

200501060A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

魚介類に含まれる食中毒原因物質の
分析法に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 相良 剛史

平成18 (2006) 年 3月

目 次

| | |
|---------------------------|----------|
| I. 総括研究報告 | |
| 魚介類に含まれる食中毒原因物質の分析法に関する研究 | ----- 1 |
| 相良 剛史 | |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. 有毒渦鞭毛藻の検索および培養 | ----- 32 |
| 西尾 幸郎 | |
| 2. 有毒魚類のバイオアッセイ | ----- 51 |
| 浅川 学 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- 75 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- 77 |

総括研究報告書

魚介類に含まれる食中毒原因物質の分析法に関する研究

主任研究者 相良 剛史 四国大学短期大学部 助手

研究要旨

本研究は分析機器を用いた化学的手法による評価を目指し、高感度で迅速、かつ簡便な「新規 CTX 類または PTX 類分析法」の開発を目的とした。まず、フィリピン産のウツボ類、ハタ類を各種クロマトグラフィーに供し、シガテラ毒の主要毒であるシガトキシン(CTX)類の精製を行い、LC/MS による分析法を検討した。また、フィリピン産のアカマダラハタとマダラハタについても同様の検討を行った。一方、PTX 類縁体の確保のために有毒渦鞭毛藻の大量培養の検討を行い、その培養法を確立するとともに、PTX 標準品での LC/MS による分析法を検討した。

まず、フィリピン産のウツボ類 120 g からシガテラ毒として 40 MU の粗毒を得た。それを精製後、Bruker 社製 Bio TOF で分析した結果、 m/z 1157.6、1146.6、1143.6、841.4、827.4、817.6、811.4、785.6 のマスキロマトグラムにおいてピークを確認することができた。一方、フィリピン産のハタ類 120 g から 20 MU のマウス毒性が得られ、現在、有毒成分の特定を急いでいるところである。フィリピン産のアカマダラハタ、マダラハタ合一試料 1,700 g より、シガテラ毒として 40 MU の粗毒を得たが、LC/MS 分析で、シガテラ毒関連成分を検出することは無かった。PTX 標準品による MS 分析では、HITACHI 社製 M-8000 のメタノールによるフローインジェクションにおいて、PTX 標準品 1 μ g 相当注入時にトータルイオンクロマトグラム(TIC)にピークが得られ、ピークのスペクトルにパリトキシンの $[M+Na+H]^{2+}$ と思われる m/z 1352 が検出された。また、Bruker 社製 Bio TOF でも TIC で明瞭なピークが得られ、100 ng 相当注入時でもピークが確認でき、そのピークのスペクトルにパリトキシンの $[M+Na+H]^{2+}$ と思われる m/z 1351.73636 が検出された。その LC 条件は、カラムに Inertsil C-4 (ϕ 2.1 \times 150 mm, GL science)溶離液を 0.1% formic acid- 100% acetonitrile (linear gradient) を用いたとき、最も明瞭なピークを得ることができた。また、パリトキシンの $[M+H]^+$ である m/z 2680-2682、 $[M+Na]^+$ である m/z 2703-2704 および $[M+Na+H]^{2+}$ である m/z 1351.7 のマスキロマトグラムにおいて、明瞭なピークを得ることができた。他方、*Ostreopsis* sp. の大量培養に成功し、その有毒成分の分離を試みたところ、溶血活性物質と溶血活性を持つマウス致死毒成分を得た。その成分の詳細に関しては、現在、検討中である。

| | |
|-------|--------------------------|
| 分担研究者 | 西尾 幸郎 四国大学短期大学部 教授 |
| | 浅川 学 広島大学大学院 助教授 |

A. 研究目的

これまで本邦におけるシガテラ中毒原因食品は熱帯または亜熱帯海域産の魚類に限られていた。また、パリトキシン (PTX) 様物質による食中毒はアオブダイによってのみ引き起こされてきた(野口ら, 1997)。しかしながら、近年、地球温暖化などの影響により、熱帯や亜熱帯でのみ生息すると考えられていた有毒渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus*、*Ostreopsis siamensis*、*Alexandrium tamiyavanichii* などが、日本近海においても頻発するようになった。*Ostreopsis* は渦鞭毛植物門、渦鞭毛藻綱、ベリジニウム目に属する藻類で、1901年にSchmidtが分離した *O. siamensis* 以来、最近まで報告がなかったが、シガテラ研究の過程で新たに2種類発見され、それぞれ *O. lenticularis*、*O. ovata* (Fukuyo, 1981)と命名された。その後、発見された *O. heptagona* (Norrisら, 1985)と *O. mascarenensis* を加えて現在5種が知られている。比較的大型の底生性鞭毛藻で、赤潮となることはない。発生学的にはシガテラ毒(シガトキシン: CTX、マイトキシン: MTX)を産生する *Gambierdiscus toxicus* と類似のものとされ(Taylorら, 1987; Taylorら, 1984)、*O. heptagona* 以外の4種はいずれも仏領ポリネシア、ガンビア諸島、琉球諸島、ニューカレドニアなどシガテラ中毒の発生する南方

海域で発見されており、20年ほど前から日本近海でも見られるようになった。

宮崎県や千葉県では地場のイシガキダイによるシガテラ中毒、西日本各地でハタ科やハコフグ科魚類による PTX 様物質による中毒が相次いで発生している(谷山ら, 2003)。一方、東南アジア等からの食用魚介類の輸入が増加するなか、誤ってシガテラ魚が混入していたケースもある。そのため、食用魚介類の安全性に対する国民の不安は大きく、それを解消すべく、マリントキシン、特にシガテラ毒や PTX 様物質に関する検査体制の徹底、また食用魚介類の毒性の再評価が求められている。

わが国における CTX 類や PTX 類の定量は、公定法であるマウス毒性試験法により行われているが、1検体当たりの検査に多量の試料と労力、多くのマウスを要するにもかかわらず検出感度が低く特異性がないため、その管理や動物愛護の点からも問題の声が挙がっている。他方、現行の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法などによる分析法は、現在、多方面で種々の改良が行われているにもかかわらず煩雑な操作や熟練を要し、なお且つ、いずれの毒も検出感度は悪く、未だ発展途上の段階である。

本研究では、魚介類の食品としての安全性を確保し、国民の健康保護を図ることを目指し、CTX 類および PTX 類を対象として、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) や飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) などの分析機器を用いた化学的手法による高感度で迅速、かつ簡便な「新規 CTX 類または PTX 類分析法」の開発を目的とした。さらに、国内外の食用魚介類につき、それら毒性の再評価、および有毒種の毒の起源の解明について検討を加えた。

B. 研究方法

1) 試料

CTX 類の精製には、2005 年 8~9 月に漁獲されたフィリピン産ウツボ科とハタ科の魚類(いずれも未同定種)、2005 年 12 月に関西空港検疫所より供与されたミャンマー産アカマダラハタとマダラハタを魚類試料とした。

一方、PTX 様物質の精製には、1983 年香川県引田町の引田港内の底泥より、香川県赤潮研究所の吉松によって分離された *Ostreopsis* sp. 培養株を用いた。

