

原 著

広島県における麻痺性貝毒により毒化した二枚貝の毒組成

高田 久美代 水田 満里 門田 達尚

Toxin Composition of Bivalves infested by Paralytic Shellfish Poison in Hiroshima Prefecture

KUMIYO TAKATA, MARI MIZUTA, TATSUHISA MONDEN

(Received Sept. 30, 1994)

The toxin compositions of oysters *Crassostrea gigas*, short-necked clams *Tapes japonica* and mussels *Mytilus edulis* infested by PSP from Hiroshima Bay in 1992 and 1993 were analyzed by HPLC.

The toxins were found to contain gonyautoxin(GTX)1, GTX2, GTX3, GTX4 and epi-GTX8(C1), GTX8(C2) as the minor components, along with saxitoxin(STX) and neosaxitoxin(neoSTX). Above all, GTX1 and GTX4 were the major components. There were no significant difference in toxin content of 1992 and 1993. The content of GTX(1+4) in 1993 was lower and that of GTX(2+3) was higher than those in 1992 however. The conspicuous feature was that the content of neoSTX in 1993 was higher than that in 1992. The toxin compositions of oyster toxin, short-necked clam toxin and mussel toxin were similar to each other.

Whereas, toxin compositions varied depending on geographical conditions or the growth stage. The content of GTX(1+4) decreased and those of GTX(2+3) and neoSTX increased depending on growth stage. It seems that the variation of toxin composition due to the occurrence of metabolic interconversions of the PSP toxins.

Key words : paralytic shellfish poison, bivalves, toxin composition, high performance liquid chromatography method

緒 言

麻痺性貝毒 (PSP) は渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属や *Gymnodinium catenatum* などが産生する強力な神経毒であり、食物連鎖によりまずカキ、イガイなどの二枚貝に蓄積され、これを摂食したヒトが食中毒を起こす。PSP はサキシトキシン (STX) を基本骨格とする多数の成分から構成されており、現在のところ18成分が知られているが[1]、その毒力は成分によって大きく異なっている。

我が国では近年、PSP による貝類の毒化が各地で起こり[2,3]、水産並びに食品衛生上の大きな問題となっているが、本県においても広島湾及びその周辺海域で1992年春に引き続き1993年春にも二枚貝が毒化した。1992年には規制値 (4 MU/g) を大幅に超える毒性値が検出され[4,5]、本県の水産業界は多大な被害を受けたが、1993年は毒性が規制値を超えたものの毒化の程度は小さかった。

1992年の広島湾におけるPSPにより毒化した二枚

貝の毒組成については既に報告されているが[5]、採取日数、採取地点が共に少なく、広島湾の二枚貝の毒組成を把握するには十分とは思われない。そこで、著者らは1992年については採取日数、採取地点を増すとともに、1993年に採取された二枚貝についても高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法を用いて毒組成の分析を行い、両年における二枚貝の毒組成を明らかにした。また、1993年の検体については毒組成の経日変化を調べたところ興味ある知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 材 料

1992年の定期検査において毒性値が検出された検体のうち4月に採取されたカキ2検体、アサリ5検体、ムラサキイガイ2検体を用いた。毒性値はそれぞれ2.2~17.4MU/g, 7.1~20.9MU/g, 98~272MU/gであった。1993年については、3月~5月に採取さ

れたカキ13検体, アサリ14検体, ムラサキイガイ17検体を用いた. 毒性値はそれぞれ 1.76~5.67MU/g, 1.86~9.06MU/g, 1.94~10.8MU/g であった.

成される蛍光物質を検出した. 測定条件を Table 1 に示した.

2. 試薬及び装置

アセトニトリル: 片山化学工業(株)製 液体クロマトグラフィー用

1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム: 和光純薬工業(株)製イオンペアクロマトグラフ用

その他の試薬は特級及び一級を用いた.

カートリッジカラム: Waters社製 Sep-Pak C-18

限外濾過膜: Millipore社製 ウルトラフリーC3LCC
ゴニオトキシン群(GTX1,2,3,4)標準品, サキントキシン群(STX, neoSTX)標準品: 広島大学生物生産学部水産物利用学研究室より分与されたものを使用した.

