

図3 各成分の検量線

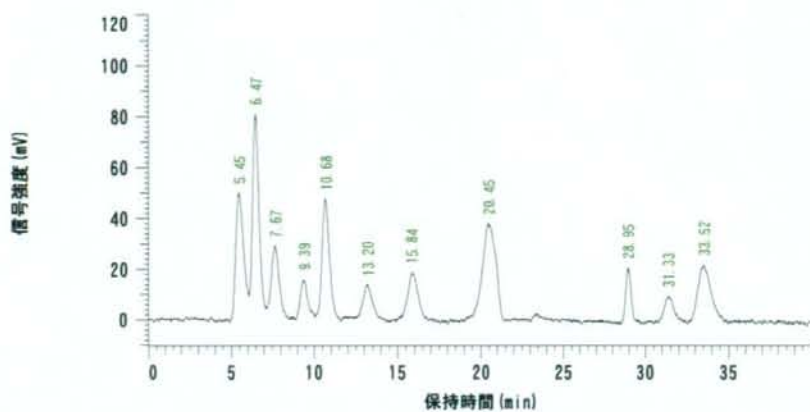


図4 添加試料の分析例(カキ)

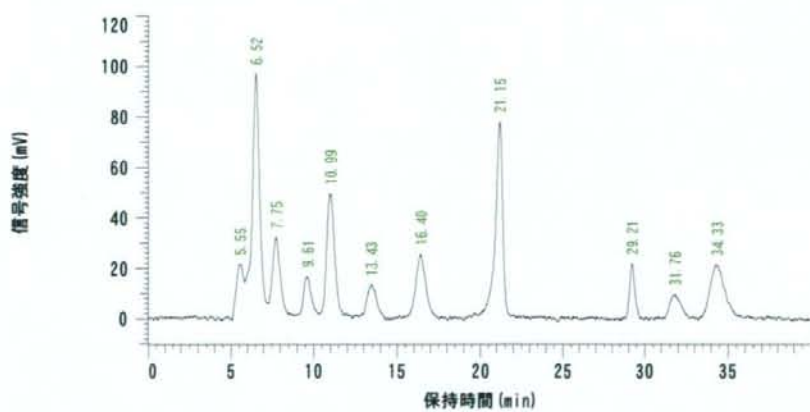


図5 添加試料の分析例(イガイ)

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20年度は、まず 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) を平成19年度に引き続き精製した。

さらに、ペクテノトキシン-3 (PTX3) 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、調製した。

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。

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に必要な主要脂溶性標準毒の単離・精製

を行うこととした。

しかしながら、近年の下痢性貝毒による毒化は微弱であるので、二枚貝を抽出試料に用いて標準毒を調製するのは困難である。そこで、毒含量の低い低品質試料を用いた。

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。

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、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旨とし、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 20 年度は下痢性貝毒の主要毒である 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) を平成 19 年度に引き続き精製した。

また、PTX3 について、低品質原料の処理法を開発した。

C. 研究結果

1) 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しなかった）ので、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 1)。

なお、今年度の培養液は沈殿物が少量であったので、吸引ろ過は行わず、HPLC 精製～Sep-pakC18 による脱塩処理操作を繰返し行った。

homoYTX 精製品の NMR スペクトルを図 2 に示す。

2) PTX3 標準品の調製

低品質原料の処理法を開発し、図 3 及び 4 に示した精製方法により、PTX3 標準品を精製した。

なお、中圧カラムによる精製は、検体が含水メタノールに溶解しなかったため、含水アセトニトリルを用いて行った。

得られ PTX3 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-a～c に示す。

以上より、homoYTX 及び PTX3 のいずれも 95%以上の純度を有する精製品を得ることができた。

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、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。

さらに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ベクテノトキシン-3 を得た。

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) 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

- 1) 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.
- 2) 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 キットによる分析法」, 平成 21 年度日本水産学会大会 口頭発表, 2009. 3. 30.

