

図 8 YT-2 株の Bio Gel C 画分のマスペクトル

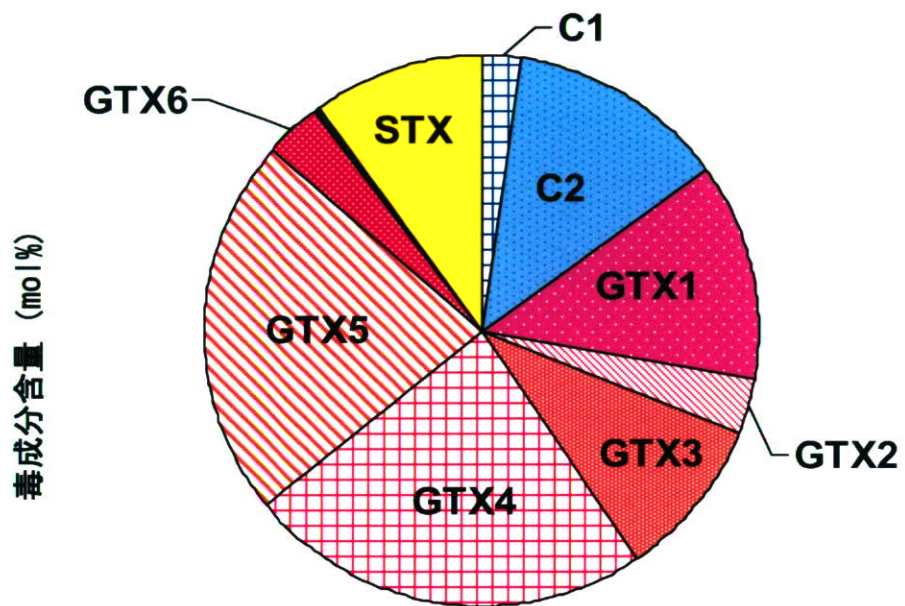


図 9 徳島県産ムラサキガイの PSP 組成

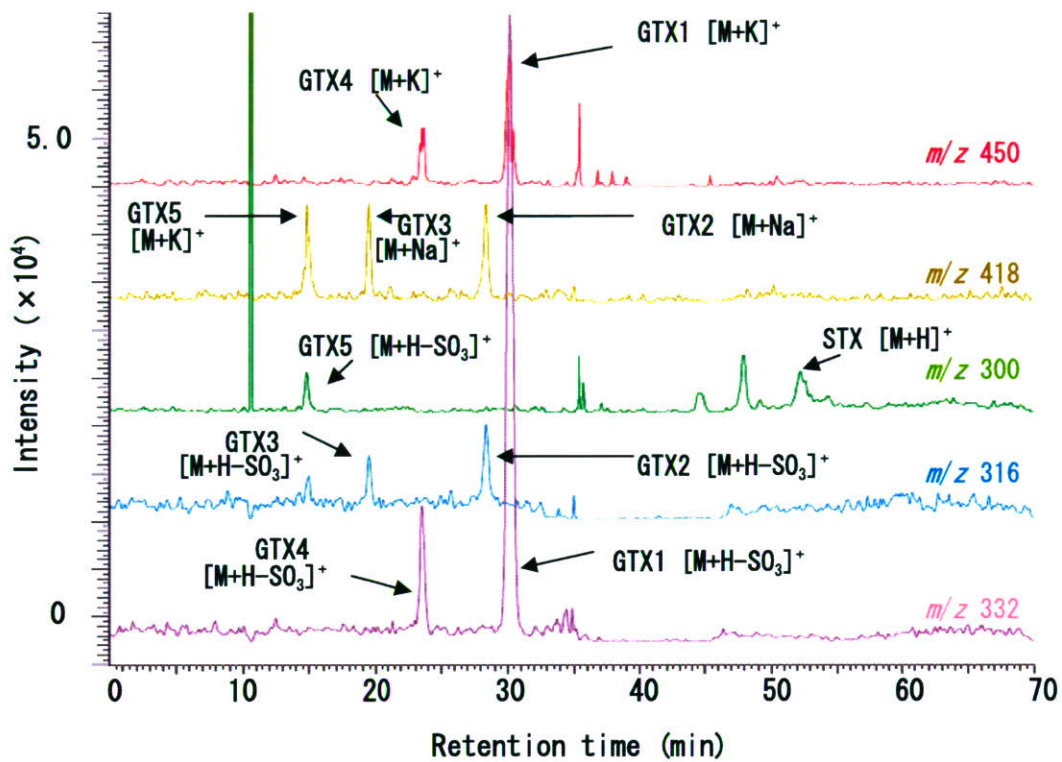


図 10 徳島県産ムラサキイガイ GTX・STX 画分の  
マスクロマトグラム

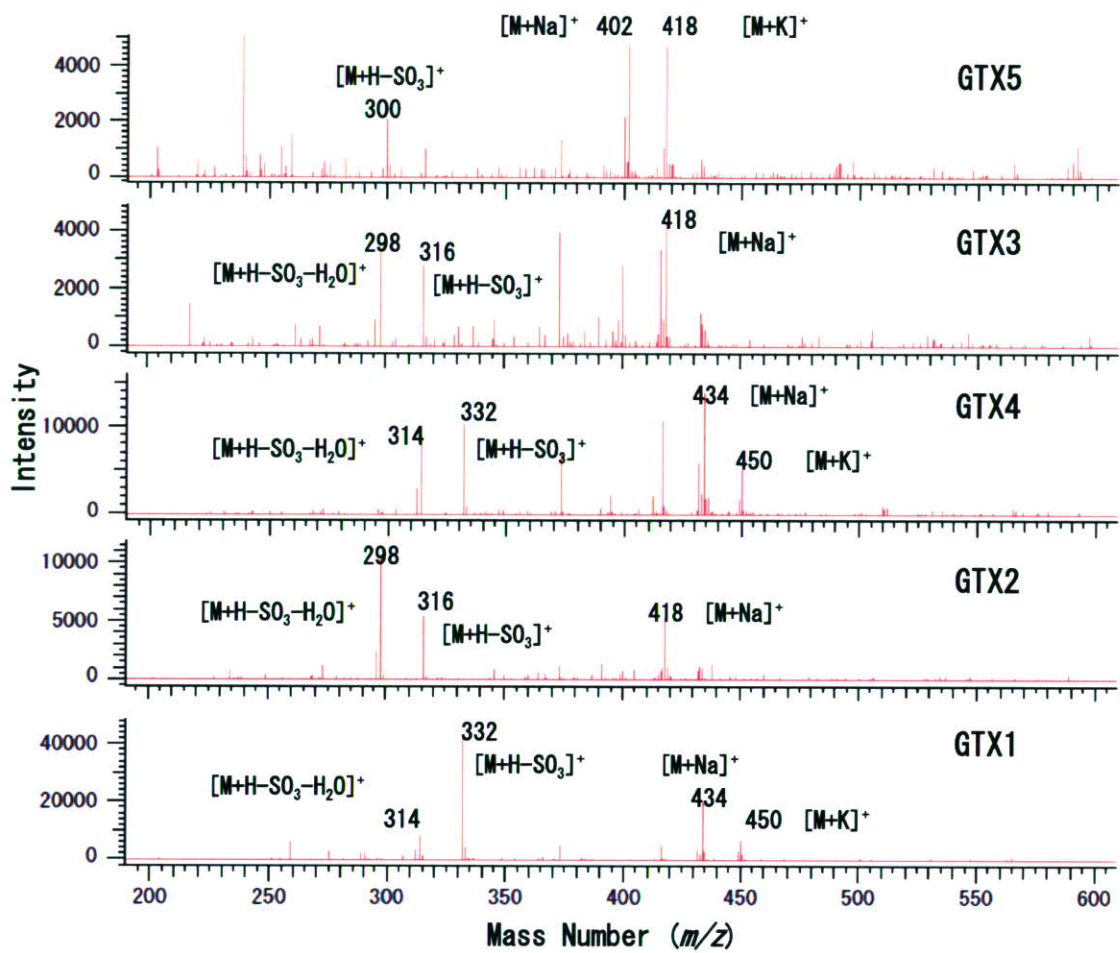


図 11 徳島県産ムラサキイガイ GTX・STX 画分の  
マススペクトル

**表1 培養条件**

<b>培地 :</b>	<b>ESM培地</b>
ろ過海水	<b>1000 ml</b>
土壌抽出液	<b>30 ml</b>
トリアミノメタン	<b>1 g</b>
硝酸ナトリウム	<b>120 mg</b>
リン酸水素二カリウム	<b>5 µg</b>
EDTA-Mn	<b>330 µg</b>
EDTA-Fe	<b>260 µg</b>
ビタミンB <sub>1</sub>	<b>100 µg</b>
ビタミンB <sub>12</sub>	<b>10 µg</b>
ビオチン	<b>1 µg</b>
pH	<b>7.8~8.0</b>
<b>光強度 :</b>	<b>40 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup></b>
<b>明暗周期 :</b>	<b>L:D=12 h:12 h</b>
<b>培養温度 :</b>	<b>20°C</b>

分担研究報告書

貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究

分担研究者 谷山茂人 長崎大学大学院生産科学研究科 助教

研究要旨

当該研究の大目的である高速液体クロマトグラフ質量分析装置（LC-MS）による麻痺性貝毒（Paralytic Shellfish Poison: PSP）成分の一斉分析を目指した絶対的PSP定量法の開発に資するため、有毒魚介類からサキシトキシン（saxitoxin: STX）群ならびにゴニオトキシン（gonyautoxin: GTX）群の精製を試みた。

まず、南西諸島に生息する毒ガニから粗毒を大量抽出後、脱脂、活性炭処理およびBio-Gel P-2カラム、Bio-Rex 70カラム（H<sup>+</sup>型）に付し、STX群を精製した。最終的に、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析により単一の2成分が得られ、これらは国内で供給されていないデカルバモイル STX（decarbamoylSTX: dcSTX）（総毒量 1,000 MU）およびヒドロキシ STX（hydroxySTX: hySTX）（総毒量 1,100 MU）であった。

次いで、北海道噴火湾で毒化した二枚貝を毒ガニ試料と同様に精製したところ、総毒量 4,280 MU の GTX2 の単一毒が分画された。一方、GTX1~4（総毒量 17,100 MU）、GTX1~3（総毒量 6,700 MU）および GTX1,4（総毒量 1,330 MU）の部分精製毒も合わせて得られた。

