

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17年度 総括・分担研究報告書  
主任研究者 安元 健

平成18（2006）年 3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	-----	21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	29

## 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る二枚貝の毒化は、世界的に発生地域が拡大し、かつ恒常化の傾向にあるため、各国は自国産の貝のみならず輸出入に関する全ての二枚貝製品について、あらゆる種類の貝毒を検査する必要に迫られている。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、アザスピロ酸貝毒に区分されている。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、世界的合意の達成が要望されている。

このような状況を受けて、すでに2001年にEUは、WTOに対して主要貝毒について新たな基準値と測定法を提案している。また、2004年にはWHO/FAO/IOCの3国際機関が合同で、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。これらの提案をめぐって世界的な議論がなされており、我が国もこの議論に参加し、さらには議論をリードするためには、貝毒に関する研究体制の整備と実験データの蓄積が急務である。加えて、我が国の貝毒は諸外国の組成と異なる点があるので、早急に独自のデータを蓄積するとともに、諸外国と調和のある規制法を設定する必要がある。

二枚貝の貝毒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トキシン（DTX）類に加えて、ペクテノトキシン（PTX）やイエツトキシン（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、DTX類の許容値を引き下げ一方で、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、現在各国で使用されている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、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。

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。貝毒の監視に用いられているマウス法は世界的に抑制の方向にあり、代替法の開発は急務となっている。

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 DTX は、主成分でも 2～3 mg 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、本事業の研究者らを除いては調製に成功していない。

本研究の第一の目的は、研究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。

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。

平成 17 年度は、下記 3 項目を重点的に推進した。(1) LC/MS 分析用標準毒としてわが国で出現する主要毒 3 種 7 成分を調製したので、これに加えて外国産試料に含まれる 3 種 3 成分を調製する。(2) LC/MS による一斉分析法を開発する。(3) 麻痺性貝毒分析法の操作性向上と実用性検証を行う。

なお、初年度に掲げた情報収集はすでに終了した。マウス試験法は国際的に廃止の方向にあるが、当分の間は公定法として使われる可能性があるため、マウス毒性試験における精度管理に必要な標準液の設計を行った。

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 年度に下痢性貝毒成分として作成した、ジノフィストキシン-1、オカダ酸、ペクテノトキシン-1、ペクテノトキシン-3、ペクテノトキシン-6、イエツトキシン及び 45-ヒドロキシイエツトキシンの 7 種の標準試料及び市販品を購入したペクテノトキシン-2に加えて、さらに、平成 17 年

度は 7-*O*-pal-0A、7-*O*-pal-DTX1 を合成した。また、海外から供与された貝毒含有試料を抽出して、神経性貝毒のプレベトキシン-2 (BTX2) 標準品を単離した。アザスピロ酸-1、アザスピロ酸-2、アザスピロ酸-3 は東北大学で調製済の試料を入手し、下痢性貝毒及び脂溶性貝毒の標準毒合計 14 成分を得た。

麻痺性貝毒は、化学分析法の導入に不可欠な標準品溶液として、国内の出現が限られているため入手の難しく、農林水産省消費・安全局の事業による標準品作成計画でも漏れていた GTX5、GTX6 の 2 成分について、昨年と同様、大分県産ムラサキガイ中腸線から精製し、それぞれ約 3mg を得て、将来の標準品調製の材料として確保した。

また、GTX6 については、定量的 NMR により濃度を決定する方法を検討した。

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。その結果、1 回の測定操作により、30 分で下痢性貝毒及び脂溶性毒の 14 成分の貝毒が測定可能となった。本年度の結果から、本事業で開発した方法は、短時間・高感度測定が可能な下痢性貝毒及び関連する全貝毒の一斉分析法であることが確認された。

また、麻痺性貝毒分析では、昨年度の研究で現在の蛍光 HPLC 分析法に改良を加え、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 GTX 群と STX 群の一斉分析法を可能にした。本年度は更に再平衡化時間の短いカラムを探索することにより更なる分析時間の短縮を目指した結果、更に 10 分間の短縮に成功し、従来法と精度に変化が無いことを確認して、一斉分析に一步近づけた。また、HPLC 分析で GTX4 付近に溶出する妨害物質の化学的性質を明らかにするために精製を試みたが、極微量であり、単離には至らなかった。

