報 文

腐肉食性小型巻貝2種に対するフグ毒給餌実験

辰野 竜平¹ 反町 太樹² 谷山 茂人¹ 大城 直雅³
久保 弘文⁴ 高谷 智裕¹ 荒川 修^{1,*}

(平成26年1月20日受理)

Accumulation of Tetrodotoxin from Diet in Two Species of Scavenging Marine Snails

Ryohei TATSUNO¹, Taiki SORIMACHI², Shigeto TANIYAMA¹, Naomasa OSHIRO³, Hirofumi KUBO⁴,
Tomohiro TAKATANI¹ and Osamu ARAKAWA^{1,*}

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

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

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

⁴ Okinawa Prefectural Research and Extension Center:
1528 Kyan, Itoman, Okinawa 901-0354, Japan;

* Corresponding author

A feeding experiment of TTX-containing diet was conducted using the small scavenging marine snails *Pliarcularia globosa* and *Reticunassa festiva*. Seventy-five specimens of each species were divided into 15 groups of 5 individuals, of which 3 groups were directly submitted, without feeding, to toxin quantification as described below. TTX was not detected. Each of the remaining 12 groups was accommodated in a plastic case (80×70×40 mm) filled with seawater, and fed for 24 hours with ovary tissue (0.1 g) of the pufferfish *Takifugu vermicularis*, whose TTX content had previously been determined. Then the seawater was exchanged for fresh seawater, the snails were reared for 4 days without feeding, and then the seawater was changed again. This feeding/rearing cycle (5 days) was repeated 8 times, and 3 groups were sampled every 2 cycles. The combined viscera and combined muscle of each group were each extracted with 0.1% aqueous acetic acid, and then TTX was quantified by liquid chromatography-mass spectrometry. The estimated amount of ingested TTX was calculated by multiplying the difference between the amounts of ovary tissue supplied and remaining by the toxin content (122–126 MU/g). Similar mean values of 5.1 MU/group/cycle in *P. globosa* and 5.3 MU/group/cycle in *R. festiva* were obtained. Toxin content (TTX amount per gram of tissue) and toxin amount (TTX amount per group) during the experimental period were 0.23–2.85 MU/g and 0.05–0.96 MU/group, respectively, in *P. globosa* viscera. Both values increased markedly from the 2nd cycle to the 6th cycle. In contrast, no such increase in toxin content/amount was observed throughout the experimental period in *P. globosa* muscle (<0.05–0.86 MU/g, <0.02–0.27 MU/group), *R. festiva* viscera (<0.05–0.8 MU/g, <0.02–0.33 MU/group), and *R. festiva* muscle (<0.05–0.81 MU/g, <0.02–0.23 MU/group). The remaining ratio of TTX (percentage of total toxin amount [sum of the toxin amount of viscera and muscle] to estimated TTX ingestion amount) was less than 4% in *P. globosa*, and less than 2% in *R. festiva* after the 4th cycle, suggesting that the possibility that these two species would accumulate TTX at levels high enough to raise food hygiene issues is low.

* 連絡先 arakawa@nagasaki-u.ac.jp

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

² 長崎大学大学院生産科学研究科: 〒852-8521 長崎県長崎市
文教町1-14

³ 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 沖縄県水産海洋技術センター: 〒901-0354 沖縄県糸満市
喜屋武1528

(Received January 20, 2014)

Key words: 腐肉食性巻貝 scavenging marine snail; フグ毒 pufferfish toxin; テトロドトキシン tetrodotoxin; 給餌試験 feeding experiment; コブムシロ *Pliarcularia globosa*; アラムシロ *Reticunassa festiva*

緒 言

ムシロガイ科やマクラガイ科に属する腐肉食性小型巻貝のうち数種は、フグ毒テトロドトキシン (TTX) を保有するが、なかには高毒化するものがあり、中国大陸や台湾で食中毒を招来してきた。すなわち、中国福建省や浙江省ではムシロガイ科オオハナムシロ *Zeuxis siquijorensis* の近縁種 *Zeuxis semiplicatus*^{1)~4)}、台湾ではムシロガイ科キンシバイ *Nassarius glans*、アラレガイ *Niotha clathrata*、オキナワハナムシロ *Zeuxis scalaris*、サメムシロ *Nassarius papillosus*、およびマクラガイ科ジウドウマクラ *Oliva miniacea* の喫食により多数の食中毒事例が発生している^{5)~13)}。日本でも、2007および2008年に、それぞれ長崎県と熊本県でキンシバイによる重篤なTTX中毒が発生しており、その後の調査では、中毒検体と同じ海域で採取された同種個体の半数以上で、筋肉から食品衛生上“強毒”もしくは“猛毒”に相当する毒性が検出されている^{14), 15)}。また、沖縄県沿岸産巻貝の毒性調査では、ムシロガイ科イボヨフバイ *Nassarius coronatus*、カゲロウヨフバイ *Zeuxis* sp., アワムシロ *Niotha albescens*、マクラガイ科サツマビナ *Oliva annulata* およびヘコミマクラ *Oliva concavospira*¹⁶⁾ からTTXが検出されており、これら腐肉食性小型巻貝の潜在的な高毒化リスクが危惧される。本研究では、当該リスク評価の前提となる腐肉食性巻貝のTTX蓄積能を評価するため、無毒のムシロガイ科巻貝2種を用いてフグ毒の給餌による毒化モデル実験を行った。

