

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

食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
－国際動向を踏まえた麻痺性貝毒の機器分析法の確立－

研究分担者	沼野 聡	水産技術研究所	任期付研究員
	渡邊龍一	水産技術研究所	安全管理グループ長
	内田 肇	水産技術研究所	主任研究員
	小澤 眞由	水産技術研究所	研究員
	松嶋良次	水産技術研究所	主幹研究員
	鈴木敏之	北里大学 海洋生命科学部	教授

要旨：麻痺性貝毒は、サキシトキシンやゴニオトキシン、Cトキシンなど約70種類の類縁体の総称である。近年、LC-MS/MS装置の性能向上に伴い、国内外で毒化した二枚貝に代謝物（M-toxin類）を含有していることが報告されている。現在の公定法であるマウス毒性試験法から機器分析法への移行に際し、まだ十分解明されていないM-toxin類の構造や毒性、標準品の確保が重要となる。

今年度は、二枚貝からのM-toxin類の精製技術の確立を行い、6成分（M1、M3～5-HA、M9、M10）を単離した。一部の成分について、定量NMRによる値付けを行うことで標準品とし、毒化二枚貝中のM-toxin類の含有量を調べた。その結果、二枚貝の採取時期によっては、全毒成分における組成（モル比）の50%前後がM-toxin類であることを確認した。

次年度以降の精製用原料として、国内沿岸で採取された二枚貝を探索したところ、西日本産のヒオウギガイにC3&4およびM7&M9を含有していることを確認した。これまでに国内沿岸でC3&4を含む毒化二枚貝の報告は少ないが、本研究ではその代謝物の存在を初めて確認した。

今後、確立した精製法によるM-toxin類の単離を継続し、構造確認や毒性評価などを行うことで、機器分析法導入時に必要となるM-toxin類を選定することが出来る見込みである。

A. 研究目的

麻痺性貝毒（Paralytic Shellfish toxin, 以下 PST）は、サキシトキシン（STX）を基本骨格として、Cトキシンやゴニオトキシン（GTX）など約70種類が知られる化合物群である。いずれの化合物も電位依存性ナトリウムチャンネルを特異

的に阻害することが知られている。その作用は、フグ毒テトロドトキシン（TTX, tetrodotoxin）に類似しており、高い毒力を持つ。

PSTは、海洋において*Alexandrium*属などの有毒プランクトンが産生する。よって、同海域に生息、養殖されている二

枚貝が有毒プランクトンを摂取することで毒化する。

我が国の公定法は、マウス毒性試験法 (Mouse Bioassay, MBA) が採用されており、規制値が 4 MU/g に定められている。MBA に使用するマウスは、体重 19 ~ 21g の ddY 系マウス (性別: オス) と指定されている。しかし、実験動物の維持や操作が煩雑であることや、動物愛護の点から代替法の検討がなされている。これまでに、ELISA やイムノクロマト法による検出法、機器分析法の開発がなされてきた。特に、HPLC や LC-MS/MS を用いた機器分析法は、国際的にも注目されている方法である。欧州連合 (EU) 域では、2019 年より蛍光 HPLC による機器分析法を公定法として採用している。また、LC-MS/MS を用いた分析法は、親水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC) のカラムを用いるものであり、麻痺性貝毒およびフグ毒分析で注目されている。同手法は、A.D. Turner らによって単一試験室での妥当性確認がなされ、のちに本研究所も含む諸外国の主要研究機関でのコラボスタディとして妥当性評価試験が行われた。また、研究分担者が行った、国内産ホタテガイを用いた妥当性評価試験により、良好な回収率を得ている (沼野ら、食品衛生学雑誌 2024)。

国際的動向としては、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 (Sanitary and phytosanitary measures, SPS 通報) がなされており、2021 年 10 月から施行され

ている。よって、麻痺性貝毒の検査方法は、MBA から機器分析法への移行が主流になりつつある状況にある。

しかし、我が国で LC-MS/MS による PST 分析法を公定法として導入するには、大きな課題が 2 つある。1 つ目の課題は、STX が化学兵器禁止法で特定物質に指定されているため、標準品の入手などに経済産業省の許可が必要なことである。この問題を解決すべく、近年東京農工大学の長澤教授らによって STX 鏡像異性体の合成技術が確立された。現在、本研究所が中心となって有用性の検証を進めているところである。

