

テトロドトキシン添加飼料投与による 養殖トラフグ *Takifugu rubripes* の毒化

本田 俊一,¹ 荒川 修,^{2*} 高谷 智裕,² 橋 勝康,²
八木 基明,^{3a} 谷川 昭夫,⁴ 野口 玉雄⁵

(2004年8月16日受付, 2005年2月28日受理)

¹長崎大学大学院生産科学研究科, ²長崎大学水産学部, ³長崎市水産センター,
⁴長崎漁港水産加工団地協同組合, ⁵財団法人日本冷凍食品検査協会

Toxification of cultured puffer fish *Takifugu rubripes*
by feeding on tetrodotoxin-containing diet

SHUNICHI HONDA,¹ OSAMU ARAKAWA,^{2*} TOMOHIRO TAKATANI,²
KATSUYASU TACHIBANA,² MOTOAKI YAGI,^{3a}
AKIO TANIGAWA⁴ AND TAMAO NOGUCHI⁵

¹Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, ²Faculty of Fisheries, Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, ³Nagasaki Municipal Fisheries Center, Nagasaki 851-0014, ⁴Nagasaki Fishing Port Fisheries Processing Plant Complex Cooperative Society, Nagasaki 851-2206, ⁵Japan Frozen Foods Inspection Corporation, Minato, Tokyo 105-0012, Japan

A total of 5 feeding experiments were conducted, in which non-toxic cultured puffer fish 'torafugu' *Takifugu rubripes* were reared for 60 days with various types of tetrodotoxin (TTX)-containing diets. The test fish administered with a crude extract from toxic tissues of a wild puffer 'nashifugu' *T. vermicularis* accumulated a small amount of TTX (less than 3 MU/g in most cases) mainly in the skin and liver at low dose (0.1 MU/(1 g body weight•day)), and a large amount (up to 57 MU/g) mostly in the liver and ovary at higher doses (0.2-1.0 MU/(1 g body weight•day)). The accumulation rate of toxin in 0-year-old fish reared in aquaria was calculated to be 0-17%, whereas that in 1-year-old fish reared in netcages to be more than 30%. The toxin, once accumulated in the puffer tissues, was retained there for at least 45 days without any toxic diet being supplied. When a purified sample of TTX (95% purity) was administered, the puffer accumulated it up to similar levels as in the crude toxin. The fish were also found to accumulate generally high concentrations of toxin if directly fed with minced tissues of *T. vermicularis*.

キーワード：養殖トラフグ, ナシフグ, テトロドトキシン, 毒化

天然トラフグ *Takifugu rubripes* の毒性に関する報告は少ない。古く谷¹⁾は北九州産トラフグを対象に部位別の毒性を調べ、卵巣と肝臓は強毒、腸は弱毒、筋肉、皮および精巢は無毒(10 MU/g未満)とした。その後、加納²⁾は東京都中央卸売市場に入荷した瀬戸内海ないし九州周辺海域産トラフグについて肝臓と卵巣の毒性を調査し、ともに毒力数百 MU/g に達する個体がみられ

るなど、谷とはほぼ同様の結果を得ている。

一方、齊藤³⁾によれば、福井、鹿児島、和歌山の各県で飼育された養殖トラフグ計 85 個体は、肝臓、生殖巣、筋肉のいずれも無毒(10 MU/g未満)であったという。さらに最近野口⁴⁾は、長崎、熊本、鹿児島、愛媛、和歌山、静岡の各県で網生け簀養殖されたトラフグ、ならびに佐賀県で濾過海水により陸上養殖されたト

* Tel & Fax : 81-95-819-2844. Email : arakawa@net.nagasaki-u.ac.jp

^a 現所属：長崎市水産農林部 (Fisheries Agriculture and Forestry Department, Nagasaki-shi, Nagasaki, Nagasaki 850-8685, Japan)

