

遊離脂肪酸による下痢性貝毒マウス試験偽陽性の発生評価

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者名	橋本,諭 西村,一彦 高橋,健一 板橋,豊
発行元	[日本食品衛生学会]
巻/号	52巻3号
掲載ページ	p. 194-198
発行年月	2011年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



遊離脂肪酸による下痢性貝毒マウス試験偽陽性の発生評価

(平成 22 年 11 月 11 日受理)

橋本 諭^{*1,2} 西村一彦¹ 高橋健一¹ 板橋 豊²

Evaluation of the Possibility That Free Fatty Acids Cause False-Positive Result in Diarrhetic Shellfish Poisoning Mouse Bioassay in Actual Use

Satoshi HASHIMOTO^{*1,2}, Kazuhiko NISHIMURA¹, Kenichi TAKAHASHI¹ and Yutaka ITABASHI²¹Hokkaido Institute of Public Health: Kita-19, Nishi-12,
Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-0819, Japan;²Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University: 3-1-1 Minato-cho,
Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611, Japan; * Corresponding author

Midgut glands of bivalves are used for the mouse bioassay of diarrhetic shellfish poison (DSP). A large quantity of free fatty acids (FFAs) causes a false positive outcome in the assay. To examine whether this is likely to occur under conditions of actual use, we analyzed the contents of the FFAs in the enlarged midgut glands during gametogenesis of Japanese scallops *Patinopecten yessoensis* that had been caught at two points in Hunka Bay on March 27, 2006, because the content of FFAs may increase with activation of lipogenesis for gametogenesis. Fatty acids (FAs) were measured with fluorometric high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-anthryldiazomethane. The total FFAs (14:0, 16:0, 18:0, 16:1, 18:1, 18:4, 20:5 and 22:6) represented 3.3–4.2 wt% of the lipid. The toxic FFAs accounted for 40–43 wt% of the total FFAs. Content of each FFA (18:1, 2.7–5.0 mg/g lipid; 18:4, tr.-2.0 mg/g; 20:4, n.d.; 20:5, 8.0–9.1 mg/g and 22:6, 2.0–2.1 mg/g) was lower than the lethal dose tentatively calculated from the relative toxicity. It appears that the likelihood of FFAs causing false-positives in the mouse bioassay is low if the sample is fresh and is extracted immediately after homogenizing.

(Received November 11, 2010)

Key words: ホタテガイ scallop; 肥大中腸腺 enlarged midgut gland; 遊離脂肪酸 free fatty acid; 多価不飽和脂肪酸 polyunsaturated fatty acid; 下痢性貝毒中毒 diarrhetic shellfish poisoning; マウス毒性試験 mouse bioassay; 偽陽性 false-positive; 蛍光検出高速液体クロマトグラフィー high-performance liquid chromatography-fluorescence detection; 9-アンスリルジアゾメタン 9-anthryldiazomethane

緒言

日本では食用二枚貝の下痢性貝毒検査法としてマウス毒性試験が行われている。マウス毒性試験は、通常の食用二枚貝の場合にはむき身のアセトン抽出物を、大型貝の場合には中腸腺のアセトン抽出物を、3匹のマウスの腹腔内に投与し、マウスの生死を観察する検査法であり、24時間以内に2匹以上死亡した場合を陽性と判定する¹⁾。「体重16~20gのマウスを24時間で死亡させる毒量」を1マウス単位(MU)と定義し、試験液の希釈投与と組み合わせることで、下痢性貝毒の含有量の範囲を表記している。

マウス毒性試験法は、下痢性貝毒に対する特異性が低い

ため、検査結果には下痢性貝毒以外の物質による偽陽性が含まれる可能性がある。このような偽陽性因子の一つに遊離脂肪酸がある。貝が生きた状態であれば体内に蓄積する遊離脂肪酸量は代謝調節されているが、中腸腺には脂質加水分解酵素が存在するため²⁾、死亡後に自己消化による遊離脂肪酸の増加が起こる可能性がある。ただし、現在の日本では検査に用いられる貝は生きた状態で搬入されるため、搬入後の処理が速やかに行われていれば、マウス毒性試験で偽陽性を示す量の脂肪酸が遊離する可能性は低い。

