オゴノリの生物活性^{*1}

(昭和 61 年 2 月 13 日受理)

鈴木英世^{*2} 尾崎幸紘^{*2}

関田節子^{*2} 原田正敏^{*2}

Biological Activities of *Gracilaria verrucosa*

Hideyo SUZUKI, Yukihiro OZAKI, Setsuko SEKITA
and Masatoshi HARADA

(National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga
1-chome, Setagaya-ku, Tokyo, Japan)

There have been two poisoning cases which were suggested to have been caused by eating seaweed belonging to the *Gracilariaceae* family in Japan, one in Yamagata Prefecture in 1980 and the other in Ehime Prefecture in 1982. We therefore examined the biological activities of *Gracilaria verrucosa* gathered in Ehime Prefecture by using guinea pigs and mice as test animals. The seaweed was extracted with ether, with chloroform-methanol (1:1) and then with methanol. On *i.p.* administration to guinea pigs, the chloroform-methanol extract and the methanol extract induced dilatation of ear blood vessels, sneezing, urination, evacuation, loss of righting reflex, etc. The methanol extract showed a laxative action and fatal toxicity in mice on *p.o.* administration. The ether extract stimulated the central nervous system when given *p.o.*, *i.p.* or *i.v.* These effects were, however, obtained only at very high doses of the samples. Accordingly, it is not clear whether the seaweed gathered was responsible for the human acute toxic symptoms.

(Received February 13, 1986)

Key words: オゴノリ *Gracilaria verrucosa*; 海藻 seaweed; 食中毒 food poisoning; 急性毒性 acute toxicity; 下痢 diarrhea; 耳血管拡張 dilatation of ear blood vessels; 正向反射 righting reflex; 中枢興奮 stimulation of central nervous system; モルモット guinea pig; マウス mouse

緒 言

昭和57年4月愛媛県で5人の成人女性がオゴノリ (*Gracilaria verrucosa* PAPENFUSS, オゴノリ科) の酢のものなどを昼食時にとり、20~30分後に2名が嘔気、腹痛、ショック症状を訴え、うち1名は入院治療を受けたが喫食10時間後に死亡した^{*3}。また昭和55年8月山形県で5人の家族がツルシラモ (*Gracilariopsis chorda* OHMI, オゴノリ科) のみそ汁などを夕食でとり、直後から4名が嘔気、嘔吐に始まり、その後水様性下痢の症状を訴え、うち1名(成人女性)だけが翌日死亡した¹⁾。以上、2つの中毒例には、死に至るまでの症状の類似性

が見られた。

現在までのところ藻類由来の毒性物質の報告は少ない、特にオゴノリなどの紅藻類についての毒性や毒性成分の検討はほとんど行われていない。しかし最近になり、伏谷により上記事故解明のための研究がされた。そこでは、オゴノリを水に浸漬した後メタノールで抽出してエキスを調製した。そして、そのエキスをマウス腹腔内に投与し、発現する下痢作用を指標としてその活性成分を検索し、プロスタグランジン E₂ 及び A₂ を単離した²⁾。今回、我々もその原因解明のために研究を行ったが、その立脚点は次のごとくである。すなわち、中毒例における原因追及において、試験すべき材料が残存しなかったり、あるいは残存しても極めて少量であるため、その後の研究を困難にしている例が少なくない。今回の事例においても材料がこの状態であったため、中毒の原因物質の存在をあらかじめ想定した上で研究を開始する

*1 天然有害物質に関する研究 (第1報)

*2 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

*3 江口 茂, 森田建基, 大瀧 勝: “オゴノリが原因と思われる食中毒死事例について”, 第19回全国衛生化学技術協議会講演集, p. 48 (1982).

