

北海道ホタテガイPatinopecten yessoensisの下痢性貝毒組成の解明及びLC/MSとマウス毒性試験により測定した毒力の比較

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	橋本, 諭 鈴木, 敏之 城田, 由里 本間, 基久 板橋, 豊 長南, 隆夫 神山, 孝史
巻/号	47巻2号
掲載ページ	p. 33-40
発行年月	2006年4月

報 文

北海道産ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* の下痢性貝毒組成の
 解明および LC/MS とマウス毒性試験により測定した毒力の比較

(平成 17 年 7 月 20 日受理)

橋本 諭*¹ 鈴木敏之*^{2,†} 城田由里*³ 本間基久*³
 板橋 豊*⁴ 長南隆夫*¹ 神山孝史*²Lipophilic Toxin Profiles Associated with Diarrhetic Shellfish Poisoning in Scallops,
Patinopecten yessoensis, Collected in Hokkaido and Comparison of the
 Quantitative Results between LC/MS and Mouse BioassaySatoshi HASHIMOTO*¹, Toshiyuki SUZUKI*^{2,†}, Yuri SHIROTA*³, Motohisa HONMA*³,
 Yutaka ITABASHI*⁴, Takao CHYOUNAN*¹ and Takashi KAMIYAMA*²(*¹Hokkaido Institute of Public Health: Kita-19 Nishi-12, Kita-ku, Sapporo 060-0819, Japan;*²Tohoku National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency: 3-27-5,
 Shinhama-cho, Shiogama 985-0001, Japan; *³Japan Frozen Foods Inspection

Corporation: 2-4-6, Shibadaimon, Minato-ku, Tokyo 105-0012, Japan;

*⁴Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University: 3-1-1,

Minato-cho, Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611, Japan;

†Corresponding author)

Lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in scallops, *Patinopecten yessoensis*, collected in Hokkaido, Japan were quantified by liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS). Pectenotoxin-6 (PTX6) and yessotoxin (YTX) were the dominant toxins in the scallops, although the percentages of these toxins were different depending on the production area or the sampling period. The quantitative results obtained for the scallops in LC/MS and in mouse bioassay (MBA) were compared. Fifty of the 55 samples found to be exceeding the local quarantine level (0.025 MU/g whole meat) in Hokkaido by LC/MS were quantified by MBA as being below the quarantine level. It is suggested that this discrepancy is due to poor detection of YTX by MBA. These results indicate that LC/MS is a better method than MBA in terms of sensitivity and accuracy to quantify known lipophilic toxins, including YTX.

(Received July 20, 2005)

Key words: オカダ酸 okadaic acid; 下痢性貝毒 diarrhetic shellfish poison; ジノフィシストキシン dinophysistoxin; 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 LC/MS; マウス毒性試験 mouse bioassay; ペクテノトキシン pectenotoxin; ホタテガイ scallop; 毒組成 toxin profile; イェットキシン yessotoxin

緒 言

わが国では、昭和 50 年代前半に東北地方でムラサキイガイによる大規模な下痢性貝毒による食中毒が発生して以来¹⁾、ホタテガイなどの食用の二枚貝については、二枚貝

の抽出液をマウスの腹腔内に投与し毒力を判定するマウス毒性試験による貝毒検査が行われている。下痢性貝毒として、これまでにオカダ酸 (okadaic acid; OA) 群のほかに、ペクテノトキシン (pectenotoxin; PTX) 群、イェットキシン (yessotoxin; YTX) 群が報告され、それらの化学構造が解明されている^{2),3)} (Fig. 1)。

わが国の二枚貝から検出される下痢性貝毒には、有毒プランクトンが生産し、二枚貝がプランクトンを摂餌することにより蓄積されるオカダ酸 (OA)⁴⁾、ジノフィシストキシン 1 (DTX1)⁴⁾、ペクテノトキシン 2 (PTX2)⁴⁾、イェットキシン (YTX)⁵⁾ のほかに、これらの毒が二枚貝の中で変換されて生じるジノフィシストキシン 3 (DTX3)^{2),6)}、

† 連絡先

*¹ 北海道立衛生研究所: 〒060-0819 札幌市北区北 19 条西 12 丁目*² 独立行政法人水産総合研究センター東北水産研究所: 〒985-0001 塩釜市新浜町 3-27-5*³ 財団法人日本冷凍食品検査協会: 〒105-0012 東京都港区芝大門 2-4-6*⁴ 北海道大学大学院水産科学研究院: 〒041-8611 函館市港町 3-1-1

