

噴火湾における有毒プランクトン(Protogonyaulax tamarensis)の麻痺性貝毒成分の同定

誌名	北海道大学水産学部研究彙報
ISSN	00183458
著者名	浅川,学 高木,光造
発行元	北海道大学水産学部
巻/号	34巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 35-41
発行年月	1983年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



噴火湾における有毒プランクトン (*Protogonyaulax tamarensis*) の
麻痺性貝毒成分の同定

浅 川 学・高 木 光 造

Identification of PSP Components of Toxic Plankton
Protogonyaulax tamarensis from Funka
Bay in Hokkaido

Manabu ASAKAWA*, Mitsuzo TAKAGI*

Abstract

Attempts were made to reveal PSP (Paralytic Shellfish Poison) compositions of toxic plankton *Protogonyaulax tamarensis* (formerly *Gonyaulax catenella* Funka) isolated from Funka Bay in Hokkaido. *Protogonyaulax tamarensis* cells were extracted with 0.1 N hydrochloric acid. The extract was purified by using two types of column chromatography on Bio-Gel P-2 and Bio-Rex 70 columns. Toxic fractions were analyzed by using fluorescence intensity monitoring, cellulose acetate strip electrophoresis and thin layer chromatography on silica gel.

Besides GTX₁₋₃, STX and neoSTX were detected. *Protogonyaulax tamarensis* isolated from Funka Bay were found to contain GTX₁₋₃, STX and neoSTX.

緒 言

Paralytic Shellfish Poison (以下 PSP と略記する) は、有毒プランクトン (*Protogonyaulax* spp.) が産生する自然毒で、食物連鎖によってこのプランクトンの毒が、貝類 (二枚貝) に蓄積され、その貝類をヒトが食べることににより麻痺を主症状とする食中毒が発生する。この食中毒は、発症までの時間が30分以内と極めて短いこと、また現在に至るまで適切な解毒法が見当らないこともあって死亡率が高く、古くからこうした食中毒の発生しているアメリカやカナダでは、これまでに多くの犠牲者が出ている。PSP に関する研究が本格的に開始されたのは 1940 年前後のことである。1937 年 Sommer ら¹⁾ はイガイ *Mytilus* sp. の毒化と *Gonyaulax catenella* の出現との間に相関関係があること、及び毒化した貝の消化管だけにのみ、この有毒プランクトンが存在することを認め、これにより PSP と *G. catenella* との間の因果関係が明らかになった。次いで 1948 年 Riegel ら²⁾ は *G. catenella* 自身から毒を抽出し、毒がこのプランクトンに由来することを証明した。1957 年 Schantz ら^{3,4)} は毒化したムラサキイガイ *Mytilus californianus* の中腸腺、及びアラスカバタークラム *Saxidomus giganteus* の水管部から saxitoxin (以下 STX と略記する) を単離し、さらに *G. catenella* の培養液体からも同様に STX を単離し、両者が同一のものであることを証明した。このような一連の研究を通じて、PSP は単一成分 (STX) を意味し、有毒プランクトン (*G. catenella*) によって特異的に産生されるとの説はゆるぎないものとなった。我が国では 1961 年 5 月、岩手県大船渡湾でアカザラガイ *Chlamys nipponensis*

* 北海道大学水産学部食品化学第二講座
(Laboratory of Food Hygiene, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