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。

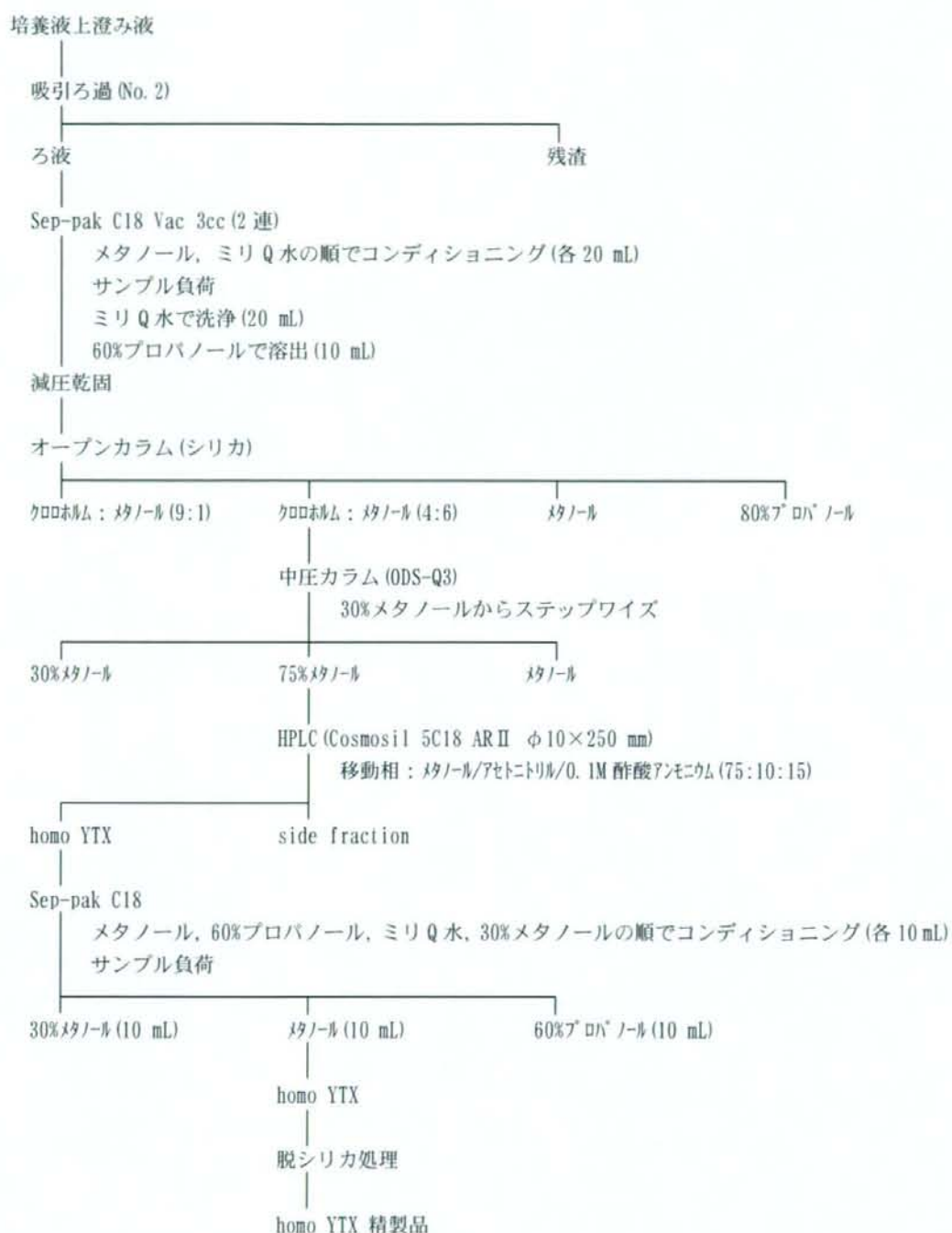


