

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全性確保推進研究事業）
分担研究報告書

有機溶媒可溶性貝毒標準品の調製に関する研究

分担研究者 関口 礼司 財団法人 日本食品分析センター お客様相談室 副部長

研究要旨

平成 19 年度は、ジノフィシストキシン-3 (DTX3) については抽出用原料が入手できなかったため、低品質のために放置されていた過去の試料の処理法を開発して、まず、ジノフィシストキシン-1 (DTX1) を調製し、さらに化学合成によって DTX3 を生産することを検討した。

精製過程において DTX1 に見られるスペクトルの異常は、金属塩の形成によることを解明し、解決した。

精製した各標準毒の純度判定は、多波長検出器を用いる HPLC、LC-MS、¹H-NMR によって行った。

また、YTX 類縁体について、毒生産性渦鞭毛藻を培養できる専門家に依頼し、培養藻体から海外で出現する同族体の標品 (homoYTX) を精製した。

A. 研究目的

二枚貝の毒化は世界的に広域化・恒常化している。国内消費者の健康の保護と円滑な輸出入を行うには、貝毒の許容値と検査法に関する世界的な合意形成が必要である。

このような状況を受けて、EU の専門家会議は、ジノフィシストキシン類の許容値の引き下げや、ペクテノトキシン (PTX) やイエツソトキシン (YTX) についての最新のリスク評価に基づく規制の設定を勧告している。しかし、現行のマウス試験法の感度と特異性では、これらの勧告に対応できない。

一方、LC-MS 法は精度と感度に優れてはいるものの、入手可能な標準毒の種類が少ないた

めに測定可能な成分が限定されている。

そこで本研究では、LC/MS による一斉分析法の精度検証を実施するための主要脂溶性標準毒の単離・精製を行うこととした。

なお、海外に出現する毒は、抽出原料の入手が困難なので、国内に出現する毒に限定して調製した。近年は脂溶性貝毒の原料に適した二枚貝試料が得られないので、毒含量の低い低品質試料を用いた。

最終的には、これら外部標準として使用する標準毒はアンプルに封入し、研究機関等に提供することにより、国内外の貝毒対策に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

前年度までの研究において、国内で出現する主要な脂溶性毒 10 成分に海外で規制の対象とされている脂溶性の貝毒 4 成分を加えた 14 成分の標準毒を作成し、LC-MS による一斉分析法を設定した。分析法の信頼性を検証するためには、性状の異なる数種の二枚貝試料について更に添加回収試験を行うことと、外部機関に検証を依頼するための標準毒添加試料を必要とする。また、事業終了時には、一定量の標準毒を試験研究機関に提供することを予定している。

近年の国内二枚貝の毒化は低く、抽出原料の入手が不可能なことを勘案し、平成 19 年度は下痢性貝毒の主要毒である DTX1 について、低品質原料の処理法を開発し、DTX1 の作製を最優先することとした。

なお、DTX1 の精製過程で確認された純度検定・定量の支障となる $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの異常を解明するため、精製操作の検討を行い、得られた精製物の NMR スペクトルにより異常の有無を比較した。

また、前年度までに作製できなかった homoYTX の作製を実施した。

C. 研究結果

DTX1 の精製過程で確認された純度検定・定量の支障となる $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの異常を、以下のように金属カラムからの溶出する金属塩の影響を防止することで解決した。

1) DTX1 標準品の調製

次の精製方法により得られた精製物の NMR スペクトルにより異常の有無を比較した。

① あらかじめ構造に異常がないことを確認し

た DTX1 粗精製画分を新たな原料として用い、今まで使用しているカラム・装置による精製操作を行った場合は、昨年度と同様の異常なスペクトルを示した (図 1)。

② NMR スペクトル全体が揺れていることから、金属塩が混在している可能性があるため、最終精製の段階で使用する新しい HPLC カラムを用いて精製し、得られた精製物の NMR を測定した結果、昨年度と同様の異常な NMR スペクトルを示した (図 2)。

