

図 24 イワスナギンチャクのマスキロマトグラム

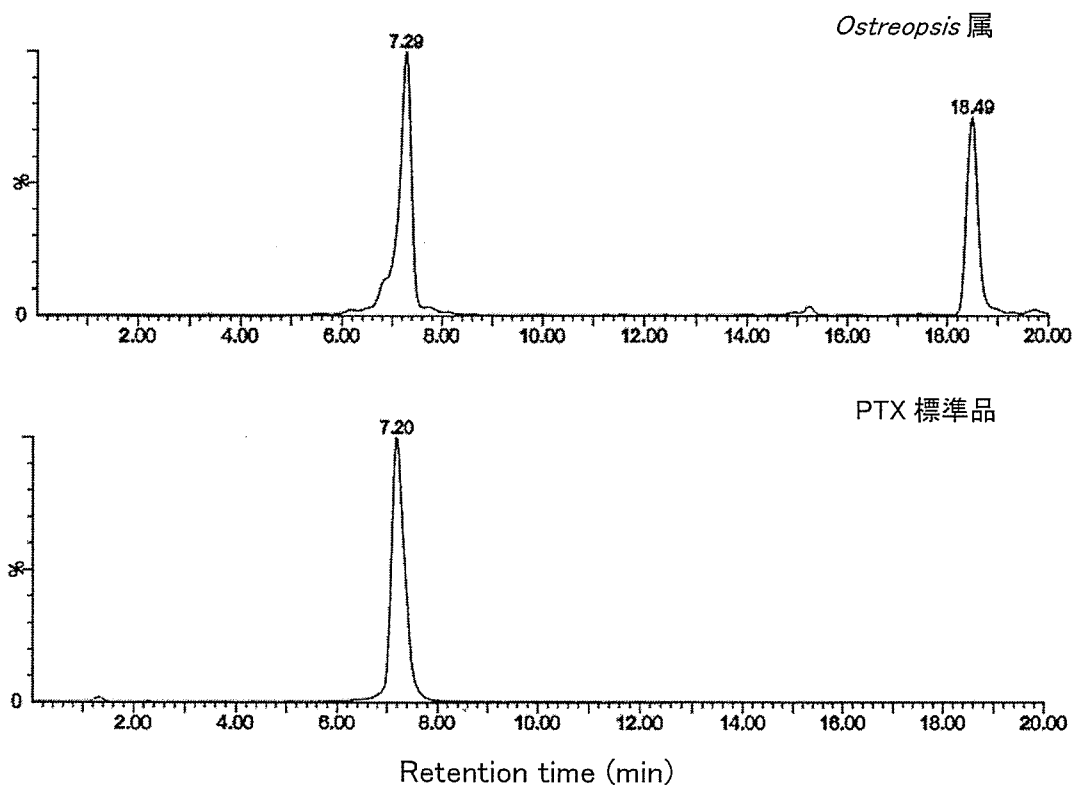


図 25 *Ostreopsis* 属の MRM (327→75.9) クロマトグラム

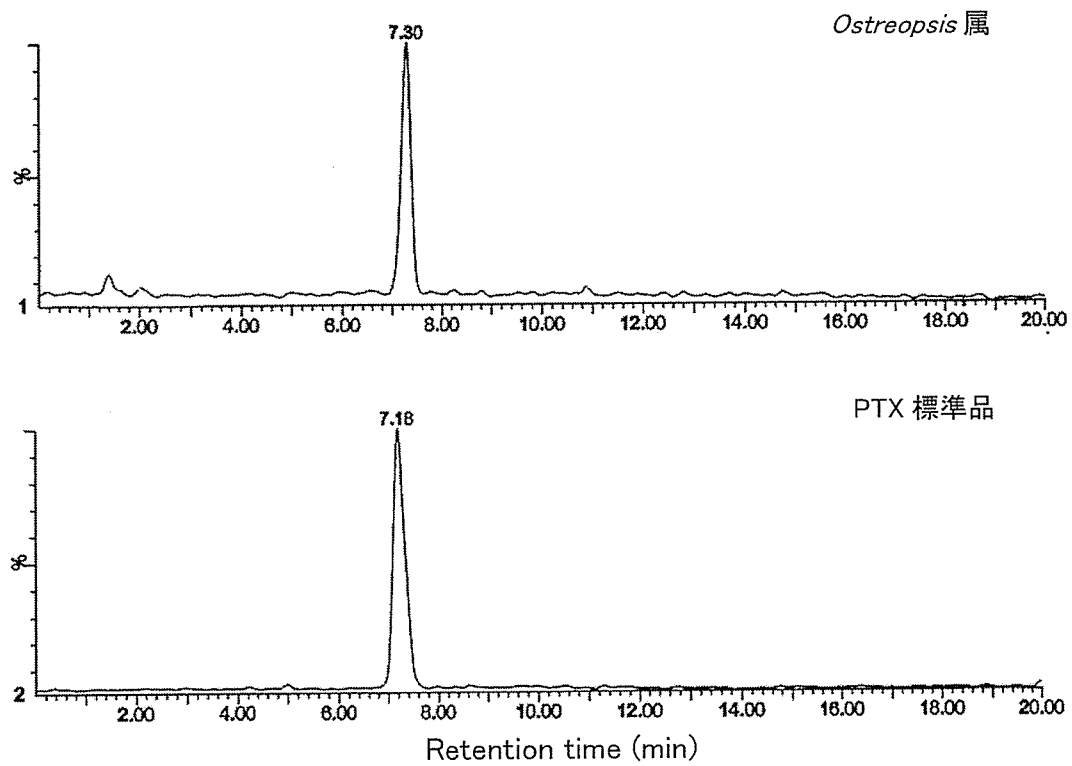


図 26 *Ostreopsis* 属の MRM (1314→327.4) クロマトグラム

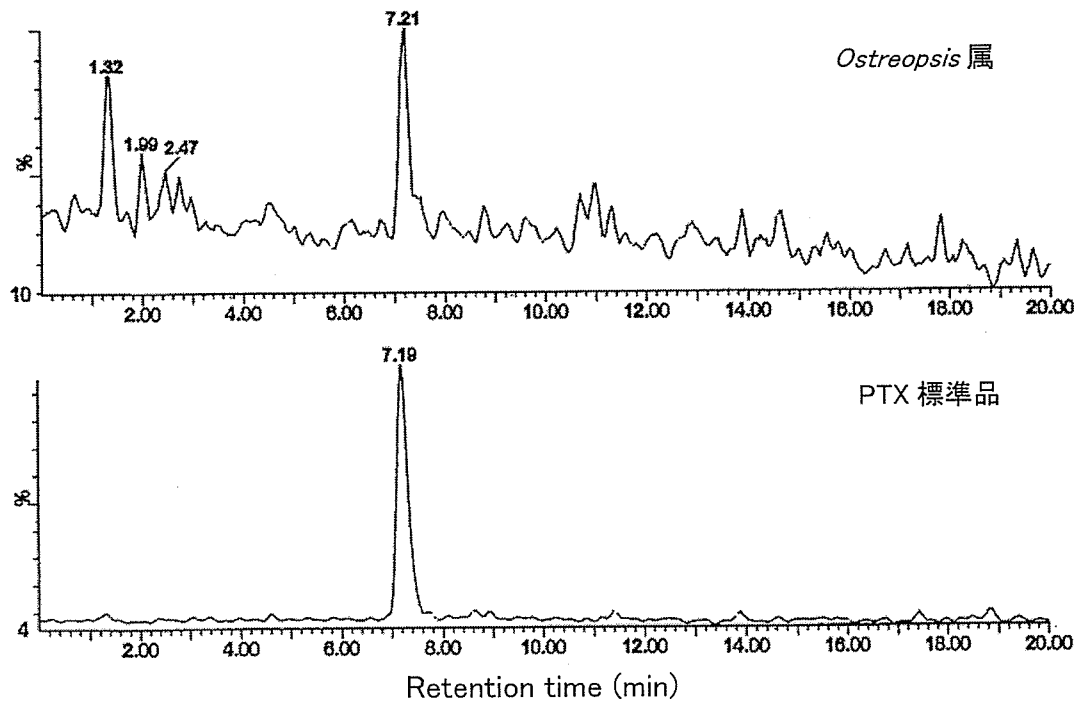


図 27 *Ostreopsis* 属の MRM (913.5→327.4) クロマトグラム

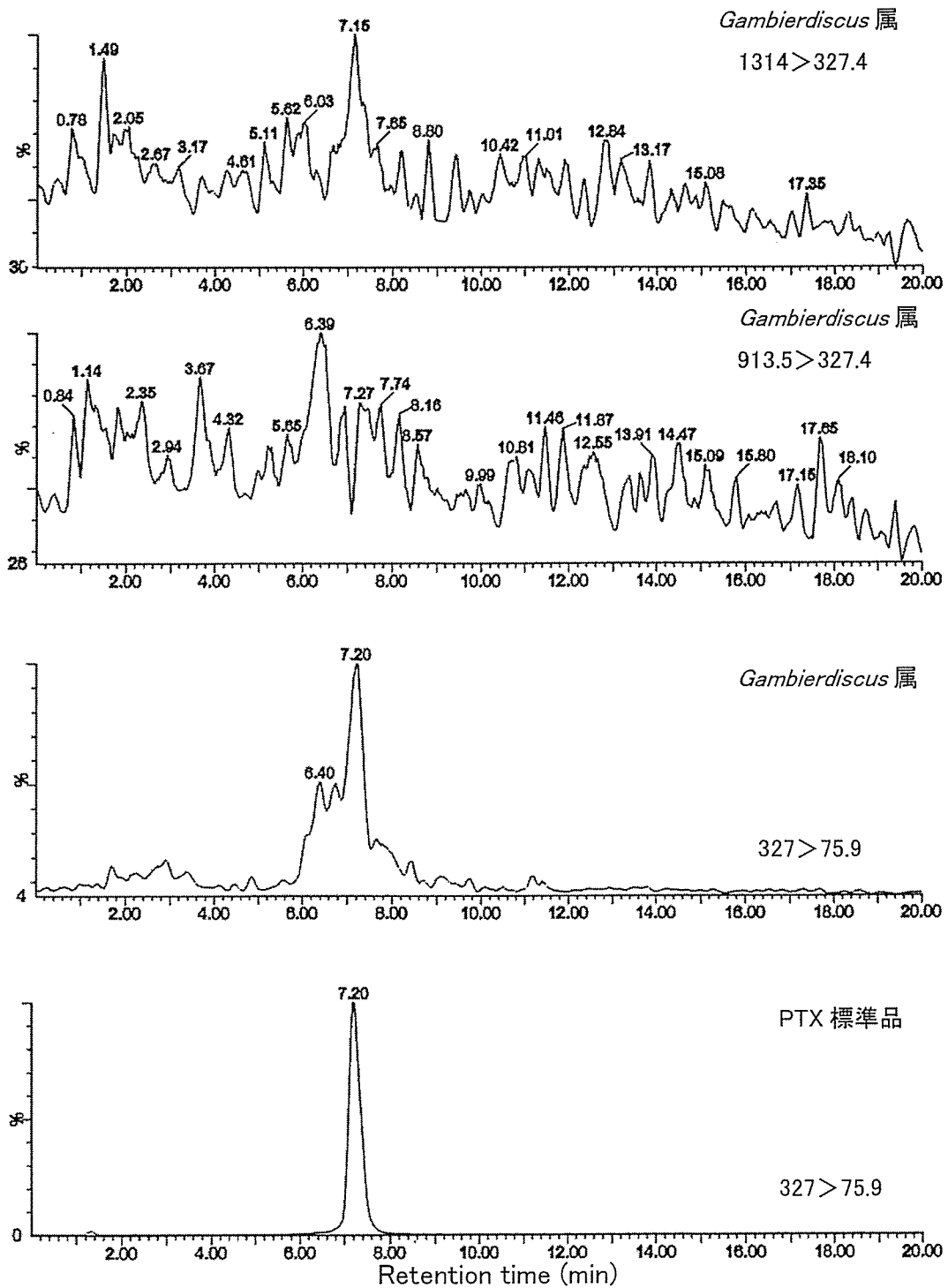


図 28 *Gambierdiscus* 属の MRM クロマトグラム

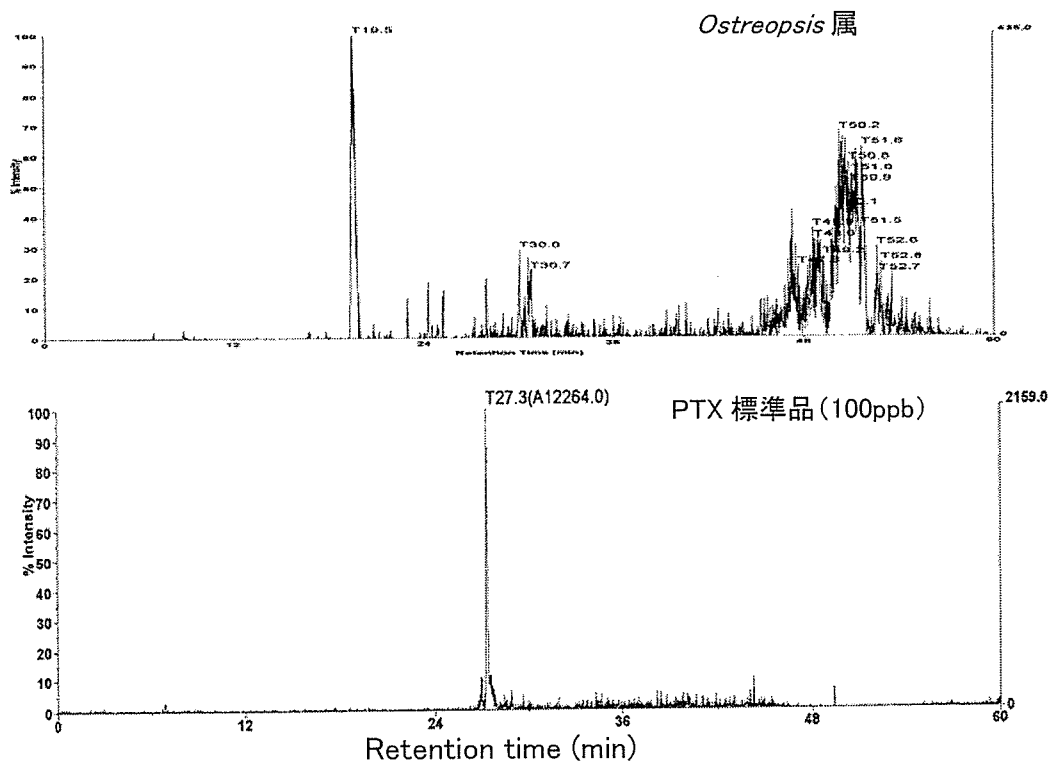


図 29 *Ostreopsis* 属のマスクロマトグラム

