

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	日本沿岸海域における熱帯・亜熱帯性魚毒による食中毒発生リスクの評価法の開発 (課題番号：0904) (研究期間：平成21年度～平成23年度)
主任研究者名	所属：国立大学法人高知大学教育研究部自然科学系 教授 氏名：足立 真佐雄 (研究課題番号：0904)

近年、わが国においては地球温暖化による沿岸海域の海水温上昇に伴い、熱帯・亜熱帯性魚毒による食中毒の発生リスクの上昇が懸念されている。これらの魚毒性中毒は、微細藻類由来の神経毒が食物連鎖を通じて魚類に蓄積することにより起こるとされているが、その原因毒、さらには毒を生産する原因生物に関する情報が不足しているため、本中毒発生のリスク評価が行えない状況にある。

そこで本研究では、本邦沿岸海域における代表的な熱帯・亜熱帯性魚毒であるパリトキシン (PTX) 様中毒とシガテラ中毒の発生リスクの評価法を開発しようとした。

まず、両中毒の原因藻とされているオストレオプシス属藻類ならびにガンビエールディスカス属藻類の本邦における分布について検討したところ、前者は4種が、後者は5種がそれぞれ分布していることが判明した。これらのうち、少なくとも6種はマウス毒性を示した。

さらに、これらの有毒種に特異的なリアルタイム PCR 法による検出・定量法の新規開発に成功した。また、LC-MS/MS を用いることにより、両中毒の原因毒とされる PTX 類ならびに CTX 類の高感度かつ高精度な同定・定量法をそれぞれ新規開発した。本手法により国内産オストレオプシス株を分析した結果、主要毒は PTX の1種であり新規なオバトキシン a の異性体と考えられる 42-hydroxy-16, 44, 70-trideoxypalytoxin (オバトキシン aAC) と推定された。

一方、国内産ガンビエールディスカス株については CTX 類が検出されなかった。また、本法を用いてアオブダイ中毒検体を分析したが、PTX 類縁体は検出されなかった。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	日本沿岸海域における熱帯・亜熱帯性魚毒による食中毒発生リスクの評価法の開発 (研究期間：平成21年度～平成23年度)
主任研究者名	所属：国立大学法人高知大学教育研究部自然科学系 教授 氏名：足立 真佐雄（研究課題番号：0904）

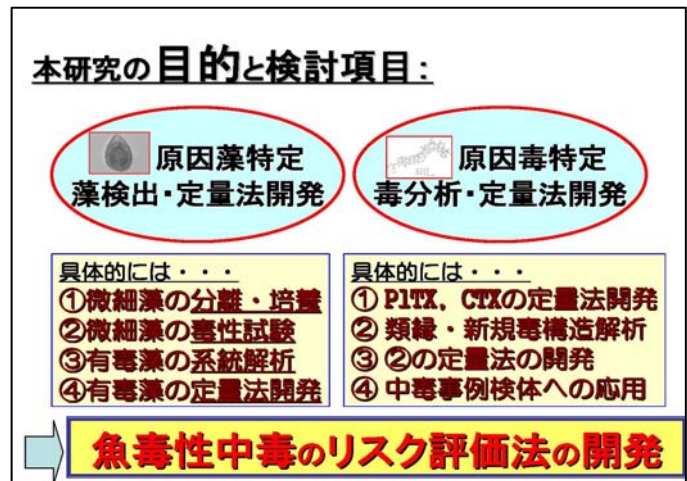
I 研究の全体計画

1 研究期間：平成21年～23年（3年間）

2 研究目的

本研究は、日本沿岸海域における、熱帯・亜熱帯性魚毒による食中毒の発生リスクの評価法を開発することを目的とする。具体的には、シガテラとパリトキシン様中毒の発生リスクの評価法に焦点を絞る。これらの食中毒は、海藻付着性の有毒微細藻類 *Gambierdiscus* 属および同 *Ostreopsis* 属により引き起こされる可能性が指摘されていることから、本研究では、まず主たる原因藻を特定した上で、これらの①特異的検出・定量法を開発する。また、有毒藻

の至適増殖・毒生産条件を検討することにより、中毒発生のリスク評価に役立てると同時に、より効率的な大量培養を行う基礎を構築する。さらに、②原因藻や魚に含まれる主たる原因毒の同定・定量法を開発する。これらにより、③中毒発生に関わるリスク評価法の確立を目指す。これらの評価法が確立できれば、日本沿岸域における原因藻の分布・動態の解明、ならびに魚類の毒化状況の解明による、食中毒発生リスクの評価が実現することが期待される。



研究目標

- (1) 日本沿岸域より、パリトキシン(PTX)様中毒およびシガテラ中毒の原因藻と考えられている有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属藻類および *Gambierdiscus* 属藻類を多数分離する。これらについて、分子系統解析を行い、その遺伝学的特性ならびにその遺伝学的集団構造を解明する。同時に、マウスを用いた毒性試験により、有毒株を特定する。また、これらの有毒株の至適増殖・毒生産条件を検討することにより、これら有毒藻の大量発生条件を明らかにすることにより中毒発生のリスク評価に役立てると同時に、より効率的

な大量培養を行う基礎を構築する。さらに、これら有毒株の簡易識別法を開発した後、有毒株に特異的な定量法の開発を試みる。

- (2) LC-MS/MS を用いて、シガトキシン (CTX) 類及び PTX 類の定量分析法、高感度同定法及び類縁体検索法の開発を行い、上記の方法により強毒とされた藻体の毒分析を行い、毒量や類縁体の有無を調べる。さらに、中毒等が疑われる魚類による食中毒検体を収集し、CTX 類及び PTX 類やその類縁体を調べ、魚類の毒化状況についてのデータを得ることにより、食中毒のリスク評価や安全対策を講ずる際の知見とする。
- (3) 日本沿岸域より採取した *Ostreopsis* 属ならびに *Gambierdiscus* 属藻類に関して、上記 (1) の結果を踏まえて、高密度かつ効率的な大量培養法を確立する。この結果を踏まえ、*Ostreopsis* 属渦鞭毛藻については、遺伝子的に異なる 3 株程度を各 100L 培養を行い、新規毒成分の分離精製と構造解析を行う。一方、*Gambierdiscus* 属藻類についても同様に 3 株程度の 100L 培養により、新規毒成分の分離精製と構造解析を行う。

3 研究内容及び方法等

(1) 研究内容及び方法

- 1) 有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明

① 有毒藻の分子系統解析

- ・ パリトキシン様中毒の原因藻とされている *Ostreopsis* 属の分子系統解析を行う。そのために、日本沿岸域より分離した多数の培養株を用い、その rDNA を PCR 増幅させ、その塩基配列を決定した後、これらの系統解析を行う。
- ・ シガテラの主たる原因藻である *Gambierdiscus* 属の細胞を、日本沿岸域より単離・培養することにより、多くの培養株を確立する。さらに、これらの rDNA を PCR 増幅させ、その塩基配列を決定した後、これらの系統解析を行う。

② 微細藻のマウス毒性試験

パリトキシン様中毒の原因藻とされている *Ostreopsis* 属およびシガテラの主たる原因藻である *Gambierdiscus* 属の毒性を評価するために、これらをマウスバイオアッセイに供する。

③ 有毒藻の至適増殖・毒生産条件の検討

上記①および②の試験により有毒であることが明らかとなった株を、様々な温度、塩分条件等の下で培養試験を行うことにより、これらの至適増殖条件の解明を目指す。同時に、様々な培養条件下における、これらの毒生産について評価することにより、毒生産条件についても解明を目指す。

④ 有毒藻の簡易判別法の開発

パリトキシン様中毒の原因藻とされている *Ostreopsis* 属およびシガテラの主たる原因藻である *Gambierdiscus* 属強毒株の簡易判別法を開発する。上記した方法により得た両属有毒株の rDNA の塩基配列に基づき、制限酵素切断片長多型 (RFLPs) 解析法を応用することにより、簡易判別を行う。

⑤ 有毒藻に特異的な定量法の開発

パリトキシン様中毒の原因藻とされている *Ostreopsis* 属およびシガテラの主たる原因藻である *Gambierdiscus* 属強毒株に特異的な塩基配列を検索し、これに結合するDNAプローブを開発する。これを用いて、リアルタイムPCR法等による、これらに特異的な定量法を開発する。

以上の課題のうち、個別課題③については、21年度に得られた結果に基づき、新たに項目として挙げたものである。

2) CTXs, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

① PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

PTX 類の定量分析法、高感度同定法および類縁体検索法を開発する。そのために、LC-MS/MS のマルチプルリアクションモニタリング法での最適な分離、イオン化、検出条件を決定する。さらに、試料マトリクスの定量分析精度への影響について調べる。また、LC-MS/MS フルスキャンスペクトル分析による PTX の高感度同定法、プレカーサーイオンモニタリング法による PTX 類縁体の検索法について検討し、最適な分析条件を決定する。開発した分析法を利用して、期間の後半には、上記した1)の②により強毒とされた藻体の毒分析を行い、毒量や類縁体の有無を調べる。さらに、開発した分析法を利用し、パリトキシン様中毒が疑われる魚類サンプルを分析し、毒含量や類縁体の有無を調べる。

② CTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

CTX 類の定量分析法、高感度同定法および類縁体検索法を開発する。そのために、LC-MS/MS のマルチプルリアクションモニタリング法での最適な分離、イオン化、検出条件を決定する。さらに、試料マトリクスの定量分析精度への影響について調べる。また、LC-MS/MS フルスキャンスペクトル分析による CTX の高感度同定法、プレカーサーイオンモニタリング法による CTX 類縁体の検索法について検討し、最適な分析条件を決定する。期間の後半には、開発した分析法を利用して、上記した1)の②により強毒とされた藻体の毒分析を行い、毒量や類縁体の有無を調べる。さらに、開発した分析法を利用し、シガテラ様中毒が疑われる魚類サンプルを分析し、毒含量や類縁体の有無を調べる。

3) 有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析

① *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の大量培養

パリトキシン様中毒の発生した高知県西部等より採取した *Ostreopsis* 属藻類について、栄養塩類と添加物、光質・光強度を検討し高密度培養条件を見出す。比増殖速度より培養期間と容量の拡大方法を決定する。500mL~50L 容器を用いた培養では、攪拌・振盪といった物理的手段の効果を検討する。有毒 *Ostreopsis* 属藻類について、遺伝子的に異なる3株程度を100L 容量で13C ラベル炭酸水素ナトリウムを添加した培養を実施する。

② *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の大量培養

ガテラ発生事例の多い沖縄県等より採取した *Gambierdiscus* 属藻類について、

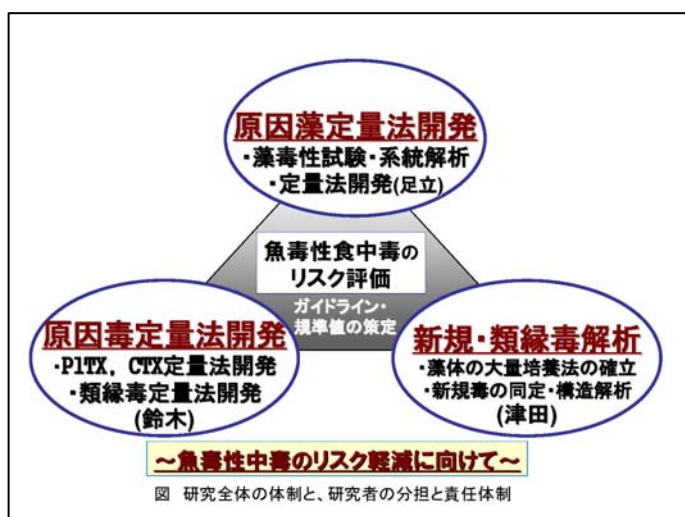
栄養塩類と添加物、光質・光強度を検討し高密度培養条件を見出す。比増殖速度より培養期間と容量の拡大方法を決定する。500mL～50L 容器を用いた培養では、攪拌・振盪といった物理的手段の効果を検討する。有毒 *Gambierdiscus* 属藻類について、遺伝子的に異なる3株程度を100L 容量で13C ラベル炭酸水素ナトリウムを添加した培養を実施する。

③ 毒成分の精製・構造解析

大量培養により得られた藻体を有機溶媒あるいは水で抽出し、得た抽出物について、種々のカラムクロマトグラフィーにより毒成分を分離・精製する。新規化合物について、13C ラベル化体を活かした高感度分光学的手法を用いて化学構造を明らかにする。既知化合物であっても、化学構造が複雑であること、文献データが不十分であることから慎重に同定を行い、物理化学データを報告する。また、標品あるいは抗体調製用原料として保管する。

(2) 研究体制

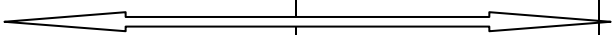
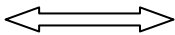
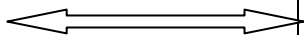
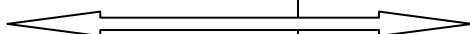
本研究では、パリトキシン様中毒やシガテラの主たる原因藻を特定した上で、これらの特異的検出・定量法を開発する。さらに、原因藻や魚に含まれる主たる原因毒の同定・定量法を開発する。これらにより、中毒発生に関わるリスク評価法の確立を目指す。この目的を達成するための研究体制として、まず原因藻の定量法の開発のために、原因藻の系統解析ならびに毒性試験を行う必要があり、これを高知大学の足立が担当する。さらに、原因藻の至適増殖・毒生産条件の解明についても、足立が検討する。また、原因毒定量法の開発のために、パリトキシンやシガトキシン標品のLC/MS/MSによる定量法の開発、さらには、これらの類縁毒の検出同定、ならびに定量法を開発する必要がある、これを水研センターの鈴木が担当する。また、有毒藻の大量培養ならびに新規・類縁毒の同定ならびに構造解析には、高知大学の津田が担当する（図参照）。この体制により、魚毒性食中毒のリスク評価法を確立する。これらの評価法が確立できれば、日本沿岸域における原因藻の分布・動態の解明、ならびに魚類の毒化状況の解明による、食中毒発生リスクの評価が実現することが期待され、魚毒性中毒リスク軽減に向けた施策の基礎的知見が得られることが期待される。

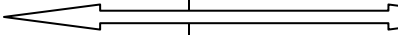
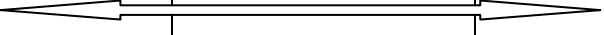
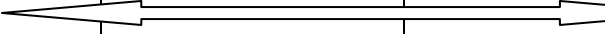


研究課題名	研究項目名	個別課題名	担当者名
日本沿岸海域に	1)有毒藻の分子	①有毒藻の分子系	足立真佐雄(高知大学)

おける熱帯・亜熱帯性魚毒による食中毒発生リスクの評価法の開発	系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明	統解析	
		②微細藻のマウス毒性試験	足立真佐雄(")
		③有毒藻の至適増殖・毒生産条件の検討	足立真佐雄(")
		④有毒藻の簡易判別法の開発	足立真佐雄(")
		⑤有毒藻に特異的な定量法の開発	足立真佐雄(")
	2)CTXs, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発	①PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発	鈴木敏之・渡邊龍一 (水産総合研究センター)
		②CTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発	鈴木敏之・渡邊龍一 (水産総合研究センター)
	3)有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析	① <i>Ostreopsis</i> 属渦鞭毛藻の大量培養	津田正史(高知大学)
		② <i>Gambierdiscus</i> 属渦鞭毛藻の大量培養	津田正史(")
		③毒成分の精製・構造解析	津田正史(")

4 研究の年度別計画

	平成 21 年度	平成 22 年度	平成 23 年度
1) 有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明 ①有毒藻の分子系統解析			
②微細藻のマウス毒性試験			
③有毒藻の至適増殖・毒生産条件の検討*1			
④有毒藻の簡易判別法の開発			

⑤有毒藻に特異的な定量法の開発			
2) CTX s, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発			
①PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発			
②CTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発			
3) 有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析			
① <i>Ostreopsis</i> 属渦鞭毛藻の大量培養			
② <i>Gambierdiscus</i> 属渦鞭毛藻の大量培養			
③毒成分の精製・構造解析			

*1: 1)③については、21 年度に得られた結果に基づき新たに項目として挙げたものである。

5 研究の年度別所要経費

	平成 21 年度	平成 22 年度	平成 23 年度
有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明	6,000 千円	12,000 千円 ^{*2}	6,250 千円
CTX s, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発	3,500 千円	2,500 千円	2,250 千円
有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析	2,500 千円	3,500 千円	2,000 千円
所要経費（千円）	12,000 千円	18,000 千円 ^{*2}	10,500 千円

*2: 21 年度に得られた結果に基づき、1)③の個別課題を遂行するために増額分を使用する。増額分については、主として当該研究を行う研究員の人件費として使用する。

6 研究担当者ごとのエフォート

研究項目	担当機関	研究担当者	エフォート (%)
------	------	-------	-----------

1) 有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明 ①有毒藻の分子系統解析 ②微細藻のマウス毒性試験 ③有毒藻の至適増殖・毒生産条件の検討^{*3} ④有毒藻の簡易判別法の開発 ⑤有毒藻に特異的な定量法の開発	国立大学法人高知大学	足立 真佐雄	30
2) CTXs, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発 ①PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発 ②CTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発	水産総合研究センター・中央水産研究所	鈴木 敏之	30
③有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析 ①<i>Ostreopsis</i> 属渦鞭毛藻の大量培養 ②<i>Gambierdiscus</i> 属渦鞭毛藻の大量培養 ③毒成分の精製・構造解析	国立大学法人高知大学	津田 正史	15

^{*3}: 1) ③については、21 年度に得られた結果に基づき新たに項目として挙げたものである。

7 倫理面への配慮について

本研究では、中毒事例における食品試料含まれる毒の定量を行う場合は、中毒を起こし

た本人およびその家族からの同意が得られた場合に限り、その分析を行う。

また、微細藻ならびに魚の毒性を評価する際に、LC-MS/MS による機器分析に加えて、マウスを用いた生物毒性評価を行うが、この際、動物愛護の観点から、試験後は速やかにマウスを頸椎脱臼により安楽死させる。なお、この動物実験については、高知大学動物実験委員会による承認をすでに受けている（承認番号 A-00155）。

8 当初計画からの変更点

（１）初年度の中間評価結果を踏まえた変更点

初年度の研究結果により、パリトキシン様中毒の原因藻 *Ostreopsis* 属藻類を安定的に培養・維持し、大量培養を行うことが難しいことが明らかになった。これを踏まえて、以下に示す新たな個別課題を掲げ、これを遂行することにより、前記の問題の解決を図る。すなわち、これらの有毒株の増殖・毒生産条件を検討することにより、これらの至適条件の解明を目指す（主任研究員・足立が担当する）。本検討により、これら有毒藻の大量発生条件を解き明かし、中毒発生リスク評価に役立てると同時に、より効率的な大量培養を行う基礎を構築する。これを行うために、研究員を新たに雇用し、増額された平成 22 年度研究費をこれに充てる。

以上の検討により、今後の地球温暖化の進行と共に、これらの熱帯・亜熱帯性藻類が発生するリスク評価に役立てると同時に、培養株の安定的維持や、より効率的な大量培養に資する知見を取得し、今後新規毒の構造解析を行うための研究基盤を固める。

（２）２年目の中間評価結果を踏まえた変更点

該当無し

Ⅱ 平成 21 年度研究成果報告

1 当該年度の研究目標

(1) 有毒藻の分子系統解析、有毒藻の簡易判別法および有毒藻の定量法の開発

日本沿岸域より、パリトキシン (PTX) 様中毒およびシガテラ中毒の原因藻と考えられている有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属藻類および *Gambierdiscus* 属藻類を多数分離する。このうち、本年度は、特に①*Ostreopsis* 属藻類を中心として分子系統解析を行い、その遺伝学的特性ならびに遺伝学的集団構造を解明する。

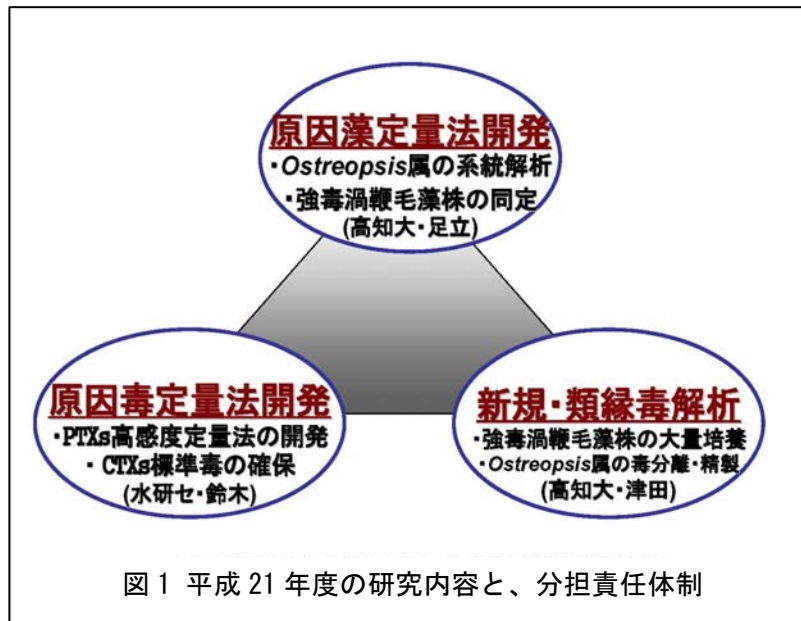


図1 平成21年度の研究内容と、分担責任体制

②同時に、マウスを用いた毒性試験により、強毒株を同定する。③また、*Gambierdiscus* 属藻類についても、マウスを用いた毒性試験により、強毒株を同定する。

(2) CTX s, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

LC-MS/MS による PTX 類の定量分析法の開発については、標準毒を対象に検液濃度として 100ng/ml 以下でも検出する手法を開発する。また、藻体や魚体中の毒の定量分析において、試料マトリクスの影響を調べ、試料マトリクスの影響を最小に抑えた抽出法や前処理、及び LC-MS/MS 分析条件を確立する。これらを踏まえ、①魚類を対象とした定量分析法として、国内公定法の規制基準値以下の毒でも正確に測定できる分析法を開発する。

LC-MS/MS による PTX 類の高感度同定法の開発は、明瞭なフルスキャン LC-MS/MS スペクトルを測定できる条件を確立するとともに、得られたスペクトルを化学構造に適切に帰属させることにより、②毒の同定を確実にするとともに、類縁体の検索を可能にするような手法を開発する。CTX 類の分析法を検討するためには標準毒を確保しなければならない。しかし、現在、CTX 標準毒は市販されておらず、また、所有する研究機関も極めてわずかである。高知大学や農林水産省並びに(独)水産総合研究センターの外交ルート等を利用して、CTX 類縁体標準毒を最低でも1毒成分は確保する。

(3) 有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析

日本より採取した *Ostreopsis* 属および *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻のうち、①有毒株に関して、高密度かつ効率的な培養法を確立する。なかでも、強毒性の *Ostreopsis* 属ならびに *Gambierdiscus* 属株については、②各々1株ずつ 100L 培養を実施し、③そのうち *Ostreopsis* 属藻類については、毒成分の分離・精製に着手し、毒成分の取得を検討する。

図1には、上記した1, 2, 3)の各内容の概要と、分担責任体制を示す。

2 平成 21 年度の主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果の概要

1) 有毒藻の分子系統解析、有毒藻の簡易判別法および有毒藻の定量法の開発

個別課題名① 有毒藻の分子系統解析 (担当：主任研究員・足立)

南日本海域より分離した *Ostreopsis* 属 150 株について、LSU rDNA の D8/D10 領域の塩基配列および、一部の株については、ITS 領域の配列を求め、これらの配列に基づき最尤法により分子系統樹を作成した。その結果、これらの株は 3 つのクレード A-C に明瞭に分かれた。クレード A は、地中海産の *O. ovata* と区別できないほど近縁であり、形態観察の結果も考慮した上で、*O. ovata* と同定した。クレード B は、クレード A とは明瞭に区別されうる新奇なクレードを形成するが、形態学的には *O. ovata* との明瞭な差異が認められず、隠蔽種である可能性が考えられた。クレード C については、上記したクレードとは明瞭に分岐しており、その細胞サイズが原記載とは一致しないものの、形態的特徴から *O. labens* であることが示唆された。これら 3 群は、いずれも沖縄県から四国沿岸域に混在して分布していたが、沖縄県には、クレード C の割合が多かった。

個別課題名② 微細藻のマウス毒性試験 (担当：主任研究員・足立)

シガテラの主たる原因藻 *Gambierdiscus* 属の日本産株を大量培養した後、「衛生試験法・注解 2005 (編 日本薬学会)」に記載されたシガテラ毒の抽出法に従って、その毒成分を抽出し、マウス毒性試験を行った。その結果、Kw070922-1 株を、マウス 1 匹あたり 5.0×10^5 cells 腹腔内投与した場合に、3 匹中 3 匹ともマウスが死に至り、その毒性値は 2.0×10^{-4} MU/1000cells と求まった。また、T070411-1 株を、マウス 1 匹あたり 2.8×10^6 cells 腹腔内投与した場合に、3 匹のマウスはいずれも死ななかった。また、パリトキシン様中毒の原因藻とされている *Ostreopsis* 属各クレード代表株の大量培養を現在行っており、これにより培養藻体を得られ次第、50%メタノール抽出による粗抽出画分を用いたマウス毒性試験を行う予定である。

2) CTXs, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

個別課題名① PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発 (担当：分担研究員・鈴木) LC-MS/MS による PTX 類の高感度かつ高精度な定量及び同定のための分析法を初めて開発した。別課題により国内及びイタリア地中海沿岸より収集した *Ostreopsis* 培養株 (国内 4 株、イタリア産 1 株) を本法により分析した結果、既知毒 3 成分 (パリトキシン、オストレオシン D、オバトキシン a) 及び未知類縁体 2 成分が検出され、LC-MS/MS 各種スペクトルによりパリトキシン類縁体であることが明らかになった。さらにパリトキシン様中毒の原因となっている代表的な魚であるアオブダイの筋肉を対象に無毒魚にパリトキシン標準毒を添加して本法により分析し、毒の回収率を検討した結果、回収率は約 90%であった。また、検出限界は目標とした 100ng/ml 検液を大きく上回る検出限界 10ng/ml の感度を達成した。

3) 有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析

個別課題名① *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の大量培養(担当:分担研究員・津田)

Ostreopsis s0662 株について、農学部培養コンテナにおける大量培養に適する培養条件の検討を行った結果、室戸海洋深層水を使った微量金属含有 SW II 培地をメンブランフィルターろ過滅菌が最適であり、培養容器はガラス製でオートクレイブ滅菌が必須であった。蛍光灯照明では 5000 lx 以上が増殖の加速に必須であった。炭酸水素ナトリウム添加は、本株の培養には不适当であり、代わりに酢酸ナトリウムを用いた場合には増殖に悪影響は与えなかった。現在までに *Ostreopsis* s0662 株について個別容器による 40L 容量の培養を行い、藻体を湿重量 12g 得て凍結乾燥後 1.2g であった。

個別課題名② *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の大量培養(担当:分担研究員・津田)

Gambierdiscus kw07922-1 株について、農学部培養コンテナにおける大量培養に適する培養条件の検討を行った結果、P-ES を 1~2% となるように添加した室戸海洋深層水をメンブランフィルターろ過滅菌が最適であり、培養容器はガラス製でオートクレイブ滅菌が必須であった。蛍光灯照明では 5000 lx 以上が増殖の加速に必須であった。プラトーに達する培養期間は 4 週間以上を要することが分った。現在までに *Gambierdiscus* kw07922-1 株について個別容器による 10L 容量の培養を行い、藻体を湿重量 3g 得た。

