報 文

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol.65, No. 12, pp. 1753~1760, 1991]

下痢性および麻痺性ホタテガイ貝毒の微生物的定量

菊池慎太郎, 安居光国, 大島由子, 安住尚也

竹内正樹, 大嶋尚士, 竹内隆男, 紀藤恭輔*

山田茂則*, 三浦敏明**

(室蘭工業大学応用化学科, *エーザイ株式会社筑波研究所,

**北海道大学医療短期大学部)

平成 3 年 5 月 16 日 受 理

Use of *Bacillus* Strains to Assay Diarrhetic and Paralytic
Shellfish Toxins in Scallops, *Patinopecten yessoensis*Shintaro KIKUCHI, Mitsukuni YASUI, Yuko OSHIMA, Naoya AZUMI,
Masaki TAKEUCHI, Takashi OSHIMA, Takao TAKEUCHI, Kyosuke KITO*,
Shigenori YAMADA* and Toshiaki MIURA**
Department of Applied Microbiology, Muroran Institute of Technology,
Muroran, Hokkaido 050, Japan

* Tsukuba Research Lab., Eisai Co., Ltd., Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

** College of Medical Technology, Hokkaido University, Sapporo,
Hokkaido 060, Japan

Two bacterial strains the growth of which was inhibited by extracts of the hepatopancreas of scallops, *Patinopecten yessoensis*, were isolated from soil and identified as being *Bacillus* spp. The growth of both strains was inhibited by the addition of okadaic acid or saxitoxin to the medium. The growth of *Bacillus* OH-D decreased to 30% with 10 µg of okadaic acid per 10 ml of broth, and was inhibited completely with 25 µg of this acid per 10 ml of the broth. There were clear growth-inhibition zones around cylinders containing saxitoxin on a carpet of *Bacillus* OH-P with the width of the zone proportional to the concentration of saxitoxin. Crude and partially purified fractions of hepatopancreas containing diarrhetic or paralytic shellfish toxins inhibited the growth of strains OH-D or OH-P, respectively. Free fatty acids in the hepatopancreas did not interfere with the inhibition of growth by these toxins. Our findings suggested microbial titration could be used to assay shellfish toxins instead of assays of lethality in mice.

(Received May 16, 1991)

緒 言

非加熱処理魚介類の摂食による食中毒は、これらの魚介類の可食部に付着する病原菌やそれらの内因毒素、あるいは付着微生物による腐敗が直接の原因となって発生するケースが多いが、ホタテガイやイガイなどの摂食による中毒は、これらの貝が捕食するプランクトンによって

生産される毒性化合物に起因するものとして前記の食中毒とは区別される。すなわち、一般に「貝毒」と呼ばれる中毒原因物質は、その一次生産者である海洋植物プランクトンを貝類が捕食することによって貝組織に蓄積、濃縮され、さらには貝類に寄生する海洋細菌によって二次的構造変化を受け、より強い毒性を発現する物質へ変換するものと考えられている⁽¹⁻³⁾。これらの毒性物質は

その化学構造と呈する中毒症状に基づいて、下痢性貝毒（オカダ酸とその誘導体、ペクテノトキシン類、イェソトキシンなど）と麻痺性貝毒（サキシトキシン、ネオサキシトキシン、ゴニオトキシン類など）とに大別されることはよく知られているところであり、またこれらの定量・分析法としては高速液体クロマトグラフィーなどの機器法⁽⁴⁾やマウス致死法⁽⁵⁾が広く採用されている。しかし、機器法においては高価な設備を必要とし、またマウス致死法においては実施者の技術的熟練が要求されるとともに1検体当たりの経費も高く、さらには毒量をマウス・ユニット（Mouse Unit；MU）として表示するために毒の絶対量がわからない、などの難点が指摘されてきた。

われわれはある種の微生物の増殖が、下痢性あるいは麻痺性貝毒存在下において阻害されることを見出したので、これを利用して貝毒の測定と評価を簡便に実施する方法について検討した。以下、その詳細について論述する。

実験材料および方法

1. 試薬類 オカダ酸は和光純薬工業から購入し、またサキシトキシンは米国食品医薬品局（F. D. A.）S. Hall 博士から譲渡された標品を使用した。抗オカダ酸モノクローナル抗体（バーオキシダーゼ標識）によるオカダ酸測定キット（DSP-キット[®]）は宇部興産から購入した。その他の試薬類はすべて市販特級品を用い、また有機溶媒については購入後の再蒸留精製を行わずに使用した。