## A. 研究目的

当該研究の大目的である高速液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-MS) による麻痺性貝毒 (PSP) 成分の一斉分析を目指した絶対的 PSP 定量法の開発には、その全成分の標準品の確保が必要不可欠である。現在、国内における PSP 標準品は農林水産省主導で配布されている。これまでに知られている PSP 成分は約 30 種類にも及ぶものの、国内で配布されている PSP 成分は protogonyautoxin (PX) 1,2 (C-toxin (C) 1,2)、gonyautoxin ( GTX ) 1 ~ 4、decarbamoyl GTX ( dcGTX ) 2,3 および neosaxitoxin (neoSTX) の 9 種類のみで、それら配布量にも事実上の制限がある。また、毒性が非常に強く化学兵器に指定されている STX や有毒二枚貝等からの検出頻度が高い hydroxySTX (hySTX)、加熱処理により硫酸基 (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) が容易に離脱して STX、neoSTX に変換する GTX<sub>5,6</sub> などの成分は、これに含まれていない。そこで、当該事業研究の大目的を達成すべく、当該年度は主として有毒魚介類からの STX 群ならびに GTX 群の精製を試みた。

## B. 研究方法

### 1) 試料

#### 1-1) 毒ガニ

1999 年 4~7 月に沖縄県石垣島で採取したツブヒラアシオウギガニ *Platypodia granulosa* 5 個体 (37.5 g) を試料 (試料 A) とし、STX 群の精製に用いた。試料は入手後、直ちに凍結して以下の試験に供するまで -20℃ で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

#### 1-2) 有毒二枚貝

2004 年 6 月に北海道噴火湾で採取されたホタテガイ *Patinopecten yessoensis* の中腸腺 500 g (試料 B) ならびに 3,500 g (試料 C) を試料とし、GTX 群の精製に供した。試料は入手後、直ちに凍結して以下の試験に供するまで -20℃ で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

### 2) PSP 精製毒の調製

#### 2-1) STX 群の抽出と精製

STX 群の抽出と精製は、マウス毒性を指標として、Arakawa ら (1995) の方法に準じた。

試料 A から 3 倍量の 80%メタノール (pH 2.0) で毒を大量抽出し、ジクロロメタンで脱脂した。得られた粗抽出液につき、活性炭処理後、Bio-Gel P-2 カラム (φ 50×330 mm, Bio-Rad Laboratories) に付し、毒を吸着させ、蒸留水で水洗したのち、0.15 M 酢酸により溶出させた。再度、この溶出画分を Bio-Gel P-2 カラム (φ 28×480 mm, Bio-Rad Laboratories) に供し、水洗後、0.05 M 酢酸により 120 画分を分取し、HPLC 分析を行った。

次に、HPLC 分析より有毒であった画分 60~69 (Fr. I) および画分 73~120 (Fr. II) を Bio-Rex 70 カラム (H<sup>+</sup>型、φ 8×940 mm, Bio-Rad Laboratories) に付し、0~1 M 酢酸を用いるリニアグラジエント法により、80 画分を分取後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析に供した。

