

表5 固相抽出によるPSPの回収率 (CE処理)

SPEカラム	回収率 (%)				
	非吸着画分	水洗画分	溶出画分1	溶出画分2	溶出画分3
GL-Pak CARBOGRAPH	MBA	-	47	-	-
	HPLC分析	-	32	-	-
Envi Carb	MBA	-	-	-	-
	HPLC分析	-	-	-	-
HyperSep Hypercarb	MBA	-	124	-	-
	HPLC分析	-	100	-	-
GL-Pak 活性炭Jr	MBA	56	-	-	-
	HPLC分析	73	-	-	-
SEPPAK Ac2	MBA	35	-	-	-
	HPLC分析	38	-	-	-
GL GCP	MBA	29	35	-	-
	HPLC分析	10	6	-	-
WAKO AC	MBA	-	-	-	-
	HPLC分析	-	-	-	-

表6 固相抽出によるPSPの回収率 (FD処理)

SPEカラム	回収率 (%)					
	非吸着画分	水洗画分	溶出画分1	溶出画分2	溶出画分3	
GL-Pak	MBA	—	8	66	—	—
CARBOGRAPH	HPLC分析	—	69	112	—	—
Envi Carb	MBA	—	9	67	4	—
	HPLC分析	—	12	206	7	—
HyperSep Hypercarb	MBA	—	—	71	—	—
	HPLC分析	—	—	141	—	—
GL-Pak 活性炭Jr	MBA	45	—	6	—	—
	HPLC分析	164	—	4	—	—
SEPPAK Ac2	MBA	25	7	13	—	—
	HPLC分析	83	8	5	—	—
GL GCP	MBA	51	36	—	—	—
	HPLC分析	56	22	—	—	—
WAKO AC	MBA	—	—	15	46	17
	HPLC分析	—	—	13	19	9

研究成果の刊行に関する一覧表

Beppu, R., Nojima, K., Tsuruda, S., Gomez-Delan, G., Barte-Quilantang, M., Taniyama, S., Sagara, T., Nishio, S., Takayama, H., Miyazawa, K., Asakawa, M.: Occurrence of PSP-producing dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* in Bingo-Nada, the central coastal water of the Seto Inland Sea, Hiroshima Prefecture, Japan. *Marine Pollution Bulletin*, 2008; 56(4): 758-763.

相良剛史, 谷山茂人, 江戸 梢, 橋本多美子, 西堀尚良, 浅川 学, 西尾幸郎. 西表島産イワスナギンチャク *Palythoa tuberculosa* の毒性について. 四国大学紀要, 2008, 26(B), 9-12.

相良剛史. 中毒発生海域より分離した *Ostreopsis* sp. のパルトキシン様物質産生能. 日水誌 2008; 74 (5), 913-914.

谷山茂人, 諫見悠太, 松本拓也, 長島裕二, 高谷智裕, 荒川 修: 腐肉食性巻貝キンシバイ *Nassarius (Alectrion) glans* に認められたフグ毒の毒性と毒成分. 食衛誌 50, 22-28 (2009).

K. Ikeda, Y. Murakami, Y. Emoto, L. Ngy, S. Taniyama, M. Yagi, T. Takatani, O. Arakawa: Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to non-toxic cultured specimens of the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Toxicon* 53, 99-103 (2009).

L. Ngy, S. Taniyama, K. Shibano, C. F. Yu, T. Takatani, O. Arakawa: Distribution of tetrodotoxin in pufferfish collected from coastal waters of Sihanouk Ville, Cambodia. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 49, 361-365 (2008).



Occurrence of PSP-producing dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* in Bingo-Nada, the central coastal water of the Seto Inland Sea, Hiroshima Prefecture, Japan

Rieko Beppu^a, Kanako Nojima^b, Shintaro Tsuruda^a, Gloria Gomez-Delan^c,
Mercy Barte-Quilantang^d, Shigeto Taniyama^a, Takefumi Sagara^e, Sachio Nishio^e,
Haruyoshi Takayama^f, Keisuke Miyazawa^a, Manabu Asakawa^{a,*}

^a Department of Bioresource Science and Technology, Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, 1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528, Japan

^b Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, 1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528, Japan

^c College of Fisheries Technology, Cebu State College of Science and Technology, Carmen, Cebu, Philippines

^d College of Fisheries and Ocean Sciences, University of the Philippines, Visayas, Iloilo 5023, Philippines

^e Shikoku University Junior College, Furukawa, Ojin-cho, Tokushima 771-1192, Japan

^f Hiroshima Prefectural Fisheries and Marine Technology Center, Ondo, Kure, Hiroshima 737-1207, Japan

Abstract

During surveillance of the distribution of the paralytic shellfish poison (PSP)-producing dinoflagellate in 2003, 2004 and 2005 along the coastlines of the Seto Inland Sea, Hiroshima Prefecture, Japan, some species of toxic phytoplankton were isolated from the eastern coasts, Bingo-Nada, the central regions of the Seto Inland Sea. It was rather unexpectedly revealed from the basis of the morphological characteristics that they were unambiguously identified as *Alexandrium tamiyavanichii* and *Alexandrium catenella*. Two strains (ATY041106, ATY051018) of *A. tamiyavanichii* showed a specific toxicity of 38.7×10^{-6} and 111.5×10^{-6} MU/cell, respectively. These values seemed to be several times or much higher than that of *A. catenella* (AC030816, AC040614), having a specific toxicity of 4.5×10^{-6} and 4.1×10^{-6} MU/cell, respectively, isolated in the same area. From the results of HPLC-furorometric analysis, it revealed that the toxins in ATY041106 exist almost exclusively as β -epimers (C2, GTX3, GTX4), which accounted for 72.7 mol%. The toxin profiles of this strain are featured by the presence of a large amount of GTX3 (59.1 mol%) and a small amount (20.6%) of C1 and 2 in comparison with the PSP compositions of *A. tamarense*, which is isolated as the main responsible species in Hiroshima Bay, a western part of coastal sea in Hiroshima Prefecture. On the other hand, it revealed that the toxin profiles of two strains (AC030816, AC040614) of *A. catenella* exist almost exclusively as β -epimers (C2, GTX3, GTX4), which accounted for 81.8 and 56.5 mol%, as the same manner. The toxin profiles of these two strains are featured by the presence of a large amount of C2 (80.5 and 46.3 mol%) in comparison with the PSP compositions of *A. tamiyavanichii*.

To our knowledge, this is the first record to show the distribution and harmful influence of *A. tamiyavanichii* and *A. catenella* in Bingo-Nada in Hiroshima Prefecture. Though contamination of bivalves with these PSP-producing planktons in this area has not occurred yet so far, attention should be paid to this species as well as the other causative dinoflagellate from the stand point of public health and food hygiene.

© 2008 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Paralytic shellfish poison; Dinoflagellate; *Alexandrium tamiyavanichii*; *Alexandrium catenella*; *Alexandrium tamarense*; Gonyautoxin; Hiroshima prefecture

1. Introduction

The occurrence of harmful algal blooms (HABs) reportedly has been spreading on a global scale in recent years.

* Corresponding author. Tel./fax: +81 82 424 7930.
E-mail address: asakawa@hiroshima-u.ac.jp (M. Asakawa).

Especially, dinoflagellates species from the genus *Alexandrium* such as *A. tamarense* and *A. catenella* have been known well known as producers for the potent neurotoxins of paralytic shellfish poison (PSP), which is one of the notorious marine toxins known (Hashimoto and Noguchi, 1989). This toxin produced can accumulate in filter-feeding shellfish that feed on the dinoflagellates, resulting in illness to humans at higher trophic levels in the food chain, mainly along with paralysis in parts of the body, followed by death in severe cases. When infestation of bivalves with PSP toxins occurred, secondary intoxication of edible gastropod such as *Rapana venosa* inhabiting there through the food web is also pointed out as an important problem from the view of food hygiene and public health as well as fishery (Ito et al., 2004). Hence, marine pollution due to PSP-producing dinoflagellate and subsequent contamination of shellfish with PSP may cause serious economic losses in the shellfish culture and its related industries, negatively impacting a public health in many coastal countries throughout the world.

Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture is one of the largest oyster culture areas in Japan. Many oyster culture rafts produce 50–70% of the total amount oysters consumed in the country. The first infestation of shellfish with PSP was reported in 1992 (Asakawa et al., 1993). Since this episode, subsequent monitoring for toxins contained in commercial shellfish by mouse bioassay showed that short-necked clams, mussels and oysters were contaminated with PSP with appearance of *A. tamarense* in Kure Bay, which is a part of Hiroshima Bay, almost every year (Asakawa et al., 1995, 2005).

In Hiroshima Bay, the main dominant species responsible for PSP is *A. tamarense*, which is one of the most harmful taxa. However, in a global scale, species belonging to other genera, such as *Gymnodinium catenatum* (Oshima et al., 1987; Ikeda et al., 1989; Takatani et al., 1998a,b) and *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (Harada et al., 1982) have also been found to be responsible for shellfish toxicity, indicating that contaminated sea is spreading along with the increase of the number of the causative species. For these reasons, a strict and constant monitoring focused on understanding the distribution of these toxic dinoflagellates along the coastlines not only in Japan but also in many other countries in the world will be needed more often from now on.

These situations prompted us to undertake the present study, which is an extension of previous studies in which the authors participated, to focus on the distribution and spread of toxic dinoflagellate in the coastal water of Hiroshima Prefecture and to assess potential health risks to human shellfish consumers with marine pollution due to toxic dinoflagellate. In this paper, we report for the first time the detection of *A. tamariyavanichii* in Uchiura Bay, which is located in the east coastal sea of Hiroshima Prefecture, Bingo-Nada, the central coastal water of the Seto Inland Sea, and report that this species is the dinoflagellate paid attention to in connection to toxification of bivalves in Hiroshima Prefecture.

