

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 以下であり、試験液の毒含量は 1 MU/ml 以下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、最適なカラムクロマトグラフィー、固相抽出法、ろ過膜の選択を検討した。カラムクロマトグラフィーで分取したピークの毒性は、40%程度に減少していたが、対照として試験したカラムを通過していない場合でも同等の減少率であった。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。固相抽出法では、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。PTX 標準品の限外ろを行ったところ、PTX が分解または変換することが明らかとなった。この結果から、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る。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。

PTX 標準品による LC/MS 分析法の検討では、HITACHI 社製 M-8000 にて、メタノールによるフローインジェクションで、PTX 標準品 1 μg において TIC にピークが得られ、その MS スペクトルに PTX の $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$ と示唆される m/z 1352

が検出された。また、Bruker 社製 Bio TOF では、メタノールによるフローインジェクションにおいて、TIC で明瞭なピークを得ることができ、濃度 100 ng でもピークが確認でき、そのピークの MS スペクトルに PTX ($[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$) と思われる m/z 1351.73636 が検出された。また、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。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。

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。本手法で簡易精製した試験液より、LC/MS により PTX を検出し、その含有量は 20 $\mu\text{g/g}$ 程度であることが判明した。さらに *Ostreopsis* 属培養株からの PTX 検出にも成功し、当該研究事業において開発した新規パルトキシン (PTX) 類分析法の有用性が実証されたものとする。

E. 結論

西表島産バラフエダイ1検体は抗CTX抗体に陽性で、かつ脂溶性毒も検出された。同島産ヒメフエダイ1検体、バラフエダイ1検体とイッテンフエダイ3検体には毒性が認められなかったが、Cigua-Check から有毒であると判定された。

ビサヤ諸島産試料は鮮魚試料4検体と干物試料の全てが抗CTX抗体に対して陽性または弱陽性反応を示した。鮮魚試料2検体と干物試料10検体の脂溶性画分からはマウス毒性も検出された。また、33検体の水溶性画分もマウスに対する遅延性致死活性を示し、このうち半数近くにPTXに類似したマウス赤血球に対する遅延性溶血活性が認められた。一方、西日本産ハコフグ42検体およびウミスズメ3検体の水溶性画分から毒性が検出され、特に長崎県産ハコフグは可食部である筋肉の有毒率が高かった。これらハコフグ科魚類の毒性の一部はPTXと類似した性状を示した。

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* 渦鞭毛藻の大量培養も成し得、培養株からPTXを検出した。

フィリピン産未同定魚類からCTX類として40MUの粗毒を得た。それを精製後、Bruker社製Bio TOFで分析した結果、 m/z 1157.6、1146.6、1143.6、841.4、827.4、817.6、811.4、785.6のMS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。ミャンマー産魚類の合一試料より、CTX類40MUの粗毒を得たが、LC/MS分析においてCTX関連成分を検出されなかった。一方、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ク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標準品によるMS分析では、HITACHI社製M-8000のメタノールによるフローインジェクションにおいて、PTX標準品1 μ gの注入時にTICにピークが得られ、そのMSスペクトルにPTX ($[M+Na+H]^{2+}$)と考えられる m/z 1352が検出された。また、Bruker社製Bio TOFでもTICで明瞭なピークが得られ、100ng注入時でもピークが確認でき、そのピークのMSスペクトルにPTX ($[M+Na+H]^{2+}$)と思われる m/z 1351.73636が検出された。また、PTXの $[M+H]^+$ である m/z 2680-2682、 $[M+Na]^+$ である m/z 2703-2704および $[M+Na+H]^{2+}$ である m/z 1351.7のMSクロマトグラムにおいて、明瞭なピークを得ることができた。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、再生セルロース(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。さらに、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。本手法で簡易精製した試験液より、LC/MSによりPTXを検出し、その含有量は 20 $\mu\text{g/g}$ 程度であることが判明した。さらに*Ostreopsis*属培養株からのPTX検出にも成功し、当該研究事業において開発した新規パルトキシン(PTX)類分析法の有用性が実証されたものと考えられる。

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-24**, 13-17 (2007).
- 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-24**, 9-12 (2007).
- 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.

相良剛史, 西堀尚良, 橋本多美子, 西尾幸郎. 徳島県産ニホンイモリの毒性について. 四国大学紀要 **B-23**, 65-68(2006).

西尾幸郎, 相良剛史, 黒田智久, 橋本多美子, 西堀尚良. 徳島県浅川湾産スベスベマンジュウガニの毒の性状. 四国大学紀要 **B-23**, 59-64(2006).

Nishibori, N., Kondo, R., Sagara, T., Nishio, S., Cyclin Box Sequence in *Skeletonema costatum*. *Bull. Shikoku Univ.* **B-23**, 65-66(2006).

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. 20. 西日本に生息する 有毒渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属、*Ostreopsis* 属のシガテラ毒、パルト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).

Sagara, T., Nishio, S., Nishibori, N., Taniyama, S., Takatani, T., Arakawa, O., Noguchi, T. Toxin profiles of xanthid crabs in the southwest Islands of Japan. 7th Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxin Cebu, October 25-29 (2005).

Nishio, S., Sagara, T., Nishibori, N. Study on LC-MS analysis of all PSP components by anion exchange and reversephase two column system. 7th Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxin Cebu, October 25-29(2005).

Taniyama, S., Asakawa, M., Arakawa, O., Takatani, T., Kuroki, R., Sagara, T., Nishio, S., Miyazawa, K., Noguchi, T. Occurrence of four food poisoning incidents by palytoxin from

Ostraciid fish in Japan. 7th Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxin Cebu, October 25-29(2005).

なし

3. その他

なし

西尾幸郎, 相良剛史, 西堀尚良. 2004年播磨灘南東部に発生した *Alexandrium tamiyavanichii* について. 2005年度日本水産学会大会, 東京, 3月31日-4月4日(2005).

