

牛ワラビ中毒の発生に関する研究 -放牧場に自生するワラビの毒性-

斎藤俊之*・木村雅美*・尾坂英樹*・七條喜一郎**

平成12年6月30日受付

*鳥取大学農学部家畜薬理学教室、**鳥取大学農学部家畜生理学教室

Studies on the Outbreak of the Cattle Bracken Poisoning: Toxicity of the Indigenous Bracken in a Cattle Pasture

Toshiyuki Saito*, Masami Kimura*, Hideki Osaka* and
Kiitiro Sitizyo**

*Department of Veterinary Pharmacology, Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680-8553, Japan

**Department of Veterinary Physiology, Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680-8553, Japan

The braxin C, one of the bracken toxins, was assayed in the indigenous bracken in the cattle pasture by HPLC. The content of the toxin was in the wide range of 0 to 3300 $\mu\text{g/g}$ D.W., and was $930.98 \pm 98.89 \mu\text{g/g}$ (mean \pm S.E., $n=67$) in the indigenous bracken collected from the pasture and other places. The toxin was contained more abundantly in the young bracken in the stockade, whereas its content was low in the mature plant and in the plant collected from out of the stockade. The toxin content increased remarkably in the plant by the cutting stimulation at a collecting point, in which the plant was very low in content of the toxin before the stimulation. These results suggest the bracken poisoning is induced in the cattle which fed on a great volume of the young plant in the stockade.

(Received 30 June 2000)

Key words: bracken fern, toxin, cattle, poisoning, toxicity

緒 言

ワラビ (*Pteridium aquilinum*) は日本を含む世界の多くの地域に広く分布しているシダ植物で、ウシや羊などの家畜に毒性を持つことで古くから知られている。ウシの急性ワラビ中毒の野外例が1893年にPenberthy [7] とStorarr [13] により報告されて以来、多くの研究によってこの疾病の臨床症状や病理学的所見についてはほぼ解明されている。一方、膀胱の腫瘍性病変を伴う慢性出血を特徴

とする“Chronic enzootic hematuria”が世界の各地で報告され、この疾病もワラビの長期間の摂取によって惹起されることがRosenberger & Heeschen [8]、Pamukcu [6] およびCampo等 [1] の発症実験により確認されている。

これまでに、ワラビからBraxin A, B 及びCの3種の毒性物質が単離されており [2, 4-5, 9-12]、これらの毒性物質により個々のウシが中毒に陥ることはほぼ間違いないと考えられている。しかし、放牧場での牛ワラビ中毒の発生状況を見ると、発症数が放牧ウシのおよそ10%以下

に止まること、また、多数のワラビが自生している牧区内のウシに中毒の発症が見られないことなどが観察されており、その発生の機転については未だ十分には明らかにされていない。

本研究では、ワラビ中毒の発生原因を明らかにする目的で、以前にワラビ中毒が頻発したH放牧場内外に自生しているワラビについて、毒性物質の1つであるBraxin C (ptaquiloside)の含量を分析し、中毒発生との関連性について検討した。

材 料 と 方 法

1. 供試材料

実験に用いたワラビは平成8年5月から10月の間に鳥取市近郊のH放牧場の牧区内外の8カ所及び鳥取県内5カ所(佐治村の果樹園、同村の旧果樹園、三滝溪、鳥取市、倉吉市)で採取した。1カ所につき採取した約5-10kgの生ワラビは個別に凍結乾燥して-20℃以下で保存した。

2. 試薬及び溶媒の調製

Braxin Cの抽出及びHPLC分析に用いたメタノールは市販一級品を再留したもの、酢酸は市販特級品を用いた。

3. 分析試料の調製

凍結乾燥したワラビ試料は細切して混合した後、10gを分取して100mlの0.5%酢酸メタノールを加えて、-20℃で3時間以上静置した。次にメタノール懸濁液は氷冷下でPOLYTRON(KINEMATICA)を用いて10分間粉碎混和した後、室温で1時間静置した。抽出液は-20℃で密封保存し、測定直前にメンブランフィルター(sartorius Minisart

