

表 1 作成した貝毒標準品の純度確認結果

	$^1\text{H-NMR}$	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、PTX2

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 : DTX1、YTX、PTX1、PTX6

本事業により精製・作製した標準品 : PTX3、pal-OA、pal-DTX1、45OH-YTX、AZA1~3

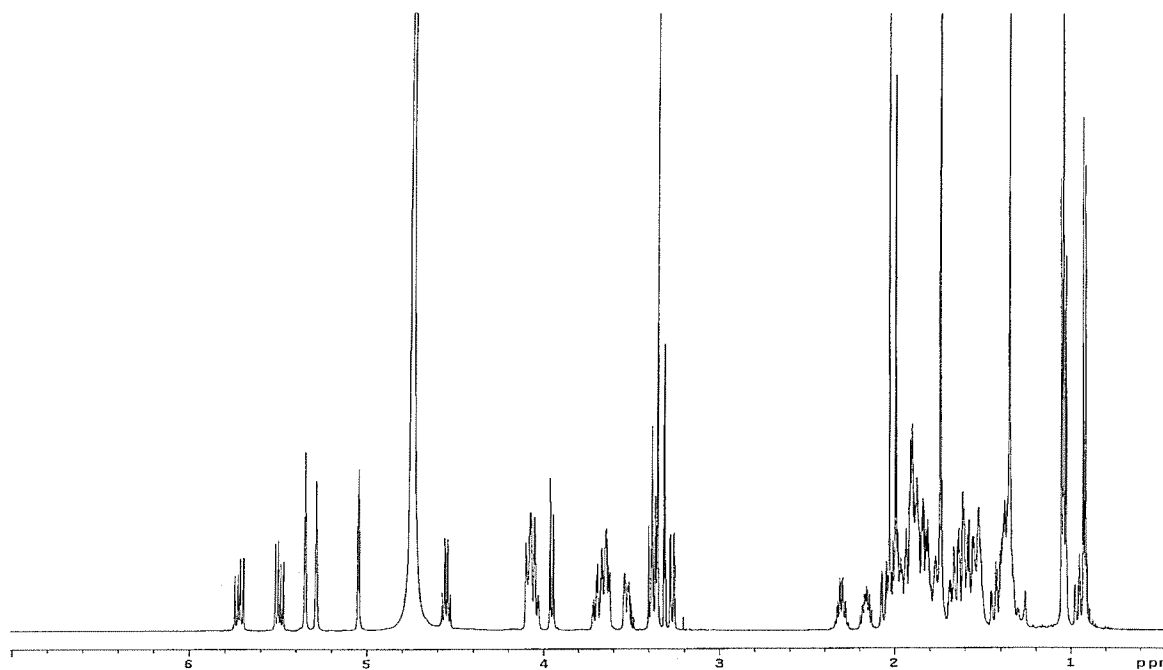


図4 オカダ酸精製品の水素核一次元核磁気共鳴スペクトル  
(500 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}(1:2)$ )

