

ワラビ配糖体のモルモットに対する急性毒性

斎藤俊之*・石井和彦*・後藤判友*

昭和56年8月1日受付

Acute Toxicity of Bracken Fern Glucoside in Guinea Pigs

Toshiyuki SAITO*, Kazuhiko ISHII* and Hanyuu GOTO*

Bracken fern glucoside (BG), prepared from ethanol extracts of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) by partition column chromatography on Sephadex G-25, was found to have an acute toxicity in guinea pigs. Clinical symptoms, i.e., edematous and hemorrhagic changes in both the urinary bladder and the ligaments of the organ, were observed at a dose of 300, 600 and 750 mg/kg, respectively, by a single oral administration. Hematuria was also observed within 12 hours after oral administration at a dose of 600 or 750 mg/kg.

These results suggest that the active substance in BG, known to release histamine from the rat peritoneal mast cells, may well be identical with the active substance responsible for this acute toxicity in guinea pigs.

緒 言

ワラビ (*Pteridium aquilinum*) がウシの血尿症をひき起こし^{13,17,23,24}、またウシ、ヒツジなどの家畜や種々の実験小動物に発ガン性のあることが多くの研究者によって確認されている^{2,3,8,15,16}。しかし、ワラビに含まれる有毒物質については、活性の判定に大量の試料と長期の実験期間を必要とするなどの実験上の制約が大きいため、いまだその本態は明らかにされていない。近年、モルモットに対するワラビの急性毒性について報告がなされ^{9,21}、その後、急性毒性としての膀胱の浮腫・出血性変化を活性指標として、有毒物質の化学的性状について検討されている^{11,12}。また、牛鳥らはモルモットに対するワラビの毒性は、長期慢性毒性としては発ガン性、亜急性毒性としては汎骨髄傍原性、急性毒性としては膀胱出血性であると報告している²²。

一方著者らは、ワラビにヒスタミン遊離活性物質が含

まれていることを見だし^{4,18}、以来、この活性物質の分離精製を試みてきた。これまでの成績から、活性物質の化学的性状はこれまでに報告されている有毒物質の化学的性状に類似しており、また、分配クロマトグラフィーによる検討で、活性物質はワラビに含まれる5~6種の配糖体のうちの2種の配糖体であることが示唆された^{5,6,19,20}。

本報では、著者らの追求しているヒスタミン遊離活性物質が出血毒因子と同一のものであるか否かを知る目的で、モルモットにワラビ配糖体 (BG) を経口投与した時の急性毒性について検討した。

材 料 と 方 法

1. ワラビ配糖体の調製

ワラビは1979年5月上旬に鳥取市近郊の美敷牧場で採取したものを、幼茎と若葉を凍結保存し、適時、凍結乾燥粉末とした。乾燥粉末の収量は生ワラビ1kg当

* 鳥取大学農学部獣医学科家畜薬理学研究室
Department of Veterinary Science, Faculty of Agriculture, Tottori University

り約100 gであった。ワラビ配糖体 (BG) の調製は Fig 1 に示す手順で行った。すなわち、乾燥粉末100 gに10倍容の冷エタノールを加えて振盪抽出 (10分間) を2回行い、エタノールを低温・減圧下で留去してエタノール抽出物を得た。抽出物は0.01N酢酸水 150mlに溶解して不溶物を除去した後、等量のベンゼンを加えて振盪した。水相は凍結乾燥して粗抽出試料とした。粗抽出試料の収量はワラビ乾燥粉末100 g当たり約8 gであった。次に粗抽出試料を用いて分配クロマトグラフィーを行い、配糖体を分離した。すなわち、担体として用いた Sephadex G-25を常法に従い膨潤後、ガラスカラム (2.5×50cm) に湿式に充填し、ゲルベットの高さを30cmに調整した。溶媒