RC4)で濾過したものをHPLCの分析試料とした。

4. HPLCによるBraxin Cの定量

抽出試料中のBraxin Cの定量は高速液体クロマトグラフ(日立665-A11)、波長可変モニター(日立665-A21)、オートインジェクター(島津SIL-9A)及びクロマトグラフ記録計(日立D-2500)を接続し、分析用カラムとしてAsahipak KIBOUSIL-C18(4.6×250mm)を用いた。溶離液には脱気したメタノールと0.02%酢酸水の混液(3/7)を用い、流速は0.5ml/minとした。カラム温度は恒温水槽に分析用カラムを浸漬して25℃に設定した。

上記溶出条件でのHPLCにおいて、調製した抽出試料(10μl)をチャージした時のクロマトグラムの例を第1図に示す。Braxin Cは260nmの検出波長では検出されないが、220nmの検出波長では約72分の位置に精度よく分離して単ピークとして検出された。

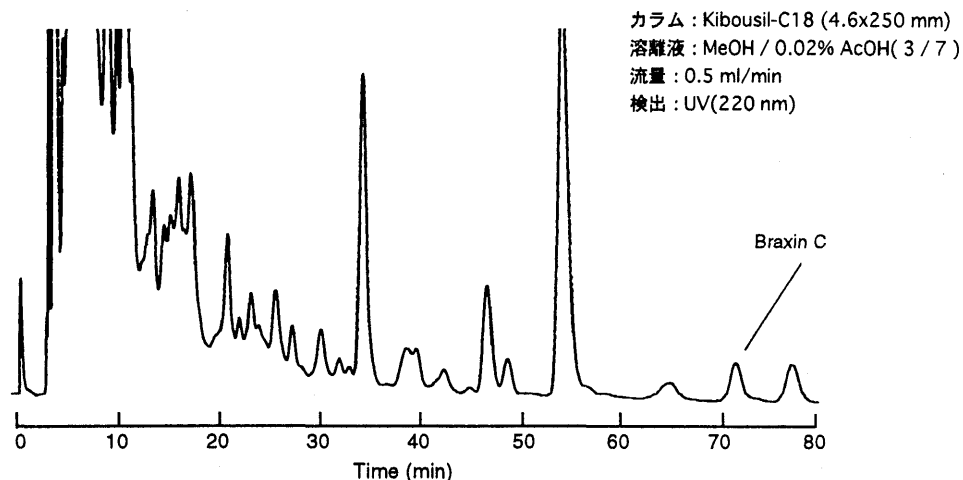
Braxin Cの検量線は溶離液で溶解したBraxin Cの標準液(10, 100, 500μg/ml)を用いて作成した。第2図に示すように、220nmの検出波長で精度の良いBraxin Cの検量線が得られ、相関係数は0.9999であった。

Braxin Cの含量(μg/gワラビ乾燥重量)は計算式 $Y = 8046.6X - 1033.4$ (X: Braxin C; μg/ml, Y: ピーク面積; $\mu V \times sec$)より求めた。

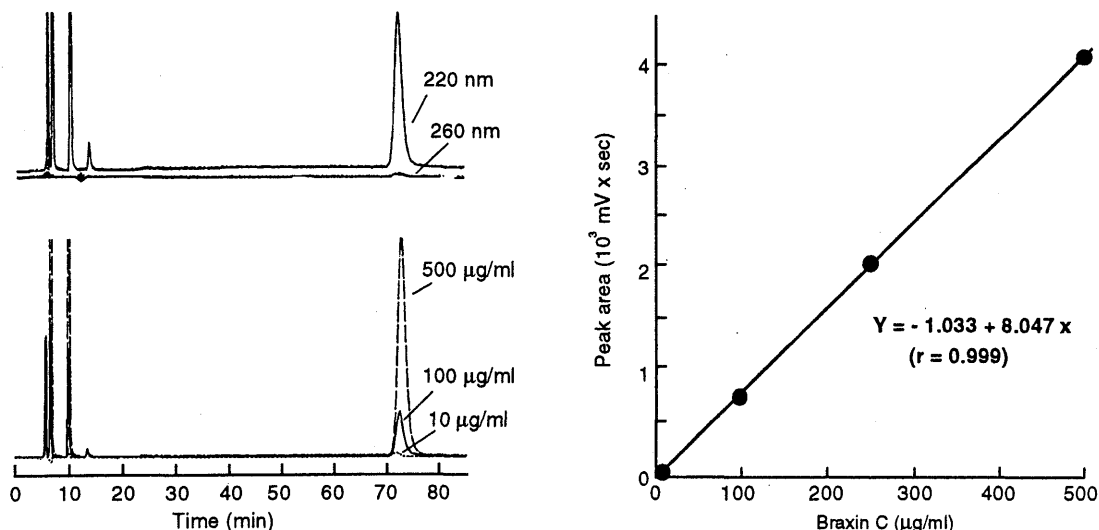
なお、抽出試料を用いてのHPLCでは、1試料の分析のたびにカラムをメタノールで洗浄し、次の分析に用いた。

