

第5章 アオブダイ毒の起源生物

1997年9月に大阪市で発生したアオブダイ中毒事例 (Table3, 事例19) の中毒検体が採捕された徳島県牟岐町沖で、同時期に採捕されたアオブダイの消化管内容物を検索したところ、砂、海藻、サンゴのかけらが見出された。他方、同海域の海藻上には底生性渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属を優占属とし、同年夏期には海藻1g当たり最大150,000 cells に達する多量の渦鞭毛藻の付着が確認された (吉松ら, 1999a, b)。また、近年、*Ostreopsis* 属が PTX 誘導体を産生するという報告がある (Usami ら, 1995; Ukena ら, 2001)。

そこで、アオブダイが海藻とともに混食している可能性の高い徳島県牟岐町沖産 *Ostreopsis* 属について、その培養藻体の毒性および毒の性状を調べた。また、アオブダイ中毒の発生率が高く、その毒化海域とされる長崎県福江島における本属の分布調査を行なったところ、本属の存在が認められたことから、その培養藻体についても同様に検討を加えた。

第1節 有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属の培養

本節では、徳島県牟岐町沖産および長崎県福江島産 *Ostreopsis* 属の培養を試みた。

試料および方法

試料

試料は、1997年10月に徳島県牟岐町沖で採取、分離した *Ostreopsis* 属および2001年6月に長崎県福江島の玉之浦湾 (Fig. 32) で得られた本属の単一株を用いた。試料は、分離後、直ちに、長崎大学水産学部水産食品衛生学研究室へ送付した。

培養

試料は、ES 変成培地 (岡市ら, 1982; Watanabe ら, 1997) (Table 14) を用い、pH 7.6 - 7.8, 培養温度 21°C, 光強度 85 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 明暗周期 12 L/12 D の条件下で培養した。

結果および考察

当初、本研究に用いた牟岐町沖産 *Ostreopsis* 属は、光学顕微鏡下における観察から *O. ovata* である可能性が示されたが、培養による細胞殻の変形が著しく、そのプレート構造の判定 (Fukuyo, 1981) が極めて困難であったため、本研究では種名を確定せず、*Ostreopsis* sp. (Fig. 33) とした。他方、玉之浦湾産 *Ostreopsis* 属は、分離直後に、長崎大学水産学部 吉田 誠 博士により、*O. siamensis* (Fig. 33) と同定された。

以上、本節では、牟岐町沖産 *Ostreopsis* sp. および玉之浦湾産 *O. siamensis* の培養藻体 (それぞれ 4.0×10^5 cells, 4.5×10^5 cells) を得た。

