HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ナガズカ卵巣の毒性物質：第2報 毒性リポ蛋白質Lipostichaerinの抽出
Author(s)	羽田野, 六男
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 20(4), 320-328
Issue Date	1970-02
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23407
Type	bulletin (article)
File Information	20(4)_P320-328.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2報　毒性リポ蛋白質 Lipostichaerin の抽出

羽田野六男*

Toxic Substance of the Roe of Northern Blenny
II. Extraction of toxic lipoprotein, lipostichaerin

Mutsuo HATANO

Abstract

A toxic substance was extracted and fractionated from the roe of northern blenny, *Stichaeus grigorjewi*. The toxicity of the extracts for mice indicated that the toxic substance was in 4% and 10% NaCl extracts, but not in the aqueous extracts.

By means of ammonium sulfate fractionation for 10% NaCl extracts, the toxicant was precipitated at 30% and 50% ammonium sulfate saturation. The infrared and ultraviolet absorption spectra of both precipitates showed protein nature. Initial extracts and each precipitate were separated into 4 bands respectively, by cellulose acetate electrophoresis using veronal buffer at pH 8.6. Band-a was in origin but band-b, -c and -d migrated towards the anode, and the latter three were lipid positive. The electrophoretic pattern of each fraction was distinct. Evident correlations between electrophoretic patterns of these fractions and their toxicities were hardly clarified. The toxic lipoprotein fractions were delipidated according to the method of Gustafson. The Lipid moiety was positive of toxicity test but the denatured protein moiety was not tested.

These 30% and 50% ammonium sulfate saturated precipitates were found toxic lipoproteins natured, the same as 'lipostichaerin' suggested by Asano and Itoh.

緒　　言

ナガズカ *Stichaeus grigorjewi* はわが国北方海域に広く分布しており，その肉は練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，過去には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たが，現在は保健所その他関係機関による指導と監視によってこの種の食中毒の発生はみられない。

このナガズカ卵巣の毒性物質の本体はまだ確認されてはいないが，坂井ら[1)2)3)]は含水アセトンで抽出される脂質性物質であるとし，また卵巣と生理的食塩水とのホモジネートを遠心分離すると浮上する脂肪層と水層には毒性はなく沈渣にのみ毒性が存在する。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は低下せず抗毒素免疫の獲得も認められないことからして，その毒性物質が蛋白質とすることは疑わしいと報告している。一方 Asano ら[4)5)]はコリンプラズマローゲン抽出の Thiele 法によってえたアセトン不溶性脂質とエタノール不溶性脂質の二種の脂質とに毒性を認めたほか，10

* 北海道大学水産学部食品化学第一講座
(*Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

% 食塩水で抽出を行ない遠心分離によって3種のリポ蛋白質に分画しそれぞれに毒性を認めた。このものをそれぞれ α-, β-, γ-lipostichaerin と命名した。さらに前述のエタノール不溶性脂質は N/P のモル比が 8.02 と高い値を示すことよりしてリポ蛋白質あるいはリポペプタイドを含むものであるとし

