

茨城県産二枚貝の麻痺性貝毒組成

村上りつ子, 山本 和則^{*1}, 野口 玉雄Paralytic shellfish poison (PSP) composition of bivalves
toxicated in Ibaraki, JapanRitsuko MURAKAMI, Kazunori YAMAMOTO^{*1}, and Tamao NOGUCHI

Paralytic shellfish poison (PSP) composition of three species of toxic bivalves collected in Ibaraki was investigated by the HPLC analyzer for PSP from 1993 to 1996.

Their PSP was composed of protogonyautoxin-1, 2 (PX1, 2; epi-GTX8, GTX8; C1, 2) and gonyautoxin (GTX)-1, 2, 3, 4 as major components.

Although the toxification of the bivalves occurred at almost the same time and geographical area during four years, some species-specific discrepancies in toxin profiles were recognized in mole ratio of N1-H carbamate toxin (GTX2, 3) to N1-OH carbamate toxin (GTX1, 4), which was distinguished in each part of the surf clam specimens.

The composition of PSP ingested in the bivalves was gradually changed, resulting in increase of ratio of α -epimer (GTX1) to β -epimer (GTX4) to near the equilibrium point, with slight increase of ratio of GTX2 (α) to GTX3(β).

Key words: 麻痺性貝毒 paralytic shellfish poison (PSP), 二枚貝 bivalves,
高速液体クロマトグラフィー HPLC, 組成 composition,
茨城県 Ibaraki Prefecture.

現在, 麻痺性貝毒 (PSP) は, サキシトキシン (STX) の同族体として, 1) サキシトキシン (STX) 群, ギニオトキシン (GTX) 群などのカルバメイトトキシン, 2) プロトギニオトキシン (PX; C) 群などの N-スルフォカルバモイルトキシン, 3) デカルバモイルトキシンなど, 大きく 3 つに分けられ, 20 を超える化学的性質と毒力の異なる成分が知られている (Fig. 1)。これらの中には, フグ毒の毒力に匹敵する高毒性のものが多いが, 2) の N-スルフォカルバモイルトキシンに属するものは, 特に低い毒性を示す。しかし, このような低毒性成分も, 加水分解により, 簡単に高毒性成分に変換することから, 現在の公定法であるマウスアッセイにより得られた毒性値だけでは, 真の毒性を求められない。このため, 毒化貝類の PSP 組成を知ることが必要である。

二枚貝は有毒プランクトンを捕食して毒化するが, その毒組成はプランクトンの PSP 組成を反映することから, 毒化貝の PSP 組成から毒化原因についての情報や毒化の予知を可能にし, さらに, 毒化機構の解明の手がかりが得られる。一方, 貝体内に取り込まれた PSP は, ある種の貝では生体内で変換が起こることが知られており, 貝類の PSP 代謝に関する知見も得られる。

そこで, 本研究では, 1993年から1996年にかけて, 茨城県で採取された毒化二枚貝, ムラサキイガイ, チョウセンハマ

グリ, ウバガイの PSP 組成を検討した。また, 貝体内における PSP 代謝機構などを知るため, 毒化したウバガイについて部位別に PSP 組成を検討した。

実験材料および方法

供試二枚貝 試料は, 1993年から1996年まで, 茨城県鹿嶋および久慈浜で採取された毒化二枚貝, ムラサキイガイ *Mytilus edulis*, チョウセンハマグリ *Meretrix lamarckii* およびウバガイ *Pseudocardium sachalinensis* を用いた。

PSP の抽出 Fig. 2 に示す操作で PSP の抽出を行った。すなわち, 毒化二枚貝の中腸腺あるいは各部位10 g に3倍容量の80%エタノール (pH3.5) を加え, 5分間ホモジナイズする。これを, 遠心分離 (5,000rpm 15分間) し, 上清を得る。さらに, この操作を2回繰り返す, 上清を合わせて, 減圧濃縮し, ジクロロメタンを用いて脱脂後, Sep-Pak C₁₈カートリッジカラム (Waters 社製) に供したものを試験溶液とした。

毒成分の HPLC 分析 上記のようにして得られた試験溶液について, Table 1 に示す条件の HPLC 法により, 毒成分を検討した。すなわち, 逆相系カラム (YMC ODS-AM314, 6×300mm) を用い, 移動相は GTX 群では, 2 mM 1-ヘ

*¹ 茨城県衛生研究所

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Toxicity(MU/mg)
STX	H	H	H	CONH ₂	5,500
neoSTX	OH	H	H	CONH ₂	3,900
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	5,000
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	4,200
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	5,600
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	1,600
GTX5(B1)	H	H	H	CONHSO ₃ ⁻	280
GTX6(B2)	OH	H	H	CONHSO ₃ ⁻	200
epiGTX8(C1,PX1)	H	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	30-40
GTX8(C2,PX2)	H	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	300-600
C3(PX3)	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	160
C4(PX4)	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	280-690
dcSTX	H	H	H	H	4,200
dcneoSTX	OH	H	H	H	80
dcGTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	H	-
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	H	1,400
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	H	3,400
dcGTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	H	3,300
hySTX	H	H	H	CONHOH	1,700
hyneoSTX	OH	H	H	CONHOH	1,400

STX:saxitoxin; GTX:gonyautoxin; PX:protogonyautoxin; dc:decarbamoyl analogues;
hy:carbamoyl-N-hydroxy analogues.

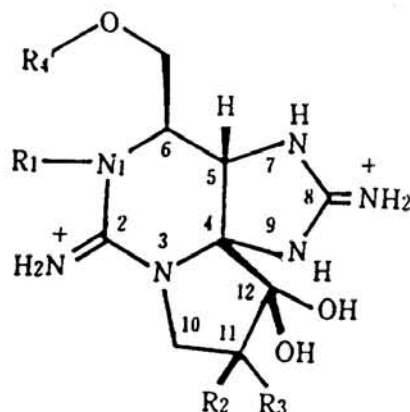


Fig 1. Structure and specific toxicity of paralytic shellfish poisons (PSP).

