

2017年冬季の宮津湾における *Gymnodinium catenatum* の発生と養殖トリガイの毒化事例 (資料)

難波真梨子, 尾崎 仁, 田中雅幸

Winter occurrence of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* and contamination of paralytic shellfish toxins in cultured Japanese cockle *Fulvia mutica*, 2017, Miyazu Bay.

Mariko Namba, Hitoshi Ozaki, Masayuki Tanaka

キーワード: 麻痺性貝毒, *Gymnodinium catenatum*, ELISA 法

麻痺性貝毒とは、プランクトン捕食者である二枚貝類が *Alexandrium* 属の一部や *Gymnodinium catenatum* 等の有毒な渦鞭毛藻類を摂餌したために、中腸腺をはじめとする体内に毒を蓄積し毒化する現象である。毒化した二枚貝をヒトが喫食した場合に中毒症状を引き起こす可能性があることから、わが国では食品衛生法に基づいた規制値が設定されており、各都道府県では、規制値を超える二枚貝等が出荷されないよう、漁業関係者と連携して生産海域における貝毒発生の監視が行われている（農林水産省消費・安全局，2018）。

本府では、1962年2月に養殖カキで毒化が確認されて以降（今井・板倉，2007）、養殖および天然二枚貝において、麻痺性貝毒による規制値を超える毒化事例が4件確認されている（西岡ほか，1993；京都府，2011,2017；尾崎・中西，2016）。

本稿では、2017年の宮津湾における養殖トリガイの毒化事例について、麻痺性貝毒原因プランクトンの増加および消長と、酵素免疫測定法（enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA）（Sato et al., 2014）により定量したその毒力の推移を示した。また、公定法により定量した毒力との対応関係やHPLC法による毒成分組成の分析結果を、2012年の宮津湾の養殖トリガイ毒化事例と比較した。

材料と方法

麻痺性貝毒原因プランクトン調査 プランクトンの採集は2017年1月13日から5月10日に宮津湾のトリガイ養殖漁場（Fig. 1）において月1回から3回の頻度で合計10回行った。1月13日および26日には、養殖コンテナが垂下されている筏において北原式採水器を用いて水深3、6、9mの3層から海水約2Lを採水し、それぞれのサンプルを10 μ m ナイロンメッシュを用いて約400倍に濃縮した。また、1月31日

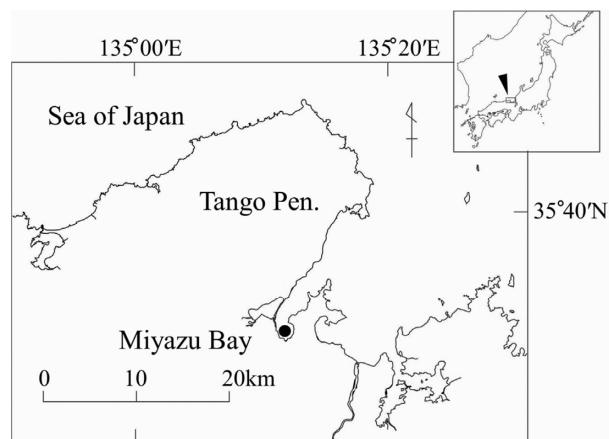


Fig. 1 Sampling station in Miyazu Bay.

から5月10日には、北原式定量プランクトンネット（目合20 μ m）による水深10mから表層までの鉛直曳により採水を行った。試料は実験室に持ち帰り、無固定の試料0.2mlをとり、麻痺性貝毒原因種である *G. catenatum* および *Alexandrium* 属の細胞数を顕微鏡下で計数した後、海水1mlあたりのプランクトン密度を算出した。

試料液調整および麻痺性貝毒分析キットによる毒力定量 宮津湾で養殖されたトリガイの毒力推定を、2016年12月2日から2017年6月22日の期間に月1回から3回の頻度で合計17回実施した。1回あたり9–12個体をランダムにサンプリングし、12月2日から5月19日にかけてはこれらの中腸腺を、5月31日から6月22日にかけては軟体部を摘出してホモジナイズし、混合させたものを1検体とした。なお、サンプリングしたトリガイの殻長は48.8–87.4mmであった。

