

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580237

研究課題名（和文） フグ体内におけるフグ毒テトロドトキシンの動態究明

研究課題名（英文） STUDIES ON THE TRANSFER/ACCUMULATION PROFILE OF TETRODOTOXIN IN PUFFERFISH

研究代表者

荒川 修 (ARAKAWA OSAMU)

長崎大学・水産学部・教授

研究者番号：40232037

研究成果の概要（和文）：フグ体内におけるテトロドトキシシン（TTX）の取込・代謝・蓄積・排泄機構、ならびにそれらと性成熟の関連解明に資するため、無毒養殖フグへの毒投与実験を行うとともに、天然フグにおける体内毒分布の季節変動について検討した。その結果、未成熟なトラフグでは、筋肉内投与された TTX は血液を介してまず肝臓に移行し、その後皮へ移行・蓄積すること、麻痺性貝毒（PSP）保有種メコンフグの場合、PSP を投与すると速やかに皮に移行・蓄積するが、TTX はほとんどが筋肉に残存すること、天然メコンフグの雌においては、性成熟期になると血液中では高分子物質と結合した TTX の割合が増加し、見かけ上、肝臓から卵巣への毒の入れ替わりが起こること、などが示された。

研究成果の概要（英文）：In our studies to clarify the transfer/accumulation mechanism of tetrodotoxin (TTX) in pufferfish body and the effect of maturation on it, several toxin administration experiments using cultured pufferfish and investigations on the maturation-associated change in toxicity of wild pufferfish were conducted. As the results, it was shown that (1) the intramuscularly administered TTX was transferred first to the liver, and then to the skin via the blood stream in unmaturing specimens of *Takifugu rubripes*, (2) when paralytic shellfish poison (PSP) was administered to the PSP-bearing species, *Tetraodon turgidus*, it was rapidly transferred/accumulated to the skin, but most part remained in the muscle in case of TTX, and (3) in wild female specimens of *Takifugu poecilonotus*, the ratio of TTX molecules that bind to high molecular weight substances in the blood increased, and apparent turnover of toxins from the liver to the ovary occurred during the maturation period.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：水産食品衛生化学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：トラフグ、メコンフグ、メコンフグ、テトロドトキシシン、麻痺性貝毒、
テトロドトキシシン結合性タンパク質、免疫組織化学、性成熟

1. 研究開始当初の背景

フグ毒テトロドトキシン (TTX) に関する研究は、近年、主に日本でめざましい進歩を遂げた。すなわち、TTX はフグのみならずイモリ、ハゼ、カエル、タコ、巻貝、ヒトデ等多様な生物に分布すること、フグやイモリは孵化時から無毒の餌を用いて人工飼育すると無毒になるが、そのような無毒個体に TTX を投与すると毒化すること、元来、海洋細菌が TTX を産生していること、有毒餌生物を遮断した状態で無毒の餌で養殖したトラフグは肝臓も無毒となること、などが順次明らかにされ、フグの毒化機構は、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。

一方、有毒餌生物を介してフグ体内に取り込まれた後の TTX の存在形態や動態に関しては、未だに不明な部分が少なくない。研究代表者らは、これまで、抗 TTX モノクローナル抗体を用いる免疫組織学的手法により、数種のフグやイモリ、ヒモムシを対象に TTX の組織内微細分布を可視化してきた。その過程で、フグでは TTX は皮の腺細胞や基底細胞、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度によって異なること、基底細胞において毒はリソゾームに分布すること、などを見出した。しかしながら、これらはいずれも、ある時点の静的な毒分布を見ているに過ぎず、フグ体内における TTX の取込・代謝・蓄積・排泄機構を明らかにするためには、TTX の動的な分布を把握する必要があると考えられた。

関連して、Matsui らはフグの血漿から TTX 結合性タンパク質 (TBP) を分離しているが、その機能や役割については必ずしも明確ではない。海産フグの場合、一般に肝臓と卵巣の毒性が著しく高いが、両者には顕著な季節変動が見られる。予備実験において、養殖トラフグに雌性ホルモンを投与すると、血漿の TTX 結合活性が上昇するという結果が得られており、TBP は単に TTX の輸送に関与するだけでなく、個体の成熟にも深く関わる物質であると推察された。

