報 文

瀬戸内海播磨灘で発生した有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamiyavanichii* と 毒化ムラサキイガイの毒性と毒成分

(平成 22 年 3 月 26 日受理)

相良 剛史^{1,2} 谷山 茂人³ 吉松 定昭⁴ 高谷 智裕³
橋本多美子⁵ 西堀 尚良¹ 西尾 幸郎¹ 荒川 修^{3,*}

Toxicity and Toxin Profile of the Dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* and
Toxic Mussels in Harima-Nada of Seto Inland Sea, Japan

Takefumi SAGARA^{1,2}, Shigeto TANIYAMA³, Sadaaki YOSHIMATSU⁴, Tomohiro TAKATANI³,
Tamiko HASHIMOTO⁵, Naoyoshi NISHIBORI¹, Sachio NISHIO¹ and Osamu ARAKAWA^{3,*}

¹Department of Science for Living, Shikoku University, Junior College:
123-1 Ebisuno, Furukawa, Ohjin-cho, Tokushima 771-1192, Japan;

²Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University:
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan;

³Faculty of Fisheries, Nagasaki University: 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan;

⁴Akashiwo Research Institute of Kagawa Prefecture: 75-5 Yashimahigashi-machi,
Takamatsu, Kagawa 761-0111, Japan;

⁵Department of Dietary Life and Food Sciences, Junior College Division, Mukogawa
Women's University; 6-46 Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan;

*Corresponding author

From October to November 2004, the paralytic shellfish poison (PSP)-producing dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* was observed at Harima-Nada, Seto Inland Sea at a maximum cell density of 4,960 cells/L. The wild cells of the dinoflagellate collected from the same seawaters, and cultured cells derived from them showed toxicity scores of $6.25-15.4 \times 10^{-4}$ and $2.7-3.5 \times 10^{-4}$ MU/cell, respectively, both of which were much higher than those of previously reported strains. PSP of the wild cells was mainly composed of gonyautoxin (GTX) 5 (40.6-52.4 mol%) and GTX4 (15.6-24.8 mol%), showing a unique composition that was greatly different from those of the previously reported strains, or of the cultured cells, whose main toxin component was GTX3 (average 37.6 mol%). The mussel *Mytilus galloprovincialis* collected from the same area in the same period accumulated a relatively high level of PSP (13-28 MU/g), suggesting a risk that *A. tamiyavanichii* may induce high-level PSP contamination of bivalves even at a cell density as low as around 5,000 cells/L.

(Received March 26, 2010)

Key words: 有毒渦鞭毛藻 toxic dinoflagellate; *Alexandrium tamiyavanichii*; ムラサキイガイ mussel; *Mytilus galloprovincialis*; 麻痺性貝毒 paralytic shellfish poison; サキシトキシン saxitoxin; ゴニオトキシン gonyautoxin

緒 言

日本沿岸では、しばしば麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poison; PSP) を産生する有毒渦鞭毛藻の発生により食用二枚貝が毒化し^{1), 2)}, 水産上および食品衛生上大きな問題となっている。特に瀬戸内海では、1992 年に広島湾において *Alexandrium tamarense* を原因として養殖マガキ *Crassostrea gigas* が毒化して以来、毎年のように同種渦鞭毛藻が発生し、関連産業の脅威となっている^{3)~5)}。当

