

マボヤの麻痺性貝毒分析法の検討

Study of paralytic shellfish toxins analysis method of *Halocynthia roretzi*

千葉 美子 新貝 達成 鈴木 優子 他力 将*¹ 田邊 徹*¹

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

ホタテガイを対象として確立した麻痺性貝毒の機器分析法を用い、マボヤへの適応性を検討した。マボヤを部位別にサンプリングし、精製後の試料溶液中マトリックスの測定値への影響を評価した。さらに、マボヤを可食部と中腸腺に分け、それぞれの試料で添加回収試験を実施した。その結果、麻痺性貝毒が蓄積するとされる肝臓における回収率は、C1, C2, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, GTX5 において 50-130%となり、活及び生鮮二枚貝のコーデックス規格における麻痺性貝毒の機器分析による検査法の性能基準を満足した。

キーワード：麻痺性貝毒；マボヤ；高速液体クロマトグラフ／質量分析計

Key words : paralytic shellfish toxins ; *Halocynthia roretzi* ; LC-MS/MS

1 はじめに

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish toxins) (以下、「PSTs」) は、渦鞭毛藻プランクトンのうちアレキサンドリウム属などによって産生され、これを捕食したホタテガイやアサリなど二枚貝類が毒化することが知られている。PSTs による中毒症状は、摂取後 30 分程度で軽度の麻痺が始まり、麻痺が次第に全身に広がって最終的には呼吸麻痺により死亡することもあるなど、フグ毒の臨床症状に似ている¹⁾。PSTs については、我が国では昭和 55 年 7 月に規制値を設け、マウス毒性試験法により規制値 (4MU/g) を超える貝類の販売等を禁止している。このため、近年では市販されている貝類による食中毒は報告されていない。

一方、マボヤは原索動物であるがプランクトンフィーダーのため、PSTs を蓄積して毒化し 1982 年には岩手県で発生した PSTs 食中毒事件の原因食品となっている²⁾。全国屈指の水産県である宮城県のマボヤ生産量は、全国 1 位で国内シェアの約 80% を占めているが、2020 年 5 月には、県の記録が残る 1992 年以降で初めて規制値を超える PSTs が検出され、約 40 日間の出荷自主規制を強いられた。そこで、県では毒化による出荷規制の長期化解消、検査体制強化及び安定出荷を図るため、監視海域を従来の 3 海域から 8 海域に細分化した経緯がある。

当所では、令和 2 年度から 3 か年計画で、「LC-MS/MS による麻痺性貝毒分析法の検討」をテーマとした調査研究を実施しており、ホタテガイの PSTs の成分分析を中心とした分析法の確立を目指している。

また、PSTs によるマボヤの毒化³⁾と毒の器官偏在性について、水産技術総合センターと共同研究を予定していることから、確立したホタテガイの PSTs 分析法のマボヤへの適応可能性について検討を行った。

2 方法

2.1 試料

水産技術総合センターにおいて採取・解剖したマボヤの鰓、筋肉、腸、肝臓、腸管内容物をそれぞれ 10 個体分合わせてホモジナイズし、マトリックスの影響評価用試料とした。また、市内の小売店で販売されていたホタテガイ 5 枚及びマボヤ 5 個を購入し、PSTs による毒化が認められないことを確認した後、ホタテガイはそれぞれ中腸腺のみを切除して合わせ、ホモジナイズして試料とした。マボヤは、それぞれ肝臓部と筋肉部に取り分け、それぞれを合わせてホモジナイズして添加回収試験用試料とした。

2.2 PSTs の分析

2.2.1 抽出

PSTs の抽出は、公定法に準じた方法により実施した。すなわち、試料 5 g をトールピーカーに正確に量り採り、試料と同量の 0.1 N 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 10mL とした。この溶液を遠心分離し、上清をろ過して抽出液とした (図 1 参照)。