2. 研究の目的

以上のような状況の下、本研究では、まずフグ体内における TTX の取込・代謝・蓄積・排泄機構解明に資するため、有毒種の無毒個体群 (養殖フグ) に TTX あるいは麻痺性貝毒 (PSP) を筋肉内投与し、その後の毒の移行・蓄積状況について検討した。次いで、天然フ

グにおける TTX の体内分布と性成熟の関連を明らかにするため、コモンフグを対象に組織別毒性の周年変化を調査するとともに、血液を介した組織間の毒の移行や、それへの TBP の関与について検討した。

3. 研究の方法

(1) 養殖トラフグへの TTX 投与実験

無毒養殖トラフグ *Takifugu rubripes* の稚魚を 40 尾ずつ 2 区に分け、それぞれ TTX 標品 (PTTX) および有毒フグ卵巣の粗抽出液 (CTTX) を 50 MU/個体の用量で筋肉内投与後、168 時間飼育した。この間、経時的に各区 5 尾ずつ取り上げ、抗 TTX モノクローナル抗体を用いる ELISA 法により毒の移行/蓄積状況を調べるとともに、毒投与 120 時間後に取り上げた試験魚の皮膚につき、免疫組織学的手法により TTX の微細分布を観察した。

(2) 養殖メコンフグへの PSP/TTX 投与投与

カンボジアの淡水産メコンフグ *Tetraodon turgidus* は、TTX をもたず、代わって主に皮に PSP を保有する。孵化仔魚から無毒の餌を与えて 7 ヶ月間人工飼育した同種フグ 33 個体につき、15 個体ずつの 2 区と残り 3 個体に分け、2 区については PSP と TTX をそれぞれ 50 MU/個体の用量で筋肉内投与した。PSP 投与区については、12、24、48 時間後に 5 個体ずつ、TTX 投与区については死亡直後に全個体を取り上げ、毒を投与しなかった 3 個体とともに PSP は HPLC-蛍光法、TTX は ELISA 法で各部位の毒量を調べた。

(3) 有明海産コモンフグにおける体内毒分布の季節変動

2006 年 10 月～2007 年 12 月に、長崎県南島原市有家沖で漁獲された天然コモンフグ *Takifugu poecilonotus* 計 138 尾 (♀:93 尾、♂:45 尾) につき、麻酔後、開腹して肝門脈から採血した。得られた血液から血漿を取り、分画分子量 50,000 の限外ろ過膜にて低分子画分と高分子画分に分画後、前者は直接、後者は 0.1%酢酸を添加のうえ ELISA 法で TTX 量を測定した。高分子画分の TTX を結合 TTX (b-TTX)、低分子画分の TTX を遊離 TTX (f-TTX)、これらの合計を血漿 TTX (p-TTX)、p-TTX 中に占める b-TTX の割合を結合率とした。一方、採血済みフグから肝臓、生殖腺および皮を取り、それぞれマウス毒性試験に供して毒力を測定した。

4. 研究成果

(1) 養殖トラフグにおける TTX の移行・蓄積プロフィール

部位別 TTX 量の推移を図 1 および図 2 に示す。肝臓毒量の推移は、PTTX 区と CTTX 区で大きく異なっていた。毒投与 1 時間後、肝臓毒量はともに 12 MU/g であったが、PTTX 区ではその後漸減し、12 時間後以降は微量 (0.5-1.5 MU/g) の残存がみられるのみであったのに対し、CTTX 区では一旦増加し、8-12 時間後に最大 (21 MU/g 程度) となった。その後は減少したが、168 時間後でも 6.4 MU/g の毒が残存していた。皮の毒量の推移も、両区で若干異なっていた。ともに毒量は 1 時間後から 72 時間後の間に顕著に増加し、それ以後は 15 MU/g 程度の毒量を維持していたが、CTTX 区の場合、増加の立ち上がりが 12 時間後以降と PTTX 区より遅かった。毒投与部位である筋肉の毒量は、両区ともに急速に減少し、8 時間後以降は検出限界 (0.01 MU/g) 未満となった。血漿の毒量 (5 個体分の血漿を合一して測定) は、両区ともに 1 時間後が最も高く (PTTX 区で 5.9 MU/g、CTTX 区で 9.8 MU/g)、その後は減少した。

