

海産植物プランクトンが産生する毒素について*

(国外派遣研修報告)

杉山昭博

1. 序

海産植物プランクトンのうちDinoflagellates(鞭毛藻類)は単細胞で、2本の鞭毛を用いて運動する。以前は運動することから原生動物門に分類されていたが、現在は微細藻類に含まれる。鞭毛藻類は光合成能力を持ち、他の微細藻類と共に食物連鎖の基礎構成物として海洋の生産性に重要な役割を果たしている。これらの内有毒鞭毛藻として知られている種類は大変少なく、さらに他の生物に対して有毒性を示すためには大量の異常発生が必要で、適水温、栄養塩濃度、塩分量、及びその他の要因が関係する。Gonyaulax catenella は最も良く知られた有毒性鞭毛藻で、北部カリフォルニア、オレゴン、及びワシントン州、ブリティッシュコロンビア、アラスカ、アリューシャン諸島、及び日本列島沿岸域に分布し、麻痺性貝毒(Paralytic shellfish poisoning:PSP)の原因である。メキシコ湾にしばしば見られるGymnodinium breveは冷、温血動物の両方に有毒であり、この異常発生は魚の大量斃死を誘発し、毒性はPSPとは異なりシガテラ中毒に類似したゆっくりとした症状を示す。これらの種類の外にも有毒性を疑われているものが多々ある。沖縄及び南太平洋海域で広く発生し、大きな問題となっているシガテラ中毒も(毎年世界中で約50,000例が発生)この鞭毛藻類Gambierdiscus toxicus からの食物連鎖であることは良く知られているが、これを実験的に立証したものはいない。ハワイ大学のScheuer グループはシガテラ研究の困難性(個体、時期、場所によって変動が大きく、含まれる毒の量もきわめて微量)を克服してCiguatoxin(CTX)の分子量を1,111.7、分子式を $C_{53}H_{77}NO_{24}$ 、または $C_{54}H_{78}O_{24}$ と報告した。そして、東北大学の安元等はシガテラ魚の内臓1,000kgから粗CTX1.1mgを得、分子構造を解明した(図)。毒素の薬理学的特徴は興奮伝導の際、神経膜でのナトリウムイオンの透過性を増加することである。マウスに対する急性毒性は $LD_{50} 0.45 \mu g/kg$ で、Tetrodotxin(TTX)の約20倍も強力である。CTXと関係が深いMaitotoxinのマウス毒性は $0.17 \mu g/kg$ と、CTXより更に強く、現在知られている魚貝毒の中では最強と言われている。しかし、シガテラ毒についてはまだ未知の部分が多い。

ロードアイランド大学(URI)の清水グループはこれら鞭毛藻類や他の微細藻類を実験室内で培養し、粗毒素を抽出してバイオアッセイにかけ(培養細胞、モルモット、バクテリアなどに対して)、精製、及び構造決定等を行なっている。そこで、鞭毛藻類の培養法を学び、更に粗毒素の抽出までを行った。今後本県の水産動植物の生理生態を考える上で、このような毒素や、忌避及び嗜好性化学物質の存在を考慮し、また天然でのプランクトンとの関係も注意深く検討する必要がある。

*:(財)沖縄県人材育成財団・平成2年度海外派遣研究

2. PSP

PSP毒素の化学的構造の研究は約20年間行われ、結局エックス線結晶解析を用いて決定された。その間、貝類の毒化とプランクトンの関係が調査され、*Gonyaulax catenella*と*G. tamarensis*が毒素の真の産生者であることが明らかになった。

現在、PSP標本からは12種類以上の毒素が認知されており、構造的にSaxitoxinとNeosaxitoxinの2グループに分けられる(図)。各グループとも11-O-sulfate群の存在、およびその立体化学的相違から変異体を生ずる。また、前例のないN-sulfate carbamoyl群の存在も特徴的である。N-sulfate毒素は弱酸性下で容易に加水分解してcarbamoyl毒素と無機硫酸塩になる。Neo-saxitoxinは1-(N)-hydroxysaxitoxinである。

