HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ナガズカ卵巣の毒性物質：第1報 毒性物質の抽出とその化学的性質
Author(s)	羽田野, 六男; 座間, 宏一; 高間, 浩蔵; 坂井, 稔; 五十嵐, 久尚
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 15(2), 138-146
Issue Date	1964-09
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23226
Type	bulletin (article)
File Information	15(2)_P138-146.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ナガズカ卵巣の毒性物質*

第1報　毒性物質の抽出とその化学的性質

羽田野六男・座間宏一・高間浩蔵・**坂井稔・五十嵐久尚
(北海道大学水産学部水産化学教室)(**北海道大学水産学部微生物学教室)

Toxic Substance of the Roe of Northern Blenny

I. On the extraction of toxic substance and its chemical properties

Mutsuo HATANO, Kōichi ZAMA, Kōzō TAKAMA,
Minoru SAKAI and Hisanao IGARASHI

Abstract

The food poisoning of the roe of northern blenny, *Stichaeus grigorjewi* HERZENSTEIN, for its eater has been reported occasionally in Hokkaido, Japan.

The symptoms of the poisoning are mostly gastrointestinal troubles, viz., vomiting, diarrhea, abdominal pains and lassitude. In severe cases there may be death.

An unknown toxic substance was found in this roe. Small quantities of the acetone extract injected intraperitoneally into a mouse caused bristling up the hair coat, severe paralysis in limbs, and at last death in about 24 hours.

This toxic substance possibly consists of glycerol, choline, phosphorus, fatty acids and amino acids, showing acidity in nature as found positive in the bromphenol blue test.

The infrared spectrum (KBr) showed characteristic absorption at 1730, 1675, 1645 and 1570 cm^{-1} and rich discrete absorption in the 900 to 1500 cm^{-1} region at 1470, 1235 and 1085 cm^{-1}.

緒　　言

フグを除く魚類の卵巣に原因する食中毒をIchthyoötoxismと称し，ヨーロッパ，アジアの各地方で古くから発生しているが，フグ毒の本体がほぼ究明されたのに反しその化学的研究はほとんど行なわれていない。

魚卵食中毒に関しては McCrudden[1] による Barbel, *Barbus fluviatilis* (ニゴイに類似) の魚卵に原因する Barben cholera の研究に端を発し，その後 Barbel および Pike, *Esox lucius* (カワカマス属)の魚卵毒性物質[2]についても化学的研究を行なった結果，その本体を水溶性の Toxalbumin であると報告した。また Phisalix[3] は Fresh-water bream, *Abramis* (アナゴに類似) と Fine-scaled carp, *Schizothorax* (ニゴイに類似) に，Schultz[4] および Walford[5] は Cabezon, *Scorpaenichthys marmoratus* (カジカの一種) の魚卵も同様に食中毒をおこすと述べ，Hubbs[6] は 1923 年に自ら試

