

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月13日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07865

研究課題名(和文) ホタテガイ外套膜組織に含まれる毒物質の同定と作用機構

研究課題名(英文) Identification and its action mechanism of a novel toxin from scallop mantle tissue

研究代表者

長谷川 靖 (Hasegawa, Yasushi)

室蘭工業大学・工学研究科・教授

研究者番号：80261387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ホタテガイ、あさりなどの二枚貝類は麻痺性貝毒、下痢性貝毒をもつ渦鞭毛藻を食べることで中腸線に毒を蓄積する。貝毒は、我々の健康に危害を与えるだけでなく、水産業、食品加工業にも大きなダメージを与えてきた。貝毒発生状況は定期的に検査され、貝毒を持ったホタテガイの市場への流通は止められてきた。しかし我々は、市販されているホタテガイ外套膜を数%含む餌をラットに食餌させることで、食物摂取量の減少、血糖値の上昇がみられ死に至ることを明らかにし(図1)、その毒性がすでに知られている貝毒とは異なる未知毒物質によるものであることを示してきた (Hasegawa et al 2018)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麻痺性貝毒(ナトリウムチャンネル阻害物質)や下痢性貝毒(ホスファターゼ阻害物質)は摂取後すぐに下痢や痙攣などの症状が現れる急性毒性を示すのに対し、外套膜に含まれる毒物質は摂取し続けることで毒性が現れる亜急性毒性を示す。また、0.01%(餌に含まれる外套膜含量)という少量の外套膜組織(体重比で換算すると50kgのヒトで毎日約1gの摂取に相当)を含む餌でさえ数か月後にラットが死亡したことから(図2)、毒物質が体内に蓄積する可能性も否定できない。ホタテガイに含まれる未知の毒物質がヒトに対して毒性を示すかどうか明らかにするため、まず外套膜組織に含まれる毒物質の同定と作用メカニズムの解明が急務である。

研究成果の概要(英文)：Japanese scallops *Patinopecten yessoensis* are one of the main marine products of Hokkaido, Japan. In addition to adductor muscle, scallop mantle tissue is also eaten in Japan. We fed Wistar rats diets containing the scallop mantle epithelial cell layer for 8 weeks and compared the outcomes with a control group. No differences in general appearance or behavior were observed between the groups for the first 2 weeks. Thereafter, a significant decrease in food consumption was observed, and the treated rats died between 6 and 8 weeks. A diet containing a water extract from scallop mantle epithelial cells caused toxicity in mice, but a diet containing a methanol extract, which dissolves paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin, or an extract in heated 0.1 M HCl, which dissolves paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin, did not cause toxicity. These results suggest that a water-soluble component other than DSP or PSP toxin causes toxicity

研究分野：生化学

キーワード：ホタテガイ 外套膜 毒

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ホタテガイ、あさりなどの二枚貝類は麻痺性貝毒、下痢性貝毒をもつ渦鞭毛藻を食べることで中腸線に毒を蓄積する。貝毒は、我々の健康に危害を与えるだけではなく、水産業、食品加工業にも大きなダメージを与えてきた。貝毒発生状況は定期的に検査され、貝毒を持ったホタテガイの市場への流通は止められてきた。しかし我々は、市販されているホタテガイ外套膜を数%含む餌をラットに食餌させることで、食物摂取量の減少、血糖値の上昇がみられ死に至ることを明らかにしてきた(図1)。本申請研究では、外套膜に含まれる毒物質の性質について詳細に検討した。

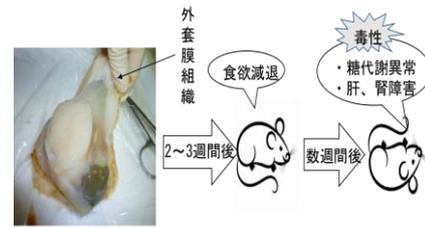


図1 外套膜の毒性

2. 研究の目的

以下のことを明らかにするため研究を実施した。

- ・毒物質の作用機構を明らかにする
- ・既存のマヒ性貝毒、下痢性貝毒とは異なる毒物質であることを明らかにする
- ・外套膜以外のホタテ組織の毒性を評価する
- ・毒物質の性状を明らかにする

3. 研究の方法

・ホタテガイ外套膜組織を含む餌を表1に示すように作製しマウスに毎日4gずつ与えた。水は自由摂取とし、毎日食べた餌の量を測定した。動物実験は、室蘭工業大学動物実験委員会での承認を得て実施した。

