

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17年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 相良 剛史

平成19（2007）年 3月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 78
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 79

総合研究報告書

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「新規シガトキシン(CTX)類またはパリトキシン(PTX)類分析法」の開発を目的とした。

フィリピン産の有毒魚類からCTX類の精製を行い、液体クロマトグラフ質量分析(LC/MS)による分析法を検討した。カラムにInertsil C-4(ϕ 2.1×150 mm、GL science)、移動相に0.1%ギ酸溶液および1%ギ酸-90%アセトニトリル溶液のリニアグラジエントを用いることにより、飛行時間型(TOF)MS(Bruker社製Bio TOF II)で m/z 1157.6、1146.6、1143.6、841.4、827.4、817.6、811.4、785.6のマスクロマトグラムにおいてCTX関連物質と示唆されるピークが確認された。一方、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。

PTX標準品によるLC/MS分析ではカラムにPurospher STAR RP-8e(ϕ 2 mm×250 mm、Merck)を、移動相に0.1%ギ酸-20%アセトニトリル溶液と0.1%ギ酸-80%アセトニトリル溶液によるリニアグラジエント用い、Bruker社製Bio TOFで検出した結果、PTX濃度10 ppmで明瞭なピークが得られ、さらに同ピークのマススペクトルにおいてPTXの多価イオン $[M+Na+H]^{2+}$ と示唆される m/z 1351.73636が検出された。また、Micromass社製Quattro micro タンデムマスではMRM(Multiple Reaction Monitoring)法により、PTX濃度50 ppb以上の微量定量分析、HITACHI社製NanoLC/Linear-Trap-TOF NanoFrontier LDではPTX濃度10 ppb以上の微量分析ならびに500 ppb以上で精密質量分析が可能となった。一方、PTX標準品を限外ろ過処理に付すと、成分の変換または分解により失活することが判明した。しかしながら、ポリビニリデンフルオライド(PVDF)やポリテトラフルオロエチレン(PTFE)を用いた精密ろ過の場合は影響を受けず、前処理法として適当であった。また、Sep-Pak C18(Waters)およびOASIS MAX(Waters)による固相抽出法も有効で、特に後者が最適であった。本手法により、沖縄県産イワサナギンチャクの粗毒からPTXが同定ならびに定量され、*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。

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るとされてきた (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ルトキシン (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

I. 魚類の毒性評価

1) シガテラ対象魚類のスクリーニング

1-1) 試料

試料 (i) 群: 1999 年～2005 年に採捕された国産バラフエダイ *Lutjanus bohar* 13 検体、ソウシハギ *Aluterus scriptus* 3 検体、バラハタ *Variola louti* 2 検体ヒメフエダイ *Lutjanus gibbus* 1 検体 (いずれも東京都市場衛生検査所より供与) を、また 2005 年 6 月に沖縄県西表島で釣獲したバラフエダイ 2 検体とイッテンフエダイ *L. monostigma* 3 件を用い、CTX を対象として以下の試験に供した。

試料 (ii) 群: わが国に輸入された外国産魚類のうち、食品衛生法により輸入や販売の禁止されている魚類であるミャンマー産アカマダラハタ *Epinephelus fuscoguttatus* 2 検体、マダラハタ *E. polyphkadion* 3 検体、スジアラ属魚類

Plectropomus pessuliferus 3 検体、コクハンアラ *P. laevis* 2 検体、オオスジハタ *E. latifasciatus* 2 検体、ヤイトハタ *E. salmonoides* 2 検体、フィリピン産アマダレドクハタ *P. oligacanthus* 2 検体、インドネシア産アマダレドクハタ *P. oligacanthus* 3 検体、リビア産ダスキーグルパー *E. marginatus* 1 検体、リビア産ゴールデンブルーパー *E. costae* 1 検体、スリランカ産バラフエダイ *L. bohar* 1 検体、オーストラリア産バラハタ 2 検体とコクハンハタ *Cephalopholis sexmaculata* 2 検体、また原産国不明のチャイロマルハタ *E. coioides* 2 検体、ユカタハタ *Cephalopholis miniata* 1 検体、アカマダラハタ *E. fuscoguttatus* 1 検体、スジアラ 1 検体 *P. leopardus* を試料とし (いずれも関西空港検疫所または東京都市場衛生検査所より供与)、CTX を対象として以下の試験に供した。

