

高速液体クロマトグラフィーを用いた麻痺性貝毒成分の分析について

仲谷 正

I はじめに

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poison, PSP) は主に *Alexandrium* 属などの有毒渦鞭毛藻が産生する神経毒で、その毒力はフグ毒成分であるテトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX) に匹敵する。これらによる二枚貝の毒化は日本を含む多くの世界の海域で問題となっており、大阪湾域でも以前より報告されており、食品衛生上または健康危機管理上大きな問題となっている。

PSPの毒成分は最も毒性の強いサキントキシン (Saxitoxin, STX) を始め現在までに20種以上の同族体の存在が確認されており、その成分は高毒性成分であるSTXやneoSTX、ゴニオトキシン (Gonyautotoxin, GTX) 1~4などのカルバメート型、それらの側鎖のカルバモイル基 (-CONH₂) の代わりに水素 (-H) がついた脱カルバモイル型 (Decarbamoyl, dc)、低毒性成分であるプロトゴニオトキシン (Protogonyautotoxin, PXまたはC-toxin) 1~4やGTX5,6などのカルバモイル基がスルホン化されたN-スルフォカルバモイル型に大きく分けられる。これらの成分は原因プランクトンの種類や生息域によって異なることが多い。

日本における二枚貝に対する麻痺性貝毒の規制値は4マウスユニット (MU)/gが設定されており、単位は異なるが世界的にもこの4MU/gに相当する0.8mg STX等量 (eq)/kgが多く採用されている。麻痺性貝毒の試験を行う際、多くの国々でマウス試験法 (MBA) が公定法として用いられているが、近年、動物実験に対する国際的な自粛の流れからMBAに代わる代替法が世界的に求められてきている。

MBAに替わる代替法として酵素免疫測定法 (ELISA法) や高速液体クロマトグラフィー (LC) (ポストカラム蛍光化高速液体クロマトグラフィー [LC-FL]、または質量分析器付き高速液体クロマトグラフィー [LC/MSまたはLC/MS/MS]) による測定法が多く報告されてきている。

中でもLCによる測定法は、貝毒の成分が複数の成分で構成されているため、個別定性・定量を行うことによりMBAで得られなかった情報が得られる利点がある (毒化原因プランクトンの推定、毒化された時期等)。

一方で日本国内においてはPSP全成分の標準品の入手が困難なため、LCによる測定では一部の成分しか分析できない状況にある。

そこで今回、本研究所で実施したMBAの結果より、PSP陽性を示した二枚貝試料を用いて、留学先であるフリードリッヒシラー・イエナ大学、栄養学研究所でLCの測定を行った。また、最近ではフグ中のフグ毒としてTTX以外にPSP成分も含まれている報告事例があるため、フグ試料についても同様の測定を行った。

II 二枚貝試料中のPSP成分について

試料は、シジミ可食部抽出液 (中腸線を含む)、アサリ可食部抽出液 (中腸線を含む)、およびその中腸線 (未抽出) であり、シジミ可食部およびアサリ可食部抽出液は0.1M塩酸酸性下で加熱後、ホモジナイズ抽出し、遠心分離後の上清より得られたもので、MBAのため用いられたものであった。これらをフィルターろ過後、試料溶液として用いた。またアサリの中腸線の試料溶液は0.03M酢酸酸性下で超音波粉碎抽出し、遠心分離後上清をフィルターろ過したものを用いた。各試料溶液中のC-toxin群 (C1, C2, C3, およびC4) の毒成分量は1M 塩酸酸性下加熱により加水分解を行い、加水分解前の溶液と同時に分析し、増加したGTX群 (GTX2, GTX3, GTX1, およびGTX4) の毒成分量から算出した。測定は分析カラムにLuna C18(2) 100A (250 mm×4.6mm) を用い、ポストカラム蛍光化LC法により行った。

その結果、アサリ試料 (可食部および中腸線) からはC1,2, GTX2, GTX3, dcGTX2, dcGTX3, neoSTX, STXおよびdcSTXの存在が確認でき、シジミ可食部からはそれらに加えてGTX1およびGTX4の存在も確認できた (図)。各試料中の各毒成分量にPSP相対毒性値を掛け合わせ、マウスユニット値へ変換したPSP毒力はいずれも規制値 (4MU/g) 以上かそれに近い値であった。またシジミ可食部およびアサリ可食部抽出液それぞれのマウスユニット値はMBAで得られた値と比較的よく一致した。アサリ中腸線に対するMBAは行われていないが、中腸線以外の部分にほとんどPSP毒成分