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、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、毒成分の変換も認められ、二枚貝の組織により異なる様式を示した。

今年度は、国内の毒化二枚貝の種類によっては多量に含まれる C1/C2 から化学変換により dcSTX を調製し、マウス標準化手法に適した濃度、梱包を設計するとともに、US FDA から提供された標準サキトキシン溶液と毒性を比較して、新規標準液の  $\mu\text{g}$  STX 相当量濃度を決定することにより、世界に通用する標準とすることを目的とした。

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。

平成 17 年度は西日本の毒化二枚貝に多く含まれ C1/C2 から化学変換によりデカルバモイルサキシトキシンを調製し、そのままマウス標準化に使用可能な溶液を調製するとともに、FDA のサキシトキシン標準品との比較によりサキシトキシン相当量の毒力を求めた。その結果から今回調製した dcSTX 標準液は 0.88  $\mu$ gSTX/mL の値を示すことになることが明らかとなった。

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。

2001年及び2004年の貝毒専門家会議では、下痢性貝毒とアザスピロ酸貝毒の許容値を引き下げることが提案された。その根拠は、現行の許容値が貝類の最大摂食量を100gと仮定して算出していたのを、他の食品の場合と同様に、WHOのデータ集記載の最大摂食量「250g」を用いて再計算した結果である。また、従来は下痢性貝毒に含めていたペクテノトキシンとイエツトキシンのリスクを再評価し、許容値を引き上げる（規制を緩和する）ことも科学的根拠に基づいている。これらのことを勘案すると、わが国で多発する下痢性貝毒による毒化に対しては、マウス試験法の感度と特異性では対処できなくなることが明らかである。麻痺性貝毒に関しては、大島の蛍光検出液体クロマトグラフィー法が高い評価を得た。そこで、前年度の計画に掲げたマウス試験法の検討に関して、マウス試験法は迅速性、感度、特異性に劣り、CODEXから提案が予想される低い許容値と複雑な毒組成の個別分析に対応できない。しかしながら、当分の間は公定法として使われる可能性があることから、初年度の計画に掲げたマウス試験法の検討に関する項目を削除し、平成17年度はマウス試験法の精度管理に必要な標準毒の設計と標準毒を用いた機器分析法

の開発とに重点を置くこととした。

## 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。

平成17年度は平成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。

国内の毒化二枚貝の種類によっては多量に含まれるC1/C2から化学変換によりdcSTXを調製し、マウス標準化手法に適した濃度、梱包を設計するとともに、US FDA

から提供された標準サキシトキシン溶液と毒性を比較して、新規標準液の $\mu\text{g STX}$ 相当量濃度を決定することにより、世界に通用する標準とすることを目指した。

(3) LC/MS による下痢性貝毒及び脂溶性貝毒の一斉分析法確立 (平成 16~18 年度)

研究者 (安元 健他) が以前に開発した 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、特に分析時間短縮を図り、実用性を高める。

(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、単離した GTX5、GTX6 をモデルにして定量的 NMR による濃度決定法の検討を行うとともに、マウス毒性試験を実施して、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。

さらに、他の成分についても比毒性の再検討を開始する。

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。

2005 年 11 月に開催された第 40 回有毒微生物専門部会日米合同会議 (UJNR) において、研究者 (安元及び大島) は本研究における成果を発表し、米国関係者と情報交換を行った。さらに、2005 年 12 月に環太平洋国際化学会主催の学会 PACIFICHEM 2005 における特別シンポジウム「海洋毒：その構造、毒性と検出」において、主任研究者は本研究における成果を発表した。また、本学会において国内の貝毒被害防止の方策を将来的に探る本研究課題の遂行に重要な各種情報を交換した。

