

研究分野	2 食の安全・安心の確保に関する技術開発	部 名	漁場保全部
研究課題名	(1) 二枚貝等の貝毒に関する研究 (2) 麻痺性貝毒で毒化した介類の低毒化技術の開発		
予算区分	県単 (水産物品質管理推進事業)		
試験研究実施年度・研究期間	令和元年度～令和5年度		
担当	(主) 加賀 新之助 (副) 渡邊 志穂、瀬川 叡、多田 裕美子		
協力・分担関係	北里大学海洋生命科学部		

<目的>

東日本大震災後、貝毒原因プランクトンの大量発生によりホタテガイ等の毒化が大きな問題となっている。そこで、北里大学との共同により、短期間の給餌飼育による麻痺性貝毒の低毒化技術を開発することを目的とする。

なお、マガキ及びホタテガイの麻痺性貝毒減衰機構の解明と減衰効果のある飼料の開発は北里大学が担当し、当所は給餌飼育によるマガキ及びホタテガイの低毒化試験方法の確立と麻痺性貝毒を効果的に低毒化するための給餌飼育技術開発を担当する。

<試験研究方法>

本研究は、ホタテガイの毒蓄積における個体差およびホタテガイが飼育海水中に放出する毒量を考慮に入れた Sekiguchi et al. (2001)の方法に従い、*A. catenella* (Group I)の摂餌による個体別のホタテガイの麻痺性貝毒蓄積を行った後にフェザーミール給餌 (以下、「FM 給餌」という) による低毒化現象を確認した。

1 材料

(1) 給餌用 *A. catenella* (Group I)

令和2年10月7日に北里大学小檜山准教授から供与された大船渡湾産の *A. catenella* (Group I) 株は、F/2 培地 3 リットル中、15°C、20 $\mu\text{mol photon}/\text{m}^2/\text{s}$ (12:12h LDcycle)の条件下で培養し、対数増殖期にある細胞密度 2,500-3,000 cells/ml 程度に増殖したものを試験に用いた。

(2) ホタテガイ

本県沿岸では、令和2年に麻痺性貝毒による出荷自主規制が広域化した。そのため、毒化していない海域からホタテガイの入手を試みた。すなわち、ホタテガイ生産海域区分の北部海域からホタテガイを入手した。野田村漁業協同組合の地種 (1次分散したベビーホタテ) 110 個体を野田村漁協から県北広域振興局水産部を介して令和2年10月30日に譲り受けた。同ホタテガイは、水産技術センターまでクーラーボックス内のスポンジに海水を浸漬し、下水をして速やかに持ち帰り、表面の付着物を除去した後、1 μm カートリッジフィルターでろ過した海水を通水し水槽内に収容し、通気しながら、16.8-18.4°Cの条件下で5日間馴致させた (写真1)。その後、試験開始直前に無作為に12個体を抽出し (可食部湿重量, mean \pm SD= 0.79 \pm 0.18g, n=12)、試験に供した。なお、ベビーホタテは、令和2年10月30日に野田村漁業協同組合のホタテガイ生産者が朝採取し、漁港内の蓄養水槽に流水かけ流しで飼育したものである。

(3) フェザーミール

令和2年9月29日に北里大学佐藤繁教授から供与されたフェザーミール溶液 (0.14g/40 ml) を用いて試験を実施した。

2 方法

ホタテガイ9個体は、写真2に示すとおり1個体ずつ500 ml 容器に収容した。これらの検体は、ろ過海水 300 ml を満たした500 ml 容の水槽9個に個体別に浸漬し、通気しながら14.6-15.7°C、20 $\mu\text{mol photon}/\text{m}^2/\text{s}$ (12:12h LDcycle)の条件下で飼育した。飼育海水は、全て1 μm のカートリッジフィルター

でろ過したものを用い、1日1回新たに調整したものと交換した。



写真1 馴致期間中の飼育水槽



写真2 ホタテガイ低毒化試験

(1) 毒化試験区

培養した *A. catenella* (Group I) 細胞は、あらかじめ飼育条件に馴致しておいたろ過海水 300 ml を含む水槽に細胞密度が 300-400 cells/ml になるように加えた。次にホタテガイを同水槽に移し、上記の条件下で毒化試験区 (No. 1-3) として飼育した。24 時間後、ホタテガイを同様に調整した *A. catenella* (Group I) 細胞を含むろ過海水 300 ml 入りの水槽に移して飼育し、この操作を繰り返し、4 日間給餌しながら飼育した。給餌期間中は、*A. catenella* (Group I) 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て、顕微鏡観察により *A. catenella* (Group I) 細胞を計数し、摂餌された細胞数を算出した。給餌 24 時間後の海水 100 ml は、各水槽から毎日採取し、酢酸を添加して pH を 4 付近に調整した後、低温保存し、飼育海水中の毒量分析用の試料とした。飼育中のホタテガイ検体は、4 日目に 3 個体採取し、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。

