

フグ毒添加による *Vibrio alginolyticus* の増殖促進効果

斎藤 俊郎・池田 貴哉・仁科 徳啓

The effect of tetrodotoxin on growth of *V. alginolyticus*

Toshio Saito, Takaya Ikeda and Tokuhiko Nishina

東海大学海洋研究所研究報告
第 29 号 (2008), 53 - 59 頁別刷

Reprinted from Bull. Inst. Oceanic Res. & Develop.,
Tokai Univ. (2008), 29, 53 - 59

フグ毒添加による *Vibrio alginolyticus* の増殖促進効果

斎藤 俊郎¹⁾・池田 貴哉¹⁾・仁科 徳啓²⁾

The effect of tetrodotoxin on growth of *V. alginolyticus*

Toshio Saito¹⁾, Takaya Ikeda¹⁾ and Tokuhiko Nishina²⁾

Abstract

We conducted experiment to determine the function of tetrodotoxin (TTX) in *Vibrio alginolyticus*. *V. alginolyticus* was isolated from the digestive tube of kusahifugu (*Takifugu niphobles*) and they were cultured under aerobic condition at 25°C for 48 hours in the medium of 3% NaCl Buffered Peptone Water added with crude-TTX. We used 3 ml of medium with TTX concentration of 30 MU/ml in our experiment. Optical density (OD) of the medium was measured by a spectrophotometer at the wavelength of 660 nm. After 48 hours, OD of the medium in the sample with crude-TTX was found to be about twice than that of the control. Furthermore, growth pattern of *V. alginolyticus* in control was undergoing stationary phase, while *V. alginolyticus* in crude TTX sample was still in logarithmic growth phase. Our result indicated that crude-TTX has an inducing effect on growth of *V. alginolyticus*.

緒 言

フグ毒は長期に亘りフグ類特有の毒であると信じられてきた。ところが、1964年カリフォルニアイモリ *Taricha torosa* (Mosher *et al.*)からフグ毒が検出され、フグ類以外の生物がフグ毒を保有することが明らかとなった。これをきっかけとして、以後主に軟体、棘皮動物(成田, 1988)、節足、扁形、紐形動物(宮沢, 1988)からフグ毒が續々と発見されることとなった。そして1986年には、スベスベマンジュウガニ *Atergatis floridus* の消化管からフグ毒産生菌 *Vibrio* sp. (Noguchi *et al.*)が、また石灰藻体表からフグ毒産

生菌 *Pseudomonas* sp. (Yasumoto *et al.*)が発見され、フグ毒の起源が細菌であることが分かったのである。

現在では、フグ毒はフグ毒産生菌により産生され食物連鎖を介して上記生物群さらにはフグ類に蓄積されると考えられるようになった。これは同時に、生物界におけるフグ毒の全容が明らかになりつつあることも意味している。

このようにフグ毒の全容が明らかになるにつれ、フグ毒研究分野では「多くのフグ毒産生あるいは保有生物におけるフグ毒の機能」が新たな問題となっている。

フグ類におけるフグ毒の機能としては、トラフグ *Takifugu rubripes* が皮膚からフグ毒を分泌することが

1) 東海大学海洋学部 〒424-8610 静岡市清水区折戸3-20-1

School of Marine Science and Technology, Tokai University, 3-20-1 Orido, Shimizu-ku, Shizuoka 424-8610, Japan

2) 株式会社中部衛生検査センター 〒428-0007 島田市島663-3

Chubu Food and Environmental Safety Center, 663-3 Shima, Shimada 428-0007, Japan

(2007年11月8日受付 / 2008年1月7日受理)

見出され、フグ毒を自己防御に用いている可能性が報告されている (Saito *et al.*, 1985)。また、スベスベマンジュウガニも硬い皮膚からフグ毒を分泌し、フグ毒を自己防御に用いていることが示唆されている (Saito *et al.*, 2006)。

しかしながら、フグ毒産生菌を初めとする細菌におけるフグ毒の機能については全く究明が進んでいない。わずかにフグ毒の抗菌性が10種の細菌に対して調べられ、フグ毒には抗菌性がないこと (清水, 1989) が示唆された程度である。

