

海水試料の毒量分析による麻痺性貝毒モニタリング 手法の開発と検証

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2024-08-06
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 及川, 寛, 山本, 圭吾, 長井, 敏
	メールアドレス:
URL	所属:
	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2010534

This work is licensed under a Creative Commons
Attribution 4.0 International License.



原著論文

海水試料の毒量分析による 麻痺性貝毒モニタリング手法の開発と検証

及川 寛^{*1}・山本圭吾^{*2}・長井 敏^{*3}

Analysis of Paralytic Shellfish Toxin Content in the Water Column as an Alternative Method of Monitoring *Alexandrium tamarense*

Hiroshi OIKAWA, Keigo YAMAMOTO and Satoshi NAGAI

Several species of dinoflagellate produce paralytic shellfish toxin (PST), the accumulation of which in bivalves is a serious problem to public health and the fisheries and aquaculture of bivalves. The causative substances are saxitoxin and its analogues. The direct measurement of these substances in seawater samples was studied as an alternative method for the monitoring of the causative dinoflagellate *Alexandrium tamarense* by microscopic observation. Toxin profiles in 23 strains of *A. tamarense* isolated from Osaka Bay were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC), and the major toxin in these strains was C2 (N21-sulfocarbamoyl gonyautoxin-3). The S/N (signal to noise ratio) of the C2 peak in HPLC analysis was over the quantitative level ($S/N > 10$) when the cell density of *A. tamarense* in the sample was > 100 cells/mL. Since the prefectural government has called for attention to PST in bivalves when the cell density of *A. tamarense* exceeds 5 cells/mL, the volume of the sample should be reduced to 1/20 to detect C2 by HPLC for monitoring purposes. In spring 2012, seawater samples were continuously collected at two monitoring sites in Osaka Bay, and the toxin contents and cell density of *A. tamarense* were analyzed. The toxin contents by direct measurement had good correlations (St. 12: $r=0.834$; St. 19: $r=0.817$) with the cell density. These results indicate the possibility of the direct measurement of PST as an alternative method of monitoring.

2013 年 7 月 12 日受付, 2013 年 10 月 29 日受理

麻痺性貝毒の原因成分はサキシトキシンとその類縁体成分である。海洋環境では 10 種以上の渦鞭毛藻が麻痺性貝毒成分を生産する種として知られている^{1,4)}。これらの渦鞭毛藻が出現した海域ではフィルターフィーダーである二枚貝などが貝毒成分を蓄積し、それをヒトが食べた場合に麻痺性貝毒による食中毒が起こる可能性がある。国内では *Alexandrium tamarense*⁵⁾, *A. catenella*⁶⁾, *A. tamiyavanichii*⁷⁾, *Gymnodinium catenatum*⁸⁾ の 4 種を原因藻

とした二枚貝の毒化が報告されているが、毒化した二枚貝の採捕や流通を防ぐために、生産者ならびに都道府県の関係機関は二枚貝を対象とした検査を行い⁹⁾、可食部が規制基準値となる 4 MU/g を超えた場合に採捕や出荷を自粛する措置がとられる^{10,11)}。このように、二枚貝の毒化は食品衛生上の大きな問題であるとともに漁業生産上も大きな障害であり、2012 年には 11 の道・県で採捕や出荷の自粛措置がとられた*。生産現場では二枚貝の

*1 独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所
〒739-0452 広島県廿日市市丸石 2-17-5

National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, FRA, 2-17-5 Maruishi, Hatsukaichi, Hiroshima 739-0452, Japan
oikawah@fra.affrc.go.jp

*2 地方独立行政法人 大阪府立環境農林水産総合研究所水産技術センター

*3 独立行政法人水産総合研究センター 中央水産研究所

毒化を調べるほかにも、水産関係機関を中心に二枚貝の毒化予察を目的として原因となる渦鞭毛藻のモニタリングを行っている^{11,12)}。毒化予察は、毒化した貝類を流通させてしまう危険性をより小さくすることや、計画的な出荷のための有益な情報となる。現在、原因藻のモニタリングは顕微鏡観察による計数が一般的であり、この方法は顕微鏡以外に特別な設備は必要なく簡便な方法である。しかし、主要な原因藻である *Alexandrium* 属は形態的に類似したものが多く、国内でも有毒種、無毒種の両方が出現する¹³⁻¹⁵⁾。また、国内ではこれまで毒化の原因となっていないが、有毒とされる種が散見されることがあり¹⁶⁾、これらを顕微鏡観察により判別するには相当な技術や知識・経験を必要とする。そのため、限られた人材で必要十分な数の観測定点を網羅することが困難な場合がある。このように原因藻の顕微鏡観察によるモニタリングは安価で簡便に行うことができる手法である一方、配置できる人数や観測者の技術・経験によってその情報量と精度が左右される可能性がある。また、麻痺性貝毒のリスクの根源は原因藻が生産する毒成分であり、その毒成分の種類や量は原因種や同じ種でも株によって異なることが知られている^{2,17)}。すなわち、原因藻の計数結果はそのようなリスクの違いを正確に反映したものではない。

