

表6 ホタテ中腸腺を用いた貝毒標準品の添加回収結果

	OA	DTX1	pal-OA	pal-DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX	450H YTX
Ave. (%)	90.5	84.4	73.8	97.0	91.0	91.2	79.7	99.7	84.2

添加濃度：1.0 mg/g 中腸腺、試行数：2

表7 ムラサキイガイ中腸腺を用いた貝毒標準品の添加回収結果

	OA	DTX1	pal-OA	pal-DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX	450H YTX
Ave. (%)	83.1	86.7	95.7	86.0	82.0	69.7	78.4	88.2	94.3

添加濃度：1.0 mg/g 中腸腺、試行数：2

表8 ホタテ中腸腺の抽出液を用いた貝毒標準品の添加回収結果(陰イオンモード)

	OA	DTX1	pal-oa	pal-DTX1	PTX1	PTX2	PTX3	PTX6	YTX	450H YTX
Ave. (%)	100.2	84.2	109.0	85.8	91.5	87.7	103.4	83.9	90.7	95.5

表9 ムラサキイガイ中腸腺抽出液を用いた貝毒標準品の添加回収結果(陰イオンモード)

	OA	DTX1	pal-oa	pal-DTX1	PTX1	PTX2	PTX3	PTX6	YTX	450H YTX
Ave. (%)	99.4	108.3	100.0	105.7	85.4	81.3	95.9	91.3	97.9	92.1

表10 ホタテ中腸腺の抽出液を用いた貝毒標準品の添加回収結果(陽イオンモード)

	AZA1	AZA2	AZA3	PTX1	PTX2	PTX3	BTXB2
Ave. (%)	127.3	87.0	95.9	100.4	120.1	109.6	92.7

表11 ムラサキイガイ中腸腺抽出液を用いた貝毒標準品の添加回収結果(陽イオンモード)

