

LC-MS/MS を用いたホタテガイとアカガイの麻痺性貝毒分析について

Analysis of paralytic shellfish toxins by LC-MS/MS in ark shell

新貝 達成 姉齒 健太郎 千葉 美子 近藤 光恵

Tatsunari SHINGAI, Kentaro ANEHA, Yoshiko CHIBA, Mitsue KONDO

麻痺性貝毒により毒化したホタテガイとアカガイを対象に、機器分析と MBA の毒力値の比較を行った。機器分析に供した試料と同一日、同一地点で採取された試料の MBA のモニタリング検査結果を参照した結果、2 法の毒力値は強い相関を示したが、「機器分析値 < MBA 値」の傾向が認められ、標準品未販売のため当所で測定できない毒成分の影響等が示唆された。個体差等の影響を排除するため、機器分析に供した試料と同一試料を MBA に供し、毒力値を比較した結果、2 法は非常に強い相関を示し、2 法の毒力値はほぼ一致した。また、アカガイについて、標準品未販売毒成分を含めた分析を依頼した結果、STX 等の含有が確認された。

キーワード：麻痺性貝毒；ホタテガイ；アカガイ；LC-MS/MS；MBA

Key words : paralytic shellfish toxins ; scallop ; ark shell ; LC-MS/MS ; MBA

1 はじめに

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish toxins : 以下、「PSTs」) とは、有毒プランクトン (*Alexandrium* 属) が産生する神経毒であり、二枚貝類は、これらのプランクトンを捕食することで毒化する。宮城県では、近年、毎年のように貝毒が発生しており、養殖業に甚大な被害を及ぼしている。

PSTs 分析の公定法であるマウス毒性試験法 (以下、「MBA」) は、マウスの管理が煩雑で緊急時の対応が困難なことに加え、毒成分の構成比などのデータは得られない。また、動物福祉の観点からも問題視され、機器分析法などの代替法の開発が進められている。

本研究は、LC-MS/MSを用いた分析法 (以下、「機器分析法」) を確立するため令和2年度から検討を行ってきた。令和2年度は、主に分析条件等を検討し、検討した条件で毒化したアカガイの試行的な分析を行った。令和3年度は、アカガイに加え、毒化したホタテガイも用いて、機器分析法とMBAの比較検討を行ったので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬等

ゴニオトキシン 1&4(GTX1,GTX4), ゴニオトキシン 2&3(GTX2,GTX3), ゴニオトキシン 5(GTX5), デカルバモイルゴニオトキシン 2&3(dcGTX2,dcGTX3), C トキシン 1&2(C1,C2)の各標準品はカナダ NRC 社製を用いた。その他の試薬類は既報¹⁾のものを用いた。

2.2 試料

試料の採取地点を図1に示す。ホタテガイは、宮城県北部海域の7地点 (A~G) で2021年4月~9月に、アカガイは、宮城県南部海域の3地点 (H~J) で2021年4月~6月に各々おおむね1週間ごとに採取されたものを用いた。ホタテガイは1検体当たり10枚程度、アカガイは1検体当たり8~20個体を使用した。

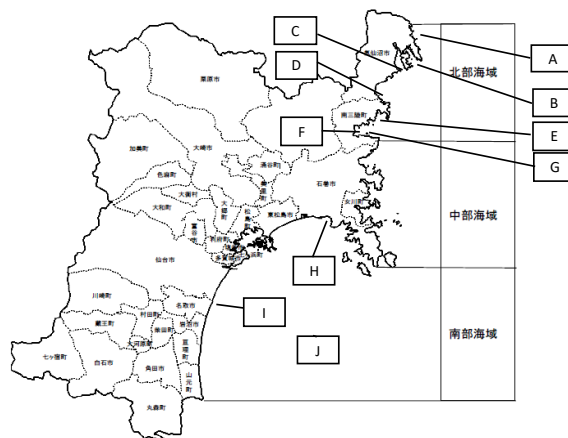


図1 試料の採取地点

2.3 装置と分析条件

装置、分析条件とMRM条件は既報¹⁾の条件とした。

2.4 試験液調製法

ホタテガイは中腸腺を、アカガイはむき身全体をホモジナイザーで均質化した。次に、MBAの公定法に準じて調製した抽出液を、沼野ら²⁾の方法に一部変更を加えた方法で精製し、試験液とした。試験液調製フローを図2に示す。