そこで、本報告では原因藻を含む海水の麻痺性貝毒量を直接測定してその毒量をモニタリング指標とすることを目指し、顕微鏡観察によるモニタリングで二枚貝の毒化に注意を喚起する細胞密度（大阪湾、5 cells/mL）以下の海水でも麻痺性貝毒成分量を測定できる手法を検討した。さらに、検討した測定方法により、近年麻痺性貝毒の被害が頻発する大阪湾¹⁸⁾で採取した海水試料の毒量を測定し、顕微鏡観察で求めた原因藻の計数値と比較することにより本手法の貝毒予察指標としての可能性を検証した。

材料と方法

A. tamarense の毒成分組成 本報告において対象海域とした大阪湾で出現する麻痺性貝毒原因藻 *A. tamarense* の主要な毒成分を明らかにするため、大阪湾から本種を分離培養して毒成分組成を調べた。大阪湾で2011年4月5日に採取した海水から *A. tamarense* を1細胞ずつ改変 f/2 培地を満たした浮遊細胞培養用24穴プレートに分離し、温度15℃、光量子束密度を100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、明暗条件をD:L=8h:16hとしたグロースチャンバー内で培養した。そのうち増殖が確認出来た株は、最終的に50 mLの培地を入れた100 mL容のガラス製フラスコまで培養サイズを大きくして2週間培養し、その培養液12

mLを遠心分離（600 g, 3 min）して *A. tamarense* 藻体を回収した。回収した藻体は0.2 mol/Lの酢酸で2倍希釈（w/v）したのちに2分間の超音波破碎を行い、遠心式の限外ろ過フィルター（Ultrafree, UFC30GV00, Millipore）でクリーンアップして後述の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析に供した。なお、遠心分離前の培養液中の細胞数から遠心分離後の遠心上清中に認められた細胞数を差し引いて分析試料中の細胞数を求め、細胞あたりの毒量算出に用いた。

海水試料処理方法の検討 大阪湾で行政が麻痺性貝毒の発生に注意を喚起する *A. tamarense* の細胞密度は5 cells/mLであり、この密度の海水試料で主要な麻痺性貝毒成分が測定できるように海水試料の濃縮方法を検討した。検討には、大阪湾で分離した培養株のうち、細胞当たりの毒量が少なく比較的増殖がよいOSK-6株を用いた。まず、海水試料の濃縮に用いるプランクトンネットの目合いについて、*A. tamarense* の細胞密度が1,000 cells/mLとなるように海水試料を調製し、この海水試料1 Lをろ過濃縮したときにネットを通過した細胞の数を調べて使用する目合いを判断した。なお、ネットの目合いは10, 15, 20, 30 μm の4種とし、ろ過には、現場での使用を考慮し、直径10cm、長さ5cmの塩ビ管にプランクトンネットを貼り付けた簡易のろ過器を使用した。

次に、*A. tamarense*（OSK-6株）の細胞密度が5, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 cells/mLとなるように海水試料を調製し、この海水試料を後述のHPLC分析に供して主要なPSP成分について定量下限となる細胞密度を求めた。そして、その結果から5 cells/mLの海水の毒成分測定に必要な濃縮倍率を判断した。このときの海水試料も0.2 mol/Lの濃度の酢酸で2倍希釈（v/v）し、2分間の超音波破碎を行い、限外ろ過フィルター（Ultrafree, UFC30GV00, Millipore）でクリーンアップして分析に供した。なお、定量下限は対象成分のS/N比により判断し、その値が10以上の場合を定量可能とした¹⁹⁾。

現場海水の毒量と原因藻密度の比較 大阪湾（図1）において2定点（St. 12およびSt. 19）をもうけ、麻痺性貝毒の発生時期である2012年2月～5月に原則として週1回採水し、海水試料中の麻痺性貝毒量の分析と原因藻の顕微鏡観察による計数を行い結果を比較した。海水試料を宮村ら²⁰⁾の方法に従って内径35mm、長さ10mmのプラスチック製ホースを垂直に沈めて柱状に採水し、全量をポリバケツで受けたのち2 Lをプラスチックボトルに入れて広島県内の所属する研究所に送付した。海水試料は採取翌日の午前中に受け取り、本報告で検討した方法により1 Lを5-10 mLに濃縮処理した。濃縮処理後