③ 金属塩が何から由来しているか不明のため、陽イオン交換樹脂を用いて金属塩を取り除くこととした。すなわち、②で得られた精製物を TOYOPEARL CM-650M 中圧カラムを用いてイオン交換処理し、溶出液の NMR スペクトルを測定した結果、DTX1 本来の NMR スペクトルが得られ、ピークもシャープになった (図 3)。

以上より、NMR スペクトルが異常となった原因は金属塩の影響に因るものと解明された。HPLC 注入に用いるガラス製シリンジを新しいものに替え精製を行っても、スペクトルは異常なままで金属塩が何処から混入してきているかは究明できなかったが、陽イオン交換樹脂で処理することにより取り除くことができ、95%以上の純度を有する DTX1 精製品を得ることができた。

2) homoYTX 標準品の調製

YTX 類縁体について二枚貝（主としてホタテガイ）中の濃度が上昇すれば抽出試料に用いる。

濃度上昇がなければ、毒生産性渦鞭毛藻を培養できる専門家に依頼し、培養藻体から海外で出現する同族体の標品 (homoYTX) を調製した (図 4)。

homoYTX 精製品の NMR スペクトル、MS スペクトル及び HPLC のクロマトグラムを図 5~7 に示

す。

D. 考察

本研究の第一の目的は、研究者らがこれまでに培った技術と能力を生かして、標準毒と高精度分析法を開発し、国産二枚貝の正確な貝毒監視を可能にすることである。

さらに、二枚貝製品の輸出の際に検査を要求されることの多い、神経性貝毒とアザスピロ酸貝毒についても、両毒の代表的成分の標準品を作成し、LC-MSによる検査を可能にする。

標準毒は、添加・回収試験や、外部評価機関に提供する添加試料の作製に必要な毒で、外部標準毒より多量を必要とする。海外に出現する毒は、抽出原料の入手が困難なので、調達方法を調査する必要がある。

また、国内においても近年は脂溶性貝毒の原料に適した二枚貝試料が得られないので、毒含量の低い低品質試料を用い、抽出・精製法に改良を加えるという煩雑かつ時間のかかる手法により毒を得ることの必要性が一層増している。

E. 結論

研究遂行のために必要な追加試料の調製を実施した。まず、毒含量の低い低品質試料を用い、抽出・精製法に改良を加えてジノフィシストキシン-1を得た。また、YTX類縁体について、毒生産性渦鞭毛藻を培養できる専門家に依頼し、培養藻体から海外で出現する同族体の標品 (homo-YTX) を精製した。

F. 健康危険情報

健康危険情報について、該当事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Megumi Suzuki, Reiji Sekiguchi, Masatoshi Watai, Takeshi Yasumoto: Preparation and simultaneous LC-MS analysis of fourteen shellfish toxins, Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae 2006, Copenhagen, Denmark (in press).

2. 学会発表

M. Suzuki, R. Sekiguchi, M. Watai, T. Yasumoto: Preparation of fourteen shellfish toxins and their simultaneous analysis by LC-MS (poster), 121st AOAC Annual Meeting & Exposition, Anaheim, California USA, September 16-20, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定はない。

