フグ毒の加熱による影響について

(昭和 61 年 1 月 22 日受理)

渕 祐 一* 局 伸 男* 森 崎 澄 江*
溝 腰 利 男* 首 藤 真 寿 美* 藤 井 幹 久*
山 田 謙 吾* 林 薫*

Effect of Heat on Toxin of Pufferfish “Tetrodotoxin”

Yuuichi FUCHI, Nobuo TSUBONE, Sumie MORISAKI, Toshio MIZOKOSHI,
Masumi SHUTO, Mikihiisa FUJII, Kengo YAMADA
and Kaoru HAYASHI

(Institute for Environmental Pollution and Public Health, Oita Prefecture:
Hogawara-danchi, Magari, Oita, Japan)

Key words: フグ肝臓 pufferfish liver; テトロドトキシン tetrodotoxin

はじめに

先に、著者らは大分県下のフグ料理専門店のいわゆる「キモ料理」の一方法を検討し、長時間の煮沸で有毒肝臓の毒性が徐々に減少することを報告した¹⁾。従来、フグ毒は加熱に対してアルカリ性で不安定、中性及び微酸性で安定であるといわれている²⁾。しかし、著者らがフグ肝臓調理方法の煮沸工程で認めた毒性の減少率は、フグ毒の熱安定性に関する従来の報告^{3)~7)}にはみられないほど著しいものであった。

本報告では、中性域及び酸性域でのフグ毒の熱による影響を検討すると共に、肝臓調理方法の煮沸工程における除毒のメカニズムについて若干の考察を試みた。

実験方法

1. 毒性試験法

毒性試験は、「食品衛生検査指針 II」²⁾中のフグ毒検査法に従って行った。

2. 有毒肝臓抽出液の調製

トラフグの有毒肝臓(毒力 330 MU/g, 雌)約 140 g を細切した後、佐久間製作所製ホモジナイザー 500D-2 型でホモジナイズした。これに 1.5 倍量の精製水を加え沸騰水浴中で 5 分間抽出した。3,000 rpm で 15 分間遠心分離した後、上清を吸引ろ過した。ろ液を 10,000 rpm で 20 分間遠心分離した後、上清を東洋濾紙 No. 2 でろ過し、247 MU/ml の抽出液 168 ml を得た。この抽出液

作による毒力を指標とした回収率は、89.8% であった。

1) 中性抽出液

上記の抽出液 35 ml に精製水 40 ml を加え、中性域での加熱実験に供する試験溶液とした。この試験溶液は pH 6.8, 毒力 106 MU/ml を示した。以下には、この試験溶液を中性抽出液という。

2) 酸性抽出液

上記の抽出液 35 ml に 0.2% 酢酸 30 ml を加えた後、5% 酢酸で pH 4.0 に調整した。これに精製水を加え全量を 75 ml として、酸性域での加熱実験に供する試験溶液とした。この試験溶液は 115 MU/ml の毒力を示した。以下には、この試験溶液を酸性抽出液という。

3. テトロドトキシン (TTX) 標品水溶液の調製

シグマ社製の TTX 標品 (TTX 1 mg に pH 4.8 のクエン酸緩衝液 5 mg を含むもの) を精製水に溶かし、pH 6.5, 毒力 22.7 MU/ml の試験溶液を調製した。加熱実験には 100 ml を供試した。以下には、この試験溶液を TTX 標品水溶液という。

4. 加熱実験の方法

供試液を 500 ml の二頸フラスコに入れ、以下に示す 1) 及び 2) の方法で加熱した。二頸フラスコにはジムロート冷却器を装着して還流し、一定時間ごとに供試液の温度を測定すると共に 3~5 ml ずつサンプリングした。サンプルはただちに室温まで冷却した後、毒性試験法に従って加熱時間と毒力変化の関係について調べた。なお、加熱終了時の供試液の量は加熱前の 50% 以上が残るように留意した。

* 大分県公害衛生センター：大分県大分市大字曲芳河原団地

1) 直火加熱法

供試液を入れた二頸フラスコをアスベスト上で直火加熱した。加熱開始後約 6 分で供試液は沸騰し、加熱 10 分以後では温度は終始 $100\sim 104^{\circ}$ を示した。以下には、この方法を直火加熱法という。

2) 水浴加熱法

供試液を入れた二頸フラスコを沸騰水浴中で加熱した。加熱開始後約 8 分で供試液の温度は 90° に達し、その後は $90\sim 93^{\circ}$ の範囲にあった。以下には、この方法を水浴加熱法という。

