

令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）

（総括（分担）研究報告書

EU向け輸出二枚貝の海域指定及びモニタリング計画作成の加速化のための調査研究

研究代表者又は研究分担者

渡邊 龍一 中央水産研究所 主任研究員
内田 肇 中央水産研究所 任期付研究員
松嶋 良次 中央水産研究所 主任研究員
及川 寛 中央水産研究所 グループ長

研究要旨：EUに動物性食品を輸出するためには、EUが求める衛生要件に適合する必要がある。そのため、ホタテガイなどの二枚貝類についても、都道府県が指定する生産海域においてサンプリング計画を作成し、国内規制に基づく措置に加え、必要に応じて追加のモニタリング検査を行う必要がある。貝毒のなかでは、麻痺性貝毒ならびに下痢性貝毒について国内でも規制値が設けられているが、EUにおいては、さらに脂溶性貝毒（ペクテノトキシン、イエソトキシン）、アザスピロ酸、記憶喪失性貝毒（ドウモイ酸）のモニタリング検査が行われている。本課題では、現在EUへの輸出向けホタテガイの指定生産海域となっていない青森県陸奥湾西部海域ならびに北海道根室海域のホタテガイについて、機器分析法により麻痺性貝毒ならびに下痢性貝毒に加えて、脂溶性貝毒、アザスピロ酸およびドウモイ酸を分析して汚染実態を調査し、国内規制値およびEU規制値と比較し、モニタリングの必要性などを検討した。

A. 研究目的

EUに動物性食品を輸出するためには、EUが求める衛生要件に適合する必要がある。二枚貝においては国内で設けられている下痢性貝毒および麻痺性貝毒の規制値に加えて、脂溶性貝毒（ペクテノトキシン、イエソトキシン）およびアザスピロ酸、記憶喪失性貝毒（ドウモイ酸）のモニタリング検査が求められる。2019年6月に「農林水産物・食品の輸出拡大のための輸入国規制への対応等に関する関係閣僚会議」において「輸出拡大のための相手国・地域の規制等への対応強化（工程表）」が取りまとめられ、EU向けホタテガイ生産海域の追加について、言及されている。EU向けホタテガイの海域指定を行うにあたり必要となる、ホタテガイの貝毒の実態調査等を行い、効率的かつ迅速

に海域指定を行う科学的知見を提供し、モニタリング計画作成手法について検討することを目的とし、ホタテガイ可食部に含まれる機器分析法により麻痺性貝毒ならびに下痢性貝毒に加えて脂溶性貝毒、アザスピロ酸、ドウモイ酸について分析した。

B. 研究方法

1. 貝毒分析用ホタテガイ試料

本研究課題により収集した青森県陸奥湾ならびに北海道根室海域のホタテガイについて表1に示す。ホタテガイは中腸線を含む可食部10個体(200g以上)を均質になるまでホモジナイズし麻痺性貝毒分析用試料として 5.00 ± 0.05 g、下痢性・脂溶性貝毒分析試料として 2.00 ± 0.05 g、ドウモイ酸分析

用試料として 4.00±0.05 g を採取した。

表 1. 収集したホタテガイ試料

地域	漁協	発送日	受取日	二枚貝重量
				(10枚)
青森県	後潟漁協	2019/11/27	2019/11/28	477.0g
	平内漁協	2019/12/11	2019/12/12	400.4g
	外ヶ浜漁協	2019/12/16	2019/12/17	295.6g
	蓬田村漁協	2019/12/16	2019/12/17	462.7g
	平内漁協	2020/1/15	2020/1/16	458.5g
	平内漁協	2020/2/10	2020/2/12	562.6g
	平内漁協	2020/2/18	2020/2/20	535.3g
北海道	野付漁協	2019/12/5	2019/12/9	736.8g
	野付漁協	2020/1/14	2020/1/16	881.8g
	野付漁協	2020/1/27	2020/1/29	865.3g
	野付漁協	2020/2/18	2020/2/20	785.6g
	野付漁協	2020/2/26	2020/2/28	770.8g

