

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
	足立真佐雄	高知大学	教授
	長澤和夫	東京農工大学	教授
	山下まり	東北大学	教授
	土方悠希	愛知県衛生研究所	医動物研究室 主任
	内田 肇	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
	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
	長谷川晶子	愛知県衛生研究所	医動物研究室 室長
研究協力者			

要旨：近年、LC-MS/MSを用いた麻痺性貝毒の機器分析法の発達に伴い、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。公定法であるマウス毒性試験法から機器分析法へ移行を検討する際、M-toxin 類の構造や毒性を明らかにし、測定対象成分の標準品を確保することが重要となる。

今年度は、前年度までに確立した精製技術や化学誘導法を用いて M1、M3、M5-HA、M9、M10 の精製、M2 および M4 の不斉合成、M8 の化学誘導による調製、定量 NMR (qNMR) 法を用いた各 M-toxin 類の濃度決定、Neuro2A 細胞を用いた各 M-toxin 類の Na⁺チャネル阻害活性評価、毒化二枚貝中の M-toxin 類の含有量を調べた。その結果、一部の M-toxin 類に弱い Na⁺チャネル阻害活性が確認されると共に、毒化二枚貝中における M-toxin 類の含有量や蓄積部位が、貝種や時期によって異なることが明らかとなった。今後、機器分析法導入時に測定対象となる M-toxin 類を選定することが出来る見込みである。

また、近年、世界各国の沿岸域において、二枚貝から微量のフグ毒（tetrodotoxin, TTX）が相次いで検出されている。毒化原因生物は、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、食物連鎖や毒化機構の全容は明らかになっていない。また、麻痺性貝毒の機器分析法導入時に、TTX を測定対象とするかが重要となる。

今年度は、前年度に引き続き、北日本で採取したホタテガイ中腸腺に含まれる麻痺性貝毒と TTX の季節変動を LC-MS/MS で調べた。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。西日本のマガキを

対象とした試験でも、同様の結果を得た。二枚貝におけるメタバーコーディングによる餌生物解明において、ホタテガイ由来の rDNA 増幅を高効率で抑制する必要があったため、前年度にペプチド核酸 (PNA clamp) を設計した。今年度は、設計した PNA ならびにこれを用いた PCR 最適条件下で、18S rDNA V8-V9 領域を対象としたメタバーコーディングを行い、中腸腺に含まれる餌生物組成を解析した。その結果、渦鞭毛藻や単細胞緑藻等の微細藻類や、甲殻類やホヤ類等の動物が検出された。一方で、オオツノヒラムシやアカハナヒモムシなどの既報の TTX 保有生物は検出されなかった。また、16S rDNA V3-V4 領域を対象とした細菌組成解析では、*Synechococcus* 属のシアノバクテリアが大半を占めることが明らかとなった。

今後は、LC-MS/MS 分析で TTX 陽性になったサンプルについて、メタバーコーディングによって毒化原因生物の特定を行う予定である。

A. 研究目的

(1) 麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin)

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish toxin, PST) は、サキシトキシン (saxitoxin, STX) を基本骨格として、異なる置換基を持つ C トキシンやゴニオトキシン (gonyautoxin, GTX) など約 70 種類が知られる化合物群である。わが国で毒化した二枚貝における主要成分として C1&2、GTX1~6、dcSTX (decarbamoyl STX)、neoSTX、STX などが知られてきた。加えて、約 20 年前には、Quilliam, M.らによって、国外の二枚貝中に含まれる新規類縁体として麻痺性貝毒代謝物 M-toxin 類の存在が提唱された。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 が存在すると提唱され、M1~M4 までが NMR による構造決定がなされた (Dell' Aversano, *J. Nat. Prod.*, 2012)。また、ヘミアミナール構造を有する M-toxin を構造決定し、M5-HA および M6-HA と命名している (Numano, Yotsu-Yamashita, *Chemosphere*, 2021)。それ以外の成分 (M5~12) については、詳細な構造情報が未だ不明である。M-toxin 類の構造上の特徴は、C11

