

魚介毒の化学成分と薬理作用

長島 裕二

1. 食中毒を起こす魚類の毒

わが国で最も問題になるのはフグ毒である。フグ毒の主成分はテトロドトキンで、骨格筋や神経の膜電位依存性ナトリウムチャンネルに結合して、チャンネル内へのナトリウムイオンの流入を阻害して神経伝達を遮断する。このため、痺れや呼吸困難などの中毒症状が起こる。今のところ有効な治療法や解毒剤はないが、速やかに人工呼吸を行い、呼吸を確保して適切な処置を施せば確実に延命できることを付記しておきたい。

熱帯・亜熱帯海域を中心に、世界中で毎年数万人規模の食中毒を起こしているのがシガテラである。日本では沖縄奄美地方で散発的に発生していたが、近年、温暖化の影響からか本州沿岸でも毒化した魚が漁獲されることがある。原因毒素はシガトキシンで、電位依存性ナトリウムチャンネルに結合して、フグ毒とは反対に、チャンネルを活性化することで神経伝達に異常をきたし、温度感覚異常、関節痛、筋肉痛、搔痒、痺れなどの中毒症状を起こす。中毒症状は長期間続くことが多いが、幸いなことに致死率は低い。

魚を食べて激しい筋肉痛や全身痛、黒褐色の排尿（ミオグロビン尿症）を伴う変わった食中毒症状を起こすことがある。これはパリトキシンによるもので、骨格筋横紋筋の融解で説明される。この他、パリトキシンは電位依存性ナトリウムチャンネルに作用してナトリウムイオン透過性の上昇や赤血球の破壊（溶血性）を示し、致死率が高い点に注意を要する。

2. 食中毒を起こす貝類の毒

貝類の毒は、中毒症状により分けられる。神経麻痺症状を起こす麻痺性貝毒、下痢を起こす下痢性貝毒、記憶喪失を起

こす記憶喪失性貝毒が三大貝毒といえる。これらの毒素は二枚貝類から見つけられたため貝毒といわれるが、毒素を作っているのはプランクトン類である。有毒プランクトンが発生する海域および時期にそこで生息した場合、貝が毒化するので、汚染海域から毒化原因プランクトンが消失すれば貝類の毒も減少する。

麻痺性貝毒はサキシトキシンを基本骨格とする 30 以上の類縁体が存在する。これらの薬理作用は、フグ毒テトロドトキシンとほぼ同様で、ナトリウムチャンネルに結合して、ナトリウムイオンの流入をブロックし神経の麻痺を引き起こす。中毒症状や対処法はフグ毒と同じである。

下痢性貝毒はオカダ酸とその類縁体ジノフィシトキシンからなり、下痢以外に、吐気、嘔吐、腹痛を伴うが、回復は早く死亡例はない。オカダ酸群はタンパク質脱リン酸化酵素を特異的に阻害するため、強い下痢原性だけでなく、強力な発がん促進作用をもつ点が注目される。

記憶喪失性貝毒の原因毒素はドウモイ酸である。これは中枢神経伝達物質 L-グルタミン酸に化学構造が似ているため、神経細胞のイオンチャンネル型グルタミン酸受容体に結合し、脳に侵入した場合、海馬、視床、扁桃体細胞を壊死させる。

ツブあるいはツブ貝とよばれる肉食性巻貝の唾液腺には高濃度のテトラミン（テトラメチルアンモニウムイオン）が含まれ、食後 30 分ほどで頭痛、めまい、酩酊感を起こすことがあるが回復は早い。

この他にも様々な種類の毒素があるので、詳細は巻末の参考資料や厚生労働省 HP「自然毒のリスクプロファイル」等を参照していただきたい。

動物界におけるフグ毒の分布

荒川 修

日本で発生する食中毒の中で、死者数ではフグ毒テトロドトキシン (TTX) によるフグ中毒が最も多い。また、中国や台湾では巻貝による TTX 中毒が頻発して問題になっている。ここでは、TTX 保有生物とそれらによる食中毒について簡単に紹介したい。

1. フグにおける TTX の分布

日本近海に生息するフグの中では、トラフグ、マフグ、シマフグなど少なくともフグ科の 22 種が有毒種とされている。一方、ハリセンボン科とハコフグ科のフグは TTX をもたない。有毒部位は種によって異なるが、一般に肝臓と卵巣は猛毒 (10 g の摂取で致命的) ないし強毒 (100 g の摂取で致命的) で、腸や皮の毒性がそれに次ぐ。筋肉と精巣は、ドクサバフグなど一部の例外を除き無毒または弱毒で、多くのフグで食用が認められている。フグの毒性には大きな個体差や地域差、季節変動がみられ、有毒種のフグでも常に高毒性とは限らない。このことがかえって油断を招き、フグ中毒が多発する一因となっている。各地の沿岸で簡単に釣れるクサフグやヒガンフグ、コモンフグ、ショウサイフグは猛毒の個体が多く、しばしば致死的中毒の原因となる。

2. フグ以外の生物における TTX の分布

TTX はフグのみがもつ毒と考えられていたが、1964 年にカリフォルニアイモリの毒が TTX と同定されて以来、ツムギハゼ、アテロパス属のカエル、ヒョウモンダコ、肉食性巻貝ボウシュウボラ、モミジガイ属のヒトデ、スベスベマンジュウガニ、カブトガニ、ヒラムシ類、ヒモムシ類、腐肉食性巻貝類、ウミウシなど、多様な生物に TTX が見出されてきた。日本各地の

田んぼや水路にみられるニホンイモリ (アカハライモリ) も TTX を保有する。フグやイモリは皮に腺組織ないし分泌細胞をもち、外的刺激により TTX を分泌することから、彼らは外敵の捕食から身を守る防御物質として TTX を保有している可能性がある。一方、1980 年代にはフグ毒保有生物から分離された数種の海洋細菌に相次いで TTX 産生能が見出され、フグ毒の起源は海洋細菌と考えられるようになった。

3. フグ以外の生物による TTX 中毒

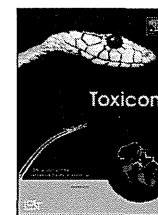
日本では、1979 ~ 1987 年にボウシュウボラによる TTX 中毒が計 3 件発生している。本種の場合、TTX が中腸腺に局在しており、この部位の喫食が中毒の原因となった。その後、2007 年と 2008 年には腐肉食性巻貝キンシバイによる中毒が九州で各 1 件発生しているが、この貝は中腸腺のみならず筋肉にも多量の毒をもつ。同様の小型巻貝類による TTX 中毒は、中国や台湾でも頻発している。一方、タイやカンボジアではカブトガニの卵を食用にしており、時折それによる中毒が発生する。有毒種は尾の断面が丸い。他方、オーストラリアでは、ダイバーなどが TTX を保有するヒョウモンダコに咬まれて中毒死することがあるという。

最近、ニュージーランドでウミウシによる犬の TTX 中毒が突然発生した。一方、日本沿岸では、本来南方の海域に生息するドクサバフグが頻繁に出現して問題になっている。温暖化などの海洋環境の変化により、TTX 保有生物の多様化、分布広域化が起きているのかもしれない。



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicol

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

DNA microarray analysis on gene candidates possibly related to tetrodotoxin accumulation in pufferfish



Holger Feroudj^{a,1}, Takuya Matsumoto^{a,1}, Yohei Kurosu^a, Gen Kaneko^a, Hideki Ushio^a, Katsuaki Suzuki^b, Hidehiro Kondo^b, Ikuo Hirono^b, Yuji Nagashima^c, Seiji Akimoto^d, Kazushige Usui^d, Shigeharu Kinoshita^a, Shuichi Asakawa^a, Masaaki Kodama^a, Shugo Watabe^{a,e,*}

^a Department of Aquatic Bioscience, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

^b Laboratory of Genome Science, Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Tokyo 108-8477, Japan

^c Department of Food Science and Technology, Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Tokyo 108-8477, Japan

^d Kanagawa Prefecture Fisheries Research Center, Jogashima, Miura, Kanagawa 238-0237, Japan

^e School of Marine Biosciences, Kitasato University, Minami, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 July 2013

Received in revised form 8 October 2013

Accepted 30 October 2013

Available online 7 November 2013

Keywords:

Tetrodotoxin

Pufferfish

Takifugu rubripes

DNA microarray

Gene expression

Keratin

ABSTRACT

Pufferfish accumulate tetrodotoxin (TTX) at high levels in liver and ovary through the food chain. However, the mechanisms underlying TTX toxicification in pufferfish have been poorly understood. In order to search gene candidates involved in TTX accumulation in the torafugu pufferfish *Takifugu rubripes*, a custom 4x44k oligonucleotide microarray slide was designed by the Agilent eArray program using oligonucleotide probes of 60 bp in length referring to 42,724 predicted transcripts in the publicly available Fugu genome database. DNA microarray analysis was performed with total RNA samples from the livers of two toxic wild specimens in comparison with those from a nontoxic wild specimen and two nontoxic cultured specimens. The mRNA levels of 1108 transcripts were more than 2-fold higher in the toxic specimens than in the nontoxic specimens. The levels of 613 transcripts were remarkably high, and 16 transcripts encoded by 9 genes were up-regulated more than 10-fold. These genes included those encoding forming structural filaments (keratins) and those related to vitamin D metabolism and immunity. It was also noted that the levels of the transcripts encoding serpin peptidase inhibitor clade C member 1, coagulation factor X precursor, complement C2, C3, C5, C8 precursors, and interleukin-6 receptor were high in the toxic liver samples.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: APP, acute phase protein; flp, fibrinogen-like protein; IL-6, interleukin-6; LC-FLD, liquid chromatography–fluorescence detection; RAP RT-PCR, mRNA arbitrarily primed reverse transcription–polymerase chain reaction; SSH, suppression subtractive hybridization; TTX, tetrodotoxin.

* Corresponding author. School of Marine Biosciences, Kitasato University, Minami, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan. Tel.: +81 42 778 9094; fax: +81 42 778 5010.

E-mail address: swatabe@kitasato-u.ac.jp (S. Watabe).

¹ These authors equally contributed to this study.

1. Introduction

Tetrodotoxin (TTX) is one of the most potent non-proteinous neurotoxins blocking voltage-gated sodium channels (Narahashi et al., 1967; Kao, 1982) and commonly present in various tissues of pufferfish (Hashimoto, 1979). Pufferfish generally show the highest toxicity in the liver and ovary, followed by the intestine and skin, although their TTX accumulation patterns are species-specific (Watabe et al., 1987; Noguchi and Arakawa, 2008). TTX had been

believed to be present only in pufferfish for a long time. In 1960s and 1970s, however, TTX was found in other vertebrates including California newt *Taricha torosa* (Mosher et al., 1964), the goby *Yongleichthys criniger* (Noguchi and Hashimoto, 1973), and Costa Rican frogs *Atelopus* spp. (Kim et al., 1975). Since then, TTX has been detected in various organisms of different phylogenetic classes including invertebrates such as trumpet shell *Charonia sauliae* (Narita et al., 1987), xanthid crab *Atergatis floridus* (Noguchi et al., 1984), blue-ringed octopus *Hapalochlaena maculosa* (Sheumack and Howden, 1978; Yotsu-Yamashita et al., 2007) and flatworm *Planocera multitentaculata* (Miyazawa et al., 1986). Finally, it was found that TTX is produced in intestinal bacterial strains of *Vibrio* sp. from pufferfish and toxic crabs (Noguchi et al., 1986, 1987) and in other bacteria such as *Shewanella alga* and *Alteromonas tetraodonis* from red calcareous alga *Jania* sp. (Yasumoto et al., 1986a,b). Thus it is likely that TTX-bearing pufferfish accumulate TTX in their body through the food chain. This scheme is supported by the fact that non-toxic cultured pufferfish were never toxic when reared with non-toxic diets (Matsui et al., 1981), but became toxic upon ingesting the toxic ovary of wild pufferfish (Saito et al., 1984). However, there is another possibility that TTX is synthesized in pufferfish themselves, because *in vivo* cultured TTX-producing bacteria do not produce enough quantities of TTX that explain toxicity of wild pufferfish (Matsui et al., 1990). The problem is that genes participating in TTX biosynthesis have not been found yet in any TTX-bearing organisms.

Lee et al. (2007) first attempted to investigate genes related to the biosynthesis or accumulation of TTX in pufferfish. In their study, mRNA expression patterns in the liver of pufferfish, akamefugu *Takifugu chrysopterus* and kusafugu *Takifugu niphobles*, were compared by mRNA arbitrarily primed reverse transcription–polymerase chain reaction (RAP RT–PCR) with pufferfish bearing different concentrations of TTX and its derivatives in the liver. RAP RT–PCR provided three fibrinogen-like protein (flp) genes that were expressed higher in toxic than non-toxic pufferfish liver. Relative mRNA levels of flp-1, flp-2, and flp-3 genes showed a linear correlation with toxicity in the liver of two pufferfish species. Later, Matsumoto et al. (2011) examined changes in the gene expression profile in the liver of the torafugu pufferfish, *Takifugu rubripes*, induced by an intramuscular administration of TTX by employing suppression subtractive hybridization (SSH). The SSH study revealed that genes encoding acute-phase response proteins such as hepcidin precursors (Krause et al., 2000; Park et al., 2001), complement C3 and warm-temperature-acclimation-related 65 kDa protein (Wap65) (Hirayama et al., 2003) increased their transcript levels in the liver.

