ナガズガ卵巣の毒性物質

第6報 Lipostichaerin と毒性燐脂質投与ラットにおける毒性の比較*

羽田野六男**

Toxic Substance of the Roe of Northern Blenny

VI. Comparison of effects on rats administered with Lipostichaerin and toxic phospholipid.

Mutsuo HATANO

Abstract

The purpose of the present paper is to elucidate the pathological differences caused by Lipostichaerin and toxic phospholipid reported in the 4th report of this series.

Adult rats (Wistar strain, male) were divided into five groups, including a control group (Group 1), Group 2 administered with Lipostichaerin (*i.p.*), Group 3 (same with Group 2, *p.o.*), toxic phospholipid, (Group 4, *i.p.*) and Group 5 (same with Group 4, *p.o.*).

The symptoms in the affected rats of each group were observed within six hours: In the rats administered with Lipostichaerin, the volume of urine increased showing a brownish yellow color, while the rats administered with toxic phospholipid caused diarrhea. During the autopsy of the rats administered with both toxic substances: Groups 2 and 3 showed no abnormality in the parenchymic organs, but in Groups 4 and 5, enlargement of the liver and congestion of the intestine appeared.

Furthermore, the blood plasma components and enzyme activities of the affected rats were compared with those of the normal group. The results obtained from this experiment are shown in Tables 3 and 4. The decrease of glucose, total lipids, neutral lipids, and total cholesterol was observed in the blood plasma of the affected groups. The levels of the GPT, especially GOT, and LDH were high, but the levels of the Amylase and ChE were low.

The toxic action of these substances used for the rats caused acute toxipathic hepatitis and acute pancreatitis, and acute intestinitis in the case of toxic phospholipid administration.

緒　　言

著者は第4報[1]においてナガズカ卵巣のリポ蛋白質，Lipostichaerin に毒性を認め，さらにその脂質部分にアミノ燐脂質の1種が Toxic component として存在することを推定した。また Lipostichaerin とこの毒性燐脂質をマウスに接種し死後直ちに剖検を行なった結果，両者の病変に若干の相違があることを認めた。

この剖検所見の相違はこの毒性燐脂質が蛋白質と結合した複合体であるか否かによってその毒作用

* 昭和43年10月日本水産学会秋季大会（福岡）にて講演発表

** 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)

Table 1 Analytical methods of chemical compositions and enzyme activities of blood plasma

Items	Methods
Hematocrit value	Wintrobe
Total protein	Refractometric analysis
Protein fraction	Cellulose acetate electrophoresis
Blood glucose	Glucose-oxidase procedure
Bilirubin	Lathe-Hogg
Total lipids	De La Huerga's turbidimetry
Phospholipids	Ernster (Lipid P×25)
Neutral lipids	(Total lipids – Phospholipids)
Total cholesterol	Zak-Henly
Na	Flame photometry
K	Flame photometry
Glutamic-oxalacetic transaminase (GOT)	Reitman-Frankel
Glutamic-pyruvic transaminase (GPT)	Reitman-Frankel
Alkaline phosphatase (AlP)	Kind-King
Lactic dehydrogenase (LDH)	Wróblewski
Cholinesterase (ChE)	Takahashi-Shibata
Amylase	Caraway

発現の機序に相違を示すのではなかろうかと推察されるが，これらの点を明らかにする目的で次のごとき実験を行なったのでその結果を報告する。

実験および結果

実験材料

(1) 毒性リポ蛋白質，Lipostichaerin

前報同様[9]，N, 11.17%; P, 0.62%; LD_{50}, 200mg/kg (*i. p.*) のものを生理的食塩水に溶解して供試した。

(2) 毒性燐脂質

前報同様，N 8.38%; P, 3.61%; 沃素価，73.8; LD_{50}, 60mg/kg (*i. p.*) のものを 0.1% Tween 60 水溶液に懸濁して供試した。

