

200807036A

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 相良 剛史

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
相良 剛史	
II. 分担研究報告	
1. 貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究	
～麻痺性貝毒成分の単離・精製～	39
谷山 茂人	
2. 貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究	
～記憶喪失性貝毒の単離・精製～	53
高谷 智裕	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	60
IV. 研究成果の刊行物・別刷	61

総括研究報告書

貝毒を含む食品の安全性確保に関する研究

主任研究者 相良 剛史 四国大学短期大学部 助手

研究要旨

本研究では、魚介類の食品としての安全性を確保し、国民の健康保護を図ることを目指して、貝毒、特に麻痺性貝毒(PSP)の、現行のマウス毒性試験(公定法)の代替試験法とする、高感度で迅速、かつ簡便な液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)によるPSP一斉分析法の開発を目的とした。

まず、有毒渦鞭毛藻ならびに有毒魚介類から、必要十分量のサキシトキシン(STX)群(hyneoSTX, neoSTX, hySTX, dcSTX, STX)、ゴニオトキシン(GTX)群(GTX1-6, dcGTX2,3)、プロトゴニオトキシン(PX: C-トキシン)群(C1,2) 15種のPSP精製毒を確保した。またテトロドトキシン(TTX)、6-epiTTX、4-epiTTX、11-oxoTTXおよびドウモイ酸(DA)を得た。

次に、HITACHI社製M-8000を用いたPSP 17成分(hyneoSTX, neoSTX, hySTX, dcSTX, dcneoSTX, STX, GTX1-6, dcGTX2,3, C1-3)の一斉分析が可能となり(分析条件I)、本法は蛍光検出法と質量分析法に有効で、かつ相互に比較検討と補完できる性能を併せ持った手法であること、その分析時間も60分以内と迅速であることが再確認され、その有用性が示された。さらに、分析条件IではPSP成分に加え、TTXやTTX関連成分、DAの検出可能であった。従って、PSP-DA-TTXの総合的な一斉分析法への応用が強く期待された。

一方、Thermo Fisher Scientific社製LCQ fleetによる分析(分析条件II)では、PSP標準品またはPSP精製毒の分析において、 $m/z$  300, 316, 332, 396, 412の各マスマトリクスにおいて、PSP成分と示唆されるピークを見出した。これらピークのMS/MSおよびMS/MS/MSスペクトルから、脱水 $[M-H_2O+H]^+$ 、脱硫酸基 $[M-SO_3+H]^+$ 、脱水脱硫酸基 $[M-SO_3-H_2O+H]^+$ などのフラグメントイオンが検出されたことから、それぞれC1, C2, C4, GTX5およびGTX6と判断された。同様に、MS/MSないしMS<sup>3</sup>スペクトルによるSTX群およびGTX群の解析を行ったところ、hyneoSTX, neoSTX, hySTX, STX, GTX1-5, dcGTX2,3の同定に成功した。他方、 $m/z$  332におけるピークをC3と推定したものの、イオン量がごく微量であったことから、MS/MSスペクトルによる同定は困難であった。次いで、未知試料である有毒渦鞭毛藻の粗抽出液につき、分析条件Iと同様に、固相抽出による前処理を施して分析条件IIに供したところ、neoSTX, STX, GTX1,4-6, C1,2が同定された。以上、分析条件IIにおけるMS/MSおよびMS/MS/MSスペクトル解析によるPSP15成分の分析法を確立し、その検出感度は分析条件Iよりも勝っていた。

平成20年度における本研究事業は、研究開始当時に計画していた目的をほぼ達成できるものと考えられる。

分担研究者	谷山 茂人 長崎大学大学院生産 科学研究科 助教
	高谷 智裕 長崎大学水産学部 准教授

#### A. 研究目的

近年、瀬戸内海では地球温暖化の影響を受け、元来、熱帯および亜熱帯に生息する有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamiyavanichii* の発生による二枚貝の貝毒汚染が発生している。一方、東南アジアで食用二枚貝の毒化原因種とされる *Pyrodinium bahamense* の日本沿岸での発生も危惧され始めている。また、輸入食品から貝毒の検出例が相次いでいることから、魚介類の食品としての安全性を確保するために、より一層の監視体制の強化が求められている。

これまで貝毒の検査法は、マウス毒性試験(公定法)や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)-蛍光分析法が一般的であった。しかしながら、動物愛護や信頼性に鑑み、液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)による貝毒分析方法の開発が世界的に行われている。下痢性貝毒(DSP)においては、LC/MSによる一斉分析法が開発され、実用段階にある。しかしながら、麻痺性貝毒(PSP)については、当該事業の昨年度(平成19年度)までの研究成果から、既存のPSP標準品についての一斉分析法を示したものの、対象成分や検出感度に改善の余地が見られ、さらなる検討が必要な状況である。

LC/MSによるPSPの分析は、1990年代にOshimaら(1995)によって開発されたLC-ポストカラム蛍光(FLD)法を応用することにより可能となったが、本法は分割分析法であり、その検出感度も非常に低いものであった。

全PSP成分を短時間で分析する試みは、Lockeら(1994)、Jaimeら(2001)、Hashimotoら(2002)とNishio(2002)、Aversanoら(2004)によって、LC-FLDやキャピラリー電気泳動法(CE)-MS、LC/MSへの適応について検討されている。また、Pereiraら(2000)、Itoら(2003)、Negriら(2003)は、LC/MSがPSP成分分析に極めて有効であることを示している。しかしながら、これらの方法は検出感度が低く、多岐にわたるPSP誘導体の相互分離を無視したものであるため、実用化したとは言い難い。

一方、国内におけるPSP標準品の配布は農林水産省主導で行われているが、その種類はプロトゴニオトキシン(PX: C-トキシン)1,2、ゴニオトキシン(GTX)1,2,3,4、デカルバモイル GTX(dcGTX)2,3 およびネオサキシトキシン(neoSTX)の9種類のみである。これらには、毒性が強く化学兵器に指定されているSTXや試料からの検出頻度が高いハイドロキシSTX(hySTX)、また加熱処理によりSO<sub>3</sub>が容易に離脱しSTX、neoSTXに変換するGTX5,6などの成分が含まれていないため、現段階では機器分析のみによる魚介類の毒性評価は困難である。特に、西日本や南西諸島に発生するPSPには既存の標準品のみでは不十分といえる。

また、PSPと記憶喪失性貝毒(ASP)を併せ持つ貝類やPSPとテトロドトキシン

(TTX)を同時に保有するフグ類も存在するため、ASP と TTX を同時に分析できる PSP-ASP-TTX 一斉分析法の開発も、今後、重要になってくると考えられる。

そこで、本研究では、貝毒の定量に必要な PSP 成分の精製毒を作製し、LC/MS を用いた PSP 一斉分析法による絶対的定量法の確立を目指した。さらに、本分析法を応用した TTX、ASP 関連成分の同時分析を検討した。

