バイ (海つぼ) 毒素に関する研究

小菅卓夫,^a 全田 浩,^b 辻 邦郎*,^a

静岡薬科大学,^a 干422 静岡市小鹿 2-2-1

信州大学医学部,^b 干390 松本市旭 3-1-1

Elucidation of Toxins and Their Origin in the Japanese Ivory Shell, *Babylonia japonica*

TAKUO KOSUGE,^a HIROSHI ZENDA,^b and KUNIRO TSUJI*,^a

Shizuoka College of Pharmacy,^a 2-2-1 Oshika, Shizuoka 422, Japan and

Department of Pharmacy, Shinshu University Hospital,^b

3-1-1 Asahi, Matsumoto, 390, Japan

In September 1965, the Japanese ivory shell, *Babylonia japonica* harvested from the Ganyudo area of Suruga Bay, Shizuoka Prefecture, caused an outbreak of food poisoning. The causative toxins, designated as neosurugatoxin and prosurugatoxin, were isolated from the digestive gland of the shellfish, and their chemical structures were determined.

Pharmacological studies suggested that the toxins have selective affinity for ganglionic nicotine receptors, its affinity constant for these receptors being more than three orders of magnitude greater than that of hexamethonium.

Surugatoxin derived from prosurugatoxin was isolated from culture medium of Coryneform bacterium which was isolated from digestive gland of toxic ivory shell, indicating that the origin of the toxins were bacterium.

Keywords—surugatoxin; neosurugatoxin; prosurugatoxin; Japanese ivory shell; *Babylonia japonica*; ganglion blocking agent; marine bacteria; origin of toxins; food poisoning

人類は今後、海洋とより密接な関係を保っていく必要があり、そこに存在する生物の相互作用、特異物質の解明は重要な問題となりつつある。特に、海洋生物のもつ毒素は、食中毒の原因となるものがあり、その化学的解明は食糧問題上からも重要であるが、海洋生物毒は、陸棲生物には見られない特異な化学構造、生物作用を示すものが多く、医学的、薬学的にも興味もたれる。

本研究の発端となった食用バイ *Babylonia japonica* による食中毒は、1965 年静岡県富士市で発生した。当時の薬学における天然物研究の中心は、陸棲の植物成分であったが、毒化バイを研究対象とすることにより、新分野である海洋天然物研究への足掛かりが得られることを期待して、この研究に着手した。今、振り返って見ると、我々が研究を開始した当時は、フグ毒テトロドキシンの合成研究、麻痺性貝毒サキントキシンの構造研究、海洋腔腸動物からプロスタグランジンの分離研究などが進行中であり、まさに海洋天然物研究の幕明けの時代であった。

1. バイによる食中毒

バイはエゾバイ科に属する肉食性巻貝で、沿岸の砂泥底に棲息し、広く食用に供されているが、これまでに 3 例の毒化が報告されている。その最初のもは、1957 年、6—7 月、新潟県三島郡寺泊町、信濃川分水河口で漁獲されたバイによるもので、5 名が食中毒にかかり、そのうち 3 名が死亡した。その中毒症状は、喫食後 10—22 時間後に現れ、初期症状としては激しい腹痛、嘔吐、下痢が認められ、更に進むと四肢の痙攣、意識混濁、顎関緊急、チアノーゼを起し死に至ると記録されている。¹⁾

次の食中毒例が、我々の研究対象となったものであるが、1965 年 9 月、静岡県富士市で 26 名の食中毒患者を

本総説は、名城大学薬学部 井上昭二教授と連名で受賞した昭和 62 年度日本薬学会学術賞の受賞業績を中心に記述したものである。

Fig. 1. Japanese Ivory Shell (*Babylonia japonica*)

Fig. 2. Location of Ganyudo Area

Fig. 3. Map Showing Sampling Places

だった。この中毒を起こしたバイは、沼津市我入道海域で漁獲されたものであった。中毒症状は喫食後 3—18 時間後に現れ、視力減退、瞳孔散大、口渇、腹部膨満、便秘、血圧降下等が観察されており、寺泊産バイ中毒とは異なった症状を呈した。

静岡県は、1965 年 10 月、我入道バイの採取禁止の行政処置をとったが、1967 年 8 月、他地区の漁船がバイを違反採取し、新たに 9 名の食中毒者をだしている。更に、1971 年 8 月、我入道海域に隣接する島郷海域で採取されたバイによる食中毒が発生した。静岡県衛生部は、1967 年、我入道に隣接する海域の調査を行っているが、²⁾ そのときの島郷海域バイの毒性は、我入道産バイが 2 000 MU の強い毒性を示したのに対し、30—60 MU 程度の弱い毒性を示したにすぎなかった。しかし、中毒発生時のものは 2500 MU 以上の強い毒性を有していた。

