molecular mechanisms involved in TTX transportation/accumulation to the oocytes and skin, is currently under investigation.

Acknowledgments

We would like to express sincere thanks to Mr. Nobuhiko Shimadzu, for collecting *Y. criniger* specimens. This work was partly supported by Grant-in-aids from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, and the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and by Mikimoto Fund for Marine Ecology.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Ikeda, K., Emoto, Y., Tatsuno, R., Wang, J.J., Ngy, L., Taniyama, S., Takatani, T., Arakawa, O., 2010. Maturation-associated changes in toxicity of the pufferfish *Takifugu poecilonotus*. *Toxicon* 55, 289–297.
- Japan Food Hygiene Association, 2005. Puffer toxin. In: Shokuhin Eisei Kensa Shishin. Environmental Health Bureau, Ministry of Health and Welfare, Tokyo, pp. 661–673 (Manual for Methods for Food Sanitation Testing).
- Kodama, M., Ogata, T., Sato, S., 1985. External secretion of tetrodotoxin from puffer fishes stimulated by electric shock. *Marine Biol.* 87, 199–202.
- Lin, S.J., Hwang, D.F., Shao, K.T., Jeng, S.S., 2000. Toxicity of Taiwanese gobies. *Fish. Sci.* 66, 547–552.
- Mahmud, Y., Okada, K., Takatani, T., Kawatsu, K., Hamano, Y., Arakawa, O., Noguchi, T., 2003a. Intra-tissue distribution of tetrodotoxin in two marine puffers *Takifugu vermicularis* and *Chelonodon patoca*. *Toxicon* 41, 13–18.
- Mahmud, Y., Arakawa, O., Ichinose, A., Tanu, M.B., Takatani, T., Tsuruda, K., Kawatsu, K., Hamano, Y., Noguchi, T., 2003b. Intracellular visualization of tetrodotoxin (TTX) in the skin of a puffer *Tetraodon nigroviridis* by immunoenzymatic technique. *Toxicon* 41, 605–611.
- Matsui, T., Yamamori, K., Furukawa, K., Kono, M., 2000. Purification and some properties of a tetrodotoxin binding protein from the blood plasma of kusafugu, *Takifugu niphobles*. *Toxicon* 38, 463–468.
- Miyazawa, K., Noguchi, T., 2001. Distribution and origin of tetrodotoxin. *J. Toxicol.-Toxin Rev.* 20, 11–33.
- Mosher, H.S., Fuhrman, F.A., Buchwald, H.D., Fischer, H.G., 1964. Tarichatoxin-tetrodotoxin: a potent neurotoxin. *Science* 144, 1100–1110.
- Nakashima, K., Arakawa, O., Taniyama, S., Nonaka, M., Takatani, T., Yamamori, K., Fuchi, Y., Noguchi, T., 2004. Occurrence of saxitoxins as a major toxin in the ovary of a marine puffer *Arothron firmamentum*. *Toxicon* 43, 207–212.
- Noguchi, T., Arakawa, O., 2008. Tetrodotoxin – distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Marine Drugs* 6, 220–242.
- Noguchi, T., Hashimoto, Y., 1973. Isolation of tetrodotoxin from a goby *Gobius criniger*. *Toxicon* 11, 305–307.
- Noguchi, T., Kao, H., Hashimoto, Y., 1971. Toxicity of the goby, *Gobius criniger*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 37, 642–647.
- Saito, T., Kishimoto, H., 2003. Variation in toxicity and digestive tube contents of the shadow-goby, “tumugihaze” (*Yongeichthys criniger*) during June–November, 1998 in Ayanda River estuary of Iriomote Island, Japan. *J. Sch. Marine Sci. Technol. Tokai Univ.* 56, 27–37.
- Saito, T., Maruyama, J., Kanoh, S., Jeon, J.K., Noguchi, T., Harada, T., Murata, O., Hashimoto, K., 1984. Toxicity of the cultured pufferfish *Fugu rubripes rubripes* along with their resistibility against tetrodotoxin. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 50, 1573–1575.
- Saito, T., Noguchi, T., Harada, T., Murata, O., Hashimoto, K., 1985. Tetrodotoxin as a biological defense agent for puffers. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51, 1175–1180.
- Saito, T., Imakiire, M., Kishimoto, H., 2002. Toxicity of the fertilized eggs and the parent fishes in the shadow-goby, *Yongeichthys criniger*, from the Iriomote Island, southern Ryukyu. *Sci. Rep. Mus., Tokai Univ.* 4, 79–85.
- Shibuno, T., Nakamura, Y., Horinouchi, M., Sano, M., 2008. Habitat use patterns of fishes across the mangrove-seagrass-coral reef seascape at Ishigaki Island, southern Japan. *Ichthyol. Res.* 55, 218–237.
- Tanaka, Y., Yamada, K., Imai, K., Takayanagi, N., Kishimoto, H., 2005. Reproduction and rearing of the goby, *Yongeichthys criniger*, in the aquarium. *Bull. Inst. Oceanic Res. Develop., Tokai Univ.* 26, 45–64.
- Tanu, M.B., Mahmud, Y., Takatani, T., Kawatsu, K., Hamano, Y., Arakawa, O., Noguchi, T., 2002. Localization of tetrodotoxin in the skin of a brackishwater puffer *Tetraodon steindachneri* on the basis of immunohistological study. *Toxicon* 40, 103–106.
- Tatsuno, R., Yamaguchi, K., Takatani, T., Arakawa, O., 2012. Two proteins homologous to pufferfish saxitoxin- and tetrodotoxin-binding protein (PSTBP) found in the plasma of non-toxic cultured specimens of the pufferfish (*Takifugu rubripes*). *Toxicon* 60, 153.
- Tsuruda, K., Arakawa, O., Kawatsu, K., Hamano, Y., Takatani, T., Noguchi, T., 2002. Secretory glands of tetrodotoxin in the skin of the Japanese newt *Cynops pyrrhogaster*. *Toxicon* 40, 131–136.
- 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., Yamaki, H., Okoshi, N., Araki, N., 2010. Distribution of homologous proteins to puffer fish saxitoxin and tetrodotoxin binding protein in the plasma of puffer fish and among the tissue of *Fugu pardalis* examined by Western blot analysis. *Toxicon* 55, 1119–1124.