2. Materials and methods

2.1. Dinoflagellate and shellfishes

Fig. 1 shows Uchiura Bay which belong to Bingo-Nada, central region of the Seto Inland Sea, in the eastern coasts in Hiroshima Prefecture and Kure Bay, a part of the Hiroshima Bay, in the western coasts. The Seto Inland Sea has many islands and narrow waterways, and divided into several basins called "Nada". Seawater samples were collected from 0 m depth in spring, summer and fall from 2003 to 2005, simultaneously with the trial to isolate the toxic dinoflagellate. The 20 µm mesh-screen net hauling seawater was concentrated properly. Each vegetative cell in the net hauling samples was isolated by capillary pipet method. Total six clonal cultures of dinoflagellate were established and used for their toxicities and/or toxin analysis. These six strains were mass-cultured using 3 L Fernbach flasks. Cells were harvested at late-exponential phase. The culture method, toxicity assays and toxin composition analysis of these strains were almost the same as reported previously (Asakawa et al., 1995). On the other hand, specimens of bivalves such as oysters *Crassostrea gigas* and mussels *Mytilus edulis* adherent to the rocks and short-necked clams *Tapes japonica* in the mud were collected simultaneously from the same area. These live specimens were transported to our laboratory in ice, and shucked. Some of them were immediately assayed for toxicity as described below.

2.2. Assay of toxicity

In the assay for toxicity of the dinoflagellates, cells were suspended in 0.1 mol/L acetic acid and ultrasonicated for 10 min. The lysate was centrifuged at 2000g for 20 min and the supernatant was obtained. A series of test solution was prepared by dilution with a small amount of distilled water and assayed for PSP toxicity by an official Japanese method (Kawabata, 1978). The PSP toxicity of the shellfish samples was measured by the same method, using 0.1 N hydrochloric acid as the extraction solvent. The activity was expressed in mouse units (MU), in which 1.0 MU is defined as the dose of toxin required to kill a 20 g ddY strain male mouse in 15 min after i.p. injection.

2.3. Purification of toxins from dinoflagellate

The acetic acid extract of cultured cells was concentrated and loaded on to a Sep-Pak Plus C18 Environmental Cartridge (Waters). The unbound portion was collected and concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was dissolved in a small volume of water and injected into the HPLC-fluorometric system (Asakawa et al., 1993, 1995). The content of each toxin was estimated by comparing the peak area of each toxin with that of each toxin standard and calculated as mol%. The reference standards of PSP used in this study were prepared from the digestive glands of PSP-infested scallops *Patinopecten yessoensis* in Ofunato

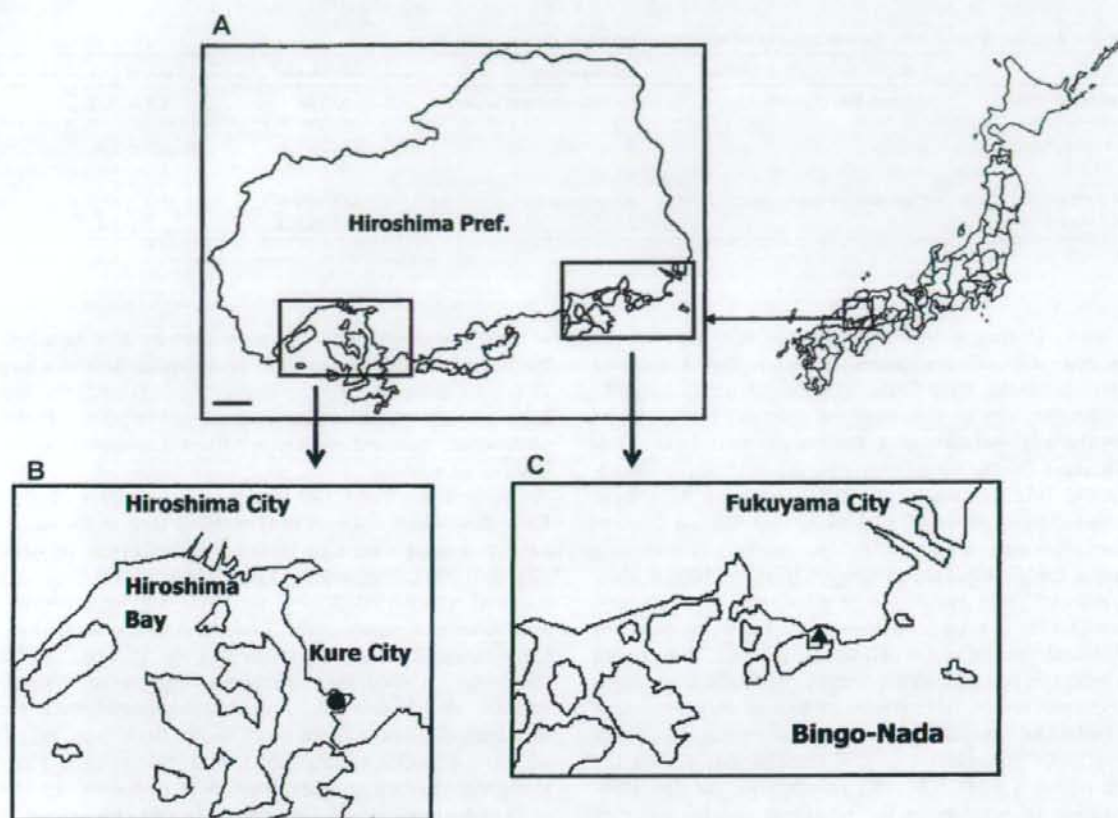


Fig. 1. Map showing sampling stations along with coast lines of Hiroshima Prefecture. (A) Hiroshima Prefecture, scale bar (—) means 10 km. (B) Western coastal sea; Kure Bay (●). (C) Eastern coastal sea; Uchiura Bay (▲).

Bay, Iwate Prefecture (Noguchi et al., 1981) and from a xanthid crab *Zosimus aeneus* from Kabira in Ishigaki Island, Okinawa Prefecture (Daigo et al., 1985). Due to the lack of standard toxins, the contents of N-sulfo carbamoyl derivatives of C1 (PX1 or epi-GTX8), C2 (PX2 or GTX8), C3 (PX3), C4 (PX4), GTX5 (B1) and GTX6 (B2) were estimated by comparing chromatograms before and after acid hydrolysis, assuming corresponding carbamate toxins of GTX2, GTX3, GTX1, GTX4, STX and neoSTX. Acid treatment was performed with 0.1 N hydrochloric acid for 15 min in boiling water. The HPLC results were expressed in relative amount of each toxin on molar basis (mol%).

3. Results and discussion

As Table 1 shows, six strains of the toxic dinoflagellate were isolated from the coastal water of the Seto Inland Sea in Hiroshima Prefecture. At first, four strains isolated from Uchiura Bay, which belong to the eastern part of coastal waters in Hiroshima Prefecture, Bingo-Nada, central region of the Seto Inland Sea, in 16 November

2004, 18 October 2005, 16 August 2003 and 14 June 2004, designated ATY041106, ATY051018, AC030816, and AC040614, were rather unexpectedly were identified as *A. tamiyavanichii* (formerly called *A. cohrticula*) and *A. catenella*. Seawater temperature at 0 m depth in Uchiura Bay, when the sea water sample was collected, was 20.0, 23.0, 26.0 and 19.0 °C, respectively. As for natural population densities of *A. tamiyavanichii* in 16 November 2004 and 18 October 2005, both were 40 cells/L, respectively.

The extracts of all strains isolated in the present study killed mice with typical symptoms associated with PSP toxins. Specific toxicities of these strains are summarized in Table 1. The specific toxicities of two *A. tamiyavanichii* strains were different from each other (ATY041106, 38.7×10^{-6} MU/cell; ATY051018, 111.5×10^{-6} MU/cell). These toxicity scores seemed to be several times or much higher than that of two *A. catenella* strains (AC030816, 4.5×10^{-6} MU/cell; AC040614, 4.1×10^{-6} MU/cell), isolated in the same area. However, paralytic toxicity from the bivalves such as mussels, clams and oysters in this and adjacent area was not detected by mouse bioassay at all. These phenomena were observed in the Gulf of

Table 1
Toxic dinoflagellate isolated from the coastal water of Hiroshima Prefecture, Japan

Date/year	Isolation locale ^a (0 m depth)	Dinoflagellate	Strain no.	Toxicity ($\times 10^{-6}$ MU/cell)
November 16/2004	Uchiura Bay (Eastern coast)	<i>Alexandrium tamiyavanichii</i>	ATY041106	38.7 \pm 10.9
October 18/2005			ATY051018	111.5
August 16/2003		<i>A. catenella</i>	AC030816	4.5 \pm 2.8
June 14/2004			AC040614	4.1 \pm 1.1
April 20/2004	Kure Bay (Western coast)	<i>A. tamarensis</i>	AT040420	33.0 \pm 12.5
April 13/2005			AT050413	3.7 \pm 1.4

^a Refer to Fig. 1.

Thailand. During monitoring *Alexandrium* spp. in the Gulf, four *Alexandrium* species, *A. fraterculus*, *A. leei* and *A. tamiyavanichii*, were found to occur, though no significant shellfish toxicity was observed (Fukuyo et al., 1989).

By the way, isolation of *A. tamiyavanichii* from the Gulf of Thailand during a monitoring survey of toxic dinoflagellates and confirmation of its PSP production by culture experiments was reported, suggesting that this is a tropical species (Kodama et al., 1988). This species was originally found in the phytoplankton samples from the Bay of Mexico (Balech, 1967). Judging from all of these facts, *A. tamiyavanichii* has been considered to be a tropical or subtropical species so far. However, in 1988, this species was found in phytoplankton samples collected from Japanese coastal water, Aburatsubo in Sagami Bay, Japan, in November and its PSP production was confirmed (Ogata et al., 1990). Specific toxicity of these strains was in the range of 0.8–1.0 MU/10⁴ cells. In addition, the first PSP-infestation of bivalves in the southeast coastal water of the Seto Inland Sea, Harima-Nada, Kagawa Prefecture, in early December 1999 and the isolation of *A. tamiyavanichii* with the specific toxicity as 7200 cells/MU, whose score is equivalent to 138.9 $\times 10^{-6}$ MU/cell, from the Straits of Naruto was reported (Hashimoto et al., 2002; Yoshimatsu et al., 2001). This toxicity score is almost the same as that of the strain ATY051018 isolated in the present study. The Seto Inland Sea is surrounded by three major islands (Honshu, Shikoku and Kyushu) of Japan and is connected to the open ocean by only a few narrow straits such as Kitan, Naruto, Hoyo and Kanmon Straits. Though PSP compositions of this strain were not examined, its specific toxicity indicates the possibility of identity of our strain with the strain isolated from the Straits of Naruto. From a series of these studies including our present study, this species also seemed to be distributed in not only tropical or subtropical but also temperate water. In this connection, prior to this episode, PSP-infestation of green mussel *Perna viridis* due to the same species of dinoflagellate was confirmed in Okinawa Prefecture in early summer, 1996 (Kojima et al., 2001).

