

厚生労働科学研究研究費補助金  
食品の安全性高度化推進研究事業

貝毒の安全性確保に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書  
主任研究者 安元 健

平成17（2005）年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告		
貝毒の安全性確保に関する研究	-----	1
安元 健		
II. 分担研究報告		
1. 麻痺性貝毒の定量分析に関する基礎的研究		
大島 泰克	-----	12
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	21

## 貝毒の安全性確保に関する研究

主任研究者 安元 健 財団法人 日本食品分析センター 学術顧問

### 研究要旨

有毒プランクトンの発生により二枚貝に蓄積される貝毒は、毒成分の種類により麻痺性貝毒、下痢性貝毒、神経性貝毒、記憶喪失性貝毒、アザスピロ酸貝毒区分されている。これらの貝毒から消費者を保護するために、二枚貝の生産地では有毒プランクトンの発生や貝の毒化状況についてモニタリングが実施され、貝毒が一定の基準値を超えると出荷が停止される。しかし、貝毒の規制は国により異なるため、モニタリングの実施方法、出荷規制の基準値、毒の測定方法等について、世界的な見直しと統一化が望まれている。

近年、学会等で種々の試験方法が発表されているが、簡便で、精度が良く、かつバリデートされた方法によるデータが豊富に得られているとはいえない。また CODEX、WHO 等で貝毒に関する協議を行う際には、十分なデータが必要となる。

そこで、本研究では、国内外のデータ等の収集及びマウス法も視野に入れた適正な毒性評価を行うための分析方法の検討・開発を通じて、我が国における国民の安全を確保するための貝毒の規制方法や基準値の見直し等の施策立案に用いるデータ等を提供し、さらに国際的な規制の統一化に資することを目的とする。

貝毒分析法の開発と、その精度管理を行うには標準毒を必要とするが、大多数の毒は供給されていない。そこで、平成 16 年度は、国内で入手した毒化二枚貝やクロイソカイメンを原料として抽出・精製を行い、標準毒を自作した。まず、下痢性貝毒成分としては、ホタテガイからペクテノトキシン-1 (PTX1)を約 10 mg 及びペクテノトキシン-6 (PTX6)を約 3 mg、クロイソカイメンからオカダ酸(OA)を約 10 mg 及びジノフィシストキシン-1 (DTX1)を約 6 mg、培養液からイエツトキシン(YTX)を約 10 mg、ムラサキイガイから 450H-イエツトキシン(450H-YTX)を約 2 mg 作製した。

以上の結果、主要下痢性貝毒 6 成分の標準試料を作製した。なお、ペクテノトキシン-2 (PTX2)は市販品を購入した。また、現在ホタテガイから PTX2、ペクテノトキシン-3 (PTX3)及びパルミトイルジノフィシストキシン-1 (pal-DTX1)について、HPLC による精製を実施中である。

麻痺性貝毒では、正確な標準品が無く、かつ比毒性も測定されていないゴニオトキシン-6 (GTX6) を選び、定量的 NMR により濃度を決定する方法を検討し、ムラサキイガイ中腸線から 4 mg を精製した。

分析法の開発に関しては、下痢性貝毒分析に使用する液体クロマトグラフィー/質量分析装置 (LC/MS) を設置し、標準毒を用いて一斉分析法の検討を行った。カラム、溶離液の組成、溶出条件及びモニターイオンの種類等を選択することにより、どの物質も妨害ピーク等がなく測定できる条件を設定することができた。この結果から、本年度開発した方法は、短時間・高感度測定が可能な下痢性貝毒の一斉分析法であると判断された。

また、麻痺性貝毒分析における検液調製法の検討を行い、現在使用している SepPak C-18 より効果的なものは無いことを確認した。さらに蛍光 HPLC 分析法におけるゴニオトキシン (GTX) 群とサキシトキシン (STX) 群の一斉分析法について検討し、ODS 系カラムを使い、移動相のアセトニトリル濃度を変化させることによって、再平衡化時間も含め 50 分で分析できる条件の設定に成功した。

マウス試験法については、麻痺性貝毒の抽出液調製の問題点を系統的に調査した。すなわち、大船渡産ホタテガイをモデルとして抽出過程における pH、温度、加熱時間の影響を調査した結果、ホモジェネートの pH が高いと主成分 GTX1~GTX4 が減少する傾向が認められたが、現行の指定条件を守ればほぼ安定であることが明らかとなった。

毒性学的データとしては、単離した GTX6 をモデルにして溶液のマウス毒性試験を実施し、現在世界標準となっているアメリカ FDA の標準サキシトキシン (2 塩酸塩) との相対的な腹腔内投与毒性を決定した。すなわち、軽水中で測定する外部標準法と重水-重酢酸溶液の未置換酢酸メチルプロトンを基準とする内部標準法の NMR パルスシーケンスを設定し、カフェインを基準に濃度を測定したところ、前者が約 10 % 高い値を与えた。GTX6 の比毒性は 180 MU/ $\mu$ mole、35  $\mu$ g STX eq./ $\mu$ mole であった。

分担研究者 大島 泰克 東北大学大学院 生命科学研究科 教授
--------------------------------------

## A. 研究目的

本研究の第一の目的は、申請者らがこれまでに培った技術と能力を生かして、標準毒と高精度分析法を開発し、国産二枚貝の正確な貝毒監視を可能にすることである。また、二枚貝製品の輸出の際に検査を要求されることの多い、神経性貝毒とアザスピロ酸貝毒(AZP)についても、両毒の代表的成分の標準品を作成し、LC/MSによる検査を可能にする。

## B. 研究方法

### (1) 諸種貝毒の物理化学的性状と毒性、及び諸外国の規制状況に関する資料蒐集(平成16~17年度)

二枚貝の貝毒成分及びその毒性データの調査、貝毒規制の実態調査、並びに試験方法及び規制の根拠となる文献の調査を行う。

### (2) マウス法の改良(平成16~17年度)

麻痺性貝毒について、基準となるAOAC法は50年以上前にサキシトキシン(STX)を対象に設定されたが、現在は毒性の異なる30近い同族体の存在が判明している。これらの同族体は抽出過程における安定性が異なり、また、二枚貝成分の影響を受けて容易に他成分に変換されるため、現行の操作法では適正に毒性が評価されているとは言い難い。本研究では各操作過程におけるpH、温度、加熱時間等の二枚貝中の毒成分に及ぼす影響を体系的なモデル実験で明らかにし、より精度の高い試験法とするための基礎データを収集する。

### (3) LC/MSによる有機溶媒可溶毒の一斉分析法確立(平成16~18年度)

研究者(安元 健他)が開発したLC/MS法による下痢性貝毒の分析法は、成分の特性に応じて複数条件下で測定を行うため、前処理方法が煩雑となっている。そこで本研究では、この方法を改良し、多成分の同時分析法の検討を行う。

また、アザスピロ酸貝毒同族体について、LC/MS法による一斉分析法の可能性について検討を行う。

### (4) 麻痺性貝毒分析におけるHPLC法の実用性の検証(平成17~18年度)

研究者(大島泰克他)が提案した蛍光HPLC法は多くの研究機関で使用されている。これを一般の安全性試験法として使用するには、分析時間の短縮等の改良が望ま

れる。開発当時に比べ各種分析カラムには技術的改良がなされている。本研究ではこれらの新しいカラムの麻痺性貝毒分析への適用性を探り、試料調製法と合わせて蛍光HPLC法の改良を図る。

