

鹿児島沿岸ハナヤナギ生息地の海藻類 及び貝類のドウモイ酸含有量

朴 煥埜, 高谷 智裕, 野口 玉雄

Screening Test of Domoic Acid in Algae and Shellfishes Around Kagoshima where "Hanayanagi" *Chondria armata* Inhabits

Hoan-joon PARK, Tomohiro TAKATANI, and Tamao NOGUCHI

Domoic acid isolated from "hanayanagi", a red alga *Chondria armata* by Daigo et al.¹⁾ is a biotoxic amino acid, which had been used as an anthelmintic in the Ryukyu Islands. In Canada at 1987, a big amnesic shellfish poisoning (ASP) case occurred due to ingestion of the cultured mussel. The causative agent was concluded to be domoic acid which a diatom *Pseudonitzschia pungens* forma *multiseries* produced. ASP infestation to bivalves has not been reported in Japan. On the other hand, "hanayanagi" is known to possess high concentration of domoic acid in Kagoshima, although the mechanism is unknown. In order to elucidate the origin of domoic acid, screening tests of domoic acid were carried out for many algae and shellfishes in Hanasezaki and Yakushima, Kagoshima Prefecture during November 1997 to December 1997. In this connection, seasonal variation of domoic acid content in "hanayanagi" was investigated at Hanasezaki, during November 1997 to July 1998. "Hanayanagi" showed high domoic acid content of 256.0–903.0 ppm at Hanasezaki during 1997 to 1998 and of 614.4 ppm at Yakushima, in December 1997. A small seasonal variation of its content was recognized in Hanasezaki. Some seaweeds entwining "hanayanagi" showed comparatively high domoic acid content in the tide pool which "hanayanagi" inhabits, while others separating from "hanayanagi" showed a small or none content. However, domoic acid was not detected in the shellfishes investigated in Hanasezaki and Yakushima. The result of bioassay of domoic acid in a mouse showed that minimum dose of domoic acid to cause a mouse scratching syndrome was 30 µg.

Key words: 鹿児島県 Kagoshima Prefecture ドウモイ酸 Domoic acid
ハナヤナギ Hanayanagi, *Chondria armata*

緒 言

ドウモイ酸は Daigo¹⁾ によって鹿児島県徳之島で地域住民が回虫駆除の目的で服用していた紅藻類フジマツモ科のハナヤナギ *Chondria armata* (地方名: ドウモイ) から単離されたアミノ酸系の生物毒である。

1987年11月から12月にかけて、カナダ東海岸のプリンスエドワード島周辺で養殖ムラサキガイ *Mytilus edulis* を食した人々の間に胃腸ならびに神経障害を主徴とした中毒が発生し、患者107人のうち4人が死亡、12人に記憶障害の後遺症が残った。Wright²⁾ らはその中毒原因物質をドウモイ酸と同定した。この事件はドウモイ酸による初めての中毒であった。その後、珪藻類 *Pseudonitzschia pungens* forma *multiseries* が多数中毒原因ムラサキガイの消化管に認められたことから、貝はこのプランクトンが産生したドウモイ酸を食物連鎖により摂取して毒化したと結論された。この珪藻は太平洋、大西洋およびインド洋に生息しているが、そこではこの種による貝の毒化の報告例はない。一方、Noguchi と Arakawa³⁾

は鹿児島県下において採集したハナヤナギおよび数種の海藻中に多量のドウモイ酸を検出している。しかし、これまで日本でドウモイ酸による食中毒(記憶喪失性貝中毒)の報告は見られていない。

本研究ではドウモイ酸汚染状況を明らかにするために鹿児島県花瀬崎、屋久島においてドウモイ酸を著量に含有するハナヤナギの群生地帯に生息する海藻類や貝類について詳細にドウモイ酸の分析を行った。さらに、ハナヤナギのドウモイ酸含有量の季節変化を調査した。また、貝類の毒化の際におけるヒトの安全性に鑑み、簡易検査の方法としてドウモイ酸によるマウスの最少発症量について検討した。

