

Alexandrium tamarense 納餌におけるマガキによる 麻ひ性貝毒の蓄積および減毒の様相

加賀新之助・関口勝司・佐藤 繁・児玉正昭

Accumulation and depuration kinetics of paralytic shellfish toxins in the oyster *Crassostrea gigas*
fed *Alexandrium tamarense*

Shinnosuke Kaga, Katsushi Sekiguchi, Shigeru Sato* and Masaaki Kodama*

Abstract

Adult oyster, *Crassostrea gigas*, held for 8d separately in tanks and fed known amounts of cultured cells of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* were held without feeding for an additional 10d. During the 18d study, 3 oysters were removed every 2d and the quantity of each toxin present was analyzed individually. The toxins released into the environmental seawater were recovered and also analyzed.

In feeding period, the amount of toxins accumulated in the oyster did not increase in parallel with supply of toxic dinoflagellates, suggesting that the oyster was resistant to accumulate toxins. The sum of the amount of toxins accumulated in the oyster and that released into the water was always fluctuating below the amount of the supplied toxins. In the period without feeding, the amount of toxins accumulated in the oyster decreased gradually, whereas the sum of the amount of toxins accumulated in the oyster and that released into the water seemed to be increasing.

These results suggest that toxins supplied to the closed system containing the oyster and its environmental water did not easily decrease.

Key words ; paralytic shellfish toxin, oyster, *Alexandrium tamarense*, feeding experiment

キーワード；麻ひ性貝毒，マガキ，*Alexandrium tamarense*，給餌実験

はじめに

フィールドに麻ひ性貝毒原因藻 *Alexandrium tamarense* が発生すると、これらを摂取する二枚貝など多くの生物種が藻類の毒を取り込み毒化するが、ほぼ同一環境下にある生物種ごとの単位重量当たりの毒量、および毒の保持能には大きな差異があることが知られており、たとえばマガキ (*Crassostrea gigas*) は、ホタテガイ (*Patinopecten yessoensis*) やムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*) に比べ、毒量は低く、また蓄積された毒の除去も速やかであるとされている¹⁻⁵⁾。

現在、国内ではホタテガイを中心とした二枚貝類の貝毒監視体制が整備されているが、より効果的かつ効率的な監視体制を構築するためには、このような生物種による毒化の差異を詳細に把握する必要がある。これを行

う上では、各生物種個体が摂取した藻類の量が明確に把握できる個体別飼育－給餌法が最適であると考え、我々は先に⁶⁾ ホタテガイを対象に本方法を適用し、非常に興味深い結果を得た。すなわち、ホタテガイに取り込まれた毒成分は、その一部が高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などの測定機器に検出されない形で体内で変換され、しばらくすると再び体内で毒成分に再変換される、という毒の動態の一部が示唆されたのである。この結果は、フィールドにおいてしばしばみられる有毒藻類消失後にホタテガイの毒量が増加する現象の説明を容易にしてくれるなど、多くの知見を与えてくれた。

このような知見をさらに発展させるべく、今回、本県の有用な養殖対象種で、かつフィールドにおける毒化の挙動がホタテガイと異なるマガキを対象とし、毒の蓄積および減毒について詳細に調べるために、同様の実験を行

*外部研究者：北里大学水産学部 (School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Ofunato, Iwate 022-0101, Japan)

い若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

給餌用 *A.tamarensense*

北里大学緒方教授より提供された*A.tamarensense*のクローン培養株（株名OF935AT6）をT1培地中⁷⁾, 15±1°C, 80~100 μmol photon · m⁻² · s⁻¹ (12 : 12hLD cycle) の条件下で静置培養し、対数増殖期後期（約2,500cells/mL）に達した*A.tamarensense*を給餌に用いた。給餌した*A.tamarensense*細胞の一部は給餌毎にOshima⁸⁾に従い抽出し、後述の方法により毒成分を分析した。

給餌実験

岩手県山田湾の養殖場より無毒のマガキ27検体（可食部湿重量mean±SD：24.9±6.3g）を入手した。これらの検体をろ過海水5Lを満たした7L容の水槽27個に個体別に飼育し、通気しながら12.8~15.6°C, 8~10 μmol photon · m⁻² · s⁻¹ (12 : 12hLD cycle) の条件下で飼育した。飼育海水は全て0.5 μmのカートリッジフィルターでろ過したものを使い、1日1回新たに調整したものと交換した。このような飼育条件に5日間馴致した後、実験を開始した。

