

下痢性貝毒成分（オカダ酸ならびにペクテノトキシン-2） 投与マウスに関する病理学的研究

Pathological Studies on the Mice Administrated with the
Causative Agent of Diarrhetic Shellfish Poisoning
(Okadaic Acid and Pectenotoxin-2).

石下 真通 佐藤七七郎 安元 健*

Masamichi Ishige, Nanao Satoh and Takeshi Yasumoto.

緒 言

ホタテガイ等の食用二枚貝が食物連鎖によって毒化し、麻痺性貝中毒や下痢性貝中毒などを引き起こすことが知られている。このうち、1976年の宮城県のイガイによる食中毒¹⁾に端を発した下痢性貝中毒は、今や全世界的にその分布が確認²⁾されるようになっている。北海道でも1983年に日本海沿岸各地で多数のこの中毒事例が報告³⁾されており、その後もこの海域の二枚貝の毒化現象は春から夏にかけて毎年発生し、食品衛生上ばかりでなく水産養殖業においても重要問題化している。これまでに、下痢性貝毒化二枚貝から少なくとも11成分の毒成分が単離され、そのうち化学的基本骨格が異なる3群8成分の構造が決定^{2),4),5),6)}されている。第一群に属するオカダ酸(Okadaic acid, OA)は、そもそもクロイソカイメンから単離され⁷⁾、その種名に因んで命名されたもので、ヨーロッパ産ムラサキイガイの下痢性貝毒の主成分であり、C38ポリエーテル脂肪酸の構造を持ち、日本の東北地方の二枚貝からも僅かだが検出されている。その毒性について、体重20gのddY系雄マウスに腹腔内投与して求めた最小致死量は、200μg/kgと推定されており、また薬理学的性状についてもモルモットの腸管平滑筋に非可逆的収縮をもたらすこと⁸⁾が知られている。しかし、OA投与後の実験動物の消化管に及ぼす影響について病理組織学的検索の報告は見あたらない。

第二群に属するペクテノトキシン-2 (Pectenotoxin-2, PTX-2)は、ポリエーテルラクトンの基本骨格を持ち、その毒性はマウス腹腔内投与により約240μg/kgの最小致死量を示すとされている。しかし下痢中毒症状における役割

や、それを投与された実験動物における病理学的变化についての報告はまだ成されていない。

本研究では、OAならびにPTX-2の毒性評価を目的として、それらを経口投与したマウスについて病理学的検索を行った。

実 験 方 法

毒成分：Murata *et al.*, Yasumoto *et al.*の方法^{4,5)}に基づき、OAおよびPTX-2を二枚貝から単離、抽出した。

動物：市販のddY系雄マウスで体重20g前後のものを用いた。

OA投与：体重(kg)あたり2000, 1000, 400, 200μgになるように生理食塩水で希釈したOAを、それぞれ1, 1, 3, 5匹のマウス胃内にステンレス製胃ゾンデを用いて投与した。

PTX-2投与：体重(kg)あたり2500, 2000, 1000, 250μgになるように生理食塩水で希釈したPTX-2を、それぞれ1, 1, 5, 1匹のマウス胃内に同じく投与した。

3匹のマウスについてはOAならびにPTX-2の希釈に用いた生理食塩水0.5mlを同じく投与しコントロールとした。

すべてのマウスについて臨床症状を観察しながら、投与3から6時間後にエーテル麻酔下放血殺し、剖検を行った。主要臓器について、10% formalin液固定・パラフィン包埋・ヘマトキシリン-エオジン染色、PAS染色を、またPTX-2 2000μg/kg投与マウスの肝臓については凍結切片にズダン-III染色を施して、病理組織標本を作成し、鏡検した。

* 東北大学農学部

実験結果

1. OA 投与例

OA を $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与した 5 例中 1 例、 $400\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与の 3 例中 2 例及び $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与の 2 例は投与 30min から 360min 後に水様性下痢便を排泄した。特に、 $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与の 2 例は激しい下痢症状を呈した。

肉眼的所見：OA 投与全例の小腸前半部は水様性内容を充して拡張していた。とくに、 $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与の 2 例において、その状態は大腸にも及び、漿膜面からの観察で小腸全長の充血は明かであった。