報 文

沖縄県沿岸に分布する腐肉食性および肉食性巻貝の毒性と毒成分

(平成24年9月5日受理)

谷山茂人¹ 高谷智裕¹ 反町太樹² 相良剛史³
 久保弘文⁴ 大城直雅⁵ 小野 要⁶ 肖 寧²
 橋 勝康¹ 荒川 修^{1,*}

Toxicity and Toxin Profile of Scavenging and Carnivorous Gastropods from the Coastal Waters of Okinawa Prefecture, Japan

Shigeto TANIYAMA¹, Tomohiro TAKATANI¹, Taiki SORIMACHI², Takefumi SAGARA³, Hirofumi KUBO⁴, Naomasa OSHIRO⁵, Kaname ONO⁶, Ning XIAO², Katsuyasu TACHIBANA¹ and Osamu ARAKAWA^{1,*}

¹Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University:
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan;

²Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University:
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan;

³Department of Science for Human Health, Shikoku University
Junior College: 123-1 Ebisuno, Furukawa, Ohjin-cho, Tokushima 771-1192, Japan;

⁴Okinawa Prefectural Fisheries and Ocean Research Center:
1-3-1 Nishizaki, Itoman, Okinawa 901-0305, Japan;

⁵Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment:
2085 Aza-Ozato, Nanjo, Okinawa 901-1202, Japan;

⁶Department of Food and Nutrition, Shokei University Junior College:
2-6-78 Kuhonji, Chuou-ku, Kumamoto 862-8678, Japan;

* Corresponding author

From January to June 2009, a total of 64 gastropod specimens of 15 species were collected from the coastal waters of Okinawa Prefecture, Japan, and examined for toxicity by means of mouse bioassay. Among the specimens tested, 5 species, *Nassarius glans*, *Nassarius coronatus*, *Oliva annulata*, *Oliva concavospira* and *Zeuxis* sp., were toxic. The toxicity scores of *N. glans* were very high; 39.6–461 MU/g in muscle, and 98.6–189 MU/g in viscera including digestive gland, followed by *Zeuxis* sp. (12.7 MU/g in whole body), *N. coronatus* (5.64–11.1 MU/g in whole body), *O. annulata* (10.8 MU/g in the whole body), *O. concavospira* (6.65 MU/g in the muscle). Liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS) revealed that the major toxic component was tetrodotoxin (TTX), which accounting for 13–82% of the total toxicity. As for the remaining toxicity in the case of *N. glans*, 4,9-anhydroTTX, 4-epiTTX and 11-oxoTTX were contributors. Moreover, *Niotha albescens* showed no toxicity (less than 10 MU/g) in mouse bioassay, but TTX (5.08 MU/g) was detected by LC-MS. Paralytic shellfish poison was not detected in any of the specimens by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection (HPLC-FLD).