akazara による食中毒事件が発生し、川城ら⁵⁾は有毒アカザラガイから STX とは化学的に異なる毒成分を単離し chlamyotoxin と命名したが、この食中毒事件と PSP との関連性については、原因プランクトンによる赤潮の発生が見られなかったこと、また当時は上述のように PSP=STX という説が広く受け入れられていたことより、それ以上深く追求されることはなかった。その後、1968 年 Evans ら⁶⁾はイギリスの北東海岸で、*G. tamarensis* により毒化したムラサキイガイ *Mytilus edulis* には STX とは異なる毒成分が存在し、且つそれが主成分であることを明らかにし、従前の PSP=STX という固定概念に疑問を投げかけると共に PSP の多様性をはじめて明確に打ち出した。また、清水ら^{7,8)}によっても 1972 年、1974 年、アメリカ東海岸のニューイングランドで毒化したオオノガイ *Mya arenaria*、及びその原因プランクトン *G. tamarensis* を用いて同様の観察がなされ、STX 以外に gonyautoxin II (以下 GTX₂ と略記する)、gonyautoxin III (以下 GTX₃ と略記する) と、命名された毒成分が新たに認められるに至り、PSP の多様性が改めて問題とされるようになった。ところで、我が国で PSP がにわかにより重要視されるようになったのは、1975 年 1 月の三重県尾鷲湾で発生した赤潮による貝類の毒化事件以後である。つまり、この事件の際の原因プランクトンが、安達⁹⁾によって *G. catenella* であると同定され、さらに、野口ら⁹⁾によって貝類の毒性が調べられ、日本でも PSP によって貝類が毒化することが明らかにされてからである。また、この際、野口¹⁰⁾は清水らと共同で上述の尾鷲湾で *G. catenella* により毒化した貝類の毒成分を検討しているが、やはり、*G. catenella* が STX を特異的に産生するとのこれまでの定説とは一致せず、GTX 群を主成分とする多数の成分から成り立っていることを明らかにしている。以後、日本各地で PSP による貝類の毒化が報告され、また、その際の原因プランクトンも明らかにされている。1977 年 5 月岩手県大船渡湾で発生したホタテガイ *Patinopecten yessoensis* の毒化に際し、福代は原因プランクトンの一つとして *G. excavata* OF-1 (現在では、*P. tamarensis* OF-1 とされている) を分離し、さらに安元ら¹¹⁾はこのプランクトンが毒成分を産生することを確かめている。また、1978 年 6 月噴火湾でのホタテガイの毒化に際して、西浜¹²⁾は原因プランクトンとして *G. catenella* 類似種 (仮称 GCF は現在 *P. tamarensis* とされている) を分離している。こうした有毒プランクトンにより毒化した貝類から分離された PSP 成分も、主成分として GTX 群、副成分として STX というパターンを示している。このように現在では、従来単一成分 (STX) と考えられていた PSP も複数の成分から成り立っていることが明らかにされており、現在までに GTX₁₋₈ 及び STX, neoSTX の合計 10 成分が分離され¹³⁾、また日本でも GTX₁₋₅ 及び STX, neoSTX の 7 成分が検出されている¹⁴⁾。ところで、北海道では上述のように 1978 年 6 月噴火湾で突如として貝類の毒化が起こり、1979 年 4 月には噴火湾産の毒化したムラサキイガイ *Mytilus edulis* を食べて、3 人が PSP による食中毒にかかりこのうち 1 人が死亡している。こうした貝類の毒化は毎年同時期にくり返されており、特にホタテガイ養殖の盛んな噴火湾では水産上のみならず食品衛生上由々しい問題である。北海道地域における PSP 研究は、これまでホタテガイについて若干行なわれているのみで、未だ他の毒化貝及び原因プランクトンの毒成分についての研究は行なわれていないのが現状である。そこで著者らは噴火湾における有毒プランクトン (*P. tamarensis*)、及びそれにより毒化した貝類との間の毒成分の相互関係について検討すべく本研究に着手した。

試 料 と 方 法

I. 試 料

実験には噴火湾から単離した有毒プランクトン (*P. tamarensis*) を著者らの研究室で、BSW-4 培地¹⁵⁾を用いて培養し、その培養液を用いた。培養条件は白色蛍光灯を用い、照度は約 3000 lux、照明は 16-8 時間明暗とし、12°C、18 日間培養を行なった。

II. 毒の抽出・精製

メンブランフィルター (0.45 μ -東洋濾紙) により培養液を集めた後、0.1 N 塩酸を用いて毒抽出液

100 ml (その毒力は 10000 MU/ml) を作成し以下の精製に供した。前述の毒抽出液を減圧濃縮し、濃縮液をクロロホルムで脱脂した後、水層を 1 N 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 5.5 にし、Bio-Gel P-2 (Bio-Rad Lab.) カラムに付して毒を吸着させ、蒸留水でカラムを洗浄後、0.15 N 酢酸で毒を溶出させた。得られた有毒画分を減圧濃縮し、Bio-Rex 70 (Bio-Rad Lab. H⁺ 型) カラムに吸着させ、0-0.03 N 酢酸 (300 ml-300 ml), 0.03-1.30 N 酢酸 (300 ml-300 ml) の濃度勾配法で毒成分を溶出させた。その際ペリスタポンプの流量を 0.5 ml/min に設定し、フラクションコレクターで 4 ml ずつ分取した。