The objective of this study was to find gene candidates possibly involved in TTX accumulation by DNA microarray analysis with wild torafugu specimens that have different concentrations of TTX in the liver.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Three wild torafugu specimens (526, 650, and 975 g body weight) were collected from Tokyo Bay off Miura

Peninsula in December, 2009 (Table 1). Two cultured torafugu specimens (782 and 815 g body weight) were obtained alive from a local fish farmer in Ehime Prefecture, Japan, which had been cultured by a conventional method in net cages at Uwa Sea, and used as non-toxic control samples. Crystalline TTX (Wako Pure Chemicals Industries, Osaka, Japan) was used as a standard for the liquid chromatography–fluorescence detection (LC–FLD) analysis. All other chemicals were of a reagent grade.

2.2. TTX extraction and determination

TTX was extracted from the liver with 0.1% acetic acid by heating in a boiling water bath for 10 min according to the standard assay procedures for TTX (Kodama and Sato, 2005). The extracts were then applied to a Bio-Gel P-2 column (3 cm × 15 cm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) equilibrated with water after adjusting pH of the extract to 6.5 with 0.1 N NaOH. TTX quantitation was performed by LC–FLD analysis according to the methods of Nagashima et al. (1987) and Yotsu (1989).

2.3. Design of torafugu microarray

The nucleotide sequences of predicted transcripts in fugu genome were cited from the ensemble database version 55. Among 48,623 transcripts, 42,724 annotated were used for designing probes. Oligonucleotide probes of 60 bp in length were designed by eArray program (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>) and spotted on a slide glass by Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA; design ID, 025856).

2.4. Microarray analyses

Total RNA was extracted from the liver using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The RNA was labeled with Cy3 using One Color Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) and hybridized on the microarray using Agilent Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions. After hybridization, the slide glass was washed using Agilent Gene Expression Wash Buffer Kit (Agilent Technologies) and scanned with Genepix 400B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Fluorescence intensity was calculated by using Feature Extraction software version 9.5 (Agilent Technologies) and the data was analyzed with GeneSpring GX software version 11.0 (Agilent Technologies). The data was normalized among the arrays and the transcripts showing more than 2-fold differences between toxic and

Table 1
Toxicity of the liver of wild torafugu *Takifugu rubripes*.

No.	Body length (cm)	Body weight (g)	Liver weight (g)	TTX conc. (µg/g)	Toxicity (MU/g)
1	36	650	14.5	90.7	452
2	33	526	11.1	24.5	123
3	39	975	26.5	N.D.	–

N.D. indicates a sample where TTX was not detected (<0.15 µg TTX/g tissue). MU indicates mouse unit.

non-toxic pufferfish samples at a certain statistical cut-off were searched.

3. Results and discussion

TTX in the liver of wild specimens was analyzed by LC–FLD, and the concentrations of TTX determined are listed in Table 1. TTX was detected in the liver from wild pufferfish No. 1 and No.2, but not in the liver of No. 3 (<0.15 µg TTX/g tissue). The liver of the cultured specimens used in this study did not contain any detectable amount of TTX.

Based on these results, DNA microarray analysis was performed with total RNA from the liver of two toxic wild specimens in comparison with those from a non-toxic wild specimen and two cultured specimens. The DNA microarray analysis revealed that the mRNA levels of 1108 transcripts showed more than 2-fold differences in the liver between toxic and non-toxic pufferfish. The levels of 613 transcripts were higher in the toxic liver than in the non-toxic liver, and the levels of 16 transcripts encoded by 9 genes were up-regulated more than 10-fold in the toxic liver (Table 2). These are involved in the formation of structural filaments (keratins), vitamin D metabolism, and immunity. Lee et al. (2007) claimed that, in two different pufferfish, akamefugu *T. chrysops* and kusafugu *T. niphobles*, the mRNA levels of fibrinogen-like and hepcidin-like genes that are likely to be involved in immunity were high in the liver containing high concentrations of TTX. Matsumoto et al. (2011) also identified various genes in the liver of cultured torafugu induced by an intramuscular administration of TTX, with a possible relation to immunity. In this study, we identified several genes involved in blood coagulation and complement pathway (Table 3). Because the mRNA levels of certain genes identified so far, such as hepcidin, were too high, the fluorescent intensity was saturated and we could not detect any differences in the mRNA levels for these genes between toxic and non-toxic livers.

In addition to the blood coagulation factors/regulators and complement components, the mRNA level of the

interleukin-6 (IL-6) receptor gene was high in the toxic liver (Table 3). IL-6 is a cytokine that affects various cells (Van Snick, 1990). Especially in mammals, IL-6 induces the expression of acute phase proteins (APPs) in the liver during injury, infection, and tissue trauma (Moshage, 1997). Some blood coagulation factors/regulators and complement components are APPs in other animals. Because the mRNA levels of many putative APP genes seemed to be high in the toxic liver, circulating IL-6 levels might be high in pufferfish. In mammal, IL-6 has a pleiotropic function, including the induction of keratinocyte proliferation (Grossman et al., 1989). In this study, 2 genes encoding keratin, which is abundant in keratinocytes, were up-regulated in the toxic liver. Therefore, these results possibly reflect high circulating IL-6 levels in the toxic liver. In torafugu, IL-6 transcripts have been detected in various tissues and increased by certain immune stimulants such as phytohemagglutinin, lipopolysaccharide, and polyinosinic-polycytidylic acid (Bird et al., 2005). Although there are no reports available whether or not IL-6 gene expression and/or IL-6 level in the blood is increased by TTX, Honda et al. (2005) showed that TTX acts as an immune stimulant in torafugu. Unfortunately, however, these markedly up-regulated genes are not likely candidate members that encode those related to biosynthesis or accumulation of TTX.

In this study, 3 wild specimens and 2 cultured specimens were used for the DNA microarray analysis, where two wild pufferfish were toxic and one non-toxic. The normalized relative mRNA levels of each transcript listed in Table 2 for different specimens are shown in Fig. 1. All transcripts showed higher levels in the toxic samples (fish 1 and 2) than in the non-toxic samples (fish 3–5). However, some of them showed lower levels in the liver of cultured pufferfish (fish 4 and 5) than in the wild non-toxic liver (fish 3). Rearing conditions may strongly affect the physiological condition of pufferfish, resulting in the mRNA levels of certain genes being different between the wild and cultured pufferfish. We are now performing DNA microarray analyses on the cultured pufferfish with or without

Table 2
Genes up-regulated more than 10 folds in the toxic liver.

No.	Group	Product name	Gene ID	Transcript ID	FC ^a
1	Structural protein	Type I cytokeratin, enveloping layer	ENSTRUG00000000933	ENSTRUT00000002225	39.2
2				ENSTRUT00000002226	28.8
3				ENSTRUT00000002227	22.6
4				ENSTRUT00000002229	48.8
5	Keratin, type I cytoskeletal 13		ENSTRUG00000002582	ENSTRUT00000006040	32.3
6				ENSTRUT00000006043	18.3
7				ENSTRUT00000004482	39.3
8	Vitamin D metabolism	Vitamin D 25-hydroxylase 25-hydroxyvitamin D-1 alpha hydroxylase, mitochondrial Precursor	ENSTRUG00000017301 ENSTRUG00000018507	ENSTRUT00000044482	33.9
9				ENSTRUT00000044483	
10	Immunity	Major histocompatibility complex class I protein ^b	ENSTRUG00000000486 ENSTRUG00000002296 ENSTRUG00000000481 ENSTRUG00000008312	ENSTRUT00000047536	44.7
11				ENSTRUT00000047537	63.0
12				ENSTRUT00000047538	52.9
13				ENSTRUT00000001153	193.0
14	Other	Synaptosomal-associated protein, 91kDa homolog Agmatinase, mitochondrial Precursor Transmembrane protease, serine 13	ENSTRUG00000000486 ENSTRUG00000002296 ENSTRUG00000000481 ENSTRUG00000008312 ENSTRUG00000013292	ENSTRUT00000005314	61.5
15				ENSTRUT00000001139	11.3
16				ENSTRUT00000020887	76.9
17				ENSTRUT00000033970	11.7

^a FC (fold change) of the gene with plural transcripts is represented by the mean value.

^b The predicted product was localized in 2 genes in different scaffolds.

Table 3
Immune-related genes up-regulated in the toxic liver.

Group	Product name	Gene ID	Transcript ID	FC ^a
Coagulation factor/regulator	Serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	ENSTRUG00000010570	ENSTRUT00000026784	3.5
		Coagulation factor × precursor	ENSTRUG00000004411	ENSTRUT00000010534
			ENSTRUT00000010535	5.3
			ENSTRUT00000010536	4.4
			ENSTRUT00000010538	4.6
			ENSTRUT00000010539	4.4
			ENSTRUT00000010540	4.5
			ENSTRUT00000010541	4.6
			ENSTRUT00000010542	4.6
			ENSTRUT00000010543	4.5
Complement component	Complement C2 precursor	ENSTRUG00000008352	ENSTRUT00000020998	4.5
			ENSTRUT00000020999	4.8
			ENSTRUT00000021000	5.1
			ENSTRUT00000021001	5.3
			ENSTRUT00000021002	5.0
		ENSTRUT00000021003	4.6	
	Complement C3 precursor	ENSTRUG00000002842	ENSTRUT00000006677	4.2
	Complement C5 precursor	ENSTRUG00000012757	ENSTRUT00000032416	4.3
			ENSTRUT00000032417	5.1
	Complement component C8 beta chain precursor	ENSTRUG00000006173	ENSTRUT00000015084	4.2
		ENSTRUT00000015085	3.6	
		ENSTRUT00000015086	3.6	
		ENSTRUT00000015087	3.6	
Cytokine receptor	Interleukin-6 receptor subunit beta precursor	ENSTRUG00000011889	ENSTRUT00000030166	3.1
			ENSTRUT00000030168	3.1
			ENSTRUT00000030169	3.2
			ENSTRUT00000030171	3.4
			ENSTRUT00000030172	3.2
			ENSTRUT00000030173	3.2

^a FC (fold change) of the gene with plural transcripts is represented by the mean value.

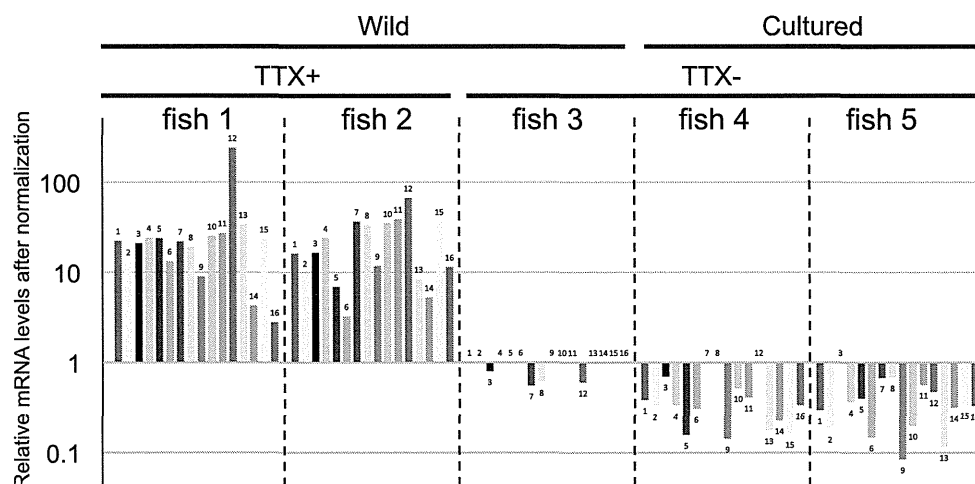


Fig. 1. The relative mRNA levels of the transcripts with more than 10-fold higher in the toxic than in non-toxic liver. The relative mRNA levels of the transcripts listed in Table 2 are shown for each fish (fish 1–5). The numbers on the bars correspond to those of the transcripts listed in Table 2. Fish 1–3 correspond to those listed in Table 1, whereas fish 4 and 5 do to cultured ones (782 and 815 g body weight, respectively) used as non-toxic control samples. Wild and cultured indicate the wild and the cultured pufferfish specimens, respectively. TTX+ and TTX– indicate the toxic and non-toxic specimens, respectively.

TTX, using more samples for statistical analyses to confirm the present results.

Acknowledgment

This study was partly supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) from Japan Society for the Promotion of Science (JSPS).

Conflict of interest

None.

