

二枚貝の麻痺性貝毒に関する調査研究

【食品衛生室】

森田晃祥・山根一城・南條吉之

Paralytic Shellfish Poisons in Bivalves Collected in Tottori

Akiyoshi MORITA, Kazuki YAMANE, Yoshiyuki NANJO

Abstract

It is for the present common to use HPLC to analyze paralytic shellfish poisons (PSP) of bivalves. We tried quicker highly precise analysis with LC/MS/MS. The peaks of PSP were detected selectively by LC/MS/MS. However, in comparison with the HPLC, detection limits with LC/MS/MS became high by these kinds of toxins.

In addition, three kinds of bivalves were bred in the sea, and the differences of toxin accumulation and elimination among those were investigated. As a result, the highest accumulations were found in mussel. Furthermore, there were cysts of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* that caused paralytic shellfish poisons of bivalves in mud of the breeding spot.

1 はじめに

麻痺性貝毒は、*Alexandrium*属等の有毒渦鞭毛藻が産生する強力な神経毒であり、これを捕食した二枚貝に移行、蓄積される。毒化貝による食中毒は極めて重大な健康被害をもたらすため、食品衛生上問題となっている。そのため、鳥取県では特産品のイワガキの出荷時期に検査を行い、食の安全の確保に努めている。平成13年度からムラサキイガイの麻痺性貝毒についても調査を行っており、平成15年度にはムラサキイガイから麻痺性貝毒2.5MU/gを検出した。しかし、このムラサキイガイは、市場に流通しておらず、出荷規制値の4MU/gを下回るものであった。

現在、貝の毒組成分析は、HPLCポストカラム蛍光法による分析が一般的である。しかし、貝毒と疑われるピークが検出された場合には、そのピークが試料中のマトリックス等である可能性もあるため、貝毒成分のピークであることを確認する必要がある。そこで、貝毒のLC/MS/MSによる一斉分析法¹⁾を参考として、麻痺性貝毒の分析を行ったので報告する。

また、鳥取県沖の二枚貝の毒化・解毒機構の実態調査のために、二枚貝の海中垂下飼育実験をおこなったので合わせて報告する。

2 調査方法

1) LC/MS/MS一斉分析法

(1) 試料：毒化したムラサキイガイ

(鳥取県中部の漁港内で平成15年7月採取)

(2) 標準品：(社)日本水産資源保護協会配布の麻痺性貝毒標準品(GTX1-4, C1-2)

試薬：塩酸、水酸化ナトリウム、酢酸、リン酸、アンモニア水(25%)、オルト過ヨウ素酸は和光純薬工業㈱製の特級を、1-ヘプタスルホン酸ナトリウムは和光純薬工業㈱製のイオンペアクロマトグラフ用を、アセトニトリル、ギ酸、ギ酸アンモニウムは、和光純薬工業㈱製のHPLC用を用いた。1.0Mテトラブチルアンモニウムリン酸溶液はアルドリッチ社製を用いた。

(3) 測定条件

ポストカラム蛍光誘導化HPLC測定条件²⁾

LC : LC10A [Shimazu]

蛍光検出器 励起波長 : 330nm

測定波長 : 390nm

カラム : Inertsil C8-3 [GL Sciences]

(4.6mm i.d. × 150mm, 5 μm)

カラム温度 : 35

移動相

GTX群 : 2 mM 1-ヘプタスルホン酸ナトリウム塩

10mMリン酸アンモニウム緩衝液 (pH7.1)
 C群：2 mMテトラブチルアンモニウムリン酸塩 (pH6.0)
 反応液：7 mM過ヨウ素酸, 50mMリン酸緩衝液 (pH9.0)
 反応：65℃, テフロンコイル (0.5mm×5 m)
 中和液：0.5M酢酸
 流速 移動相：0.8ml/min、反応：0.4ml/min、
 中和液：0.4ml/min
 注入量：10 μL
 LC/MS/MS測定条件
 MS/MS：API3000 [Applied Biosystems]
 LC：Agilent 1100 Series [Agilent]
 カラム：TSK gel Amide80 [Tosoh]
 (2.0mmi.d. ×250mm、5 μm)
 移動相 A：H₂O, B：95%CH₃CN (A, Bは2 mMギ酸アンモニウム及び3.6mMギ酸を含む)
 A：B=35：65

イオン化法：ESI イオンモード：Positive
 イオンスプレー電圧：5500V
 イオン源温度：350
 流速：0.2ml/min. 注入量：5 μL

(4) 試験溶液の調製

公定法³⁾に準じて調製した酸抽出液をOASIS - HLBカートリッジカラム (Waters) で精製し、遠心ろ過チューブ型の限外ろ過膜 (Ultrafree UFC3LGC00, Millipore) に移して、12000rpmで10分間遠心ろ過し、得られたろ液を試験溶液とした。

