

### ③ 注解および留意点

#### 1) 「毒かます」について(昭和28年6月22日, 衛環発第20号)

「毒かます」(俗名おにかます)は, 太平洋, 印度洋の熱帯及び亜熱帯海岸にせい息している魚類であるが, 最近我国の漁場の拡大にともない, 漁獲され, 一般鮮魚とともに市場に販売されるむきがあり, また, これによる中毒の発生も二, 三起こっている。「毒かます」は神経系を侵す固有の有毒物質を有し, 食品衛生法第4条第2号(現第6条第2号)に該当するものとみられるので, 今後これが食用に供せられないことがないように販売そのほかについて十分処置されたい。特に, 毒かますの分布地域の魚類の陸揚げされる漁港のある都道府県においては十分注意され, 食品衛生の万全を期せられたい。

#### 2) 太平洋からは骨格の異なるシガトキシン-1B (CTX1B) 群(図7-6)とシガトキシン-3C (CTX3C) 群(図7-7)が, また, カリブ海からはカリビアン・シガトキシン(C-CTX)群など, これまで20以上のシガトキシン類(CTXs)が報告されている<sup>文献1, 2)</sup>。最近, 南西諸島における原因物質はCTX1B群であることが明らかになった<sup>文献3)</sup>。それ以外の海域では, CTX3C群もしくは, CTX1B群とCTX3C群との混合型が知られている<sup>文献3)</sup>。

ナンヨウブダイから検出されてスカリトキシンと称された成分は, シガトキシン4Aと4Bの混合体であることが明らかとなっている<sup>文献2)</sup>。小型藻食魚のサザナミハギからはマイトトキシンなどの毒が得られているが, わが国沿岸のこれらの魚種での中毒事例はない。

本来は無毒な魚が毒化する機構は, 藻類付着性の有毒渦鞭毛藻(*Gambierdiscus toxicus*)を起点とする食物連鎖で説明される。CTX1Bのマウス腹腔内投与による最小致死量は $0.35 \mu\text{g}/\text{kg}$ である<sup>文献1)</sup>。

#### 3) 濃縮液に濁りがでてきたタイミングでエタノールを数mL加えるとよい。必要に応じて, この操作を繰り返す。

#### 4) まず, ナス形フラスコの壁面についている抽出物をエマルジョン化し, 徐々に底面のほうへ進めていくとよい。最初の2~3mLで全抽出物をエマルジョン化し,

試験管に回収する。残物は0.5～1 mLのTween 60液でナス形フラスコとピペットを洗いこみながら回収する。

- 5) 検体の量が試験法に定める240 gに達しない場合は、試験法に記された抽出溶媒の量や試験液量を、比例的に減じる。マウス毒性試験は試験液（原液）のみで行い、食用の適、不適を判定する。内臓の毒含量は、筋肉より数倍高いことが多いので、筋肉より少量の試料で試験を行うことが可能である。
- 6) 通常、食用の対象にされる筋肉のシガトキシン含量は低いので、濃度と致死時間との関係を用いて定量を行うことはできない。シガトキシンを投与したマウスでは、下痢や唾液の分泌亢進が見られることが多い。しだいに不活発になり、呼吸の異常と後肢の麻痺が認められる。呼吸が困難になると、嘔吐に似た動作を示す。死亡直前には、激しくけいれんし飛び跳ねることが多い。
- 7) アメリカでは、魚肉中に含まれるシガトキシン類の指針値として、太平洋産は0.01 ppb CTX1B相当量（約0.0014 MU/g）、カリブ海産は0.1 ppb C-CTX1（図7-8）相当量が示されている<sup>文献4)</sup>。マウス法でこのような低濃度の測定を達成するのは困難である。
- 8) CTXsの分析法として、アメリカや仏領ポリネシアでは、マウス神経芽細胞を用いた細胞毒性試験、マウスシナプトソームへの親和性を利用したレセプターバインディング法などが採用されている<sup>文献5)</sup>。最近では、ELISA法<sup>文献6)</sup>やLC-MS/MS法<sup>文献3)</sup>による分析法の開発が進められており、とくにLC-MS/MS分析法による定量結果は、マウス毒性試験法と一致している。

天然試料からCTXsを単離することはきわめて困難であるため、分析用CTXs標品を所有する機関は、国立医薬品食品衛生研究所など少数の機関に限られている。なお、有機合成されたCTX3C（100 ng）が、本稿執筆時点で和光純薬工業から購入可能である。

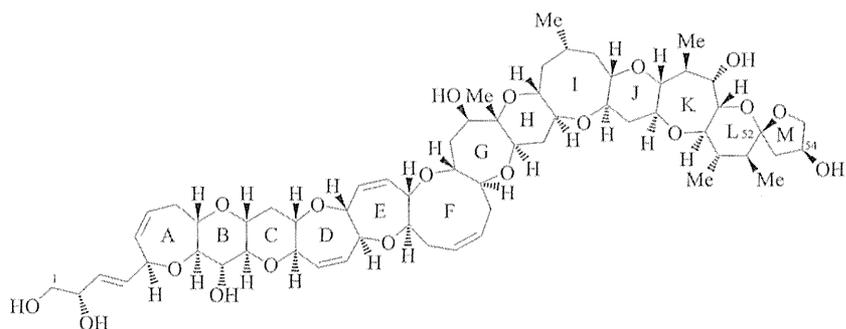


図 7-6 シガトキシン (シガトキシン-1B, CTX1B)

