

表4 外国産魚類(試料B群)のCigua-Check反応と脂溶性画分の毒性

No.	試料名	採取場所	筋肉		内臓	
			Cigua-Check 反応	毒性 (MU/g)	Cigua-Check 反応	毒性 (MU/g)
20	アカマダラハタ <i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	ミャンマー	+	0.025	NA	NA
21			+	<0.025	NA	NA
22	マダラハタ <i>E. polyphekadion</i>	ミャンマー	±	<0.025	NA	NA
23			-	<0.025	NA	NA
24			-	<0.025	NA	NA
25	アマダレドクハタ <i>Plectropomus oligacanthus</i>	インドネシア	-	<0.025	-	NA
26			-	<0.025	-	NA
27			-	<0.025	-	NA
28	ダスキークールパー <i>E. marginatus</i>	リビア	-	<0.025	-	NA
29	ゴールデングールパー <i>E. costae</i>	リビア	-	<0.025	-	NA
30	バラフエダイ <i>L. bohar</i>	スリランカ	-	NA	-	NA
31	スジアラ属の魚類 <i>P. pessuliferus</i>	不明	+	<0.025	NA	NA
32		不明	+	<0.025	NA	NA
33		不明	±	<0.025	NA	NA
34	アマダレドクハタ <i>P. oligacanthus</i>	不明	+	0.025	NA	NA
35		不明	+	<0.025	NA	NA
36	コクテンアラ <i>P. laevis</i>	不明	+	<0.025	NA	NA
37		不明	+	<0.025	NA	NA
38	オオスジハタ <i>E. latifasciatus</i>	不明	+	<0.025	NA	NA
39		不明	+	<0.025	NA	NA
40	ヤイトハタ <i>E. salmonoides</i>	不明	+	<0.025	NA	NA
41		不明	+	<0.025	NA	NA
42	チャイロマルハタ <i>E. coioides</i>	不明	+	<0.025	NA	NA
43		不明	+	<0.025	NA	NA
44	ユカタハタ <i>Cephalopholis miniata</i>	不明	+	0.05	NA	NA
45	アカマダラハタ <i>E. fuscoguttatus</i>	不明	±	<0.025	NA	NA

+: 陽性; ±: 弱陽性; -: 陰性; NA: 未試験

表5 フィリピン産魚類(試料D群)のCigua-Check反応と毒性

No.	試料名	供試部位	Cigua-Check 反応	マウス毒性(MU/g)	
				脂溶性画分	水溶性画分
73	マダラハタ <i>Epinephelus polyphekadion</i>	筋肉	+	<0.025	<0.5
		内臓	±	NA	NA
74	マダラハタ <i>E. polyphekadion</i>	筋肉	+	<0.025	<0.5
		内臓	-	NA	NA
75	ゴマモンガラ <i>Balistoides viridescens</i>	筋肉	+	0.025	<0.5
		内臓	±	NA	NA
76	ブチブダイ <i>Scarus niger</i>	筋肉	+	0.05	<0.5
		内臓	±	NA	NA
77	ブチブダイ <i>S. niger</i>	筋肉	-	<0.025	<0.5
		内臓	±	NA	NA
78	ブチブダイ <i>S. niger</i>	筋肉	±	0.05	0.5
		内臓	NA	NA	NA
79	イロブダイ <i>Bolbometopon bicolor</i>	筋肉	+	0.025	0.5
		内臓	NA	NA	NA
80	ヒブダイ <i>S. ghobban</i>	筋肉	+	<0.025	0.5
		内臓	NA	NA	NA
81	ヒブダイ <i>S. ghobban</i> *	筋肉	+	<0.025	1.0
		内臓	NA	NA	NA
82	アカテンモチノウオ <i>Cheilinus chlorourus</i>	筋肉	±	NA	1.0
		内臓	NA	NA	NA
83	アカテンモチノウオ <i>C. chlorourus</i>	筋肉	±	NA	1.0
		内臓	NA	NA	NA
84	スジアラ属の魚類 <i>Plectroponus</i> sp.	筋肉	+	0.025	NA
		内臓	NA	NA	NA
85	スジアラ属の魚類 <i>Plectroponus</i> sp. <i>Plectroponus</i> sp.	筋肉	+	0.025	NA
		内臓	NA	NA	NA
86	未同定魚類	筋肉	+	0.025	NA
		内臓	NA	NA	NA
87	未同定魚類	筋肉	+	<0.025	2.0
		内臓	NA	NA	NA
88	未同定魚類	筋肉	+	0.025	1.0
		内臓	NA	NA	NA
89	未同定魚類	筋肉	+	0.025	1.0
		内臓	NA	NA	NA
90	未同定魚類	筋肉	+	0.025	1.0
		内臓	NA	NA	NA

*: 3検体を合一; +: 陽性; ±: 弱陽性; -: 陰性; NA: 未試験

表6 国産魚類(試料C群)の水溶性画分の毒性

No.	試料名	採取場所	毒性(MU/g)			
			筋肉	肝臓	消化管	
46	アオブダイ <i>Scarus ovifrons</i>	徳島県	<0.5	0.5	<0.5	
47			<0.5	<0.5	<0.5	
48		和歌山県	<0.5	NA	NA	
49	ハコフダ <i>Ostracion cubicus</i>	長崎県	0.5	0.25	1.0	
50			0.5	0.5	1.0	
51			<0.5	0.5	0.5	
52			<0.5	<0.5	0.5	
53			<0.5	<0.5	0.5	
54			<0.5	<0.5	<0.5	
55			<0.5	<0.5	<0.5	
56			<0.5	<0.5	<0.5	
57			徳島県	<0.5	<0.5	<0.5
58			<0.5	<0.5	<0.5	
59			<0.5	<0.5	<0.5	
60			<0.5	<0.5	<0.5	
61			<0.5	<0.5	<0.5	
62			宮崎県	0.5	<0.5	<0.5
63	<0.5	<0.5	<0.5			
64	ウミスズメ <i>Lactoria diaphana</i>	徳島県	<0.5	<0.5	<0.5	
65			<0.5	<0.5	<0.5	
66			<0.5	<0.5	<0.5	
67			<0.5	<0.5	<0.5	
68			<0.5	<0.5	<0.5	
69			宮崎県	<0.5	<0.5	0.5
70			<0.5	<0.5	0.25	
71			<0.5	<0.5	0.25	
72			<0.5	<0.5	<0.5	

NA: 未試験

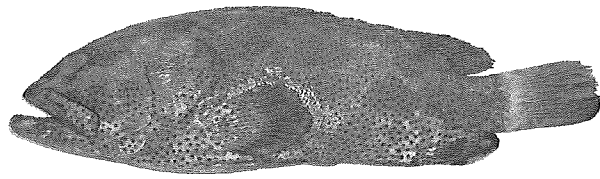


図 18 マダラハタ *E. polyphekadion* (試料 No. 22)

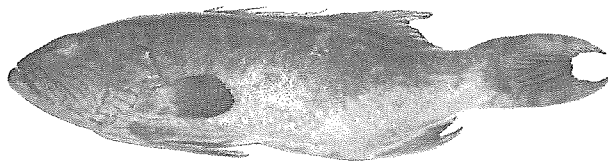


図 19 アマダレドクハタ *Plectropomus oligacanthus* (試料 No. 25)

