調査・資料

キタマクラ (*Canthigaster rivulata*) 中のテトロドトキシン (TTX),
および麻痺性貝毒 (PSTs) の含有量と組成について

(平成27年11月15日受理)

仲谷 正* 清水 充 山野 哲夫

The Contents and Composition of Tetrodotoxin and Paralytic Shellfish Poisoning Toxins
in Marine Pufferfish *Canthigaster rivulata*

Tadashi NAKATANI *, Mitsuru SHIMIZU and Tetsuo YAMANO

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences: 8-34 Tojo-cho, Tennouji-ku,
Osaka 543-0026, Japan; *Corresponding author

The contents and composition of tetrodotoxin (TTX) and paralytic shellfish toxins (PSTs) in skin, muscle, and internal organs of two samples of marine puffer fish *Canthigaster rivulata* from Wakayama prefecture, Japan, were analyzed. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection (LC-FLD) were used for the analysis of TTX and PSTs, respectively. For both samples, TTX and two analogues of PSTs, saxitoxin (STX) and decarbamoyl STX (dcSTX), were detected at levels over the limit of quantization (LOQ) only in the skin. These toxins in the muscle and internal organs were at trace levels, or not detected (ND). TTX contents were 11,000 and 13,000 ng/g (or 35 and 41 nmol/g), while PSTs contents were 168 and 460 ng/g (or 0.63 and 1.72 nmol/g) in the two skin specimens. The compositions of total toxin content were 98.2 and 96.0 mol% TTX and 1.8 and 4.0 mol% PSTs, respectively. Thus, the main contributor to toxin content in *C. rivulata* skin was TTX and the levels of PSTs toxicity in *C. rivulata* were very low. When the PSTs contents were converted into mouse unit score from the LC-FLD results, the resulting values of 1.0 and 2.8 MU/g of PSTs in *C. rivulata* skin were similar to those in *Takifugu poecilonotus* and *Takifugu vermicularis* in Japan, as determined in previous studies.

(Received November 15, 2015)

Key words: LC-MS; LC-FLD; キタマクラ *Canthigaster rivulata*; テトロドトキシン tetrodotoxin; 麻痺性貝毒 paralytic shellfish toxins; サキシトキシン saxitoxin; デカルバモイルサキシトキシン decarbamoyl STX

緒 言

フグを原因とする食中毒は、例年西日本を中心に発生しており、平成元年～22年の間に発生した食中毒の全死者144名のうち56名(39%)をフグ喫食由来の食中毒事例が占めている。また、フグ喫食による食中毒は、死亡率(死者数/患者数)が高いこと、家庭内での発生事例が最も多いことがその特徴として挙げられる¹⁾。

日本近海に生息するフグの毒成分は、テトロドトキシン(TTX)であることが一般的に知られてきた。しかしながら日本沿岸域で採取されたコモンフグ(*Takifugu poecilonotus*)、ナシフグ(*Takifugu vermicularis*)、ヒガンフグ

(*Takifugu pardalis*) などにはTTX以外にも麻痺性貝毒(PSTs)の一成分であるサキシトキシン(STX)が微量に存在していることが報告されている^{2), 3)}。そのほか、フィリピンに生息するフグ中にもPSTsがTTXと等量かそれ以上の量で混在していることが確認されており⁴⁾、タイやカンボジアに生息している淡水フグではPSTsのみを含有していることが報告されている^{5), 6)}。最近の報告では、日本沿岸部で採取されたホシフグ(*Arothron firmamentum*)の卵巣中からも高濃度のPSTsが検出されている⁷⁾。これらの報告によりフグの毒には、種や生息域によってTTXとPSTsが異なる比率で存在していることが明らかにされてきた。

