

琉球列島におけるフグ毒保有魚類の毒化に及ぼす
Planocera 属ヒラムシの影響に関する研究

上田 紘之

2024

目次

第 1 章 緒言.....	1
第 2 章 沖縄本島近海で採取された TTX 保有ヒラムシ.....	5
第 1 節 目的.....	5
第 2 節 試料および方法.....	6
2.1 試料採取.....	6
2.2 TTX の検出.....	6
2.2.1 TTX の抽出.....	6
2.2.2 LC-MS/MS 分析.....	7
2.3 分子生物学的手法による塩基配列解析.....	7
2.3.1 DNA 抽出.....	7
2.3.2 プライマーの設計.....	8
2.3.3 DNA の増幅.....	9
2.3.4 DNA の精製.....	9
2.3.5 塩基配列解析および決定.....	10
2.3.6 ミトコンドリア DNA 全塩基配列の決定.....	10
2.3.7 系統解析.....	11
第 3 節 結果.....	13
3.1 形態的特徴による種同定.....	13
3.2 TTX の検出.....	13
3.3 分子生物学的手法による塩基配列解析.....	14
3.3.1 28S rRNA 塩基配列にもとづく系統樹.....	14
3.3.2 COI 塩基配列にもとづく系統樹.....	14

3.3.3	cytochrome <i>b</i> 塩基配列にもとづく系統樹	14
3.3.4	ミトコンドリア DNA の全塩基配列にもとづく系統樹	15
第 4 節	考察	15
第 3 章	TTX 保有生物の毒化に <i>Planocera</i> sp. の果たす役割.....	18
第 1 節	<i>Planocera</i> 属ヒラムシの保有する TTX および類縁化合物 (TTXs) 18	
1.1	目的	18
1.2	試料および方法	19
1.2.1	試料	19
1.2.1.1	<i>Planocera</i> sp.....	19
1.2.1.2	オオツノヒラムシ、ツノヒラムシおよびオキヒラムシ	19
1.2.2	TTXs の検出.....	20
1.2.2.1	TTXs の抽出.....	20
1.2.2.2	TTXs の精製.....	20
1.2.2.3	LC-MS 分析.....	21
1.3	結果	21
1.4	考察	22
第 2 節	オオツノヒラムシ卵を用いた TTX 保有生物の毒化実験	23
2.1	目的	23
2.2	試料および方法	24
2.2.1	試料	24
2.2.1.1	オオツノヒラムシ	24
2.2.1.2	クサフグ	25
2.2.1.3	オキナワフグおよびツムギハゼ	25
2.2.2	飼育実験	25

2.2.3	TTXs の検出.....	25
2.2.3.1	TTXs の抽出.....	25
2.2.3.2	TTXs の精製.....	25
2.2.3.3	LC-MS 分析.....	26
2.3	結果.....	26
2.3.1	オオツノヒラムシ卵を摂餌したクサフグ稚魚の保有する TTXs....	26
2.3.2	オオツノヒラムシ卵を摂餌したオキナワフグの保有する TTXs....	26
2.3.3	オオツノヒラムシ卵を摂餌したツムギハゼの保有する TTXs.....	27
2.4	考察.....	27
第 4 章 TTX 保有ヒラムシの毒化に関する要因の探索.....		29
第 1 節 オオツノヒラムシの性成熟に伴う毒性の変化.....		29
1.1	目的.....	29
1.2	試料および方法.....	30
1.2.1	試料.....	30
1.2.2	生殖腺発達段階の判別.....	30
1.2.3	TTXs の検出.....	30
1.2.3.1	TTXs の抽出.....	30
1.2.3.2	LC-MS/MS 分析.....	31
1.3	結果.....	31
1.3.1	天然環境下での生殖腺発達状況.....	31
1.3.2	体重の変化.....	31
1.3.3	TTX 濃度の変化.....	31
1.3.4	1 個体あたりの TTX 量の変化.....	32
1.3.5	Gonadosomatic index (GSI) の変化.....	32

1.4 考察.....	32
第2節 バイオプシー飼育実験による受精囊発達期の TTX 保有量推定	34
2.1 目的.....	34
2.2 試料および方法.....	34
2.2.1 試料.....	34
2.2.2 飼育実験.....	35
2.2.3 TTXs の検出.....	35
2.2.3.1 TTXs の抽出.....	35
2.2.3.2 LC-MS/MS 分析.....	35
2.3 結果.....	35
2.3.1 オオツノヒラムシ個体の TTX 量の変化.....	35
2.3.2 オオツノヒラムシの体重および産卵回数の変動.....	36
2.3.3 産卵経験の有無による TTX 量の差.....	36
2.3.4 産卵時に供給される TTX 量.....	36
2.3.5 オオツノヒラムシの TTX 増加量.....	37
2.4 考察.....	37
第3節 バイオプシー飼育実験による貯精囊発達期の TTX 保有量推定	39
3.1 目的.....	39
3.2 試料および方法.....	39
3.2.1 試料.....	39
3.2.2 飼育実験.....	40
3.2.3 TTXs の検出.....	40
3.2.3.1 TTXs の抽出.....	40
3.2.3.2 LC-MS/MS 分析.....	40

3.3	結果	41
3.3.1	オオツノヒラムシ個体の成長率	41
3.3.2	TTX 量と TTX 濃度の変化	41
3.4	考察	41
第 4 節	バイオブシー飼育実験による生殖腺未発達期の TTX 保有量推定	42
4.1	目的	42
4.2	試料および方法	42
4.2.1	試料	42
4.2.2	飼育実験	42
4.2.3	TTXs の検出	43
4.2.3.1	TTXs の抽出	43
4.2.3.2	LC-MS/MS 分析	43
4.3	結果	43
4.3.1	オオツノヒラムシ個体の成長率	43
4.3.2	TTX 量と TTX 濃度の変化	43
4.4	考察	44
第 5 節	個体群単位の飼育実験による生殖腺未発達期の TTX 保有量変化	44
5.1	目的	44
5.2	試料および方法	45
5.2.1	試料	45
5.2.2	飼育実験	45
5.2.3	TTXs の検出	45
5.2.3.1	TTXs の抽出	45
5.2.3.2	LC-MS/MS 分析	46

5.3 結果.....	46
5.4 考察.....	46
第5章 総括.....	49
謝 辞.....	53
参考文献.....	54
図および表.....	66

第 1 章 緒言

フグが保有していることで知られている強力な神経毒テトロドトキシン (TTX) は、 $C_{11}H_{17}O_8N_3$ で表される分子構造を持つ化合物である (Narahashi, 1972; Omana-Zapata et al., 1997; Moczydlowski, 2013)。その構造は、1964 年に京都市で開催された国際天然物化学会議において日米の 3 グループによって報告された (Tsuda et al., 1964; Woodward, 1964; Goto et al., 1965)。体重およそ 50 kg のヒトにおける致死量は、1~2 mg 程度とされており (Noguchi and Ebesu, 2001)、電位依存性ナトリウムチャネルの阻害剤として働く最も有毒な天然物質の一つとしても知られている (Colquhoun et al., 1972; Narahashi, 2001; Noguchi et al., 2006)。ヒトの体内には蓄積せず依存性もないことから、鎮痛剤などとしても利用されている (Bucciarelli et al., 2021)。

フグ食文化を有するわが国では、TTX による食中毒事故がしばしば発生しており、1989~2010 年の 22 年間に 651 件で 56 名が死亡している (Toda et al., 2012)。最近ではフグを喫食することによる食中毒の発生は少なくなっているものの、しらす加工品にフグの稚魚が混入する事件などが発生している (Kiriake et al., 2016)。また、環境の変化に伴い発生した新たな問題として、ショウサイフグ *Takifugu snyderi* とゴマフグ *Takifugu stictonotus* の交雑種が増加することによるフグ毒中毒の発生も懸念されている (Takahashi et al., 2017)。さらに、食中毒の事例こそないものの、食用二枚貝から TTX が検出される事例はアジア、ヨーロッパおよびニュージーランドなど世界各地で発生しており (EFSA CONTAM Panel et al., 2017; Biessy et al., 2019)、わが国においても、ホタテガイ *Mizuhopecten yessoensis* やアカザラガイ *Azumapecten farreri* subsp. *akazara* などからの TTX の検出が報告されている (Numano et al., 2019; Okabe et al., 2021; Yasukawa et al.,

2023)。

フグ科魚類のみが保有するものと考えられていた TTX だが、1964 年に Mosher et al.によりカリフォルニアイモリ *Taricha torosa* から検出されたのをはじめとして、それ以降ツムギハゼ *Yongeichthys criniger* (Noguchi and Hashimoto, 1973) や、フキヤガマ *Atelopus varius* (Kim et al., 1975)、ヒョウモンダコ *Hapalochlaena fasciata* (Sheumack et al., 1978)、ボウシュウボラ *Charonia lampas sauliae* (Narita et al., 1981)、トゲモミジガイ *Astropecten polyacanthus* (Noguchi et al., 1982)、スベスマンジュウガニ *Atergatis floridus* (Noguchi et al., 1983)、オオツノヒラムシ *Planocera multitentaculata* (Miyazawa et al., 1986)、ヒモムシ類 (Miyazawa et al., 1988)、コウガイビル *Bipalium adventitium* (Stokes et al., 2014) などの様々な分類群の生物が TTX を保有していることが明らかとなった。

海洋環境では、フグは TTX を自ら産生するのではなく TTX を保有する種々の海産生物を捕食することで獲得していることが明らかとなっている (Noguchi et al., 2006)。また、Noguchi et al. (1986) により *Vibrio* 属細菌による TTX の産生が報告されていることから、海洋細菌の産生した TTX が食物連鎖によってフグに蓄積している可能性が支持されている。また、TTX の生合成経路としてはフグ類から単離された 5,6,11-trideoxyTTX や 4-*epi*TTX、11-norTTX-6(*S*)-ol など多くの TTX 類縁化合物の構造をもとに、5,6,11-trideoxyTTX を前駆物質とした酸化反応によるものが推定されている (Pavelka et al., 1982; Yotsu-Yamashita et al., 1995; Yotsu-Yamashita et al., 2013; Bane et al., 2014)。しかし、海洋細菌からフグに至るまでの TTX の動態や供給経路には、未だに不明な点が数多く残されている。フグ食文化の根強いわが国において、無毒であることが確認されているにもかかわらず養殖トラフグの肝臓等の販売が許可されない背景には、このような未解明の事象が数多く残されていることがあげられる。

本研究で対象とするヒラムシ類では、*Planocera* 属の2種や *Stylochoplana* 属に分類される種で TTX の保有が報告されており (Miyazawa et al., 1986; Tanu et al., 2004; Salvitti et al., 2015a, b)、特に *Planocera* 属のオオツノヒラムシは高い毒性を示すことが報告されている (Miyazawa et al., 1986; Yamada et al., 2017)。また、過去には毒化した養殖トラフグが発見された台湾の陸上養殖場から、微量の TTX を保有する *Stylochus* 属のヒラムシが発見された事例 (Lin et al., 1998) や、犬が摂食することで中毒を引き起こしているウミフクロウ *Pleurobranchaea maculata* の毒化に *Stylochoplana* 属のヒラムシが関与していた事例 (Salvitti et al., 2015a, b) が報告されている。海底から離れた網生簀で養殖されたトラフグや、ろ過海水や人工海水を用いた陸上施設で養殖されたトラフグからは TTX が検出されなかったことから (Noguchi et al., 2004)、中毒が発生するほどの毒をもつウミフクロウやフグの TTX の獲得源となり得るヒラムシ類はこれを捕食する種の水産食品としての安全性に大きな影響を与える存在であることが示唆される。

最近の研究により、日本列島近海の TTX 保有生物の毒化に対するオオツノヒラムシの関与が明らかにされてきた。クサフグの消化管内容物からオオツノヒラムシの cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) 遺伝子と一致する配列が検出されたほか、オオツノヒラムシの卵板を積極的に摂餌する様子も観察され、オオツノヒラムシがクサフグの毒化に深く関与していることが示唆されている (Itoi et al., 2018; Okabe et al., 2019)。対して、琉球列島近海においてはオキナワフグ *Chelonodon patoca* やツムギハゼを含む数多くの TTX 保有魚類が生息しているものの (Matsuura, 2002; Shibuno et al., 2008)、*Planocera* 属ヒラムシを発見したとの原著論文はない。沖縄県石垣島および西表島の沿岸域で採捕されたオキナワフグおよびツムギハゼの消化管内容物からオオツノヒラムシの COI 遺伝子と一致する配列が検出されていることから、琉球列島近海のオオツノヒラムシの生

息が示唆されているが (Itoi et al., 2020; Ito et al., 2022)、これまで所属研究室のヒラムシ類の生息調査の中でオオツノヒラムシが琉球列島近海で発見された事例はなく、あいまいな情報にとどまっている (Noguchi, 2003)。

そこで本研究では、琉球列島近海で魚類を含む TTX 保有生物の供給源となり得るヒラムシ類を探索し、その生態や琉球列島近海における TTX 保有生物とのかかわりを検討することで、TTX 保有生物の生態および毒化機構を明らかにすることを目的とした。

なお、本研究で得られた成果の一部は以下の通り公表済みである。

1. Ueda, H., Itoi, S., Sugita, H., 2018. TTX-bearing planoceric flatworm (Platyhelminthes: Acotylea) in the Ryukyu Islands, Japan. *Marine Drugs* 16: 37.
2. Ueda, H., Ito, M., Yonezawa, R., Hayashi, K., Tomonou, T., Kashitani, M., Oyama, H., Shirai K., Suo, R., Yoshitake, K., Kinoshita, S., Asakawa, S., Itoi, S., 2024. Japanese planoceric flatworms: Difference in composition of tetrodotoxin and its analogs and the effects of ingestion by toxin-bearing fishes in the Ryukyu Islands, Japan. *Marine Biotechnology* 26: 500–510.

第2章 沖縄本島近海で採取された TTX 保有ヒラムシ

第1節 目的

フグ毒として知られている TTX は、フグ科魚類のみならず種々の海産底生生物からも検出されている (Sheumack et al., 1978; Noguchi et al., 1982; Noguchi et al., 1983)。ヒラムシ類では、台湾において養殖トラフグの毒化が発生した際に陸上養殖場から *Stylochus* 属の1種が発見されたこと (Lin et al., 1998) や、*Stylochoplana* 属のヒラムシがウミフクロウの毒化に寄与していることが報告されている (Salvitti et al., 2015a, b)。 *Planocera* 属においては2種が TTX を保有し、そのうち一種であるオオツノヒラムシでは卵板が親個体の 2~50 倍の毒性を示すことなどが報告されたほか (Miyazawa et al., 1986, 1987; Tanu et al., 2004)、TTX 保有量の季節変動が明らかになっている (Yamada et al., 2017)。また、クサフグの消化管内容物からオオツノヒラムシの COI 遺伝子と一致する部分配列が検出されるなど、オオツノヒラムシがクサフグの毒化に関与している可能性が示唆されている (Itoi et al., 2018; Okabe et al., 2019)。また、三陸沿岸のアカザラガイの毒化にオオツノヒラムシが関与していることなどが明らかとなり (Okabe et al., 2021)、本州沿岸の TTX 保有生物とオオツノヒラムシとの関係性は徐々に明らかにされつつある。

対して琉球列島近海においては、TTX 保有魚類の生息が数多く報告されているが (Matsuura, 2002; Shibuno et al., 2008)、TTX を保有するヒラムシ類を発見したとの原著論文は現在まで見当たらない。沖縄県石垣島および西表島の沿岸域で採捕されたオキナワフグおよびツムギハゼの消化管内容物からオオツノヒラムシの COI 遺伝子と一致する配列が検出されていることから、オオツノヒラムシの生息が示唆されているものの (Itoi et al., 2020; Ito et al., 2022)、我々のこれま

での調査の中でも発見されていない。そのため、琉球列島近海の TTX 保有生物の生態や低次生物群間の TTX の授受に関する知見はいまだに不足している。また、日本列島近海においてはオオツノヒラムシおよびツノヒラムシを含む 5 種が *Planocera* 属として報告されているものの (Kato, 1944)、TTX 保有の有無や TTX 保有能を有する種の系統学的地位なども明らかにされていない。

そこで本章では、琉球列島近海においてオオツノヒラムシもしくはそれに近縁なヒラムシ類を探索することで、琉球列島近海に生息する TTX 保有生物や低次生物群間の TTX の授受を明らかにすることを目的とした。

第 2 節 試料および方法

2.1 試料採取

2017 年 8 月に沖縄県名護沖の水深約 10 m の海底でスキューバダイビングによってヒラムシ類の採取を行った。採取は海底で直径 50 cm 程度の転石を返しながら行った。採取した個体はポリ容器に入れて活かしたまま実験室へ持ち帰り、生体時の特徴を記録するために色彩や眼点、触角などの外部形態を観察し、写真を撮影した。採取した個体は撮影後重量を測定し -30°C で冷凍保存した。

2.2 TTX の検出

2.2.1 TTX の抽出

-30°C で冷凍保存した試料から、公定法により TTX の抽出を行った。試料はそれぞれ外縁部を 0.2 g 程度量りとり、1.5 mL マイクロチューブ内ですり潰し、ホモジナイズした。0.1%酢酸を 1 mL 加え、ボルテックスで攪拌した。沸騰させた湯の中で 10 分間加熱処理を行い、その際、約 3 分ごとに湯から引きあげ、ボルテックスミキサーにより攪拌した。加熱処理の後、氷上で十分冷却した試料を

21,880 ×g で 20 分間遠心分離した。得られた上清を 0.45 μm Supra Pure Syringe Filter (Recenttec, Taipei, Taiwan) でろ過し、回収したものを分析用抽出液とした。抽出液を 0.1%酢酸で $10^1 \sim 10^5$ 倍に希釈した後、liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 分析に供した。

2.2.2 LC-MS/MS 分析

LC-MS/MS 分析は、マルチリアクションモニタリング (MRM) モードに設定し、Quattro Premier XE (Waters, Milford, MA, USA) に接続された Acquity UPLC システム (Waters) を使用した。分析用抽出液には希釈倍率 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ のものを用い、サンプル溶液の分析は、Atlantis HILIC Silica カラム (2.1 mm × 150 mm, 5 μm, Waters) を用い、溶媒 A には 0.1%ギ酸、溶媒 B にはアセトニトリルを使用し、流速 0.3 mL/min で実施した。検量線は 0、1、2.5、5、10、25、50 および 100 ng/mL の TTX 標準溶液を LC-MS/MS 分析に供して得られたクロマトグラムのピーク面積から算出した。試料の TTX 量は、ピーク面積を求めた後に検量線を用いて算出した。

2.3 分子生物学的手法による塩基配列解析

2.3.1 DNA 抽出

各試料の外縁部から切り出した組織片より、Tsunashima et al. (2017) の手法に従い全 DNA の抽出を行った。40 mg 程度の組織片を、1.5 mL マイクロチューブに移し、10 mM EDTA (pH 8.0)、34 mM NaCl、0.1% SDS、1 mM 2-メルカプトエタノール、8 M 尿素を含む DNA 抽出緩衝液 (pH 8.0) 500 μL および 10 mg/mL proteinase K 溶液 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 10 μL を加え、ホモジナイザーで組織片を潰して破砕した。その後 55°C に設定したヒートブロックで 2 時

間半静置した。2時間半後、フェノール/クロロホルム溶液を 500 μ L 加え、転倒攪拌後 5 分間静置し、4°C、21,880 \times g で 5 分間遠心分離した。得られた上清を別のマイクロチューブに移してクロロホルムを 500 μ L 加え、転倒攪拌後 5 分間静置して 4°C、21,880 \times g で 5 分間遠心分離した。得られた上清を別の 1.5 mL マイクロチューブに移し、上清の 10 分の 1 の量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と、2.5 倍量の -30°C に冷却した 100%エタノールを加えて、4°C、21,880 \times g で 15 分間遠心分離した。その後、上清を除去して -30°C に冷却した 70%エタノール 200 μ L を加え、4°C、21,880 \times g で 10 分間遠心分離した。遠心分離後上清を除去し、微量遠心濃縮機 (Micro vac MV-100) で約 5 分間乾燥させたものを抽出 DNA サンプルとし、-80°C で冷凍保存した。

2.3.2 プライマーの設計

無脊椎動物の COI 遺伝子領域を対象としたユニバーサルプライマー (Vanhove et al., 2013) およびヒラムシ類と同じ渦虫綱に含まれる三岐腸目の当該遺伝子領域を対象としたプライマーセット (Alvarez-Presas et al., 2008) を用いて増幅した *Notocomplana humilis*、*Notoplana delicata* および *Pseudostylochus obscurus* の塩基配列を元に、COI 遺伝子領域の DNA 増幅を行うために設計されたプライマー、HRpra2 (5'-AATAA GTATC ATGTA RACTD ATRTC T-3') および HRprb2-2 (5'-GDGGV TTTGG DAATT GAYTA ATACC TT-3') (Tsunashima et al., 2017) を用いた。また、28S rRNA 遺伝子領域の DNA 増幅を行うために、*N. humilis* の 28S rRNA の塩基配列にもとづき設計されたユニバーサルプライマー、HRNT-F2 (5'-AGTTC AAGAG TACGT GAAAC C-3') および HRNT-R2 (5'-AACAC CTTTT GTGGT ATCTG ATGA-3') (Tsunashima et al., 2017) を用いた。

2.3.3 DNAの増幅

PCR法によりミトコンドリアDNAにコードされるCOI遺伝子領域(約750 bp)および28S rRNA遺伝子領域(約1,100 bp)を増幅した。PCR反応はサーマルサイクラーMyCycler (Bio-Rad, CA, USA)を用いて行った。反応液は0.625 units TaKaRa ExTaq DNA polymerase (Takara Bio, Otsu, Shiga, Japan)、10× ExTaq DNA polymerase buffer (Takara Bio) 2 μL、10 μMプライマー各2.6 μL、2.5 mM dNTP混合液1.6 μL、抽出DNA溶液1 μLに超純水を加えて計20 μLとした。反応条件は、まず95°Cで1分間保温した後、95°Cで10秒間の熱変性、55°Cで30秒間のアニーリング、72°Cで2分の伸長反応のサイクルを35回行い、最後に4°Cで冷却した。

2.3.4 DNAの精製

増幅を確認するため、PCR産物3 μLに色素液(0.25% xylene cyanol、0.25% bromophenol blue および0.25% orange Gを含む50%グリセロール溶液)1 μLを混合し、TAE buffer中にAgarose S (Nippongene, Tokyo, Japan)を溶解して調製した2%アガロースを用いて電気泳動を行った。増幅バンドを確認した後、PCR産物の不純物を取り除くための精製を行った。1.5 mLマイクロチューブにPCR産物17 μLを移し、超純水33 μLとクロロホルム50 μLを加えて5分間振とうした。冷却遠心機を用いて4°C、12000×gで5分間遠心分離し、得られた上清を別のマイクロチューブに移した。3 M酢酸ナトリウム溶液(pH 5.2)を12 μLおよび40% polyethylene glycol (PEG) 8000 および100 mM MgCl₂を含むPEG溶液を30 μL加えて十分に混合し、10分間室温で静置した。その後4°C、12,000×gで15分間遠心分離し、上清を除去した。-30°Cに冷却した70%エタノールを500 μL加え、4°C、12,000×gで15分間遠心分離し、上清を除去した後、乾燥遠心機で

5 分間乾燥させた。超純水を 10 μL 加え、完全に溶解させたものを精製 PCR 産物とした。

2.3.5 塩基配列解析および決定

精製 PCR 産物を鋳型に、サーマルサイクラー MyCycler (Bio-Rad) を用いてラベリング反応を行った。反応液は 5 μM プライマー 0.3 μL 、精製 PCR 産物 2 μL 、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 1 μL 、希釈 buffer 1.5 μL に超純水 5.2 μL を加えて全量を 10 μL とした。反応は、96°C で 1 分間保温した後、96°C で 10 秒間の熱変性、55°C で 5 秒間のアニーリング、60°C で 2 分間の伸長反応のサイクルを 25 回行い、最後に 4°C に冷却したものをラベリング反応産物とした。ラベリング反応産物 10 μL を 1.5 mL マイクロチューブに移し、3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 1 μL および 100%エタノール 40 μL を加えて 4°C、19,060 $\times g$ で 20 分間遠心分離した。遠心分離後上清を除去し、70%エタノールを 500 μL 加え、4°C、19060 $\times g$ で 20 分間遠心分離した。上清を除去し、乾燥遠心機で 5 分間乾燥させたものを、Applied Biosystems 社製 3130xl Genetic Analyzer を用いて分析した。

得られた塩基配列から、コンピューターソフト MEGA11 (Tamura et al., 2021) を用いてヒラムシ類各種の COI 遺伝子領域 (約 750 bp) および 28S rRNA 遺伝子領域 (約 1,100 bp) の塩基配列を決定した。また、配列のアラインメントには Clustal W (Thompson et al., 1994) および Clustal Omega (Sievers et al., 2011) を用いた。

2.3.6 ミトコンドリア DNA 全塩基配列の決定

採取された *Planocera* 属様ヒラムシについては QIAamp FFPE Tissue Kit

(Qiagen, Hilden, Germany) を、オキヒラムシ *Planocera pellucida* については DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を使用し、組織から全ゲノムを抽出した。*Planocera* 属様ヒラムシのライブラリ調製は MGIEasy FS DNA Library Prep Set (MGI, Shenzhen, China) を使用し、オキヒラムシのライブラリ調製は Nextera DNA Flex library Prep kit (Illumina, San Diego, CA, USA) を使用した。*Planocera* 属様ヒラムシの次世代シーケンス解析は DNBSEQ-T7 (MGI) を使用し、オキヒラムシの次世代シーケンス解析は HiSeqX (Illumina) および DNBSEQ-G400 (MGI) を使用した。ミトコンドリア DNA の全塩基配列は、CLC Genomics Workbench ver. 8.0.1 (Qiagen) を使用しオオツノヒラムシの配列 (LC503532) にリード配列をマッピングすることで構築した。rRNA の推定と tRNA の予測を含む遺伝子のアノテーションには、Geneious Prime Java ver. 11.0.14.1+1 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) および MITOS2 (Donath et al., 2019) を使用した (Yonezawa et al., 2020)。

2.3.7 系統解析

決定した塩基配列から、コンピューターソフト MEGA11 (Tamura et al., 2021) を用いてヒラムシ類各種の 28S rRNA 遺伝子領域 (約 1,100 bp) および COI 遺伝子領域 (約 750 bp) の塩基配列を比較し系統解析を行った。系統樹は最尤法で構築し、1000 回の反復によって Bootstrap 値 (%) を算出した。

28SrRNA 遺伝子を用いる系統解析は、*Prosthiostomum vulgare* (LC100091) を外群とし、*Amemiyaia pacifica* (LC100077)、*Callioplana marginata* (LC100082)、*Echinoplana celerrima* (HQ659020)、*Hoploplana villosa* (LC100076)、*Idioplana australiensis* (HQ659008)、*Ilyella gigas* (LC100080)、*Koinostylochus elongatus* (LC100083)、*Leptostylochus gracillis* (LC100078)、*Melloplana ferruginea*

(HQ659014)、*N. humilis* (LC100085)、*Notocomplana japonica* (LC100087)、*Notocomplana koreana* (LC100086)、*Notocomplana* sp. (LC100089)、*Notoplana australis* (HQ659015)、*N. delicata* (LC100088)、*P. multitentaculata* (LC100081)、*Planocera reticulata* (LC341284)、*Paraplanocera oligoglana* (KC869849)、*P. obscurus* (LC100084) および *Stylochus ijimai* (LC100079) の配列を用いた。

