

## LC-MS/MS によるアカガイの麻痺性貝毒分析

## Analysis of paralytic shellfish toxins by LC-MS/MS in ark shell

新貝 達成 鈴木 優子 姉齒 健太郎 千葉 美子

Tatsunari SHINGAI, Yuko SUZUKI, Kentaro ANEHA, Yoshiko CHIBA

麻痺性貝毒により毒化したアカガイについて、LC-MS/MS を用いて麻痺性貝毒の分析を行ったところ、主に強毒成分の GTX1~4、弱毒成分の C1 のほか、C1,2 の代謝物である M トキシン 1,3,5 と推察されるピークが検出され、良好な定性性を示した。一方、各毒成分濃度に比毒性を乗じて算出した毒力値とマウス毒性試験法により得られた毒力値との間に明確な相関は認められず、マトリックスによるイオン化抑制や今回未検討の毒成分の影響等が考えられた。

キーワード：麻痺性貝毒；アカガイ；LC-MS/MS

Key words : paralytic shellfish toxins ; ark shell ; LC-MS/MS

## 1 はじめに

麻痺性貝毒(paralytic shellfish toxins:以下、「PSTs」)は主に *Alexandrium* 属などの有毒渦鞭毛藻が産生する神経毒で、これらによる二枚貝の毒化は、近年長期化する傾向があり、令和 2 年は、宮城県の一部の海域において、アカガイなどの主要水産物が 3 月に規制値(4MU/g)を超過して以降、12 月まで出荷自主規制が続くなど、水産業に甚大な被害を及ぼしている。

PSTs 分析の公定法であるマウス毒性試験法(以下、「MBA」)は、マウスの管理が煩雑で緊急時の対応が困難なことに加え、毒成分の構成比などのデータは得られない。また、動物愛護の観点からも問題視され、機器分析法などの代替法の開発が進められている。

今回、生活化学部では既報<sup>1,2,3)</sup>を参考にして、LC-MS/MS を用いて、毒化したアカガイの PSTs 分析を行ったので報告する。

## 2 実験方法

## 2.1 試薬等

麻痺性貝毒成分の標準品 C1&2, dcGTX2&3, GTX1&4, GTX2&3, GTX5, GTX6 は、カナダ NRC 社製の認証標準物質を用いた。なお、PSTs 成分のうち最も比毒性が高い STX は、「化学兵器の禁止及び特定物質の規制に関する法律」により所持できないことから、STX の測定は実施しなかった(図 1)。標準品は 0.5mM 塩酸溶液で適宜希釈し、LC-MS/MS 最適条件検討用及び検量線用溶液とした。

その他の試薬類として、0.1N 塩酸は関東化学株式会社製容量分析用滴定液、酢酸アンモニウムは関東化学株式会社製特級、酢酸は富士フィルム和光純薬株式会社製液体クロマトグラフ用、n-ヘキサン 300 は関東化学株式会社製残留農薬試験用、ギ酸は富士フィルム和光純薬株式会社製 LC/MS 用、アセトニトリルは関東化学株式会社

製 LC/MS 用を使用した。

## 2.2 試料

宮城県の石巻湾海域で、令和 2 年 6 月 9 日から 10 月 14 日に採取されたアカガイを宮城県漁業協同組合(以下、「県漁協」)から委託検査機関(一般財団法人日本食品検査仙台検査所)を通して入手した。入手した試料と同日・同地点で採取された試料は、宮城県又は県漁協による MBA を用いたモニタリング検査で 4~14MU/g の毒化が確認されている。

## 2.3 試料溶液の調製

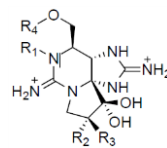
試料の抽出は公定法に準じて行った。すなわち、生鮮試料 10 個程度から可食部を採取、5 分間水切り後、均一化し、20 g をトルビーカーに正確に量り採り、20mL の 0.1 N 塩酸を加え、よく攪拌後、5N 塩酸で pH が 3.0 付近になるように調整した。次いで電気コンロ上で 5 分間静かに加温沸騰させた後、室温まで放冷し、再度 pH が 3.0 付近になるように調整して定容容器に移し、水を加えて 40mL に定容した。この溶液を遠心分離(3,000rpm×10min)し、上清をろ過したものを試料原液とした。その後、既報<sup>1,2,3)</sup>を参考に、機器分析用試料の調製を行った。すなわち、試料原液 3mL に 15mL の