* 連絡先

¹ 四国大学短期大学部生活科学科: 〒771-1192 徳島県徳島市
応神町古川戒子野 123-1

² 長崎大学大学院生産科学研究科: 〒852-8521 長崎県長崎
市文教町 1-14

³ 長崎大学水産学部: 〒852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

⁴ 香川県赤潮研究所: 〒761-0111 香川県高松市屋島東町 75-5

⁵ 武庫川女子大学短期大学部食生活学科: 〒663-8558 兵庫県
西宮市池開町 6-46

初より問題となっていた有毒種は *A. tamarense* および *A. catenella* で、前者は 5,000~10,000 cells/L、後者は 50,000~100,000 cells/L といずれも高密度の発生により二枚貝の毒化を引き起こしてきたが^{6)~8)}、1999 年以降、これらに加えて新たに *A. tamiyavanichii* が出現するようになった^{6), 7), 9)~15)}。本種は以前、*Protogonyaulax cohorticula* と呼ばれ^{16)~18)}、熱帯ないし亜熱帯性の有毒種とされていたが^{18)~21)}、1988 年に相模湾で分布が確認され²²⁾、さらに 1999 年 12 月に瀬戸内海南東部海域で大量発生し、養殖アカガイ *Anadara broughtonii* などの毒化を引き起こした^{9), 10)}。その後 4 年間、同海域では毎年 *A. tamiyavanichii* が出現し、それに起因する二枚貝の毒化も見られたが^{11)~14)}、毒力が出荷規制値 (4 MU/g) を超えることはなかった。しかしながら、当研究室が独自に行っているモニターリングにおいて、2004 年に瀬戸内海播磨灘にて、*A. tamiyavanichii* 以外の既知の PSP 産生渦鞭毛藻が全く観察されないにもかかわらず、二枚貝から規制値を上回る毒性が検出された。*A. tamarense* や *A. catenella* 同様、*A. tamiyavanichii* も二枚貝の高毒性化を招来するのであれば、水産上および食品衛生上新たな脅威をもたらす種として注視する必要がある。そこで本研究では、瀬戸内海播磨灘で二枚貝が規制値を超えて毒化した原因を明らかにするため、同海域における *A. tamiyavanichii* の出現状況を調べるとともに、本種の天然藻体と培養藻体、ならびに毒化ムラサキイガイの毒性と毒成分について検討した。

実験方法

1. 試料

2004 年 10 月 16 日~11 月 4 日に徳島県鳴門市撫養町、同市鳴門町、同市瀬戸町、同市北灘町、香川県東かがわ市引田の沿岸および引田沖（以下、それぞれ St. 1~6 とする）(Fig. 1, Table 1) の水深 0 または 0.5 m にて海水を 5 L ずつ採水した。いずれも 100 μ m 孔および 20 μ m 孔のふるいでろ過し、後者のふるい上から回収された微細藻類に含まれる *A. tamiyavanichii* を試料とした。試料は採取後、生かしたまま研究室に持ち帰り、速やかに各試験に供した。本研究では、10 月 16 日に St. 1~5、10 月 19 日に St. 1~4、11 月 4 日に St. 6 で採取した *A. tamiyavanichii* 天然藻体をそれぞれ At1~5、At1'~4'、および At6 (Table 1) とした。

一方、2004 年 10 月 17 日に St. 4、10 月 21 日に St. 2 でそれぞれ約 100 個体のムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* を採集して試料（それぞれ Mg4 および Mg2）とし、氷蔵にて研究室に持ち帰り、直ちに試験に供した。

2. *A. tamiyavanichii* の細胞数の計測

天然藻体 At1~At5、At1'~At4'、および At6 につき、光学顕微鏡下で細胞数を計測した。

3. *A. tamiyavanichii* の培養

At6 から単離後、予備培養したクローン株を 4 群 (At6-c1~At6-c4) に分け、いずれも ESM 培地^{23), 24)}を用い、培養温度を 20°C、光強度を 40 μ mol photon/m²/s¹、明暗周期を 12 hr/12 hr とし 30 日間培養した。得られた培養藻体 At6-c1: 2.0×10^7 cells, At6-c2: 2.0×10^7 cells, At

Fig. 1. Map showing sampling stations (●) in Harima-Nada where *A. tamiyavanichii* and/or mussel *M. galloprovincialis* specimens were collected.

Table 1. Cell density and toxicity of *A. tamiyavanichii* at Harima-Nada in 2004, along with toxicity of mussel *M. galloprovincialis*

Species	Date of collection	Place of collection*	Sample code	Cell density (cells/L)	Number of assayed cells	Toxicity (MU/cell or MU/g)**	
						Mouse assay	HPLC
<i>A. tamiyavanichii</i>	Oct. 16	St. 1	At1	388	19×10^3	$< 25.7 \times 10^{-4}$	—
		St. 2	At2	1930	97×10^3	15.4×10^{-4}	21.5×10^{-4}
		St. 3	At3	395	20×10^3	$< 25.3 \times 10^{-4}$	—
		St. 4	At4	4960	250×10^3	6.25×10^{-4}	8.7×10^{-4}
		St. 5	At5	96	5×10^3	$< 104 \times 10^{-4}$	—
	Oct. 19	St. 1	At1'	0.3	—	—	—
		St. 2	At2'	0.5	—	—	—
		St. 3	At3'	16	—	—	—
		St. 4	At4'	0	—	—	—
	Nov. 4	St. 6	At6	350	—	—	—
		(Cultured cells)	At6-c1	—	20×10^6	2.7×10^{-4}	3.8×10^{-4}
			At6-c2	—	20×10^6	3.5×10^{-4}	3.5×10^{-4}
			At6-c3	—	25×10^6	3.4×10^{-4}	2.9×10^{-4}
			At6-c4	—	35×10^6	2.7×10^{-4}	2.8×10^{-4}
<i>M. galloprovincialis</i>	Oct. 17	St. 4	Mg4	—	—	28	50
	Oct. 21	St. 2	Mg2	—	—	13	—

* See Fig. 1 for the locations of St. 1–6.