西堀尚良, 相良剛史, 西尾幸郎. 渦鞭毛藻類の増殖にともなう細胞内ポリアミン含量の変化. 2005年度日本水産学会大会, 東京, 3月31日-4月4日(2005).

谷山茂人, 浅川 学, 黒木亮一, 西尾幸郎, 相良剛史, 高谷智裕, 荒川 修, 宮澤啓輔, 野口玉雄. ハコフグ中毒に関連して-ハコフグ科魚類の毒性スクリーニング-. 2005年度日本水産学会大会, 東京, 3月31日-4月4日(2005).

相良剛史, 西尾幸郎, 橋本多美子, 西堀尚良, 荒川修, 野口玉雄. 2004年10月四国東部沿岸におけるマガキ、ムラサキイガイの *Alexandrium tamiyavanichii* による毒化. 第89回日本食品衛生学会学術講演会, 東京, 5月19日-5月20日(2005).

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

(A)



(B)



(C)

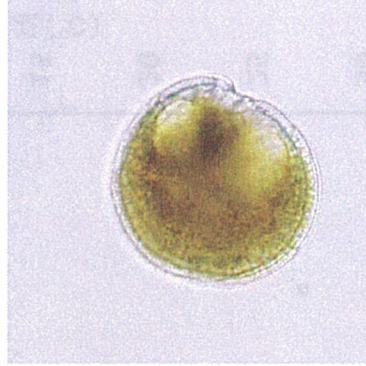


図1 *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻

(A: 高知県産 G-M0505 株; B: 徳島県産 G-M0504 株; C: フィリピン産 G-C0510 株)