2. 試料ホタテガイ 1989年8月および1990年7月に北海道噴火湾沿岸の室蘭市あるいは豊浦町で採取した二年齢ホタテガイ（平均殻長：88±14 mm，平均重量：86±10 g）を試料貝として用いた。なお、これらはいずれもマウス致死法による定量で規定を越える下痢性あるいは麻痺性貝毒が検出されたため出荷規制措置のなされたものである。

3. 下痢性貝毒の抽出と部分精製 試料貝からの下痢性貝毒の抽出と部分精製は Yasumoto らによって報告された方法^(6,7)を以下のように改変して行った。すなわち、試料ホタテガイの中腸腺約 20 g に 40 ml のアセトンを加えブレンダーミルによって室温で3分間ホモジナイズした後、10,000 rpm で10分間遠心分離した。沈殿に 40 ml ずつのアセトンを加えてさらに2回抽出、遠

心分離を行い、それぞれの抽出画分を集めて減圧濃縮および凍結乾燥によって溶媒を留去し、粗下痢性貝毒画分とした。次いでこの画分を 5 ml の脱イオン水に懸濁し、等容のエーテルを加えて攪拌し下痢性貝毒を抽出した。抽出は3回繰り返す、それぞれのエーテル抽出画分を集めて溶媒を減圧下で留去した後、残渣を少量のヘキサンに溶解してシリカゲル・カラム・クロマトグラフィー（1×10 cm）に負荷した。シリカゲル（Wakogel-G, 30～50 メッシュ）は加熱活性化せずに等重量のハイフロスーパーセルと混合してガラス製カラム管に充填し、また溶出は各 30 ml のベンゼン：エーテル（1：1）混液、ベンゼン、ベンゼン：メタノール（2：1）混液、およびメタノールの順に行った。ベンゼン：メタノール混液溶出画分を集めて溶媒を留去した後アセトンに再溶解して高速液体クロマトグラフィー（Wakosil-5 C 18 T, 4.4×300 mm）に負荷した。溶出はアセトニトリル：水（6：4）混液によって行った。溶出画分を 1 ml ずつ分画して集め、それぞれの画分の溶媒を減圧濃縮ならびに凍結乾燥によって除去した後マウス致死試験を行い、下痢性貝毒毒性を発現する画分を部分精製下痢性貝毒画分として集めて以後の実験に供した。

4. 麻痺性貝毒の抽出と部分精製 試料貝からの麻痺性貝毒の抽出は以下のように行った。すなわち、試料ホタテガイの中腸腺約 20 g に塩酸で pH 3.5 に調整した 70% エタノール 40 ml を加え、下痢性貝毒の場合と同様に室温で3分間ホモジナイズした後遠心分離によって沈殿を除去し、上清を粗麻痺性貝毒画分とした。抽出はおのおの 40 ml の 70% エタノール（pH 3.5）で3回繰り返した。次いで減圧溶媒留去と凍結乾燥によってこの画分を濃縮し、Oshima らの方法⁽²⁾、および Kodama らの方法⁽⁸⁾に従って高速液体クロマトグラフィー（Wakosil-5 C 18 T, 4.4×300 mm）により分画した。サキシトキシン標準品の溶出時間をあらかじめ測定しておき、さらにすでに報告されている^(2,8)各種麻痺性貝毒成分の溶出時間に対応する画分を集めて、溶媒を減圧濃縮ならびに凍結乾燥によって除去した後、部分精製麻痺性貝毒画分として以後の実験に供した。

5. 薄層クロマトグラフィーならびに濾紙電気泳動

粗画分および部分精製画分における下痢性あるいは麻痺性貝毒の検出は薄層クロマトグラフィーならびに濾紙電気泳動によって行った^(6,8)。薄層クロマトグラフィーは Kieselgel 60（Merck 社）プレートを用いて行い、展