I. 謝辞

エステル型毒の調製にご協力いただいた(株)トロピカルテクノセンターの吉野博士に感謝致します。

試料をご提供いただいた Santiago de Compostela 大学の Dr. L. Botana 及び北里大学小池博士に感謝致します。

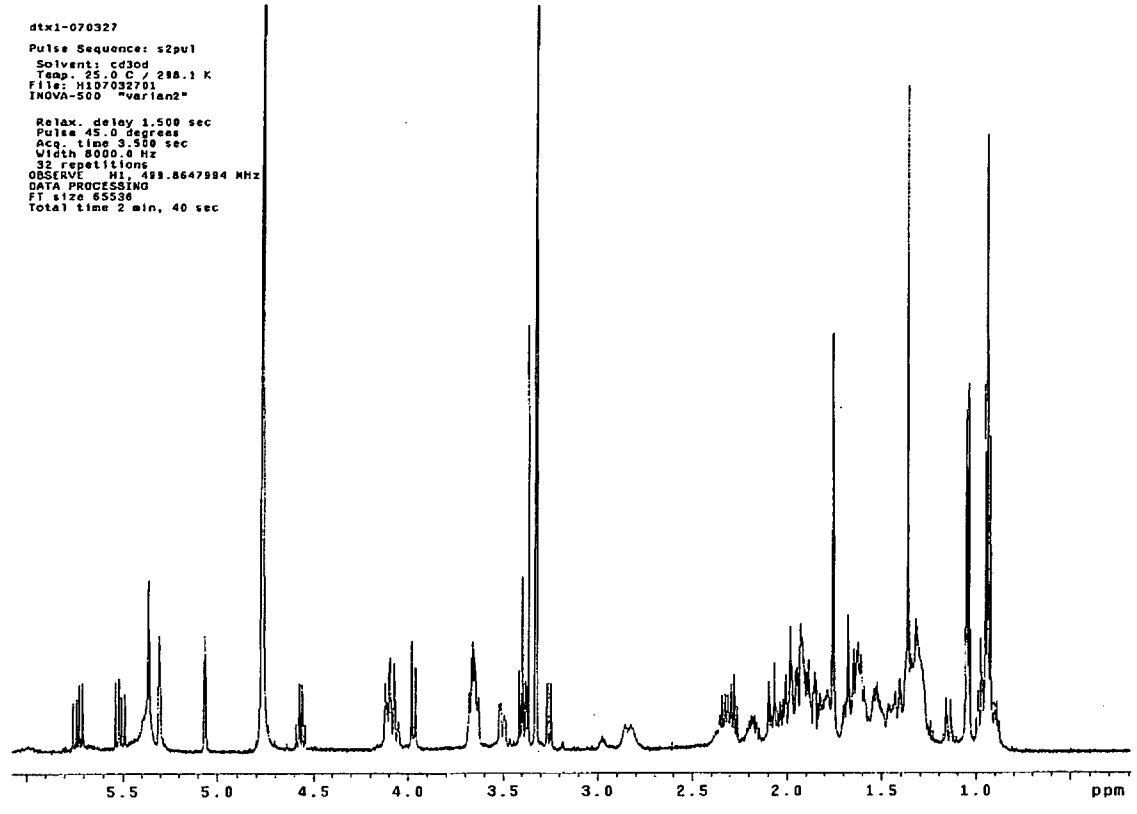


