ノート

結晶テトロドトキシン経口投与による養殖クサフグ稚魚の毒化

(平成 15 年 10 月 1 日受理)

山森 邦夫^{*1} 河野 迪子^{*2,†} 古川 清^{*3} 松居 隆^{*3}The Toxicification of Juvenile Cultured Kusafugu *Takifugu niphobles*
by Oral Administration of Crystalline TetrodotoxinKunio YAMAMORI^{*1}, Michiko KONO^{*2,†}, Kiyoshi FURUKAWA^{*3} and Takashi MATSUI^{*3}(*¹School of Fisheries Sciences, Kitasato University: 160-4, Sanriku-cho, Ofunato, Iwate 022-0101, Japan; *²Fisheries Research Laboratory, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,

The University of Tokyo: 2971-4, Maisaka-cho, Hamana-gun, Shizuoka 431-0211, Japan;

*³Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo: 1-1-1,

Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan; † Corresponding author)

Non-toxic cultured juvenile kusafugu were fed with diet containing crystalline tetrodotoxin (TTX) for 30 days and then fed with non-toxic diet for 170 days. During this period, 5 fish were sampled and the toxicity of each tissue was determined periodically. The amount of total accumulated toxin in the fish was 90 μg , representing 50% of the administered TTX (180 μg /fish) at the 60th day. It decreased to 54 μg (30%) at the 80th day and then remained unchanged up to the 200th day. The amount of toxin in the liver amounted to 40 μg (45% of total accumulated toxin) at the 30th day and gradually decreased to 5 μg (10%) at the 200th day. The toxin amount in the skin reached the highest level with 30 μg (30%) at the 50th day and then remained unchanged during the experimental period. The testes had almost no toxicity. Although the ovaries were immature, the toxin amounts increased as the weight of the tissues increased. With administration of crystalline TTX, all kusafugu used in the experiment became toxic and retained the toxin at the level of 30% of the administered toxin for about 5 months thereafter, while being fed with non-toxic diet.

(Received October 1, 2003)

Key words: テトロドトキシン tetrodotoxin (TTX); クサフグ kusafugu *Takifugu niphobles*; 経口投与 oral administration; 毒化 toxification

はじめに

フグを好んで食するわが国においては、テトロドトキシン (TTX) によるフグ類の毒化は食品衛生学上重要な課題である。天然フグの毒性には個体差や地域差があること¹⁾、さらに養殖フグは無毒であること²⁾などからフグの毒化はシガテラ毒魚³⁾やボウシュウボラ⁴⁾などと同様に食物連鎖によるものと考えられる。しかしながら食物連鎖だけでは説明できないほど多量の毒を有するフグ類がいることなど、解明しなければならない多くの問題点がある。著者らはすでに無毒の養殖トラフグに有毒フグ卵巣、そのエタノール抽出液および結晶 TTX を経口的に 20 日間投与

すると、各投与区で TTX 蓄積に差があることを報告している⁵⁾。そこで今回は、トラフグより一般に毒性の高いクサフグについて以下の実験を実施し、フグの毒化機構解明の一助とした。本研究では無毒養殖クサフグに既定量の結晶 TTX を添加した飼料を 30 日間経口投与した後、さらに無毒飼料で 170 日間飼育し、経時的に TTX の各組織への蓄積量を測定し、蓄積した毒量がどのように変化していくかを調べた。

実験方法

1. 実験魚

飼育実験に使用したクサフグは、愛知県三河湾産天然クサフグから 2001 年 5 月に採卵して得られた孵化仔魚を静岡県浜名郡舞阪町の東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所において養殖した 1 年魚である。

† 連絡先

*¹ 北里大学水産学部: 〒022-0101 岩手県大船渡市三陸町 160-4*² 東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所: 〒431-0211 静岡県浜名郡舞阪町 2971-4*³ 東京大学大学院農学生命科学研究科: 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

2. 飼育飼料および飼育方法

基礎飼料はウナギ用配合飼料-冷凍オキアミ-水を 50 : 10 : 40 の割合で混合しペレット状に成型したものである。TTX 添加飼料は、基礎飼料の水の代わりに結晶 TTX 溶液を加え TTX 含量が $40 \mu\text{g/g}$ になるように調製した。

クサフグ 75 尾（平均魚体重 7.5 g）を室内 400 L 容ポリタンクに収容し、浜名湖から汲み上げた海水の流水下において 5 日間基礎飼料で飼育した。つづく 30 日間は TTX 添加飼料を与えて飼育した。投餌は実験魚ができる限り均等に食べかつ残餌を出さないように観察しながら行った。実験魚の TTX 摂取量は 1 日、1 尾当たり計算上 $6 \mu\text{g}$ とした。31 日目以降は基礎飼料を与えて飼育した。飼育日数は TTX 添加飼料投与開始日を 1 日目とした。

3. TTX 含量の測定

飼育日数 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 140, 170 および 200 日目の翌日、実験水槽から 5 尾を別の水槽に移し 2 日間絶食させ消化管に内容物がなくなった後採取し、TTX 測定用の試料魚とした。試料魚は氷水で麻酔し、直ちに肝臓、生殖腺、筋肉、骨および皮を分離し、それ以外を内臓として合わせた。各組織を細かく刻んだ後、9 倍量の 0.1% 酢酸を加え沸騰浴中で 10 分間加熱した。次いで、ウルトララックスでホモジナイズ後、3,500 rpm, 20 分間遠心分離し、上澄液を $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターに通した後、TTX 量を HPLC⁶⁾ によって測定した。

