

二枚貝の下痢性及び脂溶性貝毒同時分析法の検討

梶田弘子

要 約

LC-MS/MSを用いたホタテ試料中の下痢性貝毒オカダ酸群 (OA, DTX), 脂溶性貝毒ペクテノトキシン群及びエッソトキシンの同時分析法を構築した. 本法は, 試験法としての妥当性評価ガイドラインの目標値を概ね満たしていた. 本法を用いて, マウス試験法で規制値0.05 MU/gを超過したため出荷規制された県内A海域のホタテ試料を分析した結果, 下痢性貝毒DTX1が新たに設定された規制値0.16 μ gOA当量/gを超える量検出され, 脂溶性貝毒の含有量を同時に定量することができた. 貝毒の毒性は, その成分ごとに差があり, その組成比は海域や二枚貝の種類によって異なることから, 下痢性貝毒及び脂溶性貝毒成分を同時に把握できる本法は有用と考えられた.

キーワード: 下痢性貝毒, 脂溶性貝毒, オカダ酸群, LC-MS/MS

緒 言

下痢性貝毒は, 1976年6月に宮城県産のムラサキイガイを原因食品とする食中毒が端緒となり発見された. その後, 1983年までに1,300人以上の患者数が報告されたことから, 国は, 食品衛生法により麻痺性及び下痢性貝毒に関する規制値を設定し, 試験法としてマウス試験法 [1] が通知された.

都道府県及び漁業関係者は連携し, 原因プランクトンの監視 (毒化予知) や出荷前に貝毒検査を行い, 規制値超過の場合は出荷規制する監視体制を構築しリスク管理を進めた結果, 下痢性貝毒による食中毒事件数は大幅に減少し, 平成以降は3件 [2] のみである.

下痢性貝毒の成分は, オカダ酸 (OA), 関連物質ジノフィシストキシン (DTX) 及びそのエステル体のOA群からなり, その組成は二枚貝の種類, 海域や季節によって異なることが報告されている [3-4]. マウス試験法は下痢原性を有するOA群に加え, 下痢原性をもたないペクテノトキシン (PTX) 群やエッソトキシン (YTX) 群の脂溶性貝毒成分 [5] や飽和脂肪酸 [6] も一括して検出することから, 下痢性貝毒としての毒性を過大評価する可能性がある.

諸外国では, 感度・特異性の低さ, 動物実験という倫理的な問題から, マウス試験法に替わって各成分

を特異的に検出し, 毒性を正しく評価可能なLC-MS/MSによる機器分析法の導入を進めているが, その規制状況は国によって異なっている. アメリカはOA群に0.16 mg OA当量/kg, カナダはOA群に0.2 mg OA当量/kg, PTX群に0.2 mg/kgの規制値を設定している. EUはOA群とPTX群を合わせて0.16 mg OA当量/kgの規制値を設定し, YTX群には3.75mg/kgを設定しており, EUにホタテなど二枚貝可食部を輸出する場合は, これらの貝毒成分について規制値以下であることを確認することが求められている [7].

我が国は, 国際的な現状を鑑み, 2015年4月からOA群にCodex規格である0.16 mg OA当量/kgの規制値を設定し, 試験法として機器分析法が通知された[8]. LC-MS/MSによるOA群, PTX群及びYTX群の分析法は複数報告 [9-11] されているが, これらを同時に精製する試料調製法はほとんど報告されていない.

岩手県保健環境研究センターでは, この通知発出に先立ち, 機器分析法への速やかな移行を図り, 岩手県の検査体制強化を目的にOA群に加え, EU等で規制対象であるPTX群及びYTX群を含めた試料調製法とLC-MS/MS同時分析法を検討した.