### (5) マウス試験及び機器分析法の検証に必要な標準毒の調製(平成16~18年度)

マウス法における個々の物質の毒性を適正に評価するため及びマウス法に替わる高精度・高特異的分析法の開発に必要な標準毒の調製を行う。

### (6) 毒性学的データの収集(平成16~18年度)

貝毒の規制方法や基準値の見直し及びHPLC法等新しい分析法を導入するためには個々の成分の持つ毒性を正確に把握しておく必要がある。

麻痺性貝毒は、分担研究者(大島泰克他)が数年前に当時唯一適用可能な方法であった元素分析を基準にして主要貝毒成分の比毒性を測定した。この数値は未だに世界中で使用されているが、最新の方法を使って再検討する必要がある。このため、本研究では、定量的NMRでモル濃度を決定した溶液についてマウス毒性試験を実施し、現在世界標準となっているアメリカFDAの標準サキシトキシン(2塩酸塩)との相対的な腹腔内投与毒性を決定する。

## 倫理面への配慮

本研究は臨床研究や疫学研究等には該当しないため、倫理面の問題はないと判断した。また、マウス法の代替法を検討することから、実験動物に対する動物愛護を配慮した研究内容と考えられる。

ただし、本研究に使用するマウスの数は、最小量に止めることとする。なお、貝毒含有試料の採取場所等が特定される場合は風評被害による影響を受けないよう、都道府県名のみ記すこととする。

## C. 研究結果

### [文献及び情報の収集(平成16~17年度)]

2004年9月にFAO、WHO、及びIOC(UNESCO政府間海洋学委員会)の3国際機関は合同で、二枚貝の毒に関する「毒性評価」、「試験法」、「有毒プランクトン監視法」の3項目について専門家を招集し、その意見を聴取して統一の見解をまとめ、CODEXに答申する作業を行った。

主任及び分担研究者は、毒性評価及び試験法の2部会に専門家として参加し、今後の研究の方向を定めるのに十分な、文献と情報の収集を行った。

なお、入手した資料等は非公開とされているため、本報告書には添付できないが、主任研究者が保管している。

#### [標準毒作成 (平成16~18年度)]

貝毒分析法の開発と、その精度管理を行うには標準毒を必要とするが、大多数の毒は供給されていない。

そこで、国内で入手した毒化二枚貝やクロイソカイメン等を原料として抽出・精製を行い、標準毒を自作した。まず、下痢性貝毒成分としては、ホタテガイからペクテノトキシン-1 (PTX1) を約10 mg 及びペクテノトキシン-6 (PTX6) を約3 mg (図1)、クロイソカイメンからオカダ酸 (OA) を約10 mg 及びジノフィシストキシン-1 (DTX1) を約6 mg (図2)、培養液からイエツトキシン (YTX) を約10 mg (図3)、ムラサキイガイから450H-イエツトキシン (450H-YTX) を約2 mg 作製した (図1)。

なお、ペクテノトキシン-2 (PTX2) は市販品を購入した。また、現在ホタテガイからPTX2 及びペクテノトキシン-3 (PTX3) について、HPLC による精製を実施中である。また、パルミトイルジノフィシストキシン-1 (pal-DTX1) 及びパルミトイルオカダ酸 (pal-OA) については、それぞれジノフィシストキシン-1 及びオカダ酸から合成する予定である。

以上の結果、国内で出現する下痢性貝毒主要10成分の標準品が得られることになる。

作製した標準毒の確認及び純度検定はNMR、LC/MS、HPLC によって行い、全て95%以上の純度であることを確認した。

一例として、オカダ酸精製品の<sup>1</sup>H NMR スペクトルを図4に、またLC/MS のスペクトル及びHPLC のクロマトグラムを図5及び図6に示した。

一方、一般に麻痺性貝毒各成分は微量にしか得られず、吸湿性が高く不安定なため、定量が困難である。また、安全性評価に必要な各成分の比毒性についても、より精度の高い最新の方法を使って再検討する必要がある。

そこで、正確な標準品が無く、かつ比毒性も測定されていないゴニオトキシン-6 (GTX6) を選び、定量的NMR により濃度を決定する方法を検討し、大分県産ムラサキイガイ中腸線から4 mg 精製した。

#### [分析法開発 (平成16~18年度)]

##### 1. LC/MS 法による下痢性貝毒分析法の開発

下痢性貝毒分析に使用する液体クロマトグラフィー/質量分析装置 (LC/MS) を設置し、標準毒を用いてLC/MS による一斉分析法の検討を行った。なお、今回精製が終了していないPTX2、pal-DTX1 については消費安全局の事業で配付された標準品を使用した。また、PTX3、pal-OA については溶出時間を確認するために以前主任研究者が構造決定に用いた精製品を少量使用した。

この結果、図7に示したようにどの標準品もきれいなピーク形状であった。なお、若干いくつか溶出位置に近いものもあるが、選択しているモニターイオンが異なっているため問題ないと判断した。

実際にホタテガイ・ムラサキイガイそれぞれの中腸腺1g に標準品の添加を行い、LC/MS にて回収率を求めた結果を、表1及び2に示した。

その結果、ムラサキイガイの1例を除き、ホタテガイ、ムラサキイガイともに80%以上の良好な回収率を得ることが出来た。

また、LC/MS のスペクトルを図8及び9に示した。どの物質も妨害ピーク等がなく測定できていた。しかし、他にも夾雑ピークが多く検出されるため、同定・定量には標準品が必須となる。

LC/MS 法による検出限界値は中腸腺1g あたりで0.1 µg であった。OA、PTX 群に対するEU 基準値が可食部1g あたりで0.16 µg であるため、可食部あたりに換算した場合でも十分に基準値相当が測定可能であった。

YTX の基準値は可食部1g あたり1 µg であるため測定には全く問題はない。

この結果から、短時間・高感度測定が可能な下痢性貝毒の一斉分析法の条件を設定することに成功した。

##### 2. 麻痺性貝毒分析における HPLC 法の実用性の検証 (平成17~18年度)

###### 1) 検液調製法の検討

HPLC 分析で GTX4 付近に溶出する妨害物質の除去法として、種々の最新カートリッジカラム数種について検討したが、現在使用している SepPak C-18 より効果的なものは無かった。

###### 2) 蛍光 HPLC 分析法の改良

現在の方法は多数存在するサキシトキシン (STX) 同属体を電荷により3群に分けて別々に分析している。より簡便化をはか

るために今年度はゴニオトキシン(GTX)群とサキシトキシン(STX)群の一斉分析法について検討した。

その結果、ODS系カラムを使い、移動相のアセトニトリル濃度を変化させることによって、再平衡化時間も含め50分で分析できる条件の設定に成功した。

#### [マウス法の改良(平成16~17年度)]

麻痺性貝毒のマウス試験法用抽出液調製の問題点を系統的に調査した。現在、化学分析用の毒の抽出にはマウス毒性試験(AOAC法)がそのまま用いられている。この方法は saxitoxin を基準に設定されたもので、その後発見された gonyautoxin(GTX)等他の成分の分析に適しているかどうかは検討されていない。

そこで大船渡産ホタテガイをモデルとして抽出過程における pH、温度、加熱時間の影響を調査した。

その結果、ホモジェネートの pH が高いと主成分 GTX1~GTX4 が減少する傾向が認められたが、現行の指定条件を守ればほぼ安定であることを明らかにした。

#### [毒性学的データの収集(平成16~18年度)]

単離した GTX6 をモデルにして溶液のマウス毒性試験を実施し、現在世界標準となっているアメリカ FDA の標準サキシトキシン(2塩酸塩)との相対的な腹腔内投与毒性を決定した。

すなわち、軽水中で測定する外部標準法と重水-重酢酸溶液の未置換酢酸メチルプロトン基準とする内部標準法の NMR パルスシーケンスを設定し、カフェインを基準に濃度を測定したところ、前者が約10%高い値を与えた。GTX6 の比毒性は 180 MU/ $\mu$ mole、35  $\mu$ g STX eq./ $\mu$ mole であった。