著者らはフグ毒産生菌におけるフグ毒の機能解明に当たり、本細菌類がフグ毒保有生物の消化管から見出されるとの一連の報告に着目している。一例を挙げると Noguchi ら (1987) は、ショウサイフグ *Takifugu snyderi* 消化管からフグ毒および同関連物質を産生する菌を見出し、これを *V. alginolyticus* と同定している。この結果は、当然ながらフグ毒産生菌は消化管内に生息していることを示している。さらに、加納 (1989) はショウサイフグを初めとするフグ類6種の消化管内容物の毒量を調べ、いずれについても毒が認められたこと、すなわち消化管内にはフグ毒が存在することを報告している。

上記の諸結果を概括してみると、フグ毒産生菌 *V. alginolyticus* が生息する消化管、すなわち環境には、フグ毒が存在していることが分る。未だフグ毒産生菌

におけるフグ毒の機能は不明であるが、著者らは上記の諸事実を根拠として、フグ毒が本種フグ毒産生菌の増殖に益することを予想した。

以上の状況を踏まえ、本研究ではフグ毒産生菌 *V. alginolyticus* におけるフグ毒の機能究明の一環として、以下の2つを行うことにした。まず1つは供試クサフグの毒量、特に消化管内容物毒量を測定することである。2つはクサフグ消化管から単離した *V. alginolyticus* をクサフグ由来のフグ毒添加培地で培養し、フグ毒が本種細菌の増殖に及ぼす影響を検討することである。

材料と方法

1. クサフグ毒量測定

1-1 供試魚

2006年6月28日神奈川県観音崎にある観音崎大橋下の海岸で、産卵のため集まったクサフグ *Takifugu niphobles* (Fig. 1) 224 個体を手網で採集した。毒量測定には、その内の雄10個体、雌10個体の計20個体を用いた。体長、体重については Table 1 に示した。残りの204個体の使用方法については後述する。

1-2 毒量測定

採集したクサフグは直ちに冷蔵で当研究室に運搬し、毒量測定まで-40℃で凍結保存した。毒量測定に際しては、まず半解凍状態のクサフグを消化管、消



Fig. 1 “Kusafugu” *Takifugu niphobles*.

化管内容物、胆嚢、肝臓および生殖腺に解剖し、各部位の毒量を『食品衛生検査指針Ⅱ』(厚生省環境衛生局, 1978)中のフグ毒検査法により調べた。なお、部位重量が微量なものは適宜合一して測定に供した。また、毒量が5 MU/g未満の場合、これを無毒とし計算時には無毒を0として扱った。

2. フグ毒添加培地による *V. alginolyticus* の培養

2-1 クサフグ消化管からの *V. alginolyticus* の単離

クサフグ採集時、その場で4個体から各消化管を取り出した。次いでそれぞれを滅菌済みのキャップ付遠沈管(15 ml容, IWAKI)に入れ当研究室に冷蔵で運んだ。なお、解剖時にはクサフグ体表由来の雑菌混入を防ぐため、80%エタノールを含ませた脱脂綿で体表をよく拭いた後、滅菌済みのハサミとピンセットを用いて消化管を取り出した。

翌日、冷蔵保存中の消化管それぞれから内容物を取り出し各試験管に入れた。次いでそれぞれに9倍量のアルカリ性ペプトン水(日水製薬株式会社)を加え、37℃で24時間培養した。培養後白金耳で本培養液をCHROMagar™ *Vibrio* (CHROMagar, 関東化学)平板培地に画線塗布した。これを37℃で24時間培養後、*V. alginolyticus*と思われるコロニーから白金耳で菌を採取した。これらの菌は、TSI寒天培地(日水製薬株式会社)、LIM培地(日水製薬株式会社)、塩分濃度を0, 1, 8, 10%に各調整したNutrient Broth(Difco)による生化学的性状試験、ラピッドID32Eアピ試験(日本ビオメリュー株式会社)およびテスト紙によるオキシダーゼ試験(栄研化学)で同定した。

同定、単離された *V. alginolyticus* は、フグ毒添加培地による培養時までゼラチンデスク法(柳澤, 1978)により保存した。

なお、上記同定試験は実験開始時だけでなく、本培養(2-4で後述)終了時でも行なった。

2-2 添加フグ毒

フグ毒添加培地による *V. alginolyticus* の培養では、添加フグ毒としてフグ毒純品(ALEXIS CORPORATION)およびクサフグから粗抽出したフグ粗毒の2種類を用いた。

