

第4章 バングラデシュ産淡水フグによるアオブダイ中毒様食中毒の原因物質

近年、バングラデシュにおいて、淡水フグによる一般的なフグ中毒とは若干異なる特異な中毒が報告されている (Mahmud ら, 2000)。本中毒事例では、患者に一般的なフグ中毒の症状以外に筋肉痛やミオグロビン尿症、血清 CPK 値の上昇がみられ、致死時間は数十時間とかなり長い事例が多く、アオブダイ中毒に酷似している。これまで、フグ中毒は TTX が原因毒とされてきたが、最近、主成分として PSP を保有する海産フグ (Sato ら, 2000) や淡水フグが報告され (Kungsuwan ら, 1997; Zaman ら, 1997, 1998)、フグ中毒が TTX 以外の毒に起因して発生することが示唆された。

バングラデシュにおけるこの種による中毒の公式記録は Mahmud ら (2000) の報告しかないものの、食糧事情に乏しい地方の村落ではこの淡水フグの喫食による中毒が頻発し、多数の死者が出ているといわれており、食品衛生上、大きな問題となっているため、原因物質の解明が急務となっている。

そこで、その原因物質の解明の一助として、バングラデシュ産淡水フグの毒性ならびに毒の性状について検討した。

第1節 淡水フグ毒のマウスに対する致死活性

本節では、バングラデシュ産淡水フグについて、マウスに対する致死活性を検討した。

試料および方法

試料

試料は、1999年5月にバングラデシュのキショルゴンジュ (Fig. 26) で採捕された淡水フグ *Tetraodon* sp. (Fig. 27) を用いた。試料は、入手後、直ちに凍結し、長崎大学水産学部水産食品衛生学研究室へ送付し、試験液の調製に供するまで -25°C で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

1. 急性毒を対象とした検討

試験液の調製

試験液の調製は、食品衛生検査指針理化学編フグ毒および麻痺性貝毒検査法（厚生省環境衛生局監修，1991a, b）に準拠した。

試料は、皮、筋肉、肝臓、生殖腺、腸の5部位に腑分け後、部位別に数個体を合一し、それぞれに0.1 M 塩酸を加えて沸騰水浴中で5分間加熱抽出し、氷水中で急冷後、5,000 g で10分間遠心分離し、得られた上清を試験液とした。

マウス毒性試験

試験には ddY 系の雄で体重が 19 - 21 g のマウスを用いた。1 投与量に対しては、1 群 3 尾のマウスを用い、試験液 1 ml をマウスの腹腔内に投与し、特有の症状である歩行困難、運動不能後横臥、呼吸困難等を経て死に至るまでの時間を秒単位で計測した。毒量の算出には、TTX と PSP の致死時間-MU 換算表を用いた。なお、TTX の 1 MU は、体重 20 g のマウス 1 匹を 30 分間で死亡させる毒量、PSP の 1 MU は体重 20 g のマウス 1 匹を 15 分間で死亡させる毒量を示す。