* 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課事務連絡（平成24年12月20日、No. 25）貝毒発生に伴う出荷自主規制措置及び解除について。

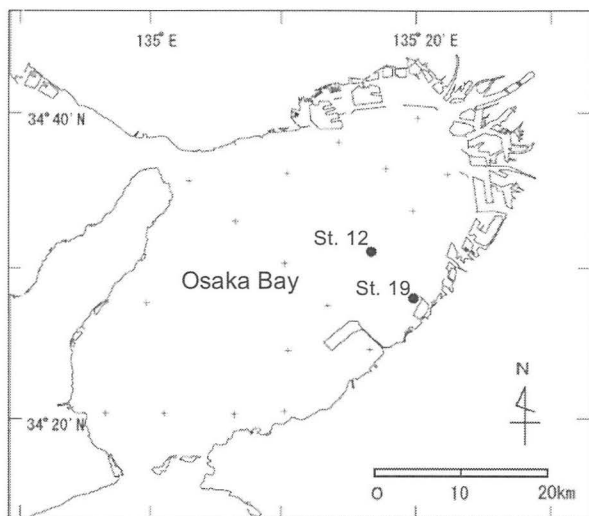


図 1. 大阪湾における現場海水試料の採水地点

の試料は他の分析と同様に 0.2 mol/L の酢酸で 2 倍希釈 (w/v) し、超音波破碎後に限外ろ過フィルターでクリーンアップして分析に供した。また、これとは別に、海水 100 mL を 15 μ m のプランクトンネットを用いて 10 mL 前後に濃縮し、そのうち 1 mL を倒立顕微鏡により検鏡して *A. tamarens* の細胞数を計数した。検鏡は 1 試料につき 3 回行い、平均値をその試料の細胞密度とした。

HPLC による麻痺性貝毒成分の分析 HPLC 分析は

Oshima²¹⁾が報告したポストカラム蛍光法により行い、分析用標準品は農林水産省消費安全局から配布された gonyautoxin 1 (GTX1), GTX2, GTX3, GTX4, decarbamoyl GTX2 (dcGTX2), dcGTX3, N21-sulfocarbamoyl gonyautoxin 2 (C1), N21-sulfocarbamoyl gonyautoxin 3 (C2), neosaxitoxin (neoSTX) と、水産総合研究センター中央水産研究所渡邊龍一博士より分与いただいた GTX5, GTX6, 当所にて製造し広島大学浅川准教授に定量していただいた saxitoxin (STX) の計 12 成分を用いた。HPLC 分析装置は Hitachi 製の L-7250 オートサンプラー, L-7100 送液ポンプ, L-7300 反応槽 (65 $^{\circ}$ C), L-7480 蛍光検出器 (励起波長 330 nm, 蛍光波長 390 nm) を使用し、分析用カラムは Inertsil C8-3 (GL サイエンス, 4.6 mm id $\times$ 150 mm) を用いた。

結 果

A. tamarens の毒成分組成 大阪湾から分離した 23 株では、標準品として用いた 12 成分のうち GTX1, GTX3, GTX4, GTX5, C1, C2, neoSTX, STX, dcGTX3 の 9 成分が検出された (図 2)。このなかで第一の主要な成分である C2 の組成比は 28.5-79.6 mol% の範囲に、第二の主要な成分である GTX4 の組成比は 7.4-44.8 mol% の範囲に分布し、この上位 2 成分を株ごとに合計 (C2 + GTX4) した割合は 69.0-97.5 mol% となった。この合計値を単純に平均した値は 85.4 mol% となり、全毒成分の 8 割以上をこの 2 成分で占めるという結果であ