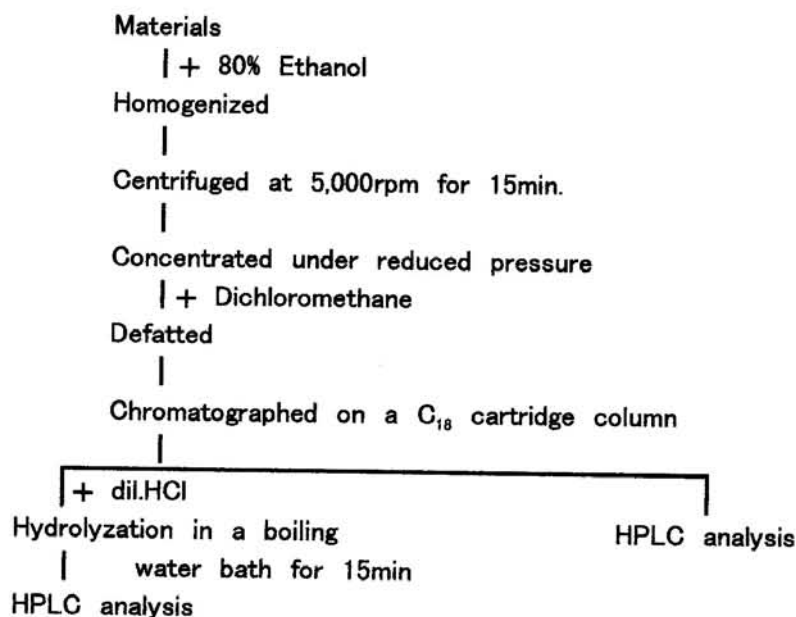


Fig 2. Procedure for assay of paralytic shellfish poison (PSP) composition of toxicated bivalves.

ブタスルホン酸を含む1%メタノール-0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0), STX群では, 同じく25%メタノール-0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)を用いた。分離された毒成分はアルカリ性下, 過ヨウ素酸で分解し, 得られた生成物の蛍光を, 励起波長336nm, 蛍光波長390nmで測定するポストカラム蛍光化HPLC法¹⁾により分析した。弱毒成分であるPX(C)群は, 試験溶液を0.1N塩酸中, 100°Cで15分間加熱して得られた試験溶液をGTX群と同様に分析し, 増加したGTX群の毒成分量から算出した。

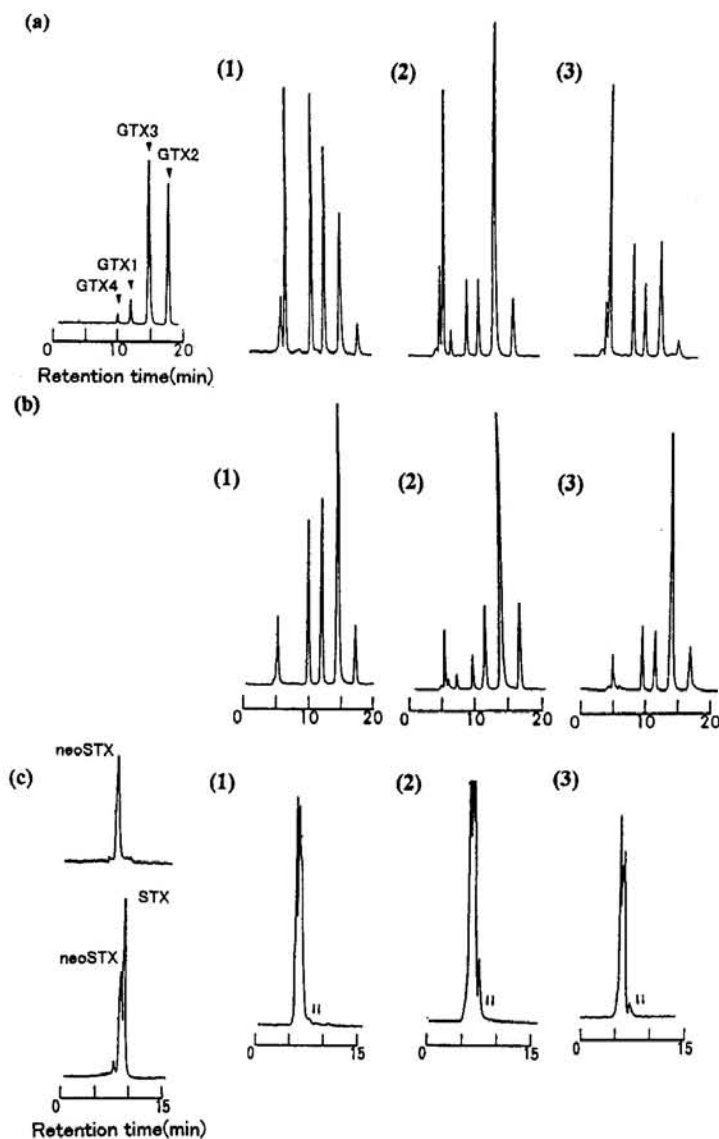
なお, 標準品は, GTX群はNoguchiら²⁾の方法, STX群はDaigoら³⁾の方法により調製したものをを用いた。

結 果

HPLCクロマトグラム 1996年の, ムラサキイガイ, チョウセンハマグリおよびウバガイの中腸腺の代表的なHPLCクロマトグラムをFig. 3に示した。毒化した各貝のGTX群の分析では, いずれも主として5つのピークが認められた。

Table 1. Operating conditions for HPLC analysis of paralytic shellfish poison (PSP)

