

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～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 安元 健

平成19(2007)年 3月

目 次

I. 総合研究報告		
貝毒の安全性確保に関する研究	-----	1
安元 健		
分担研究報告		
麻痺性貝毒の定量分析に関する基礎的研究		
大島 泰克	-----	29
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	45
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	45

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）
総合研究報告書

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、世界的に広域化・恒常化しているため、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別されている。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、国内消費者の健康の保護と円滑な輸出入を行うには、貝毒の許容値と検査法に関する世界的な合意形成が必要である。

このような状況を受けて、2001年にはEUが、2004年にはWHO/FAO/IOCの3国際機関が合同で専門家会議を召集して統一の見解をまとめ、CODEXに答申する作業を行った。専門家会議では、WHOのデータブックに従った許容値の再計算及びリスク評価に基づく許容値の設定が合意された。また、検出感度と精度に優れた代替法の開発が急務であることが確認された。現在各国で使用されているマウス腹腔内注射試験法は迅速性、感度、特異性に劣り、提案が予想される低い許容値と複雑な毒組成に対応できない。一方、これらの点で優れている液体クロマトグラフ-質量分析法（LC-MS）は、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。

麻痺性貝毒では、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高い評価を得て、多検体分析に向けた操作性向上が期待された。

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の毒化二枚貝から得られる主成分は数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。

[文献及び情報の収集]

2001年にはEUが、2004年にはWHO/FAO/IOCの3国際機関が合同で、専門家会議を召集した。主任研究者は両会議に、分担研究者の大島は後者に参加し、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。

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。

2006年9月に、The International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA) 主催の学会「12th International Conference on Harmful Algae」において本研究における成果を発表し、同時に海外の貝毒被害防止策の動向に関する情報収集を実施した。

[標準毒作成]

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を抽出して標準毒を自作した。

まず、国内で入手した毒化二枚貝やクロイソカイメンを抽出して、下痢性貝毒成分として、ジノフィシストキシン-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、イェットキシンの標準試料を作成した。ペクテノトキシン-2は市販品を購入した。さらに7-0-pal-0A、7-0-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、当初は東北大学で調製済の試料を使用したが、現在ではEUから提供された原料を用いて自作を行っている。このようにして合計14成分の有機溶媒可溶貝毒の標準毒を得た。

さらに研究遂行のために必要な追加試料の調製を実施し、YTX類縁体について、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)を精製した。

麻痺性貝毒は、これまで入手の難しかった GTX6、GTX5 の2成分を各10mg 程度単離した。これらを用いて、昨年度までに定量 NMR 法による麻痺性貝毒の濃度決定法を示したが、内部標準とする重酢酸上の未置換プロトンの面積測定において軽酢酸の影響を受ける可能性があった。

そこで、内部標準の条件を満たす各種試薬を検討した結果、tert-ブチルアルコールが極めて汎用性の高い内部標準となりうる事が明らかとなった。

[分析法開発]

LC-MS 法による下痢性貝毒分析法の開発については、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、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分以下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。

さらに、LC-MS による一斉分析法の精度を検証するため、ホタテ貝中腸腺及びイガイを用いた単一試験室における妥当性確認試験を実施した。

その結果、検量線の直線性、検出限界、定量下限、精度、正確性について十分満足できる結果が得られた。

麻痺性貝毒分析における HPLC 法の実用性の検証に関しては、GTX 群、STX 群を40分以内に分析する一斉分析法を開発し、従来法と精度に変化が無いことを確認して、麻痺性貝毒の一斉分析に一步近づけた。さらに、C 毒群を含む一斉分析法の完成を目指した。すなわち、昨年度までに開発したポストカラム蛍光化 HPLC による GTX 群および STX 群の一斉分析法の条件では C1、C2 が保持されないことから、GTX 群用の溶離液を用いて C1、C2 を保持させるカラムを探索した結果、強塩基性イオン交換カラムの1種を使うことにより、保持、分離が可能となった。これにより、旧来の逆相分配型カラムに連結することにより、C 群から STX 群までの一斉分析の可能性が明らかとなった。分離条件の最適化を検討した結果、C 群から GTX 群 STX 群にいたる一斉分析法の開発に成功した。