#### 2-2) GTX 群の抽出と精製

GTX 群の抽出と精製は、マウス毒性を

指標として、野口ら（1981）の方法に準拠して行った。

まず、試料 A または試料 B から 1%酢酸-20%エタノールで毒を大量抽出した。次に、B. 研究方法 2-2) と同様に脱脂、活性炭処理後、Bio Gel P-2 カラムクロマトグラフィー（ $\phi$  20×360 mm、Bio-Rad Laboratories）および Bio-Rex70 カラムクロマトグラフィー（H<sup>+</sup>型、 $\phi$  20×250 mm、Bio-Rad Laboratories）供し、HPLC にて有毒成分を分析した。

### 3) マウス毒性試験

本試験は、食品衛生検査指針理化学編 PSP 検査法（厚生省, 1993）に従った。

試験には ddY 系の雄で体重が 19~21 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、試験液 1 ml をマウスの腹腔内に投与し、死に至るまでの時間を秒単位で計測した。毒量の算出には PSP の致死時間-MU 換算表を用いた。なお、PSP の 1 MU は体重 20 g のマウス 1 匹を 15 分間で死亡させる毒量と定義されている。

### 4) HPLC 分析

#### 4-1) STX 群の精製毒の分析

本分析は Arakawa ら（1994）の方法に従い、Waters LC Module-I 装置にて行った。

カラムには Lichro CART superspher RP-18 (e) ( $\phi$  4.6×250 mm、Merck) を、移動相には 2 mM ヘプタスルホン酸を含む 4%アセトニトリル-30 mM リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.3) を用い、その流速を 0.8 ml/min とした。また、有毒成分

の蛍光化およびそれを促進させるための反応液として、50 mM 過ヨウ素酸と 0.2 M 水酸化カリウム-1 M ギ酸アンモニウム-50%ホルムアミド混合液（蛍光物質安定剤）を 0.4 ml/min ずつ流した。反応液をカラム通過後の緩衝液に混合させ、恒温槽内において 60°C で 1.5 分間加熱して蛍光化させ、その強度を蛍光検出器で励起波長 336 nm、蛍光波長 392 nm で測定した。

#### 4-2) GTX 群の精製毒の分析

本分析は Asakawa ら（1993, 1995）の方法に準拠し、JASCO HPLC system で行った。

カラムには、Mightily RP-18 (e) GP ( $\phi$  4.6×250 mm、Cica) を、移動相には 2 mM ヘプタスルホン酸含有 10 mM リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.3) を検出試薬に酸化剤として 50 mM 過ヨウ素酸を用いた。蛍光物質安定剤ならびに検出条件は B. 研究方法 4-1) と同様とした。

## C. 研究結果

### 1) STX 群の精製毒

試料 A から得られた粗毒（総毒量 37,500 MU）を脱脂および活性炭処理に付したところ、総毒量 23,300 MU が回収された。次いで、Bio-Gel P-2 クロマトグラフィーにおいて、総毒量 16,600 MU の有毒画分を分取し、さらに Bio-Rex 70 カラムクロマトグラフィーにて分画された Fr. I に 1,000 MU、Fr. II に 1,100 MU の総毒量を示す精製物質が得られ、HPLC 分析から前者は dcSTX と、後者は hySTX と一致する



単一のピークが検出された (図 1)。

よって、Fr. I を dcSTX、Fr. II を hySTX の精製毒とした。

## 2) GTX 群の精製毒

まず試料 A から総毒量 35,200 MU の粗毒を得て、活性炭処理ならびに Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーに付し、総毒量 2,300MU の有毒画分を回収した。さらに、Bio-Rex 70 カラムクロマトグラフィーにより画分 17 に 3,590 MU、画分 18 に 4,790 MU、画分 19 に 1,040 MU の総毒量が得られた。一方、HPLC 分析において、いずれの画分からも GTX1~4 が検出され (図 2)、画分 17 の主成分は GTX1 (46 mol%)、画分 18 と 19 は GTX2 (それぞれ 50 mol%、75 mol%) が主成分であった (図 3)

他方、試料 B からは最終的に、Bio-Rex 70 カラムクロマトグラフィーにて溶出された画分 3~9 に総毒量 29,400 MU を得た。画分 3 は主成分として GTX1 (62 mol%) が、副成分に GTX4 (28 mol%) が含まれていた (図 4、図 5)。画分 4~6 については、主成分はやはり GTX1 であったが、いずれも GTX4 は 2 mol% 以下を示し、GTX2 または GTX3 が副成分であった (図 4、図 6)。一方、画分 7 では GTX2 が 94 mol% を占め、わずかに GTX1,3 が含まれていた (図 4、図 7)。さらに、画分 8 と 9 については 98 mol% 以上が GTX であった (図 4、図 8)。従って、画分 3 を GTX1,4 (総毒量 1,330 MU)、画分 4~6 を合一して GTX1~4 (総毒量 17,100 MU)、画分 7 を GTX1~3 (総毒量 6,700 MU) の部分精製毒、画分 8 と 9 を合一して GTX2

(総毒量 4,280 MU) の精製毒とした。

## D. 考察

### 1) STX 群の精製毒

現在、STX は国際条約で化学兵器に指定されている。わが国でも 1995 年に制定された「化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律」において、STX の製造、保管、譲渡などが制限されており、事実上使用が禁止されている。そこで、当該研究では国内で供給されていない STX 群のうち、dcSTX および hySTX の精製を試みた。公定法で 510~3,900 MU/g の毒力を示したツブヒラアシオウギガニの合一試料 37.5 g から dcSTX (総毒量 1,000 MU) および hySTX (総毒量 1,100 MU) の精製に成功し、当該事業研究の大目的である LC-MS による絶対的 PSP 定量法 (PSP 一斉分析法) の開発に際し、いずれも十分な量であった。一方で、これらの成分は毒化した食用二枚貝等からの検出例が多いこと、将来的に PSP 検査が LC-MS などの化学分析に移行することなどを踏まえ、現在、国内で配布されている neoSTX 以外の dcSTX や hySTX といった STX 群標準品を確保すべきであろう。

また、国内で重要な食用二枚貝であるホタテガイなどが毒化すると、その主成分として GTX 群が検出される例が極めて多い。わが国では GTX 群に関して 6 成分 (GTX1~4、dcGTX2,3) が供給されている。しかしながら、その供給量には限りがあるのが現状となっており、やはり将来的に PSP 検査法が化学分析に移行した場合、供給すべき GTX 群標準品の成分の

拡大と供給量の増加が見込まれる。本分担研究では、GTX 群の単一精製毒は GTX2 (総毒量 4280 MU) のみであったが、GTX1~4 が混在した総毒量 34,500 MU の部分精製毒も得られており、今後、GTX 群標準品の作製が期待される貴重な試料といえる。

#### E. 結論

国内で供給されていない dcSTX と hySTX につき、それぞれ単一毒として総毒量 1,000 MU、総毒量 1,100 MU を精製した。

総毒量 4,280 MU の単一な GTX2 の精製毒を調製した。

GTX1~4 の標準品作製に期待される総毒量 34,500 MU の部分精製毒を得た。

#### F. 参考文献

Arakawa, O., Noguchi, T., Shida, Y., Onoue, Y. Occurrence of carbamoyl-N-hydroxy derivatives of saxitoxin and neosaxitoxin in a xanthid crab *Zosimus aeneus*. *Toxicon* 32, 175-183 (1994).