図1 homo YTX 培養液からの抽出・精製

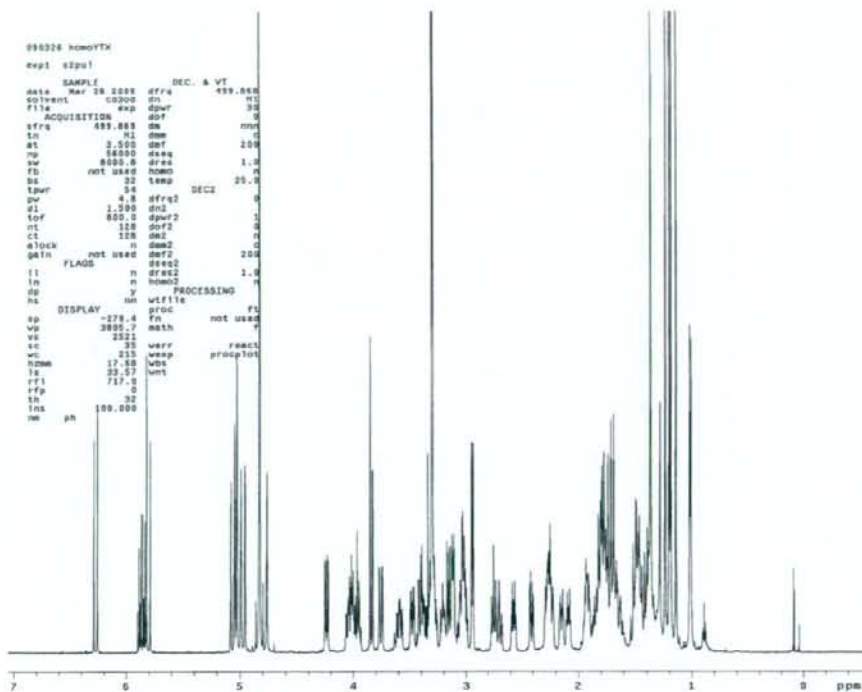


図2 homoYTX精製品の¹H-NMRスペクトル
(500 MHz, CD₃OD)