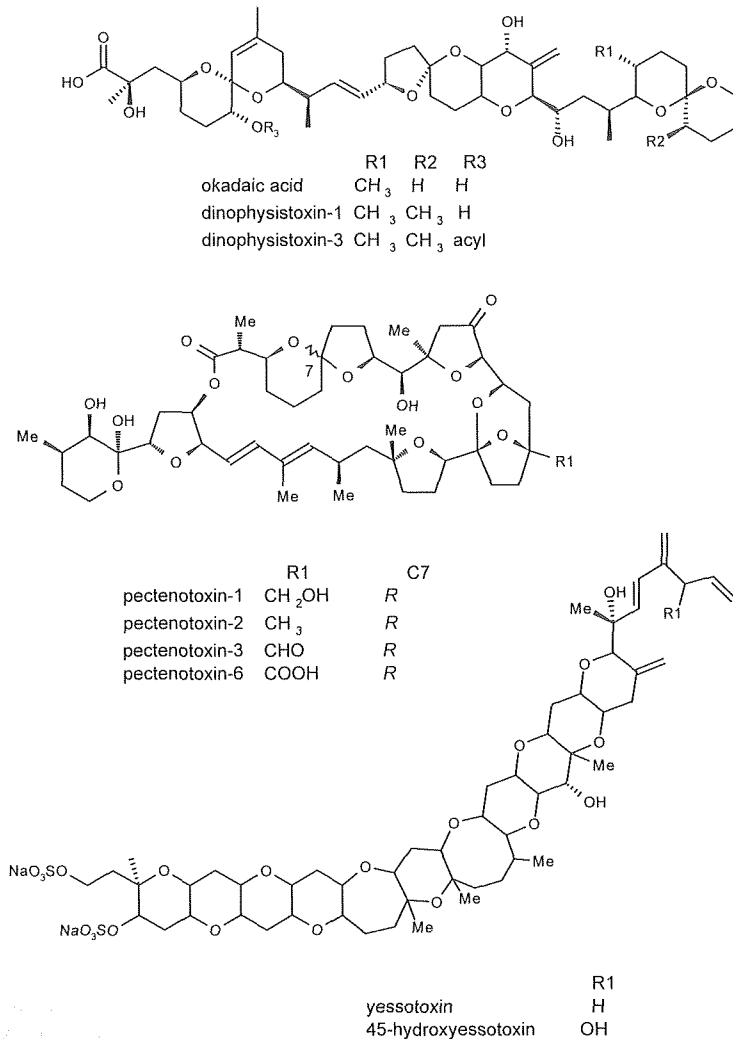


Fig. 1. Structures of typical lipophilic toxins found in Japanese bivalves

ペクテノトキシシン 1 (PTX 1)²⁾, ペクテノトキシシン 6 (PTX 6)^{2), 7)}, 45-ヒドロキシエッセットキシシン (45-OHYTX)^{8), 9)} などがある。食品衛生上最も重要な毒は OA 群であり、強力な下痢原性に加えて¹⁰⁾, 発がん促進作用も確認されている¹¹⁾。一方, PTX 群や YTX 群については, マウスに対する顕著な経口毒性が認められないため^{12)~14)}, ヒトに対する危険性は OA 群と比較して低く評価されており, 欧州連合 (EU) では近年 YTX 群に対する規制基準値を緩和した¹⁵⁾。各毒群ごとに毒性の違いがあることから, 下痢性貝毒組成を把握することは重要な事項であるといえる。しかし, わが国の公定法をはじめ世界的に貝毒規制のための試験法として普及しているマウス毒性試験では, 各毒群を個別に定量することが困難であり, 毒群ごとに定量が可能な検査法の開発が望まれるようになってきた。

近年, LC/MS による下痢性貝毒の分析技術が進歩し^{16)~21)}, 貝毒規制に対する実用的な検査法の候補として注目されている。最近, 著者らが報告した下痢性貝毒 3 群の一斉分析法により, 試料の前処理をせず, 3 毒群を迅速かつ正確に測定することが可能になった²²⁾。また, 国内

主要生産海域から収集した二枚貝多数検体を LC/MS で測定し, 下痢性貝毒組成を明らかにするとともに, 測定結果をマウス毒性試験で測定された毒力と比較することにより, 検査法としての有効性について報告した²²⁾。しかし, 生産海域が広大な北海道産ホタテガイについては, 詳細な生産海域ごとの毒組成は明らかにされていない。また, 北海道漁業協同組合連合会では下痢性貝毒の規制値として, 国が定めた自主規制基準値 (可食部 1 g 当たり 0.05 マウスユニット (MU))²³⁾ のほかに, 自粛規制基準値 (可食部 1 g 当たり 0.025 MU) を自主的に定め, 出荷規制を実施しているため, この基準値に基づいた LC/MS とマウス毒性試験の測定結果の比較も重要な検討課題である。