References

Bird, S., Zou, J., Savan, R., Kono, T., Sakai, M., Woo, J., Secombes, C., 2005. Characterisation and expression analysis of an interleukin 6

- homologue in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*. Dev. Comp. Immunol. 29, 775–789.
- Grossman, R.M., Krueger, J., Yourish, D., Granelliperno, A., Murphy, D.P., May, L.T., Kupper, T.S., Sehgal, P.B., Gottlieb, A.B., 1989. Interleukin-6 is expressed in high-levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 6367–6371.
- Hashimoto, Y., 1979. Marine Toxins and Other Bioactive Metabolites. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 70–91.
- Hirayama, M., Nakaniwa, M., Ikeda, D., Hirazawa, N., Otaka, T., Mitsuboshi, T., Shirasu, K., Watabe, S., 2003. Primary structures and gene organizations of two types of Wap65 from the pufferfish *Takifugu rubripes*. Fish Physiol. Biochem. 29, 211–224.
- Honda, S., Ichibu, T., Arakawa, O., Takatani, T., Tachibana, K., Yagi, M., Tanigawa, A., Noguchi, T., 2005. Antibody productivity against sheep red blood cells and splenocyte proliferation reaction of tiger puffer (*Takifugu rubripes*) fed with tetrodotoxin-containing diets. Aquacult. Sci. 53, 205–210.
- Kao, C.Y., 1982. Actions of nortetrodotoxin on frog muscle and squid axon. Toxicon 20, 1043–1050.
- Kim, Y.H., Brown, G.B., Mosher, F.A., 1975. Tetrodotoxin: occurrence in ateloid frogs of Costa Rica. Science 189, 151–152.
- Kodama, K., Sato, S., 2005. In: Ministry of Health Labour and Welfare (Ed.), Standard Methods of Analysis in Food Safety Regulation, Chemistry. Japan Food Hygiene Association, Tokyo, pp. 661–666.
- Krause, A., Neitz, S., Magert, H.J., Schulz, A., Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P., Adermann, K., 2000. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. FEBS Lett. 480, 147–150.
- Lee, J.H., Kondo, H., Sato, S., Akimoto, S., Saito, T., Kodama, M., Watabe, S., 2007. Identification of novel genes related to tetrodotoxin intoxication in pufferfish. Toxicon 49, 939–953.
- 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., Taketsugu, S., Sato, H., Yamamori, K., Kodama, K., Ishii, A., Hirose, H., Shimizu, C., 1990. Toxication of cultured puffer fish by the administration of tetrodotoxin producing bacteria. Nippon Suisan Gakkaishi 56, 705.
- Matsumoto, T., Ishizaki, S., Nagashima, Y., 2011. Differential gene expression profile in the liver of the marine puffer fish *Takifugu rubripes* induced by intramuscular administration of tetrodotoxin. Toxicon 57, 304–310.
- Miyazawa, K., Jeon, J.K., Maruyama, J., Noguchi, T., Ito, K., Hashimoto, K., 1986. Occurrence of tetrodotoxin in the flatworm *Planocera multidentaculata*. Toxicon 24, 645–650.
- Moshage, H., 1997. Cytokines and the hepatic acute phase response. J. Pathol. 181, 257–266.
- Mosher, H.S., Fuhrman, F.A., Buchwald, H.D., Fischer, H.G., 1964. Tarchatoxin–tetrodotoxin: a potent neurotoxin. Science 144, 1100–1110.
- Nagashima, Y., Maruyama, J., Noguchi, T., Hashimoto, K., 1987. Analysis of paralytic shellfish poison and tetrodotoxin by ion-pairing high-performance liquid-chromatography. Nippon Suisan Gakkaishi 53, 819–823.
- Narahashi, T., Moore, J.W., Poston, R.N., 1967. Tetrodotoxin derivatives: chemical structure and blockage of nerve membrane conductance. Science 156, 976–979.
- Narita, H., Matsubara, S., Miwa, N., Akahane, S., Murakami, M., Goto, T., Nara, M., Noguchi, T., Saito, T., Shida, Y., Hashimoto, K., 1987. *Vibrio alginolyticus*, a TTX-producing bacterium isolated from the starfish *Astropecten polyacanthus*. Nippon Suisan Gakkaishi 53, 617–621.
- Noguchi, T., Hashimoto, Y., 1973. Isolation of tetrodotoxin from a goby *Gobius criniger*. Toxicon 11, 305–307.
- Noguchi, T., Uzu, A., Daigo, K., Shida, Y., Hashimoto, K., 1984. A tetrodotoxin-like substance as a minor toxin in the xanthid crab *Atergatis floridus*. Toxicon 22, 425–432.
- Noguchi, T., Jeon, J.K., Arakawa, O., Sugita, H., Deguchi, Y., Shida, Y., Hashimoto, K., 1986. Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio* sp. isolated from the intestines of a xanthid crab, *Atergatis floridus*. J. Biochem. 99, 311–314.
- Noguchi, T., Hwang, D.F., Arakawa, O., Sugita, H., Deguchi, Y., Shida, Y., Hashimoto, K., 1987. *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fugu vermicularis vermicularis*. Mar. Biol. 94, 625–630.
- Noguchi, T., Arakawa, O., 2008. Tetrodotoxin-distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. Mar. Drugs 6, 220–242.
- Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., Ganz, T., 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. J. Biol. Chem. 276, 7806–7810.
- 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. Nippon Suisan Gakkaishi 50, 1573–1575.
- Sheumack, D.D., Howden, M.E.H., 1978. Maculotoxin: a neurotoxin from the venom glands of the octopus *Hapalochlaena maculosa* identified as tetrodotoxin. Science 199, 188–189.
- Van Snick, J., 1990. Interleukin-6: an overview. Annu. Rev. Immunol. 8, 253–278.
- Watabe, S., Sato, Y., Nakaya, M., Nogawa, N., Oohashi, K., Noguchi, T., Morikawa, N., Hashimoto, K., 1987. Distribution of tritiated tetrodotoxin administered intraperitoneally to pufferfish. Toxicon 25, 1283–1289.
- Yasumoto, T., Nagai, H., Yasumura, D., Michishita, T., Endo, A., Yotsu, M., Kotaki, Y., 1986a. Interspecies distribution and possible origin of tetrodotoxin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 479, 44–51.
- Yasumoto, T., Yasumura, D., Yotsu, M., Michishita, T., Endo, A., Kotaki, Y., 1986b. Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin. Agric. Biol. Chem. 50, 793–795.
- Yotsu, M., 1989. An improved tetrodotoxin analyzer. Agric. Biol. Chem. 53, 893–895.
- Yotsu-Yamashita, M., Mebs, D., Flachsenberger, W., 2007. Distribution of tetrodotoxin in the body of the blue-ringed octopus (*Hapalochlaena maculosa*). Toxicon 49, 410–412.

平成 24 年度水産学進歩賞

フグ類が保有する毒の分布、蓄積機構、および生理機能^a

荒 川 修

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

Distribution, accumulation mechanism, and physiological functions of pufferfish toxins

OSAMU ARAKAWA

Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University, Bunkyo, Nagasaki 852-8521, Japan

日本で発生する食中毒の中では、死者数で見ると動物性自然毒（魚介毒）、特に‘フグ毒’テトロドトキシン（TTX）によるフグ中毒が最も多い。TTX は特異な化学構造をもつ低分子の神経毒で、神経膜のナトリウムチャンネルを特異的に塞ぐことにより活動電位の伝導を阻害する。ヒトの主な中毒症状は、唇、舌の先、四肢のしびれや知覚麻痺、言語障害、呼吸困難などで、重篤な場合は呼吸麻痺で死亡する。台湾や中国では、以前から腐肉食性の小型巻貝による TTX 中毒が多発していたが、最近、日本でも同様の巻貝、キンシバイによる中毒が九州で 2 件発生した。一方、1990 年以降、西日本でハコフグの喫食による中毒が立て続けに発生し、計 13 名が中毒、うち 1 名が死亡している。ハコフグ中毒は、一般のフグ中毒とは異なり、横紋筋融解症を主徴とする点でアオダイ中毒（日本で希に起こる特異な食中毒）に酷似する。海洋環境の変化に伴い、フグ、あるいはフグの毒による中毒が多様化、広域化しているように思われる。日本人は昔からフグを好んで食べ、独自のフグ食文化を築き上げてきたが、中毒を避け、フグ食の安全・安心を確保するためには、毒そのものに加え、それを保有する生物に関する根本的な理解が不可欠である。筆者らは、これまで長年にわたり、フグの毒の分布や蓄積機構、生理機能などに関して様々な知見を集積してきており、本稿ではそれらの概要について紹介したい。

1. 水生生物における TTX の分布とフグの毒化機構

TTX はフグのみがもつ毒と考えられていたが、1964 年にカリフォルニアイモリの毒が TTX と同定されて以来、ツムギハゼ、*Atelopus* 属のカエル、ヒョウモンダコ、肉食性巻貝ボウシュウボラ、モミジガイ属のヒトデ、およびヒラムシ類から TTX が相次いで見出され

た。これらの先駆的研究に続き、筆者らは、まず水生生物における TTX の分布を調べ、ヒモムシ類、オウギガニ科有毒ガニ、バングラデシュ産のカブトガニやある種のカエル、腐肉食性巻貝類などから新たに TTX ないしその誘導体を検出するとともに、数種の TTX 保有生物から分離した *Vibrio* 属などの海洋細菌に TTX 産生能を見出した。これらの成果は、他のいくつかの知見（フグの毒性には著しい個体差や地域差がみられること、ボウシュウボラは有毒ヒトデを食べて TTX を蓄積すること、無毒の餌を与えて人工飼育したトラフグやクサフグは毒をもたないが、これらのフグに TTX を経口投与すると効率よくこれを蓄積すること、など）と併せて、フグの毒化外因説、すなわち「フグは自分自身で毒を作るのではなく、細菌を起源とし、食物連鎖を介して生物濃縮された毒を有毒餌生物から得ている」との説（図 1）を強く支持するものである。¹⁾ また、この説に基づけ

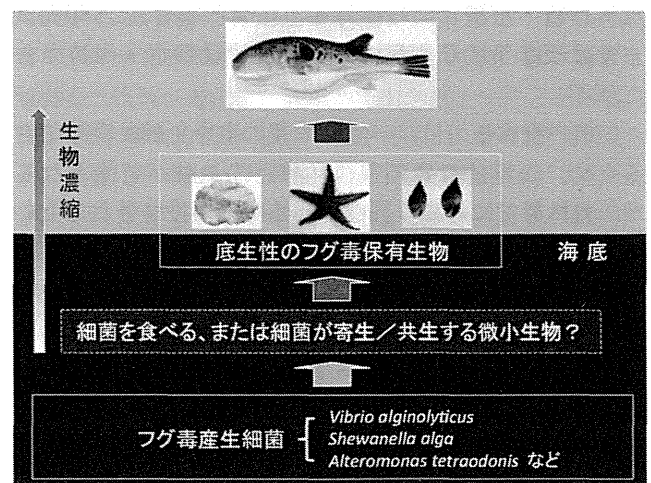


図 1 フグの毒化機構

Tel : 81-95-819-2844. Fax : 81-95-819-2844. Email : arakawa@nagasaki-u.ac.jp

^a 受賞題目：フグ類が保有する毒の分布、蓄積機構、および生理機能に関する研究

ば、'囲い養殖法'すなわち、「有毒餌生物を遮断した状態で無毒の餌を与えて飼育する方法」で養殖すれば、フグは無毒になると考えられる。そこで筆者らは、日本の主要なフグ養殖地である長崎、佐賀、熊本、鹿児島、愛媛、和歌山、静岡の7県から囲い養殖されたトラフグ当歳～3年魚計約5,000個体を集め、主に肝臓の毒性を調査した。その結果、いずれの個体からも毒性は検出されず、フグの毒化は餌生物由来であること、ならびに囲い養殖により肝も無毒のフグが生産可能であることが示された。²⁾

2. フグにおける TTX の体内動態

2-1. 長期的な毒の蓄積と短期的な毒の部位間移行

フグの毒化は細菌から始まる食物連鎖で説明することが可能となったが、有毒餌生物を介してフグ体内に取り込まれた後の TTX の代謝や蓄積、排泄については依然として不明な部分が多い。この点の解明に資するため、無毒養殖フグを用いて種々の TTX 投与試験を行った。まず、養殖トラフグに TTX 添加飼料を与えながら 60 日間飼育したところ、低用量では皮や肝臓に微量の毒を、高用量では皮と内臓に少量、肝臓と卵巣に多量の毒を蓄積した。毒蓄積率は、水槽飼育の当歳魚で 2 割未満、網生け簀飼育の 2 年魚では 3 割程度で、一旦蓄積した毒は投与を止めても長期間各組織に保持されていた。³⁾