2. 貝毒分析用試料の調製

1) 麻痺性貝毒用分析試料

ホタテガイのホモジネイトから麻痺性貝毒の抽出および分析のための前処理は Boundy らの方法 (J. Chromatogr. A, 2015, 1387, pp1-12) に従った。すなわち、ホモジネイト 5.0 g に対し、等量の 1%酢酸を加え、良く攪拌したのち、加熱抽出し、遠心分離によって得られる上清を回収した。次に、回収した上清 1 ml に対し、25%アンモニア水を 5ul 加えよく攪拌したのち、0.4ml をグラフアイトカーボンカートリッジ (Supelclean ENVI-Carb 250 mg/3ml) に負荷した後、カートリッジを蒸留水 0.7 ml で洗浄し、1%酢酸含有 20%アセトニトリル 2 ml で毒を溶出・回収した。回収した溶出液 0.1ml に対し、アセトニトリル 0.3 ml を加え 4 倍希釈したものを分析用試料とした。

2) 下痢性・脂溶性貝毒分析用試料

ホタテガイのホモジネイト 2.0 g に対し、1 度目の抽出では、9 mL のメタノールを加えて 3 分間ホモジナイズし、遠心分離 (2000 ×g, 10 分間) した上清を分取した。2 度目の抽出は、遠心分離した

沈殿物に 9 mL のメタノール：水 (90 : 10, v/v) を加えて 1 分間ホモジナイズし、遠心分離 (2000 ×g, 10 分間) で上清を分取した。2 回の抽出により得た上清を合わせてメタノール：水 (90 : 10, v/v) で 20 mL に定容したものをメタノール抽出液とし、含まれる脂溶性貝毒 (ペクテノトキシン群、イエソトキシン群) およびアザスピロ酸群を高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS/MS) で分析した。

なお、下痢性貝毒であるオカダ酸群の分析は、メタノール抽出液を加水分解処理したのちに分析した。加水分解処理では、メタノール抽出液 2.0 mL に 2.5 M の水酸化ナトリウム水溶液を添加し、76°C で 40 分間加熱し、試料を室温程度まで冷却した後 2.5 M の塩酸を 250 μL 加えて中和した。アルカリ加水分解した試料は LC/MS/MS 法により下痢性貝毒オカダ酸群を分析した。

3) 記憶喪失性貝毒用分析試料

ホタテガイのホモジネイト 4.0 g に対し、16 mL のメタノール：水 (1 : 1, v/v) を加えて 3 分間ホモジナイズし、遠心分離 (3000 ×g, 10 分間) で得た上清をシリンジフィルター (0.46 μm) でろ過したろ液を分析用試料とした。記憶喪失性貝毒は、LC/PDA 法により分析した。

3. 各貝毒成分の分析方法

1) 麻痺性貝毒

Boundy らの方法 (J. Chromatogr. A, 2015, 1387, pp1-12) を参考に装置を最適化して分析した。分析用標準物質は C1/2, GTX1-6, dcGTX2/3, neoSTX, dcSTX, STX の 13 成分を使用した。また、分析によって得られた各成分の濃度と大島が報告した比毒性情報 (J. AOAC int., 1995, 78, p 528) から毒力を換算した。

2) 下痢性貝毒・脂溶性貝毒

下痢性貝毒オカダ酸および脂溶性貝毒イエソトキシン群は陰イオンモードの LC/MS/MS による多重反応モニタリング (MRM) で分析した。分析

カラムとして Hypersil Gold C8 2.1 mm i.d. × 100 mm をカラムオープンにより 30°C に保ち用いた。移動相は 50 mM ギ酸および 2 mM ギ酸アンモニウムを含む (A) 水、(B) アセトニトリル：水 (95 : 5, v/v) の二相によるリニアグラジエント分析によってオカダ酸およびイェソトキシン群を分離した。平衡化を 20%B で 7 分間行ったのち、10 分間で 20%B から 100%B にし、100%B を 15 分間保った。流量は 0.3 mL/min で行った。試料は 5 μL 注入した。