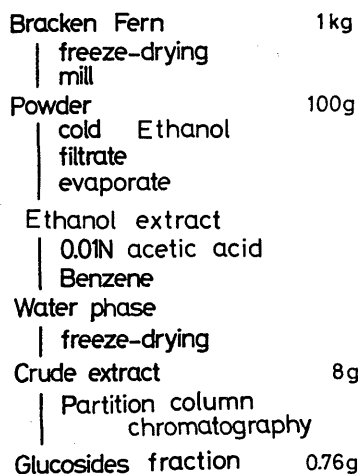


Fig. 1 A procedure for the preparation of bracken fern glucoside

系としては、n-ブタノール-0.01 N酢酸水 (1:1 v/v) を用いた。まず下相 (固定相) と上相 (移動相) でゲルベットの平衡化をはかった後、粗抽出試料 (約1 g) を上相 5 mlに溶解しカラムに注入した。展開は上相で流速13 ml/hrで行った。配糖体は25~250mlの位置に溶出されることから、この位置の溶出液225mlを採取し、低温減圧下で溶媒を留去後、0.01N酢酸水に溶解、凍結乾燥して配糖体試料 (BG) とした。BGの収量はワラビ乾燥粉末100 g当たり約0.76 gであった。

2. 実験動物及び投与方法

体重200~300 gのハートレー系雄モルモット38匹を実験に供した。モルモットは、供試前12時間自由飲水下で絶食させた。BGは150, 300, 600及び750 mg/kgになるように生理食塩水 1 mlに溶解し、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与は1回とし、投与後2時間は絶水絶食させた。

3. 検査項目及び方法

一般症状は、投与直後から約4時間観察し、その後、放血殺するまで随時観察した。病理解剖は、投与24時間後にエーテル麻酔下で放血殺して行った。特に膀胱索と膀胱の浮腫・出血性の変化に注目し、肉眼的に観察した。病理組織学的検査は、膀胱について10%ホルマリン固定後、膀胱中央部の横断切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施して鏡検した。

結 果

1. 一般症状

BG投与に原因すると思われる症状は、300 mg/kg以下の投与では観察されなかったが、600及び750 mg/kgの投与例において、間歇性の震戦及び立毛が認められた。しかし、これらの症状は時間の経過につれて消失した。また、600 mg/kg投与の1例と750 mg/kg投与の4例において、投与後12時間以内に血尿が認められた (Table 1)。

Table 1 Pathological findings in guinea pigs after oral administration of bracken fern glucoside

Single dose (mg/kg)	No. of animals	No. of animals		
		Edema in ligaments of urinary bladder	Hemorrhages in urinary bladder	Hematuria
0	6	0	0	0
150	6	0	0	0
300	16	12	5	0
600	6	6	3	1
750	4	4	4	4

