

藻華及其毒素檢測 之現況與發展

林蘭砮、傅幼敏

水產品藻源毒素所引起的食物中毒依症狀大約可分為五類：麻痺性貝類中毒(paralytic shellfish poisoning, PSP)、失憶性貝類中毒(amic shellfish poisoning, ASP)、下痢性貝類中毒(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)、神經性貝類中毒(neurotoxic shellfish poisoning, NSP)、熱帶珊瑚礁魚類中毒(ciguatera fish poisoning, CFP)。產毒藻類由濾食性雙殼貝或草食性熱帶珊瑚礁魚類攝入，再經由食物鏈傳遞(如頭足、腹足類軟體動物食用雙殼貝或肉食性魚類食用草食性魚類)，蓄積在一些本不具毒性的水產品體內；文獻上亦有蝦、蟹等甲殼動物及迴游性近岸魚種造成中毒事件之記載。台灣位處亞熱帶，一些類此之毒藻陸續地被分離與研究，甚至自養殖池中亦可分離出毒藻。近年來隨著台灣加入世界貿易組織(WTO)及兩岸貿易及走私頻繁，水產品衛生安全之檢驗已不限於一般化學及微生物之檢驗，藻源毒素之問題亦越發受到關注。

亞太經濟合作會議(Asia Pacific Economic Cooperation, APEC)係亞太地區以經濟體(economics)組成非正式諮商論壇，於 1989 年成立，我國以中華台北(Chinese Taipei)名稱於 1991 年加入。為避免藻毒問題造成各經濟體及與非 APEC 成員間之水產品往來貿易受阻，2001 年 APEC 中之海洋資源保護(Marine Resource Conservation)工作小組之紅潮及有害藻華管理計劃(Red Tide/Harmful Algal Bloom Project)成立了一個專戶，名為「貿易與投資之自由及設備專戶」(Trade and Investment Liberalisation and Facilitation Special Account, TILF)，希望以三年(2001~2004 年)的時間達成以下目的：(1)發展適當的分析方法來監測水產品是否受到污染；(2)發展經認證之校正標準品(certified calibration standard)及參考物質(certified reference materials)，提供進行毒素化學分析鑑定時所需；(3)將上述兩項成果結合，並以研討會之方式介紹給 APEC 所有會員體中有關執行水產品檢測之單位。執行此三年計劃之主要單位為加拿大國家研究委員會(National Research Council)的海洋生物科學研究所(Institute for Marine Bioscience)，另有來自不同經濟體如紐西蘭、澳洲、中華台北(窗口為台灣大學漁業科學研究所周宏農教授實驗室)、新加坡、日本及美國等其他實驗室參與。2003 年 11 月 26 日至 11 月 30 日，TILF 在紐西蘭南島的納爾遜(Nelson)舉辦了 HABTech 2003(2003 年有害藻華相關技術研討會)，此研討會堪稱是一「藻類及藻毒檢驗技術交流暨成果發表會」。研討會之內容包括(1)報告各國監測藻華之最新技術、管理現況及因應措施(2)展示各國對有害

藻類及其毒素偵測之最新技術(3)安排實地參觀納爾遜當地之海洋毒素檢驗實驗室(Cawthron Institute)，了解各種分子生物技術(DNA probe、biochip、ELISA、RT-PCR)及貴重儀器(LC-MS、LC-MS/MS、NMR)於海洋毒素偵測上之應用。茲將所得摘錄於後。