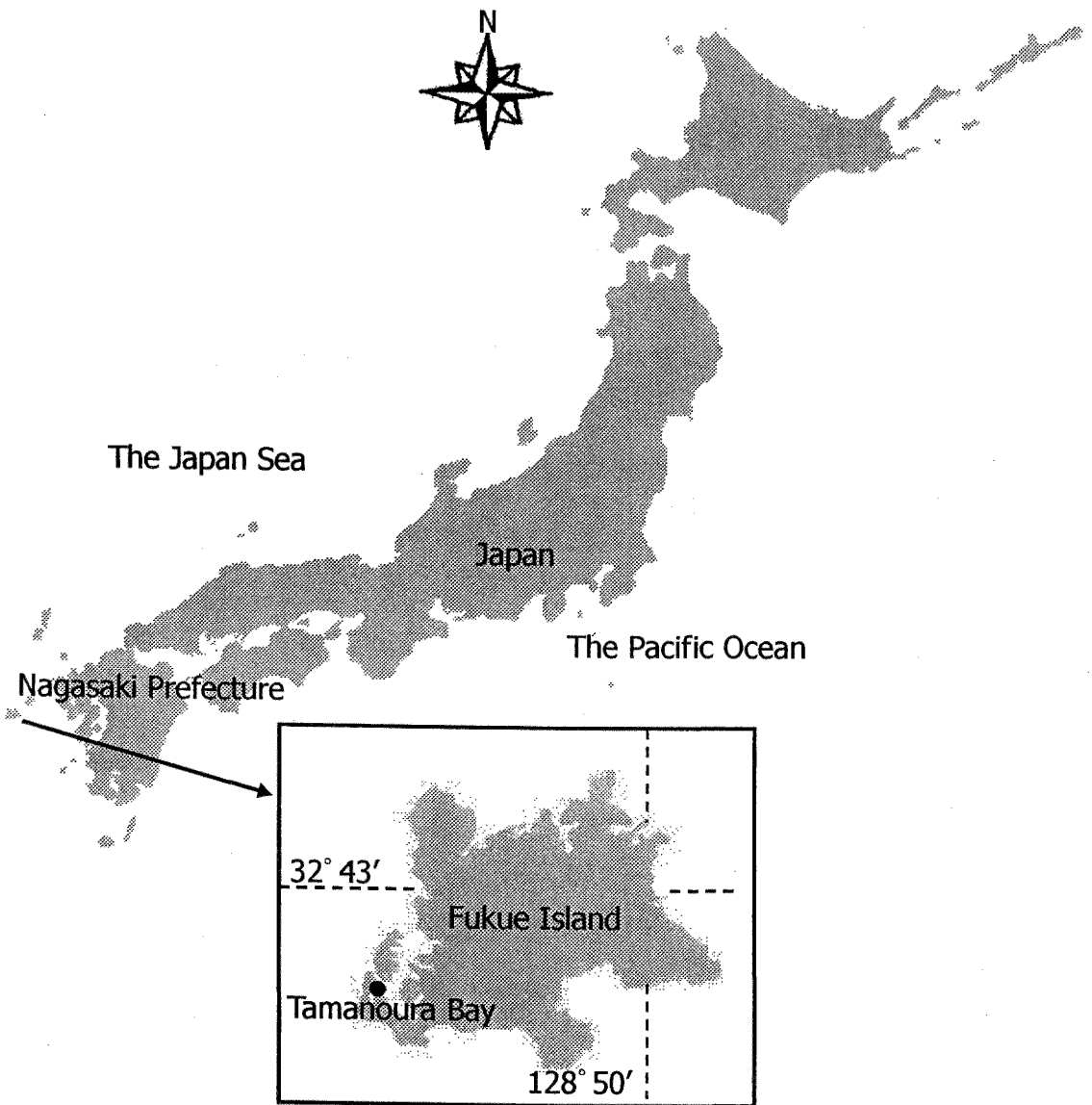


Fig. 32. Map showing the Tamanoura Bay (●) where *O. siamensis* was harvested.

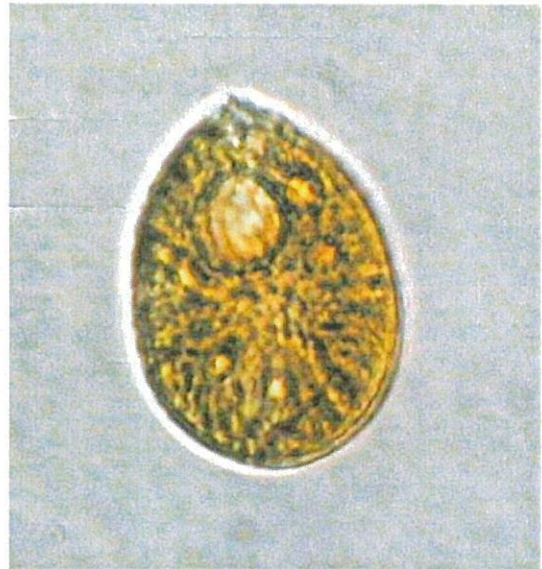


Fig. 33. *Ostreopsis* sp. (left) from the offshore of Mugi Town, Tokushima Prefecture and *O. siamensis* (right) from the Tamanoura Bay, Nagasaki Prefecture.

第2節 *Ostreopsis* 属産生毒のマウスに対する致死活性および血清 CPK 上昇活性

本節では、本章第1節で得られた牟岐町沖産 *Ostreopsis* sp. および玉之浦湾産 *O. siamensis* の培養藻体につき、産生毒のマウスに対する致死活性を調べた。また、前者の産生毒については、マウス血清に及ぼす生化学的性状の検討を行なった。

試料および方法

試料

試料は、牟岐町沖産 *Ostreopsis* sp. および玉之浦湾産 *O. siamensis* の培養藻体（それぞれ 4.0×10^5 cells, 4.5×10^5 cells）を用い、試験液の調製に供するまで -25°C で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

試験液の調製

試験液の調製は、第1章第4節の試験液の調製法に準拠した。

各試料に3倍量の50%メタノールを加え、超音波破壊機を用いて氷水中で3分間抽出し、11,000 g で15分間遠心分離して上清を抽出液とした。残渣については、同様の操作を2回繰り返して上清を合一した。抽出液を減圧濃縮後、同量のジエチルエーテルで2回脱脂した。得られた水画分を蒸留水：1-ブタノール（1：1）による溶媒分画に付し、1-ブタノール画分を試験液とした。

マウス毒性試験

本試験は、第2章第1節のマウス毒性試験法と同様に行った。

マウス血清の調製

マウス血清の調製は、第2章第2節のマウス血清調製法と同様に行った。

ただし、牟岐町沖産 *Ostreopsis* sp. より得られた粗毒（0.5 MU/20 g マウス）を投与してから6, 12, 24時間後に採血し、血清を調製した。

また、PTX 標品 (12 ng/ml) 投与についても同様に行なった。

結果および考察

いずれの 1-ブタノール画分も、供試マウスを 48 時間程度で死亡させる遅延性致死活性を示す毒 (いずれも 1.0×10^{-4} MU/cell) を保有しており、それらの毒力に差異は認められなかった。その際、マウスは、約 1 時間経過すると四肢の麻痺が始まり、呼吸困難や痙攣を呈したのち、嗜眠状態となり、そのまま死亡した。さらに、牟岐町沖産 *Ostreopsis sp.* より得られた粗毒 (非致死量) を投与したマウスの血清 CPK 値は、6 時間後に 110 - 180 IU/l (130 ± 30 IU/l)、12 時間後に 130 - 780 IU/l (370 ± 290 IU/l) と徐々に上昇し、24 時間後に最高値 980 - 1,600 IU/l ($1,240 \pm 270$ IU/l) に達した (Fig. 33)。他方、PTX 標品を投与したマウスの血清 CPK 値は、6 時間後に最高で 2,700 - 4,300 IU/l ($3,500 \pm 1500$ IU/l) に達し、12 時間後に 2,400 - 3,500 IU/l ($2,900 \pm 580$ IU/l)、24 時間後に 1,200 - 1,900 IU/l ($1,500 \pm 410$ IU/l) と減少した (Fig. 34)。

