

LC/MS/MS による貝毒分析

Analysis of Shellfish Toxins by LC/MS/MS

橘田 規

Tadashi KITTA

一般財団法人日本冷凍食品検査協会 事業本部 試験部

〒236-0004 横浜市金沢区福浦 2-13-45

TEL : 045-781-9213

E-mail : t_kitta@jffic.or.jp

1. はじめに

ホタテガイやカキなどの二枚貝は餌として有毒プランクトンを捕食すると、有毒プランクトンがもつ毒素を一時的に体内に蓄積し毒化する。これらの二枚貝をヒトが摂食すると、中毒症状を引き起こすことがあり、その症状は下痢性貝毒、麻痺性貝毒、神経性貝毒、記憶喪失性貝毒に分類される（表 1）。二枚貝およびその加工品の国際物流が活発化する中、消費者の健康保護および公正な食品貿易の促進を目的として、国際食品規格の策定等を担う政府間組織（CODEX 委員会）は、貝毒の毒素群ごとにそれらの基準値を 2008 年に設定した（表 2）。CODEX 委員会の加盟国はこの基準値をそのまま国内法制化することを強いられる訳ではなく、食品の汚染実態や食品摂取に伴うヒトへの健康影響の程度によっては、国際食品規格と異なる規制内容にすることができる。実際に、欧州連合（EU）では、下痢性貝毒を内包する脂溶性貝毒というカテゴリーを設け、貝毒に係る国際食品規格と異なる規制が行われている。

本講演では、日本国内で流通する二枚貝の下痢性貝毒分析と日本から EU に輸出される二枚貝の脂溶性貝毒分析について、LC/MS/MS の活用事例を紹介する。

表 1 貝毒の症状¹⁾

貝毒の分類	症状
麻痺性貝毒	中毒症状はフグ毒中毒によく似る。食後 30 分程度で軽度の麻痺がはじまり、麻痺は次第に全身に広がり、重症の場合には呼吸麻痺により死亡することがある。
下痢性貝毒	おもな症状は消化器系の障害で、下痢、吐気、嘔吐、腹痛が顕著である。症状は食後 30 分から 4 時間以内の短時間で起こる。回復は早く通常は 3 日以内に回復する。後遺症はなく、死亡例もない。
記憶喪失性貝毒	中毒症状は食後数時間以内に吐気、嘔吐、腹痛、頭痛、下痢が起こり、重症の患者では記憶喪失、混乱、平衡感覚の喪失、けいれんがみられ、昏睡により死亡する場合もある。
神経性貝毒	中毒症状は、口内のしびれとひりひり感、運動失調、温度感覚異常などの神経障害を特徴とする。食後 1～3 時間で症状があらわれる。吐気、腹痛、下痢、嘔吐などの胃腸障害を伴うこともある。死亡例はない。

表 2 貝毒の CODEX 基準値²⁾

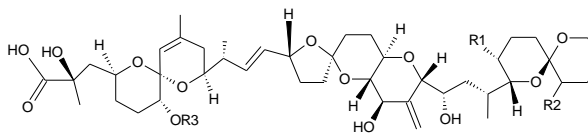
毒素群	基準値
サキシトキシン群 (麻痺性貝毒)	≤ 0.8 mg STX 当量/kg
オカダ酸群 (下痢性貝毒)	≤ 0.16 mg OA 当量/kg
ドウモイ酸群 (記憶喪失性貝毒)	≤ 20 mg DA/kg
ブレバトキシン群 (神経性貝毒)	≤ 200 MU/kg
アザスピロ酸群 (下痢性貝毒に類似)	≤ 0.16 mg/kg