実験材料および方法

試 料

1997年11月に鹿児島県花瀬崎、12月に鹿児島県屋久島で試料採集を行った。花瀬崎において、海藻類では紅藻類ハナヤナギ、モサズキ類 *Jania* sp., オゴノリ類 *Gracilariaceae* sp., マグリ *Digena simplex*, ハイゴナハダ *Liagora caenomyce*,

褐藻類シワヤハズ *Dictyopterus undulata*, ヘラヤハズ *Dictyopterus prolifera*, 緑藻類フサイズタ *Caulerpa okamurai* を, 貝類ではカキ類 *Ostreidae* sp., カメノテ *Capitulum mitella*, ヒザラガイ類 *Chitonidae* sp., フジツボ類 *Balanidae* sp., アマオブネガイ類 *Neritidae* sp. を採集した。屋久島においては, 海藻では紅藻類ハナヤナギ, イソダンツウ *Caulacanthus okamurai*, ハイテングサ *Gelidium divaricatum*, 緑藻類ミドリゲ *Cladophoropsis zollingeri* を, 貝類ではカキ類, アマオブネガイ類, タマキビガイ類 *Littorinidae* sp. を採集した。また, 1998年1月, 6月, 7月に花瀬崎でハナヤナギを採集した。これらの試料は-25℃で数日間凍結保存した後, 以下の実験に供した。マウスアッセイ用のドゥモイ酸はSigma社(純度:90%)製標品を使用した。

ドゥモイ酸の抽出

Fig. 1 に示す操作でドゥモイ酸の抽出を行った。すなわち, 試料に同容の0.1N 塩酸を加え, ホモジナイズ後沸騰水浴中で5分間加熱した。冷却後, 遠心分離に付し, 上清を得た。さらに, Sep-Pak C₁₈ カートリッジカラム (Waters 社製), 次いでメンブランフィルター0.45μm (Toyo Roshi 社製) に供して試験溶液とした。

Materials

Combined with an equivalent volume of 0.1N HCl

Homogenized

Heated in a water bath for 5 min

Centrifuged at 10,000 g for 15 min

Supernatants

Applied to a Sep-Pak C₁₈ cartridge column

Filtered through cellulose acetate membrane(0.45 μ m)

HPLC analysis

Fig. 1. Preparation of test solution for the HPLC analysis of domoic acid

HPLC (高速液体クロマトグラフィー) 分析

上記のようにして得られたドゥモイ酸試験溶液について, Table 1 に示す HPLC 条件により, 分析した。カラムは逆相 ODS シリカ系カラム Finapak SIL C18 T-5 (4.5X 250mm, 日本分光) を用い, 移動相の溶媒にはアセトニトリル, ヘプタフルオロ酪酸, 水 (12.0 : 0.43 : 87.57) の混合液をアンモニア水で pH3.05 に調整して使用した。流

Table 1. Operating conditions for the HPLC analysis of domoic acid

Column	; Finapak SIL C18 T-5(4.5 X250mm)
Temperature	; Room temperature
Mobile phase	; Acetonitrile - heptafluorobutyric acid - water (12 : 0.43 : 87.57, pH 3.05)
Flow rate	; 0.8ml /min
Detection	; 242nm

速は0.8ml/min とした。測定にはドゥモイ酸が有する共役二重結合の特徴的な吸収を与える 242nm を用い, また試料注入量は25μl とした。あらかじめ, ドゥモイ酸標準液25μl (濃度20.0ppm, Sigma 社) を HPLC に付して, ピーク出現の保持時間 (Retention time: RT) を測定した。またこの分析の検出限界濃度は1.0ppm であった。

マウスアッセイ

マウス (ddY 系, 19~20g, ♂) におけるドゥモイ酸の最少発症量を調べるために濃度20.0~100.0ppm のドゥモイ酸を用いてマウスの腹腔内に1ml 投与し, 毒性試験を行った。