日本近海域には多種のフグが生息していることや、フグ喫食を原因とする食中毒の死亡率が食中毒事例の中でも非常に高いことを考慮するとフグ中の詳細な毒成分の調査

* 連絡先 tada-nakatani@city.osaka.lg.jp

大阪市立環境科学研究所: 〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34

は、食品衛生上また学術的にも重要であると考えられる。

今回、本州中部以南部の太平洋に生息している小型フグの一種であるキタマクラ (*Canthigaster rivulata*)⁸⁾ について、TTXおよびPSTsの含有量を調査し若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

2007年10月に和歌山県紀州灘沿岸部で採取されたキタマクラ2試料を使用した。種の鑑別は、「改訂日本近海産フグ類の鑑別と毒性」⁸⁾などを参考にして行った。試料1および2の体重は、21.4、および22.2 gで全長はそれぞれ9.0、および9.5 cmであった。試料は皮、筋肉、および内臓に分割し、冷凍後、ドイツ連邦共和国のFriedrich Schiller University JenaのBernd Luckas教授の研究室へ空輸した。すべての試験は、この研究室内で実施された。

2. 標準品および試薬等

標準品：TTX標準品はAxxora社製のものを使用した。PSTs各標準品、すなわちサキシトキシン (STX)、デカルバモイルサキシトキシン (dcSTX)、ネオサキシトキシン (neoSTX)、ゴニオトキシン1~4 (GTX1~4)、デカルバモイルゴニオトキシン2、および3 (dcGTX2, 3) はNational Research Council Canada (NRC) から購入したCRM-STX、-dcSTX、-NEO、-GTX1&4、-GTX2 & 3、および-dcGTX2 & 3を用いた。

そのほかの試薬：アセトニトリルはACROS Organics社製、テトラヒドロフラン (THF) はFisher Scientific社製の高速液体クロマトグラフ用を用いた。塩酸、酢酸、硝酸、過ヨウ素酸、リン酸、酢酸ナトリウムおよびアンモニアはMerck社製、ヘプタンスルホン酸ナトリウム、オクタンスルホン酸ナトリウム、リン酸アンモニウム、ギ酸およびギ酸アンモニウムは、ACROS Organics社製のanalytical gradeのものを用いた。

水は、水道水をMillipore-Q RG Ultra Pure Water System (Millipore社製) より精製して用いた。

3. 装置

超音波ホモジナイザー：BANDELIN UW70 (Bandelin社)。遠心分離機：Heraeus SEPATECH Labofuge A (Boxter社) およびHERMLE 2200M/H (Hermle社)。LC-MS: HPLC部にAgilent 1100 Series (Agilent Technologies社製) を、質量分析計部には、API 165 (PE Sciex社製) を使用した。ポストカラム蛍光検出高速液体クロマトグラフ (LC-FLD)：オートサンプラーにAS 950 (Jasco社製)、カラムオープンにCTO-10AC ((株)島津製作所製)、移動相のポンプにLC-9A ((株)島津製作所製)、反応液および中和液のポンプにPU980 (Jasco社製)、蛍光検出器にFP920 (Jasco社製)、反応槽にCRX400 (Pickering Laboratories社製) を連結させて使用した。

4. 試料溶液の調製

皮、筋肉および内臓に分割した試料を粉碎後、それぞれ2 g用い0.03 mol/L酢酸3 mLで超音波粉碎抽出し遠心分離した (1分間、2,500 rpm)。皮抽出液上清は3 mLに、水分含有量が皮より多かった筋肉および内臓各試料の抽出液上清は4 mLに定容後、再度遠心分離し (10分間、5,000 rpm)、ナイロンフィルター (0.45 μ m) に通液した上清をPSTs定量分析用の試料溶液とした。C1およびC2の毒成分量は、既法に^{9), 10)} 準じ試料溶液150 μ Lと1 mol/L塩酸37 μ Lを十分に攪拌し、90℃で15分間加熱後1 M酢酸ナトリウム75 μ L添加して得られた溶液を無処理の試料溶液と同様に分析し、増加したGTX2およびGTX3の毒成分量より算出した。