この分析法を用いて, 過去に生産者が実施した自主検査で規制値超過となり出荷規制となったホタテ試料

や市販流通品について、各成分の定量を行ったので報告する。

材料及び方法

試料、試薬および器具：

試料は、平成26年4月から12月にかけて県内で販売された岩手県及び青森県産ホタテの中腸腺及びむき身を用いた。また、過去に生産者が実施したマウス試験法による自主検査で0.05~0.1 MU/gと規制値を超え、出荷規制された県内A海域のホタテ（中腸腺、むき身）と平成26年6月及び7月に販売されたホタテ流通品（以下6月および7月市販品）を、本論文で検討した方法で貝毒の定量を行った。

標準品のオカダ酸群（OA, DTX1, DTX3）、PTX群（PTX1, PTX2, PTX6）及びYTXは、水産庁貝毒安全対策事業配付標準品を使用した。各々標準品10 mgを精秤し、メタノールに溶解して20 mLとしたものを標準原液とし、冷凍保存した。なお、DTX2については標準品を入手できなかったことから検討項目から除外した。

試料精製用の固相抽出カートリッジカラムは、Waters社製のジビニルベンゼンN-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムOASIS HLB 60 mg（以下HLBカラム）を用い、最終試験溶液用の除粒子フィルターは、アドバンテック東洋(株)製DISMIC（親水性PTEE, 0.2 μm）を用いた。

装置および測定条件：

液体クロマトグラフはAgilent technologies社製1100シリーズ、質量分析装置はAB SCIEX社製API 4000を用い、表1に示す条件を用いた。イオン化はエレクトロスプレー（ESI）によりOA群及びYTXはネガティブイオンモード、PTX群はポジティブイオンモードで測定した。

検量線の作成：

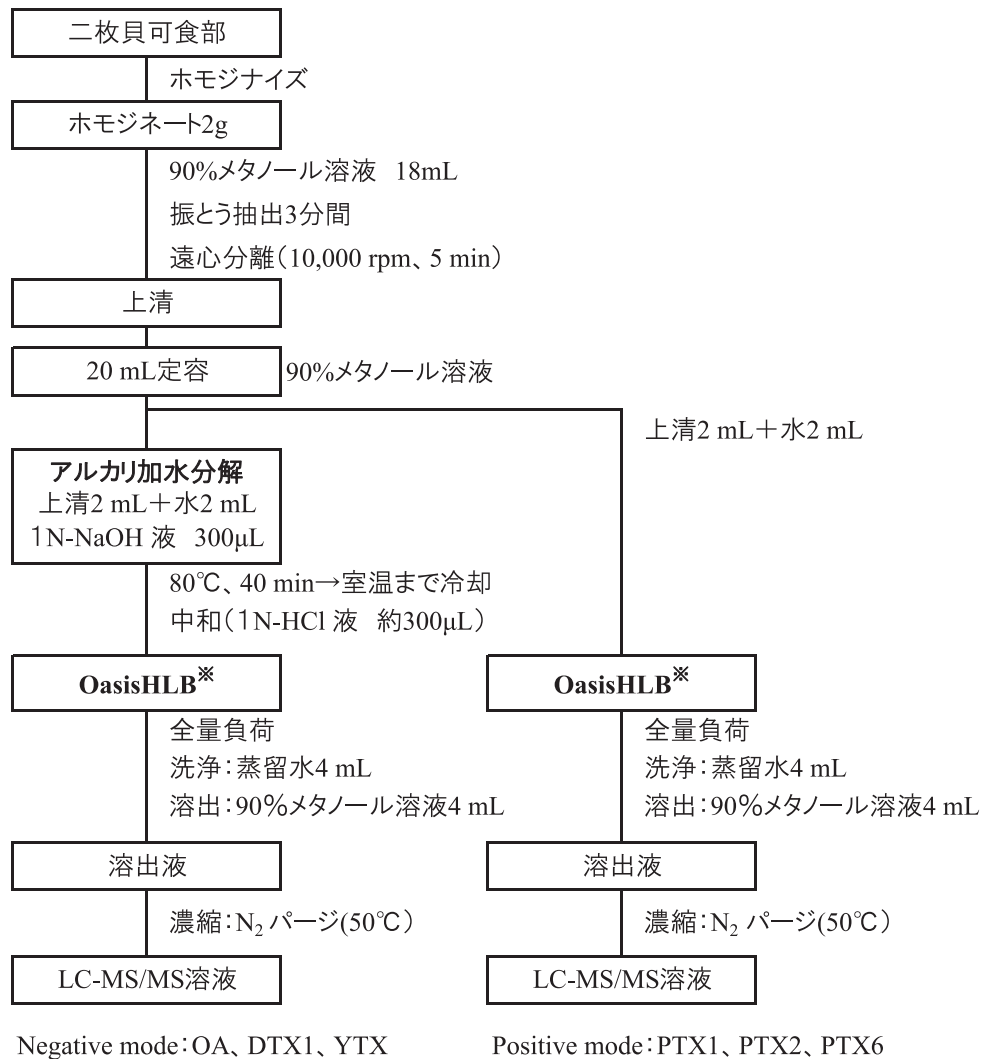
DTX3を除く標準原液を90%メタノール溶液で希釈し、YTXは0.001~0.2 μg/mL、YTX以外は0.0001~0.02 μg/mL濃度範囲の標準溶液を調製し、5 μLをLC-MS/MSに注入した。得られたクロマトグラムから各成分のピーク面積をそれぞれ求め、絶対検量線法で検量線を作成した。