高速液体クロマトグラフ: (株)島津製作所製 LC-10AS 蛍光検出器 RF-10A

3. 実験操作

公定法[6]に準じて調製した酸抽出液をカートリッジタイプの ODS カラムに通し, 次いで遠心チューブ型の限外濾過膜に移して 12,000rpm で10分間遠心分離した. 得られた濾液を測定液として大島ら[7]の開発した HPLC 法によって分析し, 毒組成を測定した. すなわち, 毒成分をイオン対クロマトグラフィーで分離し, 過ヨウ素酸を用いたポストカラム酸化により生

結果及び考察

1. 1992年の二枚貝の毒組成

4月18日採取のカキ, アサリ, ムラサキイガイの HPLC クロマトグラムと毒組成比を Fig.1, 2 に示した. また, 毒組成の分析結果を Table 2 に示した. GTX 群分析においては強毒性の Carbamate トキシンである GTX1, GTX2, GTX3, GTX4 がカキ, アサリ, ムラサキイガイのいずれの検体からも検出された. また, リテンションタイム 4.1 分付近にいずれの検体からも検出されたピークは GTX2,3 の側鎖 Carbamoyl に Sulfon 基が付加した低毒性の N-Sulfocarbamoyl トキシン epi-GTX8, GTX8 (C1, C2) と考えられた [2,5]. そこで, 測定液を強酸性 (pH1.5) の条件下で加水分解を行ったところ, このピークはほとんど消失し, その代わりに GTX2, GTX3 が増加した. このことから, このピークは C1, C2 であると推定された. 加水分解前後の HPLC クロマトグラムを Fig.3 に示した. STX 群分析においてはカキ, アサリからは neo STX のみが, ムラサキイガイからは neo STX と微量の STX が検出された. ここでは高毒性の Carbamate トキシン GTX1~4, STX, neoSTX に着目することとした.

Table 1. Operating Conditions for HPLC Analysis of PSP Toxins

Column	: Inertsil ODS (5 μ m, 4.6 \times 150mm)
Mobile phases	: flow rate at 0.8ml/min (1) for GTX1-GTX4 2mM sodium 1-heptanesulfonate in 10mM ammonium phosphate (pH 7.1) (2) for STX, neoSTX 2mM sodium 1-heptanesulfonate in 30mM ammonium phosphate (pH 7.1), 5% acetonitrile
Oxidizing reagent	: flow rate at 0.4ml/min 7mM periodic acid in 50mM sodium phosphate buffer (pH 9.0)
Reaction	: at 65 $^{\circ}$ C in Teflon tubing 0.5mm \times 10m
Acidifying reagent	: flow rate at 0.4ml/min 0.5M acetic acid
Detection	: excitation wavelength 330nm, emission wavelength 390 nm

