HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Protogonyaulax tamarensisと比較した噴火湾産毒化ホタテガイの麻痺性貝毒成分
Author(s)	浅川, 学; 高木, 光造
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 34(2), 140-147
Issue Date	1983-06
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23822
Type	departmental bulletin paper
File Information	34(2)_P140-147.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大水産彙報
34(2). 140–147, 1983.

Protogonyaulax tamarensis と比較した噴火湾産毒化ホタテガイの麻痺性貝毒成分

浅川　学*・高木光造*

PSP Components of Toxic Scallops from Funka Bay in Comparison with Those of *Protogonyaulax tamarensis*

Manabu ASAKAWA* and Mitsuzo TAKAGI*

Abstract

To examine the mutual relationship of PSP (Paralytic Shellfish Poison) components between toxic plankton *Protogonyaulax tamarensis* and plankton feeders, identification of PSP components in toxic scallops *Patinopecten yessoensis* was made.

The digestive glands of the scallop collected from Funka Bay were extracted with acidified ethanol. The extract was defatted two or three times with chloroform, treated with activated charcoal, and then purified by using two types of column chromatography on Bio-Gel P-2 and Bio-Rex 70. Toxic fractions thus obtained were analyzed by using fluorescence intensity monitoring, cellulose acetate strip electrophoresis and thin layer chromatography on silica gel.

A remarkable difference was recognized in PSP components between toxic scallops and *P. tamarensis*. Both organisms contained GTX_{1-3}, STX and neoSTX in common. But in addition to the above five toxic components, toxic scallops contained GTX_4 and GTX_5.

緒　言

1975年1月に三重県尾鷲湾で *Protogonyaulax catenella* による赤潮が発生し貝類が毒化して以来，近年，我が国の多くの海域で Paralytic Shellfish Poison（以下 PSP と略記する）を産生する有毒プランクトン *Protogonyaulax* spp. による二枚貝の毒化が明らかとなり，ホタテガイ養殖に代表される増養殖業の発達とからんで食品衛生上のみならず水産上重大な問題となっている。1978年夏には，日本一の生産高を誇る噴火湾産の養殖ホタテガイが突如として毒化し，むき身の毒性値が 4MU/g 未満になるまでの5か月間近く出荷が停止されホタテ漁家に大きな経済的損失を与えたことは記憶に新しい。一度毒化した地域では，その後，毎年あるいは隔年，同時期に毒化が繰り返されており，噴火湾では上述の1978年の毒化現象発生以来，ここ数年，養殖ホタテガイの毒化が継続し増養殖業に深刻な影響を与えている。1979年4月には噴火湾で採捕した毒化ムラサキイガイを食べて3人が PSP による食中毒にかかり，うち1人が死亡するという事件も発生した。さて，前報[1]において著者らは，噴火湾において毎年恒常的に養殖ホタテガイなどの二枚貝を毒化させている有毒プランクトン *P. tamarensis*

* 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*)

には PSP 成分として，gonyautoxin I-III（以下 GTX_{1-3} と略記する)。saxitoxin（以下 STX と略記する)，neosaxitoxin（以下 neo STX と略記する）の5成分が含まれていること，また PSP 成分の組成については日本各地で観察されているように GTX 群を主成分，STX 群を副成分とすることを報告した。一方，噴火湾から単離した *P. tamarensis* に STX が検出されたことから，著者らは安元ら[2,3]の形態学的に等しく *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を異にする系統群（岩手県大船渡湾に分布する *P. tamarensis* には，STX が検出されない株が存在する）が存在するとの主張を裏付けた。