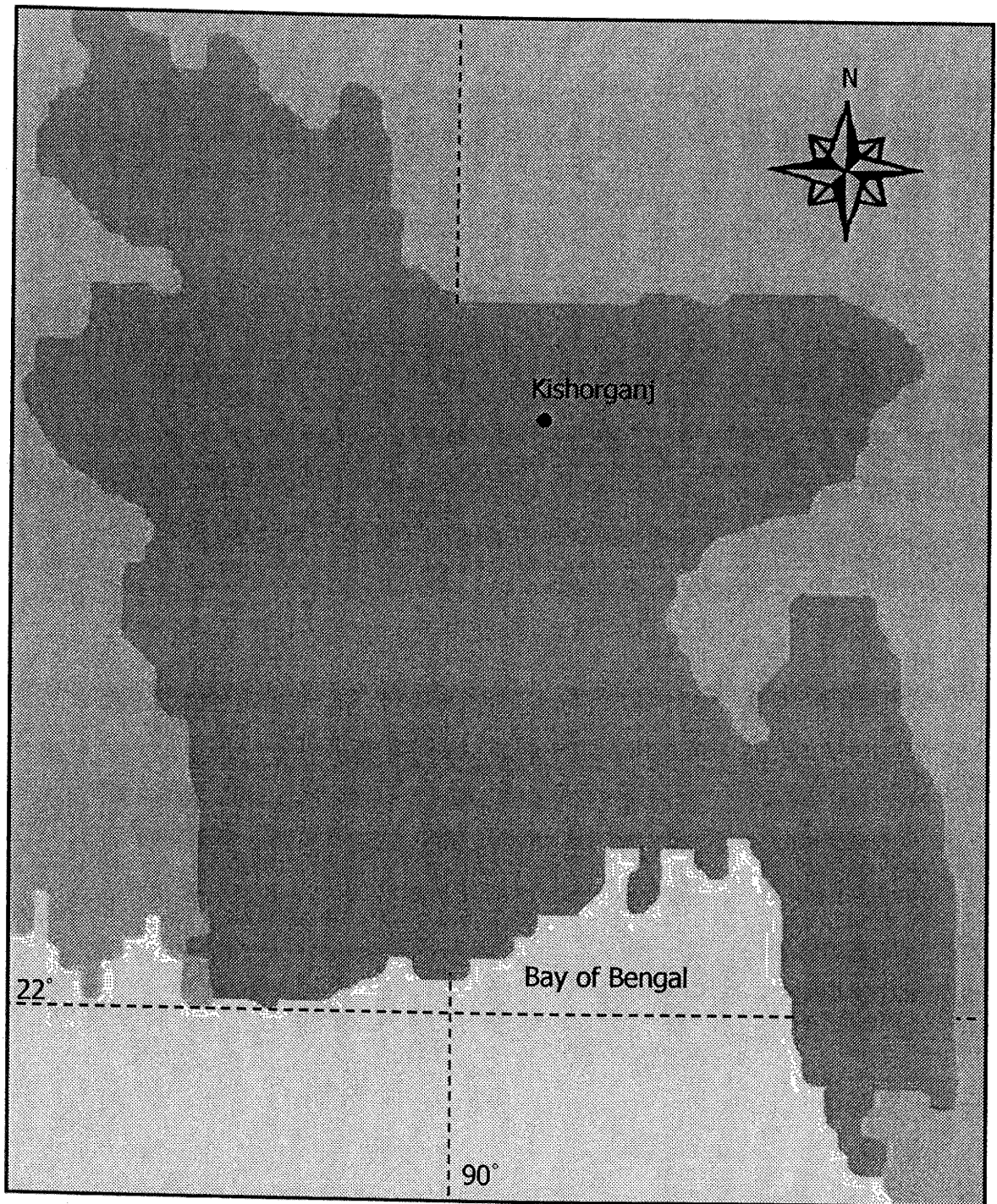


Fig. 26. Map of Bangladesh showing Kishorganj (•) where *Tetraodon* sp. was harvested.

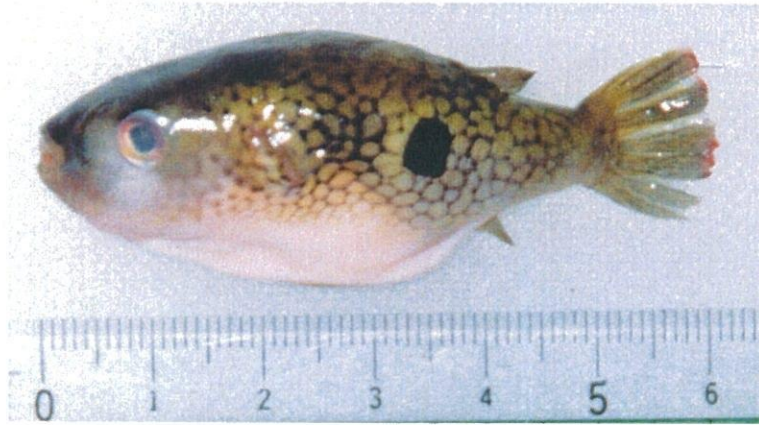


Fig. 27. *Tetraodon* sp.