Column	: Silica ODS column (YMC AM-314, 6×300 mm)
Temperature	: Room temperature
Mobile phase	
for GTXs	: 0.05M phosphate buffer (pH7.0) containing 2mM HSA and methanol (99 : 1)
for STXs	: 0.05M phosphate buffer (pH7.0) containing 2mM HSA and methanol (75 : 25)
Flow rate	: 1.0ml/min
Post column reaction	
Reagent	: (A) 0.05M periodic acid (B) 0.2N KOH plus 1M ammonium formate in 50% formamide
Flow rate	: (A): (B)=1 : 1, 1.0ml/min
Reaction	: 10m teflon tubing (0.25 mm i.d.) at 65°C
Detection	: Excitation 336nm, Emission 392nm

**Fig 3.** Paralytic shellfish poison (PSP) profiles of bivalves toxification in 1996 by HPLC analyzer.

- (a) Analysis for GTX group, (b) Analysis for GTX group after hydrolyzation,
(c) Analysis for STX group.
(1) Mussel (3/28), (2) Hard clam (4/10), (3) Surf clam (4/10); () sampling date.

そのうち4つのピークはそれぞれ GTX 4, 1, 3 および 2 の標準品のそれと一致した。保持時間 6 分過ぎに現れるピークは、塩酸酸性下加熱することにより消失し、代わって GTX 3 のピークが顕著に増大し、GTX 2 のピークも少し大きくなったことから、PX 2 (C 2) と少量の PX 1 (C 1) が存在することがわかった。従って、ピークは、PX 1, 2 (C 1,

2) および GTX 4, 1, 3, 2 であることがわかった。STX 群の分析では、いずれも STX 群はほとんど検出されなかった。

PSP 組成比 以上のことから、これまでの茨城県産毒化二枚貝の PSP の主成分は、GTX 1, 2, 3 および 4 と PX(C) であることがわかったが、各年を通じて、貝の種類によって、

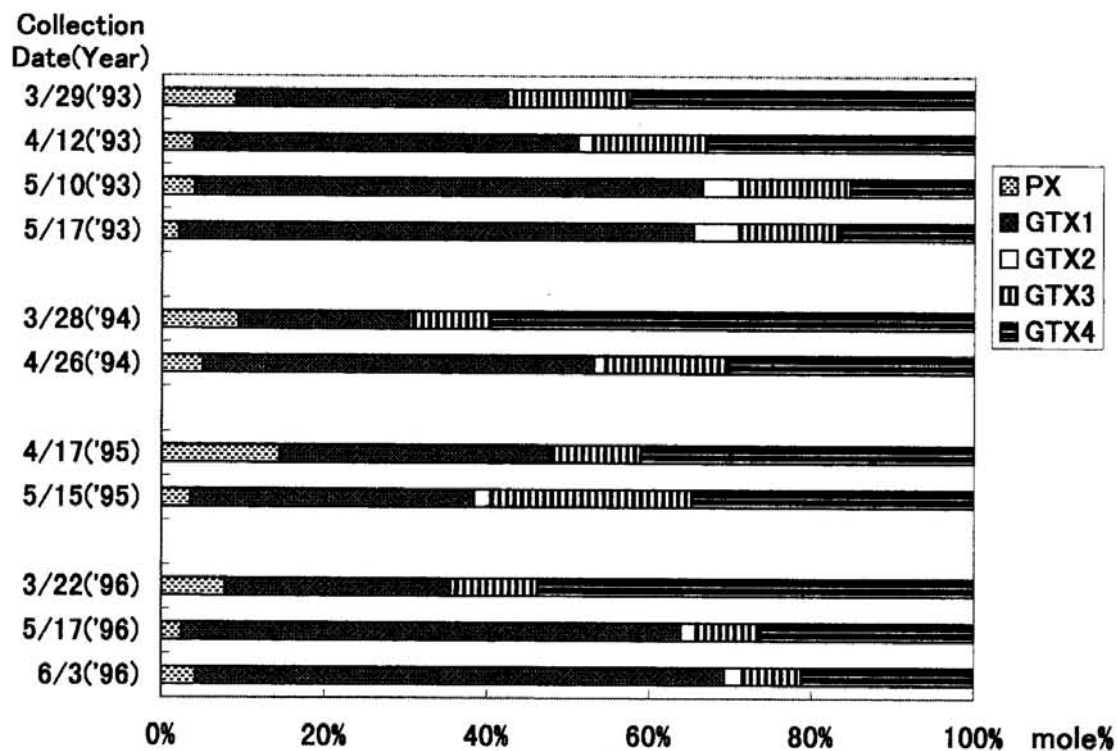


Fig 4. Paralytic shellfish poison (PSP) composition of mussel toxificated in Ibaraki, Japan.