個別課題名③ 毒成分の精製・構造解析(担当:分担研究員・津田)

大量培養により得られた *Ostreopsis* s0662 株の藻体 0.2g について、毒成分の分離予備実験を行った。

(2) 全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

南日本産 *Ostreopsis* 属 150 株について、分子系統解析を行った結果、大きくクレード A-C に分かれた。クレード A は、*O. ovata* と考えられ、クレード B は新奇なクレードを形成するが、*O. ovata* の隠蔽種と考えられた。クレード C については、形態的特徴から *O. labens* であることが示唆された。*Ostreopsis* 属ならびに *Gambierdiscus* 属のマウス毒性試験を行った結果、いずれも有毒株が見出された。また、LC-MS/MS による PTX 類の高感度かつ高精度な定量分析法を初めて開発した。本法により、供試した *Ostreopsis* 培養株には、既知毒 3 成分 (PTX、オストレオシン D、オバトキシニン a) 及び未知なパリトキシニン類縁体 2 成分が検出された。さらに、無毒なアオブダイの筋肉試料に、PTX 標準毒を添加・分析した結果、回収率は約 90% であった。検出限界は、10ng/ml を達成した。また、両属藻類の中規模培養を行い、それぞれ培養藻体を得た。

2) 研究成果

(1) 有毒藻の分子系統解析、有毒藻の簡易判別法および有毒藻の定量法の開発

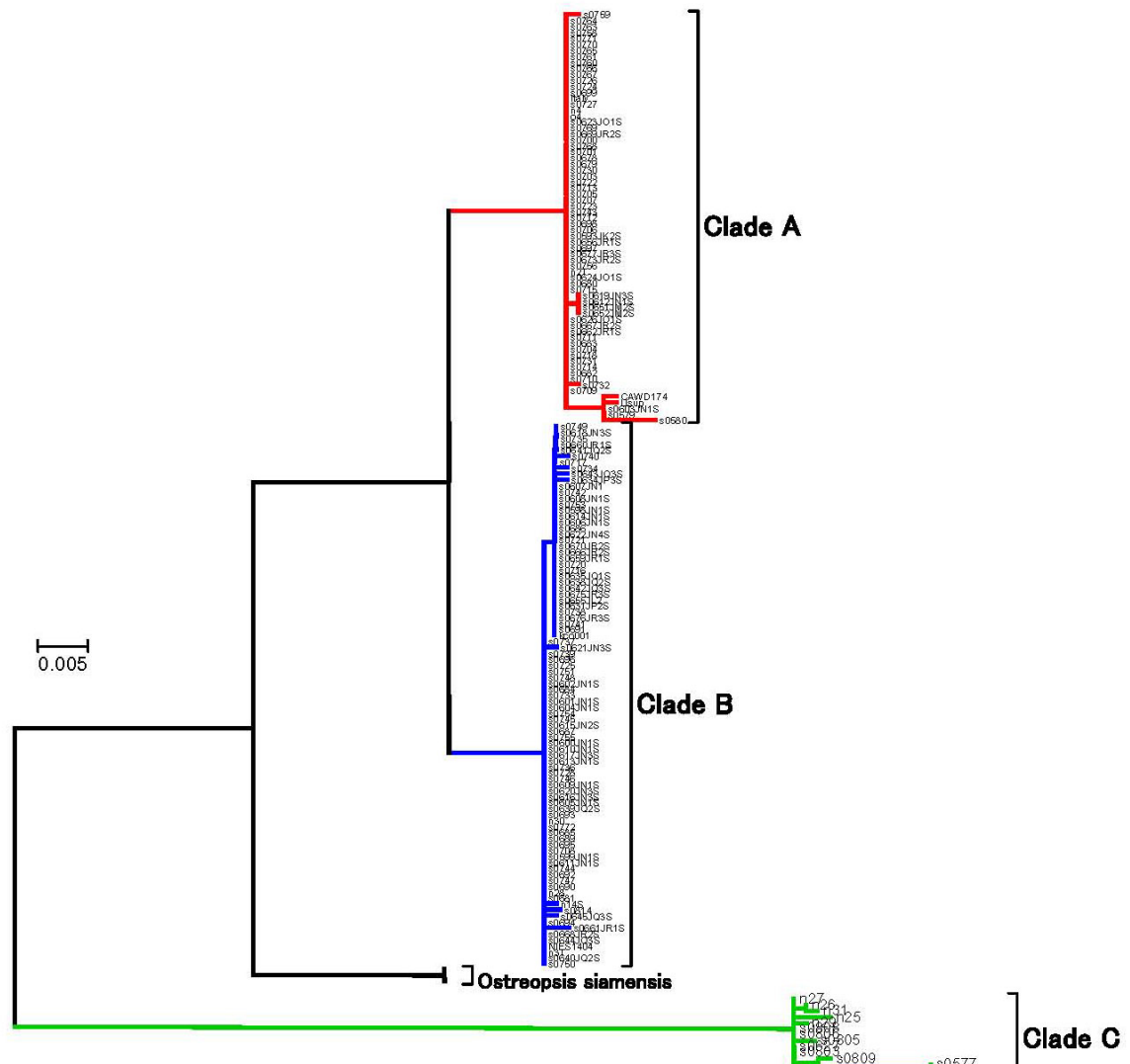


Fig. 1. 藻類付着性渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属の LSU rDNA D8-D10 領域による分子系統樹

沖縄から、九州、四国沿岸域を含む南日本海域 15 地点より、*Ostreopsis* 属の細胞を 1 細胞ずつ単離・培養することにより、およそ 120 株の新たな分離株を確立した。これらの株を用い、それらの LSU rDNA の D8/D10 領域を PCR 増幅した。得られた増副産物の配列を用いて、最尤系統樹を構築した。その結果、本邦産 *Ostreopsis* 属 150 株は、3 つのクレード(クレード A-C)に明瞭に分かれた(Fig. 1)。その結果、クレード A は、呼吸系疾患等を引き起こすことで問題となっている地中海・イタリア産の *O. ovata* と区別できないほど近縁であった。一方、クレード B は、上述したクレード A およびマレーシア産 *O. ovata* とは明瞭に区別されうる、新奇なクレードを形成することが判明した。また、クレード C については、上記した両クレードとは明瞭に分岐しており、マレーシア産 *O. lenticularis* のクレードに属したが、これとも明瞭に区別可能であった。また、*Ostreopsis* 属 A, B, C タイプ株を培養しこの藻細胞を回収後、99.5%メタノールを用いて毒画分を抽出し、これを蒸発・乾固させた試料を用いてマウス毒性試験を行った。その結果、これら各タイプ株の中には、マウス毒性を示すものが存在した。また、シガテラの主たる原因藻 *Gambierdiscus* 属の日本産株についても大量培養した後、「衛生試験

法・注解 2005（編 日本薬学会）に記載されたシガテラ毒の抽出法に従って、その毒成分を抽出し、マウス毒性試験を行った。その結果、Kw070922-1 株はマウス毒性を示したが、T070411-1 株はマウス毒性を示さなかった。

（考察及び結論）

本研究により、南日本海域には、系統的に 3 つの異なる *Ostreopsis* のタイプが分布していることが、初めて明らかとなった。これら 3 タイプ株を用いてマウス毒性試験を行った結果、いずれにも有毒株が存在することが明らかとなり、今後これらがどのような毒を生産するのか、LC-MS/MS 分析により、これら各タイプの株に含まれる毒成分やその含量について、詳細に検討する必要がある。

（2）CTX s, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

イオンスプレーイオン化法 (ESI) の陽イオンモードの条件で、C8 逆相カラムを用い、移動相としてギ酸、ギ酸アンモニウムを含む蒸留水 A およびアセトニトリル/蒸留水 (95 : 5) B のグラジエント分析によりパリトキシンの良好なクロマトグラフィーによる分離が得られた。LC-MS/MS では高感度かつ定量的な検出法であるマルチプルリアクションモニタリング法により、第一検出器 Q1 でパリトキシンの $[M+2H-7H_2O]^{2+}$ である m/z 1277 を選択し、コリジョンセル Q2 で生じたフラグメントイオン m/z 327 を第二検出器 Q3 で検出することにより極めて高精度かつ高感度なパリトキシンの検出・定量が可能になった（図 1）。

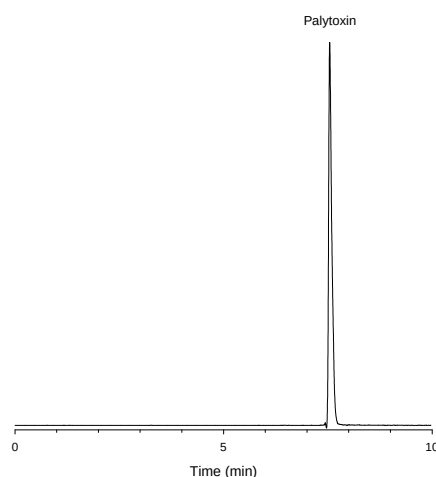


図1 パリトキシン標準毒のLC-MS/MSクロマトグラム

この検出条件を基礎にして、これまでに報告されているオバトキシナ_a やオストレオシン D などの PTX 類縁体 6 種類、さらに本課題で発見した新規類縁体 2 種類、計 8 類縁体の一斉分析条件を確立し、藻体及び魚体中の PTX 類縁体の迅速な分析法を確立した。

検討した各種 LC-MS/MS 法により、別課題「有毒藻の分子系統解析、有毒藻の簡易判別法および有毒藻の定量法の開発」により国内及びイタリア地中海沿岸で採取した *Ostreopsis* 培養株（国内 4 株、イタリア産 1 株）を分析した。その結果、既知毒

3成分（パリトキシン、オストレオシンD、オバトキシンa）及び未知類縁体2成分が検出された。イタリア地中海産の株からはオバトキシンa、パリトキシン、新規パリトキシン（#1）が検出された。一方、沖縄沿岸で採取した株からはオストレオシンDが検出された。また、高知県沿岸で採取したS0716株からはオバトキシンaが検出されS0662株からは新規パリトキシン（#2）が検出された。

アオブダイのパリトキシン様中毒の原因を究明する目的で、無毒のアオブダイの筋肉及び内臓の抽出にパリトキシン標準毒を添加して検液中のパリトキシン濃度を100ng/ml 及び1000ng/ml とした試料を本法のマルチプルリアクションモニタリング法で定量した結果、いずれの濃度でも筋肉では90%以上の回収率が得られた。

（考察及び結論）

本課題により PTX 類の高精度かつ高感度な定量・同定法が初めて開発された。本課題により検出されたパリトキシン、オバトキシンa、オストレオシンD、新規パリトキシン2成分のうちオバトキシンaと新規パリトキシン2成分については化学構造が解明されていないことから、今後、これらの毒を単離して化学構造を解明するとともに毒性を明らかにすることが重要である。

本課題で開発したLC-MS/MS分析法はアオブダイ中のPTX類縁体も高感度かつ高精度に定量・同定が可能である。今後、中毒検体の入手が可能になった場合には、パリトキシン様中毒の原因物質の解明に向けて極めて有効な分析法が開発されたといえる。

（3）有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析

Ostreopsis 属渦鞭毛藻の大量培養条件の検討として、500mL 容量（培地量 200mL）のオートクレーブ滅菌ガラス容器を用いて、SWⅡMM 室戸深層水（pH7.8、塩分 35）、光量 7,000lx、培養日数 28 日の環境条件にて、藻体収量が 28mg と最も高くなった。

上記の環境条件にて 200mL 容量深底シャーレ通算 200 個（1 ロット 40 個にて 5 回分）を用いて培養を行い、フィルター濾過、遠心により集藻し、藻体を湿重量 12g 得た。さらに凍結乾燥後 1.2g であった。本学農学部の培養コンテナにおいて、*Gambierdiscus* kw07922-1 株の大量培養条件の検討として、500mL 容量（培地量 200mL）のオートクレーブ滅菌ガラス容器を用いて、1%PES SWⅡMM 室戸深層水（pH7.8、塩分 35）、光量 7,000lx、培養日数 28 日の環境条件にて、藻体収量が 78mg と最も高くなった。RUN5 の環境条件にて 200mL 容量深底シャーレ通算 90 個（1 ロット 10 個 1 回と 40 個にて 2 回分）を用いて培養を行い、フィルター濾過、遠心により集藻し、藻体を湿重量 5.8g 得た。

（考察及び結論）

Ostreopsis 属および *Gambierdiscus* 属の培養には、室戸海洋深層水を使った SWⅡ 培地（塩分 35、pH7.8）および PES を 1（～2%）となるように添加した室戸海洋深層水をそれぞれメンブランフィルター（0.22 μm）ろ過滅菌した培地が最適であり、培養容器はガラス製でオートクレーブ滅菌が必須であった。照度は 5000 lx 以上、培養期間は 4 週間程度が適当であった。

Ⅲ 平成 22 年度研究成果報告

1 当該年度の研究目標

1) 有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明

本年度は、①日本沿岸域より分離したシガテラ原因藻 *Gambierdiscus* 属藻類の分子系統解析を重点的に行い、その遺伝学的特性ならびに遺伝学的集団構造を解明する。② *Ostreopsis* 属有毒タイプの株について、水温・塩分条件をはじめとする至適増殖条件ならびに毒生産条件を明らかにする。これにより、今後の地球温暖化の進行と共に、これらの熱帯・亜熱帯性藻類が発生するリスク評価に役立てると同時に、培養株の安定的維持や、より効率的な大量培養に資する知見を取得し、今後新規毒の構造解析を行うための研究基盤を固める。③遺伝的に異なる集団から構成されている日本沿岸域に分布する *Ostreopsis* 属藻類について、簡便かつ客観的にタイピング可能な分子生物学的手法を開発する。④上記した *Ostreopsis* 属藻類について、機器分析やマウス毒性試験により有毒株とされたものに関する定量法を開発するために、本属有毒タイプに特異的なプローブを開発する。このうち②については、21 年度に得られた結果に基づき、新たに項目として挙げたものである。なお、平成 22 年度の研究費増額分については、主として本項目の検討を行う研究員の人件費として使用する。

2) CTX s, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

LC-MS/MS による PTX 類の分析では、21 年度に分析法を確立することができたため、22 年度は別課題「有毒藻の分子系統解析、有毒藻の簡易判別法および有毒藻の定量法の開発」の藻体分析において 21 年度に分析できなかった株の分析を行う。また、同時に溶血活性についても調べる。本課題で発見した新規パリトキシン 2 成分及びオバトキシン a の単離と化学構造の解明は本課題の所期の目的には含まれていない。しかし、別課題「有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析」の進捗を補助するために、本課題で発見した新規パリトキシン等の精製・構造解析を実施する。また、アオブダイ中毒検体の入手を試み、入手ができた場合にはパリトキシン類縁体を本課題で開発した分析法で分析し、中毒原因物質を特定する。

LC-MS/MS による CTX 類の定量分析法の開発では、標準毒を対象に検液濃度として 100ng/ml 以下でも検出しうる手法を開発する。また、定量分析において、試料マトリクスの影響を調べ、試料マトリクスの影響を最小に抑えた抽出法や前処理、及び LC-MS/MS 分析条件を確立する。魚類を対象とした定量分析法として、国内公定法の規制基準値以下の毒でも正確に測定できる分析法を開発する。LC-MS/MS による CTX 類の高感度同定法の開発は、明瞭なフルスキャン LC-MS/MS スペクトルを測定できる条件を確立するとともに、得られたスペクトルを化学構造に適切に帰属させることにより、毒の同定を確実にするとともに、類縁体の検索を可能にするような手法を開発する。

3) 有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析

前年度確立した *Ostreopsis* 属培養株ならびに *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻を収集する。既存の毒生産株に関して、高密度かつ効率的な培養法を確立し、強毒性 *Ostreopsis* 属な

らびに *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻を各々3 および 2 株について 100L 培養を実施し、*Ostreopsis* 属と *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻については、毒成分の分離・精製に着手し、毒成分の取得を検討する。

2 平成22年度の主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果の概要

1) 有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明

個別課題① 有毒藻の分子系統解析 (担当:主任研究員・足立)

沖縄から四国、本州沿岸域を含む本邦沿岸域より単離・培養した *Gambierdiscus* 属について分子系統解析を行った結果、供試した本属藻類は5つの type (*Gambierdiscus* sp. type 1-5)に分かれることが判明した。本結果を既報の結果と照らし合わせたところ、本邦沿岸域には、従来その存在が報告されていた *Gambierdiscus* 属 2 タイプに加えて、遺伝的に異なる3つのタイプが存在することが新たに明らかになり、本邦の *Gambierdiscus* 属藻類は遺伝的に極めて多様なものから構成されることが明らかとなった。また、これまで本州・四国沿岸域には、無毒と考えられる *Gambierdiscus* sp. type 2 のみ分布し、有毒なタイプの存在は報告されていなかったが、本研究により複数の有毒なタイプが、本州・四国沿岸域に分布していることが初めて明らかとなった。

個別課題② 微細藻のマウス毒性試験 (担当:主任研究員・足立)

前年度の試験により、パリトキシン様中毒の原因藻とされている *Ostreopsis* 属ならびにシガテラの原因藻とされている *Gambierdiscus* 属のいずれの株についても、マウス毒性を有する有毒株を同定することができた。よって、本年度は、個別課題①および③以降の研究に専念することとし、マウス毒性試験は実施しない。

個別課題③ 有毒藻の至適増殖・毒生産条件の検討 (担当:主任研究員・足立)

パリトキシン様中毒の原因藻とされている *Ostreopsis* 属藻類に関して、昨年度の報告により日本沿岸域における優占種であることが判明した *Ostreopsis* クレード A および B に属する S0662 株および S0716 株の培養法ならびに至適増殖条件について検討した。その結果、これら2株は IMK 培地ならびに f/2 培地において最も高い細胞収量ならびに増殖速度を示した。次に、これらの水温・塩分に関する至適増殖条件について検討した結果、クレード A 株は水温 25℃と塩分 30 の条件下にて最大増殖速度 1.03 divisions/day および最大バイオマス量 253rel. fluol. を示した。また、クレード B 株は水温 25℃と塩分 35 の条件下にて最大増殖速度 0.549 divisions/day および最大バイオマス量 33.8 rel. fluol. を示した。また、クレード A 株について、本藻の毒生産条件について検討した結果、対数増殖期の細胞より定常期の細胞はより毒含量が高い傾向が認められた。

個別課題④ 有毒藻の簡易判別法の開発 (担当:主任研究員・足立)

パリトキシン様中毒の原因藻とされている *Ostreopsis* 属有毒株の簡易判別法を開発することを目指し、本属藻類株の 5.8S rDNA およびそれに隣接する内部スパーサー (ITS) 領域を PCR 増幅させ、制限酵素 *Mbo*II を用いてこれらの制限酵素切断片長多型 (RFLPs) を解析した。その結果、供試した本州・四国沿岸域より分離した本属藻類 22 株は、3つの切断パタ

ーンを示した。これらの PCR 増幅産物の塩基配列を決定した後、これらを用いて系統解析を行った結果、これらのパターンは、クレード A, B および C にそれぞれ対応することが判明した。よって、本手法を用いて、クレード A~C 株、なかでも有毒なクレード A, B 株を簡易に判別することが可能と考えられた。

個別課題⑤ 有毒藻に特異的な定量法の開発（担当：主任研究員・足立）

パリトキシン様中毒の原因藻とされている *Ostreopsis* 属有毒株に特異的な定量法を開発するために、昨年度報告した本属藻類のクレード A~D の LSU rDNA8/D10 領域においてそれぞれに特異的な塩基配列を検索し、これらの配列に結合する 4 種のプローブ・プライマーセットを設計・調製した。これらを、定量 PCR に供した結果、いずれも高感度（10 コピー以上検出可能）かつ高効率で（1.9~2.0）目的遺伝子を増幅可能であり、さらにこれらは目的とするクレードにそれぞれ特異的であることが判明した。また、これらのプローブ・プライマーセットと共にクレード A~D 各株の培養細胞を定量 PCR に供することにより、それぞれのクレードの細胞内に含まれる rDNA コピー数を明らかにすることができた。

以上の個別課題のうち、個別課題③については、21 年度に得られた結果に基づき、新たに項目として挙げたものである。

2) CTX s, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

個別課題名①PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発（担当：分担研究員・鈴木）

昨年度に本州沿岸で単離した *Ostreopsis* 培養株から検出されたオバトキシン a は、イタリア株から発見されたオバトキシン a とは異なるパリトキシン類縁体であることが明らかになり、オバトキシン a2 と命名した。また、本年度に新たに本州沿岸で単離した *Ostreopsis* 培養株について、20 株中 8 株からオバトキシン a2 を検出し、本州沿岸の *Ostreopsis* の主要毒はオバトキシン a2 であることが示唆され、本成分の毒性評価が今後、国内沿岸の *Ostreopsis* 属有毒渦鞭毛藻のリスクを評価する上で重要であると推測された。

個別課題名②CTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発（担当：分担研究員・鈴木）

Gambierdiscus 属有毒渦鞭毛藻が生産する主要毒 CTX3C を対象とする高精度かつ高感度な LC-MS/MS 分析法を開発した。国内沿岸で採取した *Gambierdiscus* 培養株から CTX3C は検出されなかった。近年、本州で散発的に発生しているシガテラ中毒の原因魚であるイシガキダイの筋肉を対象に、無毒魚に CTX3C 標準毒を添加して本法により分析し、毒の回収率を検討した結果、回収率は約 80% 以上であった。また、検出限界は目標とした 100ng/ml 検液を上回る検出限界 11ng/ml の感度を達成した。

3) 有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析

個別課題名① *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の大量培養（担当：分担研究員・津田）

構造解析用のパリトキシン様化合物を $100\sim 400\mu\text{g}$ ($1\sim 4\text{ pg/cell} \times 1,000\text{ cells/ml} \times 10^5\text{ ml}=100\text{L}$) 程度確保するために、*Ostreopsis* 株の大量培養を試みた。この際、別課題にて検討した培養条件を用いることにより、昨年度比でおよそ 5 倍の細胞収量 ($5,000\text{ cells/ml}$) が得られること、さらに本課題にて新たに開発した溶血試験を用いることにより、昨年度に比べ約 3 倍以上毒含量が高い高毒生産株 ($13\sim 15\text{ pg/cell}$) を得ること

とができたことから、これらを用いて効率的に大量培養を行うことにより、遺伝子タイプの異なる 3 株について、754~925 μ g のパリトキシン様化合物を含む藻体の確保に成功した。また、 ^{13}C ラベル炭酸水素ナトリウムを 0.1% 添加して同様の培養を実施したところ、その収量は上記のその 1/10 程度と低かった。

個別課題名② *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の大量培養 (担当: 分担研究員・津田)

本邦沿岸域に分布するシガテラ原因藻 *Gambierdiscus* 属藻類のうち、昨年度のマウスバイオアッセイ試験により有毒である可能性が高いタイプにそれぞれ属する 3 株を用いて、これらの大量培養を試みたが、いずれも増殖が安定せず増殖速度も低いことから、これを行うことは極めて困難であった。そこで、大量培養の基礎となる増殖に至適な培地について検討したところ、f10k、L2、f/2 および IMK/2 培地において良く増殖し、とりわけ IMK/2 培地を用いた場合、既報に比べ約 10 倍の最大細胞収量が得られたことから、本属藻類を大量培養するためには、本培地を用いて効率的に培養することが有効であると考えられた。

個別課題名③ 毒成分の精製・構造解析 (担当: 分担研究員・津田)

大量培養により得られた *Ostreopsis* s0752 株の藻体について、血液平板培地を用いた溶血試験を指標とした、溶媒抽出・分液、続くカラムクロマトグラフィーによる毒成分の分離実験により、パリトキシン様毒成分の単離を検討中である。

(2) 全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

本邦沿岸域に分布するシガテラ原因藻 *Gambierdiscus* 属藻類は、系統学的に多様なものから構成されることが明らかとなった。また、パリトキシン様中毒の原因藻と考えられている *Ostreopsis* 属藻類の水温・塩分に関わる至適増殖条件を解明した。さらに、本邦における優占種と考えられる 2 種について、その至適水温・塩分に関わる増殖特性がやや異なること、さらにこれらが産生する主要なパリトキシン類は、オバトキシン a2 であることを明らかにした。さらに、*Ostreopsis* 属藻類各種を特異的に検出可能な定量 PCR 用のプローブ・プライマーセットの開発に成功した。また、LC-MS/MS による CTX 類の高感度かつ高精度な定量分析法を開発し、魚などの筋肉中に含まれる CTX 類を定量的かつ高感度に検出可能であることを示した。さらに、簡易な溶血活性試験法を確立し、これにより選抜した高毒生産株の大量培養を行い、毒の構造解析に向けた藻体を確保した。

2) 研究成果

(1) 有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明

Gambierdiscus 属株を用い、これらの分子系統解析を行った。その結果、日本産株は 5 つの type (*Gambierdiscus* sp. type 1-5) に分かれた (Fig. 1)。このうち、*Gambierdiscus* sp. type 1 株および 2 株は、Kuno et al. (2010) における *Gambierdiscus* sp. type 1 および 2 にそれぞれ対応すること、さらに前者は Litaker ら (2009) により報告された *G. belizeanus* 等が構成するクレードに、後者は *G. caribaeus* 等が構成するクレードに位置するが、これらとは明確に異なる未記載種であることが判明した (Fig. 1)。

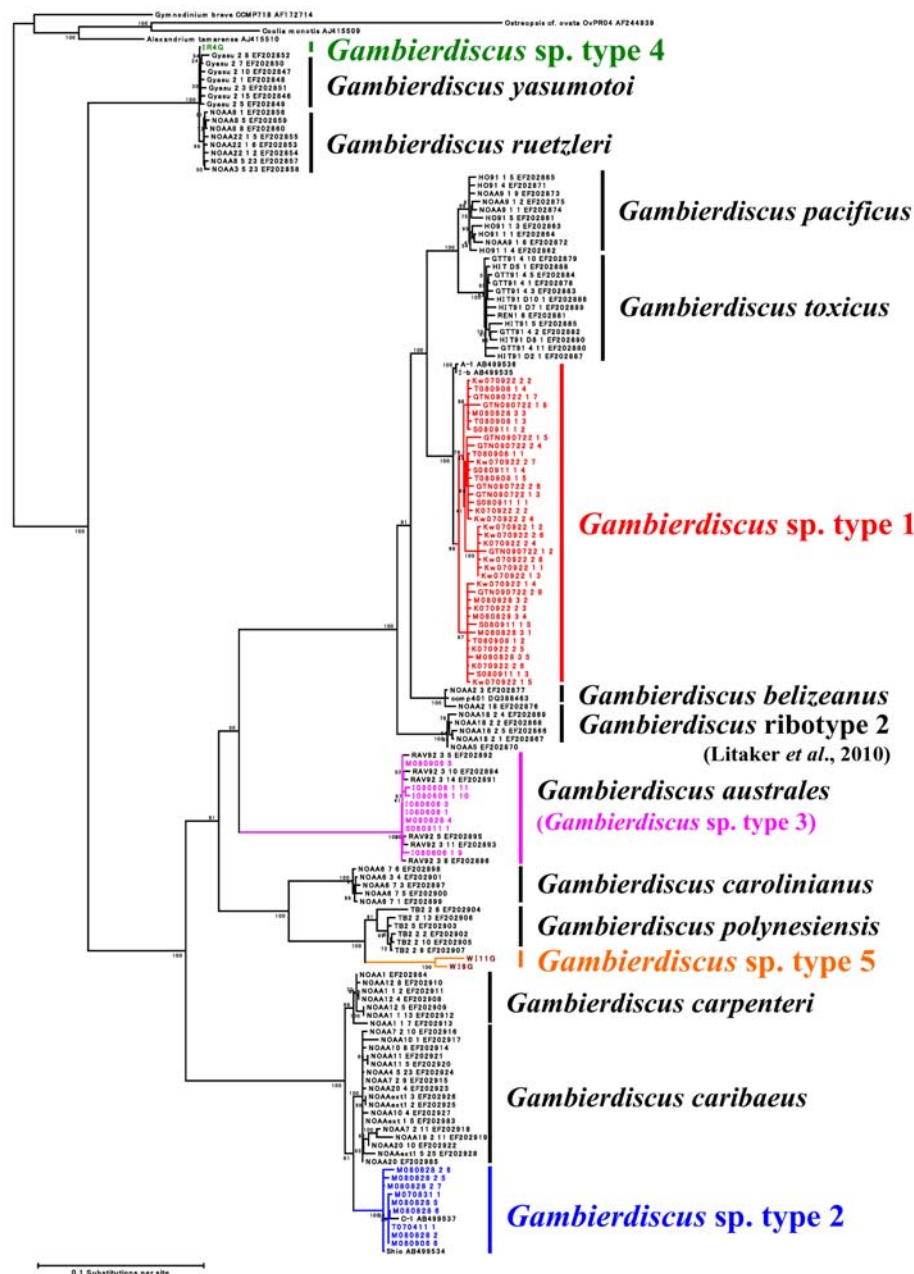


Fig. 1 シガテラ原因渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属の SSU rDNA による最尤系統樹
着色部位は、本研究により得られた結果を示す