Not only detection of PSP-producing phytoplankton *A. tamiyavanichii* in Bingo-Nada, the eastern part of coastal sea in Hiroshima Prefecture but also toxification of the bivalves in this area has not been reported so far. From the present results, there is a possibility of the contamination

of bivalves during late fall to winter in this area with blooms of *A. tamiyavanichii* in near future. This is a huge threat to massive oyster culture area, Hiroshima Bay, belong to the western coastal waters of Hiroshima Prefecture, where cultured oysters are harvested mainly during late fall to winter.

On the other hand, two strains isolated at 0 m depth in Kure Bay, which is a part of Hiroshima Bay, in the eastern part of coastal waters in Hiroshima Prefecture, in April, 2004 and 2005, designated ATK040420 (33.0 $\times 10^{-6}$ MU/cell) and ATK050413 (3.7 $\times 10^{-6}$ MU/cell) were identified as *A. tamarensis*, respectively (Table 1). At this time, seawater temperature at 0 m depth in Kure Bay was 15.7 and 12.0 °C, respectively. Cells density of this dinoflagellate on that time was 4.0 and 0.6 cells/mL. Specific toxicities of these two *A. tamarensis* strains were much lower than those of two *A. tamiyavanichii* strains isolated in the present study, along with the data on other strains of *A. tamarensis* reported so far (Asakawa et al., 1995, 2005). In this connection, *A. tamiyavanichii* and *A. catenella* were not observed in this bay. In this area, *A. tamarensis* has been mainly responsible for PSP (Asakawa et al., 1995, 2005) since 1992.

Table 2 shows the PSP profiles of cultured cells of toxic dinoflagellate isolated in the coastal waters of the Seto Inland Sea in Hiroshima Prefecture. In *A. tamiyavanichii*, the amounts of C1 and 2 were only 20.6%. On the contrary, more than 70% of toxins were composed of C1 and 2 in *A. tamarensis* and *A. catenella* regardless of the place of their collection. This may be the reason why specific toxicity of *A. tamiyavanichii* is higher than that of *A. tamarensis* and *A. catenella*. The PSP composition of *A. tamiyavanichii* strain isolated in Harima-Nada, Kagawa Prefecture, in early December 1999 mentioned above show similar tendency. The total amounts of C1 and 2 were only 2.0% (Hashimoto et al., 2002).

The relative abundance of β -epimers of 11-hydroxysulfate toxins (C2, GTX3, GTX4) always exceeded those of α -epimers (C1, GTX2, GTX1). In many *Alexandrium* species, this phenomenon has been observed in common (Hall et al., 1990; Oshima et al., 1990; Asakawa et al., 1995, 2005). As for *A. tamiyavanichii* (ATY041106), the PSP toxins exist almost exclusively as β -epimers (C2, GTX3, GTX4), which accounted for 72.7 mol%. The toxin profiles of this strain are featured by the presence of a large amount of GTX3 (59.1 mol%) in comparison with the PSP compositions of

Table 2
Toxin compositions of PSP-producing dinoflagellates isolated from the coastal water of Hiroshima Prefecture, Japan

Area	Uchiura Bay ^a		Kure Bay ^a		
	<i>Alexandrium tamiyavanichii</i>	<i>A. catenella</i>	<i>A. tamarense</i>		
Dinoflagellate					
PSP Components	ATY041106	AC030816	AC040614	AT040420	AT050413
C1	8.1	16.2	32.6	21.8	4.0
C2	12.5	80.5	46.3	61.2	88.6
GTX1	9.3	0.8	1.3	5.5	0.6
GTX2	9.9	1.0	9.2	5.1	0.5
GTX3	59.1	Trace	0.6	2.3	3
GTX4	1.1	1.3	9.6	1.5	0.2
neoSTX	0	0.2	0.4	2.6	3.1

All results are shown in mol%. Trace: less than 0.1%.

^a Refer to Fig. 1.

A. catenella and *A. tamarense*. In addition, it revealed that the toxin profiles of two *A. catenella* strains (AC030816, AC040614) exist almost exclusively as β -epimers (C2, GTX3, GTX4), which accounted for 81.8 and 56.6 mol%, as the same manner. The toxin profiles of these strains are featured by the presence of a large amount of C2 (80.5, 46.3 mol%) in comparison with the PSP compositions of *A. tamiyavanichii*.

Until the 1980s, in Japanese coastal waters, contamination of bivalves with PSP by toxic dinoflagellates had been restricted to some areas such as the Hokkaido and Tohoku regions. But since the 1990s, toxic dinoflagellates have bloomed at new areas in western and eastern Japan. In Hiroshima Bay, PSP outbreaks have occurred almost every year (Asakawa et al., 1993, 2005). The causative organisms of PSP in Japan are mostly *A. tamarense*, *A. catenella* and *G. catenatum* as shown in many reports on the occurrence of these dinoflagellates. (Asakawa et al., 2005; Fukuyo, 1985; Noguchi et al., 1990; Takatani et al., 1998a,b). As for *A. tamiyavanichii*, there was no report on the occurrence of toxic dinoflagellate in eastern coastal waters of the Seto Inland Sea, Hiroshima Prefecture. In early December 1999, a bloom due to *A. tamiyavanichii*, which has not been reported so far as causative plankton for PSP infestation of bivalves, occurred around the southeast coast of the Seto Inland Sea in Kagawa Prefecture, resulting in PSP toxication of mussels *Mytilus edulis* and ark shell *Anadara broughtonii* (Hashimoto et al., 2002). These data including our results shows that it is also distributed in temperate waters. In addition to this, the present paper is the first record of harmful influence of *A. tamiyavanichii* in Hiroshima Prefecture. The present study adds *A. tamiyavanichii* to the list of possible causative organisms of PSP in Hiroshima Prefecture. Actually, in Hiroshima Bay, the western part of coastal water, this species has not been detected until now.

Bivalves are suddenly infested with PSP, causing a serious damage to fisheries and related industries. In late autumn of 1988, the scallop *P. yessoensis* was suddenly and unexpectedly infested with PSP in Funaka Bay, Hokkaido, where is one of the representative scallop culture areas in Japan, causing a serious damage to fisheries and its

related industries. The responsible dinoflagellate was identified as *A. catenella*, whose lethal potency was estimated to be 2.5×10^4 cells/MU. Scallops became toxic with the highest toxicity score exceeding 400 MU/g digestive gland. Before 1988, scallops have extensively been infested with *A. tamarense* in late spring to early summer in almost every year, but never in autumn or winter. So is the case with Hiroshima Bay. In this connection, from the results of feeding the cultured *A. tamiyavanichii* cells to green mussel to examine toxin accumulation, this dinoflagellate is harmful enough to make bivalves inedible in a short time, when they are exposed to the bloom (Wisessang et al., 1991). Judging from the history of other areas where PSP toxication or blooms of toxic dinoflagellate has occurred, these episodes tend to occur repeatedly every year. Therefore, attention should be paid to this species as well as the other causative dinoflagellates throughout the coastlines in Hiroshima Prefecture. It would allow farmers to harvest seafood products before they can become contaminated with dinoflagellate toxins, relocate aquaculture stocks to non-affected areas, and to adjust marketing strategies.

Finally, it is very important to monitor *A. tamiyavanichii* strictly in addition to *A. tamarense* and *A. catenella*, especially in fall to early winter, because a large number of culture oysters are harvested in Hiroshima Bay.

References

- Asakawa, M., Miyazawa, K., Noguchi, T., 1993. Studies on paralytic shellfish poison (PSP) toxication of bivalves in association with appearance of *Alexandrium tamarense*, in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture. J. Food Hrg. Soc. Jpn. 34, 50–54.
- Asakawa, M., Miyazawa, K., Takayama, H., Noguchi, T., 1995. Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* as the source of paralytic shellfish poison (PSP) contained in bivalves from Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. Toxicon 33, 691–697.
- Asakawa, M., Takayama, H., Beppu, R., Miyazawa, M., 2005. Occurrence of paralytic shellfish poison (PSP)-producing Dinoflagellates *Alexandrium tamarense* in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan, during 1993–2004 and its PSP profiles. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 46, 246–250.
- Balech, E., 1967. Dinoflagellate nuevos o interesantes del Golfo de Mexico. Revist. Mus. Argent. Cienc. Nat. Ber. Riv. Hidrobiol. 2, 77–129.