現在 PSP は GTX_{1-8}，STX 及び neo STX の10成分から成る[4]とされ，個々の成分の性状もしだいに明らかにされている。すなわち GTX_1 及び GTX_4 は互いにエピマーであり，水溶液中では GTX_1 と GTX_4 は平衡状態にあること（GTX_2，GTX_3 についても同様）が清水ら[5,6]によって明らかにされ，また西尾ら[7]は山口県仙崎湾産の毒化マガキから西日本特有とされている PSP 成分，GTX_5 を分離し，このものは比毒性が低い（280 MU/mg）にもかかわらず温和な酸（0.01N 塩酸）処理をするとその毒性は約5倍も上昇し，且つ STX が生成されたと報告しており，STX の前駆体の可能性が示唆されている。さらに，原田ら[8]はパラオ諸島に分布している有毒プランクトン *Pyrodinium bahamense* var. *compressa* から分離した GTX_6 について同様な酸処理による neo STX の生成を報告し，GTX_6 が neo STX の前駆体ではないかと考えられている。Hall ら[9]は，アラスカに分布する *Protogonyaulax* sp. から低い pH で STX，neo STX，GTX_2，GTX_3 に変換する低毒性の新しい PSP 成分（B1，B2，C1，C2）を発見した。同氏らは上記の新成分と共に検出された毒性の高い既知成分（GTX_1，GTX_4，neo STX）の量が少ないことなどから，*Protogonyaulax* sp. の生体内で PSP は前駆体と推測される低毒性成分として存在しているのではないかと述べている。野口ら[10]も山口県仙崎湾産の毒化マガキ及びその原因プランクトン *P. catenella* から C1，C2 成分を検出している。上述のような低毒性成分から毒性の高い成分への変換は生体内でも十分起こり得るものと推測されており，餌生物として二枚貝に捕食された有毒プランクトン *Protogonyaulax* spp. の PSP 成分は貝の体内で変換を受けると一般的に考えられている。著者らは PSP 成分の生体内変換を考える上で，餌生物である有毒プランクトン（*P. tamarensis*）と捕食者（二枚貝）との間の PSP 成分についてまず比較検討する必要があるとの観点から前報[1]で報告した *P. tamarensis* の PSP 成分の同定に引き続き毒化ホタテガイの PSP 成分の同定に着手した。

試料と方法

I. 試　料

1981年8月26日，北海道噴火湾沿岸の南茅部町大船で採捕した養殖ホタテガイ *Patinopecten yessoensis*（4年貝平均重量 240 g，中腸腺の毒性値 180MU/g）を生きたまま研究室に運び中腸腺を分離後凍結保存し，解凍の上以下の実験に供した。

II. 毒の抽出・精製

上記中腸腺約1kg を倍量の塩酸酸性 80% エタノール（pH 2.0）を用いてホモジナイズし，遠心分離後，上澄液を得た。残渣についてさらに同様の操作を2回行ない，これらの上澄液を合一し減圧下でエタノールを除去して濃縮した。次いでこの濃縮液を等量のクロロホルムで2，3回脱脂した後，水層を減圧濃縮した。このようにして得られた毒抽出液を 1N 水酸化ナトリウム溶液で pH 5.5 に調整し，水洗した活性炭（和光純薬）に加えて毒を吸着させた後，水洗して不純物を除去した。毒の溶出には酢酸酸性エタノールを用い，得られた溶出液を減圧濃縮した。この濃縮液を 1N 水酸化ナトリウム溶液で pH 5.5 に調整し Bio-Gel P-2（Bio-Rad Lab.）カラムに付して毒を吸着させ 1000 ml の蒸留水でカラムを洗浄後，2000 ml の 0.15N 酢酸で毒を溶出させた。ここに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 0-0.03N 酢酸 300 ml-300 ml, 0.03-1.30N 酢酸 300 ml-300 ml の濃度勾配法で毒を溶出させた。なおその際，ペリスタポンプの流量を 0.5 ml/min とし，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

Bio-Rex 70 カラムを用いた濃度勾配法により部分精製した毒について，まず螢光強度及び毒性値 (MU) の測定を行ない毒の溶出曲線を作成し，得られた溶出曲線にみられるピーク中の毒成分を電気泳動及び薄層クロマトグラフィーを用いて同定した。

1. 螢光強度の測定

それぞれの画分から溶出液 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，分光螢光光度計（日立 650-10 型）を用い励起波長 365 nm，測定波長 400 nm にて螢光強度を測定した。なお，螢光強度のグラフ上へのプロットは，各画分の値を Fr. 1 から順に 3 本ずつ合計したものを用いた。

2. 毒性値 (MU) の測定

各画分 (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を測定し，螢光強度と共にグラフ上にプロットした。なお，毒性値の測定法は，麻痺性貝毒検査法（厚生省環境衛生局乳肉衛生課)[11] 及び A.O.A.C. 法[12] に従った。

