

[ノート]

兵庫県における麻痺性・下痢性貝毒の検出状況（2005年～2007年） および貝毒成分の分析

吉岡 直樹^{1*} 押部 智宏² 武田 信幸¹ 近平 雅嗣²
渡邊 龍一³ 大島 泰克³

Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) and Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) in Hyogo Prefecture between 2005 and 2007

Naoki YOSHIOKA^{1*}, Tomohiro OSHIBE², Nobuyuki TAKEDA¹, Masatsugu CHIKAHIRA²,
Ryuichi WATANABE³ and Yasukatsu OSHIMA³

¹ Life Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan, ² Infectious Disease Research Division and ³ Tohoku University, Graduate School of Life Sciences

The results of PSP and DSP monitoring were presented for the oyster and short-necked clam samples collected in Hyogo prefecture between 2005 and 2007. Toxicity was determined by the official mouse bioassay method. In 2005, no samples exceeded the regulatory limit (4 MU/g) of PSP. In 2006 and 2007, highly toxic samples of PSP were found. In contrast, there were no samples exceeded the detection limit (0.05 MU/g) of DSP in the period 2005-2007. PSP toxins (Saxitoxins, Gonyautoxins, and C toxins) were determined by HPLC for the positive samples in 2007. The major components were C1, C2, GTX1, and GTX4.

I はじめに

兵庫県では、1980年から貝毒監視のためのモニタリング調査を実施しており、現在は生産量の多いアサリ、マガキを主な対象として、それぞれの出荷時期にモニタリングを実施している。県内産の貝による中毒事例はないものの、最近では、ほぼ毎年のように麻痺性貝毒による毒化は起きており、注意喚起が必要である。本県の麻痺性貝毒の主な原因種は、渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* であり、下痢性貝毒

では、渦鞭毛藻 *Dinophysis fortii* や *D.acuminata* である。それらのプランクトンを計数することで毒化予知の一助としている。

また、本県の沿岸部は、淡路島を挟んで大阪湾側、播磨灘側と紀伊水道側に分かれており、それらが明石海峡、友ヶ島水道、鳴門海峡でつながっている特殊な地形をしている。特に、大阪湾側は明石海峡と友ヶ島水道が海水の流出入口であり、閉鎖性が高い。

当研究センターでは、兵庫県水産課の依頼により、県内で採取されたアサリ・マガキ等の貝類について、麻痺性および下痢性貝毒試験を行っている。今回、2005年～2007年に実施された、公定法による貝毒試験の結果を報告する。また、2007年には検査開始以来、アサリにおいて最高濃度 92.2 MU/g の麻痺性貝毒を検出したことから、同年のサンプルについて、ポストカラム蛍光検出高速液体クロマトグラフィー

¹健康科学部 ²感染症部

³東北大学大学院生命科学研究科

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究センター
健康科学部 吉岡 直樹

(HPLC)により、麻痺性貝毒の有毒成分であるサキシトキシン(STX)群, ゴニオトキシン(GTX)群, およびCトキシン群の各類縁体の定量分析を行ったので, その結果も併せて報告する.

II 方法

1. 試料

2005年1月~2007年12月に採取された, アサリ75検体, マガキ54検体(合計129検体)を用いた. 採取地点は, 赤穂市, 相生市, たつの市, 姫路市, 神戸市, 芦屋市, 南あわじ市, および洲本市の各海岸である. これらの採取地点をFig.1に示した.

2. 麻痺性貝毒試験

麻痺性貝毒試験は, 麻痺性貝毒検査法¹⁾に従って実施した. ホモジナイズした試料100 gに0.1N塩酸100 mLを加え, pHを4.0以下に調整後, さらにホモジナイズし, 5分間加温沸騰させたのち, 室温になるまで放冷した. これをpH 2.0~4.0に再調整し, 水を加えて200 mLに定容した. 攪拌後, ろ紙でろ過したものをマウス毒性試験に使用した.

