二枚貝の脂溶性分画の毒性について

佐二木順子，工藤　幸子，福田　芳生，高橋　勝弘

Toxicity of the Lipo-soluble Fraction in Bivalves

Junko SAJIKI, Sachiko KUDO, Yoshio FUKUDA
and Katsuhiro TAKAHASHI

Summary

During our screening of the diarrhetic shellfish poisoning in bivalves, the present authors observed a phenomenon that oxyhemoglobin red changed gradually to brownish red or brown, dose-dependently, when the ether extracts from the toxic bivalves by bioassay using mice were added to blood *in vitro*. The hemolysate adding the ether extracts showed the spectrum with new two peaks at 500 nm and 630nm, instead of disappearance of the oxyhemoglobin peaks. From the result, it is considered that the new peaks were originated from methemoglobin. This phenomenon was not observed in the ether extracts from non-toxic bivalves.

In the experiment using purification procedure of the diarrhetic shellfish toxin derived from planktons by cilicic acid column, toxic effect was not seen in the eluate which must be detected these toxic substances.

We further examined the toxic effect to hemoglobim by okadaic acid, which possesses cytotoxic action and is an important diarrhetic toxin in bivalves. Nothing of positive effect for the oxyhemoglobin test was seen till 1.0MU of the toxicity.

In conclusiom, the change of oxyhemoglobin into methemoglobin should not relate the diarrhetic toxic substances derived from planktons as previously reported.

はじめに

1978年，安元ら[1]によりわが国初めての脂溶性の貝毒が報告され，その臨床症状から下痢性貝毒と命名されて以来その原因物質についての研究がなされてきている。Murataら（1982）[2]は，毒化したムラサキイガイおよび原因と考えられる渦鞭毛藻から35S－methyl okadaic acidを抽出，精製しdinophysistoxin－I（DTX_1）と名付けた。その後Pectenotoxinが同定され原因物質に加えられた[3]のをはじめ，Murataら（1987）[4]は陸奥湾のホタテ貝より硫酸エステルを有するポリエーテル化合物yessotoxinを同定している。

一方，下痢性貝毒スクリーニングにおいて，貝の毒化と原因プランクトンの出現とに相関が認められない場合も少なくなく，他の原因についての検討も進められている。[5)6)]なかでも，Takagiら[7]はオホーツク産のホタテ貝の脂溶性分画の主成分が遊離の高級不飽和脂肪酸であったこと，高級不飽和脂肪酸（C18：3，C20：4，C20：5）はマウスに対して毒性を示すことから，下痢性貝毒の原因物質として，遊離の高級不飽和脂肪酸の可能性を報告している。この様に下痢性貝毒の原因については多くの不明な点が残されている。

著者らは，最近，二枚貝の脂溶性分画中にマウスに毒性を示し，血球に対しヘモグロビンを変性させる作用をもつ物質の存在を示唆する興味深い現象をみいだしたので報告する。

材料および測定器材

二枚貝は，昭和61年１月30日採取分，３検体，昭和62年７月13日採取分４検体である。検体番号は表１に示した。毒性試験に用いたマウスはdd－Y系の雄（16～20ｇ）を用いた。血球は，ヒト血球を生理食塩水（生食）

千葉県衛生研究所
（1988年９月30日受理）

にて4～5回洗滌したものを用いた。シリカゲルは，Merk社製（60～230メッシュ）を用いた。マウス血清の生化学的検査はオーストアナライザー（ABBOTT－VP）によった。分光光度計は日立557を用いた。オカダ酸は，東北大学農学部安元教授より分与された。

実験方法

1．一般貝毒検査

1）麻痺性貝毒

厚生省の定めた「麻痺性貝毒検査法」[8]に準じた。

2）下痢性貝毒

厚生省の定めた「下痢性貝毒検査法」[9]に準じた。エーテル抽出原液は，二枚貝むき身にあっては1 mℓあたり20 g，中腸腺にあっては2 gを含むものである。ちなみに表1における，希釈倍率×1，×2は原液をそれぞれ1 mℓ，0.5mℓ，×4，×8は原液を1％Tween60含有生食にて4倍に希釈したものをそれぞれ1 mℓ，0.5mℓ，×16，×32は原液を1％Tween60含有生食にて16倍希釈したものをそれぞれ1 mℓ，0.5mℓマウス腹腔内に投与した。毒力はマウスを24時間で死亡させる毒量を1マウス単位（MU）として計算した。

Table. 1　Toxic values of bivales.

