

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580227

研究課題名（和文）フグ毒のトラフグ中枢神経と行動に対する作用

研究課題名（英文）Effects of tetrodotoxin on the central nervous system and behavior of tiger puffer

研究代表者

阪倉 良孝 (SAKAKURA YOSHITAKA)

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・教授

研究者番号：20325682

研究成果の概要（和文）：フグ毒（TTX）がトラフグ稚魚の中枢神経と行動に与える影響について検討を行った。まず、天然稚魚と人工種苗のフグ毒の組織内分布の比較を行った。抗 TTX モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学により、各組織のフグ毒の分布を精査した。その結果、天然稚魚の皮膚と肝臓から TTX を検出した。さらに、TTX が中枢神経、特に菱脳部、小脳、視神経および嗅上皮に存在することを初めて明らかにした。無毒の人工種苗に対して経口および筋肉注射によって TTX を投与したところ、いずれの投与方法でも投与後少なくとも 24 時間以内に TTX の蓄積が見られ、天然稚魚と同じ組織中にフグ毒を検出した。無毒の人工種苗が新規環境に晒されると表層を遊泳し（boldness）、追尾行動（攻撃行動）が見られるのに対し、有毒天然稚魚は底層を遊泳し、追尾行動を示さなかった。TTX を投与した人工種苗は、新規環境に晒されると底層を遊泳し、噛み合いが有意に減少した。さらに、天然水域を模したメソコスムに放流すると、無毒の稚魚よりも被食が少なく、生残率の高いことが分かった。以上のことから、フグ毒はトラフグ稚魚の情動反応を制御する neuro-transmitter を修飾する分子として機能すると考えた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of tetrodotoxin (TTX) on the central nervous system and behavior of juvenile tiger puffer *Takifugu rubripes*. We compared distribution of TTX in the tissues between wild and artificially raised fish. Monoclonal anti-TTX antibody was used for detection of TTX in the various tissues of tiger puffer juveniles. We detected TTX in the skin and liver of the wild puffer juveniles. Moreover, we firstly demonstrated that TTX were present in the central nervous system, especially in the hindbrain, cerebellum, optic nerve and olfactory epithelium. When TTX was administrated to artificially raised puffer juveniles by diet and injection to muscle, the same TTX distribution as wild fish was observed. Behavioral observation revealed that artificially raised puffer juveniles, which do not contain TTX, were bold to a novel environment comparing to the wild juveniles. Administration of TTX to the juvenile puffer significantly decreased boldness and agonistic interactions, and raised the survival after release to the environment with predators. Synthesizing these results, we hypothesized that TTX is a kind of neuro-transmitter.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：生理・行動

1. 研究開始当初の背景

我が国の重要な水産資源であり固有の食文化を支えるトラフグを中心として、その安全な利用の観点から、フグ毒（TTX、tetrodotoxin）に関わる多くの疫学的調査がなされてきた。最近、連携研究者の研究グループはフグ類の毒化機構の研究を精力的に進め、トラフグのTTX蓄積はTTX保有ペントスの摂餌に依ることを明らかにするとともに、養殖トラフグへのTTX添加が免疫機能を賦活化することを見いだした（Noguchi et al. 2005）。さらに、TTX結合タンパク（Yotsu-Yamashita et al. 2002）やTTX耐性遺伝子（Venkatesh et al. 2005）がトラフグで同定されるようになってきた。このように、フグはTTXを体内に保持することにより独自の生体内恒常性を維持すると考えられ、フグ体内におけるTTX分子作用機序を理解することは学術的に興味深い上に、我が国の重要水産資源の養殖生産性技術を向上させるうえで要求される生物学的根拠の究明にも繋がる。

代表者、研究分担者および連携研究者の研究グループは、激減したトラフグ資源回復のための種苗放流に関する研究を通じて、天然トラフグ稚魚の生態調査と、人工種苗と天然魚の行動比較を実施してきた。その結果、①稚魚期のトラフグの減耗要因が被食であること、②放流実験から、人工種苗は天然稚魚に比べて被食回避能力が有意に劣り捕食を受けやすいこと、③人工種苗と天然稚魚では新規環境に曝されたときの情動行動（遊泳水深、攻撃行動）の異なること、④天然トラフグ稚魚が皮膚と肝臓にTTXを蓄積しているが、逃げ場所のない閉鎖環境では、捕食者は天然稚魚と人工種苗を区別せずに捕食する、という4点が明らかになり、「TTXはトラフグ稚魚の被食回避に直接機能していない」ことが示された。

以上の成果と予備知見を総合し、「TTXが、トラフグ稚魚の生体防御機能のみならず、捕食者回避行動に関わる高次行動のニューロトランスミッターを修飾する分子として機能する」という仮説に辿り着いた。