一、藻華及藻毒之監測與管理

(一)藻類鑑定技術：加拿大學者發表了原位(*in situ*)監測之技術，澳洲學者介紹以同步聚合酵素鏈反應(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)鑑定水樣中藍綠藻(Cyanobacterium)之成果，紐西蘭之專家則闡述以去氧核糖核酸探針(DNA probe)鑑定有毒藻類及無毒藻類之快速檢驗方法，並說明將此技術導入納爾遜 Marlborough 峽灣魚貝類水產品監測計劃之實施情形。足見為有效區分產毒與不產毒藻類，各國學者已採用分子生物技術來輔佐傳統顯微鏡鏡檢之不足。美國諸多大學教授聯合發表以 RT-PCR 針對藻類之 18S SSU rRNA genome 做為 target sequence，目前已可成功鑑定多種會產毒之藻類。在另一篇報告中，澳洲學者與美國學者亦說明如何利用 RT-PCR 鑑定湖水及水庫中會產生肝毒素(alkaloid heptatoxin cylindrospermopsin)之 *Cylindrospermopsis raciborskii*。由於水庫中蓄積之水流動性較差，若有害藻華一旦發生，恐將危害人民用水之安全。因此，巴西聖保羅大學之教授於會中發表有關使用 RT-PCR 來檢測 15 個水庫中 *Microcystis* spp. 之報告，使用 *mcyB* 序列，在 60 株篩選出菌株中可以成功鑑定 17 株。除了 RT-PCR，德國及加拿大專家亦聯合發表以 long subunit (ls) 或 small subunit (ss) rRNA 做為探針(probe)，鑑定亞歷山大藻(*Alexandrium* species)，同時搭配 HPLC-FD 或 HPLC-MS 確認，證實此方法可應用於監測系統中。墨西哥學者亦使用 16s rDNA probe 來鑑定水庫中之藍綠藻，以監測水之品質。

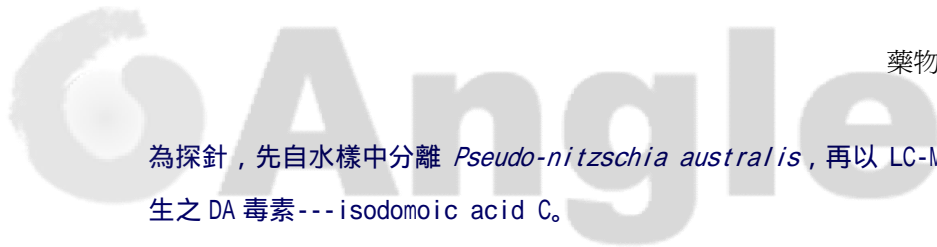
(二)採集技術：紐西蘭之專家提出一種新的蒐集水樣技術：Solid Phase Adsorption Toxin Tracking(SPATT)，做為原位(*in situ*)監控的利器。

(三)藻毒分析方法：

1. 麻痺性貝毒(PSP)：日本 Dr. Oshima 報告應用小白鼠生物毒性分析法鑑定 PSP 時，加入由扇貝(scallop)中萃取的天然毒素做為 in-house reference material，當做品質控管(quality control)之條件。Dr. Oshima 同時發表以高效液相層析儀(high performance liquid chromatography, HPLC)搭配管柱後衍生反應(post-column derivatization)及使用螢光偵測器(fluorescence detector)鑑定藻類中之 PSP，並應用到監測系統中。使用管柱後衍生反應者亦有加拿大 Dr. Quilliam 的報告。但 Dr. Quilliam 針對管柱後衍生反應需要花費較多時間之缺點，又提出搭配管柱前氧化反應(prechromatographic oxidation)之方法，並和其他 18 個實驗室做共同研究(collaborative study)，獲得不錯的成果。除了使用螢光偵測器，Dr. Quilliam 介紹另外一種偵測器---chemiluminescent nitrogen detector (CLND)，此偵測器可針對含氮

化合物反應，因此舉凡含氮毒素如 PSP、河魴毒素(tetrodotoxin)、anatoxin(一種 freshwater toxin)、螺旋藻毒(spirolide)、domoic acid(一種 ASP)等皆可使用 LC-CLND 定量。近幾年來 LC-MS 及 LC-MS/MS 技術發展日新月異，研究藻毒之學者亦善加利用，發表不少報告。首先，紐西蘭專家提出以 LC-MS/MS 鑑定多種藻類毒素殘留分析之方法，加拿大 Dr. Quilliam 也發表以 hydrophilic interaction liquid chromatography(HILIC)-MS 鑑定 PSP 之技術；新加坡學者向 Dr. Quilliam 取經後，亦使用相同技術鑑定分離自 *Gymnodinium catenatum* 之 PSP。由於使用化學分析時需要使用經驗證參考標準品及經驗證參考物質，在這方面執世界牛耳之加拿大國家研究委員會提出三篇報告，介紹如何自藻類中純化 PSP、如何確認毒素之純度及穩定度，並使用核磁共振(magnetic resonance spectroscopy, NMR)來定量。其他分析方法尚有澳洲學者針對 PSP 的毒性受體毒素分析(receptor assay)、智利學者針對 PSP 的毒性官能基分析(functional assay)、紐西蘭專家針對各種貝類的免疫分析(immunoassay)提出改進方法與期許；同時亦有紐西蘭環境科學研究所之專家提出利用 neuroblastoma assay 做為篩選神經毒素(neurotoxin)的定性方法，可初步判斷是否含有 PSP 或 NSP。其中有一篇報告非常有趣：加拿大 Dr. Joanne F. Jelllett 將其實驗室心血結晶發展為市售檢驗 PSP 及 ASP 套組，無奈上市後因單價高、接受度不大之因素面臨公司轉手之命運，這慘痛經驗告訴與會者：「對科學家而言，研發一種新的檢驗方法的確是一項挑戰，但卻只是產品商品化及為大眾接受的一小步而已---困難的還在後面」。