2) CTX 関連成分の抽出と精製

・マウス毒性試験

各魚類試料の毒性を食品衛生検査指針理化学編(厚生省環境衛生局監修, 1991)シガテラ検査法に準拠して調べた。まず、フィリピン産魚類試料それぞれ 240 g、ミャンマー産魚類については合一して(1700 g)にアセトン 700 ml または 5000 ml を加えて 3 分間ホモジナイズし、減圧ろ過してろ液を得た。残渣については、同様の操作を 2 回繰り返してろ液を合一した。ろ液を減圧濃縮後、蒸留水:ジエチルエーテル(1:2)による溶媒分画に付し、ジエチルエーテル画分を減圧濃縮して 90%メタノール:n-ヘキサン(1:2)で脱脂し、90%メタノール画分を粗抽出液とした。粗抽出液を濃縮して 1% Tween 生理食塩水 6 ml で溶解し、試験原液(40 g 試料相当量/ml)とし、マウス毒性試験に供した。本試験には ddY 系の雄で体重が 17~20 g のマウスを用いた。1 投与量に対しては 1 群 3 尾のマウスを用い、投与してから 24 時間後のマウスの生死を観察し、3 尾ともあるいは 3 尾中少なくとも 2 尾のマウスが死亡する最小濃度を求めた。毒力の表示は検体 1 g に含まれる毒力(MU/g)で行った。ただし、本試験の 1

MU(マウス単位)は、供試マウス 1 尾を 24 時間で死亡させる毒量と定義される。

・Cigua-Check による試験

本試験は、Toxitec 社製(USA) Fish Poison Test Kit である Cigua-Check を用いて、そのマニュアルに準拠して行った。まず、各試料から米粒大の筋肉または内臓を分取し、付属の試験片とともにメタノール中に 10 分間浸漬させた。次いで、試験片を 20 分間風乾し、抗 CTX 抗体と 10 分間反応後、試験片の呈色反応を観察した。

精製過程の有毒画分のチェックには分取原液をそのまま用いた。

・精製

前述のマウス毒性試験の過程で得られたフィリピン産魚類の各粗抽出液を用い、Pottier ら(2003)の方法に準拠して、有毒または関連物質の分離を試みた。まず、それぞれの粗抽出液を TOYOPEARL HW-40S(φ 30×250 mm, 東ソー)に供し、メタノール(流速 1.0 ml/min)で溶出させ、15 ml ずつ分取した。Cigua-Check により陽性反応を示した有毒画分または活性画分を合一し、TOYOPEARL HW-40S(φ 8×400 mm, 東ソー)に附し、同様にメタノール(流速 1.0 ml/min)で溶出させ、7 ml ずつ分取した。得られた有毒画分を合一後、Pottier ら(2002)の方法に準じて、逆相系の TSKgel OCTYL-80Ts(φ 8×250 mm, 東ソー)カラムクロマトグラフィーに附した。溶離液に 0.1%ギ酸(溶離液 A)、0.1%ギ酸-90%アセトニトリル(溶離液 B)を用い、60 分間で溶離液 B を 0%から 60%にするリニアグラジエントで行い、流速は 1.0 ml/min とした。その後、溶離液 B 200 ml により未溶出物質を回収した。次いで、

Cigua-Check により活性画分を調べ、LC/MS にて分析した。

一方、ミャンマー産魚類の粗抽出液についても、Pottier ら(2003)の方法に準拠して CTX 類を精製した。ただし、粗抽出液を TOYOPEARL HW-40S (φ 30×250 mm, 東ソー)に供し、メタノール(流速 1.0ml/min)で溶出させ、7 ml ずつ分取後、Cigua-Check により陽性反応を示した画分を再度、同カラムに附し、同様にメタノール(流速 1.0 ml/min)で 7 ml ずつ分取した。次いで、同様に Cigua-Check により活性画分を調べて LC/MS 分析を行った。

・分析

CTX 関連物質の LC/MS による分析は Pottier ら(2003)の方法に準拠して行った。カラムには C-4 (φ 2.0×150 mm, GL science)を用いた。溶離液 A として 0.1%ギ酸、溶離液 B として 0.1%ギ酸- 90%アセトニトリルを用い、溶離液 B を 0%から 60%にする 60 分間のリニアグラジエント後、溶離液 B 液を 2 分間流す合計分析時間 62 分間とし、流速は 0.2 ml/min とした。

MS は HITACHI 社製 M-8000 または Bruker 社製 Bio TOF を用いた。M-8000 は音速噴霧イオン化 (SSI) 法イオン源を用い、MS 測定条件をポジティブモード、第一細孔温度 170°C、シールド温度 300°C、検出器 400 V、フォーカス電圧 30 V、ドリフト電圧 30 V とした。Bio TOF は、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を採用し、LC 流量が 0.2 ml/min の際にドライガス温度を 250°C、同 0.05 ml/min の際にドライガス温度を 150°C とし、検出器 1800V、リペラー電圧 8300V、ポジティブモードで測定した。

3) PTX 標準品による LC/MS 分析法の検討

Lenoir ら(2004)の方法に準拠して、PTX 標準品 (Wako) を用いて LC/MS による分析法の検討を行った。

まず、メタノールによるフローインジェクションにより、HITACHI M-8000 MS および Bruker Bio TOF MS による PTX 標準品の検出を確認した。M-8000 は、音速噴霧イオン化 (SSI) 法イオン源を用い、MS 測定条件をポジティブモード、第一細孔温度 170°C、シールド温度 270°C、検出器 400 V、フォーカス電圧 30 V、ドリフト電圧 50V とした。Bio TOF は、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を採用し、ドライガス温度 250°C、検出器 1800V、リペラー電圧 8300V とし、ポジティブモードで測定した。両装置とも流速を 0.2 ml/min とし、100 ppm の PTX 標品を 10 μl 使用した。高感度に検出された場合は、標品を蒸留水で適宜希釈し再度、同条件による検出を確認した。いずれの装置もトータルイオンクロマトグラムおよびマスクロマトグラムによりモニターを行った。

次いで、Bruker Bio TOF による LC/MS の分析条件を検討した。検討した条件は以下のとおりである。

検討条件 A) として、カラムに Inertsil C-4 (φ 2.1×150 mm, GL science)、溶離液に 0.02% トリフルオロ酢酸- 100% アセトニトリルによるリニアグラジエント法を用い、流速を 0.2 ml/min とした。検討条件 B) としてカラムに Inertsil C-4 (φ 2.1×150 mm, GL science)、溶離液に 0.1% ギ酸- 100% アセトニトリルによるリニアグラジエント法を用い、流速を 0.2 ml/min とした。検討条件 C) として、カラムに Capcell Pak MG-II (φ 2.0×150 mm, Shiseido)、溶離液に 0.02% トリフルオロ酢酸- 100% アセトニトリルによるリニアグラ

