[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
衛生 化学 学
42 (4) 333-339 (1996)

生カキ中腸腺のホスホリパーゼ A 活性値の変化について —酸添加並びに保存温度の影響—

佐二木順子,^a 佐藤正美^b
千葉県衛生研究所,^a イカリ薬品^b

Effects of Acids and Storage Temperatures on the Phospholipase A Activities in Oyster Digestive Glands

JUNKO SAJIKI^a and MASAMI SATO^b

Public Health Laboratory of Chiba Prefecture,^a 666-2 Nitona-cho, Chuo-ku, Chiba 260,
Japan and Ikari Co., Ltd.,^b 1-12-3 Akanehama, Narashino 275, Japan

(Received February 27, 1996)

Effects of the acids and storage temperatures on the phospholipase A (PLase A) activities in oyster digestive glands (ODG) were investigated. The results were summarized as follows; 1) Specific activities of both PLase A₁ and A₂ in ODG treated with acetic acid and stood at 37°C were higher than those in control group. The increase of these enzyme activities in ODG treated with 4% acetic acid (pH 2.5) was larger than those with 1% and 16% acetic acid. The enhancement of the enzyme activities in ODG was induced within 1 hr after the treatment. 2) No significant change was observed in the specific activities of PLase A₁ and A₂ in ODG treated with 0.01 N HCl (pH 2.2) and stood at 37°C throughout experimental period (5 h). The values were not different from those in control group. 3) Protein contents in all ODG samples treated with acids were lower than those in control group. The ODG treated with 4% acetic acid at 37°C had the lowest value. 4) Specific activities of both PLase A₁ and A₂ increased 3 d after the storage at 5°C. The increase of these specific activities observed until 2 weeks after the storage at 5°C was considered to be due to the decrease of protein contents. The degree of increase in enzyme specific activity at 3 weeks, however, was proportionally larger than that of the decrease in protein contents. No significant change was observed in PLase A activity in ODG stored at both -20°C and -70°C. 5) The optimum temperatures of PLase A₁ and A₂ were 37°C. The results showed that an increase of PLase A activity was induced in the early stage of oyster marination stood at 37°C. It was suggested that hydrolysis in phospholipid and protein denaturation would precede the enhancement of PLase A, and temperature could be one of the important factors on the enzyme activation.

Key words — oyster ; phospholipase A ; acids treatment ; storage temperature.

はじめに

生カキによる食中毒は、主として細菌、¹⁾ウイルス²⁾等の微生物により引き起こされるものと考えられており、流通における品質管理に関しては多大な注意が払われている。にもかかわらず、わが国では、生カキによる食中毒が跡を断たない。

最近、漁獲後の魚³⁾や二枚貝^{4,5)}中で産生される遊離多価不飽和脂肪酸並びにその酸化物のマウスに對

する致死作用が報告されている。著者らは、これら物質が生カキの食中毒の一因となりうるものと推定し、その動態について検討してきた。これまで、神経性並びに下痢性貝毒ともに認められない生カキに、食酢と同濃度の4%酢酸を添加し体温下(37°C)に3時間放置すると、カキに多く含まれる多価不飽和脂肪酸が遊離し、同時に脂肪酸の酸化物も生成されることが明らかになった。⁶⁾この脂肪酸の遊離は酢酸処理によって活性化されるホスホリパーゼA

(PLase A) の作用に起因することが推測された。⁷⁾ しかしながら、PLase A の活性化が酢酸処理後どの位の時間に生じるか、ヒトが生カキを摂取した際問題となる、胃酸存在下においても同様に生じるか等については不明である。

そこで今回は、生カキ中腸腺が酢酸並びに胃酸と類似の pH をもつ塩酸で処理された場合の PLase A 活性値の経時変化について調べた。また、生カキ中腸腺を低温保存した場合の PLase A 活性値の変化についても調べた。

実験材料並びに方法

1. サンプル調整 生カキは 1995 年 1—2 月に宮城県太平洋沿岸で採取された、市販のもの(生食用)を購入後直ちに実験に用いた。カキ (600 g) から中腸腺 (oyster digestive gland; ODG) を摘出し、均一にホモジナイズしたものに以下の処理を施した。

実験 1) 酸による PLase A 活性値の経時変化——酸は酢酸 (1, 4, 16%) 並びに 0.01 N 塩酸 (pH 2.2) を用いた。酸を ODG の 2 倍量加え、37°C 下に放置した。放置後、経時的 (1, 2, 3, 5 時間) に一定量 (3.6 g) 取り出し、同量の 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加えホモジナイズし、5000 rpm にて 10 分間遠心した上清 (ODG サンプル) を実験に用いた。なお、酸の代わりにリン酸緩衝食塩水 (PBS, pH 7.4) を添加したものを対照群とした。

