

いても、同様に200 MU (回収率10%), 20 MU (回収率1%), 400 MU (回収率20%), 200 MU (10%)の毒力を示し、さらに1%酢酸-80%メタノールで再度溶出を試みたが、その溶出面分の毒力は20 MU未満 (回収率1%未満)であった。一方、1-ブタノール画分 (3g 試料相当量/ml)も水画分と同様、それぞれ160 MU (回収率10%), 20 MU (回収率1%), 320 MU未満 (13%未満), 160 MU (回収率10%), 20 MU (回収率1%)であった (表1)。

次いで、OASIS MAX 6 cc ミニカラムでは、水画

表1 OASIS MAX 3 cc ミニカラムによる固相抽出段階における毒力と回収率

試験液	非吸着画分	2%アンモニア水洗浄画分	10%メタノール洗浄画分	1%酢酸-80%メタノール洗浄画分 (1回目)	1%酢酸-80%メタノール洗浄画分 (2回目)
粗抽出液	毒量 (MU) 80 回収率 (%) 5	20 1	<200 <13	100 6	—
水画分	毒量 (MU) 200 回収率 (%) 10	20 1	400 20	200 10	<20 <1
1-ブタノール画分	毒量 (MU) 160 回収率 (%) 10	20 1	<320 <20	160 10	20 <1

分において、OASIS MAX 3 cc ミニカラムの場合と同様にそれぞれ600 MU未満, 350 MU, 2,600 MU, 2,500 MU, 500 MU未満の毒力を示し、各回収率は12%未満, 7%, 53%, 50%, 10%未満であった。また、1-ブタノール画分では、それぞれ500 MU未満 (回収率13%未満), 500 MU (回収率13%), 2,500 MU未満 (回収率63%未満), 2,500 MU (回収率63%), 350 MU未満 (回収率9%未満)であった (表2)。これらの結果を踏まえ、1-ブタノール画分から得られた1%酢酸-80%メタノール溶出面分 (2,500 MU)を以下の試験に供した。本

表2 OASIS MAX 6 cc ミニカラムによる固相抽出段階における毒力と回収率

試験液	非吸着画分	2%アンモニア水洗浄画分	10%メタノール洗浄画分	1%酢酸-80%メタノール洗浄画分 (1回目)	1%酢酸-80%メタノール洗浄画分 (2回目)
水画分	毒量 (MU) <600 回収率 (%) <12	350 7	2,600 53	2,500 50	<500 <10
1-ブタノール画分	毒量 (MU) <500 回収率 (%) <13	500 13	2,500 63	2,500 63	<350 <9

画分につき、Sep-Pak C18ミニカラムによるさらなる固相抽出法を検討したところ、毒力は非吸着画分で5 MU未満, 水洗浄画分で5 MU未満, 20%メタノール洗浄画分で5 MU未満, 50%メタノール洗浄画分で10 MU未満, 80%メタノール洗浄画分で25 MU未満, 100%メタノール洗浄画分で100 MU, 回収画分で25 MU未満を示し、回収率はそれぞれ1.3%未満, 1.3%未満, 1.3%未満, 2.5%未満, 6.3%未満, 25%, 6.3%未満であった (表3)。

表3 Sep-Pak C18ミニカラムによる固相抽出段階における毒力と回収率

	非吸着画分	水洗浄画分	20%メタノール洗浄画分	50%メタノール洗浄画分	80%メタノール洗浄画分	100%メタノール洗浄画分	回収画分
毒量 (MU)	<5	<5	<5	<10	<25	100	<25
回収率 (%)	<0.4	<0.4	<0.4	<0.8	<2	8	<2

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 *P. tuberculosa* の主成分が100% MeOH 画分に溶出したものと考え、これを HPLC に供したところ、図3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/kg¹⁰⁾であるので、0.1 μg の PTX

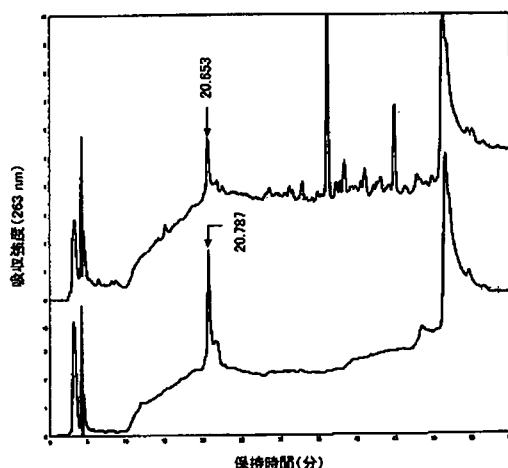


図3 イワスナギンチャクの有毒画分(上)と PTX 標準品(下)の HPLC クロマトグラム

約11 MUがHPLCによる検出限界と計算できる。注入した*P. tuberculosa* 精製画分はHPLC分析結果から毒量8.2 MUと算出された。*P. tuberculosa* 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。

まとめ

西表島産イワスナギンチャク*P. tuberculosa*の精製からマウス致死性神経毒を精製した。ブタノール分配画分に粗抽出液が示した毒量の30%、40,000 MUが回収された。これらをOASIS MAX, Sep-Pak C18で固相抽出した有毒画分をHPLCで分析したところPTX標準品の溶出時間とはほぼ一致する時間にピークが検出された。PTXと同じ保持時間の20分に確認されたピークはPTXの紫外吸収波長に近似していた。

総合的に考えると、固相抽出法にはOASIS MAXおよびSep-Pak C18を併用し、100%MeOH洗浄画分にて最終的に得られる液を回収するとPTXが比較的高濃度に得られることが明らかになった。

謝 辞

本研究の一部は、私立大学教育研究高度化推進特別補助および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により行った。

参考文献

- 1) 内海富士夫, 1982. 原色日本海岸動物図鑑. 保育社, 大阪.
- 2) 塩見一雄, 長島祐二: 2006. 新訂版海洋動物の毒—フグからイソギンチャクまで—成山堂書店, 東京.
- 3) 伊藤勝昭, 浦川紀元, 1982. 海産毒 Palytoxin の生理活性. 生体の科学33号: 319 - 325.
- 4) S. Taniyama, Y. Mahmud, M. B. Tanu, T. Takatani, O. Arakawa, and T. Noguchi, 2001. Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer *Tetraodon* sp. toxin. *Toxicon* 39: 725 - 727.
- 5) S. Taniyama, Y. Mahmud, M. Terada, T. Takatani, O. Arakawa and T. Noguchi, 2002. Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan. *Journal of Natural Toxin* 11 (4): 277 - 282.
- 6) S. Taniyama, O. Arakawa, M. Terada, S. Nishio, T. Takatani, Y. Mahmud, and T. Noguchi, 2003. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus oviceps*. *Toxicon* 42: 29 - 33.
- 7) P. Riobo, B. Paz, and J. M. Franco, 2006. Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 566: 217 - 223.
- 8) D. Uemura, Y. Hirata, T. Iwashita, and H. Naoki, 1985. Studies on palytoxin. *Tetrahedron* 41 (6): 1007 - 1017.
- 9) 伊藤勝昭, 1984. バリトキシン Palytoxin. 生体の科学35号: 513 - 515.

(相良剛史・西堀尚良・西尾幸郎: 四国大学短期大学部生活科学科食物栄養専攻)

(谷山茂人: 長崎大学大学院生産科学研究科)

(江戸 梢: 徳島大学大学院人間・自然環境研究科)

(橋本多美子: 四国大学短期大学部生活科学科生活福祉専攻)

(浅川 学: 広島大学大学院生物圏科学研究科)