	AZA1	AZA2	AZA3	PTX1	PTX2	PTX3	BTXB2
Ave. (%)	101.8	96.8	108.9	95.0	93.7	149.0	114.1

AZA1～3・BTXB2：添加濃度:0.05 mg/ml 抽出液、試行回数：1

PTX1～3：添加濃度:0.01 mg/ml 抽出液、試行回数：2

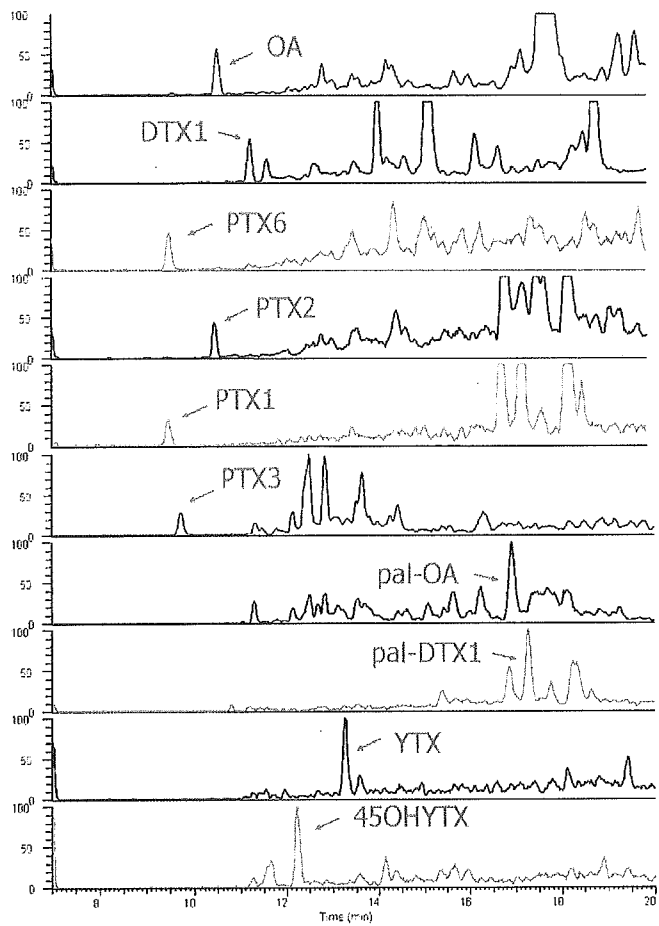


図5 ホタテ中腸腺を用いた貝毒標準品の添加回収試験におけるマスクロマトグラムの結果

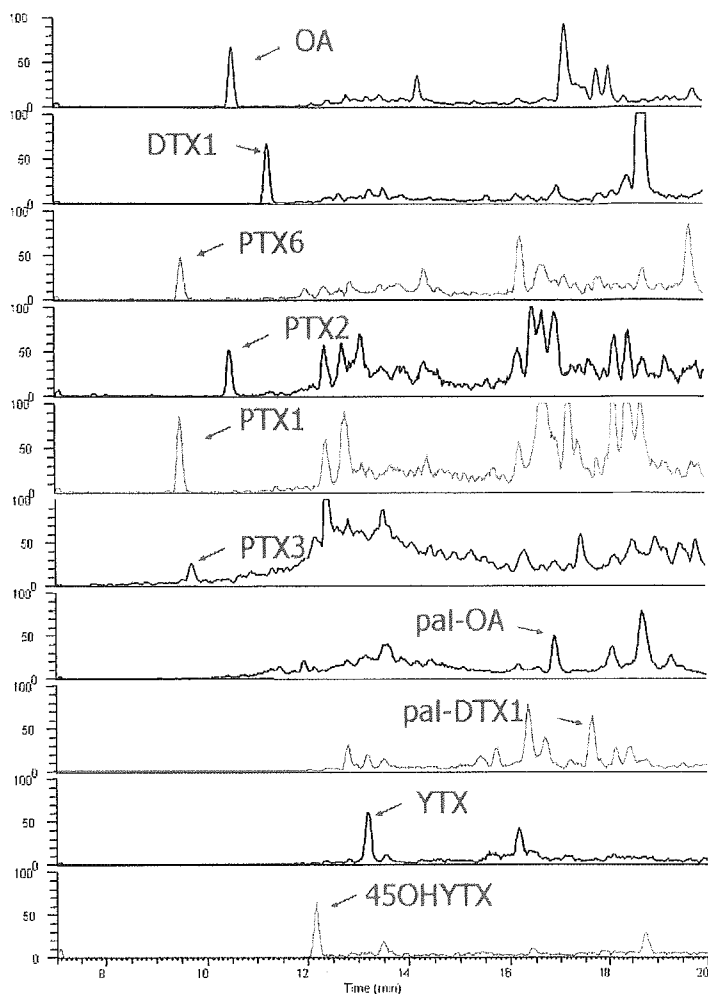


図6 ムラサキガイ中腸腺を用いた貝毒標準品の添加回収試験におけるマスクロマトグラムの結果

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：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。

さらに、当分の間は公定法として使われる可能性のあるマウス毒性試験について、精度管理に必要な標準液の設計を行った。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。

また、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。

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。また、麻痺性貝毒定量にかかわる基盤技術の整備に努める。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) 蛍光 HPLC 法の改良

昨年度設定したグラジエント溶出を導入した改良法をさらに発展させる。特に再平衡化時間の短いカラムを探索することにより、分析時間の短縮をはかる。さらに、ホタテガイに含まれ、GTX4 の近傍に溶出して分析を妨害する蛍光物質について、その効果的な除去方法を開発するために、単離して化学的特性を明らかにすることを試みた。

2) マウス毒性標準化のためのデカルバモイルサキシトキシン(dcSTX)溶液の調製とサキシトキシン相当量の特定

諸外国では麻痺性貝毒のマウス毒性試験の際に、アメリカ食品医薬品局 (US FDA) から供給されるサキシトキシン標準液を用いてマウスの感受性を補正する、いわゆる標準化 (standardization) の操作がとられ、試験結果も μgSTX 相当量/g 等で表示される。このマウス感受性を補正し、かつ、精度管理につながる操作を国内でも取り入れることが必須と思われる。しかし、化学兵器禁止条約によってサキシトキシンが指定されていることが実現を難しくしている。我々は先に同条約の枠外となるデカルバモイルサキシトキシン (dcSTX) が、サキシトキシンと等しい投与量・致死時間曲線を示し、かつ、マウスの体重依存性も等しいことを明らかにし、代替品として使用可能なことを示した。ここでは、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的とした。