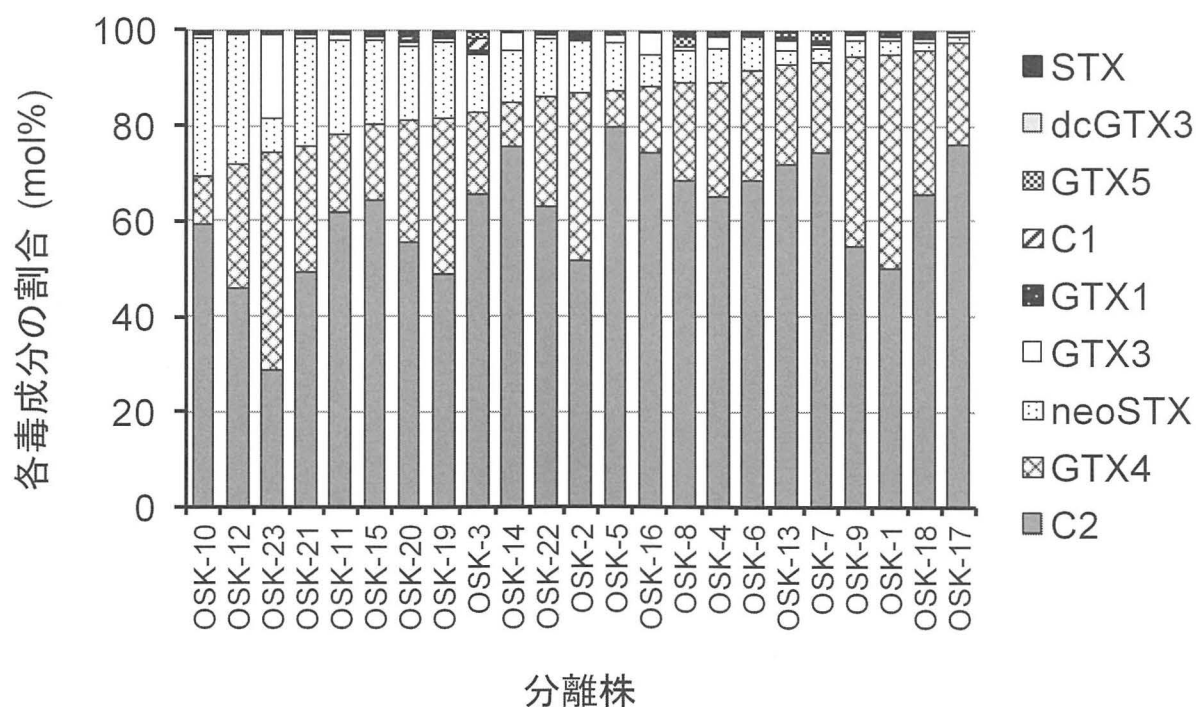


図 2. 大阪湾から分離した *Alexandrium tamarens* の麻痺性貝毒成分組成

った。また、細胞あたりの毒量は 12.2 fmol/cell から 129.9 fmol/cell まで株ごとに大きく異なっていた。

海水試料処理方法の検討 大阪湾の *A. tamarense* は C2 および GTX4 の 2 成分が主要成分であることから、*A. tamarense* の細胞密度が 5 cells/mL あるいはそれ以下でこの 2 成分を検出するための海水処理方法を検討した。

まず、培養した *A. tamarense* (OSK-6 株) を添加した海水試料を用いてろ過試験を行い使用する目合いを検討した。各目合いにおいてネットを通過した *A. tamarense* 藻体の割合を表 1 に示したが、30 μm ではほとんど全てが、20 μm の目合いでは 7 割ほどがネットを通過してしまうことがわかった。一方、15 μm の目合いでは通過する割合は 5% 程度であり、10 μm では 1% ほどしか通過しなかった。このうち 10 μm の目合いは、ろ過に時間がかかるうえ現場海水では目合いが小さいため珪藻などにより目詰まりが生じて高倍率に濃縮できないこと

表 1. 各種目合いのプランクトンネットを通過した *Alexandrium tamarense* 培養株細胞の割合

目 合 い (μm)	通 過 し た 割 合 * (%)
10	0.6 $\pm$ 0.04
15	5.5 $\pm$ 0.90
20	74.2 $\pm$ 8.3
30	98.7 $\pm$ 4.1

* 平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$)

表 2. 各種細胞密度に *Alexandrium tamarense* 培養株* を添加した海水試料の HPLC 分析における麻痺性貝毒成分 C2 および GTX4 の S/N 比

細胞密度 (cells/mL)	S/N (C2) ^a	S/N (GTX4) ^b
5	NA**	NA
50	5.7	NA
100	11.2	1.4
200	23.3	1.9
400	50.6	3.7
600	66.8	4.8
800	92.6	7.2
1000	126.9	9.5

* 使用株 (OSK-6) の毒量は C2 が 10 fmol/cell, GTX4 が 3.4 fmol/cell

** ピーク不検出

^{ab} 2 回の分析の平均値

から、濃縮処理には 15 μm の目合いのプランクトンネットが適当と判断した。

次に、海水の濃縮倍率を検討するため各種の細胞密度に OSK-6 株を添加した海水試料の HPLC 分析を行い、C2 および GTX4 の 2 成分について S/N 比を求めた (表 2)。S/N 比とはベースラインノイズに対するピーク高さの比であり、一般的に定量下限は $S/N > 10$ とされる¹⁹⁾。したがって、C2 では細胞密度が 100 cells/mL で S/N は 10 を超えており、5 cells/mL の細胞密度を想定すると、20 倍の濃縮で C2 は定量できると考えられた。一方、組成比の低い GTX4 は 1000 cells/mL で S/N が定量下限に近い 9.5 であった。このことから、5 cells/mL の細胞密度の試料で GTX4 を定量するには 200 倍以上の濃縮が必要と考えられた。

