

厚生労働科学研究研究費補助金
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20年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 安元 健

平成21(2009)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
安元 健		
II. 分担研究報告		
1. 麻痺性貝毒の定量分析に関する研究		
大島 泰克	-----	14
2. 有機溶媒可溶性貝毒標準品の調製に関する研究		
関口 礼司	-----	21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	30

貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究

主任研究者 安元 健 財団法人 日本食品分析センター 学術顧問

研究要旨

二枚貝に蓄積する毒の中で有機溶媒に可溶性脂溶性成分（脂溶性毒）について、LC-MSによる定量法の確立を目指して、標準毒の調製とLC-MS条件の検討を行った。標準毒は2種類に大別された。第一のタイプは、外部標準として使用する標準毒である。比較的少量で数年の需要に応えられるので、国内・国外で出現する脂溶性毒をほぼ網羅するように努力した。前年度までに調製したOA、DTX1、pal-OA、pal-DTX1、PTX1、PTX2、PTX6、YTX、BTXB2、AZA1に加えて、20年度はPTX3、homoYTXが追加できた。第2のタイプの標準毒は、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が必要とする。海外に出現する毒は、抽出原料の入手が困難なので、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、抽出・精製法に改良を加えて毒を得た。DTX3やpal-OAは、半合成的に作成することができた。また、新たにhomoYTXの標準毒を作成した。調製した標準品の品質評価をLC、LC-MS、¹H-NMRを用いて行った。

LC-MSによる一斉分析の条件は既に定めてある。従来は、貝が毒化する春～夏の試料を用いて条件の検討を行った。しかし、輸出が行われる冬季には貝の脂質含量が高まり、マトリックスによる妨害が大きいことも予想されたので、本年度はその検討を行った。その結果、規制値の十分の一に相当する低い含量では、ホタテガイでは回収率が140%に達する成分もあったが、外部標準毒を使用によって実用的な定量が可能な結果が得られた。

麻痺性貝毒については、Dual column-Gradient elutionによる一斉分析法について改良を加え、陽イオン交換カラム10種について検討した結果、InertsilAX (4.4x33 mm)がC1/2成分の保持に最適の資材であることを発見した。また、溶離液の変化に伴って生ずるベースラインの乱れが毒の定量性に影響を与える点について、移動相に関わる全ての要素を検討した結果、イオンペア試薬に含まれる不純物であることを発見し、問題を解決した。また、バリデーション試験に必要な標準毒混合液および主要二枚貝6種(ホタテガイ、マガキ、アサリ、アカガイ、ウバガイ、ムラサキガイ)からなる分析試料を調製した。

分担研究者 大島 泰克 北里大学 海洋生命科学部 教授
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

A. 研究目的

EUの専門家会議は、ジノフィシトキシン類(DTX)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緩和を勧告している。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。また、現行の麻痺性貝毒分析法も問題が多い。

本研究の主任研究者は、平成18年度にわが国で出現する主要毒を含め14成分を作成し、新たにLC-MSによる主要有機溶媒可溶毒群の一斉分析法を開発した。

本研究の第一の目的は、申請者らがこれまでに培った技術と能力を生かし、標準毒の作製と分析法をさらに検証し、国産二枚貝の正確な貝毒監視を可能にする。また、二枚貝の国内の流通を監視するだけでなく、輸出入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測定や、麻痺性貝毒の高精度の検査を可能にする。

高精度分析に必要な標準毒の作成は主成分であっても決して容易ではなく、副成分や神経性貝毒、アザスピロ酸貝毒、麻痺性貝毒の一部では更に困難が多く、申請者らの技術的優位性を発揮できる。

そこで、有機溶媒可溶標準毒は申請者が平成18年度に作成した14成分を基本とし、国内20機関での使用量を勘案すると、各成分を5 μ g/vialずつ、合計200 μ g、すなわち各成分の1mgを調製すれば5年間の需要に応えられる。しかし、標準品の調製に当っては正確な重量測定が求められるので、各成分を2mgずつ得ることを目標とした。ただし、AZA類のように原料入手の困難な成分は1mg未満でも止むを得ない。

一方、麻痺性貝毒のポストカラムHPLC分析については、大島らが開発した分析法の実用性と精度検証を実施する。

機器分析法では、実施研究機関によって

使用機種が異なり、その性能に差異がある。

また、測定対象とする貝の種類も多様であるために抽出物中の妨害物質の量と性質に差異がある。国内産の貝の抽出物に標準品を添加した試料と標準品を持参して共同研究機関と現地で実証試験を実施して、改善すべき点があれば協議しながら対策を講じることが効果的である。

このように全ての貝毒の分析精度と実用性向上を図り、消費者の安全を確保する。

B. 研究方法

[標準毒作成(平成19~20年度)]

脂溶性標準毒の作成:

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(図1)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、事業終了後でも、LC-MS法の試験・実施を希望する試験・研究機関に提供することを目指した。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、下記の方針で研究を進めた。

- 1) 下痢性貝毒の主要毒であるOAとDTX1及びそのエステル系の作製を実現する。
- 2) 低品質原料の処理法を開発して、必要な標準毒を作製する。
- 3) 前年度までに作製できなかったhomoYTXとPTX3を作製する。
- 4) 純度判定に重要な¹H-NMRスペクトルのデータを整備する。
- 5) LC-MSデータの再現性・精度検証を行う。

麻痺性標準毒の作成:

麻痺性貝毒については、分析に必要なC1、C2、GTX1~GTX5、neoSTX及びdcSTXの主

要麻痺性貝毒 3 群 9 成分からなる標準毒混合液を新たに調製する。また、主要二枚貝数種からなる分析試料を調製し、バリデーション試験を実施する。

[分析条件の検討 (平成 19~20 年度)]

LC-MS 法による脂溶性貝毒分析法:

国内で出現する 10 成分と海外で出現する代表的な 4 成分を加えた合計 14 成分について一斉分析法の条件検討を行う。その基本方針は次のように定めた。

- 1) 国内の公定法に従い、中腸腺を抽出の試料とする。
- 2) 迅速性と簡便性を目指すので、抽出液の前処理、ヘキサン分配やカートリッジカラム処理は行わない。
- 3) エステル型下痢性貝毒は、エステル脂肪酸が異なる同属体の混合物であり、分離が困難なので、70%を占める主要成分のバルミチン酸エステルの測定によって判定する。
- 4) LC-MS 測定は選択イオン検出 (SIM) で行ない、多重反応イオン検出 (MRM) は行わない。理由は MRM 法が機種と試料マトリックスの影響による変動が大きいこと、エステル体の分離が困難なこと、MS/MS 可能な機種の普及度が十分でないことである。