結果および考察

本実験に用いたクサフグ稚魚を実験開始時ならびに 200 日間基礎飼料のみで飼育後、各 5 尾について TTX 含量の測定をしたところ、すべていずれの組織でも無毒であった。著者らは、本実験に使用したと同サイズの天然クサフ

グ稚魚はすでに有毒であることを報告している²⁾。

試料魚には飼育期間や組織によって多少の相違はあるものの、HPLC 分析⁶⁾ によって主成分の TTX のほかに若干の 4-*epi*TTX と anhydroTTX が検出された。本実験においては TTX 含量のみを測定した。

実験結果を Fig. 1 に示した。図においては x 軸に採取日、y 軸に各組織名および z 軸に毒量を示し、1 カラムが 1 個体の各組織の毒量を示す。30 日目から 50 日目までは性別の判断が困難なため、生殖腺は内臓に含めた。60 日目から雌雄の判別が可能になり、生殖腺の毒量を加えた。なお各採取日の 5 カラムの前半に雌、後半に雄を配した。生殖腺に毒量がないものは雄である。また、各組織の毒量の合計を 1 尾当たりの総毒量として y 軸の最後に示した。

TTX 投与終了直後の 30 日目から 60 日目までの総毒量は投与毒量 $180 \mu\text{g}$ の約 50% に相当する $80 \sim 90 \mu\text{g}$ であった。80 日目には約 30% の $50 \mu\text{g}$ 程度まで減少したが、その後は 200 日目までほとんど変化なく推移した。肝臓に蓄積した平均毒量の変化を見ると、30 日目には約 $40 \mu\text{g}$ であり総毒量の 40~50% を占めていた。その後は徐々に減少し、200 日目には $5 \mu\text{g}$ で総毒量の 10% ほどになった。肝臓の毒量は個体差が大きいものの、生殖腺を採取し始めた 60 日目から雌雄別に見ると、雌は雄に比べ減少量が大きかった。

皮の毒量の変化を見ると、30 日目の毒量 $17 \mu\text{g}$ は総毒量の 20% であったが、50 日目には最高値の $30 \mu\text{g}$ (30%) へと上昇し、それ以降はほぼ一定の値を保った。

60 日目以降の生殖腺の毒量は雌雄の差が大きく、雄にはほとんど毒が検出されなかった。雌の毒量は 60~110 日目までは $18 \sim 20 \mu\text{g}$ で総毒量の 20~30% を占めたが、140 日目で $24 \mu\text{g}$ (40%)、さらに 170 日目には $32 \mu\text{g}$

Fig. 1. TTX contents accumulated in various tissues of kusahfugu during the experiment

(50%) に達した。生殖腺の重量も 60 日目では 0.06 g であったが、170 日目には 0.2 g 以上に増加した。雌では雄に比べて肝臓の毒量が大きく減少したのは、そこに蓄積していた毒が生殖腺に移行したためと考えられる。

内臓の毒量には個体差があるが、50 日目に最高の 25 μ g (総毒量の 30%) になり、その後減少して 200 日目には 8 μ g (10%) 程度になった。筋肉および骨には全期間を通じてほとんど毒は蓄積されなかった。

今回の実験と投与 TTX 量がほぼ同じである養殖トラフグを用いた実験では、卵巣投与区の毒性が最も高く、次いでそのエタノール抽出物投与区であった。エタノール抽出物投与区の毒性は卵巣投与区の 1/3 から 1/4 であり、20 日目には調べたすべての組織で毒化した。結晶 TTX 投与区では 15 および 20 日目の肝臓が若干毒化した但他的組織は毒化せず、投与区によって TTX の蓄積に相違が認められた⁵⁾。結晶 TTX をクサフグに投与した本研究では肝臓をはじめとした各種組織が毒化し、トラフグでの結果とは明らかに異なった。この原因はクサフグとトラフグとの種の相違と考えられる。

以上、養殖クサフグに結晶 TTX を経口投与すると、投与終了後から 1 か月後までは投与量の 40~50% が蓄積された。その後やや減少するものの、TTX 無添加の飼料で 5 か月間あまり飼育を続けても 30% 程度の毒が保持された。蓄積された毒量は組織によって異なり、飼育日数の経過とともに変動した。最後に、本実験では 1 個体の例外

もなくすべての個体が毒化したことは注目に値する。

謝 辞

本研究に当たり、実験に協力された北里大学水産学部学生の中島恵理佳氏と藤木由佳氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Matsui, T., Hamada, S., Yamamori, K., Local variation of toxicity of the puffer fish *Fugu niphobles*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **48**, 1,179 (1982).
- 2) Matsui, T., Sato, H., Hamada, S., Shimizu, C., Comparison of toxicity of the cultured and wild puffer fish *Fugu niphobles*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **48**, 253 (1982).
- 3) Yasumoto, T., Shokumotsu Rensa To Gyokairui No Dokuka Kikou. Farumashia, **25**, 695-701 (1989).
- 4) Noguchi, T., Narita, H., Maruyama, J., Hashimoto, K., Tetrodotoxin in the starfish *Astropecten polyacanthus*, in association with toxification of a trumpet shell, "Bo-shubora" *Charonia sauliae*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **48**, 1,173-1,177 (1982).
- 5) Matsui, T., Hamada, S., Konosu, S., Difference in accumulation of puffer fish toxin and crystalline tetrodotoxin in the puffer fish, *Fugu rubripes rubripes*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **47**, 535-537 (1981).
- 6) Yasumoto, T., Michishita, T., Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography. Agric. Biol. Chem., **49**, 3,077-3,080 (1985).