位における脱硫酸体であり、11-hydroxy 体もしくは 11-dihydroxy 体となっていることである。M-toxin 類の毒性は未だ不明であると共に、認証標準物質が発売されていないため、LC-MS/MS による定性および定量が出来ない。よって、毒化二枚貝における麻痺性貝毒の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た。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。したがって、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。

本事業では、二枚貝からの単離精製や化学誘導、不斉合成により調製した M-toxin 類について、毒性評価を行う。また、LC-MS/MS を用いて、M-toxin 類も含めた分析法を確立する。さらに、国内沿岸で毒化する主要な二枚貝 (ホタテガイ、ヒオウギガイ)

における M-toxin 類の含有量や蓄積部位について明らかにする。

(2) 二枚貝中のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX)

近年、世界各国の沿岸域において、二枚貝から微量のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX) が相次いで検出されている。TTX は、フグや巻貝、カニ、ヒラムシ、ヒモムシなどに含有していることが知られているが、その食物連鎖や毒化機構の全容は明らかになっていない。また、麻痺性貝毒の機器分析法導入時に、TTX を測定対象とするかが重要となる。

本事業では、二枚貝中の TTX の餌生物を特定するために、北日本で採取したホタテガイ中腸腺および西日本で採取したマガキ中腸腺に含まれる麻痺性貝毒と TTX の季節変動を LC-MS/MS で調べた後、18SrDNA V8-V9 領域を対象としたメタバーコーディングを行うことで中腸腺に含まれる餌生物相を解析し、毒産生生物を絞り込む。また、二枚貝における TTX 含有量を継続的に調査する。

B. 研究方法

(1) 麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin)

前年度までに確立した精製法を用いて、ホタテガイやヒオウギガイ、アサリから M1、M3、M5-HA、M9、M10 を得た。また、化学誘導法を検討し、市販の GTX1&4 の脱硫酸化を行い、M8 を得た。不斉合成は、令和 6 年度に M2 および M4 を得ていたが、酸化反応が完結出来なかったため、M2 と M4 の混合物を親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) カラム精製することで、それぞれの精製物を得た。マレイン酸を用いた定量 NMR (qNMR) 法により、得られた M-

toxin 類の濃度決定を行った。今年度、収量が十分であった M1、M3、M5-HA、M4 について、マウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞を用いた Na⁺チャネル阻害活性試験を行った。前年度には、同試験法において M2 や dcSTX、neoSTX、TTX を行ったため、得られた結果を基に各化合物の 50%効果濃度 (EC₅₀) を比較検討した。

M-toxin 類の含有量および蓄積部位については、前年度に引き続き、東日本で毒化したホタテガイを用いて調べた。凍結融解による組織汚染を防ぐために、産地より冷蔵で届いた検体を、部位別 (貝柱、中腸腺、腎臓、生殖腺、鰓) に解剖した。公定法に準じて、希塩酸抽出を行った後、既報 (Boundy et al. 2015, *J. Chromatogr.A* 1387, p1) に従って固相カートリッジ ENVI-Carb で精製したものを LC-MS/MS で分析した。

(2) 二枚貝中のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX)

北日本で養殖された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。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 LC-MS/MS による分析用に使用した。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、既報 (Boundy et al. 2015, *J. Chromatogr.A* 1387, p1) に従って固相カートリッジ ENVI-Carb で精製したものを LC-MS/MS で分析した。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。TTX を含め、麻痺性貝毒標準品は、カナダの NRC が提供している認証標準物質を用いた。サキシトキシンのみ鏡像異性体を用いた。西日本のマガキについても同様に処理した。

また、前年度に 18SrDNA V8-V9 領域を対象とし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、BlockptPNA) を設計した。今年度は、本 PNA を用いて、ホタテガイ中腸腺に含まれる餌生物組成を解明した。また、16S rDNA V3-V4 領域を対象とするメタバーコーディングにより、ホタテガイ中腸腺に含まれる細菌組成についても解明した。