結果および考察

HPLC クロマトグラム

HPLC 分析の結果を Table 2~3 に示した。1997年11月花瀬崎で採集したハナヤナギはドゥモイ酸を506.0ppm 含有していた。ハナヤナギに巻き付いていた海藻はモサズキ類, オゴノリ類, シワヤハズでそれぞれ9.6ppm, 11.7ppm, 54.7ppm のドゥモイ酸を含有していた。また同じタイドプール

Table 2. Content of domoic acid in samples collected at Hanasezaki, Kagoshima Prefecture in November, 1997

Sample	Domoic acid (ppm)
Shellfishes	
<i>Ostreidae</i> sp.	<1.0(wet)
<i>Capitulum mitella</i>	<1.0(wet)
<i>Chitonidae</i> sp.	<1.0(wet)
<i>Balanidae</i> sp.	<1.0(wet)
<i>Neritidae</i> sp.	<1.0(wet)
Red algae	
<i>Chondria armata</i>	256.0 - 903.0**(wet)
<i>Jania</i> sp. *	9.6(wet)
<i>Gracilariaceae</i> sp. *	11.7(wet)
<i>Digenea simplex</i>	1.2(wet)
<i>Liagora caenomyce</i>	<1.0(wet)
Brown algae	
<i>Dictyopterus undulata</i> *	54.7(wet)
<i>Dictyopterus prolifera</i>	<1.0(wet)
Green algae	
<i>Caulerpa okamurai</i>	<1.0(wet)

* Entwining *C. armata*

** Samples were collected four times through 1997 to 1998

Table 3. Content of domoic acid in samples collected at Yakushima, Kagoshima Prefecture in December, 1997

Sample	Domoic acid(ppm)
Shellfishes	
<i>Ostreidae</i> sp.	<1.0(wet)
<i>Littorinidae</i> sp.	<1.0(wet)
<i>Neritidae</i> sp.	<1.0(wet)
Red algae	
<i>Chondria armata</i>	614.4(wet)
<i>Caulacanthus okamurai</i> *	22.5(wet)
<i>Gelidium divaricatum</i> *	28.6(wet)
<i>Gelidium divaricatum</i>	9.9(wet)
Green algae	
<i>Cladophoropsis zollingeri</i>	<1.0(wet)

* Entwining *C. armata*

で採集したマクリも1.2ppmのドウモイ酸を含有していた。しかしながら、同じタイドプールで採集された貝類はすべてドウモイ酸が1.0ppm未満であった。一方、1997年12月に屋久島で採集したハナヤナギはドウモイ酸を614.4ppm含有していた。花瀬崎での場合と同様に、ハナヤナギに巻き付いていた海藻イソダンツウ、ハイテングサにはそれぞれ22.5ppm、28.6ppmのドウモイ酸が含有されていた。また同じタイドプールで採集されたハイテングサも9.9ppmのドウモイ酸を含有していた。ハナヤナギは両地域とも100ppm以上のレベルでドウモイ酸を含有しており、地域差は認められなかった。またハナヤナギに巻き付いている海藻には2地域ともドウモイ酸が検出されるとともに、同じタイドプールに生息する海藻にも僅かながらドウモイ酸が検出されることは、ドウモイ酸による毒化が単なるハナヤナギの体内での生合成によるものだけの理由では説明できない。今後、ハナヤナギのドウモイ酸毒化機構をこの点から検討したい。同じタイドプールで採集された貝類はすべてドウモイ酸が1.0ppm未満であり、ドウモイ酸による汚染は認められなかった。これらのことから日本におけるドウモイ酸による汚染は主として紅藻類が汚染され、カナダやアメリカのように寒冷地域における貝類毒化とは異なるルートがあることが強く示唆された。したがって、水産食品の安全性のために、特に日本南部の鹿児島県内のハナヤナギ群生周辺地域について、ドウモイ酸による魚介類汚染に今後引き続き注意を払う必要があると思われる。