平成 18 年度も国際会議等に参加し、引き続き海外の動向に関する情報収集を実施する予定である。

### [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、平成 16 年度に下痢性貝毒成分として作成した、ジノフィシストキシン-1 (DTX1、約 6 mg)、オカダ酸 (OA、約 10 mg)、ペクテノトキシン-1 (PTX1、約 10 mg)、ペクテノトキシン-3 (PTX3、約 0.1 mg)、ペクテノトキシン-6 (PTX6、約 3 mg)、イエツトキシン (YTX、約 10 mg) 及び 45-ヒドロキシイエツトキシン (45OH-YTX、約 2 mg) の 7 種の標準試料及び市販品を購入した。ペクテノトキシン-2 (PTX2) に加えて、さらに、平成 17 年度はパルミトイルオカダ酸 (7-*O*-pal-OA)、パルミトイルジノフィシストキシン-1 (7-*O*-pal-DTX1) を合成した (約 2 mg)。また、海外から供与された貝毒含有試料を抽出して、神経性貝毒のブレベトキシン-2 (BTX2) 標準品を単離した (約 1 mg)。アザスピロ酸-1、アザスピロ酸-2、アザスピロ酸-3 は東北大学で調製済の試料を入手した。一例としてホタテガイ中腸腺から DTX1、OA、PTX1~3 及び PTX6 を精製した方法の概略を図 1 に、また、パルミトイルオカダ酸 (7-*O*-pal-OA) 及びパルミトイルジノフィシストキシン-1 (7-*O*-pal-DTX1) の合成方法の概略を図 2 に示した。

以上の結果、国内及び海外で出現する下痢性貝毒及び脂溶性貝毒の標準毒合計 14 成分を得た。

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 97 %以上の純度であることを確認した (表 1)。

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、これまで入手の難しかったゴニオトキシニン-6 (GTX6) 及び、ゴニオトキシニン-5 (GTX5) の2成分を各10mg程度単離した。また、GTX6については、定量的NMRにより濃度を決定する方法を検討した。

また、マウス法の世界的標準となっているサキシトキシニンが化学兵器に指定されたことに伴って代替品の候補としてデカルバモイルサキシトキシニンの効率的な調製法を検討する。

#### [分析法開発 (平成16~18年度)]

##### 1. LC/MS法による下痢性貝毒及び脂溶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法による一斉分析法の条件を検討した結果、1回の測定操作により、30分で下痢性貝毒及び脂溶性毒の14成分の貝毒が測定可能となった。AZA、PTX類は陽イオンを、その他の成分は陰イオンを測定した。また、ホタテガイ、ムラサキガイを用いた添加回収試験についても測定を実施した。

この結果、図3及び4に示したようにどの標準品も明確なピーク形状であった。なお、若干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。

標準毒の検出限界は、0.0005~0.01ppmの範囲内にあり、規制値に対応することが十分

可能であった。分析に供する試料は、90%MeOH抽出液を希釈するだけで良く、前処理が不要なので簡便・迅速な測定が可能であった(表2~5)。

LC/MS法による検出限界値は中腸腺1gあたりで0.1 $\mu$ g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 $\mu$ g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 $\mu$ gであるため測定には全く問題はない。

実際にホタテガイ・ムラサキガイそれぞれの中腸腺1g及び90%メタノール溶液の抽出液に標準品9成分について添加を行い、LC/MSにて回収率を求めた結果を表6~11に示した。

その結果、ホタテガイ、ムラサキガイ共に70~120%の回収率が得られた。

また、LC/MSのスペクトルを図5及び6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。

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。

また、HPLC 分析で GTX4 付近に溶出する妨害物質の化学的性質を明らかにするために精製を試みたが、極微量であり、単離には至らなかった。

## 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、昨年度の研究で現在の蛍光 HPLC 分析法に改良を加え、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 GTX 群と STX 群の一斉分析法を可能にした。

本年度は更に再平衡化時間の短いカラムを探索することにより更なる分析時間の短縮を目指した結果、更に 10 分間の短縮に成功し、従来法と精度に変化が無いことを確認して、一斉分析に一步近づけた。

### [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。また、毒成分の変換も認められ、二枚貝の組織により異なる様式を示した。

### [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 を基準とする内部標準法の NMR パルスシークエンスを設定し、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。