- Daigo, K., Uzu, A., Arakawa, O., Noguchi, T., Seto, H., Hashimoto, K., 1985. Isolation and some properties of neosaxitoxin from a xanthid crab *Zosimus aeneus*. *Nippon Suis. Gakk.* 51, 309–313.
- Fukuyo, Y., 1985. Morphology of *Protogonyaulax tamarensis* (Lebour) Taylor and *Protogonyaulax catenella* (Whedon and Kofoid) Taylor from Japanese coastal waters. *Bull. Mar. Sci.* 37, 529–537.
- Fukuyo, Y., Yoshida, K., Ogata, T., Ishimaru, T., Kodama, M., Pholpunthin, P., Wisessang, S., Phanichyakarn, V., Piyakarnchana, T., 1989. Suspected causative dinoflagellates of paralytic shellfish poisoning in the Gulf of Thailand. In: Okaichi, T., Anderson, D.M., Nemoto, T. (Eds.), *Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology*. Elsevier, New York, pp. 403–406.
- Hall, S., Strichartz, G., Moczydlowski, E., Ravindran, A., Reichardt, P.B., 1990. The saxitoxin: sources, chemistry, and pharmacology. The saxitoxins: sources, chemistry and pharmacology. In: Hall, S., Strichartz, G. (Eds.), *Marine Toxins – Origin, Structure and Molecular Pharmacology*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 29–65.
- Harada, T., Oshima, Y., Kamiya, H., Yasumoto, T., 1982. Confirmation of paralytic shellfish toxins in the dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressa*. *Nippon Suisann gakkaiishi* 48, 821–825.
- Hashimoto, K., Noguchi, T., 1989. Recent studies on paralytic shellfish poison in Japan. *Pure. Appl. Chem.* 61, 7–18.
- Hashimoto, T., Matsuo, S., Yoshimatsu, S., Miki, K., Nishibori, N., Nishio, S., Noguchi, T., 2002. First paralytic shellfish poison (PSP) infestation of bivalves due to toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*, in the southeast coasts of the Seto, Inland Sea, Japan. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 43, 1–5.
- Ikeda, T., Matsuno, S., Sato, S., Ogata, T., Kodama, M., Fukuyo, Y., Takayama, H., 1989. First report on paralytic shellfish poisoning caused by *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae) in Japan. In: Okaichi, T., Anderson, D.M., Nemoto, T. (Eds.), *Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology*. Elsevier, New York, pp. 411–414.
- Ito, K., Asakawa, M., Beppu, R., Takayama, H., Miyazawa, K., 2004. PSP-toxication of the carnivorous gastropod *Rapana venosa* inhabiting the estuary of the Nichi River, Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 1116–1121.
- Kawabata, T., 1978. Assay method for paralytic shellfish poison. *Food Hygiene Examination Manual*. In: Environmental Health Bureau, Ministry of Health and Welfare, vol. 2. Japan Food Hygiene Association, Tokyo, pp. 240–244.
- Kodama, M., Ogata, T., Fukuyo, Y., Ishimaru, T., Wisessang, S., Saitanu, K., Panichyakarn, V., Piyakarnchana, T., 1988. *Protogonyaulax cohorticula*, a toxic dinoflagellate found in the Gulf of Thailand. *Toxicon* 26, 707–712.
- Kojo, A., Tamanaha, K., Abe, Y., Oshiro, N., Teruya, N., 2001. Studies on paralytic shellfish poisons in Okinawa Prefecture II. Okinawaken Eisei Kankyo Kenkyujo Shoho 35, 59–61.
- Noguchi, T., Kohno, M., Ueda, Y., Hashimoto, K., 1981. Isolation of gonyautoxin-2, a main component of paralytic shellfish poison from toxic scallop and its properties. *J. Chem. Soc. Jpn.* 5, 652–658.
- Noguchi, T., Asakawa, M., Arakawa, O., Fukuyo, Y., Nishio, S., Tanno, K., Hashimoto, K., 1990. First occurrence of *Alexandrium catenella* in Funka Bay, Hokkaido, along with its unique toxin composition. In: Graneli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 493–498.
- Ogata, T., Pholpunthin, P., Fukuyo, Y., Kodama, M., 1990. Occurrence of *Alexandrium cohorticula* in Japanese coastal water. *J. Appl. Phycol.* 2, 351–356.
- Oshima, Y., Hasegawa, H., Yasumoto, T., Hallegraef, G.S., Blackburn, S., 1987. Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish. *Toxicon* 25, 1105–1111.
- Oshima, Y., Sugino, K., Itakura, H., Hirota, M., Yasumoto, T., 1990. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In: Graneli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier Science Publishing, New York, pp. 391–396.
- Takatani, T., Morita, T., Anami, A., Akaeda, H., Kamijyo, Y., Tsutsumi, K., Noguchi, T., 1998a. Appearance of *Gymnodinium catenatum* in association with the toxication of bivalves in Kamae, Oita Prefecture. *Jpn. J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 39, 275–280.
- Takatani, T., Akaeda, H., Kaku, T., Miyamoto, M., Mukai, H., Noguchi, T., 1998b. Paralytic shellfish poison infestation to oyster *Crassostrea gigas* due to dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in the Amakusa Islands, Kumamoto Prefecture. *Jpn. J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 39, 292–295.
- Wisessang, S., Ogata, T., Kodama, M., Fukuyo, Y., Ishimaru, T., Saitanu, K., Yongvanich, T., Piyakarnchana, T., 1991. Accumulation of paralytic shellfish toxins by green mussel *Perna viridis* by feeding on cultured cells of *Alexandrium cohorticula* isolated from the Gulf of Thailand. *Nippon Suisann Gakkaishi* 57, 127–131.
- Yoshimatsu, S., Ochi, Y., Ueda, T., Yamanishi, S., Miki, K., 2001. An annual report at 1999 edited by Kagawa Akashiwo Research Institute. Kagawaprefecture, 13–15.

西表島産イワスナギンチャク *Palythoa tuberculosa* の毒性について

相良 剛史・谷山 茂人・江戸 梢・橋本多美子・
西堀 尚良・浅川 学・西尾 幸郎

Toxicity of *Palythoa Tuberculosa* Collected on the Reef of Iriomote Island

Takefumi SAGARA, Shigeto TANIYAMA, Kozue EDO, Tamiko HASHIMOTO,
Naoyoshi NISHIBORI, Manabu ASAKAWA and Sachio NISHIO

緒 言

イワスナギンチャク *Palythoa tuberculosa* は、軟質サンゴの一種である腔腸動物門花虫綱スナギンチャク目のイワスナギンチャクの一種で、本州中部沿岸以南、トカラ列島、ミクロネシア、ベトナム沿岸、インド洋、紅海に分布し、低潮線付近より数m深の、サンゴ礁の浅海の岩に着生している。各ポリプの大きさは不同で、高さ10-20mm、直径6-10mmであり、やや紅褐色や黄色のものがある¹⁾。*P. tuberculosa* は、我々がしばしば目にする動物でもなく、一般にはあまりなじみがない生物であるが、1960年代に本種より極めて致死活性の高い毒であるバリトキシン(PTX)が発見されたことにより、世界の天然物化学者からの注目を集めた²⁾。

PTXは強心作用を有する毒で、その分子量は2680であり、糖やアミノ酸、核酸の反復構造を含まない生体高分子としては最大の部類に入る³⁾。その毒性は、フグ毒テトロドトキシンの約20倍で、静脈注射による50%致死量は25 ng/kg (ウサギ) ~450 ng/kg (マウス) である。

現在では、PTXおよびその関連毒はオウギガニ科のヒロハオウギガニ *Lophozozymus pictor*、ウロコオウギガニ *Demania scaberrima* などの毒ガニ、紅藻ハナヤナギ *Chondria armata*、カワハギ科のソウシハギ *Aluterus scriptus*、また、ミクロネシアでシガテラ魚とされているモンガラカワハギ科のクロモンガラ *Melichthys vidua* などにおいて存在が確認されている⁴⁾。

P. tuberculosa の毒性に関する報告は、国内では

沖縄県石垣島や奄美大島に生息するもののみであり、その他の地域の本種の毒性に関しては報告例が無いため、本研究では西表島に生息する本種に含有されるPTX成分について調べた。

方 法

材料

2006年6月に沖縄県西表島(図1)で採取したイワスナギンチャク150gを試料とした。試料は採取後、直ちに凍結し、四国大学短期大学部に送付し、実験に供するまで-30℃で冷凍保管した。なお、供試する際には流水中で急速解凍した。



図1 イワスナギンチャクの採取場所 (●)

試験液の調整

試験液の調整は、Taniyama らの⁴⁾の方法に準拠した。

試料に3倍量の酢酸酸性75%エタノール (pH 3.5) 加えて10分間ホモジナイズし、遠心分離(10,000 g, 20分間, 室温)して上清を得た。残渣については同様の作業を2回繰り返して上清を合一した。次いで上清(粗抽出液: 150 ml)に等量のジエチルエーテルを加え、脱脂して水画分(50 ml)とジエチルエーテル画分(100 ml)に分画後、前者を水:1-ブタノール(1:1)で分配し、1-ブタノール画分(50 ml)と水溶性画分(100 ml)とし、粗抽出液ならびに各画分を試験液とした(図2)。

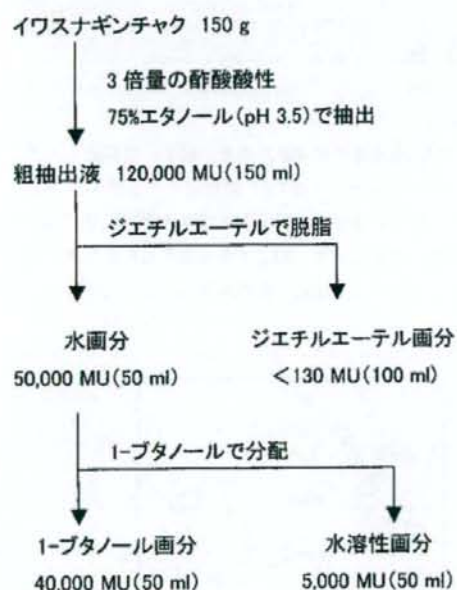


図2 イワスナギンチャクからの活性画分の精製

マウス毒性試験

マウス毒性試験はTaniyama らの方法⁴⁾に準じて行った。各試験液を ddY 系雄マウスに 1 ml 腹腔内投与して48時間観察し、生死を確認した。本研究において、1マウス単位(mouse unit: MU)は供試マウス1尾を約48時間で死亡させる毒量と定義した⁴⁾。

試験液の前処理(固相抽出)

各試験液 2 ml につき、有毒画分をメタノールと蒸留水で平衡化した2種の OASIS MAX 3 cc または OASIS MAX 6 cc(Waters) ミニカラムに吸着させ、2%アンモニア水と100%メタノールで洗浄後、1%酢酸・80%メタノールで溶出させた⁷⁾。次いで、溶出液をメタノールと蒸留水で平衡化した Sep-Pak C18(Waters) ミニカラムに付し、蒸留水、20%メタノール、50%メタノールおよび80%メタノールで順次洗浄し、100%メタノールで有毒画分を溶出させ、HPLC 分析に供した。