開溶媒は下痢性貝毒についてはベンゼン：アセトン：メタノール：6N 酢酸（150：80：19：1），また麻痺性貝毒についてはピリジン：酢酸エチル：酢酸：水（75：35：15：30）とした。展開後にプレートに 50% 硫酸を噴霧して加熱し（110℃，10 分間），検出されるスポットの R_f を下痢性貝毒標準品の文献値と比較して下痢性貝毒の存在を推定し，あるいは 1% 過酸化水素水を噴霧した後波長 365 nm の紫外線を照射して検出されるスポットの R_f を麻痺性貝毒標準品の文献値と比較することによって麻痺性貝毒の存在を推定した。また麻痺性貝毒の濾紙電気泳動は酢酸セルロース膜を支持体として 0.085 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.2）中 0.55 mA/cm で 1 時間通電し，泳動後のスポットの検出は上述と同様に過酸化水素水を噴霧して行った。

6. マウス致死法あるいは酵素標識抗体法による貝毒の定量 マウス致死試験は 20 g 重の ddY 系雄マウスを用いて A. O. A. C. 法⁽⁶⁾に従って行った。また，酵素標識抗体法によるオカダ酸の定量は宇部興産の DSP-キット[®]を用いて行った。

7. 貝毒感受性細菌の分離 L 培地（精製水 1 l 中，トリプトファン 10 g，酵母エキス 5 g，塩化ナトリウム 10 g，および固形培地の場合は寒天 25 g を含む。pH 7.2）を用いて土壌から貝毒感受性微生物を分離した。すなわち，土壌約 0.5 g を 1 ml の生理的食塩水に懸濁し，これを常法に従って固形 L 培地表面に分散接種した。33℃ で一夜培養して出現するコロニーのそれぞれを L 斜面培地に鈎菌接種し，再度 33℃ で一夜培養した。これらの分離微生物のおおのを，それぞれ約 25 MU の部分精製下痢性貝毒，あるいは約 50 MU の部分精製麻痺性貝毒を含む 10 ml の液体 L 培地に接種し 33℃ で振盪培養した。なお貝毒を含まない液体 L 培地に各分離微生物を接種，培養して対照とした。微生物の増殖を波長 590 nm における比濁度の増加によって測定し，下痢性貝毒存在下において増殖が完全に阻害される微生物を下痢性貝毒感受性微生物とし，また麻痺性貝毒存在下において増殖が完全に阻害される微生物を麻痺性貝毒感受性微生物として検索し，それぞれの貝毒感受性微生物各 1 株ずつを得た。これらの貝毒感受性微生物は形態学的に細菌であることが確認されたので Bergey's Manual（1984 年）⁽⁹⁾ に従って同定した。

8. 下痢性貝毒感受性菌による下痢性貝毒の定量（液体培地法） 下痢性貝毒粗画分あるいは部分精製画分

の溶媒を減圧濃縮および凍結乾燥によって除去した後，残渣を 70% エタノールに溶解し，その 0.1 ml を 10 ml の液体 L 培地に添加した。これに波長 590 nm における比濁度が 0.8 に達した下痢性貝毒感受性菌の前培養液 0.1 ml を接種し，12 時間培養後の同波長における比濁度を対照のそれで除して増殖阻害率を求めた。すなわち，

$$\text{増殖阻害率 (\%)} = (\text{貝毒存在下における比濁度} / \text{貝毒不在下における比濁度}) \times 100$$

なお対照として 0.1 ml の 70% エタノールのみを添加した 10 ml の液体 L 培地に上記と同様に下痢性貝毒感受性菌の前培養液を接種，培養したものをを用いた。以上のようにして求めた増殖阻害率を，既知濃度のオカダ酸を用いて同様の方法で別途に作成した検量線に対応させ，添加した下痢性貝毒量をオカダ酸量として算出した。

9. 麻痺性貝毒感受性菌による麻痺性貝毒の定量（カップ法） ペトリ皿に 10 ml の基層 L 培地（寒天濃度 2.5%）を分注し固化させた。他方，あらかじめ L 斜面培地で 12 時間前培養した麻痺性貝毒感受性菌を波長 590 nm における比濁度が 10 となるように 5 ml の生理食塩水に懸濁し，これを 100 ml の上層 L 培地（寒天濃度 0.7%）と混和した後その 5 ml を先に調製した基層 L 培地の表面に均一に重層接種した。上層培地が固化した後この上にステンレス製カップ（内径 5.5 mm，高さ 10 mm，日本抗生物質医薬品基準⁽¹⁰⁾ならびに日本薬局方⁽¹¹⁾規定）を置いた。ペトリ皿 1 枚当たりのカップは 4 個とし，そのうち 3 個には既知濃度のサキントキシンを入れ，他の 1 個には検査しようとする麻痺性貝毒試料を入れて 33℃ で 8 時間温置した。なお麻痺性貝毒粗画分あるいは部分生成画分の溶媒を減圧濃縮および凍結乾燥によって除去し，残渣を精製水に溶解したものを麻痺性貝毒試料とした。温置後に観察される阻止円の直径をノギスで精確に測定し常法^(10,11)に従って試料に含まれる麻痺性貝毒量をサキントキシン量として算出した。