脂溶性貝毒ペクテノトキシン群およびアザスピロ酸群は陽イオンモードの LC/MS/MS による MRM で分析した。分析カラムとして Hypersil Gold C8 2.1 mm i.d. × 100 mm をカラムオープンにより 30°C に保ち用いた。移動相は 50 mM ギ酸および 2 mM ギ酸アンモニウムを含む (A) 水、(B) アセトニトリル：水 (95 : 5, v/v) の二相によるリニアグラジエント分析によって PTX 群・AZA 群を分離した。平衡化を 5%B で 7 分間行ったのち、10 分間で 5%B から 100%B にし、100%B を 15 分間保った。流量は 0.3 mL/min で行った。試料は 5 μL 注入した。

MRM 分析条件は EU の標準操作手順書「EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS. Version 5.」に従って装置を最適化して測定した。

3) 記憶喪失性貝毒

記憶喪失性貝毒ドモイ酸は EU の標準操作手順書「EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of domoic acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using UV detection」の条件を改変し、LC/PDA の 242 nm の吸収波長をモニターして分析した。カラムとして、L-column3 C18 2.1 i.d. × 100 mm をカラムオープンにより 25°C に保ち用いた。移動相として (A) 10 mM ギ酸アンモニウム、0.1% ギ酸を含む水、(B) アセトニトリルの二相によるリニアグラジエントによって分離した。平衡化を 5%B で 10

分間行い、20 分間で 5%B から 25%B にした。7 分間 25%B を保ち、3 分間で 25%B から 5%B にした。流量は 0.3 mL/min で行った。試料は 5 μL 注入した。

C. 結果

1) 麻痺性貝毒

麻痺性貝毒の国内規制値は 4 MU/g であり、これを超えている場合、出荷の自主規制となる。青森県陸奥湾の試料については、いずれの試料も比毒性情報から換算した毒力は規制値未満であった。具体的には、2019/11/27 (以下発送日で示す) の後潟漁協で 0.5 MU/g, 2019/12/11 の平内漁協で 0.1 MU/g, 2019/12/16 の外ヶ浜漁協で 0.1 MU/g, 同日の蓬田村漁協では <0.1 MU/g であった。また、平内漁協の 2020/1/15, 2020/2/10, 2020/2/18 の試料では、それぞれ 0.1 MU/g, 不検出, 不検出であった。実際のマウス毒性試験においては、2 MU/g 前後が検出限界であることから、いずれも、マウス毒性試験に供した場合には毒性が不検出となる毒量であった。

北海道根室海域のホタテガイ試料でも、換算した毒力はすべて規制値未満の毒量 (0.0 MU/g~0.2 MU/g) であり、マウス試験に供した場合にはすべて不検出となる毒量であった。

2) 下痢性貝毒およびペクテノトキシン

青森県平内漁協の試料における下痢性貝毒 (オカダ酸群) およびペクテノトキシン群の推移を図 1 に示す。2019 年 12 月 11 日の 8.0 ng OA eq./g が最も高く、その後経時的に減少した。ペクテノトキシン群は 2019 年 12 月 11 日および 2020 年 1 月 15 日のホタテガイ試料においては検出限界以下であったが、2020 年 2 月 10 日以降に採取した試料では検出され、2020 年 2 月 18 日の試料において 25.9 ng PTX_{1,2}/g まで増加した。

また、そのほかの試料では、後潟漁協のホタテガイで 22.4 ng OA eq./g、外ヶ浜漁協のホタテガイで 4.4 ng OA eq./g、蓬田村漁協のホタテガイで 7.1 ng OA eq./g のオカダ酸群が検出され、PTX 群はい

ずれの試料からも検出されなかった。したがって、OA 群および PTX 群を合わせた毒量においても、全ての試料で規制値の 160 ng OA eq./g よりも低い値であった。