本研究では, 北海道産ホタテガイの下痢性貝毒組成の詳細を前報で確立した LC/MS²²⁾ を用いて明らかにし, 同一試料に対して, LC/MS で測定した毒力をマウス毒性試験で測定した毒力と比較したので報告する。

実験方法

1. 試料

北海道産ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* の中腸腺

は、道内の漁業協同組合の協力により、出荷自主規制が実施されるホタテガイ生産海域区分ごとに、自主検査用検体の一部として入手した。

2. 試薬

有機溶剤：メタノール（HPLC用，特級試薬），アセトニトリル（HPLC用）は和光純薬工業（株）製を使用した。ギ酸（特級），ギ酸アンモニウム（特級）はナカライテスク（株）製を使用した。移動相に使用した蒸留水は，蒸留水を Milli-Q システムで再精製した。

下痢性貝毒標準品：オカダ酸（OA），ジノフィシトキシン 1（DTX1），ジノフィシトキシン 3（DTX3），ペクテノトキシン 1（PTX1），ペクテノトキシン 2（PTX2），ペクテノトキシン 6（PTX6），イェットトキシン（YTX）は（財）日本食品分析センターより入手した。それぞれの貝毒標準品を HPLC 用メタノールに溶かし等量ずつ混合した後，100 ng/mL の濃度に HPLC 用メタノールで希釈し，標準溶液とした。

3. マウス毒性試験

マウス毒性試験は公定法に準じて行った²⁴⁾。下痢性貝毒は中腸腺に偏在するため試料は中腸腺を用いた。また，あらかじめ当該可食部における中腸腺の重量比を求めておき，この比を基に中腸腺 1 g 当たりの毒力を可食部 1 g 当たりの毒力に換算した。北海道独自の出荷自粛基準値である可食部 1 g 当たり 0.025 MU を検出限界とするために，抽出に用いる試料の量は公定法の倍とした。マウス毒性試験は限度試験であるため結果はその試料の毒力の範囲という形で表される。しかし範囲表記では LC/MS の測定結果と比較する際に不便であるため，範囲を代表する具体的な値に変換した。代表値には各範囲の下限値と上限値の中間の値を用いた。例えばマウス毒性試験の結果が 0.025～0.05 MU/g の場合には，0.025 と 0.05 の中間の値である 0.0375 MU/g をその試料の毒力とした。

4. LC/MS 分析

LC/MS 分析は既報に従い行った²²⁾。

装置：液体クロマトグラフは Hewlett-Packard 社製 Model 1050 を用いた。また，質量分析装置は Finnigan MAT 社製 SSQ7000 を用いた。

LC/MS 測定条件：イオン化は電子スプレーイオン化法（ESI）法により，イオンの検出は，選択イオンモニタリング（SIM）法を用いた。カラムは Hypersil-BDS-C8（50 mm×2.1 mm i.d.）（Keystone Scientific, Bellefonte, PA, 米国）を 35℃ に加温し，揮発性の緩衝剤として 2 mmol/L ギ酸アンモニウムおよび 50 mmol/L ギ酸を含有する移動相 A（蒸留水）および同じ濃度のモディファイアを含有する移動相 B（アセトニトリル-蒸留水，95:5 v/v）のグラジエント分析を行った。グラジエント分析は 10 分間で 20%B から 100%B までリニアグラジエントを行い，その後，15 分間 100%B で溶出させた。移動相の流量は 0.2 mL/min とした。イオン源への試料導入部の上流にダイバージョンバルブを設置し，測定に必要な毒の溶出画分

のみを質量分析計に導入した。

SIM 法で選択したイオンは， $[M-H]^-$ として OA (m/z 803.5)，DTX1 (m/z 817.5)，DTX3 (m/z 1055.7)， $[M+HCOOH-H]^-$ として PTX1 (m/z 919.5)，PTX2 (m/z 903.5)，PTX6 (m/z 933.5)， $[M-2Na+H]^-$ として YTX (m/z 1141.5)，45-OHYTX (m/z 1157.5) である。

試験液の調製：マウス毒性試験に用いたホタテガイ中腸腺ホモジネートの一部を遠沈管にひょう量し，試料 1 g 当たり 9 mL の 90%メタノールを加えてホモジナイズした。2,500 rpm で 5 分間遠心した後，上澄みを試験液とした。遠心後も懸濁が見られる場合は 0.45 μ m のフィルタでろ過した。