2. 遅延性毒を対象とした検討

試験液の調製

試験液の調製は、本章第1節の試験液の調製法に準拠した。

試料は数十個体を合一し、3倍量の塩酸酸性80%エタノール(pH 2.0)を加えて5分間ホモジナイズし、5,000 gで15分間遠心分離して上清を抽出液とした。残渣については、同様の操作を2回繰り返して上清を合一した。抽出液を減圧濃縮後、同量のジエチルエーテルで2回脱脂して水画分を蒸留水:1-ブタノール(1:1)による溶媒分画に付し、得られた1-ブタノール画分を試験液とした。

マウス毒性試験

本試験は、第2章第1節のマウス毒性試験法と同様に行った。

結果および考察

淡水フグの部位別毒性を Table 12 に示す。

皮に 3.8 - 5.9 MU/g, 筋肉に 1.7 - 2.3 MU/g, 肝臓に 2.0 - 2.5 MU/g, 生殖腺に 1.9 - 4.9 MU/g, 腸に 2.1 - 4.0 MU/g (いずれも PSP 換算) と全ての部位にマウスに対して急性致死活性を示す毒がみられた。それらのマウスは、投与後は暫く静止していたが、急に歩行困難となり、最後に激しい痙攣を呈して反転し、死亡した。他方、1-ブタノール画分には、マウスを24時間程度で死亡させる遅延性致死活性を示す毒 0.5 MU/g が認められた。本毒を投与したマウスは3時間程経過すると徐々に呼吸困難や痙攣を呈したのち、嗜眠状態となり、そのまま死亡した。従って、本種はマウスに対して急性ならびに遅延性致死活性を示す2種類の毒性因子が含まれていると考えられた。

以上、本節では、バングラデシュ産淡水フグはマウスに対する2種類の致死活性因子を保有していることが推察された。

Table 12. Anatomical distribution of toxicity of freshwater puffer in Bangladesh

Specimens tested	Mean body weight (g)	Mean body length (cm)	Toxicity (MU/g)				
			Skin	Muscle	Liver	Gonad	Intestine
8	33±9.3	11±1.3	5.9	2.3	2.5	4.9	4.0
5	20±3.2	8.1±0.5	3.8	1.7	2.5	1.9	2.1
11	11±5.0	6.7±1.5	4.7	1.9	2.0	2.8	2.1

第2節 急性致死活性因子の組成

本節では、本章第1節で得られた急性致死活性因子の組成について、HPLC分析による検討を行なった。

試料および方法

試料

本章第1節2の試験液の調製の際に得られた水面分を試料とし、試験に供するまで -25°C で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

試験液の調製

水面分を活性炭処理およびBio-Gel P-2 (Bio-Rad Laboratories) カラムクロマトグラフィーで部分精製して試験液とし、ゴニオトキシン (gonyautoxin: GTX) 群, サキシトキシン (saxitoxin: STX) 群, TTX 群を対象とする HPLC-蛍光分析に供した。

HPLC 分析

本分析は、既報の方法 (Arakawa ら, 1994) に基づいて、Waters LC Module-1 を用いた逆相イオン対カラムクロマトグラフィーのシステムで行った (Table 13)。

カラムには LiChroCART Superspher RP-18(e) ($\phi 4 \times 250$ mm, Merck) を用いた。移動相には、GTX 群に 2 mM ヘプタンスルホン酸を含む 10 mM リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.3), STX 群に 2 mM ヘプタンスルホン酸を含む 4% アセトニトリル-30 mM リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.3), TTX 群に 2 mM ヘプタンスルホン酸を含む 10 mM リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.0) を用い、その流速を 0.8 ml/min とした。

また、毒成分の蛍光化およびそれを促進させるため、PSP 分析の際に (a) 50 mM 過ヨウ素酸, (b) 0.2 M 水酸化カリウム-1 mM ギ酸アンモニウム-50%ホルムアミド混合液, TTX 分析の際に 4 M 水酸化ナトリウムを反応液とした。

PSP 分析は、(a) と (b) を 0.4 ml/min ずつ流し、カラム通過後の緩衝液に混合させた。

Table 13. Conditions of HPLC analysis

HPLC system : Waters LC-Module 1

Column : LiChroCART Superspher RP-18(e) (ϕ 4×250 mm, Merck)

Column temperature : 30°C

Mobile phase : Flow rate 0.8 ml/min

PSP ; (I) GTXs: 2 mM heptanesulfonic acid in 10 mM ammonium phosphate buffer (pH 7.3)

(II) STXs: 2 mM heptanesulfonic acid in 4% acetonitrile-30mM ammonium phosphate buffer (pH 7.3)

TTX ; 2 mM heptanesulfonic acid in 10 mM ammonium phosphate buffer (pH 7.0)