COI 遺伝子を用いる系統解析は、*Enchiridium* sp. (NC028199)、*P. obscurus* (LC190983) および *Pseudostylochus intermedius* (AB049114) を外群とし、*I. gigas* (LC190985)、*N. humilis* (LC190978)、*N. japonica* (LC190979)、*N. koreana* (LC190980)、*Notocomplana* sp. (LC190981)、*P. oligoglana* (LC545563)、*P. multitentaculata* (LC503532)、*P. pellucida* (LC785388)、*P. reticulata* (LC503531) および *Stylochoplana* sp. (KP259873) の配列を用いた。

Cytochrome *b* 遺伝子を用いる系統解析は、*Chromoplana* sp. (KC869920) および *Prosthiostomum siphunculus* (NC 028201) を外群とし、*I. australiensis* (MW392980)、*N. australis* (MW392986)、*Notoplana* sp. (MW392985)、*P. multitentaculata* (LC503532)、*P. pellucida* (LC785388) および *P. reticulata* (LC503531) の配列を用いた。

ミトコンドリア DNA 全塩基配列を用いる系統解析は、*Echinococcus canadensis* (AB208063) を外群とし、*B. adventitium* (MZ561467)、*Diversibipalium* sp. (MZ561470)、*Dugesia japonica* (AB618487)、*Enchiridium* sp. (KT363734)、*Girardia* sp. (KP090061)、*Miropalana shenzhensis* (NC 062124)、*P. multitentaculata* (LC503532)、*P. pellucida* (LC785388)、*P. reticulata* (LC503531) および *P. siphunculus* (KT363736) の配列を用いた。

第3節 結果

3.1 形態的特徴による種同定

沖縄本島名護沖の水深約 10 m の海底から *Planocera* 属様ヒラムシ 2 個体を採取した。個体 No. 1 (以下 S1) は 1.88 g、個体 No. 2 (S2) は 2.69 g であった。これらの外部形態は、半透明の胴体に灰色ないしは薄い赤褐色の斑点が数多く存在し、茶色の網状模様を呈していた (Fig. 1A, B)。また、2 つの円錐形の触角の基部に眼点を有していた (Fig. 1C)。形態的特徴に関する唯一の報告 (Kato, 1944) にもとづく、茶色の網状模様の有無や触角の色彩など *P. multitentaculata* および *P. reticulata* の特徴とは異なる特徴がいくつか存在したが、2 個体共に *Planocera* 属の特徴を有していた。貯精嚢は両方の標本で観察されたが、受精嚢は S2 のみに確認された (Fig. 1D, E)。

3.2 TTX の検出

本研究で採取された 2 個体の体組織から TTX を抽出し、LC-MS/MS 分析を行った。その結果、TTX 標品と一致するピークを示すクロマトグラムが得られた (Fig. 2)。1~100 ng/mL の TTX 標品を使用して得られた検量線は、良好な直線性および精度 ($y = 119.609x - 34.773$, $R^2 = 0.9897$) を示し、検出限界 (LOD) は 15.45 ng/mL であった。S1 および S2 の TTX 濃度は、それぞれ 1,000 倍および 10,000 倍希釈した抽出液によって測定された。当該 2 個体の TTX 濃度は 249 および 1,351 $\mu\text{g/g}$ であり、したがって、体内の TTX の総量は 468 μg と 3,634 μg と算出された (Table 1)。

3.3 分子生物学的手法による塩基配列解析

3.3.1 28S rRNA 塩基配列にもとづく系統樹

本研究で採取された2個体の標本の28S rRNA (約1,100 bp) 遺伝子配列を決定し、これまでに報告されている無吸盤蛭目ヒラムシ類の配列とともに系統解析を行った。最尤法によって構築した系統樹から、当該2個体はTTX保有ヒラムシ *P. multitentaculata* および *P. reticulata* と同じクラスターを形成した (Fig. 3)。本研究において決定した28S rRNA 遺伝子領域の塩基配列はアクセッション番号 LC341282~LC341283 で DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録した。

3.3.2 COI 塩基配列にもとづく系統樹

本研究で採取された2個体の標本のCOI (約750 bp) 遺伝子配列を決定し、これまでに報告されている無吸盤蛭目ヒラムシ類の配列とともに系統解析を行った。最尤法によって得られた系統樹は、当該2個体の間に高いブートストラップ値を示し、TTX保有ヒラムシ *P. multitentaculata* および *P. reticulata* と同じクラスターを形成した (Fig. 4)。 *Stylochoplana* sp.の配列を含むCOIの系統樹では、*P. multitentaculata* および *P. reticulata* が *Stylochoplana* sp.と同一の、TTX保有能にもとづくクラスター化も示された。本研究において決定したCOI 遺伝子領域の塩基配列はアクセッション番号 LC341285~LC341286 で DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録した。

3.3.3 cytochrome *b* 塩基配列にもとづく系統樹

本研究で採取された2個体の標本のcytochrome *b* (約460 bp) 遺伝子配列を決定し、これまでに報告されている無吸盤蛭目ヒラムシ類の配列とともに系統解析を行った。最尤法によって構築した系統樹から、当該2個体はTTX保有ヒ

ラムシ *P. multitentaculata* および *P. reticulata* と同じクラスターを形成した (Fig. 5)。

3.3.4 ミトコンドリア DNA の全塩基配列にもとづく系統樹

本研究で採取された 2 個体の標本の mitochondrial DNA (約 15,000 bp) の塩基配列を決定し、これまでに報告されている無吸盤亜目ヒラムシ類の配列とともに系統解析を行った。最尤法によって構築した系統樹から、当該 2 個体は TTX 保有ヒラムシ *P. multitentaculata* および *P. reticulata* と同じクラスターを形成した (Fig. 6)。

また、*Planocera* sp. を含む TTX 保有種のみトコンドリア DNA にコードされる遺伝子の順序は種間で一致していたものの、TTX を保有していないオキヒラムシ *P. pellucida* のそれとは異なっていた (Fig. 7)。本研究において決定したミトコンドリア DNA の全塩基配列はアクセッション番号 LC785386~LC785388 で DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録した。

第 4 節 考察

本章で採取されたヒラムシ 2 個体は形態学的特徴および系統解析の結果から *Planocera* 属に分類されると考えられる。日本列島近海においてはオオツノヒラムシおよびツノヒラムシを含む 5 種が *Planocera* 属として報告されている (Kato, 1944)。これらの分類は形態的特徴によって分類されたものであるが、Tsunashima et al. (2017) の報告による分子生物学的手法を用いた分類からも支持されている。本章の *Planocera* 属様ヒラムシ 2 個体の形態学的特徴はその中でも *Planocera heda* と一致していた (Kato, 1944)。当該 2 個体は *P. heda* と同様に水深約 10 m の海底から採取されたが、*P. heda* の生息地とされる伊豆半島周辺と沖縄本島では約 1,400 km 離れている。また、残念なことに *P. heda* の標本は第二次世界大戦

によって失われてしまったため、当該2個体が *P. heda* かどうかを確認する術はない。しかしながら、いずれにしても当該2個体は *P. heda* かそれに近縁な種である可能性は高い。COI の部分配列にもとづく系統解析によると、*Planocera* 属およびその近縁種と *Stylochoplana* 属ヒラムシ (Salvitti et al., 2015a, b) が同じクラスターを形成した。さらには、その中でも TTX を保有していないオキヒラムシが外縁部に配置され、TTX 保有種である *Planocera* 属様ヒラムシ、オオツノヒラムシ、ツノヒラムシおよび *Stylochoplana* sp. が内側に配置された。*Stylochoplana* sp. は *Planocera* 属ヒラムシと同様に半透明の胴体に灰色の斑点を有することが報告されている (Salvitti et al., 2015a)。*Stylochoplana* sp. が *Planocera* 属内部に配置されていることに加え、形態的特徴に共通点が見出されていることから、*Stylochoplana* sp. が *Planocera* 属の1種である可能性が示唆されている。ミトコンドリア DNA 全塩基配列にもとづく系統解析の結果においても TTX 保有能を持つヒラムシが *Planocera* 属内の特定のクラスターに集中していた。また、*Planocera* 属様ヒラムシ、オオツノヒラムシおよびツノヒラムシのミトコンドリア DNA にコードされるグルタミン tRNA の配置がオキヒラムシのそれと異なっており、*Planocera* 属様ヒラムシ、オオツノヒラムシおよびツノヒラムシの共通祖先が TTX の蓄積能力を獲得したことが示唆された。それを検討するために、台湾の陸上養殖場において養殖トラフグの毒化に関与していることが示唆された TTX を保有する *Stylochus* 属のヒラムシ (Lin et al., 1998) についても同様の調査を試みる必要がある。

本研究において両標本の TTX 濃度および量はオオツノヒラムシに匹敵することを示した。オオツノヒラムシの TTX 保有量の季節変動に関する報告 (Yamada et al., 2017) と同様に、体重依存的に TTX を蓄積するものと予想される。事実、当該2個体の TTX 保有量は、貯精囊のみ確認された S1 よりも受精囊の確認さ

れた S2 において高い値を示した。これらのヒラムシは琉球列島近海の TTX 保有魚類に対する TTX の重要な供給者であることが予想され、TTX 保有生物との関連性についてより詳細な調査が求められる。また、以降 *Planocera* 属様ヒラムシを *Planocera* sp. として記載する。

第3章 TTX 保有生物の毒化に *Planocera* sp.の果たす役割

第1節 *Planocera* 属ヒラムシの保有する TTX および類縁化合物 (TTXs)

1.1 目的

前章において、琉球列島近海の TTX 保有生物として *Planocera* 属様ヒラムシの存在が明らかとなった。*Planocera* 属様ヒラムシはその系統学的地位から、同じく高い濃度で TTX を保有するヒラムシとして知られるオオツノヒラムシと同じ *Planocera* 属であることが示唆されている。しかし、*Planocera* 属様ヒラムシ (*Planocera* sp.) は安定的に採取する手段が確立されていない種であり、その生態や資源量などには不明な点が多い。琉球列島近海における TTX の授受へのかわりに興味を持たれるところである。

TTX には多様な類縁化合物が報告されており、その保有状況は TTX 保有生物によって異なることが知られている。現在では、5,6,11-trideoxyTTX、5-deoxyTTX、6-deoxyTTX、5,11-dideoxyTTX、6,11-dideoxyTTX、11-norTTX-6(S)-ol など、多くの TTX 類縁化合物がヒラムシやフグ類、イモリなどから見つかっている (Yotsu-Yamashita et al., 1992, 1995, 1999, 2013; Jang and Yotsu-Yamashita, 2007; Kudo et al., 2014; Suo et al., 2022; Ito et al., 2022)。陸水生態系と海洋生態系で TTX 生合成系は異なる可能性も示唆されている (Hanifin et al., 2003, 2008; Cardall et al., 2004; Kudo et al., 2012; Gall et al., 2014; Kudo et al., 2014; Ueyama et al., 2018; Mebs and Yotsu-Yamashita, 2021)。また、TTX を保有する魚類は自ら TTX を産生できないため、餌生物から直接 TTX およびその類縁化合物を摂取し、その組成が TTX を保有する魚類のそれに反映されることが示唆されており (Asakawa et al., 2013; Suo et al., 2022; Vlasenko et al., 2023)、TTX 保有魚類の TTX 循環における不明点の推定には、TTX およびその類縁化合物の組成を調査することが有効だと思わ

れる。また、近年クサフグの毒化に深く関与していることが明らかとなったオオツノヒラムシでは、保有する TTX 類として TTX、5,6,11-trideoxyTTX、11-deoxyTTX、6-deoxyTTX および 5-deoxyTTX などが報告されている (Itoi et al., 2018; Okabe et al., 2019; Suo et al., 2022)。

琉球列島近海においては、オキナワフグやツムギハゼの消化管内容物からオオツノヒラムシのミトコンドリア DNA の COI 遺伝子の部分配列が検出されており、それらの TTX 蓄積にオオツノヒラムシが関与していることが示唆されている (Itoi et al., 2020; Ito et al., 2022)。琉球列島近海で生息が確認されている TTX 保有ヒラムシは *Planocera* sp.のみであり、その生態や TTX の授受に関する知見は不足している。本章ではそれらを検討する手段として TTX およびその類縁化合物の検出を実施した。なお、TTX および類縁化合物の検出の有無については Suo et al. (2022) を参考にし、検出時間、検出されたフラグメントイオン、検出強度を用いて総合的に判断した。

1.2 試料および方法

1.2.1 試料

1.2.1.1 *Planocera* sp.

本節で使用したヒラムシ 2 個体は第 2 章第 2 節と同じ個体である。

1.2.1.2 オオツノヒラムシ、ツノヒラムシおよびオキヒラムシ

本節で用いたオオツノヒラムシは、2023 年 6 月に茨城県ひたちなか市の岩礁地帯で採取した。オオツノヒラムシは満潮時に海水に浸っている転石の裏面に生息しているため、採取は干潮時に潮間帯の磯で転石を返しながら行った。採取した個体はポリ容器に入れて実験室へ持ち帰り、生体時の外見的特徴を記録す

るために色彩や眼点、触角などの外部形態を観察し、写真を撮影した。すべての個体は撮影後重量を測定し-30°C で冷凍保存した。

本節で用いたツノヒラムシは、2023年5月に神奈川県三浦市の岩礁地帯で採取した。採取は干潮時に潮間帯の磯で転石を返しながらいった。採取した個体はポリ容器に入れて実験室へ持ち帰り、生体時の外見的特徴を記録するために色彩や眼点、触角などの外部形態を観察し、写真を撮影した。すべての個体は撮影後重量を測定し-30°C で冷凍保存した。

本節で用いたオキヒラムシは、2020年6月に神奈川県三浦郡の岩礁地帯で採取した。採取は干潮時に潮間帯の磯で転石を返しながらいった。採取した個体はポリ容器に入れて実験室へ持ち帰り、生体時の外見的特徴を記録するために色彩や眼点、触角などの外部形態を観察し、写真を撮影した。すべての個体は撮影後重量を測定し-30°C で冷凍保存した。

1.2.2 TTXs の検出

1.2.2.1 TTXs の抽出

組織片および卵板は第2章第2節と同様に TTXs の抽出に供した。

1.2.2.2 TTXs の精製

TTX 抽出液には不純物が多く存在し、そのままでは TTX および類縁化合物の定性分析には不向きであったため、不純物を取り除くために精製を行った。TTX 抽出液 200 μ L に 0.01 M 酢酸を 1.8 mL 加えた調製液に NaOH を用いて pH を 6 に調整した。146 mm パスツールピペット (Corning, New York, USA) に綿と活性炭を詰め作製した活性炭カラムに超純水をよく流し、カラムを洗浄した。その後、TTX 調製液全量 (水層 1)、1.5 mL の超純水 (水層 2)、9 mL の混合溶液 (酢酸

2 : 水 49 : エタノール 50) (酢酸層) の順に活性炭カラムに流し入れた。得られた酢酸層は、スピードバック遠心濃縮乾燥機により乾固した。乾固した精製産物は 0.1%酢酸で溶解し、10 mg/mL に濃度を調整した。

1.2.2.3 LC-MS 分析

LC-MS 分析には Shimadzu LC-20AD solvent delivery system および ESI イオン源を備えた X500R Q-TOF Mass Spectrometer (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) を使用した。サンプル溶液の分析は 0.2 mL/min の流速で TSKgel Amide-80 カラム (2.0 mm × 150 mm, 5 μm; TOSOH, Tokyo, Japan) を用いて実施した。TTX および類縁化合物の定性解析は、既報の方法 (Suo et al., 2022) に沿って行った。すなわち TTX は m/z 320.1 > 302.1 で定性イオンを、 m/z 320.1 > 162.06 で定量イオンを観測した。また、5,6,11-trideoxyTTX は m/z 272.1 > 254.1 で定性イオンを、 m/z 272.1 > 162.1 で定量イオンを観測した。DideoxyTTX 類は m/z 288.1 > 270.1 で定性イオンを、 m/z 288.1 > 162.1 で定量イオンを観測した。DeoxyTTX 類は m/z 304.1 > 286.1 で定性イオンを、 m/z 304.1 > 162.1 で定量イオンを観測した。11-norTTX-6(S)-ol は m/z 290.1 > 272.1 で定性イオンを、 m/z 290.1 > 162.1 で定量イオンを観測した。

1.3 結果

Planocera sp.、オオツノヒラムシ、ツノヒラムシおよびオキヒラムシの TTX およびその類縁化合物の定性解析の結果、*Planocera* sp. とオオツノヒラムシの間に共通するピークが検出された (Fig. 8)。 m/z 320.1088 の 15.8 分のピークは TTX のものと、14.0 分のピークは TTX の化学平衡分子の 1 つである 4-*epi*TTX と同一だった。 m/z 272.1241 の 5.7 分のピークは 5,6,11-trideoxyTTX と同一で、 m/z

290.0983 の 12.4 分のピークは 11-norTTX-6(S)-ol と同一だった。さらに、 m/z 304.1139 の 10.7 分および 13.5 分のピークは、それぞれ 11-deoxyTTX および 6-deoxyTTX と同一だった。 m/z 288.1190 の 6~9 分のピークは、5,11-dideoxyTTX および 6,11-dideoxyTTX と同一のイオンと考えられる。ツノヒラムシの TTX およびその類縁化合物でも同様のパターンが観察されたが、オキヒラムシでは、TTX および類縁化合物のピークは検出されなかった。

1.4 考察

近年、TTX および類縁化合物については多くの研究が行われており、5,6,11-trideoxyTTX や dideoxyTTX 類、deoxyTTX 類などの類縁化合物がフグ科魚類や両生類、ヒラムシなどから検出されている (Yotsu-Yamashita et al., 1992, 1995, 1999, 2013; Jang and Yotsu-Yamashita, 2007; Kudo et al., 2014)。このような TTX 類縁化合物の生物間移動や体内動態を調査することで、天然環境下における TTX の授受や TTX 生合成機構の解明および TTX 保有生物の毒化機構の解明において重要な知見になると考えられる。

本節において、*Planocera* sp. の TTX およびその類縁化合物の組成を検出したところ、TTX、5,6,11-trideoxyTTX、6-deoxyTTX、11-deoxyTTX、6,11-dideoxyTTX、および 11-norTTX-6(S)-ol が検出された。5-deoxyTTX は *Planocera* sp. S2 においてのみわずかなピークが検出された。オオツノヒラムシでは TTX、4-*epi*TTX、5,6,11-trideoxyTTX、11-norTTX-6(S)-ol、dideoxyTTX 類に加えて、deoxyTTX 類として 11-deoxyTTX と 6-deoxyTTX の他に 5-deoxyTTX が報告されており (Suo et al., 2022)、*Planocera* sp. においてもオオツノヒラムシと同様の類縁化合物が検出された。また、本節においてはオオツノヒラムシから 5-deoxyTTX は検出されなかったものの、それ以外の類縁化合物組成は既報と矛盾しない結果が得られた。

5-deoxyTTX は他の deoxyTTX 類に比べ極少量しか含まれていないために、ヒラムシ類のように多量に deoxyTTX 類を保有する生物では、11-deoxyTTX のピークと重なって見えてしまう可能性が考えられる。このことに加え、TTX、5,6,11-trideoxyTTX のシグナル強度が非常に高い点も、*Planocera* sp. とオオツノヒラムシで共通している。また、ツノヒラムシにおいてはオオツノヒラムシと同様のピークのパターンが検出されているものの、シグナル強度が低く、オキヒラムシにおいては既報の通り TTX は検出されず (Kashitani et al., 2020)、また TTX の類縁化合物も検出されなかった。

近年、日本列島近海ではクサフグの消化管内容物からオオツノヒラムシの COI 遺伝子と一致する配列が検出されたほか、クサフグがオオツノヒラムシの卵板を積極的に摂餌する様子も観察されており、オオツノヒラムシがクサフグの毒化に深く関与していることが示唆されている (Itoi et al., 2018; Okabe et al., 2019)。本章において、*Planocera* sp. とオオツノヒラムシの保有する TTX およびその類縁化合物に共通点が見出されており、それぞれの生息域の TTX の授受において類似した役割を担っている可能性は否定できない。

第 2 節 オオツノヒラムシ卵を用いた TTX 保有生物の毒化実験

2.1 目的

前節までの結果から、*Planocera* sp. とオオツノヒラムシがともに高濃度の TTX を保有し、その類縁化合物の組成に共通点が多いことが明らかとなった。本州近海においてオオツノヒラムシがクサフグやアカザラガイの毒化に関与していると同様に (Itoi et al., 2018; Okabe et al., 2019; Okabe et al., 2021)、琉球列島近海で *Planocera* sp. が TTX 保有生物への供給源となっている可能性が示唆された。

Planocera sp. は水深約 10 m の海底で発見されたヒラムシであるが、これまで

に琉球列島近海において高濃度の TTX を保有するヒラムシ類は発見されていない。また、その生態や生息域周辺における資源量なども謎に包まれており、安定的に捕獲する手段は確立されていないのが現状である。前節において、*Planocera* sp. がオオツノヒラムシと同様の毒性を有していることが明らかとなり、オオツノヒラムシが果たす役割と *Planocera* sp. が果たす役割の類似性が示唆されている。このことから、*Planocera* sp. による TTX 保有生物の毒化がオオツノヒラムシを用いて再現することが可能なのではないかとの仮定を立てた。

先行研究において、クサフグの TTX および類縁化合物の蓄積にはオオツノヒラムシが深くかかわっていることが明らかとなっており (Itoi et al., 2018; Okabe et al., 2019)、*Planocera* sp. の採取場所周辺にもクサフグが生息していることから、本節ではクサフグに対してオオツノヒラムシの卵板を摂餌させ、保有する TTX および類縁化合物の組成への影響を検討した。また、同様にオキナワフグおよびツムギハゼに対してオオツノヒラムシの卵板を摂餌させ、保有する TTX および類縁化合物の組成への影響を検討した。この TTX および類縁化合物組成を天然個体と比較することで、*Planocera* sp. が TTX 保有生物の類縁体組成に与える影響をシミュレーションし、琉球列島近海における TTX 保有生物の毒化機構の解明を目指した。

2.2 試料および方法

2.2.1 試料

2.2.1.1 オオツノヒラムシ

本節で用いたオオツノヒラムシは、2022 年に神奈川県三浦郡の岩礁地帯で転石を返しながらか採取した。採取したオオツノヒラムシを実験室で飼育し、産卵した際にその卵板を回収し飼育実験に使用した。

2.2.1.2 クサフグ

天然環境下のクサフグとして 2022 年 6 月に沖縄県名護市で採取された 10 個体を試料とした。採取直後に氷水で冷却し、その後-80°Cの冷凍庫で保存した。また、無毒のクサフグ稚魚は江の島で採取したクサフグの卵を研究室で孵化させて育成した 11 個体を試料とした。

2.2.1.3 オキナワフグおよびツムギハゼ

2022 年 6 月に沖縄県名護市で採取したオキナワフグ 9 個体およびツムギハゼ 10 個体を試料とした。ただし、採取後 1 か月程度無毒環境下で飼育し実験室内の環境に馴致させて実験に使用した。

2.2.2 飼育実験

各個体をプラスチックケース（17.3×11.8×11.7 cm）に収容し、1 日馴致させた。その後、それぞれ 1 個体ずつにオオツノヒラムシの卵板を飽食量与え、TTX 類が魚体の組織中へ十分に蓄積するように摂餌後 1 週間人工飼料を与えて飼育し、氷冷麻酔した後に分析まで- 80°Cで冷凍保存した。

2.2.3 TTXs の検出

2.2.3.1 TTXs の抽出

組織片および卵板は第 2 章第 2 節と同様に TTXs の抽出に供した。

2.2.3.2 TTXs の精製

抽出液は前節と同様に TTXs の精製に供した。

2.2.3.3 LC-MS 分析

抽出液は前節と同様に LC-MS 分析に供した。

2.3 結果

2.3.1 オオツノヒラムシ卵を摂餌したクサフグ稚魚の保有する TTXs

沖縄本島で採取された天然のクサフグ、実験室で毒化させたクサフグ、毒化前の無毒のクサフグおよび餌として使用したオオツノヒラムシの卵板の TTX およびその類縁化合物の定性解析の結果、人為的に TTX を投与したクサフグが短期間で毒化し、その TTX および類縁化合物が沖縄本島で採取された天然個体とよく一致していることが示された (Fig. 9)。人工孵化後、人工飼料のみを与えて育てたクサフグは TTX およびその類縁化合物を保有していなかったが、人為的に毒化させた個体からは TTX、5,6,11-trideoxyTTX、5-deoxyTTX、11-deoxyTTX および 11-norTTX-6(S)-ol が検出されたが、dideoxyTTX 類は検出されなかった。

2.3.2 オオツノヒラムシ卵を摂餌したオキナワフグの保有する TTXs

沖縄本島で採取されたオキナワフグおよび同地点で採取後にオオツノヒラムシの卵を摂餌させた個体の保有する TTX およびその類縁化合物の定性解析の結果、天然個体からは TTX、5,6,11-trideoxyTTX、11-deoxyTTX、6-deoxyTTX および 11-norTTX-6(S)-ol が検出された (Fig. 10)。一方、オオツノヒラムシを摂餌させた個体からは、上記の TTX 類縁化合物に加え、6,11-dideoxyTTX が検出された。また、オオツノヒラムシを摂餌させた個体では、全ての TTX 類縁化合物の検出強度が天然個体と比較して高かった。

2.3.3 オオツノヒラムシ卵を摂餌したツムギハゼの保有する TTXs

沖縄本島で採取されたツムギハゼおよび同地点で採取後にオオツノヒラムシの卵を摂餌させた個体の保有する TTX およびその類縁化合物の定性解析の結果、天然個体からは TTX、5,6,11-trideoxyTTX、5-deoxyTTX、11-deoxyTTX および 11-norTTX-6(S)-ol が検出された (Fig. 11)。一方、オオツノヒラムシを摂餌させた個体からは、上記の TTX 類縁化合物に加え、6,11-dideoxyTTX が検出された。同一個体を使用しているわけではないため、一概には言えないものの、ツムギハゼではオキナワフグのように全ての TTX 類縁化合物の検出強度が高くなるわけではなく、明確な変化があったのは deoxyTTX 類のみであり、その他の TTX 類縁化合物には顕著な差は確認されなかった。

2.4 考察

前節の結果より、*Planocera* sp. とオオツノヒラムシがともに高濃度の TTX を保有し、その類縁化合物の組成の類似性が見出された。本州近海におけるオオツノヒラムシと同様に (Itoi et al., 2018; Okabe et al., 2019; Okabe et al., 2021)、琉球列島近海で *Planocera* sp. が TTX 保有生物への供給源となっている可能性が示唆されているが、その生態や生息域周辺における資源量などは謎に包まれており、安定的に捕獲する手段は確立されていない。

本節において、クサフグに対してオオツノヒラムシの卵板を摂餌させ、保有する TTX および類縁化合物の組成への影響を検討した結果、人為的に TTX を投与されたクサフグの TTX および類縁化合物組成は天然個体とよく一致していた。本節で使用した天然環境下のクサフグにおいては、TTX および 5,6,11-trideoxyTTX のシグナル強度が高く、そのほかの類縁化合物として 11-norTTX-6(S)-ol、11-deoxyTTX などが検出されているもののどれも強度は高くなかった。

