

ホタテガイの下痢毒性についての検討

An Examination on the Diarrhetic Toxicity of Scallops.

石下 真通 田沢悌二郎 佐藤七七郎

Masamichi Ishige, Teijiro Tazawa and Nanao Satoh.

緒 言

1976年に宮城県でおきたムラサキガイの摂食による中毒事件¹⁾以降、二枚貝摂食に起因する下痢性中毒患者の発生は、1985年までに日本全国で約1,500名に達している。この中毒を起こす毒性成分は、二枚貝中腸腺に含まれ、そのアセトン・エーテル抽出成分をヘキサンと含水エタノールで液々分配したエタノール層区分から、検出・単離・構造決定された²⁾。その際に用いられたバイオアッセイは、腹腔内投与によるマウスの生死判定であった。ヘキサン層区分も毒性を示すが、全毒性の4%であったこと、化学的に非常に不安定であったことから、それ以上の追求はなされなかつた。ところが、オホーツク海北海道沿岸で採捕されたホタテガイの場合、ヘキサン層区分の毒性がむしろエタノール層区分の毒性より高い値を示すこと、その主要毒性成分は遊離脂肪酸であること^{3,4)}が報告された。このことは、種々の問題を生じた。即ち、現在、毒性成分検出のために行われている下痢性貝毒検査法（公定法）⁵⁾は、アセトン・エーテル抽出成分で行うため、ヘキサン層区分毒性を含有していること、ヘキサン層区分の主要毒性成分である遊離脂肪酸の人体に対する毒性について明確な知見がないこと⁶⁾、二枚貝の採捕される海域によっては遊離脂肪酸含量が大幅に変化すること⁷⁾等から、オホーツク海北海道沿岸で採捕されるホタテガイは、下痢性貝毒の毒性が過大に評価され、出荷規制期間が、実際の人間に対する下痢毒性について考えると長期間すぎること⁷⁾が指摘された。さらに、腹腔内投与されたマウスの死因が明らかでないことが、問題をさらに複雑にしている。

本研究では、毒化期のホタテガイ中腸腺のアセトン・エーテル抽出成分をヘキサンと含水エタノールで液々分配し、両区分を腹腔内投与したマウスの死因を病理学的に明らかにし、さらに、両区分の下痢毒性について、マウスに経口

投与を行って検討した。

実験方法

1. 試料

オホーツク海沿岸猿払村で、1983年8月の下痢性貝毒毒化期に採捕されたホタテガイを用いた。

公定法にもとづき、ホタテガイ中腸腺をホモジナイザー（ポリトロン）でよくホモジナイズしたあと、その200gをビーカーに移し、600mlのアセトンを加え、2分間同様にホモジナイズした。次いで減圧下で濾過して抽出液を得た。残渣について400mlのアセトンを用いて更に2回抽出し、抽出液を合せた。これをロータリーエバボレーターのフラスコに移し、40°C以下でアセトンを減圧除去し濃縮を行った。

この濃縮物を100mlのジエチルエーテルと少量の蒸留水を用いて分液ロートに洗い込み、軽く振盪した後、ジエチルエーテル層と水層に分け、水層を除いた。次いで、50mlの蒸留水を用いてジエチルエーテル層を2回洗浄した後、ジエチルエーテル層をフラスコに移し、減圧下でジエチルエーテルを留去して濃縮した。濃縮物をすべて1% tween 60 生理食塩水に懸濁させて50mlにメスアップし、全脂溶性区分の試料とした。

同様の方法を用いて、ホモジナイズしたホタテガイ中腸腺100gからアセトン・エーテル抽出によって得た濃縮物に、ヘキサンと85% w/w 含水エタノール各々200mlを加え液々分配^{2,4)}を行った。次いで200mlのヘキサンを用いてエタノール層を更に4回液々分配し、ヘキサン層を合せた。この合同ヘキサン層について85% w/w 含水エタノールを用いて更に2回液々分配しエタノール層を合せた。