2.2.2 精製

精製は、沼野ら⁴⁾及び Turner ら⁵⁾の方法を参考に実施した。抽出液 3mL を PP 製試験管に分取し、n-ヘキサン 6mL を加えて 15 秒間激しく振盪した。遠心分離後、上層の n-ヘキサンを取り除く操作を計 3 回繰り返し、最後に最下層の試料溶液を採取した。

試料溶液 2mL を Oasis PRiME HLB 3cc に負荷し、その溶出液を採取して限外ろ過し、そのろ液 400μL をあらかじめ 0.25% 酢酸含有 20% アセトニトリル 3mL と

*1 水産技術総合センター

0.0028%アンモニア水 6mL でコンディショニングした ENVI-Carb 6mL に負荷した。700 μ L の水で洗浄した後、0.25%酢酸含有 20%アセトニトリル 2mL で溶出し、正確に 2mL に定容して機器分析用試料溶液（以下、「試験溶液」とした（図 1 参照）。

2.3 標準及び試薬

PSTs の標準品 N-Sulfocarbamoylgonyautoxin-2&3 (C1,C2), Gonyautoxin-1&4(GTX1,GTX4), Gonyautoxin-2&3(GTX2,GTX3), Decarbamoylgonyautoxin-2 &3(dcGTX2,dcGTX3), Gonyautoxin-5(GTX5), Gonyautoxin-6(GTX6)は、カナダ NRC 社製 CRM を用いた。その他の試薬類は、特級、残留農薬分析用、HPLC 用及び LC/MS 用を用途に応じて使い分けた。

2.4 器具・機材

ろ紙は ADVANTEC 社製の No.5C, カラムは Waters 社製 Oasis PRiME HLB (3cc/60mg) 及び Supelco 社製 ENVI-Carb (6mL/500mg) 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, 10kDa を使用した。