麻痺性貝毒により毒化した二枚貝の毒組成

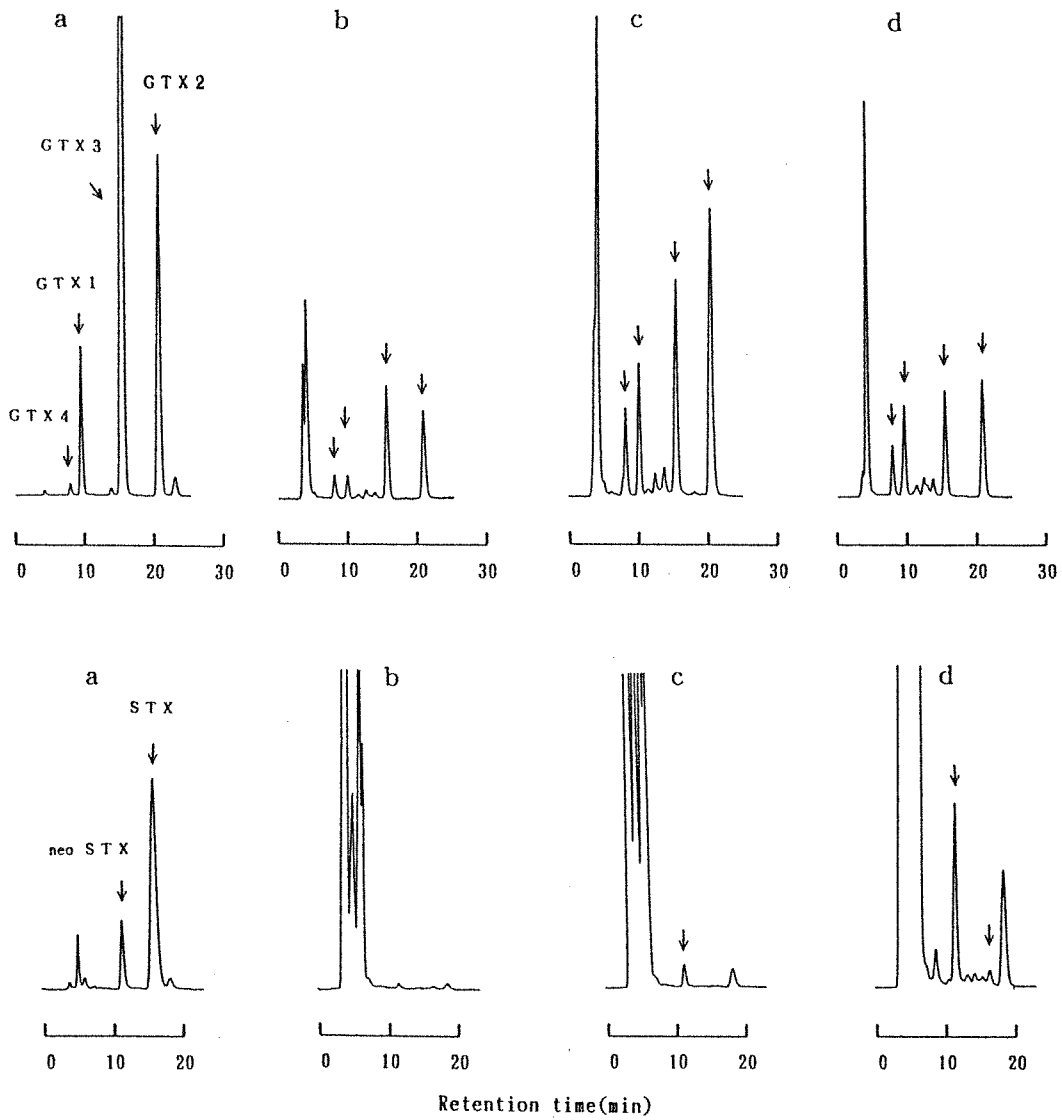


Fig.1.HPLC analysis of oyster, short-necked clam and mussel in 1992, along with standards
 a : standards b : oyster toxin c : short-necked clam toxin d : mussel toxin

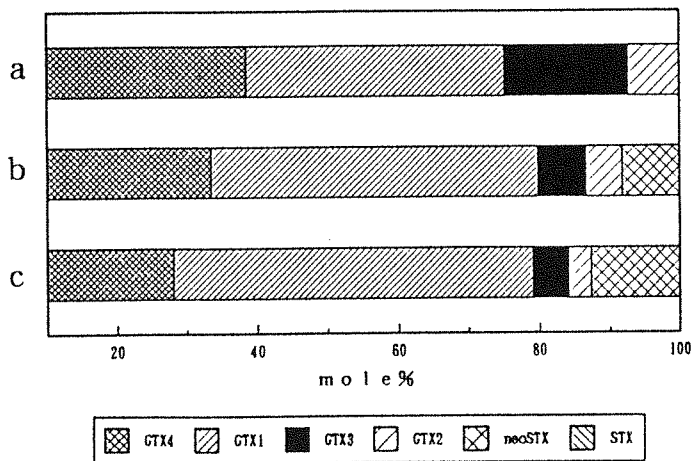


Fig.2.Toxin composition of bivalves in 1992
 a : oyster b : short-necked clam c : mussel