北海道野付漁協の試料における下痢性貝毒（オカダ酸群）およびペクテノトキシン群の推移を図 2 に示すが、2019 年 12 月 5 日の 13.2 ng OA eq./g から経時的に減少した。ペクテノトキシン群は、2020 年 1 月 14 日の試料が最も高く、56.0 ng PTX1,2/g となり、OA 群および PTX 群を合わせた毒量は EU における規制値の約 1/3 の毒量であった。

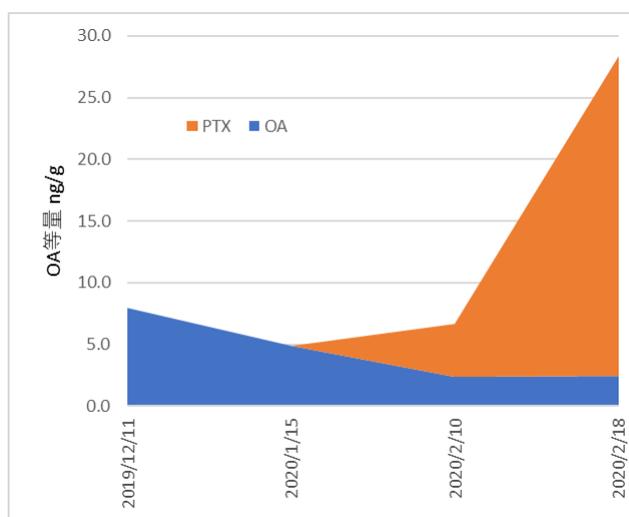


図 1. 青森県平内漁協のホタテガイにおける下痢性貝毒およびペクテノトキシン群含有量の推移

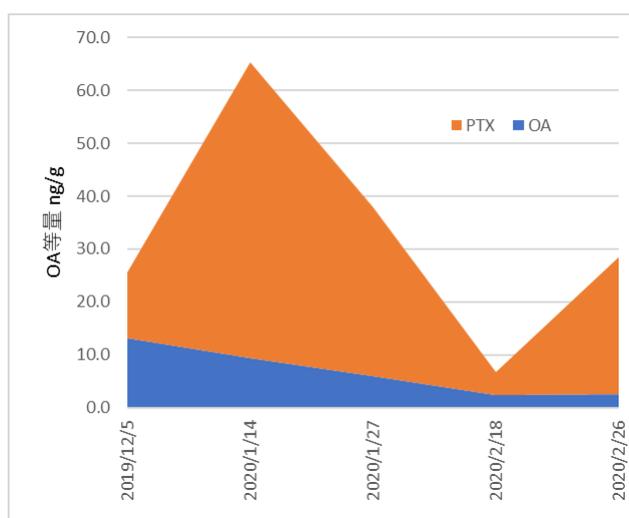


図 2. 北海道野付漁協のホタテガイにおける下痢性貝毒およびペクテノトキシン群含有量の推移

3) イエソトキシン

青森県平内漁協の試料におけるイエソトキシン群の推移を図 3 に示す。イエソトキシン群は 2019/12/11 の試料において 257.7 ng YTX eq./g が検出され、その後は経時的に減少する傾向が見られた。後潟、外ヶ浜、蓬田村漁協で採取したホタテガイの YTX はそれぞれ 205.0 ng eq./g、156.9 ng eq./g、186.3 ng eq./g であった。

北海道野付漁協の試料におけるイエソトキシン群の推移を図 4 に示す。イエソトキシン群は青森県の試料と比較して低濃度であったが、2020 年 1 月 27 日の試料以降においてわずかに増加する傾向が見られ、2020 年 2 月 26 日の試料では、81.3 ng YTX eq./g となった。以上のように、青森県陸奥湾および北海道根室海域の試料においてイエソトキシンは検出されたが、EU の規制値（イエソトキシン群；3,750 ng YTX eq./g）を超える毒量となる試料はなかった。