図1 従来のカラム・装置による精製操作を行った DTX1 精製物の NMR スペクトル

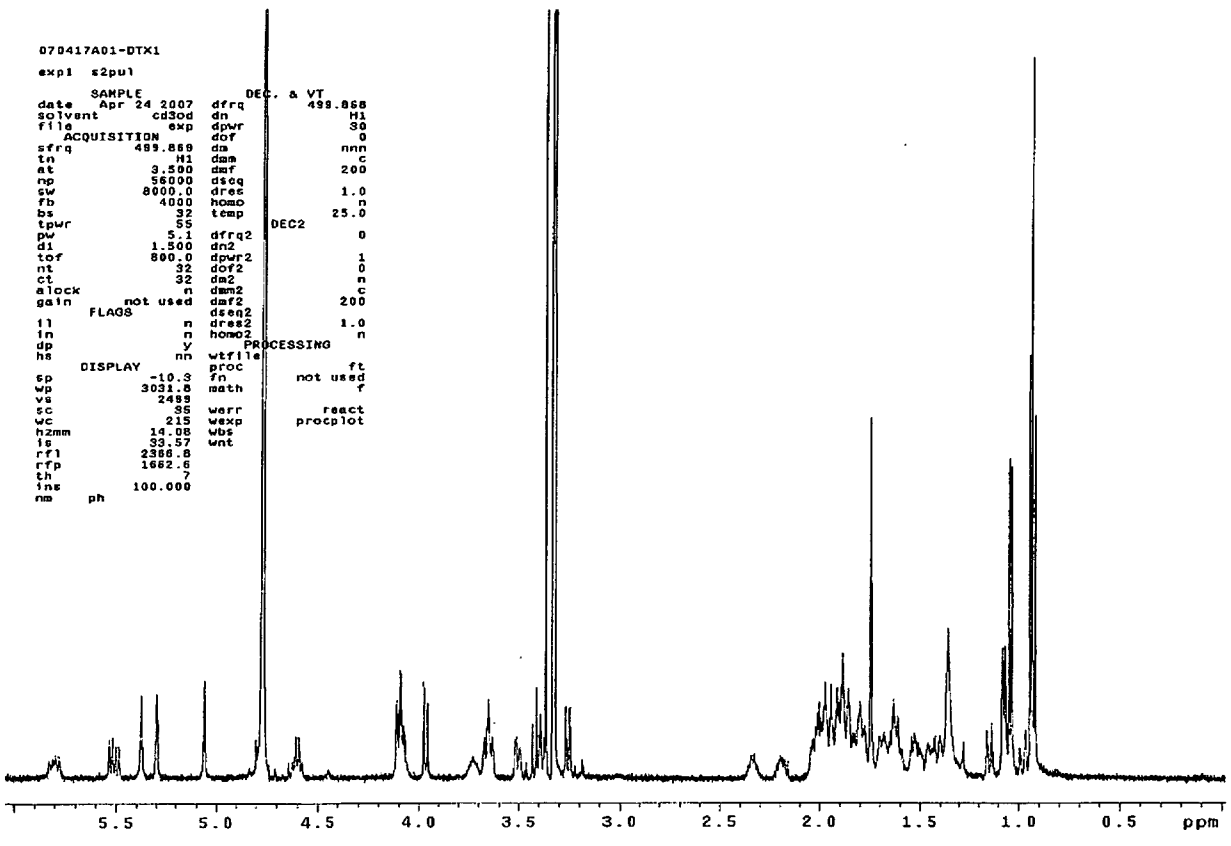


図2 新しい HPLC カラムを用いて得られた精製物の NMR スペクトル

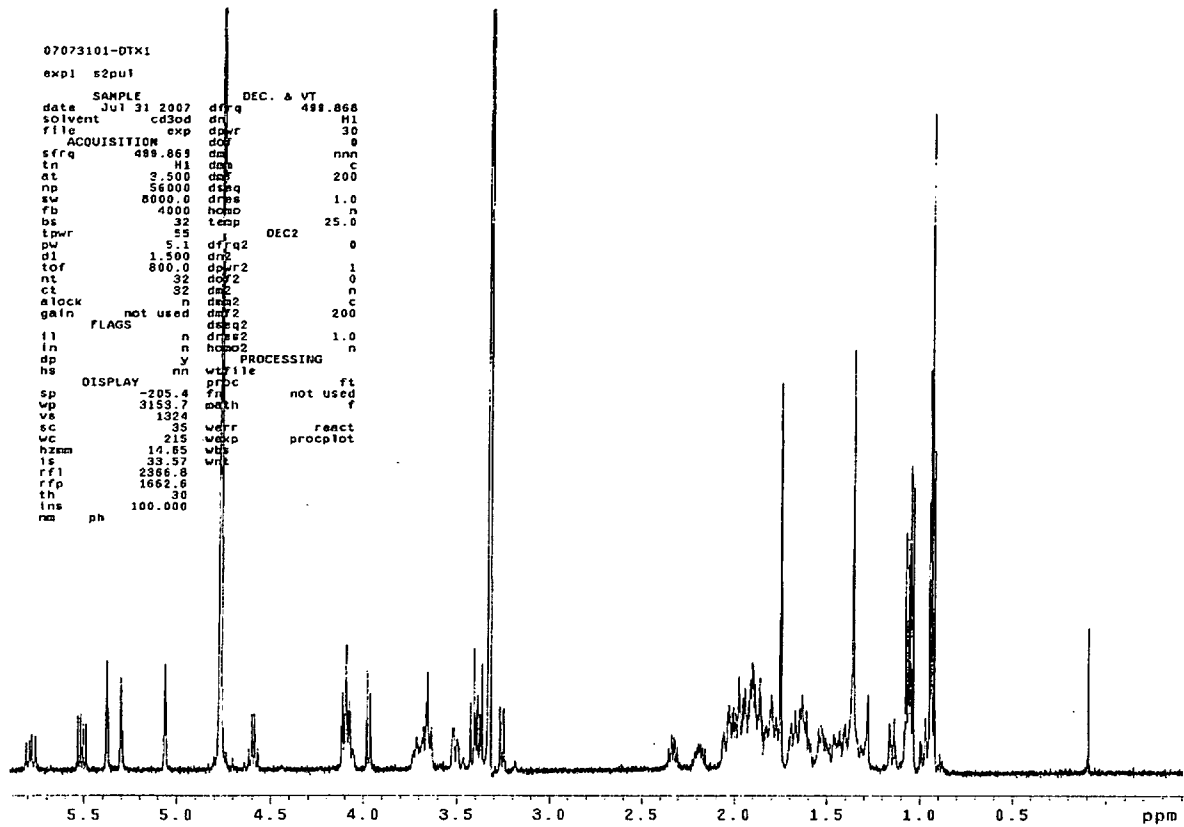


図3 陽イオン交換樹脂 (TOYOPEARL CM-650M) 溶出液のNMRスペクトル

homoYTX培養液 7L

Sep-pak C18 Vac 3cc(2連)
60% PrOH溶出

オープンカラム(φ2.5cm シリカ 40g)

クロロホルム:メタノール(4:6)溶出画分

中圧カラム(ODS Q3 φ20×250)

移動相: 30% MeOHからステップワイズ溶出

75%メタノール溶出画分

HPLC(Cosmosil φ10×250)