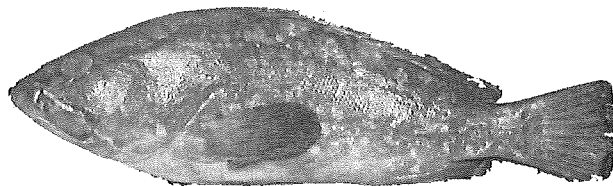


図 20 ダスキーグループー *E. marginatus* (試料 No. 28)

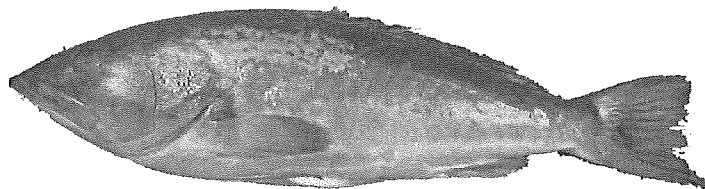


図 21 ゴールデングルーパー *E. costae* (試料 No. 29)

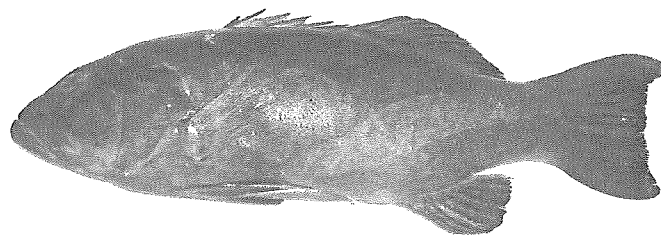


図 22 スジアラ属 *P. pessuliferus* (試料 No. 31)

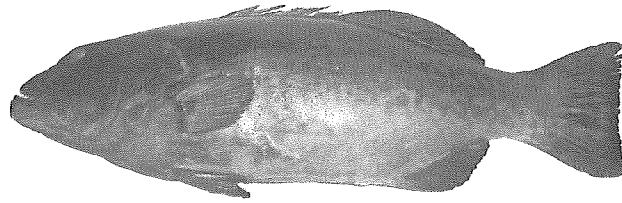


図 23 コクハンアラ *P. laevis* (試料 No. 36)

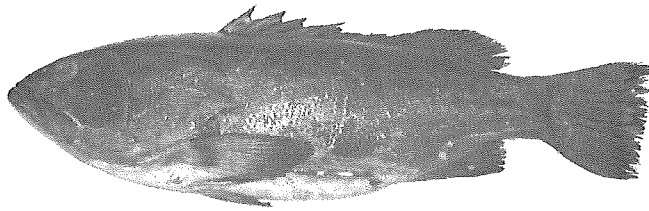


図 24 オオスジハタ *E. latifasciatus* (試料 No. 38)

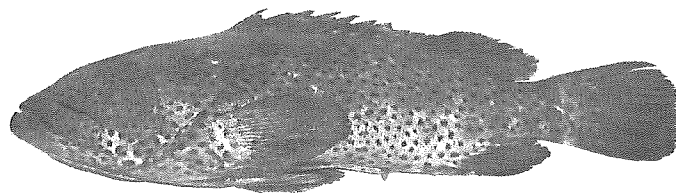


図 25 ヤイトハタ *E. salmonoides* (試料 No. 40)

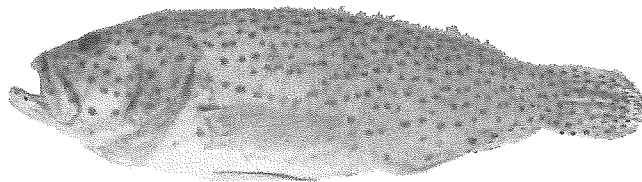


図 26 ユカタハタ *Cephalopholis miniata* (試料 No. 44)



図 27 アオブダイ *Scarus ovifrons* (試料 No. 47)

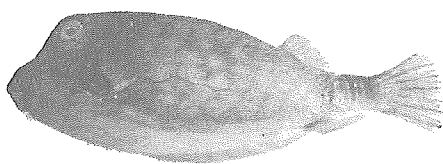


図 28 ハコフゲ *Ostracion cubicus* (試料 No.49)



図 29 ウミスズメ *Lactoria diaphana* (試料 No. 69)

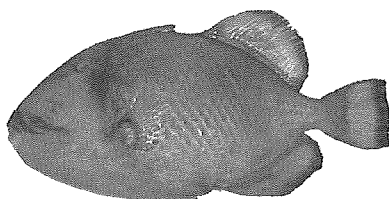


図 30 ゴマモンガラ *Balistoides viridescens* (試料 No. 75)

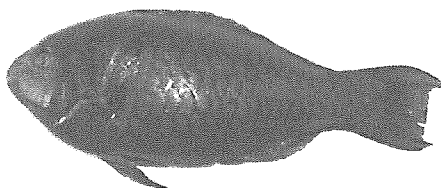


図 31 ブチブダイ *S. niger* (試料 No. 76)

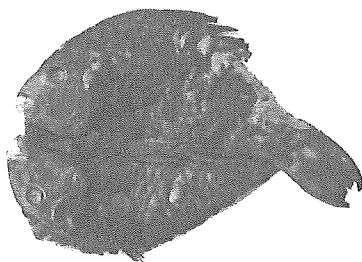


図 32 ブチブダイ *S. niger* (試料 No. 78)

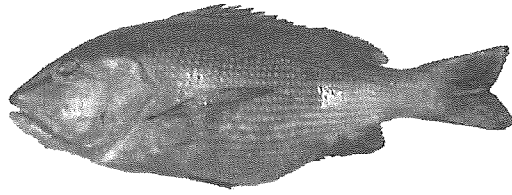


図 13 バラフェダイ *Lutjanus bohar* (試料 No. 1)



図 14 ソウシハギ *Aluterus scriptus* (試料 No. 14)

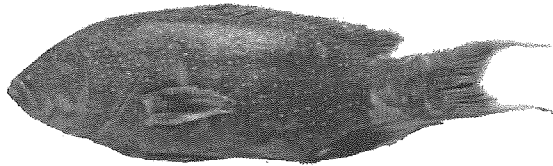


図 15 バラハタ *Variola louti* (試料 No. 17)



図 16 ヒメフェダイ *L. gibbus* (試料 No. 19)

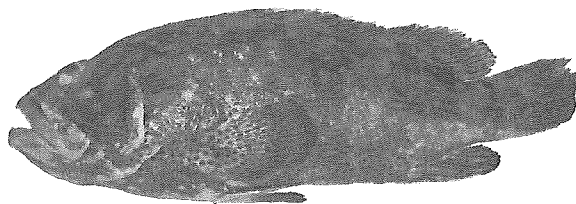


図 17 アカマダラハタ *Epinephelus fuscoguttatus* (試料 No. 20)

