

システインによるフグ毒の解毒について

藤井 実・原田 勝彦*・松田 真*

On the Counteracting of the Effects of Puffer Poison by Cysteine

By

Minoru FUJII, Katsuhiko HARADA* and Makoto MATSUDA*

Summary

The authors had further reported the studies of counteracting of the effects of puffer poison, tetrodotoxin, by using antidote (tentatively named "S-P" reagent), which was prepared by the combination of sodium sulfite and orthophosphoric acid.

Now the authors report in this papers on the counteracting tetrodotoxin by using cysteine.

The results obtained in this experiments are summarized as follows.

1. Mice don't die if they are injected by tetrodotoxin which was counteracted by cysteine.

2. If animals are injected by cysteine necessary for counteracting three times at intervals of 10 minutes after they have given injection of tetrodotoxin mortal or more, they are found alive.

3. When tetrodotoxin counteracted by cysteine, cysteine residue is added to the lactone ring in tetrodotoxin molecule, as the result of which the lactone ring reaction disappears, and also hydroxy radical in tetrodotoxin molecule is reduced.

Department of Agricultural Chemistry
Faculty of Agriculture
Saga University
Saga, Japan

フグ毒テトロドキシンの解毒剤として亜硫酸塩と燐酸との混合物 (S-P 剤と略す) が著効を示すことを動物実験で示しその理論を化学的に証明した¹⁾。しかし S-P 剤を注射等の方法により生体内に注入すれば解毒効果を発揮すると共に、他面生体組織に悪い影響をおよぼすことも当然考慮しなければならない。したがって S-P 剤と同じ解毒効果を示し、かつ安全に使用できる解毒剤を見出すことが先決問題となる。有毒フグ類に他のフグ毒を注射しても決して中毒症状を示さないことは古くから知られた事実である²⁾。

一般に動物の解毒作用は肝臓において行なわれているといわれているから、フグの肝臓の水抽

* Shimonoseki University of Fisheries, Shimonoseki, Japan.

液について分析を試みた結果、未だその存在が不明確であったシスチンが相当量含有されていることを確かめた³⁾。そこでシスチン標品を使用してテトロドトキシンと反応させたら S-P 剤に勝るとも劣らない解毒効果を示した。そこでシスチンとテトロドトキシンの反応について得られた実験結果および動物実験結果について報告する。

実験の部

1. 試料の調製

1-1 テトロドトキシン試料

前報告¹⁾で述べた方法と全く同様にして調製した。そしてできるだけ組成成分の変化を避けるため生鮮トラフグ卵巣を使用し、その水抽出液を得て、これに Amberlite IRC-50 (NH₄-型) を加えてテトロドトキシン (TT と略す) を吸着し、しかる後吸着 IRC-50 を 10% 酢酸溶液 (pH 4~5) で処理して TT を溶離し、溶離液を減圧濃縮して使用した生卵巣 1g が 1ml になるようにした。この TT 溶液はその濃度の 1/8 の稀釈溶液 0.1ml、すなわち生卵巣に換算して 12.5mg で 20g 体重のマウスを 15分で殺す毒力を示した。

1-2 シスチン溶液の調製

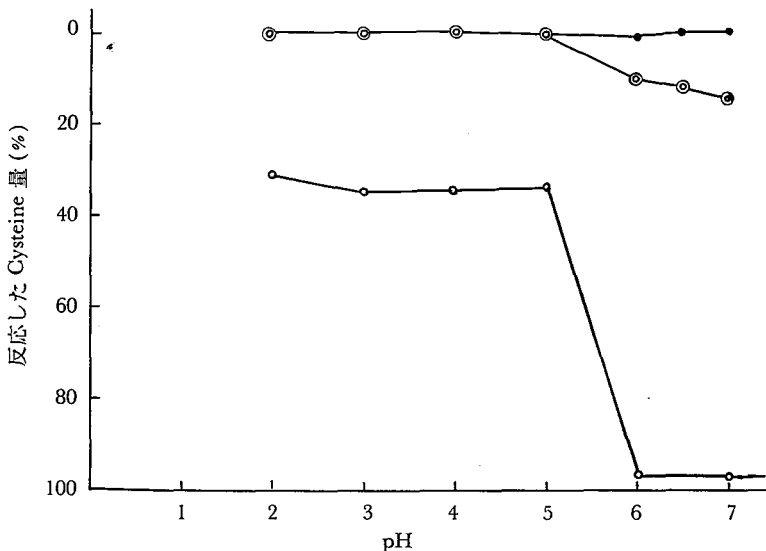
0.1g のシスチンに 1M クエン酸溶液を適量添加して pH を 1 とし亜鉛末 0.5~1g を加えて 3分間加熱沸騰させ、40°C の恒温槽中に 1時間放置した後、濾過し水で 100ml とする。