## B. 研究方法

### 1) PSP 精製毒の作成方法

#### 1-1) 有毒渦鞭毛藻の培養方法

A. *tamiyavanichii* の培養株 (At041104 株) を 4 群 (A~D 群) に分け、それぞれ ESM 培地 (岡市ら, 1982; Watanabe ら, 1997) (表 1) を用い、培養温度を 20°C、光強度を 40  $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 、明暗周期を 12h/12h として、30 日間培養した。いずれも培養 30 日後に、A 群から  $2.0 \times 10^7$  cells、B 群から  $2.5 \times 10^7$  cells、C 群から  $2.0 \times 10^7$  cells、D 群から  $3.5 \times 10^7$  cells を回収して試料とした。

一方、At041104 株につき、同条件下で培養するとともに (E-1 群、E-2 群)、同培地、同光強度の下、培養温度を 25°C、明暗周期を 14h/10h で培養した (F-1 群、F-2 群)。いずれも培養開始時の細胞密度を 100 cells/ml とし、30 日間培養し、試料とした。また、培養 3 日毎に、顕微鏡下で細胞数を測定し、成長曲線を作成した。

#### 1-2) 培養藻体からの毒の抽出方法

試料に 0.5 M 酢酸を 5 ml 加え、超音波破碎し、500 g で 10 分間遠心分離して上清を得た。沈殿物については、同様の操作を

2 回繰り返す、得られた上清を合一して粗抽出液とした。粗抽出液を限外濾過に付して、ろ液を HPLC 分析に供した。

#### 1-3) マウス毒性試験 (MBA)

本試験は公定法 (2005) に準じて行った。体重 20 g の ddY 系雄マウスに、試験溶液 1 ml を腹腔内投与して、投与が終了した時間からマウスの呼吸が完全に停止するまでの時間 (致死時間) を測定した。PSP の場合、呼吸が 15 分で停止する毒力を 1 マウスユニット (MU) と定義されている。

#### 1-4) HPLC 分析

カラムに HITACHI 社製 HG3013N ( $\phi 4.6 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$ ) および野村化学社製 Develosil C-30 UG-5 ( $\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ) を使用した。2 種の移動相を用い、移動相 A を 5 mM ヘプタフルオロ酪酸を含む 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.8)、移動相 B を 10 mM ヘプタフルオロ酪酸を含む 10% アセトニトリル-30 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.1) とした。分析開始時から 25 分後まで移動相 A、次いで 45 分後まで移動相 B、さらに分析終了時 (70 分後) まで移動相 A で分析した。カラムからの溶離液には、7 mM 過ヨウ素酸を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 10) を同じ流速で混合させ、65°C で加熱して蛍光化させ、その後 0.5 M 酢酸を同じ流速で混合して蛍光強度を増感させ、励起波長 340 nm、蛍光波長 410 nm の蛍光強度を測定した。

### 2) 簡易精製に関する検討方法

#### 2-1) 部分精製毒を用いた方法

試料は有毒魚介類から得られた GTX を中心とする部分精製毒 (GTXsKA2M) を用いた。

まず、市販の固相抽出カラムとして

GL-Pak CARBOGRAPH 500 mg/ 6 ml (GL Sciences)、Envi Carb 250 mg/3 ml (SUPELCO)、HyperSep Hypercarb SPE Column 500 mg/6 ml (Thermo SCIENTIFIC)、GL-Pak 活性炭 Jr 400 mg (GL Sciences)、Seppak-Ac2 (Waters) を用いた。さらに、エンプティリーザーパー 6 ml (GL Sciences) に、グラファイトカーボンパウダー UFG-30 (GL Sciences) 500 mg を充填したカラム (GC GCP)、活性炭素 (Wako) を 500 mg 充填したカラム (WAKO Ac) についても検討した。

各カラムに、2 ml の 1% 酢酸-20% エタノールと 2 ml の蒸留水を通過させ、平衡化した。次に、2 ml の部分精製毒を添加し (非吸着画分)、2 ml の蒸留水で洗浄 (水洗画分) 後、2 ml の 1% 酢酸 20% エタノールで 3 回に分けて、有毒成分を溶出させた (それぞれ溶出画分 1、溶出画分 2、溶出画分 3)。

次に、非吸着画分、水洗画分、溶出画分 1、溶出画分 2、溶出画分 3 につきの各画分液に 2 ml の蒸留水を加え、遠心エバポレーター (CE) または凍結乾燥 (FD) に付し、蒸留水で 2 ml に定容してマウス毒性試験および HPLC 分析に供した。

## 2-2) MBA

B. 1-3) と同様に行った。

## 2-3) HPLC 分析

B. 1-4) と同様に行った。

## 3) LC/MS による PSP 一斉分析法

### 3-1) 分析条件 I

既存の配布 PSP 標準品 (FASTD1) 9 成分 (C1 0.99  $\mu$ M、C2 0.26  $\mu$ M、GTX1 3.60  $\mu$ M、GTX2 1.27  $\mu$ M、GTX3 0.45  $\mu$ M、GTX4 1.11  $\mu$ M、dcGTX2 0.32  $\mu$ M、

dcGTX3 0.10  $\mu$ M および neoSTX 1.34  $\mu$ M)、PSP 部分精製毒 (PSP-S15) を用いた。LC 部には、HITACHI 陰イオン交換ゲル 3013 N カラムと Develosil RP -Aqueous -AR カラムを直列に配置した。前者のカラムを 50°C、後者を 20°C に制御し、移動相には 0.1% ヘプタフルオロ酪酸 (HFBA) および 0.1% ペンタフルオロプロピオン酸 (PFPA)-4% アセトニトリルの 2 種を用い、流速を 0.6 ml/min とした。MS 部には、音速噴霧イオン化 (SSI) 法を装備した HITACHI M-8000 を使用した。ドリフト電圧 +40V、フォーカス電圧 30V、ネフライザーの窒素圧 300 mmHG、シールド温度 300°C、第一細孔温度 170°C、第二細孔温度 120°C、検出器電圧 500V とした (表 2)。

一方、PSP-S15 に TTX を混合したもの (PSP-TTX 混合標準品) および DA を混合したもの (PSP-DA 混合標準品) についても同様の分析を行った。

### 3-2) 分析条件 II

分析条件 I と同様の PSP 試料を用いた。LC 部に、HITACHI ゲル 3013N と Develosil RP-AQUEOUS カラムを連結して、カラム昇温プログラムを用いた。移動相には 10 mM 酢酸アンモニウムを含む 0.1% HFBA-1% アセトニトリルと 10 mM 酢酸アンモニウムを含む 0.1% PFPA-8% アセトニトリルを用い、流速 0.25 ml/min とした。MS 部に、Thermo Fisher Science LCQ FLEET を使用し、ポジティブ ESI イオン化法、スプレー電圧 3 kV、キャピラリー温度 330°C、質量範囲  $m/z$  100-800 の条件でデータディペンデントスキャンとフルスキャン MS/MS を併用して分析した (表 3)。