2.5 機器分析の毒力値と毒成分濃度

機器分析の毒力値は、大島³⁾が報告した比毒性を用いて次式により求めた。

$$\text{総毒力値 (MU/g)} = \sum [\text{各毒成分濃度 (検出量) nmol/g} \times \text{比毒性 MU/}\mu\text{mol}]$$

なお、ホタテガイについては、中腸腺1g相当の値に中腸腺/むき身の重量比を乗じ、むき身1g当たりの値に換算した。

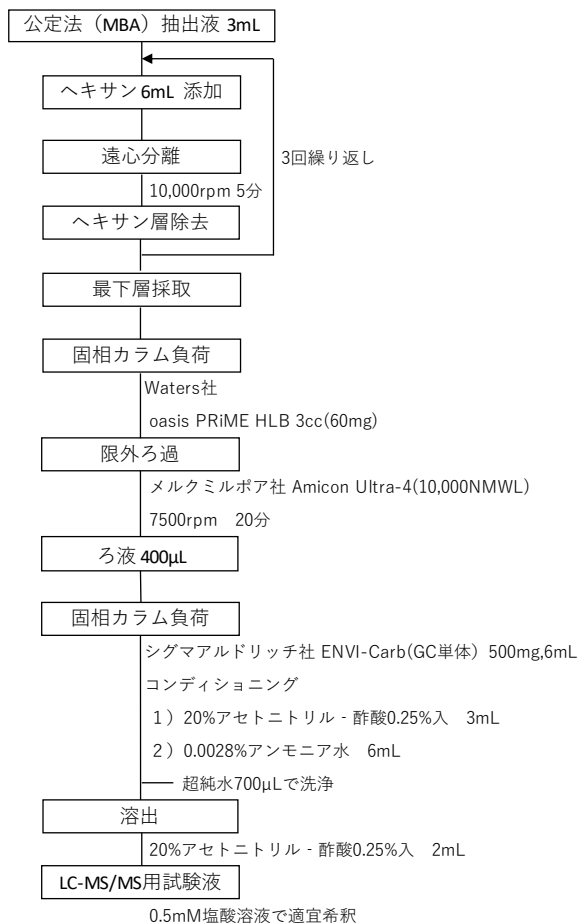


図2 試験液調製フロー

2.6 機器分析とMBAの毒力値の比較

2.6.1 機器分析とモニタリングMBAの毒力値の比較

機器分析に供した試料と同一日、同一地点で採取された試料の宮城県及び宮城県漁業協同組合が実施したMBAのモニタリング検査結果（以下、「モニタリングMBA」）を参照し、機器分析とMBAの比較を行った。

2.6.2 機器分析とMBA同一試料の毒力値の比較

機器分析とモニタリングMBAの比較では、試料の個体差や2法で抽出液を調製する試験所が異なることによる差が生じる可能性があるため、機器分析とMBAに全く同一の試料を用いて比較を行った。すなわち機器分析に供した抽出液の一部をMBA検査に供した。MBA検査は登録検査機関に委託した。試料は、ホタテガイ、アカガイ共に2021年4月～5月に採取した試料の一部を用いた。

2.7 標準品未販売毒成分を含めた分析

当所で測定した9毒成分のほか、標準品未販売のため当所で測定できない3毒成分、サキシトキシン（以下、「STX」）、ネオサキシトキシン（以下、「NEO」）及びデカルバモイルサキシトキシン（以下、「dcSTX」）を含めた計12毒成分の分析を（国研）水産研究・教育機構水産技術研究所（以下、「水産機構」）に依頼した。

試料は、アカガイを使用し、2021年4月～6月及び2020年6月～10月に採取された試料の一部を用いた。

抽出液の調製は当所で行い、それ以降の操作は水産機構が行った。

3 結果と考察

3.1 毒成分濃度と組成

ホタテガイの毒成分濃度の結果を図3に示す。採取地点によりピーク時期や毒成分の蓄積の程度が異なる傾向を示した。採取地点毎の最高値について、4月28日に地点B, Fで各々42nmol/g, 33nmol/g, 5月11日に地点A, C, Gで各々54nmol/g, 9.6nmol/g, 28nmol/g, 6月8日に地点Dで12nmol/gの最高値を示した。

アカガイの毒成分濃度の結果を図4に示す。4月6日に地点Hで最高値17nmol/gを示した。地点Iは、4月～6月期間においては1.5nmol/g前後で推移した。

ホタテガイの毒成分組成の結果を図5に示す。毒化のピーク時はいずれの地点もGTX1, GTX2の順に割合が高く、各々32～40%, 17～33%を占めた。減毒するに従いGTX1, GTX4の割合が減少し、GTX2の割合が増加した。9月に採取した試料はGTX2の割合が40～52%に達した。

