

ノート

フグ食中毒患者尿からのフグ毒テトロドトキシンの検出

高田 久美代, 山田 圭一, 石川 憲司*, 小川 博美

Detection of Tetrodotoxin from Urine Samples of Puffer-fish Poisoned Patient

KUMIYO TAKATA, KEIICHI YAMADA, KENJI ISHIKAWA* and HIROMI OGAWA

(Received Oct. 30, 2001)

In March, 2001, a poisoning incident due to ingestion of puffer-fish occurred in Hiroshima prefecture. Onset of symptoms appeared in 4hours after ingestion and symptoms of patient resembled those of puffer-fish poisoning. There were no food samples.

Therefore,urine samples obtained from patient 1day and 9days after ingestion and serum sample 1day after were assayed for toxicity by mouse bioassay,and analyzed for tetrodotoxin(TTX) by HPLC method. Toxicity of urine sample 1day after was 0.57MU/mL, and 0.29 μ g/mL of TTX was detected in it. Toxicity of urine sample 9days after and serum sample was not detected.

These results suggest that it is possible to detect TTX from urine samples of poisoned patients in case we are not able to obtain food samples.

Keywords : puffer-fish toxin, tetrodotoxin (TTX), food poisoning, urine, high performance liquid chromatography (HPLC)

緒 言

わが国では、フグは古くから食用にされ、多数の中毒事例を起こしているが、依然として中毒の発生が絶たない。1990～1999年までの10年間におけるフグ中毒の件数は264件、患者総数は414名、うち死者は30名にのぼる[1]。フグ中毒は件数では全食中毒事件の2%程度で患者数からみると0.13%である。しかし、死者数では全体の40%を占めている。このように、フグ中毒事例は患者数は少ないものの死亡率が高いことから特に注意を要する。

フグ毒テトロドトキシシン(TTX)(Fig.1)は食中毒の原因物質として知られ、フグの内臓、特に、肝臓、卵巣や皮膚、筋肉中に含まれている。TTXは筋肉や神経を麻痺させる作用のある神経毒であり、多量摂取の場合(最小致死量2.2mg[2])は、呼吸筋の完全麻痺により死亡することが知られている[3]。

フグ毒の症状は、食後20分ないし3時間で現れる。まず、口唇、舌端のしびれに始まり、次いで指先のしびれが続く、頭痛、腹痛、腕痛などを伴うこともある。やが

て全身に完全な運動麻痺が現れ、呼吸困難となり、意識は混濁し、意識消失後まもなく呼吸が停止する[3]。

本県でも1995～1999年の5年間で22名の患者、4名の死者を出している[4]。

著者らは、2001年3月、県内で発生した食品残品が得られないフグ食中毒事例について、患者の尿からマウス毒性試験と高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析によってフグ毒TTXを検出し、フグ食中毒と特定したので、その概要を報告する。

発生概況

2001年3月23日K保健所に、市内の病院からA町の1名をフグ中毒と診断したとの連絡があった。聞き取り調査の結果、患者は3月20日近所の鮮魚店からフグを入手し、自宅で調理して夕食に味噌汁にして家族と共に摂食した。翌日の昼頃、再び家族と共に、味噌汁にして摂食した。この時、患者のみ内臓を摂食したことが明らかとなった。患者は摂食約4時間後の午後4時頃、口唇のしびれ、手足のしびれ、手足の麻痺、吐き気、嘔吐、言語

*広島県呉地域保健所：Hiroshima Prefectural Kure Regional Community Health Center

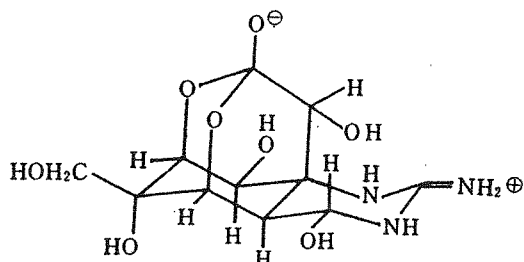


Fig. 1. Structure of tetrodotoxin

障害等の症状を呈し、午後4時30分頃K市内の病院へ救急搬送された。搬送された時患者は呼吸停止、心臓停止、瞳孔散大の状態であった。その後、患者の容態は回復し、幸いにも一命は取り留めた。