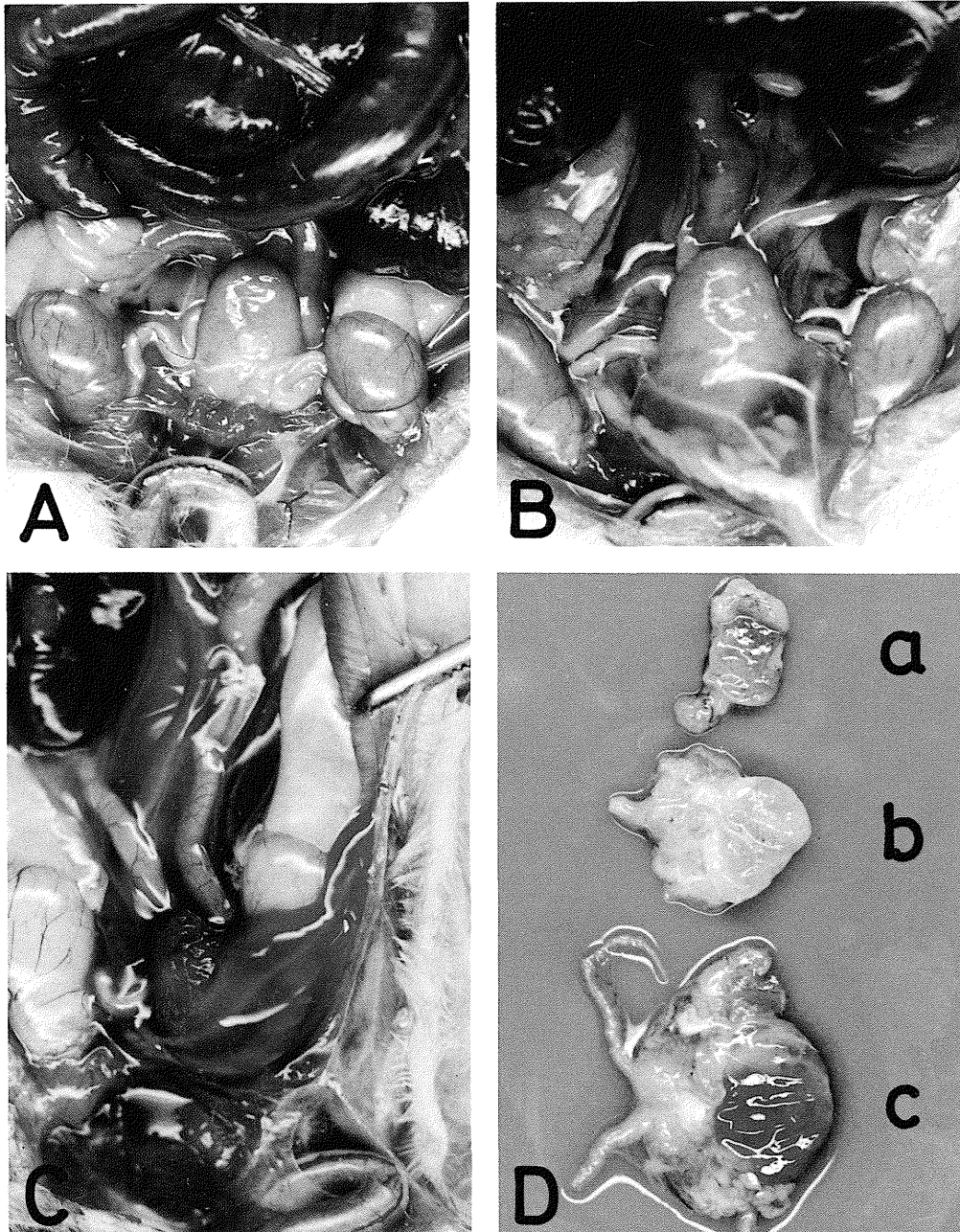


Fig. 2 Gross appearance of edematous and hemorrhagic changes in guinea pigs sacrificed about 24 hr after the oral administration of bracken fern glucoside (BG).
 A: 0 mg/kg (control) ; B: 300 mg/kg ; C: 750 mg/kg ; D: urinary bladder of control (a), 300 mg/kg (b) and 600 mg/kg (c) of BG.

