

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）

（分担）研究報告書

自然毒等のリスク管理のための研究

—国際的に妥当性が評価された LC/MS/MS 法による国内貝毒検査法の確立—

研究分担者	渡邊龍一	水産技術研究所	主任研究員
	小澤真由	水産技術研究所	研究員
	内田 肇	水産技術研究所	研究員
	松嶋良次	水産技術研究所	安全管理グループ長
	鈴木敏之	水産技術研究所	環境・応用部門長

要旨： 国際的に妥当性が評価された、親水性相互作用カラムを用いた液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法（HILIC-MS/MS）を用いて、産業上重要な水産物であるホタテガイを分析し、マウスを用いた動物試験法（MBA）との相関性（370 検体）を調べた。さらに、その他の二枚貝（9 種, 178 検体：別プロ研で実施）についても調べた。その結果、MBA で測定した毒量に対し、HILIC-MS/MS の結果は全二枚貝種を用いた場合、半分程度（近似曲線の傾き：0.64, 決定係数：0.85）の毒力となった。その傾向は高毒力の試料ほど顕著であった。ただし、ホタテガイを除く二枚貝種で相関を調べると、MBA の毒量と比較的よく一致した（近似曲線の傾き：0.84, 決定係数：0.89）。ホタテガイ毒力における両手法の乖離要因として、二枚貝代謝物 M-toxins の影響（毒性は未解明）が考えられた。分析に必要な標準品は昨年と同様に 13 成分（C1/2, GTX1-6, dcGTX2/3, neoSTX, dcSTX, STX）は必ず必要であることが明らかになった。特定物質であるサキシトキシン（STX）を分析する際に標準品が必要であるか否かを検証するため、その組成比、毒力比を調べた。毒組成では 2.4-64.9 % の範囲で、毒力組成では 3.6-83.9 % を占めており、STX 標準品を用いて正確に定量する必要があることが明らかになった。また、ホタテガイ中腸腺からテトロドトキシン（TTX）を検出したが、その毒力は最大でも可食部で 1 MU/g 未満と極めて低いものであった。既報ではホタテガイのほかにアカザラガイが比較的高含量の TTX（～4.0 MU/g）を有することが報告されているが、本事業で調べた結果、最大でも 1 MU/g 付近であることが明らかになった。

A. 研究目的

ホタテガイをはじめとする二枚貝は、生息海域に発生する、麻痺性貝毒を生産する有毒プランクトンを摂取することで毒化する。日本では、生産海域に発生する有毒プランクトンをモニタリング

しており、その発生を確認し、細胞密度などから監視強化に移行するなどの措置をとっている。わが国の麻痺性貝毒の検査は、公定法であるマウス毒性試験が用いられており、二枚貝に含まれる麻痺性貝毒の規制値は、4 MU/g（0.8 mg

STX·2HCl eq./kg 相当) と定められている。近年、二枚貝に含まれる麻痺性貝毒を正確に定量できる手法が開発され、国際的に妥当性が確認された分析法(親水性相互作用カラムを用いた液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法: HILIC-MS/MS) がマウス毒性試験に代わる検査法として注目されている。本研究班の課題担当グループもこの妥当性確認試験に参画した。また欧州連合(EU)では2019年1月から動物試験を廃止し、機器分析法に移行しており、2020年10月にEU向け二枚貝輸出において機器分析を使用するよう通知(SPS 通報)がなされ、2021年10月から施行されている。このように、国際的に機器分析への移行が主流になりつつある。そこで本事業では、機器分析法を国内で普及させていくために不可欠な要因を精査した。

検査対象とすべき成分として、50成分以上ある麻痺性貝毒類縁体のうち、Oshimaにより主要成分とされている15標準物質を用いた分析例では、マウス毒力と正の高い相関が報告されている。

特定物質に指定されているサキシトキシシン(STX)の標準物質については、ホタテガイなどに含まれるSTXの毒組成と毒力に占める割合を明らかにすることにより、標準物質として使用する必要性について検証することが求められている。

フグ毒として知られるテトロドトキシシン(TTX)は、近年、二枚貝から検出される事例が西欧を中心に報告されている。EFSAにおけるリスク管理では、

食品中のTTXの許容量として、44 µg/kgを基準値として設定している。一方、二枚貝の麻痺性貝毒の基準値は0.8 mg STX·2HCl eq./kgと定められており、この基準値にTTXを含めるか否かについて検討する必要がある。日本では、フグ毒TTXを扱う際には、10 MU/g(2.2 mg/kg相当)を規制値として定めている。一方で、国内産ホタテガイやアカザラガイからTTXが検出されており、後者の場合は最大で9 mg/kg-中腸腺(可食部換算で約4 MU/g)にも達しており、その毒力は無視できない。現在のマウス毒性試験では塩酸抽出によってある程度TTXも抽出され、毒性評価がなされている状況と考えられる。二枚貝中のTTXの存在が明らかになっている現状において、麻痺性貝毒の機器分析検査の際に、二枚貝中のTTXをどのように扱うかについて検討する必要がある。