** Toxicity of *A. tamiyavanichii* is expressed in MU/cell, and that of *M. galloprovincialis* in MU/g.

—: not designated or not assayed.

6-c3: 2.5×10^7 cells, At6-c4: 3.5×10^7 cells (Table 1) を以下の試験に供した。

4. 試験液の調製

天然藻体 At1~5 および培養藻体 At6-c1~c4 につき、0.5 mol/L 酢酸溶液を加えて超音波破碎して毒を抽出後、遠心分離 ($2,000 \times g$, 20 分間) して得られた上清を試験液とした。

一方、ムラサキイガイ Mg4 と Mg2 については、食品衛生検査指針理化学編麻痺性貝毒検査法²⁵⁾に準じて毒の抽出を行った。それぞれ剥き身 100 g を合一し、ホモジナイズ後、10 g を分取して 0.1 M 塩酸で毒を加熱抽出し、遠心分離 ($10,000 \times g$, 20 分間) 後の上清を試験液とした。

5. 毒性試験

At1~5, At6-c1~c4, Mg4 および Mg2 につき、食品衛生検査指針理化学編麻痺性貝毒検査法²⁵⁾ (公定法) に準じて各試験液をマウス毒性試験に供し、藻体では 1 細胞当たり、ムラサキイガイでは 1 g 当たりの毒力 (マウスユニット; MU) を測定した。ここで 1 MU とは、体重 20 g の ddY 系雄マウスを 15 分で死亡させる毒力と定義する。本試験の実施にあたっては、文部省 (現 文部科学省) 学術国際局長通知 “大学等における動物実験について” (文学情第一四一号) に準じた配慮を行った。

6. 毒成分分析

1) HPLC 分析

毒性試験で検出限界以上の毒力を示した At2, At4, At6-c1~c4, ならびに比較的毒力が強かった Mg4 を対象に毒成分の分析を行った。すなわち、藻体試料については試験液を限外ろ過 (10,000 Da) したものを、Mg4 については試

験液を Sep-Pak C18 カートリッジカラム (Waters 社製) 処理および限外ろ過 (10,000 Da) に付したものを HPLC 分析に供した。

本分析は、従来の HPLC 蛍光法^{26), 27)}に加え、Hashimoto らが開発した方法^{9), 28)}に準拠して行った。すなわち、ゴニオトキシン (GTX) 群とプロトゴニオトキシン (PX) 群 (C 群) については一括して分析を行い、サキントキシン (STX) 群のみ別に分析した。GTX/PX 群の分析では、カラムに HG3013N ($\phi 4.6 \times 50$ mm, Hitachi) と Develosil C-30 UG-5 ($\phi 4.6 \times 250$ mm, Nomura Chemical 社製) を用い、前者の温度を 50°C、後者を 25°C に加温制御した。移動相 A: 5 mmol/L ヘプタフルオロ酪酸を含む 10 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.8) および移動相 B: 10 mmol/L ヘプタフルオロ酪酸を含む 10% アセトニトリル–30 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.1) を用い、分析時間 0~25 分を移動相 A, 25~45 分を移動相 B, 45~70 分を移動相 A として、流速を 0.6 mL/min に設定した。カラムからの溶離液に 7 mmol/L 過ヨウ素酸を含む 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 10.0) を混合し、65°C で加熱して蛍光化後、0.5 mol/L 酢酸で蛍光強度を増幅し、励起波長 340 nm, 蛍光波長 410 nm で測定した。一方、STX 群の分析は、カラムに Develosil C-8 ($\phi 4.6 \times 250$ mm, Nomura Chemical 社製), 移動相に 2 mmol/L ヘプタンスルホン酸を含む 4% アセトニトリル–30 mmol/L リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.3) を用いて、同様の条件で分析した。

2) LC/MS 分析

Mg4 の試験液を限外ろ過 (10,000 Da) 後、既報¹⁹⁾に準

じて Bio-Gel P-2 (Bio-Rad) カラムで処理した部分精製毒を LC/MS 分析に供した。本分析は Hashimoto らの方法²⁸⁾に準拠し、MS 部に高速噴霧イオン化 (SSI) 法を備えた M-8000 (Hitachi) を使い、ポジティブモード、第一細孔温度 170°C、シールド温度 300°C、検出器電圧 400 V、フォーカス電圧 30 V、ドリフト電圧 30 V で行った。