ことはできなかった。よって本報においては、オゴノリから各種抽出エキスを作成し、それらが急性毒性を含めて何んらかの薬理活性を持つかどうかを検討することとし、その結果からオゴノリが中毒の原因になりうるかの可能性を考察した。

実験方法

1. オゴノリ

愛媛県衛生研究所により、昭和58年5月同県の海岸で採集され、ただちに当所へ氷冷輸送され、 -20° の冷凍庫に保存されていたものを使用した。この採集場所は中毒が起きたオゴノリを採集した場所と同一である。

2. 試薬

1) 塩酸セミカルバジド：和光純薬工業(株)製，試薬特級

2) 二塩酸ヒスタミン：東京化成工業(株)製，試薬特級

3) 塩酸ジフェンヒドラミン：東京化成工業(株)製

4) 硫酸アトロピン：和光純薬工業(株)製，試薬特級

3. 器具及び装置

1) イオン交換樹脂カラム：あらかじめガラスウールを詰めたカラムクロマト管（内径 15 mm，長さ 300 mm）に弱酸性イオン交換樹脂 Amberlite IRC-50（オルガノ社製）50 g を水を用いて充てんし，2 N 塩酸→水→1 N 酢酸アンモニウム緩衝液（pH 6.0）→水の順で洗い活性化した。

2) 薄層プレート：シリカゲル Kieselgel 60 F₂₅₄，Merck 社製

3) 凍結乾燥器：FTS SYSTEMS 社製，ED-14-54-UF 型

4) 原子吸光分析計：日立製作所(株)製 170-50 型

4. 動物

日本医科動物(株)より購入し，体重 350 g 前後のハートレー系雄性モルモット及び体重 30 g 前後の ddY 系雄性マウスを使用した。

5. エキス作製

抽出方法の概略を Scheme 1 に示した。生オゴノリ 10 kg を凍結乾燥後，析出した塩類をはたいて除き，エーテル→クロロホルム-メタノール（1:1）→メタノールの順に3種類の溶媒系で抽出した。各抽出とも 20 L の溶媒を使用し，1週間ずつ3回，室温で浸漬抽出を行い，抽出液を合せ，溶媒を減圧留去して，それぞれよりエーテルエキス（Eエキス），クロロホルム-メタノールエキス（CMエキス），メタノールエキス（Mエキス）を得た。さらにMエキス 10 g を水 100 ml に分散後，*n*-ブタノール 100 ml で3回振とう分配抽出した。その水層は凍結乾燥し，*n*-ブタノール層は溶媒を減圧留去して，それぞれより水エキス（Aqエキス），*n*-ブタノールエキス（Buエキス）を得た。

6. 成分定量

6.1. 塩類の定量

Scheme 1. Extraction and fractionation of *Gracilaria verrucosa*

[]: yield (%) from fresh seaweed

* Extraction was carried out by soaking in solvent at r.t. for a week, three times.

** Salt was separated when extract soln. was concd.

各種エキスの塩含量は、原子吸光分析計を用い、炎光光度法によりナトリウムとカリウムを定量して、それぞれ塩化ナトリウムと塩化カリウム量に換算した。

6.2. 灰分の定量

エキス中の灰分量は、日本薬局方生薬試験法³⁾に従って行った。

6.3. ヒスタミンの定量

生オゴノリ 30 g と 0.002 M 塩酸セミカルバジド 100 ml をワーリングブレンダーのカップに取り、周囲を氷冷し10分間の磨砕をしてかゆ状とした。遠心分離をして上清を除き、残留物はさらに2回同様にして抽出した。上清を合し、ろ紙 (5C) を用いてろ過し、ろ液に水を加えて液量を 300 ml とした。この溶液 100 ml をイオン交換樹脂カラムに毎分 1~2 ml の速さで通した。ついで水 100 ml で洗浄後、2 N アンモニア水 100 ml で溶出させ、溶出液を減圧下で乾固し、その残留物をメタノール 0.5 ml に溶解させて試験溶液とした⁴⁾。この溶液 10 μ l をシリカゲルの薄層プレートに付して、展開溶媒 (0.1 N 塩酸・エタノール=1:1.5) で展開させ、ヒスタミンの検出は、ニンヒドリン試薬を噴霧して行った⁵⁾。定量は、薄層プレート展開時に段階希釈をしたヒスタミンを同時に展開させ、発色スポットの濃度と比較して行った。