次いで、短期的な毒の部位間移行をみるため、養殖トラフグを用い、TTX の筋肉内投与試験を行った。1 個体当たり 50 MU の用量で TTX を単回投与したところ、投与された毒は速やかに筋肉から他の部位へ移行したが、精製毒と粗毒では移行様式が若干異なり、前者の場合、肝臓にはあまり保持されず、12 時間後以降は大部分（投与量の 6 割程度、体内残存量の 96% 以上）が皮へ移行・蓄積したのに対し、後者の場合、24 時間後までは投与量の 2 割程度が一旦肝臓に移行・保持された。⁴⁾

筋肉内投与法では、一度に大量の毒を正確に投与できるため、短期的な毒の部位間移行の追跡が可能となるが、自然界では起こり得ない経路で毒が投与されるという大きな欠点がある。そこで、シリンジを用いて TTX 添加飼料ホモジネートを直接腸管内に注入する経口経管投与を試み、筋肉内投与と比較した。トラフグ（♀）とマフグ（♂）の人工交雑個体（トラマ）に 400 MU/個体の用量で TTX を経口経管投与したところ、24 時間後までは消化管の毒量（組織 1g 当たり）が急速に減少し、これに呼応して肝臓の毒量が増加したが、その後は肝臓の毒量が漸減するとともに、皮への毒の移行がみられた。一方、筋肉内投与した場合、TTX は速やかに肝臓と皮に移行し、1 時間後でも筋肉にはほとんど毒が残

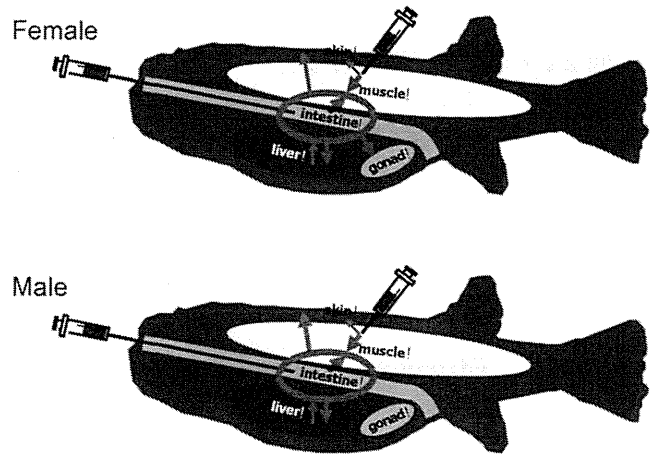


図2 フグ体内における TTX の移行

っていない。1 個体当たりの残存毒量（投与毒量に対する相対値）は、経口経管投与群が 31～45%，筋肉内投与群が 42～74% で、総じて前者の方が低かったが、この差異は、消化管からの TTX の吸収効率を反映したものと推察された。部位別にみると、経口投与、筋肉内投与ともに 8 時間後以降は肝臓が 23～52% と最も多く、72 時間後以降は皮（11～21%）がこれに次いだ。筋肉内に投与された TTX は、肝臓のみならず皮にも速やかに移行するが、消化管からフグ体内に取り込まれた TTX は、血液を介して一旦肝臓に移行・保持され、その後皮に移行することが示された（図 2）。⁵⁾

2-2. TTX 体内動態への性ないし性成熟の関与

天然海産フグでは、一般に卵巣の毒性はきわめて高いが、精巣は弱毒ないし無毒である場合が多く、従って毒の体内動態には性差があり、性成熟の影響を受けると考えられる。そこでまず、天然コモンフグを対象に、部位別毒力の周年変化を調査したところ、同変化のパターンは雌雄で大きく異なり、雌の場合、通常期は肝臓、性成熟期は卵巣の毒力が高く、両部位間で見かけ上毒の入れ替わりが起こっているようにみえたのに対し、雄では性成熟と関連した変化は認められなかった。一方、血漿中で高分子物質に結合した TTX の割合をみると、雌雄ともに通常期は比較的 low、かつ変動が大きいのに対し、性成熟期には安定して高かった。血液を介した毒の部位間移行や蓄積には、性成熟が大きく関与することが示唆された。⁶⁾

この点をより明確に示すため、トラフグより成熟の早いクサフグ（♂）をトラフグ（♀）にかけ合わせて人工交雑個体（トラクサ）を作出し、TTX の筋肉内投与実験を行った。146 MU/個体の用量で TTX を単回投与したところ、トラフグ同様、投与された毒は血液を介して速やかに筋肉から他の部位に移行した。組織 1g 当たりの毒量でみると、卵巣への移行が際立っており、実験期間中、肝臓と皮は最高でも数 MU/g 程度、精巣はほと

んどが無毒 (0.01 MU/g 未満) であったのに対し、卵巣の毒量は漸増して 72 時間後には 50 MU/g を超えた。一方、1 個体当たりの毒量 (投与毒量に対する相対値) では、皮、次いで肝臓の値がそれぞれ 20~54%、2~24% と高かったが、肝臓の毒量は 12 時間後以降次第に減少し、雌では 48 時間後以降卵巣の毒量を下回った。一旦肝臓に取り込まれた毒は、雌では卵巣、雄では皮に移行・蓄積するものと推察された (図 2)。⁷⁾

3. TTX の組織内微細分布と生理機能

抗 TTX モノクローナル抗体を用いる免疫組織化学的手法により、種々の TTX 保有生物を用いて TTX の組織内微細分布を可視化した。その結果、フグ類では TTX は皮の腺組織 (図 3) または分泌細胞、基底細胞、卵母細胞中の卵黄物質などに分布するが、その様式は種や卵の成熟段階により異なること、ニホンイモリは皮に TTX を保有する腺組織をもち、外的刺激によりそこから TTX を分泌すること、アカハナヒモムシでは、表皮杆状細胞や吻腔上皮、腎管の球状末端、卵などに加え、口吻の擬刺胞に隣接した顆粒細胞に高濃度の TTX をもち、餌生物の捕獲に TTX を利用している可能性があること、などを示すことができた。⁸⁻¹⁰⁾ これら一連の研究は、生体防御物質、あるいは餌生物捕獲のための攻撃物質としての機能を含め、TTX 保有生物における TTX の生理機能解明に大きな示唆を与えるものである。

一方、フグにおいて TTX は免疫賦活剤ないし精神安定剤のような機能を有している可能性もある。前述のとおり、無毒の餌を与えて囲い養殖したフグは毒をもたないが、そのような無毒養殖フグは、しばしば噛み合いを起こし、細菌、ウイルスの感染や寄生虫による疾病で大量死することがある。筆者らは、「毒をもたない養殖フグは本来もつべき TTX を与えることで健全化できる」との仮説に基づき、種々の TTX 添加飼料を用いて十数

回に及ぶトラフグの飼育試験を行った。飼育終了時に試験魚より脾臓を採取し、リンパ球の幼若化反応を検討したところ、各種マイトゲン (PWM, Con A あるいは LPS) の刺激で、TTX 添加飼料投与区が対照区より有意に高い幼若化反応を示した。加えて、ヒツジ赤血球に対する抗体産生能も TTX 添加飼料投与区の方が対照区より有意に高かった。¹¹⁾ さらに TTX 添加飼料の投与が生残率の向上や尾鰭の噛み合い防止にも有効であることを示唆するデータも得られており、フグにおいて TTX は免疫機能の活性化やストレス軽減に寄与しているものと推察された。

4. フグが保有する TTX 以外の毒

4-1. 麻痺性貝毒 (PSP)

東南アジアの河川や湖沼には、淡水産の小型のフグが生息している。日本にも輸入されて観賞用に売られているが、食用にされることはない。しかしながら、タイやカンボジアでは時にこれによる食中毒が発生し、死者も出ている。まずタイ産淡水フグ 2 種 *Tetraodon leiurus* および *T. suvattii* の毒組成を調査したところ、TTX はまったくみあたらず、主に皮から著量の麻痺性貝毒 (PSP) が検出された。¹²⁾ さらに、淡水フグではバングラデシュ産の *T. cutcutia* やカンボジア産の *T. turgidus*、海産フグでは日本近海産のホシフグも主要毒成分として PSP を保有することを見出した。¹³⁻¹⁵⁾ 興味深いことに、淡水フグでは皮の毒性が高く、海産のホシフグでは卵巣に PSP が局在していた。*T. turgidus* の無毒養殖個体に PSP を筋肉内投与したところ、同毒は速やかに筋肉から他の部位へ移行したが、肝臓への移行量は僅かで、最終的に体内に残存した毒の 9 割以上が皮に移行・蓄積した。ホシフグでは卵巣に、淡水フグでは皮に特異な PSP 蓄積機構が存在するものと思われる。

PSP はある種の有毒渦鞭毛藻が産生する一群の神経毒で、それらが異常発生すると、その海域に棲む通常は無毒の二枚貝が毒化し、食中毒を引き起こすことがある。PSP の主要成分であるサキシトキシン (STX) は、分子の大きさや毒力、作用機序が TTX とほぼ同じで、化学兵器に指定されている強力な毒である。筆者らは、バングラデシュ産 *T. cutcutia* やオウギガニ科有毒ガニから複数の新規 STX 誘導体を分離・同定した。

4-2. パリトキシン (PTX) 様毒

バングラデシュには、前述の *T. cutcutia* を含め、2 種の淡水フグが生息する。これらに市場価値はほとんどないが、地方の漁村では他の魚種と混獲されたフグを食べ、死者を伴う中毒が発生することがある。中毒事例を調査したところ、呼吸困難や麻痺など一部の症状は TTX もしくは PSP 中毒に似るが、ミオグロビン尿症や血清 CPK 値の著しい上昇を伴う激しい筋肉痛がみられ

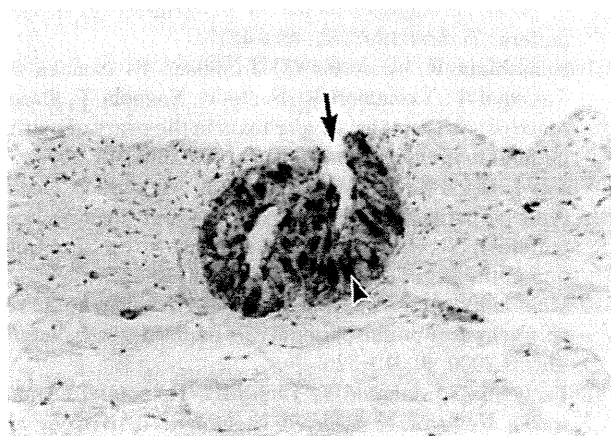


図 3 ナシフグ皮の TTX 分泌腺 (矢じり) とその開口部 (矢印)

る点、ならびに発症から死亡もしくは回復に至るまでの時間経過が比較的長いという点ではアオブダイ中毒に酷似していた。¹⁶⁾ 前述のように、バングラデシュ産淡水フグも PSP を保有するが、食用となる筋肉の毒量はほとんどの個体で数 MU/g と低く、これだけで死者を伴う食中毒を説明するのは難しい。そこで、同フグ抽出液の性状を調べたところ、マウスおよびヒト赤血球に対して、抗パリトキシン (PTX) 抗体もしくはウワバインにより特異的に抑制される遅延性溶血活性を示した。¹⁷⁾ したがって、本種はアオブダイ同様、PTX 様の毒を保有し、横紋筋融解症を招来するものと推察された。一方、日本では、1990 年から 2008 年にかけて、鹿児島、長崎、宮崎、三重の各県でハコフグ類の喫食により同様の中毒が 9 件発生し、13 名が中毒、うち 1 名が死亡している。患者の症状やハコフグ毒の性状から、本中毒の原因物質も PTX 様毒と推察される。