2) 二枚貝の海中垂下飼育試験

- (1) 実施期間：平成16年5月～7月
- (2) 実施場所：平成15年にムラサキイガイから麻痺性貝毒を検出した漁港内および港外の2地点
- (3) 実施方法：別海域で採取した二枚貝 (イワガキ約80個体、ムラサキイガイ約300個体) を入れた飼育カゴ (1 m×1 m×0.5 m) を海中に垂下し、水深1.5 m地点で飼育する (Fig. 1)。

マウス試験及びLC/MS/MS一斉分析法により、二枚貝の毒化解毒状況及び異なる貝種の毒化の差等を調査した。



Fig. 1 The breeding spot

3 結果及び考察

1) LC/MS/MS一斉分析法

(1) Product ion scan測定

マススペクトルの一例として、GTX 4 標準品のプロダクトイオンスキャン測定結果をFig. 2 に示した。Q 1 で[M+H]⁺イオン (m/z 412) を選択し、Q 3 でフラグメントを測定した。

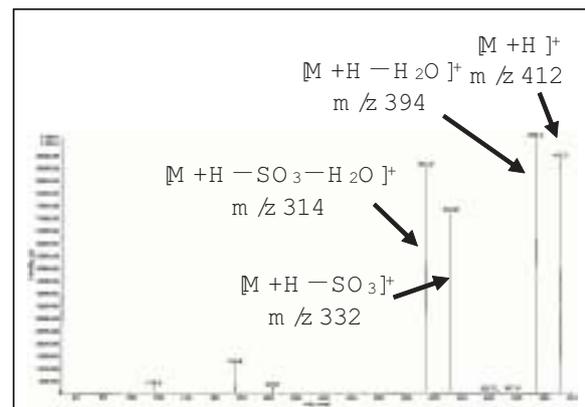


Fig. 2 Product ion scan Mass Spectrum of GTX4

[M+H·H₂O]⁺イオン (m/z 394) と [M+H·SO₃]⁺イオン (m/z 332) と [M+H·SO₃·H₂O]⁺イオン (m/z 314) を観察することができた。GTX 1 は、GTX 4 の異性体であり、GTX 4 とほぼ同様のマススペクトルを観察できた。

GTX3 標準品及びC2 標準品もプロダクトイオンスキャンによる測定を行い、フラグメントピークを確認した。(Fig. 3, Fig. 4) 異性体のGTX2及びC1についても、それぞれほぼ同様のマススペクトルを観察できることを確認した。

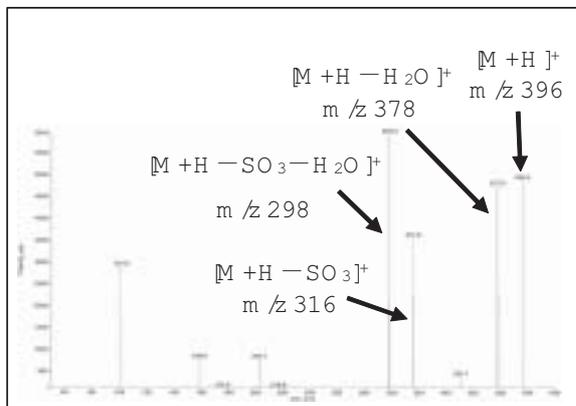


Fig. 3 Product ion scan Mass Spectrum of GTX3

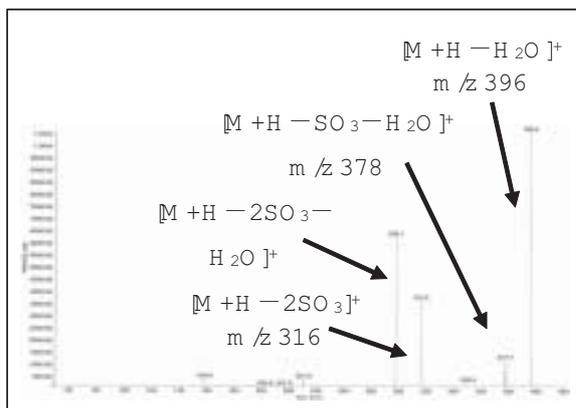


Fig. 4 Product ion scan Mass Spectrum of C2

(2) 検出限界

低濃度の標準溶液を5回繰り返し測定し、濃度とその標準偏差を求め、標準偏差をもとに検出限界値を算出⁴⁾した。この結果、LC/MS/MS分析は、HPLC分析と比較して、C1以外では検出下限値が高かった。