2. 研究の目的

「フグが何故毒（TTX）を持つのか？」という問いは水産学・生物学上の長い疑問である。これまで、TTXが捕食者回避に機能する、免疫賦活作用を持つなどの説が出されているが、明確な答えが出ているとは言い難い。申請者は、トラフグ稚魚をモデルとした行動学

的研究（平成19年度科研費基盤研究C）を通じて、「TTXはトラフグ稚魚の被食回避に直接機能していない」ことを見いだすとともに、「TTXが、捕食者回避行動に関わる高次行動のニューロトランスミッターを修飾する分子として機能する」という仮説に辿り着いた。この仮説を検証するために、トラフグ稚魚をモデル生物系として、TTXがトラフグの中枢神経のどの部位に作用し、その結果として行動をどのように変化させるのかを明らかにすることによって、TTXのフグ体内における作用機序を理解するための一助とすることを目的とした。

3. 研究の方法

「フグ毒のトラフグ中枢神経と行動に対する作用」を解明するために、次の2項目について実験を進めることとした。

- I) トラフグ中枢神経に対するTTXの作用：人工種苗に異なる方法でTTXを投与したものと、同サイズの天然トラフグ稚魚について、中枢神経内のTTXの分布と動態を調べる。
- II) TTX投与がトラフグ人工種苗の行動に与える影響：TTXの投与によりトラフグ稚魚の行動が天然稚魚と同等に変化することを実証する。

そこで、次に示す実験を実施し、これらの課題を明らかにすることとした。

実験1 トラフグ中枢神経内のTTXの分布
研究分担者の山崎が所属する瀬戸内海区水産研究所百島実験施設近海において、体長3~10 cmの天然トラフグ稚魚を採捕した。天然稚魚を採集し中性ホルマリンで灌流固定を施した後、TTXモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的手法によって、各組織、特に中枢神経中のTTXの分布様式を調べた。

実験2 TTX投与によるトラフグ中枢神経内のTTXの動態

天然稚魚と同サイズの無毒人工種苗に対して筋肉注射（10 MU）と経口投与によるTTX添加（0, 7, 14 MU/g feed）を行い10日間飼育し、経時的にサンプリングを行いTTXの組織内分布を調べた。その後、天然稚魚と同様の手法で中枢神経内のTTXの分布様式を調べ、天然稚魚およびTTX無添加の人工種苗のそれとを比較した。得られたTTXの分布様式の比較から、より天然魚に近いTTX分布様式を示す投与法を決定し、

その方法を用いて投与直後から経時的なサンプリングを行い、短時間から中長期的な TTX の中枢神経内の動態を調べるための基礎とすることとした。

実験 3 TTX がトラフグ稚魚の情動行動に与える影響

天然稚魚、同一サイズの人工種苗、および実験 2 に示した方法で TTX を投与した人工種苗について、新規環境に曝した後の稚魚の情動行動を行動学的に定量評価することとした。稚魚を 5 尾ずつ 500 L 容水槽に移槽し、移槽直後から 24 時間の遊泳水深と攻撃行動（追尾行動、噛み合い）の頻度の経時変化を調べた。

実験 4 天然水域を模した環境に放流した無毒のトラフグ人工種苗の経時的な毒化過程

実験 2 の TTX 投与と同一条件の供試魚を用いて、実験 3 で得られたパラメータをもとに、TTX 投与による情動行動の経時変化の詳細な解析を行った。

実験 5 天然水域を模した環境に放流した無毒および TTX 投与のトラフグ稚魚の被食状況

実験 2 の TTX 投与と同一条件の供試魚を用いて、捕食者（スズキ）の存在する環境の放流した場合に、TTX の有無によって稚魚の生残が異なるかどうかを調べた。

4. 研究成果

実験 1 トラフグ中枢神経内の TTX の分布

天然トラフグ稚魚の組織ごとの TTX 分布を精査したところ、TTX が皮膚、肝臓の他、脳（特に小脳、菱脳部）、視神経、嗅上皮に分布することを確認した。

実験 2 TTX 投与によるトラフグ中枢神経内の TTX の動態

いずれの投与方法でも TTX は少なくとも 24 時間以内に速やかに蓄積され、天然魚と同様の組織内分布を示した（図 1、2）。このことから、人工種苗に対する TTX の投与方法は、経口・筋肉注射のいずれでも問題ないことを確認することができた。

