鶏胚を用いたテトロドトキシンの毒力検定試験法の検討

(昭和 50 年 12 月 19 日受理)

三 浦 利 之* 栗 飯 原 景 昭*

Studies on the Toxicity Test of Tetrodotoxin by Chicken Embryos

Toshiyuki MIURA and Kageaki AIBARA

(Department of Biomedical Research on Foods, National Institute of Health:
Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo)

This study aimed to establish a rapid and reliable biological test using chick embryos for estimation of toxicities of various substances contained in foods.

Tetrodotoxin was tested in this experiment. The sample dissolved in acetic acid solution, pH 3.5 was inoculated into air cells or yolk sacs of White Leghorn fertile eggs aged three to seven days and toxicity of the sample was estimated by their mortalities during three days after inoculation. All the chick embryos proved more sensitive to air cell inoculation than yolk sac one, among which five day-old eggs were most sensitive.

Therefore, it is considered that the method with air cell inoculation using five day-old chick embryo is preferable concerning both sensitivity and reliability. Moreover, it was found that the chick embryo test was more excellent than the toxicity test using mouse because of its good sensitivity and reproducibility.

(Received December 19, 1975)

緒 言

Platt ら¹⁾が1962年にアフラトキシンの毒力検定試験法として、鶏胚を用いる方法を提案したのを契機として、最近では多くのマイコトキシンのみならず諸化学物質などの毒力検定試験法として鶏胚法が用いられている^{2)~7)}。すなわち、鶏胚法は操作が簡単で、再現性があり、かつ鋭敏であるという、いくつかの利点を有している。

そこで著者らは食品と関係をもつ、多くの物質の安全性を迅速に評価するための試験法を確立することを目的として、鶏胚を用いた生物学的試験法についての基礎的研究を行ってきた。

今回はフグによる食中毒の原因物質として知られているテトロドトキシンについて、従来から行われているマウスによる毒力検定法と比較検討する目的で鶏胚法の応

用を試みた。

すなわち、マウスによる毒力検定法では用いるマウスの系統によってテトロドトキシンの毒性に対する感受性が多少異なること、またこの種の実験動物の入手が困難な地域もあるという、我が国の現状を考え、一般的に入手が容易である有精鶏卵を用いた鶏胚法がテトロドトキシンの毒力検定法に应用が可能か否かについて、胚令および接種方法の面から検討した。

実験方法

1. 試料およびその調製

供試したテトロドトキシンは三共(株)製のもので、pH 3.5 の酢酸溶液にて 0.1 $\mu\text{g/ml}$ から 100 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度の試料液を調製し、ミリポアフィルターを用いて除菌処理操作を行った後、実験に供した。

2. 鶏胚法による毒性試験

試験には採卵用白色レグホン種の有精卵を用いた。ふ

* 国立予防衛生研究所：東京都品川区上大崎 2-10-35

Fig. 1. Dose-response curves for the chicken embryos by the yolk sac inoculation of tetrodotoxin

△---△, 3 day-old; ○---○, 4 day-old;
●—●, 5 day-old; ▲····▲, 6 day-old;
◆—◆, 7 day-old.

Fig. 2. Dose-response curves for the chicken embryos by the air cell inoculation of tetrodotoxin

△---△, 3 day-old; ○---○, 4 day-old;
●—●, 5 day-old; ▲····▲, 6 day-old;
◆—◆, 7 day-old.

(孵)卵開始後3日令から7日令の各胚令について気室内 (air cell 法)あるいは卵黄嚢内 (yolk sac 法)に試料を接種 (0.1 ml/egg)する方法を用いた。なお試料接種の手技は著者らが、すでに報告した方法⁷⁾に準じて行っ

Fig. 3. Relations between LD_{50} s of tetrodotoxin for the chick embryos and their ages

た。

実験結果は原則として、1試料1希釈段階について10個の有精卵を使用し、4回の反覆実験によった。ふ卵は温度 38° 、相対湿度60%の転卵装置つきふ卵器で行った。接種後24, 48, 72時間ごとに検卵し、最終的に72時間後の鶏胚の生死を判定し、その斃死率をもって毒性の強さとした。

実験結果

1. 卵黄嚢内接種

卵黄嚢内接種法ではいずれの胚令においても感度が低く、斃死率は $10 \mu\text{g}/0.1 \text{ ml/egg}$ の接種量で3日令の場合65%, 4日令で10%の値を示し、5日令以上においては全く斃死するものが認められなかった (Fig. 1)。