2 つ目の課題は、麻痺性貝毒の代謝物 M-toxin 類の存在である。この化合物は、LC-MS/MS を用いた二枚貝試料の分析で発見されたものであり、Metabolite の頭文字より M-toxin 類と呼ばれている。Quilliam らによって、C1&C2 由来の M1、M3、M5、C3&4 由来の M7、M9、M11、GTX2&3 由来の M2、M4、GTX1&4 由来の M8、M10、M12 が代謝物として存在すると提唱され、M1~M4 までは Dell'Aversano らによって構造決定されている。また、沼野・山下らにより、ヘミアミナル構造を有する M-toxin を構造決定し、M5-HA および M6-HA と命名している。それ以外の成分 (M5~12) については、詳細な構造情報が不明である。加えて、M-toxin 類は毒性が未だ不明である。さらに認証標準品が発売されていないため、二枚貝中の蓄積濃度を LC-MS/MS で定量できず、毒力の算出が出来ない状況にある。令和 4 年度の本事業において、マウス毒性試験による

毒力と LC-MS/MS から得られた毒値 (測定対象成分：C1, C2, GTX1~6, STX, TTX) から換算した毒力とが、一部乖離する結果となった。このことより、試料中に含まれる M-toxin 類が、毒力にある程度寄与している可能性が示唆される。LC-MS/MS で M-toxin 類を未測定とした場合、毒化試料中の毒力を過小評価する可能性がある。よって、M-toxin 類の構造確認や毒性評価、二枚貝中における定性および定量が重要となる。

以上の背景から、本事業では、単離または化学合成により調製した M-toxin 類について、毒性評価を行うとともに、LC/MS/MS 法の前処理条件などを改良し、M-toxin 類も含めた分析法を確立する。今年度は、M-toxin 類の単離技術の確立の検討を行った。また、M-toxin 類の原料を確保するため、国内沿岸で毒化した二枚貝(ホタテガイ、アカザラガイ、ヒオウギガイ)の M-toxin 類含有について調査した。

B. 研究方法

(1) M-toxin 類の単離技術の確立

Numano S., Yotsu-Yamashita M. *et al.*, *Chemosphere*, 2021 を基にし、一部改良した方法とした。検討用のサンプルは、東日本で毒化したホタテガイと西日本産ヒオウギガイとした。まず、二枚貝の希塩酸抽出液を活性炭に通した後、oasis HLB や限外ろ過によって粗抽出液を得た。次に、陽イオン性交換樹脂およびゲル濾過のカラムに通し、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) である TSKgel amide80 で精製した。

(2) 国内沿岸で毒化した二枚貝中の M-toxin 類探索

日本沿岸におけるプランクトンの発生状況や出荷規制状況を確認し、研究用として毒化した二枚貝を入手した。前年度までの本事業において、高毒化したホタテガイの部位別 (貝柱、中腸腺、腎臓、生殖腺、鰓) 分析を行い、M-toxin 類の主な蓄積部位が中腸腺と腎臓であることを明らかにしている。そこで、本研究では、東日本よりホタテガイ、アカザラガイ、西日本よりヒオウギガイを入手し、中腸腺と腎臓の分析を行った。各二枚貝について、公定法の希塩酸抽出もしくは既報 (沼野ら, *食品衛生学雑誌*, 2024) に従って 1%酢酸抽出を行い、ENVI-Carb で精製したものを LC-MS/MS で分析した。探索の対象は、M1~M4、M5-HA、M6-HA、M7~10 とした。M-toxin 類は標準品が発売されていないため、測定して得られたクロマトグラムと既報のクロマトグラムとを比較することにより、化合物を推定した。

C. 研究結果と考察

(1) M-toxin 類の単離技術の確立

方法 B(1) に従って、ホタテガイより精製を行ったところ、M1、M3、M5-HA が単離出来た。また、ヒオウギガイを同手法で精製したところ、同様に M1、M3、M5-HA が単離出来た。加えて、C3&C4 由来の推定 M9 を単離出来ることを確認した。一方で、TSKgel-amide80 では M2 と M6-HA、M4 と M10 の溶出がそれぞれほぼ同時であり、単離が不可能で

