

18. 貝毒プランクトンによるホタテガイ毒化実態調査研究（受託研究）

担当者	調査研究部	馬場 勝寿・金森 誠
協力機関	独立行政法人	水産総合研究センター 中央水産研究所 サロマ湖養殖漁業協同組合

（１）目的

平成17年以降、貝毒監視体制が強化されたが、より効率的・科学的な貝毒監視体制が必要とされている。近年、貝毒分析技術が飛躍的に進歩し、天然の貝毒プランクトン1～数十個程度あれば、毒成分の測定が可能となっている。本研究では、最新の分析技術を用い、貝毒プランクトンの毒性とホタテガイ毒化の現場調査を実施し、効率的・科学的な貝毒監視体制の立案に必要なホタテガイ毒化機構解明のための基礎的資料とする。

また、現在の公定法であるマウス毒性試験は経費等の負担が大きいことから、現場漁協等から機器分析や簡易測定法導入への要望が強い。そこで、本研究では、機器分析と簡易測定キットによる貝毒の分析も行い、各海域における毒化の特徴を明らかにするとともに、それらの導入の生産者に対するメリット・デメリットを検討する。

下痢性・麻痺性貝毒とも機器分析の方がマウス毒性試験よりも毒性が高めの結果がでることがわかっている。下痢性貝毒の場合、マウス毒性試験では、下痢性貝毒成分のうち、PTX6とYTXが測定されないためであり、麻痺性では塩分効果のためである。

国際食品規格を作成している国際機関CODEXは、2008年に、顕著な経口毒性がないことから、下痢性貝毒成分のうち、PTX群とYTX群を規制すべき毒成分リストから除外した。このため、すでに機器分析を公定法としているニュージーランド・米国・韓国では、これら両成分を規制対象から除外している。

EUでは2014年から機器分析を公定法として導入することが決まっており、2015年から日本を含む輸出国にも義務化してくると見込まれている。機器分析の導入に際し、EUではYTXの規制値は10倍にし規制を緩和したが、PTXの規制値はそのままとしている。ただし、EU域に生息する二枚貝は*Dinophysis*属の持つPTX2をマウス毒性試験陰性のPTX2sa（PTX2セコ酸）に速やかに代謝するので、ほとんど問題にならないと考えられる。また、日本のホタテガイ（*Mizuhopecten yessoensis*）

はPTX2をマウス毒性試験陽性のPTX6に代謝するが、日本がEUに輸出する場合でも、PTX6は規制対象外になる可能性が高い（中央水研からの情報）。

国内向けに関しても、農林水産省主導で、機器分析の導入が積極的に検討されている。現在の日本の貝毒規制の基準はマウス毒性試験を前提としたものであり、機器分析を導入する場合は、新しい基準を定める必要がある。機器分析の公定法への導入で、本道産ホタテガイの水揚げにどのような影響があるか慎重に考察・議論する必要がある。

（２）経過の概要

ホタテガイは八雲（噴火湾西部海域）離岸5km付近（水深24m）とサロマ湖湖央で垂下養殖されているものを、月1回採取した（図1）。貝毒プランクトンの毒性分析用の採水は、ホタテガイ垂下地点近傍で行い、試水（水深0, 5, 10, 15, 20, 25, 30mで各2Lずつ）を20 μ mメッシュのプランクトンネットで約30mLまでろ過濃縮後、倒立顕微鏡下で種ごとに約9～100細胞集め、毒性分析に供した。調査対象（海域）・作業項目とその担当機関を表1に示した。

ホタテガイ中腸腺の毒力・毒成分分析はマウス毒性試験、LC/MS分析法及びHPLC分析法で行った。なお、サロマ湖産ホタテガイのマウス毒性試験については、佐呂間漁協の出荷時の行政検査及び自主検査の結果を用いた。

噴火湾八雲沖とサロマ湖湖央の貝毒プランクトンの密度は、函館水試と中央水試が実施した「ホタテ貝等二枚貝に関するモニタリング」事業で得られたデータを用いた。

なお、ホタテガイの毒化や貝毒プランクトンの出現には年変動が大きいので、実態の把握には長期のデータが必要である。そこで、2009～2011年に実施された本事業と同名の前事業の結果と、2008年及び2011年に実施したサロマ湖における事前調査の結果もあわせて報告する。