Arakawa, O., Noguchi, T., Onoue, Y. Paralytic shellfish toxin profiles of xanthid crab *Zosimus aeneus* and *Atergatis floridus* collected on reefs of Ishigaki Island. *Fish. Sci.* 61, 659-662 (1995).

Asakawa, M., Miyazawa, K., Noguchi, T. Studies on paralytic shellfish poison (PSP) toxification of bivalves, in association

with appearance of *Alexandrium tamarense*, in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 34, 50-54 (1993).

Asakawa, M., Miyazawa, K., Takayama, H., Noguchi, T. Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* as the source of paralytic shellfish poison (PSP) contained in bivalves from Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. *Toxicon* 33, 691-697 (1995).

厚生省生活衛生局監修. 麻痺性貝毒. 食品衛生検査指針理化学編, 日本食品衛生協会. 東京, pp. 300-305 (1993).

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麻痺性貝毒の主成分 Gonyautoxin-2 の単離と諸症状, 日化誌 5, 652-658 (1981).

#### G. 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*, in press.

##### 2. 学会発表

1) 国際学会

Taniyama, S., Asakawa, M., Takatani, T., Arakawa, O. Occurrence of food poisoning incidents due to ingestion of marine boxfish, along with their toxicity in the western Japan. The 6th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, Nagasaki, Japan (2007).

Ngy, L., Shibano, K., Yu, C. F., Taniyama, S., Takatani, T. Arakawa, O. Toxicity assessment for pufferfishes from Cambodian waters. The 6th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, Nagasaki, Japan (2007).

2) 国内学会

鶴田慎太郎, 菊池太佑, Delan, G. G., 下村通誉, 谷山茂人, 浅川 学. フィリピン産オウギガニ科カニ *Demania cultripes* の毒性と毒成分について. 平成 20 年度日本水産学会春季大会, 静岡 (2008).

惠本 佑, 池田光壺, 谷山茂人, 高谷智裕, 荒川 修. コモンフグにおける組織別毒性の周年変化と血液を介した毒の移行. 平成 20 年度日本水産学会春季大会, 清水 (2008).

谷山茂人, 諫見悠太, 松本拓也, 長島裕二, 高谷智裕, 荒川 修. 長崎市で発生した小型巻貝中毒に関連して一原因種キンシバイの毒性と毒成分一. 平成 20 年度日本水産学会春季大会,

清水 (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. 平成 20 年度日本水産学会春季大会, 清水 (2008).

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

なし

3. その他

なし

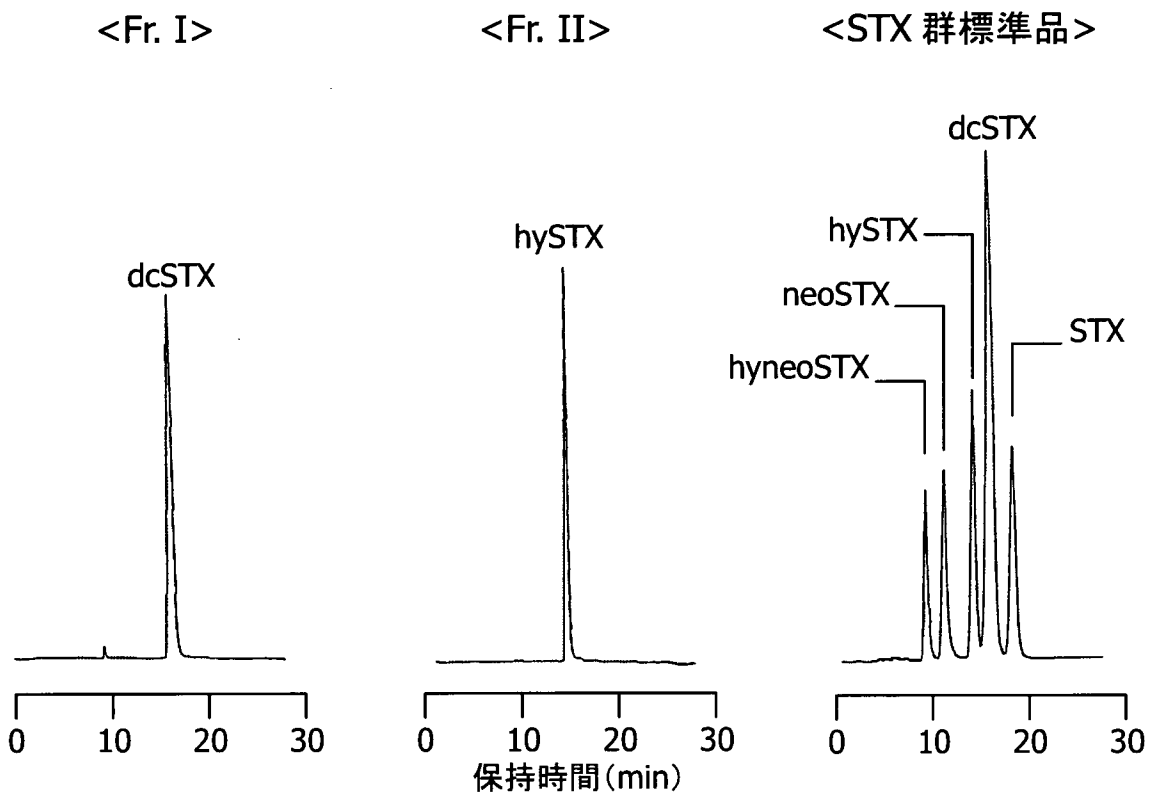
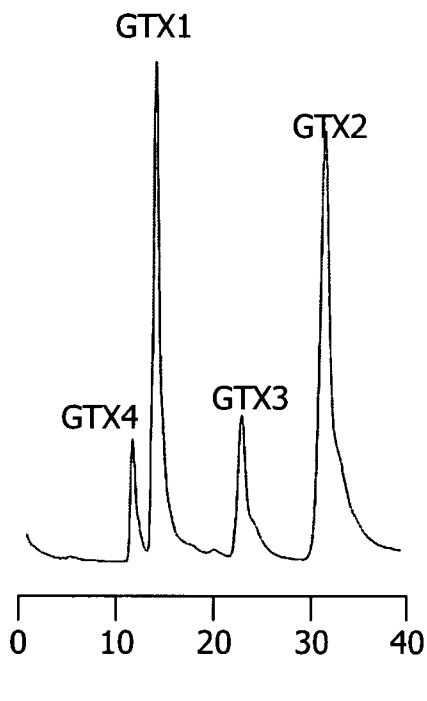
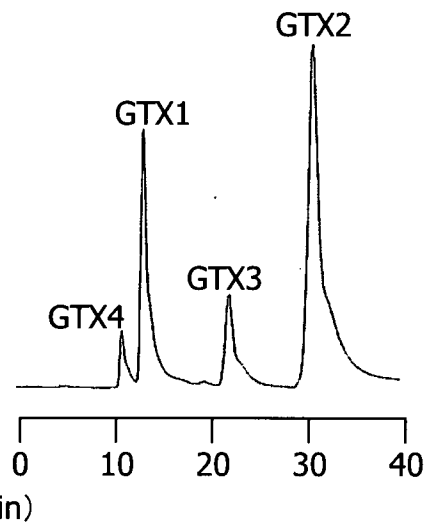


