

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 相良 剛史

平成19（2007）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	----- 53
西尾 幸郎	
2. 有毒魚類のバイオアッセイ	----- 68
浅川 学	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----103
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----104

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、フィリピン産有毒魚類から調製したシガトキシン(CTX)類の粗毒、あるいはパルトキシシン(PTX)標準品および沖縄県産イワスナギンチャクの粗毒を用いて、固相抽出法による有効な簡易精製法を検討した。次いで、見出された簡易精製法により部分精製した各有毒成分につき、液体クロマトグラフ質量分析(LC/MS)に供して、それぞれの構造情報を得るとともに、高感度で迅速、かつ簡便な分析条件に検討を加えた。

CTX 類の簡易精製には Sep-Pak C18 (Waters)、ENVI-Carb (SUPELCO) および GL-PAK CARBOGRAPH (GL science)、PTX 類には OASIS MAX (Waters) による固相抽出法が極めて有効であった。また、PTX 標準品を限外ろ過と精密ろ過に付したが、前者の回収率は著しく低く、後者による前処理が適当であると考えられた。次いで、有毒なフィリピン産魚類の部分精製毒を Bruker 社製 Bio TOF により分析ところ、 m/z 1117.2 の MS クロマトグラムにおいて CTX 関連成分と示唆されるピークが検出された。一方、PTX 標準品による LC/MS 分析は、Bruker 社製 Bio TOF では濃度 50 ppm 以上で精密質量分析、Micromass 社製 Quattro micro タンデムマスでは MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法で濃度 50 ppb 以上の微量定量分析、さらに HITACHI 社製 NanoLC/Linear-Trap-TOF NanoFrontier LD では濃度 10 ppb 以上の微量分析ならびに 500 ppb 以上の精密質量分析が可能となった。これら PTX の分析では、共通してリニアグラジエント法を特異な条件として設定した。本手法はイワスナギンチャクならびに *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の有毒成分の分析においても良好な成果が得られたことから、その実用性が証明された。

以上、平成 18 年度当該研究事業の当初の目的をほぼ完遂できたものと言える。

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

これまで本邦では、フグ毒テトロドトキシン (tetrodotoxin: TTX) や麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poison: PSP) を原因とする海洋性自然毒による食中毒が発生し、ヒト健康に多大な被害をもたらしてきた。一方、南北回帰線に挟まれる熱帯や亜熱帯地方では、TTX 中毒や PSP 中毒とは異なるシガトキシン (ciguatoxin: CTX) またはその関連物質を原因物質とするシガテラ中毒が多発し、わが国では主として南西諸島が発生地域にあたとされてきた (橋本, 1979; 野口ら, 1997)。本中毒は熱帯または亜熱帯海域に生息する有毒魚類が原因であるとされ、過去に本州で発生した同様の食中毒の原因魚類も熱帯あるいは亜熱帯産であった。しかしながら、1998年4月と11月に宮崎県と千葉県でそれぞれの沿岸域で採捕されたイシガキダイ *Oplegnathus punctatus* による集団食中毒が相次いで発生し、いずれも典型的なシガテラ中毒であった。一方、本邦で発生する海洋性自然毒による特異な食中毒としてパリトキシン (palytoxin: PTX) 中毒が挙げられる。これまで、わが国では本中毒は有毒なアオブダイ *Scarus ovifrons* によってのみ引き起こされてきた (天野ら, 1975; Noguchiら, 1987; Okanoら, 1998; 吉嶺ら, 2001; Taniyamaら, 2003)。ところが、近年、ハタ科魚類 (*Epinephelus* 属魚類)、

ブダイ *Calotomus japonicus* (推定原因魚類)、ハコフグ *Ostracion cubicus* もしくはその近縁種によるアオブダイ中毒様食中毒が続発している (Taniyamaら, 2002; 谷山ら, 2003; 楠原ら, 2005)。

また、近年、熱帯や亜熱帯を生息域とする PSP 産生渦鞭毛藻 *Alexandrium tamiyavanichii* が温帯海域である瀬戸内海で発生し、食用貝類が毒化した (Hashimotoら, 2002)。また、アオブダイの毒蓄積機構に、本来、熱帯ないし亜熱帯海域に生息する *Ostreopsis* 渦鞭毛藻が関与し、本属が徳島県ならびに長崎県沿岸に分布していることが報告された (Taniyamaら, 2003)。さらに、平成17年度の当該研究事業の成果により、高知県と徳島県沿岸に *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻が、高知県と宮崎県沿岸に *Ostreopsis* 渦鞭毛藻が生息していることを新たに明らかにした。さらに、両者の天然株あるいは培養株は、CTX類またはPTX類産生能を持つことが示唆された。

他方、種々の食用魚介類の輸入が増大するなか、誤ってシガテラ毒魚が混入していたケースがある。これらは幸いにも関係機関の徹底した監視・検査により、市場への流通が防止されている。しかしながら、最近では輸入魚類の種類や輸出国はますます増加傾向にあり、有毒種が混入されるリスクも高くなっている。

このような状況の下、国民の食用魚介類に対する安心・安全確保に関する関心は非常に高く、CTX類や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、その倫理面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) CTX 関連成分の抽出と精製

1-1) 試料

2006 年 10 月に採捕されたフィリピン産未同定魚類 3 検体 (試料 A、B、C) を試料として用いた。

1-2) 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、試料 A の内臓 128 g、試料 B の内臓 288 g および試料 C の内臓 133 g に 3 倍量のアセトンを加えて 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。

1-3) 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、付属の試験片と共にメタノール中に 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。

なお、本試験による精製過程における有毒画分活性の検討には、それぞれ画分の原液を用いた。

1-4) 固相抽出による簡易精製法の検討

B. 研究方法 1-2) において、試料 B から調製した粗抽出液を用い、LC/MS に供するための前処理 (カートリッジカラム処理) 法を検討した。

まず、粗抽出液を 10 ml に濃縮後、Sep-Pak C18 (Waters) に供し、メタノールで溶出させ、2 ml ずつ 3 画分 (Sep-Pak 画分 1、2 および 3)

を分取した。非吸着画分については同様の操作を2回繰り返して、各画分を合一した。次いで、各画分の活性をCigua-Checkにより調べた。陽性反応を示した有毒または活性画分を1 mlに濃縮してOasis MCX(Waters)、Oasis WAX(Waters)、Oasis WCX(Waters)およびENVI-Carb(SUPELCO)に供し、4 mlのメタノールを通過させた。通過液のCigua-Check陽性画分を合一後、1 mlに濃縮し、GL-PAK CARBOGRAPH(GL science)に付し、メタノールで2 mlずつ分取した。有毒または活性画分をTSK GEL G2000PW(φ8×380 mm、TOSOH)に付し、80%メタノール(流速1.0 ml/min)で溶出させ、5 mlずつ分取し、Cigua-Checkにより活性を調べた。得られた活性画分をPottierら(2002)の方法に準じてLC/MSにて分析した。