結果及び考察

1. 有毒肝臓抽出液の加熱実験

前報¹⁾で報告した肝臓調理方法の煮沸工程は、細切したフグの肝臓を調理鍋に入れ十分な水を加えてガスコンロ上で、5 回にわたり延 3 時間余り煮沸することであった。このときの煮沸水の液性は中性域 (pH 7.5) にあり、温度は $100\sim 104^{\circ}$ であった。そこで、今回は中性域及び酸性域の肝臓抽出液について直火及び水浴加熱法による加熱実験を行い、水溶液中のフグ毒の熱による影響を検討した。

実験結果は Fig. 1 に示した。中性抽出液では両加熱法とも加熱直後から毒力の減少が認められ、加熱 30 分後の減毒率は直火加熱法 68.2%，水浴加熱法 43.2% で、180 分後にはそれぞれ 99.0% 及び 84.8% に達した。pH は、両加熱法とも加熱前 6.8 に対し加熱後 6.7 でほとんど変化しなかった。一方、酸性抽出液では両加熱法とも加熱開始から 10 分間は毒力に変化が認めなかったが、その後減毒が始まり、加熱 30 分後の減毒率は直火加

熱法 25.8%，水浴加熱法 17.4% で、180 分後ではそれぞれ 60.1% 及び 27.0% であった。加熱前後の pH は 4.0 で、両加熱法とも全く変化しなかった。

また、減毒率がほぼ一定となる加熱 20 分以後について、加熱 20 分後の残存毒力を 100 としたときの加熱 180 分後の中性及び酸性抽出液の減毒率を比較すると、前者では直火加熱法 97.3%，水浴加熱法 75.0% に対し、後者ではそれぞれ 51.2%，9.8% であった。

このように、水溶液中のフグ毒は加熱時の液性及び温度によって強く影響を受けた。従来の報告^{4)~7)}によれば、 100° で 30 分間加熱したときの減毒率は 17% ないし 20% とされている。実験条件が異なるため直接の比較はできないが、これらの減毒率に最も近似していたのは、著者らの実験条件では酸性抽出液と水浴加熱法の組合せであった。他の条件ではいずれも 25% 以上の減毒率を示し、特に中性抽出液を直火及び水浴加熱したときの減毒率 68.2% 及び 43.2% は、従来の報告をはるかに上回るものであった。従って、「フグ毒検査法」²⁾中の酢酸抽出法においては、上記の酸性抽出液の性状を十分に考慮すべきであると考ええる。

2. TTX 標品水溶液の加熱実験

有毒肝臓の抽出液を pH 6.8 で $100\sim 104^{\circ}$ に加熱すると顕著な毒力の減少が認められたが、肝臓組織成分による影響も考えられるので、中性域の TTX 標品水溶液を試料とした直火加熱の実験を行った。

結果は Fig. 2 に示した。加熱開始直後から毒力の減少が認められ、減毒率は加熱 30 分後で 82.3%，60 分後では 92.9% に達し、90 分後には毒力の検出下限である

Fig. 1. Effect of heat on toxicity of pufferfish "Torafugu" liver

- : Acid extract heated to boiling in water bath
- : Acid extract heated to boiling directly
- △—△: Neutral extract heated to boiling in water bath
- ▲—▲: Neutral extract heated to boiling directly

Fig. 2. Effect of heat to boiling directly on the standard TTX preparation

1 MU/ml 未満となった。また、pH は加熱前後とも 6.5 で変化を認めなかった。この結果は、中性域の直火加熱という同一条件にもかかわらず、TTX 標品水溶液の方が有毒肝臓の抽出液よりも減毒傾向が著しいことを示している。このような差異が生じる原因については明らかでないが、肝臓組織成分が影響しているものと考えられる。

以上のように、著者らは有毒肝臓の抽出液及び TTX 標品水溶液を用いた加熱実験を行ったが、加熱時の液性及び温度によっては、水溶液中のフグ毒は従来^{9)~11)}いわれているほど熱に安定でないことが明らかとなった。

3. フグ肝臓調理方法の煮沸工程における除毒機構について

今回行った加熱実験のうち中性域・直火加熱の組み合わせは、前報で述べたフグ肝臓調理方法の煮沸工程と液性及び加熱条件が一致していることから、煮沸工程での除毒のメカニズムを調べるための実験と考えられる。