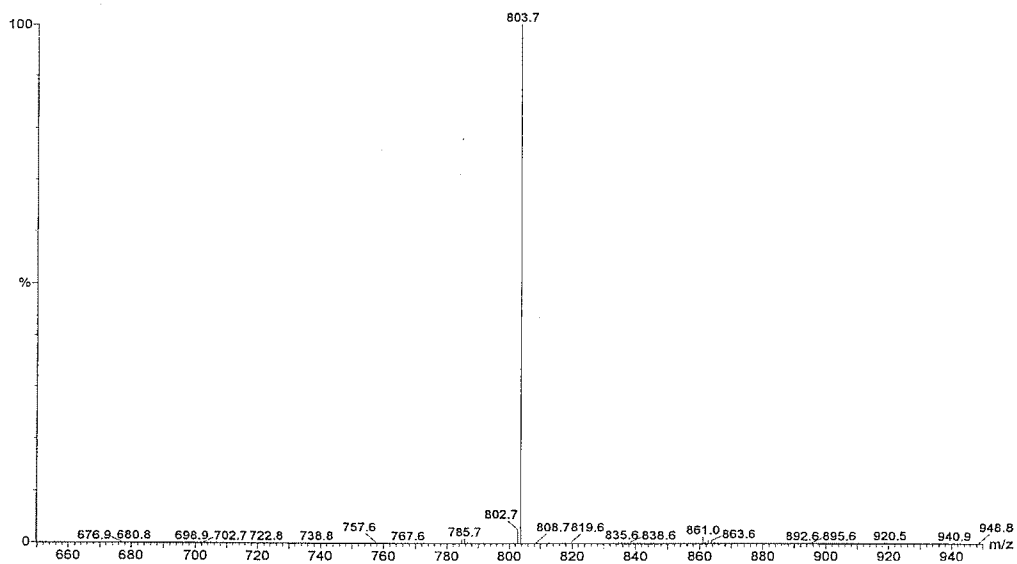


図5 オカダ酸精製品の陰イオンESI-MSスペクトル

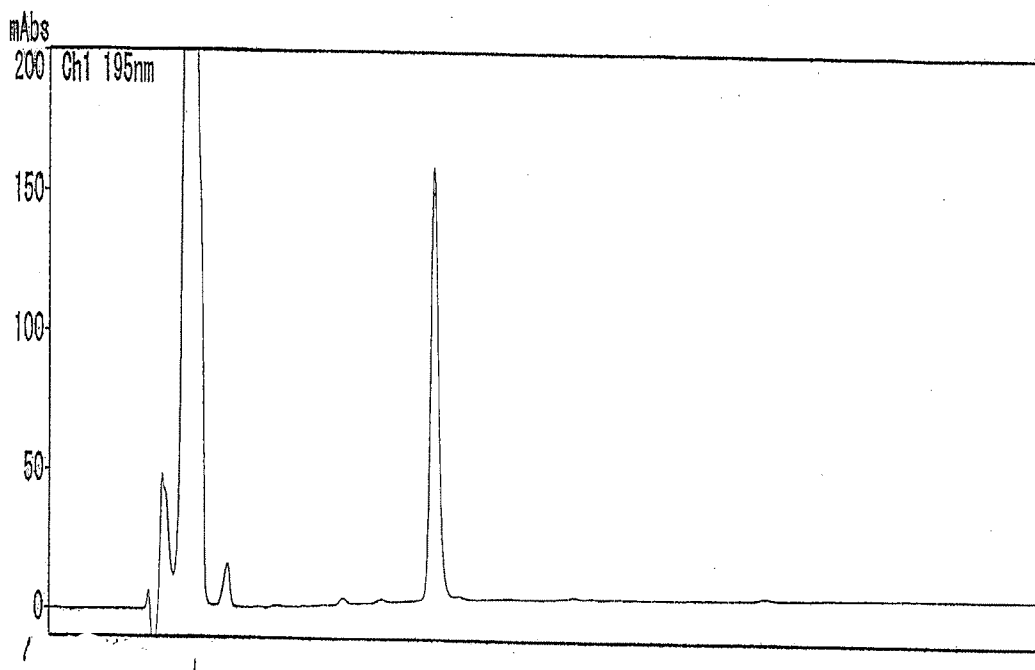


図6 オカダ酸精製品のHPLCクロマトグラム

表2 選択したイオンと相対強度比

陽イオンモード	相対強度比
• AZA1 : 828.5 [M+H] <sup>+</sup>	1
• AZA2 : 842.5 [M+H] <sup>+</sup>	0.7
• AZA3 : 856.5 [M+H] <sup>+</sup>	0.7
• BTXB2 : 1034.6 [M+H] <sup>+</sup>	0.02
陰イオンモード	
• OA : 803.5 [M-H] <sup>-</sup>	1
• DTX1 : 817.5 [M-H] <sup>-</sup>	1
• pal-OA : 1041.7 [M-H] <sup>-</sup>	0.4
• pal-DTX1 : 1055.7 [M-H] <sup>-</sup>	0.5
• PTX1 : 919.5 [M-H+HCOOH] <sup>-</sup>	0.4
• PTX2 : 903.5 [M-H+HCOOH] <sup>-</sup>	0.4
• PTX3 : 949.5 [M-H+CH <sub>3</sub> OH+HCOOH] <sup>-</sup>	0.2
• PTX6 : 887.5 [M-H] <sup>-</sup>	0.5
• YTX : 1141.5 [M-2Na+H] <sup>-</sup>	0.4
• 45OH-YTX : 1157.5 [M-2Na+H] <sup>-</sup>	0.6

### Hepatopancreas

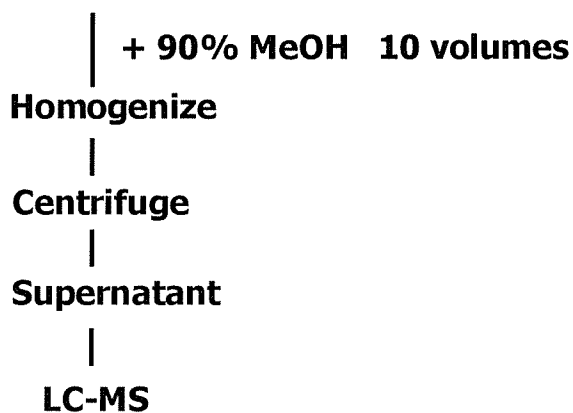


図7 LC/MS 法による試料の抽出方法概略

**-LC : NANOSPACE (SHISEIDO)**

**Column; Capcellpak C18 MG II 2.0 × 100 mm (SHISEIDO) , Flow rate; 0.2 mL / min**

**Mobile phase; A: 2 mM HCOONH<sub>4</sub> + 50 mM HCOOH / H<sub>2</sub>O**

**B: 2 mM HCOONH<sub>4</sub> + 50 mM HCOOH / MeCN:MeOH 2:8**

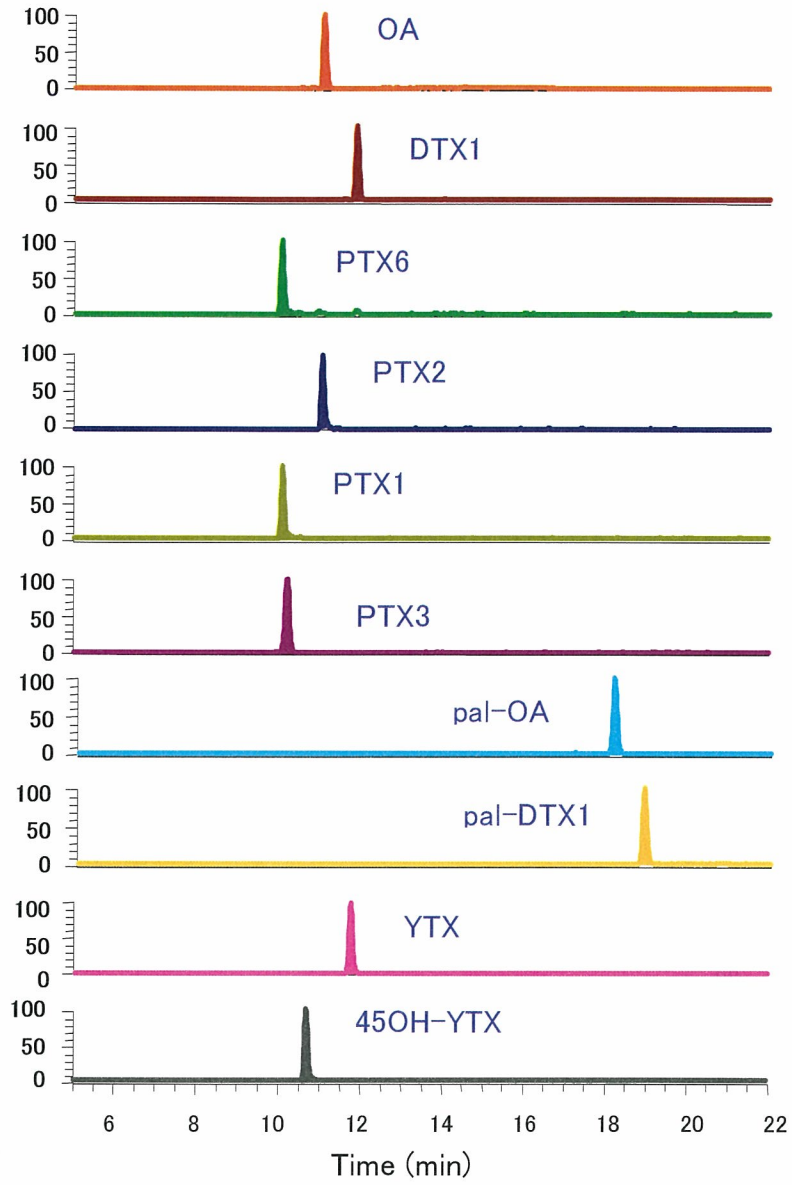
**-MS : FINNIGAN TSQ Quantum DISCOVERY (Thermo)**

