

九州沿岸海域における麻痺性貝毒に関する研究

高谷 智裕

Studies on Paralytic Shellfish Poison in Coastal Waters of Kyushu

Tomohiro TAKATANI

Paralytic shellfish poison (PSP) infestation to bivalves recently tends to spread to all over the world. In Japan, *Alexandrium catenella* and *A. tamarense* have been known to be main causative dinoflagellates for PSP-infestation to the bivalves but now a days, instead, *Gymnodinium catenatum* is going to be a new face as the causative agent for PSP in Kyushu district. This paper deals with the recent PSP-infestation and its causative organism (*G. catenatum*) in the coasts of Kyushu. In this connection, toxin components of *G. catenatum*, and toxin accumulation and depuration by shellfish have also been described as follows.

1) Paralytic shellfish poison in the coasts of Kyushu

30 species of shellfish were collected at Fukue Island, Nagasaki Prefecture from January 1995 to October 1996, and screened for PSP. Six species such as, *Pecten albicans* (scallop), *Chlamys farreri* (scallop), *Septifer virgatus* (mussel), *Pinna bicolor* (pen shell), *Arca boucardi* (ark shell) and *Pseudochama retroversa* (jewel boxes) were found to be toxic. In scallop, the digestive gland was determined as the most toxic part, with the highest score of 133.8MU/g in *P. albicans*. The toxin profile of bivalves featured the dominant presence of C-toxins (Protogonyautoxins; PXs) and gonyautoxin (GTX) 5, 6 with low toxic components. In this connection, the mossworms adherent to shells of *C. farreri* were screened and found to be contained a low level of PSP, with major components of decarbamoyl GTX2 (dcGTX2) and GTX2, along with dcGTX3 and GTX3 as minor, which were different from those of *C. farreri*.

In 1996, three species of bivalves (*Chlamys nobilis*, *Mytilus edulis*, *Tapes japonica*) were toxified in Kamae, Oita Prefecture due to *G. catenatum*. The maximal toxicity scores of the scallop, mussel and short-necked clam were 81MU/g, 253MU/g and 28MU/g, respectively. The toxin components of different groups of bivalves closely resembled, consisting of C1 (PX1), C2 (PX2) and GTX6 as the major component. In this connection, the toxin profiles of *G. catenatum* were examined, and found to be similar to those of bivalves. These results indicate that *G. catenatum* might be a causative dinoflagellate for PSP infested bivalves in Kamae.

In January and July 1998, the wild oyster *Crassostrea gigas* was toxified with toxic dinoflagellate, *G. catenatum* at Miyanokawachi Bay, Amakusa, Kumamoto. The maximal toxicity score of the oyster was 438MU/g in January and 60.8MU/g in July. Toxin compositions of the oyster and dinoflagellate resembled each other, consisting of C1 (PX1) and C2 (PX2) as the major toxins, and GTX5, GTX6, dcGTX2, dcGTX3 and dcSTX as the minor. From these results, it is strongly postulated that toxic oysters from Kumamoto had been toxified by *G. catenatum* through the food chain.

2) Mass outbreak of paralytic shellfish poisoning at Tamano-ura, Nagasaki

A mass outbreak of food poisoning incident due to ingestion of wild oyster occurred in March 1997 at Tamanoura, Fukue Island, Nagasaki. The causative agent was determined to be PSP from HPLC analysis and mouse assay for PSP. The maximal toxicity score of the oyster was 135MU/g, belonging the main toxic components of PSP (C1,2 and GTX5,6) in common, which were closely similar to those of Oita and Kumamoto specimens. However, the popularly known causative toxic dinoflagellates were not found in the plankton samples from the infested seawater.

3) Toxin productivity of *Gymnodinium catenatum*

The effects of temperature and Light-Dark (LD) cycle on PSP production by an axenic culture of *G. catenatum* were examined. The culture system was carried out at four different temperatures (12, 15, 18 and 21 °C), or at four different LD cycles (8-16, 10-14, 12-12 and 14-10 h). Cells were harvested at late logarithmic phase, and submitted to the toxin analysis with HPLC. The highest toxin production in the cell was observed at lower temperature (12 > 15 > 18 > 21 °C), with toxin contents from 77.6 to 282.8 fmol/cell. At different LD cycles, growth and toxin production were almost similar, ranging the toxin contents from 74.4 to 104.4 fmol/cell.

4) Accumulation and depuration of PSP toxin by scallop cultured in the sea water

Non-toxic scallop *Chlamys nobilis* was cultured for about one month at the Miyanokawachi Bay, Kumamoto Pref. in January 1999. The scallop specimens were hanged at three different depths (3, 6 and 9 m) of water. Twenty five specimens were collected from each depth at a time in a week, and examined. Most of the toxin existed in the digestive gland (ca. 95%) and the remaining in the gonad (ca. 5%). Toxicity of scallop from each depth had correlation with the cell density of *G. catenatum*. Their toxin composition consisted mainly of low toxic components of C1,2 and GTX5,6, and resembled to that of *G. catenatum*.

5) Toxin accumulation and depuration by feeding experiment

The non-toxic short-necked clams were fed with dinoflagellates *G. catenatum* and *A. catenella* to investigate their (short-necked clam) accumulation and depuration ability to PSP. The clam specimens were fed on each reared dinoflagellate for 168 hrs. Most of the dinoflagellates were filtered by clams within 12 hrs. The maximum accumulation ratios of PSP in the short-necked clam were 26% for *A. catenella* and 16% for *G. catenatum*. The toxin accumulated to the short-necked clam reached to maximum value (184.8-210.3 nmol/10 clams) after 12 hours. Thereafter, it decreased to 15-30% and < 3% in 72 and 168 hrs, respectively. On the other hand, toxin in the seawater from the clams rearing aquarium increased gradually after filter-feeding of dinoflagellates, which reached to 70-90% of total accumulated toxin in 168 hrs. Toxin components in the short-necked clam were almost similar to those of each dinoflagellate. During rearing period of clams, they quickly excreted the low toxic components (C1,2 and GTX5,6), while the high toxic components (STXs and decarbamoyl derivatives) were excreted slowly. Toxin accumulation efficiency of the short-necked clams was not remarkable. From the results it can be suggested that after accumulation of the dinoflagellate toxin by non-toxic clams, they quickly excrete toxins to the seawater through their gills.

Key Words: 麻痺性貝毒 (PSP) Paralytic Shellfish Poison, PSP, 九州 Kyushu, 渦鞭毛藻 dinoflagellate

序 論

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poison, PSP) は、主として *Alexandrium* 属などの有毒渦鞭毛藻が産生する神経毒で、その毒力はフグ毒 (Tetrodotoxin, TTX) に匹敵し、青酸ソーダの1000倍という猛毒である。PSPは、昔から北米やカナダの太平洋および大西洋沿岸ではよく知られており、これまでに多くの犠牲者を出している。

Halstead (1965) は、1689～1965年の間に世界各地で900名以上の麻痺性貝中毒が発生し、うち200名以上が死亡したとしている¹⁾。

日本におけるPSPの発生は、1975年1月に三重県尾鷲湾で *Gonyaulax* (現在 *Alexandrium*) *catenella* による赤潮が見られ、アサリやムラサキガイなどの二枚貝の毒化が初めて確認された^{2,3)}。その後、北海道の噴火湾や岩手の大船渡湾でのホタテガイの毒化をはじめ、広島湾や仙崎湾のマガキ、

大分や宮崎県北浦のヒオウギガイなど全国に広がり、二枚貝の出荷規制などの漁業被害を出している。

PSP中毒は、二枚貝等の喫食後30分程度で口唇や舌、顔面にしびれや、灼くような感じを生じ、徐々にこの症状が首や腕、足と四肢の末端まで広がるとともに麻痺に変わり、随意運動が困難となる。重篤な場合は、言語障害や流涎、頭痛、口渴、吐気、嘔吐などの症状が現れ、麻痺が進み、呼吸困難をきたして死亡する。

日本におけるPSP中毒は、不確定なものを含めて、これまで1948年に愛知県豊橋でアサリの喫食により12名が中毒(死者1名)したのをはじめ、これまでに北海道、青森、岩手、鹿児島など11件(死者4名)起こっている (Table 1)。九州では、1987年6月、鹿児島県山川湾で、アサリによる中毒が起こっている⁴⁾。

日本でPSPにより毒化する生物は、ホタテガイ *Patinopecten yessoensis*, アカザラ *Chlamys nipponensis*,

Table 1. Incidences of paralytic shellfish poisoning in Japan

Date	Causative shellfish	Location of collection	Number of Patients (Deaths)
1948. 7	short-necked clam	Toyohashi, Aichi	12 (1)
1961. 5	scallop "akazara"	Ofunato, Iwate	20 (1)
1962. 2	Oyster	Miyazu, Kyoto	42 (0)
1979. 1	Oyster	Senzaki, Yamaguchi	16 (0)
1979. 4	Mussle	Asahikawa, Hokkaido	3 (1)
1982. 5	Ascidian	Ofunato, Iwate	2 (0)
1987. 6	short-necked clam	Yamagawa, Kagoshima	2 (0)
1989. 4	Mussle	Ofunato, Iwate	1 (0)
1989. 4	scallop "hotate"	Ofunato, Iwate	5 (0)
1989. 7	Mussle	Higashidori, Aomori	6 (1)
1997. 3	Oyster	Tamanoura, Nagasaki	26 (0)

マガキ *Crassostrea gigas*, ムラサキガイ *Mytilus edulis*, アサリ *Tapes japonica*, ヒオウギガイ *Chlamys nobilis*などの二枚貝がほとんどであるが、東北地方の三陸沿岸では、原索動物のマボヤ *Holocynthia roretzi*⁵⁾、沖縄では肉食性の巻貝であるギンタカハマガイ *Tectus pyramis*が毒化しているという報告がある⁶⁾。

これらの毒化原因プランクトンとして、*Alexandrium tamarense*, *A. catenella*, *Gymnodinium catenatum*の3種が知られている。また近年、沖縄や瀬戸内海⁷⁾で毒化した原因がタイで報告されていた *A. tamiyavanitii* (旧分類 *A. cohorticula*) によるものと考えられている⁸⁾。

*Gymnodinium catenatum*は、連鎖群体を形成する無殻の渦鞭毛藻の一種で、*Alexandrium*属の有毒渦鞭毛藻ほど発生域は広くないが、世界各地でその発生が確認されている。本種はカリフォルニア湾でその発生が初めて報告された⁹⁾。しかし、当時はまだ *G. catenatum*がPSPを産生することは知られておらず、スペイン北西部のガリシアで初めて *G. catenatum*により二枚貝が毒化したことが確認され、有毒プランクトンとして認識された^{10,11)}。以来、メキシコ¹²⁾、ポルトガル¹³⁾、タスマニア^{14,15)}等で *G. catenatum*の発生が確認されている。日本では、1986年山口県仙崎湾において本種によりカキなどの二枚貝を毒化させたのが最初であり、これまで他の海域では本種による貝の毒化は報告されていない¹⁶⁾。

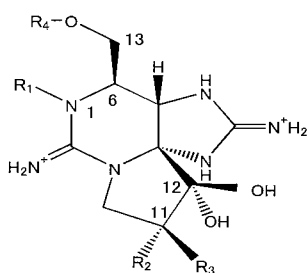
PSP産生プランクトンには、他にアメリカの湖で見られた *Aphanizomenon fros-aquae*¹⁷⁻¹⁹⁾や *Lyngbya wollei*²⁰⁾、オーストラリアで家畜に被害を与えた *Anabaena circinalis*²¹⁾、ブラジル産の *Cylindrospermopsis raciborskii*²²⁾などの淡水産ラン藻も知られている。

PSPをもつ生物はプランクトンや貝類だけでなく、南西諸島をはじめとする熱帯・亜熱帯地域に生息するオウギガニ科のウモレオウギガニ *Zosimus aeneus*、スベスベマンジュウガニ *Atergatis floridus*、ツブヒラアシオウギガニ *Platypodia granulosa*などもSTX群を主とするPSPを持つことが知られている^{23,24)}。これらのカニはプランクトンフィーダーではな

く、その毒化機構については不明である。また、1994年にスペインのVigoから輸入されたセイヨウトコブシ *Haliotis tuberculata*がPSPで毒化していることがわかった。通常、二枚貝が毒化する場合、中腸腺に局在的に毒を蓄積するが、この貝は内臓よりも筋肉に毒を高濃度に蓄積していた。また、その毒成分はデカルバモイルサキシトキシン (dcSTX) を主成分とするものであった。セイヨウトコブシはプランクトンフィーダーではなく、藻類を餌としていることから、その毒化機構が注目された。殻に付着していた外肛動物であるコケムシからPSPが検出されたことから、海藻に付着するコケムシを混食して毒化したのではないかと疑われたが、毒化機構の解明にはいたっていない²⁵⁻²⁹⁾。コケムシ類は大型の海藻などに付着共生し、群体をなすものである。北海道噴火湾のPSP汚染海域の促成コンブに付着するコケムシからもPSPが検出されている。なお、これまで日本産のアワビ、トコブシ類からはPSP毒化は認められていない³⁰⁾。

PSPの毒成分は当初、サキシトキシン (Saxitoxin, STX) のみであると考えられていたが、後にSTXと構造がよく似たゴニオトキシン (Gonyautoxin, GTX) 群が見つけれ、現在までに20種以上の同族体が確認されている。これらの毒成分は構造によりその毒性は異なり、高毒性成分であるSTXやneoSTX, GTX1-4などのカルバメート型、それらの側鎖のカルバモイル基 (CONH₂) の代わりに水素 (H) がついた脱カルバモイル型 (Decarbamoyl, dc), 低毒性成分であるプロトゴニオトキシン (Protogonyautoxin, PX, C-toxin) 1-4やGTX5,6などのカルバモイル基がスルホン化されたN-スルフォカルバモイル型に大きく分けられる。また、近年の分析技術の進歩によりデオキシデカルバモイル体³¹⁾やハイドロキシ体³²⁾なども確認されている。現在のところ日本産の二枚貝からは主としてFig. 1に示す20成分が確認されており、ほとんどの場合、数成分の混合物として中腸腺部に集中して存在し、原因プランクトンの種類や生息域などによって毒成分が異なることが多い。二枚貝類からは主にGTX1-4, GTX5,6, C (PX) 1,2, dcGTX2,3, STX, neoSTX, dcSTXが検出される。原因プランクトンの毒成分と毒化した二枚貝の毒成分が異なることがあるが、これはプランクトンが産生する毒がC1,2 (PX1,2) やGTX5,6といったN-スルフォカルバモイル型の毒成分であるのに対し、二枚貝に取り込まれてから体内でカルバモイル型のGTX1-4やSTX, neoSTX, 脱カルバモイル型のdcGTX2,3などに毒の一部が生体内変換していると考えられる³³⁾。また、プランクトンではC2 (PX2) やGTX3,4などの型の異性体を主体としているが、二枚貝に入ると化学的に安定な型へと変換が進む。これらの変換にはプランクトン、二枚貝のそれぞれが持つ酵素が関わっていると考えられている。

二枚貝の毒化において、毒の保持期間は貝の種類や毒化のレベルにより大きく異なり、ホタテガイやアカザガイなどのイタヤガイ科の貝類は比較的強い毒力を有し、しかも毒を長く保持するといわれ、大きく毒化したときなど有毒プランクトンが消失しても1年近く毒を保有し続けることもある。反対にアサリ、カキ、ムラサキガイなどは毒化の程度にも



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
			- CONH ₂	- CONHSO ₃ ⁻	H	- CONHOH
H	H	H	STX (2,438)	GTX5 (160)	dcSTX (1,274)	hySTX (1,740)
OH	H	H	neoSTX (2,295)	GTX6 (180)	dcneoSTX (33)	hyneoSTX (1,490)
OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX1 (2,468)	PX3(C3) (33)	dcGTX1 (1,500)	
H	OSO ₃ ⁻	H	GTX2 (892)	PX1(C1) (15)	dcGTX2 (1,617)	
H	H	OSO ₃ ⁻	GTX3 (1,584)	PX2(C2) (239)	dcGTX3 (1,872)	
OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX4 (1,803)	PX4(C4) (143)	dcGTX4 (1,080)	

PX:protogonyautoxin; GTX:gonyautoxin; STX:saxitoxin

(): specific toxicity (MU/μmol)

Fig. 1 Structures and specific toxicities of PSP.

よるが、1月程度で速やかに毒性が下がる³⁴⁾。二枚貝のほとんどが肝臓に毒を集中して蓄積するが、北米産二枚貝のアラスカバタークラム *Saxidomomus giganteus*などは水管に毒を蓄積することで知られる。

九州沿岸海域では、ヒオウギガイの養殖が盛んで、大分や長崎、熊本などで広く行われている。PSPによる被害も何度か報告されており、1982年に宮崎県北浦でヒオウギガイやアサリが毒化したのをはじめ、1987年には鹿児島県山川湾でアサリが毒化し、それを喫食した2人が中毒した³⁵⁾。1988年には大分県蒲江でヒオウギガイが³⁶⁾、1994年には長崎県対馬の浅茅湾においてヒオウギガイが毒化している。この時の原因プランクトンはいずれも *A. catenella*であった。

しかし、1996年以来、九州沿岸各地で *G. catenatum* による二枚貝の毒化が報告されてきた。 *G. catenatum* による貝の毒化は、これまで山口県仙崎湾での例が報告されているが、九州沿岸海域では初めてであった。これらのことから、本研究では九州沿岸海域におけるPSPを調査するとともに貝と原因プランクトンの毒性と毒成分組成を調べることで、貝とプランクトンの毒を比較し、その関係を明らかにすること、また、 *G. catenatum* の産生する毒の性状を明らかにするとともに、貝体内でのPSP毒の推移についても検討を行い、PSP毒の蓄積・代謝のメカニズムを明らかにすることを目的としている。

第1章 九州各地における麻痺性貝毒 (PSP)

九州沿岸海域におけるPSPの発生は、これまで1982年に宮崎県北浦で *A. catenella* によってヒオウギガイなどの二枚貝

が毒化したのをはじめ、鹿児島県山川、大分県蒲江、長崎県対馬、熊本県天草など各地に発生してきた。九州沿岸での二枚貝の養殖としては、ヒオウギガイを主体としており、それ以外の二枚貝類はあまり盛んに行われていない。

第1節 長崎県沿岸

1. 麻痺性貝毒 (PSP) のスクリーニング

長崎県におけるPSPの発生については、1994年対馬浅茅湾において養殖しているヒオウギガイ *Chlamys nobilis* が *A. catenella* の出現により毒化した報告³⁷⁾があるが、その他の地域に関する知見は少ない。そこで、長崎県下における魚介類(貝類、カニ類)についてサンプリングを行い、毒性試験を行うことによりPSPの発生状況を調べた。

試料および方法

試料

1995年7月15日から1995年11月31日の間にFig. 2に示した長崎県内8ヶ所(野母崎、檜山、福江島富江、福江島戸岐湾、福江島奥浦湾、白浜、大瀬戸、対馬浅茅湾)において採取または福江市内の鮮魚店で購入した貝類24種(二枚貝類10種、巻貝類14種)を試料とした。これらの試料は採取後、氷蔵により研究室まで持ち帰り、その後毒性試験を行うまで-40℃で凍結保存した。

毒性試験法

毒性試験は、「食品衛生検査指針」理化学編³⁸⁾の中の麻痺性貝毒検査法に準じて行った。貝類については、殻をはずし、

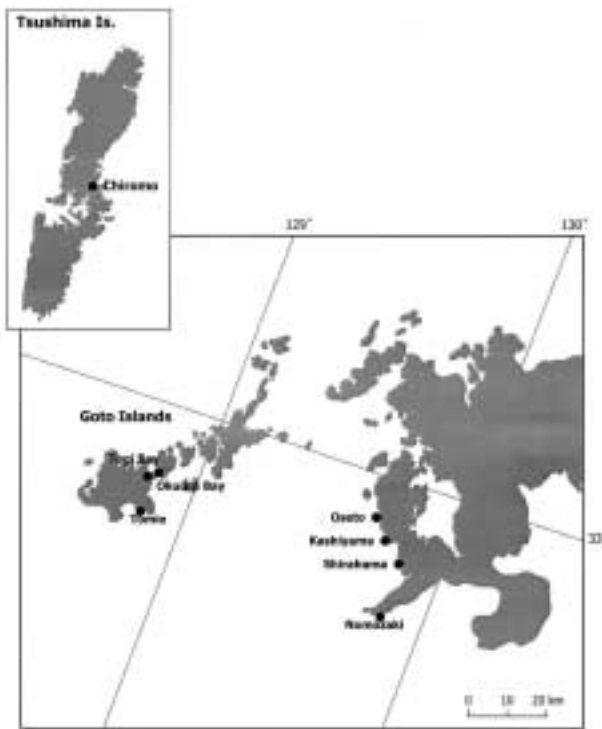


Fig. 2 Map showing seven sampling places of shellfishes in Nagasaki Prefecture.

筋肉（貝柱）、内臓（中腸腺）、その他（ひも）の3部位または、筋肉部位（筋肉および“ひも”）と中腸腺の2部位に腑分けし、または剥き身全体を秤量後ホモジナイズし、0.1N HCl 1 mlを加えて5分間煮沸抽出した。冷却後、5,000 × gで20分遠心分離をし、得られた上清の1 mlを体重20 g前後のddY系雄マウス（3～4週齢）に腹腔内注射し、致死（呼吸が停止するまでの）時間を測定した。毒力は20 gのマウスが15分間で死亡した場合を1マウスユニット（mouse unit, MUと略記）とした。

結果および考察

Table 2 - 1～3に毒性試験の結果を示した。長崎沿岸（西彼杵半島沿岸）では、ほとんどの貝類に毒性は認められなかった（筋肉：< 2 MU/g、中腸腺：< 5 MU/g）が、五島列島の福江島で採取された2種の二枚貝、イタヤガイ *Pecten albicans*、アズマニシキガイ *Chlamys farreri*、そして、対馬千尋藻において採取されたヒオウギガイ *Chlamys nobilis*からそれぞれ毒性が検出された。イタヤガイからは中腸腺に< 5.0～17.3 MU/gの毒性が見られ、アズマニシキガイからは同じく中腸腺に7.1 MU/g、ヒオウギガイからは、規制値である4 MU/gには満たないが、中腸腺に2.0 MU/gの毒性が見られた。PSPが検出されたのは、いずれもホタテガイと同じイタヤガイ科の二枚貝で、5月に採取した試料の毒性が最も高く、その後毒性が減少していることや、5月採取の他の二枚貝から毒性がまったく検出されていないことなどから、福江島での有毒プランクトンの発生時期は4月～5月初旬ではないかと思われた。福江島のイタヤガイは福江市

内の市場で購入したもので、正確な採取場所は不明である。しかし、福江島沿岸の各湾奥部でサンプリングした結果、同島の戸岐湾で採取したアズマニシキガイからPSPを検出した。戸岐湾で有毒プランクトンが発生していたことが推察された。

対馬では、例年、浅茅湾で *A. catenella* の発生により、大規模に行われているヒオウギガイの養殖に大きな被害（出荷規制など）を与えているが、今回用いた試料は浅茅湾産のものではなく、外海（日本海側）に面した千尋藻の天然試料から検出されたことから、対馬での有毒プランクトンの発生は、

Table 2 - 1. Toxicity of shellfishes and crabs collected at Nagasaki Prefecture

Place of sampling (date of catch)			
No.	"Japanese name"	Scientific name	Toxicity (MU/g)
Nomozaki (Jul. 13, 1995)			
1	"hesoakikubo-gai"	<i>Chlorostma turbinatum</i>	< 2
2	"hizara-gai"	<i>Liolophura japonica</i>	< 2
3	"hiogi-gai"	<i>Chlamys nobilis</i>	< 2
4	"tokobushi"	<i>Sulculus diversicolor aquatilis</i>	< 2
Tomie, Fukue Island (Jul. 15, 1995)			
1	"kumanoko-gai"	<i>Chlorostma xanthostigma</i>	< 2
2	"hesoakikubo-gai"	<i>Chlorostma turbinatum</i>	< 2
3	"hizara-gai"	<i>Liolophura japonica</i>	< 2
4	"sugai"	<i>Lunella coronata coreensis</i>	< 2
5	"himeyouraku-gai"	<i>Ergalatax contractus</i>	< 2
6	"otomegasai-gai"	<i>Scutus sinensis</i>	< 2
Benten-shirahama (Sep. 28, 1995)			
1	"hizara-gai"	<i>Liolophura japonica</i>	< 2
2	"murasaki-igai"	<i>Mytilus edulis</i>	< 2
3	"matsuba-gai"	<i>Cellana nigrolineata</i>	< 2
4	"magaki"	<i>Crassostrea gigas</i>	< 2
5	"akoya-gai"	<i>Pinctada fucata martensi</i>	< 2

Table 2 - 2. Toxicity of shellfishes and crabs collected at Nagasaki Prefecture

Place of sampling (date of catch)			
No.	"Japanese name"	Scientific name	Toxicity (MU/g)
Kashiyama (Sep. 28, 1995)			
1	"murasaki-igai"	<i>Chlorostma turbinatum</i>	< 2
2	"matsuba-gai"	<i>Cellana nigrolineata</i>	< 2
3	"magaki"	<i>Crassostrea gigas</i>	< 2
Okura Bay, Fukue Island (Nov. 6, 1995)			
1	"murasaki-igai"	<i>Chlorostma turbinatum</i>	< 2
2	"matsuba-gai"	<i>Cellana nigrolineata</i>	< 2
3	"urauzu-gai"	<i>Astraliu haemafragum</i>	< 2
4	"ohebi-gai"	<i>Serpulorbis imbricatus</i>	< 2
Togi Bay, Fukue Island (Nov. 7, 1995)			
1	"murasaki-igai"	<i>Chlorostma turbinatum</i>	< 2
2	"magaki"	<i>Crassostrea gigas</i>	< 2
3	"akoya-gai"	<i>Pinctada fucata martensi</i>	< 2
4	"azumanishiki-gai"	<i>Chlamys farreri</i>	< 2
5	"nadeshiko-gai"	<i>Chlamys irregularis</i>	< 2
6	"sarunokashira-gai"	<i>Pseudochama retroversa</i>	< 2
Aso Bay, Tsushima Island (Nov. 8, 1995)			
1	"akoya-gai" (cultured)	<i>Pinctada fucata martensi</i>	< 2
2	"akoya-gai" (wild)	<i>Pinctada fucata martensi</i>	< 2
3	"hiogi-gai" (wild)	<i>Chlamys nobilis</i>	< 2
4	"tengunishi" (market, wild)	<i>Hemifusus tube</i>	< 2

Table 2 - 3. Toxicity of the shellfishes from the fish market in Fukue Island, Nagasaki Prefecture