外套膜組織からの水抽出液、塩酸抽出液、メタノール抽出液は以下に記載するように調製し餌に混ぜて与えた。

各臓器は餌を食事させてから数週間後に屠殺後、すみやかに肝臓、腎臓、血清を採取し測定に使用した。

Table 1. Composition of control diet and mantle diet

	control diet (%)	mantle diet (%)
casein	20.06	20
corn starch	15.11	15
cellulose	5.02	5
mineral mixture	3.5	3.5
vitamine mixture	1	1
free base L-cysteine	0.3	0.3
choline bitartrate	0.2	0.2
soybean oil	5.01	5
lard	0	0
mantle epithelial cell layer	0	0.2
sucrose	50	50
Total	100.2	100.2

4. 研究成果

外套膜を含む餌を摂取させたマウスでは3週間後には餌摂取量の減少、体重の低下がみられた。さらに4週間後にはマウスの運動量は顕著に落ち、毛が逆立つなどの症状がみられ死亡した(図2)。マウスに餌を摂取させたのちマウスを屠殺し各臓器重量変化を測定したところ、外套膜組織を含む餌を食事させたマウスにおいて脂肪組織重量の有意な減少と腎臓組織における組織重量の増加(肥大化)を認めた(表2)。また、血中の生化学的なパラメーターについて評価したところ肝障害の指標であるグルタミルピルビン酸トランスフェラーゼ(GPT)および腎臓障害マーカーである尿素窒素の有意な増加を認めた。また、空腹時血糖値も2倍近くに増加していることを見出した。これらの結果は、外套膜組織を含む餌を食事したマウスでは、肝障害、腎障害がおこっていることを示している(表3)。

外套膜組織の摂取に伴う毒性の作用をさらに調べるため肝臓組織、腎臓組織において酸化障害が起きているかどうか検討を行った(図3)。酸化障害の指標である過酸化脂質量は肝臓、腎臓組織いずれにおいても増加していた。また各組織の組織切片を作製し組織学的評価を行ったところ腎臓組織においては腎尿細管の肥大化がみられ肝臓組織においては肝細胞の萎縮が検出された(図4)。これらの結果もまた、外套膜組織摂取によって肝臓、腎臓組織に障害が起きていることを示している。

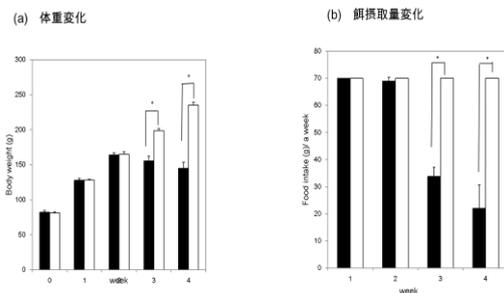


図2

Table 2. Tissue weights of rats fed control diets or mantle diet

	(g/weight 100g)	
	Control diet	mantle diet
inguinal adipose tissue	1.35±0.16	0.89±0.19*
retiopentoneum adipose tissue	1.54±0.33	0.44±0.25*
liver	4.22±0.24	3.67±0.54
kidney	0.72±0.05	1.03±0.10*
stomach	0.64±0.07	0.72±0.08
colon	0.48±0.06	0.49±0.04
cecum	0.41±0.09	0.49±0.08

Each value is mean ± SD for five rats. Asterisk is significantly different from those of rats fed with the control diet

腎臓組織においては腎尿細管の肥大化がみられ肝臓組織においては肝細胞の萎縮が検出された(図4)。これらの結果もまた、外套膜組織摂取によって肝臓、腎臓組織に障害が起きていることを示している。

Table 3. Serum biochemistry in rats fed control diets or mantle diets.

	control diet	mantle diet
triaclylglycerol (mg/dl)	59.3±9.3	62±16.0
total bile acid (mmol/l)	31.7±5.1	39.8±2.2*
total cholesterol (mg/dl)	27.1±4.4	36.5±4.3*
γGTP (IU/l)	7.4±1.0	9.8±1.2*
GOT (IU/l)	55.9±2.7	52.8±6.6
GPT (IU/l)	61.5±2.7	68.3±6.2*
urea nitrogen (mg/dl)	13.0±2.8	21.0±1.9*
creatinine (mg/dl)	1.5±0.09	1.7±0.11*
fasting blood sugar (mg/dl)	42.2±4.0	87.2±21.8*

Each value is mean ± SD for five rats. Asterisk is significantly different from those of rats fed with the control diet