図1 Fr. I、Fr. IIおよびSTX群標準品のHPLCクロマトグラム

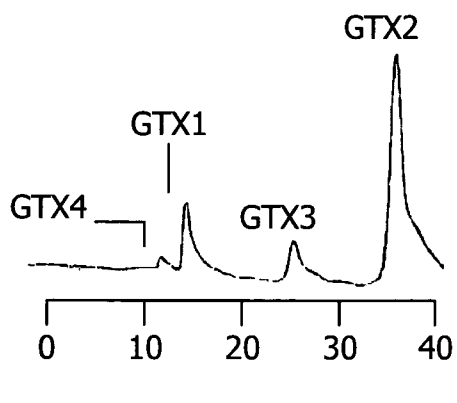
<画分 17>



<画分 18>



<画分 19>



<GTX 群標準品>

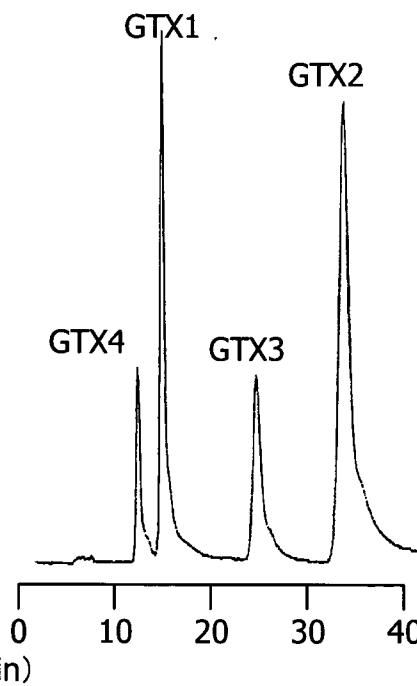


図 2 試料 B の Fr. 17~19 および GTX 群標準品の HPLC クロマトグラム

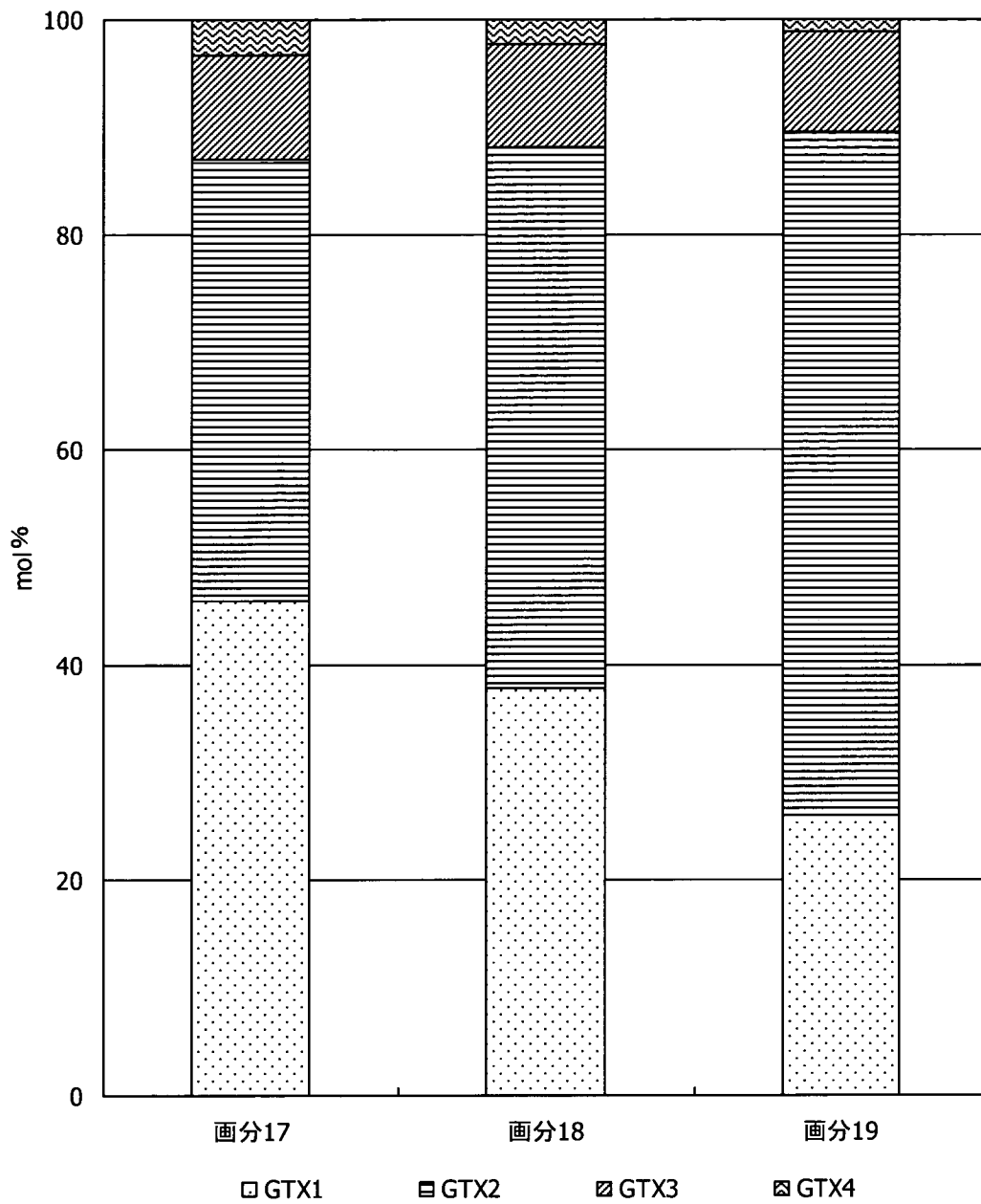


図3 試料Bの画分17~19のGTX群の組成

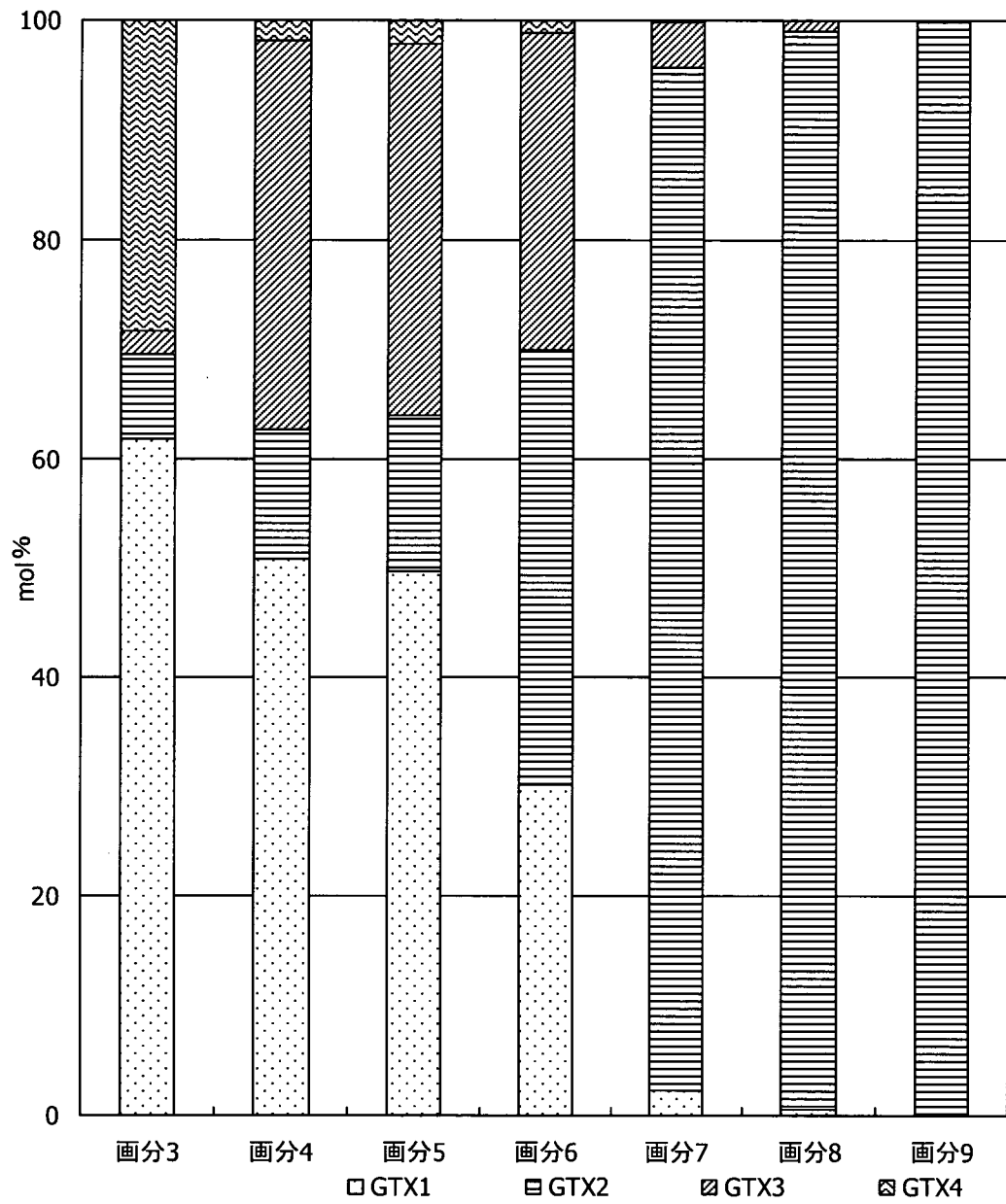


図4 試料Cの画分3~9のGTX群の組成

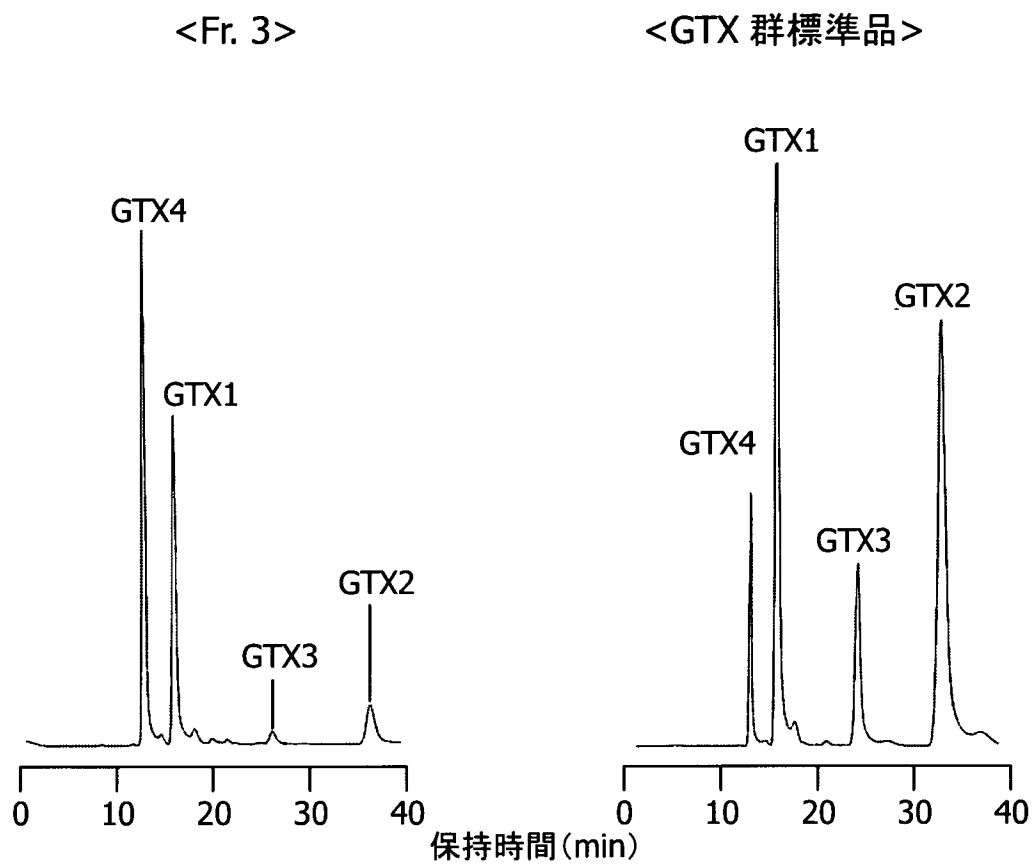


図5 試料CのFr. 3とGTX群標準品のHPLCクロマトグラム