組織学的所見：病変は腺胃以下の消化管全長の粘膜に存在し、その広がりと重篤度は投与毒量に比例していた。即ち、 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ および $400\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与例において、小腸前半部は急性カタール性腸炎の像を呈し、粘膜固有層は充血水腫を示して拡張し、粘膜上皮細胞は細胞質に微小なものから大形なものに至る空胞を形成していた。特に、大形の空胞は細胞質の粘膜固有層に面する側に出現していた (Fig. 2)。それら上皮細胞の一部は剥離しつつあるものもあった。また、腺胃も、粘膜固有層の充血と表層粘液細胞の軽度剥離を示した。 $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与例では、小腸はその全長で絨毛のほとんどが脱落し、急性壊死性腸炎の像を呈していた (Fig. 3)。腺胃においても粘膜固有層は充血し、表層粘液細胞の剥離が頻繁に指摘された。盲結腸においても上皮細胞は細胞質に空胞を形成し、ところどころで剥離を示していた。これらの消化管粘膜上皮細胞の細胞質内空胞には液状成分や細線維成分が頻繁に観察された。全例で、消化管以外の臓器組織は肉眼的ならびに組織学的に異常を示さなかった。

2. PTX-2 投与例

PTX-2 を $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与されたマウスは何れも投与直後から行動不活発となり、 $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与の 5 例中 1 例および $2000\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与の 2 例は 90min から 180min 後に粘性ないし水様性下痢便を排泄した。

肉眼的所見： $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与マウス全例の小腸は、その全長に水様性内容を充し、拡張していた。 $250\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与の 1 例も十二指腸部分は水様性内容を充し、軽度拡張していた。 $2000\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与の 2 例の肝臓は中等度の充血を示した。

組織学的所見：病変は投与全例の消化管粘膜と $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与の肝臓に存在し、その広がりと重篤度は投与毒量に比例していた。即ち、 $250\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与例において、小腸前半部の絨毛先端部に配列する粘膜上皮細胞はその少数のものが細胞質に空胞を軽度形成していた。空胞は微細なものから細胞質の大半を占めるものまであり、かつ、細胞質

の表層即ち腸管腔に面する側から形成される傾向を示した。それらの多くは、水腫液や細線維成分を含んでおり、PAS 弱染色の硝子滴も散見された。また、これら空胞形成上皮細胞の一部は微絨毛も消失し、壊死過程を示すものもあった。これら変性上皮細胞近傍の粘膜固有層は軽い充血水腫を示した。 $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与例では、 $250\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与例でみられたと同様の空胞が腺胃から大腸に至る消化管全長の粘膜表層の上皮細胞細胞質に存在した (Fig. 4)。十二指腸粘膜固有層では充血水腫も明かであった。また肝臓では、肝細胞が小葉周辺性に軽い顆粒性変性を示した。 $2000\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与の 2 例では病変はさらに激しいものであった。特に、小腸はその全長で絨毛のほとんどが脱落し、急性壊死性腸炎の像を呈していた (Fig. 5)。胃（腺胃）や盲結腸においても、固有層の充血、表層の上皮細胞の細胞質内空胞形成はより顕著になっていた。肝臓も劇的な変化を示した。即ち、小葉周辺性の傾向の肝細胞硝子滴変性・顆粒性変性と小葉中間帶性の巣状の海綿状病巣の出現であった。この巣状病巣は、肝細胞細胞質の水腫性空胞性変性・硝子滴変性・顆粒性変性、充血と線維素性成分の集積をともなう類洞の限局性の拡張ならびに類洞内皮細胞の水腫性膨化によりもたらされたものであった (Fig. 6)。なお、これら肝細胞にみられた硝子滴は PAS 染色弱陽性を、空胞はズゲン-III 染色陰性を示した。その他の臓器組織は肉眼的ならびに組織学的に異常を示さなかった。

3. コントロール例

コントロールとした 3 例のマウスはいずれも肉眼的ならびに組織学的に異常を示さなかった。

考 察

二枚貝による下痢性貝中毒の症状は、食後 2 時間以内に始まる下痢を主徴とし、吐き気、嘔吐、腹痛、頭痛、眠気を伴なうこと^{1,3)}が知られている。本実験は、毒化二枚貝から単離された化学的構造を異にする二つの成分 OA ならびに PTX-2 をマウスに経口投与することによって、下痢症状を発現させ、しかも病理学的にそれらがカタール性ないし壊死性腸炎に基づくものであることを明らかとした。このことは、OA ならびに PTX-2 が下痢性貝中毒の下痢発症の原因毒素として位置付けられたことを意味している。