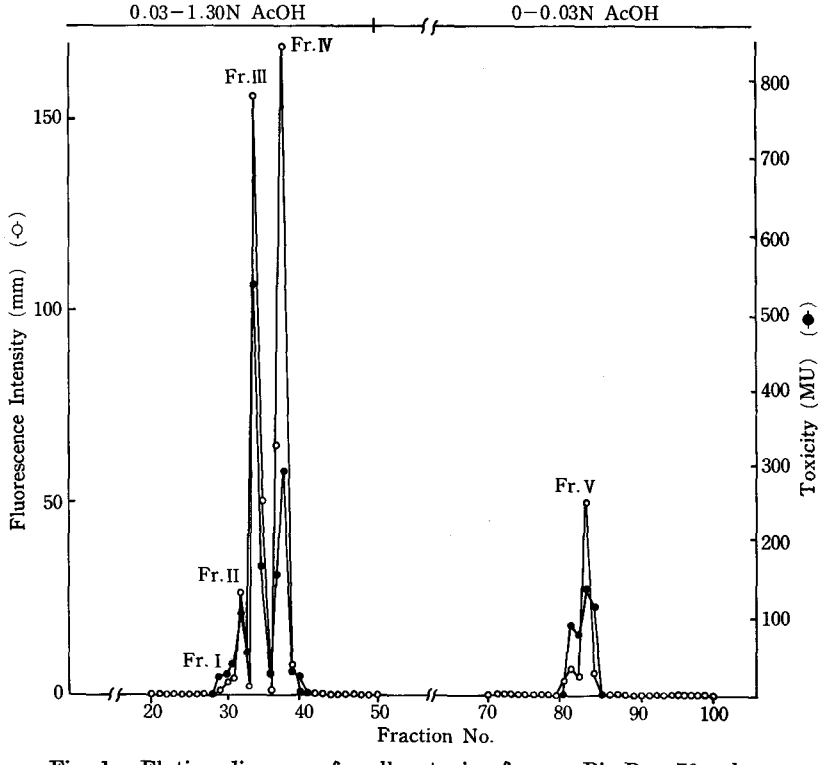

Fig. 1. Elution diagram of scallop toxins from a Bio-Rex 70 column.

3. 電気泳動

毒の溶出曲線 (Fig. 1) にみられる各ピーク，すなわち有毒画分 (I, II, III, IV, V) をそれぞれ減圧濃縮し，GTX 群標品 (GTX_{1-3}，1部 GTX_1 のエピマーである GTX_4 を含む)，STX 群標品 (STX, neo STX) と共に，セルロースアセテート膜 (Cellogel, Chemetron) に塗布し，0.8 mA/cm で 30 分間泳動させた。この際，緩衝液には 0.08M トリス－塩酸緩衝液 (pH 8.7) を用い，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 の螢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。

結　　果

毒の溶出曲線 (Fig. 1) において Fr. I-Fr. IV は 0-0.03N 酢酸，Fr. V は 0.03-1.30N 酢酸のそれぞれ濃度勾配で溶出される GTX 群画分，STX 群画分であり，総毒性のうち Fr. I-Fr. IV，すなわち GTX 群が 78% を占める主成分であることがわかった。また Fr. I-Fr. V に含まれる毒成分について電気泳動及び薄層クロマトグラフィーの結果から Rm 値 (STX の移動度を 1.0 とした時の他の PSP 成分の相対移動度)，Rf 値を求め GTX 群標品及び STX 群標品のそれらと比較した結果を Fig. 2，Fig. 3 に示した。これにより Fr. I は GTX_1，GTX_4 及び未知成分 (Rm＝0.50，Rf＝0.52) を Fr. II は GTX_1，GTX_4 を，Fr. III は，GTX_1，GTX_2，GTX_3，GTX_4 を，Fr. IV は GTX_2，GTX_3 を，そして Fr. V は neo STX，STX をそれぞれ含んでいることがわかった。

なお，Fr. I に含まれる未知成分は，薄層クロマトグラム上のスポットの位置[13]，電気泳動によるセルロースアセテート膜上のバンドの位置[14,15] 及び Bio-Rex 70 カラムクロマトグラフィーによる溶出位置[13] などを総合して検討した結果，GTX_5 と考えられた。