Place of sampling			
Date of collection	"Japanese name"	Scientific name	Toxicity (MU/g)
July 1995	"itaya-gai"	<i>Pecten albicans</i>	17.3
"	"onisazae"	<i>Chicoreus asianus</i>	<2
"	"gintakahama-gai"	<i>Tectus pyranis</i>	<2
"	"imo-gai"	?	<2
"	"matsuba-gai"	<i>Cellana nigrolineata</i>	<2
Oct. 1995	"itaya-gai"	<i>Pecten albicans</i>	7.1
"	"tsukihi-gai"	<i>amuseum japonicum</i>	<2
"	"hamaguri"	<i>Meretrix lusoria</i>	<2
Nov. 1995	"itaya-gai"	<i>Pecten albicans</i>	<5
"	"tsukihi-gai"	<i>amuseum japonicum</i>	<2
"	"tengunishi"	<i>Hemifusus tube</i>	<2

浅茅湾だけでなく外海側の湾でも発生している可能性がある。尚、今回は比較的長期間毒を保有しつづけるイタヤガイ科の二枚貝にPSPが検出された。しかし、毒化が確認できた湾で採取したカキやムサキイガイなどからはPSPはまったく確認されていないことから、同湾での毒化原因プランクトンは既に消失した後であった可能性が高い。

2. 五島列島福江島におけるPSPの性状

1.の結果より、福江島の二枚貝がPSPで毒化していることが確認された。これにより、福江島で毒化した2種の二枚貝イタヤガイおよびアズマニシキガイについて、スクリーニングを続けるとともに、毒性および毒成分を調べてその特徴を調べた。また、戸岐湾で採取した二枚貝に付着していたコケムシから微量ながらPSPを検出したことから、その毒成分を周辺に生息する二枚貝とそれとの比較をし、その来源を検討した。

試料および方法

貝 類

長崎県五島列島福江島において1995年5月から1996年10月にかけて採取または鮮魚店で購入した試料を使用した。これらの試料は採取後、氷蔵により研究室まで持ち帰り、その後毒性試験を行うまで-40℃で凍結保存した。

コケムシ

福江島戸岐湾において1996年5月から10月に採取したアズマニシキガイに付着または周辺の岩に付着していたコケムシを試料とした。

コケムシはマウス毒性試験に供するだけの十分な量が得られなかったことから、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によりPSPを確認した。コケムシの抽出は0.1mol/Lの酢酸を等量加えて加熱抽出5分間行い、冷却後、5,000×gで20分間遠心分離し、得られた上清について0.45μmメンブランフィルターでろ過を行ったものをHPLC分析試料とした。

毒性試験法

イタヤガイの毒性試験は1.1の毒性試験法と同様に行った。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

試料は0.1mol/Lの酢酸で5分間加熱抽出され、急冷後、遠心分離 (5,000×g, 20min) して得られた上清を分画分子量1000daの限外ろ過 (YM-1, Amicon) に供した。通過液をHPLC分析に供した。

HPLCは、既報のPSP分析法³⁹⁾に基づいて、Waters LC-Module 1を用いた逆相イオン対クロマトグラフィーのシステムにより行った。

カラムには、LiChroCART RP-18(e) (4×250mm, Merck) が用いられ、移動相には、その毒成分 (GTX群, STX群) に応じて下記の2種のものを使い、流速を0.8ml/minと設定した。

() GTX群分析用: 2 mMヘプタンスルホン酸を含む10mMリン酸アンモニウム緩衝液 (pH7.3)

() STX群分析用: 2 mMヘプタンスルホン酸を含む4%アセトニトリル - 30mMリン酸アンモニウム緩衝液 (pH7.3)

蛍光化およびそれを促進するための反応液として50mM過よう素酸および、0.2M水酸化カリウム - 1 Mギ酸アンモニウム - 50%ホルムアミド混合液をそれぞれ0.4ml/minずつで流し、カラム通過後に混合させる。そして、恒温槽内において65℃で1.5分間加熱することにより反応させたものを蛍光検出器で目的の毒成分を検出した。この時の検出器の波長は、励起波長: 336nm, 蛍光波長: 392nmに設定した。

N-スルフォカルバモイル毒群 (C1,2, GTX5,6) については、0.1Mになるように抽出試料 (HPLC分析用試験液) に塩酸を加え、沸騰浴中で10分間過熱し、加水分解させ、変換後に生成した成分量から計算した³⁶⁾。

結果および考察

毒性試験

毒性試験の結果、戸岐湾で採取した5種の二枚貝および鮮魚店で購入したイタヤガイ *Pecten albicans* に毒性が認められた (Table 3)。イタヤガイは中腸腺に局在的に毒性を示し、1996年7月には133.8MU/gの最高毒性値を記録した。貝柱およびその他 (ひも) の部位には、どの試料からも毒性は検出されなかった (2 MU/g未満)。アズマニシキガイもイタヤガイ同様、中腸腺に毒性が認められ、1996年5月に25.0MU/gの最高毒性値を示した。その他には、1996年5月には、ムサキイガイ *Septifer virgatus*, サルノカシラガイ *Pseudochama retroversa*, コベルトフネガイ *Arca boucardi* の可食部からそれぞれ1.9, 3.2, 2.3MU/gの毒性を、同年7月にはハボウキガイ *Pinna bicolor* の中腸腺に4.9MU/gの毒性をそれぞれ検出した。

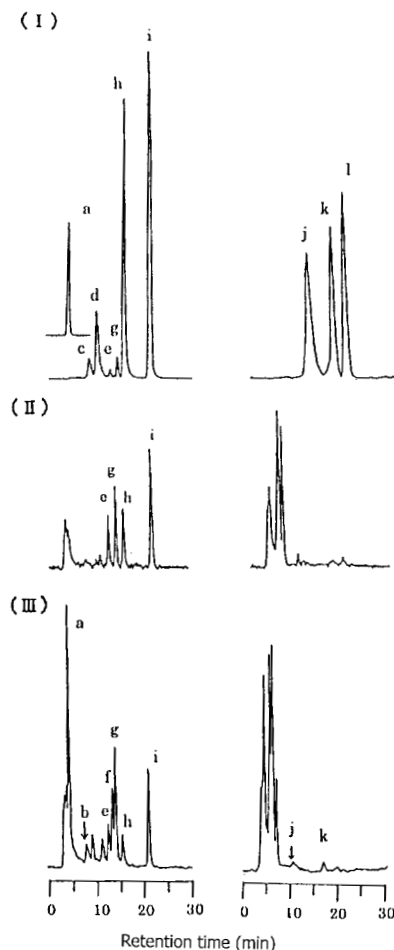
一方、コケムシの試料はマウス毒性試験に供するだけの十分な量が確保できなかった。

毒成分組成

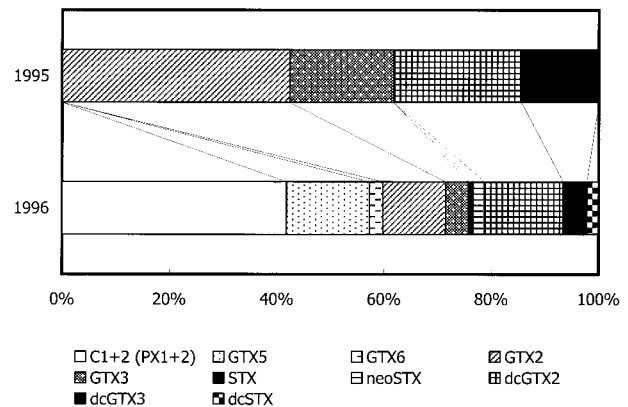
イタヤガイ *Pecten albicans* (中腸腺) のHPLC分析の結果をFig. 3 およびFig. 4 に示す。

Table 3. Toxicity of the bivalves collected from Fukue Island, Nagasaki Prefecture

Species	Date of collection	Toxicity (MU/g)		
		Muscle	Digestive gland	Others
<i>Pecten albicans</i>	Jul. 15, 1995	<2	17.3	<2
	Oct. 5, 1995	<2	7.1	<2
	Nov. 10, 1995	<2	<5	<2
	May 15, 1996	<2	37.7	<2
	Jun. 18, 1996	<2	101.5	<2
	Jul. 19, 1996	<2	133.8	<2
	Oct. 31, 1996	<2	12.9	<2
<i>Chlamys farreri</i>	Oct. 5, 1995	<2	7.1	<2
	May 15, 1996	<2	25.0	<2
	Jul. 18, 1996	<2	3.7	<2
	Sep. 12, 1996	<2	3.3	<2
	Sep. 14, 1996	<2	3.2	<2
<i>Septifer virgatus</i>	May 15, 1996		1.9 (whole body)	
<i>Pseudochama retroversa</i>	May 15, 1996		3.2 (whole body)	
<i>Arca arabica</i>	May 15, 1996		2.3 (whole body)	
<i>Pinna bicolor</i>	Jul. 16, 1996		4.9 (whole body)	

**Fig. 3** HPLC chromatograms of standard toxin (I), of the extract (II) and (III) from scallop, *P. albicans* specimen collected in 1995 and in 1996, respectively.

Peaks for GTXs (left); a: C1+2(PX1+2), b: GTX6, c: GTX4, d: GTX1, e: dcGTX3, f: GTX5, g: dcGTX2, h: GTX3, i: GTX2
Peaks for STXs (right); j: neoSTX, k: dcSTX, l: STX

**Fig. 4** Toxin profiles of the scallop *P. albicans* collected in 1995 and 1996.

1995年採取のイタヤガイ（7月：25.0MU/g）の毒成分は GTX2,3, dcGTX2,3の主として4つのピークに標品の Retention time (Rt) と一致するピークが検出された。各成分のモル比 (mol%) は, GTX2: 42.4, GTX3: 19.4, dcGTX2: 23.8, dcGTX3: 14.4であった。STX群においては, ごくわずかにSTXやdcSTXに一致するピークが得られたが, この程度のピークでは, 狭雑物の可能性があり, STX群については, ほとんど含まれないと判断した。1996年採取の試料（7月：133.8MU/g）では, C1,2 (PX1,2), GTX2, 3, GTX5,6, neoSTX, dcGTX2,3, dcSTXの10成分が検出された。各成分のモル比 (mol%) は, C1+C2 (PX1+PX2): 42.7, GTX2: 11.7, GTX3: 4.2, GTX5: 15.5, GTX6: 2.5, neoSTX: 2.1, dcGTX2: 14.7, dcGTX3: 4.4, dcSTX: 2.2であった。

アズマニシキガイ *Chlamys farreri* (中腸腺) のHPLC分析の結果をFig. 5に示す。

1996年採取の試料（5月：25.0MU/g）のHPLC分析をした結果, C1,2 (PX1,2), GTX2,3, GTX5,6, STX, neoSTX, dcGTX2,3, dcSTXの11成分が検出された。各成分のモル比 (mol%) は, C1+C2 (PX1+PX2): 38.3, GTX2: 11.4, GTX3: 4.8, GTX5: 18.3, GTX6: 3.7, STX: 3.4, neoSTX: 1.8, dcGTX2: 10.5, dcGTX3: 4.0, dcSTX: 3.8であった。

アズマニシキガイに付着していたコケムシのHPLC分析の結果, 微量ながら4成分の標準品のピークと一致するピークを検出した。各成分のモル比 (mol%) は, GTX2: 29.6, GTX3: 8.4, dcGTX2: 43.7, dcGTX3: 17.8であった (Fig. 6)。

イタヤガイの毒成分組成を見ると, 1995年7月にはGTX2, 3およびdcGTX2,3の4成分のみであったのに対し, 1996年7月の試料からはC (PX) 群やSTX群などを含む10成分が検出され, その毒成分組成に大きな違いが見られた。特に1996年の試料では, 低毒性成分であるN-スルフォカルバモイル型 {C1,2 (PX1,2), GTX5,6} が多くの割合を占めていた (60.7mol%)。この毒成分の違いには原因プランクトンが違ってもその要因として考えられるが, むしろ, 毒の代謝や変換によるものである可能性が考えられた。1995年の毒性

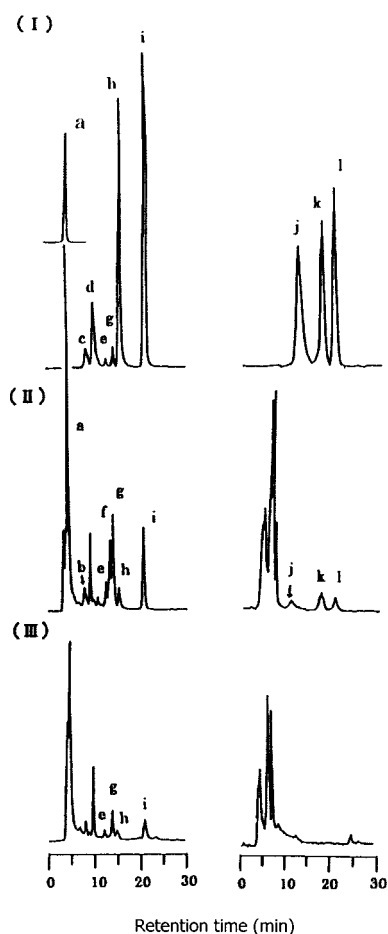


Fig. 5 HPLC chromatograms of standard toxin (I), of the extract (II), and (III) from scallop, *C. farreri* specimen and mossworm specimen, respectively.

Peaks for GTXs (left); a: C1+2(PX1+2), b: GTX6, c: GTX4, d: GTX1, e: dcGTX3, f: GTX5, g: dcGTX2, h: GTX3, i: GTX2
Peaks for STXs (right); j: neoSTX, k: dcSTX, l: STX

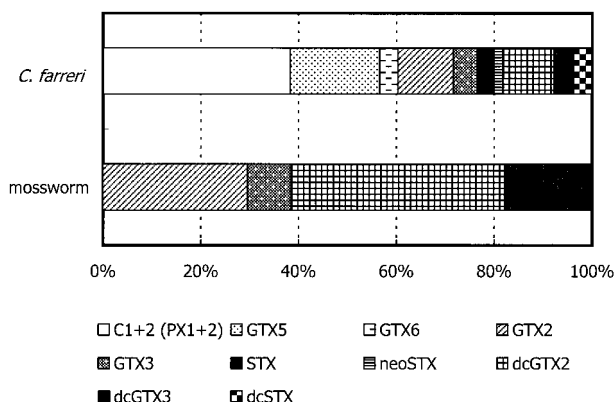


Fig. 6 Toxin profiles of *C. farreri* and mossworm.

値の推移を見ると、1995年の最高毒性を示した7月が既に毒の減少期になっているのが推察でき、毒成分パターンからもデカルバモイル毒群が比較的多く含まれる (38.2mol%) こ

とからも毒の減少期に低毒性成分からの変換あるいは毒の減少速度の違いにより、このような毒成分組成を含んでいたと推察された。アズマニシキガイとそれに付着していたコケムシの毒成分を比較すると、アズマニシキガイが1996年採取のイタヤガイのそれとほぼ類似しており、低毒性成分を多く含む (60.3MU/g) パターンであるのに対し、コケムシからは1995年のイタヤガイのパターンに類似したGTX2,3 + dcGTX 2,3のパターンであった。これは、コケムシとアズマニシキガイの毒の排出スピードまたは、体内の成分変換能力の違いによるものであることが推察された。

今回、原因プランクトンの確認はできなかったが、戸岐湾ではアズマニシキ以外の二枚貝からほとんど毒性が確認されなかったことから、今回の採取時期 (1995年7月、1996年5月) はともにプランクトンの消失した後であったことが考えられた。また、ホタテガイやヒオウギガイなどと同じイタヤガイ科の二枚貝であるイタヤガイとアズマニシキガイは、一度毒を蓄積すると中腸腺中に長期間保持し続けると考えられたため、今回の時期に毒性が確認できたと推察した。また、アズマニシキガイに付着していたコケムシからPSP成分が確認されたことから、同海域の巻貝の毒化が考えられたが、毒性は確認されなかった。しかし、今回の採取地にはコケムシが多量に発生しており、有毒プランクトンの大量発生や、発生期間が長引いた場合、海藻やなどに付着したコケムシを混食した巻貝が毒化する可能性が考えられる。

これらのことから、福岡県ではPSP毒化が例年起こっており、二枚貝の毒化状況や毒性の推移から見て、有毒プランクトンは春先 (3月～5月) に発生しているもの (戸岐湾) と思われる。

今後、原因プランクトンの同定や、二枚貝が毒化する時期の予測のためにも、プランクトン調査をする必要があると考えられる。

第2節 大分県蒲江町沿岸

大分県では、1988年に蒲江町沖で *A. catenella* を原因プランクトンとするPSPが発生した。それによってヒオウギガイ等の二枚貝が毒化し、大きな漁業被害を与えた。以来、蒲江町沿岸では定期的にPSP毒化が起きている。大分県蒲江町ではヒオウギガイの養殖が盛んで、西日本では盛んに養殖されており、九州では、長崎県対馬、熊本県天草、宮崎県北浦などでも広く行われている。ヒオウギガイは、イタヤガイ科の食用二枚貝で、房総半島から沖縄諸島に分布する。潮間帯の下部から水深20m程度の岩礁に足糸で付着している。殻の色が美しく、赤色、橙色、黄色、紫色と多彩であり、その貝柱は美味である。

本節では、1996年3月、大分県蒲江町猪串湾 (Fig. 7) および周辺海域においてヒオウギガイ *Chlamys nobilis*、ムラサキイガイ *Mytilus edulis*、アサリ *Tapes japonica* などの二枚貝がPSP毒化したことから、これら二枚貝の毒性を周年的に調べるとともに、その毒成分組成も調べた。

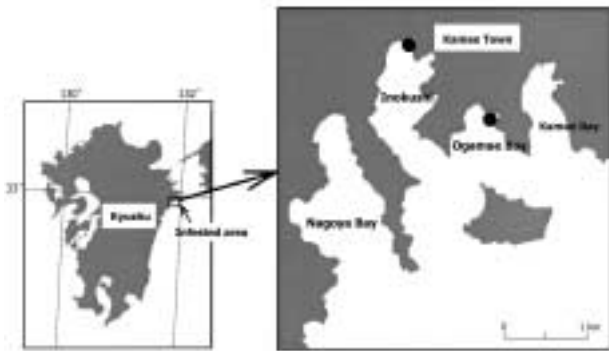


Fig. 7 Map showing the PSP-infested areas in Oita Prefecture.

1. 大分県蒲江におけるPSPの性状

試料および方法

試料

1996年3月から1997年2月に大分県小蒲江湾で採取されたヒオウギガイ、1996年4月と5月に猪串湾森崎地先で採取されたムラサキガイおよび1996年4月に同湾で採取されたアサリを試料とした。ヒオウギガイは貝柱、中腸腺、生殖腺、その他の内臓の4部位に分け（一部の試料については、中腸腺と可食部の2部位、または、貝柱・中腸腺・その他の3部位に分けた）、アサリおよびムラサキガイについては剥き身の状態では凍結し、長崎大学水産学部水産食品衛生学研究室まで送付した。そして、実験に供するまで - 40℃ で冷凍保存した。

プランクトン試料については、蒲江町の猪串湾および小蒲江湾の定点で水深0, 2, 5, 10mで海水を採取し、顕微鏡で検鏡することにより原因プランクトンを調べた。プランクトンの毒性・毒成分分析用試料は、数十リットルの現場海水を吸引ろ過して得られたろ紙を凍結し、二枚貝同様研究室に送付し、実験に供するまで保存した。

抽出方法

二枚貝類：試料はすべて流水中にて急速解凍を行い、ヒオウギガイは4部位を、アサリおよびムラサキガイについては剥き身をそれぞれ公定法に準じて0.1mol/L塩酸で抽出した。なお、ヒオウギガイの中腸腺のみ抽出比を5とし、それ以外の試料については抽出比を2とした。

プランクトン：海水を濾したろ紙を細切し、少量の0.1mol/Lの酢酸を加え、氷水中で1分間超音波処理により抽出し、3,000×gで15分間遠心分離した。残渣について同様の操作をさらに2回繰り返す、得られた上清を5mlに定容し、ポアサイズ0.45μmセルロースアセテート・メンブランフィルター（ADVANTEC）でろ過したものを試験液とした。

毒性試験

第 4 章の毒性試験法と同様の方法によった。

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）

第 4 章のHPLC分析方法と同様に行った。

結果および考察

大分県蒲江町沖で発生した有毒渦鞭毛藻は、検鏡により *Gymnodinium catenatum* であると同定された（大分県海洋水産研究センター：堤憲太郎研究員）（Fig. 8）。 *G. catenatum* の発生は、猪串湾、小蒲江湾をはじめ、名護屋湾、蒲江湾でも確認された。

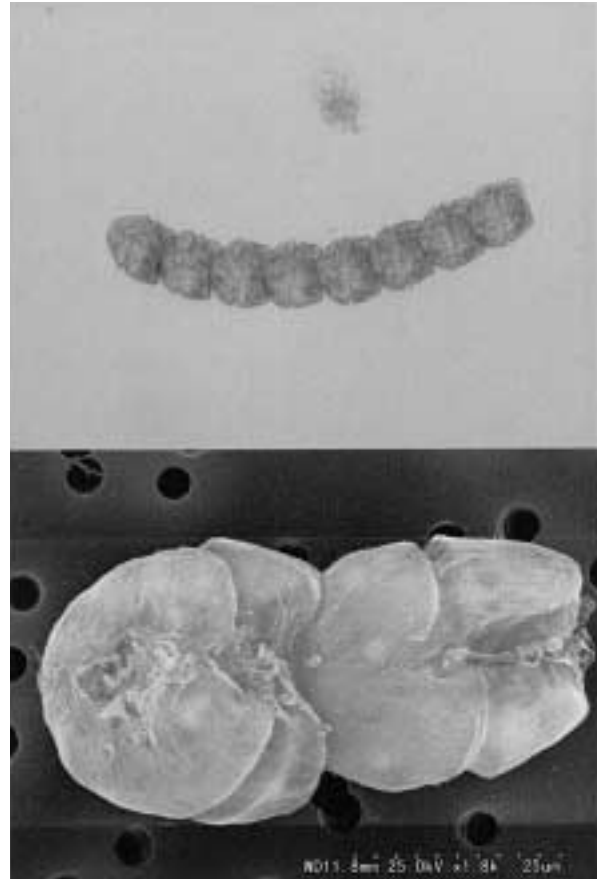


Fig. 8 *Gymnodinium catenatum* Graham.

小蒲江湾における *G. catenatum* の発生とヒオウギガイ（中腸腺）の毒性の推移をFig. 9に、猪串湾における *G. catenatum* の発生とアサリおよびムラサキガイの毒性の推移をFig.10にそれぞれ示した。小蒲江湾では、1996年4月上旬に *G. catenatum* の発生が認められ、同月下旬には水深10mで1,367cells/Lの最高細胞数を記録した。これに伴い、同湾で養殖されていたヒオウギガイの中腸腺の毒性が上昇し、5月の初旬には、最高毒性値80.6 MU/g（5/07）を記録した。しかし、同時期には *G. catenatum* は急激に減少し、5月中旬に一度消失するが、6月初旬に再び約150cells/Lの出現が確認され、その後、7月には完全に消失した。猪串湾でも、4月上旬に発生が確認されてから同月下旬に急激に細胞数の上昇が見られ、水深2mで44,350cells/L（4/22）の最高細胞数を記録した。この時、同湾で採取されたアサリとムラサキガイも最高毒性値を記録し、それぞれ40.7, 256.6MU/gの毒性を示した。小蒲江湾と同様に、その後、急激に *G.*

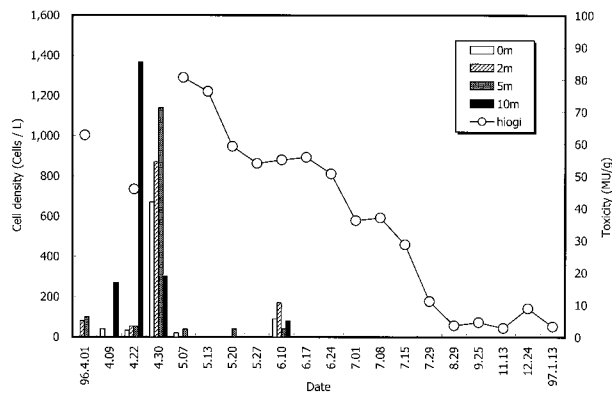


Fig. 9 Seasonal changes in cell density of *Gymnodinium catenatum* and in toxicity of scallop collected from Ogamae Bay, Oita.

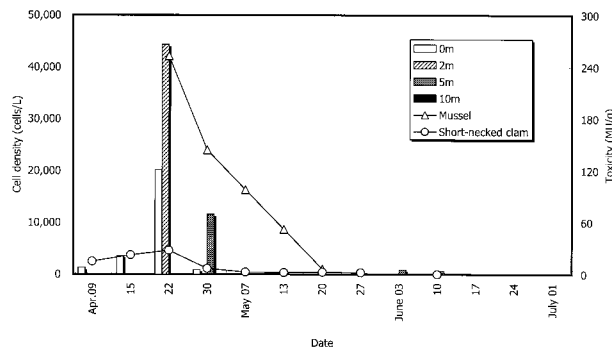


Fig. 10 Seasonal variations of cell density of *G. catenatum* and of toxicity score of edible portion of bivalves collected from Inokushi Bay, Oita.

*catenatum*が減少し、それと相関するようにアサリとムラサキガイの毒性も急激に減少した。アサリは5月初旬に、ムラサキガイは5月の下旬に規制値である4 MU/gを下回った。これに対し、小蒲江湾のヒオウギガイは、*G. catenatum*が完全に消失した7月上旬でも37.0 MU/gの毒性を示し、9月の下旬にようやく規制値を下回った。これは、ヒオウギガイがアサリやムラサキガイに比べ、一度蓄積したPSP毒を解毒あるいは排泄しにくい特徴をもつことが確認された。また、他の部位（貝柱、生殖腺、その他）には、ほとんど毒性は見られず、毒は中腸腺にほぼ集中的に蓄積していた（Table 4）。

毒成分組成：3種の二枚貝類（ヒオウギガイ、アサリ、ムラサキガイ）および*G. catenatum*の毒成分組成を逆相蛍光HPLCにより分析した結果、得られたHPLCのクロマトグラムをFig.11～14に示した。また、*G. catenatum*および二枚貝類のモル比（mol%）をTable 5に示した。3種の二枚貝の毒成分組成は、ほぼ類似したパターンを示した。ヒオウギガイでは、GTX群に標品のR_tと一致するピークが5つ見られ、それらの成分がGTX5、GTX6、dcGTX3、dcGTX2、GTX2であることが確認された。STX群では、STX、dcSTX、neoSTXの3成分が、PX群（C群）にはPX1（C1）およびPX2（C2）の2成分が確認された。毒成分の存在比（mol%）は、低毒性

Table 4. Anatomical distribution of toxicity of scallop, *Chlamys nobilis* collected from Ogamae Bay, Oita Prefecture

Date of collection	Toxicity (MU/g)			
	adductor muscle	ovary	others	digestive gland
96.3.18	—	—	—	40.8
4.01	—	—	—	62.7
4.15	—	—	—	53.3
4.22	<2	<2	<2	45.9
5.07	<2	<2	<2	80.6
5.13	2.9 (edible part)			76.3
5.20	3.0 (edible part)			59.2
5.23	<2	<2	<2	26.1
5.27	<2	<2	<2	53.9
6.03	<2	<2	<2	20.4
6.10	<2	<2	1.6	55.0
6.17	<2	<2	<2	55.8
6.24	<2	<2	<2	50.7
7.01	<2	<2	<2	36.2
7.08	<2	<2	<2	37.0
7.15	<2	<2	<2	28.7
7.29	<2	<2	<2	11.1
8.29	<2	<2	<2	5.6
9.25	<2	<2	<2	2.2
11.13	<2	<2	<2	2.8
12.24	<2	<2	<2	8.9
97.1.13	<2	<2	<2	3.3
2.15	<2	<2	<2	2.0

Table 5. Toxin compositions of *Gymnodinium catenatum* and bivalves

Component	(mol%)			
	<i>G. catenatum</i>	scallop	mussel	short-necked clam
C1 (PX1)	20.4	28.3	22.3	25.2
C2 (PX2)	42.1	15.6	14.1	17.0
GTX2	—	0.3	—	—
GTX5	1.6	5.3	4.2	4.1
GTX6	30.5	43.1	54.5	49.5
dcGTX2	3.0	4.3	2.3	2.3
dcGTX3	2.4	2.2	1.2	1.4
STX	—	0.1	—	—
dcSTX	—	0.8	1.0	0.4
neoSTX	—	0.1	0.4	0.1

—: Below detectable limit.