第 1 章第 1 節で述べたように、アオブダイ中毒の患者の CPK 値は、発症日もしくは発症 2-3 日で最高値を示すように、ヒトの場合、その上昇時間に差異が認められており、これは原因物質の摂取量に関係していると思われる。従って、牟岐町沖産 *Ostreopsis sp.* から得られた粗毒によるマウス血清の CPK 値の上昇時間の差異も投与毒量が低かったことと、また、本毒は PTX 標品とは異なり粗毒であったために、第 2 章第 2 節で述べたアオブダイ毒および本節で示された PTX 標品による場合と比較して、遅延的に上昇したと推察され、本毒のマウスに対する CPK 上昇活性は、それらの性状と酷似していると考えられた。

以上、本節では、牟岐町沖産 *Ostreopsis sp.* および玉之浦湾産 *O. siamensis* の産生毒はマウスに対して遅延性致死活性を示すとともに、前者の毒はマウスに対する血清 CPK 上昇活性を保持していると推察された。

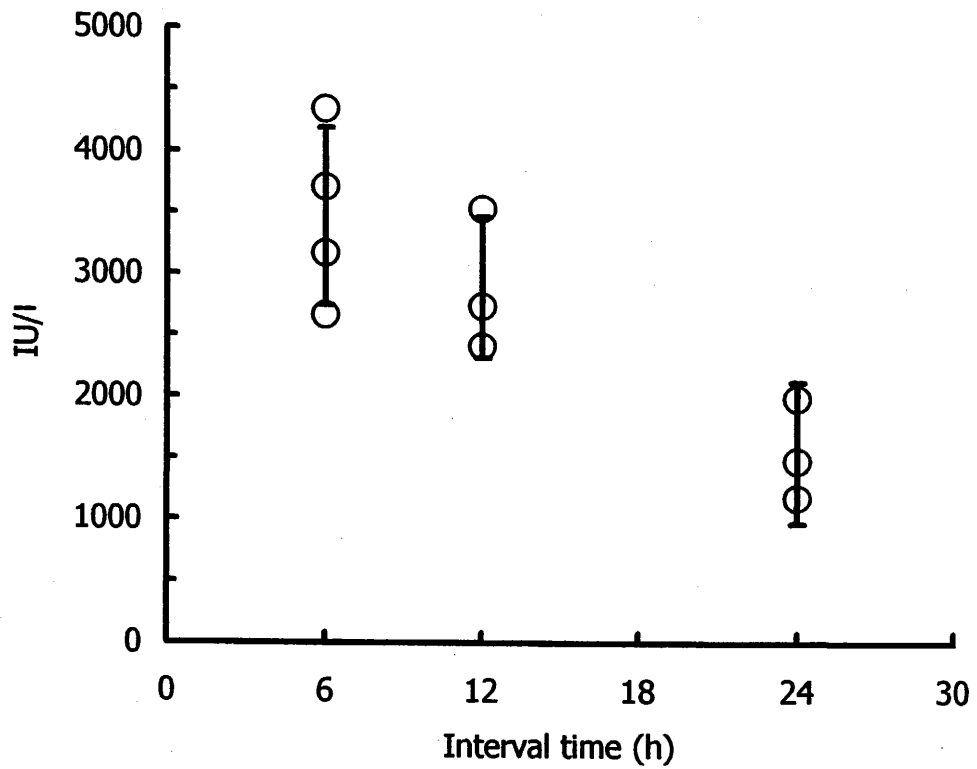
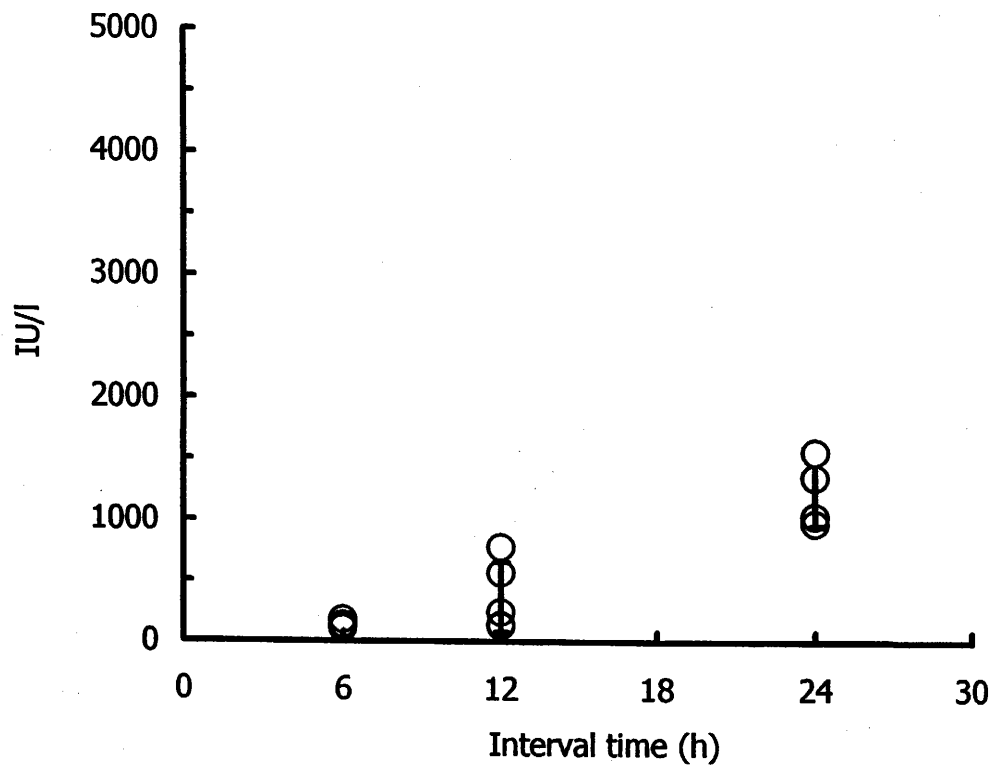


Fig. 34. CPK level of mouse after being injected with the toxin in the 1-butanol layer from *Ostreopsis* sp. (upper) and PTX standard (lower) at different time.