2. 気室内接種

気室内接種法においては、卵黄嚢内接種の場合に比べると、はるかに感度は高い。しかしながら、胚令と感度が相関しないという現象が認められた。すなわち、感度は3日令では低いが、4日令、5日令と胚令が進むに従って急激に感度を増し5日令をピークとし、その後は漸次低下することが分かった (Fig. 2)。

Fig. 3は毒性の強さと胚令との関係をより明らかに示すため、Behrens法によって求めた LD_{50} 値と胚令の関係を示したものである。これからも LD_{50} 値は5日令が最低となり、毒性に対する感度が最も高いことが分かる。

考 察

鶏胚を用いテトロドトキシンの毒力検定を卵黄嚢内接

種および気室内接種の2方法によって検討したが、卵黄嚢内接種法では胚令とともに感度は低下する傾向を示し、かつ検討した胚令中、最も感度が高かった3日令といえどもマウス法に比べて1/50以下と感度が極めて低いことから、その応用は困難であることが認められた。

小倉⁹⁾はテトロドトキシンの吸収毒性は必ずしも急激に現れず摂取後20～30分ごろより作用が発現し、現在のところ酵素による毒素の分解反応は見いだされていないが、臓器成分、温度、pHなどの影響を受けやすく、比較的容易に毒性は低下すると述べ、さらに総説¹⁰⁾においてテトロドトキシンは Na^+ 、 K^+ の細胞膜透過性に対して生理学的な効果をもっていると説明している。

卵黄嚢内の成分(タンパク質、脂質、炭水化物、ビタミン、無機イオン、酵素)の変化は一般的に胚の発育過程の中期以降にみられるといわれているので、本実験に用いた鶏卵ではその成分にあまり変化はないと思われる。すなわち、卵黄嚢内接種の場合においてみられたテトロドトキシンの鶏胚に対する毒性発現の低下は、卵黄の成分あるいはpHの影響によるものではないかと考える。

しかし気室内接種法では前者に比べていずれも感度は高く5日令において最も高い感度を示し、Behrens法によって得られたその LD_{50} 値は $0.044 \mu\text{g}/\text{egg}$ であった。この値はマウス(♂、体重20g)の腹腔注射による毒性試験の LD_{50} 値 $=0.2 \mu\text{g}/\text{mouse}$ ⁸⁾の約1/5に相当し感度の高いことが分かった。

気室内接種において3、4、5日令と胚令が進むに従って毒性に対する感度が高まり、5日令を最高とし、それ以後は漸次低下するという極めて特徴ある現象がみられたが、これは血管の発育状態による試料の吸収の難易、さらには胚の発達による抵抗性の発現によるものではないかと推測される。

以上の実験結果から、適当な胚令つまり5日令の鶏胚

を用いた気室内接種法によるならば、従来のマウスを用いた毒力検定法よりも高感度でテトロドトキシンの毒力の強さを判定することが可能であることが分かった。またテトロドトキシンの接種量と鶏胚の致死率との間に、きれいな直線関係のあることを認めた。

なお細部にわたって検討の余地はあるが、供試生物である有精鶏卵の入手が容易であること、実験手技が簡単であること、また試験を反覆して実施した場合にも、その結果の再現性が優れていることなどを考慮すると、フグ毒の試験法としてこの鶏胚法を応用し得る可能性が高いと考える。

文 献

- 1) Platt, B.S., Stewart, R. J. C., Gupta, S. R.: Proc. Nutr. Soc. (Engl. Scot.), **21**, XXX (1962).
- 2) Verrett, M. J., Marliac, J. P., McLaughlin, J. Jr.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **47**, 1003 (1964).
- 3) Adekunle, A. A., Bassir, O.: Toxicol. Appl. Pharmacol., **31**, 384 (1975).
- 4) McLaughlin, J. Jr., Marliac, J. P., Verrett, M. J., Mutchler, M. K., Fitzhugh, O. G.: Amer. Ind. Hyg. Assoc. J., **25**, 282 (1964).
- 5) Gebhardt, D. O. E., Van Logten, M. J.: Toxicol. Appl. Pharmacol., **13**, 316 (1968).
- 6) Sauter, E. A., Steele, E. E.: Poultry Sci., **51**, 71 (1971).
- 7) 三浦利之, 土田雅子, 宮木高明: 油化学, **20**, 335 (1971).
- 8) 津田恭介, 河村正明: 薬誌, **72**, 187, 771 (1952).
- 9) 小倉保己: 総合臨床, **16**, 749 (1967).
- 10) 小倉保己: 千葉大腐研報, **21**, 1 (1968).