

200734050A

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

貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 相良 剛史

平成20（2008）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究	----- 1
相良 剛史	
II. 分担研究報告	
1. 貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究	
～麻痺性貝毒成分の単離・精製～	----- 24
谷山 茂人	
2. 貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究	
～フグ毒関連成分の単離・精製～	----- 38
高谷 智裕	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 50
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 51

総括研究報告書

貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究

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、貝毒、特に麻痺性貝毒 (PSP) の、現行のマウス毒性試験(公定法)の代替試験法とする、高感度で迅速、かつ簡便な液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) による PSP 一斉分析法の開発を目的とした。

まず、分析法の開発に必要な PSP 成分を確保するために、PSP 産生渦鞭毛藻 *Alexandrium tamiyavanichii*, *A. catenella* および *Gymnodinium catenatum* の大量藻培を行い、有毒渦鞭毛藻の培養藻体に、希少な PSP 成分である GTX5 および 6 が大量に含まれていることを確認した。一方、分担研究者により有毒二枚貝ならびに有毒ガニから PSP 成分を大量抽出し、各種クロマトグラフィーに供して PSP 精製毒を作成した。次いで、得られた PSP 精製毒ならびに国内で配布されている 9 種の PSP 標準品を用いて、日立陰イオン交換樹脂カラム 3013 N カラムと Develosil RP-Aqueous-AR カラムを直列に配置した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析法を検討した。本法では前者のカラムを 50°C、後者を 20°C に制御し、2 種類の移動相、すなわち 0.1% ヘプタフルオロ酪酸および 0.1% ペンタフルオロプロピオン酸/4% アセトニトリルを用いた。PSP 成分の検出には、ポストラベル蛍光 (LC-FLD) 検出法とともに、音速噴霧イオン化法 SSI を装備した日立 M-8000 を使用した MS 分析も行った。

各 PSP 成分の MS 分析では、脱スルホン $[M+H-SO_3]^+$ 、脱水 $[M+H-H_2O]^+$ 、 $[M+H]^+$ および $[M+Na]^+$ 付加のシグナルを PSP 判定の条件とすることにより、 m/z 300 で GTX5 と STX、 m/z 316 で GTX2, 3, 6, C1, 2, neoSTX, ハイドロキシ STX (hySTX)、 m/z 332 で GTX1, 4, hyneoSTX, C3、 m/z 273 で dcGTX2, 3, dcneoSTX、 m/z 257 で dcSTX の検出が可能となった。C1, C2, GTX6, GTX5, dcGTX2, dcGTX3, GTX4, GTX2, GTX1, dcneoSTX, hyneoSTX, hySTX, STX および neoSTX の保持時間は、それぞれ 7.0, 8.2, 11.8, 12.5, 14.5, 16.2, 19.1, 23.1, 24.2, 34.3, 45.5, 47.6, 50.0 および 51.2 分であった。これにより、PSP17 成分の LC/MS による一括分析が実現した。本分析法は対象となる PSP 成分が 17 成分ではあるものの、LC-FLD 検出法と MS 分析法に有効で、かつ相互に比較検討と補完できる性能を併せ持った手法であり、その分析時間も 60 分以内であることから迅速な分析法であると言える。

分担研究者	谷山 茂人 長崎大学大学院 助教
	高谷 智裕 長崎大学水産学部 准教授

A.研究目的

これまで貝毒の化学的な検出はマウスや HPLC-蛍光分析法が一般的であったが、動物愛護の観点やその信頼性からも、分析機器による確実に高感度な分析方法の開発が求められている。一方、数年前からこれら低分子毒の分析に LC/MS が取り入れられるようになり、本装置の導入が以前より容易になってきつつある今日では、実用化にむけた高精度な分析方法の開発が関心を集めている。下痢性貝毒(DSP)においては、その LC/MS による一斉分析法が開発され、実用段階にあるが、PSP では申請者らが既存の標準品についての一斉分析法を示しているものの、分析対象とする毒成分や検出感度について問題点があるため、国際的に認められる手法とするためには更なる改善が必要な状況である。そこで、分析対象とする PSP 成分を 20 種以上にまで拡大した LC/MS による一斉分析法を用いた絶対的 PSP 定量法の確立が急務となっている。

LC/MS による PSP の分析は、1990 年代に大島らによって開発された LC-蛍光分析法(1995)を応用することにより、Waters 社製等の耐久性の高い MS 装置

に限ればその成分の検出が可能となったが、C 群、GTX 群および STX 群の 3 群に分割して分析しなければならず、その検出感度も非常に低いものであった。

PSP 全成分を短時間に分析する試みは、キャピラリー電気泳動法(CE)を応用して Locke ら(1994)、イオン交換樹脂カラムを用いて Jaime ら(2001)、逆相系カラムに関して研究協力者の Hashimoto ら(2002)と Nishio(2002)、amide ゲルカラムについて Aversano ら(2004)によって検討されている。いずれもポストカラム蛍光法の LC-FLD を視野に入れながらも、MS を検出器とした CE-MS や LC/MS への適応を目的としている。また、藍藻 *Aphanizomenon flos-aquae* が産生する GTX5、STX、neoSTX、dcSTX を同定した Pereira ら(2000)、ヒトデから STX、dcSTX、hyneoSTX を検出した Ito ら(2003)、*G. catenatum* から 3 種の新規 PSP 成分として hydroxy- benzoate- STX 誘導体を発見した Negri ら(2003)は、LC/MS が PSP 成分分析に極めて有効であることを示している。しかし、これらの方法は検出感度が低いことと、多岐にわたる PSP 誘導体の相互分離を無視したものであるため、実用化したとは言い難い。

また、国内における PSP 標準品の配布は農林水産省主導で行われているが、その種類は C1,2、GTX1,2,3,4、dcGTX2,3 および neoSTX の 9 種類のみである。これらには、PSP 成分中で毒性が強く化学兵器に指定されている STX や試料からの検出頻度が高い hySTX、また加熱処理により SO₃ が容易に離脱し

STX、neoSTX に変換する GTX5,6 などの成分が含まれていないため、現段階では機器分析のみによる魚介類の毒性評価は困難であり、特に西日本や南西諸島に発生する PSP には既存の標準品のみでは不十分である。