麻痺性貝毒の定量には、一般財団法人新日本検定協会製の麻痺性貝毒分析キット SKit ELISA for PSP を用い、ELISA 法により行った。検量線作成のための標準液には、キット付属の標準毒（試薬 H）をリン酸緩衝液（試薬 I）で 1.25 nM, 2.5 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM に段階希釈したものと、空試験（0 nM, 試薬 I）を含めた計 6 系列を用いた。毒力が高いと予測される時期の試験液については、毒力が検量線の検出限界（20nM）以上となることを避けるため、標準液リン酸緩衝液で適宜希釈した後、分析に供した。分析する試験液は、付属の取扱説明書に準じて調整した。以下では、ELISA 法により推定した二枚貝の毒力を ELISA 毒力とする。

SKit ELISA for PSP による分析、および検量線の作成方法はキット付属の取り扱い説明書に従った。マイクロプレートリーダーは ChroMate[®] Microplate Reader (Awareness Technology, Inc.) を用い、450 nm の波長で測定した。中腸腺を用い毒力推定を行った 12 月 2 日～5 月 19 日の検体は、その内臓重量を乗算したものを軟体部全体の重量で除し、軟体部換算の ELISA 毒力 (nmol/g) を算出した。

公定法による毒力推定および HPLC による毒組成分析

ELISA 法に供した検体のうち、5 月 31 日から 6 月 22 日の検体については、公定法（社団法人日本食品衛生協会、2005）によりマウス試験での毒力を算出した。また、公定法に供した試験液を用い、国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所へ依頼し、HPLC 分析により毒成分の分析を行った。

結果と考察

麻痺性貝毒原因プランクトンの出現状況 2017 年における *G. catenatum* の出現状況と、2016 年 12 月 2 日から 2017 年 5 月 19 日までの軟体部換算した ELISA 毒力の推移を Fig. 2 に示した。なお、水深 3, 6, 9 m から採水を行った 1 月 13 日、26 日のプランクトンの細胞密度については 3 層の平均細胞密度を示した。調査期間中に確認された麻痺性貝毒原因種は *G. catenatum* のみであり、*Alexandrium* 属有毒種は確認されなかった。*G. catenatum* は、2017 年 1 月 13 日には 3 m 層で 1,911 cells/L, 6 m 層で 2,485 cells/L, 9 m 層で 2,084 cells/L, 3 層の平均で 2,160 cells/L と高密度で出現していた。1 月 26 日には、3 m 層で 2,323 cells/L, 6 m 層で 17,319 cells/L, 9 m 層で 7,053 cells/L, 3 層の平均で 8,898 cells/L であり、調査期間中の最高密度となった。その後、1 月 31 日には 89 cells/L と急速に減少し、2 月 14 日以降は確認されなかった。

ELISA 法による養殖トリガイの推定毒力 ELISA 毒力は、2016 年 12 月 2 日には 0.8 nmol/g であったが、

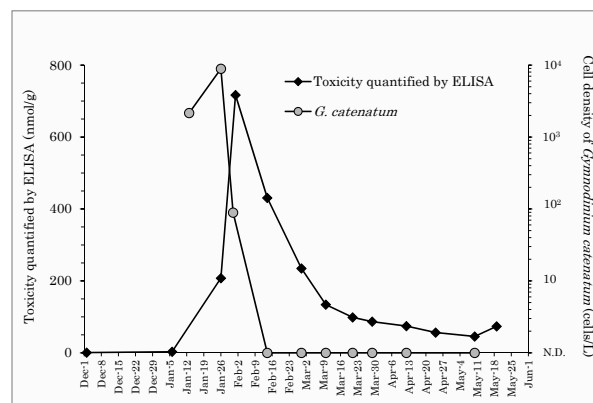


Fig. 2 Changes of *Gymnodinium catenatum* cell densities and toxicity quantified by ELISA in Japanese cockle collected from January 6th to May 19th in Miyazu Bay.