ジェント法を用い、流速を 0.2 ml/min とした。検討条件 D)として、カラムに Capcell Pak MG-II (φ 2.0×150 mm、Shiseido)、溶離液に 0.1%ギ酸-100%アセトニトリルによるリニアグラジエント法を用い、流速を0.2 ml/min とした。検討条件 E)として、カラムに Capcell Pak UG120 (φ 1.0×75 mm、Shiseido)、溶離液に 0.02%トリフルオロ酢酸-100%アセトニトリルによるリニアグラジエント法を用い、流速を 0.05 ml/min とした。検討条件 F)として、カラムに Capcell Pak UG120 (φ 1.0×75 mm、Shiseido)、溶離液に 0.1%ギ酸-100%アセトニトリルによるリニアグラジエント法を用い、流速を 0.05 ml/min とした。

4) PTX 関連成分の抽出と精製

・*Ostreopsis* sp. の培養

培養は、ESM培地(岡市ら, 1982; Watanabeら, 1997) (表 1) を用い、培養温度を 20°C、光強度を 40 μmol photon/m²/s¹、明暗周期を 12 時間明/12 時間暗の条件下で行った。

・マウス毒性試験

試料(*Ostreopsis* sp. の培養藻体)からの毒の抽出は、橋本ら(1979)の方法に準じて行った。試料に 20 倍量の 70%または 80%エタノールを加え、超音波ホモジナイザーまたはミキサーでホモジナイズ後、遠心分離し、上澄液を得た。残渣については同様の操作を 2 回繰り返した後、さらに 70%熱エタノールで抽出し、遠心分離して上澄液を合一した。次いで、得られた上澄液をジエチルエーテルまたはクロロホルムで脱脂し、水画分を試験液(粗抽出液)としてマウス毒性試験に供した。本試験は、試験液 1 ml を体重 20 g 前後の ddY 系の雄のマウスの腹腔に注射し、その致死時間より毒性を

判定した。粗抽出液を公比で希釈し、最小致死濃度を 1 MU とする用量-致死時間曲線を作成し、以後毒量は MU を単位として表した。一方、同試料から得られた脂溶性画分については 2% Tween 60 生理食塩水で溶解して試験液として同様にマウス毒性試験を行った。また、体重 20 g をはずれるものは 20 g を 1 とする体重補正を行った。

・溶血活性試験

本試験にはマウス(ddY系、♂、17~20 g)および健康な成人男性から得られたヒトの血液を用いた。採取した血液はただちに 0.85%生理食塩水に懸濁させ、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。これを 3 回行うことによって洗浄した各赤血球に、採血量 1 ml 当たり 50 ml または 100 ml の 0.85% 生理食塩水を加え、2%または 1%血球浮遊液とした。毒成分の精製過程における各クロマトグラフィーからの溶出液の溶血活性の検定には 1%血球浮遊液 2 ml に検液 5~50 μl を加え、37°C で 8 時間振盪後、遠心分離を行い、上澄液の 542 nm における吸収を測定した。また、精製の各段階で得られた活性物質について溶血による比活性を求めた。試料は 1 mg~0.001 μg の数段階の濃度のも各 1 ml を用意し、これに 2%血球浮遊液 1 ml を加えて、1 時間振盪した。活性は同様に行ったサポニン標品(Wako)の溶血活性と比較した。

・粗毒の化学的性質の検討

a) 熱に対する安定性

粗抽出液(61 MU/ml)各 2 ml を常温、凍結、凍結乾燥の状態 で 24 時間放置し、その活性の変化を調べた。凍結および凍結乾燥物は -20°C に置いた。

b) 各種溶媒に対する安定性

粗抽出液 (40.5 MU/ml) 各 1 ml に各種溶媒 1 ml を加え、100°C で 5 分間加熱後その活性を調べた。使用した溶媒はエタノール、メタノール、n-ブタノール、アセトニトリル 1 N ピリジン、1 N 酢酸、1 N アンモニア水、水である。なお加熱後溶媒は減圧濃縮によって完全に除去し、水に溶媒させてマウスアッセイした。

c) 溶媒による抽出法の検討

水で希釈して 10 ml とした粗抽出液 300 MU を 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で pH 10 に調整し、これを等量のクロロホルムと合わせて分液漏斗中でよく振った後、分配した。クロロホルム画分はさらに 0.1 N 塩酸で pH 3 に調整した水と合わせて同様に分配した。各画分のうち、酸性およびアルカリ性の水層は中和した後、クロロホルム層は減圧乾固後 2% Tween60 生理食塩水を加えてそれぞれマウス毒性試験を行った。

Nakajima ら (1981) は *Ostreopsis* の毒の抽出に各種溶媒と水との分配法について検討しているので本研究でも水と n-ブタノールによる分配および n-ブタノール:ピリジン:水 (5:2:10) による分配について検討した。後者については粗抽出液 (1517 MU) を蒸留水で 150 ml 容とし、ピリジン 30 ml、n-ブタノール 75 ml を加え、分液漏斗中で 9 時間振盪後 7 時間放置して各画分の毒量を調べた。

・各種カラムクロマトグラフィーによる精製

以下のカラムクロマトグラフィーについて粗毒の精製条件を検討した。

a) ゲルクロマトグラフィー

カラム Sephadex G-15
カラムサイズ φ 1.5×900 mm、
 φ 2.6×600 mm

| | |
|--------|--|
| 溶 媒 | 蒸留水 |
| カラム | Bio-Gel P-2 |
| カラムサイズ | φ 1.5×900 mm、 φ 3.0×600 mm |
| 溶 媒 | 蒸留水、20%メタノール |
| カラム | Toyopearl HW-40S、 HW-40C(S: Superfine、C: Coarse) |
| カラムサイズ | φ 1.0×400 mm、 φ 1.5×900 mm、 φ 2.6×600 mm |
| 溶 媒 | 蒸留水 蒸留水—40%メタノール— 80%メタノール—100%メ タノール (Stepwise) n-ブタノール:ピリジン:蒸 留水 (5:5:10) n-ブタノール:ピリジン:蒸 留水 (5:2:5) n-ブタノール:ピリジン:蒸 留水 (5:2:10) 50%ピリジン |
| ・HPLC | |
| カラム | Finepak SIL C18 |
| カラムサイズ | φ 4.6×150 mm |
| 溶 媒 | 蒸留水—20%メタノール— 50%メタノール—80%メ タノール—100%メ タノール (Stepwise) 0.05 N チオ硫酸ナトリウム —20%メタノール—50%メ タノール—100%メ タノール (Stepwise) |

| | | |
|--------|--|--|
| カラム | LiChrosorb RP-18 | 35:8) |
| カラムサイズ | φ 6mm×150 mm | (G)90%エタノール |
| 溶媒 | 0.05 N ピリジン—0.5 N ピリジン—50%メタノール—100%メタノール (Stepwise) | (H)ピリジン:酢酸エチル:蒸留水:酢酸 (75:25:30:15) (I)n-ブタノール:ピリジン:蒸留水 (4:1:1) スポットの検出には、70%または 50%硫酸および UV ランプを使用した。またニンヒドリン試薬、ドラーゲンドルフ試薬による発色について検討した。 |

| | |
|--------|--|
| カラム | TSKgel G3000SWXL |
| カラムサイズ | φ 7.8 mm×300 mm |
| 溶媒 | 0.01 N ピリジン 0.05 N ピリジン 0.1 N 酢酸アンモニウム n-ブタノール:ピリジン:蒸留水 (5:2:10) n-ブタノール:n-プロパノール:蒸留水 (2:1:3) 80%ピリジン |

