

2008j7036B

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19年度～20年度 総合研究報告書

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
相良 剛史	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 81
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 83

総合研究報告書

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)による全成分一斉分析法の開発を目的とした。

まず、有毒生物から、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精製成分、ドウモイ酸(DA)、テトロドトキシン(TTX)、6-*epi*TTX、4-*epi*TTX、11-oxoTTX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る条件(分析条件I)を見出した。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ち、分析時間も60分以内と迅速で、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、DAやTTX、TTX関連成分の検出も可能となった。

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精製成分の分析において、 $m/z$  300、316、332、396、412のマスキンググラムにおいて、MS/MSおよびMS/MS/MSスペクトルに脱水[M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>、脱硫酸基[M-SO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>、脱水脱硫酸基[M-SO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>などのフラグメントイオンがみられるピークを検出し、C1、C2、C4、GTX5およびGTX6を同定した。また、MS/MSないしMS/MS/MSスペクトルによるSTX群成分およびGTX群成分を解析したところ、hyneoSTX、neoSTX、hySTX、STX、GTX1-5、dcGTX2,3の同定に成功した。次いで、含まれるPSP成分が未知の試料について、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。

以上、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

四方を海で囲まれた日本では、水産資源は国民への安定的食料供給の重要な一翼を担っており、多様な水産物により動物性タンパク質の約 4 割が供給されている。二枚貝も良質なタンパクを含む食品として広く食されているが、しばしば貝毒に汚染されることがあり、経済的にも甚大な被害をもたらしている。近年、瀬戸内海では、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頻発している。一方、東南アジアで二枚貝の毒化原因種とされる *Pyrodinium bahamense* が日本沿岸で発生することも危惧されている。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。

現在、日本での貝毒検査はマウス毒性試験法を公定法として実施されているものの、特異性がなく、多数の実験動物を使用するため、動物愛護の観点からも問題となっている。また、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) - 蛍光分析 (FLD) 法による分析が合わせて行われていることも少なくないが、煩雑な操作を要する上、検出感度など改善

すべき課題がある。一方、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) の普及に伴い、世界的に貝毒分析方法の開発が活発化している下痢性貝毒 (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、1990 年代に HPLC-FLD 法による分析法が確立されたのを契機に、これまで LC/MS 法への応用が図られているものの、未だ発展途上の段階である。

一方、日本国内における 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 およびネオサキントキシン (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 をはじめ、有毒魚介類から検出頻度が高いハイドロキシ STX (hySTX)、また加熱処理により  $\text{SO}_3$  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。そのため、HPLC や LCMS による魚介藻類の毒性評価は困難な現状にある。

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、貝毒のうち、PSP に着目し、標準品に準じた PSP 成分を精製するとともに、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) 有毒渦鞭毛藻の PSP 成分

#### 1-1) 培養方法

A. *tamiyavanichii* 培養株 (At041104 株) を 4 群 (A~D 群) に分け、それぞれ ESM 培地を用い、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、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) 試験液の調製方法

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 回繰り返して、得られた上清を合して粗抽出液とした。粗抽出液を限外ろ過に付して、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 mm  $\times$  50 mm) および野村化学社製 Develosil C-30 UG-5 ( $\phi$  4.6 mm  $\times$  250 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、流速を 0.6 ml/min 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) 有毒魚介類からの PSP 成分の精製

#### 2-1) STX 群成分の精製方法

1999 年 4~7 月に沖縄県石垣島で採取したツブヒラアシオウギガニ *Platypodia granulosa* 5 個体 (37.5 g) (試料 A) および 2002 年 9 月に石垣島で採取したウモレオウギガニ 1 個体から内臓と卵巣を除いた試料 B (68 g) を用いた。試料は入手後、直ちに凍結して以下の試験に供するまで -20°C で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

試料から 3 倍量の塩酸酸性 80% メタノール (pH 2.0) または酢酸酸性 80% エタノール (pH 3.5) で毒を大量抽出し、ジクロロメタンで脱脂後、活性炭処理に付した。次いで試料 A は、Bio-Gel P-2 カラム ( $\phi$  50 mm  $\times$  330 mm, Bio-Rad

Laboratories) に付し、毒を吸着させ、蒸留水で水洗したのち、0.15 M 酢酸により溶出させた。再度、この溶出画分を Bio-Gel P-2 カラム (φ 28 mm×480 mm, Bio-Rad Laboratories) に供し、水洗後、0.05 M 酢酸により 120 画分を分取し、HPLC 分析を行った。HPLC 分析より有毒であった画分 60~69 (Fr. I) および画分 73~120 (Fr. II) を Bio-Rex 70 カラム H<sup>+</sup> 型 (φ 8 mm×940 mm, Bio-Rad Laboratories) に付し、0~1 M 酢酸を用いるリニアグラジエント法により、80 画分を分取した。一方、試料 B については、Bio-Gel P-2 カラム (φ 40 mm×750 mm) に付して有毒成分を吸着後、水洗して 0.05 M 酢酸、次いで 0.15 M 酢酸で吸着画分を溶出させた。溶出液 (BG-I-Fr. 1~300) のうち、STX 群成分の溶出量が特に多かった BG1-Fr. 237~250 を凍結乾燥後、0.05 M 酢酸で溶解し、再び Bio-Gel P-2 カラム (φ 18 mm×900 mm) クロマトグラフィーに供し、0.05 M 酢酸により吸着画分 (BG-II-Fr. 1~50) を溶出させた。