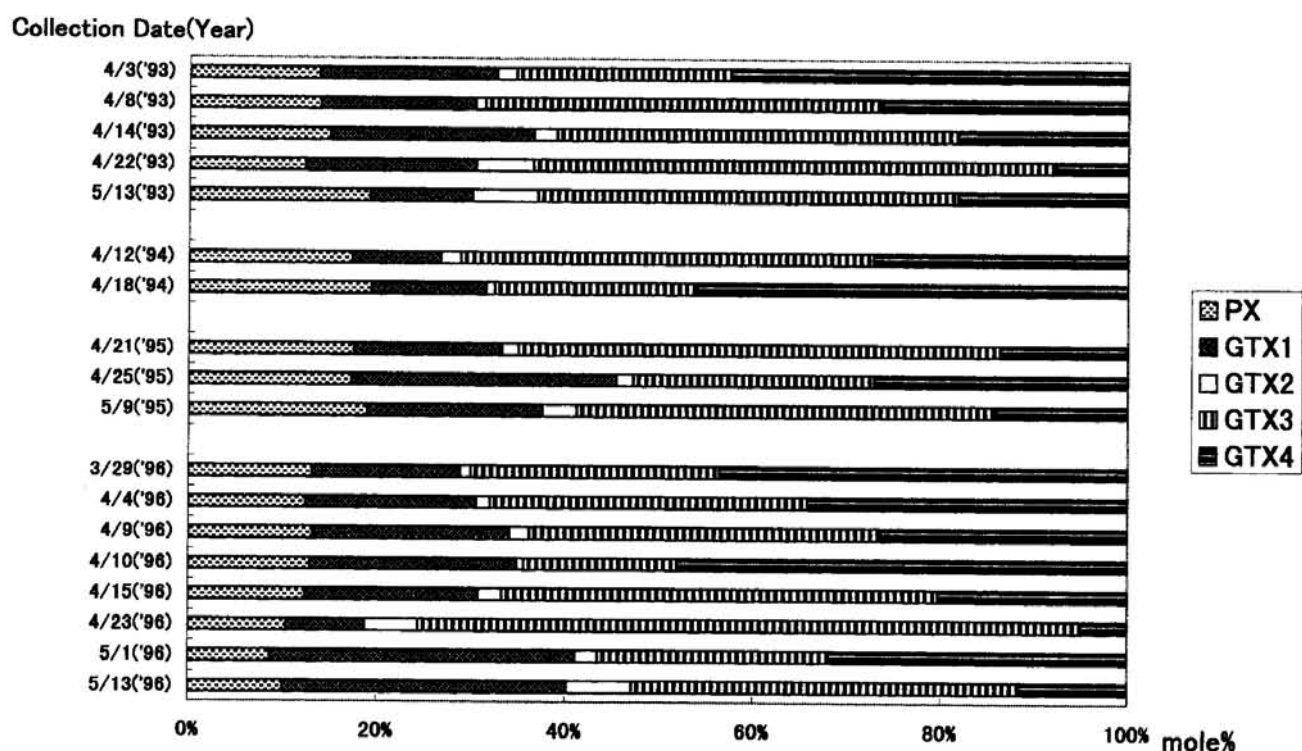


Fig 5. Paralytic shellfish poison (PSP) compisition of hard clam toxificated in Ibaraki, Japan.

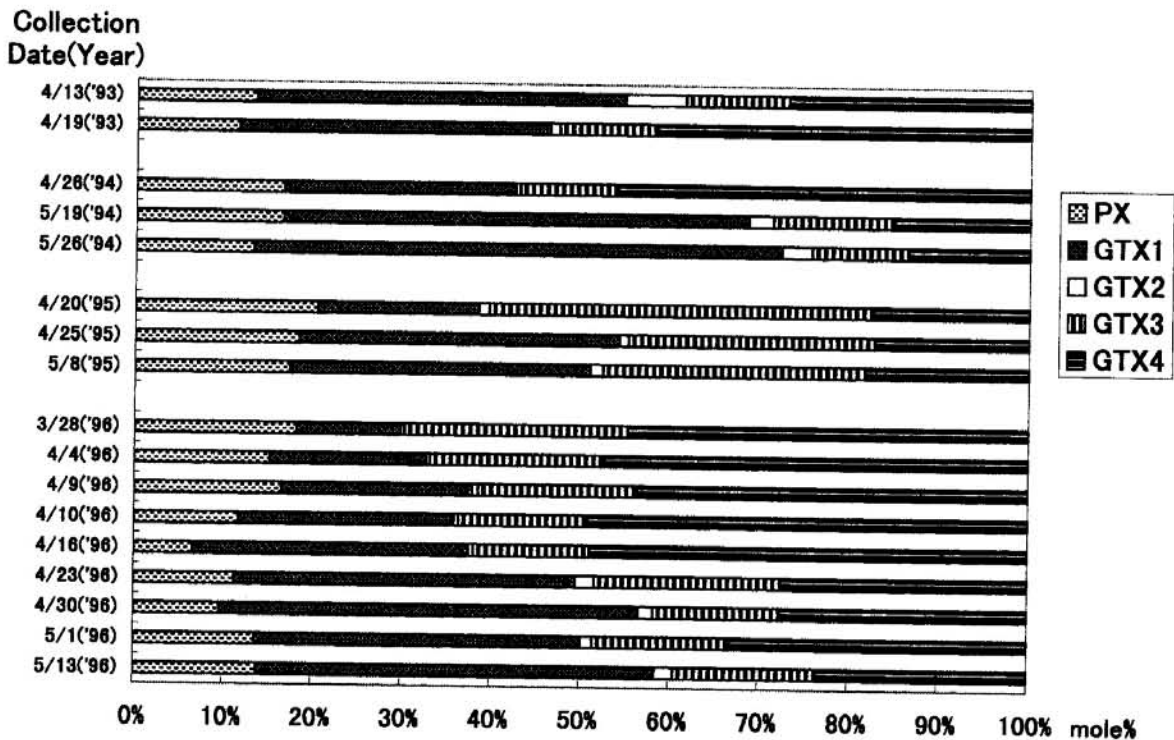


Fig 6. Paralytic shellfish poison (PSP) composition of surf clam toxicated in Ibaraki, Japan.