3) 標準毒の精製

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。国内で

は昨年までは水産庁、現在は農林水産省消費・安全局の事業として、標準品の調製が試みられてきた。しかし、GTX5, GTX6 のように。ある種の成分は、その出現が認められて定量が必要にもかかわらず、高濃度に毒化した材料が得られないために供給されていないものがある。昨年の研究で入手した大分県産ムラサキイガイには高濃度で両成分が含まれていたため、今後の研究の重要な資源として単離・精製することとした。

B. 研究方法

1) 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 3 種について、同一濃度でイオンペアー試薬および緩衝液を含む 10%アセトニトリルから 2%アセトニトリル溶出液に戻し、定期的に GTX 群を注入して、保持時間の変化を追跡することによって、再平衡化に必要とする時間を求めた。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)、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。さらに、選択したカラムについて最適のタイムプログラムを設定するとともに、連続運転による分離能の変化、再現性を調査した。

ホタテガイの分析妨害物質の検索では ODSカラムを用いる単純な蛍光 HPLC 条件を設定し、これを指標に AOAC 法に準拠した抽出物から溶媒分画、各種クロマトグラフィーで精製を試みた。

2) マウス毒性標準化のためのデカルバモイルサキシトキシン(dcSTX)溶液の調製とサキシトキシン相当量の特定

3) で述べる GTX5, GTX6 の精製に用いた大分県産ムラサキイガイには C1/C2 も多量に含まれていた。C1/C2 を精製し、中性溶液中の加熱による脱 N-スルホカルバモイル化、及び、メルカプトエタノールとの加熱による脱硫酸エステル化の 2 段階の反応で dcSTX を調製した。純度を確認した上で、0.05 M 酢酸で希釈したのち、HPLC における標準毒と比較して濃度を決定した。さらに異なる 3 濃度で 10 尾のマウスの致死時間中央値が 5~7 分に入るよう試験を実施し、その平均値を毒力とした。平行して US FDA の標準サキシトキシン溶液で同様の実験を行い、調製した dcSTX 溶液が標準サキシトキシン何 μ g/mL に相当するかを決定した。

3) 標準毒の精製

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 GTX5 及び GTX6 を精製した。純度は蛍光 HPLC, RSI-マススペクトル、NMR スペクトルで確認した。

C. 研究結果

1) 蛍光 HPLC 法の改良

試験した 4 種のカラムのうち、Mightysil RP-18 GPAqua (Φ 4.6 \times 150mm) が最も再平衡化時間が短く、かつ、各成分の分離も良好であった。図 1

に実験結果を示す。19 分以上の初期溶媒の溶出で、保持時間がほぼ一定になった。このカラムについて溶媒のタイムプログラムの最適化をはかり、図 2 に示すプログラムにより GTX1-GTX5, neoSTX, dcSTX, STX の完全分離を可能にした。昨年の Develosil ODS-MG5 カラムに比べ 10 分の短縮時間となった。標準毒及び規制値近傍の毒性を示したホタテガイの分析結果を図 3 に示す。繰り返し分析の結果を表 1 に示すが、良好な再現性を示している。

UK と仮称したホタテガイに含まれる分析妨害物質を 500g の可食部から希塩酸加熱抽出し、水-ブタノール溶媒分画後、SepPakC18 カートリッジカラムで精製し、分取 HPLC が使用可能な程度に精製した。これを Develosil C30 カラムに供したところ、多波長検出器のピークと一致するところに蛍光物質が検出された。この画分を NMR で解析したところほぼ純粋にイノシンが得られていることが判明した。イノシン自身は蛍光をもたず、偶然に極微量の UK と同時溶出したものと推定される。予備試験で両者の分離が可能な条件を見いだしているため、今後量を増やして単離に努める予定である。