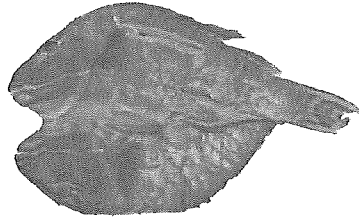


図 33 イロブダイ *Bolbometopon bicolor* (試料 No. 79)

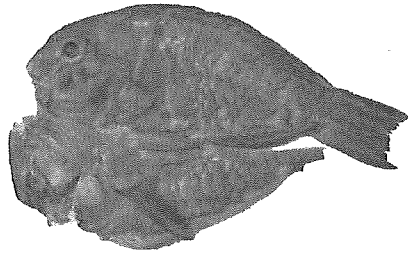


図 34 ヒブダイ *S. ghobban* (試料 No. 80)

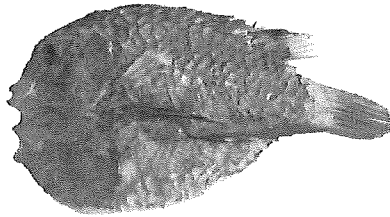


図 35 アカテンモチノウオ *Cheilinus chlorourus* (試料 No. 83)

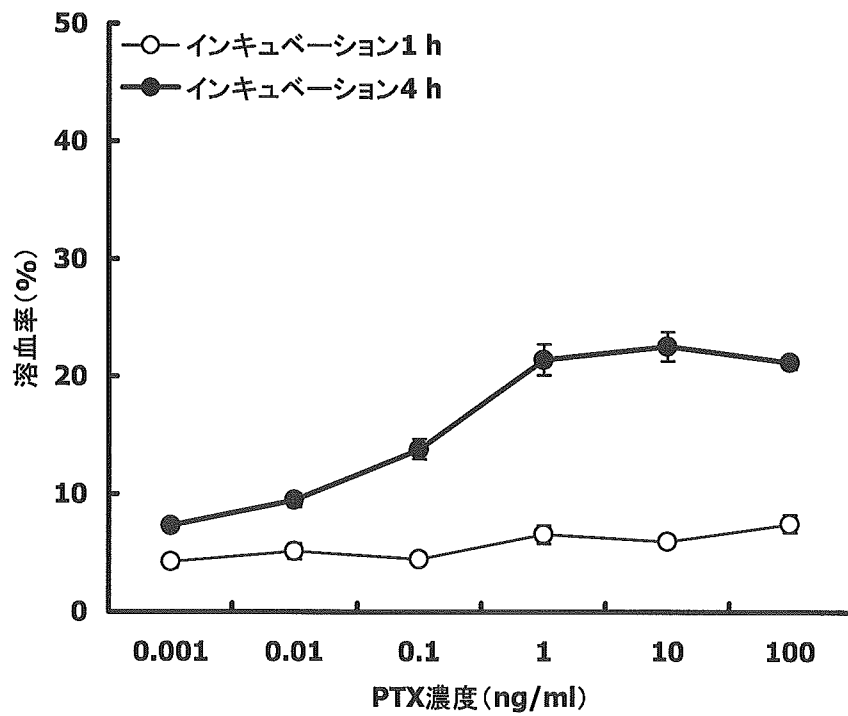
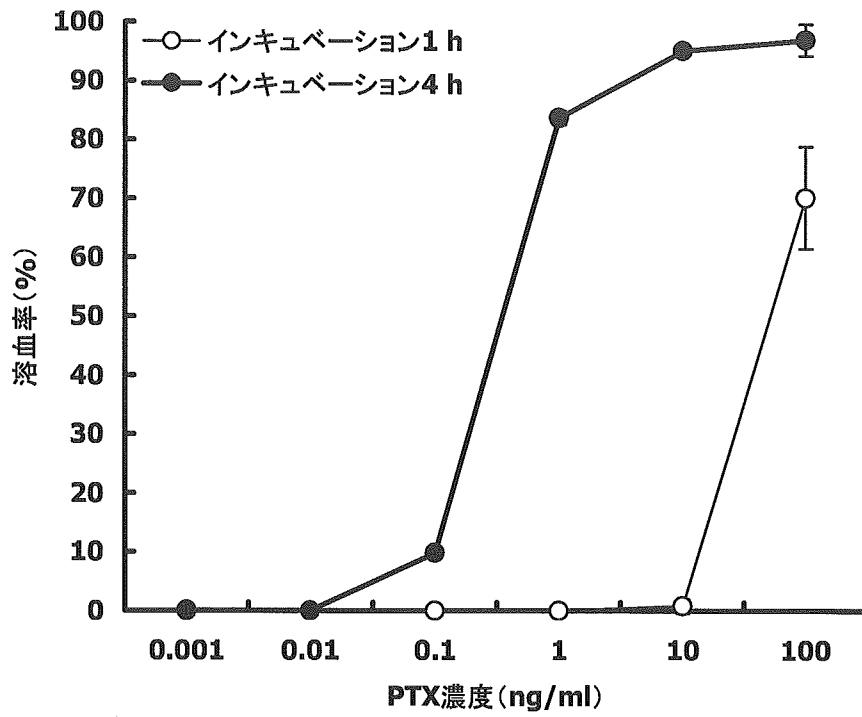


図36 PTX標準品のマウス(上)およびヒト(下)赤血球に対する溶血率

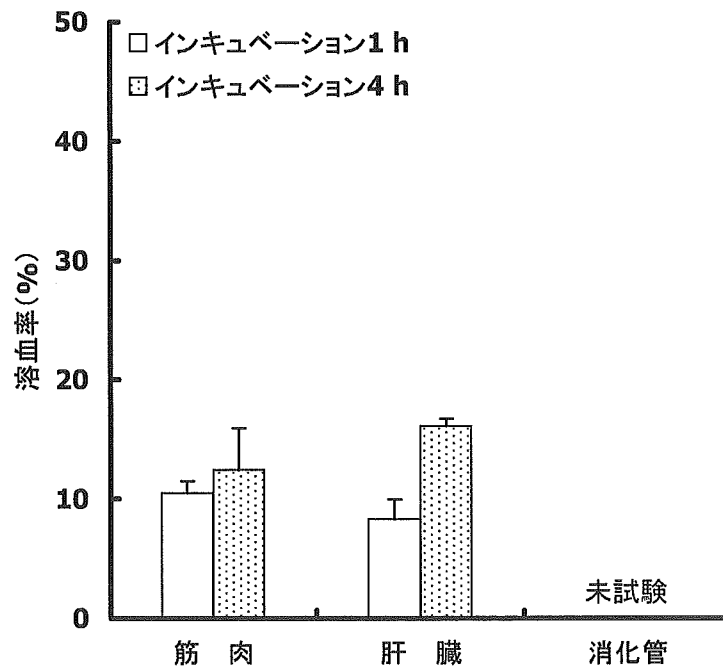
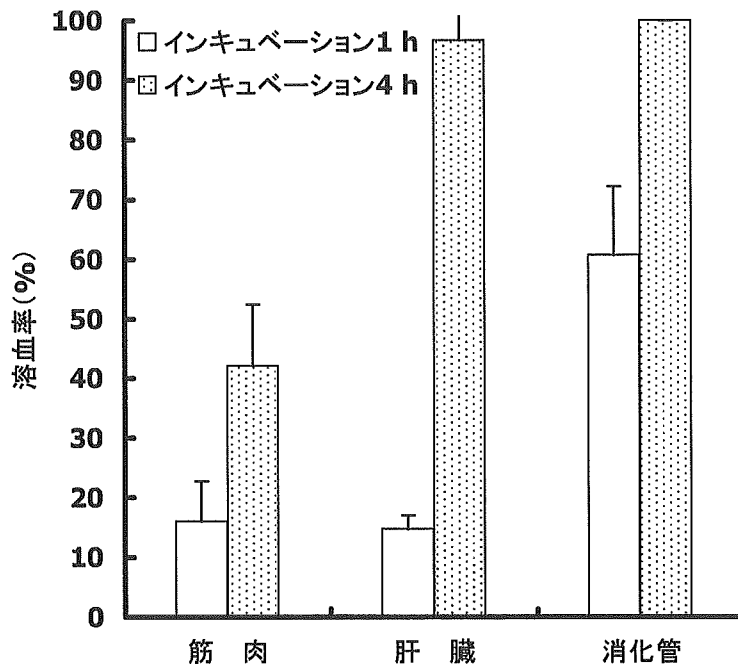