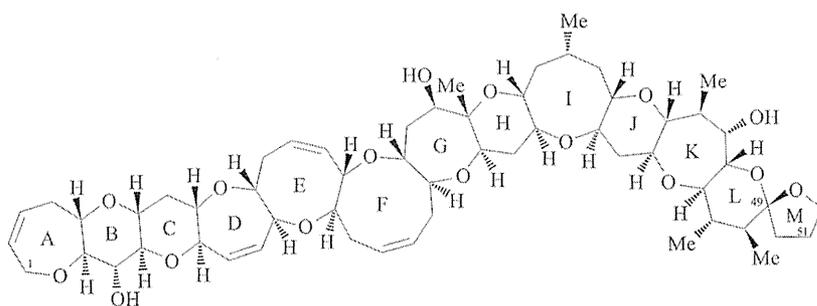


図 7-7 シガトキシン-3C (CTX3C)

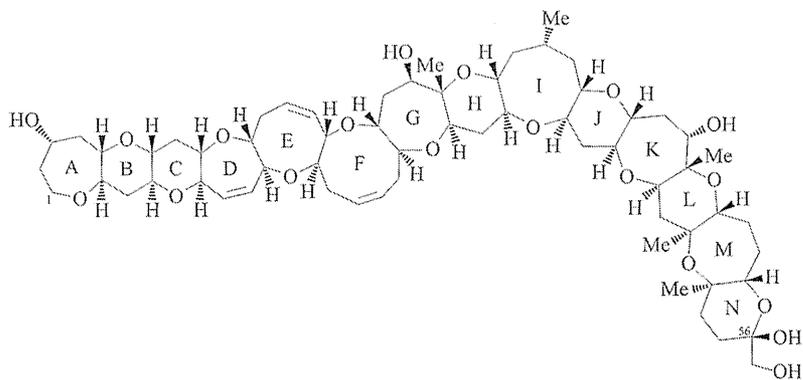


図 7-8 カリビアン・シガトキシン-1 (C-CTX1)

[参考文献]

- 1) T. Yasumoto : *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **81**, 43 (2005)
- 2) 大城直雅 : *食品衛生研究*, **60**, 36 (2010)
- 3) K. Yogi, *et al.* : *Anal Chem*, **83**, 8886 (2011),  
K. Yogi, *et al.* : *J. AOAC Int.*, **97**, 398 (2014)
- 4) *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance Fourth Edition (2011)*, FDA  
<http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/seafood/>

## 5. シガテラ毒

サンゴ礁が発達した熱帯・亜熱帯の海域では、本来は無毒な多数の魚が毒化し、シガテラと呼ばれる特異な食中毒の原因となることがある。

中毒症状としては、下痢や嘔吐などの消化器系障害、知覚異常や筋肉痛や関節痛そして搔痒感などの神経系症状、脈拍数や血圧の低下などの循環器障害が認められる。とくに、冷たいものに触れたときに、電氣的刺激のような痛みを感じる温度感覚異常はドライアイスセンサーシオンと呼ばれ、最も特徴的な症状である。軽症の場合は、神経症状のみを認めることが多い。致命率は低い、神経症状が長期間持続することが多い。世界的には毎年2～5万人の患者が発生していると推定されている。わが国では、沖縄県や鹿児島県奄美地方を中心に毎年発生が見られる。それ以外の地域では、熱帯・亜熱帯産の魚が持ち込まれて発生した事例が大部分であるが、沿岸魚による食中毒も散発している。毒かます（ドクカマス、オニカマス）については、通知により食品衛生法第6条第2号に該当するとして食用禁止措置が取られている<sup>解説注1)</sup>。毒の本体はシガトキシンとその類縁体であり、熱安定な脂溶性の環状ポリエーテル化合物である<sup>解説注2)</sup>。筋肉中の濃度より内臓の濃度が高いが、通常の食中毒は筋肉の摂食によって起きている。

なお、毒力が0.025 MU/gを超えるものは食用不適とされている。

### マウス毒性試験法（参考法）

#### ① 機器・試薬

##### (a) 機器・器具

- 細碎器（ホモジナイザー）
- ロータリーエバポレーター
- ブフナー漏斗
- 分液漏斗（300 mL または 500 mL, 200 mL）
- ナス形フラスコ（2 L, 500 mL, 100 mL）
- 目盛付き試験管
- ボルテックスミキサー
- 注射器（ツベルクリン用 26 G など）

##### (b) 試薬

- アセトン（特級）
- エーテル（特級）
- n-ヘキサン（特級）
- メタノール（特級）

1% Tween 60 液 (Tween 60 を 1% になるように生理食塩水に溶解)