#### D. 考察

二枚貝毒の研究の進展につれて貝中には多様な毒が蓄積し、これらの毒は化学構造のみならずリスクの面でも大きく異なることが明らかとなった。代表的な例として、わが国で多発する下痢性貝毒がある。下痢原性のあるジノフィシストキシン類に加えて、ペクテノトキシン(PTX)やイエツソトキシン(YTX)が共存することが多いので、これらは一括して下痢性貝毒に分類されてきた。

専門家会議は、ジノフィシストキシン類の許容値を引き下げる一方で、PTXやYTXについては最新のリスク評価に基づいて、規制を

大幅に緩和することを勧告している。しかし、現行のマウス試験法の感度と特異性では、これらの勧告に対応できない。

一方、LC/MS法は精度と感度に優れてはいるものの、入手可能な標準毒の種類が少ないために測定可能な成分が限定されている。そのために、従来報告されたLC/MS法は簡易検出法とみなされ、行政処置の執行に必要なデータを得るには不十分であると判断されている。

高精度分析に必要な標準毒の作成は決して容易ではない。わが国の代表的貝毒である下痢性貝毒の場合、100kgの毒化二枚貝を得たとしても、むき身の量は30kgであり、そこから得られるジノフィシストキシンは、主成分でも2~3mgに過ぎない。副成分や神経性貝毒、アザスピロ酸貝毒、麻痺性貝毒の一部では更に困難が多く、研究者らを除いては調製に成功していない。

従って、次年度以降下記の内容について研究を継続することが必須と考えられる。

#### 1. 下痢性貝毒標準品の調製

前年度の研究で、ジノフィシストキシン-1とオカダ酸を6~10mg調製したので、LC/MS実験の開始には支障がない。しかし、研究の遂行には追加試料の調製を必要とする。近年の下痢性貝毒による毒化は微弱であるので、二枚貝を抽出試料に用いて標準毒を調製するのは困難である。そこで、オカダ酸とジノフィシストキシン-1の両成分を含有するクロイソカイメンを原料として両毒を調製し、さらにそれらを用いてパルミトイルジノフィシストキシン-1(pal-DTX1)及び相当するオカダ酸エステルを化学合成する。クロイソカイメンの採集適地を発見する必要がある。

#### 2. イエツソトキシン標準品の調製

イエツソトキシン類縁体について二枚貝(主としてホタテガイ)中の濃度が上昇すれば、抽出試料に用いる。濃度上昇がなければ、毒生産性渦鞭毛藻を培養できる専門家に依頼して培養藻体から抽出する。

#### 3. ペクテノトキシン標準品の調製

毒化ホタテガイの中腸腺を抽出する以外に供給の道がなく、貝の毒化状況に左右されるところが大きい。ペクテノトキシン-1(PTX1)と6(PTX6)は調製済みなので、試料が入手できればペクテノトキシン-3(PTX3)を調製する。

#### 4. 神経性貝毒とアザスピロ酸貝毒の標準品

上記貝毒の発生したニュージーランドとアイルランドから供与された少量の試料を抽出して、標準毒を調製する。

#### 5. LC/MS の条件設定

上記標準毒を使用して LC/MS の条件設定を行う。既に 2000 年に発表した個別分析の条件を改め、傾斜溶出法による一斉分析の可能性を追求する。

#### 6. 麻痺性貝毒標準品の調製

新たに主要毒を精製し、標準の調製と比毒性の再検討を行う。

#### 7. 麻痺性貝毒の蛍光 HPLC 分析法の改良

麻痺性貝毒の蛍光 HPLC 分析法の改良、特に分析時間短縮をはかり、C 毒群を含めた一斉分析法の開発を目指す。

#### 8. マウス法の改良及び毒性学的データの収集

平成 16 年度に実施した GTX1~GTX4 を主成分とするホタテガイに引き続き、C1、C2 等を主成分とする西日本の毒化試料を用い、各操作過程の pH、温度、加熱時間等の影響を系統的に調査する。

また、本年度の研究で基本的な測定条件が設定でき、定量 NMR を使えば微量でも定量可能なことを示せたので、今後パラメーターの細部の修正をはかるとともに基準化合物を変えて内部標準法と外部標準法の整合性をはかる。

さらに、他の成分についても比毒性の再検討を開始する。

### E. 結論

#### [文献及び情報の収集]

研究者は、2004 年 9 月に開催された FAO、WHO、及び IOC (UNESCO 政府間海洋学委員会) の 3 国際機関の合同会議に毒性評価及び試験法の 2 部会に専門家として参加し、今後の研究の方向を定めるのに十分な、文献と情報の収集を行った。

#### [標準毒作成]

貝毒分析法の開発と、その精度管理を行うために必要な標準毒として、下痢性貝毒成分のオカダ酸 (OA)、ジノフィシストキシン-1 (DTX1)、イエツトキシン (YTX)、450H-イエツトキシン (450H-YTX)、ペクテノトキシン-1 (PTX1) 及びペクテノトキシン-6 (PTX6) の主要下痢性貝毒 6 成分について、全て 95 %以上の純度を有する標準試料を作製

した。

麻痺性貝毒のゴニオトキシン-6 (GTX6) を精製し、新しい濃度決定法を開発した。

#### [分析法開発 (平成 16~18 年度)]

下痢性貝毒分析に使用する液体クロマトグラフィー/質量分析装置 (LC/MS) を設置し、標準毒を用いて LC/MS による一斉分析可能な条件を設定した。

また、麻痺性貝毒分析における検液調製法の検討を行い、現在使用している SepPak C-18 より効果的なものは無いことを確認した。さらに蛍光 HPLC 分析法における GTX 群と STX 群の一斉分析法について検討し、ODS 系カラムを使い、移動相のアセトニトリル濃度を変化させることによって、再平衡化時間も含まれ 50 分で分析できる条件の設定に成功した。

#### [マウス法の改良]

マウス試験法については、麻痺性貝毒の抽出液調製の問題点を系統的に調査した結果、ホモジェネートの pH が高いと主成分 GTX1~GTX4 が減少する傾向が認められたが、現行の指定条件を守ればほぼ安定であることを確認した。

#### [毒性学的データの収集]

単離したゴニオトキシン-6 (GTX6) をモデルにして溶液のマウス毒性試験を実施し、これまで正確な数値の無かった比毒性を決定した。

### F. 健康危険情報

健康危険情報について、該当事項はない。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

該当事項なし。

#### 2. 学会発表

平成 17 年度日本水産学会大会口頭発表

下痢性貝毒及びその他貝毒の LC/MS 測定用標準品作製

### H. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定はない。



ホタテガイ中腸腺：青森県産（40kg）、ムラサキイガイ中腸腺：ノルウェー産（20kg）  
 |  
 アセトン 3倍量、メタノール 3倍量 抽出  
 |  
 液々分配（ホタテガイ；ヘキサン分配、ジクロロメタン分配、  
 | ムラサキイガイ；ヘキサン分配、酢酸エチル分配、ブタノール分配）  
 塩基性アルミナカラムクロマトグラフィー  
 |  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - MeOH (1:1)画分 (PTX1、2、3)  
 | 1 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  - MeOH (1:1)画分 (PTX6、450H-YTX)  
 シリカゲルカラムクロマトグラフィー  
 | アセトン 画分 (PTX1、3)、アセトン/ヘキサン 1:1 画分 (PTX2)  
 |  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - MeOH 8:2 画分 (PTX6、450H-YTX)  
 球状ODS中圧カラムクロマトグラフィー  
 | 70 % メタノール画分  
 分取HPLC カラムクロマトグラフィー（繰り返し実施）  
 移動相：・65% アセトニトリル、70%メタノール (PTX1、2、3、6)  
 ・メタノール：アセトニトリル：酢酸アンモニウム (450H-YTX)