**Ion mode; ESI negative or positive**

**Capillary voltage; 4.0 kV**

図8 LC-MS の測定条件

陰イオンモード



陽イオンモード

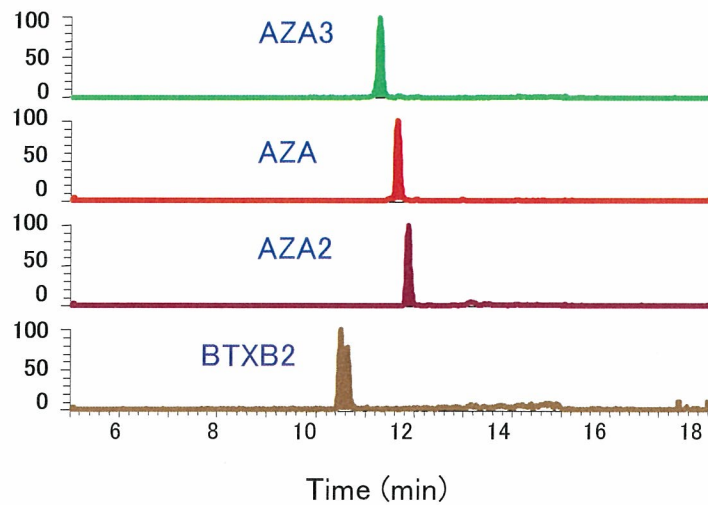


図9 貝毒標準品のマスクロマトグラム

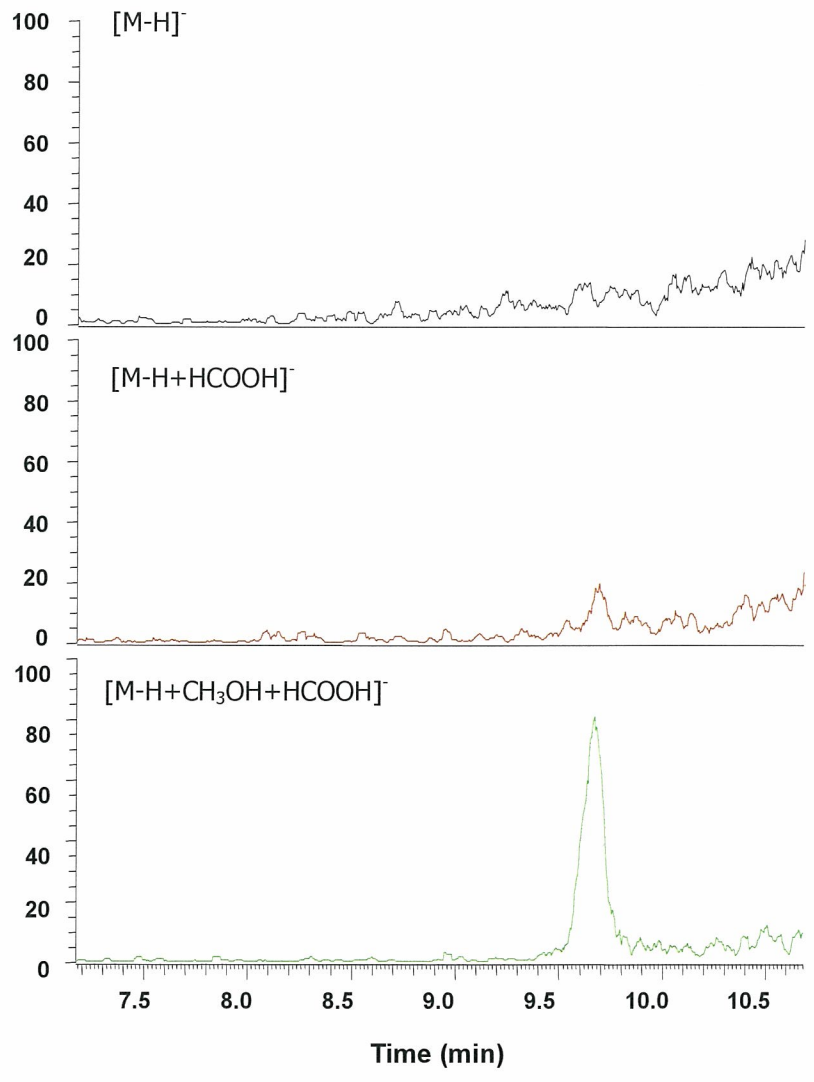
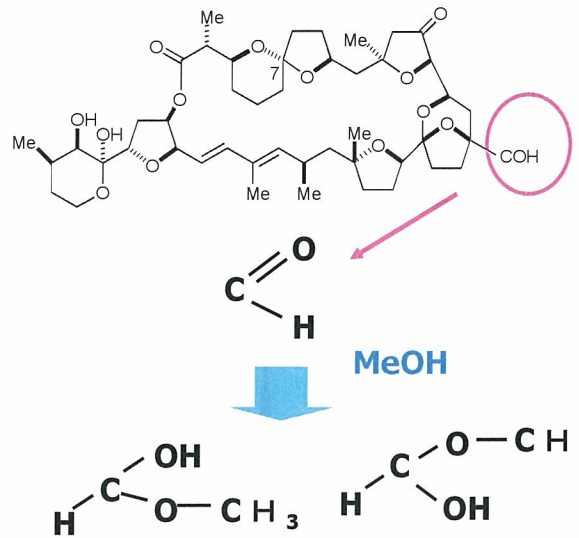


図10 PTX3のマスクロマトグラム

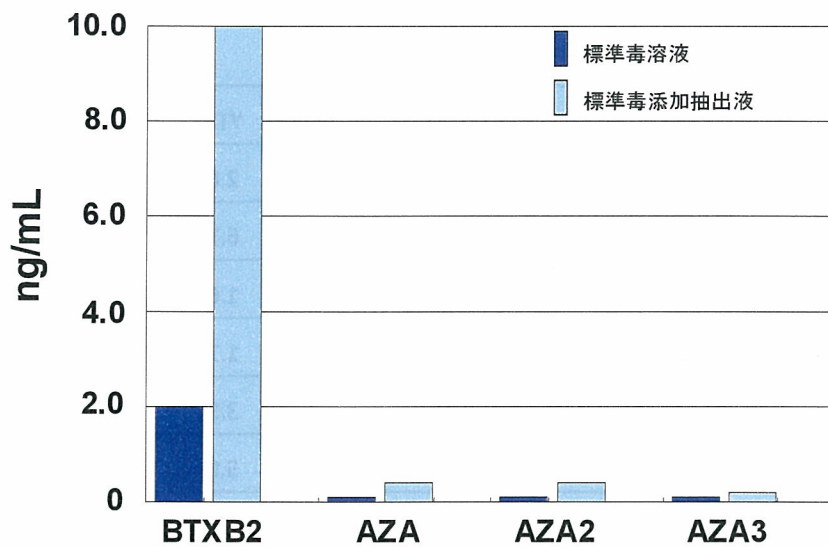
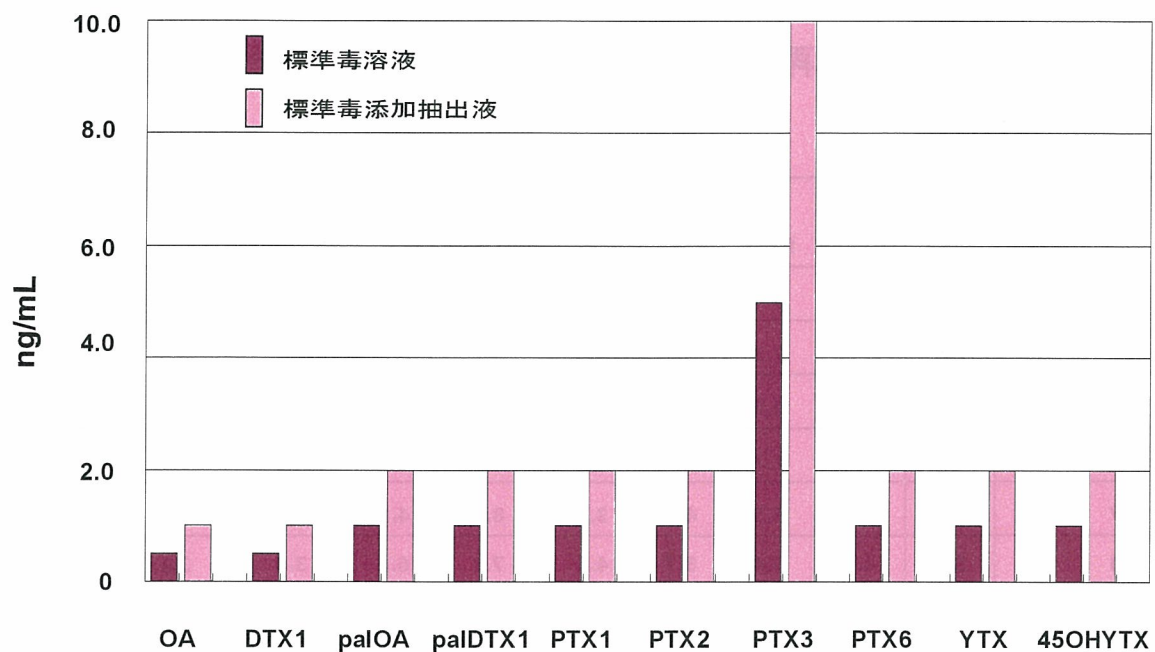