TTXの測定にはPSTs定量分析用の試料溶液をさらに40倍希釈し、分析に供した。

5. 測定条件

1) LC-MSによるTTXの測定条件

TTXは、Dienerらの方法¹¹⁾ を一部改変し測定した。

分析カラム：SeQuant ZIC-HILIC (5 μ m, 2.1 mm $\times$ 150 mm, SeQuant社製)、ガードカラムSeQuant ZIC-HILIC (5 μ m, 2.1 mm $\times$ 20 mm, SeQuant社製)、移動相：A液：10 mMギ酸アンモニウムおよび10 mMギ酸緩衝液 (pH 3.7)、B液：5 mMギ酸アンモニウムおよび2 mMギ酸含有80%アセトニトリル (pH 4.0)、グラジエント条件：0 min (B液100%) $\rightarrow$ 7 min (B液55%) $\rightarrow$ 10 min (B液55%) $\rightarrow$ 10.01 min (B液35%) $\rightarrow$ 18 min (B液35%) $\rightarrow$ 18.01 min (B液100%) $\rightarrow$ 28 min (B液100%)、流速：0.25 mL/min、注入量：20 μ L、カラム温度：40℃、イオン化法：ESI法 (positive)、測定モード：SIM、測定イオン： m/z 320。

2) LC-FLDによるPSTsの分析条件

PSTsは、Diener¹²⁾ らの方法に従い測定した。

分析カラム：Luna C18 (2) 100A (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm, Phenomenex社製)、移動相：A液：6 mmol/Lオクタンスルホン酸ナトリウム、6 mmol/Lヘプタンスルホン酸ナトリウム、および40 mmol/Lリン酸アンモニウムを含む0.75% THF緩衝液 (pH 7.0)、B液：7 mmol/Lオクタンスルホン酸ナトリウム、7 mmol/Lヘプタンスルホン酸ナトリウム、48 mmol/Lリン酸アンモニウム、10%アセトニトリルを含む1% THF緩衝液 (pH 7.0)、グラジエント条件：0 min (B液0%) $\rightarrow$ 15 min (B液0%) $\rightarrow$ 16 min (B液100%) $\rightarrow$ 43 min (B液100%) $\rightarrow$ 44 min (B液0%) $\rightarrow$ 65 min (B液0%)、流速：1 mL/min、注入量：20 μ L、カラム温度：25℃、検出波長：励起波長：333 nm、蛍光波長：395 nm、反応コイル：TEFテフロンコイル (0.3 mm $\times$ 15 m)、反応液：10 mmol/L過ヨウ素酸-550 mmol/Lアンモニア水、中和液：750 mmol/L硝酸、反応液および中和液流速：0.4 mL/min、反応温度：50℃。

6. 定 量

ピーク面積法により作成した絶対検量線を用いて定量を行った。検量線は、Bernd Luckas教授の研究室内ですでに調製されたTTX標準原液およびPSTs混合標準原液を0.03 mol/Lの酢酸を用い適宜希釈し、TTXに対しては22.4~740 ng/mLの濃度範囲内で7点の標準溶液を、PSTsに対してはSTXで36~210 ng/mL, dcSTXで40~

240 ng/mL, neoSTXで103~615 ng/mL, GTX1で270~1635 ng/mL, GTX2で29~180 ng/mL, GTX3で10~60 ng/mL, GTX4で90~540 ng/mL, dcGTX2で25~150 ng/mL, およびdcGTX3で7~45 ng/mLの濃度範囲内で6点の混合標準溶液を準備し、作製した。

