

フグ毒存在下においてフグ腸内細菌が産生する代謝産物機能解明の試み —有毒および無毒トラフグ *Takifugu rubripes* における腸内容物の比較—

日比慶久^{*1}・伊藤 優^{*1}・早瀬善正^{*2}・斎藤俊郎^{*1}

An attempt to elucidate the role of metabolic function of the digestion system on diet preference of puffers:
Comparison of intestinal contents in toxic and non-toxic puffer (*Takifugu rubripes*)

Yoshihisa HIBI, Yuu ITO, Yoshimasa HAYASE and Toshio SAITO

Abstract

This investigation is aimed at comparing the gut contents of toxic and non-toxic puffer fish (*Takifugu rubripes*) using 81 toxic and 119 non-toxic specimens. Diet composition was investigated in the intestine of toxic (n=45) and non-toxic (n=70) specimens respectively. The results of gut content analysis showed that out of 45 toxic puffers, 25 exclusively fed on fish, 13 exclusively fed on benthic organisms and 7 had mixed food contents belonging to the mixed categories. In case of non-toxic puffers, out of 70 puffers, 62 exclusively fed on fish, 1 exclusively fed on benthic organisms and 7 had mixed food contents belonging to the mixed categories. Significant difference was observed between the diet composition of the toxic and non-toxic puffers. It is worth mentioning that the benthic animals were predominant diet of toxic puffers taking into account the number of the specimens fed on the diet belonging to both benthic and the mixed category. On the contrary, the diet of non-toxic puffers were predominantly belonged to the fish category. Results from the present study clearly indicate diet preference of the toxic puffers for benthic organisms, which are commonly known to be the source of tetrodotoxin (TTX).

緒言

1964年、カルフォルニアイモリ *Tarica torosa* 特有の毒とされてきたタリカトキシンがフグ毒であると明らかにされた (Mosher *et al.*, 1964). これはフグ以外の動物がフグ毒を保有していることが初めて明らかとなった報告である。これを契機に、硬骨魚類のツムギハゼ *Yongeichthys criniger* (Noguchi *et al.*, 1973), 両生類の *Atelopus* 属のカエル (Kim *et al.*, 1975), 軟体動物のヒヨモモンダコ *Hapalochlaena fasciata* (Sheumack *et al.*, 1978), ボウシュウボラ *Charonia sauliae* (Narita *et al.*, 1981), ハナムシロガイ *Zeuxis castus* (Narita *et al.*, 1984), 棘皮動物のトゲモミジガイ *Astropecten polyacanthus* (Noguchi *et al.*, 1982), 節足動物のスベスベマンジュウガニ *Atergatis floridus* (Noguchi *et al.*, 1983), 扁形動物のオオツノヒラムシ

Planocera multitentaculata (Miyazawa *et al.*, 1986), 紐形動物のミドリヒモムシ *Lineus fuscoviridis* (Miyazawa *et al.*, 1988) 等様々な動物からフグ毒が検出された。さらに、1986年には *Vibrio* 属の細菌にフグ毒産生能があると明らかにされた (Noguchi *et al.*, 1986). このように1970年代から1980年代にかけて次々に発見されたフグ毒保有あるいは産生物は、食物連鎖の観点から統一的にまとめられている (野口, 1988). その結果、現在ではフグ毒保有生物の毒化はフグ毒産生細菌のフグ毒に端を発し、食物連鎖を介して起こると広く認められている。以上のようにフグ毒保有動物の全容が明らかになったことで新たに「これらフグ毒保有動物におけるフグ毒の機能」が問題となってきたのである。

これに関連して、斎藤らはトラフグのフグ毒に対する誘引効果実験を行い、本魚種はフグ毒に著しく誘引されること、さらにこれを積極的に摂取することを見出した (Saito

2015年10月26日受付 2016年8月29日受理

*1 東海大学海洋学部 〒424-0023 静岡市清水区折戸3-20-1

*2 株式会社東海アクアノーツ 〒424-0023 静岡市清水区八坂北1-10-12

et al., 2000). また無毒トラフグにフグ毒含有餌料を投与するとトラフグ同士のかみ合いが激減することも報告(斎藤ほか, 2002)している. これら一連の報告はフグ毒がフグ毒保有動物にとって単なる「毒」ではなく, 何らかの必要物質としても機能する可能性を示唆している.