図11 標準毒溶液及び添加試料での検出下限

上図: 陰イオンモード測定 of 標準毒

下図: 陽イオンモード測定 of 標準毒

表3 再現精度の測定結果 (RSDr%)

1) 標準毒溶液 (n=3)

( $\mu\text{g/mL}$ )	OA	DTX1	PTX6	PTX2	PTX1	PTX3	palOA	palDTX1	YTX	450HYTX	BTXB2	AZA*	AZA2*	AZA3*
0.005	7.1	4.3	2.7	10.1	5.5	13.8	4.4	15.1	6.3	5.6	-	-	-	-
0.01	2.5	1.5	2.8	10.9	7.3	6.7	2.8	5.1	5.5	2.5	5.9	7.1	2.9	8.5
0.02	2.7	2.6	1.6	4.7	2.9	10.3	2.8	5.0	2.3	5.0	2.0	10.4	9.2	7.9
0.05	4.7	3.5	3.9	3.0	1.7	7.9	4.0	7.6	1.8	2.0	5.4	6.0	3.4	4.9
0.1	4.7	0.0	3.5	7.2	5.5	4.3	3.2	8.4	4.1	3.4	3.5	3.8	3.9	3.0
0.2	0.0	0.0	5.8	4.7	5.4	3.7	4.6	7.8	6.2	3.6	3.1	1.1	2.0	1.2

—: 未測定

\* AZA1~3: 0.001  $\mu\text{g/g}$ , 0.002  $\mu\text{g/g}$ , 0.005  $\mu\text{g/g}$ , 0.01  $\mu\text{g/g}$ , 0.02  $\mu\text{g/g}$  について実施

2) 標準毒添加抽出液 (n=5)

	OA	DTX1	PTX6	PTX2	PTX1	PTX3	palOA	palDTX1	YTX	450HYTX	BTXB2	AZA	AZA2	AZA3
scallop 1	5.6	3.6	3.8	5.3	7.4	7.9	8.2	3.9	2.8	1.4	0.0	-	-	-
scallop 2	6.6	2.6	9.8	10.2	8.6	9.0	5.5	9.3	6.7	2.8	7.1	1.2	13.8	19.5
scallop 3	-	6.2	5.4	-	-	-	-	11.1	1.6	4.9	0.0	-	-	-
mussel 1	4.2	5.0	4.0	2.7	4.6	4.4	4.2	5.2	1.7	1.5	0.0	-	-	-
mussel 2	7.4	4.4	6.2	7.6	4.2	7.2	11.1	8.0	3.5	4.3	8.0	4.8	5.2	10.1
mussel 3	7.7	9.5	6.7	-	-	-	3.1	-	5.0	-	-	1.8	1.8	1.7

—: ND

scallop 1; 0.05  $\mu\text{g}$  spiked (BTXB2, AZAsは除く)    scallop2; 0.02  $\mu\text{g}$  spiked    scallop3; raw sample  
 mussel 1; 0.05  $\mu\text{g}$  spiked (BTXB2, AZAsは除く)    mussel2; 0.02  $\mu\text{g}$  spiked    mussel3; raw sample