なお、HPLC 分析で GTX4 付近に溶出する妨害物質がホタテガイだけでなくヒオウギにも含まれることが明らかになり、化学的性質を明らかにするために精製を試み、単離に成功したが、不溶化したため構造決定には至らなかった。

[マウス法の精度管理]

麻痺製貝毒のマウス法の精度管理のため、マウス試験法の試料の抽出過程における pH、温度、加熱時間の影響を調査した。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]

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 の標準サキトキシン（2 塩酸塩）との相対的な腹腔内投与毒性の比較を行った。昨年度までの研究で重酢酸の未置換プロトンシグナルを内部標準とする濃度測定法を提唱した。しかし、このシグナルには麻痺性貝毒精製の際に使用し、塩でもある酢酸のメチルシグナルと一部重複する。このため、酢酸シグナルの強さ、あるいは SIM の調整の違いにより、微妙に面積比が変動し、場合によっては 5%程度濃度を過小評価することが判明した。新たな内部標準を検討した結果、麻痺性貝毒のシグナル領域との関係、試薬の安定性、除去の容易さ等を考慮して、tert-ブタノールを選び、直線性などによる定量性の評価、軽酢酸の影響等を検討するとともに毒誘導体を対象に濃度測定を実施した。これを用いて GTX5、 GTX6 の濃度を測定し直したところ、6-7%過小評価していたことが判明し、両毒の正確な比毒性は 148、133 MU/ μmol と計算された。さらに、麻痺性貝毒を化学的修飾によって得られる成分の定量等にも有効であることが明らかになった。

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、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、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、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。

分担研究者 大島 泰克 東北大学大学院 生命科学研究所 教授

A. 研究目的

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、我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ストキシン (DTX) 類に加えて、DTX 類と共存することの多いペクテノトキシン (PTX) やイエソトキシン (YTX) は一括して下痢性貝毒に分類されてきた。EU の専門家会議は、DTX 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再評価し、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。

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2~3mg 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、申請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、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。

さらに、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、国際的な規制の統一化に資することを目的とする。

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。また、国際会議等に参加し、本研究における成果を発表するとともに、情報交換を行い、海外の動向に関する情報収集を実施する。

(2) マウス法の精度管理 (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。

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こと及びいかなる分析法を使う場合も規制基準は毒性となるので、必要な毒性学的データの収集をはかる。また、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う。

具体的には、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、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 μg 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。

本事業で開発した傾斜溶出法を用いた LC/MS による一斉分析法を検証するため、ホタテガイ中腸腺、イガイ及びムラサキイ

ガイを用いた単一試験室における妥当性確認試験を実施し、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。

(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)

1) 蛍光 HPLC 法の改良

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。

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。特にその条件では保持されない C1/C2 を含めて分離分析する一斉分析法の開発を目指す。

2) HPLC 妨害物質の特定

ポスト蛍光化反応による HPLC 分析では二枚貝中の蛍光物質が分析を妨害する可能性がある。ホタテガイでは GTX4 付近に溶出する強い蛍光物質が妨害となるため、ODS カートリッジカラムによる除去策をとっているが、完全に除去できない場合がある。新たな予備精製による除去方法を開発するには物質の化学的性状を把握することが前提となるので、精製単離して構造解析を目指す。

(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。

1) 下痢性貝毒標準品の調製

国内及び海外で出現する下痢性貝毒及び脂溶性貝毒の主要標準毒を調製し、研究の遂行のため、さらに追加試料の調製を行う。

・オカダ酸群標準品の調製

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 DTX1 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 DTX3 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見出す必要がある。

・YTX 標準品の調製

YTX 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。

・PTX 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。PTX1、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 PTX3 が必要で、試料が入手できれば PTX3 を追加調製する。

・神経性貝毒とアザスピロ酸 (AZA) 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、EU から提供された原料を用いて AZA1、2 及び 3 を調製する。

2) 麻痺性貝毒の調製

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、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る。

マウス試験法は国際的に廃止の方向にあるが、いかなる分析法を使う場合も規制基

準は毒性となるので、必要な毒性学的データの収集及び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。

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 16~18 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的理解をまとめ、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。

2006 年 9 月に、The International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA) 主催の学会「12th International Conference on Harmful Algae」に出席して本研究における成果を発表し、同時に海外の貝毒被害防止策の動向に関する情報収集を実施した。