検出には紫外部における UV220、280、314、320 nm における吸収を1つまたは数個組み合わせて行った。また、電気化学的検出器(ボルタンメトリー検出器)による検出も行った。

・薄層クロマトグラフィー(TLC)

使用したプレートは Whatman LHP-K、Silicagel 60 (Merck)、HPTLC 60 (Merck)で、溶媒は以下の 9 種類について検討した (Yasumoto ら, 1976; Oshima, 1979; Taylor ら, 1984; Fusetani ら, 1985)。

- (A)n-ブタノール:酢酸:蒸留水 (2:1:1)
- (B)n-ブタノール:酢酸:蒸留水 (4:1:5)
- (C)n-ブタノール:酢酸:蒸留水 (4:1:2)
- (D)n-ブタノール:エタノール:蒸留水 (4:1:2)
- 2)
- (E)n-プロパノール:蒸留水 (7:3)
- (F)クロロホルム:メタノール:蒸留水 (60:

・液滴向流分配クロマトグラフィー(DCC)

東京理化学器械製の DCC を使用した。カラムサイズは φ 3 mm×400 mm×25 本×11 カセット (計 275 本)の 2 種類を用いた。溶媒は、n-ブタノール:ピリジン:蒸留水 (5:2:10)の上層液の一方を固定相、他方を移動相として用いた。

クロマトグラフィーと DCC に使用した機器は以下のとおりである。

635 型日立液体クロマトグラフ(ポンプ、UV 検出器)

日本分光 TRI ROTAR-V (ポンプ)

日本分光 BIP-I (ポンプ)

日本分光 875-UV (UV 検出器)

東京理化学器械 PLC-5 (ポンプ、UV 検出器)

Yanaco VMD-101 A (ボルタンメトリー検出器)

C. 研究結果

1) CTX 関連成分の分離

まず、フィリピン産のウツボ科魚類から CTX 類と示唆される 40 MU の粗毒を得た。本毒を TOYOPEARL HW-40S に供したところ、fr. 4 および 5 は Cigua-Check 陽性反応を示した。fr. 4 と 5 を合一後、TOYOPEARL HW-40S に附したところ、fra.2 は Cigua-Check において陽性であった。さらに、この fra. 2 の逆相系の TSKgel

OCTYL-80Ts カラムクロマトグラフィー後の Fr. 11 が Cigua-Check 陽性反応を示したので、これを LC/MS 分析に供した。

まず、HITACHI 社製 M-8000 を用いて検出条件の検討を行ったが、明瞭なピークを得ることができなかった。次いで、Bruker 社製 Bio TOF による検出条件の検討を試みた。その分析の結果を図 1 に示す。 m/z 1157.6、1146.6、1143.6、841.4、827.4、817.6、811.4、785.6 のマスクロマトグラムにおいてピークを確認することができた。Pottier ら(2002)の報告によると、シガトキシン類の代表的な成分は m/z 1141.6 において $[M+H]^+$ を生じるため、 m/z 1157.6 や 1143.6 は関連物質である可能性が考えられる。

一方、フィリピン産のハタ科魚類から 20 MU のマウス毒性が得られ、現在、有毒成分の特定を急いでいるところである。

一方、ミャンマー産魚類の合一試料からも同様に 40 MU の粗毒を得た。粗毒を TOYOPEARL HW-40S に供したところ、fr. 8 付近に茶褐色の妨害成分とともに、Cigua-Check 弱陽性画分が現れた。そこで、fr. 1~10 を合一し、再び同カラムに附したところ、fr. 6 付近に茶褐色の妨害成分とともに、Cigua-Check 弱陽性反応を示したので、各画分を濃縮後 LC/MS 分析に供したが、CTX 関連成分を検出することはできなかった。

2) PTX 標準品による LC/MS 分析法の検討

まず、HITACHI 社製 M-8000 にて、検出条件の検討を行った。メタノールによるフローインジェクションにおいて、濃度 1 μg にてトータルイオンクロマトグラム(TIC)における PTX の単一ピークが得られ、この MS スペクトルに PTX ($[M+Na+H]^{2+}$)と示唆される m/z 1352 が検出さ

れた。また、Bruker 社製 Bio TOF による分析においても、メタノールによるフローインジェクションにおいて、TIC での明瞭なピークを得ることができ、濃度 100 ng でも検出が可能であった(図 2)。さらに、そのピークの MS スペクトルに PTX ($[M+Na+H]^{2+}$)と示唆される m/z 1351.73636 が検出された。

次いで、Bruker 社製 Bio TOF を用いた LC/MS の分析条件の検討を試みた。まず、検討条件 A)による分析を行ったが、良好なクロマトグラムを得ることができなかった。しかしながら溶離液を 0.1%ギ酸-100%アセトニトリルによるリニアグラジエント(検討条件 B)で分析したところ、明瞭なピークを得ることができた(図 3)。また、PTX の水素付加の 1 価イオン $[M+H]^+$ である m/z 2680-2682、ナトリウム付加の 1 価イオン $[M+Na]^+$ である m/z 2703-2704 およびナトリウム付加の 2 価イオン $[M+Na+H]^{2+}$ である m/z 1351.7 のマスクロマトグラムにおいて、明瞭なピークを得た。さらに、検出感度を高めるために、Capcell Pak UG120 (ϕ 1.0 \times 75 mm, shiseido)(検討条件 C)を用いて検討を行ったが、良好な結果が得られなかった。

3) PTX 関連成分の抽出と精製

Ostreopsis sp. の培養

培養は 1 L コマ型フラスコでは、常に 2 週間前後で 5000~7000 cells/ml の増殖を示したが、10 L 培養ビンを用いた場合では、10 日ほどで 8000 cells/ml まで増えることもあったが、ほとんどの場合 14~18 日で 4000~5000 cells/ml であり、コマ型フラスコよりも 1 L 当たりの回収率は低かった。50 リットル培養槽を用いた場合では、平均約 5000 cells/ml の回収を得た

本研究のために行った大量培養の総量と回収した藻体量(湿重)は次のとおりである。

1 L コマ型フラスコ 134 L 26.5g 0.198g/l
 10 L 培養ビン 170 L 22.4g 0.132g/l
 50 L 培養槽 420 L 75.0g 0.179g/l
 742L の培地より湿重量として総計 132.9g の藻体を得た。

粗毒をマウスの腹腔に注射した時の用量-致死時間曲線を図 4 に示す。最小致死濃度で最も遅く死んだのは 46 時間後で、高濃度では 10~20 分で死亡した。10~20 分で死ぬ場合、マウスは注射後 2~3 分でけいれんを示しはじめた。元気がなく、じっとうずくまったまま時々このけいれんを起こし、次第に体温の低下が見られた。