生殖巣が成長後期から成熟期にある春先のホタテガイでは中腸腺の顕著な肥大が観察される。配偶子、特に卵の形成には多量の脂質を要するため、中腸腺における脂質生成は活発となり脂質の蓄積量も増加する。このため、肥大した中腸腺では遊離脂肪酸量も増加していることが考えられる。しかしながら、これまで配偶子形成期に採取されたホ

* 連絡先 satoshi@iph.pref.hokkaido.jp

¹ 北海道立衛生研究所: 〒060-0819 札幌市北区北19西12² 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

タテガイの肥大中腸腺の遊離脂肪酸量や組成を詳細に調べた例は報告されていない。

そこで、本研究では脂肪酸分析用蛍光誘導体化試薬 9-アンスリルジアゾメタン (9-Anthryldiazomethane) を用いた蛍光検出高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC-FL) による遊離脂肪酸測定^{3),4)} を検討し、3月末に採取され、生きた状態で搬入されたホタテガイの肥大中腸腺における総脂質脂肪酸および遊離脂肪酸の含量を測定した。その結果から、肥大期中腸腺中の遊離脂肪酸により下痢性貝毒マウス毒性試験の偽陽性が発生する可能性について評価を試みた。

実験方法

1. 試料

北海道噴火湾西部に位置する長万部(42°33'N140°30'E)と落部(42°12'N140°27'E)の2か所で2006年3月27日に採取された、輸出ホタテガイの貝毒検査のための試料から分取した。試料の輸送中の温度は温度記録計で10分ごとに記録した。冷蔵開始後から試料の受け取りまでの温度変動範囲は-0.7~10°Cであり、輸送中は-0.7~2°Cに保たれていた。遊離脂肪酸測定用には、生きた状態の貝10個(長万部)および15個(落部)を用いた。

2. 試薬

蛍光誘導体化試薬: 9-アンスリルジアゾメタンは同仁(株)から入手した。

標準品: ペンタデカン酸(15:0)を除く飽和脂肪酸、パルミトレイン酸(16:1)、オレイン酸(18:1)、リノール酸(18:2n-6)、 α -リノレン酸(18:3n-3)およびイコセン酸(20:1)は和光純薬工業(株)から、ペンタデカン酸(15:0)、ミリストレイン酸(14:1)、オクタデカテトラエン酸(18:4n-3)、アラキドン酸(20:4n-6)、イコサペンタエン酸(20:5n-3)およびドコサヘキサエン酸(22:6n-3)はシグマ(株)から入手した。

その他の試薬: メタノールとクロロホルムはHPLC用を用いた。ヘキサンは残留農薬測定用を用いた。その他の試薬はすべて特級を使用した。いずれも和光純薬工業(株)より入手した。

3. 試験液の調製

下痢性貝毒検査における通常の操作と同様に、ホタテガイの殻を除去し、むき身総重量を計測した。その後、中腸腺をむき身から分離し、中腸腺総重量を計測した後、中腸腺をホモジナイズした。総脂質はそのホモジネート10gからFolch法⁵⁾に準じて抽出した。得られた総脂質重量を測定した後、ブチルヒドロキシルエンを1 μ g/mL含有するクロロホルム-メタノール(2:1, v/v)に、脂質濃度がほぼ10mg/mLとなるように溶解し、測定まで約3か月間-80°Cで冷凍保存した。測定前に室温に戻し、クロロホルム-メタノール(2:1, v/v)で脂質濃度が100 μ g/mLとなるように希釈したものを試験原液とした。試験原液は5mLずつ共栓付試験管に小分けし、そのうちの5本を測