試料 (iii) 群: 2005～2006 年にフィリピンの水産市場で購入したネグロス島産マダラハタ *E. polyphkadion* 2 検体、ゴマモンガラ *Balistoides viridescens* 1 検体、ブチブダイ *S. niger* 2 検体を鮮魚試料として、ブチブダイ 1 検体、イロブダイ *Bolbometopon bicolor* 1 検体、ヒブダイ *S. ghobban* 1 検体、未同定魚類 3 検体を干物試料として、セブ島産ヒブダイ 1 検体、ベラ科魚類 1 検体、アカテンモチノウオ *Cheilinus chlorourus* 2 検体、スジアラ属の魚類 *Plectropomus* sp. 2 検体、未同定魚類 10 検体を干物試料として、パナイ島産未同定魚類 17 検体を干物試料として用いた。いずれも CTX を対象として、また干物試料については合わせて PTX を対象として以下の試験に供した。

試料 (iv) 群: 1981 年、2003 年～2006 年に国内で採捕されたアオブダイ *S. ovifrons* 2 検体、ハコフグ *Ostracion cubicus* 109 検体、ウミスズ

メ *Lactoria diaphana* 9 検体を試料として、PTX を対象として以下の試験に供した。

試料は入手後、直ちに凍結し、広島大学大学院生物圏科学研究科海洋生物資源化学研究室へ送付または持ち帰り、試験液の調製に供するまで -20°C で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

1-2) Cigua-Check による試験

まず、試料(i)～(iii)群につき、予備的な毒性スクリーニングとして CTX 簡易検出キット Cigua-Check に供した。

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、付属の試験片とともにメタノール中に 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。本試験において呈色反応が観察された場合、食用不適切と判断される。

1-3) 脂溶性画分(CTX 粗毒)の調製

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、脂溶性画分の試験液を調製した。各試料 240 g にアセトン 700 ml を加えて 3 分間ホモジナイズし、減圧ろ過してろ液を抽出液とした。残渣については、同様の操作を 2 回繰り返してろ液を合一した。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、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。次にメタノール画分を脂溶性画分として減圧濃縮して 1%Tween 生理食塩水 6 ml で溶解し、脂溶性画分の試験原液(40 g 試料相当量

/ml)とした。

1-4) CTX 粗毒のマウス毒性試験

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拠して行った。

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。

1-5) 水溶性画分(PTX 粗毒)の調製

試験液の調製は Noguchi ら(1987)の方法に準拠した。まず、試料(20 g)を筋肉、肝臓、消化管または肝臓と消化管を含む内臓に腑分け後、得られた各部位につき、3 倍量の酢酸酸性 75%エタノール(pH 3.5)を加えて 5 分間ホモジナイズし、5000 g で 15 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 回脱脂して得られた水面分を蒸留水 10 ml で定容して水溶性画分の試験原液(2 g 試料相当量/ml)とした。

1-6) PTX 粗毒のマウス毒性試験

マウス試験には 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 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。

1-6) PTX 粗毒の溶血活性試験

本試験では PTX を対象としたマウス毒性試験で調製した試験原液 (2 g 試料相当量/ml) を用いた。また、PTX 標準品 (和光純薬工業株式会社, 大阪) につき、2000 ng/ml、200 ng/ml、20 ng/ml、2 ng/ml、0.2 ng/ml、0.02 ng/ml に濃度調製し、本試験に供した。