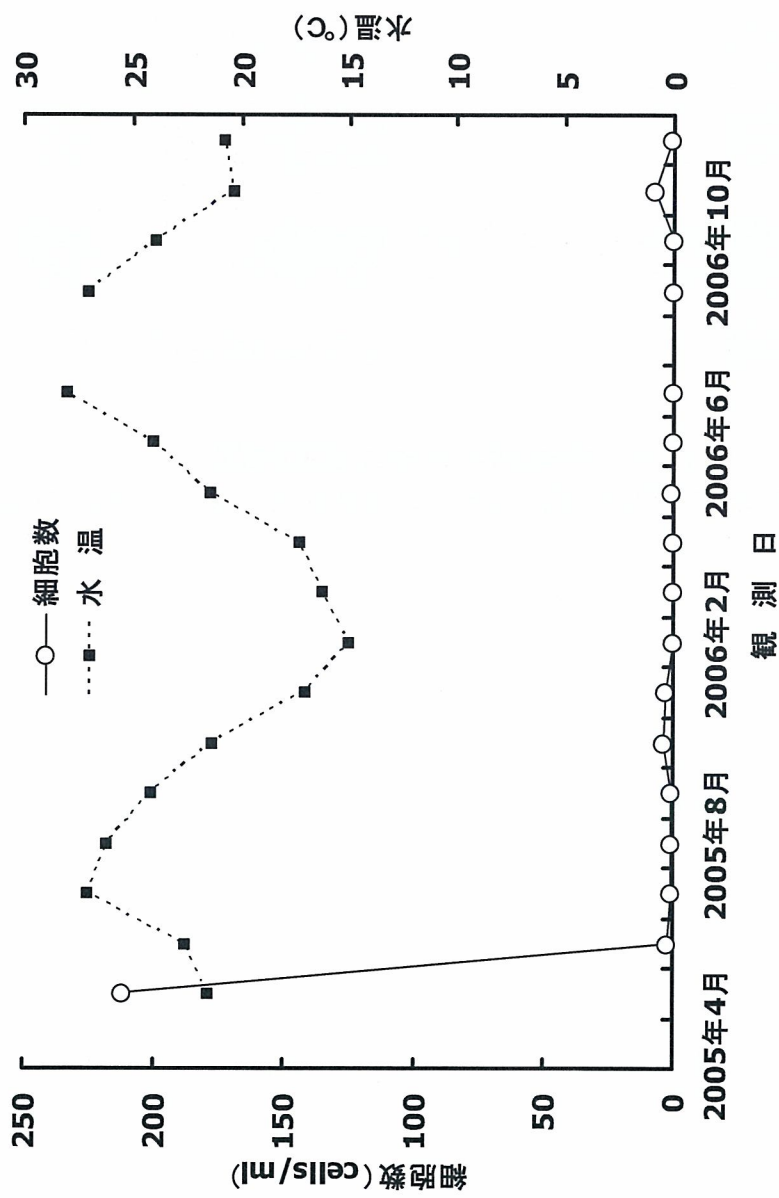


図2 高知県における *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の出現の推移

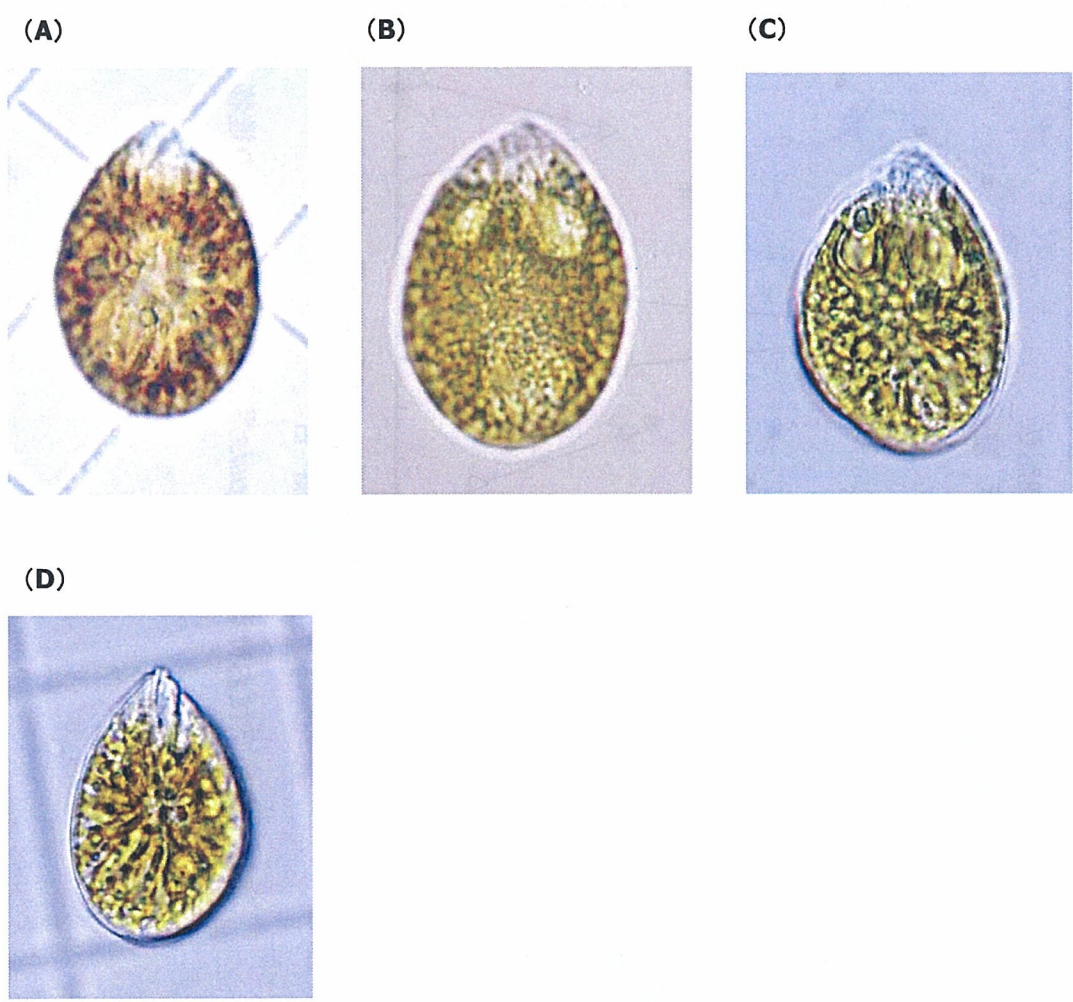


図3 *Ostreopsis*属渦鞭毛藻
(A: 高知県産 O-M0511 株; B: 徳島県産 O-M0504 株; C: 長崎県産 O-F0506 株;
D: 千葉県産)