次いで合同ヘキサン層を40°C以下でヘキサンの減圧除去を行い濃縮した。また、合同エタノール層について40°C以下でエタノールを減圧除去した後、100mlのエーテルを加

え、エーテル抽出を行ったあと、エーテル層を減圧除去し濃縮物を得た。各々の濃縮物をすべて 1% tween 60 生食に懸濁させて 10 ml にメスアップし、ヘキサン層区分及びエタノール層区分の試料とした。

2. 毒性試験

1) 実験動物

ddY 系 SPF 雄マウスを日本医科学動物資材から 3 週齢で購入し、1 週間の環境馴致後使用した。体重は腹腔内投与時では 18~20 g、経口投与時では 19~21 g であった。

2) 試料投与

試料投与量が腹腔内投与では 40 ml/kg b. w.、経口投与では 33 ml/kg b. w. 以下となるように、3 試料それぞれ 1% tween 60 生食で適宜希釀し、正午から午後 2 時の一定した時間に、1 用量あたり原則として 5 匹のマウスに投与を行った。

a. 腹腔内投与

全脂溶性区分を公比約 1.15 で 6 用量、ヘキサン層区分を公比約 1.08 で 5 用量、エタノール層区分を公比約 1.09 で 6 用量をマウス腹腔内に投与し、24 時間後の死亡率から Lichfield-Wilcoxon 法により 50% 致死量 (LD_{50}) を決定した。尚、1% tween 60 生食 40 ml/kg b. w. を 5 匹のマウス腹腔内に投与し、対照群とした。

b. 経口投与

全脂溶性区分及びヘキサン層区分を公比約 1.14 で 7 用量、エタノール層区分を公比約 1.14 で 6 用量を注射筒に接続した胃ゾンデを用いて胃内に投与した。尚、1% tween 60 生食 33 ml/kg b. w. を 5 匹のマウスに同じ方法で経口投与し対照群とした。

投与後、マウスを一匹づつ金網ケージに入れ、ケージ受け皿にはペーパータオルを敷きつめた。餌・水を与えないかった。投与後 4 時間、臨床観察を行った。下痢の判定には、18~20 時間後に、ペーパータオル上に残された糞を用いた。即ち、糞周囲に染みがはっきりと残っていた場合 (Fig. 1, 2) に、下痢陽性とし、その陽性率から Lichfield-Wilcoxon 法により 50% 下痢量 (DD_{50}) を決定した。

3) 毒性表示

上記で求められた LD_{50} 値及び DD_{50} 値を、それぞれ 1 マウス単位 (MU) と定め、中腸腺 1 g 中の MU 値で表わした。また、Lichfield-Wilcoxon 法にもとづき 3 試料それぞれの腹腔内投与と経口投与間の用量反応直線の平行性を確認し、それらの毒性比及び 95% 信頼限界を求めた。

3. 病理学的検索

1) 腹腔内投与

ヘキサン層区分 8 MU 及びエタノール層区分 3 MU を、それぞれ 2 匹のマウスに投与し、斃死直後に剖検した。ま

た、両区分の 0.5~1 MU 及び 1% tween 60 生食 40 ml/kg を、それぞれ 9 匹のマウスに投与し、投与 3, 6 及び 24 時間後に、それぞれの試料につき 3 匹づつ、エーテル麻酔下放血殺し、剖検を行った。

2) 経口投与

ヘキサン及びエタノール層区分の 16 MU をそれぞれ 6 匹、8 及び 4 MU をそれぞれ 3 匹のマウスに投与し、24 時間適時に臨床観察を行った。但し、ヘキサン及びエタノール層区分 16 MU 投与の前者で 3 匹、後者で 2 匹については、投与 3 時間後にエーテル麻酔下放血殺し、また、エタノール層区分 16 MU 投与の途中死亡 2 例は、死亡直後に剖検を行った。1% tween 60 生食投与の 2 匹のマウスについても、投与 3 時間後にエーテル麻酔下放血殺し、剖検を行った。