Ostreopsis 培養株 2.4 g (湿重) を 70% エタノールで 3 回抽出したところ、2150 MU に相当する毒が抽出された。残渣をさらに熱 70% エタノールで抽出したものからは 30 MU が得られたにすぎなかった。またエタノール抽出液を濃縮した後、エーテルで脱脂を行ったがその際 16 MU がエーテルに移行した。残渣を熱エタノールで再抽出しても 1.4% が得られたにすぎなかった。

抽出後減圧濃縮した有毒画分をクロロホルムで脱脂した場合には、水溶性画分の約 2 割に当たる毒量がクロロホルムに溶解した。この結果により脱脂にはエーテルを用いることにした。なお、クロロホルムが不適切なことは研究過程の途中で分かったので、以後述べる結果の中にはクロロホルムを用いたものもある。

常温 24 時間放置、-20°C で 24 時間保存、凍結乾燥後 -20°C に 24 時間保存した試料の活性の変化は次のとおりであった。

はじめの粗抽出液は 61.0 MU/ml であったが、24 時間後のそれぞれの活性は、常温 37.8 MU/ml、凍結 29.4 MU/ml、凍結乾燥 53.3 MU/ml であり、それぞれ 62.0%、48.2%、

87.4% に低下していた。これより、試料は凍結乾燥による保存を心がけた。

40.5 MU/ml の粗毒を用いて、100°C 5 分間加熱した場合の結果は以下のとおりである。

| 溶媒 | 毒性(MU/ml) | 回収率(%) |
|---------------|-----------|--------|
| エタノール | 40.2 | 99 |
| メタノール | 44.5 | 110 |
| n-ブタノール | 40.9 | 101 |
| アセトニトリル | 43.7 | 108 |
| 1 N ピリジン | 38.2 | 94 |
| 1 N 酢酸 | 10.0 | 25 |
| 1 N 水酸化アンモニウム | 10.1 | 25 |
| 蒸留水 | 41.0 | 101 |

対照の蒸留水も含めてほとんどの溶媒について安定であるが、酸・アルカリに対しては非常に不安定であるといえる。この結果により精製法の検討には、酸またはアルカリ溶媒を用いるイオン交換クロマトグラフィーの使用をなるべく避けるようにした。また前述の常温放置の結果と多少矛盾するが、5 分間とはいえ 100°C の加熱においてもほとんどの活性が低下していないので、この物質はかなり安定なものであると思われた。アルカリ、酸による溶媒転溶では、毒性はクロロホルム画分、酸抽出画分ともに活性はなく、もとのアルカリ画分のみ、130 MU 存在した。また、使用した粗抽出液の毒量は 300 MU であったので、短時間ではあるが、pH 10 に調整したことで活性は 43% に低下したことになる。酸、アルカリ抽出は不適であると判断した。

水と n-ブタノールによる分配では毒成分はすべてブタノール画分に移り、水層には毒性はなかった。n-ブタノール:ピリジン:水 = 5:2:10 で 9 時間振盪した場合、上層に 1716 MU、下層に 311 MU の毒量が分配された。

ゲルろ過の検討には Sephadex G-15、Bio-Gel P-2、Toyo Pearl HW-40S、HM-40C を用いた。

Sephadex G-15 を用いて粗毒を展開したときの分離の様子を図 5 に示した。毒成分の溶出位置と溶血活性はよく一致した。また、毒成分の前に別の溶血活性成分が存在した。溶出成分の検出は UV 320 nm で行ったが、その吸収の強さは必ずしも毒の活性とは一致しなかった。毒性試験による回収率は 60.5%であった。この有毒画分 390 MU の G-15 による再カラムクロマトグラフィーを行った(図 6)。検出は 280 nm で行ったが UV による成分検出パターンは毒成分の溶出パターンとは一致しなかった。溶血活性と毒成分の溶出パターンは一致した。回収された毒量は 11 MU で 2.8%の回収率であった。

Bio-Gel P-2 によるクロマトグラムの一例を図 7 に示した。試料は粗毒 3430 MU を用いた。毒成分は 400~500 ml にわたって溶出し、毒性は 1630 MU であった。これは溶血活性の溶出と一致した。ボイド容量(V_0)直後に別の溶血活性成分が溶出し、これにも 300 MU の毒性が認められたが、このとき以外にこのような顕著な毒性が認められることはなかった。これはマウス毒性試験のミスによるものと思われる。なお、毒成分の回収率は 54.3%であった。

表 2 に Bio-Gel P-2 による毒成分の回収率を示した。これからも分かるように、Bio-Gel P-2 による回収率は高低の差が激しく、50%を下回ることが多かった。また UV 検出による溶出曲線の様子も再現性に乏しく、毒成分の溶出位置の確認にはマウス毒性試験法を用いるしかなかった。

Toyo Pearl HW-40C を用いて、粗毒を水・ま

たは水からエタノールへ溶媒濃度を段階的に変えたが、毒成分はまったく溶出しなかった。また、*n*-ブタノール、ピリジン、水の混合溶媒を用いたものについては、その溶媒比は 5:2:10 では毒成分は溶出せず、5:2:5 で 8%の回収、5:5:10 で 43%の回収が得られた。50%ピリジンを溶出溶媒としたときに 75%の回収率を得た。しかしながら、UV315 nm および電気伝導度 (Anodic) 検出による溶出曲線はどちらもほぼ単一のピークを示し、他の混在する成分の分離は実現しなかった。

そこで、Toyo Pearl HW-40S を用いてカラムサイズを大きくして、50%ピリジンについて検討したところ、約 100%の回収を得た。その溶出の様子を図 8 に示した。

2 種類の逆相シリカゲル (ODS) のカラムについて検討した。試料は粗毒を Bio-Gel P-2 ($\phi 1.5 \times 900$ mm, 20%メタノール)により分画して得た有毒画分を用いた。Finepak SIL C18、LiChrosorb RP-18 とともに、方法に示したすべての溶媒において毒成分の溶出は見られなかった。UV 314nm による検出で、8~17 個のピークを確認した。代表的なクロマトグラムを図 9 に示す。

TSKgel G3000SWxl による分離の様子を図 10 に示した。溶出溶媒は 0.01 N ピリジン、検出は UV 280 nm で行った。中央の主ピークは図では一分画に見えるが、検出器のメーターの読みから 2 つのピークからなることが確認されている。全体を 14 の画分に分けマウスアッセイと溶血試験を行ったところ、fr. 8 に 14 MU、fr. 9 に 49 MU の毒性があり、また fr. 8 は完全溶血、fr. 9 は約 40%の溶血活性を示した。これより、Bio-Gel P-2 で同時に溶出した毒成分と溶血成分が TSKgel によって 2 つに分離したと考えた。なお、このときの回収率は 13.7%で

あった。そこで 2 成分のさらに良い分離を求めて溶媒として 0.1 N 酢酸アンモニウムについて検討したところ良好な分離を示した。これによる分離の様子を図 11 に示す。カラムは同じものを 2 本連結して使用した。図 8 の 0.01 N ピリジンによる分離の結果から p.1~3 のどれかが、それぞれ溶血成分であり、毒成分であると考えたが、3 つの画分のすべてについて溶血成分、毒性ともに存在しなかった。