これに対して人為的に毒化させたクサフグにおいては、同様に TTX および 5,6,11-trideoxyTTX のシグナル強度が高いことに加え、そのほかの類縁化合物の組成はオオツノヒラムシの卵板の組成を反映した。検出されている TTX および類縁化合物組成に大きな乖離はなく、短期間で大量の TTX を蓄積した点からみても、沖縄本島で採取された天然環境下の個体と類似した組成を保有するに至ったと考えられる。無毒クサフグにオオツノヒラムシの卵板を与えることで、沖縄本島の天然クサフグの毒化をシミュレーションできる可能性が示唆された。

続いて、同様の手法を用いて琉球列島近海に生息する他の TTX 保有生物の毒化に *Planocera* sp. が果たす役割を検討した。供試魚として沖縄本島近海で採取されたオキナワフグとツムギハゼを使用した。ツムギハゼにおいては、採取後 1 か月程度無毒環境下で飼育することで TTX が排出され、TTX 量が減少することが報告されているため (Tatsuno et al., 2022)、本節においても採取後 1 か月程度無毒環境下で飼育してからオオツノヒラムシの卵板を投与した。結果として、オキナワフグでは、クサフグと同様に TTX、5,6,11-trideoxyTTX のシグナル強度が強化され、そのほかの TTX 類縁化合物はオオツノヒラムシの卵板の組成を反映した。対してツムギハゼでは様々な TTX 類縁化合物を高濃度に含有しているオオツノヒラムシの卵板を摂餌したにもかかわらず、deoxyTTX 類以外の TTX 類縁化合物組成に大きな変化は見られなかった。ツムギハゼはフグ類と比べて TTX の排出速度が早く、保持能力が低いことが報告されている (Tatsuno et al., 2022)。TTX を保有する餌生物の類縁化合物が排出されてしまったことで、その組成がツムギハゼの TTX および類縁化合物組成に反映されていないように見えている可能性が考えられる。ツムギハゼの TTX およびその類縁化合物組成は地域差が大きいことが報告されており (Ito et al., 2022)、TTX の蓄積機構がフグ類とは異なっている可能性が示唆された。

第4章 TTX 保有ヒラムシの毒化に関する要因の探索

第1節 オオツノヒラムシの性成熟に伴う毒性の変化

1.1 目的

第3章までの結果から、*Planocera* sp.がオオツノヒラムシに匹敵する量の TTX を保有しており、それぞれの TTX およびその類縁化合物組成が似通っていることが示唆された。また、琉球列島近海に生息する TTX 保有生物の毒化を、オオツノヒラムシを餌生物として用いることによってシミュレーションできる可能性が示唆されたことから、*Planocera* sp.とオオツノヒラムシの生態の類似性が明らかになっていると考えられる。

ヒラムシ類においては、ニュージーランドのウミフクロウの毒化に *Stylochoplana* 属のヒラムシが関与していることや、台湾の陸上養殖場でのトラフグの毒化に *Stylochus* 属のヒラムシが関与していることなどが報告されている (Lin et al., 1998; Salvitti et al., 2015a, b)。海洋環境において重要な地位の生物であると考えられるようになりつつあるヒラムシ類だが、その TTX の保有の有無や毒性に関してはいくつかの報告がある (Miyazawa et al., 1986; Tanu et al., 2004; Salvitti et al., 2015a, b)。一方で、ヒラムシ類の生態に着目した低次の生物群間での TTX の動態や、高次の捕食者との関係性に関する知見は乏しい。これらのことから、当該生物群における TTX の動態を調査することは、水産資源の安全な流通に寄与するだけでなく、低次の生物群間での TTX の動態解明およびフグ類の毒化機構の一端を解明する上で重要な知見となるものと考えられる。

近年の研究では、クサフグやアカザラガイの毒化にオオツノヒラムシが関与していることが明らかにされており (Itoi et al., 2018; Okabe et al., 2019; Okabe et al., 2021)、TTX 保有生物の毒化にヒラムシ類が重要な役割を果たしているとの

説が特に強化されている。そこで本研究では、ヒラムシ類の中でも特に高い毒性を示し、日本列島近海においてに豊富な資源量が確認されているオオツノヒラムシに着目し、その生態および TTX の動態解明に取り組むことで、琉球列島近海に生息する低次の生物群やフグ類の TTX 蓄積機構の一端を解明することを目的とした。

1.2 試料および方法

1.2.1 試料

本節で使用したオオツノヒラムシは2016年2月～2017年2月にかけて第3章第2節と同じ地点で採取した。その後、第3章第2節と同様の方法で外部形態を観察後、写真を撮影した。すべての個体は撮影後重量を測定し-30°Cで冷凍保存した。

1.2.2 生殖腺発達段階の判別

採取した個体を、貯精囊が発達している個体、貯精囊の有無にかかわらず受精囊が発達している個体、どちらも発達していない個体に分別した。それらの個体は Yamada et al. (2017) の報告に倣い、体表腹側から観察した貯精囊および受精囊の面積の体表面積に対する比率を便宜上の gonadosomatic index (GSI) として数値化した。画像解析には ImageJ (NIH, USA) を使用した。

1.2.3 TTXs の検出

1.2.3.1 TTXs の抽出

組織片は第2章第2節と同様に TTXs の抽出に供した。

1.2.3.2 LC-MS/MS 分析

組織片は第 2 章第 2 節と同様に LC-MS/MS 分析に供した。

1.3 結果

1.3.1 天然環境下での生殖腺発達状況

2016 年 2 月から 1 年間かけて得られたオオツノヒラムシの生殖腺発達段階を月毎に集計したところ、貯精囊発達個体の比率が最も高くなったのは 3 月で 94.3%であった。それに対して、受精囊発達個体の比率が最も高くなったのは 6 月で 66.6%であり (Fig. 12)、雄性先熟であることが確認された。

1.3.2 体重の変化

貯精囊発達期から受精囊発達期 (1~7 月) にかけてオオツノヒラムシの体重は Fig. 13 のように変動した。貯精囊発達個体の体重がピークに達したのは 4 月で、受精囊発達個体の体重がピークに達したのは 5 月であった。受精囊発達期 (4~7 月) のオオツノヒラムシの体重を生殖腺の発達段階ごとに検討した結果、貯精囊発達個体、受精囊発達個体および未発達もしくは産卵後個体ではそれぞれ 3.81 ± 1.07 g、 2.97 ± 1.04 g および 1.94 ± 0.40 g となり、それぞれの間で有意な差が認められた (ANOVA, $P < 0.05$; Fig. 14)。

1.3.3 TTX 濃度の変化

貯精囊発達期から受精囊発達期 (1~7 月) にかけてオオツノヒラムシの TTX 濃度は Fig. 15 のように変動した。すなわち、貯精囊発達個体の TTX 濃度がピークに達したのは 3 月であったが、受精囊発達個体の TTX 濃度がピークに達したのは 5 月であった。受精囊発達期 (4~7 月) のオオツノヒラムシの TTX 濃度を生殖腺の発達段階ごとに検討した結果、貯精囊発達個体、受精囊発達個体および

未発達もしくは産卵後個体ではそれぞれ $142 \pm 62.9 \mu\text{g/g}$ 、 $280 \pm 232 \mu\text{g/g}$ および $134 \pm 45 \mu\text{g/g}$ となり、それぞれの間には有意な差が認められた (ANOVA, $P < 0.05$; Fig. 16)。

1.3.4 1 個体あたりの TTX 量の変化

貯精囊発達期から受精囊発達期 (1~7 月) にかけてオオツノヒラムシの 1 個体あたりの TTX 量は Fig. 17 のように変動した。貯精囊発達個体 1 個体あたりの TTX 量がピークに達したのは 4 月であったが、受精囊発達個体 1 個体あたりの TTX 量がピークに達したのは 5 月であった。受精囊発達期 (4~7 月) のオオツノヒラムシ 1 個体あたりの TTX 量を生殖腺の発達段階ごとに検討した結果、貯精囊発達個体、受精囊発達個体および未発達もしくは産卵後個体では、それぞれ $590 \pm 379 \mu\text{g}$ 、 $851 \pm 817 \mu\text{g/g}$ および $255 \pm 90 \mu\text{g/g}$ となり、それぞれの間には有意な差が認められた (ANOVA, $P < 0.05$; Fig. 18)。

1.3.5 Gonadosomatic index (GSI) の変化

貯精囊発達期から受精囊発達期 (1~7 月) にかけてオオツノヒラムシの貯精囊および受精囊を指標とした GSI は Fig. 19 のように変動した。貯精囊は 1 月~6 月の個体において確認され、GSI がピークに達したのは 4 月であった ($1.53 \pm 0.64\%$)。受精囊は 4 月~6 月に確認され、GSI がピークに達したのは 5 月であった ($1.67 \pm 0.95\%$)。また、Total GSI がピークに達したのは 4 月であった ($1.86 \pm 0.87\%$)。

1.4 考察

オオツノヒラムシにおいて、その毒性の高さや組織への局在に関してはいくつかの報告がある (Miyazawa et al., 1986, 1987; Yamada et al., 2017) 一方で、その

生態に着目した長期的な TTX の動態に関する報告は非常に少ない。グアムで発見された新種の *Planocera* 属のヒラムシでは巻貝類などを捕食するために TTX を用いており、捕食後 1 日目ではヒラムシの毒性が減少するが、8 日後には 1 日目よりも有意に高い毒性を示すことが報告されている (Ritson-Williams et al., 2006)。また、オオツノヒラムシの TTX の蓄積が体重依存的であること、そして、産卵期 (4~7 月) にはそれ以外の期間と比較しても有意に TTX 量が高いことが報告されている (Yamada et al., 2017)。

本研究では、産卵期におけるオオツノヒラムシの TTX 蓄積がどのような要素と関連しているのかを調査した。その結果、産卵期のオオツノヒラムシは受精囊の発達に伴い急激に TTX 濃度を上昇させることが明らかとなった。一方で、産卵準備期のオオツノヒラムシは貯精囊を発達させるが、その際の毒性の変動は受精囊発達期のそれと比較しても低いものであり、そこに関係性は見出せない。以上の結果から、生殖腺が未発達の時期から貯精囊発達期にかけて体重依存的に TTX を蓄積したオオツノヒラムシは、産卵期に入ると受精囊の発達に伴い急激にその TTX 濃度を上昇させているものと考えられる。

年間を通して高い毒性を示すオオツノヒラムシの産卵期の急激な TTX 蓄積が、受精囊の発達に伴って生じることが分かり、オオツノヒラムシの TTX 動態の一部が明らかとなった。しかし本章の結果からは、産卵期のオオツノヒラムシの TTX 蓄積が餌生物などの外的要因によるものなのか、共生細菌による産生やオオツノヒラムシ自身による生合成などの内的要因によるものなのかを検討できないことに加え、オオツノヒラムシの卵板に関わる TTX の動態に関する知見も未だに不足している。今後、オオツノヒラムシがどのように TTX を獲得し、利用し、そして授受しているのかを明らかにすることは、TTX を保有する低次の生物群と高次の生物群の間にある関係性や、海洋環境における TTX の循環を解

明する上で重要な知見になると考えられる。そのためにも、依然として不明な点が多く残されるオオツノヒラムシの生活環における TTX の動態を早急に解明することが求められる。

第 2 節 バイオプシー飼育実験による受精囊発達期の TTX 保有量推定

2.1 目的

第 1 節の結果から、オオツノヒラムシの受精囊の発達が TTX 蓄積に関与している可能性が示唆された。しかし、オオツノヒラムシ体内の TTX 量が上昇する要因が、TTX を保有する餌生物を捕食することなどの外的要因によるものなのか、オオツノヒラムシの腸管内等に共生する TTX 産生細菌によるもの、もしくはオオツノヒラムシ自身による TTX の生合成という内的要因によるものなのか、という点については判断できない。そのため、オオツノヒラムシの TTX の蓄積に及ぼす要因を検討するために、オオツノヒラムシを個体識別し TTX 量の変動を継続的に観察することのできる技術を確立する必要性が生じた。過去にはウミフクロウの毒性を継続的に観察する目的で、バイオプシーを用いた飼育実験を行った研究例があった (Khor et al., 2013)。オオツノヒラムシが扁形動物であり、プラナリアと同様に体組織の再生能力を有することからも、ある程度の裂傷に耐性がある可能性が考えられる。これらのことから、本章ではオオツノヒラムシの保有する TTX を非致死的に観察する技術の確立とオオツノヒラムシの TTX 蓄積に及ぼす要因を検討することを目的とした。

2.2 試料および方法

2.2.1 試料

本節で使用したオオツノヒラムシ 60 個体は第 4 章第 1 節と同じ地点で採取し

た。

2.2.2 飼育実験

オオツノヒラムシ 60 個体の外部形態を記録し、プラスチック製容器に 1 個体ずつ隔離した。飼育期間中は、植食性であり TTX の検出事例のないイシダタミガイ *Monodonta confuse* を餌として与えて飼育した。また、飼育水は 20°C の人工海水を用い、外部からオオツノヒラムシへの TTX の供給要因となるものは極力排除した。飼育中は月に一度体重を記録し、分析のために個体外縁部の毎回同じ部位の体組織を 0.2 g 程度採取した。採取した組織片は -30°C で冷凍保存した。また、飼育期間中に産卵された卵板は回収し、組織片と同様に -30°C で冷凍保存した。

2.2.3 TTXs の検出

2.2.3.1 TTXs の抽出

組織片および卵板は第 2 章第 2 節と同様に TTXs の抽出に供した。

2.2.3.2 LC-MS/MS 分析

組織片および卵板は第 2 章第 2 節と同様に LC-MS/MS 分析に供した。

2.3 結果

2.3.1 オオツノヒラムシ個体の TTX 量の変化

飼育したオオツノヒラムシの TTX 保有量は Fig. 20 のように変動した。飼育したオオツノヒラムシの TTX 保有量は 4 月をピーク ($1,265 \pm 549 \mu\text{g}$) に徐々に減少していた。本研究において得られたデータの信頼性を検討するべく、同時期に天然環境下から採取されたオオツノヒラムシの TTX 保有量と比較すると同レベ

ルで推移した。

2.3.2 オオツノヒラムシの体重および産卵回数の変動

産卵期のオオツノヒラムシの体重変動と産卵回数を月毎に示した。5月の産卵回数は 6.52 ± 4.48 回/個体、6月の産卵回数は 6.57 ± 4.57 回/個体、7月の産卵回数は 2.33 ± 1.22 回/個体であったのに対し、体重は4月をピーク (2.64 ± 1.38 g) に減少し続けた (Fig. 21)。また、体重および産卵回数をそれぞれ月毎に比較するとこれらの間には有意な差が検出された (ANOVA, $P < 0.05$)。

2.3.3 産卵経験の有無による TTX 量の差

5月時点で飼育していたオオツノヒラムシをそれまでの産卵経験の有無に分けて TTX 保有量を比較した (Fig. 22)。その結果、産卵経験のない個体は $1,653 \pm 1,177$ μg 、産卵経験のある個体は 908 ± 761 μg であり、産卵経験のない個体の方が有意に高かった (Student *t*-test, $P < 0.05$)。

2.3.4 産卵時に供給される TTX 量

オオツノヒラムシ個体の TTX 量、産卵回数、卵板の総 TTX 量を合算して、オオツノヒラムシが一回の産卵によって卵板に供給する TTX 量と個体に対する比率を算出した (Fig. 23)。卵板1個の TTX 量は7月に最も高い値を示し (280 ± 96 μg)、6月に最も低い値を示した (203 ± 119 μg)。それに対して比率は5月 ($11.4 \pm 5.39\%$) に最も低い値を示し、6月 ($14.3 \pm 8.93\%$) から7月 ($32.9 \pm 16.8\%$) にかけて急激に上昇していた (ANOVA, $P < 0.05$; Fig. 24)。

2.3.5 オオツノヒラムシの TTX 増加量

オオツノヒラムシの卵板の総 TTX 量と、産卵前後の個体の TTX 保有量を用いてオオツノヒラムシの TTX 蓄積量を算出した (Fig. 23)。4 月に蓄積した TTX 量は $945 \pm 638 \mu\text{g}$ 、5 月に蓄積した TTX 量は $1,207 \pm 1,621 \mu\text{g}$ 、6 月に蓄積した TTX 量は $588 \pm 1,184 \mu\text{g}$ 、7 月に蓄積した TTX 量は $291 \pm 515 \mu\text{g}$ であった。また、これらの間には有意な差が検出された (ANOVA, $P < 0.05$; Fig. 25)。

2.4 考察

オオツノヒラムシにおいて、その毒性の高さや組織への局在に関してはいくつかの報告がある (Miyazawa et al., 1986, 1987; Yamada et al., 2017)。一方で、その生態に着目した長期的な TTX の動態に関する報告は少ない。また、グアムで発見された新種の *Planocera* 属のヒラムシでは巻貝類などを捕食するためにその TTX を用いていることが報告されているが (Ritson-Williams et al., 2006)、オオツノヒラムシが TTX を保有する要因や用途に関しては不明な点が非常に多く残されている。

本章において、オオツノヒラムシの TTX 蓄積と、産卵期の受精囊の発達の関連性が示唆されたため、本節ではオオツノヒラムシの TTX 動態に関する非致死的な技術の開発に加え、オオツノヒラムシの TTX 蓄積に及ぼす要因を検討した。過去に報告されているウミフクロウに対するバイオプシーを用いた飼育実験 (Khor et al., 2014) を参考に、扁形動物であり体組織の再生能を期待できるオオツノヒラムシにおいて同様の飼育実験を行った。

その結果、オオツノヒラムシの体組織外縁から保有する総 TTX 量を推定することが可能であった。TTX を保有している可能性のある餌生物に接触しない環境下で飼育した結果、天然環境下のオオツノヒラムシと同様に産卵期に TTX 保

有量がピークを迎え、その標準偏差は天然環境下のオオツノヒラムシのそれと比較し減少傾向にあった。天然環境下では毎月別個体を用いて測定しているのに対し、本実験が同一個体を継続的に観察していること、そして飼育環境の水温が一定（20°C）であることなどが要因として考えられる。

また、産卵は5月から7月にかけて確認され、6月に最も多くの卵板を回収した。体重は4月以降に減少し続けていたことから、産卵によってエネルギーを消耗し、それに伴い縮小したものと考えられる。それを検証するために、産卵のピークである5月に産卵経験の有無によって TTX 保有量を比較した。その結果、産卵未経験の個体では、産卵経験のある個体と比べて有意に TTX 保有量が高かったことから、産卵によって TTX を放出し、それに伴って体重が減少することを示唆している。また、本実験で回収した卵板の平均 TTX 濃度は $3,330 \pm 1,579$ $\mu\text{g/g}$ であった。親個体のそれと比較しても非常に高い値であり、既報の論文（Miyazawa et al., 1987）とも矛盾しない。オオツノヒラムシの卵板の TTX 量は産卵期の前期後期を問わず高水準であったが、オオツノヒラムシ個体の TTX 量に対する比率は7月に大きく上昇していた。これは、卵板に供給される TTX 量が一貫して高水準であるのに対して、産卵したオオツノヒラムシ個体は縮小に伴い体重および保有 TTX 量が減少したことによるものと考えられる。

これらの結果から、産卵期のオオツノヒラムシにおける TTX の蓄積が、産卵による TTX の垂直供給を目的としたものであることが示唆された。そしてその TTX の蓄積は餌生物などのような外的要因によるものではなく、共生細菌による産生やオオツノヒラムシ自身による生合成などの内的要因によるものであることが示唆された。また、オオツノヒラムシ個体の TTX 保有量と卵板の総 TTX 量から算出した1ヶ月間の TTX の増加量は $860 \pm 1,236$ μg で、月別に見ると産卵のピークである5月に最も高い値を示した。個体によっては自身の TTX 保有

量に匹敵する量を 1 ヶ月間のうちに蓄積していることから、その蓄積能力が非常に高いものであることを示している。

本節において、オオツノヒラムシの TTX 蓄積とそれに及ぼす要因が内的なものである可能性が示唆された。しかし、本節の成果からはオオツノヒラムシが生殖腺の発達前から TTX を蓄積しているとする既報の説をすべて包括することができない。オオツノヒラムシが TTX を保有する低次生物群と高次生物群をつなぐ上で、占めている役割を明らかにするためにも、オオツノヒラムシの貯精囊発達期、生殖腺未発達期の TTX 蓄積についても、更なる調査が必要である。

第 3 節 バイオプシー飼育実験による貯精囊発達期の TTX 保有量推定

3.1 目的

前節において、受精囊発達期にかけてのオオツノヒラムシの TTX 蓄積が、産卵による TTX の垂直供給を目的としたものである可能性に加え、受精囊発達期のオオツノヒラムシの TTX 蓄積が、餌生物に依存しない内的要因によるものである可能性が示唆された。そこで本節では、貯精囊発達期の TTX 蓄積に着目して前節と同様の飼育実験を実施し、貯精囊発達期の TTX 蓄積にかかわる要因を検討することを目的とした。

3.2 試料および方法

3.2.1 試料

本節で使用したオオツノヒラムシ 10 個体は 2019 年 12 月に第 4 章第 1 節と同じ地点で採取した。また、採取時点の TTX 量を測定するためオオツノヒラムシを背面から見た時の右上縁付近（以下 a とする）と左下縁付近（以下 b とする）の一部をコルクボーラーで打ち抜き、TTX 定量用として採取した（Fig. 26）。

3.2.2 飼育実験

前節と同様、オオツノヒラムシ 10 個体の外部形態を記録し、プラスチック製容器に 1 個体ずつ隔離・収容した。飼育期間中は、植食性であり TTX の検出事例のないイシダタミガイを餌として与えて飼育した。また、飼育水は人工海水を用い、外部からオオツノヒラムシへの TTX の供給要因となるものは極力排除した。また、1 週間に 1 度、オオツノヒラムシの成熟度合いと大きさ、体重の変化を確認するために表裏の写真撮影と重量を測定し、その変化も記録した。所属研究室の先行研究にもとづき、飼育時の水温が低い場合、性成熟および産卵が遅れることが明らかになったことから、本研究では受精嚢に TTX 濃度の高い卵母細胞が蓄積して TTX 濃度が偏ることを避けるため、外部冷却装置を用いて 12°C に設定し、性成熟を可能な限り遅らせた。

体組織の採取は飼育開始時および飼育終了時の 2 回実施した。オオツノヒラムシが性成熟して受精嚢に卵母細胞が蓄積するタイミングで飼育終了とし、飼育終了とした個体は、保有 TTX 量を比較するため、飼育前に採取した部分と同じ部分の体組織を採取し、飼育開始時の体組織と同様に分析まで -30°C で冷凍保存した。

3.2.3 TTXs の検出

3.2.3.1 TTXs の抽出

組織片は第 2 章第 2 節と同様に TTXs の抽出に供した。

3.2.3.2 LC-MS/MS 分析

組織片は第 2 章第 2 節と同様に LC-MS/MS 分析に供した。

3.3 結果

3.3.1 オオツノヒラムシ個体の成長率

12月から4月までの85日間無毒の餌を与えて飼育したオオツノヒラムシは全て生存し、その体重は個体番号1~10全ての個体で増加した(Table 2、Fig. 27)。その間に体重は 2.36 ± 0.4 g から 4.95 ± 1.06 g に有意に増加した。特に個体番号8~10では大幅な体重の増加がみられ、飼育開始時と飼育終了後の体重を比較すると2.58~3.42倍に増加していた。

3.3.2 TTX量とTTX濃度の変化

採取したオオツノヒラムシの体組織の1部から得られたTTX量およびTTX濃度の飼育実験前後での変化をまとめた(Table 3、Fig. 28)。飼育開始時の個体のa部分のTTX量、b部分のTTX量、a部分のTTX濃度、b部分のTTX濃度は、それぞれ 230.0 ± 117.7 μg 、 246.9 ± 93.6 μg 、 96.3 ± 41.5 $\mu\text{g/g}$ 、 106.8 ± 41.5 $\mu\text{g/g}$ であった。一方、飼育終了後の個体のa部分のTTX量、b部分のTTX量、a部分のTTX濃度、b部分のTTX濃度は、それぞれ、 $6,643.1 \pm 3,214.3$ μg 、 $6,507.2 \pm 2,596.9$ μg 、 $1,397.8 \pm 778.5$ $\mu\text{g/g}$ 、 $1,341.7 \pm 534.1$ $\mu\text{g/g}$ であり、飼育開始時の個体と飼育終了後の個体では、それぞれの間でいずれも有意差が認められた(Student *t*-test, $P < 0.05$)。また、飼育実験前後のどちらにおいても、採取したa部分とb部分の間に有意差は見られなかった。

3.4 考察

本節において、オオツノヒラムシの貯精囊発達期のTTX蓄積にかかわる要因を検討したところ、無毒環境下で飼育しているにもかかわらずオオツノヒラムシの保有するTTX量および濃度が有意に増加していることが明らかとなった。

本節では、貯精囊の発達前から受精囊の発達し始める時期までを飼育期間としており、受精囊の発達に伴って急激に毒化するとする第 1 節のデータとも矛盾しない結果といえる。引き続き、生殖腺未発達期の TTX 蓄積を検討することで、オオツノヒラムシ生活環全体での TTX 蓄積にかかわる要因を検討していく必要がある。

第 4 節 バイオプシー飼育実験による生殖腺未発達期の TTX 保有量推定

4.1 目的

前節までの結果から、受精囊発達期にかけてのオオツノヒラムシの TTX 蓄積が、産卵による TTX の垂直供給を目的としたものであり、受精囊の発達とあわせて急激に TTX を蓄積することが明らかとなった。そこで本節では引き続き生殖腺未発達期の TTX 蓄積に着目した前節と同様の飼育実験を実施し、生殖腺発達前のオオツノヒラムシの TTX 蓄積にかかわる要因を検討することを目的とした。

4.2 試料および方法

4.2.1 試料

本節で使用したオオツノヒラムシ 8 個体は、2020 年 8 月に第 4 章第 1 節と同じ地点で採取した。また、前節と同様に採取時点の TTX 量を測定するためオオツノヒラムシの背面 a および b の 2 ヶ所をコルクボーラーで打ち抜き、TTX 定量用として採取した (Fig. 26)。

4.2.2 飼育実験

前節と同様、オオツノヒラムシ 8 個体の外部形態を記録し、プラスチック製容器に 1 個体ずつ隔離した。飼育期間中は、植食性であり TTX の検出事例がな

いイシダタミガイを餌として与えて飼育した。また、飼育水は 20°Cの人工海水を用い、外部からオオツノヒラムシへの TTX の供給要因となるものは極力排除した。体組織の採取は飼育開始時および飼育終了時の 2 回実施した。オオツノヒラムシが性成熟し貯精嚢が発達するタイミングで飼育終了とし、飼育終了とした個体は、保有 TTX 量を比較するため、飼育前に採取した部分と同じ部分の体組織を採取し、飼育開始時の組織片と同様に分析まで- 30°Cで冷凍保存した。

4.2.3 TTXs の検出

4.2.3.1 TTXs の抽出

組織片は第 2 章第 2 節と同様に TTXs の抽出に供した。

4.2.3.2 LC-MS/MS 分析

組織片は第 2 章第 2 節と同様に LC-MS/MS 分析に供した。

4.3 結果

4.3.1 オオツノヒラムシ個体の成長率

8 月から翌年 1 月までの 149 日間無毒の餌を与えて飼育したオオツノヒラムシは全て生存し、その間に体重が 0.33 ± 0.11 g から 3.09 ± 0.64 g に有意に増加した (Table 4)。

