麻痺性貝毒のマウス試験におけるカルシウムの影響^{*1}

(平成 3 年 2 月 28 日受理)

只野 敬子^{*2} 安田 和男^{*2}
牛山 博文^{*2} 二島 太一郎^{*2}

Effect of Calcium on the Mouse Bioassay Method for Paralytic Shellfish Poison (Hygienic Studies on Health Food (III))

Keiko TADANO^{*2}, Kazuo YASUDA^{*2}, Hirofumi USHIYAMA^{*2} and Taichiro NISHIMA^{*2}

(^{*2}The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1,
Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan)

Seventeen oyster extract tablets, so-called health food, on the market were investigated for paralytic shellfish poison (PSP) by the standard mouse bioassay method. Eleven samples contained toxicity in the range of 3.9-12.5 MU/g. However, in samples that had a positive mouse bioassay result, PSP was not identified by thin-layer chromatography and fluorescence analysis and was also not detected by high performance liquid chromatography.

It was found that the mouse toxicity was correlated with the concentration of calcium in samples. The toxicity may be caused by the conversion of CaCO_3 in tablets into CaCl_2 by HCl used for the extraction of PSP. It was found that sulfuric acid, citric acid or phosphoric acid could be employed to extract PSP in place of HCl.

(Received February 28, 1991)

Key words: 健康食品 health food; 麻痺性貝毒 paralytic shellfish poison; カキ oyster; カキエキス錠剤 oyster extract tablet; マウス試験法 mouse bioassay method; マウス mouse; 炭酸カルシウム calcium carbonate; 塩化カルシウム calcium chloride

緒 言

著者らは、健康食品として市販されている多種多様の食品について、安全性評価を目的として従来から種々の衛生学的調査を行い報告^{1), 2)}してきた。今回は、海産物を主原料とする健康食品のうち、需要の多い貝類を原料とする製品について調査した。

貝類については、二枚貝が有毒プランクトンの渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属を摂取して消化管(中腸腺)などに蓄積することにより、貝が毒化する麻痺性貝毒が知られている。

現在、麻痺性貝毒としてサキシトキシン saxitoxin (STX) 群、ゴニオトキシン gonyautoxin (GTX) 群など十数種の毒素が確認されている。近年、毒化する貝の種類も増加し、貝毒発生地域も全国的に拡大する傾向が認められている³⁾。

そこで、貝類製品のうち過去にいくつか中毒事例報告^{4), 5)}があるカキを主原料とするカキ加工食品のカキエキス錠剤について、麻痺性貝毒試験を行った。

麻痺性貝毒試験法としては、A. O. A. C. 法⁶⁾に基づいたマウスを用いる動物試験のみが公定法⁷⁾として定められている。そこでこの公定法⁷⁾に従って試験を行ったところ、マウスが麻痺性貝毒によると見られる症状を呈して死亡する例があった。しかし、化学試験により麻痺性貝毒の確認を行ったが貝毒は検出されなかったため、その致死原因を検討した結果、若干の知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

試料は、都内のデパート及び健康食品専門店で市販されていたカキエキス錠剤 17 試料(8 社)を用いた。

2. 貝毒標準品、毒化貝抽出液及び毒化貝

1) 貝毒標準品及び毒化ホタテガイ抽出液

STX 群 (STX, neoSTX) 標準品, GTX 群 (GTX₁,

^{*1} 健康食品の衛生学的調査(第3報)

^{*2} 東京都立衛生研究所: 東京都新宿区百人町 3-24-1

GTX₂, GTX₃, GTX₄) 標準品及び毒化ホタテガイ酢酸抽出液は東京大学農学部水産化学教室より分与されたものである。なお、ホタテガイ抽出液のマウス毒性は 66 MU/ml であった。

2) 毒化アカザラガイ抽出液

毒化アカザラガイ酢酸抽出液は宮城県気仙沼保健所より分与されたものである。なお、アカザラガイ抽出液のマウス毒性は 8.6 MU/ml であった。

3) 毒化ホタテガイ

毒化ホタテガイ 20 個は 1990 年 5 月に岩手県大船渡湾で採取され、岩手県水産試験場より分与されたものである。

それらの中腸腺を摘出して合し、ホモジナイザーで磨砕均質化した後、約 20 g づつ共栓試験管に分取し、凍結保存した。なお、この中腸腺のマウス毒性は 124 MU/g であった。