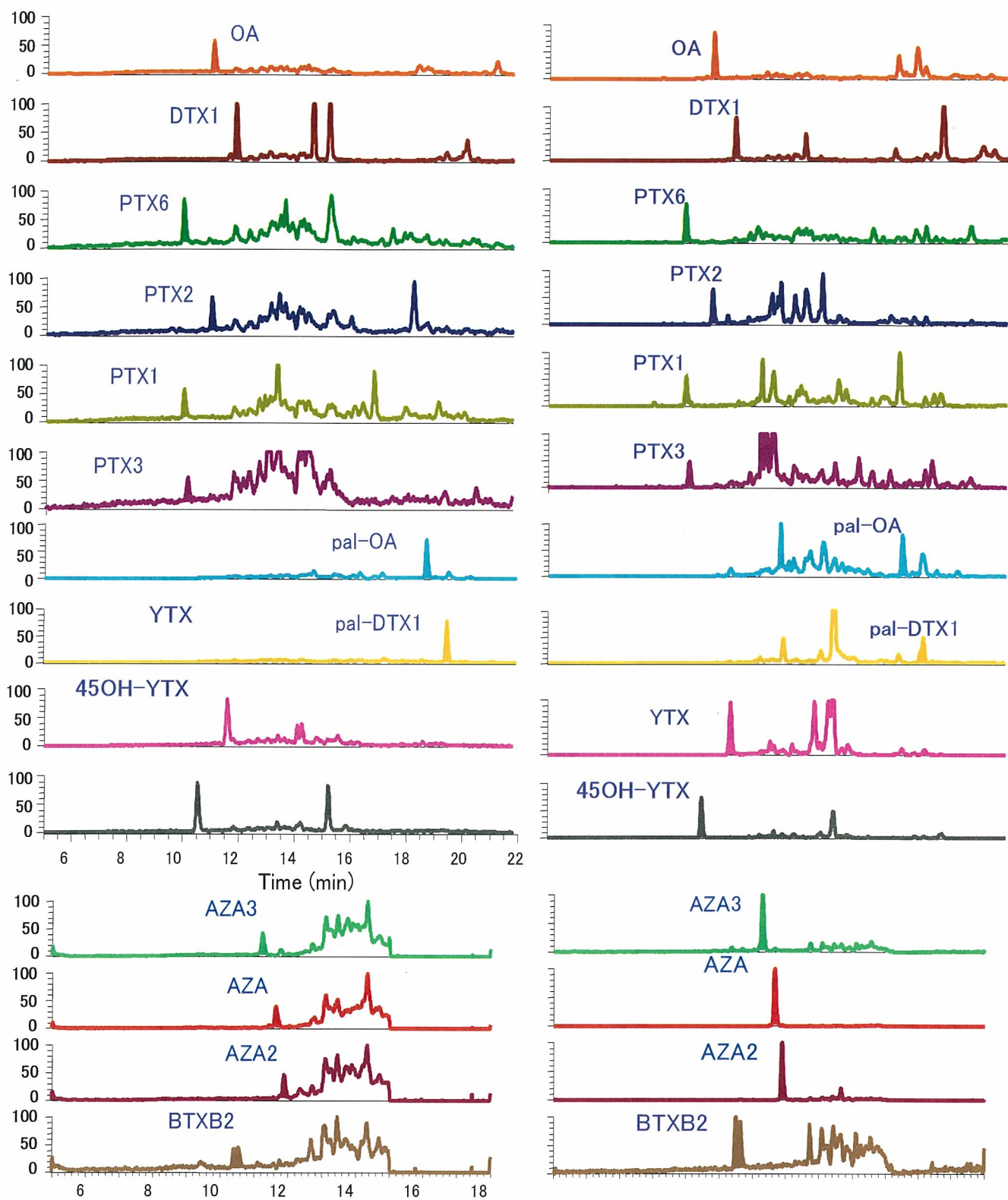


図12 貝毒標準品のマスクロマトグラム(ホタテガイ・ムラサキイガイ抽出液に添加)

上図:陰イオンモード (左:ホタテガイ, 右:ムラサキイガイ)

下図:陽イオンモード (左:ホタテガイ, 右:ムラサキイガイ)

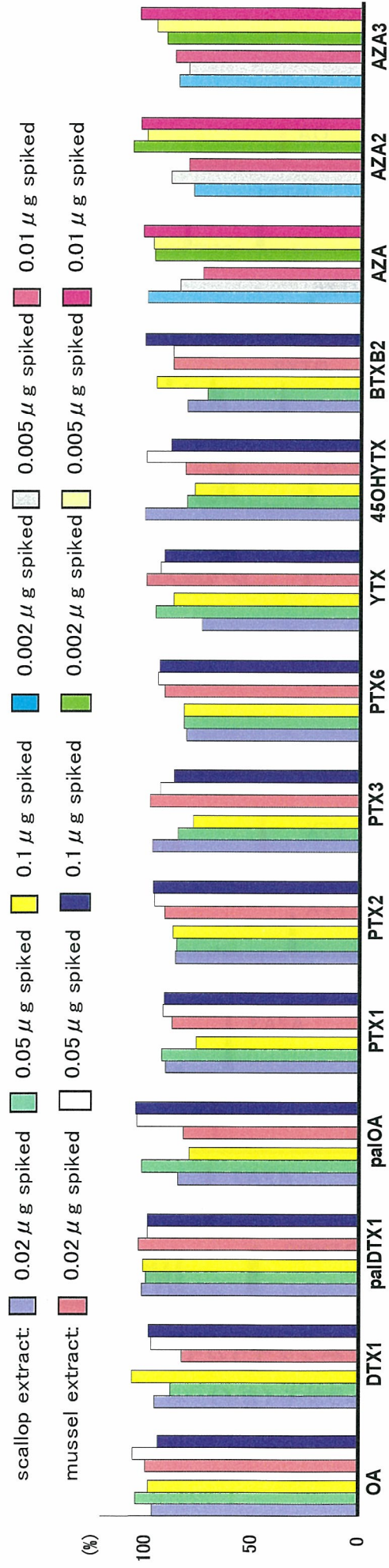


図10 抽出液に標準毒を添加した時の添加回収率

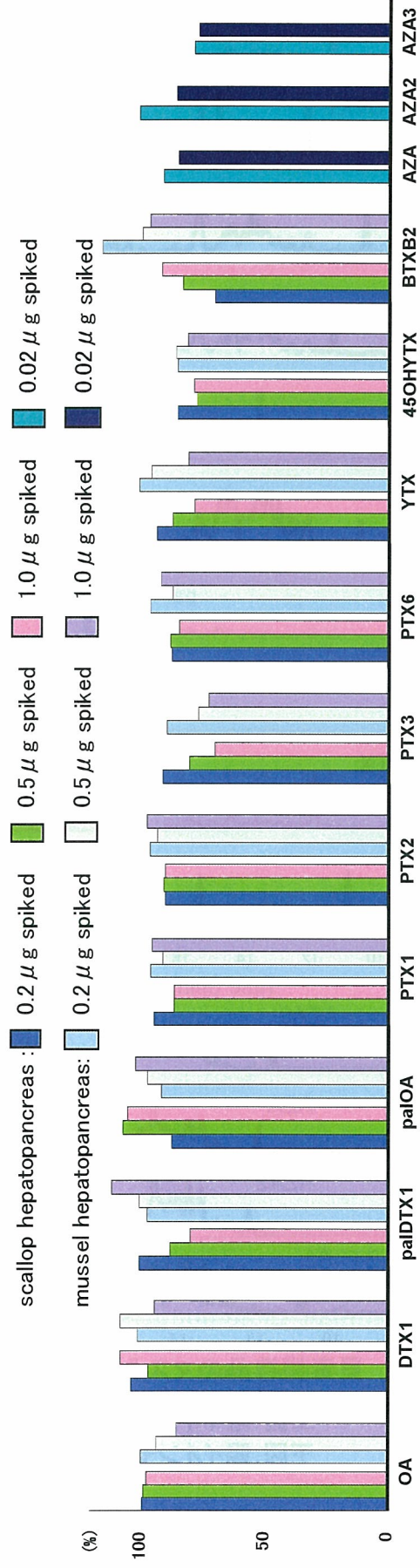


図11 中腸腺に標準毒を添加した時の添加回収率

## 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

抽出条件の検討：化学分析にはマウス毒性試験用の抽出液が用いられているが、多数の同族体を含む試料に適しているかどうかを検討した。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、指定されている条件を守れば現行法で問題ないことが明らかとなった。

予備精製法の検討：HPLC 分析の妨害となる蛍光物質の除去法として、種々の最新カートリッジカラムについて検討した結果、現行の SepPac C-18 より効果的な資材は見当らなかった。また、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、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。