2) デカルバモイルサキシトキシン(dcSTX)標準溶液の調製とサキシトキシン相当量の特定

C1/C2 から図 4 に示す方法で 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 3MU/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 ± 0.08 μM 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 (表 2)。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 (表 3)。以上の結果から今回調製した dcSTX 標準液は 0.88 μgSTX/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℃で保存した。

3) 標準毒の精製

昨年度の精製行程にけるサイドフラクションから精製を進め、最終的に約 3 mg の GTX6 と GTX5 を酢酸塩として得た。

D. 考察

1) 蛍光 HPLC 法の改良

一斉分析による分析時間短縮、簡便化は麻痺性貝毒分析法として HPLC 法が普及する上で重要な要素となる。このたび、分離能だけでなく再平衡化に要する時間が同じ ODS 系のカラムにより異なることが明らかになった。その結果、調査したカラムの範囲でも 20% (10 分) の時間短縮につながった。このことは更なる改良が可能であることを示している。今後、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。

妨害物質の除去のための基礎情報を得る目的で、UK の化学的性状を目指したが単離に至らなかった。しかし、この物質が極微量で強い蛍光を有することが明になるとともに、単離のめどがついた。次年度は抽出量を増やし、NMR, MS 等機器分析測定可能な量の単離を目指す。

2) デカルバモイルサキシトキシン (dcSTX) 標準溶液の調製とサキシトキシン相当量の特定制

麻痺性貝毒の分析法として将来的には化学分析に移行することが考えられるが、当分の間はマウス毒性試験法が公定法として残ることが予想される。しかるに、現在の我が国の体制では標準毒の供給がなされておらず、今後必須となる精度管理に最大の障害となりうる。そこで、本研究では「化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律」に抵触しないデカルバモイルサキシトキシンを選び、将来の供給形態も考慮した標準液のモデルを作成した。AOAC 法に準拠すれば、使用するマウス群の感度を特定する変換係数 (Cf 値) を求めるには「5-7 分に中央致死時間がおさまるよう、濃度の少しづつずれた 3 希釈液を各 1mL ずつ 10 匹のマウスに腹腔内投与し、そこから得られる Cf 値を平均することになっている。従って、約 3 MU/mL の溶液を 25 mL ずつ梱包することにした。モデル的には、原液各 7mL を 6, 7, 8 mL の蒸留水で希釈して 3 希釈液をつくることによって余裕をもって実験が

可能となる。また、今回の実験によって FDA のサキシトキシン相当量を求めて提示してあるので、各試験機関では使用するマウスコロニーの Cf 値を求め、毒性試験結果を MU/g 単位だけでなく、世界的に通用している単位 $\mu\text{gSTXeq./100 g}$ または mgSTXeq./kg で表示することが可能となる。

なお、マウス試験の標準化に必要な毒量は HPLC の標準の 100 倍以上必要となる。dcSTX が C1/C2 から効率的に作成可能であることを本研究で示したが、その材料となる毒化二枚貝を機会を捉えて採捕して準備しておく必要がある。場合によっては国内需要を勘案して 10-20 年分の dcSTX を一気に調製して備蓄する国家計画が必要であろう。

3) 標準毒の精製

HPLC 分析にとって、必要な多成分=分析対象となる全成分をセットして有することが必須である。GTX5, GTX6 は近年西日本で多発している *Gymnodinium catenatum* の生産する毒の重要な構成成分であるにもかかわらず、十分な量が確保されていなかった。今回精製した 3 mg は貴重な材料となることが期待される。

E. 結論

- 1) GTX 群および STX 群の一斉分析法の改良をはかり、分析時間を短縮した。
- 2) dcSTX 溶液を調製し、マウス毒性試験標準化用標準に適した濃度と梱包のモデルを作成した。また、この溶液の STX 相当濃度も合わせて提示した。