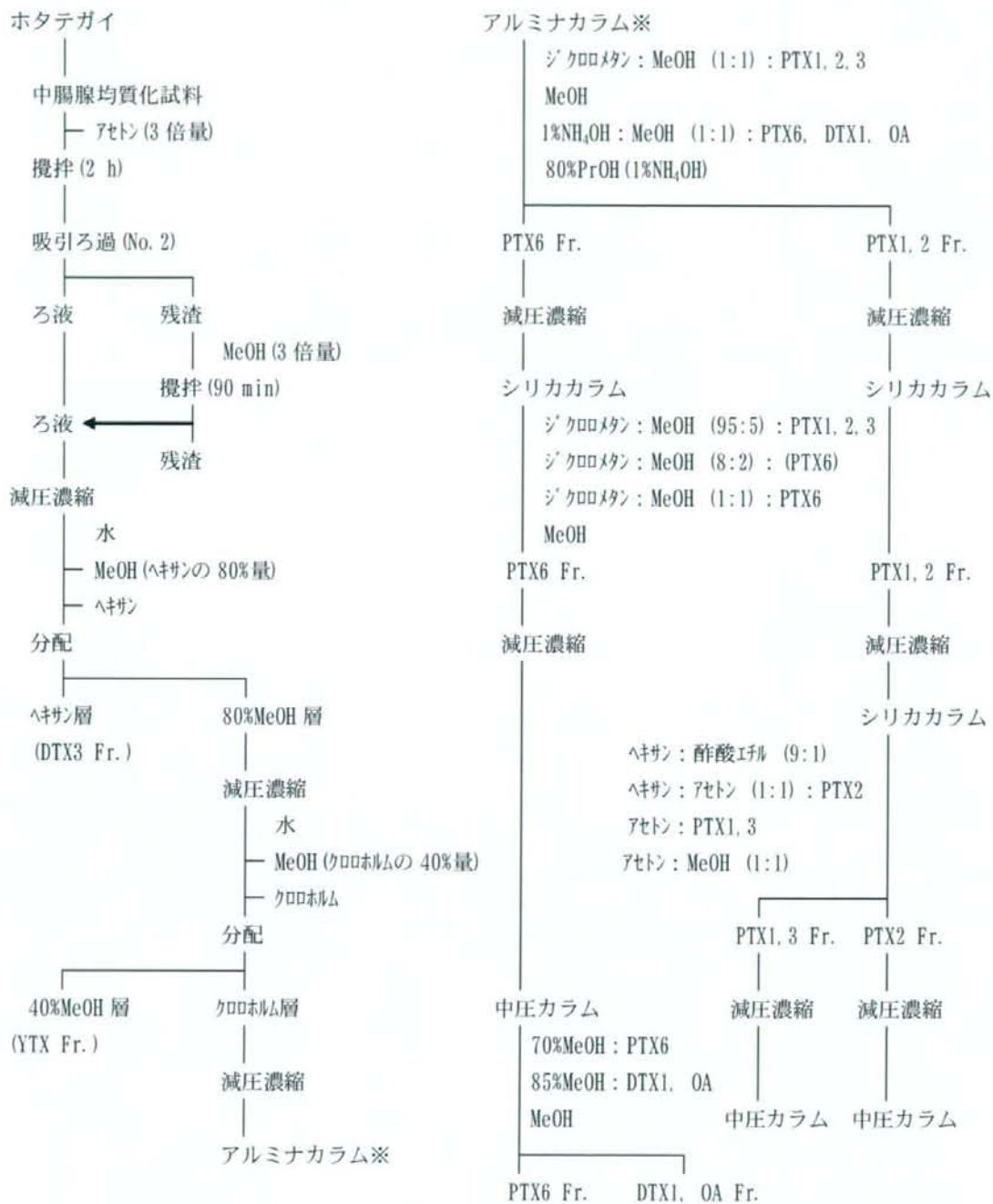


図3 ホタテガイからのPTXs精製操作の概略

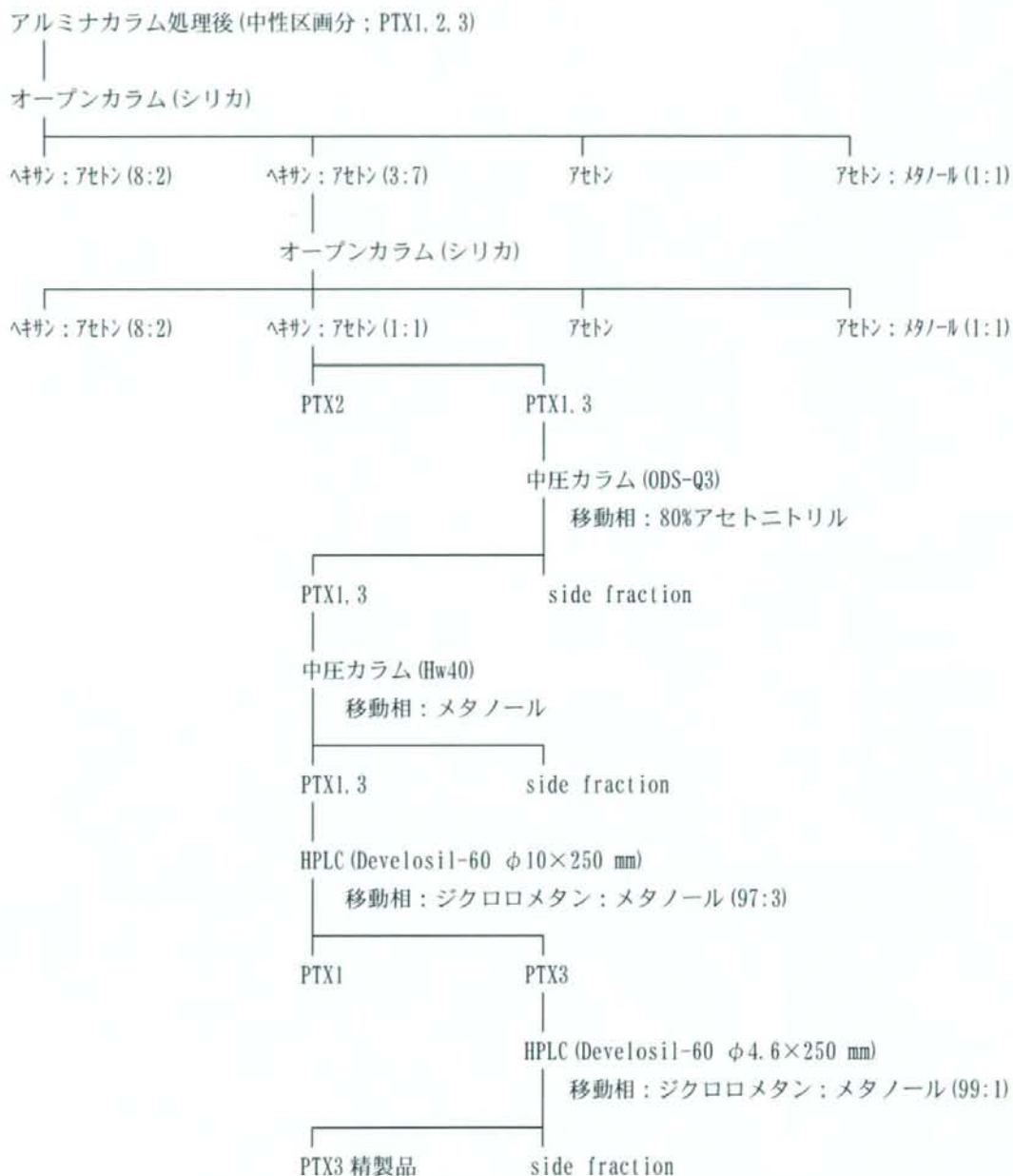


図4 PTX3 精製フロー