1-5)LC/MS分析

本分析はPottierら(2003)の方法を改良して行った。

LC部にはHITACHI社製L-2100を、カラムにはC-4(φ2.0×150 mm、GL science)を、移動相Aとして0.1%ギ酸溶液、移動相Bとして0.1%ギ酸-90%アセトニトリル溶液を用いた。まず、分析時間0~60分間で移動相Aを35%から40%(移動相B:65%→60%)とするリニアグラジエント後、分析時間60~62分間は移動相B液100%(移動相A:0%)とし、流速は0.2 ml/minに設定した。

MS部にはHITACHI社製M-8000またはBruker社製Bio TOFを用いた。音速噴霧イオン化(SSI)法を用いるM-8000では、測定条件をポジティブモード、第1細孔温度170℃、シールド温度300℃、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)法を備えており、LC部の流速が0.2 ml/minの条件下でドライガス温度を250℃、同様に流速0.05 ml/minの際にドライガス温度を150℃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。

2)PTX簡易精製法の検討

2-1)PTX標準品

和光純薬工業株式会社製のPTX標準品を使用し、100 μgを蒸留水1 mlに溶解して以下の試験に供した。

2-2)マウス毒性試験

本試験はTaniyama(2003)らの方法に準じて行った。試験液をddY系雄マウスに1 ml腹腔内投与して48時間観察し、生死を確認した。本研究において、1 MUとは供試マウス1尾を約48時間で死亡させる毒量と定義した。

2-3)HPLC分析

PTXを対象とした本分析では、カラムにPurospher STAR RP-8e(φ2 mm×250 mm、Merck)を、移動相Aとして0.1%ギ酸-20%アセトニトリル溶液、移動相Bとして0.1%ギ酸-80%アセトニトリル溶液を用いた。移動相については、分析時間0~60分間で移動相A100%→0%(移動相B:0%→100%)となるリニアグラジエント法を用い、流速を0.2 ml/minとした。検出にはPTX標品特有の紫外外部極大吸収の263 nmを使用した。

2-4)カラムクロマトグラフィーの検討

カラムクロマトグラフィーは研究方法B.2-2)の方法に基づき行った。濃度100 ppmのPTX標準品10 μlを注入し、PTXが溶出する保持

時間のピークを分取した。分取した画分は減圧下で濃縮乾固してギ酸およびアセトニトリルを除去し、蒸留水にて溶解して毒性を確認した。カラム以外の要因での PTX の失活を考慮し、対照として分析系のカラムのみを取り除いたものでも同様の作業を行った。

2-5) 固相抽出法の検討

メタノールと蒸留水で平衡化した OASIS MAX (Waters) に濃度 100 ppm の PTX 標準品 1 ml を吸着させて 2 ml の 2%アンモニア溶液と 100%メタノールを通過させ、1%酢酸-80%メタノールで毒を溶出させた。それらを減圧濃縮したものを少量の蒸留水に溶解し、毒性を確認した。

2-6) ろ過膜の検討

ろ過膜材質に再生セルロース (RC) を使用した Ultrafree-MC (MILLIPORE) 10,000 Dalton (RC 10 kDa)、ポリエーテルスルホン (PES) を使用したビバスピ 500 (sartorius) 5,000 Da (PES 5 kDa) および 10,000 NMWL (PES 10 kDa) の 3 種類の限外ろ過ユニットと、ポリビニリデンフルオライド (PVDF) を使用した Ultrafree-MC 0.45 μm (PVDF 0.45 μm) および親水性ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) を使用した Ultrafree-MC 0.5 μm (PTFE 0.5 μm) の 2 種類の精密ろ過ユニットを用いた。

RC 10k Da は保湿剤として施されているグリセリンによる PTX への影響を把握するため、蒸留水を用いてグリセリン除去処理したものを準備し、未処理のものと共に PTX 標準品 500 MU/100 μl をろ過して、得られたろ液の毒性を検討した。

次に、ろ過膜のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 処理による吸着防止作用を確認するた

め、PES 5 kDa、PES 10 kDa、PVDF 0.45 μm および PTFE 0.5 μm のデバイスに 5% SDS 0.5 ml を入れ一晩放置し、蒸留水にて 2 回洗浄する処理を施し、未処理のものと共に PTX 標準品 500 MU/100 μl をろ過して、得られたろ液の毒性を検討した。

3) PTX 標準品による LC/MS 分析法の検討

Lenoir ら (2004) の方法を参考に、PTX 標準品を用いて分析法の検討を行い、有効な分析法として以下の 3 条件を検討した。

条件 A: カラムに Purospher STAR RP-8e (ϕ 2 mm \times 250 mm、Merck) を、移動相 A として 0.1%ギ酸-20%アセトニトリル溶液、移動相 B として 0.1%ギ酸-80%アセトニトリル溶液を用いた。移動相については、分析時間 0~60 分間で移動相 A 100% \rightarrow 0% (移動相 B: 0% \rightarrow 100%) となるリニアグラジエント法を用い、流速を 0.2 ml/min とした。検出には HITACHI 社製 L-2100 高圧グラジエントシステムを接続した Bruker 社製 Bio TOF を用いた。エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を採用し、ドライガス温度を 250 $^{\circ}\text{C}$ 、検出器 1800 V、リペラー電圧 8300V で、ポジティブモードで測定した。

条件 B: カラムに XBridgeC18 (ϕ 2.1 mm \times 250 mm、Waters) を用い、3 種類の移動相 (移動相 A: 純水、移動相 B: メタノール、移動相 C: 2%酢酸溶液) を用いた。流速 0.25 ml/min、移動相 A を 85%、移動相 B を 10%、移動相 C を 5%の割合で分析を開始し、リニアグラジエントにより 7 分後に移動相 B を 50%、移動相 C を 50%とした。次いで 10 分間は移動相 B を 95%と移動相 C を 5%とし、さらに 15 分間は移動相 A を 85%、移動相 B 10%、移動相 C を 5%に設定し、分析時間は合計 32 分間とした。検出には Waters 社製 Alliance2695 Separation