- 3) GTX5, GTX6 を精製し、貴重な標準品の材料として確保した。

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。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定はない。

表1 新分析法の繰り返し実験の結果

Toxins	GTX4	GTX1	GTX5	GTX3	GTX2	neoSTX	dcSTX	STX
1回目	6.51	7.35	9.37	10.53	12.52	23.23	25.00	25.83
2回目	6.15	6.97	8.99	10.29	12.45	23.33	25.08	26.01
3回目	6.16	6.95	8.93	10.21	12.36	23.25	25.01	25.95
4回目	6.12	6.92	8.95	10.20	12.32	23.25	25.11	25.96
5回目	6.12	6.91	8.89	10.20	12.29	23.24	25.07	25.95
1-5回 平均	6.21	7.02	9.03	10.29	12.39	23.26	25.05	25.94
1-5回 標準偏差	0.17	0.19	0.20	0.14	0.10	0.04	0.05	0.07
1-5回 CV (%)	2.70	2.65	2.17	1.38	0.77	0.17	0.19	0.26
2-4回 平均	6.14	6.94	8.94	10.23	12.36	23.27	25.07	25.97
2-4回 標準偏差	0.02	0.03	0.04	0.04	0.07	0.04	0.04	0.03
2-4回 CV (%)	0.34	0.40	0.47	0.43	0.56	0.18	0.17	0.11

表2 dcSTX 標準液の毒力測定結果

希釈様式		希釈度	致死時間 (分:秒)	希釈液毒力 (MU/mL)	原液毒力 (MU/mL)	平均 (MU/mL)	標準 偏差	CV (%)
原液 mL	純水 mL							
7	6	0.538	4:42	2.03	3.77			
7	7	0.500	5:02	1.82	3.65	3.67	0.09	2.51
7	8	0.467	5:20	1.67	3.59			

原液 サキシトキシン相当量濃度 (MU/mL x Cf 値) = 3.67 x 0.24 = 0.88 μg

表3 使用したマウス(ddY系 雄 ~20g)の変換係数 Cf 値

希釈液 濃度 μg/mL	毒力 中央値 MU/mL	Cf 値 MU/μg	平均 (MU/μg)	標準偏差	CV (%)
0.40	1.71	0.23			
0.38	1.49	0.26	0.24	0.02	7.10
0.42	1.84	0.23			