現場海水の毒量と原因藻密度の比較 ここまで検討した手法により、大阪湾の 2 定点において柱状採水した海水試料の毒量値を分析するとともに、*A. tamarense* の出現細胞を顕鏡により計数して細胞密度を求め、両者の結果

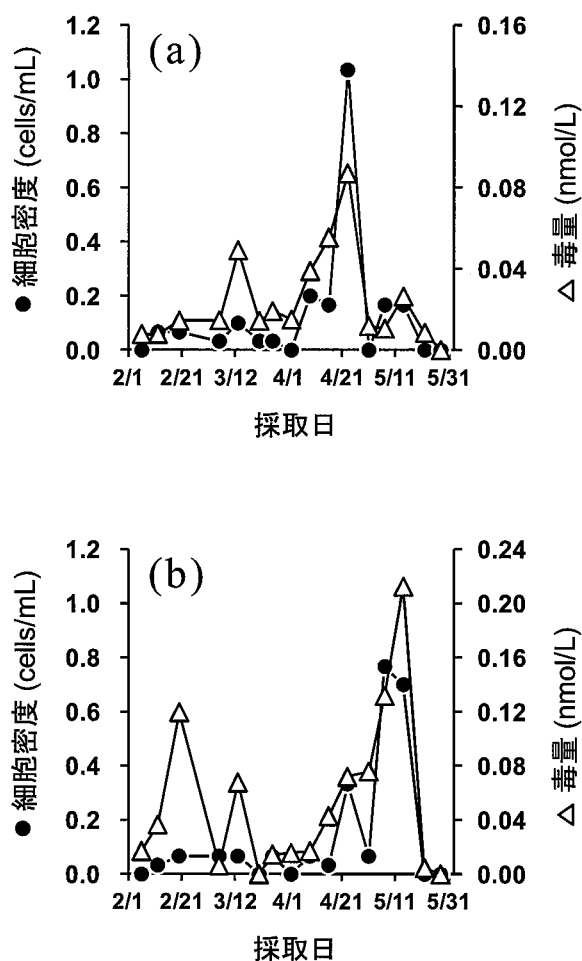


図 3. 大阪湾の St. 12 (a) および St. 19 (b) で採取した海水試料の *Alexandrium tamarense* 細胞密度 (●) と測定した毒量値 (Δ) の推移

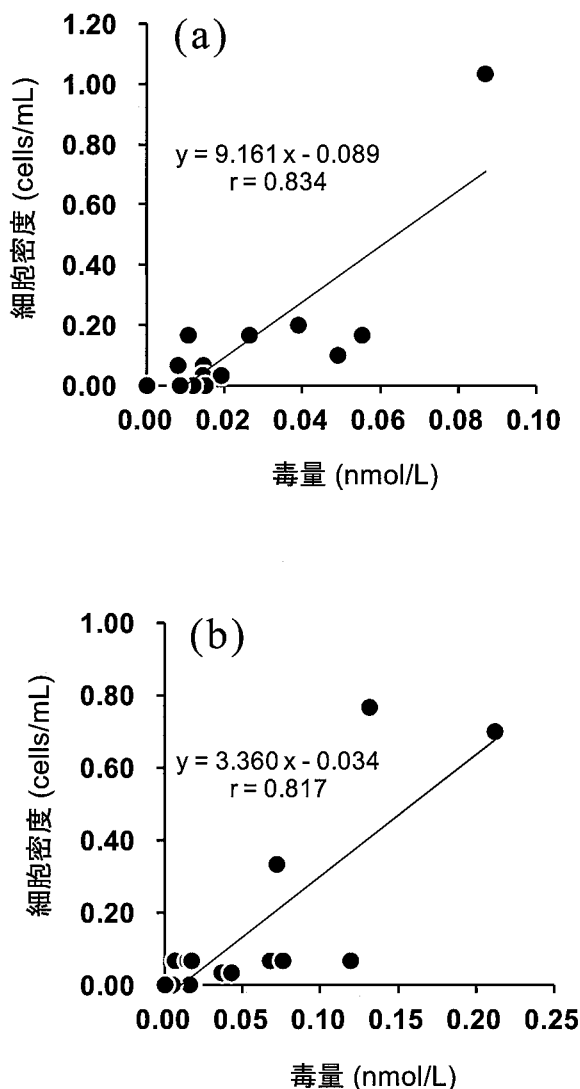


図 4. 大阪湾の St. 12 (a) および St. 19 (b) で採取した海水試料における毒量値と *Alexandrium tamarense* 細胞密度の相関