成分である*N*-スルフォカルバモイル型のGTX6 (43.1mol%)、PX 1 (C1) (28.3mol%)、PX2 (C2) (15.6mol%) が主成分として見られ、その他、デカルバモイル型のdcGTX2 (4.3mol%)、dcGTX3 (2.2mol%)、dcSTX (0.8mol%) や高毒性成分であるカルバモイル型のSTX、neoSTX、GTX2 (0.5mol%) であった。アサリおよびムラサキガイは、ほぼ類似した毒成分比を示し、8つの毒成分と一致するピークが確認された。主成分としては、ヒオウギガイと同様に低毒性成分 {GTX5,6, C1,2 (PX1,2)} が90%以上を占めており、高毒性成分 (neoSTX, dcSTX, dcGTX2,3) は、5%以下とごくわずかしが含まれていなかった。

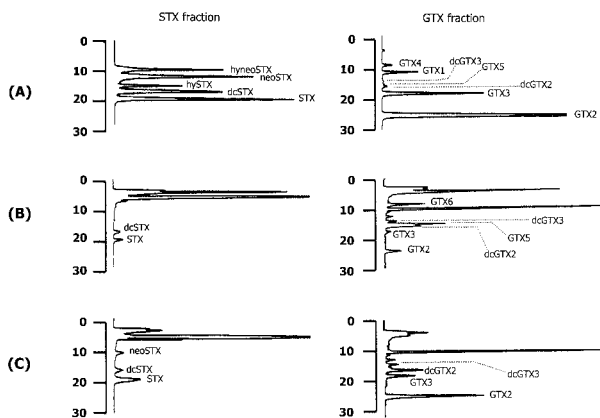


Fig. 11 HPLC chromatograms of toxin from scallop, *C. nobilis*.
(A) standard toxin; (B) before hydrolysis;
(C) after hydrolysis

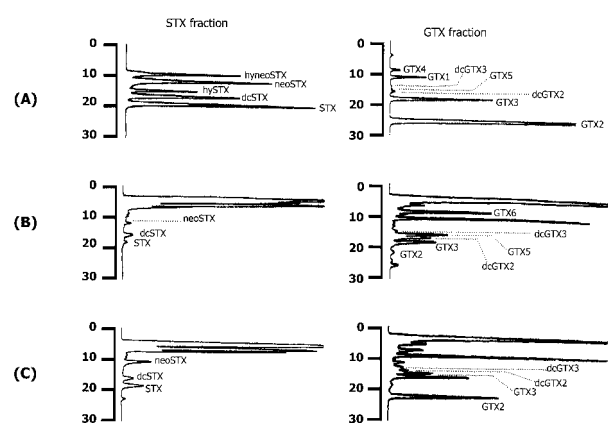


Fig. 13 HPLC chromatograms of toxin from mussle, *Mytilus edulis*.
(A) standard toxin; (B) before hydrolysis;
(C) after hydrolysis

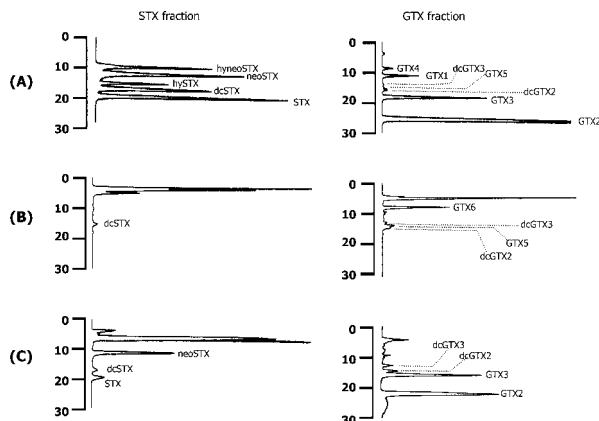


Fig. 12 HPLC chromatograms of toxin from short-necked clam.
(A) standard toxin; (B) before hydrolysis; (C) after hydrolysis

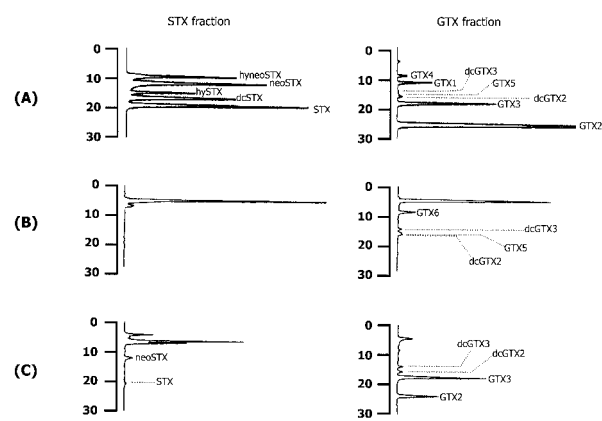


Fig. 14 HPLC chromatograms of *G. catenatum* toxin collected from Kamae, Oita.
(A) standard toxin; (B) before hydrolysis; (C) after hydrolysis

*G. catenatum*の毒成分組成は、GTX群に4つの毒成分と一致するピークとPX (C) 群に2つの毒成分と一致するピークの計6成分がHPLC分析から確認された。PX (C) 群が62.5mol%と全体の半分以上を占め、GTX6 (30.5mol%)、GTX5 (1.6mol%) を含めて、低毒性成分だけで94.6%と毒成分のほとんどをN-スルフォカルバモイル型の毒成分が占めていた。二枚貝類の毒成分組成と比較すると、まず、*G. catenatum*の毒成分には二枚貝類に存在したSTX, neoSTX, dcSTX, GTX2などの高毒性成分が含まれていないことがわかる。これら高毒性成分は、*G. catenatum*が二枚貝類による摂取後、*G. catenatum*中のGTX5やGTX6の成分が貝体内で変換してできたものと考えられる。また、C1 (PX1) とC2 (PX2) の存在比が*G. catenatum*ではC2 (PX2) > C1 (PX1) であったのに対し、二枚貝類ではC1 (PX1) > C2 (PX2) となっている。これは、貝体内では11位の硫酸エステルがプランクトンで生成される型から型へと変換して化学的に安定するためであると考えられる。

1996年3月から1997年2月にかけてヒオウギガイ中腸腺の毒成分組成の周年変化をみたところ、原因プランクトンが消失して、中腸腺中の毒が減少していくに連れて、低毒性成分{C1,2 (PX1,2), GTX5,6}の割合が徐々に減少し、代わって高毒性成分(STX群, GTX2,3)やデカルバモイル毒群(dcSTX, dcGTX2,3)の割合が増加している (Fig.15)。この結果から、ヒオウギガイ体内で低毒性成分から高毒性成分への変換がおこっているか、または、毒の代謝速度が低毒性成分の方が速いことが推察された。貝体内に毒が取込まれると、デカルバモイル体の毒成分が増加する現象は、実際に中腸腺のホモジネートに毒を加えてインキュベートすると酵素変換によりデカルバモイル型の毒になることが報告されている³³⁾。また、毒化してから時間が経つほどデカルバモイル体の毒成分が顕著に増加する傾向が見られた。

以上の結果より、*G. catenatum*と毒化したヒオウギガイやアサリ、ムラサキガイの毒に含まれる毒成分組成がほぼ一致することから、今回の二枚貝類の毒化原因は*G. catenatum*に

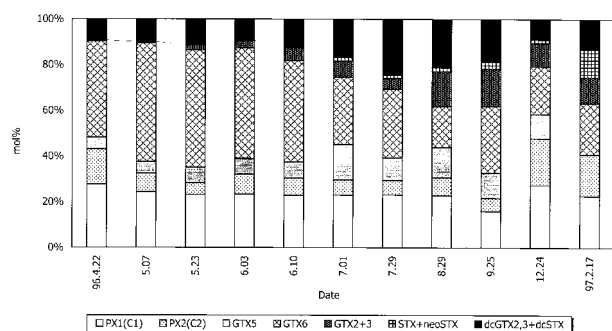


Fig. 15 Seasonal variations in toxin composition of "hiogi" scallop collected from Ogamae Bay, Oita

よるものであることが明らかになった。*G. catenatum*による貝類の毒化は、これまで山口県仙崎湾に限って引き起こされてきた¹⁶⁾が、大分でも本種による毒化が初めて確認された。これまで九州沿岸でのPSP毒化原因プランクトン種は、*A. catenella*だけであったが、本種による二枚貝の毒化は初めてである。毒成分組成の特徴として、低毒性成分 {C1,2 (PX1, 2), GTX5,6} を主成分とし、高毒性成分をほとんど含まない (カルバモイル型の毒成分は一切含まない) パターンを示している。また、貝体内で高毒性成分に変換する可能性があることから、一旦毒化した後に毒性が上昇する可能性も考えられる。このことから、本種が低毒性成分主体であるからとはいえ、高毒化しにくいということは無く、毒化被害に対し楽観はできない。

2. ヒオウギガイ *Chlamys nobilis* の毒の精製

大分県小蒲江湾で毒化した養殖ヒオウギガイの毒成分を詳細に調べるため、ヒオウギガイの中腸腺から毒を抽出し、ゲルろ過、イオン交換等のカラムクロマトグラフィーに供し、毒を精製した。また、精製した毒は、HPLC分析およびLC/ESI-MS分析により毒成分を特定した。

試料および方法

試料

1996年4月から6月にかけて大分県小蒲江湾において毒化した養殖ヒオウギガイ *Chlamys nobilis* から中腸腺を分取し、合一したものを試料とした。

毒の精製方法

毒の精製は、Fig.16のように行った。ヒオウギガイの中腸腺1.5kgに3倍量の塩酸性80%エタノール (pH2.0) を加えて、十分にホモジナイズした後、遠心分離 (3,000 × g, 20min) を行い、上清と残渣に分けた。残渣についてはさらに同じ操作を2回繰り返して、得られた上清を合一し、これをエバポレーターで減圧濃縮した。濃縮した抽出物は等量のジクロロメタンを加えて脱脂し、ジクロロメタン層と水層に分けた。次に、水層画分のジクロロメタンを留去した後、1 M NaOHでpHを5.5に調整し、よく蒸留水で洗浄した活性炭に付し、水洗いを充分した後、1%酢酸-20%エタノールで毒を

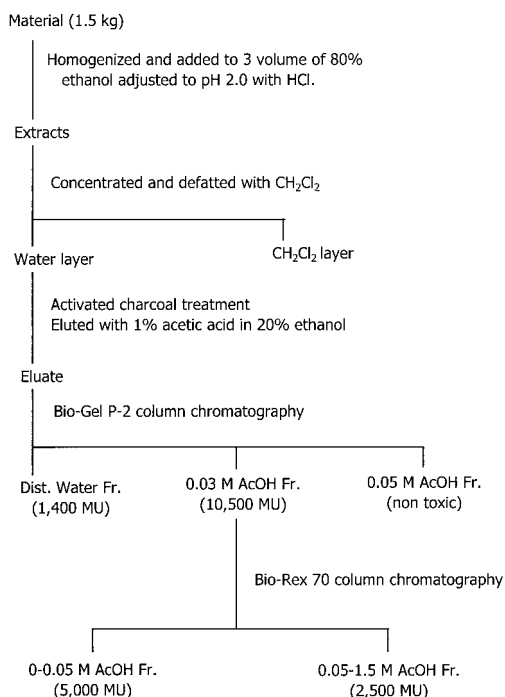


Fig. 16 Purification procedure of toxin from scallop *Chlamys nobilis*.

溶出させた。溶出液を再び減圧濃縮し、酢酸とエタノールを除去後、1 M NaOHでpHを5に調整し、これをBio-Gel P-2カラム (Bio-Rad Labs.: 5 × 90 cm) に付し、2 Lの蒸留水で洗浄した。この際、溶出液を10mlずつのフラクションで分取した。次に、0.03M酢酸を1 L、次いで0.05M酢酸を1 L順次流し、毒を溶出した。各フラクションの毒性を調べた結果、水画分に1400MU、0.03M酢酸画分に10,500MUの毒性が認められた。溶出液ごとに有毒画分を合一し、減圧濃縮後、Bio-Rex 70カラム (H⁺型, Bio-Rad Labs.: 1.6 × 94cm) に付した。0-0.05M酢酸および0.05-1.5M酢酸を用いる2-step linear gradient法によるカラムクロマトグラフィーを行った。溶出液は、4 mlずつ分取し、それぞれの有毒画分を調べるとともに、その毒成分についてHPLC分析により求めた。

毒性試験法

マウスを用いた公定法に準じて行った。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

毒成分群 {GTX群, STX群, C (PX) 群} に応じて3種の緩衝液を使い分けて分析をした。GTX群およびSTX群の分析については、第1節のHPLC分析方法と同様に行った。

C (PX) 群については、Oshimaの方法に準じて次の条件で分析を行った⁴¹⁾。

移動相に1 mMリン酸テトラ-n-ブチルアンモニウムをpH 6.0に調整したものをを用い、流速0.8ml/minで分析を行った。移動相以外の条件は、GTX群およびSTX群の分析条件と同様に設定した。

液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)

LC/MSの分析条件をTable 6 に示す。

LC/MSのシステムには、マス部にmicromass社のZsprayTM MS, LC部にalliance 2690EX (Waters) を用いたZMD-Mk LC/MSシステム (Waters) を使用した。イオン化法には、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を採用し、GTX群およびSTX群にはポジティブ・モード (ESI⁺) で、C (PX) 群にはネガティブ・モード (ESI⁻) で分析した。LC部の分析条件は、カラム, カラム温度, 緩衝液, 流速などなどについては上記HPLC法と同じ条件で設定した。LC部からMS部へ導入するところで、スプリッターを用いることによりMS部への流速 (流量) を約1/4の0.2ml/minに調整した。Desolvation温度 (溶媒を気化する) を350 , Source block温度 (イオン化する温度) を120 とし、コーン電圧を30Vにそれぞれ設定した。

Table 6. Condition of LC/MS analysis

LC/MS System

alliance LC/MS system (Waters ZMD)

Condition of liquid chromatography (LC)

HPLC : Alliance 2690XE (Waters)

Column : LiChroCART RP-18(e) (4.6 × 250 mm, Merck)

Column Temp. : 35 °C

Mobile phase :

C-toxins (PXs): 1 mM tetrabutyl ammonium phosphate (pH 5.8)

GTXs: 2mM HSA in 10 mM ammonium phosphate buffer (pH 7.3)

STXs: 2mM HSA in 4% acetonitrile-30 mM ammonium phosphate buffer (pH 7.3)

Flow rate : 0.8 ml/min

Condition of mass spectrometry (MS)

Ionization : ESI⁺ for GTXs and STXs

ESI⁻ for C-toxins (PXs)

Desolvation Temp. : 300-350 °C

Sourceblock Temp. : 120 °C

Cone Voltage : 30-50V

Flow rate : 0.2 ml/min

結果および考察

Bio-Gel P-2の蒸留水溶出画分の毒溶出パターンをFig.17 に、0.03M酢酸溶出画分の毒溶出パターンをFig.18にそれぞれ示した。Bio-Gel P-2の水溶出画分ではフラクション (Fr.) 39 ~ 47に毒性が認められた。水溶出画分の総毒量は約1,400MUであった。これらの各有毒画分をHPLCで分析したところ、PX1 (C1) とPX2 (C2) の混合物であった。次に、0.03 M酢酸で溶出した結果、Fr.133 ~ 154に毒性が見られ、ここでの総毒量は約10,500MUであった。この有毒画分をHPLCで分析した結果、GTX群とSTX群の混合物であった。これらPX (C) 画分 (Fr.39 ~ 47), GTX & STX画分 (Fr. 133 ~ 154) をそれぞれ合一し、次の精製過程に用いた。なお、0.05 M酢酸で溶出したフラクション (10ml × 100Fr.) から

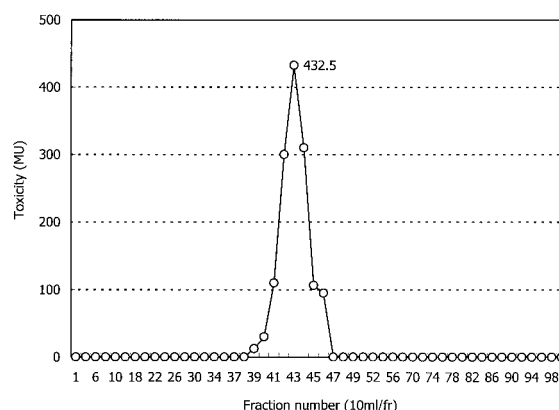


Fig. 17 Elution profile of scallop, *Chlamys nobilis* toxin from Bio-Gel P-2 column.
(Distilled water fractions : Fr.1-100)

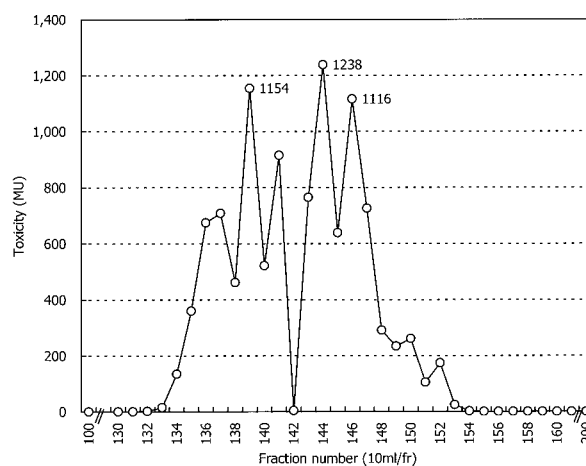


Fig. 18 Elution profile of scallop, *Chlamys nobilis* toxin from Bio-Gel P-2 column.
(0.03 M acetic acid fractions : Fr.101-200)

は全く毒性は認められなかった (<10MU/Fr.)。

Bio-Gel P-2で分離した有毒画分の内、GTX&STX画分 (Fr.133 ~ 154) について濃縮したものをBio-Rex 70カラムに供した。溶出液は0から0.05M (400ml) および0.05から1.5M (400ml) の酢酸を2ステップ・リニアグラジエントで濃度勾配をかけて毒を溶出させた。フラクション毎に分取した毒の溶出結果をFig.19に示した。各フラクション4mlずつ分取した結果、0-0.05MでFr.42 ~ 65に毒性が確認された。総毒量は約5,000MUであった。HPLC分析により毒成分を確認したところ、標品のRtと一致するGTX6, dcGTX2, dcGTX3, GTX5, GTX3, GTX2の6成分が確認できた。0.05-1.5M酢酸溶出画分では、Fr.141 ~ Fr.146に毒性が確認された。この6フラクションの総毒量は約2,500MUであった。HPLC分析により、標品のRtと一致するneoSTX, dcSTX, STXの3成分が確認された。

以上より、毒化したヒオウギガイ中腸腺の毒を精製した結果、毒成分はHPLC分析によってC1,2 (PX1,2), GTX2,3, GTX5,6, dcGTX2,3, neoSTX, dcSTX, STXの11成分が

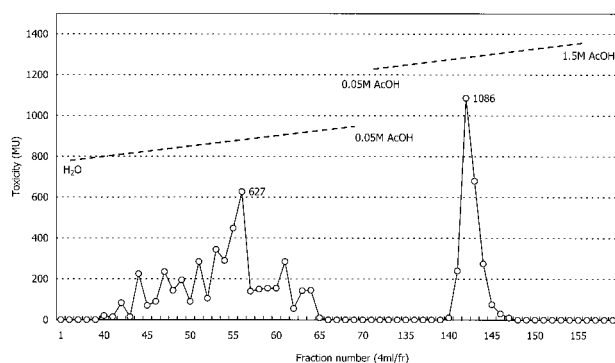


Fig. 19 Elution profile of scallop, *Chlamys nobilis* toxin from Bio-Rex 70 column.

含まれていた。最終的に各精製過程の回収率の違いもあるが、C (PX) 群：1,400MU, GTX群：5,000MU, STX群：2,500 MUと毒量ではGTX群が高い値を示した。

LC/MS

ネガティブ・モードでBio-Gel P-2水溶出画分 (PX群：Fr. 39~47) の分析した結果、C1,2 (PX1,2) の $[M-H]^-$ m/z 474および $[M-H_2O-H]^-$ m/z 456のSIR (選択イオン) でRtが4.1分と5.3分にピークを得た (Fig.20)。それぞれのリテンションタイムにおけるマススペクトルを見ると、C1 (PX1), C2 (PX2) とともに m/z 474のピークがみられ、またPX2のスペクトルには脱水ピークである $[M-H_2O-H]^-$ の m/z 456も確認できた (Fig.21)。

Bio-Rex70において0.05-1.5M酢酸で溶出させたFr.42~65の有毒画分 (GTX群) についてポジティブ・モードで m/z 300, 316, 353 のSIR (選択イオン) でそれぞれマスクロマ

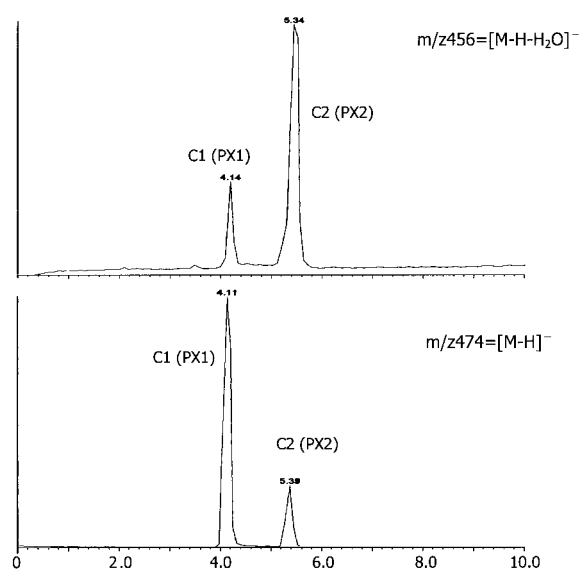


Fig. 20 LC/MS chromatograms of C1 (PX1) and C2 (PX2).
Monitor ions : m/z 456 (upper) and m/z 474 (lower)

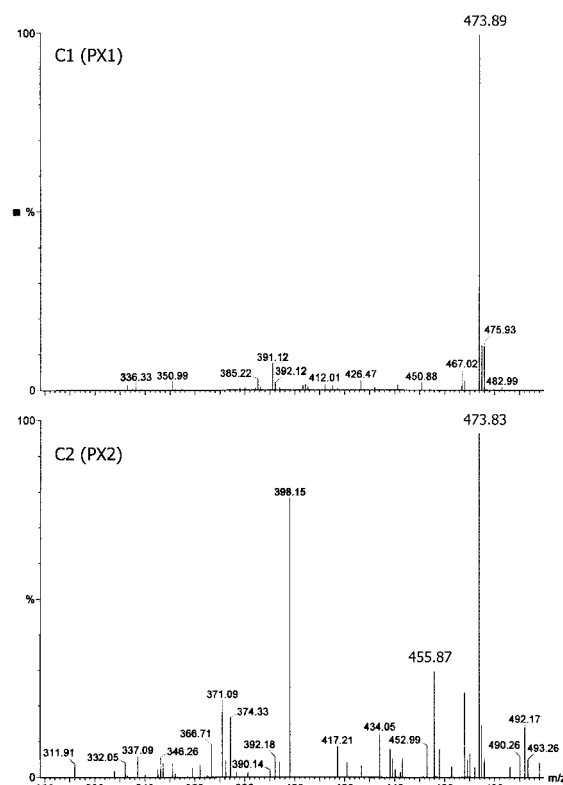


Fig. 21 LC/MS spectra of C1 (PX1) (upper) and C2 (PX2) (lower).