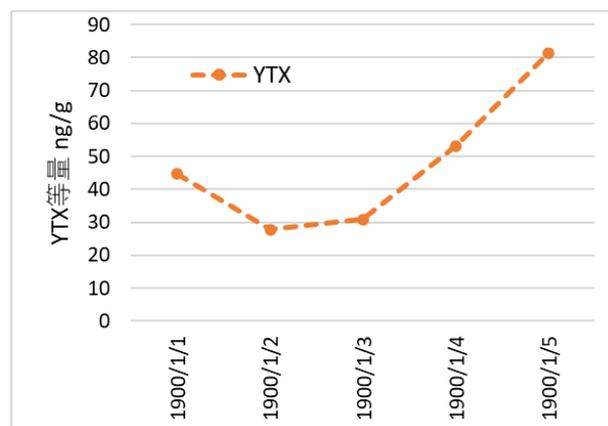


図 3. 北海道野付漁協のホタテガイにおけるイエソトキシン群含有量の推移

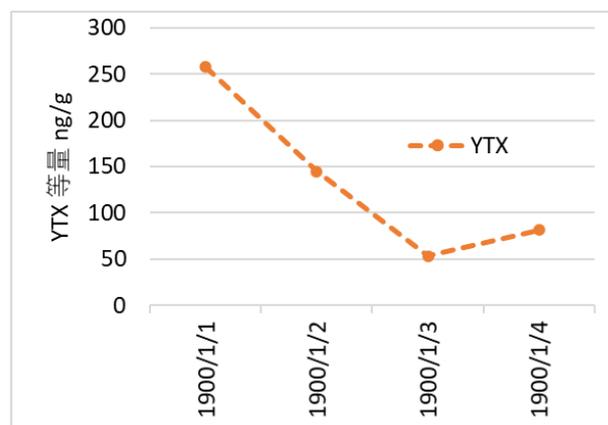


図4. 青森県平内漁協のホタテガイにおけるイェットキシン群含有量の推移

表2. 青森県海域で採取したホタテガイのイェットキシン群

採取場所	採取日	YTX (ng eq./g)
後潟	2019/11/28	205.0
外ヶ浜	2019/12/16	156.9
蓬田村	2019/12/16	186.3

4) アザスピロ酸

青森県陸奥湾西部海域で11月および12月に採集したホタテガイ試料において、蓬田村漁協の試料を除き、全ての試料においてトレースレベルの濃度でアザスピロ酸-2が検出された。アザスピロ酸-1当量に換算したホタテガイ可食部あたりの毒量は0.3-0.5 ng AZA1 eq./gであり、EUの設けている基準値(160 ng AZA1 eq./g)よりも極めて低い濃度であった。一方、北海道野付漁協の試料において、アザスピロ酸群はいずれも検出限界以下であった。

5) 記憶喪失性貝毒

青森県陸奥湾および北海道根室海域で採取したホタテガイ試料のドウモイ酸をLC/PDA分析により分析したが、すべて検出限界以下であった。

D. 考察

本課題において北海道根室海域で採取したホタテガイにおいても微量に麻痺性貝毒成分が検出された。過去に北海道が行ったホタテガイの貝毒モニタリングでも根室海峡海域において麻痺性貝毒によるホタテガイの毒化が報告されておりモニタリングは必要と思われる。また、青森県陸奥湾西部で採取したホタテガイの分析でも麻痺性貝毒が微量に検出された。検出された麻痺性貝毒は規制値を大きく下回る毒量であり、過去に青森県が行

ってきた貝毒モニタリングでも、ホタテガイが規制値を上回って毒化したことは無く、毒化原因藻類の検出も報告されていない。以上より、陸奥湾においては麻痺性貝毒による毒化リスクは低いと思われるが、毒成分が微量に検出されたことから、毒化原因藻類の出現動態についてはモニタリングが必要と思われる。

下痢性貝毒(オカダ酸群)は北海道根室海域および青森県陸奥湾西部の試料とともに少量検出された。北海道や東北地方の沿岸域は下痢性貝毒(オカダ酸群)の産生能が高い有毒渦鞭毛藻である*Dinophysis fortii*の分布域であり(Toxins, 2018, 10(11), 457)、下痢性貝毒による毒化はこれまでも二枚貝のリスクの一つと認識されておりモニタリングが必要である。一般的に本種は春季から秋季に多く出現するとされ、本課題で試料採取を行った冬季は出現頻度が低い時期である。そのため微量に検出されたオカダ酸群は2019年度の初夏に毒化した際のオカダ酸群が残存して検出された可能性も考えられる。