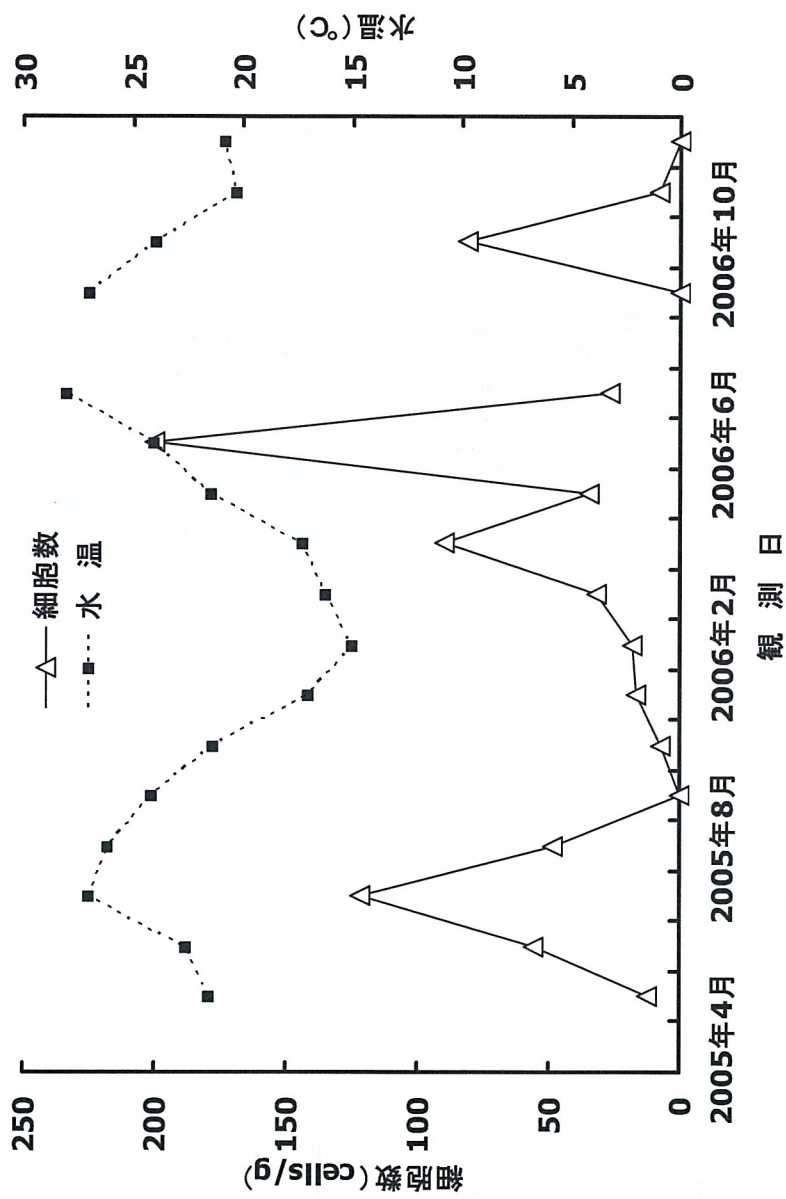


図4 高知県における *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の出現の推移

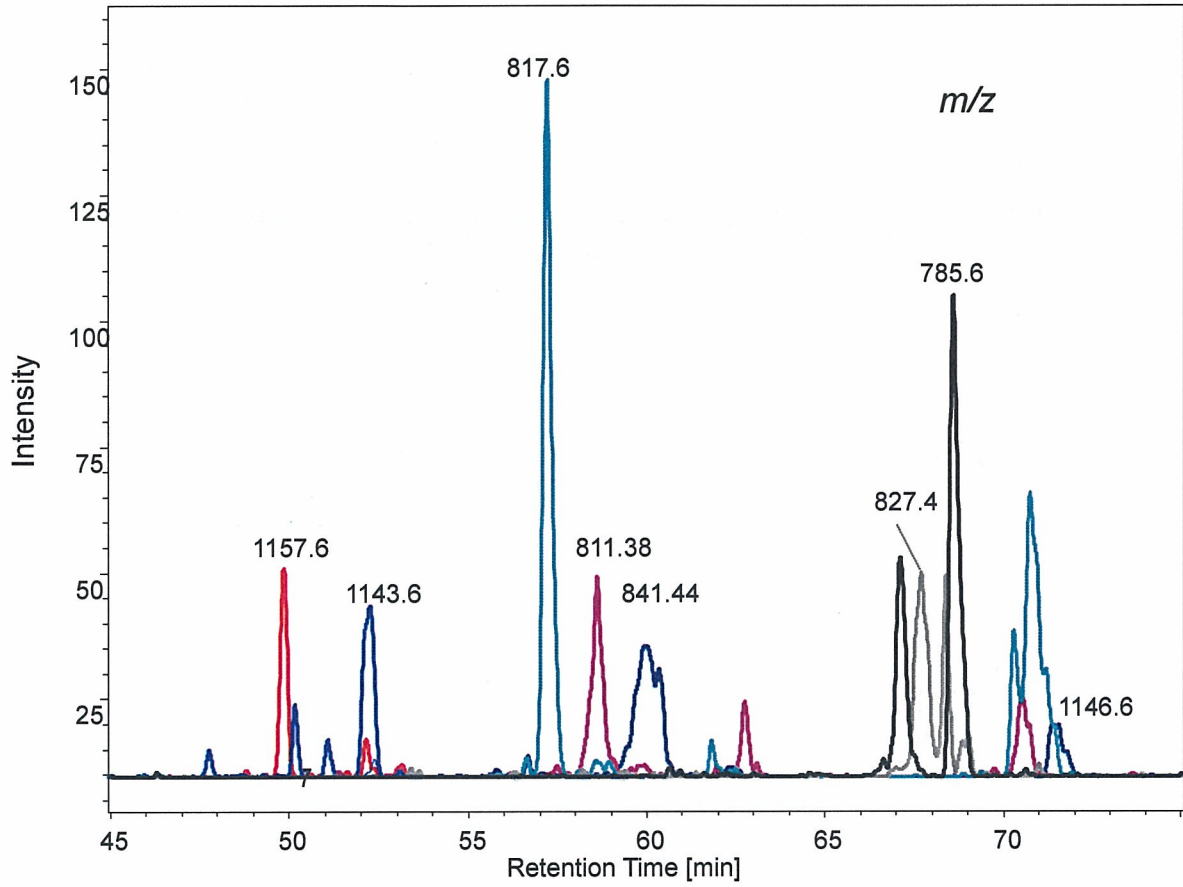