トグラムをモニターした結果、 m/z 300では、Rt 9.4分にGTX5の $[M+H-SO_3]^+$ を示すピークが得られ、 m/z 316でRt 4.8分にGTX6の $[M+H-SO_3]^+$ が、Rt 10.5分にはGTX3の $[M-SO_3+H]^+$ 、Rt 15.2分にはGTX2の $[M-SO_3+H]^+$ のピークをそれぞれとらえることができた。また、Rt 8.6および9.4分にはPSPの成分に関連すると思われるunknownのイオンピークも出現した。また、 m/z 353では、Rt 8.9分とRt 10.4分にdcGTX3とdcGTX2の $[M+H]^+$ のイオンピークがそれぞれ確認された (Fig.22)。

Bio-Rex70において0.05-1.5 N酢酸で溶出させたFr.140~146の有毒画分 (STX群) についてpositive modeで m/z 257, 273, 300, 316のSIR (選択イオン) でそれぞれマスクロマトグラムをモニターした結果、 m/z 257では、Rt.13.4分にdcSTXの $[M+H]^+$ のピークが確認され、 m/z 300では、Rt 15.0分にSTXの $[M+H]^+$ 、 m/z 316でRt.7.8分にneoSTXの $[M+H]^+$ のイオンピークがそれぞれ確認された。また、 m/z 273において7.8分にイオンピークを確認し、これはHPLC分析では確認できなかったdcneoSTXであると考えられた (Fig.23)。

以上のことから、LC/MSを用いて分析することにより、ヒオウギガイのPSP成分としてC1 (PX1), C2 (PX2), GTX2, GTX3, GTX5, GTX6, dcGTX2, dcGTX3, STX, dcSTX, neoSTX, dcneoSTXの12成分が確認された。これは、蛍光HPLC分析では分離、検出ができなかった成分 (dcneoSTX) が検出されたり、未確認の成分と思われる分

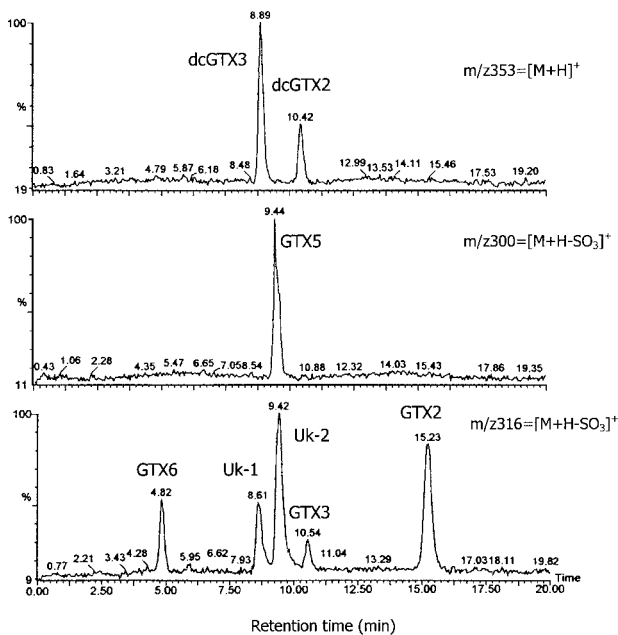


Fig. 22 LC/MS chromatograms of GTX fraction.
Monitor ions: m/z 353 (upper), m/z 300 (middle)
and m/z 316 (lower)

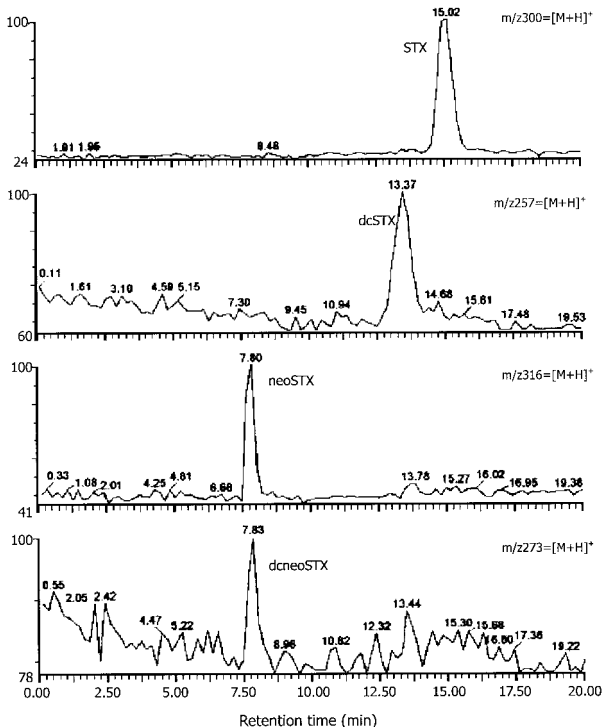


Fig. 23 LC/MS chromatograms of STX fraction.
Monitor ions: m/z 300, m/z 257, m/z 316 and m/z
273

子イオンピークが見られたりするなど、MS検出器の有用性が見られ、今後検出感度の問題などを解決することなどにより、PSP成分の貝体内での分解・代謝成分などが確認できる可能性が考えられた。

第3節 熊本県天草宮野河内湾

熊本県では、1994年に *A. catenella* による二枚貝の毒化が起こって以来、天草諸島の宮野河内湾で天然のマガキやアサリが、天草崎湾では養殖ヒオウギガイが毒化してきた。PSP産生渦鞭毛藻としては、*A. catenella* 以外に八代海などで *G. catenatum* のシストが確認されている⁴¹⁾ が、本種による大量発生と貝類の毒化はこれまで起こっていなかった。しかし、1998年1月に宮野河内湾において *G. catenatum* のブルームが発生し、マガキやアサリなどの二枚貝を毒化させた。本節では、熊本県天草宮野河内湾における有毒渦鞭毛藻の出現の推移と、マガキの毒性の変化を調べ、有毒渦鞭毛藻の発生と二枚貝の毒化の関係を調べた。また、両者の毒成分を調べることで両者の毒成分の特徴を捉えた。

1. 有毒渦鞭毛藻の発生とマガキの毒化状況

試料および方法

マガキ試料

試料には、1998年1月から1999年3月に熊本県天草宮野河内湾 (Fig.24) で採取された天然マガキ *Crassostrea gigas* を用い、可食部について公定法に基づいて毒性を調べた。

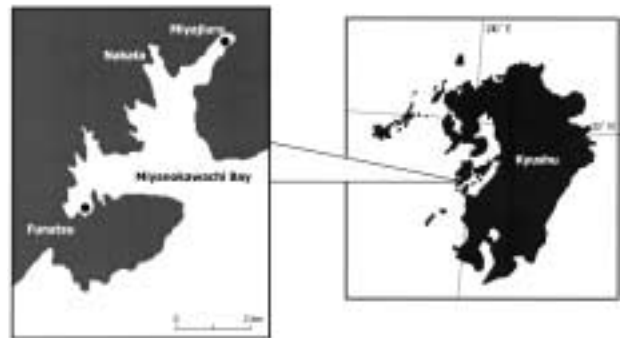


Fig. 24 Map of Miyakawachi Bay, Kumamoto Prefecture

渦鞭毛藻試料

有毒渦鞭毛藻の種の判別および出現数 (細胞密度) については、熊本県水産研究センターの結果に基づいた⁴²⁾。

結果および考察

1998年1月～7月

1998年の宮野河内湾における毒化状況をFig.25に示した。1998年1月中旬に熊本県天草下島の宮野河内湾において天然マガキおよびアサリの毒化が報告された。調査の結果、原因プランクトンは *G. catenatum* であることが判明した。宮野河内湾の北東部に位置する宮地浦、北部に位置する中田および南西部にあたる船津の3地点を定点として *G. catenatum* の発生状況と二枚貝の毒力を調べたところ、宮地浦では、1月16日に *G. catenatum* が113,150cells/L確認され、1月22日に赤潮となり、最大細胞密度である627,000cells/Lを記録した後、急激に減少し、1月28日の308,000cells/Lの後、2

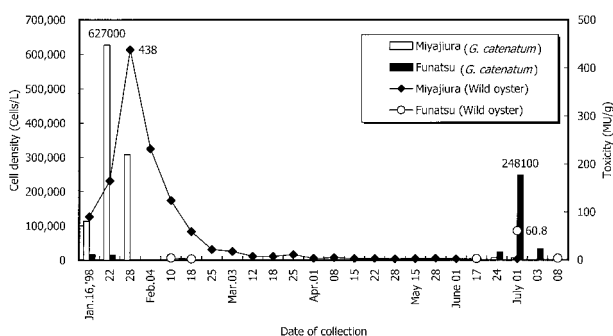


Fig. 25 Seasonal variation of cell number of *Gymnodinium catenatum* and toxicity score of wild oyster collected from Miyanakawachi Bay (Jan.1998-July.1998)

月以降は *G. catenatum* はほとんど消失した。天然マガキの毒性は、*G. catenatum* が最大細胞数を記録した1月22日に165MU/gとなり、その1週間後、438MU/gの最高毒性値を記録し、その後減少に転じた。しかし、マガキの毒化は長期化を呈し、*G. catenatum* がほとんど消失した2月4日でも232MU/gの毒性があり、4月初めにようやく出荷規制値（4 MU/g）を下回った。アサリの毒性はマガキほど高くなく、1月28日に最高毒性65.6MU/gを記録した後、速やかに減少し3月初旬には規制値以下になった。同じ海域において、マガキとアサリで毒化の大きさに大きな違いが出ているのは、マガキが潮間帯に生息するのに対し、アサリは海底の砂地などに生息するという生息域の違いによるもの（原因プランクトンの摂食量の差）あるいは毒の蓄積効率が貝の種類により違うことが推察された。宮地浦の西部にある中田でも、宮地浦と同じような *G. catenatum* の出現とマガキの毒化パターンを示し、最大細胞数が250,000cells/L（1月22日）、最高毒性値321MU/gを記録した。また、宮路浦とほぼ同時期に規制値を下回った。これに対し、宮野河内湾南西部の船津では、最大細胞数は16,200cells/L（1月16日）と北部の2地点より1桁以上少ない細胞密度で出現し、マガキの毒性も2月の中旬に規制値を下回った。

G. catenatum は、4月以降宮野河内湾全域で出現していなかったが、6月初旬に再び3地点で確認された。最大細胞数は宮地浦で6,670cells/L（7月1日）、中田で11,640cells/L（7月1日）と、宮野河内湾北部ではあまり高密度にならなかったため、マガキは中田で6月17日～24日の期間5.9-7.2 MU/gと規制値を若干上回っただけであった。しかし、宮野河内湾南西部の船津では、7月1日に248,100cells/Lの細胞密度となり、マガキの毒性は60.8MU/gまで上昇した。*G. catenatum* の出現およびマガキの毒化期間は約1ヶ月で、海水温度が25℃を越す時期に *G. catenatum* が高密度に発生した。このようなことはこれまでにない現象であった。

1998年の宮野河内湾では、冬季に湾北部の宮地浦や中田で *G. catenatum* の大量発生が見られ、また7月には、湾南西部で大量発生し、いずれもマガキを毒化させた。

1998年12月～1999年3月

1998年12月から1999年3月にかけて宮野河内湾で有毒プランクトンの発生が見られ、二枚貝が毒化した。この時は、*A. catenella* と *G. catenatum* の2種のPSP産生プランクトンが確認された。宮野河内湾宮地浦、中田および船津におけるこれら2種のプランクトンの出現細胞密度および天然マガキの毒性をFig.26に示した。宮地浦では、12月11日に2種のプランクトン *A. catenella*、*G. catenatum* の発生が確認され、12月17日には *A. catenella* が最高密度113,270cells/Lになり、同月28日には *G. catenatum* が最高密度8,050cells/Lを記録した。両種の細胞数はその後速やかに減少した。この時、12月中旬頃からマガキの毒化が認められ、*A. catenella* が最高密度を記録して4日後（12月21日）最高毒力84.1MU/gまで上昇し、その後、*A. catenella* の減少とともにマガキの毒性も低下した。1999年1月12日には8.5MU/gまで低下したが、翌週（1月18日）には、両種とも再び増加し（*A. catenella*: 15,000cells/L, *G. catenatum*: 5,640cells/L）、マガキの毒性も2月2日には15MU/gに上昇した。その後、プランクトンの減少につれて毒性も減少した。

中田においても宮地浦と同様に *A. catenella* と *G. catenatum* の発生が同時期に確認された。最高密度は *A. catenella* が13,660cells/L（12月21日）と宮地浦の10%程度しか出現しな

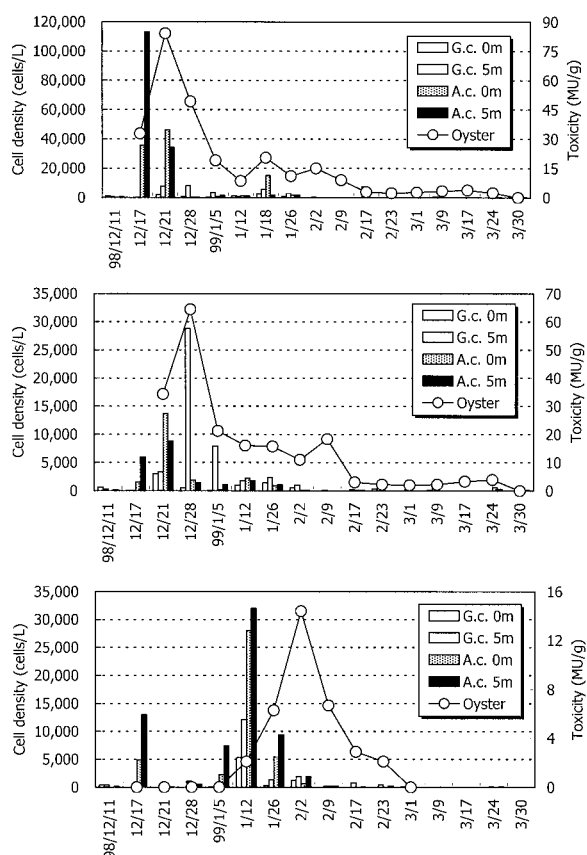


Fig. 26 Changes in cell density of G.c. and A.c. and toxicity of oyster. (upper: Miyajima; middle: Nakata; lower: Funatsu)

かった。しかし、*G. catenatum*は12月28日に28,770cells/Lの最高密度を示し、マガキの毒性が最高毒性値64.4MU/gまで上昇した。中田でのマガキ毒性の上昇については*G. catenatum*による影響が大きかったものと思われた。その後、両種の渦鞭毛藻の減少に伴い、マガキの毒性は減衰し、2月中旬には、出荷規制値を下回った。

船津では、宮地浦や中田のプランクトン出現パターンとは異なり、1月の中旬頃に最高密度で、*A. catenella*が32,000cells/L、*G. catenatum*が12,090cells/Lに達した。*A. catenella*が30,000cells/L以上の出現にもかかわらず、二枚貝の毒性は1月18日に最高毒性値14.4MU/g程度であった。有毒渦鞭毛藻の減少後の2月中旬には4 MU/gを下回った。

熊本県天草宮野河内湾の3地点における有毒渦鞭毛藻の発生状況をみると、北部地方（宮地浦、中田）から有毒プランクトンが出現し始め、遅れて南部地域の船津で出現することがわかる。*A. catenella*の出現数は宮地浦が最も多く、マガキの毒性も84MU/gと最も高かった。中田と船津では、種が違ふものの、出現数が30,000cells/L程度とほぼ同じであったが、マガキの毒性が4倍以上の差があった。*A. catenella*と*G. catenatum*による二枚貝の毒化に大きな差があった。

以上の結果から、マガキの毒性は原因プランクトンの出現数の増減に対し、4日～1週間程度遅れて対応するという傾向が見られた。また、発生していた原因プランクトンの細胞数が減少するとマガキの毒力も速やかに減少した。マガキの毒は、アサリやムラサキイガイと同じく、プランクトン消失後10日から1ヶ月程度で無毒化した。

2. *G. catenatum*および天然マガキの毒成分

1998年の熊本県宮野河内湾では、1月と7月の2度にわたり*G. catenatum*のブルームが出現したが、このときの最多細胞数を記録した時の発生水温は、1月期で約13℃、7月期では約24℃と大きく異なっていた。このことから、両時期のマガキおよび*G. catenatum*の毒性と毒成分を調べ、その毒性の違いを比較した。また、1998年12月からの毒化では、*G. catenatum*に加えて*A. catenella*も出現していたことから、この2種の有毒渦鞭毛藻によって毒化したマガキについても同様に毒成分を調べ、その特徴について検討を行った。

試料および方法

マガキ試料

試料には、1998年1月に熊本県天草宮野河内湾宮地浦および、同年7月に同湾船津、で採取した天然マガキ*Crassostrea gigas*、1998年12月に宮地浦および中田でそれぞれ採取した天然マガキを用いた。試料は採取後直ちに冷蔵して研究室へ送付され、試験に供するまで-40℃で凍結保存された。

渦鞭毛藻試料

1998年1月28日および同年7月9日に宮野河内湾において表層の海水1Lを採水し、直ちに冷蔵で長崎大学水産学部の研究室まで送付された。1月の試料は、1Lの海水の内600mlを毒の抽出用に、残りを顕微鏡観察による種判別用およ

び有毒種の単離、クローニング用に用いた。7月の試料は、10Lの海水を抽出に用いた。

なお、有毒渦鞭毛藻の出現数（細胞密度）については、熊本県水産研究センターの結果に基づいた⁴²⁾。

抽出方法

マガキ：マガキの毒の抽出は前節と同様に行った。

渦鞭毛藻：試料の海水600mlをNo.1フィルター（ADVANTEC TOYO）でろ過し、残ったろ紙につき、細かくきざみ、80%エタノールを酢酸でpHを3.5に調整したものを5ml加え、氷水中で冷却しながら30秒間超音波処理を行った。抽出液は遠心分離し、得られた残渣について更に2回同様な抽出操作を繰り返した。得られた上清を合一し、エバポレーターで濃縮し、酢酸およびエタノールを除去した。次に、濃縮済み試料を3mlにメスアップし、0.45μmセルロース・アセテート膜を通過させた。通過液をHPLC分析に供し毒性を調べた。

HPLC分析

HPLC分析は第1章第1節2の方法によった。

結果および考察

1998年1月および7月におけるPSP：

Fig.27およびFig.28に1998年1月に宮地浦および7月に船津でそれぞれ採取された天然マガキおよび渦鞭毛藻試料をHPLC分析により得られたクロマトグラムを示した。また、Table 7には、これらの結果をもとに算出して得られたそれぞれのPSP成分組成をモル比（mol%）で示した。1月採取のマガキからはGTX群にC（PX）群と思われる高いピーク

Table 7. Toxin composition of oyster and *G. catenatum* collected from Miyanakawachi Bay, Kumamoto

Jan. '98	(mol%)	
Component	Oyster	<i>G. catenatum</i>
C1 (PX1)	53.7	25.2
C2 (PX2)	25.9	63.3
GTX5	3.8	2.5
GTX6	7.1	3.3
dcGTX2	5.6	2.1
dcGTX3	2.4	3.5
dcSTX	1.3	tr

tr : Trace (< 0.1mol%)

Jul. '98	(mol%)	
Component	Oyster	<i>G. catenatum</i>
C1 (PX1)	46.3	38.0
C2 (PX2)	16.3	24.0
GTX5	2.8	0
GTX6	0.4	0
dcGTX2	20.7	20.8
dcGTX3	8.9	17.2

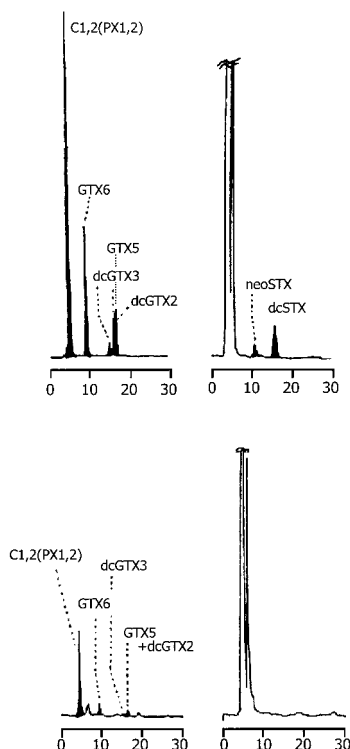


Fig. 27 HPLC chromatograms of oyster toxin (upper) and *G. catenatum* toxin (lower) collected from Miyajiura, Kumamoto (Jan., 1998).

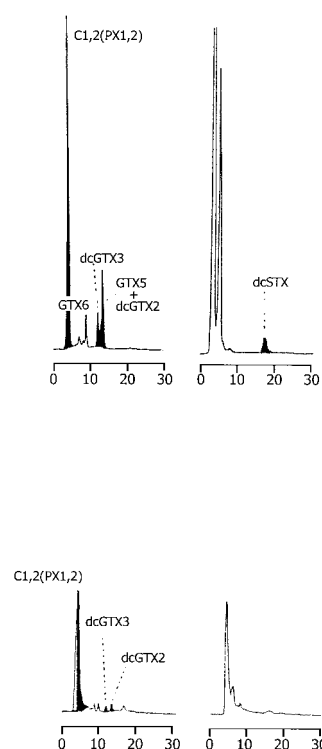


Fig. 28 HPLC chromatograms of oyster toxin (upper) and *G. catenatum* toxin (lower) collected from Funatsu, Kumamoto (July, 1998).

とGTX6,5, dcGTX2,3の4成分のピークが確認された。STX群では、neoSTXとdcSTXの2成分に一致するピークが確認された。また、酸加水分解処理からC (PX) 群の成分はC1 (PX1) とC2 (PX2) の2成分であることがわかった。毒成分組成は、主として低毒性成分である*N*-スルフォカルバモイル毒の成分が見られた。C1 (PX1) が53.7mol%と最も高く、次いで、C2 (PX2) が25.9mol%, GTX6が7.1mol%, GTX5が3.8mol%と低毒性成分が全体の90%以上を占めた。これに対し、同時期に発生していた*G. catenatum*の毒成分は、HPLC分析の結果、7つの既知毒成分のピークを検出し、マガキ同様、PX1,2 (C1,2) およびGTX5,6が主成分であった (94.3mol%)。両者の毒成分組成がほぼ一致したことから、このマガキの毒化が*G. catenatum*によるものであることが明らかになった。

1998年7月に船津で採取された天然マガキでは、PX1,2, GTX5,6, dcGTX2,3の6成分が確認された。各成分のモル比は、C1 (PX1) が46.3mol%, C2 (PX2) が16.3mol%, dcGTX2が20.7mol%, dcGTX3が8.9mol%とこの4成分が主成分として存在し、他にGTX5および6がそれぞれ2.8mol%, 0.4mol%含まれていた。*G. catenatum*の毒成分は、PX1,2およびdcGTX2,3の4成分のみ検出され、その成分比はC1 (PX1) が38.0mol%, C2 (PX2) が24.0mol%, dcGTX2が20.8mol%, dcGTX3が17.2mol%であった。両者の毒成分を比較すると、マガキの毒に含まれているGTX5,6などが*G. catenatum*の毒成分には含まれていないが、C1,2 (PX1,2)

およびdcGTX2,3の含有率がほぼ一致することや、マガキに含有されているGTX5,6が微量であることから、この*G. catenatum*が毒化原因プランクトンであることがうかがえた。

以上の結果より、熊本県天草の宮野河内湾で1998年1月と7月にPSP毒化を引き起こした原因種が*G. catenatum*であることが確認された。1月のマガキ毒化の場合、C1,2 (PX1,2) やGTX5,6などの低毒性成分である*N*-スルフォカルバモイル体の毒成分が主成分としてみられた。これは、山口県仙崎湾や大分県蒲江で発生した例とほぼ一致する毒の組成であった。しかし、7月に船津で本種が高密度化した時の毒成分はC1,2 (PX1,2) およびdcGTX2,3であり、1月のそれとは大きく異なっていた。また、7月は*G. catenatum*の細胞数の割にはマガキの毒性が低かった。*G. catenatum*の毒性が1月発生試料で209.8fmol/cellであったのに対し、7月発生の試料は28.2~45.9fmol/cellで1月試料に比べ1/4~1/8と*G. catenatum*一細胞あたりの毒産生量が低かったことが原因となっていることが推察された。これは、両時期の発生環境を見た場合、水温が1月で13℃、7月が24℃と大きく違いがあり、この差が産生する毒成分に大きく影響した可能性が考えられた。大分では*G. catenatum*が発生した時、水温が20℃を超える頃にはほとんどが減少し急激に消失したが、この時は、20℃を越えてから増加し始めるという、極めて異常な現象であった。水温が24℃にもなった環境で*G. catenatum*が高密度化した原因は不明であるが、産生する毒性および毒成分に大きく影響を与えたことが推察された。

1998年12月～1999年3月におけるPSP:

1998年12月の中旬に宮野河内湾のほぼ全域で*A. catenella*と*G. catenatum*の2種のPSP産生プランクトンが同時に発生しているのが確認され、天然マガキのPSP毒化が確認された。宮地浦および中田において1998年12月～1999年3月に採取された天然マガキの毒成分組成の推移をFig.29に示した。1998年12月28日採取の宮地浦マガキはC1,2 (PX1,2) が57.4 mol%, GTX5,6が5.8%と低毒性成分が約63.2%を占めており、高毒性成分のGTX1,4が17.9mol%, GTX2,3が7.7mol%, STXが0.8mol%と合わせて26.4%占め、その他デカルバモイル体のdcSTX + dcGTX2,3 (10.4%) が確認された。これに対し、中田のマガキの毒成分組成は、C1,2 (PX1,2) が69.5%, GTX5,6が10.6mol%と低毒性成分が約80%を占めており、高毒性成分のSTXおよびGTX1-4が合わせて13.5mol%, その他、デカルバモイル体のdcSTX, dcGTX2,3が確認された。両者の毒成分組成を比較すると、低毒性成分の含有量が宮地浦で63.2mol%, 中田で80mol%であった。これは宮地浦のマガキにGTX1,4の高毒性成分が比較的多く含有されていたため、*G. catenatum*はGTX1,4を産生しないことや、この時の宮地浦でのPSP産生プランクトンの発生状況からも、宮地浦でのマガキの毒化が*A. catenella*による影響を強く受けていることがわかる。中田のマガキには、少しGTX1,4の成分が確認でき、*A. catenella*による影響も見られるが、ほぼ*G. catenatum*の典型的な毒成分組成に近いことから、主と

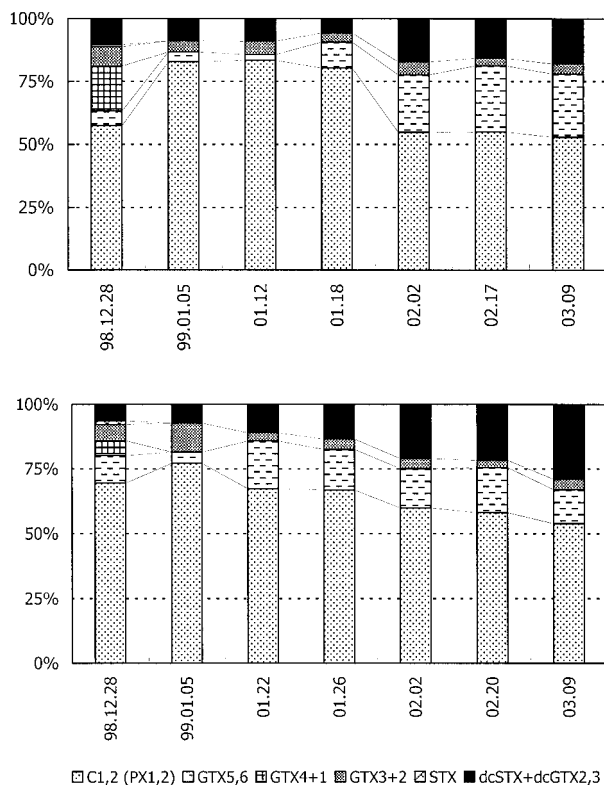


Fig. 29 Changes in toxin composition of oyster collected from Miyajiura (upper) and Nakata (lower), Kumamoto.