Number of the samples (Date of sampling)	Portion of the bivalves	Location of the sampling	numbers of mice died* (×1	×2	×4	×8	×16	×32†)	Toxicity (MU／g)
1 (January 1986)	edible	A	3／3**	3／3**	3／3	2／3	0／3	0／3	0.4
2 (〃)	〃	B	3／3**	3／3***	3／3	0／3	0／3	0／3	0.2
3 (〃)	digestive gland	A	3／3	3／3	0／3	0／3	0／3	0／3	1.0
4 (July 1987)	edible	A	3／3**	3／3**	3／3**	3／3	0／3	0／3	0.4
5 (〃)	〃	B	3／3**	3／3**	0／3	0／3	0／3	0／3	0.2
6 (〃)	〃	C	0／3	0／3	0／3	0／3	0／3	0／3	N.D.
7 (〃)	digestive gland	A	3／3	0／3	0／3	0／3	0／3	0／3	0.5
8 (〃)	〃	D	1／3	0／3	0／3	0／3	0／3	0／3	N.D.

* Number of mice died within 24 hrs after intraperitoneal injection of the sample.

** All of the experimental mice were died within 10 min.

*** Two of the experimental 3 mice were died within 10 min.

N.D. Toxicity was not detected.

† Dilution (times)

2．エーテル抽出物の生物学的影響

1）*In vivo*における試験

上記の一般下痢性貝毒検査について毒性が認められた検体のうちNo.1投与マウスで24時間生存したものについて血清生化学検査｛GOT，GPT，アルカリホスファターゼ（Al－P）尿素窒素（BUN），総蛋白（T－P），アルブミン（Alb)｝の測定を行なった。また，投与直後に斃死した検体No.1投与マウス3例については，直ちに開腹し，各臓器（肝臓，脾臓，腎臓，小腸）を10％ホルマリン液にて固定し，常法に従い病理組織学的検索を行なった。染色は，ヘマトキシリン・エオジン染色ならびにP-AS染色を行なった。

Table. 2　Clinical data of serum in survived mice for 24 hrs after injection of the sample No.1

Dilution times	number of mice	GOT (IU／ℓ)	GPT (IU／ℓ)	Al-P (IU／ℓ)	BUN (mg／dℓ)	TP (mg／dℓ)	Alb (mg／dℓ)
8	3	256.2** ±52.5	153.7** ±13.8	293.0** ±43.2	39.3* ± 3.0	4.8** ± 0.2	2.9* ± 0.5
16	3	133.9 ±71.8	121.7* ±84.3	293.9** ±50.5	33.2 ± 8.2	5.3** ± 0.2	3.3** ± 0.1
32	3	112.7 ±52.6	52.8 ±13.1	383.6 ±67.0	30.3 ± 2.7	5.7** ± 0.3	3.6 ± 0.3
Control	5	107.0 ±45.9	45.6 ± 7.5	470.7 ±87.6	28.8 ± 3.2	6.2 ± 0.2	3.7 ± 0.2

◦ Data were analysed according to t-test　　**P<0.01　*P<0.05

◦ Non-treated mice were used as control

2）*In vitro*における試験

① 溶血試験

検体No.2の原液を適宜希釈した液を洗滌ヒト赤血球に添加し，37℃浴槽中にて反応させ，10，60，300分に一定量サンプリングし，その上清の溶血度を既報[10]により測定した。