図 5 フィリピン産未同定魚類試料のマスクロマトグラム

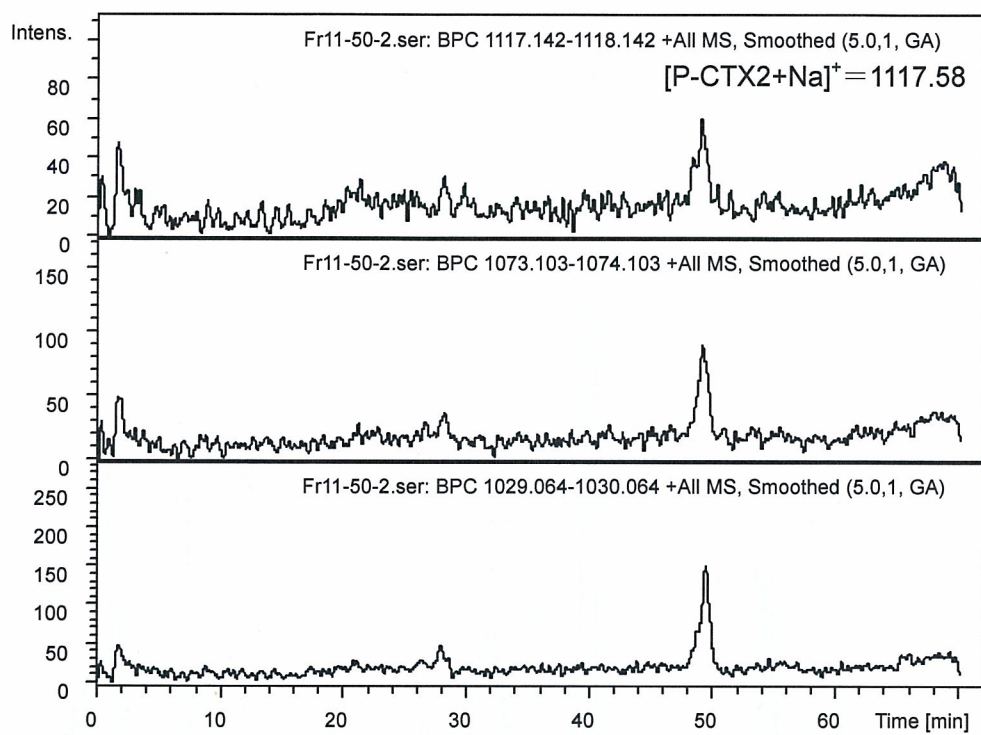


図 6 フィリピン産未同定魚類試料のマスクロマトグラム

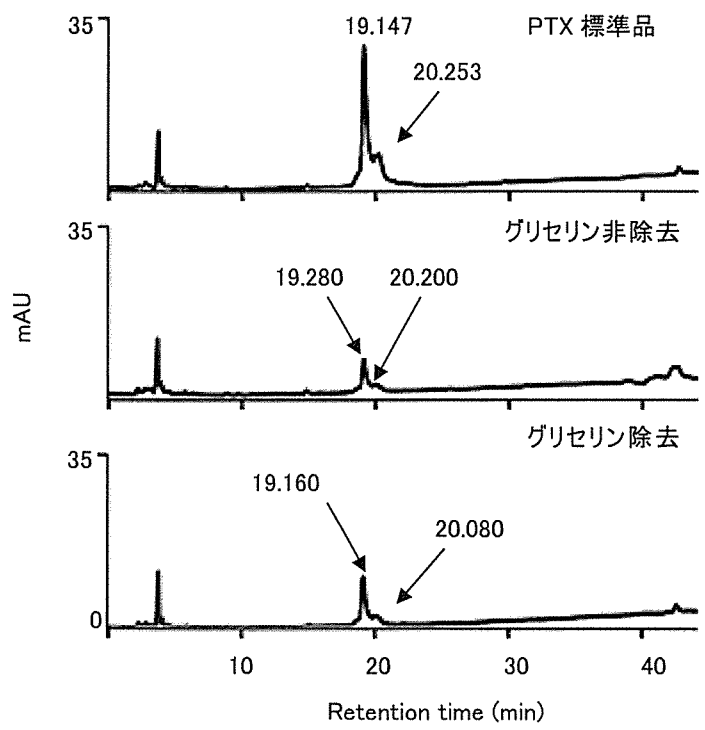


図 7 再生セルロース膜で限外ろ過した PTX 標準品の HPLC 分析結果