実験方法

巻貝試料

2011年6月に沖縄県西表島で採取したコブムシロ *Pliarcularia globosa* 75個体 (殻高 11.2 ± 1.10 mm, 殻径 8.93 ± 0.72 mm, 重量 0.83 ± 0.16 g) および2011年8月に広島県尾道市で採取したアラムシロ *Reticunassa festiva* 75個体 (殻高 14.4 ± 1.86 mm, 殻径 7.22 ± 0.64 mm, 重量 0.58 ± 0.12 g) を試料とした。いずれも採集後、生体の状態で長崎大学水産学部水産食品衛生学研究室に持ち帰り、給餌実験に用いた。

餌料用ナシフグ卵巣

TTX含有餌料には、凍結保存しておいた有明海産ナシフグ *Takifugu vermicularis* 1個体分の卵巣を用いた。左葉と右葉からそれぞれ一部分を採り、あらかじめ後述のLC-MS法でTTX含量を測定の上、残りを給餌実験に使用した。

本研究では、便宜上、LC-MS法で測定したTTX量をマウス単位 (MU; 1 MUは体重20 gのddY系雄マウスを30分間で死亡させる毒力と定義され、TTX 220 ngに相当す

る¹⁷⁾) に換算して表示する。給餌実験に用いた卵巣左右葉のTTX含量 (一部分を用いて測定した値) は、それぞれ122および126 MU/gで、11-oxoTTXは検出されなかった。卵巣内のTTXの分布は明らかではないが、左右葉ごとにほぼ均一と仮定し、以下、当該TTX含量をもって、それぞれ左右葉全体のTTX含量とみなした。

給餌実験

コブムシロおよびアラムシロをそれぞれ5個体ずつ15群に分け、うち3群は毒を投与せずに直接後述のLC-MS法でTTX量を測定し、残りの12群を以下の毒化モデル実験に用いた。すなわち、自然海水を入れたプラスチックケース (80×70×40 mm) に各群を収容し、通気した状態で、有毒ナシフグ卵巣からかき取った断片0.1 g (12.2または12.6 MU) を1日間給餌した。給餌期間終了時に飼育海水 (約100 mL) を回収し、メンブレンフィルター (C020A047A, ADVANTEC) でろ過後、フィルター上の残餌をスパーテルで注意深く採取し、重量を測定した。試料巻貝については、新たな自然海水にて4日間通気しながら無給餌で飼育した。給餌開始から、無給餌期間終了時に再度飼育海水を新鮮海水と交換するまでを1サイクルとし、これを計8サイクル (40日間) 繰り返した。この間、2サイクル (10日間) ごとに3群ずつ取り上げ、内臓と筋肉に含まれるTTX量を測定した。また、コブムシロについては、無給餌期間の飼育海水 (約100 mL) を回収し、活性炭 (10 g) に添加してTTXをいったん吸着させ、水洗後、吸着したTTXを1%酢酸含有20%エタノール (100 mL) で溶出して、LC-MS法で定量した。

TTXの定量

各群の内臓と筋肉をそれぞれ合一し、食品衛生検査指針理化学編のフグ毒検査法¹⁷⁾ に準じて毒の抽出を行った。抽出液は関東化学 (株) 製のHLC-DISK 13水系メンブレンフィルター (0.45 μm) でろ過後、ZMD2000質量分析計を搭載したAlliance 2690 HPLCシステム (Waters社製) を用い、既報の方法¹⁸⁾ に準拠してLC-MS分析を行った。カラムに関東化学社製のMightysil RP-18 GP (2.0×250 mm, 5 μm)、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 (移動相に用いた試薬はいずれも和光純薬工業 (株) 製)。デソルベション温度350℃、ソースブロック温度120℃、コーン電圧50 Vに設定し、イオン化法はESIポジティブモードで、プロトン付加分子 $[M+H]^+$ の m/z (TTX: 320, 11-oxoTTX: 336) をモニタリングし、MassLynxTM オペレーションシステムにて解析した。標準物質として、和光純薬工業 (株) 製のTTX (生化学用) を用いた。