検出限界 (LOD) はS/N比3以上, 定量下限 (LOQ) はS/N比10以上を満たす検量線範囲内濃度とし, LOD以

Table 1. Contents and composition of TTX and PSTs in *Canthigaster rivulata*

	Specimen 1			Specimen 2		
	Skin	Muscle	Internal organs	Skin	Muscle	Internal organs
Toxin contents (ng/g) ¹⁾						
TTX	11,000 (35)	ND	ND	13,000 (41)	ND	ND
dcSTX	110 (0.44)	tr	tr	300 (1.2)	tr	tr
STX	58 (0.19)	tr	tr	160 (0.52)	tr	tr
neoSTX	tr	ND	ND	ND	ND	ND
Toxin composition (mol%)						
TTX	98.2	—	—	96.0	—	—
PSTs	1.8	—	—	4.0	—	—
dcSTX	1.3	—	—	2.8	—	—
STX	0.5	—	—	1.2	—	—
Total toxins	100	—	—	100	—	—
Mouse unit scores converted from toxin contents (MU/g) ^{2), 3)}						
TTX	50	—	—	59	—	—
PSTs	1.0	—	—	2.8	—	—

ND: <Limit of detection (LOD). tr: detected at <limit of quantitation (LOQ).

LOQ in skin and the other tissues: 4,500 and 6,000 ng/g for TTX; 59 and 80 ng/g for dcSTX; 54 and 72 ng/g for STX; 160 and 210 ng/g for neoSTX.

¹⁾ Values in parentheses are in units of nmol/g.

²⁾ Mouse unit scores for TTX were calculated as 1 MU to 220 ng (1/220 MU/ng).

³⁾ Mouse unit scores for PSTs were calculated using the following values of specific toxicity (MU/μmol), taken from Oshima (1995): 1274 for dcSTX; 2483 for STX.

Fig. 1. Selected ion mass chromatograms (m/z 320) of (a) TTX standard solution (500 ng/mL), and of various tissue extracts from *Canthigaster rivulata* (Sample 1): (b) skin, (c) muscle, and (d) internal organs. TTX contents were below the limit of detection (LOD) in (c) muscle and (d) internal organs extracts (not detected).

Fig. 2. LC-FLD chromatograms of (a) PSTs standard mixture solution (GTX4: 141 ng/mL, GTX1: 380 ng/mL, dcGTX2: 47 ng/mL, dcGTX3: 13 ng/mL, GTX2: 75 ng/mL, GTX3: 25 ng/mL, neoSTX: 429 ng/mL, dcSTX: 64 ng/mL, STX: 69 ng/mL), and of various tissue extracts from *Canthigaster rivulata* (Sample 1): (b) skin, (c) muscle, and (d) internal organs. The "tr" indicates peaks corresponding to toxin contents between the limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ).

上かつLOQ未満で各対象物質が確認できた場合は、痕跡(tr: trace)として取り扱った。

またTTXおよびPSTsのマウスユニット(MU)換算値(MU/g)は、各分析機器より定量された含有量と既法にある比毒性(TTX: 1/220 MU/ng, STX: 2,483 MU/μmol, dcSTX: 1,274 MU/μmol)^{13), 14)}を基に、TTXおよびPSTsのMU換算値(PSTsの場合はSTXとdcSTXの換算値の合計値)を算出した。

結果および考察

Table 1は、今回分析に供したキタマクラの各試料の皮、筋肉および内臓における毒成分の含有量および比毒性^{13), 14)}を用いて計算したMU換算値を示したものであ

る。TTXおよびPSTsがLOQ以上で検出された部位は、皮のみであり、筋肉および内臓ではLOD未満(ND)またはLOD以上LOQ未満(tr)であった(Fig. 1, 2)。PSTsはdcSTXとSTXがすべての部位より検出され、neoSTXは試料1の皮からのみ検出された(Fig. 2)。その他のPSTsはいずれの部位からも検出されず、試料溶液中にC群が存在した場合、加水分解処理後の試料溶液から新たに出現するはずのGTX群のピークも検出されなかった。