MU : マウスユニット

2. 日本国内で流通する二枚貝の下痢性貝毒分析

1976 年に宮城県で下痢性貝毒による中毒事件が確認されてから 1980 年代前半までに同様の中毒事件が多数発生した。しかし、生産海域ごとの有毒プランクトン監視等による出荷自主規制がされて以降、市販の二枚貝による食中毒は発生していない。日本では、1980 年 7 月に下痢性貝毒について可食部 1 g 当たり 0.05 MU の規制値を設け、マウス毒性試験によりこの規制値を超える貝類の流通を規制してきた。日本のマウス毒性試験で検出できる毒性物質は、オカダ酸 (OA) 群、ペクテノトキシン (PTX) 群およびエッソトキシン (YTX) 群であることから、これらが下痢性貝毒の規制対象物質であったことになる。日本に先駆けて EU 等ではマウス毒性試験よりも高精度かつ高感度に検出が可能な機器分析法を制定していた。日本においても 2015 年 3 月に下痢性貝毒の規制に機器分析法が導入された。従前のマウス毒性試験で規制対象としてきた毒性物質のうち、オカダ酸群にのみヒトへの下痢原性が確認されているため、オカダ酸群に対しては 0.16 mg OA 当量/kg の規制値が設けられた。

下痢性貝毒の機器分析法は、平成 27 年 3 月 6 日に厚生労働省から通知された「下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について」に示された³⁾。この分析法で対象となる分析種は、オカダ酸、ジノフィシストキシン-1 (DTX1) 及びジノフィシストキシン-2 (DTX2) 並びにそれらのエステル化合物 (DTX3) である。そして、①選択性、②真度及び精度、③定量限界の性能基準を満たす方法を用いることとされた。また、この通知に示されたオカダ酸群の分析操作の例では、DTX3 を加水分解して、OA、DTX1 又は DTX2 に変換した後、LC/MS/MS で測定する。変換したそれらの定量値に毒性等価係数 (TEF) を乗じたものの総和を OA 群濃度とする (図 1)。OA と DTX2 は互いに位置異性体の関係にあるが、それぞれの TEF が異なるために、HPLC で分離し個別に定量する必要があることに注意しなければならない。



	R1	R	R3	分子量	TEF
OA	CH ₃	H	H	804.5	1
DTX1	CH ₃	CH ₃	H	818.5	1
DTX2	H	CH ₃	H	804.5	0.5
DTX3	(H or CH ₃)		Acyl		

図 1 オカダ酸群の分析種

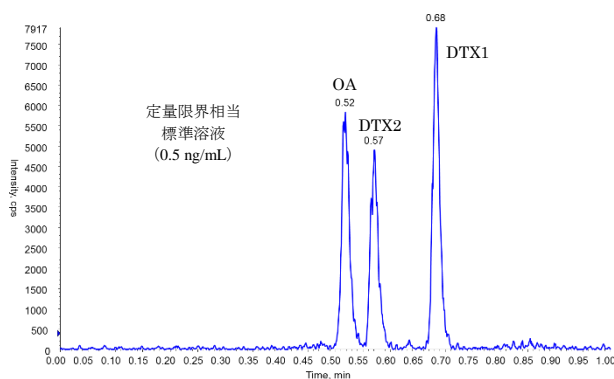


図 2 オカダ酸群のトータルイオン
カレントクロマトグラム

日本冷凍食品検査協会（以降当会）では、輸入あるいは国内産の二枚貝とその加工品等の分析が毎日行われている。そして、それら検体の処理数が多いことから、当会では、迅速・簡便な前処理法と 1 サイクル約 1 分間で OA と DTX2 を完全分離することができる LC/MS/MS 条件（図 2）を開発し、複数の事業所で手分けして分析を行っている。

3. 日本から EU に輸出される二枚貝の脂溶性貝毒分析

EUではその物理化学的性質からOA群、PYX群、アザスピロ酸（AZA）群およびYTX群を“脂溶性貝毒”と呼び、これらの毒素群に対して基準値⁴⁾⁵⁾を設定している（表3）。ヨーロッパでよく食されるムラサキガイ（ムール貝、カラス貝とも呼ばれる）は、OA群を蓄積しやすいため、スペイン、フランス、ノルウェーなど、ヨーロッパ大西洋岸を中心に数千を超える下痢性貝毒症例が報告されている。また、ノルウェーではOA群で毒化したカニによる数百人規模の食中毒も発生している⁶⁾。PTX群およびYTX群は、ヒトへの毒性を示すデータや中毒事例がない他、動物での経口毒性も非常に低く、下痢原性を示さない⁷⁾とされているが、EUにおいては規制の対象となっている。AZA群は、1995年にアイルランド産ムラサキガイから初めて検出された毒素群である。その後の研究により、特にムラサキガイはAZA群に毒化しやすいことが判明した⁷⁾。