フグ粗毒の抽出に用いたのは、前述のクサフグ採集時に入手した200個体である。なお、この時のクサフグ体長は90.3~159.2mm、体重は32.3~138.8gであった。これらから取り出した肝臓を合一し、Fig. 2に示すフグ毒抽出法でフグ粗毒を総量45,000 MU得た。

2-3 添加用フグ粗毒に含まれる酢酸の除去

フグ粗毒添加培地による *V. alginolyticus* の培養に先立ち解決すべき問題があった。それはフグ粗毒に抽出液の酢酸が混入すること(Fig. 2)である。酢酸が *V. alginolyticus* の増殖に与える悪影響を考慮すると、事前に酢酸を取り除くことが必要となった。そこで以下の2つの対策を立てた。

1つはエバポレーションを繰り返すことによりフグ粗毒中の酢酸を除去することである。この時、フグ粗毒600 MUにつき25 mlの割合で蒸留水を加えエバポレーションを行い、乾固すると蒸留水添加とエバポレーションの工程を繰り返した。酢酸臭が無くなるまでを目安にこれを計5回行った(以後エバポレーション処理)。さらに1つの対策は、まず抽出時に必要な酢酸量を入れ、これをエバポレーション処理した対照区を設けることである。その際フグ粗毒に含まれる酢酸量は、粗毒600 MUに対し氷酢酸0.24 mlとした。

2-4 フグ毒添加培地による *V. alginolyticus* の培養

前培養：前述した様に *V. alginolyticus* の菌株はゼラチンデスクに保存されている。そこでまずゼラチンデスク1枚を、3% NaCl 添加 SCD 培地ダイゴ(日水

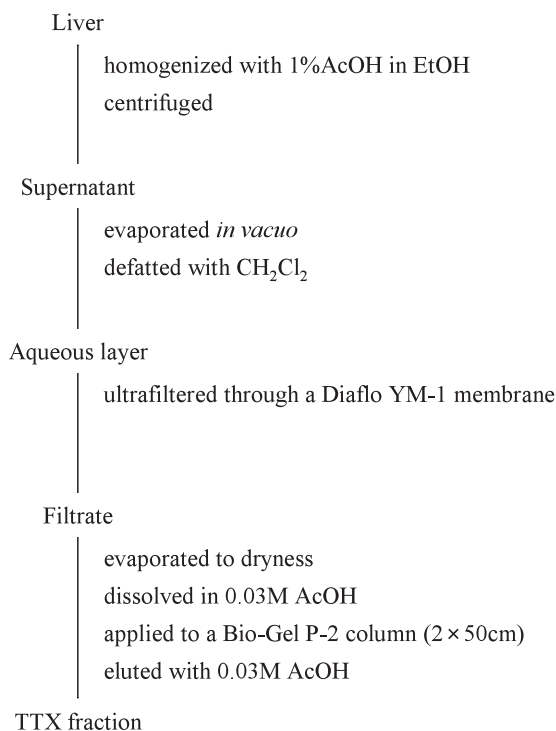


Fig. 2 Procedure of separation of TTX fraction.

製薬株式会社)が 10.0 ml 入った試験管に入れ、25℃で 18 時間培養した。次いで、PBS (-) (日水製薬株式会社)で 10^5 倍希釈し、その菌液 0.1 ml を 3% NaCl 添加 BUFFERED PEPTONE WATER (OXOID) (以下 BPW) が 9.9 ml 入った試験管に接種、25℃で 12 時間培養した。前実験の結果から、この時点の菌は対数増殖期中期にあることが分っている。また次項に示す本培養では、この菌液を PBS (-) でさらに 10^3 倍希釈し、菌数を平均 2×10^3 細胞/ml にして供試した。

本培養：実験方法の概要を示すと、試験区は 4 つ、すなわちフグ粗毒を添加したフグ粗毒区およびフグ毒純品を添加したフグ毒純品区の 2 つと、エバポレーション処理をした酢酸を添加した酢酸区および蒸留水のみ加えた蒸留水区の 2 対照区の計 4 試験区とした。次に各試験区で *V. alginolyticus* を好気条件下、25℃、48 時間培養後、各細菌数を分光光度計で測定するのである。以下、具体的に述べる。