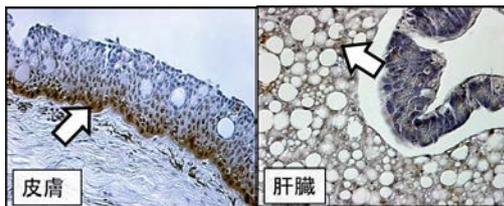


図 1. 筋肉注射後 10 日目の稚魚の上皮基底細胞（左）および肝細胞への TTX の蓄積（矢印で示した茶褐色の部分）が抗 TTX モノクロー

ナル抗体に対する陽性反応部位を示す）

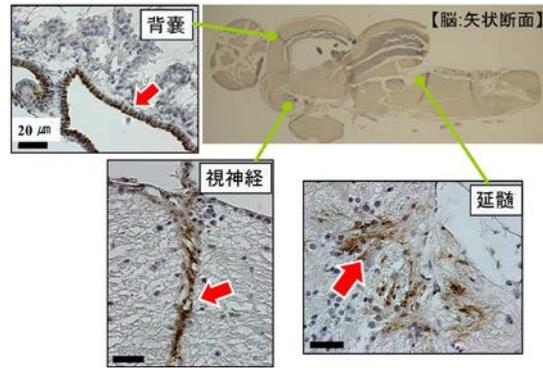


図 2. TTX 経口投与 10 日目のトラフグ中枢神経内の TTX の蓄積（矢印で示した茶褐色の部分）が抗 TTX モノクローナル抗体に対する陽性反応部位を示す）

実験 3 TTX がトラフグ稚魚の情動行動に与える影響

天然稚魚は新規環境に晒されると、底層を遊泳する頻度が高く、攻撃行動は全く観察されなかった。

一方、無毒人工種苗、TTX 筋肉注射投与人工種苗について、新規環境に曝した後の稚魚の情動行動を行動学的に定量評価したところ、TTX 投与種苗は天然魚に近い行動特性を示すことが明らかになった（図 3）。

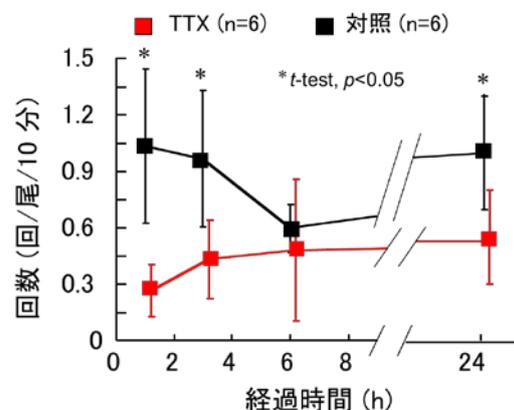
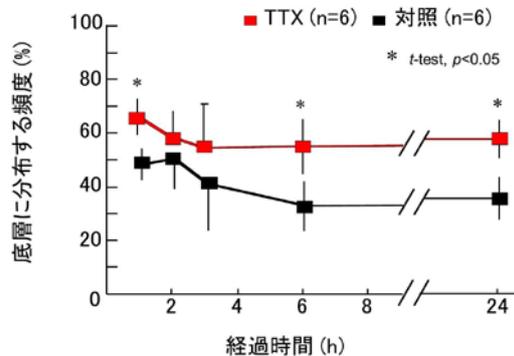


図 3. 無毒のトラフグ人工種苗および TTX 筋肉注射した人工種苗の新規環境に晒され

たときの情動反応の経時変化（上段：遊泳水深、下段：追尾行動の頻度）

実験4 天然水域を模した環境に放流した無毒のトラフグ人工種苗の経時的な毒化過程

天然水域を模したメソコスムに放流した無毒のトラフグ人工種苗の経時的な毒化過程を同様の手法で調べたところ、放流後少なくとも6日目には中枢神経および上皮基底細胞・肝臓へのフグ毒蓄積を確認することが出来、新規環境に対する情動行動も抑制傾向が見られた。

実験5 天然水域を模した環境に放流した無毒およびTTX投与のトラフグ稚魚の被食状況

TTXを投与した人工種苗と無毒の人工種苗を天然水域を模したメソコスムに放流し、捕食者回避行動が異なるかどうかを検証した結果、TTX保有魚は捕食に遭いにくいことを明らかにできた（図4）。