## ② 試験液の調製

皮や骨を除いた筋肉 240 g を包丁で細切して細碎器に入れ、アセトン 700 mL を加えて 3 分間抽出を行う。ブフナー漏斗を用いて減圧ろ過する。ろ紙上のフィルターケーキを、同様の操作で再度抽出する。抽出液を合わせて減圧濃縮する。アセトンが留去されて水層表面に油が分離し始めると、非常に発泡しやすくなるので注意する。液量が 100 mL 以下になったと思われる時点で濃縮を止め、濃縮液を分液漏斗 (300 mL または 500 mL 容) に移す。濃縮フラスコに付着した油を、総量 200 mL のエーテルを数回に分けて洗い込みながら分液漏斗に加え、分配によりエーテル層を得る。水層を分液漏斗に戻し、エーテル 200 mL で再び抽出し、エーテル層を 1 回目の抽出液と合わせて減圧乾固する。分液漏斗を激しく振ると、頑固なエマルジョンを形成するので注意する。エマルジョンのために 2 層に分離しないときには、飽和食塩水を適量加えてもう一度振り直す。エーテル層を濃縮すると、含まれていた水が残り、表層に油が分離して発泡しやすくなる。いったん減圧を切り、エタノールを加えて水を共沸で除くとよい。減圧乾固したエーテル抽出物に 50 mL の 90% 含水メタノールと 100 mL の *n*-ヘキサンを加え、200 mL 容の分液漏斗に移し、分配を行う。下層の含水メタノール層をフラスコに移し、減圧乾固する。最後の段階で発泡しやすいので、エタノールを加えるとよい<sup>解説注3)</sup>。

含水メタノールを乾固して得た粗毒画分に、2~3 mL の 1% Tween60 液を加え、ボルテックスミキサーなどを用いてエマルジョンとし<sup>解説注4)</sup>、10 mL の目盛り付き試験管に移し、全量を 6 mL にして試験液とする。試験液 1 mL は検体魚筋肉の 40 g に相当する。

## ③ マウス腹腔内投与<sup>解説注5)</sup>

試験には ddY または ICR 系の雄で体重が 17~20 g の範囲にあるマウスを用いる。1 投与量に対しては 1 群 3 尾のマウスを用いる。まず、試験液 1 mL ずつを 3 尾のマウス腹腔内に注射する。次いで、0.5 mL ずつを第 2 群のマウス 3 尾に投与する。試験液は静置すると直ちに水層と油層に分離するので、毎回よくかくはんし、均一なエマルジョンにして注射器に採取する。目盛り付き試験管内に残った試験液に 3 倍量の Tween 60 液を加えてエマルジョンとし、4 倍希釈試験液とする。希釈試験液の各 1 mL と 0.5 mL ずつを用いて、それぞれ 3 尾ずつのマウスの腹腔内に注射する。必要に応じて、16 倍、64 倍希釈液を同様に調製し、マウスに投与する。注射してから 24 時間後のマウスの生死を観察し、3 尾ともすべて、あるいは 3 尾中少なくとも 2 尾のマウスが死亡する最小濃度を求める<sup>解説注6)</sup>。

## ④ 毒力の計算と表示

毒力の表示はフグ毒や貝毒の場合と同じく、検体 1 g 中に含まれる毒量 (MU/g) で行う。1 マウス単位 (MU) は、供試マウス 1 尾を 24 時間で死亡させる毒量と定義され、シガトキシン-1B (CTX1B) 7 ng に相当する。マウス毒性試験の結果から、表 7-7 に従って検体の毒力を算出する。検体の毒力が 0.025 MU/g を超えた場合は、食用に不適と判定する<sup>解説注7, 8)</sup>。

表 7-7 投与量と毒力の関係 (シガテラ)

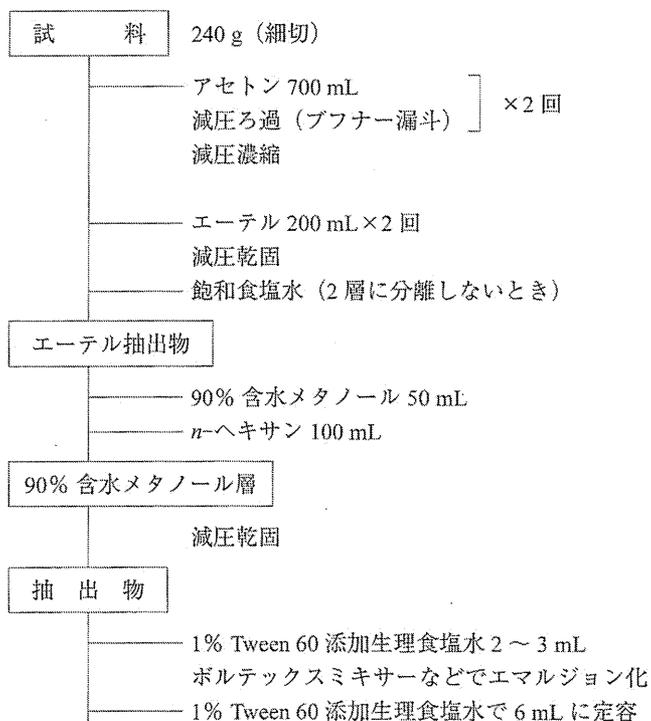
試験液	投与量 (mL)	投与量相当検体量 (g)	検体毒力 (MU/g)
原液	1.0	40	0.025
原液	0.5	20	0.05
4倍希釈	1.0	10	0.1
4倍希釈	0.5	5	0.2