一斉分析法の開発：現在の HPLC 分析は多数存在する 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。簡便化を目指して一斉分析法を検討した。まず、GTX 群・STX 群のグラジエント溶出による分析を可能にするために再平衡化時間の短いカラムの探索した結果、ODS 系カラムを使うことにした。ついで、この溶出条件で C1/C2 を保持するカラムの探索した結果、陰イオン交換樹脂カラムが適していることが明らかになったので、両カラムを接続し、グラジエント溶出条件を調整した結果、主要毒 10 成分を 40 分以内で分析することができた。

標準溶液調製基盤技術の開発：化学分析に不可欠な標準品溶液の作製のための基盤技術として、微量、高吸湿性、不安定である麻痺性貝毒の濃度決定法として定量的 NMR 法を検討した。まず、重酢酸溶液の未置換酢酸メチルプロトン、ついで *tert*-ブタノールを内部標準とする方法により、高精度の定量を可能にした。

また、正確な標準品が無く、かつ比毒性も測定されていない GTX6 を大分県産ムラサキガイ中腸線から 10 mg 精製し、定量 NMR で濃度を決定した後マウス毒性を測定し、比毒性を 180MU/ $\mu$  mole, 35  $\mu$  g STX eq./ $\mu$  mole と決定した。また、当分の間は公定法として使われるマウス毒性試験の精度管理に必要な標準液の設計を行った。C1/C2 から化学変換により dcSTX を調製し、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 STX 標準品との比較により STX 相当量の毒力を求めた。

## 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。本年度は以下の4項目について基礎データを収集することとした。

### 1) 分析用検液調製法の検討

麻痺性貝毒分析のための抽出はマウス毒性試験と同じ方法が採られている。しかし、この AOAC 法は 50 年以上前に saxitoxin(STX)を対象に設定されたもので、現在までに存在が判明している 30 近い同族体に対して適用可能であるかの検討はなされていない。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。国内の二枚貝で最も含量の高い gonyautoxin-1~4 (GTX1~GTX4)について検討した。

また、蛍光 HPLC 分析前には妨害物質の除去のため予備精製が必要である。新素材を含め、効率的な予備精製法をあわせて検討する。さらに除去方法を開発するために妨害物質の化学的性状に知ることが必要であるので、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、単離して化学的特性を明らかにすることを試みた。

### 2) 蛍光 HPLC 法の改良

我々が提案したポストカラム蛍光化 HPLC 法は多くの研究機関で利用されて

いる。分解能を重視して設定した現在の分析条件は、多数存在する STX 同属体を電荷により 3 群に分けて別々に分析する必要がある。これを安全性試験法として汎用化するには、分析時間の短縮等の改良が必須である。開発当時に比べ各種分析カラムの技術的改良が進んでいるので、これを利用し、一斉分析法を目指す。まず、GTX 群と STX 群の一斉分析法について検討し、ついで C 群を加えた全群の一斉分析を目指す。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。

### 3) 定量<sup>1</sup>H NMR を用いる標準溶液濃度決定法の検討

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が、一般に微量にしか得られず、吸湿性が高く不安定なため、秤量、濃度の決定が困難である。また、安全性評価に必要な毒性については 10 年以上前に元素分析を基準に標定した主要成分の比毒性が未だに世界中で使用されており、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。本年度は定量的 NMR により濃度を決定する方法を開発し、溶液のマウス毒性試験を実施して標準サキシトキシンとの相対的な腹腔内投与毒性を決定することを目的とした。検討の対象（モデル）としては、近年 *Gymnodinium catenatum* の発生に伴い国内の貝中にも多く検出されるにも関わらず、正確な標準品が無く、かつ比毒性も測定されていない GTX6 を中心に実施する。

#### 4) 標準毒の調製

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。国内では水産庁及び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。3) の目的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。

一方、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 STX 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  $\mu\text{gSTX}$  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 STX が指定されていることが実現を難しくしている。我々は同条約の枠外となる decarbamoyl-saxitoxin (dcSTX) が、STX 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 STX 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。

#### B. 研究方法

##### 1) 分析用検液調製法の検討

規制値の 1.5 倍をめぐりに大船渡産ホタテガイの均一磨砕物を調製した。試料 10 g に対し 10 mL の 0.075, 0.10, 0.20, 0.30 N の塩酸 10 mL を加え、沸騰湯浴で 5 分間加熱した。氷冷後 3000 rpm で遠心分離し、上澄み液の pH を測定するとともに、SepPak ODS, 限外濾過による予備精製を行った後、蛍光 HPLC で GTX 含量を測定した。分析は 3 連で行った。

予備精製法の検討にも大船渡産ホタテガイ抽出液を用いた。遠心分離 (11,000rpm、5 min.) 後、各種固層抽出用カートリッジカラムに供した。固層抽出用カラムとして現行の SepPack C18 (Waters 社)に加え、Oasis HLB Plus (Waters 社)、Bond Elut PH(3 mL/200 mg、VARIAN 社)、NEXUS(6 ml/200mg、VARIAN 社)を試みた。なお、Oasis HLB Plus および Bond Elut については MeOH で conditioning した場合と未処理の両方を試みた。カラムからの溶出液を約 0.4 ml ずつ分注し、Ultra-Free (Millipore 社、10,000 cut) で限外ろ過後 HPLC 分析に供した。精製の評価として、GTX4 近傍に溶出する未知の蛍光物質 UK の除去率を指標とした。

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 法に準拠した生殖巣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) 蛍光 HPLC 法の改良

C18 の結合様式、エンドキャッピング様式の異なる ODS 系のカラム 4 種について、現行の GTX 用溶出液とそれに各種濃度でアセトニトリルを添加した溶出液による GTX 群および STX 群の分離状況について標準液を用いて調査した。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)、CAPCELL PAK C18 MG (資生堂ファインケミカル事業部、東京都港区、日本)、Synergi Hydor-RP (Phenomenex、Carfornia, 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。分離の良い条件を組み合わせ、かつ、再平衡に要する時間を調査することにより、グラジエント溶出による一斉分析法条件を設定した。再平衡化時間の測定は、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求めた。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。

ついで、アミノカラムの Develosil NH2-5 (φ 4.6×35 mm, 野村化学) および陰イオン交換カラムの IC-Pak Anion HC (φ 4.6×150 mm, Waters) と HITACHI GEL #3013-N (φ 4.0×150 mm, 日立製作所) について、ヘプタンスルホン酸をイオンペアーとして含む GTX 用の移動相を流した場合に C1/C2 および

GTX 群標準がどのような挙動を示すかを検討した。

もっとも良好な分離を示した IC-Pak Anion HC カラムを Synergi Hydor-RP (φ 4.6×150 mm Phenomenex) の直前に接続し、昨年度設定した GTX 群、STX 群分離の溶離条件を適用した。移動相の内容、タイムプログラムを微調整して最適化をはかったのちに、標準毒混合液の連続分析を実施して検出感度、再現性等を検証した。