これに関連し, 池田(2007)はクサフグ *Takifugu niphobles* の腸内から単離した *Vibrio alginolyticus* を同じくクサフグの肝臓から粗抽出したフグ粗毒を添加した培地で好気培養すると, 培地濁度が有意に増加すること, またフグ毒(純品)や無毒クサフグ肝臓由来のフグ毒画分を培地に添加しても上記培地濁度の増加は見られないことを報告した. さらに, 平板法で対照区とフグ毒添加区の細菌数を測定し, 両者に大きな違いはないことも確認している. 次いで加藤(2009)は池田と同条件で *V. alginolyticus* を嫌気培養し, 培地濁度と共にリアルタイム PCR にて菌数を測定した. その結果, 対照区とフグ毒添加区の培地濁度に有意差があるものの, 両者の菌数にほとんど差はないことを報告し, 培地濁度の増加現象は菌数の増加によるものではなく, フグ毒存在下で *V. alginolyticus* が産生する代謝産物に起因する可能性を示した. 以上の諸結果は, 有毒フグ腸内にフグ毒が存在すること(加納, 1989)とを考えると, 生きたフグ腸内でもフグ毒存在下で腸内細菌が上記培地濁度を増加させる代謝産物(以下培地濁度増加物質)を新たに作り出す可能性を示唆している.

現在, 著者らはこの培地濁度増加物質がフグの消化に関与していることを予想し, 本物質のタンパク質分解能について調べているが, この物質には高いタンパク質分解能があることを明らかにしつつある(伊藤, 2013). フグ毒存在下で腸内細菌がタンパク質分解能をもつ代謝産物を作り出す結果は全て *in vitro* によるものであるが, 培地濁度増加物質がフグの腸内で消化に関与する可能性を強く示している. そのため, 有毒と無毒フグ間で消化能に違いがあること, ひいては両者間で餌料生物に違いがあるのではないかと考えた.

以上を踏まえ, 有毒と無毒トラフグの腸内容物を比較したところ, 両者の食性は有意に異なり, 有毒個体に底生動物をより多く食する傾向が認められたので報告する.

方法

実験材料: 2012年~2014年にかけ静岡県遠州灘で延縄により漁獲されたトラフグ200個体から肝臓付き消化管を摘出して材料とした. これらトラフグ200個体の腸管内容物を同定に供した.

なお, トラフグは漁獲後市場より冷蔵で浜松市内のフグ料理屋に送られ, そこで内臓が取り出された後, 冷凍状態で研究室に輸送され, 実験まで -40°C で保存された.

フグ毒量の測定: 有毒および無毒の判別は, 食品衛生検査指針(厚生省環境衛生局, 1978)に準じたマウスアッセイ

法により行なった.

まず, トラフグ肝臓の胆嚢付近から肝臓組織5gを切り取り試験官に入れた. これに抽出液として0.1%酢酸を5ml加え, 10分間沸騰水中に入れて抽出した. 抽出液を冷やした後, その1mlをddy系クリーンマウスに腹腔内投与し, 致死時間から毒量を計算した. その際, 検出限界を2MU/gとし, 2MU/g以上を有毒, これ未満を無毒と判断した.

腸内容物の同定: 本実験の供試フグは延縄漁にて漁獲されたものである. そのため, 延縄漁にて仕掛けられた釣り餌としては魚が用いられている. そのため漁獲されたフグの消化管の前方には釣り餌としての魚が残っている可能性が考えられた. そこで, 膨張囊にあるものは同定の対象としないことにし, 今回は腸内の内容物のみを同定の対象とした.

まず腸内容物を観察しやすくするために, 腸を中央部で二分し, 前部を腸前部, 後部を腸後部とした. これら二分した腸をそれぞれ切り開き, 双眼実体顕微鏡下で内容物を調べた. 内容物は消化され, 原型を留めていなかったため, 同定のレベルを「魚類」, 「甲殻類」, 「貝類」, 「砂」および腸内容物が認められなかった「空腸」として分類した.

なお, 有毒および無毒個体の腸内容物の違いを検討するために, 甲殻類, 貝類, あるいは砂のいずれかが腸内から見出された個体は一括して底生動物を摂食していた個体と考えた. 特に砂は, 底生動物の範疇に加えた. 砂はフグが貝類やゴカイ類等を食べる時に同時に飲み込まれ, それらが消化された後腸管内に残ることが考えられるためと, そもそも底生動物を食さなければ砂が腸内に入らないことも考慮したからである.