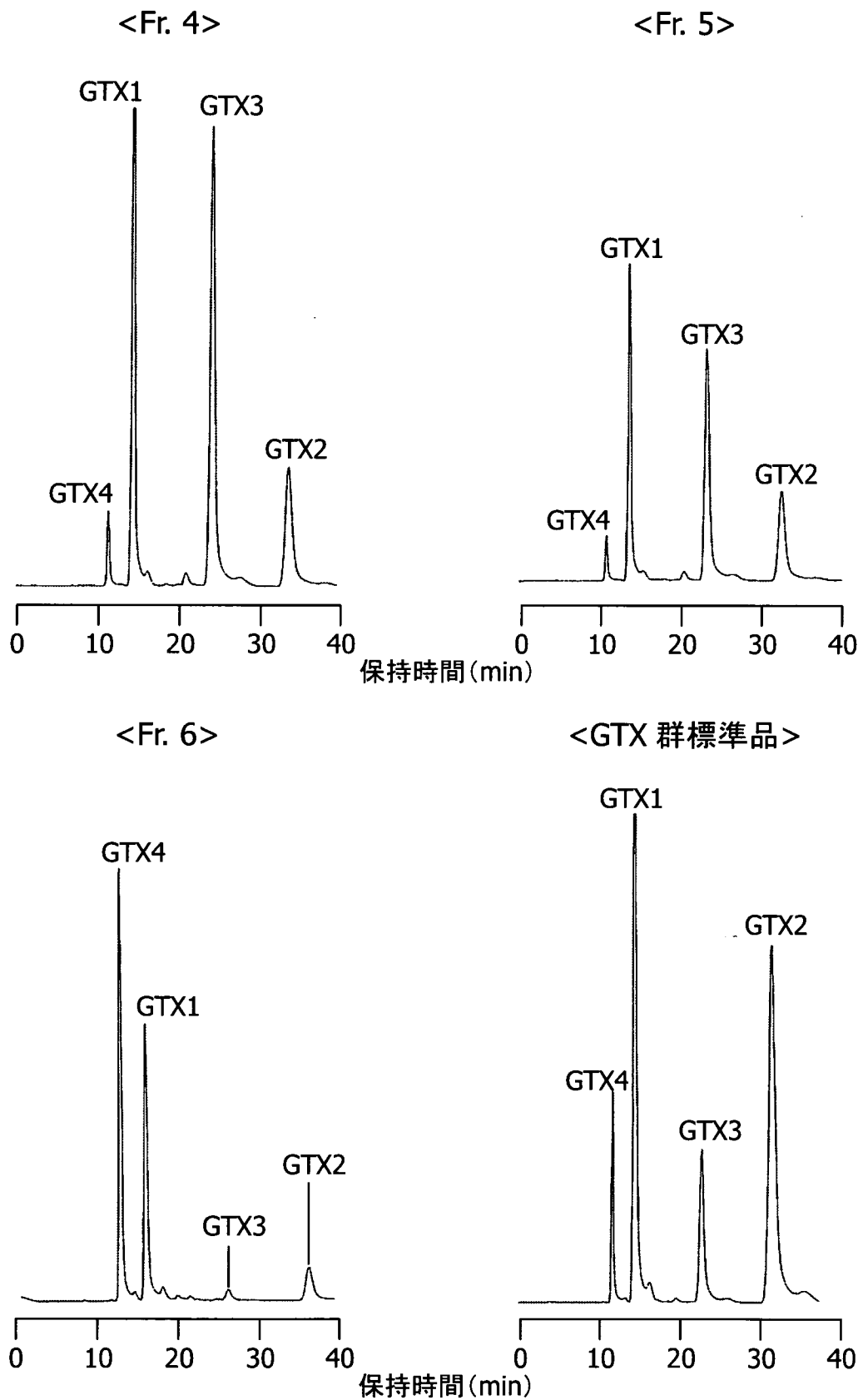


図6 試料CのFr. 4~6とGTX群標準品のHPLCクロマトグラム

<Fr. 7>

<GTX 群標準品>

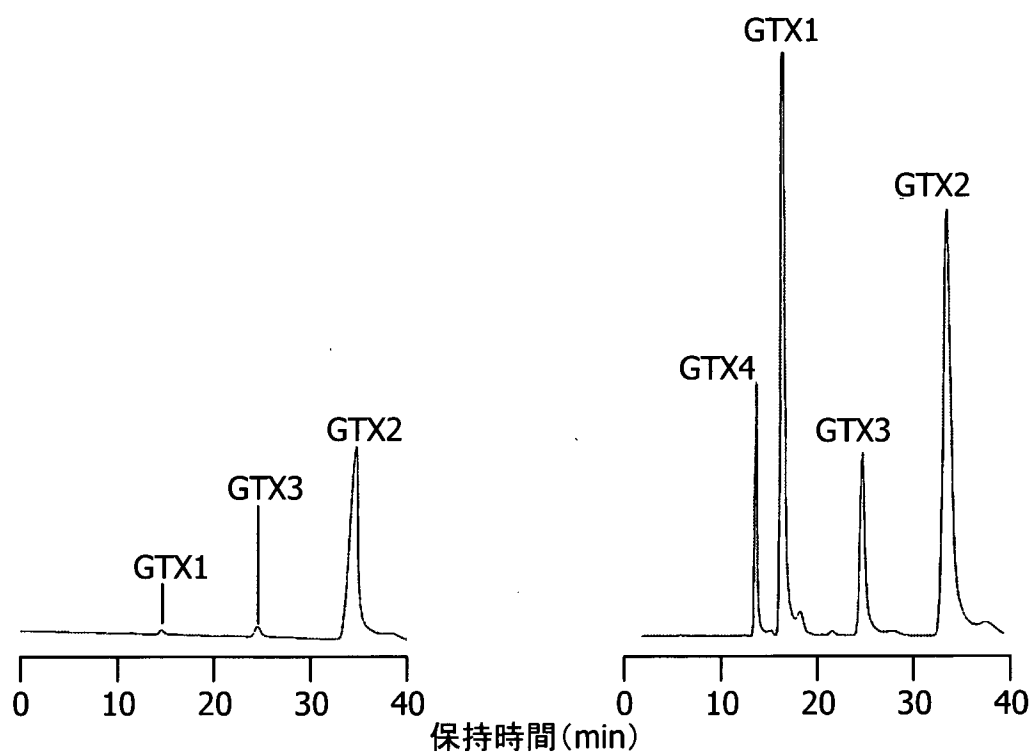


図7 試料CのFr. 7とGTX群標準品のHPLCクロマトグラム

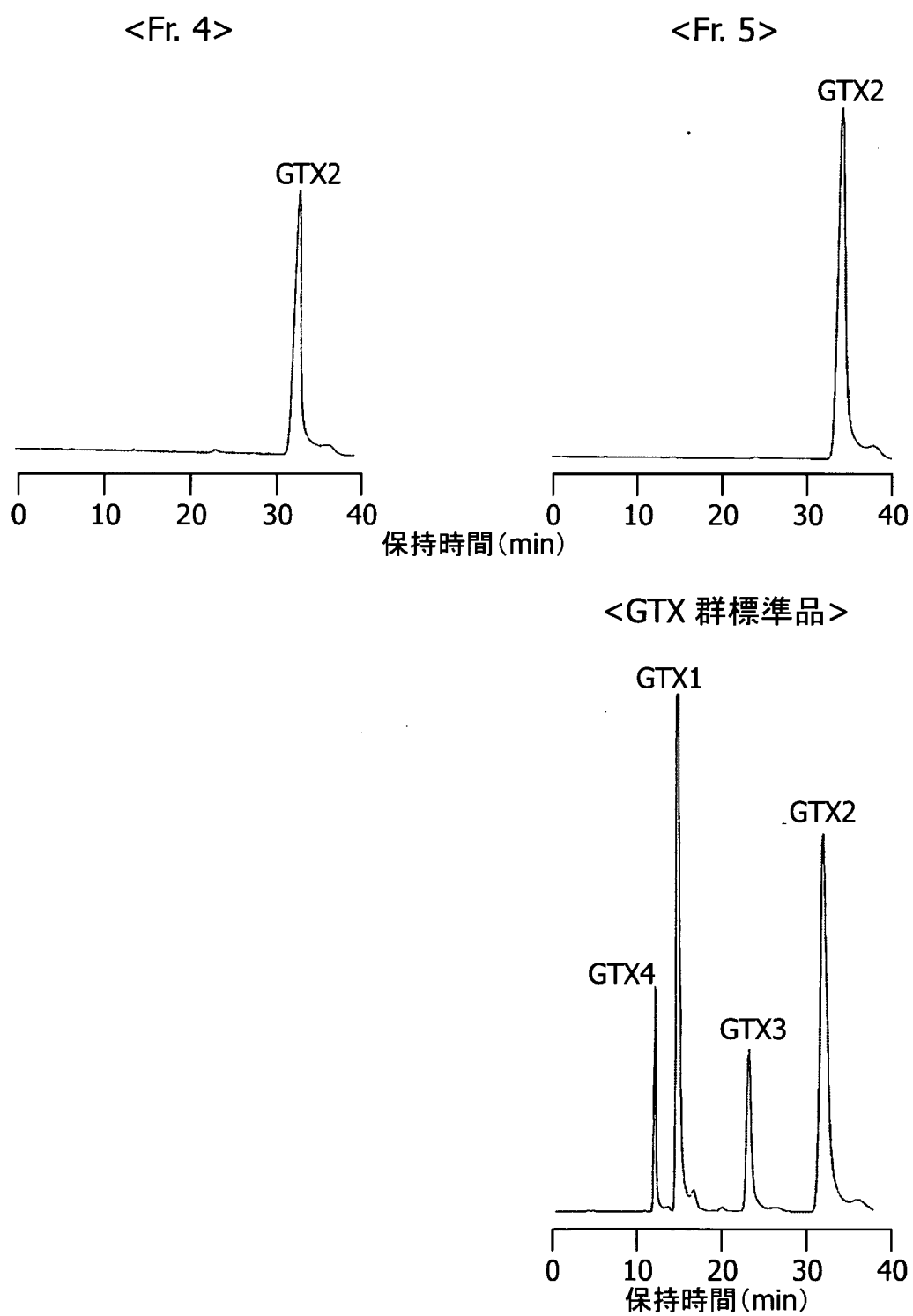


図 8 試料 C の Fr. 8、9 と GTX 群標準品の HPLC クロマトグラム

分担研究報告書

貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究

分担研究者 高谷智裕 長崎大学水産学部 准教授

研究要旨

本研究では、LC/MS による PSP 一斉分析法の開発の一環として、水産物中に含まれる TTX およびその誘導体も同時に分離分析することを目的としていることから、本年度は分離分析に用いる TTX および TTX 誘導体の精製を行った。