4.3.2 TTX 量と TTX 濃度の変化

8 月に採取したオオツノヒラムシの TTX 保有量は 377.9 ± 215.5 μ g から、 $8,142.3 \pm 3,642.7$ μ g に有意に増加した (Student *t*-test, $P < 0.05$)。加えて TTX 濃度も $1,090.3 \pm 392.6$ μ g/g から $2,549.8 \pm 837.7$ μ g/g に有意に増加した (Student *t*-test, $P < 0.05$; Fig. 29)。

4.4 考察

本節において、オオツノヒラムシの生殖腺未発達期の TTX 蓄積にかかわる要因を検討したところ、無毒環境下で飼育しているにもかかわらずオオツノヒラムシの保有する TTX 量および濃度において有意に増加していることが明らかとなった。本節では、生殖腺の未発達時期から貯精囊の発達し始める時期までを飼育期間としており、特に TTX 濃度の変化は受精囊発達期の急激な変化と比較すると小さい。Yamada et al. (2017) の先行研究や前節までの結果から考えても、生殖腺の未発達時期には体サイズ依存的に TTX を蓄積するとする説と矛盾しない結果であるといえる。

前節までの結果を踏まえると、オオツノヒラムシは生殖腺が未発達の時期から貯精囊発達期にかけて体重依存的に TTX を蓄積し、産卵期に入ると受精囊の発達に伴い急激に TTX を体内に蓄積させているものと考えられ、そのどちらも餌生物に由来しない内的要因による蓄積であると考えられる。

第 5 節 個体群単位の飼育実験による生殖腺未発達期の TTX 保有量変化

5.1 目的

前節までの結果から、受精囊発達期にかけてのオオツノヒラムシの TTX 蓄積が、産卵による TTX の垂直供給を目的としたものであり、受精囊の発達とあわせて急激に TTX を蓄積することが明らかとなった。そこで本節ではオオツノヒラムシを個体ごとではなく個体群単位で無作為に分析対象個体を選択することで、小さいサイズから飼育することによる天然環境時の影響を極力小さくし、飼育開始時と飼育終了時の保有 TTX および TTX の類縁化合物の一つである 5,6,11-

trideoxyTTX の変化を調べることで、オオツノヒラムシにおける TTX 類の蓄積機構に関するさらなる知見を得ることを目的とした。

5.2 試料および方法

5.2.1 試料

本節で使用したオオツノヒラムシ幼体は、2021年8月に第4章第1節と同地点で採取した。また、採取時点の保有 TTX およびその類縁化合物である 5,6,11-trideoxyTTX 量を確認するため 5 個体を無作為に選択し、TTX および 5,6,11-trideoxyTTX の定量を行った。残りの個体は第4節と同様に無毒環境下における飼育実験に使用した。

5.2.2 飼育実験

8月に第2章第1節と同地点で採取したオオツノヒラムシをプラスチックケース (15 cm W × 10 cm L × 10 cm H) に 5~6 個体収容し、餌は前節と同様にイシダタミガイとした。飼育開始初期段階ではオオツノヒラムシの体サイズが小さかったため、イシダタミガイを細かく刻んで食べやすいサイズにカットし、給餌した。また、水温は室温である約 20°C に設定し、過密飼育とならないようにスペースに余裕を持たせた。オオツノヒラムシが成熟し、受精嚢に卵母細胞が蓄積する直前で飼育を終了した。飼育を終了した個体は回収し、保有 TTX および 5,6,11-trideoxyTTX 量を比較するため、分析まで -30°C で冷凍保存した。

5.2.3 TTXs の検出

5.2.3.1 TTXs の抽出

組織片は第2章第2節と同様に TTXs の抽出に供した。

5.2.3.2 LC-MS/MS 分析

組織片は第 2 章第 2 節と同様に LC-MS/MS 分析に供した。

5.3 結果

採取したオオツノヒラムシは、8 月から 182 日間無毒の餌を与えて飼育し、その体重は 0.2 ± 0.07 g から 1.41 ± 0.48 g に増加した。個体ごとの TTX および 5,6,11-trideoxyTTX 濃度は、それぞれ 255.1 ± 119.9 $\mu\text{g/g}$ から 106.3 ± 27.6 $\mu\text{g/g}$ および 154.8 ± 72.8 $\mu\text{g/g}$ から 130.5 ± 44.2 $\mu\text{g/g}$ と変化していたものの有意差は認められなかった。TTX および 5,6,11-trideoxyTTX 保有量は 44.3 ± 8.1 μg から 152.6 ± 69.1 μg および 27.0 ± 6.1 μg から 189.7 ± 92.0 μg と有意に増加した (Student *t*-test, $P < 0.05$; Fig. 30)。

5.4 考察

TTX はフグ科魚類のみならず、様々な動物門の生物から検出されており (Noguchi et al., 1982; Yotsu-Yamashita et al., 1992; Hwang et al., 1996)、*Vibrio* 属や *Pseudomonas* 属などの海洋細菌を始まりとした食物連鎖によって生物濃縮され、多くの TTX 保有生物の体内に蓄積するとされている (Noguchi et al., 1987; Simidu et al., 1987; Miyazawa and Noguchi, 2001; Noguchi et al., 2006; Noguchi and Arakawa, 2008; Magarlamov et al., 2017)。しかし、これらの海洋細菌が産生する TTX 量はごくわずかであり、フグ類など多量の TTX を保有する生物では、海洋細菌以外にも主要な TTX 供給源が存在することが考えられている。

近年の研究で、クサフグが TTX を多量に保有するオオツノヒラムシの卵を摂餌する行動が観察され、採取された天然個体の消化管内容物からはオオツノヒラムシの DNA 断片が検出されている (Itoi et al., 2018; Okabe et al., 2019)。その

他にも、台湾の陸上養殖場から微量の TTX を保有する *Stylochus* 属のヒラムシが発見された事例や (Lin et al., 1998)、*Stylochoplana* 属のヒラムシがウミフクロウの毒化に関与していることが報告されている (Salvitti et al., 2015)。

オオツノヒラムシを含むヒラムシ類の TTX の動態や TTX 類の蓄積機構については研究例が少なく、詳細は明らかになっていない。特に、オオツノヒラムシが体内に保有する TTX 量は膨大で、フグ科魚類と同様に海洋細菌が産生する TTX 量だけではその量を説明できないとの指摘もある (Yamada et al., 2017)。

琉球列島近海においては沖縄県石垣島および西表島の沿岸域で採捕されたオキナワフグおよびツムギハゼ稚魚の消化管内容物からオオツノヒラムシの COI 遺伝子と一致する配列が検出されていることから、オオツノヒラムシの生息が示唆されているものの、我々のこれまでの調査の中でも TTX を保有するヒラムシ類は発見されていなかった (Itoi et al., 2020; Ito et al., 2022)。しかし、本研究において新たに *Planocera* sp. の存在が明らかにされたことで、琉球列島近海における TTX の授受を解明するための重要な知見が得られたといえる。*Planocera* sp. の生態や資源量については不明な点が多いものの、本研究において *Planocera* sp. の保有する TTX およびその類縁化合物組成がオオツノヒラムシと類似していることが明らかとなった。

前節までの結果として、ヒラムシ類の中でも特に高い毒性を示し日本列島近海においてに豊富な資源量が確認されているオオツノヒラムシに着目し、その生態および TTX の動態を検討したところ、オオツノヒラムシは生殖腺が未発達の時期から貯精囊発達期にかけて体重依存的に TTX を蓄積し、産卵期に入ると受精囊の発達に伴い急激に TTX を体内に蓄積させていることが明らかとなり、またオオツノヒラムシの TTX 蓄積が餌生物に由来しない内的要因によるものと示唆された。

本節においては、オオツノヒラムシを個体ごとではなく個体群単位で無作為に分析対象個体を選択することで、体サイズの小さい時期に飼育することによる影響を抑える飼育実験を実施した。結果として、前節までと同様に、無毒の餌のみを与えて飼育しても、TTX およびその類縁化合物である 5,6,11-trideoxyTTX 量は大幅に増加することが示唆された。対して、TTX および 5,6,11-trideoxyTTX の濃度に関しては有意な変化が観察されなかった。前節までのバイオプシー飼育実験においては実験前後で同一個体を測定できるが、本節の飼育実験においては実験前後で異なる個体を測定することになるため、個体差によるデータのばらつきの影響を受けやすいと考えられるが、それを加味しても、オオツノヒラムシが生殖腺未発達期から貯精囊発達期にかけて体重依存的に TTX を蓄積するとする既報のデータ (Yamada et al., 2017) と矛盾しないと考えられる。

本章における大きな成果として、オオツノヒラムシが生殖腺の未発達時期から貯精囊発達期にかけて体重依存的に TTX を蓄積し、産卵期に入ると受精囊の発達に伴い急激に TTX を体内に蓄積させている (Fig. 31) 点が明らかとなったことに加え、それらの TTX 蓄積が餌生物に由来しない内的要因による毒化である点は、海洋環境における TTX 循環の解明において非常に重要な知見であると考えられる。また、類似した TTX 組成を有している *Planocera* sp. においても同様の生態および TTX 蓄積機構を有している可能性は否定できない。低次生物群と高次生物群の TTX 循環において当該ヒラムシが果たす役割について、より詳細な調査が望まれるところである。

第5章 総括

フグ食文化を持つわが国において、TTX の生合成機構、フグの毒化機構の解明、あるいは海洋環境における TTX の循環経路を解明することは急務である。しかし、これまでにフグ科魚類の毒性やその TTX の局在、生理機能やその他の TTX 保有生物の探索およびその毒性などについては活発な研究が行われてきたにもかかわらず、未だ TTX 保有生物における毒化機構や TTX 循環の全容は明らかとなっていない (Miyazawa and Noguchi, 2001)。近年になって、オオツノヒラムシの卵やミユラー幼生が高濃度の TTX を保有しており、体サイズ依存的に TTX 量が増加させていることが明らかとなった (Yamada et al., 2017)。相模湾沿岸ではクサフグがその生活史を通じてオオツノヒラムシを摂餌し TTX を蓄積していること (Itoi et al., 2018; Okabe et al., 2019)、三陸沿岸のアカザラガイの毒化にオオツノヒラムシが関与していることなどが明らかとなり (Okabe et al., 2021)、オオツノヒラムシが本州近海の TTX 循環において非常に重要な存在であることが示唆されている。しかし、琉球列島近海においてはオキナワフグやツムギハゼの消化管内容物からオオツノヒラムシのミトコンドリア DNA の COI 遺伝子の部分配列が検出されておりその関与が示唆されているものの (Itoi et al., 2020; Ito et al., 2022)、オオツノヒラムシに匹敵するような高濃度の TTX を保有するヒラムシ類は報告されていなかった。

本研究の第2章において、琉球列島近海で発見された *Planocera* sp. の TTX 量と TTX 濃度は、オオツノヒラムシのそれに匹敵することが明らかになった。産卵期には大量の TTX を保有する可能性がある。資源量によっては琉球列島近海の TTX 保有生物に対する TTX の供給者として重要な地位にあることが示唆される。現在、*Planocera* 属、*Stylochoplana* 属および *Stylochus* 属のヒラムシにおいて TTX を保有することが報告されているが (Miyazawa et al., 1986; Lin et al., 1998;

Tanu et al., 2004; Salvitti et al., 2015a, b)、本研究において採取されたヒラムシを対象とした系統解析により、*Stylochoplana* 属のヒラムシが *Planocera* 属と同じクラスターを形成した。また、TTX を保有しないオキヒラムシがその最外縁部に配置されたことから、TTX 保有能を持つヒラムシが *Planocera* 属内の特定のクラスターに集中しており、それらの共通祖先が TTX 保有能を獲得した可能性が示唆された。

第 3 章では、*Planocera* sp. の保有する TTX およびその類縁化合物のクロマトグラムが、オオツノヒラムシに類似していることが明らかとなった。TTX および 5,6,11-trideoxyTTX のシグナル強度が非常に高く検出されているだけでなく、同様の組成で 11-norTTX-6(S)-ol、deoxyTTX 類および dideoxyTTX 類が検出されている点でも、オオツノヒラムシと *Planocera* sp. がより近縁であることを示している。また、この結果から、琉球列島近海において *Planocera* sp. を摂餌した TTX 保有生物に蓄積する TTX および類縁化合物組成を、オオツノヒラムシを摂餌させることによって再現できる可能性が示唆された。

琉球列島近海において *Planocera* sp. を摂餌することによって起きる毒化をシミュレーションし、TTX 保有生物と *Planocera* sp. の関係性を検討するため、無毒のクサフグに対してオオツノヒラムシの卵板を与える毒化実験を実施し、その TTX および類縁化合物組成を沖縄本島で採取された天然環境下のクサフグと比較した。その結果、クサフグはオオツノヒラムシの卵板を摂餌することで、TTX および 5,6,11-trideoxyTTX を大量に蓄積し、卵板に含まれる 11-norTTX-6(S)-ol、deoxyTTX 類および dideoxyTTX 類の組成を反映した。沖縄本島で採取したクサフグとよく類似した類縁化合物組成が観察されたことから、本州近海におけるオオツノヒラムシと同様に、琉球列島近海における TTX 保有生物への供給源となっているとする前章の示唆を強化している。この結果から、オオツノヒラ

ムシを利用した同様のシミュレーションが可能であると考えられ、琉球列島近海に生息するオキナワフグおよびツムギハゼを対象とした同様の実験を実施したところ、オキナワフグにおいては先述のクサフグと同様に TTX および 5,6,11-trideoxyTTX を大量に蓄積し、卵板に含まれる 11-norTTX-6(S)-ol、deoxyTTX 類および dideoxyTTX 類の組成を反映した。対してツムギハゼにおいては、deoxyTTX 類以外の TTX 類縁化合物の組成に大きな変化は見られなかった。ツムギハゼはフグと比較して TTX の保持能力が低いことが報告されており (Tatsuno et al., 2022)、TTX の蓄積機構がフグ類と異なっている可能性が示唆された。

第 4 章では、受精囊発達期のオオツノヒラムシの毒性の上昇は受精囊の発達に関連しており、それはオオツノヒラムシが捕食する餌生物によりもたらされるものではなく共生細菌やヒラムシ自身による生合成などの内部要因によることが示唆された。過去にはオオツノヒラムシの卵板は親個体の 2~50 倍の毒性を示すことなどが報告されており (Miyazawa et al., 1986, 1987)、本研究の結果からもオオツノヒラムシは保有する TTX の大半を卵あるいは幼生を保護するために利用しているものと考えられる。また、個体によっては自身の保有する TTX 量と同程度の TTX を卵板に供給していることから、オオツノヒラムシ自身の TTX 蓄積能は非常に高いことが示唆された。Yamada et al. (2017) の報告からオオツノヒラムシは産卵期を過ぎると世代交代している可能性が示唆されている。産卵を行った個体が徐々に体サイズを小型化させていたことから、この可能性は支持されている。以上のことから、フグ科魚類を含めた TTX 保有魚類よりも低次の TTX 保有生物間の TTX の循環およびその毒化機構において、オオツノヒラムシが特に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

また、バイオプシー技術を用いて TTX を観察する実験は、過去にウミフクロウやカリフォルニアイモリで行われてきた (Khor et al., 2013; Bucciarelli et al., 2014)。しかし、オオツノヒラムシを含む TTX 保有ヒラムシにおいてはそのような実験が行われてこなかった。本研究の技術がヒラムシ類を中心とした TTX 循環の解明に向けた足がかりとなることが期待される。

本研究の成果は、琉球列島近海においても *Planocera* 属のヒラムシが低次生物群間での TTX の循環と高次の生物群間での TTX の循環をつなぐ重要な鍵となる生物群であることを示唆している。今後、当該生物群を中心とした海洋環境における TTX の循環経路を調査・考察することで、現在も不明な点が多く残されている TTX 保有生物の毒化機構のみならず、海洋細菌を始点とした低次生物群における TTX の循環経路に関する新たな知見を得られることが期待される。加えて、多くの TTX 保有魚類においても調査を続けていくことにより、わが国で盛んに行なわれているトラフグ養殖の安全性をこれまで以上に高め、フグ食文化の伝統を守るだけでなく、更なる発展、水産資源の開発につながることを望まれる。

謝 辞

本研究は日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科増殖環境学研究室の糸井史朗教授および周防玲専任講師の御指導、御鞭撻の下に行われたもので、ここに深甚なる謝意を表す。

本研究の進行にあたって多大なご協力をいただいた東京大学水圏生物工学研究室 米澤遼博士、吉武和敏助教、木下滋晴准教授、浅川修一教授の皆様に厚く御礼申し上げます。

また、本論文の作成にあたってご助言いただいた高井則之教授、福島英登教授、小島隆人教授、尾山輝博士、伊藤正晟氏には深く謝意を表す。

最後に本研究に関して多くの助言、協力をいただいた日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科増殖環境学研究室の皆様に心からの謝意を申し上げます。

参考文献

- Abe, T., 1949. Taxonomic studies on the puffers (Tetraodontidae, Teleostei) from Japan and adjacent regions-V synopsis of the puffer from Japan and adjacent regions. *Bull. Biogeogr. Soc. Jpn.* 14, 89–140.
- Alvarez-Presas, M., Bagaña, J., Riutort, M., 2008. Molecular phylogeny of land and freshwater planarians (Tricladida, Platyhelminthes): from freshwater to land and back. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 555–568.
- Asakawa, M., Ito, K., Kajihara, H., 2013. Highly toxic ribbon worm *Cephalothrix simula* containing tetrodotoxin in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. *Toxins* 5, 376–395.
- Biessy, L., Boundy, M.J., Smith, K.F., Harwood, D.T., Hawes, I., Wood, S.A., 2019. Tetrodotoxin in marine bivalves and edible gastropods: A mini-review. *Chemosphere* 236, 124404.
- Bucciarelli, G.M., Li, A., Kats, L.B., Green, D.B., 2014. Quantifying tetrodotoxin levels in the California newt using a non-destructive sampling method. *Toxicon* 80, 87–93.
- Bucciarelli, G.M., Lechner, M., Fontes, A., Kats, L.B., Eisthen, H.L., Shaffer, H.B., 2021. From poison to promise: the evolution of tetrodotoxin and its potential as a therapeutic. *Toxins* 13, 517.
- Cardal, B.L., Brodie, E.D., Jr., Brodie, E.D., III, Hanifin, C.T., 2004. Secretion and regeneration of tetrodotoxin in the rough-skin newt *Taricha granulosa*. *Toxicon* 44, 933–938.
- Colquhoun, D., Henderson, R., Ritchie, J.M., 1972. The binding of labeled tetrodotoxin to non-myelinated nerve fibres. *J. Physiol.* 227, 95–126.

- Eickbush, T.H., Eickbush, D.G., 2007. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175, 477–485.
- EFSA CONTAM Panel, Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Nebbia, C.S., Oswald, I.P., Rose, M., Roudot, A.C., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., Wallace, H., Arnich, N., Benford, D., Botana, L., Viviani, B., Arcella, D., Binaglia, M., Horvath, Z., Steinkellner, H., van, Manen, M., Petersen, A., 2017. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA J.* 15, e04752.
- Faubel, A., 1983. The Polycladida, Turbellaria proposal and establishment of a new system Part I The Acotylea. *Mitt. Hambg. Zool. Mus. Inst.* 80, 17–121.
- Gall, B.G., Stoked, A.N., Pett, J.J., Spivey, K.L., French, S.S., Brodie, E.D., III, Brodie, E.D. Jr., 2014. Tetrodotoxin concentrations within a clutch and across embryonic development in eggs of the rough-skinned newts (*Taricha granulosa*). *Toxicon* 90, 249–254.
- Goto, T., Kishi, Y., Takahashi, S., Hirata, Y., 1965. Tetrodotoxin, *Tetrahedron* 21, 2059–2088.
- Hanifin, C.T., Brodie, E.D., III, Brodie, E.D., Jr., 2003. Tetrodotoxin levels in eggs of the rough-skin newt, *Taricha granulosa*, are correlated with female toxicity. *J. Chem. Ecol.* 29, 1729–1739.
- Hanifin, C.T., Brodie, E.D., Jr., Brodie, E.D., III, 2008. Phenotypic mismatches reveal escape from arms-race coevolution. *PLoS Biol.* 6, 471–482.

- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Soc. B Biol. Sci.* 270, 313–321.
- Hwang, D.F., Tsai, Y.H., Chai, R.J., Jeng, S.S., 1996. Occurrence of tetrodotoxin and paralytic shellfish poison in Taiwan Crab *Zosimus aeneus*. *Fish. Sci.* 62, 500–501.
- Itoi, S., Sato, T., Takei, M., Yamada, R., Ogata, R., Oyama, H., Teranishi, S., Kishiki, A., Wada, T., Noguchi, K., Abe, M., Okabe, T., Akagi, H., Kashitani, M., Suo, R., Koito, T., Takatani, T., Arakawa, O., Sugita, H., 2020. The planocercid flatworms is a main supplier of toxin to tetrodotoxin-bearing fish juveniles. *Chemosphere* 249, 126217.
- Ito, M., Furukawa, R., Yasukawa, S., Sato, M., Oyama, H., Okabe, T., Suo, R., Sugita, H., Takatani, T., Arakawa, O., Adachi, M., Nishikawa, T., Itoi, S., 2022. Local differences in the toxin amount and composition of tetrodotoxin and related compounds in pufferfish (*Chelonodon patoca*) and toxic goby (*Yongeichthys criniger*) juveniles. *Toxins* 14, 150.
- Jang, J.H., Yotsu-Yamashita, M., 2007. 6,11-Dideoxytetrodotoxin from the puffer fish, *Fugu pardalis*. *Toxicon* 50, 947–951.
- Katayama, T., Nishioka, M., Yamamoto, M., 1996. Phylogenetic relationships among turbellarian orders inferred from 18S rDNA sequences. *Zool. Sci.* 13, 747–756.
- Kato, K., 1944. Polycladida of Japan. *J. Sigenkagaku Kenkyusyo* 1, 257–319.
- Kashitani, M., Okabe, T., Oyama, H., Noguchi, K., Yamazaki, H., Suo, R., Mori, T., Sugita, H., Itoi, S., 2020. Taxonomic distribution of tetrodotoxin in acotylean flatworms (Polycladida: Platyhelminthes). *Mar. Biotechnol.* 22, 805–811.
- Kawabata, T., 1978. Tetrodotoxin. In Veterinary Sanitation Division, Environmental Health Bureau, Ministry of Health and Welfare (Ed.), *Food hygiene examination*

- manual (shokuhin eisei kensa shishin)*. Tokyo: Japan Food Hygiene Association, p. 223–241.
- Khor, S., Wood, S.A., Salvitti, L., Ragg, N.L.C., Taylor, D.I., McNabb, P., Cary, S.C., 2013. Development of a non-lethal biopsy technique for estimating total tetrodotoxin concentrations in the grey side-gilled sea slug *Pleurobranchaea maculata*. *Toxicon* 74, 27–33.
- Khor, S., Wood, S.A., Salvitti, L., Taylor, D.I., Adamson, J., McNabb, P., Cary, S.C., 2014. Investigating diet as the source of tetrodotoxin in *Pleurobranchaea maculata*. *Mar. Drugs* 12, 1–16.
- Kim, Y.H., Brown, G.B., Mosher, H.S., Fuhrman, F.A., 1975. Tetrodotoxin: occurrence in atelopid frogs of Costa Rica. *Science* 189, 151–152.
- Kiriake, A., Ohta, A., Okayama, S., Matsuura, K., Ishizaki, M., Nagashima, Y., 2016. Molecular identification and toxicity of pufferfish juveniles contaminating whitebait products. *Shokuhinn Eiseigaku Zasshi* 57, 13–18.
- Kudo, Y., Finn, J., Fukushima, K., Sakugawa, S., Cho, Y., Konoki, K., Yotsu-Yamashita, M., 2014. Isolation of 6-deoxytetrodotoxin from the pufferfish, *Takifugu pardalis*, and a comparison of the effects of the C-6 and C-11 hydroxy groups of tetrodotoxin on its activity. *J. Nat. Prod.* 77, 1000–1004.
- Kudo, Y., Yasumoto, T., Konoki, K., Cho, Y., Yotsu-Yamashita, M., 2012. Isolation and structural determination of the first 8-epi-type tetrodotoxin analogs from the newt, *Cynops ensicauda popei*, and comparison of tetrodotoxin analogs profiles of this newt and the puffer fish, *Fugu poecilonotus*. *Mar. Drugs* 10, 655–667.
- Lin, S.J., Chai, T.J., Jeng, S.S., Hwang, D.F., 1998. Toxicity of the puffer *Takifugu rubripes* cultured in northern Taiwan. *Fish. Sci.* 64, 766–770.

- Litvaitis M.K., Newman L.J.A., 2001. Molecular framework for the phylogeny of the Pseudocerotidae (Platyhelminthes, Polycladida). *Hydrobiologia* 444, 177–182.
- Magarlamov, T.Y., Melnikova, D.I., Chernyshev, A.V. 2017. Tetrodotoxin-producing bacteria: detection, distribution and migration of the toxin in aquatic systems. *Toxins* 9, 166.
- Matsuura, K., 2002. A review of two morphologically similar puffers, *Chelonodon laticeps* and *C. patoca*. *Natl. Sci. Mus. Monogr.* 22, 173–178.
- McNabb, P., Selwood, A.I., Munday, R., Wood, S.A., Taylor, D.I., MacKenzie, L.A., van Ginkel, R., Rhodes, L.L., Cornelisen, C., Heasman, K., Holland, P.T., King, C., 2010. Detection of tetrodotoxin from the grey side-gilled sea slug - *Pleurobranchaea maculata*, and associated dog neurotoxicosis on beaches adjacent to the Hauraki Gulf, Auckland, New Zealand. *Toxicon* 56, 466–473.
- Mebs, D., Yotsu-Yamashita, M., 2021. Acquiring toxicity of a newt, *Cynops orientalis*. *Toxicon* 198, 32–35.
- Miyazawa, K., Higashiyama, M., Ito, K., Noguchi, T., Arakawa, O., Shida, Y., Hashimoto, K., 1988. Tetrodotoxin in two species of ribbon worm (Nemertini), *Lineus fuscoviridis* and *Tubulanus punctatus*. *Toxicon* 26, 867–874.
- Miyazawa, K., Jeon, J.K., Maruyama, J., Noguchi, T., Ito, K., Hashimoto, K., 1986. Occurrence of tetrodotoxin in the flatworm *Planocera multitentaculata* (Platyhelminthes). *Toxicon* 24, 645–650.
- Miyazawa, K., Jeon, J.K., Noguchi, T., Ito, K., Hashimoto, K., 1987. Distribution of tetrodotoxin in the tissues of the flatworm *Planocera multitentaculata* (Platyhelminthes). *Toxicon* 25, 975–980.