Ostreopsis クレード A および B に属する S0662 株および S0716 株の 2 株は IMK 培地ならびに f/2 培地において最も高い細胞収量ならびに増殖速度を示した。さらに、クレード A 株は水温 25℃と塩分 30 の条件下にて最大増殖速度および最大バイオマス量を示した。また、クレード B 株は水温 25℃と塩分 35 の条件下にて最大増殖速度および最大バイオマス量を示した。

Ostreopsis 属有毒株の 5.8S rDNA およびそれに隣接する内部スペーサー (ITS) 領域を制限酵素 *Mbo*II を用いて制限酵素切断片長多型を解析した結果、供試した本州・四国沿岸域より分離した本属藻類 22 株は、3 つの切断パターンを示した。よって、本手法を用いて、クレード A~C 株、なかでも有毒なクレード A, B 株を簡易に判別すること

が可能と考えられた。さらに、*Ostreopsis* 属有毒クレード A~D の LSU rDNAD8/D10 領域の特異的な塩基配列に結合する 4 種のプローブ・プライマーセットを設計・調製した。これらを、定量 PCR に供した結果、いずれも高感度かつ高効率で目的遺伝子を増幅可能であり、さらにこれらは目的とするクレードにそれぞれ特異的であることが判明した。また、それぞれのクレードの細胞内に含まれる rDNA コピー数を解明した。

(考察および結論)

本邦沿岸域には従来報告されていた *Gambierdiscus* 属 2 タイプに加えて、遺伝的に異なる 3 つのタイプが存在することが新たに明らかになり、未記載種の type 1, 2, 5 を含めて、本邦産の *Gambierdiscus* 属藻類は遺伝的に極めて多様なものから構成され、前年の結果から、これらには有毒なものが多いことから、今回新たに開発した制限酵素切断片長多型解析は、これらの有毒種の簡易判別に有用と考えられた。また、リアルタイム PCR の基礎的条件設定が終了したため、今後はこれを現場試料の解析に応用可能なものにして、上記の有毒藻のモニタリングへの応用が期待される。また、上記の至適増殖試験の結果は、これらの毒分析用の大量培養を行う際に極めて有用と考えられた。

(2) CTXs, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

昨年度にイタリア株から発見した新規パリトキシン (#1) は、オバトキシン b (Toxicon, Ciminiello et al., in press) と同一成分であると推定された。また、新規パリトキシン (#2) については、本株の毒量が極めて低く、更なる構造解析に必要な量を得ることが困難であった。一方、S0716 株から検出したオバトキシン a は、イタリア株から検出されるオバトキシン a よりも逆相クロマトグラフィーでは遅れて溶出し、両者の保持時間が異なることが明らかになった。このことから前者はオバトキシン a とは異なる毒と判断し、オバトキシン a2 (オバトキシン a AC に名称を変更) と命名した。また、本州沿岸で採取した *Ostreopsis* 培養株 20 株の生産する主要なパリトキシンはオバトキシン a2 であることが判明した。

イオンスプレーイオン化法 (ISI) の陽イオンモードの条件で、C8 逆相カラムを用い、移動相としてギ酸、ギ酸アンモニウムを含む蒸留水 A およびアセトニトリル/蒸留水 (95 : 5) B のグラジエント分析により CTX3C の良好なクロマトグラフィーによる分離が得られた。LC-MS/MS では高感度かつ定量的な検出法であるマルチプルリアクションモニタリング法により、第一検出器 Q1 で CTX3C の $[M+NH_4]^+$ である m/z 1040 を選択し、コリジョンセル Q2 で生じたフラグメントイオン m/z 125 を第二検出器 Q3 で検出することにより極めて高精度かつ高感度な CTX3C の検出・定量が可能になった (次ページ図 1)。

また、 $[M+NH_4]^+$ から生じるフラグメントイオン $[M+H]^+$ m/z 1023 を選択することにより、ほぼ同様の感度で CTX3C が検出できることが明らかになり、得られるクロマトグラムも図 3 とほぼ同様であった。本年度検討した分析条件を用いて、本州沿岸で採取した *Gambierdiscus* 培養株 3 株を分析したが、CTX3C は検出されなかった。

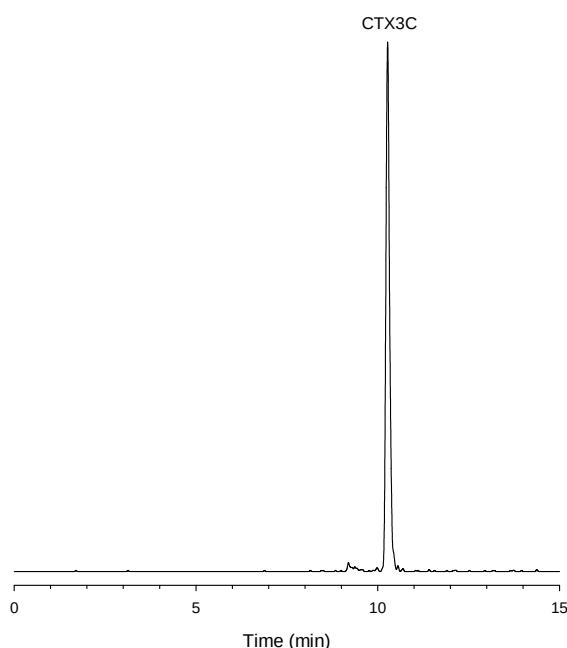


図1 CTX3C の LC-MS/MS クロマトグラム
選択イオン $[M+NH_4]^+$ m/z 1040>125

(考察及び結論)

今回国内産株から発見したオバトキシン a2 は 9 位から 78 位間で水酸基の還元部位が異なる異性体と推察された。また、本課題により CTX3C の高精度かつ高感度な定量・同定法が開発された。今後は、本法における前処理を高度化することにより、検出感度をより一層改善し、中毒発生レベル以下の魚においても CTX 類を検出できる手法に高度化できれば、シガテラ中毒のリスク評価技術の確立に向けて大きく前進させることができる。

(3) 有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析

まず、より効率的にパリトキシン関連化合物を得るために、毒含量の多い株を選抜・培養することが重要である。そこで、高毒株の簡便な選抜を目指し、溶血活性試験法について検討し、これを新たに開発した。本法を用いて *Ostreopsis* 属高毒株の選抜に成功した。

これらの高毒株を、前年度解明した至適培地を用い大量培養したところ、754~925 μg のパリトキシン関連化合物を含む藻体の確保に成功した。また、 ^{13}C ラベル炭酸水素ナトリウムを 0.1% 添加して同様の培養を実施したところ、上記の 1/10 程度の藻体を得られた。

本邦沿岸域に分布するシガテラ原因藻 *Gambierdiscus* 属藻類のうち、有毒タイプの株を用いて、大量培養の基礎となる増殖に至適な培地について検討したところ、f10k、L2、f/2 および IMK/2 培地において良く増殖し、とりわけ IMK/2 培地を用いた場合、既報に比べ約 10 倍の最大細胞収量を得られた。

大量培養により得られた *Ostreopsis* s0752 株の藻体について、血液平板培地を用いた溶血試験を指標とした、溶媒抽出・分液、続くカラムクロマトグラフィーによる毒成分の分

離実験により、パリトキシン様毒成分の単離を検討中である。

(考察及び結論)

馬血液平板培地を用いることで、*Ostreopsis* 属藻由来の溶血原因パリトキシン様毒素を定量可能であることが判明した。これを用いて本属高毒株の選抜に成功し、NMR による構造解析に供する試料を確保することができた。。さらに、本法を用いることにより、毒の精製過程における活性画分の追跡が容易となったため、これを用いたパリトキシン様毒成分の単離を検討中である。

IV 平成 23 年度研究成果報告

1 当該年度の研究目標

1) 有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明

23 年度は、22 年度に行った本邦産シガテラ原因藻 *Gambierdiscus* 属藻類の分子系統解析結果に基づき、これらの培養株を簡便かつ客観的に群別化可能な分子生物学的手法を開発する。また、22 年度に開発した *Ostreopsis* 属各クレードに特異的なプローブ・プライマーセットによる定量 PCR を行い、本藻を含む試料への適用性について検討することにより、現場試料に含まれる本属藻類を特異的かつ定量的に検出可能な手法を確立する。さらに、*Gambierdiscus* 属藻類についても、これに特異的なプローブ・プライマーセットを新たに開発する。これを用いて定量 PCR を行い、本藻を含む試料への適用性について検討することにより、現場試料に含まれる本属藻類を特異的かつ定量的に検出可能な手法について検討する。

2) CTXs, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

「PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発」では、アオブダイ中毒検体の入手を試み、入手した場合にはパリトキシン類縁体を本課題で開発した分析法で分析し、中毒原因物質を特定する。

「LC-MS/MS による CTX 類の定量分析法の開発」では、所期の目標である検液濃度として 100ng/ml 以下でも検出しうる手法の開発に成功した。来年度は前処理法を高度化することにより、検出感度を検液で 1 ng/ml 程度に上げることで、シガテラ毒魚のリスク評価手法として完成させることを目指す。また、*Gambierdiscus* から検出された CTX 様化合物の同定を行うために、CTX3C 以外の標準毒を入手して LC-MS/MS スペクトルを測定することにより、CTX 群から検出されるスペクトルの化学構造への帰属を行い、類縁体の同定を確実にするとともに、類縁体検索の精度を上げる。また、新たに四重極ー飛行時間型質量分析計を用いた高精度な CTX 類縁体の同定法について検討する。

3) 有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析

シガテラ原因藻 *Gambierdiscus* 属について、*Ostreopsis* 属と同様に、水温や塩分に関する至適増殖条件について検討する。この結果を踏まえて、本属株ならびに *Ostreopsis* 属株の大量培養を行い、構造解析に用いる藻体を確保する。また、本年度確保した *Ostreopsis* 属有毒株の藻体から抽出した画分等を用いることにより、本年度別課題にて明らかとなった新奇な Ovatoxin-a2 をはじめとするパリトキシン様関連化合物の精製ならびにその構造解析に取り組み、この解明を目指す。

2 平成23年度の主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果の概要

1) 有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明

個別課題④ 有毒藻の簡易判別法の開発 (担当:主任研究員・足立)

シガテラ原因藻 *Gambierdiscus* 属有毒株の簡易判別法を開発することを目指し、本属藻類株の ITS 領域を PCR 増幅させ、制限酵素 *Bst* I を用いてこれらの制限酵素切断片長多型 (RFLPs) を解析した結果、供試した本州・四国沿岸域より分離した本属藻類 40 株は、3つの切断パターンを示し、これらのパターンはタイプ 1、2、*G. australes* にそれぞれ対応することが判明した。よって、本手法により有毒なタイプ (種) を簡易に判別することが可能と考えられた。

個別課題⑤ 有毒藻に特異的な定量法の開発 (担当:主任研究員・足立)

昨年度開発した本 *Ostreopsis* 属のクレード A~D 株に反応する 4 種のプローブ・プライマーセットの有用性について、擬似現場試料ならびに現場試料を用いて評価した結果、これらを用いることによって種特異的かつ正確に各有毒種を定量・検出できることが判明し、本法を現場試料に適用可能であると判断した。また、シガテラ中毒の原因藻とされている *Gambierdiscus* 属有毒株に特異的な定量法を開発するために、昨年度報告した本属藻類のタイプ 1~3、*G. australes* の SSU rDNA 領域においてそれぞれに特異的な塩基配列を検索し、これらの配列に結合する 4 種のプローブ・プライマーセットを新たに設計・調製した。これらを、定量 PCR に供した結果、いずれも高感度 (10 コピー以上検出可能) かつ高効率で目的遺伝子を増幅可能であり、さらにこれらは目的とするタイプ (種) にそれぞれ特異的であることが判明した。また、これらのプローブ・プライマーセットを用いて、各タイプ (種) の株の培養細胞を鋳型として定量 PCR を行うことにより、それぞれのタイプの細胞内に含まれる rDNA コピー数を解明することができた。

2) CTX s, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

個別課題名①PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発 (担当:分担研究員・鈴木)

本年度、宮崎県延岡市及び東京都でアオブダイによるパリトキシン様中毒が発生し、中毒検体を入手した。本課題で開発したパリトキシン及びパリトキシン類縁体の LC-MS/MS 分析法を利用するために、中毒検体の前処理法を検討し、検体あたり検出限界は 0.5ppb 以下の超高感度分析が可能になった。本法により中毒検体中のパリトキシン及びパリトキシ

ン類縁体を検査したが、パリトキシンやわが国沿岸の *Ostreopsis* の主要毒であるオバトキシン a2 は検出されなかった。この結果からアオブダイのパリトキシン様中毒の原因毒はパリトキシン類ではないことが解明された。

個別課題名②CTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発（担当：分担研究員・鈴木）
昨年度検討した CTX3 を対象とした LC-MS/MS のマルチプルリアクションモニタリング法の分析条件を再検討し、*Gambierdiscus* の主要毒である CTX3C、CTX4A、CTX4B 一斉分析法を開発した。本法は *Gambierdiscus* 培養株の CTX の分析においては十分な感度を有する手法である。本州沿岸から採取した *Gambierdiscus* 培養株（25 株）を分析した結果、CTX3C、CTX4A、CTX4B は検出されず、本州沿岸から CTX 群を生産する *Gambierdiscus* 株を発見されなかった。さらに、中毒魚検体の鑑定を前提とした抽出・前処理法を検討し、最も感度が良い CTX3C では魚体あたり 0.1ppb 以下の毒を検出できる手法を開発した。

3) 有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析

個別課題名① *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の大量培養（担当：分担研究員・津田）

前年度までに得られた *Ostreopsis* 高毒生産株の 1 種について 63L 容量の大量培養を試みて、当初の予定通り数 mg 程度のパリトキシン用物質を含む藻体を確保した。

個別課題名② *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の大量培養（担当：分担研究員・津田）

シガテラ毒産生株について、44L 容量の培養を試みて、5.4g の藻体を確保した。一方、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 添加培養による培養を検討したが、藻の増殖は認められなかった。

個別課題名③ 毒成分の精製・構造解析（担当：分担研究員・津田）

Ostreopsis S0752 株の藻体 57g について、溶媒抽出・分液、続くカラムクロマトグラフィーによる毒成分の分離を行い、分子量 2646 を示すパリトキシン様物質 (20 μg) を分離した。本物質（オバトキシン aAC）は、42-hydroxy-16, 44, 70-trideoxypalytoxin と推定された。イタリアの *Ostreopsis* から発見されているオバトキシン a は 42-hydroxy-17, 44, 64-trideoxypalytoxin である。本課題で発見し構造を推定したパリトキシンは新規パリトキシンであった。

（2）全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

制限酵素 *Bst* I を用いた制限酵素切断片長多型 (RFLPs) 解析により、シガテラ原因藻 *Gambierdiscus* 属の有毒なタイプ（種）を簡易に判別することが可能となった。昨年度開発した *Ostreopsis* 属のクレード A~D 株に反応する 4 種のプローブ・プライマーセットを用いたリアルタイム PCR 法により、現場試料に含まれる有毒なタイプの本属細胞を種特異的かつ正確に定量・検出可能な手法を新たに開発した。また、中毒検体について、昨年度開発した LC-MS/MS 分析法を利用して分析したところ、アオブダイのパリトキシン様中毒の原因毒はパリトキシン類ではないことが解明された。CTX3C、CTX4A、CTX4B 一斉分析法を開発し、これを用いて国内産株を分析したがこれらの毒は検出されなかった。*Ostreopsis* 株より分子量 2646 を示すパリトキシン様物質 (20 μg) を分

離した。本物質は、その分子量より Ovatoxin-a (*J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 1869) の異性体であることが判明した。本異性体（オバトキシン aAC）は、42-hydroxy-16, 44, 70-trideoxypalytoxin と推定され、新規パリティキシンと考えられた。

2) 研究成果

(1) 有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明

個別課題④：有毒藻の簡易判別法の開発（担当：主任研究員・足立）

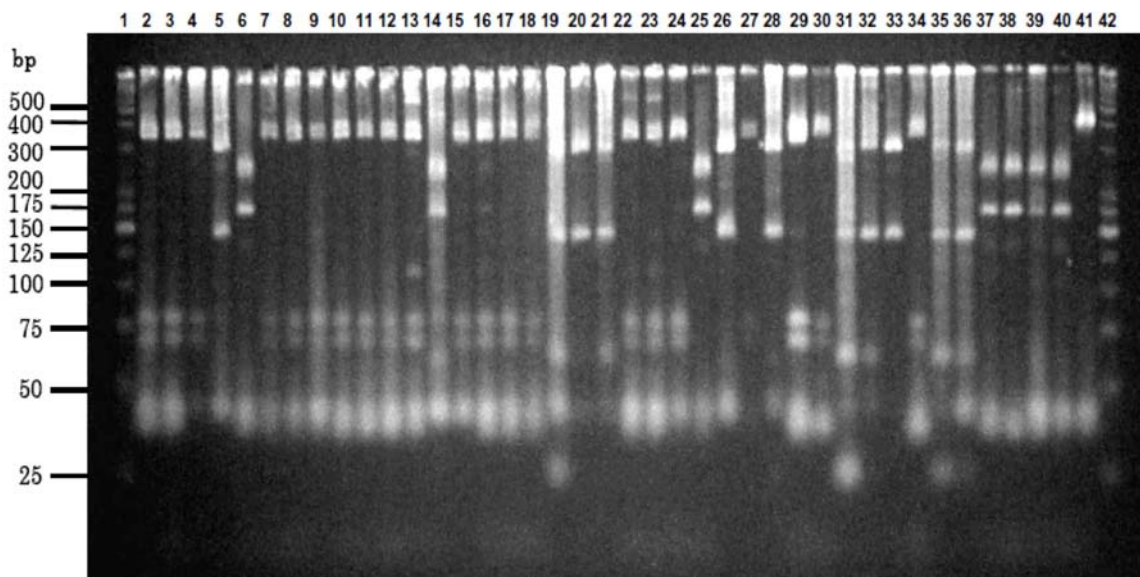


Fig. 1 本邦産 *Gambierdiscus* 属各株の制限酵素 *Bst* I を用いた RFLP s 解析の結果
各レーン、本州・四国沿岸域より分離した培養株に対応、

シガテラ原因藻 *Gambierdiscus* 属有毒株の簡易判別法を開発することを目指し、本属藻類株の 5.8S rDNA およびそれに隣接する内部スパーサー（ITS）領域を PCR 増幅させ、制限酵素 *Bst* I を用いてこれらの制限酵素切断片長多型 (RFLPs) を解析した。その結果、供試した本州・四国沿岸域より分離した本属藻類 40 株は、3 つの切断パターンを示し、これらのパターンは、タイプ 1、2、*G. australes* にそれぞれ対応することが判明した (Fig. 1)。よって、本手法により有毒なタイプ（種）を簡易に判別することが可能と考えられた。これら ITS 領域について、未消化の PCR 増幅産物の塩基配列を決定した後、これらを用いて系統解析を行った結果、これらのパターンは、昨年度報告したタイプ 1、2、*G. australes* にそれぞれ対応することが判明した。よって、本手法を用いて、有毒なタイプ（種）の株を簡易に判別することが可能と考えられた。

（考察および結論）

シガテラの原因藻 *Gambierdiscus* 属株の 5.8S rDNA およびそれに隣接する内部スパーサー（ITS）領域を PCR 増幅させ、制限酵素 *Bst* I を用いてこれらの制限酵素切断片長多型 (RFLPs) を解析することにより、当該培養株がタイプ 1、2、*G. australes* のいずれに属するかについて、簡易に判別することが可能となった。本手法は、本属藻類の培養株のグルーピングや簡易同定に極めて有用であると考えられる。しかし、現場海域にて発

生する本属藻類の発生状況や動態を明らかにするためには、後述するリアルタイム PCR（定量 PCR）法等を開発する必要がある。

個別課題⑤ 有毒藻に特異的な定量法の開発（担当：主任研究員・足立）

昨年度報告した本 *Ostreopsis* 属のクレード A~D 株にそれぞれ特異的であり、かつこれらを高感度に検出可能な 4 種のプローブ・プライマーセットを用いて、各有毒種を一定量ずつ添加・混合することにより調製した擬似現場試料に適用することにより、これらの定量性を評価したところ、種特異的検出が可能であり、さらに添加量が少ない対象種であっても、正確に定量・検出できることが判明した (Fig. 2)。

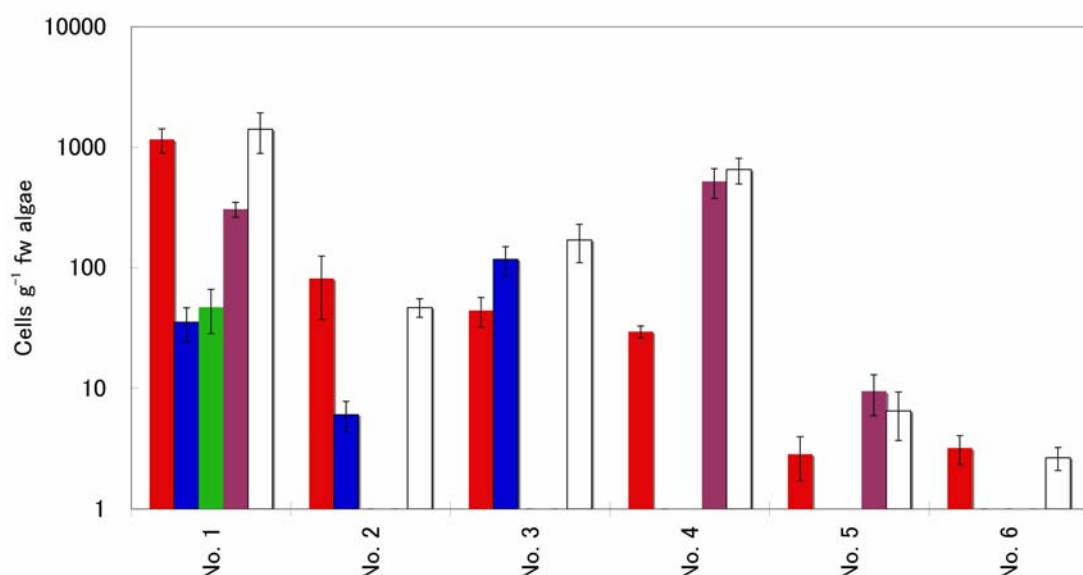
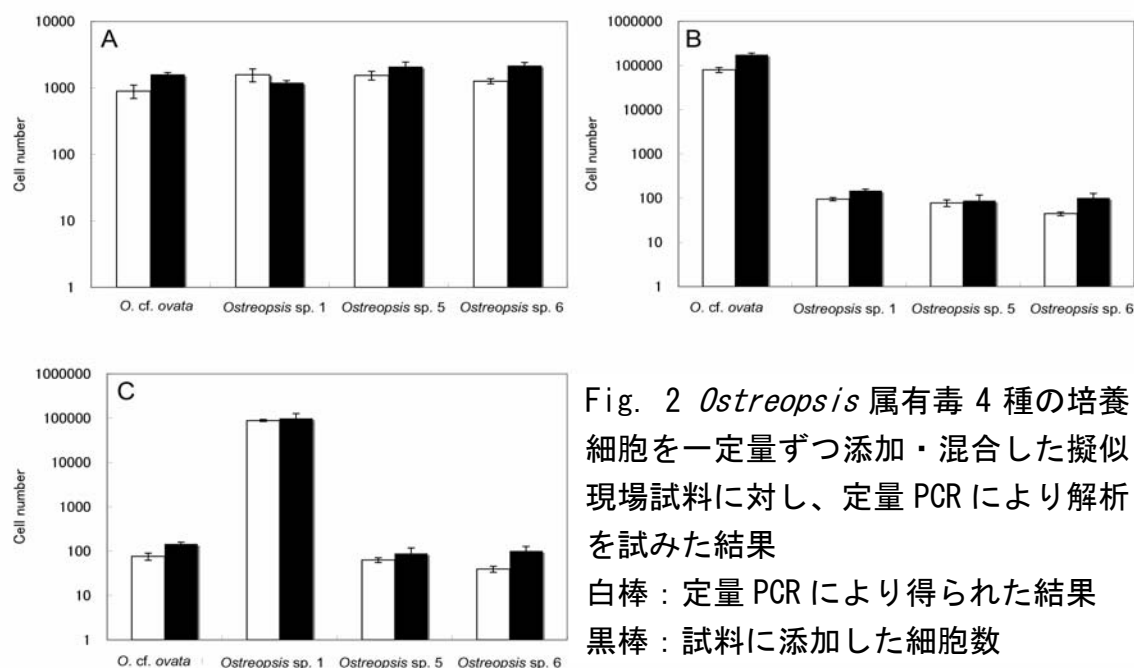


Fig. 3 *Ostreopsis* 属細胞を含む現場試料に対し定量 PCR を応用した結果
赤棒：クレード A プローブによる計数結果、青棒：クレード B プローブによる計数結果、緑棒：クレード C プローブによる計数結果、紫棒：クレード D プローブによる計数結果、白棒：顕微鏡による *Ostreopsis* spp. の計数結果

さらに、本法を本邦沿岸域より採取した現場試料に対して用い、その有用性について検討した。その結果、個々の有毒種細胞数を求めることができ、これら定量 PCR により求めた藻細胞数の合計値は、顕微鏡下における本属藻全体の細胞計数値とほぼ一致していたことから (Fig. 3)、本法の定量性は優れていると考えられ、Fig. 2 の結果も考え合わせて、本法は現場試料に適用可能であると判断した。

昨年度報告した *Gambierdiscus* 属藻類のタイプ 1~3、*G. australes* の SSU rDNA 領域においてそれぞれに特異的な塩基配列を検索し、これらの配列に結合する 4 種のプローブ・プライマーセットを設計・調製した。