使用に際しては 1M 重炭酸ソーダ溶液で pH を 7 に調整するかあるいは反応液を pH 7 にした後シスチン (CySH) 溶液を添加してさらに pH を 7 に調整する。

2. シスチンの活性におよぼす pH, 温度および反応時間等について

2-1 pH の影響

従来 CySH は酸性で活性であると考えられていたが著者等の実験の結果、TT を初めとしてカ



第1図 Cysteine (CySH) と Tetrodotoxin (TT) との反応におよぼす pH の影響

- CySH+TT (40°C, 15分間反応)
- ◎--- CySH のみ (40°C, 15分間反応)
- CySH のみ (40°C, 1分間反応)

ルポニル基を有する炭素環状化合物に対して中性の pH で最大の反応を示すことを知った。

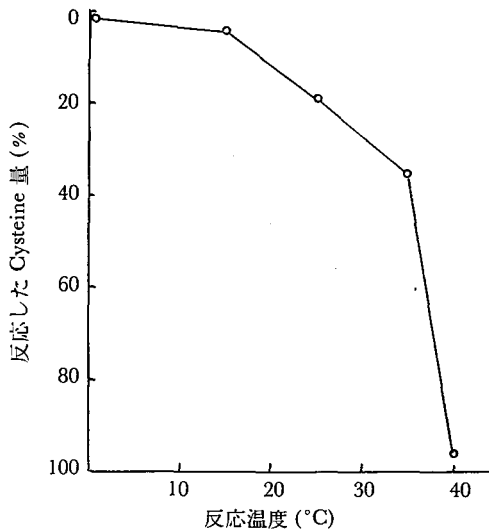
CySH 溶液の一定量に TT 溶液 5ml を添加し 1M 重炭酸ソーダ溶液ならびに緩衝溶液 (McILVAINE) を使用して pH を 2 から 7 まで調整し、40°C で 15 分間反応させた後、KIO₃ 溶液 (M/1200) で滴定した。そしてその際の反応 CySH 量 (%) と pH の関係を求めたところ第 1 図の如くになった。

第 1 図で示されるように反応溶液の pH が 2 では反応した CySH は約 31%、pH 5 では約 34% であることがわかる。pH が 6 になると反応は急激に進行するため反応量は 97% となり、pH が 6 以上では未反応量はほとんど零となる。すなわち pH が 6.5 以上では反応は常に完結していることが確められた。これに対して Blank (CySH のみ) の滴定値から 15 分間の反応時間で CySH は 15% の不活性化を示したが、後述の実験で示されるように反応時間を 5 分とすればほとんど不活性化はみられなかった。

2-2 温度の影響

上述と全く同一試料を 0°C から 40°C までの反応温度で反応させた。pH は 7、反応時間は 15 分間とした。

得た結果を第 2 図で示す。



第 2 図 Cysteine と Tetrodotoxin の反応に及ぼす温度の影響

第 2 図で示されるように CySH は 15°C ではほとんど TT と反応しないが、25°C で 19%、35°C で 36% の反応率を示し 40°C においてはほとんど 100% の反応率を示した。これに対して生体内で酸化還元に関与するといわれるグルタチオン (GSH) の TT に対する反応率を CySH と全く同一の条件 (反応時間 15 分) で求めた結果、pH 7 の場合でも僅かに 22% を示すに過ぎなかった。

2-3 反応時間の影響

上記の 2-1、2-2 の諸反応の結果は pH 7、40°C の条件で反応時間を 15 分として得られた結果である。その場合 CySH は TT とほとんど完全に反応するが、GSH もわずかではあるが反応するので CySH と GSH の TT に対する反応差異を的確に把握する必要がある。そこで反応時間