麻痺性貝毒分析における HPLC 法:

タンデムカラムを使ったポストカラム蛍光化 HPLC による麻痺性貝毒一斉分析法を改良し、今後の普及性を考慮した妥当性確認 (メソッドバリデーション) を目指して、AOAC 基準にそった Single Laboratory Validation のデータの収集をはかる。

倫理面への配慮

本研究は臨床研究や疫学研究等には該当しないため、倫理面の問題はないと判断した。また、マウス法の代替法を検討することから、実験動物に対する動物愛護を配慮した研究内容と考えられる。下痢性貝毒ではマウス試験は行わない。

ただし、本研究に使用するマウスの数は、最小量に止めることとする。なお、貝毒含有試料の採取場所等が特定される場合は風評被害による影響を受けないよう、都道府県名のみ記すこととする。

C. 研究結果 [標準毒作成]

脂溶性標準毒:

国内及び海外で出現する主要下痢性貝毒及び脂溶性貝毒を図 1 に示した。

わが国の代表的下痢性貝毒成分である DTX1, DTX3, 及び 45OHYTX は、毒化試料の入手が不可能なので、低純度試料の処理技術とエステル合成技術の検討を実施した。まず、低純度のヘキサン画分をアルミナカラムで処理して効果的に DTX3 を分離し、加水分解によって DTX1 を精製する技術を開発した (図 2)。DTX1 から DTX3 を合成する方法はすでに検討済みである。この結果、国内で脂溶性区に出現する DTX1, DTX3, OA, OA-エステル, PTX1, PTX2, PTX6, YTX, 45-OHYTX の 10 成分をほぼ確保した。平成 20 年度は homoYTX と PTX3 の標準品を新たに調製できた。国外で出現する BTXB2, AZA-1, AZA-2, AZA-3 は抽出原料となる毒化二枚貝が入手できなかった。ただし、分析標準品としての最小必要量はすでに保持している。DTX1 の ¹H-NMR スペクトルに見られる異常は、金属塩の形成によることを解明し、イオン交換樹脂処理によって解決した。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。一例として、DTX1 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 3~5 に示す。

一方、麻痺性貝毒については、標準毒調製の原材料としてラン藻 *Anabaena circinalis* の大量培養とその主成分 C1, C2 の精製と GTX2, GTX3 への化学変換による調製およびそれらの濃度決定を目指した。

また、C1, C2, GTX1~GTX5, neoSTX 及び dcSTX の主要麻痺性貝毒 3 群 9 成分からなる標準毒混合液を新たに調製した。さらに、規制値の 2 倍程度の毒力を有するホタテガイ、マガキ、アカガイ、ムラサキガイの試験液を天然毒化試料から 30 セット調製した。

[分析条件の検討]

LC-MS 法による脂溶性貝毒分析法:

脂質含量が高く、多量の妨害物質が予想される冬季の中腸腺についても、既報の条件で分析に支障がないことを確認した (図 6, 7)。

すなわち、添加回収試験に使用する二枚貝 (ホタテガイとムラサキガイ) は、従来は毒化期の初夏に採取していた。今回は、海外への輸出が行われる冬季の試料について試験を行った。その結果、規制値の十分の一に相当する濃度での回収率は、ホタテガイでは良好であった (70~140%) がムラサキガイの試料では、OA と DTX1 の回収率が 150% を超えることがあり、今後の検討が必要と判断された (表 1-1~2)。

同一機種を使用し、同一分析条件で試験を実施した際の再現性、精度の検証を行った。

麻痺性貝毒分析における HPLC 法:

タンデムカラムによる一斉分析法の一部条件を改良して、直線性、検出・定量限界を調べるとともに天然二枚貝抽出物に添加した毒の回収率を調べるなど、妥当性確認に必要な基礎データの収集をはかった

D. 考察 (脂溶性毒に関する部分)

海外における LC-MS による脂溶性毒の分析は、ニュージーランドのコースロン研究所が最も熱心に取り組み、In-House Validation のデータも報告している。我々の方法との違いは、①MS/MS を行って検出 (MRM) していること、②オカダ酸エステルの測定は加水分解後のオカダ酸の測定を行っていること、③可食部全体を抽出に使用することである。①の MRM 測定を採用しているのは標準品が利用困難なためと推測される。MRM 測定は使用機種や試料二枚貝の種類の違いやマトリックスの影響が大きい。各研究機関が保有する機種や測定対象二枚貝ごとに回収率を検討することが必要になるが、その検討に使用する標準毒が揃わないことが普及の難点とされている。それに対して、我々は必要な標準毒の調製・供給を行って選択イオン測定を行うので、使用機種や使用二枚貝試料の差異による影響は小さいと考えた。②のエステル型標準毒を使用する利点も大きい。加水分解を行うと PTX 類は破壊され、他の成分も減少するので、一つの試料について加水分解の前後において 2 回の測定が必要となる。エステル型標準品を使用してエステル体の含量を推定し、顕著に検出される試料についてのみ加水分解を行えばよく、測定の作業・時間が短縮される。③EU では可食部全体の抽出を定めている。しかし、下痢性貝毒が中腸腺に局在することは、国内の二枚貝および EU のイガイでも確認されている。毒濃度の高い中腸腺の使用は測定に有利である。④平成 19 年と平成 20 年に実施した測定の結果を表 1-1~2 に示す。重要成分である DTX1 の回収率がかなり高い値を示した。また、機器の不都合により一部試料の測定が不可能であった。マトリックス効果が大きいと推定して、10 倍希釈試験液で測定するとデータが改善された。ムラサキガイでは低毒力試料の測定に支障をきたしたが、産業的に重要なホタテガイでは測定可能であった。なお、脂質含量が高い冬季の試料でも、標準毒を使用すれば下痢性貝毒の検

出・定量は可能であった。

LC-MS 法による貝毒定量に対する海外での評価は、マウスを使用せず、迅速かつ精度が高い方法として位置付けられている。しかし、標準品の供給がないと機種やマトリックスの違いによる誤差の修正が不可能もしくは困難なために公定法に採用されるには至っていない。