これらが結合する領域を組み込んだプラスミドを調製し、これを鋳型として定量 PCR を行った結果、いずれも高感度 (10 コピー以上検出可能) かつ高効率で (1.9~2.0) 目的遺伝子を増幅可能であることが判明した。

さらに、様々な本属藻類株に加え、同じく藻類付着性の *Ostreopsis* 属や *Coolia* 属株も用いて、これらのプローブ・プライマーセットの特異性について検討した結果、これらは目的とするクレードにそれぞれ特異的であることが判明した。

また、これらのプローブ・プライマーセットを用いて、タイプ 1~3、*G. australes* の培養細胞あるいは現場細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型として定量 PCR を行い、それぞれのタイプ (種) の細胞内に含まれる rDNA コピー数について検討した結果、それぞれの細胞内コピー数が明らかになり、タイプ 3 株のそれは、タイプ 1 株のそれと比較して約 7 倍多いこと等、種によりそのコピー数が大きく異なることが判明した。

(考察および結論)

シガテラの原因藻である *Gambierdiscus* 属株の 5.8S rDNA およびそれに隣接する内部スパーサー (ITS) 領域を PCR 増幅させ、制限酵素 *Mbo*II を用いてこれらの制限酵素切断片長多型 (RFLPs) を解析することにより、当該培養株がタイプ 1、2、*G. australes* のいずれに属するのか、簡易に判別することが可能となった。本手法は、本属藻類の培養株のグルーピングや簡易同定に極めて有用であると考えられる。さらに、新たに開発した定量 PCR 法により、*Ostreopsis* 属有毒種の特異的検出・定量が可能となった。また、*Gambierdiscus* 属有毒種を特異的に検出するプローブセットを開発し、これらのプローブ・プライマーセットを用いて、各タイプ (種) の株の培養細胞を鋳型として定量 PCR を行うことにより、それぞれのタイプの細胞内に含まれる rDNA コピー数を解明することができた。今後は、本定量 PCR の現場試料への適用性を検討することが望まれる。

(2) CTXs, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

個別課題名①PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発 (担当: 分担研究員・鈴木)

平成 23 年 3 月 6 日に宮崎県延岡市でアオブダイを原因とする食中毒が発生した。さらに同年 10 月 26 日にも東京都でアオブダイを原因とする食中毒が発生した。いずれも患者の中毒症状からパリトキシン様中毒と診断された。宮崎県で発生した中毒検体はアオブダイの頭部を入手し、東京都で発生した中毒検体については頭部、内臓カレー煮付け、調理前の生の切り身を入手し、本研究で開発したパリトキシン及びオバトキシン a2 等パリ

トキシン類縁体の LC-MS/MS 分析法により鑑定した。

本課題で検討した LC-MS/MS 法の検出限界は 10ppb であり、EFSA が定めた食品中のパリトキシン暫定基準値 (30ppb) にも対応しうる感度である。しかし、中毒検体の鑑定にあたり、万全を期すために前処理法について再検討した。スキム 1 に本課題で検討した抽出・前処理手順を示す。

中毒検体からの抽出操作

- (1) アオブダイ (フライ用切り身, 頭部, カレースープ) 20g
- (2) 180mL 90%メタノールによりホモジナイズ
- (3) 3000rpm で 2 分間遠心分離し上澄み 20mL (2g 相当量) を取る * 1
- (4) 20mL ヘキサンを加えて攪拌分配により脱脂
- (5) ヘキサン層を除去した後, 20mL ヘキサンを加えて攪拌分配により再度脱脂する
- (6) 含水メタノールに蒸留水 8mL, 30mL クロロフォルムを加えて攪拌分配により脱脂する。
- (7) クロロフォルム層を除去した後, 30mL クロロフォルムを加えて攪拌分配により再度脱脂する
- (8) クロロフォルム層を除去した後, 含水メタノール層の溶媒をロータリーエバポレータにより除去する
- (9) 頭部とカレースープはメタノール: 蒸留水 (50:50, v/v) 1mL に溶解させ試料の一部 (20μL) を LC-MS/MS に注入。切り身はメタノール: 蒸留水 (5:95, v/v) 1mL に溶解させ試料の一部 (20μL) を LC-MS/MS に注入

スキム 1 中毒検体からパリトキシン類縁体を検出するための抽出・前処理手順

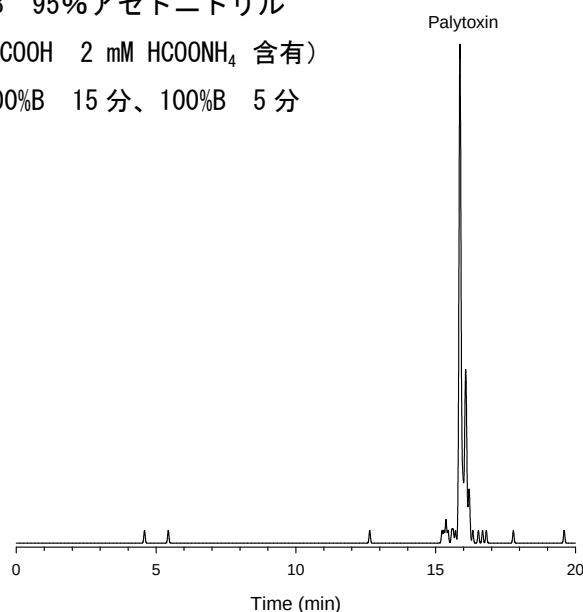
LC 分離条件

カラム: Hypersil C8 BDS (2.1x150mm)

移動相: A 蒸留水 B 95%アセトニトリル

(A、B ともに 50 mM HCOOH 2 mM HCOONH₄ 含有)

グラジエント 5%B→100%B 15 分、100%B 5 分



この抽出・前処理条件により中毒検体の鑑定を行った結果、パリトキシンやオバトキシン a2 を含めたパリトキシン類縁体は検出されなかった。本法の妥当性を確認するために、スキム 1 の 90%メタノール抽出液に 3ppb 相当量のパリトキシンを添加した。この量はアオブダイ試料では 30ppb となる添加量であり、EFSA が現在食品中のパリトキシンの暫定許容量として定めている量に相当する。図 1 にパリトキシン

図 1 パリトキシンを添加したアオブダイ切り身

抽出液の LC-MS/MS クロマトグラム

ンを添加したアオブダイ切り身抽出液の LC-MS/MS クロマトグラムを示す。明瞭なパリトキシンのピークが検出された。MS/MS 検出条件は平成 21 年度に検討した条件に基づき実施したが、LC 分離条件についてはグラジエント条件等について一部変更を行った。表 1 に添加した標準品の回収率と定量限界及び検出限界値を示す。

表 1 アオブダイ中毒検体に添加したパリトキシンの回収率と検出限界値

	回収率 (%)	定量限界値 (ppb)	検出限界値 (ppb)
頭部	58.3	1.18	0.35
カレースープ	66.7	1.50	0.45
切り身	57.1	1.60	0.48

いずれのサンプルにおいても回収率は約 60%程度であり、ほぼ良好な回収率が得られた。本分析法の定量限界と検出限界値は極めて低く EFSA 暫定許容量である 30ppb を遥かに超える 0.5ppb 以下のパリトキシンを検出する感度を有することから、中毒検体のパリトキシン同定法として十分に利用できる手法である。本分析法により中毒検体を検査した結果、アオブダイ中毒検体からはパリトキシンやその他のパリトキシン類縁体は検出されないことから、本年度、宮崎県と東京都で発生したアオブダイ中毒の原因毒は、パリトキシンやパリトキシン類縁体ではないことが明らかになった。

昨年度までの本課題により、高知県沖 *Ostreopsis* の主要毒は新規毒でありオバトキシン a2 であることが明らかになった。本年度は高知県沖から 2011 年 7 月から 9 月までの期間にハコフグを収集した (表 2)。筋肉、肝臓、肝臓を除いたその他の内臓に分けてアオブダイ中毒検体の分析法に従いパリトキシン類縁体の分析を行った。

表2 2011年に高知県沖で採取したハコフグ

No.	Place of collection	Month of collection	Body weight	Body length (mm)
A	Tei port, Konan City, Kochi Prefecture	29, July, 2011	298.2	19.4
B			361.6	21.2
C		1, August, 2011	257.98	19.7
D			294.28	20.8
E		23, August, 2011	412.57	21.5
F		28, September, 2011	328.95	20

表3 2011年に高知県沖で採取したウニ

Sample No.	Place of collection	Species (和名)	Month of collection	Shell length $\pm$ SD (cm)
1	Tei , Konan City, Kochi Prefecture	<i>Anthocidaris crassispina</i> (ムラサキウ)	5, October, 2011	3.75 $\pm$ 0.53 [n=4]
2		<i>Echinometra mathaei</i> (ナガウニ)	5, October, 2011	3.87 $\pm$ 0.56 [n=7]
3		<i>Anthocidaris crassispina</i> (ムラサキウ)	12, October, 2011	3.85 $\pm$ 0.51 [n=10]
4		<i>Anthocidaris crassispina</i> (ムラサキウ)	12, October, 2011	3.76 $\pm$ 0.51 [n=10]
5		<i>Echinometra mathaei</i> (ナガウニ)	12, October, 2011	3.79 $\pm$ 0.48 [n=10]
6		<i>Echinometra mathaei</i> (ナガウニ)	12, October, 2011	3.87 $\pm$ 0.25 [n=10]
7		<i>Tripneustes gratilla</i> (シラヒゲウニ)	12, October, 2011	7.3 [n=1]

一方、*Ostreopsis* が大量発生した海域に生息するウニからパリトキシン類縁体が検出された事例 (Toxicon 57、2011、390-399) があるため、高知県沿岸で 2011 年 10 月にウニを採取した (表 3)。高知県沖の *Ostreopsis* の主要毒がオバトキシン a2 であることから、この毒に注目してパリトキシン類縁体の分析を行ったが、ハコフグ及びウニからはパリトキシン類縁体は検出されなかった。

(考察及び結論)

本年度、宮崎県延岡市及び東京都でアオブダイ中毒が発生し、中毒検体入手し本課題で開発したパリトキシン類縁体の LC-MS/MS 分析法により鑑定した。鑑定で用いた分析法の定量限界と検出限界値は極めて低く、EFSA 暫定許容量である 30ppb を遥かに超える 0.5ppb 以下のパリトキシンを検出する感度であることから、中毒検体のパリトキシン同定法として十分に利用できる手法であったが、パリトキシン類縁体は検出されなかった。アオブダイ中毒は、パリトキシン様中毒と呼ばれ、その原因毒はパリトキシン類縁体とされ、厚生労働省のホームページにも記載されている。中

毒原因物質に関する知見は、中毒患者への治療等において極めて重要な知見である。本課題により中毒原因物質がパリトキシン類縁体ではないことがほぼ確定したことは、今後の本中毒の行政対策等において重要な知見である。一方、高知県沿岸の *Ostreopsis* の主要毒がオバトキシン a2 であることから、この毒に注目してハコフグやウニのパリトキシン類縁体の分析を行ったが、パリトキシン類縁体は検出されなかった。限定的な調査ではあるが、この調査により *Ostreopsis* を起源とするオバトキシン a2 の食物連鎖による高次生物への蓄積は確認せず、国内沿岸の底生生物によるパリトキシン類縁体を原因とする食中毒のリスクは低いと推察された。

個別課題名②CTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発（担当：分担研究員・鈴木）

図 2 に CTX3C、CTX4A、CTX4B 標準品混合液のマルチプルリアクション LC-MS/MS クロマトグラムを示す。表 4 に LC-MS/MS 分析条件を示す。CTX の検出は親イオンとして $[M+H]^+$ イオンを選択し、CTX の壊裂により生じる m/z 125 及び 155 のイオンを選択することにより高感度かつ選択性が高い CTX の検出が可能になった。これらのフラグメントイオンは CTX3C、CTX4A、CTX4B 全ての CTX から検出され、四重極一飛行時間型質量分析計（QTOF）による精密質量の測定から CTX の L 環の壊裂により生じるイオンと推定された。表 5 に CTX 標準品の検出限界値（LOD）及び定量限界値（LOQ）を示す。最も感度が良い CTX3C では 1ppb 以下の毒を検出できる手法を開発した。本

分析法は *Gambierdiscus* 培養株の CTX 検出法としては十分な感度を有することから国内沿岸で収集し培養した *Gambierdiscus* 株の分析を行った。その結果、CTX3C、CTX4A、CTX4B は検出されなかった（表 6）。一方、四重極一飛行時間型質量分析計（QTOF）による CTX 群の LC-MS 分析条件についても検討したが、標準品の分析において、トリプル四重極 LC-MS/MS による CTX 群の検出と比較して感度的に劣り、実試料の分析においても藻体や魚体マトリクスの影響を受けやすいことが明らかになり、QTOF LC-MS による CTX の分析法は、現時点では有効ではないとの結論に至った。

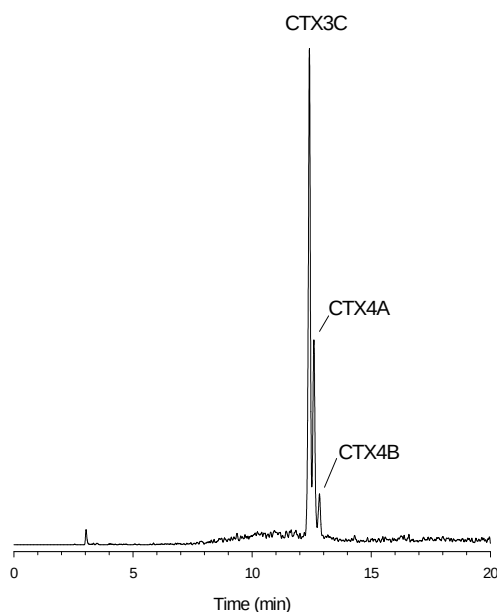


図 2 CTX3C、CTX4A、CTX4B 標準品混合液（100ppb）の LC-MS/MS クロマトグラム

表 4 CTX の LC-MS/MS 分析条件

カラム	Hypersil BDS C8 (2.1×50mm)	
移動相	A:蒸留水 B:95%アセトニトリル 含 0.1% ギ酸	
グラジエント条件	0-10min	30-100%B
	20min	100%B
	12min	30%B(平衡化)
カラム温度	20°C	
流速	0.2mLmin ⁻¹	
注入量	10 μL	

CTX 検出条件

DP : Declusterization Potential

CE: Collision Energy

	CTX3C	CTX4A, B
MRM m/z (Q1>Q3)	1023>125	1061>125
[M+H] ⁺ >	1023>155	1061>155
DP (V)	86	91
CE (V)	75	75

表 5 CTX 標準品の検出限界値 (LOD) 及び定量限界値 (LOQ)

	検出限界値 (ppb)	定量限界値(ppb)
CTX3C	0.59	1.96
CTX4A	1.32	4.40
CTX4B	6.40	21.32

表 6 *Gambierdiscus* 株の CTX 検出結果

Strains	CTX3C	CTX4A	CTX4B
S0080911-1	ND	ND	ND
KW070922-1	ND	ND	ND
W11G	ND	ND	ND
G1G	ND	ND	ND
K070922-2	ND	ND	ND
M080828-3	ND	ND	ND
T080908-1	ND	ND	ND
M080828-2	ND	ND	ND
G2G	ND	ND	ND
I080606-1	ND	ND	ND
M080828-4	ND	ND	ND
S4G	ND	ND	ND
W19G	ND	ND	ND
G18G	ND	ND	ND
G19G	ND	ND	ND
U1G	ND	ND	ND
W129G	ND	ND	ND
ON2G	ND	ND	ND
OI4G	ND	ND	ND
OI6G	ND	ND	ND
U2G	ND	ND	ND
M14G	ND	ND	ND
Ho-91	ND	ND	ND
RAV-92	ND	ND	ND
T070411-1	ND	ND	ND

次に本分析法を中毒魚検体の鑑定法とすることを前提に、魚体の CTX の抽出・前処理法について検討した。スキム 2 に本課題で検討した抽出、前処理手順を示す。前処理については、既報 (Anal Chem 2011, 83, 8886-8891) の前処理法等を参考に、本課題で検討した LC-MS/MS 法に応用するために検討した手順である。魚肉あたり 1ppb の CTX3C、CTX4A、CTX4B を添加したイシガキダイ試料を分析した結果、CTX3C と CTX4A については明瞭なピークが検出されたが、CTX4B についてはピーク強度が不十分であり、検出が困難であった (図 3)。表 7 に本分析における魚肉中の CTX の検出限界値 (LOD)、定量限界値 (LOQ) 及び回収率 (%) を示す。CTX4B についてはこの濃度でピークを検出することが困難であったが、CTX3C と CTX4A については、80%以上の回収率が得られた。また、定量限界も 0.5ppb 以下であることから、中毒検体の確認分析法として、CTX3C と CTX4A については利用可能であることが明らかになった。

魚体の CTX の抽出及び前処理法

抽出

- (1) 魚肉 5 g
- (2) 45mL 90% メタノールを加えてホモジナイズ
- (3) 遠心分離 (3000 rpm, 2 mi) して上澄み 20 mL (魚肉 2g 相当量) をとる
- (4) ヘキサン 20 mL を加えて分配し、ヘキサン層を捨てる (2 回繰り返す)
- (5) 90% メタノール 溶液に 蒸留水 8mL, クロロホルム 30 mL を加え攪拌
- (6) クロロホルム (下層) をとり保管
- (7) 含水メタノール層にクロロホルム 30 mL を加えて攪拌
- (8) クロロホルム層 (6) (7) を合わせてエバポレート

前処理

- (9) (8) の残渣を酢酸エチル-メタノール MeOH (9:1, v/v) 2mL に溶かして Sep-Pak Plus Florisil にとおす
- (10) カートリッジを酢酸エチル-メタノール MeOH (9:1, v/v) 2mL で洗浄
- (11) カートリッジ溶出物 (9) (10) の溶媒を除き、アセトニトリル 3mL に溶かす
- (12) アセトニトリル溶液を Sep-Pak Plus Short PSA にとおし、アセトニトリル 3mL でカートリッジを洗う
- (13) カートリッジをメタノール 3 mL で洗う
- (14) アセトニトリル溶離液 (12) とメタノール溶離液 (13) を合わせてエバポレーターで溶媒を除去し、メタノール 0.2mL に溶かす

スキム 2 CTX 群の抽出、前処理手順

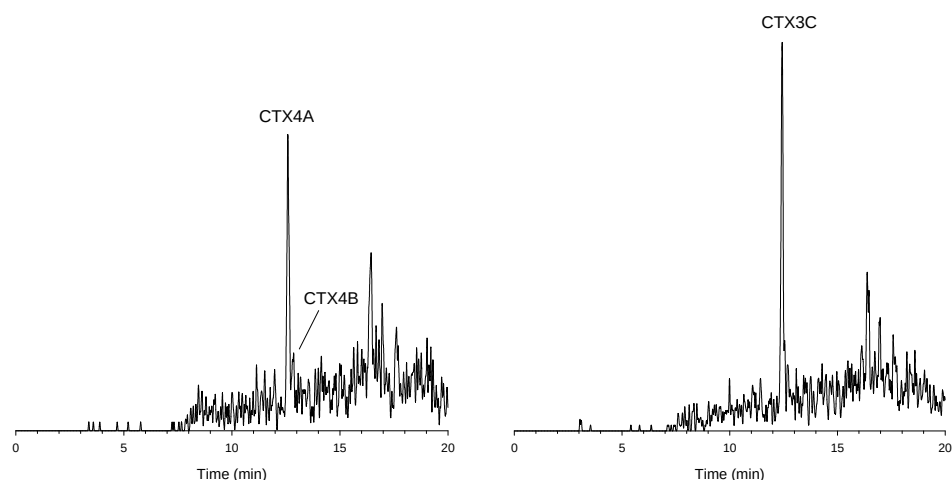


図3 CTXを添加したイシガキダイ（1ppb）のLC-MS/MSクロマトグラム

表7 イシガキダイの魚肉に1ppbの濃度となるように添加したCTXの検出限界値（LOD）、定量限界値（LOQ）及び回収率

	検出限界 (ppb)	定量限界(ppb)	回収率 (%)
CTX3C	0.08	0.28	84
CTX4A	0.14	0.46	115
CTX4B	—	—	—

（考察及び結論）

本年は *Gambierdiscus* の主要毒である CTX3C、4A、4B を対象に LC-MS/MS 分析法をより高感度な分析法に高度化し、国内で収集した 25 培養株の毒分析を行ったが、いずれの株からも毒は検出されなかった。現在、CTX 群の生産が確認されている *Gambierdiscus* 培養株は世界的に 3 株しか存在しない。わが国沿岸から単離した *Gambierdiscus* 培養株から CTX 群が検出された例も皆無である。LC-MS/MS 分析により、一部の株では CTX 類縁体の存在を示唆するデータが得られたが、分析用標準毒の量が限られていることから、類縁体の存在については十分な検討ができなかった。今後は、既知毒については *Gambierdiscus* 以外の生産種を検索するとともに、保有している *Gambierdiscus* 株については CTX 類縁体の検索と毒性について検討を進める必要がある。

一方、シガテラ魚による中毒は、CTX 含量の経口摂食で 70ng 程度でも発症すると推定されている。100 グラムの魚肉を喫食する場合、魚肉当たり 0.7ppb (0.7ng/g) の CTX が含まれている場合でも中毒症状を発症する可能性がある。本年度検討した魚肉を対象とした LC-MS/MS 分析法では、CTX3C と 4A の検出限界値は魚肉あたりそ

れぞれ 0.08、0.14ppb であった（表 7）。シガテラ中毒検体の鑑定において現在用いられている分析法はマウス毒性試験である。この手法は試料として少なくとも 120 グラム以上が必要であり、検出感度や特異性も低い。本課題で開発した LC-MS/MS 法は魚肉 5 グラムから分析が可能であり、CTX3C や CTX4A の検出法としては十分に中毒検体の鑑定にも使用できる手法である。一方、その他の主要毒である CTX4B や CTX1B の分析法については、今後の検討課題として残されたが、分析法の開発に当たっては一定量の標準毒が必要であり、この分野の研究を推進するためには標準毒の製造配付体制の整備が不可欠である。

3) 有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析

個別課題名① *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の大量培養（担当：分担研究員・津田）

新たに見出した高毒生産株 S0752 株について、IMK 培地あるいは IMK/2 培地を用い、28℃・塩分濃度 3.5‰の滅菌天然海水、光量 60~80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 条件の下で総計 63L の大量培養を行った結果、湿重量にて 57g 藻体の確保に成功した。

（考察及び結論）

高毒生産株 S0752 株について、総計 63L の大量培養を行った結果、湿重量にて 57g の藻体の確保に成功した。パリトキシン関連化合物の含有量が当初予想のとおりであれば、数 mg 得られることが期待される。

個別課題名② *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の大量培養

シガテラ原因藻 *Gambierdiscus* Kw07922-1 株について、IMK/2 培地において 28℃、滅菌天然海水、光量 60~80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 条件の下で総計 44L 培養を行い、乾重量にて 5.4g の藻体を確保した。

一方、毒性分の ^{13}C ラベル化体調整に必要な $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 添加実験を行った。シガテラ原因藻 *Gambierdiscus* Kw07922-1 株について、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を 0.1% 添加した各種培地において 28℃、滅菌天然海水、光量 60~80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 条件の下で 1L 培養を各 3 回検討した。結果として IMK/2 培地を除き藻の増殖が見られず、増殖の見られた IMK/2 培地においてもコントロールと比較して 1/30 程度の収量であった。

（考察及び結論）

Gambierdiscus Kw07922-1 株について、総計 44L の大量培養を行った結果、乾重量にて 5.4g の藻体を確保した。しかし、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ の添加実験では増殖が認められない、あるいは収量の激減が認められ、毒成分の ^{13}C ラベル化とそれを用いる構造解析は困難であった。

個別課題名③ 毒成分の精製・構造解析（担当：分担研究員・津田）

昨年度確保した *Ostreopsis* 属有毒株の藻体から抽出した画分を用いることにより、昨年度別課題にて明らかとなった新奇な Ovatoxin-a2 (Ovatoxin-aAC と改名) の化学特性について、四重極-飛行時間型 (QTOF) 質量分析計を用いて分析した。オバトキシン aAC の四重極-飛行時間型 (QTOF) 質量分析計により得られた m/z は 2647.5062 であり、組成式は $C_{129}H_{244}N_3O_{52}$ ($M+H$ 誤差 3.2ppm) と推定された。ここで推定された組成式はイタリアの *Ostreopsis* から発見されているオバトキシン a と一致した。図 1 には、QTOF LC-MS/MS により得られたオバトキシン aAC のスペクトルを示す。測定は陽イオンモードで行った。 m/z 997, 1372, 1400 はパリトキシンから得られるイオンと比較して 16 マスユニット低く、 m/z 2249 は 32 マスユニット低かった。その他のイオンは全てパリトキシンから得られるイオンと一致した。得られたスペクトルは全て精密質量が測定されているため、パリトキシンの構造への正確な帰属が可能である (図 2)。図 2 で示すように m/z 997 は C41-42 位間の解裂により生じ、 m/z 1372 は C49-50 位間の解裂により生じるイオンと帰属することができた。一方、C1-15 位、C78-115 位までの構造から生じるイオンについてはパリトキシンとオバトキシン aAC は完全に一致するため同一構造と推定した。C41 位の水酸基はフラグメンテーションを生じさせるために不可欠である。これらの結果からオバトキシン aAC は C16-20 位、C53-73 位の水酸基が欠損した構造であると推定された。さらに QTOF LC-MS/MS の陰イオンモードによる測定により、C42 位が酸化され、C44 位の水酸基が欠損した構造であることも明らかになった。

次に更なる構造解析のために、 m/z 1372 及び m/z 997 イオンを対象にイオントラップ型 LC-MS により生じるフラグメントイオンを測定した。図 3, 4 に m/z 1372 及び m/z 997 イオントラップ MS³ スペクトルを示す。 m/z 1372 及び m/z 997 は図 2 で示したように C50-115 位及び C1-41 位までの構造から生じるフラグメントイオンである。図 3, 4 で得られたフラグメントイオンはこれらの構造に帰属させることができたが、オバトキシン aAC の水酸基の欠損部位を特定するためには図 3, 4 の赤字で示したイオンが重要であった。 m/z 900 及び 905 イオンにより QTOF LC-MS/MS で推定された C53-73 位の水酸基の欠損部位は C70 位と特定することができた。また、 m/z 497 及び 527 イオンにより QTOF LC-MS/MS で推定された C16-20 位の水酸基の欠損部位は C16 位と特定することができた。以上の結果からオバトキシン aAC は 42-hydroxy-16, 44, 70-trideoxypalytoxin と推定された。イタリアの *Ostreopsis* から発見されているオバトキシン a は 42-hydroxy-17, 44, 64-trideoxypalytoxin である。本課題で発見し構造を推定したパリトキシンは新規パリトキシンであった。

High-resolution LC-MS/MS product ion spectra obtained for Ovatoxin a AC by Qtof LC-MS/MS