そこで肝臓調理方法で有毒肝臓を調理した21例のうち、全調理工程ごとの毒力を測定することができた11例(調理前の毒力 112 MU/g~1,270 MU/g)の煮沸工程における除毒の回帰式を求め、これら回帰式の傾きを平均して、煮沸前の毒力 1,000 MU/g からの調理除毒回帰線を推定した。この推定による調理除毒回帰線、最高有毒肝臓 (1,270 MU/g) を調理したときの除毒回帰線、中性抽出液及び TTX 標品水溶液を直火加熱したときの減毒回帰線のそれぞれを Fig. 3 に示して比較した。また、これら除毒及び減毒回帰線の傾き(後述する関係式の定数 a_0 及び a_{20}) を Table 1 に示した。なお最高有毒肝臓の調理例の場合、調理前の毒力は 1,270 MU/g であったが、肝臓調理方法に従って皮剥ぎ・細切・手揉み・水晒し処理したところ毒力は 748 MU/g に減少した。このときの肝臓重量は調理前の 75.4% に減少していたので、

Fig. 3. Detoxication of liver extract and standard tetrodotoxin preparation by heat to boiling

- A: ---, estimated removal of toxicity by cooking.
 B: ○—○, a sample with maximum toxicity in liver extract treated by cooking.
 C: △—△, neutral extract heated to boiling directly.
 D: ▲—▲, standard TTX solution heated to boiling directly.

※: Toxicity of a material (※) indicated 1,270 MU/g was decreased by hand-press and rinse in running water before examination of heat to boiling.

毒力に重量減少比を乗じて求めた煮沸前の補正毒力は 564 MU/g と算定された(調理方法及び補正毒力については前報を参照)。

Fig. 3 から明らかなように、調理による除毒(図中の A, B) 及び加熱実験(同 C, D) のいずれも煮沸あるいは加熱時間の増加に伴って毒力は指数的に減少し、減毒の傾向もよく類似した。また、これらはいずれも加熱20分後を境として減毒率に違いがみられ、加熱20分までの方が20分以後より減毒率は高かった。

ここで加熱20分までの減毒の様相に着目すると、調理による除毒の方が加熱実験の場合よりも減毒率は高くなっている。これは調理による除毒の場合、熱によるフグ毒自体の毒性失活に加え、肝臓切片から煮沸水中へフグ毒が溶出したためと考えられる。このことは、肝臓調理

Table 1. Slant Constant of “ a_0 ” and “ a_{20} ” on Detoxication by Heat to Boiling

Heated times (t)	$t \leq 20$ min.			$t > 20$ min.		
Equations	$\text{Log [MU]}^{a)}$ $= -a_0 \cdot t + \log [b_0]^{b)}$			$\log [\text{MU}]^{a)}$ $= -a_{20}(t-20) + \log [b_{20}]^{c)}$		
Slant constant	“ a_0 ”	γ	n	“ a_{20} ”	γ	n
Estimated removal of toxicity	$3.25 \times 10^{-2} \text{ }^{d)}$ $\pm 1.32 \times 10^{-2}$	—	—	$1.18 \times 10^{-2} \text{ }^{d)}$ $\pm 0.28 \times 10^{-2}$	—	—
Maximum of toxicity in liver	3.38×10^{-2}	-1.00	2	1.04×10^{-2}	-0.998	5
Neutral extract	2.11×10^{-2}	-0.990	3	0.99×10^{-2}	-0.999	7
Standard TTX preparation	2.81×10^{-2}	-0.993	5	1.29×10^{-2}	-0.988	7

Remarks: The sign of number in parenthesis appeared in the column of “Equations” and “Estimated removal of toxicity” means respectively as follows:

^{a)} Toxicity: after heating

^{b)} Toxicity: before heating

^{c)} Toxicity: after heating for 20 minutes

^{d)} Values : mean $\pm$ standard deviation (S.D.)

方法の煮沸工程における1回目の煮沸(約20分, 前報を参照)では煮沸前と比較して肝臓重量が平均 56.5% (25.3%~74.1%, $n=11$) 減少したこと, 最高有毒肝臓の調理例において1回目の煮沸で得た煮沸水をマウスに注射したところフグ毒特有の症状を呈して死亡したこと, 2点から推察される。しかし, 加熱実験での減毒率を考慮すると, 煮沸工程での1回目の煮沸における除毒の主なメカニズムは, 熱によって肝臓中でフグ毒自体が失活するためと考えられる。

一方, 加熱20分以後では, 調理による除毒及び加熱実験とも極めて近似した減毒率を示したことから, 肝臓調理方法の煮沸工程における2回目以後の煮沸(延煮沸時間として20分以後)では, 熱によって肝臓中のフグ毒が失活していると考えてよい。このことは, 煮沸工程の2回目以後の煮沸では肝臓重量がほとんど変化しなかったことから推察できる。