結果と考察

1. 貝毒感受性菌の同定

Table I に示した分離貝毒感受性菌の形態学的，生化学的諸性質から，下痢性貝毒感受性菌ならびに麻痺性貝毒感受性菌はいずれも *Bacillus* 属の細菌と同定されたので，以下，下痢性貝毒感受性菌を *Bacillus* OH-D 株，また麻痺性貝毒感受性菌を *B.* OH-P 株として区別する

Table I. Morphological and Biochemical Characteristics of Strains OH-D and OH-P

	OH-D	OH-P
Form	Rods	Rods
Size	1.0 μm $\times$ 2.5–5 μm	1.0 μm $\times$ 1.5–4.5 μm
Motility	Motile	Motile
Gram stain	Positive	Positive
Spores	Oval ; central	Oval ; central
Catalase	Positive	Positive
Cytochrome oxidase	Negative	Negative
Quinone type	MK-7	MK-7
Urease	Negative	Negative
Voges-Proskauer test	Positive	Positive
Hydrolysis of starch	Positive	Positive
Hydrolysis of gelatine	Positive	Positive
Reduction of nitrate	Reduced	Reduced
Utilization of arabinose	Not utilized	Utilized
Utilization of maltose	Utilized	Not utilized
Utilization of citrate	Utilized	Utilized
Utilization of malate	Utilized	Not utilized
Utilization of gluconate	Utilized	Utilized

Fig. 1. Effects of Okadaic Acid on the Growth of *Bacillus* sp. OH-D. The test organism was cultivated in 10 ml of L-liquid medium aerobically with (10 μg , $\blacktriangle$; 25 μg , $\bullet$) or without ($\square$) okadaic acid. At the time indicated with an arrow, 35 μg of okadaic acid were added to 10 ml of the medium and the cultivation was continued ($\cdots\bullet\cdots$).

Fig. 2. Effects of Saxitoxin on the Growth of *Bacillus* sp. OH-P. Four cylinders containing various concentrations of saxitoxin were placed on a carpet of the test organism. After incubation at 33°C for 8 hr, each size of the inhibition zone appeared was measured with precision. (a), no saxitoxin; (b), 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; (c), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; (d), 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of saxitoxin.

ことにした。

2. 貝毒標準品による OH-D 株あるいは OH-P 株の増殖阻害

オカダ酸あるいはサキントキシンが、それぞれ OH-D 株あるいは OH-P 株の増殖におよぼす影響を検討した。Fig. 1 に示すように 10 ml の培地に 10 μg (約 2.5 MU に相当) のオカダ酸を添加することによって OH-D 株の増殖はオカダ酸無添加の対照に比較して約 70% 抑制

され、また 25 μg (約 6 MU に相当) の添加によって完全に阻害された。さらに対数増殖期中期に同じく 10 ml の培地に 35 μg のオカダ酸を添加すると、被検菌の増殖はほとんど遅滞なく停止した。他方サキントキシンについては Fig. 2 に見られるようにカップの周囲に OH-P 株の増殖阻止円が明瞭に観察された。Fig. 3 にオカダ酸濃度と増殖阻害率 (Fig. 3, a) あるいはサキントキシン濃度と増殖阻止円の直径 (Fig. 3, b) との相関を示した

Fig. 3. Typical Examples of Growth Inhibition of the Test Organism by Okadaic Acid or Saxitoxin. A curve was plotted relating the relative growth rate of *Bacillus* OH-D (a) or the diameter of the inhibition zone of *B. OH-P* (b) to the concentration of OA or STX, respectively. The growth rate in (a) was calculated by following equation ;

$$\text{growth rate (\%)} = \frac{A_{590} \text{ in the presence of OA}}{A_{590} \text{ in the absence of OA}} \times 100$$
 where A_{590} is the absorbance of the culture broth at 590 nm after the incubation for 12 hr.

