



有毒藻類の大量培養による下痢性貝毒認証標準物質の製造

内田 肇・渡邊 龍一・松嶋 良次・及川 寛・石原 賢司・鈴木 敏之*
 (国立研究開発法人 水産研究・教育機構 中央水産研究所)

山崎 太一・川口 研・高津 章子
 (国立研究開発法人 産業技術総合研究所)

1976年と1977年に東北地方沿岸で発生したムラサキイガイによる食中毒は下痢性貝毒と命名され、その後、ヨーロッパの大西洋岸など世界的に多くの中毒患者が発生した。毒化した二枚貝をヒトが摂取すると下痢(92%)、吐き気(80%)、嘔吐(79%)、腹痛(53%)などを発症する。通常、発熱はみられず、腹痛も腸炎ビブリオ中毒よりも軽度である。喫食から発症までの時間は短く、70%の患者が4時間以内に発症する。安静にしていれば2、3日で回復する¹⁾。わが国では、北海道・東北沿岸域の二枚貝が毎年、散発的に毒化している。下痢の原因となっているオカダ酸(OA)群(図1)²⁾は、*Dinophysis*属有毒プランクトンが一次生産者であり、二枚貝が有毒プランクトンの摂食により毒を体内に蓄積する。これを二枚貝の毒化と呼ぶ。ジノフィシストキシン1(dinophysistoxin-1: DTX1)の7位水酸基に脂肪酸がエステル結合した7-O-acyl-dinophysistoxin-1は、ジノフィシストキシン3(dinophysistoxin-3: DTX3)とも呼ばれ二枚貝の代謝物である。*Dinophysis*属有毒プランクトンが生産するDTX1が前駆体である。これらはいずれも脂溶性物質である。*Dinophysis*属有毒プラン

クトンの他に底生渦鞭毛藻の*Prorocentrum lima*などもOA群を生産することが知られているが、二枚貝の毒化にどの程度関与しているかについては不明である。

わが国の二枚貝は、生産者による出荷前自主検査により安全性が確認され、国が定めた規制値を超える二枚貝については、出荷自主規制措置により、市場に流通することはない。したがって、市場に流通した二枚貝による貝毒被害は近年ほとんど発生していない。しかし、出荷自主規制措置により二枚貝の出荷が滞るため、二枚貝産業上の大きな問題となっている。貝毒の検査法は、多くの国々で動物検査法であるマウス毒性試験が採用されてきた。この試験法は、二枚貝の抽出液をマウスの腹腔内に投与し、試料の希釈率とマウスの生死により毒力を判定する方法である。しかし、マウス毒性試験は、遊離脂肪酸などによる偽陽性反応により、OA群が含まれていない二枚貝でも陽性と判定されてしまうため、機器分析法を中心にさまざまな分析手法が開発されている。近年、LC/MS/MS法³⁾などにより二枚貝の毒力を検査、監視する国が増えている。2015年3月に厚生労働省から発出された「食安発0306 第1号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知」により、わが国においてもマウス毒性試験法に代わりLC/MS/MS法が公定法となった。機器分析法で定量する場合、分析機器から得られる出力信号を濃度などの分析値とするためには、濃度が既知の標準物質が必要であり、国の公定法が機器分析法に改正されたことにより、貝毒検査の現場では下痢性貝毒標準物質が不可欠となっている。下痢性貝毒OA群の標準物質はカナダのNational Research Council (NRC)が製造したものが市販されており、世界的に普及している標準物質であるが、供給量が限られるため、在庫は十分にあるとは言い難い。二枚貝生産大国であるわが国において、貝毒検査の標準物質を海外の製品にのみ依存することは、在庫切れに伴う貝毒検査の停滞などのリスクを勘案すると望ましいことではない。そこで、有毒藻類*P. lima*の