毒成分	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	比毒性 (MU/μmol)
C1	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	15
C2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	239
GTX1	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONH <sub>2</sub>	2468
GTX2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONH <sub>2</sub>	892
GTX3	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONH <sub>2</sub>	1584
GTX4	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONH <sub>2</sub>	1803
GTX5	H	H	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	160
GTX6	OH	H	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	180
dcGTX2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H	1617
dcGTX3	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	1872
STX <sup>※</sup>	H	H	H	CONH <sub>2</sub>	2483

※STXは標準品の入手が困難なため測定対象外

図 1 測定対象とした PSTs 成分の構造式及び比毒性

(機器分析結果の毒力値への換算計算式：機器分析の MU/g 値=各毒成分濃度 μmol/g × 比毒性 MU/μmol)



ヘキサンを加え、よく攪拌した後、遠心分離(10,000rpm×5min)し、ヘキサン層を除去した。これを3回繰り返した後、ヘキサン層及び中間層を除いた最下層を精製用固相カラムに負荷し、その流出液約1mLを限外ろ過(7,500rpm×20min)した。そのろ液400μLを、あらかじめ0.25%酢酸入り20%アセトニトリル3mLと0.0028%アンモニア水6mLでコンディショニングした活性炭カートリッジに負荷した。700μLの水を負荷して洗浄した後、0.25%酢酸入り20%アセトニトリル2mLで溶出し、その溶出液をLC-MS/MS測定用試料溶液とした。

## 2.4 器具・機材

ろ紙はADVANTEC社製のNo.5C、精製用固相カラムはWaters社製Oasis PRiME HLB(3cc/60mgカートリッジ)、活性炭カートリッジはSupelco社製ENVI-Carb(0.5g/6mL)を、遠心式限外ろ過フィルターはメルクミリポア社製Amicom Ultra-4, 10,000NMWLを使用した。

## 2.5 装置及び測定条件

LC部はAgilent Technologies 1200 Infinity series, MS部はAB Sciex QTRAP4500 LC-MS/MS systemを使用した。測定条件(表1)及びMRM条件(表2)は既報<sup>1,2,3)</sup>を参考にしたほか、イオンソース及びMS内部パラメータの最適化を行い決定した。

表1 測定条件

カラム	TSKgel Amide-80 5μm 2.0mmI.D.×25cm
カラム温度	40°C
移動相	A: 0.2%HCOOH+2mM-CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> B: MeCN
グラジエント条件	(A:B)=0min(20:80)→8min(45:55)→18min(70:30)→20min(70:30)→22min(20:80)→37min(20:80)
流速	0.2mL/min
注入量	10μL
イオン化モード	ESI positive
Ionspray voltage	5,500V

表2 MRM条件

成分	定量イオン		定性イオン		MS内部パラメータ*			
	Q1(m/z)	Q3(m/z)	Q1(m/z)	Q3(m/z)	DP(V)	EP(V)	CE(V)	CXP(V)
C1	396	316	396	298	21	10	19	22
C2	396	298	396	316	1	10	25	28
GTX1	412	332	412	314	1	10	33	20
GTX2	396	316	396	298	21	10	19	22
GTX3	396	298	396	316	1	10	25	28
GTX4	412	314	412	332	1	10	31	10
GTX5	380	300	380	282	66	10	33	24
GTX6	396	316	396	298	21	10	19	22
dcGTX2	353	273	325	255	1	10	29	12
dcGTX3	353	255	353	273	1	10	27	22

\*定量イオンのみ抜粋

## 3 結果及び考察

毒化したアカガイを測定したところ、強毒成分のGTX1,2,3,4、弱毒成分のC1,2のほか、今回使用した標準品では同定できないが、既報<sup>4)</sup>よりC1,2の代謝物であるMトキシシン1,3,5(以下、M1,3,5)と推察されるピークが主に検出され、定性性は良好であった(図2)。

総毒成分濃度は6月10日に約1.2μg/gと最大値を示し、その後低下し、8月26日に約0.6μg/gと最小値を示したが、9月30日に約1.1μg/gと再び大きく上昇し、そ

の後緩やかに低下した(図3)。毒成分組成はいずれの試料もほぼ同様の傾向を示し、GTX2が約50%、次いでGTX3が約20%、GTX1が約10%、C1が約10%を占めた(図4)。

各毒成分濃度に比毒性を乗じて算出した毒力値とMBAにより得られた毒力値との間に明確な相関は認められなかった(図5)。M1,3,5については、標準品未発売のため定量はできないが、毒力は低いとの報告<sup>5)</sup>があり、相関性が低かった原因とは考え難い。

