

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19年度～平成20年度 総合研究報告書

主任研究者 安元 健

平成21（2009）年 3月

目 次

I. 総合研究報告		
貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究	1
安元 健		
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	42
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	50
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	61
III. 研究成果の刊行物・別刷	61

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

研究の要旨

有毒プランクトンの発生による二枚貝の毒化は、世界的に広域化・恒常化しているため、各国は自国産の貝のみならず輸出入に関する全ての二枚貝製品について、あらゆる種類の貝毒を検査する必要に迫られている。二枚貝に蓄積される貝毒は、毒成分の種類により麻痺性貝毒、下痢性貝毒、神経性貝毒、記憶喪失性貝毒、アザスピロ酸貝毒に区分されている。これらの貝毒から消費者を保護するために、二枚貝の生産地では有毒プランクトンの発生や貝の毒化状況についてモニタリングが実施され、貝毒が一定の基準値を超えると出荷が停止される。しかし、貝毒の規制は国により異なるため、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、2001年にはEUが、2004年にはWHO/FAO/IOCの3国際機関が合同で専門家会議を召集して統一の見解をまとめ、CODEXに答申する作業を行った。専門家会議では、WHOのデータブックに従った許容値の再計算及びリスク評価に基づく許容値の設定が合意された。また、検出感度と精度に優れた代替法の開発が急務であることが確認された。

現在各国で使用されているマウス腹腔内注射試験法は迅速性、感度、特異性に劣り、提案が予想される低い許容値と複雑な毒組成に対応できない。一方、これらの点で優れている液体クロマトグラフ-質量分析法（LC-MS）は、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。そのために、標準品による補正を行っていないLC/MS法は簡易検出法であって、行政処置の執行に必要な信頼性に欠けると見なされることがある。

一方、麻痺性貝毒については、分担研究者の大島が開発した蛍光検出液体クロマトグラフ法が高い評価を得ており、多検体分析に向けた操作性向上と標準品作製が期待されている。

近年、学会等で種々の試験方法が発表されているが、簡便で、精度が良く、かつバリデートされた方法によるデータが豊富に得られているとはいえない。またCODEX、WHO等で貝毒に関する協議を行う際には、十分なデータが必要となる。貝毒の監視に用いられているマウス法は世界的に抑制の方向にあり、代替法の開発は急務となっている。

高精度分析に必要な標準毒の作成は決して容易ではない。わが国の代表的貝毒である下痢性貝毒の場合、100kgの毒化二枚貝から得られる主成分は数mgに過ぎない。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、本事業の研究者らを除いては調製に成功していない。

そこで、本研究では、国内外のデータ等の収集及びマウス法も視野に入れた適正な毒性評価を行うための分析方法の検討・開発を通じて、我が国における国民の安全を確保するための貝毒の規制方法や基準値の見直し等の施策立案に用いるデータ等を提供し、さらに国際的な規制の統一化に資することに留意した。

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、国内で発生する下痢性貝毒と関連脂溶性貝毒および麻痺性貝毒について高精度分析法を開発し、その実施に必要な標準毒を調製して国産二枚貝の正確な貝毒監視を可能にすることである。また、国内で発生していない貝毒であっても、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、微量ではあるが主要成分の標準品を作成し、LC/MSによる検査を可能にした。

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

下痢性貝毒に端を発した二枚貝脂溶性毒の研究によって、貝中には多様な毒が蓄積し、これらの毒は化学構造のみならず健康リスクの面でも大きく異なることが明らかとなった。主要毒の名称と化学構造を図1に示す。我が国で多発する下痢性貝毒の場合、下痢原性のあるジノフィシストキシン(DTX)類と、下痢原性のないベクトノトキシン(PTX)やイエツトキシン(YTX)類が共存することが多く、マウス試験法では区別がつかないために一括して下痢性貝毒に分類されてきた。EUの専門家会議は、DTX類の許容値を引き下げる一方で、YTXやPTXについては最新のリスク評価に基づいて再評価し、規制を大幅に緩和することを勧告している。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・感度・特異性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。そのため、標準毒を使用しないLC/MS法は行政処置の執行に必要な信頼性に欠けると判断されてきた。

高精度分析に必要な標準毒の作成は決して容易ではない。わが国の代表的貝毒である下痢性貝毒の場合、100kgの毒化二枚貝を得たとしても、むき身の量は30kgであり、そこから得られるのは主成分のDTX1であっても僅か2~3mgに過ぎない。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、申請者らを除いては調製に成功していなかった。

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。また、国内では出現していなくても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。

さらに、国内外のデータ等の収集及びマウス法も視野に入れた適正な毒性評価を行うための分析方法の検討・開発を通じて、我が国における国民の安全を確保するための貝毒の規制方法や基準値の見直し等の施策立案に用いるデータ等を提供し、国際的な規制の統一化に資することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 諸種貝毒の物理化学的性状と毒性、及び諸外国の規制状況に関する資料蒐集
二枚貝の貝毒成分及びその毒性データの調査、貝毒規制の実態調査、並びに試験方法及び規制の根拠について文献調査を行った。また、国際会議等に参加し、本研究における成果を発表するとともに、情報交換を行い、海外の動向に関する情報収集を実施した。