(Received September 5, 2012)

Key words: 腐肉食性巻貝 scavenging gastropod; 肉食性巻貝 carnivorous gastropod; キンシバイ *Nassarius 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

* 連絡先

¹長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科：〒852-8521 長崎県長崎市文教町1-14

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

³四国大学短期大学部人間健康科：〒771-1192 徳島県徳島市応神町古川字戎子野123-1

⁴沖縄県海洋研究センター：〒901-0305 沖縄県糸満市西崎1-3-1

⁵沖縄県衛生環境研究所：〒901-1202 沖縄県南城市大里字大里2085

⁶尚絅大学短期大学部食物栄養学科：〒862-8678 熊本県熊本市中央区九品寺2-6-78

緒言

巻貝による自然毒性食中毒として、日本では肉食性大型巻貝フジツガイ科ボウシユウボラ *Charonia saulia* による中毒が知られている。本中毒は1979~1987年に静岡、和歌山、宮崎の各県でそれぞれ1件発生し、罹患者は計4名、原因物質はテトロドトキシン (tetrodotoxin; TTX) と報告されている^{1)~3)}。最近では、2007年に長崎県、2008年には熊本県で腐肉食性小型巻貝ムシロガイ科キンシバイ *Nassarius glans* による極めて重篤なTTX中毒が発生した。これを受けて、著者らは長崎および熊本県産キンシバイの毒性調査を行い、多くの個体が高毒力で、かつ半数以上で筋肉に毒が偏在していたことから、キンシバイは食品衛生上極めて危険な種であると報告した^{4), 5)}。一方、中国大陸では、腐肉食性小型巻貝ムシロガイ科オオハナムシロ *Zeuxis siquijorensis* の近縁種 *Zeuxis samiplicatus* を原因とするTTX中毒が、これまでに判明しているだけでも320件以上発生し、患者総数は419名、死亡者総数は19名にのぼる^{6)~9)}。さらに、台湾でも、同様の巻貝類によるTTX中毒が1994~2004年に少なくとも9件発生し、死亡者3名を含む46名が中毒している^{10)~18)}。台湾では巻貝12種がTTX中毒の原因種とされ、その他5種もTTXを保有することが報告されている^{10)~18)}。このうちムシロガイ科キンシバイやアラレガイ *Niotha clathrata*、オキナワハナムシロ *Zeuxis scalaris*、サメムシロ *Nassarius papillosus*、マクラガイ科ジウドウマクラ *Oliva miniacea* は日本沿岸にも分布する¹⁹⁾。中国の巻貝中毒発生地域や台湾の気候は、日本では沖縄県に類似するが、同県産の巻貝の毒性については、古くにリュウテンサザエ科2種とニシキウズカイ科2種に関する報告²⁰⁾があるのを除き、見るべき知見がほとんどない。そこで、本研究では水産食品としての巻貝類の安全性確保に資するため、沖縄県沿岸に分布する腐肉食性および肉食性小型巻貝8科15種を対象に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

2009年1~6月に沖縄県沿岸で採集したムシロガイ科キンシバイ6個体、イボヨフバイ *Nassarius coronatus* 5個体、カゲロウヨフバイ *Zeuxis* sp. (学名未確定種)¹⁹⁾ 6個体、アワムシロ *Niotha albescens* 6個体およびコブムシロ *Pliarcularia globosus* 3個体、マクラガイ科サツマビナ *Oliva annulata* 8個体、ヘコミマクラ *Oliva concavospira* 2個体およびジウドウマクラ3個体、バイ科ウスイロバイ *Balyllonia kirana* 5個体、アキガイ科ガンゼキボラ *Chicoreus brunneus* 3個体、イトマキボラ科イトマキボラ *Pleuroploca trapezium paeteli* 1個体、フジツガイ科サツマボラ *Cymatium aquatile* 5個体とシノマキガイ *Cymatium pileare* 5個体、フデガイ科ニシキノキバフデ *Mitra stictica* 1個体、ツクシガイ科ハマヅト *Costellaria*

exasperata 5個体の計8科15種64個体を試料とした。いずれも採集後、直ちに氷蔵にて研究室に持ち帰り、-20℃で凍結保存した。供試の際、試料をプラスチックバックに入れ、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。ただし、イボヨフバイ、コブムシロ、ハマヅトはいずれの個体も小さかったため、個体ごとに筋肉と内臓を合一したもの（以下、可食部）を、同様にカゲロウヨフバイとアワムシロはそれぞれ6個体の筋肉と内臓を合一したもの（以下、合一可食部）を用いた。