皮におけるTTXの含有量は11,000および13,000 ng/g, dcSTXの含有量は110および300 ng/g, STXの含有量は58および160 ng/gであった(Table 1)。またモル換算した各毒の含有量はそれぞれ、TTXで35および41 nmol/g, dcSTXで0.44および1.2 nmol/g, STXで0.19および0.52 nmol/gであった(Table 1)。

全毒量(TTX+PSTs)に対するTTXのモル比(mol%)は皮において両試料で98.2および96.0%であり、PSTs(dcSTXおよびSTXの総量)ではそれぞれ1.8および4.0%であった。また、TTXおよびPSTs含有量のMU換算値は、TTXで50および59 MU/g, PSTsで1.0および2.8 MU/gであり、いずれの値もTTXが著しく高く、キタマクラの毒の主成分、および毒性の主体はともにTTXであることがわかった。

今回の結果ではTTXおよびPSTsとも皮にほとんど分布しており、これらの結果はキタマクラの毒が皮で最も強いことを示した過去の報告と一致する¹⁵⁾。キタマクラ中のPSTsはSTX群のみで構成されており、C群あるいはGTX群を含む二枚貝の組成とは大きく異なっていた。これらの所見はフグを対象にしたほかの調査結果とほぼ同様の傾向であった^{2-7), 16)}。

なお、キタマクラ組織中にもPSTsが存在することを明らかにしたのは、今回が初めてとなる。

今回PSTsの分析に用いたLC-FLD法は、Dienerらの報告¹²⁾に準じたものであり、塩酸下加熱処理を行った試料溶液を併行して分析することによって、1つの測定条件で、C群、GTX群およびSTX群の各化合物の定量が可能な方法である。この方法は、N-スルホカルバモイル型の毒であるC群が、塩酸下加熱処理により加水分解され、カルバモイル型の毒であるGTX群へ容易に変換する性質を利用したものである^{9), 10)}。PSTsの測定で多く用いられているOshima¹⁴⁾のLC-FLD法では、C群、GTX群およびSTX群の各化合物の分離に3つの測定条件を要するが、今回採用した方法では、移動相の交換が不要なため分析時間が短縮でき、今後のPSTsに関する調査研究の効率化において期待できる方法であると考えられる。

Table 2は、フグ中のPSTsの含有量および全毒量(TTX+PSTs)に対するモル比について、今回調査したキタマクラとほかの同様な調査の結果とを比較したものである。日本沿岸部で採取されたコモンフグおよびナシフグの肝臓、卵巣および消化器官で検出されたPSTs含有量は0.04~4.6 MU/gであり、TTXを含む全毒量に対するPSTs

Table 2. Contents of PSTs in puffer fish species

Species (Japanese name)	Collection site and period	Number of specimen	Contents of PSTs (MU/g) ¹⁾						mol % ²⁾	Reference no.
			Skin	Muscle	Liver	Digestive tract	Testis/Ovary	Egg		
<i>Canthigaster rivulata</i> (Kitamakura)	Wakayama, Japan in October 2007	2	1.0–2.8	tr	—	—	—	—	1.8–4.0	This study
<i>Takifugu poecilonotus</i> (Komonfugu)	Miyagi, Japan in August 1982	1 ³⁾	—	—	4.6	3.4	2.0	—	0.1–0.4	2
<i>Takifugu vermicularis</i> (Nashifugu)	Miyagi, Japan in August 1982	1 ⁴⁾	—	—	0.3	0.04	1.3	—	0.01–0.1	2
<i>Arothron firmamentum</i> (Hoshifugu)	Oita, Japan in November 1995 Iwate, Japan in August 2000	13	<5	<2	<5	—	5–740 ⁵⁾	—	93	7
<i>Tetraodon turgidus</i>	Kandal and Phnom Penh, Cambodia in April–May 2005 in December 2005–January 2006	12 (2) ⁶⁾ 6 (1) ⁷⁾	4–37 10–14	<2 <2	<2 <2	— —	15–19 27	— —	100 100	6
<i>Tetraodon leirurus</i> (type 2)	Udonthani province, Thailand in May 1995 in July 1995 in August 1995 in June 1996	8 3 1 10	16–266 104–220 nd 11–101	31–111 0–18 nd 5–58	32–119 36–880 nd 10–26	— — — —	— — — —	0–49 — nd 55–113	100 100 — 100	5
<i>Tetraodon suvatii</i>	Udonthani province, Thailand in May 1995 in July 1995 in February 1996 in June 1996	5 4 3 (1) ⁸⁾ 2	64–213 82–230 58 58–128	6–19 11–106 7 13–70	4–174 7–60 nd 5–11	— — — —	— — — —	24–129 63–116 117 nd–117	100 100 100 100	5