2015年1月にEUの脂溶性貝毒分析法は、従前のマウス毒性試験から機器分析法に移行した。現在では、EU域外で生産された二枚貝をEUに輸出する際にも、機器分析法による脂溶性貝毒検査が行われている。脂溶性貝毒の分析法は、マリンバイオトキシン欧州連合標準検査機関（EU-RL-MB）が示したLC-MS/MS法⁸⁾が広く使われている。この方法は定量分析用認証標準物質の入手が難しいことから、1毒素群につき1種類の認証標準物質を用いて検量線を作成し、同じ毒素群に分類される全ての規制対象物質をこの1つの検量線で定量し、それぞれの定量値にTEFを乗じたものの総和を求めるものである。2016年現在、認証標準物質を製造・販売しているのは産業技術総合研究所 計量標準総合センター（NMIJ）、カナダ国家研究会議（NRC）等の数機関に限定されていることから、認証標準物質の安定的な供給と確保が重要な課題となっている。

当会で実施している脂溶性貝毒分析では、分析対象となる試料の種類が限定されており、加工されていない試料が多いため、マトリックス添加標準溶液を用いた絶対検量線法により定量を行っている。また、LC/MS/MS 分析では YTX 群の感度が他の毒素群と比較して極端に低いため、ルーチン分析ではタンデム質量分析計の中でも高感度な機種を使用している。

表 3 EU における脂溶性貝毒の基準値

毒素群	分析種	TEF	基準値
OA 群	OA	1	≤ 160 µg OA 当量/kg
	DTX1	1	
	DTX2	0.6	
PYX 群	PTX1	1	
	PTX2	1	
AZA 群	AZA1	1	≤ 160 µg AZA 当量/kg
	AZA2	1.8	
	AZA3	1.4	
YTX 群	YTX	1	≤ 3.75 mg YTX 当量/kg
	homo YTX	1	
	45 OH YTX	1	
	45 OH homo YTX	0.5	

4. さいごに

貝毒は多種様々な有毒プランクトンが産生する天然毒であり、いずれの毒素群にも複数の類縁体が存在することが明らかになっている。しかし、規制対象となっているのはその一部であるため、LC-MS/MS 分析で規制対象外の類縁体を検出した場合、分析値にはプラスのバイアスがかかる場合がある。このバイアスが大きくなれば、最悪の場合、偽陽性の判定を下してしまう可能性がある。陽性の判定がされると、二枚貝の生産海域全体に出荷規制が掛かり、水産養殖業者に甚大な被害がもたらされるため、偽陽性の判定は絶対にあってはならない。

当会では偽陽性の判定を排除することを目的とし、検出時には高分解能質量分析計の一種である四重極オービトラップ質量分析計による定性分析を行い、規制対象外の類縁体を誤って定量することのないように万全の体制を構築している。

今後も、我が国の輸出促進と国民の健康保護に資するべく、分析技術の維持・向上を図っていきたい。

参考文献

- 1) 厚生労働省 “事前毒のリスクプロファイル”, available from
 <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/poison/index.html>, (accessed 2006-12-12).
- 2) CODEX STAN 292-2008, STANDARD FOR LIVE AND RAW BIVALVE MOLLUSCS, I-5.2 (2008).
- 3) 下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について，平成 27 年 3 月 6 日付け食安基発 0306 第 3 号及び食安監発 0306 第 1 号.
- 4) Regulation EC No 853/2004.
- 5) Regulation EC No 786/2013.

- 6) Torgersen T., Aasen J., Aune T., Diarrhetic shellfish poisoning by okadaic acid esters from Brown crabs (*Cancer pagurus*) in Norway, *Toxicon*, **46**, 572-578 (2005).
- 7) Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs (2004).
- 8) European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins, EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS, Version 5 (2015).