定に用いた。

脂肪酸測定用の試験液は次のとおり調製した。試験原液5mLから1mLを正確に分取し常法によりけん化した。得られた脂肪酸はヘキサン1mLに溶解し、蛍光誘導体化用の試験液とした。

遊離脂肪酸測定用の試験液は下記のとおり調製した。残った試験原液から3mLを正確に分取し、溶媒をヘキサン3mLに置換した。2mol/L塩酸を3mL加え1分間振とうした後、1,880 \times gで遠心分離し、パスツールピペットで塩酸層を除去した。残ったヘキサン層から2mLをホールピペットで正確に分取し、窒素気流下でヘキサンを除去した後、再度ヘキサン2mLをホールピペットで加えた。このうち1mLを蛍光誘導体化用の試験液とした。

4. 脂肪酸の蛍光誘導体化とHPLC分析

蛍光誘導体化用試験液(脂肪酸の総量が100 μ g未満であること)の溶媒を窒素気流下で除去後、濃度1mg/mLの9-アンスリルジアゾメタン含有メタノール溶液100 μ Lを加え室温暗所に2時間放置し、脂肪酸を9-アンスリルメチル化した。メタノール900 μ Lを加えて全量を1mLとし、誘導体化した脂肪酸をHPLC-FLで測定した。分析条件はTable 1に示した。定量は、同様に誘導体化した各成分(濃度0.2, 1, 5 μ g/mL)の標準品混合液の測定値から作成した絶対検量線法により行った。標準品混合液0.1 μ g/mLを測定した場合、C8カラム測定ではS/Nが7.5~15.2、ODSカラム測定ではS/Nが5.5~10.7であったことから、定量下限値は0.2 μ g/mL(2mg/g total lipidに相当)に設定した。インテグレーターから出力させたクロマトグラムデータは、LC solution v1.11SP((株)島津製作所製)を用いて解析した。保持時間だけでは同定が難しい成分については、西村らの方法⁶⁾に準じ

Table 1. Conditions of fluorometric HPLC

Common conditions	
Apparatus	LC-7000 series (low-pressure mixing)
Column temp.	40°C
Injection volume	1 μ L
Flow rate	1.0 mL/min
Detection	fluorometric (Ex: 365nm; Em: 412 nm)
Conditions for C8 column	
Column	Inertsil C8-3, GL Science (4.6-mm i.d. \times 150 mm, 3- μ m particle)
Eluate	A: methanol-water (85:15, v/v) B: methanol-water (95:5, v/v)
Gradient profile	min 0 20 50 60 70 B% 0 0 50 100 100
Conditions for C18 column	
Column	Superspher RP18e, Merck (4-mm i.d. \times 250 mm, 5- μ m particle)
Eluate	A: methanol-water (90:10, v/v) B: methanol-water (95:5, v/v)
Gradient profile	min 0 60 95 B% 0 100 100

て、高速液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LC-MS) を用いて同定した。

結 果

1. HPLC-FL による蛍光誘導体化脂肪酸の分析

C8 カラム (Inertsil C8-3) と ODS カラム (Superspher RP18e) による蛍光誘導体化脂肪酸の分離をメタノール/水系溶出液を用い検討した。今回測定対象とした脂肪酸を Superspher RP18e カラムを用いて 3 液グラジェント溶出で完全分離した例⁷⁾が報告されているが、本研究ではより簡単な 2 液グラジェント溶出法による分析法を検討した。また、分析時間の短縮化のために C8 カラムによる分析も検討した。その結果、ODS カラムの場合、最も溶出が遅い 20:0 を測定するために 95 分程度 (20:0 保持時間 89.6~90.1 分) 要したが、C8 カラムでは 70 分程度 (20:0 保持時間 66.2~66.3 分) で測定できた。C8 カラム