nd: Not detected. —: Not analyzed or not assayed.

1) Values from mouse bioassay except for this study.

2) PSTs mol % were calculated as $\text{PSTs (mol)} / (\text{PSTs (mol)} + \text{TTX (mol)}) \times 100$.

3) Pooled specimen of 15 males and 28 females.

4) Pooled specimen of 22 males and 20 females.

5) All specimens were ovary.

6) Number of assayed ovary specimens in parentheses.

7) Number of pooled ovary specimens of 6 individuals in parentheses.

8) Number of toxic specimens in parentheses.

のモル比の範囲は0.01~0.4%と極めて低い²⁾。一方、カンボジアやタイなどの熱帯地域の淡水に生息するフグの組織中からはPSTsのみが検出されており、その含有量は、今回調査したキタマクラや上述したフグ種の含有量と比べ著しく高いレベルにある場合が多い^{5), 6)}。また、日本近海に生息している一部のホシフグの卵巣からも熱帯地域の淡水フグとはほぼ同レベルのPSTsが検出されている⁷⁾。

今回調査したキタマクラの皮におけるPSTsの含有量および全毒量に対するモル比は上述したコモンフグおよびナシフグなどと同レベルであった。しかしながら、過去の調査よりフグの採取時期⁵⁾や地域⁷⁾によりPSTsの含有量が異なることが示されているため、今後さらに詳細な調査が必要であると考えられる。

PSTsによるフグの毒化機構には、外的要因としてPSTsにより毒化した貝の摂取⁴⁾やPSTs産生性細菌の関与³⁾が考えられており、また内的要因としてフグ血漿内から単離されたTTXやSTXと結合性を示す可溶性糖タンパク質 (pufferfish STX and TTX binding protein; PSTBP) がPSTsの蓄積や排せつに関与していると予想されている¹⁷⁾。しかしながらその毒化の詳細なメカニズムについては現在のところ不明である。したがって多種のフグを対象としたPSTs含有量の調査と併行して、今後はフグのPSTs毒化メカニズムの解明についてさらなる研究が期待される。

ま と め

キタマクラの毒成分としてTTX以外にもSTX, dcSTXおよびneoSTXからなるPSTsが含有していることを、本調査により初めて明らかにした。これらの毒成分は皮に局在し、含有量の96% (モル比) 以上がTTXによって占められており、PSTsは微量であった。これらの結果は、日本産コモンフグおよびナシフグを対象とした過去の調査結果と同様の傾向を示した。今回の結果ではPSTs含有量は比較的微量であったが、地域や時期によって変動することもあると考えられるためさらなる調査が望まれる。

謝 辞

今回の調査にあたり多大な協力をいただいたFriedrich Schiller UniversityのBernd Luckas教授に深く感謝します。本調査の遂行に当たりご協力いただきました大阪市各関係部局および大阪市立環境科学研究所の関係者の皆様に感謝いたします。

