HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	イカ食中毒の生化学的研究：第3報 イカ肉アミン類の人血清アセチルコリン・エステラーゼに及ぼす影響
Author(s)	村田, 喜一; 飯田, 優
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 10(1), 77-81
Issue Date	1959-05
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23062
Type	bulletin (article)
File Information	10(1)_P77-81.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

イカ食中毒の生化学的研究

第3報　イカ肉アミン類の人血清アセチルコリン•エステラーゼに及ぼす影響

村田喜一・飯田優
(北海道大学水産学部水産食品化学教室)

Biochemical Studies on Squid Meat Food Poisoning

III. The effect of amines of squid meat on the activivity of human serum acetylcholinesterase

Kiichi MURATA and Atsushi IIDA

Abstract

In the present work, the authors observed the effect of amines of squid meat on the acetylcholinesterase activity in human serum.

Three fractions of amines: total, volatile and non-volatile, were obtained from squid meat which had been kept at 27°C, and each of these fractions was added into enzymic reaction medium.

The results may be stated briefly as follows:

(1) Though, on each fraction, the inhibition to acetylcholinesterase activity increased in proportion to the content of amines, respective inhibition by volatile and non-volatile fraction was always far smaller than that by total fraction. It is reasonable to consider that the inhibition of acetylcholinesterase activity by the amines of squid meat depends upon co-operative action of volatile and non-volatile amines.

(2) The meat which had been kept at 27°C for 0 and 24 hrs. could be eaten, and the fraction of total amines from such meat samples gave 3.5 and 10 per cent inhibition of acetylcholinesterase activity respectively.

アセチルコリンエステラーゼが人体副交感神経のホルモン，アセチルコリンの代謝に関与することは周知の如くであるが，イカ肉食中毒のうち，一部にその症状が，アセチルコリンの異常蓄積によつて起こる症状と似ていることから，岩本氏ら[1]はスルメイカエキスが，アセチルコリンエステラーゼ阻害度の強いこと，特にトリメチルアミンの分離を行いその増加量とアセチルコリンエステラーゼ阻害度とが相対的に増加することから，イカエキス中のトリメチールアミンが人血清アセチルコリンエステラーゼ阻害作用を持つものであると述べている。

他方，宮木・林氏ら[2]は中毒性サンマ桜干しの中毒原因として，ヒスタミンの他にアルカイン，アグマチン，メチールグアニヂンの3種を挙げているが，これら3種のアミンは，さきに著者ら[3][4]の行つた実験で，イカ肉から生成されることを同定確認しているものであり，又トリメチールアミンの増量と共にその量的増加もまた，ペーパークロマトグラフによつて認められたのである。

以上により，スルメイカエキス部のアセチルコリンエステラーゼ阻害度が，トリメチールアミンによるものか，又はエキス中のトリメチールアミン以外のものもこれに与るものか，又は宮木氏らの如く各種アミン類の協働的な作用によつて惹起せられるために，血清コリンエステラーゼに影響を持つものか，これらの関係を知らんとした。即ち宮本氏らが検体として取扱つたイカエキス部を，更に宮木氏等のアルミナ・クロマト法により分割し，先ずトリメチールアミン含有区と，非含有区に分け，両者のコリンエステラーゼに及ぼ

す影響を求めるため，一定温度に貯蔵したスルメイカ筋肉から，アミン類を分離し更にこれを揮発性アミン類，不揮発性アミン類に分割し，これらの窒素量と人血清アセチルコリンエステラーゼに及ぼす影響との関係を検討したものである。

実 験 方 法

1. 試料

供試材料はスルメイカの外套部筋肉を用いた。先ず表皮を剝離したのち短冊形に切つて，滅菌シャーレに入れ，27°C の恒温器に貯蔵し，直後，24時間，48時間並びに72時間経過後のものについて，必要量を採取試験に供した。