試験溶液の調製：

試験溶液の調製方法を図1に示した。試料2 gに9倍量の90%メタノール溶液を加え、3分間振とう抽出し遠心分離後、上清を分取し20 mLに定容した。この抽出液2 mLに同量の蒸留水を加え、HLBカラムに負荷する溶液を調製した。エステル体のDTX3は、HLBカラムに負荷した場合、メタノール溶液では脱離しないため、この溶液に1 N水酸化ナトリウム300 μLを加え、80℃で40分間のアルカリ加水分解処理を行いDTX 1に変換した。室温に冷却後、1 N塩酸約300 μLを加え、pH7前後に調整したものをHLBカラムに負荷し試験溶液を作製した。PTX群は、アルカリ加水分解

表1 LC-MS/MS測定条件

Column	Waters X Terra MS C8(2.1mm × 150mm、3.5 μm)						
Column Temp.	40℃						
Mobile Phase	A : 0.1% formic Acid+10mM ammonium formate B : acetonitrile						
Gradient	Time (min)	0	1	6	15	15.01	20
	B (%)	90	90	10	10	90	90
Flow rate	0.2mL/min						
Injection Volumn	5 μL						
Ionization	ESI						
Mode	Multiple Reaction Monitoring(MRM)						
Run time	20min						
IS Temp.	(+) 600℃ (-) 500℃						
Ion voltage	(+) 5kv (-) -4kv						
MRM(m/z)	(+)	Quantitation			Confirmation		
	PTX1	892.6	→	839.6	892.6	→	821.6
PTX2	876.6	→	823.5	876.6	→	841.6	
PTX6	906.5	→	853.3	906.5	→	835.5	
MRM(m/z)	(-)	Quantitation			Confirmation		
	OA	803.6	→	255.3	803.6	→	113.0
	DTX1	817.5	→	255.3	817.5	→	113.0
	YTX	1141.6	→	1061.7	1141.6	→	855.4



※:メタノール4 mL、蒸留水4 mLでコンディショニング

図1 試料調製法

解により消失することから、OA群及びYTXとは別フローで精製した。

添加回収試験：

ホタテ中腸腺およびむき身試料に混合標準溶液を0.1 μg/g (YTX0.5 μg/g) 添加し、試行数5回で試験を行った。

なお、試験に用いた中腸腺試料は定量下限値を超えるPTX6を含有していたことから、PTX6についてはマトリックス標準添加法で検量線を作成した。

成績

HLBカラムにおける各種貝毒保持能の検討：

HLBカラムにおける挙動を把握するため、混合標準溶液のメタノール濃度を10~90%の範囲で段階的に変え、HLBカラムに負荷し各種貝毒成分の保持能を検討した(図2)。エステル体のDTX3はカラムに吸

着しメタノールで溶出しないため、HLBカラムによる他の成分との同時処理が困難であった。DTX3を除く6成分は負荷液のメタノール濃度が50%を超えると保持されず溶出するため、抽出液のメタノール濃度を50%以下に調整しHLBカラムに負荷することとした。

アルカリ加水分解処理の貝毒回収率への影響：

使用したエステル体のDTX3標準品は、アルカリ加水分解処理により、DTX1としての回収率が91.1±4.0% (試行数5回)であったことから、DTX3は全量DTX1に変換していると推定された。ネガティブモードで測定するOA、DTX1及びYTXについて、アルカリ加水分解の影響の有無を見るため、ホタテむき身試料に混合標準溶液を添加し、抽出液についてアルカリ加水分解したものと未実施の試料についてHLBカラムにそれぞれ負荷する添加回収試験を行った(表2)。各成分とも両処理群の回収率に有意差はなかったこと