図 10 に示した条件での毒成分回収率は、上記のように 13.7%と非常に低いものであったので、この回収率を上げるため他の溶媒について検討を行ったところ、n-ブタノール:ピリジン:水(5:2:10)によるクロマトグラフィーで 39%の回収率を得た。しかしながら、n-ブタノール:プロパノール:水(2:1:3)では活性成分の溶出はなかった。最も高い回収率を示したのは 80%ピリジンを用いたときで、79 MU の試料を用いたところ 55 MU を回収した。回収率は 69.6%であった。

Silicagel 60TLC で、Bio-Gel P-2 で分画した有毒成分を(A)~(H)の溶媒で展開した結果、n-ブタノール:酢酸:水(2:1:1)およびn-プロパノール:水(7:3)において、70%硫酸で 3 成分、ニンヒドリン試薬で 2 成分を確認したが、その分離はどちらも良好なものではなかった。前者の溶媒で Rf 値 0.6 前後の画分に毒性があったが、その回収率は約 15%であり、またこの後に行った溶媒安定性試験で酢酸は不相当であったこと、および後者の溶媒はその後の追試でさらに分離が悪かったことから、(A)~(H)はすべて使用不可であると判断した。Whatman LHP-K および Merck HPTLC60 を用いて n-ブタノール:ピリジン:水(4:1:1)で展開したところ、非常に良好な分離が得られた。

一般のクロマトグラフィーが固定相やその支

持体に個体を用いるのに対し、DCC は固定相にも液体を用いるので、試料が吸着される個体がなく、回収率が高くなることが予想された。また固定相の容量が大きいので大量の試料が処理できるなどの特徴がある。特に、最近の HPLC 用の送液ポンプは超低流量の安定した定圧・定流送液が可能で、これを用いることによって微小な液滴を安定して送ることができるようになり抽出効率が極めて高くなっていることから、本法を使用することにした。

まず $\phi 3 \text{ mm} \times 400 \text{ mm}$ のカラム 1 カセット(25 本)を用いて DCC の有効性について検討した。溶媒は n-ブタノール:ピリジン:水(5:2:10)を用い、その上層液を固定相とし、下層液を移動相とした。試料は、粗抽出液から n-ブタノールで抽出したものを 500 MU を使用した。各フラクションは 5 ml ずつ分画し、それを減圧濃縮後、1 夜真空デシケーターに入れ減圧下でブタノールを完全に除去した後、水 2 ml を加えてマウス毒性試験を行った。毒成分は Vo 直後から 50 ml 以上にわたって広く溶出した。回収された毒量は 76 MU で回収率は約 15%であった。

同じカラムを用いて、移動相と固定相を逆にしてクロマトグラフィーを行った。試料は、上述のものと同じものを 360 MU 使用した。カラム容量の 4 倍以上に当たる 300 ml を流したが、毒成分は溶出しなかった。また色素もカラム内に留まった。カラム内の固定相および移動相を回収し、減圧濃縮乾固後 10 ml の水を加えてマウス毒性試験を行おうとしたが、白濁し、水に不溶性物質が存在した。これをそのまま 1 ml マウスに注射したところ 15 時間で死亡した。毒成分が水に不溶化している可能性があるかと判断し、前回の DCC の有毒画分より 6 MU をとり、濃縮乾固後 2% Tween 60 に溶解させマ

ウス毒性試験を行ったところ、活性は 16 MU に上昇した。また粗抽出液の n-ブタノール抽出物についても、水に溶解させマウス毒性試験を行った場合 3 時間で死亡したのに対し、2% Tween 60 を用いて溶解させると 2 時間で死亡した。なお 2% Tween 60 によるマウスへの影響はまったく見られなかった。その結果、毒成分は脂溶性の性質もあると考え、マウス毒性試験には 2% Tween 60 を用いることにした。再度、上層液を固定相とする DCC を行った。652 MU の試料を使用し、下層液を 300 ml 流した後回収した固定相を 2% Tween 60 で検定したところ、561 MU の毒性を示した。86% の回収率であった。

D. 考察

フィリピン産ウツボ科魚類から、各種クロマトグラフィーにより微量ながら CTX 関連成分と思われる物質が得られたものの、本成分を M-8000 質量分析計で検出するには至らなかった。本試料から得られた毒量は 40 MU であり、有毒成分がすべて CTX であったと仮定すると、そのマウス腹腔内投与による最小致死量を 0.4 µg/kg として計算すると、320 ng 存在していたことになる。今回の分析では、1 分析あたり全容量の 1/100 を用いているので、回収率が 100% であっても、分析に供した量は 3 ng となる。参考までに本装置による麻痺性貝毒の成分であるサキントキシン (M.W. 299) の検出感度は 500 ng 程度であることから全量を分析しても検出されない可能性があると考えられた。しかしながら、Bio TOF による分析では、 m/z 1157.6 や 1143.6 の MS クロマトグラムにピークが確認できた。

ミャンマー産魚類の合一試料は比毒性が低く、CTX 関連物質の精製は、大量の試料抽出

液を用いたため、夾雑物が多く困難を極めた。抽出液をカラムに供するために濃縮を行ったが、液体状態では 50 ml までの濃縮が限界で、これをカラムに供しても良好な分離は望めなかった。今回、CTX の精製に採用した精製法は既報のゲルろ過によるものであるが、類似成分の精製に逆相分配系を採用している例もあることから (Satake ら, 2005)、今後検討する必要があると思われる。しかしながら、この分離モードには、物質の変移等の注意が必要である。

PTX 標準品による LC/MS 分析法の検討では、HITACHI 社製 M-8000 にて、メタノールによるフローインジェクションで、PTX 標準品 1 µg において TIC にピークが得られ、その MS スペクトルに PTX の $[M+Na+H]^{2+}$ と示唆される m/z 1352 が検出された。また、Bruker 社製 Bio TOF では、メタノールによるフローインジェクションにおいて、TIC で明瞭なピークを得ることができ、濃度 100 ng でもピークが確認でき (図 1)、そのピークの MS スペクトルに PTX ($[M+Na+H]^{2+}$) と思われる m/z 1351.73636 が検出された。

本研究で用いた *Ostreopsis* sp. は底生性鞭毛藻であるため、当初、大容量の培養槽は適さないのではないかと考えられたが、50 L 培養槽による培養が可能となり、大量の試料の確保が比較的容易になった。

本 *Ostreopsis* sp. の種名について、未同定であるが、毒性で見ると明らかなに *O. ovata* ではなく、*O. siamensis* に近い種と思われる。*Ostreopsis* に関する報告はそれ自体少なく、毒性に関しては、Nakajima ら (1981) が沖縄で行った底生鞭毛藻のスクリーニング時に見出した *O. siamensis* と新種の *O. ovata* に関するものの他には Bagnis (1985) が *O. lenticularis* について、MTX 様の毒と、脂溶性