あった。そこで、TSKgel amide80 で溶出した M4 および M10 画分について、別の HILIC カラムに通すことで、それぞれが単離出来ることを確認した。M2 や M6-HA の単離法は今後検討が必要であるが、既に構造確認がなされていることや、当事業で長澤らによって合成される予定であるため優先度が低いと考えた。今年度精製した M1、M3、M4、M10 については、収量が少なかったが定量 NMR 法による値付けを行った。

(2) 国内沿岸で毒化した二枚貝中の M-toxin 類の探索

東日本で毒化したホタテガイ、アカザラガイには、主に M1~4、M5-HA、M6-HA、M8、M10 が含有していた。これらの貝種において、GTX2&3、GTX1&4 が高濃度に蓄積しているため、その代謝物である M4 や M8、M10 が高感度で検出されたものと考えられた。また、採取日によって代謝物群の組成に差があり、変換や貝体外への排出が起きたものと考えた。定量 NMR 法で値付けした M-toxin 類を標準として中腸腺中の定量を行ったところ、採取日によっては全毒成分における組成（モル比）の 50%前後が M-toxin 類であることを確認した。

西日本で毒化したヒオウギガイには、主に M1~3、M5-HA が含有していた。加えて、C3&4 由来の M7&9 が含有していることを確認した (Fig.1)。M9 については、MS/MS フラグメント解析により、既報で M9 と推定された化合物と同一のものであることが分かった。国内沿岸における C3&4 に毒化した二枚貝の

報告は少なく、M7&9 の検出例は本研究が初めてである。

東日本のホタテガイやアカザラガイと、西日本のヒオウギガイで蓄積していた M-toxin 類が異なるが、これは毒化原因となった有毒プランクトンの種類に起因すると考えられる。プランクトンの発生状況を把握し、同地域で毒化した二枚貝を入手することで、有用な精製の原料を確保できるものと考えた。

D. 結論

令和 6 年度の研究では、M-toxin 類の単離技術を確立した。また国内沿岸で毒化した二枚貝における M-toxin 類を探索し、貝種による蓄積の差などを確認した。今後、当事業で単離もしくは合成した M-toxin 類を用いて毒性評価を行うことで、機器分析法で標準品が必要な化合物を選定することが出来る。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

沼野 聡、渡邊龍一、小澤眞由、内田肇、松嶋良次、鈴木敏之、麻痺性貝毒の機器分析法導入に向けた妥当性評価試験および代謝物 (M-toxins) 研究について、漁場環境保全関係研究開発水深会議 赤潮貝毒部会 東日本貝毒分科会 (2024、仙台)

沼野 聡、渡邊龍一、小澤眞由、内田 肇、松嶋良次、鈴木敏之、ホタテガイ中の麻痺性貝毒およびテトロドトキシンを対

象とした液体クロマトグラフィータンデム型質量分析法の妥当性評価、食品衛生学雑誌 Vol.65、No.5、129-135

H. 知的財産の出願・登録状況
なし

土方悠希、長谷川晶子、沼野聡、渡邊龍一、小澤眞由、内田肇、松嶋良次、鈴木敏之、安井善宏、愛知県産アサリにおける M-toxins の蓄積時期と PSTs 成分との関連性、第 61 回全国衛生化学技術協議会年会 (2024、大阪)

G. 学会発表

沼野 聡、渡邊龍一、内田 肇、小澤眞由、松嶋良次、鈴木敏之、麻痺性貝毒ゴニオトキシン類の代謝物 (M-toxins) に関する検討、第 120 回日本食品衛生学会 学術講演会 (2024、愛知)

沼野 聡、渡邊龍一、内田 肇、小澤眞由、松嶋良次、鈴木敏之、LC-MS/MS を用いた麻痺性貝毒検査法の妥当性確認、第 120 回日本食品衛生学会 学術講演会 (2024、愛知)

沼野 聡、渡邊龍一、内田 肇、小澤眞由、松嶋良次、鈴木敏之、ヒオウギガイとアカザガイにおける麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin 類) の蓄積、令和 7 年度 日本水産学会 春季大会 (2025、神奈川)