Reagents : PSP; Flow rate 0.4 ml/min

(A) 50 mM periodic acid

(B) 0.2 M KOH containing 1 M ammonium formate-50% formamide

TTX ; Flow rate 0.8 ml/min
4 M NaOH

Reactor : TOYOSODA RE-8000 ; (PSP) 65°C, 1.5 min

(TTX) 110°C, 2 min

Detector : TOYOSODA FS-8020 fluorescence detector

PSP; Emission: 392 nm; Excitation: 336 nm

TTX; Emission: 505 nm; Excitation: 382 nm

恒温槽内において、65°Cで1.5分間加熱して蛍光化させ、その強度を蛍光検出器（励起波長：336 nm，測定波長：392 nm）で測定した。TTX分析は、(c)を0.8 ml/minで流し、カラム通過後の緩衝液に混合させた。恒温槽内において、110°Cで2分間加熱して蛍光化させ、その強度を蛍光検出器（励起波長：382 nm，測定波長：505 nm）で測定した。

結果および考察

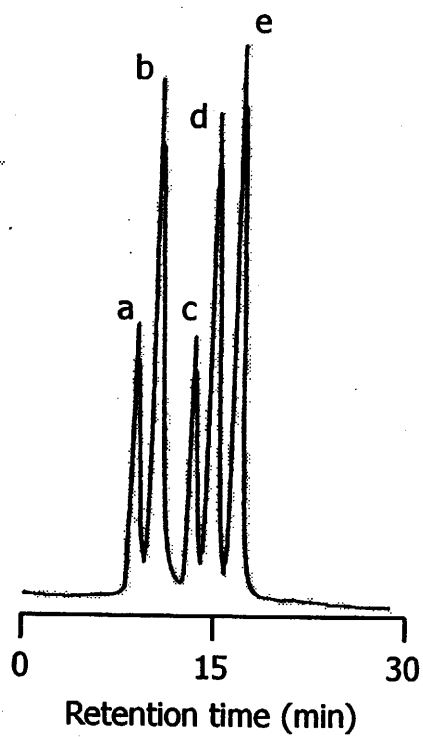
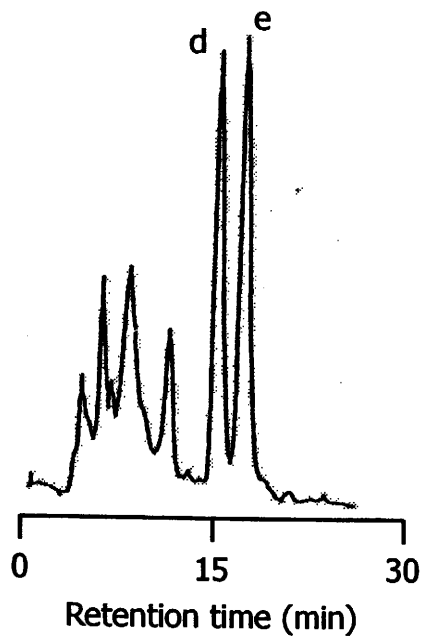
STX群を対象としたHPLC分析において、デカルバモイルSTX(decarbamoylSTX: dcSTX)およびSTXとそれぞれ保持時間が一致するピークが得られた (Fig. 28)。しかしながら、GTX群ならびにTTX群を対象とした分析では、既知毒成分と一致する保持時間にピークは確認されなかった。

従って、本章第1節において、マウスに対して急性致死活性を示した毒性因子は、dcSTXとSTXを主成分とするPSPであることが示された。

近年、タイ産淡水フグ *T. leiurus complex* および *T. suvatii* からSTX, neoSTX, dcSTXを主成分とするPSPが検出され、前者の淡水フグは最高880 MU/gの毒力を肝臓に保有していたことが報告されている (Kungsuwannら, 1997)。また、Zamanら (1997) によると本種以外のバングラデシュ産淡水フグ *T. patoca* および *T. cutcutia* がSTXとGTX_{2,3}を主成分とするPSPを保有し、特に皮の毒力が高く、最高で20 MU/gを示した。

他方、バングラデシュで発生している淡水フグ中毒は患者の症状等から (Mahmudら, 2000), その原因物質のひとつにPSPが疑われた。しかしながら、PSPの最少致死量は3,000 MU/gであることを考慮すると、本研究で得られたその毒力は1.7 - 5.9 MU/g (本章第1節) とかなり低く、それだけで死者を含む中毒が発生することは考え難い。すなわち、本中毒はPSPに加えて、他の毒因子が深く関与していることが推察された。