以上の背景から、北海道・東北地方のホタテガイを主として、その他二枚貝を試料として、機器分析法(HILIC-MS/MS)とマウス毒性試験における毒力の相関を調べることを目的とする。そこで相関性が低い場合、その原因を精査する。また、特定物質であるSTXの毒力および毒組成それぞれに占める割合を求め、標準物質が必要か否かを明らかにする。さらに、ホタテガイに含まれるTTX含量を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ホタテガイの主要な生産海域である北海道及び東北地方の本二枚貝について、マウス毒性試験(MBA)とHILIC-

MS/MS による分析を行い、両者の相関性を明らかにする。比較のため、別事業で行っているホタテガイ以外の二枚貝の分析データも合わせて検討する。各成分の総毒力に対する寄与度から国内で入手可能な標準品について必要性を検証する。また、特定物質であるサキシトキシン (STX) については、二枚貝毒組成に占める割合および毒力に占める割合をそれぞれ求め、STX 標準品が必要か否かについて検証する。さらには、ホタテガイに含まれるテトロドトキシン (TTX) について、その含量から規制対象とすべきか検証する。

MBA と HILIC-MS/MS に供するホタテガイホモジネートは、日本食品検査でホモジネートを調製後、一部を MBA に使用し、一部を HILIC-MS/MS に使用した。試料は、ホタテガイ可食部全体あるいは中腸腺とした。その他二枚貝についても同様とした。HILIC-MS/MS 分析に供するホタテガイを含めた二枚貝試料は、*J. Chromatogr. A* 1387 (2015) p1-12 に従い、抽出・前処理を行った。HILIC-MS/MS 分析は、先述の論文を参考に、水産技術研究所所有の質量分析装置を最適化した方法で行った。分析に用いた標準物質は、カナダの NRC 製認証標準物質 14 成分 (C1/2, GTX1-6, dcGTX2/3, NEO, dcNEO, dcSTX, TTX) を用いた。dcGTX1/4 はニュージーランドのコースロン研究所から提供されたものを用いた。それらは段階的希釈列を作製し、5-7 点のポイントを使い検量線を作成した。STX は当所が所有する標準液を用いた。C3/4 は選択的反応モニタリング

(SRM) トランジションを複数チャンネル設定し、確認検出を行った。HILIC-MS/MS で分析すると試料に含まれる麻痺性貝毒成分の毒濃度 (nmol/g) が得られるため、それに Oshima (1995) によって算出されたモル毒力 (MU/ μ mol) を乗じることで、マウス毒力 (MU/g) に換算した。また、MBA に供するホタテガイ試料は、食品衛生検査指針に記載されている麻痺性貝毒検査法 (公定法) に従って調製した。

*Oshima, *J. AOAC int.* (1995) 78, p528.

C. 研究結果と考察

北海道・東北地方のホタテガイを主とした二枚貝 (全 548 検体) を分析した。必要に応じてデータの一部を北海道のみ、あるいは東北地方のみとして、報告する。

2022 年度は北海道・東北地方のホタテガイ計 370 検体を分析した。その他別事業で実施した二枚貝類 (アカガイ、アカザラガイ (中腸腺)、ムラサキイガイ、マガキ、マボヤ、トゲクリガニ、イワガキ、アサリ、エゾイシカゲガイの全 9 種 178 検体) も同様に、MBA および HILIC-MS/MS で分析した。MBA による毒力は、2.0 MU/g -625 MU/g までの範囲であった。それらについて得られた MBA 毒力と HILIC-MS/MS から換算したマウス毒力との相関を調べた。その結果、近似曲線の傾きは 0.64 となり、MBA の方が HILIC-MS/MS の分析値よりも約 2 倍近く高いマウス毒力を示した。決定係数は 0.85 であった。ホタテガイのみの近似曲線を作成すると、傾きが 0.61 (決定係数:

0.86) となり、二枚貝全体と相違はないが、ホタテガイを除く二枚貝類で近似曲線を作成すると、傾きが 0.84(決定係数: 0.89) となり、MBA の結果とほぼ一致した。このことから、ホタテガイのみが、代謝物 M-toxins の影響を大きく受けていることが明らかになった。その他二枚貝ではそれほど M-toxins の影響はないと思われる。

北海道や東北地方のホタテガイでは可食部を用いた場合は 4 MU/g を規制値、2.0 MU/g を監視強化として扱っている事例があるが、可食部に占める中腸腺の割合は 10% 程度のため、中腸腺を使用した分析では 20 MU/g で監視強化、40 MU/g で規制値付近となる。そこで、MBA と HILIC-MS/MS の毒力を縦軸に採り、サンプル番号を横軸にプロットした図を作成し、規制値との関連を調べた。

