

原 著

広島県海域における麻痺性貝毒の原因プランクトン *Alexandrium tamarense*の毒成分

水田 満里 山田 圭一

Toxin Composition of the Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in Hiroshima Prefecture

MARI MIZUTA and KEIICHI YAMADA

(Received Sep. 29, 1995)

Clonal isolates of the dinoflagellate genus *Alexandrium tamarense* were derived from Kure Bay (Hiroshima prefecture) in 1993 and 1994.

Extracts of clonal cell culture were subjected to toxin analysis by HPLC. The toxin composition included C2 (>70 mole%) as a major component, subsequently GTX4 (9-32 mole%), GTX3 (trace-13 mole%) and neoSTX (trace-13 mole%); and C1 (<5 mole%), GTX1 (<2 mole%), GTX2 (<3 mole%) and STX (<1 mole%) as minor components. The toxin profiles showed 2 patterns, one was higher proportion of neoSTX, the other was higher proportion of GTX3 and lower of neoSTX. Toxin content was 49-62 fmol / cell and a specific toxicity was (32-34.5) $\times 10^6$ MU/cell.

Keywords: *Alexandrium tamarense*, dinoflagellate, toxin composition, protogonyautoxin, gonyautoxin, neosaxitoxin, paralytic shellfish poison, HPLC

はじめに

麻痺性貝毒は渦鞭毛藻の*Alexandrium*属等の有毒プランクトンが産生する一群の神経毒であるが、食物連鎖により、これを餌とする二枚貝が毒を蓄積し、この毒化した二枚貝を摂食したヒトが食中毒を起こす。

広島県では、平成4年に広島湾及び周辺海域で、カキを始めとした二枚貝が著しく毒化し [1,2], 水産業界は多大な損害を被ったが、その後も、程度は異なるが、引き続き毒化している。最近、日本だけでなく世界的にも毒化地域が拡大していることから、貨物船が船の安定のために使用するバラスト水に含まれるシスト(休眠接合子)が有毒プランクトンの分布域の拡大に関与している可能性も指摘されている [3]。これら有毒プランクトンの毒成分の組成比は一様でなく、分離した海域によっても異なっているため、発生海域の系群の判別指標となりうることなども報告されている [3]。

広島県の麻痺性貝毒の原因有毒プランクトンは*Alexandrium tamarense*であり、その毒成分については一部報告されているが [4], 今回、平成3年と4年に同一湾内から分離された*Alexandrium tamarense*を培養して毒成分を調べた結果、興味ある知見が得られたので報告する。

材料と方法

Alexandrium tamarense: 広島県水産試験場において、1993年と1994年に呉湾から分離し、それぞれ継代されていたATHS93及びATHS94を使用した。

なお、ATHS93とATHS94はクローン株でないので、1細胞ずつ分離し、クローン株としたものをATHS93のK-1からK-3及びATHS94のK-1からK-4とした。

培養条件: 培地はOgataら [5] のT1培地を使用した。16℃の温度で、16時間の明(7000Lu x)と8時間の暗を繰り返す、10日から14日間培養した。

毒成分の抽出: 細胞数が 10^6 /ml前後の対数増殖期の培養藻体から抽出した。培養藻体を3000rpm/10分遠心後、沈査をpH3.0の酸性(0.001NHCl又は0.25N酢酸)にして、超音波(TOMY Ultrasonic Disruptor)で、氷冷下2分間破碎した。顕微鏡下で細胞の破碎を確認した後、3000rpm/10分遠心した後の上澄液を試料とした。

毒成分の分析: 試料を限外ろ過膜のウルトラフリー3LCC(Millipore)で遠心処理した後、大島ら [6] の高速液体クロマトグラフィー法(HPLC法)で分析した。

分析条件は表1に示した。標品として、和光製品のゴニオトキシン(GTX)混合物(1~4)とカルバイ

Table 1. Operating Conditions for HPLC Analysis of PSP Toxins

| | |
|--------------------|---|
| Column | : Inertsil ODS2 (5 μ m, 4.6 \times 150mm) |
| Mobile phases | : flow rate at 0.8ml/min (1) for GTX1-GTX4 2mM sodium 1-heptanesulfonate in 10mM ammonium phosphate (pH7.1) (2) for STX, neoSTX 2mM sodium 1-heptanesulfonate in 30mM ammonium phosphate (pH7.1) , 5% acetonitrile |
| Oxidizing reagent | : flow rate at 0.4ml/min 7mM periodic acid in 50mM sodium phosphate buffer (pH9.0) |
| Reaction | : at 65 $^{\circ}$ C in Teflon tubing 0.5mm \times 10m |
| Acidifying reagent | : flow rate at 0.4ml/min 0.5M acetic acid |
| Detection | : excitation wavelength 330nm, emission wavelength 390 nm |