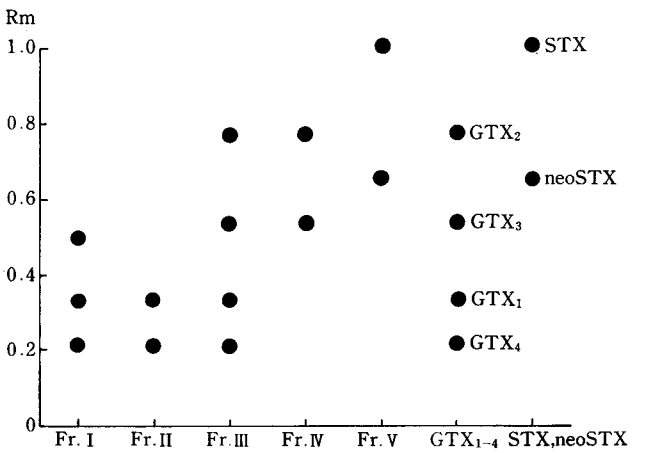

Fig. 2. Electrophoretic behavior of scallop toxins on a cellulose acetate strip. Relative mobility was calculated by assuming mobility of STX as 1.0.

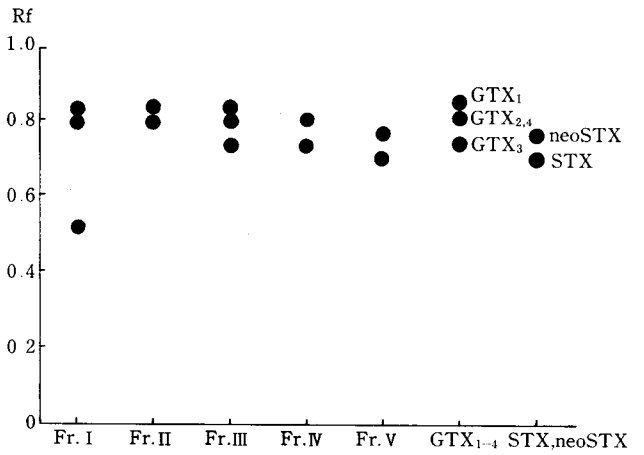

Fig. 3. Chromatographic behavior of scallop toxins on a silica gel plate with a solvent system of pyridine – ethylacetate – acetic acid – water (75:25:15:30).

考　　察

I. Gonyautoxin V について

GTX_5 は，1975年に三重県尾鷲湾産の毒化二枚貝（ムラサキイガイ，アサリなど）及びその原因プランクトン *P. catenella* から[16]，1976年に瀬戸内海沿岸（香川県）産の毒化ムラサキイガイから[17]，1981年に山口県仙崎湾産の毒化マガキから[18]それぞれ検出されている西日本特有の成分である。東日本では野口ら[19]が1981年に岩手県大船渡湾産の毒化ホタテガイからはじめて検出した例以外は，これまでに報告されていない。今回の GTX_5 の検出は東日本では，上述の大船渡湾以来のことであり，北海道水域（噴火湾）で GTX_5 が検出されたのははじめてのことである。前述のように GTX_5 は 280 MU/mg という低毒性の成分で STX（=5500MU/mg）の前駆体としての可能性が示唆されており，生体内におけるその存在は興味深い。

II. PSP 溶出曲線について

毒の溶出曲線（Fig. 1）から噴火湾産の毒化ホタテガイでは，Fr. I-Fr. IV に示される GTX 群が総毒性の 78% を占めていることがわかり前報[1]において報告した噴火湾における有毒プランクトン *P. tamarensis* の PSP 成分の組成，すなわち GTX 群が総毒性の 74% を占める主成分であることが，プランクトンフィーダーであるホタテイガにもそのまま反映されていることがわかる。しかし，GTX 群が主成分であると言っても，個々の PSP 成分を *P. tamarensis* と毒化ホタテガイとの間で比較してみると相違がみられる。Table 1 に今回の実験で毒化ホタテガイから検出された PSP 成分と前回[1]，*P. tamarensis* から検出された PSP 成分を示した。

Table 1 からわかるように餌生物である *P. tamarensis* とそれを捕食して毒化したホタテガイとの間には PSP 成分の組成に違いがあり，餌生物である *P. tamarensis* に存在しない PSP 成分（GTX_4 及び GTX_5）が毒化ホタテガイに検出されている。このように餌生物である有毒プランクトンとそれを捕食して毒化した二枚貝との間に PSP 成分の組成に違いがみられる現象は，著者らの対象としている噴火湾だけではなく外国でも観察されている。Wichmann ら[20]は，カナダの Fundy 湾産の毒化ホタテガイ及びその原因プランクトンである *G. excavata*（現在では *P. tamarensis* とされている）の PSP 成