試料の測定：試験液 5 μ L を LC/MS 装置に注入し，得られた各毒成分の SIM クロマトグラムからのピーク面積値から毒含量を定量した。毒の標準溶液（100 ng/mL）は，試料 5 検体ごとに注入した。ポリエーテル化合物の類縁体を SIM で検出する際，類縁体間の検出感度に差異はほとんどないことが報告されている²²⁾。45-ヒドロキシイェットトキシン（45-OHYTX）の標準品は入手が困難であるため，測定は YTX 標準液により作成した検量線を用い定量した。

MU への換算：LC/MS により定量した中腸腺 1 g 当たりの各毒成分含量は，既報^{25), 26)}で報告されているマウス腹腔内投与による比毒性（OA=4，DTX1=3.2，DTX3=5，PTX1=5，PTX2=4.6，PTX6=10，YTX=2，45-OHYTX=10 μ g/MU）をもとに MU に換算した。各成分の毒力の総和を中腸腺 1 g 当たりの毒力とし，マウス試験の場合と同様に，あらかじめ求めておいた可食部全体の重量における中腸腺の重量の比をもとに可食部 1 g 当たりの毒力を算出した。

結果および考察

1. LC/MS 分析

Fig. 2 にホタテガイ中腸腺抽出液から検出され PTX6 と YTX の SIM クロマトグラムを示す。

検出しているイオンが m/z 800 以上の比較的高質量領域であることと，SIM による選択的な検出により，測定を妨害するきょう雑物ピークは少なく，きょう雑物ピークが検出されても LC によりほぼ完全に分離された。試料を 5 回測定するたびに，毒標準溶液で被検体のピーク面積と保持時間の変動を追跡しながら連続測定し，全試料は 6 回に分けて測定した。各測定における毒標準溶液のピーク面積の変動係数はほぼ 10% 以下であり 20% を超えるものはなかった。これは先に報告した結果²²⁾と同様であり，本法が北海道産ホタテガイの下痢性貝毒を検査する場合にも実用的な手法であることが裏づけられた。

2. 北海道産ホタテガイの下痢性貝毒組成

Table 1 に 2003 年の秋季（10 月～11 月）に北海道内の各生産海域で採取したホタテガイ中腸腺の下痢性貝毒含量を示す。

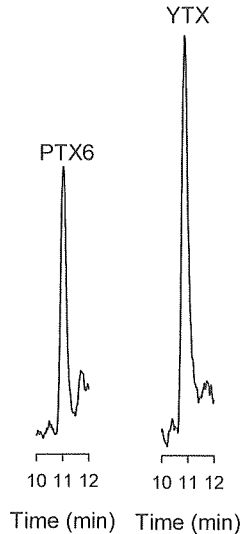


Fig. 2. Selected ion monitoring (SIM) LC/MS chromatograms obtained from scallops collected at Iburi in the eastern area of Funka Bay in November 2003

Left: m/z 933.5 SIM chromatogram for $[M+HCOOH-H]^-$ of PTX6 at a concentration of 149 ng/mL; Right: m/z 1,141.5 SIM chromatogram for $[M-2Na+H]^-$ of YTX at a concentration of 39 ng/mL

LC/MS conditions were as described in the text.

Dinophysis 属有毒プランクトンを起源とする DTX 群と PTX 群については、有毒プランクトンが生産する PTX2 のホタテガイ代謝産物である PTX6 が主要毒であった。一方、有毒プランクトン *Protoceratium reticulatum* を起源とする YTX 群では、YTX が主要毒であった。PTX6 と YTX は原因プランクトンが異なるため、ホタテガイから検出されるそれらの相対的な比率に変動が見られるが、青森県、岩手県、宮城県産ホタテガイでも主要毒であることが明らかになっている²²⁾。本結果を既報の結果²²⁾と統合すると、北海道から宮城県までの主要生産海域のホタテガイの主要毒は PTX6 と YTX であることが示された。PTX6 の値が比較的高い試料からは、PTX6 の代謝前駆体である PTX1 も検出された。これらの毒のほかに、*Dinophysis* 属有毒プランクトンが生産する DTX1、そして DTX1 のホタテガイ代謝産物である DTX3 が検出された。

