

薄層クロマトグラフィーと電気泳動による  
噴火湾産ホタテガイ中腸腺抽出液に  
含まれる麻痺性貝毒成分の同定

Identification of Paralytic Shellfish Toxins in  
Extract of Scallop Midgut-Glands from Funka Bay  
with Thin Layer Chromatography and Electrophoresis

田沢悌二郎

Teijiro Tazawa

二枚貝等に含まれる麻痺性貝毒成分はサキシトキシンを始めとして多数のその誘導体から構成されることが報告されている<sup>1)</sup>。噴火湾産ホタテガイに含まれる麻痺性貝毒成分についてはいくつか発表されている<sup>2~6)</sup>が、二枚貝等に含まれる麻痺性貝毒の定量用いられる麻痺性貝毒検査法<sup>7)</sup>にもとづいて調製された抽出液に含まれる毒成分については報告はない。この検査法はその操作の単純性及び迅速性にもかかわらず、一定体重の特定系統マウスを多数確保しなければならないこと、生物試験のため精度が低いこと<sup>8)</sup>、塩化ナトリウムの干渉があること<sup>9)</sup>などから、化学的定量法の開発が望まれている。著者はこの検査法に従って調製された抽出液に含まれる毒成分の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による定量を検討している。HPLCによる分析対象にすべき毒成分を検索する目的で、麻痺性貝毒検査法にしたがって調製した噴火湾産ホタテガイの中腸腺抽出液に含まれる毒成分を薄層クロマトグラフィーと電気泳動により同定した。

ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* は噴火湾沿岸の大船沖で、1983年7月25日に採捕されたものを用いた。そのホタテガイの中腸腺45g(湿重量)に同量の0.1N 塩酸を加え、ホモジナイズし pH を3に調整した。次いで、5分間静かに加温沸騰した後、室温になるまで放冷し、再び pH を3に調整した。この液を18,000rpmで40分間遠心し、得られた上清を抽出液とした(6,860MU)。この抽出液を1N 水酸化ナトリウム溶液でpH5.5に調整し Bio-Gel P-2(200~400mesh, Bio-Rad Lab.)カラム(Φ5cm×90cm)に負荷した。蒸留水、続いて0.03M 酢酸溶液を流速3ml/minでこのカラムに流し、溶出液を20mlずつ分取した。Fig. 1に示

すように、酢酸溶出液中に毒分画が認められた(5,940 MU)。この分画を減圧濃縮した後、凍結乾燥を行ない、少量の蒸留水に溶解した。この液を Bio-Rex 70(-400mesh, H<sup>+</sup>型, Bio-Rad Lab.)カラム(Φ1.5cm×30cm)に負荷し、流速0.75ml/minで蒸留水、0.03M 酢酸溶液、0.01N 塩酸溶液をこの順に流し、溶出液を5.8mlずつ分取した。Fig. 2に示すように、酢酸溶出液中(Fr. I, 4, 290MU)と塩酸溶出液中(Fr. II, 1, 670MU)に毒分画が認められ、Bio-Rex 70カラムクロマトグラフィーにおける回収率は87%であった。なお、Bio-Gel P-2とBio-Rex 70カラムクロマトグラフィーの各フラクションの毒量は1分から30分の範囲の致死時間から Sommer 表<sup>7)</sup>を用いて求めた。回収試験の毒量は麻痺性貝毒検査法<sup>7)</sup>に従って求めた。Fr. IとFr. IIをそれぞれ減圧濃縮し、濃縮液中の毒成分を同定するために、薄層クロマトグラフィー(TLC)と電気泳動(EP)を行なった。TLCはWhatmann社製LHP-KタイプのHPTLCシリカゲルプレート(200μ thickness, 5 cm×10 cm)に、ピリジン-酢酸エチル-酢酸-水(75:25:15:20, v/v)からなる展開溶媒を用いて行なった。EPはChemetron社製セルロースアセテート膜(Cellogel, 12cm×12cm)を用い0.08M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.7)中、1.7mA/cmの定電流で30分間泳動した。TLCは風乾後、EPはそのまま、1%過酸化水素水を噴霧し、110℃、5分間加熱した。毒成分の検出は365nmの紫外線照射下で行なった。この結果をFig. 3に示したが、Fr. IにゴニオトキシンI, II, III, IV(GTX 1, 2, 3, 4), Fr. IIにサキシトキシン(STX), ネオサキシトキシン(neoSTX)が認められ、これらの成分が主要毒成分であることが示された。