図1 ホタテガイ・ムラサキイガイからの標準品作製フロー

クロイソカイメン：愛知県産（20kg）  
 |  
 アセトン 3倍量、メタノール 3倍量 抽出  
 |  
 液々分配（ヘキサン分配、ジクロロメタン分配）  
 |  
 塩基性アルミナカラムクロマトグラフィー  
 | 1 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  - MeOH (1:1) 画分  
 シリカゲルカラムクロマトグラフィー  
 | クロロホルム/メタノール 95:5 画分  
 球状ODS中圧カラムクロマトグラフィー  
 | 85 % メタノール画分  
 分取HPLC カラムクロマトグラフィー（繰り返し実施）  
 移動相：0.05% 酢酸含有 65% アセトニトリル  
 → 溶出位置によってOAとDTX1を分離

図2 クロイソカイメンからの標準品作製フロー

Protoceratium reticulatum の培養液 40L (北里大 小池提供)  
|  
Sep Pak C18 Vac 3 cc (2連) ; 60 % プロパノール 溶出  
|  
シリカゲルカラムクロマトグラフィー  
| クロロホルム/メタノール 1:1 画分  
球状ODS中圧カラムクロマトグラフィー  
| 70 % メタノール画分  
分取HPLC カラムクロマトグラフィー  
| ; メタノール:アセトニトリル:酢酸アンモニウム  
Sep Pak C18による脱塩後再クロマトグラフィー