して*G. catenatum*の影響による毒化であることが示唆された。

宮地浦産マガキ毒成分のその後の経時変化を見ると、1999年1月5日から1月18日にかけてC1,2 (PX1,2) の割合は80%を超え、STX + GTX1,2,3,4は5%前後まで減少した。2月2日から3月9日にかけてはマガキの毒力が減少するに従って、マガキ中のC1,2 (PX1,2) の占める割合は約55%にまで減少し、dcSTX + dcGTX2,3の占める割合は約16%まで上昇した。

中田で採取されたマガキは、その後、両種のプランクトンが急激に減少し、マガキの毒力が減少するに従って、マガキ中のC1,2 (PX1,2) の占める割合は減少し、dcSTX + dcGTX2,3の占める割合が高くなり、1999年3月9日のマガキ (2.2MU/g) の毒組成はC1,2 (PX1,2) が53.9%, dcSTX + dcGTX2,3が29.0%となった。

以上の結果から、原因プランクトンが消失し、マガキの毒性が減少するにつれて、C (PX) 群の毒成分は減少していき、代わりにデカルバモイル体の毒成分の割合が増加することからも、C (PX) 群の毒成分はマガキから代謝されやすく、デカルバモイル体の毒成分は代謝されにくいという結果が得られた。

第Ⅱ章 長崎県五島列島玉之浦で発生したPSP食中毒事件

1997年3月下旬、長崎県五島列島玉之浦町 (Fig.30) で天然マガキ*Crassostrea gigas*喫食による集団食中毒が起こった。これは、3月24日から27日に玉之浦町およびその周辺住民が玉之浦湾で採取した天然マガキを喫食後、口や手足にしびれなどの症状を示した。これらの症状から典型的な麻痺性

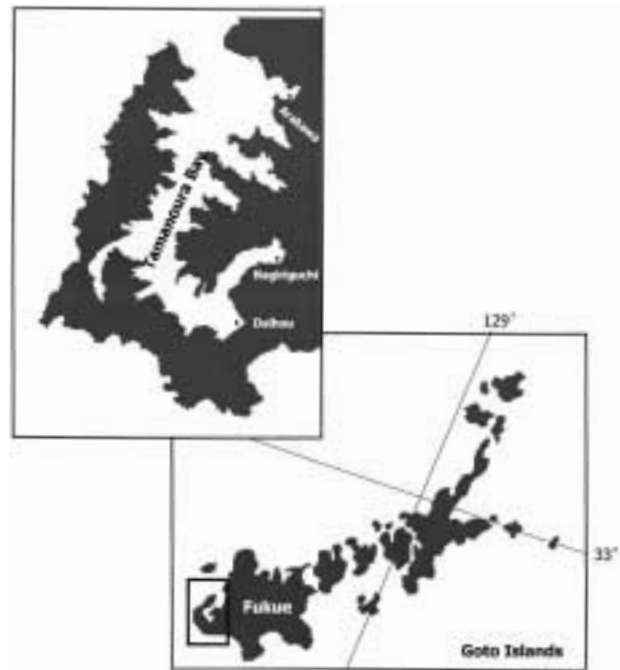


Fig. 30 Map showing the location of Tamanoura Bay, Fukue Island.

貝毒による食中毒が疑われた。中毒した患者は26名で、内9名が入院したが、幸い全員が無事回復した。

本章では、本集団食中毒の疫学調査を行うとともに、玉之浦湾の名切口、大宝郷、荒川郷山浦の3地域において採取した天然マガキの毒性および毒成分を調べることににより、中毒原因の解明を試みた。

1. 中毒事例

平成9年3月下旬に長崎県五島列島玉之浦で天然マガキの喫食による食中毒が発生した。中毒患者に対し、当時の状況に関して聞き取り調査を行って、PSP中毒の実態を検証した。本節では、中毒事例の3例について検討した。

[事例A]

中毒患者：65才、女性、体重46kg

採取日および場所：平成9年3月22日 荒川郷山浦崎

喫食（調理）方法：殻付きをフライパンで14～15個を焼きそれに酒を垂らして、酒蒸にして殻を開け、中身5個程度を夕食時にビールのつまみとして食べた。

中毒症状：22日10時に手指先、口唇のしびれ、吐気、嘔吐がありまた手足がしびれ、体が浮いたような状態であった。翌朝5時、脱力感があったため、午前中病院に行き診察を受けた。24日の昼には味噌汁の味見をしたが、味が分からなかった。残りのカキ4個（剥き身）を入れた汁を二口すったところ、めまいがあり、再入院した。この時も体に浮遊感があり、やがて意識を数秒失った。

診察状況：1回目 血圧は160-96mmHgであった（通常血圧が高く、降圧剤を服用しても、200mmHgである）。治療に、胃洗浄、ステロイド、Vitamin B12の投与を行ったところ、やや落ち着いたので、帰宅した。

2回目 血圧は、116-60mmHg（通常200mmHg）と下がった。治療にはミノファゲンC、メイドン重炭酸が投与された。その後症状は消え、3月27日退院した。

[事例B]

中毒患者：67才、男性、体重65～70kg

（事例Aの夫）

中毒症状：事例Aの妻と同程度のカキ5個を喫食したが、口唇、手足のしびれ、めまい、吐気はあるものの、症状は事例Aに比べてひどくなく、意識を失うことはなかった。事例Aと同様3月24日に入院した。3月26日には症状が消え退院した。

[事例C]

中毒患者：35才、男性

採取日および場所：平成9年3月25日

中須郷（名切口）で採取。

喫食（調理）方法：採取したマガキの殻をはずし、その身をコップ一杯（約100g）を、酢ガキやフライにして朝と夜に喫食した。

中毒症状：3月25日夜、食後2時間で口、手足のしびれがあり、ふらついて歩けなくなった。発症30分後に医院で診察を受けた。

診察状況：血圧は138～78mmHgと平常値よりやや高かった。

上記中毒症状3例からみて、典型的なPSPによる中毒であると思われる。今回のPSP中毒は、玉之浦町やその周辺地域などを含む福江島の住人らが玉之浦湾で採取した天然のマガキを自分たちで料理をして食べた結果起こったもので、中毒患者26名（うち入院患者9名）を出す大規模な食中毒事件であったが、幸い死者は1人も出なかった。事例Aのように、マガキを加熱して調理して食べたにもかかわらず、重症になっていることから、この時のカキの毒性が非常に高かったことが伺える。PSPによる人の最少致死量は3,000MUとされている。

2. マガキおよび原因プランクトンの毒性、毒成分

章 - 1. では、天然マガキの喫食による食中毒患者の中毒の症状から原因を推察したが、中毒症状を呈した患者の全員が玉之浦湾で採取した天然マガキを食べていることから、これが原因食品であることが推察された。そこで、ここでは中毒原因と考えられたマガキの毒性を調べるとともに、マガキの毒化原因についても検討した。

試料および方法

試料

試料には、1997年3月28日に長崎県五島列島玉之浦湾の名切口、大宝郷、荒川郷山浦の3地区において採取した天然マガキ *Crassostrea gigas* を用いた。採取したカキ試料は冷蔵し、研究室へ速やかに送付し、実験に供した。また、毒化した海域で海水を採水し、毒化原因プランクトンの同定および毒成分分析用に供した。

天然マガキからPSPの抽出

毒の抽出は、「食品衛生検査指針」中の麻痺性貝毒検査法に準じて行った。まず、マガキの殻を剥き、可食部をホモジナイズしたものに等量の0.1M塩酸を加え加熱により抽出して得られた毒抽出液をマウスアッセイに用いた。

HPLC用の試料は、マガキ可食部のホモジネートに等量の酢酸を加えて抽出し、ジクロロメタンで脱脂後、分画分子量1,000da.の限外ろ過（YM-1, Amicon）に供した。

プランクトンの毒の抽出

採取した海水10LをNo. 1 フィルターに通過させ、プランクトンを濾したろ紙を得た。得られたろ紙は細かくきざみ、0.1M酢酸を加え、超音波下で抽出し、0.45 μ mのメンブランフィルターに通過させたものをHPLC分析に供した。

HPLC分析方法

HPLC分析方法には、前章と同様の方法によった。

結果および考察

マガキの Maus 毒性試験の結果をTable 8 に示した。3 地区で採取されたマガキの毒性は名切口で96 ~ 115 MU/g (平均102.3MU/g), 大宝郷で7.1 ~ 55.1MU/g (平均43.8MU/g), 荒川郷で13.3 ~ 135MU/g (平均75.4MU/g) であった。この毒性結果から、名切口のマガキで30 g 以上喫食すると、生命に危険があったと推測された。中毒患者に対する聞き取り調査から、中毒患者の多くがこのマガキを25 g 程度の喫食であったために死亡者が出なかったものと考えられる (最少致死量: 約3,000MU)。

Table 8. Toxicity of wild oysters collected from Tamanoura Bay

Sample number	Toxicity (MU/g)		
	Nagiriguchi	Daiho-go	Arakawa-go
1	115	49	13
2	102	57	15
3	96	7	104
4	100	51	135
5	99	55	110
Ave.	102	44	75

3 地区で採取したマガキの毒成分をHPLC分析により調べた結果、3 地区ともほぼ同様の毒成分を示した。名切口の試料のHPLCクロマトグラムをFig.31に示した。低毒性成分であるC1,2 (PX1,2) およびGTX5,6や、デカルバモイル体のdcGTX2,3, dcSTXおよびneoSTX (dcneoSTX), GTX2,3の10成分のピークが確認された。各成分のモル%を調べた結果、主成分として、C1 (PX1) が58.8 ~ 65.6mol%と最も高く、次いでC2 (PX2) が19.1 ~ 20.2mol%とC (PX) 群の2成分で79 ~ 85.5mol%を含有した。副成分として、GTX5 (2.2 ~ 2.3mol%), GTX6 (1.8 ~ 2.9mol%), dcGTX2 (7.5 ~ 10.7 mol%), dcGTX3 (2.1 ~ 3.5mol%) 等が見られ、GTX2,3やdcSTXなどもわずかに確認された (Table 9)。これらマガキの毒成分組成のパターンは、大分や熊本で*G. catenatum*により毒化した二枚貝の毒成分パターンと類似していた。

3月28日から4月15日にかけて、玉之浦湾ではプランクトンの赤潮化は確認されておらず、3月28日の海水を濃縮し、顕微鏡による存在種の確認と毒成分分析を行った。3月28日の海水から検出された渦鞭毛藻は小型のアレキサンドリウム属で、これまで日本で確認されているPSP産生プランクトン

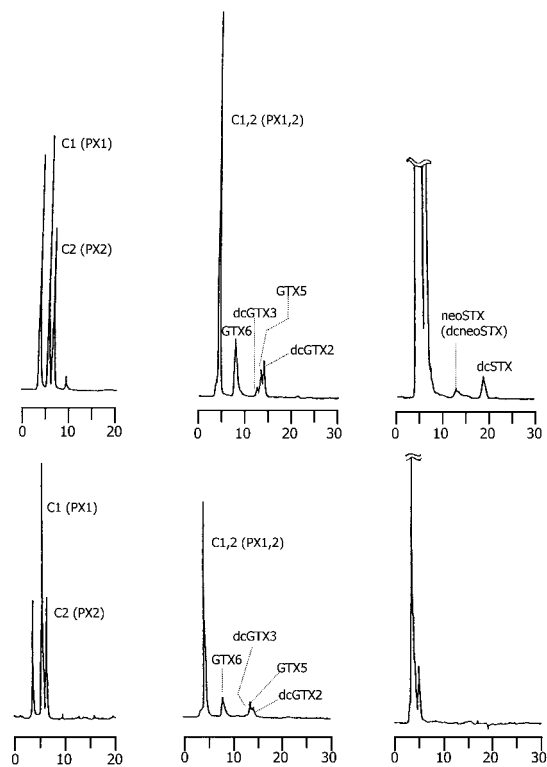


Fig. 31 HPLC chromatograms of oyster toxin (upper) and plankton toxin (lower) collected at Nagiriguchi, Tamanoura Bay.
[left: C-toxins(PXs); center: GTXs; right: STXs]

Table 9. Toxin compositions of wild oysters and causative plankton

Component	Oyster			Plankton
	Nakiriguchi	Daihou-go	Arakawa-go	
C1(PX1)	61.9	65.6	58.8	65.2
C2(PX2)	19.1	19.9	20.2	23.0
GTX6	2.5	1.8	2.9	1.3
GTX5	2.2	2.3	2.3	1.8
GTX2	0.7	tr	1.1	0
GTX3	tr	tr	tr	0
dcGTX2	10.7	7.5	10	6.0
dcGTX3	2.3	2.1	3.5	2.7
dcSTX	tr	tr	1.1	0
neoSTX	tr	tr	tr	0

tr: Trace (<0.5 mol%).

Alexandrium tamarense, *A. catenella*, *G. catenatum*の3種は全く確認されなかった (Table 10)⁴³⁾。しかし、海水をろ過し、抽出した試料のHPLC分析の結果、PSPの毒成分が確認された。プランクトンの毒成分もマガキと同様、低毒性成分を主成分としており、C1 (PX1) が65.2mol%, C2 (PX2) が23.0mol%と、全体のC (PX) 群が90%近くを占めていた。副成分としてGTX5,6およびdcGTX2,3が見られた (Fig.31, Table 9)。今回、海水中からは、*Alexandrium andersonii*⁴⁴⁾、や*A. insuetum*, *A. minutum*⁴⁵⁾等、海外で

Table 10. The formation of the plankton in the seawater collected of Tamanoura Bay*

Species	Content(%)
<i>Alexandrium andersonii</i>	48
<i>Alexandrium insuetum</i>	13
<i>Prorocentrum sigmoides</i>	33
<i>Protoperidinium</i> spp.	4
<i>Dinophysis</i> sp.	1
<i>Ceratium pentagonum</i>	1

Alexandrium minutum : only 1 cell was confirmed.

* Yoshida *et al.* 1997

毒産生が疑われている種が確認されているが、今のところ、毒化原因種の特定には至っていない。また、玉之浦湾の泥中から *G. catenatum* のシストが確認された⁴⁶⁾ ことや、毒成分組成が日本の *G. catenatum* の毒成分パターンに類似する点などから、今回のマガキの毒化原因種が *G. catenatum* である可能性が高い。

今回の毒成分分析の結果、原因プランクトンとそれにより毒化したマガキの両者ともに低毒性成分を主成分としていたが、マガキの毒性は100MU/gを超える毒が蓄積し、26名もの中毒者を出す結果となったことから、含有毒成分が低毒性のものであっても非常に危険であるといえる。

第三章 *G. catenatum* の培養条件によるPSP毒産生能

PSP産生プランクトンの一種である *G. catenatum* は、日本ではこれまで山口県仙崎湾でのみ二枚貝の毒化例が報告されていたが、近年、九州においても大分、熊本などで連続して *G. catenatum* の発生に伴う二枚貝の毒化が起こっている。熊本県天草宮野河内湾では、1998年1月と7月の2度にわたり *G. catenatum* による二枚貝の毒化が起こった。この時、それぞれの時期に採取された天然の *G. catenatum* の毒成分および毒産生量は大きく異なっていた。

G. catenatum による二枚貝の毒化はオーストラリアやスペインなど世界各地で起こっており、*G. catenatum* が産生するPSPの毒成分は、株あるいは生息地域により、その毒成分組成に違いがあることが報告されている。ここでは、異なる条件下で *G. catenatum* を培養することにより、熊本県天草で採取した *G. catenatum* の毒産生能を調べた。

1. 日照時間の違いによる影響

G. catenatum の日照時間（明暗周期）の違いによる培養を行い、プランクトンの毒産生量および毒成分組成の変化を調べた。

試料及び方法

試 料

試料は、1998年1月に熊本県天草宮野河内湾宮地浦で採取された海水の中から分離され、18、明暗周期16-8 (L-D) で

継代培養されていた株を用いた。

培地および培養方法

プランクトン培養のための培地には、海水にチアミン、ニコチン酸、ピオチンなどのビタミン類 (S-3 vitamins) やマンガン、亜鉛、コバルトなどの金属類 (P1 metals) を添加した改変SWM-培地を使用した (Table 11)。

培養温度は18℃に固定し、照度3,000 lxのインキュベーター内で1日の日照時間を8-16, 10-14, 12-12, 14-10 (明-暗) に設定して培養した。前培養として、16-8 (L-D)、18℃の条件で培養された *G. catenatum* の株から各100cells/mlの密度になるように植え継ぎ、定常期に達するまでそれぞれの条件下で培養を行った。

各条件下で培養した *G. catenatum* が定常期に達したら、再度100cells/mlになるように植え継ぎ、試験に供した。

Table 11. Medium composition of SWM-

Components	(sea water 1,000 ml)
NaNO ₃	170 mg
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	16 mg
Na ₂ SiO ₃	24 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.5 mg
Na ₂ EDTA	11 mg
H ₂ SeO ₃	2.6 mg
TRIS	500 mg
P1 Metals	
H ₃ BO ₃	62 mg
MnSO ₄ ·5H ₂ O	8.4 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.2 mg
CoCl ₂ ·7H ₂ O	2.8 μg
CuCl ₂ ·5H ₂ O	2.5 μg
S-3 Vitamins	
Thiamine-HCl	0.5 mg
Nicotinic acid	0.1 mg
Ca-Pantothenate	0.1 mg
P-Amino benzoic acid	10 μg
Biotin	1.0 μg
myo-Inositol	0.5 mg
Folic acid	2.0 μg
Cyanocobalamin	1.0 μg
Thymin	0.3 μg

毒の抽出方法および試験液の調製

プランクトンからの毒の抽出は、各条件について定常期に到達後、それぞれ 1.0×10^5 細胞を計り取り、1,500 × g で10分間遠心分離した。得られた上清をピペットで注意深く取り除き、沈殿した細胞に約10倍量の0.05mol/L酢酸を加え、氷水中で30秒間超音波抽出を行った。次に、3,000 × g で10分間再度遠心分離を行い、上清と残渣に分けた。残渣については、同様の操作をさらに2回繰り返し、得られた上清を合し、蒸留水で5 mlに定容した。定容したものについて、0.2 μmセルロース・アセテート膜 (ADVANTEC) を透過させ、透過液について限外ろ過 (MILLIPORE) に付し、10,000da以下の画分を試験液とした。

HPLC分析

*G. catenatum*の毒産生量および毒成分については、第章のHPLC-蛍光分析と同様により求めた。

結果および考察

*G. catenatum*の増殖速度

Fig.32に各条件下における増殖曲線を示す。各条件とも培養開始後5日目から増殖速度が増し始め、10-14 (明期-暗期, L-D) および14-10 (L-D) 条件の培養株は培養開始16日目ですべて6,000cells/mlの最高細胞密度に達した。8-16 (L-D) および12-12 (L-D) の培養株は培養開始22日目ですべて8,700cells/ml, 5,100cells/mlで最高細胞密度に達した。4条件とも最高細胞密度に達した後*G. catenatum*の密度は減少した。

4条件において*G. catenatum*の培養をした結果、増殖速度について多少の違いは見られたが、日照条件と相関的な相違は確認できず、ほぼ同様の増殖曲線を示したことから、*G. catenatum*の増殖は日照条件によってあまり大きな影響は受けないことが示唆された。

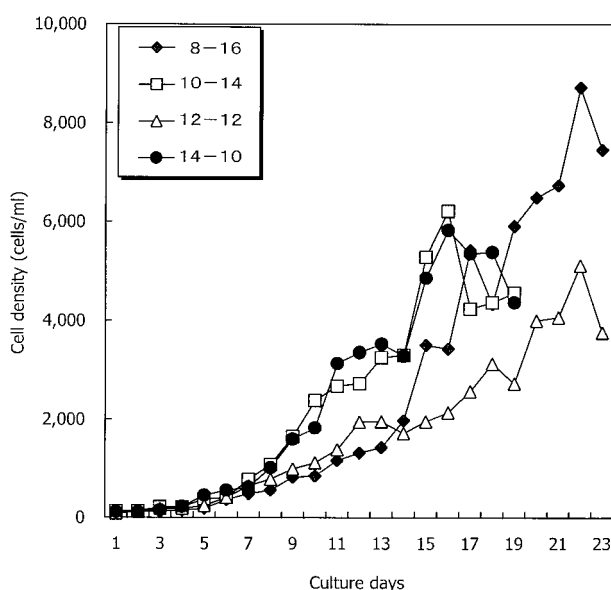


Fig. 32 Changes in the cell density of *G. catenatum* cultured under each L-D cycle.

毒産生量および毒成分組成

Fig.33に各条件下での毒成分量および毒成分組成を示した。

各条件いずれも主成分は低毒性成分であるPX1,2, GTX5, 6を含み、微量な成分としてdcGTX2,3も検出された。また、GTX1~4およびSTX群などの高毒性成分は含まれていなかった。C (PX) 群では、いずれの条件でもC2 (PX2) が高い割合で含まれており、特に8-16 (L-D) 条件では71.1fmol/cell (70.1mol%) と高く、10-14 (L-D), 12-12 (L-D), 14-10 (L-D) ではそれぞれ37.7fmol/cell (50.6mol%), 51.8 fmol/cell (57.3mol%), 49.9fmol/cell (59.3mol%) と50%

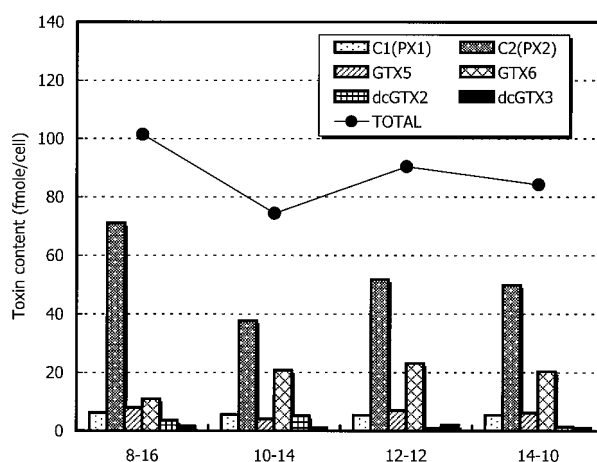


Fig. 33 Comparison of the PSP toxin content (fmole/cell) of *G. catenatum* cultured under each L-D cycle.

近くの割合であった。一方、C1 (PX1) においては、5.4-7.5 fmol/cellと全体の6%程度で条件によりあまり違いはみられなかった。GTX5,6については、8-16 (L-D) において、それぞれ7.8mol%, 10.8mol%と両成分の差がほとんどなかったのに対し、他の3条件 (10-14, 12-12, 14-10) ではGTX6の方が高い毒産生を示した。また、この3条件におけるGTX5,6の毒産生量は、24.9-30.2fmol/cell (31.6-33.5mol%) と類似していた。dcGTX2,3については2.9~8.5mol%と多少の違いはみられたものの含有量が微量 (2.4-6.3fmol/cell) であったので大きな違いはないと考えられた。

各条件におけるC1,2 (PX1,2), GTX5,6, およびdcGTX2, 3の割合に若干の相違がみられたのは、抽出段階において異性体あるいは構造的に似た成分間において容易に成分変換を起こしていることが考えられた。

全体の毒産生量は、8-16 (L-D) では101.4fmol/cellと最も高く、次いで、12-12 (L-D) では90.4fmol/cell, 14-10 (L-D) では84.2fmol/cell, 10-14 (L-D) では74.4fmol/cellと順に低くなった。

以上の結果から、日照条件と*G. catenatum*の毒産生量の間に顕著な相関関係はみられなかったが、日照条件と細胞の増殖速度との関係に着目すると成長の早かった10-14 (L-D), 14-10 (L-D) の条件での毒量は低く、成長の遅かった8-16 (L-D), 12-12 (L-D) が高い毒量を示していることから、増殖速度は毒産生に関与していることが示唆された。

しかしながら、いずれにしても日照条件により*G. catenatum*の毒産生量および毒成分組成に大きな影響を与えることはないと推察された。

2. 培養温度の違いによる影響

熊本県天草宮野河内湾では1998年1月および同年7月の2度に渡り*G. catenatum*のブルームが発生した。この時の二枚貝の毒化状況および*G. catenatum*の発生密度と海水中のプランクトンの毒産生量などから、1月期の方が7月期に発生した*G. catenatum*に比べ、毒産生量が高かった。1月期

では、水温が13℃前後の時に最高細胞密度を記録したのに対し、7月期では、24℃と比較的高い水温時にブルームが発生していた。このことから、環境水温の変化により *G. catenatum* の毒産生能に大きく影響を与えていることが推察されたことから、培養温度の違いによる増殖速度、毒産生量および毒成分への影響について検討した。

試料および方法

試料

試料は、1998年1月に熊本県天草宮野河内湾宮地浦で採取され、分離後、18℃、明暗周期12-12 (L-D) で継代培養されていた株を用いた。

培地および培養方法

培地には、本章第1節と同様の改変SWM-培地を使用した。

培養温度は12、15、18および21℃の4段階の条件を設け、照度3,000 lx.のインキュベーター内で1日の日照時間を12-12 (明-暗) に設定した。前節と同様、前培養を各条件下で行い、定常期近くになった *G. catenatum* の株から各100 cells/mlの密度になるように新しい培地に植え継ぎ、試験に供した。

毒の抽出方法および試験液の調製

毒の抽出および試験液の調製は、前節と同様に行った。

HPLC分析

G. catenatum の毒産生量および毒成分については、第4章のHPLC-蛍光分析により求めた。

結果及び考察

G. catenatum の増殖速度

Fig.34に各条件下における増殖曲線を示す。各条件とも培養開始後4日目までは、ほぼ同様の増殖速度を示していたが、

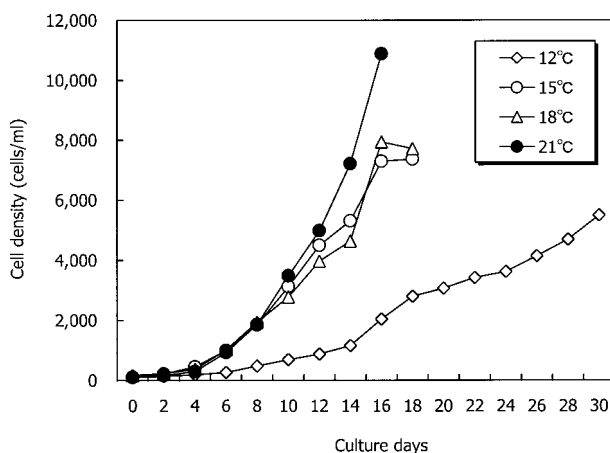


Fig. 34 Effect of temperature on the growth of *G. catenatum*.

徐々に増殖速度に差が見え始め、最高細胞密度は15℃、18℃、21℃で培養開始16~18日目に到達し、細胞数はそれぞれ7,400, 8,000, 11,000 cells/mlであった。12℃においては、極端に他の3条件より増殖速度が遅く、培養開始後30日目で5,000 cells/mlとなった。増殖速度および細胞密度は21℃ > 18℃ > 15℃ > 12℃となり、培養温度が高いほど早く多くの細胞分裂を起こし、温度が低いほど増殖速度が遅く、細胞数もあまり増えないことが明らかになった。

以上のことより、培養温度によって増殖速度および細胞分裂などに大きく影響を与えることが示唆された。

毒産生量および毒成分組成

Fig.35に各条件下での毒成分量および毒成分組成を示した。各条件のいずれも低毒性成分であるPX1,2, GTX5,6の4成分からなり、GTX 1~4やSTX群、デカルバモイル毒群などの高毒性成分は含まれていなかった。C (PX) 群では、いずれの条件でもC2 (PX2) が高い割合で含まれており、全体の71.8-85.8 mol%を占めていた。各条件下での毒産生量では、12℃が最も高く、1細胞あたり314.4 fmolの毒産生が見られた。ついで15℃の239.7 fmol/cellが高く、18℃になると急激に毒産生量が87.5 fmol/cellまで下がり、21℃では12℃の1/4近く低い77.6 fmol/cellしか産生していなかった。この結果、毒産生は12℃ > 15℃ > 18℃ > 21℃となり、培養温度が低いほど毒産生量が多くなることが明らかになった。これは、*G. catenatum* の増殖速度と関係していると見られ、温

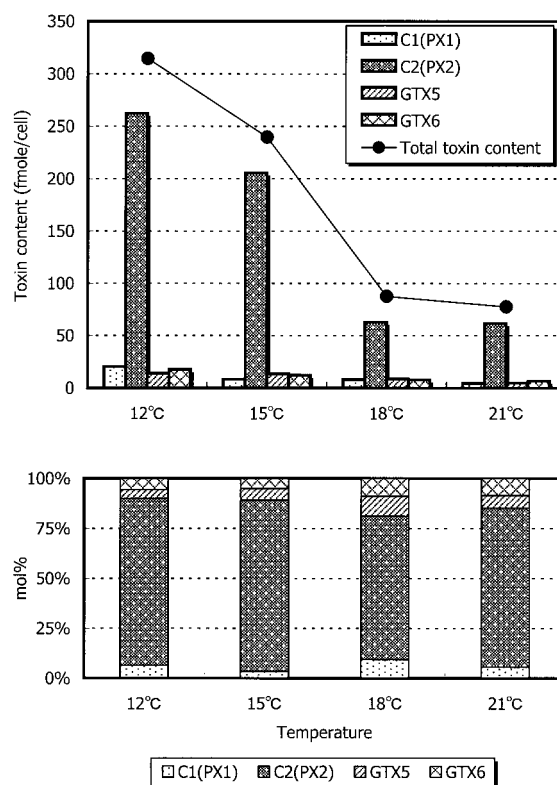


Fig. 35 Effect of temperature on the PSP toxin content (upper) and toxin composition (lower) in *G. catenatum*.