(3) 実験動物

市販固型飼料で1カ月間予備飼育した健康な雄ラット（ウィスター・今道系，体重 210-310g) を使用した。

実験方法

(1) 投与方法

Table 2 に示すとおり，対照群（5尾）には1尾当り生理的食塩水 1.5 ml を腹腔内接種 (*i. p.*) し，Lipostichaerin 投与群は1尾当り 80 mg 腔腔内接種（5尾）し，あるいは 400 mg 経口投与 (*p. o.*)（5尾）した。毒性燐脂質投与群についても 20 mg 腹腔内接種（5尾）および 100 mg 経口投与（5尾）した。なお投与量は毒力 (LD_{50}) から決定した。

(2) 血漿採取法

投与6時間後，ラットをエーテルで麻痺し抗凝固剤としてヘパリンを使用し，心臓より直接採血，血漿を分離した。

(3) 測定項目

大森[9]の提唱する急性毒性試験項目にしたがって行なったが，測定方法など[4-8]については Table 1

Table 2 Toxicity tests of Lipostichaerin and toxic phospholipid in rats.

Group (Route*)	Average body wt., g (Range**)	Dose, per a rat	Symptoms after 6 hours	Autopsy
Control (*i.p.*)	299 (280-310)	1.5ml of 0.9% NaCl	No apparent symptoms	Normal
Lipostichaerin (*i.p.*)	289 (270-310)	80mg/1.5ml of 0.9% NaCl	Increase urinary volume; Brownish yellow color	No apparent abnormality in parenchymic organ
Lipostichaerin (*p.o.*)	288 (280-300)	400mg/3ml of 0.9% NaCl	Ditto	Ditto
Toxic phospholipid (*i.p.*)	265 (210-285)	20mg/1.5ml of 0.1% Tween 60	Diarrhea	Enlarged liver; Congestion of intestine
Toxic phospholipid (*p.o.*)	270 (265-280)	100mg/3ml of 0.1% Tween 60	Ditto	Ditto

* Route: *i.p.* Intraperitoneal inoculation; *p.o.* Per os administration
** Five male rats (Wistar-Imamichi strain) were used for each group

Table 3 Blood plasma compositions in affected rats, administered with two toxic substances

Composition	Control	Lipostichaerin		Toxic phospholipid	
		i.p.	*p.o.*	*i.p.*	*p.o.*
Hematocrit value (%)	45.9± 2.4	50.0± 1.1	44.0± 1.7	47.9± 1.4	50.6± 2.9
Total protein (g/dl)	6.0± 0.1	5.9± 0.2	5.9± 0.3	5.7± 0.6	6.7± 0.1
Albumin (%)	52.1± 1.5	54.1± 1.2	44.4± 3.6	46.9± 5.7	49.7± 3.7
α_1-globulin (%)	13.0± 0.7	11.4± 1.3	9.2± 0.7	10.1± 1.4	11.3± 1.0
α_2-globulin (%)	5.9± 0.6	6.1± 0.4	9.4± 1.5	6.5± 0.8	5.9± 0.8
β-globulin(%)	4.5± 0.8	4.7± 0.8	6.3± 1.7	5.2± 1.5	4.7± 0.6
ϕ-globulin (%)	19.0± 0.9	17.7± 1.6	23.4± 1.9	21.8± 3.7	19.2± 3.8
γ-globulin (%)	5.5± 0.5	6.0± 0.4	7.3± 3.9	9.4± 2.5	9.2± 2.5
A/G (ratio)	1.09± 0.06	1.18± 0.05	0.80± 0.12	0.90± 0.19	0.99± 0.14
Blood glucose (mg/dl)	156.2±12.5	142.0±11.0	158.3±14.4	114.0±21.9	140.0±10.0
Bilirubin (mg/dl)	trace	trace	trace	trace	trace
Total lipids (mg/dl)	567.7±45.4	373.4±36.9	437.7±35.9	199.5±60.8	412.3±34.9
Phospholipids (mg/dl)	88.4± 6.7	66.8±12.8	82.2± 5.7	64.4±14.4	69.3±17.6
Neutral lipids (mg/dl)	479.3±39.3	306.8±28.8	355.5±33.8	153.1±46.8	344.0±23.2
Total cholesterol (mg/dl)	58.4±10.3	46.7± 4.5	50.4± 1.3	36.6±12.2	44.7± 9.3
Na (meq/l)	154.0± 9.8	151.0± 9.8	142.3±21.4	150.8± 8.0	157.6± 8.1
K (meq/l)	4.5± 0.8	3.8± 0.8	4.6± 0.7	4.1± 0.6	4.3± 0.6