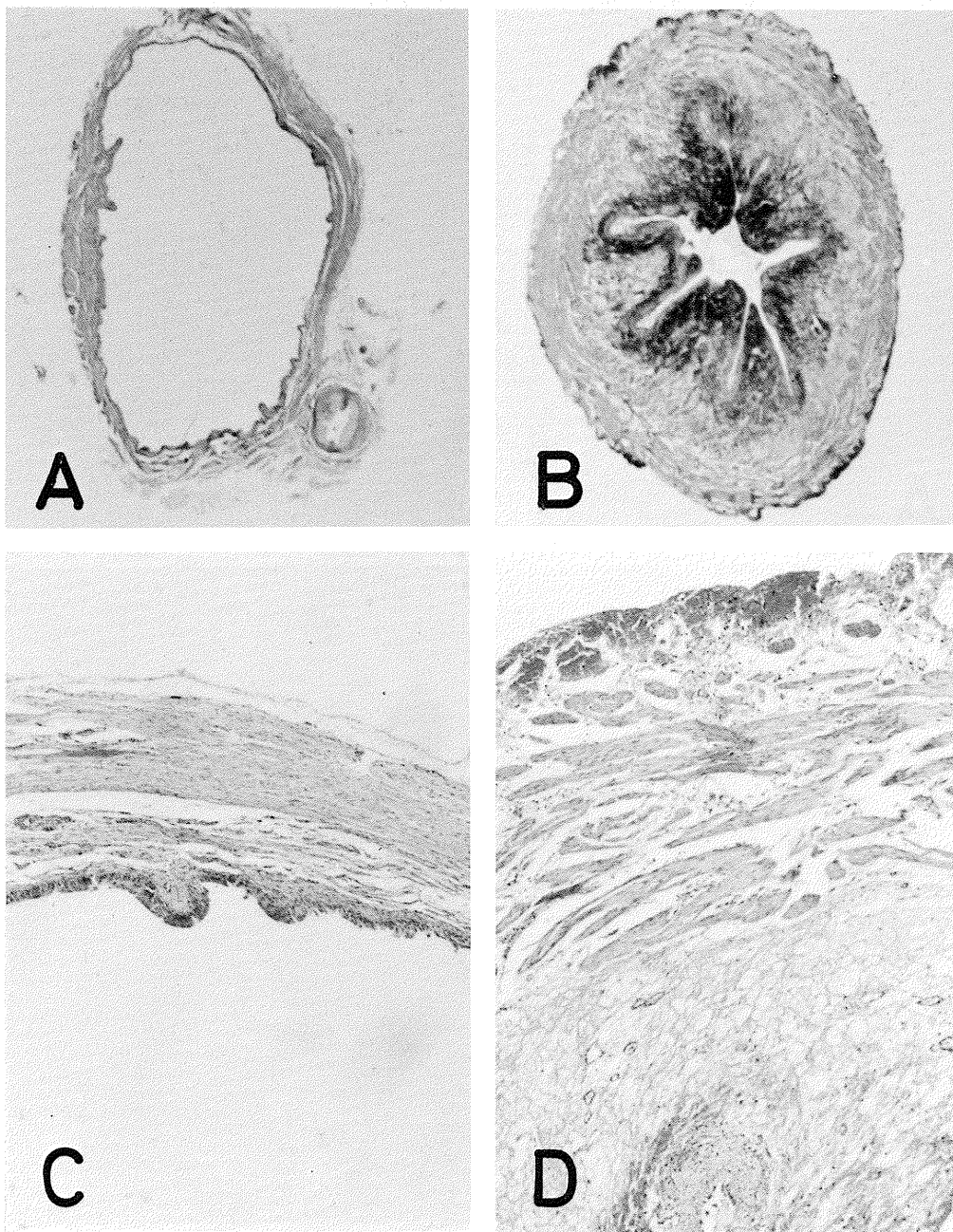


Fig. 3 Light microscopic appearance of edematous and hemorrhagic changes of the urinary bladder in guinea pigs sacrificed about 24 hr after the administration of bracken fern glucoside (BG). Hematoxyline-Eosin stain. A and C: control; B and D: typical changes by 750 mg/kg. A and B: $\times 8.5$; C and D: $\times 57$

2. 病理解剖所見

BG投与に関連すると思われる主要病変は、膀胱索と膀胱における浮腫・出血性の変化であった (Table 1)。すなわち、150 mg/kg の投与群では病変は認められなかったが、300 mg/kg 投与群では16例中12例において膀胱を保定している膀胱索 (外側膀胱索と正中膀胱索) に限局してゼラチン様浮腫が認められた (Fig. 2 B)。膀胱索に浮腫を認めたモルモットの膀胱は、いずれも軽度に浮腫性であり、3例で粘膜面に点状あるいは斑状の出血を認めた (Fig. 2 D-b)。600 mg/kg 投与例においては、浮腫性変化は膀胱索、膀胱にとどまらず、尿管や血管周囲結合組織、腹腔内の漿膜に波及して認められ、また、膀胱の出血性変化は粘膜面で重度になる一方 (Fig. 2 D-c)、漿膜面にも点状出血を認めた。750 mg/kg 投与群においては、全例で血尿を認めたほか、膀胱索などの腹腔内結合組織も高度の浮腫性変化を来し、漏出性の出血を伴っていた (Fig. 2 C)。また、膀胱は粗糙となってほぼ全面に出血し、粘膜面と漿膜面の出血も顕著であった (Fig. 2 C)。