7. 薬理実験

7.1. 試験試料

エーテルエキス (Eエキス) は 1% ツイーン 80 (和光純薬工業(株)製) を含む生理食塩液に、その他のエキスはすべて蒸留水に溶解して調製した。また以下に述べる薬理学的試験においては、用量は塩の形で示す。

7.2. 症状観察

モルモットにおいては、試料を腹腔内投与し、その後の一般の症状を観察した。マウスにおいては、試料は経口投与と腹腔内投与を行った。マウスの経口投与の場合のみ、16時間前より絶食させたが、水は自由に与えた。

7.3. 中枢興奮作用

マウスを用い、実験開始1時間前に水と餌を除き、1ケージに1匹ずつ入れ、その環境に慣らした。マウスは通常ではこの時間内に静止状態を示し、頭を下方に丸めて目を閉じ、あたかも睡眠状態に入るようになるので、この時をもって睡眠開始時期とした。試料を静脈内、腹腔内、経口の3ルートでそれぞれ投与し、この時点からの睡眠開始時間を調べ、対照群に比してその延長をもって中枢興奮性を調べた。結果の統計処理は Student's *t*-test によった。

7.4. 急性毒性

マウスに薬液を静脈内投与し、その急性毒性 (LD_{50}) を up and down 法⁶⁾ により求めた。

Table 1. Salt Composition in Extracts

Ext.	Ash (%)**	Composition as	
		NaCl (%)	KCl (%)
CM	25	20	7
M	36	20	8
Separated salt*	94	20	80
Bu	—	14	5
Aq	—	20	9

* This was separated when methanol-extract soln. was concd.

** Ext. was reduced to ashes.

Fig. 1. Thin layer chromatogram for detection of histamine

Plate: silicagel Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck); developing solvent: 0.1 N hydrochloric acid-ethanol (1:1.5); detection: ninhydrine reagent

Ten μ l of the test soln. was spotted.

実験結果と考察

1. エキス収量並びに塩類含量

生オゴノリより直接抽出で得た各エキス並びに分配により得た画分の量を Scheme 1 に示した。生オゴノリの水分含量は多く、その約 83% は水であった。3種類の溶媒系で抽出された全エキス量は約 1.5% であって、それらがすべて多糖類であったとしても、使用した有機溶媒系では抽出が少ないことがわかった。一方、本抽出過程で析出する無機塩の総量は約 2.3% であった。Eエキスは黄色オイル状で収量は少量であり、CM エキス並びにMエキスは共に黄色粘土状でほぼ同じ収量であった。Mエキスから分配された Bu エキスと Aq エキスの割合は 1.2:6.4 で M エキス中には水可溶性成分の方が多かった。

2. 各エキス中の灰分

CM エキス、Mエキス、並びにMエキス調製時に析出した塩類を灰化し、その灰分量を Table 1 に示した。またそれらのエキスと塩類及び Bu エキスと Aq エキス中のナトリウムとカリウムの組成をそれぞれの塩化物として示した。オゴノリのメタノール抽出液を濃縮した場合、ナトリウムよりもカリウムの方が多く析出しており、エキスを含まれるカリウムの動物に対する影響をできるだけ除去するには本法のような析出法が適切と考えられた。

Table 2. General Observation of Symptoms Induced by Administration of Exts. to Guinea Pigs