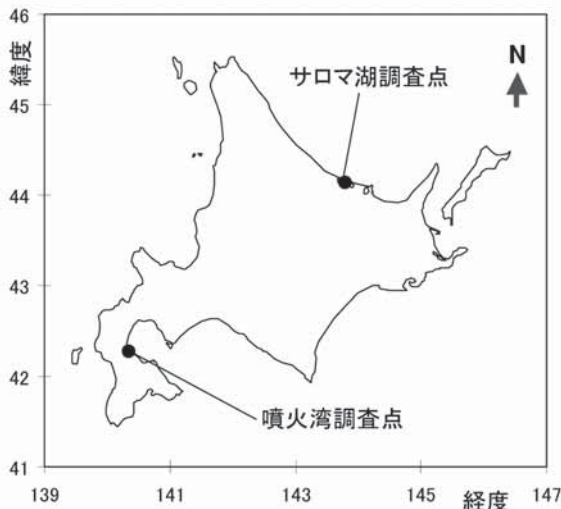


図1 調査地点図

表1 調査対象・作業項目と担当機関

調査対象(海域)	担当機関
(噴火湾西部・サロマ湖)	
下痢性貝毒プランクトン(<i>Dinophysis</i> 属)	
採取、計数、ソーティング、毒抽出・濃縮	函館水試・養殖組合
毒測定	函館水試・中央水研
ホタテガイ下痢性貝毒	
採取、体測定、毒抽出	函館水試
酵素阻害法(PP2A)による毒測定	函館水試
LC/MSIによる毒測定	函館水試・中央水研
(噴火湾西部)	
麻痺性貝毒プランクトン(<i>Alexandrium</i> 属)	
採取、計数、ソーティング、培養	函館水試
毒抽出・毒測定	中央水試
ホタテガイ麻痺性貝毒	(噴火湾西部)
採取、体測定	函館水試
毒抽出、毒測定	中央水試

(3) 得られた結果

ア 天然 *Dinophysis* 属プランクトン各種の毒性

天然 *Dinophysis* 属プランクトンの毒組成には、種間変動、種内変動、地域変動が大きい(表2, 3)。

噴火湾では、強い経口毒性を持つオカダ酸(OA)を含むプランクトンは *D. norvegica* だけであり、それ以外のプランクトンからは検出されなかった。また、強い経口毒性を持つディノフィストキシン1(DTX1)を最も多く含むのは *D. fortii* であり、次いで *D. acuminata* であった。噴火湾ではこれら3種が危険種と考えられる。顕著な経口毒性がないペクテノトキシン2(PTX2)を多く含むのは主に秋に出現する *D. tripos* であった。*D. mitra* から毒が検出されることはまれであり、検出されてもPTX2が少量の場合が多く、*D. mitra* は弱毒種と考えられる。また、*D. rotundata* から毒が検出された事はなく、*D. rotundata* は無毒種と考

えられる。

サロマ湖では、強い経口毒性を持つOAやDTX1を含むプランクトンは *D. acuminata* と *D. fortii* であり、これら2種が危険種と考えられる。*D. norvegica* からはOAもDTX1も検出されず、*D. norvegica* は弱毒種と考えられる。*D. mitra* からは少量のOAとDTX1とPTX2が検出されるだけであり、弱毒種と考えられる。また、*D. rotundata* からは毒は検出されず、無毒種と考えられる。

イ 噴火湾産ホタテガイの下痢性貝毒蓄積状況と

Dinophysis 属プランクトンの出現状況

噴火湾では、2009年から2012年の4年間でマウス毒性試験で毒性が検出されたのは2010年7~10月と2012年5~8月であった(図2-1)。OA・DTX群, PTX群, YTX群の機器分析結果からマウスユニットに換算した毒力は実際のマウス毒性試験の結果より高かった。下痢性貝毒管理に機器分析を導入する際に、これら3群の成分をそのまま規制対象にすると大幅な規制強化になると考えられる。一方、経口毒性のあるOA・DTX群の機器分析結果だけをマウスユニットに換算した場合、値が規制値を超えることはなかった。したがって、下痢性貝毒管理に機器分析を導入する際に、ニュージーランド・米国・韓国と同様にPTX群とYTX群を規制対象から除外した場合、下痢性貝毒で出荷規制されることはかなり少なくなると考えられる。

噴火湾のホタテガイがOA・DTX群の毒を蓄積している期間は主に春(2~5月)と夏~秋(7~10月)である(図2-2)。春は *D. acuminata* と *D. norvegica* が、夏~秋は *D. acuminata* と *D. fortii* が出現しており(図3-1, 2)、これら3種が原因種と考えられる。また、春先(2010年2月, 2011年3月)にDTX1を主体にホタテガイから検出されることがある(図2-2)。この両期間に大量に出現している *Dinophysis* 属プランクトンはなく、原因種は不明である。