フグ毒Tetrodotoxinと同じように、ナトリウムイオンの細胞膜通過を妨害することで神経筋肉系に素早く作用し、呼吸麻ひを引き起こす。

3. Brevetoxin

赤潮生物の*Gymnodinium breve*が産生する多環エーテル構造の脂溶性毒素で、エーテルを用いて抽出でき、光と空気に変化しやすい(図)。

4. PL toxin

*Prorocentrum lima*はPL toxin-I,II,およびIIIを産生し、PL toxin-IとIIはジエチルエタノール可溶性、PL toxin-IIIは1-ブタノール可溶性で、主要毒素のPL toxin-IIは海綿類から最近分離されたOkadaic acidに一致する

この毒素はシガテラ毒のScaritoxinとCiguatoxinにクロマトグラフィーにおける性状が非常によく似ている。

5. PSP毒素の単離法

毒素を純粋化する方法は弱酸性樹脂に強く結合する性質を利用している(図)。毒素はpH6.0付近でSephadex-15やBio-Gel P-2のような小型のマトリックスゲルに吸着するので、それを酢酸溶液で抽出する。粗毒素混合物はBio-Rex 70のような弱酸性樹脂で、酢酸の濃度勾配を用いて個々の毒素に分離できる。

6. 培養藻類からの試験用サンプルの準備方法

人工的に培養している藻類からの毒性試験用サンプル作成方法は次のとおりである。すなわち、培養液から遠心分離等で細胞を回収してi-プロパノールで抽出し、エバポレーションで乾燥する。それをさらにi-プロパノールで数回抽出してバイオアッセイ用のサンプルとする。培養液の遠心分離後の上澄み液はXAD-2カラムでろ過し、i-プロパノール抽出の後エバポレーションして試験用サンプルに供する。

7. 研究内容

1) 培地の用意

2) 単離培養技術の習得

初めに採集標本からDinoflagellateを1個体ずつ取り出し、そこから純粋培養を開始しなければならない。その為の単離培養技術を習得した。

3) 保存株の維持管理

研究室で保存しているDinoflagellatesや珪藻類継代作業の補助。

4) 培養藻類の収穫

十分に藻類が増殖した培地は、連続遠心分離や限外ろ過で藻体を回収する。その作業の補助。

5) *Prorocentrum minimum*と*limu*の培養からバイオアッセー用サンプルの作成まで

Dinoflagellateの一種である*Prorocentrum* 2種類について、種株から拡大培養して藻体を回収し、その後バイオアッセー用のサンプルの作成までを行なった。種株から12リットル規模までに藻体を拡大するのに約1.5箇月かかった。そして、遠心分離して藻体を回収し、i-プロパノールで毒素を抽出し、抽出液をエバポレーションして乾燥粉末状の粗毒素を作成した。この後マウス等に接種して毒性が確認できれば、この粗毒素に含まれていると思われる複数の毒素の純化とその性状検査を行ない、既存の毒素との比較検討を行なり。今回は時間の関係で粗毒素の作成までしか行なえなかった。

6) 顕微鏡撮影

Dinoflagellates保存株の写真撮影を行なった。種類は以下のとおりである。

Gymnodinium, sp., *golutheonum*, *catenafum*, *savguineum*

Gyrodinium aureolum

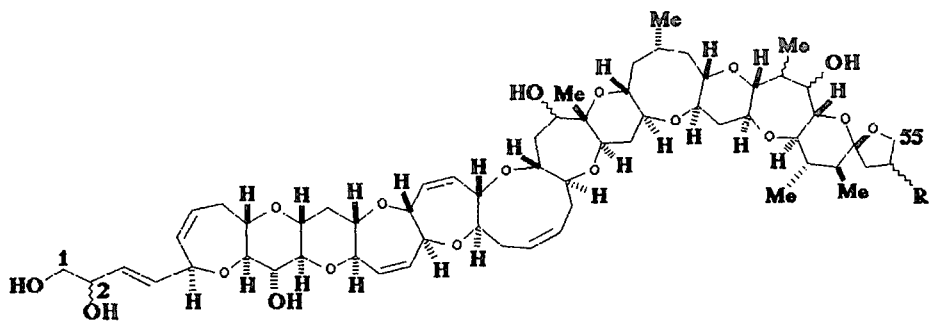
Prorocentrum minimum, *concovun*, sp., *mexican*, *minimum*

