〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
30 (1) 19-22 (1984)

北海道噴火湾産のムラサキイガイに含まれる麻痺性貝毒について

浅川 学, 高木光造

北海道大学水産学部

Studies on Paralytic Shellfish Poisons Contained in the Mussel *Mytilus edulis* from Funka Bay, Hokkaido

MANABU ASAKAWA and MITSUZO TAKAGI

Faculty of Fisheries, Hokkaido University, 1-1, Minatocho
3-chome, Hakodate 041, Japan

(Received September 24, 1983)

Attempts were made to reveal the composition of paralytic shellfish poisons (PSP) in the mussel *Mytilus edulis* from Funka Bay, Hokkaido.

The shucked mussels were extracted with 80% ethanol (pH 2.0). The extract was defatted with chloroform, treated with activated charcoal, and then purified by column chromatography on Bio-Gel P-2 and Bio-Rex 70. Each fraction thus obtained was analyzed by fluorescence intensity monitoring and mouse assay. PSP components contained in toxic fractions were identified by using cellulose acetate membrane electrophoresis and thin layer chromatography on silica gel.

The mussel from Funka Bay was found to contain gonyautoxin VIII and its epimer, together with gonyautoxin I-V, saxitoxin and neosaxitoxin. The ratios of each PSP component in the total toxicity were as follows; gonyautoxin I (31%), gonyautoxin II (12%), gonyautoxin III (15%), gonyautoxin IV (16%), gonyautoxin V (3%), gonyautoxin VIII plus its epimer (2%), saxitoxin plus neosaxitoxin (21%). This is the first time that gonyautoxin VIII and its epimer, which have been mainly detected in the bivalves from the western part of Japan, are detected in Hokkaido.

It was revealed from these results that low toxic components having *N*-sulfonato carbamoyl group such as gonyautoxin V and VIII are present not only in the western part of Japan but also in the eastern part of Japan, particularly in Hokkaido.

Keywords—paralytic shellfish poison; *Mytilus edulis*; Bio-Rex 70; gonyautoxin; saxitoxin; neosaxitoxin; *N*-sulfonato carbamoyl group; cellulose acetate membrane electrophoresis

緒 言

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poison, 以下 PSP と略記する) は、渦鞭毛藻である *Protogonyaulax catenella*, *Protogonyaulax tamarensis* などの産生する強力な神経毒である。これらのプランクトンは、主に西日本に *P. catenella*, 東日本に *P. tamarensis* が分布しており、これらにより産生される PSP はプランクトンフィーダーであるイガイ、ホタテガイなどの二枚貝に蓄積されて麻痺性貝中毒の原因となる。北海道噴火湾、岩手県大船渡湾、山口県仙崎湾などでは、毎年継続して PSP による貝類の毒化がみられ、その他の多くの海域でもこ

のような貝類の毒化が報告されている。1979年1月、山口県仙崎町では PSP により毒化したマガキを食べて16人が食中毒にかかり¹⁾、また、同年4月、北海道旭川市でも PSP により毒化した噴火湾産のムラサキイガイを食べて3人が食中毒にかかり、このうち1人が死亡している。²⁾ このように PSP による貝類の毒化は噴火湾、大船渡湾におけるホタテガイの養殖、仙崎湾におけるマガキの養殖など養殖業及び公衆衛生、食品衛生にとって重大な問題となっている。