結果および考察

推定TTX摂取量

コブムシロとアラムシロの摂餌量を直接測定することは困難であったため、給餌量 (0.1 g) と給餌期間終了時の残餌量の差をもって推定摂餌量とし、これに毒量 (122または126 MU/g) を乗じた値を推定TTX摂取量とした。コブムシロの場合、推定TTX摂取量 (積算値) の平均値は、2サイクル目では1.2 MU/群と低かったが、4サイクル目では29.6 MU/群と大きく増加し、8サイクル目では49.6 MU/群に達した (Fig. 1)。一方、アラムシロでは2~8サイクル目まで漸増し、8サイクル目では43.0 MU/群に達した。1サイクルあたりの平均値を求めると、コブムシロで5.1 MU/群/サイクル、アラムシロで5.3 MU/群/サイクルとなり、2種の巻貝は同程度のTTXを摂取したものと推定された。

組織別TTX量の推移

コブムシロ、アラムシロ共に毒を投与せず、給餌前に直接LC-MS分析に付した群からは、TTXは全く検出されなかった (検出限界0.05 MU/g)。

一方、TTX含有餌料を投与した群については、その多くで内臓と筋肉の両者からTTXが検出された。両種の巻貝における毒含量 (組織1 gあたりのTTX量) の推移をFig. 2に示す。コブムシロの場合、内臓の毒含量は、2サイクル目から6サイクル目にかけて顕著に増加し、6~8

サイクル目では、6群中5群で2 MU/gを超えたのに対し、筋肉の毒含量は、4サイクル目から6サイクル目にかけて若干上昇したものの、いずれの群も1 MU/gを超えることはなかった。他方、アラムシロの場合、筋肉のみならず内臓でも、コブムシロの筋肉同様、毒含量の顕著な増加は見られなかった。実験期間中の最高毒含量は、コブムシロで2.85 MU/g (内臓)、アラムシロで0.81 MU/g (筋肉) で、小型巻貝バイ *Babylonia japonica* (15~53 MU/g)¹⁹⁾、アレガイ *Niotha clathrata* (4~35 MU/g)²⁰⁾、イボヨフバイ (5.64~11.1 MU/g)、カゲロウヨフバイ (12.7 MU/g)、アラムシロ (5.08 MU/g)、サツマビナ (10.8 MU/g) およびヘコミマクラ (6.65 MU/g)¹⁶⁾ 天然個体の毒力のいずれも下回った。

次に、両種における毒量 (1群あたりのTTX量) の推移をFig. 3に示す。コブムシロの場合、内臓の毒量は2サイクル目から6サイクル目にかけて顕著に上昇し、6サイクル目に0.9 MU/群前後に達した後、8サイクル目に若干減少した。一方、筋肉では、4サイクル目になって初めて毒の移行が見られ、以後その量は若干増加したが、総毒量 (内臓と筋肉の毒量の和) に占める割合はおおむね2割程度にとどまった。他方、アラムシロの場合、内臓の毒量に顕著な増加は見られず、実験期間を通して0.2~0.3 MU/群程度であった。筋肉では、2サイクル目に毒の移行が見

Fig. 1. Change in the estimated amount of TTX ingested during the experimental period
Data are shown as the mean (column) and standard deviation (error bar) of every 2 cycles.

Fig. 2. Change in the toxin content (TTX amount per gram tissue) of viscera (closed circle) and muscle (open circle) during the experimental period.

Data are shown as individual values (closed/open circles) and the mean of every 2 cycles (horizontal bars).

Fig. 3. Change in the toxin amount (TTX amount per group) during the experimental period. Bars indicate values in viscera (closed column) and muscle (open column).

Fig. 4. Change in the remaining ratio of TTX during the experimental period.

Data points are shown as circles and the mean (dots joined by the solid line) of every 2 cycles.