以上、筆者らは、フグが保有する自然毒を対象に多様な観点から研究を展開してきた。現在、フグにおける TTX の生理機能、体内動態と成長/性成熟の関連やそこに関わる分子機構、交雑フグの毒蓄積能、PTX 様毒の性状などの解明を目指して研究を進めており、TTX はフグの中樞神経系において情報伝達の制御 (行動の制御) に関与する可能性があること、TTX 保有魚類では個体の成長や性成熟に依存して TTX の体内動態が変化すること、そこに関わる分子機構の担い手の候補として、トラフグはフグ毒結合性タンパク質 PSTBP に相同な 4 種のアイソフォーム遺伝子を保有すること、交雑フグでは両親種の組み合わせが同一でも母親・父親が逆転すると有毒部位が異なる可能性のあること、などが明らかになりつつある。これらの研究を担う若い研究者、ならびに学生諸氏の健闘と成長に大きな期待を寄せている。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多くの恩師、先輩方、友人や後輩のみなさんに多大なご支援をいただいた。特に、学生時より常に暖かいご指導、ご鞭撻を賜ってきた橋本周久先生、野口玉雄先生、鹿児島大学でご指導いただいた尾上義夫先生、長崎大学でともに研究を進めている高谷智裕先生、谷山茂人先生に厚くお礼申し上げる。また、多くの共同研究者の方々、ならびに学生諸氏の熱意と努力が研究進展の原動力となってきた。関係の皆様にご心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Noguchi T, Arakawa O. Tetrodotoxin—distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Marine Drugs* 2008; **6**: 220-242.
- 2) 野口玉雄, 高谷智裕, 荒川 修. 囲い養殖法により養殖されたトラフグの毒性. *食衛誌* 2004; **45**: 146-149.
- 3) 本田俊一, 荒川 修, 高谷智裕, 橋 勝康, 八木基明, 谷川昭夫, 野口玉雄. テトロドトキシン添加飼料投与による養殖トラフグ *Takifugu rubripes* の毒化. *日水誌* 2005; **71**: 815-820.
- 4) Ikeda K, Murakami Y, Ngy L, Taniyama S, Yagi M, Takatani T, Arakawa O. Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to non-toxic cultured specimens of the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Toxicon* 2009; **53**: 99-103.
- 5) Wang J, Araki T, Tatsuno R, Nina S, Ikeda K, Takatani T, Arakawa O. Transfer profile of orally and intramuscularly administered tetrodotoxin to artificial hybrid specimens of pufferfish, *Takifugu rubripes* and *Takifugu porphyreus*. *Food Hyg. Saf. Sci.* 2012; **53**: 33-38.
- 6) Ikeda K, Emoto Y, Tatsuno R, Wang J-J, Ngy L, Taniyama S, Takatani T, Arakawa O. Maturation-associated change in toxicity of the pufferfish *Takifugu poecilonotus*. *Toxicon* 2010; **55**: 289-297.
- 7) Wang J, Araki T, Tatsuno R, Nina S, Ikeda K, Hamasaki M, Sakakura Y, Takatani T, Arakawa O. Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to artificial hybrid specimens of pufferfish, *Takifugu rubripes* and *Takifugu niphobles*. *Toxicon* 2011; **58**: 565-569.
- 8) Tsuruda K, Arakawa O, Kawatsu K, Hamano Y, Takatani T, Noguchi T. Secretory glands of tetrodotoxin in the skin of a Japanese newt *Cynops pyrrhogaster*. *Toxicon* 2002; **40**: 131-136.
- 9) Mahmud Y, Okada K, Takatani T, Kawatsu K, Hamano Y, Arakawa O, Noguchi T. Intra-tissue distribution of tetrodotoxin in two marine puffers *Takifugu vermicularis* and *Chelonodon patoca*. *Toxicon* 2003; **41**: 13-18.
- 10) Tanu MB, Mahmud Y, Arakawa O, Takatani T, Kajihara H, Kawatsu K, Hamano Y, Asakawa M, Miyazawa K., Noguchi T. Immunoenzymatic visualization of tetrodotoxin (TTX) in *Cephalothrix* species (Nemertea: Anopla: Palaeonemertea: Cephalotrichidae) and *Planocera reticulata* (Platyhelminthes: Turbellaria: Polycladida: Planoceriidae). *Toxicon* 2004; **44**: 515-520.
- 11) 本田俊一, 一部哲哉, 荒川 修, 高谷智裕, 橋 勝康, 八木基明, 谷川昭夫, 野口玉雄. フグ毒添加飼料を投与した養殖トラフグのヒツジ赤血球に対する抗体産生能と脾臓細胞の幼若化反応. *水産増殖* 2005; **53**: 205-210.
- 12) Kungsuwan A, Arakawa O, Promdet M, Onoue Y. Occurrence of paralytic shellfish poisons in Thai fresh water puffers. *Toxicon* 1997; **35**: 1341-1346.
- 13) Zaman L, Arakawa O, Shimosu A, Onoue Y. Occurrence of paralytic shellfish poison in Bangladeshi freshwater puffers. *Toxicon* 1997; **35**: 423-431.
- 14) Nakashima K, Arakawa O, Taniyama S, Nonaka M, Takatani T, Yamamori K, Fuchi Y, Noguchi T. Occurrence of saxitoxins as a major toxin in the ovary of marine puffer *Arothron firmamentum*. *Toxicon* 2004; **43**: 207-212.
- 15) Ngy L, Tada K, Yu C-F, Takatani T, Arakawa O. Occurrence of paralytic shellfish toxins in Cambodian Mekong pufferfish *Tetraodon turgidus*: selective toxin accumulation in the skin. *Toxicon* 2008; **51**: 280-288.
- 16) Mahmud Y, Arakawa O, Noguchi T. An epidemic survey on freshwater puffer poisoning in Bangladesh. *J. Natural Toxins* 2000; **9**: 319-326.
- 17) Taniyama S, Mahmud Y, Tanu MB, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T. Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer *Tetraodon* sp. toxin. *Toxicon* 2001; **39**: 725-727.

報 文

天然トラフグ肝臓の毒性分布

(平成25年4月16日受理)

谷口香織¹ 高尾秀樹¹ 新名真也² 山中祐二² 岡田幸長³ 中島梨花³
 王俊杰² 辰野竜平² 阪倉良孝² 高谷智裕² 荒川修^{2,*} 野口玉雄⁴

Distribution of Toxicity in Liver of Wild Pufferfish *Takifugu rubripes*

Kaori TANIGUCHI¹, Hideki TAKAO¹, Shinya NIINA², Yuji YAMANAKA², Yukinaga OKADA³,
 Rika NAKAJIMA³, Junjie WANG², Ryohei TATSUNO², Yoshitaka SAKAKURA²,
 Tomohiro TAKATANI², Osamu ARAKAWA^{2,*} and Tamao NOGUCHI⁴

¹ Division of Research and Development, Manbou Corp:

1944-1 Tononoura Yobuko-cho, Karatsu, Saga 847-0304, Japan;

² Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University:

1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan;

³ Faculty of Fisheries, Nagasaki University:

1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan;

⁴ Faculty of Healthcare, Tokyo Healthcare University:

3-11-3 Setagaya, Setagaya-ku, Tokyo 154-8568, Japan;

* Corresponding author

Livers from wild pufferfish, *Takifugu rubripes*, can be described as having a smooth frontal side and an upper-region that is attached to the hepatic portal vein. Based on this description, the liver can be divided into 10 parts (L1-5 and R1-5), and in this work, the lethal potency of each part was determined by mouse bioassay. Among the raw livers from 58 individuals, all 10 parts of 16 individuals, and some parts of 4 individuals showed mouse lethality, but no toxicity was detected in any part of the liver from 22 individuals. In the livers of 4 individuals that were partially toxic, the lethal potency of the toxic parts was less than 4 mouse units (MU)/g, and no part showed especially high toxicity. The remaining 16 individuals were considered non-toxic based on the assay of only one part. Among 13 frozen livers, all parts of 9 individuals were toxic, while all parts of 4 individuals were non-toxic. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis revealed that all parts of a weakly toxic raw liver and a strongly toxic frozen liver had tetrodotoxin as the major toxin. Regarding the 16 raw and 9 frozen livers, whose parts were all toxic, the relative lethal potency of each part to the mean lethal potency of the individual (8.9-709 MU/g) was calculated, and subjected to a two-way analysis of variance with 2 factors (left/right and top/bottom) for each group of livers (raw or frozen). The analysis indicated non-significance among factors and interactions at a significance level of 5% in the frozen livers. However, in the raw livers, although no interaction between the 2 factors was detected, the right-side and the 4th-portion from the top were significantly higher than the left-side and the other portions, respectively. Therefore, we concluded that individual inspection using R4, which is the region that lies below the right-center location of the liver, is suitable for toxicity evaluation of liver to ensure the safe consumption of pufferfish.

(Received April 16, 2013)

Key words: トラフグ *Takifugu rubripes*; 肝臓 liver; テトロドトキシン tetrodotoxin; 毒性 toxicity

* 連絡先 arakawa@nagasaki-u.ac.jp

¹ 株式会社 萬坊 研究開発室: 〒847-0304 佐賀県唐津市呼子町殿ノ浦 1944-1

² 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

³ 長崎大学水産学部: 〒852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

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

緒 言

トラフグ *Takifugu rubripes* は昔から高級魚として珍重され、食されてきた。しかし、天然個体は肝臓をはじめ卵巣や腸にフグ毒 (テトロドトキシン, TTX) を持ち¹⁾、しばしば食中毒を招来する。厚生労働省は「フグの衛生確保について」の通知^{*1,*2}により食用にできるフグの種と部

位、ならびに採捕海域を規定しているが、フグ類による食中毒は致死率が高く、近年でも依然としてフグ、特に毒性の高い肝臓を食べて命を落とす事例が後を絶たない²⁾。一方、フグの毒化は有毒餌生物由来の外因性であり、これを遮断して無毒の餌で飼育すれば肝臓も無毒のフグを生産できることが分かってきた^{1), 3), 4)}。現在、前述の通知により、フグ肝臓の食品としての販売などは全面的に禁じられているが、個別の毒性検査により毒力がおおむね10 MU/g以下であることを確認した場合*2はこの限りではないとされており、そのような検査に基づく適切な管理体制を確立できれば、無毒養殖トラフグ肝臓を食用化できる可能性がある。フグ肝臓を食品として扱う場合、毒性検査において個体全体を細片化後、その一部を供試する方法では、食品としての価値が大幅に低下する。一方、肝臓中の毒性分布を明らかにできれば、毒性検査における効果的なサンプリング方法が明確となり、検査で使用する部位以外は貴重な食品として有効利用できる。トラフグ肝臓中の毒性分布については、森崎らの報告⁵⁾があるが、トラフグ肝臓の有毒率が低く試料の入手が困難で、十分な調査ができなかったと記されている。そこで、今回、サンプル数を増やし、肝臓を10分割した場合の毒性分布を調査したので報告する。

実験方法

1. 試料

2012年に日本近海で漁獲された天然トラフグの肝臓71個体を試料とした。このうち58個体は、採取後直ちに生のまま研究室に冷蔵輸送した（以下、生肝臓とする）。残りの13個体は、採取後直ちに凍結し、冷凍輸送後、 -20°C で凍結保存した（以下、凍結肝臓とする）。生肝臓はそのまま、凍結肝臓は半解凍後、滑らかな面を表側、消化管との隣接面を裏側、肝門脈との結合部を上部として左右に2分割し、さらに上下の全長を均等に5分割して10部位（L1～5およびR1～5）に分けた（Fig. 1）。

2. 毒性試験

食品衛生検査指針理化学編フグ毒検査法⁶⁾に準じ、各部位をホモジナイズ後、通常は2倍量、試料量が少ない場合は3～5倍量の0.1%酢酸を加えて加熱抽出した。遠心分離後の上清を試験液とし、必要に応じて適宜希釈のうえ、ddY系雄マウス（体重19～21 g）の腹腔内に投与し、マウスの致死時間から1 g当たりの毒力を算出した。TTXの1マウス単位（MU）は、体重20 gのマウスを30分間で死亡させる毒力と定義されており、TTX 220 ngに相当する⁶⁾。

*1 フグの衛生確保について（局長通知）、昭和58年12月2日環乳第59号、最終改正：平成22年9月10日消費表第326号、厚生省環境衛生局長通知

*2 フグの衛生確保について（課長通知）、昭和58年12月2日環乳第59号、最終改正：平成7年12月27日衛乳第272号、厚生省環境衛生局肉肉衛生課長通知

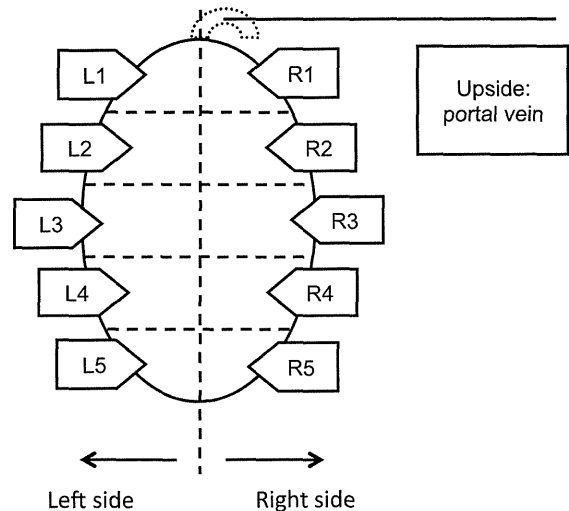


Fig. 1. Sampling scheme of 10 parts from a liver.