2017 年 1 月 6 日には 3.1 nmol/g と増加した。その後 ELISA 毒力は急激に増加し、1 月 26 日には軟体部換算で 207.7 nmol/g 以上、2 月 1 日には調査期間中最高となる 716.9 nmol/g 以上となった。*G. catenatum* が確認されなくなった 2 月 14 日以降、ELISA 毒力は 3 月中旬まで急速に減少し続けたが、3 月中旬以降は減毒速度は遅くなり、5 月中旬まで 40.0 nmol/g を超える高い ELISA 毒力を維持した (Fig. 2)。

プランクトン調査期間中には *G. catenatum* のみが確認されたことから、本調査期間における麻痺性貝毒原因種は本種であると推察された。トリガイの毒力上昇は、*G. catenatum* の細胞密度の増加および減少と概ね対応していた。また、原因プランクトンの消滅後も約 1 ヶ月半以上にわたって毒化が継続した 2012 年の事例と同様、2017 年の事例においても、*G. catenatum* が確認されなくなって以降も 3 ヶ月以上の長期にわたり高い毒力が検出された。

麻痺性貝毒原因プランクトンにより二枚貝が高毒化した場合、毒化はより長期におよぶ傾向がある。例えばムラサキイガイでは、最高毒力が 283 MU/g であった場合、毒化ピークから約 1 ヶ月半で毒力が不検出となったが (高田ら、2004)、最高毒力が 2,100 MU/g まで高毒化した事例では、原因プランクトンの消滅後はじめのうちは急速に毒力が減衰したものの、次第にその速度は鈍り、完全に無毒化するまでには毒化ピークから 4 ヶ月を要した (池田ら、1988)。特に池田ら (1988) における毒力減衰の推移は、本府で 2017 年に確認された事例と酷似している。

2012 年の養殖トリガイ毒化事例で確認された ELISA 毒力の最高値である 25.4 nmol/g (尾崎・中西、2016) と比較すると、2017 年の養殖トリガイにおける ELISA 毒力の最高値は 716.9 nmol/g 以上と著しく高い。以上から、2017 年の毒化事例はトリガイ体内

の毒変換および水温上昇に伴う毒の排出能力の低下(尾崎ら, 2017)ではなく, 麻痺性貝毒原因プランクトンである *G. catenatum* の高密度発生とそれに伴う高毒化の結果, 毒化が長期におよんだ可能性が高い。

2012年および2017年の毒化事例における養殖トリガイの公定法毒力とELISA法による推定毒力の対応関係, およびHPLCによる毒組成分析結果。公定法の毒力は, 5月31日, 6月8日, 6月15日, 6月22日のサンプルでそれぞれ6.82 MU/g, 7.58 MU/g, 6.11 MU/g, 4.94 MU/gであり, 毒化を確認した約5ヶ月後においても規制値を超える高い毒力が認められた。

2012年および2017年に宮津湾で毒化が確認された養殖トリガイのサンプルについて, 公定法の毒力とELISA毒力との関係をFig. 3に示した。2017年のデータは, 1データを除いて2012年に得られた回帰直線(尾崎・中西, 2016)の予測区間を外れていた。

この原因として, サンプルの麻痺性貝毒成分の組成に変化が生じたことが考えられる。HPLC分析における2012年および2017年の宮津湾の養殖トリガイにおける各年の毒成分組成の経時変化をFig. 4に示した。2012年の調査期間を通じて最も高い割合を占めたのは弱毒成分であるスルホカルバモイルトキシン群(C1, C2, GTX5, およびGTX6)で, その割合は平均67.9%であった。強毒成分であるカルバモイルトキシン群(GTX1~4, neoSTXおよびSTX)の割合は極めて低く平均5.6%, 毒力が両者の中間であるデカルバモイルトキシン群(dcGTX1~4およびdcSTX)の割合は26.5%であった。