OA ならびに PTX-2 同様二枚貝から単離・抽出されているこれら毒素それぞれの誘導体であるディノフィリストキシン-1 (DTX-1) および PTX-1 については、Terao *et al.* が乳呑みマウスを使って病理組織学的検討を行っている⁹。DTX-1 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ を腹腔内投与されたマウスは投与 1 時間以内に小腸絨毛における粘膜固有層の水腫と粘膜上皮細胞の細胞質内空胞形成を示した。一方、PTX-1 を腹腔内

投与されたマウスは肝臓にのみ病変を現わし、胃腸管を含めその他臓器組織には異常を示さなかった。これらのことから、DTX-1は下痢性貝中毒の下痢発症の1つの原因毒素であるが、PTX-1はそれに関与していないと結論している。

本実験において、OAを200から400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 経口投与したマウスは消化管粘膜固有層の充血水腫とそれらの粘膜上皮細胞に細胞質内空胞形成を示し、さらに高毒量投与例では下痢症状を必発し、形態的にも絨毛の脱落に至る壞死性腸炎を呈した。このことは、OAが本中毒における下痢発症の原因毒素の一つであることを示している。また、腸管粘膜上皮細胞の固有層に面する側に形成された細胞質内空胞等の病理像はDTX-1投与マウスで記載されている所見に一致していた。このことはOAとDTX-1のマウス腸管に対する毒作用機序が近似したものである可能性を示唆している。

一方、PTX-2について行った本実験で、250から1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 経口投与したマウスは小腸の粘膜上皮細胞の細胞質に空胞形成を示し、さらに高毒量投与例では下痢症状を必発し、OA投与例同様絨毛の脱落に至る壞死性腸炎を示した。このことは、本中毒症の主徴である下痢発症にPTX-2も少なからず関与していることを意味している。また、腸管粘膜上皮細胞細胞質に形成された大形の空胞がOAでは粘膜固有層に面する側であったのに対比し、むしろ細胞質表層の方から形成されていた。このことは、OAならびにPTX-2によりもたらされる腸管粘膜ないしは粘膜上皮細胞の病変の病理発生がそれぞれ異なる可能性が強いことを示唆している。また、PTX-2 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与例の肝臓には、小葉周辺性の肝細胞硝子滴変性と小葉中間帶性に肝細胞の水腫性空胞変性を伴う海綿状病巣が存在した。これらは、Terao *et al.*がPTX-1腹腔内投与マウスで遭遇した病変ならびに著者らがオホーツク海産ホタテガイ中腸腺から得た粗毒を投与したマウスで遭遇した病変¹⁰⁾に酷似している。このことは、PTX群の毒が含まれた貝の中毒量の摂食によって肝臓障害がもたらされる可能性、同時に、オホーツク海産ホタテガイ中腸腺にPTX群の毒が含まれている可能性を示唆している。一方、Terao *et al.*の実験では、本実験結果と異なり、マウス消化管に病変が存在しなかった。これは、肝臓にもたらされた病理像の酷似性を考慮するならば、PTX-1とPTX-2の標的臓器ならびに毒作用機序が異なっていたためでなく、マウスに対する投与経路が異なっていたことに起因するものと思われる。

現在、OAならびにPTX-2によりもたらされるマウスの消化管ならびに肝臓病変の病理発生について、電顕検索

を含めたさらに詳細な検討を行っている。

結 語

1 下痢性貝毒成分のOAならびにPTX-2についてその毒性評価をマウスを用いて病理学的に追求した。

2 OAならびにPTX-2ともに経口投与を行ったマウスに下痢を発症させ、しかも、それがカタル性ないし壞死性腸炎に基づくものであることが明かとなった。このことは、両者がともに下痢性貝中毒における下痢発症の原因毒素であることを結論付けている。

3 PTX-2については2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与マウスの肝臓に病変を惹起した。このことはPTX群の毒を持った二枚貝による下痢性貝中毒では肝臓にも障害がもたらされる可能性を示唆している。