表1 粗抽出液のSep-Pak C18を用いた固相抽出法のCigua-Checkによる活性検討

Fraction	Through	Charge		
		Sep-Pak1	Sep-Pak2	Sep-Pak3
Sep-Pak C18	+	-	+	-

表2 Sep-Pak2画分を用いた固相抽出法のCigua-Checkによる活性検討

Fraction	Through	Charge
Oasis MCX	+	+
Oasis WAX	+	-
Oasis WCX	+	-
ENVI-Carb	-	+

表3 有毒画分及び活性画分を用いた固相抽出法のCigua-Checkによる活性検討

fraction	Through	Charge		
		CARBOGRATH1	CARBOGRATH2	CARBOGRATH3
GL-PAK CARBOGRAPH	-	+	-	-

表4 TSK GEL G2000PWのCigua-Checkによる画分確認

Fraction	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
volume(ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Cigua-check	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Fraction	11-50		51-90		91-130		131-170			
volume(ml)	200		200		200		200			
Cigua-check	+		-		-		-			

表 5 PTX 標準品 (5,000 MU) の OASIS MAX 3cc 処理による溶出位置

画分	非吸着	2%NH ₄ OH	100%MeOH	1%AcOH-80%MeOH
毒量(MU)	<100	<100	<100	4,000
回収率(%)	<2	<2	<2	80

表 6 OASIA MAX 3cc によるイワスナギンチャク毒の固相抽出法検討結果

粗精製 画分		画分 I	画分 II	画分 III	画分 IV	画分 V
粗抽出液	毒量(MU)	80	20	<200	100	—
	回収率(%)	5	1	<13	6	—
水溶性画分	毒量(MU)	200	20	400	200	<20
	回収率(%)	10	1	20	10	<1
ブタノール 分配画分	毒量(MU)	160	20	<320	160	20
	回収率(%)	10	1	<20	10	<1

表 7 OASIS MAX 6cc によるイワスナギンチャク毒の固相抽出法検討結果

		画分 I	画分 II	画分 III	画分 IV	画分 V
水溶性画分	毒量(MU)	<600	350	2,600	2,500	<500
	回収率(%)	<12	7	53	50	<10
ブタノール 分配画分	毒量(MU)	<500	500	2,500	2,500	<350
	回収率(%)	<12.5	12.5	62.5	62.5	<8.75