② 血球ヘモグロビンの変化について

検体No.2ならびにNo.6の原液を適宜希釈したものを2%ヒト血球浮遊液に添加し，24時間室温に放置したものを蒸留水にて溶血させ，その上清について700nmから460nmまでのスペクトルを得た。オキシヘモグロビン値は，既に報告した二波長分光法[11]により560nmと540nmの吸光度差で表わし，メトヘモグロビン生成量は650nmと630nmの吸光度差で表わした。なお，オキシヘモグロビン減少率は次式にて求めた。

オキシヘモグロビン減少率（%）

$$= \frac{\text{サンプル添加血球の}\triangle\text{OD}\ (\lambda_1=540\text{nm},\ \lambda_2=560\text{nm})}{1\%\text{Tween60含有生食添加血球の}\triangle\text{OD}\ (\lambda_1=540\text{nm},\ \lambda_2=560\text{nm})}$$

オダカ酸についてもヘモグロビンへの影響を調べた。

3．エーテル抽出物の分画と毒性

1）液－液分配による分画

毒性が認められた検体No.4の200gをアセトンならびにエーテルにて抽出したものをFig.1のフローシートに従い酸性分画（A－1），弱酸性分画（A－2），塩基性分画（B）中性分画（N）に分け，それぞれの分画について1%Tween60含有生食2.5mℓにて溶解したものをそれぞれマウス腹腔内に1mℓずつ投与した。同時に2%ヒト血球浮遊液にも添加し，ヘモグロビンに及ぼす影響も調べた。

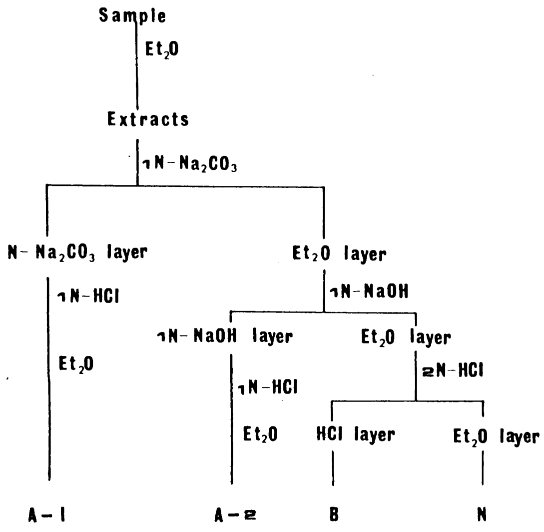

Fig.1 Fractionation of the lipophilic shellfish toxin

2）下痢毒精製法による分画

毒性の認められた検体No.5の200g（約40MUに相当）をアセトン，エーテルで順次抽出したものを，浜野らの用いた下痢毒精製法[12]に準じて分画し（Fig.2）各溶出分画について赤血球に及ぼす影響を調べた。

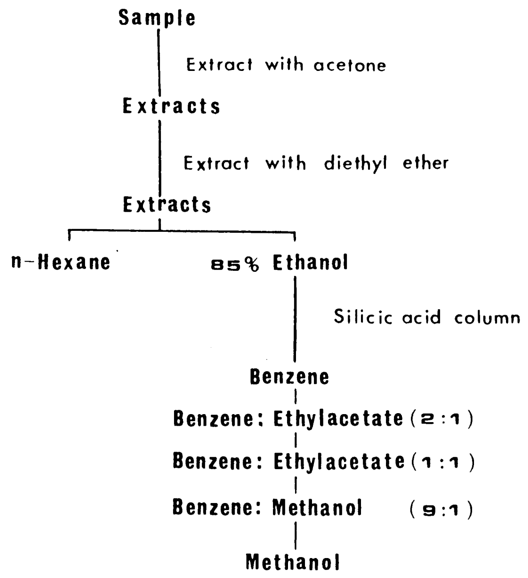

Fig.2 Purification of the diarrhetic toxins according to the method by Hamano(1984)[12]