本試験は既報の方法 (Gleibs ら, 1995; Taniyama ら, 2003) に準拠した。まず、0.5 mM ホウ酸および 1.0 mM 塩化カルシウムを含むダルベッコリン酸緩衝液 (D-PBS) (Gibco BRL) で 2 回洗浄したマウス (ddY 系、雄、体重 17~20 g) もしくは健康な成人男性から得られたヒトの血液に D-PBS を加え、0.5% マウスまたはヒト赤血球懸濁液とした。各試験液 50 μ l に 0.5% 赤血球懸濁液 950 μ l をそれぞれ添加し、37°C で 1 または 4 時間インキュベーション後、900 g で 10 分間遠心分離し、得られた上清につき 405 nm で吸光度を測定した。また、1% サポニン溶液 50 μ l に 0.5% マウス赤血球懸濁液 950 μ l を添加し、インキュベーション 30 分後の溶血を完全溶血 100% として吸光度の比率から各試験液の溶血率を求めた。

II. 有毒渦鞭毛藻の培養と毒量確保

1) 出現動向

高知県室戸市 (室戸岬) 沿岸を定点とし、2005 年 4 月~2006 年 12 月における *Gambierdiscus* 属と *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の出現動向を調べた。また同時期に、徳島県牟岐町、長崎県福江島、千葉県館山市およびフ

イリピン・セブ島沿岸でもこれら有毒渦鞭毛藻の分布を不定期に調べた。

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 μ m と 20 μ m のメッシュに供し、20~100 μ m 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) 培養

2-1) *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 株を試料とした。培養は、ESM 培地 (岡市ら, 1982; Watanabe ら, 1997) を用い、培養温度を 20°C、光強度を 40 μ mol photon/m²/s¹、明暗周期を 12 時間明/12 時間暗の条件下で行った。

2-2) *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) のクローン株を試料として用いた。培養は、B. 研究方 II. 2-1) と同様の方法で行った。

3) 試験液の調製

3-1) *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻 (培養藻体) 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。

3-2) *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻(培養藻体)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。

4) マウス毒性試験

本試験は、脂溶性画分については B. 研究

方法 I. 1-4)、水溶性画分については同 1-6)と同様に行った。

III. CTX 類と PTX 類の簡易精製と分析

1) CTX 粗毒の部分精製

1-1) 試料

2005 年 8~9 月に漁獲された有毒なフィリピン産未同定種 2 検体から脂溶性画分(粗抽出液)を調製して、合わせて試料とした。

1-2) 精製

粗抽出液を Pottier ら(2003)の方法に準拠して、TOYOPEARL HW-40S(φ30×250 mm、東ソー)に供し、メタノール(流速 1.0 ml/min)で溶出させ、15 ml ずつ分取した。Cigua-Check により陽性反応を示した有毒画分または活性画分を合一し、TOYOPEARL HW-40S(φ8×400 mm、東ソー)に附し、同様にメタノール(流速 1.0 ml/min)で溶出させ、7 ml ずつ分取した。得られた有毒画分を合一後、Pottier ら(2002)の方法に準じて、逆相系の TSKgel OCTYL-80Ts(φ8×250 mm、東ソー)カラムクロマトグラフィーに附した。移動相に 0.1%ギ酸溶液(移動相 A)、0.1%ギ酸-90%アセトニトリル溶液(移動相 B)を用い、60 分間で溶離液 A を 100%から 40%とするリニアグラジエントで行い、流速は 1.0 ml/min とした。その後、移動相 B 200 ml により未溶出物質を回収した。次いで、Cigua-Check により活性画分を調べ、LC/MS にて分析した。

1-2) CTX 精製毒の LC/MS 分析

CTX 関連物質の LC/MS 分析は Pottier ら(2003)の方法に準拠して行った。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 60% (移動相 B: 65%→40%)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 は HITACHI 社製 M-8000 または Bruker 社製 Bio TOF を用いた。M-8000 は音速噴霧イオン化 (SSI) 法イオン源を用い、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 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) 法を採用し、LC 流量が 0.2 ml/min の際にドライガス温度を 250℃、同 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) CTX 粗毒の簡易精製と LC/MS 分析