(2) 無給餌区および FM 給餌区

試験に用いたホタテガイ検体は、*A. catenella* (Group I) を含まない海水を用いて無給餌区 (No. 4-6)、フェザーミール給餌区 (No. 7-9) に分けて 1 個体ずつそれぞれの区で合計 3 個体を 500 ml 容器に収容し飼育した。フェザーミール給餌区は、フェザーミール溶液 (0.14g/40 ml) 1 ml をろ過海水 300 ml を含む水槽に 7 日目まで毎日加えて試験した。無給餌区およびフェザーミール区では、24 時間後の海水 100 ml を各水槽から毎日採取し、酢酸を添加して pH を 4 付近に調整した後、低温保存し、飼育海水中の毒量分析用の試料とした。飼育中のホタテガイ検体は、それぞれの試験区から 8 日目に 3 個体採取し、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。

(3) ホタテガイおよび給餌した *A. catenella* (Group I) の麻痺性貝毒成分の分析

ホタテガイ検体の麻痺性貝毒成分の分析は、個体別に殻長、殻高、全重量、可食部湿重量 (中腸線を含む) を測定し、可食部を「食品衛生検査指針 理化学編 2005」(厚生労働省監修、日本食品衛生協会発行) の方法に準拠して毒物質を抽出し、Oshima (1995) の報告に従い、機器分析法 (HPLC-蛍光法) によって実施した。得られたむき身 1g 当たりの nanomole 数 (nmol/g) の結果は、MU/g の値に比毒性換算した。

給餌した *A. catenella* (Group I) 細胞は、給餌ごとにその一部を Oshima (1995) の方法により毒物質を抽出し、その毒成分を HPLC-蛍光法で分析した。

(4) 飼育海水中の麻痺性貝毒成分の分析

採取した飼育海水は、各試験区において連続する飼育日数すべてを合一し、氷冷下で 5 分間超音波処理して残存する *A. catenella* (Group I) 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 0.1N 水酸化ナトリウムを滴下して pH5.5 に調整後、クロマトグラフ活性炭 (Wako) を充填したガラスカラム (2×5 cm) に添加した。その後、活性炭に吸着した毒成分は、200 ml の純粋で洗浄

し、1%酢酸/25%エタノール200 mlにて溶出させ、溶出画分を減圧濃縮(40°C)後、凍結乾燥した。得られた固形物は、1 mlの0.03M酢酸に溶解し、限外ろ過(Milipore, Ultrafree-MC)した後、ろ液をOshima(1995)の方法に従い、HPLC蛍光法により分析した。なお、Sekiguchi et al. (2001)は、海水に溶出した麻痺性貝毒成分の活性炭カラムによる回収試験を行い、93.3±10.4%の毒が回収できるとしている。そこで、本研究において得られた海水中の毒量は、この回収率(93.3%)で補正した値を採用した。

<結果の概要・要約>

1 *A. catenella* (Group I)のホタテガイへの給餌試験

ホタテガイの飼育試験は、ホタテガイ9検体を9個の水槽中で個別に飼育し、それぞれの検体に同量の*A. catenella* (Group I)培養細胞を給餌して行った。飼育期間中へい死するホタテガイ検体は、認められなかった。

2 *A. catenella* (Group I)培養細胞の毒含量および毒成分組成

給餌ごとに採取した4検体の*A. catenella* (Group I)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った。毒含量は398.1±71.0 fmole/cell (mean±SD, n=4)と算出され、毒成分組成はGTX4およびC2がそれぞれ70.5±3.8 mol%および22.8±2.8 mol%と大半を占め、その他に微量のGTX3とneoSTXが検出された。

3 *A. catenella* (Group I)の給餌毒量に対するホタテガイ毒量と飼育海水総毒量の積算値の毒量収支

図1に*A. catenella* (Group I)の給餌毒量に対するホタテガイ毒量と飼育海水総毒量の積算値の毒量収支を示す。全体的に見ると、3連の実験全てで供給した毒量を下回る毒がホタテガイおよびその飼育海水から回収された。毒化試験区では、給餌量の43-56%の毒がホタテガイに、24-30%の毒が飼育海水中に検出された。給餌量の13-31%の毒は回収できず、実験系から消失した。無給餌区およびFM給餌区では、それぞれ供給した毒量の17-19%および14-23%の毒量がホタテガイに、18-24%および23-29%の毒が飼育海水中に検出された。実験系から消失した毒量は、毒化試験区よりも増加し、それぞれ供給した毒量の59-62%および52-57%が消失した。