著者らは噴火湾を対象として、そこに分布する *P. tamarensis* 及びそれにより毒化した二枚貝との間の PSP

成分の相互関係を明らかにする目的で、両者の PSP 成分を調べ、双方とも gonyautoxin (GTX) 群を主成分としているものの、*P. tamarensis* が GTX₁₋₃, saxitoxin (STX), neosaxitoxin (neoSTX) の 5 成分を、ホタテガイが GTX₁₋₅, STX, neoSTX の 7 成分をそれぞれ含んでおり、また個々の PSP 成分の量も両者の間で異なっていることを明らかにした。³⁻⁵⁾ このことはホタテガイにおける PSP 成分の生体内変換の可能性を示唆する。また、著者らは、これまでに西日本産の二枚貝に主に検出され、既存の PSP 成分に比べて毒性の低い成分 (GTX₅, GTX₆, GTX₈ など) のうち、GTX₅ が噴火湾ではじめて検出されたことから、貝の種類によっては GTX₅ 以外にも低毒性の PSP 成分の含まれる可能性のあることも報告した。^{4,5)} そこで今回著者らは、これまで報告例のない噴火湾産のムラサキイガイを用いて、それに含まれる PSP 成分の検討を行なったので、以下報告する。

実験の部

1. 試料 1983年5月13日、北海道噴火湾沿岸の鹿部村で採捕したムラサキイガイ *Mytilus edulis* 51個 (平均重量 240 g, むき身の平均毒性値 2 MU/g) を生きたまま研究室に運び、貝殻を除去してむき身とした後、以下の実験に供した。

2. 抽出・精製 噴火湾産ホタテガイからの PSP 抽出・精製法⁴⁾ に準じて抽出・精製を行なった。

1) 抽出——上記の むき身約 4.5 kg (総毒量 9000 MU) を 2 倍容の 80% エタノール (pH 2.0) で 3 回抽出し、得られた抽出液を減圧濃縮後、クロロホルムで脱脂した。

2) 精製——水層を活性炭 (和光純薬) 処理し、粗毒成分を吸着させた後、酢酸酸性エタノールでこれを溶出した。脱着液を減圧濃縮後、pH 5.5 に調整し、Bio-Gel P-2 (Bio-Rad Lab.) カラム (φ3×40 cm) にのせ粗毒成分を吸着させた。カラムを蒸留水で洗浄後、0.15 N 酢酸 2000 ml で有毒成分を溶出させた。得られた有毒画分を濃縮後、Bio-Rex 70 (H⁺ 型, -400メッシュ, Bio-Rad Lab.) のカラム (φ1×100 cm) に吸着させ、0—0.03 N 酢酸 (300 ml—300 ml), 0.03—1.30 N 酢酸 (300 ml—300 ml) のリニアグラジエント法により有毒成分の精製を行なった。この際、ペリスタポンプ (アトー株式会社, SJ-1211 型) の流量を 0.5 ml/min とし、フラクションコレクター (東洋科学産業, SF-200 H) 型により 12 ml ずつ分取した。

3. 分析法 1) 蛍光強度の測定——1%過酸化水素水との反応により PSP が蛍光を発すること⁶⁾ を利用

して各画分の蛍光強度を測定した。すなわち、試験管にそれぞれの画分から 0.5 ml を取り、これに 1%過酸化水素水 0.5 ml を加え、15 分間煮沸後、分光蛍光光度計 (日立 650-10 型) を用い、励起波長 365 nm, 蛍光波長 400 nm にて蛍光強度を測定した。

2) 毒力の測定——各画分のマウスに対する毒力 (MU) を測定し、蛍光強度と共にグラフ上にプロットした。マウスに対する毒力は A.O.A.C. 法⁷⁾ 及び麻痺性貝毒検査法 (厚生省環境衛生局乳肉衛生課)⁸⁾ に従い、体重 18—20 g の ddY 系マウス (♂) を用いて測定した。

3) 電気泳動——有毒成分の溶出曲線 (Fig. 1) にみられる 5 つの画分 (Fr. I—Fr. V) をそれぞれ減圧濃縮し、40%メタノール中に保存しておいたセルロースアセテート膜 (12×12 cm, Cellogel, Chemetron) に GTX 群標品 (GTX₁₋₃, 1 部 GTX₁ のエピマーである GTX₄ を含む), STX 群標品 (STX, neoSTX) と共に塗布し、0.8 mA/cm で 30 分間泳動させた。この際、緩衝液には 0.08 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.7) を使用した。泳動後、1%過酸化水素水を噴霧し、110°C で 10 分間加熱後、365 nm の蛍光ランプ (Ultra-Violet Products, Inc. TL-33 型) により有毒成分を検出した。なお、標品として用いた GTX₁₋₃, STX, neoSTX は東京大学農学部水産化学研究室橋本周久教授、野口玉雄博士から恵与されたものである。