[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 は当初は東北大学で調製済の試料を使用した、現在では自作を行っている。

図 1 に国内及び海外で出現する主要下痢性貝毒及び脂溶性貝毒を示した。また、下痢性貝毒標準品の調製の一例としてホタテガイ中腸腺から DTX1、0A、PTX1~3、PTX6 及び YTX を精製した方法の概略を図 2 に、パルミトイルオカダ酸 (7-*O*-pal-0A) 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 3 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)。一例として、オカダ酸精製品の ¹H NMR スペクトルを図 4 に、また陰イオン ESI-MS 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、国内の出現が限られているため入手が難しく、水産庁の事業による標準品作成計画でも漏れていたゴニオトキシン-6 (GTX6) 及びゴニオトキシン-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。

さらに、化学分析法の導入に不可欠な標準品溶液として、GTX5、GTX6 の 2 成分について、大分県産ムラサキイガイ中腸腺から精製し、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、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。

麻痺性貝毒については、昨年度までに定量 NMR 法による濃度決定法を示したが、内部標準とする重酢酸上の未置換プロトンの面積測定において軽酢酸の影響を受ける可能性があった。

そこで、内部標準の条件を満たす各種試薬を検討した結果、tert-ブチルアルコールが極めて汎用性の高い内部標準となりうる事が明らかとなった。

[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。この結果から、本研究で開発した方法は、短時間・高感度測定が可能な下痢性貝毒の一斉分析法であると判

断された。

1) LC/MS の条件設定

上記標準毒を使用し、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 分で国内・国外の代表的な下痢性貝毒及び脂溶性毒 14 成分の一斉分析を達成した。この時、AZA 類及び BTXB2 は陽イオンを、その他の成分は陰イオンを測定した。

選択したイオンと相対強度比を表 2 に示した。

LC/MS 法による試料の抽出方法の概略を図 7 に、LC-MS の測定条件を図 8 に示した。

14 種類の貝毒標準品（メタノール溶液）のマスキロマトグラムを図 9 に示した。

図 9 の結果から、どの標準品も明確なピーク形状であった。ただし、PTX3 類縁物質は aldehyde、dihydrate、43(S)- 及び 43(R)-methyl hemiacetals の混合物質であるため、検出は低感度であった。BTXB2 も同様に、スルホキシド基の stereoisomer が存在するため、わずかに分裂ピークが生成している。

なお、PTX3 はメタノール溶液中でメチルアセタールへ変換するため、 $[M-H+CH_3OH+HCOOH]^-$ イオンを測定した。(図 10)

これらの結果から、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) LC/MS 法の精度確認

開発した LC-MS による一斉分析法に関して、検出下限及び再現精度 (RSDr) の測定、添加回収試験により単一試験室における妥当性確認試験を実施した。

図 11 に示した標準毒及び標準毒をホタテガイまたはムラサキイガイ中腸腺抽出液に添加した場合の検出下限の測定結果から、PTX3 及び BTXB2 は LC/MS の条件設定の項で述べた理由のため両成分共に 10.0 ng/mL であったが、他の毒成分は 2.0 ng/mL 程度あるいはそれ以下であった。このような検出下限は規制で要求される濃度以下である。

再現精度 (RSDr) は、標準毒及びホタテガイまたはイガイの抽出液に標準毒を添加した溶液を用いて実施した。その結果を表 3 に示した。

これらの結果から、ほとんどの標準毒では再現精度 (RSDr) は 10% 以下であったが、pa1DTX1 は試験に用いた最も低い濃度においては 15.1% と増大した。

また、ホタテガイ中腸腺及びイガイの抽出液に貝毒を添加したマスキロマトグラムの例を図 12 に示した。

選択したイオンをモニターしたが夾雑ピークが多く、また、マトリックスの影響で多くのピークではベースラインが上昇した。しかし、標準毒の使用により同定は可能であり、どの物質も妨害ピーク等がなく測定できていた。

添加回収試験は、毒化していないホタテガイまたはムラサキイ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毒の添加を行い、あるいは中腸腺に標準毒を添加した後に抽出操作を行った抽出液について、LC/MS にて回収率を求めた結果を図 13 及び 14 に示した。