三角フラスコ (100 ml 容) を 5 つ用意し、それぞれに BPW を 3 倍希釈し、NaCl を添加した 3% NaCl-BPW/3 を 18 ml 入れた。BPW を希釈する理由は、幾

分栄養価を減少させた方が、フグ毒の効果が明確になると予想したからである。

次いで、試験区ごとに調整溶液を 1 ml と上記した前培養後の希釈菌液 1 ml (菌数: 2×10^3 細胞) を入れ、各総量 20 ml とした。この際、調整溶液の内訳は各試験区で異なっている。すなわち、フグ粗毒区ではエバポレーション処理したフグ粗毒水溶液 1 ml (600 MU) とし、結果的に本試験区の毒濃度は 30 MU/ml とした。フグ毒純品区では、純品 600 MU に前項 2-3 で示した量の酢酸および蒸留水を入れエバポレーション処理した 1 ml とし、上記同様毒濃度を 30 MU/ml とした。なお、毒濃度を 30 MU/ml としたのは、クサフグ消化管内容物の毒量試験結果を参考にした(後述)。酢酸区では、フグ粗毒 600 MU に含まれる酢酸 (2-3 項参) をエバポレーション処理した 1 ml とした。蒸留水区では蒸留水 1 ml とした。5 つ目の三角フラスコは分光光度計測定時のブランク用とし、調整溶液の蒸留水 1 ml と細菌を含まない培養液、すなわち 3% NaCl 添加 BPW を PBS (-) で 10^{-3} 倍希釈した 1.0 ml を加えた。なお、上記各試験区の調整溶液は、全て 0.2 μ m のフィ

Table 1 Toxicity distribution in different parts of the body of kusahfugu *Takifugu niphobles*.

No.	Sex	Body weight (g)	Body length (cm)	Toxicity (MU/g)				
				Digestive tube without contents	Contents of digestive tube	Gall	Liver	Ovary and testis
1	♂	88.1	12.9	<5	<5	* 60	<5	<5
2		72.4	12.7	<5	<5		22	<5
3		81.7	11.8	22	11		237	<5
4		66.9	11.8	45	13		221	<5
5		74.1	11.4	<5	<5		8	<5
6		84.1	12.2	<5	*<5		<5	<5
7		70.9	11.6	17	<5		233	<5
8		75.2	12.3	<5	*<5		10	<5
9		57.0	11.5	10	<5		<5	<5
10		59.1	10.9	14	<5		168	<5
11	♀	76.5	13.2	<5	<5	* 88	<5	<5
12		140.0	13.1	<5	<5		<5	25
13		94.3	11.4	5	<5		12	<5
14		77.0	11.3	7	8		27	130
15		120.4	12.9	44	27		96	385
16		80.7	12.6	<5	<5		<5	116
17		96.1	12.3	43	28		196	<5
18		45.6	10.8	<5	<5		7	74
19		44.1	9.5	<5	*<5		6	75
20		31.9	8.2	755	13		1670	539

<5MU/g was treated as 0.

*: The data was obtained by mixing samples from the body parts of more than one specimens.

ルター (ADVANTEC) で濾過滅菌したものである。

各試験区3本の試験管を用意し、それぞれに各三角フラスコ内の培地を 3.0 ml 入れ 25℃ で 48 時間培養した。なお、ブランク用は試験管1本とした。

2-5 *V. alginolyticus* の菌数測定

各試験区の菌数は、分光光度計 (Thermo Spectronic) を用い、波長 660 nm で測定した。測定は培養開始を含め 1 時間毎に合計 49 回行った。各試験区3本の試験管吸光度を測定し、平均値をその時点での値とした。これらの値を元に各試験区の増殖曲線を作成した。

結 果

1. クサフグ毒量測定

Table 1 にクサフグの部位別毒量を示した。

まず消化管では、雄では 10 個体の平均毒量は 11 ± 15 MU/g、雌では同じく平均毒量 85 ± 236 MU/g となり、雌の方が高毒となった。しかし、有意 (t-検定, $P < 0.05$) な性差は認められなかった。