ラフグ, 計 4,515 個体につき, 主に肝臓の毒性を調査し, すべて無毒 (2-5 MU/g 未満) であったと報告している。このように囲い養殖されたトラフグが無毒であることに加え, 小型巻貝, ヒラムシ, ヒトデなどフグの餌生物からフグ毒テトロドトキシン (TTX) が検出されていること,⁵⁾ 養殖フグに TTX を経口投与するとこれを蓄積すること,⁶⁾ などから, 現在, フグの毒化は食物連鎖を介する外因性のものと考えられている。関連して, 湾を仕切っただけの粗放的な養殖や, 海水を濾過せず直接池に汲み入れて行う陸上養殖では, 有毒個体の出現例が報告されている。^{7,8)} 養殖フグでも, 有毒餌生物を遮断しない環境で飼育すると, 当然毒化が起こる可能性があると言える。

本研究では, トラフグにおける TTX の蓄積・代謝・排泄機構を明らかにする研究の一環として, 屋内の 1 t 水槽もしくは海面の網生け簀に養殖トラフグを収容し, 種々の TTX 添加飼料を与えて 60 日間飼育する「飼育試験」を都合 5 回実施して毒の蓄積状況を調べた。

試料および方法

試験魚 長崎市水産センターで, ワムシ, アルテミア, 市販のトラフグ用飼料などを用いて孵化仔魚から飼育した養殖トラフグ当歳魚 A (体重 61.2 ± 8.6 g, 体長 12.4 ± 0.7 cm) 400 尾, B (体重 14.4 ± 2.0 g, 体長 8.1 ± 0.4 cm) 300 尾, C (体重 129 ± 24 g, 体長 17.2 ± 0.9 cm) 180 尾, および 2 年魚 D (体重 613 ± 120 g, 体長 26.3 ± 1.2 cm) 200 尾, ならびに NCC 開発株式会社で同様に飼育した養殖トラフグ 2 年魚 E (体重 195 ± 44 g, 体長 18.6 ± 1.4 cm) 1,880 尾を試験魚として用いた。

飼料添加用 TTX の調製 長崎県産ナシフグ *Takifugu vermicularis* の加工残滓 (筋肉と精巢以外の部位) を飼料添加用 TTX の原料とした。凍結保存しておいた残滓ブロックを粉砕し, 3 倍量のエタノールで 2 回抽出後, 大型エバポレーターで減圧濃縮し, TTX 粗抽出液 (25~2,000 MU/mL) を得た。この粗抽出液, ならびに残滓ブロックの粉砕物 (20~300 MU/g) を有毒飼料の調製に用いた。

飼料の調製 以下のとおり, 7 種類の飼料を調製した。

1. 無毒飼料 市販の発酵魚粉 (大洋食品) と冷凍サバを 1:1 の割合で混ぜ, フィードオイル (理研ビタミン) を外割 2.5% 添加後, モイストペレットとした。
2. 0.1 MU TTX 添加飼料 TTX 粗抽出液を試験魚への投与量 (投餌予定量から算出したもの) が 0.1 MU/(1 g body weight·day) となるように無毒飼料に添加した (飼料中の TTX 濃度は 2.1~6.3 MU/g)。
3. 0.2 MU TTX 添加飼料 TTX 粗抽出液を試験魚への投与量が 0.2 MU/(1 g body weight·day) となるように無毒飼料に添加した (飼料中の TTX 濃度は 4.2~

13 MU/g)。

4. 1.0 MU TTX 添加飼料 TTX 粗抽出液を試験魚への投与量が 1.0 MU/(1 g body weight·day) となるように無毒飼料に添加した (飼料中の TTX 濃度は 21~63 MU/g)。

5. 0.2 MU 精製 TTX 添加飼料 純度 95% の精製 TTX を試験魚への投与量が 0.2 MU/(1 g body weight·day) となるように無毒飼料に添加した (飼料中の TTX 濃度は 4.2~13 MU/g)。

6. 残滓ミール 魚粉とナシフグ残滓ブロックの粉砕物を, 1:1 の割合で混ぜ, フィードオイルを外割 2.5% 添加後, モイストペレットとした。

7. 1/2 残滓ミール 魚粉, 冷凍サバおよびナシフグ残滓ブロックの粉砕物を 1:0.5:0.5 の割合で混ぜ, フィードオイルを外割 2.5% 添加後, モイストペレットとした。