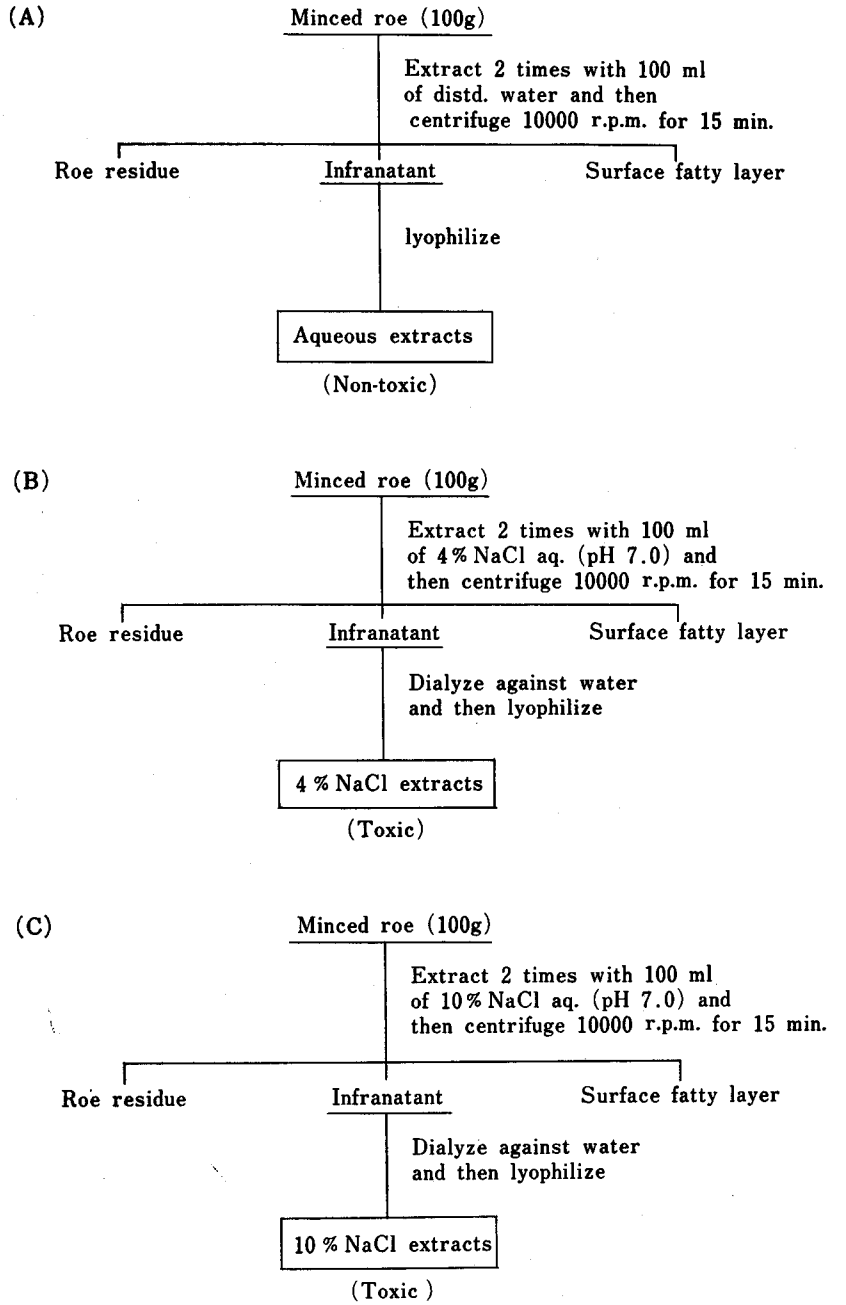


Fig. 1. Non-lipidic extracts from the roe with various procedures

δ-lipostichaerin と命名している。

著者は前報[7]において毒性物質が脂質性物質であると述べたが，リポ蛋白質とする説もあるのでこれらの点を明らかにする目的で実験を行ないリポ蛋白質区分にも毒性が存在することを認めたので報告する。

実 験 お よ び 結 果

実験方法: P は Fiske-Subbarow 法，N は Micro Kjeldahl 法．蛋白質の定量は Biuret 法，蛋白質の電気泳動はセルローズアセテート膜（セパラックス）を使用し，蛋白質はポンソー 3 R，結合脂質はアセチルスダンブラック B で染色を行ないオズマー 82 型濃度計によって測定した。紫外部吸収スペクトル（UV スペクトル）は島津自記分光光度計 SV-50 により測定し，赤外線吸収スペクトル（IR スペクトル）は前報と同様にして行なった。

動物接種試験は試料を生理的食塩水に溶解あるいは懸濁させたのちその 0.5 ～ 1.0 ml を体重 20-25g のマウス (NIH) に腹腔内接種し毒性の有無を検討した。