図37 長崎県産ハコフグ(試料No. 49)のマウス(上)およびヒト(下)赤血球に対する溶血率

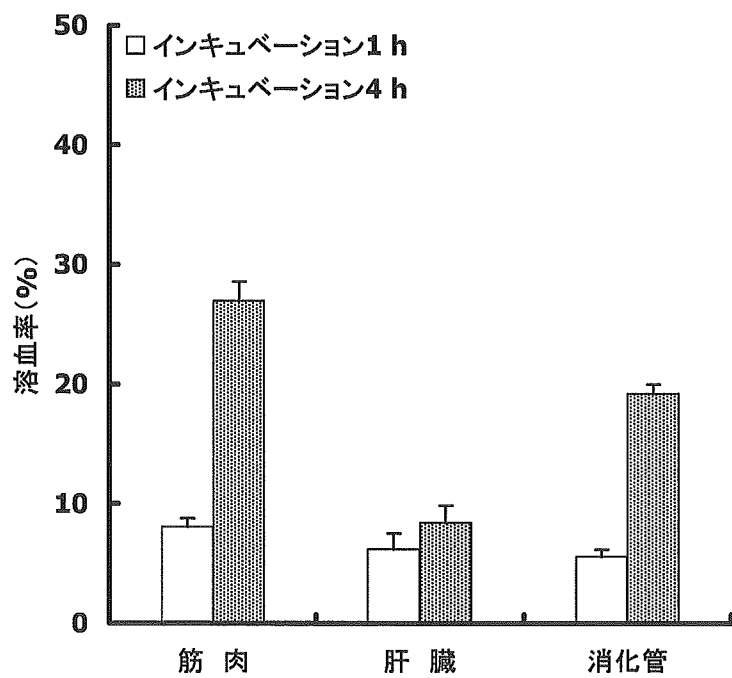
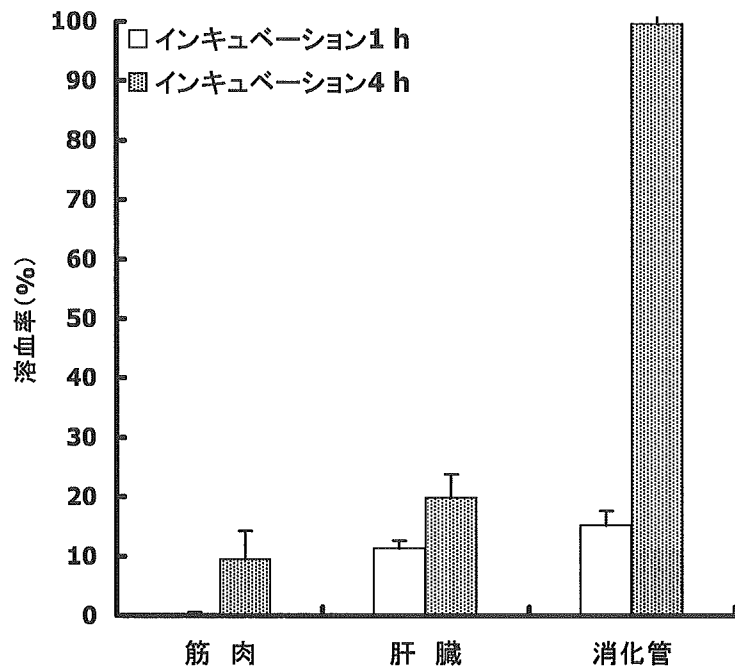


図38 長崎県産ハコフグ(試料No. 50)の Maus(上)およびヒト(下)赤血球に対する溶血率

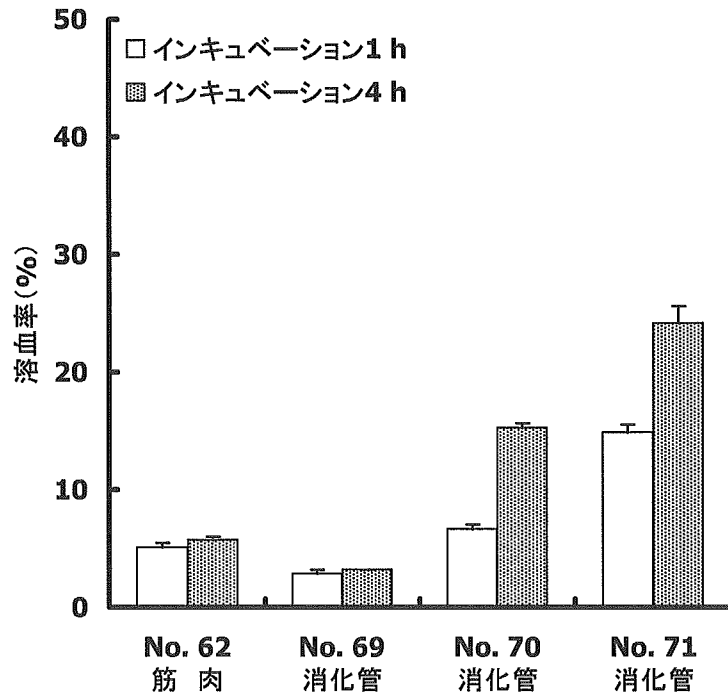
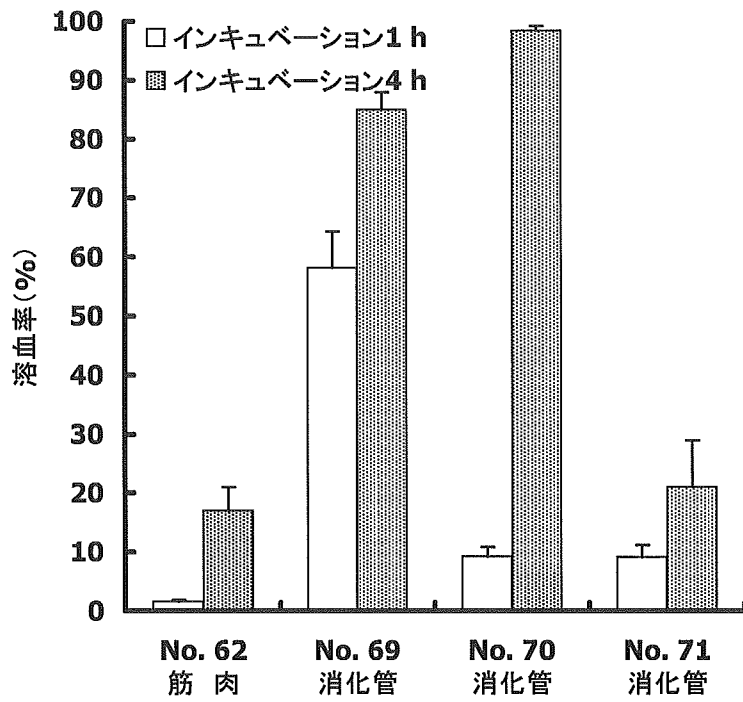