そこで、本研究では貝毒の定量に必要な PSP 成分の精製毒を作製し、LC/MS を用いた PSP 一斉分析法による絶対的定量法の確立を実現させる。さらに、この分析システムでの TTX、ASP 関連成分の同時分析を検討する。本研究の遂行は、行政のみならず民間も含めた検査機関での貝毒検査体制の充実・強化に貢献し、国内外産を問わず、本邦に流通する魚介類のモニタリング実施に大きく寄与すると考えられる。

B. 研究方法

1) 有毒渦鞭毛藻培養株の確保

香川県東かがわ市沿岸で 2004 年 11 月に分離した *A. tamiyavanichii* 1 株 (At041104 株) (図 1)、徳島県徳島市吉野川河口域より 2000 年 5 月に分離した *A. catenella* 1 株 (YT-2 株)、和歌山県東牟婁郡串本町沿岸で 2006 年 6 月に分離した *A. catenella* 1 株 (AcWU0617 株) および大分県佐伯市沿岸より 2003 年 2 月に分離した *G. catenatum* 1 株 (GcO0302 株) を試料として用いた。それぞれの分離株は培養後、一部の藻体を用いて、産生毒成分の確認を行った。

1-1) 有毒渦鞭毛藻の培養

株の培養は、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 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 、明暗周期を 12 時間明/12 時間暗の条件下で行った。

2) 有毒渦鞭毛藻培養株の毒性

B. 研究方法 1) 有毒渦鞭毛藻培養株の確保 1-1) により得られた培養株のうち、At041104 株および YT-2 株の 2 株について毒産生能を確認するため、マウス毒性試験および HPLC 分析に供した。

2-1) 毒の抽出

At041104 株は 5.0×10^4 細胞を分取後、0.5 M 酢酸を 2 ml 加え細胞を超音波破碎し、500 G で 10 分間遠心分離して上清を得た。沈殿物については、0.5 M 酢酸を 1 ml 加え同様の操作を 2 回繰り返して、得られた上清を合一後、ロータリーエバポレーターにて酢酸を除去し、蒸留水で 5 ml に定容し、マウス毒性試験および HPLC 分析の試験液とした。

YT-2 株は、4.7 g (約 3.13×10^8 細胞) を用い、80% エタノール・1% 酢酸溶液で磨碎抽出し、1000 G で 15 分間遠心分離して上清を得た。沈殿物については、同様の操作を 2 回繰り返して、これらの上清を合一後、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。この濃縮液にジクロロメタンを加え 4 回脱脂後、水層を減圧濃縮してマウス毒性試験に供した。

2-2) マウス毒性試験法

マウス毒性試験は公定法 (2005) に

準じて行った。抽出及び精製の各段階でマウス毒性試験を行った。体重 20 g の ddY 系雄マウスに、試験溶液 1 ml を腹腔内投与して、投与が終了した時間からマウスの呼吸が完全に停止するまでの時間(致死時間)を測定した。TTX の場合は、呼吸が 30 分で停止する毒力を 1 マウスユニット(MU)とし、PSP の場合は、呼吸が 15 分で停止する毒力を 1 MU とした。上記の方法で測定した致死時間から、TTX 及び PSP の換算表を用いて毒性値を求めた。

2-3) HPLC 分析

HPLC による PSP 成分一括分析のカラムに日立社製 HG3013N(ϕ 4.6 mm \times 50 mm)と野村化学社製 Develosil C-30 UG-5(ϕ 4.6 mm \times 250 mm)を使用した(2002)。

移動相 A に 5 mM ヘプタフルオロ酪酸を含む 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液(pH 3.8)、移動相 B に 10 mM ヘプタフルオロ酪酸を含む 10%アセトニトリル-30 mM 酢酸アンモニウム緩衝液(pH 7.1)を用いた。分析開始時から 25 分まで移動相 A、26 分から 45 分を移動相 B、46 分から分析終了の 70 分まで移動相 A を流して分析した(2002)。

カラムからの溶離液に、7 mM 過ヨウ素酸を含む 50 mM リン酸緩衝液(pH 10)を同じ流速で混合させ、65 $^{\circ}$ C で加熱して蛍光化させ、その後 0.5 M 酢酸を同じ流速で混合して蛍光強度を増感させ、励起波長 340 nm、蛍光波長 410 nm の蛍光強度を測定した(1995)。

3) LC/MS による PSP 一斉分析法の検討

3-1) 標準品を用いた検討

既存の PSP 標準品 C1 0.99 μ M、C2 0.26 μ M、GTX1 3.60 μ M、GTX2 1.27 μ M、GTX3 0.45 μ M、GTX4 1.11 μ M、dcGTX2 0.32 μ M、dcGTX3 0.10 μ M および neoSTX 1.34 μ M 水溶液の 9 成分を用いた。

3-1-1) LC/MS 分析条件

本分析は LC 条件を、B.研究方法 2) 有毒渦鞭毛藻培養株の毒性 2-3)と同様とし、質量分析には音速噴霧イオン化法(SSI)を装備した日立 M-8000 LC/ 3DQMS を使用した。ドリフト電圧 +40V、フォーカス電圧 30V、ネフライザーの窒素圧 300 mmHG、シールド温度 300 $^{\circ}$ C、第一細孔温度 170 $^{\circ}$ C、第二細孔温度 120 $^{\circ}$ C、検出器電圧 500V で分析した(2002)。

3-2) YT-2 株を用いた検討

3-2-1) 毒の抽出および精製

B.研究方法 2)により毒成分が確認された YT-2 株抽出液を 200 ml に希釈し、ADVANTEC 社製 UK-10 膜にて限外ろ過を行い、分子量 10,000 da 以下の画分を凍結乾燥した。試料を少量の水に溶かし、Bio-Rad 社製 Bio-Gel P-2 カラム(ϕ 40 mm \times 150 mm)にて精製した。蒸留水、0.05 M 酢酸、0.5 M 酢酸を流して PSP を溶出させた。溶出の確認には、HPLC 用発色試薬(1995)を使用したフローインジェクション法にて有毒画分を検出し、蛍光強度が高かったフラクションについては、