4．二枚貝中の脂質ならびに過酸化脂質について

今回実験に供した検体について，総脂質はFolch抽出

Table.3 Values of total lipid and lipoperoxide in the experimental bivalves

Number of the sample	Total lipid (mg／g)	Lipoperoxide (nmole／g wet wt.)
1	10.7	253.3
2	7.3	200.0
3	45.7	1849.5
4	11.6	258.5
5	10.3	346.3
6	17.3	439.0
7	46.8	3220.0
8	40.7	590.0

による重量測定法により，過酸化脂質値はOhkawaらのTBA法[13]により求めた。

実験結果

1．一般貝毒検査

1）麻痺性貝毒

すべての検体について毒性は認められなかった。

2）下痢性貝毒

それぞれの検体についての結果をTable 1に示した。検体No. 1，2，3，4，5，7について毒性が認められた。なかでも，No. 1とNo. 5については，原液と×2投与マウス，No. 4については原液，×2，×4投与マウス，No. 2については，原液投与マウスならびに×2投与マウスのうち1匹は，腹腔内注射後10分以内に斃死した。これらのマウスは，すべてショック死であった。なお，採取場所の異なる二枚貝No. 6，8については，何ら毒性は認められなかった。

2．エーテル抽出物の生物学的影響

1）*In vivo*における試験

Table 2に検体No. 1の24時間生存しえたマウスについて血清生化学データを示した。GOTについては，×8投与マウスにGPTについては×8，×16投与マウスに，BUNについては，×8投与マウスに有意な値の上昇が認められた。Al−Pについては，×8，×16投与マウスに，TPについては×8，×16，×32投与マウスに，Albについては×8，×16投与マウスに値の有意な低下が認められた。

なお，検体No. 1の原液投与直後ショック死により斃死したマウスの病理組織学的検索の結果，二枚貝の抽出原液によると考えられる特記すべき所見は認められなかった。

2）*In vitro*における試験

① 溶血試験

洗滌ヒト赤血球に検体No. 2の希釈液を加え37℃下でインキュベートしたところ，原液の2.4％の濃度では，添加後直ちに赤血球のもつ鮮紅色が褐色に変化した。なお，0.9％，0.5％添加のものについても時間の経過とともに退色が明らかであった。肉眼的に添加後1時間までは溶血は認められなかったが，5時間目に2.4％添加液の上清は黄褐色を，0.9％以下の上清は赤色を呈した。この様にヘモグロビンの変化が顕著であったためオキシヘモグロビンを指標とする方法では，各希釈段階における溶血度を測定することはできなかった。

② 血球ヘモグロビンの変化について

2％洗滌ヒト赤血球に検体No. 1の希釈液を添加し，室温に24時間放置した際のヘモグロビンスペクトルをFig. 3に示した。原液の0.05％添加（0.008MUに相当）のものでは，それぞれ540nm，578nm付近に2つのピークをもつオキシヘモグロビンのスペクトルが得られたが，添加濃度が増加するに従い，オキシヘモグロビンのピークは消失し，500nm，630nm付近にピークをもつメトヘモグロビンと思われるスペクトルが得られた。ただし，濃度が2.4％（0.4MUに相当）になると，すべてのヘモグロビンピークは消失した。次に，検体No. 1の原液を0.3，0.6，1.2，2.4％（それぞれ0.05，0.1，0.2，0.4MUに相当）添加した際のヘモグロビンの経時変化をFig. 4に示した。0.3％添加では60分間何ら変化は認められなかったが，1.2％添加のものでは添加後10分，2.4％添加では添加後3分まで一次反応に近いオキシヘモグロビンピークの減少がみられその後は平衡状態に移行した。なお0.6％添加した血球のオキシヘモグロビンの減少とメトヘモグロビンの生成とは60分間全く逆の挙動を示した。毒性の認められなかった検体No. 6についてはこのような変化は全く観察されなかった。またオカダ酸を用いた実験では1.0MUまで何ら変化を示さなかった。