結 果

1. A. *tamiyavanichii* の細胞密度

2004 年 10 月 16 日の St. 1~5 における A. *tamiyavanichii* の細胞密度は 96~4,960 cells/L (平均細胞密度±標準偏差: 1,554±1820 cells/L, 以下同様) であったが、10 月 19 日には St. 1~4 で 0~16 cells/L (4.2±6.8 cells/L) と急激に減少した。その後、11 月 4 日に St. 6 で 350 cells/L が観測された (Table 1)。一方、A. *tamiyavanichii* 以外の既知の PSP 産生渦鞭毛藻は期間を通して全く観察されなかった。

2. A. *tamiyavanichii* とムラサキイガイの毒性

Table 1 に各試料の毒性を示す。A. *tamiyavanichii* 天然藻体については、供試 5 藻体中、十分な細胞数が得られた 2 藻体 (At2 および At4) でのみマウス毒性を測定することができ、毒力はそれぞれ 15.4 および 6.25×10^{-4} MU/cell で、相互に大きな差異があった。一方、培養 4 藻体は $2.7 \sim 3.5 \times 10^{-4}$ MU/cell と、互いに類似した毒力を示した。他方、ムラサキイガイ (Mg4 および Mg2) は共に有毒で、毒力はそれぞれ 28 および 13 MU/g であった。

3. A. *tamiyavanichii* とムラサキイガイの毒成分

HPLC 分析における各試料のクロマトグラムを Fig. 2, それらから算出した成分ごとの物質量を Table 2 に示す。総 PSP 量は、供試した天然 2 藻体で 2,410 および 840 fmol/cell, 培養 4 藻体で 220~359 fmol/cell と毒力同様、前者のほうが後者よりも高かった。天然藻体では GTX5 の含量が最も多く (1,260 および 341 fmol/cell), 次いで GTX4, STX, PX2, GTX6, GTX3, GTX1 の順となった。少量の PX1, GTX2 および neoSTX も検出された。一方、培養藻体では GTX3, GTX5, PX2, GTX2, STX, neoSTX, および GTX4 の含量が比較的多く (それぞれ平均毒量 103, 51.6, 38.6, 21.8, 21.6, 14.2 および 12.2 fmol/cell), その他に少量の PX1, dcGTX3, GTX1, hySTX を含んでいた。すなわち、天然藻体は GTX5 (52.4 および 40.6 mol%) を主成分, GTX4 (15.6 および 24.8 mol%) や STX (15.8 および 13.8 mol%) を主な副成分とするのに対し、培養藻体は GTX3 (平均 37.6 mol%, 以下同様) が主成分, GTX5 (18.1 mol%) や PX2 (12.8 mol%) が主要な副成分で, GTX4 はわずか 4.7 mol%, STX も 7.7 mol% しか含まれていなかった (Fig. 3)。

ムラサキイガイの試料のうち、毒力の高かった Mg4 につき、HPLC 分析に供したところ、総 PSP 量は 37.6 nmol/g と算出された (Fig. 2, Table 2)。主成分は GTX4

Fig. 2. HPLC chromatograms of extracts from A. *tamiyavanichii* and mussel M. *galloprovincialis*, and of PSP standards.

At2 and At4: wild cells of A. *tamiyavanichii*; At6-c1, At6-c2, At6-c3 and At6-c4: cultured cells of A. *tamiyavanichii*; Mg4: M. *galloprovincialis*. a: PX1 (C1); b: PX2 (C2); c: GTX5; d: dcGTX3; e: dcGTX2; f: GTX3; g: GTX4; h: GTX2; i: GTX1; j: neoSTX; k: hySTX; l: dcSTX; m: STX

および GTX5 で、23.8 mol% (8.92 nmol/g) および 22.5 mol% (8.46 nmol/g) を占めており、副成分として STX や GTX1, GTX3 が含まれていた (Table 2, Fig. 3)。微量の PX1, 2, GTX2, GTX6, dcGTX2, neoSTX も検出された。

既報¹⁾の比毒性に基づき各試料の PSP 量を毒力に換算したところ、天然藻体は 21.5 および 8.7×10^{-4} MU/cell, 培養藻体は $2.8 \sim 3.8 \times 10^{-4}$ MU/cell, ムラサキイガイは 50 MU/g となった (Table 1)。