実験 2) 低温保存による PLase A 活性値の経時変化——均一にホモジナイズされた ODG を等分し、5°C, -20°C, -70°C に保存した。保存後、3 日、1, 2, 3, 4 週間目に取り出し、ODG に 2 倍量の PBS, 3 倍量の酢酸緩衝液を加えホモジナイズし、遠心した上清を ODG サンプルとした。

2. 脂質の抽出と脂質分画 ODG 上清 (4 ml) からの脂質の抽出は Folch 法⁸⁾ を用いた。8 ml の 0.001% の抗酸化剤 (BHT) を含むクロロホルム: メタノール (2:1) を加え、ホモジナイズした後、クロロホルム層を集めた。この操作を 2 回行い、集めた溶媒を留去した。抽出脂質 (上清 0.4 ml 相当) をシリカゲルプレート (20 cm × 20 cm, 0.25 mm, Merck 社, 120°C で 2 時間焼き、使用時までデシケータにて保存) に添付し、ベンゼン-ジエチルエーテル-酢酸エチルエステル-酢酸 (80:10:10:0.2) を展開溶媒に用い、脂質の分画を行った。リン脂質濃度は、シリカゲルプレートからリン脂質画分をかきとり、含まれる無機リンを定量する比色法⁹⁾

で測定した。遊離脂肪酸については、シリカゲルプレートに硫酸-エタノール (50:50) を噴霧し、180°C で 15 分焼き、炭化濃度を画像解析装置 Bio-Profil (1-D) (Vilber Lourmat, France) で分析し、面積値で表示した。

3. PLase A の活性測定 活性値の測定は Nalbone 等の方法¹⁰⁾ に従った。すなわち、0.93 kBq 2-[1-¹⁴C]palmitoyl phosphatidylcholine (PC) (4.14 GBq/mmol, Amersham Japan Co., Tokyo, Japan), 1.85 kBq 1, 2-[1-¹⁴C]PC (2.18 GBq/mmol, Amersham Japan Co., Tokyo, Japan) を基質に用い 5 mM CaCl₂, 0.3% のデオキシコール酸ナトリウム, サンプル (25—50 μ l の ODG 上清), 50 mM の緩衝液 (pH 4.0: 酢酸緩衝液, pH 7: リン酸緩衝液), を加え、反応液量を 0.53 ml にした。37°C で 30 分間反応させた後、5 μ l の 1 N HCl と 3 ml のクロロホルム: メタノール (2:1) を加え反応を止めた。遠心によりクロロホルム層を分取後、N₂ 下で溶媒を留去した。得られた脂質を TLC にて分画し、生成した PC 分解物 (リゾ PC, 遊離脂肪酸) 量をシンチレーションカウンターで測定した。PLase A の活性値は、既報¹¹⁾ に示した計算式から求めた。

4. タンパク質の測定 ODG サンプル中のタンパク質は、牛アルブミンを標準に用いた Bio-Rad 社のタンパク質測定用キットで測定した。

結果並びに考察

今回実験に用いた生カキ中腸腺について公定法¹²⁾ により麻痺性、下痢性貝毒試験を行ったが、毒性は検出されなかった。

著者らは、食酢と同濃度の 4% 酢酸を ODG に添加し 37°C に 3 時間放置すると、PLase A の活性値が高まり脂肪酸が遊離する現象を観察した。^{6,7)} この酢酸による PLase A 活性値の高まりが、添加する酢酸濃度によりどのように変化するかを 37°C に 3 時間放置という条件で調べた (Fig. 1)。その結果、どの濃度の酢酸でも添加しない場合に比べ PLase A₁, A₂ ともに比活性値が高まることが明らかであった。その効果は 4% で最も大きかった。比活性値の増加は、1% 及び 4% の酢酸を添加した場合、37°C で 3 時間加温することにより高まったが、16% において、加温の影響はみられなかった。4% 酢酸添加、37°C 加温による PLase A₁, A₂ の高まりは対照群 ODG (加温なし) の値の 10 倍以上であった。この PLase A 比活性値の高まりは 4% 酢酸の添加により生じるタンパク質の減少を上回るものであった。

Fig. 1. Changes of PLase A₁ and A₂ Specific Activities and Protein Concentrations in Acetic Acid Added ODG Samples with and without Incubation at 37°C for 3 h as a Function of Acid Concentration

Enzyme assay was done at pH 4.0.