## 3) 定量<sup>1</sup>H NMR を用いる標準溶液濃度決定法の検討

測定の対象となる毒のプロトン、標準物質のプロトンの象緩和時間を測定するとともに、L-アルギニンを使ってパルスシクエンス等、測定パラメーターを決定した。また、濃度の異なるも出る化合物および麻痺性貝毒成分の溶液を測定し、定量性を検討した。

基準物質としてははじめに重酢酸のメチル未置換プロトンについて検討し、ついで、プロピオン酸、ジメチルホルムアミド、*tert*-ブタノール、メタノールの計 4 化合物の<sup>1</sup>H NMR 内部標準物質としての可能性を検討した。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。

## 4) 標準毒の調製

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 GTX6 及び比較のための GTX5 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。最終精製後、両毒の一定溶液を作成し、2 種類の定量的 NMR 測定で濃度を求めた。また、標準化したマウス毒性試験を行って GTX6 及び GTX5 の比毒性を求めた。

つぎに、C1/C2 を精製して dcSTX の原材料とした。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 に変換した。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試験を行い、調製した dcSTX 溶液が標準サキシトキシン何  $\mu\text{g/mL}$  に相当するかを決定した。

## C. 研究結果

### 1) 検液調製法の検討

GTX1~GTX4 の各 pH における抽出効率を図 1 に示す。添加した塩酸の濃度により pH は 2.5 ~ 4.8 の範囲であったが、抽出されてくる各毒の量に差は認められなかった。高 pH では二枚貝成分により N-OH の還元や 11 位硫酸エステルの脱離

が起こることが懸念されたが、指定されている pH 4 以下の条件を守れば問題がないことが明らかとなった。

ホタテガイ等二枚貝は未知の蛍光物質 (UK と仮称) を含むことがあり、ポストカラム蛍光化分析を妨害することがある。今回の研究でもヒオウギガイに大量のこの物質が含まれることを発見した。このため、カートリッジカラムによる除去を行っているが、完全には取り除けないことがある。そこで最新のカラムについて検討した。図 2 にカートリッジカラムの効果を調べた代表例を示す。毒はカラムの膨潤 (conditioning) に要するメタノールを除去するために使った水が残っているために溶出初期は希釈されて溶出する。不純物 UK はカラムにある程度保持されるものの徐々に溶出してくる。希釈されなくなり、かつ、不純物の溶出が始まる前の画分が得られることが理想的であるが、残念ながらこのような画分は得られていない。なお、conditioning が不要とされる NEXUS では不純物 UK はまったく保持されず、毒に混ざって溶出してきた。

UK と仮称したホタテガイに含まれる分析妨害物質を 250g の生殖巣から希塩酸加熱抽出し、図 3 に示すスキームに従い精製した。最終の Develosil C30 カラムに供したところ、多波長検出器で純粋な物質が得られた。効率的に精製が進んだが、最終的に得られた化合物は不溶化し、良好な NMR スペクトルが得られなかった。また、マススペクトルによる分子量の決定もできなかった。不完全な  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを解析すると、プロトン数が少なく、UV 330 nm の吸収から芳香環が想定さ

れるにもかかわらずオレフィンプロトンが観察されなかった。麻痺性貝毒の蛍光化反応物と同様にヘテロ芳香環を3つ以上もつ可能性ある。

## 2) 蛍光 HPLC 法の改良

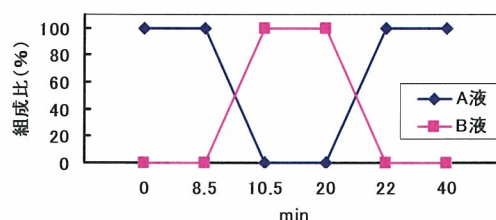
検討したカラムでのアセトニトリルを含まないものと 2% 含む溶出溶媒による GTX2 (GTX 群でもっとも保持時間が長い) の溶出位置を図 4 に示す。最も保持力の強いものは Develosil ODS-MG5 であり、CAPCELL PAK C18 MG はピーク形状のブロードニングが目立った。しかし、再平衡化時間では Synergi Hydor-RP が最も短かったため、このカラムを以下の 2 液のグラジエント溶出による一斉分析に用いることにした (図 5)。すなわち、19 分以上の初期溶媒の溶出で、保持時間がほぼ一定に戻っている。このカラムについて溶媒のタイムプログラムの最適化をはかり、GTX1-GTX5, neoSTX, dcSTX, STX の完全分離を可能にした。

移動相 :

- (A) 4 mM HSA in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0)+ 2 % CH<sub>3</sub>CN
- (B) 4 mM HSA in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0)+ 10 % CH<sub>3</sub>CN

次に、C1/C2 分離のために新たに接続するカラムの検討を行った。Develosil NH2-5 はまったく C1/C2 を保持せず、IC-Pak Anion HC は C1/C2 をわずかに保持し、かつ分離した (図 6)。HITACHI GEL #3013-N は保持力が強すぎ、GTX 群までも保持し、C 群は 1 時間以内には溶出しなかった。

IC-Pak Anion HC カラムを Synergi Hydor-RP カラムと直列に接続し、先に設定した GTX 群、STX 群分離の溶離条件を適用したクロマトグラムを図 7 (上) に示す。C1/C2 と GTX4 の分離をさらに良くするために初期のアセトニトリル濃度を 1% 変えたところ (A 液: 4 mM HSA in 20 mM phosphate buffer (pH 7.1)+ 1 % CH<sub>3</sub>CN)、分離が良好になった (図 7 下)。以下に最終的に設定したタイムプログラムを示す。



測定範囲内で良い直線性を示し、表 1 に示す検出限界が得られた。GTX1, GTX4, GTX5 の感度が悪いが、規制値近傍の試料の分析には十分な検出感度である。

次に標準溶液を 10 回の繰り返し分析に供し、再現性を調べた。保持時間とピーク面積の変化を図 8、図 9 に示す。40 分間の繰り返し分析で保持時間には良い再現性が見られている。また、ピーク面積では neoSTX と GTX2 の変動がやや大きい。その原因としてグラジエント溶出によるベースラインの乱れがピーク面積の計算に影響しているものと思われる。

## 3) 定量<sup>1</sup>H NMR を用いる標準溶液濃度決定法の検討

構造解析、純度検定等に用いる<sup>1</sup>H NMR には重水溶媒が使われる。麻痺性貝



毒の場合毒を安定に保つために重水素置換した酢酸を加える。われわれは経験的に4%重酢酸を用いているが、この際、酢酸メチル基の未置換プロトンが軽酢酸のメチルとは分かれて観測される。このシグナルを内部標準とすれば、貴重な試料を汚染することなく濃度が決定できると判断し、諸条件を検討した（内部標準法）。通常のNMR測定ではプロトンの電磁的環境により緩和時間が異なるため、シグナルの面積（積分値）が微妙に異なってくる。そこで、L-アルギニンを使って測定パラメータを決定し、かつ、濃度による定量性を検討した。図10に待ち時間による各プロトンの積分値の差を示す。9秒以上の待ち時間を設ければ緩和時間による面積の差がなくなることから待ち時間を11秒とし、90度パルス6.3 $\mu$ 秒、データ取得時間1.8秒で測定することとした。この条件でアルギニンの濃度を変えて測定すると0.8~12 mMの範囲で濃度とシグナル面積に高い相関( $r^2=0.9995$ )が認められた。なお、第一次標準としてカフェイン溶液を用いて測定したところ、使用した4.3%重酢酸中に含まれる未置換1プロトン濃度は、8.92mMと求められた。