移動相: MeOH/MeCN/AcONH₄=75:10:15

Sep-pak C18

メタノール溶出画分

homoYTX

} 繰り返し実施

図4 培養液からhomoYTXの作製フロー

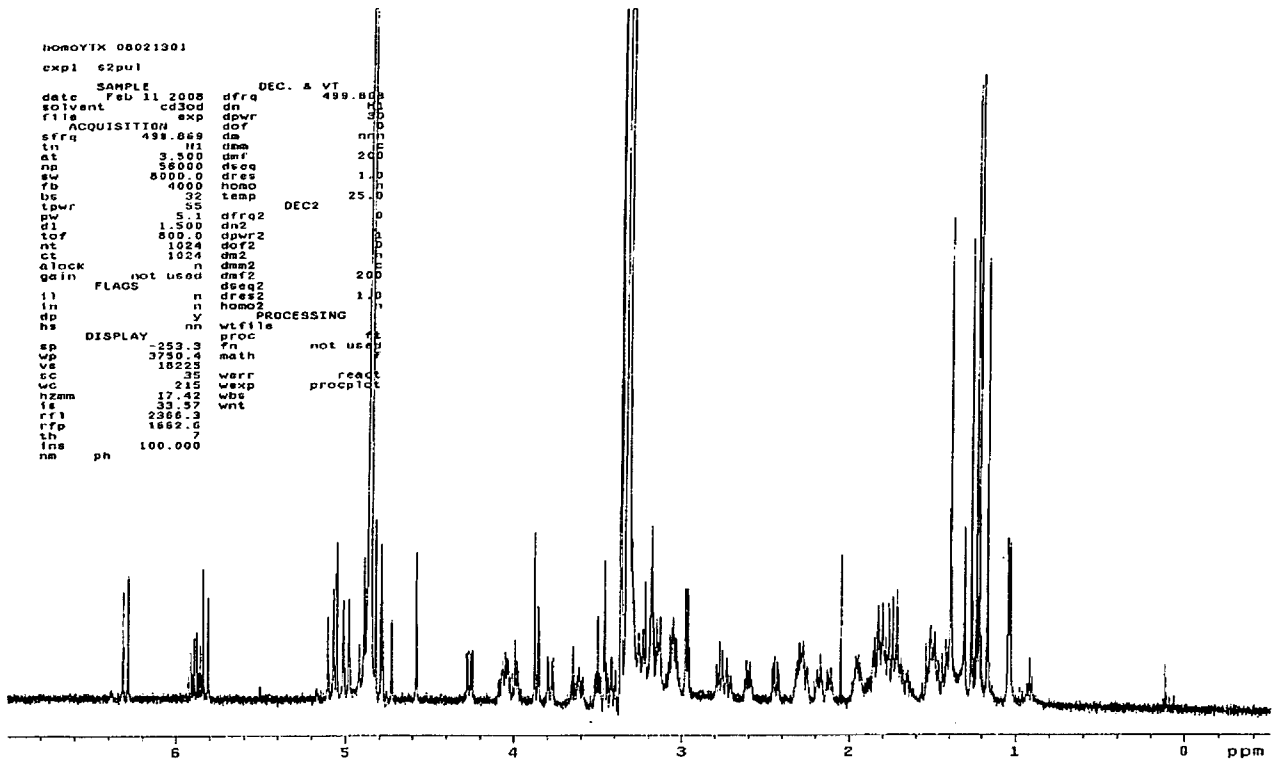


図5 homoYTX精製品のNMRスペクトル

071128scan045RAW #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 4.08E4
T: -c Q1MS [800.00-1300.00]