試料：昭和 41 年 5 月 10 日に北海道森町沿岸で漁獲されたナガズカの成熟卵巣を用いた。

非脂質性毒性物質の抽出ならびにその毒性；Fig. 1 に示すごとく卵巣から卵巣膜を除去し卵を磨砕し，それぞれ 100 g に対し 100 ml の割合で 2 回，蒸留水 (A)，4 % 食塩水 (B)，10 % 食塩水 (C) とともにホモジナイザーで均質にしたのち遠心分離 (10,000 rpm, 15 分) を行ない，浮上脂肪層を除いた水層を水に透析したのち凍結乾燥し試料とした。各抽出物をマウスに接種した結果は Table 1 に示すとおりであるが，(A) の場合接種マウスに異常は認められなかったが (B) と (C) の場合は全接種マウスが前報で報告したような特異的症状を示して斃死した。つぎに (B) と (C) の場合における抽出能を検討するために目安として抽出液中の蛋白質含量を測定した結果，10 % 食塩水抽出の (C) の場合が 18.12 % と高い値を示した。

Table 1. Toxicity test of each extract from roe with various procedures

Extracts	Amount of protein, %*	Mouse test					
		Body wt. (g)	Sex	Dose**			Death time, hrs.
				mg	ml	mg/g B.W.	
Aqueous exts.	—	21.0	♂	40.0	0.5	1.90	Survived
		20.0	♂	40.0	0.5	2.00	Survived
4% NaCl exts.	9.98	23.0	♂	50.0	0.8	2.17	5
		22.5	♀	50.0	0.8	2.22	5
		24.0	♂	25.0	0.4	1.04	7
		23.0	♀	25.0	0.4	1.18	7
10% NaCl exts.	18.12	21.5	♂	31.0	0.8	1.44	Within 5
		22.0	♀	31.0	0.8	1.40	Within 5
		20.5	♂	16.0	0.4	0.78	12
		22.0	♀	16.0	0.4	0.72	12

* in original roe wt.
** Route: intraperitoneal injection

蛋白性物質の抽出，分画とその毒性：前述の結果より Fig. 2 に示すごとく再び 10 % 食塩水で抽出を行ない固型硫酸アンモニウムを添加し，蛋白質の分画を試みた。その毒性と性状については Table 2 に，UV，IR スペクトルは Fig. 3 と 4 にセルローズアセテート電気泳動については Fig. 5 と Table 3