なお、心臓、肺臓、肝臓、胃、腸管、腎臓では、BG投与に関連すると思われる変化は認められなかった。

3. 病理組織学的所見

BG 300 mg/kg 以上の投与によって認められた膀胱の特徴的な変化は、粘膜固有層の顕著な浮腫性変化であった。浮腫の重度のものでは筋層も浮腫性となっており、また、破綻性の出血を伴っていた (Fig. 3 D)。浮腫を呈する粘膜固有層には多数のリンパ球および好中球の浸潤が認められた。

考 察

ワラビの発ガン性、汎骨髄原性あるいは出血性に関する発症試験については多数報告されているが^{2,3,8,13,15-17,23}、有毒物質を追求している報告は少なく、いまだにその本態は明らかにされていない。その理由としては、有毒物質の分離・精製を進めるに当り多量の試料を必要とすること、また活性判定に長期の実験期間を要することが挙げられる。更には有毒物質は化学的に不安定な物質と思われ、分離・精製の過程でその活性が低下することも本態の解明を妨げる理由の一つになっていると考えられる。

牛島らはモルモットに対するワラビの毒性について詳細に検討しており、ワラビの長期給与 (約1年) で膀胱と腸管に腫瘍を認め、約3~4週間の給与では汎骨髄癆を、2~3日の給与では膀胱に限局して浮腫・出血性の変化を認めたと報告している²²。その後、大滝らはこの膀胱

の浮腫・出血性変化を指標にして、Amberlite XAD-2やSephadex LH-20により有毒物質の精製を進めているが¹⁹、同定するまでには至っていない。また、森田らはモルモット膀胱の浮腫・出血性変化を指標にして有毒物質の性状について検討した結果、出血毒は水、メタノール、エタノール、酢酸エチル、アセトンに可溶性で¹¹、酢酸鉛及び塩基性酢酸鉛に沈澱性である¹²として、この出血毒の性状がワラビの発ガン物質や再生不良性貧血因子と類似していることに言及している。

一方、著者らは、いわゆるウシのワラビ中毒における主要症状としてみられる粘膜及び皮下織の浮腫性変化に注目して、この症状発現には血管透過性亢進因子の1つであるヒスタミンが関与しているものと推測して検討したところ、ワラビがヒスタミン遊離活性物質を含んでいることを明らかにした^{4,18}。その後、この活性物質の分離・精製を進め、分配クロマトグラフィーで調製した配糖体 (BG) に強いヒスタミン遊離活性を認めた^{6,7}。そこで本実験においては、モルモットに対するBG 1回投与による急性毒性について、病理学的に検討を加えた。

BGの投与モルモットにみられた一般症状は、低投与量 (300 mg/kg 以下) ではみられず、高投与量 (600 mg/kg, 750 mg/kg) において、軽度の立毛、震戦を認め、また投与後12時間以内に血尿を観察した。投与24時間後の剖検所見では、300 mg/kg 以上の投与例で膀胱索及び膀胱の浮腫・出血性変化が目玉された。この浮腫・出血性の変化は、牛島ら²²と森田ら^{11,12}の報告している所見と本質的に同一のものと思われる。