による反応率の差異を検討した。第1表はその結果を示す。

第1表 Cysteine および Glutathione (GSH) と Tetrodotoxin の
反応におよぼす反応時間の関係

反 応 時 間 (分)		5	10	15	5 (Blank)
KIO ₃ (M/1200) 溶液 の滴定値 (ml)	CySH	0.038	0.030	0.025	13.902
	GSH	1.554	1.450	1.318	1.554

CySH : Cysteine

Blank : CySH のみ

表1の結果は CySH が反応時間5分で完全に TT と反応しているのに反し GSH はほとんど反応していないことを示している。すなわち反応液の pH 7, 反応温度 40°C, 反応時間5分で CySH は TT と完全に反応するのに反し GSH はほとんど反応しない。

3. システィンによるテトロドトキシン分子中のラクトン環の変化

TT 分子中には1個のラクトン環の存在が知られているので CySH を添加した場合ラクトン環がどのように変化するかを検討した。

TT に CySH を添加して常法にしたがって反応させた後蒸発乾固する。次にヒドロキシラミン溶液 (10g/dl) を添加し、さらに 1N 水酸化ソーダ溶液で pH を 7 とした後、pH 9 の緩衝溶液 (Clark a. Lubs) を添加し pH を 9 に調整して蒸発乾固する。次に 1N 塩酸溶液を添加して酸性となし塩化第二鉄溶液 (0.1N 溶液で 0.1N 塩酸溶液としたもの) 1ml を添加する。第2表は実験結果の1例を示す。

第2表 Tetrodotoxin 分子の Lactone ring reaction に対する Cysteine の影響

TT (ml)	Blank					
	1	1	1	1	1	1
CySH (ml)	0	1	3	5	7	9
Violet color	+++	+	±	±	-	-

TT : Tetrodotoxin

CySH : Cysteine

第2表で示されるように盲検では強い紫色を呈した。これは明らかに TT 分子中にラクトン環が存在することを示すものである。そして CySH を添加した場合、その添加量が増加するにつれて紫色がうすくなり、この実験では CySH の 7~9ml の添加で紫色は完全に消失した。

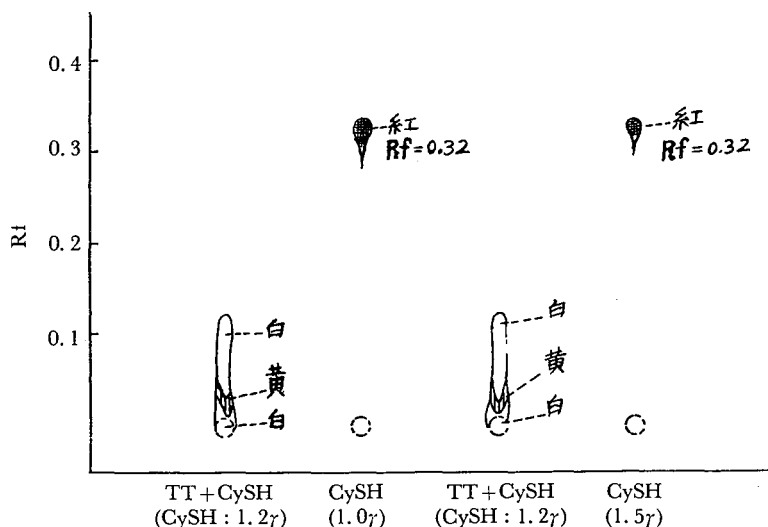
この事実から恐らく CySH がすべての TT 分子中のラクトン環に付加的に反応したためにラクトン呈色反応が消失したものであろうと推定した。

4. テトロドトキシンと反応したシスティンの薄層クロマトグラフィー

CySH を TT に添加した場合、付加反応をおこすことは上述の諸実験結果から明らかである。そのような反応を肉眼的に確かめるため付加 CySH の薄層クロマトグラムを求めた。

TT 溶液 5ml に CySH (0.01g/dl) 溶液 1ml を添加して pH 7, 40°C で 5分間反応させた後、常法の通り KIO₃ 溶液で滴定し反応溶液中に未反応の CySH が存在しないことを確認した。この

溶液をシリカゲルの薄層にスポットして n-ブタノール：氷酢酸：水=4：1：1 の割合の溶媒で展開した。各スポット中の CySH 相当量は 1.2~1.5 γ で CySH のみのコントロールのそれは 1.0~1.2 γ であった。第3図は得られたクロマトグラムである。