いずれの餌も飼育試験と並行して 2 週間ごとに必要量を調製した。調製後は直ちに小分けして密封式の脱酸素剤エージレス (三菱ガス化学) とともにビニール袋に封入し, 試験魚に投与するまで, -20°C で冷凍保存した。

飼育試験 以下のとおり, 5 回の飼育試験を行った。

試験 1. 2000 年 10 月から 2000 年 12 月にかけて, 長崎市水産センター屋内に設置した 8 基の水槽に試験魚 A を 50 尾ずつ収容し, 以下の 8 区, すなわち無毒飼料区 (無毒飼料を与える区), 0.1 MU TTX 区 (0.1 MU TTX 添加飼料を与える区), 0.2 MU TTX 区 (0.2 MU TTX 添加飼料を与える区), 1.0 MU TTX 区 (1.0 MU TTX 添加飼料を与える区), 0.2 MU 初期投与区 (最初の 15 日間は 0.2 MU TTX 添加飼料を, その後は無毒飼料を与える区), 1.0 MU 初期投与区 (最初の 15 日間は 1.0 MU TTX 添加飼料を, その後は無毒飼料を与える区), 0.2 MU 精製 TTX 区 (0.2 MU 精製 TTX 添加飼料を与える区) および残滓ミール区 (残滓ミールを与える区) を設定した。飼育期間中の投餌量は各区 2.7~2.9 g/(fish·day) とした。

試験 2. 2001 年 7 月から 2001 年 10 月にかけて, 長崎市水産センター屋内に設置した 3 基の水槽に試験魚 B を 100 尾ずつ収容し, 無毒飼料区, 0.1 MU TTX 区および残滓ミール区の 3 区を設定した。飼育期間中の投餌量は各区 1.8~6.0 g/(fish·day) とした。

試験 3. 2001 年 10 月から 2001 年 11 月にかけて, 長崎県島原市内の民間施設に設置した 3 基の水槽に試験魚 C を 60 尾ずつ収容し, 無毒飼料区, 0.1 MU TTX 区および 1/2 残滓ミール区 (1/2 残滓ミールを与える区) の 3 区を設定した。飼育期間中の投餌量は各区 6.2~11 g/(fish·day) とした。

試験 4. 2000 年 11 月から 2001 年 1 月にかけて長崎

市三重新漁港内に設置した2つの網生け簀に、試験魚Dを100尾ずつ収容し、無毒飼料区および0.2 MU TTX区の2区を設定した。飼育期間中の投餌量は各区15~50 g/(fish・day)とした。

試験5. 2001年6月から2001年8月にかけて長崎市三重新漁港内に設置した4つの網生け簀に、試験魚Eを470尾ずつ収容し、無毒飼料区、0.1 MU TTX区、残滓ミール区および1/2残滓ミール区の計4区を設定した。飼育期間中の投餌量は各区2.1~4.0 g/(fish・day)とした。

屋内の飼育においては、1000 L容の掛け流し式パンライト水槽を用い、試験1と2ではUV照射ろ過海水、試験3では海岸に掘削した井戸から汲み上げた地下水を5 L/minで注水し、絶えずエアレーションを行って飼育した。60日間の飼育期間中、試験1と5では15日毎、試験2では30日毎、試験3と4では飼育60日目に各区から試験魚を5から10尾ずつ取り上げ、以下の方法により毒の蓄積状況を調べた。

毒性試験 試験1と2では筋肉、皮、肝臓およびその他の内臓に、試験3-5では筋肉、皮、肝臓、生殖巣およびその他の内臓に腑分け後、「食品衛生検査指針Ⅱ理化学編」⁹⁾のフグ毒検査法に準じてマウス毒性試験に

供し、毒の蓄積状況を調べた。ここで、1 MU (マウスユニット)とは、体重20 gのddY系雄マウスを30分で死亡させる毒量のことをいう。

結果

いずれの飼育試験においても、試験魚の体重・体長の推移に、各試験区の間で際だった差はみられなかった。生残率についても、試験5で無毒飼料区が他の区より最終的に1割程度低かったのを除き、各試験区の間でほとんど差がなかった。