マウス試験法は迅速性、感度、特異性に劣り、CODEX から提案が予想される低い許容値と複雑な毒組成の個別分析に対応できない。しかしながら、当分の間は公定法として使われる可能性があることから、初年度の計画に掲げたマウス試験法の検討に関する項目を削除し、平成 17 年度はマウス試験法の精度管理に必要な標準毒の調製と標準毒を用いた機器分析法の開発とに重点を置くこととした。なお、マウス試験法は国際的に廃止の方向にあるので、新規標準毒の毒力確認等は

最小限の実験に止めた。また、初年度の計画に掲げたマウス試験法は、本法が迅速性、感度、特異性に劣り、CODEX から提案が予想される低い許容値と複雑な毒組成の個別分析に対応できないため、この検討に関する項目を削除し、標準毒を用いた機器分析法の開発と精度管理に必要な標準毒調製に重点を置くこととした。

C1/C2 から dcSTX を得た。収率は約 60% であった。NMR、MS で純度を確認した後、約 3 MU/mL となるように 0.05M 酢酸に溶かした。この濃度を手持ちの標準を基準として濃度を  $4.62 \pm 0.08 \mu\text{M}$  と決定した。この溶液を希釈して 3 濃度の検液を調製し、ddY 系雄マウスに各 1 mL、10 匹に注射して、その致死時間から毒力を求めた。3 濃度の希釈液から求めた標準液の平均は 3.67 MU/mL であった。同時に過去に S. Hall 博士から供与された FDA のサキシトキシン標準液も用いてマウス感受性の指標となる Conversion Factor (Cf 値) を求めたところ 0.24 となった。

以上の結果から今回調製した dcSTX 標準液は  $0.88 \mu\text{gSTX/mL}$  の値を示すことになる。なお、この標準液は 1 回の標準化に使用する量を考慮して、各 25mL ずつにプラスチックボトル (30mL 容) に分注し、 $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### D. 考察

国際的にはカナダの National Research Council (NRC) が中心となり、ニュージーランドの 2 研究財団とオスロ大学が加わって標準毒作成に努力している。しかし、現在までに供給が可能になったのは、下痢性関連

毒では、オカダ酸とペクテノトキシン-2 及びイェソトキシンの 3 成分のみであり、わが国での主要成分であるジノフィシトキシン-1 と同 3 及びペクテノトキシン-1、3、6 については、当面供給される可能性がない。

麻痺性貝毒については、サキシトキシンの標準毒を米国 FDA が供給し、ゴニオトキシンの 1~5、C1、C2 等をカナダ NRC が販売しているが、高価である。

下痢性貝毒に関する LC/MS 分析例は急増している。しかしながら、入手可能な標準毒の種類が限定されているために、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。

麻痺性貝毒に関しては、分担研究者の大島が開発した蛍光検出/液体クロマトグラフ法が、最も精度の高い方法として認知されている。国外では、簡易型蛍光・液体クロマトグラフ法や免疫抗体法が提案されているが、精度が劣るので予備試験法として位置付けられている。

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トキシンは、主成分でも 2~3 mg 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

2年間の研究で、国内及び海外で出現する下痢性貝毒及び脂溶性貝毒の標準毒合計14成分を得たので、LC/MS実験には支障がない。しかし、測定精度の確認等を始めとして、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ジノフィシトキシン-3及び相当するオカダ酸エステルを化学合成することを継続する。ただし、クロイソカイメンの採集適地を発見する必要がある。

麻痺性貝毒については、マウス法の世界的標準となっているサキシトキシンの代替品として、デカルバモイルサキシトキシンの効率的な調製法を検討する。

#### 2. イェットトキシン標準品の調製

イェット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、培養藻体から海外で出現する同族体の標品(homo-YTX)を調製する。

#### 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、3及び6は調製済みであるが、LC/MS法の精度確認のためには、さらにペクテノトキシン-3が必要で、試料が入手できればペクテノトキシン-3を追加調製する。

#### 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たが、LC/MS法の精度確認のためには、さらに追加試料の調製が必要で、試料が入手できればアザスピロ酸-1、アザスピロ酸-2、アザスピロ酸-3を調製する。