2. アミン類の分離と分別

第2報[4]記載の方法に準拠した。即ち筋肉は刻細して10g を採取し，20%トリクロール酢酸をもつて抽出した。

全アミン区……抽出液は予め pH 5.0に調製した，Amberlite IRC-50，100〜120mesh，径 1 cm，高さ15cm のカラムを通過せしめ，吸着部を 2 N HCl で溶出し水洗する。溶出液及び洗液を合して湯浴上で蒸発乾固を繰り返し，遊離塩酸を除去したのち，水を加えて50ccとする。

揮発性アミン区……前段全アミン区にて調製し得た液の20cc を採り，これに水を加えて適当に稀釈した後 1 N NaOHでpH 9〜10として水蒸気蒸溜を行い，溜分を稀塩酸に捕集する。捕集液は前と同様にして遊離塩酸を除去し，水を加えて20ccとする。

不揮発性アミン区……前段水溜残液を濃縮した後，これを稀塩酸を以て中和し，水を加えて全量を20ccとする。

以上の分別法による，各アミン類の再現率は，第1表に示すとおりである。しかして全アミン区，不揮発性アミン区にはNaClの混在することを認めた。

3. 窒素の定量

各アミン区分のアミン量はNmg%で表わした。尚全アミン区の全窒素量は，その硫酸分解液について，又揮発性窒素量は，未分解液について定量したので，特に不揮発性窒素量を定量することなしに，両者の差を不揮発性窒素量として示した。

Table 1. Changes in the amount of amines of squid meat

Fraction of amines \ Time elasped (hrs.)		0	24	48	72
Total	(N mg%)	49.22	96.88	349.20	429.56
volatile	(〃)	21.52	32.03	272.23	348.15
non-volatile	(〃)	27.70	64.85	76.97	81.41
Volatile	(N mg%)	21.38	31.64	263.66	322.35
Recovery	(%)	99.35	98.78	96.85	92.59
Non-volatile	(N mg%)	27.70	64.83	76.94	81.37
Recovery	(%)	100	99.97	99.96	99.95

Recovery …… N mg% of volatile and non-volatile fraction was reduced with them respectively in total fraction.

4. 各アミン区溶液の人血清アセチルコリン・エステラーゼに対する阻害作用の測定

アセチルコリン，アセチルコリンエステラーゼの反応系の上で得た，各アミン区分溶液を添加して，酵素活性の変化を見た。酵素活性の測定は岩本氏[1]らの方法を一部改修して行つたもので，第1図はその概要を示したものである。

+ 2cc of M/5 phosphate buffer at pH 7.4
+ 1cc of 0.02M acetylcholine chloride
+ 0.5cc of acquor solution of inhibitory materials
+ 0.5cc of human serum …… 0.1cc original serum was diluted to 0.5cc with aquor before using

↓ incubated at 37°C for 1 hr.

+ 1cc of 3.5M NaOH
+ 1cc of 2M hydroxylamine hydroxide

↓ kept at room temp. after shaking

+ 1cc of 12% HCl
+ 1cc of 0.37M ferric chloride

↓ Optical density was measured with AKA type electro-photometer at 530mμ

Fig. 1 Determiminating method of the activity and inhibity of human serum acetylcholineterase in the presence of some inhibitory materials

基質にはアセチルコリンクロライド，酵素液は健康女子の血液 100cc より遠心分離した血清を用いた。而して本血清のアセチルコリンエステラーゼ活性は 83.1±0.3% であり，これを水を加えて5倍容に稀釈して使用した。アミン類溶液の供試量は0.5ccで，筋肉0.1g に相当する。

反応液の比色定量はAKA 型光電比色計を用い，セル 5 mm，波長530mμに於ける吸光値を読み，各シリーズの吸光値を

A……血清を添加しないもの

B_0……供試液を添加しないもの

B_n……血清，アセチルコリン及び供試液を添加したもの，とした。

又全アミン区と不揮発性アミン区の溶液は混溶している NaCl が酵素活性を阻害するので，これを控除する操作を行つた。即ち NaCl 0～4.0% の各溶液を供試液として第1図の方法に準じて吸光値を求め，食塩溶液を加えたものの吸光性をC_m，加えざるものの吸光値をC_0とし，$C_m-C_0=C_n$と食塩濃度との関係を求めて第2図に示すが如き結果を得た。

