

下痢性貝毒オカダ酸群の機器分析

Instrumental analysis of diarrhetic shellfish toxin okadaic acid analogues

(独)水産総合研究センター中央水産研究所 水産物応用開発研究センター衛生管理グループ グループ長・博士 鈴木 敏之

Toshiyuki Suzuki

National Research Institute of Fisheries Science

はじめに

東北地方では昔から「桐の花が咲く頃、ムラサキイガイを食べるな」という伝承があり、二枚貝がある特定の時期に毒を持つことは古くから知られている。本来毒を持たない二枚貝がどのようにして毒を蓄積するのか、という毒化のメカニズムの詳細については、依然として解明すべき課題も残されているが、ほとんどのケースで、毒の一次生産者である有毒プランクトンを二枚貝が餌として食べ、その毒を体内にそのまま蓄積するか、あるいは代謝により毒の化学構造の一部を変換して蓄積することにより毒化する。こうして毒化した二枚貝は、外見や味覚において普通の二枚貝と識別することが困難であるため、人が中毒許容量を越える二枚貝を食べたときに食中毒が発生する。貝毒には中毒症状に因んで、麻痺性貝毒、下痢性貝毒、記憶喪失性貝毒など様々な貝毒があるが、我が国で問題になっている貝毒は、麻痺性貝毒と下痢性貝毒である¹⁾。

貝毒による食中毒を防ぐために、水揚げされた二枚貝の毒力は定期的に検査されており、毒力が基準値を越えると、生産者による出荷自主規制措置が講じられる¹⁾。二枚貝の毒力検査は、厚生労働省が定めた公定法に基づいて実施されている²⁾。公定法は、生きたマウスの腹腔内に貝の抽出液を投与し、マウスの生死や死亡時間で毒力を判定するマウス腹腔内投与法(マウス毒性試験)である。マウス毒性試験は、貝毒検査の公定法として国際的にも広く普及しており、二枚貝の安全性を確保するために果たしている役割は極めて大きい。しかし、マウス毒性試験は、マウスの症状からある程度

は検出している毒の種類についての情報が得られるものの、検査対象である貝毒に対して必ずしも特異的な手法とは言えない。マウス毒性試験の代替検査法として様々な分析法が開発されているが、麻痺性貝毒では、蛍光HPLC法³⁾が、また、下痢性貝毒においては、LC/MS/MS法⁴⁾が汎用的な検査法として注目されている。2015年1月から欧州連合(EU)において下痢性貝毒のマウス毒性試験が廃止され、LC/MS/MS法の導入が決定されるなど、欧米諸国ではマウス毒性試験のように生きた動物を使用する検査を可能な限り制限しようとしている。また、国内の情勢としては、食品安全委員会において下痢性貝毒オカダ酸群のリスク評価が行われており、検討内容は評価書として公開されることになる。それを受けて、厚生労働省や農林水産省においては、下痢性貝毒公定法や関連通知等の改正が始まる見通しである。

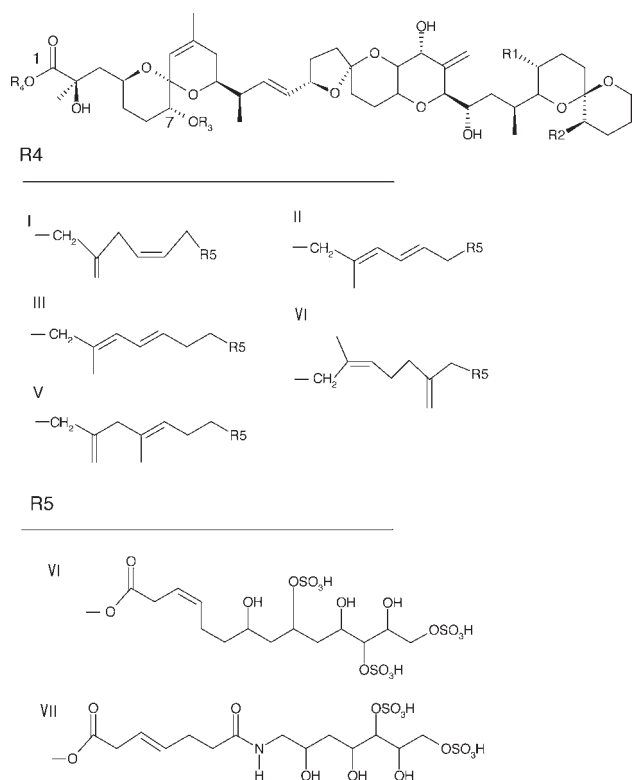
本稿では、食品安全委員会で現在検討している下痢性貝毒について、化学構造と毒性などについて概説し、当センターで学術雑誌等に報告したLC/MS/MSによる研究⁴⁾を中心に分析例を紹介する。