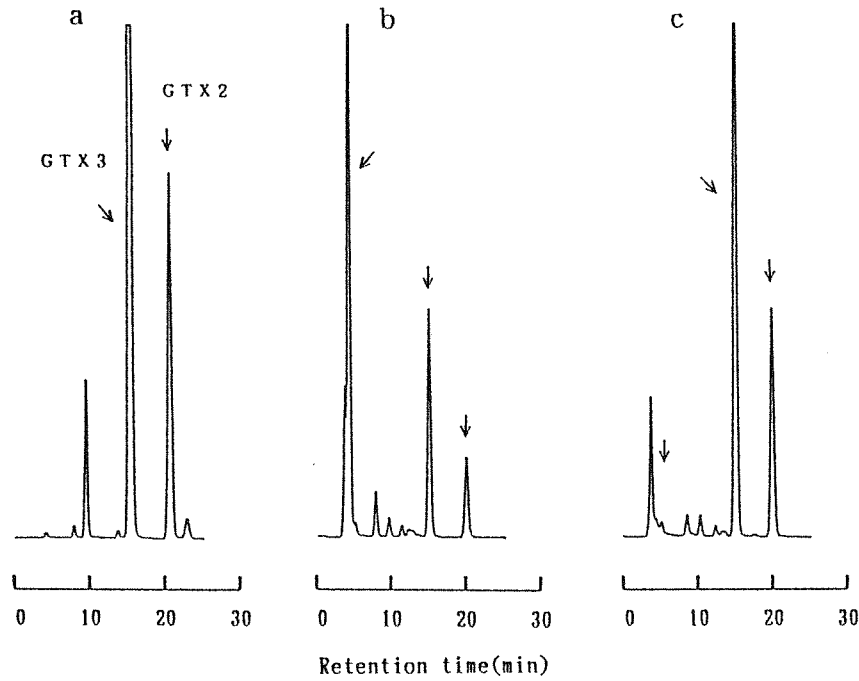


Fig.3.HPLC analysis of acid hydrolyzate of oyster toxin
a : standards b : oyster toxin c : acid hydrolyzate of oyster toxin

Table 2.Toxin Composition of Bivalves in 1992 (mole%)

	oysters		short-necked clams	mussels	
GTX(1+4)	75.0	82.7	77.1~84.1	79.0	82.7
GTX(2+3)	25.0	14.1	6.9~16.7	8.3	11.1
neo STX	ND	3.2	4.0~ 9.4	12.6	6.1
STX	ND	ND	ND	0.1	0.1
n	2		5	2	

n: number of samples; ND: not detected

Table 2において立体異性体である GTX1 と GTX4, GTX2 と GTX3 はその和で示した. GTX(1+4) はカキ, アサリ, ムラサキイガイのいずれについても約80モル%を, GTX(2+3) は, 6.9~25.0モル%を占めた, STX 群については, neoSTX が3.2~12.6モル%の範囲に含まれていたが, STX はムラサキイガイに僅かに含まれているだけであった. 以上のようにどの貝種についても GTX1,4 が主成分であり, 次いで GTX2,3 が多くを占め, STX 群は微量成分であった. また HPLC 法の定量値から換算した毒性値とマウス試験法の毒性値はほぼ一致した. Asakawa ら [5] は広島湾で採取したカキ, アサリ, ムラサキイガイの毒組成を分析し, GTX 群については GTX1~4, C1, C2 が検出され, GTX1 が主成分で約 51~55 モル%を占め, アサリ, ムラサキイガイからは痕跡程度の STX

が検出されたと報告している. 著者らの分析では, GTX 群についてはほぼ同様の結果となったが, STX 群については, STX がムラサキイガイのみから痕跡程度検出され, neoSTX がどの貝種からも 3.2~12.6モル%の範囲で検出された. PSP は構造的に多様であり, 生体内での変化や貝の種類, 時間的経過などによって複雑化するといわれており [8], 著者らとは採取日と採取地点が異なることからこのような結果になったものと思われる. また, Table 2 からわかるように, 貝種間の毒組成については, GTX 群においては, 組成比に若干の違いはあるものの顕著な相違はみられなかったが, STX 群においては, neoSTX の含有量がカキに比較してアサリ, ムラサキイガイにおいてやや高かった.