度が高いほど増殖速度は速く、細胞分裂が早く起こっていることが推察される。このため高い水温では *G. catenatum* 1細胞が、分裂するまでにプランクトン内で毒産生を行う時間が短く、水温が低い環境では逆に分裂スピードが遅いことから、1細胞が毒産生を行う時間が長いために毒産生量が高いことが考えられた。

毒成分を見ると、主成分である C2 (PX2) の成分量が最も大きく変化しており、12 で 262.5 fmol/cell 産生しているのに対し、15, 18, 21 ではそれぞれ 205.6, 62.8, 61.8 fmol/cell と温度が上がるにつれて大きく減少していた。これより、C2の毒量の変化(増減)が全体の毒量に影響していることがわかった。C1 (PX1) では、12 で 20.3 fmol/cell と最も高く、ついで 15 (8.3 fmol/cell), 18 (8.1 fmol/cell), 21 (4.31 fmol/cell) となり、最も多かった12

と少なかった21では成分量は16fmol(約4.7倍)の差が見られた。GTX5およびGTX6では、ほとんど同じ産生量を示しており、細かく見た場合、12と21でGTX6の方がGTX5より成分量が多く見られたのに対し、15と18ではGTX5の成分量が多かった。GTX5+GTX6を各条件で比較すると、これも培養温度が低いほど産生量は多く、12 (31.6 fmol/cell) と21 (11.5 fmol/cell) で約3倍の差が見られた。

これらの結果、毒成分間においても、もともとの成分含量の差が大きくC2 (PX2) の増減が目立つが、他の成分もほとんど同じ割合で変化しており、成分により異なった影響はほとんど見られなかった。

以上の結果から、培養温度条件(12 - 21)と *G. catenatum* の毒産生量の間に温度が低いほど毒産生量が高くなるという関係が見られた。これは、温度が高いほど細胞分裂の速度が速く、細胞内で作られた毒が細胞分裂により半減することによる毒性の低下が推察される。しかしながら、15

とほぼ同じ増殖速度を示した18の毒産生量は15の1/3程度しか無く、大きな差がでた。このことから、増殖曲線(増殖速度)と毒産生量の間に明確な相関が見られるとは言えず、毒産生に対して細胞分裂の速度だけが要因では無いことが推察された。

3. 成長段階における毒の産生と代謝

本章では、ここまで日照時間と培養温度の違いによる *G. catenatum* の毒産生について、検討してきた。また、毒産生を比較するにあたっては、成長段階の定常期に達した状態のものについて見てきたが、渦鞭毛藻の生活史の中には、対数増殖期、定常期、死滅期などの成長段階が存在し、それらの段階での毒産生については検討していない。さらに、プランクトンの毒産生能を考える上で、プランクトン細胞内の毒だけではなく、細胞外へ代謝している毒の存在も確認する必要がある。このようなことから、本節では、18 下での培養による *G. catenatum* の成長段階による毒産生量の違いを見るときともに、培地中の毒量も確認し、プランクトン細胞内の毒と細胞外へ出た毒との関係について検討した。

試料および方法

試料

試料は、1998年1月に熊本県天草宮野河内湾宮地浦で採取され、分離後、18, 明暗周期12-12 (L-D) で継代培養されていた株を用いた。

培地および培養方法

培地には、本章1.と同様の改変SWM-培地を使用した。培養温度は18の条件に固定し、照度3,000 lx.のインキュベーター内で1日の日照時間を12-12 (明-暗) に設定した。前節と同様、前培養を同じ条件で行い、定常期近くになった *G. catenatum* の株から各100 cells/mlの密度になるように新しい培地に植え継ぎ、試験に供した。

2日に1度の割合で検鏡により細胞密度のチェックを行い、細胞密度がそれぞれ1,000, 5,000, 7,000 cells/mlに達したときにプランクトンおよび培地中の毒性を検査した。

毒の抽出方法および試験液の調製

プランクトン中の毒の抽出および試験液の調製は、前節と同様に行った。

培地中の毒の抽出は、培地をNo. 1ろ紙でろ過した後、十分洗浄した湿重量15 gの活性炭カラムに、培地を流速4 ml/min.で流しPSPを吸着させ、次に蒸留水80 mlで洗浄し、5%酢酸40%エタノール120 mlでPSPを溶出させた。得られた溶出液を減圧濃縮し、pHを4.0に調整後、5 mlに定容したものを抽出液とした。

HPLC分析

G. catenatum の毒産生量および毒成分ならびに培地中の毒量および毒成分については、第4章のHPLC-蛍光分析法を用いた。

結果および考察

Fig.36に *G. catenatum* の18における増殖曲線と各成長段階における *G. catenatum* の毒産生量と培地中の毒量(1細胞あたり換算)を示した。培養開始6日目に1,000 cells/mlに到達し、12日目には5,000 cells/ml, 16日目には7,000 cells/ml

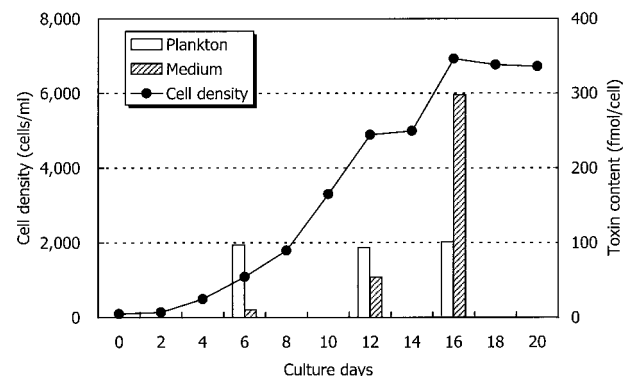


Fig. 36 Toxin content (fmole/cell) of plankton and medium at different cell density cultured at 18.

mlにそれぞれ達した。この時、6日目は対数増殖初期、12日目が対数増殖期、16日目が定常期であったと考えられた。各成長段階でのプランクトンが産生する毒の総量は、細胞密度が1,000cells/mlの時、97.2fmol/cellで、5,000細胞では93.6 fmol/cell、7,000細胞では、101.1fmol/cellと成長段階によりほとんど毒産生量に差は見られなかった。一方、培地中の毒量は、成長が進むにつれて急増しており、細胞密度が1,000細胞の時、10.3nmol/mlであったのが、5,000細胞の時には、268nmol/mlになり、7,000細胞では2,086nmol/mlにまで上昇した。

以上の結果から、*G. catenatum*は増殖段階により毒産生量がほとんど変化しないことが明らかになった。また、毒を産生すると同時に培地中へ毒を代謝している可能性があることが明らかになった。しかし、この培地中の毒性の上昇には、プランクトンの死滅による毒の流出などの要因も考えられることから、正確な代謝量は不明である。

Fig. 37に成長段階別の毒成分量と成分組成ならびに培地1日1細胞あたりの毒成分量 (fmol/cell/day) とその成分組成を示した。プランクトン細胞内の毒成分は、C1 (PX1)、C2 (PX2)、GTX5、GTX6の低毒性成分であるN-スルホカルバモイル毒群の4成分から成り、成長段階により成分の変化は見られなかった。各成分量および成分比をみると、1,000細胞の時、C1 (PX1) が19mol%占めていたのに対し、5,000細胞以上になると、5-10mol%と存在比が低下し、代わりにC2 (PX2) の割合が68.6mol%から80mol%以上へと増加しているのが確認され、成分比に若干の変化が見られた。培地中の毒成分は、C1 (PX1)、C2(PX2)、dcGTX2、dcGTX

3の4成分が検出され、プランクトンが含有していたGTX5およびGTX6の2成分は確認できなかった。これは、もとの成分量が少なかったことから、pHの比較的高い培地中へ成分が入ると化学的にも不安定となり、分解されたり、変換されたりし易くなったためであると考えられた。新たに検出されたdcGTX2とdcGTX3の2成分はC1 (PX1) とC2 (PX2) の両成分が変換されて生成してきたものと思われる。培地中の成分量 (毒量) を見ると、成長段階が進むにつれて代謝される毒量が増加し、特に対数増殖期から定常期 (細胞密度5,000~7,000cells/ml) にかけては約8.5倍に大きく増加し、培地中への毒の流出がこの時期に増えることが確認された。各毒成分をみると、定常期にはデカルバモイル体の毒成分が多くなり、培地中での毒成分の変換が起こっている事が推察された。また、培地中ではC1 (PX1) の成分含量が多くなっており、これはプランクトン細胞内でC1 (型) > C2 (型) で安定であった成分が細胞外へ出たことにより不安定になり、一部がC2 (PX2) からC1 (PX1) へ変換を起こしたためであると推察された。

以上のことから、成長段階により毒成分はあまり変化しないことが確認され、培地中において毒成分の分解や成分変換が起こっている事が推察された。正確なプランクトンからの毒の代謝量を知るためには、死滅する細胞から出る毒量や毒成分についても確認する必要がある。

第四章 ヒオウギガイ垂下による毒の蓄積・代謝

ヒオウギガイ *Chlamys nobilis* は、ホタテガイの代用品と

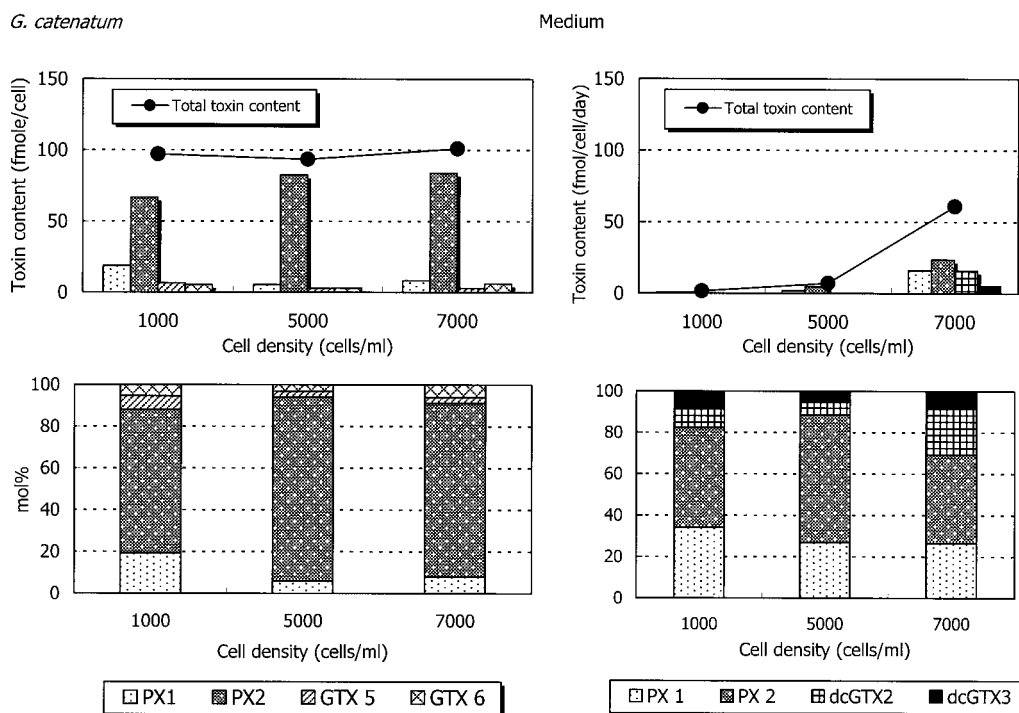


Fig. 37 Toxin content (upper) and toxin profiles (lower) of *G. catenatum* and medium at different cell density cultured under 18 °C.

して比較的容易に養殖できることから、西日本では食用としてヒオウギガイが養殖されている。しかし、ヒオウギガイはアサリやマガキと比べて、一度毒化すると無毒化するまで時間がかかり、出荷自主規制が長期化するため、地域によっては養殖業から撤退を強いられることもある。

本章では、同一海域内で異なる深度による毒化状況の相異から毒化防止の可能性を探ることを目的として、有毒プランクトン発生海域においてヒオウギガイを深度別に垂下し、毒化の推移を比較するとともにヒオウギガイ体内でのPSPの推移を検討するために毒成分についても調べた。

試料および方法

ヒオウギガイ試料

ヒオウギガイ試料として、1999年1月に熊本県天草河浦町崎津湾で採取された無毒（4 MU/g未満）のヒオウギガイを用いた。

ヒオウギガイ垂下実験

同湾宮地浦において、1999年1月25日から3月1日にかけて試料を水深3 m、6 m、9 m層に提灯籠で垂下し、隔週毎に25個体を採取した。

PSPの抽出

貝柱、外套膜、中腸腺、足、えら、直腸、生殖腺の7部位に分け、それぞれの重量を測定後、第 4 章の抽出法に従ってPSPを抽出した。

マウス毒性試験

各抽出液について、PSP公定法のマウス毒性試験法に準じて行った。

HPLC-蛍光分析

前述のHPLC-蛍光分析方法に従って、HPLC試験液の調製、およびHPLC-蛍光分析を行った。

結果および考察

ヒオウギガイの部位別重量

Fig.38に各採取日のヒオウギガイの部位別重量（30検体相当）を水深別に示す。Control（1月25日）より若干総重量が増しているが、試験期間を通じてどの水深帯の貝もほぼ同じ重量、重量比であった。

部位別毒性

試験期間を通じて毒のほとんどが中腸腺に局在（全毒量の95%前後）し、その他の部位では生殖腺にのみ全体の5%前後の毒性が確認され、それ以外の部位（貝柱、外套膜、直腸、足、鰓）からは全く毒性は認められなかった（Table 12）。実験開始時のヒオウギガイの中腸腺に毒性が3.8MU/g見られたが、これは今回使用したヒオウギガイの元の養殖海域である天草西岸の崎津湾においても有毒プランクトンが発生していた可能性が考えられた。Fig.39に示すように、中腸腺および生殖腺の毒性を水深別に見ると、9 m > 6 m > 3 mの順に毒性が高い傾向が見られた。これは同時期に発生していた毒化原因プランクトンである*G. catenatum*の出現傾向とほぼ相関していた（Fig.40）。中腸腺の毒性の変化を見ると、1月25日のヒオウギガイ中腸腺から3.8MU/gの毒性が元々検出されていたが、試験開始1週間後には中腸腺の毒化は大きく進み、3 m層で47.6MU/g、6 m層で56.2MU/g、9 m層で81.8MU/gとなった。その後、試験海域の有毒プランクトン（*G. catenatum*, *A. catenella*）出現数が激減したが、ヒオウギガイ中腸腺の毒性の減少は緩やかで、それぞれ30.8,

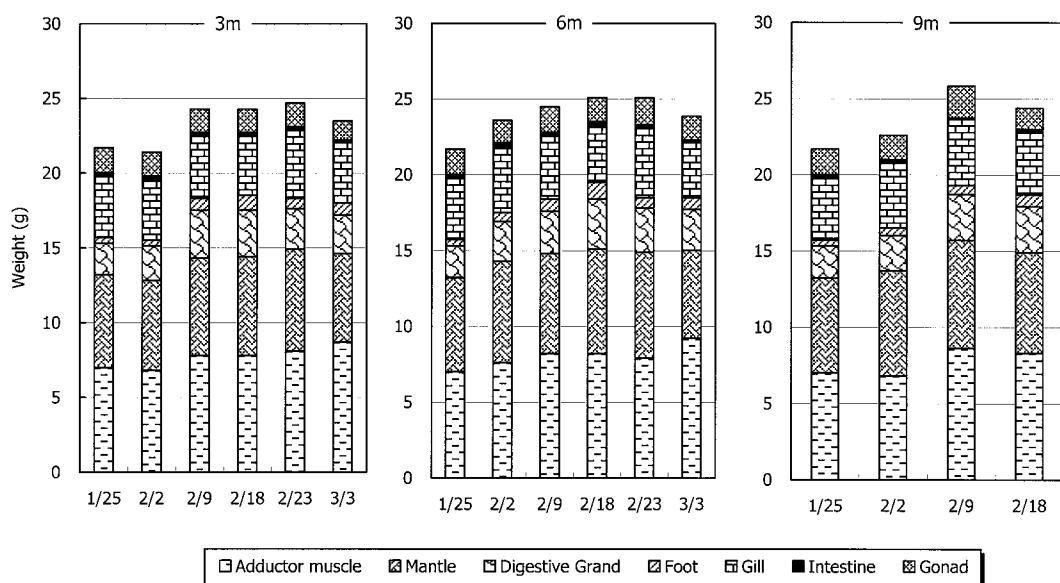


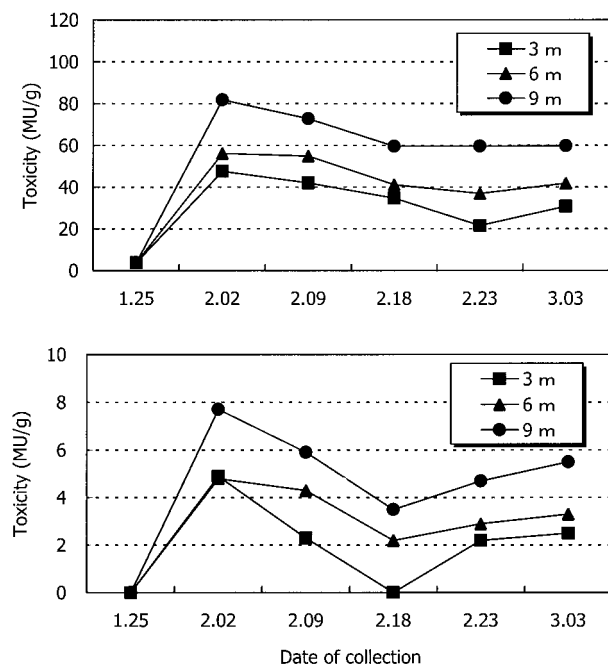
Fig. 38 Seasonal variation of weight of scallops cultivated at the depth of 3 m (left), 6 m (center), 9 m (right).

Table 12. Toxicity of scallops cultivated at the depth of 3 m, 6 m, 9 m (1999.1.25 ~ 2.9)

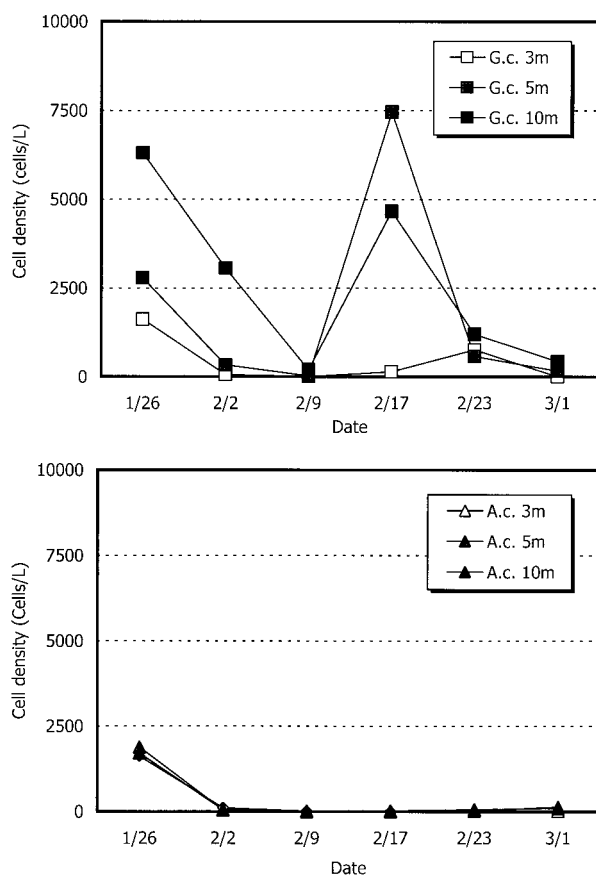
3 m						
Parts	Toxicity (MU/g)					
	1999.1.25	1999.2.2	1999.2.9	1999.2.18	1999.2.23	1999.3.3
Adductor muscle	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Mantle	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Digestive Gland	3.8	47.6	42.1	34.7	21.5	30.8
Foot	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Gill	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Intestine	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Gonad	< 2.0	4.9	2.3	< 2.0	2.2	2.5
Whole	0.8	5.5	5.6	4.5	2.5	3.5

6 m						
Parts	Toxicity (MU/g)					
	1999.1.25	1999.2.2	1999.2.9	1999.2.18	1999.2.23	1999.3.3
Adductor muscle	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Mantle	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Digestive Gland	3.8	56.2	54.9	41.2	36.9	41.8
Foot	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Gill	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Intestine	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Gonad	< 2.0	4.8	4.3	2.2	2.9	3.3
Whole	0.8	6.5	6.6	5.6	4.4	4.9

9 m						
Parts	Toxicity (MU/g)					
	1999.1.25	1999.2.2	1999.2.9	1999.2.18	1999.2.23	1999.3.3
Adductor muscle	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Mantle	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Digestive Gland	3.8	81.8	72.8	59.6	59.6	59.8
Foot	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Gill	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Intestine	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Gonad	< 2.0	7.7	5.9	3.5	4.7	5.5
Whole	0.8	9	8.9	7.6	7.5	7.1

**Fig. 39** Change in toxicity of digestive gland (upper) and gonad (lower) of scallops cultivated.

41.8, 59.8MU/gとなった。この間、2月17日には再び*G. catenatum*の増加が見られたために2月23日以降の中腸腺毒性は減少から転じて若干増加（或いは横ばい）になった。

**Fig. 40** Seasonal variations of cell density of *G. catenatum* (upper) & *A. catenella* (lower) at the depth of 3 m, 6 m, and 9 m.

PSP成分組成

1月25日 (Control) 試料の中腸腺からはC1,2 (PX1,2), GTX5,6, GTX2,3, dcGTX2,3の成分が検出されたが、これは、もともと毒化していたもので、毒成分量は微量であった。垂下1週間後の2月2日には主成分となるC1,2 (PX1,2) およびGTX5,6の低毒性成分が顕著に増加した。増加した成分の特徴およびプランクトンの出現数から、*G. catenatum*による毒化が考えられた。また、GTX1,4の増加もわずかに見られたことから*A. catenella*による毒化も少しは同時に起こっていると考えられた。2月9日になると原因プランクトンの減少に伴いGTX6が顕著に減少し、GTX1,4の2成分は消失した。2月18日には毒の代謝は更に進み、C1,2 (PX1,2) も完全に消失した。この時の成分はGTX5及びdcSTXの2成分で90% (mol%) 以上を占めており、中でもGTX5は50mol%近くを占める主成分として二枚貝中に残存していた。低毒性成分が毒の減少時期に多く残存する傾向は珍しく、どの深度にも同じ傾向が見られた。2月23日には再びC1,2 (PX1,2) およびGTX6の増加が見られ、これは2月17日前後に*G. catenatum*が一時的に増加し、再毒化した事によるものと考えられた。また、水深別による毒成分組成の違いはほとんど見られなかった (Fig.41)。

今回のヒオウギガイ垂下による毒化実験においては、有毒

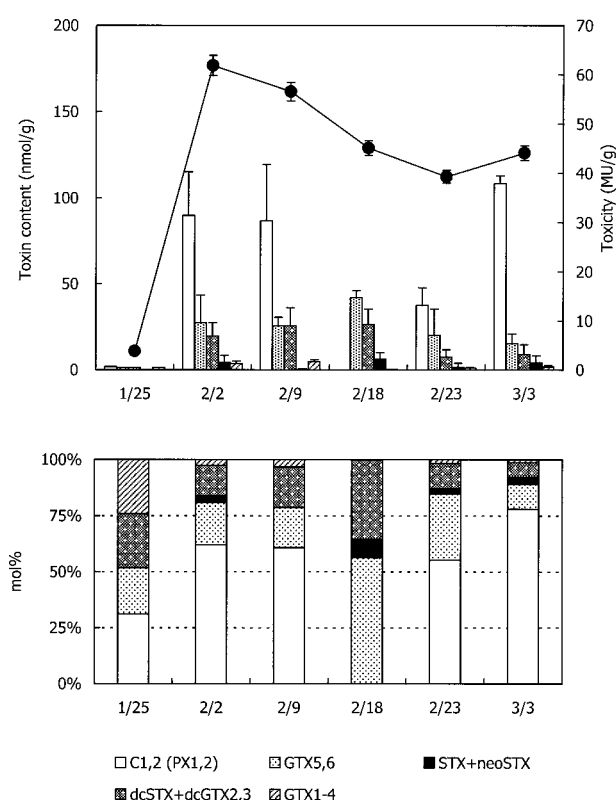


Fig. 41 Change in toxin contents and toxicity (upper), and toxin compositions (lower) of scallops cultivated.