#### 5. LC/MSの条件設定

上記標準毒を使用し、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、開発した傾斜溶出法を用いたLC/MSによる一斉分析法の精度確認を実施し、高度化・高精度化された世界基準の貝毒の測定法として提案することを目指す。

#### 6. 麻痺性貝毒標準品の調製

麻痺性貝毒については、マウス法の世界的標準となっているサキシトキシンが化学兵器に指定されたことに

伴って代替品の候補としてデカルバモイルサキシトキシンの効率的な調製法を検討する。

また、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。また、試料調製時の誤差要因とその解決法を明らかにする。

#### 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（安元及び大島）は、2005 年 11 月に開催された第 40 回有毒微生物専門部会日米合同会議 (UJNR) において、本研究における成果を発表し、米国関係者と情報交換を行った。また、2005 年 12 月に開催された環太平洋国際化学会主催の学会 PACIFICHEM 2005 において、研究者（安元及び大島）は本研究における成果の発表を行った。

##### [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、昨年度に下痢性

貝毒成分として作成した、ジノフィシトキシン-1 (DTX1、約 6 mg)、オカダ酸 (OA、約 10 mg)、ペクテノトキシン-1 (PTX1、約 10 mg)、ペクテノトキシン-3 (PTX3、約 mg)、ペクテノトキシン-6 (PTX6、約 3 mg)、イエツトキシン (YTX、約 10 mg) 及び 45-ヒドロキシイエツトキシン (45OH-YTX、約 2 mg) の 7 種の標準試料及び市販品を購入したペクテノトキシン-2 (PTX2) に加えて、さらに、今年度はパルミトイルオカダ酸 (7-*O*-pal-OA)、パルミトイルジノフィシトキシン-1 (7-*O*-pal-DTX1) を合成した。また、海外から供与された貝毒含有試料を抽出して、神経性貝毒の BTX2 標準品を単離した。アザスピロ酸-1、アザスピロ酸-2、アザスピロ酸-3 は東北大学で調製済の試料を入手した。

以上の結果、国内及び海外で出現する下痢性貝毒及び脂溶性貝毒の標準毒合計 14 成分について、全て 97%以上の純度を有する標準試料を作製した。

麻痺性貝毒は、これまで入手の難しかった GTX6、GTX5 の 2 成分について、昨年と同様、大分県産ムラサキイガイ中腸線から精製し、それぞれ約 3mg を得て、将来の標準品調製の材料として確保した。

##### [分析法開発 (平成 16~18 年度)]

下痢性貝毒及び脂溶性貝毒の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 法による一斉分析法の条件を検討した結果、1 回の測定操作により、30 分で下痢性貝毒及び脂溶性毒の 14 成分の貝毒が測定可能とな

った。

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 40 分で分析できる条件の設定に成功し、従来法と精度に変化が無いことを確認して、一斉分析に一步近づけた。

#### [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。また、毒成分の変換も認められ、二枚貝の組織により異なる様式を示した。

#### [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。

西日本の毒化二枚貝に多く含まれ C1/C2 から化学変換によりデカルバモイルサキシトキシンを調製し、そのままマウス標準化に使用可能な溶液を調製するとともに、FDA のサキシトキシン標準品との比較によりサキシトキシン相当量の毒力を求めた。

#### 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

1) 「Supportive efforts behind method developments - Preparation of toxin standards」、T. Yasumoto, UJNR symposium on Development of New Detection Techniques for Marine Toxins in Japan and Their Application to Improve Shellfish Safety, (2005. 11)

2) 「Preparation of standard shellfish toxins and their simultaneous analysis by LC-MS (Poster)」, Megumi Suzuki, Reiji Sekiguchi, Masatoshi Watai, Kazuhiko Koike and Takeshi Yasumoto, The Pacifichem 2005 Congress (2005. 12)

3) 「Increasing diversity of marine toxins and the tasks set for chemists」、T. Yasumoto, The Pacifichem 2005 Congress, (2005. 12)