第3節 *Ostreopsis* 属産生毒の Maus およびヒト赤血球に対する溶血活性

本節では、牟岐町沖産 *Ostreopsis* sp. および玉之浦湾産 *O. siamensis* の産生毒について、Maus ならびにヒト赤血球に対する溶血活性を検討した。

試料および方法

試料

試料は、本章第2節で牟岐町沖産 *Ostreopsis* sp. および玉之浦湾産 *O. siamensis* から得られた粗毒を用い、試験に供するまで -25°C で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

試験液の調製

試験液の調製は、第2章第3節の試験液の調製法に準拠し、いずれも 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 , 2×10^1 cells/ml に調製したものを試験液とした。

溶血活性試験

本試験は、第2章第3節の溶血活性試験法と同様に行った。

結果および考察

牟岐町沖産 *Ostreopsis* sp. より得られた粗毒は、インキュベート1時間において試料濃度 10^4 cells/ml で $87.9 \pm 0.734\%$ と高い溶血率を示したが、試料濃度 10^3 cells/ml では $6.35 \pm 0.565\%$ 、試料濃度 10^2 cells/ml ではほとんど溶血しなかった (1%未満) (Fig. 35)。しかしながら、インキュベート4時間において、試料濃度 10^2 cells/ml で $19.6 \pm 1.67\%$ 、試料濃度 10^3 cells/ml で $87.9 \pm 2.99\%$ 、試料濃度 10^4 cells/ml ではほぼ100%と遅延性溶血活性を示した (Fig. 35)。さらに、試料濃度 $10^2 - 10^4$ cells/ml における本活性は、抗 PTX 抗体により抑制された (Fig. 36)。また、本画分は、ヒト赤血球に対してもウワバインにより抑制される

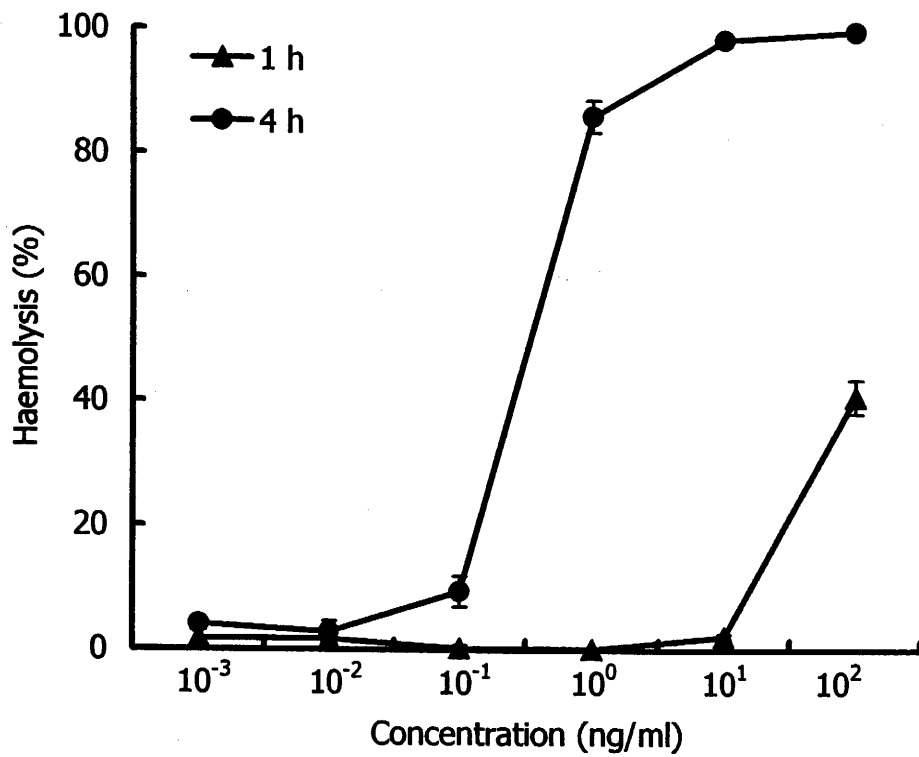
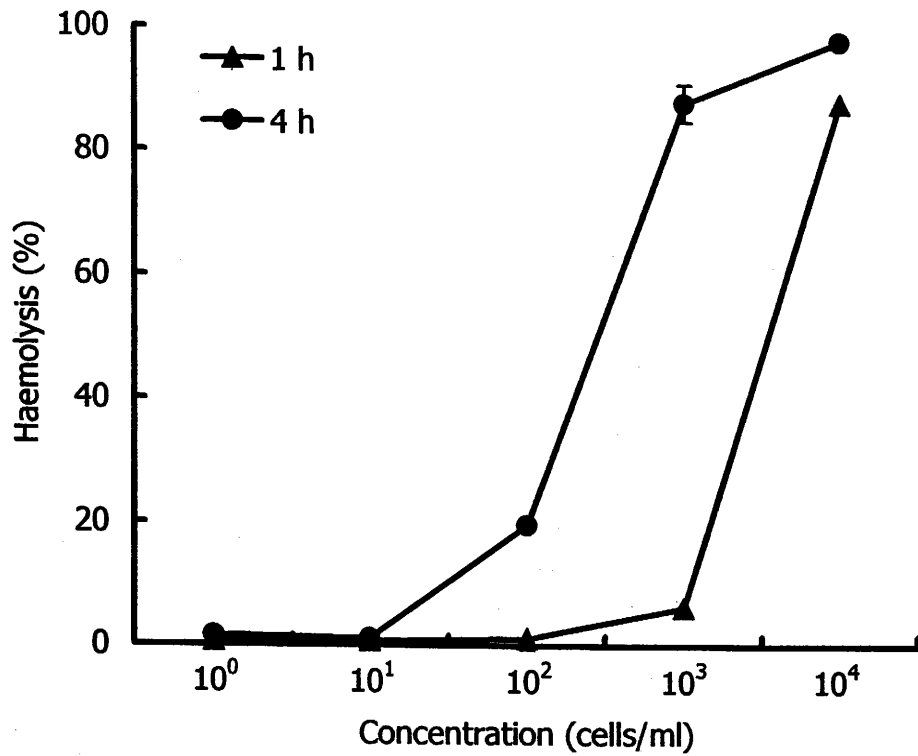


