

各種二枚貝及びマボヤにおける

LC-MS/MSによる下痢性貝毒（オカダ酸群）の分析

Various bivalve shells and sea squirts
Analysis of diarrhetic shellfish poison (okadaic acid group) by LC-MS / MS

千葉 美子 大内 亜沙子 佐藤 智子 佐藤 由紀*1 佐々木 隆一*2
Yoshiko CHIBA, Asako OUCHI, Satoko SATO, Yuki SATO, Ryuichi SASAKI

下痢性貝毒（オカダ酸群）の定量法について、LC-MS/MSによる機器分析法を検討し、その結果を既報において報告した。今回、本法を用いて毒化したホタテガイへの適応性を確認し、検査対象部位を中腸腺又は中腸腺を含む可食部とした場合の差が、分析値に与える影響について精査した結果、中腸腺のみを試料とした方が毒量のばらつきが小さいことを確認した。また、ムラサキイガイとカキへの適応性を検証したところ、全ての毒素において定量法の性能基準を満たした。さらに、マボヤの器官別に性能評価試験を行い、毒化したマボヤにおける器官局在性を調査し、オカダ酸群が肝臓に偏在していることを確認した。

キーワード：下痢性貝毒；オカダ酸群；妥当性評価；液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計
Key words : diarrhetic shellfish poison ; okadaic acid group ; validation study ; LC-MS/MS

1 はじめに

下痢性貝毒の検査は、従来、マウスアッセイ法により実施されてきたが、平成27年3月に改正された通知¹⁾により機器分析法が導入され、オカダ酸群（オカダ酸、ジノフィシストキシン1、ジノフィシストキシン2（図1参照）並びにそれらのエステル化合物（以下「OA、DTX1、DTX2」））に対して規制値が定められた。しかし、検査法については分析操作例²⁾が示されたのみで、分析法の妥当性確認は各検査機関の必須事項となっていた。当所では、操作例に準じて分析法を検討し、精製の一部を改良した方法でホタテガイの中腸腺を対象として妥当性評価を行い、分析法を確立した。さらに、毒化したホタテガイを用いて適応性を確認し報告した³⁾。

今回、ホタテガイの中腸腺のみを試料とする場合と中腸腺を含む可食部（むき身）全体を試料とする場合について、対象とする試料の差が定量値に与える影響について検討した。また、確立した分析法についてムラサキイガイ及びカキへの適応性を検証した。さらに、マボヤ中オカダ酸群定量法の器官別性能評価を行い、毒化したマボヤでオカダ酸群の器官局在性を求めたので報告する。

2 方法

2.1 試料

ホタテガイは宮城県漁業協同組合から購入し、それ以外の試料は、宮城県水産技術総合センター気仙沼水産試験場（以下「水産試験場」）が採取したものをを用いた。

マボヤについては、水産試験場で解剖し、器官毎（肝

臓、筋膜体（生殖巣含む）、腸管、腸内内容物、鰓）に分別したものを均質化した。それ以外の貝類の調製は通知に従い均質化し、それぞれ-30℃で保存した。

2.2 標準品及び試薬等

標準品：NMIJ製のOA標準液、DTX1標準液、NRC製のCRM-DTX2を使用した。

試薬：関東化学（株）製のLC/MS用メタノール、残留農薬試験用ヘキサン、その他の試薬類は特級を用いた。

分散固相：Sigma-Aldrich社製Supel QuE Z-Sep 2mL Tube（以下「Z-Sep」）を使用した。

メンブレンフィルター：ADVANTEC社製DISMIC JP13020ANを用いた。

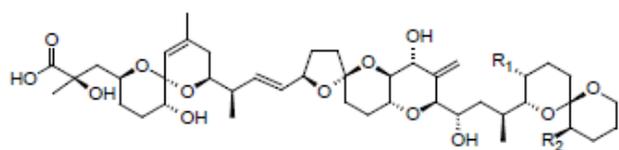
2.3 使用機器及び分析条件

使用機器及び分析条件を表1に示す。

2.4 試験溶液の調製

分析操作例に従い抽出、加水分解後、ヘキサンによる精製を2回行った。ヘキサン除去後、窒素パージによりヘキサンを完全に留去し、メタノールを加え2mLに定容した。混和後、1mLをZ-Sep Tubeに採取し、1分間手振りで激しく振とうした後、毎分3,500回転で10分間、遠心分離した。上清を適量分取し、メンブレンフィルターによりろ過し、ろ液をメタノールで適宜希釈して試験溶液とした（以下「Z-Sep精製」）。

なお、2mL定容後の溶液の性状により、Z-Sepによる精製が不要と判断した試料にあつては、メンブレンフィルターによるろ過後、メタノールで適宜希釈して試験溶液とした（以下「Z-Sep未精製」）。