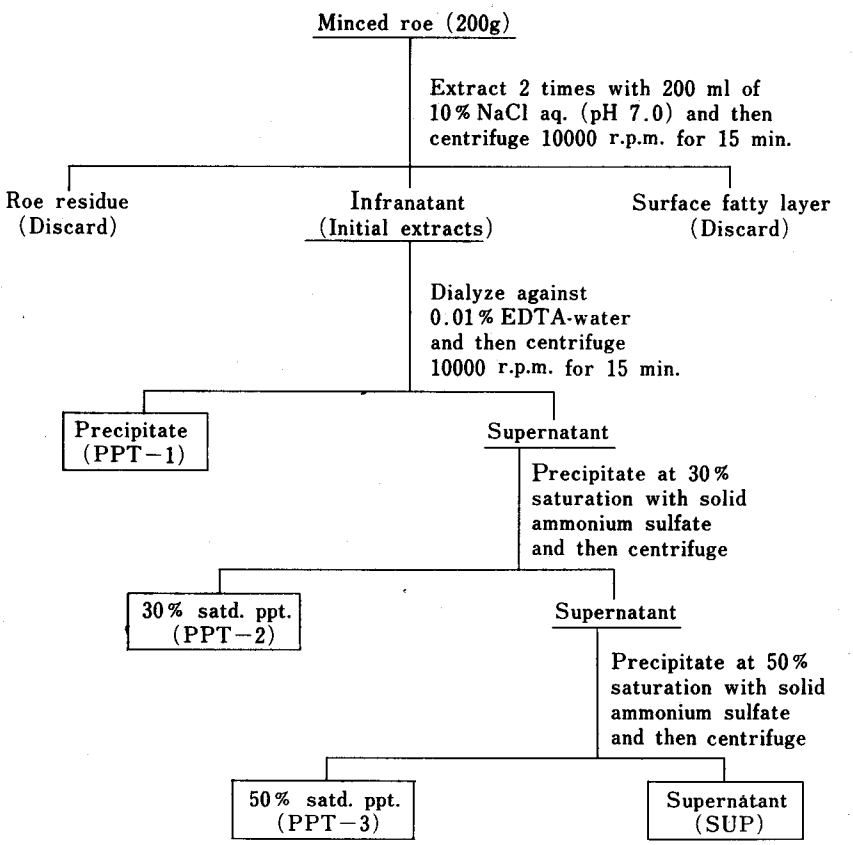


Fig. 2. Extraction and fractionation of toxic protein from the roe with 10% NaCl aqueous solution

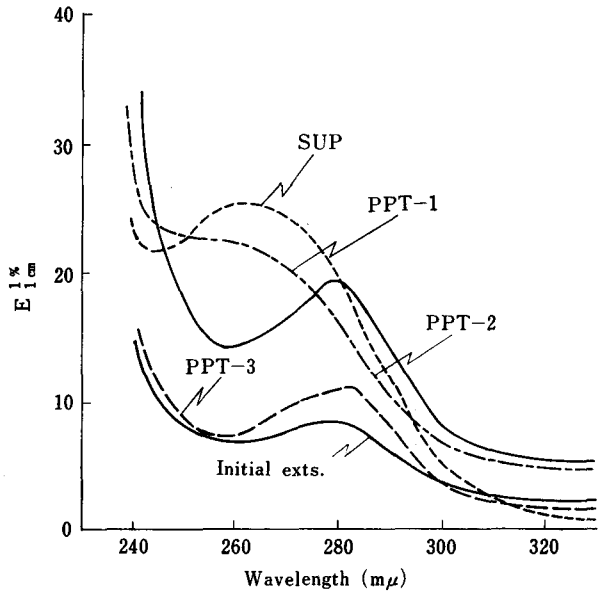
に示すとおりである。以上の結果 PPT-2, と PPT-3 に毒性が認められセルローズアセテート電気泳動の結果からもアセチルスダンブラック B で染色される区分も存在することよりして，これらの毒性蛋白質はリポ蛋白質であると考えられる。

毒性リポ蛋白質の脱脂質(Delipidation)：リポ蛋白質の脱脂質の方法は Gustafson[7] 方法を若干変え Fig. 6 に示すごとく行なった。すなわち PPT-2 (5.39 g) と PPT-3 (7.84 g) から脱脂質を行ない Table 4 に示す結果を得た。脂質組成については薄層クロマトを行ない，その毒性とあわせて検討を行なった。これらの結果は Table 5 と 6 とに示す通りであるがクロロホルム・メタノールで抽出される複合脂質区分に毒性が認められ，薄層クロマトの結果と比較すると原点にとどまる未同定脂質が毒性ときわめて関係が深いことが推察された。なおアポ蛋白区分については溶剤処理による変性が認められるので毒性試験は行なわず毒性の有無は不明である。