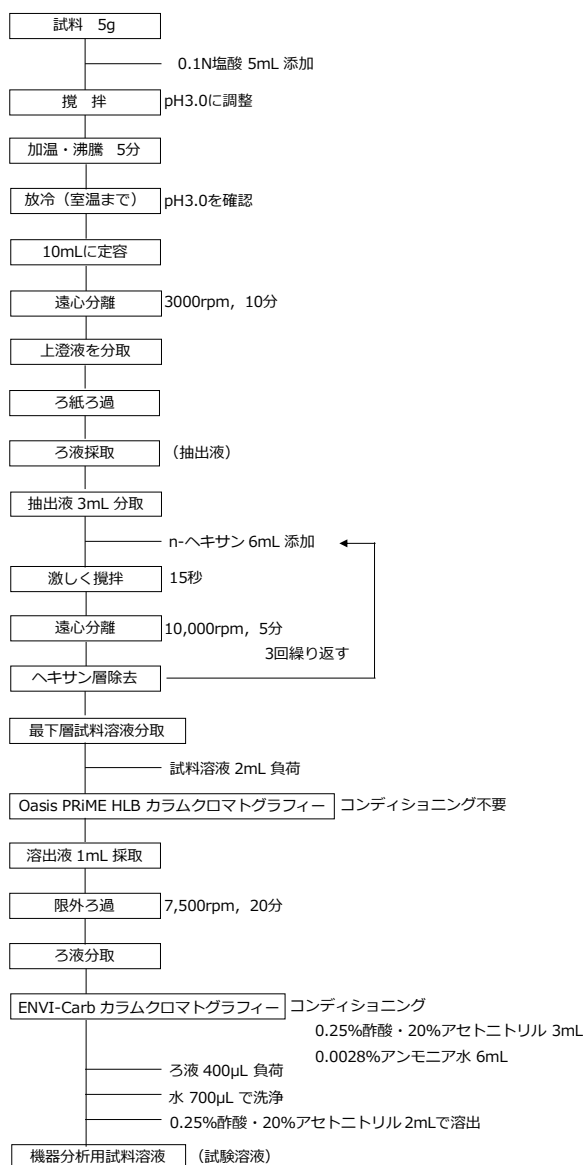


図 1 PSTs の抽出及び精製フロー

2.5 装置及び分析条件

LC 装置及び測定条件を表 1 に、MRM 条件を表 2 に示す。

3 結果及び考察

3.1 マトリックスの影響評価

マボヤの各器官から調製した試験溶液に、各標準液を表3の濃度になるように添加し、0.5mM塩酸で調製した標準液の面積値と比較した。鰓、筋肉及び腸の試験溶液は、全ての毒成分においてマトリックスによるイオン化抑制の影響を受けており、特に、腸におけるGTX1や筋肉におけるdcGTX3などでは、面積比が50%未満となっていた（図2参照）。

また、毒化期間中に採取した試料で、標準液未添加の肝臓及び腸管内容物の試験溶液では、希釈を行わない場合に非常に強いイオン化抑制が認められ、特に腸管内容物ではその影響が顕著であった。腸管内容物の主成分は、プランクトンなどを濾し取った消化後の糞であることから、多彩なマトリックスが含まれていると推測される。

そこで、マトリックス効果の解決策として希釈操作の有用性を検討した。各器官の試験溶液に希釈操作を加え、肝臓の試験溶液は20倍希釈時の濃度を、腸管内容物の試験溶液は50倍希釈時の濃度を100%として、原液及び

表 1 装置及び測定条件

LC 部	Agilent Technologies 1200 Infinity series
カラム	TOSOH TSKgel Amide-80 5 μ m 2.0mmI.D.×25cm
カラム温度	40℃
移動相	A : 0.2% <chem>HCOOH</chem> · 2mM- <chem>CH3COONH4</chem> B : MeCN
グラジエント条件	(A:B) = 0min(20:80) → 8min(45:55) → 18min(70:30) → 20min(70:30) → 22min(20:80) → 37min(20:80)
流速	0.2mL/min
注入量	10 μ L
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)	

表 2 MRM 条件

PST	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
	396	298	1	10	25	28
dcGTX2	353	273	1	10	29	12
	353	255	1	10	27	22
dcGTX3	353	255	1	10	27	22
	353	273	1	10	29	12

表3 添加濃度 (μmol/L)

C1	C2	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	GTX6	dcGTX2	dcGTX3
0.567	0.1695	0.572	0.513	0.2175	0.18	0.268	0.132	0.5005	0.147

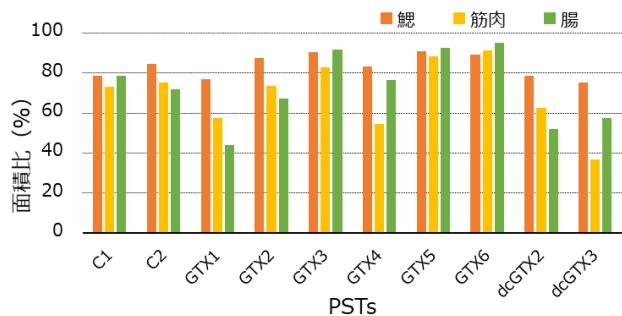


図2 各試料におけるマトリックスの影響

表4 肝臓、腸管内容物におけるマトリックスの影響 (濃度比%)

PSTs	対象部位 希釈倍率	肝臓			腸管内容物		
		×1	×10	×20	×1	×20	×50
C1		56	92	100	-	-	-
C2		73	94	100	27	99	100
GTX1		54	89	100	12	78	100
GTX2		55	88	100	-	-	-
GTX3		63	94	100	24	98	100
GTX4		30	90	100	11	99	100

10倍又は20倍希釈液の濃度を比較した(表4参照)。その結果、肝臓試験溶液では10倍、腸管内容物試験溶液でも20倍の希釈を行えばイオン化抑制の影響を回避でき、希釈操作が有用であることを確認した。