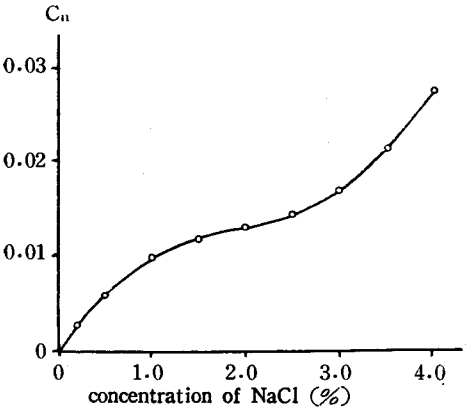

Fig. 2. Relation between the concentration of NaCl and the defference of optical density C_m-C_0 ($=C_n$)

一方溶液中の塩素量をMohr法で滴定，食塩濃度を知り，第2図からC_nを求めた。これらの吸光値を用いて酵素活性と活性阻害度を次の如くにして示したが，これらはアミン類溶液0.5cc存在下の血清0.1cc当りの値を求めたことになるのである。

アセチルコリンエステラーゼ活性度＝

$$100\times\frac{A-(B_n-C_n)}{A}(\%)$$

アセチルコリンエステラーゼ活性阻害度＝

$$100\times\left\{1-\frac{A-(B_n-B_0-C_n)}{A}\right\}(\%)$$

試験結果及び考察

第2表はその成績を示したもので，前記の条件でイカ肉を処理すると，24時間経過後には多少アンモニア臭を放つが，イカ独自の臭いが勝り，食用に供して何等の支障ないが，48時間経過により，アンモニア臭強く，辛じて加熱することにより食用に供し得ると云う程度で普通一般の食品としては不適当であり，72時間経過後のものは，アミン臭強く，外観も悪く食用の対象にはなり得ないものとなつていた。随つて24時間処理の筋肉が普通の正常なる食品として考え得られる限界であろう。

Table 2. The activity* and inhibition* of acetylcholinesterase of human serum † in the presence of amines of spuid meat

	Fraction of amines	Time elasped (hrs.) 0	24	48	72
Acetylchollnesterase activity (%) in the presence of	total	79.50	73.04	60.00	43.41
	volatile	82.83	83.07	79.39	76.95
	non-vlatile	82.00	79.00	75.69	71.56
Inhibition (%) of acetylcholinesterase by	total	3.48	10.43	23.02	39.45
	volatile	0.15	0.30	3.58	6.08
	non-volatile	1.29	4.30	7.41	11.26
Inhibition (%) of acetylcholinesterase per 1 mg% nitrogen of	total	0.07	0.11	0.07	0.09
	volatile	0.00	0.00	0.01	0.02
	non-volatile	0.05	0.07	0.10	0.14

※……Activity and inhibition was exhibited on 0.1cc human serum in the presence of 0.5cc solution of amines.

†……This serum gave 83.1±0.3% acetylcholinesterase activity.