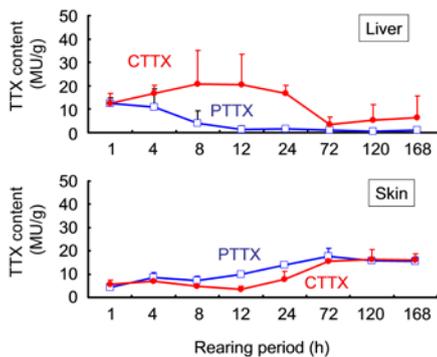


図 1 肝臓 (上) および皮 (下) における TTX 量の推移

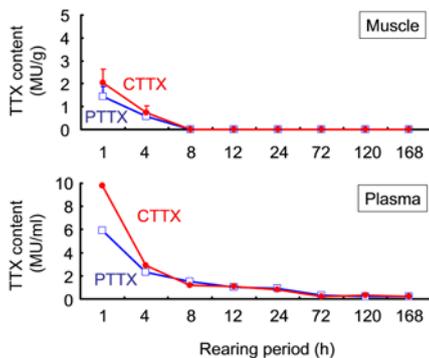


図 2 筋肉 (上) および血漿 (下) における TTX 量の推移

各部位に移行・残存した毒量の推移を図 3 に示す。各部位の毒量の総和をみると、両区ともに 1-4 時間後は投与した毒量 (50 MU/個体) の 60% 前後で、8-12 時間後に一旦低下後、24-168 時間後には 60-80% 程度となった。肝臓の毒量の推移は PTTX 区と CTTX 区で異なり、PTTX 区の場合 1-8 時間後にかけて漸減し、12 時間後以降は投与毒量の 1.6% 未満 (残存毒量の 3.2% 未満) となったのに対し、CTTX 区では 24 時間後まで低下せず、投与毒量の 15-23% (残存毒量の 28-58%) を占めた。皮の毒量は両区ともに飼育期間中漸増し、168 時間後には残存毒量のほとんど (PTTX 区: 98%; CTTX 区: 89%) を占めた。

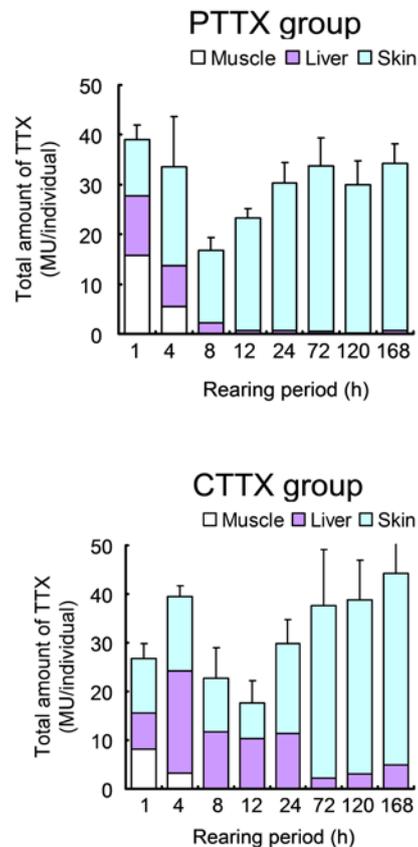


図 3 PTTX 区 (上) および CTTX 区 (下) における体内残存 TTX 量の推移

TTX 投与 120 時間後の皮膚の一部をとり、免疫組織化学的観察を行ったところ、PTTX 区、CTTX 区ともに基底細胞にのみ TTX の陽性反応が認められた。上皮中には分泌細胞も見られたが、TTX 陰性であった (図 4)。