結果および考察

有毒および無毒トラフグの各腸内容物の有無についてTable 1にまとめた. 有毒トラフグでは内容物が認められた個体数は45, 「空腸」個体の数は36であるのに対し, 無毒トラフグでは前者が70, 後者が49であった. 有毒と無毒間でピアソンの χ^2 検定を行なったところ, 有意差は認められなかった. これは有毒あるいは無毒に関わらず, トラフグにおける空腸率に偏りがないことを示唆している. また, 供試トラフグの漁獲からその肝臓の毒量測定までの過程に, 毒量に変化する要因は見られない. そのため, 以下に示す腸内餌生物の出現状況は, 天然下における有毒および無毒トラフグの餌の選択を反映していると判断された.

腸内餌生物は, 魚類のみを食していたトラフグ数は有毒で25個体, 無毒で62個体, 底生動物を捕食していたトラフグは有毒で13個体, 無毒で1個体, 底生動物と魚類の両方を食していたトラフグは有毒で7個体, 無毒で7個体であった(Table 2).

Table 1 Number of toxic and non-toxic puffer used for this study and the number of puffer from each category with detected/non-detected intestinal contents

	intestinal contents	
	detected	non-detected
Number of toxic puffer (N=81)	45	36
Number of non-toxic puffer (N=119)	70	49

Pearson's chi-square test $\chi^2=3.84$, $p>0.05$ **Table 2** Number of toxic and non-toxic puffer based on composition of intestinal diet contents belonging to different groups of marine organisms and sediment as detected in the intestine: fish, benthic organisms and both categories

	diet contents belonging to different groups of marine organisms		
	fish	benthic organisms	both categories
Number of toxic puffer (N=45)	25	13	7
Number of non-toxic puffer (N=70)	62	1	7

Pearson's chi-square test $\chi^2=5.99$, $p<0.05$ indicates significant difference between the diet composition of the toxic and non-toxic puffers.

これを踏まえ、有毒と無毒トラフグの腸内餌生物組成を比較するため、ピアソンの χ^2 検定を行なった。その結果、両者間に有意差が認められ ($\chi^2=5.99$, $p<0.05$)、有毒と無毒トラフグでは餌生物が違い、さらに有毒個体では底生動物を、無毒個体では魚類を明らかに高い比率で捕食する傾向が示唆された。

最後に餌生物と毒化の関係についてオッズ比を求めた。前述したように、フグは有毒餌生物、それも底生動物を摂餌することで毒化すると考えられている。そのため、毒化については底生動物を摂餌するか否かが重要と考えられる。そこで、Table 2において底生動物と魚類を同時に摂餌していた個体、すなわち有毒トラフグで7個体、無毒トラフグで7個体をそれぞれ底生動物を摂餌していた個体と考え、オッズ比を求めた。オッズ比は6.2,95%信頼限界で2.4~15.9となり、有意差を示した。これは、底生動物を食する個体が有意に毒化すること、さらに底生動物を摂餌していた個体は、魚類しか腸内に認められない個体よりも6.2