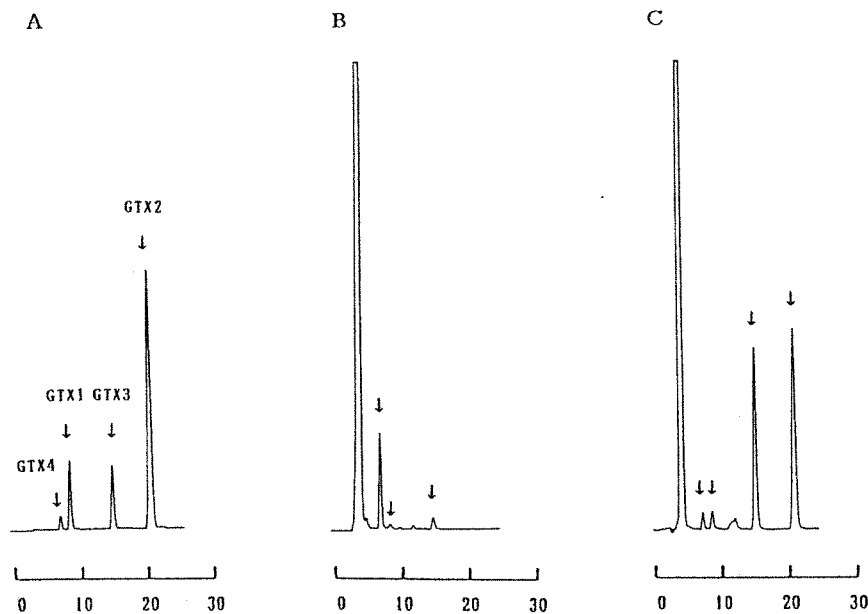


Fig.1. Chromatograms of GTX group of toxins in *Alexandrium tamarense*

A; GTX standards, B; ATHS93 (K-1), C; ATHS94 (K-1)

オケム製品のサキシトキシン (STX) を用いた。C群の carbamoyl-N-sulfo-11 α hydroxysaxitoxin sulfate (C1) と carbamoyl-N-sulfo-11 β -hydroxysaxitoxin sulfate (C2) は強塩酸性 (pH1.5) で15分間煮沸した後, GTX2に変換したものをC1とし, GTX3へ変換したものをC2とした。neoSTXは東北大学で定量されたプランクトン抽出物中のneoSTXを内部標品として使用した。

結 果

毒成分の抽出方法は, プランクトンでは酢酸による場合が多いが, 貝毒のマウスアッセイによる公定法は塩酸で抽出することから, 両データを比較するために,

pHを3.0にした希塩酸抽出も併せて行った。しかしながら, 両方法による結果に大きな違いはみられなかったため, ここでは希塩酸抽出の結果について述べる。

HPLCによる毒成分のGTX群とSTX群のクロマトグラムをFig.1とFig.2に示した。

各々クローン株について, 8つの毒成分 (C1, C2, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, neoSTX, STX) それぞれの総モルに対するモル比率 (%) を表2に示した。各々のクローン株の培養は2回から4回おこなった。

毒成分の組成比 (mole%) はGTX3の前駆体であるC2が一番多く, いずれの株も60%以上を占めた。しかしながら, GTX2の前駆体であるC1は5%以下と低かった。次に多いのが, GTX4で9から32%を占めたが,