られ、その量は6~8サイクル目に若干増加して内臓の毒量と同程度（総毒量に占める割合が5割前後）となった。コブムシロとアラムシロは、筋肉に少量の毒が移行する点では類似するが、内臓の毒の保持能力には若干差があり、コブムシロの方が内臓に毒が残しやすいものと推察された。小型巻貝のうち、キンシバイ^{10), 14), 16)}、マサメダマ *Natica lineata*²¹⁾、およびヘコミマクラ¹⁶⁾では、筋肉に毒が偏在する個体も見られるが、少なくともコブムシロでは、そのような個体が出現する可能性は低いものと推察される。

TTX残存率

TTX残存率（推定TTX摂取量（積算値）に対する総毒量の割合）の推移をFig. 4に示す。コブムシロ、アラムシロともに2サイクル目では10%を超える群も見られたが、それ以降はコブムシロで4%未満、アラムシロで2%未満と低い値を示した。時に高毒化するボウシュウボラ *Charonia sauliae*²²⁾の無毒個体に対し、有毒トゲモミジガイ *Astropecten polyacanthus*を給餌した毒化モデル実験²³⁾では、中腸腺の毒蓄積率（ここでのTTX残存率と同意）は18~91%であったと報告されている。これらの値は、コブムシロ、アラムシロのTTX残存率よりもはるかに高い。一方、前述のとおり、コブムシロ、アラムシロともに毒を投与しなかった群からTTXは全く検出されなかった。また、コブムシロについては既報¹⁶⁾でも無毒（10 MU/g未満）とされていることから、これら2種の巻貝に、ボウシュウボラのような

な高濃度のTTXを蓄積する能力はないものと推察される。

コブムシロのTTX排出について検討するため、無給餌期間中の飼育海水につき、活性炭処理後にLC-MS分析を行ったところ、ほとんどの群でTTXが検出されたものの、いずれも2 MU未満と微量であった。今回、給餌から毒の排出まで24時間以上かかることを想定していたため、給餌期間中の飼育海水については分析を行わなかったが、今後、同様の給餌実験を行う場合は、餌料からの漏出や海水中での分解を含め、この期間のTTXの動態について十分に検討する必要がある。一方、これまでに数種の巻貝からTTX誘導体が検出されており^{14), 24)}、貝体内における毒成分の変換についても考慮しなければならない。なかでも、キンシバイで検出例のある11-oxoTTXは、TTXより毒性が強いため¹⁴⁾、TTXもしくは無毒/弱毒誘導体からの変換について特段の注意を払う必要がある。本研究では、LC-MSで少なくとも11-oxoTTX (m/z 336 ($[M+H]^+$))の保持時間¹⁴⁾付近にピークは認められず、当該変換はなかったものと推察される。しかしながら、ほかの誘導体の分析は行っておらず、貝体内においてTTXが別の誘導体に変換、もしくは分解された可能性は否定できない。巻貝のTTX代謝機構については今後の検討課題である。

まとめ

腐肉食性小型巻貝であるコブムシロとアラムシロに

TTX含有餌料を投与すると、ともに内臓と筋肉が僅かに毒化するが、内臓のTTX保持能力には種間で若干差があり、コブムシロのほうが、毒が残存しやすいことが示された。しかしながら、コブムシロでも最高毒含量は3 MU/g程度で、かつTTX残存率は4%未満と非常に低く、自然界においてこれら2種が食品衛生上問題となるほど高毒化する可能性は低いものと推察された。

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金に基づく研究成果の一部であり、関係各位に深謝する。また試料の採集に多大なご尽力を賜った吉村 浩名誉教授（長崎大学水産学部附属練習船長崎丸 前船長）をはじめ乗組員に謝意を表する。

