

麻痺性貝毒により毒化したトゲクリガニの 加熱加工による減毒効果について

Reduction of paralytic shellfish toxins by heated process in *Telmessus acutidens*

千葉 美子 新貝 達成 鈴木 優子 阿部 美和
他力 将*1 田邊 徹*1

Yoshiko CHIBA, Tatsunari SHINGAI, Yuko SUZUKI, Miwa ABE
Masaru TARIKI*1, Toru TANABE*1

麻痺性貝毒により毒化したトゲクリガニについて、加熱処理を施し除毒効果を検証した。低濃度の麻痺性貝毒毒量測定及び各毒成分組成の観察に必要な機器分析法の検討を行い、前処理方法や機器分析条件を整えた。さらに、検証に必要な毒化トゲクリガニの作出において、毒化したムラサキガイの給餌により急激に毒化し、給餌中止とともに急激に減毒することを確認した。蒸し加工及び茹で加工による加熱処理後の残存毒量は、いずれの加熱処理でも除毒効果が認められたが、一部の毒成分についてはほぼ減衰することなく残存していた。また、消失した毒成分は調理水に移行することなく、アルカリ性下で加熱処理されたことにより失活したものと推測され、トゲクリガニにおいても二枚貝類と同様、加熱処理が除毒に有効であることが確認された。

キーワード：麻痺性貝毒；トゲクリガニ；加熱加工；低減

Key words : paralytic shellfish toxin ; *Telmessus acutidens* ; heated process ; reduction

1 はじめに

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish toxin) (以下「PST」という。) は、渦鞭毛藻のアレキサンドリウム属などによって産生されることから、PSTを含有する藻類が発生する水域では、これらを餌にする動物はすべて毒化する可能性がある¹⁾。さらに、食物連鎖によってプランクトン食の動物に蓄積された貝類等を喫食した人は、麻痺をはじめとする神経性の症状を伴う麻痺性貝中毒を引き起こすことがある²⁾。

PSTの成分として、現在22物質、カルバミン酸塩グループ (STX, neoSTX, GTX1~4)、N-スルホ-カルバモイルグループ (GTX5~6, C1~4)、デカルバモイルグループ (dcSTX, dc-NeoSTX, dcGTX1~4)、ヒドロキシル化サキシトキシン類 (M1 β , M2 β , M3, M4)の化学構造が明らかになっており¹⁾、これらの成分については、一部の物質を除き入手が可能である。

我が国ではアサリ、マガキ、ホタテガイ、ムラサキガイなど二枚貝類の他、マボヤとウモレオウギガニでも食中毒の発生事例があるほか、中毒事例はないが、甲殻類のトゲクリガニなどからもPSTが検出されている¹⁾。

トゲクリガニは、東北地方において2~6月頃に水揚げ、流通し、主に茹でガニなどにより食用として供されるが、このカニは肉食性が高くPSTにより毒化した二枚貝等を捕食して毒を蓄積することが知られ、本県では貝毒監視の対象種となっている。

PSTの毒素は、貝類では主に中腸腺から検出されるが、カニ類も同様に筋肉部にはほとんど毒を蓄積せず、肝臓臓部 (カニみそ) に毒を蓄積するとされている。

PSTを含む貝類の取扱いについては、「生産海域における貝毒の監視および管理措置について」(平成27年3月6日付け26消安第6073号)により、マウスバイオアッセイ (以下「MBA」という。) を試験法とし、可食部1gあたり4MUの毒量を超えた場合は、出荷の自主規制を要請することとしているが、同様にトゲクリガニも「麻痺性貝毒による二枚貝等の捕食生物の毒化について」(平成16年4月13日付け食安監発第0413003号)により、肝臓臓部1gあたりのPSTの毒量が4MUを超える場合にあっては、貝類と同様に食品衛生法の規制対象となる。

一方、PSTでは、毒化した二枚貝を茹でることで毒量の大幅な減少が見られたという報告例³⁾がある。トゲクリガニは主に茹でガニとして食べられることから、PSTにより毒化したトゲクリガニを用いて、熱調理によるPSTの挙動について、MBAよりも検出感度に優れ、毒成分の構成比を明らかにすることができる機器分析法を用いて検討した。