以上のことから肝臓調理方法の煮沸工程では, 煮沸時の熱によって, 主として肝臓中のフグ毒が失活し除毒されることが証明できたと考えられる。また, このような加熱による減毒は, 津田の報告⁵⁾を参照するとテトロドトキシンが無毒なテトロドン酸に段階的に構造変化を起こすためと推定されるが, この点については今後検討を加えたい。

ところで, 加熱による減毒が熱依存性の一次反応であるとする, 加熱時間と毒力との間に次式が成立する。

① 加熱 20分まで ($t \leq 20$)

$$\log [\text{MU}] = -a_0 \cdot t + \log [b_0]$$

② 加熱 20分以後 ($t > 20$)

$$\log [\text{MU}] = -a_{20}(t-20) + \log [b_{20}]$$

MU : 加熱 t 分後の毒力

t : 加熱時間 (分)

b_0 : 加熱前の毒力

b_{20} : 加熱20分後の毒力

ただし, この式でいう毒力とは, 肝臓調理方法の場合には毒力に肝臓重量比を乗じて算出した補正毒力の値である。

そこで関係式の定数 a_0 及び a_{20} を調理による除毒 11 例から求めたところ, $a_0 = 3.25 \times 10^{-2} \pm 1.32 \times 10^{-2}$, $a_{20} = 1.18 \times 10^{-2} \pm 0.28 \times 10^{-2}$ と算定された (Table 1)。この式から, フグ肝臓調理方法においては煮沸前の肝臓毒力を知ることにより, 毒性消失までの煮沸時間の推定が可能と考えられる。

ま と め

1. フグ毒の加熱による影響について以下の知見を得た。

1) トラフグ(雌)の有毒肝臓抽出液を中性域 (pH 6.8) 又は酸性域 (pH 4.0) で 30 分間直火 (100~104°) 又は水浴 (90~93°) 加熱したときの減毒率は, 中性域の直火加熱で 68.2%, 中性域の水浴加熱で 43.2% に対し, 酸性域の直火加熱で 25.8%, 酸性域の水浴加熱で 17.4% であった。

2) TTX 標品水溶液を中性域 (pH 6.5) で 30 分間直火加熱 (100~104°) したときの減毒率は, 82.3% であった。

3) このように, 水溶液中のフグ毒は加熱時の液性及び温度によって影響を受けたが, pH 6.5~6.8 で 90~100° に加熱すると, 従来の報告にはみられない著しい減毒が認められた。

2. 大分県下の「キモ料理」方法の煮沸工程に関して以下の知見を得た。

1) 肝臓調理方法の煮沸工程における減毒傾向は, 肝臓抽出液及び TTX 標品水溶液を中性域で直火加熱し

たときの減毒傾向とよく類似した。

2) 加熱20分後を境として減毒率に違いがみられ、加熱20分までの方が20分以後より減毒率が高かった。また、減毒傾向は加熱20分まで及び20分以後とも、それぞれ一次直線に回帰できた。

3) 肝臓調理方法の煮沸工程における除毒機構は、熱によって、主として肝臓中のフグ毒が構造変化を起こし失活するためと推定された。

4) 加熱時間と毒力との間に関係式が成立することから、肝臓調理方法の煮沸工程では、煮沸時間による毒性消失の推定が可能と考えられた。

文 献

- 1) 局 伸男, 瀧 祐一, 森崎澄江, 溝腰利男, 首藤真寿美, 藤井幹久, 山田謙吾, 林 薫: 食衛誌. **27**, 561~564 (1986).
- 2) 厚生省環境衛生局編: “食品衛生検査指針 II” p. 232~240 (1978) 日本食品衛生協会.
- 3) 福田得志: 実地医家と臨床. **13**, 437~447 (1936).
- 4) 城田 直, 藤田寛一, 河村正朗: 高峰研究所年報. **4**, 45~49 (1952).
- 5) 津田恭介: 化学の領域 (増刊80号) p. 9~42 (1967).
- 6) 末兼敏男, 八木昭介: 山口大学農学部学術報告. (21), 1~17 (1970).
- 7) 山口県衛生部環境衛生課監修: 改訂版 “ふぐ” p. 47~48 (1984) 山口県食品衛生協会.

1) 局 伸男, 瀧 祐一, 森崎澄江, 溝腰利男, 首藤