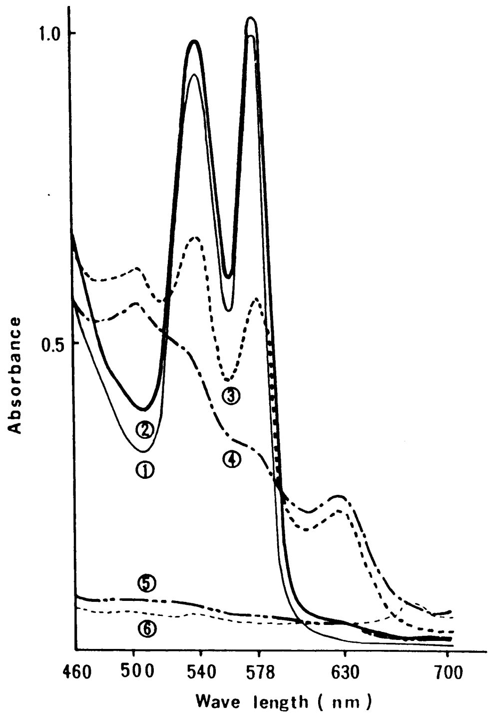

Fig. 3 A hemoglobin spectrum of red blood cell reacted with ether extracts of bivalves(No.1) with various toxicities
①0.01MPBS (PH7.4) ②0.008MU／g toxicity ③0.08MU／g ④0.15MU／g ⑤0.4MU／g and ⑥only bivalves extract in 0.01MPBS as control

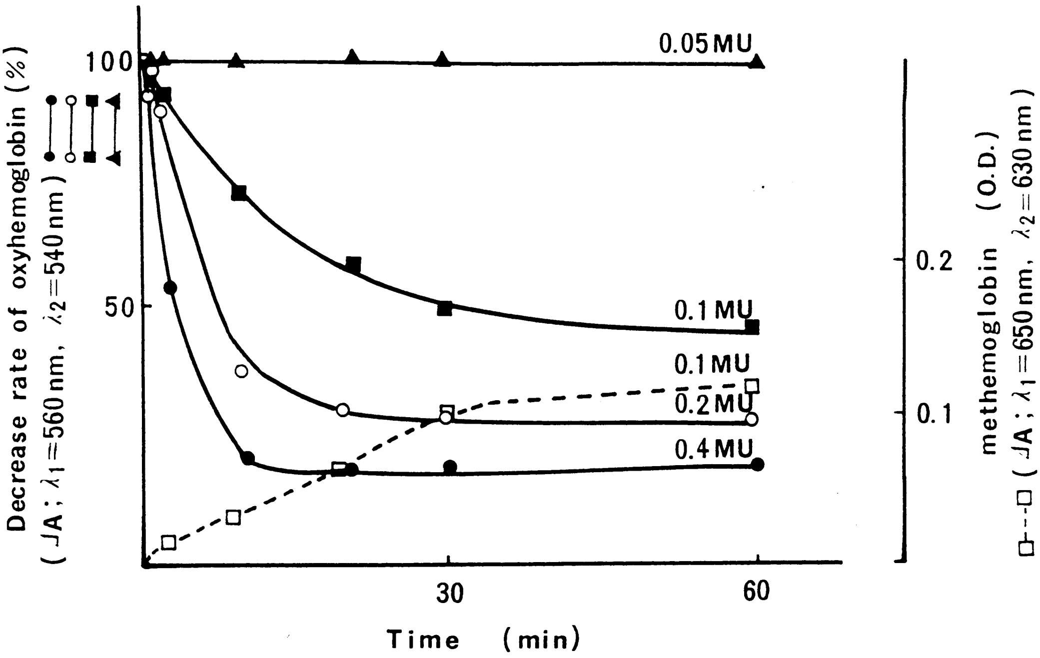

Fig. 4　Relationships between the decrease rates of oxyhemoglobin and methemoglobin synthesis as a function of time after adding ether extracts of bivalves with various toxicities.