### 4) LC/MS による実試料の分析方法

ESM 培地にて、培養温度 20°C、光強度 40  $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}^1$ 、明暗周期 14h/10h で培養された *A. catenella* (AcWU-01 株) の培養藻体を用いた。

LC/MS 分析は、B. 3-1) ならびに 3-2) に従った。

## C. 研究結果

### 1) At041104 株の毒性と毒成分

A~D 群の毒性は、それぞれ 3,700 cells/MU、2,940 cells/MU、2,850 cells/MU、3,700 cells/MU であった。また、産生毒の主成分は、いずれも GTX3 で平均的には 50% 以上を占めていた (図 1、2)。次いで、STX が 20% 以上含まれており、C1、C2、GTX2、dcGTX3 も産生していた (図 2)。一方で、*A. tamiyavanichii* の天然株の PSP 成分組成を調べたところ、GTX4 が 30~40%、GTX5 が 25~35% GTX3 が約 5%、STX が約 10% であった (図 2、3)。

一方、E-1 群および E-2 群は、増殖速度が遅く、いずれも最高細胞密度は約 6,000 cells/ml であった (図 4)。また、産生毒の主成分は GTX3 と STX が主成分であり、GTX2、GTX4、C2 を僅かに産生していた。他方、F-1 群および F-2 群は、いずれも培養 12 日目までは緩やかな増殖を示した (図 4)。その後、E-1 群は急激に増殖し、培養 27 日目に 12,000 cells/ml 以上となった。E-2 群は増殖速度が遅いものの、培養 21 日以降に活発に増殖し、培養 30 日目には最高細胞密度 (約 10,000 cells/ml) に達した。また両群は、C2、GTX3 および STX が主成分で、いずれも C2 は培養 15 日目頃から増加した。しかしながら、GTX3 の産生量は培養日数が経過するにつれて減少

し、F-1 群では 33%、F-2 群では 35% 減少した。さらに、前者の GTX4 の産生量は培養 21 日目以降に減少したが、後者は培養開始日から、その産生量は増加し続けていた。

### 2-1) 固相抽出による PSP の回収率

固相抽出による非吸着画分、水洗画分、溶出画分 1、溶出画分 2、溶出画分 3 の MBA および HPLC 分析から換算した PSP の回収率を表 4、5 に示す。

まず、CE 処理における回収率 (表 4) において、GL-Pak CARBOGRAPH および HyperSep Hypercarb による固相抽出にて、溶出画分 1 から、それぞれ MBA 換算で 47%、124% の PSP が回収された。これらを HPLC 分析から換算したところ、それぞれ 32% と 100% となった。Envi Carb、GL-Pak 活性炭 Jr、Seppak-Ac2、GL GCP、WAKO Ac では、いずれの溶出画分にも PSP は検出されなかった。

次いで、FD 処理 (表 5) においては、GL GCP を除く固相抽出にて、溶出画分 1、溶出画分 2 または溶出画分 3 から PSP が検出された。特に、GL-Pak CARBOGRAPH、Envi Carb、HyperSep Hypercarb では MBA 換算で約 70% の PSP が回収された。さらに、これらの回収率を HPLC 分析から算出したところ、それぞれ 112%、206%、141% と高い値を示した。

### 2-2) 毒成分組成

GTXsKA2M および有毒画分の HPLC クロマトグラムを図 6、7、8 に示す。各カラムの非吸着画分の毒成分は処理前のものと比較して毒成分の変化は少なかったが、カラムに吸着後に溶出させた溶出画分の毒成分は、処理前のものと比較し GTX5 が減

少していた。一方、1%酢酸を添加して凍結乾燥を行ったものについては毒成分の変化は殆どみられなかった。

### 3-1) 分析条件 I による LC/MS 分析

PSP-S15 と TTX 標準品の分析において、 $m/z$  300 で STX、 $m/z$  316 で GTX2,3、 $m/z$  332 で GTX1,4、hyneoSTX が、 $m/z$  320 で TTX、 $m/z$  302 で anhydroTTX が検出された(図 9)。また、PSP15DA の分析では、 $m/z$  273 で dcGTX2,3、 $m/z$  300 で GTX5 および STX、 $m/z$  316 で C1,2、GTX2,3,6、hySTX および neoSTX、 $m/z$  332 で GTX1,4 および hyneoSTX を検出すると同時に、 $m/z$  312 で DA が検出された。(図 10)。

### 3-2) 分析条件 II における LC/MS 分析

PSP-S15 の分析において  $m/z$  300、316、332、396、412 のマスクロマトグラムにおいて、PSP 成分と示唆されるピークが検出された(図 11)。各ピークの MS/MS および MS/MS/MS スペクトルから、脱水  $[M-H_2O+H]^+$ 、脱硫酸基  $[M-SO_3+H]^+$ 、脱水脱硫酸基  $[M-SO_3-H_2O+H]^+$  などのフラグメントイオンが検出されたことから、それぞれ C1、C2、GTX1、GTX2、GTX3、GTX4、GTX5、GTX6、neoSTX および STX と同定された(図 12)。

FASTDI を用いた分析では、その検出は可能であり、特に GTX3 と GTX4 では、それら 10 倍希釈液でも各成分が検出された。それらのピークエリアは濃度に依存して増大しており、定量下限値は 1 pmol であった(図 13,14)。

### 4) LC/MS による実試料の分析

AcWU01 株の粗抽出液を分析条件 II による LC/MS 分析に供したところ、 $m/z$  273、300、316、332、396、392 および 412 のマス

クロマトグラムにおいて、多数のピークが検出された(図 15、16)。 $m/z$  396 で保持時間 8.1 分にピークが検出されたためそのイオンを開裂させたところ、80 da 小さい  $m/z$  316 のフラグメントイオンが生成され、それをさらに開裂させると、脱水イオンと示唆される 18 da 小さい  $m/z$  298 のフラグメントイオンが検出された(図 17)。また、保持時間 9.8 分に検出された  $m/z$  396 のイオンを開裂させると  $m/z$  316 が検出された(図 18)。一方、保持時間 15.4 分には  $m/z$  380 と  $m/z$  300 でピークが検出され、 $m/z$  300 のイオンを開裂させると  $m/z$  282 のフラグメントイオンが生成された(図 19)。保持時間 15.6 分で検出された  $m/z$  396 のピークの開裂によって  $m/z$  316 のイオンを生じ(図 20)、23.2 分および 29.2 分で検出された  $m/z$  412 のピークのイオンを開裂させると  $m/z$  332 のイオンが生成された(図 21、22)。他方、STX 群については、保持時間 55.3 分で検出された  $m/z$  316 のピークは分子量から neoSTX および hySTX の可能性があり(図 23)、保持時間 55.7 分および 55.8 分で検出された  $m/z$  300 の 2 成分については、両者とも STX と同様の開裂パターンを示した(図 24)。