ホタテガイに蓄積されたDTX・OA群の毒は、春(2~4月)はDTX1が主体で、初夏~冬(5~12月)はDTX3の割合が高くなった(図2-2)。*Dinophysis* 属が持つ成分はOAとDTX1であり、DTX3はホタテガイの代謝産物である。季節によりホタテガイのDTX・OA群に対する代謝速度が異なる事を示していると考えられる。

加水分解処理後に脱リン酸化酵素PP2A阻害法により測定した毒性とLC/MS測定した毒性との一貫性は高かった(図2-2)。加水分解未処理のサンプルの測定値は加水分解処理群に比べて非常に低かった(図2-2)。

このことは、ホタテガイ中腸腺に含まれるDTX・OA群の毒のほとんどはエステル型（他の高分子と結合したもの）である事を示している。また、機器分析の結果

表2 噴火湾八雲沖5km（水深32m）（貝毒プランクトンモニタリング定点）で採取された *Dinophysis* 属各種の含有毒（LC/MS）

採取日	採取場所	種	毒含量 (pg/cell)			細胞数
			OA 0.25*	DTX1 0.31*	PTX2 0.22*	
2008年						
3/17	噴火湾	<i>D. acuminata</i>	0.0	0.0	0.0	9
5/22	噴火湾	<i>D. norvegica</i>	0.0	0.0	14.4	50
5/22	噴火湾	<i>D. acuminata</i>	0.0	1.5	5.9	50
6/17	噴火湾	<i>D. norvegica</i>	0.0	1.4	16.9	50
6/17	噴火湾	<i>D. acuminata</i>	0.0	1.7	8.4	50
8/17	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	15.6	17
8/17	噴火湾	<i>D. mitra</i>	0.0	0.0	0.0	50
9/25	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	63.3	50
9/25	噴火湾	<i>D. mitra</i>	0.0	1.1	0.0	50
10/20	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	39.5	50
11/12	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	18.7	19
2009年						
3/17	噴火湾	<i>D. acuminata</i>	0.0	2.3	55.6	50
6/16	噴火湾	<i>D. acuminata</i>	0.0	4.7	10.9	50
6/16	噴火湾	<i>D. norvegica</i>	0.0	1.3	89.2	50
7/23	噴火湾	<i>D. fortii</i>	0.0	0.0	0.0	50
8/21	噴火湾	<i>D. mitra</i>	0.0	0.0	0.0	50
9/14	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	144.4	50
11/24	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	230.4	50
2010年						
6/21	噴火湾	<i>D. norvegica</i>	2.6	0.7	74.4	50
6/21	噴火湾	<i>D. rotundata</i>	0.0	0.0	0.0	50
7/23	噴火湾	<i>D. fortii</i>	0.0	12.8	0.0	15
7/23	噴火湾	<i>D. acuminata</i>	0.0	2.9	20.5	50
8/24	噴火湾	<i>D. fortii</i>	0.0	25.7	36.1	50
8/24	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	137.3	37
8/24	噴火湾	<i>D. mitra</i>	0.0	0.0	0.0	50
8/24	噴火湾	<i>D. acuminata</i>	0.0	3.2	25.4	50
8/24	噴火湾	<i>D. rotundata</i>	0.0	0.0	0.0	50
9/21	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	137.2	50
9/21	噴火湾	<i>D. mitra</i>	0.0	2.6	0.0	50
9/21	噴火湾	<i>D. fortii</i>	0.0	97.6	74.0	50
10/14	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	39.9	50
11/25	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	142.0	50
2011年						
7/27	噴火湾	<i>D. acuminata</i>	0.0	0.0	44.0	50
7/27	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	78.8	50
8/29	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	416.0	50
8/29	噴火湾	<i>D. mitra</i>	0.0	0.0	2.8	50
9/27	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	160.4	50
9/27	噴火湾	<i>D. mitra</i>	0.0	0.0	2.5	50
2012年						
3/16	噴火湾	<i>D. acuminata</i>	0.0	18.9	16.1	30
5/14	噴火湾	<i>D. norvegica</i>	40.4	0.0	18.0	50
6/25	噴火湾	<i>D. acuminata</i>	0.0	0.0	9.7	50
6/25	噴火湾	<i>D. rotundata</i>	0.0	0.0	0.0	24
7/17	噴火湾	<i>D. acuminata</i>	0.0	0.0	0.0	50
7/17	噴火湾	<i>D. norvegica</i>	30.7	0.0	1.5	50
8/14	噴火湾	<i>D. acuminata</i>	0.0	12.5	23.5	50
8/14	噴火湾	<i>D. norvegica</i>	36.9	0.0	85.6	50
8/14	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	393.2	50
8/14	噴火湾	<i>D. mitra</i>	0.0	0.0	16.4	34
8/14	噴火湾	<i>D. rotundata</i>	0.0	0.0	0.0	13
11/13	噴火湾	<i>D. tripos</i>	0.0	0.0	158.4	50
11/13	噴火湾	<i>D. caudata</i>	0.0	0.0	22.9	15