All values are expressed as mean±S.D.
Five male rats were used for each group.

に示すとおりである。

実験結果

各毒性物質投与による症状と病変:

Lipostichaerin 投与群は黄褐色尿の排泄増がみられ肝機能障害が推定されたが，剖検結果からは外

Table 4 Enzyme activities of blood plasma in affected rats, administered with two toxic substances

Enzyme (unit)	Control	Lipostichaerin		Toxic phospholipid	
		i.p.	*p.o.*	*i.p.*	*p.o.*
GOT (Karmen)	73.5± 7.1	170.4±34.1	121.0± 40.7	161.4± 53.3	118.0± 18.1
GPT (Karmen)	32.7± 9.3	106.9±55.0	33.8± 2.6	95.8± 32.9	45.4± 7.1
AlP (King-Armstrong)	22.7± 4.9	25.1± 3.0	14.4± 3.0	17.4± 5.0	18.4± 3.2
LDH (Wróblewski)	446.5±121.8	778.6±284.2	713.3±116.8	620.2±155.1	544.3±116.0
ChE (*d*pH)	0.19± 0.0	0.17± 0.01	0.17± 0.01	0.15± 0.03	0.16± 0.03
Amylase (Smith-Roe)	161.4± 15.(	79.4±14.6	130.5± 32.3	57.9± 39.7	164.6± 8.0

All values are expressed as mean ±S.D.
Five male rats were used for each group.

観上肝臓の異常はみられなかった。毒性燐脂質投与群では下痢症状を呈し消化器系の障害が推定されたが，やはり剖検でも腸管に充血がみられさらに肝臓に混濁腫脹の病変がみられた。

各毒性物質投与群の血漿中成分と血漿中の酵素活性:

これらの測定結果は Table 3 と 4 に示すとおりである。

以上の結果，特に血糖量の低下が毒性燐脂質投与群において認められ膵炎の惹起が推察された。蛋白分画像からは各投与群とも γ-グロブリンの軽度の増加がみられた。河合[9] は γ-グロブリンの軽度増加と他の分画に著しい変化を示さないのが急性肝炎の特徴であると述べていることより各投与群は急性肝炎を惹起しているものと考えられる。さらに主として肝機能と膵機能に関係ある酵素では各投与群とも GOT, GPT, LDH 活性の上昇と ChE 活性の低下が認められるが，この傾向も肝炎の惹起を示している。また Amylase 活性の低下もみられ膵炎の併発も推察された。

考察および総括

ナガズカ卵巣の毒性物質は抽出法の違いによって蛋白性と脂質性の2種類の毒性物質が得られるが，系統的に抽出，分画を行なった結果，蛋白性の Lipostichaerin 中に脂質性の Toxic component として毒性燐脂質が存在することを認め，この両者の関係を明らかにした[1]。しかしマウスに対する毒性試験結果では両毒性物質の由来で同じであるにもかかわらず剖検結果から両者の所見に若干の相違がみられた。