渦鞭毛藻の発生密度が低い深度ほど、ヒオウギガイの毒性が低くなる、という傾向が見られた。有毒渦鞭毛藻の発生と二枚貝の毒化の関係を熊本県天草宮野河内湾で毒化したマガキの場合と比較すると、マガキの場合、有毒渦鞭毛藻の発生数が減少すると、それに伴いマガキの毒力もすみやかに低下していたのに対し、ヒオウギガイの場合、有毒渦鞭毛藻細胞数の減少に伴う毒性の低下は、マガキに比べて非常に緩やかであった。これは、第 2 章の大分県蒲江でのヒオウギガイ等二枚貝の毒化の時と毒性の減少傾向が一致した。また、今回の深度別に垂下する実験においてヒオウギガイは一度毒化すると、有毒渦鞭毛藻の少ない深度に垂下してもそれを無毒化させることは困難であることが示唆された。しかし有毒渦鞭毛藻の少ない深度に垂下することは、確実にヒオウギガイの毒化の程度を低くする効果があった。ヒオウギガイやホタテガイのようなイタヤガイ科の二枚貝においては毒の代謝（減少）が遅く、これらのような二枚貝にとっては、現時点では、毒化防止のためには有毒プランクトンの発生海域と密度を予測しか方法しかないと思われた。今後は有毒渦鞭毛藻発生時に深度だけでなく飼育海域の変更を行うなどとして、意図的に有毒渦鞭毛藻の発生数を減少させることを検討することにより、毒化の被害を抑える必要があると考えられた。

第 V 章 有毒渦鞭毛藻の給餌によるアサリ体内の PSP の蓄積・代謝

第 4 章では、熊本県天草宮野河内湾内における二枚貝の毒化が、毒化の原因となった有毒渦鞭毛藻である *G. catenatum* および *A. catenella* の発生によることを明らかにした。また、第 4 章で *G. catenatum* の毒産生能について検討した結果、環境水温に大きく影響を受けることも明らかになった。しかし、2 種の有毒渦鞭毛藻種によりそれぞれ毒化した二枚貝の PSP 成分組成の違いや、二枚貝が毒化し、無毒化に至るまでの、二枚貝体内の PSP の推移等は未だ不明である。本研究では他の二枚貝に比べて毒化の程度が低く、比較的短時間で無毒化するアサリを用いて、PSP 蓄積・代謝・排泄機構を調べるため、アサリへ *G. catenatum* および *A. catenella* をそれぞれ給餌し、アサリ体内および海水中への PSP および PSP 成分の推移を検討した。

1. *G. catenatum* 給餌

試料および方法

試料

アサリは長崎市多良川河口で採取したものをを用いた。有毒渦鞭毛藻は熊本県宮野河内湾において 1998 年 1 月に発生した *G. catenatum* を分離し、継代培養した株を用いた。

G. catenatum の培養および給餌実験

無毒アサリを 1 週間程度新鮮な濾過海水で馴化後、10 個体ずつ 12 区に分け、それぞれ 1 L の濾過海水を満たした飼育水槽に収容した。一方、*G. catenatum* は SWM- 培地 (Table 11) で、温度 21℃、照度 4,000 lux、明暗周期 12L/12D の条件下で大量培養した。定常期に達した時点でプランクネットの濾過により藻体を集め、1 区当たり 400 万細胞/100 ml の割合で、各 12 区ずつのアサリ飼育水槽に給餌した。給餌 0.5 時間から 168 時間 (7 日) 後にかけて経時的に各 1 区ずつアサリを取り上げるとともに、飼育水槽中の海水を 0.45 μm メンブランフィルターで濾過し、藻体残渣およびフン (排泄物) と濾過海水に分離した (Fig. 42)。

PSP の抽出

G. catenatum

G. catenatum については、定常期に達した時点で、10 万細胞分の培地を取り出し、1,500 × g で 10 分間遠心分離した。注意深く上清をピペットで取除き、得られた藻体残渣におおよそ 10 倍量の 0.05 M 酢酸を加え、1 分間超音波処理による抽出を行い、3,000 × g で 15 分間遠心分離した。残渣について同様の操作を 3 回繰り返し、得られた上清を合一後、5 ml に定容し、抽出液とした。

アサリ

アサリは 10 個体それぞれの殻を外し、剥き身の体重を測定後、3 個体、3 個体、4 個体の 3 つに分け、磨砕した。それぞれ 0.5 倍量の 0.1 M 塩酸を加えたホモジネートを、1 分間超

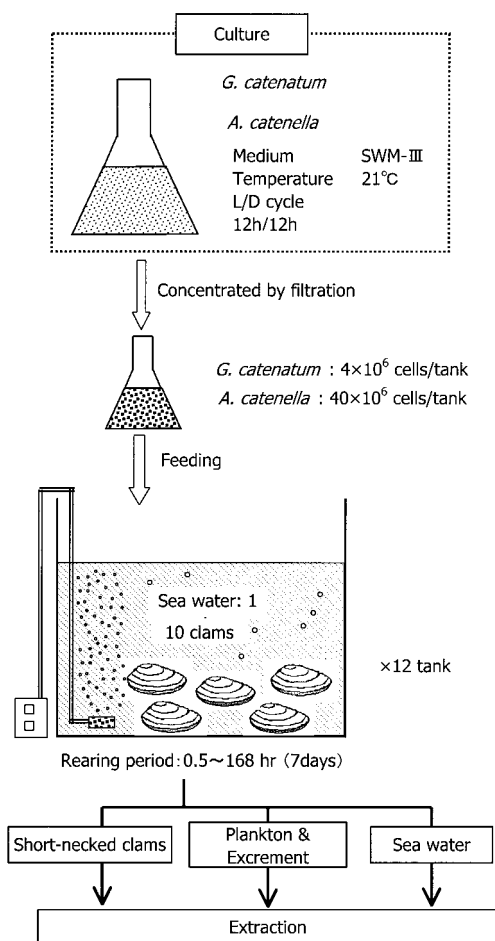


Fig. 42 Outline of feeding experiment.

音波処理し、 $10,000 \times g$ で20分間遠心分離後、上清を得た。残渣については同様の操作を3回繰り返し、各上清を合一後、5 mlに定容したものを抽出液とした。

藻体残渣およびフン

飼育海水を濾過して得られた $0.45 \mu m$ メンブランフィルターをメスで細切し、1.5 mlの0.05 M酢酸を加え、30秒間超音波処理し、 $3,000 \times g$ で20分間遠心分離後、上清を得た。残渣については同様の操作を3回繰り返し、上清を合一後、5 mlに定容したものを抽出液とした。

海 水

濾過海水について、湿重量15 gの活性炭カラムに、濾過海水を流速4 ml/minで流しPSPを吸着させ、蒸留水80 mlで海水を洗浄後、5 %酢酸60 %エタノール120 mlで毒を溶出させた。得られた溶出液を減圧濃縮し、pHを4.0に調整後、10 mlに定容したものを抽出液とした。

HPLC-蛍光分析

上記4種の抽出液について、第 4章のHPLC-蛍光分析の方法に従って、HPLC試験液の調製、およびHPLC-蛍光分析を行った。

結果および考察

給餌用の*G. catenatum*は培養開始後、8日程度で対数増殖期に入り、培養12日から13日後に定常期に達した。定常期の細胞密度は6,900細胞/mlであった。Fig.43に大量培養した*G. catenatum*の細胞の毒性およびPSP成分組成を示した。*G. catenatum* 1細胞当たりのPSP産生量は279 fmol、毒力は 6.0×10^{-5} MUであり、計算上給餌したPSP量(400万細胞)は飼育水槽1区当たり1,160 nmol、240 MUであった。PSP成分組成は低毒性成分のC2 (PX2) が約80 mol%を占めており、その他C1 (PX1) (6 mol%), GXT5 (6 mol%), GTX6 (6 mol%) が確認され、*G. catenatum*の産生するPSP成分はすべて低毒性成分であった。

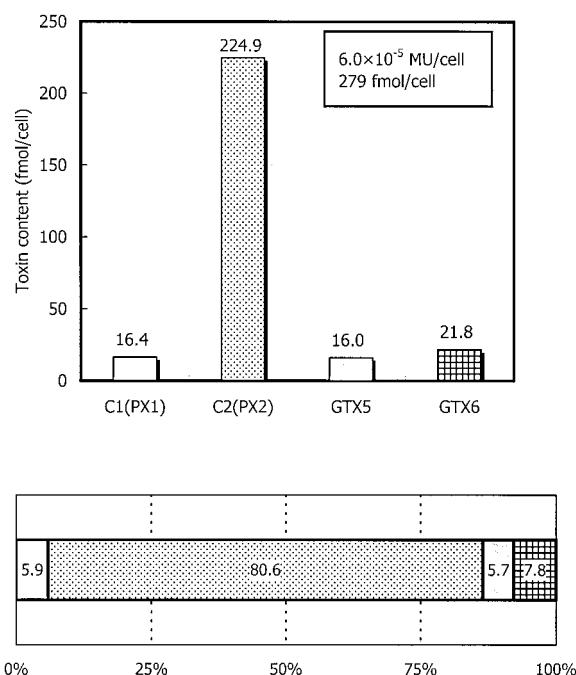
Fig. 43 Toxicity and toxin composition of *G. catenatum* cells cultured.

Fig.44に*G. catenatum*を給餌したときの細胞数の経時変化、およびアサリ10個体分のPSPの蓄積mol量を示した。アサリは給餌12時間後までにはほぼすべての藻体を摂食した。アサリ中からは給餌0.5時間後からPSP成分が確認され、藻体の減少にともないアサリ中のPSP蓄積mol量も上昇し、給餌12時間後に蓄積mol量は最大の184.8 nmolとなった。給餌12時間後以降は時間経過とともに下降し、給餌168時間後には11.5 nmolと最大蓄積時の6.2%まで下降した。アサリに蓄積したPSP毒は最大でも給餌量の約16%であった。

Fig.45に*G. catenatum*を給餌したときのアサリ10個体分のPSP蓄積成分量 (mol量)、および毒力 (MU, HPLC分析により求められた成分量と各成分の比毒性から算出した) を示した。アサリの毒力は毒が確認された給餌0.5時間後から確認され、蓄積mol量の上昇と平行して上昇した。アサリのPSP成分について、*G. catenatum*は産生するC1 (PX1) と

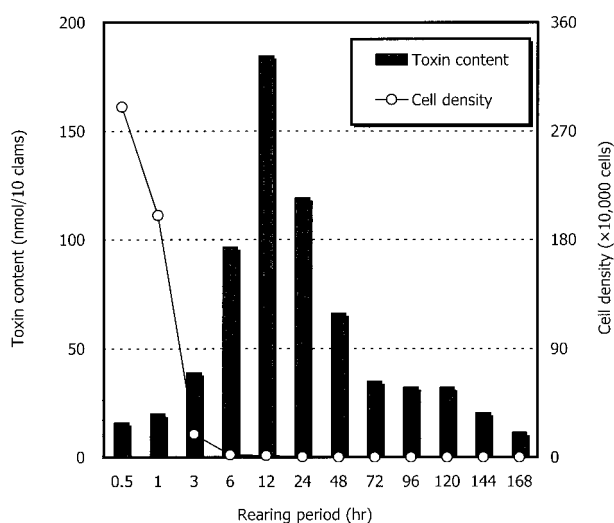


Fig. 44 Change in toxin content of clams fed with *G. catenatum* and its cell density.

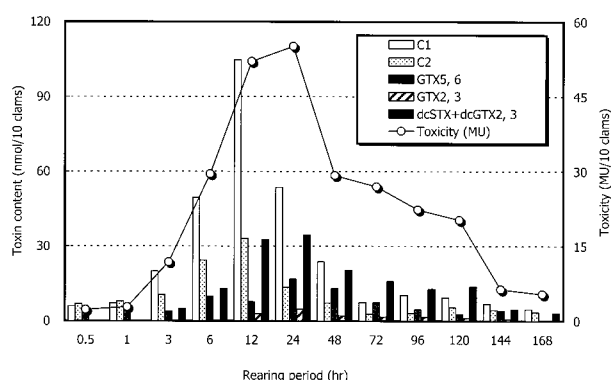


Fig. 45 Change in toxin content and toxicity of clams fed with *G. catenatum*.

C2 (PX2) の組成比がC2 (PX2) の方が高いのに対し、給餌3時間後以降、アサリ体内ではC1 (PX1) とC2 (PX2) の組成比ではC1 (PX1) が高く、プランクトンとは逆であることが確認された。また給餌1時間後までは *G. catenatum* が産生するC1,2 (PX1,2), GTX5,6といった低毒性成分のみを蓄積したが、給餌3時間以降は *G. catenatum* が産生しない GTX2,3, dcSTX, dcGTX2,3といった高毒性成分が出現した。これら高毒性成分は、その後24時間まで増加し、その際低毒性成分が急激な減少を示したが、dcSTX, dcGTX2,3についてはその減少が緩やかであった。アサリのPSP成分組成は給餌12時間後以降、蓄積mol量が減少するにつれて、dcSTX, dcGTX2,3の占める割合は高くなった。最大蓄積mol量は給餌12時間後、最大毒力は給餌24時間後の55.3MUであった。

Fig.46に *G. catenatum* を給餌したときの藻体残渣およびフンのPSP成分量、および海水中的PSP成分量を示す。海水に残った両者のPSP成分量は給餌0.5時間後に590.8nmolと給餌毒量の51%を占めたが、その後急激に減少し、給餌12時間後には、ほぼ消失した。そのPSP成分組成は給餌1時間ま

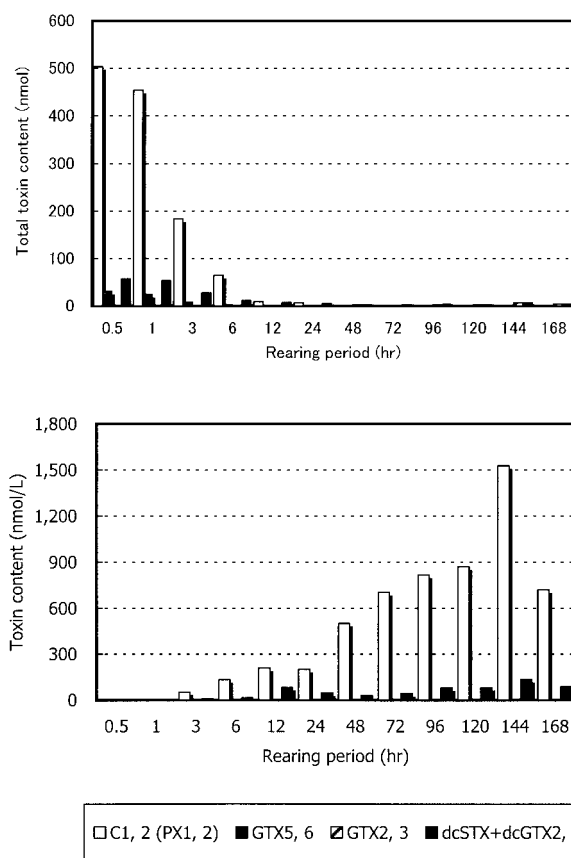


Fig. 46 Change in toxin contents of plankton & excrement (upper) and sea water (lower) in rearing aquarium of clams fed with *G.c.*

では *G. catenatum* が主に産生していたC1,2 (PX1,2) が70~85%を占めていたが、以降時間経過とともにC1,2 (PX1,2) は急激に減少し、dcSTX, dcGTX2,3が多く残存した。これに対し、海水のPSP mol量は給餌3時間後以降出現して以降、給餌144時間後まで増加し、給餌168時間後には総給餌料の約70%程度に達した。給餌実験中、海水中のPSPで主に増加していたのはC1,2 (PX1,2) で、その他dcGTX2,3は給餌12時間後に81.6 nmolまで増加し、その後はほぼ一定の値を示した。また *G. catenatum* が産生したGTX5,6は確認されなかった。

Fig.47に *G. catenatum* の給餌実験におけるアサリ、藻体残渣およびフン、海水中的PSPの推移を示した。総給餌量のPSPが1160nmolであったのに対しアサリ中、海水中、藻体残渣およびフン中の毒を合わせた回収率は27.4-146.6%であった。総給餌PSP量に対し、アサリが蓄積したmol量は最大蓄積時の給餌12時間後でも15.8%であった。フンおよび藻体残渣の毒量は海水中に残存する *G. catenatum* の減少とともに大きく減少した。また、それに伴いアサリ中の毒量は増加したが、毒の大部分は海水中へそのまま排出されたと考えられた。

今回、毒の回収率が低くなった原因としては、まず *G. catenatum* の投与毒量の過大評価が考えられた。本実験では、1細胞あたり279fmol/cellを投与したと計算しているが、実

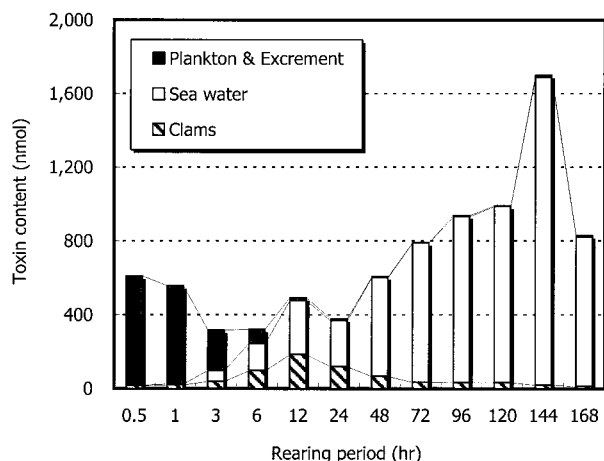


Fig. 47 Distribution of toxin in clams, plankton & excrement and sea water during feeding experiment with *G. catenatum*.

際、第 3 章の培養実験のデータを見ると、21 培養によって得られる毒性は100fmol/cell程度であることから、もう少し投与毒量が低かった可能性も考えられた。また、*G. catenatum*は無殻の渦鞭毛藻で、細胞が壊れやすいため、投餌のために細胞を濃縮する時点で一部の細胞が壊れて毒が流出したことも考えられるなど、今回の回収率のばらつきを起こした原因と考えられた。

2. *A. catenella* 給餌

試料および方法

試料

アサリは長崎市多良川河口で採取した天然のものを用いた。*A. catenella*は2000年2月に熊本県宮野河内湾において採取した海水から単離し、継代培養したものを用いた。

*A. catenella*の培養および給餌実験

多良川で採取した無毒アサリを水槽に入れ、1週間程度新鮮な濾過海水で馴化後、10個体ずつ12区に分け、それぞれ1Lの濾過海水を満たした飼育水槽に収容した。一方、*A. catenella*は、SWM- 培地中 (Table 11) で、温度21℃、照度4,000lux、明暗周期12L/12Dの条件下で大量培養した。対数増殖期～定常期に達した時点でプランクトンネットを用いて藻体を濃縮し、1区当たり4,000万細胞/100mlの割合で、各12区ずつのアサリ飼育水槽に給餌した。給餌0.5時間から1、3、6、12、24、48、72、96、120、144および168時間(7日)後の時点で経時的に各1区ずつアサリを取り上げるとともに、飼育水槽中の海水を0.45μmメンブランフィルターで濾過し、藻体残渣およびフンと濾過海水に分離した。

PSPの抽出

A. catenella

*A. catenella*については、定常期に達した時点で、1000万細胞分の培地を取り出し、1500×gで10分間遠心分離した。得られた藻体残渣の抽出方法は本章1の*G. catenatum*の抽

出と同様に行った。

アサリ、藻体残渣およびフンについても、本章1と同様に抽出を行った。

HPLC-蛍光分析

第 3 章のHPLC-蛍光分析の方法に従って、HPLC試験液の調製、およびHPLC-蛍光分析を行った。

結果および考察

*A. catenella*は培養開始後、7日程度で対数増殖期に入り、培養14日から15日後に定常期に達した。定常期の細胞密度は25,800cells/mlであった。Fig.48に大量培養した*A. catenella*の毒性およびPSP成分組成を示した。*A. catenella*1細胞当たりのPSP産生量は20.6fmol、毒力は 1.7×10^{-5} MUであり、給餌PSP量(400万細胞)は計算上飼育水槽1区当たり824nmol、680MUとなった。PSP成分組成は低毒性成分のC2(PX2)が43%を占めており、その他低毒性成分のC1,3,4(PX1,3,4)、GTX5,6、高毒性成分のGTX1,4が確認された。

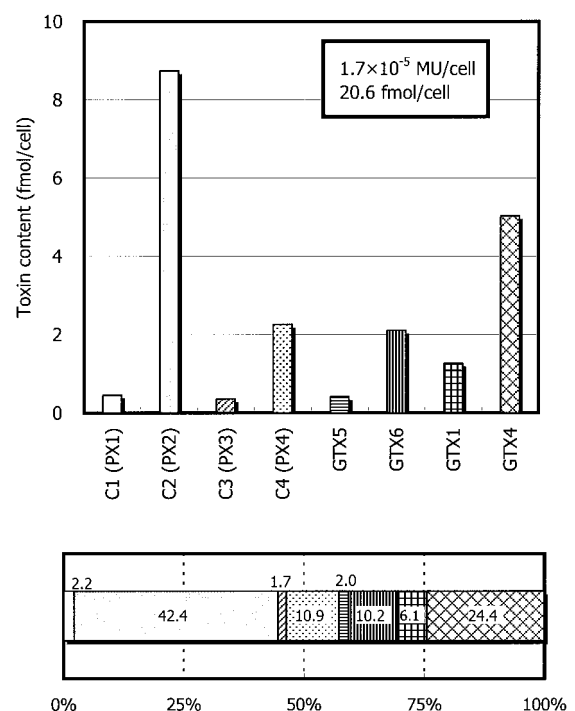


Fig. 48 Toxicity and toxin composition of *A. catenella* cells cultured.

Fig.49に*A. catenella*を給餌したときの細胞数の変化、およびアサリ10個体分のPSPの蓄積mol量を示す。アサリは給餌12時間後までにはほぼすべての藻体を摂食した。アサリからは給餌0.5時間後からPSPが確認され、藻体の減少に平行してアサリ中のPSP蓄積mol量も上昇し、給餌12時間後に蓄積mol量は最大の210.3nmolとなった。給餌12時間以降は時間経過とともに下降し、給餌168時間後には1.5nmolと最大蓄積時の0.7%まで下降した。

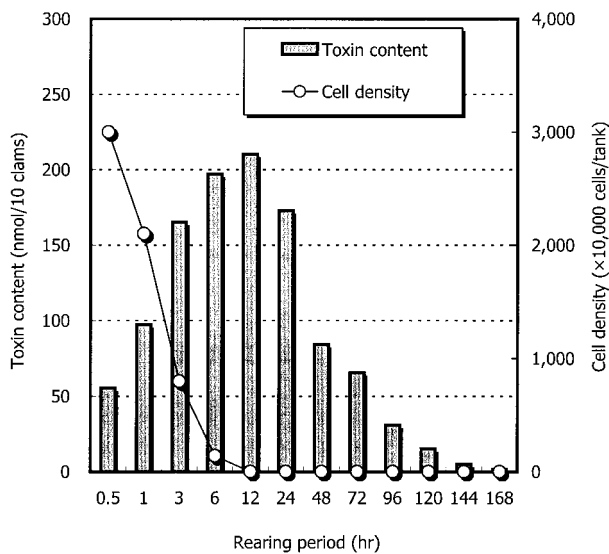


Fig. 49 Change in toxin content of clams fed with *A. catenella* and cell density.

Fig.50に *A. catenella* を給餌したときのアサリ10個体分のPSP成分の蓄積mol量, および毒力 (HPLC分析により求められた成分量と各成分の比毒性から算出したマウス毒性) を示す。アサリの毒力はmol量が測定された給餌0.5時間後から確認され, 蓄積mol量の上昇と平行して上昇した。アサリが最大毒力はアサリのPSP蓄積mol量が最大になった給餌12時間後で, その毒力は89.2MUであった。

アサリのPSP成分については, *A. catenella* はC1 (PX1) よりC2 (PX2) を多くを産生するが, 給餌3時間後以降, アサリ体内におけるC1 (PX1) とC2 (PX2) の組成比の逆転が確認された。また給餌0.5時間後は *A. catenella* が産生するC1,2,3,4 (PX1,2,3,4), GTX5,6, GTX1,4を蓄積したが, 給餌1時間後以降は, *A. catenella* が産生しない高毒性成分GTX2,3, dcSTX, dcGTX2,3, また給餌6時間後以降STX, neoSTXが出現した。給餌12時間後以降, アサリのPSP蓄積mol量の減少とともに低毒性成分C1,2,3,4 (PX1,2,3,4), GTX5,6は減少し, 給餌168時間後には消失した。一方STX, neoSTX, GTX1,4は給餌12時間まで増加後, GTX1,4は給餌

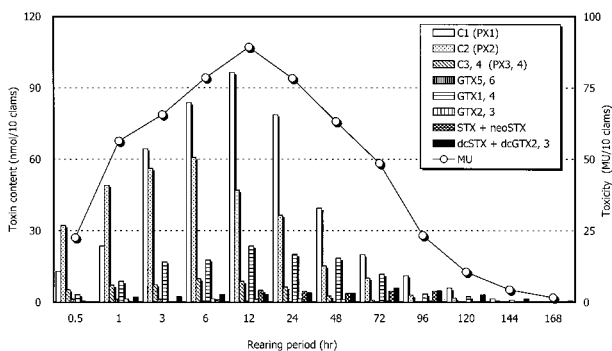


Fig. 50 Change in toxin content and toxicity of clams fed with *A. catenella*.

48時間まで, STXとneoSTXは給餌96時間までほぼ一定の値を示し, その後減少した。またdcSTXおよびdcGTX2,3は給餌96時間まで増加し, 以降168時間まで消失しなかった。これにより給餌12時間以降, アサリのPSP成分は蓄積mol量が減少するにつれて高毒性成分の占める割合が高くなった。

Fig.51に残存 *A. catenella* とフンの毒量, および海水中のPSP量を示した。海水中に残った両者のPSP mol量は給餌0.5時間で755.5nmolと給餌毒量の92%を占めたが, その後時間経過とともに減少し, 給餌168時間後には, 10.8nmolまで減少した。そのPSP成分は給餌1時間までは *A. catenella* が主に産生するC1,2,3,4 (PX1,2,3,4), GTX5,6, GTX1,4のみであったが, 給餌3時間以降dcSTX, dcGTX2,3が出現した。時間経過とともにC1,2,3,4 (PX1,2,3,4), GTX5,6, GTX1,4は減少し, 給餌120時間後には消失した。一方dcSTX, dcGTX2,3は給餌6時間後まで増加し, その後給餌168時間まで確認された。これに対し, 海水中のPSP mol量は給餌0.5時間後から給餌144時間後にかけて増加し, 以降給餌168時間後までほぼ一定の値を示した。PSP成分組成はそのほとんどがC1,2,3,4 (PX1,2,3,4) であった。

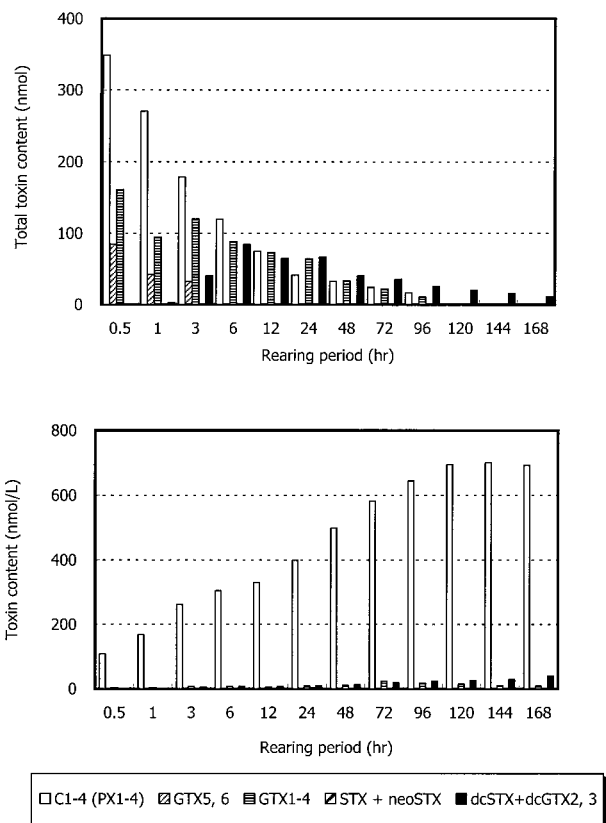


Fig. 51 Change of toxin contents of plankton & excrement (upper) and sea water (lower) in rearing aquarium of clams fed with *A. catenella*.