Module を接続した Micromass 社製 Quattro micro タンデムマス検出器を用いた。ESI 法でイオン化し、キャピラリー電圧 1 kV、脱溶媒ガスを流速 600 l/hr で温度 350°C、イオン源温度 120°C、ポジティブモードで測定した。検出の際、MS 1 で選択した擬分子イオンをコリジョンセルでフラグメンテーションさせた PTX のプロダクトイオンスペクトルのトランジションをモニターするMRM (Multiple Reaction Monitoring) で行った。

条件 C:濃縮カラムに Monolith Trap Column ($\phi 50 \mu\text{m} \times 150 \text{mm}$, HITACHI)、分離カラムに MonoCap for Nano Flow ($\phi 75 \mu\text{m} \times 150 \text{mm}$, GL science) を、移動相 A として 0.1%ギ酸-2%アセトニトリル溶液と移動相 B として 0.1%ギ酸-98%アセトニトリル溶液を用いた。移動相 A で平衡化した Monolith Trap Column に試験液を注入し、移動相 A を流速 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ で 3 分間流して試験液を濃縮した。次いで Monolith Trap Column を、10 方バルブを用いて、90%移動相 A-10%移動相 B で平衡化された MonoCap for Nano Flow の前に繋ぎ替え、流速 200 nL/min でリニアグラジエント法により 30 分間かけて 40%移動相 A-60%移動相 B に切り替えた。さらに、同流速で移動相 B を 20 分間流した後、90%移動相 A-10%移動相 B を 30 分間流して次の分析に備えた。

検出にはナノエレクトロスプレーイオン化法 (Nano-ESI) を用いた、HITACHI 社製 NanoLC/Linear-Trap-TOF NanoFrontier LD を使用し、カウンターガス 0.6 L/min 、スプレー電圧 1600V、ポジティブモードで測定した。

4) PTX 関連成分の抽出と精製

4-1) 試料

2006 年 6 月に沖縄県西表島で採取したイワ

スナギンチャク *Palythoa tuberculosa* 150 g を試料とした。試料は採取後、実験に供するまで -30°C で冷凍保管した。

4-2) 毒の抽出

毒の抽出は Taniyama ら(2003)の方法に従って行った。

試料を流水中で急速解凍し、3 倍量の 1% 酢酸を含む 75%エタノールを加えてホモジナイズし、遠心加速度 10,000 $\times g$ で 20 分間遠心分離を行った。残渣について、同様の操作を 2 回繰り返した。得られた上澄みを合一後、エバポレーターによる減圧濃縮と凍結乾燥処理を行い、酢酸とエタノールを完全除去した後、蒸留水で溶解させて 150 ml に定容し、粗抽出液とした。次に、粗抽出液に等量のジエチルエーテルを加え、分液ロートにより振とうして液液分配を行った。同様の操作を 3 回繰り返して、水層およびジエチルエーテル層をそれぞれ分取した。ジエチルエーテル層に蒸留水を加え、逆抽出を実施し、得られた水層を合一して蒸留水で 50 ml に定容し、水溶性画分液 (画分 A) とした。さらに、ジエチルエーテル層を減圧濃縮により乾固した後、90%メタノールとヘキサンを 100 ml ずつ加え振とうし、90%メタノール層をジエチルエーテル-メタノール画分 (画分 B)、ヘキサン層をジエチルエーテル-ヘキサン画分 (画分 C) 液とした。また、画分 A を水:1-ブタノール (1:1) で分配し、ブタノールに毒を転溶させた。これを凍結乾燥してブタノールを完全除去後、50 ml に蒸留水で定容し、水溶性-ブタノール転溶画分 (画分 D) とした。

下層の水画分については減圧濃縮し、ブタノールを完全除去した後、50 ml に蒸留水で定容し、水溶性-水画分 (画分 E) とした。なお、各画分の毒量はマウス毒性試験により求めた。

4-3) マウス毒性試験

本試験は Taniyama ら(2003)らの方法に準じて行った。前述の各画分を減圧下で濃縮乾固し、画分 A、D および E については蒸留水、画分 B および C については 1% Tween60 水溶液で溶解し、試験液とした。試験液 1 ml を ddY 系雄マウスに腹腔内投与してから 48 時間観察し、死亡の有無により毒性を判定した。

本研究において、1 MU とは供試マウス 1 尾を約 48 時間で死亡させる毒量と定義した。

4-4) 固相抽出法の検討

各画分液の一部をメタノールと蒸留水で平衡化した OASIS MAX (Waters) に吸着させ、2% アンモニア溶液と 100% メタノールを通過後、1% 酢酸-80% メタノールで毒を溶出させ、減圧濃縮した後少量の蒸留水に溶解し、毒溶出液を得た。1% 酢酸-80% メタノール溶出画分を、メタノールと蒸留水で平衡化した Sep-Pak Vac C18 (Waters) に付し、蒸留水、20% メタノール、50% メタノールおよび 80% メタノールを通過させた後、100% メタノールで毒を溶出させ HPLC 分析に供した。一方、B. 研究方法 4-2) で得られた画分 D 20 ml をメタノールと蒸留水で平衡化した Mega Bond Elute Flash C18 (VAPIAN) に吸着させ、20% メタノール、50% メタノール、80% メタノール、100% メタノールを連続して 4 回を通過させ、1% 酢酸-80% メタノールで毒を溶出後、さらに、100% メタノール、1% 酢酸-100% メタノールおよび 100% メタノールの順に通過させ、20% メタノール画分、50% メタノール画分、80% メタノール画分、100% メタノール I 画分、100% メタノール II 画分、100% メタノール III 画分、100% メタノール IV 画分、1% 酢酸-80% メタノール I 画分、100% メタ

ノール V 画分、1% 酢酸-100% メタノール II 画分および 100% メタノール VI 画分の溶液を得た。これらを減圧濃縮した後、蒸留水にて 6 ml に定量した。各画分をマウス毒性試験に供し、毒性が確認された 100% メタノール I 画分、1% 酢酸-80% メタノール I 画分および 100% メタノール V 画分について、各画分をメタノールと蒸留水で平衡化した OASIS MAX (Waters) に付し、2% アンモニア水溶液と 100% メタノールを通過後、1% 酢酸-80% メタノールで毒を溶出させ、減圧濃縮した後、Ultrafree- MC 0.5 μ m (PTFE 0.5 μ m) の精密ろ過ユニットを通過させた。その後、ろ液と等量の 100% メタノールを続けて通過させ、100% メタノール I -50% メタノール溶出液、1% 酢酸-80% メタノール I -50% メタノール溶出液および 100% メタノール V -50% メタノール溶出液を得、これらを LC/MS 分析に供した。なお、本溶出液 1 ml は、イワスナギンチャク 3g に相当する。