一方、いずれの試験においても、無毒飼料区のトラフグはTTXを蓄積していなかった(いずれの部位も2.0 MU/g未満)。有毒飼料投与区についても、毒性試験に供したすべての試験魚で、筋肉と精巣には毒の蓄積がみられなかった(2.0 MU/g未満)。その他の部位のTTX蓄積状況は以下のとおりである。

試験1 各区の部位別毒力の推移をFig. 1に示す。0.1 MU TTX区の場合、飼育30日目までは毒の蓄積がみられなかったが、45日目以降は皮にのみ<2.0~2.4 MU/gと微量の毒が認められた(Fig. 1-B)。0.2 MU TTX区では、30日目以降、皮と肝臓に、60日目にはその他の内臓にも<2.0~4.2 MU/gと少量の毒が蓄積

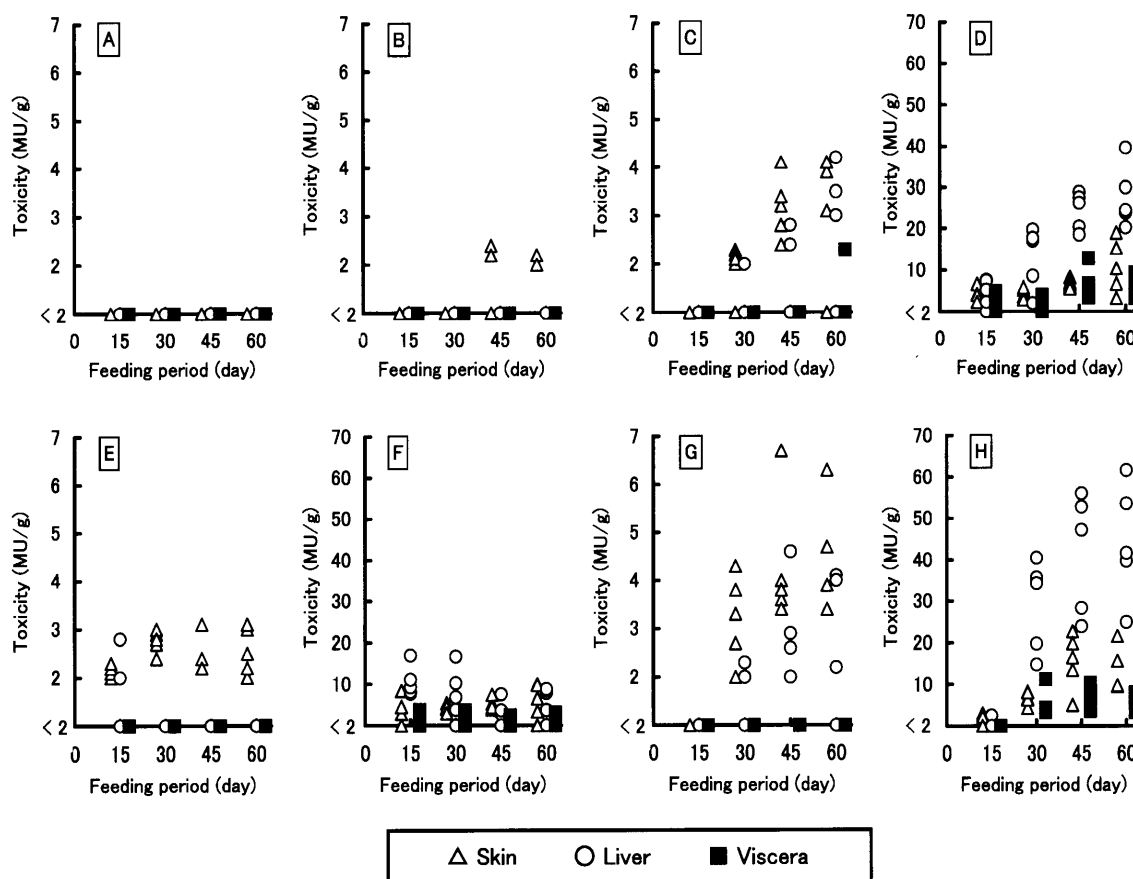


Fig. 1 Toxin accumulation in the test fish during the feeding experiment-1. A, non-toxic diet group; B, 0.1 MU TTX group; C, 0.2 MU TTX group; D, 1.0 MU TTX group; E, 0.2 MU TTX initial administration group; F, 1.0 MU TTX initial administration group; G, 0.2 MU purified TTX group; H, scrap meal group.