図3 培養液からの標準品作製フロー

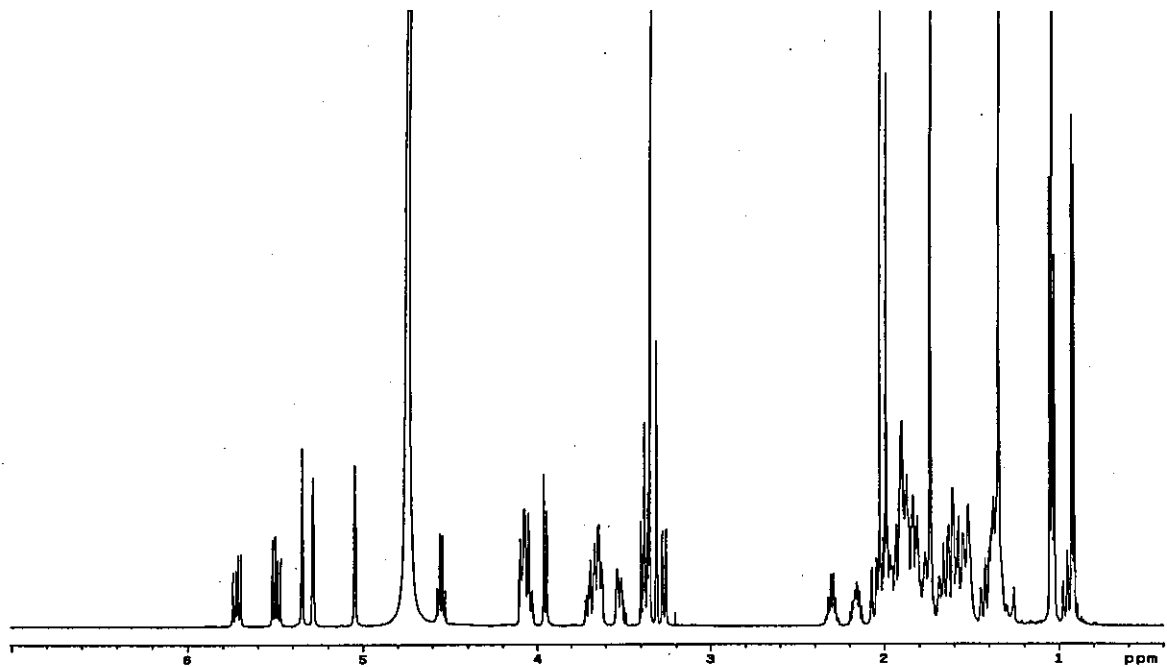


図4 オカダ酸精製品の水素核一次元核磁気共鳴スペクトル

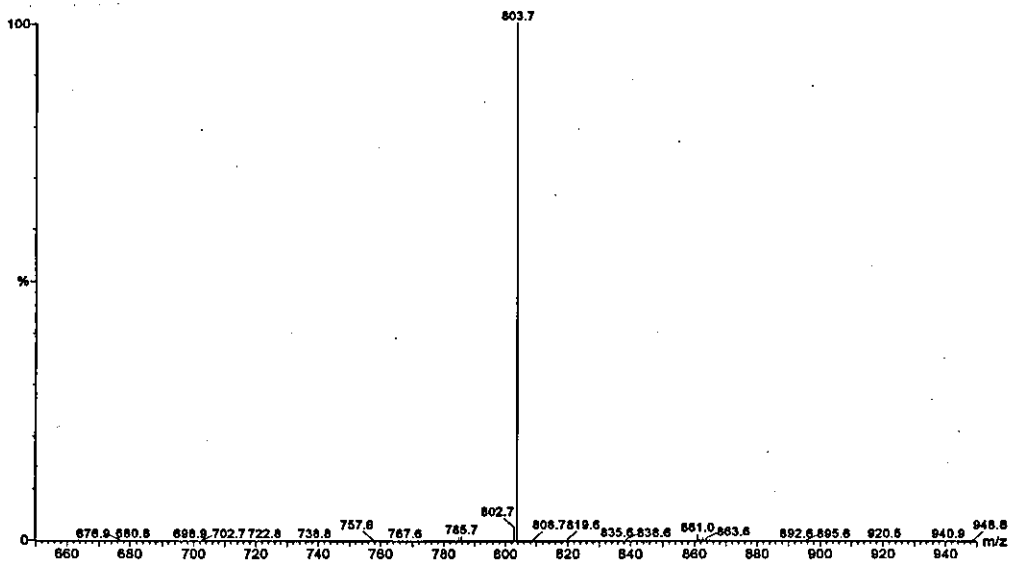


図5 オカダ酸精製品のLC/MSスペクトル

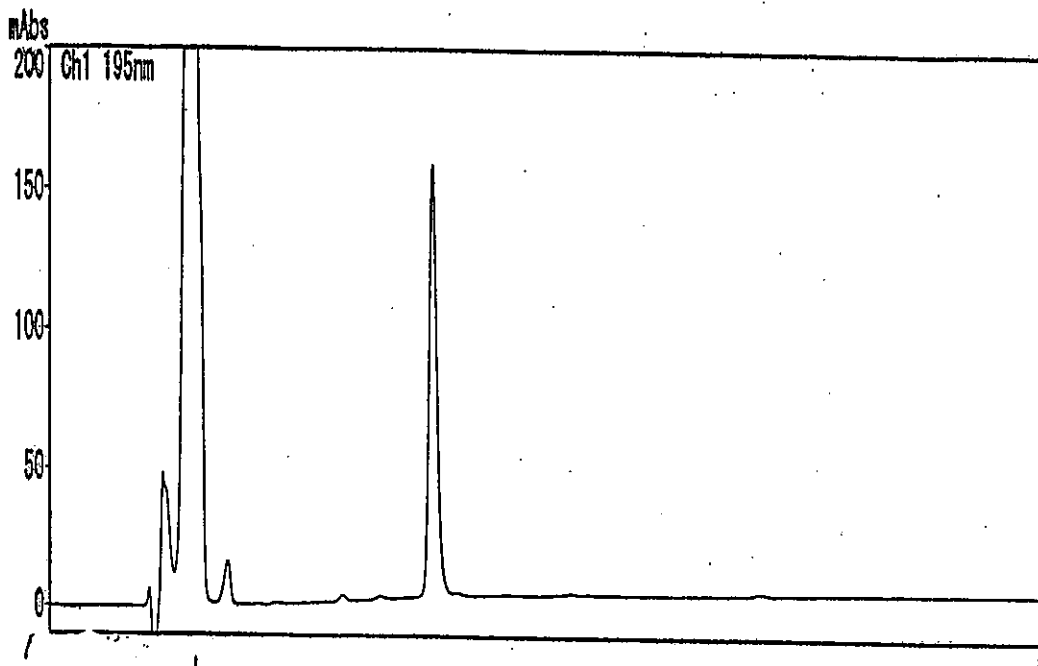


図6 オカダ酸精製品のHPLCクロマトグラム

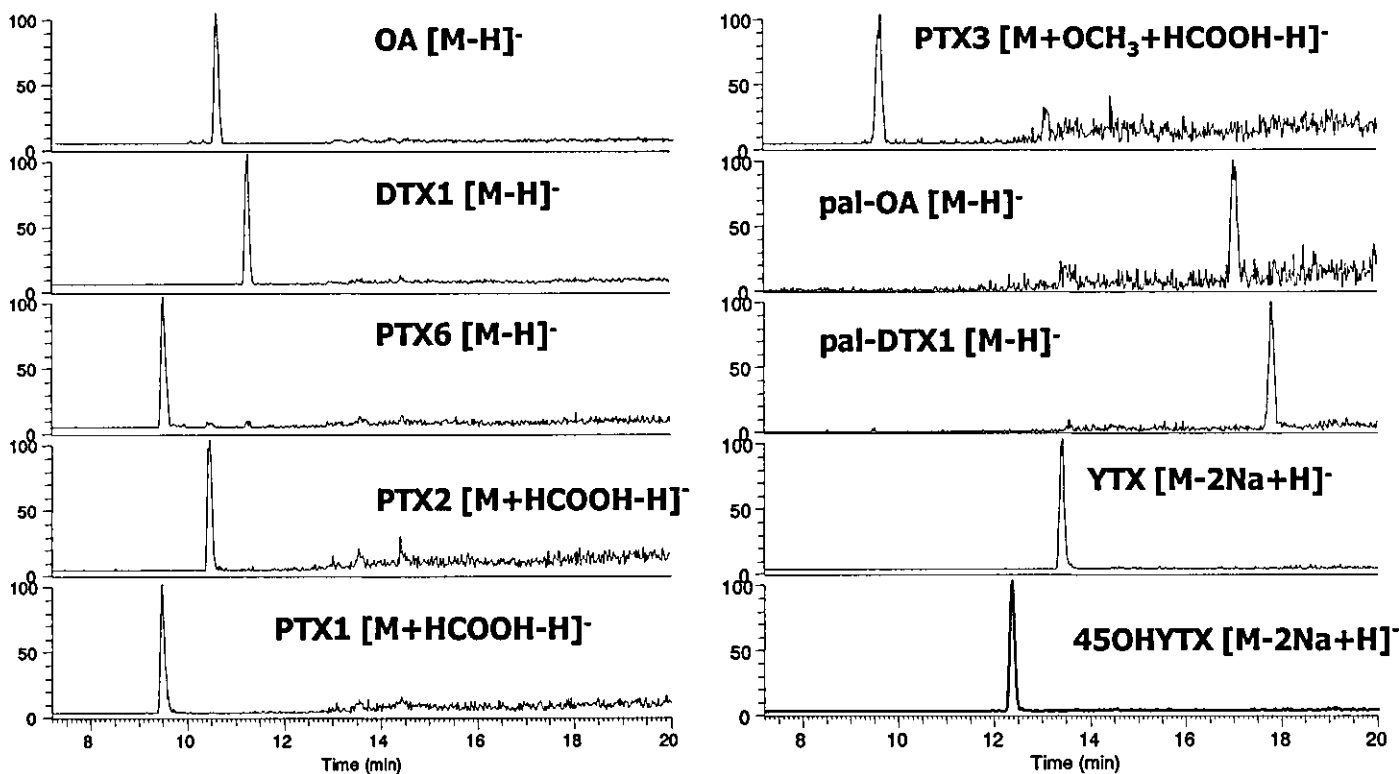


図7 各標準品のLC/MSスペクトル

表1 ホタテガイ中腸腺を用いた添加回収試験結果

毒名	OA	DTX1	pal-DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX	45OH-YTX
平均値(%)	98.5	87.8	90.5	99.1	99.3	86.7	88.6	84.7

ホタテガイ中腸腺に各 1 μg/g 相当添加、試行回数：2

表2 ムラサキイガイ中腸腺を用いた添加回収試験結果

毒名	OA	DTX1	pal-DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX	45OH-YTX
平均値(%)	91.3	95.3	94.4	90.2	77.4	87.1	87.6	103.6

ムラサキイガイ中腸腺に各 1 μg/g 相当添加、試行回数：2

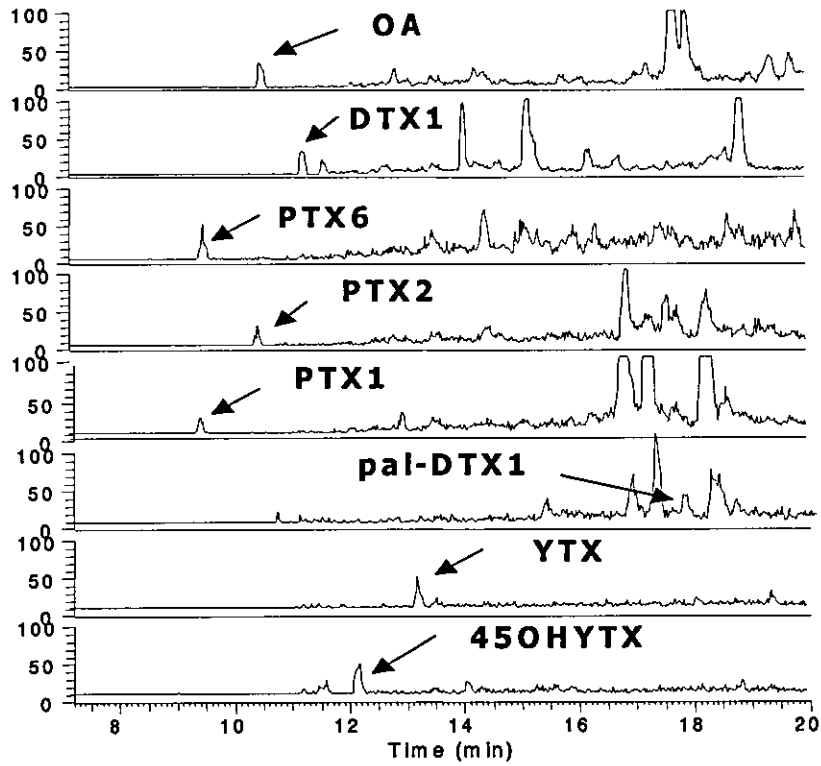


図8 ホタテガイ中腸腺を用いた添加回収試験  
のLC/MSスペクトル (ホタテガイ中腸腺 1 $\mu$ g/g 相当添加)