Table 1. Comparison of PSP components between toxic scallops and *P. tamarensis* from Funka Bay

organism	PSP component
P. tamarensis	GTX_1, GTX_2, GTX_3, STX, neoSTX
scallop	GTX_1, GTX_2, GTX_3, GTX_4, GTX_5 STX, neoSTX

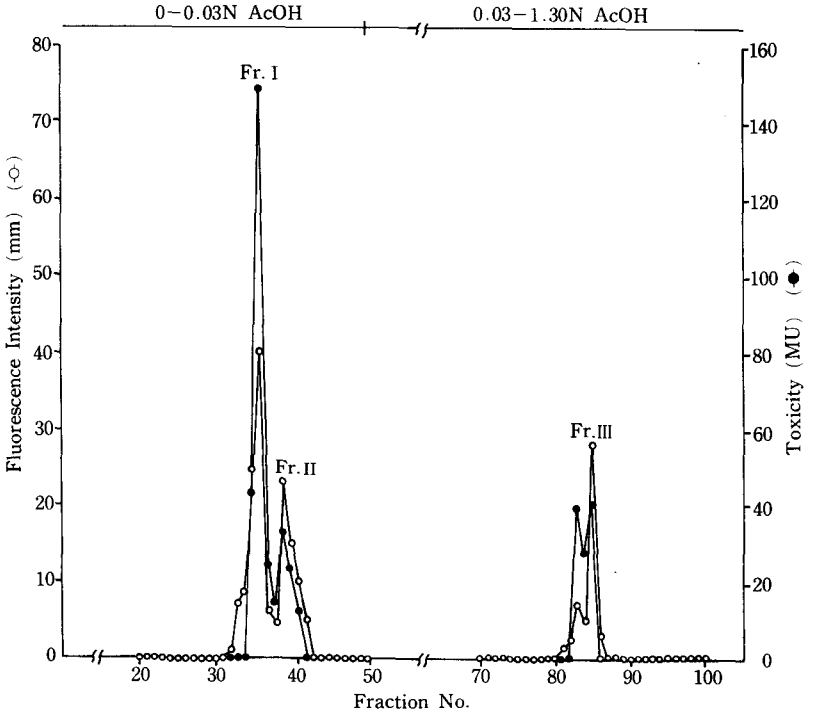

Fig. 4. Elution diagram of *P. tamarensis* toxins from a Bio-Rex 70 column.

分を調べ，両者の間にはPSP成分の組成に著しい違いのあることを報告している。尾上ら[21]は，山口県仙崎湾で毒化したマガキと有毒プンクトン *P. catenella* の遊泳型細胞，非遊泳型細胞（いわゆるシスト）との間におけるPSP成分を調べ両者の間で成分の相違はみられなかったが，Bio-Rex 70 カラムを用いた濃度勾配法により得られた毒成分の溶出パターンは相違したことを報告しており，また上田ら[22]は，岩手県大船渡湾で毒化したホタテガイと *P. tamarensis* のPSP成分を調べ，尾上らと同様の結果を報告している。噴火湾産の毒化ホタテガイの毒の溶出曲線（Fig. 1）を前報[1]の *P. tamarensis* の溶出曲線（Fig. 4）と比較してみると，0-0.03N 酢酸の濃度勾配で溶出されるGTX群画分のピークに明瞭な差が認められる。このような毒の溶出パターンの相違は個々のPSP成分が生体内で変換を受け，PSP成分の組成に変化をきたしたと考えると容易に説明される。しかし，GTX_1 及び

GTX_4 と GTX_2 及び GTX_3 は，互いにエピマーであり容易に平衡状態となること[5,6]や GTX_1 の不安定性[21]など個々の PSP 成分の性状を考慮すると，単に PSP 成分の存否だけで貝の体内での変換を論ずることはできない。試料の貯蔵（凍結保存）期間中や PSP の抽出・精製の段階で PSP 成分が化学変化を起こし，そのために生体内におけるその組成を大きく変化させる可能性も考えられるので，これらについての検討も必要であろう。また，今回の実験では毒化ホタテガイの PSP 成分を同定し，前報[1]で報告した *P. tamarensis* の PSP 成分と比較しただけであるから，双方の PSP 成分の量的関係の把握も生体内変換を考える上で重要なポイントとなることは言うまでもない。著者らは噴火湾を対象として，各生物の PSP 成分の量的把握にも努め，今後報告して行くつもりである。