2017年には, 5月31日から6月15日の3サンプルと6月22日のサンプルで毒成分の組成が異なっていた。5月31日から6月15日の3サンプルにおいて最も高い割合を占めたのは, カルバモイルトキシン群(平均42.0%)であり, デカルバモイルトキシン群(32.8%), スルホカルバモイルトキシン群(25.3%)がそれに続いた。

一方, 6月22日のサンプルでは, スルホカルバモイルトキシン群が平均58.9%と最も多く含まれ, デカルバモイルトキシン群(36.1%), カルバモイルトキシン群(5.0%)が続き, 毒成分群の組成は, 同年のサンプルである5月31日から6月15日の3サンプルよりも2012年のサンプルに類似した。

つまり, 2012年および2017年6月22日のサンプルでは, スルホカルバモイルトキシン群が高い割合で検出され, カルバモイルトキシン群の割合は低かった。対照的に, 2017年の5月31日から6月15日のサンプルでは, カルバモイルトキシン群の割合が高く, スルホカルバモイルトキシン群の割合は低かった(Fig. 5)。

毒成分が変化する原因としては, サンプリング

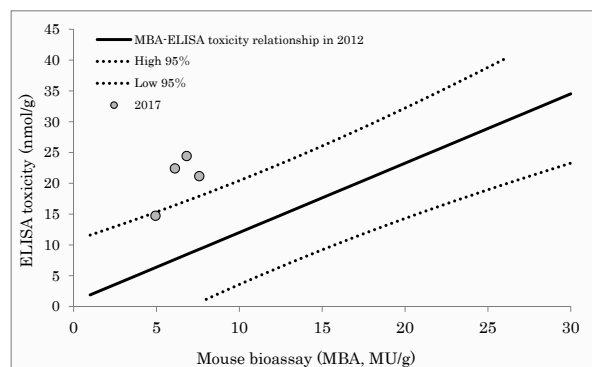


Fig. 3 Relationships between the toxicity quantified by mouse bioassay and that quantified by ELISA in 2012 and 2017.

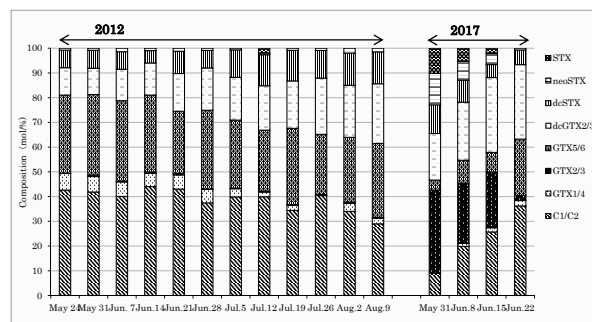


Fig. 4 Changes in composition of toxin components in Japanese cockle in 2012 and 2017.

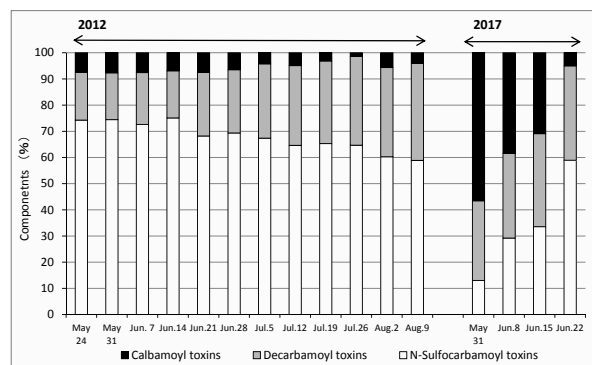


Fig. 5 Changes in composition of toxins in Japanese cockle in 2012 and 2017.