から、OA群及びYTXはアルカリ加水分解処理-HLBカラム精製の方法を採用した。

ホタテ試料における各種貝毒の添加回収試験：

ホタテ試料を用いた各種貝毒の添加回収試験結果を表3に示した。中腸腺試料のYTXのみ回収率が68.3%と70%未満であったが、その他の成分の回収率は70～120%の範囲内であった。併行精度 (RSD) は、むき身試料のOAが16.0%とやや高めであったが、その他の成分は10%未満と良好な結果が得られた。

規制値超過検体および市販品における貝毒の定量：

OAは、LC-MS/MSを用いる本法においても、いずれの検体からも検出されず、このことはこれまでの報

告 [34] と一致していた。

マウス試験法により規制値0.05 MU/gを超えたため出荷が自主規制となった海域で採取されたホタテの中腸腺、むき身試料では、DTX1が各々0.95、0.19 μgOA当量/g検出され、現行の規制値0.16 μgOA当量/gを超えていた (表4)。

市販品のむき身試料については2検体ともDTX1は検出されなかった。一方、脂溶性貝毒のPTX1は6月市販品、7月市販品から各々0.04μg/g、0.01μg/g、PTX6は各々0.31μg/g、0.19μg/g検出された。また、YTXが6月市販品から0.35μg/g検出された。DTX1標準溶液と検体のクロマトグラムを図3に示す。

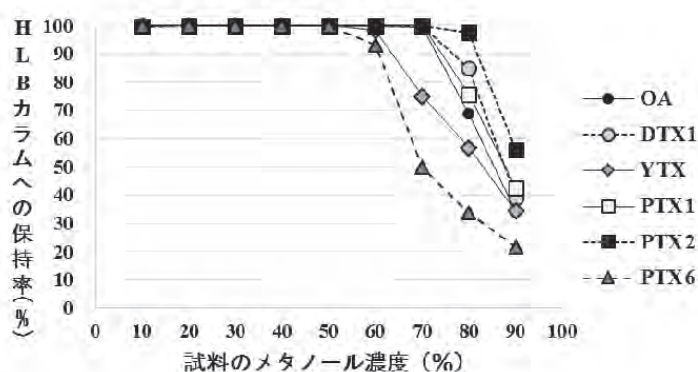


図2 HLBカラムにおける各種貝毒保持能

表2 アルカリ加水分解処理の貝毒回収率への影響

成分	Alkaline hydrolysis + OasisHLB	OasisHLB
DTX3	DTX1として91.1 ± 4.0	
OA	85.3 ± 9.1	94.6 ± 10.0
DTX1	85.6 ± 1.6	87.8 ± 12.9
YTX	91.3 ± 5.9	94.8 ± 10.2

表3 ホタテ試料における各種貝毒の添加回収試験結果

ホタテ試料	回収率 (真度) ± 併行精度 (RSD) (%)					
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
中腸腺	117.6 ± 5.8	81.1 ± 2.1	86.9 ± 2.4	84.2 ± 2.4	103.3 ± 6.1*	68.3 ± 4.8
むき身	106.9 ± 16.0	87.5 ± 2.0	72.0 ± 4.7	74.7 ± 6.4	87.2 ± 1.7	91.3 ± 5.9

※供試料に含まれていたため標準添加法により定量

表4 規制値超過検体および市販品における貝毒の定量

検体	OA群 (μg OA当量/g)		PTX群 (μg/g)			YTX (μg/g)
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
規制値超過検体 (中腸腺)	-	0.95	0.34	0.02	3.0	1.1
規制値超過検体 (むき身)	-	0.19	0.09	-	0.60	-
市販品 (H26年6月購入)	-	-	0.04	-	0.31	0.35
市販品 (H26年7月購入)	-	-	0.01	-	0.19	-