以上、本節では、バングラデシュ産淡水フグがdcSTXおよびSTXを主成分とする低い毒力のPSPを保有していることを示した。



**Fig. 28. HPLC of freshwater puffer toxin (upper) and authentic STXs (lower).
a: hyneoSTX; b: neoSTX; c: hySTX; d: dcSTX; e: STX**

第3節 遅延性致死活性因子のマウスおよびヒト赤血球に対する溶血活性

本節では、本章第1節で得られた遅延性致死活性因子について、マウスおよびヒト赤血球に対する溶血活性の検討を行なった。

試料および方法

試料

試料は、本章第1節で得られた1-ブタノール画分を用いて、試験液の調製に供するまで -25°C で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

溶血活性試験

本試験は、第2章第3節の溶血活性試験法と同様に行った。

結果および考察

1-ブタノール画分は、マウス赤血球に対してインキュベート1時間において全く溶血を起こさなかったのに対し、試料濃度 10^{-2} g/mlにおいてインキュベート4時間で $4.89 \pm 0.861\%$ 、6時間で $22.5 \pm 0.988\%$ 、と上昇し、8時間では $33.3 \pm 4.11\%$ を示し、試料濃度 10^{-1} g/mlではいずれのインキュベート時間においても90%以上の遅延性溶血活性を示した(Fig. 29)。さらに、試料濃度 10^{-2} および 10^{-1} g/mlにおける本活性は、抗PTX抗体により抑制された(Fig. 30)。また、本画分は、ヒト赤血球に対しても試料濃度 10^{-1} g/mlにおいて遅延性溶血活性 $30.6 \pm 1.26\%$ を示し、本活性はウバインにより $13.2 \pm 0.958\%$ にまで抑制された(Fig. 31)。これらの諸性状は、第2章第1および3節で述べたアオブダイ毒ならびにPTXと酷似していた。