3. 毒成分の分析

生および凍結肝臓各1個体につき、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、ZsprayTM MD 2000を搭載したAlliance 2690システム（Waters社製）を用い、既報の方法⁷⁾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 ($\phi 2.0 \times 250 \text{ mm}$)、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°C 、ソースブロック温度 120°C 、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、MassLynxTMオペレーションシステムにて解析した。外部標準には和光純薬工業（株）製のTTX標準品を用いた。

結果および考察

1. 肝臓の毒性

生肝臓58個体のうち、16個体は10部位すべてがマウス毒性を示し、22個体はすべてが毒性未検出であった。これら38個体の毒性をTable 1に示す。表中、平均毒力の数値は1個体全体の総毒力（各部位の総毒力の合計値）を総重量で割った値を、n.d.はすべての部位が毒性未検出であったことを表す。一方、58個体中、一部の部位で毒性が認められた4個体については、部位別毒力をTable 2に示す。残り16個体については、1部位のみの毒性試験に基づき、無毒と見なした。生肝臓の最高平均毒力は709 MU/gで、食品衛生上‘強毒’（100～999 MU/g）が10個体（17.2%）、‘弱毒’（10～99 MU/g）が5個体（8.6%）、‘無毒’（10 MU/g未満）が43個体（74.1%；平均毒力8.9 MU/gの個体、一部の部位で毒性が認められた4個体を含む）であった。トラフグの有毒肝臓出現頻度は33.3%であったとの報告⁸⁾があり、今回の生肝臓の調査結果はこれとおおむね合致した。

凍結肝臓の毒性をTable 3に示す。13個体中9個体は全

部位にマウス毒性が認められ、残り4個体は全部が毒性未検出であった。‘強毒’7個体(53.8%)、‘弱毒’2個体(15.4%)、‘無毒’4個体(30.8%)で、有毒個体出現頻度

は生肝臓よりはるかに高かった。天然トラフグでは、高齢個体の大型肝臓になるほど毒性が高いことが示唆されている^{9)~11)}。今回、凍結肝臓については、重量の大きいものを優先的に選択したため、有毒個体出現頻度が高くなったものと思われる。

2. 毒成分

低毒性の生肝臓 (Specimen No. 33; 平均毒力 8.9 MU/g; Table 1) および高毒性の凍結肝臓 (Specimen No. 44; 平均毒力 202 MU/g; Table 3) の各部位について、LC-MS分析を行った。典型的な分析例 (Specimen No. 44 の L1 と R4 の例) を Fig. 2 に示す。Specimen No. 44 において、L1 (180 MU/g) は毒力が最も低かった部位、R4 (235 MU/g) は2番目に高かった部位である。m/z 320 のイオンクロマトグラムにおいて、両肝臓ともに、毒力の高低にかかわらず、いずれの部位からも保持時間が TTX と一致する主要ピーク、および 4-epiTTX と推定される微小ピークが得られた。今回、他の TTX 誘導体を対象とした分析は行わなかったが、LC-MS 分析で求めた TTX 量 (MU 換算値) のマウス毒性に対する割合 [平均 (Av) ± 標準偏差 (σ)] は、低毒性生肝臓で 93.5 ± 19.8%、高毒性凍結肝臓では 80.9 ± 11.7% で、ともに TTX が総毒力の 8~9 割を占める主要成分であることが示された。

Table 1. Toxicity of raw livers

Collection location	Specimen No.	Liver weight (g)	Mean lethal potency* (MU/g)
Shizuoka Pref.	1	101.3	709
	2	68.2	541
	3	79.3	384
	4	74.4	347
	5	140.2	283
	6	72.0	237
	7	136.9	215
	8	61.3	195
	9	64.1	136
	10	99.3	97.3
	11	71.7	78.8
	12	71.0	34.2
	13	73.2	11.6
	14	71.3	10.4
	15	106.8	n.d.
	16	79.9	n.d.
	17	102.5	n.d.
	18	88.5	n.d.
	19	72.1	n.d.
	20	70.7	n.d.
	21	56.2	n.d.
	22	63.6	n.d.
	23	92.7	n.d.
	24	98.1	n.d.
	25	111.2	n.d.
	26	93.7	n.d.
	27	60.4	n.d.
Yamaguchi Pref.	28	144.8	n.d.
	29	135.9	n.d.
	30	161.3	n.d.
	31	176.6	n.d.
Ishikawa Pref.	32	697.4	642
	33	152.8	8.9
	34	532.4	n.d.
Hyogo Pref.	35	113.6	n.d.
Unknown	36	104.1	n.d.
	37	158.3	n.d.
	38	88.4	n.d.

*Mean lethal potency was calculated by dividing the total lethal potency of whole liver (sum of the total lethal potency of each part) by whole liver weight; 'n.d.' indicates that no toxicity was detected in any part (<3.0-6.0).

Table 3. Toxicity of frozen livers

Collection location	Specimen No.	Liver weight (g)	Mean lethal potency* (MU/g)
Unknown	43	674.6	392
	44	537.4	202
	45	430.1	183
	46	514.6	153
	47	361.6	148
	48	541.7	125
	49	404.6	115
	50	264.6	82.3
	51	373.3	25.5
	52	348.9	n.d.
	53	242.5	n.d.
	54	172.7	n.d.
55	241.1	n.d.	

*Mean lethal potency was calculated by dividing the total lethal potency of whole liver (sum of the total lethal potency of each part) by whole liver weight; 'n.d.' indicates that no toxicity was detected in any part (<3.0).

Table 2. Toxicity of raw livers that partially showed toxicity

Collection location	Specimen No.	Liver weight	Lethal potency (MU/g)									
			R1	R2	R3	R4	R5	L1	L2	L3	L4	L5
Shizuoka Pref.	39	71.4	3.6	<3.0	<3.0	<3.0	<4.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
	40	109.2	3.1	<3.0	<3.0	<3.0	<5.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
Yamaguchi Pref.	41	304.4	3.2	<3.0	<3.0	3.3	3.6	3.4	3.2	3.8	3.7	3.6
Unknown	42	120.7	<3.0	<3.0	3.5	3.7	3.1	<3.0	<3.0	3.5	3.3	3.3

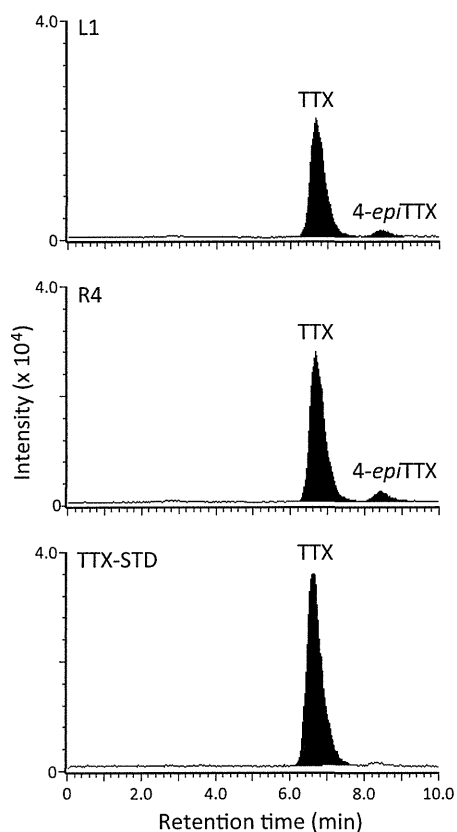


Fig. 2. LC-MS chromatograms at m/z 320 obtained from L1 (upper) and R4 (middle) of Specimen No. 44 (see Table 3), and from TTX standard (lower).

3. 毒性分布

全部位にマウス毒性が認められた生肝臓 ($n=16$) につき、個別別に平均毒力を1として各部位の相対毒力を求め、それらを部位ごとに平均して比較したところ、おおむね中央部の毒性が高く、両端の毒性が低い傾向が見られた (Fig. 3). 各部位の相対毒力につき、左右と上下の2要因に分けて二元配置分散分析により解析したところ、有意水準5%で要因間の交互作用は認められなかった ($p=0.054$). そこで要因ごとに評価したところ、左右では右のほうが相対毒力が高く ($p=0.0007$), 上下では中央の部位4の毒力が他の部位よりも高かった ($p=0.00005$). 森崎ら⁵⁾は、トラフグ有毒肝臓6個体の毒性分布を調べ、下端の重量比5%以内の切片が上端に比べ低い毒性を示したと報告しているが、本研究では、R4、すなわち肝臓右側中央下寄りの部位が有意に高い毒性を示すことが分かった。

一方、有毒凍結肝臓 ($n=9$) につき、同様に各部位の相対毒力を求めて比較したところ、生肝臓と同様の傾向が見られたが (Fig. 4), 二元配置分散分析による解析では、左右 ($p=0.17$), 上下 ($p=0.072$) のいずれの要因にも有意差が認められず、要因間の交互作用も検出されなかった ($p=0.64$). フグでは、凍結、解凍に伴い毒が他の組織へ移行することがある^{12), 13)}. 凍結肝臓では、サンプル数が少なかったのに加え、凍結、解凍に伴い肝臓内の毒分布の偏りが若干均一化した可能性も考えられる。

他方、一部の部位で毒性が認められた生肝臓4個体の場

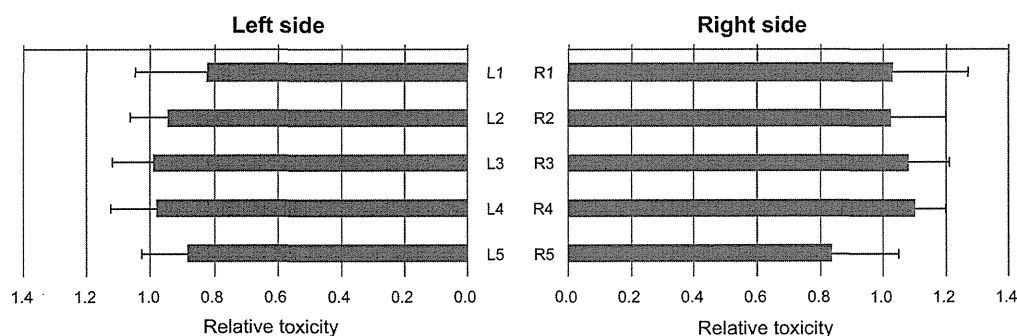


Fig. 3. Distribution of toxicity in raw livers. Data are shown as mean (column) and standard deviation (SD, error bar) of each part ($n=16$).

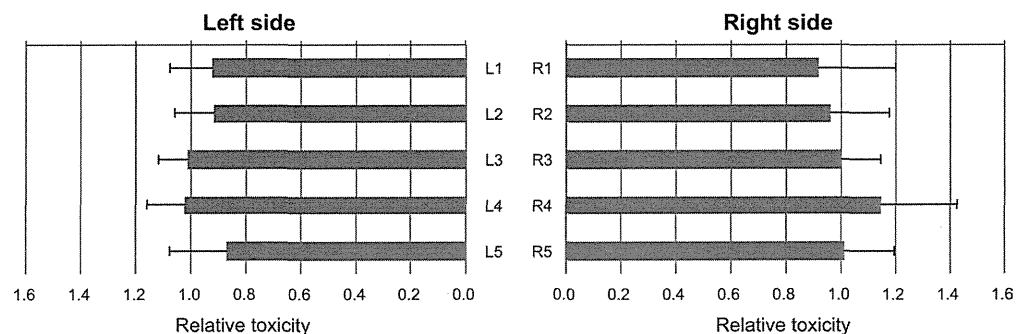


Fig. 4. Distribution of toxicity in frozen livers. Data are shown as mean (column) and standard deviation (SD, error bar) of each part ($n=9$).

合、重量が足りず検出下限値が4または5 MU/gとなった部位もあるが、有毒部位の毒力はいずれも4 MU/g未満であり、突出して毒性が高い部位は認められなかった (Table 2).