Fig. 35. Delayed haemolysis by the toxin in the 1-butanol layer from *Ostreopsis* sp. (upper) and PTX standard (lower).

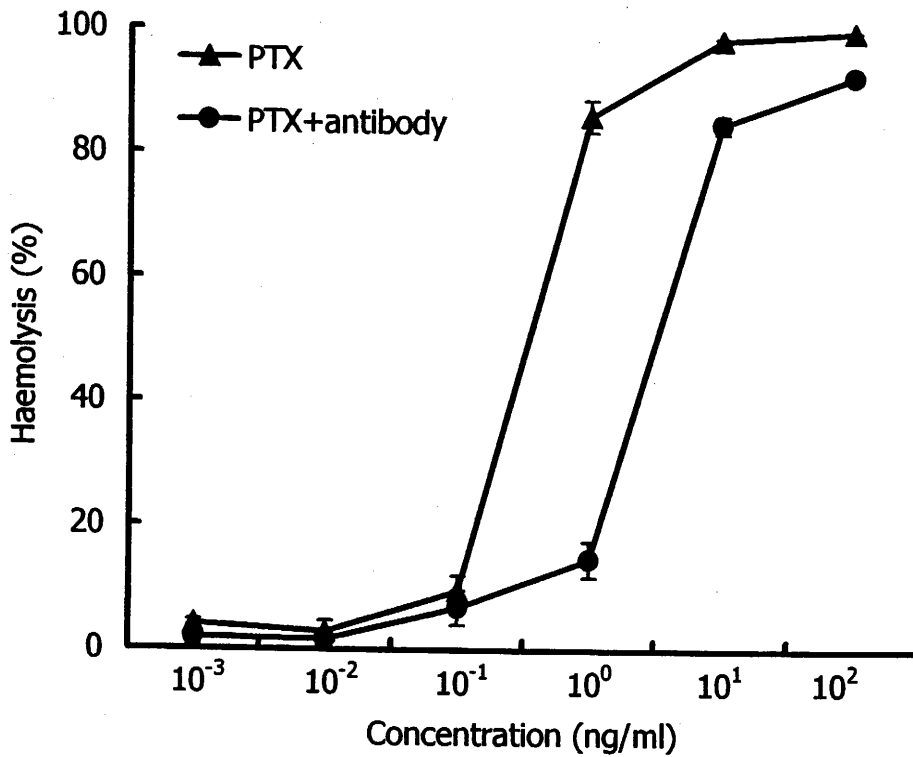
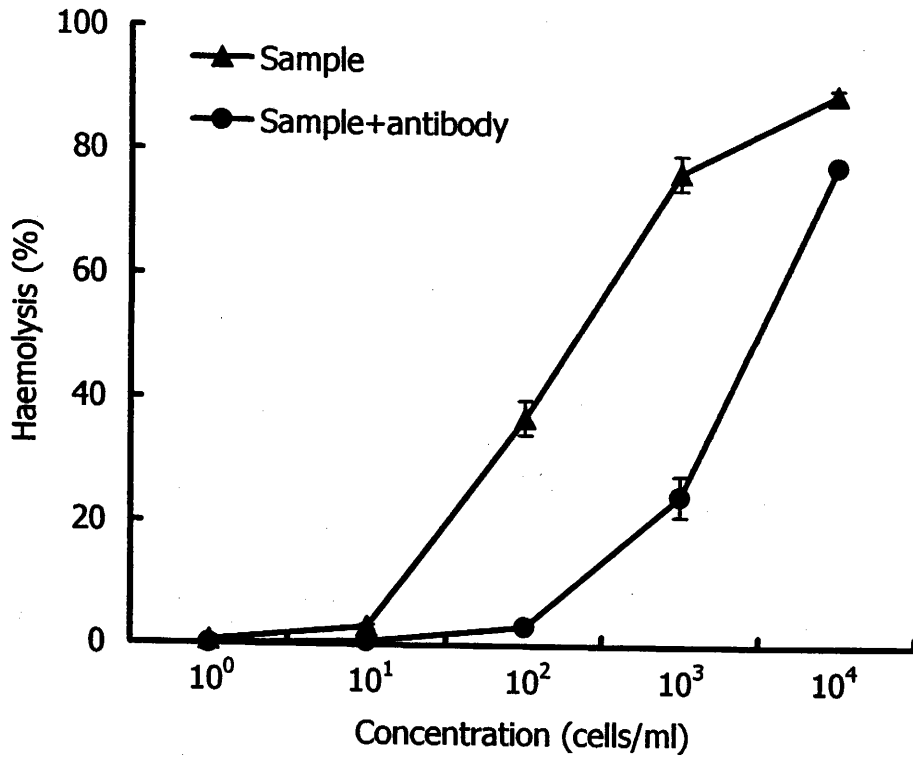