Table 1 Detection limits with HPLC and LC/MS/MS

Toxins	HPLC	LC/MS/MS
GTX 1	3.9	13
GTX 2	0.53	6.0
GTX 3	0.75	1.8
GTX 4	1.1	4.8
C 1	0.80	0.43
C 2	0.41	3.4

Unit : nmol/L

(3) Multiple Reaction Monitoring測定

平成15年7月に採取したムラサキイガイ中のGTX1-4及びC1-2について、Multiple Reaction Monitoring

(MRM) 測定を行った。MRM測定時のprecursor ionとproduct ionは、Table 2のとおりとした。

Table 2 Precursor ion and Product ion

Toxins	Precursor ion (Q ₁)	Product ion (Q ₃)
GTX1,4	[M+H] ⁺ (m/z 412)	[M+H-SO ₃] ⁺ (m/z 332)
GTX2,3	[M+H] ⁺ (m/z 396)	[M+H-SO ₃] ⁺ (m/z 316)
C1,2	[M+H-SO ₃] ⁺ (m/z 396)	[M+H-2SO ₃] ⁺ (m/z 316)

MRM測定の結果、ムラサキイガイからGTX1-4のピークを選択的に検出した。(Fig. 5) 検出した毒量は、それぞれGTX1 84nmol/L、GTX2 26nmol/L、GTX3 18nmol/L、GTX4 98nmol/Lであり、これは総和で0.87MU/gの毒力に相当した。また、C1-2は検出されなかった。

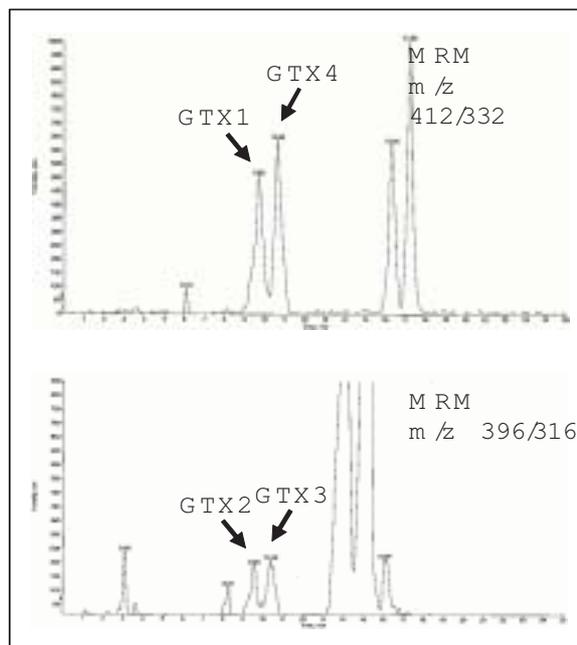


Fig. 5 MRM chromatograms of mussels

2) 二枚貝の海中垂下飼育試験

(1) マウス試験

すべての検体で麻痺性貝毒は検出下限値の1.75MU/g未満であった。公定法であるマウス試験では中央致死時間から毒力を求めるため、5匹中3匹以上が60分以上生存すれば検出下限値未満となる。6月7日及び6月21日に漁港内で採取したムラサキイガイのマウス試験では、それぞれ5匹中2匹が60分以内に麻痺性貝毒の症状で死亡した。そのため、これらのムラサキイガイ中には1.75MU/g未満ではあるが麻痺性貝毒の存在が示唆された。

(2) LC/MS/MS一斉分析

3種類の二枚貝を、2地点で8回サンプリングした計

48件のMRM測定を行った。

その結果、港内で採取したムラサキイガイ 3 件とムラサキイガイ 1 件から麻痺性貝毒を検出した。麻痺性貝毒が検出されたサンプルの毒力はTable 3 及びFig. 6 のとおりであった。

Table 3 The toxicity of PSP in bivalves

Bivalve	Mytilus edulis (mussel)			Septifer virgatus
	6/7	6/23	6/30	
Date	6/7	6/23	6/30	6/23
GTX 1	0.074	0.27	0.13	0.094
GTX 2	ND	0.012	0.074	0.078
GTX 3	0.11	0.027	0.014	0.019
GTX 4	0.061	0.036	0.028	0.012
C 1	ND	ND	ND	ND
C 2	ND	ND	ND	ND
Total	0.24	0.35	0.25	0.20