3. 試薬及び装置

1) カラムクロマトグラフィー用活性炭：和光純薬工業(株)製

2) 薄層用シリカゲルプレート：DC-Fertigplatten kieselgel 60, Merck 社製

3) その他の試薬はいずれも市販特級品を用いた。

4) 高速液体クロマトグラフ：(株)日立製作所製, 638-50 型 (けい光検出器付)

5) けい光分光光度計：(株)日立製作所製, MPF-4 型

6) 原子吸光光度計：Varian 社製, AA-975 型

4. 動物試験

食品衛生検査指針 II, 麻痺性貝毒試験法⁷⁾に従い次のとおり行った。

4.1 試験溶液の調製

粉砕した試料 10 g を秤り、0.1 N 塩酸 30 ml を加えてかくはんし、5 N 塩酸で pH 3 に調整した後、沸騰水浴中 5 分間加熱した。室温まで放冷後、再び pH 3 に調整した後、水で 40 ml とし、よくかくはんしてから 3,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上澄液を試験溶液とした。

4.2 マウス試験方法

4 週齢の ddY 系雄マウスを購入し、3 日間予備飼育後、体重 19~21 g のものを選び 1 群 5 匹としてマウス試験を行った。試験溶液 1 ml を腹腔内投与し、マウスが麻痺性貝毒による典型的な症状を呈し死亡するまでの時間から、中央致死時間を求め、Sommer の表⁶⁾によりマウス単位 (MU) に換算した。この時の 1 MU とは体重 20 g のマウスを 15 分で死亡させる毒量を言う。さらに、得られたマウス単位を、試験溶液中の試料量で除した値を試料 1 g 当りの毒力として、MU/g で表わした。

5. 化学試験

5.1 試験溶液の調製⁸⁾

マウス試験で用いた試験溶液 3 ml を、さらに 1 N 水

酸化ナトリウムで pH 5.5 に調整し、活性炭カラムに負荷した。蒸留水約 20 ml で十分洗浄した後、酢酸-20% エタノール (1:99) 混液 15 ml で溶出した。溶出液を減圧濃縮し、水で 3 ml としたものを試験溶液とした。

5.2 試験方法

1) 薄層クロマトグラフィー⁹⁾ (TLC 法)

試験溶液 20 μ l をシリカゲルプレートに塗布し、1-ブタノール-酢酸-水 (2:1:1) 混液を用いて展開した。プレートを風乾後、1% 過酸化水素水を噴霧し 110° で 5 分間加熱した。放冷後、紫外線 (365 nm) 照射下で試料のけい光を観察し、同様に操作した毒化貝のけい光スポットの R_f 値及び色調と比較して判定した。

2) けい光強度法

麻痺性貝毒の多くはアルカリ性下で過酸化水素処理を行うと、けい光物質に変換する¹⁰⁾。

そこで、試験溶液 1 ml に 0.5 N 水酸化ナトリウム 1 ml 及び 4% 過酸化水素水 0.3 ml を加え、暗所で 30 分間放置後、酢酸を加えけい光強度 (励起波長 340 nm, けい光波長 395 nm) を測定し、同様に操作した毒化貝抽出物と比較した。

3) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC 法)

長島らの方法¹¹⁾に従い、過ヨウ素酸酸化によるポストカラム法で測定した。

6. 無機成分の測定

衛生試験法・注解¹²⁾に従い、カルシウム、カリウム、ヒ素は原子吸光法、ホウ素はクルクミン発色法、塩化ナトリウムはモール法により測定した。

実験結果及び考察

1. 動物試験

市販のカキエキス錠剤 17 試料を公定法⁷⁾に従って調査したところ、11 試料から 3.9~12.5 MU/g のマウス毒性が認められた。

そこで、このマウス毒性を食品衛生法¹³⁾及び健康食品業界の自主規格基準¹⁴⁾に照らし合せ考察した。食品衛生

Fig. 1. Manufacturing process for oyster extract tablet

Fig. 2. Thin-layer chromatogram of extract of oyster extract tablets

A: extract of toxic scallop *Patinopecten yes-soensis*

B: extract of toxic scallop *Chlamys nipponensis akazara*

C: extract of oyster extract tablet (I)

D: extract of oyster extract tablet (II)

TLC plate: kieselgel 60

Developing solvent: 1-butanol-acetic acid-water (2:1:1)

After development, the plate was air-dried, sprayed with 1% H_2O_2 , and heated at 110°C for 10 min, and fluorescent spots were detected under UV light at 365 nm.