なお AZA 群以外は 3 濃度レベルの貝毒を添加した。(0.2、0.5、and 1.0 μ g/g homogenate) AZA 群は陽イオンをモニター

することにより高感度で検出できることから、0.02 $\mu\text{g/g}$ 添加した。

その結果、抽出液に添加した濃度範囲では、添加回収率は 80~110%であった。中腸腺に添加した場合の添加回収率は 70~110%であった。

以上の結果から、本法は、迅速性、精度、感度、再現性に優れていることが確認できた。

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

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。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、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。

さら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。

加えて、C 毒群を含む一斉分析法の完成を目指し GTX 群用の溶離液を用いて C1、C2 を保持させるカラムを探索した結果、強塩基性イオン交換カラムの 1 種を使うことにより、保持、分離が可能なが判明した。これにより、旧来の逆相分配型カラムに連結することにより、C 群から STX 群までの一斉分析の可能性が明らかとなった。分離条件の最適化を検討した結果、C 群から GTX 群 STX 群にいたる一斉分析法の開発に成功した。

なお、HPLC 分析で GTX4 付近に溶出する妨害物質がホタテガイだけでなくヒオウギにも含まれることが明らかになり、化学的性質を明らかにするために精製を試み、単離に成功したが、不溶化したため構造決定には至らなかった。

[マウス法の精度管理 (平成 16~18 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 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の比較を行った。昨年度までの研究で重酢酸の未置換プロトンシグナルを内部標準とする濃度測定法を提唱した。しかし、このシグナルには麻痺性貝毒精製の際に使用し、塩でもある酢酸のメチルシグナルと一部重複する。このため、酢酸シグナルの強さ、あるいは SIM の調整の違いにより、微妙に面積比が変動し、場合によっては 5%程度濃度を過小評価することが判明した。新たな内部標準を検討した結果、麻痺性貝毒のシグナル領域との関係、試薬の安定性、除去の容易さ等を考慮して、*tert*-ブタノールを選び、直線性などによる定量性の評価、軽酢酸の影響等を検討するとともに毒誘導体を対象に濃度測定を実施した。これを用いて GTX5、GTX6 の濃度を測定し直したところ、6-7%過小評価していたことが判明し、両毒の正確な比毒性は 148、133 MU/ μmol と計算された。さらに、麻痺性貝毒を化学的修飾によって得られる成分の定量等にも有効であることが明らかになった。

また、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。そ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ことが明らかとなった。

本研究において、定量 NMR 法による麻痺性貝毒の濃度決定法を示したが、内部標準とする重酢酸上の未置換プロトンの面積測定において軽酢酸の影響を受ける可能性があった。そこで、内部標準の条件を満たす各種試薬を検討した結果、*tert*-ブチルアルコールが極めて汎用性の高い内部標準となりうることが明らかとなった。

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 及びイェットキシンの 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ストキシンは、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。

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。

具体的には、麻痺性貝毒について改良した HPLC 法は今後の実試料分析に利用して、データ収集の効率化をはかる。GTX6 については希釈標準溶液を調製し、マウス毒性試験と HPLC 分析の比較に利用する。また、その比毒性とあわせ、国内で HPLC 分析を行っている機関で希望する者に配布する。

国内産の多数の検体を分析した結果、多数存在するサキシトキシン同族体の内、13 成分をそろえれば、問題なく安全性を評価できることを明らかにしている。本研究により、入手が難しかった GTX6 の標準品を作

成するとともに標準溶液の秤定法を開発した。一斉分析法の開発法と合わせ、麻痺性貝毒の安全性試験法として HPLC 法が実用に移る体制を整えることが出来るものと思われる。

さらに、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。

また、LC-MS 法による下痢性貝毒分析法は、海外機関との共同試験を通じて評価が確立したならば、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できると推察される。

以上の研究により得られた成果から、

① 海外の貝毒発生状況及び規制の実態調査、マウス法の改良、個別貝毒試験法の開発並びに分析データの蓄積により、我が国における貝毒の規制方法や基準値の見直しの施策立案にあたり、総量規制か個別規制かを選択するための基礎的資料が提供できる。

