報 文

囲い養殖法により養殖されたトラフグの毒性

(平成 16 年 1 月 13 日受理)

野口玉雄*¹ 高谷智裕*² 荒川 修*^{2,†}

Toxicity of Puffer Fish Cultured in Netcages

Tamao NOGUCHI*¹, Tomohiro TAKATANI*² and Osamu ARAKAWA*^{2,†}

(*¹Japan Frozen Foods Inspection Corporation: 2-4-6, Shibadaimon, Minato-ku, Tokyo 105-0012, Japan; *²Faculty of Fisheries, Nagasaki University: 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan; †Corresponding author)

During 1990 to 2003, the toxicity of the liver in 4,515 specimens of the puffer fish *Takifugu rubripes* (torafugu) cultured in netcages or on land were investigated by means of mouse bioassay and liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS). Other tissues (skin, muscles, gonads, etc.) were also investigated in some of them. All the livers and other parts examined were found to be non-toxic. The peak corresponding to tetrodotoxin (TTX) was not detected in the samples by LC/MS analysis for TTX (<0.1 MU/g). These results show that puffer fish fed on a non-toxic diet in netcages do not become intoxicated.

(Received January 13, 2004)

Key words: トラフグ puffer fish; 養殖 culture; テトロドトキシン (TTX) tetrodotoxin (TTX); 毒性 toxicity

緒 言

フグ中毒は毎年発生しており、1967 年までは死者は 3 桁にのぼり、1968～1985 年までは 2 桁を記録した。1983 (昭和 58) 年 12 月 2 日、厚生省 (現 厚生労働省) は「フグの衛生確保について」の厚生省環境衛生局長通知を発表し、食べて良いフグを明文化した結果、無毒種を含めたあらゆる種類のフグの肝臓が食べられなくなった。そのためか、1986 年以降フグ中毒による死者は 1 桁に減少している。近年は、天然トラフグの漁獲量の減少に伴って養殖トラフグの取扱量が高まり、トラフグ市場の 8 割を養殖トラフグが占めている¹⁾。

フグ毒研究の進歩により、フグ以外のフグ毒保有生物が次々と発見され、その毒化が食物連鎖により起こることが明らかになった。1979 年 12 月に静岡県清水市で発生した大型の食用巻貝ボウシュウボラによる中毒で、その中毒原因物質がフグ毒 (tetrodotoxin, TTX) であることがわかった²⁾。同時に、その起源が餌であるヒトデ類のトゲモミジガイであることがわかった³⁾。その後、オオナルトボラや小型巻貝のハナムシロガイ、アラレガイなどにもフグ毒が検出され^{4)～6)}、これらも肉食性で食物連鎖により毒化

するものと推察された。一方、フグ養殖の際に外部からフグ毒保有生物の侵入を防ぎ、フグ毒を含まない餌でフグを養殖すれば、無毒のフグが得られることが実験的にわかってきた⁷⁾。

そこで、フグの毒化がフグの餌に由来するという推論に基づいて、1990 年から 2003 年にかけて日本各地の囲い養殖 (網生簀養殖、陸上養殖) 場から採取した 4,515 尾の養殖トラフグの肝臓、一部については筋肉を含むほかの部位の毒性について調査を行ったので報告する。

実験方法

1. 試 料

鹿児島県福山町沖で網生簀を用いて 1989 年 8 月から 12～17 か月間養殖されたトラフグ計 40 個体につき、肝臓、腸、生殖巣、皮、筋肉などの毒力を測定した。また、2001～2003 年にかけて、長崎県鷹島、熊本県天草、愛媛県宇和島、鹿児島県福山町、和歌山県広川、静岡県沼津で網生簀により囲い養殖 (底の網を海底から離す網生簀養殖) されたトラフグの稚魚～3 年魚 4,133 尾、ならびに佐賀県呼子で陸上養殖された 2 年魚 342 尾の計 4,475 個体につき、肝臓の毒力を測定するとともに、この中の一部の個体については筋肉、皮、そのほかの内臓、生殖巣の毒力についても測定した。

† 連絡先

*¹ (財)日本冷凍食品検査協会: 〒105-0012 東京都港区芝大門 2-4-6*² 長崎大学水産学部: 〒852-8521 長崎市文教町 1-14

2. 試験溶液の調製

フグ毒抽出は、食品衛生検査指針・理化学編中のフグ毒検査法⁸⁾に準じて行った。すなわち、フグの肝臓または筋肉、皮、生殖巣などを細切し、9倍量、4倍量、もしくは等量の0.1%酢酸を加え、沸騰水浴中で10分間加熱抽出した。氷水中で冷却後、遠心分離し、得られた上清をマウス毒性試験溶液とした。