HPLC 分析

カラムに Purosphere STAR RP-8e(φ2 mm×250 mm, Merck) を使用した。移動相 A に 0.1% 酢酸・20% アセトニトリル、移動相 B に 0.1% 酢酸・80% アセトニトリルを用い、移動相 A から移動相 B に 60 分間かけて切替えるリニアグラジエント法を用い、流速を 0.2 ml/min とした。有毒成分の検出には PTX 標品特有の紫外部極大吸収の 263 nm⁸⁾ を使用した。PTX 標準品は和光純薬工業株式会社製を使用した。

結果および考察

マウス毒性試験

イワスナギンチャク 150 g 相当の粗抽出液の毒力は、120,000 MU、水画分は 50,000 MU、ジエチルエーテル画分は 130 MU 未満、1-ブタノール画分は 40,000 MU、水溶性画分は 5,000 MU であった(いずれも PTX 換算)(図2)。

固相抽出

まず、OASIS MAX 3 cc ミニカラムを用いて粗抽出液(1 g 試料相当量/ml)を固相抽出に供したところ、非吸着画分で 80 MU、2%アンモニア水洗浄画分で 20 MU、100%メタノール洗浄画分で 200 MU 未満、1%酢酸・80%メタノール溶出画分で 100 MU の毒力を示し、回収率はそれぞれ 5%、1%、13%、6%であった。水画分(3 g 試料相当量/ml)につ

いても、同様に200 MU (回収率10%)、20 MU (回収率1%)、400 MU (回収率20%)、200 MU (10%)の毒力を示し、さらに1%酢酸・80%メタノールで再度溶出を試みたが、その溶出画分の毒力は20 MU未満 (回収率1%未満)であった。一方、1-ブタノール画分(3g 試料相当量/ml)も水画分と同様、それぞれ160 MU (回収率10%)、20 MU (回収率1%)、320 MU未満 (13%未満)、160 MU (回収率10%)、20 MU (回収率1%)であった(表1)。

次いで、OASIS MAX 6 cc ミニカラムでは、水画

表1 OASIS MAX 3 cc ミニカラムによる固相抽出段階における毒力と回収率

試験液	非吸着画分	2%アソモニア水洗浄画分	10%メタノール洗浄画分	1%酢酸・80%メタノール洗浄画分(1回目)	1%酢酸・80%メタノール洗浄画分(2回目)
固相抽出	毒量(MU) 80	20	<200	100	—
	回収率(%) 5	1	<13	6	—
水画分	毒量(MU) 200	20	400	200	<20
	回収率(%) 10	1	20	10	<1
1-ブタノール画分	毒量(MU) 160	20	<320	160	20
	回収率(%) 10	1	<20	10	<1

分において、OASIS MAX 3 cc ミニカラムの場合と同様にそれぞれ600 MU未満、350 MU、2,600 MU、2,500 MU、500 MU未満の毒力を示し、各回収率は12%未満、7%、53%、50%、10%未満であった。また、1-ブタノール画分では、それぞれ500 MU未満 (回収率13%未満)、500 MU (回収率13%)、2,500 MU未満 (回収率63%未満)、2,500 MU (回収率63%)、350 MU未満 (回収率9%未満)であった(表2)。これらの結果を踏まえ、1-ブタノール画分から得られた1%酢酸・80%メタノール溶出画分(2,500 MU)を以下の試験に供した。本

表2 OASIS MAX 6 cc ミニカラムによる固相抽出段階における毒力と回収率

試験液	非吸着画分	2%アソモニア水洗浄画分	10%メタノール洗浄画分	1%酢酸・80%メタノール洗浄画分(1回目)	1%酢酸・80%メタノール洗浄画分(2回目)
水画分	毒量(MU) <600	350	2,600	2,500	<500
	回収率(%) <12	7	53	50	<10
1-ブタノール画分	毒量(MU) <500	500	2,500	2,500	<350
	回収率(%) <13	13	63	63	<9

画分につき、Sep-Pak C18ミニカラムによるさらなる固相抽出法を検討したところ、毒力は非吸着画分で5 MU未満、水洗浄画分で5 MU未満、20%メタノール洗浄画分で5 MU未満、50%メタノール洗浄画分で10 MU未満、80%メタノール洗浄画分で25 MU未満、100%メタノール洗浄画分で100 MU、回収画分で25 MU未満を示し、回収率はそれぞれ1.3%未満、1.3%未満、1.3%未満、2.5%未満、6.3%未満、25%、6.3%未満であった(表3)。

表3 Sep-Pak C18ミニカラムによる固相抽出段階における毒力と回収率

	非吸着画分	水洗浄画分	20%メタノール洗浄画分	50%メタノール洗浄画分	80%メタノール洗浄画分	100%メタノール洗浄画分	回収画分
毒量(MU)	<5	<5	<5	<10	<25	100	<25
回収率(%)	<0.4	<0.4	<0.4	<0.8	<2	8	<2

HPLC分析

Sep-Pak C18による固相抽出の溶出毒量および回収率の結果より有毒西表産イワスナギンチャク *P. tuberculosa* の主成分が100% MeOH 画分に溶出したものと考え、これを HPLC に供したところ、図3に示す結果を得た。

PTX 標準品には、20.7分に特有のピークが検出された。HPLC 分析による PTX の検出限界は 0.1 μg 程度と報告されている。一般に、PTX のマウスに対する LD₅₀ は 450 ng/kg¹⁰⁾ であるので、0.1 μg の PTX

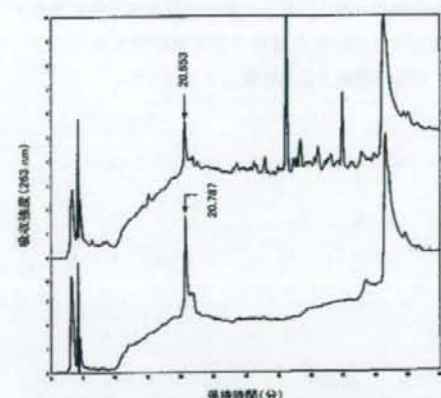


図3 イワスナギンチャクの有毒画分(上)とPTX標準品(下)のHPLCクロマトグラム

約11MUがHPLCによる検出限界と計算できる。注入した *P. tuberculosis* 精製画分はHPLC分析結果から毒量8.2MUと算出された。*P. tuberculosis* 精製画分で保持時間20.7分にPTX標準品に一致するピークを検出した。これらの結果より西表島産イワスナギンチャクに含まれる有毒成分はPTXが主成分であることが示唆された。

まとめ

西表島産イワスナギンチャク *P. tuberculosis* の精製からマウス致死性神経毒を精製した。ブタノール分配画分に粗抽出液が示した毒量の30%, 40,000 MUが回収された。これらをOASIS MAX, Sep-Pak C18で固相抽出した有毒画分をHPLCで分析したところPTX標準品の溶出時間とほぼ一致する時間にピークが検出された。PTXと同じ保持時間の20分に確認されたピークはPTXの紫外部吸収波形に近似していた。

総合的に考えると、固相抽出法にはOASIS MAXおよびSep-Pak C18を併用し、100%MeOH洗浄画分にて最終的に得られる液を回収するとPTXが比較的高濃度に得られることが明らかになった。

謝 辞

本研究の一部は、私立大学教育研究高度化推進特別補助および厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業により行った。

参考文献

- 1) 内海富士夫, 1982. 原色日本海岸動物図鑑. 保育社, 大阪.
- 2) 塩見一雄, 長島祐二: 2006. 新訂版海洋動物の毒—フグからイソギンチャクまで—成山堂書店, 東京.
- 3) 伊藤勝昭, 浦川紀元, 1982. 海産毒 Palytoxin の生理活性. 生体の科学33号: 319-325.
- 4) S. Taniyama, Y. Mahmud, M. B. Tanu, T. Takatani, O. Arakawa, and T. Noguchi, 2001. Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer *Tetraodon* sp. toxin. *Toxicon* 39: 725-727.
- 5) S. Taniyama, Y. Mahmud, M. Terada, T. Takatani, O. Arakawa and T. Noguchi, 2002. Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan. *Journal of Natural Toxin* 11 (4): 277-282.
- 6) S. Taniyama, O. Arakawa, M. Terada, S. Nishio, T. Takatani, Y. Mahmud, and T. Noguchi, 2003. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon* 42: 29-33.
- 7) P. Riobo, B. Paz, and J. M. Franco, 2006. Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 566: 217-223.
- 8) D. Uemura, Y. Hirata, T. Iwashita, and H. Naoki, 1985. Studies on palytoxin. *Tetrahedron* 41 (6): 1007-1017.
- 9) 伊藤勝昭, 1984. バリトキシン Palytoxin. 生体の科学35号: 513-515.