バイの毒化が認められた最後の例は、1980年、福井県坂尻産のもので、この毒素については、テトロドトキシンであることがつきとめられた。^{3,4)}

2. 我入道産毒化バイより毒素の分離

魚介類を広く利用してきた我が国では、有毒海産生物に対する関心が深く、これまでに、活発な研究が行われてきた。しかしながら、突発的に毒化を起こした魚介類は、短期間のうちに個体が無毒化してしまったり、大量の研究材料の入手が困難などの理由から、原因毒素が未解決のままのことが多い。寺泊バイ食中毒の原因毒素については、バイの毒性が急激に消失してしまい、不明のままである。

我入道バイの毒性も1969—1971年をピークに急激に減少し、しかも中毒発生当時は、異常発生とも思えるほど大量のバイが棲息し、採取も容易であったが、毒性が低下するにつれ少なくなり、現在ではバイ一匹を採集するのも容易でない。

毒素分離に用いたバイは、1970—1971年、毒活性がもっとも高かった項、大量に採取し、 -20°C で凍結保存しておいたものを使用した。

目的の毒素を単離するためには、分離の指標となる毒素検定法が必要である。フグ毒、麻痺性貝毒のように、マウスが死亡するほど強い毒性があれば、それを分離の指標として使えるが、我入道バイの場合は、内臓5g相当の抽出物を投与しても、マウスは少し元気がなくなる程度で、すみやかに回復してしまう。しかし、橋本らは、⁵⁾内臓2g相当の抽出物をネコに経口投与したところ、ネコが異常を訴え、よく観察したところ、瞳孔は散大し、外斜視状態となり、その症状は、我入道バイ食中毒の症状とよく一致するものであった。

ネコに観察された瞳孔散大作用は、マウスにも認められ、橋本らによってマウスの散瞳率を調べる検定法が確立されたので、我々もこれを分離の指標として用いることとした。また、分離に先立ち、毒素の安定性を検討したところ、アルカリには極めて不安定であり、熱に対してもかなり不安定であることが認められたので、分離は中性又は弱酸性条件で低温で行った。

毒素はバイの中腸腺に局在していたので、毒化バイ20kgより中腸腺1.9kgを取り出し、1%酢酸で抽出し、アセトンで除蛋白、エーテルで脱脂後、Sephadex G-25で先ず分離した。そのクロマトグラムと瞳孔散大活性をFig. 4に示したが、毒素はSephadex G-25にかなり強く吸着され、活性は大量の不活性物質が溶出した後の黄色の分画No. 60—90に認められた。この活性分画は、中腸腺1.9kgから約3.7g得られ、その20 μg をマウスに投与(i.p.)すると瞳孔は完全に散大した。

目的物質の分離過程において、同一分離手段を2度つづけて繰り返すことは、分離剤の能力からいって、あまり効果が期待できず、分配、吸着、解離、分子の大きさ等、化合物のもつ化学的、物理的特性の違いに着目した分離方法を交互に使用することにより、良い結果が得られる場合が多い。そこで、次に、Sephadex G-25で得られた活性分画をCM-Sephadex C-25で分離した。そのクロマトグラムをFig. 5に示したが、活性はNo. 40—90の分画(active fract. I) 2.2g及びNo. 100—150の分画(active fract. II) 1.3gに認められ、2種の毒素の存在が示唆された。これらの分画の活性はほぼ等しく、10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で100%以上の散瞳活性を示した。

Fig. 4. Gel Filtration of 1% AcOH Extract on Sephadex G-25

Fig. 5. CM-Sephadex C-25 Chromatograph of Active Fractions Obtained from Sephadex G-25

これらのうち、先に溶出してきた active fract. I からは, Sephadex G-15 で更に精製し, 有毒バイの棲息する駿河湾にちなみ, スルガトキシン (SGTX) と命名した化合物を単離した.⁶⁾

また, 後から溶出してきた active fract. II からは, Bio-Gel P-2, CM-Sephadex, Sephadex G-15, 更には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製を繰り返し, ネオスルガトキシン (Neo-SGTX) を単離した.^{7,8)}

SGTX 分離を行った 1970 年当時は HPLC もほとんど普及しておらず, 微量でしかも不安定な水溶性成分の分離研究は困難を極めたが, Neo-SGTX を分離した 1980 年には HPLC も普及し, その間 10 年の分離技術の進歩は目覚ましいものがある.