⊗: blue fluorescence; ⊙: white fluorescence

法¹³⁾においては貝類のむき身の暫定的出荷規制値は 4 MU/ml と定められているのみで、カキ加工食品についての基準値はないため、直ちに不適品とは言えない。しかし、自主規格基準¹⁴⁾ではカキ加工食品は「カキの水抽出物の乾燥重量が製品の 40% 以上含有するもの」と定義された上で、貝毒については「検出されてはならない」と定められていることから考えると、マウス毒性が認められた試料は不適品とみなされる。

次に、Fig. 1 に示したカキエキス錠剤の製造工程の一例から、これらのマウス毒性が認められた原因を考察した。この製造法から考えると麻痺性貝毒は水溶性のため溶出されやすく、また、熱に対しても安定であるため、エキスを抽出するときの 90° 程度の温度では分解されにくいものと思われる。さらに、製造過程には濃縮工程があるため、原料のカキが低毒力の場合でも製品では高濃度になることも考えられる。

2. 化学試験

動物試験でマウス毒性を示した試料について、TLC 法、けい光強度法及び HPLC 法により化学試験を行い貝毒の確認及び毒成分の同定を試みた。

Fig. 3. Relationship between the toxicity and fluorescence intensity in standard and sample extracts

Fluorescent monitor: Ex. 340 nm; Em. 395 nm

○: extract of toxic scallop *Patinopecten yes-soensis*; ●: extract of oyster extract tablet

1) TLC 法

カキエキス錠剤抽出物の薄層クロマトグラムを Fig. 2 に示した。毒化ホタテガイ及びアカザガイ抽出物には、 R_f 0.6 付近に麻痺性貝毒によると思われる 2 つの青白いけい光が認められた。しかし、試験溶液ではマウス試験で陽性を示したにもかかわらず、同様の R_f 値付近にけい光スポットは見られなかった。

2) けい光強度法

マウス毒性とけい光強度の関係を Fig. 3 に示した。毒化ホタテガイから調製した 0.5~4 MU/ml の溶液では、マウス毒性が強くなるに従いけい光強度はほぼ比例して増加した。しかし、試験溶液については、それぞれのマウス毒性を示す MU/ml 値に対応したけい光強度の増加は認められなかった。

3) HPLC 法

TLC 法及びけい光強度法では酸化剤として過酸化水素を使用するため、GTX₁ や neoSTX のように 1 位の窒素に水酸基を持つ成分はけい光を発しない。そこで、特異性と検出感度を高めるため過ヨウ素酸で酸化後、塩化アセトアルデヒドと反応させるポストカラム方式による HPLC 法¹¹⁾を用いた。貝毒標準品 (STX 群混合標準溶液: 0.1 MU/ml, GTX 群混合標準溶液: 0.2 MU/ml) 及びカキエキス錠剤抽出物 (試験溶液: 0.5 MU/ml, 錠剤あたり: 12.0 MU/g) のクロマトグラムを Fig. 4 に示した。マウス試験で陽性を示した試料でも STX 群、GTX 群に相当する位置にピークは見られなかった。

以上のことから、マウス試験で毒性を示す試料であっても、3 通りの化学試験で貝毒が検出されないという矛盾した結果が得られた。

3. マウス致死原因の検討

動物試験ではマウスが麻痺性貝毒と酷似した症状を呈

Fig. 4. High performance liquid chromatograms of extract of oyster extract tablet and standards