2. 下痢性貝毒(DSP)：日本教授針對 DSP 的蛋白質磷解酵素(protein phosphorylase 2a, PP2A)提出改進方法與期許，澳洲學者提出以 HPLC 定量自昆士蘭及新南威爾斯省採集貽貝中之 DSP，紐西蘭 Cawthron Institute 則使用離子阱(ion-trap) LC-MS 做為鑑定 DSP 相關毒素(yessotoxin 及 pectenotoxin-2)結構之工具。英國學者使用 LC-MS 來分析水溶性魚貝毒素(lipophilic shellfish toxins)，包括 okadaic acid、pectenotoxin-2 及 azaspiracid-1 等。日本學者與紐西蘭 Cawthron institute 合作，亦以 LC-MS/MS 為分析方法，自貝類檢體中鑑定出 DSP 毒素如 brevetoxin B1 及 PbTx-3，找出在紐西蘭爆發下痢性貝毒之元兇。英國學者也報告在藍貽貝(blue mussel)萃出物中，以 LC-MS 鑑定發現 pectenotoxins、okadaic acid 及 dinophysistoxin-2 等三種 DSP 毒素，這是首次在藻類 *Dinophysis acuta* 中發現有三種毒素同時存在。除了化學分析，紐西蘭之專家也使用 PP2A 之分析來鑑定 DSP 毒素。
3. 失憶性貝毒(ASP)：以 HPLC 分析 ASP 是目前 AOAC 建議方法之一(另一項是麻痺性貝毒的小白鼠生物毒性分析)，秘魯學者提出以 HPLC 鑑定採集自其國家之北海岸及南海岸之雙殼貝類中的 domoic acid (DA)，並探討氣候之影響。另外，挪威與紐西蘭學者亦共同發表以直接式酵素連結免疫分析反應(direct c-ELISA)鑑定海水中及貝類中之 DA，研究結果顯示可使用於監測系統中。紐西蘭專家以核糖體核糖核酸(ribosomal RNA)做



為探針，先自水樣中分離 *Pseudo-nitzschia australis*，再以 LC-MS 鑑定該(株)菌所產生之 DA 毒素---isodomoic acid C。

4. 微囊藻毒(Microcystins)：Microcystins 為藍綠藻(*Cyanobacterium*)產生之細胞外代謝物，為肝毒素(cyclic hepapeptide toxins)，常見於湖水及水庫中，和 anatoxins 統稱為 freshwater toxins，別稱「水庫殺手」。短時間內食用含大量微囊藻毒之水會造成肝損傷，長時間飲用則會促進肝腫瘤之產生。近來最受注目之例子為巴西 60 名洗腎患者進行血液透析時使用含有微囊藻毒之水而引起肝功能損傷，甚至死亡之案例。世界衛生組織(World Health Organization, WHO)因此而訂定飲水中之限量標準為 1 µg/L。此次研討會德國學者報告以 HPLC 搭配光二極體偵測(photo-diode-array)來鑑定水中微囊藻毒，前處理可使用固相萃取(SPE-C18)或免疫親和性管柱(immunoaffinity column)。此方法並正被國際標準組織(International Standardization Organization, ISO)評估中，目前有 30 家實驗室參與共同研究。而澳洲學者有感於使用 HPLC 分析耗時費力，嚐試評估三種市售 ELISA 套組鑑定微囊藻毒之可行性，發現僅有一種套組可真正應用於實務上。加拿大和澳洲學者聯手合作，先使用免疫親和性管柱萃取水樣，再使用多(株)抗體(polyantibodies)來篩選水樣中之微囊藻毒，模擬水樣中存在有許多不同毒素之真實情形。德國教授發表使用 LC-MS 定量 saxitoxin、DA、OA、anatoxin-A 時，同時可檢測六種 microcystins，並可得知此六種毒素之結構。LC-MS 應用性之廣可見一斑。
5. 其他毒素：Spirolides 為螺旋藻所產生之一群毒素總稱，可在魚貝類親油性(lipophilic)萃出物中發現，注射至小鼠中會引起神經毒症狀(neurotoxic symptoms)，並在 3-20 分鐘內死亡。加拿大 Dr. Quilliam 以 LC-MS/MS 分析藻類及貝類檢體，可靈敏地鑑定不同結構之 spirolides，偵測極限可達 ppb 程度。