4) 薄層クロマトグラフィー——シリカゲル 60 を担体とした HPTLC プレート (10×20 cm, Merck) に上記試料液及び PSP 標品を塗布し、ピリジン-酢酸エチル-酢酸-水 (75:25:15:30, v/v) を用いて展開した。展開後、有毒成分を電気泳動の場合と同様にして検出した。

4. 有毒成分の定量 Bio-Gel P-2 処理まで行なった粗有毒成分の 1 部を 1 MU/μl に調整後、セルロースアセテート膜電気泳動により各毒成分に分け、0.01 N 酢酸を用いた切り取り抽出後、毒力を測定し、有毒成分の組成を調べた。

結果と考察

ムラサキイガイに含まれる有毒成分の溶出曲線 (Fig. 1) において、1%過酸化水素水との反応により強い蛍光を生じる Fr. I は、その腹腔内注射によりマウスを死に至らしめるまでには到らないが、マウスに明らかな麻痺症状を起こさせたため、Fr. I には PSP が含まれているものと推定された。Fr. I—Fr. V に含まれる有毒成分を電気泳動法及び薄層クロマトグラフィーにより分析した結果を Fig. 2, Fig. 3 に示した。

Fr. I に含まれる有毒成分は電気泳動において陽極側

Fig. 1. Elution Diagram of Mussel Toxins from a Bio-Rex 70 Column.

Fig. 2. Electrophoretic Behavior of Mussel Toxins on a Cellulose Acetate Membrane.

Relative mobility was calculated by assuming the mobility of STX as 1.0.

に移動すること^{9,10)} 薄層クロマトグラフィーにおけるスポットの位置¹⁰⁾ Bio-Rex 70 カラムクロマトグラフィーにおける溶出位置¹¹⁾ などから、野口ら⁹⁻¹¹⁾ が、山口県仙崎湾産のマガキから分離した新しい有毒成分 PX-2, PX-1 であると推定されたが、0.1 N 塩酸存在下で加温すると、それぞれ GTX₃, GTX₂ になることから最終的に PX-2, PX-1 であると同定した。これらの有毒成分は、現在ではそれぞれ GTX₃ 及びその 11β-エピマー (GTX₃ エピマー) と呼ばれている。

また、Fr. II は GTX₁, GTX₄, GTX₅ を、Fr. III は GTX₁, GTX₄ を、Fr. IV は GTX₁, GTX₂, GTX₃, GTX₄ を、そして Fr. V は STX, neoSTX をそれぞれ含んでいた。

Fig. 3. Chromatographic Behavior of Mussel Toxins on a Silica Gel Plate with a Solvent System of Pyridine-Ethylacetate-Acetic Acid-Water (75:25:15:30).

なお、セルロースアセテート膜電気泳動を用いた切り取り抽出により求めた各 PSP 成分の組成は、GTX₁ (31%), GTX₂ (12%), GTX₃ (15%), GTX₄ (16%), GTX₅ (3%), GTX₃+GTX₃ エピマー (2%), STX + neoSTX (21%) であった。

これまで噴火湾産の二枚貝において、高毒性である GTX₃ 及び GTX₂ の前駆体としての可能性の示唆されている GTX₃ や GTX₃ エピマーのような低毒性成分の検出報告はなく、今回の検出がはじめてである。今回の実験に用いたムラサキガイから検出された GTX₅ (希塩酸による加水分解で毒性の強い STX に変換する¹²⁾), GTX₃ 及び GTX₃ エピマーは著者らの培養した *P. tamarensis* からは検出されておらず、⁹⁾ 二枚貝の餌となる *P. tamarensis* に含まれる PSP 成分は、プランクトンフィーダーである二枚貝を介する食物連鎖を通じてより多様化するものと推測される。