- Miyazawa, K., Noguchi, T., 2001. Distribution and origin of tetrodotoxin *J. Toxicol. Toxin Rev.* 20, 11–33.
- Moczydlowski, E.G., 2013. The molecular mystique of tetrodotoxin. *Toxicon* 63, 165–183.
- Narahashi, T., 1972. Mechanism of action of tetrodotoxin and saxitoxin on excitable membranes. *Fed. Proc.* 31, 1124–1132.
- Narahashi, T., 2001. Pharmacology of tetrodotoxin. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 20, 67–84.
- Narita, H., Noguchi, T., Maruyama, J., Ueda, Y., Hashimoto, K., Watanabe, Y., Hida, K., 1981 Occurrence of tetrodotoxin in a trumpet shell boshubora *Charonia sauliae*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47, 935–941.
- Noguchi, T., 2003. Marine toxins. *Nippon Suisan Gakkaishi* 69, 895–909.
- Noguchi, T., Arakawa, O., 2008. Tetrodotoxin–Distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Mar. Drugs* 6, 220–242.
- Noguchi, T., Arakawa, O., Daigo, K., Hashimoto, K., 1986. Local differences in toxin composition of a xanthid crab *Atergatis floridus* inhabiting Ishigaki Island, Okinawa. *Toxicon* 24, 705–711.
- Noguchi, T., Arakawa, O., Takatani, T., 2006. Toxicity of pufferfish *Takifugu rubripes* cultured in net cages at sea or aquaria on land. *Comp. Biochem. Physiol. D* 1, 153–157.
- Noguchi, T., Arakawa, O., Takatani, T., 2006. TTX accumulation in pufferfish. *Comp. Biochem. Physiol. D* 1, 145–152.
- Noguchi, T., Ebesu, J.S.M., 2001. Puffer poisoning: Epidemiology and treatment. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 20, 1–10.

- Noguchi, T., Hashimoto, K., 1973. Isolation of tetrodotoxin from a goby *Gobius criniger*. *Toxicon* 11, 305–307.
- Noguchi, T., Hwang, D.F., Arakawa, O., Sugita, H., Deguchi, Y., Shida, Y., Hashimoto, K. 1987. *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fugu vermicularis vermicularis*. *Mar. Biol.* 94, 625–630.
- Noguchi, T., Narita, H., Maruyama, J., Hashimoto, K., 1982. Tetrodotoxin in the starfish *Astropecten polyacanthus*, in association with toxification of a trumpet shell, ‘Boshubora’ *Charonia sauliae*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48, 1173–1177.
- Noguchi, T., Uzu, A., Koyama, K., Maruyama, J., Nagashima, Y., Hashimoto, K., 1983. Occurrence of tetrodotoxin as the major toxin in the xanthid crab *Atergatis floridus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 49, 1887–1892.
- Numano, S., Kudo, Y., Cho, Y., Konoki, K., Yotsu-Yamashita, M., 2019. Temporal variation of the profile and concentrations of paralytic shellfish toxins and tetrodotoxin in the scallop, *Patinopecten yessoensis*, cultured in a bay of east Japan. *Mar. Drugs* 17, 653.
- Okabe, T., Oyama, H., Kashitani, M., Ishimaru, Y., Suo, R., Sugita, H., Itoi, S., 2019. Toxic flatworm egg plates serve as a possible source of tetrodotoxin for pufferfish. *Toxins* 11, 402.
- Okabe, T., Saito, R., Yamamoto, K., Watanabe, R., Kaneko, Y., Yanaoka, M., Furukoshi, S., Yasukawa, S., Ito, M., Oyama, H., Suo, R., Suzuki, M., Takatani, T., Arakawa, O., Sugita, H., Itoi, S., 2021. The role of toxic planoceric flatworm larvae on tetrodotoxin accumulation in marine bivalves. *Aquat. Toxicol.* 237, 105908.

- Omana-Zapata, I., Khabbaz, M.A., Hunter, J.C., Clarke, D.E., Bley, K.R., 1997. Tetrodotoxin inhibits neuropathic ectopic activity in neuromas, dorsal root ganglia and dorsal horn neurons. *Pain* 72, 41–49.
- Oyama, H., Ito, M., Suo, R., Goto-Inoue, N., Morisasa, M., Mori, T., Sugita, H., Mori, T., Nakahigashi, R., Adachi, M., Nishikawa, T., Itoi, S., 2022. Changes in tissue distribution of tetrodotoxin and its analogues in association with maturation in the toxic flatworm, *Planocera multitentaculata*. *Mar. Biotechnol.* 24, 1158–1167.
- Prudhoe, S., 1985. *A Monograph on Polyclad Turbellaria*. Oxford University Press, Oxford, 259.
- Ritson-Williams, R., Yotsu-Yamashita, M., Paul, V.J., 2006. Ecological functions of tetrodotoxin in a deadly polyclad flatworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3176–3179.
- Salvitti, L., Wood, S.A., Taylor, D.I., McNabb, P., Cary, S.C., 2015a. First identification of tetrodotoxin (TTX) in the flatworm *Stylochoplana* sp. a source of TTX for the sea slug *Pleurobranchaea maculata*. *Toxicon* 95, 23–29.
- Salvitti, L.R., Wood, S.A., Winsor, L., Cary, S.C., 2015b. Intracellular immunohistochemical detection of tetrodotoxin in *Pleurobranchaea maculata* (gastropoda) and *Stylochoplana* sp. (turbellaria). *Mar. Drugs* 13, 756–769.
- Sheumack, D.D., Howden, M.E., Spence, I., Quinn, R.J., 1978. Maculotoxin: A neurotoxin from the venom glands of the octopus *Hapalochlaena maculosa* identified as tetrodotoxin. *Science* 199, 188–189.
- Shibuno, T., Nakamura, Y., Horinouchi, M., Sano, M., 2008. Habitat use patterns of fishes across the mangrove-seagrass-coral reef seascape at Ishigaki Island, southern Japan. *Ichthyol. Res.* 55, 218–237.

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert M., Söding J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539.
- Simidu, U., Noguchi, T., Hwang, D.F., Shida, Y., Hashimoto, K., 1987. Marine bacteria which produce tetrodotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1714–1715.
- Stokes, A.N., Ducey, P.K., Neuman, L.L., Hanifin, C.T., French, S.S., Pfender, M.E., Brodie III, E.D., Brodie, Jr, E.D, 2014. Confirmation and distribution of tetrodotoxin for the first time in terrestrial invertebrates: two terrestrial flatworm species (*Bipalium adventitium* and *Bipalium kewense*), *PLoS One* 9, e100718.
- Suo, R., Tanaka, M., Oyama, H., Kojima, Y., Yui, K., Sakakibara, R., Nakahigashi, R., Adachi, M., Nishikawa, T., Sugita, H., Itoi, S., 2022. Tetrodotoxins in the flatworm *Planocera multitentaculata*. *Toxicon* 216, 169–173.
- Takahashi, H., Toyoda, A., Yamazaki, T., Narita, S., Mashiko, T., Yamazaki, Y., 2017. Asymmetric hybridization and introgression between sibling species of the pufferfish *Takifugu* that have undergone explosive speciation. *Mar. Biol.* 164, 90.
- Tanu, M.B., Mahmud, Y., Arakawa, O., Takatani, T., Kajihara, H., Kawatsu, K., Hamano, Y., Asakawa, M., Miyazawa, K., Noguchi, T., 2004. Immunoenzymatic visualization of tetrodotoxin (TTX) in *Cephalothrix* species (Nemertea: Anopla: Palaeonemertea: Cephalotrichidae) and *Planocera reticulata* (Platyhelminthes: Turbellaria: Polycladida: Planoceridae). *Toxicon* 44, 515–520.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022–3027.
- Tatsuno, R., Shikina, M., Yamamoto, Y., Kanahara, Y., Takatani, T., Arakawa, O., 2022.

- Tetrodotoxin retention in the toxic goby *Yongeichthys criniger*. *J. Mar. Sci. Eng.* 10, 191.
- Toda, M., Uneyama, C., Toyofuku, H., Morikawa, K., 2012. Trends of food poisonings caused by natural toxins in Japan, 1989-2011. *Foo. hyg. saf. sci.* 53, 105-120.
- Tsuda, K., Ikuma, S., Kawamura, R., Tachikawa, K., Sakai, C., Tamura, C., Amakasu, D., 1964. Tetrodotoxin. VII. On the structures of tetrodotoxin and its derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 12, 1357–1374.
- Tsunashima, T., Hagiya, M., Yamada, R., Koito, T., Tsuyuki, N., Izawa, S., Kosoba, K., Itoi, S., Sugita, H., 2017. A molecular framework for the taxonomy and systematics of Japanese marine turbellarian flatworms (Platyhelminthes, Polycladida). *Aquat. Biol.* 26, 159–167.
- Ueyama, N., Sugimoto, K., Kudo, Y., Onodera, K., Cho, Y., Konoki, K., Nishikawa, T., Yotsu-Yamashita, M., 2018. Spiro bicyclic guanidino compounds from pufferfish: Possible biosynthetic intermediates of tetrodotoxin in marine environments. *Chem. Eur. J.* 24, 7250–7258.
- Vanhove, M.P.M., Tessens, B., Schoelinck, C., Jondelius, U., Littlewood, D.T., Artois, T., Huyse, T., 2013. Problematic barcoding in flatworms: A case-study on monogeneans and rhabdoceles (Platyhelminthes). *ZooKeys* 365, 355–379.
- Vlasenko, A.E., Magarlamov, T.Y., 2023. Tetrodotoxins in ribbon worms *Cephalothrix* cf. *simula* and *Kulikovia alborostrata* from Peter the great bay, Sea of Japan. *Toxins* 15 16.
- Woese, C.R., 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8392–8396.
- Woodward, R.B., 1964. The structure of tetrodotoxin. *Pur. App. Chem.* 9, 49–74.

- Yamada, R., Tsunashima, T., Takei, M., Sato, T., Wajima, Y., Kawase, M., Oshikiri, S., Kajitani, Y., Kosoba, K., Ueda, H., Abe, K., Itoi, S., Sugita, H., 2017. Seasonal changes in the tetrodotoxin content of the flatworm *Planocera multitentaculata*, *Mar. Drugs* 15, 56.
- Yasukawa, S., Shirai, K., Namigata, K., Ito, M., Tsubaki, M., Oyama, H., Fujita, Y., Okabe, T., Suo, R., Ogiso, S., Watabe, Y., Matsubara, H., Suzuki, N., Hirayama, M., Sugita, H., Itoi, S., 2023. Tetrodotoxin detection in Japanese bivalves: toxification status of scallops. *Mar. Biotechnol.* 25, 666–676.
- Yonezawa, R., Itoi, S., Igarashi, Y., Yoshitake, K., Oyama, H., Kinoshita, S., Suo, R., Yokobori, S., Sugita, H., Asakawa, S., 2020. Characterization and phylogenetic position of two sympatric sister species of toxic flatworms *Planocera multitentaculata* and *Planocera reticulata* (Platyhelminthes: Acotylea). *Mitochondr. DNA Part B* 5, 3.
- Yotsu-Yamashita, M., Abe, Y., Kudo, Y., Ritson-Williams, R., Paul, V.J., Konoki, K., Cho, Y., Adachi, M., Imazu, T., Nishikawa, T., Isobe, M., 2013. First identification of 5,11-dideoxytetrodotoxin in marine animals, and characterization of major fragment ions of tetrodotoxin and its analogs by high resolution ESI-MS/MS. *Mar. Drugs* 11, 2799–2813.
- Yotsu-Yamashita, M., Mebs, D., Yasumoto, T., 1992. Tetrodotoxin and its analogues in extracts from the toad *Atelopus oxyrhynchus* (family: Bufonidae). *Toxicon* 30, 1489–1492.
- Yotsu-Yamashita, M., Schimmele, B., Yasumoto, T., 1999. Isolation and structural assignment of 5-deoxytetrodotoxin from the puffer fish *Fugu poecilonotus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 961–963.

Yotsu-Yamashita, M., Yamagishi, Y., Yasumoto, T., 1995. 5,6,11-Trideoxytetrodotoxin from the puffer fish, *Fugu poecilonotus*. *Tetrahedron Lett.* 36, 9329–9332.

図および表

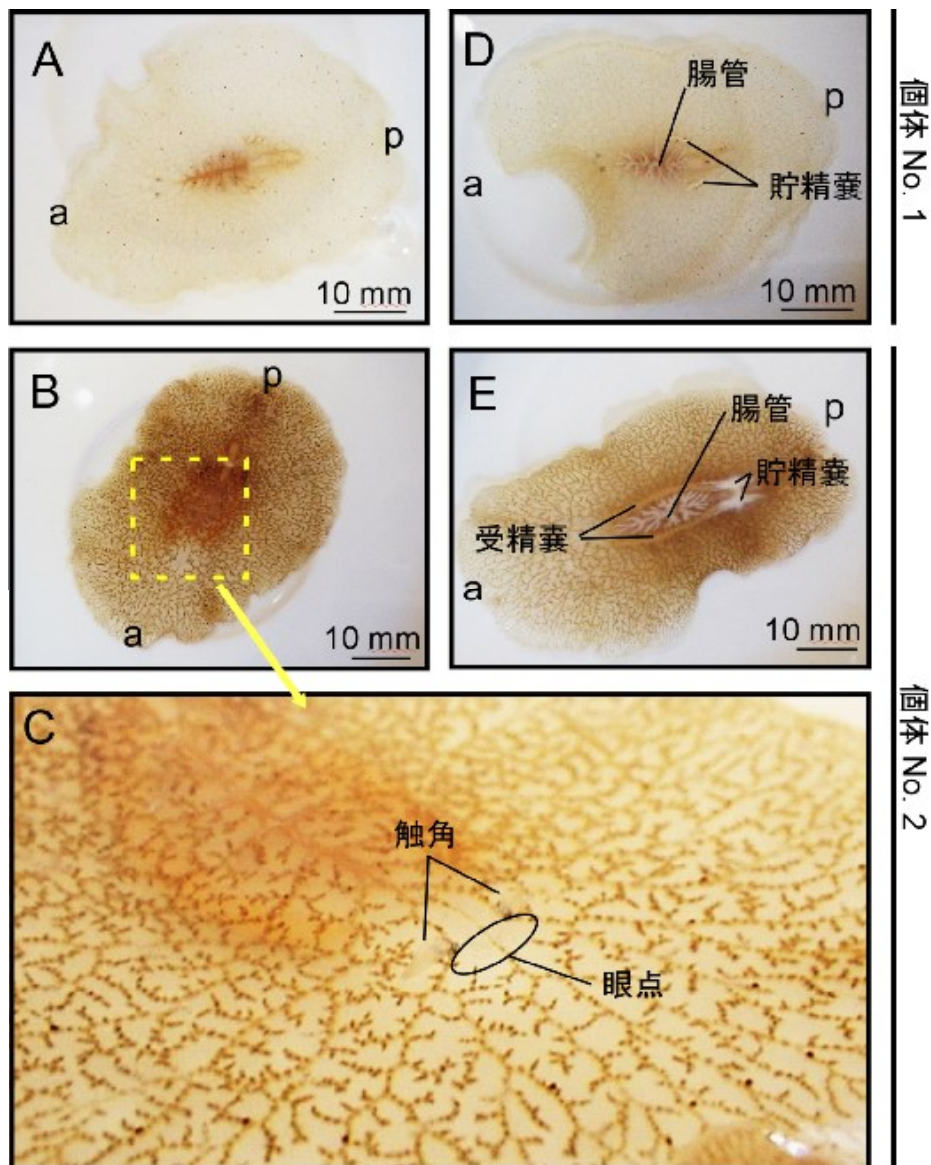


Fig. 1. 沖縄本島名護沖で採取されたヒラムシの外部形態. 上のパネルが個体 No. 1 (S1)、下のパネルが個体 No. 2 (S2) を示している. A および B は背面図、D および E は腹面図を示す. C は黄色の点線部分の拡大図を示している. a と p はそれぞれ体の前端 (anterior end) と後端 (posterior end) を示す.

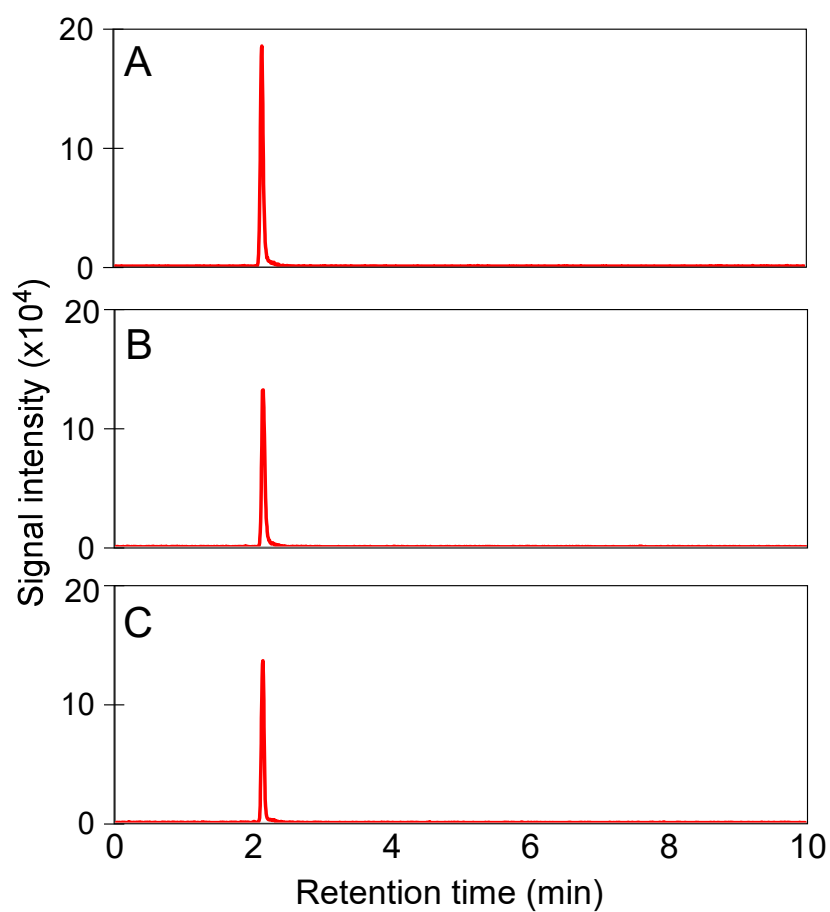


Fig. 2. MRM モードで得られた LC-MS/MS のクロマトグラム (m/z 320 > 302). A は S1 の抽出物、B は S2 の抽出物、C は 25 ng/mL の TTX 標品のクロマトグラムを示す. S1 および S2 のクロマトグラムはそれぞれ 1,000 倍希釈および 10,000 倍希釈の抽出液から得られた.

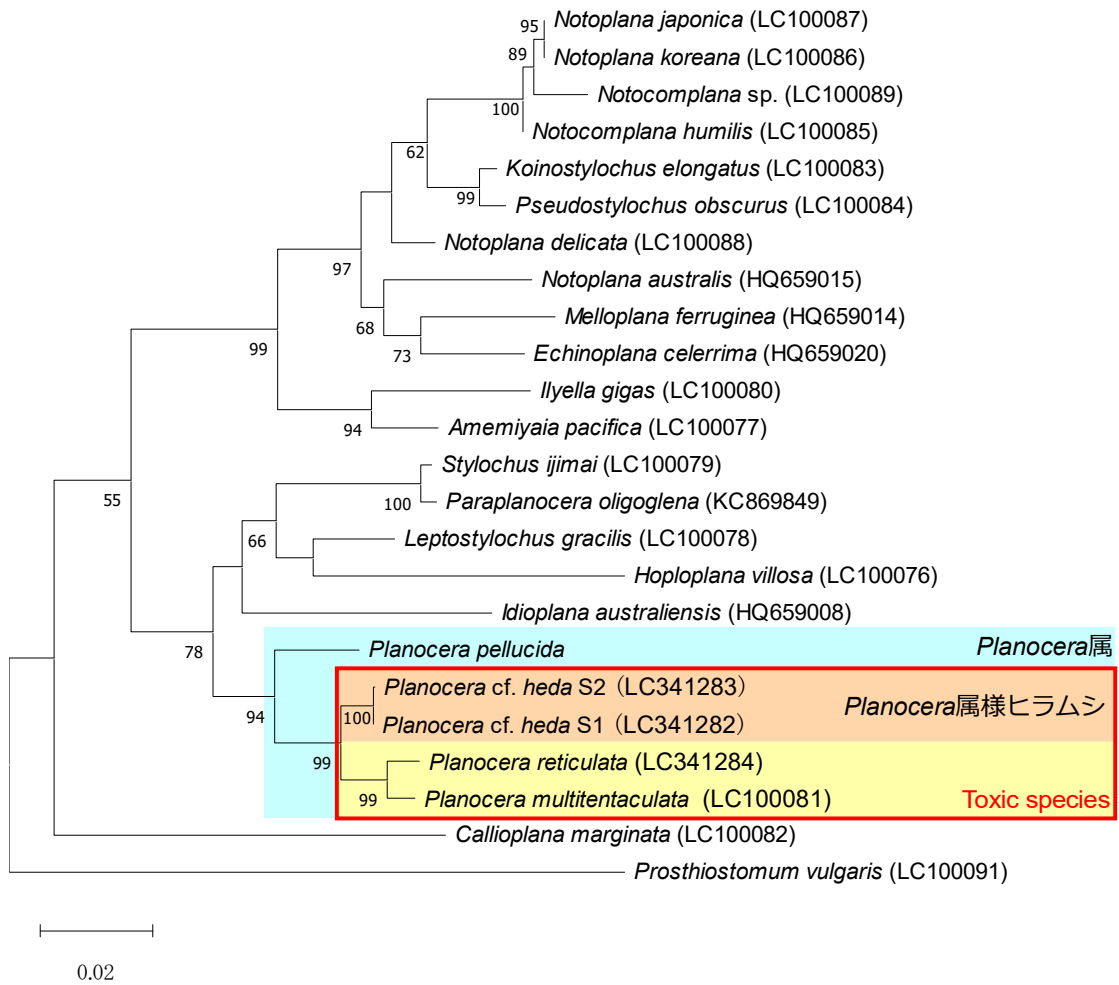


Fig. 3. 28S rRNA 遺伝子の部分塩基配列 (約 1,100 bp) をもとに構築された *Planocera* 属様ヒラムシ、オオツノヒラムシ *Planocera multitentaculata*、ツノヒラムシ *Planocera reticulata*、オキヒラムシ *Planocera pellucida* および近縁種の系統学的地位. 系統樹は最尤法によって構築、枝の数値は 1,000 回の反復によるブートストラップ値 (%) を示す. 配列の登録番号をカッコ内に示す. 登録番号 LC341282~LC341283 は本研究において DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されたものを示す. 外群として *Prosthiosomum vulgaris* を使用した. ブートストラップ値は 50%を超えたもののみ表示した.

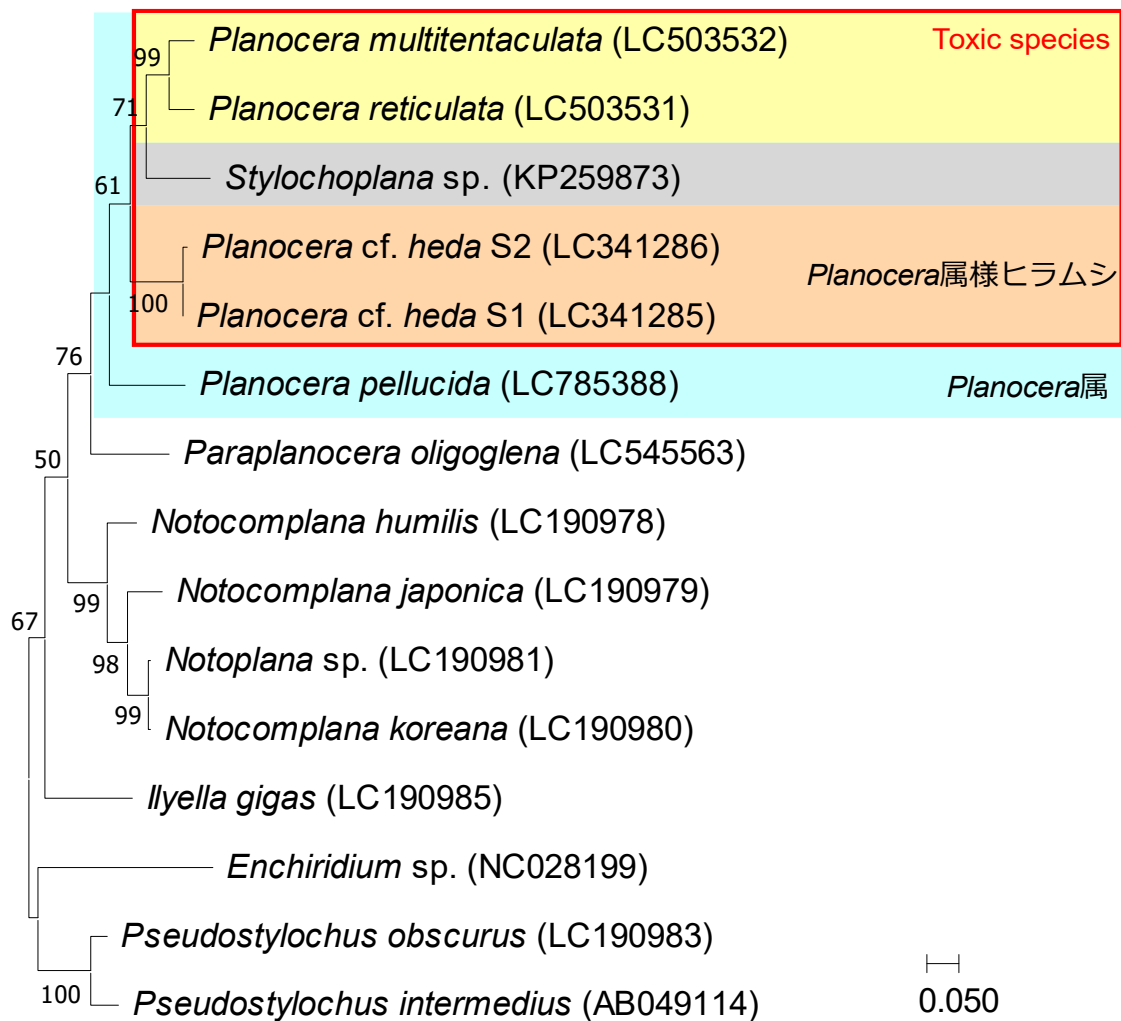
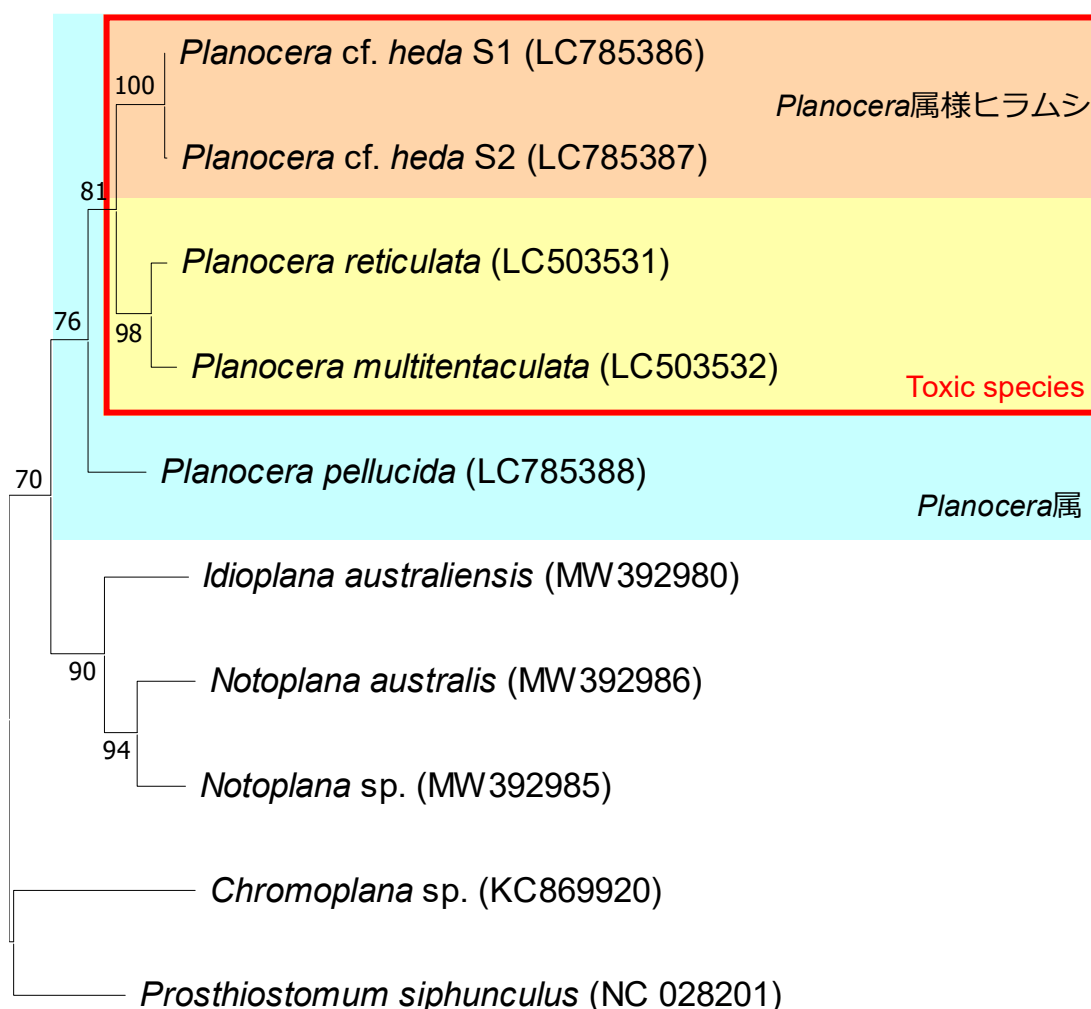


Fig. 4. COI 遺伝子の部分塩基配列 (1,078 bp) をもとに構築された *Planocera* 属様ヒラムシ、オオツノヒラムシ *Planocera multitentaculata*、ツノヒラムシ *Planocera reticulata*、オキヒラムシ *Planocera pellucida* および近縁種の系統学的地位. 系統樹は最尤法によって構築、枝の数値は 1,000 回の反復によるブートストラップ値 (%) を示す. 配列の登録番号をカッコ内に示す. 登録番号 LC341285~LC341286 および LC785388 は本研究において DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されたものを示す. 外群として *Enchiridium sp.*、*P. obscurus* および *P. intermedius* を使用した. ブートストラップ値は 50%を超えたもののみ表示した.



