

LC/MS/MS による貝毒分析法の貝毒モニタリング調査への応用

森岡浩文・野中勇志・野崎祐司・樺山恭子

Application of shellfish poison analysis method to plankton monitoring program by LC/MS/MS

Hirofumi MORIOKA, Yuji NONAKA, Yuji NOZAKI, Kyoko KABAYAMA

Abstract

Food poisoning due to a natural poison is an important problem on the food hygiene. It is necessary to maintain the analysis method to correspond to food poisoning due to such a natural poison promptly. We examined the analysis method about the shellfish poison, and applied it to the seawater sample collected for the shellfish poison monitor investigation. The diarrhetic shellfish poison was detected from the seawater sample in the shellfish poison analysis method by examined LC/MS/MS though the plankton that showed the poison of the shellfish did not detect in the plankton monitoring program. The existence of the plankton that had these poisons from the element of the detected diarrhetic shellfish poison was suggested.

Key words: DSP, PSP, LC/MS/MS

はじめに

フグ毒やきのこの毒など自然毒による食中毒は、細菌やウイルス性食中毒に比べて年間の発生件数、患者数ともはるかに少ないが、食中毒の症状はきわめて重篤なものが多く食品衛生上きわめて重要な課題である。

宮崎県における自然毒による食中毒は、フグ、アオブダイ、ツキヨタケ、サバなどのヒスタミンによるものがほとんどであるが、厚生労働省の食中毒発生状況によると全国的には、様々な自然毒による食中毒が発生している。

こうした食中毒に迅速に対応するため当所では植物毒の一斉試験法やフグ毒分析法など LC/MS/MS などの機器分析法を検討してきた。

海洋性自然毒のうち貝毒については、宮崎県北部の北浦町で 1996 年に発生した麻痺性貝毒による食中毒が最後となっている。このことは、有毒プランクトンの発生状況調査や二枚貝の貝毒試験といった定期的なモニタリングによる毒化した二枚貝の流通防止策によるところが大きい。

貝毒試験法は、公定法としてマウス毒性試験法が採用されているが、この試験法は、毒の強弱を判定する試験であり、毒成分の内容までを判定するものではない。こうしたなか近年、LC/MS 等を用いて貝毒成分を測定する分析法が報告されている。

今回、食中毒発生時の機器分析対応として LC/MS/MS による貝毒分析法を検討し、貝毒モニタリング調査で採取した海水に応用したので報告する。

方 法

1) 貝毒プランクトン調査及び赤潮調査

- ・実施機関: 宮崎県水産試験場

(貝毒安全対策事業)

- ・調査地点: 古江, 宮野浦, 浦城, 土々呂, 庵川
- ・調査期間: 平成 22 年 3 月～10 月
- ・調査内容: 各地点の水温測定

貝毒プランクトンの計測, 同定

2) 貝毒分析

- ・試料: 調査地点で採水した海水

- ・ 試薬および器具
 - エムポアディスク C18 90mm 3M 社製, 3M 社製エムポアディスク用マニホールド ジーエルサイセンス社製, 活性炭素 nacalaitesque 社製, Amicon Ultra-0.5 Milipore 製
 - その他の試薬は特級または HPLC 用を使用した.
- ・ 標準品
 - 下痢性貝毒
 - OA YTX PTX1 PTX2 PTX6 DTX1 各々 20 μ g
 - 麻痺性貝毒
 - neoSTX (1.51 μ M), dcGTX2 (0.286 μ M), dcGTX3 (0.093 μ M), GTX1 (3.01 μ M), GTX2 (1.02 μ M), GTX3 (0.38 μ M), GTX4 (1.16 μ M), dcSTX (2 μ M), C1 (1.23 μ M), C2 (0.33 μ M)
 - 水産庁貝毒貝毒安全対策事業配布標準品
- ・ 装置
 - Agilent6460TripleQuadLC/MS
- ・ 測定条件
 - LC 測定条件およびプレカースーイオン, プロダクトイオンの選択は文献¹⁾²⁾³⁾⁴⁾を参考に最適化した (Table1).
- ・ 抽出
 - 貝毒抽出法は, (独)水産総合研究センター中央水産研究所平成 21 年度貝毒分析研修会テキストを参考にした¹⁾ (Fig1).
 - プランクトンを含む海水は, 凍結融解しプランクトン細胞を破壊した後, 試験に供した. 下痢性貝毒は, C18 固相カラム, 麻痺性貝毒は, 活性炭カラムによる精製濃縮を行った.