Fig. 36. Suppression of haemolytic activity of the toxin in the 1-butanol layer from *Ostreopsis* sp. (upper) and PTX standard (lower) by anti-PTX antibody.

遅延性溶血活性を示した (Fig. 37)。他方、玉之浦湾産 *O. siamensis* から得られ粗毒もマウスならびにヒト赤血球に対して抗 PTX 抗体もしくはウワバインにより抑制される遅延性溶血活性を示した (Fig. 38 および 39)。

これら *Ostreopsis* 属の産生毒のマウスおよびヒト赤血球に対する性状は、第 2 章第 3 節で述べたアオブダイ毒ならびに PTX のそれと酷似しているとともに、本章第 2 節において、牟岐町沖産 *Ostreopsis* sp. より得られた粗毒は、アオブダイ毒ならびに PTX と同様にマウスに対して血清 CPK 上昇活性を示したことから、1997 年夏季に *Ostreopsis* 属が大量発生した牟岐町沖では、本属が多量に付着した海藻類をアオブダイが捕食して毒化し、*Ostreopsis* sp. から得られた粗毒と同様の性状を示すアオブダイ毒を保有したと推察された。一方、玉之浦湾においても本属、すなわち *O. siamensis* が大量発生した場合にアオブダイが毒化する可能性が示唆された。

以上、本節では、アオブダイ毒の起源生物は、底生性有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属であり、本属の大量発生によりアオブダイが食物連鎖によって毒化することが強く推察された。

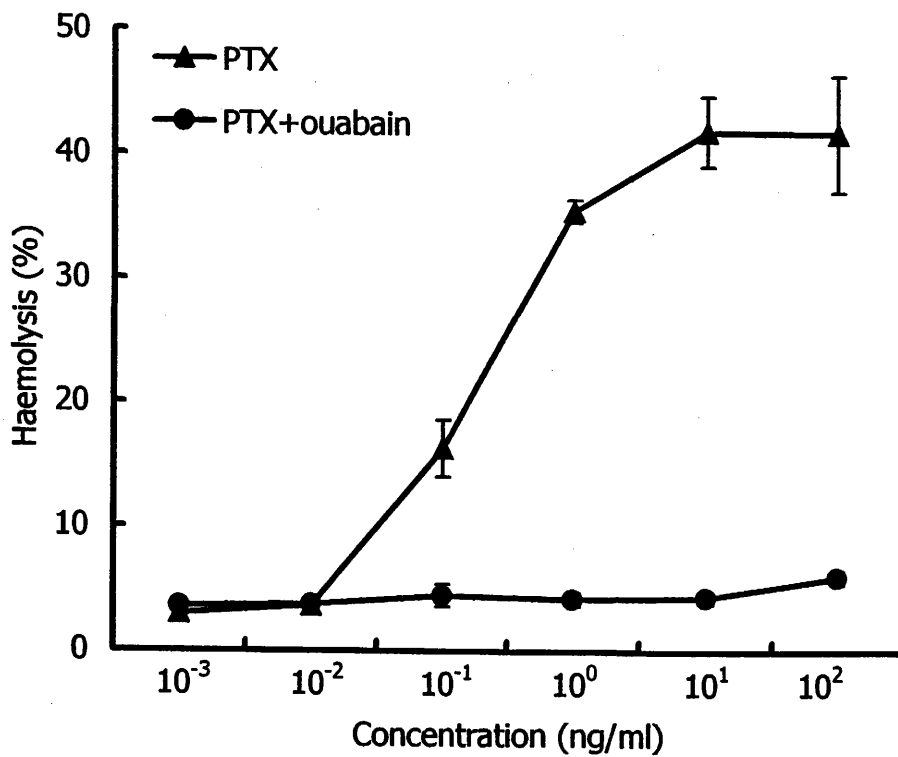
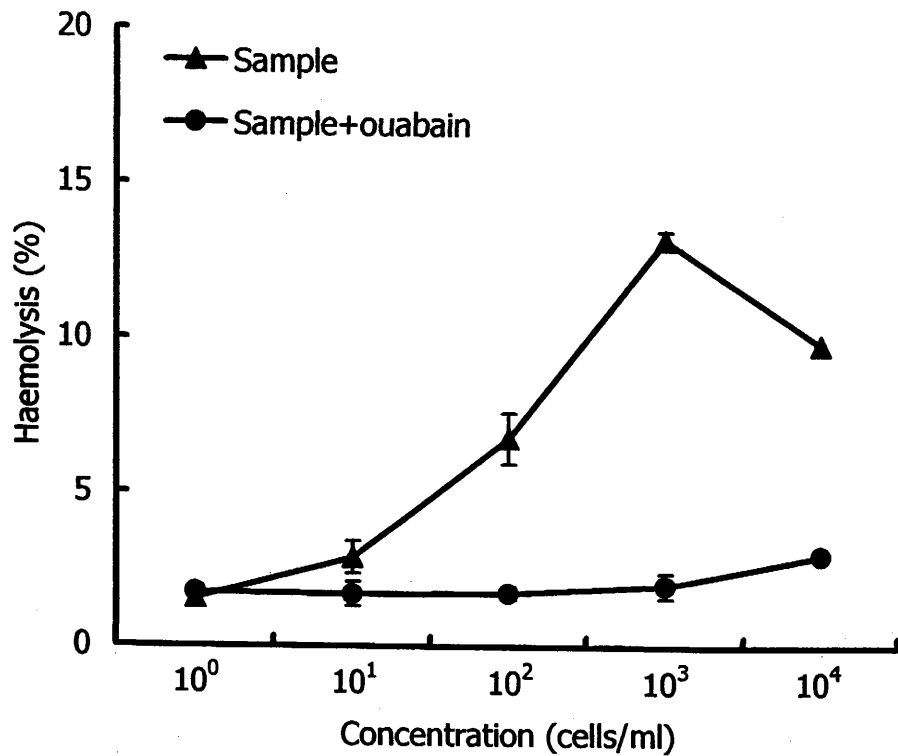