本研究の計画では、一次水産物である貝類を測定対象としているが、最近の話題・問題点としては、貝類を使用した加工食品の安全性についても消費者の関心が強いことから、今後の課題として加工食品への適用も考える必要がある。

E. 結論

- 1) 毒の抽出・精製法に改良を加え、低品質原料から標準毒を確保する道を開いた。
- 2) わが国の下痢性貝毒監視に最も重要な DTX1, DTX3 を確保した。
- 3) ¹H-NMR に於ける異常スペクトルの問題を解決した。
- 4) 新たに homoYTX と PTX3 の標品を調製した。
- 5) マトリックス妨害の大きくなる冬季二枚貝の抽出液でも LC-MS 適用の見通しを得た。
- 6) 同一機種で同一条件による測定を行っても、時間の経過につれてデータが変動した。当面は最も重要な二枚貝であるホタテガイについて基礎資料を蓄積し、状況に応じて応用を拡大する必要がある。今回作製した標準毒はそのような試験を可能にする。
- 7) 麻痺性貝毒の標準毒調製の原材料としてラン藻 *Anabaena circinalis* の大量培養とその主成分 C1, C2 の精製と GTX2, GTX3 への化学変換による調製およびそれらの濃度決定を定量 NMR により行った。培養することにより、安定的な毒の生産が可能となった。

- 8) 麻痺性貝毒の一斉分析法の一部条件を改良して、イオン交換カラムのカラム長を長くすることにより、ポイドボリューム付近の夾雑物と C1/C2 の分離がさらに向上するかどうかを検討した。C1/C2 の保持時間が 1 分以上長く、かつ、分離能が良好となった。

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

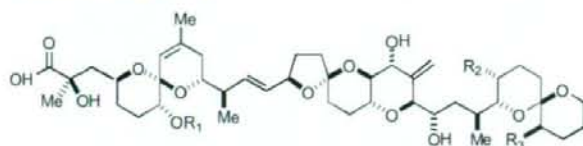
- 1) Takeshi Yasumoto: Algal Toxins - An Overview: Methods for Detection and Quantification of Marine Toxins, Proceedings of the International Symposium on Algal Toxins, Trieste 25-27 May 2007. (in press)
- 2) Megumi Suzuki, Reiji Sekiguchi, Masatoshi Watai, Takeshi Yasumoto: Preparation and simultaneous LC-MS analysis of fourteen shellfish toxins, Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae 2006, Copenhagen, Denmark (in press).
- 3) C. Alfonso, A. Alfonso, M. J. Pazos, M. R. Vieytes, T. Yasumoto, A. Milandri, R. Poletti, L. M. Botoana: Extraction and cleaning methods to detect yessotoxins in contaminated mussels, Analytical Biochemistry, 363, 228-238, 2007.
- 4) Yasukatsu Oshima: Characteristics of PSP-toxin profiles in bivalves from Japanese coastal waters, Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae 2006, Copenhagen,

Denmark (in press).

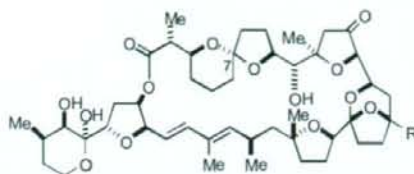
2. 学会発表

- 1) Takeshi Yasumoto: Marine Toxin Detection at the Chemistry/Biology Interface, (Plenary lecture), 121st AOAC Annual Meeting & Exposition, Anaheim, California, USA, September 16-20, 2007
- 2) Takeshi Yasumoto: Algal Toxins - An Overview, (Plenary lecture), International Symposium on Algal Toxins, Trieste, May 27-29, 2007.
- 3) 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.
- 4) 安元 健, 渡井正俊, 木船信行, 関口礼司, 高橋なつき, 永江美加: 「チリ産下痢性貝毒試料のLC-MSとPP2Aキットによる分析」, 平成 21 年度日本水産学会大会口頭発表, 2009. 3. 30.

脂溶性貝毒

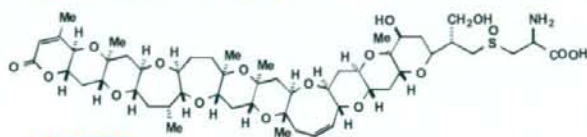
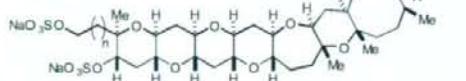
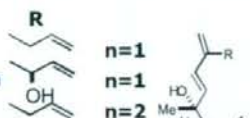


okadaic acid (OA)	R1	R2	R3
■ dinophysistoxin1(DTX1)	H	Me	H
■ pal-OA	H	Me	Me
■ pal-DTX1	pal	Me	Me

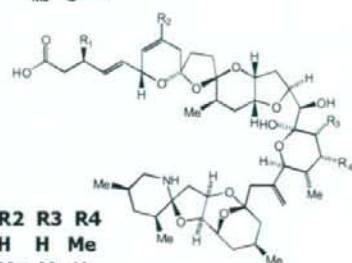


■ pectenotoxin1 (PTX1)	R
■ pectenotoxin2 (PTX2)	CH ₂ OH
■ pectenotoxin3 (PTX3)	CH ₃
■ pectenotoxin6 (PTX6)	COH
	COOH

yessotoxin(YTX)	R
■ 45-hydroxyyessotoxin	OH
Homo-YTX	



■ BTXB2
BTXB4
(国外)



	R1	R2	R3	R4
Azaspiracid	H	H	H	Me
■ Azaspiracid -2	H	Me	Me	H
■ Azaspiracid -3	H	H	H	H
(国外)				