毒素	R ₁	R ₂
OA	CH ₃	H
DTX1	CH ₃	CH ₃
DTX2	H	CH ₃

図1 オカダ酸群化学構造式

表1 使用機器及び分析条件

LC	Agilent Technologies 1200 Infinity series						
MS/MS	AB SCIEX QTRAP4500						
カラム	InertSustainSwift C18 (2.1mm×100mm, 3µm)						
移動相	A相: 水 (2mM半酸アンモニウム及び50mM半酸含有) B相: 95%メタノール (2mM半酸アンモニウム及び50mM半酸含有)						
溶出方法	グラジエント法						
	min	0	0.5	3.5	6.5	6.51	16.5
A %		30	30	0	0	30	30
B %		70	70	100	100	70	70
カラム温度	40℃	流速	0.2mL/min		注入量	5µL	
イオン化法	ESI (Negative)	IS	-4,500V		TEM	700℃	
定量イオン(確認イオン)	OA及びDTX2		m/z 803.5 → 255.0 (803.5 → 113.0)				
	DTX1		m/z 817.5 → 255.0 (817.5 → 113.0)				

2.5 性能評価試験と適応性の検証

抽出液に、各成分0.05mg/kgとなるように標準液を添加後、90%メタノールで20mLに定容した。この溶液2mLを加水分解、精製して性能評価試験（5併行1日）を実施し、適応性の検証を行った。

2.6 マボヤにおけるオカダ酸群の器官局在性調査

本法を適用して、毒化したマボヤを対象に、オカダ酸群の器官局在性調査を行った。試料は、マボヤ10～20個（採取日の異なる3～5試料）の各器官（肝臓、筋膜、腸管、腸内内容物及び鰓）とした。

3 結果及び考察

3.1 ホタテガイの毒量比較

ホタテガイの中腸腺のみを試料とする場合と中腸腺を

含む可食部（むき身）全体を試料とする場合について、対象とする試料の差が定量値に与える影響について検討した。その結果、中腸腺のみを試料とした方がバラツキが小さい傾向にあった。ホタテガイは中腸腺の除去が容易であることから、中腸腺を試料として定量し、むき身相当に換算した方が、正確な毒量を反映すると考えられた。また、毒量の内訳として、DTX2は不検出であり、DTX1が毒量の大部分を占めていた（表2参照）。

なお、平成29年度に参加したオカダ酸群技能試験のパイロットスタディでは、本法を用いてホタテガイのむき身試料の定量試験を実施した。調製濃度0.146mg/kgに対し、報告値は0.140mg/kg、z-スコアは-0.19と非常に良好であり、中腸腺で確立した定量法を可食部（むき身）全体に適用できることが確認できた。

3.2 ムラサキイガイ、カキにおける適応性の検証

3.2.1 ムラサキイガイ及びカキの性能評価試験

貝毒毒化の指標種であるムラサキイガイ及び当県で生産量の多いカキを対象に、本法の適応性を検証した。

下痢性貝毒は中腸腺に局在するが、ホタテガイとは異なり、ムラサキイガイやカキでは中腸腺の除去が煩雑となるため、むき身全体を対象として実施することとした。

これらの生鮮試料に標準液を添加し、30分後に抽出を開始した試験溶液は、添加直後及び抽出液に標準液を添加して操作したものと比較して、真度が約20%低下する傾向が見られた。この現象は、加熱処理を施した試料やホタテガイでは見られなかったことから、生鮮ムラサキイガイや生鮮カキでは、添加後に何らかの要因でオカダ酸群が減衰すると推察された。したがって、性能評価試験は、抽出液に標準液を添加する方法で実施した。

ヘキサン精製後の試験溶液は、粘性の夾雑物が多く認められたが、Z-Sepによる精製後は、非粘性の透明な試験溶液が得られた。この試験溶液をメタノールで5倍及び10倍に希釈し、機器分析に供した。