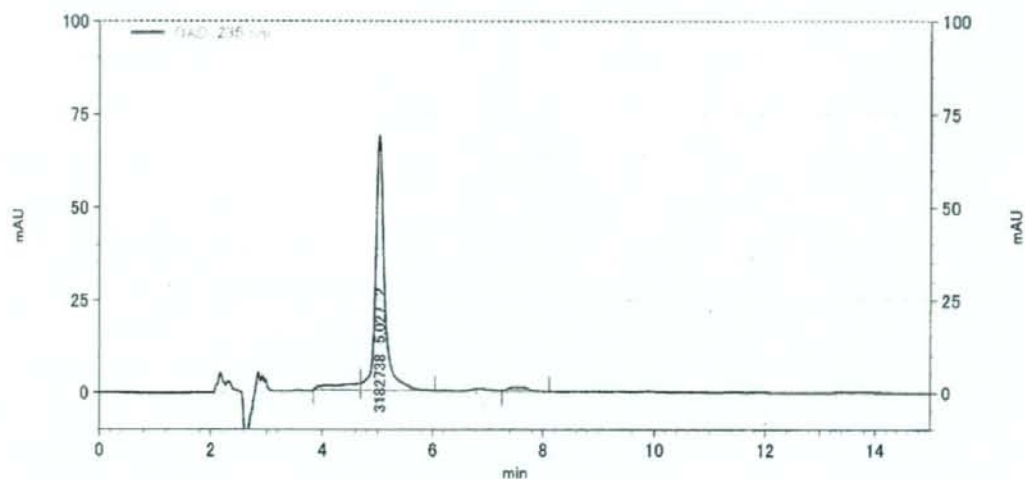


図5-a PTX3精製品のHPLC測定結果

CapcellpakC18 UG120 ϕ 4.6 \times 250, 65%MeCN/0.05%AcOH, 1.0mL/min, 35 $^{\circ}$ C