Mg4 の LC/MS 分析では、基本的に HPLC 分析と一致す

Table 2. Amount of each PSP component in wild and cultured cells of *A. tamiyavanichii*, and in mussel *M. galloprovincialis*

Component	<i>A. tamiyavanichii</i> (wild)		<i>A. tamiyavanichii</i> (cultured)					<i>M. galloprovincialis</i>
	At2 (fmol/cell)	At4	At6-c1	At6-c2	At6-c3 (fmol/cell)	At6-c4	Mean±SD	Mg4 (nmol/g)
PX1 (C1)	10.4	5.94	11.1	16.9	5.09	3.12	9.05±5.40	1.27
PX2 (C2)	127	56.5	43.1	71.4	22.1	17.8	38.6±21.2	2.44
GTX1	63.6	25.9	2.55	2.60	4.80	2.17	3.03±1.03	4.80
GTX2	6.56	2.37	23.1	24.2	22.6	17.3	21.8±2.65	1.25
GTX3	58.5	31.2	96.2	109	109	100	103±5.48	3.64
GTX4	375	208	6.44	9.36	14.6	18.3	12.2±4.60	8.92
GTX5	1,260	341	68.2	63.8	39.9	34.6	51.6±14.6	8.46
GTX6	114	45.8	—	—	—	—	—	1.28
dcGTX2	—	—	—	—	—	—	—	0.0976
dcGTX3	—	—	6.41	9.29	4.77	3.06	5.88±2.30	—
neoSTX	9.61	6.36	19.2	24.2	7.14	6.08	14.2±7.76	0.207
hySTX	—	—	—	—	4.25	1.21	2.73	—
STX	381	116	12.5	27.7	30.2	15.8	21.6±7.55	5.17
Total	2,410	840	289	359	264	220	283±58.1	37.6

Fig. 3. Toxin composition of wild and cultured cells of *A. tamiyavanichii*, and of mussel *M. galloprovincialis*

■ PX1 (C1); □ PX2 (C2); ▨ GTX1; ▩ GTX2;
 ▤ GTX3; ▥ GTX4; ▦ GTX5; ▧ GTX6;
 ▨ dcGTX2; ▩ dcGTX3; ▤ hyneoSTX;
 ▥ neoSTX; ▦ hySTX; ▧ dcSTX; ▨ STX

る結果が得られた。すなわち、 m/z 300 のクロマトグラムにおいて GTX5 ($[M+H-SO_3]^+=300$) と STX ($[M+H]^+=300$)、 m/z 316 で GTX3 ($[M+H-SO_3]^+=316$) と GTX2 ($[M+H-SO_3]^+=316$)、 m/z 332 で GTX4 ($[M+H-SO_3]^+=332$) と GTX1 ($[M+H-SO_3]^+=332$) が検出された (Fig. 4)。

考 察

本研究では、播磨灘の6地点で採水した海水中に最高4,960 cells/Lの密度で *A. tamiyavanichii* が観察された。

Fig. 4. Selected ion mass chromatograms (m/z 300, 316 and 332) of partially purified toxin from mussel *M. galloprovincialis* (Mg4).

同海域では、1999年に最高30,000 cells/L、その後も2003年にかけて最高8,000~27,000 cells/Lの密度で同種の出現が観測されている^{10)~15)}。これらと比較して、今回の調査で確認された *A. tamiyavanichii* の出現密度は特に高いものではなかった。

一方、*A. tamiyavanichii* 天然藻体 (At2 および At4) の毒力は、それぞれ 15.4 および 6.25×10^{-4} MU/cell と測定された。また、これらとほぼ同時期同海域で採取したムラサキガイ (Mg2 および Mg4) の毒力は13および28 MU/gであった。Hashimoto ら⁹⁾によれば、1999年に播磨灘で発生した *A. tamiyavanichii* 天然藻体の毒力は 13.9×10^{-5} MU/cell、そのときのムラサキガイの毒力は最高7.3 MU/gであったという。すなわち、今回得た藻体の毒力は、Hashimoto らのものより5~11倍も高かったわけであり、ムラサキガイが28 MU/gと比較的高い水準にまで毒化したのは、*A. tamiyavanichii* の出現密度というよりは1細胞当たりの毒力が通常より高かったため

と推察される。

他方、A. *tamiyavanichii* 培養藻体 (At6-c1~c4) の毒力は、 $2.7\sim 3.5\times 10^{-4}$ MU/cell と天然藻体よりは低かったが、Beppu ら⁶⁾が2004年に瀬戸内海備後灘から分離したA. *tamiyavanichii* 培養藻体の毒力と比較すると2~9倍も高かった。培養藻体の毒力が天然藻体のそれより低いのはPSP産生渦鞭毛藻では一般的な現象であり²⁹⁾、At6も、本来、高い毒産生能を有していたと推察される。