以上、未成熟なフグでは生体内に導入された TTX は血液を介してまず肝臓に移行し、その後皮へ移行・蓄積すること、その際、純度の低い毒の方が肝臓に保持されやすいこと、などが示唆された。

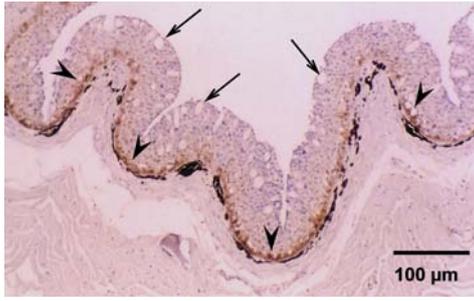


図4 TTX 投与 120 時間後の皮における TTX の組織内微細分布

(2) 養殖メコンフグにおける PSP/TTX の移行・蓄積プロファイル

毒を投与しなかった 3 個体からは、PSP、TTX ともにまったく検出されなかった。

PSP 投与区では、いずれの個体も死亡することはなく、筋肉内に投与した毒は速やかに他の部位へ移行した(図 5)。各部位の毒量の総和は、投与した毒量(50 MU/個体)の 45-50%程度で、12 時間後から 48 時間後にかけて大きな変化はなかった。皮の毒量が他を凌駕し、48 時間後では残存毒量の 92.8%を占めた。

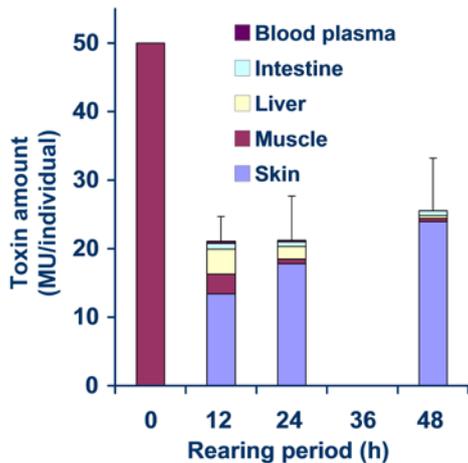


図5 PSP 投与区における体内残存 PSP 量の推移

一方、TTX 投与区の場合、いずれの試験魚も毒投与 3-4 時間後に死亡した。死亡個体に残存していた毒の分布を図 6 に示す。グラム当たりの毒量は、筋肉、肝臓、腸が同程度であったが、個体当たりの毒量では、筋肉(25.3 MU/個体)が他を凌駕し、PSP 区とは対照的に、皮への移行毒量は、微量であった。残存総毒量は投与毒量の 72.0%を占め、そのうち 70.3%を筋肉が占めた。

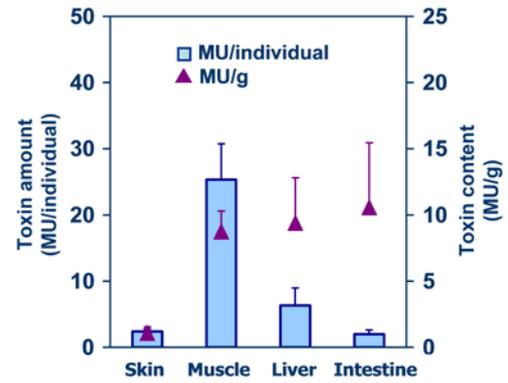


図6 TTX 投与区における体内残存 TTX 量

トラフグに TTX を投与した場合やメコンフグに PSP を投与した場合、毒は速やかに他の部位に移行したが、メコンフグに TTX を投与した場合は、ほとんどが筋肉に残存した。TTX を保有する海産フグは TTX、PSP を保有する淡水フグは PSP に特異的な毒の運搬・蓄積機構を備えているものと推察された。