3. 下痢性貝毒試験

下痢性貝毒試験は, 下痢性貝毒検査法²⁾に従って実施した. ホモジナイズした試料200 gにアセトン600 mLを加え, さらにホモジナイズし, 減圧ろ過した. 抽出残渣にアセトン400 mL加えて同様に抽出を行い, さらにこの操作を繰り返し, 合計3回の抽出を行った. 合わせた抽出液をロータリーエバポレーターで約1/8程度になるまで減圧濃縮し, 濃縮物を分液漏斗に移しジエチルエーテル150 mLを加え, 軽く振とうし, 水層を除いた. エーテル層を約半量の水で洗浄し, さらにこの操作を繰り返した. 最後に, エーテル層をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し, 1% Tween60生理食塩水に懸濁させ, 全体を10 mLに定容した. これをマウス毒性試験に使用した.

4. HPLCによる麻痺性貝毒分析

4.1 試薬

イオンペアー試薬であるリン酸テトラブチルアンモニウム, ヘプタンスルホン酸ナトリウムはHPLC用を用い, その他は試薬特級を用いた. 毒の定量には, 東北大学において調製された麻痺性貝毒の標準毒溶液を用いた.

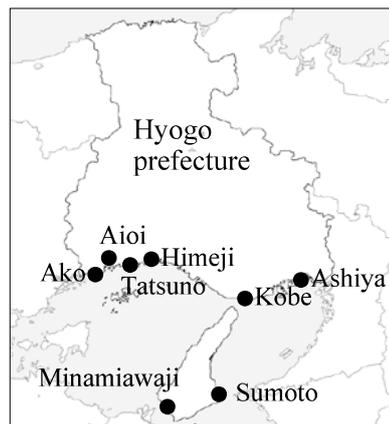


Fig.1 Locations of sampling sites.

4.2 前処理

麻痺性貝毒検査法に従って調製したマウス毒性試験用原液を4 mL取り, Sep-pak plus C18 (メタノール10 mL, 水10 mLの順でコンディショニング後, 水を切ったもの)を通過させた. 最初に溶出する2 mL分を捨て, 次に溶出する画分を限外ろ過カートリッジ (Millipore Ultrafree-0.5, NMWL: 10kDa)に取り, 12000rpmで10分間遠心ろ過したものをHPLC試験溶液とした.

4.3 HPLC条件³⁾

移動相ポンプ: 日立L-2100

反応液および中和液ポンプ: Lab-quatec Work-21 MP-311

カラム: Mightysil RP-8 GP (内径4.6mm×150mm)

反応コイル: テフロンチューブ (内径0.5mm×10m)

検出器: 日立L-7480蛍光検出器

Cトキシン群 (C1, C2) 用移動相: 2mM リン酸テトラブチルアンモニウム (pH 6.3)

GTX群 (GTX1-5, dcGTX2, 3) 用移動相: 2mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム-10mM リン酸アンモニウム (pH 7.2)

STX群 (STX, neoSTX, dcSTX用) 用移動相: 2mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム-30mM リン酸アンモニウム (pH 7.0) / アセトニトリル (100 : 4.3)

反応液: 7mM 過ヨウ素酸-50mM リン酸緩衝液 (pH 9.0)

中和液: 0.5M酢酸

移動相流速: 0.8 mL/min

反応液および中和液流速: 0.4 mL/min

注入量: 10 μ L

検出波長: 330 nm (励起), 390 nm (蛍光)

反応温度: 85°C

III 結果および考察

1. 公定法による検査結果

2005年～2007年の麻痺性貝毒の検査結果を Table 1 に示し, Table 2 に下痢性貝毒の検査結果を示した.

麻痺性貝毒について, 2005 年は規制値 (4 MU/g) を越える貝毒は検出されなかったが, 芦屋において 4 月中旬から 5 月上旬にかけて, 検出限界 (2.0 MU/g)

以上の貝毒がアサリから検出された. 2006 年には, 芦屋・南あわじ・洲本の 3 ヶ所において毒化がみられ, 芦屋においては 4 月上旬に規制値を越える 5.8 MU/g の毒力を検出した. また洲本においては 3 月下旬から 5 週にわたり毒化が続き, ピーク時の 4 月 6 日採取のサンプルは 73.2 MU/g の毒力であった. 2007 年は, 大阪湾沿岸の神戸・芦屋・洲本の 3 ヶ所において毒化がみられ, 芦屋においては 5 月上旬に規制

Table 1 Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxicities of oysters and short-necked clams in 2005, 2006, and 2007