## D. 考察

### 1) PSP 精製毒の作成

A. *tamiyavanichii* の天然株は、GTX5 など希少 PSP 成分を含有する PSP 標準品の有望な材料の一つであるが、当初の培養条件で培養した培養株は、GTX5 を産生することはなく、GTX2,3 などの一般的な PSP 成分のみが得られた。しかしながら、同培養株を用い、培養温度を 25°C、明暗周期 14h/10h と一部改変すると、増殖過程



により産生する毒成分に変化がみられた。今後、更に検討を行い、GTX5 を始めとする希少成分を多量に産生する培養方法が見出されれば、今後、これら PSP 成分の作成、確保が容易になると考えられた。

### 2) 至適簡易精製法

LS/MS による PSP 一斉分析法の開発の一助として、その検出感度を向上を図るため、各種充填剤を用いた固相抽出法による簡易精製法についても検討を加えた。全体的に、充填剤としてグラファイトカーボンを用いた市販カラムを用いることで、PSP を簡易に精製でき、その回収率も良好であった。また GL-Pak CARBOGRAPH および HyperSep Hypercarb による簡易精製では、溶出画分 1 から MBA 換算で 47~124% の PSP の回収されたが、HPLC 分析から換算した PSP の回収率は 32~206% であり、大きな差異が認められた。その要因として、溶出された PSP 成分が異なっている可能性が考えられた。

GTXsKA2M の PSP 成分を HPLC 分析により調べたところ、簡易精製前後でその成分は大きく異なっていた。一方、充填剤に活性炭を用いたカラムには、PSP は殆ど吸着されずに添加画分にそのまま残存していた。添加画分における PSP の回収率は、MBA 換算で 6~56%、HPLC 分析換算では 4~83% となった。各カラムにおける添加画分の PSP 成分は簡易精製前と比較して変化はほとんどみられなかった。PSP 成分を精製する際には、イオン交換カラムクロマトグラフィーが汎用されているが、グラファイトカーボンや活性炭クロマトグラフィーでも、良好な成果が得られた。

### 3) LC/MS による PSP 一斉分析法の検討

分析条件 I において、PSP-S15 と TTX 標準品の分析では、 $m/z$  300 で STX、 $m/z$  316 で GTX2,3、 $m/z$  332 で GTX1,4、hyneoSTX が、 $m/z$  320 で TTX、 $m/z$  302 で anhydroTTX が検出され、PSP と TTX の同時分析が可能であることが示唆された。また、PSP15DA の分析では、 $m/z$  273 で dcGTX2 と 3、 $m/z$  300 で GTX5 と STX、 $m/z$  316 で C1,2、GTX2,3,6、hySTX と neoSTX、 $m/z$  332 で GTX1,4 および hyneoSTX が検出されると同時に、 $m/z$  312 で DA が検出され、これにより PSP-TTX-DA 17 成分の一斉分析が実現した。本手法は FLD 法と MS 法に有効で、かつ相互に比較検討と補完できる性能を併せ持ち、その分析時間も 60 分以内と迅速で、その有用性が示された。

一方、分析条件 II では、PSP-S15 の分析において  $m/z$  300、316、332、396 および 412 の各マスキロマトグラムに示されたピークの MS/MS および MS/MS/MS スペクトルから、脱水  $[M-H_2O+H]^+$ 、脱硫酸基  $[M-SO_3+H]^+$ 、脱水脱硫酸基  $[M-SO_3-H_2O+H]^+$  などのフラグメントイオンが検出され、C1、C2、GTX1-6、neoSTX、STX を同定した。また、FASTD1 を用いた検討では、その 10 倍希釈液を検出することが可能で、定量下限値は 1 pmol であった。

他方、AcWU01 株の粗抽出液を分析条件 II で分析したところ、 $m/z$  273、300、316、332、396、392 および 412 のマスキロマトグラムにおいて多数のピークが検出された。 $m/z$  396 で保持時間 8.1 分にピークが検出されたイオンを開裂させたところ、80 da 小さい  $m/z$  316 のフラグメントイオンが生成され、それをさらに開裂させると、脱水イオン

と思われる 18 da 小さい  $m/z$  298 のフラグメントイオンが検出された。本ピークは、保持時間より分子量 475 の C1 によるものと推察され、検出された  $m/z$  396 のピークは C1 のカルバモイル基に結合していた  $\text{SO}_3$  が離脱して H に置き換わったイオンによるものであり、その開裂によって生じた  $m/z$  316 は、11- $\alpha$  位の  $\text{SO}_3$  が離脱して H に置き換わったイオンであると考えられる。同様に、保持時間 9.8 分に検出された  $m/z$  396 のピークは C2 のカルバモイル基に結合していた  $\text{SO}_3$  が離脱して H に置き換わったイオンによるものであり、その開裂によって生じた  $m/z$  316 は、11- $\beta$  位の  $\text{SO}_3$  が離脱して H に置き換わったイオンであると考えられた。また、保持時間 15.4 分に  $m/z$  380 と  $m/z$  300 で検出されたピークは GTX5 の  $[\text{M}+\text{H}]^+$  と  $[\text{M}-\text{SO}_3+\text{H}]^+$  によるものであると判断され、 $m/z$  300 のイオン開裂により生じた  $m/z$  282 のフラグメントイオンは  $[\text{M}-\text{SO}_3-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  であると判断した。保持時間 15.6 分で検出された  $m/z$  396 のマスクロマトグラムのピークは GTX3 の  $[\text{M}+\text{H}]^+$  によるもので、その開裂によって生じた  $m/z$  316 のマスクロマトグラムのピークは  $[\text{M}-\text{SO}_3+\text{H}]^+$ 、23.2 分および 29.2 分で検出された  $m/z$  412 のマスクロマトグラムのピークは GTX4 および 1 の  $[\text{M}+\text{H}]^+$  によるもので、それらの開裂によって生じた  $m/z$  332 のイオンは  $[\text{M}-\text{SO}_3+\text{H}]^+$  であると判断した。他方、STX 群については、保持時間 55.3 分で検出された  $m/z$  316 のマスクロマトグラムのピークは分子量から neoSTX および hySTX の可能性があり、保持時間 55.7 分および 55.8 分で検出された  $m/z$  300 のマスクロマトグラムの 2 成分については、両者とも STX と同様の開裂パターンを示し

た(図 24)。このことより、LC/MS による STX 群の分析には、さらに若干の検討が必要といえる。

#### E. 結論

本研究により、有毒渦鞭毛藻ならびに有毒魚介類から、必要十分量の STX 群 (hyneoSTX、neoSTX、hySTX、dcSTX、STX)、GTX 群 (GTX1-6、dcGTX2,3)、C 群 (C1,2) の 15 種の PSP 精製毒を確保した。また同様に、TTX とその関連成分である 6-*epi*TTX、4-*epi*TTX、11-oxoTTX および DA を得た。