バイ毒素は後述するように, 神経節のニコチン性受容体のみ特異的に作用する. 生理現象を特異的に阻害する薬物は, その生理現象自体の解明に有力な手段となるものであり, 多くの研究者からサンプルの提供を求められた. そこで, 大量の毒素分離を目的として, CM-Sephadex で得られる active fract. I を HPLC で検討したところ, スルガトキシンのピークには活性が認められず, Neo-SGTX と異なる全く別のピークに活性が認められた.

そこで, active fract. I を再度 Bio-Gel P-2 で精製し, 逆相 HPLC で Neo-SGTX より後に溶出してくる新毒素を分離した. この新毒素は酢酸水溶液で放置すると SGTX を生成することからプロスルガトキシン (Pro-SGTX) と命名した.⁹⁾ 我々は先に, SGTX を毒の本体と見誤ったが, 以前に分離した SGTX を HPLC で精製したところ, このものには約 0.5% 程度の Pro-SGTX が混在していることが認められた.

3. スルガトキシンの化学構造⁹⁾

Sephadex G-15 精製で得られた活性分画は, 淡黄色粉末であったが, 薄層クロマトグラフィー, 電気泳動, ペーパークロマトグラフィー上単一スポットを与え, 当時の純度確認方法では, ほぼ単一物質と考えられた. 物質が単一であることを完全に証明することは, 各種分析機器が発達した今日においても容易なことではないが, 結晶になるということは純粋に単離されたことの 1 つの証拠ともなるものであり, また, 微量で全く新しいタイプの化合物の構造決定は, X 線結晶解析にたよるしかなく, 毒素の結晶化を試みた.

しかしながら, 種々試みた方法はいずれも不成功に終り, やむなく酸, アルカリによる分解を行い構造推定を試みた.

活性分画を 1 N HCl, 2 N アンモニアで封管中 100°C に加熱分解し, 分解物をトリメチルシリル (TMS) 化後, ガスクロマトグラフィー (GC) で分析した結果, *myo*-inositol が生成することが認められた. また, 2 N NaOH で封管中 100°C, 10 時間加熱分解後, TMS 化し, GC で分析の結果 lumazine (2,4-dioxypteridine) が認められた. またマススペクトル (MS) より臭素を含むことも判明したが, これらの構成フラグメントからだけでは, 構造を推定することは到底困難であった.

そこで, 一度はあきらめかけた結晶化を再び試み, 数ヶ月後, ついに結晶化に成功した. X 線結晶解析は, 京大・真崎規夫助教授の全面的指導のもとに行われ, SGTX の構造を Fig. 6 のように決定した. SGTX は分離の過程では, 水に極めて易溶であり, 結晶化させることは大変困難であったが, 一旦, 結晶として析出したものは, 水にほとんど不溶となってしまう. この原因は, X 線結晶解析の結果, 7 分子の結晶水がインドール環, イノシトール, プテリジン環及び臭素原子で囲まれた直径約 6 Å の空洞につまっており (Fig. 7), これ

Fig. 6. Surugatoxin

Fig. 7. The Molecule of Surugatoxin Heptahydrate Viewed Along the C Axis

ら結晶水は **SGTX** の極性部分のすべてと水素結合のフレームワークを作り、頑固な結晶構造を形成し、分子全体の極性を消失してしまったためと考えられた。**SGTX** の結晶を減圧下、乾燥すると、3 分子の結晶水が脱離し、結晶は白色の粉末となる。

4. ネオスルガトキシンの化学構造⁷⁾

HPLC で精製された **Neo-SGTX** も白色粉末であったため、結晶化を検討した。しかし、このものは不安定な化合物で、低温下、水溶液で 2 日間も放置すると黄色に着色し、HPLC 上、多数の分解物ピークが認められるようになり、スルガトキシンの場合と同様、結晶化はあきらめざるを得なかった。