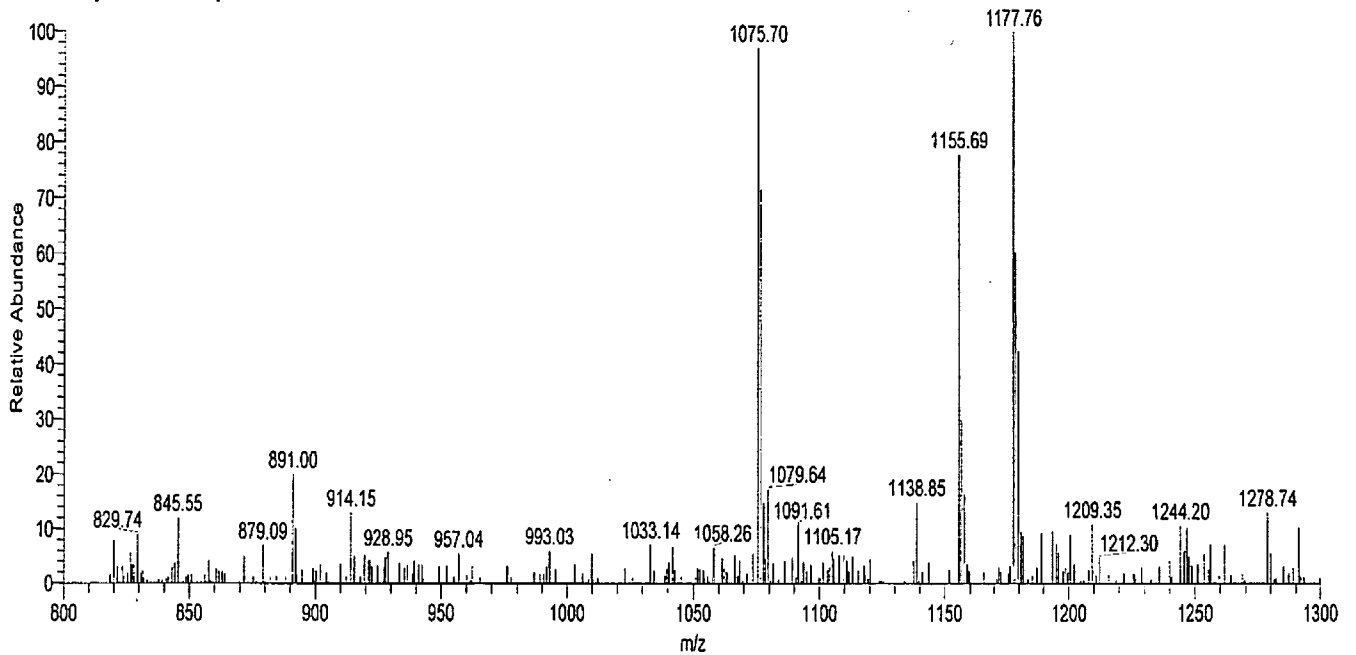


図6 homoYTX精製品のLC/MSスペクトル

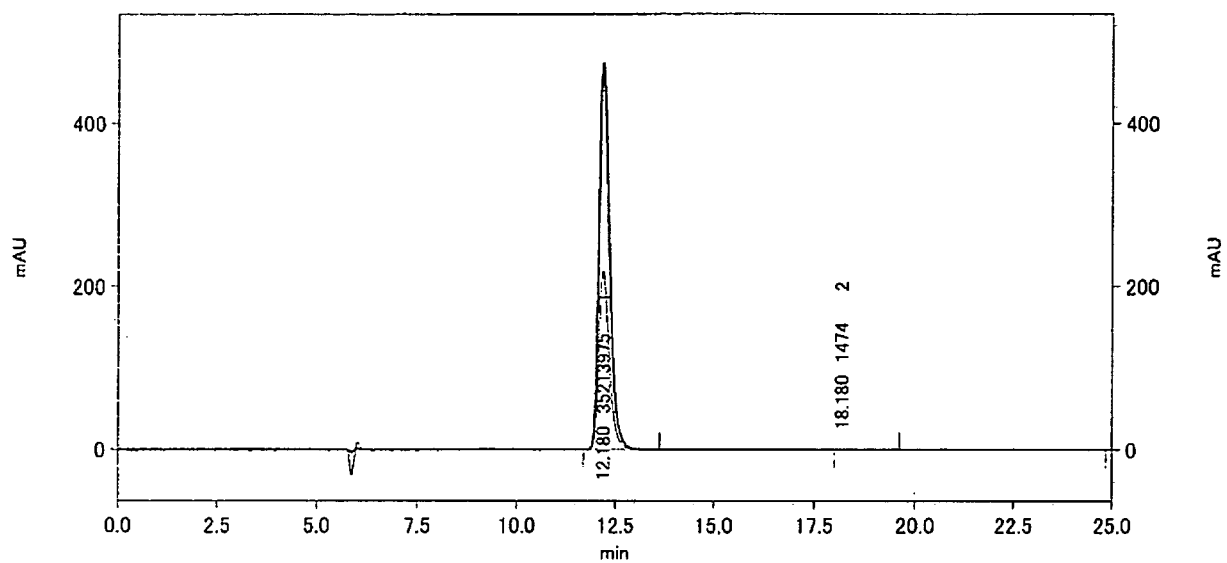


図7 homoYTX精製品のHPLCクロマトグラム

Cosmosil $\phi 10 \times 250$, MeOH/MeCN/0.1M AcONH₄, 2.0mL/min, 35°C

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当事項なし。							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当事項なし。					