文 献

- 1) Yasumoto, T. *et al.*: Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 44, 1249 (1978)
- 2) 安元 健: 特定研究・生物トキシン報告集, 41 (1986)
- 3) 佐藤七七郎他: 道衛研所報, 33, 78 (1983)
- 4) Murata, M. *et al.*: Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 48, 69 (1982)
- 5) Yasumoto, T. *et al.*: Tetrahedron, 41, 1019 (1985)
- 6) 李 鍾寿他: 日本水産学会春季大会講演要旨集, 81, (1988)
- 7) Tachibana, K. & Scheuer, J.P.: J. Am. Chem. Soc., 103, 2469 (1981)
- 8) Shibata, S. *et al.*: J. Pharmacol. Exp. Ther., 223, 135 (1982)
- 9) Terao, K. *et al.*: Toxicology, 24, 1141 (1986)
- 10) 石下真通他: 道衛研所報, 36, 9 (1986)

英 文 要 約

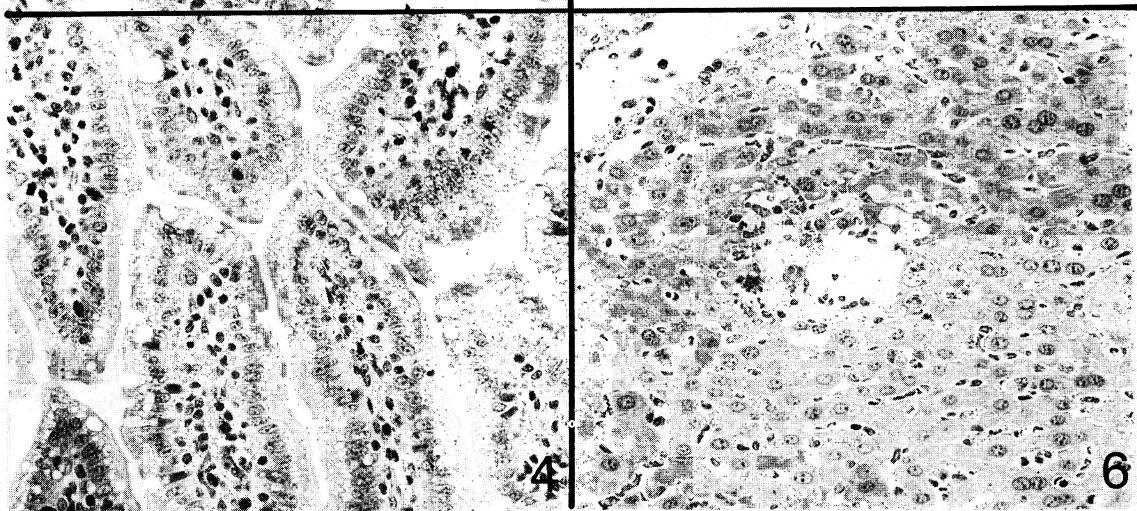
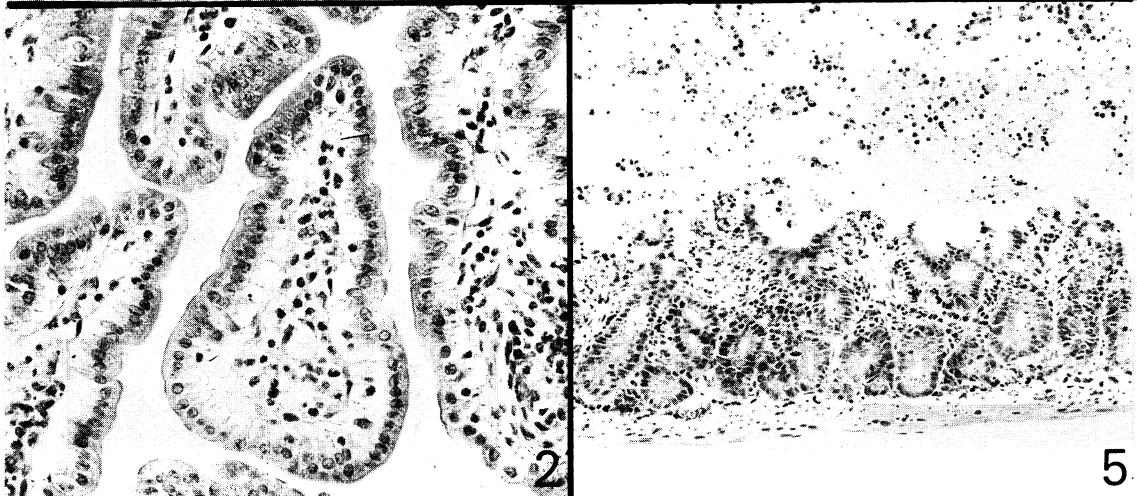
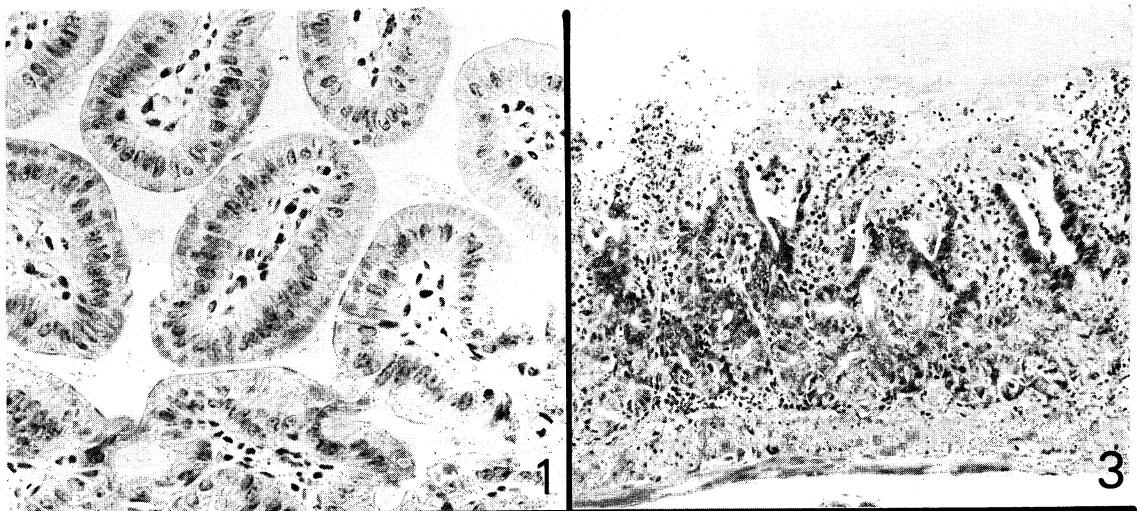
Sequential histological changes were studied in mice after *per os* injection of okadaic acid and pectenotoxin-2, causative agents of diarrhetic shellfish poisoning. Okadaic acid and pectenotoxin-2 induced diarrhetic symptoms and produced severe mucosal injuries in the small intestine of mice from 30 min to 360 min. In addition, Pectenotoxin-2 revealed the hepatic injuries. The hyaline droplet degeneration appeared in the hepatocyte around the peripheral parts of the hepatic lobules and the intermediate zone of its lobules showed the nests of the spongiosis lesions consisting of the hydropic vacuolar degeneration, the hyalinedroplet