を用いた測定では、試料から 20:0 (#18) が検出されなかったため (Fig. 1, C8 column, b, c), ODS カラムにおける測定対象から 20:0 を除くことで測定時間の短縮を図った。

C8 カラムでは 14:0 (#5)~20:5 (#6)~18:3 (#7) 間の分離および、15:0 (#9)~22:6 (#10)~20:4 (#11)~18:2 (#12) のそれぞれの脂肪酸間での分離が不完全であった (Fig. 1, C8 column, a)。またロットによっては 20:5 (#6), 22:6 (#10), 20:4 (#11) の保持時間がずれ、隣接するピークと重なる場合もあった。ODS カラムによる測定では、これらのピークの間隔は 22:6 を除き向上したが、一方で 14:1 (#2)~18:4 (#4), 14:0 (#5)~22:6 (#10)~16:1 (#8), 18:2 (#12)~15:0 (#9), 16:0 (#13)~18:1 (#14), 18:0 (#16)~20:1 (#17) の分離が不完全となった (Fig. 1, ODS column, a)。中腸腺試料中の各脂肪酸の分離と夾雑ピークの有無を基に検討した結果、ホタテガイ中腸腺については、18:3, 20:4, 20:5 を ODS カラムで、他を C8 カラムで分析することにより各脂肪酸の含量を定量することができた。しかし、実試料の測定では、抽出液に含まれるさまざまな化合物の影響で保持時間の再現性にばらつきがあり、22:6, 20:4, 18:2 や、標準品と保持時間が近いが夾雑ピークであることが疑われたピークを確認するため、LC-MS による定性分析⁷⁾が必要であった。

2. ホタテガイ試料の総脂質量およびむき身重量における中腸腺の重量比

3 月 27 日に採取した試料の総脂質量は、長万部試料が中腸腺重量の 8.5%、落部試料は 13.1% であり、長万部試料のほうがやや低い値となった。長万部試料の全むき身重量は 560.1 g (10 個)、全中腸腺重量は 70.2 g (10 個) であり、むき身重量における中腸腺重量比は 12.5% であった。一方、落部試料の全むき身重量は 671.9 g (15 個)、全中腸腺重量は 109.4 g (15 個) であり、むき身に対する中腸腺重量比は 16.3% であり、中腸腺重量比も長万部試料のほうが低い値となった。

3. 肥大中腸腺脂質の脂肪酸

肥大中腸腺総脂質を構成する脂肪酸は 20:5 が最も多く、測定した全脂肪酸の 47.2 wt%, 48.8 wt% (長万部、落部、以後同順) を占めていた (Table 2)。次いで 16:0 が 12.7 wt%, 13.7 wt%, 16:1 が 8.4 wt%, 10.2 wt% 存在し、この 3 つの脂肪酸で全脂肪酸重量の約 7 割となった。他の脂肪酸として、14:0 (6.0 wt%, 7.1 wt%), 22:6 (6.9 wt%, 6.0 wt%), 18:4 (5.4 wt%, 5.5 wt%), 18:1 (5.4 wt%, 4.7 wt%), 18:0 (2.6 wt%, 1.4 wt%) が検出され、この 8 脂肪酸で全脂肪酸重量の 9 割以上を占めた。多量に腹腔内投与するとマウスが死亡することが分かっている遊離脂肪酸 (18:1, 18:4, 20:4, 20:5, 22:6)^{8),9)}の総量は全脂肪酸の 66.5~67.5 wt% であり、その 7 割前後を比毒性の高い 20:5 が占めていた。