A.tamarensense 培養細胞を、ろ過海水5Lを含む水槽に細胞密度が約45cells/mLになるように加えた。次に、マガキを同水槽に移し、上記の条件下で飼育した。24時間後、マガキを同様に調整した*A.tamarensense*細胞を含むろ過海水5L入りの水槽に移して飼育し、この操作を繰り返して8日間給餌しながら飼育した。9日目から*A.tamarensense*を含まない海水を用いて同じ操作を繰り返し、さらに10日間無給餌で飼育した。給餌期間中は、*A.tamarensense*をろ過海水に添加直後および24時間経過後に、それぞれ各水槽の海水の一部を採取し、顕微鏡観察により*A.tamarensense*細胞を計数し、その差から摂餌された細胞数を求めた。給餌24時間後の海水800mLを各水槽から毎日採水し、酢酸を添加してpHを4.1に調整した後、-30°Cで凍結保存し、飼育海水中の毒量分析用の試料とした。またマガキを1日おきに3個体ずつ採取し、可食部を摘出した後、個体別に-30°Cに凍結保存し、蓄積毒量分析用の試料とした。

マガキおよび給餌した *A.tamarensense* の麻ひ性貝毒の分析

マガキの可食部を個体別に重量を測定し、AOAC法⁹⁾に従って抽出した。抽出液をOshima⁸⁾の方法に従い、HPLC-蛍光法によって毒成分を分析した。また、給餌に用いた*A.tamarensense*細胞についても給餌毎にその一部

をOshima⁸⁾の方法により抽出し、その毒成分をHPLC-蛍光法により分析した。

飼育海水中の麻ひ性貝毒の分析

海水試料から500mLを分取し、同一のマガキから得られたものを合一し、均一化した後、1,000~2,000mLずつに分け、10分間超音波処理して残存する*A.tamarensense*細胞を含む懸濁粒子をホモジナイズした後、ろ紙を用いてろ過し、得られたろ液にアンモニア水を滴下してpHを5.5に調整後、クロマトグラフ用活性炭（Wako）を充填したガラスカラム（2×5cm）に添加した。カラムを200mLの純水で洗浄後、1%酢酸／25%エタノール200mLで溶出し、溶出画分を減圧濃縮後、凍結乾燥した。得られた固体物を0.5mLの0.03M酢酸に溶解し限外ろ過（Millipore,ULTRAFREE-MC）した後、ろ液をOshima⁸⁾の方法に従いHPLC-蛍光法により分析した。また、マガキ飼育海水中の毒成分の経時的变化をみるため、18日間飼育した3つの区の飼育海水から毎日200mLずつ分取し、2日分ずつ合一（1200mL）したのち、上記と同様の処理および分析を行った。

結果および考察

A.tamarensense のマガキへの給餌実験

飼育期間中にへい死するマガキ検体は認められなかった。また、いずれの試験区においても、給餌24時間後には飼育海水中に*A.tamarensense*細胞は観察されず、給餌した*A.tamarensense*細胞はほとんど全てマガキに摂餌されたものと考えられた。

A.tamarensense 培養細胞の毒含量および毒成分組成

給餌毎に採取した8検体の*A.tamarensense*培養細胞の毒含量および毒成分にはほとんど差が認められなかつた。毒含量は55.1±7.9fmole/cell (mean±SD, n=8)と算出され、毒成分組成はC2およびGTX4がそれぞれ67.7±1.8mol%および26.6±1.6mol%と大半を占め、その他に微量のC1, GTX1, GTX3, neoSTXが検出された。

マガキおよび飼育海水中の毒成分

1日おきに採取したマガキ3個体の毒成分の推移（3個体の平均）をFig.1に示す。経時的変化を対比するため、試験全期間にわたりマガキを飼育した3つの区の飼育海水から回収された毒成分を同様にFig.1に示す。

マガキの毒成分組成には、期間中大きな変化は認められず、GTX1+4が4~5割、C1+2が3~4割、GTX2+3が1~2割をそれぞれ占め、その他に微量のneoSTXおよびSTXが検出された。給餌した*A.tamarensense*の組成と比べ、GTX1+4およびGTX2+3が増加し、一方でC1+2の

