



Title	ナガズカ卵巣の毒性物質：第4報 毒性リポ蛋白質, Lipostichaerinと毒性燐脂質との関係
Author(s)	羽田野, 六男; HATANO, Mutsuo
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 21(4), 315-323
Issue Date	1971-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23440
Type	departmental bulletin paper
File Information	21(4)_P315-323.pdf



ナガズカ卵巣の毒性物質

第4報 毒性リポ蛋白質, Lipostichaerin と毒性磷脂質との関係

羽田野六男*

Toxic Substance of the Roe of Northern Blenny

IV. Relationship between Lipostichaerin and toxic phospholipid

Mutsuo HATANO

Abstract

The previous paper dealt with the toxic lipoprotein, named Lipostichaerin, from the roe of *Stichaeus grigorjewi*, and a certain phospholipid was also proved to be of toxic material. Therefore, this paper aims to clarify the relation between Lipostichaerin and a toxic phospholipid.

The saline extract, *i.e.* Lipostichaerin was toxic but free lipids and remaining lipids in the roe residue were not. The Lipostichaerin fraction was delipidated with cold ethanol-ether and then cold ether. The lipid moiety was toxic and the protein moiety, the apoprotein was non-toxic. Thus, the apoprotein proved to be innocuous for the mouse.

Furthermore, the lipid moiety was chromatographed on a silicic acid column. The only Fraction 3, eluted with CHCl_3 -MeOH- H_2O (65:25:4) mixture, was toxic and it consisted mainly of phosphatidylcholine, small amounts of phosphatidylserine, and an unidentified phospholipid, showing the lowest R_f value by means of thin-layer chromatography when using CHCl_3 -MeOH-AcOH- H_2O (75:20:1:2) as a solvent.

In conclusion, a certain phospholipid as mentioned above, was a toxic component of the Lipostichaerin.

In addition, when Lipostichaerin and toxic phospholipid were inoculated intraperitoneally into mice, a slight difference in symptoms and lesions was observed in them.

緒 言

前報¹⁾においてナガズカ卵巣の毒性はリポ蛋白質すなわち Lipostichaerin にあることを報告したが、脂質性毒性物質との関係については不明であった。すでに坂井ら^{2),3)}は本魚卵毒の本態を複合脂質—磷脂質—ときわめて関係深いものと報告しており、また浅野ら⁴⁾は Lipostichaerin を脂質部分と蛋白部分に分け、その脂質部分に毒性を認めているが蛋白部分(アポ蛋白質)については論及していない。なお最近 Fuhrman ら⁵⁾は Cabezon(カジカの1種)卵巣より抽出した毒性リポ蛋白質について、その脂質部分には毒性は認められなかったが、Toxic component は蛋白質あるいは蛋白質と結合しているある種の化合物であろうと推定している。

著者はナガズカ卵巣の Lipostichaerin と脂質性毒性物質との関係を明らかにする目的で本実験を行った。この結果 Lipostichaerin を構成する蛋白部分には毒性が認められず、かつその脂質部分に毒性を認め ある種の磷脂質が毒性ときわめて関係があることを認めたのでここに報告する。

* 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)