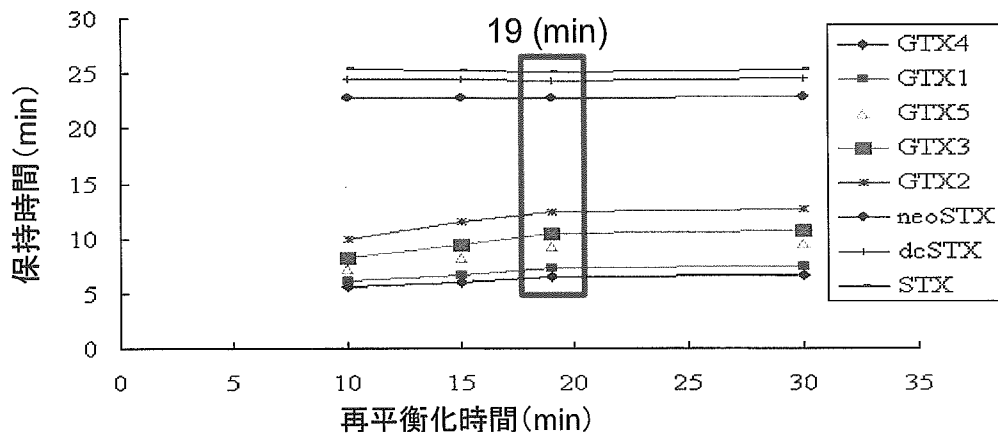


図1 Mightysil RP-18 GPAqua の再平衡化時間に伴う GTX1~GTX4 の保持時間と分離

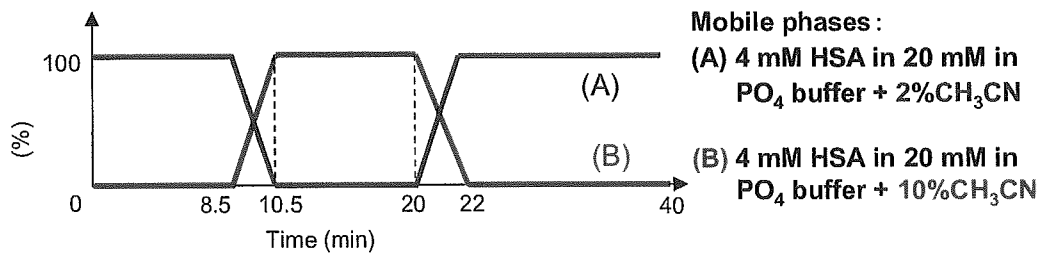


図2 一斉分析のための溶離液タイムプログラム

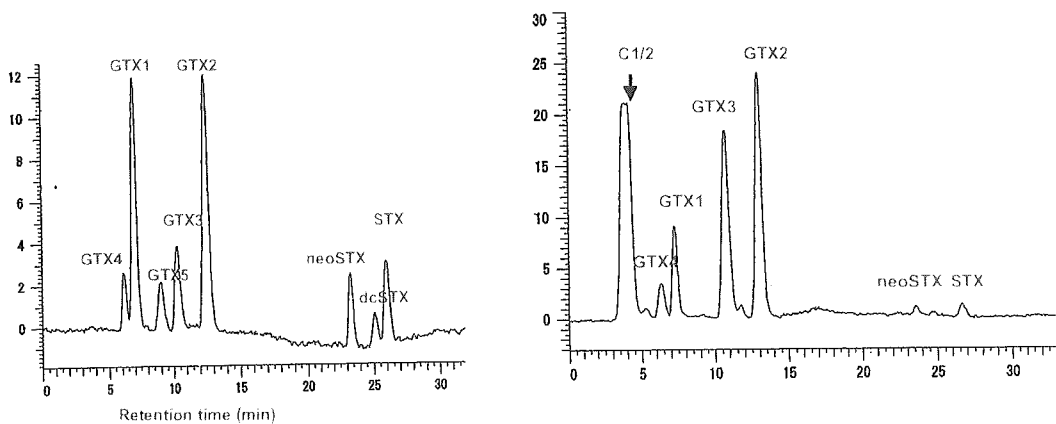


図3 一斉分析改良法による標準毒(左)とホタテガイ抽出液(右)のクロマトグラム

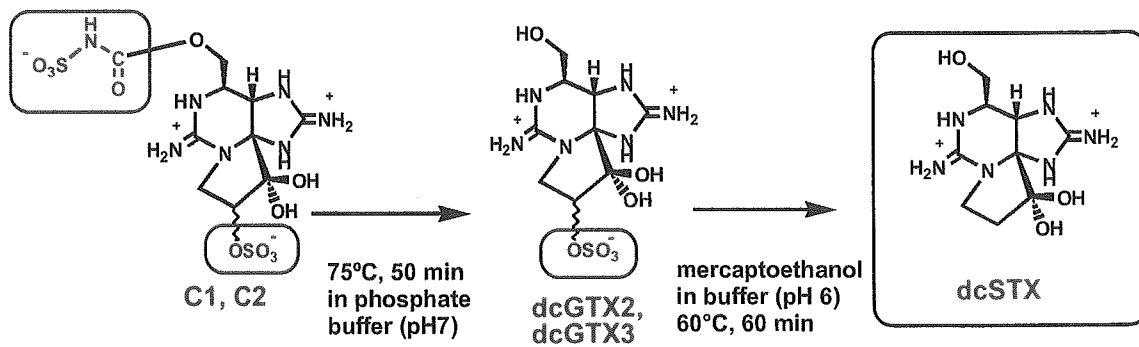


図4 C1/C2 から dcSTX の調整法

別紙5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当事項なし。							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当事項なし。					