---

* 昭和 38 年 10 月　日本水産学会秋季大会 (小樽) にて講演

食試験を行ない悪寒と発熱，嘔吐と下痢の症状のあることを認め，さらに 1950 年に水とのホモジネートをラット，モルモットに経口投与しその毒性を確認した。

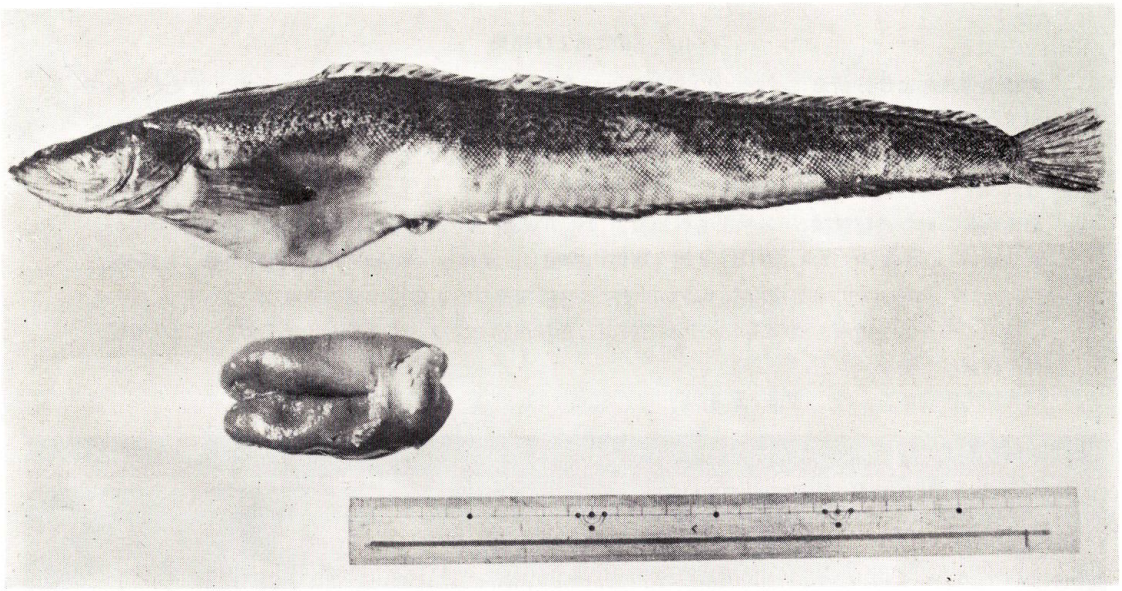

Fig. 1. The upper shows a female northern blenny, *Stichaeus grigorjewi*, and the lower shows its ovary

ナガズカ *Stichaeus grigorjewi* はタウエガジ科に属しわが国北方海域に広く分布しており，その肉は煉製品原料として利用されている。卵巣は一見タラの卵巣に似ているが有毒であり，これに原因する食中毒がしばしば発生し食品衛生上注目されている。しかしその毒性物質は未だ確認されておらずその防止対策も明らかにされていない。

ナガズカの卵巣については古くから産地の住民の間で食中毒を起すことが知られていたが，最初に高柳ら[7]によって嘔吐，下痢，腹痛などの胃腸障害をおこすことが発表された。その後浅野ら[8]はその毒性物質が Ichthulin 様の有毒性リポ蛋白質であり，その脂質部分にも蛋白質部分にも毒性があると述べ，特にこのリポ蛋白質を Dinogunellin と命名している。一方坂井ら[9]は胃腸障害の他に神経系にも障害を起すことを認め，毒性物質は含水アセトンで抽出され，コリン含有燐脂質と極めて関係が深いことを報告した。さらに卵巣と生理食塩水とのホモジネートを遠沈した場合[10]，浮上脂肪層および水層には毒性はなく，沈渣に毒性を認めた。さらにこのホモジネートをトリプシン消化を行なっても毒性の差異はなく，また抗毒素免疫の獲得は認められないことからしてその毒性物質が蛋白質であることは疑わしいと報じている。

著者らはこの毒性物質の究明を行なっているが，本報では抽出条件および抽出物の毒性に対し二，三の知見を得たので報告する。

ナガズカ卵巣による食中毒の一般的症状

昭和 36 年，37 年にこの種の食中毒が発生し正確な調査がなされた数例からみると，ナガズカの卵巣を調理し摂食後 2～4 時間にして突然激烈な腹痛と嘔吐感に襲われ，数度にわたり嘔吐，下痢を繰り返えし，悪寒，顔面蒼白，心臓部の苦痛を訴え，全身違和・倦怠，頭痛，眩暈等を感じ，重症者に

あっては手足の麻痺，痙攣をおこし失神することもある。大体は 3～5 日後には回復するが，重症の場合は経過も永引き約1ケ月にわたり症状の消散を見ない場合もあり，また摂食後 12 時間にして死亡した例もある。

実験および結果

実験操作法および分析法： 抽出液の濃縮および溶剤の溜去はすべて 40°C 以下窒素ガス気流中減圧下で行ない，P は Fiske-Subbarow 法，N は Conway 微量拡散分析法，沃素価は Wijs 法によって測定した。また赤外線吸収スペクトル（IR スペクトル）は KBr 製錠を行ない光研 DS-301 型赤外分光光度計によって 4000–650 cm^{-1} の吸収を測定した。

毒性物質の動物接種試験： 各抽出毒性物質を 1% Tween 80 水溶液に懸濁させた後，その 0.5 ml を体重 25 g 前後のマウス（NIH）2 尾宛腹腔内接種し，接種量，致死時間より毒性の強さを調べた。（なお 1% Tween 80 水溶液のみ 0.5 ml をマウスに接種しても毒性は認められない。）