3.2 添加回収試験

「麻痺性貝毒の検査法の性能基準(活及び生鮮二枚貝のコーデックス規格: CODEX STAN 292-2008)」⁶⁾を参考に、添加回収試験を実施した。試料はマボヤの肝臓及び筋肉とし、比較対照としてホタテガイの中腸を用いた。各試料から抽出したそれぞれの抽出液に、各標準液を添加して10mLに定容した。その後、2.2.2 精製に示す方法で3人がそれぞれ精製し、試験溶液を調製した。

各毒成分のコーデックス規格と添加量を表5に示す。市販されている標準液濃度の都合により、GTX1は過剰添加、dcGTX3は過小添加となったが、適用範囲をおお

表5 CODEXの性能基準と添加量

毒成分	適用範囲 (mg/kg)	検出下限 (mg/kg)	定量下限 (mg/kg)	空間再現精度 RSD _{0.5} %	回収率 (%)	添加量 (mg/kg)
C1	0.1 - 0.5	0.03	0.06	≤38	50 - 130	0.4312
C2	0.1 - 0.5	0.03	0.06	≤38	50 - 130	0.129
GTX1	0.05 - 0.2	0.01	0.02	≤44	50 - 130	0.2824
GTX2	0.1 - 0.5	0.03	0.06	≤38	50 - 130	0.3246
GTX3	0.1 - 0.5	0.03	0.06	≤38	50 - 130	0.1376
GTX4	0.05 - 0.2	0.01	0.02	≤44	50 - 130	0.0888
GTX5	0.1 - 0.5	0.03	0.06	≤38	50 - 130	0.1626
GTX6	0.1 - 0.5	0.03	0.06	≤38	50 - 130	-
dcGTX2	0.1 - 0.5	0.03	0.06	≤38	50 - 130	0.2822
dcGTX3	0.1 - 0.5	0.03	0.06	≤38	50 - 130	0.0828

むね満たしている。

性能基準のうち、検出下限値及び定量下限値については、事前の検討により全ての毒成分において性能基準を上回っていることを確認した。また、検量線の直線性に問題は無く、定量に支障はないと考えられた。

n=3で実施した添加回収試験の結果を、図3及び表6に示す。回収率の比較から、全ての試験溶液で強いイオン化抑制が確認され、マトリックスが大きく影響していることが示唆される結果となった。これは、精製操作による損失や毒成分の変換等も考慮する必要があるが、試験溶液を希釈せずに分析を行ったことに因るところが大きいと推測される。

既報によれば、貝毒成分はホタテガイでは中腸⁷⁾に、マボヤでは肝臓に蓄積される⁷⁾とされている。そこで、今回の検討対象であるマボヤについては、肝臓での測定値を重視して評価を行った。回収率は、ホタテガイ中腸と同等又はそれ以上となっており、dcGTX3の39%を除き、その他の毒成分では全て性能基準である50%を上回っていた。

しかし、FESA(欧州食品安全機関)では、毒力計算に用いるTEF(毒性等価係数)をGTX1は1.00、GTX2は0.4、GTX3は0.6、GTX4は0.7、GTX5は0.1、GTX6は0.1、C1は0、C2は0.1、C3は0、C4は0.1、dcGTX2は0.2、dcGTX3は0.4としており、TEFが比較的高値で、かつ回収率が低値であるdcGTX3やGTX4が検出された場合には、毒力値の成分別寄与率に影響を及ぼすことが想定される。そのため、正確な毒力値算出にはイオン化抑制を最小限に抑えることが重要となる。