図1 国内及び海外で出現する主要下痢性貝毒及び脂溶性貝毒

青字：市販品ナシ

■：貝の代謝産物

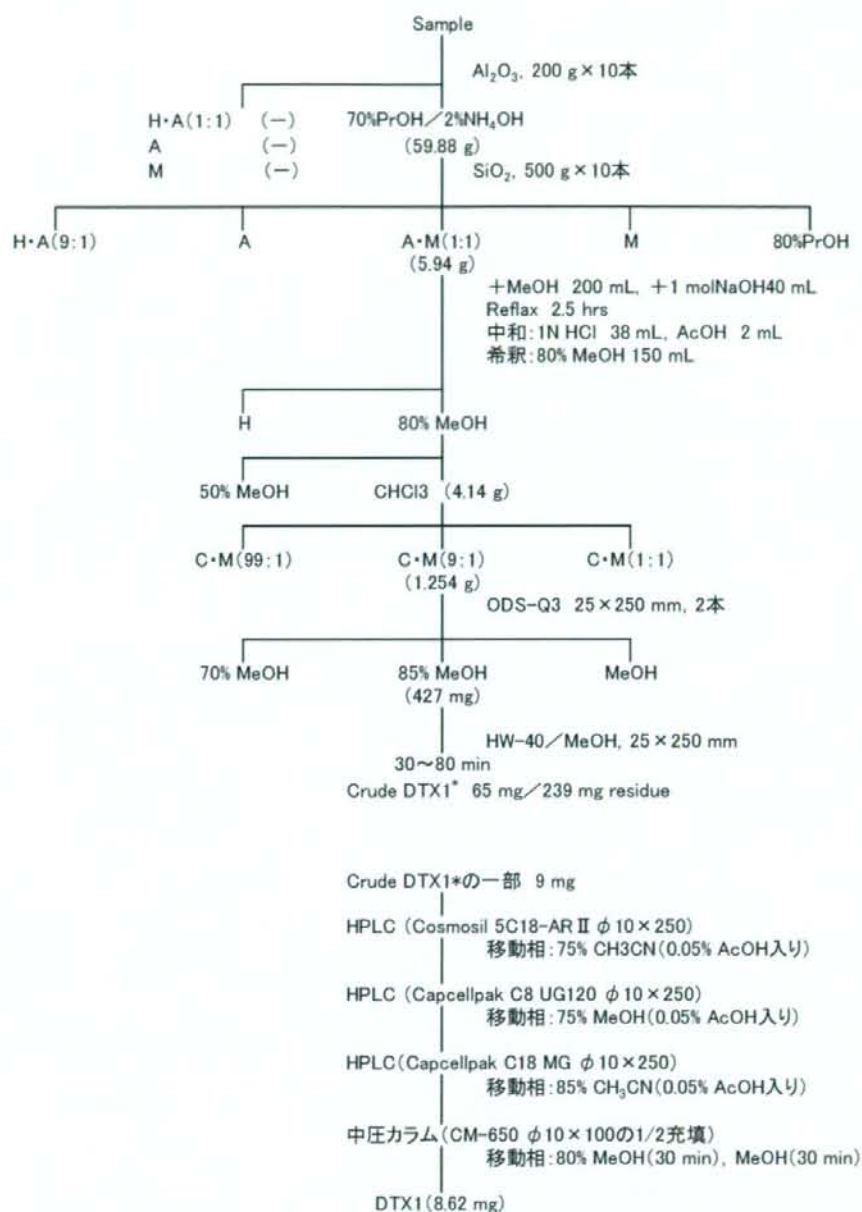


図5 DTX1の調製例

試料: 1995年陸奥湾産ホタテガイ中腸腺ヘキサニン区 2.24 kg DTX1換算88 mg含有

略号: H: Hexane, A: Acetone, C: Chloroform, M: Methanol, SiO₂: シリカゲル60, Al₂O₃: アルミナ(活性度Ⅲ)