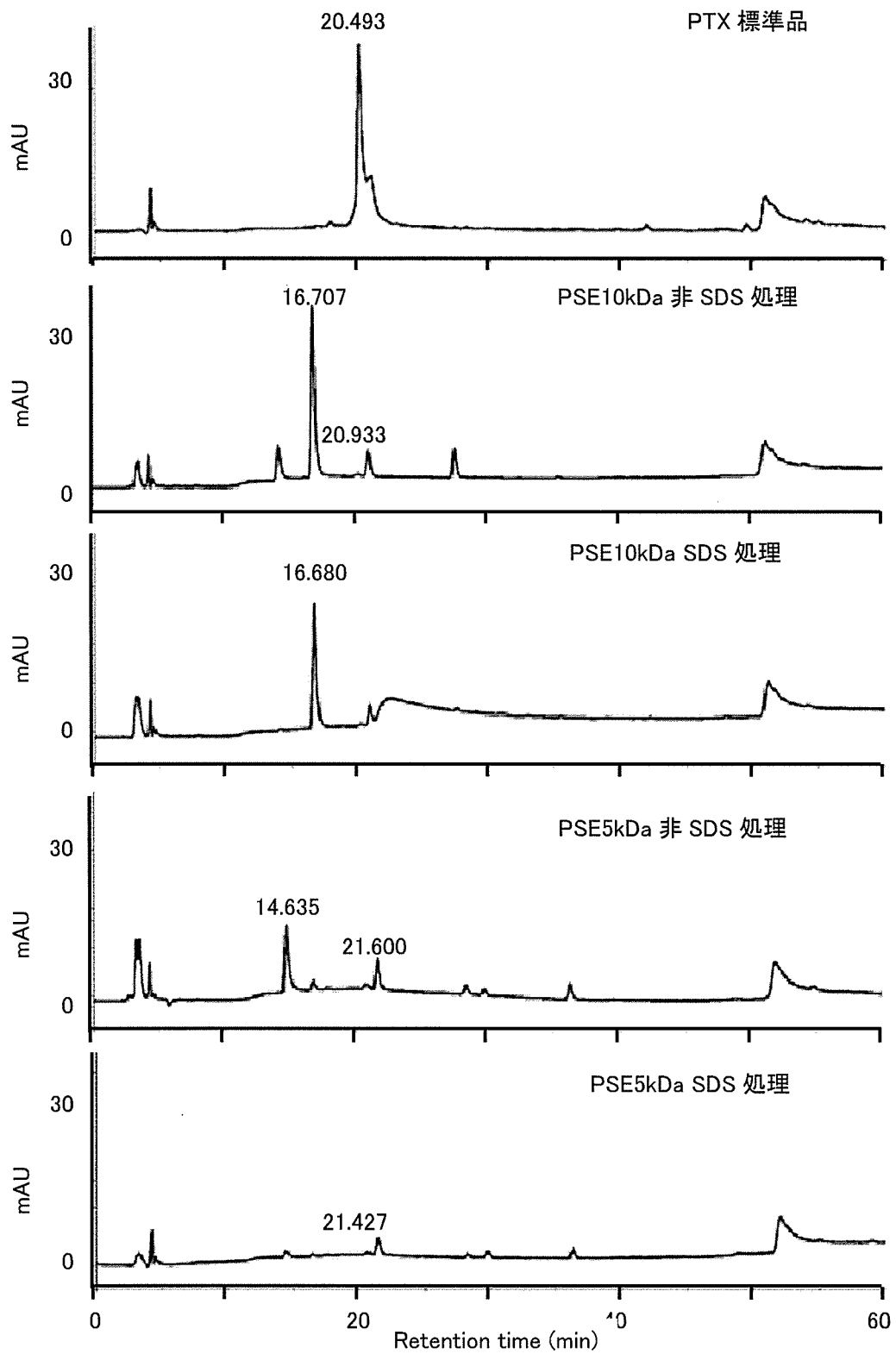


図 8 限外ろ過した PTX 標準品の HPLC 分析結果

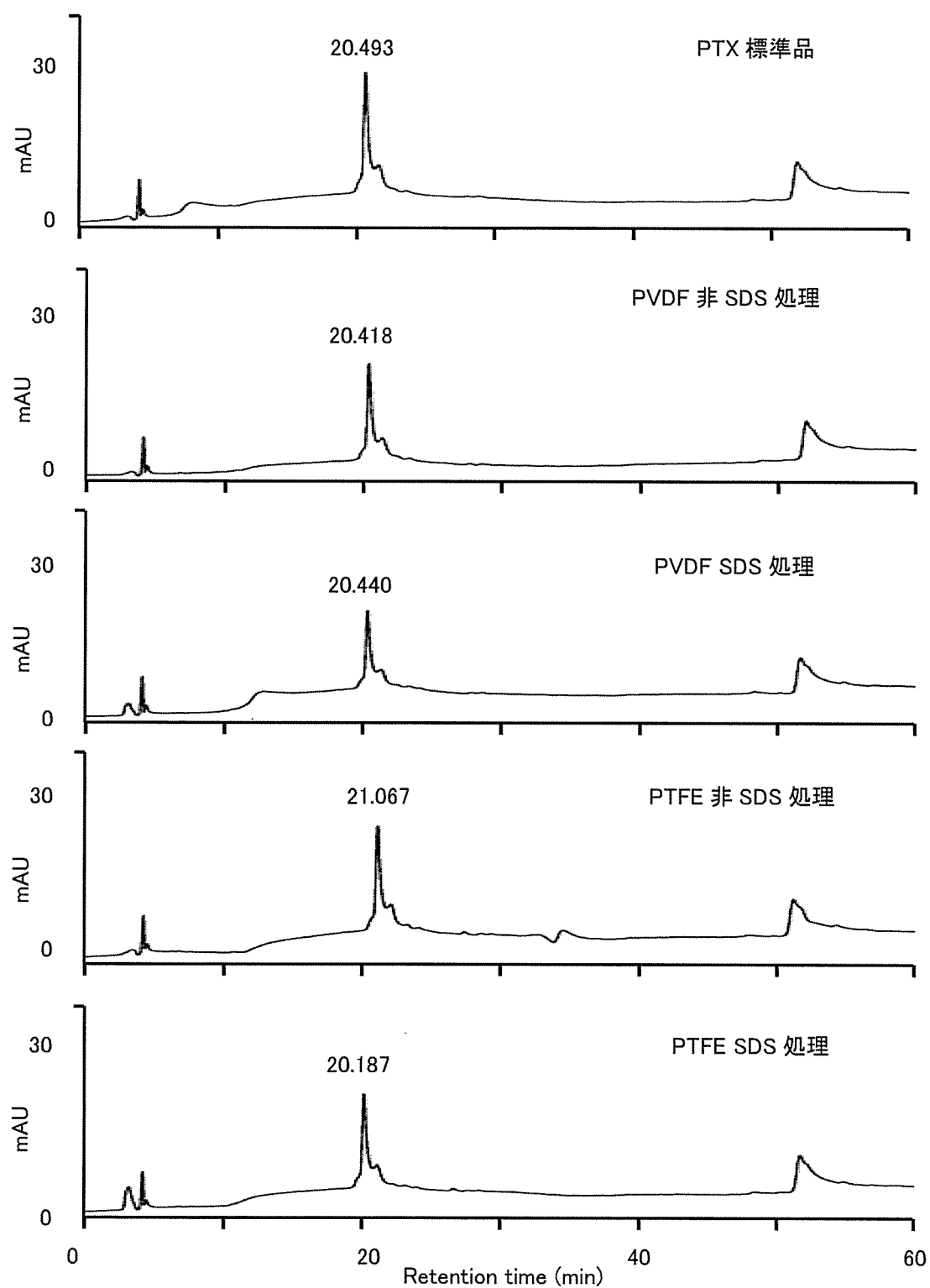


図 9 精密ろ過した PTX 標準品の HPLC 分析結果