その組成比に特徴がみられた。

1993年から1996年におけるこれらの毒化貝の PSP 組成を貝の種類ごとに、Fig. 4～6 に示した。すなわち、ムラサキイガイでは、NI-OH カルバメイトキシンである GTX 1, または、そのエピマーである GTX 4 が主成分であり、合わせて80モル%以上を占めた。PX (C) は毒化の初期には9～14モル%であったが、毒化の終期には、1.8～4.2モル%に減少し

た。

ウバガイとチョウセンハマグリでは、PX (C) は10～20モル%と比較的多量に含まれ、毒化を通してのその消長は明らかではなかった。

ウバガイでは、ムラサキイガイと同様に、NI-OH カルバメイトキシンの GTX 1 またはそのエピマーの GTX 4 が主成分であったが、その量はムラサキイガイよりは少なく、NI

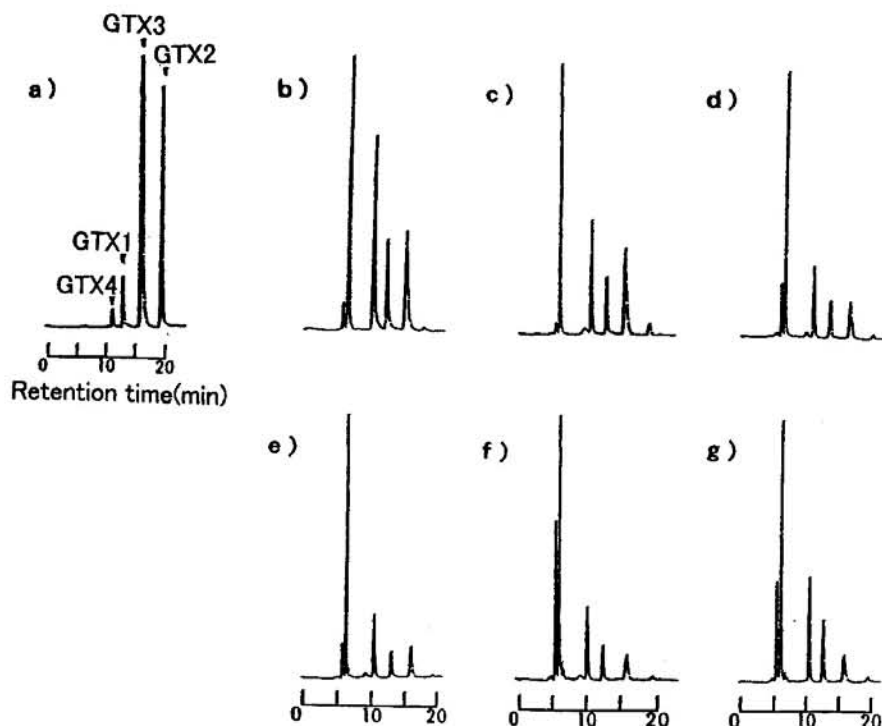


Fig 7. Paralytic shellfish poison (PSP) profiles of anatomical parts of surf clam toxicated in 1994 by HPLC analyzer.

a) GTX standard, b) digestive gland, c) intestine, d) gill, e) mantle, f) muscle, g) adductor muscle.

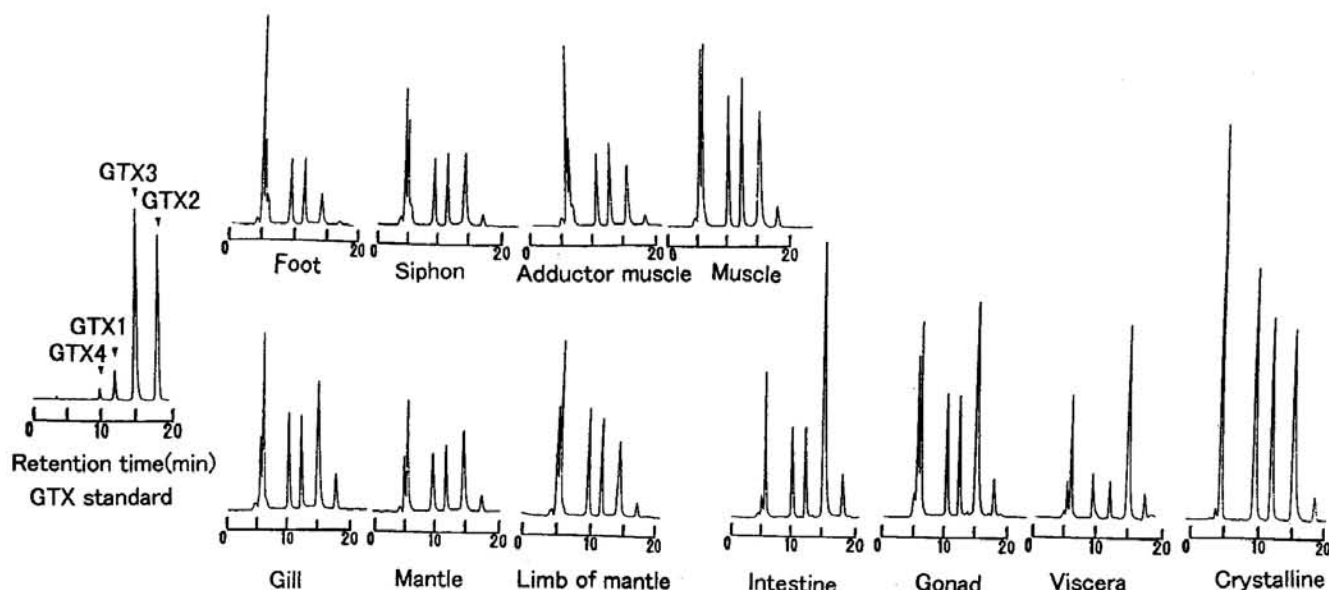


Fig 8. Paralytic shellfish poison (PSP) profiles of anatomical parts of surf clam toxicified in 1996 by HPLC analyzer.