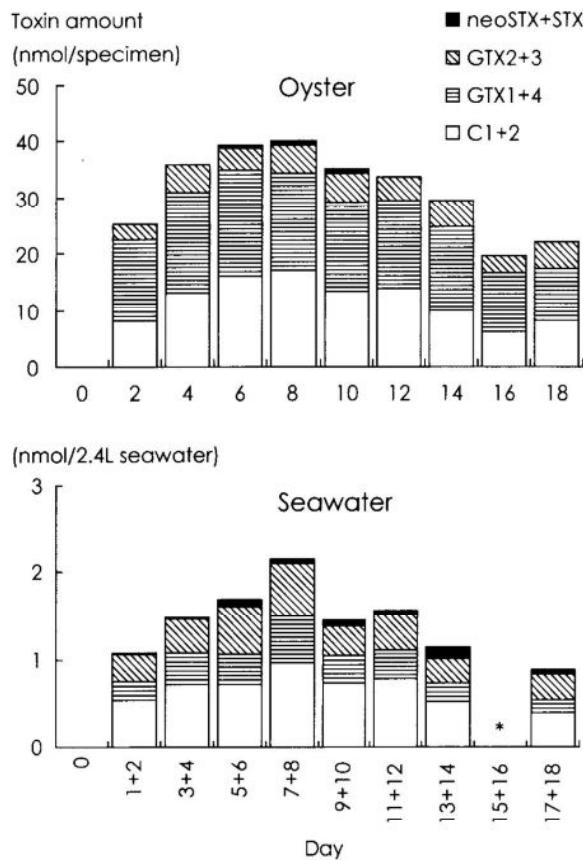


Fig.1. Change in PSP toxins recovered from rearing water. Toxin composition is shown in each bar. The change of PSP toxins accumulated in the oysters are also shown for comparison in upper.
* A seawater sample was lost by accident.

減少が認められているが、これはこれまでに二枚貝類の毒化に関して報告されている事例^{10, 11)}と同様の傾向であった。

飼育海水中の毒成分組成にも試験期間中大きな変化は認められず、C1+2が4～5割、GTX2+3が2～3割、GTX1+4が1～2割をそれぞれ占め、他に少量のneoSTX+STXが検出された。マガキの組成に比べ、GTX2+3の増加とGTX1+4の減少が認められることから、飼育中あるいは試料処理中の還元反応の進行がうかがわれる。

飼育海水から回収される毒量は、給餌期間中は増加傾向を示し、また無給餌移行後は減少に転ずるもの、継続して毒成分が検出され、マガキから無給餌移行後も毒成分が排出されていることが明らかとなった。

A.tamarensense から供給された毒量、マガキに蓄積された毒量および飼育海水中に放出された毒量の様相

Fig.2にマガキの毒量と飼育海水から回収された毒量(以下、回収毒量)の積算をA.tamarensenseの給餌により

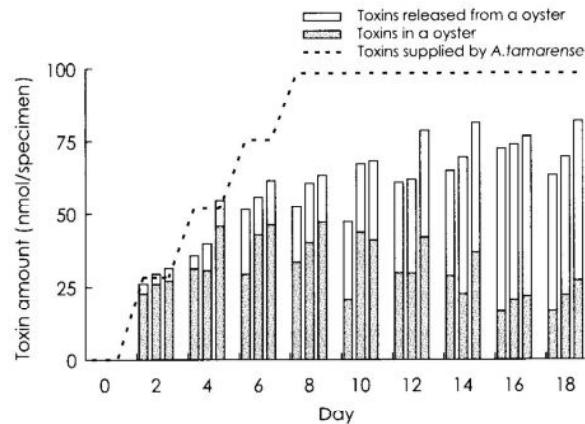


Fig.2. Change in amounts of PSP toxins accumulated in oyster specimens reared separately in individual tanks. The integrated amounts of toxins released from a single specimen and those supplied to each specimen by feeding *Alexandrium tamarense* cells are also shown.