2005														
Sampling site	Oyster			Short-necked clam								Oyster		
	Jan.17	Feb.14	Mar.7	Mar.28	Apr.11	Apr.18	Apr.25	May 2	May 9	May 16	May 23	Oct.24	Nov.14	Dec.12
Ako	ND	ND	ND	ND	—	ND	—	—	ND	—	ND	ND	ND	ND
Aioi	ND	ND	ND	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	ND	ND
Tatsuno	ND	ND	ND	ND	ND	—	—	—	ND	—	—	ND	ND	ND
Himeji	—	—	—	ND	ND	ND	—	—	ND	—	—	—	—	—
Kobe	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ashiya	—	—	—	—	—	2.4	2.7	2.2	ND	ND	—	—	—	—
Minamiawaji	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sumoto	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(MU/g)

2006															
Sampling site	Oyster			Short-necked clam								Oyster			
	Jan.16	Feb.13	Mar.6	Mar.27	Apr. 3	Apr.10	Apr.13	Apr.24	Apr.27	May 8	May 15	Jun.5	Oct.23	Nov.13	Dec.11
Ako	ND	ND	ND	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—	ND	ND	ND	ND
Aioi	ND	ND	ND	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	ND	ND
Tatsuno	ND	ND	ND	ND	—	ND	—	—	ND	ND	—	ND	ND	ND	ND
Himeji	—	—	—	ND	ND	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—	—	—
Kobe	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(May 4) ND	—	(Jun.3) ND	—	—	—
Ashiya	—	—	—	—	5.8	2.3	(Apr.17) ND	ND	—	—	—	—	—	—	—
Minamiawaji	—	—	—	—	(Mar.31) 3.2	(Apr.6) 2.8	—	ND	ND	—	—	—	—	—	—
Sumoto	—	—	—	17.4	(Mar.30) 61.6	(Apr.6) 73.2	49.2	5.7	2.5	ND	ND	—	—	—	—

(MU/g)

2007															
Sampling site	Oyster			Short-necked clam								Oyster			
	Jan.15	Feb.5	Mar.5	Mar.26	Apr.9	Apr.23	May 1	May 7	May 14	May 21	May 28	Jun. 4	Oct. 22	Nov.12	Dec.10
Ako	ND	ND	ND	ND	ND	—	—	ND	—	—	—	ND	ND	ND	ND
Aioi	ND	ND	ND	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	ND	ND
Tatsuno	ND	ND	ND	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	ND	ND
Himeji	—	—	—	ND	—	—	—	ND	—	—	—	—	—	—	—
Kobe	—	—	—	—	—	—	—	2.2	ND	ND	—	ND	—	—	—
Ashiya	—	—	—	ND	—	2.7	15.4	2.5	ND	ND	—	—	—	—	—
Minamiawaji	—	—	—	ND	—	—	—	ND	—	—	—	—	—	—	—
Sumoto	—	—	—	ND	—	—	92.2	57.2	7.1	2.3	ND	ND	—	—	—

(MU/g)

—: Not tested, ND: <2.0 MU/g, Bold: >4 MU/g (regulatory limit)

Table 2 Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxicities of oysters and short-necked clams in 2005, 2006, and 2007

2005											
Sampling site	Oyster			Short-necked clam					Oyster		
	Jan.17	Feb.14	Mar.7	Mar.28	Apr.11	Apr.18	May 9	May 23	Oct.24	Nov.14	Dec.12
Ako	ND	ND	ND	ND	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Aioi	ND	ND	ND	—	—	—	—	—	ND	ND	ND
Tatsuno	ND	ND	ND	ND	ND	—	ND	—	ND	ND	ND
Himeji	—	—	—	ND	ND	ND	ND	—	—	—	—
Kobe	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ashiya	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(MU/g)

2006											
Sampling site	Oyster			Short-necked clam				Oyster			
	Jan.16	Feb.13	Mar.6	Mar.27	Apr.10	May 8	Jun.5	Oct.23	Nov.13	Dec.11	
Ako	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Aioi	ND	ND	ND	—	—	—	—	ND	ND	ND	
Tatsuno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Himeji	—	—	—	ND	ND	ND	ND	—	—	—	
Kobe	—	—	—	—	—	(May 4) ND	(Jun.3) ND	—	—	—	
Ashiya	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

(MU/g)