(3) 有明海産天然コモンフグにおける体内毒分布の季節変動

まず、生殖腺体指数(GSI)を測定したところ、雌の場合、12月から増加し始め、3月にピーク(average±SD: 15.5±3.4%)に達した後、4月には抱卵1個体を除き急激に低下した。一方、雄では、雌より1ヶ月早く11月から顕著に増加し始め、1月にピーク(12.7±1.2%)に達した後、4月にかけて漸減した。以上の結果に基づき、雌:12月から3月、雄:11月から3月を性成熟期、4月を産卵直後、その他の月を通常期とみなし、以下、毒性と性成熟の関連について検討した。

雌における各部位の毒力の周年変化を図 7 に示す。いずれの部位の毒力も総じて高く、平均毒力は、皮は12月中4月、肝臓の場合、12月中5月で1000 MU/gを、卵巣では6月で500 MU/gを上回った。特に肝臓では、6月と8月に平均毒力が3000 MU/gを超えた。各部位の毒力には性成熟に伴う変動がみられた。すなわち、肝臓の毒力は性成熟期よりも通常期の方が有意に高かったのに対し、卵巣の毒力はその逆であった。皮の毒力は、肝臓や卵巣に比べて変動が少なく、年間を通して高かったが、肝臓同様、性成熟期に若干減少する傾向にあった。いずれの部位も、産卵直後の4月には毒力が著しく低下した。

雄における各部位の毒力の周年変化を図 8 に示す。雄の場合、総じて皮の毒力が高かった。平均毒力は、雌よりは若干低いものの、12月中2月で約1000 MU/gを上回った。一方、肝臓の平均毒力は、6月に極端に高かったのを除き、12月中8月で300 MU/gを下回った。

精巣の毒力は総じて低く、6月～9月を除き、平均毒力は10 MU/g未滿であった。雄も雌同様、産卵直後の4月に毒力の低下がみられた。しかしながら、雌に認められたような性成熟期における皮と肝臓の毒力低下は雄ではみられず、精巣の毒力は性成熟期よりもむしろ通常期に高かった。

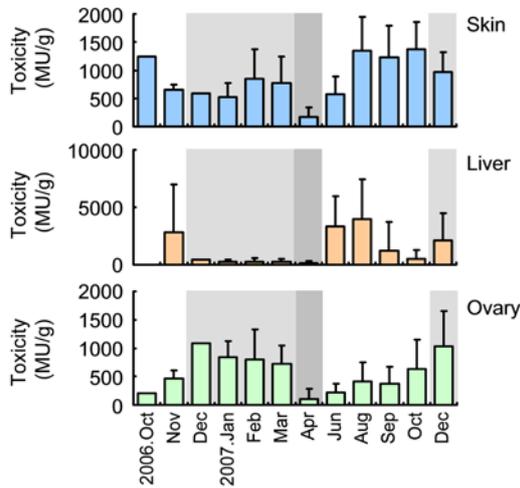


図7 雌における組織別毒力の周年変化

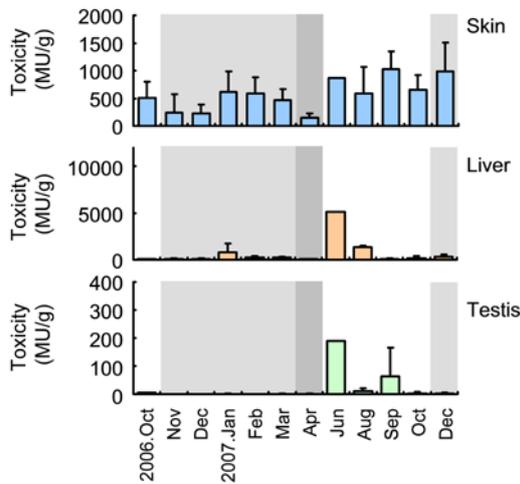


図8 雄における組織別毒力の周年変化

雌における各部位の総毒力と血漿 TTX 量の周年変化を図9に示す。皮の毒力は、卵巣と肝臓の毒力の和と同程度で、それらはともにおよそ 20000 MU/個体を中心として上下に変動した。個体当たりの毒力でみると、性成熟に伴う肝臓と卵巣の毒力の変動がより鮮明になった。すなわち、通常期は肝臓の毒力が高く、卵巣の毒力はごく僅かであるのに対し、性成熟期には肝臓の毒力が大きく低下し、これに代わり、GSI の増加に呼応して卵巣の毒力が著しく上昇した。ただし、この上昇は、卵巣体積の増加に依存するものであり、卵巣