4) 「下痢性貝毒及びその他貝毒の LC/MS 法による一斉分析法の開発」、鈴木 芽、関口 礼司、渡井 正俊、安元 健、平成 18 年度日本水産学会大会 (2006. 3)

5) 「Characteristics of PSP-toxin profiles in bivalves from Japan coastal waters」、Yasukatsu Oshima, UJNR symposium on Development of New Detection Techniques for Marine Toxins in Japan and Their Application to Improve Shellfish Safety, (2005. 11)

6) 「Application of post-column derivatization

HPLC method for the paralytic shellfish toxins monitoring」、Yasukatsu Oshima、The Pacificchem 2005 Congress、(2005. 12)

7) 「麻痺性貝毒標準品調整法に関する研究」、渡邊龍一、八田真澄、大島泰克、平成 18 年度日本水産学会大会 (2006. 3)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定はない。

#### I. 謝辞

エステル型毒の調製にご協力いただいた(株)トロピカルテクノセンターの吉野博士に感謝致します。



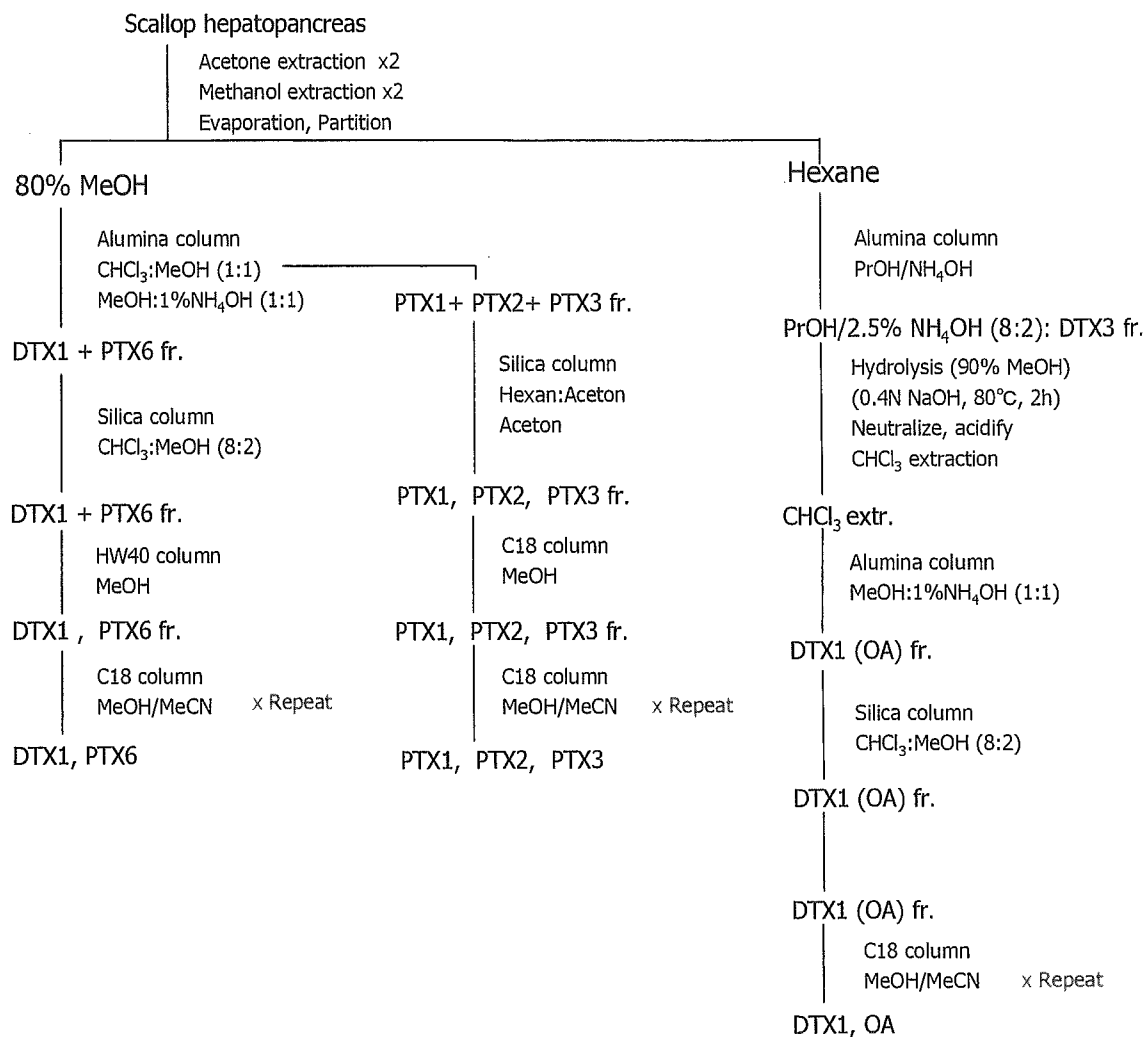


図1 ホタテガイ・ムラサキガイからの下痢性貝毒標準品の作製概略図

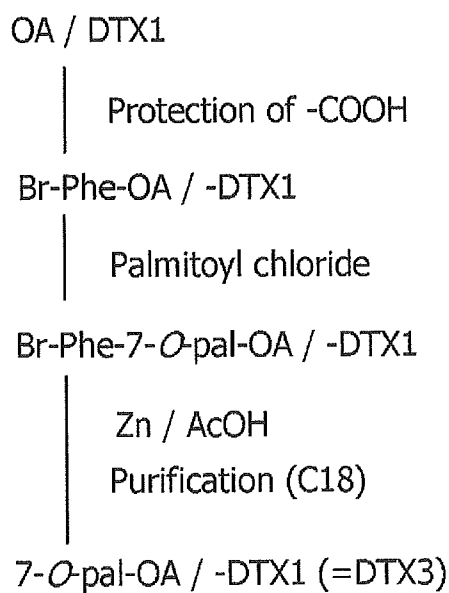


図2 オカダ酸及びジノフィシストキシン-1からパルミトイルオカダ酸 (7-O-pal-OA)、パルミトイルジノフィシストキシン-1 (7-O-pal-DTX1) の合成方法概略図

表 1 作成した貝毒標準品の純度確認結果

	<sup>1</sup> H-NMR	LC-DAD	LC-MS
OA	○	○	○
DTX1	○	○	○
pal-OA	○	○	○
pal-DTX1	○	○	○
PTX1	○	○	○
PTX2	○	○	○
PTX3	○	○	○
PTX6	○	○	○
YTX	○	○	○
45OHYTX	○	○	○