電気泳動にて毒成分の大概を調べた。電気泳動は Chemetron 社製セルロースアセテート膜を担体に 0.08 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.7) を用いて、0.8 mA/cm で 15 分間泳動して PSP 成分を分析した。泳動後、1% 過酸化水素水を噴霧し、加熱乾燥させた後、365 nm の紫外線を照射して毒成分を蛍光検出した (1981)。その結果に基づいて 4 画分に分け、凍結乾燥した。それぞれを 30 ml に定容し、一部を HPLC 分析試料とした。残りをマウスアッセイに使用した。マウスアッセイにて確認した有毒画分それぞれを 0.05 M 酢酸で緩衝化した Bio-Gel P-2 カラム (φ 20 mm×300 mm) に通して不純物を除き LC/MS 分析の試料とした。

3-2-2) LC/MS 分析条件

HPLC の条件は、分析カラムに HG3013N (φ 2.7 mm×50 mm) と Develosil RP-AQUEOUS-AR (φ 3 mm×250 mm) とを連結して使用した。前カラムを 50°C、後カラムを 25°C に制御した。移動相は 0.05% ヘプタフルオロ酪酸を含む 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液を A 液、0.05% ペンタフルオロプロピオン酸を含む 1% アセトニトリル-10mM 酢酸アンモニウム緩衝液を B 液として用いた。0-20 分に A 液、20-21 分に A 液から B 液に移行、21-45 分に B 液、45-46 分に B 液から A 液に移行、46-70 分に A 液が流れるように設定した。ポンプの流量を 0.3 ml/min とした。GTX 群、STX 群の質量分析にはイオン化法に SSI を採用した

日立 M-8000 LC/3DQMS を使用した。ドリフト電圧 +40V、フォーカス電圧 30V、ネフライザーの窒素圧 300 mmHG、シールド温度 300°C、第一細孔温度 170°C、第二細孔温度 120°C、検出器電圧 500V でポジティブモードで MS 分析を実施した (2002)。一方、C 群の分析カラムに HG3013N (φ 2.7 mm×150 mm) を使用し、移動相として 0.1% 酢酸を用いた。この場合の MS 測定はネガティブモードとした (2002)。

3-3) 毒化ムラサキイガイを用いた検討

平成 16 年 10 月 17 日に徳島県鳴門市北灘町沿岸で採取した *A. tamiyavanichii* により毒化したと思われるムラサキイガイを試料とした。

3-3-1) 毒の抽出および精製

毒の抽出は、厚生労働省監修食品衛生検査指針理化学編の麻痺性貝毒の項に準じて行った (2005)。試料を磨碎し、等量の 0.1 M 塩酸を加えて沸騰水中で 5 分間加熱抽出した後、4,800 G で 20 分間の遠心分離によって得られた上清を粗毒抽出液とした。得られた粗毒抽出液は、マウス毒性試験に供するとともに、Seppak C-18 および限外ろ過を施し、HPLC 分析に供した。

また、粗抽出液については、UK-10 膜にて限外濾過を行い、分子量 10,000 da 以下の画分を凍結乾燥した。試料を少量の水に溶かし、Bio-Gel P-2 カラム (φ 40 mm×150 mm) にて精製した。蒸留水、0.05 M 酢酸、0.5 M

酢酸を流して PSP を溶出させ、HPLC 用発色試薬を使用したフローインジェクション法にて有毒画分を検出し、有毒画分について LC/MS 分析に供した。

3-3-2) マウス毒性試験

マウス毒性試験は、B.研究方法 2) 有毒渦鞭毛藻培養株の毒性 2-2)と同様に行った。

3-3-3) HPLC による毒成分確認

本分析は、B.研究方法 2) 有毒渦鞭毛藻培養株の毒性 2-3)と同様に行った。

3-3-4) LC/MS 分析条件

本分析は、B.研究方法 3) LC/MS による PSP 一斉分析法の検討 3-1-1)と同様に行った。

C. 研究結果

1) 有毒渦鞭毛藻培養株の確保

培養により At041104 株を約 5 億細胞、YT-2 株を約 3 億 5 千万細胞、AcWU0617 株を約 1 億細胞および GcO0302 株を約 700 万細胞確保した。

2) 有毒渦鞭毛藻培養株の毒性

At041104 株はマウス毒性試験の結果、1 細胞あたり 6.25×10^4 MU の PSP を産生することがわかった。また、その産生毒成分は HPLC の結果から、主成分として GTX4 が約 40% を占め、GTX5 が約 30%、C2 および STX が約 10% を

占めているものと推察された(図 2)。

一方、YT-2 株は供試した 4.7 g (約 3.13×10^8 細胞) から 590 MU の PSP が抽出されたため、1 細胞あたりの毒性は約 1.9×10^{-6} MU と計算された。

3) LC/MS による PSP 一斉分析法の検討

3-1) 標準品を用いた検討結果

既存の標準品を用いて、LC/MS 分析を試みたが、ピークを確認することが出来なかった。

3-2) YT-2 を用いた検討結果

B.研究方法 2) 有毒渦鞭毛藻培養株の毒性 2-1) で得られた、YT-2 株の抽出液 (590 MU) を Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーで精製した結果を図 3 に示す。蛍光検出された画分を Fra. I-IV に区分した。それぞれの毒性をマウスアッセイ法にて調べたところ Fra. II から 177 MU、Fra. III から 510 MU が検出された。これらを電気泳動法で分析したところ Fra. II から陽極方向への相対移動度 (+R_m) 0.16, 0.35, 0.45 の三成分を、そして Fra. III から陰極への -R_m 値 0.22, 0.13 の二成分を検出した。これらの結果から Fra. II の 3 成分をそれぞれ C1、C2、C3 と推定し C 画分と呼ぶことにした(11,12)。また、Fra. III の 2 成分はそれぞれ GTX5、GTX6 と判断して GTX 画分とした(1982)。C 画分、GTX 画分それぞれを HPLC にて分析し、YT-2 株の PSP 成分組成を調べた。図 4 に 1 細胞あたりの毒量 fmol/cell の結果を示した。YT-2 株は、GTX5 が 7.0 fmol/cell と飛

びぬけて多く、次に GTX6 が 3.4 fmol/cell 産生されていた。C1、C2、GTX1、GTX4 はそれぞれ 0.8、0.2、1.1、0.3 fmol/cell であった。GTX3、GTX2 は極微量で、STX および neoSTX は検出されなかった。