*:MU/μg

からマウスユニット換算した値よりも、PP2A阻害法で測定した値の方が高いことから、PP2A阻害法は経口毒性のあるOA・DTX群のスクリーニング法として有望であると考えられる。

ホタテガイに蓄積されているPTX群の成分はPTX6が主体であった（図2-3）。*Dinophysis*属が持つ成分はPTX2であり、PTX1とPTX6はホタテガイの代謝産物である。他の二枚貝ではPXT2はほとんどマウス毒性試験陰性のPTX2sa（PTX2セコ酸）に代謝される。PTX6はホタテガイに特異的な代謝産物である。原因種はPTX群の成分を持つ*D. acuminata*、*D. norvegica*、*D. fortii*、*D. tripos*と考えられる。

ホタテガイに蓄積されているイエソトキシン（YTX）群の成分はYTXと45ヒドロキシYTX（45OH YTX）が主体であった（図2-4）。特に2010年の蓄積量が多かった。2010年10月に原因プランクトンの *Protoceratium reticulatum* が大量に出現していたと考えられる。*P. reticulatum* はモニタリングの対象外である。*P. reticulatum* が持つ成分はYTXであり、45OH YTXはホタテガイの代謝産物である。

表3 サロマ湖調査定点（貝毒プランクトンモニタリング定点）で採取された *Dinophysis* 属各種の含有毒（LC/MS）

採取日	採取場所	種	毒含量 (pg/cell)			細胞数
			OA 0.25*	DTX1 0.31*	PTX2 0.22*	
2008年						
7/22	サロマ湖	<i>D. acuminata</i>	0.0	2.4	12.2	50
7/22	サロマ湖	<i>D. fortii</i>	0.0	12.6	22.8	50
8/19	サロマ湖	<i>D. fortii</i>	0.0	41.6	52.0	50
9/16	サロマ湖	<i>D. fortii</i>	0.0	47.2	58.8	50
9/16	サロマ湖	<i>D. mitra</i>	0.8	3.9	0.0	50
12/5	サロマ湖	<i>D. acuminata</i>	0.4	0.7	22.8	50
2011年						
7/20	サロマ湖	<i>D. fortii</i>	0.0	39.7	82.8	50
8/22	サロマ湖	<i>D. fortii</i>	0.0	30.5	58.4	50
8/22	サロマ湖	<i>D. rotundata</i>	0.0	0.0	0.0	20
9/7	サロマ湖	<i>D. fortii</i>	0.0	18.9	39.4	36
10/11	サロマ湖	<i>D. fortii</i>	0.0	26.7	86.8	50
11/29	サロマ湖	<i>D. acuminata</i>	0.0	0.0	31.7	50
12/20	サロマ湖	<i>D. acuminata</i>	0.0	0.0	36.6	50
12/20	サロマ湖	<i>D. norvegica</i>	0.0	0.0	30.4	15
2012年						
1/29	サロマ湖	<i>D. acuminata</i>	0.0	0.0	23.8	11
1/29	サロマ湖	<i>D. norvegica</i>	0.0	0.0	15.1	9
2/27	サロマ湖	<i>D. norvegica</i>	0.0	0.0	20.1	28
5/23	サロマ湖	<i>D. acuminata</i>	33.4	0.0	16.6	50
8/22	サロマ湖	<i>D. fortii</i>	0.0	22.4	39.8	50
9/6	サロマ湖	<i>D. fortii</i>	0.0	34.6	52.4	50
9/6	サロマ湖	<i>D. mitra</i>	0.0	2.1	1.6	40
9/6	サロマ湖	<i>D. rotundata</i>	0.0	0.0	0.0	50
10/14	サロマ湖	<i>D. fortii</i>	60.5	0.0	0.0	21
12/4	サロマ湖	<i>D. acuminata</i>	19.7	0.0	19.7	50

*:MU/μg

ウ サロマ湖産ホタテガイの下痢性貝毒蓄積状況と *Dinophysis*属プランクトンの出現状況

サロマ湖では、2008年と2011年から2012年の3年間でマウス毒性試験で毒性が検出されたのは2011年8月と2012年6月であった(図4-1)。OA・DTX群、PTX群、YTX群の機器分析結果からマウスユニットに換算した毒力は実際のマウス毒性試験の結果より総じて高いものの、自肅規制値(0.025MU)を超えたのは、2012年12月だけであった。一方、経口毒性のあるOA・DTX群の機器分析結果だけをマウスユニットに換算した場合、値が規制値を超えることはなかった。したがって、下痢性貝毒管理に機器分析を導入する際に、ニュージーランド・米国・韓国と同様にPTX群とYTX群を規制対象から除外した場合、下痢性貝毒で出荷規制されることは非常に少なくなると考えられる。