また、サンプル中のタンパク質濃度は酢酸の添加により著しく減少したが、添加酢酸濃度や加温の影響を受けなかった。以上の結果から、酢酸添加、加温により ODG 中の PLase A 活性値が亢進することは明らかであった。

酸の種類による PLase A 活性値への影響を調べるため、4%酢酸を添加し37°C加温した場合、0.01 N HCl を添加し 37°C 加温した場合の経時変化を対照群と比較した (Fig. 2, A)。0.01 N HCl を添加した ODG の PLase A₁, A₂ 活性値は、添加後5時間まで対照群とに差がみられなかったが、4%酢酸処理の場合、活性値の亢進は明らかであった。酢酸処理後1時間目の活性値の亢進は3時間目におけるものより大きかった。酢酸添加後5時間目で、PLase A 活性値は酢酸添加のみ (加温なし) の値に戻った。この実験に用いた ODG サンプル中のタンパク質の濃度の変化は Table I に示した。対照群も加温によりタンパク質濃度は減少し、5時間目の濃度は加温なしの1/2以下であった。タンパク質濃度は、0.01 N HCl で処理した場合、5時間放置すると対照群加温なしの約1/3に、4%酢酸処理の場合1/7に減少した。この様に酸の種類により除蛋白効果が異なったため、PLase A 比活性値に酸の種類による著しい差が現れた (Fig. 2B)。実験に用いた酸の pH は4%酢酸が2.5、0.01 N HCl が2.2であった。すでに4%酢酸と同じモル濃度のギ酸 (pH 2.0) において、酢

酸と同様、PLase A の活性亢進が認められるが、同じモル濃度の HCl (pH 0.5) では逆に活性は抑制されることが明らかである。⁷⁾ 今回、4%酢酸と類似の pH をもつ HCl においても PLase A の亢進がみられなかった事実は、PLase A の亢進に及ぼす差が酸の pH によるのではなく、酸の種類によることを示唆するものであった。

酢酸添加による ODG での PLase A の亢進機構は不明であるが、哺乳動物では、PLase A₂ 活性値が過酸化脂質、¹³⁾ リゾリン脂質や遊離脂肪酸の存在により亢進する¹⁴⁾ ことが知られている。著者らは、ODG に4%酢酸を添加後37°C加温すると、30分後には脂質の酸化を示す shiff 塩基が増加することを確認した。¹⁵⁾ また、PLase A 活性はリポコルチンや G プロテインと呼ばれるタンパク質の制御を受けていることが知られており、^{16,17)} これらタンパク質の変性が活性亢進の一因である可能性が考えられる。今回の実験でも、4%の酢酸添加はタンパク質含量の減少を引き起こした。このような酢酸添加後早期に生じる脂質、並びにタンパク質の変性が PLase A 活性値の亢進という結果を導いたと考えられる。今回明らかであった酸の種類による活性値の差は酸の種類による除蛋白作用の差に起因するのかも知れない。

次に、低温保存が PLase A 活性値に及ぼす影響について調べた結果を Fig. 3 に示した。-70°C 下で

Fig. 2. Changes of PLase A₁ and A₂ Activities (A) and Their Specific Activities (B) in the Acid Treated ODG Samples as a Function of Incubation Time at 37°C

4% acetic acid (pH 2.5), HCl at 0.01 N (pH 2.2) and PBS at pH 7.4 for the control. Enzyme assay was done at pH 4.0.

保存されたものについては保存期間4週間にまで大きな変動はみられなかった。-20°C保存の場合、4週間目にタンパク質の減少に基づくと思われるPLase A₁の比活性値の増加がわずかながら観察された。5°C保存の場合、PLase A₁, A₂とも3日目から比活性値に増加がみられた。この場合、タンパク質の濃度も減少しており、保存後2週間目までの比活性値の増加はタンパク質の減少に基づくものと考えられる。しかし、3週間目におけるPLase A₁比活性値の増加は、タンパク質濃度低下を上回っており、活性値の亢進を示すものであった。これらの結果は、タンパク質の変性がPLase Aの活性亢進に先駆けることを示すものと考えられた。5°C保存で、1週間目までは、PLase A₂の活性値の増加度がPLase A₁より大きかったが、その後逆転した。各温度下で保存されたODGサンプル中のリン脂質濃度、遊離脂肪酸濃度の変化についてはFig. 4に示し