BG投与による浮腫・出血の反応には、感受性に若干個体差がみられるが、その反応過程に一つの傾向が認められる。すなわち、低投与量 (300 mg/kg) では、膀胱の浮腫・出血性変化に先行して膀胱索の浮腫が顕著であり、投与量の増加に伴って、浮腫性変化は膀胱索にとどまらず尿管、血管周囲結合組織、腹腔内の漿膜に波及して行くように思われた。最高投与量 (750 mg/kg) では、浮腫は漏出性の出血を伴っていた。一方、膀胱においては、投与量の増加に伴って浮腫が高度になるとともに、出血変化はまず粘膜面に、次いで漿膜面に認められ高度化して行く傾向を示した。なお、膀胱の浮腫・出血性の変化は、鏡検所見においては粘膜固有層で最も顕著であった。膀胱における出血は、平滑筋の良く発達した収縮性に富む臓器の特性に起因する破綻性の出血と考えられる。

牛島らは、ワラビ給与による浮腫・出血性変化が膀胱に限局してみられることから、出血性因子は無毒性に腎臓及び尿管を下行後、膀胱内で活性化され粘膜側から作

用すると推測している²²⁾。しかし、浮腫・出血性の変化は上述のように膀胱に限局するものではなく、広く腹腔内の結合組織に認められたことから、出血性因子は直接、間接のいずれの作用であるにしても、血行性に作用しているものと推測される。なお、浮腫・出血の発現がBGの直接作用か、あるいは間接作用によるものかについては本実験の成績からは明らかでない。しかし、BGがラット肥満細胞からのヒスタミン遊離を促進させること^{6,7)}、また、ワラビ給与による血尿症発症ウシで血中ヘパリン値が上昇すること^{1,3,25)}から、BGにより肥満細胞からヘパリンと共に遊離されるヒスタミンが浮腫・出血の発現に関与しているものと推察される。なお、浮腫・出血の発症が極めて急性にみられたこと、また、浮腫変化が出血に先行して認められたことは、今後その発症機転を明らかにする上で興味深い。

本実験において、BG 300 mg/kg (1匹当たり約75mg, 乾燥末として約10g)の投与量で浮腫・出血性変化が認められ、750 mg/kg (1匹当たり約190mg, 乾燥末として約25g)では投与後12時間以内で全例に血尿が観察されたことは、BGに含まれている出血毒の活性が極めて高いことを示すものと考えられる。投与方法あるいは投与量が異なるため、本実験の成績と従来報告を直接比較することは出来ないが、松川らは乾燥ワラビの30%と50%添加飼料を6~9日間連日給与することにより⁹⁾、牛島らはワラビ抽出物を3~4日間給与することにより²²⁾、また、森田らは乾燥末100g分の抽出物を1日給与量として21日間ないし42日間給与することによって浮腫・出血性変化や血尿を認めている^{11,12)}。ワラビの有毒物質は、乾燥末を調製する際の天日乾燥や通風乾燥で、また、水抽出によって減毒することが知られている^{10,13)}。本実験に用いたBGは、凍結乾燥粉末を用い、低温、酢酸酸性下で調製したものであり、このような処理によってヒスタミン遊離活性は増強することを認めている⁷⁾。従って、本実験での上記の処理は出血毒の減毒防止に寄与しているものと思われる。

ワラビ配糖体 (BG) は、Sephadex G-25 を担体とする分配クロマトグラフィーで分離した画分で、ごく微量の未知物質を含むが、その大部分は5~6種の配糖体からなっており、うち2種の配糖体にヒスタミン遊離活性を認めている^{6,20)}。また、BGの化学的性状は、水、メタノール、エタノール、ブタノールに可溶、エーテル、ベンゼンに不溶であり、従来報告されているワラビ有毒物質の性状と極めて類似している。

本実験において、BGがモルモット膀胱に急性毒性を示したことは、ワラビの有毒物質の本態が活性配糖体であ

る可能性を強く示唆するものである。

総 括

ヒスタミン遊離活性を有するワラビ配糖体 (BG) は、Sephadex G-25 を担体とする分配クロマトグラフィーで調製した。BGの150, 300, 600及び750 mg/kg量を雄モルモットに1回強制経口投与し、急性毒性について検討した。