ニホンイモリ *Cynops pyrrhogaster* は TTX のほか数種の誘導体を保有することがこれまで報告されていることから、ニホンイモリを材料として TTX および TTX 誘導体の精製を試みた。

2007 年 5 月に福江島で採取したニホンイモリ 200 個体（計 800 g）から毒を 1%酢酸 80%エタノールで抽出し、脱脂後、活性炭及び Bio-Gel P-2 カラム処理に供した。TTX 誘導体を含む画分を LC/MS でモニターしつつ、Bio-Gel P-2、次いで、Bio-Rex 70(H<sup>+</sup>)カラムを用いるクロマトグラフィーに繰り返し付し、得られた各誘導体につき、LC/MS および <sup>1</sup>H-NMR 分析により同定ないし構造解析を行った。

試料の粗抽出液 63,000 MU から、最終的に TTX 誘導体 6 成分(Bio-Rex 70 カラムからの溶出順 T-I～VI と仮称)が得られた。<sup>1</sup>H-NMR 分析の結果、T-II(16,600 MU)、T-III(931 MU)、T-V (252 MU) は、それぞれ常在成分である TTX、6-*epi*TTX、4-*epi*TTX と同定された。一方、微小成分の T-I と T-IV は LC/MS における MH<sup>+</sup> の *m/z* と保持時間から、ニホンイモリでは未検出の 11-*oxo*TTX 及び 11-*deoxy*TTX と推察された。他方、T-VI は 4,9-*anhydro*-6-*epi*TTX によく似た <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを与えたが、同スペクトル中、11-CH<sub>2</sub> に代わって高磁場領域に CH<sub>3</sub> のシグナルが見られたことから、本成分を新規誘導体 4,9-*anhydro*-6-*epi*-11-*deoxy*TTX と推定した。