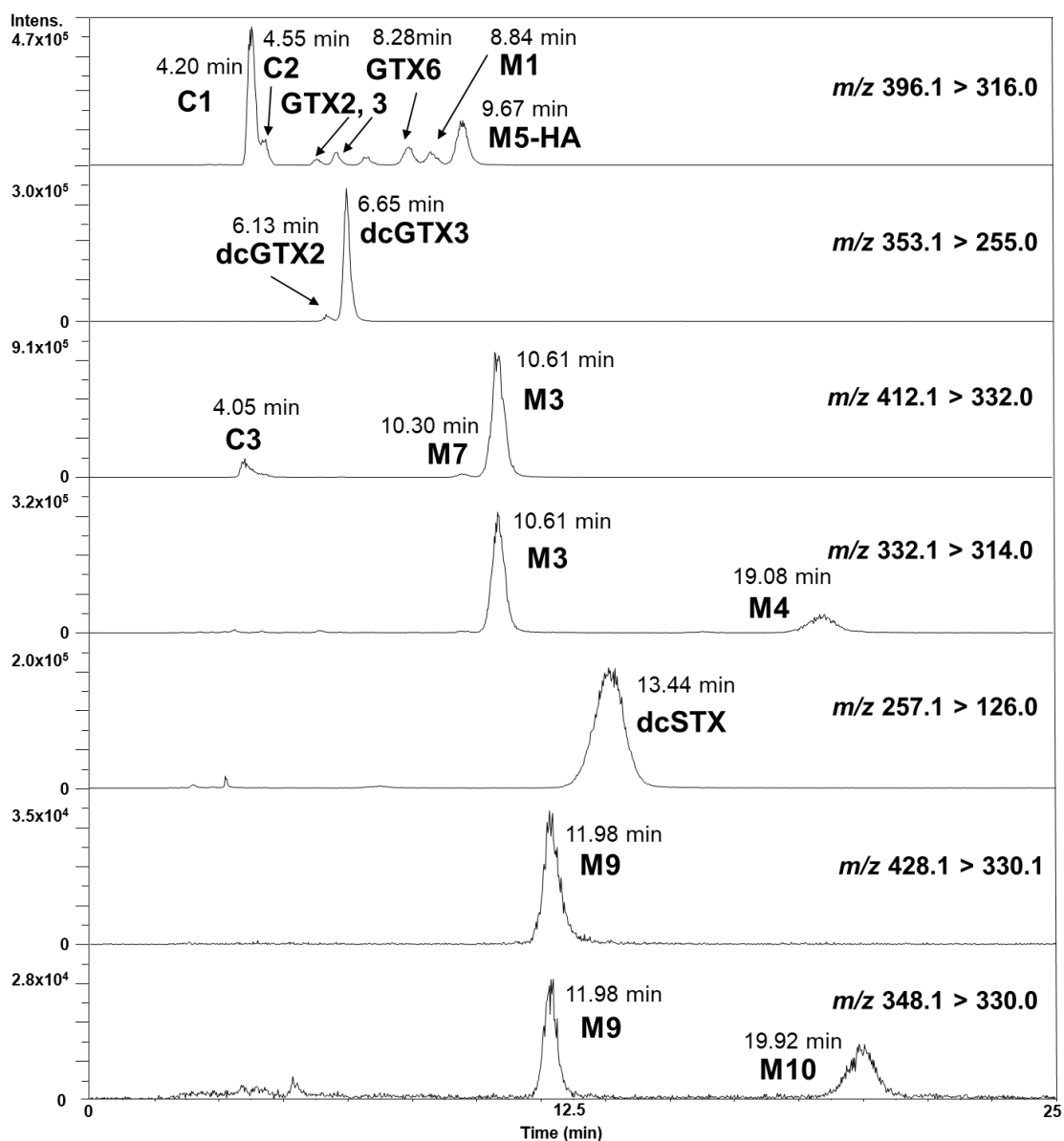


Fig.1 西日本産ヒオウギガイに含まれる PSTs のクロマトグラム

<分析条件>

カラム：TSKgel-amide80 (2.0 mm I.D.×15 cm, 5 μm、東ソー)

移動相：2 mM HCOONH₄, 60% MeCN, 0.0125% HCOOH

流速：0.2 mL/min, isocratic