分離した GTX 画分のマスクロマトグラムを図 5、マススペクトルを図 6 に示した。カラムの保持時間 10.8 分に m/z 300 で検出された成分 Peak1 は、そのマススペクトル $[M+Na]^+$ の m/z 402 および $[M-SO_3+H]^+$ の m/z 300 から GTX5 と同定された。保持時間 11.2 分に m/z 316 で検出された Peak2 は $[M+Na]^+$ の m/z 418 および $[M-SO_3+H]^+$ の m/z 316 から GTX6 に、そして保持時間 16.7 分の Peak3 は $[M+Na]^+$ の m/z 434、 $[M+H]^+$ の m/z 412、 $[M-H_2O+H]^+$ の m/z 394、 $[M-SO_3+H]^+$ の m/z 332 および $[M-SO_3-H_2O+H]^+$ の m/z 314 のマススペクトルから GTX4、保持時間 21.5 分の Peak4 は $[M+Na]^+$ の m/z 434 および $[M-SO_3+H]^+$ の m/z 332 から GTX1 と判断された。

ネガティブモードによる C 群の LC/MS 分析によるマスクロマトグラムを図 7 とマススペクトルを図 8 に示す。C1,2 に関係した $[M-H]$ の m/z 474、 $[M-H_2O-H]$ の m/z 456 で検出された保持時間 9.2 分の Peak5 と 20.2 分の Peak7 は、脱水のマススペクトルを強く与える方を β エピマーの C2 とし、他方の成分を C1 と同定した。保持時間 10.6 分に m/z 490 にて認められた Peak6 は C3 の $[M-H]$ の m/z 490 によるものと考えた。

3-3) 毒化ムラサキイガイを用いた検討

3-3-1) 毒化ムラサキイガイに含まれる毒成分

平成 16 年 10 月 17 日に徳島県鳴門市北灘町沿岸で採取したムラサキイガイは、マウス毒性試験の結果から 28.4 MU/g の PSP を含有していることがわかった。また、その毒成分は HPLC の結果から、主成分として GTX4 および GTX5 がそれぞれ約 22~24% を占め、C2 および GTX1 が約 13%、STX および GTX3 が約 10% を占めていた(図 9)。

3-3-2) LC/MS による有毒成分の検出

B. 研究方法 3) LC/MS による PSP 一斉分析法の検討 3-3) 毒化ムラサキイガイを用いた検討 3-3-1) によって得られた、ムラサキイガイ粗毒抽出液(320 MU)を Bio-Gel P-2 クロマトグラフィーに附したところ、C 群が蒸留水で、GTX・STX 群が希酢酸で溶出された。

分離した GTX・STX 画分のマスクロマトグラムを図 10 に、ピークが検出された溶出時間である 15.5 分、19.7 分、23.8 分、28.0 分、30.1 分および 52.4 分のマススペクトルを図 11 に示す。これらの結果より、カラムの保持時間 15.5 分に m/z 300 および m/z 418 で検出されたピークは、GTX5 の $[M-SO_3+H]^+$ および $[M+K]^+$ 、19.7 分に m/z 316 および m/z 418 で検出されたピークは GTX3 の $[M-SO_3+H]^+$ および $[M+Na]^+$ 、23.8 分に m/z 332 および m/z 450 で検出されたピークは GTX4 の $[M-SO_3+H]^+$ および $[M+K]^+$ 、28.0 分に m/z 316 および

m/z 418 で検出されたピークは GTX2 の $[M-SO_3+H]^+$ および $[M+Na]^+$ 、30.1 分に m/z 332 および m/z 450 で検出されたピークは GTX1 の $[M-SO_3+H]^+$ および $[M+K]^+$ 、52.4 分に m/z 300 で検出されたピークは STX の $[M+H]^+$ と判断された。

D. 考察

本研究は、魚介類の安全性確保および国民の健康保護を目指し、PSP の高感度で迅速かつ簡便な LC/MS による一斉分析法の開発を行っている。

まず、分析法の開発に必要な PSP 成分を確保するために、PSP 産生渦鞭毛藻 *A. tamiyavanichii*、*A. catenella* および *G. catenatum* の大量藻培を行った。これらの有毒渦鞭毛藻は、他の PSP 保有生物からは確保し難い GTX5,6 等といった低毒性成分を著量に産生するため、これら成分の獲得には最適の試料となる。当該年度に充分量の培養藻体が確保されたことにより、次年度の研究が円滑にすすむと思われる。また、それら培養藻体に、希少な PSP 成分である GTX5 および 6 が大量に含まれていることが確認されたため、今後の分析用標準品としての活用が期待できる。一方、分担研究者により有毒二枚貝ならびに有毒ガニから PSP 成分を大量抽出し、各種クロマトグラフィーに供して PSP 精製毒を作成した。これにより得られた PSP 成分は、現在、国内において標準品として配布されているものに加え、国内未配布の dcSTX および

hySTX が含まれている。いずれの成分も次年度の分析法の開発のために充分な量を確保できた。

一方、得られた PSP 精製毒ならびに国内で配布されている 9 種の PSP 標準品を用いて、日立陰イオン交換樹脂カラム 3013 N カラムと Develosil RP-AQUEOUS-AR カラムを直列に配置し、LC/MS による分析法を検討した結果、日立 M-8000 を使用して、PSP17 成分の一括分析が実現した。本分析法は対象となる PSP 成分が 17 成分ではあるものの、LC-FLD 検出法と MS 分析法に有効で、かつ相互に比較検討と補完できる性能を併せ持った手法であり、その分析時間も 60 分以内であることから迅速な分析法であると思われる。しかしながら、検出感度と定量性の検討は充分ではなかったため、次年度は分析対象とする PSP 成分数を拡大させるとともに、検出感度および定量性の向上に重点を置き、研究に取り組む予定である。

E. 結論

本研究により、PSP17 成分の LC/MS による一括分析が実現した。本分析法は、LC-FLD 検出法と MS 分析法に有効で、かつ相互に比較検討と補完できる性能を併せ持った手法であり、その分析時間も 60 分以内であることから迅速な分析法であると言える。この成果をもとに、分析感度および定量性の向上を図ることにより、実用的な分析法として定着するものと思われる。また、

分析対象とする PSP 成分を拡大させ、有毒成分を網羅し得れば、PSP 検出のための公定法になり得るであろう。一方、本年度に得られた貝毒およびフグ毒関連成分は PSP-TTX 一斉検出法の検討に必要な不可欠であり、当該年度に分析法開発のための充分量の標準品が得られたことにより、次年度の研究の躍進が期待できる。

F.参考文献

Aversano, C. D., Eaglesham, G. K., Quilliam, M. A. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1024**, 155-164 (2004).