消化管内容物を見てみると、雄では <5~13 MU/g、雌では <5~28 MU/g の範囲となった。全体を通じての最高毒量は 28 MU/g であった。前述した本培養ではこの値を根拠に添加フグ毒量を 30 MU/ml とした。

胆嚢については、各胆嚢重量が少なかったため

に合一して測定した値であるが、雄 60 MU/g、雌 88 MU/g となった。

肝臓では、雄の 10 個体平均毒量は 90 ± 109 MU/g、雌の同じく平均毒量は 201 ± 520 MU/g となり、雌の方が高い傾向が見られた。しかし、個体差が大きく有意 (t-検定, $P < 0.05$) な性差は認められなかった。

生殖腺は、雄では 10 個体無毒、雌では 10 個体平均で 134 ± 183 MU/g と、明らかに雌の方が高かった。

2. フグ毒添加培地による *V. alginolyticus* の培養

Fig. 3 に本培養 (2-4 参) の結果を提示した。

各試験区の増殖曲線を概観すれば、フグ毒純品区、酢酸区および蒸留水区に比して、フグ粗毒区では著しく増殖促進が生じていることが分かる。

すなわち、培養 48 時間後の吸光度を見ると、酢酸区および蒸留水区は 0.48 ± 0.01 (平均 ± 標準偏差) および 0.45 ± 0.00 であるのに対し、フグ粗毒区では約 2 倍の 0.90 ± 0.00 と有意 (t-検定, $P < 0.05$) に高くなった。また、増殖曲線を見ると、フグ毒純品区、酢酸区および蒸留水区の各細菌は、培養開始後 8 時間位までは激しく増殖し、その後 18 時間位までは対数増殖期であり、18 時間以降では増殖の勢いは衰え、徐々に定常期に入っている。ところが、フグ粗毒区では培養 48 時間後も増殖の勢いは衰えなかった。

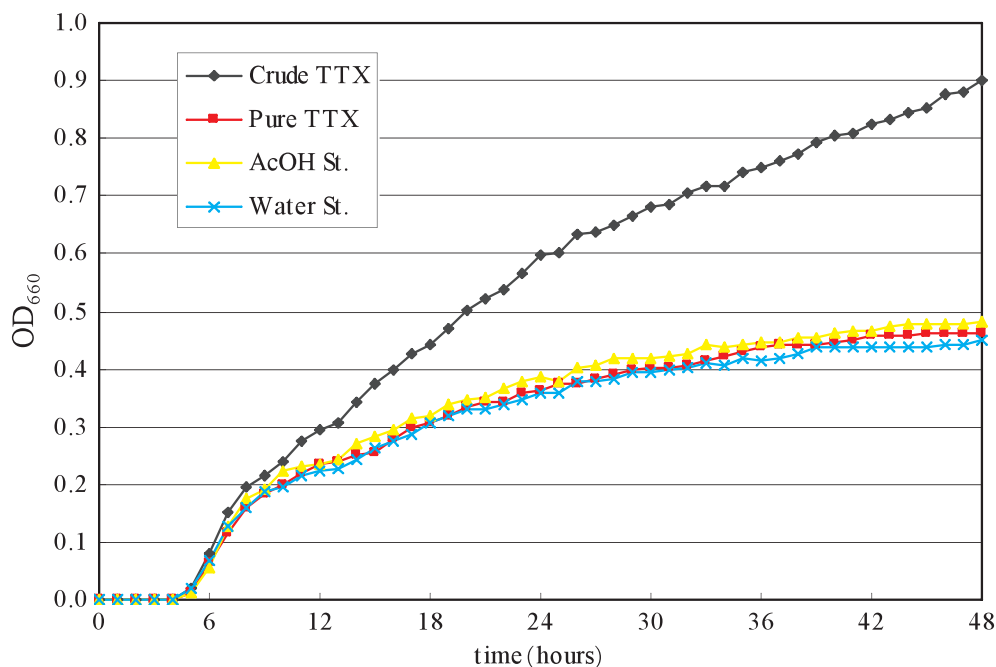


Fig. 3 The growth curve of *V. alginolyticus* during 48 hours.