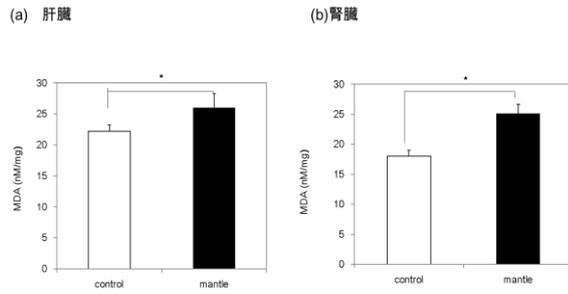


図3

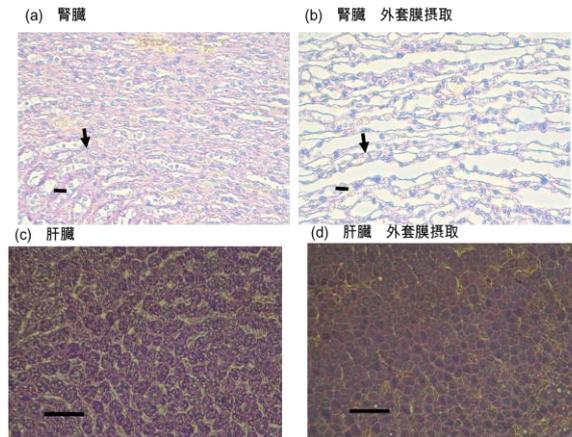


図4

外套膜組織を含む餌を食事したマウスでは血糖値が有意に高いことからグルコース負荷に伴う血中グルコース濃度変化、インスリン濃度、HOMA1R 値、そして肝臓中のグリコーゲン含量を評価した (図5)。外套膜を含む餌を食事したマウスではグルコース負荷後の定常レベルへの回復が遅いこと、血中インスリン濃度が低いことなどから外套膜を摂取したマウスでは糖代謝以上が起きていることが明らかになった。

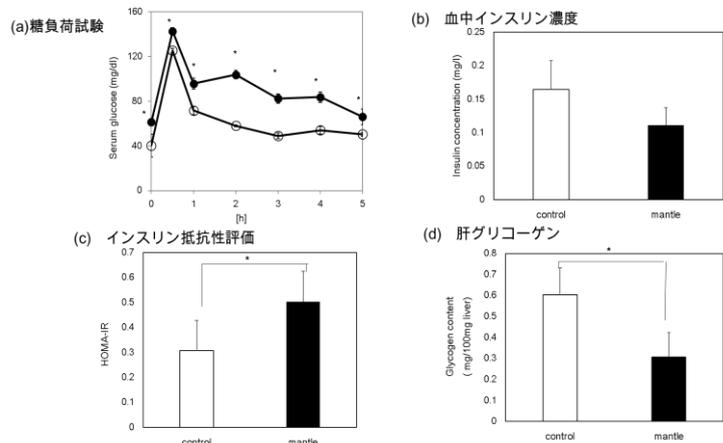


図5

外套膜に含まれる毒物質が既知のマヒ性貝毒、下痢性貝毒とは異なるものであることを明らかにするため外套膜組織から水抽出した抽出液、メタノール抽出した抽出液 (下痢性貝毒であるオカダ酸の抽出条件)、0.1M 塩酸の熱抽出 (マヒ性貝毒であるサキシトキシンの抽出条件) した試料を含む餌を作製しマウスに食事させた。メタノール抽出した試料、塩酸熱抽出した試料を含む餌では全く毒性がみられなかったものの水抽出のみに毒性が検出された (図6)。この結果は外套膜組織に含まれる毒物質が既知の毒物質ではなく新規なものであることを示している。さらに、水抽出した試料をタンパク質分解酵素であるプロナーゼで処理したところその毒性が低下した、この結果は毒物質がタンパク質成分であることを示している。

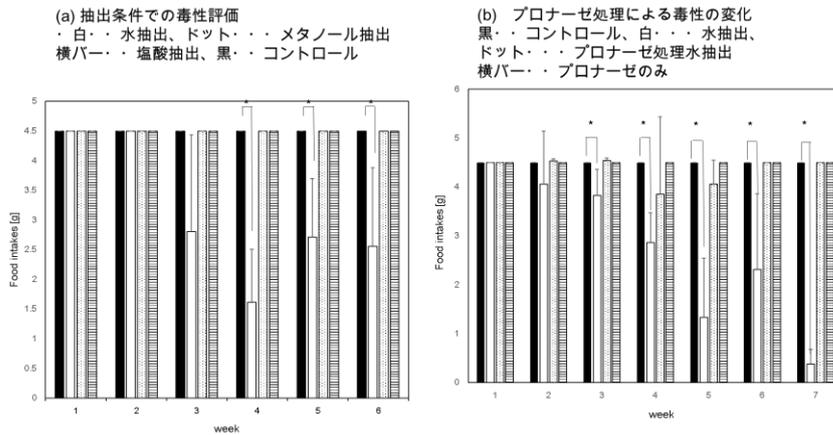


図6

ホタテガイ外套膜組織以外の組織においても毒性がみられるかどうか検討を行った。マヒ性貝毒、下痢性貝毒は中腸線に蓄積しその他の組織においてはほとんど毒物質は蓄積しない。精巣、卵巢、えら、貝柱それぞれを含む餌を調製しマウスに食事させたところ、えらおよび卵巢において毒性がみられ、精巣および貝柱には毒性がみられなかった（図7）。また、データには示さないが中腸線においても同様に毒性が検出されたもののその毒性は他の組織とほぼ同程度の毒性を示したことから今回見出した毒物質は既知のものと異なるものであることを示唆している。