## 2-2) GTX 群成分の精製方法

2004 年 6 月に北海道噴火湾で採取されたホタテガイ *Patinopecten yessoensis* の中腸腺 500 g (試料 C) ならびに 3,500 g (試料 D) を試料とし、GTX 群の精製に供した。試料は入手後、直ちに凍結して以下の試験に供するまで -20℃ で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

まず、試料から 1% 酢酸-80% エタノールで毒を大量抽出し、脱脂、活性炭処理後、Bio Gel P-2 カラムクロマトグラフィー (φ 20 mm×360 mm) および Bio-Rex70 カラム H<sup>+</sup> 型クロマトグラフィー (φ 20

mm×250 mm) 供し、HPLC にて有毒成分を分析した。

## 2-3) STX 群成分の HPLC 分析方法

本分析は、Waters LC Module-I 装置にて行った。

カラムには Lichro CART superspher RP-18(e) (φ 4.6 mm×250 mm, Merck) または Develosil C 8 カラム (φ 4.6 mm×250 mm, 野村化学) を、移動相には 2 mM ヘプタンスルホン酸を含む 4% アセトニトリル-30 mM リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.3) を用い、その流速を 0.8 ml/min とした。また、有毒成分の蛍光化およびそれを促進させるための反応液として、50 mM 過ヨウ素酸と 0.2 M 水酸化カリウム-1 M ギ酸アンモニウム-50% ホルムアミド混合液 (蛍光物質安定剤) を 0.4 ml/min ずつ流した。反応液をカラム通過後の緩衝液に混合させ、恒温槽内において 60℃ で 1.5 分間加熱して蛍光化させ、その強度を蛍光検出器で励起波長 336 nm、蛍光波長 392 nm で測定した。

## 2-4) GTX 群成分の HPLC 分析方法

本分析は、JASCO HPLC system で行った。

カラムには、Mightily RP-18(e) GP (φ 4.6 mm×250 mm, Cica) を、移動相には 2 mM ヘプタンスルホン酸含有 10 mM リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.3) を検出試薬に酸化剤として 50 mM 過ヨウ素酸を用いた。蛍光物質安定剤ならびに検出条件は B. 2-3) と同様とした。

## 2-5) HPLC による PSP 一斉分析法

B. 2) で調製した PSP 成分を Waters 製 Sep-Pak C 18 (Waters, USA) と Ultra free C3LGC (Millipore, USA) で前処理して

1-4) の方法で分析した。

### 2-6) LC-MS 分析方法

BG-II-Fr. 41 を試料として用いた。

2種の移動相を用い、移動相 A を 0.05% HFBA-10 mM 酢酸アンモニウム、移動相 B を 0.05% ペンタフルオロプロピオン酸 (PFPA) -10 mM 酢酸アンモニウム-1% メタノール (pH 7.1) とし、流速を 0.6 ml/min とした。固定相には HG3013N カラム (φ 4.6 mm × 50 mm, 日立) と Develosil C-30 RP AQUEOUS AR カラム (φ 4.6 mm × 250 mm, 野村化学) を直結し、前者を 50°C、後者を 25°C に加温制御した。分析開始から 25 分間を移動相 A、26 分～45 分を移動相 B、46 分から分析終了時 (70 分後) までを移動相 A とするグラジエントシステムで繰り返し分析した。MS 部には、音速噴霧イオン化法 (sonic spray ionization: SSI) を装備した HITACHI M-8000 を用い、極性ポジティブ、第一細孔温度 170°C、シールド温度 300°C、検出器 400 V、フォーカス電圧 30 V、ドリフト 30 V で分析した。

### 3) TTX・TTX 関連成分の精製

#### 3-1) 精製方法

2007 年 5 月に長崎県福江島で採取したニホンイモリ 200 個体 (計 800 g) を細切後、1% 酢酸-80% エタノールを 3 倍量加え、ホモジナイザー (10,000 rpm, 5 min) で均質化し、遠心分離 (8,000 rpm, 20 min) に供した後、上清を分取した。残渣をこの操作に 3 回繰り返し供し、抽出液を合一した (63,000 MU)。この抽出液を減圧濃縮し、等量のジクロロメタンを加え脱脂した。水層画分につき pH を 6 に調整した後、試料と等量の活性炭 (約 760