Unit : MU/g, ND : not detected

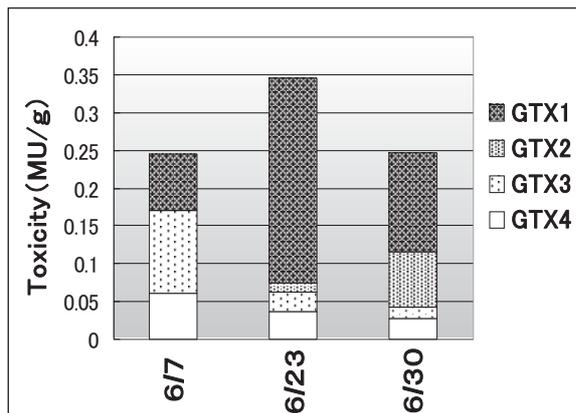


Fig. 6 The toxicity of PSP in mussel

Fig. 5 から、時間の経過とともにGTX 3、GTX 4の割合が減って、GTX 1、GTX 2の割合が増えていることがわかる。麻痺性貝毒原因プランクトンが産出する毒素はGTX 4、GTX 3、C 2であり、貝に取り込まれた後にそれぞれ異性体のGTX 1、GTX 2、C 1に変化する。よって、GTX 3、GTX 4の割合が高い6月7日頃は、貝が原因プランクトンを摂取している時期であると推察される。

対照として港外で飼育した二枚貝については、麻痺性貝毒は検出されなかった。このことから、港内の閉鎖的な環境により原因プランクトンが増殖したため、二枚貝から麻痺性貝毒が検出されたと考えられる。

3種類の二枚貝を用いた垂下飼育試験の結果からムラサキイガイが最も麻痺性貝毒を蓄積しやすいといえる。よって、いち早く毒化の危険性を察知するために、ムラ

サキイガイを指標貝としてモニタリング調査することが、漁場監視において有効な手段であると思われる。

(3) プランクトンについて

垂下試験実施地点の港内の底泥をサンプリングし、(独)水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所で調査したところ、海底泥中に6.5~31.5 cysts/gの有毒プランクトンのシストの存在が明らかとなった。シストの形態から*Alexandrium*属のシストと判断された。また、海底泥を試料として、Real time PCRを行った結果、*Alexandrium catenella*のDNAのみが検出された。毒化時における海中垂下飼育地点の水温 (Fig. 7) と他海域での*A. catenella*の適水温⁵⁾を併せて考えると、海底泥に存在するシストは、麻痺性貝毒原因プランクトン*A. catenella*のシストであると判断された。

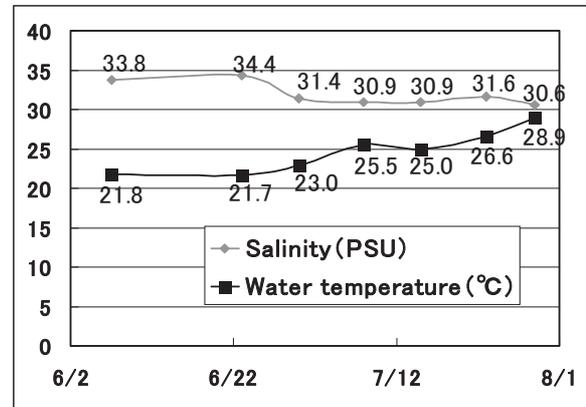


Fig. 7 Water temperature and salinity

4 まとめ

- 1) 麻痺性貝毒の分析には、ピークを選択的に検出でき、迅速に分析できるLC/MS/MSを用いた分析が有効であると考えられる。しかし、今回の研究結果では、HPLCポストカラム蛍光法と比較して、毒素の種類によって検出限界値が高くなることを確認した。
- 2) 垂下飼育実験においてムラサキイガイから麻痺性貝毒を検出したが、平成15年度に麻痺性貝毒を検出したムラサキイガイと比べて、毒力は弱かった。
- 3) 3種類の二枚貝の中では、ムラサキイガイが最も麻痺性貝毒を蓄積しやすく、漁場監視のための指標貝として有効であると思われる。
- 4) 垂下飼育地点の底泥から、*A. catenella*のシストが発見された。

5 謝 辞

LC/MS/MS分析のご指導いただいた東北区水産研究所の鈴木敏之主任研究官とシストの同定・計数にご協力いただいた瀬戸内海区水産研究所有毒プランクトン室の板倉茂室長・長井敏主任研究官に深く感謝いたします。

参考文献

1) Michael A Quilliam et. al. : Mycotoxins and

Phycotoxins in Prespective at the Turn of the Century. 383-391 (2001)

2) Y. Oshima : J. AOAC. Int. 78 (2) 528-532 (1995)

3) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：麻痺性貝毒検査法
昭和55年5月

4) 環境省環境保健部環境安全課：モニタリング調査マ
ニュアル

5) 高田久美代ら：広島県保健環境センター研究報告
8 1-5 (2000)