Table 2. Property and toxicity of each fraction

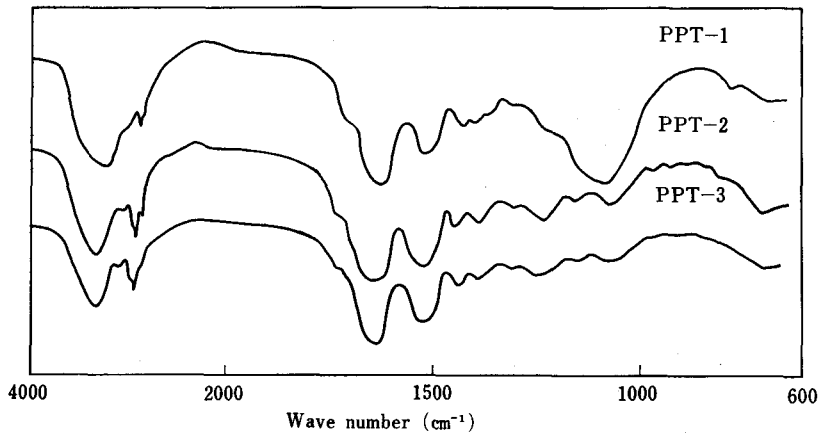
Fraction	Amount of protein, %*	N, %	P, %	λmax (mμ)	Mouse test					
					Body wt. (g)	Sex	Dose mg	Dose ml	Dose mg/g. B.W.	Death time, hrs.
Initial exts.	19.50	11.45	0.60	279	28.0	♂	24.2	0.5	0.86	24
					26.0	♀	24.2	0.5	0.93	19
PPT-1	0.20	20.44	1.03	279	25.5	♂	29.0	1.0	1.13	Survived
					26.0	♀	29.0	1.0	1.11	Survived
PPT-2	6.36	10.05	0.47	279	24.0	♂	23.2	0.8	0.96	72
					23.5	♀	23.2	0.8	0.98	84
					23.0	♂	11.6	0.4	0.50	108
					22.0	♀	11.6	0.4	0.52	100
PPT-3	8.04	12.45	0.52	287	24.0	♂	29.4	0.8	1.22	Within 21
					25.0	♀	29.4	0.8	1.17	Within 21
					21.5	♂	14.7	0.4	0.68	12
					22.0	♂	14.7	0.4	0.66	12
SUP	0.10	—	—	260	22.0	♂	29.6	0.5	1.34	Survived
					22.0	♀	29.6	0.5	1.34	Survived

* in original roe wt.



Each fraction was dissolved in 5% NaCl aq., pH 6.8

Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of each fraction



The ir-pellet was prepared from 3.0 mg of each precipitate mixed with 600 mg of KBr

Fig. 4. Infrared spectra of each precipitate

Cellulose acetate membrane : Separax
Buffer : 0.06M veronal, pH 8.6
Current : 0.5 mA/cm for 1.5 hrs.
Densitometer : Ozumor-82

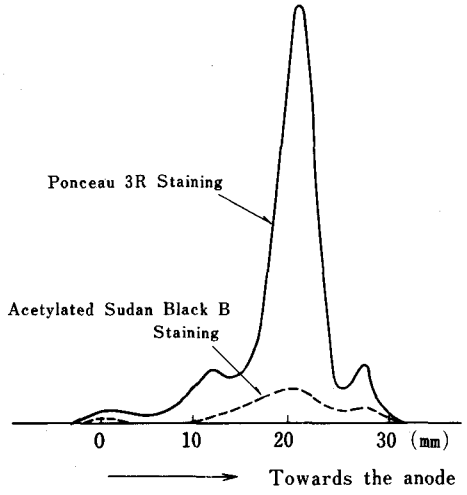


Fig. 5. Densitometric trace of an electrophoretic pattern of initial extracts on cellulose acetate

Table 3. Protein components in cellulose acetate electrophoretic pattern

Fraction	Electrophoretic distribution, %			
	Peak a (0*)	Peak b (11)	Peak c (22)	Peak d (27)
Initial exts.	2.2	9.9	81.3	6.6
PPT-1	3.4	20.0	63.6	13.0
PPT-2	3.7	16.6	74.3	5.4
PPT-3	1.1	7.7	86.8	4.4
SUP	22.2	16.6	55.5	5.7

* The numbers in parentheses are a migration anodic, mm.