Fig.52に *A. catenella* の給餌実験におけるアサリ, 藻体残渣およびフン, 海水中のPSPの推移を示す。総給餌量のPSPが802.9nmolであったのに対し各時間の回収率は84.6-99.4%

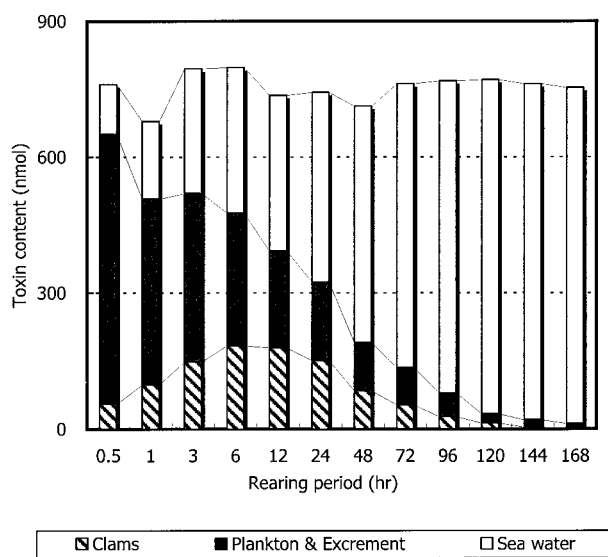


Fig. 52 Distribution of toxin in clams, plankton & excrement and sea water during feeding experiment with *A. catenella*.

であった。総給餌PSP量に対し、アサリが蓄積したmol量は最大蓄積時の給餌12時間後でも26.2%であった。藻体残渣およびフンの毒量は残プランクトンの減少とともに減少していることから、その毒性のほとんどが藻体残渣の毒性で、フンのみの毒性は72時間後で80nmol程度であると考えられた。また、フンの毒性は72時間以降も海水中の毒は0.5時間で投餌量の14%程度が確認されていたが、168時間では92.4%とそのほとんどが海水中へ排泄されることがわかった。アサリの毒量は12時間後まで増加したが、その大部分は海水中へ排出された。

今回の給餌実験においてアサリのPSP蓄積量は、*G. catenatum*給餌で最大15.8%、*A. catenella*給餌で26.2%と両者とも低く、その大部分がすみやかに海水中へ排泄されていた。これはアサリが有毒渦鞭毛藻を体内に取り込み、フンとともにPSPを排出したため、また有毒渦鞭毛藻を濾水する際に、エラから海水中へ排出したためと考えられた。アサリの毒化は、*G. catenatum*、*A. catenella*給餌ともに給餌30分ですでに始まり、有毒渦鞭毛藻が減少するに従って、毒力は上昇したが、有毒渦鞭毛藻が消失すると、アサリの毒力も減少し、給餌7日後にはほぼ無毒化した。このことから、アサリの毒化の程度は、その原因となる有毒渦鞭毛藻の発生数に大きく左右されることが示唆された。

2種の有毒渦鞭毛藻種による毒化の違いについて、*G. catenatum*と*A. catenella*では産生するPSP mol量が15倍近く異なっていた。これは*G. catenatum*の体長が45~65 μm 、体幅が30~45 μm であったのに対し、*A. catenella*の体長は20~40 μm 、対幅は18~37 μm であり、両者の細胞の大きさを反映しているものと考えられた。しかし、1細胞あたりのMUではその差が3.7倍と縮まっていた。これは*G. catenatum*のPSP成分組成が低毒性成分のみであるのに対し、

*A. catenella*には高毒性成分であるGTX1,4が含まれていたためと考えられた。このことはアサリの毒力、PSP成分組成にも反映され、*A. catenella*を給餌したアサリのPSP成分組成は、*G. catenatum*を給餌したものにはない低毒性成分のC3,4 (PX3,4)、高毒性成分のGTX1,4を含んでおり、そのため前者は後者に比べて全体的に高毒性成分の占める割合が高く、蓄積mol量に対するMU値が明らかに高かった。給餌後の時間経過によるアサリのPSP成分組成の変化について、今回の実験で用いた2種の有毒渦鞭毛藻が主に産生していたC1,2 (PX1,2)の組成比はC2 (PX2)の方が高かった。しかしアサリ体内では給餌後、時間経過とともにその組成比の逆転が確認された。また藻体が確認された給餌3時間後までは、給餌した有毒渦鞭毛藻が産生していたPSP成分を蓄積していたため、*G. catenatum*給餌の場合は主に低毒性成分を、*A. catenella*給餌の場合は主に低毒性成分とGTX1,4を蓄積していたが、その後は両者ともにdc体が出現した。以上のようなアサリ体内におけるPSP成分の変化は、*G. catenatum*給餌、*A. catenella*給餌ともに同様の傾向を示していた。大島らの報告⁴⁷⁾によると、N-スルホカルバモイル群C1-4 (PX1-4)、GTX5,6に特定の二枚貝から抽出した粗酵素液を加えてインキュベートを行うことにより、カルバモイル体やdc体の出現が確認されている。また、第3章の結果から、近年九州内で毒化したアサリやマガキ、ムラサキイガイなどの二枚貝のPSP成分組成について、毒化の原因となった有毒渦鞭毛藻のPSP成分組成と比較してC1とC2の組成比が逆転する現象が見られる。以上のことから、今回の給餌実験におけるC1,2 (PX1,2)組成比の逆転はC2 (PX2)から異性体であるC1 (PX1)への変換、dc体の出現は、低毒性成分のN-スルホカルバモイル基がとれたことによる、dc体への変換が、それぞれアサリ体内において起こっているものと考えられた。またこのdc体は給餌12時間後以降、アサリのPSP蓄積mol量が減少しても残存し、また海水中から多量のC (PX)群が検出されたことから、低毒性成分は比較的排出されやすく、dc体は蓄積しやすい成分であると考えられた。このためアサリが毒化した直後と毒化して数日後ではそのPSP成分組成に大きな違いが見られた。

以上のことからアサリの毒力、PSP成分組成は、有毒渦鞭毛藻の発生細胞数、その種の違い、また毒化した時期により大きく異なることが示唆された。特にPSP成分は有毒渦鞭毛藻種や毒化時期により、一定の傾向を示していた。このことは今後の貝毒モニタリングにおいて、毒化の原因となった有毒渦鞭毛藻種の特定や、毒化時期を予測する手段として有効であるものと考えられた。しかし1998年12月の宮野河内湾のように、異なる有毒渦鞭毛藻が同時期に発生することもあり、その判別は困難である。今回の給餌実験ではアサリに単一種の有毒渦鞭毛藻のみを与えているため、複数種の有毒渦鞭毛藻により毒化した場合の、アサリ体内のPSP蓄積・代謝やPSP成分の変化については不明である。また今回給餌に使用した2種の有毒渦鞭毛藻は、C3,4 (PX3,4)やGTX1,4の有無、またPSP産生量の違いといった点では互いに異なっていたが、両種ともC2 (PX2)を最も多く産生するなど、類似

し、両者をPSP成分組成のみから判別することは容易ではない。また天然では連続して給餌した際のPSPの推移についての確認ができないことなどの問題が挙げられる。これらの点について今後検討する必要がある。

第VI章 総合考察

本論文では、九州沿岸海域における麻痺性貝毒 (PSP) に関して研究を行ったもので、これまで日本におけるPSPの研究では九州におけるものは報告が少ない。また、これまで九州沿岸ではPSP毒化原因としては西日本で頻発する *Alexandrium catenella* によるものであったが、近年 *Gymnodinium catenatum* 発生による毒化が発生し、問題となった。日本では本種による毒化は唯一山口県仙崎湾において起こることが知られていたが、1997年大分県蒲江沿岸海域で大量発生し、養殖ヒオウギガイなどを毒化させた。続いて熊本県天草宮野河内湾でもカキやアサリを毒化させた。これまで九州で本種またはシストが確認されていたのは浅茅湾 (長崎県対馬)、伊万里湾 (佐賀県)、八代海 (熊本県)、大村湾 (長崎県) などであるが、いずれも発生密度は低く毒化には至っていない⁴¹⁾。また、その毒産生についても確認されていない。今回、大分と熊本での毒化二枚貝および *G. catenatum* の毒成分組成を調べた結果、毒化二枚貝と *G. catenatum* に共通して主としてC1,2 (PX1,2) やGTX5,6などの低毒性成分を含んでいる特長が見られた。*G. catenatum* の毒成分は *A. tamarense*^{48,49)} や *A. catenella*^{35,50)} などのように高毒性成分のGTX1-4やneoSTXはまったく検出されず、C1,2 (PX1,2), GTX5,6, dcGTX2,3の6成分からなっており、なかでもC2 (PX2) が全体の40-60mol%と高かった。毒化した二枚貝からは、原因プランクトンである *G. catenatum* が産生した6成分に加え、GTX2,3およびneoSTX, STX, dcSTXなどの高毒性成分が確認された。これらの高毒性成分は、貝体内に取り込まれたC1,2 (PX1,2) やGTX5,6が変換してできたものであると考えられた。この変換経路に関しては、ある種の酵素が関与しているとの報告がある^{33, 47, 51)}。

長崎県五島列島福江島玉之浦湾では食中毒の原因となったマガキなどが大きく毒化したが、その原因プランクトンは特定できなかった。毒化した海域から見つかった渦鞭毛藻では、有毒種としてイタリアのナポリでのみ報告されている *A. andersonii*⁴⁴⁾ が優先種として見られたが、今回玉之浦産の株では毒性確認には至っていない。むしろ、その後の調査で *G. catenatum* のシストが同湾から確認されていることや、毒成分組成 (低毒性成分主体) を考えると、原因種は *G. catenatum* であることが推測される。この点に関しては、今後の同湾における調査によって明らかにしたいと思う。

このように、1997年以降大分県蒲江、熊本県天草宮野河内湾、長崎県五島玉之浦湾 (推測) と九州沿岸海域で *G. catenatum* のブルームによる貝類毒化が急激におきていることから、*G. catenatum* の毒産生能について調べることとなった。特に熊本県宮野河内湾では、1998年1月にまず発生し、

その後同年7月に再び赤潮化するという現象が起こった。この時の発生水温は、1月時で13℃程度であったのに対し、7月では約25℃で最大細胞数を記録した。このような水温の違う環境において赤潮化したことは、今後の赤潮対策に大きな影響をもたらすことが考えられる。*G. catenatum* の毒産生能を日照条件 (明暗周期)、水温の条件を変えて培養し、その毒産生能を比較したところ、日照条件にはあまり大きく左右されなかったが、水温変化では水温が低いほど分裂スピードが遅く、毒産生能が高いことがわかった。しかしながら、水温24℃では、短期間で赤潮を形成できるほど分裂スピードが遅くないことが推察されるため、1998年7月の宮野河内湾での *G. catenatum* の赤潮化は水温とは別の要因により異常な大量発生した可能性も考えられる。また、*G. catenatum* の培養液中からもPSP毒成分が確認されたことから、*G. catenatum* は毒を産生すると同時に、体外へも毒を排泄している可能性が推察された。しかしながら、*G. catenatum* の細胞は壊れやすく、死んだ細胞や壊れた細胞からの毒の流出の可能性も考えられるため、その排泄毒量のレベルは明らかにできていない。

第 4章では *G. catenatum* の毒産生能について解明してきたが、次に実際に二枚貝への毒化をモデル的にを行い、二枚貝への毒の蓄積と代謝について調べた。まず、第 4章では、熊本県宮野河内湾にヒオウギガイを垂下し、毒化させた。この時水深を変えて3深度 (3m・6m・9m) に垂下したところ、プランクトンの発生密度とヒオウギガイの毒性 (中腸腺) に相関性が見られ、発生密度が低い深度ほど毒化程度も低かった。しかし、代謝 (減毒) のスピードは深度によってほとんど差がなかったことから、毒の蓄積・代謝に水深の違いはほとんど影響しないと推察された。また、第 4章の大分県でヒオウギガイが毒化した際の周年モニタリングの結果や、熊本での結果からも判るように、ヒオウギガイはホタテガイやアカザガイなどと同様、一度高毒化すると、毒の代謝スピードがアサリやカキ、ムラサキイガイなどよりも断然遅いことが確認された。垂下実験の際、ヒオウギガイの毒成分組成を見ると、水深別でほとんど成分に差は見られなかった。また、垂下実験開始時、実験海域では *G. catenatum* と *A. catenella* の2種がほぼ同時に発生しており、その蓄積毒成分からはGTX1,4が見られる点で *A. catenella* の影響は確認できるが、*G. catenatum* が主として産生する毒成分 {C1,2 (PX1,2), GTX5,6} は *A. catenella* も産生することから、両種個々の影響の詳細は判らなかった。

第 5章では、室内水槽においてPSP産生プランクトンをアサリに給餌し、その毒の蓄積と代謝を経時的に観察した。アサリは比較的毒の代謝が速く、天然でも1~2週間で規制値を下回ることが多い。また、砂に潜っているため、同じ海域で毒化した二枚貝類より毒性が低いことが多く、この点については、本研究でも給餌量に対する蓄積率は30%を下回るという低さが影響している可能性も考えられた。*G. catenatum* と *A. catenella* の2種を給餌した場合、1細胞あたりの毒性が10倍以上高い *G. catenatum* の方が少ない細胞数で毒化することが判った。このことから、*G. catenatum*

が発生した場合、*A. catenella*の発生蓄積・代謝ともに同様の傾向を示し、特に種によって異なることはなかった。Sekiguchiらは、13 の設定温度でホタテガイ、ムラサキガイ、アサリ、マガキの4種の二枚貝および原索動物のマボヤに対し*A. tamarense*を1週間連続給餌する実験を行っているが、給餌期間中は給餌量のほとんどを蓄積し、貝の種類による蓄積量の差は見られないことを報告している⁵²⁾。この報告に比べ本実験では蓄積率が低かったのは、飼育水温の違いによるものが推察され、今後確認する必要があると考えられた。

以上、本研究では九州沿海岸域におけるPSPに関する研究として、特に近年になり九州各地で頻発するようになった*G. catenatum*とそれによるPSP毒化について主として研究が行われた。その結果、毒化時期や毒性・毒成分のパターン、*G. catenatum*の毒産生パターン、アサリに対する毒の蓄積・代謝などが明らかになった。今後、PSPの毒化機構解明や二枚貝毒化防止対策のためには、貝に対する毒の蓄積・代謝の傾向について更に追及していく必要があると思われる。

謝 辞

本研究は前長崎大学水産学部教授（現：財団法人 日本冷凍食品検査協会 技術顧問）野口玉雄先生のご指導の下に行われたもので、ここに心より謝意を表する。また、細部にわたり研究のご指導を賜った同学部 荒川修教授に深く感謝する。

試料の採取ならびに貴重な情報を頂いた大分県海洋水産研究センター 上城義信氏、堤憲太郎氏、熊本県水産研究センター 平田満氏、向井宏比古氏、安東秀徳氏に厚くお礼申し上げます。中毒事件調査にあたり多大なる協力を頂きました長崎県五島保健所各位に感謝する。五島福江島での試料採取に際し、多大な協力と貴重な情報を頂きました長崎県総合水産試験場 清原 満氏に厚くお礼申し上げます。

プランクトン試料の分類等に終始ご協力頂いた長崎大学水産学部 松岡数充教授、吉田誠博士に深く感謝する。

研究を進めるにあたりご協力いただいた長崎大学水産学部水産食品衛生学研究室各位、特に森田孝敏氏、阿南昭宏氏、近藤真紀氏、山口泰永氏、Samsur Mohamad氏、藤原明子氏に感謝する。

最後に、本研究を進めるにあたり多大なるご指導を頂いた長崎大学水産学部 故 赤枝宏助教授に対し深く感謝するとともに、哀悼の意を表する。

参考文献

- 1) B. W. Halstead: Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. Darwin Press, Princeton, New Jersey. (1965)
- 2) Y. Hashimoto, T. Noguchi and R. Adachi: Occurrence of toxic bivalves in association with the bloom of *Gonyaulax* sp. in Owase Bay. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **42**, 671-676. (1976)
- 3) Y. Oshima, W. E. Fallon, Y. Shimizu, T. Noguchi, and Y. Hashimoto: Toxins of the *Gonyaulax* sp. and infested bivalves in Owase Bay. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **42**, 851-856. (1976)
- 4) Y. Onoue, and K. Nozawa: PSP components of toxified short-necked clams in Yamagawa Bay, Kagoshima Prefecture. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 837-841. (1989)
- 5) Y. Nagashima, T. Noguchi, J. Maruyama, S. Kamimura and K. Hashimoto: Occurrence of paralytic shellfish poisons in an ascidian *Holocynthia roretzi*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 331-334. (1984)
- 6) Y. Kotaki, Y. Oshima, and T. Yasumoto: Analysis of Paralytic Shellfish Toxins of Marine Snails. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 943-946. (1981)
- 7) T. Hashimoto, S. Matsuoka, S. Yoshimatsu, K. Miki, N. Nishibori, S. Nishio and T. Noguchi: First paralytic shellfish poison (PSP) infestation of bivalves due to toxic dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii*, in the southeast coasts of the Seto Inland Sea, Japan. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **43**, 1-5. (2002)
- 8) 大島泰克：麻痺性貝毒。中毒研究，**11**，347-353. (1999)
- 9) H. W. Graham: *Gymnodinium catenatum*, a new dinoflagellate from the Gulf of California. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **62**, 259-261. (1943)
- 10) S. Fraga and F. J. Sanchez: Toxic and potentially toxic dinoflagellates found in Galician Rias (N. W. Spain). In: Anderson, D. M., White, A. W. and Baden, D. G. (eds.) *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, Amsterdam, pp. 51-54. (1985)
- 11) D. M. Anderson, J. J. Sullivan and B. Reguera: Paralytic shellfish poisoning in Northwest Spain: the toxicity of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon*, **27**, 665-674. (1989)
- 12) L. D. Mee, M. Espinosa and G. Diaz: Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. *Mar. env. Res.* **19**, 77-92. (1986)
- 13) S. Franca and J. F. Almeida: Paralytic shellfish poisons in bivalve mollusks on the Portuguese coast caused by a bloom of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. In: Okaichi, T., Anderson, D. M. and Nemoto, T. (eds.) *Red tides: biology, environmental science and toxicology*. Elsevier, New York, pp. 93-96. (1989)
- 14) Y. Oshima, M. Hasegawa, T. Yasumoto, G. M. Hallegraeff and S. Blackburn: Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic

- shellfish toxins in Tasmanian shellfish. *Toxicon*, **25**, 1105-1111. (1987)
- 15) G. M. Hallegraeff, D. A. Steffense and R. Wetherbee: Three estuarine Australian dinoflagellates that can produce paralytic shellfish toxins. *J. Plankton Res.* **10**, 533-541. (1988)
 - 16) 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: Okaichi, T., Anderson, D. M. and Nemoto, T. (eds.) *Red tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Elsevier, New York, pp. 411-414. (1989)
 - 17) E. Jackim and J. Gentile: Toxins of a blue-green alga: similarity to saxitoxin. *Science*, **162**, 915-916. (1968)
 - 18) P. J. Sawyer, J. H. Gentile and J. J. Sasner Jr.: Demonstration of a toxin from *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs. *Can. J. Microbiol.* **14**, 1199-1204. (1968)
 - 19) M. Alam, M. Ikawa, J. J. Sasner Jr. and P. J. Sawyer: Purification of *Aphanizomenon flos-aquae* toxin and its chemical and physiological properties. *Toxicon*, **11**, 65-72. (1973).
 - 20) H. Onodera, M. Satake, Y. Oshima, and T. Yasumoto: New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Natural Toxins*, **5**, 146-151. (1997)
 - 21) L. Bowling: The cyanobacterial (blue-green algae) bloom in the Darling/Barwon River system, November-December 1991. *Department of Water Resources Technical Service Report*, pp 49. (1992)
 - 22) N. Lagos, H. Onodera, P. A. Zagatto, D. Andrinolo, S. M. F. Q. Azevedo and Y. Oshima: The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil., *Toxicon*, 1359-1373. (1999)
 - 23) Y. Hashimoto, S. Konosu, T. Yasumoto, A. Inoue and T. Noguchi: Occurrence of toxic crab in Ryukyu and Amami Islands. *Toxicon*, **5**, 85-90. (1967)
 - 24) T. Noguchi, S. Konosu and Y. Hashimoto: Identity of the crab toxin with saxitoxins. *Toxicon*, **7**, 325-326. (1969)
 - 25) 長島裕二, 野口玉雄, 塩見一雄, 荒川 修, 浅川 学, 宮澤啓輔, 橋本周久: スペイン産セイヨウトコブシの毒性. *食品衛生学会誌*, **35**, 548-549. (1994)
 - 26) 長島裕二: セイヨウトコブシの毒性. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **61**, 632-633. (1995)
 - 27) 荒川 修: セイヨウトコブシの毒組成. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **61**, 634-635. (1995)
 - 28) 浅川 学: 国内産アワビ, トコブシの安全性. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **61**, 636-637. (1995).
 - 29) Y. Nagashima, O. Arakawa, K. Shiomi and T. Noguchi: Paralytic shellfish poisons of ormer, *Haliotis tuberculata*, from Spain. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **36**, 627-631. (1995)
 - 30) T. Noguchi, M. Asakawa and K. Hashimoto: Paralytic shellfish poison in marine organisms. in "Emerging Food Safety Problem Resulting From Microbial Contamination" (ed. by K. Mise and J. L. Richard), Kohken Press, Tokyo, pp. 93-102. (1992)
 - 31) Y. Oshima, H. Itakura, K-C. Lee, T. Yasumoto, S. Blackburn and G. M. Hallegraeff: Toxin production by the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. In: Smayda, T. J. and Shimizu, Y. (eds.) *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier sci. Pub. B. V., pp. 907-912. (1993)
 - 32) O. Arakawa, T. Noguchi, Y. Shida and Y. Onoue: Occurrence of carbamoyl-N-hydroxy derivatives of saxitoxin and neosaxitoxin in a xanthid crab *Zosimus aeneus*. *Toxicon*. **32**, 175-183. (1994)
 - 33) J. J. Sullivan, W. T. Iwaoka and J. Liston: Enzymatic transformation of PSP toxins in the littleneck clam (*Protothaca staminea*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **114**, 465-472. (1983)
 - 34) Y. Oshima, T. Yasumoto, M. Kodama, T. Ogata, Y. Fukuyo and F. Matsuura: Features of paralytic shellfish poison occurring in Tohoku District. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 525-530. (1982)
 - 35) Y. Onoue, T. Noguchi, J. Maruyama, Y. Ueda, K. Hashimoto and T. Ikeda: Comparison of PSP compositions between toxic oysters and *Protogonyaulax catenella* from Senzaki Bay, Yamaguchi Prefecture. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 1347-1350. (1981)
 - 36) Y. Nagashima, Y. Sato, T. Noguchi, Y. Fuchi, K. Hayashi and K. Hashimoto: Paralytic shellfish poison in the "hiogi" scallop *Chlamys nobilis*. *Marine Biology*, **98**, 243-246. (1988)
 - 37) 長崎県水産試験場: 平成6年度 赤潮貝毒監視事業報告書 - (貝毒モニタリング), 1-11. (1994)
 - 38) 厚生省環境衛生局監修: 食品衛生検査指針 理化学編. (社) 日本食品衛生協会.
 - 39) O. Arakawa, T. Noguchi and Y. Onoue: Paralytic shellfish toxin profiles of xanthid crabs *Zosimus aeneus* and *Atergatis floridus* collected on reefs of Ishigaki Island. *Fisheries Science*, **61**, 659-662. (1995)
 - 40) Y. Oshima: Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins.

- J. AOAC Int.*, **78**, 528-532. (1995)
- 41) K. Matsuoka and Y. Fukuyo: Geographical distribution of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham in Japanese coastal waters. *Botanica Marina*, **37**, 495-503. (1994)
 - 42) 熊本県水産研究センター：重要貝類毒化対策事業 . 平成10年度熊本県水産研究センター事業報告書, 142-147. (1999)
 - 43) 吉田 誠, 福代康夫, 松岡数充, 野口玉雄：長崎県五島・玉之浦における麻痺性貝毒事件発生時に採集された小型 *Alexandrium*. 1997年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, pp. 97. (1997)
 - 44) P. Ciminiello, E. Fattorusso, M. Forino and M. Montresor: Saxitoxin and neosaxitoxin as toxic principles of *Alexandrium andersoni* (Dinophyceae) from the Gulf of Naples, Italy. *Toxicon*, **38**, 1871-1877. (2000)
 - 45) F. H. Chang, D. M. Anderson, D. M. Kulis and D. G. Till: Toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from the Bay of Plenty, New Zealand. *Toxicon*, **35**, 393-409. (1997)
 - 46) 松岡数充, 鄭 盛允, 吉田 誠, 趙 賢珍, 林 正男, 丹籐尚樹：西九州五島列島福江島沿岸海域表層堆積物中の有害・有毒渦鞭毛藻シスト. 長崎大学水産学部研究報告, **81**, 55-62. (2000)
 - 47) Y. Oshima: Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P and Marcaillou, C. (eds.) *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier Publ., Paris, pp. 475-480. (1995)
 - 48) Y. Ueda, T. Noguchi, Y. Onoue, K. Koyama, M. Kono and K. Hashimoto: Occurrence of PSP-infested scallops in Ofunato Bay during 1976-1979 and investigation of responsible plankton. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 455-458. (1982)
 - 49) Y. Oshima, C. J. Bolch and G. M. Hallegraeff: Toxin composition of resting cysts of *Alexandrium tamarense* (dinophyceae). *Toxicon*, **30**, 1539-1544. (1992)
 - 50) T. Noguchi, M. Asakawa, O. Arakawa, Y. Fukuyo, S. Nishio, K. Tanno and K. Hashimoto: First occurrence of *Alexandrium catenella* in Funka Bay, Hokkaido, along with its unique toxin composition. In: Graneli, E., Sundstom, B., Edler, L. and Anderson, D. M. (eds.) *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 493-498. (1990)
 - 51) T. Noguchi, S. Chen, O. Arakawa and K. Hashimoto: A unique composition of PSP in hiogi scallop *Chlamys nobilis*. In: Natori, S., Hashimoto, K. and Ueno, Y. (eds.) *Mycotoxins and Phycotoxins* '88, Elsevier, Amsterdam, pp. 351-358. (1988)
 - 52) K. Sekiguchi, S. Sato, S. Kaga, T. Ogata and M. Kodama: Accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins in bivalves and an ascidian fed on *Alexandrium tamarense* cells. *Fisheries Science*, **67**, 301-305. (2001)