2. 毒性試験

食品衛生検査指針理化学編のフグ毒検査法²¹⁾に準じ、各試料の筋肉、内臓、可食部または合一可食部に0.1%酢酸を加えて加熱抽出後、ddY系雄マウス（体重19~21g）の腹腔内に投与し、マウスの致死時間から試料1g当たりの毒力を算出した。TTXの1マウス単位 (MU) は体重20gのマウス1匹を30分間で死亡させる毒力と定義されている。

3. 毒成分分析

毒性試験で調製した試験液を0.45 μmのメンブランフィルターでろ過後、Zspray™ MD 2000を搭載したalliance 2690システム (Waters社製) を用い、既報の方法²²⁾に準拠してTTXを対象とするLC-MS分析を行った。カラムにMightysil RP-18 GP (φ2.0×250 mm)、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) を使用し、流速を0.2 mL/minとした。デソルベーション温度350℃、ソースブロック温度120℃、コーン電圧50 Vに設定し、イオン化法はESIポジティブモードで分析し、MassLynx™ オペレーションシステムにて解析した。標準物質として、和光純薬工業(株)製のTTXを用いた。

一方、麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poison; PSP) 成分を対象とした分析は、毒性試験で調製した試験液をSep-Pak C18カートリッジカラム (Waters社製) 処理および限外ろ過 (<10,000 Da) に付し、既報^{23)~27)}のHPLC蛍光分析法に準じて行った。標準物質として、(財)日本食品分析センターから供与されたゴニオトキシン1~4、デカルバモイルゴニオトキシン2, 3, プロトゴニオトキシン1, 2 (C1, 2), ネオサキシトキシン (neoSTX), ならびに筆者らが有毒ウモレオウギガニ *Zosimus aeneus* から精製したサキシトキシン (STX), ハイドロキシ (hy) STX, hyneoSTX²⁸⁾を用いた。なお、ウモレオウギガニからのSTXの精製、およびその使用にあたっては、「化学兵器の禁止および特定物質の規制等に関する法律」の規定に従い、あらかじめ経済産業省の「サキシトキシンの製造および使用の許可」を受け、適正な管理の下、実施した。

結果および考察

1. 小型巻貝類の毒性

供試した巻貝15種のうち、キンシバイ、イボヨフバイ、カゲロウヨフバイ、サツマビナ、ヘコミマクラの5種から

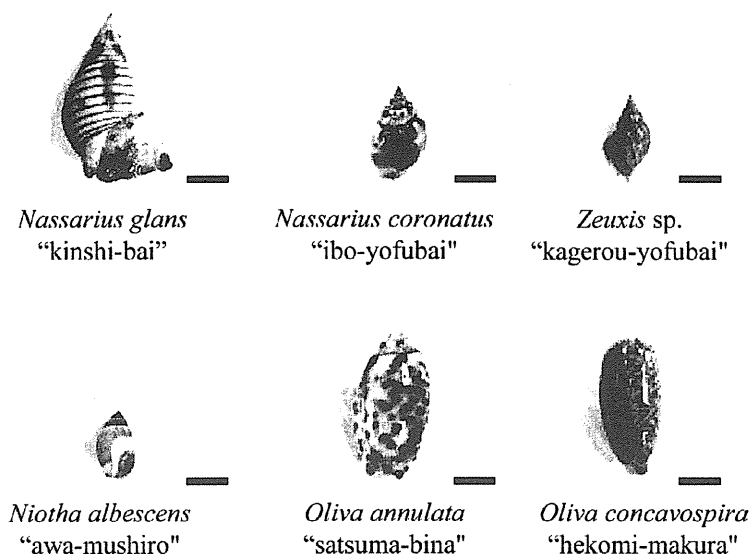


Fig. 1. Toxic species of gastropods
Scale bar, 1 cm

マウス毒性が検出された。一方、アワムシロの場合、マウス毒性は未検出 (10 MU/g未満) ながら、後述のとおり LC/MS分析で TTX が検出された。以上の6種については、写真を Fig. 1 に、毒力と TTX 含量を Table 1 に示す。その他9種はいずれもマウス毒性を示さなかった (ジユドウマクラ, ウスイロパイ, イトマキボラ, サツマボラ, シノマキガイは 5 MU/g未満, コブムシロ, ガンゼキボラ, ニシキノキバフデ, ハマヅトは 10 MU/g未満)。