III. 毒の分析法

1. 蛍光分析

それぞれのフラクションから溶出液 0.5 ml をとり、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 形) を用い、励起波長 365 nm, 測定波長 400 nm にて蛍光強度を測定した。なお、蛍光強度のグラフ上へのプロットは各フラクションの値を Fr. 1 から順に 3 本ずつ合計したものをを用いた。

2. 毒性値 (MU) の測定

各フラクション (Fr. 1 から順に 3 本ずつ合一したもの) のマウスに対する毒性値 (MU) を測定し、蛍光強度と共にグラフ上にプロットした。なお、マウスは体重 19-21 g の ddY 系の雄を用いた¹⁶⁾¹⁷⁾。

3. 電気泳動

毒の溶出曲線 (Fig. 1) にみられる各ピーク部分、すなわち有毒フラクション (I・II・III) をそれぞれ減圧濃縮し、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) とともにセルロースアセテート膜 (Cellogel, Chemetron) に塗布し、0.8 mA/cm で 30 分間泳

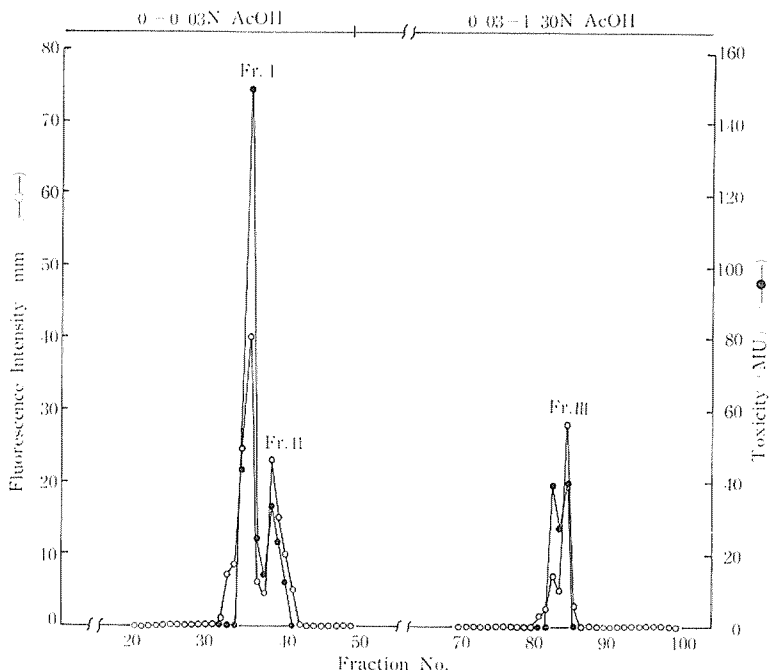


Fig. 1. Elution diagram of *P. tamarensis* toxins from a Bio-Rex 70 column.

動させた。なお、緩衝液には 0.08 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.7) を用いた。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 の蛍光ランプにより毒成分を検出した。

4. 薄層クロマトグラフィー

担体にはシリカゲル 60 (Merck), 展開剤にはピリジン-酢酸エチル-酢酸-水 (75:25:15:30) を用い、展開後、毒成分を電気泳動の場合と同様にして検出した。

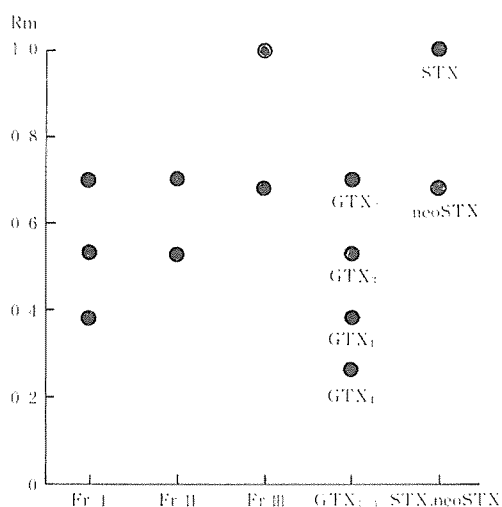


Fig. 2. Electrophoretic behavior of *P. tamarensis* toxins on a cellulose acetate strip. Relative mobility was calculated by assuming mobility of STX as 1.