全ての毒素において、真度70～120%、併行精度15%未満と良好な結果が得られ、定量法としての性能基準を満たした（表3参照）。

表2 ホタテガイ検査に使用する部位が毒量定量に及ぼす差

試料	毒素	中腸腺						可食部（むき身）全体					
		50倍希釈液		5倍希釈液		原液		5倍希釈液		原液			
①	OA	0.007	± 0.001	0.004	± 0.000	0.004	± 0.000	OA	0.009	± 0.003	0.007	± 0.000	
	DTX1	0.153	± 0.006	0.154	± 0.007	0.145	± 0.004	DTX1	0.146	± 0.012	0.137	± 0.012	
②	OA	0.000	± 0.000	0.004	± 0.000	0.004	± 0.000	OA	0.000	± 0.000	0.006	± 0.001	
	DTX1	0.164	± 0.004	0.168	± 0.001	0.164	± 0.005	DTX1	0.168	± 0.018	0.182	± 0.019	
③	OA	0.004	± 0.002	0.004	± 0.000	0.004	± 0.000	OA	0.003	± 0.001	0.003	± 0.001	
	DTX1	0.130	± 0.002	0.130	± 0.005	0.127	± 0.003	DTX1	0.083	± 0.007	0.085	± 0.013	
④	OA	0.007	± 0.001	0.008	± 0.000	0.008	± 0.000	OA	0.012	± 0.001	0.013	± 0.002	
	DTX1	0.259	± 0.010	0.263	± 0.015	0.251	± 0.011	DTX1	0.224	± 0.016	0.220	± 0.012	
⑤	OA	0.000	± 0.000	0.001	± 0.000	0.001	± 0.000	OA	0.002	± 0.001	0.002	± 0.000	
	DTX1	0.018	± 0.002	0.023	± 0.000	0.022	± 0.001	DTX1	0.019	± 0.002	0.023	± 0.001	

希釈倍率換算後の平均値±標準偏差 (mg OA当量/kg)

3.2.2 毒化したムラサキイガイの毒量測定

毒化したムラサキイガイ（採取日の異なる3試料，それぞれn=3）を用い，試験溶液を調製して5倍に希釈し，測定を行った。むき身全体におけるオカダ酸群の定量値を表4に示す。全ての試料で精度良く定量できた。また，ホタテガイと同様にDTX1が毒成分の大部分を占めており，DTX2は不検出であった。

3.3 マボヤにおける適用性の検証及び器官局在性

3.3.1 試験溶液のマトリックスによる影響

各器官に分別し，均質化したマボヤの試料（n=1）を用い，ヘキサンのみ実施した試験溶液を調製してマトリックス原液とした。肝臓の試験溶液は，着色成分等によるマトリックス効果が懸念されたが，その他の器官の試験溶液は，ほぼ無色透明で流動性も高かったため，Z-Sep精製は肝臓のみとした。各試料から調製した試験溶液原液のほか，メタノールで2倍，5倍，10倍に希釈した各溶液に，各毒素2ppbとなるように標準液を添加して，マトリックス効果の影響を比較した。

その結果，肝臓以外の器官については，希釈倍率に関係なく添加量に近似した値が得られ，マトリックスの影響を受けていないことを確認した。

一方，肝臓については，Z-Sep精製の有無に関わらず，原液及び2倍希釈溶液で明らかなイオン化促進が認められた。また，5倍希釈以上ではZ-Sep精製の有無による差は僅かであったものの，精製は必須と考えられたことから，肝臓を対象とする場合は，Z-Sep精製を行った後，5倍以上に希釈することとした（データ不掲載）。

上記の結果を踏まえ，マボヤ各器官の均質化試料（それぞれn=3）を用い，マトリックスの影響を再確認したところ，表5に示すとおり，希釈によりマトリックス効果を低減しても，原液と希釈液の間で真度に明らかな差が認められず，試験溶液中のマトリックスが測定に支障をきたすことはないと考えられた。

3.3.2 マボヤ各器官の性能評価試験

試料に標準液を添加して放置したところ，ムラサキイガイ及びカキ同様，毒量に減衰が認められたため，性能評価試験は抽出液に標準液を添加して実施した。肝臓については，Z-Sep精製後の試験溶液を，その他の器官については，Z-Sep未精製の試験溶液を，メタノールでそれぞれ5倍，10倍に希釈して評価した（各器官n=5）。その結果，全ての毒素において，真度70～120%，併行精度15%未満と良好な結果となり，定量法の性能基準を満たした（表6参照）。

3.3.3 毒化したマボヤにおけるオカダ酸の器官局在性及び毒量

毒化したマボヤ10～20個体（採取日の異なる3～5試料）の各器官（肝臓n=3，その他の器官n=1）を用い，オカダ酸群の毒量を求めた結果を表7に示す。オカダ酸群は，肝臓から高濃度に検出されたが，その他の器官からは全く検出されなかったことから，肝臓に局

表3 ムラサキイガイとカキにおける性能評価結果

		ムラサキイガイ					
		Z-Sep未精製			Z-Sep精製		
		OA	DTX1	DTX2	OA	DTX1	DTX2
5倍	真度 (%)	95	89	91	84	76	81
希釈液	併行精度 (%)	4.8	5.5	4.7	3.2	3.4	3.7
10倍	真度 (%)	88	88	90	76	74	74
希釈液	併行精度 (%)	4.3	3.7	8.8	2.6	2.3	6.0