た。5°C保存では3日目からリン脂質濃度の減少、遊離脂肪酸濃度の増加が明らかであった。-20°Cにおいて遊離脂肪酸の濃度に明らかな変化はみられなかったが、-70°C保存のものでは保存により値は減少する傾向にあった。一方、-20°C、-70°C保存ともに、サンプル中のリン脂質は1週間目から減少した。この両保存温度下におけるリン脂質の減少に比べ遊離脂肪酸の濃度変化が小さかった理由としては、上記に述べた、脂肪酸の酸化などの副反応が生じている可能性も否定できない。

ホスホリパーゼが漁獲後、魚の自己消化に重要な役割を果たしていることは多くの報告^{18,19)}により示唆されている。しかし、漁獲後の保存温度によるPLase A活性値の変化を観察したものは極めて少ない。Jeongら²⁰⁾は、-20°C以下で3カ月以上保存されたカキについて脂質クラス濃度変化を調べ、リン脂質の加水分解が進んでいることを報告してい

TABLE I. Protein Contents in the ODG Samples Treated With Acids

Treatments	Incubation time at 37°C (h)				
	0	1	2	3	5
Control ^{a)}	2.92	2.04	1.80	1.82	1.28
4% Acetic acid	0.73	0.48	0.39	0.46	0.42
0.01 N HCl	2.67	1.21	1.18	1.00	1.00

Data represented as means of duplicate (mg/ml).

^{a)} PBS added instead of acids.

る。本実験で、 -70°C 保存の場合においても1週間という早い時期にリン脂質の減少が観察された。これは、 -70°C 保存でもリン脂質の加水分解が生じていることを示すものであった。佃,²¹⁾ 佐二木²²⁾ は -70°C 、 -20°C 下に保存された魚肉や魚の内臓での総脂質の低下を観察し、リン脂質の分解によるものと考えているが、その分解機構については現在のところ不明である。 -20°C において、タンパク質の濃度に明らかな変動が見られたのは3週間、PLase A 比活性値の増加は4週間目以降であり、PLase A 活性の亢進はこの時期以降に生じるものと推測され

る。この結果は、早期に生じたリン脂質の加水分解により生成されたリゾリン脂質や遊離脂肪酸等により PLase A の活性が高まることを示唆するものであった。

ODG の PLase A₂ 活性値の温度による変化を調べたところ、pH 4 及び 7 における至適温度は 37°C であった (Fig. 5)。PLase A₁ の至適温度も同様であった。すでに、マダイの肝臓²³⁾ やニジマスの肝臓のミクロゾーム膜²⁴⁾ の PLase A₂ の活性値は、 5°C より 20°C で高いことが知られている。ODG 中の PLase A の至適温度が 37°C であった事実は、食べた酢ガキが体温に保たれた場合、消化管内で、PLase A 活性値が高まることを推測させるものであった。しかし、この活性値の高まりがヒトの消化管内での脂質分解にどのように関与しているか、また、食中毒との関連については不明である。

本実験では、PLase A の基質として $[1-^{14}\text{C}]$ palmitoyl PC を用いたが、カキに多く含まれる不飽和脂肪酸エステル PC でも同じ結果が得られるかどうかさらに検討しなければならない。

以上、ODG を酢と同濃度の 4% 酢酸の存在下で、

Fig. 3. Changes of PLase A₁ and A₂ Specific Activities in the ODG as a Function of Storage Temperatures and Time

Protein contents in the samples for enzyme assay.

Fig. 4. Changes of the Concentrations of Phospholipid and Free Fatty Acid in ODG Samples for Enzyme Assay as a Function of Storage Temperatures and Time

Free fatty acid represented as area of the density of carbonized silica gel on TLC determined by Bio-Profile (1-D).

体温に相当する 37°C に放置すると, PLase A 活性値は 1 時間内に高まることが明らかであった。無添加の ODG を 5°C に保存した場合, 早期 (3 日以内) にタンパク質, リン脂質の変化が生じ, 引き続き PLase A が活性化されるものと考えられた。PLase A の活性化は -20°C, -70°C では 1 ヶ月間おむね抑えられたが, リン脂質の変化は -70°C においても生じていた。これらの結果から, PLase A の活性化抑制には厳重な温度制御が不可欠であることが示された。

ま と め

生カキの中腸腺 (ODG) 中のホスホリパーゼ A (PLase A) の活性値に及ぼす酸並びに低温保存の影響について調べた。結果は次のとおりであった。

1) 酢酸添加後, 37°C に放置した ODG 中の PLase A₁, A₂ 比活性値はともに対照群に比べ高かった。4% 酢酸 (pH 2.5) 添加による活性値の亢進は 1%, 16% 酢酸添加のものよりはるかに大きかった。これら酵素活性値の亢進は, 酢酸添加後 1 時間以内に生じることが明らかであった。