文 献

- Sui, L. M., Chen, K., Hwang, P. A., Hwang, D. F. Identification of tetrodotoxin in marine gastropods implicated in food poisoning. *J. Nat. Toxins*, **11**, 213–220 (2002).
- Shui, L. M., Chen, K., Wang, J. Y., Mei, H. Z., Wang, A. Z., Lu, Y. H., Hwang, D. F. Tetrodotoxin-associated snail poisoning in Zhoushan: A 25-year retrospective analysis. *J. Food Prot.*, **66**, 110–114 (2003).
- 高谷智裕, 荒川 修, 野口玉雄. 中国で頻発している小型巻貝による食中毒について. *食衛誌*, **46**, J-208–J-209 (2005).
- Noguchi, T., Onuki, K., Arakawa, O. Tetrodotoxin poisoning due to pufferfish and gastropods, and their intoxication mechanism. *International Scholarly Research Network*, **2011**, 1–10 (2011).
- Hwang, D. F., Cheng, C. A., Tsai, H. T., Shih, D. Y. C., Ko, H. C., Yang, R. Z., Jeng, S. S. Identification of tetrodotoxin and paralytic shellfish toxins in marine gastropods implicated in food poisoning. *Fish. Sci.*, **61**, 675–679 (1995).
- Hwang, D. F., Shiu, Y. C., Hwang, P. A., Lu, Y. H. Tetrodotoxin in gastropods (snails) implicated in food poisoning in northern Taiwan. *J. Food Prot.*, **65**, 1341–1344 (2002).
- Yong, C. C., Han, K. C., Lin, T. J., Tsai, W. J., Deng, J. F. An outbreak of tetrodotoxin poisoning following gastropod mollusc consumption. *Human and Experimental Toxicology*, **14**, 446–450 (1995).
- Shiu, Y. C., Lu, Y. H., Tsai, Y., Chen, S. K., Hwang, D. F. Occurrence of tetrodotoxin in the causative gastropod *Polinices didyma* and another gastropod *Natica lineata* collected from western Taiwan. *J. Food Drug Analysis*, **11**, 159–163 (2003).
- Hwang, P. A., Tsai, Y. H., Lu, Y. H., Hwang, D. F. Paralytic toxins in three new gastropod (Olividae) species implicated in food poisoning in southern Taiwan. *Toxicol.*, **41**, 529–533 (2003).
- Hwang, P. A., Tsai, Y. H., Deng, J. F., Cheng, C. A., Ho, P. H., Hwang, D. F. Identification of tetrodotoxin in a marine gastropod (*Nassarius glans*) responsible for human morbidity and mortality in Taiwan. *J. Food Prot.*, **68**, 1696–1701 (2005).
- Hwang, P. A., Tsai, Y. H., Lin, S. J., Hwang, D. F. The gastropods possessing TTX and/or PSP. *Food Reviews International*, **23**, 321–340 (2007).
- Liu, F. M., Fu, Y. M., Shih, D. Y. C. Occurrence of tetrodotoxin poisoning in *Nassarius papillosus* Alectrion and *Nassarius gruneri* Niotha. *J. Food Drug Analysis*, **12**, 189–192 (2004).
- Jen, H. C., Lin, S. J., Lin, S. Y., Huang, Y. W., Liao, I. C., Arakawa, O., Hwang, D. F. Occurrence of tetrodotoxin and paralytic shellfish poisons in a gastropod implicated in food poisoning in southern Taiwan. *Food Addit. Contam.*, **24**, 902–909 (2007).
- Taniyama, S., Isami, Y., Matsumoto, T., Nagashima, Y., Takatani, T., Arakawa, O. Toxicity and toxin profile of tetrodotoxin detected in the scavenging gastropod *Nassarius (Alectrion) glans* “kinshibai”. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **50**, 22–28 (2009).
- Arakawa, O., Shiomi, K. Marine gastropod toxins: tetramine and tetrodotoxin. *Food Sanitation Research*, **60**, 15–25 (2010).
- Taniyama, S., Takatani, T., Sorimachi, T., Sagara, T., Kubo, H., Oshiro, N., Ono, K., Xiao, N., Tachibana, K., Arakawa, O. Toxicity and toxin profile of scavenging and carnivorous gastropods from the coastal waters of Okinawa prefecture, Japan. *Food Hyg. Saf. Sci.*, **54**, 49–55 (2013).
- 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), 日本食品衛生学会, 2005, p.661–666.
- 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*. *Toxicol.*, **43**, 207–212 (2004).
- Noguchi, T., Maruyama, J., Ueda, Y., Hashimoto, K., Harada, T. Occurrence of tetrodotoxin in the Japanese ivory shell *Babylonia japonica*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 909–913 (1981).
- Jeon, J. K., Narita, H., Nara, M., Noguchi, T., Maruyama, J., Hashimoto, K. Occurrence of tetrodotoxin in a gastropod mollusk, “Araregai” *Niotha clathrata*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 2099–2102 (1984).
- Hwang, D. F., Chueh, C. H., Jeng, S. S. Occurrence of tetrodotoxin in the gastropod mollusk *Natica lineata* (Lined Moon Shell). *Toxicol.*, **28**, 21–27 (1990).
- Narita, H., Noguchi, T., Maruyama, J., Ueda, Y., Hashimoto, K., Watanabe, Y., Hida, K. Occurrence of tetrodotoxin in a trumpet shell, “Boshubora” *Charonia sauliae*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 935–941 (1981).
- Narita, H., Nara, M., Baba, K., Ohgami, H., Ai, T., Noguchi, T., Hashimoto, K. Effect of feeding a trumpet shell, *Charonia sauliae* with toxic starfish. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **25**, 251–255 (1984).
- Narita, H., Noguchi, T., Maruyama, J., Nara, M., Hashimoto, K. Occurrence of a tetrodotoxin-associated substance in a gastropod, “Hanamushirogai” *Zeuxis siquijorensis*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 85–88 (1984).