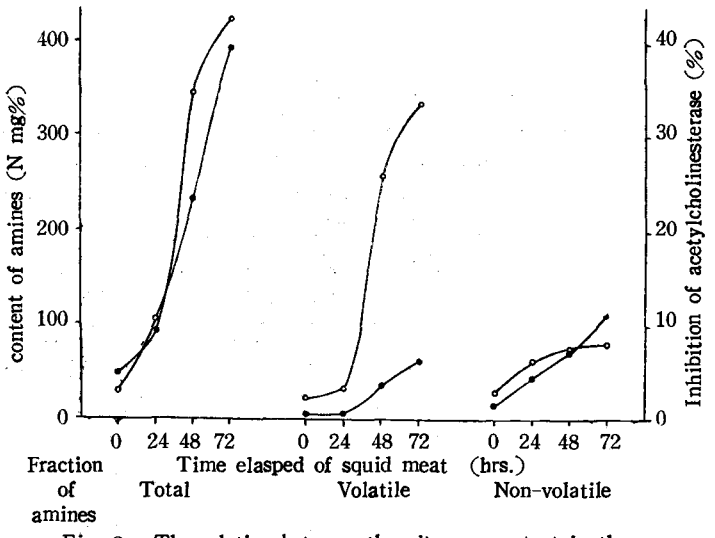

Fig. 3. The relation between the nitrogen content in three fractions of amines and the inhibition of acetylcholinesterase by these each fraction

○……nitrogen content ●……inhibition

尚本実験のアミン類の分別法は，揮発性区分の再現率は窒素量が多くなると幾分低下の傾向を持ち，例えば21.38mg%～31.64 mg%の場合は99.35～98.76%であつたが，263.66～322.35mg% においては96.85～92.5%を示すが如くであつたが，不揮発性区分の再現率は極めて良好で，窒素量の増大によつても殆んど変化を見なかつた。

第3図は各区分のアミン窒素量とアセチルコリンエステラーゼ活性度及び阻害度との関係を示したもので即ち各アミラン区分は窒素量が増加すると，エステラーゼ活性に対する阻害度も増加するが，全

アミン区分の阻害度は他の2区分の各阻害度より常に大きく且つそれら2区分の阻害度の積算値よりも大である。また揮発性区分アミン類と不揮発性区分アミン類の阻害度は，分別時の再現率を考慮に入れても尚幾分不揮発性区分高く，尚窒素1mg%当りの阻害度も不揮発性区分アミン類に於いて大である。以上より人血清コリンエステラーゼに及ぼすイカ肉アミン類の阻害作用は，揮発性区分或いは不揮発性区分のアミンの何れかが特に作用を持つものと断定し得ないもので寧ろ両区分アミン類の協働作用によつて生起せられるものと考えるのが妥当であろう。

要　　約

イカ肉を一定温度（27°C）に保存中に於けるアミンの生成と，これら全アミン類，揮発性アミン類，不揮発性アミン類の3区分のアミン類含有量と，人血清アセチルコリンエステラーゼ活性に対する影響との関係について試験を行い次の結果を得た。

1．各アミン区分に於いては，イカ肉の処理時間の経過と共に，窒素量も，コリンエステラーゼ活性に対する阻害度も共に増加したが，全アミン区に於ける阻害度は，揮発性アミン区，不揮発性アミン区に於けるものより常に大であり，且つこれら二者の積算値より大きい。即ちコリンエステラーゼ活性に対するイカ肉アミン類の阻害作用は，或る特定のアミンに依るもの，例えばトリメチールアミンに原因しているが如きと断定するよりは寧ろ各アミンの協働作用によるものと考えるのが妥当である。

2．前段の条件でイカ肉を処理したものは，24時間経過後に至るまで普通一般の正常なる食品として供し得るものであつたが，これらの筋肉より分離した全アミン類区分0.5cc（筋肉0.1g相当）は0.1ccの血清に対し，そのアセチルコリンエステラーゼ活性を，3.5%の阻害度から24時間の経過によつて10%に及ぶ阻害度に増進している。随つてイカ肉を摂取した場合，経過時間と共にその生成アミン類が次第に血清アセチルコリンエステラーゼ活性を阻害して行く可能性も考え得られる。

文　　献

1）岩本多喜男・安藤芳明・井上勝広（1956）．薬学会誌 **76**，783．
2）宮本高明・林誠（1954）．千葉腐敗研究所報告 **6**，90．
3）村田喜一・大石圭一・飯田優（1957）．北大水産学部研究彙報 **8**，74．
4）――――・――――・――――（1957）．同　　誌 **8**，81．