を比較した (図 3)。海水試料は例年麻痺性貝毒が発生する春季を中心に 4 ヶ月にわたり採取したが、*A. tamarense* の最高細胞密度は St. 12 で 4 月 23 日の 1.0 cells/mL、St. 19 で 5 月 7 日の 0.77 cells/mL であり、2 定点とも大阪湾で麻痺性貝毒の注意喚起となる 5 cells/mL を上回ることにはなかった。今回の一連の毒量分析のための試料は、5 cells/mL 以下でも毒成分を検出できるように 1 L の海水試料を 5-10 mL (100-200 倍) に濃縮したため *A. tamarense* は低密度であったが最も組成比が高いと思われる C2 を検出することができた。検出した麻痺性貝毒成分はこの C2 のみであったが、毒量のピークと細胞密度のピークはほぼ一致した。また、毒量値と細胞密度について回帰分析した結果を図 4 に示したが、相関係数は St. 12 と St. 19 ではそれぞれ 0.834 と 0.817 であり、ともに良い相関を示した。一方、2 つの定点の毒量の最大値を比較すると、St. 12 は 0.087 nmol/L、St. 19 は 0.21

nmol/L であり、細胞密度の最大値がわずかに小さい St. 19 のほうが高い毒量値を示した。

考 察

麻痺性貝毒の原因物質は、*A. tamarense* など特定の渦鞭毛藻類が産生する毒成分であり^{1,4)}、毒成分量のデータはリスクの多寡を直接反映するものである。また、経験が必要とされる微細藻類の形態による判別と異なり、毒成分のピークを確認することで容易にかつ確実に有毒種の出現を判断できる。これまでに海水試料中に微量に存在する毒成分量を測定する手法として大島²²⁾が報告した方法がよく知られる。この方法は、海水試料を活性炭カラムを通して貝毒成分を吸着させた後、蒸留水により洗浄して脱塩し、さらに酢酸とエタノールを含む溶媒で溶出した毒成分を減圧濃縮して毒量を測定する。宮村²⁰⁾は同手法により測定した海水懸濁物中の毒量と二枚貝毒化との対応を調べて予察指標としての有効性を示した。しかし、この手法は試料処理や分析に時間がかかることから、顕微鏡観察に代わる選択肢にはなっていないのが現状である。そのため、本報告ではまず海水試料中の毒成分量を簡易な濃縮処理だけで直接測定する手法を検討した。その結果、目合い 15 μ m のプランクトンネットにより 20 倍に濃縮した試料の分析により、大阪湾で注意喚起が必要とされる *A. tamarense* の細胞密度 (5 cells/mL) において主要な貝毒成分である C2 の定量が可能 (S/N>10) であることがわかった。また、C2 の次に組成比が高かった GTX4 の場合は、200 倍以上の濃縮で定量が可能であると考えられた。なお、本報告において使用した HPLC 装置は購入後 15 年が経過したもので、近年開発が進む高感度な液体クロマトグラフィー装置^{23,24)}ではないが、このような一般的に普及している HPLC 装置で検出感度は十分であった。

次に、実際に大阪湾定点で採取した現場試料を分析してこの手法の検証を行った。試料採取を行った 2012 年は *A. tamarense* の出現密度は最大でも 1 cells/mL 程度と低かったが、濃縮倍率を高めることでこのような低密度の *A. tamarense* の出現時にも組成比の高い C2 成分を検出することができ、毒量値と *A. tamarense* の細胞密度に良い相関を得た。今回は、二枚貝が毒化するような高い細胞密度の海水試料について分析できなかったが、そのような試料ではより多くの毒成分が検出されるため、より精度の高いデータとなることが期待できる。これらのことから、本手法は原因藻の計数によるモニタリングを代替できる可能性を持つと考える。また、2 つの定点の毒量値を比較すると、細胞密度の小さい St. 19 のほうが毒量値は高い値を示した。この原因としては、今回大阪湾で分離した 23 株の *A. tamarense* でも細胞当たり毒量は株間で 10 倍を超える差があったことから、St. 12 と St. 19 では異なる毒含量の集団となっていた可能性が考

えられる。このようなリスクの違いは出現細胞数のデータからは直接読み取ることができないが、毒量値を分析した場合には把握することが可能であり本手法の利点を示した結果と言える。