Fig. 37. Suppression of haemolytic activity of the toxin in the 1-butanol layer from *Ostreopsis* sp. (upper) and PTX standard (lower) by ouabain.

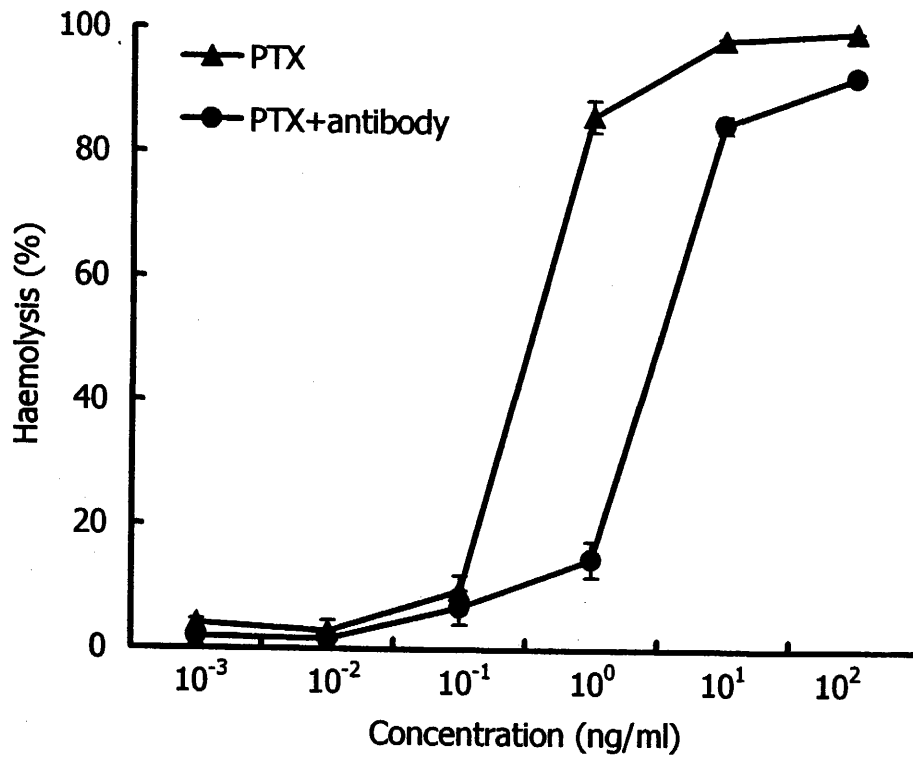
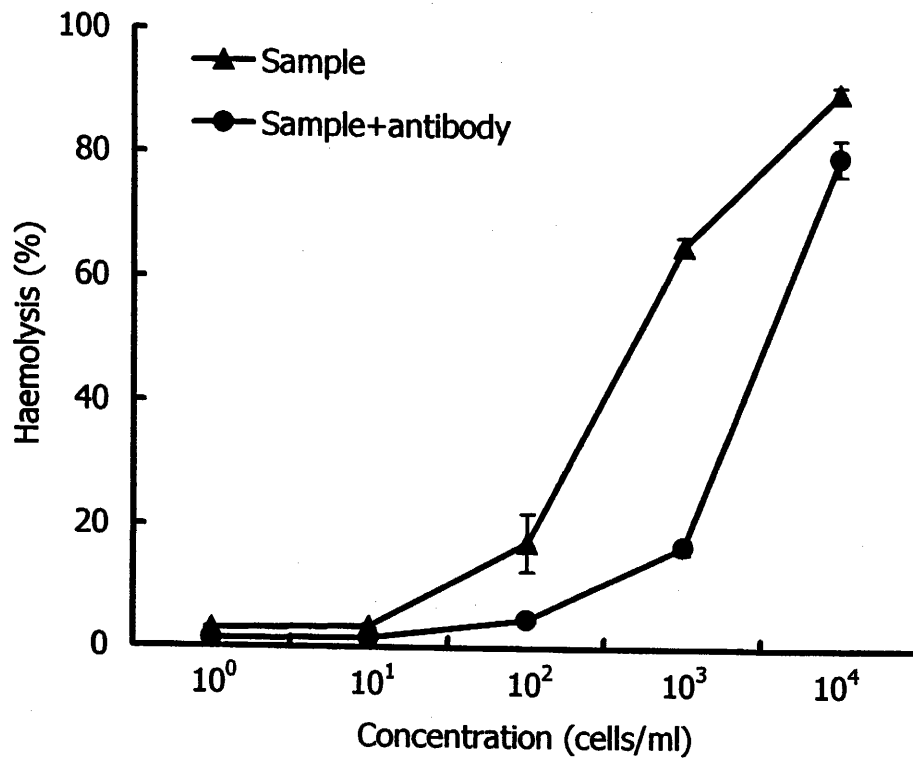


Fig. 38. Suppression of haemolytic activity of the toxin in the 1-butanol layer from *O. siamensis* (upper) and PTX standard (lower) by anti-PTX antibody.