第3図 Tetrodotoxin と反応した Cysteine の薄層クロマトグラム

TT : Tetrodotoxin
 CySH : Cysteine
 展開溶媒 : n-ブタノール：氷酢酸：水 = 4 : 1 : 1
 吸着剤 : シリカゲル-G

第3図で明らかなようにコントロールの CySH は $R_f=0.32$ を示す位置でニンヒドリン試薬に陽性を示しているが、TT に添加した CySH はコントロールの上昇位置まで上昇せずにスポットした原点付近で黄白色を示した。TT はこの展開溶媒では全く移動しないから、添加 CySH が TT に結合しているのであれば上昇できないのも当然と考えられる。そしてさらにニンヒドリン反応が陰性になったということから付加した CySH のアミノ基もはや遊離の型で存在しないで、恐らくは $>NH$ 基として新しい結合を生じているものと推定される。

5. システインと Cyclohexanone の付加反応

上記の諸実験で使用した TT 溶液は純粋な TT 溶液ではなく不純物として糖を初めとし種々の窒素化合物を含んでいる。したがって $>CO$ 基を含んだ純化合物で同様な実験を行なって TT 溶液の場合と同様な結果が得られれば上記実験結果もさらに真実性を増すわけである。

Cyclohexanone (Cyclo. と略す) は炭素原子6個を有し、そのうちの1個の炭素原子は $>CO$ 基を構成している環状化合物であるのでこの物質をモデルとしてえらんだ。

Cyclo. (5 Vol%) 5ml に CySH 1ml 添加し、反応溶液の pH を異にして反応の状態を検討した。反応の結果は KIO_3 溶液の滴定値で示した。実験結果を第3表で示す。

第3表の結果によれば CySH と Cyclo. の反応は pH の低い 3~4 ではほとんど進行しないが pH が 6.5 以上、特に 7 において 100% に近い反応を示している。そこでさらに反応条件を pH 7、温度 40°C、時間を 5 分間として CySH の量を種々異にして添加し実験した。第4表は実験結果の 1 例を示す。

第4表の結果では Cyclo. 5ml に対し CySH 1ml の添加でほとんど完全に反応して未反応の CySH はなくなっていることが示されている。CySH の 2ml 以上の添加では最早や CySH は過剰となり、したがって滴定値の増加という結果となったと考えられる。

第3表 Cysteine と Cyclohexanone との反応におよぼす pH の影響
Cyclo*. (5 vol %) : 5ml, CySH (0.1 g/dl) : 1 ml の混合溶液

pH	3	4	5	6	6.5	7	7 (Bank)**
KIO ₃ (H/1200) 溶液 の滴定値 (ml)	1.730	1.721	1.044	0.625	0.566	0.500	1.915

* Cyclo. : Cyclohexanone

** Blank : CySH のみ

第4表 Cyclohexanone に対する Cysteine の付加反応

Cyclo. (5 Vol %) (ml)	5	5	5	0
CySH (0.1 g/dl) (ml)	1	2	4	2
KIO ₃ (M/1200) 溶液 の滴定値 (ml)	0.060	0.158	1.870	3.910

Cyclo. : Cyclohexanone

以上 3, 4 および 5 の実験結果から CySH は TT 分子構造中のカルボニル基に反応して付加化合物を生じ、さらに CySH のアミノ基はもはや遊離の状態では存在せず恐らくはイミノ基となって他の原子、恐らくはカルボニル基をなしていた炭素に結合しているものと推定される。なおこの付加結合の問題については今検討中である。

6. L-アスコルビン酸とテトロドトキシンおよび Cyclohexanone の反応

6-1 L-アスコルビン酸 (ASA と略す) は生体内で重要な生理作用に関与するといわれるが、これが Indophenol に対する反応は pH 3~4 で最も強い環元作用を示し、pH がそれより上昇すると反応性は非常に弱くなる⁵⁾。血液および体液の pH は約 7.4 であるが、TT が生体内に吸収された場合、ASA が pH 7 のような条件の下で解毒的な効果を有するかを検討した。TT 溶液の一定量に ASA 溶液をそれぞれ量を異にして添加し、反応溶液の pH を 7, 反応温度を 40°C, 反応時間を 5 分として反応させ、直ちに 2M メタリン酸溶液を添加して pH を 3~4 として KIO₃