5. 統計処理

測定値は平均値±標準誤差(S.E.)で示し、有意差の検定はStudentのt検定によった。



第1図 HPLCでのワラビ抽出物のクロマトグラム



第 2 図 HPLC での Braxin C のクロマトグラムと検量線

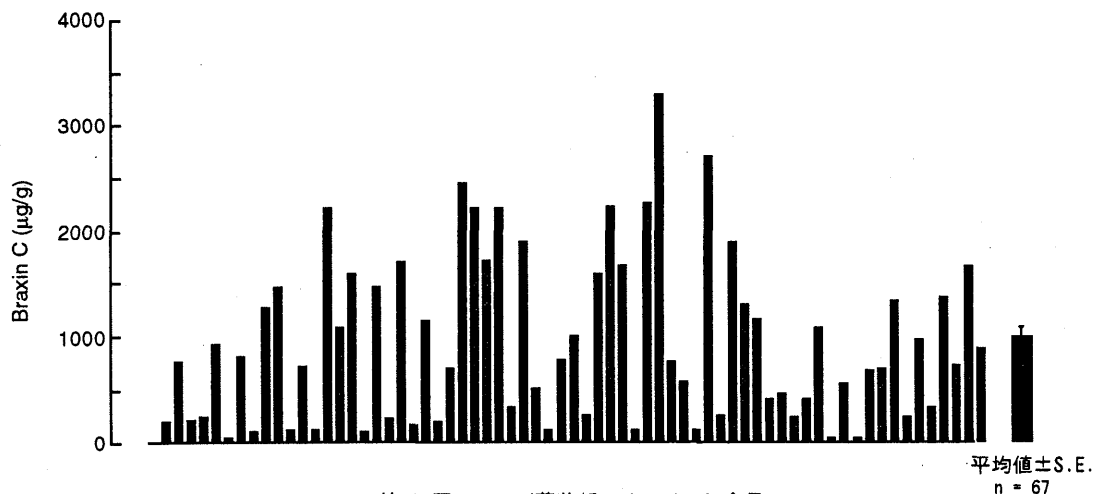
実験成績

1. 放牧場に自生するワラビの Braxin C 含量

自生ワラビの Braxin C 含量は採取したワラビ葉茎部の葉部(太い基部を除いた葉の部分)を用いて分析した。H 放牧場内の 8 地点及び放牧場外の 5 ヶ所で採取した自生ワラビ (67 例) の Braxin C 含量は検出が出来ないものから多いもので 3304.49 µg/g D.W. の間で分布し、930.98 ± 98.89 µg/g (平均値 ± S.E.) であった (第 3 図)。