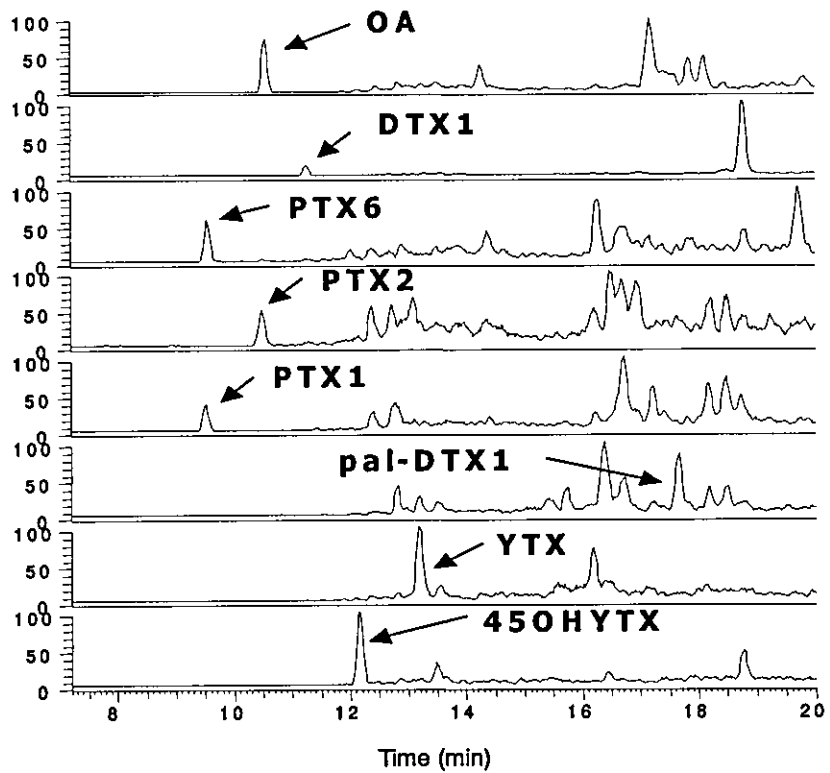


図9 ムラサキイガイ中腸腺を用いた添加回収試験  
のLC/MSスペクトル (ムラサキイガイ中腸腺 1 $\mu$ g/g 相当添加)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
分担研究報告書

麻痺性貝毒の定量分析に関する基礎的研究

分担研究者 大島泰克 東北大学大学院生命科学研究科 教授

研究要旨：化学分析用のマウス毒性試験（AOAC 法）を準用した現行の毒の抽出方法は saxitoxin(STX) を基準に設定されており、その後発見された gonyautoxin(GTX) 等他の成分の分析に適しているかどうかは検討されていない。そこで大船渡産ホタテガイをモデルとして抽出過程における pH、温度、加熱時間の影響を調査した。その結果、ホモジェネートの pH が高いと主成分 GTX1～GTX4 が減少する傾向が認められたが、現行の指定条件を守ればほぼ安定であることを明らかにした。また、HPLC 分析で GTX4 付近に溶出する妨害物質の除去法として、種々の最新カートリッジカラム数種について検討したが、現在使用している SepPak C-18 より効果的なものは無かった。

現在の蛍光 HPLC 分析法は多数存在する STX 同属体を電荷により 3 群に分けて別々に分析する必要があるため、より簡便化をはかるために GTX 群と STX 群の一斉分析法について検討した。その結果、ODS 系カラムを使い、移動相のアセトニトリル濃度を変化させることによって、再平衡化時間も含め 50 分で分析できる条件の設定に成功した。

また、化学分析法の導入に不可欠な標準品溶液の作製のための基盤技術開発を行った。微量にしか得られず、吸湿性が高く不安定であるため秤量が難しい麻痺性貝毒に適した定量的 NMR 法の検討を行った。対象として正確な標準品が無く、かつ比毒性も測定されていない GTX6 を選んだ。大分県産ムラサキガイ中腸線から GTX6 は 4 mg 精製した。軽水中で測定する外部標準法と重水-重酢酸溶液の未置換酢酸メチルプロトン基準とする内部標準法の NMR パルスシーケンスを設定し、カフェインを基準に濃度を測定したところ前者が約 10 %高い値を与えた。GTX6 の比毒性は 180 MU/ $\mu$ mole, 35  $\mu$ g STX eq./ $\mu$ mole であった。

- A. 研究目的  
麻痺性貝毒について標準毒の作出法から蛍光 HPLC 分析法を改良して、その実用検証を行うことを目的とする。本年度は以下の 3 項目について基礎データを収集することとした。

### 1) 検液調製法の検討

麻痺性貝毒分析のための抽出はマウス毒性試験と同じ方法が採られている。しかし、この AOAC 法は 50 年以上前に saxitoxin を対象に設定されたもので、現在までに存在が判明している 30 近い同族体に対して適用可能であるかの検討はなされていない。本研究では各操作過程における pH, 温度, 加熱時間等の二枚貝中の毒成分に及ぼす影響を体系的なモデル実験で明らかにし、より精度の高い試験法とするための基礎データを収集する。本年度は国内の二枚貝で最も含量の高い GTX1~GTX4 について検討した。

また、蛍光 HPLC 分析前には妨害物質の除去のため予備精製が必要である。新素材を含め、効率的な予備精製法をあわせて検討する。

### 2) 蛍光 HPLC 法の改良

我々が提案した蛍光 HPLC 法は多くの研究機関で使用されている。分解能を重視して設定した現在の分析法は多数存在する STX 同属体を電荷により 3 群に分けて別々に分析する必要がある。これを安全性試験法として汎用化するには、分析時間の短縮等の改良が必須である。開発当時に比べ各種分析カラムの技術的改良が進んでいるので、これを利用し、一斉分析法を目指す。本年度は GTX 群と STX 群の一斉分析法について検討した。

### 3) 定量 NMR を用いる標準溶液濃度決定法の検討

蛍光 HPLC 法をはじめ、麻痺性貝毒の化学分析には多数存在する全成分の標準品

をそろえることが不可欠であるが、一般に微量にしか得られず、吸湿性が高く不安定なため、秤量、濃度の決定が困難である。

また、安全性評価に必要な毒性については 10 年以上前に元素分析を基準に標定した主要成分の比毒性が未だに世界中で使用されており、より精度の高い最新の方法を使って再検討する必要がある。本年度は定量的 NMR により濃度を決定する方法を開発し、溶液のマウス毒性試験を実施して標準サキシトキシンとの相対的な腹腔内投与毒性を決定することを目的とした。検討の対象として、近年 *Gymnodinium catenatum* の発生に伴い国内の貝中にも多く検出されるにも関わらず、正確な標準品が無く、かつ比毒性も測定されていない GTX6 を選んだ。

## B. 研究方法

### 1) 検液調製法の検討

規制値の 1.5 倍をめぐりに大船渡産ホタテガイの均一磨砕物を調製した。試料 10 g に対し 10 mL の 0.075, 0.10, 0.20, 0.30 N の塩酸 10 mL を加え、沸騰湯浴で 5 分間加熱した。氷冷後 3000 rpm で遠心分離し、上澄み液の pH を測定するとともに、SepPak ODS, 限外濾過による予備精製を行った後、蛍光 HPLC で GTX 含量を測定した。分析は 3 連で行った。

予備精製法の検討にも大船渡産ホタテガイ抽出液を用いた。遠心分離(11,000rpm, 5 min.) 後、各種固層抽出用カートリッジカラムに供した。固層抽出用カラムとして現行の SepPak C18 (Waters 社)に加え、Oasis HLB Plus (Waters 社)、Bond Elut

PH(3 mL/200 mg、VARIAN 社)、NEXUS(6 mL/200mg、VARIAN 社)を試みた。なお、Oasis HLB Plus および Bond Elut については MeOH で conditioning した場合と未処理の両方を試みた。カラムからの溶出液を約 0.4 mL ずつ分注し、Ultra-Free (Millipore 社、10,000 cut) で限外ろ過後 HPLC 分析に供した。精製の評価として、GTX4 近傍に溶出する未知の蛍光物質 UK の除去率を指標とした。