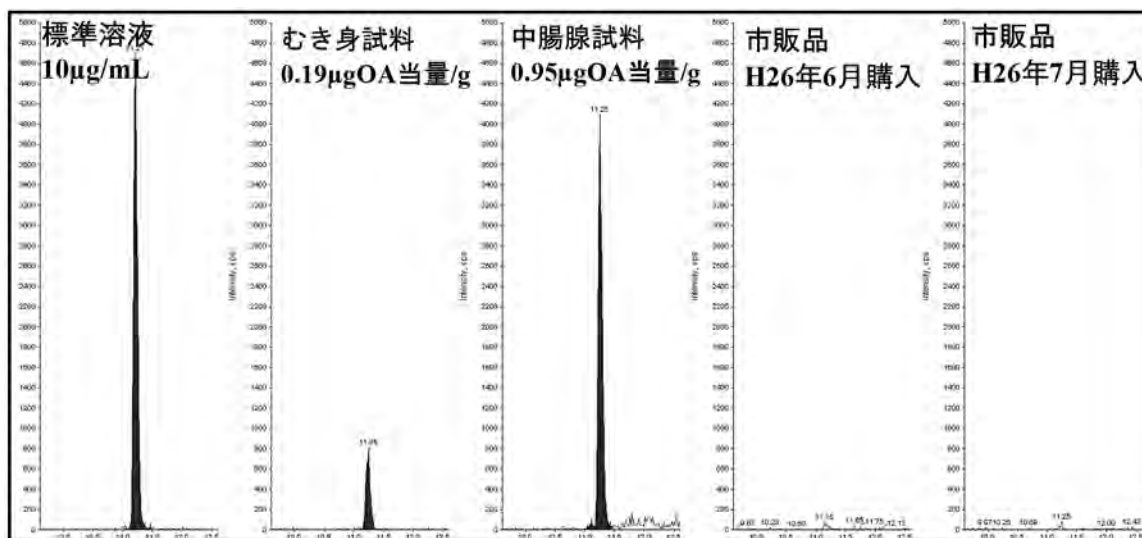


図3 下痢性貝毒DTX1のクロマトグラム

考 察

LC-MS/MSによる下痢性貝毒のOA群、脂溶性貝毒のPTX群及びYTXの同時分析法を検討した。試料調製法は90%メタノールで試料を抽出し蒸留水を同量加え、メタノール濃度50%以下に調整した抽出液について、PTX群はHLBカラムで精製、OA群及びYTXは抽出液をアルカリ加水分解した後、HLBカラムで精製する方法を構築した。

エステル体であるDTX3は二枚貝体内でOA、DTX1及びDTX2の代謝物として蓄積し、ヒトが摂取した場合、胃腸内で加水分解され、OA、DTX1等として下痢原性を発現する。今回、DTX3は夾雑物除去を目的に用いたHLBカラムに吸着し、他の貝毒成分との同時処理が困難であったことから80℃で40分間のアルカリ加水分解処理を行い、変換物をHLBカラムで精製する方法を採用した。

本試験法によるホタテ中腸腺及びむき身試料のOA及びDTX1の回収率は、絶対検量線法で81.1~117.6%、併行精度 (RSD) は2.0~16.0%で、PTX群及びYTXは回収率68.3~103.3%、RSD 1.7~6.4%であった。通知「下痢性貝毒 (オカダ酸群) の検査について」[8]では、OA群の試験法の妥当性確認の精度について、回収率 (真度) 70~120%、併行精度15%以下の目標値が示されている。今回、むき身試料のOAの併行精度が16.0%と目標値をわずかに超えたが、概ね満足できる結果が得られたことから、下痢性貝毒による食中毒事例などが発生した場合、迅速な検査対応が可能となり、本県の健康危機管理体制の強化を図ることができたものと考えられた。

本法を用いて、マウス試験法で規制値超過となった海域で採取したホタテ中腸腺及びむき身試料を分析し

た結果、規制値0.16 µgOA当量/gを超えるDTX1が検出された。マウス試験法における規制値0.05 MU/gと0.16 µgOA当量/gは、ほぼ同程度の毒力であることがわかっている。今回の分析結果より、マウス試験法で規制対象となった海域で同時期に採取されたホタテには規制値0.16 µgOA当量/gを超えるOA酸群が含まれており、マウス試験法のスクリーニング法としての有用性が確認できた。