また、個別規制を実施する場合の試験法及び基準値が提示できる。

② 本研究の成果から、諸外国と調和のある適切な規制法を設定することができる。また、我が国も国際的な議論に加わり、さらには議論をリードすることが可能となる。この結果、適正な規制値と検査法について世界的合意が達成されれば、全ての貝毒の分析精度と実用性向上を図ることが可能となり、モニタリング体制の整備を通して国内消費者の安全性を確保し、輸出入を円滑にし、かつ、貝毒による二枚貝生産者の被害を最小限に止めることが期待される。

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。

研究者（安元及び大島）は2006年9月に開催された「12th International Conference on Harmful Algae」に出席して本研究における成果を発表し、同時に海外の貝毒被害防止策の動向に関する情報収集を実施した。

[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、ジノフィシストキシン-1 (DTX1、約6mg)、オカダ酸(OA、約10mg)、ペクテノトキシン-1 (PTX1、約10mg)、ペクテノトキシン-3 (PTX3、約mg)、ペクテノトキシン-6 (PTX6、約3mg)、イエツトキシン (YTX、約10mg) 及び45-ヒドロキシイエツトキシン (45OH-YTX、約2mg) 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ストキシン-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は当初は東北大学で調製済の試料を使用した。現在では自作を行っている。

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、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、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した。

麻痺性貝毒については、昨年度までに定量NMR法による濃度決定法を示したが、内部標準とする重酢酸上の未置換プロトンの面積測定において軽酢酸の影響を受ける可能性があった。

そこで、内部標準の条件を満たす各種試薬を検討した結果、*tert*-ブチルアルコールが極めて汎用性の高い内部標準となりうる事が明らかとなった。

[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。

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分で国内・国外の代表的貝毒14成分の一斉分析を

達成した。

さらに、LC-MS による一斉分析法について、ホタテ貝中腸腺及びイガイを用いた単一試験室における妥当性確認試験を実施した結果、本法は、迅速性、精度、感度、再現性に優れていることが確認できた。

麻痺性貝毒分析法の開発に関しては、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。

さらに、C 毒群を含む一斉分析法の完成を目指し GTX 群用の溶離液を用いて C1、C2 を保持させるカラムを探索した結果、強塩基性イオン交換カラムの 1 種を使うことにより、保持、分離が可能なことが判明した。これにより、旧来の逆相分配型カラムに連結することにより、C 群から STX 群までの一斉分析の可能性が明らかとなった。分離条件の最適化を検討した結果、C 群から GTX 群 STX 群にいたる一斉分析法の開発に成功した。

[マウス法の精度管理]

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 Pacificchem 2005 Congress (2005.12)

3) 「Increasing diversity of marine toxins

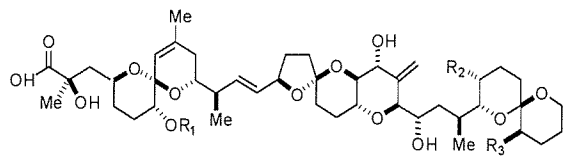
- and the tasks set for chemists」、T. Yasumoto、The Pacificchem 2005 Congress、(2005. 12)
- 4) 「下痢性貝毒及びその他貝毒の LC/MS 法による一斉分析法の開発」、鈴木 芽、関口礼司、渡井 正俊、安元 健、平成 18 年度日本水産学会大会 (2006. 3)
- 5) M. Suzuki、 R. Sekiguchi、 M. Watai、 T. Yasumoto : Preparation and simultaneous LC-MS analysis of fourteen shellfish toxins、 12th International Conference on Harmful Algae (Poster)、 2006. 9. 4.
- 6) 鈴木 芽、関口礼司、渡井正俊、安元健:「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」、平成 18 年度日本水産学会大会口頭発表、2006. 3. 31.
- 7) 「 Characteristics of PSP-toxin profiles in bivalves from Japan costal 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)
- 8) 「 Application of post-column derivatization HPLC method for the paralytic shellfish toxins monitoring」、Yasukatsu Oshima、The Pacificchem 2005 Congress、(2005. 12)
- 9) 「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)
- 10) Y. Oshima、 R. Watanabe、 Preparation of reference material and toxin standards for the analysis of PSP toxins. 10th UJNR International Symposium on Toxic Microorganisms (invited speaker)、 2006. 11. 8 (FDA、 Merryland、 USA).
- 11) R. Watanabe、 K. Nakaji、 Y. Oshima : Application of saxitoxin-conjugated affinity gel for the detection of macromolecules involved in toxin dynamics in scallops. 、 12th International Conference on Harmful Algae (Poster)、 2006. 9. 4.
- 12) Y. Cho、 K. Hiramitsu、 M. Ogata、 T. Omura、 T. Ishimaru、 Y. Oshima : Genetic characteristics of non-toxic subclones obtained from toxic clonal culture strain of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). 12th International Conference on Harmful Algae (Poster)、 2006. 9. 4.
- 13) Y. Oshima : Characteristics of PSP-toxin profiles in bivalves from Japanese coastal waters. :12th International Conference on Harmful Algae (Poster)、 2006. 9. 4.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特に予定はない。