アカガイの毒成分組成の結果を図6に示す。4月6日にGTX2, C1が各々約25%ずつを占め、その後減毒するに従い、GTX2の割合が若干増加し、GTX1の割合が若干減少したが、ホタテガイと比較すると顕著な変化は認められなかった。ホタテガイは6月以降に毒成分組成の大きな変化が起こっている。今回、アカガイの採取期間は4月～6月であり、毒成分組成の変換が進行する前であったことが考えられる。

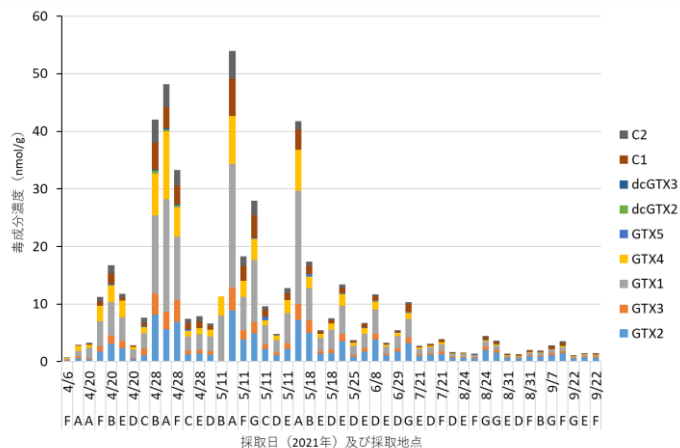


図3 ホタテガイの毒成分濃度

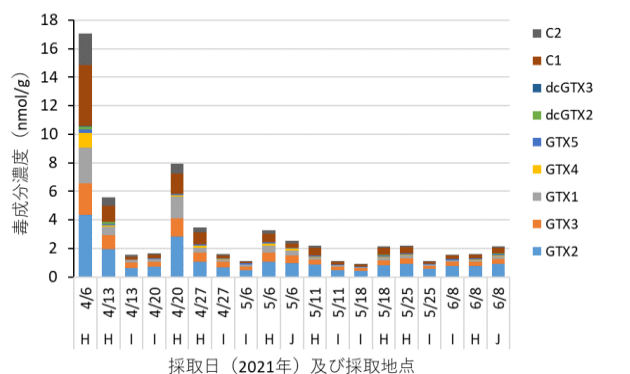


図4 アカガイの毒成分濃度

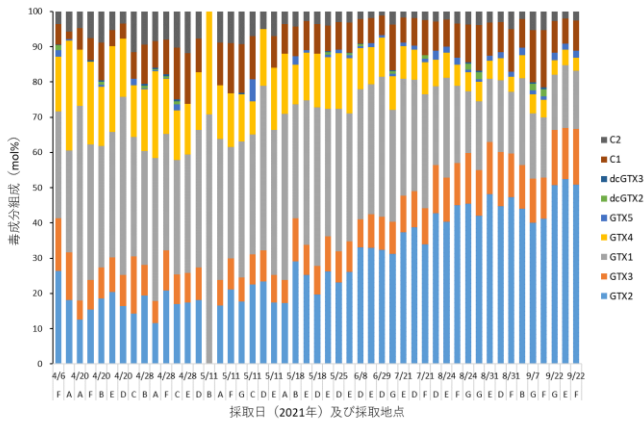


図5 ホタテガイの毒成分組成

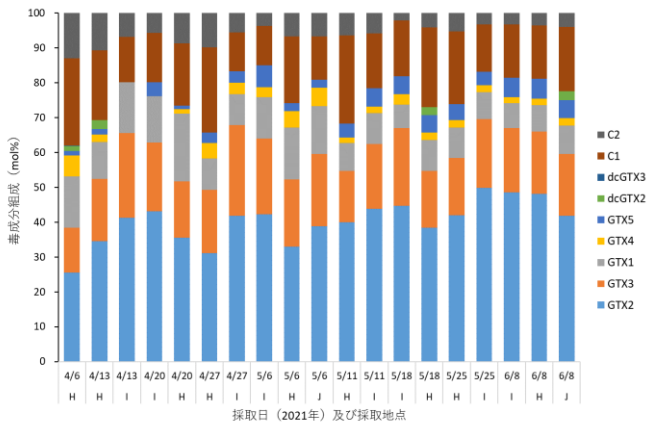


図6 アカガイの毒成分組成

3.2 機器分析とMBAの毒力値の比較

3.2.1 機器分析とモニタリングMBAの毒力値の比較

機器分析とモニタリングMBAの毒力値の比較結果を図7に示す。ホタテガイ、アカガイそれぞれ $r=0.925$, $r=0.945$ の相関性が認められた。2法による毒力値を比較すると、ホタテガイは49検体中46検体が、アカガイは19検体いずれも「機器分析値<MBA値」であり、標準品未販売毒成分の影響等が考えられた。