次に、HITACHI 社製 M-8000 を用いた PSP 17 成分 (hyneoSTX、neoSTX、hySTX、dcSTX、dcneoSTX、STX、GTX1-6、dcGTX2,3、C1-3) の一斉分析 (分析条件 I) が可能となり、本法は LC-FLD 検出法と MS 分析法に有効で、かつ相互に比較検討と補完できる性能を併せ持った手法であること、その分析時間も 60 分以内と迅速であることが確認され、その有用性が示された。さらに、本分析法では PSP 成分に加え、TTX、TTX 関連成分、DA も検出可能であった。このことから、PSP-DA-TTX の総合的な一斉分析法への応用が強く期待された。

一方、Thermo Fisher Scientific 社製 LCQ fleet (分析条件 II) では、まず、PSP 標準品または PSP 精製成分の分析において  $m/z$  300、316、332、396、412 の各マスクロマトグラムにおいて、PSP 成分と示唆されるピークを見出した。これらピークの MS/MS および MS/MS/MS スペクトルから、脱水  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 、脱硫酸基  $[\text{M}-\text{SO}_3+\text{H}]^+$ 、脱水脱硫酸基  $[\text{M}-\text{SO}_3-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  などのフラグメントイオンが検出されたことから、それぞ

れC1、C2、C4、GTX5およびGTX6と判断された。同様に、MS/MSないしMS/MS/MSスペクトルによるSTX群およびGTX群の解析を行ったところ、hyneoSTX、neoSTX、hySTX、STX、GTX1-5、dcGTX2,3の同定に成功した。他方、 $m/z$  332におけるピークをC3と推定したものの、イオン量がごく微量であったことから、MS/MSスペクトルによる同定は困難であった。次いで、未知試料である有毒渦鞭毛藻の粗抽出液につき、分析条件Iと同様の固相抽出による前処理を施して分析条件IIに供したところ、neoSTX、STX、GTX1,4-6、C1,2が同定された。従って、分析条件IIにおけるMS/MSおよびMS/MS/MSスペクトル解析によるPSP15成分の分析法を確立し、その検出感度は分析条件Iよりも勝っていた。

以上、平成20年度における本研究事業は、研究開始当時に計画していた目的をほぼ達成できるものと考えられる。

#### F.参考文献

- Aversano, C. D., Eaglesham, G. K., Quilliam, M. A.: Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1024, 155-164 (2004).
- Hashimoto, T., Matsuoka, S., Yoshimatsu, S., Miki, K., Nishibori, N., Nishio, S., Noguchi, T.: First Paralytic Shellfish poison (PSP) Infestation of Bivalves Due to Toxic Dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii*, in the Southeast Coast of the Seto Inland Sea. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 43, 1-5 (2002).
- Hashimoto, S., Nishio, S., Nishibori, N., Yoshioka, S., Noguchi, T.: A new analytical method for gonyautoxins based on postcolumn HPLC. *Food Hyg. Soc. Japan* 43, 144-147 (2002).
- Ito, K., Asakawa, M., Shida, Y., Miyazawa, K.: Occurrence of paralytic shellfish poison (PSP) in the starfish *Asterina pectinifera* collected from the Kure Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. *Toxicon* 41, 291-295 (2003).
- Jaime, E., Hummert, C., Hess, P., Luckas, B.: Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* 929, 43-49 (2001).
- Locke, S. J., Thlbault, P.: Improvement in detection limits for the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish tissues using capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry and discontinuous buffer systems. *Anal. Chem.* 66, 3436-3446 (1994).
- 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針理化学編. 日本食品衛生協会. 東京. 673-680 (2005).
- Negri, A., Stirling, D., Quilliam, M., Blackburn, S., Bolch, C., Eaglesham, G., Thomas, K., Walter, J., Willis, R.: Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chem. Res. Toxicology* 16, 1029-1033 (2004).
- Nishio, S., Noguchi, T., Onoue, Maruyama,

- J., Hashimoto, K., Seto, H.: Isolation and properties of gonyautoxin-5, an extremely low toxic component of paralytic shell poison. *Nippon Suisan Gakkaishi* 48, 959-965 (1982).
- Nishio, S.: Occurrence of toxic oyster *Crassostrea gigas* infested with *Alexandrium tamiyavanichii* in the Seto Inland Sea, Japan. in "International Scientific Symposium on Marine Toxins and Marine Food Safety". D. F Hwang. and Noguchi, T (ed). National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan, R.O.C., 78-86 (2002).
- 野口玉雄, 河野迪子, 上田要一, 橋本周久: 有毒ホタテガイからのまひ性貝毒の主成分 Gonyautoxin-2 の単離と諸性状. 日本化学会誌. 5, 652-58 (1981).
- Oshima, Y.: Post-column derivatization HPLC methods for Paralytic Shellfish Poisons. in "Manual on Harmful Marine Microalgae", G. M. Hallegraeff et al.(ed.). UNESCO. Paris, 81-94 (1995).
- Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araujo, F., Lagos, N., Oshima, Y.: Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* 38, 1689-1702 (2000).
- G.健康危険情報  
なし
- H.研究発表  
1.論文発表  
相良剛史. 中毒発生海域より分離した *Ostreopsis* sp. のパリティキシン様物質産生能. 日水誌 2008; 74 (5), 913-914.
- 2.学会発表  
竹内絵梨子, 藤田雄介, 鶴田慎太郎, 谷山茂人, 相良剛史, 伊藤克敏, 浅川学: PSP 毒化アサリ投与によるアカニシの毒化試験. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009 年 3 月.
- N. Nishibori, T. Sagara, S. Nishio, M. Yamaguchi, K. Nagasaki, Y. Tomaru, I. Imai: Possible impacts of polyamines on the growth of HAB-causing microalgae. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 2008.
- M. Asakawa, R. Beppu, S. Tsuruda, E. Takeuchi, G. Gomez-Delan, T. Sagara, S. Nishio, K. Miyazawa, Occurrence of PSP-producing dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* in Bingo-Nada, the eastern coastal water of Hiroshima Prefecture, Japan. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 2008.
- I.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)  
1. 特許取得  
なし  
2. 実用新案登録  
なし  
3. その他  
なし