3．エーテル抽出物の分画と毒性

1）液－液分配による分画

検体No. 4 の液－液分配による各分画のマウス投与試験では，A－2分画投与マウスが投与後1時間以内に斃死した。その他の分画を投与したマウスは24時間生存したがA－1分画を投与したマウスは衰弱が激しかった。赤血球への添加試験においてもA－2＞A－1の順に退色が明らかであったが，その他の分画のものでは何ら変化は認められなかった。

2）下痢毒精製法による分画

検体No. 5 の各溶媒による溶出量は，①ヘキサン溶出分画，242mg，②ベンゼン溶出分画355.9mg，③ベンゼン：酢酸エチル（2：1）溶出分画115.2mg，④ベンゼン：酢酸エチル（1：1）溶出分画10.3mg，⑤ベンゼン：メタノール（9：1）溶出分画4.7mg，⑥メタノール溶出分画60.9mgであった。赤血球に対する影響を調べた結果，④，⑤分画に非常に弱い退色が認められたが，他の分画は全く変化しなかった。

4．二枚貝中の脂質ならびに過酸化脂質について

今回実験に供したすべての個体について総脂質ならびに過酸化脂質値を測定した結果，Table 3 に示したとおり毒性値と脂質，過酸化脂質とには有意義な関係は認められなかった。中腸腺は，可食部に比べ総脂質，過酸化脂質ともに高値を示した。

考察

本県の過去5年間における貝毒スクリーニングで，規制値を上まわる下痢性貝毒の検出例はなく，下痢性貝毒の原因プランクトンと考えられている渦鞭毛藻の大量出現も確認されていない。また県下で二枚貝による重篤な食中毒も発生していない。

しかしながら，著者らは二枚貝のエーテル抽出分画中に本報に述べた様なマウス毒性をもち，血球ヘモグロビンの変性をひきおこす現象を認めた。この現象は，同一地域において2回認められたが，時期的には1月，7月と全く異なっており，原因プランクトンと考えられているDinophysis fortiiは全く確認されず，また容疑種であるDinophysis acuminataの出現も顕著でなく[14]，因果関係については不明な点が多い。これまでも，下痢性貝毒とプランクトンの出現とが一致しないという報告[5)6)]も少なくなく，プランクトン由来の物質以外にも種々の原因物質が考えられてきているが，ヘモグロビン変性をひきおこすという報告は未だなされていな

い。

今回，マウスで毒性を示した原因物質は，著しいヘモグロビン変性作用を持ち，*in vitro*の実験において，血球にサンプル添加後10分前後でオキシヘモグロビンからメトヘモグロビンに変換し，その後，変換率（%）は平衡状態に移行することが明らかである。（Fig. 4）この10分という時間は，エーテル抽出分画液（原液）をマウスに腹腔内注射した際，マウスがショック死に陥る時間とほぼ一致する。また，マウスがショック死に陥る濃度に相当するサンプル量（原液の1.2%以上）を血球に添加すると70%以上がオキシヘモグロビンからメトヘモグロビンに変換する（図4）。概してオキシヘモグロビンの70%以上がメトヘモグロビンに変換すると生物は生存が不可能になると考えられており[15]，以上の事実は，今回の原因物質のマウスへの毒性がヘモグロビン変性と深く関連していることを示唆するものとして非常に興味深い。

しかしながら，渡部ら[16]は，血球に存在するメトヘグロビンレダクターゼによりメトヘモグロビンはオキシヘモグロビンに変換されるため、*in vivo*で上記のような現象が生ずることは稀であると考えている。この様に、ヘモグロビン変換物質と死因とを一元的に把えることは危険であり，この点については今後さらに検討を加える必要がある。今回，生存マウス血清中のGOT，GPTの異常高値，蛋白，アルブミンの低値は肝臓機能の低下を示すものであり，死因を解明する上でも興味深いものと考えられる。

ところで，液一液分配による分画では，弱酸性物質分画にマウス毒性ならびにヘモグロビン変性作用が認められた。従来メトヘモグロビンへの変性をひきおこす脂溶性物質としては，芳香族アミン，フェノールの誘導体等が，知られており，[16][17]今後，フェノールの誘導体との関連も追求していかなければならない。