(相良剛史・西堀尚良・西尾幸郎: 四国大学短期大学部生活科学科食物栄養専攻)

(谷山茂人: 長崎大学大学院生産科学研究科)

(江戸 栢: 徳島大学大学院人間・自然環境研究科)

(橋本多美子: 四国大学短期大学部生活科学科生活福祉専攻)

(浅川 学: 広島大学大学院生物圏科学研究科)

中毒発生海域より分離した *Ostreopsis* sp. の パリトキシン様物質産生能

相良 剛 史

四国大学短期大学部

Profiles of palytoxin-like compounds from the dinoflagellate *Ostreopsis* sp.
isolated from the areas where poisonous fishes were collected

TAKEFUMI SAGARA

Shikoku University, Junior College, Tokushima, Tokushima 771-1192, Japan

1. はじめに

近年、わが国ではブダイ科魚類やハタ科魚類、ハコブグ科魚類の喫食によるパリトキシン (PTX) 中毒に類似した食中毒が相次いで発生し、問題となっている。^{1,2)} PTX は軟質サンゴの一種である *Palythoa toxica* より見出された毒であるが、³⁾ 底生性渦鞭毛藻の一種である *Ostreopsis siamensis* や *O. ovata* などから PTX およびその類縁体が検出され、^{4,5)} 魚類の毒化原因は *Ostreopsis* 属等の渦鞭毛藻であるとの見方が強まっている。本項では、魚類への PTX 様毒の蓄積機構解明に資するため、中毒発生海域より分離した *Ostreopsis* sp. の PTX 様物質産生能について検討をおこなったので、その概要について述べる。

2. *Ostreopsis* sp. より抽出した有毒成分の生化学的性状

2004年5月に宮崎県沿岸、2005年6月に長崎県沿岸から採取し単離した *Ostreopsis* sp. を ESM 培地⁶⁾ を用い、培養温度を 20°C、光強度を 40 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、明暗周期を 12 時間明/12 時間暗の条件下で培養した。得られた培養藻体に 3 倍量の 50% メタノールを加えて超音波破砕機でホモジナイズし、2,000 \times g で 10 分間遠心分離して上清を抽出液とした。残渣については、同様の操作を 2 回繰り返して上清を合一した。抽出液を減圧濃縮後、同量のジエチルエーテルで 2 回脱脂した。得られた水画分を再び減圧濃縮し、蒸留水で定容して水溶性画分とし、毒性および毒の性状を調べた。^{7,8)} いずれも、 1.0×10^4 cells 相当量の粗抽出液をマウスに投与したところ、遅延性致死活性が認められた。さらに、両者はマウス赤血球に対して、インキュベーション 1 時間では濃度 1.0×10^3 cells 相当量/ml でもほとんど溶血しなかったが、インキュベーション 4 時間において、前者で 86.5%、後者で 68.2% と、いずれも同濃度で高い溶血率を示した。また、ヒト赤血球に対しても同

濃度、同時間でそれぞれ溶血率 47.8% および 36.2% の活性が認められ、これらの活性はウワバインにより特異的に抑制された。従って、宮崎県産ならびに長崎県産 *Ostreopsis* sp. は、マウスならびにヒト赤血球に対して遅延性溶血活性を示す毒を産生し、本毒の性状は PTX 標準品に酷似していたことから、両株の PTX 様物質産生能が確認された。

3. *Ostreopsis* sp. より抽出した有毒成分の分析

長崎県産 *Ostreopsis* sp. の培養藻体から調製した試験液につき、Waters 社製 Quattro micro (MS/MS) および HITACHI 社製 NanoLC/Linear-Trap-TOF Nano-Frontier LD (TOF-MS) で分析した。Quattro micro を用いてマルチプルリアクションモニタリング (MRM) 法で MS/MS 分析すると、2 価 PTX のカリウム付加の脱水イオンと推察される $[\text{M}+\text{K}+\text{H}-5\text{H}_2\text{O}]^{2+} = 1314$ からフラグメンテーションにより生じた m/z 327.4 (図

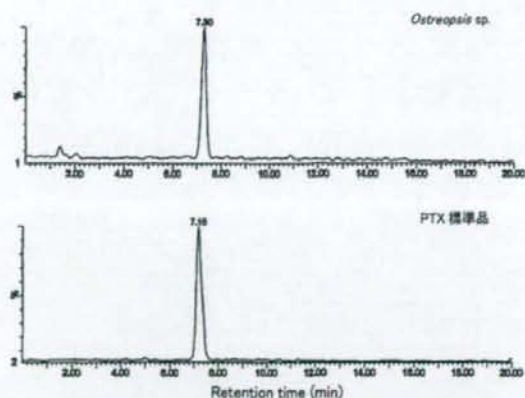


図1 PTX 特有の付加イオン $[\text{M}+\text{K}+\text{H}-5\text{H}_2\text{O}]^{2+} = 1314$ からフラグメンテーションにより生じた m/z 327.4 をモニターした *Ostreopsis* sp. の部分精製毒 (上) と PTX 標準品 (下) の MRM クロマトグラム

1), PTXの3価のナトリウム, カリウム付加イオンと推察される $[M+Na+K+H]^{2+} = 913.5$ から生じた m/z 327.4 および PTX 特有のフラグメントイオンである m/z 327 を前駆イオンとしてフラグメンテーションにより生じた m/z 75.9 のMRMクロマトグラムに, PTX標準品と一致する保持時間でピークが得られた。TOF-MS分析では, PTX標準品から検出された $[M+3H-3H_2O]^{3+} = 875.834$ のピークは検出されなかったが, $[M+3H-3H_2O]^{3+} = 977.596$ と $[M+2H-2H_2O]^{2+} = 1474.915$ を強く検出し, それらを含めた複数の3価および2価の脱水イオン等, PTX関連物質と推測されるピークがPTXのHPLC保持時間に検出された。このため, 本種の毒はPTXそのものではなく, PTX類似構造をもつ物質であると推定された。これにより, *Ostreopsis* sp. が魚介類の毒化原因となっていることが改めて示唆された。

謝 辞

本研究は, 平成17~18年度厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業「魚介類に含まれる食中毒原因物質の分析法に関する研究」の一部として実施された。関係各位に謝意を表す。

文 献

- 1) Taniyama S, Mahmud Y, Terada M, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T. Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan. *J. Nat. Toxin* 2002; **11**: 277-282.
- 2) Taniyama S, Arakawa O, Takatani T, Noguchi T. Food poisoning similar to *Scarus ovifrons* poisoning. *New Food Industry* 2003; **45**: 55-61.
- 3) Moore RE, Scheuer PJ. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science* 1971; **172**: 495-498.
- 4) Usami M, Satake M, Ishida S, Inoue A, Kan Y, Yasumoto T. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *J. Am. Chem. Soc.* 1995; **117**: 5389-5390.
- 5) Penna A, Vila M, Fraga S, Giacobbe MG, Andreoni F, Riobo P, Vernesi C. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. *J. Phycol.* 2005; **41**: 212-225.
- 6) 岡市友利, 西尾幸郎, 今富幸也. 有毒プランクトン研究法—試料の採集と培養, 「有毒プランクトン—発生・作用機構・毒成分」(日本水産学会編) 恒星社厚生閣, 東京, 1982; 22-34.
- 7) Taniyama S, Arakawa O, Terada M, Nishio S, Takatani T, Mahmud Y, Noguchi T. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon* 2003; **42**: 29-33.
- 8) Gleibs S, Mebs D, Werding B. Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. *Toxicon* 1995; **33**: 1531-1537.

ノート

腐肉食性巻貝キンシバイ *Nassarius (Alectrion) glans* に認められたフグ毒の毒性と毒成分

(平成 20 年 8 月 22 日受理)

谷山茂人¹ 諫見悠太² 松本拓也³ 長島裕二³
高谷智裕² 荒川 修^{2,*}Toxicity and Toxin Profile of Tetrodotoxin Detected in the Scavenging Gastropod *Nassarius (Alectrion) glans* "Kinshibai"Shigeto TANIYAMA¹, Yuta ISAMI², Takuya MATSUMOTO³, Yuji NAGASHIMA³,
Tomohiro TAKATANI², and Osamu ARAKAWA^{2,*}¹ Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University:
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan;² Faculty of Fisheries, Nagasaki University: 1-14 Bunkyo-machi,
Nagasaki 852-8521, Japan;³ Department of Food Science and Technology, Tokyo University
of Marine Science and Technology: 4-5-7 Konan,
Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan; *Corresponding author

From September 2007 to January 2008, a total of 66 specimens of 7 gastropod species, *Nassarius (Alectrion) glans* ($n=22$), *Bufo rana* ($n=11$), *Ficus subintermedia* ($n=10$), *Stellaria (Onustus) exutus* ($n=8$), *Tonna luteostoma* ($n=7$), *Hemifusus tuba* ($n=4$) and *Semicassis bisulcata persimilis* ($n=4$), were collected from Tachibana Bay, Nagasaki Prefecture, Japan, and their toxicity was determined by mouse bioassay. Among the gastropods tested, all *N. glans* specimens were toxic, whereas no other species showed toxicity of more than 5 MU/g. The toxicity scores of *N. glans* were very high; 48-2,730 MU/g (775 ± 615 MU/g) in the muscle, and 16-10,200 MU/g ($1,490 \pm 2,530$ MU/g) in the viscera, including digestive gland. Interestingly, toxin was localized in the muscle in 13 of 22 specimens, where the total toxicity of the muscle ($725-9,860$ MU/individual) was 5.9-110 times higher than that of the viscera. LC/MS analysis demonstrated that the toxin of *N. glans* consisted mainly of TTX, which accounting for about 60-65% of the total toxicity. As for the remaining toxicity, participation of 11-oxoTTX was suggested. No paralytic shellfish poison was detected in HPLC-FLD analysis.

(Received August 22, 2008)

Key words: 腐肉食性巻貝 scavenging gastropod; キンシバイ *Nassarius (Alectrion) glans*; 食中毒 food poisoning; フグ毒中毒 pufferfish toxin poisoning; フグ毒 pufferfish toxin; テトロドトキシン tetrodotoxin; 11-オキソテトロドトキシン 11-oxotetrodotoxin

緒 言

2007年7月下旬、長崎県長崎市において、同県橋湾産の小型巻貝を喫食した60歳の女性1名が舌のしびれ、四肢の麻痺、呼吸困難などを呈した後、一時呼吸停止に陥るといって極めて重篤な食中毒が発生した^{*1}。事件発生直後に本中毒の残品である調理済みキンシバイ *Nassarius*

(*Alectrion) glans*, および未調理のアカニシ *Rapana venosa*, テングニシ *Hemifusus tuba*, ミガキボラ *Kelletia lischkei* を入手して毒性を調べたところ、キンシバイの筋肉と中腸腺から最高4,290 MU/g に達する強い麻痺毒性が検出された。さらに LC/MS 分析により毒の本体が tetrodotoxin (TTX) であることが明らかとなり、本中毒はキンシバイを原因とする TTX 中毒であると断定された。

* 連絡先

¹ 長崎大学大学院生産科学研究科: 〒852-8521 長崎県長崎市文教町1-14² 長崎大学水産学部: 〒852-8521 長崎県長崎市文教町1-14³ 東京海洋大学海洋科学部: 〒108-8477 東京都港区港南4-5-7*¹ 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知(平成19年8月16日, 食安監発第0816003号)「ムシロガイ科キンシバイ(巻貝)での食中毒の発生事例について」, 厚生労働省。