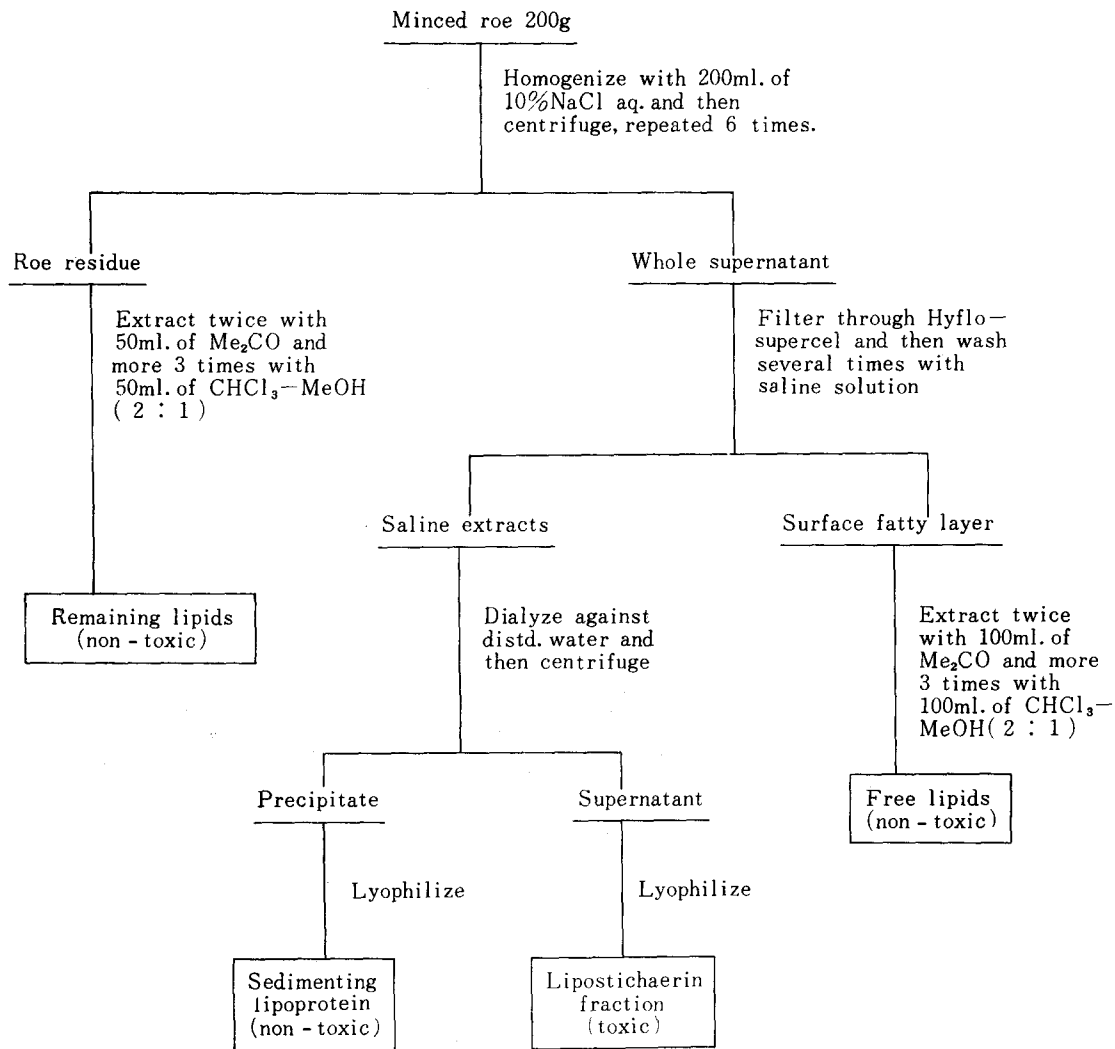


Fig. 1 Extraction and fractionation of toxic substance

実験 および 結果

実験方法:

P は Fiske-Subbarow 法, N は Micro Kjeldahl 法, 蛋白量は Biuret 法, 蛋白質の組成はセルロースアセテート膜電気泳動法によりまた蛋白質はボンソー 3R で, 結合脂質はアセチルスタンブラック B によって染色しその組成をオズマー 82 型濃度計によって求めた。脂質部分についてはケイ酸カラムクロマト (Mallinckrodt 製, 110°C, 24時間活性) により中性脂質, 複合脂質その他毒性脂質の各区分に分別し, 薄層クロマト (TLC) によって脂質組成を検討した。TLC の条件は Wako gel B-O のプレート (110°C, 30分間活性) で中性脂質は n-Hexane-Et₂O-AcOH (90: 10: 1), 複合脂質と毒性脂質区分は CHCl₃-MeOH-AcOH-H₂O (75: 20: 1: 2) を展開剤として行ない, Hanes-Isherwood 試