Hashimoto, T., Matsuoka, S., Yoshimatsu, S., Miki, K., Nishibori, N., Nishio, S., and Noguchi, T. First Paralytic Shellfish poison (PSP) Infestation of Bivalves Due to Toxic Dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii*, in the Southeast Coast of the Seto Inland Sea. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **43**, 1-5 (2002)

Hashimoto, S., Nishio, S., Nishibori, N., Yoshioka, S., and Noguchi, T. A new analytical method for gonyautoxins based on postcolumn HPLC. *Food Hyg. soc. Japan* **43**, 144-147 (2002).

Ito, K., Asakawa, M., Shida, Y., Miyazawa, K. Occurrence of paralytic

shellfish poison(PSP) in the starfish *Asterina pectinifera* collected from the Kure Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. *Toxicon* **41**, 291-295 (2003)

Jaime, E., Hummert, C., Hess, P., Luckas, B. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* **929**, 43-49 (2001)

Locke, S. J., Thlbault, P. Improvement in detection limits for the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish tissues using capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry and discontinuous buffer systems. *Anal. Chem.* **66**, 3436-3446 (1994)

厚生労働省監修. 食品衛生検査指針理化学編. 日本食品衛生協会. 東京. 673-680 (2005).

Negri, A., Stirling, D., Quilliam, M., Blackburn, S., Bolch, C., Eaglesham, G., Thomas, K., Walter, J., Willis, R. Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chem. Res. Toxicology* **16**, 1029-1033 (2004)

Nishio, S., Noguchi, T., Onoue, Maruyama, J., Hashimoto, K., and Seto, H. Isolation and properties of gonyautoxin-5, an extremely low toxic component of

paralytic shell poison. *Nippon Suisan Gakkaishi* **48**, 959-965 (1982)

Nishio, S. Occurrence of toxic oyster *Crassostrea gigas* infested with *Alexandrium tamiyavanichii* in the Seto Inland Sea, Japan. in “International Scientific Symposium on Marine Toxins and Marine Food Safety”. D. F Hwang, and Noguchi, T (ed). National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan, R.O.C., 78-86 (2002)

野口玉雄, 河野迪子, 上田要一, 橋本周久, 有毒ホタテガイからのまひ性貝毒の主成分 Gonyautoxin-2 の単離と諸性状. *日本化学会誌* **5**, 652-58 (1981)

Oshima, Y., Post-column derivatization HPLC methods for Paralytic Shellfish Poisons. in “Manual on Harmful Marine Microalgae”, G. M. Hallegraeff et al.(ed.). UNESCO. Paris, 81-94 (1995)

Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araujo, F., Lagos, N., Oshima, Y. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* **38**, 1689-1702 (2000)

G.健康危険情報

なし

H.研究発表

1.論文発表

Beppu, R., Nojima, K.; Tsuruda, S.; Gomez-Delan, G.; Barte-Quilantang, M.; Taniyama, S.; Sagara, T.; Nishio, S.; Takayama, H.; Miyazawa, K.; Asakawa, M. Occurrence of PSP-producing dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* in Bingo-Nada, the central coastal water of the Seto Inland Sea, Hiroshima Prefecture, Japan. *Marine Pollution Bulletin*, 2008; **56**(4): 758-763.

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. 西表島産イワスナギンチャク *Palythoa tuberculosa* の毒性について. *四国大学紀要*, 2008, **26**(B), 9-12.

2.学会発表

相良剛史. 中毒発生海域より分離した *Ostreopsis* sp.のパリトキシン様物質産生能 2008 年度日本水産学会春季大会ミニシンポジウム, 静岡, 3月27(2008).

相良剛史, 西尾幸郎, 西堀尚良, 橋本多美子, 吉松定昭, 浅川 学, 谷山茂人, 高谷智裕, 荒川 修. 西日本を中心とした有毒渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属および *Ostreopsis* 属の毒産性能と有毒成分. 2008 年度日本水産学会春季大会, 静岡, 3月27日 3月31日(2008).

西尾幸郎, 相良剛史, 西堀尚良, 橋本

多美子, 吉松定昭. LC/MS/MS による麻痺性貝毒分析. 2008 年度日本水産学会春季大会, 静岡, 3 月 27 日 3 月 31 日 (2008).

西堀尚良, 相良剛史, 西尾幸郎. *S. costatum* の増殖に伴う細胞内ポリアミン含量の変化. 2008 年度日本水産学会春季大会, 静岡, 3 月 27 日 3 月 31 日 (2008).