C. 研究結果と考察

(1) 麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin)

二枚貝からの精製や化学誘導によって得た M1、M3、M5-HA、M8、M9、M10 において、LC-MS/MS による MS/MS スペクトルや NMR スペクトルは、既報で構造決定や提唱されている構造を支持するものであった。また不斉合成によって得た M4 (M2 との混合物) は、HILIC カラムによる精製によって、M2 と M4 をそれぞれ分離することができ、既報の NMR スペクトルと一致した。

マレイン酸を用いた qNMR 法による定量によって、M1 : 41.4 μ M、M3 : 219 μ M、M4 : 492 μ M、M5-HA : 46 μ M と濃度決定した。それぞれの化合物を Neuro2A アッセイに供したところ、M1 : 167.89 $\pm$ 28.52 nM、M3 : 787.96 $\pm$ 95.60 nM、M4: 176.48 $\pm$ 24.12 nM、M5-HA: > 4,600 nM の 50%効果濃度 (EC₅₀) であった。前年度の M2 : 139.27 $\pm$ 36.68 nM

と合わせて、5 成分の Neuro2A アッセイを実施済みとなった。M3 は M1 の C11 位における dihydroxy 体、同じく M4 は M2 の C11 位における dihydroxy 体である。Neuro2A アッセイの結果より、dihydroxy 体の Na⁺チャネル阻害活性は、monohydroxy 体よりも弱くなる傾向があった。おそらく Na⁺チャネルの結合に際して、増加した-OH 基が障壁になっているものと考えられる。

一方で、M5-HA は、麻痺性貝毒の基本骨格 (6-5-5 員環) と異なり、特異的な骨格 (6-6-5 員環) を有する。今回の Neuro2A アッセイにより、3,250 nM で阻害活性が見られなかったことから、骨格の変化によって、Na⁺チャネルへの結合性が低下したのと考えられる。

GTX5 の C13 位が脱硫酸して STX になった場合、毒性が高くなることが知られている。同様に、M5-HA の C13 位が脱硫酸した M6-HA は、Na⁺チャネルの阻害活性を確認できる可能性がある。しかし、M6-HA は、既報 (Numano, Yotsu-Yamashita, *Chemosphere*, 2021) において、140 nM で試験を実施し、Na⁺チャネル阻害活性が確認出来なかった。次年度に合成予定の M6-HA および、精製で得られた M8~M10 について、Neuro2A アッセイを実施することで、M-toxin 類の EC₅₀ 値を得たいと考える。

M-toxin 類の含有量および蓄積部位については、ホタテガイで高毒化した場合と低毒化した場合で異なることが分かった。高毒化の際、M-toxin 類は中腸腺および腎臓に高濃度で蓄積しているが、生殖腺や鰓、外套膜、貝柱からも検出された。一方で、低毒化の際には、中腸腺と腎臓のみ検出された。高毒化した中腸腺は、全組成比において最大 70

～80%近くを M-toxin 類で占めることがあるが、低毒化の中腸腺では最大 40%であった。低毒化した場合は、毒化と共に M-toxin への変換および体外への排泄が進んでいると考えられた。一方で、高毒化した場合は、各部位へ毒が分布していくことが判明し、体外への排泄が遅くなることから、毒化の長期化が起きているものと考えられた。

(2) 二枚貝中のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX)

北日本で採取したホタテガイについては前年度までの成果と同じく、夏～秋にかけて検出した。2023～2025 年の 9 月から 12 月のサンプルにおける TTX 濃度の最大は、2024 年 12 月に 5 m 層より採取された検体で、23.4 μg TTX eq./kg 中腸腺であった。麻痺性貝毒は春頃に *Alexandrium* 属の発生によって毒化し、初夏に最大濃度を迎えるため、季節が異なっている。加えて、麻痺性貝毒に比べて、非常に低濃度の蓄積であった。西日本で採取したマガキ中腸腺を分析したところ、北日本で見られた 9 月～12 月ではなく、麻痺性貝毒による毒化が落ち着いた 6 月下旬に TTX による毒化が見られた。TTX 濃度の最大は、2025 年 6 月に採取された検体で、101 μg TTX eq./kg 中腸腺であった。