下痢性貝毒オカダ酸(okadaic acid; OA)群による中毒と化学的性状

昭和51年に宮城県で発生したムラサキイガイによる食中毒は下痢性貝毒と命名され、その後、ヨーロッパの大西洋岸など世界的に多くの中毒患者が発生した⁵⁾。毒化した二枚貝をヒトが摂取すると下痢、吐き気、腹痛、嘔吐などの症状を発症する。二枚貝を食べた後通常4時間以内に発症すること、発熱がなく腹痛が激し

くないことでビブリオ菌食中毒などとは区別される。幸い、下痢性貝毒による死亡事例は報告されていない。わが国では、北海道・東北沿岸域の二枚貝が毎年、散発的に毒化している。貝毒監視体制により食中毒の発生はほぼ完全に抑え込まれているが、出荷自主規制措置により二枚貝の出荷が滞るため、二枚貝産業上の大きな問題となっている。

下痢の原因となっているオカダ酸(OA)群⁶⁾は、これまでに10成分を越える類縁体が報告されている(図1)。



	R1	R2	R3	R4	R5	EMW
OA	CH ₃	H	H	H	-	804.5
DTX1	CH ₃	CH ₃	H	H	-	818.5
DTX2	H	CH ₃	H	H	-	804.5
DTX3	(H or CH ₃)		Acyl	H	-	
OA-D7a	CH ₃	H	H	I	OH	914.6
OA-D7b	CH ₃	H	H	II	OH	914.6
OA-D8	CH ₃	H	H	III	OH	928.6
OA-D9a	CH ₃	H	H	IV	OH	942.6
OA-D9b	CH ₃	H	H	V	OH	942.6
DTX4	CH ₃	H	H	III	VI	1472.6
DTX5a	CH ₃	H	H	II	VII	1392.6
DTX5b	CH ₃	H	H	III	VIII	1406.6

図1 オカダ酸(OA)、ジノフィストキシン(DTX)群の化学構造

Dinophysis 属有毒プランクトンが一次生産者であり⁷⁾、有毒プランクトンの摂食により二枚貝が毒化する。7位水酸基に脂肪酸がエステル結合したジノフィストキシン3(dinophysistoxin-3:DTX3)は二枚貝の代謝物であり⁸⁾、*Dinophysis* 属有毒プランクトンが生産するジノフィストキシン1(dinophysistoxin-1:DTX1)が前駆体である。これらはいずれも脂溶性物質であり、メタノール、クロロホルム、アセトンなどの有機溶媒に容易に溶解する。その他に1位カルボキシル基にジオール類がエステル結合したOAジオールエステル類も報告されている。これらは *Prorocentrum lima* や *Dinophysis* 属など有毒藻類により生産され^{9,10)}、二枚貝に取り込まれると加水分解を受けて遊離OAとなるため、二枚貝から検出されることはほとんどない。OAジオールエステルも脂溶性でメタノールなどには容易に溶解するが、DTX5などは極性が高く水溶性である。