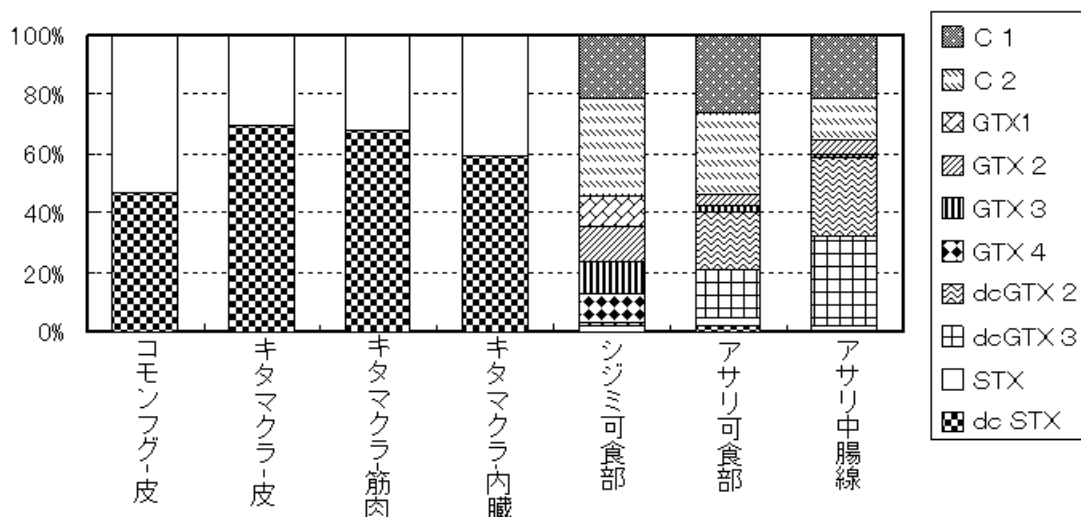


図 貝およびフグ試料中の PSP 成分組成比 (mol %)

が含まれないと仮定し、中腸腺中PSP毒分量を基に、中腸腺重量/可食部重量比から計算したアサリ可食部のマウスユニット値はMBAの結果とよく一致していた。

シジミ可食部中のPSP毒成分は*Alexandrium*属有毒渦鞭毛藻に毒化された二枚貝中によく見られる成分であったが、アサリ各試料中の毒成分はそれとは異なり、興味深い結果となった。

Ⅲ フグ中のPSP成分とTTXについて

試料はコモンフグの皮抽出物 (1試料) とキタマクラの皮、筋肉部、および内臓 (各2試料) であった。コモンフグの皮抽出物は酢酸酸性メタノールで還流抽出後、ろ過および脱脂し、MBA によるTTX測定のために用いられたもので、これをフィルターろ過したものを試料溶液として用いた。キタマクラ各試料の試料溶液はアサリ試料の試料溶液作製法と同様の方法で作製し、測定は貝試料と同様に行った。なお、フグ試料においては親水性相互作用液体クロマトグラフィー(Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC)カラムであるZIC-HILICカラム(150mm×2.1mm)を用い、LC/MSによるTTXの測定も行った。

その結果、いずれの試料からもPSP毒成分が検出されたが、その組成は貝試料のものと大きく異なり、STXおよびdcSTXのみが検出された (図)。キタマクラ各組織ごとのPSP毒力 (各PSP毒分量からPSP相対毒性値を掛け合わせ、マウスユニット値へ変換した値) を比較した場合、皮が最も高く、次に内臓、筋肉部と続いた。コモンフグ皮抽出物の毒力はキタマクラ内臓と同程度であった。キタマクラ中でのPSP成分検出の報告事例は過去にはなく、今回の測定結果が初めての検出事例となった。

各フグ試料中のSTXおよびdcSTXの個々の毒量レ

ベル、およびPSP毒力のレベルを、日本近海で採取されたフグを対象に行った同様の実験結果と比較したところ、本実験結果はヒガンフグの皮、精巢、各内臓器官中のSTXおよびdcSTXの毒量レベル、コモンフグ、シヨウサイフグおよびナシフグらの卵巣ならびに内臓器官中のPSP毒力とほぼ同等であった。

各フグ試料中のTTX測定結果は、キタマクラの筋肉部1試料を除き、すべての試料からTTXが検出された。キタマクラ各組織ごとのTTX毒力 (TTX量からマウスユニット値への変換係数を掛けた値) を比較した場合、その毒力はPSP毒力と同様、皮、内臓、筋肉部の順であった。しかしながら組織による毒力の差は大きく、PSPの場合、皮中の毒力は内臓や筋肉部に比べ1オーダーの差であったのに対し、TTXの場合、皮中の毒力は内臓や筋肉部に比べ2オーダー近くの違いとなった。

毒力全体におけるPSPとTTXの寄与率は、いずれの試料中においてもTTXの方が高く、コモンフグおよびキタマクラの各皮試料中で95%以上の割合を占め、内臓と筋肉部では70~85%の割合を占めていた。

Ⅳ おわりに

本報告は2007年10月からの1年間、ドイツのフリードリッヒシャー・イエナ大学、栄養学研究所のDr.Bernd Luckas教授のもとで行った研究の一部をまとめたものである。PSPに関する研究は、留学以前の私にとって未経験の研究分野であったためすべてが興味の対象であり、満足いくものであった。今後は留学先で学んだ知識や経験を本研究所の研究・試験検査に役立てたいと考えている。

最後に、海外留学の機会を与えていただいた食品保健担当をはじめ当研究所、および大阪市健康福祉局各位に改めて感謝申し上げます。