安全性確保を目的とした毒性試験では、毒性が最も高く見積られる方法をとる必要がある。したがって、相対毒力が他の部位より有意に高く、かつ標準偏差も小さいR4がサンプリングの箇所として最も適切と考えられる。前述の有毒生肝臓16個体につき、R4の毒力を1として他の部位の相対毒力を算出したところ、 $Av \pm \sigma$ は 0.88 ± 0.21 、最大値はSpecimen No.14 (平均毒力10.4 MU/g)におけるL1 (部位別毒力14.6 MU/g)の1.7で、R4を除いたデータ数144のうち、1.0未満は78.5%、1.5未満は98.6%に達した。同様に、有毒凍結肝臓9個体では、相対毒力の $Av \pm \sigma$ は 0.88 ± 0.28 、最大値はSpecimen No. 51 (平均毒力25.5 MU/g)におけるR1 (部位別毒力35.9 MU/g)の1.7で、R4を除いたデータ数81のうち1.0未満は67.9%、1.5未満は97.5%であった。

Kolmogorov-Smirnov検定により当該相対毒力の正規性を調べたところ、生肝臓 ($p=0.1630$)、冷凍肝臓 ($p=0.5819$)ともに正規分布に従うと判定された。これを前提とすると、相対毒力が $Av+7\sigma$ の値 (生肝臓で2.33、凍結肝臓で2.84)を超える確率は1千億分の1未満であり、事実上0とみなせるであろう。一方、R4の毒力に対する肝臓1個体の平均毒力の相対値を求めたところ、生肝臓、凍結肝臓ともに当該相対値は正規分布に従い ($p>0.999$)、生肝臓では $Av \pm \sigma=0.91 \pm 0.09$ 、 $Av+7\sigma=1.56$ 、凍結肝臓では $Av \pm \sigma=0.91 \pm 0.22$ 、 $Av+7\sigma=2.44$ となった。すなわち、生肝臓では、R4の毒力が10 MU/g未満であった場合、当該個体の平均毒力が15.6 MU/gを、部位別毒力が23.3 MU/gを超える確率は、事実上0とみなせることになる。したがって、食用化を想定した検査の場合、これらを考慮した基準 (例えば、生肝臓の場合、肝臓1個体の平均的な毒力を評価するのであればR4の毒力の1.6倍、部分的な毒力まで問題にするのであれば2.4倍の値が10 MU/gを超えないようにするなど)を設けることにより、十分に安全を確保できるものと判断した。

まとめ

天然トラフグの生および凍結肝臓につき、個体別に10分割して毒性分布を調べたところ、両者の分布は類似しており、ともに極端に高い、もしくは低い毒力を示す部位は認められなかった。しかしながら、統計的な解析を行ったところ、生の肝臓では分布に有意な偏りがあり、部位R4 (右側中央下寄りの部位)の毒力が最も高いことが分かっ

た。したがって、フグの安全確保のため、肝臓の毒性評価に際しては、本部位を用いて毒性試験もしくは毒の定量をすることが望ましいと判断した。

謝 辞

肝臓の入手に関してご協力いただいた(独)水産総合研究センター南伊豆栽培漁業センター各位に深謝する。

文 献

- 1) Noguchi, T., Arakawa, O. Tetrodotoxin—Distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Marine Drugs*, **6**, 220–242 (2008).
- 2) 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). *食衛誌*, **53**, 105–120 (2012).
- 3) 野口玉雄, 高谷智裕, 荒川 修. 困り養殖法により養殖されたトラフグの毒性. *食衛誌*, **45**, 146–149 (2004).
- 4) 大貫和恵, 野口玉雄, 荒川 修. 開放系循環水槽において養殖されたトラフグ肝臓の無毒確認とその脂質中の機能性成分. *日食化誌*, **16**, 157–162 (2009).
- 5) 森崎澄江, 洲 祐一, 局 伸男, 林 薫. フグ毒に関する研究 (第4報) 有毒フグ肝臓の毒性分布について. *大分県公害衛生センター年報*, **14**, 28–29 (1986).
- 6) 児玉正昭, 佐藤 繁. 第7章自然毒・A動物毒・1. フグ毒. *食品衛生検査指針理化学編 (厚生労働省監修)*, 日本食品衛生協会, 2005, p. 661–666.
- 7) Nakashima, K., Arakawa, O., Taniyama, S., Nonaka, M., Takatani, T., Yamamori, K., Fuchi, Y., Noguchi, T. Occurrence of saxitoxins as a major toxin in the ovary of a marine puffer *Arothron firmamentum*. *Toxicon*, **43**, 207–212 (2004).
- 8) 遠藤隆二, 松村健道, 田中一成. 天然トラフグと養殖トラフグの毒力について. *山口県衛研年報*, **24**, 64–65 (1981).
- 9) 加納碩雄, 野口玉雄, 大塚正人, 橋本周久. カラス *Fugu rubripes chinensis* とトラフグ *Fugu rubripes rubripes* の毒力の比較. *食衛誌*, **25**, 436–439 (1984).
- 10) 洲 祐一, 局 伸男, 森崎澄江, 溝腰利男, 首藤真寿美, 藤井幹久, 山田謙吾, 林 薫. トラフグとカラスの肝臓の毒力調査. *食衛誌*, **27**, 569–572 (1986).
- 11) Tatsuno, R., Shikina, M., Shirai, Y., Wang, J., Soyano, K., Nishihara, G.N., Takatani, T., Arakawa O. Change in the transfer profile of orally administered tetrodotoxin to non-toxic cultured pufferfish *Takifugu rubripes* depending of its development stage. *Toxicon*, **65**, 76–80 (2013).
- 12) 塩見一雄, 田中栄治, 熊谷純智, 山中英明, 菊地武昭, 河端俊治. 冷凍フグ解凍時における筋肉の毒化. *日水誌*, **50**, 341–347 (1984).
- 13) 塩見一雄, 柴田 哲, 山中英明, 菊地武昭. 冷凍フグ解凍時における筋肉の毒化に影響を及ぼす諸因子の検討. *日水誌*, **51**, 619–625 (1985).

報 文

奄美大島・加計呂麻島におけるシガテラ原因魚の毒組成解析

(平成25年4月25日受理)

與儀健太郎^{1,2,*} 大城直雅³ 松田聖子^{2,a}
 佐久川さつき² 松尾敏明⁴ 安元 健⁵

Toxin Profiles in Fish Implicated in Ciguatera Fish Poisoning in Amami and Kakeroma Islands, Kagoshima Prefecture, Japan

Kentaro YOGI^{1,2,*}, Naomasa OSHIRO³, Seiko MATSUDA^{2,a}, Satsuki SAKUGAWA²,
 Toshiaki MATSUO⁴ and Takeshi YASUMOTO⁵

¹ Department of Health Sciences, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus:
 207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-0215, Japan;

² Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment:
 2085 Aza-Ozato, Ozato, Nanjo, Okinawa 901-1202, Japan;

³ National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

⁴ Kakeroma Tokushukai Clinic: 747-1 Seso, Setouchi, Kagoshima 894-2322, Japan
 (Present Address: Tagami Memorial Hospital, 1799 Nishibeppu-cho,
 Kagoshima, Kagoshima 890-0033, Japan);

⁵ Japan Food Research Laboratories: 6-11-10 Nagayama,
 Tama, Tokyo 206-0025, Japan;

^a Present Address: Department of Welfare and Health, Okinawa Prefectural Government,
 1-2-2 Izumizaki, Naha, Okinawa 900-8570, Japan;

* Corresponding author

Ciguatoxins (CTXs) responsible for ciguatera fish poisoning (CFP) in Amami Islands, Kagoshima, Japan in 2008 were determined by LC-MS/MS analysis. Ciguatoxin-1B (CTX1B), 54-deoxyCTX1B, and 52-*epi*-54-deoxyCTX1B were detected in *Variola louti* and *Lutjanus monostigma*. The toxin profile distinctly differed from that of a CFP-related fish from Miyazaki, which mainly contained ciguatoxin-3C type toxins. Toxin profiles were species-specific, as observed in fish from Okinawa. The LC-MS/MS and mouse bioassay (MBA) methods produced comparable data, though 54-deoxyCTX1B was not taken into consideration owing to the lack of toxicity data. To improve assessment, toxicity data for this compound are needed. A reef fish caught on the same occasion and judged nontoxic by MBA (<0.025 MU/g) was found to contain low levels of CTX, indicating a potential risk for CFP.

(Received April 25, 2013)

Key words: シガテラ ciguatera fish poisoning; 高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 LC-MS/MS; シガトキシン ciguatoxin; マウス毒性試験 mouse bioassay; イッテンフエダイ *Lutjanus monostigma*; バラハタ *Variola louti*

* 連絡先 kent_yg@hotmail.com

¹ 琉球大学医学部保健学科: 〒903-0215 沖縄県西原町字上原207

² 沖縄県衛生環境研究所: 〒901-1202 沖縄県南城市大里字大里2085

³ 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

⁴ 加計呂麻徳洲会診療所: 〒894-2322 鹿児島県大島郡瀬戸内町大字瀬相747-1 (現所属: 田上記念病院, 〒890-0033 鹿児島県鹿児島市西別府町1799)

⁵ 財団法人日本食品分析センター: 〒206-0025 東京都多摩市永山6-11-10

^a 現所属: 沖縄県福祉保健部, 〒900-8570 沖縄県那覇市泉崎1-2-2

緒 言

シガテラ (CFP: ciguatera fish poisoning) は主にサンゴ礁域で毒化した魚類を起因とし, 急性自然毒食中毒としては世界最大の規模を示す。原因毒であるシガトキシン類 (CTXs: ciguatoxins) (Fig. 1) は底生性渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* とその近縁種により産生され, 藻食魚介類から肉食魚へと食物連鎖により伝播・蓄積される。よって, 魚の毒性は魚種, 地域, 年, 個体により顕著に異なる^{1), 2)}。主なCFP発生地域は, 南太平洋, カリブ海, およびインド洋などの熱帯・亜熱帯域であるが, 近年, 北ア

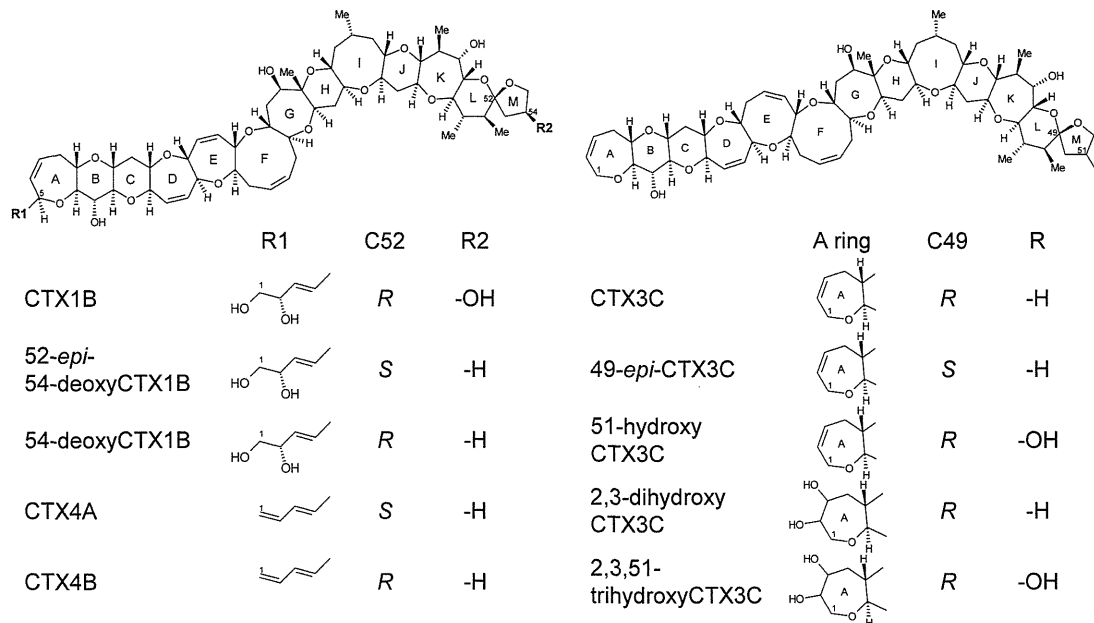


Fig. 1. Structures of representative ciguatoxins

Table 1. Epidemiological data of three CFP incidents in Amami and Kakeroma Islands

Incident	Date	Location	Foods consumed	Species involved*1	Number of consumer	Number of patients	Main symptoms
1*2	Sep. 2008	Kakeroma	Sliced raw fish, fish soup	<i>Variola louti</i>	4	4	Diarrhea, vomiting, hypotension, bradycardia, dry-ice sensation, fatigue, itching, numbness
2*2	Sep. 2008	Kakeroma	Sliced raw fish	<i>Lutjanus monostigma</i>	1	1	Diarrhea, hypotension, bradycardia, dry-ice sensation, fatigue, itching, numbness
3	Aug. 2008	Amami	Fish soup	<i>Lutjanus monostigma</i>	5	4	Vomiting, hypotension, bradycardia, dry-ice sensation, itching, fatigue

*1 The fish were from the local fishing grounds.

*2 Details of incidents 1 and 2 were reported previously²⁰⁾.