g) を加えてよく攪拌し毒を吸着させ、精製水で洗浄した後、1% 酢酸-20% エタノールで溶出し、プフナー漏斗でろ過した。この際、洗浄液から毒が検出されたため、減圧濃縮後、上記の活性炭処理に再度供し、溶出液を得た。2 つの溶出液を合一し (53,700 MU)、減圧濃縮・凍結乾燥させた後、少量の純水に溶解し、Bio-Gel P-2 カラム (φ 50 mm × 350 mm) に付した。一晩カラムを精製水で洗浄後、毒を 0.1 M 酢酸で溶出した。有毒画分 (51,800 MU) を減圧濃縮・凍結乾燥後、少量の純水に溶解し、Bio-Gel P-2 (φ 50 mm × 350 mm) カラムに付し、0.03 M 酢酸を用いたクロマトグラフィーを行った。LC/MS 分析で有毒画分を確認後、これらを適宜合一し、Bio-Gel Fr.1, 2 とした。Bio-Gel Fr.1 (15,600 MU) を減圧濃縮後、少量の精製水に溶解し、Bio-Rex 70 カラム H<sup>+</sup>型 (φ 8 mm × 900 mm) に付した。その後、0-0.03 M 酢酸を用いたクロマトグラフィーを繰り返し行い、LC/MS 分析で有毒画分を確認した。Bio-Gel Fr.2 (24,300 MU) においても同様にクロマトグラフィーを行い、カラムからの溶出順に T-I～VI の毒成分を分離した。

分離した毒については、カラムに Puresil C18 (φ 4.6 × 250 mm, Waters) を、移動相に 60 mM ヘプタフルオロ酪酸を含む 1 mM 酢酸アンモニウム緩衝液を用いた LC/ESI-MS 分析法により分析した。

#### 3-2) 精製成分の同定方法

核磁気共鳴 (NMR) システムは JEOL JNM-AL 400 MHz を使用した。また、T-VI についてはさらに Varian UNITYplus 500

MHzを使用し、NOEZYおよびCOSYスペクトルを測定した。

T-I~VIをそれぞれ4% CD<sub>3</sub>COOD-D<sub>2</sub>Oに溶解させ、NMR試験管に注入し、<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを測定した。

#### 4) DAの精製

##### 4-1) 精製方法

鹿児島県花瀬崎にて採取されたハナヤナギ1,114 gを試料とした。

試料を細切後、3倍量の精製水を加え、ホモジナイザー(15,000 rpm、10 min)で十分に均質化した後、遠心分離(8,000 rpm、20 min)を行い、上清を分取した。得られた上清を自然ろ過したものを粗抽出液とした。粗抽出液のpHを3.2に調整後、蒸留水で充分洗浄した活性炭(250 ml)を加えてよく攪拌しDAを吸着させた。蒸留水で洗浄後、3倍量の90%メタノールで2回溶出させ、ブフナー漏斗でろ過した。溶出液を合一し、減圧濃縮後、0.45 μm フィルターでろ過したものを半分ずつ2回に分けてBio-Gel P-2カラム(φ30×300 mm、Bio-Rad Laboratories)に付し、0.03 M 酢酸で溶出(0.5 ml/min)させた。有毒画分を合一後、減圧濃縮し、0.45 μm フィルターでろ過した。

##### 4-2) LC/MS分析方法

LC/MS分析条件を表1に示す。分析はイオン化法にESI<sup>+</sup>を用いて、Waters社製のZSpray<sup>TM</sup>MS検出器(ZMD)および同社HPLCであるalliance2690からなるLC/MSシステムにより行った。DAを選択イオンm/z=312で検出した。カラムはMightysil RP-18 GP(φ2.0×250 mm、関東化学株式会社)を用いた。移動相には1%酢酸-12%アセトニトリルを用い、流速は0.2 ml/minとした。DA標準品0.1、1、5、10 ppmを用い

て検量線を作成し、試料のDA含量を算出した。

#### 5) 簡易精製法の検討

##### 5-1) 精製したPSP成分を用いた方法

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バー 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に定容した。

##### 5-2) MBA

B. 1-3)と同様に行った。

##### 5-3) HPLC分析



B. 1-4)と同様に行った。

## 6) LC/MS による PSP 一斉分析

### 6-1) 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および 0.1% ペンタフルオロプロピオン酸-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、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。

### 6-2) 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% PFA-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)。

## 7) LC/MS による実試料の分析

### 7-1) 試料

*A. catenella* (AcWU0617 株、YT-2 株および) の培養藻体ならびに *tamiyavanichii* により毒化したムラサキガイより PSP を調製して試料とした。

### 7-2) LC/MS 分析条件

AcWU0617 株の培養藻体およびムラサキガイから調製した試料は B. 5-1)、B. 5-2) と同様に行った。

一方、YT-2 株から調製した試料は以下の方法に従った。LC 部は、カラムに HG3013N ( $\phi$  2.7 mm  $\times$  50 mm) と Develosil RP-AQUEOUS-AR ( $\phi$  3 mm  $\times$  250 mm) を連結して使用した。前カラムを 50°C、後カラムを 25°C に制御した。移動相は 0.05% 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を A 液、0.05% ペンタフルオロプロピオン酸を含む 1% アセトニトリル-10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液を B 液として用いた。0-20 分に A 液、20-21 分に A 液から B 液に移行、21-45 分に B 液、45-46 分に B 液から A 液に移行、46-70 分に A 液が流れるように設定した。ポンプの流量を 0.3 ml/min とした。GTX 群成分と STX 群成分の質量分析には HITACHI M-8000 LC/3DQMS を使用した。MS 部は、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 でポジティブモードとした。他方、C 群成分の分析カラムには