一般に下痢性貝毒が頻発する時期は、有毒プランクトンが高密度に発生する春季から夏季にかけてであるが、噴火湾産ホタテガイでは、有毒プランクトンの発生がまれな秋季から冬季にかけて、北海道の自粛規制基準値（可食部 1 g 当たり 0.025 MU）を超える事例が報告されている。2004 年には、11 月から 12 月まで噴火湾西部および湾口海域のホタテガイの一部に基準値を超える毒力が検出され、規制がかけられた。その一因として、マウス毒性試験で偽陽性反応を示す遊離脂肪酸^{27)~30)}の蓄積が挙げられている。採取年は異なるが、2003 年 10 月から 11 月のすべ

での試料から PTX6 や YTX が検出されたことから (Table 1)、冬季に規制基準値を超える噴火湾産ホタテガイの原因毒は、遊離脂肪酸による偽陽性反応のほかに、ホタテガイに残留した PTX6 や YTX であることが示唆された。

Table 2 に 2004 年春季（5 月～6 月）に北海道内で採取したホタテガイ中腸腺の毒含量を示す。2003 年秋季の試料と同様に PTX6 と YTX が主要毒であった。根室と噴火湾西部海域の試料を除き、PTX6 が毒組成比の大部分を占めていた。

3. マウス毒性試験と LC/MS で測定した毒力の比較

Fig. 3 にマウス毒性試験と LC/MS で測定した毒力の比較と規制検体数を示す。国が定めた自主基準値（可食部 1 g 当たり 0.05 MU）²³⁾に基づいて比較すると、マウス毒性試験で基準値を超えた検体はなく、近年の北海道産ホタテガイにおける低毒化の傾向が 2003 年から 2004 年にかけても続いていることが示された。マウス毒性試験と LC/MS で共に基準値以下の検体は、測定した 147 検体中 141 検体であった。一方、マウス毒性試験では基準値を下回り LC/MS で基準値を超えた検体は 6 検体であった。

北海道の自粛基準値（可食部 1 g 当たり 0.025 MU）に基づいて、マウス毒性試験と LC/MS による規制検体数を比較すると、マウス毒性試験と LC/MS でともに基準値以下の検体は測定した 147 検体中 91 検体であった。また、マウス毒性試験で基準値を超えた検体は 6 検体であったが、このうち 5 検体は LC/MS でも基準値を超えた。北海道のように低い基準値を設定している場合には、マウス毒性試験では遊離脂肪酸による偽陽性が生じやすいと考えられたが、本研究では偽陽性と分類された検体は 1 検体のみであった。この時期の北海道産ホタテガイでは、偽陽性反応検体は少ないことが示唆された。

一方、マウス毒性試験で北海道の自粛基準値を下回り LC/MS では基準値を超えた検体は 50 検体であった。この違いは、ホタテガイの主要毒である YTX に起因すると考えられる。マウス毒性試験では、水-ジエチルエーテルによる液液分配により麻痺性貝毒などが含まれる水溶性画分を除去しているが²⁴⁾、YTX はジエチルエーテルへの分配係数が低く、マウス毒性試験では検出されにくいことが指摘されている³¹⁾。一方、LC/MS では抽出液を直接 LC/MS に注入して測定するため、YTX は損失されずに測定される。

マウス毒性試験で基準値を下回り、LC/MS で基準値を超えた検体は、国が定めた基準値では 6 検体 (Fig. 3)、北海道の基準値では 50 検体 (Fig. 3) であったが、Table 1, 2 で示したように YTX を主要毒として含有する試料を測定したため、マウス毒性試験と LC/MS との結果に違いが生じたと推察される。

以上の結果から、YTX を主要毒とするような試料の毒力を正確に測定するためには、LC/MS はマウス毒性試験よりも検出感度、精度および正確さにおいて優れた手法で

Table 1. DSP Toxin Contents in Hepatopancreas of Scallops Collected in Hokkaido from October to November 2003