I. 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 香川県産 *Alexandrium tamiyavanichii*

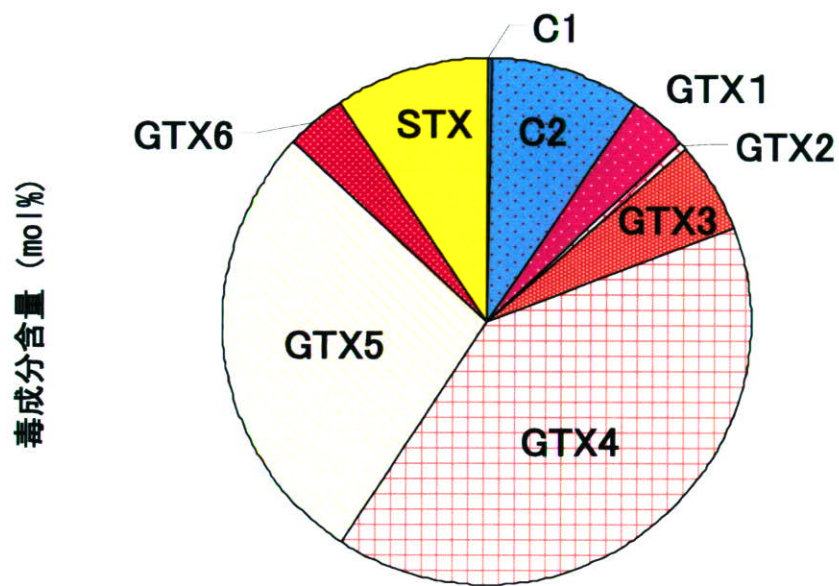


図2 香川県産 At041104 株の PSP 組成

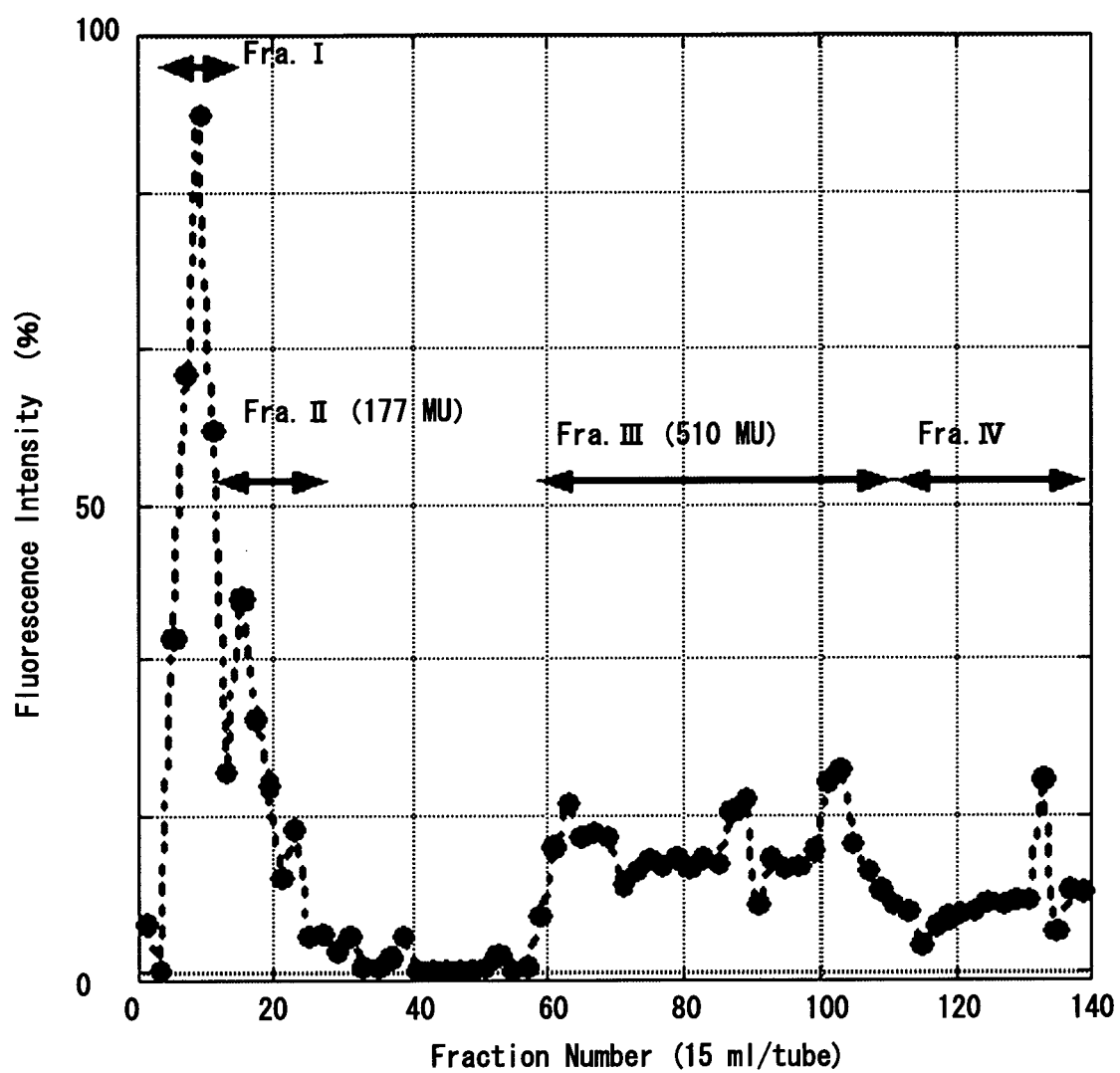


図3 YT-2 培養細胞から抽出された有毒画分の
Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィー結果