Amphidinium carteri

7) 施設見学

メイン州にあるDinoflagellates保存施設のBigela laboratoryを見学した。民間施設で株の有償配布で運営している。Dinoflagellateの世界的権威機関で、培地を考案したGuillardがいる。

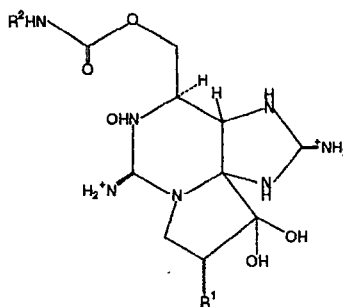
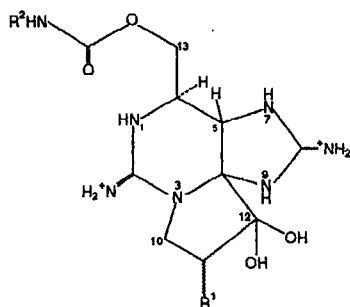
URI(University of Rhode Island)のベイキャンパス(OceanographyのGraduate Schoolがある。), NOAA(National Oceanic and Atmospheric Administration)のNational Marine Fisheries Service Northeast Fisheries Center Narragansett Laboratory, およびEPA(Environmental Protection Agency)の研究所を見学した。



30: R=OH
 31: R=OH, C(1)-H₂=C(2)-H

Ciguatoxin (by Murata, M et al.)

図 シガトキシン



Saxitoxin : R1, R2 = H

Neosaxitoxin : R1, R2 = H

Gonyautoxin-II : R1 = a -OSO₃⁻, R2 = H

Gonyautoxin-I : R1 = a -OSO₃⁻, R2 = H

Gonyautoxin-III : R1 = b -OSO₃⁻, R2 = H

Gonyautoxin-IV : R1 = b -OSO₃⁻, R2 = H

Gonyautoxin-V : R1 = H, R2 = SO₃⁻

Gonyautoxin-VI : R1 = H, R2 = SO₃⁻

Gonyautoxin-VIII : R1 = b -OSO₃⁻, R2 = SO₃⁻

C3 toxin : R1 = b -OSO₃⁻, R2 = SO₃⁻

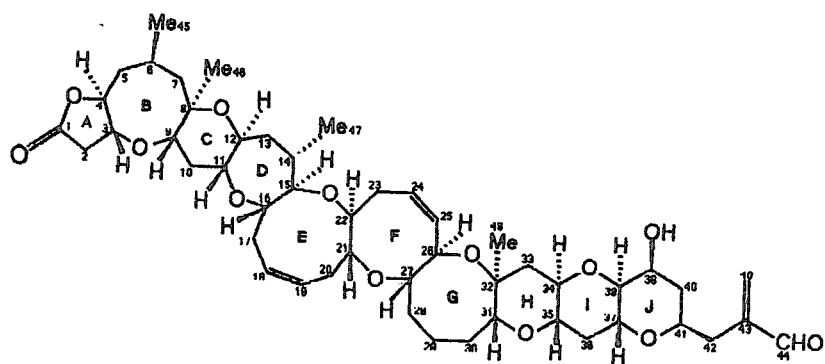
(= C2 toxin)