2-1) 試料

2006 年 10 月に採捕されたフィリピン産未同定魚類から得られた有毒な脂溶性画分の試験液を試料として用いた。

2-2) 固相抽出による簡易精製

まず、各試験液を 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、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) に附し、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) に附し、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 LC/MS にて分析した。

2-3) LC/MS 分析

本分析は B. 研究方法Ⅲ. 1-2) と同様に行った。

3) PTX 標準品による簡易精製と分析

3-1) HPLC 分析

PTX 標準品は和光純薬工業株式会社製を用い、100 μg を蒸留水 1 ml に溶解して以下の試験に供した。

本分析は、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 A 100%→0% (移動相 B: 0%→100%) とするリニアグラジエント法を用い、流速を 0.2 ml/min とした。検出には三次元多波長検出器を用いて、PTX 特有の紫外部極大吸収の 263 nm で有毒成分をモニターした。

3-2) カラムクロマトグラフィー

本手法は B. 研究方法Ⅲ. 3-1) 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。

3-3) 固相抽出

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。

3-4) ろ過

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ン 500 (sartorius) 5,000 Da (PES 5 kDa) および 10,000 Da (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 10 kDa 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。

4) PTX 標準品による LC/MS 分析

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 1800V、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 (φ 50 μm× 150 mm, HITACHI)、分離カラムに MonoCap for Nano Flow (φ75 μm× 150 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 μl/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 でポジティブモードで測定した。

5) PTX 粗毒による簡易精製と LC/MS 分析

5-1) 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、以下の実験に供

するまで -30°C で冷凍保管した。

5-2) 試験液の調製

イワスナギンチャクからの試験液の調製は 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 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。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、毒量をマウス

毒性試験により求めた。

5-3) マウス毒性試験

本試験は、画分 A、D および E については B. 研究方法 I. 1-4)、画分 B と C については同 1-6) と同様に行った。

5-4) 固相抽出による簡易精製

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 6ml 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 μm (PTFE 0.5 μm) 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 3 g に相当する。

5-5) HPLC 分析

本分析は B. 研究方法 III. 3-1) と同様に行った。

5-6) LC/MS 分析

本分析は B. 研究方法 III. 4) と同様に行った。

6) 有毒渦鞭毛藻の産生毒の LC/MS 分析

6-1) 試料

試料は B. 研究方法 II. 3) で得られた *Gambierdiscus* 属と *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の水溶性画分の試験液を試料とした。

6-2) LC/MS 分析

本分析は B. 研究方法 III. 4) と同様に行った。

C. 研究結果

I. 魚類の毒性評価

1) 試料(i)群の毒性

予備的な毒性スクリーニングである Cigua-Check において、沖縄県産ヒメフエダイ 1 検体、バラフエダイ 2 検体およびイッテンフエダイ 3 検体のそれぞれ筋肉は抗 CTX 抗体に対して陽性または弱陽性反応を示した(表 1)。さらに、沖縄県産バラフエダイ 1 検体の脂溶性画分から CTX 換算で 0.025 MU/g の毒性が検出された(表 1)

2) 試料(ii)群の毒性

31 検体中 23 検体の筋肉は Cigua-Check において陽性または弱陽性を示した(表 2)。このうち陽性反応であったフィリピン産アマダレドクハタ 1 検体と原産国不明のユカタハタ 1 検体の筋肉から毒性も検出され、それぞれの毒性値は CTX 換算で 0.025 MU/g、0.05 MU/g であった(表 2)。

3) 試料(iii)群の毒性

フィリピン産魚類の毒性を表 3-1、3-2、3-3 に示す。

まず、Cigua-Check においてビサヤス諸島産鮮魚および干物試料 46 検体中 44 検体が有毒であった。ネグロス島産鮮魚試料 5 検体のうち、ブチブダイ 1 検体とゴマモンガラ 1 検体から CTX 換算でそれぞれ 0.025 ~ 0.05 MU/g の毒性が検出された。次いで、ビサヤス諸島 3 島の干物試料 38 検体の脂溶性画分(3 検体は合一試料)につき、マウス毒性試験に供したところ、ネグロス島産試料 3 検体とセブ島産試料 8 検体から CTX 換算で 0.025~0.05 MU/g の毒性が検出された。パナイ島産魚類については、Cigua-Check に対して全て陽性または弱陽性反応を示したにもかかわらず、その脂溶性画分