上記 1) 及び 2) で剖検されたすべてのマウス並びに無処置正常マウス 2 匹 (エーテル麻酔下放血殺) の主要臓器については、常法に従い、ホルマリン液固定、パラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した組織標本を作成し鏡検した。

成績

1. 毒性試験

3 試料並びに 1% tween 60 生食腹腔内投与における死亡数を Table 1 に、経口投与における下痢陽性数を Table 2 に示した。また、Table 1 並びに Table 2 に基づいて算出された致死毒性と下痢毒性及び両者間の毒性比を Table 3 に示した。

その結果、全脂溶性区分は、致死毒性 12.0 MU、下痢毒性 13.5 MU を示し、それらの毒性比 1.12 に有意差は認められなかった。さらに、全脂溶性区分を液々分配したうちのヘキサン層区分は、致死毒性 4.1 MU、下痢毒性 4.0 MU を示し、それらの毒性比 1.02 に有意差は認められなかった。一方、エタノール層区分は致死毒性 7.6 MU に対し下痢毒性 10.0 MU を示し、それらの毒性比 1.32 に有意差が認められた。また、ヘキサン層区分毒性はエタノール層区分毒性を合算した全毒性の致死毒性で 35%、下痢毒性で 29% を示した。

2. 臨床所見

1) 腹腔内投与

死亡したマウスは、投与試料に関係なく同じ臨床経過をとった。即ち、自発運動低下、脱力、呼吸数減少、死であった。ヘキサン層区分 8 MU 及びエタノール層区分 2 MU 投与例の死亡時間は、投与 2~2.5 時間後であった。

2) 経口投与

ヘキサン層区分投与マウスの場合、16 MU 投与例は、投与 1 時間後に下痢を呈した。投与 6 時間後も下痢はまだ多

Table 1 Mortality of mice by intraperitoneal administration.

Total extract ^{*1}		Hexane-solubles		85% EtOH-solubles		1% tween 60 saline	
Dose	Mortality	Dose	Mortality	Dose	Mortality	Dose	Mortality
105.9 ^{*2}	5/5 ^{*3}	276.2	5/5	156.3	3/3	40ml/kg	0/5
91.7	3/5	257.1	4/5	138.1	4/5		
80.0	4/5	238.1	3/5	128.6	2/5		
70.0	1/5	223.8	1/5	118.8	1/5		
63.5	1/5	204.8	0/5	111.9	1/5		
53.3	0/5			102.4	0/5		
LD ₅₀	83.2	LD ₅₀	245.5	LD ₅₀	131.8		
	(71.7—96.5)		(225.2—267.6)		(119.8—145.0)		

*1. The ether extract from the aceton-soluble materials of the hepatopancreas of the scallops obtained at Okhotsk sea in August, 1983.

*2. mg of hepatopancreas.

*3. No. dead/No. tested.

Table 2 Incidence of diarrhetic mice by oral administration.

Total extract		Hexane-solubles		85% EtOH-solubles		1% tween 60 saline	
Dose	Incidence	Dose	Incidence	Dose	Incidence	Dose	Incidence
95.2	5/5 ^{*1}	375.0	5/5	138.1	5/5	33ml/kg	0/5
83.3	2/5	331.4	4/5	118.8	3/5		
72.4	1/5	287.5	4/5	102.4	4/5		
63.3	2/5	245.7	3/5	93.8	1/3		
57.1	1/5	218.8	1/5	78.6	2/5		
48.3	1/5	188.6	2/5	72.1	0/5		
43.8	0/5	168.3	0/5				
DD ₅₀	74.1	DD ₅₀	251.2	DD ₅₀	100.0		
	(63.9—86.0)		(214.7—293.9)		(84.7—118.0)		

*1. No. diarrhetic mice/No. tested.

Table 3 The toxicity of hepatopancreas of scallops in the mouse assay.