なお，検体に限りがあり，詳細な検討はできなかったが，シリカゲルを用いた下痢毒精製法による実験結果も，これまでのプランクトン由来の下痢毒原因物質であるオカダ酸等の可能性を示唆するものではなかった。また，オカダ酸にはヘモグロビン変性作用はなく[18]，今回の原因物質は，従来の下痢毒物質とは異なるものと思われる。

最近，高木ら[7]は，マウススクリーニングにおいて陽性を示す下痢性貝毒の原因物質として，高級不飽和脂肪酸の重要性を指摘している。高級不飽和脂肪酸の酸化反応はラジカル反応でありそれにより生じた過酸化脂質は，下痢をはじめ，種々の疾病の原因物質になりうることは周知の事実である。今回の二枚貝のエーテル抽出物についてTBA法による過酸化脂質の測定を試みたが，有意な結果は得られなかった。しかし，最近，ロイコトリエンをはじめ，リノール酸のエポキサイドは微量で強い細胞毒を示すことが明らかにされており[19]，TBA法による過酸化脂質値のみで結論を下すのは早計であろう。今後，本報に述べた現象と高級不飽和脂肪酸酸化物との関連について調べる必要があるものと思われる。

謝辞

本実験を遂行するにあたり御助言を頂き，オカダ酸を分与して頂いた東北大学農学部安元健教授に深謝します。

文献

1）Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. Bull. Japan, Soc. Sci. Fish 44 : 1249－1255, 1978.

2）Murata M Shimatani,M, Sugitani H, Oshima Y, Yasumoto T. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. Bull. Japan Soc. Sci. Fish 48 : 549－552, 1982.

3）Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto GK, Clardy J. Diarrhetic shellfish toxins. Tetrahedron 41 : 1019－1025, 1985.

4）Murata M, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish Poisoning. Tetrahedron Letters 28 : 5869－5872, 1987.

5）菊地秀明他，下痢性およびマヒ性貝毒調査結果，宮城衛研年報，56，58－63，1981.

6）森章宣，貝毒に関する研究　Ⅳホタテガイにおける脂溶性抽出画分の毒性について，岩手衛生年報，23，27－30，1980.

7）Takagi. T, Hayashi. T and Itabashi. T, Toxic effect of free polyenoic acids : a fat soluble marine toxin, Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 33, 255－262, 1982.

8）麻ひ性貝毒検査法，厚生省環境衛生局乳肉衛生課発行，1980.

9）下痢性貝毒検査法，厚生省環境衛生局乳肉衛生課発

行，1980.

10）佐二木順子，フタル酸エステルの溶血現象，医学のあゆみ，99，514－515，1976.

11）Sajiki J. A method for the determination of total hemoglobin content in tissues by double wavelength spectrophotometry. Hitachi Instr. News 15 : 7 －13，1984.

12）浜野米一，小田美光，山本博之，大津啓二，木下喜雄，魚貝類に関する研究（第3報），大阪府立公衛研所報，15号，125－129，1984.

13）Ohkawa. H, Ohishi. N and Yagi. K, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, Anal. Biochem. 95, 351－358, 1979.

14）昭和62年度赤潮防止対策事業報告書（貝毒モニタリング）千葉県.

15）柴田　進，病態生化学，pp217，金芳堂，1968.

16）渡部　烈，有機毒物の生体内活性化機構，化学の領域，増刊129号，7 －32，1980.

17）Kiese M. The biochemical production of ferrihemoglobin forming derivatives from aromatic amines and mechanisms of ferrihemoglobin formation. Pharmacol. Rev. 18 : 1091，1966.

18）佐二木順子，高橋勝弘，魚貝類のエーテル抽出物によるヘモグロビン変化現象について，第56回日本食品衛生学会抄録集，1988.

19）小澤高将，杉山理，リノール酸カスケード反応，医学のあゆみ，143，264－268，1987.