HG3013N(φ2.7 mm×150 mm)を使用し、  
移動相として 0.1%酢酸を用いた。このとき  
の MS 測定はネガティブモードとした。

## C. 研究結果

### 1) 有毒渦鞭毛藻の PSP 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、*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) 有毒魚介類からの PSP 成分の精製

試料 A から得られた粗毒(総毒量 37,500 MU)を脱脂および活性炭処理に

付したところ、総毒量 23,300 MU が回収された。次いで、Bio-Gel P-2 クロマトグラフィーにおいて、総毒量 16,600 MU の有毒画分を分取し、さらに Bio-Rex 70 カラムクロマトグラフィーにて分画された Fr. I に 1,000 MU、Fr. II に 1,100 MU の総毒量を示す精製物質が得られ、HPLC 分析から前者は dcSTX と、後者は hySTX と一致する単一のピークが検出された(図 5)。よって、Fr. I を dcSTX、Fr. II を hySTX の精製毒とした。

次に、総毒力 50,000 MU を示した試料 B の粗抽出液は脱脂により同 50,000 MU (抽出液)、続いて活性炭処理により得た AC1～4 の合一した画分の総毒力は 20,000 MU となった(図 6)。次いで、AC1～4 の合一画分を Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーに供したところ、BG-I-Fr. 208～236 の合一画分に 800 MU、同 237～250 の合一画分に 20,000 MU の総毒力を得た。さらに、後者の合一画分を再度 Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーに付し、BG-II-Fr. 39～40 の合一画分、同 41、同 42～44 の合一画分、同 45 から、それぞれ 2,200 MU、4,000 MU、400 MU、45 MU の総毒力を回収した。このうち、粗抽出液、抽出液、CA1～4 を HPLC 分析に供したところ、いずれも STX、dcSTX、hySTX、neoSTX、hyneoSTX、dcGTX2,3、GTX2,3 と保持時間の一致するピークが検出された。それぞれの PSP 成分組成(mol%)を比較したところ、80%以上が STX 群 5 成分であり、全てにおいて STX および neoSTX がそれぞれ 30%～40%を占めていた(図 7)。次に、CA1～4 を合一し、Bio-Gel P-2 カラムク

ロマトグラフィーに付して BG-I-Fr. 1~300 を得た。そのうち、BG-I-Fr. 50~55、56~73、74~120、121~165、166~207、208~236、237~250、251~254、255~300 につき、それぞれを合一後、HPLC 分析から各毒量を算出した (図 8)。BG-I-Fr. 237~250 の合一した画分に STX 群成分の最大毒量が得られた。その STX の毒量は 1,000 nmol、dcSTX は 81 nmol、hySTX は 220 nmol、neoSTX は 730 nmol、hyneoSTX は 34 nmol であった。そこで、BG-I-Fr. 237~250 の合一した画分を再び Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィー付したところ、BG-II-Fr. 39~42、45 に、いずれも STX、dcSTX、hySTX、neoSTX、hyneoSTX が検出された。BG-II-Fr. 39~42、45 には、それぞれ総毒量 2,000 nmol、3,600 nmol、7,000 nmol、660 nmol、17 nmol の STX 群成分が含まれていた (図 9)。最大値を示した BG-II-Fr. 41 に含まれる STX の毒量は 3,700 nmol、hySTX は 610 nmol、neoSTX は 2,700 nmol、hyneoSTX は 34 nmol であった。BG-II-41 の LC-MS クロマトグラムと MS スペクトラムを図 10 および図 11 に示す。 $m/z$  300、316、332 のクロマトグラムにおいて、それぞれ STX( $[M+H]^+=300$ )、neoSTX( $[M+H]^+=316$ )、hyneoSTX ( $[M+H]^+=332$ ) の標準品と保持時間の一致するピークが得られた。また、STX、neoSTX、hyneoSTX と推定されるピークの保持時間における MS スペクトラムに、いずれも特徴的な脱水ピークである  $[M+H-H_2O]^+=282$ 、298、314 のフラグメントイオンが検出された。従って、それぞれ STX、neoSTX、hyneoSTX と同定された。