4. 肥大中腸腺脂質中の遊離脂肪酸

検出された遊離脂肪酸量は総脂質量の 4.2 wt% (長万部)、3.3 wt% (落部) であった (Table 2)。また、検出さ

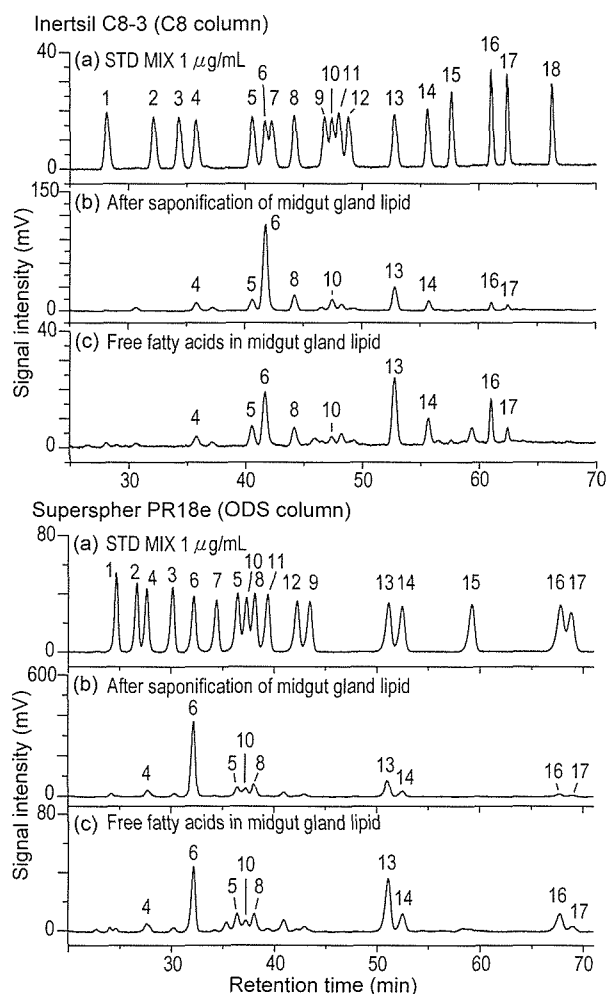


Fig. 1. Separation of the 9-anthrylmethyl esters of fatty acids by reversed-phase HPLC with fluorescence detection

Peak No.: #1 12:0, #2 14:1, #3 13:0, #4 18:4, #5 14:0, #6 20:5, #7 18:3, #8 16:1, #9 15:0, #10 22:6, #11 20:4, #12 18:2, #13 16:0, #14 18:1, #15 17:0, #16 18:0, #17 20:1, #18 20:0

Table 2. Contents of fatty acids in the total lipid of the enlarged midgut glands of scallop *Patinopecten yessoensis*

	Oshamanbe						Otoshibe					
	Fatty acid ^{a)}			Free fatty acid			Fatty acid			Free fatty acid		
	mg/g ^{b)}	RSD% ^{c)}	wt%	mg/g ^{b)}	RSD% ^{c)}	wt%	mg/g	RSD%	wt%	mg/g	RSD%	wt%
12:0	2.0	12.8	0.4	tr. ^{d)}	—	—	tr.	—	—	tr.	—	—
13:0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14:0	28	4.5	6.0	4.0	4.5	9.5	32	5.2	7.1	3.7	22.9	11.4
15:0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16:0	59	6.1	12.7	13	2.8	30.9	62	4.9	13.7	9.5	19.1	29.3
17:0	2.0	3.2	0.4	tr.	—	—	tr.	—	—	tr.	—	—
18:0	12	9.3	2.6	4.0	5.8	9.5	6.2	20.3	1.4	3.6	20.2	11.1
20:0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14:1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16:1	39	4.5	8.4	3.0	5.9	7.1	46	5.1	10.2	2.8	19.3	8.6
18:1	25	6.8	5.4	5.0	4.4	11.9	21	3.6	4.7	2.7	20.2	8.3
20:1	10	5.8	2.1	tr.	—	—	5.2	20.4	1.2	tr.	—	—
18:2n-6	6.0	7.1	1.3	tr.	—	—	2.0	66.2	0.4	tr.	—	—
18:3n-3	4.0	3.1	0.9	tr.	—	—	4.8	6.3	1.1	tr.	—	—
18:4n-3	25	7.7	5.4	2.0	6.3	4.8	25	2.1	5.5	tr.	—	—
20:4n-6	2.0	5.8	0.4	tr.	—	—	tr.	—	—	tr.	—	—
20:5n-3	220	5.0	47.2	9.1	9.6	21.6	220	5.8	48.8	8.0	15.0	24.7
22:6n-3	32	5.0	6.9	2.0	20.8	4.8	27	2.6	6.0	2.1	9.4	6.5
Total	466		100	42		100	451		100	33		100