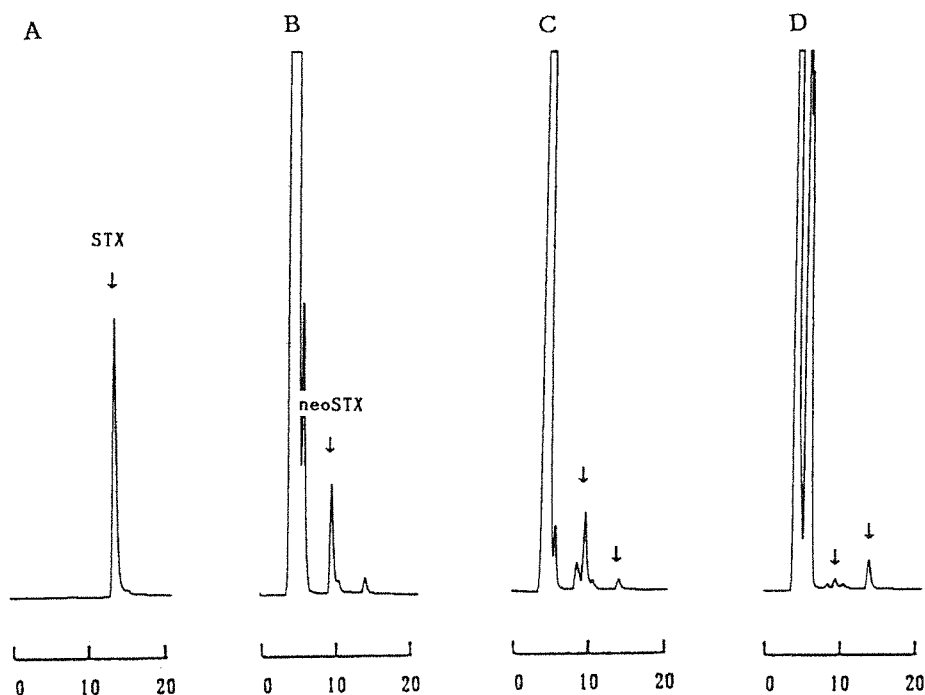


Fig.2. Chromatograms of STX group of toxins in *Alexandrium tamarense*

A; STX standards, B; Identified neoSTX, C; ATHS93 (K-1), D; ATHS94 (K-1)

Table 2. Percent contribution of individual toxic to total toxin composition

| specimens | <i>Alexandrium tamarense</i> | | | | | | | |
|-----------|------------------------------|-------|-------|---------------|-------|-------|-------|-------|
| | ATHS93 | | | ATHS94 | | | | |
| | Clonal culture | K-1 | K-2 | K-3 | K-1 | K-2 | K-3 | K-4 |
| | Mean ± S.D.** | Mean* | Mean* | Mean ± S.D.** | Mean* | Mean* | Mean* | Mean* |
| C1 | 3.5 ± 2.2 | 2.7 | 4.1 | 4.9 ± 1.5 | 1.3 | 0.9 | 2.5 | |
| C2 | 72.9 ± 1.9 | 72.8 | 72.9 | 67.9 ± 6.6 | 57.2 | 79.2 | 76.4 | |
| GTX1 | 1.9 ± 0.3 | 0.1 | 1.9 | 1.3 ± 1.3 | 1.1 | 0.5 | 0.3 | |
| GTX4 | 13.3 ± 1.1 | 16.7 | 15.2 | 8.8 ± 8.3 | 31.6 | 15.1 | 16.1 | |
| GTX2 | 0.2 ± 0.3 | - | - | 2.8 ± 2.3 | 1.5 | Tr | Tr | |
| GTX3 | 0.5 ± 0.5 | 0.3 | 0.3 | 12.5 ± 7.5 | 5.8 | 0.7 | 0.8 | |
| neoSTX | 8.9 ± 0.1 | 7.4 | 5.7 | 1.2 ± 0.3 | 1.4 | 3.6 | 4.0 | |
| STX | 0.6 ± 0.3 | - | - | 0.7 ± 0.4 | 1.3 | - | Tr | |

All results are shown in mole%. -, Not detected; Tr, less than 0.1%

** , Mean ± S.D. of 4 samples. * , Mean of 2 samples.

株によって差が見られた。GTX1はいずれの株も2%以下であった。GTX3はATHS94のK-1が平均12.5%とATHS94のK-2が5.8%を占めたが、その他は1%以下と低かった。neoSTXはATHS93のクローン株ではいずれも6%から9%を占めたが、ATHS94ではK-1とK-2が1.5%以下で低かった。

毒組成比のパターンに2つのタイプがみられた。1つはGTX4とneoSTXがかなり含まれているタイプで、ATHS93の3つのクローン株がこれに相当し、ATHS94のK-3及びK-4がこれに近かった。もう1つは