供給された毒量(以下、供給毒量)の積算値と併せて示す。海水中の毒量は、活性炭カラムで回収された毒量を、Sekiguchi⁶⁾が先に求めた回収率(93.3%)で補正した値で示してある。

マガキの毒量はA.tamarensenseの給餌に伴い4日目までは増加したもの、6日目以降は顕著な増加は認められず、給餌最終日の8日目では供給毒量の33～47%がマガキに蓄積されているに過ぎなかった。無給餌移行後は徐々に減少したが、その速さは緩慢であった。

飼育海水から回収される毒量の積算は、飼育日数の増加とともに増加する傾向を示した。

回収毒量と供給毒量との関係では、給餌2日目では両者は比較的よく合致しているが、その後給餌日数を重ねるにつれ、両者の差は大きくなり、8日目では前者は後者の53～64%にとどまっている。その後無給餌に移行し日数が経過すると、少しずつではあるが両者の差は縮まり、14日目で65～82%、そして18日目では64～83%となっている。

以上、個体別に飼育したマガキに、既知量のA.tamarensenseを給餌し、マガキに蓄積される毒量および飼育海水中に排出される毒量の推移を詳細に追跡した結果について述べたが、本種ではホタテガイについて同様に試験した場合⁶⁾とは異なるいくつかの特徴が認められた。

一つは、給餌期間中のマガキの毒量が給餌日数を重ねても増加しないことである。ホタテガイの場合では、給餌期間中、ホタテガイの毒量は徐々に増加する傾向が認められたが、マガキでは6日目以降増加していない。しかしながら、このことは、これまでのフィールドにおける

る結果、すなわちマガキはホタテガイに比べ毒化のレベルが低い、という事実を支持しているように思われる。

二つめは、回収毒量（マガキの毒量と飼育海水の毒量との合計）の推移である。給餌期間中の回収毒量は、ホタテガイの場合ではほぼ供給毒量に対応した推移を示していたのに対し、本試験では回収毒量は供給毒量よりも多く推移し、給餌最終日の8日目では供給毒量の6割程度にとどまっている。

一方無給餌移行後の回収毒量は、ホタテガイでは一旦減少-そしてその後再び増加、といったパターンが認められたのに対し、本試験では減少傾向は認められず、むしろ緩やかな増加傾向が認められている。

これらの結果は、マガキによる毒の蓄積および減毒過程はホタテガイのそれとは異なる、ということを示唆しているように思われた。

引用文献

- 1) Y. Oshima, T. Yasumoto, M. Kodama, T. Ogata, Y. Fukuyo and F. Matsuura: Features of paralytic shellfish poison occurring in Tohoku district. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 525-530 (1982).
- 2) T. Ikeda, S. Matsuno, S. Sato, T. Ogata, M. Kodama, Y. Fukuyo and H. Takayama : First report on paralytic shellfish poisoning caused by *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae) in Japan, in "Red Tides", ed. by T. Okaichi, D.M. Anderson and T. Nemoto. Elsevier, New York, 1989, pp.411-414.
- 3) 水田満里・山田圭一・高田久美代・島岡真佐子・高山晴義・大内晟:カキ、ムラサキイガイ及びホタテガイにおける麻痺性貝毒の蓄積と低下の相違.食衛誌, **40**, 19-22 (1999).
- 4) 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:マガキ、ホタテガイおよびムラサキイガイにおける麻痺性貝毒の蓄積と減毒の差異. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **70**, 598-606 (2004).
- 5) 加賀新之助・関口勝司・佐藤繁・児玉正昭: 大船渡湾における二枚貝及びマボヤの麻ひ性貝毒による毒化状況. 岩手水技セ研報, **3**, 63-70 (2003) .
- 6) K. Sekiguchi, S. Sato, T. Ogata, S. Kaga and M. Kodama: Accumulation and depuration kinetics of paralytic shellfish toxins in the scallop *Patinopecten yessoensis* fed *Alexandrium tamarense*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **220**, 213-218 (2001).
- 7) T. Ogata, T. Ishimaru and M. Kodama: Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxicity change in *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.*, **95**, 217-220 (1987).
- 8) Y. Oshima: 5. Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons, in "Manual on Harmful Marine Microalgae" (ed. by G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson and A. D. Cembella), IOC Manuals and Guides No.33, UNESCO, Paris, 1995, pp81-94.
- 9) T. Hollingworth, M. M. Wekell: in "Official methods of analysis, 15th edition" (ed. by K. Hellrich), Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, 1990, pp.881-882.
- 10) Y. Oshima, K. Sugino, H. Itakura, M. Hirota and T. Yasumoto : Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. in "Toxic Marine Phytoplankton" (ed. by E. Graneli, B. Sundstrom, L. Edler, and D. M. Anderson), Elsevier, New York, 1990, pp.391-396.
- 11) Y. Oshima : Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. in "Harmful Marine Algal Blooms" (ed. by P. Lassus, G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien, C. Marcaillou-Le Baut), Lavoisier, Paris, 1995, pp.475-480.