他方、試料 C から総毒量 35,200 MU の粗毒を得て、活性炭処理ならびに Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーに付し、総毒量 2,300MU の有毒画分を回収した。さらに、Bio-Rex 70 カラムクロマトグラフィーにより画分 17 に 3,590 MU、画分 18 に 4,790 MU、画分 19 に 1,040 MU の総毒量が得られた。一方、HPLC 分析において、いずれの画分からも GTX1~4 が検出され (図 12)、画分 17 の主成分は GTX1(46 mol%)、画分 18 と 19 は GTX2 (それぞれ 50 mol%、75 mol%) が主成分であった (図 13)。一方、試料 D からは最終的に、Bio-Rex 70 カラムクロマトグラフィーにて溶出された画分 3~9 に総毒量 29,400 MU を得た。画分 3 は主成分として GTX1 (62 mol%) が、副成分に GTX4 (28 mol%) が含まれていた (図 14、図 15)。画分 4~6 については、主成分はやはり GTX1 であったが、いずれも GTX4 は 2 mol%以下を示し、GTX2 または GTX3 が副成分であった (図 14、図 16)。一方、画分 7 では GTX2 が 94 mol%を占め、わずかに GTX1,3 が含まれていた (図 14、図 17)。さらに、画分 8 と 9 については 98 mol%以上が GTX であった (図 14、図 18)。従って、画分 3 を GTX1,4(総毒量 1,330 MU)、画分 4~6 を合一して GTX1~4(総毒量 17,100 MU)、画分 7 を GTX1~3 (総毒量 6,700 MU) の部分精製毒、画分 8 と 9 を合一して GTX2 (総毒量 4,280 MU) の精製毒とした。

### 3) TTX・TTX 関連成分の精製

各精製段階での毒の回収率を図 19 に示す。Bio-Gel P-2 によるカラムクロマトグラフィ

一により得られた各フラクションを選択イオン  $m/z$  320, 304, 302 でそれぞれ LC/MS 分析したところ図 20 のような溶出パターンとなった。Bio-Rex 70 による溶出パターンを図 21, 22 に示す。粗抽出液 (63,000 MU) から順次精製して最終的に 6 つの画分 (T-I ~ VI) を得た。

T-II (総毒量 16,600 MU) では、LC/MS 分析において選択イオン  $m/z$  320 で分析したところ、保持時間 7.07 分にピークを得、TTX 標準品のピークと保持時間が一致した (図 23)。また、このピークの MS スペクトルから、 $m/z$  320 の水素付加イオン (M+H)<sup>+</sup> も確認され、T-II は TTX と同定された。

T-III (総毒量 931 MU) では、LC/MS 分析において選択イオン  $m/z$  320 で分析したところ、保持時間 7.77 分にピークを得、6-*epi*TTX 標準品のピークと保持時間が一致した (図 23)。MS スペクトルを解析したところ、(M+H)<sup>+</sup> と考えられる  $m/z$  320 のイオンピークが確認された。このことから T-III は 6-*epi* TTX と同定された。

T-V (総毒量 252 MU) は、LC/MS 分析において選択イオン  $m/z$  320 で分析したところ、9.82 分に出現するピークを主とし、7.00 分の TTX のピークも若干認められた。9.82 分のピークの MS スペクトルを解析したところ、 $m/z$  320 の強いイオンピークが得られ、ピークの保持時間および MS スペクトルからこのピークは 4-*epi* TTX と推測され、T-V の主成分であった (図 24)。

T-I の LC/MS 分析によるクロマトグラムおよびスペクトルを図 24 に示す。11-*oxo*TTX のクロマトグラムのピークと保持時間が一致し、 $m/z$  336 の水素付加イオン [M+H]<sup>+</sup> が確認できたため、T-I は 11-*oxo*TTX と推定さ

れた。

T-IV の LC/MS 分析から 5-*deoxy*TTX-std のクロマトグラムのピークと保持時間が異なり、11-*deoxy*TTX のピークと溶出傾向が近似していた。また、このピークの MS スペクトルから、 $m/z$  304 の水素付加イオン [M+H]<sup>+</sup> が得られたため、T-IV は 11-*deoxy*TTX と推定された。

T-VI の MS スペクトル分析から、 $m/z$  304 のイオンピークが得られ、TTX から何らかの置換基が置き換わった誘導体であると推測された。

T-II, III, V, VI の NMR スペクトルチャートを図 25 に、ケミカルシフト値のデータを表 4 に示す。

#### (a) T-II

ケミカルシフト値 ( $\sigma$ ) 2.35, 3.95, 4.01, 4.03, 4.07, 4.25, 4.29, 5.50 ppm に、それぞれ C4a-H, C9-H, C11-H, C11-H, C7-H, C5-H, C8-H, C4-H に帰属し得るプロトンのシグナルが認められた。 $\sigma$ 2.35 ppm と  $\sigma$ 5.50 ppm のシグナルは結合定数  $J = 9.6$  Hz で互いにカップリングしており、TTX のスペクトル (Yotsu-Yamashita, 2001) の特徴とよく一致した。