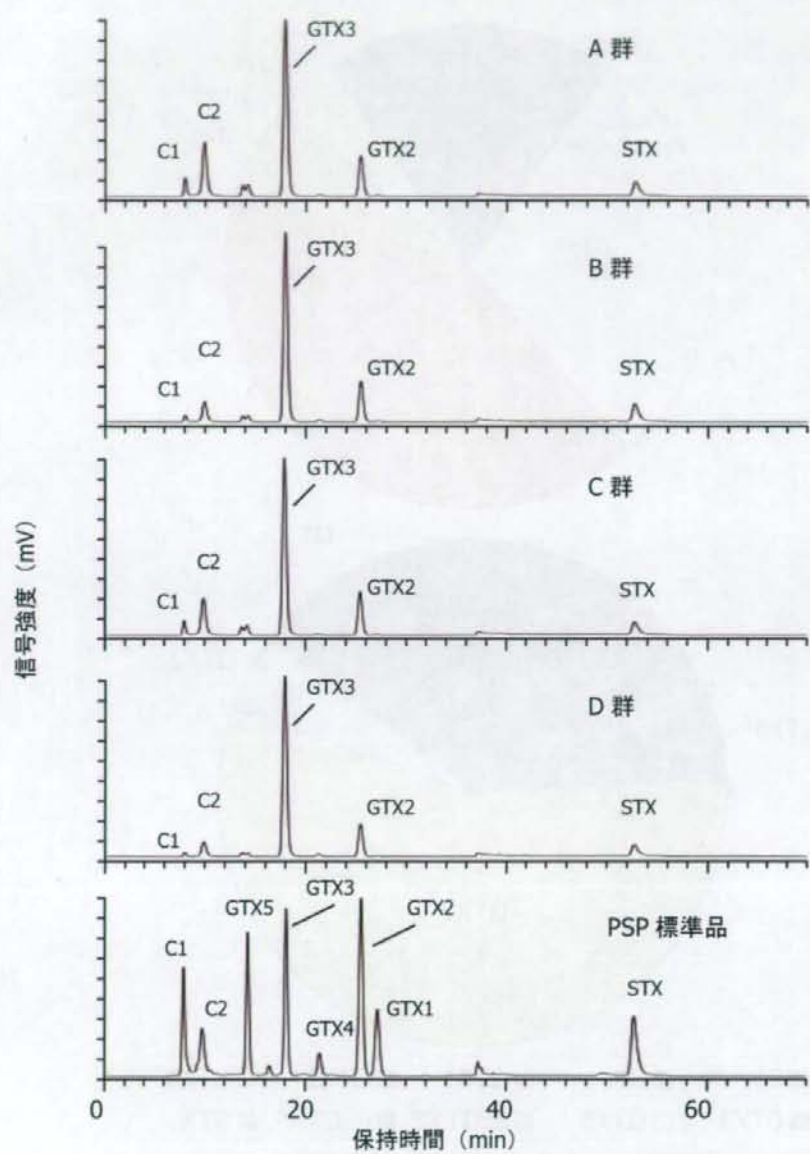


図 1. At041104 株の HPLC クロマトグラム

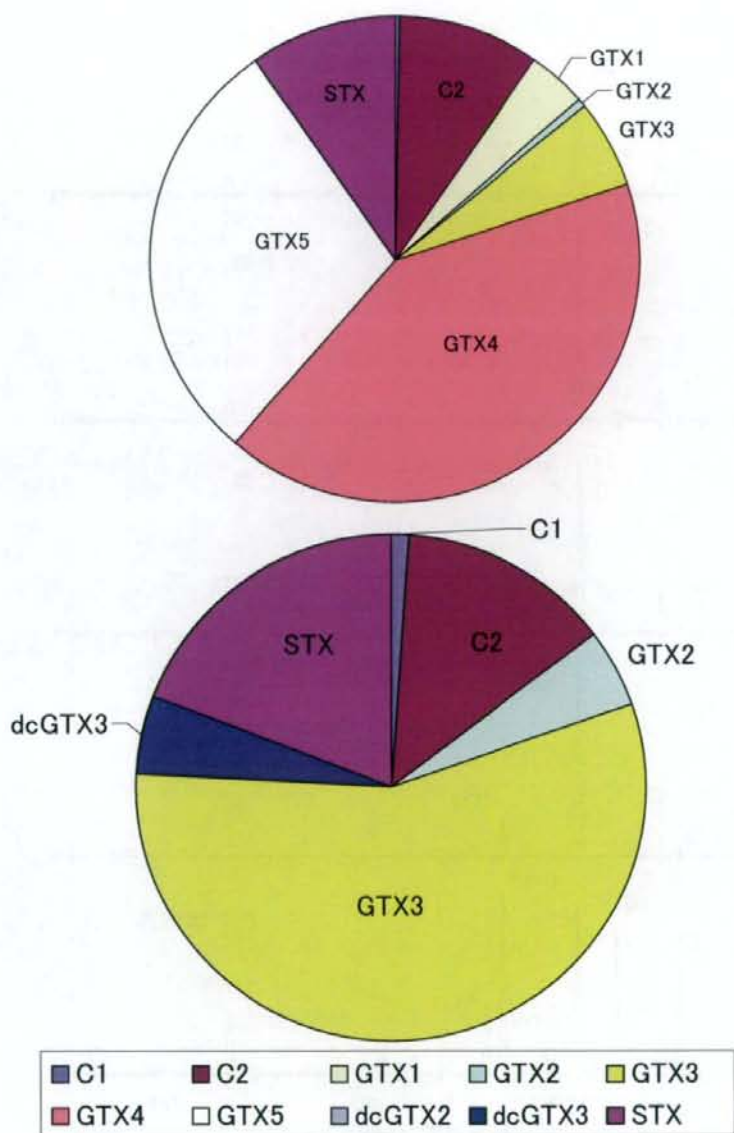


図 2. *A. tamiyavanichii* の天然株 (上) と At041104 株 (下) の毒成分組成 (mol%)