結果および考察

LC/MS/MS により得られた貝毒成分のクロマトグラムを Fig. 2 に示した.

貝毒抽出法は, 貝毒分析研修会テキストを参考にしたが, 下痢性貝毒分析は, 海水試料に適應するため抽出法の一部を変更して分析を行った. 既知量の下痢性貝毒を添加した回収試験で, 84%-112% の良好な回収率が得られた.

貝毒プランクトン調査では, 4 月~6 月にかけてアレキサンドリウム・カテネテが発生し, 6 月の古江で最大 180cells/L であった. 7 月の須美江で

は, ディノフィシス・フォルチが 0.001cells/L 発生した.

貝毒分析では, 6 月から 10 月にかけて, 下痢性貝毒の OA, PTX1, PTX2, YTX を検出したが, 麻痺性貝毒は, 調査期間中の試料からは検出しなかった (Table2).

下痢性貝毒, 麻痺性貝毒とも二枚貝が有毒プランクトンを食餌し, 体内に毒を蓄積することによって毒化が起こるため, 有毒プランクトンの種類や密度が貝の毒化と密接に関係することが知られている. そのため, 水産試験場は, 定期的に有毒プランクトンの発生調査を行っている. 貝毒モニタリング調査により毒化が確認された二枚貝は, 出荷規制されるので, 貝毒による食中毒は, 全国的に過去 10 年ほど発生していない.

下痢性貝毒による貝の毒化は, 北海道, 東北地方を中心に発生しており九州での毒化事例はない. 一方 麻痺性貝毒の毒化は, 全国的に発生しており本県では 1996 年に延岡でムラサキイガイによる食中毒が発生している.

今回の調査では, 下痢性貝毒, 麻痺性貝毒ともに貝の毒化を起こすプランクトン数には, 達していなかったが, 海水から下痢性貝毒の OA, PTX1, PTX2, YTX が検出されたことから, これらの毒を保有するとされるディノフィシス属プランクトンの存在が示唆された. 貝毒プランクトン調査結果からディノフィシス・フォルチが検出されており, 貝毒の種類からプランクトンの存在を推定することができた. 検出された貝毒は, EU の出荷規制と比較して 10^{-5} 倍程の低濃度であった.

麻痺性貝毒では, 原因プランクトンであるアレキサンドリウム・カテネテラが貝の毒化を起こすほどではないものの発生していたが, 貝毒を検出しなかった. 麻痺性貝毒の毒化にはプランクトン密度のみならず 1 細胞あたりの毒力が大きく関与すると言われているので, 機器分析の定量限界まで毒量が達していなかったものと考えられる.

まとめ

貝毒による食中毒に対応するため LC/MS/MS による貝毒分析法を検討した. この分析法を貝毒モニタリング調査で採取した海水試料に応用したところ, 下痢性貝毒の毒成分を検出した. 毒成分の検

出状況から下痢性貝毒を有するプランクトンの存在が示唆され、貝毒プランクトン調査結果からディノフィシス・フォルチが検出されており、貝毒の種類から有毒プランクトンの存在を推定することができた。麻痺性貝毒の分析では、原因プランクトンが存在するにも関わらず毒成分を検出しなかったのは、機器分析の定量限界まで毒量が達していなかったものと考えられる。

謝辞

本調査研究を行うに当たって、(独)水産総合研究センター中央水産研究所、宮崎県水産試験場の方々にご指導、ご協力を頂きましたことに対して深謝いたします。

参考文献

- 1) 平成 21 年度貝毒分析研修会テキスト
(独)水産総合研究センター 中央水産研究所
- 2) Carmela Dell' Aversano:Hydrophilic interaction liquid chromatography- mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins, Journal of Chromatography A, 1081 ,190- 201,2005
- 3) Bernd Krock:Toxin profile of Alexandrium catenella from the Chilean coast as determined by liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry,Harmful Algae 6 , 734-744, 2007
- 4) Toshiyuki SUZUKI: Quantification of lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in Japanese bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with mouse bioassay, Fish. Sci. 71, 1370-1378, 2005