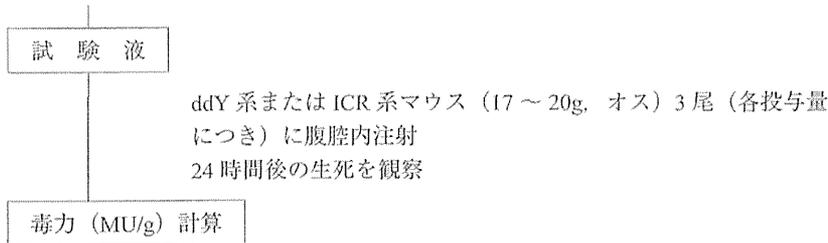
### 解説

#### ① 試験法の概要

魚肉に含まれるシガトキシン類 (CTXs) は微量であるため、抽出物を濃縮し、40 g 魚肉相当量/mL の試験液を調製する。脂溶性の CTXs をマウス腹腔内投与するために、乳化剤 (Tween 60) を添加した生理食塩水でエマルジョン化し試験液を調製する。マウスへの投与後 24 時間の生死で判定する。

#### ② 操作のフローチャート





#### ㊦ 注解および留意点

##### 1) 「毒かます」について (昭和 28 年 6 月 22 日, 衛環発第 20 号)

「毒かます」(俗名おにかます)は、太平洋、印度洋の熱帯及び亜熱帯海岸にせい息している魚類であるが、最近我国の漁場の拡大にともない、漁獲され、一般鮮魚とともに市場に販売されるむきがあり、また、これによる中毒の発生も二、三起こっている。「毒かます」は神経系を侵す固有の有毒物質を有し、食品衛生法第 4 条第 2 号 (現第 6 条第 2 号) に該当するものとみられるので、今後これが食用に供せられないことがないように販売そのほかについて十分処置されたい。特に、毒かますの分布地域の魚類の陸揚げされる漁港のある都道府県においては十分注意され、食品衛生の万全を期せられたい。

##### 2) 太平洋からは骨格の異なるシガトキシン-1B (CTX1B) 群 (図 7-6) とシガトキシン-3C (CTX3C) 群 (図 7-7) が、また、カリブ海からはカリビアン・シガトキシン (C-CTX) 群など、これまで 20 以上のシガトキシン類 (CTXs) が報告されている<sup>文献1, 2)</sup>。最近、南西諸島における原因物質は CTX1B 群であることが明らかになった<sup>文献3)</sup>。それ以外の海域では、CTX3C 群もしくは、CTX1B 群と CTX3C 群との混合型が知られている<sup>文献3)</sup>。

ナンヨウブダイから検出されてスカリトキシンと称された成分は、シガトキシン 4A と 4B の混合体であることが明らかとなっている<sup>文献2)</sup>。小型藻食魚のサザナミハギからはマイトトキシンなどの毒が得られているが、わが国沿岸のこれらの魚種での中毒事例はない。

本来は無毒な魚が毒化する機構は、藻類付着性の有毒渦鞭毛藻 (*Gambierdiscus toxicus*) を起点とする食物連鎖で説明される。CTX1B のマウス腹腔内投与による最小致死量は  $0.35 \mu\text{g}/\text{kg}$  である<sup>文献1)</sup>。

- 3) 濃縮液に濁りがでてきたタイミングでエタノールを数 mL 加えるとよい。必要に応じて、この操作を繰り返す。
- 4) まず、ナス形フラスコの壁面についている抽出物をエマルジョン化し、徐々に底面のほうへ進めていくとよい。最初の 2 ~ 3 mL で全抽出物をエマルジョン化し、

試験管に回収する。残物は 0.5 ~ 1 mL の Tween 60 液でナス形フラスコとピペットを洗いこみながら回収する。

- 5) 検体の量が試験法に定める 240 g に達しない場合は、試験法に記された抽出溶媒の量や試験液量を、比例的に減じる。マウス毒性試験は試験液（原液）のみで行い、食用の適、不適を判定する。内臓の毒含量は、筋肉より数倍高いことが多いので、筋肉より少量の試料で試験を行うことが可能である。
- 6) 通常、食用の対象にされる筋肉のシガトキシン含量は低いので、濃度と致死時間との関係を用いて定量を行うことはできない。シガトキシンを投与したマウスでは、下痢や唾液の分泌亢進が見られることが多い。しだいに不活発になり、呼吸の異常と後肢の麻痺が認められる。呼吸が困難になると、嘔吐に似た動作を示す。死亡直前には、激しくけいれんし飛び跳ねることが多い。
- 7) アメリカでは、魚肉中に含まれるシガトキシン類の指針値として、太平洋産は 0.01 ppb CTX1B 相当量（約 0.0014 MU/g）、カリブ海産は 0.1 ppb C-CTX1（図 7-8）相当量が示されている<sup>文献4)</sup>。マウス法でこのような低濃度の測定を達成するのは困難である。
- 8) CTXs の分析法として、アメリカや仏領ポリネシアでは、マウス神経芽細胞を用いた細胞毒性試験、マウスシナプトソームへの親和性を利用したレセプターバインディング法などが採用されている<sup>文献5)</sup>。最近では、ELISA 法<sup>文献6)</sup>や LC-MS/MS 法<sup>文献3)</sup>による分析法の開発が進められており、とくに LC-MS/MS 分析法による定量結果は、マウス毒性試験法と一致している。