の毒濃度は性成熟期にはあまり変化せず、むしろ通常期に徐々に増加した。個体当たりでも、産卵直後の4月には3部位ともに毒力が著しく低下した。

血漿 TTX 量 (p-TTX) は、1.75～15.1 MU/ml の範囲で、3部位の毒力に比べると遙かに低いレベルであった。p-TTX は、性成熟期より通常期に有意に高かったが、周期的に大きく変動した。この変動は、3部位の毒力の変動に呼応するものではなく、産卵直後の4月にも大きく低下しなかった。結合 TTX 量 (b-TTX) は、性成熟に関わらずほぼ一定の水準を保っていたが、性成熟期には遊離 TTX 量 (f-TTX) が減少し、それとともに結合率が上昇した。すなわち、肝臓の毒力が高い通常期には f-TTX の割合が、卵巣の毒力が高い性成熟期には b-TTX の割合が高い傾向にあった。

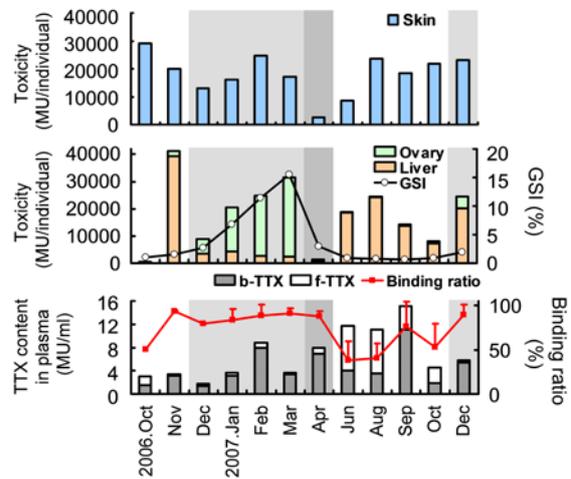


図9 雌における組織別総毒力の周年変化

雄における各部位の総毒力と血漿 TTX 量の周年変化を図10に示す。肝臓の毒力が極端に高い6月を除き、皮の毒力が他の部位を大きく上回った。総じて雌よりも毒力は低く、皮の毒力も雌の1/2程度のレベル(10000 MU/個体の水準)であった。各部位の毒力は、産卵直後の4月に低下したが、それ以外、性成熟と関連した変動は認められず、性成熟期でも肝臓の毒力が高い月があった。

p-TTX (1.59～13.5 MU/ml) は、雌と同レベルで、性成熟の程度とは無関係に変動した。しかしながら、結合率は雌とよく似た変動パターンを示し、通常期に低く、性成熟期に高かった。

以上、有明海産天然コモンフグの部位別毒性、特に雌の肝臓と卵巣の毒性には顕著かつ特徴的な季節変動がみられた。すなわち、通常期は肝臓、性成熟期は卵巣の毒力が高く、肝臓と卵巣の間で見かけ上“毒の入れ替わり”が起こっているように思われる。皮の毒力も性成熟期に若干減少する。従って、天然

有毒フグ雌において、体内に取り込まれた TTX は、通常期は主に肝臓と皮に移行するが、性成熟期になると卵巣の発達に伴い血漿中の TTX 結合性高分子物質を介して積極的に卵巣へ運搬・蓄積されることが示唆された。