(四)其他：在藻毒的其他議題中，還包括了澳洲學者報告在澳洲海域中發現新的三種雙鞭毛藻(gymnoginiod dinoflagellates)，美國學者探討在兩種 *Pfiesteria shumwayae* 藻類中，造成 ichthyotoxicity(發癢毒性)的主要毒素。紐西蘭 Cawthron Institute 是該國研究海洋毒素之學術重鎮，而研究海洋毒素須從培養有毒藻類開始，因此該研究所報告目前所有收集到之菌(株)及說明如何保存。

二、現場技術展示

展示分為六大部分：cells、probes、functional assays、immuno assays、HPLC 及 LC-MS、LC-MS/MS，目前皆已實際應用於藻類及毒素之分析。

1. Cells：已被廣泛應用於神經物理學(neurophysiology)及神經藥物學(neuropharmacology)的研究上之腦細胞切片分析法(brain slice assay)，亦使用於藻類及其毒素之分析，其原理為：腦細胞具有許多 ion channels 及不同 receptor，因此使用大鼠(rat)腦細胞切片來快速判定樣品是否含有可以阻斷 ion channel 的毒素(如：



麻痺性貝毒及神經性貝毒)。腦細胞切片置於凹槽中，將檢液滴入腦細胞切片，左右電極同時通電並以訊號放大器連接於電腦監測，藉由電波之變化可得知檢液中是否含有毒素。美國 FDA Dr. Sherwood 展示田野調查專用顯微鏡(field microscope)，利用輕便的光學顯微鏡及外接數位相機，可以隨時隨地於水邊以特殊取樣管取得水樣，再對照毒藻之圖譜，可立即監測水中是否有產毒藻類生長。美國馬里蘭大學(University of Maryland)的 Dr. Holly Bowers 則利用同步聚合酵素鏈反應(real-time PCR)，針對藻類的特定序列加以增值，偵測海水中型態相近的產毒藻類及不產毒藻類，避免誤判；並且可同時定量。

