

図22 抽出液に標準毒を添加した時の添加回収率

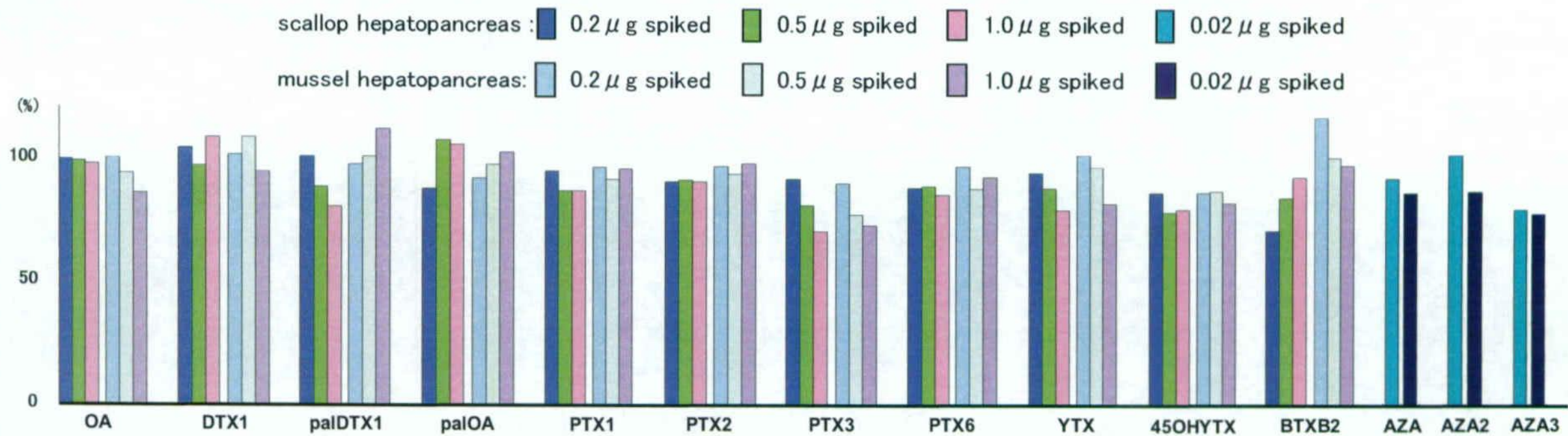


図23 中腸腺に標準毒を添加した時の添加回収率

表5-1 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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/g}$, YTX：0.15 $\mu\text{g/g}$)

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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	182	167	188		171	140	165		100	90	104		98	101	118		93	91	105		86	85	87	
0.015 $\mu\text{g/ml}$	166	191	200		144	158	149		68	96	101		105	127	95		84	123	119		81	102	88	
0.01 $\mu\text{g/ml}$	164	177	197		109	156	161		69	125	94		131	93	177		95	101	125		56	94	97	
0.005 $\mu\text{g/ml}$	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5-2 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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	215	212	123	111	278	260	216	190	162	129	168	100	107	80	103	106	159	181	116	303	105	79	59	115
0.01 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$	197	186	105	108	272	187	173	236	299	205	159	127	100	35	61	100	189	80	195	342	109	38	17	168

表7 脂溶性貝毒及び麻痺性貝毒の整備状況

脂溶性毒は今後10年の需要に対応

下痢性貝毒標準品

OA	2 mg
DTX1	2 mg
7-O-Pal-OA	調製中
7-O-Pal-DTX1	調製中

脂溶性貝毒(国内出現)

PTX1	2 mg
PTX2	2 mg
PTX3	0.1 mg
PTX6	2 mg
YTX	2 mg

脂溶性貝毒(海外出現)

BTXB2	0.2 mg
AZA-1	原料入手困難
AZA-2	同上
AZA-3	同上

麻痺性貝毒の成果

標準毒単品作製

標準毒混合物(毒群別3種、主要9成分2種)

標準分析試料(標準毒添加試料 3種2濃度
天然毒化二枚貝抽出液6種)

(数年分の使用量を確保)

各成分をマウス毒性に換算するのに必要な
比毒性を決定した

ポストカラム蛍光化HPLC

タンデムカラム分析法(高度型):

Single Laboratory Validation に必要な
データ収集中

算定の根拠(脂溶性毒)

LC-MS標準液:0.1ppm 1ml単位を20機関が1年10本10年間=2,000本
使用機種に対応した適性条件の設定に約10倍量の標準液を使用する。

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

アルカリ下で酸化すると蛍光物質に変換する麻痺性貝毒の特異な性質を利用したポストカラム蛍光化 HPLC に改良を加え、逆相分配型カラムとインイオン交換型カラムを連結することにより、主要 9 成分を 40 分で分析できる一斉分析法を開発した。また、化学分析に必要な標準品の調製法・濃度決定法に検討を加え、主要毒の標準を作成した。さらにメソッドバリデーション用に標準毒混合液や毒添加二枚貝抽出液を作成し、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標準毒の作出法から蛍光 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、麻痺性貝毒定量にかかわる基盤技術の整備に努める。

1) 蛍光 HPLC による一斉分析法の開発とその実用性検証

これまででは 3 毒群に分け、それぞれを異なるクロマトグラフィー条件で分析していたが、2 種のカラムを接続し、グラジエント溶出を適用することで、短時間での一斉分析法を目指した。

2) 標準溶液の調製

蛍光 HPLC 法をはじめ、麻痺性貝毒の化学分析には多数存在する全成分の標準品をそろえることが不可欠である。乾燥に不安定な麻痺性貝毒にあつては、正確な濃度測定法として定量 NMR 法が適していることを示してきた。ここでは、まず有毒ラン藻の大量培養による安定的な原材料の供給を検討するとともに、そこから精製・調製した 11 位硫酸エステルのエピマー平衡混合物にこの方法が適用可能かどうか調査することを目的とした。あわせて、これまで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、新分析法の