2 方法

2.1 毒化トゲクリガニの作出と加熱加工

毒化トゲクリガニの作出と加熱加工は、水産技術総合

*1 水産技術総合センター

センター気仙沼水産試験場において実施した。

トゲクリガニの飼育には90L水槽5槽を使用し、1水槽あたり25個体を収容した。飼育水には砂ろ過海水を使用し、480L/時の割合で水槽に注水した。餌料には麻痺性貝毒により毒化したムラサキイガイを殻付きで冷凍保存したものを、2日に1回の頻度で殻を潰して給餌し、人為的に毒化させた。飼育期間は2019年6月7日～7月12日で、その間の飼育水温は、13.9℃～19.3℃であった。

最初の給餌から1週間後、2週間後、3週間後にそれぞれトゲクリガニ5匹を一群としてサンプリングを行い、それぞれの群毎に蒸し加工および塩分濃度を変化させた水道水により茹で加工を行った。

なお、餌料として用いたムラサキイガイは、異なる採取地点のものを含んでいるが、給餌回数における異なる採取地点の配合割合は等しくなるよう調整し、給餌一回当たりの毒組成及び毒量については条件を統一して給餌することで毒化用餌料とした。

加熱加工のうち蒸し加工は、蒸し器に蒸し水を3L準備し、蒸気が十分行き渡った後トゲクリガニを5匹投入し、15分間加熱した。茹で加工は、水道水(塩分濃度0%)、塩分濃度を1.5%に調製した水道水、塩分濃度を3%に調製した水道水をそれぞれ鍋に2Lずつ入れ、トゲクリガニを各5匹ずつ投入して火にかけ、沸騰開始から10分間茹でた。蒸し加工および茹で加工したトゲクリガニは、加熱終了後直ちに鍋から取り出し、湯切りを行い室温で放冷後、検査まで-20℃の冷凍庫で保管した。併せて、蒸し汁および茹で汁も同様に保管した。

また、毒化の状況を確認するため、餌として魚類残渣を給餌した群をコントロール群(無毒トゲクリガニ)とし、毒化後加熱加工を行わない群を無加工群として、加工後の毒量と比較する際の対象群とした。

さらに、3週間毒化させたトゲクリガニについて、3週間後以降はコントロール群と同様に魚類残渣を捕食させ、4週間後、5週間後にサンプリングして毒量が減衰していく過程をモニタリングした。

冷凍保存しておいたサンプルは、前処理操作前日に7℃の冷蔵室に移動し、解凍して検査に供した。当日は、トゲクリガニを水切りし、トゲクリガニの総重量を測定後、毒量測定の対象部位である肝臓部(図1)を摘出し、その重量も合わせて測定した。

2.2 PSTの分析

PSTの抽出は、公定法に準じた方法により実施した。すなわち、摘出した肝臓部を群毎に均一化し、5g～20gをトールピーカーに正確に量り採り、試料と同量の0.1N塩酸を加え、よく攪拌後、5N塩酸でpHが3.0付近になるように調整した。次いで電気コンロ上で5分間静かに加温沸騰させた後、室温になるまで放冷し、再度pHが3.0付近になるように調整して定容容器に移し、水を加えて試料の2倍量とした。この溶液を遠心分離(



図1 トゲクリガニ肝臓部

3,000rpm×10min)し、既報^{4,5,6)}を参考に、機器分析用試料の調製を行った。上清をろ過した後、ろ液2mLを精製用固相カラムに負荷し、その流出液約1mLを採取して限外ろ過(7,000g×30min)した。そのろ液を0.0025N塩酸溶液で10倍に希釈して、LC-MS/MS分析用試料溶液とした。