次に、毒組成を見ると、今回採取したA. *tamiyavanichii* 天然藻体はGTX5を主成分とし、加えて相当量のGTX4, STXなどを含んでいた。これに対し、Hashimoto ら⁹⁾の天然藻体はGTX4を主成分、GTX2, 3を主要な副成分としていた。すなわち、著量のGTX4を含む点では両者は一致したが、本研究の藻体ではGTX5, Hashimoto らの藻体ではGTX2, 3の割合が高いという点で大きく異なっていた。Lim ら³⁰⁾は、本種を低い温度(20℃)で培養すると、GTX4の産生量が減少し、GTX3量が増加すること、照度が低いと温度が高くてもGTX3量が増加することを報告している。藻体の採取月(本研究では10月、Hashimoto らの場合は12月)を考慮すれば、環境水温、照度共に低かったことが、Hashimoto らの藻体でGTX3の割合が顕著に高かった原因の1つと推察された。A. *tamiyavanichii* の毒組成は多様で、これまで採取地や培養条件の違いにより、PX1+2が3割程度と多いもの⁷⁾、GTX1+4が6~9割程度と非常に多いもの^{9), 19), 22), 30), 31)}、GTX2+3が3~7割程度と比較的多いもの^{6), 9)}が報告されているが、いずれもGTX5はおおむね1割以下であり、本研究で用いた株のように、4割以上を占めた例は初めてである。

一方、培養藻体の毒組成につき、Beppu ら⁶⁾の培養藻体と比較すると、副成分の組成には大きな差異があったが、GTX3を主成分とする点では一致していた。両者の培養条件は、他の報告^{7), 9), 19), 22), 30), 31)}に比べて低温度、低照度でかつ明期時間が短いという特徴がある。前述のLim らの報告³⁰⁾に鑑みれば、このこともGTX3の産生効率を高めた一因と推察された。

ムラサキイガイの毒成分組成は、おおむねA. *tamiyavanichii* 天然藻体のそれを反映したものであった。1999年の毒化事例⁹⁾と比較しても、GTX4の割合が少なくGTX5の割合が高いという相違点が目立つ。このことに加え、今回の調査でA. *tamiyavanichii* 以外のPSP産生渦鞭毛藻が全く観察されなかったことから、当該ムラサキイガイはA. *tamiyavanichii* により毒化したものと判断した。

HPLC分析の結果から算出した毒力は、A. *tamiyavanichii* 培養藻体ではマウス毒性試験で測定した毒力の 1.07 ± 0.21 (平均値±標準偏差)倍となり、両者はほぼ一致したが、A. *tamiyavanichii* 天然藻体では1.39および1.40倍、ムラサキイガイでは1.80倍と夾雑物の多い試料ほど大きなずれが見られた。PSP同様ナトリウムチャンネルに作用

するテトロドトキシン(TTX)では、マウス毒性試験において試料中に高濃度の塩化ナトリウムが存在するとマウスの致死時間が延び、毒量が実際の値よりも低く見積もられることがある^{32), 33)}。毒力のずれの原因として、このような夾雑物の影響やHPLC分析前処理中の低毒性成分から高毒性成分への変換(特にGTX5からSTXへの変換)³⁴⁾などが考えられる。

今回、ムラサキイガイの毒化時に出現していたA. *tamiyavanichii* の細胞密度は、最高でも4,960 cell/Lと別段高い水準ではなく、同海域における過去の出現細胞密度^{10)~15)}と同程度であった。したがって、A. *tamiyavanichii* が高い毒産生能を示す場合、その出現細胞密度が5,000 cells/L未満であっても、二枚貝の毒化を引き起こす可能性が示唆される。また、同じ海域であるにもかかわらず、1999年⁹⁾と2004年(本研究)に発生したA. *tamiyavanichii* では、産生毒量や毒組成が大きく異なっていた。今後、遺伝的な変異や海洋環境の変化により、さらなる高毒量産生株の出現が懸念される。以上のことより、これまで問題となってきたA. *tamarense* やA. *catenella* のみならず、播磨灘に分布するA. *tamiyavanichii* も食品衛生上、極めて危険な種であると結論した。