4-5) HPLC 分析

本分析は、B. 研究方法 2-2) と同様に行った。

4-6) LC/MS 分析

本分析は、B. 研究方法 3) と同様に行った。

5) 渦鞭毛藻類が産生する有毒成分

5-1) 試料

分担研究者の西尾によって分離された *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻 G-C0510 株と *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻 O-F0506 株の培養藻体を試料とした。

5-2) 試験液の調製

各試料から水溶性画分と脂溶性画分を調

製し、一部を PTFE 0.20 μm (ADVANTEC) の精密ろ過フィルターを通過させ試験液とし、LC/MS 分析に供した。

5-3) LC/MS 分析

本分析は、B. 研究方法 3) と同様に行った。

C. 研究結果

1) CTX 関連成分の抽出と精製

1-1) フィリピン産魚類の毒性

試料 C の内臓から CTX 換算で 0.025 MU/g の毒性が検出されたが、試料 A と B の内臓の毒性は CTX 換算で 0.025 MU/g 未満であった。一方、いずれの検体も Cigua- Check 弱陽性反応を示した。

1-2) 固相抽出による簡易精製法の検討

試料 B の内臓の粗抽出液を 10 ml に濃縮後、Sep-Pak C18 に供したところ、非吸着画分および Sep-Pak 2 画分は Cigua-Check で陽性反応を示したが、Sep-Pak 1 と 3 画分は陰性であった(表 1)。Cigua-Check 陽性であった Sep-Pak 2 画分を Oasis MCX、Oasis WAX、Oasis WCX および ENVI-Carb に供し、4 ml のメタノールを通過させたところ、Oasis WAX および WCX では非吸着画分が、ENVI-Carb ではメタノール溶出画分が、Oasis MAX では両画分が Cigua-Check 陽性であったが、その他の画分は陰性であった(表 2)。そこで、有毒画分または活性画分を合一後、1 ml に濃縮し、GL-PAK CARBOGRAPH に付し、メタノールで 2 ml ずつ 4 画分 (CARBO- GRAPH 画分 1 ~4) を分取したところ、CARBOGRAPH 画分 1 のみが Cigua- Check 陽性であったが、非吸着画分およびその他の画分については陰性であった(表 3)。陽性であった CARBOGRAPH 画

分 1 の TSK GEL G2000PW ($\phi 8 \times 380$ mm、TOSOH) 溶出画分は溶出画分 3 および回収画分 1 が Cigua- Check 陽性であったため(表 4)、これらの画分を LC/MS にて分析した。

1-3) LC/MS 分析

Bruker 社製 Bio TOF による分析結果を図 2 に示す。P-CTX2 および P-CTX3 のナトリウム付加イオンのマスクロマトグラムである m/z 1117.14-1118.14 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。

2) PTX 簡易精製法の検討

2-1) カラムクロマトグラフィーの検討

HPLC 分析において、保持時間 27 分に PTX のピークが認められたので分取した。注入した PTX 量が 50 MU であったのに対し、この分取した溶液の毒量は 20 MU であった。一方、対照としてカラムを通過していない場合でも、回収した毒量は 20 MU であった。このことから、本研究での PTX の失活はカラム通過によるものではなく、酸性溶液下での濃縮操作に起因しているのではないかと推察された。

2-2) 固相抽出法の検討

OASIS MAX による PTX 標準品固相抽出法を検討した際の毒の回収率を表 5 に示す。供試した PTX 量 5,000 MU のうち、回収率 80% となる 4,000 MU が 1% 酢酸-80% メタノール画分に溶出され、OASIS MAX を用いた固相抽出法は PTX の簡易精製に有用であることが示された。

2-3) ろ過膜の検討

RC 10 kDa のグリセリン除去処理の有無による PTX への影響を調べたところ、両者とも供

試した PTX 量 500 MU 中、20%の回収率である 100 MU の回収が確認できた。これらを HPLC で分析したところ、グリセリンの未除去または除去に関わらず、PTX 標品と同じ保持時間にピークが見られたが、ともに小さくなっていた(図 3)。ピーク面積より算出した PTX の毒量は 20 MU であり、マウス毒性試験から算出したものと一致した。本処理により PTX の一部が RC 10 kDa を通過できなかった、または通過する際に膜に吸着して、20%程度しか回収できなかったものと推察された。

次に、SDS 処理を施したろ過膜でろ過した PTX ろ液の HPLC 分析の結果を図 4 に示す。

PES 10 kDa では、SDS 処理、非処理ともに、PTX の保持時間に小さなピークが認められ、それよりも早い 16 分あたりに大きなピークが認められた。SDS 非処理のものには PTX 標準品には含まれない複数のピークが認められた。このことより PTX は PES 10 kDa を通過すると他成分に変換するが、SDS 処理により成分が変わることがわかった。PES 5 kDa では PES 10 kDa のときに検出されたピークと異なるものも検出されたが、全体的にピーク面積が縮小した。

これらの結果から、PTX は限外ろ過することにより失活、他成分への変換などを起こし、回収率が低くなるため、機器分析の前処理法としては不適切であると思われた。

一方、PVDF 0.45 μm および PTFE 0.5 μm の精密ろ過では、SDS 処理の有無にかかわらず PTX 標準品と同様のピークが得られ、そのピーク面積も減少はなかった(図 5)。

以上の結果から、PTX の機器分析用試料を調製する際には、PVDF 0.45 μm または PTFE 0.5 μm ろ過が有効であることが示唆された。

3) PTX 標準品による LC/MS 分析法の検討

PTX の構造式を図 6 に示す。使用した装置により水素やナトリウム付加イオン、多価イオンなど、検出されやすいピークが異なった。

条件A:50 ppmのPTX標準品を分析したところ、トータルイオンクロマトグラム、水素付加の 1 価イオン $[\text{M}+\text{H}]^+$ である m/z 2680-2682、ナトリウム付加の 1 価イオン $[\text{M}+\text{Na}]^+$ である m/z 2703-2704 およびナトリウム付加の 2 価イオン $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$ の同位体イオンである m/z 1351.7 のマスクロマトグラムの 20 分付近にピークが得られ(図 7)、その保持時間におけるマススペクトルにはナトリウム付加イオンである $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$ と推察される m/z 1351.2、カリウム付加の $[\text{M}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$ の 1359.2、3 価のナトリウム付加イオンと推察される、 $[\text{M}+\text{Na}+2\text{H}]^{3+}$ である m/z 901.2、カリウム付加イオンと推察される $[\text{M}+\text{K}+2\text{H}]^{3+}$ の m/z 906.5 のシグナルが得られ、 $[\text{M}+\text{Na}+2\text{H}]^{3+}$ の同位体イオンと思われる m/z 907 が最も強いシグナルであった(図 8)。そこで、 m/z 907 のマスクロマトグラムを描くと明瞭なピークを得ることができた(図 9)。