中腸腺における 18S rDNA V8-V9 領域を対象としたメタバーコーディングの結果、渦鞭毛藻や単細胞緑藻等の微細藻類や、甲殻類やホヤ類等の動物が検出された。一方で、オオツノヒラムシやアカハナヒモムシなどの既報の TTX 保有生物は検出されなかった。また、16S rDNA V3-V4 領域を対象とした細菌組成解析では、*Synechococcus* 属のシアノバクテリアが大半を占めることが明らかとなった。いずれの結果も現時点では

検出割合であるため、今後定量 PCR 法を確立し、餌生物ならびに細菌の rDNA 量と TTX 濃度との関係などを明らかにし、TTX 生産生物の特定を行う予定である。

D. 結論

令和 7 年度の研究では、M-toxin 類の構造確認、Neuro2A アッセイ試験、ホタテガイにおける蓄積部位および濃度の確認を行った。引き続き、令和 8 年度に当事業で M-toxin 類の Na⁺チャネルの阻害活性を確認することで、機器分析法導入時の測定対象を選定することが出来る。

二枚貝中の TTX は、これまでの知見と同じように夏～秋にかけて貝類中の濃度が上昇することを確認した。DNA メタバーコーディングにより、各季節にどのような餌を取り込んでいるかを明らかにした。同手法を用いて、引き続き TTX 生産生物を絞り込んでいく予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

○ 沼野 聡、稲葉 彩、渡邊龍一、西村朋宏、毛利文香、宮村和良、加賀新之助、渡邊志穂、内田 肇、小澤眞由、松嶋良次、我が国沿岸の二枚貝における麻痺性貝毒 C3 および C4 の蓄積について、漁場環境保全関係研究開発推進会議 赤潮貝毒部会 東日本貝毒分科会 (2025、仙台)

○ 沼野 聡、内田 肇、小澤眞由、松嶋良次、渡邊龍一、LC-MS/MS を用いた麻痺性貝毒

分析に関する研究、第 11 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2025、埼玉)

G. 学会発表

○ 飯島巧望、山口晴生、大西浩平、夏池真史、渡邊龍一、小澤眞由、内田肇、沼野聡、松嶋良次、鈴木敏之、足立真佐雄、二枚貝の rDNA の PCR 増幅を特異的に抑制する PNA clamp の開発、マリンバイオテクノロジー学会 (2025、広島)、優秀演題

○ 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 を用いた毒化ホタテガイ中の麻痺性貝毒組成の解析、第 31 回 日本食品化学会 総会・学術大会 (2025、滋賀)

○ 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、アサリにおける麻痺性貝毒代謝物 (M1) の精製法と毒性評価、第 121 回 食品衛生学会 学術講演会 (2025、東京)

○ 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、麻痺性貝毒代謝物 M-toxin の精製法と毒性評価、第 62 回 全国衛生化学技術協議会 年会 (2025、群馬)、優秀演題賞

佐藤真友、○ 蒲生賢志、沼野 聡、渡邊龍一、長 由扶子、工藤雄大、此木敬一、山下まり、サキシトキシン類縁体 M8 の化学誘導と生物活性およびホタテガイからの同定、日本農芸化学会 2026 年度 京都大会 (2026、京都)

○ 飯島巧望、渡邊龍一、沼野 聡、小澤眞由、内田 肇、松嶋良次、鈴木敏之、夏池真史、水上卓哉、大西浩平、山口晴生、足立真佐雄、北海道産ホタテガイのフグ毒による毒化状況ならびに餌生物の網羅的解析、令和 8 年度 日本水産学会 春季大会 (2026、東京)、優秀演題

H. 知的財産の出願・登録状況
なし