一方で、顕微鏡観察による計数と比べると毒量分析そのものにはまだ時間がかかるのは否めない。麻痺性貝毒成分は20種以上の成分が知られており、大島の方法²¹⁾によるHPLC分析はそれら多成分の分離に優れるが、すべての成分を分析するには3種類の溶離液を使い分けて、それぞれ20分前後の分析時間が必要である。大阪湾の*A. tamarense*はC2とGTX4が主要な毒成分であるが、両者の分析には異なる溶離液による2回の分析が必要であり40分程度を要する。そのため、現時点でも微細藻類の形態判別に習熟している場合には顕微鏡観察が迅速・簡便な手法である。しかしながら、HPLC分析では多検体を自動で連続分析することが可能であり、多くの試料を一度に分析する場合に自動化の恩恵は大きい。したがって、出荷自粛を行う海域や期間をきめ細かく設定するために多くの定点からのデータを得ることが必要な場合などは本手法の導入にもメリットがあると考ええる。また、ハイスループットな超高速液体クロマトグラフィー²³⁾や液体クロマトグラフィー/質量分析²⁴⁾、同時に多検体の分析が可能なELISA法による麻痺性貝毒の分析^{25,26)}が利用可能であれば、分析時間そのものの短縮が期待できる。

本報告では、海水中の麻痺性貝毒量を貝毒予察の指標として利用するための検討を行い、簡易な濃縮処理で原因藻のモニタリングに必要とされるものと同等な感度で麻痺性貝毒成分量を測定することが可能であることを示した。また、現場で採取した海水においても毒量と原因プランクトンの出現密度には良い相関が認められた。しかし、分析そのものに要する時間の短縮や、原因藻の出現密度が低く検証することができなかった二枚貝の毒性との相関性についてなど、今後取り組むべき課題も残されている。海水中の毒量を指標とする方法は、原因藻の種類や海域によらない汎用性の高い手法となる可能性があり、これらの問題を解決して実用できる技術にしていきたいと考えている。

謝 辞

麻痺性貝毒分析に使用した標準品のうち、サキシトキシシン標準品の定量にご協力いただいた広島大学生物圏科学研究科浅川 学准教授に感謝する。また、サキシトキシシン以外の貝毒標準品は、農林水産省消費安全局海洋生物毒安全対策事業ならびに中央水産研究所渡邊龍一研究員からご提供いただいた。ここに深謝する。なお、本研究の一部は農林水産技術会議委託プロジェクト研究「海洋微生物解析による沿岸漁業被害の予測・抑制技術の開発」の一部として行われた。

文 献

- 1) HALLEGRAEFF, G.M. (1993) A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, **32**, 79-99.
- 2) LANDSBERG, J.H. (2002) The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science*, **10**, 113-390.
- 3) ANDERSON D.M., T.J. ALPERMANN, A.D. CEMBELLA, Y. COLLOS, E. MASSERET and M. MONTRESOR. (2012) The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae*, **14**, 10-35.
- 4) TOMAS, R.C., V.R. WAGONER, A.O. TATTERS, K.D. WHITE, S. HALL and J.L.C. WRIGHT (2012) *Alexandrium peruvianum* (Balech and Mendiola) Balech and Tangen a new toxic species for coastal North Carolina. *Harmful Algae*, **17**, 54-63.
- 5) OSHIMA, Y., T. YASUMOTO, M. KODAMA, T. OGATA, Y. FUKUYO and F. MATSUURA (1982) Features of paralytic shellfish poison occurring in Tohoku district. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 525-530.
- 6) HASHIMOTO, Y., T. NOGUCHI, R. ADACHI (1976) Occurrence of toxic bivalves in association with the bloom of *Gonyaulax* sp. in Owase Bay. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **42**, 671-676.
- 7) HASHIMOTO, T., S. MATSUOKA, S. YOSHIMATSU, K. MIKI, N. NISHIBORI, S. NISHIO and T. NOGUCHI (2002) First paralytic shellfish poison (PSP) infestation of bivalves due to toxic dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii*, in the southeast coast of the Seto Inland Sea, Japan. *J. Food Hyg. Soc.* **43**, 1-5.
- 8) IKEDA, T., S. MATSUNO, S. SATO, T. OGATA, M. KODAMA, Y. FUKUYO, H. TAKAYAMA (1989) First report on paralytic shellfish poisoning caused by *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae) in Japan. in "Red tides: Biology, environmental sciences and toxicology" (ed. by T. Okaichi, D.M. Anderson and T. Nemoto) Elsevier Sci. Pub. Co. Inc., New York, 411-414 pp.
- 9) 厚生省 (1980) 麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取り扱いについて。環境衛生局長通知、環乳第29号。
- 10) 大島泰克 (2005) 麻痺性貝毒。「食品衛生検査指針 (理化学編)」(厚生労働省監修)。社団法人日本食品衛生協会、東京、672-680 pp.
- 11) YAMAMOTO, M. and M. YAMASAKI (1996) Japanese monitoring system on shellfish toxins. in "Harmful and toxic algal blooms" (ed. by T. Yasumoto, Y. Ohshima and Y. Fukuyo) Sendai Kyodo Printing Co. Ltd., Sendai, 19-22pp.
- 12) 小金澤昭光、小谷祐一 (1985) 貝毒問題に関する研究と対策。「貝毒プランクトン—生物学と生態学」(日本水産学会監修、福代康夫編)。恒星社厚生閣、東京、9-18 pp.
- 13) NOGUCHI, T., J. MARUYAMA, T. IKEDA, Y. FUKUYO, and K. HASHIMOTO (1985) *Protogonyaulax fratercula* as a non-toxic plankton. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 1373.
- 14) 福代康夫 (1985) 分類と分布。「貝毒プランクトン—生物学と生態学」(日本水産学会監修、福代康夫編)。恒星社厚生閣、東京、19-30 pp.
- 15) HALLEGRAEFF, G.M., C.J. BLOCH, S.I. BLACKBURN and Y. OSHIMA (1991) Species of the toxigenic dinoflagellate genus *Alexandrium* in southern Australian waters. *Botanica Marina*, **34**, 575-587.
- 16) 結城勝久、吉松定昭. (2012) 屋島湾における渦鞭毛藻