(2) LC/MSによる下痢性貝毒及び脂溶性貝毒の一斉分析法確立

分析対象成分として、図1に示す14成分を選んだ。先に我々はLC/MSによる下痢性貝毒分析法を報告しているが、¹⁾その方法では抽出液の前処理とLC-MS測定条件が煩

雑であった。そこで本研究では、傾斜溶出法を採用して多成分の同時一斉を行った。

また、わが国では未発生のアザスピロ酸貝毒と神経性貝毒についても分析条件を確定し、貝類製品の輸出入管理への適用を可能にした。

わが国の公定分析法は、貝の可食部全体ではなく、毒が局在する中腸腺を分析の対象とすることを定めているので、本研究でも中腸腺を抽出原料とした。分析法の信頼性検証には、無毒のホタテガイ *Patinopecten yessoensis* 及びムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* の中腸腺に標準毒を添加した試料、及びこれらの中腸腺抽出液に標準毒を添加して作製した試料を用いた。方法の検証は、単一試験室における検証試験 (Single Laboratory Validation) を実施で行い、世界基準の貝毒測定法として提案可能な高度化・高精度化された方法とすることを目指した。複数機関にまたがる検証試験 (Interlaboratory Validation) は、それぞれの保有機種の性能・特性が大きく異なると予想されたので実施しなかった。機種による違いは標準品を使用すれば補正が可能である。

使用機種とモニターイオン (SIM) は表 1 に示した。分析対象成分が多く、使用機種の性能の差異も大きいので、MS/MS/MS などの MRM 分析は行わなかった。下痢性貝毒や神経性貝毒のエステル型成分では、結合脂肪酸の鎖長や飽和度の違いが多様なためにクロマト上の分離が困難なことも MSⁿ を採用しない理由である。エステル型成分については、主成分であるパルミトイルエステルを指標に用いた。

(3) 機器分析法の検証に必要な標準毒の調製

1) 下痢性貝毒標準品の調製

国内及び海外で出現する下痢性貝毒及び脂溶性貝毒の主要標準毒を既報²⁾に従って調製した。試料調製の概略を図 3 に、抽出に用いた生物材料を図 4 に示した。これらの標準品は三つの用途に必要である。まず、一斉分析を可能にするクロマトグラフィーの条件設定に必要である。つぎに、回収率、再現性、精度を検討するために、無毒試料に数段階の濃度で添加して分析試料を調製するのに使用される。そして、クロマトグラム上のピークの同定や定量を行う際の標準試料として使用される。

・オカダ酸群標準品の調製

近年のわが国では下痢性貝毒による毒化は微弱であるので、二枚貝を抽出原料として標準毒を調製するのは困難であった。

そこで、オカダ酸と DTX1 の両成分を蓄積するクロイソカイメン *Halichondria okadai* を原料とする計画を立てた。しかし、国内各地で採集したクロイソカイメンの DTX1 含量も極めて低かったので、原料とすることを断念した。一方、毒化ホタテガイのヘキササン区はエステル毒の DTX3 を含んでいるが、あまりに微量なので利用されずに放置されていた。そこで、DTX3 を加水分解して DTX1 に変換して利用する計画を立てた。大量の脂質が共存するので精製には困難が伴ったが、ヘキササン・メタノールの 2 相分配と塩基性アルミナカラムによる中性脂質との分離を反復することで DTX1 の効率的調製を可能にした (図 5)。次いで図 6 に示す 3 段階位置選択的アシル化法でパ

ルミトイル基を7位水酸基に導入してDTX3及び相当するオカダ酸エステルを化学合成した。³⁾ エステル合成に使用するOA及びDTX1は、抽出に適した原料の入手が困難だったため、本研究では分析条件設定に必要な最小量を製作した。

・YTX標準品の調製

国産二枚貝(主としてホタテガイ)及び外国産イガイ中のYTX類縁体は濃度が低く、抽出に適しなかった。そこで、研究の後半では北里大学水産学部(当時)の小池一彦博士に依頼して渦鞭毛藻 *Protoceratium reticulatum* のYTX生産性クローンを培養して頂き、藻体及び培養ろ液から既報に従ってYTXを調製した。⁴⁾

・PTX標準品の調製

大環状ラクトンであるPTX類は、まず *Dinophysis fortii* がPTX2を生産する。ついで43位メチル基がホタテガイ体内で水酸基(PTX1)、アルデヒド基(PTX3)、カルボキシル基(PTX6)へと酸化される。⁵⁾ イガイ類ではラクトン環が開環して無毒のセコ酸に分解される。⁶⁾ したがって、PTX類はホタテガイ中腸腺を抽出する以外に供給の道がなく、貝の毒化状況に左右されるところが大きい。PTX1, 2及び6は定法で調製可能である。しかし、PTX3は溶液中では水和物、メチルヘミアセタール、ジメチルアセタールを形成し、立体異性も加わって分離が極めて困難となる。しかし、LC-MS法の精度確認のためには、PTX3が必要であると考えて努力した結果、分担研究者の関口によって微量ではあるが調製が達成された。

・神経性貝毒とアザスピロ酸(AZA)