HPLC conditions¹¹⁾

Column: silica ODS column (6 mm i.d.×300 mm); mobile Phase: 2 mM heptanesulfonic acid in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0)·methanol (STXs. 75 : 25; GTXs. 99 : 1); flow rate: 1.0 ml/min

Reagents for detection of toxin: (I) 0.05 M periodic acid; (II) 0.2 N KOH plus 1 M ammonium formate in 50% formamide; (III) 1% chloroacetaldehyde in 1 M citrate buffer (pH 4.0)

Fluorescent monitor: Ex. 336 nm; Em. 390 nm

し死亡したにもかかわらず、化学試験では麻痺性貝毒が検出されなかった。これは貝毒以外の要因がマウス致死に影響を及ぼしたものと考え、カキエキス錠剤中の成分について検討を行った。

1) 錠剤中成分の調査

カキエキス錠剤は、カキエキスパウダーに乳糖、デンプンなどを加え成形した後、炭酸カルシウム、白糖などでコーティングしたものである。

そこで、これら白糖、色素、結晶セルロース及び炭酸カルシウムなどの各原料の他、塩分濃度及び各種元素などがマウス毒性を示すか否かについて調査した。

各原料のそれぞれについて、マウス試験溶液中における濃度に相当する量を公定法による試験操作に従いマウスに投与したところ、炭酸カルシウムの場合のみ麻痺性貝毒と酷似した症状を呈しマウスが死亡した。しかし、炭酸カルシウムは不溶性であり、そのまま水に懸濁させマウスに投与した場合は毒性を現さなかった。

このことから、公定法⁷⁾に従うとマウスが死亡した原因は、抽出及び pH 調整の際に使用する塩酸により炭酸カルシウムが解離して可溶性の塩化カルシウムとなり、それが毒性を示すものと推察した。

そこで、カキエキス錠剤抽出物の MU 値とカルシウム濃度の関係を検討したところ、Table 1 に示すように MU 値の高い試料では明らかにカルシウム濃度も高い傾

Table 1. Mouse Toxicity and Calcium Content in Oyster Extract Tablets

No. of samples	Toxicity (MU/g)	Ca (μg/g)
1	ND	100
2	ND	600
3	ND	1,600
4	ND	3,000
5	ND	3,400
6	ND	4,000
7	3.9	11,000
8	4.3	7,900
9	4.9	18,800
10	5.5	6,800
11	5.7	7,500
12	6.5	7,700
13	6.8	7,600
14	7.2	25,900
15	11.8	35,000
16	12.0	41,000
17	12.5	43,000

ND: not detected (<3.5 MU/g)

向が認められた。

なお、確認のためカキエキス錠剤のコーティング部分の炭酸カルシウム層を剥離して除き、マウス試験をした

Fig. 5. Relationship between the toxicity and the concentration of calcium in extract of oyster tablet and calcium chloride solution

○: calcium chloride solution; ●: extract of oyster tablet

* Concentration in mouse test solution

ところ、いずれの試料もマウスの死亡を認めなかった。

一方、塩化ナトリウムの濃度が3~4%以上になるとマウスに影響を与える¹⁵⁾と言われるが、試料の試験溶液中の濃度は0.25~2.1%であるので、マウス致死に特に影響はないものと考え、実際、塩化ナトリウム濃度5%で同様に試験した場合でもマウスが死亡することはない。

錠剤成分のうち、濃度によってはマウス致死に影響を及ぼすと考えられる各種元素について試験溶液中の濃度を測定した。ヒ素はTr~0.8 μg/ml、カリウムは1,300~4,000 μg/ml及びホウ素はTr~0.6 μg/mlでいずれもマウスの致死原因となるような濃度ではなかった。また、これらの含有量と各試料のMU値との相関も認められなかった。

2) 塩化カルシウムのマウス毒性

マウスの死亡原因と推察された塩化カルシウムのマウス毒性を確認するために、塩化カルシウム標準溶液をマウス腹腔内に投与したところ、マウスは死亡し、その症状は貝毒による症状に酷似していた。カキエキス錠剤より得られた試験溶液中のカルシウム濃度及び塩化カルシウム標準溶液におけるカルシウム濃度とマウス毒性との関係をFig. 5に示した。