蒸し汁および茹で汁は、ろ紙によるろ過を行い、そのろ液200mLについて8%酢酸によりpH5に調整し、活性炭カラムに通液した。カラムを精製水10mLで洗浄後、4%酢酸-50%メタノール溶液18mLにより毒成分を溶出し、40℃下で減圧濃縮した。窒素ガスパージによる乾固後、精製水1mLに溶解し、トゲクリガニ試料と同様、精製用固相カラムに負荷し、流出液を分取して限外ろ過を行い、ろ液をLC-MS/MS分析用試料溶液とした。

なお、給餌したムラサキイガイの麻痺性貝毒分析は実施していないことから、トゲクリガニとの貝毒成分組成比較はしていない。

2.3 試薬

麻痺性貝毒成分の標準品C1&2、dcGTX2&3、GTX1&4、GTX2&3、GTX5、GTX6は、カナダNRC社製の認証標準物質を用いた。なお、PST成分のうち最も比毒性が高いSTX(サキシトキシン)は、「化学兵器の禁止及び特定物質の規制に関する法律」により所持できないことから、STX群の測定は実施しなかった。

その他の試薬類として、0.1N塩酸は関東化学株式会社製容量分析用滴定液、酢酸アンモニウムは関東化学株式会社製特級、酢酸は富士フィルム和光純薬株式会社製液体クロマトグラフ用、ギ酸は富士フィルム和光純薬株式会社製LC/MS用、メタノールおよびアセトニトリルは関東化学株式会社製LC/MS用を使用した。

2.4 器具・機材

ろ紙はADVANTEC社製のNo.5A及びNo.5C、精製用固相カラムはWaters社製Oasis PRiME HLB(3cc/60mgカートリッジ)、活性炭カートリッジはGLサイエンス社製InertSep GC(1g/12mL)を、遠心式限外ろ過フィルターはメルクミリポア社製Amicom Ultra-4、3kDaを使用した。

2.5 装置および分析条件

分析に先立ち、MS測定条件の最適化を行った後、既

報^{7,8)}を参考にLC測定条件を検討した。装置及び測定条件を表1に、MRM条件を表2に示す。

3 結果および考察

3.1 毒化および減毒の過程

宮城県において主に出現するPSTの原因プランクトンは、*Alexandrium tamarense* (旧名) および *A. catenella* (旧名) とされている⁹⁾。プランクトン試料において、*A. tamarense* (旧名) はC1 & C2とGTX 1& GTX4を多く含み、GTX2 & GTX3やneoSTXなどが副成分となる。*A. catenella* (旧名) は、C1 & C2を80%以上含み、GTX1～GTX6やneoSTXが副成分となる¹⁰⁾。本研究でトゲクリガニに給餌したムラサキイガイは、本県が計画的に実施するPST検査において6.4～27.0MU/g (可食部換算) に毒化していた時期に採取した貝であり、採取場所は異なるが毒化していたものと推測される。本県では、採取時のプランクトン発生状況については *Alexandrium spp.* としてカウントしているが、毒化時期は春期であることから加賀ら(2006)の報告より、ムラサキイガイの毒化原因プランクトンは *A. tamarense* (旧名) であると考えられる。

図2に、人為的に毒化させたトゲクリガニの経時的な

表1 装置および測定条件

LC部	Agilent Technologies 1200 Infinity series
カラム	TOSOH TSKgel Amide-80 5µm 2.0mmI.D.×25cm
カラム温度	40℃
移動相	A : 0.2% HCOOH・2mM-CH ₃ COONH ₄ B : MeCN
グラジエント条件	(A:B) = 0min(20:80) → 8min(45:55) → 18min(70:30) → 20min(70:30) → 20.01min(20:80) → 37min(20:80)
流速	0.2mL/min
注入量	10µL
MS部	AB Sciex QTRAP4500 LC-MS/MS system
イオン化モード	ESI positive
Ionspray voltage	5,500V
Heater gas temperature	500℃
Collision gas	8psi
Curtain gas	10psi
Nebulizer gas(GS1)	70psi
Turbo Ionspray(GS2)	70psi