神経性貝毒の発生したニュージーランドの2枚貝 *Perna canaliculus* から既報⁸⁾にしたがって主要毒のBTXB2を調製した。アイルランドとスペインからは少量のAZA類を含むイガイ、*Mytilus edulis* が供与され、LC-MS法の精度確認に必要な微量のAZA1を既報に従って調整した。^{5), 9)}

C. 研究結果

[文献及び情報の収集(平成16~19年度)]

2004年9月にFAO, WHO, 及びIOC(UNESCO政府間海洋学委員会)の3国際機関は合同で、二枚貝の毒に関する「毒性評価」、「試験法」、「有毒プランクトン監視法」の3項目について専門家を招集し、その意見を聴取して統一した見解をまとめ、CODEXに答申する作業を行った。

主任及び分担研究者は、毒性評価及び試験法の2部会に専門家として参加し、今後の研究の方向を定めるのに十分な、文献と情報の収集を行った。

なお、入手した資料等は非公開とされているため、本報告書には添付できないが、安元及び大島が保管している。

2005年11月に開催された第40回有毒微生物専門部会日米合同会議(UJNR)において、研究者(安元及び大島)は本研究における成果を発表し、米国関係者と情報交換を行った。

さらに、2005年12月に環太平洋国際化学会主催の学会PACIFICHEM 2005における特別シンポジウム「海洋毒:その構造、毒

性と検出」において、主任研究者は本研究における成果を発表した。また、本学会において国内の貝毒被害防止の方策を将来的に探る本研究課題の遂行に重要な各種情報を交換した。

2006年9月に、The International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA) 主催の学会「12th International Conference on Harmful Algae」に出席して本研究における成果を発表し、同時に海外の貝毒被害防止策の動向に関する情報収集を実施した。

2007年9月に、AOAC 主催の学会 121st AOAC Annual Meeting & Exposition において、本研究における成果を発表した。同時に、本会議に出席して各種情報交換を行った。

2007年12月に、分担研究者の大島及び関口は、New Zealand, Cawthron Institute を訪問し、有機溶媒可溶性貝毒標準品の調製に関する情報交換を行った。さらに、我々が開発した LC-MS 法による一斉分析及び麻痺性貝毒分析法を、公的な分析法として承認させるための基礎データ収集について協力を要請するとともに、研究の打合せを行った。

2008年9月には、前年に引き続き 122nd AOAC Annual Meeting & Exposition において、本研究における成果を発表した。また、本会議に出席して各種情報の交換を行った。

2008年11月に、分担研究者の大島は、The International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA) 主催の学会「13th International Conference on Harmful Algae」に出席し、麻痺性貝毒の分析を必要あるいは実施している多くの研究者に対し

て、タンデムカラムによる一斉分析法について発表した。また、世界の貝毒対策関係者と意見交換を行った。

標準毒作成

下痢性貝毒標準品調製の一例としてホタテガイ中腸腺から DTX1, OA, PTX1, 2, 3, 6, 及び YTX を精製する場合の概略を図3に、7-*O*-pal-OA 及び 7-*O*-pal-DTX1 の合成方法の概略を図6に示した。個々の成分の精製については、対応する文献に記載された方法に従い、原料の性状に応じて適宜改変を加えて行った。

当初目標として図1に示した成分の中で、AZA2, 3 は国外からの原料入手が困難なため調製できなかった。45-OH-YTX も国内試料の含量が低く、微量にしか得られなかった。代わって当初予定になかった homoYTX が分担研究者の関口によって少量ながら調製されたので、合計12成分の標準毒が確保された。

作製した標準毒の同定及び純度検定は ¹H-NMR, LC/MS, HPLC-DA (ダイオードアレイ検出器) によって行った。

作製した標準毒の大部分は、抽出液や無毒ホモジェネートへ添加して試験試料を作成するのに使用された。しかし、表3に示す主要6成分 (OA, DTX1, PTX1, PTX2, PTX6, YTX) については、純度が97%以上であることを確認した上で、2mg ずつを今後の研究あるいはモニタリングに必要な標準品として提供が可能になった。7-*O*-pal-OA と 7-*O*-pal-DTX1 は合成が進行中である。BTX2, AZA1 についても、微量標準毒を提供する。PTX3, homoYTX は分担

研究者の関口が提供する予定である。

国内で入手できる毒化二枚貝だけでは全ての成分を得ることは不可能なので、オカダ酸を蓄積するクロイソカイメンや海外の二枚貝試料も使用した(図4)。エステル型下痢性貝毒は結合脂肪酸組成の異なる複雑な同属体群であり、個々の成分を単離することが非常に困難なので、一旦加水分解を行って DTX1 を調製し(図5)、これを原料として 7-*O*-pal-DTX 1 (=DTX3) を合成した。目標の 2 mg に近い量を作成した。YTX は生産渦鞭毛藻類の培養で入手した。homoYTX は分担研究者の関口が培養藻体とろ液から精製した。