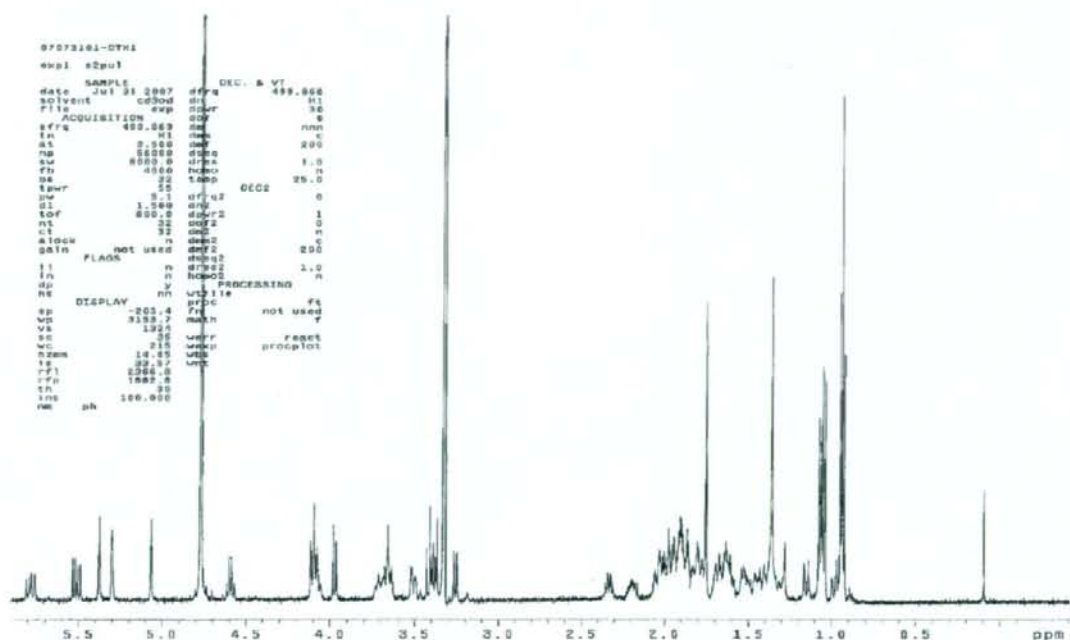


図3 DTX1精製品の水素核一次元核磁気共鳴スペクトル

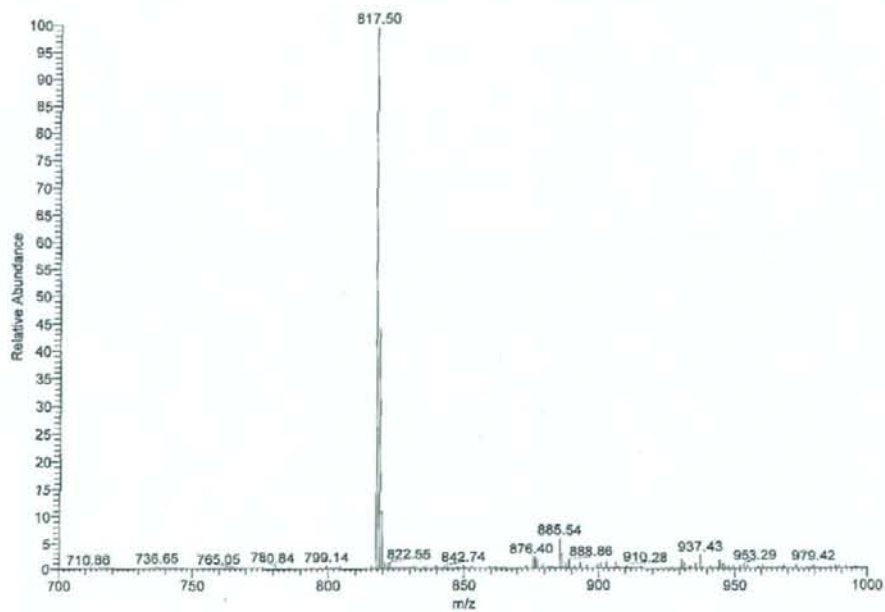


図4 DTX1精製品のLC-MSスペクトル

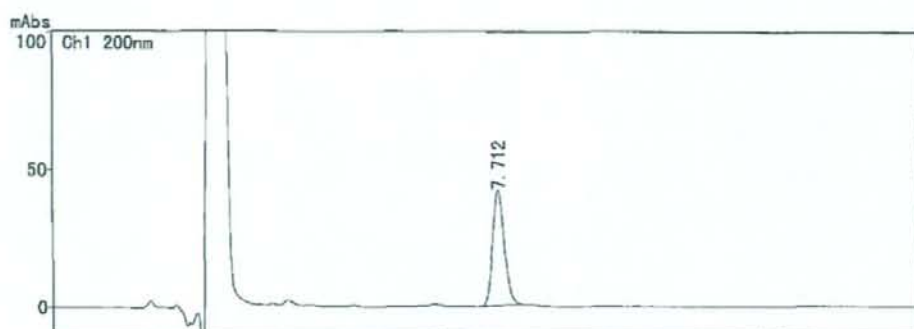


図5 DTX1精製品のHPLCクロマトグラム

DTX1 : 0.84 mg

CapcellpakC18 ϕ 4.6 \times 250, 75%MeCN/0.05%AcOH, 1.0mL/min, 35 $^{\circ}$ C

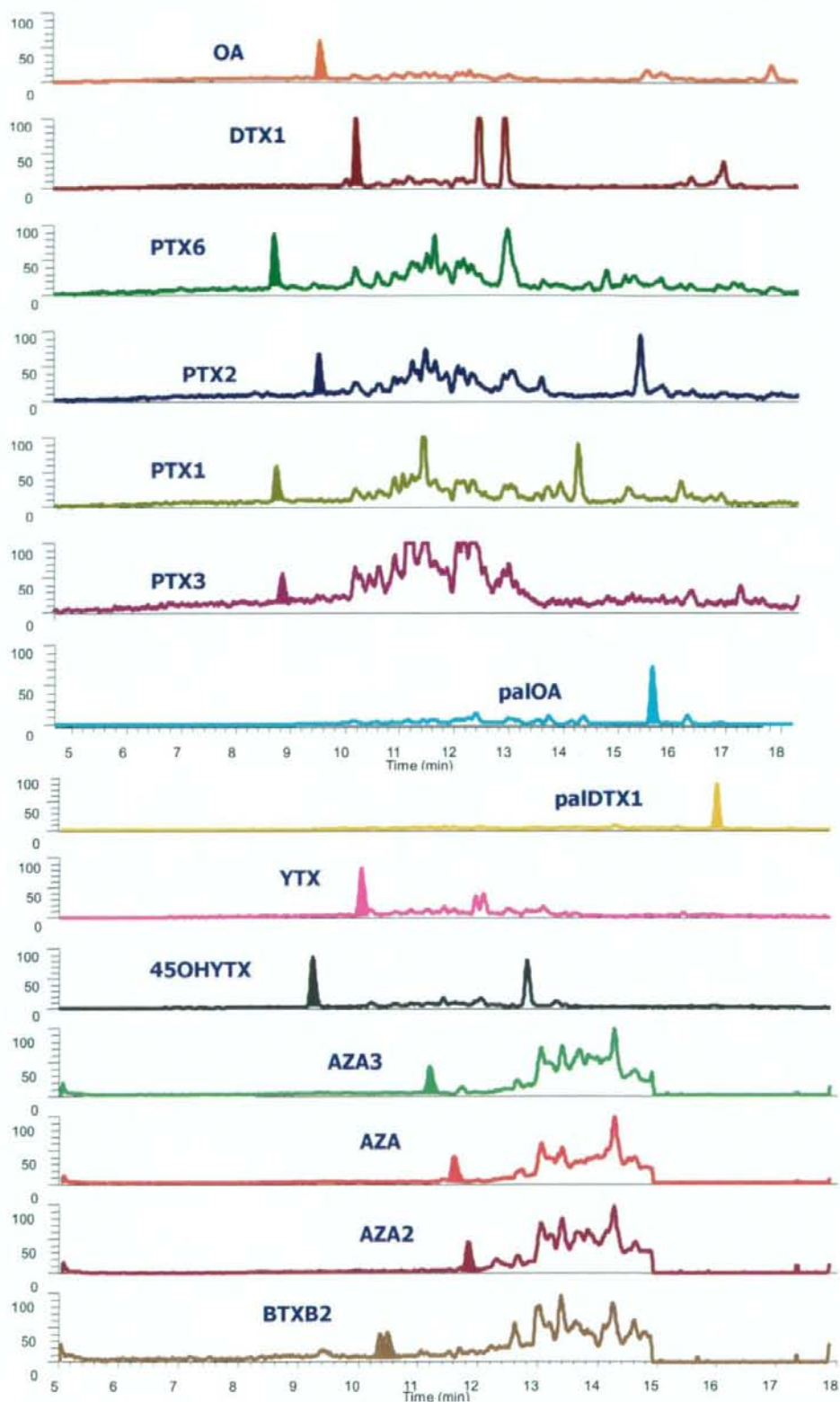


図6 ホタテガイ抽出液(標準品添加)のLCMS測定結果

初夏-初秋の試料(平成18年度実施)