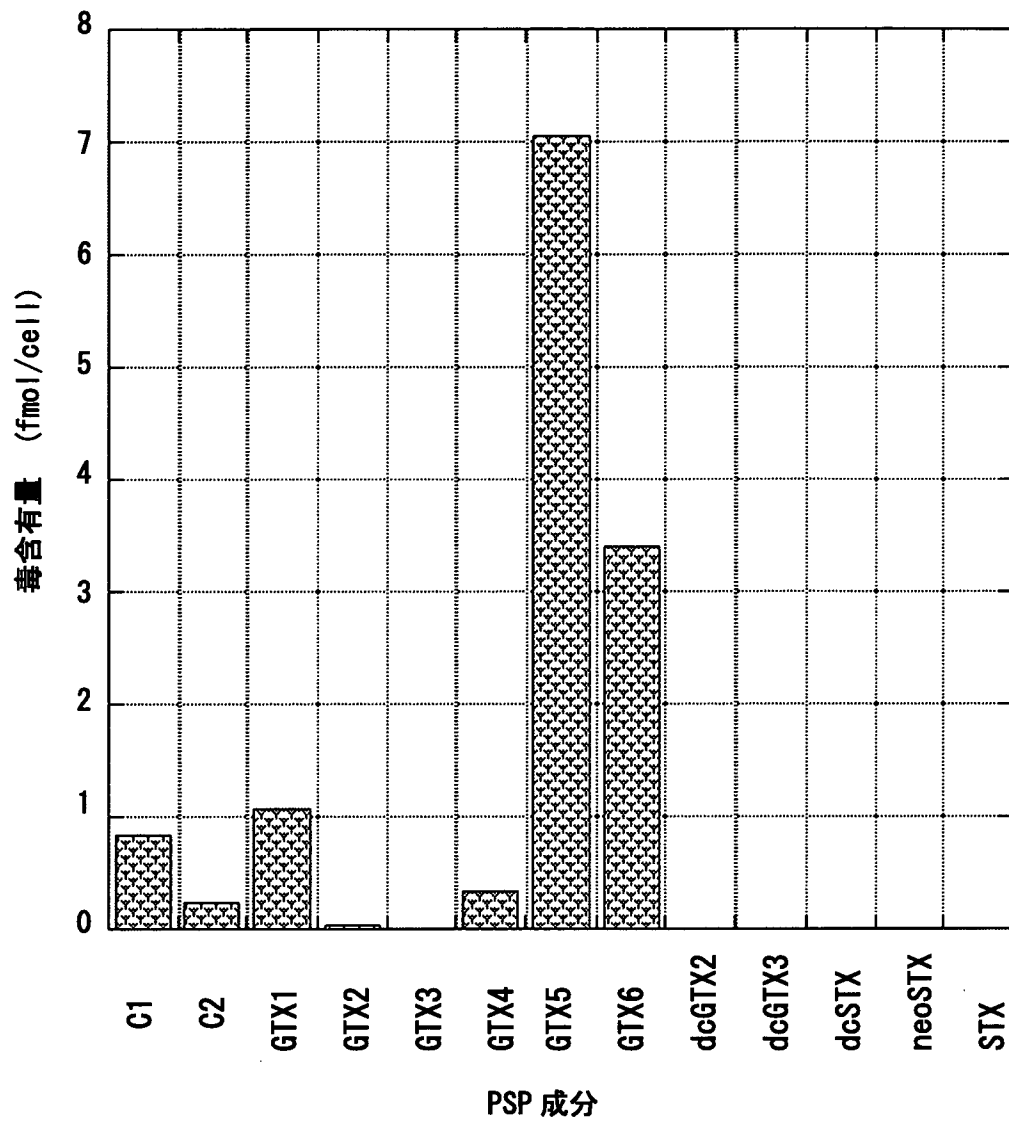


図4 YT-2 が産生する PSP 成分のモル濃度

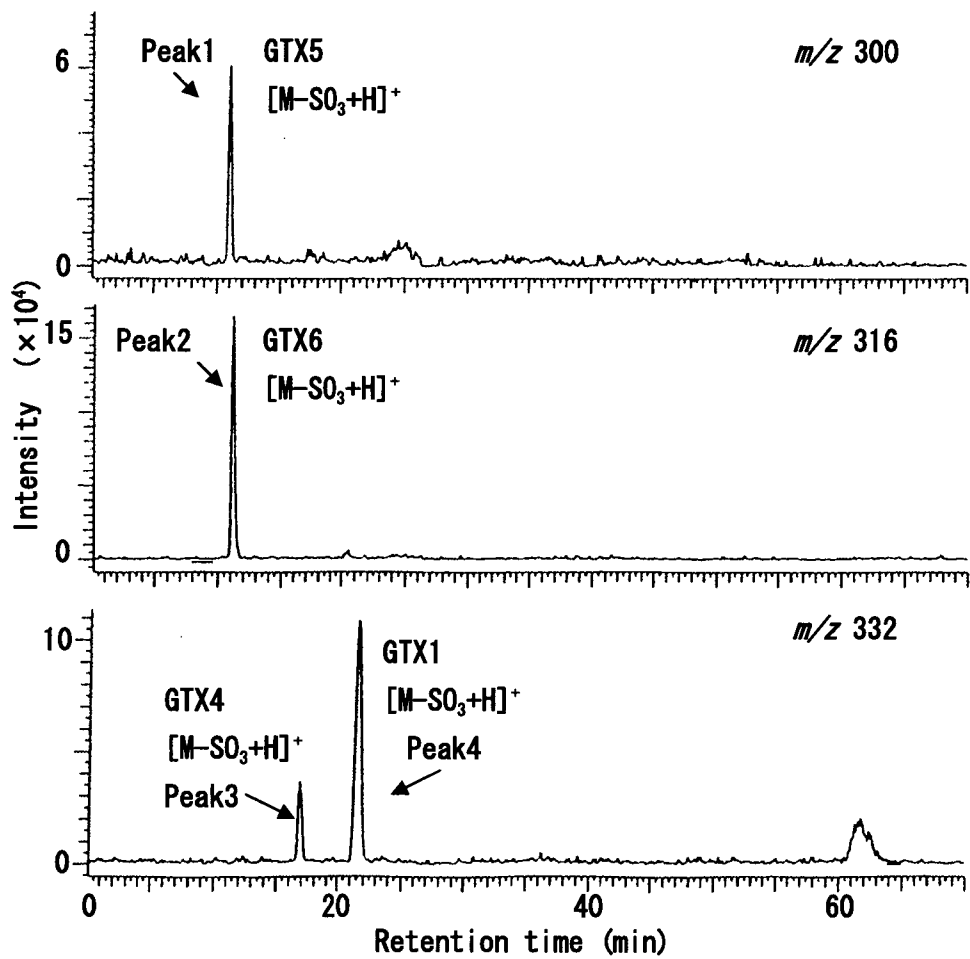


図 5 YT-2 株の Bio Gel GTX 画分のマスキロマトグラム