純度の検定

各成分の純度を示す資料を、図7から図16に示す。測定条件はそれぞれのスペクトルやクロマトグラムに付記した。

有機溶媒可溶毒は麻痺性貝毒と異なって吸湿性がないので、定量は重量測定によって行った。試料のメタノール溶液を予め重量を測定しておいたバイアルに移し、窒素気流下でメタノールを溜去する。ついで減圧デシケーターに移し、真空ポンプで排気する。定時的に重量を測定し、恒量に達する迄排気を継続する。重量測定の精度を高めるために、可能な限り 2 mg 以上の試料を測定に供した。

[分析法開発]

1. 標準毒の LC-MS 分析法

まず、標準毒を用いて一斉分析法の検討を行った。LC-MS に使用した機種、使用カラム、溶離液の組成、溶出条件及びモニタ

ーイオンの種類等は先に表1に示した。標準毒混合物のマスキングマトグラムを図15に示した。その結果、1回の測定操作により、30分で脂溶性毒14成分が測定可能であり、短時間・高感度な一斉分析法として有用であると判断された。

1) 試料の抽出と LC-MS の条件設定

無毒抽出液の調製

ホタテガイとムラサキガイを毒化原因プランクトンが出現せず、かつ、マウス毒性試験が陰性な海域から入手し、中腸腺を試料とした。細切した中腸腺 2 g を遠沈管にとり、90%メタノール 18 ml を加えて1分間ホモジェネートした。ついで、2,500 rpm で10分間遠心分離を行い、上澄み液を無毒二枚貝抽出液とした。なお、有毒試料では95%以上の毒がこの方法で抽出された。

溶出条件とイオンの選択

上記無毒二枚貝抽出液に標準毒を添加し、LC-MS 法による一斉分析法の条件を検討した。その結果、表1に示した条件で1回の測定操作によって、30分で国内・国外の代表的な下痢性貝毒及び脂溶性毒14成分の一斉分析が可能であった。この時、AZA 類及び BTXB2 は陽イオンを、その他の成分は陰イオンを測定した。選択したイオンと相対強度比を表1と表2に示した。

標準毒のマスキングマトグラムを図17に示す。いずれの成分も明確なピーク形を与えた。ただし、BTXB2 はスルホキシド基の立体異性体 (*d*1) が存在するため、ピークがわずかに分裂している。PTX3 メタノール溶液中では aldehyde, dihydrate, 43 (S)- 及び 43 (R)-methyl hemiacetal, チ

メチルアセタールの混合物質であるために成分が分散し、検出感度は悪くなる

(図18)。

標準毒添加抽出液のマスクロマトグラムを図19と図20に示す。ホタテガイは冬になると脂質含量が大幅に上昇するので、マトリックスによる妨害の程度が異なると予想し、夏季と冬季の試料で分析を行った。しかし、図に見られるようにいずれの季節でも分析には支障がなかった。

検出下限

標準毒溶液及び標準毒を添加したホタテガイまたはムラサキガイ中腸腺抽出液に添加した場合の検出下限を図21に示した。PTXB3及びBTXB2は先に述べた理由(異性体生成)によって検出下限は共に10.0 ng/mLと高かったが、他の毒成分は2.0 ng/mL程度あるいはそれ以下で検出可能であった。このような検出下限は規制で要求される濃度(ホタテガイ中腸腺では0Aの200ng/mlに相当)をはるかに下回っている。アミノ基のような陽イオン化しやすい基を有するAZAの検出下限は更に低くなる。

2) 再現性試験

標準毒及び標準毒を添加したホタテガイまたはイガイ抽出液を用いて測定した再現精度(RSDr)の結果を表4に示した。

ほとんどの標準毒で再現精度(RSDr)は10%以下であった。しかし、7-*O*-pal-DTX1では最も濃度が低い試料では15.1%とやや高い値を示した。

添加回収試験

添加回収試験は二つの条件で行った。ま

ず、無毒ホタテガイまたはムラサキガイそれぞれの中腸腺1gに標準毒を3濃度レベル(0.2, 0.5, 1.0 µg/g homogenate)で添加し、90%メタノール溶液9mlで抽出して回収率測定試料とした。なおAZA群は陽イオンをモニターすることにより高感度で検出できることから、添加濃度は0.02 µg/gとした。次に、無毒抽出液に標準毒を添加して種々の濃度の試験液を作製した。両試験液についてLC-MS分析を行い、回収率を求めた。その結果を表5-1及び5-2にまとめた。

さらに見やすいように図22及び23に示した。測定器の不調で試料の一部が測定できなかった(空欄)。

その結果、標準毒を抽出液に添加した場合の回収率は80~110%であった(図22)。次に、標準毒を中腸腺に添加して抽出操作を行った試料での添加回収率は70~110%であった(図23)。

以上の結果から、本法は、迅速性、精度、感度、再現性に優れていることが確認できた。

D. 考察

[標準毒]

国際的にはカナダのNational Research Council (NRC)が中心となり、ニュージーランドの2研究財団とオスロ大学が加わって標準毒作成に努力している。しかし、2009年現在で供給が可能になったのは、下痢性関連毒では、オカダ酸とベクテノトキシン-2及びイエツトキシンの3成分のみであり、わが国での主要成分であるジノフィシトキシン-1と同3及びベクテノトキシ