2007											
Sampling site	Oyster			Short-necked clam				Oyster			
	Jan.15	Feb.5	Mar.5	Mar.26	Apr.9	May 7	Jun.4	Oct.22	Nov.12	Dec.10	
Ako	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Aioi	ND	ND	ND	—	—	—	—	ND	ND	ND	
Tatsuno	ND	ND	ND	—	—	—	—	ND	ND	ND	
Himeji	—	—	—	ND	—	ND	—	—	—	—	
Kobe	—	—	—	—	—	—	ND	—	—	—	
Ashiya	—	—	—	ND	—	—	—	—	—	—	

(MU/g)

—: Not tested, ND: <0.05 MU/g

値を越える 15.4 MU/g の貝毒を検出した。洲本での 5 月 1 日採取のサンプルからは、兵庫県内において検査開始以来最高の 92.2 MU/g という高濃度の麻痺性貝毒が検出された。また、この年には大阪府の調査⁴⁾によっても、府内沿岸で採取した貝類から高濃度の麻痺性貝毒が検出されており、大阪府貝塚市の二色の浜で 4 月 30 日に採取されたアサリからは、その年の最高値である 140 MU/g の毒力を検出していることから、2007 年は大阪湾沿岸において広範囲にわたって麻痺性貝毒による毒化が広がっていたことが分かった。この年の調査点における毒化期間は、5 週程度であった。

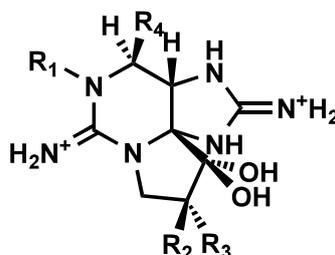
兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センターが実施した芦屋および洲本における計数 (Table 3) では、5 月 14 日の調査時点でプランクトンは消失し、アサリの毒も規制値付近まで激減した。大阪府における同日の調査⁴⁾でも、アサリの毒は規制値付近まで低下しており、大阪湾沿岸の毒化はほぼ同時期に収束したことも分かった。2006 年の毒化の推移もほぼ同じであった。

なお、播磨灘に面した調査点ではアサリの毒化は検出されなかった。

一方、下痢性貝毒については、2005 年～2007 年は、検出限界 (0.05 MU/g) を越える貝毒は検出されなかった。

2. HPLC による麻痺性貝毒分析の結果

2007 年に、麻痺性貝毒試験において陽性であったアサリ 8 サンプル (神戸 1, 芦屋 3, 洲本 4) について、ポストカラム蛍光検出 HPLC による分析を行った。Fig.2 に C トキシン群, GTX 群, STX 群の各類縁体の構造式を示し、各定量結果と、これらの濃度にマウス腹腔内投与による比毒性 (1 μmol あたりの MU) を乗じて求めた毒力を Table 4 に示した。



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	CH ₂ OCONHSO ₃ ⁻
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	CH ₂ OCONHSO ₃ ⁻
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	CH ₂ OCONH ₂
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CH ₂ OCONH ₂
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CH ₂ OCONH ₂
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CH ₂ OCONH ₂
GTX5	H	H	H	CH ₂ OCONHSO ₃ ⁻
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CH ₂ OH
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CH ₂ OH
neoSTX	OH	H	H	CH ₂ OCONH ₂
dcSTX	H	H	H	CH ₂ OH
STX	H	H	H	CH ₂ OCONH ₂

Fig.2 Chemical structures of PSP.

Table 3 Cell density of *Alexandrium tamarense* in 2007

Sampling site	<i>Alexandrium tamarense</i>						
	Mar.26	Apr.9	Apr.23	May.1	May.7	May.14	May.21
Kobe	0	0	—	—	60	0	0
Ashiya	0	100	0	180	40	0	0
Minamiawaji	0	60	100	—	520	—	—
Sumoto	0	40	1700	520	80	0	0

—: Not tested (cells/L)

Table 4 Concentrations of Paralytic shellfish toxins in short-necked clams in 2007