2. 1993年の二枚貝の毒組成

5月19日採取のカキ, アサリ, ムラサキイガイのHPLCクロマトグラムと毒組成比をFig.4,5に示した. また, 毒組成の分析結果をTable 3に示した.

1992年の検体と同様にGTX群分析においてはGTX1~4とC1,C2がカキ, アサリ, ムラサキイガイのいずれの貝種からも検出された. STX群分析においてはSTX, neoSTXがいずれの貝種からも検出された. Table 3に示すように, GTX(1+4)が16.6~86.9モル%, GTX(2+3)が13.1~55.0モル%を占め, STX群については, neoSTXがND~55.1モル%, STXがND~4.1モル%含まれていた. 1992年と同様に概ねGTX1,4が主成分であったが, 1992年に比較して1993年はいずれの貝種についてもGTX(1+4)の含有率が低く, GTX(2+3)の含有率

がやや高い傾向がうかがわれた. また, STX群については, STXは1992年と同様に微量検出されたにすぎなかったが, neoSTXについてはアサリにおいて55.1モル%, カキで21.3モル%, ムラサキイガイで17.6モル%検出されたものもあり, 1992年に比較して含有量が高いのが特徴的であった. またHPLC法の定量値から換算した毒性値とマウス試験法の毒性値はほぼ一致した. 貝種間の毒組成比については, 1992年と同様にGTX群においては顕著な相違はみられなかったが, STX群においてはneoSTXの含有率がカキ, ムラサキイガイに比べてアサリにおいて高い傾向にあった. このように貝種間の組成については, neoSTXにおいて両年とも若干の相違がみられたことから貝体内における毒の代謝機構に違いのあることが推測される.