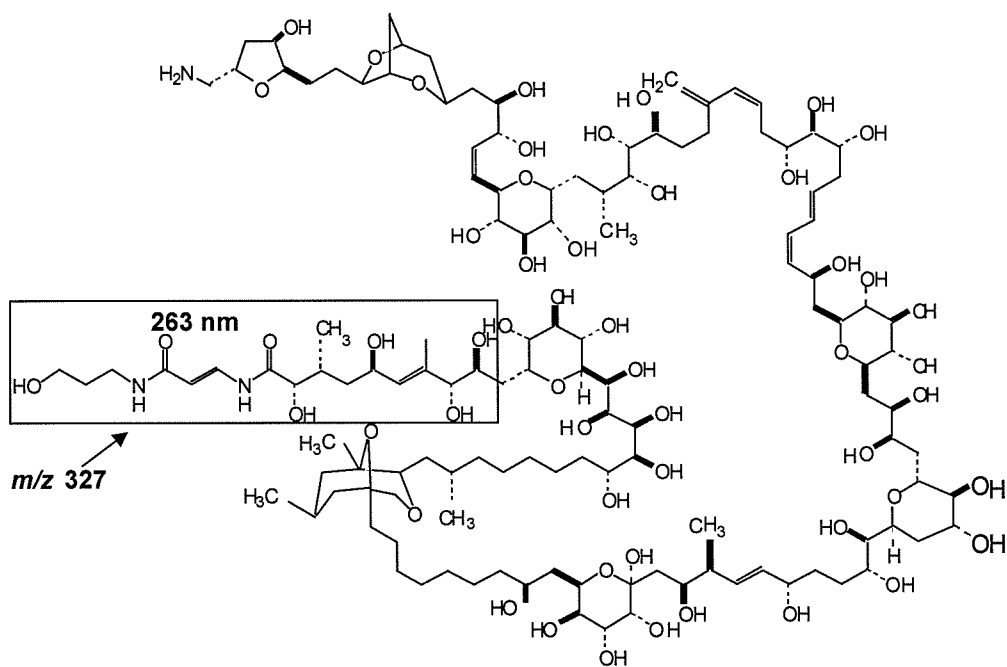


図10 パリトキシシン(PTX)の構造式

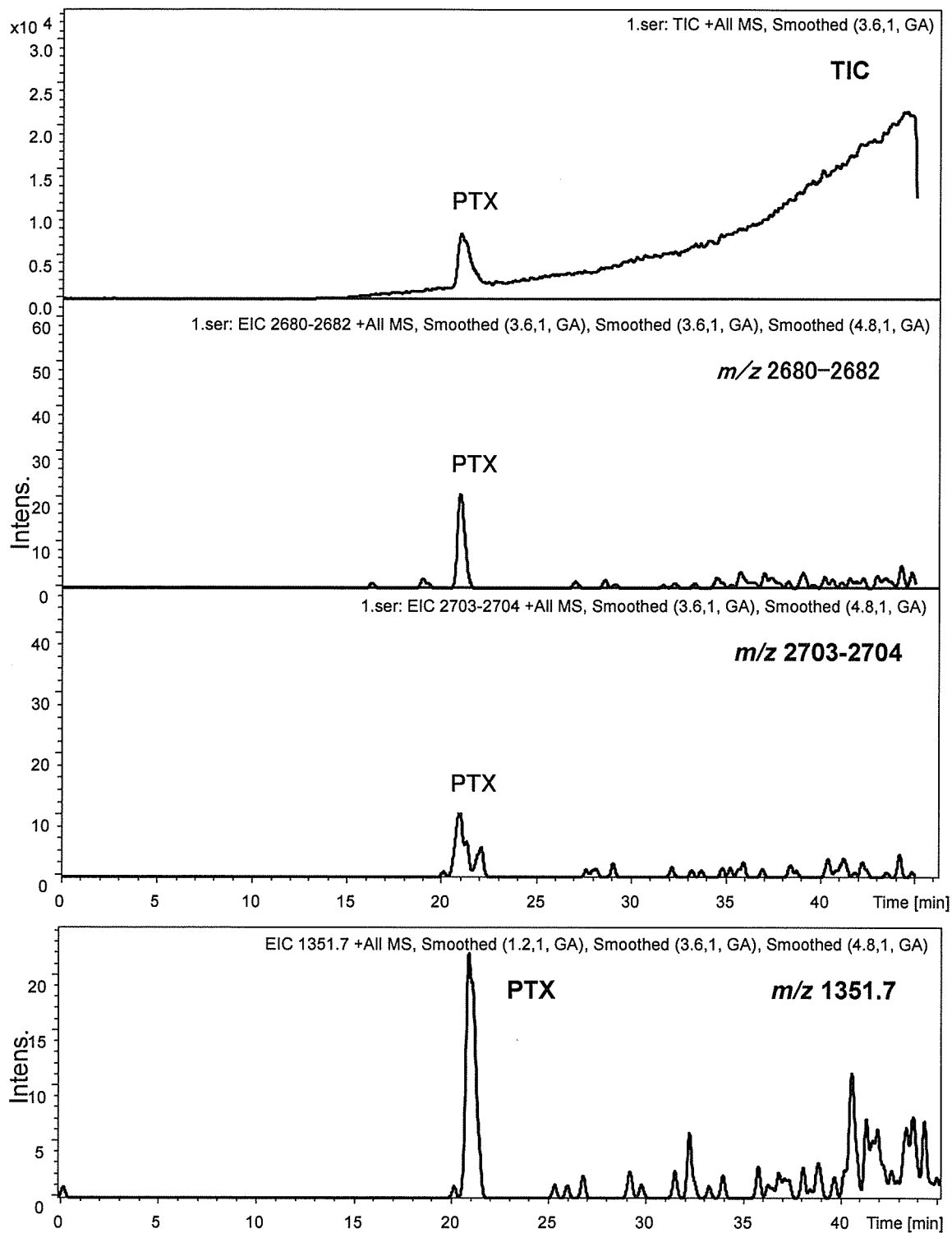


図 11 PTX 標準品の LC/MS 分析結果

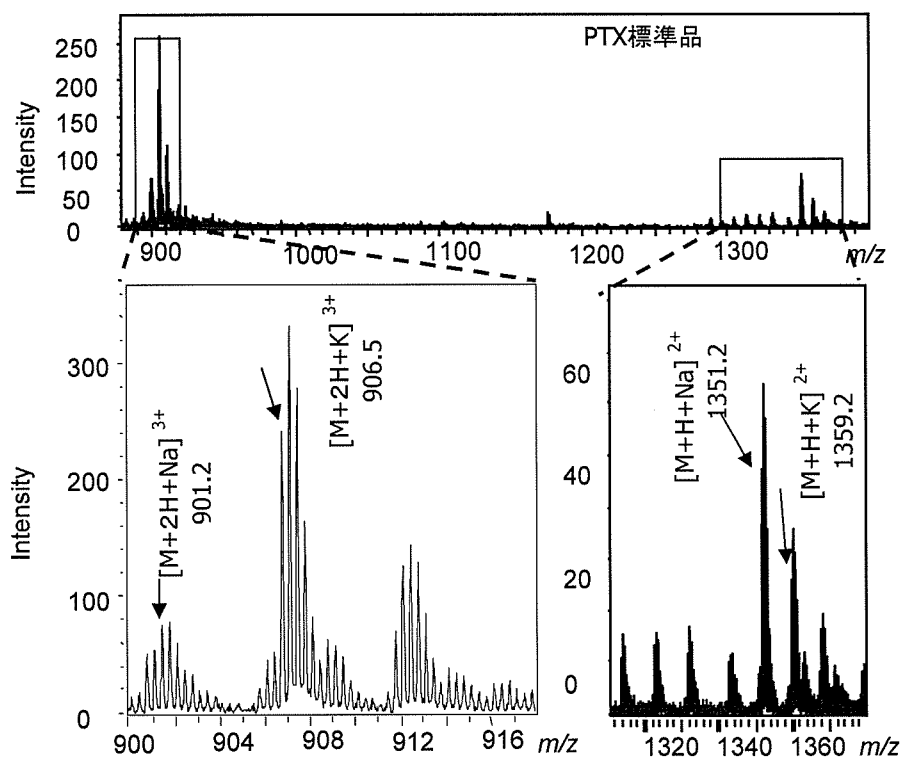