の毒性はいずれも 0.025 MU/g 未満 (CTX 換算) であった。

次に、ビサヤス諸島産干物試料 36 検体の水溶性画分をマウス毒性試験に供したところ、全て有毒で 0.5~4.0 MU/g の毒性が検出された。また、これら有毒な水溶性画分の多くはマウス赤血球に対して溶血を引き起こし、一部の溶血率のパターンは PTX と類似していた。

3) 試料(iii)群の毒性

供試したハコフグのうち長崎県産 11 検体(表 4)、徳島県産 4 検体(表 5)、宮崎県産 1 検体(表 6)および山口県産 27 検体(表 7-1、表 7-2)が有毒で、それらの毒性は 0.5~1.0 MU/g であった。一方、ウミスズメについては、徳島県産は毒性を示さず(表 8)、宮崎県産 4 検体の肝臓を除く内臓から 0.25~0.5 MU/g の毒性が検出された(表 9)。これら有毒な水溶性画分の多くはマウス赤血球に対して PTX と類似した遅延性溶血活性を示した。

II. 有毒渦鞭毛藻の培養と毒量確保

1) 出現動向

室戸岬沿岸において、海藻上に付着する *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻(図 1)の出現は、2005 年 5 月に海藻 1 g(湿重量)あたり 212 cells と最高密度を記録した(図 2)。しかしながら、その後は海藻に付着する本属をほとんど観測することはなく、いずれも 10 cells/g(湿重量)未満であった(図 2)。また、調査期間を通じて、*Ostreopsis* 属渦鞭毛藻(図 3)の付着は、ほぼ毎月確認され、2005 年および 2006 年ともに夏季に最高密度に達し、前者は 8 月に最高 122 cells/g(湿重量)、後者は 6 月に最高 200

cells/g であった(図 4)。一方、牟岐町沿岸で *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻を、牟岐町、福江島、館山市およびセブ島沿岸では *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻を不定期に観測した(図 1、図 3)。

2) *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の培養

G-M0505 株の培養は 70 日間培養を 2 回繰り返し、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

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 の毒量が得られた。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 属渦鞭毛藻 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。

III. CTX 類と PTX 類の簡易精製と分析

1) CTX 粗毒の部分精製

1-1) 精製

有毒なフィリピン産魚類から得られた CTX 類と示唆される 40 MU の粗毒を TOYOPEARL HW-40S に供したところ、fr. 4 および 5 は Cigua-Check 陽性反応を示した。fr. 4 と 5 を合一後、TOYOPEARL HW-40S に附したところ、fr. 2 は Cigua-Check において陽性であった。さらに、この fr. 2 の逆相系の TSKgel OCTYL-80Ts カラムクロマトグラフィー後の Fr. 11 が Cigua-Check 陽性反応を示したので、これを LC/MS 分析に供した。

1-2) CTX 精製毒の LC/MS 分析

まず、HITACHI 社製 M-8000 を用いて検出条件の検討を行ったが、明瞭なピークを得ることができなかった。次いで、Bruker 社製 Bio TOF による検出条件の検討を試みた。その分析の結果を図 5 に示す。 m/z 1157.6、1146.6、1143.6、841.4、827.4、817.6、811.4、785.6 のマスクロマトグラムにおいてピークが確認された。

2) CTX 粗毒の簡易精製と LC/MS 分析

2-1) 固相抽出による簡易精製

フィリピン産未同定魚類から得られた有毒な脂溶性画分を 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 10)。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、OasisMAX 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 11)。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 に附し、メタノールで 2 ml ずつ 4 画分(CARBOGRAPH 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 12)。陽性であった CARBOGRAPH 画分 1 の TSK GEL G2000PW (φ8×380 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 13)、これらの画分を LC/MS にて分析した。