海域におけるプランクトン組成の変化の他, 二枚貝体内での代謝(野口・村上, 2004; 山本・及川, 2017), 試験液の酸性が高かったことによる脱スルホン化の進行(篠崎ら, 2013)等が考えられるが, 宮津湾の事例がいずれによるものかは不明である。

年毎に麻痺性貝毒成分に変化した場合, 異なる年のサンプルを単一の回帰直線で近似することは困難であり, 結果として公定法における推定毒力を過大に評価してしまう恐れがある(掘田・鈴木, 2017)。今後は, 麻痺性貝毒モニタリングの精度を高めるた

めにも、ELISA 法により養殖トリガイを含む二枚貝において毒化が確認された場合、毒組成に変化が生じていないかを確認するため HPLC 分析を行う必要がある。また、*G. catenatum* の毒組成を調べる等、府内海域に出現する貝毒プランクトンに関する知見を蓄積することが望ましい。

国立研究開発法人水産研究・教育機構 中央水産研究所 及川寛博士には、2017 年の養殖トリガイ毒化試料の HPLC 分析において多大なるご協力をいただくとともに、数々のご教示をいただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

文 献

- 堀田敏弘，鈴木 怜．2017．貝毒発生監視調査事業（概要）．平成 27 年度高知県水産試験場事業報告書，113：123-125．
- 今井一郎・板倉 茂．2007．わが国における貝毒発生の歴史的経過と水産業への影響．「水産学シリーズ 153 貝毒研究の最先端－現状と展望」．9-18．恒星社厚生閣，東京．
- 池田武彦，松野 進，遠藤隆二．1988．貝毒に関する研究（第 3 報）*Gymnodinium catenatum* による二枚貝の毒化について．山口研内海水産試験場報告，16：59-68．
- 京都府．2011．貝毒プランクトンの発生状況調査．平成 22 年度京都府農林水産技術センター海洋センター事業報告，42-44．
- 京都府．2017．貝毒発生監視調査．平成 28 年度京都府農林水産技術センター海洋センター事業報告，63-65．
- 西岡 純，和田洋蔵，今西裕一．1993．久美浜湾における *Gymnodinium catenatum* の出現．京都府立海洋センター研究報告，16：43-49．
- 農林水産省消費・安全局．2018．二枚貝等の貝毒のリスク管理に関するガイドライン．
- 野口玉雄，村上りつ子．2004．「貝毒の謎－食の安全と安心－」．23-32．成山堂書店，東京．
- 尾崎 仁，高田義宣，今西裕一，中西雅幸，田中雅幸，藤原正夢．2017．麻痺性貝毒による養殖トリガイの毒化の特徴．京都府農林水産技術センター海洋センター研究報告，39：29-36．
- 尾崎 仁，中西雅幸．2016．ELISA 法を用いて測定したトリガイ軟体部毒量と公定法毒力との関係．京都府農林水産技術センター海洋センター研究報告，38：13-18．
- Sato S., Takata Y., Kondo S., Kotoda A., Hongo N., Kodama M. 2014. Quantitative ELISA kit for paralytic shellfish toxins coupled with sample pretreatment. J. AOAC Int. 97: 339-344.
- 篠崎貴史，渡邊龍一，川津健太郎，櫻田清成，高日信也，上野健一，松嶋良次，鈴木敏之．2013．麻痺性貝毒簡易検出キット (PEP-ELISA) を用いた貝毒モニタリングシステムの有効性．食衛誌，54：397-401．
- 社団法人日本食品衛生協会．2005．「食品衛生検査指針理化学編」．673-680．社団法人 日本食品衛生協会，東京．
- 高田久美代，妹尾正登，東久保 靖，高辻英之，高山晴義，小川博美．2004．マガキ，ホタテガイおよびムラサキガイにおける麻痺性貝毒の蓄積と減毒の差異．日水誌，70（4）：598-606．
- 山本圭吾，及川 寛．2017．大阪湾で麻痺性貝毒により毒化したアカガイ，トリガイにおける毒量および毒成分の経時変化と種間の差異．日水誌，83（4）：589-598．