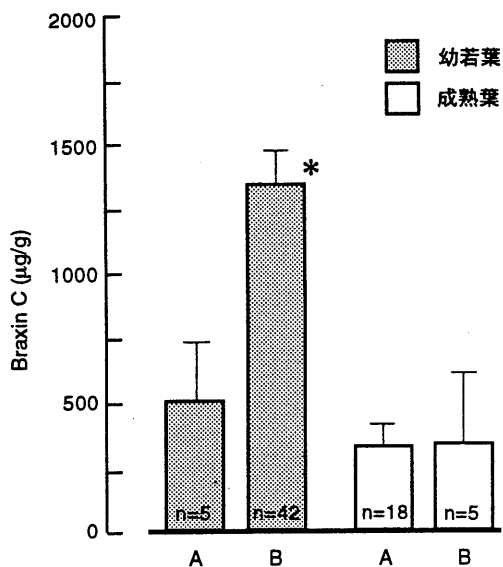
採取したワラビを H 放牧場内と放牧場外のものに区分

し、また、葉部が淡緑色を呈した発芽後約 2 週間以内の幼若ワラビと濃緑色を呈した発芽後約 3 週間以上の成熟ワラビに分けて Braxin C 含量を比較した。その成績を第 4 図に示す。H 放牧場内に自生する幼若ワラビでの Braxin C 含量は 1271.74 ± 127.13 µg/g (範囲; 0 - 3304.49 µg/g) と高値を示し、放牧場外の含量 (480.51 ± 193.07 µg/g, 範囲; 171.94 - 1121.32 µg/g) と比較して有意の高値を示した ($p < 0.05$)。一方、成熟ワラビにおいては、H 牧場内と放牧場外の Braxin C 含量はそれぞれ 328.57 ± 67.54 µg/g (0 - 1054.53 µg/g) と 322.72 ± 227.06 µg/g (範囲; 95.66 - 549.79 µg/g) といずれも低値を示し、両者の間に有意差は認めら

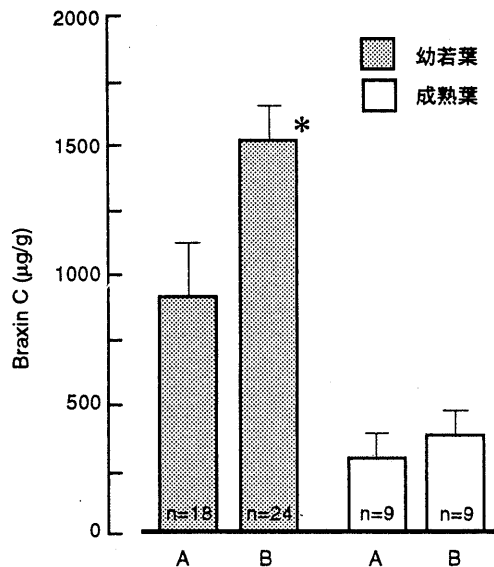


第 3 図 ワラビ葉茎部の Braxin C 含量

平均値 ± S.E.
n = 67



第 4 図 H放牧場の場外(A)と場内(B)での Braxin C 含量の比較、* P<0.05



第 5 図 H放牧場の牧区外(A)と牧区内(B)での Braxin C 含量の比較、*: P<0.05

れなかった。

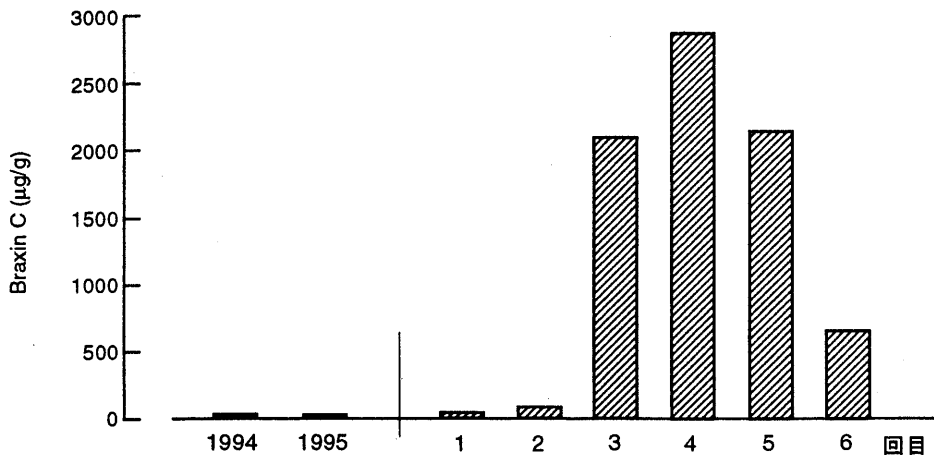
2. H放牧場における牧区内と牧区外での比較

H放牧場内に自生するワラビについて、牛が放牧されている牧区内と牧区外に分けて比較した成績を第5図に示す。牧区内に自生する幼若ワラビでのBraxin C含量は1535.59 ± 128.11 µg/g (範囲; 671.44 - 3304.49 µg/g)と高値を示し、牧区外の幼若ワラビでの含量(919.95 ± 220.48 µg/g、範囲; 0 - 2970.30 µg/g)と比較して有意の高値を示した(p<0.05)。一方、成熟ワラビについては、牧区内と牧区外