^{a)} Each value is included the content of the free fatty acid.

^{b)} Content per 1 g of total lipid

^{c)} Standard deviation/mean×100, replication: 5

^{d)} tr.: <2 mg/g total lipid

れた遊離脂肪酸の重量比と総脂質における脂肪酸の重量比を比較すると、遊離脂肪酸 16:0 の比率は全遊離脂肪酸の 30.9 wt%, 29.3 wt% (長万部, 落部, 以後同順) と総脂質における 16:0 の重量比よりも高く、一方、遊離の 20:5 の全遊離脂肪酸に占める比率は 21.6 wt%, 24.7 wt% とやや低い比率であった。また、遊離の飽和脂肪酸 14:0 の比率が 9.5 wt%, 11.4 wt%, 18:0 が 9.5 wt%, 11.1 wt%, 遊離の一価脂肪酸 18:1 が 11.9 wt%, 8.3 wt% と総脂質におけるそれぞれの重量比よりも高い値であり、遊離脂肪酸の重量比と総脂質における脂肪酸重量比の間には違いがみられた。ほかに 16:1 (7.1 wt%, 8.6 wt%), 22:6 (4.8 wt%, 6.5 wt%), 18:4 (4.8 wt%, tr.) が検出され、総脂質脂肪酸で主要であった 8 脂肪酸が遊離脂肪酸としても検出された。マウス毒性の高い多価不飽和脂肪酸の占める割合は全遊離脂肪酸の 30~33 wt%, 低毒性の 18:1 を加えても 40~43 wt% であった。

考 察

中川らは、海域は異なるが、養殖ホタテガイ中腸腺の脂質含量の変動を一年間調査しており、その変動範囲が 2.7~13.3% であったと報告¹⁰⁾ している。今回の試料の脂質含量は 8.5% (長万部), 13.1% (落部) であり、脂質が豊富であると考えられる。

ホタテガイ肥大中腸腺から抽出した脂質を調べた結果、総脂質における全脂肪酸の 47.2~48.8 wt% を 20:5 が占

めていることが明らかとなった。脂肪酸の純品をマウスの腹腔内に投与した場合の比毒性は脂肪酸 1 g において 18:1 は 35 MU, 18:2 は 83 MU, 18:3 は 167 MU, 18:4 は 83 MU, 20:4 は 185 MU, 20:5 は 167 MU, 22:6 は 83 MU と報告^{8),9)} されており、20:5 は 20:4 に次いでマウス毒性が高い脂肪酸である。20:5 の比率が高い脂質を多く含有する試料が加水分解を受けた場合、多量の 20:5 が遊離し、マウスの死亡を引き起こす可能性がある。中腸腺は肝臓の働きをする器官であり脂質加水分解酵素²⁾ を含む多くの酵素を含有しているが、本測定や通常の検査では酵素失活処理は行っていない。試験液の調製時¹¹⁾、あるいは試験液の冷凍保管中¹²⁾ に自己消化が進む可能性は十分に考えられ、注意を要する。