画分にオカダ酸様の毒がみられたと報告している。

本研究でも分離・精製を行うに当たって、当初、MTXとCTXの分離法を参考に行った。

Yasumoto ら(1974)や Bagnis(1980)らはCTXとMTXの精製にアセトン沈殿法を用いているが、本研究でも n-ブタノール抽出後の毒成分にアセトンを加え、-20°Cで1晩放置した後、沈殿物について毒性を調べたところ、20%の活性しかなく、上澄液にも活性がなかった。この点はなお検討を要するところであるが *Ostreopsis* の毒成分はMTXとは異なるものであると考えられる一つの理由でもある。

PTXは、海産毒の中では最強の活性を持つ水溶性の毒であり、当初、その分離は難行したが、HPLC用のカラムTSK G3000Sの使用によって単離への活路が開かれた。本研究でもこのカラムを用いたが、PTXの精製方法は適さなかった。しかし、溶媒条件によって最高7割近い回収率を得た。図9のTSKのクロマトグラムで主毒のマウス致死量と溶血成分が分離したように思えたが、その他の方法では2つは分離されずその溶血活性も長時間かかって発現すること、またそのマウス致死作用も、大量投与時は別として、かなり長時間かかって作用することから、この毒成分は神経毒ではなく、細胞膜に作用するようなもので、そのために溶血活性を合わせ持つと考えられる。これについては、PTXの溶血活性がその反応にやはり長時間を要することなどの例がある(Chhatwal ら, 1983)。なお溶血試験について、今回行った1時間の培養後に測定するという方法は、現在広く使用されている30分間の培養のものより長い、上述のPTXなどのように溶血に30分以上を要するものもあるので、今後はサポニン以外の溶血活性の基準を作る必要が考えられ

る。

他に、水溶性海産毒として、Fusetani ら(1985)がアオブダイの毒について報告しており、その毒の性状に本論のOTXと類似するところがあったので、その分離法を参考にしようとしたが、これも適さなかった。

今回の、この *Ostreopsis* sp. の毒成分の分離は、当初ゲルろ過やTLC、HPLCによる分離が悪く難行したが、安定性試験の結果それほど不安定な物質ではないと確信したこと、脂溶性化の可能性を見出したこと、また n-ブタノール、ピリジン系溶媒によるDCC採用の成果も多い。DCCの採用とその溶媒の他のカラムクロマトグラフィーへの足掛かりになったといえる。ただ、その精製時における検出法については、UV、電気化学蛍光検出器、ニンヒドリンおよびドラーゲンドルフ試薬などでも検出できなかったことからマウス毒性試験法を用いるしか適当な方法は見当たらない。ただし、マウスアッセイは必要な試料が多いわりには鈍感なので、LC/MSを主体にした新たな分析法の開発が急がれる。なお現状では溶血活性を検出に用いるのが最もよいと考えられるが、これも前述の用にマウス致死量と同一物質であるという確定が得られていないので、問題は残る。

今回は主要な毒であるマウス致死成分について追及したが、ジエチルエーテル画分の毒成分、溶血成分、および最終的に得られた溶血成分についてもさらに検討を進める方法を検討する必要がある。たとえば、*Ostreopsis* と同じ *Coolia mootis* や *Prorocentrum mexicanum* など、数種の鞭毛藻に未同定の溶血成分があり、これらとの関連性も考えられる。なお、溶血活性成分は、Toyo Pearl HW-40SでVo直後に溶出することから、かなり分子量が大きいと思われる。また、これは粗毒の

Bio-Gel P-2によるゲルろ過で、Vo直後に溶出する溶血成分と同一であると考えられる。

E. 結論

フィリピン産ウツボ科魚類から CTX 類として 40 MU の粗毒を得た。それを精製後、Bruker 社製 Bio TOF で分析した結果、 m/z 1157.6、1146.6、1143.6、841.4、827.4、817.6、811.4、785.6 の MS クロマトグラムにおいてピークを確認することができた。一方、フィリピン産ハタ科魚類から 20 MU のマウス毒性が得られ、現在、有毒成分の特定を急いでいる。ミャンマー産魚類の合一試料より、CTX 類 40 MU の粗毒を得たが、LC/MS 分析において CTX 関連成分を検出されなかった。PTX 標準品による MS 分析では、HITACHI 社製 M-8000 のメタノールによるフローインジェクションにおいて、PTX 標準品 1 μg の注入時に TIC にピークが得られ、その MS スペクトルに PTX ($[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$) と考えられる m/z 1352 が検出された。また、Bruker 社製 Bio TOF でも TIC で明瞭なピークが得られ、100 ng 注入時でもピークが確認でき、そのピークの MS スペクトルに PTX ($[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$) と思われる m/z 1351.73636 が検出された。その LC 条件は、カラムに Inertsil C-4 (ϕ 2.1 \times 150 mm、GL science)、溶離液を 0.1% ギ酸 - 100%アセトニトリル(リニアグラジエント) を用いたとき、最も明瞭なピークを得ることができた。また、PTX の $[\text{M}+\text{H}]^+$ である m/z 2680-2682、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ である m/z 2703-2704 および $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$ である m/z 1351.7 の MS クロマトグラムにおいて、明瞭なピークを得ることができた。

一方、海産渦鞭毛藻 *Ostreopsis* sp.の産生する毒成分の分離・精製を行った。試料とした藻体は 1 L コマ型フラスコ、10L 培養ビン、50L

培養槽による培養で総量 720 L の培地から 132.9 g(湿重)を得た。

70%エタノールで抽出し、ジエチルエーテルで脱脂した粗毒のマウスへの腹腔内投与で、最小致死量を 1 MU とする用量-致死時間曲線を作成した。大量投与では 10~15 分で、最も遅いものは 40 時間以上経過して死亡した。

毒成分は熱に対して比較的安定であり、またエタノール、*n*-ブタノール等の各種溶媒にも安定であったが、酸またはアルカリで失活した。

粗毒のゲルろ過による回収率は一般に低く不安定で、満足できるものではなかったが、Toyopearl HW-40S で溶媒に 50%ピリジンを用いたとき約 100%の回収率が得られた。

HPLC については、ODS 系のカラムでは毒成分はまったく溶出せず、TSKgel G3000WxL で約 70%の回収を得た。

カラムクロマトグラフィーでは、多くの条件において満足な結果が得られなかったが、溶媒分配の結果、*n*-ブタノール:ピリジン:蒸留水 (5:2:10)の溶媒を用いての DCC による精製が有効であることが明らかになった。

F. 参考文献

Bagnis, R.; Chanteau, S.; Chungue, E.; Hurtel, J. M.; Yasumoto, T.; Inoue, A. Origins of ciguatera fish poisoning: a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, definitively involved as a causal agent. *Toxicon*, 18(2), 199-208 (1980).