ン-1, 3, 6については、当面供給される可能性がない。

LC-MS 分析の技術を生かすには標準品の使用は必須であり、本研究で作製した標準品(表7)がわが国の機器分析に大いに活用されることが期待される。神経性貝毒とアザスピロ酸貝毒については、国内での原料調達が可能のために標準品を十分に確保して精度検証を行うことが叶わなかった。今後の原料入手に期待する。

[迅速性]

本研究で使用する試験液の作製は、試料中腸腺に9倍量の90%メタノールを加えて抽出し、遠心分離で上澄みを得るだけの簡単な操作なので多数検体を処理できる。LC-MSの自動注入装置を使用すれば終夜連続運転が可能なので多検体を処理できる。公定法であるマウス試験の数を減らし、かつ、産業界に迅速・高精度の情報を提供できる。

本研究の特徴の一つはOAとDTX1のエステルを製作したことである。エステル型を標準品混合物に加えておくことによってその含量を予測することができる。エステル型が多いことが予想されたら、試料液の加水分解を行ってOAやDTX1の全量を求める。エステル型標準品を生産できない他の国々では、最初から全試料について加水分解を行う。しかし、PTXやAZAなど多くの成分が加水分解操作によって破壊されるために、試料を加水分解の前後で測定せねばならず、2倍の時間と労力を費やす。エステル型標準品が有利な所以である。

[精度検証]

複数機関による分析精度の検証は、時間

的な制約と機種による性能差の問題で実施できなかった。標準品があれば、保有機種の性能に応じてLC条件の改変を行い解決することができると考えて、標準品作成に最大の努力を払った。しかしながら、日本食品分析センターで同一機種を使用した測定でも、日時の経過につれて大きな誤差を生じることがあり、その原因究明は容易ではなかった。試験液を10倍希釈することで改善が見られるので、マトリックスの影響が推定された。しかし希釈を行うと低毒性試料の測定が問題となる。ムラサキイガイでは規制値前後の毒量測定が困難となるが、ホタテガイでは支障が少なかった。わが国の重要な測定対象種はホタテガイなので、モニタリングを実施する場合、10倍希釈試験液を使うことも選択の一つであろう。一方、協力を依頼した他研究機関の機種では、標準溶液を使用しても特定の成分が検出されないことがあった。モニタリングを実施する場合は、使用機種の性能を確認した上で実施することが肝要である。複数機関による精度検証は重要な課題なので、今後も検討を続行する必要がある。また、当面は対象二枚貝をホタテガイに限定することが好ましい。

[補助的試験法としての活用]

LC-MS分析は、①マウス試験の数を減らす ②個別の毒のリスクに対応した規制を実施するという世界の潮流に合致する。また、多数検体の毒含量と組成を迅速に測定し、出荷を判断するのに必要な情報を提供できるので生産者のメリットは大きい。しかしながら、機種による測定値の変動は大きく、直ちにマウス試験法に代わるもので

はない。

一方、わが国では LC-MS がもたらす毒組成情報を活用する仕組みが確立していない。例えば、地域によってはマウス毒性の原因が YTX である場合が多い。YTX は腹腔内注射では高い毒性を示すが、経口投与試験では殆ど毒性を示さない。そのため EU では OA や DTX1 に比べて非常に高い許容量を提案している。PTX 類についても同様な状況にある。今回、多数の標準毒が利用可能となったことによって、多くの研究機関が LC-MS 分析に参加し、わが国で出現する脂溶性毒の実態を明らかにして、その成果を行政に反映させることが望ましい。

以上の研究で得られた成果として、

- ① 海外の貝毒発生状況及び規制の実態調査、マウス法の改良、個別貝毒試験法の開発並びに分析データの蓄積により、我が国における貝毒の規制方法や基準値の見直しの施策立案にあたり、総量規制か個別規制かを選択するための基礎的資料が提供できる。
- また、個別規制を実施する場合の試験法及び基準値が提示できる。
- ② 本研究の成果から、諸外国と調和のある適切な規制法を設定することができる。
- また、我が国も国際的な議論に加わり、さらには議論をリードすることが可能となる。
- この結果、適正な規制値と検査法について世界的合意が達成されれば、全ての貝毒の分析精度と実用性向上を図ることが可能となり、モニタリング体制の整備を通して国内消費者の安全性を確保し、輸出入を円滑にし、かつ、貝毒による二枚貝生産者の被害を最小限に止めることが期待される。

E. 結論

[文献及び情報の収集]

研究者(安元及び大島)は、2005年11月に開催された第40回有毒微生物専門部会日米合同会議(UJNR)において、本研究における成果を発表し、米国関係者と情報交換を行った。また、2005年12月に開催された環太平洋国際化学会主催の学会 PACIFICHEM 2005 において、研究者(安元及び大島)は本研究における成果の発表を行った。

研究者(安元及び大島)は2006年9月に開催された「12th International Conference on Harmful Algae」に出席して本研究における成果を発表し、同時に海外の貝毒被害防止策の動向に関する情報収集を実施した。

研究者(安元及び関口)は2007年9月に、AOAC 主催の学会 121st AOAC Annual Meeting & Exposition において、本研究における成果を発表した。同時に、本会議に出席して各種情報交換を行った。