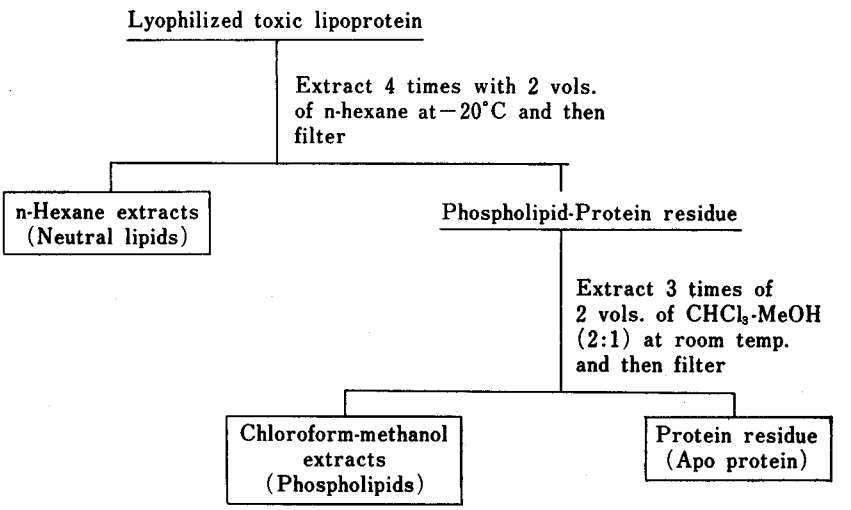


Fig. 6. Flow sheet of delipidation of toxic lipoprotein fraction

Table 4. Lipid and protein recoveries and their properties following delipidation of toxic lipoprotein fractions

Fraction	Subfraction	Recovery, %	N %	P %	N/P**	Iodine value*
PPT-2	n-Hexane exts.	1.85	0.00	0.00	—	—
	Phospholipid-protein res.	(98.15)	11.41	0.50	50.5	—
	Chloroform-methanol exts.	20.18	0.82	1.98	0.9	160.7
	Protein res. (Apo protein)	77.97	14.07	0.12	269.7	—
PPT-3	n-Hexane exts.	0.08	—	—	—	—
	Phospholipid-protein res.	(99.92)	12.55	0.55	50.3	—
	Chloroform-methanol exts.	15.57	1.00	2.51	0.9	176.9
	Protein res.	84.35	14.06	0.15	207.4	—

* Wijs' method ** Molar ratio

Table 5. Toxicity test of lipid moiety of toxic lipoprotein fractions

Fraction	Lipid moeity	Mouse Test					
		Body wt. (g)	Sex	Dose			Death time, hrs.
				mg	ml	mg/g B.W.	
PPT-2	n-Hexane exts.	23.0	♂	8.8	0.5	0.38	Survived
		23.0	♀	8.8	0.5	0.38	Survived
	Chloroform-methanol exts.	22.0	♂	8.8	0.5	0.40	48
		24.0	♀	8.8	0.5	0.36	48
PPT-3	n-Hexane exts.	—*	—	—	—	—	non-toxic?
	Chloroform-methanol exts.	23.0	♂	8.7	0.5	0.37	24
		22.5	♀	8.7	0.5	0.38	24

* Not tested

Table 6. Lipid composition of toxic lipoprotein fractions by thin-layer chromatography

Fraction	Lipid moeity	Lipid composition
PPT-2	n-Hexane exts.	Triglycerides, Monoglycerides, Free fatty acids, Free sterols and Sterol esters.
	Chloroform-methanol exts.	Lecithin, Cephalin and Unidentified lipid (Toxic ?)
PPT-3	n-Hexane exts.	Triglycerides, Monoglycerides, Free fatty acids, Free sterols and Sterol esters.
	Chloroform-methanol exts.	Lecithin, Cephalin and Unidentified lipid (Toxic ?)