OA群のLC/MS及びLC/MS/MS分析

これまでに報告されている下痢性貝毒のLC/MSやLC/MS/MSによる毒の分離は、下痢性貝毒が疎水性化合物であるため、C8やC18などの逆相分配系で内径2mm前後のセミマイクロカラムが用いられ、また、質量分析計による検出の際のイオン化は、電子スプレーイオン化法が採用されている。LC分離の際の移動相として、蒸留水にアセトニトリルかメタノールを混合し、それに酢酸、ギ酸、酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウムなどを添加した溶液が用いられている⁴⁾。酢酸やギ酸などの酸を加える理由は、貝毒化合物のイオン化の促進だけではなく、OA、DTX群などカルボキシル基を有する酸性毒をカラムで分離する際に、移動相を酸性にすることにより、酸性官能基の解離が抑制され、酸性毒に対する分離用カラムの保持能が向上し選択性が高まる。その結果、ピーク形状がシャープになり、検出感度が向上する。最近では、カラムの保持力の向上と担体の処理技術の向上による安定性の向上により、塩基性移動相を用いた分析例も報告されている¹¹⁾。陰陽両モードによる検出が可能であるが、定量分析では陰イオンモードによりOAやDTX1の[M-H]⁻を選択する Selected Ion Monitoring (SIM) や、[M-H]⁻のフラグメントイオンである m/z 255 を検出する Multiple Reaction Monitoring (MRM) 分析が

一般的である。図2は有毒プランクトン *Dinophysis fortii* 50細胞からLC/MS/MSにより検出したDTX1とペクテノトキシン2 (Pectenotoxin-2; PTX2) のクロマトグラムである¹²⁾。*Dinophysis*の細胞あたりの毒量は平均すると数ピコグラムから数十ピコグラムであるが、LC/MS/MSは極めて高感度であるため、50細胞程度を集めることにより、容易に毒を検出することが可能である。

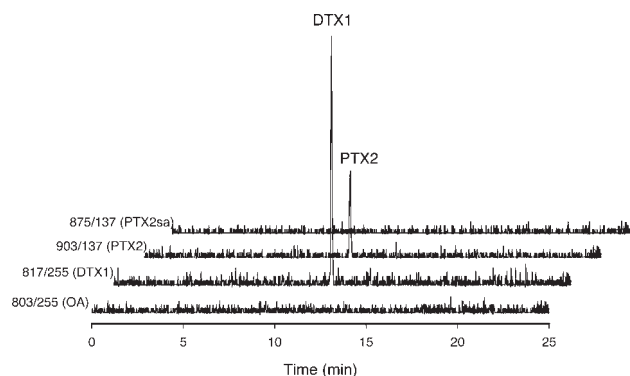


図2 有毒藻類 *Dinophysis fortii* 50細胞から得られるLC/MS/MSクロマトグラム

OAやDTX1の二枚貝代謝物であるDTX3群は、7位水酸基に様々な脂肪酸がエステル結合した化合物であり、総称してDTX3と呼ばれている。DTX3群は、LC/MS/MSにより、結合している脂肪酸種ごとの分析が可能である¹³⁾。分析は陰イオンモードによりDTX3の $[M-H]^-$ を選択し、衝突解離により生じたフラグメントイオンである遊離脂肪酸に相当するイオンを選択するMRMにより、高感度な検出が可能である。二枚貝から検出される主要なDTX3はパルミチン酸(C16:0)が結合した7-O-16:0-DTX1であるが、その他に様々な脂肪酸が結合したDTX3が検出される(図3)。図4,5に様々な脂肪酸が結合したDTX3のMS/MSスペクトルとフラグメンテーションダイアグラムを示す。MS/MSスペクトルは、図4のような各種遊離脂肪酸のイオンに加えて、DTX1の化学構造に帰属させることができる特徴的なフラグメントイオンが検出される。こうしたイオンにより、標準品の入手が困難なDTX3の同定が可能である。