Fraction	Lethal toxicity ^{*1} (i.p.)	Diarrhetic toxicity ^{*2} (p.o.)	Toxic ratio ^{*3}
Total extract	12.0 (10.4—13.9)	13.5 (11.6—15.6)	1.12 (0.93—1.35)
Hexane-solubles	4.1 (3.7—4.4)	4.0 (3.4—4.7)	1.02 (0.94—1.11)
85% EtOH-solubles	7.6 (6.9—8.3)	10.0 (8.5—11.8)	1.32 ^{*4} (1.10—1.58)

*1 & 2. 50% lethal dose (*2) and 50% diarrhetic dose (*3) are respectively designated as one mouse unit. Toxicity is expressed in terms of the mouse unit per gram of the hepatopancreas.

*3. Ratio between the lethal toxicity and the diarrhetic toxicity.

*4. Significantly different at p<0.05.

少続いていたが自発運動は活発になっていた。その他の例も遅くとも投与3時間後には下痢を呈した。それ以降に発症する例は稀であった。

エタノール層区分投与マウスの場合、16 MU 投与例は、投与30分後に下痢便の排泄を始めた。その他のマウスも遅くとも3時間後には下痢を呈した(Fig. 3)。また、4 MU 以上の投与例では、下痢が持続し、衰弱も激しかった。16 MU 投与の2例は、投与2.5時間後に虚脱状態に陥り死亡した。

3. 病理学的所見

1) 腹腔内投与

a. ヘキサン層区分投与マウス

肉眼的に、琥珀色軽度混濁乃至乳糜色腹水増量し、肝臓表面はむしろ灰白色調を呈した。病理組織学的には、急性漿液・線維素性腹膜炎を示した(Fig. 4)。即ち、腹腔内繊維器漿膜面表層における実質組織・細胞の変性・壊死、充血・水腫、好中球の浸潤及び漿膜表面における線維素析出がそのおもな所見であった。尚、死亡例及び投与3, 6, 24時間後殺例における病理像に質的な違いは認められなかった。

b. エタノール層区分投与マウス

肉眼的に、琥珀色透明腹水増量し、肝臓表面は明赤色調を呈した。病理組織学的には、急性漿液性腹膜炎、急性中毒性肝炎、脾臓漿膜直下外分泌細胞空胞性変性を呈していた。このうち、急性中毒性肝炎は肝被膜直下並びに小葉周辺性における充出血並びに肝細胞空胞性(水腫性)変性・硝子滴変性、類洞における好中球流泳及び類洞内皮細胞腫大によって特徴づけられていた(Fig. 5)。尚、死亡例及び投与3, 6, 24時間後殺例における病理像に質的な違いはなかった。

2) 経口投与

a. ヘキサン層区分投与マウス

肉眼的に、小腸は膨張し、水様性内容を充満させていた。病理組織学的には、十二指腸から空腸にかけて、絨毛の膨化、粘膜固有層の充血・水腫、絨毛の主に尖端部の上皮細胞変性がいづれも軽度なものとして認められた(Fig. 6)。

b. エタノール層区分投与マウス

肉眼的に、小腸は膨張し、水様性内容を充満させていた。十二指腸では充血も高度であった。死亡例の肝臓には充血巣が散見された。病理組織学的には急性カタール性胃・小腸炎の像であった。即ち、胃から小腸にかけて、粘膜上皮細胞の剥離、粘膜固有層及び下織における充血・水腫、特に固有層における炎症性細胞の浸潤・間葉系細胞の増殖、小腸における絨毛の高度短縮並びに膨化がその主な所見であった(Fig. 7)。尚、特に死亡例の肝臓において、急性中毒性肝炎即ち小葉周辺性肝細胞空胞性変性・硝子滴

変性が充・出血を伴って認められた。

尚、1% tween 60 生食腹腔内投与マウス9例、同じく経口投与2例、並びに無処置対照マウス2例には、臨床的、病理解剖的並びに病理組織学的に異常並びに著変を認めなかった。