有毒巻貝のうち、キンシバイの毒力は総じて高く、筋肉で 39.6~461 MU/g (平均±標準偏差: 196±185 MU/g)、内臓で 98.6 および 189 MU/g (平均 144 MU/g) であった。特に、供試6個体中3個体で筋肉の毒力が食品衛生上“強毒”となる 100 MU/g を超え、最高値は 461 MU/g に達した。また、イボヨフパイ2個体の可食部に 11.1 および 5.64 MU/g、カゲロウヨフパイ6個体の合一可食部に 12.7 MU/g、サツマビナ1個体の内臓に 10.8 MU/g、ヘコミマクラ1個体の筋肉に 6.65 MU/g の毒力が認められた。

日本で突発したキンシバイ中毒に関連して、著者らは、中毒検体が採集された長崎県橋湾および熊本県宮野河内湾に生息するキンシバイの毒性スクリーニングを行った。橋湾産キンシバイの毒力は筋肉で 48~2,370 MU/g、内臓で 16~10,200 MU/g を示し、中毒発生直後には供試個体の8割において、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 を上回っていた⁴⁾。宮野河内湾産キンシバイも中毒発生直後に 1,000 MU/g 以上の毒力を示す個体が半数以上を占め、筋肉と内臓の最高毒力は、それぞれ 2,600 および 10,800 MU/g に達した⁵⁾。また台湾産キンシバイは、筋肉に平均 1,170 MU/g、中腸腺に平均 538 MU/g と極めて高い毒力を保有していた¹⁶⁾。

他方、日本では、キンシバイ以外の小型巻貝として、同じムシロガイ科に属するオオハナムシロやアラレガイ、バイ科パイ *Babylonia japonica* から TTX の検出例があ

る^{29)~31)}。しかしながら、それぞれ可食部の毒力は 3.4 MU/g, 4~35 MU/g, 15~53 MU/g と低く、これらの巻貝による TTX 中毒としては、1957年にパイによる中毒事例が1例あるのみである⁹⁾。台湾では17種の有毒巻貝が報告されており、そのうち12種により食中毒も発生している^{10)~18)}。このうち、台湾産ジユドウマクラは中毒原因種で、可食部に 3~18 MU/g (11±5 MU/g) の TTX を保有していたが¹⁴⁾、今回調査した同種からマウス毒性は検出されなかった。また、沖縄県では食用として流通しているウスイロパイの毒力はすべて 5 MU/g未満で、食品衛生上“無毒”であった。一方、これまでサツマビナ、ヘコミマクラ、イボヨフパイ、カゲロウヨフパイの毒性に関する知見はなく、本報が初めてである。

2. 小型巻貝類の毒成分

供試した巻貝15種につき、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、各有毒個体の筋肉、内臓、可食部、合一可食部、およびアワムシロの合一可食部から 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。さらに、キンシバイでは *m/z* 302, 320, 336の各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、それぞれ 4,9-anhydroTTX ($[M+H]^+ = 302$)、4-*epi*TTX ($[M+H]^+ = 320$)、11-oxoTTX ($[M+H]^+ = 336$)^{32)~34)} と推定されるピークが認められた。

LC-MS分析で得られた TTX 量 (MU換算値) は、キンシバイの筋肉で 8.16~249 MU/g、内臓で 4.17~43.9 MU/g、サツマビナの内臓で 8.90 MU/g、ヘコミマクラの筋肉で 3.23 MU/g、イボヨフパイの可食部で 5.51 および 1.90 MU/g、カゲロウヨフパイの合一可食部で 2.69 MU/g、アワムシロの合一可食部で 5.08 MU/g であった (Table 1)。マウス毒性試験で得られた毒力との対比から、キンシバイの筋肉では総毒力の 13~66%、内臓では 18 および