条件B:本条件下でのPTXの保持時間である 7.20 分のマススペクトルは m/z 327 の強度が最も高かった。そのため、 m/z 327 を基にフラグメンテーションさせた m/z 327 \rightarrow m/z 75.9、 m/z 327 \rightarrow m/z 69.8 のモニターを行うとともに、比較的高い検出感度が得られたPTXの 3 価のナトリウム、カリウム付加イオンと推察される $[\text{M}+\text{Na}+\text{K}+\text{H}]^{3+}$ をフラグメンテーションさせた m/z 913.5 \rightarrow m/z 327.4、2 価のカリウム付加イオンの脱水ピークと推察される $[\text{M}+\text{K}+\text{H}-5\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ をフラグメンテーションさせた m/z 1314 \rightarrow m/z 327.4、 $[\text{M}+\text{K}+\text{H}-9\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ をフラグメンテーションさせた m/z 1278 \rightarrow m/z 327.4 で明瞭なMRMクロマトグラムが得られた(図 10)。特に m/z

327→*m/z* 75.9 のMRMクロマトグラムではPTXの定量限界は50 ppb(0.01 MU/2 μl)程度であった(図11)。

条件C:PTX標準品の500 ppb溶液の分析において、*m/z* 1331.242で水素付加の2価イオンの脱水ピークである[M+2H-H₂O]²⁺が、*m/z* 875.834で水素付加の3価イオンの脱水ピークである[M+3H-3H₂O]³⁺が検出された(図12)。

強度の高かった *m/z* 875 のマスキングクロマトグラムではPTX標準品の50 ppb溶液で明瞭なピークを得ることができ、検出限界は10 ppb程度であった(図13、14)。

4) PTX 関連成分の抽出と精製

4-1) 毒力

イワスナギンチャク150gの粗抽出液の総毒力はPTX換算で120,000 MU、水溶性画分50,000 MU、脂溶性画分130 MU未満、ブタノール分配画分40,000 MU、水分画分5,000 MUであった。

4-2) 固相抽出法の検討

各精製段階の毒液を用いて固相抽出法を検討した。OASIS MAXの場合、各試験液2 mlを通過させると、以下のような毒力が認められた。粗抽出液においては非吸着画分(画分I)80 MU、2%アンモニア水洗浄画分(画分II)20 MU、100%メタノール洗浄画分(画分III)200 MU未満、1%酢酸-80%メタノール溶出画分(画分IV)100 MUで、回収率は画分Iで5%、画分IIで1%、画分IIIで13%、画分IVで6%であった。水溶性画分においては画分Iで200 MU、画分IIで20 MU、画分IIIで400 MU、画分IVで200 MU、第二1%酢酸-80%メタノール溶出画分(画分V)20 MU未満で、回収率は画分Iが10%、画分IIで1%、

画分IIIで20%、画分IVで10%、画分Vで1%未満であった。ブタノール分配画分において画分Iが160 MU、画分IIで20 MU、画分IIIで320 MU未満、画分IVで160 MU、画分Vで20 MUで、回収率はそれぞれ10%、1%、13%未満、10%、1%であった(表6)。

また、OASIS MAX 6cc(Waters)を用いた場合、水溶性画分では画分Iが600 MU未満、画分II350 MU、画分III2,600 MU、画分IV2,500 MU、回収画分(画分V)500 MU未満で、回収率はそれぞれ12%未満、7%、53%、50%、10%未満であった。ブタノール分配画分液では、画分Iが500 MU未満、画分II500 MU、画分III2,500 MU未満、画分IV2,500 MU、画分V350 MU未満で、回収率はそれぞれ12.5%未満、12.5%、62.5%未満、62.5%、8.75%未満であった(表7)。

このOASIS MAXを用いたブタノール分配画分の一部をSep-Pak Vac C18による固相抽出法の検討に進めた。非吸着画分5 MU未満、水洗浄画分5 MU未満、20%メタノール洗浄画分5 MU未満、50%メタノール洗浄画分10 MU未満、80%メタノール洗浄画分25 MU未満、100%メタノール洗浄画分100 MU、回収画分25 MU未満で、回収率はそれぞれ1.3%未満、1.3%未満、1.3%未満、2.5%未満、6.25%未満、25%、6.25%未満であった(表8)。

4-3) HPLC 分析

Sep-Pak C18による固相抽出の溶出毒量および回収率の結果より有毒西表産イワスナギンチャクの主成分が100%メタノール画分に溶出したものと考え、これをHPLCに供したところ、図15に示す結果を得た。

PTX標準品には、20.7分に特有のピークが

検出された。HPLC 分析による PTX の検出限界は 0.1 µg 程度と報告されている。一般に、PTX のマウスに対する LD₅₀ は 450 ng/kg であるので、0.1 µg の PTX 約 11 MU が HPLC による検出限界と計算できる。注入したイワスナギンチャクの精製画分は HPLC 分析結果から毒量 8.2 MU と算出された。イワスナギンチャクの精製画分で保持時間 20.7 分に PTX 標準品に一致するピークを検出した。これらの結果より西表島産イワスナギンチャクに含まれる有毒成分は PTX が主成分であることが示唆された。

4-4) LC/MS 分析

条件 A での分析では、PTX 標準品の保持時間と同じ 20 分付近のマススペクトルに PTX のカリウム付加イオンと思われる $[M+K+H]^{2+}$ の m/z 1360.3、3 価のナトリウム付加イオンと推察される $[M+Na+2H]^{3+}$ である m/z 901.2、カリウム付加イオンと推察される $[M+K+2H]^{3+}$ の m/z 906.5 のシグナルが得られ、PTX 標準品と同様に、 $[M+Na+2H]^{3+}$ の同位体イオンと思われる m/z 907 が最も強いシグナルであった (図 16)。そこで、 m/z 907 のマスクロマトグラムを描くと PTX 標準品と一致する明瞭なピークを得ることができた (図 17)。

条件 B では、PTX のフラグメントイオンである m/z 327 を基にフラグメンテーションさせた m/z 327→ m/z 75.9 (図 18)、PTX の 2 価のカリウム付加イオンの脱水ピークと推察される $[M+K+H-5H_2O]^{2+}$ をフラグメンテーションさせた m/z 1314→ m/z 327.4 (図 19)、PTX の 3 価のナトリウム、カリウム付加イオンと推察される $[M+Na+K+H]^{2+}$ をフラグメンテーションさせた m/z 913.5→ m/z 327.4 (図 20) で、PTX 標準品と一致する MRM クロマトグラムが得られた。これらのピーク面積より、イワスナギンチャク 1 g に