図39 宮崎県産ハコフグとウミスズメの Maus (上) およびヒト (下) 赤血球に対する溶血率

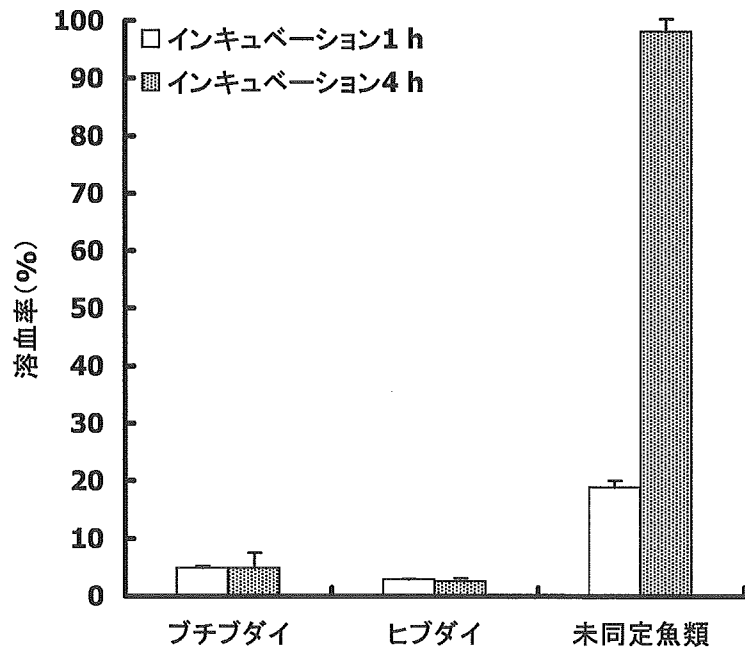
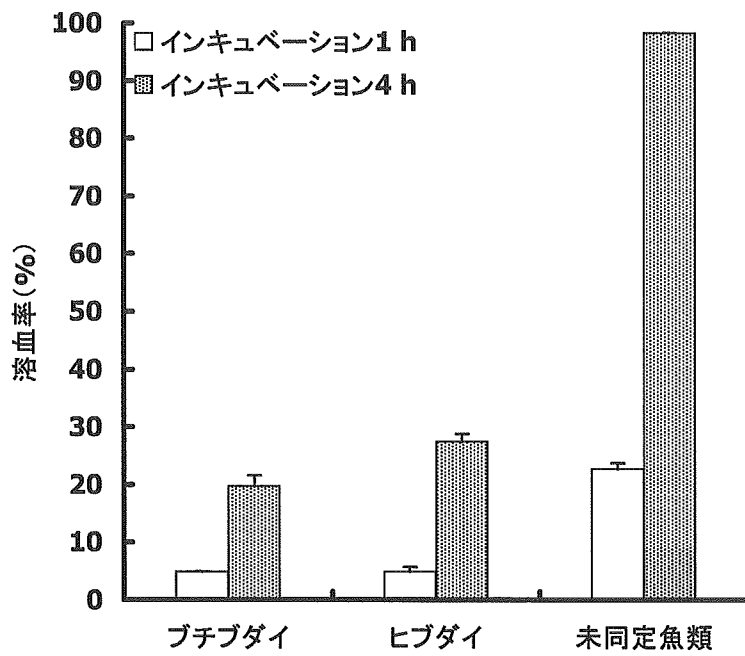


図40 フィリピン産ブチブダイ(試料No. 79)、ヒブダイ(試料No. No. 81)、未同定魚類(試料No. 89)の Maus(上)およびヒト(下)赤血球に対する溶血率

研究成果の刊行に関する一覧表

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. 徳島県浅川湾産スベ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).

Asakawa, M., Takayama, H., Beppu, R., Miyazawa, K. Occurrence of paralytic shellfish poison (PSP)-producing dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. during 1993-2004 and its PSP profiles. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **46**, 246-250 (2005).

Asakawa, M., Beppu, R., Tsubota, M., Ito, K., Takayama, H., Miyazawa, K. Paralytic shellfish poison (PSP) profiles and toxification of short-necked clams fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **46**, 251-255 (2005).

徳島県浅川湾産スベスベマンジュウガニの毒の性状

西尾 幸郎・相良 剛史・黒田 智久・橋本多美子・西堀 尚良

Toxin Profiles of a Xanthid Crab *Atergatis floridus* Collected from
Asakawa Bay in Tokushima Prefecture, Japan

Sachio NISHIO, Takefumi SAGARA, Tomohisa KURODA,
Tamiko HASHIMORO, and Naoyoshi NISHIBORI

ABSTRACT

A xanthid crab, *Atergatis floridus*, which lives along the coasts of Asakawa, in the southeastern parts of Shikoku Island, is known as a toxic marine animal. The crab contained both tetrodotoxin (TTX) and paralytic shellfish toxin (PST). The toxin was purified by Bio-Gel P-2 column chromatography and was shown to consist of TTX, 4-*epi*TTX, 6-*epi*TTX, 4, 9-anhydroTTX, and 11-saxitoxinehtanoic acid (SEA) by means of liquid chromatography mass spectrometry analysis.