Production area	Number of samples	Toxins ($\mu\text{g/g}$)							
		OA	DTX1	DTX3	PTX1	PTX2	PTX6	YTX	45-OHYTX
Okhotsk (North area)	7	ND	ND	ND	ND	ND	0.05-0.35 (6) 0.13	0.24-0.59 (7) 0.36	0.05-0.14 (7) 0.10
Okhotsk (South area)	21	ND	0.03-0.08 (2) 0.06	ND	0.07 (1)	ND	0.07-0.16 (12) 0.11	0.07-0.34 (21) 0.22	0.02-0.16 (19) 0.09
Lake Saroma	8	ND	0.04-0.04 (3) 0.04	0.04 (1)	ND	ND	0.06-0.16 (6) 0.11	0.54-0.93 (8) 0.71	0.11-0.18 (8) 0.15
Nemuro area	5	ND	0.12-0.13 (3) 0.13	ND	ND	ND	0.15-0.24 (4) 0.18	0.07-0.16 (5) 0.13	0.03-0.09 (5) 0.06
Kushiro-Tokachi area	7	ND	0.05-0.16 (4) 0.10	0.10 (1)	0.27 (1)	0.08 (1)	0.24-0.6 (7) 0.41	0.25-0.61 (7) 0.38	0.05-0.22 (7) 0.15
Funka Bay (East area)	9	ND	0.09 (1)	ND	0.27 (1)	ND	0.07-1.5 (9) 0.42	0.17-1.06 (9) 0.55	0.04-0.18 (9) 0.11
Funka Bay (West area)	9	ND	0.05-0.08 (2) 0.07	0.04-0.05 (2) 0.05	0.06-0.3 (3) 0.20	ND	0.27-1.39 (9) 0.67	0.05-0.73 (9) 0.43	0.02-0.25 (9) 0.12
Entrance of Funka Bay	13	ND	0.04-0.08 (6) 0.06	ND	0.06-0.18 (6) 0.11	ND	0.23-1.47 (13) 0.60	0.17-0.44 (13) 0.29	0.03-0.17 (13) 0.10
Tsugaru Strait (Oshima)	7	ND	0.06 (1)	ND	ND	ND	0.07-0.2 (3) 0.11	0.19-0.24 (7) 0.21	0.04-0.09 (7) 0.06
Ishikari Bay	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.52 (1)	0.15 (1)
Rumoi area	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.58 (1)	0.09 (1)

ND: not detected

Upper: Range and (number containing detectable toxin)

Lower: Average

Table 2. DSP Toxin Contents in Hepatopancreas of Scallops Collected in Hokkaido from May to June 2004

Production area	Number of samples	Toxins ($\mu\text{g/g}$)							
		OA	DTX1	DTX3	PTX1	PTX2	PTX6	YTX	45-OHYTX
Okhotsk (North area)	11	ND	0.06-0.31 (9) 0.10	0.04-0.53 (4) 0.17	0.08-0.3 (9) 0.17	0.04-0.12 (5) 0.08	0.34-4.08 (11) 1.29	0.13-0.39 (11) 0.23	0.03-0.05 (9) 0.04
Okhotsk (South area)	37	ND	0.05-0.1 (12) 0.07	0.04-0.07 (5) 0.05	0.06-0.26 (22) 0.13	0.04-0.11 (7) 0.07	0.27-1.31 (32) 0.66	0.1-0.27 (37) 0.18	0.02-0.07 (29) 0.04
Lake Saroma	2	ND	ND	ND	ND	ND	0.35-0.67 (2) 0.51	0.12-0.2 (2) 0.16	0.04 (1)
Nemuro area	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.08-0.15 (2) 0.11	0.04-0.04 (2) 0.04
Funka Bay (West area)	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.14 (1)	0.05 (1)
Tsugaru Strait (Oshima)	3	ND	0.05 (1)	0.07 (1)	ND	ND	0.27-0.57 (2) 0.42	0.05-0.12 (3) 0.08	ND
Ishikari Bay	1	ND	0.05 (1)	0.06 (1)	0.08 (1)	ND	0.93 (1)	0.06 (1)	0.03 (1)
Rumoi area	2	ND	0.07 (1)	ND	ND	0.05 (1)	0.56-2.04 (2) 1.30	0.29-0.34 (2) 0.32	0.02-0.05 (2) 0.04

ND: not detected

Upper: Range and (number containing detectable toxin)

Lower: Average

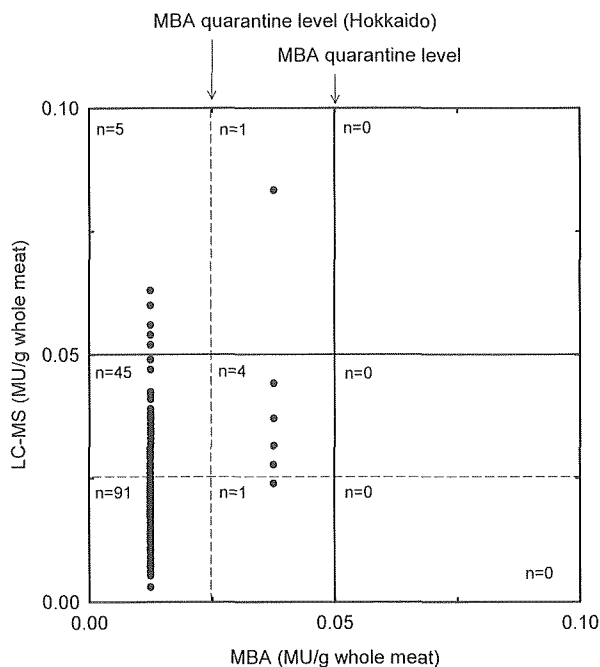


Fig. 3. Comparison of total mouse toxicities obtained by LC/MS and by MBA for scallops collected in Hokkaido, Japan ($n=147$)