従って、本章第1節でマウスに対して遅延性致死活性を示した毒因子はPTX様物質であることが示された。

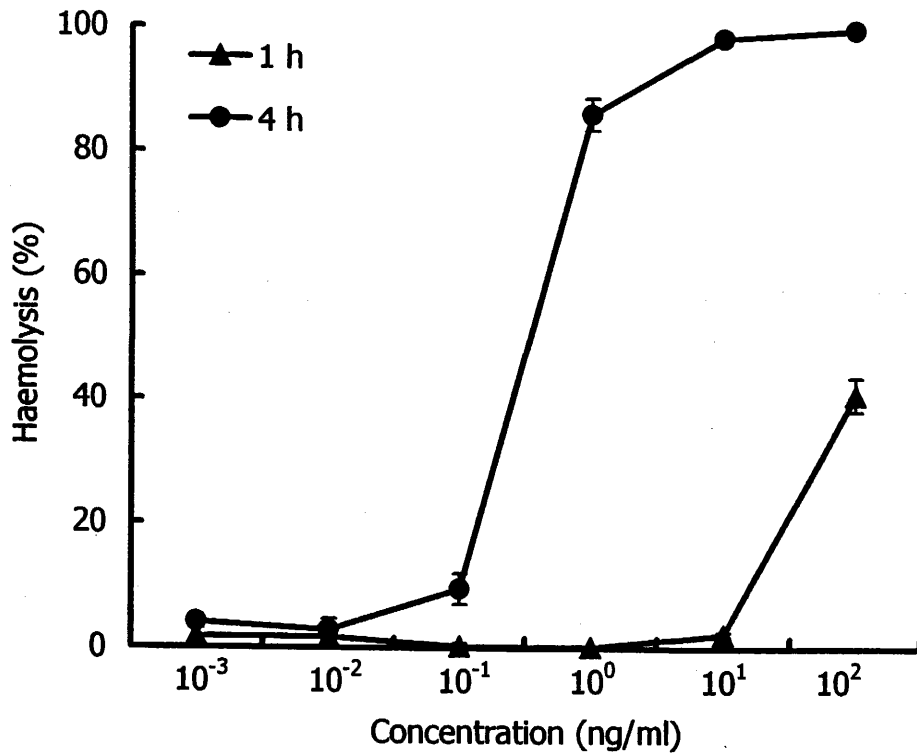
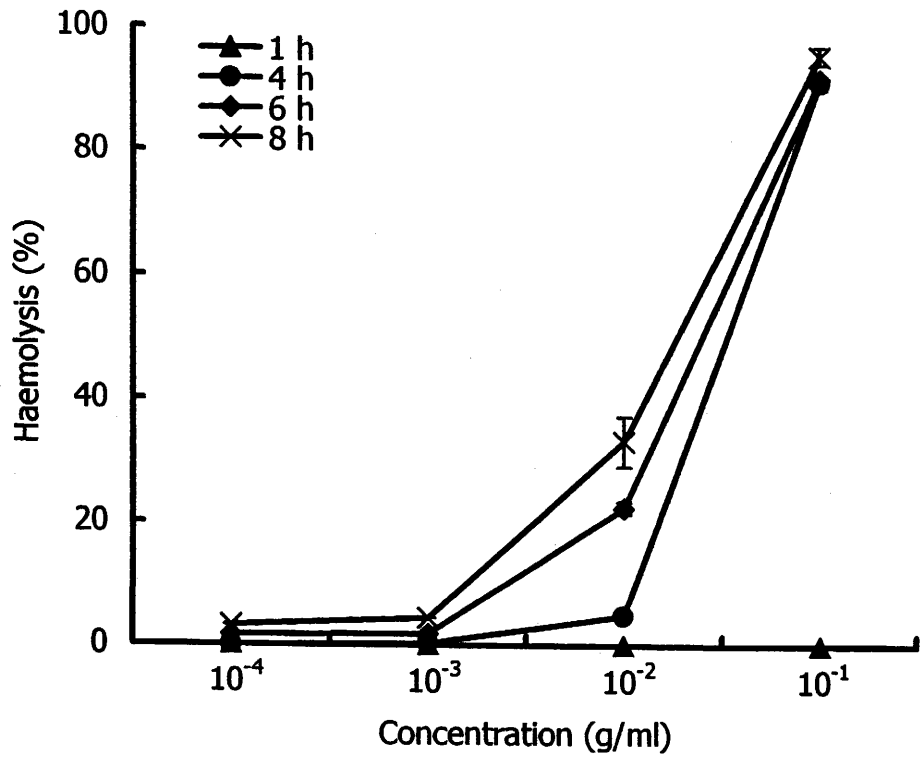


Fig. 29. Delayed haemolysis by the toxin in the 1-butanol layer from *Tetraodon* sp. (upper) and PTX standard (lower).