そこで、各種スペクトルを測定し、構造解析を試みた。紫外吸収 (UV) スペクトルは **SGTX** より長波長に吸収が認められた (Fig. 8)。プロトン核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$) スペクトルからは、**Neo-SGTX** もオキシインドール、ミオイノシトールを持っていることが示唆された。又、当時、不揮発性化合物に威力を発揮していた field desorption-mass spectrum (FD-MS) を測定したが、成功しなかった。後に分かったことであるが、secondary ion mass spectrometry (SIMS) では分子イオンピークが検出された。しかし、肝心の部分については解析することはできなかった。毒素が大量にあれば、各種分解反応を行い、分解生成物より構造を推定するという手段も可能であろうが、分離された **Neo-SGTX** は微量であり、しかも、この研究が進行していた当時はすでに我入道パイは無毒化してしまったと報告されており、新たな原料の入手は不可能という状況を考え断念した。次に $^{13}\text{C-NMR}$ の測定を計画したが、手持ちの試料では少量であったので、再度、分離を行い約 12 mg の毒素を分離した。測定のため重水に溶解しようとしたところ、元来、水には易溶のはずの毒素がまったく不溶となっていた。この不溶物を偏光顕微鏡で観察したところ、キラキラと光る細かい結晶であった。この結晶は、**SGTX** と同様、水には不溶であったが、dimethyl sulfoxide には溶解したので、HPLC で検討したところ、もとの毒素と同じリテンションタイムで、しかも、同じ強さの活性を示したことから、毒素本体の結晶であることが確認された。**Neo-SGTX** の化学構造も X 線結晶解析により決定された (Fig. 9)。A 環の $\text{N}_{(5)}$ 、 $\text{N}_{(4)}$ は等方性温度因子により窒素原子であることが指示され、また差フーリエ法による電子密度図においても、各々に結合する水素原子を検出した。一方、B 環の $\text{N}_{(2)}-\text{C}_{(10)}$ はその距離 $1.27\text{\AA}$ より二重結合と判定した。 $\text{N}_{(2)}$ に結合すべき水素原子を検出できなかったことから、 $\text{N}_{(2)}$ が窒素原子であることは確実である。次に、 $\text{C}_{(14)}$ 、 $\text{C}_{(18)}$ が sp^2 、 sp^3 のいずれかであるが、結合距離 $\text{N}_{(5)}-\text{C}_{(14)}$ 、 $1.40\text{\AA}$ 、 $\text{C}_{(14)}-\text{C}_{(13)}$ 、 $1.40\text{\AA}$ 、 $\text{C}_{(13)}-\text{C}_{(18)}$ 、 $1.45\text{\AA}$ を根拠に $\text{C}_{(14)}-\text{C}_{(18)}$ を二重結合とするには無理がある。しかしながら、 $\text{C}_{(14)}$ 、 $\text{C}_{(18)}$ に結合すべき各々の水素原子が電子密度図上に検出されなかったこと、及び $\text{C}_{(14)}$ 、

Fig. 8. UV Spectra of Neosurugatoxin (—) and Surugatoxin (---) in H_2O

Fig. 9. Molecular Structure of Neosurugatoxin

$C_{(13)}$ を中心とする原子の構成する平面の平面性が良好であること、特に、A環平面よりの $C_{(14)}-N_{(8)}$ 及び $C_{(13)}-N_{(2)}$ の内部回転角が各々 3° 、 8° と小さいこと等から $C_{(14)}$ 、 $C_{(13)}$ は sp^2 と判定、 $C_{(14)}-C_{(13)}$ を二重結合とした。尚、 $N_{(8)}$ は、これに結合する水素原子を検出している。また、Neo-SGTXの結晶構造は9ケの分子との分子間水素結合及び1分子の結晶水との水素結合が観察された。絶対配位は、 $CuK\alpha$ 線に対するBr原子の異常分散により決定した。

5. プロスルガトキシンの化学構造⁹⁾

Pro-SGTXはNeo-SGTXより更に不安定な化合物であり、結晶化はついに成功しなかった。その化学構造は、既にX線結晶解析により構造が決定されていたSGTX及びNeo-SGTXとの各種データの比較により推定した。

すなわち、Pro-SGTXよりSGTXが生成すること (Fig. 10), 更にPro-SGTXのSIMSに認められる m/z 652及び654の等しい強度の分子イオンピークの存在から (Fig. 11), Pro-SGTXはその分子内に1つの臭素原子を含有している。また、SGTXの分子量がPro-SGTXより32大きいことは、SGTXはPro-SGTXの酸化によって生成したことが考えられる。Pro-SGTXのUVスペクトルは、Neo-SGTXとほぼ同一の吸収スペクトルを示すが、SGTXとは明らかに異なっていた。Neo-SGTX及びPro-SGTXとSGTXの大きな相違点は、Neo及びPro-SGTXがマウス瞳孔散大という生物活性を有するのに対し、SGTXはまったく活性を示さないことである。SGTXとNeo-SGTXの構造について比較すると、SGTXは6-6-6 heterocyclic systemを持つのに対し、活性を有するNeo-SGTXは、6-7-5 heterocyclic systemを持っている。このことは、6-7-5 heterocyclic systemの構造が、活性発現に重要であることを示している。Pro-SGTXがNeo-SGTXと同一の生物活性を示すことは、Pro-SGTXの基本骨格がNeo-SGTXと同じであることを、生物学的に支持するものである。以上の結果、及びPro-SGTXの

Fig. 10. HPLC of the Degradation Products Formed from Prosurugatoxin

Column, YMC-Pack A-324 (ODS) 10×300 mm; mobile phase, $CH_3CN-H_2O=12.5-87.5$; flow rate, 3 ml/min; detector, UV (280 nm).