分担研究者の大島及び関口は、2007年12月に New Zealand, Cawthron Institute を訪問し、有機溶媒可溶性貝毒標準品の調製に関する情報交換を行った。さらに、我々が開発した LC-MS 法による一斉分析及び麻痺性貝毒分析法を、公的な分析法として承認させるための基礎データ収集について協力を要請するとともに、研究の打合せを行った。

主任研究者の安元は2008年9月に、前年に引き続き 122nd AOAC Annual Meeting & Exposition において、本研究における成果を発表した。また、同時に本会議に出席し

て各種情報の交換を行った。

分担研究者の大島は、2008年11月にThe International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA)主催の学会「13th International Conference on Harmful Algae」に出席し、麻痺性貝毒の分析を必要あるいは実施している多くの研究者に対して、タンデムカラムによる一斉分析法について発表した。また、世界の貝毒対策関係者と意見交換を行った。

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

該当事項なし。

2. 学会発表

- 1) T. Yasumoto, 「Supportive efforts behind method developments - Preparation of toxin standards」, UJNR symposium on Development of New Detection Techniques for Marine Toxins in Japan and Their Application to Improve Shellfish Safety, (2005. 11)
- 2) 「Preparation of standard shellfish toxins and their simultaneous analysis by LC-MS(Poster)」, Megumi Suzuki, Reiji Sekiguchi, Masatoshi Watai, Kazuhiko Koike and Takeshi Yasumoto, The Pacificchem 2005 Congress (2005. 12)
- 3) 「Increasing diversity of marine toxins and the tasks set for chemists」, T. Yasumoto, The Pacificchem 2005 Congress,

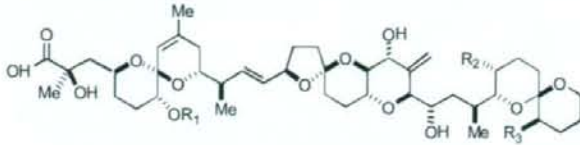
(2005. 12)

- 4) 鈴木 芽, 関口礼司, 渡井正俊, 安元 健: 「下痢性貝毒及びその他貝毒のLC/MS法による一斉分析法の開発」, 平成18年度日本水産学会大会口頭発表, 2006. 3. 31.
- 5) M. Suzuki, R. Sekiguchi, M. Watai, T. Yasumoto: Preparation and simultaneous LC-MS analysis of fourteen shellfish toxins, 12th International Conference on Harmful Algae (Poster), 2006. 9. 4.
- 6) 「Characteristics of PSP-toxin profiles in bivalves from Japan coastal waters」, Yasukatsu Oshima, UJNR symposium on Development of New Detection Techniques for Marine Toxins in Japan and Their Application to Improve Shellfish Safety, (2005. 11)
- 7) 「Application of post-column derivatization HPLC method for the paralytic shellfish toxins monitoring」, Yasukatsu Oshima, The Pacificchem 2005 Congress, (2005. 12)
- 8) 渡邊龍一, 八田真澄, 大島泰克, 「麻痺性貝毒標準品調整法に関する研究」, 平成18年度日本水産学会大会 (2006. 3)
- 9) Y. Oshima, R. Watanabe, Preparation of reference material and toxin standards for the analysis of PSP toxins. 10th UJNR International Symposium on Toxic Microorganisms (invited speaker), 2006. 11. 8 (FDA, Merryland, USA).
- 10) R. Watanabe, K. Nakaji, Y. Oshima: Application of saxitoxin-conjugated

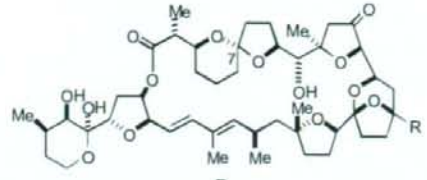
- affinity gel for the detection of macromolecules involved in toxin dynamics in scallops. , 12th International Conference on Harmful Algae (Poster), 2006. 9. 4.
- 11) Y. Cho, K. Hiramitsu, M. Ogata, T. Omura, T. Ishimaru, Y. Oshima : Genetic characteristics of non-toxic subclones obtained from toxic clonal culture strain of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). 12th International Conference on Harmful Algae (Poster), 2006. 9. 4.
- 12) Y. Oshima : Characteristics of PSP-toxin profiles in bivalves from Japanese coastal waters. : 12th International Conference on Harmful Algae (Poster), 2006. 9. 4.
- 13) T. Yasumoto, R. Sekiguchi, M. Suzuki, A. Yoshino, Marine toxin detection at the chemistry/biology interface (invited). AOAC Annual Meeting & Exposition, Anaheim, Sep. 20, 2007.
- 14) T. Yasumoto: Production of putative analogs of okadaic acid and new marcroliides by *Prorocentrum lima* (invited). 122nd AOAC Annual Meeting & Exposition, Dallas, Sep. 21-24, 2008.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 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敦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。
- 参考文献
1) H. Goto, T. Igarashi, M. Yamamoto, M. Yasuda, R. Sekiguchi, M. Watai, K. Tanno, T. Yasumoto, Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Chromatog. A*, 907, 181-189 (2001).
- 2) H. Goto, T. Igarashi, R. Sekiguchi, K. Tanno, M. Satake, Y. Oshima, T. Yasumoto, A Japanese project for production and distribution of shellfish toxins as calibrants for HPLC analysis. In: *Harmful Algae* (B.