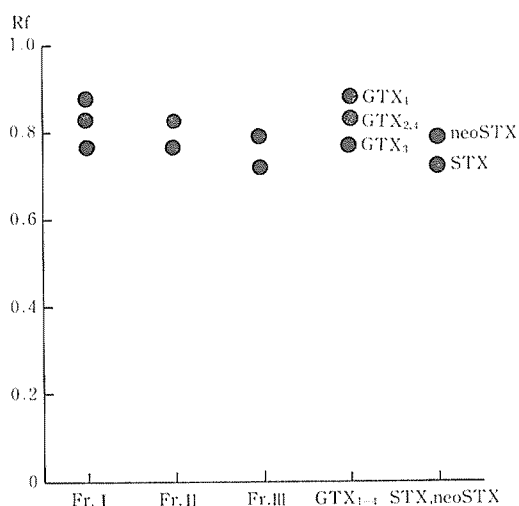


Fig. 3. Chromatographic behavior of *P. tamarensis* toxins on silica gel plate with a solvent system of pyridine-ethylacetate-acetic acid-water (75:25:15:30).

結 果

毒成分の溶出曲線 (Fig. 1) において, Fr. I 及び Fr. II は 0-0.03 N 酢酸, Fr. III は 0.03-1.30 N 酢酸のそれぞれ濃度勾配で溶出される画分である。電気泳動及び薄層クロマトグラフィーを用いて, 各フラクション (I・II・III) に含まれる毒成分を GTX 群標品, STX 群標品と比較した結果を Fig. 2, Fig. 3 に示した。電気泳動による R_m 値の比較から, Fr. I は GTX₁・GTX₂・GTX₃ を, Fr. II は GTX₂・GTX₃ を, また, Fr. III は STX・neoSTX を含むことが認められた。同様なことが薄層クロマトグラフィーによる R_f 値の比較からも観察された。これらの結果から, 噴火湾におけるホタテガイなどの二枚貝の PSP 毒化原因である有毒プランクトン (*P. tamarensis*) には GTX₁・GTX₂・GTX₃・STX・neoSTX の 5 成分が含まれていることが確認された。

考 察

I. PSP の蛍光分析について

現在, PSP の定量にはマウスを用いる生物試験法が広く用いられているが, PSP に対するマウスの感度の差や, 広く公定法として現在 MU の算出に用いられている Sommer の表が, STX を基準として作られているために, 比毒性の異なる複数の成分から成る PSP に対して誤差を生ずる原因になることなどの点で問題がないわけではなく, これまでに化学的定量法の検討も行なわれてきた。Rapoport ら¹⁸⁾¹⁹⁾ は PSP をアルカリ性下で過酸化水素処理すると, 蛍光を出すプリン誘導体になることに着目し, その蛍光を測定して PSP を定量しようと考え, STX の化学的定量法を開発しているが実験研究の域を脱していない。また, 清水ら²⁰⁾ は *G. tamarensis* に由来する PSP の化学的定量を試みている。しかしながら, GTX₁・GTX₄・neoSTX は蛍光化され難いという欠点もあって, 多成分から成る PSP に適用するには問題があるという意見もある。一方, Ikawa ら²¹⁾ は薄層プレート上に展開された PSP を過酸化処理し, 蛍光性物質にした後スキャナーでスキャンニングし, PSP を分析しようとしている。今回, 著者たちは上述の Ikawa らの PSP 分析法をカラムクロマトグラフィーによって分離した PSP に応用し, PSP 分析の一つの手段としての蛍光強度測定の有用性を検討した。Fig. 1 にみられるように PSP のマウスに対する毒性値をプロットしたグラフと, それに対応する蛍光強度をプロットしたグラフは, それぞれ互いに平行なものとなっており PSP の蛍光分析の有用性が示唆された。