2-2) LC/MS 分析

Bruker 社製 Bio TOF による分析結果を図 6 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が確認された。

3) PTX 標準品による簡易精製

3-1) カラムクロマトグラフィ

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。

3-2) 固相抽出

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 14 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。

3-3) ろ過

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 7)。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。

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 8 に示す。

PES 10k Da 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明瞭な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 処理により変換成分が変わることがわかった。PES 5kDa 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小さくなっていた。

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 9)。

4) PTX 標準品による LC/MS 分析

PTXの構造式を図10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 $[M+H]^+$ である m/z 2680-2682、ナトリウム付加の1価イオン $[M+Na]^+$ である m/z 2703-2704 およびナトリウム付加の2価イオン $[M+Na+H]^{2+}$ 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11)、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 $[M+Na+H]^{2+}$ と推察される m/z 1351.2、カリウム付加の $[M+K+H]^{2+}$ の1359.2、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、 $[M+Na+2H]^{3+}$ 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12)。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が得られた(図13)。

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→ m/z 75.9、 m/z 327→ 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 $[M+Na+K+H]^{3+}$ をフラグメンテーションさせた m/z 913.5→ 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 $[M+K+H-5H_2O]^{2+}$ をフラグメンテーションさせた m/z 1314→ m/z 327.4、 $[M+K+H-9H_2O]^{2+}$ をフラグメンテーションさせた m/z 1278→ m/z 327.4で明瞭なMRMクロマトグラムが得られた(図14)。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 μ l)程度であった(図15)。

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 $[M+2H-H_2O]^{2+}$ 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16)。

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17、18)。

5) PTX粗毒による簡易精製とLC/MS分析

5-1) 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。

5-2) 固相抽出による簡易精製

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 15)。

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 II 350 MU、画分 III 2,600 MU、画分 IV 2,500 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 II 500 MU、画分 III 2,500 MU 未満、画分 IV 2,500 MU、画分 V 350 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 16)。

この OASIS MAX を用いたブタノール分配画分 IV 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 17)。

5-3) 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 19 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。

5-4) 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分付近のマスペクトルにPTXのカリウム付加イオンと思われる $[\text{M}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$ の m/z 1360.3、3 価のナトリウム付加イオンと推察される $[\text{M}+\text{Na}+2\text{H}]^{3+}$ 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、PTX標準品と同様に、 $[\text{M}+\text{Na}+2\text{H}]^{3+}$ 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 20)。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が得られた(図 21)。

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 \rightarrow m/z 75.9(図 22)、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 $[\text{M}+\text{K}+\text{H}-5\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ をフラグメンテーションさせた m/z 1314 \rightarrow m/z 327.4(図 23)、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 $[\text{M}+\text{Na}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$ をフラグメンテーションさせた m/z 913.5 \rightarrow m/z 327.4(図 24)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 1gに含まれるパトキシンの量は 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 25、26、27)。

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シナギンチャクの PTX 含有量は 1 gあたり 19.6 μg となった(図 28)。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。

6) 有毒渦鞭毛藻の毒成分

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は得られなかった。

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 \rightarrow m/z 75.9(図 29)、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 \rightarrow m/z 327.4(図 30)、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 \rightarrow m/z 327.4(図 31)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 \rightarrow 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 32)。

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 33)。

D. 考察

沖縄県ではバラフエダイやイッテンフエダイは地方名“アカナー”と呼ばれ、有毒種として広く地域住民に知られている。しかしながら、西表島では一部の住民、特にシガテラ中毒の経験のない住民がこれらを“毒のない魚”として実際に食していると言われている。一方、本研究成果により、西表島産ヒメフエダイ、バラフエダイとイッテンフエダイは全て抗 CTX 抗体に対して陽性または弱陽性反応を示し、バラフエダイ 1 検体からはわが国の公定法で食用不適切と判断される毒性も検出された。従って、少なくとも本研究で用いた西表島産バラフエダイとイッテンフエダイはヒトに食中毒を引きこす可能性が示唆され、現地での有毒種としての周知が改めて重要であると考えられた。また、輸入違反魚類の 74.2%にあたる 23 検体は Cigua-Check において有毒であり、食用に適さないと示唆された食品衛生法に基づき、違反食品(魚類)として取り扱われた魚類が実際に有毒であったことから、今後も輸入違反魚類の毒性を慎重にモニターする必要があると考えられた。