3.2.2 機器分析とMBA同一試料の毒力値の比較

機器分析とMBA同一試料の毒力値の比較結果を図8に示す。ホタテガイは $r=0.985$, アカガイは $r=0.998$ の相関性が認められた。2法による毒力値を比較すると、ホタテガイは5検体中4検体が「機器分析値<MBA値」であったが、2法の毒力値は近似し、アカガイは機器分析値とMBA値がほぼ一致した。

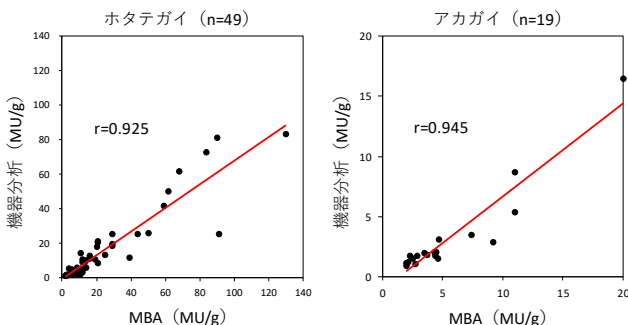


図7 機器分析とモニタリングMBAの毒力値の比較

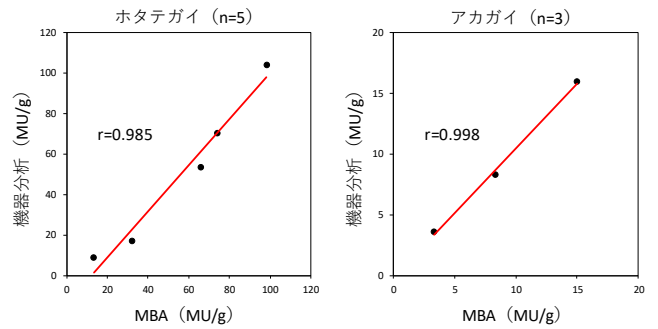


図8 機器分析とMBA同一試料の毒力値の比較

3.3 標準品未販売毒成分を含めた分析

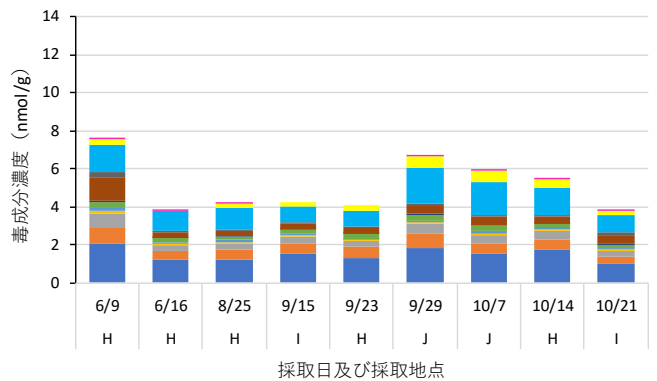
3.3.1 毒成分濃度と毒成分組成

アカガイの標準品未販売毒成分を含めた毒成分濃度の結果を図9に示す。全14検体中、STXは14検体、NEOは11検体、dcSTXは9検体で検出された。毒成分組成の結果を図10に示す。2020年の試料は、STXが19~29%の構成比を占めた。特に、9月29日、10月7日に採取された試料は、STXが最も高い構成比を占めた。2021年の試料は、STXが10~17%の構成比を占めた。

3.3.1 機器分析とモニタリングMBAの毒力値の比較

機器分析とモニタリングMBAの標準品未販売毒成分を含めた毒力値の比較結果を図11に示す。2020年は $r=0.521$, 2021年は $r=0.933$ の相関性が認められた。2020年は9検体中7検体が、2021年は5検体中4検体が「機器分析値>MBA値」であった。