表2 MRM条件

PSP toxin	Precursor ion(m/z)	Product ion(m/z)	DP(V)	EP(V)	CE(V)	CXP(V)
C1	396	316	21	10	19	22
	396	298	1	10	25	28
C2	396	298	1	10	25	28
	396	316	21	10	19	22
GTX1	412	332	1	10	33	20
	412	314	1	10	31	10
GTX2	396	316	21	10	19	22
	396	298	1	10	25	28
GTX3	396	298	1	10	25	28
	396	316	21	10	19	22
GTX4	412	314	1	10	31	10
	412	332	1	10	33	20
GTX5	380	300	66	10	33	24
	380	282	60	10	30	13
GTX6	396	316	21	10	19	22
	353	273	1	10	29	12
dcGTX2	353	255	1	10	27	22
	353	255	1	10	27	22
dcGTX3	353	255	1	10	27	22
	353	273	1	10	29	12

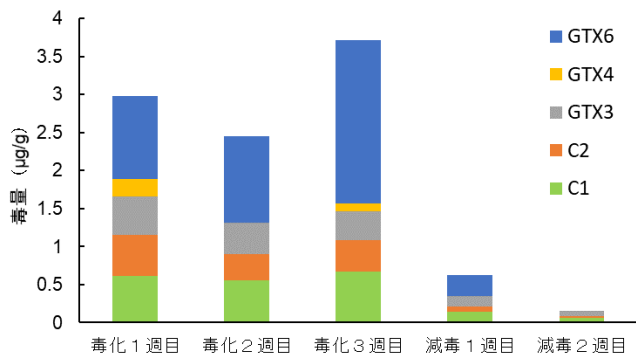


図2 トゲクリガニ肝臓中の毒成分の経時変化

毒化状況および毒成分検出状況の変化を示す。PSTにより毒化したムラサキイガイを捕食させてから1週間で急速に毒化し、2週目では若干毒量が低下したものの、3週目に最高値となった。貝毒成分の内訳は、C1, C2, GTX6が全体の約8割(毒化1週目75%, 毒化2週目83%, 毒化3週目87%)を占め、次いでGTX3、さらに若干ではあるがGTX4も検出された。PSTは毒成分によって毒性の強さが大きく異なり、STX群(neoSTX, dcSTX, STX), GTX1, GTX4, GTX2, GTX3, dcGTX2, dcGTX3は強毒性成分、C1, C2, GTX5, GTX6は弱毒性成分とされており¹¹⁾、今回の研究において高濃度で検出された毒成分の大半は弱毒性の成分であることがわかった。トゲクリガニのPST成分組成についての文献は乏しいため、興味深い知見が得られた。また、GTX6は毒化3週目で最も含有量が多くなり、毒化1週目、毒化2週目の約2倍量となっていたことから、毒化からの時間経過により確認される成分である可能性が推察された。これらの傾向については、今後更なる検証が必要と考えられる。

3週目以降は、毒化ムラサキイガイの給餌を中止してから1週間で急激に毒量が低下し、翌週にはほぼ消失した。また、コントロール群からPSTは一切検出されなかった。

さらに、群毎のばらつきを確認するため、毒化3週目、減毒1週目および減毒2週目のトゲクリガニ15匹を5匹ずつの3群に分け、それぞれの群について測定した結果を図3に示す。

検出された毒成分は、毒化3週目と減毒2週目で3群と

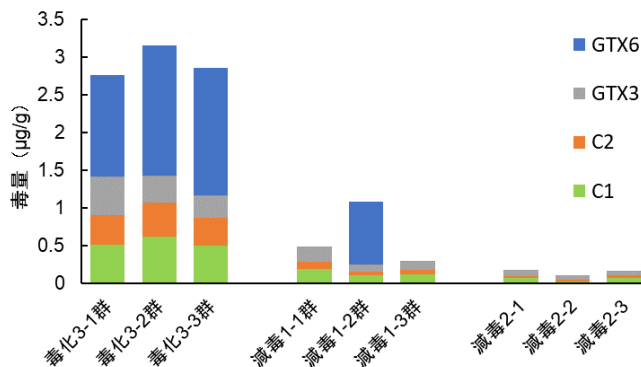


図3 毒化・減毒期間における群毎のロット間差 (n=5)