フリカ大西洋域でのCFP発生や、地中海での *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の確認が相次いだことから、EUなどこれまで非発生とされてきた地域でもその関心が高まっている^{3), 4)}。一方、国内におけるCFPは亜熱帯域に属する沖縄県で毎年発生しており、食品衛生上の重要な課題となっている^{5)~9)}。また、本州・四国・九州においても散発的な発生があり、その多くは熱帯・亜熱帯域固有種に起因する^{2), 10)~16)}。しかし、近年では九州から関東にかけての太平洋沿岸域で漁獲されたイシガキダイによるCFPが散発しており^{9), 17), 18)}、わが国でも広い範囲でCFP事例の潜在が推定されている。

食中毒の原因物質の探索は、その発生状況を把握し、予防対策を講じるうえで重要である。シガテラ毒分析にはわが国を含む多くの国でマウス毒性試験(MBA)が採用されているが、MBAは多量の試料(筋肉240g)を必要とし、精度や迅速性、動物愛護の点でも問題があることから代替法の開発が望まれている^{4), 9)}。魚肉中にppb以下のレ

ベルに含まれるCTXsを検出するには極めて高い感度と選択性が求められることから、近年では機器の普及に伴い液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)が用いられてきている^{3), 4), 9)}。しかし、CTXsは魚肉中含量がごく微量であること、脂溶性であるため脂質などのマトリクスの影響が大きいこと、さらには標準品の入手・確保が極めて困難であるなどの理由から、正確な分析や評価ができていない報告も少なくない。最近、筆者らはLC-MS/MSによるシガテラ毒一斉分析法を開発し、CTXs 13成分に加えて、*G. toxicus*が産生する類似ポリエーテル成分のガンビエロール、ガンビエール酸A, Bを含めた16成分について正確かつ迅速な分析を可能とした¹⁹⁾。これにより、沖縄県⁸⁾、宮崎県¹⁷⁾および茨城県¹⁵⁾で発生したCFPの原因成分を解明し、その毒組成には顕著な地域差と魚種特異性があることを報告した¹⁹⁾。一方で、国内では沖縄県とならび恒常的なCFP発生地とされる鹿児島県奄美群島⁵⁾におけるシガテラ原因魚の毒組成の詳細については

明らかとはなっていない。

われわれは前報²⁰⁾で、奄美群島の加計呂麻島でCFPが潜在的に高い頻度で発生していることを明らかにした。さらに同島で2008年に発生した食中毒2事例について、患者の症状、原因魚種の同定およびMBAにより、原因魚肉中に中毒量のCTXsが含まれることを示した。今回、これらの食中毒試料についてLC-MS/MSにより毒組成を解析し、同時に漁獲された近海魚についても分析を実施した。また、同年に奄美大島で発生したCFPが疑われる事例の原因魚肉を入手し、魚種同定、MBAおよびLC-MS/MSにより解析したので報告する。今回分析対象としたCFP 3事例の概要をTable 1に示す。

実験方法

1. 試料および魚種同定

2008年9月に鹿児島県大島郡瀬戸内町(加計呂麻島)沿岸で漁獲され、同島でCFP²⁰⁾の原因となったバラハタ *Variola louti* (試料1, 事例1), イッテンフエダイ *Lutjanus monostigma* (試料2, 事例2), 事例1で原因魚と同時に摂食された魚肉(試料3), およびこれらと同海域で同時に漁獲されたヒメフエダイ *Lutjanus gibbus* 2試料(試料4, 5), オジロバラハタ *Variola albimarginata* (試料6), オオグチイシチビキ *Aphareus rutilans* (試料7), オオメカマス *Sphyræna forsteri* 2試料(試料8, 9)の筋肉を用いた。さらに、同年8月に鹿児島県奄美市(奄美大島)で食中毒の原因となった同島近海産の魚肉を用いた(試料10, 事例3)。

なお、魚種については、試料1および2は遺伝子解析により、試料4~9は外部形態により同定し報告した²⁰⁾。患者らが摂食したにもかかわらずMBA陰性であった試料3および今回新たに得られた試料10について、遺伝子解析による種同定を行った。既報^{20), 21)}に準じて、ユニバーサルプライマー(16S arLおよび16S brH)によりミトコンドリアDNA中の16S rRNA遺伝子部分領域をPCR法により増幅した。PCR産物を精製後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

なお、魚種の和名は文献22の標準和名に従った。

2. 試薬

抽出用溶媒にアセトン、ジエチルエーテル、メタノール、ヘキサンの特級を使用した。固相抽出およびLC移動相にはメタノール、酢酸エチル、アセトニトリル、蒸留水、ギ酸のHPLC用グレードを用い、ギ酸アンモニウムは特級を使用した(いずれも和光純薬工業(株)製)。

標準品は、天然試料から単離・同定^{1), 23)}されたCTX1B, 52-*epi*-54-deoxyCTX1B, 54-deoxyCTX1B*, CTX4A, CTX4B, M-*seco*-CTX4A/B*, CTX3C, 49-*epi*CTX3C*, 2-hydroxyCTX3C*, 2,3-dihydroxyCTX3C, 51-hydroxy-CTX3C, M-*seco*-CTX3C*, M-*seco*-CTX3C methyl acetal* およびガンビエロールを使用した。このうち、アスタリスク(*)で示した成分は微量であり、秤量の精度が低いこ

とから、定性分析用標準品とした。

3. マウス毒性試験(MBA)

試料10の筋肉について抽出物を調製しMBAに供した。MBAは食品衛生検査指針理化学編シガテラ²⁴⁾の試験法に準じて行い、抽出に用いる筋肉量は120 gとした。抽出物は1% Tween 60含有生理食塩水でエマルジョン化し、マウス(ddY系, オス, 17~20 g, 九動(株))へ腹腔内投与後、24時間以内に死亡する最小投与量を1 MUとした。MBAの実施にあたっては、沖縄県衛生環境研究所動物実験委員会の承認を受け、その実施規定に従った。

4. LC-MS/MS

試料1~10の筋肉について試験液を調製しLC-MS/MSに供した。LC-MS/MSは既報¹⁹⁾に準じて行った。

試験液の調製: 各試料につき筋肉5 gを採肉し、アセトン15 mLでホモジナイズ、遠心分離(3,000 rpm, 10 min), 上澄みの濃縮を2回繰り返した。濃縮液(1 mL以下)をジエチルエーテル5 mLにより2回再抽出した。エーテル層の濃縮残さを90%メタノール1.5 mLに溶解し、ヘキサン3 mLによる脱脂後、濃縮乾固し抽出物を得た。抽出物を酢酸エチル-メタノール(9:1)に溶解し、ジエールサイエンス社製InertSep FL-PR(500 mg)に通液させ(4 mL), 窒素気流下で濃縮乾固した。残さをアセトニトリル溶液としてInertSep PSA(200 mg)に負荷し(3 mL), つづいてメタノール3 mLにより溶出した。アセトニトリルおよびメタノールにより溶出した分析対象物を濃縮乾固後、それぞれメタノール1 mLに調製し、必要に応じ希釈して試験液とした。

分析装置: アジレント・テクノロジー社製のAgilent 1200 LCシステムおよびAgilent 6460トリプル四重極LC/MSシステムを用いた。

LC条件: 分析対象物の重なりを最小にし、かつ短時間での分析を維持したまま、移動相の初期濃度、勾配、最終濃度の調整により、試料中マトリクスによる分析への影響を低減する条件を検討した。最終的に以下の条件を採用した。移動相には5 mmol/Lギ酸アンモニウムおよび0.1% (v/v) ギ酸を含む蒸留水(A)とメタノール(B)を用い、73%Bから90%Bまで11分間リニアグラジエントを行い4分間保持した。カラムはアジレント・テクノロジー社製のZorbax Eclipse Plus C18(2.1×50 mm, 1.8 μm)を40°Cに維持し使用した。移動相の流速は0.4 mL/min, 試験液の注入量は5 μLとした。

MS条件: イオン源にAgilent Jet Streamサーマルグラジエントフォーカシング技術を備えたエレクトロスプレーイオン化(ESI)法により、ダイナミックMRMモードで測定を行った。各パラメータは以下のとおり設定した。drying gas(300°C, 10 L/min), nebulizer gas(50 psi), sheath gas(400°C, 11 L/min), capillary voltage(5,000 V), nozzle voltage(1,000 V), fragmentor voltage(350 V), collision energy(CTXs: 40 eV, gambierol: 24 eV)。モニターイオンはプリカーサー/プロダクトイオン共にナトリウムイオン

付加分子を選択した。すなわち, $[M+Na]^+ > [M+Na]^+$ とし, 溶出順に m/z 779.5 (ガンビエロール), m/z 1,133.6 (CTX1B), m/z 1,063.6 (M-*seco*-CTX3C), m/z 1,079.6 (2,3-dihydroxyCTX3C), m/z 1,061.6 (51-hydroxyCTX3C), m/z 1,101.6 (M-*seco*-CTX4A/B), m/z 1,117.6 (52-*epi*-54-deoxyCTX1B, 54-deoxyCTX1B), m/z 1,063.6 (2-hydroxyCTX3C), m/z 1,077.6 (M-*seco*-CTX3C methyl acetal), m/z 1,045.6 (49-*epi*CTX3C, CTX3C), m/z 1,083.6 (CTX4A, CTX4B) とした。得られたクロマトグラムのピーク積分値をCTXs標準品との比較により定量した。54-deoxyCTX1Bについては, そのエピ体と同等のイオン化効率とみなし, 52-*epi*-54-deoxyCTX1Bの検量線を用いて定量した。標準品の検出下限 ($S/N > 3$) および定量下限 ($S/N > 10$) 濃度は, CTX1Bと52-*epi*-54-deoxyCTX1Bはそれぞれ0.02および0.1 ng/mLであった。その他の標準品はそれぞれ0.05および0.2 ng/mLとした。

結果

1. 魚種の同定

遺伝子解析により, 試料10の16S rRNA後半領域の塩基配列577 bpはイッテンフエダイ *Lutjanus monostigma* (DQ784735) と一致した。一方で, 試料3は前報でハマフエフキ *Lethrinus nebulosus* としていたが²⁰⁾, 決定した塩基配列581 bp (AB793299) はハマフエフキ (AB793300) と約3%の変異が見られた。また, 沖縄・奄美海域の代表的なシガテラ原因魚とも一致しなかった。

2. マウス毒性

試料10のマウス毒性は0.1 MU/gであった (Table 2)。

3. 毒組成

試料3~9の分析において, CTX1Bおよびガンビエロー

ルの保持時間に重複するピークが検出されたが (痕跡値~0.06 ppb CTX1B相当および痕跡値~0.15 ppbガンビエロール相当), 測定条件検討の結果, グラジエント条件の変更により対象成分と妨害ピークとの分離が可能となった。

CFPの原因食品であり, MBAで陽性であった試料1, 2²⁰⁾ および試料10のすべてからCTX1B類縁体が検出された。しかし, CTX3C類縁体やガンビエロールは検出されなかった (Fig. 2)。試料1はCTX1Bおよび54-deoxy-

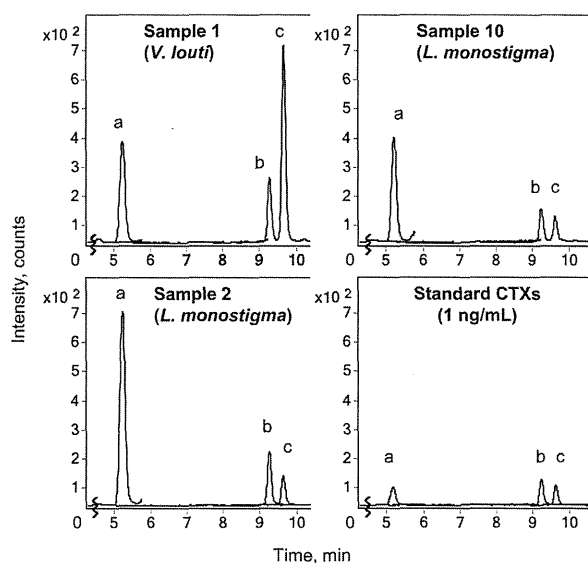


Fig. 2. Chromatograms of extracts from fish flesh implicated in CFP in Amami and Kakeroma Islands, and standard CTXs: CTX1B (a, 1 ng/mL), 52-*epi*-54-deoxyCTX1B (b, 1 ng/mL), and 54-deoxyCTX1B (c). The sample solutions used for injection were equivalent to 5 g flesh/mL (samples 1 and 10), and 1 g/mL (sample 2).

Table 2. Toxicity and contents of CTXs in fish flesh implicated in CFP and fish caught on the same occasion in coastal waters of Amami and Kakeroma Islands

Sample No.	Incident involved	Species	Toxicity* ¹ (MU/g)	Toxin content* ² (ng/g)							
				CTX1B	52- <i>epi</i> -54-Deoxy CTX1B	54-Deoxy CTX1B* ³	CTX4A	CTX4B	M- <i>seco</i> -CTX4A/B	CTX3C type toxins* ⁴	Gambierol
1	1	<i>V. louti</i>	0.2	1.12	0.32	1.48	ND	ND	ND	ND	ND
2	2	<i>L. monostigma</i>	0.8	8.78	1.18	0.90	ND	ND	ND	ND	ND
3	1	Unidentified* ⁵	ND	0.13	0.04	0.04	ND	ND	ND	ND	ND
4	—	<i>L. gibbus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	—	<i>L. gibbus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	—	<i>V. albigmarginata</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	—	<i>A. rutilans</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	—	<i>S. forsteri</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	—	<i>S. forsteri</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	3	<i>L. monostigma</i>	0.1	1.11	0.16	0.15	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detected

*¹ Toxicity was determined by MBA (The MBA results of samples 1–9 were reported previously²⁰⁾.)

*² Toxin contents were measured by LC-MS/MS.

*³ 54-DeoxyCTX1B content in flesh was estimated by comparison with its 52-epimer as a quantifiable standard.

*⁴ CTX3C, 49-*epi*CTX3C, 51-hydroxyCTX3C, 2,3-dihydroxyCTX3C, 2-hydroxyCTX3C, M-*seco*-CTX3C, and M-*seco*-CTX3C methyl acetal.

*⁵ *Lethrinus* sp. can be identified by analysis of 16S rRNA gene on mtDNA (AB793299).