Administration <i>i.p.</i>	<i>s.c.*</i>	Dilatation of ear blood vessels	Scratch- ing of nose	Sneezing or hiccough	Urina- tion	Evacua- tion	Loss of righting reflex	Time to death
Histamine								
3.0 mg/kg	Saline	(Turn black)	+	++	+	+	+	40 min
3.0 mg/kg	Diph.	—	—	—	—	—	—	—
CM ext.								
3.3 g/kg	Saline	+	±	+	+	+	+	—
6.0 g/kg	Saline	+	++	+	—	++	+	18 hr
6.0 g/kg	Diph.	+	+	—	+	+	±	18 hr
6.0 g/kg	Saline	+	+	—~+	+	+	+	2 hr
6.0 g/kg	Atro.	+	+	—	++	+	+	18 hr
6.0 g/kg	Atro.+Diph.	+	++	+	+	—	+	18 hr
M ext.								
4.5 g/kg	Saline	+	++	—	+	++	+	2 day
4.5 g/kg	Atro.	+	+	—	++	+	+	—
4.5 g/kg	Atro.+Diph.	+	—	—	++	+	+	18 hr
6.0 g/kg	Saline	+	++	—	+	++	+	18 hr
6.0 g/kg	Atro.	+	++	—	+	++	+	18 hr
6.0 g/kg	Atro.+Diph.	+	+	—	+	—	+	18 hr
Bu ext.								
1.0 g/kg	—	—	—	—	+	+	—	—
2.0 g/kg	—	—	—	—	+	++	—	3 day

Histamine: histamine dihydrochloride; Diph.: diphenhydramine hydrochloride; Atro.: atropine sulfate monohydrate; *i.p.*: intraperitoneally; *s.c.*: subcutaneously

* Saline (1 ml/kg), Diph. (10 mg/kg) and Atro. (2 mg/kg) were administered, respectively, 30 min before the administration of histamine or ext.

3. オゴノリ中のヒスタミンの化学的定量

後で述べるように薬理的にオゴノリ中にヒスタミンの存在が疑われたが、化学的には Fig. 1 に示すように、生オゴノリ中のヒスタミン量は、2.5 ppm として定量された。また本法ではヒスタミン 0.5 ppm まで検出可能であった。

文献上コンブのヒスタミン含量は 2~280 ppm⁷⁾ であって、ここで使用の生オゴノリを乾燥すると 1 オーダー高い 25 ppm 位と考えられるので両者の数値に 対応性が見られる。この程度のヒスタミンを含むオゴノリを仮に摂取したとしてもヒスタミンによる食中毒を起こすとは考えられない。

4. モルモットにおける症状観察

CM エキスまたは M エキスを 3.3~6.0 g/kg あてモルモットの腹腔内に投与した結果を Table 2 に示す。まず耳血管の赤変・拡張が起こり、約 30 分間持続した。その他の症状として掻鼻、排尿、排便、正向反射の消失が認められた。高用量の投与群では 12 時間以後に死亡する例が観察された。これらの症状はモルモットにヒスタミンを投与すると得られる症状に似るので、ヒスタミン 3 mg/kg を腹腔内に投与して比較した。この結果、多く

の症状に類似性が見られたが、耳血管の赤変・拡張はヒスタミン投与によっては、むしろ黒変という変化であった。また先の掻鼻などの症状から、エキス中にヒスタミンやアセチルコリンの存在が疑われた。そこで、ヒスタミン並びにアセチルコリンそれぞれの特異的拮抗薬であるジフェンヒドラミンとアトロピンを用いて、薬理実験をした。その結果、ヒスタミンが起こした諸症状はジフェンヒドラミンによりすべて拮抗されたが、CM または M エキスが起こした症状は各拮抗薬及びその併用によって影響されなかった。従って CM エキス並びに M エキスが起こした掻鼻、排尿、排便、正向反射の消失はヒスタミン様作用やアセチルコリン様作用とは異なった作用機序によって発現していると推定された。この結果は、3. の化学的定量でヒスタミン含量が微量であったことも一致していた。なお、上に記したようにヒスタミンでは耳血管の赤変・拡張は見られず、逆にそれが黒変したが、これはヒスタミンによる血圧降下のためと考えられる。この点でエキスによる赤変・拡張は興味ある現象と思われる。一方、M エキスから得た Bu エキスには耳血管の拡張や掻鼻などの作用は消失し、*n*-ブタノールと水の分配で作用が分かれる傾向を認めた。