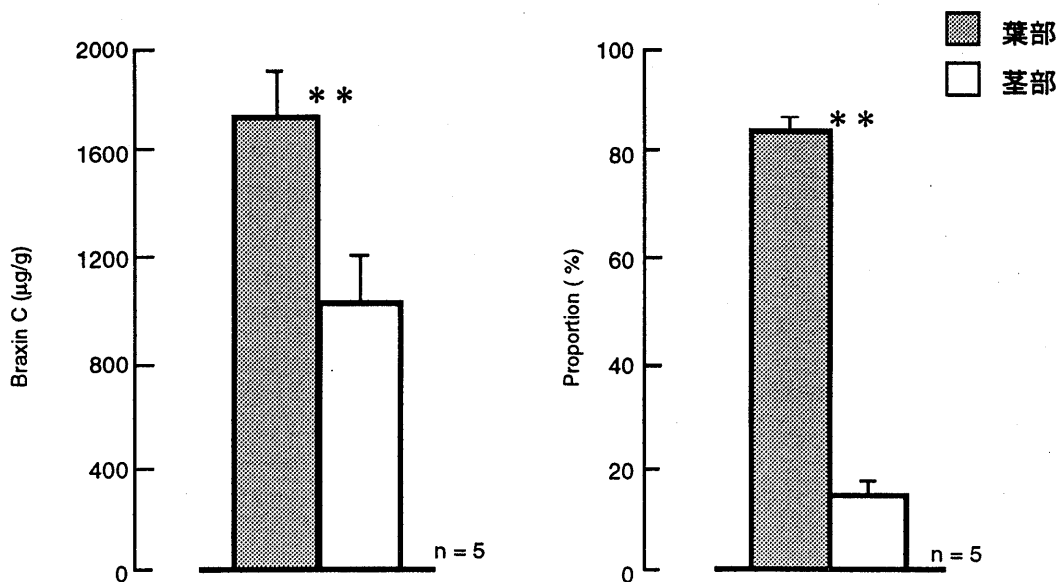
ではそれぞれ364.97 ± 68.70 µg/g (範囲; 169.38 - 744.60 µg/g)と292.17 ± 119.73 µg/g (範囲; 0 - 1054.53 µg/g)といずれも低値を示し、両者の間には有意差も認められなかった。

3. 刈り取り刺激によるBraxin C含量の変化

H放牧場の牧区外の採取地点Aにおいて、ワラビのBraxin C含量が採取を重ねることにより増加する傾向が示された。そこで、採取地点Aの限定した区画 (約5平方メートル)内に自生する幼若ワラビについて、2-3週間の間隔で計6回のワラビ採取を試み、刈り取り刺激による



第 6 図 A 地点における Braxin C 含量の変化



第 7 図 ワラビ葉莖の部位による Braxin C 含量の相違

Braxin C 含量の変化について検討した。その成績を第 6 図に示す。この地点で以前に採取し保存していた 1994 年と 1995 年のワラビでは Braxin C は殆ど検出されず、また、採取 1 回目と 2 回目の幼若ワラビの Braxin C 含量はおおよそ 40 µg/g と極めて低い値であった。しかし、3 回目以降に採取した幼若ワラビの Braxin C 含量は顕著な高値を示し、3、4、5 及び 6 回目のそれぞれの値は 2218、2970、2241 及び 674 µg/g であった。

4. ワラビ葉莖の部位による Braxin C 含量の相違

H 放牧場の牧区内で採取した成熟ワラビについて、その葉莖を微細な茎を含む葉部と莖部に区分して、それぞれの Braxin C 含量について検討した。その成績を第 7 図に示す。葉部の Braxin C 含量 (143.79 ± 19.31 µg/g, 範囲; 93.4-209.2 µg/g) は莖部のそれ (65.19 ± 10.75 µg/g, 範囲; 32.9-92.6 µg/g) と比較して有意 ($p < 0.01$) の高値を示した。葉部の乾燥重量は葉莖の約 76% を占めることから、葉部における Braxin C 含量の分配率は約 85% と計算された。なお、葉部には微細な茎が含まれていることから、この微細な茎を分離した葉部-II と微細な茎-II の Braxin C 含量について検討したが、両者の Braxin C 含量に有意差は認められなかった。なお、5 月から 10 月の間での採取において、季節に伴う Braxin C 含量の変動は認められなかった。