上図:陰イオンモード, 下図:陽イオンモード

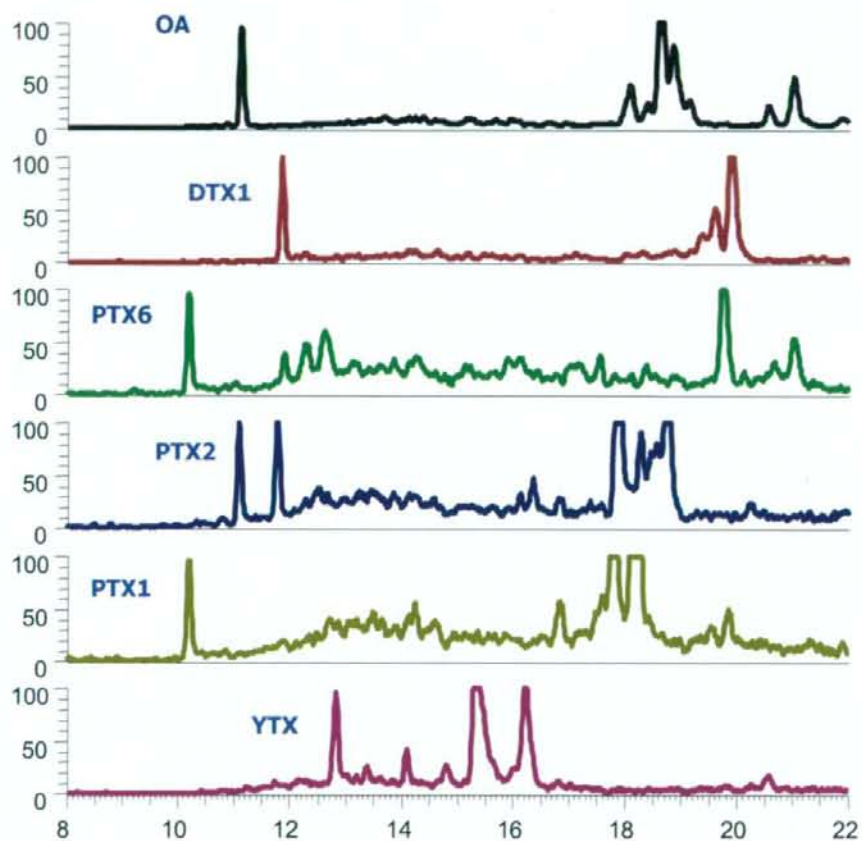


図7 ホタテガイ抽出液（標準品添加）のLCMS測定結果

冬季の試料(平成19年度実施)*，陰イオンモード

*:マトリックスの影響を受け易い成分について実施

表1-1 OA, DTX1,PTX1,PTX2, PTX6, YTX を添加した回収率の結果(2007.11~2007.12)

ホタテガイ中腸腺 抽出液濃度	回収率(%)																							
	OA				DTX1				PTX1				PTX2				PTX6				YTX			
0.5 μ g/ml	121	118	110	102	127	127	120	118	93	98	88	85	92	98	90	84	91	94	90	81	77	86	86	75
0.25 μ g/ml	112	113	106	98	129	123	116	115	89	91	89	80	87	96	95	85	92	89	92	83	76	80	89	68
0.15 μ g/ml	110	108	98	93	130	126	117	115	95	95	83	78	91	92	83	83	86	97	87	78	75	84	84	65
0.05 μ g/ml	101	108	99	95	124	132	120	121	92	95	98	85	79	100	97	84	95	101	81	88	80	83	89	64
0.03 μ g/ml	107	106	92	91	123	140	111	112	108	118	94	90	95	95	101	74	95	102	83	88	73	84	86	63
0.015 μ g/ml	113	107	90	94	115	140	117	118	96	110	86	81	130	115	113	88	113	82	40	112	70	89	95	68

ホタテガイ中腸腺：北海道産 (PTX1 ; 痕跡あり, PTX6 ; 0.13 μ g/g, YTX ; 0.15 μ g/g)

ムラサキガイ中腸腺 抽出液濃度	回収率(%)																							
	OA				DTX1				PTX1				PTX2				PTX6				YTX			
0.15 μ g/ml	176	168	180	143	156	161	154	139	97	89	96	94	94	99	95	91	96	94	88	91	81	85	85	86
0.075 μ g/ml	176	170	188	136	154	164	144	140	90	102	107	94	102	101	114	93	96	96	96	97	78	91	80	78
0.05 μ g/ml	182	167	188		171	140	165		100	90	104		98	101	118		93	91	105		86	85	87	
0.015 μ g/ml	166	191	200		144	158	149		68	96	101		105	127	95		84	123	119		81	102	88	
0.01 μ g/ml	164	177	197		109	156	161		69	125	94		131	93	177		95	101	125		56	94	97	
0.005 μ g/ml	148	193	218		108	148	322		7	81	79		77	60	97		110	86	112		42	101	59	

ムラサキガイ中腸腺：三重県産 (PTX1 ; 痕跡あり)

表1-2 OA, DTX1,PTX2, PTX6, pal-OA, YTX を添加した回収率の結果(2008.05)

ホタテガイ中腸腺 抽出液濃度	回収率(%)																							
	OA				DTX1				PTX2				PTX6				pal-OA				YTX			
0.5 μ g/ml	117	136	127	108	196	269	180	190	92	101	109	90	91	95	111	91	275	286	180	395	72	74	98	76
0.25 μ g/ml	106	125	123	106	208	267	184	202	86	99	108	85	88	99	108	90	278	280	173	385	69	77	97	81
0.15 μ g/ml	109	122	127	101	208	242	187	186	90	95	108	88	93	99	114	93	257	254	173	343	78	71	108	79
0.05 μ g/ml	134	143	129	110	240	297	228	231	90	107	105	88	113	100	118	100	275	285	198	405	82	84	114	100
0.03 μ g/ml	138	151	135	127	236	308	233	249	101	112	103	97	121	118	119	114	269	289	187	373	80	84	100	117
0.015 μ g/ml	171	154	154	116	249	296	246	249	114	91	133	103	123	137	89	107	303	312	201	290	85	96	103	154