そこで、ホタテガイの中腸と同様、マボヤも肝臓を試料として検査を実施し、肝臓に含まれる毒量から

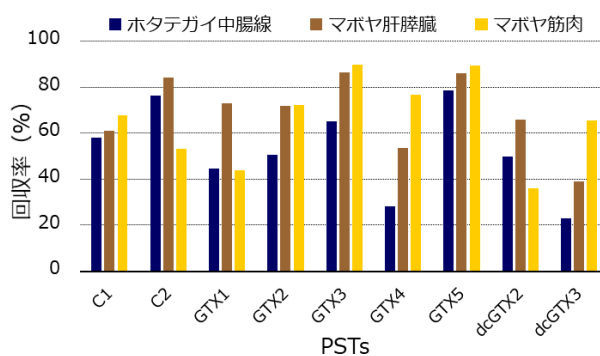


図3 回収率の比較

表6 性能評価結果

毒成分	ホタテ中腸		マボヤ肝臓		マボヤ筋肉	
	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
C1	57.9	5.3	61.1	1.2	67.7	6.8
C2	76.4	3.9	84.1	2.1	53.3	4.1
GTX1	44.7	2.8	72.8	4.0	43.9	2.9
GTX2	50.6	6.2	71.7	3.5	72.1	5.1
GTX3	65.0	1.7	86.3	1.4	89.6	1.5
GTX4	28.1	4.5	53.7	1.8	76.7	1.1
GTX5	78.6	2.0	85.9	1.7	89.2	1.5
dcGTX2	49.8	5.1	66.0	0.5	36.0	2.0
dcGTX3	22.9	1.6	39.0	0.9	65.5	1.5

肝臓を含む可食部に含まれる毒量を推定する方法により定量すれば、マトリックスの影響を受けずに分析できると考えられた。今回使用したマボヤの肝臓は、可食部全体に占める割合が約4%前後であったことから、少なくとも20倍まで希釈操作が見込め、イオン化抑制を十分に抑えることが可能になると思われる。

今後は、今回検討した内容を踏まえ、マボヤにおけるPSTsの分析法の実効性を担保するために、実際に毒化した試料を対象として、毒成分の偏在性や毒量の減衰を中心とした継続的な検討が必要と考える。

4 まとめ

PSTsにより毒化したマボヤについて、機器分析により毒力値を定量する方法を検討した。マボヤを解剖により鰓、筋肉、腸、肝臓及び腸管内容物に分け、ホタテガイの中腸腺で確立した分析法について適応性を検討した。

その結果、抽出・精製のみでは機器分析時にマトリックスによるイオン化抑制作用の影響を受けるが、10～20倍の希釈操作を行うことにより影響を回避できる可能性が示唆された。また、抽出液に標準を添加することにより実施した添加回収試験において、ホタテガイの中腸腺と同等以上の回収率が得られ、CODEXが示すPSTsの検査法の性能基準を満たした。さらに、マトリックス効果が無視できる程度まで試験溶液を希釈することにより、正確な機器分析が可能となった。

これらのことから、ホタテガイの中腸腺を対象として

検討・確立した分析法は、マボヤに対しても適応性があると考えられた。

参考文献

- 1) 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
- 2) 村上りつ子，野口玉雄：麻痺性貝毒－最近の知見を中心に－，食品衛生学雑誌，Vol.41，No.1，1-10（2000）
- 3) 田邊徹，藤田海音，増田義男：2020年に宮城県沿岸で発生した麻痺性貝毒によるマボヤの毒化と毒の減衰特性，宮城水産研報，21，31-36（2021）
- 4) 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
- 5) Dr. Andrew Turner, Mike Boundy, Dr. Tim Harwood : Determination of paralytic shellfish poisoning toxins and tetrodotoxin by UHPLC HILIC MS/MS Guidance Protocol v8 Sep 2018
- 6) 二枚貝等の貝毒のリスク管理に関するガイドライン：農林水産省 消費・安全局，農水産安全管理課，平成27年3月
- 7) Yuji NAGASHIMA, Tamao NOGUCHI, Junichi MARUYAMA, Shunichi KAMIMURA, Kanehisa HASHIMOTO : Occurrence of Paralytic Shellfish Poisons in an Ascidian *Holocynthia roretzi* , Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 50(2), 331-334 (1984)