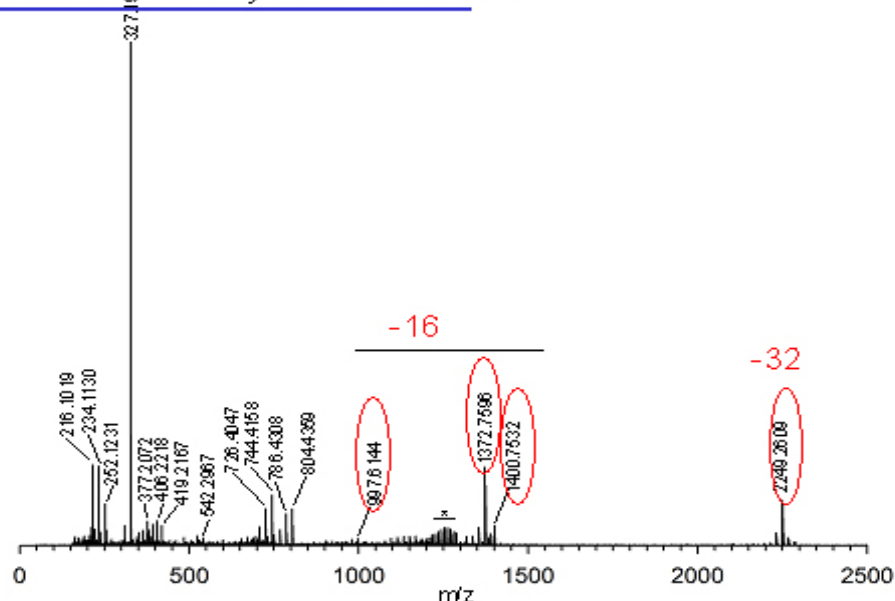


図1 オバトキシン aAC の QTOF LC-MS/MS スペクトル

Fragmentation diagram of QTOF MS/MS spectra of palytoxin

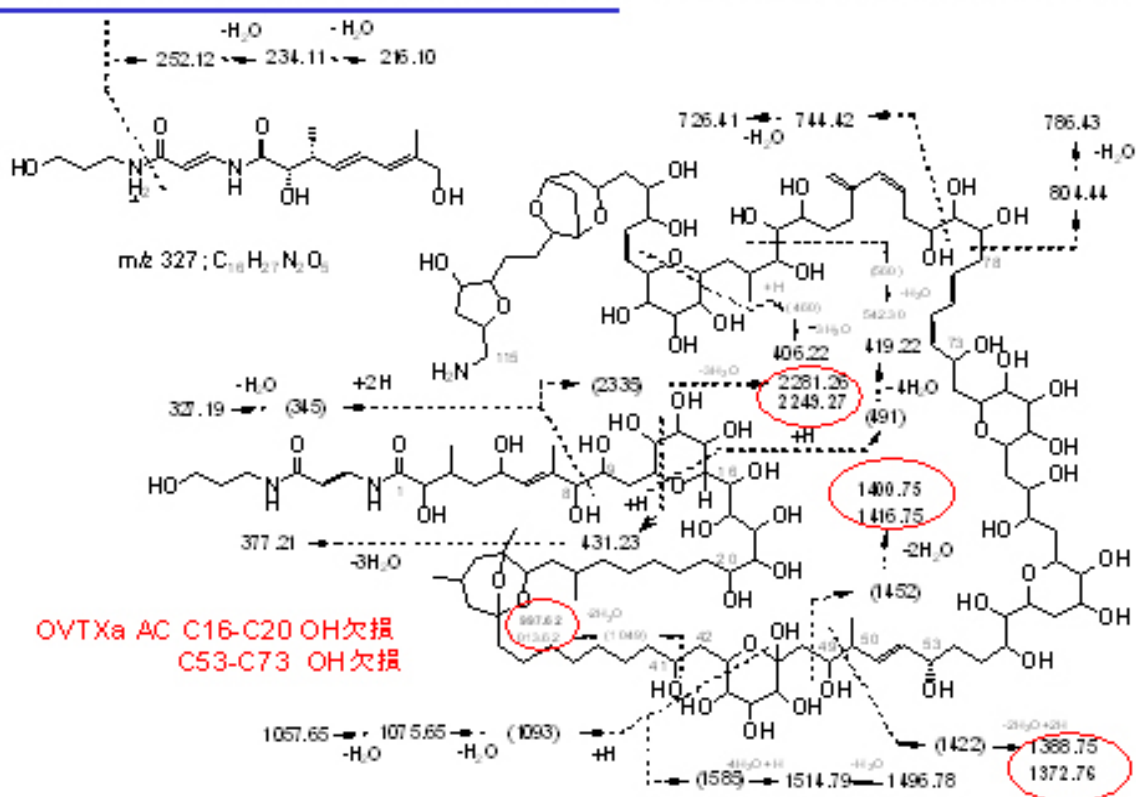


図2 オバトキシン aAC の QTOF LC-MS/MS スペクトルのパリトキシンの構造への帰属

MS3 spectrum @ m/z 1315.4 $\Rightarrow$ 1372.8
(OVTX a AC)

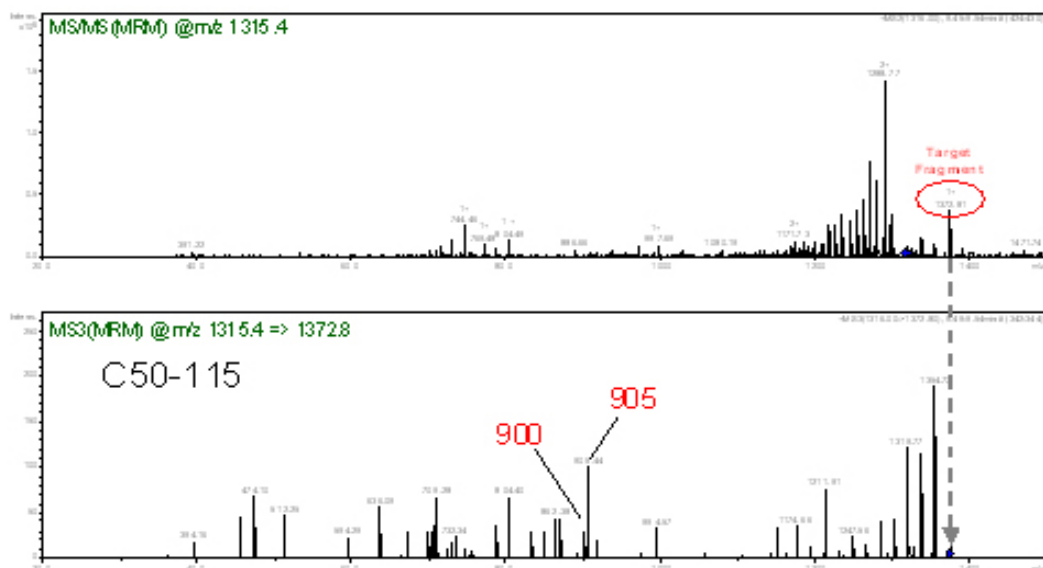


図3 m/z 1372 の MS³ フラグメントイオン

MS3 spectrum @ m/z 1315.4 $\Rightarrow$ 997.7
(OVTX a AC)

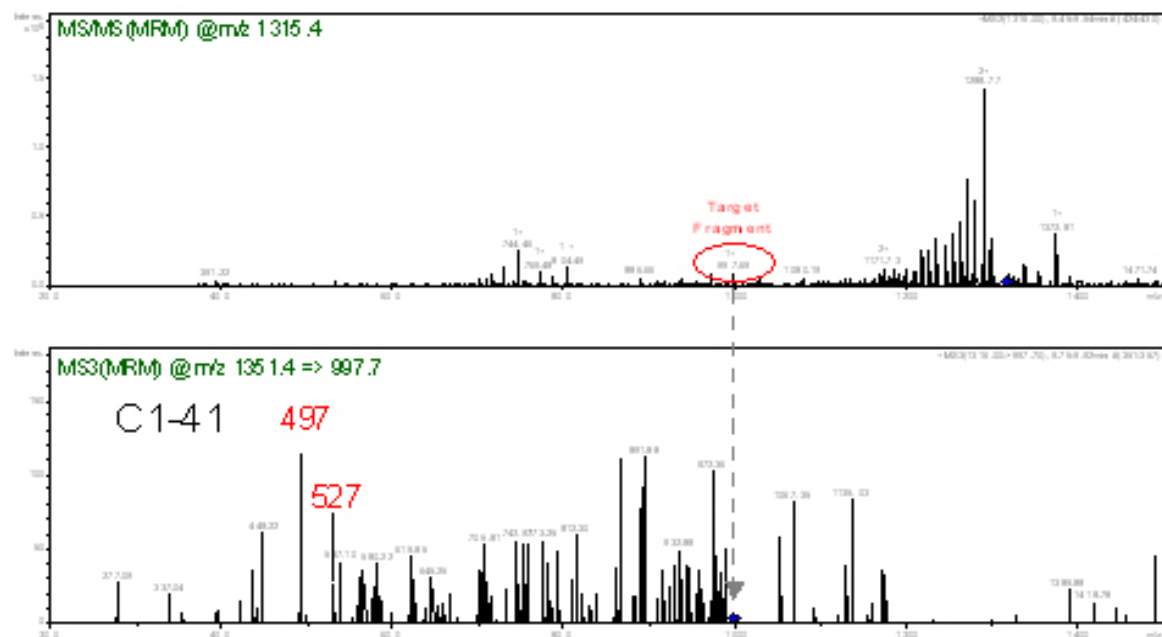


図4 m/z 997 の MS³ フラグメントイオン

Proposed fragmentation diagram of MS³ spectra of OVTXa AC

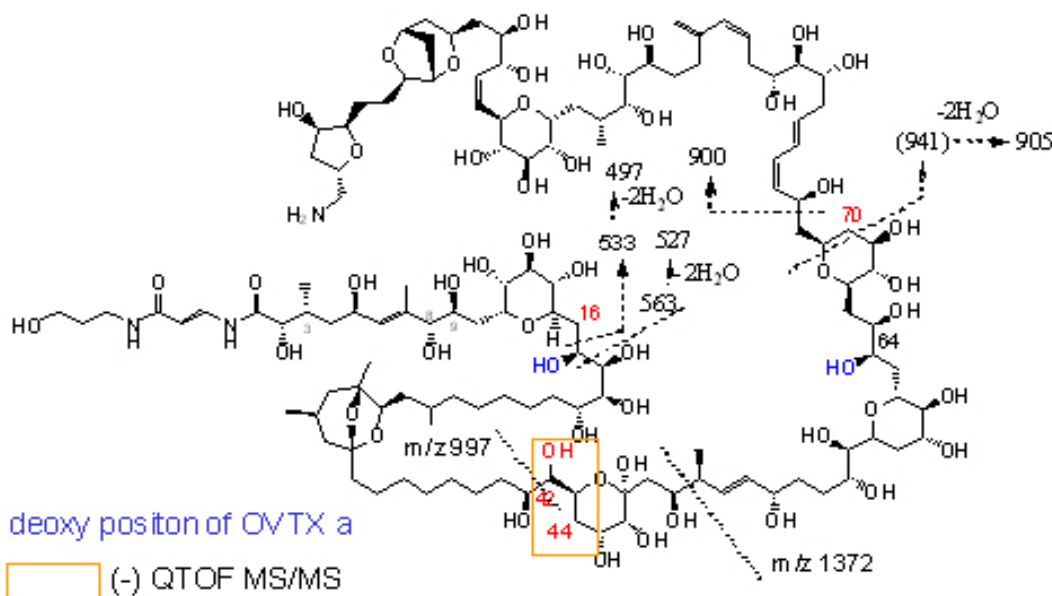


図5 m/z1372 及び m/z997 から生じる MS³ フラグメントイオンの帰属

3) 考察及び結論

Ostreopsis s752 株の産生する溶血毒素は、LC-MS を用いた追跡により行うことにより微量ながら得ることができた。分子量より Ovatoxin-a (*J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 1869) の異性体であることが判明した。本異性体 (オバトキシン aAC) は、42-hydroxy-16, 44, 70-trideoxypalytoxin と推定された。イタリアの *Ostreopsis* から発見されているオバトキシン a は 42-hydroxy-17, 44, 64-trideoxypalytoxin である。本課題で発見し構造を推定したパリトキシンは新規パリトキシンであった。今後、NMR 解析により、その立体構造が確定されることが期待される。現在のところ、本物質の溶血活性等の毒性評価は行っていないが、Palytoxin に類似した構造であることから、今後その毒性について評価することが望まれる。

V 研究期間を通じた全体の研究成果

1 3年間の主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果の概要

1) 有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明

個別課題①：有毒藻の分子系統解析 (担当: 主任研究員・足立)

南日本海域より分離した *Ostreopsis* 属 150 株について、分子系統解析を行った結果、

これらの株は3つのクレードA-Cに明瞭に分かれた。クレードAは、地中海産の *O. ovata* と区別できないほど近縁であり *O. ovata* と同定した。クレードBは、クレードAとは明瞭に区別される新奇なクレードを形成するが、その隠蔽種である可能性が考えられた。クレードCについては、*O. labens* であることが示唆された。また、沖縄から四国、本州沿岸域を含む本邦沿岸域より単離した *Gambierdiscus* 属についても分子系統解析を行った結果、供試した本属藻類は5つの type (種)に分かれることが判明した。本結果を既報の結果と照らし合わせたところ、本邦沿岸域には、従来その存在が報告されていた *Gambierdiscus* 属2タイプに加えて、遺伝的に異なる3つのタイプが存在することが新たに明らかになり、本邦の *Gambierdiscus* 属藻類は遺伝的に極めて多様なものから構成されることが明らかとなった。

個別課題② 微細藻のマウス毒性試験 (担当:主任研究員・足立)

Ostreopsis 属 A, B, C タイプ株を培養しこの藻細胞を回収後、99.5%メタノールを用いて毒画分を抽出し、これを蒸発・乾固させた試料を用いてマウス毒性試験を行った。その結果、これら各タイプ株の中には、マウス毒性を示すものが存在した。また、シガテラの主たる原因藻 *Gambierdiscus* 属の日本産株についても大量培養した後、「衛生試験法・注解 2005 (編 日本薬学会)」に記載されたシガテラ毒の抽出法に従って、その毒成分を抽出し、マウス毒性試験を行った。その結果、Kw070922-1 株をマウス毒性を示したが、T070411-1 株はマウス毒性を示さなかった。

個別課題③ 有毒藻の至適増殖・毒生産条件の検討 (担当:主任研究員・足立)

Ostreopsis 属 A, B, C タイプ株を培養しこの藻細胞を回収後、99.5%メタノールを用いて毒画分を抽出し、これを蒸発・乾固させた試料を用いてマウス毒性試験を行った。その結果、これら各タイプ株の中には、マウス毒性を示すものが存在した。また、シガテラの主たる原因藻 *Gambierdiscus* 属の日本産株についても大量培養した後、「衛生試験法・注解 2005 (編 日本薬学会)」に記載されたシガテラ毒の抽出法に従って、その毒成分を抽出し、マウス毒性試験を行った。その結果、Kw070922-1 株をマウス毒性を示したが、T070411-1 株はマウス毒性を示さなかった。

個別課題④ 有毒藻の簡易判別法の開発 (担当:主任研究員・足立)

パリトキシン様中毒の原因藻とされている *Ostreopsis* 属有毒株の簡易判別法を開発することを目指し、本属藻類株の ITS 領域を PCR 増幅させ、制限酵素 *Mbo* II を用いてこれらの制限酵素切断片長多型 (RFLPs) を解析した。その結果、供試した本州・四国沿岸域より分離した本属藻類 22 株は、3つの切断パターンを示した。本結果より、本手法を用いて有毒なクレード A, B 株を簡易に判別することが可能と考えられた。さらに、シガテラ原因藻 *Gambierdiscus* 属の ITS 領域を PCR 増幅させ、制限酵素 *Bst* I を用いてこれらの制限酵素切断片長多型 (RFLPs) を解析した結果、供試した本州・四国沿岸域より分離した本属藻類 40 株は、3つの切断パターンを示し、これらのパターンはタイプ 1、2、*G. australes* にそれぞれ対応することが判明した。よって、本手法により有毒なタイプ (種) を簡易に判別することが可能と考えられた。

個別課題⑤ 有毒藻に特異的な定量法の開発 (担当:主任研究員・足立)

パリトキシン様中毒の原因藻とされている *Ostreopsis* 属有毒株に特異的な定量法の開

発を目指し、本属 4 種のプローブ・プライマーセットを設計・調製した。これらを、定量 PCR に供した結果、いずれも高感度（10 コピー以上検出可能）かつ高効率で（1.9～2.0）目的遺伝子を増幅可能であり、さらにこれらは目的とするクレードにそれぞれ特異的であることが判明した。これら 4 種のプローブ・プライマーセットの有用性について、擬似現場試料ならびに現場試料を用いて評価した結果、これらを用いることによって種特異的かつ正確に各有毒種を定量・検出できることが判明し、本法を現場試料に適用可能であると判断した。また、シガテラ中毒の原因藻とされている *Gambierdiscus* 属有毒株に特異的な 4 種のプローブ・プライマーセットを新たに設計・調製した。これらを、定量 PCR に供した結果、それぞれのタイプの細胞内に含まれる rDNA コピー数を解明することができた。

2) CTXs, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

個別課題名①PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発（担当：分担研究員・鈴木）

LC-MS/MS による PTX 類の高感度かつ高精度な定量及び同定のための分析法を開発した。この手法により別課題により国内沿岸で採取した *Ostreopsis* 培養株を分析した結果、主要毒はイタリア地中海の *Ostreopsis* から発見されているオバトキシン a の異性体（オバトキシン a2）であることを明らかにした（平成 22 年度）。その後、国内沿岸の *Ostreopsis* の微量毒成分についての検索を続けた結果、オバトキシン b、d、e の異性体も発見し、国内沿岸に分布する *Ostreopsis* の毒組成の詳細を初めて解明した。なお、オバトキシン a2 は論文投稿にあたり、オバトキシン a AC と名称を変更した。

また、パリトキシン類縁体の一斉分析法を用いて、平成 23 年に宮崎県と東京都で発生したアオブダイ中毒の中毒検体を分析した。前処理条件を検討した結果、EFSA が定める食品中のパリトキシンの暫定許容量である 30ppb を大幅に超える 0.5ppb 以下の超高感度検出が可能な鑑定法を開発した。この手法により、パリトキシン類縁体の分析を行ったがパリトキシン類縁体は検出されずアオブダイ中毒の原因毒はパリトキシンやパリトキシン類縁体ではないことが初めて明らかになった。また、*Ostreopsis* を起源とするパリトキシン類縁体による食中毒被害のリスクを調べるために *Ostreopsis* が出現する海域のハコフグやウニの分析を行ったが、パリトキシン類縁体は検出されなかった。このことから、これらの生物によるパリトキシン類縁体による食中毒被害のリスクは低いと推察された。

個別課題名②CTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発（担当：分担研究員・鈴木）

Gambierdiscus の主要毒である CTX3C、CTX4A、CTX4B を対象に LC-MS/MS のマルチプルリアクションモニタリング法を用いた一斉分析法を開発した。本法は *Gambierdiscus* 培養株の CTX の分析においては十分な感度を有する手法である。本州沿岸から採取した *Gambierdiscus* 培養株（25 株）を分析した結果、CTX3C、CTX4A、CTX4B は検出されず、本州沿岸から CTX 群を生産する *Gambierdiscus* 株を発見されなかった。さらに、中毒魚検体の鑑定を前提とした抽出・前処理法を検討し、最も感度が良い CTX3C では魚体あたり 0.1ppb 以下の毒を検出できる手法を開発した。

3) 有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析

個別課題名① *Ostreopsis* 属渦鞭毛藻の大量培養 (担当: 分担研究員・津田)

パリトキシン様中毒原因藻 *Ostreopsis* 株のスクリーニング法として、新たに開発した溶血試験を行うことで簡便かつ安価に有毒株の選別ができることを見出した。得られた高毒性株の 1 種 S0752 株について IMK 培地あるいは IMK/2 培地を用い、28℃・塩分濃度 3.5‰の滅菌天然海水、光量 60~80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 条件の下で総計 63L の大量培養を行った結果、湿重量にて 57g 藻体の確保に成功した。

個別課題名② *Gambierdiscus* 属渦鞭毛藻の大量培養 (担当: 分担研究員・津田)

本邦沿岸域に分布するシガテラ原因藻 *Gambierdiscus* 属藻類のうち、昨年度のマウスバイオアッセイ試験により有毒である可能性が高いタイプにそれぞれ属する 3 株を用いて、これらの大量培養を試みたが、いずれも増殖が安定せず増殖速度も低いことから、これを行うことは極めて困難であった。そこで、大量培養の基礎となる増殖に至適な培地について検討したところ、f10k、L2、f/2 および IMK/2 培地において良く増殖し、とりわけ IMK/2 培地を用いた場合、既報に比べ約 10 倍の最大細胞収量が得られたことから、本属藻類を大量培養するためには、本培地を用いて効率的に培養することが有効であると考えられた。

個別課題名③ 毒成分の精製・構造解析 (担当: 分担研究員・津田)

Ostreopsis S0752 株の藻体 57g について、溶媒抽出・分液、続くカラムクロマトグラフィーによる毒成分の分離を行い、分子量 2646 を示すパリトキシン様物質 (20 μg) を分離した。本物質 (オバトキシン aAC) は、42-hydroxy-16, 44, 70-trideoxypalytoxin と推定された。イタリアの *Ostreopsis* から発見されているオバトキシン a は 42-hydroxy-17, 44, 64-trideoxypalytoxin である。本課題で発見し構造を推定したパリトキシンは新規パリトキシンであった。

(2) 全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

本邦産 *Ostreopsis* 属はクレード A-C に明瞭に分かれた。また、同 *Gambierdiscus* 属は 5 つのタイプ (種) に分かれた。これらの多くは、マウス毒性を示し有毒であった。これらの株に関して、RFLPs 解析ならびにリアルタイム PCR 法を用いて、これらの有毒種の特異的かつ高感度な検出ならびに定量法の開発にそれぞれ成功した。LC-MS/MS による PTX 類ならびに CTX 類の高感度かつ高精度な定量及び同定のための分析法を開発した。この手法により国内産 *Ostreopsis* 株を分析した結果、主要毒はオバトキシン a の異性体 (オバトキシン aAC) であった。原因毒の精製ならびに構造解析に先立ち、高毒株の選定、さらにこれらの至適培養条件を解明した。これらを用いて、大量培養を行うことにより、藻体を調製し、パリトキシン様物質を分離できた。本物質は、42-hydroxy-16, 44, 70-trideoxypalytoxin と推定され、新規パリトキシンと考えられた。一方、国内産 *Gambierdiscus* 属株については CTX 類が検出されなかった。また、本法を用いてアオブダイ中毒検体を分析したが、パリトキシン類縁体は検出されなかった。

2) 研究成果

1) 有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明

沖縄から、九州、四国沿岸域を含む南日本海域 15 地点より、岩礁域に繁茂する海藻を収集し、これに付着している微細藻類を剥離させ、顕微鏡の下で観察しながら、*Ostreopsis* 属の細胞を 1 細胞ずつ単離・培養することにより、およそ 120 株の新たな分離株を確立した。これらの株を含めて、*Ostreopsis* 属計 150 株を用い、ゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として LSU rDNA の D8/D10 領域を PCR 増幅した。この際、PCR 反応の阻害が見られた株については、DNA 精製キットを用いて、さらに DNA を精製した上で、PCR 増幅を行った。得られた増副産物について、常法により塩基配列を決定し、得られた配列および既報の株の配列を用いて多重配列を求め、続いて RAxML プログラムを用い最尤系統樹を構築した。その結果、本邦産 *Ostreopsis* 属 150 株は、3 つのクレード(クレード A-C)に明瞭に分かれた (Fig. 1)。同時に、各クレードの代表株については、5.8S rDNA およびそれに隣接する内部転写スペーサー領域 (ITS) の配列についても、上記と同様の方法で配列を求め、これに基づいて分子系統樹を構築した。その結果、クレード A は、呼吸系疾患等を引き起こすことで問題となっている地中海・イタリア産の *O. ovata* と区別できないほど近縁であった。一方、クレード B は、上述したクレード A およびマレーシア産 *O. ovata* とは明瞭に区別されうる、新奇なクレードを形成することが判明した。また、クレード C については、上記した両クレードとは明瞭に分岐しており、マレーシア産 *O. lenticularis* のクレードに属したが、これとも明瞭に区別可能であった。

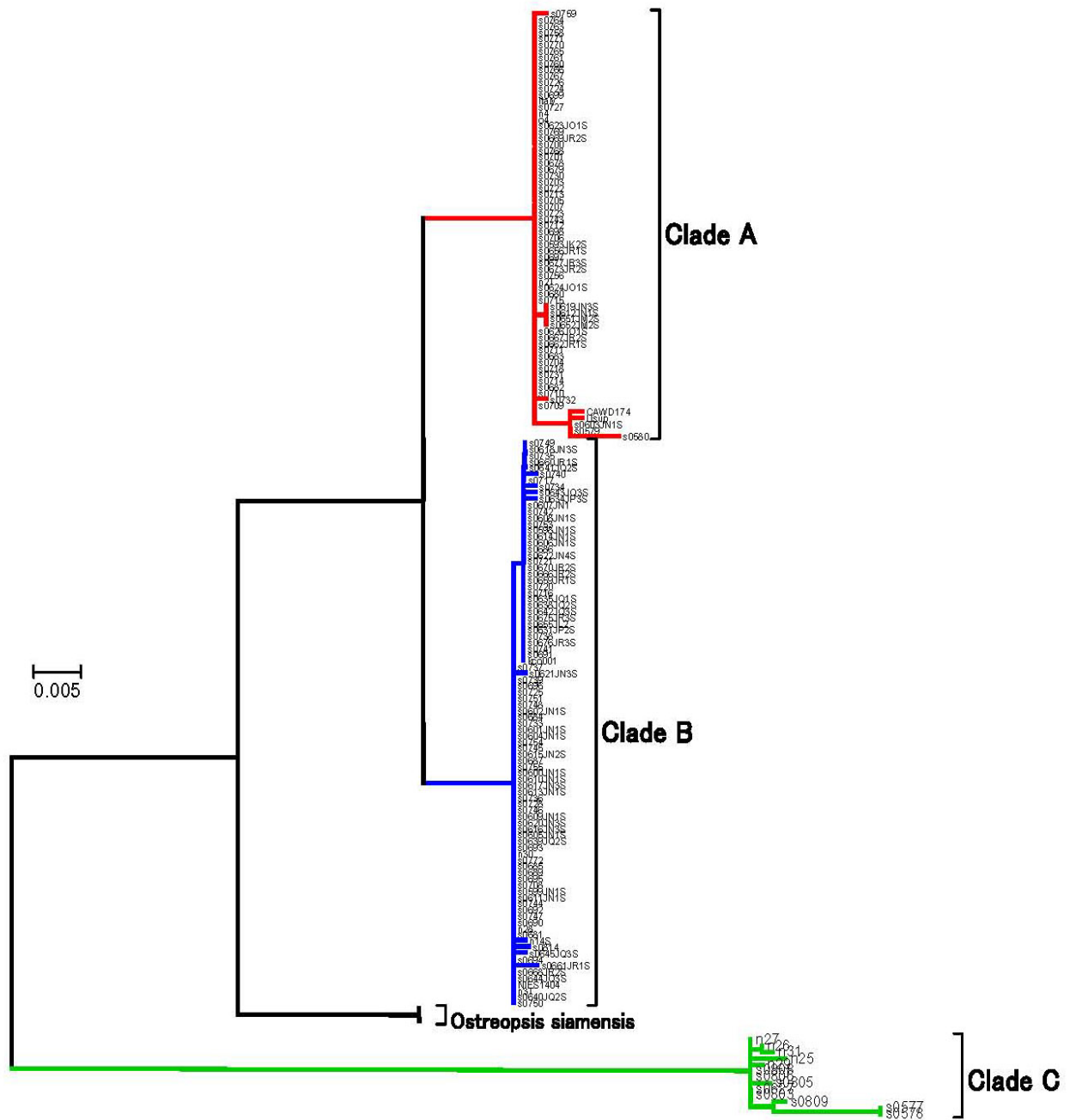


Fig. 1. 藻類付着性渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属の LSU rDNA D8-D10 領域による分子系統樹