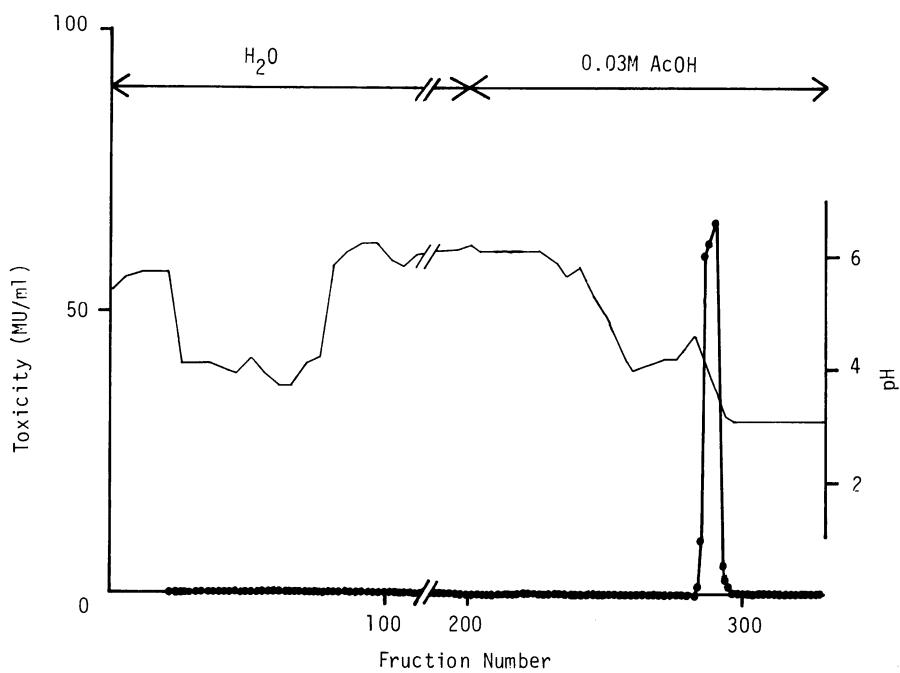


Fig. 1 Toxicity and pH Profile from Bio-Gel P-2 Column of Extract of Scallop Midgut-Glands.  
Toxicity : —●—, pH : ——.

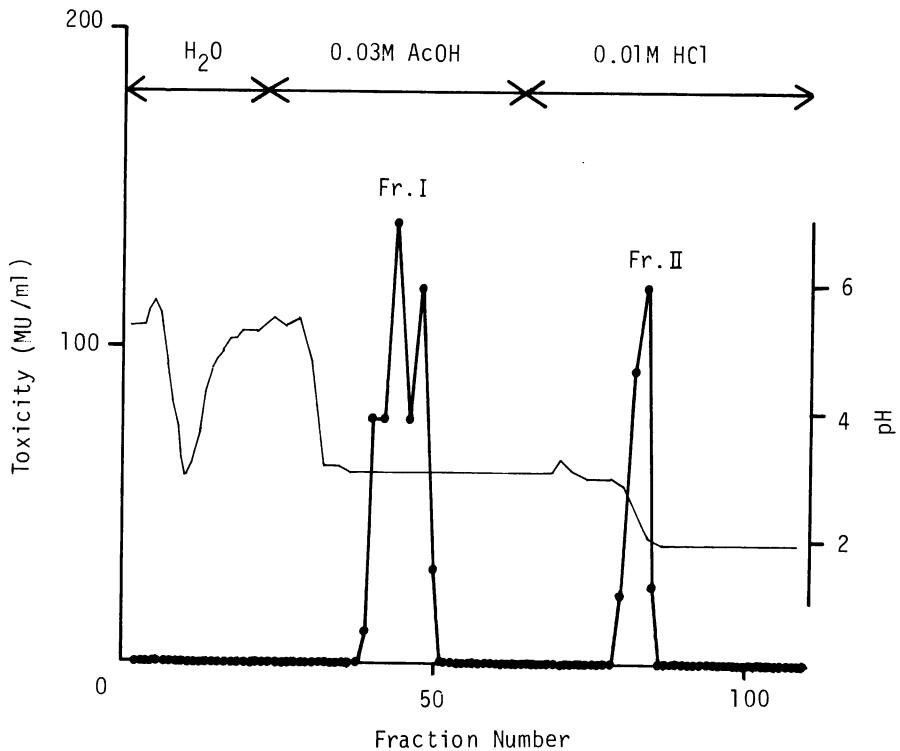


Fig. 2 Toxicity and pH Profile from Bio-Rex 70 Column of the Toxic Fraction Obtained by Bio-Gel P-2 Column.  
Toxicity : —●—, pH : ——.