ムラサキガイ中腸腺 抽出液濃度	回収率(%)																							
	OA				DTX1				PTX2				PTX6				pal-OA				YTX			
0.15 μ g/ml	175	200	126	111	283	300	217	159	111	103	96	90	93	89	88	88	163	173	100	309	93	83	85	88
0.075 μ g/ml	177	190	126	99	267	288	219	165	103	102	93	101	93	87	88	86	156	163	97	285	96	75	79	88
0.05 μ g/ml	183	186	122	110	269	286	235	178	127	123	81	103	102	85	91	88	147	146	97	302	109	78	86	102
0.015 μ g/ml	215	212	123	111	278	260	216	190	162	129	68	100	107	80	103	106	159	181	116	303	105	79	59	115
0.01 μ g/ml	209	224	136	102	250	277	197	195	212	152	92	106	113	98	97	97	158	119	149	224	103	57	58	129
0.005 μ g/ml	197	186	105	108	272	187	173	236	299	205	159	127	100	35	61	100	189	80	195	342	109	38	17	168

平成 20 年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

分担研究報告書

麻痺性貝毒の定量分析に関する研究

分担研究者 大島泰克 北里大学海洋生命科学部 教授

研究要旨：麻痺性貝毒の主要毒について、標準液の調製、濃度決定法の開発を行ない、本年度は GTX2, GTX3, C1, C4 の標準溶液を調製した。さらに、これまでに製作した標準溶液とあわせ、標準混合液を作成した。また、タンデムカラムを使ったポストカラム蛍光化 HPLC による麻痺性貝毒一斉分析法を改良し、今後の普及性を考慮した妥当性確認（メソッドバリデーション）を目指して、AOAC 基準にそった Single Laboratory Validation のデータの収集をはかった。

A. 研究目的

麻痺性貝毒についてポストカラム蛍光化 HPLC 分析法を改良して、その実用検証を行うことを目的とする。また、標準毒の調製法を検討して標準溶液を作成し、麻痺性貝毒定量にかかわる基盤技術の整備に努める。

本年度は標準毒調製の原材料としてラン藻 *Anabaena circinalis* の大量培養とその主成分 C1, C2 の精製と GTX2, GTX3 への化学変換による調製およびそれらの濃度決定を目指した。また、タンデムカラムによる一斉分析法の一部条件を改良して、直線性、検出・定量限界を調べるとともに天然二枚貝抽出物に添加した毒の回収率を調べるなど、妥当性確認に必要な基礎データの収集をはかった。

B. 研究方法

1) 標準毒の調製

オーストラリア産 *A. circinalis* (ACTA 04 株 CSIRO から分譲) の 10 L 規模の培養を試み、安定的な培養条件を探った。

上記培養の主成分 C1, C2 および側鎖の N-スルホン基を加水分解して得た GTX2, GTX3 混合液を調製し、定量 NMR で濃度を決定した。

上記の 4 成分にこれまでに調製した成分を混合し、主要 9 成分からなる混合液を調製し、以下に記す新分析法の検討に用いた。

2) 蛍光 HPLC 法の改良

昨年度、逆相分配系の Synergi 4 μ Hydro RP カラム (ϕ 4.6 \times 150mm) に陰イオン交換系のカラム Inertsil AX (ϕ 4.6 \times 33 mm) を連結することにより、C1/C2 の保

持と分離を検討した。本年度はこのイオン交換カラムのカラム長を長くすることにより、ポイドボリューム付近の夾雑物と C1/C2 の分離がさらに向上するかどうかを検討した。

まず、昨年度最適化した条件で標準毒混合液を分析して、全成分がベースライン分離するように移動相の内容、タイムプログラムを微調整した。その上で C1 の溶出時間がポイドボリュームから離れたことを確認したため、最適化した条件を用いて溶出時間の安定性、検量線の直線性、各濃度での精度を調べた。

3) 検出・定量限界の調査

検出器の設定を高感度用に変更し最適化した条件で低濃度の標準液を 3 回分析し、各成分の S/N 比を算出し、S/N = 3 となる検出限界および S/N = 5 となる定量限界濃度を求めた。

4) 添加試料の分析による回収率の調査

標準溶液を 2 段階の所定の量添加したマガキ及びムラサキガイの抽出液を最適化した条件で測定し、得られた濃度から理論値を 100%とした場合の回収率を求めた。

C. 研究結果

1) 標準毒の調製

Nargen 社製ポリカーボネイト 10 L 容カーボイに入れた Fitzgerald 培地を用い、室温 17°C、光量 25 $\mu\text{E}^2\text{sec}^{-1}$ の 16 時間明・8 時間暗の照明下、通気速度 870 mL/min で 28 日間培養することにより、

安定的な毒の生産が可能となった。平均的な C1, C2 の収量は 1.4 $\mu\text{mole/L}$ であり、これは 10 L の培養容器 1 本から 6.7 mg の毒が得られることを意味する。

C1, C2 を精製し、一部を希塩酸で加水分解して GTX2, GTX3 混合溶液を調製した。昨年度報告した条件で C1, C2 および GTX2, GTX3 の平衡混合物の濃度を測定し、新たな標準毒とした。

この 4 成分にこれまでに調製した成分を混合し、以下の示す主要 9 成分からなる混合液 (Code Name: PSPmixC) を調製した。そのモル濃度と比毒性から計算した毒力を示す。

	μM	MU/mL
C1	19.8	0.3
C2	4.3	1.0
GTX4	10.4	18.7
GTX1	30.4	74.9
GTX5	13.9	2.2
GTX3	3.1	4.9
GTX2	8.9	7.9
neoSTX	27.4	62.9
dcSTX	11.8	15.1
計	129.9	188.0

2) 蛍光 HPLC 法の改良

図 1 に示すように Inertsil AX ($\phi 4.6$ mm) のカラム長を 33 mm から 75 mm に伸長することで、C1/C2 の保持時間が 1 分以上長く、かつ、分離能が良好となった。

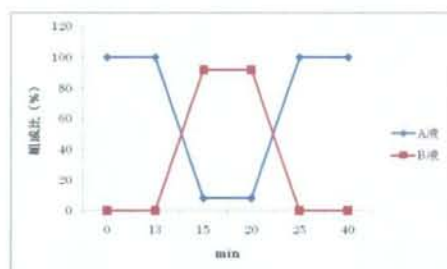
Inertsil AX カラムを Synergi Hydor RP カラムの後ろに直列に接続し、最適化した溶離条件とタイムプログラムにより図 2 に示す良好なクロマトグラムが得られた。また、分析時間も再平衡化を含めて