Fig. 11. SIMS of Prosurugatoxin

Fig. 12. ^1H -NMR Spectrum of Prosurugatoxin in D_2O

Fig. 13. Contour Plot of the COSY Map of Prosurugatoxin

^1H -NMR (Fig. 12, 13) では Neo-SGTX に認められる xylopyranose のシグナルが認められないこと、また Pro-SGTX の分子量は Neo-SGTX より 132 少ないことから、Pro-SGTX を des-xylopyranosyl-neosurugatoxin (Fig. 14) と推定した。この推定構造は名城大学薬学部・井上昭二教授らの合成によって支持された。¹⁰⁾

6. バイ毒素の薬理作用

バイ毒素のマウス瞳孔散大活性を Fig. 15 に示し

Fig. 14. Prosurugatoxin

Fig. 15. Mydriatic Effects of Neosurugatoxin (●—●), Prosurugatoxin (▲—▲) and Synthesized Prosurugatoxin (Racemic Body) (■—■)

Fig. 16. Inhibitory Effects of Neosurugatoxin (●—●), Prosurugatoxin (▲—▲) and Synthesized Prosurugatoxin (Racemic Body) (■—■)

たが, Neo-SGTX では $0.2\text{--}0.3\text{ }\mu\text{g/mouse}$ で完全にマウス瞳孔を散大させる. この強さは, アトロピンの約 10 倍である.⁹⁾

バイ毒素の生物学的性状については, 実験動物を用いて薬理的¹¹⁻¹⁶⁾ 電気生理学的^{17,18)} 及び神経化学的手法¹⁹⁾ により検討された. 先ず, 麻酔ネコにおいて, 毒素の静脈内投与により血圧の持続的な下降が認められた. また, 上頸交感神経及び大内臓神経の節前神経電気刺激による瞬膜収縮並びに心血管反応 (昇圧反応, 肝臓と脾臓血流量の変動) は, 毒素の投与により著しく抑制されたのに対し, 節後神経電気刺激によるこれらの反応はほとんど影響されなかった. したがって, バイ毒素は自律神経節遮断作用を示すことが明らかとなった.

次いで, 摘出臓器 (モルモットの小腸, 心臓及び輸精管, ウシの副腎髄質並びにラットの上頸交感神経節) を用いた実験から, 本毒素は自律神経節のシナプス部におけるニコチン性アセチルコリン受容体を選択的に結合することが判明し, 神経節伝達を遮断することが示唆された. 同様な推察は, ラット上頸交感神経節での活動電位に対する作用を調べた電気生理学的実験,^{17,18)} 並びにホスファチジルイノシトール代謝に対する作用を調べた神経化学的実験¹⁹⁾ から得られた. Fig. 16 にモルモット摘出回腸に対する抗ニコチン活性を示したが, 10 nM の Neo-SGTX は 10^{-5} M ニコチンによる腸管収縮を完全に抑制した. この活性の強さは, 現在使用されている神経節遮断薬であるヘキサメトニウム, メカミラミンの 2000—7000 倍のものである. Neo-SGTX はアセチルコリンによる腸管収縮には全く影響を及ぼさず, このことは腸管平滑筋のムスカリン性アセチルコリン受容体への直接作用でないことを示している.

最近, $[^3\text{H}]$ ニコチンを標識リガンドとする受容体結合測定法を用いて, 中枢神経系のニコチン性受容体が直接定量分析され, 同受容体に対する Neo-SGTX の作用が検討された.²⁰⁻²²⁾ その結果, Neo-SGTX は極めて低濃度で, ラット脳膜標品への $[^3\text{H}]$ ニコチン結合能を抑制し, その阻害作用は非競合的かつ持続的であった. 一方, 本毒素は脳のムスカリン性アセチルコリン受容体への $[^3\text{H}]$ キヌクリジニルベンジレート結合にはほとんど影響しなかった. また, Rapier らは,²²⁾ $[^3\text{H}]$ ドーパミンを負荷したラット線状体神経終末分画 (シナプトゾーム) を用いて 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium による $[^3\text{H}]$ ドーパミン放出が低濃度の Neo-SGTX により著しく抑制されることを, また我々は²³⁾ ニコチンによるマウスの抗侵害効果が Neo-SGTX 投与により減弱することを見出した. これらの実験結果から, Neo-SGTX は中枢神経機能と密接に関連した脳内ニコチン性受容体を選択的に遮断すると考えられる.