Table 1 Toxicity test of each extract

Extracts	Mouse Body wt. (g)	Sex	Dose*			Death time, (hrs.)
			ml	mg	mg/g. body wt.	
Free lipids	21.5	♂	0.5	25.1	1.16	Survived
	24.0	♀	0.6	30.2	1.25	Survived
	23.5	♀	0.6	30.2	1.28	Survived
Lipostichaerin fraction	20.0	♀	0.3	23.0	1.15	24
	20.5	♀	0.3	23.0	1.12	24
	21.0	♀	0.3	23.0	1.04	30
Sedimenting lipoprotein	—**	—	—	—	—	non-toxic ?
Remaining lipids in roe residue	21.5	♂	0.6	23.6	1.10	Survived
	21.5	♂	0.6	23.6	1.10	Survived
	24.5	♂	0.7	27.5	1.12	Survived

* Route: Intraperitoneal injection

** Not tested but possible non-toxic presumed from the previous report¹⁾.

Table 2 Property of each extract

Extracts	Yield*, %	N, %	P, %	Iod.V.**	Toxicity
Free lipids	3.57	0.17	0.26	195.6	—
Lipostichaerin fraction	16.87	11.84	1.22	—	+
Sedimenting lipoprotein	0.30	—	—	—	—
Remaining lipids in roe residue	0.22	0.43	0.49	143.8	—

* in original roe weight

** Wijs' method

薬により発色を行なった。

毒性試験は試料を生理的食塩水あるいは1% Tween 60 水溶液に溶解・懸濁させたのち体重20-25gのマウス(NIH)に腹腔内接種(*i. p.*)しその結果により判定した。また一部の試料については経口投与(*p. o.*)を行ない毒性を検討した。

試料:

昭和45年5月1日、北海道森町沿岸で漁獲したナガスカの新鮮な成熟卵巣を用いた。

毒性物質の抽出と分画:

Fig. 1 に示すとおり卵巣から卵巣膜を除去して得た卵200gを10%食塩水200mlで6回抽出し、浮上脂肪層(遊離脂質)とリポ蛋白質および抽出残渣とに分別した。これら各区分の毒性試験と性状はそれぞれTable 1と2に示すとおりである。

Table 1の結果より明らかなごとくLipostichaerin区分にのみ毒性が認められ、その他の区分には認められなかった。毒性の認められない遊離脂質はTLCの結果からトリグリセライド(63.6%),ステロールエステル(13.0%),および遊離ステロール(10.1%)が主成分で、また抽出残渣中の残存脂質区分もトリグリセライド(22.1%),遊離ステロール(22.2%),ステロールエステル(12.7%),ホス

Table 3 Toxicity tests of the lipid and the protein moieties of Lipostichaerin and sedimenting lipoprotein

Moiety	Mouse Body wt. (g)	Sex	Dose				Death time, (hrs.)
			Route	ml	mg	mg/g. body wt.	
Lipid moiety of Lipostichaerin fraction	20.5	♀	<i>i. p.</i>	0.50	21.6	1.05	23
	22.0	♀	<i>i. p.</i>	0.60	26.0	1.05	24
	19.0	♂	<i>i. p.</i>	0.60	26.0	1.37	25
	19.0	♀	<i>i. p.</i>	0.60	26.0	1.37	20
Protein moiety* of Lipostichaerin fraction	22.5	♂	<i>i. p.</i>	0.34	22.7	1.00	Survived
	23.5	♀	<i>i. p.</i>	0.35	23.5	1.00	Survived
	24.5	♀	<i>i. p.</i>	0.36	24.1	0.98	Survived
	19.5	♀	<i>i. p.</i>	0.40	26.8	1.37	Survived
	20.5	♀	<i>i. p.</i>	0.46	30.8	1.50	Survived
	21.0	♀	<i>i. p.</i>	0.48	32.1	1.50	Survived
	22.0	♂	<i>p. o.**</i>	0.3+0.3	49.6	2.25	Survived
	24.0	♀	<i>p. o.**</i>	0.4+0.4	62.1	2.29	Survived
	24.0	♀	<i>p. o.**</i>	0.4+0.4	62.1	2.59	Survived
Lipid moiety of sedimenting lipoprotein	19.0	♂	<i>i. p.</i>	0.6	20.8	1.09	Survived
	19.5	♂	<i>i. p.</i>	0.6	20.8	1.06	Survived
	21.5	♂	<i>i. p.</i>	0.7	24.2	1.12	Survived

* Protein moiety was prepared by modification of the method of Scanu et al.