┆
0.050

Fig. 5. Cytochrome *b* 遺伝子の部分塩基配列 (1,061 bp) をもとに構築された *Planocera* 属様ヒラムシ、オオツノヒラムシ *Planocera multitentaculata*、ツノヒラムシ *Planocera reticulata*、オキヒラムシ *Planocera pellucida* および近縁種の系統学的地位. 系統樹は最尤法によって構築、枝の数値は 1,000 回の反復によるブートストラップ値 (%) を示す. 配列の登録番号をカッコ内に示す. 登録番号 LC785386~LC785388 は本研究において DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されたものを示す. 外群として *Chromoplana* sp. および *Prosthiosomum siphunculus* を使用した. ブートストラップ値は 50% を超えたもののみ表示した.

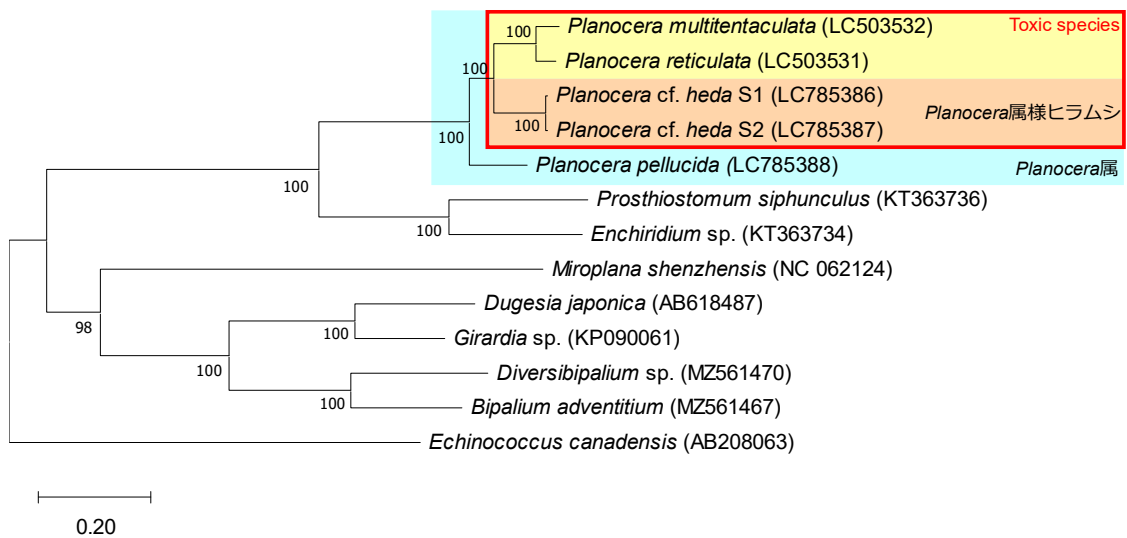


Fig. 6. ミトコンドリア DNA 全塩基配列をもとに構築された *Planocera* 属様ヒラムシ、オオツノヒラムシ *Planocera multitentaculata*、ツノヒラムシ *Planocera reticulata*、オキヒラムシ *Planocera pellucida* および近縁種の系統学的地位。系統樹は最尤法によって構築、枝の数値は 1,000 回の反復によるブートストラップ値 (%) を示す。配列の登録番号をカッコ内に示す。登録番号 LC785386~LC785388 は本研究において DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されたものを示す。外群として *Echinococcus canadensis* を使用した。ブートストラップ値は 50% を超えたもののみ表示した。

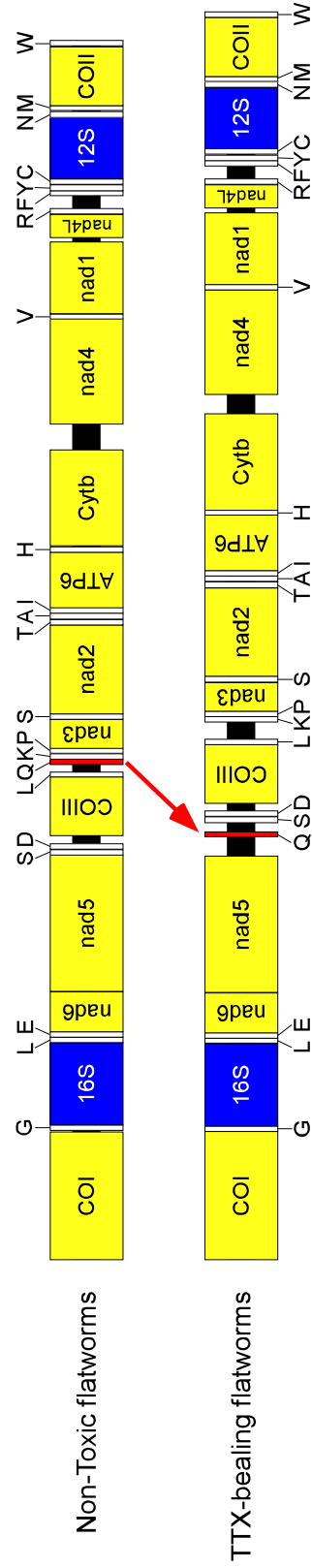


Fig. 7. 無毒の *Planocera* 属ヒラムシと有毒の *Planocera* 属ヒラムシのミトコンドリア DNA 部分配列のマトリクス図. 上段が TTX を保有しないヒラムシ (*P. pellucida*). 下段が TTX を保有するヒラムシ (*P. multientaculata*, *P. reticulata* および *Planocera* sp.) を示す.

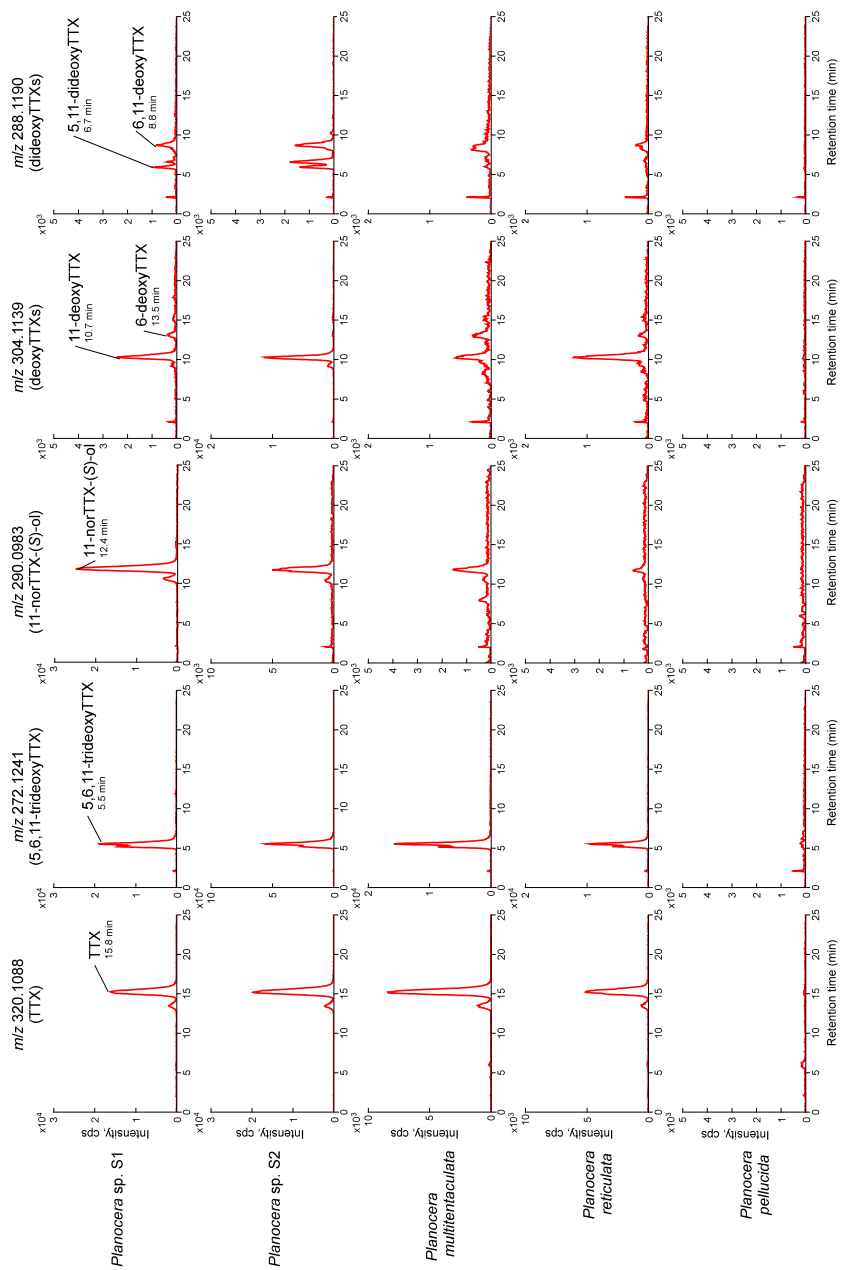


Fig. 8. *Planocera* sp., オオツノヒラムシ *Planocera multitentaculata*, ツノヒラムシ *Planocera reticulata* およびオキヒラムシ *Planocera pellucida* から抽出した TTX およびその類縁化合物のクロマトグラムの比較. 各パネルは m/z 320.1088 : TTX および 4-*epi*TTX、 m/z 272.1241 : 5,6,11-trideoxyTTX、 m/z 290.0983 : 11-norTTX-6(S)-ol、 m/z 304.1139 : deoxyTTXs、 m/z 288.1190 : dideoxyTTXs を示す. cps = counts per second.

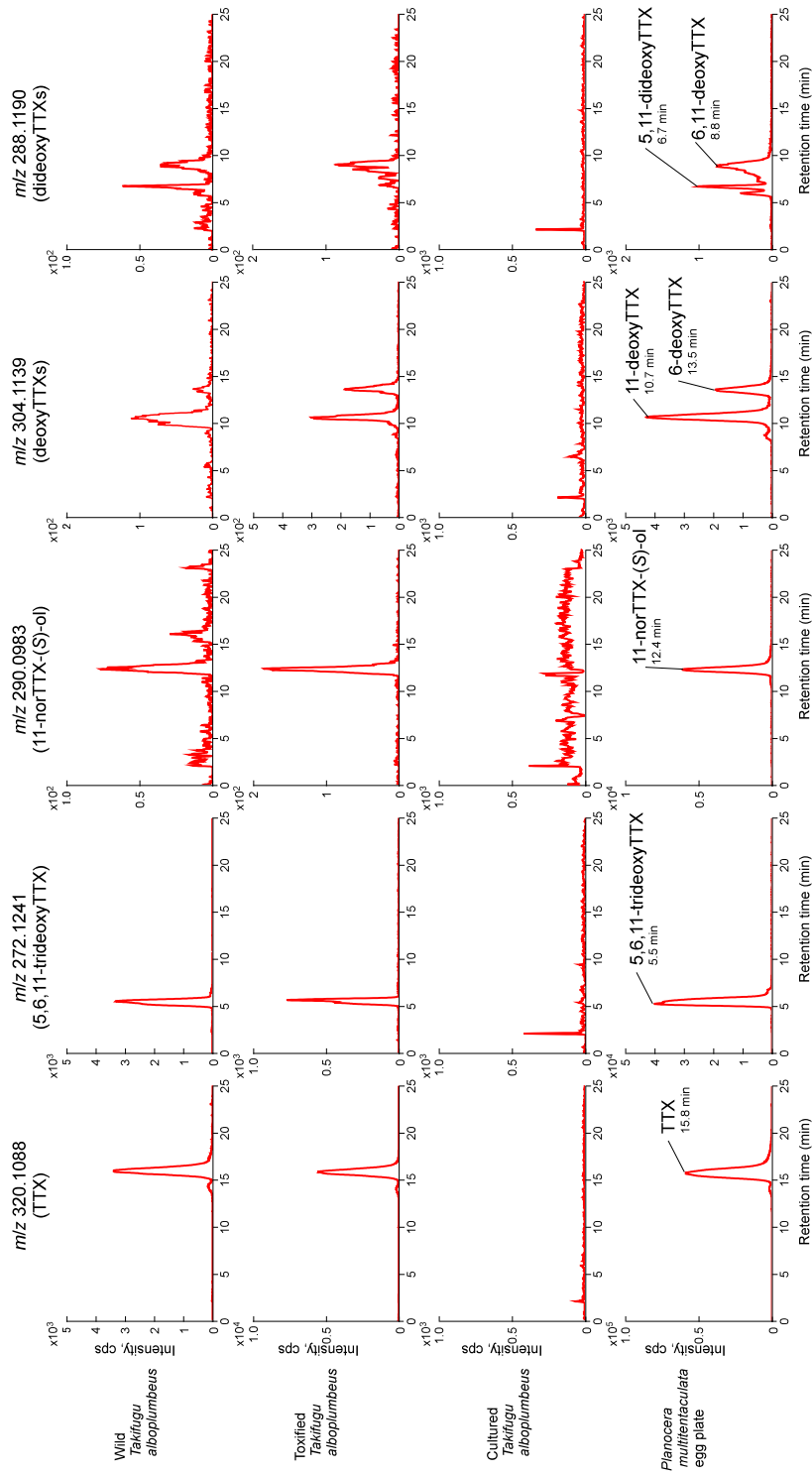


Fig. 9. オオツノヒラムシの卵板の摂餌がクサフグの TTX およびその類縁化合物組成に与える影響. 上段より沖縄本島で捕獲された野生個体、オオツノヒラムシの卵板による毒化個体、毒化前の無毒個体、オオツノヒラムシの卵板のクロマトグラムを示す. 各パネルは m/z 320.1088: TTX および 4-*epi*TTX、 m/z 272.1241: 5,6,11-trideoxyTTX、 m/z 290.0983: 11-norTTX-6(S)-ol、 m/z 304.1139: deoxyTTXs、 m/z 288.1190: dideoxyTTXs を示す. cps = counts per second.

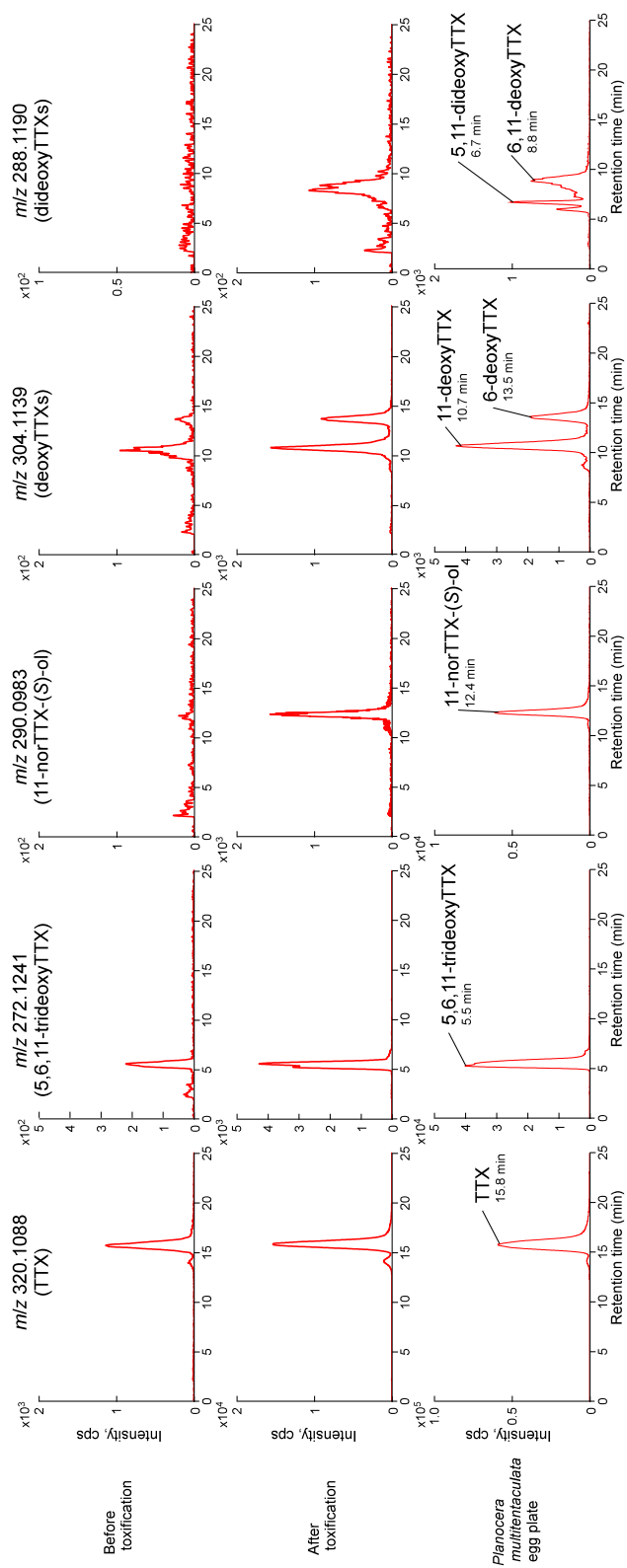


Fig. 10. オオツノヒラムシの卵板の摂餌がオキナワフグの TTX およびその類縁化合物組成に与える影響. 上段よりオオツノヒラムシの卵板摂餌前、摂餌後の個体、オオツノヒラムシの卵板のクロマトグラムを示す. 各パネルは m/z 320.1088 : TTX および 4-*epi*TTX、 m/z 272.1241 : 5,6,11-trideoxyTTX、 m/z 290.0983 : 11-norTTX-6(S)-ol、 m/z 304.1139 : deoxyTTXs、 m/z 288.1190 : dideoxyTTXs を示す. cps = counts per second.

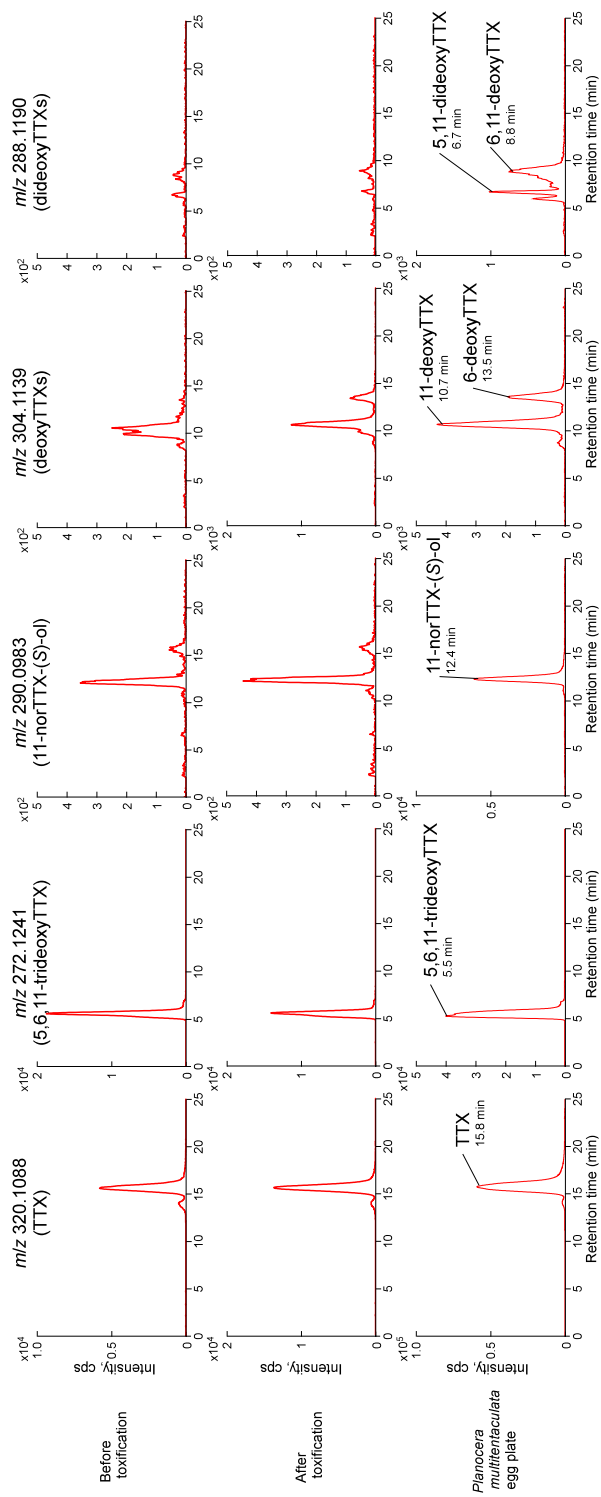


Fig. 11. オオツノヒラムシの卵板の摂餌がツムギハゼの TTX およびその類縁化合物組成に与える影響. ツムギハゼの試供魚は、捕獲後 1 か月程度実験室で飼育し、TTX 保有量が減少させて実験に供した。上段よりオオツノヒラムシの卵板摂餌前、摂餌後の個体、オオツノヒラムシの卵板のクロマトグラムを示す。各パネルは m/z 320.1088 : TTX および 4-*epi*TTX、 m/z 272.1241: 5,6,11-trideoxyTTX、 m/z 290.0983: 11-norTTX-6(S)-ol、 m/z 304.1139: deoxyTTXs、 m/z 288.1190: dideoxyTTXs を示す。 cps = counts per second.

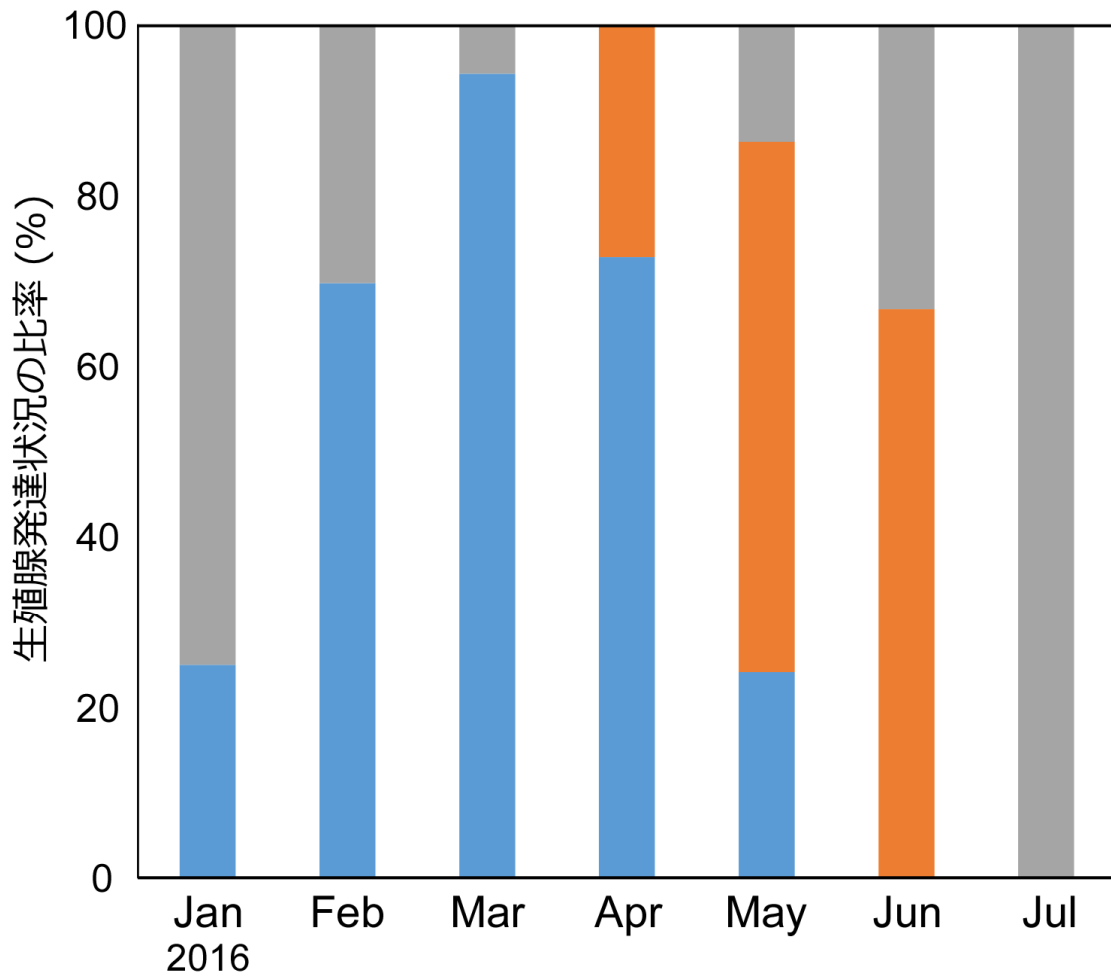


Fig. 12. 天然環境下のオオツノヒラムシの生殖腺発達状況の比率. 青、オレンジおよび灰色のカラムは、それぞれ貯精囊発達個体、受精囊発達個体および生殖腺未発達個体の比率を示す.