#### (b) T-III

スペクトルの解析により、hemilactal 型と lactone 型が混在していることが明らかとなった。ケミカルシフト値 ( $\sigma$ ) 2.01, 3.74, 4.00, 4.08, 4.16, 4.29, 5.55 ppm に、hemilactal 型のそれぞれ C4a-H, C11-H, C9-H, C7-H, C8-H, C5-H, C4-H に帰属し得るプロトンのシグナルが認められた。さらに、ケミカルシフト値 ( $\sigma$ ) 2.13, 3.68, 3.69, 4.02, 4.26, 4.58, 4.62, 5.55 ppm に、lactone 型のそれぞれ C4a-H, C11-H, C11-H, C5-H, C8-H、

C9-H、C7-H、C4-H に帰属し得るプロトンのシグナルが認められた。 $\sigma$ 2.01 ppmと $\sigma$ 5.55 ppmのシグナルは結合定数  $J = 9.2$  Hz、 $J = 8.8$  Hz で互いにカップリングしており、6-*epi* TTX のスペクトルの特徴とよく一致した。

#### (c) T-V

ケミカルシフト値( $\sigma$ ) 2.74、3.87、3.91、3.97、4.17、4.20、5.04 ppm に、それぞれ C4a-H、C5-H、C11-H、C7-H、C8-H、C9-H、C4-H に帰属し得るプロトンのシグナルが認められた。 $\sigma$ 2.74 ppmと $\sigma$ 5.04 ppmのシグナルは結合定数  $J = 4.4$  Hz で互いにカップリングしており、4-*epi* TTX のスペクトルの特徴とよく一致した。

T-I および T-IV の2画分については、精製により得られた重量が微小であり  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルが測定不可能であった。

#### (d) T-VI

400 MHz で測定したスペクトルは形状が不明瞭であり解析が困難であったため、Varian UNITYplus 500 MHz を使用してより詳しい解析を行った。詳細なスペクトルの解析により、T-VI のシグナルは過去報告されている TTX 誘導体のどのものとも一致しなかった。まず、C6-H に帰属し得るシグナルが存在した。これは、C6 に付属する水酸基(-OH)が水素(-H)に置換したことを示した。また、TTX に比べ C11-H のシグナルが高磁場にシフトしており、その積分比が2から3に変化していた。これは C11 に付属するハイドロキシメチル基(-CH<sub>2</sub>OH)がメチル基(-CH<sub>3</sub>)に置換されていることを示した。一方、TTX では存在した C5-H に帰属し得るシグナルが消失していた。

#### 4) DA の精製

試料から DA を精製する過程での DA 含有量を LC/MS により定量した結果、粗抽出液中には 416 mg、活性炭処理後に 132 mg の DA が含まれていた。次いで、Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーにより得られた各フラクションを LC/MS により選択イオン  $m/z=312$  でモニターしたところ図 26 のような溶出パターンを得た。Bio-Gel P-2 で分離した有毒画分(1回目: Fr.21~32, 2 回目: Fr.20~31)の総 DA 量は 124 mg であった。

#### 5) 至適簡易精製法

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 5、6 に示す。

まず、CE 処理における回収率(表 5)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 6)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。

GTXsKA2M および有毒画分の HPLC クロマトグラムを図 27、28、29 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。

#### 6) LC/MS による PSP 一斉分析

PSP-TTX 混合標準品の分析条件 I での分析において、 $m/z$  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 30)。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 31)。

一方、PSP-S15 の分析条件 II での分析において  $m/z$  300、316、332、396、412 のマスキ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 32)。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 33)。

FASTD1 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 34、35)。

#### 7) LC/MS による実試料の分析

YT-2 株の抽出液(590 MU)を Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーで精製した結果を図 36 に示す。蛍光検出された画分を Fr. I-IV に区分した。それぞれの毒性をマウスアッセイ法にて調べたところ Fr. II から 177MU、Fr. III から 510 MU が検出された。これらを電気泳動法で分析したところ Fr. II から陽極方向への相対移動度(+Rm) 0.16、0.35、0.45 の 3 成分を、Fr. III から陰極への -Rm 値 0.22、0.13 の 2 成分を検出した。これらから Fr. II の 3 成分をそれぞれ C1、C2、C3 と推定し C 画分とした。また、Fr. III の 2 成分はそれぞれ GTX5、GTX6 と判断して GTX 画分とした。C 画分と GTX 画分を HPLC 分析から求めた YT-2 株の毒量を図 37 示す。YT-2 株は、GTX5 が 7.0 fmol/cell と極めて多く、次に GTX6 が 3.4 fmol/cell 産生されていた。C1、C2、GTX1、GTX4 はそれぞれ 0.8、0.2、1.1、0.3 fmol/cell であった。GTX3、GTX2 はごく微量で、STX および neoSTX は検出されなかった。