-H カルバメイトトキシンの GTX 3 またはそのエピマーの GTX 2 が増加した。

チョウセンハマグリでは、さらにそれが増加し、GTX 3 を主成分とする試料が多かった。

ウバガイの部位別 PSP 組成 一方、1994年4月26日および1996年4月16日に採取した毒化ウバガイの部位別 HPLC クロマトグラムを Fig. 7 および 8 に示した。

1994年4月26日採取のウバガイの部位別の PSP 組成から、中腸腺や腸などの内臓部では、斧足や閉殻筋（貝柱）の筋肉部分に比べて、NI-OH トキシン GTX (1, 4) に対し、NI

-H トキシンである GTX (2, 3) の割合が増加する傾向がみられた (Fig. 7)。さらに、中腸腺と腸を除いた内臓の部分ではこのような傾向が顕著に認められた (Fig. 9)。すなわち、これらの部分の PSP パターンは、筋肉部のものと全く異なり、GTX (1, 4) のピークは極く小さいか、あるいは、ほとんど認められず、PX (C) と GTX 3 および GTX 2 のピークのみを示した。

1996年4月16日採取のウバガイにおいても、このような傾向がみられ、特に中腸腺と腸などを除いた内臓部分では、GTX (1, 4) が減少し、GTX (2, 3) の割合が増加する

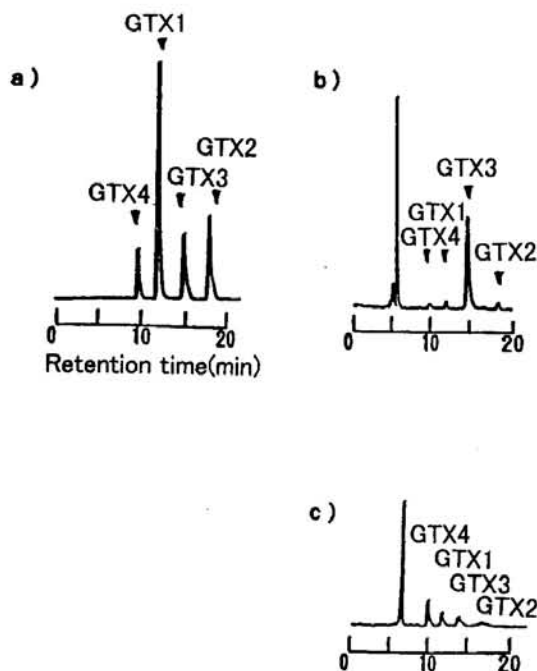


Fig 9. Paralytic shellfish poison (PSP) profiles of viscera and muscle of surf clam in 1994 by HPLC analyzer.

a) GTX standard, b) viscera extract, c) muscle extract.

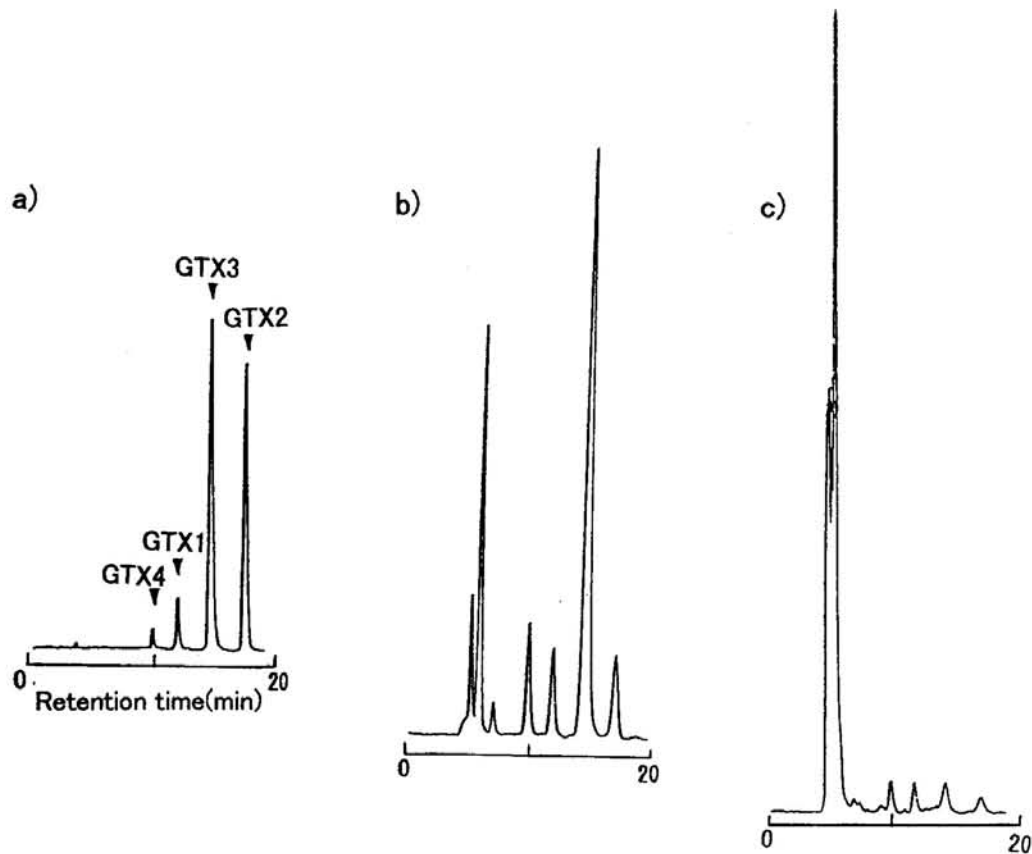


Fig 10. Paralytic shellfish poison (PSP) profiles of hard clam in 1996 by HPLC.

a) GTX standard, b) digestive gland, c) muscle.