## 2) 蛍光 HPLC 法の改良

C18 の結合、エンドキャッピング様式の異なる ODS 系のカラム 4 種について、現行の GTX 用溶出液とそれに各種濃度でアセトニトリルを添加した溶出液による GTX 群および STX 群の分離状況について標準液を用いて調査した。使用したカラムは Develosil ODS-MG5 (野村化学株式会社、愛知県瀬戸市、日本)、CAPCELL PAK C18 MG (資生堂ファインケミカル事業部、東京都港区、日本)、Synergi Hydor-RP (Phenomenex、California、U.S.A)、Mightysil RP-18 GP Aqua (関東化学株式会社、東京都中央区、日本) である。分離の良い条件を組み合わせ、かつ、再平衡に要する時間を調査することにより、グラジエント溶出による一斉分析法条件を設定した。

新条件を使って毒組成の異なるムラサキイガイ 30 検体、アサリ 10 検体、カキ 6 検体、ヒオウギ 1 検体の分析を実施し、旧法による結果と比較した。

## 3) 定量 NMR を用いる標準溶液濃度決定法の検討

宮崎県猪串湾産ムラサキイガイ中腸腺から希塩酸で毒を抽出し、HPLC を指標に各種中圧カラム (Charcoal column、Bio Gel P-2、DEAE、Bio Rex 70、Hitachi Gel 3011C) によって GTX6 及び比較のための GTX5 を精製した。最終精製後、両毒の一定溶液を作成し、2 種類の定量的 NMR 測定で濃度を求めた。また、標準化したマウス毒性試験を行って GTX6 及び GTX5 の比毒性を求めた。

## C. 研究結果

### 1) 検液調製法の検討

GTX1~GTX4 の各 pH における抽出効率を図 1 に示す。添加した塩酸の濃度により pH は 2.5 ~ 4.8 の範囲であったが、抽出されてくる各毒の量に差は認められなかった。高 pH では二枚貝成分により N-OH の還元や 11 位硫酸エステル脱離が起こることが懸念されたが、指定されている pH 4 以下の条件を守れば問題がないことが明らかとなった。

ホタテガイ等二枚貝は未知の蛍光物質を含むことがあり、ポストカラム蛍光化分析を妨害することがある。このため、カートリッジカラムによる除去を行っているが、完全には取り除けないことがある。そこで最新のカラムについて検討した。図 2 にカートリッジカラムの効果を調べた代表例を示す。毒はカラムの膨潤に要するメタノール (conditioning) を除去するために使った水が残っているために溶出初期は希釈されて溶出する。不純物 UK はカラムにある程度保持されるものの徐々に溶出してくる。希釈されなくなり、かつ、不純物の溶出が始まる前の画分が得られる



ことが理想的であるが、残念ながらこのような画分は得られていない。なお、conditioning 不要とされる NEXUS では不純物 UK はまったく保持されず、毒に混ざって溶出してきた。

## 2) 蛍光 HPLC 法の改良

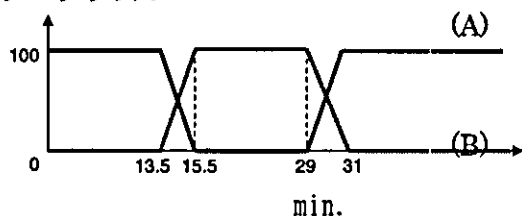
検討したカラムでのアセトニトリルを含まないものと 2% 含む溶出溶媒による GTX2 (GTX 群でもっとも保持時間が長い) の溶出位置を図 3 に示す。最も保持力の強いものは Develosil ODS-MG5 であった。CAPCELL PAK C18 MG はピーク形状のブロードニングが目立った。そこで、Develosil ODS-MG5 を用いることにし、溶出溶媒を種々検討した結果、以下の条件で標品 8 種 (GTX1~GTX5, neoSTX, dcSTX, STX) を 35 分以内に分離することができた (図 4)。

移動相:

(A) 4 mM HSA in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) + 2 % CH<sub>3</sub>CN

(B) 4 mM HSA in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) + 10 % CH<sub>3</sub>CN

プログラム:



次に再平衡化に要する時間を調べたところ、30 分以上移動相を流す必要があることがわかった。しかし、連続運転では 20 分の再平衡化時間でも、十分に再現性のある保持時間と分離が得られることが判明したので、これを用いることとした。

一斉分析法と現行の方法で測定した結果を比較すると両者には高い相関が認められた。例として GTX3/2 の濃度比較を図 5 に示す。最もよい GTX2 で R 二乗値 0.9712 だった。新分析法の方がわずかに定量値は高くなっていたが、再平衡化により、現行のイソクラティック溶出でポストカラム反応を妨害する物質が取り除かれたからだと思われる。

## 3) 定量 NMR を用いる標準溶液濃度決定法の検討

試料 1 kg から約 4.5 mg の GTX6 と 2.5 mg の GTX5 を得た。GTX6 には HPLC で 0.28 % の GTX5 を含んでいたが、他成分は HPLC の検出限界未満であった。

構造解析、純度検定等に用いる <sup>1</sup>H NMR には重水溶媒が使われる。麻痺性貝毒の場合毒を安定に保つために重水素置換した酢酸を加える。われわれは経験的に 4% 重酢酸を用いているが、この際、酢酸メチル基の未置換プロトンが軽酢酸のメチルとは分かれて観測される。このシグナルを内部標準とすれば、貴重な試料を汚染することなく濃度が決定できると判断し、諸条件を検討した (内部標準法)。通常の NMR 測定ではプロトンの電磁的環境により緩和時間が異なるため、シグナルの面積 (積分値) が微妙に異なってくる。そこで、L-アルギニンを使って測定パラメーターを決定し、かつ、濃度による定量性を検討した。図 6 に待ち時間による各プロトンの積分値の差を示す。9 秒以上の待ち時間を設ければ緩和時間による面積の差がなくなることから待ち時間を 11 秒とし、90 度パルス 6.3 μ 秒、データ取得時間 1.8 秒で測

定することとした。この条件でアルギニンの濃度を変えて測定すると 0.8~12 mM の範囲で濃度とシグナル面積に高い相関 ( $r^2=0.9995$ ) が認められた。なお、第一次標準としてカフェイン溶液を用いて測定したところ、使用した 4.3 % 重酢酸中に含まれる未置換 1 プロトン濃度は、8.92 mM と求められた。

カナダの National Research Council ではカフェインを標準として軽水中、Presaturation、Linear prediction mode で測定したスペクトルの面積から標準液の濃度を決定している (外部標準法)。基本的にこの測定条件を使って測定したところ、カフェイン濃度と 1 プロトン当りの積分値には良好な相関関係が認められ、図 7 に示すような検量線が得られた。また、同濃度のカフェイン溶液をサンプルチューブを変えて 3 連で行ったところ、各プロトン間の誤差は 2%未満、チューブ間の誤差は 1.6 %であった。

精製した GTX6 の一定量をバイアルにとって凍結乾燥し、蒸留水及び 4%重酢酸重水溶液に溶かした後、それぞれ内部標準、外部標準法用に設定した条件でスペクトルを測定した。図 8 に精製した GTX6 の内部標準法で測定したスペクトルを示す。GTX6 に帰属されるシグナル以外は観察されず、純度が高いことを示している。

両定量 NMR による GTX6、GTX5 標準溶液の濃度測定の結果を表 1 にまとめて示す。GTX6・GTX5 共に、外部標準法で求めた濃度は内部標準法で求めた濃度より低く、GTX6 で内部標準法の 86 %、GTX5 で 92 %であった。

次に GTX6 の比毒性を決定するために、

マウス毒性試験を行った。ddY 系雄のマウスを使い、MU を求めた。なお、実験に際し、dcSTX 基準溶液を使ってマウスの感受性を表す CF 値を求め、標準化した。内部標準法で求めたモル濃度を基準にして比毒性を計算すると、GTX5、GTX6 はそれぞれ 119 MU/ $\mu$ mole、118 MU/ $\mu$ mole となった。CF 値は 0.20  $\mu$ gSTX/MUであったので、標準化した比毒性は GTX5:23.4  $\mu$ gSTX/ $\mu$ mole、GTX6:34.9  $\mu$ gSTX/ $\mu$ mole となる。