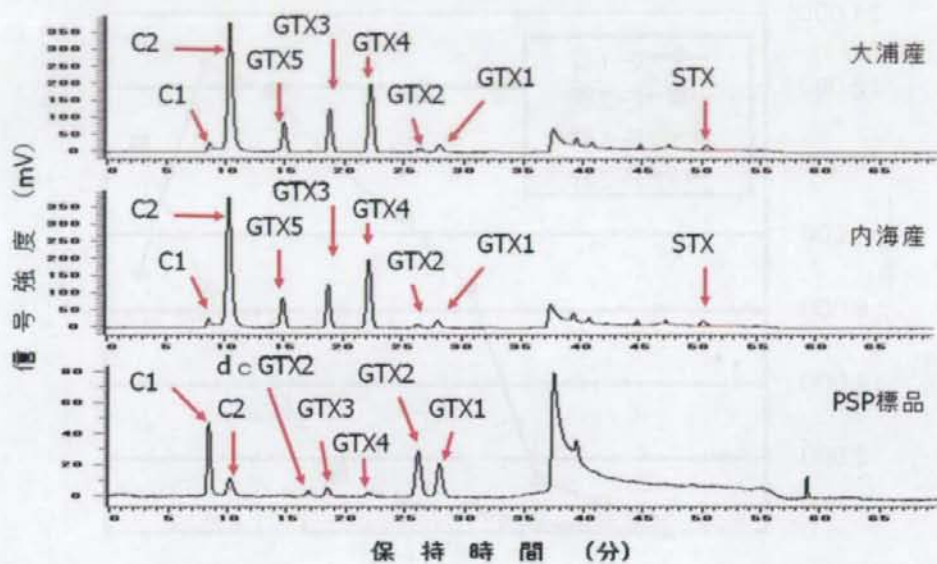


図 3. *A. tamiyavanichii* (天然株) の HPLC クロマトグラム

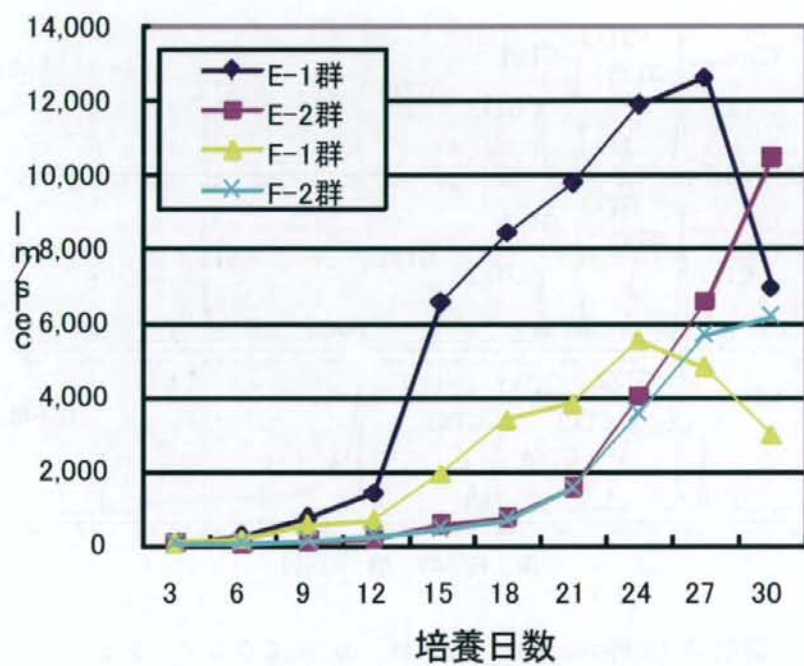


図 4. At041104 株の成長曲線



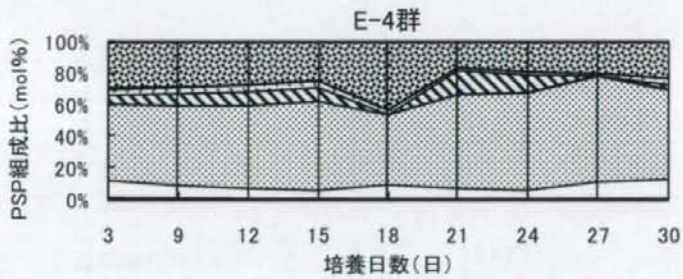
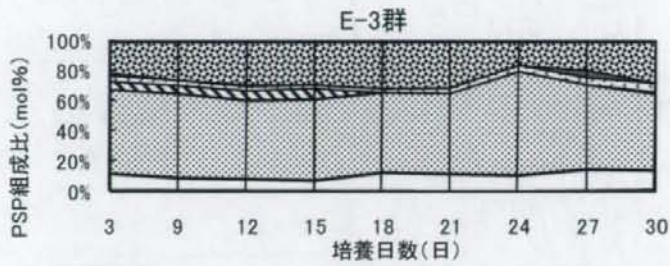
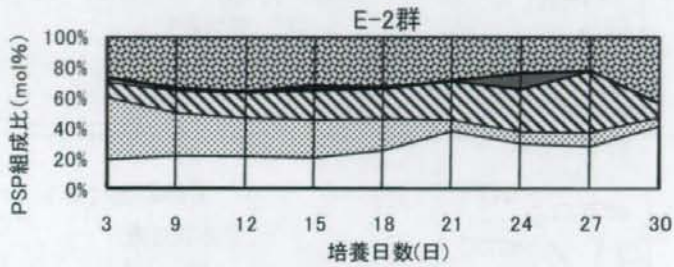
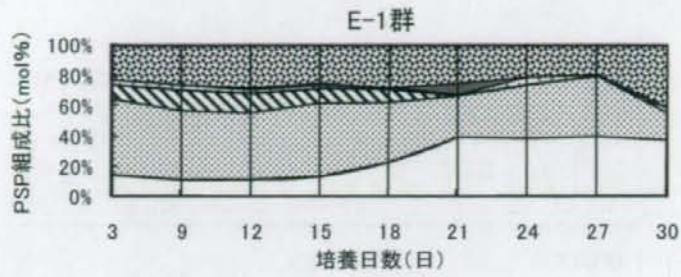