文 献

- 1) Toda, M., Uneyama, C., Toyofuku, H., Morikawa, K. Trends of food poisonings caused by natural toxins in Japan, 1989–2011. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (Food Hyg. Saf. Sci.), **53**, 105–120 (2012).
- 2) Nakamura, M., Oshima, Y., Yasumoto, T. Occurrence of saxitoxin in puffer fish, *Toxicon*, **22**, 381–385 (1984).
- 3) Kodama, M., Ogata, T., Noguchi, T., Maruyama, J., Hashimoto, K. Occurrence of saxitoxin and other toxins in the liver of the pufferfish *Takifugu pardalis*. *Toxicon*, **21**, 897–900 (1983).
- 4) Sato, S., Ogata, T., Borja, V., Gonzales, C., Fukuya, M., Hirayama, M. Frequent occurrence of paralytic shellfish poisoning toxins as dominant toxins in marine puffer from tropical water. *Toxicon*, **38**, 1101–1109 (2000).
- 5) Kungsuwan, A., Arakawa, O., Promdet, M., Onoue, Y. Occurrence of paralytic shellfish poisons in Thai fresh-water puffers. *Toxicon*, **35**, 1341–1346 (1997).
- 6) Ngy, L., Tada, K., Yu, Chun-Fai, Takatani, T., Arakawa, O. Occurrence of paralytic shellfish toxins in Cambodian Mekong pufferfish *Tetraodon turgidus*: Selective toxin accumulation in the skin. *Toxicon*, **51**, 280–288 (2008).
- 7) Nakashima, K., Arakawa, O., Taniyama, S., Nonaka, M., Takatani, T., Yamamori, K., Fuchi, Y., Noguchi, T. Occurrence of saxitoxins as a major toxin in the ovary of a marine puffer *Arothron firmamentum*. *Toxicon*, **43**, 207–212 (2004).
- 8) 莊村多加志, 改訂日本近海産フグ類の鑑別と毒性 厚生省生活衛生局乳肉衛生課・編, 東京, 中央法規出版株式会社, p. 38 (1994) (ISBN 4-8058-1229-X).
- 9) Hummert, C., Ritscher, M., Reinhard, R., Luckas, B. Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strains of *Alexandrium* by HPLC based on ion-pair chromatographic separation, post-column oxidation, and fluorescence detection. *Chromatographia*, **45**, 312–316 (1997).
- 10) Yu, R. C., Hummert, C., Luckas, B., Qian, P. Y., Li, J., Zhou, M. J. A modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from china. *Chromatographia*, **48**, 671–676 (1998).
- 11) Diener, M., Christian, B., Ahmed, M. S., Luckas, B. Determination of tetrodotoxin and its analogs in the puffer fish *Takifugu oblongus* from Bangladesh by hydrophilic interaction chromatography and mass-spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 1997–2002 (2007).
- 12) Diener, M., Erler, K., Hiller, S., Christian, B., Luckas, B. Determination of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/MS method. *Eur. Food Technol.*, **224**, 147–151 (2006).
- 13) 川井弘光. 衛生試験法・注解2010, 東京, 金原出版株式会社, p. 295 (2010) (ISBN 978-4-307-47039-1).
- 14) Oshima, Y. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.*, **78**, 528–532 (1995).
- 15) 塩見一雄, 長島裕二, 海洋動物の毒—フグからイソギンチャクまで—, 東京, 株式会社成山堂書店, p. 2 (1997) (ISBN 4-425-82622-1).
- 16) Jang, J., Yotsu-Yamashita M. Distribution of tetrodotoxin, saxitoxin, and their analogs among tissues of the puffer fish *Fugu pardalis*. *Toxicon*, **48**, 980–987 (2006).
- 17) Yotsu, M., Sugimoto, A., Terakawa, T., Shoji, Y., Miyazawa, T., Yasumoto, T. Purification characterization, and cDNA cloning of a novel soluble saxitoxin and tetrodotoxin binding protein from plasma of the puffer fish, *Fugu pardalis*. *Eur. J. Biochem.*, **28**, 5937–5946 (2001).