検討に用いた。

B 研究方法

1) 蛍光 HPLC による一斉分析法の開発
以下のコンセプトで新分析法の開発を目指した。

- a) 逆相分配系カラムに対し、アセトニトリル濃度を変更するグラジエント溶出を導入することにより、GTX 群と STX 群を同時に分析する。この場合、各毒の分離だけでなく、再平衡化に要する時間のできるだけ短いカラムを選択し、総分析時間の短縮をはかる。
- b) 上記の条件ではソルベントフロントに溶出する C1/C2 を保持分離させるカラムを選択する。その際、溶離液には a) で用いるイオンペアとしてヘプタンスルホン酸を含む溶離液を使うことが前提となるために、C1/C2 の酸としての性質に着目し、陰イオン交換系のカラムを検討した。
- c) a), b) の条件を満たすカラムを連結し、分離能、再現性等に必要な要件を検証した。

2) 標準毒溶液の調製

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ゴニオトキシン-2,3 (GTX2, GTX3)混合液およびデカルバモイルゴニオトキシン-2, 3 (dcGTX2, dcGTX3)混合液を調製し, *tert*-ブタノールを内部標準として含む重酢酸溶液に溶解して¹H NMR を測定し, 濃度を決定した。

C 研究結果

1) 蛍光 HPLC による一斉分析法の開発

逆相分配系カラムの検討では, 初発の溶離液にアセトニトリルを加えることを考慮して, これまでの C8 系より C18 系カラムを中心に調査した結果, Synergi 4 μ Hydro-RP カラム (ϕ 4.6 x 150 mm, Phenomenex, Carifornia, U.S.A)が再平衡化の効率が最もよく, 分離能も十分であることが判明した。

上記カラムに連結し, C1/C2 の保持と分離を担うカラムとして, 以下の陰イオン交換系のカラムを検討した。

- Inertsil AX (ϕ 4.6x33 mm)
- Inertsil AX (ϕ 4.6x70 mm)
- IC-Pak Anion HC (ϕ 4.6x150 mm)
- HITACHI GEL 3103-N (ϕ 4x35 mm)
- TSK-GEL DEAE-5PW (ϕ 7.5x75 mm)
- TSK-GEL DEAE-NPR (ϕ 4.6x35 mm)
- Shim-Pak PAG-DEAE (ϕ 8.0x10 mm)
- Shim-Pak WAX-2 (ϕ 4.0x50 mm)

ヘプタンスルホン酸をイオンペアーとして含む GTX 用の移動相を流した場合に C1/C2 および GTX 群標準がどのような挙動を示すかを検討した結果, Inertsil AX (GL Sciences) の 2 サイズおよび IC-Pak Anion HC (ϕ 4.6x150 mm, Waters)が適当な保持と分離を示した。これらのカラムを Synergi カラムの直後に接続し, GTX 群, STX 群分離用の移動相の内容, タイムプログラムを微調整して最適化をはかった。

これまでの検討で得られら最適条件は以下の通りである。これにより, 図 1 に示す良好なクロマトグラムが得られた。また, 標準溶液を 10 回の繰り返し分析に供し, 再

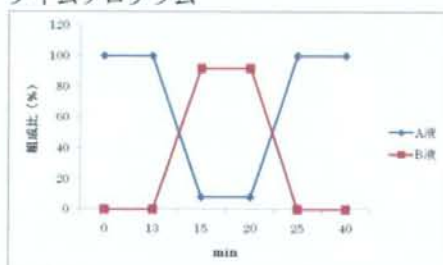
現性を調べた。保持時間の変化を図 2 に示す。40 分間の繰り返し分析でも保持時間には良好な再現性が見られている。

カラム: Synergi 4 μ Hydro-RP (ϕ 4.6x150 mm) + Inertsil AX (ϕ 4.6x70 mm)

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



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

次に 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

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。ポイドボリューム付近の夾雑物と C1 が分離し、定量が可能である。添加した毒量を 100% として回収率を計算した結果を

表 1 に示す。

表 1 麻痺性貝毒標準の回収率

	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

2) 標準溶液の調製

Nargen 社製ポリカーボネイト 10 L 容カ一ポニーに入れた Fitzgerald 培地を用い、室温 17°C、光量 25 μE²sec⁻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 μmole/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 混合溶液および dcGTX2, dcGTX3 混合溶液を調製した。図 6 に dcGTX2, dcGTX3 混合物の NMR スペクトルを示す。シグナルが独立している 10 β 面積から dcGTX3 の濃度を決定し、両者が重複している 10 α の面積のこの値を適用して dcGTX2 の濃度を決定することができた。

同様に C1, C2 混合溶液, GTX2, GTX3 混合溶液の濃度を決定した。

また、これまでの日本国内の二枚貝の毒組成を考慮して重要な成分を混合し、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

さらに、今後のメソッドバリデーションに用いる天然毒化サンプルとして、これまでに各地で集めた試料から以下の有毒抽出液を調製した。毒濃度は現行規制値の2-3倍の範囲に入るものを選び、マウス試験法に従って抽出し、SepPak C-18カラムを使い脱脂した後、0.75 mLずつ分注し、凍結保存した。

ホタテガイ	岩手県
マガキ	宮城県
アサリ	愛知県
コタマガイ	宮城県
ヒオウギ	徳島県
ムラサキイガイ	宮城県

D. 考察

新陰イオン交換カラムを接続することにより C1/C2 群から dcSTX 群にいたる一斉分析法を改良した。ほぼバリデーション実施のめどがたった。

ただし、これまでに麻痺性貝毒の分析の経験があり、グラジエント溶出、オートサンプラーによる一斉分析法に移行できる可能性のある研究室は少ない。当初は旧法をルーチンで実施している国内の研究機関に呼びかけて参加者をつのり、旧法のバリデーションを実施する予定であった。

しかし、今後の普及性を考えると40分で必要な麻痺性貝毒成分が分析できる新法を推進する方がより現実的であるとの結論に達した。そこで、まず、Single Laboratory Validation に必須なデータのに集積をはかる方向で研究を進めている。