MBA と HILIC-MS/MS がともに 4 MU/g 未満の試料数は、70 試料(全体の 13%)であった。また、MBA と HILIC-MS/MS がともに 4 MU/g 以上の試料数は、374 試料(全体の 68%)であった。これによって、HILIC-MS/MS では、81% が正確に規制値で判断できることが判明した。残る 19% のうち、9% (50 試料) は疑陽性(MBA で 4 MU/g 未満かつ HILIC-MS/MS で 4 MU/g 以上)であり、10% (54 試料) が疑陰性(MBA で 4 MU/g 以上かつ HILIC-MS/MS で 4 MU/g 未満)と判断した。これらの結果より、一定数の疑陰性が生じることが明らかになった。ただし、この疑陰性も MBA で 12 MU/g 以上の試料はほぼすべてが HILIC-MS/MS で規制値以上と判断

し、例外は 1 試料のみであった。

今年度は、同一地点の試料(ホタテガイ中腸腺と可食部)を経時的に追跡したデータも取得した。ホタテガイ中腸腺を分析したところ、ホタテガイが高毒化する初期ごろまでは、MBA と HILIC-MS/MS の毒力はよく一致していた。毒化中期ごろから MBA と HILIC-MS/MS の毒力と乖離が生じ、毒化後期になるとその乖離も小さくなり、良く一致する傾向が見られた。中腸腺を使用した貝毒監視は MBA の感度不足を補うために使用されてきたが、HILIC-MS/MS による貝毒監視は高感度検出が可能なので、可食部相当で実施するのが良いと思われる。

以上より、MBA と HILIC-MS/MS の分析結果が乖離している理由として、前年度と同様に、二枚貝代謝物 M-toxins の影響が推測された。MBA 毒力に対して、M-toxins の関与が相当量認められる場合、これら成分についても機器分析の際には認証標準物質が必要になる。

特定物質である STX を分析に使用する場合、経済産業省への使用許可申請が必要となる。そこで、STX を分析用標準品として扱う必要があるかどうか、ホタテガイにおける毒組成と毒力に占める割合を調べ、検証することとした。2022 年度の北海道と東北地方の二枚貝を分析した結果では、毒組成に占める STX の割合は 2.4% - 64.9% (平均: 11.8%) の範囲であり、毒力に占める STX の割合は 3.6% - 83.9% (平均: 15.6%) であった。このことから、STX の占める割合が高い試料も存在するため、他の毒に

よる代替検量線を使用した定量測定は不確実といえる。従って、STX の標準物質を使い、正確に定量する必要があることが明らかになった。この点に関しては、STX の鏡像異性体が、天然型 STX の代替として利用できることを実証しており、STX 鏡像異性体の普及が望まれる。

ホタテガイに含まれる TTX 量を調べた結果、可食部試料からは TTX が検出されなかったが、中腸腺試料からは微量ながら TTX を検出した。マウス単位に換算したところ、最大でも中腸腺 1g 当たり、1 MU 未満であった。このことから、北海道・東北地方のホタテガイについては TTX 量の年変動や季節変動も考えられるが、本結果においては TTX の寄与率は低いと言える。ただし、アカザラガイを別事業で測定し、TTX 量を調べたところ、約 1.2 MU/g-中腸腺（最大値）で検出した。既報のような高毒力の試料は見つからなかったが、ホタテガイと比較して、同程度かそれ以上の TTX 蓄積能があること推定される。

D. 結論

北海道・東北地方のホタテガイおよびその他二枚貝類（計 548 検体）を HILIC-MS/MS で分析し、MBA によって求めた毒力と相関性を調べた。その結果、HILIC-MS/MS で求めた換算毒力は MBA で求めた毒力の約半分程度であり、昨年度と同様の傾向を認めた。しかし、今年度はその他二枚貝類も測定し、それらは MBA と比較的よい一致を示したことから、ホタテガイ特有の問題であることが明らかになった。両手法(MBA と

HILIC-MS/MS) の検査結果が乖離した要因として、二枚貝代謝物である M-toxins の影響が考えられた。M-toxins の毒性等価係数 (TEF) は低いと推定されているが、M-toxins の毒力の影響についても検証する必要がある。

特定物質である STX の取り扱いについては、それが毒組成や毒力組成に占める割合が高い (~85%) ため、代替検量線を用いるよりも STX そのものを用いて定量した方が良いと考えられる。この点に関しては、当機構で STX 鏡像異性体が天然型 STX と同様に使用可能であることを立証しており、STX 鏡像異性体の普及が望まれる。

最後に、北海道・東北地方のホタテガイに含まれる TTX 含量は非常に少なく、1 MU/g 未満であることから、その全体の毒力に占める割合は軽微なものと考えられる。しかし、貝種・地域によっては著量の TTX を含む場合もあるので、貝種・地域の違いを調べることは今後の検討課題である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

令和 4 年度「地域保健総合推進事業」地方衛生研究所地域ブロック専門家会議（理化学部門）、麻痺性貝毒の機器分析法および簡易分析キットの概要、令和 4 年 10 月 14 日、青森県観光物産館アスパム 9 階津軽、約 20 名、地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部衛生科学研究部会部会長、概要：二枚貝が

毒化する仕組みから、現在の貝毒監視体制に触れ、AOAC 法となっているプレカラム・ポストカラム蛍光化法並びに質量分析を用いた方法、簡易分析キットについて概要を説明した。

G. 学会発表
なし

H. 知的財産の出願・登録状況
なし