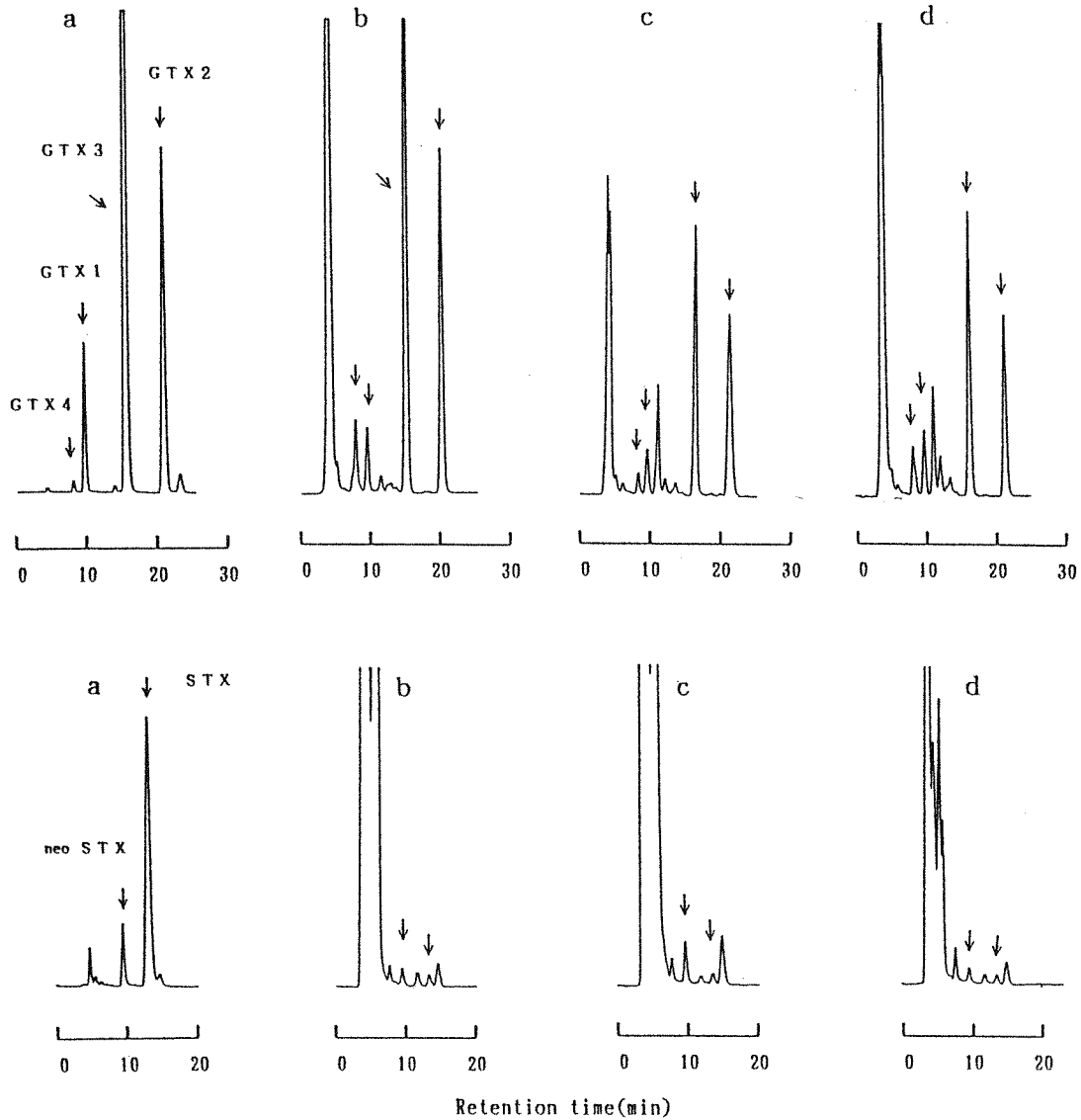


Fig.4.HPLC analysis of oyster, short-necked clam and mussel in 1993, along with standards
a : standards b : oyster toxin c : short-necked clam toxin d : mussel toxin

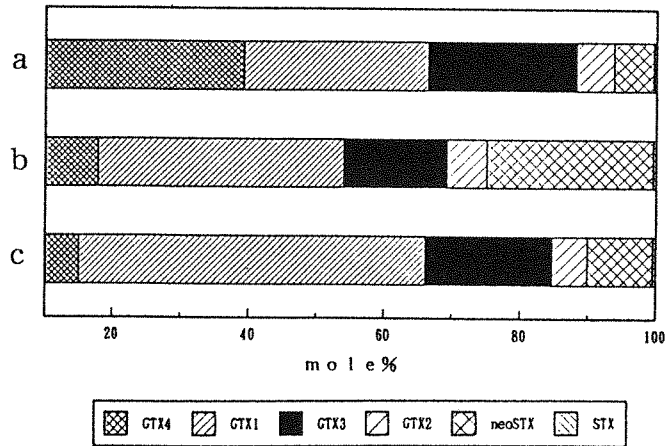


Fig.5. Toxin composition of bivalves in 1993
a : oyster b : short-necked clam c : mussel

Table 3. Toxin Composition of Bivalves in 1993 (mole%)

	oysters	short-necked clams	mussels
GTX(1+4)	41.7~85.8	16.6~80.4	50.3~86.9
GTX(2+3)	14.2~52.6	14.8~55.0	13.1~37.9
neo STX	ND~21.3	ND~55.1	ND~17.6
STX	ND~ 2.1	ND~ 0.7	ND~ 4.1
n	13	14	17

n: number of samples; ND: not detected

同一地点で採取された同種の貝の毒組成の経日変化を Fig.6,7 に示した。若干の例外はあるものの日数の経過と共に GTX(1+4) が減少し GTX(2+3) が増加する傾向がうかがわれた。また、STX 群は GTX 群の減少と共に増加する傾向にあった。貝の体内における代謝によって GTX1, GTX4 は還元的变化により GTX2, GTX3, neoSTX を経て最終的には STX になるといわれているが [8,9], 1993 年の調査ではこのこ

とを示唆する結果が得られた。

広島県における毒化の原因プランクトンは *Alexandrium tamarense* であると報告されているが [10], 種によって、また分離された地域によって毒組成に違いがあるもののその組成は遺伝的に安定であるといわれている [11]。広島湾において 1992 年と 1993 年の毒化貝の毒組成がほぼ同じであったことは、このことを裏付ける結果であった。