麻痺性貝毒 HPLC の概念図と検出の基本となる蛍光化反応を図7に示す。

また、参考として麻痺性貝毒の必要度、製造原料及び調製状況を表2に示した。

E. 結論

今回開発した一斉分析法はマウス毒性試験に代わる化学分析法として公認され、普及する可能性が極めて高い。それに必要な標準毒をはじめ基盤技術を集積することができた。

F. 研究発表

学会発表

- 1) Yasukatsu Oshima, Improvement of Post-column derivatization HPLC for paralytic shellfish toxins: Analysis of major toxins with single run on tandem column. 13th International Conference on Harmful Algae, Hong Kong, China, 3th-7th November, 2008
- 2) Ryuichi Watanabe and Yasukatsu Oshima: Quantitative NMR method with internal standard for the preparation of PSP standards. 13th International Conference on Harmful Algae, Hong Kong, China, 3th-7th November, 2008

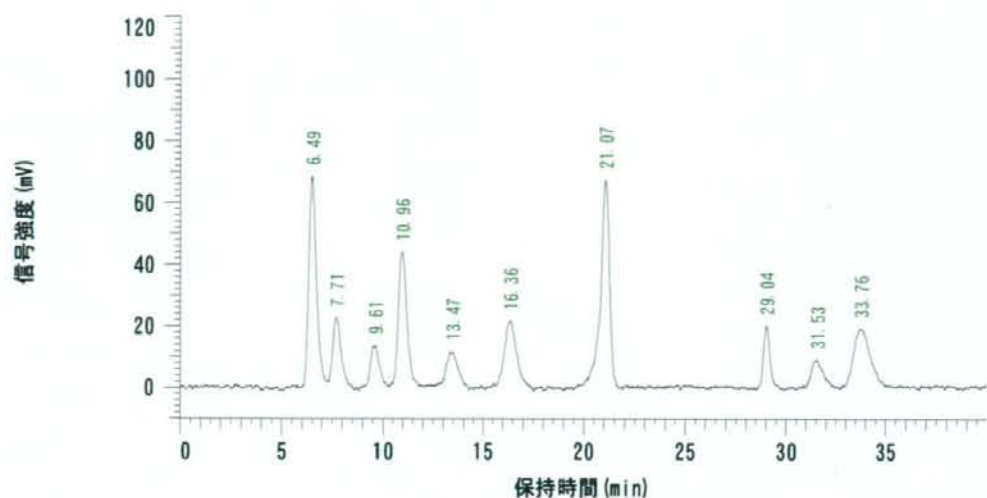


図1 Inertsil AX(ϕ 4.6×75 mm) + Synergi Hydor-RP カラムによる標準毒混合溶液のクロマトグラム

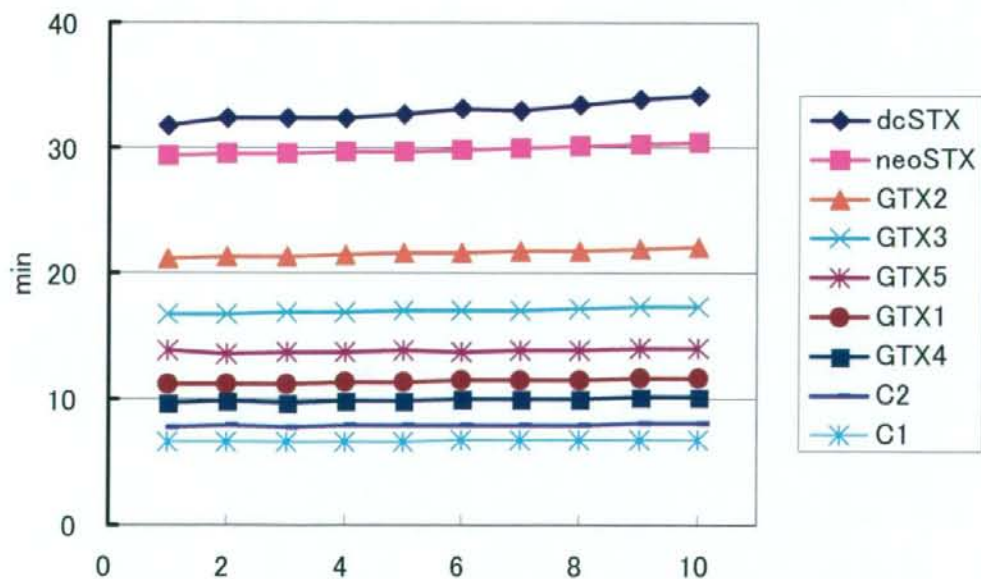


図2 繰り返し分析における各毒の保持時間の変動

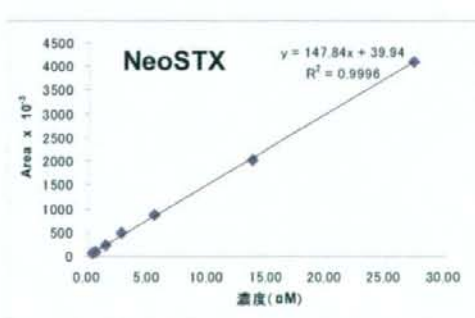
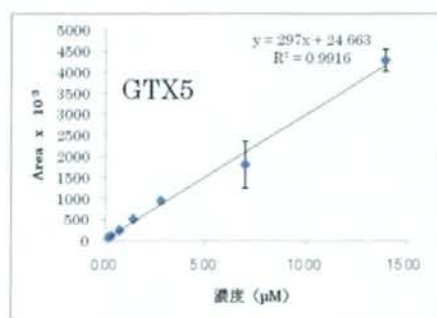
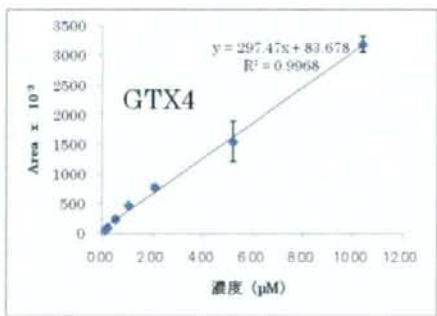
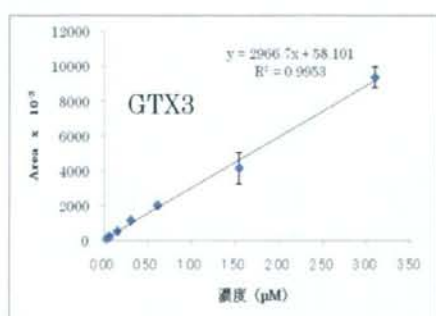
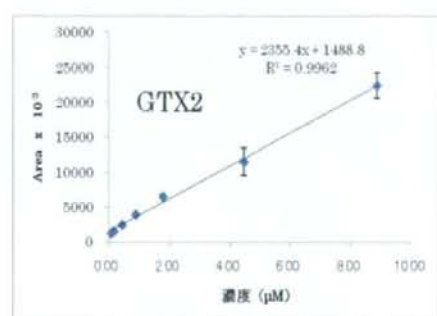
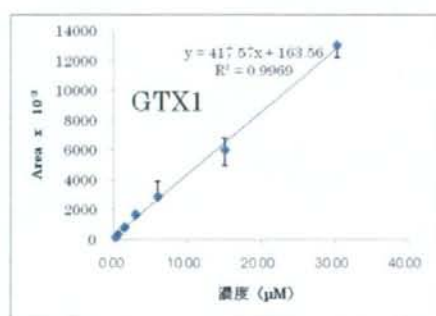
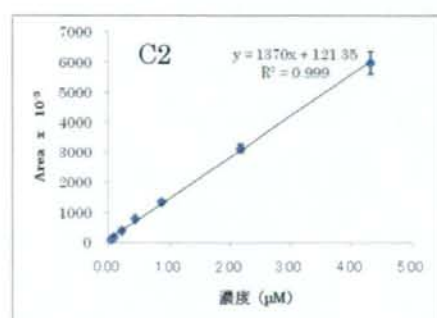
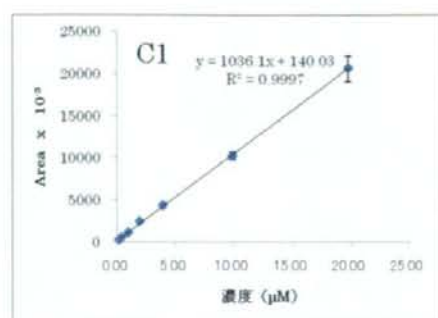


図3 各成分の検量線

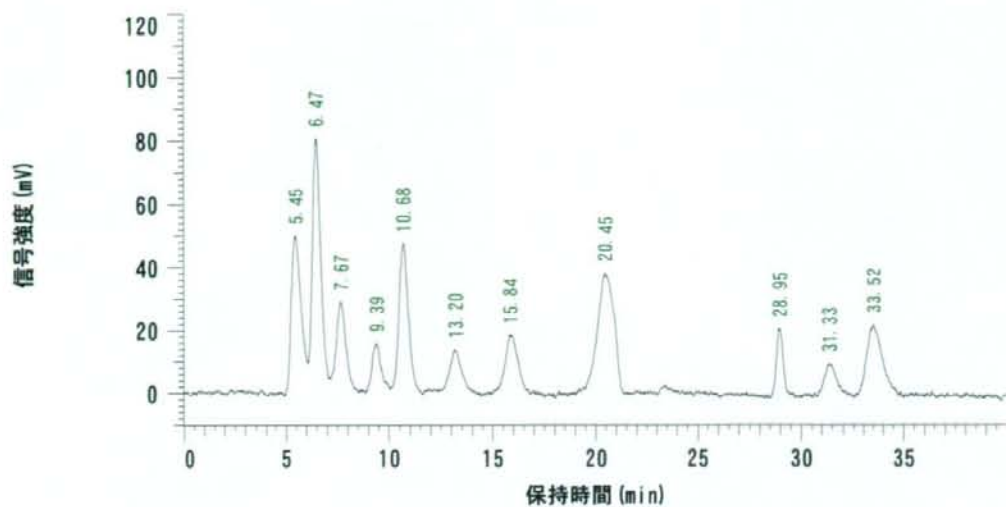


図4 添加試料の分析例(カキ)

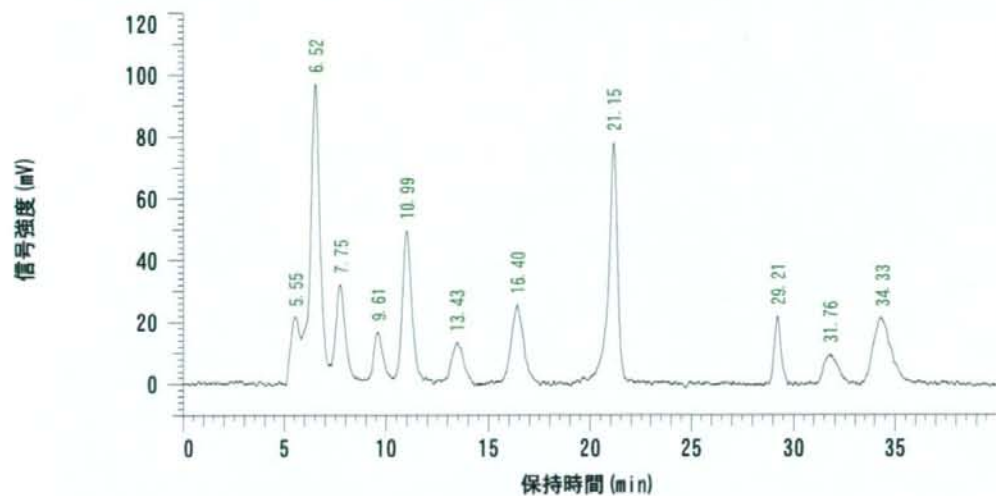


図5 添加試料の分析例(イガイ)