材料と方法

1. 材料

被検材料は摂食1日後の患者尿1検体(20mL)、血清1検体(9mL)及び摂食9日後の回復期の患者尿1検体(12mL)であった。調理残品及び摂食残品は確保できず、供試できなかつた。

2. 試薬

TTX標準品は和光純薬(株)製の生化学用を用いた。その他の試薬はHPLC用及び特級を用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：(株)島津製作所製(ポンプ：LC-10AS, 反応槽：CRB-6A, 蛍光検出器：RF-10A)

4. 方法

4.1 試料の調整

試料の調整は「食品衛生検査指針 理化学編」[5]に準じて行った。すなわち、試料の尿20mLを活性炭カラム(15mmx100mm)に負荷し、液面をカラムベッドまで下げてから、試料容器を少量の精製水で洗い、洗液をカラムに負荷した。再度液面をカラムベッドまで下げて

から、精製水30mLでカラムを洗浄し、次に、20%エタノール含有1%酢酸溶液50mLを流下して被検物質を溶出させた。この溶出液を減圧で乾固(ウォーターバス、50℃)し、残留物を精製水で溶解し5mLの定容とした。このうちの3mLをマウス毒性試験に供し、2mLを再度減圧下で乾固した後、残留物を精製水0.4mLで溶解し、HPLC測定用試料とした。

血清は、9mLのうち5mLを無処理でマウス毒性試験に供した。残りの4mLは尿試料と同様に活性炭カラムの操作を行い、残留物を蒸留水5mLで溶解し、マウス毒性試験に供した。

回復期の患者尿12mLは活性炭カラム処理を行った後4mLの定容とした。このうち2mLをマウス毒性試験に供し、2mLを再度減圧下で乾固した後、残留物を精製水0.4mLで溶解し、HPLC測定用試料とした。

4.2 マウス毒性試験

マウス毒性試験は「食品衛生検査指針 理化学編」[5]に定める方法により行った。

調整した試料1mLを体重19~21gのddY系雄マウスの腹腔内に接種し、中央致死時間を求め、マウス単位(MU)換算表により毒力を算出した。なお、1MUとは体重20gのマウスを30分で死亡させる毒量でありTTX 0.22µgに相当する[5]。

4.3 HPLCによるTTXの分析

HPLC測定用試料を限外ろ過膜(UltrafreeC3LCC)でろ過した後、野口ら[6]の蛍光分析法により分析した。分析条件をTable 1に示した。

結果

1. マウス毒性試験

患者がフグを摂食した翌日、入院先の病院で採取された尿と血清について、マウス毒性試験を行った。4倍濃縮した尿の被検液をマウス腹腔内に接種したところ、フグ毒特有の症状[5]を呈して死亡した。この時の中央致

Table 1. Operating Conditions for HPLC Analysis of TTX

Parameter	Condition or Description
Column	Wakosil-II 5C18 (4.6mm id×250mm)
Mobile Phase	
Flow rate	0.8mL/min
Composition	60mM ammonium phosphate buffer (pH5.0) containing 10mM heptanesulfonic acid and 2% acetonitrile
Hydrolyzing reagent	
Flow rate	0.8mL/min
Composition	4M NaOH
Reaction	10m Teflon tubing (0.5mm id) at 110℃ in a dry oven
Detection	Excitation wavelength 384nm, Emission wavelength 505nm