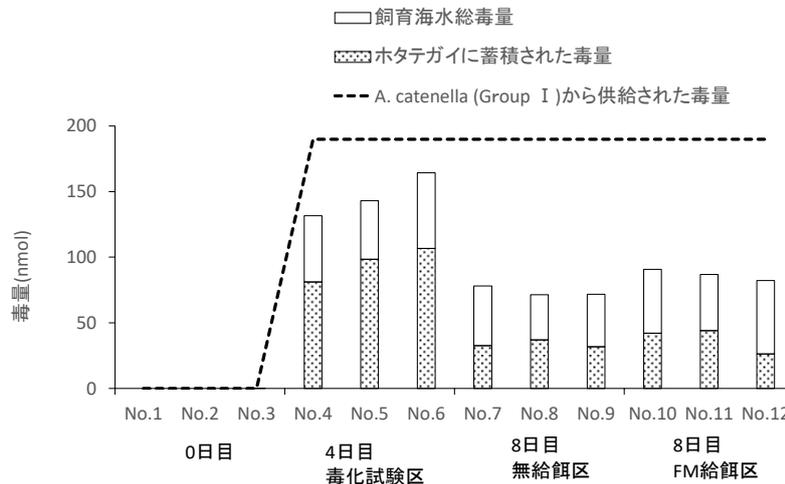


図1 *A. catenella* (Group I)の給餌毒量に対するホタテガイ毒量と飼育海水総毒量の積算値の毒量収支

無給餌区およびFM給餌区のホタテガイは、毒化試験区のホタテガイの毒量に比べ有意に毒量が減少した(Sheffe's F test, $p < 0.01$) (図2)。一方、無給餌区とFM給餌区のホタテガイ毒量には、有意差が認められなかった。すなわち、無給餌区とFM給餌区では、毒量の減少に差は認められなかった。そこで、ホタテガイの毒成分組成割合について検討した。

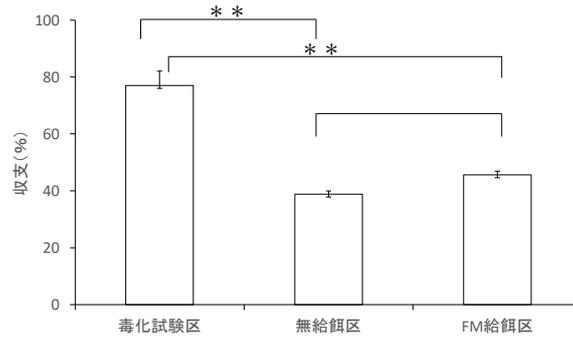


図2 *A. catenella* (Group I)の給餌毒量に対するホタテガイ毒量と飼育海水総毒量の積算値の毒量収支割合
** $p < 0.01$, barは標準偏差

図3に各試験区の麻痺性貝毒成分について、11 α -sulfo型と11 β -sulfo型、および11位に硫酸エステル基を持たない11位還元型に分けて示す。FM給餌区では、11位還元型の毒量が無給餌区に比べ有意に増加した(Sheffe's F test, $p < 0.01$)。また、毒化試験区のホタテガイ毒量に対して、無給餌区およびFM給餌区ともに11 β -sulfo型は有意に減少(Sheffe's F test, $p < 0.01$)、11 α -sulfo型は有意に増加した(Sheffe's F test, 無給餌区 $p < 0.01$, FM給餌区 $p < 0.05$)。つまり、毒化試験区に対しては、FM給餌区は、無給餌区に比べ11 α -sulfo型が除去されていることを示す。以上の結果をまとめると、毒化試験区に対しては、FM給餌区は無給餌区に比べ毒量の減少に差異は認められなかったものの、毒成分組成において11 α -sulfo型が除去されつつ、11位還元型が有意に増加した。