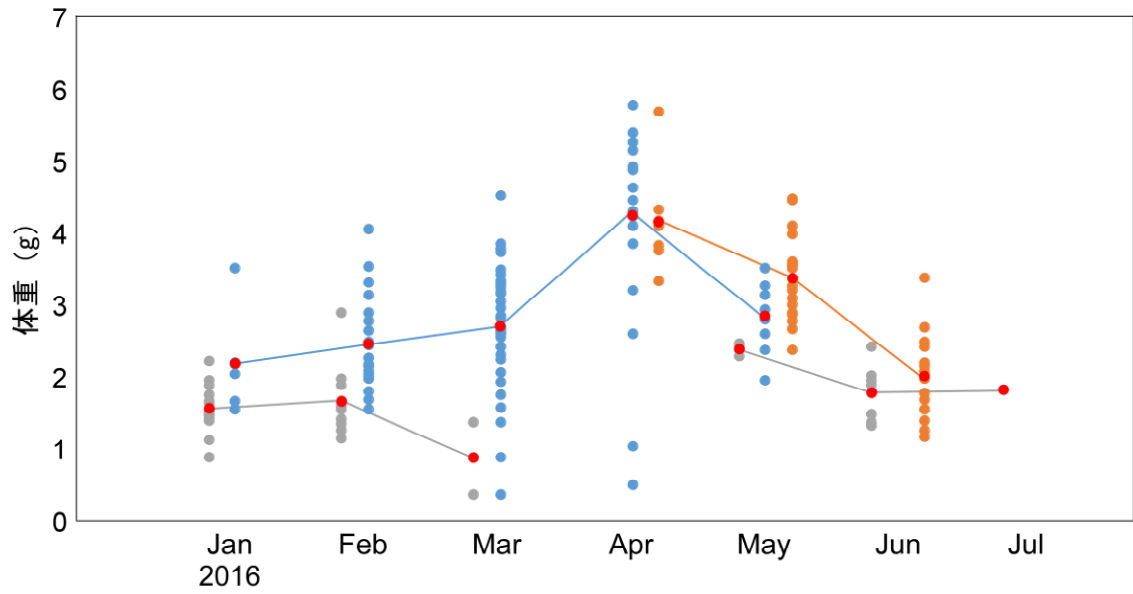


Fig. 13. オオツノヒラムシの生殖腺発達状況と体重の関係. 青、オレンジおよび灰色の点は、それぞれ貯精囊発達個体、受精囊発達個体および生殖腺未発達個体の体重を示す. 赤色の点はそれぞれの平均値を示す.

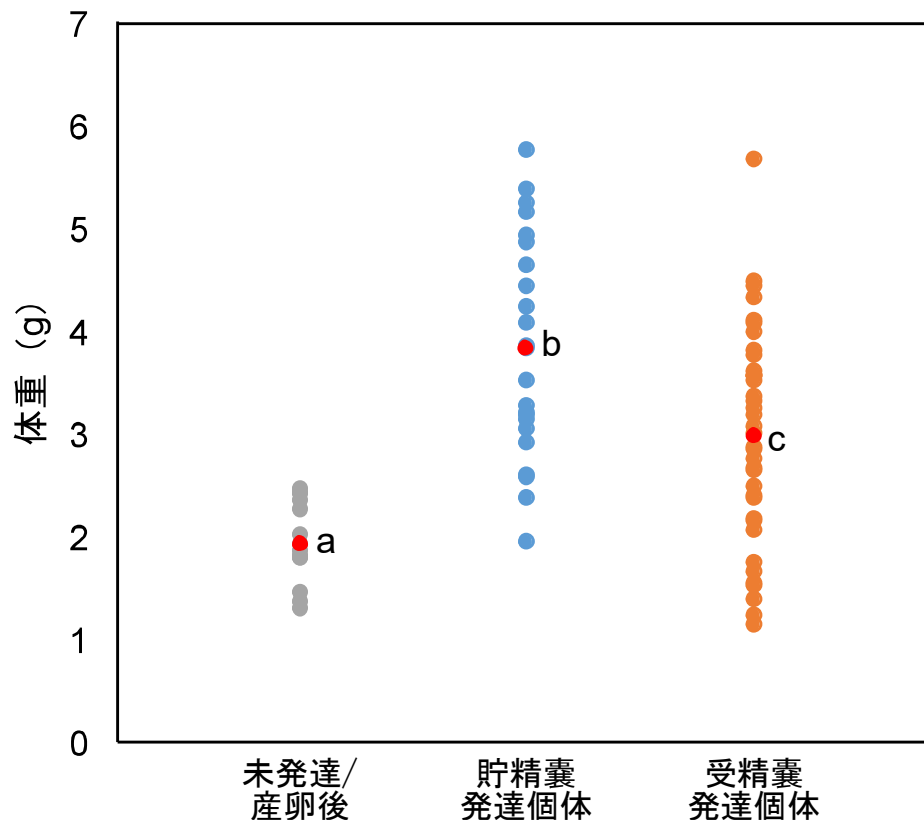


Fig. 14. オオツノヒラムシの生殖腺発達状況による体重の違い. 灰色、青およびオレンジの点は、それぞれ生殖腺未発達個体、貯精囊発達個体および受精囊発達個体の体重を示す. 赤い点はそれぞれの平均値を示す. 異なる文字は群間の有意差を示す. 有意差検定には ANOVA を用いた ($P < 0.05$).

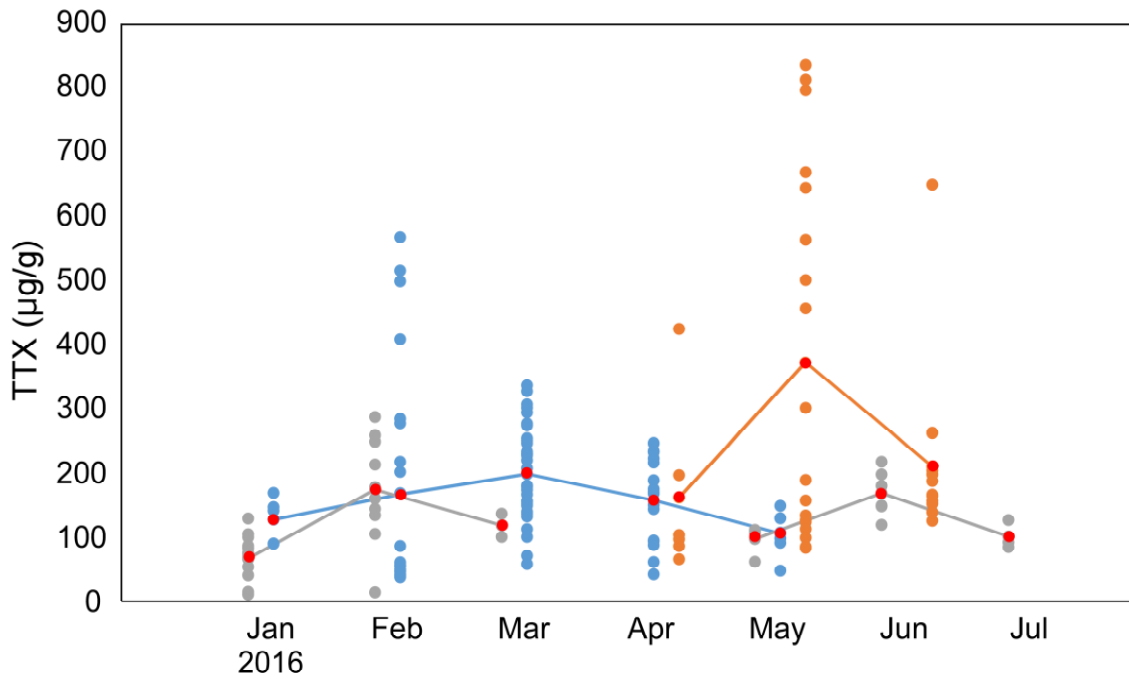


Fig. 15. オオツノヒラムシの生殖腺発達状況と TTX 濃度の関係. 青、オレンジ、灰色の点は、それぞれ貯精囊発達個体、受精囊発達個体および生殖腺未発達個体の TTX 濃度を示す. 赤色の点はそれぞれの平均値を示す.

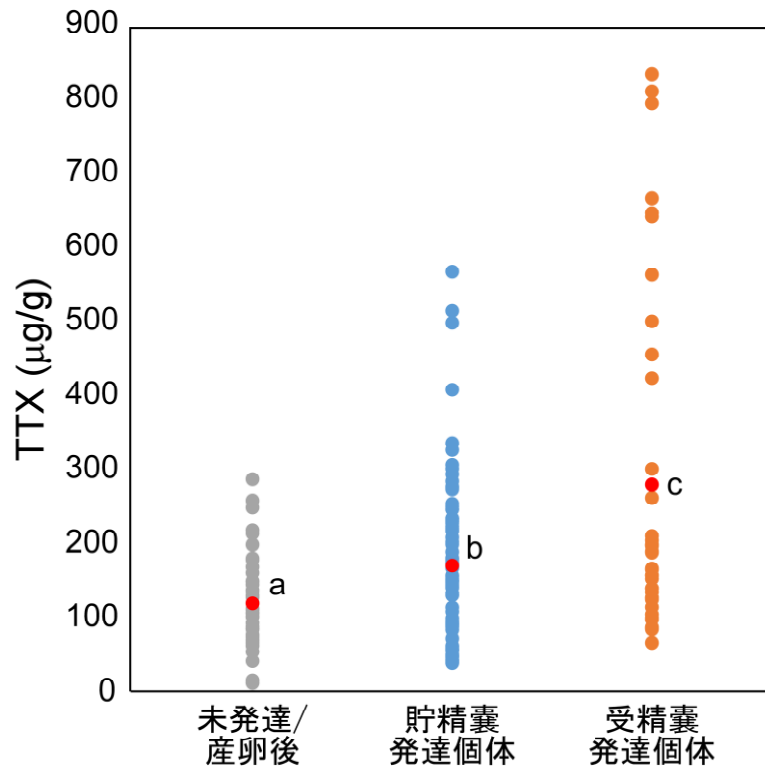


Fig. 16. オオツノヒラムシの生殖腺発達状況による TTX 濃度の違い. 灰色、青およびオレンジの点は、それぞれ生殖腺未発達個体、貯精囊発達個体および受精囊発達個体の TTX 濃度を示す. 赤色のバーはそれぞれの平均値を示す. 異なる文字は群間の有意差を示す. 有意差検定には ANOVA を用いた ($P < 0.05$).

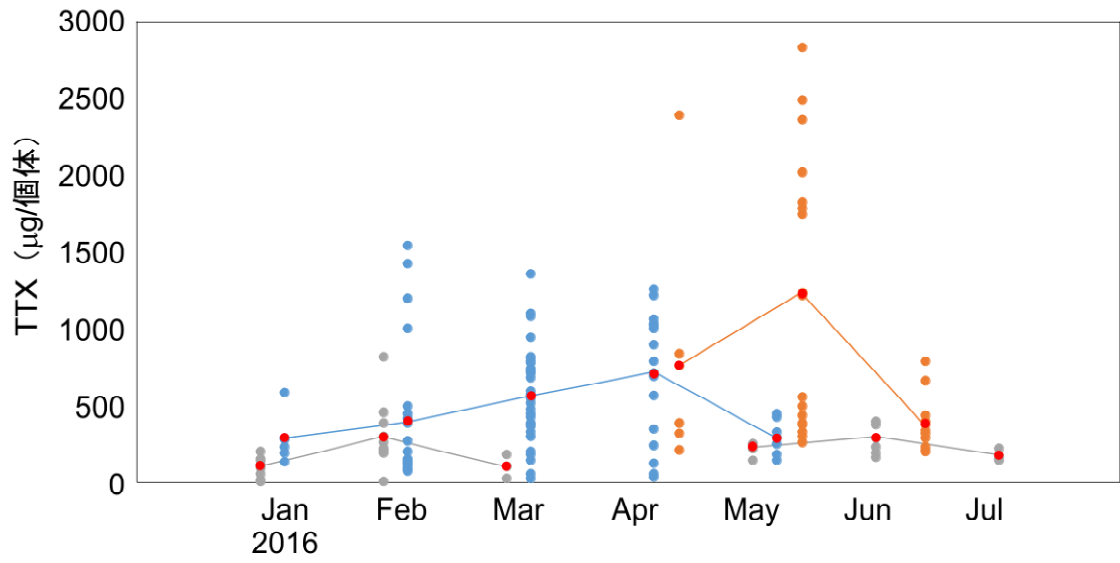


Fig. 17. オオツノヒラムシの生殖腺発達状況と 1 個体あたりの TTX 量の関係. 青、オレンジおよび灰色の点は、それぞれ貯精囊発達個体、受精囊発達個体および生殖腺未発達個体の TTX 量を示す. 赤色の点はそれぞれの平均値を示す.

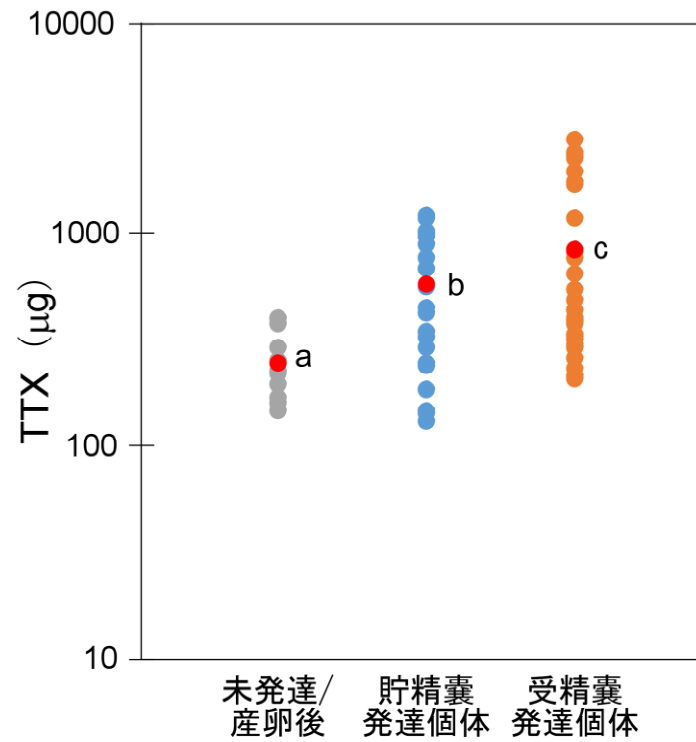


Fig. 18. オオツノヒラムシの生殖腺発達状況による TTX 量の違い. 灰色、青およびオレンジの点は、それぞれ生殖腺未発達個体、貯精囊発達個体および受精囊発達個体の TTX 保有量を示す. 赤い点はそれぞれの平均値を示す. 異なる文字は群間の有意差を示す. 有意差検定には ANOVA を用いた ($P < 0.05$).

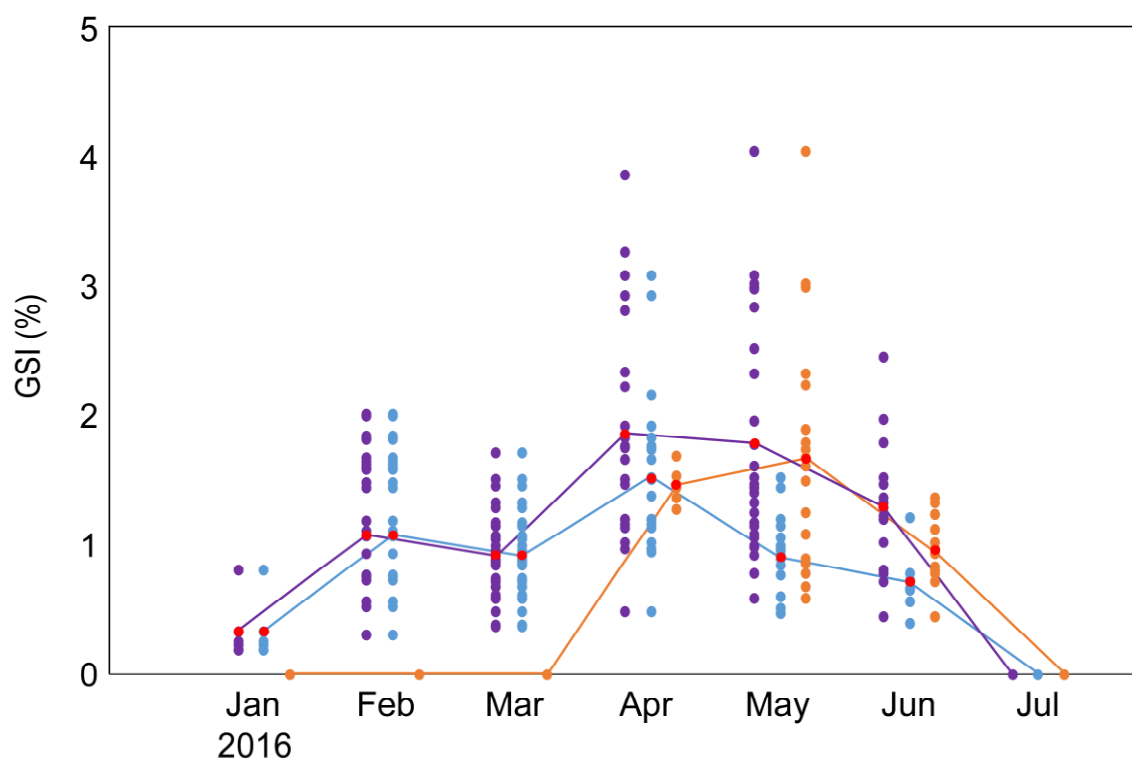


Fig. 19. オオツノヒラムシの GSI の季節変動. 青、オレンジおよび紫の点は、それぞれ貯精囊、受精囊およびそれらの合計 GSI を示す. 赤色の点はそれぞれの平均値を示す.

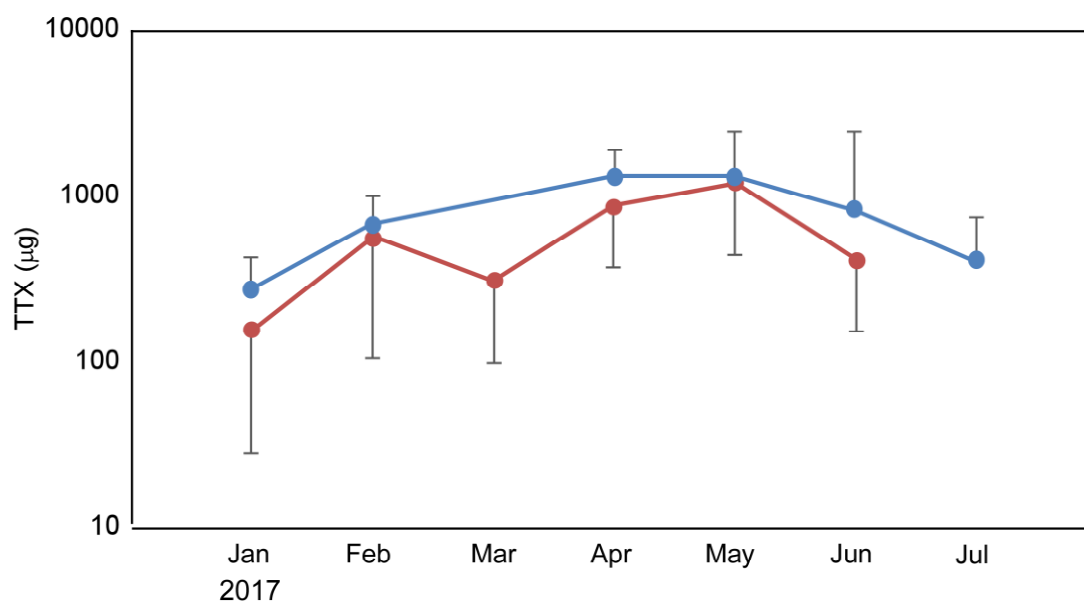


Fig. 20. バイオプシー飼育実験におけるオオツノヒラムシ個体の TTX 保有量. 青および赤い点は、それぞれバイオプシー飼育実験個体の TTX 保有量および同時期に天然環境下から採取されたオオツノヒラムシの TTX 保有量の平均値を示す. それぞれの点から伸びるバーは標準偏差を示す.

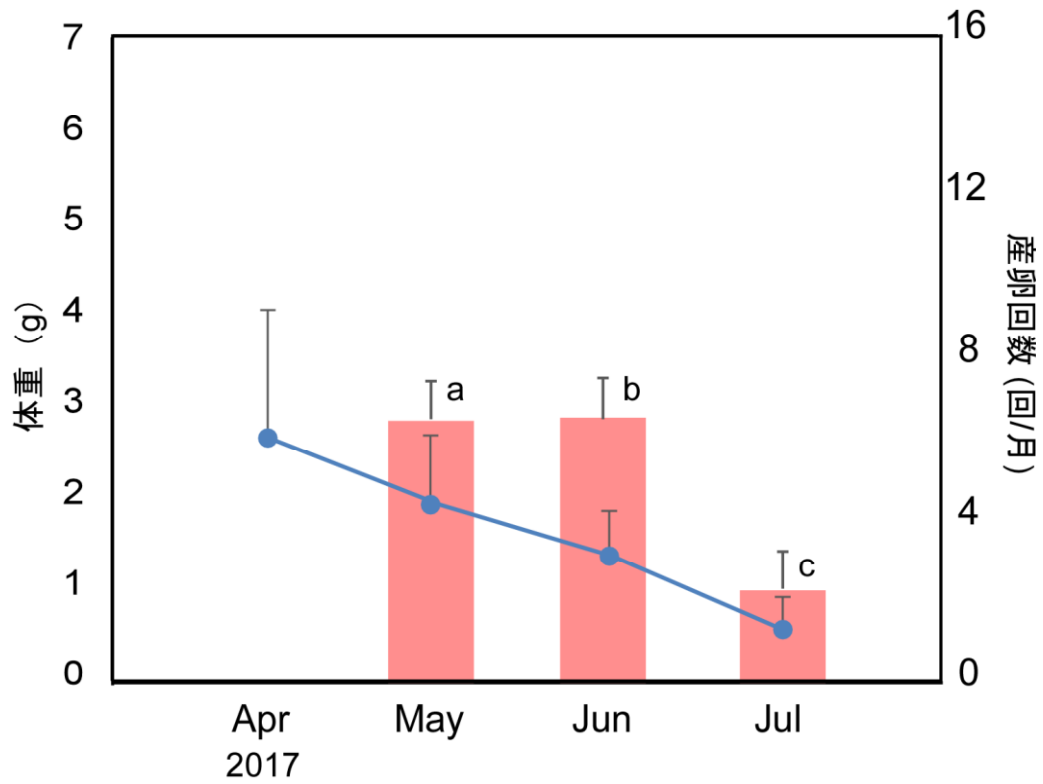


Fig. 21. バイオプシー飼育したオオツノヒラムシの体重と産卵回数. 青い点と線は体重を示し、ピンクのグラフは一ヶ月間の産卵回数を示す. それぞれのデータは平均 + 標準偏差で表し、異なる文字は群間の有意差を示す. 産卵回数の有意差検定には ANOVA を用いた ($P < 0.05$).

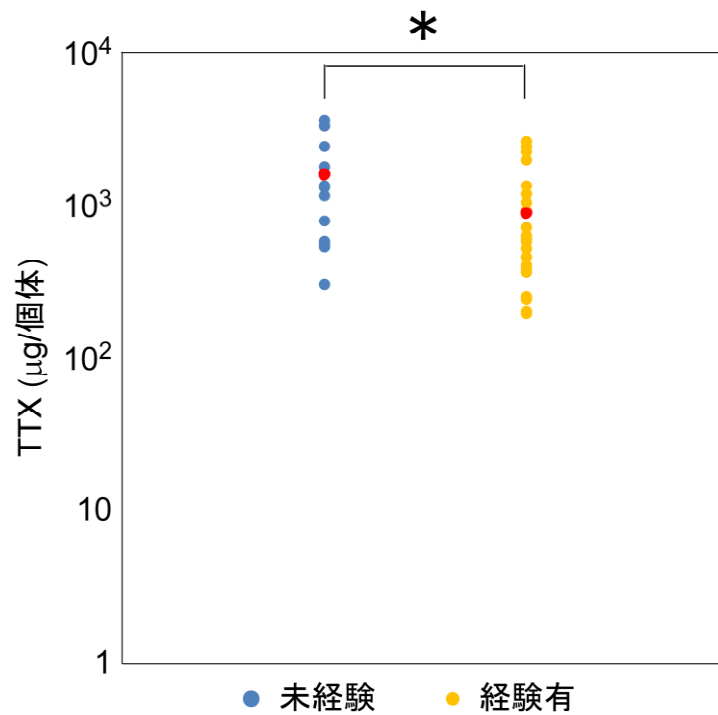
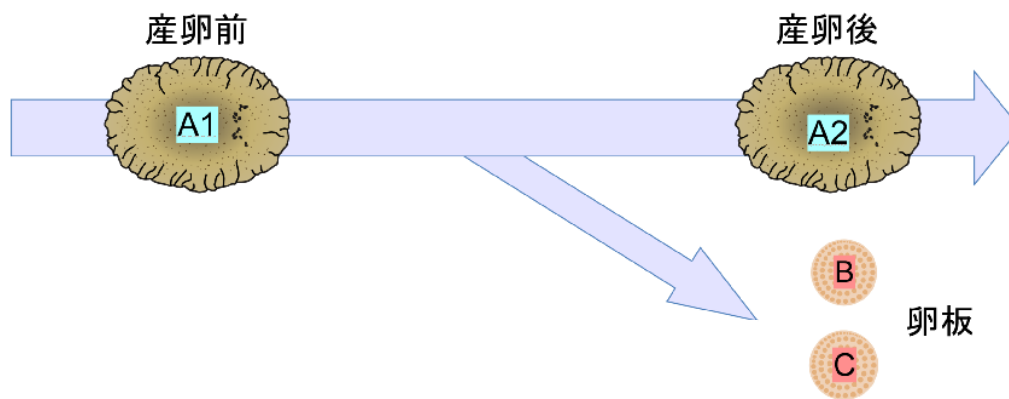


Fig. 22. 産卵経験の有無によるオオツノヒラムシの TTX 保有量の違い. 青および黄色い点は、それぞれ 5 月時点で産卵経験のある個体およびない個体の TTX 保有量を示す. *は有意差を示す. 有意差検定には Student *t*-test を用いた ($P < 0.05$).



$$\text{1回の産卵で供給されるTTXの比率} = \frac{B}{A2 + B + C} * 100$$

$$\text{1ヶ月間に増加したTTX量} = A2 + B + C - A1$$

Fig. 23. バイオプシー飼育実験における、卵板に供給される TTX の比率および増加した TTX 量の算出法. 産卵前の TTX 量を A1、産卵後の TTX 量を A2、回収した卵板の TTX 量を B、C として、一回の産卵で放出される TTX の本体に対する比率と一ヶ月間に増加した TTX 量の算出方法を示す.