- Reguera, J. Blanco, M. L. Fernandes, T. Wyatt, Eds), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 262-269 (1988).
- 3) T. Yanagi, M. Murata, T. Yasumoto, Biological activities of semisynthetic analogs of dinophysistoxin-3, the major diarrhetic shellfish toxin. *Agric. Biol. Chem.* 53, 525-529 (1989).
- 4) M. Satake, L. MacKenzie, T. Yasumoto, Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat Toxins* (5), 164-167 (1997).
- 5) T. Yasumoto, Chemistry, etiology and food chain dynamics of marine toxins. *Proc. Japan Acad. Ser. B.* 81, 43-51 (2005).
- 6) M. Daiguji, M. Satake, K. J. James, A. Bishop, L. MacKenzie, H. Naoki, T. Yasumoto, Structures of new pectenotoxin analogs, pectentoxin-2 seco acid and 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels. *Chem. Lett.*, 7, 653-654 (1998).
- 7) M. Murata, M. Sano, T. Iwashita, H. Naoki, T. Yasumoto, The structure of pectenotoxin-3, a new constituent of diarrhetic shellfish toxins. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2693-2695 (1986).
- 8) K. Murata, M. Satake, H. Naoki, H. F. Kaspar, T. Yasumoto, Isolation and structures of a new brevetoxin analog, brevetoxin B2, from greenshell mussels from New Zealand. *Tetrahedron*, 54, 735-742 (1998).
- 9) M. Satake, K. Ofuji, H. Naoki, K. J. James, A. Furey, T. McMahon, J. Silk, T. Yasumoto, Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies isolated from Irish mussels. *J. Am Chem. Soc.*, 120, 9967-9968 (1998).

脂溶性貝毒

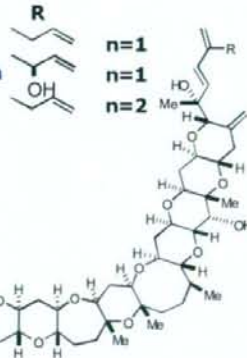


okadaic acid (OA)	R1 R2 R3
■ dinophysistoxin1(DTX1)	H Me H
■ pal-OA	pal Me H
■ pal-DTX1	pal Me Me

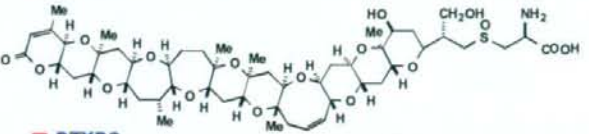
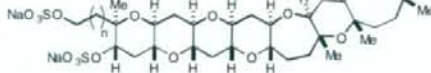


■ pectenotoxin1 (PTX1)	R
■ pectenotoxin2 (PTX2)	CH ₂ OH
■ pectenotoxin3 (PTX3)	CH ₃
■ pectenotoxin6 (PTX6)	COH
	COOH

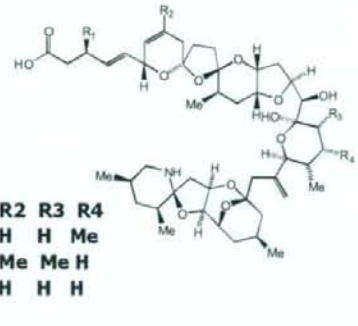
yessotoxin(YTX)
 ■ 45-hydroxyyessotoxin
 Homo-YTX



n=1
 n=1
 n=2



■ BTXB2
 BTXB4
 (国外)



Azaspiracid	R1 R2 R3 R4
■ Azaspiracid -2	H H H Me
■ Azaspiracid -3	H Me Me H
	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

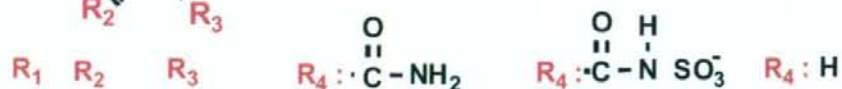
■：貝の代謝産物



STX: saxitoxin

GTX: gonyautoxin

dc-: decarbamoyl-



H	H	H	STX	(2483)	GTX5	(160)	dcSTX	(1274)
OH	H	H	neoSTX	(2295)	GTX6	(180)	dcneoSTX	(33)
OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX1	(2468)	C3	(33)	dcGTX1	(1500)
H	OSO ₃ ⁻	H	GTX2	(892)	C1	(15)	dcGTX2	(1617)
H	H	OSO ₃ ⁻	GTX3	(1584)	C2	(239)	dcGTX3	(1872)
OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX4	(1803)	C4	(143)	dcGTX4	(1080)