3. マウス毒性試験

試験溶液 1 mL を体重 18～20 g の ddY 系雄マウス (3～4 週齢) に腹腔内注射し、致死 (呼吸が停止するまでの) 時間を測定した。食品衛生検査指針のフグ毒検査法に記載の致死時間-マウス単位換算表をもとに毒量を算出した。なお、1 MU とは体重 20 g のマウスを 30 分で死亡させる毒量のことをいう。

4. 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)

2003 年 10 月採取の長崎県鷹島産トラフグ肝臓試料 20 個体について、試験溶液を 0.45 μ m メンブランフィルターに透過後、限外ろ過 (分画分子量 10,000 da.) に付し、得られた 10,000 da. 以下の画分を液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) に供した。LC/MS は、LC 部に Waters 社製 alliance 2690、MS に Micromass 社製の Z-spray MS を用いた ZMD-2000MkII LC/MS システムを使用して行った。分析条件は Table 1 に示した。

結果および考察

1. 1990 年に採取した養殖トラフグの毒性

鹿児島県福山町沖で養殖したトラフグについて、部位別に行った毒性試験の結果を Table 2 に示す。養殖期間 12、13、15、および 17 か月のものそれぞれ 10 個体を 5 個体ず

つの 2 群に分け、皮および筋肉では個体別に、そのほかの部位では各群 5 個体分の組織を合一して毒性試験に付した。その結果、いずれの毒力も検出限界 (肝臓と腸では試験溶液を減圧濃縮後にマウスに注射したため 0.1 MU/g、ほかの部位では 5 MU/g) 未満であった。

2. 2001～2003 年に採取した養殖トラフグの毒性

各地産養殖フグ肝臓の毒性試験の結果を Table 3 に示す。合計 4,133 個体のいずれも 2 MU/g 未満で、マウスに対する毒性は認められなかった。今回の試料の場合、産地については国内のトラフグ養殖地をほぼすべてカバーしているのに加え、長崎県と熊本県産のものでは周年にわたって出荷サイズが得られている。フグ類に関しては、食品衛生上 10 MU/g 未満が「無毒」と判断されており、したがって、海底から離れた網生け簀で養殖されたトラフグの肝臓は、地域や季節にかかわらずすべて「無毒」であるといえる。陸上施設で囲い養殖されたトラフグ 342 個体についても同様の結果であった。一部の試料の筋肉、皮膚、そのほかの内臓、生殖巣についても同様の検査を行ったが、すべて 2 MU/g 未満の無毒であった (Table 4)。

3. LC/MS 分析結果

LC/MS においては、TTX のプロトン化分子 (M+H)⁺ = m/z 320 を選択イオンとしてモニターしたが、20 個体のいずれの肝臓からも TTX 標準品と一致するピークは検出されなかった (0.1 MU/g 未満)。

養殖フグとは、まず天然の雌 (体重 10 kg 程度) を捕獲して採卵し、これに雄 (一般的には養殖魚) の精子をかけ、人工授精させて孵化させたものである。現在は、養殖の 3 年魚 (1.3～2.0 kg) 以上の雌からの採卵も行われている⁹⁾。孵化後、体長 20 mm 程度になるまでは、室内のコンク

Table 1. Conditions of LC/MS for TTX

LC conditions		MS conditions	
Column	Puresil C18 (ϕ 4.6×250 mm, Waters)	Ionization mode	ESI, Positive
Column temp.	25°C	Source block temp.	120°C
Mobile phase	30 mmol/L heptafluorobutyric acid in 1% ammonium acetate buffer (pH 5.0)	Desolvation temp.	350°C
Flow rate	1.0 mL/min	Cone voltage	30 V
Injection vol.	10 μ L	Flow rate	0.2 mL/min (with splitter)
		SIR	m/z = 320 (M+H) ⁺

Table 2. Anatomical Distribution of Toxicity in Puffer Fish Cultured at Fukuyama, Kagoshima

Culture period (month)	Number collected	Average body weight (g)	Toxicity (MU/g)*								
			Liver	Intestine	Gonad	Skin	Muscle	Gallbladder	Kidney	Heart	Spleen
12	5	609	<0.1	<0.1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	5	535	<0.1	<0.1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
13	5	529	<0.1	<0.1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	5	574	<0.1	<0.1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
15	5	749	<0.1	<0.1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	5	732	<0.1	<0.1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
17	5	873	<0.1	<0.1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	5	1,034	<0.1	<0.1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5

*Skin and muscle: <5 indicates that the toxicity of each of 5 specimens was <5 MU/g

Other parts: <0.1 and <5 indicate that toxicities of pooled tissues of 5 specimens were <0.1 and <5 MU/g, respectively

Table 3. Toxicity of Liver of Cultured Puffer Fish
1) Netcage Culture

Place of culture	Month of collection	Age	Number collected	Toxicity (MU/g)
Nagasaki	Apr., Jun.–Dec., 2001	1	2	< 2
		2	402	< 2
		3	61	< 2
		unknown	29	< 2
	Jan.–Dec., 2002	1	24	< 2
		2	703	< 2
		3	4	< 2
		unknown	290	< 2
	Jan.–Apr., 2003	2	240	< 2
	Kumamoto	Feb.–Jul., Sep.–Dec., 2001	1	10
2			196	< 2
unknown			623	< 2
Apr.–Feb., May–Dec., 2002		2	50	< 2
		unknown	537	< 2
Jan.–Mar., 2003		unknown	145	< 2
Ehime	Jun.–Aug., Oct., 2001	2	379	< 2
	Jun., Oct., 2002	2	140	< 2
Kagoshima	May, 2002	2	46	< 2
Wakayama	Jun., 2002	2	81	< 2
Shizuoka	Jun., 2003	2	70	< 2
Unknown	Jun.–Jul., 2001	2	101	< 2
Total			4,133	
2) Land Culture				
Place of culture	Month of collection	Age	Number collected	Toxicity (MU/g)
Yobuko, Saga	Dec., 2001	2	114	< 2
	Dec., 2002	2	228	< 2
Total			342	

リート水槽中で動物性のプランクトンのアルテミアやワムシを餌として与え、それ以降は湾内の網生簀などに移して飼育を続ける。天然トラフグの雌から採卵した場合、卵には毒性があり、受精卵もわずかながら毒性を保持している¹⁰⁾。孵化後、約1週間までは毒性が認められるが、その後毒性は見られなくなり、網生簀により養殖し、取り上げられたものには毒性がない¹⁰⁾。Sato ら¹¹⁾は生後60日ないし1年を経た養殖トラフグの腸管に0.2 MU/g程度の微量のTTXを検出し、その由来が腸内細菌であると推定している。養殖トラフグの雌から採卵した場合は、採卵した卵にも受精卵にも毒はないと考えられる。したがって、その後も毒のない餌で飼育する限り、毒は検出されない。

養殖方法には囲い網生簀養殖だけでなく湾口を網で仕

切って、その中で飼育する場合もある。また、台湾や中国ではエビ養殖池跡などにパイプで直接海水をくみ入れて養殖する方法もある。網で湾を仕切る粗放的な養殖を行う山口県仙崎湾では、天然トラフグと同様に肝臓に毒性が認められる¹²⁾。養殖池に海水をくみ入れて養殖をしていた台湾の場合も肝臓に毒性が認められた¹³⁾。これらは、トラフグが海底に棲むフグ毒保有生物を摂取することにより毒を保有するようになったと考えられる。

今回試験に供した養殖トラフグ計4,515尾については、肝臓をはじめすべての部位でいずれも毒性は認められなかった。また、斎藤ら⁷⁾は1981～1983年にかけて、福井県下、奄美大島、鹿児島県下、和歌山県下で養殖されたトラフグ当歳(1年)魚と2年魚計85個体につき、肝臓、生殖巣(卵巣または精巣)、筋肉の毒力を測定した結果、いずれも無毒であることを報告している。

これらの事例は、すべて囲い養殖で養殖されたトラフグであるため、フグの毒化が食物連鎖により起こることが実証されるとともに、この方法によって無毒のフグが生産できることがわかった。

結 論

本研究では、フグの毒化は食物連鎖由来の外因性で、囲い養殖により有毒餌生物を遮断した環境下で飼育したトラフグは、筋肉や皮だけでなく肝臓も無毒であることが明らかとなった。現在、フグの肝臓は、魚種、あるいは天然、養殖の別にかかわらず食に供してはならず、廃棄することとされている。本研究の成果に基づいて養殖フグ肝臓の食用が解禁され、伝統食品“フグ肝”が復活すれば、養殖フグの価値は一気に高まるであろう。さらに、それらにより一般消費者のフグに対する恐怖心が解消されれば、フグの需要自体も拡大し、フグ養殖業ひいては水産業の発展に大きく貢献するものと期待される。

謝 辞

本研究を行うに当たり協力していただいた長崎大学大学院生産科学研究科の菊野聖史氏、寺田正光氏、内藤 学氏に深謝いたします。また、試料を快く提供していただいた株式会社 関門海、鷹島阿翁漁業協同組合、小川水産有限会社、木梨ふぐ九州店株式会社、有限会社 萬坊、沼津養殖漁業協同組合に感謝いたします。

文 献

- Hayashi, K. “Torafugu No Gyogyo To Shigen Kanri (Fisheries and stock managements of ocellate puffer *Takifugu rubripes* in Japan)”, Tabeta, O. ed., Tokyo, Koseisha Koseikaku, 1997, p. 9-15. (ISBN 4-7699-0843-1)
- Narita, H., Noguchi, T., Maruyama, J., Ueda, Y., Hashimoto, K., Watanabe, Y., Hida, K., Occurrence of tetrodotoxin in a trumpet shell, “boshubora” *Charonia sauliae*. Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Japan Soc. Sci. Fish.), **47**, 935-941 (1981).