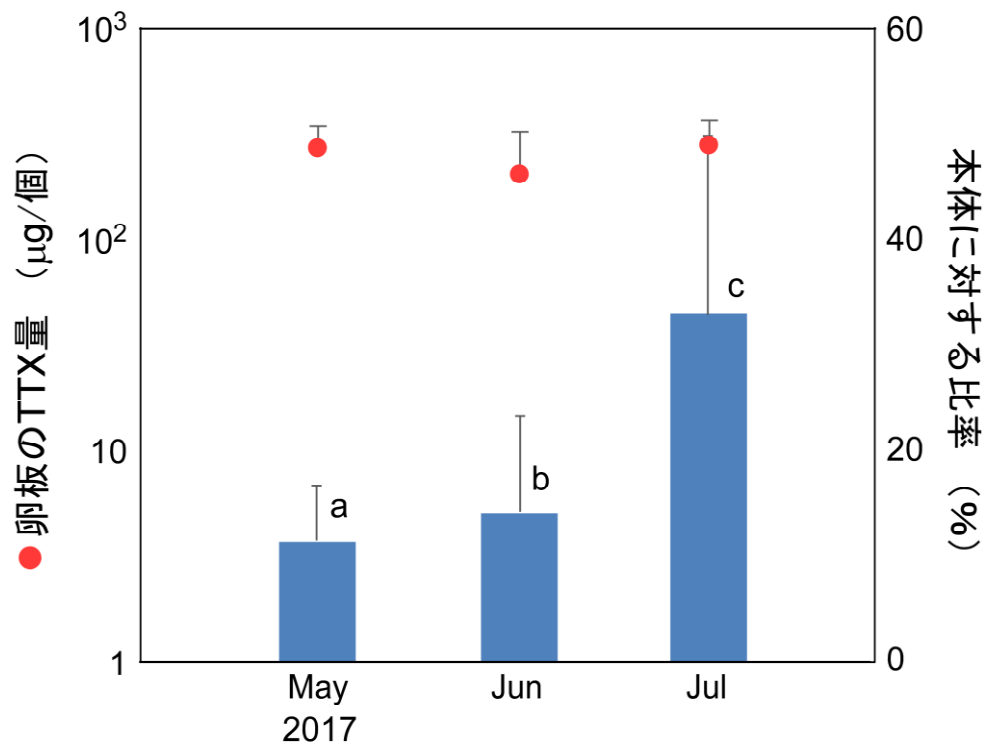


Fig. 24. 一回の産卵時に卵板に供給される TTX 量と産卵個体の毒量に対する比率. 赤い点は TTX 量を示し、青いグラフは本体に対する比率を示す. それぞれのデータは平均 + 標準偏差で表し、異なる文字は群間の有意差を示す. 有意差検定には ANOVA を用いた ($P < 0.05$).

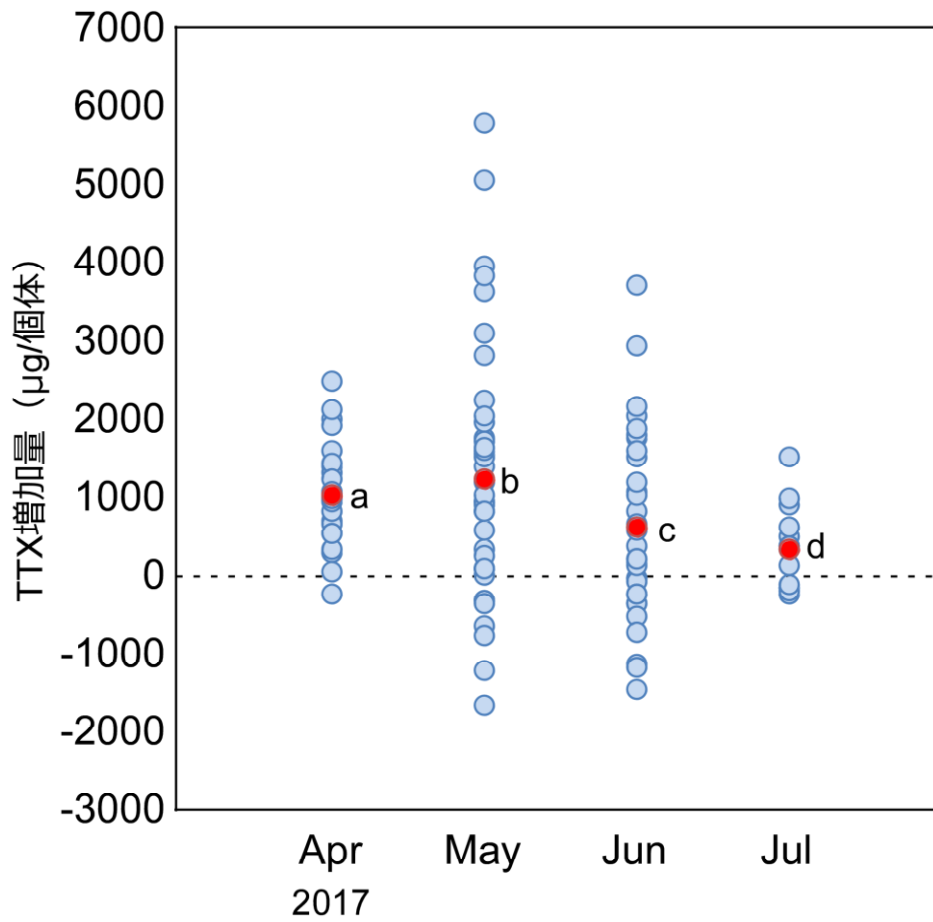


Fig. 25. オオツノヒラムシ 1 個体あたりの TTX の増加量. 水色および赤い点は、それぞれ 1 ヶ月間の TTX の増加量および平均値を示す. マイナスの値は、TTX 量が前月よりも低下していたことを示す. 異なる文字は群間の有意差を示し、各月間を比較する有意差検定には ANOVA を用いた ($P < 0.05$).

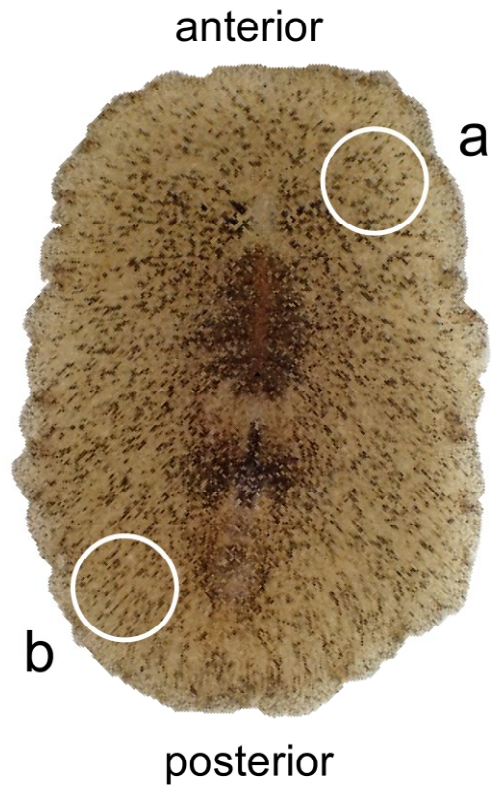


Fig. 26. オオツノヒラムシの体組織の採取位置. 丸で示した a および b の箇所より組織を採取した. anterior と posterior はそれぞれ体の前端と後端を示す.

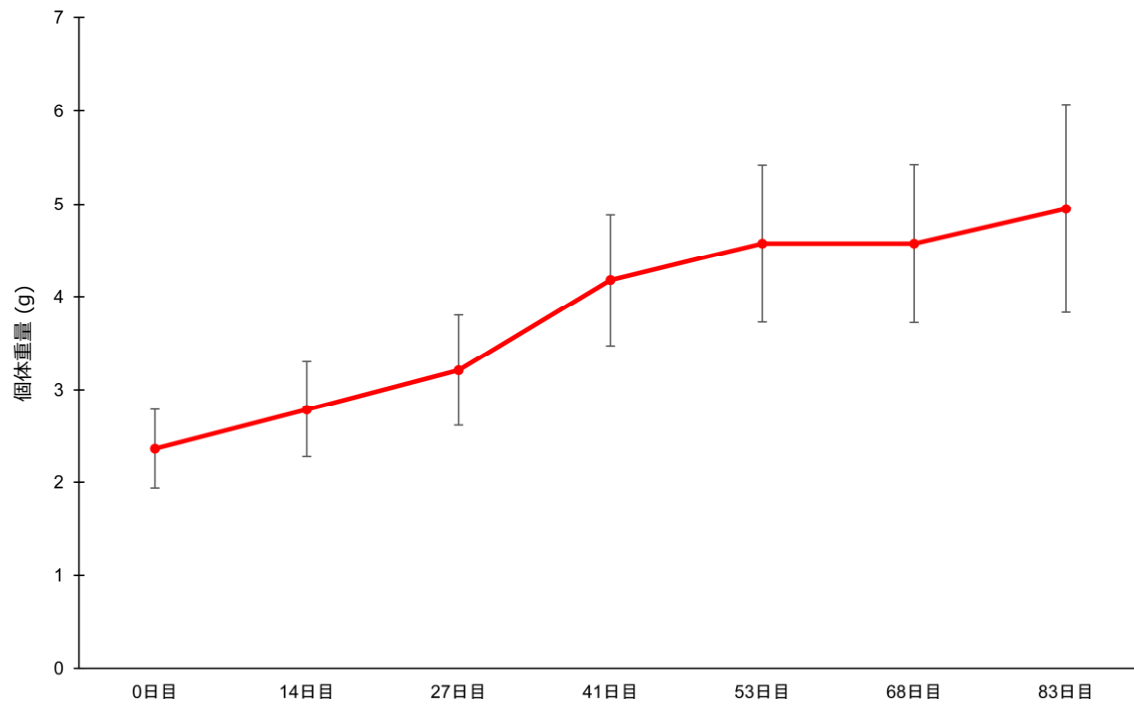


Fig. 27. 飼育したオオツノヒラムシの体重変化 (n=10). 縦軸は体組織の重量 (g/個体)、横軸は飼育開始からの日数を示す. 赤い点およびバーはそれぞれ平均 ± 標準偏差を示す.

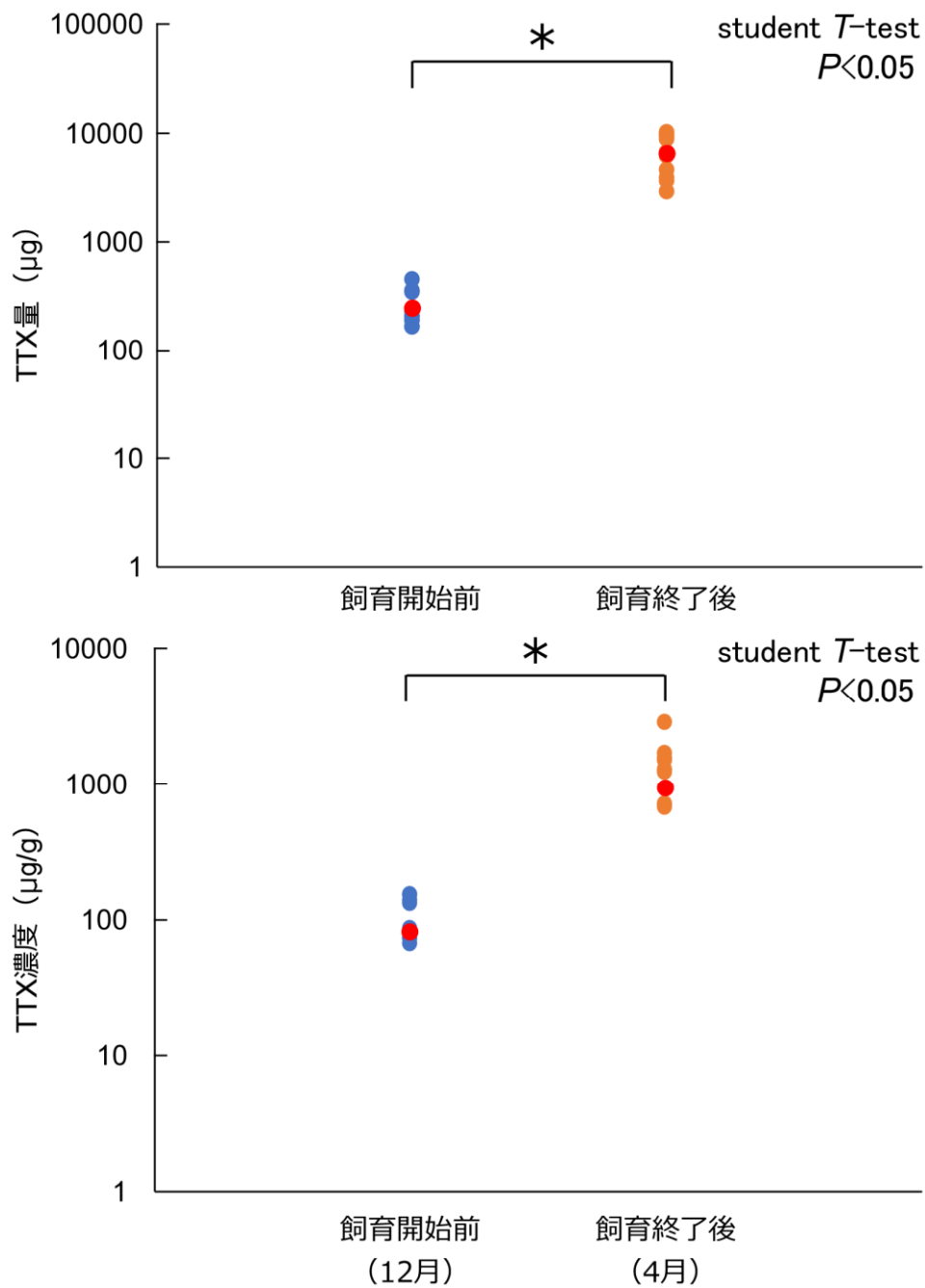


Fig. 28. バイオプシー飼育実験におけるオオツノヒラムシの TTX 量および TTX 濃度の変化. 上の図はオオツノヒラムシの保有する TTX 量 ($\mu\text{g}/\text{個体}$)、下の図は TTX 濃度 ($\mu\text{g}/\text{g}$) を示し、青色、橙色の点は、それぞれ飼育開始時 (12 月) および飼育終了時 (4 月) の TTX 量もしくは TTX 濃度を示す. 赤色の点はそれぞれの平均を示し、*は有意差を示す.

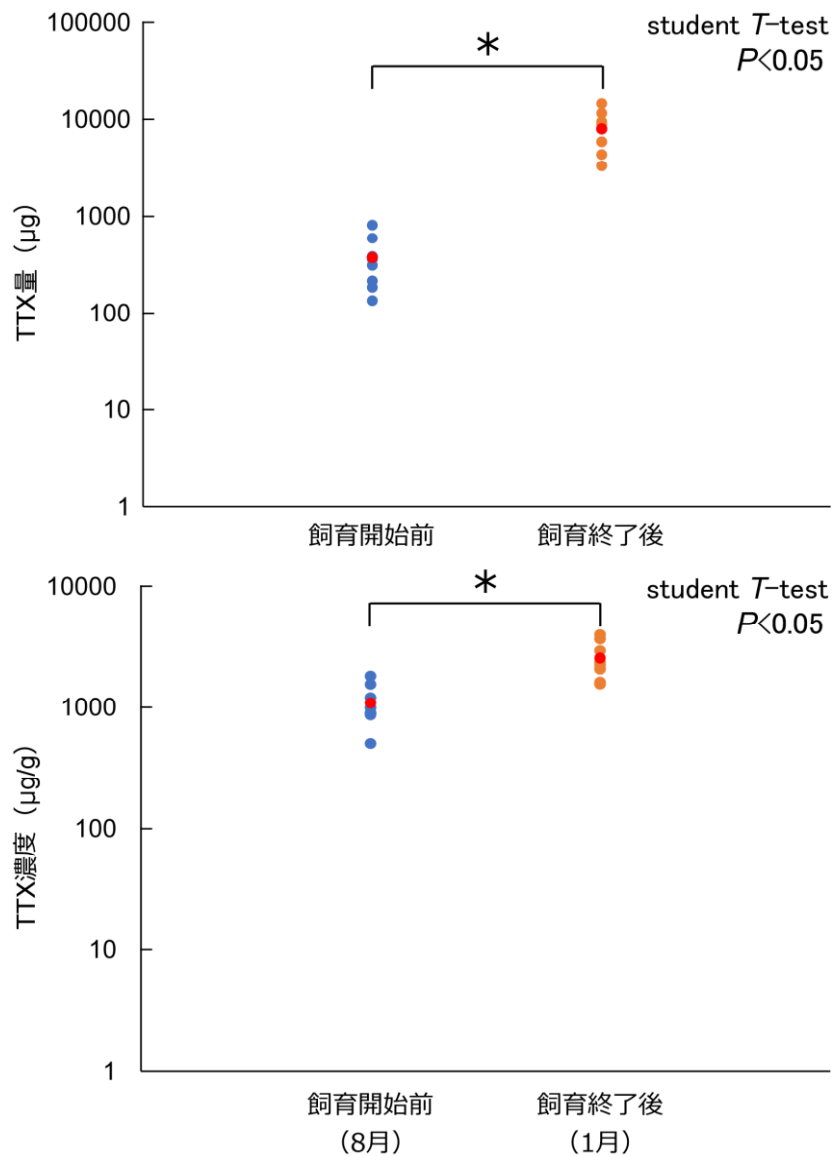


Fig. 29. バイオプシー飼育実験におけるオオツノヒラムシの TTX 量および TTX 濃度の変化. 上の図はオオツノヒラムシの保有する TTX 量 ($\mu\text{g}/\text{個体}$)、下の図は TTX 濃度 ($\mu\text{g}/\text{g}$) を示し、青色、橙色の点は、それぞれ飼育開始時 (8 月) および飼育終了時 (1 月) の TTX 量もしくは TTX 濃度を示す. 赤色の点はそれぞれの平均を示し、*は有意差を示す.

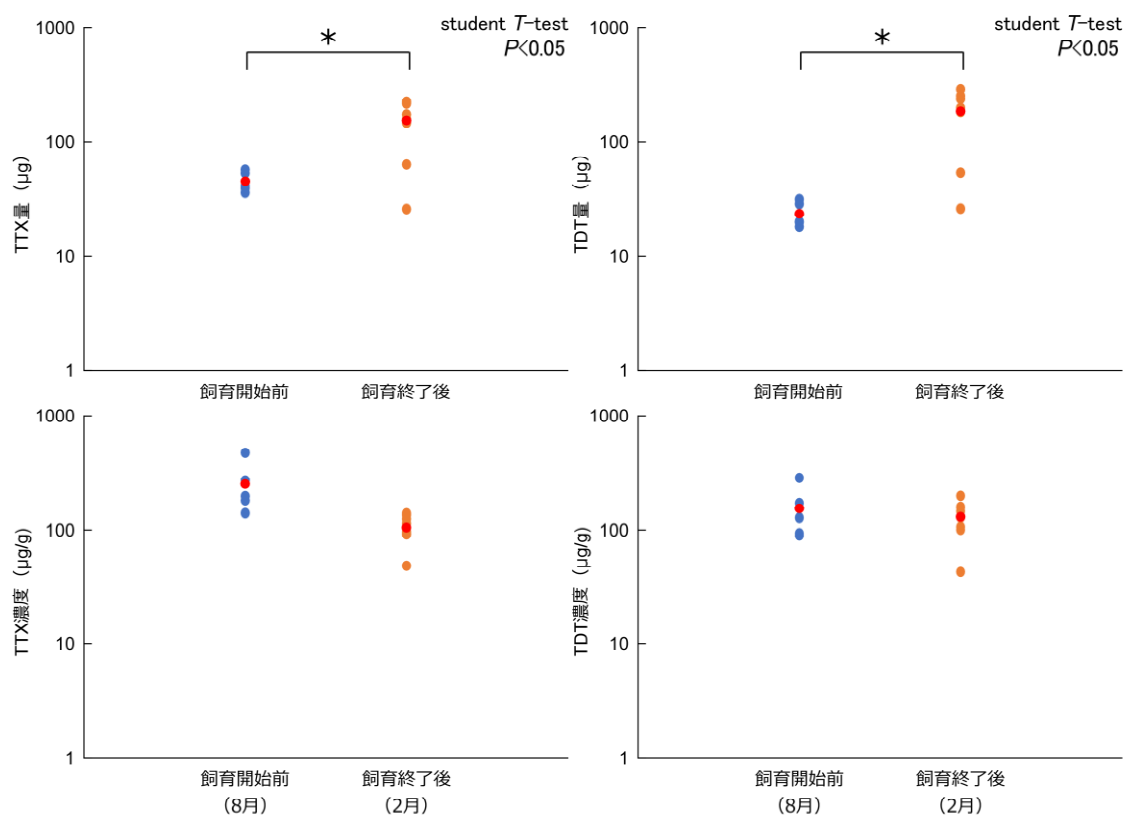


Fig. 30. 個体群単位の飼育実験におけるオオツノヒラムシの TTX および 5,6,11-trideoxyTTX (TDT) の量および濃度の変化. 上部の 2 図はオオツノヒラムシの保有する TTX および TDT 量 ($\mu\text{g}/\text{個体}$)、下部の 2 図は TTX および TDT 濃度 ($\mu\text{g}/\text{g}$) を示し、青色の点は飼育開始時 (8 月) の TTX および TDT の量もしくは濃度を示す. 黄色の点は飼育終了時 (2 月) の TTX および TDT の量もしくは濃度を示す. 赤色の点はそれぞれの平均を示し、*は有意差を示す.

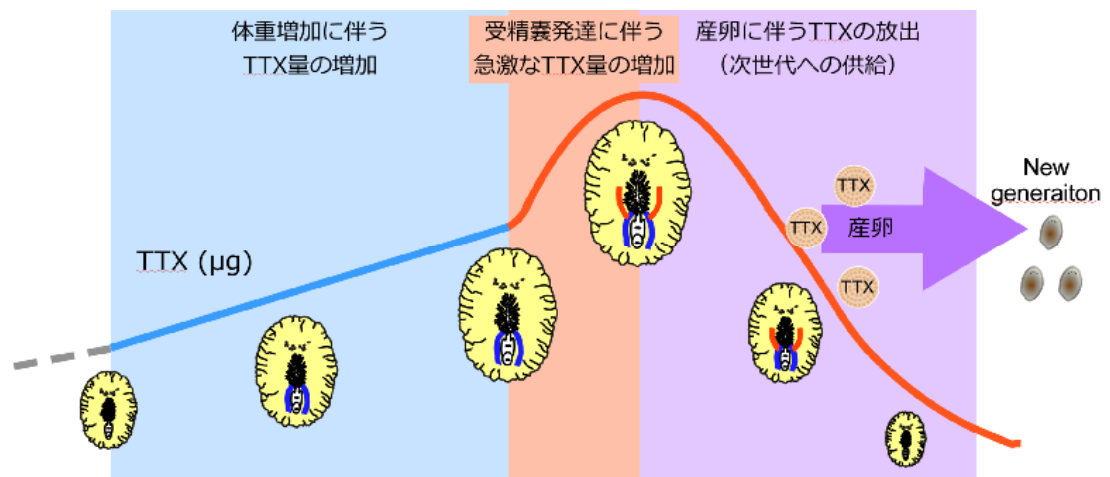


Fig. 31. 産卵期のオオツノヒラムシにおける TTX 量 (μg) の変動の模式図. 生殖腺未発達期～貯精嚢発達期には体重依存的に、受精嚢発達期には受精嚢の発達に伴い急激に TTX 量が上昇し、産卵によって TTX を放出すると同時に体サイズも縮小することを示す.

Table 1. 本研究で使用したヒラムシの毒性

Specimen	Body weight (g)	TTX Concentration ($\mu\text{g/g}$)	TTX Amount (μg)	Sequence	
				28S rRNA	COI
<i>Planocera</i> sp. S1	1.88	249	469	LC341282	LC341285
<i>Planocera</i> sp. S2	2.69	1,351	3,635	LC341283	LC341286
					LC785386
					LC785387

Table 2. バイオプシー飼育実験前後のオオツノヒラムシの組織重量(g)の変化

No.	飼育開始F	14日後	28日後	43日後	55日後	70日後	85日後	成長率*
1	2.25	2.41	2.39	3.47	3.51	3.62	4.03	1.79
2	3.14	3.61	4.18	4.59	5.56	5.57	6.49	2.07
3	2.77	3.64	4.01	5.53	5.31	5.31	6.01	2.17
4	2.47	2.96	3.54	4.83	5	4.38	4.83	1.96
5	2.57	2.57	2.84	3.63	3.3	3.48	3.07	1.19
6	2.29	2.51	2.82	3.59	4.01	3.95	4.4	1.92
7	2.21	2.78	3.1	3.69	3.9	3.77	3.78	1.71
8	2.2	2.87	3.26	4.7	4.68	5.17	5.98	2.72
9	1.51	2	2.55	3.55	4.8	4.7	5.16	3.42
10	2.23	2.52	3.42	4.2	5.64	5.76	5.75	2.58

*飼育最終日（85日後）の組織重量を飼育開始日の組織重量で除して算出した。

Table 3. バイオプシー飼育実験前後の体組織 (a, b) から算出したTTX量およびTTX濃度

No.	飼育開始前			飼育終了時		
	TTX量 (μg)	TTX濃度 (μg/g)	TTX量 (μg)	TTX濃度 (μg/g)	TTX量 (μg)	TTX濃度 (μg/g)
1	a	345.0	3225.0	153.3	800.3	
	b	346.6	2511.9	154.0	623.3	
2	a	485.1	8658.6	154.5	1334.1	
	b	393.9	10824.3	125.4	1667.8	
3	a	188.2	12902.9	67.9	2146.9	
	b	184.9	7347.5	66.8	1222.6	
4	a	241.5	3999.5	97.8	828.1	
	b	168.9	8366.6	68.4	1732.2	
5	a	265.4	10071.8	103.3	3280.7	
	b	180.2	7453.6	70.1	2427.9	
6	a	83.8	7457.4	36.6	1694.9	
	b	287.6	5865.1	125.6	1333.0	
7	a	75.1	4230.9	34.0	1119.3	
	b	251.7	5013.6	113.9	1326.3	
8	a	285.9	8729.5	129.9	1459.8	
	b	384.9	9889.8	174.9	1653.8	
9	a	175.8	3493.2	116.4	677.0	
	b	225.3	3679.7	149.2	713.1	
10	a	154.7	3662.2	69.4	636.9	
	b	171.6	4119.8	76.9	716.5	

Table 4. バイオプシー飼育実験前後のオオツノヒラムシのTTX量およびTTX濃度

個体		重量(g)	TTX量 (μg)	TTX濃度 (μg/g)
飼育開始前 (9月)	1	0.42	363.1	864.5
	2	0.39	386.9	992.0
	3	0.24	216.7	902.8
	4	0.26	313.4	1205.5
	5	0.33	599.3	1816.1
	6	0.21	186.7	889.0
	7	0.53	821.5	1549.9
	8	0.27	135.8	502.8
	平均値	0.33±0.11	377.9±230.4	1090.3±419.7
飼育終了後 (1月)	1	2.84	4427.9	1559.1
	2	2.91	6013.3	2066.4
	3	2.97	11802.3	3973.8
	4	3.29	9645.7	2931.8
	5	3.86	9101.8	2358.0
	6	4.04	14768.7	3655.6
	7	2.69	6011.5	2234.8
	8	2.08	3367.3	1618.9
	平均値	3.09±0.64	8142.3±3894.2	2549.8±895.6