II. PSP 成分について

今回, 取り扱った噴火湾産有毒プランクトン (*P. tamarensis*) の毒成分の溶出パターン (Fig. 1) をみると, 毒性値 (MU) において, GTX 群 (Fr. I・Fr. II) が全体の 74%, STX 群 (Fr. III) が 26% を占めており, 我が国の有毒二枚貝やその原因プランクトンに含まれる PSP は, GTX 群が主成分であったとした野口ら¹⁰⁾ の報告に合致している。現在, 日本では 7 種類の PSP 成分 (GTX₁・GTX₂・GTX₃・GTX₄・GTX₅・STX・neoSTX) が検出されているが, 毒成分の組成には地域によりやや相違が認められている。すなわち, 1975 年三重県尾鷲湾で毒化した貝類からは GTX₁ が検出されているが¹⁰⁾, 1976 年瀬戸内海で毒化した貝類からは GTX₁ は検出されていない²²⁾。また, これまでのところ GTX₅ は北海道では検出されておらず, 主に西日本で多く検出されている。安元²³⁾ は岩手県大船渡湾産有毒プランクトン (*P. tamarensis*) には STX が含まれておらず, 代わりに neoSTX が含まれていることを報告し, 形態学的に等しく *P. tamarensis* (あるいは, *P. catenella*) に分類される種でも, 生育環境や毒成分の組成比を異にする系統群が存在すると主張している。今回の実験で, 噴火湾から単離した *P. tamarensis* は大船渡湾産の *P. tamarensis* にみられない STX を産生することが確認され, 著者らは安元らの主張を支持する。ところで, 毒化した貝類とその原因プランクトンの毒成分の相互関係については, 有毒プランクトンを捕食して貝類が毒化することから, プランクトンの毒成分組成がそのまま貝類の毒成分組成に反映されることは当然のことのように思われるが, それでもこれまでに報告さ

れている例, たとえば, 1979年山口県仙崎湾において毒化したマガキ *Crassostrea gigas* とその原因プランクトン (*P. catenella*) との間での毒成分の溶出パターンを比較してみると相違が認められており²⁴⁾, 貝体内での毒成分の転換も考えられている。清水ら¹³⁾ は GTX 群及び STX 群はそれぞれきわめて類似した構造を持っており, 貝類が有毒プランクトン (*Protogonyaulax* sp.) を捕食後, 体内で GTX 群及び STX 群の個々の成分が相互転換して毒成分のパターン変化が起こりうることを実験的に示している。今後, 著者らは噴火湾産の毒化ホタテガイ, 毒化ムラサキイガイ等の毒成分のパターン解析を進め, 今回得られた知見と比較検討し, 有毒プランクトン (*P. tamarensis*) と毒化二枚貝との間の毒成分の相互関係を究明して行きたいと考えている。

III. *Gonyaulax* 属と *Protogonyaulax* 属について

これまで, PSP による貝類毒化原因プランクトン (渦鞭毛藻) は *Gonyaulax catenella* や *Gonyaulax tamarensis* のように *Gonyaulax* 属の名称で呼ばれてきた。Taylor²⁵⁾ は *Gonyaulax* 属の分類を整理し, 新たに *Protogonyaulax* の属名を用いることを提唱し, 我が国でもこうした考え方は最近広く支持されている。そこで著者らも渦鞭毛藻に *Protogonyaulax* 属の名称を用いることとした。なお, 引用文献で *Gonyaulax* との記載のある場合はそのままとした。

謝 辞

本研究に当り, *P. tamarensis* を分与下された 道栽培漁業総合センターの西浜雄二博士並びに 貴重な GTX₁₋₃, STX, neoSTX 標品を恵与された東京大学農学部水産化学教室の橋本周久教授, 野口玉雄博士に対し厚く感謝の意を表します。

引 用 文 献

- 1) Sommer, H., Whedon, W.E., Kofoid, C.A. and Stohler, R. (1937). Relation of paralytic shellfish poison to certain plankton organisms of the genus *gonyaulax*. *Arch. Pathol.* **24**, 537-559.
- 2) Riegel, B., Stanger, D.W., Wikholm, D.M., Mold, J.D. and Sommer, H. (1957). Paralytic shellfish poisoning, V. The primary source of the poison, the marine plankton organism *Gonyaulax catenella*. *J. Biol. Chem.* **177**, 7-11.
- 3) Schantz, E.J., Mold, J.D., Stanger, D.W., Shavel, J., Riel, F.J., Bowden, J.P., Lynch, J.M., Wyler, R.S., Riegel, B. and Sommer, H. (1957). Paralytic shellfish poison, VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clam and mussel tissue. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5230-5235.
- 4) Schantz, E.J., Lynch, J.M., Vayvada, G., Matsumoto, K. and Rapoport, H. (1966). The purification and characterization of the poison produced by *Gonyaulax catenella* in axenic culture. *Biochemistry*. **5**, 1191-1195.
- 5) 川城 敏・田辺弘也・石居昭夫・近藤竜雄 (1962). アカザラ貝毒物に関する研究. 食衛誌 **3**, 273-277.
- 6) Evans, M.H. (1970). Two toxins from a poisonous sample of mussels *Mytilus edulis*. *Br. J. Pharmac.* **48**, 847-865.
- 7) Shimizu, Y., Alam, M. and Fallon, W.E. (1975). Purification and partial characterization of toxins from poisonous clam. p. 275-285. In LoCicero, V.R. (ed.), *Proceedings of the First International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms*. The Massachusetts Science and Technology Foundation, Wakefield.
- 8) Shimizu, Y., Buckley, L.J., Alam, M., Oshima, Y., Fallon, W.E., Kasai, H., Miura, I., Gullo, V.P. and Nakanishi, K. (1976). Structures of gonyautoxin II and III from the east coast toxic dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 5414-5416.
- 9) Hashimoto, Y., Noguchi, T. and Adachi, R. (1976). Occurrence of toxic bivalves in