同じく*Dinophysis*属の有毒渦鞭毛藻*Dinophysis acuminata*が産生するペクテノトキシン群は、北海道根室海域の試料では、2020年1月14日のホタテガイ試料において濃度が最も高かった(図3)。北海道中央水産試験場より公表されている貝毒プランクトンデータでは、近隣の標準定点で*D. acuminata*が40 cells/L(水深15m)の密度で出現しており、プランクトンの出現状況とも一致していた。

2020年1月14日の北海道根室海域におけるホタテガイ試料のOA群およびPTX群を合わせた毒量は、EUにおける基準値の1/3程度であった。また青森県平内漁協の試料においても2020年2月10日および2月18日のホタテガイ試料にペクテノトキシン-1およびペクテノトキシン-2が検出されたが、OA群およびPTX群を合わせた毒量は、EUの基準値を大きく下回る値であった。なお、ホタテガイは*Dinophysis*属が産生したペクテノトキシン-2をペクテノトキシン-1へ、さらにペクテノトキシン-3、ペクテノトキシン-6へと酸化的に代

謝することが知られている。今回分析したホタテガイでは、ペクテノトキシン-1 およびペクテノトキシン-2 が検出されていることから、この時期にも毒化原因藻類の出現があり、新たなペクテノトキシン-2 の供給があった可能性が考えられた。青森県産業技術センター水産総合研究所が公表している貝毒プランクトンデータでは、2020年3月19日に *D. acuminata* を主とする *Dinophysis* 属の出現が報告されているが、ホタテガイの分析結果よりペクテノトキシン-2 が検出されたことから、2月にも本藻の出現があった可能性が示唆された。以上のように、北海道根室海域、青森県陸奥湾の双方の試料において、ペクテノトキシンおよびイエツトキシンが検出され、一部には原因藻類との関係も認められたことから、原因藻類の出現とホタテガイ毒量の間を把握することが必要と考えられた。

アザスピロ酸については、青森県陸奥湾で採取した試料から検出されたが、極めて微量であった。近年、日本近海においてアザスピロ酸を生産する微細藻類の出現が報告されているが、原因藻類が高密度で出現した例は無い。また、過去の調査においても、国内の二枚貝から今回と同様に微量のアザスピロ酸が検出されることはあったが、EUの基準値を超えるような毒力が報告されたことはない。そのため、現時点でアザスピロ酸によるホタテガイの毒化リスクは低いと思われるが、毒化原因藻類の出現動向については情報収集が必要である。

ドウモイ酸については、本課題で採取した北海道および青森県の試料ではすべて不検出であった。日本国内では EU 基準値を超えるドウモイ酸による二枚貝の毒化はこれまでに報告はなく、毒化リスクは低いと考えられた。

E. 結論

青森県陸奥湾西部海域および、北海道根室海域で採捕されたホタテガイについて、各種貝毒成分を分析し、国内やEUにおける規制値との関係を検討した。下痢性貝毒（オカダ酸群）については、

ともにモニタリングが必要と考えられるが、麻痺性貝毒については、過去の報告などから根室海域についてモニタリングが必要と考えられた。

青森県陸奥湾の麻痺性貝毒、ならびに両海域における脂溶性貝毒およびドウモイ酸は、いずれも国内およびEUの規制値を大きく下回る毒量であった。また、これらの毒成分は、過去の調査においても、規制値を上回る毒量が二枚貝から検出されたことがなく、毒化リスクは低いと考えられた。一方で、各毒成分を生産する原因藻類は、国内でも報告されている種があり、原因藻類の出現動向やそれに対する二枚貝の毒化レベルなどについて、引き続き基礎的な知見を集積することが望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし