フグ毒の毒性試験に関する 2, 3 の知見

(昭和 47 年 11 月 15 日受理)

川崎浩之進* 永田 正* 加納晴三郎*

An Experience on the Biological Assay of the Toxicity of Imported Fugu (Tetrodon)

Hironoshin KAWASAKI, Tadashi NAGATA and Seizaburo KANOH

(National Institute of Hygienic Sciences Osaka Branch: 6
Hoenzaka, Higashi-ku, Osaka)

We studied on the toxicity of tetrodotoxin of Fugu which was imported to Japan, by use of mice and the following results were obtained:

- 1) Crystalline tetrodotoxin exhibited the strongest toxicity in mice by intracerebral injection. The degree of toxicity by administration routes was expressed by the following order: intracerebral, intravenous, intraperitoneal, subcutaneous and oral.
- 2) The dose of toxin corresponded to the death time.
- 3) The toxicity of tetrodotoxin was decreased by the addition of tissue homogenate of Fugu (tetrodon).
- 4) Nashi-Fugu, and Nagoya-Fugu were not so toxic as other Fugs.

(Received November 15, 1972)

緒 言

フグ毒は各種のフグに含まれる猛毒物質であり、その肉が多くの人に賞味されることから、フグ毒含有の有無を検査することは食品衛生上重要な問題である。したがって、この検査法は衛生検査指針に記載されており大切な項目となっている。フグ毒の化学的ならびに毒物学的諸性質についてはすでに多くの業績があり^{1), 2)}、その化学構造式はつぎのように決定されている³⁾。

structure of tetrodotoxin

われわれは近年各地で多発するフグ毒中毒事件の検査機関として、西日本各港に入荷するフグの毒性検査を要

請され、フグ毒およびその検査法に興味をいただき、2, 3の基礎的実験を行なうとともに、輸入フグのフグ毒の実態を明らかにするため実験を行ない、以下に述べる成績を得たので報告する。

実験材料と方法

1. フグ毒

三共株式会社製の結晶 3X テトロドトキシンを使用し、検体フグより抽出した抽出フグ毒に対して、以下結晶フグ毒と称する。

2. 検体フグよりフグ毒の抽出

抽出法は衛生検査指針Ⅲ⁴⁾ によった。すなわちフグ各臓器をよくすりつぶしてその 5g をとり、メタノール 50 ml を加え酢酸で pH 4~5 とする。還流冷却器をつけ水浴上に 10~20 分保ち、これを 2 回繰り返し抽出液を遠心分離し、上清中のメタノールを留去し、油脂分をエーテルを加えて数回洗浄除去後、蒸留水に溶解して 10 ml としこれを原液とした。また対照とした結晶フグ毒を添加する実験においては、よく磨砕したフグ各臓器 5g に水でうすめた結晶フグ毒を一定量加え、4°, 5 時間氷室内に保持した試料と、保持しない試料とに分け、それぞれ混合物から所定のように抽出を行ない検液を作成した。

* 国立衛生試験所大阪支所：大阪市東区法円坂町 6

3. 使用動物とフグ毒（結晶、抽出）の投与法

体重 20 g 前後の市販 DD 系マウスを使用した。フグ毒は静脈内、腹腔内、皮下および脳内に投与した。投与量はフグ毒を所定の濃度に滅菌生理食塩水で希釈し、静脈内および皮下には 0.1 ml/10 g、腹腔内および経口では 0.25 ml/10 g をそれぞれ投与した。脳内には脳内注射針で 0.01 ml/10 g 投与した。

4. 室薬量の測定

マイクロケルダール法によった。

5. 判 定

衛生検査指針Ⅲ⁴⁾に準じて行なった。すなわち、注射後マウスの挙動を観察し、フグ毒特有の症状でマウスが死亡に至るまでの時間を記録し、1群4～5匹の平均死亡時間を求めた。さらにその毒力の表示は原臓器 1 g が殺し得るマウスの g 数をもって単位とし、M. U (mouse unit)/g organ で示した。

実験結果

〔I〕 結晶フグ毒の投与ルートによる LD₅₀ の差

結晶フグ毒をそれぞれ所定の濃度に滅菌生理食塩水で希釈した系列をつくり、1群4～5匹のマウスに腹腔内、脳内、静脈内、皮下および経口投与し、症状の発現と死亡時間を測定し、それぞれの投与ルートによる LD₅₀ を算出し、その結果を Table 1 に示した。すなわち毒性の発現は脳内においてもっとも強く、ついで静脈内、腹腔内、皮下および経口投与の順となる。脳内投与による毒性がもっとも著しく、静脈内の20倍以上であることは、フグ毒が神経毒であることをよく示している。

一方、各濃度における症状の発現は、脳内投与では 0.02 μg/0.02 ml/20 g で 1 分以内に運動失調、けいれんを誘発死亡し、症状の発現したものは必ず死亡することが特徴である。静脈内投与では 0.2 μg/0.2 ml/20 g では全例とも投与直後けいれんを起し死亡する。また腹腔内投与においては、0.2 μg/0.5 ml/20 g で 10 分後に鎮静と運動失調を起し、15 分後に全例死亡する。症状の発現はほぼ他と同様であるが、作用発現時間は延長している。この傾向は皮下投与によるときはさらに著しくなる。

〔II〕 結晶フグ毒の投与量と作用発現時間との関係

上述の実験から、投与ルート、投与量によって死亡時間がかかなり異なることが明らかになったので、これらの関係を一層明確にするために、脳内、静脈内、腹腔内お

よび皮下にそれぞれ一定量の結晶フグ毒を投与し、死亡時間と投与量との関係を求めたところ、Fig. 1 に示す結果がえられた。

すなわち、脳内投与によっては 0.02 μg/0.02 ml/20 g で 1 分以内にマウスは死亡する。静脈内投与でも死亡時間はきわめて早い。しかしながら、腹腔内および皮下投与では投与量と死亡時間との間にかかなり相似した平行関係が認められた。したがって毒力の強弱は一応、死亡時間の長短と比例していると考えてもよいだろう。

〔III〕 結晶フグ毒とフグ組織との相互作用

フグ毒がフグの臓器組織に対してどのような結合性を示すかを明らかにするために、結晶フグ毒とフグ筋肉組織の磨砕物を混合し、その毒性の低下を死亡時間の延長を指標として測定した。すなわち計算上、最終濃度がそれぞれ 1, 0.5, 0.25 μg/0.5 ml になるよう結晶フグ毒 (20, 10, 5 μg) を 5 g の筋肉組織磨砕物に加え所定のように抽出したものをマウス腹腔内に 0.5 ml/20 g 注射し、それぞれの死亡時間を測定したところ、Fig. 2 に示す結果がえられた。

Fig. 2 にみるように対照とした結晶フグ毒の死亡時間に対して筋肉組織磨砕物を添加した場合には死亡時間は若干延長していることが明らかであり、結晶フグ毒は何らかの形において筋肉組織によって不活性化されていることが示されたものといえる。

この傾向は結晶フグ毒とフグ筋肉および皮部組織磨砕物との混合物を長時間氷室内に保持することによって一層著明となる。すなわちそれぞれ 5 g の筋肉および皮部

Fig. 1. Dose response to death time in mice by different administration routes of tetrodotoxin

Table 1. Acute Toxicity of Tetrodotoxin in Mice by Some Different Administration Routes

Route of administration	LD ₅₀ (μg/kg)
intraperitoneal (i. p.)	8.5
intracerebral (i. c.)	0.6
intravenous (i. v.)	7.3
subcutaneous (s. c.)	14.7
oral (p. o.)	333.5

Fig. 2. Interaction of tetrodotoxin and tissue homogenate (1)....without incubation

Fig. 3. Interaction of tetrodotoxin and tissue homogenate (2)....with incubation*

* Incubation was carried out at 4°C for 5 hours.

Table 2. Content of Tetrodotoxin in Some Organs

Species	Origin	Organ	Toxicity (M. U./g organ)	Nitrogen (μg/0.5 ml)
Nashi fugu	Korea	meat	0	450
Nagoya fugu	China	"	160	380
"	"	skin	80	115
Name fugu	Korea	"	320	336
"	"	meat	160	295
Shosai fugu	China	skin	160	410
"	"	meat	80	550
Namera fugu	"	ovary	4,000	430
"	"	liver	240	210
"	"	intestine	640	600

の磨砕物に同様に結晶フグ毒(20, 10, 5 μg)を加え4°, 5時間保持し所定のように抽出したものの毒量を同様に測定するとき, Fig. 3 に示す成績がえられた。

図にみるように筋肉および皮部の毒量はそれぞれ32分および16分の死亡時間で示されるが結晶フグ毒を加え5時間保持したものは, 結晶フグ毒単独の場合に比べて致死量に変化はなく, いずれも死亡時間の延長が認められることから, 前述の実験とはほぼ同一の結果が得られたものといえよう。

[IV] 各種検体フグの毒量の測定結果について

上述の基礎的実験をもとにして, 著者らは西日本各港に陸上げされた各種のフグについて, それらの毒量を常法に従って測定するとともに, フグのその他各臓器内の毒量を同様に抽出して測定した。また, 念のため抽出した検体フグ毒の窒素量をマイクロケルダール法により測定した。この実験結果を Table 2 に示した。

すなわち卵巣はフグの毒性の中心であって他の組織に比べ10数倍の毒量を含有していることが明らかである。

Table 3. Comparison of Toxicity of Extracts in Mice by Intraperitoneal or Intracerebral Injection