本県海域では平成27年春にホヤにおいて下痢性貝毒の出荷規制措置が講じられている。今後、ホタテ以外の水産物を対象とした試験法としての妥当性評価を行い、検査体制の整備を図っていくことが必要と考えられる。

今回、市販品について同じ産地で購入時期が異なるホタテを調査したところ、OA群はいずれからも検出されなかったが、脂溶性貝毒のPTX1、PTX6と1検体からYTXが検出された。各成分の含有量は異なっていたことから脂溶性貝毒成分の組成比が時期によって変動することが確認できた。このことは神ら [4]の報告と一致していた。

通知法 [8] では、脂溶性貝毒のPTX群及びYTX群は下痢原性を持たないため下痢性貝毒としての規制対象から除外されたが、Viscianoら [12] は、YTXのヒトへの毒性は明らかではないが、YTXをマウスに腹腔内投与した場合、致死毒性があることを報告している。今後、脂溶性貝毒の下痢原性以外の毒性が明らかとなった場合、各成分を定量し評価する必要が生じる可能性が考えられる。その場合、本法を用いて県内主要海域における下痢性貝毒及び脂溶性貝毒の地域性、季節性の情報を把握することにより将来的なリスク管理が可能になると考えられる。

また、通知「対EU輸出水産食品の取扱いについて」[7]にあるように、貝可食部をEUに輸出する場合、OA群、PTX群及びYTX群等の定量分析が必要となることから、本県において二枚貝の対EU輸出が検討された場合、貝毒組成を同時に把握できる本法の活用が期待される。

貝毒の毒性は、その成分ごとに異なり、その組成比は季節、海域や二枚貝の種類によって異なることから、下痢性及び脂溶性貝毒成分を同時に把握できる本法は有用と考えられた。

引用文献

- [1] 昭和56年5月19日付け環乳第37号「下痢性貝毒の検査について」
- [2] Toda M, Uneyama C, Toyofuku H, Morikawa K: Trends of food poisonings caused by natural toxins in Japan,1989-2011, J. Food Hyg.Soc. Japan, 53, 105-120 (2012)
- [3] 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品部会資料「下痢性貝毒の検査法と国内外の基準値」(平成25年8月2日開催)
- [4] 神毅統, 三津谷正, 鈴木敏之: 陸奥湾における新たな下痢性貝毒モニタリング手法の開発(第1報), 青森県環境保健センター研究報告, 15, 8-11 (2004)
- [5] Hashimoto S, Suzuki T, Shiota Y et al: Lipophilic toxin profiles associated with diarrhetic shellfish poisoning in Scallops, *Patinopecten yessoensis*, collected in Hokkaido and comparison of the quantitative results between LC/MS and mouse bioassay, J. Food Hyg. Soc. Japan, 47, 33-40 (2006)
- [6] Hashimoto S, Nishimura K, Takahashi K, Itabashi Y: Evaluation of the possibility that free fatty acids cause false-positive result in diarrhetic shellfish poisoning, J. Food Hyg. Soc. Japan, 52, 194-198 (2011)
- [7] 平成21年6月4日付け食安発第0603001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「対EU輸出水産食品の取扱いについて」(最終改正平成28年6月30日)
- [8] 平成27年3月6日付け食安基発0306号第3号厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長「下痢性貝毒(オカダ酸群)の検査について」
- [9] Suzuki T, Yasumoto T: Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of the diarrhetic shellfish-poisoning toxins okadaic acid, dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-6 in bivalves, J. Chromatogr. A., 874,199-206(2000)
- [10] Suzuki T, Quilliam MA: LC-MS/MS analysis of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, okadaic acid and dinophysistoxin analogues, and other lipophilic toxins, Anal. Sci., 27, 571-584 (2011)
- [11] Yamaguchi M, Yamaguchi T, Kakimoto K et al: Validation study for analytical method of diarrhetic shellfish poisons in 9 kinds of shellfish, J. Food Hyg. Soc. Japan, 57, 19-22 (2016)
- [12] Visciano P, Schirone M, Tofalo R et al: Detection of yessotoxin by three different methods in *Mytilus galloprovincialis* of Adriatic Sea, Italy, J.Chemosphere, 90, 1077-1082 (2013)