沖縄から四国、本州沿岸域を含む南日本海域各地点より、単離・培養した *Gambierdiscus* 属株を用い、これらの SSU rDNA を PCR 増幅した。得られた増副産物の塩基配列を決定し、最尤系統樹を構築した。その結果、供試した南日本産本属藻類は 5 つの type (*Gambierdiscus* sp. type 1-5) に分かれた (Fig. 2)。

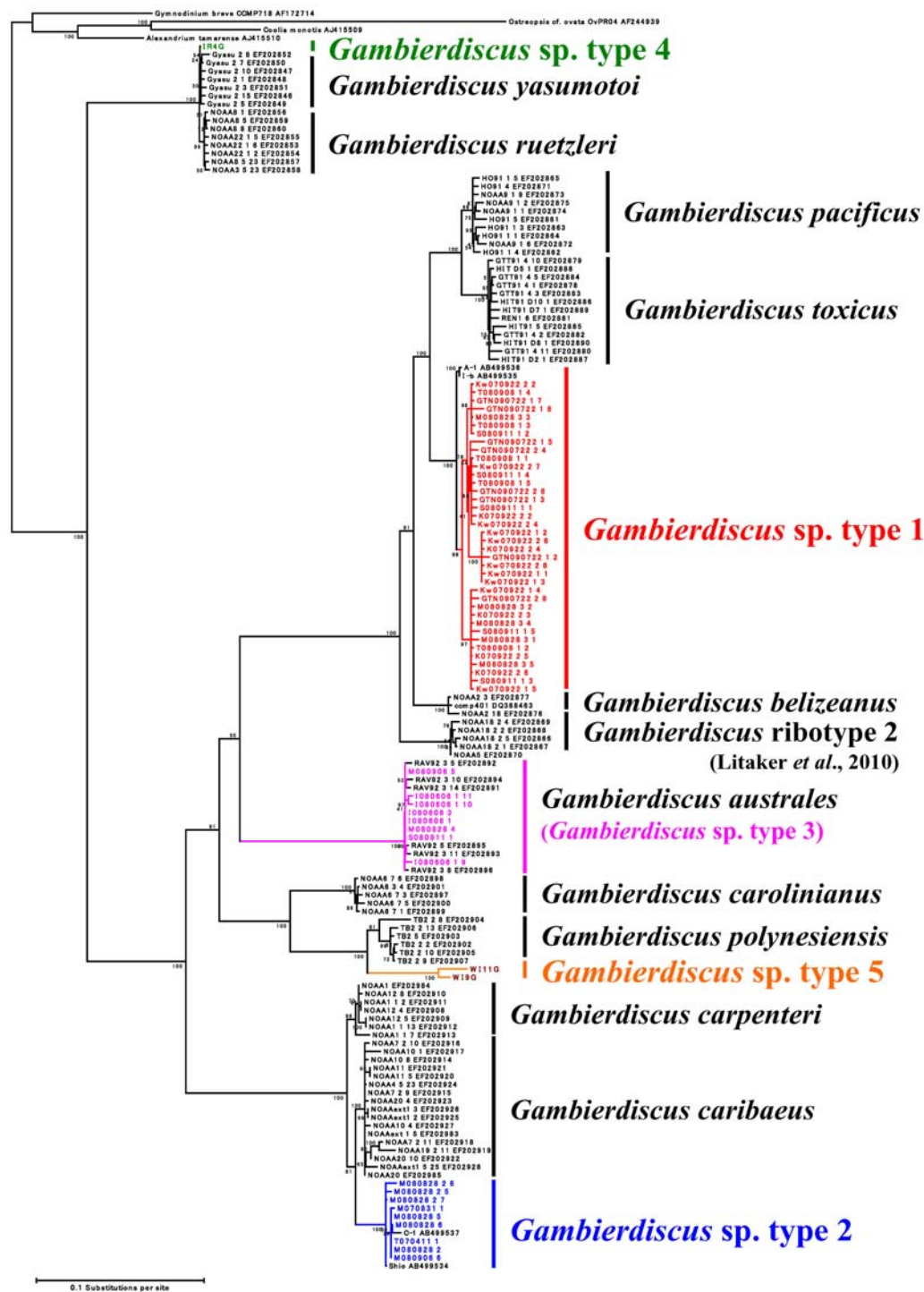


Fig. 2 シガテラ原因渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属の SSU rDNA による最尤系統樹
着色部位は、本研究により得られた結果を示す

また、*Gambierdiscus* sp. type 3 株は *G. australes* に極めて近縁であること、*Gambierdiscus* sp. type 4 株は *G. yasumotoi* / *G. ruetzleri* に極めて近縁であることが明らかとなった (Fig. 2)。さらに *Gambierdiscus* sp. type 5 株は *G. carolinianus* / *G. polynesiensis* の構成するクレードに位置するが、これらとは明確に異なる新奇クレードを形成することが明らかとなった (Fig. 2)。

パリトキシン様中毒の原因藻とされている *Ostreopsis* 属およびシガテラの主たる原

因藻である *Gambierdiscus* 属の毒性を評価するために、これらをマウスバイオアッセイに供し、毒性の強い株を特定しようとした。まず、前者については、クレード A, B, C に属する代表株を大量培養し、得られた藻体について Taniyama et al. (2002) の方法により、メタノール抽出に続いてジエチルエーテル分画、最後にブタノール分画を行うことにより、毒成分の抽出・精製を試みた。これらの画分について、分担研究者の鈴木が、LC-MS/MS を用いたパリトキシン類の有無について検討したが、これらの画分にはパリトキシン類はほとんど検出されなかった。その一方で、培養藻体を 50%メタノールあるいは 99.5%メタノールを用いて粗抽出した画分については、Ovatoxin-a、Ostreocin-D、さらには新規と思われるパリトキシン関連化合物が検出されたことから、このうち 99.5%メタノール抽出画分を蒸発・乾固させたのち、これを用いてマウス毒性試験を行った。その結果、土佐湾沿岸ならびに沖縄産株が有毒であることが判明した。また、*Gambierdiscus* 属の株についても大量培養した。これより、「衛生試験法・注解 2005 (編 日本薬学会)」に記載されたシガテラ毒の抽出法に従って、毒成分を抽出し、マウス毒性試験(参考法)を行った。このうち Kw070922-1 株を、マウス 1 匹あたり 5.0×10^5 cells 腹腔内投与した場合に、3 匹中 3 匹ともマウスが死に至り、その毒性値は 2.0×10^{-4} MU/1000cells と求まった。また、T070411-1 株を、マウス 1 匹あたり 2.8×10^6 cells 腹腔内投与した場合に、3 匹中 1 匹もマウスは死ななかった。

次に、*Ostreopsis* クレード A および B に属する S0662 株および S0716 株の培養法について検討した。その結果、これら 2 株は IMK 培地ならびに f/2 培地において最も高い細胞収量ならびに増殖速度を示した。次に、S0662 株(クレード A) および S0716 株(クレード B) を様々な水温・塩分条件下で増殖を評価した結果、クレード A 株は水温 25°C と塩分 30 の条件下にて最大増殖速度 1.03 divisions/day および最大バイオマス量 253 rel. fluor. を示した(Fig. 3)。また、クレード B 株は水温 25°C と塩分 35 の条件下にて最大増殖速度 0.549 divisions/day および最大バイオマス量 33.8 rel. fluor. を示した(Fig. 3)。クレード A 株はクレード B 株よりも大きな速度でかつ高密度(高バイオマス量)まで増殖可能である点、後者は前者より低い温度(15°C)で増殖可能である点で、異なる増殖特性を有することが明らかとなった。

パリトキシン様中毒の原因藻とされている *Ostreopsis* 属有毒株の簡易判別法を開発することを目指し、本属藻類株の 5.8S rDNA およびそれに隣接する内部スパーサー(ITS)領域を PCR 増幅させ、制限酵素 *Mbo*II を用いてこれらの制限酵素切断片長多型(RFLPs)を解析した。その結果、供試した本州・四国沿岸域より分離した本属藻類 22 株は、3 つの切断パターン A~C を示した。まず、タイプ A は 150, 130, 90, 60bp 付近に 4 本のバンドが見られたが、タイプ B については 220 および 240bp 付近に 2 本のバンドが見られた。また、タイプ C については 400, 240 および 150bp 付近に 3 本のバンドが見られた。これら ITS 領域について、未消化の PCR 増幅産物の塩基配列を決定した後、これらを用いて系統解析を行った結果、これらのパターンは、昨年度報告したクレード A, B および C にそれぞれ対応することが判明した。よって、本手法を用いて、クレード A~C 株、なかでも有毒なクレード A, B 株を簡易に判別することが可能と考えられた。同様に、シガテラ原因藻 *Gambierdiscus* 属有毒株の簡易判別法を開発する

ことを目指し、本属藻類株の 5.8S rDNA およびそれに隣接する内部スパーサー (ITS) 領域を PCR 増幅させ、制限酵素 *Bst*I を用いてこれらの制限酵素切断片長多型 (RFLPs) を解析した。その結果、供試した本州・四国沿岸域より分離した本属藻類 40 株は、3 つの切断パターンを示し、これらのパターンは、タイプ 1、2、*G. australes* にそれぞれ対応することが判明した。よって、本手法により有毒なタイプ (種) を簡易に判別することが可能と考えられた。

初年度報告した *Ostreopsis* 属藻類のクレード A~D の LSU rDNA8/D10 領域においてそれぞれに特異的な塩基配列を検索し、これらの配列に結合する 4 種のプローブ・プライマーセットを設計・調製した。これらが結合する領域を組み込んだプラスミドを調製し、これを鋳型として定量 PCR を行った結果、いずれも高感度 (10 コピー以上検出可能) かつ高効率で (1.9~2.0) 目的遺伝子を増幅可能であることが判明した。

さらに、様々な本属藻類株に加え、同じく藻類付着性の *Gambierdiscus* 属や *Coolia* 属株も用いて、これらのプローブ・プライマーセットの特異性について検討した結果、これらは目的とするクレードにそれぞれ特異的であることが判明した。

また、これらのプローブ・プライマーセットを用いて、クレード A~D 各株の培養細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型として定量 PCR を行い、それぞれのクレードの細胞内に含まれる rDNA コピー数について検討した結果、それぞれのクレードの細胞内コピー数が明らかになり、クレード C, D 株のそれは、クレード A, B 株のそれと比較して約 10 倍多いことが判明した。昨年度報告した本 *Ostreopsis* 属のクレード A~D 株にそれぞれ特異的であり、かつこれらを高感度に検出可能な 4 種のプローブ・プライマーセットを用いて、各有毒種を一定量ずつ添加・混合することにより調製した擬似現場試料に適用することにより、これらの定量性を評価したところ、種特異的検出が可能であり、さらに添加量が少ない対象種であっても、正確に定量・検出できることが判明した (Fig. 3)。

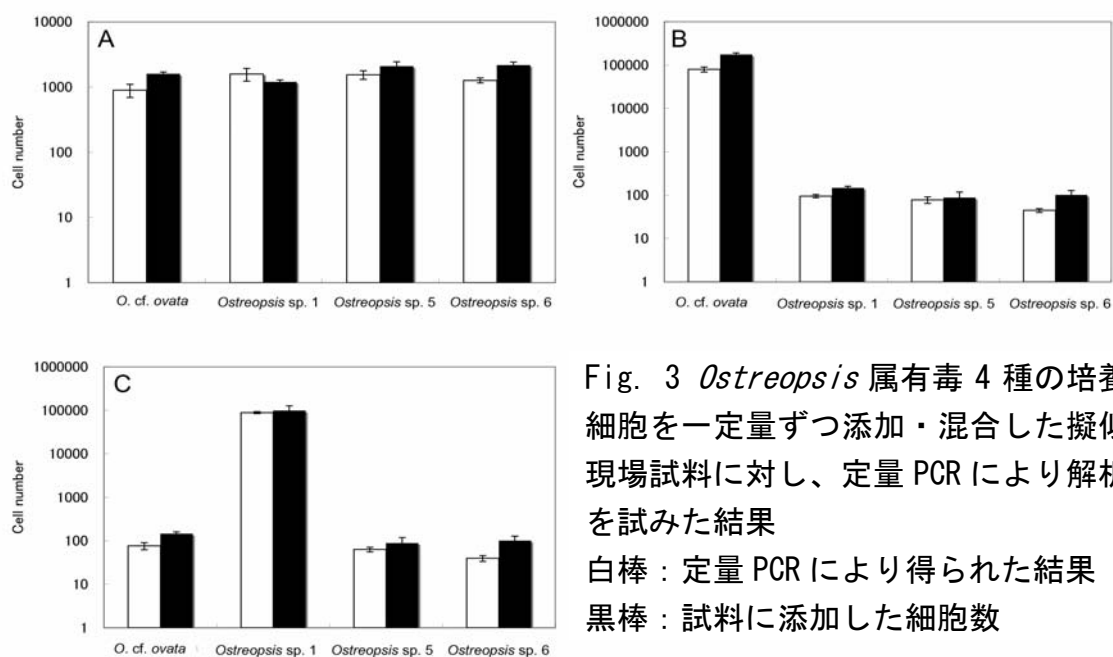


Fig. 3 *Ostreopsis* 属有毒 4 種の培養細胞を一定量ずつ添加・混合した擬似現場試料に対し、定量 PCR により解析を試みた結果
白棒：定量 PCR により得られた結果
黒棒：試料に添加した細胞数

さらに、本法を本邦沿岸域より採取した現場試料に対して用い、その有用性について

検討した。その結果、個々の有毒種細胞数を求めることができ、これら定量 PCR により求めた藻細胞数の合計値は、顕微鏡下における本属藻全体の細胞計数値とほぼ一致していたことから (Fig. 6)、本法の定量性は優れていると考えられ、Fig. 5 の結果も考え合わせて、本法は現場試料に適用可能であると判断した。

次に、*Gambierdiscus* 属藻類のタイプ 1~3、*G. australes* の SSU rDNA 領域に特異的な塩基配列に結合する 4 種のプローブ・プライマーセットを設計・調製した。様々な本属藻類株に加え、同じく藻類付着性の *Ostreopsis* 属や *Coolia* 属株も用いて、これらのプローブ・プライマーセットの特異性について検討した結果、これらは目的とするクレードにそれぞれ特異的であることが判明した。また、これらのプローブ・プライマーセットを用いて、タイプ 1~3、*G. australes* の培養細胞あるいは現場細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型として定量 PCR を行うことにより、それぞれの細胞内コピー数が明らかになった。

2) CTXs, PTX 類およびその類縁体の検出・定量法の開発

イオンスプレーイオン化法 (ISI) の陽イオンモードの条件で、C8 逆相カラムを用い、移動相としてギ酸、ギ酸アンモニウムを含む蒸留水 A およびアセトニトリル/蒸留水 (95 : 5) B のグラジエント分析によりパリトキシン標準品の良好なクロマトグラフィーによる分離が得られた。LC-MS/MS では高感度かつ定量的な検出法であるマルチプルリアクションモニタリング法により、第一検出器 Q1 でパリトキシンの $[M+2H-7H_2O]^{2+}$ である m/z 1277 を選択し、コリジョンセル Q2 で生じたフラグメントイオン m/z 327 を第二検出器 Q3 で検出することにより極めて高精度かつ高感度なパリトキシンの検出・定量が可能になった (図 1)。さらにこれらの類縁体の同定を確実に実施し、類縁体の構造解析を可能にするために、LC-MS/MS のエンハンスドプロダクトイオンスキャン法により、MS/MS スペクトルの測定条件を検討した。その結果、上述した LC-MS/MS のマルチプルリアクションモニタリング法による LC 条件を採用し、イオンの検出条件を一部修正することにより、パリトキシン標準毒の明瞭な MS/MS スペクトルの測定が可能になった (図 2)。パリトキシン標準毒から測定される主要フラグメントイオンは $[M+2H-7H_2O]^{2+}$ m/z 1277 などの脱水ピーク群 $[M+2H-nH_2O]^{2+}$ 、さらに 8 位と 9 位間の壊裂により生じる m/z 327 と脱水ピーク 309 であった。その他に m/z 804、786、744、726 が検出されたが、これらのスペクトルは全てパリトキシンの化学構造に帰属させることができ (図 3)、信頼性の高いパリトキシンの同定が可能になるとともに、新規類縁体の構造解析も可能になった。

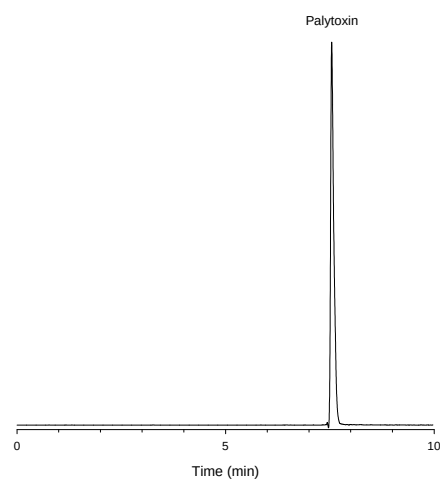


図1 パリトキシン標準毒のLC-MS/MSクロマトグラム

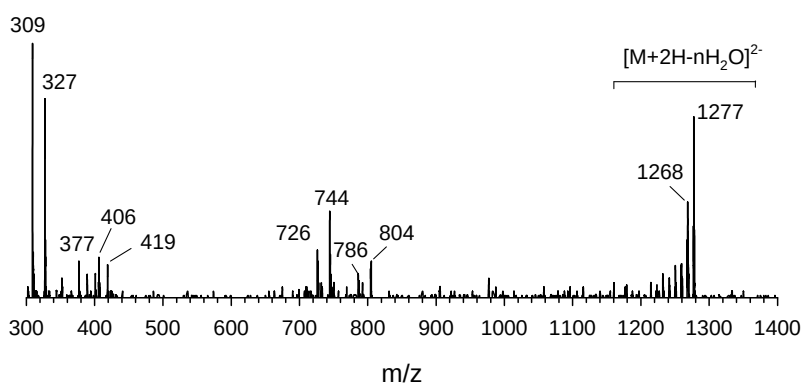


図2 パリトキシン標準毒のMS/MSスペクトル

こうして検討した各種 LC-MS/MS 法により、別課題「有毒藻の分子系統解析、有毒藻の簡易判別法および有毒藻の定量法の開発」により国内及びイタリア地中海沿岸で採取した *Ostreopsis* 培養株を分析した。図4に高知県沿岸で採取した *Ostreopsis* 培養株の LC-MS/MS クロマトグラムを示す。主要な毒成分はイタリア地中海の *Ostreopsis* の主要毒であるオバトキシン a の異性体で新規毒であることからオバトキシン a AC と命名した。

Palytoxin ($C_{129}H_{223}N_3O_{54}$)

A, B, C

Ovatoxin-a AC($C_{129}H_{223}N_3O_{52}$)

A, B-O₂, C

Ovatoxin-b AC($C_{131}H_{227}N_3O_{53}$)

A + 2CH₂ + O, B-O₂, C

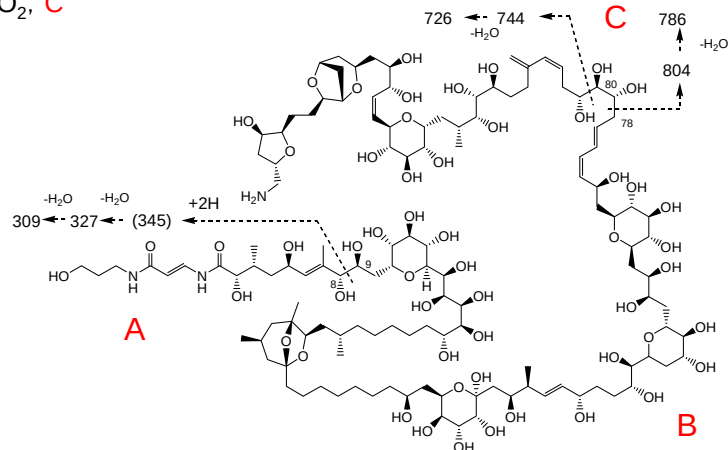


図3 パリトキシンとその類縁体の LC-MS/MS フラグメンテーション

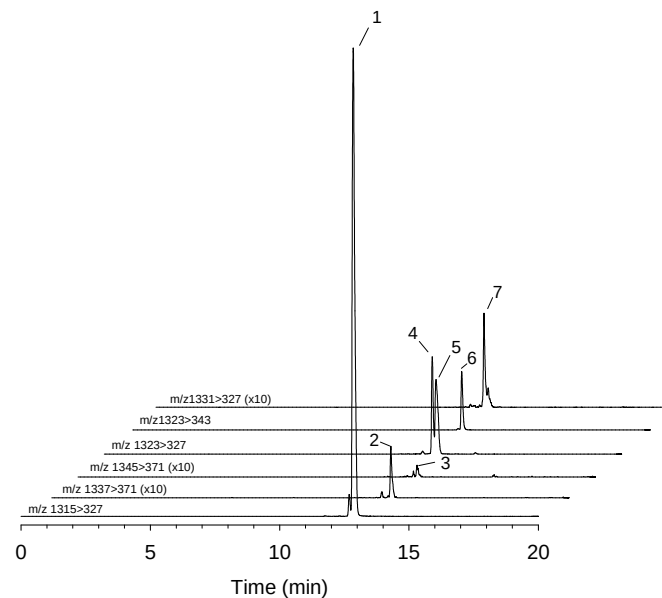


図4 国内沿岸で採取し培養した *Ostreopsis* 属から検出されるパリトキシン類縁体の LC-MS/MS クロマトグラム. ピーク1 オバトキシン a AC、ピーク2 オバトキシン b AC、ピーク4 オバトキシン d AC、ピーク6 オバトキシン e AC、ピーク7 パリトキシン。ピーク3、5 オバトキシン a AC 等の脱水イオン同位体ゴーストピーク

その他にオバトキシン b AC、オバトキシン d AC、オバトキシン e AC、パリトキシンが検出された。

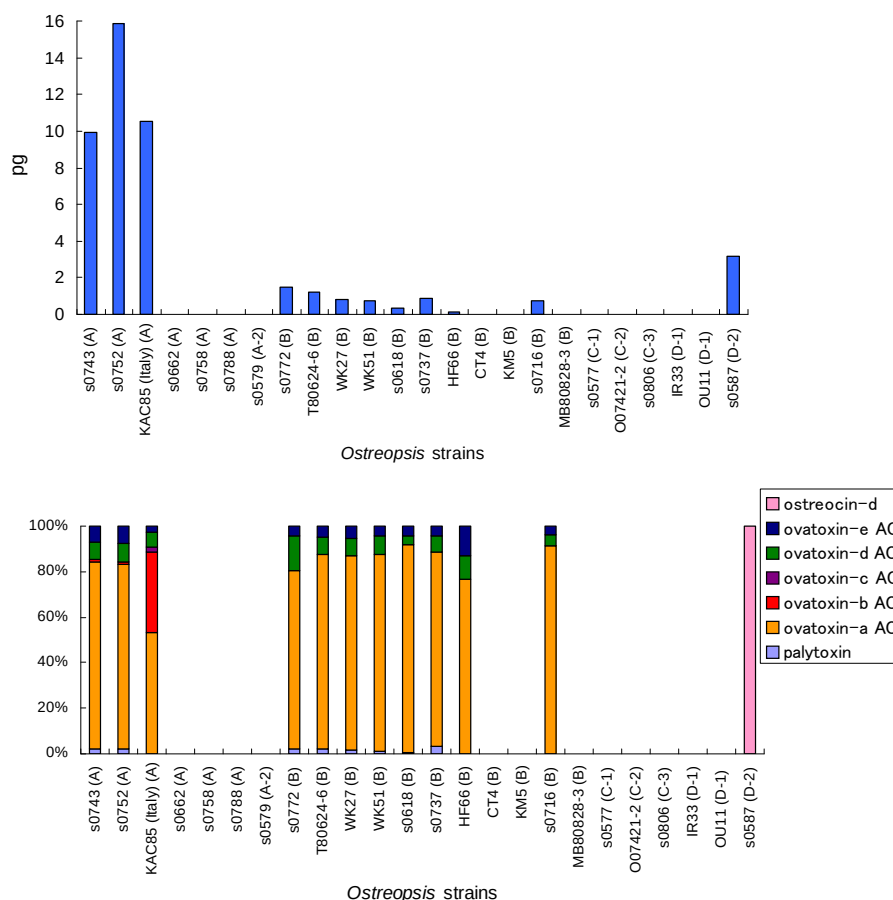


図5 国内沿岸 *Ostreopsis* の細胞あたりの毒含量 (A) と毒組成 (B)
左3列目 KAC85 株はイタリア株

図5に国内沿岸から収集した *Ostreopsis* 培養株の毒含量 (A) と毒組成 (B) を示す。沖縄で採取した s0587 株からは既知パリトキシン類縁体であるオストレオシン d が検出されたが、それ以外の毒組成は類似しており、主要毒は OVTXa AC であった。また、別課題「有毒藻の分子系統解析、有毒藻の簡易判別法および有毒藻の定量法の開発」の分子生物学的手法により識別されるクレード A と B 間の毒組成は類似しており、大きな差異は見られなかったが、概してクレード A の毒量は B よりも高かった。さらに全てのクレードに毒が検出されない無毒株が存在することも明らかになった。本州沿岸で採取した株の一部 (s0743、s0752) の毒量は、*Ostreopsis* の大量発生によりヒトの健康被害が報告されているイタリア沿岸で採取した株 (KAC85 株) に匹敵する毒量であった。

平成 23 年 3 月 6 日に宮崎県延岡市でアオブダイを原因とする食中毒が発生した。さらに同年 10 月 26 日にも東京都でアオブダイを原因とする食中毒が発生した。いずれも患者の中毒症状からパリトキシン様中毒と診断された。宮崎県で発生した中毒検体はアオブ

ダイの頭部を入手し、東京都で発生した中毒検体については頭部、内臓カレー煮付け、調理前の生の切り身を入手し、本研究で開発したパリトキシシ及びオバトキシシ a AC 等パリトキシシ類縁体の LC-MS/MS 分析法により鑑定した。スキム 1 に本課題で検討した抽出・前処理手順を示す。

中毒検体からの抽出操作

- (1) アオブダイ（フライ用切り身，頭部，カレースープ） 20g
- (2) 180mL 90%メタノールによりホモジナイズ
- (3) 3000rpmで2分間遠心分離し上澄み20mL（2g相当量）を取る *1
- (4) 20mL ヘキサンを加えて攪拌分配により脱脂
- (5) ヘキサン層を除去した後，20mL ヘキサンを加えて攪拌分配により再度脱脂する
- (6) 含水メタノールに蒸留水8mL，30mL クロロフォルムを加えて攪拌分配により脱脂する。
- (7) クロロフォルム層を除去した後，30mL クロロフォルムを加えて攪拌分配により再度脱脂する
- (8) クロロフォルム層を除去した後，含水メタノール層の溶媒をロータリーエバポレータにより除去する
- (9) 頭部とカレースープはメタノール：蒸留水（50：50，v/v） 1mL に溶解させ試料の一部（20μL）を LC-MS/MS に注入。切り身はメタノール：蒸留水（5：95，v/v） 1mL に溶解させ試料の一部（20μL）を LC-MS/MS に注入