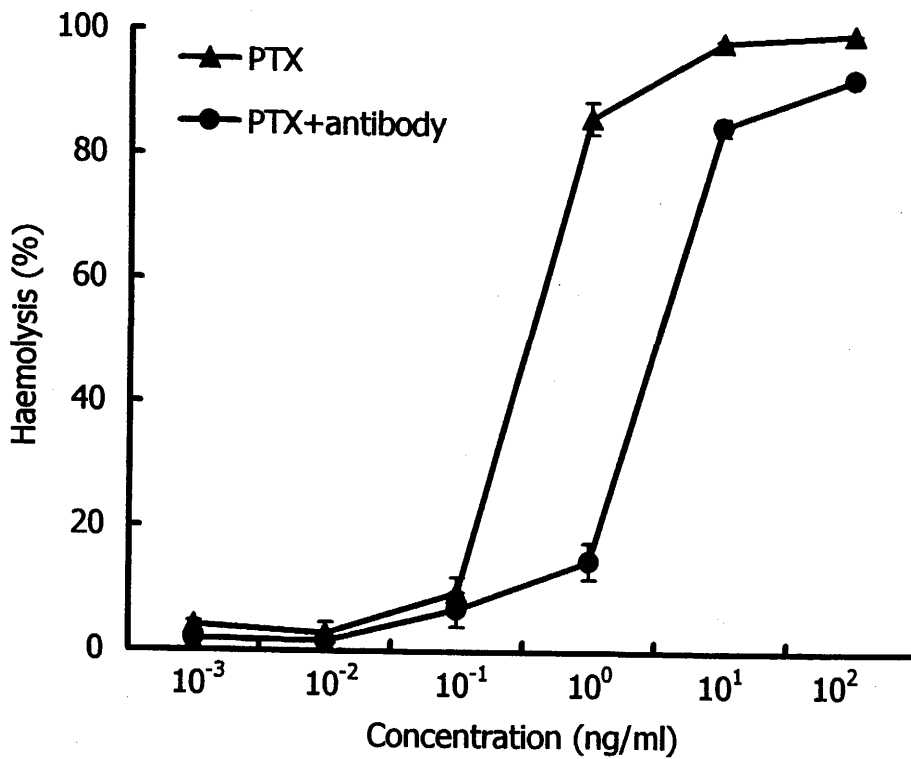
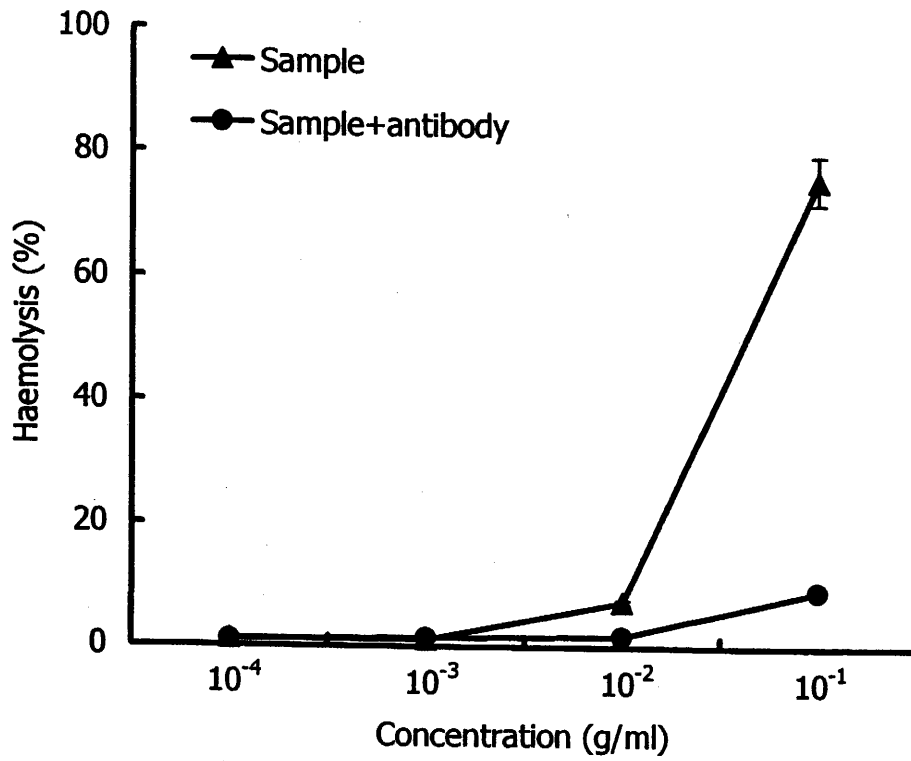


Fig. 30. Suppression of haemolytic activity of the toxin in the 1-butanol layer from *Tetraodon* sp. (upper) and PTX standard (lower) by anti-PTX antibody.