が、培地に添加したオカダ酸濃度の増加に伴って OH-D 株の増殖阻害率も増加し、またカップに注入した試料液中のサキントキシン濃度に比例して阻止円の直径も増大した。なおカップ法による検定は再現性、客観性等の諸点において液体培地法より優れるものであったが、オカダ酸をはじめとする下痢性貝毒が脂溶性であるため、この貝毒に対してカップ法を適用することは困難であった。

Itabashi らは、国内の他の地域で産出されるホタテガイに比較して北海道噴火湾産のホタテガイには eicosa-

Fig. 4. Effects of Fatty Acids on the Growth of Test Organisms. *Bacillus* OH-D (closed symbols) or *B. OH-P* (open symbols) were cultivated in 10 ml of L-liquid medium with 1.0 mg of eicosapentaenoic acid (▲ and △) and docosahexaenoic acid (■ and □) or without any acids (● and ○). (a), only the fatty acid was added; (b), the fatty acid was added with okadaic acid (10 µg/10 ml) or saxitoxin (4 µg/10 ml).

pentaenoic acid (20 : 5), あるいは docosahexaenoic acid (22 : 6) などの遊離不飽和脂肪酸が多量に存在し、マウス致死試験においてはこれらの遊離脂肪酸が貝毒と相乗的に作用する結果、見かけの貝毒量が実質値より高く評価される傾向にあることを報告している^{(12)*}。本法における遊離脂肪酸の影響について検討したところ、培地に添加したいずれの脂肪酸も、単独で 1.0 mg/ml の濃度まで貝毒感受性菌の増殖に影響を与えることはなく (Fig. 4, a), またオカダ酸標準品、あるいはサキントキシン標準品と混合して培地に添加しても、これらの脂肪酸の貝毒感受性菌の増殖に対する影響は認められなかつ

* 私信：板橋 豊（北海道大学水産学部）

た (Fig. 4, b). したがって本法における OH-D 株あるいは OH-P 株の増殖阻害は、それぞれ下痢性貝毒あるいは麻痺性貝毒によって特異的にもたらされるものであることが示唆された。

3. ホタテガイ中腸腺抽出画分による OH-D 株および OH-P 株の増殖阻害

「材料および方法」に記載した方法で調製した下痢性あるいは麻痺性貝毒画分について薄層クロマトグラフィーによる定性分析を行った。Fig. 5 に示すように粗画分および部分精製画分のいずれにおいてもオカダ酸あるいはサキシトキシンの R_f 値にほぼ等しい値を有するスポットが認められ、併せてジノフィシストキシン-3 (DTX-3)、ネオサキシトキシン (neoSTX)、ゴニオトキシン-5 (GTX-5) の R_f 値として報告されている値にほぼ等しい値を有するスポットが検出されたことから^(13,14)、これらの画分に下痢性貝毒あるいは麻痺性貝毒の存在することが推定された。なお、国内で発生する下痢性貝毒、とくに *Dinophysis fortii* に起因して発生する下痢性貝毒においてはオカダ酸よりはむしろ、この酸の 35-メチル誘導体であるジノフィシストキシン-1 (DTX-1) が主要成分であることが知られているが、これら2種類の毒素は TLC によってほとんど区別されず、また互いに免疫学的交叉性を示すために酵素標識抗体法によっても両者を区別することは困難である。したがって Fig. 5(a) においてオカダ酸と推定した画分に DTX-1 も存在する可能性が考えられる。他方、結果を図としては掲げないが、麻痺性貝毒画分の濾紙電気泳動によって調製画分にサキシトキシン、ネオサキシトキシンおよびゴニオトキシン-5 の存在することが推定された。

次いでこれらの抽出画分による OH-D 株あるいは OH-P 株の増殖阻害を検討したところ (Fig. 6, a, b)、各被検菌株の増殖はそれぞれ下痢性あるいは麻痺性貝毒の粗画分および部分精製画分によって同程度阻害され、また下痢性貝毒による OH-D 株の増殖阻害率 (液体培地法)、あるいは麻痺性貝毒により OH-P 株接種寒天培地上に形成される阻止円の直径 (カップ法) は使用した貝毒量 (マウス致死法で測定) に比例するものであった。以上の結果は、各被検菌株の増殖阻害がそれぞれの貝毒に特異的な効果であって試料中に夾雑する物質の影響を受けるものではないという前述の仮定を補強するものであり、さらには試料の調製に際して特別なクリー