n ; sample number in the marked square

あることが明らかになった。

しかし、近年の北海道産ホタテガイのように毒力の低い検体を、北海道の自粛規制を採用して LC/MS で毒力を測定すると、YTX の影響により Fig. 3 で示したように規制検体数が著しく増え、道内ホタテガイ生産者に大きな影響を及ぼすことが危惧される。YTX はマウスに対する顕著な経口毒性が認められないため、ヒトへの危険性は低いと評価されており^{13), 14)}、腹腔内投与による毒力に基づき毒力評価を行うと、試料の毒性について過大評価する危険性がある。このことから LC/MS を検査法として採用するには、各毒群の詳細な毒性評価を実施し、ヒトに対する毒性に基づいた、毒成分量による規制基準値を設定する必要があると考えられた。このことにより生産者への影響を最小限に抑えつつ、ホタテガイの安全性を確保することが可能になると考えられた。

まとめ

北海道産ホタテガイの各生産海域の下痢性貝毒成分を詳細に測定した結果、主要毒は PTX6 と YTX であり、青森県、岩手県、宮城県的主要生産海域のホタテガイ²²⁾と類似した毒組成であることを明らかにした。

同一試料におけるマウス毒性試験の結果と LC/MS 法の結果を比較検討したところ、LC/MS 法測定値から換算した毒力の方がマウス毒性試験よりも高い値を示す傾向にあることが分かった。この傾向は低毒力の試料において特に顕著であった。この結果の違いは前処理における YTX の回収率の差に起因すると推察され、回収率の良好な LC/MS 法のほうが YTX について正確な測定が可能であ

た。

以上から北海道産ホタテガイのように YTX が主要な毒成分であり、かつ低毒力の試料について正確に毒力を測定する方法としては、LC/MS 法の方がマウス毒性試験よりも優れていた。しかし検査法として LC/MS 法を導入するには、マウス腹腔内投与の毒性ではなく、ヒトに対する毒性評価に基づき新たに成分量による規制値を設定し、毒力の過大評価を避けることが必要であると思われた。

謝 辞

本研究は、北海道の「長期国内研修事業」による研修中に参加した農林水産省の「農林水産研究高度化事業」のプロジェクト研究「現場即応型貝毒簡易測定キットと安全な貝毒モニタリング体制の開発」の中で実施された。本研究を推進するために、自主検査用のホタテガイ検体を提供して頂いた北海道内の漁業協同組合および北海道漁業協同組合連合会に対して、深く謝意を表します。

また研修に当り快くご協力いただいた北海道衛生研究所食品薬品部の皆様、および関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M., Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.)*, **44**, 1,249-1,255 (1978).
- 2) Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsu-moto, G.K., Clardy, J., Diarrhetic shellfish toxins. *Tetra-hedron*, **41**, 1,019-1,025 (1985).
- 3) Yasumoto, T., Murata, M., Marine toxins. *Chem. Rev.*, **93**, 1,897-1,909 (1993).
- 4) Lee, J. S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T., Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.*, **1**, 147-152 (1989).
- 5) Satake, M., MacKenzie, L., Yasumoto, T., Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat. Toxins*, **5**, 164-167 (1997).
- 6) Suzuki, T., Ota, H., Yamasaki, M., Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dino-physistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Pati-nopecten yessoensis*. *Toxicon*, **37**, 187-198 (1998).
- 7) Suzuki, T., Mitsuya, T., Matsubara, H., Yamasaki, M., De-termination of pectenotoxin-2 after solid phase extrac-tion from seawater and from the dinoflagellate *Dino-physis fortii* by liquid chromatography with electro-spray mass spectrometry and ultraviolet detection: Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotox-in-6 in scallops. *J. Chromatogr. A*, **815**, 155-160 (1998).
- 8) Satake, M., Tubaro, A., Lee, J. S., Yasumoto, T., Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Nat. Toxins*, **5**, 107-110 (1997).
- 9) Yasumoto, T., Takizawa, A., Fluorometric measure-ment of yessotoxins in shellfish by high-pressure