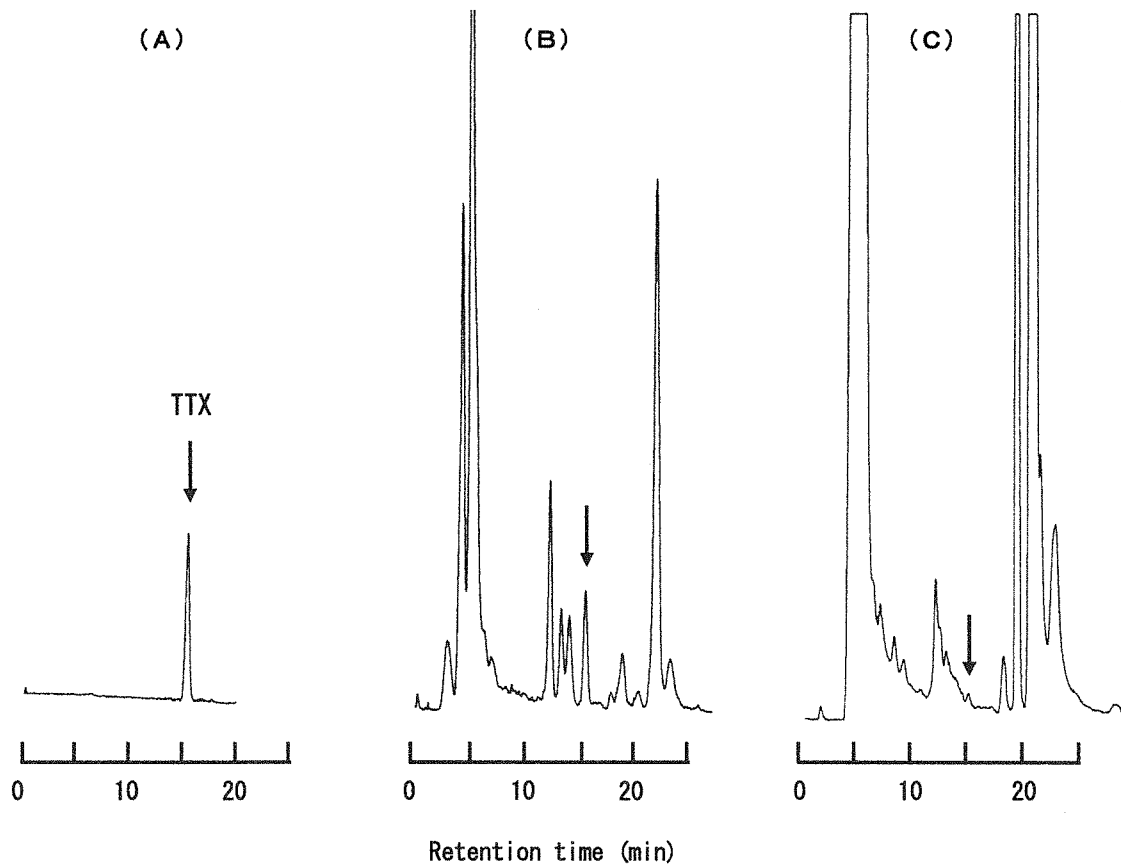


Fig. 2. HPLC chromatograms of TTX in urine samples of patient with puffer-fish poisoning
 (A): TTX standard (100ng), (B): a sample solution equivalent to 0.2mL of urine (1 day after),
 (C): a sample solution equivalent to 0.15mL of urine (9 days after)

死時間は7分17秒であった。マウス単位換算表によって毒力を算出し、濃縮比を乗じると、患者尿1 mLの毒力は0.57MU/mLであった。血清については、無処理の試料と活性炭カラム処理のみを行い濃縮操作をしない被検液をマウスに接種したが、いずれからもフグ毒は検出されなかった(それぞれ1.05MU/mL未満, 1.31MU/mL未満)。また、対照として、患者の回復期にあたる摂食から9日後の尿の3倍濃縮した被検液をマウスに接種したところ、フグ毒は検出されなかった(0.35MU/mL未満)。

2. HPLC分析

患者がフグを摂食した翌日と回復期となる9日目に採取された尿について、HPLC分析によるTTXの検出を試みた。TTX標準品、患者尿のHPLCクロマトグラムをそれぞれFig. 2に示した。

フグ摂食の翌日採取した尿からは0.29 μ g/mL (1.3 MU/mL)、対照とした摂食後9日経過した患者尿からは0.04 μ g/mL (0.18MU/mL)の微量のTTXが検出された。

考 察

今回のフグ食中毒事例は、患者が町内の鮮魚店からクサフグと推定される小型のフグを入手し、自ら調理して家族と共に摂食したが、この時は発症はみられなかった。翌日の昼食時に再び味噌汁に調理して家族と共に摂食し、発症した。患者の家族によれば、この時患者のみ内臓を摂食したとのことであったが、患者は当時意識が消失しており摂食部位等は明らかにできなかった。患者は摂食約4時間後の午後4時頃発症しており、症状は、口唇のしびれ、手足のしびれ、それに続く手足の麻痺、吐き気、嘔吐であった。午後4時過ぎに診察した医師によれば、言語障害を呈していたとのことであった。病院へ搬送された時には呼吸と心臓は停止状態であり、瞳孔は散大していた。このように、患者がフグを摂食していること、患者の発症時間、症状がフグ中毒の症状と非常に合致することから患者はフグ中毒と臨床診断された。