も一致し、毒量もほぼ同程度でありロットによる差はほぼないと考えられたが、減毒1週目に限ってはGTX6を含有しているサンプルがあった。これは、一群として分析したトゲクリガニ5匹の個体差によるところが大きいと考えられる。

3.2 加熱加工による毒量および毒成分の変化

蒸し加工および塩分濃度の異なる水道水を用いた茹で加工でのPST成分について、図4に示す。毒化1週目および2週目においては、加熱加工では対照群と比較し、明らかに毒量が低下傾向にあり、毒化1週目の蒸し加工のGTX6および塩分濃度0%の茹で加工でのGTX3は、ほぼ減少することなく残存していた。また、毒化1週目では、残存毒量および毒成分組成ともに加熱加工方法の違いで異なっていたが、毒化2週目ではいずれにおいても濃度に大きな違いは認められず、加熱処理群は対照群の毒量の1/5未満となっていた。

次に、各群の蒸し汁および茹で汁のpHおよび毒量測定結果を表3および図5に示す。全ての調理水において、pHはアルカリ性に傾いていた。特に茹で加工では、pH 8.56~8.90とばらつきが大きく、塩分濃度の差によるpHの差異も認められなかった。蒸し加工でのpHは8.80~9.01となり、茹で加工に比べてアルカリ性が強くばらつきも小さかった。また、調理水中の毒成分総量は、毒化1週目と2週目で相反する結果となったが、調理水のpHとの関係は見いだせなかった。

無加工のトゲクリガニ肝臓部に存在する毒成分総量と、加熱加工後の肝臓部および調理水中の毒成分総量を比較した結果(図6-1および図6-2)では、加熱加工後の毒成分は、毒化の期間に関わらず調理水より肝臓部

表3 調理水のpH変化

	毒化1週目	毒化2週目	毒化3週目
蒸し加工	8.93	8.80	9.01
茹で加工			
塩分濃度 0%	8.87	8.56	8.80
塩分濃度 1.5%	8.90	8.64	8.66
塩分濃度 3%	8.63	8.60	8.66