LC/MS/MSはOA群の構造解析にも有効である¹⁰⁾。陽イオンモードにより得られるMS/MSスペクトルの方が、陰イオンモードで得られるそれよりも情報量が豊富であることから、構造解析には適している。選択するイオンは、 $[M+NH_4]^+$ や $[M+H]^+$ が一般的である。 $[M+Na]^+$ は他の化合物と同様に、OA群においても極めて安定なイ

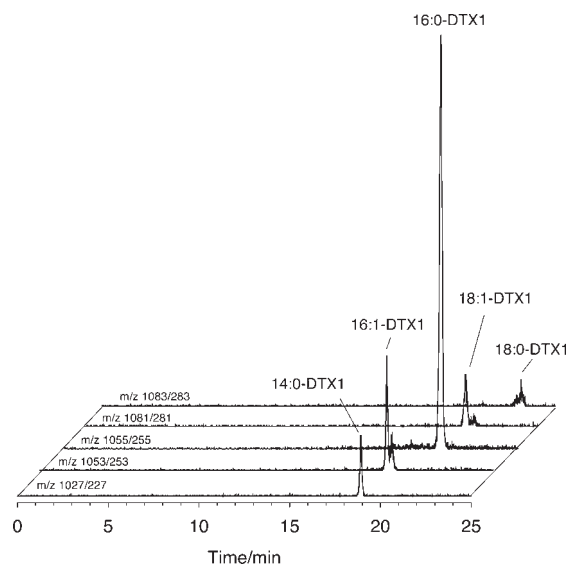


図3 LC/MS/MSによりホタテガイから検出される様々なDTX3群

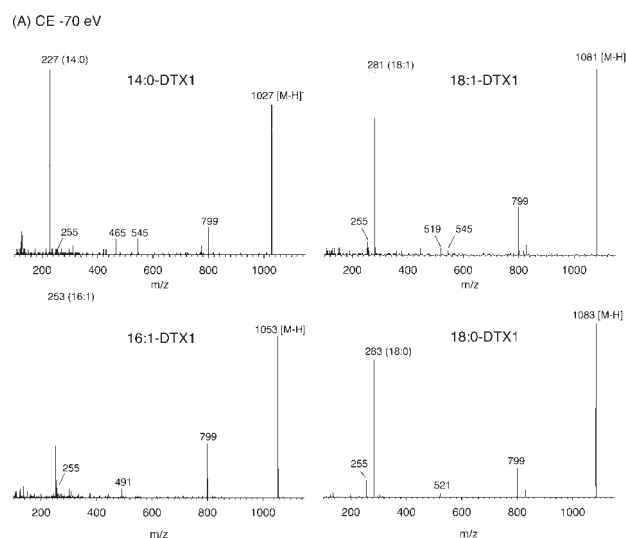


図4 様々な脂肪酸が結合したDTX3のMS/MSフラグメントイオン

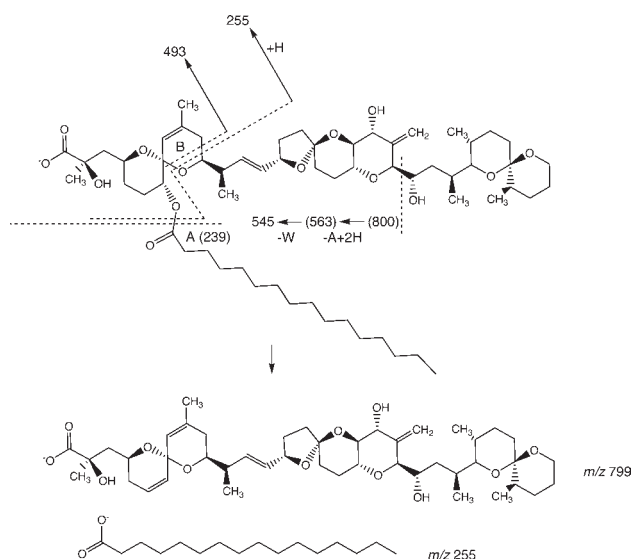


図5 DTX3のMS/MSフラグメンテーションダイアグラム

オンであるため、LC/MS/MSによりフラグメントイオンを得ることは困難である。有毒プランクトン *Dinophysis acuta* から検出される OA ジオールエステル (OA D8) の MS/MS スペクトル及び各スペクトルの化学構造への帰属を図 6, 7 に示す。図 7 の枠付きのフラグメントイオンは、測定した精密質量が理論値との比較において、誤差の範囲である 5 ppm 以内で一致したイオンである。主要なフラグメントイオンピークのほとんどが一致した。