2) 0.01 N の塩酸 (pH 2.2) 添加後 37°C に放置した ODG 中の PLase A₁, A₂ の比活性値は, 放置 5 時間まで変化なく, 対照群とも差異は認められなかった。

Fig. 5. Changes of PLase A₂ Specific Activities in ODG Samples as a Function of Temperatures

3) 酸処理を施した ODG サンプル中のタンパク質含量は、すべて対照群に比べ低かったが、4%酢酸処理によるものが最も低値であった。

4) 5°Cでの低温保存では、3日目から PLase A₁, A₂ 比活性値に増加が認められた。2週間目までの比活性値の増加は、タンパク質の変性に基づくものと思われたが、3週間目における値の増加はタンパク質の減少度をはるかに上回っていた。-20°C, -70°C 保存においては、特記すべき活性値の変化はなかった。

5) ODG 中の PLase A₁, A₂ の至適温度は 37°C であった。

以上の結果から、酢ガキが 37°C に保たれると、早期に PLase A₁, A₂ の活性値が亢進することが明らかであった。これら酵素活性の亢進は、リン脂質の加水分解、タンパク質の変性が先駆けており、温度が重要な因子であると考えられた。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、ラジオアイソトープ施設の使用を快く許可して頂きました千葉県ガンセンターの崎山 樹研究局長、並びに様々な便宜を図って頂きました千葉県ガンセンター研究局の日和佐隆樹研究員に深謝致します。

引用文献

- 1) K.C. Klontz, S. Lieb, M. Schreiber, H.T. Janowski, L.M. Baldy, R.A. Gunn, *Ann. Intern. Med.*, **109**, 318 (1988); G. Reeve, D.L. Martin, J. Pappas, R.E. Thompson, K.D. Greene, *N. Engl. J. Med.*, **321**, 224 (1989).
- 2) O.N. Gill, W.D. Cubitt, D.A. McSwiggan, B.M. Watney, C.L.R. Bartlett, *Br. Med. J.*, **287**, 1532 (1983); S. Sekine, S. Okada, Y. Hayashi, T. Ando, T. Terayama, K. Yabuuchi, T. Miki, M. Ohashi, *Microbiol. Immunol.*, **33**, 207 (1989).
- 3) J. Sajiki, K. Takahashi, *Lipids*, **27**, 988 (1992).
- 4) T. Takagi, K. Hayashi, Y. Itabashi, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 1413 (1984).
- 5) J.F. Lawrence, R.K. Chadha, W.M.N. Ratnayake, J.F. Truelove, *Natural Toxins*, **2**, 318 (1994).
- 6) J. Sajiki, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1519 (1994).
- 7) J. Sajiki, *J. Toxicol. Environ. Health*, **47**, 221 (1996).
- 8) J. Folch, M. Lees, G.H. Sistanley, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
- 9) G.R. Bartlett, *J. Biol. Chem.*, **234**, 466 (1959).
- 10) G. Nalbhone, K.Y. Hostetler, *J. Lipid Res.*, **26**, 104 (1985).
- 11) J. Sajiki, S. Taguchi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1113 (1995).
- 12) 昭和 53 年 5 月 20 日付厚生省環境衛生局乳肉衛生課事務連絡。
- 13) A. Sevanian, E. Kim, *J. Free Radicals Biol. Med.*, **1**, 263 (1985).
- 14) K.D. Philipson, R. Ward, *J. Biol. Chem.*, **260**, 9666 (1985).
- 15) J. Sajiki, H. Takahashi, K. Takahashi, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1467 (1995).
- 16) E. Solito, G. Raugei, M. Melli, L. Parente, *FEBS Lett.*, **291**, 238 (1991).
- 17) K. Badiani, X. Lu, G. Arthur, *Biochem. J.*, **288**, 965 (1992).
- 18) E.G. Bligh, M.A. Scott, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **23**, 1025 (1966).
- 19) T. Ohshima, S. Wada, C. Koizumi, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 2091 (1984).
- 20) B.Y. Jeong, T. Ohshima, C. Koizumi, Y. Kanou, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 2083 (1990).
- 21) 佃 伸夫, 東海水研報, **84**, 31 (1976).
- 22) 佐二木順子, 高橋勝弘, 千葉衛研報告, **18**, 6 (1994).
- 23) N. Iijima, M. Nakamura, K. Uematsu, M. Kayama, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1331 (1990).
- 24) N.P. Neas, J.R. Hazel, *J. Exp. Zool.*, **233**, 51 (1985).