サロマ湖産のホタテガイのOA・DTX群とPTX群の成分の含量は噴火湾に比べて明らかに低い(図4-2, 3)。これは、サロマ湖の*D. acuminata*と*D. norvegica*のOA・DTX群成分の含量が噴火湾に比べて低いことと、噴火湾で大量のPTX2を持つ*D. tripos*がサロマ湖には出現しないことが原因と考えられる。

エ 噴火湾産ホタテガイの麻痺性貝毒蓄積状況および *Alexandrium*属プランクトンの出現状況

ホタテガイに蓄積した麻痺性貝毒は2011年(最大246.0nmol/g, 6月20日)、2010年(最大22.7nmol/g, 5月17日)、2009年(最大12.0nmol/g, 6月16日)、2012年(最大9.2nmol/g, 5月14日)の順に多かった(図6)。*A. tamarense*の最大出現数と麻痺性貝毒蓄積毒量は一致していない。

出現した麻痺性貝毒プランクトンのほとんどは*A. tamarense*であり、*A. ostenferdii*はわずかだった(図7)。出現規模は2009年(最大960細胞/L, 5月21日)、2010年(最大730細胞/L, 5月17日)、2011年(最大470細胞/L, 6月20日)、2012年(最大60細胞/L, 5月14日)の順に大きかった。

麻痺性貝毒の自主規制値は可食部当たり4MU/g、自肅規制値は中腸腺当たり20MU/gかつ可食部当たり3MU/gと定められている(「可食部当たり」は中腸腺を含む)。塩分効果のため、機器分析はマウステストよりも高めの結果が出るが、塩分効果が顕著に出るのは、主に自主規制値の4MU/g前後である。自肅規制値のうち、中腸腺の20MU/gは塩分効果が顕著に出る値よりも高い値であるため、塩分効果は影響しないと考えられる。また、中腸腺重量は軟体部の約10%で

あり、中腸腺で20MU/g未満のホタテガイならば、多くの場合、可食部当たりの毒性値は3MU/gを下回ると考えられる。したがって、麻痺性貝毒管理に機器分析を導入する場合、中腸腺での測定を行っている場合は、それほど、塩分効果は影響しないと考えられる。しかしながら、中腸腺の分離が難しく、軟体部のみでの貝毒管理しか出来ない二枚貝では、機器分析の導入により、明らかに規制期間が延長されるとされている。麻痺性貝毒管理への機器分析の導入の影響については、より多角的な検討と、研究機関、行政、漁連および漁協等の関係者間での検討が必要と考える。