2020年



2021年

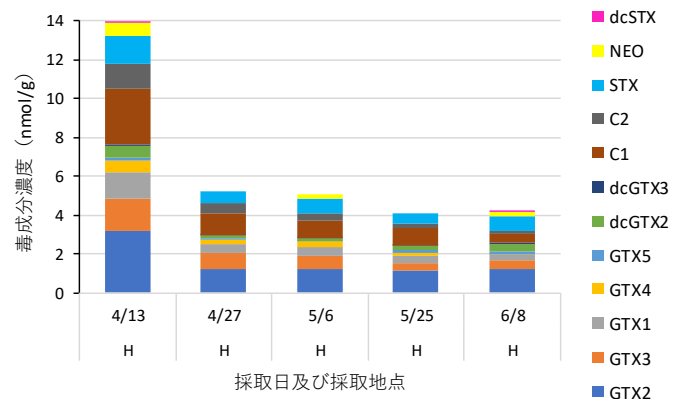


図9 アカガイの標準品未販売毒成分を含めた毒成分濃度

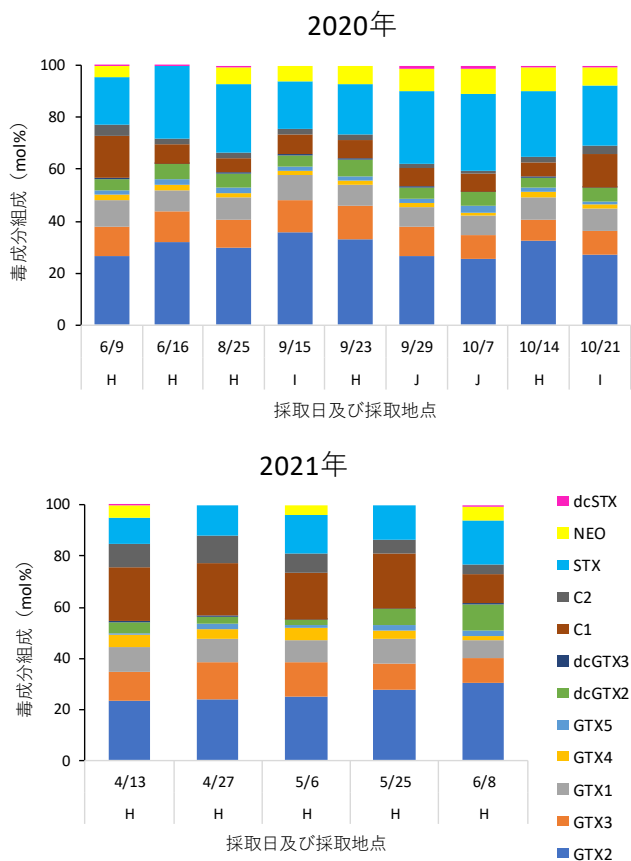


図 10 アカガイの標準品未販売毒成分を含めた毒成分組成

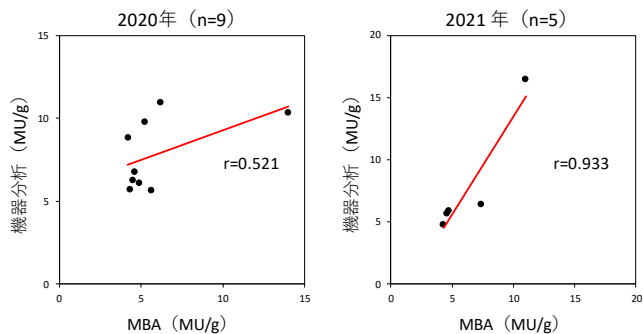


図 11 機器分析とモニタリング MBA の標準品未販売毒成分を含めた毒力値の比較

4 まとめ

機器分析と MBA 同一試料の比較では、サンプル数は少ないものの、非常に強い相関が認められた。また、機器分析と MBA の毒力値は近似し、機器分析の有効性が示された。

今後、当該方法でデータ数を蓄積し、機器分析法の確立を目指す。

5 謝辞

本研究を行うに当たり、試料の提供に御協力いただきました宮城県漁業協同組合及び日本食品検査仙台検査所の御担当者様には、この場を借りて御礼申し上げます。また、標準品未販売毒成分を含めた分析をしていただきました水産研究・教育機構水産技術研究所の渡邊龍一博士に深く感謝の意を表します。

6 参考文献

- 1) 新貝達成ら, 宮城県保健環境センター年報第 39 号, 2021,43.
- 2) Numano, S.*et al.*, *Mar.Drugs*, 2019, 17, 653.
- 3) Oshima, Y, *JAOAC Int*, 1995, 78, 528.