		カキ					
		Z-Sep未精製			Z-Sep精製		
		OA	DTX1	DTX2	OA	DTX1	DTX2
5倍	真度 (%)	100	100	110	99	91	98
希釈液	併行精度 (%)	3.9	4.5	6.0	2.5	2.6	4.5
10倍	真度 (%)	100	96	100	97	91	97
希釈液	併行精度 (%)	3.1	5.8	5.1	3.9	6.5	3.8

表4 毒化したムラサキイガイの毒量

	毒素		毒量	
	OA	DTX1		
①	OA		N.D.	
	DTX1		N.D.	
②	OA	0.005	±	0.001
	DTX1	0.176	±	0.003
③	OA	0.001	±	0.000
	DTX1	0.027	±	0.002
④	OA	0.001	±	0.000
	DTX1	0.093	±	0.003

希釈倍率換算後の平均値±標準偏差 (mg OA当量/kg)

表5 マボヤにおける器官別マトリックス効果の影響

器官	希釈倍率	真度 (%)					
		Z-Sep未精製			Z-Sep精製		
		OA	DTX1	DTX2	OA	DTX1	DTX2
肝臓	*2	107	105	120	98	88	109
	*5	97	94	111	93	89	109
	*10	92	89	109	86	80	101
筋膜体	*1	102	87	110			
	*2	105	87	108			
腸管	*1	104	100	103			
	*2	101	100	99			
腸内内容物	*1	103	98	99			
	*2	105	102	103			
鰓	*1	101	93	102			
	*2	99	91	100			

在していることが示唆された。

次に，毒化したマボヤの肝臓のみを試料として，前処理及びZ-Sep精製の後，5倍希釈して毒量を定量した（表8参照）。

試料としたマボヤの肝臓重量比は，むき身全体重量の約5%であったことから，肝臓における毒量（0.003～0.22mg OA当量/kg）をむき身相当に換算したところ，N.D.～0.011mg OA当量/kgとなった。

また，ホタテガイやムラサキイガイ，カキでは毒の大

表6 マボヤにおける器官別性能評価試験結果

試験 溶液	器官 毒素	Z-Sep精製			Z-Sep未精製											
		肝臓			筋膜体			腸管			腸内内容物			鰓		
		OA	DTX1	DTX2	OA	DTX1	DTX2	OA	DTX1	DTX2	OA	DTX1	DTX2	OA	DTX1	DTX2
原液	真度 (%)	95	82	87												
	併行精度 (%)	3.1	3.1	2.3												
5倍 希釈液	真度 (%)	100	82	81	110	92	100	110	110	110	98	110	97	110	110	97
	併行精度 (%)	6.7	7.3	10	8.1	5.1	1.4	5.8	2.5	5.3	5.8	0.7	1.5	12	2.5	2.9
10倍 希釈液	真度 (%)	89	81	85	100	97	91	100	100	93	110	110	100	95	110	100
	併行精度 (%)	9.2	5.9	9.2	1.4	1.5	7.8	2.8	5.5	4.6	6.7	5.0	0.0	7.4	4.0	0.0

表7 マボヤにおけるオカダ酸群の器官局在性

器官	試料				
	毒化前	毒化中①	毒化中②	毒化中③	毒化中④
肝臓	N.D.	0.061	0.118	0.181	0.107
筋膜体	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
腸管	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
腸内内容物	N.D.	N.D.	-	N.D.	-
鰓	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

オカダ酸群濃度(mg OA当量/kg)

表8 毒化したマボヤの肝臓毒量

試料	毒素	毒量
①	OA	0.003
	DTX1	N.D.
②	OA	0.027
	DTX1	0.047
③	OA	0.079
	DTX1	0.064
④	OA	0.110
	DTX1	0.110
⑤	OA	0.075
	DTX1	0.053

希釈倍率換算後の平均値 (mg OA当量/kg)

各毒素の定量下限値は0.002mg/kg

部分を DTX1 が占めていたのに対し、マボヤ肝臓の毒素は、OA と DTX1 がほぼ同程度混在していた。この現象は、二枚貝類とマボヤでのオカダ酸群に対する代謝機能の差によるものと考えられた。DTX2 は、二枚貝類と同様に検出されなかった。

4 謝辞

本研究の実施にあたりご協力いただきました、宮城県漁業協同組合並びに宮城県水産技術総合センター気仙沼水産試験場に深謝いたします。

参考文献

- 1) 麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取扱いについて (平成 27 年 3 月 6 日付食安発 0306 第 2 号)
- 2) 下痢性貝毒 (オカダ酸群) の検査について (平成 27 年 3 月 6 日付食安基発 0306 第 4 号, 食安監発 0306 第 2 号)
- 3) 佐藤智子, 千葉美子, 佐藤由紀, 高橋剛: 宮城県保健環境センター年報 (第 35 号 2017 p.55)