Table 3. Acute Toxicity and Laxative Action of Extract in Mice

Extract	Dose (g/kg)	Route	Death/Total	Laxative action (min)	[ratio]
E ext.	10	<i>p.o.</i>	0/3		[0/3]
E ext.	15	<i>p.o.</i>	0/3		[0/3]
CM ext.	20	<i>p.o.</i>	1/3		[0/3]
→Ash*	20	<i>p.o.</i>	0/3		[0/3]
CM ext.	5	<i>i.p.</i>	1/1		[0/1]
CM ext.	10	<i>i.p.</i>	2/2		[0/2]
M ext.	10	<i>p.o.</i>	0/3		[0/3]
M ext.	15	<i>p.o.</i>	3/3	10-14	[3/3]
M ext.	20	<i>p.o.</i>	3/3	10-14	[3/3]
→Ash*	20	<i>p.o.</i>	0/3		[0/3]
M ext.	2.5	<i>i.p.</i>	0/3		[0/3]
M ext.	5	<i>i.p.</i>	0/3		[0/3]
M ext.	10	<i>i.p.</i>	2/2		[0/2]
Bu ext.	8	<i>p.o.</i>	0/2		[0/2]
Bu ext.	10	<i>p.o.</i>	0/1	47	[1/1]
Aq ext.	10	<i>p.o.</i>	0/2		[0/2]
Aq ext.	20	<i>p.o.</i>	2/2	110	[1/2]
Aq ext.	30	<i>p.o.</i>	1/1	20	[1/1]
Separated salt**	4	<i>p.o.</i>	1/3		[0/3]
Separated salt**	8	<i>p.o.</i>	3/3		[0/3]

* *p.o.*: per oral; *i.p.*: intraperitoneally, Ext. was reduced to ashes and the equivalent amount of ash was administered.

** This was separated when methanol extract-soln. was concd.

Fig. 2. Acute toxicity of methanol extract in mice

M ext. was administered intravenously.

Up and down method was applied. LD₅₀: 1.06 g/kg

5. マウスにおける症状観察

各種エキスの致死活性と下痢作用を Table 3 及び Fig. 2 に示す. 各エキスは致死活性を示さないか, あるいは極めて大量投与した時のみ致死活性を示した. 例えば, 経口投与では CM エキスが 20 g/kg, Aq エキスが 20 g/kg で, また腹腔内投与では CM エキスが 5 g/kg, Mエキスが 10 g/kg で死亡を与えた. これらの結果は各エキスとも極めて急性的な毒性が低いことを示す. 作用を発現した CM エキスと Mエキスに含まれる灰分の当量分の投与では作用がでないので, それら両エキスの毒性発現本体は, 含有される有機物であると考えられる. Mエキスの静脈内投与による LD₅₀ 値は 1.06 g/kg であり, やはり低い毒性を示した (Fig. 2).

CM エキス, Mエキス並びに Bu エキスの腹腔内投与時と経口投与時において, 動物は鎮静状態を示し, 大量

Fig. 3. Effect of E ext. on time to falling asleep in mice

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

投与では正向反射が消失し、平臥して動かなくなり、そのまま死に至った。Mエキ스는経口投与後10分程で顕著な下痢作用を示したが、この量では動物は死亡し、下痢作用と致死活性を分離できなかった。Mエキスの致死活性と下痢作用は Bu エキスと Aq エキスの結果より Aq エキスに移行すること、そしてその下痢作用は当量の灰分が無作用であったことから有機物であることが確かめられた。なお析出塩については、Table 1 に示した様にその 94% が無機物であったが、経口投与で致死活性を示した。これはカリウム含量が高いことによるものと考えられた。

6. 中枢興奮作用

Eエキスでは、他のエキスとは異なり症状観察時に興奮様作用が認められたので、それをさらに検討した。Fig. 3 に示したように、静脈内投与、腹腔内投与、経口投与の3ルートで、それぞれ 150 mg/kg, 300 mg/kg, 500 mg/kg で中枢興奮作用を与えた。

一般に中枢興奮作用を示す薬物は血液-脳関門を通過する必要があるが、Eエキ스는脂溶性でありその可能性を持っているといえる。またその作用発現量はどの投与ルートによってもそれほど大きな差がないので、効率よく消化管から吸収され、容易に中枢部位へ到達するものと考えられる。一方、Table 3 に示したようにEエキスで死亡例、下痢例は認められなかったこと、及び本作用は極めて低い用量で発現するという点でこの中枢作用は興味ある作用といえる。