試料より得られた試験溶液の場合はカルシウム濃度2,000 μg/ml以上で、塩化カルシウム標準溶液の場合は5,000 μg/ml以上でカルシウム濃度とMU値の間に明らかに正相関が認められた。

カルシウムイオンは生体内において細胞膜の透過性、神経、心臓、筋などの興奮性、血液凝固、ある種の酵素の活性化などの生命現象の維持に重要な役割を持っている¹⁶⁾ことが知られている。そこで、細胞内外のカルシウムイオンの一定濃度差を維持することは細胞にとって必須である¹⁷⁾。したがって、高濃度の塩化カルシウムがマ

Table 2. Comparison of Extract Rate with Various Acids

Solvents for extraction	Toxicity (MU/g)*	Relative toxicity**
Hydrochloric acid	124	1.0
Sulfuric acid	137	1.10
Citric acid solution	134	1.08
Phosphoric acid	112	0.90
Water	104	0.83

* Toxicity detected in digestive gland of toxic scallop *Patinopecten yessoensis*.

Each value is an average of 3 trials.

** Relative toxicity was expressed as a ratio of the toxicity of the extracts extracted with the solvents other than hydrochloric acid to the toxicity of hydrochloric acid extract.

ウス毒性に関与することは十分考えられる。

なお、カルシウム濃度が同程度でも塩化カルシウム標準溶液に比較すると試験溶液のMU値は若干高くなる傾向が認められた。この原因としては、カルシウムの作用の他に試験溶液中に存在する種々の塩類など、個々にはマウスに対しほとんど作用を与えない無機成分の影響が複合されて現われたことも考えられる。

4. 麻痺性貝毒の抽出における酸類の検討

1) 各種酸類によるマウス試験への影響

カキエキス錠剤の貝毒試験を公定法⁷⁾に従い行くと、塩酸で可溶性カルシウム塩が生成しマウス毒性を現わすことが認められたので、塩酸の代わりに他の酸類を抽出溶媒として使用し、炭酸カルシウムの影響を除くことができるか否かを検討した。

硝酸、硫酸、リン酸、酢酸及び乳酸の各0.1 N溶液及びクエン酸の0.1 M溶液を用い、カキエキス錠剤について公定法⁷⁾に準じて試験溶液を調製しマウス試験を行った。

その結果、塩酸の場合と同様に可溶性カルシウム塩が生成されると思われる硝酸、酢酸及び乳酸を用いた場合はマウス毒性が認められ、不溶性カルシウム塩が生成されると思われる硫酸、リン酸及びクエン酸溶液では毒性が認められなかった。

なお、0.1 N硝酸、0.1 N酢酸及び0.1 N乳酸の各カルシウム塩標準溶液について、それぞれ10,000 μg (カルシウムとして) /ml溶液1 mlをマウスに腹腔内投与したところ、いずれもマウス毒性のあることが確認された。

2) 抽出率の比較

マウス試験でカルシウム塩の影響がなかった硫酸、リン酸及びクエン酸溶液について貝毒の抽出率を塩酸の場合と比較した。

凍結毒化ホタテガイ中腸腺試料を解凍し、均一化した後、10 g づつを試験管に採取し、0.1 N 塩酸、0.1 N 硫酸、0.1 N リン酸及び 0.1 M クエン酸溶液各 10 ml を用い、それぞれ公定法に準じ試験溶液を調製しマウス試験を行った。

各酸類の抽出率を比較した結果を Table 2 に示した。硫酸及びクエン酸溶液での抽出率は塩酸の場合に比較して 10% 程度高く、リン酸では 10% 程度低い値だった。しかし、マウスを用いた動物試験では $\pm 20\%$ の定量誤差を伴うものと見なされていることから、これらの酸の抽出率は、塩酸の場合と大差ないものと考えられる。一方、蒸留水 (pH 6.0) で抽出した場合は、いずれの酸と比較しても抽出率は低かった。

この結果、長島らの報告^{*)}にもあるように貝毒の抽出には pH の影響が大きく、抽出溶媒の酸の種類による差はないため、硫酸、クエン酸及びリン酸を用いても塩酸を用いた場合と同程度に貝毒を抽出できることが分かった。