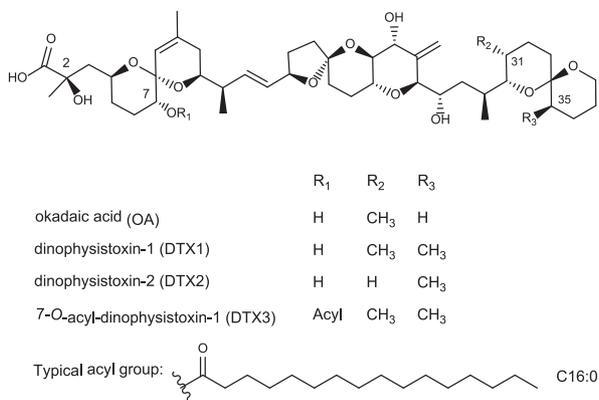


図1. オカダ酸群の化学構造



大量培養により，国産標準物質を安定供給するための技術を開発した。

有毒藻類の大量培養によるOA群の製造

国内の二枚貝から検出される下痢性貝毒成分は，DTX1とその脂肪酸エステルであるDTX3が主であるがOAが検出されることもある。わが国の公定法では，DTX3はアルカリ加水分解により，DTX1に変換して分析する。また，日本では海外で問題となるジノフィシストキシン2 (dinophysistoxin-2: DTX2) の検出例がないことから，標準物質として必要となるのはOAおよびDTX1である。下痢性貝毒の毒化原因は渦鞭毛藻の *Dinophysis* 属であり，当然これらはDTX1またはOAを生産する。しかし，これらの渦鞭毛藻は従属栄養の生態をもつため，培地に添加する栄養分，光合成のための光照射のほか動物プランクトンの一種である *Mesodinium rubrum* の生細胞を餌生物として与える必要がある。このため *Dinophysis* 属の大量培養は可能ではあるが非常に煩雑な作業となる。一方，海藻などに付着生活する渦鞭毛藻 *P. lima* がOAやDTX1を生産するため，高知大学や民間研究機関であるトロピカルテクノプラスとともに日本全国の海藻付着物から *Prorocentrum* 属を分離して培養株を作製し，OA群の生産をLC/MS/MSを使っ

て調査した。国内沿岸で分離した数百株以上をスクリーニングし，OAならびにDTX1の高生産株を単離した。さらに，*P. lima* の大量培養についても検討した。本種はもともと海藻などに付着して生活していることから，人工的に培養した場合には容器底面に付着して増殖する。そのため浮遊性種のように通気培養で大量かつ高密度に培養することができない。そこで，付着面積を大きくするために大型で浅い培養槽を複数個用いることによって大容量の培養を行った(図2)。また，*P. lima* 代表株の培養条件について，培養温度20°Cと25°Cで比較したところ(図3)，細胞内の毒量は培養温度25°Cで高く，培養期間50日以降に最大となり，DTX1の相対含量も高くなったことから，25°Cで60日間の培養を基本としている。100 Lの培養でOA，DTX1合わせて数十ミリグラムが得られる。OAやDTX1は，各種クロマトグラフィーにより単離することができるが，精製工程が煩雑であるため，より効率的な抽出法や精製法について，現在，検討している。なお，DTX2は国内で問題となったことはなく，今回実施したスクリーニングによっても生産株は発見されなかった。一方で，海外への輸出を伴う生産現場では必要な検査対象となる可能性もあるので，DTX2の生産株の探索が今後検討すべき課題として残されている。

下痢性貝毒認証標準物質

標準物質は，わが国の国家計量標準機関である国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研)がトレーサビリティ体系において最上位の標準物質を開発し提供している。そのため，精製したOAとDTX1を原料として，産総研が中心となり，水産研究・教育機構と日本食品分析センターが協力する形で標準物質の開発が行われた。開発した下痢性貝毒標準物質は2016年4月から市販されている(図4，表1)。標準物質の濃度は定量核磁気共鳴法(qNMR)により決定された^{4,5)}。qNMRとは，化