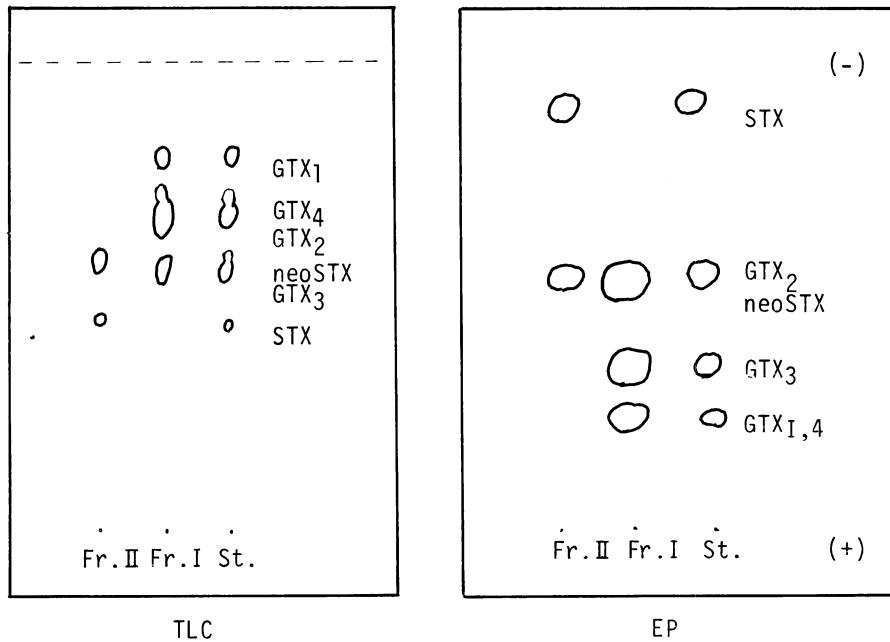


Fig. 3 Thin Layer Chromatogram (TLC) and Electrophorogram (EP) of the Toxic Fractions Obtained by Bio-Rex 70 Column.  
St.: Standards

噴火湾から採取したホタテガイの中腸腺抽出液中に本実験で示された上記毒成分以外に Oshima ら<sup>5)</sup>は Bio-Gel P-2カラムに吸着しない毒成分が含まれていることを、また浅川ら<sup>6)</sup>はゴニオトキシンV(GTX<sub>5</sub>)が含まれていることを報告している。彼らは塩酸でpH2に調整したエタノール水溶液を試料に加え、ホモジナイズし、遠心後、得られた上清を抽出液とした。本実験では麻痺性貝毒検査法<sup>7)</sup>に従い、塩酸酸性下で加熱して抽出液を調製した。Oshima<sup>5)</sup>らおよび浅川ら<sup>6)</sup>との毒成分の違いは抽出法に起因することが考えられる。しかし、Bio-Gel P-2カラムに吸着しない毒成分と GTX<sub>5</sub>は微量毒成分として含まれる可能性もあることから、これらの毒成分については今後も詳細に検討を行ないたい。

貴重な麻痺性貝毒標準品を恵与下された北海道大学薬学部生薬学教室小林優博士に深く謝意を表します。

## 文 献

- 1) 安元 健：食品衛生研究, 36(6), 19 (1986)
- 2) 市原 侃ら：道衛研所報, 27, 95 (1977)
- 3) 市原 侃ら：同上, 28, 98 (1978)
- 4) 市原 侃ら：同上, 29, 110 (1979)
- 5) Oshima, Y. et al.: Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 48, 851 (1982)

- 6) 浅川 学ら：北大水産彙報, 34, 140 (1983)
- 7) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課通牒：麻痺性貝毒検査法 (1980)
- 8) Kroph, P.: Nord. Vet-Med., 31, 302 (1979)
- 9) Schantz, E.J. et al.: Journal of A.O.A.C., 41, 160 (1958)