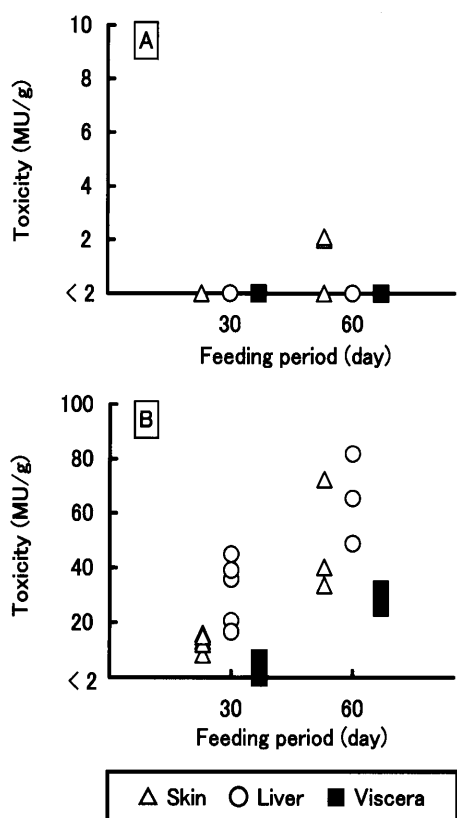


Fig. 2 Toxin accumulation in the test fish of '0.1 MU TTX group' A and 'scrap meal group' B on the 30th and 60th day of feeding experiment-2.

していた (Fig. 1-C)。1.0 MU TTX 区では、いずれの部位にも飼育期間を通して毒の蓄積がみられた (Fig. 1-D)。特に肝臓では日数の経過とともに毒量が増え、60日目には 20~40 MU/g に達する高毒量を蓄積していた。

一方、0.2 MU 初期投与区と 1.0 MU 初期投与区は、最初の 15 日間でそれぞれ <math>< 2.0\sim 2.8</math> MU/g, <math>< 2.0\sim 17</math> MU/g と対応する TTX 粗抽出液投与区と同程度に毒を蓄積し、皮ではそれをほぼそのまま 60 日目まで保持していた (Fig. 1-E, F)。0.2 MU 精製 TTX 区は、30 日目から毒の蓄積がみられ、その後は 0.2 MU TTX 区同様、皮と肝臓に <math>< 2.0\sim 6.7</math> MU/g と少量の毒を蓄積した (Fig. 1-G)。残滓ミール区の場合、1.0 MU TTX 区とはほぼ同様に毒を蓄積したが、肝臓の毒量は同区よりも総じて高く、60 日目には 25~62 MU/g に達した (Fig. 1-H)。

試験 2 0.1 MU TTX 区では、飼育 30 日目まで毒の蓄積がみられず、60 日目に <math>< 2.0\sim 2.1</math> MU/g の微量の毒を皮に蓄積したのみであった (Fig. 2-A)。これに対し、残滓ミール区では、30 日目で既に肝臓の毒力が 17~45 MU/g と高く、60 日目には肝臓で 49~82 MU/g、皮でも 34~72 MU/g に達する高濃度の毒を蓄積していた (Fig. 2-B)。