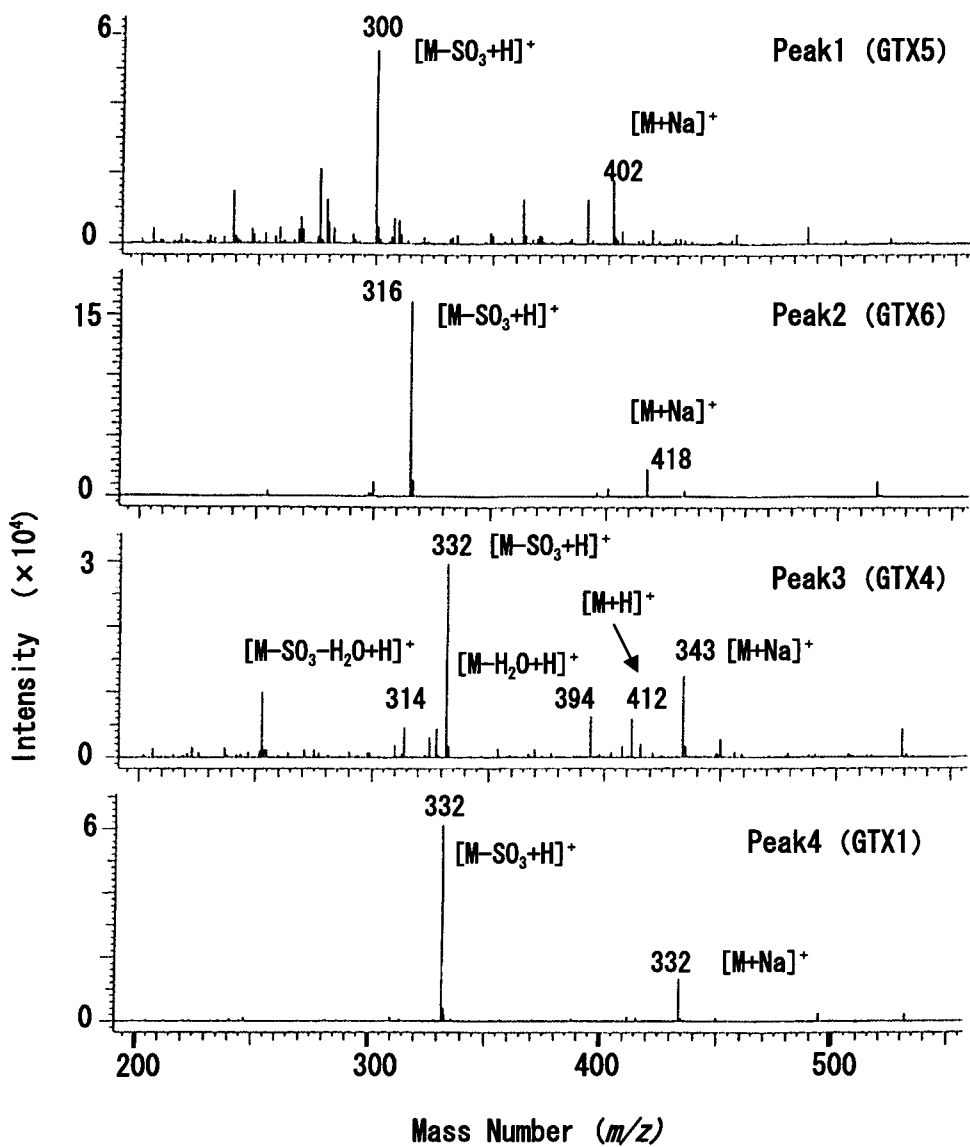


図 6 YT-2 株の Bio Gel GTX 画分のマスペクトル

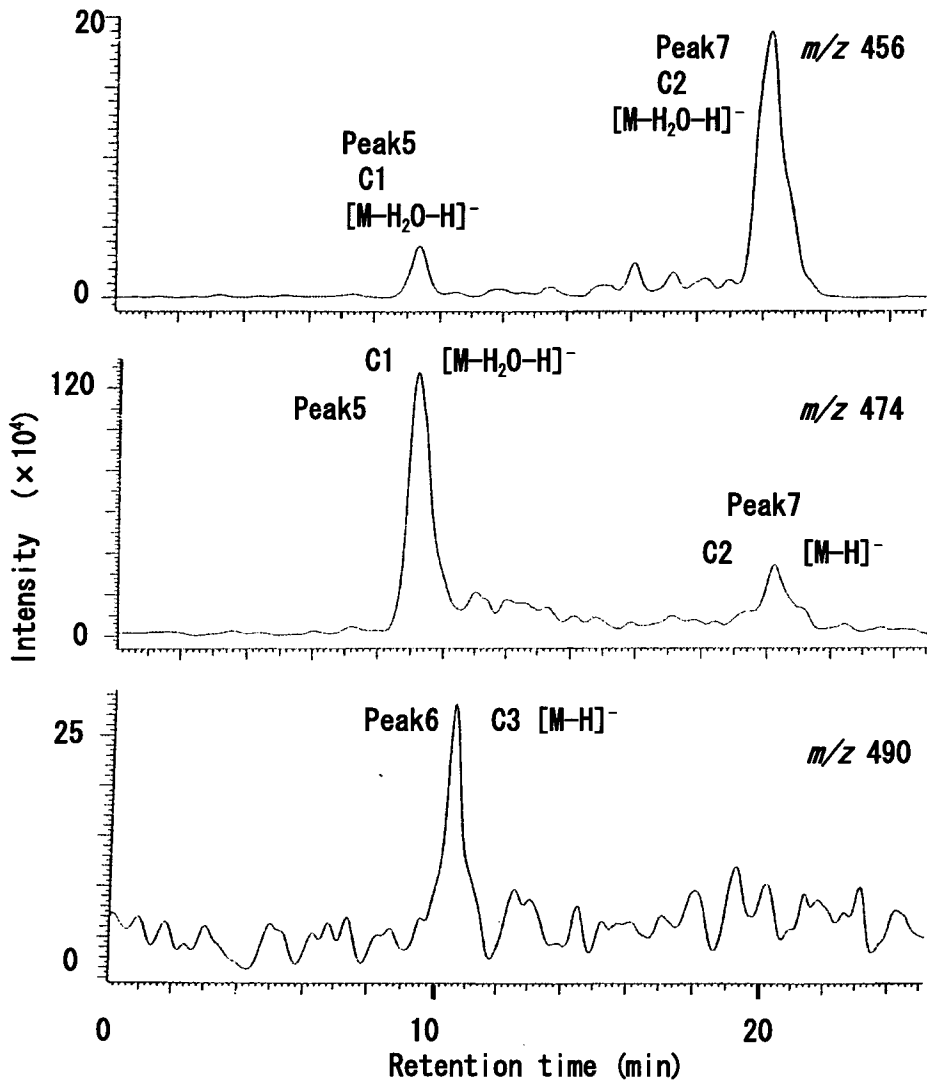


図 7 YT-2 株の Bio Gel C 画分のマスクロマトグラム