下痢性貝毒 OA 群の LC/MS/MS フラグメンテーションは、トリプル四重極 LC/MS/MS や四重極/飛行時間型 LC/MS/MS (qtof LC/MS/MS) においては、異なるメーカーの装置でもほぼ類似した MS/MS スペクトルが得られるため、新規類縁体が発見された場合の化学構造の解析などに極めて有効である。

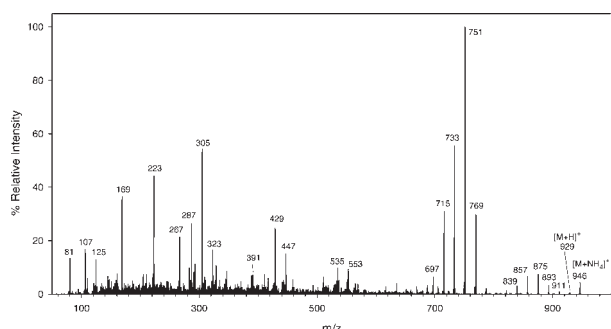


図6 OA ジオールエステル (OA D8) の MS/MS フラグメントイオン

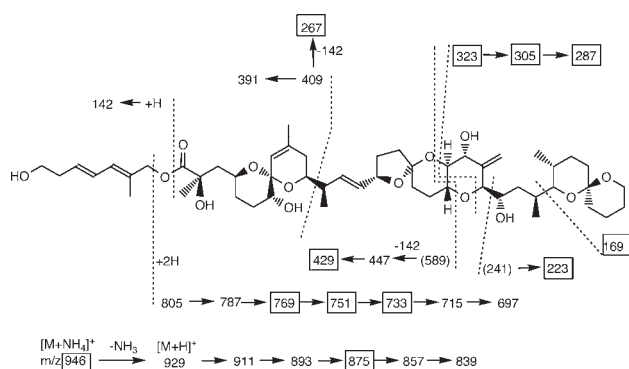


図7 OA ジオールエステル (OA D8) の MS/MS フラグメンテーションダイアグラム

OA 群を対象とした LC/MS/MS 法は、EU などの SOP (Standard Operating Procedures)¹⁴⁾ にも記載された手法である。わが国においても LC/MS/MS 法は下痢性貝毒 OA 群の公定法となる可能性が高い。LC/MS/MS による OA 群の定量分析においては、二枚貝試料マトリクスの影響により定量誤差が生じることが知られている¹⁵⁾。陰陽両モードにおいてマトリクスの影響が出るが、比較的

影響が出にくい陰イオンモードによる OA 群の分析においても、イオン化促進により回収率が 120% を超えることも珍しくない。そのため、マトリクス検量線を用いた定量が有効であるが、装置のイオン源やカラムへの負担を考慮すると、適切な前処理法を検討することも重要である。当センターでは現在、有効な前処理法について検討中であり、近々、学会誌等で公表する予定である。