図 5. At041104 株の培養条件別 PSP 組成

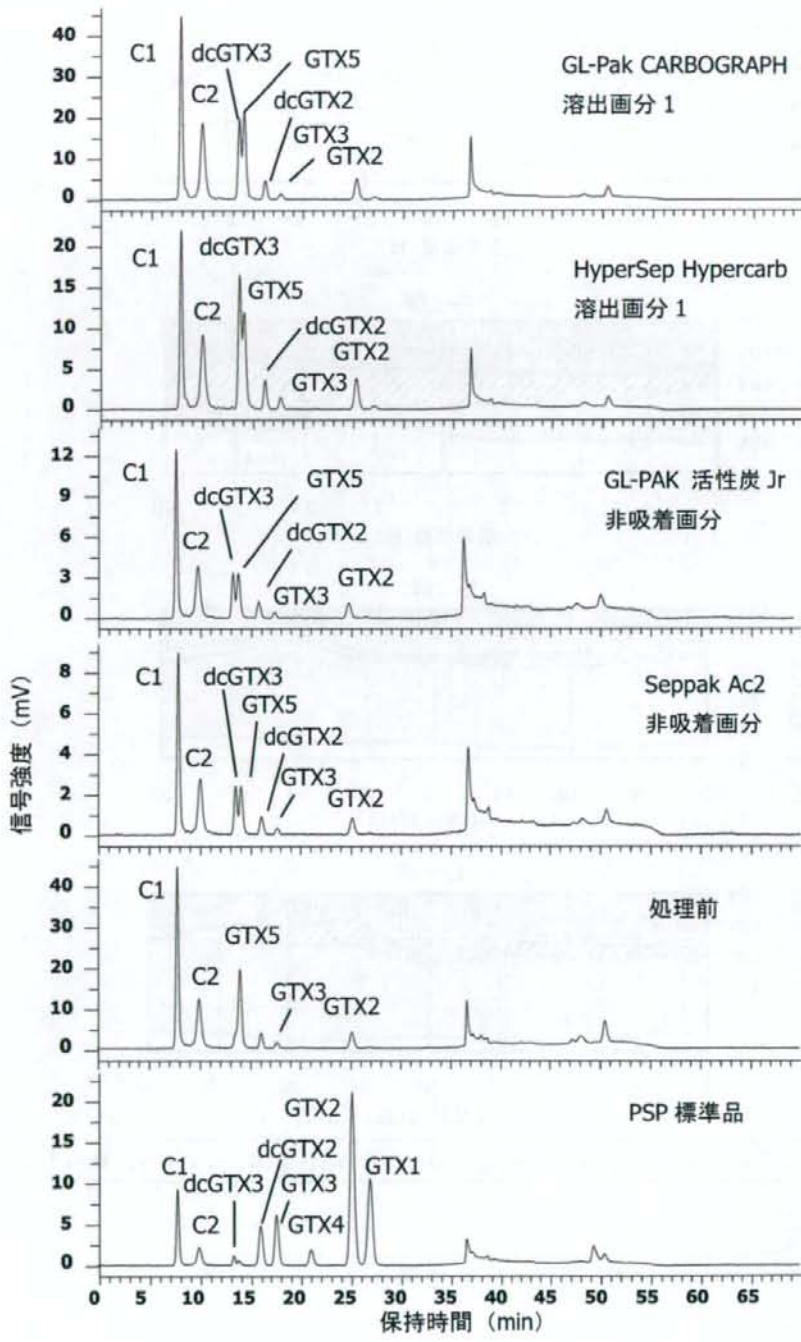


図 6. 遠心エポレーターで濃縮した固相カラム溶出液の HPLC クロマトグラム

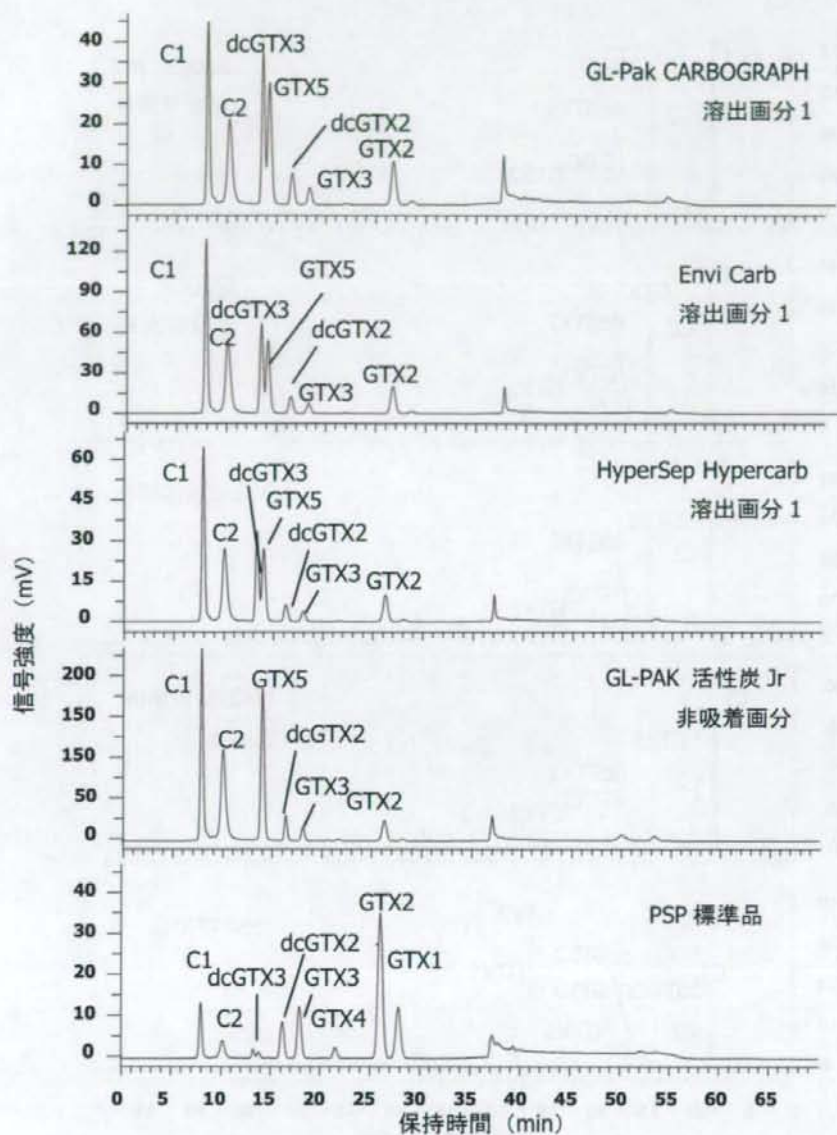


図 7. 凍結乾燥機で濃縮した固相カラム溶出液の HPLC クロマトグラム

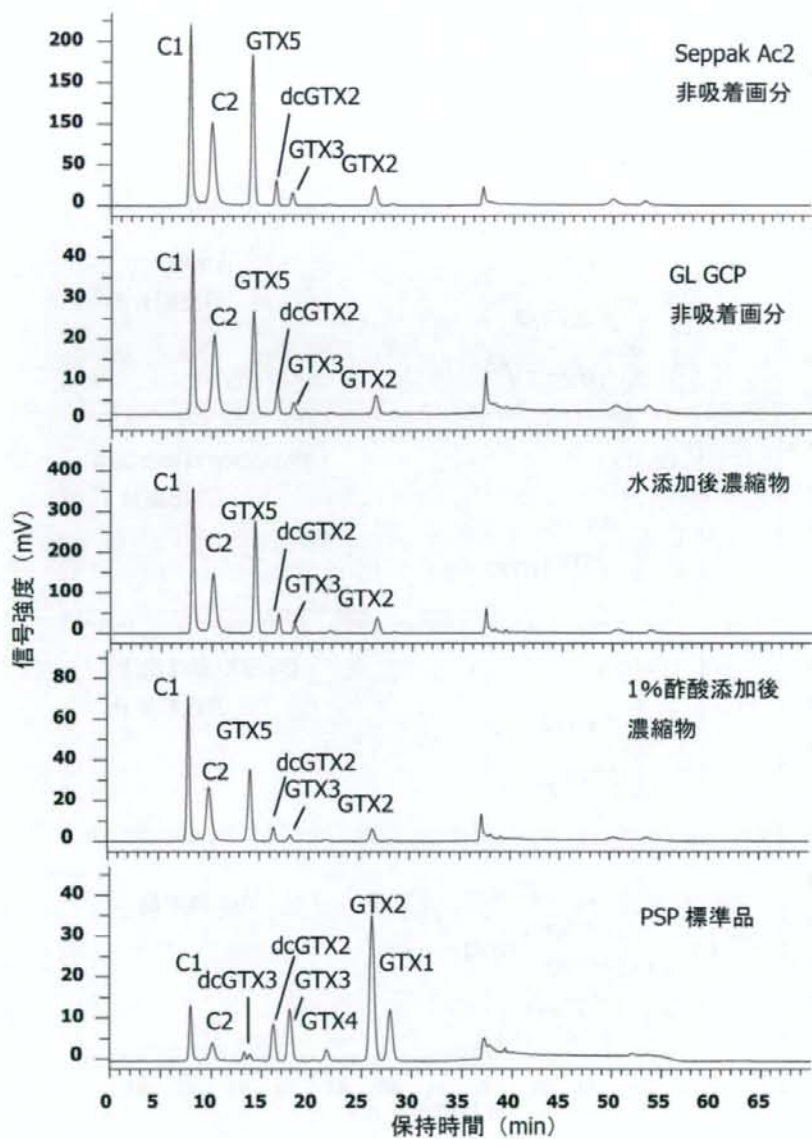


図 8. 凍結乾燥機で濃縮した固相カラム溶出液の HPLC クロマトグラム