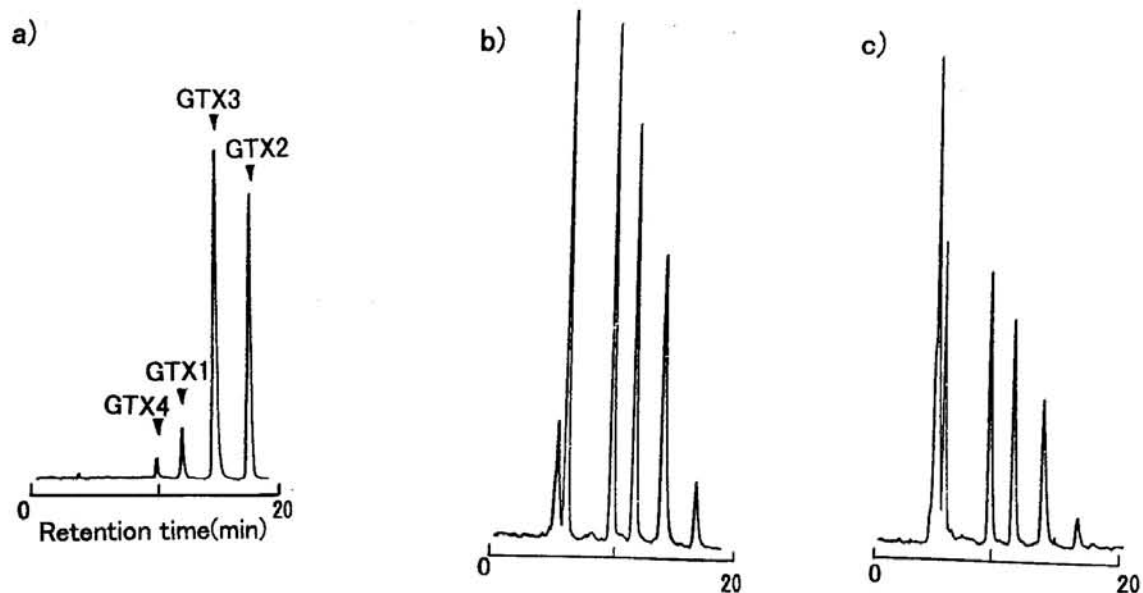


Fig 11. Paralytic shellfish poison (PSP) profiles of mussel in 1996 by HPLC.

a) GTX standard, b) digestive gland, c) muscle.

パターンがみられた。しかしながら、中腸腺に次いで、高い毒性を示した晶体では、NI-OH トキシンの GTX (1, 4) が主成分であり、その HPLC クロマトグラムでは、PX (C) と GTX 1, 2, 3 および 4 のピークが認められた (Fig. 8)。

このような差異はウバガイ以外でも、1996年4月15日採取したチョウセンハマグリの中腸腺とこれを除く可食部全体のクロマトグラムでも同様にみられた (Fig. 10)。また、1996年

3月22日採取したムラサキガイでは PSP パターンには差異はみられず、どちらも GTX (1, 4) が主成分であった (Fig. 11)。

考 察

PSP によって毒化した貝類の PSP 組成は、原因プランク

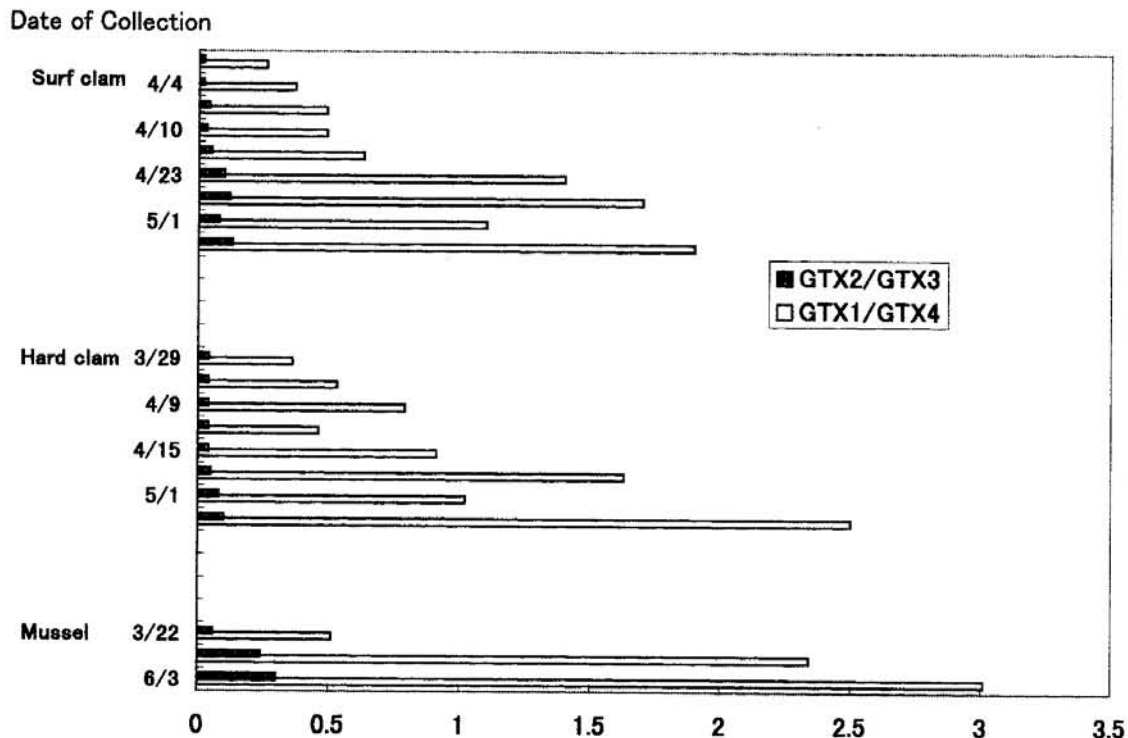


Fig 12. Transition of the ratio of α -to β -epimer during toxification in three kinds of shellfishes in 1996.

