

厚生労働科学研究費補助金（食品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－

～ホタテガイの TTX による毒化状況とその毒化原因生物の解明～

研究分担者	足立真佐雄	高知大学	教授
	渡邊龍一	水産技術研究所	安全管理グループ長
	沼野聡	水産技術研究所	安全管理グループ 任期付研究員
	松嶋良次	水産技術研究所	安全管理グループ 主幹研究員
	内田肇	水産技術研究所	安全管理グループ 主任研究員
	小澤真由	水産技術研究所	安全管理グループ 研究員

要旨：近年、本邦を含む世界各国の沿岸域において、二枚貝からフグ毒（TTX）が相次いで検出されている。二枚貝の毒化原因生物に関して、オオツノヒラムシやアカハナヒモムシの関与が示唆されているが、二枚貝の TTX による毒化機構の全容は明らかになっていない。本研究では、まず北海道噴火湾にて養殖されているホタテガイを定期的に採捕し、その中腸腺に含まれる麻痺性貝毒とテトロドトキシンの季節変動を調べた結果、両者に相関はなく、本海域には麻痺性貝毒産生生物とは異なる TTX 産生生物が存在することを示唆するデータを得た。また、TTX による二枚貝の毒化原因生物の解明を目指して、その探索に資するメタバーコーディングによる餌生物解明に先立ち、二枚貝由来の rDNA の PCR 増幅に有用なペプチド核酸（PNA clamp）を設計し、その増幅抑制効果を検証した。その結果、設計した PNA は、二枚貝の中でもとりわけホタテガイの rDNA の PCR 増幅を高効率で抑制した。本 PNA は、ホタテガイの餌生物の解明、さらにはその毒化原因生物の解明に有用と考えられる。

## A. 研究目的

フグ毒として知られているテトロドトキシン (TTX) は、魚類、頭足類、腹足類、甲殻類、扁平動物、紐形動物、細菌など様々な分類学上の生物が保有することが報告されている強力な神経毒である。これまでの研究により、TTX は細菌によって生合成され、食物連鎖を通じてフグなどの高次捕食者に蓄積されると考えられてきたが、海洋生物の TTX による毒化機構の詳細は明らかになっていない。この様な状況の下、近年ヨーロッパをはじめとする世界各国において、マガキやイガイなどの養殖二枚貝から TTX が相次いで検出されている。本邦沿岸域においては、主にアカザラガイやホタテガイなどのイタヤガイ科の二枚貝から TTX が検出されており、北海道噴火湾の二枚貝の垂下養殖場では、2020 年以降夏～秋にかけてホタテガイが TTX により毒化する傾向が認められている。

二枚貝の毒化原因生物について、これらは海水中の微粒子を海水ごと吸引する濾過摂食者であることから、浮遊性の微生物の中には二枚貝を毒化させる生物が存在すると考えられる。これに関して、TTX により毒化した東北地方産アカザラガイの中腸腺から、TTX を保有することが知られている扁平動物であるオオツノヒラムシの DNA が検出されたことに加え、無毒のイガイにオオツノヒラムシの幼生を給餌するとイガイが毒化したことから、本種が二枚貝の TTX による毒化に関与している可能性が指摘されている。しかし、二枚貝が毒

化しているにも関わらず、中腸腺からオオツノヒラムシの DNA が検出されない事例も報告されていることから、オオツノヒラムシとは異なる毒化原因生物が存在することが示唆されている。また、ヨーロッパにおける二枚貝の毒化に関して、マガキの殻に付着していることが知られる TTX 保有紐形動物であるアカハナヒモムシの海水中に含まれる DNA 量と、マガキ中腸腺の TTX 含量との間に正の相関が見られたことから、二枚貝の毒化に本種が関与している可能性が示唆されているが、二枚貝がヒモムシ類を摂食するのかは明らかにされていない。また、本種は本邦沿岸域に生息していることが報告されているが、本邦において本種と二枚貝の毒化との関連は未検討である。以上のように、二枚貝の毒化には複数の生物が関与している可能性が考えられ、さらに本邦沿岸には新奇な TTX 産生・保有微生物が存在する可能性も考えられるが、その詳細は不明である。

そこで本研究では、北海道噴火湾の二枚貝垂下養殖場よりホタテガイを定期的に採取し、TTX による毒化状況を LC-MS/MS を用いて経時的に分析すると同時に、試料中に含まれる生物の群集組成をその DNA の塩基配列に基づいて網羅的に解析することが可能なメタバーコーディングを用いて、ホタテガイに摂食された餌生物を網羅的に解明することにより、毒化時期に特異的に検出される毒化原因候補生物を選抜する。その後、選抜した生物を現場より分離・培養し、その TTX 産生能および TTX 保有能を

検討することにより、ホタテガイの毒化原因生物を解明することを目的とする。

## B. 方法

北海道噴火湾にて養殖されているホタテガイを 2023 年 6 月から 2024 年 5 月まで定期的に採捕し、その中腸腺に含まれる麻痺性貝毒とテトロドトキシンの季節変動を調べた。