KEYWORDS : *Atergatis floridus*, TTX, 4-*epi*TTX, 6-*epi*TTX, 4, 9-anhydroTTX, 11-saxitoxinehtanoic acid (SEA)

緒言

スベスベマンジュウガニ(*Atergatis floridus*)はオウギガニ科に属し、成長すると甲長が35 mm, 甲幅が52 mmに達する小型の毒ガニである。甲殻の表面は名前のおり平滑で体色は濃紫色, 褐色又は淡緑色で明るい雲状紋があり, 鉗の先は黒い。雑食性で, 神奈川県三浦半島産のスベスベマンジュウガニ胃内容物から, 紅藻類, 海綿類, 環形動物の組織, 動物の卵及び砂が検出されている¹⁾。

紅海, 東及び南アフリカ海岸, オーストラリア, タヒチ, ハワイなどに広く分布するインド太平洋種で, 岩礁地帯やサンゴ礁の浅瀬などに普通にみられる。日本では, 千葉県房総半島以南の太平洋沿岸各地, 沖縄県南西諸島まで分布し, 徳島県では県南部の浅川湾と県北部の小鳴門水道近くで確認されている²⁾。

スベスベマンジュウガニは生息地域によって毒組成が著しく異なり, 徳島県浅川湾産のものはフグ毒 Tetrodotoxin(TTX)と麻痺性貝毒 Paralytic Shellfish Poison(PSP)の両方をあわせもち, 冬期採取試料に TTX 含有割合が高くなる傾向がある²⁾。他の地域では, TTX を主成分とするもの³⁾と PSP を主

成分とするもの⁴⁾の2つのタイプにほぼ限られ, 浅川湾産のもの様に明らかに両者が共存しているものはほとんどみられない。

本研究は, 徳島県浅川湾産スベスベマンジュウガニに含まれる毒素を精製し, 高速液体クロマトグラフィー(HPLC), 液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)による毒成分の超精密分析を行い, これまでの結果と比較する事を目的とした。

材料及び方法

材料

1991年12月に徳島県浅川湾で採取し, -20℃で長期間凍結保存したスベスベマンジュウガニを試料とした。内臓は取り除き, 殻と筋肉部を試料とした。

毒の抽出

スベスベマンジュウガニの殻及び筋肉部約2,000 gを磨砕後, 3倍量の1%酢酸-80%メチルアルコールを加え, 磨砕抽出した。3,000 ×gで20分間遠心分離して上清と残渣に分けた。残渣に同様の操作を2回繰り返して, 得られた上清を合一して減圧濃縮した。濃縮物にジエチルエーテルで2回, ジクロ

ロメタンで1回、分液ロートにて脱脂操作を加え、水層を有毒画分とした。有機溶媒層に蒸留水を注いで分配し、水層を有毒画分に合一した。これらの操作で得た水層を減圧下で濃縮し、2,000 mlとした。限外ろ過膜を用いて、分子量1,000以下の画分を得て試料とした。

マウス毒性試験法

フグ毒及び麻痺性貝毒のマウス毒性試験は公定法⁹⁾に準じて行った。抽出及び精製の各段階でマウス毒性試験を行った。体重20 gのddY系雄マウスに、試験溶液1 mlを腹腔内投与して、投与が終了した時間からマウスの呼吸が完全に停止するまでの時間(致死時間)を測定した。TTXの場合は、呼吸が30分で停止する毒力を1マウスユニット(MU)とし、PSPの場合は、呼吸が15分で停止する毒力を1 MUとした。上記の方法で測定した致死時間から、TTX及びPSPの換算表を用いて毒性値を求めた。

活性炭処理

限外ろ過処理した毒抽出液を1 M水酸化ナトリウムでpH 5.5に調整した。よく水洗した活性炭1,000 mlを攪拌し、毒を活性炭に吸着させた。毒成分を吸着した活性炭に2,000 ml蒸留水を加え2分間攪拌してろ過した。集めた活性炭に1%酢酸-20%エチルアルコール4,000 mlを注加し1時間攪拌し、さらに5%酢酸-40%エチルアルコール4,000 mlで1時間攪拌して、毒を活性炭から溶出した。得られた有毒脱着液をそれぞれFra. I及びIIとした。

Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィー

得られた有毒画分I及びIIをそれぞれ減圧濃縮後、Bio-Rad社製Bio-Gel P-2カラム(40 mmφ×800 mm)クロマトグラフィーに供した。毒溶液をカラムに吸着させ、蒸留水1,000 ml次いで0.1 M酢酸2,000 mlを流して毒成分を溶出させた。得られた毒溶液を減圧濃縮し、酢酸を除去した後、蒸留水でよく洗浄して0.15 M酢酸で緩衝化させたBio-Gel P-2カラム

(10 mmφ×900 mm)により精製した。

HPLC用の試料調製

試料を、蒸留水とメタノールで活性化させたWaters社製Sep Pak C18カートリッジカラムに通し、妨害成分を吸着除去した。これで得た溶液を、Millipore社製ウルトラフリーを用いて15,000×gで20分間遠心ろ過し、適当な濃度に調製してHPLC用サンプルとした。

TTX分析用HPLC

カラムにGLサイエンス社製Inertsil ODS-3(4.6 mmφ×250 mm)を、移動相に10 mMヘプタンスルホン酸を含む2%アセトニトリル-60 mMリン酸アンモニウム緩衝液(pH 5.0)を用い、流速は0.6 ml/minとした。カラムからの溶離液に、4 M水酸化ナトリウムを同じ流速で混合させ、110°Cに制御した10 mテフロンチューブで加熱して発色させ、励起波長384 nm、蛍光波長505 nmの蛍光強度を測定した⁶⁾。

HPLCによるPSPの分析

全PSP成分一括分析のカラムに日立社製HG3013 N(4.6 mmφ×50 mm)と野村化学社製Develosil C-30UG-5(4.6 mmφ×250 mm)を、STX及びGTXそれぞれの分析に野村化学社製Develosil C-8を使用した。

移動相Aに5 mMヘプタフルオロ酪酸を含む10 mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 3.8)、移動相Bに10 mMヘプタフルオロ酪酸を含む10%アセトニトリル-30 mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 7.1)を用いた。分析開始時から25分まで移動相A、26分から45分を移動相B、46分から分析終了の70分まで移動相Aを流して分析した⁷⁾。

STX分析の移動相には、カラムに野村化学社製Develosil C-8(4.6 mmφ×250 mm)を、移動相に2 mMヘプタンスルホン酸を含む4%アセトニトリル-30 mMリン酸アンモニウム緩衝液(pH 7.3)を用いた。

GTX分析の移動相には、カラムにDevelosil C-8(4.6 mmφ×250 mm)を、移動相に2 mMヘプタンスルホン酸を含む10 mMリン酸アンモニウム緩衝液

(pH 7.3)を用いた。いずれの分析も流速は0.6 ml/minとした。

カラムからの溶離液に、7 mM 過ヨウ素酸を含む50 mM リン酸緩衝液 (pH 10.0) を同じ流速で混合させ、65℃で加熱して蛍光化させ、その後0.5 M 酢酸を同じ流速で混合して蛍光強度を増感させ、励起波長340 nm, 蛍光波長410 nmの蛍光強度を測定した。

液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS)

カラムに日立社製 HG3013N (4.6 mm φ×50 mm) と野村化学社製 Develosil RP-AQUEOUS-AR (4.6 mm φ×250 mm) を使用した。移動相 A に5 mM ヘプタフルオロ酪酸を含む10 mM 酢酸アンモニウムを、移動相 B に5 mM ヘプタフルオロ酪酸を含む10% メチルアルコール-30 mM 酢酸アンモニウムを用いた。HPLC の全 PSP 成分一括分析と同様に、分析開始時から25分までを移動相 A, 26分から45分を移動相 B, 46分から分析終了の70分までを移動相 A とした。溶離液を音速噴霧イオン化法 sonic spray ionization (SSI)[®] を装備した日立 M-8000型 LC/MS に導き、質量分析を検出器とした HPLC を実施した。MS 測定条件をポジティブモード、第一細孔温度170℃、シールド温度300℃、検出器400V、フォーカス電圧30V、ドリフト電圧30V とした。