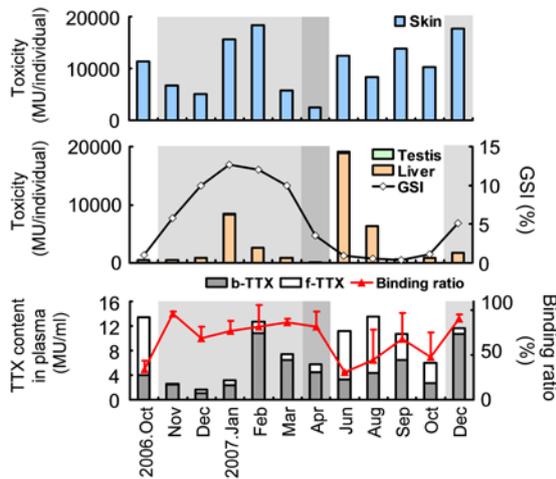


図9 雄における組織別総毒力の周年変化

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4件)

- ① Ikeda, K., Emoto, Y., Tatsuno, R., Wang, J. J., Taniyama, S., Takatani, T., Arakawa, O., 2010: Maturation-associated changes in toxicity of the pufferfish *Takifugu poecilonotus*. *Toxicon* **55**, 289-297 (査読有)
- ② Ikeda, K., Murakami, Y., Emoto, Y., L. Ngy, Taniyama, S., Yagi, M., Takatani, T., Arakawa, O., 2009: Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to non-toxic cultured specimens of the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Toxicon* **53**, 99-103 (査読有)
- ③ Noguchi, T., Arakawa, O., 2008: Tetrodotoxin - distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Marine Drugs* **6**, 220-242 (査読有)
- ④ Ngy, L., Tada, K., Yu, C.-F., Takatani, T., Arakawa, O., 2008: Occurrence of paralytic shellfish toxins in Cambodian Mekong pufferfish *Tetraodon turgidus*: selective toxin accumulation in the skin. *Toxicon* **51**, 280-288 (査読有)

[学会発表] (計4件)

- ① 角南慶卓, 高谷智裕, 佐藤哲哉, 阪倉良

孝, 中安純一, 山崎英樹, 崎山一孝, 谷山茂人, 荒川 修: フグ毒のトラフグ稚魚に対する作用-1: フグ毒の組織内動態, 平成21年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009年3月29日

- ② Ikeda, K., Emoto, Y., Tatsuno, R., Yagi, M., Taniyama, S., Takatani, T., Arakawa, O.: Maturation-associated accumulation of tetrodotoxin in pufferfish ovary. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 22, 2008.
- ③ 惠本 佑, 池田光堯, 谷山茂人, 高谷智裕, 荒川 修: コモンフグにおける組織別毒性の周年変化と血液を介した毒の移行, 平成20年度日本水産学会春季大会, 東京, 2008年3月30日.
- ③ Laymithuna Ngy, 余 振輝, 田多健志, 高谷智裕, 荒川 修: メコンフグ *Tetraodon turgidus* の毒性 - 皮への選択的な麻痺性貝毒蓄積, 平成20年度日本水産学会春季大会, 東京, 2008年3月30日.

[その他]

ホームページ等

<http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/handle/10069/8331>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 修 (ARAKAWA OSAMU)
長崎大学・水産学部・教授
研究者番号: 40232037

(2) 研究分担者

橘 勝康 (TACHIBANA KATSUYASU)
長崎大学・水産学部・教授
研究者番号: 20171712
高谷 智裕 (TAKATANI TOMOHIRO)
長崎大学・水産学部・准教授
研究者番号: 90304972

(3) 研究協力者

八木 基明 (YAGI MOTOAKI)
長崎市・水産センター・所長
ニー ライミトナ (NGY LAYMITHUNA)
長崎大学・大学院生産科学研究科・院生
池田 光堯 (IKEDA KOICHI)
長崎大学・大学院生産科学研究科・院生
村上 由美 (MURAKAMI YUMI)
長崎大学・大学院生産科学研究科・院生
惠本 佑 (EMOTO YU)
長崎大学・大学院生産科学研究科・院生