- association with the bloom of *Gonyaulax* sp. in Owase Bay. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **42**, 671-676.
- 10) Oshima, Y., Fallon, W.E., Shimizu, Y., Noguchi, T. and Hashimoto, Y. (1976). Toxins of the *Gonyaulax* sp. and infested bivalves in Owase Bay. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **42**, 851-856.
- 11) Oshima, Y. and Yasumoto, T. (1979). Analysis of toxins in cultured *Gonyaulax excavata* cells originating in Ofunato Bay, Japan. p. 377-380. In Taylor, D.L. and Seliger, H.H. (ed.), *Toxic Dinoflagellate Blooms*. 505 p. Elsevier/North Holland, New York, Amsterdam, Oxford.
- 12) 西浜雄二・内田卓志・佐藤七七朗 (1979). 1978年噴火湾産養殖ホタテガイ毒化原因プランクトン (ゴニオラックス カテネラ類似種) について. 北水試月報 **36**, 65-74.
- 13) 清水 譲 (1980). 赤潮毒. 化学と生物 **18**, 792-799.
- 14) Onoue, Y., Noguchi, T. and Hashimoto, K. (1980). Studies on paralytic shellfish poison from the oyster cultured in Senzaki Bay, Yamaguchi Prefecture. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **46**, 1031-1034.
- 15) 高木光造・鎌田英嗣・田崎 篤 (1980). 噴火湾ホタテ漁場における *Protogonyaulax* sp. 発生原因に対する一考察. 北大水産彙報 **31**, 215-221.
- 16) 厚生省環境衛生局肉乳衛生課 (1980). 通牒, 麻痺性貝毒検査法, 食品衛生研究 **30**, 767-773.
- 17) Horwitz, W. (1980). Paralytic shellfish poison, biological method (32)-official final action. p. 298-299. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 13th ed. A.O.A.C., Washington, D.C.
- 18) Bates, H.A. and Rapoport, H. (1975). A chemical assay for saxitoxin, the paralytic shellfish poison. *J. Agric. Food Chem.* **23**, 237-239.
- 19) Bates, H.A., Kostriken, R. and Rapoport, H. (1978). A chemical assay for saxitoxin. Improvements and modifications. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 252-254.
- 20) Buckley, L.J., Oshima, Y. and Shimizu, Y. (1978). Construction of a paralytic shellfish toxin analyzer and its application. *Analytical Biochemistry*. **85**, 157-164.
- 21) Buckley, L.J., Ikawa, M. and Sasner, J. (1976). Isolation of *Gonyaulax tamarensis* toxins from soft shellclam (*Mya arenaria*) and a thin-layer chromatographic-fluorometric method for their detection. *J. Agric. Food Chem.* **24**, 107-111.
- 22) Oshima, Y., Shimizu, Y., Nishio, S. and Okaichi, T. (1978). Identification of paralytic shellfish toxins in shellfish from Inland Sea. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **44**, 395.
- 23) 安元 健 (1980). 麻痺性貝毒. 食品衛生研究 **30**, 576-584.
- 24) Onoue, Y., Noguchi, T., Maruyama, J., Ueda, Y., Hashimoto, K. and Ikeda, T. (1981). Comparison of PSP compositions between toxic oysters and *Protogonyaulax catenella* from Senzaki Bay, Yamaguchi Prefecture. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **47**, 1347-1350.
- 25) Taylor, F.J.R. (1979). The toxigenic gonyaulacoid Dinoflagellates. p. 47-56. In Taylor, D.L. and Seliger, H.H. (ed.), *Toxic Dinoflagellate Blooms*. 505 p. Elsevier/North Holland, New York, Amsterdam, Oxford.