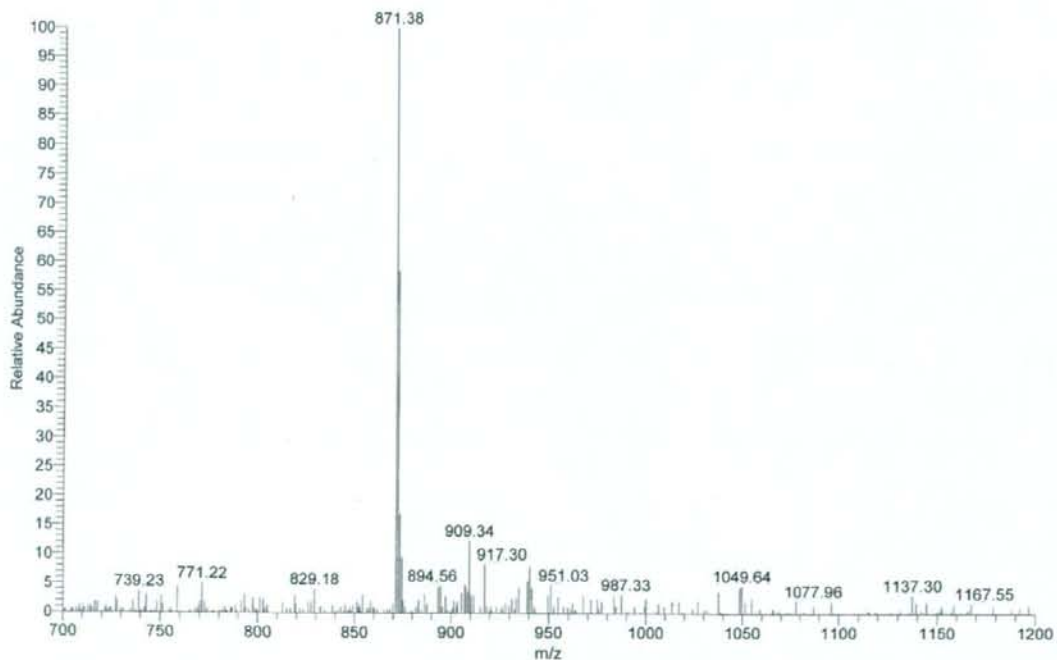


図5-b PTX3精製品のMSスペクトル (陰イオンモード)

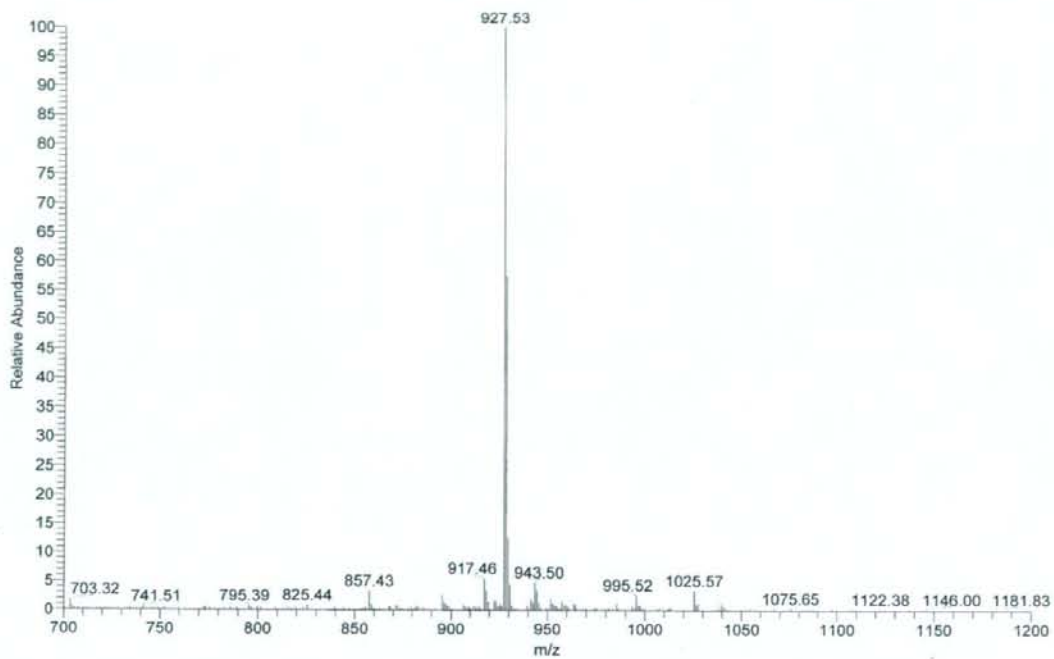


図5-c PTX3精製品のMSスペクトル (陽イオンモード)

別紙 4

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。					