表 8 Sep Pak C18 によるイワスナギンチャクブタノール分配画分の固相抽出法検討結果

	非吸着 画分	水洗浄 画分	20%MeOH 画分	50%MeOH 画分	80%MeOH 画分	100%MeOH 画分	回収画分
毒量 (MU)	<5	<5	<5	<10	<25	100	<25
回収率 (%)	<0.4	<0.4	<0.4	<0.8	<2	8	<2

分担研究報告書

食中毒原因物質を産生する有毒渦鞭毛藻に関する研究

分担研究者 西尾 幸郎 四国大学短期大学部 教授

研究要旨

当該研究事業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て CTX 類および PTX 類を対象として、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」の開発を大目的とする。そこで、本分担研究ではその一環として、高知県室戸岬沿岸での *Gambierdiscus* 属および *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の出現動向を調べた。さらに、有毒種のクローン株培養を試み、各培養藻体からの毒の確保を試みた。

まず、2006 年 4 月～12 月に室戸岬沿岸において、海藻上の *Gambierdiscus* 属と *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の付着細胞数を調べた。前者はいずれの時期も海藻上にはほとんど付着しておらず、最高出現細胞数は海藻 1 g（湿重量）あたり 7.08 cells（11 月）であった。しかしながら、後者はほとんどの時期で海藻上での付着が観察され、前年と同様に夏季（6 月）に最大 200 cells/g（湿重量海藻）の付着細胞数であった。他方、フィリピン・セブ島産 *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の大量培養に成功し、脂溶性毒（CTX 換算で 700 MU）の毒量を確保した。また、同培養藻体からは水溶性毒も検出された。さらに、長崎県福江島産 *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の大量培養をも成し得て、PTX 様物質と示唆される 2700 MU の毒量を回収した。また、同培養藻体から調製した脂溶性画分にはマウスに対する弱い致死活性因子が含まれていることが示された。これまで、*Gambierdiscus* 属と *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻は底生性であるため、大容量の培養槽による培養は非常に難しいと思われたが、毒産生能を持つ両者の大量確保が可能となった。特に、当該研究事業の遂行により、脂溶性毒の CTX 類産生能を有するセブ島産 *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の大量培養の成功を成し得たことは大きな成果であると言える。

A. 研究目的

周囲を海で囲まれているわが国は、古来より魚介類を貴重な動物性タンパク質の供給源として依存している。また近年、海洋性生物からヒトの健康に応用が期待される有効な天然生理活性物質が次々と見出され、魚介類の消費はさらに増加しつつあると言える。一方、これら魚介類にはフグ毒テトロドトキシン (tetrodotoxin: TTX) や麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poison: PSP) に代表されるヒトの健康に被害を及ぼす毒が含まれているものがあり、しばしば死者を伴う悲惨な食中毒を引き起こす。わが国では種々の検査機関での TTX や PSP に関連した検査体制が徹底されており、特に PSP については、食用貝類ならびにその起源生物である有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* や *A. catenella*, *Gymnodinium catenatum* (Oshima ら, 1990; Noguchi ら, 1990; Asakawa ら, 1995) のモニタリングが定期的に行われている。さらに、最近では瀬戸内海西部海域で新たに PSP 産生能の高い *A. tamiyavanichii* の発生による二枚貝の毒化が報告され (Hashimoto ら, 2002)、関係省庁ならびに地方自治体では迅速な対策が講じられている。

他方、TTX や TTX とは異なる特異な魚介類の毒 (マリントキシン) による食中毒として、シガテラ中毒ならびにパリトキシン (palytoxin: PTX) 中毒がある。

シガテラ中毒は南北回帰線に挟まれた熱帯や亜熱帯海域で広く発生し、わが国は南西諸島が主な中毒海域として知られている (橋本, 1979; 野口ら, 1997)。本中毒の原因物質はシガトキシン (ciguatoxin: CTX) またはその関連物質で、1960 年代に Scheuer