要 約

オゴノリ類によると考えられる食中毒について生物活性の点よりその発生原因を検討した。愛媛県での中毒の場合、農薬、食中毒菌、シアノ、ヒ素、水銀などは検出されていない*3。本実験で用いられたマウスはしばしば天然毒の検出に用いられており、またモルモットはヒスタミンなどの成分に対して感受性が強い。従って、オゴノリ成分にその中毒が由来するならば、オゴノリエキスをそれらに大量投与することよりなんらかの生物活性の発現が期待される。今回、中毒者が食べ残したオゴノリの量は極めて少量であって、やむなくそのオゴノリと同一場所で採集した新鮮オゴノリを用いた。

1. 乾燥オゴノリを無極性溶媒から順次極性を上げ、室温で浸漬抽出を行った。抽出液に含まれて来る無機塩、特にカリウム塩の効率的な除去は、抽出液を濃縮し、析出塩をろ別することにより行った。この結果、カリウムに由来する毒性を除くことができ、各種エキスを過剰に投与して薬理活性を検討することが可能となった。

2. CM エキスや M エキスのモルモット腹腔内投与により、耳血管拡張、掻鼻、排尿及び正向反射の消失を

認めた。これらの作用はヒスタミンによるものではなかった。このことは化学的定量の結果とも一致した。

3. Mエキスのマウスへの経口投与では、顕著な下痢作用に引き続き、死亡が見られた。

4. Eエキスでは、経口、腹腔内、静脈内いずれの投与ルートによっても、中枢興奮作用が認められた。

5. 以上、オゴノリには種々の薬理活性と毒性を認めた。特に、モルモットにおける耳血管拡張などの諸症状は中毒時に発現する急性毒性症状と関係するようにも考えられる。しかし、本研究において使用した各種エキスの用量は極めて高く、例えば CM エキス 3.3 g/kg は生オゴノリに換算すると、約 500 g/kg に相当する。また、これらの薬理活性と毒性は腹腔内投与では認められたが、経口投与では、マウスの実験結果から見て、諸症状の発現はさらに少なくなっているものと推定される。一方、ヒトにおける中毒発現の過程から、もし毒性物質が存在していたとすると、それは極めて溶出、吸収され易いことが予想される。このため、今回用いた3種の溶媒抽出法で取得できない成分に毒性の候補があるとは考えにくい。従って、オゴノリは薬理活性と毒性を示す成分(群)を含むといえるが、それがヒトに中毒を与えることを示唆するデータは得られなかった。

謝 辞

本研究の実施にあたり有益な御助言を頂いた当所、内山 充、斎藤行生、高仲 正、戸部満寿夫の各部長、山形県衛生研究所所長、片桐 進博士、愛媛県衛生研究所前所長、園田俊郎博士並びに現所長、井上博雄博士に感謝いたします。また園田、井上両博士には、オゴノリ採集等に御尽力頂きました。併せて感謝いたします。本研究の一部は昭和57～59年度厚生科学研究費によった。

文 献

- 1) 相川勝悟、鈴木道子、小野啓二郎：山形県衛研所報、2, 81～82 (1981)。
- 2) 伏谷伸宏：“オゴノリに関する研究” 昭和57年度水産庁漁業公害調査委託、全国総点検調査報告書 (1982)。
- 3) 厚生省編：“第十一改正日本薬局方” p. 48 (1986)。
- 4) 佐竹一夫：“クロマトグラフィー” p. 54 (1963) 共立全書。
- 5) 日本薬学会編：“衛生試験法・注解” p. 165 (1980) 金原出版。
- 6) 高木敬次郎、小澤 光編：“薬物学実験” p. 204 (1967) 南山堂。
- 7) 小菅卓夫、粕谷東雄、山本藤輔、辻 邦郎：薬誌、103, 683～685 (1983)。