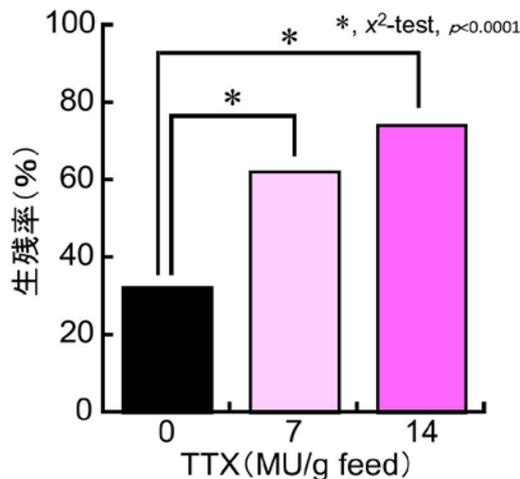


図4. 放流5日後のトラフグ稚魚の生存率。カラムは生存個体の割合、アスタリスクは各実験区間に統計的な有意差があることを示す。

以上の成果を総合し、フグ毒の中枢神経と行動に対する作用について考察する。

フグ毒モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学試験の結果、いずれの投与方法においてもフグ毒投与後24時間以内に速やかに中枢神経にフグ毒が移行し、特に、行動を司る小脳や感覚器官の中枢である延髄に強い陽性反応が得られた。フグ毒保有天然稚魚とフグ毒投与人工種苗は新規環境に対する情動反応が無毒の個体に比べて有意に抑制されることが明らかになった。これらの結果から、投与後にフグ毒はトラフグ中枢神経のうち、感覚・行動を司る部位に働きかけ、その結果

として情動行動を抑制する働きがあると考えられた。

さらに、天然水域を模したメソコスムに放流した無毒のトラフグ人工種苗の経時的な毒化過程を同様の手法で調べたところ、放流後少なくとも6日目には中枢神経および上皮基底細胞・肝臓へのフグ毒蓄積を確認することが出来、情動行動も抑制傾向が見られた。すなわち、天然水域と実験環境の結果の整合性がとれており、フグ毒はトラフグ稚魚の中枢神経に作用し、行動をコントロールするニューロトランスマITTERを修飾する分子として位置づけられると考えた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計2件）

① 阪倉良孝、高谷智裕、山崎英樹、崎山一孝 III-4. フグの行動とフグ毒、日本水産学会誌、査読無、Vol.78、No.1、2012、p.93

② 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*, 査読有, Vol.58, No.6-7, 2011, pp.565-569

〔学会発表〕（計7件）

① 沖田光玄・山崎英樹・崎山一孝・山根晃・新名真也・高谷智裕・荒川修・阪倉良孝：トラフグ稚魚のフグ毒感知器官。平成24年度日本水産学会春季大会，平成24年3月26-30日 東京海洋大学，東京

② 阪倉良孝：フグの行動とフグ毒。平成23年度日本水産学会秋期大会シンポジウム「フグ研究とトラフグ生産技術開発の最前線」，平成23年10月2日 長崎大学，長崎

③ 沖田光玄・中安純一・山崎英樹・崎山一孝・田中幸太郎・高谷智裕・荒川修・阪倉良孝：トラフグ稚魚のフグ毒に対する選択性。平成23年度日本水産学会秋期大会，平成23年9月28-10月2日 長崎大学，長崎

④ Sakakura, Y., Takatani, T., Nakayasu, J., Okita, K., Yamasaki, H., Sakiyama, K. Aggressive behavior and TTX in puffer fish. ICCPB 2011, May 31-June 5, 2011, Nagoya, Japan.

⑤ 沖田光玄・中安純一・山崎英樹・崎山一孝・田中幸太郎・高谷智裕・荒川修・阪倉良孝：トラフグ天然稚魚とフグ毒投与人工種

苗の組織内でのフグ毒蓄積部位の比較. 平成 23 年度日本水産学会春季大会, 平成 23 年 3 月 27-31 日 東京海洋大学, 東京

- ⑥ 中安純一・山崎英樹・崎山一孝・福島優喜・角南慶卓・佐藤哲哉・阪倉良孝・高谷智裕: 捕食者の提示がトラフグ種苗の行動に与える影響. 平成 21 年度日本水産学会秋季大会, 平成 21 年 9 月 30 日-10 月 3 日 いわて県民情報交流センター, 盛岡
- ⑦ 阪倉良孝・山崎英樹・崎山一孝: フグの行動とフグ毒. 平成 21 年度日本水産学会九州支部例会シンポジウム～九州産フグ研究と生産技術開発の最前線～, 平成 21 年 9 月 19 日 長崎大学水産学部, 長崎

6. 研究組織

(1)研究代表者

阪倉 良孝 (SAKAKURA YOSHITAKA)
長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・教授
研究者番号: 20325682

(2)研究分担者

山崎 英樹 (YAMAZAKI HIDEKI)
独立行政法人水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・主任技術開発員
研究者番号: 10466261

(3)連携研究者

高谷 智裕 (TAKATANI TOMOHIRO)
長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・准教授
研究者番号: 90304972