試験 3 0.1 MU TTX 区では、いずれの試験魚にも

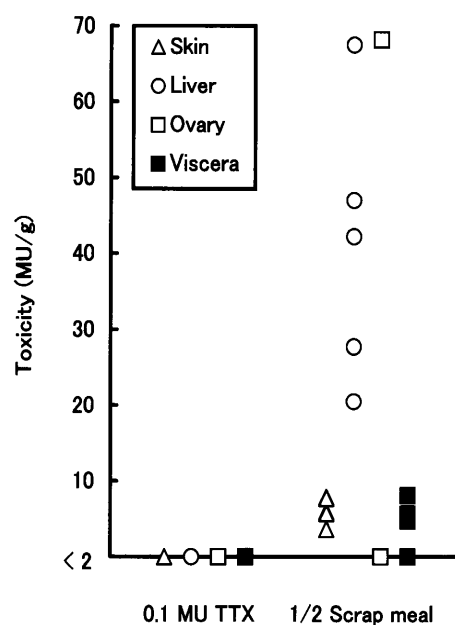


Fig. 3 Toxin accumulation in the test fish of '0.1 MU TTX group' and '1/2 scrap meal group' on the 60th day of feeding experiment-3.

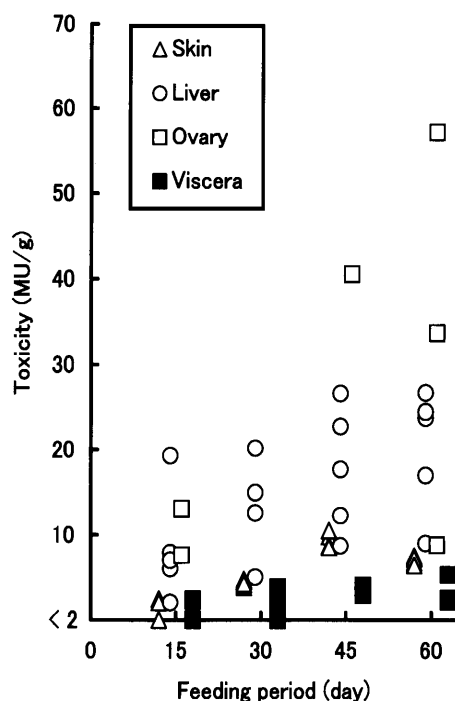


Fig. 4 Toxin accumulation in the test fish of '0.2 MU TTX group' during feeding experiment-4.

毒の蓄積がみられなかったのに対し、1/2 残滓ミール区では、皮と内臓に少量 (<math>< 2.0\sim 8.1</math> MU/g)、肝臓と卵巣に高濃度 (<math>< 2.0\sim 68</math> MU/g) の毒を蓄積していた (Fig. 3)。

試験 4 0.2 MU TTX 区の蓄積毒量は、肝臓、皮、内臓の場合、45 日目まで飼育日数の経過とともに若干増加し、最終的には、皮 (6.4~7.5 MU/g) と内臓

(2.1~5.3 MU/g) に微量の毒を、肝臓 (9.0~27 MU/g) に多量の毒を蓄積した (Fig. 4)。卵巣では、45 日目と 60 日目に特に高毒量 (33~57 MU/g) の個体がみられた。

試験 5 0.1 MU TTX 区および残滓ミール区では、皮と内臓に <2.0~7.7 MU/g、肝臓に <2.0~21 MU/g の毒を蓄積していた (Fig. 5)。1/2 残滓ミール区では、皮、肝臓およびその他の内臓に <2.0~5.4 MU/g の少量の毒を蓄積していた。いずれの区も、卵巣には最高 100 MU/g に達する高濃度の毒の蓄積がみられた。

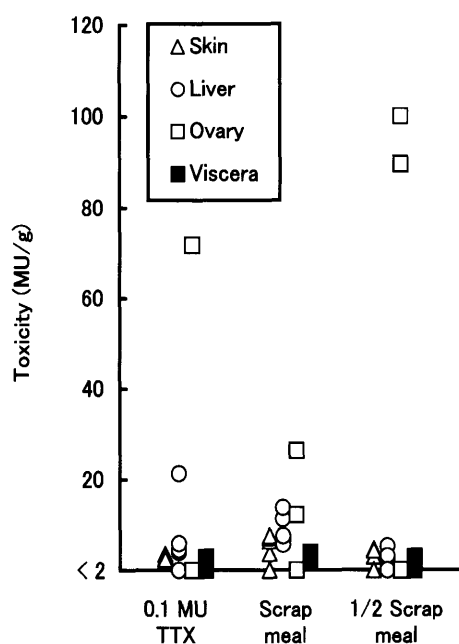


Fig. 5 Toxin accumulation in the test fish of '0.1 MU TTX', 'scrap meal group' and '1/2 scrap meal group' on the 60th day of feeding experiment-5.