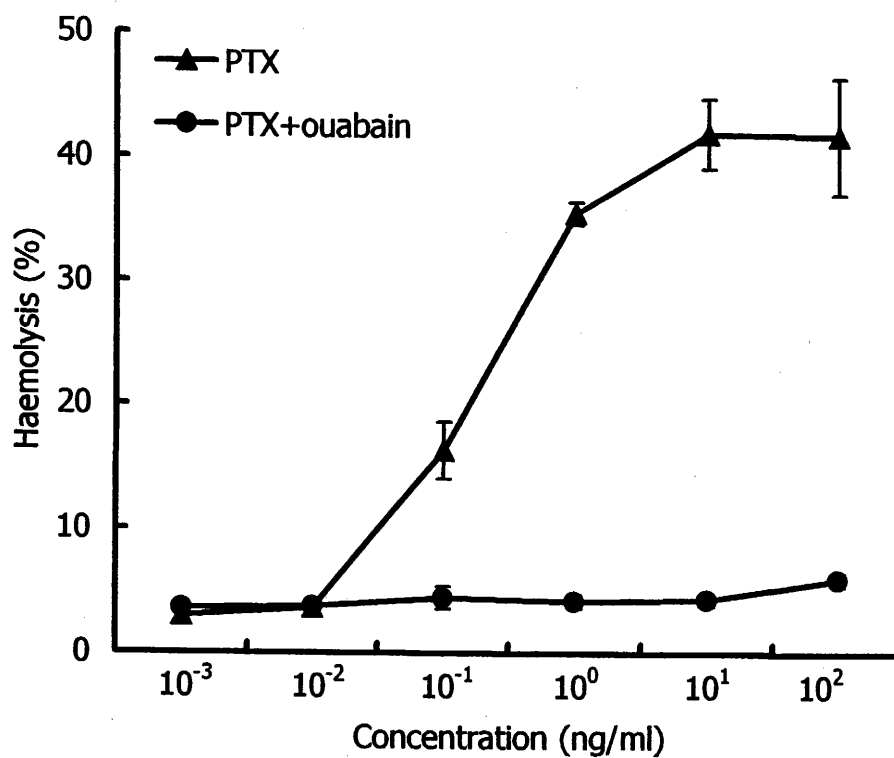
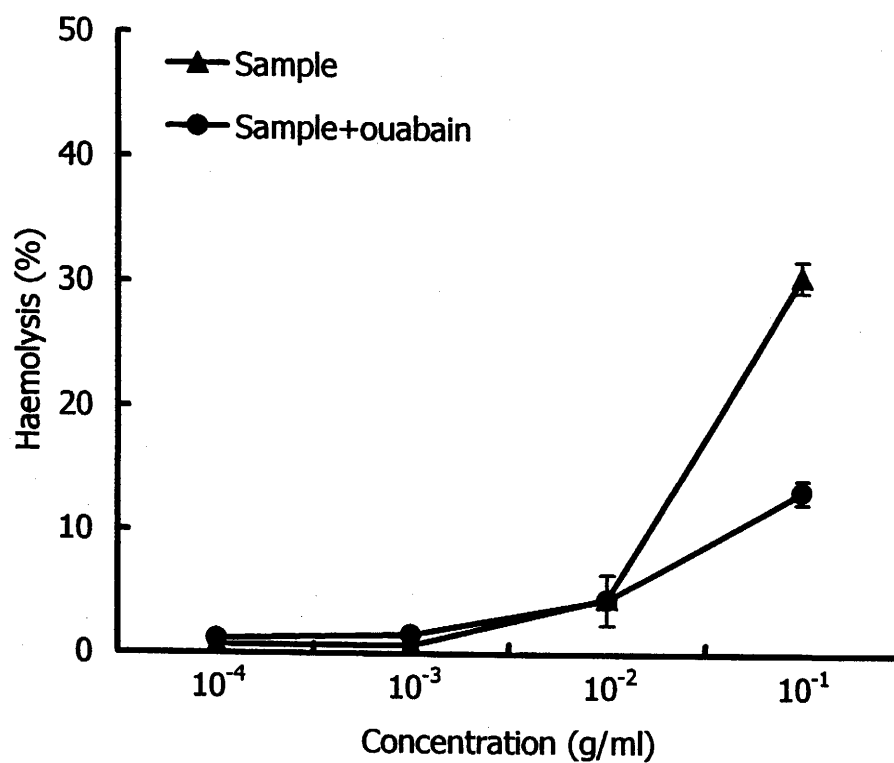


Fig. 31. Suppression of haemolytic activity of the toxin in the 1-butanol layer from *Tetraodon* sp. (upper) and PTX standard (lower) by ouabain.

バングラデシュで発生している淡水フグ中毒の潜伏時間は30分から数時間で、その患者らは唇のしびれ、頭痛、吐気、嘔吐、麻痺、呼吸困難など一般的なフグ中毒と同様の症状を呈しているが (Mahmudら, 2000)、これらは本章第2節で述べたようにPSPによるものと考えられる。しかしながら、それら以外の筋肉痛やミオグロビン尿症といった症状、患者の血清CPK値の上昇、致死時間や回復時間の長さはPSPによるものではなく、本研究で得られたPTX様物質に起因すると考えられた。さらに、後者の毒性因子によると考えられる諸症状等がより重度であったことから、本中毒の原因物質はPTX様物質によるところが大きいと示唆された。

以上、本節では、バングラデシュ産淡水フグ *Tetraodon sp.* がPSPとともにPTX様物質を同時に保有していること示すとともに、本種による中毒の主たる原因物質は後者の物質であると推察した。