一方、フィリピンの水産市場ではマダラハタなどの有毒種が高級魚として流通しており、一部の魚類からは抗 CTX 抗体に対して陽性ま

たは弱陽反応を示す毒性も検出された。マウス毒性を指標にビスヤス諸島産試料、特に干物試料の毒性を比較すると、セブ島産試料の61.5%が、ネグロス島産試料の33.3%が有毒であったが、パナイ島産試料には毒性は認められなかった。従って、ビスヤス諸島産魚類(干物)の毒性には地域差があると考えられた。また、同試料の水溶性画分は全て有毒で、パナイ島産試料はネグロス島およびセブ島産試料(それぞれ平均1.1 MU/g、平均1.4 MU/g)よりもやや高い毒性(平均1.8 MU/g)を示し、最高値は4.0 MU/gであった。これら、有毒な水溶性画分につき、マウス赤血球に対する溶血活性を検討したところ、約40%の画分がPTXと類似した遅延性の溶血率のパターンを示したが、半数以上が異なる性状であった。従って、これら水溶性画分にはPTXまたはPTX様物質とともに、他の毒因子も存在している可能性が推察された。従って、ビスヤス諸島産試料にはCTX類または水溶性の毒因子が、あるいは両者が同時に含まれていることが示唆された。今後、これら毒因子のヒト健康に対する影響評価を早急に行う必要があると考えられた。

他方、本邦では九州を中心に“ハコフグ”料理は郷土料理として、また重要な観光資源として半世紀以上にわたって食されてきた。これまで、日本産ハコフグの皮、筋肉、肝臓、生殖腺、腸は無毒であると報告され(谷, 1945)、その筋肉と精巢は可食部となっている(厚生省, 1983)。しかしながら、最近、西日本を中心にハコフグ科魚類による食中毒が相次ぎ(谷山ら, 2003; 楠原ら, 2005)、その毒性評価の見直しが求められていた。特に、ハコフグの消費が多いうえ、過去に食中毒事例のある長崎県産ハコフグについては、可食部である筋肉

の有毒率が高かった。一方、これら有毒試料の多くはPTXと類似した性状を示し、その毒因子は既報(谷山ら, 2003)と同様にPTX様物質である可能性が見出された。さらに、ハコフグの近縁種であるウミスズメの一部も有毒であったことから、今後も、本邦に生息するハコフグ科魚類の毒性を詳細に検討し、毒本体を明らかにすることが急務であると考えられた。

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℃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℃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。

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。

フィリピン産未同定魚類から、各種クロマトグラフィーにより微量ながら CTX 関連成分と思われる物質が得られたものの、本成分を M-8000 質量分析計で検出するには至らなかった。本試料から得られた毒量は 40 MU であり、有毒成分が全て CTX であったと仮定すると、そのマウス腹腔内投与による最小致死量を 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ として計算すると、320 ng 存在していたことになる。今回の分析では、1 分析あたり全容量の 1/100 を用いているので、回収率が 100% であっても、分析に供した量は 3 ng となる。参考までに本装置による麻痺性貝毒の一成分であるサキトキシン (分子量 299) の検出感度は 500 ng 程度であることから全量を分析しても検出されない可能性があると考えられた。しかしながら、Bio TOF による分析では、 m/z 1157.6 や 1143.6 の MS クロマトグラムで CTX が溶出する保持時間にピークが確認できた。Pottier ら (2002) の報告によると、シガトキシン類の代表的な成分は m/z 1141.6 において $[\text{M}+\text{H}]^+$ を生じるため、 m/z 1157.6 や 1143.6 は関連物質である可能性が考えられる。

一方、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