Sampling Site	Date	Concentration in shellfish (nmol/g)											Toxicity (MU/g)		
		C toxins		Gonyautoxins (GTXs)						Saxitoxins (STXs)			by HPLC	(by Mouse bioassay)	
		C1	C2	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	dcGTX2	dcGTX3	neoSTX	dcSTX			STX
Kobe	May 7, 2007	0.41	0.10	1.13	0.22	0.09	ND	ND	0.08	0.02	0.10	ND	0.07	3.7	(2.2)
Ashiya	Apr.23, 2007	1.86	1.05	1.67	0.38	0.22	0.91	ND	0.09	0.08	0.16	ND	0.04	7.5	(2.7)
Ashiya	May 1, 2007	6.88	4.63	5.57	0.91	0.69	3.41	ND	0.39	0.35	0.71	ND	0.17	26.3	(15.4)
Ashiya	May 7, 2007	1.21	0.27	1.31	0.49	0.20	ND	ND	0.10	0.04	0.18	ND	0.12	5.0	(2.5)
Sumoto	May 1, 2007	8.15	12.96	18.29	1.22	2.86	24.56	ND	0.11	0.35	1.14	ND	0.26	102.3	(92.2)
Sumoto	May 7, 2007	7.11	3.99	17.18	2.36	1.81	13.32	ND	0.24	0.28	1.04	0.06	0.47	77.0	(57.2)
Sumoto	May 14, 2007	1.12	0.17	2.79	1.11	0.46	0.52	ND	0.21	0.08	0.34	ND	0.32	11.7	(7.1)
Sumoto	May 21, 2007	0.40	0.08	0.88	0.39	0.16	ND	ND	0.11	0.04	0.23	ND	0.08	3.8	(2.3)
Specific toxicity (MU/μmol)		15	239	2468	892	1584	1803	160	1617	1872	2295	1274	2483		

ND <0.01 nmol/g

これらのサンプルからは C トキシン群, GTX1~4 が主に検出され, STX 群は低濃度であった. それらを毒力に換算したところ, GTX1~4 のみで総毒力の 8 割を占めており, マウス毒性試験で検出した毒力の主要成分であると考えられた. 従って, 本マウス毒性試験が適正に行われていたことが裏付けられた. また, HPLC による定量値から換算した毒力と, 公定法によるマウス毒性試験から得られた毒力を比較すると, 高毒力のサンプルでは値は近似していたが, 低毒力のサンプルでは, マウス毒性試験の方が低い値を示した. これは, 毒力が低い場合, マウス試験においては抽出液をそのまま, あるいは低倍率希釈で投与することから, 食塩等の不純物が毒性の発現を遅らせるためであると言われている⁵⁾.

Fig.3には, 類縁体ごとの成分組成をmol% で示した結果を示した. すべてのサンプルにおいて, C1, C2, GTX1の3種類の合計で全体の半分以上の割合を占めた.

また, 芦屋のサンプルは, 神戸, 洲本のサンプルよりC1, C2の割合が高かった.

洲本において, 毒化した5月1日から5月21日採取サンプルの麻痺性貝毒の成分組成を見ると, C2およびGTX4の割合が徐々に減っていき, C1, GTX1およびGTX2が増加している. 芦屋においても, ほぼ同様の傾向が見られた. この理由として以下のことが考えられる. GTX群については11位硫酸エステル立体配置によって安定性が異なり, β 配位より α 配位であ

る α エピマー (C1, GTX1およびGTX2等)の方が安定である⁶⁾. また, C1-C2, GTX1-GTX4, GTX2-GTX3は互いに立体異性体として存在している. 毒化の初期には, 渦鞭毛藻自体が生合成している11 β エピマー(C2, GTX3およびGTX4)の割合が多く, 時間の経過につれて, それらが二枚貝体内で, 安定な α エピマー (C1, GTX1およびGTX2等)に異性化することによるものと考えられる. また, 少量であったGTX2とneoSTXが徐々に増加していった. これは, 主要成分であるC1, C2の13位側鎖における脱硫酸もしくはGTX1, GTX4のN1位水酸基の還元, 11位硫酸基の還元的脱離が, 貝体内の化学物質あるいは酵素によって進行したものと考えられた.