図2. *Prorocentrum lima* の大量培養

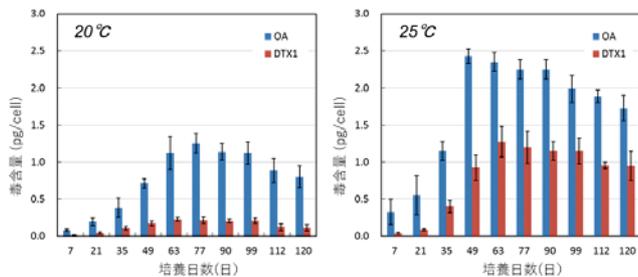


図3. 培養温度20°Cならびに25°Cにおける *Prorocentrum lima* の細胞毒量の変化

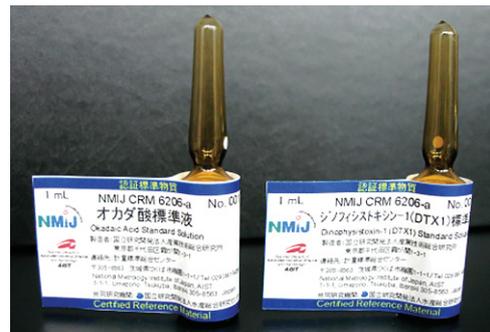


図4. オカダ酸標準液(左)とジノフィシストキシン-1標準液(右)



表1. 下痢性貝毒認証標準物質の認証値および性状

標準物質名	オカダ酸標準液	ジノフィシストキシン-1 標準液
標準物質番号	NMIJ CRM 6206-a	NMIJ CRM 6207-a
認証値	0.909 µg/mL	1.079 µg/mL
拡張不確かさ	0.073 µg/mL	0.078 µg/mL
溶媒	0.5% (体積分率) エタノール含有メタノール	
容量	1 mL	

学シフトの異なるNMR信号の面積比が信号に寄与する原子の数の比に対応することに基づき、ある信号に寄与する原子数が既知である物質を添加して測定を行い、NMR信号の面積を比較することで濃度未知の有機化合物の定量を行う方法である。メートル条約の下での国際度量衡委員会が設けた化学計量に関する諮問委員会では、国際単位系(SI)につながるいわゆるSIトレーサブルな高精度分析法を「一次標準測定法」と呼んでいるが、qNMRは一次標準測定法の候補として検証が続けられており、さまざまな有機化合物への適用が期待されている。このqNMRにより濃度決定された下痢性貝毒標準物質は、カナダNRCが提供している標準物質と同様、「一つ以上の規定特性について、計量学的に妥当な手順によって値付けられ、規定特性の値およびその不確かさ、ならびに計量計測トレーサビリティを記載した認

証書が付いている標準物質」と定義される認証標準物質であり、分析結果についてのトレーサビリティの確立を行うことができる。

今後、わが国の下痢性貝毒検査体制を維持するためには、開発した認証標準物質を持続的に提供できるような頒布体制を構築する必要があるが、そのためには、民間試薬メーカーが積極的に関与することが望ましい。こうした体制作りに向けた検討も進められている。

謝 辞

本研究は、「SIP (戦略的イノベーション創造プログラム) 次世代農林水産業創造技術 (新たな機能の開拓による未来需要創出技術) 未利用藻類の高度利用を基盤とする培養型次世代水産業の創出に向けた研究開発 (平成26~28年度)」および「革新的技術開発・緊急展開事業 (うち経営体強化プロジェクト) 先端技術を活用した世界最高水準の下痢性貝毒監視体制の確立 (平成29~31年度)」による支援を受けて行った。関係者に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Yasumoto, T. *et al.*: *Bull. Japan, Soc. Sci. Fish.*, **44**, 1249 (1978).
- 2) Yasumoto, T. *et al.*: *Tetrahedron*, **41**, 1019 (1985).
- 3) Suzuki, T. and Quilliam, M. A.: *Anal. Sci.*, **27**, 571 (2011).
- 4) Kato, T. *et al.*: *Anal. Sci.*, **32**, 729 (2016).
- 5) Watanabe, R. *et al.*: *Toxins*, **8**, 294 (2016).