結果及び考察

1. 有毒画分の抽出と精製

スベスマンジュウガニ試料約2,000 g から TTX 換算で約45,000 MU の粗毒を抽出した。これらを限外ろ過して、分子量1,000以下の画分に30,000 MU を回収した。全量を活性炭にて処理し、希酢酸エチルアルコール溶液で着脱した。1% 酢酸-20% エチルアルコール溶液で18,000 MU (Fra. I) を、そして5% 酢酸-40% エチルアルコール溶液で3,000 MU (Fra. II) を得た。こうした活性炭処理での毒の回収率は70%と低かったが、茶褐色に着色し濃縮すると粘性が高くなっていた抽出液が、凍結乾燥により淡黄色パウダー状になるほど不純物が取り除か

れ、毒の純度は飛躍的に上昇したと思われた。

18,000 MU の Fra. I を水洗した Bio-Gel P-2 カラム (40 mm φ×800 mm) に展開して精製した。カラムから水で溶出した画分を Fra. A, 0.1 M 酢酸溶出画分を Fra. B とした。同様に3,000 MU の Fra. II も Bio-Gel P-2 カラムで精製し、0.1 M 酢酸溶出画分を Fra. C とした。カラムから溶出した各画分の毒性は、それぞれ Fra. A が5,000 MU, Fra. B が34,000 MU, Fra. C が2,000 MU となった。Fra. A と B の合計した毒量は39,000 MU であり、Bio-Gel P-2 カラム処理前と比較すると217% 毒量が増大した。一方、Fra. C は67% と減少した。Fra. A と B での毒量増大は、精製の過程で低毒性成分が一部分解して高毒性成分へ変換したためと推測された。これは、deoxyTTX に酸素原子が付加して TTX になる場合などが考えられる。

続いて、カラムサイズ10 mm φ×900 mm での Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーを行った。Fra. A, B, C をそれぞれ別々に精製した。10 ml ずつの画分に分けた結果、Fra. A は Fra. 10~16 に PSP 換算で約2,000 MU, Fra. B は Fra. 28~35 に TTX 換算で約30,000 MU, Fra. C は Fra. 25~33 に PSP 換算で約1,000 MU の毒性を示した (図1)。

2. HPLC 分析

Fra. A~C それぞれの第2回 Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィー結果から、有毒成分溶出の各ピークより Fra. A の Fra. 14 (A-Fra. 14), Fra. B の Fra. 31 (B-Fra. 31), Fra. C の Fra. 29 (C-Fra. 29) を選び、HPLC の試料とした。A-Fra. 14, C-Fra. 29 からは、PSP 成分として保持時間31~32分に強いピークが検出された。後に述べる LC/MS の結果から、11-saxitoxinethanoic acid (SEA) と同定された。一方、B-Fra. 31 から保持時間15.4分, 17.3分, 19.9分にピークが検出され、前記と同様に LC/MS の結果から、それぞれを溶出順に tetrodotoxin (TTX), 4-epiTTX, anhydroTTX と判断した。B-Fra. 31 には TTX が最も高濃度で溶出しており、これは約8,500 MU の毒性を示した。以上の結果を図2に示す。

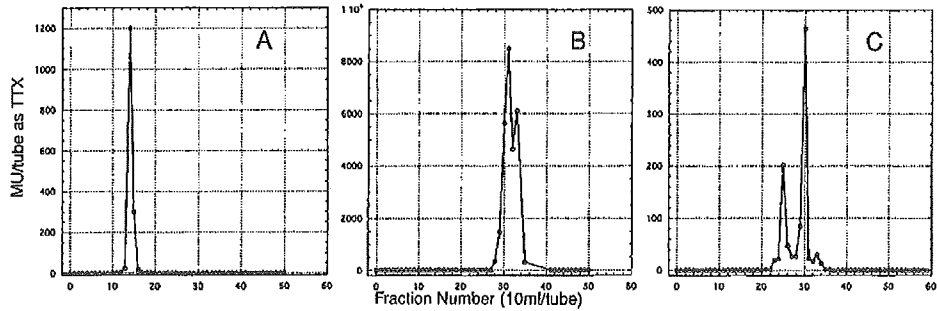


図1 浅川湾産スズメダイの1回目Bio-GelP-2カラムクロマトグラフィーで溶出した有毒成分A,B及びCを2回目Bio-Gel P-2カラムクロマトグラフィーに付した有毒成分の溶出結果
A: Fraction A (5,000 MU) を試料としたもの, B: Fraction B (18,000 MU) を試料としたもの, C: Fraction C (2,000 MU) を試料としたもの

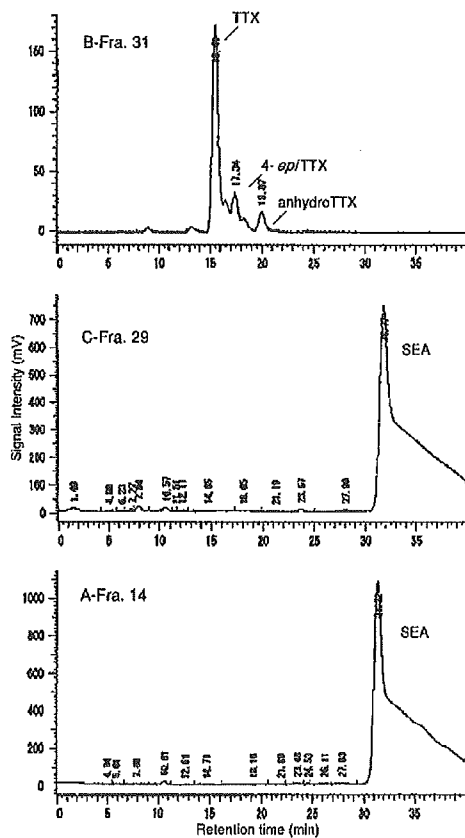


図2 2回目Bio-Gel P-2カラムクロマトグラフィーで精製されたスズメダイ有毒フラクションのHPLC分析結果

3. LC/MS分析

HPLC分析においてTTXが検出されたB-Fra. 31について、日立M-8000型LC/SSI-MSにて質量分析を行った。結果を図3及び図4に示す。図3のAはTTX, 4-*epi*TTXの[M+H]⁺=320のマスクモトグラムを示したものであり、12.8分と15.0分に2つのピークが出現した。それぞれのマススペクトルを図3のB, Cに表示した。両成分ともm/z 320の[M+H]⁺を与える事から、溶出の順に