2. Probes: 由德國的 Dr. Linda Medlin 介紹 biochip(生物晶片)及 FISH(螢光原位雜交法)於藻類鑑定之應用。Biochip 係利用 DNA 微陣列技術(DNA microarray)，將不同產毒藻類的 DNA 或 RNA 鑲嵌在載玻片或尼龍薄膜上，再與從樣品萃得之 DNA 或 RNA fragment 進行雜交(hybridization)，可同時檢測出九種產毒藻類。而螢光原位雜交(fluorescence in situ hybridization, 簡稱 FISH)，不必破壞細胞(省略萃取步驟)，可以在 30 秒內同時鑑定樣品中是否含有產毒藻類。以顯微鏡觀察水中藻類型態，是最原始、簡單可得知水樣中是否有產毒藻類生長的方法。然而，有時產毒藻類與不產毒藻類型態相近，或數量太多難以計算，易造成判斷上之困難。Cawthron Institute 介紹使用 DNA 探針(DNA probe)來捕捉海水中產毒藻類之核糖體核糖核酸，再以分光光度計偵測吸光值(optical density)，可在 1 小時內同時偵測三種型態相近的藻類並計算其數量，彌補上述單純用顯微鏡觀察時之缺點。同時展示 whole cell format DNA probe，可以不用經過萃取步驟，直接捕捉海水中目標藻類之核糖體核糖核酸，再以顯微鏡(inverted microscope, 光源由下往上投射)觀察，將可減少誤判情形發生。
3. Functional assay: 利用毒素致病機制，已發展出下痢性貝毒及失憶性貝毒之 functional assay。下痢性貝毒之主要毒素為 okadaic acid(OA)，毒性主要作用於對蛋白質磷脂酵素(PP2A)之抑制。利用自日本貝類(*Neptunea arthritic*)中萃取之 PP2A 及已商品化之 *p*-nitrophenyl phosphate 做為基質，再加入水樣及貝類樣品，利用產物在分光光度計下之讀值，可測定樣品中 OA 含量。OA 亦可使用靈敏度較佳之螢光光度計偵測，原理為：利用 4-methylumbelliferyl phosphate 及 fluorescein diphosphate 在 PP2A 作用下會產生螢光物質的特性，將水樣及貝類樣品萃出物加入上述基質中，偵測其於螢光光度計下之讀值，可測定樣品中 OA 含量。而失憶性貝毒之主要毒素為 domoic acid(DA)，其毒性為在腦與中央神經系統上干擾一種胺基酸---谷氨酸(glutamate)的正常傳導機制，病理組織上之研究亦證明腦部海馬區的神經系統因 DA 的作用而受損。利用放射性 ^3H -kainic acid(^3H -海人草酸)在 SF9 昆蟲細胞上之谷氨酸接受器(glutamate receptor)上被 DA 取代之特性，可用以檢測樣品中是否含有 OA。再配合 96-well microplate 及閃爍計數器(multiwell scintillation counter)，可應付大量樣品分析



之需求。

4. Immuno assay：利用直接競爭式酵素連結免疫分析(direct cELISA)，可快速分析樣品中是否含有失憶性貝毒毒素-domoic acid(DA)。先將 DA-protein conjugate 固著在 96-well microplate 上，再加入 DA 標準品、樣品及 anti-DA HRP conjugate，進行競爭反應，可由吸光值判讀毒素之含量。利用 lateral flow (又稱 immunochromatographic strip, 廣泛應用於驗孕試紙) 快速檢驗技術，目前已有檢驗套組可檢測麻痺性貝毒(PSP) 及失憶性貝毒(ASP)。檢液經由毛細現象通過 T(test) zone 時，若檢液中含有毒素，會和 T zone 的特殊抗原結合，使得 signal reagent 無法與 T zone 之抗原結合，固無法呈色；但仍然可與 C(control) zone 的特殊抗原結合，呈現紅色。此快速檢驗除可定性，亦可做半定量試驗。
5. HPLC：相對於需要投注較多人力、物力之 LC-MS 及 LC-MS/MS，HPLC 為較為普遍使用之分析儀器。以 HPLC 分離，配合管柱後氧化(post-column oxidation)，再以螢光偵測器 (fluorescence detector) 偵測，可以檢測所有的麻痺性貝類毒素 (saxitoxin, neosaxitoxin, gonyautoxins)，但需要較多時間。若將移動相溶液由 isocratic 改變為 gradient，可節省三分之二的時間。
6. LC-MS 及 LC-MS/MS：以 HPLC 搭配紫外光檢出器 (UV detector) 及質譜儀 (mass spectrum)，可不需經過衍生化處理，定性及定量藻類毒素。但目前更先進的化學分析方法為 LC-MS/MS：以 HPLC 搭配 UV detector 及 triple quadrupole MS/MS，HPLC 可以分離出單一毒素，第一個 MS 可以決定最大的離子片段 (parent ion)，得到一個 m/z 值，針對此離子再撞擊、分裂可得第二個離子片段 (daughter ion)，又得到另一 m/z 值。設定只讓符合這些參數之物質通過，可同時定性及定量不同藻類毒素。