含まれるパリティキシンの量は 25.5 µg であると推察された。

条件 C では、 m/z 1331.242 で PTX の水素付加の 2 価イオンの脱水ピークである $[M+2H-H_2O]^{2+}$ が、 m/z 875.834 で水素付加の 3 価イオンの脱水ピークである $[M+3H-3H_2O]^{3+}$ が検出された (図 21、22、23)。

強度の高かった m/z 875 のマスクロマトグラムでは PTX 標準品と一致するピークを得ることができ、ピーク面積から求めたイワスナギンチャクの PTX 含有量は 1g あたり 19.6 µg となった (図 24)。本結果は条件 B で求めた値とほぼ一致しており、タンデムマスでの MRM およびナノフロー TOF を用いることにより、PTX の微量定量分析が可能となった。

5) 渦鞭毛藻類が産生する有毒成分・試料

条件 A では *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻および *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻ともに、トータルイオンクロマトグラム、PTX 由来多価イオンおよびフラグメントイオンのマスクロマトグラムにピークを得ることができなかった。

条件 B では、*Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の分析において、PTX のフラグメントイオンである m/z 327 を基にフラグメンテーションさせた m/z 327→ m/z 7 5.9 (図 25)、PTX の 2 価のカリウム付加イオンの脱水ピークと推察される $[M+K+H-5H_2O]^{2+}$ をフラグメンテーションさせた m/z 1314→ m/z 327.4 (図 26)、PTX の 3 価のナトリウム、カリウム付加イオンと推察される $[M+Na+K+H]^{2+}$ をフラグメンテーションさせた m/z 913.5→ m/z 327.4 (図 27) で、PTX 標準品と一致する MRM クロマトグラムが得られた。これらのピーク面積より *Ostreopsis* 属に含まれるパリティキシンの量は 1.7 pg/cell であると推察された。*Gambierdiscus* 属の分析においては、 m/z

327→ m/z 75.9 のMRMモニタリングでPTXの溶出時間と一致したが、定量限界以下であり、その他のPTX由来のMRMクロマトグラムにピークは得られなかった(図 28)。

条件Cでは、*Ostreopsis*属の分析において、PTXの分析では最も強度の高い、 m/z 875.834 水素付加の 3 価イオンの脱水ピークである $[M+3H-3H_2O]^{3+}$ の m/z 875.834 でマスクロマトグラムをモニターしたが、PTXを検出することはできなかった(図 29)。

D. 考察

CTX の LC/MS による分析法を検討するために、フィリピン産有毒魚類を用いて、簡易精製方法の検討を行った。その結果、シガトキシン(CTX)類の粗毒の簡易精製には Sep-Pak C18 (Waters)、ENVI-Carb (SUPELCO) および GL-PAK CARBOGRAPH (GL science) が有効であった。本手法では、CTX の性質上、試料の溶媒をメタノールとしたが、溶出液にもメタノールを用いている。そのため、試料の容量が多いと、吸着と溶出が同時になされるため、回収率と精製効率を考慮すると、試験溶液は 2 ml 以下が望ましいと思われた。得られた部分精製毒を Bruker 社製 Bio TOF MS により分析ところ、 m/z 1117.2 の MS クロマトグラムにおいて CTX 関連成分と示唆されるピークが検出された。本試料は < 0.025 MU/g であり、試験液の毒含量は < 1 MU/ml のものであったため、検出されたピークが CTX 由来のものであれば、非常に高感度に検出できたことになる。しかしながら、他の関連イオンおよび派生イオンのピークは検出されていないため、CTX の検出を断言できるものではないと考える。

PTX の LC/MS 分析法を確立するために、標準品を用いて、最適な固相抽出法、ろ過膜の選択を検討した。その結果、固相抽出法は

ポリマー樹脂と陰イオン樹脂を用いている OASIS MAX (Waters) が有効であった。しかしながら、PTX 標準品のろ過を行ったところ、限外ろ過により PTX が分解または変換することが明らかとなった。一方、PTFE や PVDF での精密ろ過では、ほぼ 100% の回収率が得られたため、分析試料作製のための前処理に適していると思われた。

一方、PTX 標準品による LC/MS 分析は、Bruker 社製 Bio TOF では濃度 50 ppm 以上で精密質量分析、Micromass 社製 Quattro micro タンデムマスでは MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法で濃度 50ppb 以上の微量定量分析、さらに HITACHI 社製 NanoLC/Linear-Trap-TOF NanoFrontier LD では濃度 10 ppb 以上の微量分析ならびに 500 ppb 以上の精密質量分析が可能となった。四重極質量分析計での選択イオン分析 (SIM) は、比較的定量性に優れている特長を持つが、本研究で採用したタンデムマスによる MRM 法は、SIM 以上に分析対象物質に特異性を持たせることが可能なため、固相抽出程度の前処理で分析可能となったものとする。また、ナノフロー LC/MS は微量の試料からの精密質量分析が可能であるため、既知の中毒原因物質の類縁体等の検出に必須のものとする。

E. 結論

まず、フィリピン産魚類を中心に有毒種から得られた CTX 類の粗毒を用いて、ミニカラムを用いた各種充填剤による固相抽出法を検討したところ、充填剤 C-18 および活性炭が有効であった。そこで、CTX 類の粗毒を合一し、これらの充填剤による固相抽出およびゲルろ過に付して部分精製毒を調製した。部分精製毒を、カラムに逆相系 C-4、移動相にギ酸-アセトニト

リルの濃度勾配を用い、分析時間を 70 分間とした LC/ESI-TOF MS により分析した結果、溶出時間 50~60 分間において CTX 関連成分と示唆される数種のピークをマスキロマトグラムより検出した。一方で、各種 CTX 成分の単一毒の精製を試みているが、各成分の単離精製に要する有毒試料の不足から、その確保には至っていない。