## D. 考察

### 1) 検液調製法の検討

国内産二枚貝の主成分とする GTX 群については、加熱抽出の際に AOAC 法で指定されている pH 3 ~ 4 を守れば問題ないことを確認した。今後は C 毒群についても検討する必要がある。

抽出液の予備精製に現在使用している SepPak C18 カートリッジはカラム保護、クロマトグラムベースラインの安定化に極めて有効であり、UK と仮称している妨害物質を殆ど取り除くことができる。しかし、この化合物のシグナルが巨大で一部残存してしまう場合は GTX4 量の過大評価につながることがあった。そこで、新素材のカートリッジカラム、特に conditioning 不要と称せられるものに期待して検討を加えたが、現在の方法を上回るものは見出せなかった。今後、UK の化学的性状を明らかにして、その特性を生かした除去方法を検討する必要がある。

### 2) 蛍光 HPLC 法の改良

分解能を優先して開発された C8 系カラ

ムを用いる従来の蛍光 HPLC 法では再平衡化に要する時間が長いため、あえて 3 分割した isocratic 溶出による方法をとっていた。今回、新型の C18 系カラムを導入することにより、GTX 群および STX 群の 50 分以内の一斉分析に成功した。さらに、分析時間の短縮を目指し、反応系の改良も含めたカラムの小型化や、更に新型のカラムについて検討することを予定している。また、C 毒群も含めた一斉分析法を検討する予定である。

### 3) 定量 NMR を用いる標準溶液濃度決定法の検討

非破壊的な定量 NMR 法により、1 mg 以下という微量の試料を定量できることが明らかになった。しかし、検討した両法には無視できない差が認められたので、標準物質の選択やさらに精密な NMR 測定条件を含めて再検討する予定である。

安全性評価の基本となる比毒性については、これまで正確なデータの無かった GTX6 について結果をえることができた。平行して測定した GTX5 については、測定当時のマウスの感受性に関するデータが無いため比較が難しい点はあるが、過去の元素分析による濃度を基準に求められた GTX5 の比毒性と比較すると低く、63 % の値となった。全成分について系統的な再検討が必要と考えられる。その際には、今回実施したようなマウス感受性の差を排除する標準化が必須である。

## E. 結論

- 1) GTX 群を主成分とする国内産二枚貝の検液調製法として pH 範囲を守れば

AOAC 法に準拠した抽出条件で問題ないことを確認した。

- 2) GTX 群および STX 群を一斉分析可能な基本的な条件を設定した。
- 3) 非破壊で低濃度の麻痺性貝毒の濃度を決定できる NMR 測定法を開発した。これを利用し、これまでにデータの無かった GTX6 の比毒性を決定した。

## G. 研究発表

今年度の研究成果については一部を国内の学会で口頭発表する予定である。研究内容が多方面にわたったため、論文に取りまとめる段階にいたっていないが、次年度以降の研究とあわせ早急に公表する予定である。

これとは別に、今回調製した GTX6 の標準液については比毒性に関する情報とあわせ、国内で麻痺性貝毒の HPLC 分析を実施している機関に情報を流し、要求があれば提供することを考えている。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定はない。

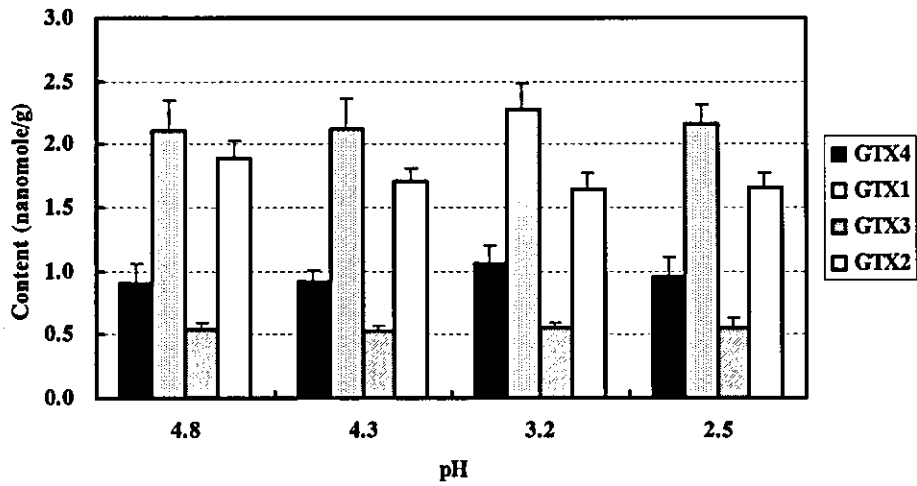


図1 pHによる GTX1~GTX4 の抽出効率の比較

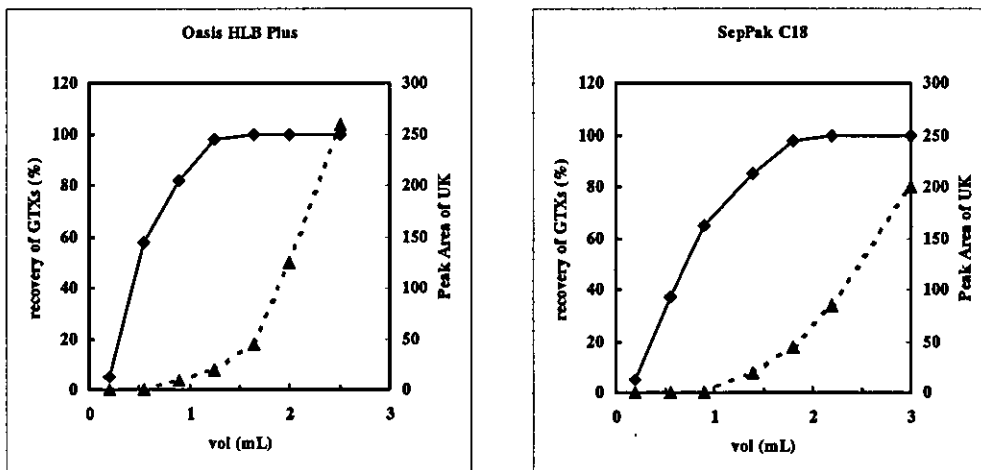


図2 カートリッジカラムによる妨害物質除去効率の比較

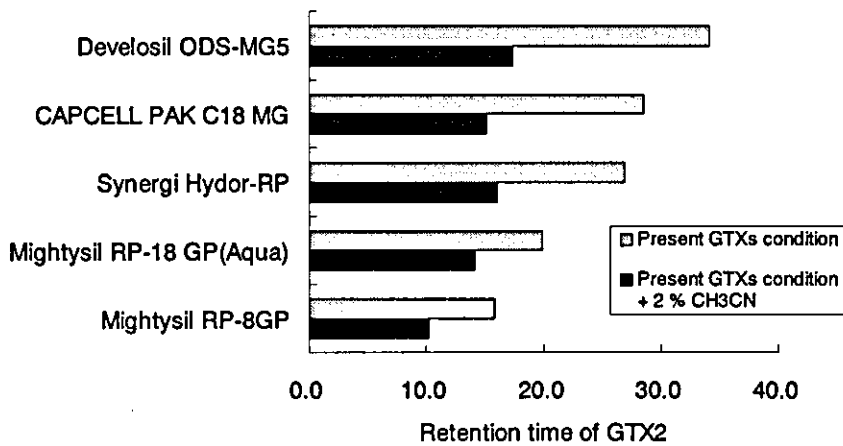


図3 ODS系各種カラムの GTX2 に対する保持力の比較