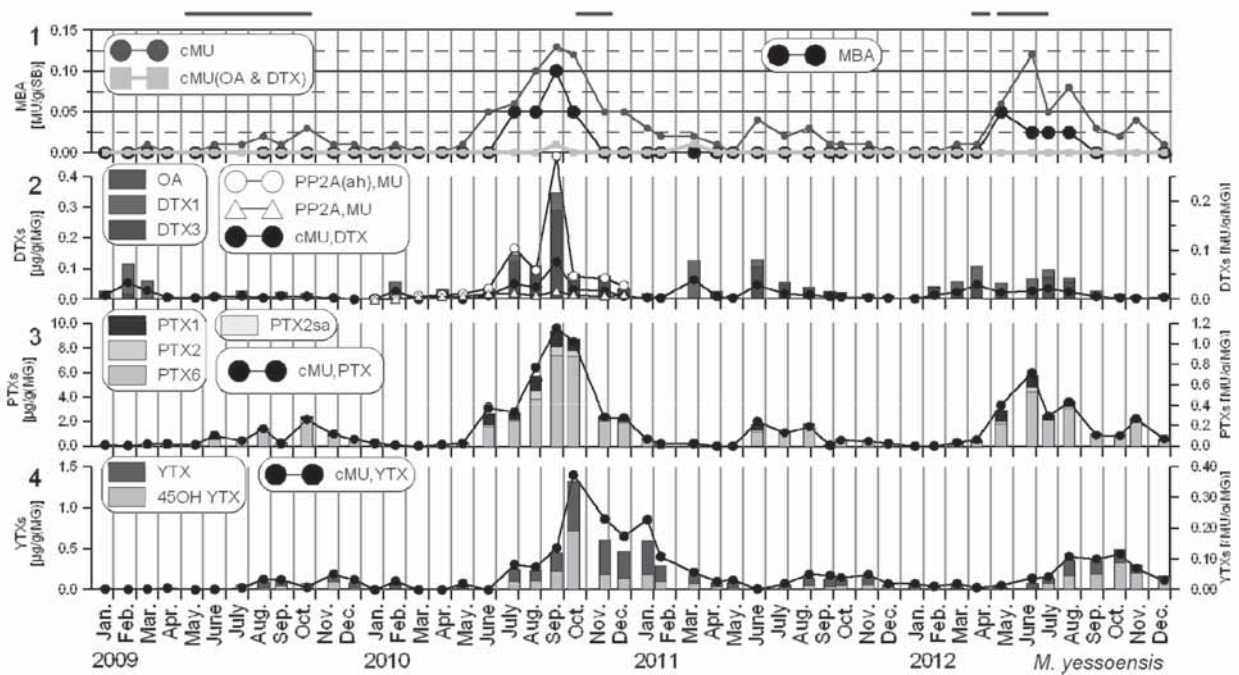


図2 噴火湾八雲沖(離岸4.5km,水深24m)に垂下された耳吊りホタテガイ (*Mizuhopecten yessoensis*) に蓄積した下痢性貝毒。1: マウス毒性試験の結果(可食部1g当たり)(MBA: mouse bioassay)と全成分の機器分析の結果から換算したマウス毒性(cMU)と経口毒性のあるOA・DTX群成分だけの機器分析の結果から換算したマウス毒性(cMU(OA & DTX)), 2: DTX・OA群の毒量(LC/MS測定)と脱リン酸化酵素PP2A阻害法により測定したオカダ酸相当量DTX・OA群毒力(MU)(a.h.は加水分解群), 3: PTX群の毒量(LC/MS測定), 4: YTX群の毒量(LC/MS測定)。cMUはマウスユニット換算値。グラフ上部の細線は自粛規制期間,太線は自主規制期間。