倍毒化することを示唆している。

以上の諸結果より、有毒トラフグと無毒トラフグでは摂食している生物が有意に異なること、有毒トラフグは底生動物をより多く摂食している傾向が示唆された。

謝辞

本研究遂行に当たり、統計処理に関して種々の有益な助言を下された元東海大学海洋学部水産資源課程小椋将弘先生に深謝する。

文献

- 池田貴哉 (2007): クサフグ腸内より単離したフグ毒産生菌 *Vibrio alginolyticus* におけるフグ毒の機能, 東海大学大学院海洋学研究科修士論, 75 pp.
- 伊藤優 (2013): フグ毒存在下でクサフグ *Takifugu niphobles* 腸内細菌が産生する代謝産物の機能について, 東海大学大学院海洋学研究科修士論文, 86 pp.
- 加納碩雄 (1989): フグの毒性に関する研究, 東京大学博士論文, 136 pp.
- 加藤 芳 (2009): フグ腸内のフグ毒がクサフグ腸内細菌 *Vibrio alginolyticus* に及ぼす影響, 東海大学大学院海洋学研究科修士論文, 73 pp.
- Kim, Y.H., G.B. Brown, F. A. Fuhrman (1975): Tetrodotoxin, occurrence in ateloid frogs of Costa Rica, Science, 189, 151-153.
- 厚生省環境衛生局 (1978): 食品衛生指針Ⅱ「食品別」, 日本食品協会, 東京, 735 pp.
- Miyazawa, K., K. Higashiyama, K. Ito, K. Arakawa, T. Noguchi, Y. Shida and K. Hashimoto (1988): Tetrodotoxin in two species of ribbon worm. *Lineus fuscus* and *Tubulanus punctatus*, Toxicon, 26, 867-874.
- Miyazawa, K., J. K. Jeon, J. Maruyama, T. Noguchi, K. Ito and K. Hashimoto (1986): Occurrence of tetrodotoxin in the flatworm *Planocera multitentaculata*, Toxicon, 24, 645-650.
- Mosher, H. S., F. A. Fuhrman, H. D. Buchwald and H. G. Fisher (1964): Tetrodotoxin-Tetrodotoxin: A potent neurotoxin, Science, 144, 1100-1110.
- Narita, H., T. Noguchi, J. Maruyama and K. Hashimoto (1984): Occurrence of a tetrodotoxin-associated substance in agastr "Hanamushirogai" *Zeuxis siquijorensis*, Nippon Suisan Gakkaishi, 50, 85-88.
- Narita H., T. Noguchi, J. Maruyama, Y. Ueda, K. Hashimoto, Y. Watanabe, K. Hida (1981): Occurrence of tetrodotoxin in a trumpet shell, "boshubora" *Charonia sauliae*, Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish, 47, 935-942.
- 野口玉雄 (1988): 食物連鎖によるフグ毒保有生物の毒化, "フグ毒研究の最近の進歩" (橋本周久編), 恒星社厚生閣, 東京, 117 pp.
- Noguchi, T., and Y. Hashimoto (1973): Isolation of tetrodotoxin from a goby *Gobius Criniger*, Toxicon, 11, 305-307.
- Noguchi, T., J. K. Jeon, O. Arakawa, H. Sugita, Y. Deguchi, Y. Shida and K. Hashimoto (1986): Occurrence of tetrodotoxin

- and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio* sp. Isolated from the intestines of a xanthid crab, *Atergatis floridus*, The Journal of Biochemistry, **99**, 311-314.
- Noguchi T., H. Narita, J. Maruyama, K. Hashimoto (1982): Tetrodotoxin in the starfish *Astropenten polyacanthus*, in association with toxification of a trumpet shell, "boshubora" *Charonia sauliae*, Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish, **48**, 1173-1179.
- Noguchi, T., A. Uzu, K. Koyama and K. Hashimoto (1983): Occurance of tetrodotoxin as a major toxin in xanthid crab *Atergatis floridus*, Nippon Suisan Gakkaishi, **49**, 1887-1892.
- 斎藤俊郎・堀口新吾・斎藤寛・舞田正志 (2002): フグ毒がトラフグの噛み合いに及ぼす影響について, 東海大学紀要海洋学部, **55**, 79-87.
- Saito, T., K. Kageyu, H. Goto, K. Murakami and T. Noguchi (2000): Tetrodotoxin attracts pufferfish ("torafugu" *Takifugu rubripes*), Bull. Inst. Oceanic Res. & Develop. Tokai Univ., **21**, 93-96.
- Sheumack, D. D., M. E. Howden, I. Spence, R. J. Quinn (1978): Maculotoxin: a neurotoxin from the venom glands of the octopus *Haplochlora maculosa* identified as tetrodotoxin, Science, **199**, 188-191.

要 旨

有毒トラフグ81個体と無毒トラフグ119個体の腸内容物の有無を調べた結果、有毒では45個体、無毒では70個体に腸内容物が確認された。腸内容物から餌料生物を同定したところ、魚類のみ：有毒25、無毒62個体、底生動物のみ：有毒13、無毒1個体、および両方：有毒7、無毒7個体であった。有毒および無毒トラフグの腸内餌生物の違いを χ^2 検定で評価したところ、5%水準で有意差が認められた。以上の結果、有毒個体と無毒個体では餌生物が異なり、有毒個体では底生動物を、無毒個体では魚類を高い比率で摂食する傾向であることが認められた。底生動物と毒化の関係を見るためにオッズ比を求めた。その結果、オッズ比は6.2、95%信頼限界で2.4~15.9となり、底生動物を摂餌しているトラフグは魚類のみ摂餌している個体より6.2倍毒化していることが分かった。以上のことから、有毒と無毒トラフグでは食性が有意に異なり、有毒個体は底生動物をより多く摂食している傾向が認められた。