Bagnis, R. et al. The dynamics of three toxic benthic dinoflagellates and the toxicity of ciguateric surgeonfish in French Polynesia. In: *Toxic Dinoflagellates*, pp. 177-182

- (1985).
- Ostreopsis lenticularis*
Chhatwal, G. S., Hessler, H. J., Beress, L., Habermann, E. The action of palytoxin on red cell membrane. *Toxicon, Suppl.* 3 61-4 (1983).
- Fukuyo, Y. Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. *Bull. Japan. Soc. Sic. Fish.* 47, 967-978 (1979).
- Fusetani, N., Sato, S., Hashimoto, K. Occurrence of a water soluble toxin in a parrotfish which is probably responsible for parrotfish liver poisoning. *Toxicon* 23, 105-112 (1985).
- 橋本芳郎. 魚介類の毒. 学会出版センター, 東京, p. 369 (1979).
- 厚生省生活衛生局監修. 4. シガテラ. 食品衛生検査指針理化学編, 日本食品衛生協会, 東京, pp. 309-312 (1991).
- Lenoir, S.; Ten-Hage, L.; Turquet, J.; Quod, J.; Bernard, C.; Hennion, M. First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean. *Journal of Phycology* (2004), 40(6), 1042-1051.
- Nakajima, I., Ohshima, Y., Yasumoto, T. Toxicity of benthic dinoflagellates in Okinawa. *Bull. Japan. Soc. Sic. Fish.* 47, 1029-1033 (1981).
- 野口玉雄, 阿部宗明, 橋本周久. 有毒魚介類携帯図鑑. 緑書房, 東京. p. 191 (1997).
- Norris, D. R., Bomber, J. W., Balech, E. Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from the Florida Keys. I *Ostreopsis heptagona* sp. Nov. In: *Toxic Dinoflagellates*, Elsevier, New York, pp. 39-44 (1985).
- Oshima, Y. Analysis of toxins in cultured *Gonyaulax excavate* cells originating in Ofunato Bay, Japan. In *Toxic Dinoflagellates Blooms* (ed. by Taylor, Seliger) pp. 377-380 (1979).
- Pottier, I.; Hamilton, B.; Jones, A.; Lewis, R. J.; Vernoux, J. P.. Identification of slow and fast-acting toxins in a highly ciguatera toxic barracuda (*Sphyraena barracuda*) by HPLC/MS and radiolabelled ligand binding. *Toxicon*, 42(6), 663-672 (2003).
- Pottier, I.; Vernoux, J.P.; Jones, A.; Lewis, R. J. Characterization of multiple Caribbean ciguaterins and congeners in individual specimens of horse-eye jack (*Caranx latus*) by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxicon*, 40(7), 929-939 (2002).
- Satake, M.; Tanaka, Y.; Ishikura, Y.; Oshima, Y.; Naoki, H.; Yasumoto, T. Gymnocin-B with the largest contiguous polyether rings from the red tide dinoflagellate, *Karenia* (formerly *Gymnodinium*) *mikimotoi*.

Tetrahedron Letters (2005), 46(20), 3537-3540.

谷山茂人, 荒川 修, 高谷智裕, 野口玉雄.
アオブダイ中毒様食中毒. *New Food Industry* **45**, 55-61 (2003).

Taylor, F. J. R. Toxic dinoflagellate: Taxonomic and biogeographic aspects with emphasis on protogonyaulax. In: *Seefood Toxicin* (ed. by Ragelis, E. P.), American Chemical Society, Washington, DC, pp. 77-79 (1984).

Taylor, F. J. R. *The biology of dinoflagellates*. Blackwell scientific publications, Oxford (1987).

Yasumoto, T., Endo, M. Toxicity study on a marine snail, *Turbo argyrostoma*-I presence of two sulfur-containing amines in the acetone soluble fraction. *Bull. Japan. Soc. Sic. Fish.* **40**, 841 (1974).

Yasumoto, T., Bagnis, R., Vernoux, J. P. Toxicity of surgeonfishes-II, properties of the principal water-soluble toxin. *Bull. Japan. Soc. Sic. Fish.* **42**, 359-365 (1976).

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

相良剛史, 西堀尚良, 橋本多美子, 西尾幸郎. 徳島県産ニホンイモリの毒性につ

いて. *四国大学紀要* **B-23**, 65-68 (2006).

西尾幸郎, 相良剛史, 黒田智久, 橋本多美子, 西堀尚良. 徳島県浅川湾産スペースベマンジュウガニの毒の性状. *四国大学紀要* **B-23**, 59-64 (2006).

Nishibori, N., Kondo, R., Sagara, T., Nishio, S., Cyclin Box Sequence in *Skeletonema costatum*. *Bull. Shikoku Univ.* **B-23**, 65-66 (2006).

2. 学会発表

Sagara, T., Nishio, S., Nishibori, N., Taniyama, S., Takatani, T., Arakawa, O., Noguchi, T. Toxin profiles of xanthid crabs in the southwest Islands of Japan. 7th Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxin Cebu, October 25-29 (2005).

Nishio, S., Sagara, T., Nishibori, N. Study on LC-MS analysis of all PSP components by anion exchange and reversephase two column system. 7th Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxin Cebu, October 25-29 (2005).

Taniyama, S., Asakawa, M., Arakawa, O., Takatani, T., Kuroki, R., Sagara, T., Nishio, S., Miyazawa, K., Noguchi, T. Occurrence of four food poisoning incidents by palytoxin from Ostraciid fish in Japan. 7th Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxin Cebu, October 25-29 (2005).

西尾幸郎, 相良剛史, 西堀尚良. 2004 年播磨灘南東部に発生した *Alexandrium tamiyavanichii* について. 2005 年度日本水産学会大会, 東京, 3 月 31 日-4 月 4 日 (2005).

西堀尚良, 相良剛史, 西尾幸郎. 渦鞭毛藻類の増殖にともなう細胞内ポリアミン含量の変化. 2005 年度日本水産学会大会, 東京, 3 月 31 日-4 月 4 日 (2005).

谷山茂人, 浅川 学, 黒木亮一, 西尾幸郎, 相良剛史, 高谷智裕, 荒川 修, 宮澤啓輔, 野口玉雄. ハコフグ中毒に関連して-ハコフグ科魚類の毒性スクリーニング-. 2005 年度日本水産学会大会, 東京, 3 月 31 日-4 月 4 日 (2005).

相良剛史, 西尾幸郎, 橋本多美子, 西堀尚良, 荒川修, 野口玉雄. 2004 年 10 月四国東部沿岸におけるマガキ、ムラサキイガイの *Alexandrium tamiyavanichii* による毒化. 第 89 回日本食品衛生学会学術講演会, 東京, 5 月 19 日-5 月 20 日 (2005).

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 培養条件

| | | |
|--------|---------------------------------------|----------------|
| 培地 : | ESM培地 | |
| | Seawater | 1000 ml |
| | Soil extract | 30 ml |
| | Tris-aminomethane | 1 g |
| | NaNO₃ | 120 mg |
| | K₂HPO₄ | 5 µg |
| | EDTA-Mn | 330 µg |
| | EDTA-Fe | 260 µg |
| | Vitamin B₁ | 100 µg |
| | Vitamin B₁₂ | 10 µg |
| | Biotin | 1 µg |
| | pH | 7.8~8.0 |
| 光強度 : | 40 µmol photon/m²/s | |
| 明暗周期 : | L:D=12 h:12 h | |
| 培養温度 : | 20°C | |