キンシバイは、ムシロガイ科の腐肉食性小型巻貝で、相模湾以南の潮間帯ないし水深 20 m の砂泥底に生息しているが¹⁾、日本では食習慣がなく、食中毒や毒性に関する知見もほとんどない。このような状況の下、本研究では中毒検体が採捕された横湾における小型巻貝類の毒化状況を把握し、中毒の未然防止に資することを目的として、キンシバイを中心に同湾産小型巻貝類の毒性と毒成分について検討した。

実験方法

1. 試料

2007年9月～11月および2008年1月に長崎県横湾 (Fig. 1) で採集されたキンシバイ (Fig. 2) 22 個体、および

2007年9月と10月に同海域で採集されたミヤコボラ *Bufo rana* 11 個体、ビワガイ *Ficus subintermedia* 10 個体、キヌガサガイ *Stellaria (Onustus) exutus* 8 個体、ヤツシロガイ *Tonna luteostoma* 7 個体、テングニシ 4 個体、ウラシマガイ *Semicassis bisulcata persimilis* 4 個体を試料とした。試料は採集後、直ちに冷蔵にて長崎大学水産学部水産食品衛生学研究室に持ち帰り、 -20°C で凍結保存した。供試の際、試料を流水中で急速解凍し、筋肉と中腸腺を含む内臓に分けて用いた。

2. 毒性試験

毒性試験は、食品衛生検査指針理化学編フグ毒検査法²⁾ (公定法) に準じて行った。

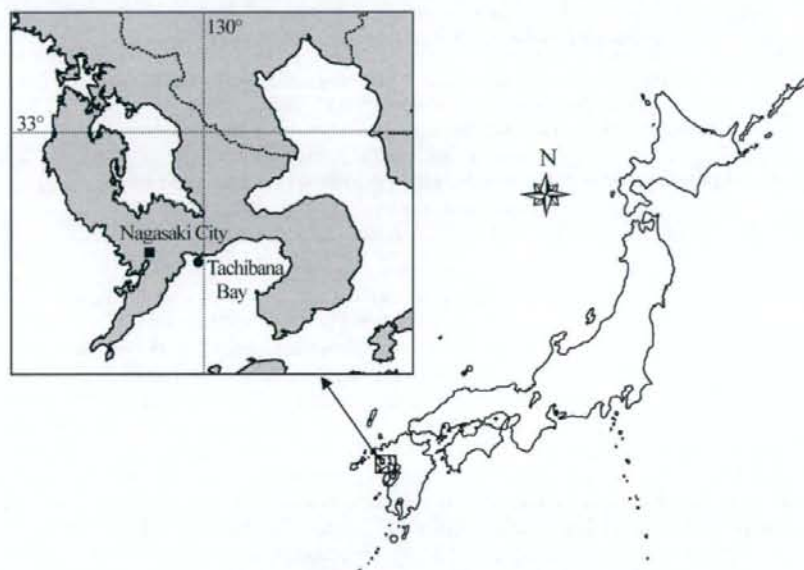


Fig. 1. Map showing Tachibana Bay (●) where gastropods specimens were collected.



Fig. 2. *Nassarius (Alectrion) glans* "kinshibai"

3. 毒成分分析

毒成分の分析は TTX 成分を対象として Nakashima ら³⁾の LC/MS 法に準拠して行った。一方、麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poison; PSP) 成分については、既報^{4),5)}の HPLC 蛍光分析法にて分析した。

結果および考察

1. 小型巻貝類の毒性

供試した 7 種の巻貝のうち、キンシバイのみが有毒で、その他 6 種計 44 個体はいずれも無毒 (5 MU/g 未満) であった。

キンシバイの部位別毒力を Table 1 に示す。供試 22 個体の筋肉と内臓はいずれも有毒であった。毒力は総じて強く、筋肉で 48~2,370 MU/g (平均毒力±標準偏差: 775±615 MU/g, 以下同様)、内臓で 16~10,200 MU/g (1,490±2,530 MU/g) と測定された。特に 2007 年 9 月には供試 10 個体中 8 個体において、筋肉と内臓のどちらか一方、または両方が食品衛生上「猛毒」となる 1,000 MU/g を上回り、最高毒力は筋肉で 2,370 MU/g、内臓で 10,200 MU/g に達した。また、同時期における筋肉の平均毒力は 1,010 MU/g で採集期間を通じて最も高い値となり、その後は徐々に減少し、2008 年 1 月に 276 MU/g にまで低下した。一方、内臓の平均毒力は 2007 年 9 月に最高値 2,450 MU/g を示した後、急激に減少し、2008 年

1 月には 65 MU/g となった。これらの結果から、食中毒の発生した 2007 年 7 月から同年 9 月にかけて、橋湾ではキンシバイのみが毒化して高濃度の毒を筋肉および内臓に蓄積し、それらの毒力はその後しだいに減少したと考えられた。

日本では、1979 年に静岡県静岡市で発生した肉食性巻貝ボウシュウボラ *Charonia saulia* による食中毒を契機として、同種や類似の巻貝オオナルトボラ *Tutufa lisso-stoma*、さらにはキンシバイと同じ肉肉食性巻貝であるハナムシロガイ *Zeuxis siquijorensis* やアラレガイ *Niotha clathrata* から TTX が検出された^{6)~9)}。しかしながら、ハナムシロガイとアラレガイの毒力は低く (それぞれ可食部で 3.4 MU/g, 4~35 MU/g)、日本ではこれらによる食中毒は発生していない。一方、台湾では小型巻貝による食中毒が 1994 年から 2006 年にかけて少なくとも 9 件発生し、46 名が中毒、うち 3 名が死亡している^{10~18)}。特に、2004 年 4 月には、キンシバイにより患者 6 名中 2 名が喫食後 30 分で死亡するという深刻な事例が発生した¹⁶⁾。関連の調査では、中毒検体と同じ海域で採取したキンシバイから筋肉で 1,170±557 MU/g (最高 2,990 MU/g)、中腸腺で 538±608 MU/g (最高 2,050 MU/g) に及ぶ極めて高い毒力が検出された¹⁶⁾。これらの値は、台湾産有毒巻貝類 (ムシロガイ科 9 種、タマガイ科 1 種およびマクライガイ科 3 種)^{10~18)} の中でも際立って高い。他方、中国

Table 1. Toxicity of *Nassarius (Alectrion) glans* specimens collected at Tachibana Bay, Nagasaki Prefecture

Month of collection	Specimen No.	Shell length (mm)	Shell width (mm)	Body weight (g)	Muscle			Viscera		
					Weight (g)	Toxicity* ¹ (MU/g)	Total toxicity* ^{1,2} (MU/individual)	Weight (g)	Toxicity* ¹ (MU/g)	Total toxicity* ¹ (MU/individual)
Sept. 2007	1	44	20	9.8	3.9	360	1,420	1.6	5,580	9,150
	2	41	16	7.9	4.2	1,470	6,150	0.8	73	57
	3	40	21	6.7	3.1	494	1,540	1.4	36	50
	4	45	23	8.5	3.6	491	1,770	1.8	1,880	3,380
	5	43	21	8.8	4.8	591	2,860	1.4	1,980	2,830
	6	42	22	6.6	2.7	1,200	3,230	1.1	4,300	4,730
	7	42	17	8.1	4.0	1,970	7,880	1.4	285	410
	8	43	24	7.3	3.1	542	1,660	1.5	10,200	15,100
	9	40	21	7.7	4.2	2,370	9,860	1.1	119	133
	10	35	13	5.0	2.2	589	1,300	1.1	41	44
	Mean±SD	43±2.8	20±3.4	7.6±1.4	3.6±0.80	1,010±711	3,770±3,090	1.3±0.30	2,450±3,350	3,590±4,500
Oct. 2007	11	38	20	6.4	2.8	1,260	3,520	1.2	53	62
	12	38	21	6.5	2.8	48	132	1.4	154	216
	13	41	22	8.5	3.6	862	3,070	1.6	3,850	6,120
	14	35	20	5.3	3.0	245	725	0.8	72	57
	15	37	21	6.1	2.2	307	682	0.8	1,910	1,430
	16	36	22	6.0	2.7	416	1,130	1.1	61	68
	Mean±SD	38±1.9	21±0.89	6.5±1.1	2.8±0.43	523±451	1,540±1,400	1.1±0.33	1,020±1,570	1,330±2,410
Nov. 2007	17	38	23	7.0	3.2	1,250	3,980	1.4	28	38
	18	47	23	7.3	3.1	1,360	4,180	1.0	102	98
	19	41	23	8.4	3.7	288	1,070	1.6	1,890	3,080
	20	39	21	7.0	3.3	394	1,310	1.3	16	21
		Mean±SD	41±4.0	23±1.0	7.4±0.66	3.3±0.28	823±560	2,640±1,670	1.3±0.28	509±921
Jan. 2008	21	46	24	9.1	4.5	216	976	1.5	113	165
	22	41	22	8.1	3.9	336	1,320	1.3	17	22
		Mean	44	23	8.6	4.2	276	1,150	1.4	65

*¹: Toxicity scores were determined by mouse bioassay.

*²: Bold numbers show the specimens in which total toxicity of the muscle was 5.9–110 times higher than that of viscera.