カナダのNational Research Councilではカフェインを標準として軽水中、Presaturation、Linear prediction modeで測定したスペクトルの面積から標準液の濃度を決定している（外部標準法）。基本的にこの測定条件を使って測定したところ、カフェイン濃度と1プロトン当りの積分値には良好な相関関係が認められた。また、同濃度のカフェイン溶液をサンプルチューブを変えて3連で測定したと

ころ、各プロトン間の誤差は2%未満、チューブ間の誤差は1.6%であった。

ここで内部標準と設定した重酢酸の未置換プロトンシグナルは、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（図11）。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。

そこで、新たな内部標準を検討した結果、1.24 ppm にあらわれるtert-ブタノールのメチルシグナルが麻痺性貝毒のシグナルから十分に離れており、緩和時間も2.2秒と短いこと、また、蒸留による除去も容易であることから最も適していると判断した（図12）。また、直線性やNMR応答性も良好であり、麻痺性貝毒の定量法として有効であることが判明した。定量範囲は0.2 - 10 mMであり、検出限界は0.02 mMであった。これを用いてGTX5、GTX6の濃度を測定しなおしたところ、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/ $\mu$ molと計算された（図13）。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。

#### 4) 標準毒の調製

ムラサキイガイの中腸腺1 kgから約10 mgのGTX6と6 mgのGTX5を得た。GTX6にはHPLC測定で0.28%のGTX5を含んでいたが、他成分はHPLCの検出限界未満であった。精製したGTX6の一定量をバイアルにとって凍結乾燥し、蒸留

水及び 4%重酢酸重水溶液に溶かした後、それぞれ内部標準、外部標準法用に設定した条件でスペクトルを測定した。GTX6 に帰属されるシグナル以外は観察されず、純度が高いことを示していた。

次に GTX6 の比毒性を決定するために、マウス毒性試験を行った。ddY 系雄のマウスを使い、MU を求めた。なお、実験に際し、dcSTX 基準溶液を使ってマウスの感受性を表す CF 値を求め、標準化した。前述のとおり、内部標準法で求めたモル濃度を基準にして比毒性を計算すると GTX5、GTX6 はそれぞれ 133 MU/ $\mu$  mole、148 MU/ $\mu$  mole となり、CF 値は 0.20  $\mu$  gSTX/MU であったので、標準化した比毒性は GTX5: 27  $\mu$  gSTX/ $\mu$  mole、GTX6: 30  $\mu$  gSTX/ $\mu$  mole となる。

C1/C2 から図 14 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  $4.62 \pm 0.08 \mu$  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 (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 (Sf 値) を求めたところ 0.84 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  $\mu$  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

スティックボトル (30mL 容) に分注し、 $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### D. 考察

##### 1) 検液調製法の検討

国内産二枚貝の主成分とする GTX 群については、加熱抽出の際に AOAC 法で指定されている pH 3 ~ 4 を守れば問題ないことを確認した。今後は C 毒群についても検討する必要がある。

抽出液の予備精製に現在使用している SepPac C18 カートリッジはカラム保護、クロマトグラムベースラインの安定化に極めて有効であり、UK と仮称している妨害物質を殆ど取り除くことができる。しかし、この化合物のシグナルが巨大で一部残存してしまう場合は GTX4 量の過大評価につながる可能性がある。そこで、新素材のカートリッジカラム、特に conditioning 不要と称せられるものに期待して検討を加えたが、現在の方法を上回るものは見出せなかった。UK の化学的性状を調べるために精製法を検討したが、残念ながら不溶化の原因を解決できない限り、構造解析は困難と考えられる。当分はトライ・アンド・エラーにより除去方法を探るしかない。

##### 2) 蛍光 HPLC 法の改良

再平衡化速度の速い ODS カラムの使用と、陰イオン交換カラムを接続することにより C1/C2 群から STX 群にいたる一斉分析法の開発に成功した。今後、実試料によるマトリックス効果の有無等の最終的な検討を行い、実用性を証明できれば公定法

としての普及も可能と思われる。  
しかし、いくつかの改良すべき点も存在する。IC-Pak Anion HC による C1/C2 の分離は必ずしも十分ではない。15cm のカラムをこれ以上長くすることは耐圧限界を超える可能性があり、現実的ではない。逆に、HITACHI GEL #3013-N の強い保持力に着目して、この充填材の極端に短いカラムを用いることも 1 つの解決法であろう。また、グラジエント効果によるベースラインの乱れも定量性を上げるために解決すべき問題である。ブランクのベースラインを減らすデータ処理による方法も効果があるが、水を始め、使用する試薬の徹底的な純化も効果があろう。

移動相のさらなる検討によっては再平衡化時間も含め 30 分以内での分析が可能となる感触を得ている。早急に理想的な条件を設定して実用化と普及を目指したい。

### 3) 定量<sup>1</sup>H NMR を用いる標準溶液濃度決定法の検討

非破壊的な定量 NMR 法により、1mg 以下という微量の試料を定量できることが明らかになった。極めて定量性がよく、実用性の高い方法が開発できた。これを使った系統的な標準毒 13 成分の調製が期待される。

### 4) 標準毒の精製

世界的にこれまで供給の無かった GTX6 の標準を始めて作成した。安全性評価の基本となる比毒性についても、定量 NMR 法を使うことにより提示できた。比毒性については全成分について系統的な再検討が必要と考えられる。その際には、

今回実施したようなマウス感受性の差を排除する標準化が必須である。

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、濃度の少しずつずれた 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  $\mu$ 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。

#### E. 結論

- 1) TX群を主成分とする国内産二枚貝の検液調製法として pH 範囲を守れば AOAC 法に準拠した抽出条件で問題ないことを確認した。
- 2) C 群 GTX 群 STX 群を一斉分析可能な基本的な条件を設定した。
- 3) 非破壊で低濃度の麻痺性貝毒の濃度を決定できる NMR 測定法を開発した。これを利用し、これまでにデータの無かった GTX6 の比毒性を決定した。
- 4) 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。

#### G. 研究発表

研究成果については一部については国内外の学会で口頭発表した。また、論文に取りまとめて早急に発表する予定である。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。

これとは別に、今回調製した GTX6 の標準液については比毒性に関する情報とあわせ、国内で麻痺性貝毒の HPLC 分析

を実施している機関に情報を流し、要求があれば提供することを考えている。また、マウス毒性試験の標準となる dcSTX 溶液も希望者に配布する予定である。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定はない。