- liquid chromatography. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1,775–1,777 (1997).
- 10) Terao, K., Ito, E., Yanagi, T., Yasumoto, T., Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon*, **24**, 1,141–1,151 (1986).
 - 11) Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamada, K., Murata, M., Yasumoto, T., Sugimura, T., Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Gan (Jpn. J. Cancer Res.)*, **79**, 1,089–1,093 (1988).
 - 12) Miles, C. O., Wilkins, A. L., Munday, R., Dines, M. H., Hawkes, A. D., Briggs, L. R., Sandvik, M., Jensen, D. J., Cooney, J. M., Holland, P. T., Quilliam, M. A., MacKenzie, A. L., Beuzenberg, V., Towers, N. R., Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon*, **43**, 1–9 (2004).
 - 13) Ogino, H., Kumagai, M., Yasumoto, T., Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat. Toxins*, **5**, 255–259 (1997).
 - 14) Aune, T., Sorby, R., Yasumoto, T., Ramstad, H., Landsverk, T., Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon*, **40**, 77–82 (2002).
 - 15) European Commission decision 2002/225/EC (Mar. 15, 2002). Official Journal of the European Communities.
 - 16) Quilliam, M. A., Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.*, **78**, 555–570 (1995).
 - 17) Quilliam, M. A., The role of chromatography in the hunt for red tide toxins. *J. Chromatogr. A*, **1000**, 527–548 (2003).
 - 18) Suzuki, T., Yasumoto, T., Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of the diarrhetic shellfish-poisoning toxins okadaic acid, dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-6 in bivalves. *J. Chromatogr. A*, **874**, 199–206 (2000).
 - 19) Goto, H., Igarashi, T., Yamamoto, M., Yasuda, M., Sekiguchi, R., Watai, M., Tanno, K., Yasumoto, T., Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **907**, 181–189 (2001).
 - 20) Suzuki, T., Beuzenberg, V., MacKenzie, L., Quilliam, M. A., Liquid chromatography-mass spectrometry of spiroketal stereoisomers of pectenotoxins and the analysis of novel pectenotoxin isomers in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *J. Chromatogr. A*, **992**, 141–150 (2003).
 - 21) Suzuki, T., Beuzenberg, V., Mackenzie, L., Quilliam, M. A., Discovery of okadaic acid esters in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand using liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 1,131–1,138 (2004).
 - 22) Suzuki, T., Jin, T., Shiota, Y., Mitsuya, T., Okumura, Y., Kamiyama, T., Quantification of lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in Japanese bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) and comparison with mouse bioassay (MBA) as the official testing method in Japan. *Fish. Sci.*, **21**, 1,370–1,378 (2005).
 - 23) 水産庁長官通達 “ホタテガイ等の貝毒について” 昭和54年5月12日, 54水研第519号 (1979).
 - 24) 厚生省乳肉衛生課長通知 “下痢性貝毒検査法” 昭和56年5月19日, 環乳第37号 (1981).
 - 25) Yasumoto, T., Fukui, M., Sasaki, K., Sugiyama, K., Determinations of marine toxins in foods. *J. AOAC Int.*, **78**, 574–582 (1995).
 - 26) Satake, M., Terasawa, K., Kadowaki, Y., Yasumoto, T., Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogs from toxic scallops. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 5,955–5,958 (1996).
 - 27) Takagi, T., Hayashi, K., Itabashi, Y., Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxin by intraperitoneal injection. *Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.)*, **50**, 1,413–1,418 (1984).
 - 28) Lawrence, J. F., Chadha, R. K., Ratnayake, W. M., Truelove, J. F., An incident of elevated levels of unsaturated free fatty acids in mussels from Nova Scotia and their toxic effect in mice after intraperitoneal injection. *Nat. Toxins*, **2**, 318–321 (1994).
 - 29) Suzuki, T., Yoshizawa, R., Kawamura, T., Yamasaki, M., Interference of free fatty acids from the hepatopancreas of mussels with the mouse bioassay for shellfish toxins. *Lipids*, **31**, 641–645 (1996).
 - 30) Fukushi, A., Imamura, T., Takahashi, H., Itabashi, Y., Suzuki, T., Increase of free fatty acids in the hepatopancreas of scallops kept in freezer. *Fish. Sci.*, **69**, 1,081–1,083 (2003).
 - 31) Ramstad, H., Larsen, S., Aune, T., Repeatability and validity of a fluorimetric HPLC method in the quantification of yessotoxin in blue mussels (*Mytilus edulis*) related to the mouse bioassay. *Toxicon*, **39**, 1,393–1,397 (2001).