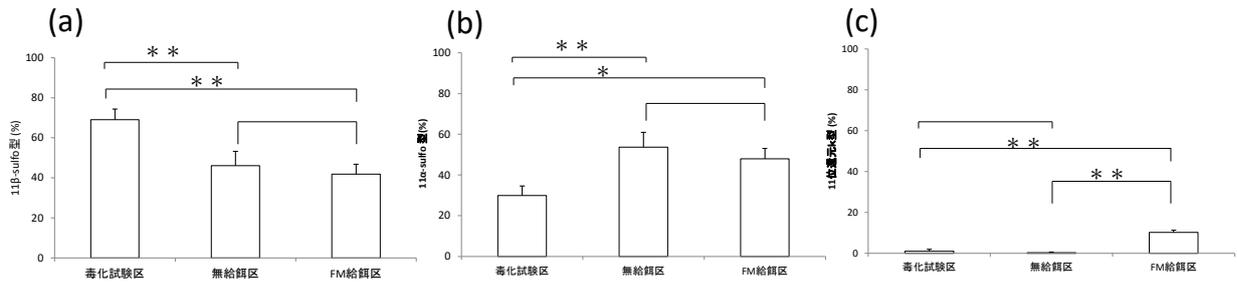


図3 ホタテガイにおける各試験区の麻痺性貝毒成分の毒組成割合
(a) 11 β -sulfo型、(b) 11 α -sulfo型、(c) 11位還元型
** $p < 0.01$
* $p < 0.05$
barは標準偏差

Sato et al. (2000) は、GTX2, 3あるいはGTX1, 4など11位に硫酸エステルを持つ毒成分がグルタチオンやメルカプトエタノールのようなチオール化合物の作用で還元分解され、STXあるいはneoSTXに変換される過程で、GTXの11位の炭素がチオール化合物の硫黄と共有結合した安定な反応中間体を生成することを報告した(図4)。このような反応中間体は、HPLCなどの通常の毒分析法では検出することができず、

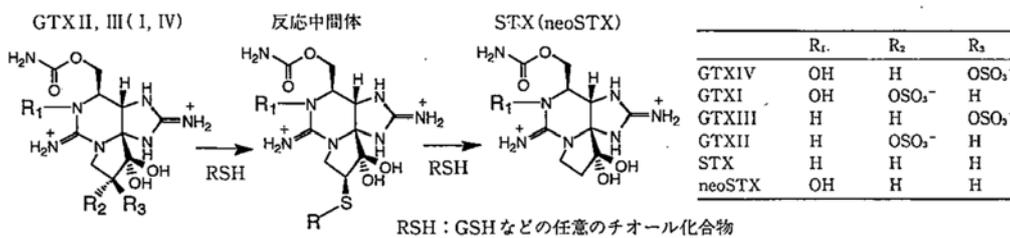


図4 チオール化合物によるGTX群からSTX群の毒への変換における反応中間体の存在

中間体に変化した毒は反応系から消失したように見える。また、中間体の生成は、生理的条件下で起こることから、有毒渦鞭毛藻の捕食により貝に移行した麻痺性貝毒成分は、貝の生体成分であるチオールと結合して体内に存在し、代謝を受けることが推定される。本研究において観察された毒が反応系から消失した現象は、このようなチオール化合物による毒成分の変換が一部関与したものと推察した。

「佐藤繁. 麻痺性貝毒成分の除去. 特開 2009-171954, 2009.」では、FM 給餌により毒化ホタテガイの 11 α -sulfo 型の麻痺性貝毒成分を顕著に除去できることが確認されている。FM はホタテガイの体内で消化され、豊富に含まれるシステインが遊離して 11 α -sulfo 型の麻痺性貝毒成分を分解するとしている。また、システインなど、SH 基の近傍にアミノ基を有するチオール化合物も *in vitro* で 11 α -sulfo 型の毒成分と反応するが、生じた結合体は著しく不安定で自発的に分解される¹⁾としている。本研究においては、毒化試験区に対して FM 給餌区は無給餌区に比べ 11 α -sulfo 型が除去されていることから上記の反応が生じたものと推察した。また、毒化試験区に対して FM 給餌区は無給餌区に比べ 11 位還元型が有意に増加したことから、11 位に硫酸エステルを持つ毒成分がシステインのようなチオール化合物の作用で還元分解され、STX あるいは neoSTX に変換されたものと推察した。

以上のことから、毒化試験区に対しては、FM 給餌区は無給餌区に比べ、麻痺性貝毒成分除去効果があったものと考えられた。

<今後の問題点>

- 1 FM 飼料に改良を加えて、無給餌区に比べ有意に毒量が減少することを確認する必要がある。
- 2 今回、マガキについて同様の試験を行ったが、マガキの毒化レベルにおいて個体差が大きく、給餌方法等を検討する必要がある。

<次年度の具体的計画>

- 1 改良を加えた FM 飼料により、今年度と同じ試験を実施する。

<結果の発表・活用状況等>

なし