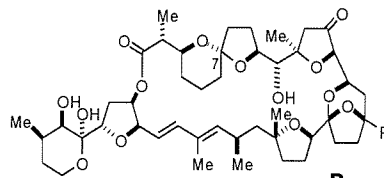
I. 謝辞

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。

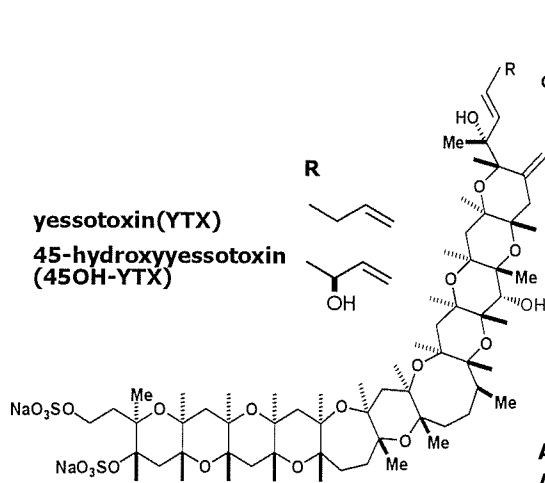
試料をご提供いただいた Santiago de Compostela 大学の Dr. L. Botana 及び北里大学小池博士に感謝致します。



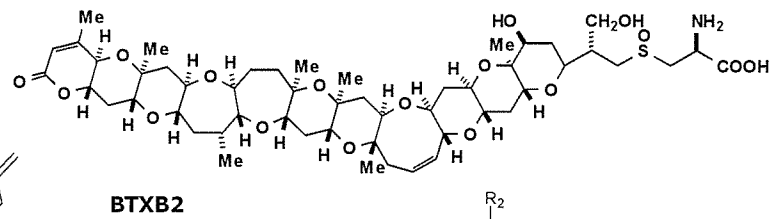
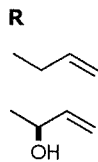
okadaic acid (OA)	R1	R2	R3
dinophysistoxin 1 (DTX1)	H	Me	H
pal-OA	H	Me	Me
pal-DTX1	palmitoyl	Me	H
	palmitoyl	Me	Me



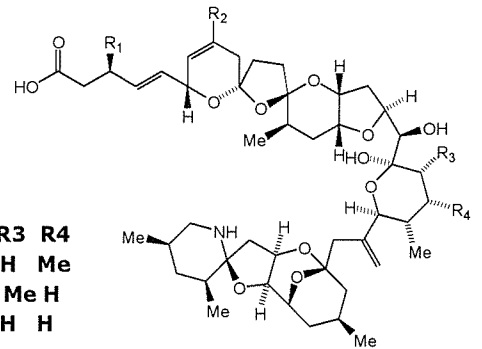
	R
pectenotoxin1 (PTX1)	CH ₂ OH
pectenotoxin2 (PTX2)	CH ₃
pectenotoxin3 (PTX3)	CHO
pectenotoxin6 (PTX6)	COOH



yessotoxin (YTX)
45-hydroxy-yessotoxin (45OH-YTX)