Plate: Wako gel B-5, 0.25 mm, activated for 30 min. at 110°C
Solvents I: n-Hexane-Et_2O-AcOH (90:10:1)
Solvents II: $CHCl_3$-MeOH-AcOH-H_2O (80:13:3:0.3)

考察および総括

ナガズカ卵巣を蒸留水，4% 食塩水，10% 食塩水でそれぞれ抽出した結果，水抽出物には毒性は認められず 4%，10% 食塩水抽出物に毒性が認められた。つぎに 10% 食塩水抽出液に固型硫酸アンモニウムを添加した結果，30% と 50% 飽和沈殿 (PPT-2, PPT-3) に毒性を認めた。これらは UV スペクトルでは 279 mμ に極大吸収を有し，IR スペクトルでもアミド結合に帰属される 1675 cm^{-1}～1550 cm^{-1} の波数領域に強い吸収を有しい，ずれも蛋白質であることを認めた。

また化学的にはいずれも Biuret 反応陽性であり，セルローズアセテート電気泳動の結果は pH 8.6 で陰極へ移動する Peak a, b, c, d の 4 peak に分離される。各 Peak の蛋白質は同定することはできなかったが，Young[8] らと Hamano[9] のサケ卵黄リポ蛋白質の電気泳動図，Bernardi ら[10] のニワトリ卵黄リポ蛋白質の電気泳動図より，Peak a は未知物質，Peak b は γ-livetin，Peak c は lipovitellin，Peak d は α-, β-livetin と推定される。しかしいずれの区分においても Peak c 成分がもっとも多く占めていることのほか，毒性と関連ずけて考えられる知見は得られなかった。

さらに毒性リポ蛋白質区分を脱脂質し，脂質部分とアポ蛋白質部分とに分離し検討を加えたが脂質部分は中性脂質と複合脂質よりなり，毒性については複合脂質区分にあることが認められ，このものは薄層クロマトの結果，レシチン，ケファリン以外に原点にとどまる未同定脂質よりなり，毒性と関連ずけて考えると未同定脂質がきわめて関係が深いことが推定された。なおアポ蛋白質区分については脱脂質の操作過程中，特にクロロホルム・メタノール処理で変性をうけ水および食塩水に対し不溶化を示したので毒性の検討を行なわなかった。(蛋白質部分に毒性がないことは後報で発表する予定である。) 従って蛋白質部分の毒性の有無は不明であるが脱脂質を行なう前のリポ蛋白質が有毒であることよりして Asano ら[5] の毒性リポ蛋白質，Lipostichaerin とは同種類のものと考えられる。

以後 Asano らと同様に今回抽出した毒性リポ蛋白質を Lipostichaerin と称することにした。

謝辞

本研究において本学部五十嵐久尚教授，坂井稔教授，座間宏一助教授に種々の御指導をいただき，また動物試験については微生物学講座絵面良男修士に御援助を，試料入手については木古内保健所林功課長の御好意によったことをここに記して厚く感謝の意を表す。

文 献

1) 坂井稔・木村喬久・信濃晴雄・絵面良男・坂正紀・林功 (1964). 食衛誌 5, 420-425.
2) ——・——・——・——・——・—— (1964). 同誌 5, 426-433.
3) ——・——・——・——・——・—— (1964). 同誌 5, 434-440.
4) Asano, M. (1964) .*Tohoku J. Agr. Res.* 14, 113-130.
5) Asano, M. & Itoh, M. (1966). *Tohoku J. Agr. Res.* 16, 299-316.
6) 羽田野六男・座間宏一・高間浩蔵・坂井稔・五十嵐久尚 (1964). 本誌 15, 138-146.
7) Gustafson, A. (1964). *Biochim. Biophys. Acta* 84, 223-225.
8) Young, E. G. & Phinney. J. I. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 73-80.
9) Hamano, S. (1957). *Mem. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 5, 91-143
10) Bernardi, G. & Cook, W. H. (1960). *Biochim. Biophys. Acta.* 44, 86-96.