** Per os administration; given 24 hrs. after the first dose.

Table 4 Properties of the lipid- and the protein moieties of Lipostichaerin and sedimenting lipoprotein

Moiety*	Recovery, %	N, %	P, %	Iod. V.	Toxicity
Lipid moiety of Lipostichaerin fraction	15.22	1.80	2.90	171.4	+
Protein moiety of Lipostichaerin fraction	84.78	14.06	0.96	—	—
Lipid moiety of sedimenting lipoprotein	46.47	0.80	1.08	160.5	—
Protein moiety of sedimenting lipoprotein	53.53	—	—	—	—**

* Lipid- and protein moieties were prepared with CHCl₃-MeOH (2:1) extraction.

** Not tested

ファチジルコリン (レシチン, 14.6%), ホスファチジルエタノールアミン (13.5%) などよりなることから、これら両区分については毒性の認められない結果になったことは当然であろう。

Lipostichaerin 区分の脂質および蛋白部分の毒性の検討:

Lipostichaerin の脂質部分と蛋白部分の毒性を検討するため下記のごとき方法で行なった。

すなわち Lipostichaerin 区分 10.64g をクロロホルム・メタノール (2:1) 30 ml で4回抽出し 1.61g の脂質部分を得たが、この方法では蛋白部分の変性が著しいので次に Scanu ら⁹⁾の方法にしたがい再び Lipostichaerin 区分 1.13g を -20°C でエタノール・エーテル (3:1) とエーテルで抽出を行ない蛋白部分 (アポ蛋白質) を得た。このアポ蛋白質はなお微量の脂質 (0.18%) を保有している

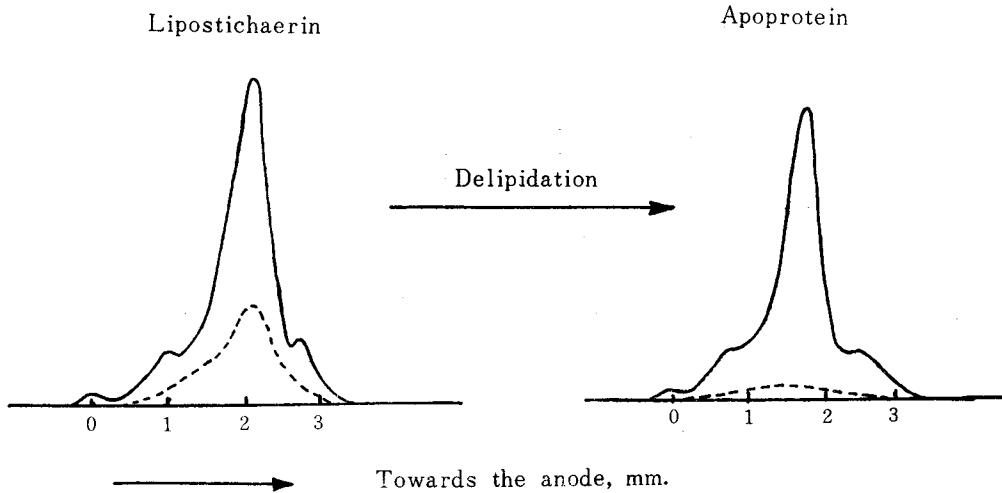


Fig. 2 Densitometric traces of electrophoretic patterns of Lipostichaerin and apoprotein on cellulose acetate.