Fig. 5. Thin-Layer Chromatograms of the Extract from Hepatopancreas of Scallops. Crude (lane 1 and 5 in (a) and (b), respectively) and partially purified extracts (lane 2, 3 and 6) were developed on a silica gel plate with the solvent system of benzene-acetone-methanol-acetic acid (150 : 80 : 19 : 1) in (a) or pyridine-ethylacetate-acetic acid-water (75 : 35 : 15 : 30) in (b). Authentic okadaic acid (OA, lane 4) or saxitoxin (STX, lane 7) were also developed as the standard in (a) or (b), respectively. After development, spots on each plate were detected as described in the text. R_f values of dinophysistoxin-3 (DTX-3), neosaxitoxin (neoSTX) and gonyautoxin-5 (GTX-5) were reported in literatures.

ン・アップ操作を行うことなく貝毒の定量を実施しうる可能性を示唆するものである。

4. 中腸腺以外の組織の抽出画分による被検菌株の増殖阻害

下痢性貝毒および麻痺性貝毒はいずれも中腸腺にもっとも多量に存在し、次いで中腸腺以外の軟組織部、鰓部、可食部に含まれることが報告されている^(14,15)。「材料および方法」に記載した方法でこれらの各組織の粗画分を調製し、OH-D 株あるいは OH-P 株の増殖に対するそれらの影響を Table 2 に示した。本法によって定量した下痢性貝毒の組織分布傾向は、酵素標識抗体法あるいはマウス致死法による結果と一致した。なお酵素標識抗体法による下痢性貝毒定量値と本法による微生物学的下痢性貝毒定量値との間には差が認められるが、これは前

Fig. 6. Titration of the Diarrhetic Shellfish Toxins (DST) and Paralytic Ones (PST) from Hepatopancreas of Scallops. The crude (●) and partially purified toxins (▲) from hepatopancreas were titrated by the growth inhibition of the test organisms. (a) diarrhetic toxins (DST); (b), paralytic toxins (PST).

者がオカダ酸モノクローナル抗体を利用して試料中のオカダ酸およびジノフィシトキシン-1 (DTX-1) のみを測定するのに対し、後者においては試料中の各種の下痢性貝毒の総量 (Fig. 5 参照) を測定することが一因となっているのかもしれない。

サキントキシンが神経細胞膜のナトリウム・チャンネルを特異的に阻害することはよく知られているところであり⁽¹⁶⁾、他方オカダ酸については、この酸が各種の酵素活性の調節に関与する (脱)リン酸化酵素 (ホスファターゼ) を阻害し、その結果、たとえばオルニチン脱炭酸酵素などの酵素活性が阻害され、あるいは強力な non-TPA 型発癌プロモーターとして作用することが報告されている^(17,18)。そのような観点からも OH-D 株あるいは OH-P 株に対する下痢性あるいは麻痺性貝毒の特異

Table II. Anatomical Distribution of Shellfish Toxins in Scallops

	DST			PST	
	GI*	AN*	ML*	GI**	ML**
Hepatopancreas	8.4	2.8	2.1	65.5	140
Gill	4.2	0.9	1.7	23.5	71.0
Adductor muscle	<0.1	0.3	<0.5	7.5	<10.0

* Diarrhetic toxin (DST) was measured by the growth inhibition test reported in this paper (GI; μg of toxin per gram of tissue), enzyme-labeled immunochemical reaction using "DSP-Kit" (AN; μg of toxin per gram of tissue) or mouse lethal test (ML; MU per gram of tissue). ** Paralytic toxin was measured by the growth inhibition test reported in this paper (GI; the same as above) or mouse lethal test (ML; the same as above).