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金に基づく研究成果の一部であり、関係各位に深謝する。

文 献

- 1) Hashimoto, K., Noguchi, T. Recent studies on paralytic shellfish poison in Japan. Pure & Appl. Chem., **61**, 7-18 (1989).
- 2) Murakami, R., Noguchi, T. Paralytic shellfish poison. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food. Hyg. Soc. Japan), **41**, 1-10 (2000).
- 3) Asakawa, M., Miyazawa, K., Noguchi, T. Studies on paralytic shellfish poison (PSP) toxification of bivalves in association with appearance of *Alexandrium tamarense*, in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food. Hyg. Soc. Japan), **34**, 50-54 (1993).
- 4) Asakawa, M., Miyazawa, K., Takayama, H., Noguchi, T. Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* as the source of paralytic shellfish poison (PSP) contained in bivalves from Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. Toxicon, **33**, 691-697 (1995).
- 5) Asakawa, M., Takayama, H., Beppu, R., Miyazawa, K. Occurrence of paralytic shellfish poison (PSP)-producing dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan, during 1993-2004 and its PSP profiles. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food. Hyg. Soc. Japan), **46**, 247-251 (2005).
- 6) Beppu, R., Nojima, K., Tsuruda, S., Gomez-Delan, G., Barte-Quilantang, M., Taniyama, S., Sagara, T., Nishio, S., Takayama, H., Miyazawa, K., Asakawa, M. Occur-