GTX3がかなり含まれ、neoSTXが少ないタイプで、ATHS94のK-1がこれに相当した (Fig.3)。

培養藻体当たりの総モル量はATHS93のK-1が49.2 ± 24.9fmol/cell, ATHS94のK-1が62.1 ± 33.5fmol/cellであった。同一クローン株においても、実験ごとに大きなバラツキがみられたが、平均値は両者とも近い値を示した。

HPLC法で測定した各毒成分量をマウス・ユニットで換算した毒力は、培養藻体当たり、ATHS93のK-1が(32.0 ± 16.3) × 10⁴MU, ATHS94のK-2が(34.5 ± 14.4)

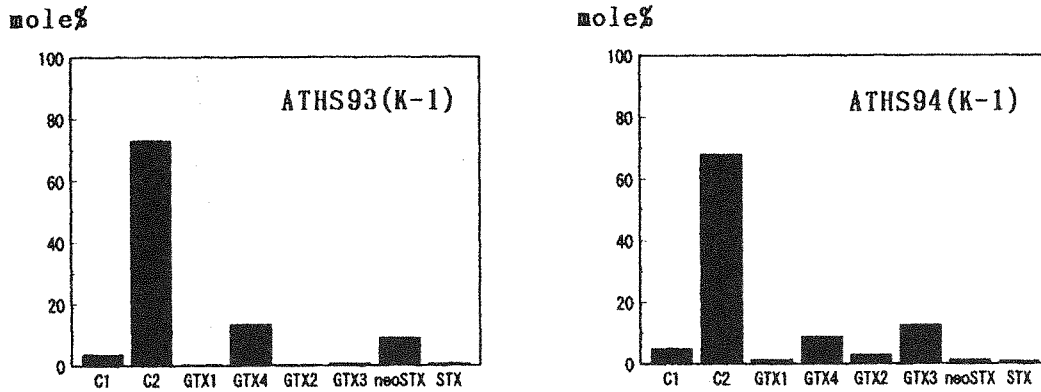


Fig.3. Relative abundance of each toxins (mole %) in *Alexandrium tamarense*

$\times 10^6$ MUであった。いい換えれば、1マウスユニットはそれぞれ培養藻体5万2千±4万1千と4万3千±3万3千に当たる。同一クローン株のバラツキは大きい、平均値は両者とも比較的近い値を示した。

考 察

*Alexandrium*属の毒量は培養条件の違いや増殖段階に伴って変化することや [7,8,9], 毒組成も栄養塩等の培養条件の違いによって変わることが報告されている [8]. しかしながら、毒組成はクローン株や一定の培養条件では変化しないと言われている [9, 10].

今回、培養条件を一定にしたクローン株について検討した結果、同一湾内から分離された株の毒組成比に図3に示した2つのタイプが認められた。ATHS93のクローン株はいずれも非常によく似た組成比のタイプ1を示した。ATHS94のクローン株はATHS93と同じタイプ1の株も含まれるが、それ以外に、異なったパターンタイプ2のクローン株が認められた。これらのタイプのクローン株は、数回の実験において、多少のバラツキはみられるものの、組成比のパターンは大きく変わらないので、遺伝的な差によるのではないかと推定された。ATHS94はクローン株間の毒組成比にかなりのバラツキがみられることから、変異株が混在していた可能性が高い。Asakawaら [4] の1992年と1993年の*Alexandrium tamarense*の組成比は、GTX4とneoSTXが多いタイプ1であるが、タイプ1に比べてC2が低く(約37-40mole%), GTX1は高かった(約9-12mole%)。

*Alexandrium*属の毒組成比を指標として、他の海域の系群間の相似性が比較されているが [11, 12], 日本海域における毒組成比についての報告は少ないので、限られた海域での比較であるが、タイプ1はKimら [12] の大船渡湾の平均的な*Alexandrium tamarense*

の組成比に非常によく似たパターンを示し、大島ら [13] の噴火湾のシストから発芽させたクローン培養株とも比較的よく似たパターンを示した。しかしながら、neoSTXの比率が少なく、GTX3の比率が比較的多いタイプ2に該当する例はみられなかった。しかしながら、同一の天然シストから発芽して得られた株においても、毒組成比が大きく異なる例や [12], 同一湾内においても、天然藻体、シスト由来継代株や栄養藻体継代株の間で毒組成比に差がみられることも報告されているので [13], 自然界における多数の変異株の混在が予想される。