Condition: The same as previous report.¹⁾ Protein: — ; Bound lipids: ----

Table 5 Protein components of Lipostichaerin and apoprotein fractions

	Lipostichaerin		Apoprotein	
	Migration anodic, mm	%	Migration anodic, mm	%
Band-a	0	2.5	0	1.8
Band-b	1.0	3.7	0.9	3.6
Band-c*	2.2	85.2	2.0	85.7
Band-d	2.8	8.6	2.6	8.9

* Lipostichaerin

が生理的イオン強度の塩類溶液には易溶のものである。次に比較のために Sedimenting lipoprotein (0.70g) も同様に処理し脂質部分と蛋白部分とに分離したが、これらの毒性試験と性状はそれぞれ Table 3 と 4 に示すとおりである。この結果 Lipostichaerin 区分の脂質部分にのみ毒性を認め蛋白部分には毒性が認められなかった。

蛋白部分 (アポ蛋白質) のセルローズアセテート膜電気泳動:

Lipostichaerin 区分とアポ蛋白質についてセルローズアセテート膜電気泳動を行なったが、その結果は Fig. 2 と Table 5 に示すとおりである。なお泳動条件は前報¹⁾ の場合と同様である。

これらの結果、アポ蛋白質の泳動パターンは抽出処理前の Lipostichaerin のそれと同一であるが、しかし両者の各バンドの移動距離に若干の相違がみられた。このような現象について Sodhi ら⁷⁾ も認めているがその原因については不明である。しかしアポ蛋白質に毒性が認められないことは直接に関連がないものと考えられる。

脂質部分の分画とその毒性:

Table 3 に示すとおり脂質部分にのみ毒性が認められたので、この脂質部分 1.238g をケイ酸カラムクロマト (40g, 3×15 cm) にかけて Fraction 1, 2 および 3 に分画した。それぞれの画分の性状と毒性

Table 6 Properties of fractions chromatographed from lipid moiety on a silicic acid column

Fraction	Eluent (ml)	Yield, %	N, %	P, %	Iod. V.	Toxicity
1	CHCl ₃ (200)	20.9	0.07	<0.01	176.8	-
2	MeOH (300)	58.3	1.86	3.42	156.1	-
3	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O* (200)	20.8	1.87	3.33	128.9	+

* 65 : 25 : 4, V/V

Table 7 Toxicity tests of fractions chromatographed from lipid moiety on a silicic acid column

Fraction	Mouse Body wt. (g)	Sex	Dose*			Death time, (hrs.)
			ml	mg	mg/g. body wt.	
1	23.0	♂	0.70	29.7	1.29	Survived Survived
	22.0	♀	0.70	29.7	1.35	
2	22.5	♀	0.50	20.3	0.90	96 Survived Survived Survived
	24.0	♀	0.50	20.3	0.85	
	26.0	♂	0.40	16.3	0.63	
	26.0	♂	0.40	16.3	0.63	
3	21.5	♂	0.60	13.1	0.61	40 46 26 26
	22.0	♂	0.60	13.1	0.60	
	22.0	♀	0.65	22.0	1.00	
	21.0	♀	0.62	20.9	1.00	

* Route: Intraperitoneal injection

を検討した結果はTable 6 と 7 に示すとおりである。

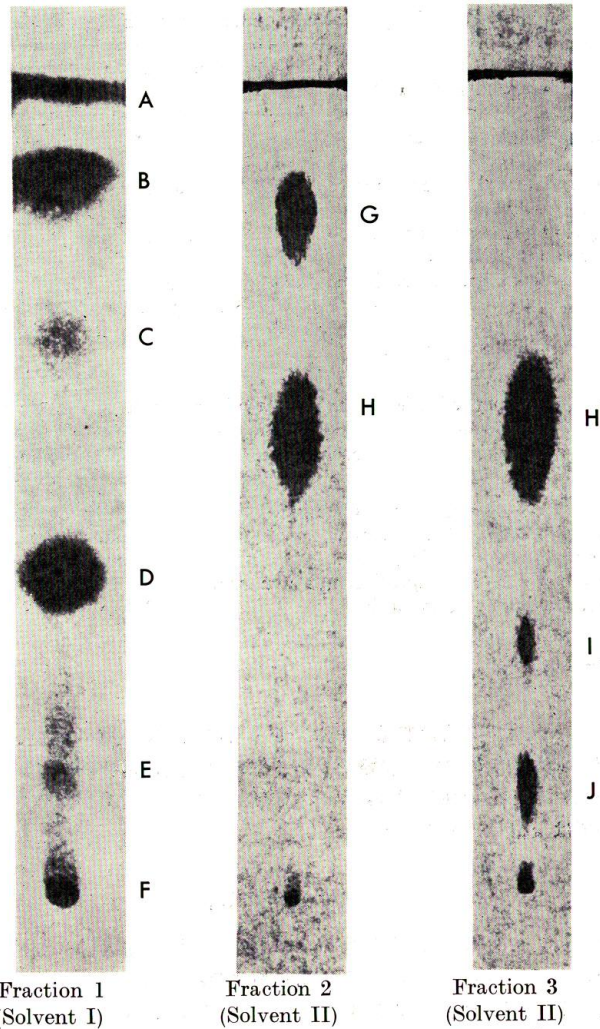
Fraction 3 (毒性磷脂質画分) の検索:

Table 6 と 7 の結果よりクロロホルム・メタノール・水 (65:25:4) で溶出される Fraction 3 へのみ毒性が認められたので TLC (Fig. 3) により検索を行なった。この結果から Fraction 3 には3種の磷脂質が存在するが、すなわち Dragendorff 反応陽性の R_f 値 0.56 の物質 (含量 93.6%) が主なものであり、このものは別にナガズカ卵巣より調製したホスファチジルコリン (レシチン) の R_f 値と一致した。次に R_f 値 0.30 の物質 (含量 3.5%) は Ninhydrin 反応陽性で文献よりホスファチジルセリン (ケファリン) と考えられるものである。また R_f 値 0.13 の物質 (含量 2.9%) は Dragendorff 反応陰性で Ninhydrin 反応陽性のもので、かつ Fraction 1 と 2 には全く存在しないものである。したがって毒性との関連性からこのものがナガズカ卵巣の毒性発現に関与するものであり、アミノ磷脂質の1種と推定した。また Lipostichaerin の磷脂部分中のこの物質の含量は約 0.6% である。

マウスに対する毒性試験

Lipostichaerin とこのものより得た毒性磷脂質をマウスにそれぞれ腹腔内接種し、症状の観察と斃死直後の剖検を行ない Table 8 と 9 および Fig. 4 に示す結果を得た。

Table 9 と Fig. 4 の結果から Lipostichaerin 接種マウスは肝臓の混濁腫脹 (Cloudy swelling), 小腸壁の充出血 (Congestion, Hemorrhage), 脾臓および腎臓の肥大 (Enlargement), 腹腔内滲出液として漿液性 (Serous fluid) のものがみられ、一方毒性磷脂質接種マウスでは肝臓の混濁腫脹, 小腸壁の出血, 脾臓および腎臓の出血が認められた。すでに本魚卵巣毒性物質の動物投与試験について若干



Fraction 1 (Solvent I) Fraction 2 (Solvent II) Fraction 3 (Solvent II)

Plate: Wako gel B-O, 0.25 mm, activated for 30 min., at 110°C
 Solvent I: n-Hexane-Et₂O-AcOH (90: 10: 1) Solvent II: CHCl₃-MeOH-AcOH-H₂O (75: 20: 1: 2)

A: Sterol esters or Hydrocarbons B: Triglycerides C: Diglycerides D: Free sterols E: Monoglycerides F: Phospholipids G: Phosphatidyl ethanolamine
 H: Phosphatidyl choline I: Phosphatidyl serine J: Unidentified amino-phospholipid (toxic component?)

Fig. 3 Thin-layer chromatograms of fractions chromatographed from lipid moiety on a silicic acid column (Plate 1)

の報告がみられるが、高柳ら⁹⁾はイヌに本魚卵巣エタノール抽出物を投与した結果、肝臓と脾臓の肥大、腸重積症などがおこることを認めているほか、浅野⁹⁾が脂質性毒性物質投与でマウスに脂肪肝がおこることもみている。また坂井ら^{9),10)}は卵巣の含水アセトン抽出物のエーテル可溶部をエタノール可溶部と不溶部に分画し、前者の接種マウスについてその症状、剖検所見ならびに病理組織学的所見

Table 8 Onset of symptoms in affected mice, caused by intraperitoneal injection of Lipostichaerin and toxic phospholipid