考 察

Matoba ら [3] は日本の各地に自生しているワラビについて、毒性物質の 1 つである ptaquiloside (Braxin C) を薄層クロマトグラフィーで分析したところ、その含量は採取の地域や季節で大きく異なることを認めたが、ワラビ中毒症の発生との関連はないと報告している。一方、Smith ら [14] は、ニュージーランド北島内の二つの地域でのワラビについて ptaquiloside を分析したところ、その含量は採取地域によって大きく異なり、この含量相違がワラビ中毒症の発生と関連していると報告している。本研究において、比較的狭い領域で自生しているワラビについても、Braxin C 含量は採取地点や育成時期の相違によりおよそ 0-3304 µg の範囲で大きな相違がみられ、H 放牧場に自生しているワラビの Braxin C の含量は放牧場以外の地域で採取したワラビのそれと比較して有意の高値を示した。この傾向は放牧場内に自生しているワラビにおいても同様で、採取地点及び育成時期により同様の範囲で大きな相違が認められた。特に牧区内の幼若ワラビで Braxin C の含量が顕著に高値を示すことが確認された。H 放牧場は数年前までウシの急性ワラビ中毒が頻発しており、採取地点の中で特に牧区内で多数の幼若ワラビが観察されることから、牧区内に自生している幼若ワラビがウシのワラビ中毒症の発生に関与しているもの

と推察された。

通常、ワラビは林の中で散発的に観察されるシダ植物であるが、本来の性質が日照を好む植物であるために、山火事や牧場の造成などで樹木が無くなると、主に地下茎の伸長によって急速に成育領域を拡大することが知られている。また、ワラビは葉基部が採食や刈り取りにより障害をうけると、地下茎に準備されている幼芽が障害のたびに順次発芽して成長を開始することで知られている。ワラビのBraxin C含量が採取地域で大きく異なる要因としては地質や気候が考えられているが、その因果関係を示している報告は見あたらない。本研究において、Braxin Cをほとんど含んでいないワラビの自生地、採取場所を限定しの刈り取り刺激を繰り返したところ、ワラビのBraxin C含量が3回目の刈り取り以降で顕著な増加を示した。このようなBraxin Cの含量増加の傾向はH放牧場に隣接する山火事跡での繰り返し採取においても認められた。これらのことから、ワラビのBraxin Cの含量は地質や気候によりそれぞれの自生地、採取地、採取方法で固定しているのではなく、ワラビに加えられる障害刺激の強弱や頻度に依存している可能性が示唆され、Braxin C含量がウシが放牧されている牧区内のワラビで高かったことには頻繁なウシによる採食刺激が関与していると推測された。

ワラビは成長が早く、発芽してから幼芽、幼若期を経ておよそ3週間で成熟期に達すると考えられる。幼若期と成熟期のワラビを厳密に識別することは困難であるが、大きさや葉の開き具合に加えてそれぞれが淡緑色と濃緑色を呈することでおよそその成育期を知ることが出来る。本研究において、幼芽を含む幼若ワラビでBraxin C含量が高く、成熟ワラビで低値であったが、幼若ワラビと成熟ワラビのそれぞれの1個体でのBraxin Cの総量比較ではほぼ等しいと算定された。一方、ワラビの地下茎は常に約1000 µg/gのBraxin Cを含有していることが確認されている(未発表)、これらのことから、Braxin Cが葉基部で合成されるのではなく、貯蔵部の地下茎から供給されることを示唆しており、その供給のほとんどはすでに幼若期で終息し、その後の葉基部の成長に伴う細胞骨格の増加によって含量が低下するものと推測された。ワラビがその幼若期で高濃度の毒性物質を保有していることは種を維持する生体の防御機構として効率のよい対応法であると思われる。