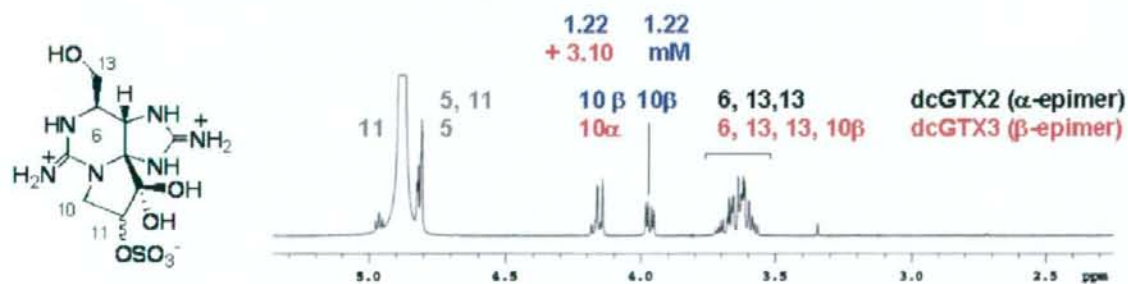


図6 定量NMRによるdcGTX2/3の濃度決定

Ion-pair chromatography

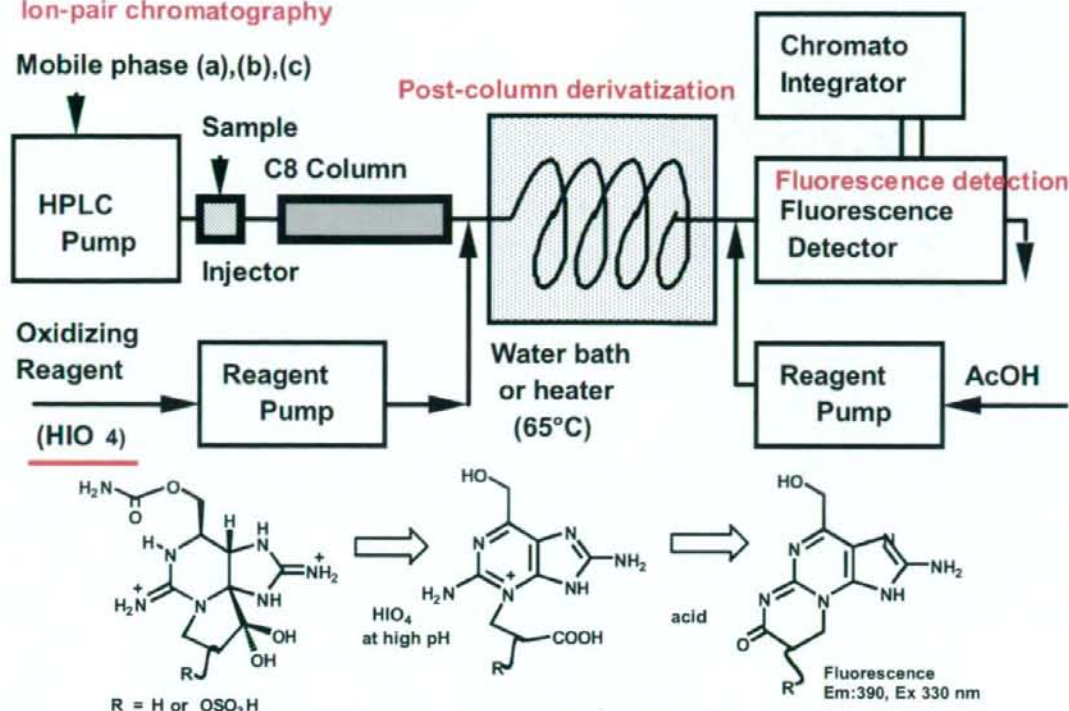


図7 麻痺性貝毒 HPLC の概念図と検出の基本となる蛍光化反応を

表2 麻痺性貝毒標準品の必要度、製造原料、調製状況

Toxins	優先度	抽出材料	標準品*
C1, C2	A	ラン藻 <i>Anabaena circinalis</i> 培養 熊本産毒化カキ (<i>G. catenatum</i>)	◎
GTX2, GTX3	A	ラン藻 <i>Anabaena circinalis</i> 培養 C1, C2からの化学変換	◎
GTX1, GTX4	A	大船渡産、噴火湾産毒化ホタテガイ (<i>A. tamarense</i>)	○
neoSTX	A	大船渡産、噴火湾産毒化ホタテガイ (<i>A. tamarense</i>) ラン藻 <i>Aphanizomenon fros-aquae</i> 培養	○
STX	(A)	(製造、使用について許可が必要)	-
dcSTX	A	dcGTX2, dcGTX3からの化学変換	◎
dcGTX2, dcGTX3	B	C1, C2からの化学変換	◎
GTX5, GTX6	B	宮崎産毒化ムラサキイガイ (<i>G. catenatum</i>)	◎
C3, C4	B	タスマニア産毒化ムラサキイガイ (<i>G. catenatum</i>)	○
dcneoSTX	C	neoSTXから酵素変換	△
dcGTX1, dcGTX4	C	GTX1, GTX4から酵素変換	△

*確保状況: ◎ Validationに十分量確保、◎ NMRで濃度再検査、△ 製造法確認済み

()内は毒化原因渦鞭毛藻

ラン藻 *Anabaena circinalis* の大量培養と化学変換によりC1, C2, GTX2, GTX3, dcGTX2, dcGTX3, dcGTX4が入手可能

渦鞭毛藻の培養が非効率なため、GTX1, GTX4, neoSTXは二枚貝の毒化に頼らざるを得ない。化学変換の開発が急務。

GTX5, GTX6, C3, C4は特定の海域の毒化二枚貝が必要で、入手が難しい。

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

ジノフィシストキシン-3 (DTX3) 及びベクテノトキシン-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、精製品を得ることとした。まず、ジノフィシストキシン-3 (DTX3) については、ジノフィシストキシン-1 (DTX1) を調製し、さらに化学合成によって DTX3 を生産することを検討した。

精製過程において DTX1 に見られるスペクトルの異常は、金属塩の形成によることを解明し、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。

また、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) を精製した。

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、ベクテノトキシン (PTX) やイエソトキシン (YTX) についての最新のリスク評価に基づく規制の設定を勧告している。しかし、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、これらの勧告に対応できない。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 法) 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の主要脂溶性標準毒の単離・精製を行うこととした。

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。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た。これに加えて、さらに試料が入手可能なものについて

追加調製する。

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、研究機関等に提供することにより、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 19 年度は下痢性貝毒の主要毒である DTX1 について、低品質原料の処理法を開発し、DTX1 の作製を最優先することとした。