BGの投与による一般症状は比較的軽度であったが、300 mg/kg以上の投与量において、主として膀胱索と膀胱に浮腫及び出血性の変化を認めた。浮腫・出血性変化は投与量の増加に伴い重度となり、膀胱索などの結合組織の浮腫は漏出性の出血を伴った。一方、膀胱の破綻性出血は粘膜面から漿膜面におよび、鏡検所見において、出血は粘膜固有層で最も顕著であった。最高投与量の750 mg/kgでは投与後12時間以内で血尿が観察された。

以上の結果から、ワラビに含まれるヒスタミン遊離活性物質と出血毒は同一の物質である可能性が示唆され、この活性物質は配糖体であると推測された。

文 献

- 1) Evans, I. A. and Howell, R. M. : *Nature*, **194**, 584-585 (1962)
- 2) Evans, I. A. and Mason, J. : *Nature*, **208**, 913-914 (1965)
- 3) Evans, I. A. : *Cancer Res*, **28**, 2252-2261 (1968)
- 4) Ishii, K., Saito, T. and Sakatani, M. : *J. Fac. Agr., Tottori Univ.*, **9**, 27-33 (1974)
- 5) 石井和彦・齋藤俊之・小島晴雄：鳥大農研報，**31**，134-139 (1979)
- 6) 石井和彦・桐原祥修・齋藤俊之・後藤判友：第87回日本獣医学会講演要旨，52 (1979)
- 7) 石井和彦・後藤判友・齋藤俊之：第88回日本獣医学会講演要旨，55 (1979)
- 8) 前田勉：鳥大農研報，**27**，79-88 (1975)
- 9) 松川清・牛島純一・岡田雅照・湯浅亮・高橋清志：第74回日本獣医学会講演要旨，42 (1972)
- 10) 森田二郎・仙田久芳・松岡克幸：鳥大農研報，**27**，89-93 (1975)
- 11) 森田二郎・仙田久芳・山本義雄・松岡克幸：鳥大農研報，**28**，66-72 (1976)
- 12) 森田二郎・仙田久芳・山下正信：鳥大農研報，**29**，12-17 (1977)
- 13) 農林省家畜衛生試験場：牧野における牛の汎骨髄癆

- に関する特別研究推進会議資料, 1-16 (1972)
- 14) 大滝清・牛島純一・新岡琴瀬：第87回日本獣医学会講演要旨, 48 (1979)
- 15) Pamukcu, A. M., Göksoy, S. K. and Price, J. M. : *Cancer Res.*, **27**, 917-924 (1967)
- 16) Pamukcu, A. M., Yalciner, S., Price, J. M. and Bryan, G. T. : *Cancer Res.*, **30**, 2671-2674 (1970)
- 17) Rosenberger, G. and Heesch, W. : *Deut. Tierärztl. Wochschr.*, **67**, 201-208 (1960)
- 18) 斎藤俊之・坂谷真郎・石井和彦・板垣啓三郎：第75回日本獣医学会講演要旨, 25 (1973)
- 19) 斎藤俊之・大久保吉啓・桐原祥修・石井和彦：第86回日本獣医学会講演要旨, 62 (1978)
- 20) 斎藤俊之・石井和彦・大久保吉啓：鳥大農研報, **31**, 140-147 (1979)
- 21) 牛島純一・松川清・湯浅亮・岡田雅照：第77回日本獣医学会講演要旨, 59 (1974)
- 22) 牛島純一・大滝清・松川清：第87回日本獣医学会講演要旨, 173 (1979)
- 23) 山根乙彦・林隆敏・迫悟・木原保・小山実・板垣啓三郎：鳥大農研報, **27**, 68-77 (1975)
- 24) Yamane, O., Hayashi, T., Sako, S., Kihara, T. and Koyama, M. : *Jap. J. Vet. Sci.*, **37**, 335-340 (1975)
- 25) Yamane, O., Hayashi, T., Sako, S., Tatematsu, S., Takeda, K. and Fukushima, H. : *Jap. J. Vet. Sci.*, **37**, 341-347 (1975)