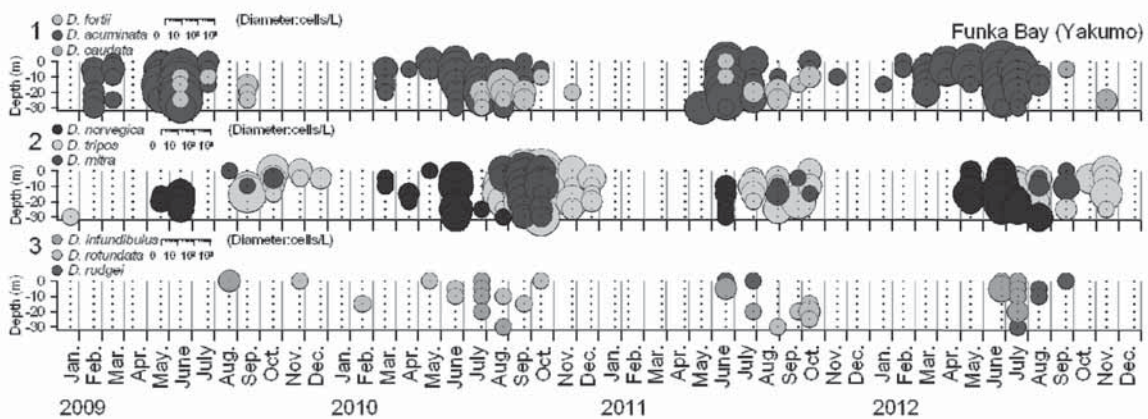


図3 噴火湾八雲沖(離岸5km,水深32m)における下痢性貝毒プランクトン *Dinophysis* 属渦鞭毛藻9種の出現状況

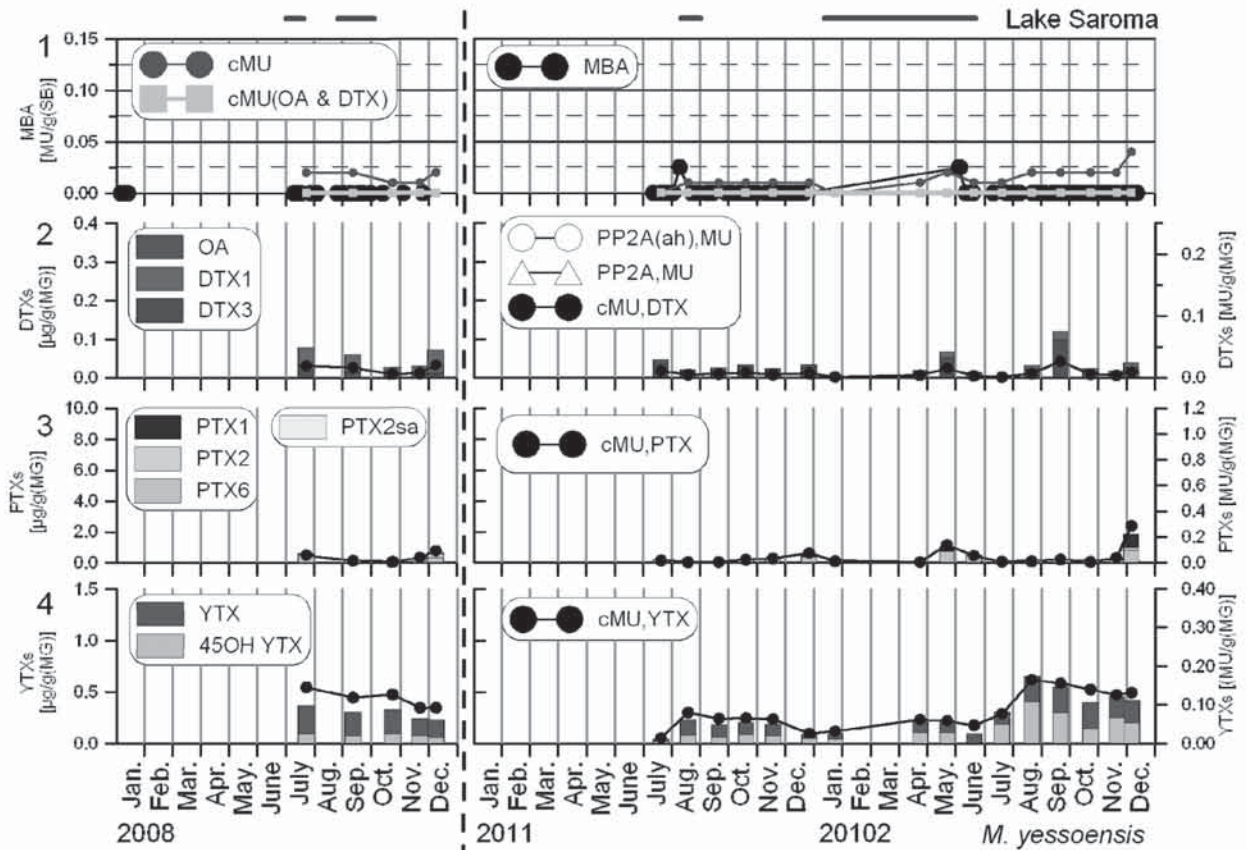


図4 サロマ湖（湖央付近）に垂下された耳吊りホタテガイ（*Mizuhopecten yessoensis*）に蓄積した下痢性貝毒。1：マウス毒性試験の結果（可食部1g当たり）（MBA：mouse bioassay）と全成分の機器分析の結果から換算したマウス毒性（cMU）と経口毒性のあるOA・DTX群成分だけの機器分析の結果から換算したマウス毒性（cMU(OA & DTX)），2：DTX・OA群の毒量（LC/MS測定），3：PTX群の毒量（LC/MS測定），4：YTX群の毒量（LC/MS測定）。cMUはマウスユニット換算値。グラフ上部の細線は自肅規制期間，太線は自主規制期間。