Table 4. Anatomical Distribution of Toxicity in Puffer Fish Cultured at Kumamoto and Nagasaki

a) Kumamoto; May, 2001

No.	Body length (mm)	Body weight (g)	Toxicity (MU/g)			
			Muscle	Liver	Skin	Other viscera**
1	223	290	<2	<2	<2	<2
2	208	223	<2	<2	<2	<2
3	185	189	<2	<2	<2	<2
4	168	133	<2	<2	<2	<2
5	176	131	<2	<2	<2	<2
6*	—	—	<2	<2	<2	<2

* Ten juvenile fish were pooled

** Gonads were included

b) Takashima, Nagasaki; Feb., 2002

No.	Body length (mm)	Body weight (g)	Toxicity (MU/g)				
			Muscle	Liver	Skin	Gonads	Other viscera
1	292	846	<2	<2	<2	<2	<2
2	288	825	<2	<2	<2	<2	<2
3	294	800	<2	<2	<2	<2	<2
4	286	800	<2	<2	<2	<2	<2
5	300	752	<2	<2	<2	<2	<2
6	280	750	<2	<2	<2	<2	<2
7	222	396	<2	<2	<2	—	<2***
8	224	394	<2	<2	<2	—	<2***
9	222	367	<2	<2	<2	—	<2***

*** Gonads were included

c) Takashima, Nagasaki; Oct., 2002

No.	Body length (mm)	Body weight (g)	Toxicity (MU/g)				
			Muscle	Liver	Skin	Gonads	Other viscera
1	306	960	<2	<2	<2	<2	<2
2	274	880	<2	<2	<2	<2	<2

- 3) Noguchi, T., Narita, H., Hashimoto, K., Tetrodotoxin in the starfish *Astropecten polyacanthus*, in association with toxification of a trumpet shell, "boshubora" *Charonia sauliae*. Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Japan Soc. Sci. Fish.), **48**, 1,173–1,177 (1982).
- 4) Noguchi, T., Maruyama, J., Narita, H., Hashimoto, K., Occurrence of tetrodotoxin in the gastropod mollusk *Tutufa lissostoma* (frog shell). Toxicon, **22**, 219–226 (1984).
- 5) Narita, H., Noguchi, T., Maruyama, J., Nara, M., Hashimoto, K., Occurrence of a tetrodotoxin-associated substance in a gastropod, "hanamushirogai" *Zeuxis siquijorensis*. Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Japan Soc. Sci. Fish.), **50**, 85–88 (1984).
- 6) Jeon, J.-K., Narita, H., Nara, M., Noguchi, T., Maruyama, J., Hashimoto, K., Occurrence of tetrodotoxin in a gastropod mollusk, "araregai" *Niotha clathrata*. Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Japan Soc. Sci. Fish.), **50**, 2,099–2,102 (1984).
- 7) Saito, T., Maruyama, J., Kanoh, S., Jeon, J.-K., Noguchi, T., Harada, T., Murata, O., Hashimoto, K., Toxicity of the cultured pufferfish *Fugu rubripes rubripes* along with their resistibility against tetrodotoxin. Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Japan Soc. Sci. Fish.), **50**, 1,573–1,575 (1984).
- 8) 厚生省生活衛生局監修 "食品衛生検査指針・理化学編 1991" 東京, 日本食品衛生協会, 1991, p. 296–300.
- 9) Chuda, H., Matsuyama, M., Ikeda, Y., Matsuura, S., Development of the maturation- and ovulation-induction method in cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* by hormonal treatments. Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Japan Soc. Sci. Fish.), **63**, 728–733 (1997).
- 10) Noguchi, T., "Fugudoku Kenkyu No Saikin No Shinpo (Recent advances in tetrodotoxin research)" Hashimoto, K. ed., Tokyo, Koseisha Koseikaku, 1988, p. 85–93. (ISBN 4-7699-0617-X)
- 11) Sato, S., Komaru, K., Ogata, T., Kodama, M., Occurrence of tetrodotoxin in cultured puffer. Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Japan Soc. Sci. Fish.), **56**, 1,129–1,131 (1990).
- 12) Endo, R., Muramatsu, K., Tanaka, K., Tennen Torafugu To Yoshoku Torafugu No Dokuka Ni Tsuite (Toxicification of wild and cultured puffer *Takifugu rubripes*). Yamaguchiken Eiken Nenpo, **24**, 64–65 (1981).
- 13) Lin, S.-J., Chai, T.-J., Jeng, S.-S., Hwang, D.-F., Toxicity of the puffer *Takifugu rubripes* cultured in northern Taiwan. Fish. Science, **64**, 766–770 (1998).