()内の数字は比毒性を示す MU/μ mole 赤字は日本産の試料で確認されている13毒を示す

図2 主要な麻痺性貝毒の構造とモル当たりの毒性

表1-a 選択したイオンと相対強度比

陽イオンモード	相対強度比
• AZA1 : 828.5 [M+H] ⁺	1
• AZA2 : 842.5 [M+H] ⁺	0.7
• AZA3 : 856.5 [M+H] ⁺	0.7
• BTXB2 : 1034.6 [M+H] ⁺	0.02
陰イオンモード	
• OA : 803.5 [M-H] ⁻	1
• DTX1 : 817.5 [M-H] ⁻	1
• pal-OA : 1041.7 [M-H] ⁻	0.4
• pal-DTX1 : 1055.7 [M-H] ⁻	0.5
• PTX1 : 919.5 [M-H+HCOOH] ⁻	0.4
• PTX2 : 903.5 [M-H+HCOOH] ⁻	0.4
• PTX3 : 949.5 [M-H+CH ₃ OH+HCOOH] ⁻	0.2
• PTX6 : 887.5 [M-H] ⁻	0.5
• YTX : 1141.5 [M-2Na+H] ⁻	0.4
• 45OH-YTX : 1157.5 [M-2Na+H] ⁻	0.6

表1-b LC-MSの使用機種と測定条件

•LC : NANOSPACE (SHISEIDO)

Column; Capcellpak C18 MG II 2.0×100 mm(SHISEIDO) , Flow rate; 0.2mL / min

Mobile phase; A: 2mMHCOONH₄+50mMHCOOH / H₂O

B: 2mMHCOONH₄+50mMHCOOH / MeCN:MeOH 2:8

•MS : FINNIGAN TSQ Quantum DISCOVERY (Thermo)

Ion mode; ESI negative or positive

Capillary voltage; 4.0kV

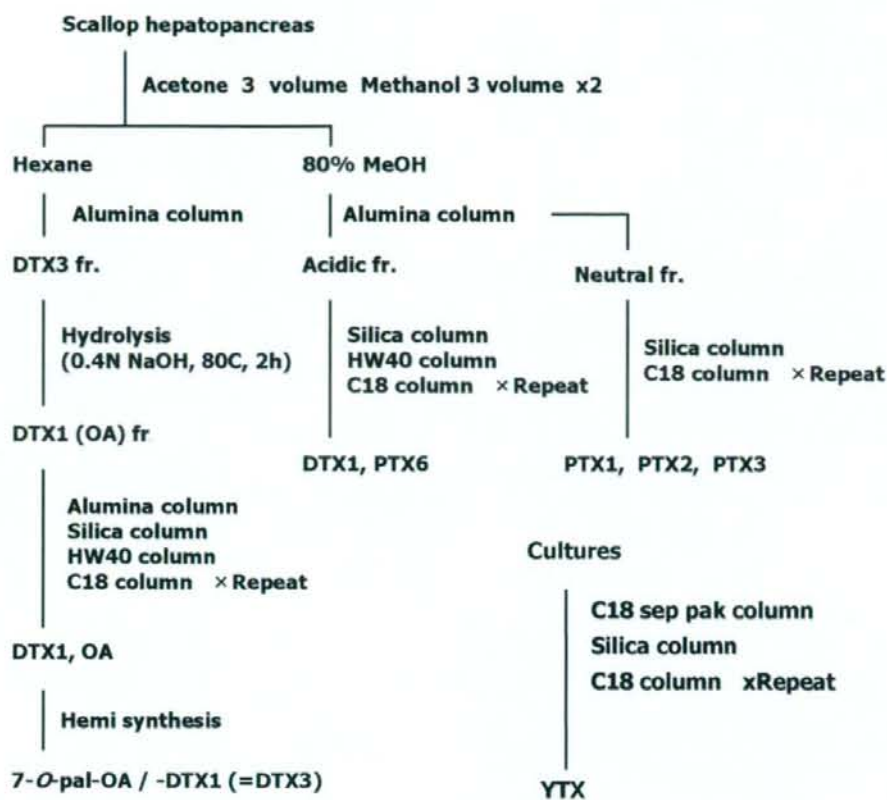


図3 ホタテガイ・ムラサキガイからの下痢性貝毒標準品の作製概略図

多様な抽出原料を国内外から入手

下痢性貝毒とその他の脂溶性貝毒

日本

ホタテガイ
(*Patinopecten yessoensis*)

DTX1
PTX1, 2, 3, 6
YTX, 45-OHYTX



クロイソカイメン
(*Halichondria okdai*)

OA



ニュージーランド

ミドリイガイ (*Perna canaliculatus*)
BTXB2 ⇒ BTX
BTBX4



アイルランド

ムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*)
Azaspiracid
Azaspiracid-2
Azaspiracid-3



ノルウェイ

ヨーロツパイガイ (*Mytilus edulis*)
YTX, carYTX



培養

Protoceratium reticulatum
YTX, HomoYTX



合成

OA, DTX1 → 7-O-palmitoyl-OA, 7-O-palmitoyl-DTX1

麻痺性貝毒 (PSP)

ムラサキイガイ
(*Mytilus galloprovincialis*)



マガキ (*Crassostrea gigas*)



アサリ (*Ruditapes philippinarum*)



Alexandrium
tamarense



A. catenella



A. tamiyavanichii



Gymnodinium
catenatum

((独)中央水研HPより引用)

図4 貝毒標準品の抽出原料