考 察

以上のように、無毒の養殖トラフグは、屋内外いずれの飼育試験においても、TTX 添加飼料の投与により毒を蓄積した。飼育期間中の毒蓄積率 (MU を指標として算出した値) は、当歳魚を用い、屋内水槽で飼育した試験 1-3 の場合、残滓ミール区を除くいずれの区も 2 割に満たなかったのに対し、2 年魚を用い、海面の網生け簀で飼育した試験 4 と 5 では、飼育時期がそれぞれ 11~1 月、6~8 月と大きく異なるにもかかわらず、ともに 3 割程度と高かった (Table 1)。この差異が魚齢の違いからくるのか、あるいは屋内水槽と海面の網生け簀という飼育環境の違いからくるのか、今後さらに検討する必要がある。

Matsui ら⁶⁾は、トラフグに有毒フグ卵巣もしくはその粗抽出液を投与すると毒を蓄積するが、結晶 TTX を投与してもほとんど毒化しなかったと報じている。しかしながら、今回の試験 (試験 1) では、純度 95% の精製 TTX を投与した場合でも、試験魚はナシフグから抽出した粗毒と同程度にこの毒を蓄積した (Fig. 1, Table 1)。他方、ナシフグ残滓ブロック粉碎物は、含有毒量のロット差が大きく、さらに同一ロットでも十分に均一化することが困難であったため、残滓ミール区と 1/2 残滓ミール区については、投与毒量が明確ではない。従って、毒蓄積率を算出することができなかったが、これらの区では、いずれの試験においても総じて高濃度の毒蓄積がみられた。関連して、Matsui ら⁶⁾の報告では、卵巣を直接投与した方が一旦抽出した粗毒を投与した場合より蓄積率が高かったとされている。

毒蓄積状況を部位別にみると、試験魚は、低用量では主として皮に少量の毒を、高用量では肝臓と卵巣に多量の毒を蓄積する傾向がみられた (Fig. 1)。フグは摂取した毒をまず皮に蓄積するが、さらに過剰の毒を取り込

Table 1 Accumulation rate of TTX in the fish of each test group during the feeding experiments

Feeding experiment no.	Test group	Dose of TTX [MU/(1 g bw·day)]	Total amount of TTX administered (MU/fish)	Total amount of TTX accumulated (MU/fish)	Accumulation rate (%)
1	0.1 MU TTX	0.1	480	31	6
	0.2 MU TTX	0.2	960	106	11
	1.0 MU TTX	1.0	4,800	498	10
	0.2 MU TTX initial ad.	0.2	240	38	16
	1.0 MU TTX initial ad.	1.0	1,200	208	17
	0.2 MU purified TTX	0.2	960	103	11
2	0.1 MU TTX	0.1	220	12	5
3	0.1 MU TTX	0.1	1,050	0	0
4	0.2 MU TTX	0.2	8,400	2,760	33
5	0.1 MU TTX	0.1	1,280	392	31