本事例は、調理残品や食べ残し材料がなく、その原因を摂取食品や患者の症状等から推定したが、特定することはできなかった。しかし、治療の段階で患者の尿と血

清が採取され保存されていたために、フグ毒検出のための試験が可能であった。

さらに、マウス毒性試験という生物学的試験法とHPLC分析という化学的試験法の両法でいずれも患者の尿中からフグ毒が検出された。摂食1日後の患者尿の被検液をマウスに接種した場合、フグ毒特有の症状を呈して死亡すること。対照として回復期の摂食9日後の患者尿の被検液を接種した場合にはマウスが死亡しなかったことから、患者尿中のマウスに対する致死毒はフグ毒であると推定された。さらに、HPLCによる確認分析の結果、摂食1日後の患者尿からTTXの標準品と同じリテンションタイムにピークが検出された。摂食9日後の尿からは極微量のTTXが検出された。このHPLC蛍光分析法は、TTXを逆相分配用カラムとイオンペアー溶離液の組み合わせで分離し、カラム溶出液を4 M NaOHと混合加熱してC₉塩基への加水分解中に生じる蛍光物質を測定するものであり、TTXに対する特異性を有し、かつ測定感度の高い分析法である[7,8,9]。このことから、患者尿中の毒はフグ毒TTXであることが確認された。

摂食1日後の患者尿の毒力は、マウス毒性試験では0.57MU/mL、HPLC分析による毒量0.29 μg/mLを毒力に換算すると1.3MU/mLであった。フグ毒測定において、マウス毒性試験法とHPLC法は良好な相関を示すとの報告[7]もあるが、10MU以上の領域についてであり、本事例のような低濃度の検体についてはバラツキも大きいことから、両法の測定値が一致することは難しいと考えられる。

動物実験からTTXは代謝、分解されず尿中に排泄されるとの報告[10]もあり、食品材料が得られない場合には患者の尿による試験が有効であると考えられるが、中毒時の検体採取の困難性などもあって、尿からTTXを検出した事例はほとんど見られない。

今回、患者の尿についてマウス毒性試験とHPLC分析の両法を行うことによりフグ中毒を特定することが可能であることが確認できた。

ま と め

2001年3月、県内A町でフグを摂食した1名が口唇のしびれ、手足のしびれ、嘔吐、言語障害等の症状を示す食中毒が発生した。患者は発症時間、臨床症状等からフグ毒による食中毒と診断された。食品残品はなかったが、患者材料の尿と血清が入手できたことから、これら

についてマウス毒性試験とHPLC分析を行ったところ、摂食1日後の患者尿中からフグ毒TTXが検出された。以上のことから、食品材料が得られない場合のフグ中毒の特定に当たっては、マウス毒性試験とHPLC分析の両法を用いた患者尿からのフグ毒の検出が有効であることがわかった。

謝 辞

貴重な患者の血清及び尿を提供していただきました中国労災病院救急部医長吉田哲先生に深謝致します。

また、本研究に当たりご指導をいただいた長崎大学水産学部野口玉雄教授並びに荒川修助教授に深謝致します。

文 献

- [1] 厚生省生活衛生局食品保健課(2000):平成11年食中毒発生状況, 食品衛生研究, 50(9), 118-195.
- [2] 厚生省生活衛生局監修(1978):食品衛生検査指針II, 238, 東京, 社団法人日本食品衛生協会.
- [3] 橋本芳郎(1983):魚貝類の毒, 74-89, 東京, 学会出版センター.
- [4] 広島県福祉保健部環境衛生課(2000):平成11年度環境衛生業務概要, 49.
- [5] 厚生省生活衛生局監修(1991):食品衛生検査指針理化学編, 296-300, 東京, 社団法人日本食品衛生協会.
- [6] Tsuruda, K., Arakawa, O., and Noguchi, T. (2001): Toxicity and toxin profiles of the newt, *Cynops pyrrhogaster* from western Japan, J.Natural Toxins, 10(2), 79-89.
- [7] Yasumoto, T. and Michishita, T. (1985): Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography, Agric. Biol. Chem., 49(10), 3077-3080.
- [8] 安元 健(1989):海産毒の分析と応用, 化学と生物, 27(6), 401-406.
- [9] 長島裕二(1988):橋本周久編, フグ毒研究の最近の進歩, 9-12, 東京, 恒星社厚生閣.
- [10] Kao, C.Y. (1966): Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena, Pharm. Rev., 18(2), 1015-1016.