引 用 文 献

1) 浅川 学・高木光造 (1983). 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. 北大水産彙報 **34**, 35–41.
2) 安元 健 (1980). 麻痺性貝毒. 食品衛生研究 **30**, 576–584.
3) Oshima, Y., Harada, T., Hashimoto, M., Kotaki, Y. and Yasumoto, T. (1982). Classification of *Protogonyaulax tamarensis* from Northern Japan into three strains by toxic composition. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* **48**, 851–854.
4) 清水 譲 (1980). 赤潮毒. 化学と生物 **18**, 792–799.
5) Shimizu, Y. and Hsu, C.P. (1981) Confirmation of the structure of gonyautoxin I-IV by correlation wiht saxitoxin. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 314–315.
6) Shimizu, Y., Alam, M., Oshima, Y. and Fallon, W.E. (1975). Presence of four toxins in red tide infested clams and cultured *Gonyaulax tamarensis* cells. *Biochem. Biophy. Res. Commun.* **66**, 731–737.
7) Nishio, S., Noguchi, T., Onoue, Y., Maruyama, J., Hashimoto, K. and Seto, H. (1982). Isolation and properties of gonyautoxin-5, an extremely low-toxic component of paralytic shellfish poison. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **46**, 1031–1034.
8) Harada, T., Oshima, Y. and Yasumoto, T. (1982). Structures of two paralytic shellfish poison, gonyautoxin V and VI, isolated from a tropical dinoflagellate, *Pyrodinium bahamense* var. *compressa*. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1861–1864.
9) Hall, S., Reicharldt, P.B. and Neve, R.A. (1980). Toxins extracted from an Alaskan isolate of *Protogonyaulax* sp. *Biochem. Biophy. Res. Commun.* **97**, 649–653.
10) Onoue, Y., Noguchi, T., Maruyama, J., Hashimoto, K. and Ikeda, T. (1981). New toxins separated from oysters and *Protogonyaulax catenella* from Senzaki Bay, Yamaguchi Prefecture. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **47**, 1643.
11) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課 (1980). 通牒, 麻痺性貝毒検査法. 食品衛生研究 **30**, 767–773.
12) 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.
13) Shimizu, Y., Fallon, W.E., Wekell, J.C., Gerber, D. Jr. and Gauglitz, E.J. Jr. (1978). Analysis of toxic mussels (*Mytilus* sp.) from the Alaskan inside passage. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 878–881.
14) Harada, T., Oshima, Y., Kamiya, H. and Yasumoto, T. (1982). Confirmation of paralytic shellfish toxins in the Dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressa* and bivalves in Palau. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **48**, 821–825.
15) Fallon, W.E. and Shimizu, Y. (1977). Electrophoretic analysis of paralytic shellfish toxins. *J. Environ. Sci. Health.* **A12**, 455–464.
16) 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.
17) Oshima, Y., Shimizu, Y., Nishio, S. and Okaichi, T. (1978). Identification of paralytic shellfish toxins in shellfish from Inland Sea. *ibid.* **44**, 395.

18) Onoue, Y., Noguchi, T. and Hashimoto, K. (1980). Studies on paralytic shellfish poison from the oyster cultured in Senzaki Bay, Yamaguchi Prefecture. *ibid.* **46**, 1031–1034.

19) 丸山純一・野口玉雄・尾上義雄・橋本周久 (1982). 大船渡湾産有毒ホタテガイにおける GTX_5 の検出. 昭和57年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 264.

20) Wichmann, C.E., Boyer, G.L., Divan, C.L., Schantz, E.J. and Schnoes, H.K. (1981). Neurotoxins of *Gonyaulax excavata* and Bay of Fundy scallops. *Tetrahedron Lett.* **22**, 1941–1944.

21) 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.

22) Ueda, Y., Noguchi, T., Onoue, Y., Koyama, K., Kono, M. and Hashimoto, K. (1982). Occurrence of PSP infested scallops in Ofunato Bay during 1976–1979 and investigation of responsible plankton. *ibid.* **48**, 455–458.