C4 toxin : R1 = a -OSO₃⁻, R2 = SO₃⁻

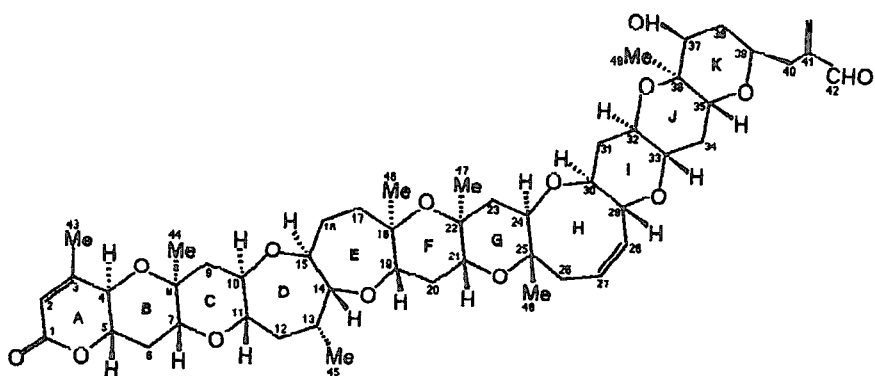
Epgonyautoxin-VIII : R1 = a -OSO₃⁻, R2 = SO₃⁻

(= C1 toxin)

図 麻痺性貝毒 (サキシトキシン等)



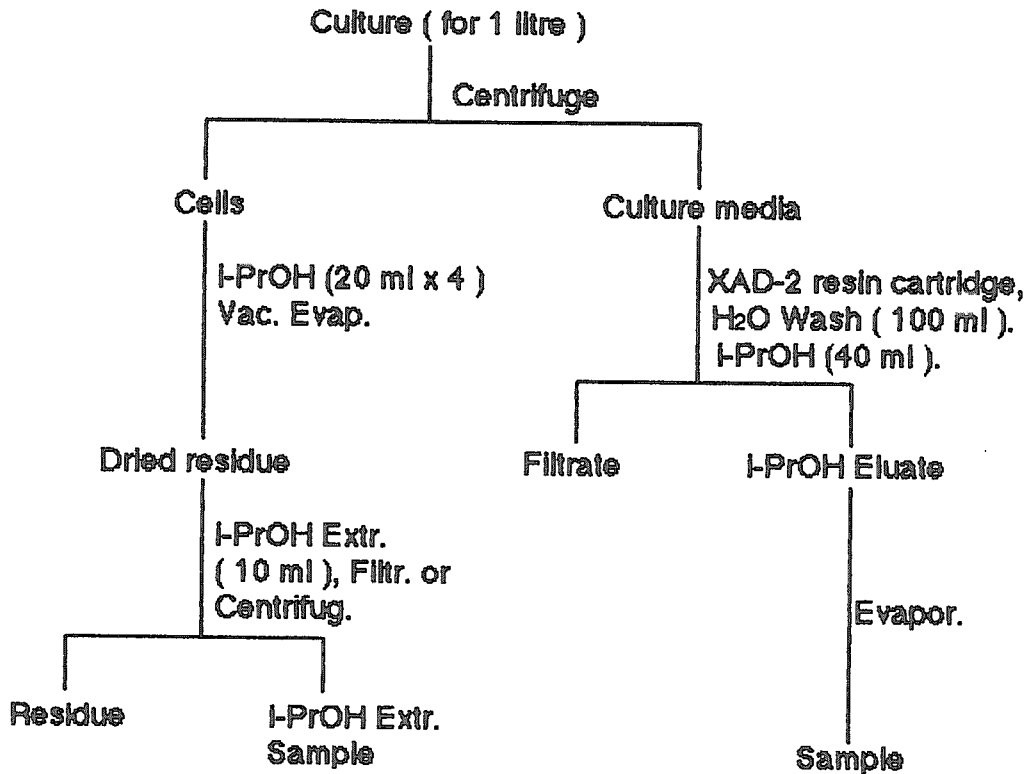
Brevetoxin-A



Brevetoxin B

☒ プレベトキシン

Standard procedure for preparation of test samples
from algal culture



i-PrOH : HPLC-grade
XAD-resin, purified by EPA method

11/8/89

図 麻痺性貝毒の単離法