一方、鹿児島県花瀬崎のハナヤナギにおけるドウモイ酸はFig. 2のように256.0~903.0ppm含有し季節的な差が見られた。夏と冬で時期別に比べて見ると、もっとも濃度が高かったのは1月の903.0ppmで、7月の約3.5倍であった。この結果は先の野口ら³⁾の結果とほぼ同じであり、これはハナヤナギの生活史との関連性がうかがわれた。

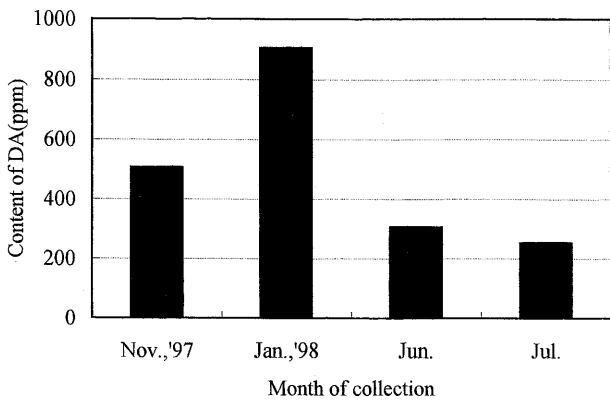


Fig. 2. Seasonal variation of content of domoic acid in *Chondria armata* at Hanasezaki

マウス毒性試験

ドウモイ酸のマウスに対する投与量と特徴的な症状であるscratching syndrome (腹部を後足で掻く症状)の発症時間との関係をFig. 3に示した。同症状と投与量との関係を見てみると、投与量が増えるに従って、この症状の発症時間が早くなる傾向が見られた。また、マウスの個体差等も考えられるが、ドウモイ酸による最少発症量は30 μ g程度であることが推察された。これは暫定的な水産物の出荷規制値である20 μ gドウモイ酸をマウス毒性試験法では検出できず、マウスのドウモイ酸に対する感度はあまりよくないことを示した。

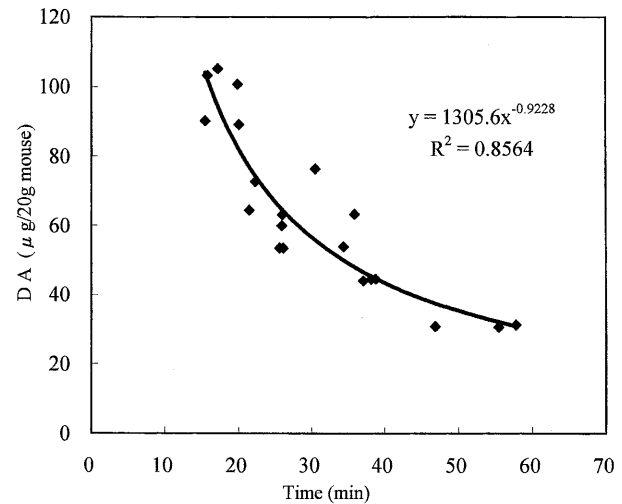


Fig. 3. Dose-scratching syndrome time curve of domoic acid in mice

文 献

- 1) 醍醐湖二：薬学雑誌79, 353~356 (1959).
- 2) J.L.C. Wright, R.K. Boyd, A.S.W. de Freitas, M. Falk, R.A.Foxal, W.D.Jamieson, M.V.Laycock, A.W.McCulloch, A.G.McInness, P.Odense, V.P.Pathak, M.A.Quilliam, M.A.Ragan, P.G.Sim, P.Thibault and J.A. Walter: *Can. J. Chem.* 67, 481~490 (1989).
- 3) T. Noguchi and O. Arakawa: *Natural Toxins II*, Plenum Press, New York, 521~526 (1996).