ら (1967) がバラフエダイ *Lutjanus bohar* から CTX を単離し、分子量 1110 のポリエーテル化合物であると推定した。また、Yasumoto ら (1977) により、本毒の起源は海藻表面に付着生育する熱帯性の有毒渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* であることが明らかとなった。さらに、仏領ポリネシア産ドクウツボの内臓と天然藻体 *G. toxicus* から精製された CTX について、それぞれ CTX1B (分子式 $C_{60}H_{86}O_{19}$) と CTX4B (分子式 $C_{60}H_{84}O_{16}$) の構造が解明された (Murata ら, 1990)。一方、近年、本州沿岸で採捕されたイシガキダイ *Oplegnathus punctatus* を原因食品とするシガテラ中毒 (集団食中毒) が発生し、*G. toxicus* の分布が温帯海域にまで拡大している可能性が指摘されている。

一方、PTX (分子式: $_{29}H_{223}N_3O_{54}$; 分子量 2,680) は 1960 年代に軟質サンゴの一種である腔腸動物門花虫綱スナギンチャク科のイワスナギンチャク *Palythoa* spp. から見出された検出された神経毒である (Moore と Scheuer, 1971; Moore と Bartolini, 1981; Uemura ら, 1981)。わが国ではアオブダイ *Scarus ovifrons* による原因不明の食中毒が半世紀近く散発するなか、Noguchi ら (1987) により本中毒の原因物質は PTX 様物質であることが初めて明らかとなった。さらに、長らく不明であったアオブダイの毒化についても、*G. toxicus* と同様に海藻に付着する底生性の *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻を起源生物とする食物連鎖によるものであると報告されている (Taniyama ら, 2003)。一方、近年、西日本を中心にハタ科魚類やハコフグ科魚類による同様の食中毒が相次ぎ (Taniyama ら, 2002; 谷山ら, 2003)、アオブダイ以外の魚類が新たに PTX または同類縁物質によ

り毒化する可能性が懸念され始めている。

しかしながら、これら有毒な *G. toxicus* および *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻は、本来、熱帯や亜熱帯海域を生息域としており、これまでわが国では同海域に属する南西諸島の分布が報告されているだけであった (Fukuyo, 1981)。しかしながら、宮崎県産および千葉県産イシガキダイによるシガテラ中毒の発生や徳島県沿岸における *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の分布が報告され (Taniyama ら, 2003)、熱帯海域に起源を持つ有毒渦鞭毛藻の生息域が広がりを見せていると考えられている。さらに、平成 17 年度における当該研究事業の成果から、実際に西日本沿岸での *Gambierdiscus* 属ならびに *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の分布が明らかとなった。

このような知見に基づき、本分担研究では、「新規 CTX 類または PTX 類分析法」の開発に関連して、西日本およびフィリピンでの *Gambierdiscus* 属と *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の分布を調査し、有毒株を大量培養して毒性を調べるとともに、毒量の確保を試みた。

B. 研究方法

1) 有毒渦鞭毛藻の出現動向

平成 17 年度に引き続き、高知県室戸市 (室戸岬) 沿岸を定点とし、2006 年 4 月～12 月における *Gambierdiscus* 属と *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の出現動向を調べた。

試料の採集は、吉松ら (1999) の方法に準拠した。調査対象の大型海藻 (約 200 g) 数種を採集し、10 倍量の海水とともに強く 100 回攪拌した。次いで、得られた海水を

目幅 100 μm と 20 μm のメッシュに供し、20～100 μm 画分の付着生物等を採取した。攪拌後の海藻については同様の操作をさらに 1 回繰り返した。

付着生物は直ちに四国大学短期大学部食品化学研究室へ持ち帰り、光学顕微鏡を用いて、*Gambierdiscus* 属および *Ostreopsis* 属を観察、計測し、海藻湿重量 1 g あたりに付着していた観測日における最高出現細胞数を算出した。

2) *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の培養

高知県室戸岬沿岸で 2005 年 5 月に、またフィリピン・セブ島で 2005 年 10 月に採取した *Gambierdiscus* 属の天然株のクローン株それぞれ G-M0505 株、G-C0510 株 (図 1、図 2) を試料とした。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 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}^1$ 、明暗周期を 12 時間明/12 時間暗の条件下で行った。

3) *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の培養

2005 年 6 月に長崎県福江島沿岸で採取した同属の天然株 (O-F0506 株) (図 3) のクローン株を試料として用いた。培養は、B. 研究方法 2) と同様の方法で行った。

4) *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻からの試験液の調製

G-M0505 株および G-C0510 株の培養藻体を試料とし、水溶性と脂溶性画分の試験液を調製した。まず、各試料に 3 倍量のメタノールを加えて超音波破壊機を用いて氷水中で 3 分間抽出し、2,000 g で 10 分間遠心分離して上清を抽出液とした。残渣につい