三、心得與建議

此次研討會網羅了世界各國研究藻類毒素的精英，在短短幾天時間中吸收各家精華，學習管理與處理有害藻華之技術、最新偵測方法，謹將心得與建議摘要如後。

(一) 藻毒分析之發展方向

會議最後一天，討論小白鼠生物毒性分析法之未來及如何推動新的分析技術應用於監測系統上。各國學者熱烈討論，各抒己見，最後討論出一個共識：雖然以化學儀器如 LC、LC-MS 及 LC-MS/MS 可以鑑別個別毒素及定量，然而考量儀器成本及人員訓練，再加上標準品及參考物質已被列為化學武器，取得所費不貲及有所管制，要推廣 LC-MS 成為 AOAC 建議之方法還有一段路要走(雖然 LC-MS/MS 是比 LC-MS 更強而有力之分析利器，但由於儀器設備十分昂貴之限制，現階段暫時先推廣 LC-MS 之分析方法)。因此，小白鼠生物毒性分析法雖然有其缺點(個體差異性及無法辨別個別毒素劑量)，還是有其存在之必要。目前本局有能力執行 PSP 的小白鼠生物毒性分析法及 LC-FD 化

學分析法，但既然 LC-MS 有可能成為未來 AOAC 建議之方法，建立 LC-MS 之檢驗方法還是有其必要。

(二)藻毒分析之跨國合作

此次研討會發表多篇由不同國家實驗室共同合作的結果，亦有多篇有關毒素分析方法的共同研究(collaborative study)報告，顯示開發新的分析方法已不再是單打獨鬥，跨國合作的時代已經來臨。要掌握分析方法的最新脈動，參加相關研討會實屬必要。再者，由口頭報告或海報論文亦可看出：美國藥物食品管理署(FDA)、加拿大國家研究委員會及紐西蘭 Cawthron Institute 為當今世界研究海洋毒素之學術重鎮，日本、新加坡等國家皆曾派員學習相關技術後，再返國建立分析系統。若能派員循此模式赴海外相關實驗室研習，相信對提昇國內相關檢驗技術大有助益。

(三)中國大陸沿海漁獲安全堪憂

此次研討會重點著重於分析方法之建立，然而僅有的幾篇藻華監測報告背後所揭露的意義值得令人深思。有害藻華已普遍發生於全球各地區，雖然台灣由於地形及洋流關係，這方面的問題並不嚴重，但隨著水產品貿易往來頻繁，對於海洋毒素可能帶來之危害仍不可輕忽。中國大陸朱明遠教授於會中發表三年來於山東膠州灣監測 DSP 及 ASP 之報告，與其詳談，得知目前中國大陸對海岸藻華之監測尚未有全面性之通盤計劃，因此與台灣交易頻繁的大陸東南沿海地區漁獲之安全性堪憂。

(四)微囊藻毒素問題

除了魚貝類產品有海洋毒素，綠藻錠及水庫蓄積的水亦有藻類毒素污染之隱憂，值得關切注意。飼養綠藻時通常也會有螺旋藻生長，而螺旋藻會產生 spiroside，加拿大 Dr. Quilliam 曾在會中報告以 LC-MS/MS 分析藻類及貝類檢體，發現不同結構式之 spiroside。微囊藻毒在近年來越來越受重視，除了巴西 60 名洗腎患者死於此毒素引起之疾病，此毒素亦有可能導致水庫水質不堪飲用。2003 年 9 月中央研究院吳俊宗博士曾發出「翡翠水庫微囊藻有暴增傾向」之警訊；台大海洋研究所白書禎教授亦發表一篇「旱象解除、水庫水質無人問」之文章，即是針對水庫水質惡化時由於微囊藻大量增加，而產生微囊藻毒之現象提出嚴重警告。緣此，若能建立相關檢驗技術，將可為消費者健康安全做更嚴格之把關。

(五)值得學習之敬業態度

大會安排於會議最後一天前往紐西蘭貽貝養殖重鎮---馬爾波羅參觀，行程包括搭乘遊艇前往位於峽灣間的貽貝養殖場，瞭解養殖及採收方式。美國 FDA Dr. Sherwood、韓國 Dr. Kim 等各國研究藻類生態之學者，到不同水域皆蒐集當地水樣，回到遊艇上立即使用攜帶式光學顯微鏡觀察，瞭解水樣中有何種藻類存在。此種把握各種機會學習之敬業精神及寓工作於日常生活之專業態度，令筆者懾服之際也提出與各位同仁互勉之。