また、本培養終了時における各試験区の同定試験では、全試験区 *V. alginolyticus* のみであることが分かった。

論 議

1. クサフグ毒量測定

今回消化管からも毒量が測定された。雄雌共に10個体中5個体が無毒 (<5 MU/g) であったが、雄雌共に肝臓毒量が3桁代と高いと消化管にも毒量が認められており、両者に相関があることが分かる。著者らはこの理由を、クサフグが消化管を介して毒を吸収し、この毒を肝臓において蓄積するからだと考えている。これをさらに具体的に言えば、2つのことが考えられよう。口から摂取されたフグ毒は、消化管で吸収される。そのため、1つは「多くのフグ毒を摂取した個体の消化管には、吸収されたフグ毒が存在している」ことである。さらに、吸収されたフグ毒はその後肝門脈を経て肝臓に移動する。今回卵巣にも毒が認められることから分かる様に、肝臓に移動したフグ毒のあるものは血液を介してフグ毒を必要とする全身に運ばれると考えられる。よって、2つ目の理由としては「何らかの理由から肝臓からのフグ毒が消化管に蓄積している」ことも考えられる。

今回、消化管内容物から毒量が検出された個体が見られたが、消化管内容物に毒が認められる理由としては、2つを考えている。1つは、当然これらクサフグがフグ毒含有餌生物を摂食した故が考えられる。もう1つは、胆嚢経由で消化管に分泌されるフグ毒が消化管内容物と混合する故である。というのは、胆汁は消化時に消化管に流れ出てくるからであり、さらに今回、各個体の胆嚢を合一したとは言え、胆嚢からも毒量が認められているからである。このことは、非常に重要な意味を持つと思う故後で詳しく述べる。

2. フグ毒添加培地による *V. alginolyticus* の培養

今回、フグ毒純品区、酢酸区および蒸留水区に比して、フグ粗毒区の *V. alginolyticus* は明らかに増殖が促進された。特に、増殖開始後48時間において、上記3試験区の細菌は定常期に入っているのに対し、フグ粗毒区は今なお対数増殖期である事実は、この増殖促進作用が増殖の質までも変化させる強いレベルであることを意味している。よってこれら諸結果は、「好気条件においてフグ粗毒は *V. alginolyticus* の増殖を促進させる」こと、さらに「環境中のフグ粗毒が *V.*

alginolyticus の生存に良い影響を与える」ことを強く示唆している。

フグ毒純品区では、フグ粗毒区のような増殖促進は起こらなかった。また、フグ毒純品区を増殖曲線は、酢酸区および蒸留水区と遜色無かった。これらの結果は、フグ毒純品が *V. alginolyticus* の増殖を促進させないこと、よって、フグ毒純品とフグ粗毒とは質的に異なることを示唆している。これに関連して、フグ毒は精製が進み純粋となると難水溶性になること(平田, 1979)が知られている。生体は、そのほとんどが水分と言っても過言ではない。その生体の中でフグ毒が難水溶性であることは非常に考えにくい。そのため、長年「生体内のフグ毒の状態は純品と異なるのではないか。」と問題視されているが未解決である。詳しいメカニズムは未知であるが、著者らは上記の質的違い故に、フグ毒純品区で増殖促進が起こらなかった可能性を考えている。

3. 総合的観点からの論議

今まで示してきた諸結果を踏まえ、著者らは、「クサフグを初めとするフグの消化管において、フグ毒は *V. alginolyticus* 等のフグ毒産生菌の維持に関与している可能性」を考えている。

この理由は、以下の3つである。

1つは、フグ毒産生菌がフグの消化管から単離される(Noguchi *et al.*, 1987)と共に、消化管内容物からフグ毒が検出される(加納, 1989)ことである。つまり、フグ毒産生菌はフグ毒の存在する環境に生息していることである。2つは、Watabeら(1987)がトリチウムでラベルしたフグ毒を無毒のフグに投与し、フグ毒が、生殖腺、肝臓および胆嚢に蓄積されたことを報告していることである。この結果は、肝臓や胆嚢におけるフグ毒の蓄積が何か意味のあることを伺わせる。3つは、胆嚢から消化管に流れ出た胆汁が、消化管のマイクロフローラに影響を与える(瀬良ら, 1975)故、つまり、胆汁は腸内細菌の環境を作る大きな1要因となっているからである。よって、胆嚢に蓄積するフグ毒が消化管のマイクロフローラに何らかの影響を与える可能性は充分考えられる。4つは、今回好気条件下であるが、クサフグ由来のフグ粗毒が、これまたクサフグの消化管由来の典型的フグ毒産生菌 *V. alginolyticus* の増殖を著しく促進したからである。よって、本種細菌にとって、フグ粗毒は生存に有利に機能していることが示唆される。