なお、DTX1 の精製過程で確認された純度検定・定量の支障となる ¹H-NMR スペクトルの異常を解明するため、精製操作の検討を

行い、得られた精製物の NMR スペクトルにより異常の有無を比較した。

また、今までに作製できなかった 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) の作製を実施した。

C. 研究結果

DTX1 の精製過程で確認された純度検定・定量の支障となる ¹H-NMR スペクトルの異常を、以下のように金属カラムからの溶出する金属塩の影響を防止することで解決した。

1) DTX1 標準品の調製

次の精製方法により得られた精製物の NMR スペクトルにより異常の有無を比較した。

- ① あらかじめ構造に異常がないことを確認した DTX1 粗精製画分を新たな原料として用い、今まで使用しているカラム・装置による精製操作を行った場合は、昨年度と同様の異常なスペクトルを示した (図 1)。
- ② NMR スペクトル全体が揺れていることから、金属塩が混在している可能性があるため、最終精製の段階で使用する新しい HPLC カラムを用いて精製し、得られた精製物の NMR を測定した結果、昨年度と同様の異常な NMR スペクトルを示した (図 2)。
- ③ 金属塩が何から由来しているか不明のため、陽イオン交換樹脂を用いて金属塩を取り除くこととした。すなわち、②で得られた精製物を TOYOPEARL CM-650M 中圧カラムを用いてイオン交換処理し、溶出液の NMR スペクトルを測定した結果、DTX1 本来の NMR スペクトルが得られ、ピークもシャープになった (図 3)。

以上より、NMR スペクトルが異常となった原因は金属塩の影響に因るものと解明された。HPLC 注入に用いるガラス製シリンジを新しいものに替え精製を行っても、スペクトルは異常なままで金属塩が何処から混

入してきているかは究明できなかったが、陽イオン交換樹脂で処理することにより取り除くことができ、95%以上の純度を有する DTX1 精製品を得ることができた。

2) 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ため、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 4)。

homoYTX 精製品の NMR スペクトルを図 5 に示す。

3) PTX3 標準品の調製

低品質原料の処理法を開発し、図 6 及び 7 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 8-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、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ジノフィストキシン-1及びベクテノトキシン-3を得た。また、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。

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

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

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.

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。

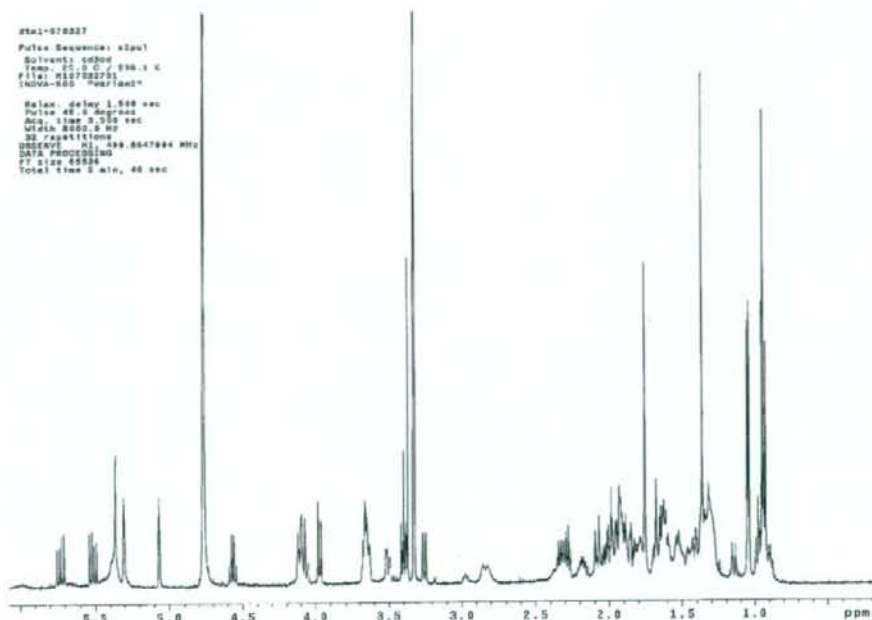


図1 従来のカラム・装置による精製操作を行ったDTX1精製物の¹H-NMRスペクトル
(500 MHz, CDCl₃-CD₃OD (1:2))