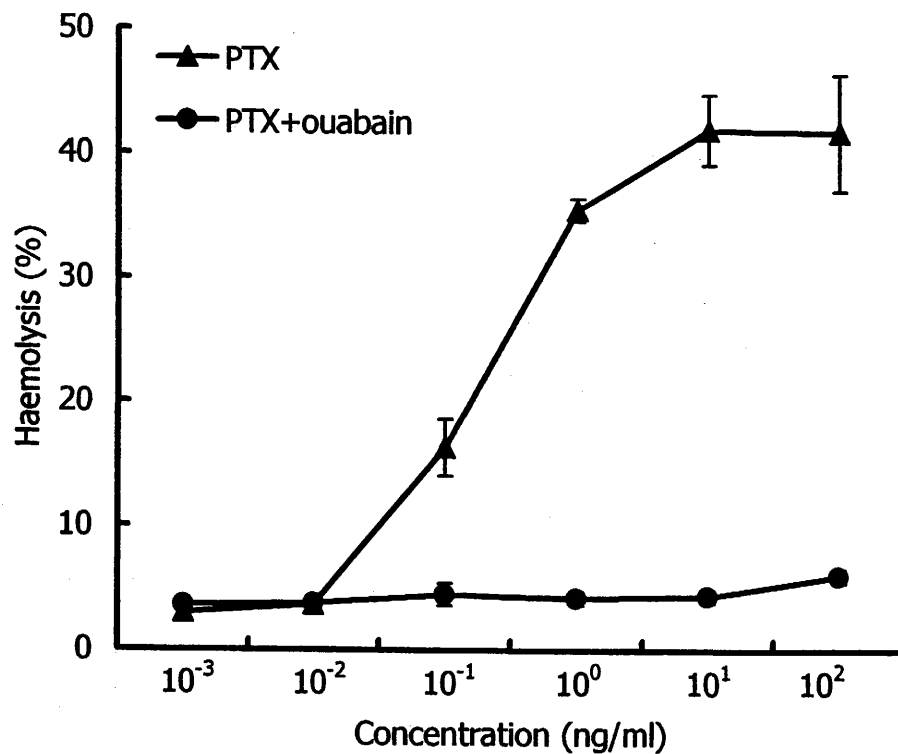
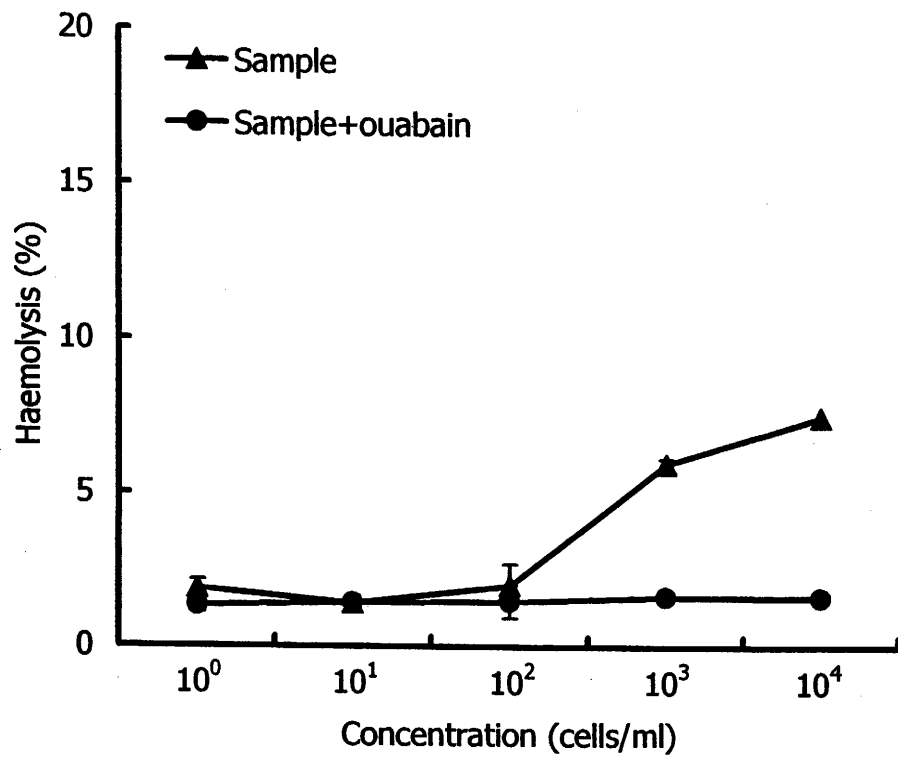


Fig. 39. Suppression of haemolytic activity of the toxin in the 1-butanol layer from *O. siamensis* (upper) and PTX standard (lower) by ouabain.