天然試料から CTXs を単離することはきわめて困難であるため、分析用 CTXs 標品を所有する機関は、国立医薬品食品衛生研究所など少数の機関に限られている。なお、有機合成された CTX3C (100 ng) が、本稿執筆時点で和光純薬工業から購入可能である。

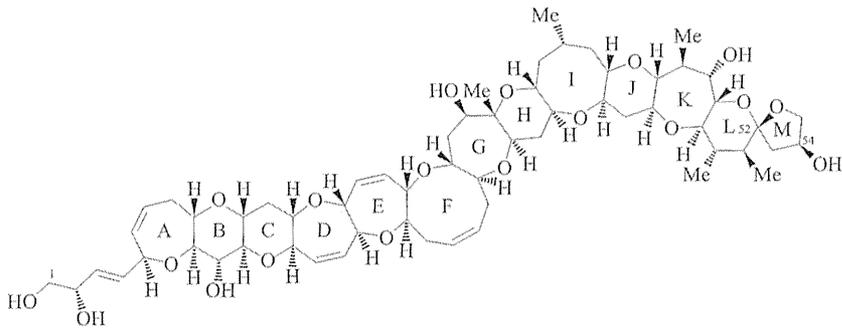


図7-6 シガトキシン (シガトキシン-1B, CTX1B)

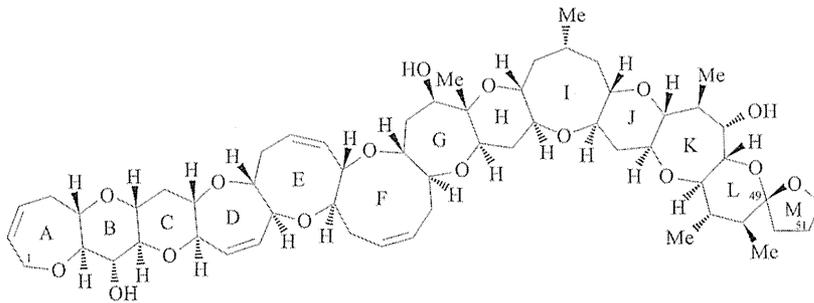


図7-7 シガトキシン-3C (CTX3C)

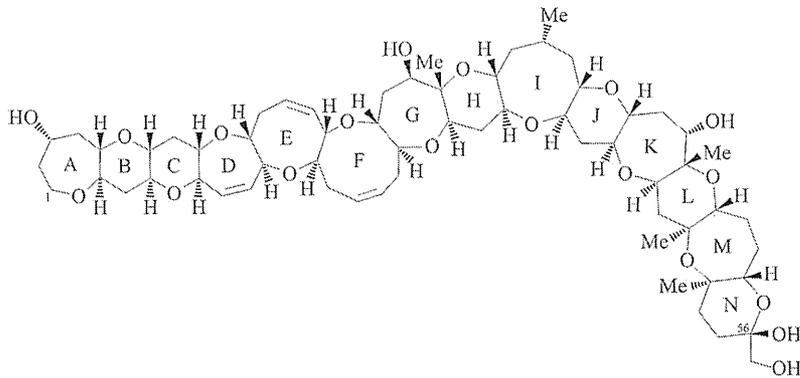


図7-8 カリビアン・シガトキシン-1 (C-CTX1)

[参考文献]

- 1) T. Yasumoto : *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **81**, 43 (2005)
- 2) 大城直雅 : *食品衛生研究*, **60**, 36 (2010)
- 3) K. Yogi, *et al.* : *Anal Chem*, **83**, 8886 (2011),  
K. Yogi, *et al.* : *J. AOAC Int.*, **97**, 398 (2014)
- 4) *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance Fourth Edition (2011)*, FDA  
<http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/seafood/>

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<sup>a</sup>

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ブダイ中毒（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プ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。<sup>1)</sup> また、この説に基づけ