ては、同様の操作を2回繰り返して上清を合一した。抽出液を減圧濃縮後、蒸留水：ジエチルエーテル（1：2）による溶媒分画に付し、水溶性画分を得るとともに、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）で脱脂した。次に90%メタノール画分を脂溶性画分とし、減圧濃縮して1%Tween 生理食塩水で溶解後、マウス毒性試験に供した。また、水溶性画分についても同様に試験した。

5) *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻からの試験液の調製

O-F0506 株の培養藻体を試料とし、Taniyama ら（2003）の方法に準拠して水溶性画分の試験液を調製した。試料に3倍量の50%メタノールを加えて超音波破壊機で抽出し、2,000 g で10分間遠心分離して上清を抽出液とした。残渣については、同様の操作を2回繰り返して上清を合一した。抽出液を減圧濃縮後、同量のジエチルエーテルで2回脱脂した。得られた水画分を再び減圧濃縮し、蒸留水で定容して水溶性画分とし、マウス毒性試験に供した。一方、ジエチルエーテル画分については、減圧濃縮して90%メタノール：n-ヘキサン（1：2）による溶媒分画に付し、90%メタノール画分を脂溶性画分としてマウス毒性試験を行った。

6) 脂溶性画分のマウス毒性試験

本試験は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じて 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の定義に従った。

7) 水溶性画分のマウス毒性試験

本試験は既報 (Noguchi ら, 1987; Taniyama ら, 2003) に従い、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 48 時間観察し、3 尾中 2 もしくは 3 尾のマウスが死亡する最小濃度を求めた。毒力の表示は CTX と同様に検体 1 g に含まれる毒力 (MU/g) で行った。ただし、本試験における 1 MU は供試マウス 1 尾を約 48 時間で死亡させる毒力と定義した。

C. 研究結果

1) 有毒渦鞭毛藻の分布

2006 年 5 月~7 月、11 月、12 月に室戸岬沿岸で採取した海藻上に *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の付着が観察された。観測日ごとの海藻 1 g (湿重量) あたりの最高出現細胞数は、5 月に 0.4 cells、6 月に 0.1 cells、7 月に 0.1 cells、11 月に 7.1 cells、12 月に 0.7 cells であった (図 4)。採取した海藻はウミウチワ、マクサ、ガラガラ、ジョロモク、エンドモクあるいはそれらの近縁種であったが、それら海藻の種類や海水温度と付着細胞数に明瞭な相関は認められなかった。

一方、同時期に同海域では、2006 年 4 月~7 月、10 月、11 月に *Ostreopsis* 属渦鞭毛

藻が海藻上に付着していた。観測日ごとの最高出現細胞数は、4月に89.8 cells/gであったが、5月に34.7 cells/gに減少し、6月に再び200 cells/gと観測期間を通じて最高値を示した(図5)。その後7月に27 cells/g、9月には0 cells/gと急激に減少したが、10月に再度81 cells/gを観測したものの、11月には7.6 cells/gとなり、12月には全く出現しなかった(図5)。

2) *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の培養

*Gambierdiscus*属渦鞭毛藻G-M0505株の培養は、70日間培養を2回行い、合計 680×10^3 cellsの培養藻体を回収した。また、セブ島産G-C0510株は、培養日数: 43日間、37日間、28日間、48日間と4回培養し、合計 175×10^6 cellsの培養藻体を得た。

3) *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の培養

*Ostreopsis*渦鞭毛藻O-F0506株は培養日数48日間、28日間の2回を行い、合計 136×10^6 cells細胞を得た。

4) *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の毒性

Gambierdiscus 属渦鞭毛藻 G-M0505株の培養藻体から調製した脂溶性画分につき、試料濃度500,000 cells相当量/mlの試験液を最高濃度としてマウスに投与したが、致死活性は認められなかった。一方、G-C0510株の培養藻体の脂溶性画分は、試料濃度250,000 cells相当量/mlでマウスが死亡し、同培養藻体から総量700 MUの毒量を得られた。また、同培養藻体から調製した水溶性画分も79,545 cells相当量/mlでマウス致死毒性を示した。

5) *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の毒性

Ostreopsis 渦鞭毛藻 O-F0506株の培養藻体の水溶性画分は、50,370 cells相当量/mlでマウスに対する遅延性致死活性が認められ、同画分に2,700 MUの毒量を得た。一方、脂溶性画分からもマウス毒性が検出され、その毒量は170 MUであった。