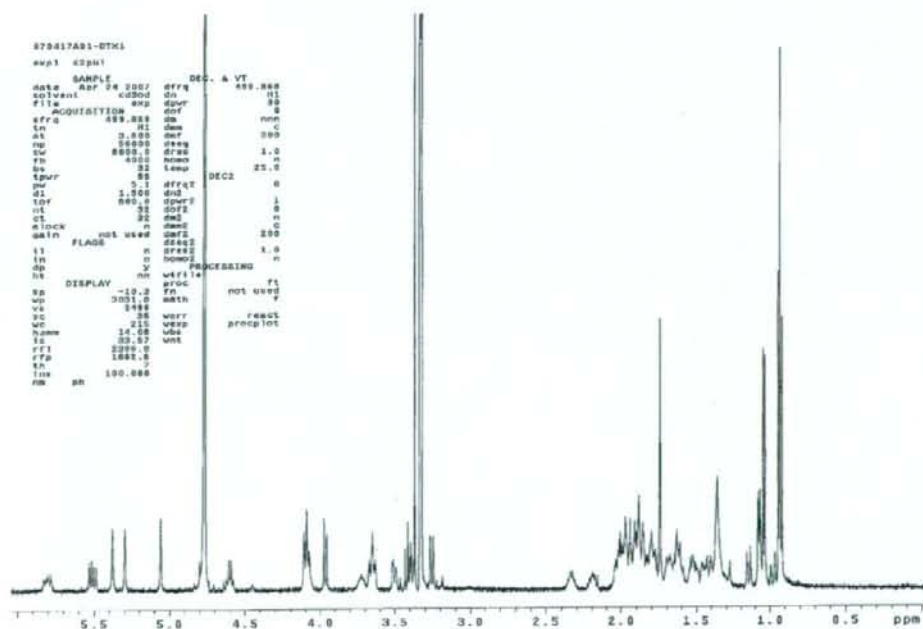


図2 新しいHPLCカラムを用いて得られた精製物の¹H-NMRスペクトル

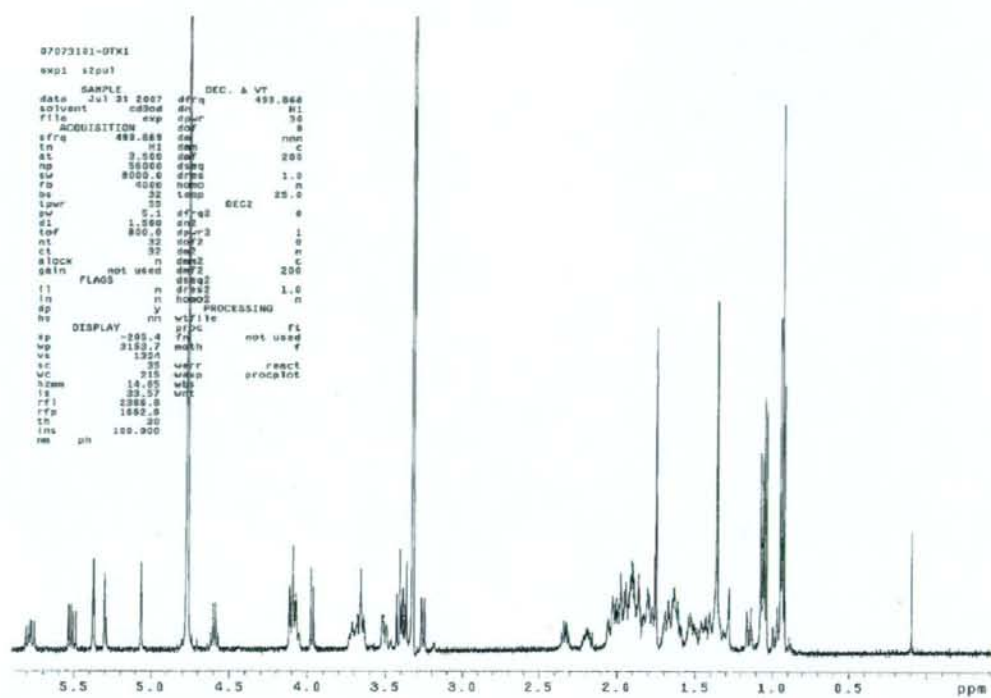


図3 陽イオン交換樹脂 (TOYOPEARL CM-650M) で処理した DTX1 の ¹H-NMR スペクトル