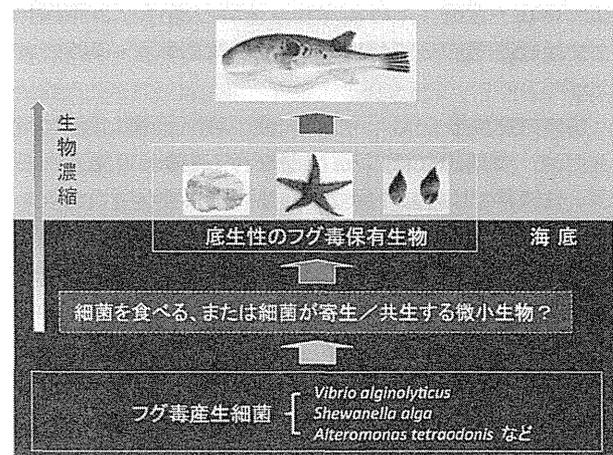


図 1 フグの毒化機構

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

<sup>a</sup> 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。<sup>2)</sup>

## 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。<sup>3)</sup>

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。<sup>4)</sup>

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

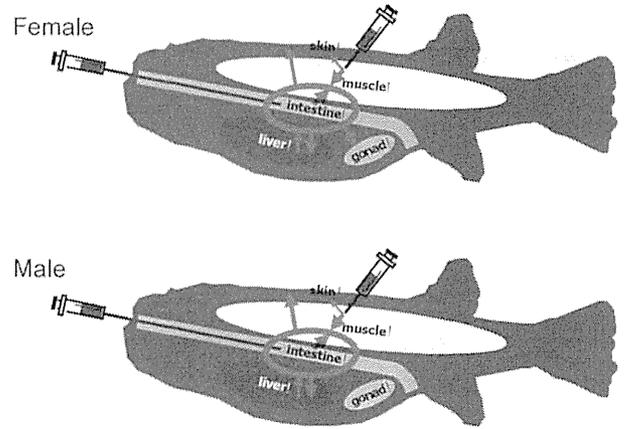


図2 フグ体内における TTX の移行

っていないかった。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）。<sup>5)</sup>

### 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く、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。<sup>6)</sup>

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)。<sup>7)</sup>

### 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。<sup>8-10)</sup> 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。<sup>11)</sup> 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 leuurus* および *T. suwattii* 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。<sup>12)</sup> 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。<sup>13-15)</sup> 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

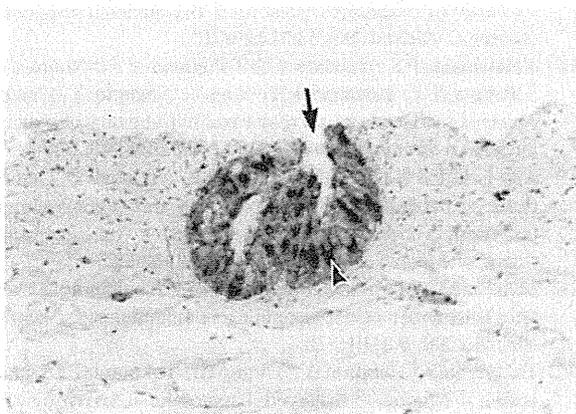


図 3 ナシフグ皮の TTX 分泌腺 (矢じり) とその開口部 (矢印)

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。<sup>16)</sup> 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。<sup>17)</sup> 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 はフグの中枢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。関係の皆様にお礼申し上げる。

## 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: Cephalotrichiidae) and *Planocera reticulata* (Platyhelminthes: Turbellaria: Polycladida: Planocerae). *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<sup>1</sup> 高尾秀樹<sup>1</sup> 新名真也<sup>2</sup> 山中祐二<sup>2</sup> 岡田幸長<sup>3</sup> 中島梨花<sup>3</sup>  
 王 俊杰<sup>2</sup> 辰野竜平<sup>2</sup> 阪倉良孝<sup>2</sup> 高谷智裕<sup>2</sup> 荒川 修<sup>2,\*</sup> 野口玉雄<sup>4</sup>

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

Kaori TANIGUCHI<sup>1</sup>, Hideki TAKAO<sup>1</sup>, Shinya NIINA<sup>2</sup>, Yuji YAMANAKA<sup>2</sup>, Yukinaga OKADA<sup>3</sup>,  
 Rika NAKAJIMA<sup>3</sup>, Junjie WANG<sup>2</sup>, Ryohei TATSUNO<sup>2</sup>, Yoshitaka SAKAKURA<sup>2</sup>,  
 Tomohiro TAKATANI<sup>2</sup>, Osamu ARAKAWA<sup>2,\*</sup> and Tamao NOGUCHI<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Division of Research and Development, Manbou Corp:

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

<sup>2</sup> Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University:

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

<sup>3</sup> Faculty of Fisheries, Nagasaki University:

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

<sup>4</sup> 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

<sup>1</sup> 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<sup>2</sup> 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<sup>3</sup> 長崎大学水産学部: 〒852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14<sup>4</sup> 東京医療保健大学医療保健学部: 〒154-8568 東京都世田谷区世田谷 3-11-3

## 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<sup>1)</sup>、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<sup>\*1,\*2</sup>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<sup>2)</sup>。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<sup>1), 3), 4)</sup>。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<sup>\*2)</sup>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<sup>6)</sup>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、 $-20^{\circ}\text{C}$ 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<sup>6)</sup>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<sup>6)</sup>。