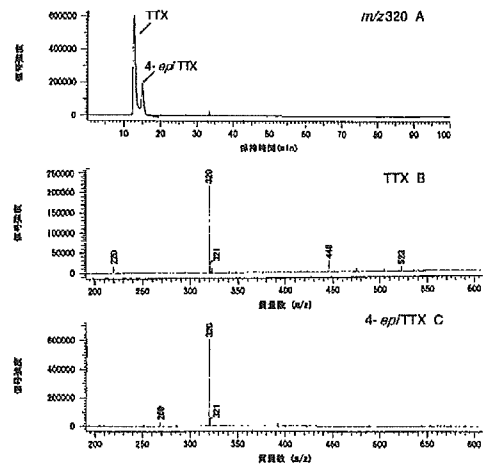


図3 B-Fra. 31のLC/MS分析結果
A: m/z 320によるマスクモトグラム
B: 保持時間12.73分に溶出したTTXのマススペクトラム
C: 保持時間14.98分に溶出した4-*epi*TTXのマススペクトラム

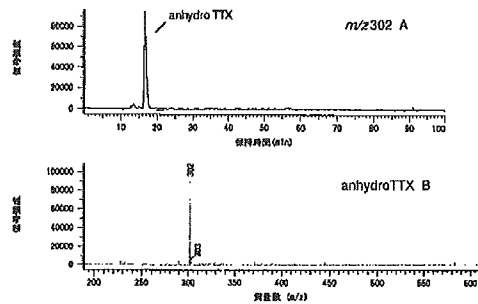


図4 B-Fra. 31のLC/MS分析結果
A: m/z 302によるマスククロマトグラム
B: 保持時間16.58分に溶出した anhydroTTX のマススペクトラム

TTX, 4-*epi*TTX と同定した。

また, TTX から脱水した anhydroTTX を m/z 302 で検出した (図4-A)。保持時間17.8分に強いピークがみられ, そのマススペクトル図4-Bが m/z 302 の単独シグナルを与える事から, 本成分を anhydroTTX と同定した。

次に, HPLC 分析において SEA と思われるピークが検出された A-Fra. 14について LC/MS 分析を行った結果を図5に示す。主要 PSP 成分として認められた SEA は LC/MS の分析条件で保持時間41~42分に溶出する事が m/z 358でのマスククロマトグラム図5-Aで明らかとなった。ピークトップが割れており, 2成分存在するとの推測もできるが, イオントラップ型質量分析の特徴である成分過剰に

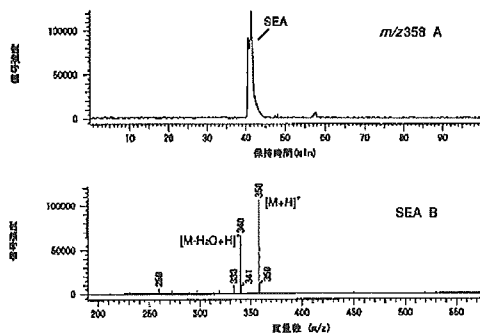


図5 A-Fra. 14のLC/MS分析結果
A: m/z 358によるマスククロマトグラム
B: 保持時間41.35分に溶出した SEA のマススペクトラム

よる飽和が原因と判断した。そのマススペクトログラム図5-Bは $[M+H]^+=358$, $[M+H-H_2O]^+=340$ の2本が検出されており, PSP成分で11位にカルボキシル基が結合した11-saxitoxinethanoic acid (SEA)⁹⁾と同定された。C-Fra. 29についても同様の結果が得られた。

まとめ

1991年12月の浅川湾産スベスベマンジュウガニは TTX 換算で約22.5 MU/g とかなり低い毒性値であったが, これは長期間保存していたため, 毒性が著しく低下したのではないかと考えられる。Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーを行った後毒性値が大きく跳ね上がったが, これは低毒性成分が高毒性成分に変換された事を意味しており, 結果として TTX, 4-*epi*TTX, anhydroTTX, SEA が測定されたと結論した。同定された4種類の毒成分を母体とした各種前駆体の存在が推測される。

徳島県浅川湾産スベスベマンジュウガニは, TTX と PSP の両方をあわせもち, その比率は7:3であった。有毒成分の精製を行った結果, TTX 群の大部分を TTX が占め, PSP はほぼ SEA のみで構成されていた。SEA は PSP 標品として入手しがたい貴重な物質である。PSP 産生種として知られている渦鞭毛藻や毒化した二枚貝の PSP 代謝は主としてスルホン化である。SEA は STX にカルボキシル基が導入されたものであり, この様な特殊な PSP 代謝酵素群がオウギガニ科スベスベマンジュウガニに分布する事が推測された。

本研究では, 今までの浅川湾産スベスベマンジュウガニの分析結果と同様の傾向がみられ²⁾¹⁰⁾, 数種の TTX 関連物質を確認する事ができた。冬期採取試料のためか, TTX の含有割合が高かった。今後この地域のスベスベマンジュウガニの毒成分組成について詳しく調査すべきであると考えられる。

なお, 本研究の一部は学術研究高度化推進費ならびに四国大学学術助成をうけ行われたものである。

引用文献

- 1) 野口玉雄, 1996. フグはなぜ毒をもつのか—海洋生物の不思議. 日本放送出版協会, 東京: 155-159.
- 2) 西尾幸郎, 1991. 浅川湾産スベスマンジュウガニからフグ毒関連物質の分離について. 四国女子大学紀要11: 31-40.
- 3) T. Noguchi, A. Uzu, K. Koyama, J. Maruyama, Y. Nagashima, and K. Hashimoto, 1983. Occurrence of Tetrodotoxin as the Major Toxin in a Xanthid Crab *Atergatis floridus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*49: 1887-1892.
- 4) T. Noguchi, S. Konosu, and Y. Hashimoto, 1969. Identity of the Crab Toxin with Saxitoxin. *Toxicon* 7: 325-326.
- 5) 厚生省生活衛生局監修, 1991. 食品衛生検査指針(理化学編). 日本食品衛生協会, 東京: 296-305.
- 6) M. Yotsu, A. Endo, and T. Yasumoto, 1989. An improved tetrodotoxin analyzer. *Agric. Biol. Chem.* 53: 893-895.
- 7) S. Nishio, 2002. Occurrence of Toxic Oysters *Crassostrea gigas* Infested with *Alexandrium tamiyavanichii* in the Seto Inland Sea, Japan. *Proceedings of International Scientific Symposium on Marine Toxins and Marine Food Safety*, 78-87.
- 8) T. Hashimoto, S. Nishio, N. Nishibori, S. Yoshioka, and T. Noguchi, 2001. A New Analytical Method for Gonyautoxins Based on Postcolumn HPLC. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 43 No. 3: 144-147.
- 9) O. Arakawa, S. Nishio, T. Noguchi, Y. Shida, and Y. Onoue, 1995. A New Saxitoxin Analogue from a Xanthid Crab *Atergatis floridus*. *Toxicon*33: 1577-1584.
- 10) 橋本多美子, 西堀尚良, 西尾幸郎, 1994. 浅川湾産スベスマンジュウガニが含有する tetrodotoxin 様有毒物質について. 四国大学紀要 2: 93-100.

(西尾幸郎・相良剛史・西堀尚良: 四国大学短期大学部生活科学科食物栄養専攻)

(橋本多美子: 四国大学短期大学部生活科学科生活福祉専攻)

(黒田智久: ヤマク食品株式会社)