以上より、「クサフグを初めとするフグの消化管において、フグ毒は *V. alginolyticus* 等のフグ毒産生菌の維持に関与している可能性」を考えるのである。

今後は、消化管環境に近い完全嫌気あるいは微好気条件下でも上記と同様 *V. alginolyticus* の増殖促進が起こるか否かを調べる予定である。また、今回培地に添加したのはフグ粗毒であるため、この増殖促進がフグ粗毒以外の物質に起因する可能性も否定できない。

そこで早急に、無毒のクサフグから同様の方法で得た抽出物を添加し *V. alginolyticus* の培養実験を行ないたい。

謝 辞

本論文作成に当たり、クサフグの写真を快く提供して下さった元東海大学海洋学部助教授岸本浩和先生、時には徹夜に及ぶ実験を共に行なってくれた本学海洋生物学科齋藤研究室卒業生の川合敏夫君、またクサフグ採集に協力してくれた同研究室各位に心から感謝する。

文 献

- 平田義正 (1979) 低分子毒の化学. 化学総説 No. 25 海洋天然物化学, 学会出版センター, 東京. 287 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.
- 厚生省環境衛生局 (1978) 1. フグ毒, c. 魚介類の毒. 食品衛生検査指針 II 「食品別」, 日本食品協会, 東京. 735 pp.
- 宮澤啓輔 (1988) 節足, 扁形, 紐形動物などにおけるフグ毒の分布. 水産学シリーズ 70 フグ毒研究の最近の進歩, 恒星社厚生閣, 東京. 117 pp.
- Mosher, H. S., Fuhrman, F. A., Buchwald, H. D. and Fisher, H. G. (1964) Toricatotoxin: A potent neurotoxin. *Science*, **114**, 1100-1110.
- 成田弘子 (1988) 軟体, 棘皮動物におけるフグ毒の分布. 水産学シリーズ 70 フグ毒研究の最近の進歩, 恒星社厚生閣, 東京. 117 pp.

- Noguchi, T., D. F. Hwang, O. Arakawa, H. Sugita, Y. Deguchi, Y. Shida and K. Hashimoto (1987) *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fugu vermicularis vermicularis*. *Marine Biol.*, **94**, 625-630.
- 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*. *J. Biochem.*, **99**, 311-314.
- Saito, T., T. Kohama, K. Ui and S. Watabe (2006) Distribution of tetrodotoxin in the xanthid crab (*Atergatis floridus*) collected in the coastal waters of Kanagawa and Wakayama Prefectures. *CBP.*, Part D1, 158-162.
- Saito, T., T. Noguchi, T. Harada, O. Murata and K. Hashimoto (1985) Tetrodotoxin as a biological defense agent for puffers. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51** (7), 1175-1180.
- 瀬良 洋・石田祐三郎 (1975) 魚類消化管内のマイクロフローラ形成について. 微生物の生態 (2) - 相互作用をめぐって. 東京大学出版会, 東京. 216 pp.
- 清水 潮 (1989) フグ毒のなぞを追って. 裳華房, 東京. 123 pp.
- Watabe, S., Y. Sato, M. Makaya, N. Nogawa, K. Oohashi, T. Noguchi, N. Morikawa and K. Hashimoto (1987) Distribution of tritiated tetrodotoxin administered intraperitoneally to pufferfish. *Toxicon*, **25** (12), 1283-1289.
- 柳澤 謙 (1978) 細菌・真菌検査 微生物検査必携 第2版. 日本公衆衛生協会, 東京. 576 pp.
- Yasumoto, T., D. Yasumura, M. Yotsu, T. Michishita, A. Endo and Y. Kotaki (1986) Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin. *Agric Biol Chem.*, **50** (3), 793-795.