他方、PTX 標準品を用いた固相抽出法では、OASIS MAX がその簡易精製に有用であることが示された。また、再生セルローズ(CA)およびポリエーテルスルホン(PSE)による分画分子量 10,000 da での限外ろ過、ポリビニリデンフルオライド(PVDF)およびポリテトラフルオロエチレン(PTFE)を用いた孔径 0.45 μm および 0.5 μm の精密ろ過を検討したところ、限外ろ過では両材質とも回収率が低く、成分が変換するという弊害が生じるため、機器分析の前処理法としては不適切であると示唆されたが、精密ろ過では両者とも成分に影響がみられなかったことから、有効であると考えられた。また、PTX の HPLC による分析条件の検討を行う際に、LC/MS での高感度検出法への応用を図るため、移動相にギ酸を用いたところ、263 nm の波長で分析可能であり、検出限界も 0.1 μg 以上と既報の 10 倍以上の検出感度が得られた。また、Micromass 社製 Quattro micro タンデムマスでは MRM 法で濃度 50 ppb 以上の微量定量分析が、さらに HITACHI 社製 Nano LC/ Linear-Trap-TOF NanoFrontier LD では濃度 10 ppb 以上の微量分析ならびに 500 ppb 以上の精密質量分析が可能となった。一方、沖縄県産イワスナギンチャクの粗毒を用いて固相抽出法を検討したところ、ODS および陰イオン交換樹脂が有効であることが示された。さらに、*Ostreopsis* 属培養株から PTX の検出に成功し、本分析法の実用性が実証された。

F.参考文献

天野昌彦, 今村諒道, 川西令子, 横野浩一, 菊池 悟, 水野信彦, 佐伯 進, 花房英機, 日下孝明, 老耷宗忠, 大江 勝, 馬場茂明, 鹿住 敏, 藤田 博, 松木幸夫. アオブダイ肝臓によると思われる集団食中毒. 内科 36, 662-666 (1975).

橋本芳郎. 魚介類の毒. 学会出版センター, 東京, p. 369 (1979).

Hashimoto, T., Matsuoka, S., Yoshimatsu, S., Miki, K., Nishibori, N., Nishio, S., Noguchi, T. First paralytic shellfish poison (PSP) infestation of bivalves due to toxic dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii*, in the southeast coasts of the Seto Inland Sea, Japan. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 43, 1-5 (2002).

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).

楠原健一, 西浦亮介, 谷山茂人, 矢澤省吾, 工藤隆志, 山本展誉, 野口玉雄. “ハコフグ”喫食により発症した横紋筋融解症の一例. 日本内科学会雑誌 94, 144-146 (2005).

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* 40, 1042-1051 (2004).

Noguchi, T., Hwang, D. F., Arakawa, O.,

Daigo, K., Sato, S., Ozaki, H., Kawai, N., Ito, M., and Hashimoto, K. Palytoxin as the causative agent in the parrotfish poisoning. In: *Progress in Venom and Toxin Research* (ed. by Gopalakrishnakone, P. and Tan, C. K.), National University of Singapore, Kent Ridge, Singapore, pp. 325-335 (1987).

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).

Okano, H., Masuoka, H., Kamei, S., Seko, T., Koyabu, S., Tsunemoto, K., Tamiya, T., Ueda, K., Nakazawa, S., Sugawa, M., Suzuki, H., Watanabe, M., Yatani, R., Nakano, T. Rhabdomyolysis and myocardial damage induced by palytoxin, a toxin of blue humphead parrotfish. *Internal Medicine* **37**, 330-333 (1998).

Pottier, I., Hamilton, B., Jones, A., Lewis, R. J., Vernoux, J. P. Identification of slow and fast-acting toxins in a highly ciguatoxic barracuda (*Sphyraena barracuda*) by HPLC/MS and radiolabelled ligand binding. *Toxicon* **42**, 663-672 (2003).

Pottier, I., Vernoux, J.P., Jones, A., Lewis, R. J. Characterization of multiple Caribbean ciguatoxins and congeners in individual specimens of horse-eye jack (*Caranx latus*) by high-performance liquid chromatography/ mass spectrometry. *Toxicon* **40**, 929-939 (2002).

Taniyama, S., Mahmud, Y., Terada, M.,

Takatani, T., Arakawa, O., Noguchi, T. Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan. *J. of Natural Toxins* **11**, 277-282 (2002).

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).

Taniyama, S., Arakawa, O., Terada, M., Nishio, S., Takatani, T. Mahmud, Y., Noguchi, T. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon* **42**, 29-33 (2003).

吉嶺厚生, 折田 悟, 岡田俊一, 園田 健, 窪田一之, 米澤藤士. アオブダイによる食中毒の 2 例. *日本内科学会雑誌* **90**, 157-159 (2001).

F.健康危険情報
なし

G.研究発表

1.論文発表

相良剛史, 谷山茂人, 江戸 梢, 橋本多美子, 西堀尚良, 浅川 学, 西尾幸郎. パリトキシンの高速液体クロマトグラフィーによる微量分析. 四国大学紀要(B), 13-17.

相良剛史, 谷山茂人, 江戸 梢, 橋本多美子, 西堀尚良, 浅川 学, 西尾幸郎. 軟体動物ウミフクロウの有毒成分について. 四国大学紀要(B), 9-12.

Samsur M, Takatani T, Yamaguchi Y, Sagara T,

Noguchi T, Arakawa O. Accumulation and elimination profiles of paralytic shellfish poison in the short-necked clam *Tapes japonica* fed with the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2007; 48(1), 13-18.

Samsur M, Yamaguchi Y, Sagara T, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T. Accumulation and depuration profiles of PSP toxins in the short-necked clam *Tapes japonica* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Toxicon* 2006; 48(3): 323-330.

2.学会発表

Sagara T, Taniyama S, Arakawa O, Hashimoto T, Nishibori N, Asakawa M, Nishio S, Toxicity of *Gambierdiscus* sp. and *Ostreopsis* sp. collected from the coasts of western Japan. 15th World Congress on Animal, Plant & Microbial Toxins 2006.

Nishio S, Sagara T, Taniyama S, Hashimoto T, Nishibori N, Asakawa M, LC-MS Analysis of All PSP Toxins Using Anion Exchange and Reverse Phase Columns Connected in Series. 15th World Congress on Animal, Plant & Microbial Toxins 2006.

Shigeto Taniyama, Takefumi Sagara, Ryoichi Kuroki, Satoshi Takamoto, Shintaro Tsuruda, Gloria Gomez Delan, Sachio Nishio, Manabu Asakawa. Toxicity of Edible Dried Fish in the Philippines. 15th World Congress on Animal, Plant & Microbial Toxins 2006.

相良剛史, 谷山茂人, 黒木亮一, 西堀尚良, 橋本多美子, 荒川 修, 浅川 学, 西尾幸郎. 西日本に生息する有毒渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属、*Ostreopsis* 属のシガテラ毒、パリキシン様物質産生能について. 2006 年度日本水産学会大会, 高知, 3月29日-4月2日(2006).