アカガイは通常の軟体動物とは異なり、血液中にヘム色素を持つエリスロクルオリンを含むことが広く知られており<sup>6)</sup>、GTX1,4がヘムタンパクにより触媒され、速やかに還元されることでGTX2,3が主成分になったと推察される。更に還元反応が進むと最終的に最も安定的なSTXに変化するとされ、既報<sup>6)</sup>では、毒化期間の後半になるほどSTXの割合が増加したとの報告がある。今回、6月から10月の間に採取された試料を用いたが、本県の麻痺性貝毒による毒化のピークである春期を過ぎていたため、前述のとおりSTXの割合が増加していた可能性も考えられる。

また、今回のMBAのデータは、機器分析法で用いた試料と同日・同地点で採取された試料の宮城県又は県漁協によるモニタリング検査結果を参照しており、機器分析法とMBAで同一の試料ではないため、固体差も影響していると考えられ、今後は同一の試料を用いて機器分析とMBAの比較を行う必要がある。

今後は、報告例の多いホタテガイも用いて、品種による影響を評価するほか、MBAとの比較や妥当性評価を行い、機器分析法の確立を目指す。

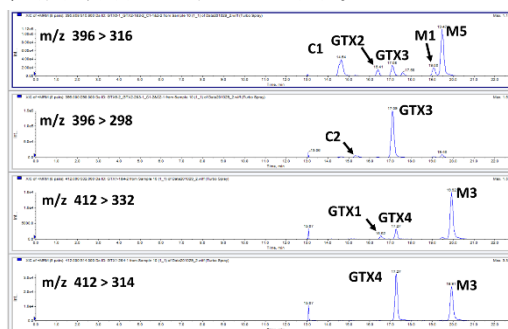


図2 毒化アカガイの代表的なMRMクロマトグラム

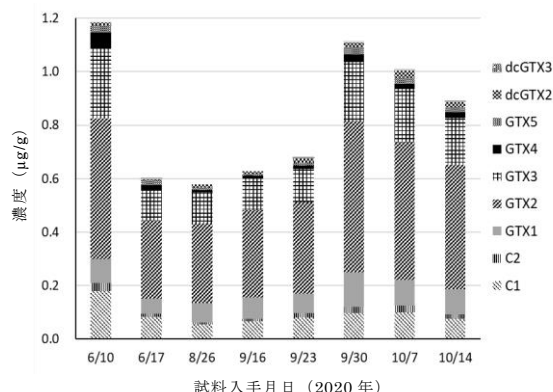


図3 アカガイ可食部中の毒成分濃度

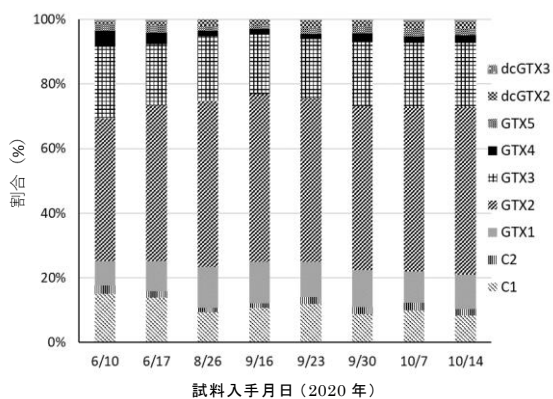


図 4 アカガイ可食部中の毒成分組成

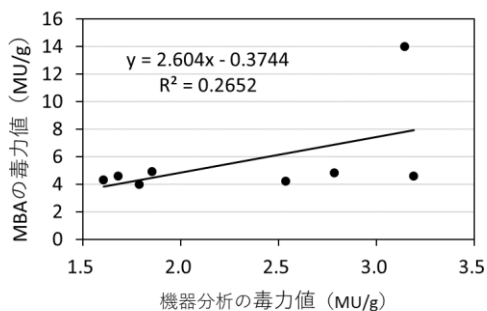


図 5 機器分析の毒力値と MBA の毒力値の相関性

#### 4 参考文献

- 1) Numano.S.et al.,Mar.Drugs,2019,17,653
- 2) Thomas K.M. et al.,Anal Bioanal Chem,2017,409,5675-5687
- 3) 仲谷正ら,第 47 回全国衛生化学技術協議会年会講演集,2010
- 4) 沼野聡ら,第 56 回全国衛生化学技術協議会年会講演集,2019
- 5) 沼野聡,岩手県環境保健研究センター年報第 18 号,2018
- 6) 山本圭吾ら,Nippon Suisan Gakkaishi 83(4),589-598(2017)