バイ毒素の化学構造と活性部位については興味あるところであるが, Pro-SGTX の瞳孔散大活性及び抗ニコチン活性は Neo-SGTX の約 $1/5$ である. また, 井上教授らによって合成されたバイ毒素 aglycon 部, desbromo aglycon 部についてモルモット摘出回腸, ラット脳膜標品における抗ニコチン作用を比較したところ, ニコチン性受容体への高い親和力発現には臭素原子が大きく関与していることが認められた.²⁴⁾

TABLE I. Toxicities of Ivory Shell Specimens from Ganyudo Area

Date	Number of specimens	Total weight (g)	Weight of mid-gut gland (g)	Toxicity (MU/g)
1984. 6	3	220	25	200
1984. 7	37	2800	345	100
1984. 9	8	555	50	500

以上述べたように、バイ毒素は中枢神経と末梢神経におけるニコチン性受容体に結合することによりコリン作働性神経伝達を遮断すると考えられ、バイによる食中毒の臨床症状の多くは、このコリン作働性神経機能障害に起因するものである。

ところで、ニコチン性受容体による神経刺激伝達機構に関しては、未だ不明な点が多いことから、バイ毒素を用いての神経系、特に脳内ニコチン性受容体特性の究明は、コリン作働性神経機能障害を特徴とする中枢神経疾患の病態生理の解析、並びに有効な治療薬開発への重要な手掛りを提供すると考えられ、今後の一層の研究が期待されるところである。

7. バイの毒化原因²⁶⁾

先にも述べたとおり、我入道バイの毒性は 1969—1971 年にかけてピークに達し、その後は急激に減少し、1978 年には 20 MU 以下となったため、その後の調査は打ち切られた。²⁶⁾ しかし、我々が 1980 年、研究を再開した当時の調査では、弱いながら依然毒活性が認められた。Table I に 1984 年の調査結果を示したが、この毒素も Neo-SGTX 及び Pro-SGTX であることを確認している。²⁷⁾

毒化を起こしたバイは、我入道及びその近辺の限定された海域にのみ棲息し、年間を通じて毒性が認められたが、特に 7—10 月にかけて毒性が強くなるという季節変化が認められている。²⁸⁾ また、他の海域で採取した無毒のバイを標識し、我入道海域に放流すると、約 50 日で毒化し、我入道毒化バイを人工飼育すれば、約 1 ヶ月で無毒化することを考えると、²⁾ バイの毒化原因が我入道の環境に存在することは明らかである。

我々は、バイの毒化原因の手掛りを得るために、まず、我入道産毒化バイと市販無毒バイについて、成分的な検討を行った。すなわち、毒化バイと無毒バイの中腸腺各々 200 g を 1% 酢酸抽出後、除蛋白、脱脂を行い、Sephadex G-25 で分離した。そのクロマトグラムを Fig. 17 に示したが、両者を比較すると、毒化バイにおいて毒素が溶出してくる分画 (No. 60—90) は黄色であるのに対し、無毒バイのものでは、ほとんど無色であり、また UV 吸収も弱い。勿論、無毒バイからのいずれの分画にも瞳孔散大、抗ニコチン活性は認められなかった。

バイ毒素はその分子中に臭素原子を含有しているが、これは海洋生物成分に特有なものであり、毒化原因解明の 1 つの手掛りになりうると考えられる。そこで次に、バイ成分中の臭素原子に着目し、毒化バイ及び無毒バイ中の臭素の定量を行った。すなわち、毒化バイ及び無毒バイの Sephadex G-25 カラ

Fig. 17. Sephadex G-25 Chromatography of Toxic Ivory Shell from Ganyudo Area (—) and Non-toxic Ivory Shell (---)

TABLE II. Stability of Prosurugatoxin (Recovery %)

	0°C		40°C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
H ₂ O	96.3	93.5	80.4	60.0
0.01 N HCl	83.6	72.2	57.3	42.8
0.1% AcOH	88.8	74.8	80.0	61.0
5.0% AcOH	81.5	64.7	24.4	—