しかしながら、本研究で用いた試料からは多量の遊離脂肪酸は検出されなかった。高木ら⁹⁾ はホタテガイ試料を用いて遊離脂肪酸の毒性評価を行ったが、実験に用いた試料を測定まで -20℃ で冷凍保存していた。福士ら¹²⁾ は -20℃ および -45℃ の冷凍保存ではホタテガイ中腸腺試料中の遊離脂肪酸量が増加することを報告している。このため、高木らの試料は脂質からの脂肪酸の遊離が進行した状態であったと推測される。高木らの試料では遊離脂肪酸量は抽出物の 13.5~19.5 wt% に達していたが、生きた貝を用いた我々の試料では遊離脂肪酸の量は総脂質の 4.2 wt% (長万部) または 3.3 wt% (落部) 程度であった。また、その遊離脂肪酸の中でマウス毒性が報告されている脂

肪酸は総脂質の1.8 wt% (長万部), 1.3 wt% (落部) と少量であった。

本試料から検出された遊離脂肪酸の量は少なく, 本試料の前処理および抽出液の -80°C での冷凍保存に問題はなかったと考えられる。貝の処理, および有機溶媒による抽出操作までは通常検査と同じであり, 特別な処理は加えていない。中腸腺中に存在する酵素による脂質加水分解反応の進行を抑えるために, 試料に生きた状態のホタテガイを用いること, また, 中腸腺のホモジナイズ後の溶媒抽出を速やかに行うことに留意すれば, 前処理中に多量の脂肪酸が遊離することはないと考えられる。

次に, 本研究で使用した試料から検出された遊離脂肪酸がマウス毒性試験結果に与える影響について評価を試みた。機器測定値からマウス毒性試験の結果を推定する方法として, 各比毒性値をもとに測定値から毒量(MU)を算出し, それらを加算して総毒量(総MU)を求める評価法がしばしば用いられる。しかし, それぞれ毒性や毒力が異なる遊離脂肪酸の毒量(MU)を加算できるとする根拠となるデータはまだない。このため, 本研究では検出されたそれぞれの遊離脂肪酸量と1 MU相当量との比較のみを行った。

遊離多価不飽和脂肪酸および遊離の18:1の1 MU相当量は各比毒性値から算出できる。いずれかの脂肪酸の投与量が1 MU相当量を超えていれば, マウス毒性試験の結果が陽性になる可能性が高い。投与量, つまりむき身ホモジネート 25 g^{*1} に含まれる各遊離脂肪酸量は, 測定値, 中腸腺の脂質含量および中腸腺とむき身の重量比を用いて算出できる。本研究で用いた試料からは, 毒性の高い遊離脂肪酸として, 20:5, 18:1, 18:4, 22:6の4つが検出されたが, 20:5の投与量は長万部試料で2.4 mg, 落部試料で4.3 mg, 18:1は長万部1.3 mg, 落部1.6 mg, 18:4は長万部0.5 mg, 22:6は長万部0.5 mg, 落部1.1 mgであった。比毒性値^{8),9)}を基に1 MU相当量を算出すると20:5は6 mg, 18:1は29 mg, 18:4と22:6は12 mgであり, 検出された遊離脂肪酸はいずれも1 MU相当量を超えていないことから, マウス毒性試験の結果が陽性になると推定できる試料はなかった。1 MUはその定義より全数致死量または99%致死量を想定していると考えられる。このため, 投与量が致死量を下回っていてもマウスが死亡する可能性があったが, 下痢性貝毒検査の結果は陰性であり, 両試料から検出された遊離脂肪酸量でマウスが死亡する可能性は低いと考えられる。

しかしながら, 本研究で用いた試料の20:5の投与相当量は1 MU相当量の40~72%に相当していた。1 MU相当量を超える20:5を含有している試料が存在する可能性は十分考えられる。また, 複数の遊離脂肪酸を同時投与した場合の影響についても検討しなければならない。今後, マウス毒性試験に機器測定を併用し, 遊離脂肪酸含量につ