総括

過去10数年にわたりウシの急性ワラビ中毒が頻発した

H放牧場に自生しているワラビについて、毒性物質の1つであるBraxin Cの含量をHPLCにより測定し、他の地域のワラビのそれと比較した。その結果、ワラビ葉部のBraxin C含量は採取地域により0-3304 µg/gの範囲で大きく異なり、67例の測定試料で930.975 ± 98.887 µg/g(平均値±S.E.)であった。H放牧場に自生している幼若ワラビのBraxin C含量は他の地域のそれと比較して有意の高値を示した。また、H放牧場の牧区内に自生している幼若ワラビのBraxin C含量は牧区外のそれと比較して有意の高値を示した。一方、成熟ワラビのBraxin C含量は低値を示し、採取地域による差も認められなかった。Braxin C含量がほとんど認められなかったワラビの採取地点で刈り取り刺激によるBraxin C含量の変化を検討したところ、1, 2回目の採取ではBraxin Cの含量は約40 µg/gと極めて低かったが、3, 4, 5, 6回目ではそれぞれ約2218, 2970, 2241, 674 µg/gと、顕著な含量増加が認められた。ワラビの葉部は茎部に比べてBraxin C含量が高く、その分配率は約85%であり、Braxin Cの大部分は葉部に含まれていると推察された。

以上の成績より、狭い領域に自生しているワラビにおいて認められたBraxin Cの含量相違にはウシの採食や刈り取りなどの刺激が関与していると推測された。また、ウシの急性ワラビ中毒の発生には牧区内に自生している幼若ワラビが大きく関与しているものと思われた。

引用文献

- 1) Campo, M. S., Jarrett, W. F. H., Barron, R., O'Neil, B. W. and Smith, K. T.: Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Res.*, 52:6898-6904 (1992)
- 2) Hirono, I., Kono, Y., Takahashi, K., Yamada, K., Niwa, H., Ojika, M., Kigoshi, H., Niiyama, K. and Uosaki, Y.: Reproduction of acute bracken poisoning in a calf with ptaquiloside, a bracken constituent. *Vet. Rec.*, 115: 375-378 (1984)
- 3) Matoba, M., Saito, E., Saito, K., Koyama, K., Natori, S., Matusima, T. and Takimoto, M.: Assay of ptaquiloside, the carcinogenic principle of bracken, *pteridium aquilinum*, by mutagenicity testing in salmonella typhimurium. *Mutagenesis*, 2:419-423 (1987)
- 4) Niwa, H., Ojika, M., Wakamathu, K., Yamada, K., Hirono, I. and Mathushita, K.: Ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *pteridium aquilinum* var. *Jatiusculum*. *Tetrahedron Lett.*, 24:

- 4117-4120 (1983)
- 5) Niwa, H., Ojika, M., Wakamathu, K., Yamada, K., Ohda, S., Saito, Y., Hirono, I. and Mathushita, K. : Stereochemistry of ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. Tetrahedron Lett., 24:5371-5372 (1983)
 - 6) Pamukcu, A. M. : Epidemiological studies on urinary bladder tumours in Turkish cattle. Ann. N. Y. Acad. Sci., 108:938-947 (1963)
 - 7) Penberthy, J. : Vegetable poisoning simulating anthrax in cattle. J. Comp. Pathol. Therapeut., 6:266-275 (1893)
 - 8) Rosenberger, G. and Heeschen, W. : Adlerfarn (*Pteris aquilina*)-die Ursache des sogennate Stallrates der Ringer (*Haematuria vesicalis bovis chronica*). Deutsch Tierartzl Wochenschrift, 67:201-208 (1960)
 - 9) Saito, T., Kirihara, Y. and Ishii, K. : Isolation of an active glucoside in bracken fern, *pteridium aquilinum*. J. Toxicol. Sci., 9:253-262 (1984)
 - 10) Saito, T. and Mochizuki, D. : Isolation of two active glucosides, braxinA1 and A2, from rhizomes of bracken fern. J. Toxicol. Sci., 11:15-27 (1986)
 - 11) Saito, T., Takeno, K., Nakamura, S. and Uehara, M. : Acute poisoning with braxin A1, a bracken glucoside, in guinea pigs. Jpn. J. Vet. Sci., 49:181-183 (1987)
 - 12) Saito, T., Takeno, K., Kawata, J. and Urano, Y. : Isolation of toxic constituents from bracken rhizomes. In basic science in toxicology. 5th Int. Congr. Toxicology, Brighton, p.21. (1989)
 - 13) Storrar, D. M. : Cases of vegetable poisoning in cattle. J. Comp. Pathol., Therapeut., 6:276-279 (1893)
 - 14) Smith, B. L., Embling, P. P., Agnew, M. P., Lauren, D. R. and Holland, P. T. : Carcinogenicity of bracken fern (*pteridium esculentum*) in New Zealand. N. Z. vet. J., 36: 56-58 (1988)