これらの相違について検討を加える目的でウィスター系雄ラットを用い，Lipostichaerin と毒性燐脂質を投与した結果，症状では Lipostichaerin 投与群は黄褐色の排尿がみられ肝機能の異常が予想されたが剖検所見上では肝臓その他の実質臓器にさしたる異常は認められなかった。一方毒性燐脂質投与群では下痢症状を呈し消化器系障害が推定されたが剖検でも肝臓の混濁腫脹と腸管の充血が認められた。いずれも第4報で述べたマウスの剖検所見と異なるが，これは本実験では初期症状を対象としたことに原因するものと考えられる。

次に対照群と各毒性物質投与群との血漿成分と酵素活性について測定し比較した結果，蛋白分画における A/G 比に若干の変動がみられるほか，γ-グロブリンの軽度増加も各投与群にみられ急性中毒性肝炎を惹起していることを示した。血糖量については特に毒性燐脂質 *i. p.* 群が著しい減少を示すが各投与群にも減少の傾向がみられ急性膵炎の併発も推定される。また血漿脂質についても各投与群とも低下の傾向を示すがこの原因については不明である。

GOT と GPT 活性は各投与群（特に GPT は *i. p.* 群において）ともかなりの上昇がみられ，かつ GOT 活性 >GPT 活性なる関係を認めた。この傾向も急性肝炎の惹起していることを示している。

次に ChE 活性はラットでは非常に弱く，このため変動度も小さいが各投与群ともわずかながら活性の低下がみられる。ChE は肝細胞障害に対し鋭敏で障害の初期にも変動が現われることから急性肝炎による肝機能障害も推察された。その他 LDH 活性の上昇と Amylase 活性の低下は急性の肝炎・膵炎であることを示しているが前述の血糖量の低下と考えあわせると急性膵炎の併発と考えるのが妥当であろう。

このような検査成績からだけで結論ずけることは困難ではあるが，Lipostichaerin と毒性燐脂質投与群との間の測定値の変動は中毒症状の程度を示すものであるほか，投与した毒性物質の毒力にも関係があると考えられ，さらに Lipostichaerin と毒性燐脂質との化学構造上の相違，すなわち毒性燐脂質が蛋白質と結合している複合体かあるいは遊離している状態かということもかなり大きい要因であると考えられる。特に後者の毒性燐脂質の場合は腸管粘膜に作用して充血（マウスの例では重症の場合は出血）をもたらし腸炎を惹起するものと考えられる。また投与方法（*i. p.* か *p. o.*）も検査成績に影響し一般的に変動度は *i. p.* > *p. o.* の傾向を示した。

以上の結果からナガズカ卵巣による食中毒初期について動物実験的にみた場合，両物質とも急性膵炎（Acute pancreatitis），急性腸炎（Acute intestinitis）を併う急性中毒性肝炎（Acute toxipathic hepatitis）を惹起させることを認めた。

謝　　辞

本研究にあたり終始御指導を賜わ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，御助言を頂いた本学獣医学部久保周一郎教授，札幌医科大学佐々木禎一助教授，横山彰助教授，本学部座間宏一助教授，動物実験に御援助下さった中外製薬株式会社綜合研究所渡辺一郎氏に厚く感謝の意を表する。

文　　献

1) 羽田野六男 (1971). 北大水産彙報 **21**(4), 315-323.
2) 羽田野六男 (1971). 同誌 **21**(4), 325-330.
3) 大森義仁 (1966). 食品衛生研究 **16**(14), 1302-1313.
4) 小川恕人 (1965). 代謝 **2**(6), 74-92.
5) 金井泉 (1964). 臨床検査法提要. 東京；金原出版.
6) 斎藤正行・北村元仕・丹羽正治 (1968). 臨床化学分析 II　東京；化学同人.
7) 丹羽正治・――――・斎藤正行 (1966). 臨床化学分析 III　東京；化学同人.
8) 赤堀四郎 (1961). 酵素研究法. IV 676p. 東京；朝倉書店.
9) 河合忠 (1970). セパラックス電気泳動法による血清蛋白像のいろいろ. 東京；富士写真フイルム.