いての基礎データを蓄積していく必要があると考えられる。

試料として生きた貝を用い, かつ, ホモジナイズ後の溶媒抽出を速やかに行えば, ホタテガイの肥大中腸腺のように20:5に富む脂質が豊富な試料であっても, マウス毒性検査において偽陽性とならないことが本研究により初めて確認された。

文 献

- 1) Nihon Syokuhin Eisei Kyokai ed. "Gerisei Kaidoku", Syokuhin Eisei Kensa Shishin—Rikagaku Hen. Tokyo, Nihon Syokuhin Eisei Kyokai, 2005, p. 680-685.
- 2) Itabashi, Y., Ota, T. Lipase activity in scallop hepatopancreas. *Fish. Sci.*, **60**, 347 (1994).
- 3) Suzuki, T., Matsuyama, Y. Determination of free fatty acids in marine phytoplankton causing red tides by fluorometric high-performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, 1211-1214 (1995).
- 4) Nishimura, K., Suzuki, T., Itabashi, Y. Determination of free fatty acids in milk and dairy products by reverse-phase HPLC with fluorescence detection. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, 230-233 (2002).
- 5) Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).
- 6) Nishimura, K., Suzuki, T., Katsura, E., Itabashi, Y. Reversed-phase HPLC-MS analysis of fatty acid 9-anthrylmethyl ester derivatives. *Bunseki Kagaku*, **53**, 533-539 (2004).
- 7) Terasaki, M., Itabashi, Y., Suzuki, T., Nishimura, K. An improved method for determining the composition of FFA in red tide flagellates by RP-HPLC with fluorescence detection. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, 1181-1186 (2002).
- 8) Takagi, T., Hayashi, K., Itabashi, Y. Toxic effect of free polyenoic acids: A fat-soluble marine toxin. *Hokkaido Daigaku Suisangakubu Kenkyu Iho (Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.)*, **33**, 255-262 (1982).
- 9) Takagi, T., Hayashi, K., Itabashi, Y. Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxin by intraperitoneal injection. *Nihon Suisan Gakkaishi (Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.)*, **50**, 1413-1418 (1984).
- 10) Nakagawa, Y., Hayashi, K. On the seasonal variations of the lipid contents of the cultured scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay), in lake Saroma. *Hokkaido Suisan Gakkaishi (Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.)*, **35**(9), 58-66 (1978).
- 11) Kramer, J. K., Hulan, H. W. A comparison of procedures to determine free fatty acids in rat heart. *J. Lipid Res.*, **19**, 103-106 (1978).
- 12) 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**, 1081-1083 (2003).

*1 輸出用ホタテガイ検査において, 投与1回分の試験液調製に要するむき身ホモジネート重量。

遊離脂肪酸による下痢性貝毒マウス試験偽陽性の発生評価
(ノート)

橋本 諭* 西村一彦 高橋健一 板橋 豊
食衛誌 52(3), 194~198 (2011)

多量の遊離脂肪酸は下痢性貝毒マウス毒性試験において偽陽性を起こす。脂質含量が多い試料として、配偶子形成期にあるホタテガイの肥大中腸腺の脂質加水分解脂肪酸量および遊離脂肪酸量について測定し、偽陽性の発生評価を行った。脂肪酸は 9-アンスリルジアゾメタンを用い蛍光ラベル化した後、蛍光検出高速液体クロマトグラフィーで測定した。肥大中腸腺は総脂質脂肪酸の 47~49 wt% を比毒性の高い 20:5 が占めており、偽陽性を起こす可能性を有していた。しかし、検出された遊離脂肪酸量は総脂質の 3.3~4.2 wt% であり、マウス毒性が報告されているものは総脂質の 1.3~1.8 wt% であった。いずれも致死量相当量を下回ることから、生きた貝を用い、ホモジナイズ後速やかに抽出を行えば、ホタテガイ肥大中腸腺試料であっても、貝毒下痢性検査において偽陽性が発生する可能性は低いと考えられる。

* 北海道立衛生研究所生物科学部