D. 考察

平成17年度の当該研究事業の成果により、2005年5月に室戸岬沿岸で*Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の分布を観測し、その最高出現細胞数は海藻湿重量1gあたり212 cellsであった。しかしながら、その後は急激に減少し、2005年12月までの出現細胞数は4 cells未満で、2006年2月と3月に至っては全く出現しなかった。さらに、平成18年度にも同海域での*Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の調査を継続した。2006年5月以降に、僅かに*Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の出現を観測した。同年11月に最高出現細胞数7.08 cells/gを記録した以外は、全て1 cells/g未満であった。本研究では、観測日ごとに数種の海藻を採取して海藻別の*Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の付着細胞数ならびに海水温度との因果関係にも検討を加えたが、明瞭な結果は得られなかった。従って、2005年4月における*Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の発生は規模が比較的大きく、何らかの環境因子等による現象であったと推察された。一方、室戸岬沿岸では2005年4月～2006年3月に、ほぼ定期的に*Ostreopsis* 属渦鞭毛藻が出現し、本属は海水温度の上昇とともに出現細胞数も増加し、2005年8月に出現細胞数と海水温度は最高となり、

それぞれ 212 cells/g と 27.0°C であった。これは 2006 年 4 月～12 月における同海域での *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の分布調査でも同様であり、海水温度が 24°C となった 6 月に最高出現細胞数 200 cells/g を示した。このことから、室戸岬沿岸の海藻には *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻が年間を通じてほぼ付着しており、その付着細胞数は夏季に最大になると考えられた。一方で、室戸岬沿岸に隣接する徳島県牟岐町沖では、1997 年夏季に海藻上に *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻が多量に付着し、それら海藻を捕食したと推定されるアオブダイが毒化し、集団食中毒を引きこした (Taniyama ら, 2003)。その後、当該研究事業の分担研究者である西尾が不定期ながらも、牟岐町沖での *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の出現を観測しているが、アオブダイの毒化は確認されていない (未発表)。しかしながら、アオブダイの毒化に影響する *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の細胞数については、未だ不明な点がある。また、当該研究事業の成果から、西日本各地で *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の分布が示された。そこで、今後とも西日本沿岸における *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の出現動向を慎重にモニターするとともに、魚類の毒化に及ぼす影響についても詳細に検討する必要があると考えられた。さらに、*Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻に関しても同様の警戒が急務であると言える。

E. 結論

他方、室戸岬産 *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の培養藻体は、脂溶性画分ならびに水溶性画分ともにマウスに対する致死活性因子は検出されなかった。しかしながら、セブ島

産本属の培養藻体からは水溶性毒と脂溶性毒が検出され、毒産生能を有する *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の培養に成功した。Yasumoto ら (1977) によれば、*G. toxicus* の培養藻体は CTX 関連物質である水溶性毒であるマイトトキシン (maitotoxin) のみを産生すると報告しており、CTX 産生能を有する *G. toxicus* の培養は極めて困難であると考えられてきた。しかしながら、当該研究事業により、セブ島産 *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の培養藻体から脂溶性毒と水溶性毒が見出され、さらには本属の大量培養を成し得た。一方、福江島産 *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の大量培養にも成功し、多量の水溶性毒 (PTX 様物質) を確保するに至った。また、本属の培養藻体の脂溶性画分からも毒性が検出され、*Ostreopsis* 属渦鞭毛藻が脂溶性毒を産生する可能性が示唆された。

今後、有毒な *Gambierdiscus* 属ならびに *Ostreopsis* 渦鞭毛藻が産生する毒本体を単離し、詳細な構造を突き止めることによって、学術的にも新たな知見が得られるものと大きく期待される。

これらの結果を以下に要約する。

高知県室戸岬沿岸の海藻上には *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻が付着していたが、その付着細胞数は非常に少ないものであった。しかしながら、同海域の海藻には *Ostreopsis* 渦鞭毛藻は、ほぼ周期的に付着しており、その付着細胞数は夏季に最大となることが再確認された。

一方、脂溶性毒と水溶性毒を産生するフィリピン産 *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の大量培養に成功し、高濃度の脂溶性毒と水溶性毒を確保した。さらに、PTX 類産生能を持つ長崎県産 *Ostreopsis* 渦鞭毛藻の大量培