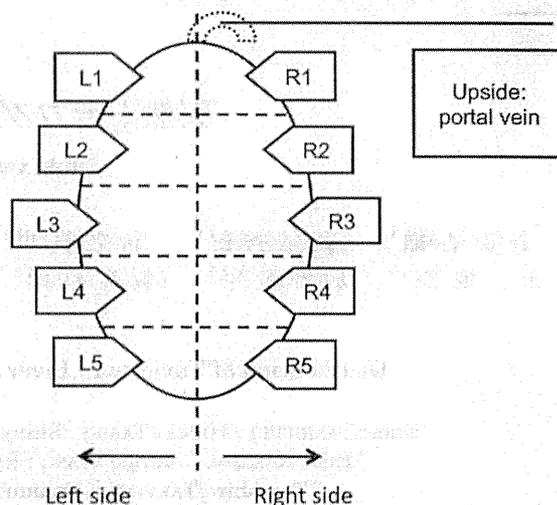


Fig. 1. Sampling scheme of 10 parts from a liver.

### 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 $0.45\ \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過後、Zspray<sup>TM</sup> MD 2000を搭載したAlliance 2690システム（Waters社製）を用い、既報の方法<sup>7)</sup>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 $350^{\circ}\text{C}$ 、ソースブロック温度 $120^{\circ}\text{C}$ 、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、MassLynx<sup>TM</sup> 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<sup>8)</sup>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

\*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、厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知

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<sup>9)~11)</sup>。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 ( $\sigma$ )] は、低毒性生肝臓で  $93.5 \pm 19.8\%$ 、高毒性凍結肝臓では  $80.9 \pm 11.7\%$  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

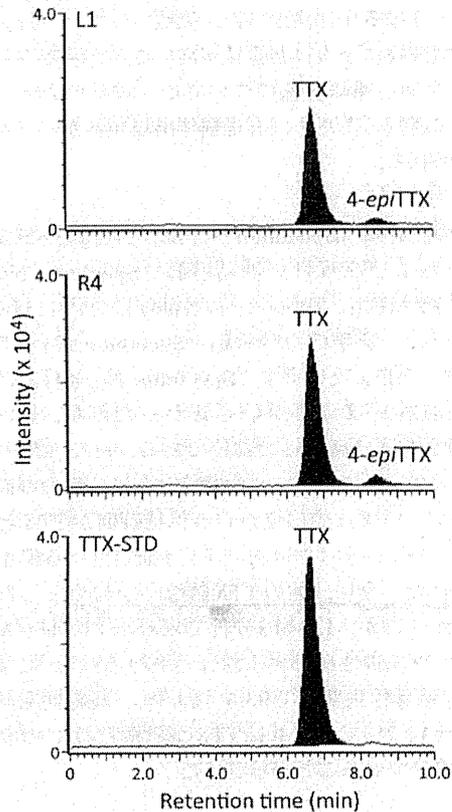


Fig. 2. LC-MS chromatograms at  $m/z$  320 obtained from L1 (upper) and R4 (middle) of Specimen No. 44 (see Table 3), and from TTX standard (lower).

### 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<sup>5)</sup>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<sup>12), 13)</sup>。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

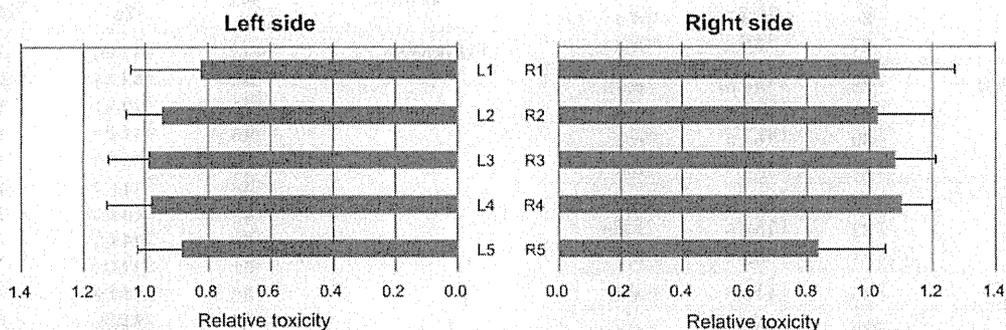


Fig. 3. Distribution of toxicity in raw livers. Data are shown as mean (column) and standard deviation (SD, error bar) of each part ( $n=16$ ).

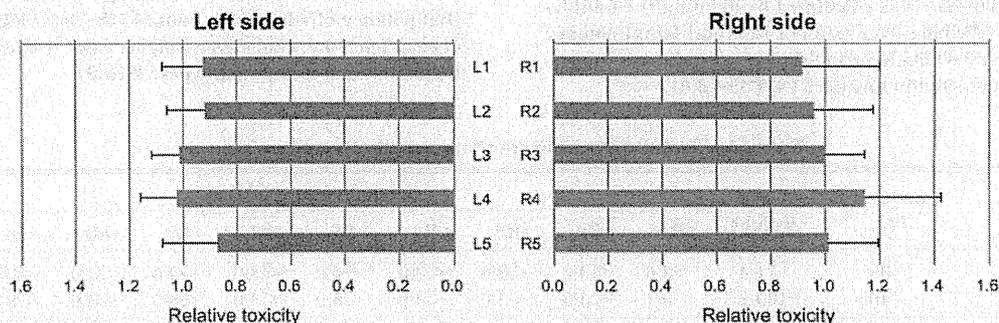


Fig. 4. Distribution of toxicity in frozen livers. Data are shown as mean (column) and standard deviation (SD, error bar) of each part ( $n=9$ ).