degeneration in the hepatocyte, the dilatation of the sinusoids and the hydropic swelling of the endothelial cells.

Key Word: diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, pectenotoxin, mice, pathology.

Legends of figures

- Fig. 1 The normal villi of the small intestine from a control mouse. Haematoxiline and eosine stain (H-E). x300.
- Fig. 2 The villi of the small intestine from a mouse administrated with $250\mu\text{g}/\text{kg}$ of OA. There is marked formation of intracytoplasmic vacuoles in the absorbed epithelium. The vacuoles are mainly confined to the side directed to the lamina propria. H-E. x300.
- Fig. 3 Acute necrotic enteritis on a mouse administrated with $2000\mu\text{g}/\text{kg}$ of OA. H-E. x150.
- Fig. 4 The villi of the small intestine from a mouse administrated with $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ of PTX-2. Therer is marked formation of intracytoplasmic vacuoles in the absorbed epithelium. The vacuoles are confined to the side directecd to the intestinal lumen. H-E. x300.
- Fig. 5 Acute necrotic enteritis on a mouse administrated with $2000\mu\text{g}/\text{kg}$ of PTX-2. H-E. x150.
- Fig. 6 A focal spongiosis lesion in the liver from a mouse administrated with $2000\mu\text{g}/\text{kg}$ of PTX-2. H-E. x300.



4

6

5

3

1

2