第5表 L-Ascorbic acid と Tetrodotoxin の反応
(反応条件 : pH 7, 40°C, 5 分)

TT (ml)	1	1	1	Blank		
				0	0	0
ASA (ml)	1	2	3	1	2	3
KIO ₃ (M/1200) 溶液 の滴定値 (ml)	1.065	2.112	3.050	1.015	2.165	3.191

TT : Tetrodotoxin

ASA : L-Ascorbic acid

溶液で滴定した。得た結果を第5表で示す。

第5表の結果をみるに、ASA 1ml 添加の場合試験区の値は Blank 値よりむしろ高い値を示して両者間に何らの反応もないように見える。しかし ASA の2および3ml 添加区ではその滴定値が Blank 値よりやや低い値を示した。したがって ASA は或は TT に対し幾分の反応をするのではないかとも考えられるが、何分滴定値差が僅少であるので何とも判断し難い。

6-2 L-アスコルビン酸と Cyclohexanone の反応

若し ASA が TT に反応するならば TT の毒性に関係があるといわれるカルボニル基に反応するものか否かを知ることは解毒の問題を考える点で重要なことである。そこでカルボニル基を有する Cyclo. を使用して ASA のカルボニル基に対する反応性を確めた。Cyclo. の一定量に ASA をそれぞれ量を異にして添加し、緩衝溶液 (McILVAINE) および 1M 炭酸ナトリウム溶液を使用して pH を7とし、常法の如く反応させた後滴定した。得た結果は第6表の如くである。

第6表 L-Ascorbic acid と Cyclohexanone の反応について
(反応条件: pH 7, 40°C, 5分間)

Cyclo. (5 Vol %) (ml)	5	5	5	Blank		
				0	0	0
ASA (50mg/dl) (ml)	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
KI ₂ (M/1200) 溶液の 滴定値 (ml)	1.185	2.204	3.310	1.150	2.045	3.275

Cyclo.: Cyclohexanone

AsA : L-Ascorbic acid

第6表の示すところによれば ASA は Cyclo. と全く反応しないようである。すなわち Cyclo. に ASA を添加したすべての実験区の滴定値が Cyclo. 未添加の盲験区のそれに比較してむしろやや高い値を示している。このことは ASA が Cyclo. 分子構造中のカルボニル基に全く反応しないことを示しているものと考えてよい。つまり ASA は -OH 基と反応する可能性はあるがカルボニル基とは反応しない、すなわち ASA は TT 分子構造内のカルボニル基には反応しないと考えられる。

7. Glutathione (GSH) と Cyclohexanone 反応

GSH が一定の条件下では TT に反応しないことはさきに発表した⁴⁾通りであるが、さらに Cyclo. に対して反応するかどうかを確めた。GSH と Cyclo. の使用量は第7表の如くにし常法にしたがって反応させ滴定を行なった。その結果を第7表で示す。

この表で示される如く Cyclo. 無添加と添加した試料 (GSH: 2ml) 滴定値はほとんど同一であ

第7表 Glutathione と Cyclohexanone の反応について
(反応条件: pH 7, 40°C, 5分間)

Cyclo. (5 Vol %) (ml)	5	5	5	5	5	0 (Blank)
GSH (0.25g/dl) (ml)	2	4	6	8	10	2
KIO ₃ (M/1200) 溶液 滴定値 (ml)	0.205	0.412	0.625	0.805	1.055	0.215

Cyclo: Cyclohexanone

GSH : Glutathione

り、また Cyclo. の一定量に GSH を 2, 4, 6, 8 および 10 ml 添加した場合、Cyclo. の存在に無関係に滴定値も 2, 3, 4, および 5 倍という結果を示した。すなわち GSH は Cyclo. 分子構造中のカルボニル基には反応しない、したがって TT 分子中の $>CO$ 基に反応しないことが推定された。

8. システィンによるテトロドトキシン分子中の $-OH$ 基の変化

TT 分子中には 6 個の $-OH$ 基が存在するので、これらは S-P 剤処理の場合と同様に CySH により還元されてその数を減少し或は消失することが考えられる。そこで TT 溶液に CySH 溶液を一定量添加し中性で常法の如く反応させた後、既報の如き方法に従って¹⁾ 実験を行なった。実験条件および結果は第 8 表に示す通りである。