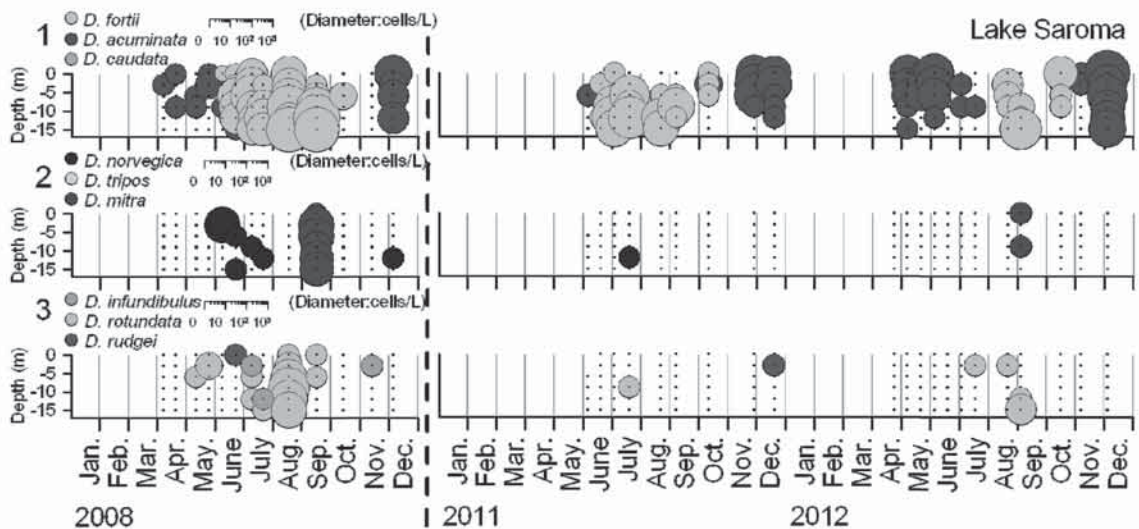


図5 サロマ湖（湖央付近）における下痢性貝毒プランクトン *Dinophysis* 属渦鞭毛藻9種の出現状況

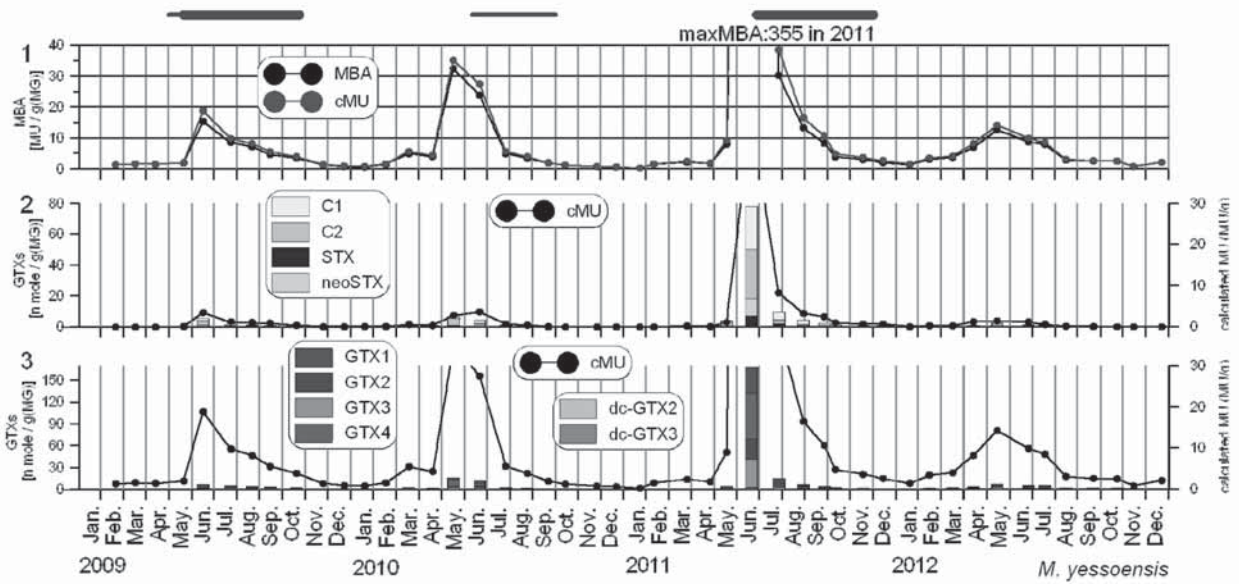


図6 噴火湾八雲沖(離岸4.5km,水深24m)に垂下された耳吊りホタテガイ (*Mizuhopecten yessoensis*) に蓄積された中腸腺1g当たりの麻痺性貝毒, 1:マウステストの結果, 2:GTX群(C1, C2, STX, neoSTX)の毒量(HPLC測定), 3:GTX群(GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, dcGTX2, dcGTX3)の毒量(HPLC測定)。cMUはマウスユニット換算値。グラフ上部の細線は自粛規制期間, 太線は自主規制期間

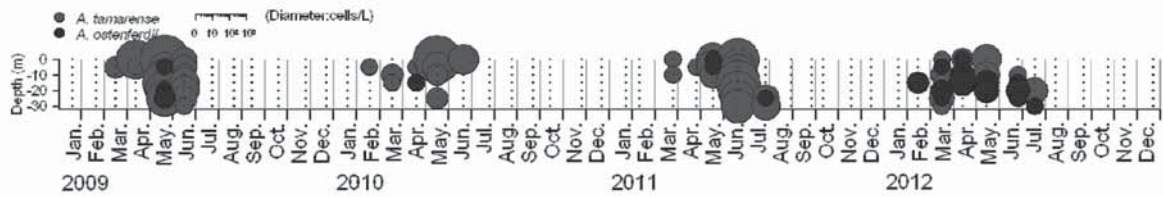


図7 噴火湾八雲沖(離岸5km,水深32m)における麻痺性貝毒プランクトン *Alexandrium* 属渦鞭毛藻2種の出現状況