OA 群のカラムスイッチング自動前処理蛍光 HPLC 分析

OA 群の蛍光 HPLC 分析は、Lee らにより 1987 年に開発された分析法¹⁶⁾であり、LC/MS や LC/MS/MS が普及するまでは、有毒プランクトンの毒生産能や二枚貝における減毒動態の解析など研究現場を中心に活用されてきた。この分析法は OA 群が有するカルボキシル基に蛍光化試薬アンスリルジアゾメタン (ADAM) を反応させ、蛍光誘導体となった OA 群を特異的に検出する手法である。しかし、OA 蛍光誘導体を調製した後の前処理手順が煩雑であることから、多数検体の分析が必要となる二枚貝の貝毒検査には利用しにくい一面がある。そこで、前処理をカラムスイッチング HPLC により自動化するとともに、抽出手順などの分析手順の改良を行った¹⁷⁾。装置構成及びこの分析法により得られる二枚貝試料中の OA 蛍光誘導体のクロマトグラムを図 8, 9 に示す。OA 群の添加回収実験やバラツキに関するデータは LC/MS や LC/MS/MS と比較して、むしろ良好な結果が得られている。本改良法では、使用する有機溶媒量を減らすとともに、アルカリ処理を加えて DTX3 や OA ジオールエステルを DTX1 や OA に加水分解することにより、エステル毒の一括分析も可能になり、毒化した二枚貝の検査法として、極めて有効な手法である。本法で使用したカラムは内径 4.6 mm のカラムであるが、内径 2.0 mm 以下のセミマイクロカラムやマイクロカラムを利用すれば、使用する移動総量を 1/5 程度に減らすことが可能である。蛍光 HPLC 法は、LC/MS や LC/MS/MS とは異なり、装置の違いによるイオン化効率やマトリクスの影響による定量結果の差異が生じることはほとんどない。したがって、異なる装置を用いた異なる試験室間においても均一な結果を得やすい利点がある。LC/MS や LC/MS/MS による OA 群の検査法の確立が注目されているが、蛍光 HPLC 法についても再度、有効な検査法の一つとして認識する必要がある。