第 8 表 Cysteine による Tetrodotoxin 分子中の $-OH$ 基の減少について
(反応条件および結果)

TT. (ml)	2	2	0 (Blank)
CySH (0.1g/dl) 溶液 (ml)	2	0	0
蒸留水 (ml)	0	2	4
上記混合液を 40°C に 5 分間加温した後下記を添加する			
KIO ₄ (0.5%) 溶液 (ml)	0.1	0.1	0.1
H ₂ SO ₄ (N) 溶液 (ml)	0.5	0.5	0.5
上記混合液を 63°C, 2 分間加温した後飽和臭素水を適量添加し、煮沸し発生した気体をバリタ水に導く。生成した白沈を分取し、これに硫酸を加えてとかした溶液を苛性ソーダ溶液で滴定			
添加した H ₂ SO ₄ (N/100) 溶液 (ml)	5	5	5
苛性ソーダ (N/100) 溶液の滴定値 (ml)	3.019	1.722	3.923

TT : Tetrodotoxin

第 8 表の結果は明らかに CySH が TT 分子中の $-OH$ 基に作用したことを示す。すなわち TT のみの滴定値は 1.722 であるのに対し CySH 添加の場合の滴定値は 3.019 と高く示された。この値は試薬だけの場合の滴定値 3.923 に近い。このように盲験値に接近したことは CySH が TT 分子中の $-OH$ 基を恐らく還元してその数を減少させたためギ酸の生成が減少したことを示すものである。

9. 動物実験

9-1 致死量の決定

上記の TT 溶液を希釈してマウス (体重 20~25g) に背部皮下注射 (あるいは腹部皮下注射) し 30~40 分で死ぬ量とした。

9-2 ラクトン環反応を消失したテトロドトキシン溶液の注射

あらかじめ TT 溶液に CySH を添加してラクトン環反応を消失させた混合溶液を致死量に相当するだけ注射したがマウスには何らの悪い反応をあたえなかった。これに反して無処理の TT を同量注射したものは麻痺を起した後 30~40 分後に死んだ。

9-3 テトロドトキシンを注射した後システィンを注射した場合

TT を注射した後、20 分経過し呼吸はげしく菌をかちかちとかみ合せるような状態になった

頃、CySH を注射したら上記の症状は速やかに消滅した。また TT を注射した後10分おきに3回にわたり TT を解毒するに足る CySH を分注したがマウスには何らの変化をも見られなかったが CySH を注射しないものはいずれも死んだ。

以上の諸実験結果から明らかなように CySH は TT 分子中のカルボニル基に付加して変化をあたえ -OH 基数を減少させる等の反応をする結果として TT を無毒化する。これに反して還元剤として知られるグルタチオン (GSH) や L-アスコルビン酸は TT の解毒には無力であることが明らかとなった。

総 括

フグ毒テトロドトキシンはシスティンにより解毒されることを明らかにした。

実験結果を要約すると次のようになる。

- 1) テトロドトキシンをシスティンで解毒したものをマウスに注射しても死なない。
- 2) テトロドトキシンを致死量或はそれ以上注射した後 10, 20 および30分と解毒に必要なシスティン量を分けて注射することにより動物は助かる。
- 3) テトロドトキシンをシスティンで処理することによりテトロドトキシンのラクトン環反応は消失する。またテトロドトキシン分子中の -OH 基は還元されて減少する。
- 4) L-アスコルビン酸およびグルタチオン (GSH) はテトロドトキシンに対して解毒効果を有しない。

本報告の大要は日本栄養・食糧学会西日本支部大会（昭和40年度）において発表した。

文 献

- 1) 藤井 実・原田勝彦・大島寿夫：真空化学 Vol 12, 221~225, 1964
- 2) 末広恭雄：魚類学岩波書店 P 254., 1966
- 3) 藤井 実・松田 真：未発表
- 4) 藤井 実・原田勝彦・松田 真：佐賀大学農学彙報 Vol 23, 27~31, 1966
- 5) 藤井 実・立川英毅：水産大研報 Vol 13, 7~16, 1964