スキム 1 中毒検体からパリトキシシ類縁体を検出するための抽出・前処理手順

この抽出・前処理条件により中毒検体の鑑定を行った結果、パリトキシシやオバトキシシ a AC を含めたパリトキシシ類縁体は検出されなかった。本法の妥当性を確認するために、スキム 1 の 90%メタノール抽出液に 3ppb 相当量のパリトキシシを添加した。この量はアオブダイ試料では 30ppb となる添加量であり、EFSA が現在食品中のパリトキシシの暫定許容量として定めている量に相当する。表 1 に添加した標準品の回収率と定量限界及び検出限界値を示す。

表 1 アオブダイ中毒検体に添加したパリトキシシの回収率と検出限界値

	回収率（%）	定量限界値（ppb）	検出限界値（ppb）
頭部	58.3	1.18	0.35
カレースープ	66.7	1.50	0.45
切り身	57.1	1.60	0.48

いずれのサンプルにおいても回収率は約 60%程度であり、ほぼ良好な回収率が得られた。本分析法の定量限界と検出限界値は極めて低く EFSA 暫定許容量である 30ppb を遥かに下回る濃度のパリトキシシの検出が可能であることから、中毒検体

のパリトキシン同定法として十分に利用できる手法である。本分析法により中毒検体を検査した結果、アオブダイ中毒検体からはパリトキシンやその他のパリトキシン類縁体は検出されないことから、本年度、宮崎県と東京都で発生したアオブダイ中毒の原因毒は、パリトキシンやパリトキシン類縁体ではないことが明らかになった。

また、*Ostreopsis* を起源とするパリトキシン類縁体による食中毒被害のリスクを調べるために *Ostreopsis* が出現する海域のハコフグやウニの分析をスキム 1 の前処理手順に従って行った。ハコフグは 2011 年 7 月から 9 月までの期間に高知県沿岸で収集した試料を筋肉、肝臓、肝臓を除いたその他の内臓に分けて分析を行った。ウニは高知県沿岸で 2011 年 10 月に採取した試料を分析した。いずれの試料からもパリトキシン類縁体は検出されなかった。

LC-MS/MS による CTX 類縁体の定量分析法の検討は *Gambierdiscus* 有毒渦鞭毛藻の主要毒である CTX3C、CTX4A、CTX4B 標準品を用いて行った。イオンスプレーイオン化法 (ISI) の陽イオンモードの条件で、C8 逆相カラムを用い、移動相として 0.1% ギ酸を含む蒸留水 A およびアセトニトリル/蒸留水 (95 : 5) B のグラジエント分析により CTX 群の一斉分析が可能になった。LC-MS/MS では高感度かつ定量的な検出法であるマルチプルリアクションモニタリング法により、第一検出器 Q1 で CTX3C の $[M+H]^+$ を選択し、コリジョンセル Q2 で生じたフラグメントイオン m/z 125 及び 155 を第二検出器 Q3 で検出することにより極めて高精度かつ高感度な CTX3C の検出・定量が可能になった (図 6)。図 7 に CTX3C の LC-MS/MS スペクトルを示す。 m/z 125 及び 155 が特徴的なイオンとして検出されたが、これらのイオンは CTX4A や CTX4B から検出された。四重極-飛行時間型質量分析計 (QTOF) による精密質量の測定から m/z 125 及び 155 は、CTX の L 環の壊裂により生じるイオンと推定された。CTX3C から得られた LC-MS/MS スペクトルや特徴的なイオンである m/z 125 及び 155 は CTX3C、CTX4A、CTX4B 類縁体の検索に有用な情報となる。本課題で検討した LC-MS/MS 法の CTX3C、CTX4A、CTX4B の検出限界値は 0.6、1.3、6.4ppb であることから、*Gambierdiscus* 培養株の CTX 検出法としては十分な感度を有する。そこで別課題「有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明」で収集し培養した *Gambierdiscus* 株 (25 株) の分析を行ったが、CTX3C、CTX4A、CTX4B は検出されなかった。

次に本分析法を中毒魚検体の鑑定法とすることを前提に、魚体の CTX の抽出・前処理法について検討した。スキム 2 に本課題で検討した抽出、前処理手順を示す。前処理については、既報 (Anal Chem 2011, 83, 8886-8891) の前処理法等を参考に、本課題で検討した LC-MS/MS 法に応用するために検討した手順である。魚肉あたり 1ppb の CTX3C、CTX4A、CTX4B を添加したイシガキダイ試料を分析した結果、CTX3C と CTX4A については明瞭なピークが検出されたが、CTX4B についてはピーク強度が

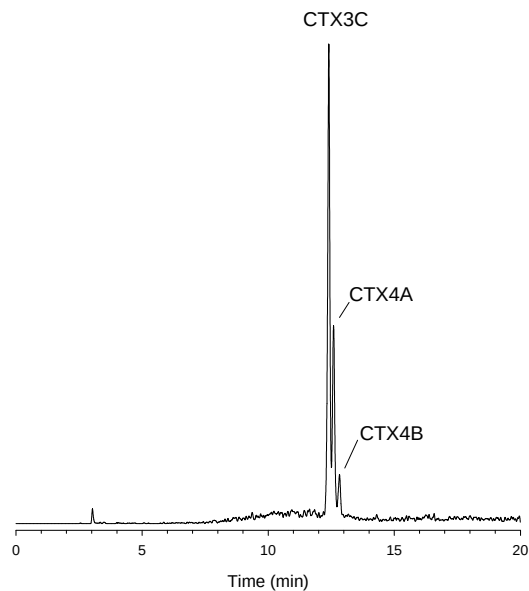


図6 CTX3C、CTX4A、CTX4B 標準品混合液（100ppb）の LC-MS/MS クロマトグラム

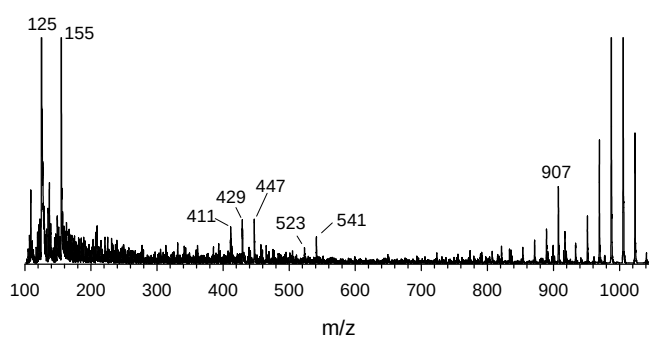


図7 CTX3C の LC-MS/MS スペクトル

不十分であり、検出が困難であった（図8）。表2に本分析における魚肉中のCTXの検出限界値（LOD）、定量限界値（LOQ）及び回収率（%）を示す。CTX4Bについてはこの濃度でピークを検出することが困難であったが、CTX3CとCTX4Aについては、80%以上の回収率が得られた。また、定量限界も0.5ppb以下であることから、中毒

検体の確認分析法として、CTX3C と CTX4A については利用可能であることが明らかになった。

魚体の CTX の抽出及び前処理法

抽出

- (1) 魚肉 5 g
- (2) 45mL 90% メタノールを加えてホモジナイズ
- (3) 遠心分離 (3000 rpm, 2 mi) して上澄み 20 mL (魚肉 2g 相当量) をとる
- (4) ヘキサン 20 mL を加えて分配し、ヘキサン層を捨てる (2 回繰り返す)
- (5) 90% メタノール 溶液に 蒸留水 8mL , クロロホルム 30 mL を加え攪拌
- (6) クロロホルム (下層) をとり保管
- (7) 含水メタノール層にクロロホルム 30 mL を加えて攪拌
- (8) クロロホルム層 (6) (7) を合わせてエバポレート

前処理

- (9) (8) の残渣を酢酸エチル-メタノール MeOH (9:1, v/v) 2mL に溶かして Sep-Pak Plus Florisil にとおす
- (10) カートリッジを酢酸エチル-メタノール MeOH (9:1, v/v) 2mL で洗浄
- (11) カートリッジ溶出物 (9) (10) の溶媒を除き、アセトニトリル 3mL に溶かす
- (12) アセトニトリル溶液を Sep-Pak Plus Short PSA にとおし、アセトニトリル 3mL でカートリッジを洗う
- (13) カートリッジをメタノール 3 mL で洗う
- (14) アセトニトリル溶離液 (12) とメタノール溶離液 (13) を合わせてエバポレーターで溶媒を除去し、メタノール 0.2mL に溶かす

スキム 2 CTX 群の抽出、前処理手順

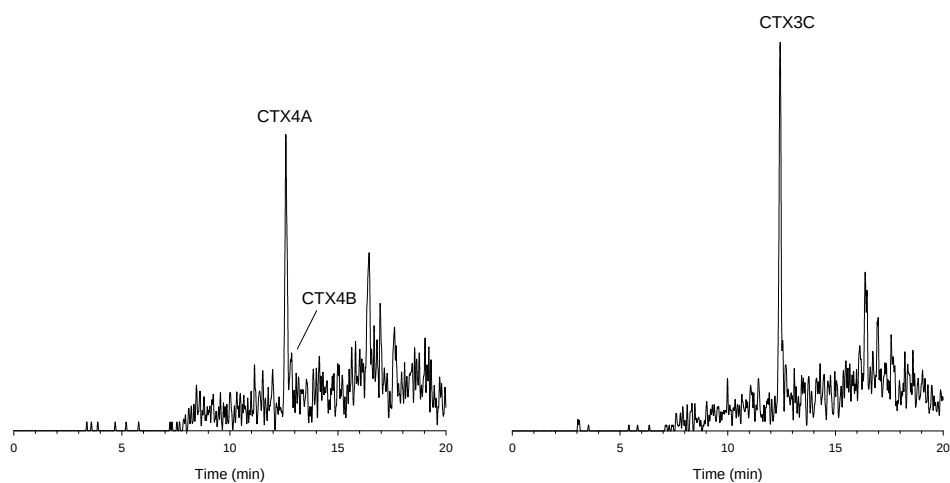


図 8 CTX を添加したイシガキダイ (1ppb) の LC-MS/MS クロマトグラム

表2 イシガキダイの魚肉に 1ppb の濃度となるように添加した CTX の検出限界値 (LOD)、定量限界値 (LOQ) 及び回収率

	検出限界 (ppb)	定量限界(ppb)	回収率 (%)
CTX3C	0.08	0.28	84
CTX4A	0.14	0.46	115
CTX4B	—	—	—

3) 有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析

本邦沿岸に由来する *Ostreopsis* 属藻類には、0.5~4 pg/cell 程度の Ovatoxin-a 様物質あるいは Ostreosin-D が含まれることが昨年度の研究により明らかになっていることから、その細胞収量(大量培養時には約 1,000 cells/ml)を考慮して 100L 程度培養することにより、同化合物 100~400 μ g 程度を確保しようとした。その際、他の個別課題により今年度新たに解明された至適培養条件 (IMK あるいは f/2 培地を用い、25℃、塩分 30~35) の下で深底シャーレを用いて本藻を培養したところ、その細胞収量が 5 倍程度(約 5,000 cells/ml)改善した。さらに、より効率的にパリトキシン関連化合物を得るために、毒含量の多い株を簡易に選抜しようとした。これを行うために、溶血活性試験法について検討した。まず、馬血液平板培地(ニッスイ)に直径 2 mm 穴をあけ、そこに濃度の異なるパリトキシン標品試料を添加した。そのプレートに 25℃暗所の条件下で培養し、その間、溶血に伴って形成されるクリアゾーン(プラーク)の直径(プラーク径)を経時的に測定した。

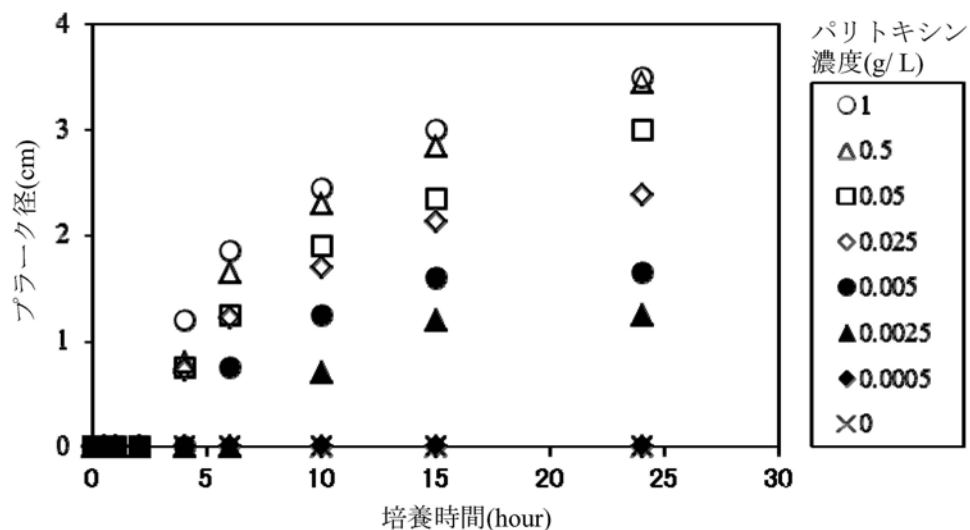


Fig. 1 各濃度のパリトキシンの試料添加区の溶血に伴うプラーク径の経時変動

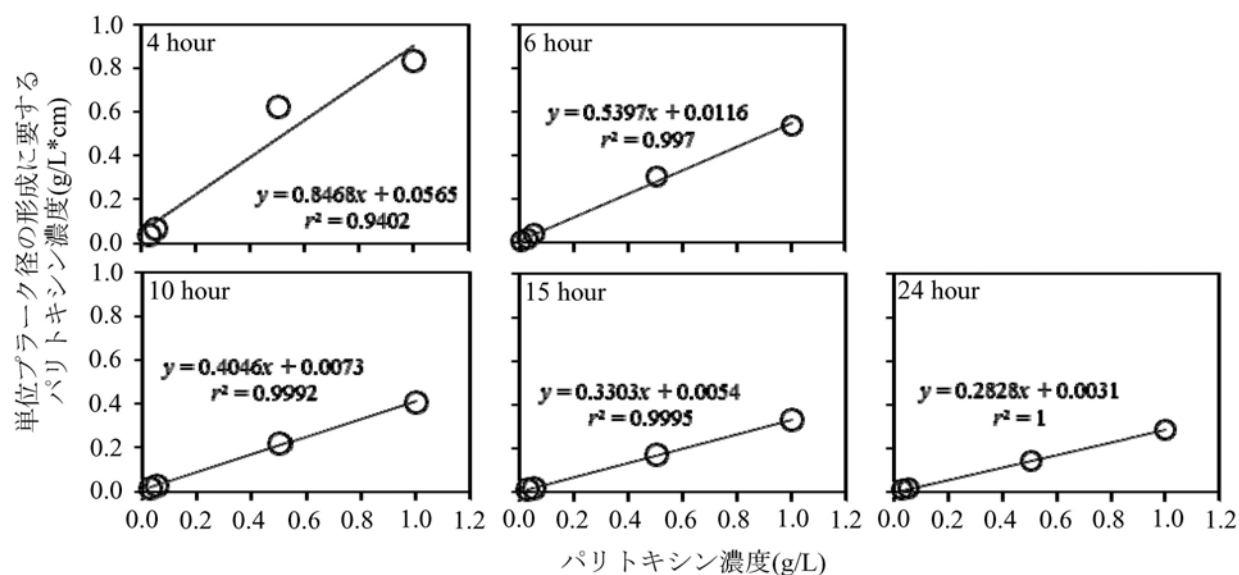


Fig. 2 パリトキシン濃度と単位プラーク径の形成に要するパリトキシン濃度との関係

その結果、インキュベーション3時間目までは、すべての試料でプラークは認められなかった (Fig. 1)。インキュベーション4時間目以降から、パリトキシン標品を添加した試験区でのみプラークが形成され、その直径は濃度の増大ならびに時間の経過に伴って大きくなった (Fig. 1)。パリトキシン濃度はプラーク径を変数とする回帰直線 (Fig. 2) で算出可能なことから、馬血液平板培地を用いることで、パリトキシン濃度を推算可能と判断した。本邦沿岸域より単離した *Ostreopsis* 属培養株、S0716、S0587、S0743 および S0752 株、ならびにイタリア沿岸より単離した Italy 株について、その細胞抽出液を馬血液平板培地に添加し、培養した。その結果、培養4時間目よりプラークの形成が認められ、その時間に伴う変動は、パリトキシン標品を試料とした場合とほとんど同様であった (Fig. 3)。パリトキシン様毒素を多量に保有していることが既に判明している、イタリア株においては、培養10時間で約1 cm 径のプラークが形成された (Fig. 3)。それに対し、S0743 および S0752 株では、同じ培養時間で、より大きな1.5~1.8 cm のプラーク (Fig. 3) が認められた。

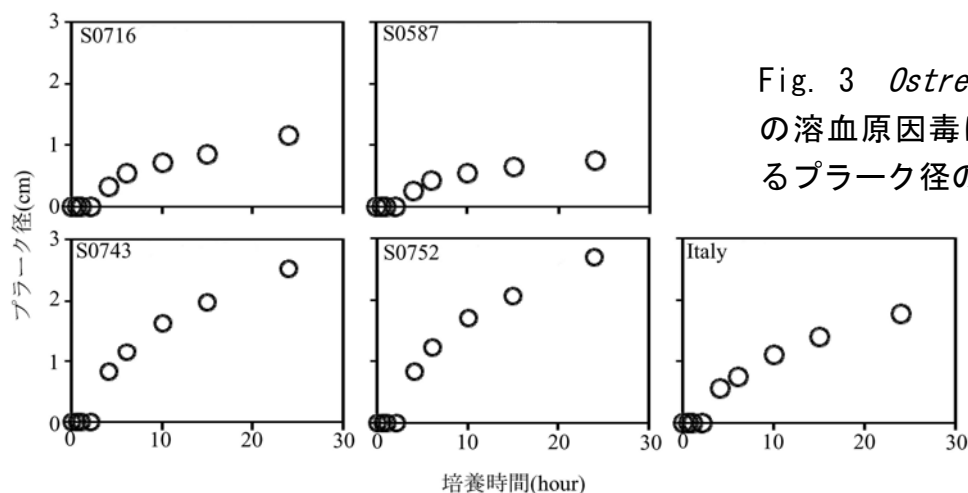


Fig. 3 *Ostreopsis* 属各供試株の溶血原因毒によって形成されるプラーク径の経時変動.

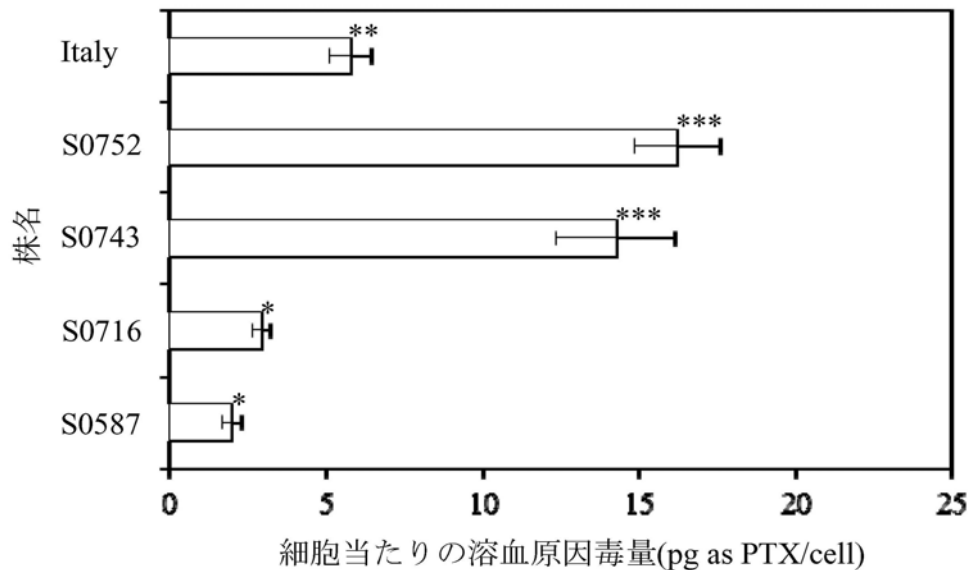


Fig. 4 *Ostreopsis* 属各株の細胞当たりの溶血原因毒量. 各アステリクスは Turkey の多重比較検定の結果: ***, 全ての株の中で最も毒量が高いことを示す; **, 2 番目に高い毒量を示す; *, 3 番目に高い毒量を示す.

本邦沿岸域より単離した、それぞれ遺伝的に異なる *Gambierdiscus* 属藻 (タイプ 1、3 および 5) を試験に供した。これらを IMK/2、f/2、f10k、L2 および PES/2 培地にそれぞれ接種し、25°C、90~100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、12hr:12hr LD サイクルの下で培養した。その間、経時的に細胞密度およびクロロフィル蛍光値を測定した。各培地における最大増殖速度、最大細胞収量および最大クロロフィル蛍光量に基づいて、*Gambierdiscus* 属の培養に最も適した培地について検討した。その結果、これら供試藻は f10k、L2、f/2 および IMK/2 培地において良く増殖し、IMK/2 で最大の細胞密度およびクロロフィル蛍光量を示した。これまで *Gambierdiscus* 属藻の培養に用いられた培地は、K、L2、f10k あるいは f/2 培地といった多種にわたり、試験者によってまちまちである。これらの培地で得られる細胞収量は、最大でも 4×10^2 cells/mL 程度 (Lartigue et al. 2009) と小さく、様々な解析を進める上で大きな障害となっている。これらの収量に対し、本試験の IMK/2 培地で得られた最大細胞収量 $3.2 \sim 4.9 \times 10^3$ cells/mL は 1 桁以上高い。また、クロロフィル蛍光量についても、70 rel. fluor. から最大で 100 rel. fluor. を超える値が得られた。この値は、赤潮を引き起こす大増殖型の植物プランクトンのそれと同程度である。

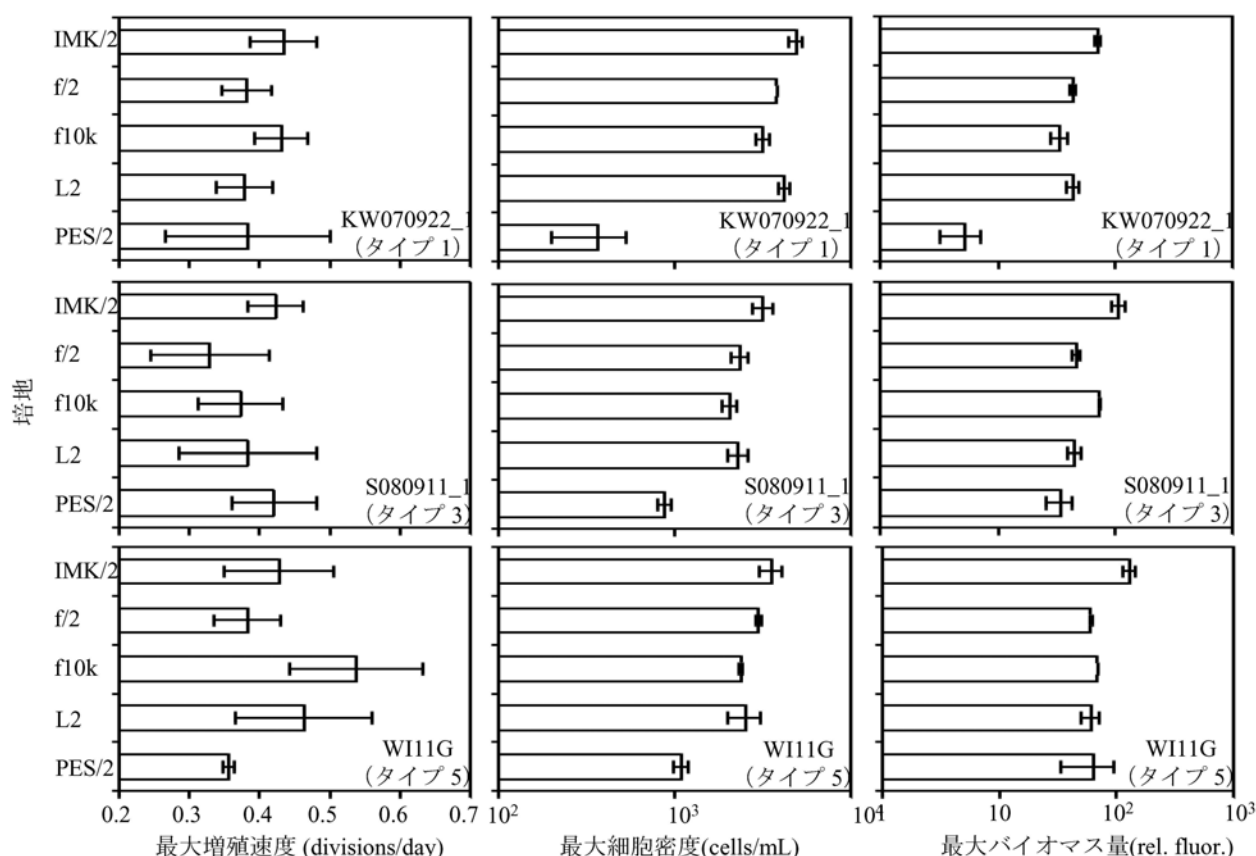


Fig. 5 各培地における *Gambierdiscus* 属 KW070922_1 (タイプ 1) 株、S080911_1 (タイプ 3) 株および WI11G (タイプ 5) 株の最大細胞密度、最大増殖速度および最大バイオマス量. エラーバーは標準偏差を示す.