機器分析用OA群標準品

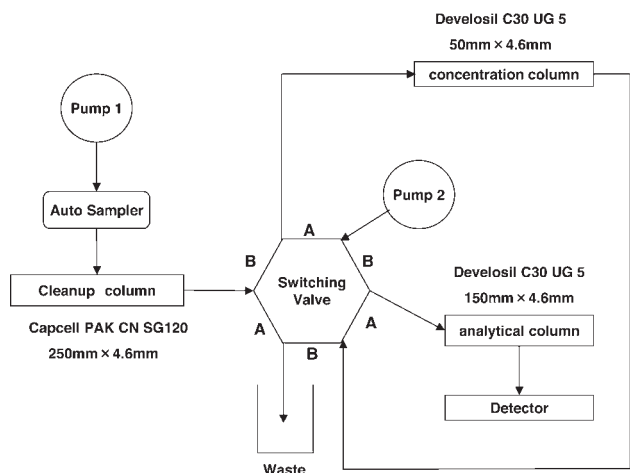


図8 OA群分析用カラムスイッチング自動前処理HPLCシステム

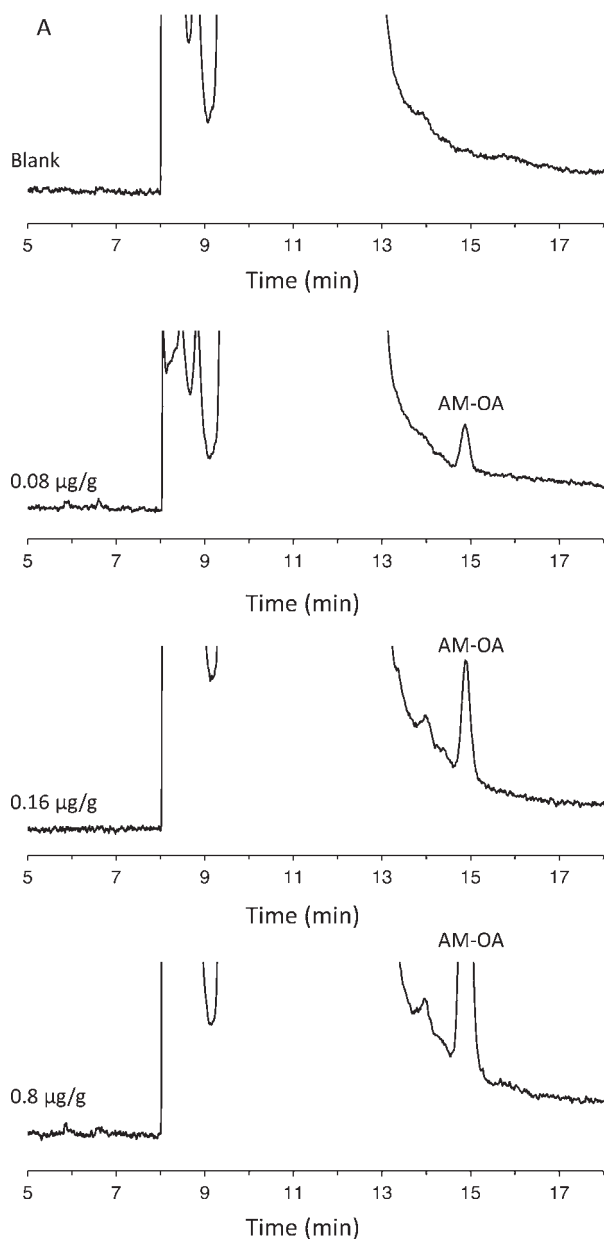


図9 ホタテガイから検出されるOA蛍光誘導体のクロマトグラム

二枚貝の安全性管理のために、二枚貝試料を検査する際には、OA群の分析用標準品が必要になる。さらに、標準品を二枚貝試料に添加し、回収率や定量結果のバラツキなどを調べ、分析手法の妥当性を評価する必要がある。分析用OA標準品は、カナダのNational Research Council (NRC) が販売しており、世界的に普及している国際標準物質である。しかし、在庫は必ずしも十分ではなく、世界的には標準品供給体制の強化が望まれているところである。NRC標準品は、国内でも関東化学(株)を介して入手が可能である。DTX3やOAジオールエステルのようなエステル型OA類縁体の標準品は市販されておらず、入手は極めて困難であるが、これらの化合物はアルカリ加熱条件下で、DTX1やOAに容易に加水分解される^{14, 17)}。したがって、分析手順に簡単な加水分解手順を加えることにより、OAやDTX1に加えて、これらのエステル化合物を一括して分析することができる。現在検討中のCODEX基準値においても、OA群の基準値(160 µg/kg 二枚貝可食部)は、エステル毒も含めたOA群の総量として定義されているため、試料のアルカリ加水分解は二枚貝の検査においても不可欠な処理である。

当センターではOA標準品を含めた様々な貝毒標準品を農林水産省の事業により製造し、配布を行ってきた。今後、下痢性貝毒検査の公定法が改正され、マウス毒性試験からLC/MS/MSなどの機器分析法に移行した場合に、貝毒の自主検査や流通した二枚貝の貝毒検査は機器分析等により行われることになる。そのためには、供給が不安定な海外の標準品のみに依存することなく、国内でも機器分析用標準品を安定的に供給できる体制を確立することが、二枚貝の安全性を確保し、それに裏付けられた二枚貝産業を振興する上で極めて重要な課題である。当センターでは、農林水産省が推進する「レギュラトリーサイエンス新技術開発事業」において、プロジェクト研究「有毒藻類の培養による各種貝毒標準品の製造技術の確立」を推進し、これまでのように毒化した二枚貝原料に依存せずに、有毒藻類の培養により貝毒標準品を安定的に製造する技術を開発した。本プロジェクト研究には、当センターの他に(株)トリピカルテクノセンターが参画して、下痢性貝毒OAや