特にアセトン抽出液を濃縮後エーテルで抽出した抽出物をマウスに接種し，その症状および解剖所見を観察した結果，

共通的症状としては，（Fig. 2. a, b）

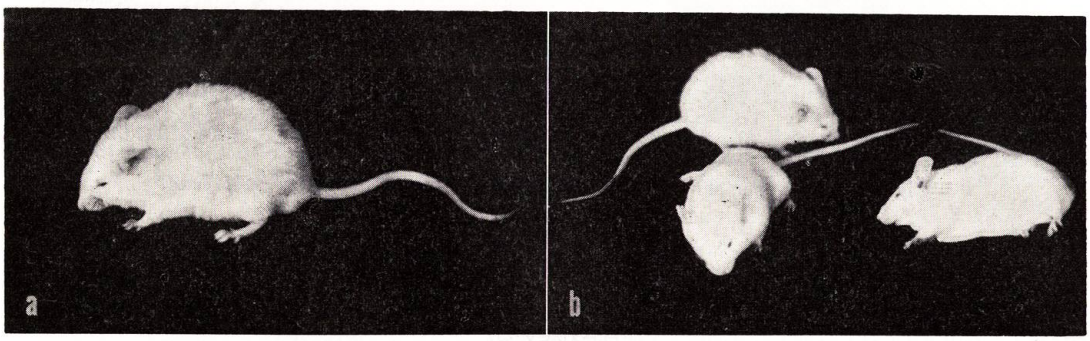

Fig. 2. The sick mice, caused by intraperitoneal inoculation of the extracted toxic substance from the roe

a: Dullness of the hair coat, bristling up the hair coat, blepharoptosis, developed visual disturbances and photophobia as observed 5 hrs. after inoculation

b: Loss the reflex of the eyelid, the cornea and the skin, marked paralysis of limbs, especially the hind legs as observed 20 hrs. after inoculation

約 3～4 時間後： 被毛光沢消失，毛を逆立て，運動緩慢となる。

約 6～8 時間後： 眼症状現われ，羞明症状甚し。

約 16～20 時間後： 眼瞼を閉じ，不安状態を示しケージの隅にかたまってうずくまる。

24 時間前後（末期）： 眼瞼・角膜・皮膚等の反射機能はほとんど消失，尾力は全く欠如し，四肢特に後肢の麻痺著明。死にいたる。

共通的解剖所見としては，(1) 肝臓の溷濁腫張，(2) 小腸の充出血，(3) 腎臓および脾臓の出血，(4) 副腎の肥大，(5) 全身リンパ節における血液吸収，水腫性腫大ならびにリンパ装置における出血，(6) 血液凝固稍々不良

などの所見が観察された。

試料： 昭和 38 年4月 26 日，5月9日に北海道森町沿岸で漁獲されたナガズカの卵巣の成熟したもの 22.4 kg（324 葉）を用いた。

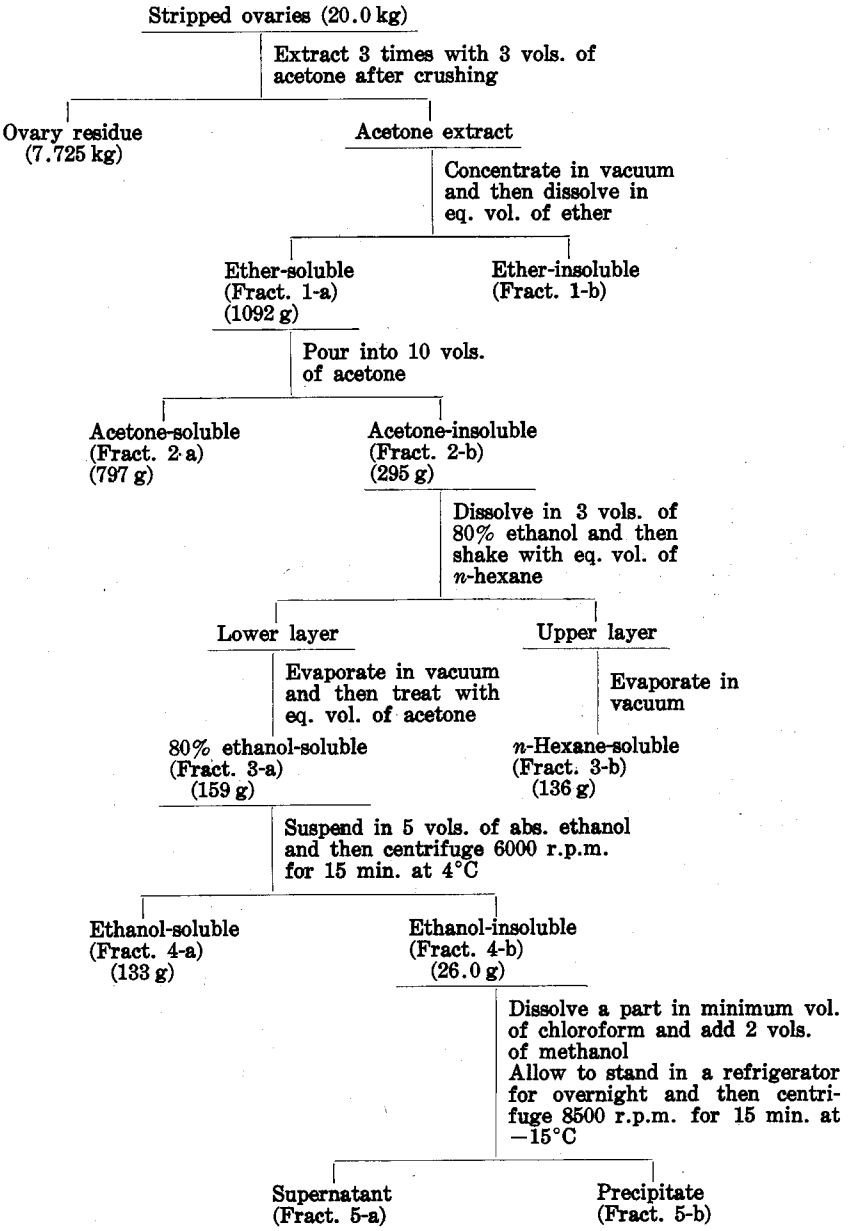

Fig. 3. Extraction and fractionation of toxic substance from the roe of northern blenny

試料の調製と毒性物質の溶剤分画： 卵巣 (22.4 kg) から卵巣膜を除去した卵を磨砕しその 20.0 kg を Fig. 3 に示すごとく調製した。各画分の分析とマウスに対する接種試験および IR スペクトルはそれぞれ Table 1, 2 と Fig. 4 に示す通りである。なおナガズカ卵巣レシチンとサケ, *Oncorhynchus*

Table 1. Properties of each fraction

Fraction no.	Fraction obtained	Description	P, %	N, %	N/P*	Sapon. no.	Acid no.	Iod. no.	n_D^{20}
1-a	Ether soluble	Yellowish viscous liquid	1.64	1.12	1.51	186.8	3.1	185.8	1.4926
1-b	Ether insoluble	Light yellow powder	—	—	—	—	—	—	—
2-a	Acetone soluble	Yellowish oily liquid	trace	trace	—	171.3	1.8	197.8	1.4885
2-b	Acetone insoluble	Brownish curdiness	3.33	1.47	0.98	—	—	162.5	—
3-a	80% Ethanol soluble	Brownish curdiness	3.34	1.90	1.26	—	—	141.5	—
3-b	*n*-Hexane soluble	Brownish viscous oil	3.36	1.53	1.01	—	—	171.8	—
4-a	Ethanol soluble	Brownish viscous oil	3.40	1.46	0.96	—	—	153.9	—
4-b	Ethanol insoluble	Dark yellow powder	3.95	7.35	4.11	—	—	128.2	—
5-a	Supernatant	Dark yellow viscous liquid	4.24	4.80	2.51	—	—	131.5	—
5-b	Precipitate	Pale yellow powder	3.92	11.55	6.54	—	—	126.5	—
Control-1	Lecithin, northern blenny roe	Brownish curdiness	3.16	1.44	1.00	—	—	168.7	—
Control-2	Acetone insoluble, salmon roe	Brownish viscous oil	3.12	1.42	1.00	—	—	75.4	—
Control-3	Acetone insoluble, pollack roe	Brownish viscous oil	3.18	1.65	1.15	—	—	75.3	—

* Molar ratio

Table 2. Toxicity of each fraction by intraperitoneal injection into mice*

Fraction no.	Amount injected (mg. extract/g. mouse)	Hours until death after injection
1-a	0.55	60, Survived
1-b	0.55	Both survived
2-a	0.80	Both survived
2-b	0.44	24, 48
3-a	0.38	19, 40
3-b	0.35	40, 72
4-a	0.33	48, 48
4-b	0.30	15, 16
5-a	0.32	17, 20
5-b	0.26	10, 10
Control-1	0.50	Both survived
Control-2	0.50	Both survived
Control-3	0.80	Both survived

* Two mice were used for each fraction.

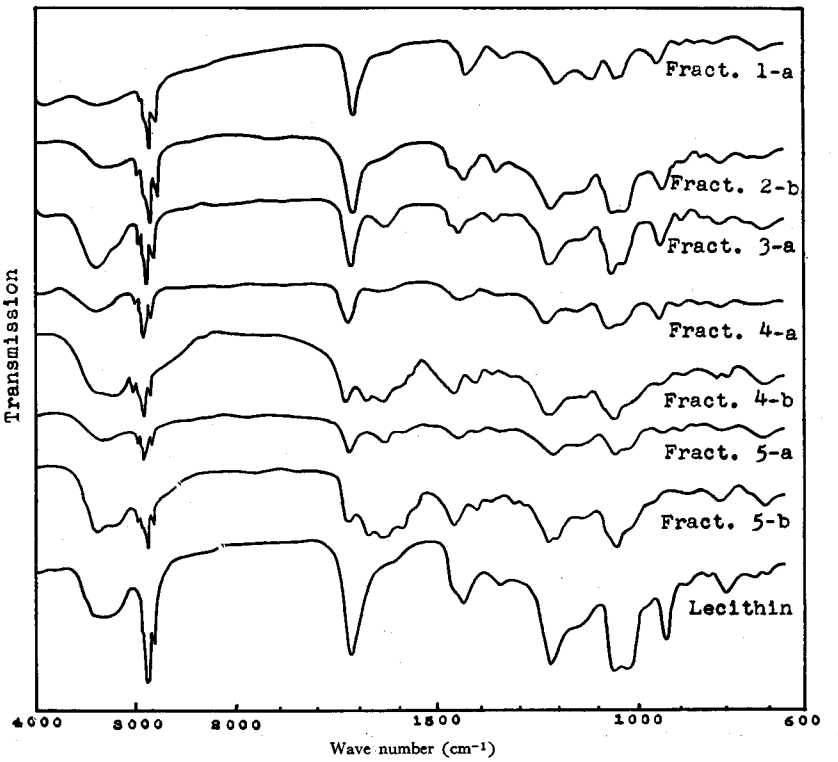

Fig. 4. Infrared spectra of each fraction, passed in KBr

keta およびスケトウダラ, *Theragra chalcogramma* の卵巣を処理し Fig. 3 の Fraction 2-b に相当するアセトン不溶部を対照試験に供した。

Fraction 5-b のセルローズパウダー・カラムクロマトグラフィー: 前述の Fraction 5-b, 1.5 g をさらにセルローズパウダー・カラムクロマトグラフィーによって分画を試みた。即ちセルローズパウダー (Whatman cellulose, standard grade) 50 g をカラム (2×44.5 cm) に充塡, クロロホルムで洗滌後, 試料をクロロホルム 20 ml に懸濁させて注入し, クロロホルム, クロロホルム-メタノール, メタノール, 水の順で溶出を行ない, Table 3 に示す結果を得た。

Table 3. Fraction 5-b chromatographed over powedered cellulose

Fraction no.	Eluting solvent (ml)		Yield (mg)	Mouse test*	
				Amount injected (mg. extract/g. mouse)	Death time (hrs.)
5-b-1	$CHCl_3$	170	236	0.14	12, 12
5-b-2	$CHCl_3$	100	4	—	—
5-b-3	$CHCl_3$-MeOH (2:1)	42	107	0.12	12, 12
5-b-4	MeOH	150	51	0.50	Both survived
5-b-5	H_2O	100	72	0.55	Both survived

* Also two mice were used.

さらに各溶出区分をペーパークロマトグラフィーにより定性的に検索した結果は Table 4 に示す通りである。

Table 4. Paper chromatography of powdered cellulose chromatographic fraction (R_F values)

	5-b-1		5-b-3		5-b-4					5-b-5	
Phosphorus	0.41	0.60	0.41	0.57	—	—	—	0.50	0.60	0.05	—
Choline	0.40	—	0.40	—	—	—	—	—	—	—	—
Lipid	0.40	0.57	0.36	0.60	—	—	—	0.48	0.62	—	—
Aldehyde	—	0.60	—	0.60	—	—	—	—	0.62	—	—
Amino base	0.40	—	0.40	—	0.04	0.28	0.32	0.50	—	0.04	0.15
Acidic compound	0.40	—	0.40	—	—	—	—	—	—	—	—

Ascending chromatography was carried out at room temperature for 15 hours on dilute HNO_3-treated paper (Tōyō No. 51) and employing *n*-BuOH/ethyleneglycol/H_2O (4:1:3) as solvent.

The spots were detected by staining with acid-molybdate solution, phosphomolybdic reagent, Rhodamine 6 G solution, Schiff's reagent, ninhydrin reagent and bromphenol blue reagent.

Table 3 の結果より毒性の認められるのは Fraction 5-b-1 と 5-b-3 であるが, これらはいずれも淡黄色の粉末であり, 空気中に放置すると次第に褐色を呈してくる。これらのものの IR スペクトルは Fig. 5 に示す通りである。

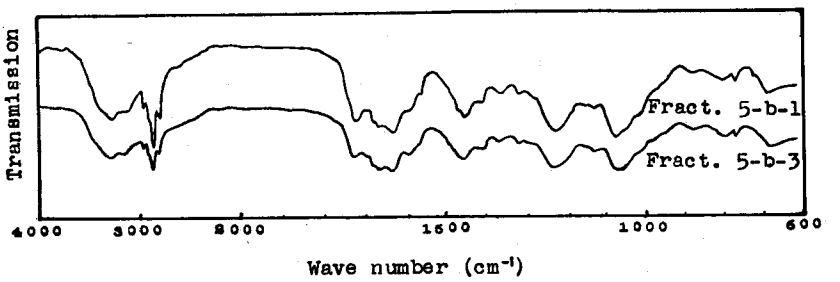

Fig. 5. Infrared spectra of toxic substance separated from Fraction 5-b by cellulose powder column chromatography

毒性物質の酸加水分解： Fraction 5-b-1 は未だ精製不充分ではあるが，一応その構成々分をみるために，6N·HCl により封管中で 100°C, 24 時間加水分解し，クロロホルム可溶部（構成脂肪酸）を除去した水溶性物質をペーパークロマトグラフィーにより定性的に検索し Table 5 に示す結果を得た。

Table 5. Paper chromatography of 6N-HCl hydrolysates of Fraction 5-b-1 (R_F values)

Amino base*				Glycerol and Inositol**	
0.12	Cys.	0.42	Ala.	0.14	Inositol
0.19	?	0.45	Tyr.	0.21	?
0.22	Arg.	0.54	Ethanolamine	0.37	?
0.30	Ser.	0.62	Val.	0.55	Glycerol
0.38	Thr.	0.68	Phe.		
0.40 (Yellow)	Pro.	0.75	Leu.		

Ascending chromatography was carried out at room temperature for 17 hrs. on Tōyō No. 51A filter paper and employing *n*-BuOH/AcOH/H_2O (3:1:1) as solvent. The spots were detected by staining with ninhydrin reagent* and Hough's reagent**.

考察および総括

ナガズカの卵巣のアセトン抽出物をエーテルで抽出し，濃縮後アセトンで処理して得られたアセトン不溶画分（Fraction 2-b）はマウスに対して毒性を示した。なお対照試験としてサケおよびスケトウダラの卵巣を同様に処理して得られたアセトン不溶画分は毒性を示さない。このことからして本毒性物質はナガズカの卵巣にのみ存在する特有なものであることが推定された。また溶剤分画（Fig. 3）の結果，Table 1, 2 に示すように N/P のモル比の増加とともに毒性が強くなってくる傾向がみられ，その他沃素価も対照試料のサケ，スケトウダラ卵巣のそれと比較してかなり高いことが認められた。次いで IR スペクトル（Fig. 4）が 1550～1675 cm^{-1} の波数領域における吸収の強度が増加するに従い毒性も強くなる傾向が認められる。このことはこの波数領域に α, β 不飽和カルボニール（1675 cm^{-1}），アミド I（1645 cm^{-1}），C=C 不飽和結合（1640 cm^{-1}），アミド II（1570 cm^{-1}）などの吸収帯が存在するのであるが，ナガズカ卵巣レシチン（Control-1）と比較してみると Control-1 には構成脂肪酸[11]として高度不飽和酸が著量に存在するにもかかわらず，これらの吸収は認められない。