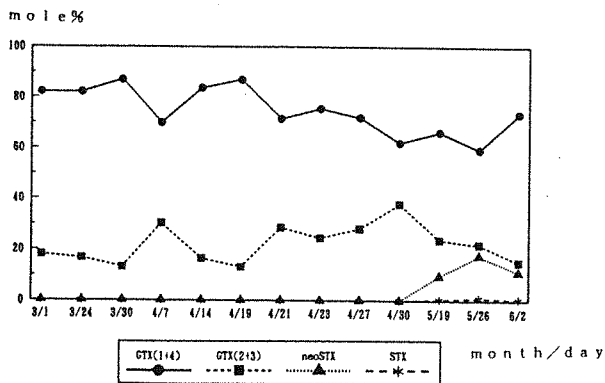


Fig.6. Variation of toxin compositions of mussels in 1993

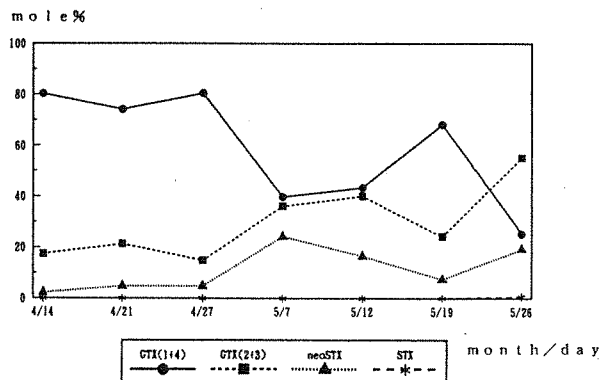


Fig.7. Variation of toxin compositions of short-necked clam in 1993

まとめ

1992年と1993年に広島湾及びその周辺海域でPSPにより毒化した二枚貝（カキ、アサリ、ムラサキイガイ）の毒組成を調べた。両年ともいずれの貝種からもGTX1, GTX2, GTX3, GTX4, C1, C2, neoSTX, STXが検出され、主成分はGTX1, GTX4であった。原因プランクトンが同じであったことから毒組成に顕著な相違はなかったが、1993年は1992年に比較してGTX(1+4)の含有率がやや低く、GTX(2+3)の含有率がやや高かった。またneoSTXの含有率が高いのが特徴的であった。貝種間の組成については、neoSTXにおいてその含有率に若干の相違がみられた。

同一地点における同種の貝の毒組成の経日変化をみると、日数の経過と共に組成が変化していることから、貝の体内における吸収、代謝、排泄等によりPSPが複雑に変化していることが示唆された。

PSPは多数の成分が存在し、その毒力も異なることから、毒化貝の毒組成を把握しておくことは重要なことである。今後はより正確な毒組成を把握するために、低毒性で微量成分であるN-Sulfocarbamoylトキシンをも含んだ毒組成の調査を行うことが必要であると考えられる。

本研究の遂行にあたり、貴重な麻痺性貝毒標品をご提供くださった広島大学生物生産学部宮澤啓輔教授並

びに浅川学助教授に深謝致します。

文 献

- [1] 神谷久男, 幹 渉 編: 海洋生理活性物質研究法, 恒星社厚生閣, 東京 (1992), p.60.
- [2] 大島 泰克: 水質汚濁研究, **12**, 763-768 (1989).
- [3] 加藤 巖 編 (1988): 生物トキシン—医学・生物学への応用, p.9-13, 東京, 学会出版センター.
- [4] 水田満里, 高田久美代, 門田達尚, 海佐裕幸 (1993): 広島県保健環境センター研究報告, **1**, 37-41.
- [5] Asakawa, M., Miyazawa, K., Noguchi, T.: J. Food Hyg. Soc. Japan, **34**, 50-54 (1993).
- [6] 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.
- [7] Oshima, Y., Sugino, K., Yasumoto, T.: Mycotoxins and Phycotoxins '88, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, (1989), 319-326.
- [8] 清水 譲: 化学と生物, **18**, 792-799 (1980).
- [9] 野口玉雄: 化学と生物, **25**, 47 (1987).
- [10] 広島県: 平成4年度赤潮貝毒監視事業報告書, 1-6 (1993).
- [11] 左子芳彦: 化学と生物, **30**, 726-734 (1992).