考 察

下痢性貝毒の検出において、腹腔内投与によるマウスの生死判定が用いられているが、その死因についてこれまで明らかにされておらず、そのことがより下痢性貝毒の簡易定量法である公定法の精度に疑義を抱かせていた。本実験の病理検索によって、ヘキサン層区分によるマウスの死因は漿液・線維素性腹膜炎であり、一方エタノール層区分による死因は漿液性腹膜炎+急性中毒性肝炎であることがわかった。このことは、公定法の評価及び下痢性貝毒成分の毒性評価に基礎的資料を提供し得たものと考えられる。

次に、本実験でペーパータオル上の糞周囲の染みを下痢毒性判定に用いたところ、全脂溶性区分の致死毒性12.0 MUに対し、下痢毒性13.5 MUを示し、その毒性比1.12に有意差は認められなかった。このことは、マウス腹腔内投与による下痢性貝毒定量法の根拠を示し得ると同時に、ヘキサン層区分とエタノール層区分それぞれの下痢毒性評価を成し得ることを示している。

ヘキサン層区分は、致死毒性4.1 MUに対し、下痢毒性4.0 MUを示し、その毒性比1.02に有意差は認められなかった。また、この区分の毒性はエタノール層区分の毒性を合算した値の致死毒性で35%、下痢毒性で29%を示した。以上のこととは、ヘキサン層区分も下痢性貝中毒において一定の役割を持つことを示唆している。しかし、経口投与マウスは小腸絨毛の軽い膨化と小腸粘膜上皮の軽度変性を示したが、腹腔内投与の際にみられたような激しい炎症像は示さず、また、臨床的に16 MUを経口投与されても死亡することなく、下痢便排泄の持続時間も短く、下痢便排泄後に自発運動も活発となったことから、下痢性貝中毒において、ヘキサン層区分はあくまで副次的な役割を持つにすぎないであろう。

一方、エタノール層区分の毒性は、致死毒性7.6 MUに対し、下痢毒性10.0 MUを示し、その毒性比1.32に有意差が認められた。また、経口投与マウスは急性カタール性胃小腸炎を呈し、下痢便排泄持続時間も長く、16 MUで死亡する例もあった。尚、YASUMOTO et al¹¹も下痢性貝毒によるマウス経口投与による致死量は、腹腔内投与によるそれの16倍であると報告している。

以上の結果より、オホーツク海北海道沿岸で採捕されるホタテガイにおいても、下痢性貝中毒を起こす毒性成分の

主体が、少くとも今回の採捕時点において、量的にも質的にもエタノール層区分に存在していることが示唆された。

尚、この結果は TAKAGI et al⁴ が同じ海域のホタテガイにおいて、むしろヘキサン層区分の毒性が高かったと報告していることと一致を見ないが、その理由は貝採捕時期の違いによるのかもしれない。

また、腹腔内投与マウスの死因の一つと考えられた急性中毒性肝炎が、高毒量の経口投与例においても生じていたことは、下痢性貝中毒において肝障害ももたらされる可能性のあることを示唆している。

これまでに、エタノール層区分からは 8 種類の毒性成分が検出、単離され、その主なものについては構造決定もされているが⁸、その各々が致死毒性と下痢毒性の毒性比に有意差が示されたことと合せて、マウスにみられた病理像とどのように関わっているのか興味深いところである。

要 約

下痢性貝中毒化期のホタテガイ中腸腺のアセトン・エーテル抽出成分を、ヘキサンと含水エタノールで液々分配し、両区分の毒性をマウスを使って検討した。

1. 腹腔内投与によるマウスの死因は、ヘキサン層区分の場合、漿液・線維素性腹膜炎であり、エタノール層区分のそれは、漿液性腹膜炎+急性中毒性肝炎であった。

2. ヘキサン層区分は致死毒性 4.0 MU、下痢毒性 4.1 MU を示し、それらの毒性比に有意差は認められなかった。また、全毒性に占めるその値は、致死毒性で 35%、下痢毒性で 29% を示した。しかし、経口投与されたマウスの下痢便排泄は一過性であり、小腸における病変も軽度なものであったことから、ヘキサン層区分は、下痢性貝中毒において一定の役割を持つものの、それは副次的なものであることが示唆された。