- Alexandrium minutum* Halim と *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) Balech et Tangen の出現. *Bull. Akashiwo Res. Inst. Kagawa Pref.*, 香川赤潮研報, **8**, 1-6 pp.
- 17) 大島泰克. (1982) 麻痺性貝毒の発生状況. 「有毒プランクトン－発生・作用機構・毒成分」(日本水産学会編). 恒星社厚生閣, 東京, 73-87 pp.
 - 18) 山本圭吾, 松山幸彦, 大美博昭, 有山啓之. (2010) プルーム盛期における麻痺性貝毒原因プランクトン *Alexandrium tamarense* の日周鉛直異動, 環境要因および細胞毒量の変化. 日水誌, **76**, 877-885.
 - 19) JIS K 0124: 2011. 高速液体クロマトグラフィー通則. 1-44 pp.
 - 20) 宮村和良, 松山幸彦, 呉 碩津. (2007) 大分県猪串湾における有毒渦鞭毛藻 *Gymnodinium catenatum* の出現と海水懸濁物中の麻痺性貝毒量およびヒオウギガイ *Chlamys nobilis* の毒化予察. 日水誌, **73**, 32-42.
 - 21) OSHIMA, Y. (1995) Post column derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.*, **78**, 528-532.
 - 22) 大島康克. (1996) 貝類中の麻痺性貝毒代謝の種類特性. 平成7年度貝毒被害防止対策事業報告書, 水産庁, 1-5 pp.
 - 23) 江崎達哉, 田中直美. (2007) 液体クロマトグラフィーにおける超高速・超高分離技術の確立. *Chromatography*, **28**, 75-79.
 - 24) WATANABE, R., R. MATSUSHIMA, T. HARADA, H. OIKAWA, M. MURATA and T. SUZUKI (2013) Quantitative determination of paralytic shellfish toxins in cultured toxic algae by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants*, in press.
 - 25) KAWATSU, K., Y. HAMANO, A. SUGIYAMA, K. HASHIZUME and T. NOGUCHI (2002) Development and application of an enzyme immunoassay based on a monoclonal antibody against gonyautoxin components of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Food Prot.*, **65**, 1304-1308.
 - 26) SATO S., Y. TAKATA, S. KONDO, A. KOTODA, N. HONGO and M. KODAMA (2013) Quantitative ELISA kit for paralytic shellfish toxins coupled with sample pretreatment. *J. AOAC Int.*, in press.

海水試料の毒量分析による麻痺性貝毒モニタリング手法の開発と検証

及川 寛・山本圭吾・長井 敏

海水中の麻痺性貝毒量をモニタリング指標として利用することを目指し、モニタリングで必要とされる感度で毒量を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定する方法を検討するとともに、大阪湾の現場海水試料で指標としての可能性を検証した。大阪湾の *Alexandrium tamarense* は複数含まれる毒成分のうち C2（N21-sulfocarbamoyl gonyautoxin-3）の組成比が最も高く、培養細胞を添加した海水の検討では、行政が注意喚起する細胞密度（5 cells/mL）において、C2 分析ピークの S/N 比（signal to noise ratio）が定量下限の 10 を超えるには、目合い 15 μ m のネットで 20 倍以上に濃縮することが必要と考えられた。2012 年 2～5 月に大阪湾で採取した海水は *A. tamarense* が最大で 1.0 cells/mL と低かったため 100 倍以上の濃縮を行い分析したところ、C2 の測定値と細胞密度は良い相関を示し、本手法による毒量値はモニタリング指標として利用できる可能性があると考えられた。

水産技術, 6 (2), 161-167, 2014