- rence of PSP-producing dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* in Bingo-Nada, the central coastal water of the Seto Inland Sea, Hiroshima Prefecture, Japan. Mar. Pollut. Bull., **56**, 758–763 (2008).
- 7) Oh, S. J., Matsuyama, Y., Nagai, S., Itakura, S., Yoon, Y. H., Yang, H. S. Comparative study on the PSP component and toxicity produced by *Alexandrium tamiyavanichii* (Dinophyceae) strains occurring in Japanese coastal water. Harmful Algae, **8**, 362–368 (2009).
 - 8) Sakamoto, S., Kotani, Y. Variation of paralytic shellfish contents and composition in *Alexandrium tamarense* collected at Kure Bay, Hiroshima Prefecture. Bull. Nansei Natl. Fish. Res. Inst., **31**, 45–52 (1998).
 - 9) Hashimoto, T., Matsuoka, S., Yoshimatsu, S., Miki, K., Nishibori, N., Nishio, S., Noguchi, T. First paralytic shellfish poison (PSP) infestation of bivalves due to toxic dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii*, in the southeast coasts of the Seto Inland Sea, Japan. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food. Hyg. Soc. Japan), **43**, 1–5 (2002).
 - 10) Yoshimatsu, S., Ochi, Y., Ueda, T., Matsumoto, S., Yamanishi, S., Miki, K. “An annual report at 1999”, ed. by Kagawa Akashiwo Research Institute, Kagawa Prefecture, 2001, p. 13–15.
 - 11) Ochi, Y., Matsuoka, S., Yoshimatsu, S., Yamanishi, S., Miki, K. “An annual report at 2000”, ed. by Kagawa Akashiwo Research Institute, Kagawa Prefecture, 2002, p. 13–15.
 - 12) Ochi, Y., Matsuoka, S., Yoshimatsu, S., Yamanishi, S., Miki, K. “An annual report at 2001”, ed. by Kagawa Akashiwo Research Institute, Kagawa Prefecture, 2003, p. 13–15.
 - 13) Ochi, Y., Matsuoka, S., Yoshimatsu, S., Yamanishi, S., Miki, K. “An annual report at 2002”, ed. by Kagawa Akashiwo Research Institute, Kagawa Prefecture, 2004, p. 14–16.
 - 14) Honda, K., Matsuoka, S., Yoshimatsu, S., Miki, K. “An annual report at 2003”, ed. by Kagawa Akashiwo Research Institute, Kagawa Prefecture, 2005, p. 14–16.
 - 15) Honda, K., Ohyama, K., Yoshimatsu, S., Miki, K. “An annual report at 2004”, ed. by Kagawa Akashiwo Research Institute, Kagawa Prefecture, 2006, p. 14–16.
 - 16) Balech, E. Dinoflagelados nuevos o interesantes del Golfo de Mexico y Caribe. Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat. “Ber. Rev.”, **2**, 77–129 (1967).
 - 17) Taylor, F., J., R., Fukuyo, Y., Larsen, J. “Manual on harmful marine microalgae”, Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. eds., France, UNESCO, 1995, p. 296–299.
 - 18) Fukuyo, Y., Pholpunthin, P., Yoshida, K. *Protogonyaulax* (Dinophyceae) in the Gulf of Thailand. Bull. Plankton Soc. Jpn., **35**, 9–20 (1988).
 - 19) Kodama, M., Ogata, T., Fukuyo, Y., Ishimaru, T., Wisessang, S., Saitanu, K., Panichyakarn, V., Piyakarnchana, T. *Protogonyaulax cohorticula*, a toxic dinoflagellate found in the Gulf of Thailand. Toxicon, **26**, 707–712 (1988).
 - 20) Phanichyakarn, V., Wisessang, S., Piyakarnchana, T., Fukuyo, Y., Ishimaru, T., Kodama, M., Ogata, T. Ultra-structure of *Alexandrium cohorticula* found in the Gulf of Thailand. Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Smayda, T. J., Shimizu, Y. eds., Elsevier, Amsterdam, 1993, p. 165–168.
 - 21) Usup, G., Pin, L. C., Ahmad, A., Teen, L. P. Phylogenetic relationship of *Alexandrium tamiyavanichii* (Dinophyceae) to other *Alexandrium* species based on ribosomal RNA gene sequences. Harmful Algae, **1**, 59–68 (2002).
 - 22) Ogata, T., Pholpunthin, P., Fukuyo, Y., Kodama, M. Occurrence of *Alexandrium cohorticula* in Japanese coastal water. J. Appl. Phycol., **2**, 351–356 (1990).
 - 23) 岡市友利, 西尾幸郎, 今富幸也. 2. 有毒プランクトン研究法—試料の採集と培養. 有毒プランクトン—発生・作用機構・毒成分. 恒星社厚生閣, 東京, 1982, p. 22–34.
 - 24) Watanabe, M. M., Miroki, M., Simizu, A., Erata, M., Mori, F., Sakurai, Y. NIES-collection, List of strains, Fifth edition, Microalgae and Protozoa. National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, 1997, p. 140.
 - 25) 大島泰克. 第7章自然毒・A動物毒・3. 麻痺性貝毒. 食品衛生検査指針理化学編(厚生労働省監修), 日本食品衛生協会, 東京(2005), p. 673–680.
 - 26) Oshima, Y. Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. eds., Paris, France, UNESCO, 1995, p. 81–94.
 - 27) Arakawa, O., Noguchi, T., Onoue, Y. Paralytic shellfish toxin profiles of xanthid crabs *Zosimus aeneus* and *Atergatis floridus* collected on reefs of Ishigaki Island. Fish. Sci., **61**, 659–662 (1995).
 - 28) Hashimoto, T., Nishio, S., Nishibori, N., Yoshioka, S., Noguchi, T. A new analytical method for gonyautoxins based on postcolumn HPLC. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food. Hyg. Soc. Japan), **43**, 144–147 (2002).
 - 29) Sekiguchi, K., Ogata, T., Kaga, S., Yoshida, M., Fukuyo, Y., Kodama, M. Accumulation of paralytic shellfish toxins in the scallop *Patinopecten yessoensis* caused by the dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Otsuchi Bay, Iwate Prefecture, northern Pacific coast of Japan. Fish. Sci., **67**, 1157–1162 (2001).
 - 30) Lim, P.-T., Leaw, C.-P., Usup, G., Kobiyama, A., Koike, K., Ogata, T. Effects of light and temperature on growth, nitrate uptake, and toxin production of two dinoflagellates: *Alexandrium tamiyavanichii* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). J. Phycol., **42**, 786–799 (2006).
 - 31) Wisessang, S., Ogata, T., Kodama, M., Fukuyo, Y., Ishimaru, T., Saitanu, K., Yongvanich, T., Piyakarnchana, T. Accumulation of paralytic shellfish toxins by green mussel *Perna viridis* by feeding on cultured cells of *Alexandrium cohorticula* isolated from the Gulf of Thailand. Nippon Suisan Gakkaishi, **57**, 127–131 (1991).
 - 32) Ozawa, C. Detoxication of poisonous puffer roe pickled in rice bran. I. Toxicity of puffer roe pickled in rice bran. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food. Hyg. Soc. Japan), **24**, 258–262 (1983).

-
- 33) Shimada, K., Ohtsuru, M., Nigota, K. Effects of coexisting materials on the mouse bioassay method for the determination of tetrodotoxin. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food. Hyg. Soc. Japan), **26**, 507–510 (1985).
- 34) Nagashima, Y., Sato, Y., Noguchi, T., Fuchi, Y., Hayashi, K., Hashimoto, K. Paralytic shellfish poison in the “hiogi” scallop *Chlamys nobilis*. *Mar. Biol.*, **98**, 243–246 (1988).