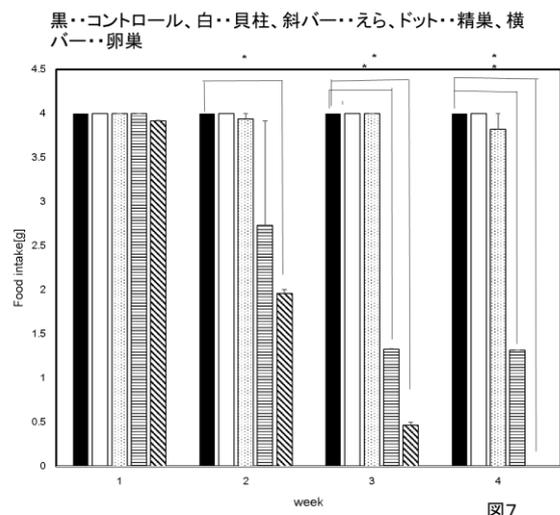


図7

次に、外套膜の摂取量と毒性の関係について評価を行った。外套膜組織を餌の0.2%、0.1%、0.05%、0.01%含む餌を作製しマウスに食事させた。0.05%含む餌を食事させたマウスでは毒性が検出されたものの、0.1%の外套膜を含む餌を食事したマウスでは6週間では毒性が検出されなかった。この結果は外套膜の摂取量がかなり低くても毒性がみられることを示している。

黒●●コントロール、白●●0.2%、斜めバー●●0.1%、ドット●●0.05%、横バー●●0.01%

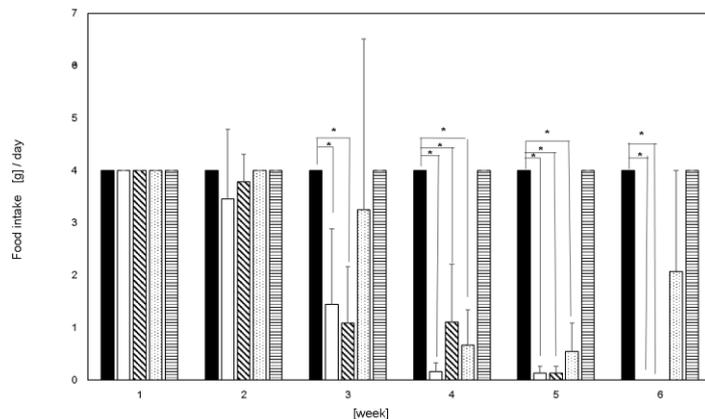


図8

以上の結果はホタテガイ外套膜組織には、現在までに報告されていない新規貝毒が含まれていることを示している。外套膜はひもとして燻製や刺身として広く食されており、今後毒物質の同定と作用機構の解明は食品の安全性を維持する観点から社会的、学術的意義も大きい。

今後は下記項目について明らかにして行く予定である

- ・ 毒物質の単離、構造決定、遺伝子クローニング
- ・ 毒物質の抗体作製と毒物質の発現組織、発現量
- ・ 毒物質の安定性
- ・ 作用機構の解明
- ・ 簡易な毒性評価法の確立

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2件）

- ・Yasushi Hasegawa, Daisuke Itagaki, Kiwako Konno, Chihiro Hasegawa
Feeding of scallop mantle epithelial cell layer causes subacute toxicity against rodents
Fisheries Science 2018, 84, 91-100
- ・Takahide Kariya, Koto Takahashi, Daisuke Itagaki, Yasushi Hasegawa
Scallop mantle extract inhibits insulin signaling in HepG2 cells
Food Science and Nutrition 2019 in press

〔学会発表〕（計 5件）

- ・松本宏太・板垣大介・今野貴和子・長谷川靖
ホタテガイ外套膜に含まれる新たな毒物質 食品衛生学会 2018
- ・刈屋賢英・高橋琴・板垣大助・今野喜和子・長谷川靖
ホタテガイ外套膜に含まれる毒物質Ⅱ 食品衛生学会 2018
- ・刈屋賢英・長谷川靖
ホタテガイ外套膜に含まれる毒物質Ⅱ 日本水産学会 2018
- ・松本宏太・板垣大介・今野喜和子・長谷川靖
ホタテガイ外套膜に含まれる毒物質Ⅰ 日本水産学会 2018
- ・中川絵里奈、長谷川靖
ホタテ貝外套膜組織中に存在する毒物質の探索 水産学会 北海道支部会 2018

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：劉云春
ローマ字氏名：Liu Yun Chun

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。