DTX1を効率的に生産する優良株を検索し、OA群生産藻類 *Prorocentrum lima* の大量培養技術により、効率的にOA群を製造する技術を開発した(図10)。現在、この技術を利用して、OAやDTX1標準品を大量に製造するとともに、厚生労働省や農林水産省及びその管

轄研究機関や(独)産業技術総合研究所など関係機関が連携して、国家標準物質や国際標準物質を製造することを目標に、関係機関間で調整が進められている。こうして製造された標準品が、将来的には市販され、多くの貝毒検査者に利用されることを願ってやまな

い。また、国産標準品を海外に提供・販売することが可能になれば、東南アジア諸国など、貝毒問題に対して十分な対応がなされていない国々に対しても、少なからず貢献することになるであろう。

謝辞

本研究で紹介した研究の一部は、農林水産省「レギュラトリーサイエンス新技術開発事業」におけるプロジェクト研究「有毒藻類の培養による各種貝毒標準品の製造技術の確立」中で実施された。関係者各位に対して、深く謝意を表します。



藻種: *Prorocentrum lima*
培地: ES1栄養塩培地
温度: $25 \pm 1^\circ\text{C}$
照明: 植物育成灯
照射時間: 14時間明期/10時間暗期

図10 OA群生産藻類 *Prorocentrum lima* の大量培養

参考文献

- 鈴木敏之, 高坂祐樹, 木村淳子, 松嶋良次, 渡邊龍一, 村田昌一. 食品衛生学雑誌. 2013, 54(3), 265-274.
- 厚生省環境衛生局肉乳衛生課長通知.“下痢性貝毒検査法”. 昭和56年5月19日, 環乳第37号別添(1981).
- Oshima, Y. J. AOAC Int. 1995, 78(2), 528-532.
- Suzuki, T.; Quilliam, M.A. Anal. Sci. 2011, 27(6), 571-584.
- Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Yamaguchi, M. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 1978, 44(11), 1249-1255.
- Yasumoto, T.; Murata, M.; Oshima, Y.; Sano, M.; Matsumoto, G.K.; Clardy, J. Tetrahedron. 1985, 41(6), 1019-1025.
- Lee, J.S.; Igarashi, T.; Fraga, S.; Dahl, E.; Hovgaard, P.; Yasumoto, T. J. Appl. Phycol. 1989, 1(2), 147-152.
- Suzuki, T.; Ota, H.; Yamasaki, M. Toxicon. 1999, 37(1), 187-198.
- Yasumoto, T.; Seino, N.; Murakami, Y.; Murata, M. Biol. Bull. 1987, 172(1), 128-131.
- Suzuki, T.; Beuzenberg, V.; Mackenzie, L.; Quilliam, M.A. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004, 18(10), 1131-1138.
- Gerssen, A.; Mulder, P.P.J.; McElhinney, M.A.; J. de Boer. J. Chromatogr. A. 2009, 1216(9), 1421-1430.
- Suzuki, T.; Miyazono, A.; Baba, K.; Sugawara, R.; Kamiyama, T. Harmful Algae. 2009, 8(2), 233-238.
- Suzuki, T.; Kamiyama, T.; Okumura, Y.; Ishihara, K.; Matsushima, R.; Kaneniwa, M. Fish. Sci. 2009, 75(4), 1039-1048.
- EU reference laboratory for marine biotoxins ed. “EU-harmonised standard operating procedure for determination of lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS Version 4”. Vigo. 2011.
- Ito, S.; Tsukada, K. J. Chromatogr. A. 2002, 943(1), 39-46.
- Lee, J.S.; Yanagi, T.; Kenma, R.; Yasumoto, T. Agric. Biol. Chem. 1987, 51(3), 877-881.
- Uchida, H.; Watanabe, R.; Matsushima, R.; Uchida, N.; Nagai, H.; Kamio, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Suzuki, T. J. AOAC Int. 2014, 97(2), 391-397.