谷山茂人, 黒木亮一, 相良剛史, 高本 聡, 持原舞子, 鶴田慎太郎, 西尾幸郎, 浅川 学. フィリピン産魚介類の毒性スクリーニング. 2006 年度日本水産学会大会, 高知, 3月29日-4月2日(2006).

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

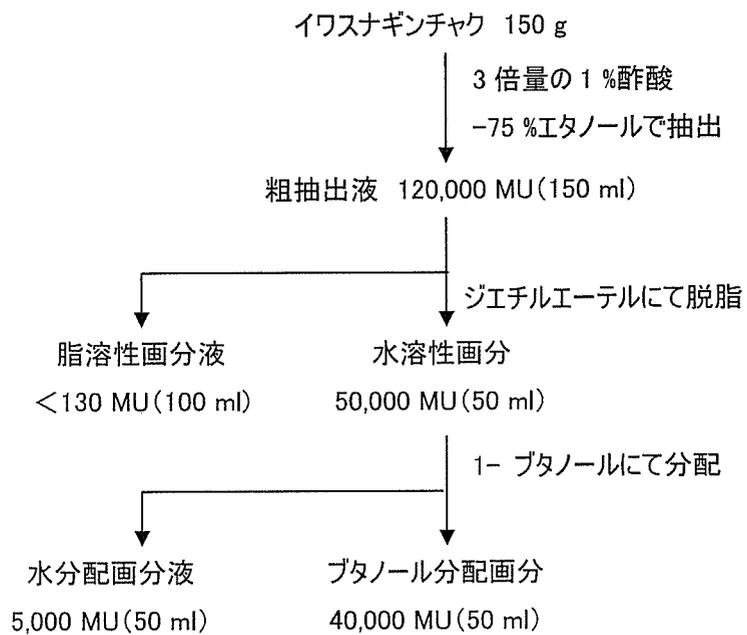


図 1 西表島産イワスナギンチャクからの神経毒抽出方法

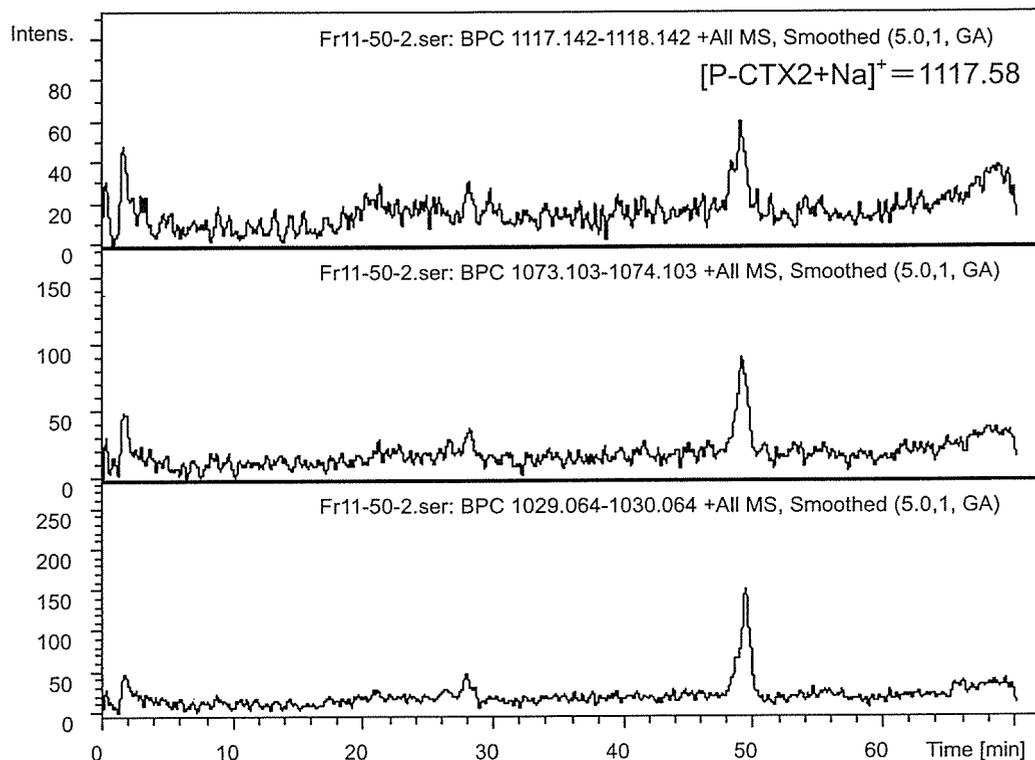


図 2 フィリピン産カマス類試料のマスクロマトグラム

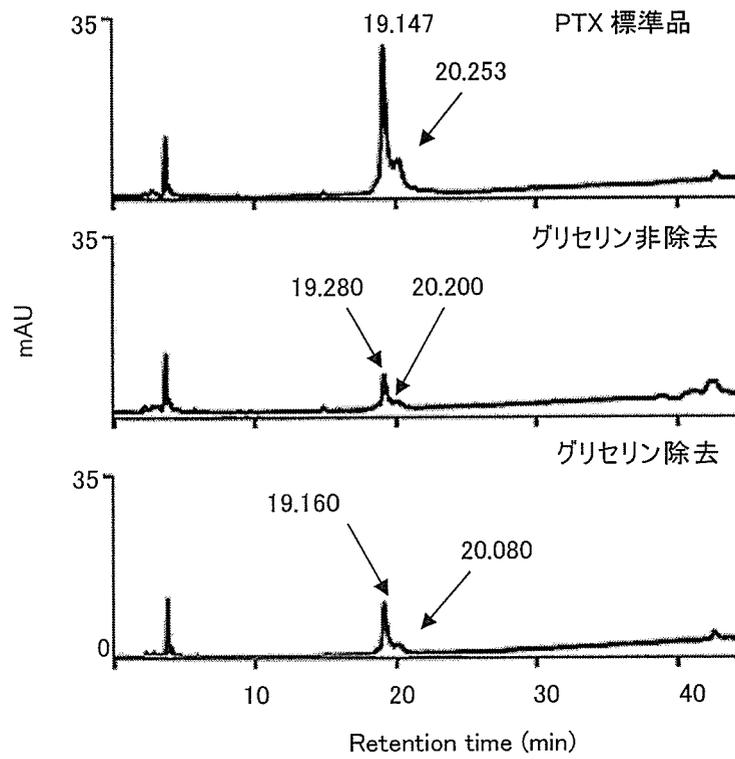


図 3 再生セルロース膜で限外ろ過した PTX 標準品の HPLC 分析結果