図12 PTX標準品のマススペクトル

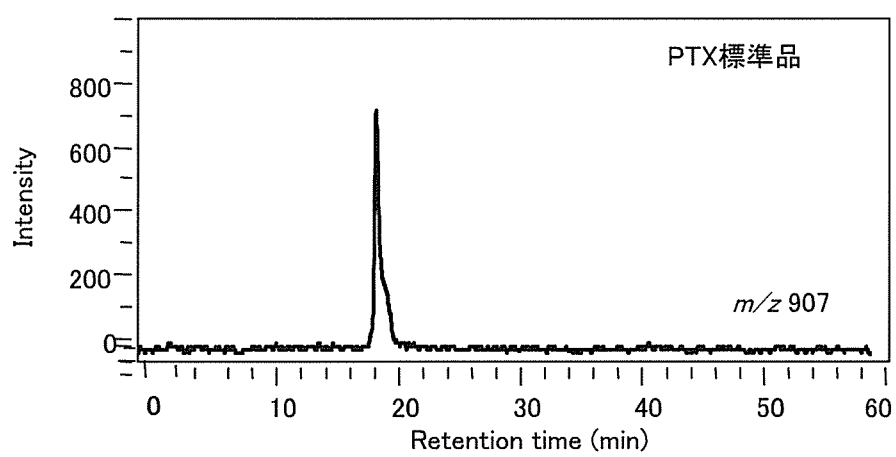


図 13 PTX 標準品のマスクロマトグラム

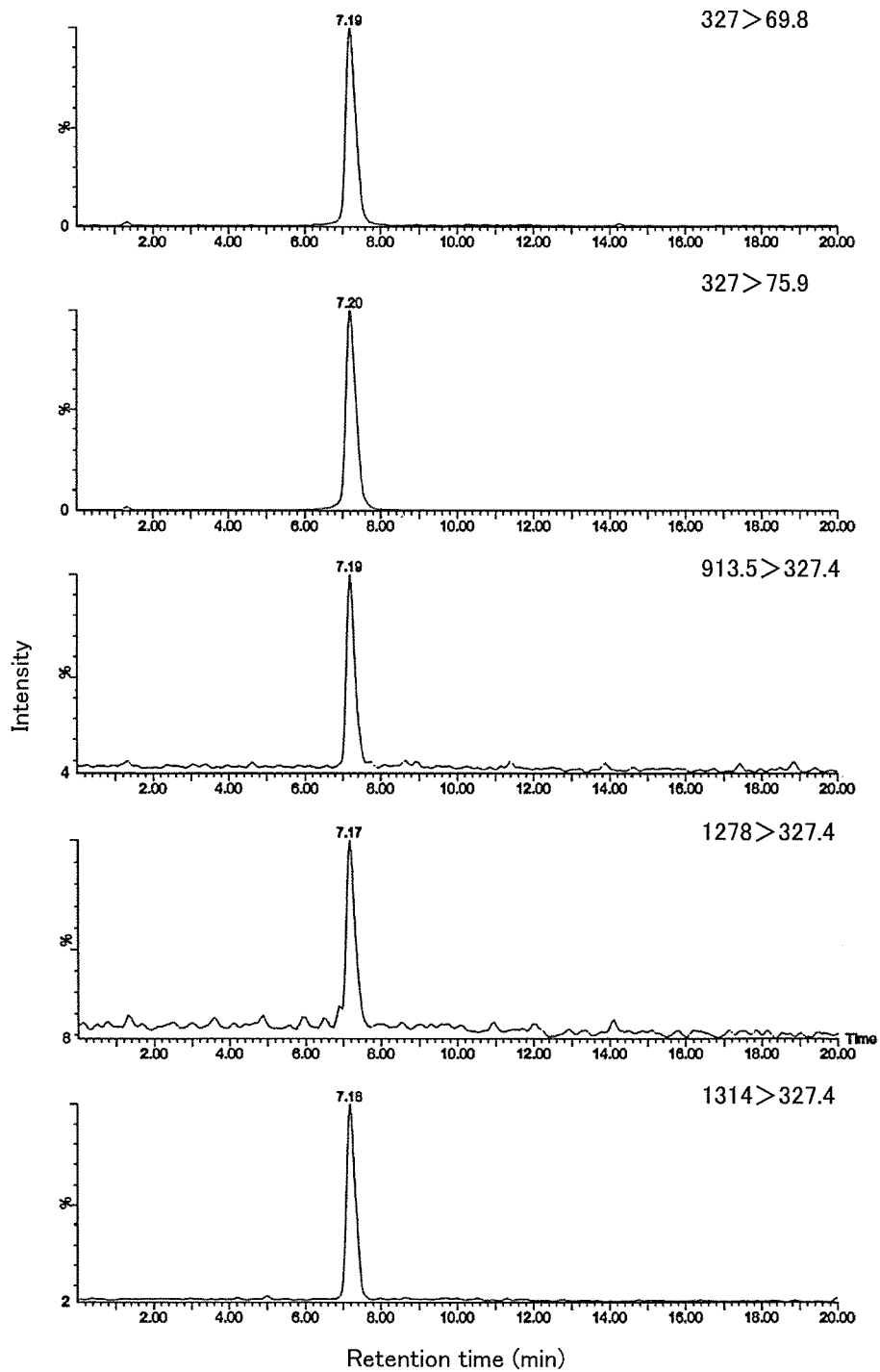


図 14 PTX 標準品(1ppm)の MRM クロマトグラム