○ : >97%

市販されている標準品 : OA, DTX1, PTX2, YTX

貝毒標準品事業（農林水産省消費・安全局）より入手可能な標準品 : PTX1, PTX6, pal-DTX1

本事業により精製・作製した標準品 : PTX3, pal-OA, 45OH-YTX, AZA1~3

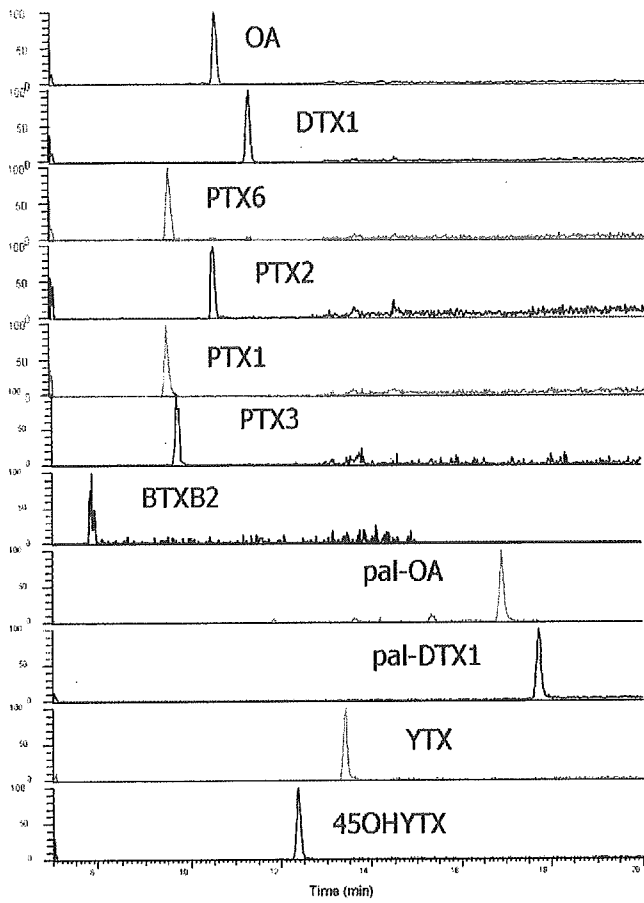


図3 貝毒標準品のマスクロマトグラム  
(陰イオンモード)

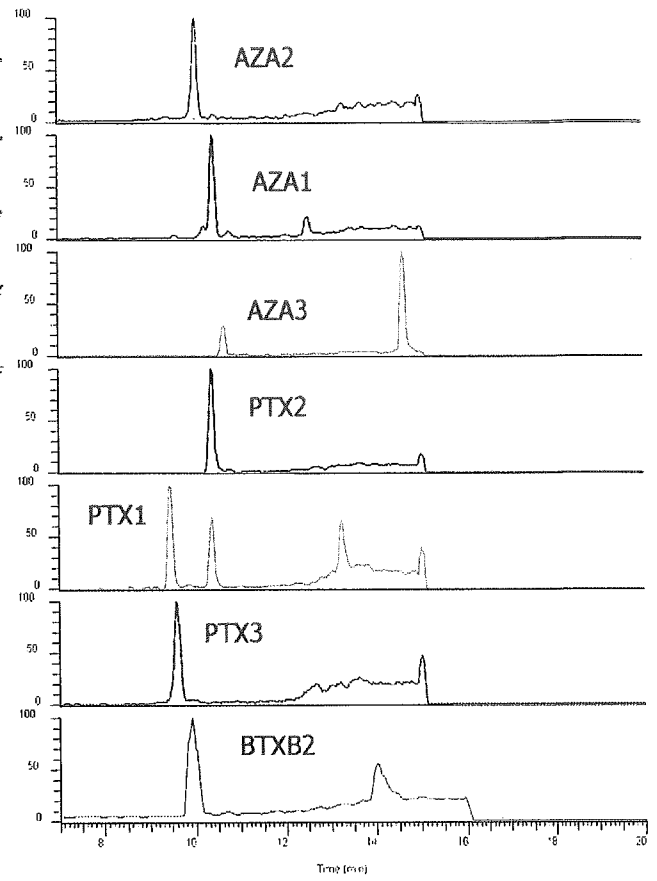


図4 貝毒標準品のマスクロマトグラム  
(陽イオンモード)

表 2 貝毒標準品の検出限界(陰イオンモード)

OA	DTX1	pal-OA	pal-DTX1	PTX1	PTX2	PTX3	PTX6	YTX	45OHYTX	BTX-B2
5 pg	5 pg	20 pg	10 pg	20 pg	20 pg	32 pg	20 pg	10 pg	10 pg	20 pg

表 3 貝毒標準品の検出限界(陽イオンモード)

PTX1	PTX2	PTX3	BTX-B2	AZA1	AZA2	AZA3
2 pg	0.5 pg	4 pg	20 pg	0.4 pg	1 pg	0.4 pg

表 4 貝毒標準品をホタテ中腸腺抽出液に添加した場合の検出限界(陰イオンモード)

OA	DTX1	pal-OA	pal-DTX1	PTX1	PTX2	PTX3	PTX6	YTX	45OHYTX	BTX-B2
5 pg	5 pg	40 pg	20 pg	20 pg	20 pg	64 pg	20 pg	40 pg	40 pg	40 pg

表 5 貝毒標準品をホタテ中腸腺抽出液に添加した場合の検出限界(陽イオンモード)

PTX1	PTX2	PTX3	BTX-B2	AZA1	AZA2	AZA3
4 pg	1 pg	4 pg	40 pg	1 pg	1 pg	1 pg