麻痺性貝毒はサキシトキシンを基本骨格とした多くの成分が知られているが、これらの一部はある種の酵素によって変換されるのではないかと推測されている。事実、プランクトンの毒組成比と、それを摂取した貝体内の毒組成比は大きく異なっている [4]. 我々も同一湾内において、*Alexandrium tamarense*の発生消長とカキ及びムラサキガイの毒の蓄積と解毒の関係を経目的に調べたが、プランクトンの発生増殖期は、貝内の毒組成はC2やGTX3及びGTX4が多く、プランクトンの毒組成を反映していると思われたが、プランクトンの消失期には、毒力が下がるにつれて、これらは減少し、反対にC1とGTX2及びSTXの割合が増加する傾向を示し、代謝による毒成分の経目的な変化が窺われた [14]. とくに、今回のプランクトン中に多かった毒成分のC2やGTX3及びGTX4は11-hydroxysulfateの β -epimersであるが、貝体内では、それに対応するC1やGTX2の α -epimersの11-hydroxysulfateが増加していった。大島ら [13] は*Alexandrium tamarense*の栄養細胞には β -epimersが多いが、シストには、それに比べて α -epimersが多い事を報告している。栄養細胞は β -epimersを生合成し、これが徐々に化学的に安定な α -epimersへ変換すると考えられている [3,13]. このように、原因プランクトンの毒組成比と貝体内の

毒組成比が異なり、しかも、貝体内でも代謝によって毒組成比が変化していくことを利用すれば、毒組成比は毒の蓄積期か解毒期かの判断材料となる可能性を含んでいる [4,14].

今後は、*Alexandrium tamarense* の細胞当たりの毒力や原因プランクトンの毒組成比及び貝体内の毒組成比等を含めて、更に、貝毒の発消長の予測に役立つ因子を解明していくことが重要であると思われる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、貴重な *Alexandrium tamarense* ATHS93 および ATHS94 を分与して下さった広島県水産試験場高山晴義主任研究員に深く感謝致します。

また、内部標品として使用したプランクトンの neoSTX の定量をしていただきました東北大学の 大島泰克博士に深く感謝致します。

文 献

- [1] 水田満里, 高田久美代, 門田達尚, 海佐裕幸 (1993) : 広島保健環境センター研究報告, 1, 37-41.
- [2] 高田久美代, 水田満里, 門田達尚 (1994) : 広島保健環境センター研究報告, 2, 1-7.
- [3] 大島泰克 (1992) : 化学増刊121, 37-42.
- [4] Asakawa, M., Miyazawa, K., Takayama, H., and Noguchi, T., (1995) : *Toxicon*, 33, 691-697.
- [5] Ogata, T., Ishimaru, T., and Kodama, M., (1987) : *Marine Biology*, 95, 217-220.
- [6] 大島泰克: 神谷久男, 幹 渉編 (1992), 59-69, 海洋生理活性物質研究法, 東京, 恒星社厚生閣.
- [7] Boczar, B. A., Beitler, M.k., Liston, J. Sullivan, J. J., and Cattolico, R. A. (1988) : *Plant Physiol.*, 88, 1285-1290.
- [8] Anderson, D. M., Kulis, D. M., Sullivan, J. J., and Hall, S. (1990) : *Toxicon*. 28, 885-893.
- [9] Kim, C., Sako, Y., and Ishida, Y. (1993) : *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 633-639.
- [10] Boyer, G. L., Sulliiivan, J. J., Andersen, R. J., Harrison, P. J. and Taylor, F. J. R. (1987) : *Marine biology*, 96, 123-128.
- [11] Cembella, A. D., Sullivan, J. J., Boyer, G. L., Taylor, J. R., and Andersen, R. J. (1987) *Biochemical Systematic and Ecology*, 15, 2, 171-186.
- [12] Kim, C., Sako, Y., and Ishida, Y. (1993) : *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 641-646.
- [13] Oshima, Y., Bolch, C., J., and Hallegraeff, G., M. (1992) : *Toxicon*, 30, 1539-1544.
- [14] 水田満里, 高田久美代, 山田圭一, 門田達尚, 高山晴義, 大内 晟 (1995) : 日本食品衛生学会第70回学術講演会講演要旨集. 24.