BTXB2



	R1	R2	R3	R4
Azaspiracid	H	H	H	Me
Azaspiracid -2	H	Me	Me	H
Azaspiracid -3	H	H	H	H

図1 国内及び海外で出現する主要下痢性貝毒及び脂溶性貝毒

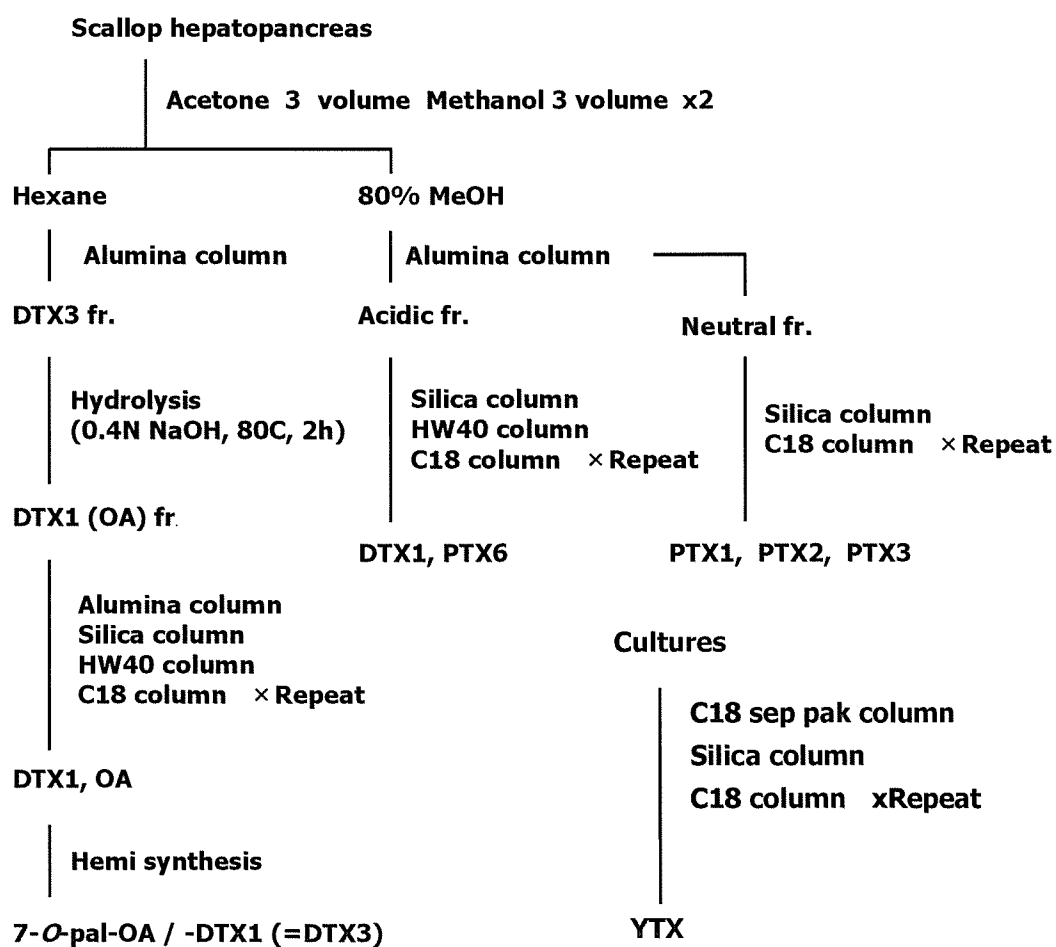


図2 ホタテガイ・ムラサキガイからの下痢性貝毒標準品の作製概略図

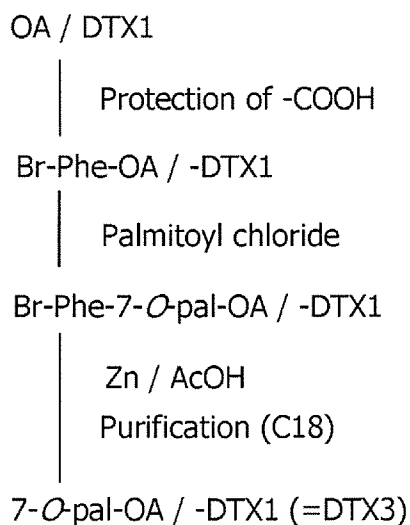


図3 オカダ酸及びジノフィシストキシン-1からパルミトイルオカダ酸 (7-O-pal-OA)、パルミトイルジノフィシストキシン-1 (7-O-pal-DTX1) の合成方法概略図