また N/P の値が 1.00 より大なることから考えてもこの吸収帯は α, β 不飽和カルボニール，アミド I. アミド II に由来するものと考えられる。

セルローズ・パウダー・カラムクロマトグラフィーによって毒性物質の単離と精製を試みたが，充分な結果は得られなかった。しかし毒性物質はクロロホルムによって溶出され，IR スペクトル (Fig. 5) は 3400 cm^{-1} (O-H, N-H), 2900 cm^{-1} (C-H), 1730 cm^{-1} (C=O エステル), 1675 cm^{-1} (α, β 不飽和カルボニール), 1645 cm^{-1} (アミド I), 1570 cm^{-1} (アミド II), 1470 cm^{-1} ($-CH_2$, CH_3), 1235 cm^{-1} (P=0), 1085 cm^{-1} (P=O) の波数に主な吸収帯を有する。なおペーパークロマトグラフィー (Table 4) の結果より R_F 値 0.40 と 0.60 のスポットを有するが，毒性を示さない Fraction 5-b-4 と比較して R_F 0.60 のスポットが共通しているので R_F 0.40 のスポットを示すものがこの毒性物質の本体と考えられる。このものは燐，コリンおよびアミノ基を有し，かつ Bromphenol blue 試薬によって呈色される脂質である。さらに Fraction 5-b-1 を塩酸加水分解した結果 (Table 5), 11 種のアミノ酸とエタノールアミン，グリセロールとイノシトール，未確認の糖 2 種が検出され，コリンは 2.95% (ライネッケ塩法) の値を示した。

従ってこれらの点から総合して考えてみると，コリンを含む燐脂質の一種であるレシチンのみでは毒性を示さないが，レシチンをも含めてコリンを含有する燐脂質のうちの一種とペプタイドよりなる酸性物質が，本毒性物質の本体と極めて関係が深いことが推察された。

またマウスの接種試験結果より現在までの段階でマウスの体重 1 g 当り毒性物質 120 γ で 12 時間で致死させる毒性を有した。

本研究を遂行するに当り，本学理学部松本毅教授に終始御懇切なる御指導を賜り，動物接種試験については本学部微生物学教室木村喬久，絵面良男の両氏に，試料の採取には道立森保健所坂正紀所長，林功係長に御援助を頂いたことをここに記し，厚く感謝の意を表する次第である。

文 献

1) McCrudden, F. H. (1910). *Proc. Amer. Soc. Biol. Chem.*, ix.
2) McCrudden, F. H. (1921). *Arch. exptl. Path. Pharm.* **91**, 46-80.
3) Phisalix, M. (1922). *Poissons toxicophores: Animaux venimeux et venins.* **Vol. I**, 488-615 p., Paris, Masson.
4) Walford, L. A. (1931). *Fish Bull.* (28) 1-181, [127 p.], illustr.
5) Schultz, L. P. and Stern, E. N. (1948). *The ways of fishes.* xii, [264 p.], illustr. D. Van Nostrand Co., London.
6) Hubbs, C. L. and Wick, A. N. (1951). *Calif. Fish Game* **37**, 195-196.
7) 高柳文雄・佐藤富夫・北村輝子 (1953). 第5回北海道公衆衛生学会講演抄録, 46.
8) Asano, M. and Itoh, M. (1962). *Tohoku J. Agr. Res.* **13**, 151-167.
9) 坂井稔・木村喬久・信濃晴雄・絵面良男・坂正紀・林功 (1962). 食品衛生研究, **12**, 53-68.
10) ——・——・——・——・——・—— (1963). 日本水産学会秋季大会 (小樽) にて講演.
11) 五十嵐久尚・座間宏一・羽田野六男 (1964). 日水誌, **30**, 519-522.