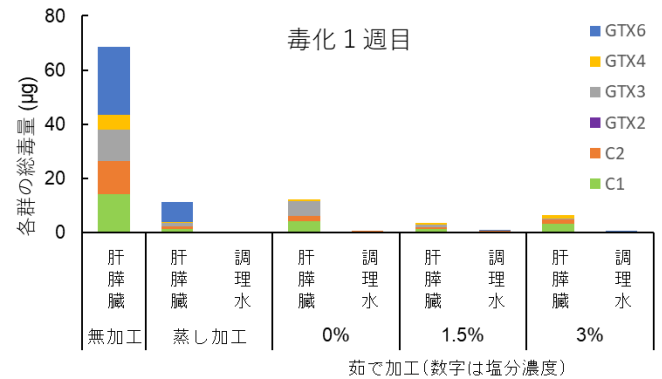


図6-1 毒化1週目における加熱加工後の総毒量および毒成分

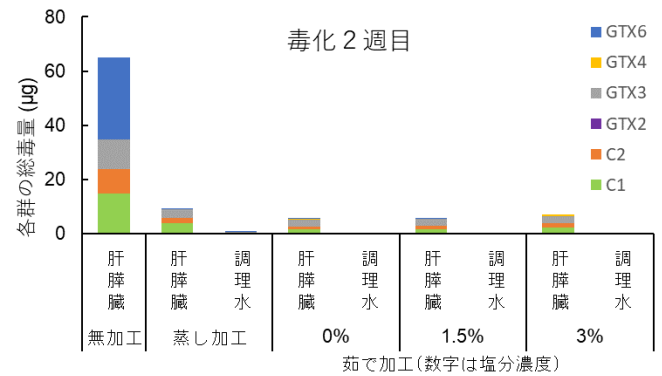


図6-2 毒化2週目における加熱加工後の総毒量および毒成分

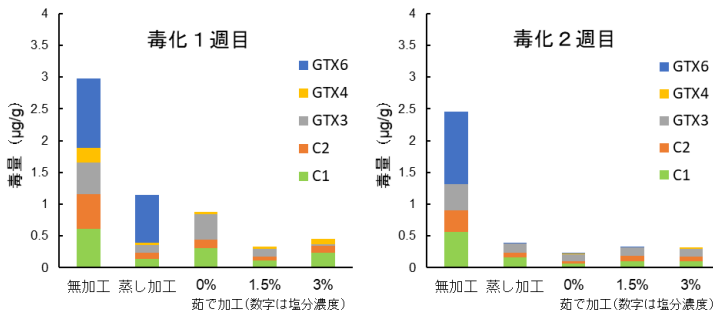


図4 加熱加工による毒量および毒成分の変化 (トゲクリガニ肝臓部)

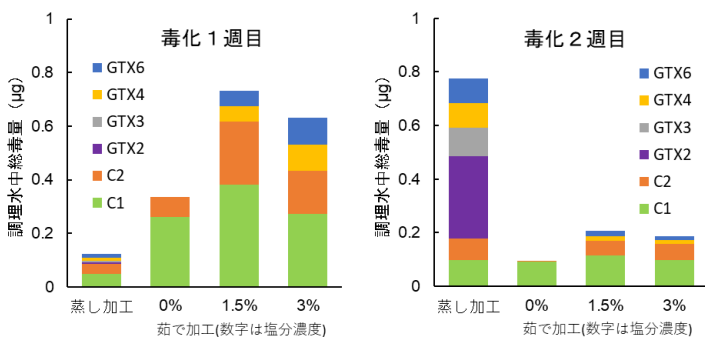


図5 加熱加工による毒量および毒成分の変化 (調理水)

に多く残存しており、調理水からの検出量は蒸し加工、茹で加工のいずれも肝臓部と比べほぼゼロに近い値であった。また、茹で汁の塩分濃度も残存毒量には関係なかったが、毒化1週目、毒化2週目の両蒸し汁から、極低濃度であるがGTX2を検出した。GTX2は、いずれの試料からも不検出の毒成分であり、GTX6が変換してきたものと推測される。各群のそれぞれの総毒量収支については、加熱加工した肝臓部の総毒量に調理水の総毒量を加算しても、無加工の肝臓部の総毒量には遠く及ばないことから、加熱加工によりトゲクリガニの肝臓部から消失した毒成分は、調理水に移行したわけではなく毒成分が減衰あるいは消失していると考えられた。

3.2 アルカリ性下におけるPST標準溶液の経時変化

PST成分は、中性あるいは弱酸性溶液中では加熱に対して安定なため、一般的な加熱調理では分解しないが、アルカリ性では不安定とされている。本研究で得られた調理水のpHは、8.56~9.01と弱アルカリ性であったことから、pH 9.0における毒成分の安定性を観察した。通常、

毒成分標準品は0.0025 N塩酸溶液で希釈して用いるため、溶液のpHは3.4付近となっている。そこで、PST成分標準品を各々200倍に希釈し、混合した溶液に0.1 N水酸化ナトリウム溶液を添加して混合し、pH 9.0とした後、一定時間放置して再び0.1 N塩酸溶液でpHを3.4に戻して機器分析に供し、標準溶液の濃度変化を測定した結果を図7に示す。

C1, C2, GTX3は、変動はあるものの比較的安定していたが、GTX1, GTX2, GTX6, dcGTX2は、変動が大きいものでは20%以上の開きが認められた。しかし、変動幅を最大に見積もっても、無加工肝臓部の毒総量との収支が合わないことから、pHがアルカリ性という要因だけでは本研究結果と同様な毒成分の減衰は生じないと考えられる。可能性として想定されることは、アルカリ性かつ加熱操作という複合要因による処理が挙げられる。PST標準品を用いてアルカリ性下で熱処理を行う検証実験は未実施であるが、トゲクリガニにおいても二枚貝類と同様に、茹で加工などの加熱処理を行うことで毒量が大幅に減少することが判明した。