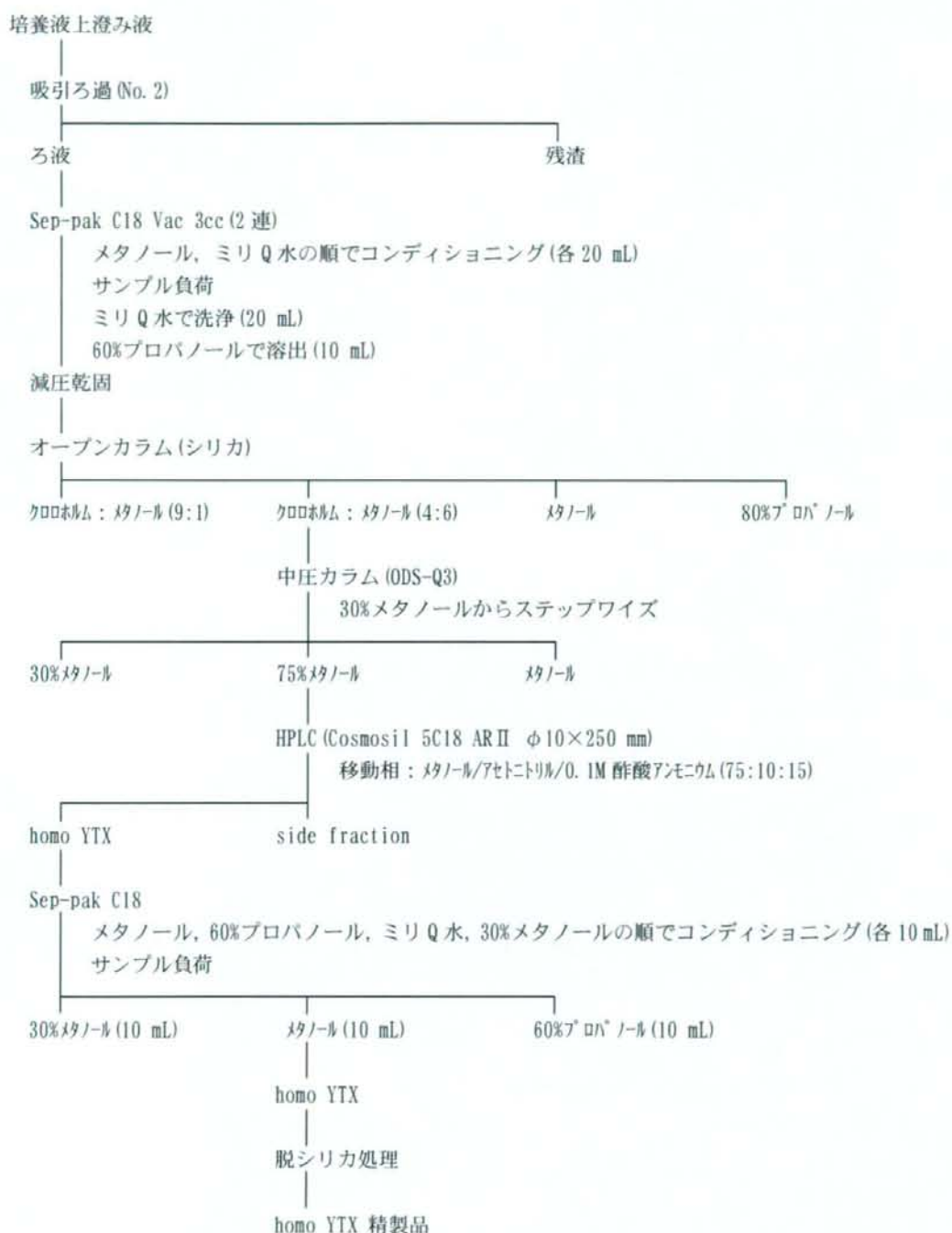


図4 homo YTX 培養液からの抽出・精製

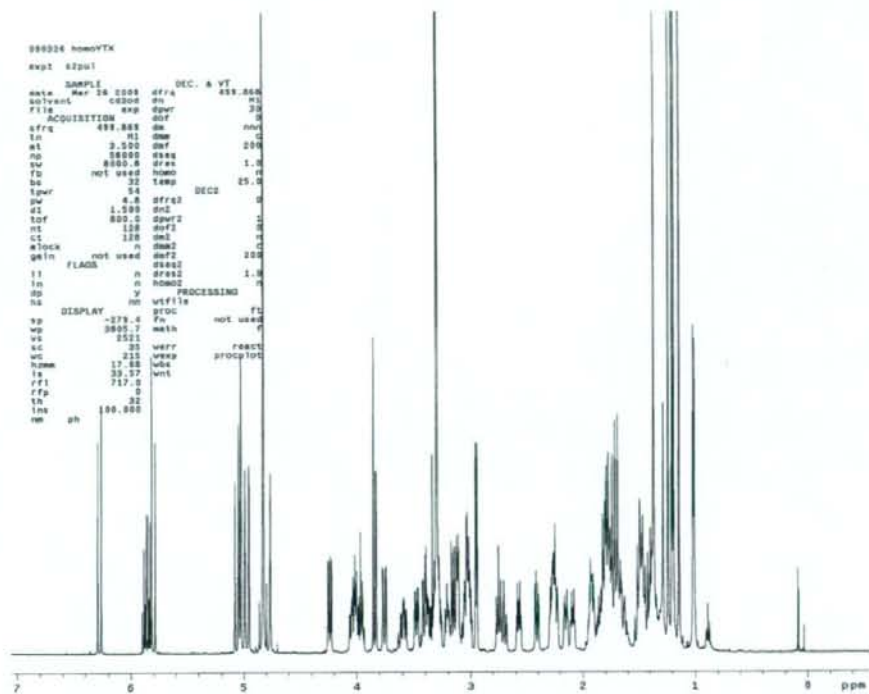


図5 homoYTX精製品の¹H-NMRスペクトル
(500 MHz, CD₃OD)

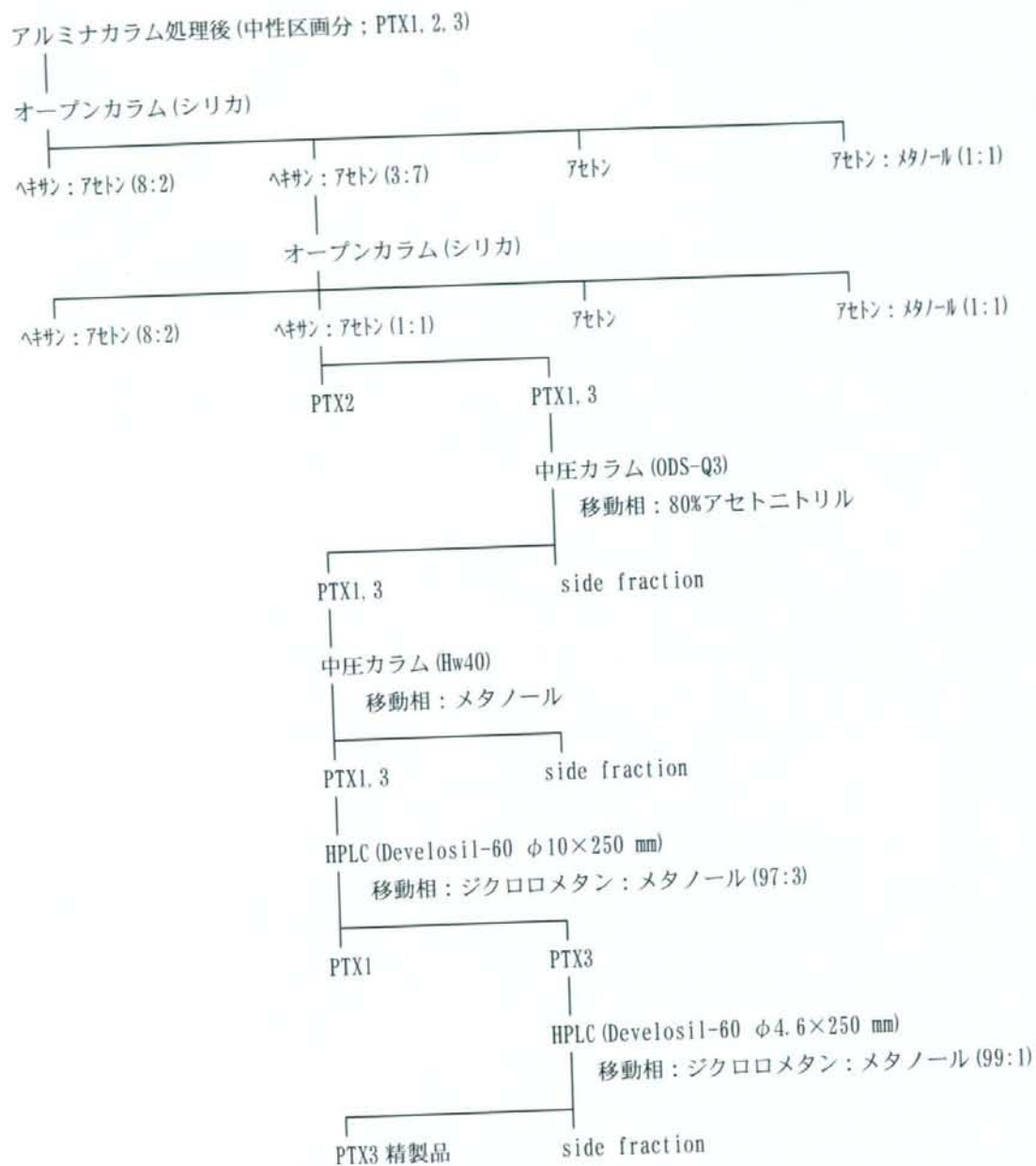


図7 PTX3精製フロー