むと皮では保持しきれず, 肝臓や卵巣に高濃度に蓄積すると推察された。一方, TTX 添加飼料を与えて一旦毒化させた後, 無毒飼料で飼育した場合 (試験 1 の初期投与区), 皮では蓄積した毒を保持し続けていたが, 肝臓では若干減少する傾向にあった (Fig. 1)。天然トラフグでは, 一般に皮は無毒とされているが,¹⁾ 毒性が検出された例もある。¹⁰⁾ また, クサフグ *Takifugu niphobles*, ヒガンフグ *T. pardalis* など, 皮に高毒性を示す種は少なくない。¹⁾ これらのフグは, 外的な刺激により皮から毒を放出することが知られており,^{11,12)} 生体防御物質としてこの毒を利用しているとの視点にたてば, 通常はできる限り皮に毒を保持し続けた方が有利であると考えられる。関連して, Mahmud^ら^{13,14)} は, 免疫組織学的手法を用い, ナシフグ, オキナワフグ *Chelonodon patoca* などの皮に TTX を保有する腺組織もしくは腺細胞を確認している。トラフグにおいても, 毒化機構や生体防御に皮が深く関与している可能性がある。この点を明らかにするため, 養殖トラフグに TTX を投与した際の血中 TTX 濃度の変化や TTX の組織内微細分布の動態などにつき, 現在, Mahmud^ら^{13,14)} と同様の手法を用いたアプローチを試みている。

謝 辞

本研究を行うにあたり, フグの飼育にご協力いただいた長崎市水産センター職員各位, ならびに有限会社 入千代商店魚市場の入江徳幸氏に心から感謝の意を表す。本研究は, 財団法人 日本学術振興会の科学研究費補助金により行われたものであり, ここに記して深謝する。

文 献

1) 谷 巖. 「日本産フグの中毒学的研究」帝国図書, 東

- 京. 1945; 15-27.
- 2) 加納碩雄, 野口玉雄, 大塚正人, 橋本周久. カラス *Fugu rubripes chinensis* とトラフグ *Fugu rubripes rubripes* の毒力の比較. 食衛誌 1984; **25**: 436-439.
 - 3) 斉藤俊郎, 丸山純一, 加納碩雄, 銭 重均, 野口玉雄, 原田輝雄, 村田 修, 橋本周久. 養殖トラフグの毒性とテトロドトキシン抵抗性. 日水誌 1984; **50**: 1573-1576.
 - 4) 野口玉雄, 高谷智裕, 荒川 修. 囲い養殖法により養殖されたトラフグの毒性. 食衛誌 2004; **45**: 146-149.
 - 5) 野口玉雄, 荒川 修, 橋本周久. フグの毒, とくにその起源と毒化機構について. 食衛誌 1989; **30**: 281-288.
 - 6) Matui T, Hamada S, Konosu S. Difference in accumulation of puffer fish toxin and crystalline tetrodotoxin in the puffer fish, *Fugu rubripes*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 1981; **47**: 535-537.
 - 7) 野口玉雄. 食物連鎖によるフグ毒保有動物の毒化. 「フグ毒研究の最近の進歩」(橋本周久編) 恒星社厚生閣, 東京. 1988; 85-93.
 - 8) Lin S-J, Chai T-J, Jeng S-S, Hwang D-F. Toxicity of the puffer *Takifugu rubripes* cultured in northern Taiwan. *Fish. Sci.* 1998; **64**: 766-770.
 - 9) 厚生省生活衛生局. 「食品衛生検査指針Ⅱ理化学編」日本食品衛生協会, 東京. 1993; 296-300.
 - 10) 加納碩雄. フグの毒性に関する研究. 博士論文, 東京大学, 東京. 1989.
 - 11) Kodama M, Ogata T, Sato S. External secretion of tetrodotoxin from puffer fishes stimulated by electric shock. *Marine Biol.* 1985; **87**: 199-202.
 - 12) Saito T, Noguchi T, Harada T, Murata O, Hashimoto K. Tetrodotoxin as a biological defense agent for puffers. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1985; **51**, 1175-1180.
 - 13) Mahmud Y, Okada K, Takatani T, Kawatsu K, Hamano Y, Arakawa O, Noguchi T. Intra-tissue distribution of tetrodotoxin in two marine puffers *Takifugu vermicularis* and *Chelonodon patoca*. *Toxicon* 2003; **41**: 13-18.
 - 14) Mahmud Y, Arakawa O, Ichinose A, Tanu MB, Takatani T, Tsuruda K, Kawatsu K, Hamano Y, Noguchi T. Intracellular visualization of tetrodotoxin (TTX) in the skin of a puffer *Tetraodon nigroviridis* by immunoenzymatic technique. *Toxicon* 2003; **41**: 605-611.