40 分以内に抑えることができた。以下に最終的に設定した溶出条件を示す。

A 液：4 mM ヘプタンスルホン酸
20 mM リン酸アンモニウム
0.5% (v/v) アセトニトリル
pH 7.1

B 液：4 mM ヘプタンスルホン酸
20 mM リン酸アンモニウム
9.2% (v/v) アセトニトリル
pH 7.1

タイムプログラム



標準溶液を 10 回の繰り返し分析に供し、再現性を調べた。保持時間の変化を図 2 に示す。40 分間の繰り返し分析でも保持時間には良好な再現性が見られている。

3) 検量線の直線性範囲

7 種の濃度の標準液を 3 本ずつ連続分析し、各成分の検量線の直線性を調べたところ、いずれも 0.99 以上の良好な値を示した (図 3)。各成分の濃度範囲は以下の通りである。

C1	0.198 ~ 19.8 μ M
C2	0.043 ~ 4.3 μ M
GTX4	0.104 ~ 10.4 μ M
GTX1	0.304 ~ 30.4 μ M

GTX5	0.139 ~ 13.9 μ M
GTX3	0.031 ~ 3.1 μ M
GTX2	0.089 ~ 8.9 μ M
neoSTX	0.274 ~ 27.4 μ M
dcSTX	0.118 ~ 11.8 μ M

4) 検出・定量限界の調査

9 成分について上記の最低濃度の標準液を高感度設定 (時定数: 8 秒, PMT 電圧: high) で 3 回分析し、各成分の S/N 比の平均を計算した。検出限界 (S/N = 3 とする) を以下のように決定した。

C1	12 nM
C2	7 nM
GTX4	36 nM
GTX1	29 nM
GTX5	53 nM
GTX3	6 nM
GTX2	5 nM
neoSTX	56 nM
dcSTX	89 nM

また、S/N = 5 となる 9 成分の定量限界は以下の通りとなった。

C1	20 nM
C2	12 nM
GTX4	59 nM
GTX1	48 nM
GTX5	88 nM
GTX3	10 nM
GTX2	8 nM
neoSTX	93 nM
dcSTX	149 nM

この濃度を各成分の比毒性から換算す

ると以下のごとくとなり、感度の悪い N1-OH 系の成分でも、安全性試験に必要な十分な感度で測定できることを示している。

	MU/ml
C1	0.0003
C2	0.0029
GTX4	0.0935
GTX1	0.118
GTX5	0.0141
GTX3	0.018
GTX2	0.00714
neoSTX	0.213
dcSTX	0.190
計	0.657

5) 添加試料の分析による回収率の調査

無毒の岩手県産マガキおよびムラサキイガイから AOAC 法に準拠して抽出液を調製し、SepPacC-18 カートリッジカラムに通して脱脂した。これに先に示した麻痺性貝毒標準混合溶液を添加して分析した。両サンプルのクロマトグラムを図4、図5に示す。昨年度に比べて、わずかだがポイドボリューム付近の夾雑物と C1 の分離能が向上した。理論値を 100%として回収率を計算した結果を表1に示す。

表1 添加試料の回収率 (%)

	濃度(μM)	マガキ	ムラサキイガイ
C1	1.98	102	131
C2	0.43	93	109
GTX4	1.04	104	111
GTX1	3.04	109	118
GTX5	1.39	102	101
GTX3	0.31	76	105
GTX2	0.89	89	109
neoSTX	2.74	113	118
dcSTX	1.18	95	126

E. 研究発表

今年度の研究成果については一部を国内の学会で口頭発表する予定である。また、早急に論文に取りまとめる予定である。

F. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定はない。

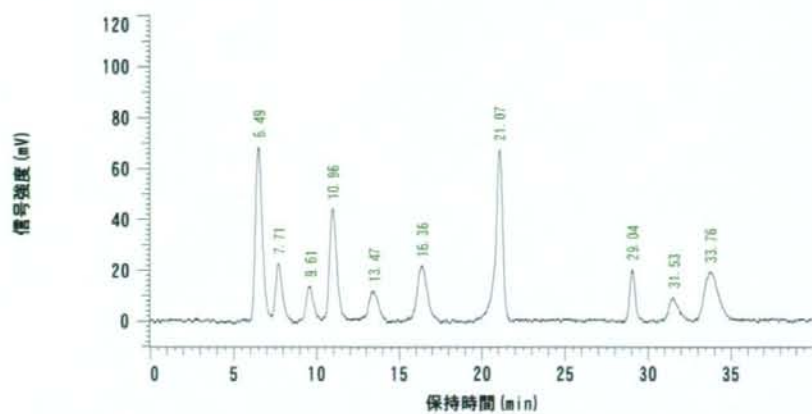


図1 Inertsil AX($\phi 4.6 \times 75$ mm) + Synergi Hydor-RP カラムによる標準毒混合溶液のクロマトグラム

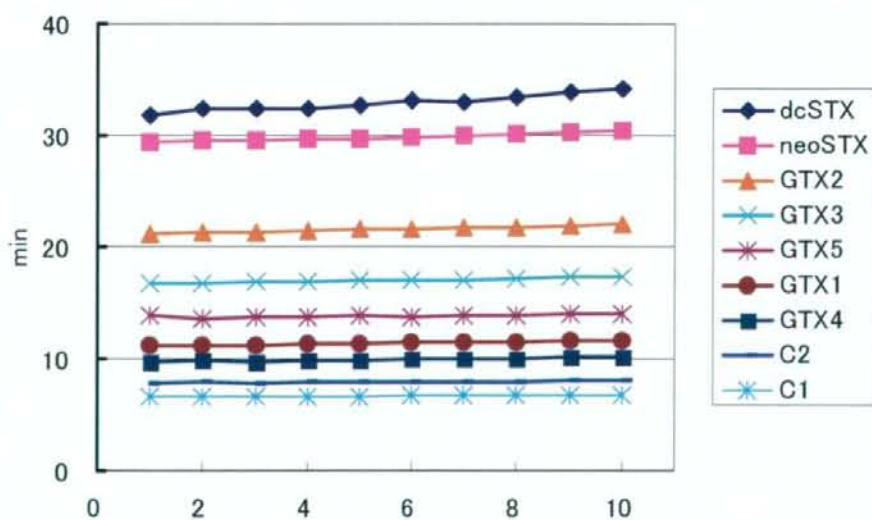


図2 繰り返し分析における各毒の保持時間の変動