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も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 $0.88 \pm 0.21$ 、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 $0.88 \pm 0.28$ 、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 ( $p=0.1630$ )、凍結肝臓 ( $p=0.5819$ )とも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)の毒性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. 囲い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, 淵 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) 淵 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. *日本誌*, 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. *日本誌*, 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<sup>1,2,\*</sup> 大城直雅<sup>3</sup> 松田聖子<sup>2,a</sup>  
佐久川さつき<sup>2</sup> 松尾敏明<sup>4</sup> 安元 健<sup>5</sup>

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

Kentaro Yogi<sup>1,2,\*</sup>, Naomasa OSHIRO<sup>3</sup>, Seiko MATSUDA<sup>2,a</sup>, Satsuki SAKUGAWA<sup>2</sup>,  
Toshiaki MATSUO<sup>4</sup> and Takeshi YASUMOTO<sup>5</sup>

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

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

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

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

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

<sup>a</sup> 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

<sup>1</sup> 琉球大学医学部保健学科: 〒903-0215 沖縄県西原町字上原207<sup>2</sup> 沖縄県衛生環境研究所: 〒901-1202 沖縄県南城市大里字大里2085<sup>3</sup> 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<sup>4</sup> 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)<sup>5</sup> 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<sup>a</sup> 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<sup>1),2)</sup>。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<sup>3)</sup>、近年、北ア

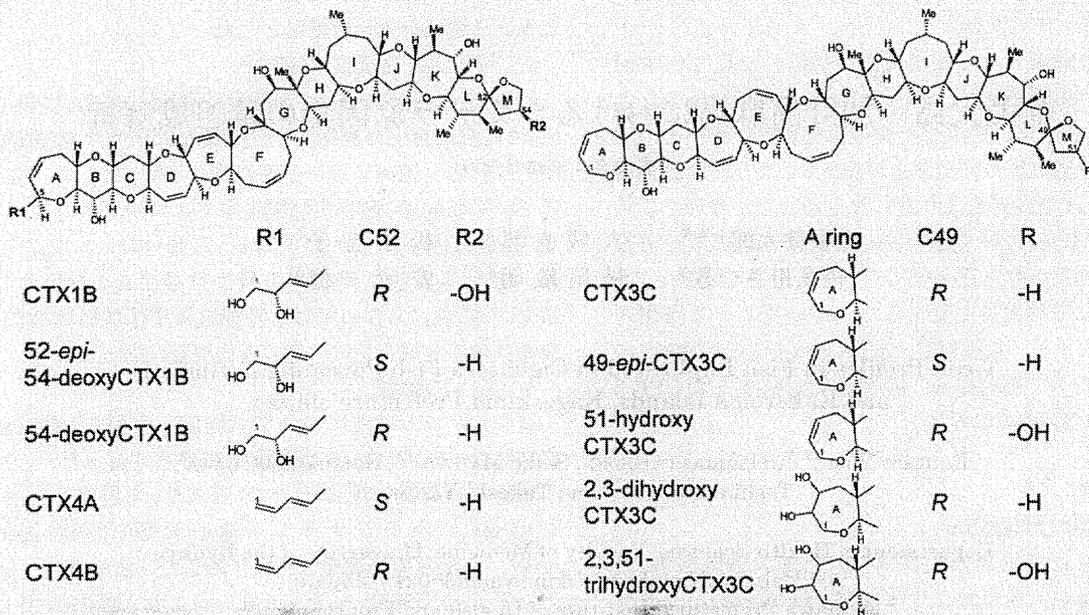


Fig. 1. Structures of representative ciguatoxins

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

Incident	Date	Location	Foods consumed	Species involved* <sup>1</sup>	Number of consumer	Number of patients	Main symptoms
1* <sup>2</sup>	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* <sup>2</sup>	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

\*<sup>1</sup> The fish were from the local fishing grounds.

\*<sup>2</sup> Details of incidents 1 and 2 were reported previously<sup>20)</sup>.

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<sup>3), 4)</sup>。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<sup>5)~9)</sup>。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<sup>2), 10)~16)</sup>。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<sup>9), 17), 18)</sup>、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 240 g) 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<sup>4), 9)</sup>。魚肉中に ppb 以下のレ

ベルで含まれる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<sup>3), 4), 9)</sup>。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<sup>19)</sup>。これにより、沖縄県<sup>8)</sup>、宮崎県<sup>17)</sup> および茨城県<sup>15)</sup> 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<sup>19)</sup>。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<sup>5)</sup> におけるシガテラ原因魚の毒組成の詳細については