トンの PSP 組成を反映するものの、捕食した貝体内の蓄積や排泄、変換などの代謝能の違いにより、異なった組成を示すことも考えられる。実際、*Alexandrium spp.*などの毒化原因プランクトンは、PX (C) などの低毒性成分が圧倒的に多いのに対して、毒化した二枚貝では、高毒性成分が多量に検出され、貝体内での変換が考えられている。

中腸腺の PSP 成分 PX (C) および GTX 1, 2, 3, 4 は、毎年供試した貝に共通して検出され、原因プランクトンの PSP 組成を反映しているものと考えられたが、各供試貝の PSP 組成比は、同一原因プランクトン^{*1,*2}によるほぼ同時期、同地点での毒化であるにもかかわらず、貝の種類によって異なり、各年を通じて、一定の組成比の特徴がみられた。

すなわち、各貝の中腸腺の PSP 組成は、ウバガイやチョウセンハマグリでは、ムラサキガイと比較して、PX (C) の含量が多かった。また、ウバガイは、ムラサキガイより、GTX (1, 4) の NI-OH カルバメイトトキシンに対する GTX (2, 3) の NI-H カルバメイトトキシンの割合の増加がみられたが、チョウセンハマグリでは、その増加はさらに顕著であった。

一方、NI-OH トキシン GTX 1 と GTX 4 および NI-H トキシン GTX 2 と GTX 3 は、それぞれ11位の α -, β -エピマーであるが、プランクトンでは主に β -エピマー (GTX 3, GTX 4, PX 2 (C 2) など) が生産され、貝体内に取り込まれたのち、次第に安定な α -エピマーに変化し、その α/β 比率は 3/1 で平衡に達すると考えられている。⁴⁾ また、Shimizu ら⁵⁾ によると、GTX 1 (α)/GTX 4 (β) および GTX 2 (α)/GTX 3 (β) の平衡点は 7/3 である。供試した二枚貝でも、

毒化の初期には GTX 4 (β) が多い (α/β 比率 < 1) が、毒化が進むにつれて、GTX 1 (α) の割合が増え、毒化の末期には、 α/β が逆転し、平衡点に近づくように思われた。1996 年の結果を Fig. 12 に示した。他方、N1-H トキシンの GTX 2 (α) と GTX 3 (β) の間では、毒化の末期に、GTX 2 (α) が徐々に増える傾向はみられたが、 α/β は 0.5 を超えることはなかった。GTX 3 (β) へのエピマー化は、中性付近でも、酢酸塩などの塩の極く少量の存在下で、非常に増加する⁶⁾ことが知られている。本実験結果に示されるように、GTX 3 (β) から GTX 2 (α) へのエピマー化が起こりにくかった要因は塩の存在などが考えられる。

さらに、ウバガイの部位別 PSP 組成についてみると、筋肉部位に比べて、内臓部位では、NI-H トキシンの GTX 2 および GTX 3 の割合が多く、両者で明らかに異なっており、NI-OH トキシンがほとんどみられなかった内臓部位もあった。

NI-OH から NI-H への変換は、緩和な還元剤などにより、容易に還元されるという報告がある。^{5,7,8)} また、Shimizu ら⁹⁾ は、PSP とホタテガイ *Placochlamys magellanicus* の各部位のホモジネートを用いた PSP 変換実験により、特に、貝柱や斧足などの運動器官での酸化還元酵素の PSP 変換への関与を示唆している。しかし、Oshima ら¹⁰⁾ は、そのような酵素の関与には否定的であり、貝の常在成分であるグルタチオンやシステインなどにより、徐々に還元され得るとしている。このように、PSP 変換が貝体内の特定の部位で種特異的に容易に起こると考えると、貝の PSP 組成を知ることは、中腸腺の PSP 組成の比較のみでは、十分とはいえない。

また、このような部位による PSP 組成の差異はムラサキ

*¹ 平成 5, 6, 7 年度茨城県水産試験場報告

*² 茨城県平成 8 年度赤潮貝毒監視事業報告書

ガイの内臓部位と筋肉部位ではみられなかったことから、ウバガイやチョウセンハマグリとはPSP代謝機構に差があると考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、試料採取の御協力ならびに御助言をいただきました茨城県水産試験場の大川雅登氏、藤富正毅氏に感謝します。

文 献

- 1) Nagashima, Y., Maruyama, J., Noguchi, T., and Hashimoto, K.: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 819-823 (1987).
- 2) Noguchi, T., Kono, M., Ueda, Y., and Hashimoto, K.: *J. Chem. Soc. Japan*, 1981 (5), 652-658 (1981).
- 3) Daigo, K., Uzu, A., Arakawa, O., Noguchi, T., Seto, H., and Hashimoto, K.: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 309-313 (1985).
- 4) Oshima, Y., Bolch, C. J., and Hallegraef, G. M.: *Toxicon*, **30**, 1539-1544 (1992).
- 5) Shimizu, Y.: Paralytic shellfish poisons [Progress in the Chemistry of Organic Natural Products] (ed. by Herz, W., Griesbach, H., Kirby, G. W.), Springer-Verlag, Wien, 235-264 (1984).
- 6) Shimizu, Y., Buckley, L. M., Alam, M., Oshima, Y., Fallon, W. E., Kasai, H., Miura, I., Gullo, V. P., and Nakanishi, K.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 5414 (1976).
- 7) 浅川 学, 高木光造, 飯田 優, 大石圭一: 衛生化学, **32**, 212-218 (1986).
- 8) 浅川 学, 高木光造, 飯田 優, 大石圭一: 衛生化学, **33**, 50-55 (1987).
- 9) Shimizu, Y., Yoshioka, M.: *Science*, **212**, 547-549 (1981).
- 10) Oshima, Y.: Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms [Harmful Marine Algal Blooms] (ed. by Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., and Marcaillou, C.) © Technique et Documentation-Lavosier, Intercept Ltd, 475-480 (1995).