(Dose, mg/g. body wt.)	Lipostichaerin (1.1)	Toxic phospholipid (1.0)
Dullness of the hair coat and piloerection	10-13*	3-4
Developed visual disturbance and photophobia	15-18	6-8
Staggering gait and marked paralysis in limbs	20-24	16-20
Loss the reflex and convulsion	30	24
Diarrhea	Not appeared	Appeared

* Hours after injection

Table 9 Autopsy of affected mice, inoculated with tow toxic substances

	Lipostichaerin	Toxic phospholipid
Liver	Cloudy swelling	Cloudy swelling
Spleen	Enlargement	Hemorrhage
Kidney	Enlargement	Hemorrhage
Intestine	Congestion and hemorrhage	Extended hemorrhage
Intracelial fluid	Serous fluid	None

(See Fig. 4)

を報告するとともに、後者の場合は収量が少ないが前者に比して肝臓における充血が高度であるのに反し、小腸の充出血は軽度でかつ接種後斃死に至るまでの時間が短い傾向を認めている。本実験においても Lipostichaerin と毒性磷脂質接種マウスの所見に若干の相違が認められたが、このことに関連する検討については後報で述べることにする。

考察および総括

ナガズカ卵巣を 10% 食塩水で抽出して得たりボ蛋白質、浮上脂肪層、卵巣抽出残渣についてマウスに対する毒性を検討した結果、水溶性のりボ蛋白質のみ毒性が認められた。このりボ蛋白質は前報¹⁾で述べた Lipostichaerin に相当するが、このものは Scanu らの方法によって脂質部分と蛋白部分 (アポ蛋白質) に分離し、さらに毒性を検討した結果脂質部分のみ毒性を認め、蛋白部分には認められなかった。すでに坂井ら²⁾が卵巣ホモジネートにトリプシンを作用させても毒性が消失しないことを報告しているが、このこともアポ蛋白質に毒性が存在しないことを示唆している。

本実験において抽出した Lipostichaerin 区分よりクロロホルム・メタノール抽出によって得られた脂質部分をケイ酸カラムクロマトで分画した結果、クロロホルム・メタノール・水 (65: 25: 4) によって溶出される画分に毒性が認められ、TLC の結果からこの画分の脂質中 Ninhydrin 反応陽性の R_f 値 0.13 の物質が毒性ときわめて関係が深く、アミノ磷脂質の 1 種と推定された。このものの含量は Lipostichaerin の脂質部分中約 0.6% である。またこの毒性アミノ磷脂質は遊離脂質には存在しないことから自然状態では蛋白質と結合しているものと考えられる。さらにこのものについてはすでに著者¹⁾のほか坂井ら²⁾、浅野³⁾がコリン含有磷脂質に関係が深いものと推定していたが、その時点では未だ分離・精製が不十分であったためと考えられ、本実験結果から明らかなごとくナガズカ卵巣の Toxic component はアミノ磷脂質の 1 種によるものと推察された。

なお Lipostichaerin と毒性磷脂質をマウスに非経口的に投与した結果, 症状のほか剖見上においても若干の相違が認められ, 共通的な病変は急性中毒性肝炎で特に後者の場合腸管に異常が認められるが, このことは前記坂井ら¹⁰⁾のエーテル可溶部接種マウスにおける所見と一致している。

謝 辞

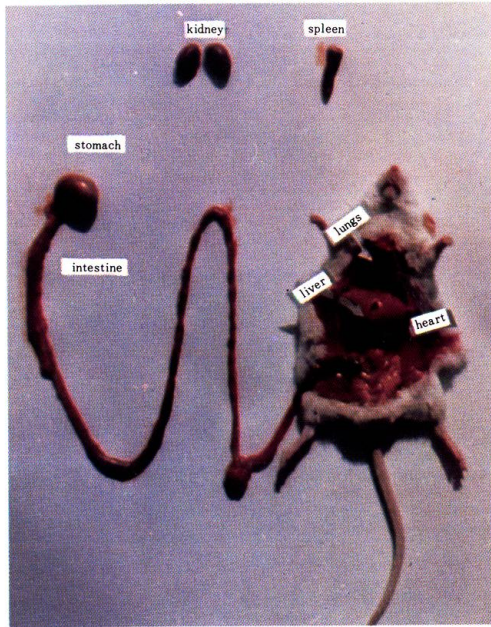
本研究において終始御指導を賜った本学部五十嵐久尚教授ならびに坂井稔教授に深く感謝するとともにまた座間宏一助教授に種々の御助言と御援助を頂いたことをここに記し厚く感謝の意を表する。