IV まとめ

2005年~2007年の兵庫県における貝毒試験の結果について報告した. 麻痺性貝毒について, 2005年は規制値を超える貝毒は検出されなかったが, 2006年および2007年は, 大阪湾に面した調査点のアサリにおいて高い毒化が見られた. 毒化は年度によって異なるものの, 3月下旬から5月中旬にかけてであり, 毒化期間は3~5週であった. また, 大阪湾沿岸(大阪, 兵庫の両府県)に生息するアサリは, ほぼ同時期に毒化のピークを迎え, 収束したが, 大阪湾沿岸と播磨灘沿岸における毒化は同期していなかった. 一方, 下痢性貝毒については, 検出限界を超える貝

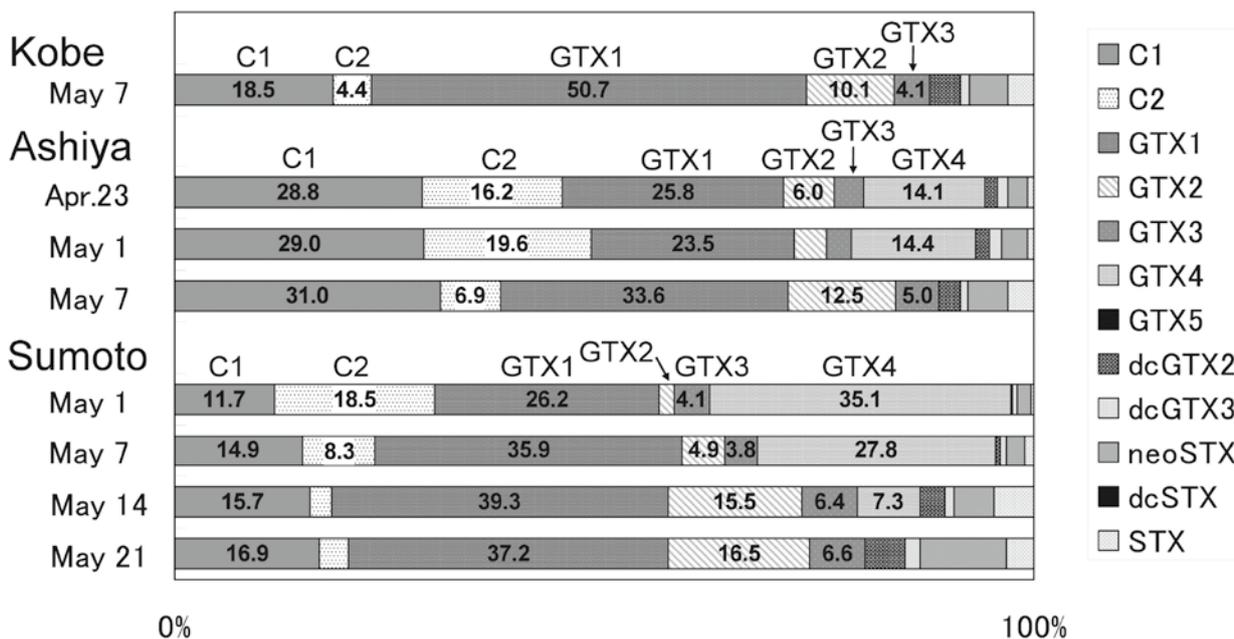


Fig.3 Toxin profiles of short-necked clams collected in 2007.

毒は検出されなかった。

また、2007年に麻痺性貝毒が検出されたサンプルについて、ポストカラム蛍光検出 HPLC により各類縁体ごとに定量分析を行い、毒組成を明らかにした。

2008年においても、前年に続き麻痺性貝毒による高い毒化がみられていることから、今後ともモニタリングによる監視が重要であると考えられる。

謝 辞

本報告は、兵庫県の貝毒被害防止対策事業、貝毒・有害物質被害防止対策事業の一環として行われたものである。試料を採取して頂きました兵庫県農政環境部水産課、各農林水産振興事務所、兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センターの担当者の方々、ならびにプランクトン調査データを提供して頂いた同水産技術センター西川哲也主任研究員に深謝致します。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知：貝毒の検査法等について，1980年7月1日，環乳第30号
- 2) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知：下痢性貝毒の検査について，1981年5月19日，環乳第37号
- 3) Oshima, Y.: Postcolumn Derivatization Liquid Chromatographic Method for Paralytic Shellfish Toxins, *J. AOAC Int.*, **78**, 528-532(1995)
- 4) 濱野米一ら：平成19年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部自然毒部会研究発表会抄録集，p.25-28(2008)，大阪
- 5) 大島泰克，濱野米一：麻痺性貝毒のモニタリング。今井一郎，福代康夫，広石伸互編，貝毒研究の最先端－現状と展望，p.19-29，恒星社厚生閣，東京(2007)
- 6) Murakami, R., Yamamoto, K. and Noguchi T.: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **40**, 46-54(1999)