このように PSP 成分のうち GTX₅, GTX₃ などのような *N*-sulfonato carbamoyl 基を有する低毒性成分は、これまで報告されている西日本^{1,9-11,13,14)}に限らず、東日本、特に北海道地方にも存在し、これら成分の分布については西日本、東日本といった地域による差のないことが、これまでのホタテガイの PSP 成分^{4,5)} 及び今回のムラサキガイの PSP 成分の検討を通して明らかとなった。

ただ、このような低毒性成分を量的な面から見た場合、西日本と東日本との間には相違があるように思われる。すなわち、野口ら¹⁴⁾は、徳島県椿泊湾産のムラサキガイから GTX₅, GTX₃ (希塩酸による加水分解で高毒性の neoSTX に変換する¹²⁾), GTX₃ をそれぞれ 7%, 2%, 11% 検出し、また、香川県引田湾産のムラサキ

ガイから GTX₅, GTX₆, GTX₈ をそれぞれ 1.8%, 1.3%, 5.4% 検出している。著者らは前述のように噴火湾産のムラサキガイから GTX₅, GTX₈+GTX₈ エピマーをそれぞれ 3%, 2% 検出し、また、同湾産のホタテガイを用いた前回の研究⁵⁾において GTX₅ を 2% 検出した。このようなことから GTX₅, GTX₈ のようなみかけは低毒性であっても、潜在的に強い毒性のある成分は量的には東日本よりも西日本の PSP に多いように思わ

れる。

謝辞 貴重な GTX₁₋₃, STX 及び neoSTX 標品を恵与された 東京大学 農学部 水産化学研究室 橋本周久教授、野口玉雄博士に深甚なる謝意を表する。また、貴重な試料提供の便宜を与えられた北海道指導漁業協同組合連合会函館支所長田口満夫氏に心から御礼申し上げる。

引用文献

- 1) Y. Onoue, T. Noguchi, K. Hashimoto, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **46**, 1031 (1980).
- 2) 野口玉雄, 橋本周久, 医学のあゆみ, **112**, 861 (1980).
- 3) 浅川 学, 高木光造, 北大水産研究彙報, **34**, 35 (1983).
- 4) 浅川 学, 高木光造, 北大水産研究彙報, **34**, 140 (1983).
- 5) M. Asakawa, M. Takagi, *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **34**, 345 (1983).
- 6) L.J. Buckley, M. Ikawa, J. Sasner, *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 107 (1976).
- 7) W. Horwitz, "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists," 13th ed., A.O.A.C., Washington, D.C., 1980, p. 298.
- 8) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課, 通牒, 食品衛生研究, **30**, 767 (1980).
- 9) Y. Onoue, T. Noguchi, J. Maruyama, K. Hashimoto, T. Ikeda, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 1643 (1981).
- 10) Y. Onoue, T. Noguchi, J. Maruyama, K. Hashimoto, H. Seto, *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 420 (1983).
- 11) T. Noguchi, J. Maruyama, Y. Onoue, K. Hashimoto, T. Ikeda, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 499 (1983).
- 12) T. Harada, Y. Oshima, T. Yasumoto, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1861 (1982).
- 13) a) Y. Oshima, W.E. Fallon, Y. Shimizu, T. Noguchi, Y. Hashimoto, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **42**, 851 (1976); b) Y. Oshima, Y. Shimizu, S. Nishio, T. Okaichi, *Ibid.*, **44**, 395 (1978).
- 14) a) 西尾幸郎, 野口玉雄, 丸山純一, 橋本周久, 昭和58年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 1983, p. 215; b) 西尾幸郎, 野口玉雄, 丸山純一, 橋本周久, 同要旨集, 1983, p. 216.