ホタテガイ中腸腺は 2 個体を合一してホモジネートを調製し、半量をメタバーコーディング用に、残りの半量を機器分析用に使用した。機器分析用のホタテガイ中腸腺ホモジネートの重量に対し、2 倍容の 1%酢酸溶液を添加し、混合した。遠心分離後に得た上清 0.4ml を、グラファイトカーボンを充填した固相カートリッジに供し、脱塩・洗浄後、20%アセトニトリル+1%酢酸溶液 2ml にて吸着した毒を溶出させた。溶出液は適宜希釈して、LC/MS/MS 分析に供した。

LC/MS/MS の分析条件は既報(Boundy et al. 2015, J. Chromatogr.A 1387, p1)の条件を最適化して用いた。標準品は、カナダの NRC が提供している認証標準物質を用いた。

また、メタバーコーディングによるホタテガイの餌生物の解明に先立ち、ホタテガイの rDNA の PCR 増幅抑制に有用なペプチド核酸 (PNA clamp) を設計した。まず、二枚貝ならびにその餌生物と想定される微細藻の 18S rDNA V8-V9 領域の塩基配列を用いて多重配列を作成し、これを用いてホタテガイを含むイタヤガイ科の二枚貝に特異的な塩基配列を検索し、これに結合する PNA clamp である BlockptPNA を設計した。本 PNA を

用いて、これと塩基置換数が異なる二枚貝 3 種 (ホタテガイ、アサリ、ミドリイガイ) および微細藻類 3 種 (*Heteroshigma akashiwo*、*Alexandrium catenella*、*Azadinium poporum*) のゲノム DNA を鋳型として、18S rDNA V8-V9 領域を増幅対象とする PCR を行った。その際、本 PNA の添加濃度 (0.2-1.0  $\mu$ M) とアニーリング温度 (60-65°C) を変化させた。得られた増幅産物を電気泳動に供し、これにより得られたバンドの濃淡から本 PNA による rDNA の増幅抑制効果を評価した。また、プライマーの Tm 値に対しアニーリング温度を高く設定する際、得られる増幅産物量の減少が懸念されるため、アニーリング温度の上昇に伴う増幅産物量の変化を同様の方法により評価した。

## C. 研究結果と考察

北海道噴火湾にて養殖されているホタテガイを 2023 年 6 月から 2024 年 5 月まで定期的に採捕し、その中腸腺に含まれる麻痺性貝毒とテトロドトキシンの季節変動を調べた結果、麻痺性貝毒による二枚貝の毒化は、5 月頃の有毒プランクトンの出現後 6-7 月にピークを迎え、その後減少していき、2024 年 5 月には再度、二枚貝の毒化の兆候が見られた。一方、TTX による二枚貝の毒化時期は、麻痺性貝毒による二枚貝の毒化時期とは重なっておらず、相関はないことから、本海域には麻痺性貝毒産生生物とは異なる TTX 産生生物が存在ことを示唆するデータを得た。

また、ホタテガイをはじめとするイタヤガイ科の二枚貝や、その想定餌生物のゲノムを鋳型として用いて、アニーリング温度

を変化させてそれらの rDNA の増幅を試みたところ、アニーリング温度を 65°C に設定した場合に得られる増幅産物量が、60°C に設定した試験区のそれに比べ有意に減少することが判明した。また、ホタテガイをはじめとするイタヤガイ科の二枚貝に特異的結合すると考えられる BlockptPNA を新たに設計した。本 PNA を用いて、その配列と比較して塩基置換数が 1 以下のホタテガイおよびアサリのゲノム DNA を鋳型として用いた試験区では、その添加濃度やアニーリング温度に関わらず、PNA 非添加区のそれに比べ得られる増幅産物量が有意に減少した。また、2 塩基の置換を有するミドリイガイでは、その添加濃度が 1.0  $\mu\text{M}$ 、アニーリング温度が 65°C の場合のみ増幅抑制が見られ、想定餌生物として用いた 9 塩基以上の置換を有する微細藻 3 種ではいずれの場合も増幅抑制が見られなかった。

#### D. 結論

北海道噴火湾のホタテガイの中腸腺に含まれる麻痺性貝毒とテトロドキシンの季節変動を調べた結果、両者に相関はなく、本海域には麻痺性貝毒産生生物とは異なる TTX 産生生物が存在ことを示唆するデータを得た。

また、新たに設計した PNA は、塩基置換数が 1 以下の二枚貝の rDNA の PCR 増幅抑制に有用であり、最適な PCR 条件はその添加濃度が 1.0  $\mu\text{M}$ 、アニーリング温度が 62.5°C であると考えられた。今後は、本 PNA ならびにこれを用いた PCR 最適条件のもとで、メタバーコーディングを行うことにより、ホタテガイの餌生物が網羅的に解明され、その中から TTX による毒化原因生物が解明されることが望まれる。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

なし

#### G. 学会発表

なし

#### H. 知的財産の出願・登録状況