Species	Dilution	Organ	i. p.		i. c.	
			Time (min)	Mortality (%)	Time (min)	Mortality (%)
Nashi fugu	x 1	meat	—	0	—	0
Namera fugu	x 1	"	8	100	ND	ND
	x 2	"	15	100	1	100
	x 3	"	25	40	3	100
	x 4	"	—	0	10	33
	x 1	skin	14	100	1	100
Shosai fugu	x 2	"	—	0	2	100
	x 1	meat	—	0	3	100
	x 2	"	—	0	—	0

Note ND: not detected

腸管はこれに続いて比較的毒力が強く 640 M. U. を示した。また卵巣のみならず毒力は皮部および筋肉部にも存在していることも明らかである。産地およびフグの種類によっても著しい差があることが示された。また窒素量は被検物については一定の関係が認められないが、おそらく検体の種類や各臓器の含水量等、抽出条件の差異に起因するものと考えられる。

〔V〕 各種検体抽出フグ毒のマウスにおける腹腔内および脳内投与による差

結晶フグ毒について腹腔内および脳内投与による毒力の差が認められたことから、検体よりの抽出フグ毒について同様のことが認められるか否かを検討した。この結果を Table 3 に示した。すなわち韓国産ナシフグは腹腔内に投与しても毒性を示さず、さらに脳内投与しても同様に毒性を示さなかった。しかし、中国産ナメラフグは原液の2倍希釈で100%死亡するが、4倍希釈では死亡しなかった。同様の検液を脳内投与すると、4倍希釈でもマウスは死亡し、いずれもその死亡時間は腹腔内投与に比べて著しく短い。また中国産ショウサイフグについても類似の成績であり、実験〔I〕における結晶フグ毒の場合と同様の結果であった。

考 察

上述のように著者らはフグ毒の検査にあたり、対照として結晶フグ毒を用いてフグ毒の検定に必要な基礎的実験を試み、その後実際に検体からフグ毒を抽出しその検定についての結果の一部を記録した。フグ毒はテトロドトキシンとして詳細に研究され、その構造式が明らかにされたが、その毒性は著しく強く、LD₅₀ はマウスでは腹腔内で 8 µg/kg、ラットではその致死量は腹腔内で 12 µg/kg、家兎では静脈内で 2 µg/kg である。さまざまな薬理作用を示すが、死因はすべて呼吸マヒである。投与量と死亡時間との間には反比例の関係があることが知られている。著者らはこの関係をもとに他の投与ルートよ

り結晶フグ毒を投与し、この関係が認められるや否やを検討したところ、腹腔内投与とほぼ同様な関係が成立することを明らかにするとともに、毒性の発現時間は脳内投与がもっとも短かく、ついで静脈内、腹腔内および皮下投与の順であった。このことはフグ毒の中樞作用を示す結果であると考えられた。またマウスに対して腹腔内投与で死亡しない量であっても、脳内投与すれば死亡することは毒力を検討する上に考慮すべき点であると考えられた。フグ毒の投与による死亡をまぬがれたマウスは腹腔内あるいは脳内投与においても、その後の体重増加は順調に上昇し、約1週間で回復することから、毒力の持続性は少なく、ほぼ一過性のものと考えられた。これらの基礎実験に対して、各種の輸入フグよりフグ毒を抽出して同様にマウスに対して投与したところ、ほぼ類似の成績がえられた。フグ毒の含有量はフグの種類によって異なり、ショウサイフグの毒性がもっとも著しいことを認めた。また、フグ毒はフグの筋肉および皮部組織の磨砕物によって不活性化されることが明らかになった。しかしながらフグ毒がそれら組織との間にどのような結合性を示すかという点は今後の検討に待たねばならない。

結 論

輸入フグのフグ毒の検査にあたり、結晶フグ毒を対照としてマウスを用いてそれらの毒性を各種の投与条件について検討し、以下のような成績がえられた。

1. 結晶フグ毒をマウスに対して各種の投与ルートで試験するとき、脳内投与法がもっとも強く毒性の発現がみられ、ついで静脈内、腹腔内、皮下および経口投与の順であった。脳内投与法では経口投与法にくらべて約500倍も感度は高い。

2. いずれの投与法においても、死亡時間の長短と毒量とは相関性がみられた。

3. 結晶フグ毒とフグの筋肉あるいは皮部組織の磨砕物とを混合し、所定のように抽出したものを注射する

と、毒性は低減された。

4. 各種の輸入フグのうち、ナシフグおよびナゴヤフグはほとんど毒性を認めなかった。

本実験を行なうにあたり、多大の御協力をいただいた厚生省食品衛生課の方々、大阪食品衛生駐在官新谷一道技官、ならびに結晶フグ毒を恵与された三共株式会社に厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Kao, C. Y.: Pharm. Rev. 18, 997 (1966).
- 2) Cheymol, J., Bourillet, F.: Actual. Pharmacol. 19, 1 (1966).
- 3) Goto, T., Kishi, Y., Takahashi, S., Hirata, Y.: Tetrahedron 21, 2059 (1965).
- 4) 厚生省編纂: 衛生検査指針Ⅲ, 食品衛生検査指針 (I), 各論 p. 40 (1959).