分離した GTX 画分のマスキロマトグラムを図 38、マススペクトルを図 39 に示す。カラムの保持時間 10.8 分に  $m/z$  300 で検出された成分 Peak1 は、そのマススペクトル  $[M+Na]^+$  の  $m/z$  402 および  $[M-SO_3+H]^+$  の  $m/z$  300 から GTX5 と同定された。保持時間 11.2 分に  $m/z$  316 で検出された Peak2 は  $[M+Na]^+$  の  $m/z$  418 および  $[M-SO_3+H]^+$  の  $m/z$  316 から GTX6 に、保持時間 16.7 分の Peak3 は  $[M+Na]^+$  の  $m/z$  434、 $[M+H]^+$  の  $m/z$  412、 $[M-H_2O+H]^+$  の  $m/z$  394、 $[M-SO_3+H]^+$  の  $m/z$  332 および  $[M-SO_3-H_2O+H]^+$  の  $m/z$  314 のマススペクトルから GTX4、保持時間 21.5 分の Peak4 は  $[M+Na]^+$  の  $m/z$  434 およ

び[M-SO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>の *m/z* 332 から GTX1 と判断された。

ネガティブモードによる C 群の LC/MS 分析によるマスプロトグラムを図 40 とマスペクトルを図 41 に示す。C1,2 に関係した [M-H]<sup>-</sup>の *m/z* 474、[M-H<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup>の *m/z* 456 で検出された保持時間 9.2 分の Peak5 と 20.2 分の Peak7 は、脱水のマスペクトルを強く与える方を β エピマーの C2 とし、他方の成分を C1 と同定した。保持時間 10.6 分に *m/z* 490 にて認められた Peak6 は C3 の [M-H]<sup>-</sup>の *m/z* 490 によるものと考えた。

他方、毒化ムラサキイガイは、MBA より 28.4 MU/g の PSP を含有し、GTX4 および GTX5 がそれぞれ約 22~24%、C2 および GTX1 が約 13%、STX および GTX3 が約 10%を占めていた(図 42)。そこで、このムラサキイガイの粗毒抽出液(320 MU)を Bio-Gel P-2 クロマトグラフィーに附したところ、C 群が蒸留水で、GTX 群成分と STX 群成分が希酢酸で溶出された。分離した両群の成分のマスペクトルを図 43 に、ピークが検出された溶出時間である 15.5 分、19.7 分、23.8 分、28.0 分、30.1 分および 52.4 分のマスペクトルを図 44 示す。保持時間 15.5 分に *m/z* 300 および *m/z* 418 で検出されたピークは、GTX5 の [M-SO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> および [M+K]<sup>+</sup>、19.7 分に *m/z* 316 および *m/z* 418 で検出されたピークは GTX3 の [M-SO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> および [M+Na]<sup>+</sup>、23.8 分に *m/z* 332 および *m/z* 450 で検出されたピークは GTX4 の [M-SO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> および [M+K]<sup>+</sup>、28.0 分に *m/z* 316 および *m/z* 418 で検出されたピークは GTX2 の [M-SO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> および [M+Na]<sup>+</sup>、30.1 分に *m/z* 332 および *m/z* 450 で検出されたピークは GTX1 の [M-SO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> および

[M+K]<sup>+</sup>、52.4 分に *m/z* 300 で検出されたピークは STX の [M+H]<sup>+</sup> と判断された。

また、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 のマスプロトグラムにおいて、多数のピークが検出された(図 45、46)。*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ると、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 47)。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 48)。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 49)。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 50)、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 51、52)。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 53)、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 54)。



## D. 考察

### 1) 有毒渦鞭毛藻の PSP 成分

*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 を産生することではなく、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、さらに検討を行い、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) 有毒魚介類からの PSP の精製

現在、STX は国際条約で化学兵器に指定されている。わが国でも 1995 年に制定された「化学兵器の禁止および特定物質の規制等に関する法律」において、STX の製造、保管、譲渡などが制限されており、事実上使用が禁止されている。そこで、当該研究では国内で供給されていない STX 群のうち、dcSTX および hySTX の精製を試みた。公定法で 510~3,900 MU/g の毒力を示したツブヒリアシオウギガニの合一試料 37.5 g から dcSTX (総毒量 1,000 MU) および hySTX (総毒量 1,100 MU) の精製に成功し、当該事業研究の大目的である LC-MS による絶対的 PSP 定量法 (PSP 一斉分析法) の開発に際し、いずれも十分な量であった。他方、ウモレオウギガニの予備的な毒性スクリーニングから、その最小値 (150 MU/g) と最大値 (14,000 MU/g) では約 10 倍の差異があったことから、個体差が大きい

といえる。また、1 個体当たりの総毒力の和は約 2,400,000 MU であったが、最大毒力を示した個体の総毒力は 1,500,000 MU となり、全体の 65% を占めていた。一方、全個体 (約 1,000 g) を合一して PSP 成分を抽出・精製するには、多くの労力と時間を要することが予想された。しかしながら、最高毒力を示した個体の重量は 110 g であり、同試料から PSP 成分を抽出・精製することが合理的であると判断された。一方で、これらの成分は毒化した食用二枚貝等からの検出例が多いこと、将来的に PSP 検査が LC/MS などの化学分析に移行することなどを踏まえ、現在、国内で配布されている neoSTX 以外の dcSTX や hySTX といった STX 群標準品を確保すべきであろう。