ま と め

健康食品として市販されているカキエキス錠剤 17 試料について麻痺性貝毒試験を行ったところ、11 試料から 3.9~12.5 MU/g のマウス毒性が認められた。しかし、この毒性を示した原因は、公定法⁷⁾において抽出及び pH 調整に用いる塩酸が、錠剤のコーティング部分に使用されている炭酸カルシウムを塩化カルシウムに変えるためであることが分かった。さらに、この塩化カルシウムにより麻痺性貝毒と類似した症状を呈することを認めた。

そこで、本試料のように高濃度のカルシウムを含む製品について、マウス試験でカルシウム塩の影響をうけない酸類を検討したところ、塩酸に代えて硫酸、クエン酸及びリン酸などの酸を使用することができ、貝毒の抽出も塩酸を使用した場合と同程度の結果が得られることが認められた。

また、動物試験が公定法⁷⁾として定められている麻痺性貝毒試験を健康食品のような加工製品に適用する場合は、含有成分に留意する必要がある、特に多量のカルシウム塩を含有する試料については、公定法⁷⁾の塩酸の代わりに硫酸、クエン酸及びリン酸を用いて試験溶液を調製するか、HPLC 法などの他の分析手段を併用することが必要と考える。

なお、本研究の概要は日本食品衛生学会第 59 回学術講演会 (1990 年 5 月、東京) において発表した。

謝 辞

本報告に際し、御懇切なる御指導及び貴重な試料の御提供をいただいた茨城大学橋本周久先生、東京大学野口玉雄先生、浅川 学先生に深謝致します。

文 献

- 1) 安田和男, 西島基弘, 斎藤和夫, 上村 尚, 井部明広, 永山敏廣, 牛山博文, 田端節子, 松本幸子, 直井家壽太, 二島太一郎: 食衛誌. 25, 371~377 (1984)
- 2) 安田和男, 西島基弘, 斎藤和夫, 上村 尚, 井部明広, 永山敏廣, 牛山博文, 田端節子, 直井家壽太, 二島太一郎: 同上 27, 302~310 (1986).
- 3) 安元 健: 化学と生物 27, 401~406 (1989).
- 4) Onoue, Y., Noguchi, T., Hashimoto, K.: Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 46, 1,031~1,034 (1980).
- 5) 野口玉雄: 衛生化学 29, 10~15 (1983).
- 6) Horwitz, W., ed.: Official Methods of Analysis of A. O. A. C., 12 th Ed. p. 319 (1975), A. O. A. C., Washington, D. C.
- 7) 厚生省環境衛生局 監修: “食品衛生検査指針 II” p. 240~244 (1978), 日本食品衛生協会.
- 8) 菊地秀明, 牛沢 勇: 宮城県保健環境センター年報 2, 104~105 (1984).
- 9) Shoptaugh, N. H., Buckley, L. J., Ikawa, M., Sasner, Jr., J. J.: Toxicon 16, 509~513 (1978).
- 10) Bates, H. A., Rapoport, H.: J. Agr. Food Chem. 23, 237~239 (1975).
- 11) Nagashima, Y., Maruyama, J., Noguchi, T., Hashimoto, K.: Nippon Suisan Gakkaishi 53, 819~823 (1987).
- 12) 日本薬学会編: “衛生試験法注解” p. 73~75, p. 270, p. 271, p. 1,174~1,175, p. 1,344 (1990), 金原出版.
- 13) 厚生省環境衛生局長通知: “麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取扱いについて” 昭和 55 年 7 月 1 日, 環乳第 29 号 (1980).
- 14) (財)日本健康食品協会編: “健康食品規格基準集 (その 2)” p. 18 (1987).
- 15) 日本薬学会編: “衛生試験法注解” p. 424~429 (1990), 金原出版.
- 16) 石館守三 監修: “食品添加物公定書第四版” p. B-138~B-142 (1979), 廣川書店.
- 17) 福本誠二, 松本俊夫: 臨床栄養 74, 571~579 (1989).

^{*)} 長島裕二, 野口玉雄, 橋本周久, 河端俊治: 昭和 60 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 205 (1985).