4 まとめ

PSTにより毒化したトゲクリガニについて、加熱処理を施し除毒効果を検証した。

低濃度のPST毒量測定および各毒成分組成の観察に必要な機器分析法の検討を行い、前処理方法や機器分析条件を整えた。さらに、検証に必要な毒化トゲクリガニの作出において、毒化したムラサキイガイの給餌により、急速に毒化し給餌中止とともに急激に減毒することを確認した。

蒸し加工および茹で加工による加熱処理後の残存毒量値は、いずれの加熱処理でも除毒効果が認められた。また、消失した毒成分は調理水に移行することなく、アルカリ性下で加熱処理されたことにより失活したものと推測され、トゲクリガニにおいても他の二枚貝と同様、加熱処理が除毒に有効であることが確認された。

今後は、本研究が比較的低い毒量での検証であったことから、高濃度に毒化したトゲクリガニを対象として、加熱加工による除毒の状況を確認する必要があると思わ

れる。

謝辞

本研究は、令和元年度宮城県公衆衛生研究振興基金の助成により実施しました。

参考文献

- 1) 食品安全委員会：ファクトシート（麻痺性貝毒），平成26年11月25日
- 2) 自然毒のリスクプロファイル：二枚貝：麻痺性貝毒，厚生労働省ホームページ
- 3) 橋本多美子：麻痺性貝毒含有二枚貝の嗜好性を高める除毒調理法の確立，科学研究費助成事業研究成果報告書，平成27年6月29日
- 4) 仲谷正，山口之彦，山野哲夫，清水充：LC/MS/MSによる麻痺性貝毒の分析—試料溶液調製法の検討，第48回全国衛生化学技術協議会年会講演集，106-107
- 5) 沼野聡：LC-MS/MSを用いたホタテガイ中の麻痺性貝毒の分析について，第54回全国衛生化学技術協議会年会講演集，138-139
- 6) 宮村和良，松山幸彦，呉碩津：大分県猪串湾における有毒渦鞭毛藻*Gymnodinium catenatum*の出現と海水懸濁物中の麻痺性貝毒量およびヒオウギガイ*Chlamys nobilis*の毒化予察，*Nippon Suisan Gakkaishi*, 73(1), 32-42 (2007)
- 7) Krista M.Thomas, Daniel G.Beach, Kelley L.Reeves, Ryan S.Gibbs, Elliot S.Kerrin, Pearse McCarron, Michael A.Quilliam: Hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for quantitation of paralytic shellfish toxins: validation and application to reference materials, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(24), 5675-5687 (2017)
- 8) 仲谷正，山口之彦，山野哲夫，清水充：LC/MS/MSによる麻痺性貝毒成分分析法の基礎的検討，第47回全国衛生化学技術協議会年会講演集，198-199
- 9) 宮城県ホームページ（貝毒対策—貝毒とは）：まひ性貝毒プランクトンの種類について
- 10) (独)水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所 赤潮環境部 有毒プランクトン研究室：有毒プランクトン図鑑
- 11) 大島泰克：麻痺性貝毒に関する化学・生化学的研究，*Nippon Suisan Gakkaishi*, 74(5), 767-771 (2008)

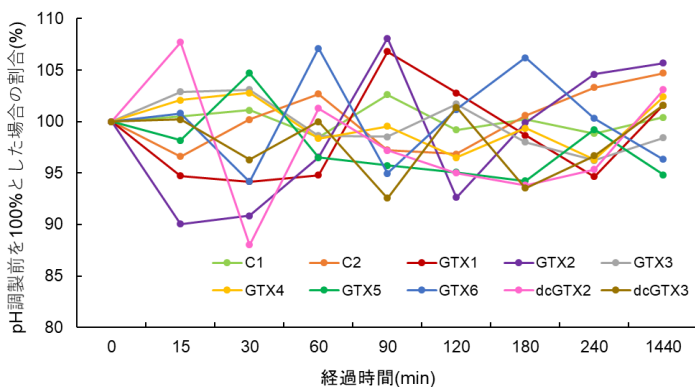


図7 標準溶液濃度の経時変化