また、国内で重要な食用二枚貝であるホタテガイなどが毒化すると、その主成分として GTX 群が検出される例が極めて多い。わが国では GTX 群に関して 6 成分 (GTX1-4, dcGTX2,3) が供給されている。しかしながら、その供給量には限りがあるのが現状となっており、やはり将来的に PSP 検査法が化学分析に移行した場合、供給すべき GTX 群標準品の成分の拡大と供給量の増加が見込まれる。本研究では、GTX 群の単一精製成分は GTX2 (総毒量 4280 MU) のみであったが、GTX1~4 が混在した総毒量 34,500 MU の部分精製毒も得られており、今後、GTX 群標準品の作製が期待される貴重な試料といえる。

総毒量が最も多かった BG-II-Fr. 41 につき LC-MS 分析を行ったところ、*m/z* 300 クロマトグラムにおいて STX

( $[M+H]^+=300$ ) の単一なピークが検出された。さらに、その保持時間における MS スペクトラムから特徴的な脱水ピーク ( $[M+H-H_2O]^+=282$ ) が確認されたことから、精製度の極めて高い STX が得られた。一方、 $m/z$  316 と 332 のクロマトグラムに、それぞれ neoSTX ( $[M+H]^+=316$ ) および hyneoSTX ( $[M+H]^+=332$ ) が検出されたが、前者は保持時間 45 分付近にも信号強度の低いピークが、後者にも同様のピークが複数みられた。しかしながら、neoSTX と hyneoSTX の保持時間における MS スペクトラムに、STX と同様の脱水ピーク (それぞれ  $[M+H-H_2O]^+=298, 314$ ) が確認され、いずれも十分な精製度であったと考えられた。

### 3) TTX・TTX 関連成分の精製

T-II は、TTX のスペクトルとよく一致したことから TTX であると同定された。

T-III は、hemilactal 型と lactone 型が混在しており、それぞれ 6-*epi* TTX のスペクトルとよく一致したことから 6-*epi* TTX であると同定された。

T-V は、4-*epi* TTX のスペクトルとよく一致したことから 4-*epi* TTX であると同定された。

T-VI については、C6 に付属する置換基が水素 (-H) に、C11 に付属する置換基がメチル基 (-CH<sub>3</sub>) に、さらに、C5 に付属する水素が別の置換基に置き換わっていた。さらに、LC/MS 分析により、メインピークを  $m/z$  304 とするスペクトルが得られたことから、Fig. 26 に示すような新規誘導体の存在が示唆された。これは、6,11-dideoxyTTX の lactone 型に構造が似ているが、6,11-dideoxyTTX のメインピー

クは  $m/z$  288 であることから、T-VI の C5 には分子量の合計が 17 となる置換基が存在することになる。さまざまな置換基の中で容易に想像し得るのは水酸基 (-OH) である。しかし、C5 に水酸基が付属するとアセタール構造となり、非常に不安定な物質なのですぐに脱水された構造へと反応が進む。脱水された構造物の  $m/z$  は 286 となるはずであり、T-VI とは異なる。さらに、hemilactal 型で存在する可能性もあるが、lactone 型と互変異性体であるため、lactone 型に変換した直後に脱水されていくと考えると、hemilactal 型で存在できる可能性は低くなる。

以上のことより、T-VI は 6,11-dideoxyTTX の lactone 型に近い構造を持ち、C5 に付属する置換基が分子量 17 のものに置き換わった、新規誘導体である可能性が示唆された。

### 4) DA の精製

試料から調製した粗抽出液中 416 mg 含まれていた DA が活性炭処理後に 132 mg しか回収できず、回収率は 32% となった。今回の DA の定量は検出の特異性の高い LC/MS により行っているため、狭雑物による検出への影響は少なく、正確に定量できた結果と考えれば、活性炭処理は DA の精製に効果的でないと思われた。

また、Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーによる画分ごとの DA の溶出濃度は、1 回目では Fr. 21 に始まった溶出が Fr. 24 に 9 mg/10 ml まで増加したが、次の Fr. 25 で 8 mg/10 ml と低下し、その後、また徐々に溶出濃度が増加した。Fr. 24~29 での各画分の DA 溶出濃度は 8~11 mg/10 ml であり、Fr. 32 で溶出が終了するまで、明確な溶出濃度

のピークは見られなかった。ハナヤナギには DA の異性体も含まれることが知られているが、本研究で用いた LC/MS 条件により DA と分離できない異性体が試料に含まれていたら、Bio-Gel P-2 カラムクロマトグラフィーにより微妙に分離しながらブロードに溶出された可能性も考えられる。何れにしても、この有毒画分の DA を今後さらに精製していくことが必要とされる。

#### 5) 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、その検出感度の向上を図るため、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。

#### 6) LC/MS による PSP 一斉分析

分析条件 I において、PSP-TTX 混合標準品の分析では、 $m/z$  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 の各マスク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、FASTDI 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。

#### 7) LC/MS による実試料の分析

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 のマスクロマトグラムに

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。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。