大陸では古くからムシロガイ科巻貝の食習慣があり、これに伴う食中毒も頻発している。2001年6月には、*Z. samiplicatus* の喫食により31名が中毒し、その中毒検体の可食部から 307 ± 192 MU/g (最高688 MU/g)、中腸腺から 370 ± 118 MU/g (最高532 MU/g) の毒力が検出されている¹⁹⁾。さらに最近では、オオハナムシロ *Z. siquijorensis* による同様の食中毒も相次いで発生しており、その可食部に数十 MU/g の毒性が認められたとの報告もある²⁰⁾。

一方、今回調査したキンシバイ1個体当たりの総毒力を見ると、22個体中13個体で筋肉が内臓よりも5.9~110倍高い値を示した (Table 1)。すなわち、これらの個体では毒の86~99%が筋肉に偏在していたことになる。日本産の TTX 保有巻貝はいずれも中腸腺に毒が局在している^{6)~9)}。しかしながら、Hwang ら²¹⁾は、台湾産マサメダマ *N. lineata* の部位別毒性を詳細に調べ、同一個体では筋肉の毒力 (最高毒力720 MU/g) が中腸腺 (同12 MU/g) やその他の部位 (同28 MU/g) より高く、筋肉に高濃度の TTX が含まれていたと報告している。さらに、台湾産キンシバイについても、85%の個体で筋肉の毒力が

中腸腺より1.7~8.3倍高かったと述べている¹⁶⁾。日本産キンシバイの毒蓄積パターンは、これら台湾産巻貝類と酷似している。

TTX 保有生物のうち、クサフグ *Takifugu niphobles* やナシフグ *T. vermicularis* では、いったん凍結後に緩慢解凍すると、有毒部位から毒が筋肉に移行することが知られているが、急速解凍ではこのような毒の移行はほとんど起こらない^{22~24)}。今回調査したキンシバイについては、いずれも急速解凍のうえ毒性試験に供した。さらに、生きたキンシバイを用いた予備実験においても、今回と同様の毒分布 (筋肉あるいは内臓への毒の偏在) が認められている。したがって、本調査において、凍結解凍による部位間の毒の移行は、あっても無視しうるレベルと考えられた。

2. キンシバイの毒成分

キンシバイの筋肉と内臓につき、LC/MSにて毒成分を分析したところ、 m/z 320のクロマトグラムにおいてすべての個体から TTX ($[M+H]^+ = 320$) 標品と保持時間の一致するピークが検出された。Fig. 3a および 3c にその一例を示す。また、 m/z 336のクロマトグラムにおいては、TTX に対する相対的な溶出位置から^{25), 26)}、11-

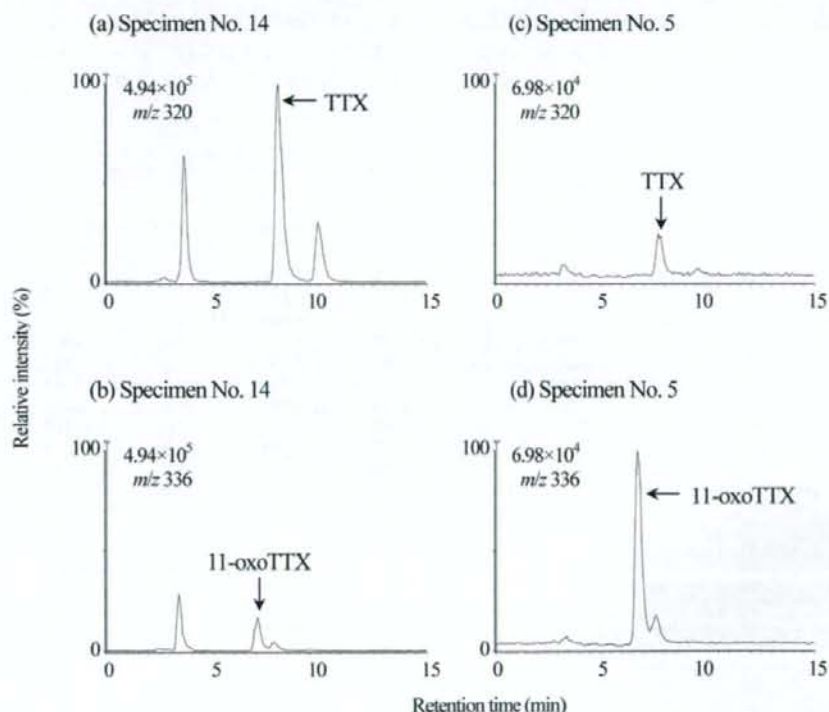


Fig. 3. LC/MS chromatograms at m/z 320 (a, c) and 336 (b, d) obtained from muscles of specimen No. 14 (a, b) and No. 5 (c, d) (see Table 1 for specimen numbers).

LC/MS³⁾ was carried out on an Alliance LC/MS system (Waters) equipped with a ZsprayTM MS 2000 detector, using a reversed-phase column with 30 mmol/L heptafluorobutyric acid in 1 mmol/L ammonium acetate buffer (pH 5.0) as the mobile phase, and the flow rate was set at 1.0 mL/min. As for MS conditions, about 20% of the eluate was introduced *via* a splitter into the ion source of MS, ionized by means of positive-mode electrospray ionization (ESI), and monitored through a MassLynxTM NT operating system.

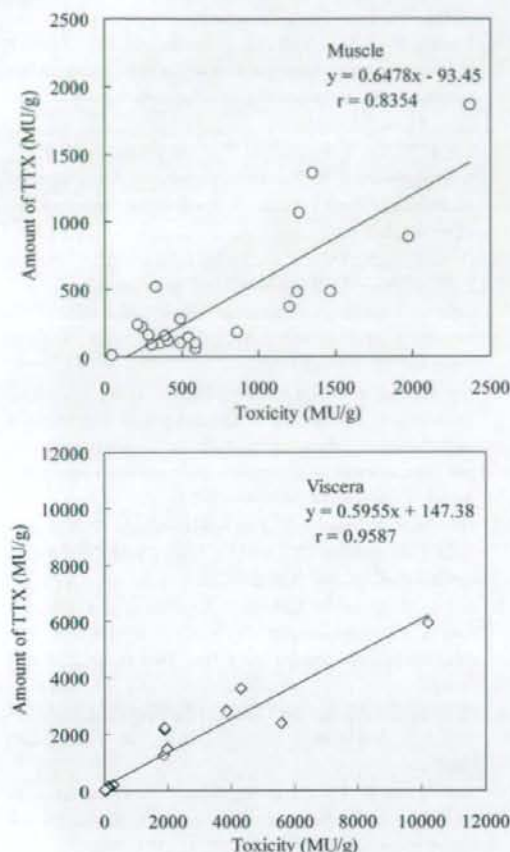


Fig. 4. Comparison between toxicity scores determined by mouse bioassay and amounts of TTX by LC/MS

oxoTTX $[(M+H)^+ = 336]$ と推定されるピークが認められた (Fig. 3b および 3d).

LC/MS 分析から算出された TTX の毒力と '公定法で測定された毒力' の相関について検討したところ、筋肉と内臓における相関係数がそれぞれ 0.8354 および 0.9587 となり、ともに良好な正の相関を示すことが分かった (Fig. 4)。両者の回帰直線は、それぞれ $y = 0.6478x - 93.45$ と $y = 0.5955x + 147.4$ で、平均的には筋肉で総毒力の約 65%、内臓では約 60% を TTX が占めると判断された。

一方、11-oxoTTX と推定される成分につき、マウスに対する比毒性が TTX の 2 倍で、かつ LC/MS 分析における単位量当たりのイオン強度が TTX と同等と仮定して毒力を算出し、'当該毒力と TTX の毒力の和' と '公定法で測定された毒力' の相関について検討したところ、筋肉、内臓ともに極めて良好な正の相関が認められ (相関係数はそれぞれ 0.9073 および 0.9763)、回帰直線はそれぞれ $y = 1.060x + 75.97$ および $y = 0.9664x + 176.8$ となった。したがって、前述の仮定が正しければ、TTX と 11-

oxoTTX ではほぼ 100% マウス毒性を説明できることになる。11-oxoTTX は、ヨーロッパアカガエル *Rana temporaria* の骨格筋の細胞膜における Na チャンネル阻害作用が TTX の 4~5 倍強い²⁷⁾。これに基づき、マウスに対する比毒性も TTX の 4~5 倍と仮定すると、TTX と 11-oxoTTX の毒力の和がマウス毒性を大きく上回るという矛盾が生じるが、生物種による差や活性測定法の違いを考慮すれば、問題の比毒性が TTX の 2 倍以下である可能性は否定できないであろう。あるいは、2 倍以上であったとしても、単位量当たりのイオン強度が TTX より十分に高ければ、当該矛盾は起こらない。いずれにしても、この点を明らかにするためには、11-oxoTTX を分離・同定・定量する必要がある。

11-oxoTTX は、これまでコクテンフグ *Arothron nigropunctatus*、スベスベマンジュウガニ *Atergatis floridus*、プチモリ *Notophthalmus viridescens*、コガネガエル科カエル *Brachycephalus ephippium* から分離されているが^{(25), (26), (28), (29)}、巻貝からの検出例はない。したがって、キンシバイは、内臓のみならず筋肉に極めて高濃度の毒を保持することを含め、特異な TTX 蓄積機構を備えているものと推察される。この点については、毒の起源や 11-oxoTTX の分離・同定・定量、他の TTX 関連成分の存在などと併せて現在検討中である。

ムシロガイ科巻貝のうち、日本産のハナムシロガイやアラレイの毒成分は TTX またはその関連物質であることが知られているが^{(8), (9)}、台湾に生息する同種の巻貝は、TTX に加え、副成分として PSP 成分である gonyautoxin 1~4 および neosaxitoxin を保有するという⁽¹⁰⁾。キンシバイについても、PSP を対象として HPLC 蛍光分析を行ったが、同成分は全く検出されなかった。台湾産キンシバイも毒の主体は TTX であり、PSP 成分は保有しない⁽¹⁰⁾。

まとめ

長崎県橋湾に生息する小型巻貝 7 種 66 個体につき、マウスに対する毒性を調べたところ、キンシバイ (22 個体) のみが有毒であった。本種の毒力は、これまでに報告のある腐肉食性巻貝⁽⁸⁻²¹⁾ の中で最も強く、内臓で 10,000 MU/g を上回る個体も見られた。また、半数以上の個体で筋肉に毒が偏在しており、内臓を除去しても数個体の喫食でヒトの最小致死量 (10,000 MU)⁽³⁰⁾ に達する可能性のあることが示された。一方、LC/MS 分析により、キンシバイでは総毒力の 6~7 割を TTX が占めることが明らかとなり、さらに残余毒力の相当部分を 11-oxoTTX が占めると推定された。以上の結果から、キンシバイは食品衛生上極めて危険な種であると結論した。

謝辞

本研究を行うにあたり、試料採集にご協力いただいた長崎市水産センター所長 八木基明博士ならびに長崎市たち