Prosugatoxin (50 µg) was dissolved in 0.5 ml of medium. Remaining prosugatoxin was determined by HPLC.

gram-positive
 shape of cells vary from coccoids to rods depending on growth phase
 non-motile, non-flagellated
 no endospore formation
 non-acid fast
 grow well aerobically and not grow anaerobically
 catalase positive
 oxidase positive (trace)
 acid is not produced from glucose
 nitrate is not reduced
 non-hemolytic (horse blood)
 pale yellow pigment produced
 citric acid utilization: negative (no growth)
 esculin hydrolysis: negative (no hydrolysis)
 acetoin production: negative
 lysostaphin resistance: grow in the presence of 200 $\mu\text{g/ml}$ lysostaphin
 lysozyme resistance: grow in the presence of 100 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme
 casein hydrolysis: positive
 arginine dihydrolase: negative

Fig. 18. Morphological and Physiological Characteristics of AalxII Strain

ムで得た各分画について、酸素フラスコ燃焼法により試料中の有機臭素化合物を無機臭素とし、電位差滴定及び比色定量した。その結果、毒化バイのものには高い臭素含量が検出されたのに対し、無毒バイからのものには、臭素は検出限界以下であった。このことは、臭素化合物は毒化バイに特有なものであり、我入道海域に棲息する生物中の臭素化合物の調査等、臭素に着目して研究を進めれば、毒化原因の解明につながることを示唆している。

それまで知られていた魚介類の毒化は、プランクトンが関与したいわゆる食物連鎖で説明されていたが、中毒発生当時、我入道海域に特殊なプランクトンが大量発生したという事実はなく、²⁸⁾ しかもバイは肉食性であることを考えると、プランクトン起源は可能性は低いと考えた。

我入道は伊豆半島を縦走し流れている狩野川の河口に位置し、栄養豊富な上にバイの毒性が高くなる 7—9 月には海水の温度は 30°C 近くにも達し、微生物の繁殖には適した条件が揃っていることから、バイの毒化原因として海洋細菌を想定し、研究を進めた。

細菌の分離に用いたバイ、泥は 1981 年 9 月我入道で採集したものを用いたが、このバイは 500 MU の毒性を有していた。バイは生きたまま研究室に持ち帰り、外部を滅菌海水で洗浄後、内容物を取り出し、細菌の分離を行った。その結果、117 種の細菌を選別したが、これらすべてについて培養条件を検討し、大量培養を行いバイ毒素の産生を調べることは事実上無理であるので、先に述べた毒化バイには臭素化合物が特異的に含まれる、という実験結果をもとに、この 117 種の細菌につき臭素濃縮能を検討した。その結果、13 種の臭素濃縮能を有すると思われる細菌を選別したが、これらのうち、特に臭素濃縮能の高かった 5 種につき、先ず大量培養を行い、バイ毒素の産生を検討した。

5 種の細菌の培養液を凍結乾燥後、Sephadex G-25、更に HPLC で二度精製し、バイ毒素と同一の分画を集め、マウス瞳孔散大活性及びモルモット回腸に対する抗ニコチン活性を検討した結果、バイ中腸腺より分離した一種の細菌 (AalxII) からのものに活性が認められた。しかしながら、AalxII 菌が産生する活性物質は、その活性の強さから逆算すると、25 ng/l 程度しか産生されておらず、化学的な同定に必要な量を得るためには 4000—5000 l の培養が必要となる。更に、毒素が不安定な化合物 (Table II) であることを考えると、それ以上の培養が必要となり、毒素の単離は不可能である。

我々はバイ毒素の分離研究において、Pro-SGTX が分解して比較的安定な化合物 SGTX に変換することを知っていたので、AalxII 菌が Pro-SGTX を産生しておれば、培養液には SGTX が蓄積しているのではないかと考え、分離を行った。その結果、AalxII 菌培養液 3 l から約 0.6 mg の結晶を単離し、このものの各種スペクトルデータは完全に SGTX と一致した。このことは、AalxII 菌が産生したバイ毒素と同じ生物活性を示したものが、Pro-SGTX であることを証明したものである。²⁵⁾ AalxII 菌は gram-positiv, catalase positive の好気性、通性好

塩菌である。AalxII 菌の性状を Fig. 18 に示した。

以上、我入道バイの食中毒原因毒素及び毒化原因として海洋細菌をつきとめることができたが、このことは、魚介類の毒化に細菌が関与することもあることを初めて示したものである。しかし、細菌の産生した毒素をバイがどのような方法で蓄積したのか、また、我入道海域のバイだけがなぜ毒化を起こしたのか等、解決しなければならない問題が残されている。