3. エタノール層区分は致死毒性 7.6 MU、下痢毒性 10.0 MU を示した。経口投与されたマウスは下痢持続時間も長く、病理組織学的に急性カタール性胃小腸炎を示し、高毒量投与例では急性中毒性肝炎を伴った。

以上の結果より、オホーツク海北海道沿岸で採捕されるホタテガイにおいても、少くとも今回の採捕時点において、下痢性貝中毒毒性成分の主体が、量的にも質的にも、エタノール層区分に含有されていることが示唆された。

稿を終えるにあたり、ホタテガイ中腸腺の採取に御尽力下さった稚内地区水産技術普及指導所、青柳 浩氏に感謝致します。

文 献

- 1) T. Yasumoto et al: Bul. Japan. Soc. Sci. Fish., 44, 1249 (1978).
- 2) M. Murata et al: Bul. Japan. Soc. Sci. Fish., 48, 549 (1982).
- 3) T. Takagi et al: Bul. Fac. Fish. Hokkaido Uni., 33, 255 (1982).
- 4) T. Takagi et al: Bul. Japan. Soc. Sci. Fish., 50, 1413 (1984).
- 5) 安元 健: 食品衛生研究, 31, 566(1981)
- 6) 高木 徹 他: 昭和58年度日本水産学会道支部大会講演要旨, 5 (1984)
- 7) 高木 徹 他: 昭和59年度日本水産学会道支部大会講演要旨, 206(1085)
- 8) T. Yasumoto et al: Tetrahedron, 41, 1019 (1985).

英 文 要 約

The acetone extracts from the hepatopancreas of scallops in the diarrhetic shellfish poisoning season were fractionated into two parts, hexane soluble fraction and aqueous ethanol soluble fraction. Each fraction was examined on the lethal toxicity and the diarrhetic toxicity in the mouse assay.

1. The cause of death by intraperitoneal injection of the hexane fraction into mice was acute serofibrinous peritonitis. On the other side the cause of death by intraperitoneal injection of the ethanol fraction into mice was acute serous peritonitis and acute toxic hepatitis.

2. The hexane fraction showed 4.0 MU in the lethal toxicity and 4.1 MU in the diarrhetic toxicity and the significant difference was not detected in those toxicities. Moreover this fraction showed 35% lethal toxicity and 29% diarrhetic toxicity of total toxic values. However, the effects of oral administration of the fraction on mice were a transient diarrhea and the mild pathological features in the small intestine. It is suggested that the hexane fraction has a definite but secondary role in the diarrhetic shellfish poisoning.

3. The ethanol fraction showed 7.6 MU in the lethal toxicity and 10.0 MU in the diarrhetic toxicity. The effects of oral administration of this fraction on mice were continual diarrhea and severe acute gastroenter-

itis, accompanied with acute toxic hepatitis in severer cases.

It is suggested that the major toxic components of the diarrhetic shellfish poison of scallops obtained at Okhotsk sea are contained in the ethanol fraction.

The explanation of figures.

- Fig. 1 The diarrhetic feces blotting on the paper towel.
- Fig. 2 The non-diarrhetic feces.
- Fig. 3 The diarrhetic mouse (left) at 3 hours after oral administration of 4 MU ethanol-solubles. The normal control mouse (right).
- Fig. 4 Acute serofibrinous peritonitis. The fibrin is seen adherent to the surface of the peritoneum. The underlying liver cells suffer superficial necrosis. The case killed at 24 hours after i. p. administration of 1 MU hexane-solubles.
- Fig. 5 Acute toxic hepatitis. Vacuolar (hydropic) degeneration-hyalinedroplet degeneration in the peripheral parts of the lobule in the liver. The dead case at 2 hours after i. p. administration of 3 MU ethanol-solubles.
- Fig. 6 Mild swelling of the villi of jejunum of the case at 3 hours after oral administration of 16 MU hexane-solubles.
- Fig. 7 Acute catarrhal jejunitis in the dead case at 2.5 hours after oral administration of 16 MU ethanol-solubles.