Table 1 LC/MS/MS Condition for analysis

LC condition			LC condition		
column:	Cadaza CD-C18 2X150mm 3 μm		column:	TSK gel Amide80 2.0i.d. X 250mm, 5 μm	
mobile phase:	A: Buffer B: 95% acetonitrile Both containing 50mM formic acid and 2mM ammonium acetate		mobile phase:	A: Buffer B: 95% acetonitrile Both containing 2mM ammonium formate and 2.0mM formic acid	
gradient elution:	B 20%→100%(10min)-100%(30min)		isocratic flow:	20°C	
column temp.:	40°C		flow:	0.2mL/min	
flow:	0.2mL/min		injection volume:	5 μL	
injection volume:	5 μL				
MS condition			MS condition		
ionization mode	ESI-negative		ionization mode	ESI-positive	
DSP	precursor ion(m/z)	product ion(m/z)	PSP	precursor ion(m/z)	product ion(m/z)
Yessotoxin	1141.5	1061.3	GTx1	412	332
Pectenotoxin-6	887.5	519.1	GTx2	396	316
Pectenotoxin-2	857.5	137.2	GTx3	396	296
Pectenotoxin-1	873.5	137.2	GTx4	412	314
Oxadaic acid	803.5	255.1	C1	396	316
Dinophysistoxin-1	817.5	255.1	C2	396	296
			de-GTX-2	353	273
			de-GTX-3	353	255
			neo1	316	296
			neo2	316	220
			de-STX-1	257	197
			de-STX-2	257	159

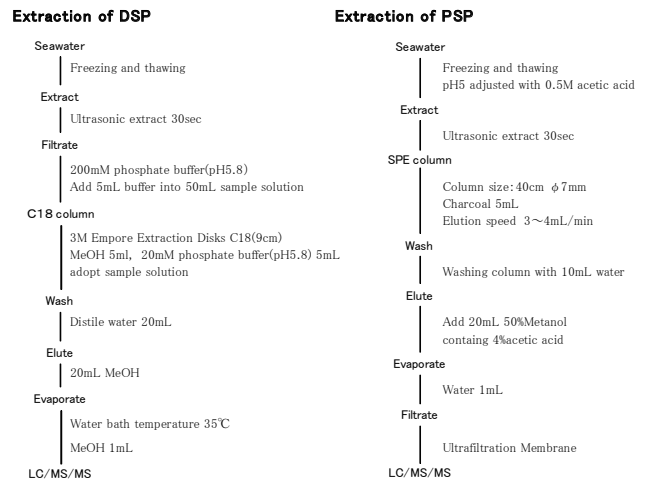


Fig.1 Sample preparation method for DSP (left), PSP (right)

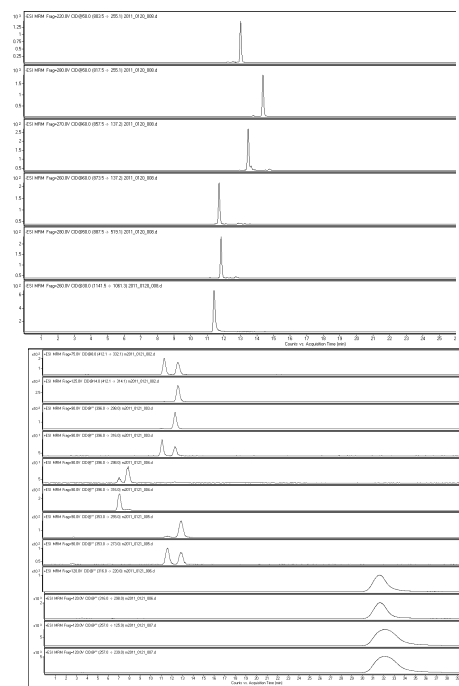


Fig.2 LC/MS/MS chromatograms of standard solution. upper: DSP bottom: PSP

Table 2 Analysis results of shellfish poisons

	OA	PTX1	PTX2	YTX
6月	古江 8ng/L		古江 36ng/L 宮野浦 72ng/L	
7月		古江 105ng/L		
8月	古江 2.3ng/L 浦城 1.2ng/L 宮野浦 1.2ng/L		古江 13ng/L 浦城 5.6ng/L 宮野浦 5.7ng/L	古江 0.1ng/L 浦城 0.3ng/L
9月	古江 12.8ng/L 宮野浦 5.8ng/L		古江 25.9ng/L 宮野浦 7.8ng/L	
10月	古江 2.3ng/L 浦城 3.1ng/L 宮野浦 1.7ng/L		古江 4.5ng/L 浦城 11.6ng/L	