謝辞 本研究の遂行にあたり、終始御指導、御協力を下さいました岡本敏彦 東京大学名誉教授、林 栄一 静岡女子短期大学学長、東京大学 首藤紘一教授、飯高洋一教授、名城大学 井上昭二教授、岡田邦輔助教授、京都大学 真崎規夫助教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究に御協力いただいた引用文献に共著となられている諸氏に心からの感謝を申し上げます。更に、研究費の一部は、文部省科学研究費並びに三島海雲記念財団学術奨励金によった。

引 用 文 献

- 1) 町田正平, 食衛誌, **6**, 87 (1965).
- 2) 木村庄治, 杉山 茂, 成田弘子, 静岡県衛生研究所年報, **16**, 163 (1972).
- 3) T. Noguchi, J. Maruyama, Y. Ueda, K. Hashimoto, T. Harada, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**, 909 (1981).
- 4) T. Yasumoto, Y. Oshima, M. Hosaka, S. Miyakoshi, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**, 929 (1981).
- 5) Y. Hashimoto, K. Miyazawa, H. Kamiya, M. Shibota, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **33**, 661 (1967).
- 6) T. Kosuge, H. Zenda, A. Ochiai, N. Masaki, M. Noguchi, S. Kimura, H. Narita, *Tetrahedron Lett.*, **1972**, 2545.
- 7) T. Kosuge, K. Tsuji, K. Hirai, K. Yamaguchi, T. Okamoto, Y. Iitaka, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 3417.
- 8) T. Kosuge, K. Tsuji, K. Hirai, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3255 (1982).
- 9) T. Kosuge, K. Tsuji, K. Hirai, T. Fukuyama, H. Nukaya, H. Ishida, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2890 (1985).
- 10) 井上昭二, 岡田邦輔, 谷野秀雄, 橋爪清松, 田 久江, 第 27 回天然有機化合物討論会, 要旨集, 1985, p. 259.
- 11) H. Hirayama, K. Gohgi, N. Urakawa, M. Ikeda, *Jpn. J. Pharmacol.*, **20**, 311 (1970).
- 12) 林 栄一, 山田静雄 医学のあゆみ, **89**, 848 (1974).
- 13) E. Hayashi, S. Yamada, *Brit. J. Pharmacol.*, **53**, 207 (1975).
- 14) 林 栄一, 小田静雄, 加藤正秀, 日薬理, **73**, 657 (1977).
- 15) S. Yamada, E. Hayashi, *Jpn. J. Pharmacol.*, **29**, 295 (1979).
- 16) J. E. Bourke, P. D. Marley, B. G. Livett, *J. Neurochem.*, in press.
- 17) D. A. Brown, J. Garthwaite, E. Hayashi, S. Yamada, *Br. J. Pharmacol.*, **58**, 157 (1976).
- 18) P. Ascher, W. A. Large, H. P. Rang, *J. Physiol.*, **295**, 139 (1979).
- 19) M. R. Pickard, J. N. Hawthorne, E. Hayashi, S. Yamada, *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 448 (1977).
- 20) E. Hayashi, M. Isogai, Y. Kagawa, N. Takayanagi, S. Yamada, *J. Neurochem.*, **42**, 1491 (1984).
- 21) S. Yamada, M. Isogai, Y. Kagawa, N. Takayanagi, E. Hayashi, K. Tsuji, T. Kosuge, *Mol. Pharmacol.*, **28**, 120 (1985).
- 22) C. Rapier, R. Harrison, G. G. Lunt, S. Wonnacott, *Neurochem. Int.*, **7**, 389 (1985).
- 23) S. Yamada, Y. Kagawa, N. Takayanagi, E. Hayashi, K. Tsuji, T. Kosuge, *Brain Res.*, **375**, 360 (1986).
- 24) S. Yamada, Y. Kagawa, E. Hayashi, K. Tsuji, T. Kosuge, K. Okada, S. Inoue, *Jpn. J. Pharmacol.*, **39**, 779 (1985).
- 25) T. Kosuge, K. Tsuji, K. Hirai, T. Fukuyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3059 (1985).
- 26) 成田弘子, 木村庄治, 静岡県衛生研究所報告, **18**, 69 (1975).
- 27) 辻 邦郎, 福山俊典, 平井孝一, 夏山龍煥, 小菅卓夫, 日水誌, **52**, 319 (1986).
- 28) 成田弘子, 木村庄治, 静岡県衛生研究所年報, **16**, 173 (1972).