文 献

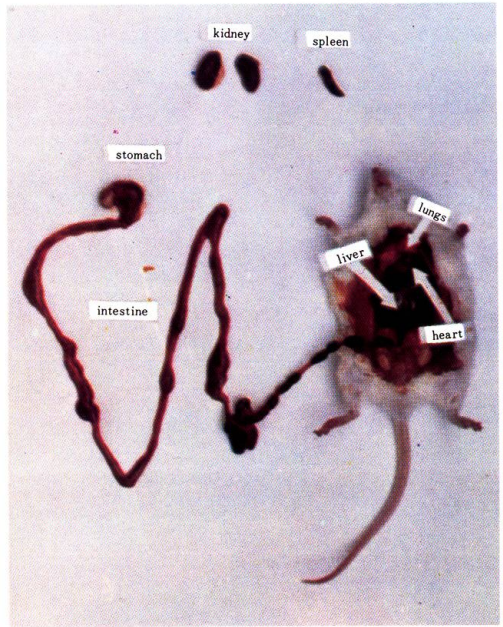
- 1) 羽田野六男(1970). 北大水産彙報 20(4), 329-338.
- 2) 坂井稔・木村喬久・信濃晴雄・絵面良男・坂正紀・林功(1962). 食品衛生研究 12(7), 53-68.
- 3) ————(1964). 食衛誌 5(6), 426-432.
- 4) Asano, M. & Itoh, M. (1966). *Tohoku J. Agr. Res.* 16(4), 299-316.
- 5) Fuhrman, F.A., Fuhrman, G.J., Dull, C.L. & Mosher, H.S. (1969). *J. Agr. Food Chem.* 17(3), 417-424.
- 6) Scanu, A., Lewis, L.A., & Bumpus, F.M. (1958). *Arch. Biochem. Biophys.* 74 390-397.
- 7) Sodhi, H.S. & Gould, R.G. (1967). *J. Biol. Chem.* 242(6), 1205-1210.
- 8) 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.
- 9) Asano, M. (1964). *Tohoku J. Agr. Res.* 15(1), 113-130.
- 10) 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(6), 420-425.
- 11) ————(1964). 同誌 5(6), 433-440.
- 12) 羽田野六男・座間宏一・高間浩蔵・坂井稔・五十嵐久尚(1964). 北大水産彙報 15(2), 138-146.

PLATE I

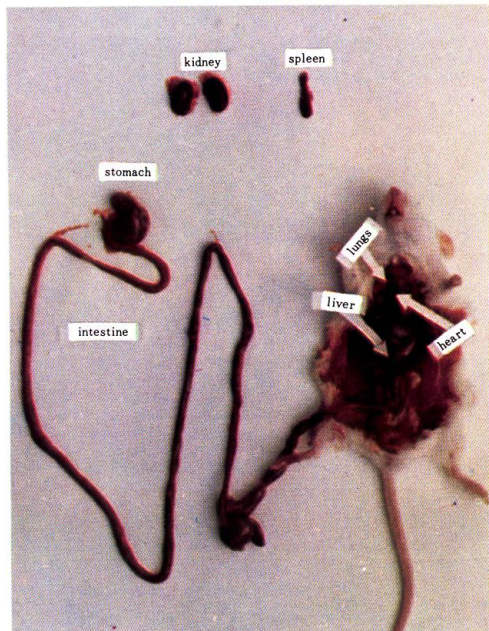
Fig. 4 Macroscopical symptoms of affected mice, inoculated with Lipostichaerin and toxic phospholipid (Plate 2)



(A)



(B)



(C)

Fig. 4. Macroscopical symptoms of affected mice, inoculated with Lipostichaerin and toxic phospholipid

(A) Lipostichaerin (B) Toxic phospholipid (C) Normal