的抗菌効果は興味深いものであり、それぞれの貝毒の作用機序の詳細について現在検討中である。

要 約

麻痺性貝毒あるいは下痢性貝毒によって毒化したホタテガイの中腸腺抽出液によって増殖を阻害される 2 種類の *Bacillus* 属細菌を土壌から分離し、前者を *Bacillus* OH-P 株、また後者を *Bacillus* OH-D 株としてこれらを被検細菌とする貝毒の微生物的貝毒定量について試みた。

(1) *Bacillus* OH-P 株あるいは *B. OH-D* 株の液体培地に麻痺性貝毒例としてのサキントキシン、あるいは下痢性貝毒例としてのオカダ酸を添加すると、それぞれの貝毒濃度に比例しておのおのの被検細菌の増殖が阻害された。とくに *B. OH-P* 株においては、この菌株を固形培地に接種した後サキントキシンを試料液とするカップ法を適用するとカップの周囲に増殖阻止円が観察され、その直径はカップ内に注入したサキントキシン濃度に比例するものであった。

(2) ホタテガイ中腸腺から調製した麻痺性貝毒画分あるいは下痢性貝毒画分を液体培地に添加すると *B. OH-P* 株あるいは *B. OH-D* 株の増殖はそれぞれ添加した貝毒量 (マウス致死法で測定) に比例して阻害され、また前者の菌株にカップ法を適用するとサキントキシンの場合と同様にカップの周囲に阻止円が形成された。さらに、貝毒粗画分および部分精製画分のいずれを用いた場合にも同程度の増殖阻害効果が認められ、あるいはホ

タテガイ中腸腺に著量存在する不飽和脂肪酸を培養系に添加しても被検菌の増殖に変化が見られなかったことから、被検菌増殖阻害効果は貝毒に特異的なものであり、中腸腺に存在する夾雑物質によっては影響されないと推定された。

(3) 中腸腺、生殖腺、鰓部および可食部の抽出液による被検菌の増殖阻害効果について検討したところ被検菌の増殖はこの順で阻害され、マウス致死法および酵素標識抗体法によって測定した結果に一致した。

以上の結果から、マウスを被検動物とする従来法に代えて微生物を用いる貝毒定量の可能性が示唆された。

本研究は、第十回北海道新聞・学術文化研究奨励金、ならびに平成二年度北海道科学研究費補助金によって実施されたものである。

- (1) T. Yasumoto, Y. Oshima, W. Sugawara, H. Oguri, T. Igarashi and N. Fujita: *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **46**, 1405 (1980).
- (2) Y. Oshima, J. Buckley, M. Alam and Y. Shimizu: *Comp. Biochem. Physiol.*, **57B**, 31 (1977).
- (3) Y. Kotaki, Y. Oshima and T. Yasumoto: *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 1009 (1985).
- (4) Y. Oshima, M. Machida, K. Sasaki, Y. Tamaoki and T. Yasumoto: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1707 (1984).
- (5) J. Schantz, F. McFarren, C. Schafer and H. Lewis: *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **41**, 160 (1958).
- (6) M. Murata, M. Shimatani, H. Sugitani, Y.

- Oshima and T. Yasumoto: *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 549 (1982).
- (7) T. Yanagi, M. Murata, K. Torigoe and T. Yasumoto: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 525 (1989).
- (8) M. Kodama, T. Ogata and S. Sato: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1075 (1988).
- (9) R. Krieg and G. Holt ed.: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.
- (10) 厚生省薬務局監修:「日本抗生物質医薬品基準解説」, 薬業時報社, 1971, p. 525.
- (11) 日本公定書協会:「日本薬局方第一部解説書, 第7改正」, 廣川書店, 1966, p. D 51.
- (12) T. Takagi, K. Hayashi and Y. Itabashi: *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 1413 (1984).
- (13) Y. Ueda, T. Noguchi, Y. Onoue, K. Koyama, M. Kono and K. Hashimoto: *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 455 (1982).
- (14) T. Yasumoto, Y. Oshima and M. Yamaguchi: *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 1249 (1978).
- (15) T. Harada, Y. Oshima, H. Kamiya and T. Yasumoto: *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 821 (1982).
- (16) Y. Kao and A. Nishiyama: *J. Physiol.*, **180**, 50 (1965).
- (17) H. Fujiki, M. Suganuma, H. Suguri, S. Yoshizawa, K. Takagi, N. Uda, K. Wakamatsu, K. Yamada, M. Murata, T. Yasumoto and T. Sugiura: *Jpn. Cancer Res.*, **79**, 1089 (1988).
- (18) P. Choen and W. Choen: *J. Biol. Chem.*, **246**, 21435 (1989).