新たに見出した高毒生産株 S0752 株について、IMK 培地あるいは IMK/2 培地を用い、28°C・塩分濃度 3.5‰の滅菌天然海水、光量 60~80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 条件の下で総計 63L の大量培養を行った結果、湿重量にて 57g 藻体の確保に成功した。

シガテラ原因藻 *Gambierdiscus* Kw07922-1 株について、IMK/2 培地において 28°C、滅菌天然海水、光量 60~80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 条件の下で総計 44L 培養を行い、乾重量にて 5.4g の藻体を確保した。

一方、毒性分の ¹³C ラベル化体調整に必要な NaH¹³CO₃ 添加実験を行った。シガテラ原因藻 *Gambierdiscus* Kw07922-1 株について、NaH¹³CO₃ を 0.1% 添加した各種培地において 28°C、滅菌天然海水、光量 60~80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 条件の下で 1L 培養を各 3 回検討した。結果として IMK/2 培地を除き藻の増殖が見られず、増殖の見られた IMK/2 培地においてもコントロールと比較して 1/30 程度の収量であった。

昨年度確保した *Ostreopsis* 属有毒株の藻体から抽出した画分を用いることにより、昨年度別課題にて明らかとなった新奇な Ovatoxin-a2 (Ovatoxin-aAC と改名) の化学特性について、四重極-飛行時間型 (QTOF) 質量分析計を用いて分析した。オバトキシン aAC の四重極-飛行時間型 (QTOF) 質量分析計により得られた m/z は 2647.5062 であり、組成式は C₁₂₉H₂₄₄N₃O₅₂ (M+H 誤差 3.2ppm) と推定された。ここで推定された組成式はイタリアの *Ostreopsis* から発見されているオバトキシン a と一致した。測定は陽イオンモ

ードで行った。 m/z 997, 1372, 1400 はパリトキシンから得られるイオンと比較して 16 マスユニット低く, m/z 2249 は 32 マスユニット低かった。その他のイオンは全てパリトキシンから得られるイオンと一致した。得られたスペクトルは全て精密質量が測定されているため, パリトキシンの構造への正確な帰属が可能である (図 1)。図 1 で示すように m/z 997 は C41-42 位間の解裂により生じ, m/z 1372 は C49-50 位間の解裂により生じるイオンと帰属することができた。一方, C1-15 位, C78-115 位までの構造から生じるイオンについてはパリトキシンとオバトキシン aAC は完全に一致するため同一構造と推定した。C41 位の水酸基はフラグメンテーションを生じさせるために不可欠である。これらの結果からオバトキシン aAC は C16-20 位, C53-73 位の水酸基が欠損した構造であると推定された。さらに QTOF LC-MS/MS の陰イオンモードによる測定により, C42 位が酸化され, C44 位の水酸基が欠損した構造であることも明らかになった。

次に更なる構造解析のために, m/z 1372 及び m/z 997 イオンを対象にイオントラップ型 LC-MS により生じるフラグメントイオンを測定した。 m/z 1372 及び m/z 997 は図 1 で示したように C50-115 位及び C1-41 位までの構造から生じるフラグメントイオンである。得られたフラグメントイオンはこれらの構造に帰属させることができたが, オバトキシン aAC の水酸基の欠損部位を特定するためには, m/z 900 及び 905 イオンが重要であり、これらにより QTOF LC-MS/MS で推定された C53-73 位の水酸基の欠損部位は C70 位と特定することができた。また, m/z 497 及び 527 イオンにより QTOF LC-MS/MS で推定された C16-20 位の水酸基の欠損部位は C16 位と特定することができた。以上の結果からオバトキシン aAC は 42-hydroxy-16, 44, 70-trideoxypalytoxin と推定された。イタリアの *Ostreopsis* から発見されているオバトキシン a は 42-hydroxy-17, 44, 64-trideoxypalytoxin である。本課題で発見し構造を推定したパリトキシンは新規パリトキシンであった。

Fragmentation diagram of QTOF MS/MS spectra of palytoxin

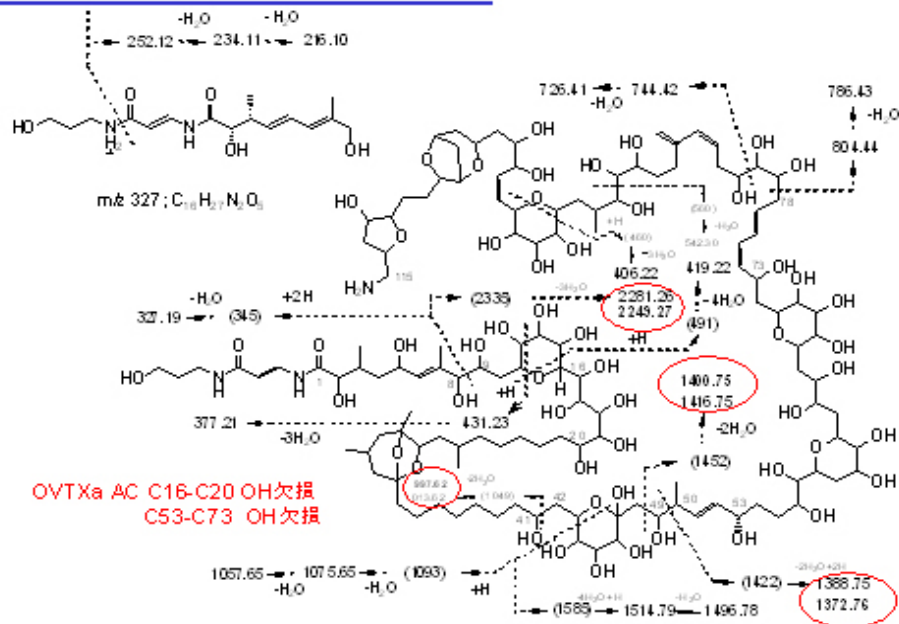


図1 オバトキシシン aAC の QTOF LC-MS/MS スペクトルのパリトキシシン構造への帰属

(考察及び結論)

本研究により、南日本海域には、系統学的に3つの異なる *Ostreopsis* のタイプが分布していることが、初めて明らかとなった。これらは有毒であることが判明したため、今後日本沿岸域におけるこれら各タイプの発生状況について、本研究にて新たに確立した定量 PCR 法により正確に把握することが重要と考えられた。また、シガテラ原因藻について、本邦沿岸域には従来報告されていた *Gambierdiscus* 属2タイプに加えて、遺伝的に異なる3つのタイプが存在することが新たに明らかになり、未記載種の type 1, 2, 5 を含めて、本邦産の *Gambierdiscus* 属藻類は遺伝的に極めて多様な有毒なものから構成されることが明らかとなった。これらについても、今後開発中の定量法により、本属藻類有毒藻の発生状況を把握することは、これらの地域におけるシガテラ発生リスクを評価する上で、極めて重要な課題であると考えられた。

国内沿岸の *Ostreopsis* の主要な毒は、オバトキシシン a の新規異性体であり、オバトキシシン a AC と命名した。これまで不明であった国内沿岸の *Ostreopsis* の詳細な毒組成が初めて明らかになった。また、毒量についても本州沿岸で採取した一部の株の毒量は、イタリア地中海沿岸でヒトへの健康被害をもたらしている *Ostreopsis* の毒量に匹敵することが明らかになった。これらの結果から、国内沿岸の *Ostreopsis* の潜在的な危険性が初めて明らかになった。ヒトへの健康被害を未然に防止するためには、*Ostreopsis* の定期的な監視が必要と考えられる。また、*Ostreopsis* の監視に当たっては、本課題で開発した手法により、主要毒であるオバトキシシン a AC の毒生産能を調べることであり、より高精度なリスク評価が可能になるであろう。

近年、国内で散発的に発生しているアオブダイ中毒については、本課題により極めて重要

な知見が得られた。本課題において、中毒検体のパリトキシンの同定用に検討した分析は、EFSA が定める食品中のパリトキシンの暫定許容量である 30ppb を遥かに下回る 0.5ppb のパリトキシンを検出する高感度検出法である。中毒検体のパリトキシン同定法として十分に利用できる手法であったが、パリトキシン類縁体は検出されなかった。アオブダイ中毒は、パリトキシン様中毒と呼ばれ、その原因毒はパリトキシン類縁体とされ、厚生労働省のホームページにも記載されている。中毒原因物質に関する知見は、中毒患者への治療等において極めて重要な知見である。本課題により中毒原因物質がパリトキシン類縁体ではないことがほぼ確定したことは、今後の本中毒の行政対策等において重要な知見である。アオブダイ中毒の原因毒はパリトキシンではないことが解明されたが、一方で EFSA が食品中のパリトキシンの暫定許容量を 30ppb として定めているように、魚介類中のパリトキシンのリスク評価や検査体制の整備は、わが国においても依然重要な課題である。魚介類中のパリトキシンの許容量を EFSA のリスク評価によるガイドラインに従い設定した場合、本課題で開発した LC-MS/MS 法はその測定感度や精度の点から十分に利用可能な手法である。今後、本法を様々な魚介類のパリトキシンの検査に利用することにより、わが国においてもアオブダイにとどまらず様々な魚介類でリスク評価が可能になり、パリトキシン検出される魚介類については、許容量を 30ppb と定めた上で本 LC-MS/MS 法を検査法として公定法化することにより、魚介類のパリトキシンについての検査体制を構築することが可能になる。

Gambierdiscus の主要毒である CTX3C、4A、4B を対象に LC-MS/MS 分析法を開発し、国内で収集した 25 培養株の毒分析を行ったが、いずれの株からも毒は検出されなかった。現在、CTX 群の生産が確認されている *Gambierdiscus* 培養株は世界的に 3 株しか存在しない。わが国沿岸から単離した *Gambierdiscus* 培養株から CTX 群が検出された例も皆無である。LC-MS/MS 分析により、一部の株では CTX 類縁体の存在を示唆するデータが得られたが、分析用標準毒の量が限られていることから、類縁体の存在については十分な検討ができなかった。今後は、既知毒については *Gambierdiscus* 以外の生産種を検索するとともに、保有している *Gambierdiscus* 株については CTX 類縁体の検索と毒性について検討を進める必要がある。

本研究において用いた IMK 培地は、安価で調整が簡便な培地であるが、これまで本培地を *Gambierdiscus* 属藻に応用した例はない。今回、IMK 培地を半分量まで薄めることで、これまで前例がない速度で、かつ高収量まで供試藻を培養できたことから、本培地により *Gambierdiscus* 属藻の大量培養がより容易となる可能性が初めて示された。今後、遺伝的に異なるタイプ株のそれぞれについて、水温・塩分に関する至適増殖条件を解明できれば、これらをより効率良く大量培養を行うことが可能となると考えられる。*Gambierdiscus* Kw07922-1 株について、総計 44L の大量培養を行った結果、乾重量にて 5.4g の藻体を確保した。しかし、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ の添加実験では増殖が認められない、あるいは収量の激減が認められ、毒成分の ^{13}C ラベル化とそれを用いる構造解析は困難であった。

Ostereopsis s752 株の産生する溶血毒素は、LC-MS を用いた追跡により行うことにより微量ながら得ることができた。分子量より Ovatoxin-a (*J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134,

1869)の異性体であることが判明した。本異性体(オバトキシン aAC)は、42-hydroxy-16, 44, 70-trideoxypalytoxinと推定され、新規パルトキシンと考えられた。今後、NMR 解析により、その立体構造が確定されることが期待される。現在のところ、本物質の溶血活性等の毒性評価は行っていないが、Palytoxinに類似した構造であることから、今後その毒性についても評価されることが望まれる。

3 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト(論文は添付すること。)

- 1) T. Suzuki et al., “Shellfish toxin monitoring system in Japan and some Asian countries” In: New Trends in Marine and Freshwaters Toxins: Food Safety Concerns “, Nova Science , pp.305-314 (2012)
- 2) T. Suzuki et al., LC-MS/MS Analysis of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) Toxins, Okadaic Acid and Dinophysistoxin Analogues and Other Lipophilic Toxins, Anal. Sci., 27, 571-584, 2011
- 3) Shinya Sato, Tomohiro Nishimura, Keita Uehara, Hiroshi Sakanari, Wittaya Tawong, Naohito Hariganeya, Kirsty Smith, Lesley Rhodes, Takeshi Yasumoto, Yosuke Taira, Shoichiro Suda, Haruo Yamaguchi, Masao Adachi (2011) Phylogeography of *Ostreopsis* along West Pacific coast, with special reference to a novel clade from Japan. PLoS ONE 6(12): e27983.
- 4) Toshiyuki Suzuki, Ryuichi Watanabe, Hajime Uchida, Ryoji Matsushima, Hiroshi Nagai, Takeshi Yasumoto, Takamichi Yoshimatsu, Shinya Sato, Masao Adachi (2012) LC-MS/MS analysis of novel ovatoxin isomers in several *Ostreopsis* strains collected in Japan. Harmful Algae, 20, 81-91.
- 5) Haruo Yamaguchi, Yuko Tanimoto, Takamichi Yoshimatsu, Shinya Sato, Tomohiro Nishimura, Keita Uehara, Masao Adachi (2012) Culture method and growth characteristics of the marine benthic dinoflagellate *Ostreopsis* spp. isolated from Japanese coastal waters. Fisheries Sci., 78(5), 993-1000.
- 6) Naohito Hariganeya, Yuko Tanimoto, Haruo Yamaguchi, Tomohiro Nishimura, Wittaya Tawong, Hiroshi Sakanari, Takamichi Yoshimatsu, Shinya Sato, Christina M. Preston, Masao Adachi (2013) Quantitative PCR Method for Enumeration of Cells of Cryptic Species of the Toxic Marine Dinoflagellate *Ostreopsis* spp. in Coastal Waters of Japan. PLoS ONE, e57627.
- 7) Tomohiro Nishimura, Shinya Sato, Wittaya Tawong, Hiroshi Sakanari, Keita Uehara, Md Mahfuzur Rhaman Shah, Shoichiro Suda, Takeshi Yasumoto, Yosuke Taira, Haruo Yamaguchi and Masao Adachi (2013) Genetic Diversity and Distribution of the Ciguatera-causing Dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) in Coastal Areas of Japan. PLoS ONE, e60882.

4 本研究を基にした学会発表の実績

- 1) 佐藤晋也・西村朋宏・上原啓太・山口晴生・足立真佐雄： 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属の系統と分布. 平成 22 年度日本水産学会春季大会、日大(平成 22 年 3 月)
- 2) 鈴木敏之・渡邊龍一・池内円香・石原賢司・松嶋良次・内田直行・金庭正樹・足立真佐雄： 国内産及び地中海産の付着性渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属のパリトキシン類縁体. 平成 22 年度日本水産学会春季大会、日大(平成 22 年 3 月)1) 西村朋宏(高知大農)・佐藤晋也(英国エジンバラ王立植物園)・上原啓太・坂成浩嗣・山口晴生・足立真佐雄(高知大農)： 本邦産 *Gambierdiscus* sp. type1 株の形態学的特徴について. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会、京大(平成 22 年 9 月)
- 3) Tomohiro Nishimura, Shinya Sato, Keita Uehara, Hiroshi Sakanari, Haruo Yamaguchi and Masao Adachi : Phylogeny And Distribution Of *Gambierdiscus* spp. In Coastal Areas Of Japan. 14th International Conference on Harmful Algae, Crete, Greece (1-5 November, 2010)
- 4) Shinya Sato, Tomohiro Nishimura, Keita Uehara, Haruo Yamaguchi, Kirsty Smith, Lesley Rhodes and Masao Adachi : Phylogeography of *Ostreopsis* revealed a novel clade from Japanese coast. 14th International Conference on Harmful Algae, Crete, Greece (1-5 November, 2010)
- 5) 上原啓太(高知大農)・佐藤晋也(英国エジンバラ王立植物園)・西村朋宏・坂成浩嗣・Wittaya Tawong・山口晴生・足立真佐雄(高知大農)： 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属に関する研究－Ⅰ. 本属藻の分子系統ならびに分布. 平成 23 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大(平成 23 年 3 月)
- 6) 山口晴生・吉松孝倫(高知大農)・谷本祐子(愛媛大連農)・佐藤晋也(英国エジンバラ王立植物園)・西村朋宏・上原啓太・足立真佐雄(高知大農)： 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属に関する研究－Ⅱ. 本属藻の培養法ならびに増殖生理. 平成 23 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大(平成 23 年 3 月)
- 7) 吉松孝倫・山口晴生(高知大農)・谷本祐子(愛媛大連農)・佐藤晋也(英国エジンバラ王立植物園)・西村朋宏・上原啓太・足立真佐雄(高知大農)： 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属に関する研究－Ⅲ. *Ostreopsis* cf. *ovata* の増殖に及ぼす水温と塩分の影響. 平成 23 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大(平成 23 年 3 月)
- 8) 谷本祐子(愛媛大連農)・吉松孝倫・山口晴生(高知大農)・佐藤晋也(英国エジンバラ王立植物園)・西村朋宏・上原啓太・足立真佐雄(高知大農)： 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属に関する研究－Ⅳ. 新奇クレードの増殖に及ぼす水温と塩分の影響. 平成 23 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大(平成 23 年 3 月)
- 9) 針金谷尚人(高知大農)・谷本祐子(愛媛大連農)・西村朋宏・上原啓太・坂成浩嗣・吉松孝倫(高知大農)・佐藤晋也(英国エジンバラ王立植物園)・山口晴生・足立真佐雄(高知大農)： 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属に関する研究－Ⅴ. 本藻の rDNA コピー数の同定. 平成 23 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大(平成 23 年 3 月)
- 10) 針金谷尚人(高知大農)・谷本祐子(愛媛大連農)・西村朋宏・上原啓太・坂成浩嗣・吉松孝倫(高知大農)・佐藤晋也(英国エジンバラ王立植物園)・山口晴生・足立真佐雄(高知大農)： 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属に関する研究－Ⅵ. 定量 PCR を用いた

- 検出・定量法の開発. 平成 23 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大(平成 23 年 3 月)
- 11) 西村朋宏(高知大農)・佐藤晋也(英国エジンバラ王立植物園)・上原啓太・坂成浩嗣・Wittaya Tawong・山口晴生・足立真佐雄(高知大農): 本邦産新奇 *Gambierdiscus* sp. Type5 株の性状について. 平成 23 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大(平成 23 年 3 月)
- 12) 谷本祐子・吉松孝倫・山口晴生・佐藤晋也・西村朋宏・上原啓太・足立真佐雄. 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属新奇クレードの培養法ならびに増殖生理. 2011 年度日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会, 高知大学 (9 月 16 日~19 日・平成 23 年)
- 13) 吉松孝倫・山口晴生・谷本祐子・佐藤晋也・西村朋宏・上原啓太・足立真佐雄. 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* cf. *ovata* の培養法ならびに増殖生理. 2011 年度日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会, 高知大学 (9 月 16 日~19 日・平成 23 年)
- 14) 西村朋宏・佐藤晋也・上原啓太・坂成浩嗣・Wittaya Tawong・山口晴生・足立真佐雄. 本邦において優占する *Gambierdiscus* 属未記載種の形態学的特徴. 2011 年度日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会, 高知大学 (9 月 16 日~19 日・平成 23 年)
- 15) 足立真佐雄. 黒潮流域に発生する有毒な底生性渦鞭毛藻について. 2011 年度日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会・シンポジウム, 高知大学 (9 月 16 日~19 日・平成 23 年)
- 16) 針金谷尚人・谷本祐子・西村朋宏・原啓太・坂成浩嗣・吉松孝倫・佐藤晋也・山口晴生・足立真佐雄. 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属に関する研究-6. 定量 PCR を用いたクレード特異的検出・定量法の開発. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 長崎大学 (9 月 28 日~10 月 2 日・平成 23 年)
- 17) 針金谷尚人・谷本祐子・西村朋宏・上原啓太・坂成浩嗣・吉松孝倫・佐藤晋也・山口晴生・足立真佐雄. 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属に関する研究-5. 本藻の rDNA コピー数の同定. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 長崎大学 (9 月 28 日~10 月 2 日・平成 23 年)
- 18) 谷本祐子・吉松孝倫・山口晴生・佐藤晋也・西村朋宏・上原啓太・足立真佐雄. 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属に関する研究-4. クレード C および D の増殖に及ぼす水温・塩分の影響. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 長崎大学 (9 月 28 日~10 月 2 日・平成 23 年)
- 19) 山口晴生・吉松孝倫・谷本祐子・佐藤晋也・西村朋宏・上原啓太・足立真佐雄. 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属に関する研究-3. クレード A および B の増殖に及ぼす水温・塩分の影響. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 長崎大学 (9 月 28 日~10 月 2 日・平成 23 年)
- 20) 佐藤晋也・上原啓太・西村朋宏・坂成浩嗣・Wittaya Tawong・山口晴生・安元健・須田彰一郎・足立真佐雄. 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属に関する研究-2. 分子系統ならびに分布. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 長崎大学 (9 月 28 日~10 月 2 日・平成 23 年)
- 21) 西村朋宏・上原啓太・坂成浩嗣・Wittaya Tawong・池上拓志・中村正利・佐藤晋也・針金谷尚人・山口晴生・足立真佐雄. 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属に関する研究-1. 土佐湾沿岸域における動態. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 長崎大学 (9 月 28 日~10

月 2 日・平成 23 年)

- 22) 針金谷尚人・谷本祐子・西村朋宏・上原啓太・坂成浩嗣・吉松孝倫・佐藤晋也・山口晴生・足立真佐雄. 定量 PCR を用いた本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属の rDNA コピー数の同定. 第 75 回植物学会, 東京大学 (9 月 17 日~9 月 19 日・平成 23 年)
- 23) 西村朋宏・佐藤晋也・上原啓太・坂成浩嗣・Wittaya Tawong・Shah・MD. Mahfuzur Rhaman・須田彰一郎・安元健・平良洋介・山口晴生・足立真佐雄. 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属に関する研究-1. 南日本各海域間における種組成の差異. 平成 24 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学 (3 月 26 日~30 日・平成 24 年)
- 24) 吉松孝倫・山口晴生・西村朋宏・岩本悠・足立真佐雄. 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属に関する研究-2. 培養法ならびに増殖生理. 平成 24 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学 (3 月 26 日~30 日・平成 24 年)
- 25) 吉松孝倫・山口晴生・西村朋宏・岩本悠・足立真佐雄. 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属に関する研究-3. *Gambierdiscus* sp. type 1 および *G. australes* の増殖に及ぼす水温と塩分の影響. 平成 24 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学 (3 月 26 日~30 日・平成 24 年)
- 26) 岩本悠・吉松孝倫・西村朋宏・山口晴生・足立真佐雄. 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属に関する研究-4. *Gambierdiscus* 有毒株の増殖特性と分布の関係. 平成 24 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学 (3 月 26 日~30 日・平成 24 年)
- 27) 針金谷尚人・谷本祐子・西村朋宏・Wittaya Tawong・上原啓太・坂成浩嗣・吉松孝倫・佐藤晋也・山口晴生・足立真佐雄. 本邦産有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属に関する研究-6. -定量 PCR を用いた土佐湾沿岸域における種特異的動態解析-. 平成 24 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学 (3 月 26 日~30 日・平成 24 年)
- 28) 鈴木敏之・渡邊龍一・内田 肇・松嶋良次・安元 健・永井宏史 (海洋大)・佐藤晋也・足立真佐雄: 国内産付着性渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属のオバトキシン異性体の LC-MS/MS 分析. 平成 24 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大 (平成 24 年 3 月)
- 29) 内田肇・鈴木敏之・渡邊龍一・松嶋良次・永井宏史・浮穴学宗・安元 健: LC-MS/MS の陰・陽両イオンモードの相補的測定による *Ostreocin-B* の構造解析. 平成 24 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大 (平成 24 年 3 月)
- 30) T. Suzuki et al., Discovery of novel ovatoxin isomers in Japanese *Ostreopsis* strains by LC-MS/MS. 11th International Symposium on Toxic Microorganisms in 46th UJNR Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting (March 4-9, 2012)

5 特許及び特許出願の数と概要
該当無し

6 その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)
毎日新聞・高知版朝刊 (平成 23 年 3 月 29 日付) の「パリトキシン様中毒原因藻に関する新聞記事」に於いて、本事業により得られた結果の一部を紹介

7 今後の問題点等

本研究により、本邦には有毒な *Ostreopsis* と *Gambierdiscus* 属がそれぞれ分布していること、さらに新たに確立した定量 PCR 法によりこれらの動態把握が可能となったことから、今後は本邦におけるそれらの動態把握、さらにどのような条件でこれらの有毒藻が発生するのかについて解明することにより、魚類の毒化の予測、さらには中毒発生リスク評価が行われることが期待される。

本研究によりパリトキシン様中毒（アオブダイ中毒）の原因物質がパリトキシン類縁体ではないことがほぼ確定したことは、本中毒の行政対策等において重要な知見であるが、今後の課題として、中毒名称の再検討や中毒原因物質の解明が必要である。

本課題では、国内沿岸から採集した *Gambierdiscus* から CTX を生産する株を発見することができなかった。国内沿岸に生息する *Gambierdiscus* からは未だに CTX 生産能を有する株が発見されておらず、国内で発生しているシガテラ中毒の発生機構については不明な点が多い。今後の課題として、本課題で開発した CTX の LC-MS/MS 法などを利用して、国内沿岸の *Gambierdiscus* において CTX 生産能を有する株を検索するとともに、新規 CTX 類縁体の検索も必要である。また、*Gambierdiscus* 以外に CTX を生産する有毒藻類を検索することも必要である。本課題で開発した LC-MS/MS 法は CTX3C や CTX4A の検出法としては十分に中毒検体の鑑定にも使用できる手法である。一方、その他の主要毒である CTX4B や CTX1B の分析法については、今後の検討課題として残されたが、分析法の開発では一定量の標準毒が必要であり、この分野の研究を推進するためには標準毒の製造体制の整備が不可欠である。

本研究では、本邦産 *Ostreopsis* 属に含まれる主要毒はパリトキシン類縁体である Ovatoxin-a の異性体（オバトキシン aAC）であることが判明し、本異性体は 42-hydroxy-16, 44, 70-trideoxypalytoxin と推定された（イタリアの *Ostreopsis* から発見されているオバトキシン a は 42-hydroxy-17, 44, 64-trideoxypalytoxin である）。本パリトキシン類縁体は新規パリトキシンであった。今後、NMR 解析により、その立体構造が確定されることが期待される。今後、本物質の毒性について評価することが望まれる。

IV 主任研究者による自己評価

項目	評価結果	評価コメント
1 研究の妥当性	5	主任・分担研究者がそれぞれの役割分担について、研究計画に基づき成果を挙げた。すなわち、魚毒性中毒の原因藻に関して、日本沿岸域に分布する有毒種を解明し、それらの特異的な定量検出法を確立したこと。パリトキシン(PLTX)類の高感度かつ高精度な定量分析法を開発したこと。有毒藻の主要毒が、42-hydroxy-16, 44, 70-trideoxypalytoxinと推定できたこと。さらに、アオブダイ中毒の原因毒が、パリトキシン類縁体ではないことを明らかにしたこと。これらの成果は、いずれも中毒発生のリスク評価を行う上で極めて重要な基盤的知見であり、3年間にわたる研究助成に見合うものと判断できる。
2 研究目標の達成度	5	「有毒藻の分子系統解析、簡易判別法、定量法の開発ならびにこれらの至適増殖・毒生産条件の解明」、「CTX s, PTX類およびその類縁体の検出・定量法の開発」と「有毒藻の大量培養と、新規・類縁毒の精製・構造解析」について、いずれもほぼ研究目標を達成できた。これに関わる論文として3編、学会発表30件と高い研究成果を挙げた。
3 研究成果の有用性	5	魚毒の原因と思われる藻類の有毒種のモニタリングが可能となり、魚毒性中毒の発生リスク評価への道を開いたこと。また、魚毒の原因毒の定量法を開発できたことから、中毒検体を分析することにより、本中毒の原因物質特定への道を開いた。さらに、本成果を踏まえて、魚類の毒化状況の把握が進めば、中毒のリスク軽減に向けて、国がガイドライン・規制値の策定を行う上で重要となる科学的知見が得られることが期待され、さらに消費者や生産者へのリスク説明が容易になり、本研究は社会的・経済的にも大きな貢献を果たすものである。今後は、本研究の成果を踏まえて本邦沿岸域のシガテラ毒による魚類の毒化状況が解明されることが期待される。また、アオブダイ中毒の原因毒がパリトキシン類ではないことが明らかとなり、この原因毒ならびにこれを生産する原因生物の解明が望まれる。
合 計	15	
総合コメント：魚毒性中毒のリスク評価法を行う上で、極めて有用な知見が得られ、これらの中毒のリスク低減への道を開いた点で高く評価できる。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述する。

(別紙) 平成 23 年度研究委託費の支出額及び平成 24 年度研究委託費の計画

1 平成 23 年度研究委託費の支出額 (実績)

(※第 5 の 1 に規定する新規採択時及び継続決定時は省略すること。)

項目	金額 (円)	備考
設備備品費	0	
消耗品費	1,808,491	
人件費	5,378,195	
謝金	0	
旅費	201,140	
外注費	0	
印刷製本費	0	
会議費	0	
通信運搬費	6,200	
光熱水料	0	
その他	85,974	培養作業補助者の賃金
再委託費	2,250,000	
間接経費	770,000	
合計	10,500,000	