総説

貝毒の規制値、監視体制と機器分析

鈴木 敏之*

Regulatory Levels, Monitoring System of Shellfish Toxins and Instrumental Analyses

Toshiyuki SUZUKI

National Research Institute of Fisheries Science: 2-12-4 Fukuura, Kanazawa, Yokohama 236-8648, Japan.

1. はじめに

ホタテガイ、ムラサキイガイ、カキ、アサリなどの二枚貝は、海水中に浮遊するプランクトンなどを餌としている。プランクトンの中には、ヒトに危害をもたらす毒を有する有毒プランクトンも存在する。二枚貝が餌として取り込んだプランクトンの中に有毒プランクトンが存在していると、有毒プランクトンが有する毒を蓄積し、二枚貝は毒化する。毒化した二枚貝をヒトが摂食することにより「shellfish poisoning」を発症する。「shellfish poisoning」は「貝中毒」であるが、「貝毒」とも呼ばれている。一方、中毒の原因物質である原因毒は、「shellfish toxin」であるが、こちらも「貝毒」である。本稿では混乱を避けるために、ヒトの食中毒を「貝中毒」、原因毒を「貝毒」とし、これらを分けて使用する。

有毒プランクトンが発生すれば、その海域のすべての二枚貝が毒化すると考えてよいが、二枚貝種により、毒に対する代謝や蓄積動態が異なるため、主要毒や毒化の程度については異なることが多い。毒は中腸腺に蓄積されるが、生殖腺などから検出されることもある。二枚貝のほか、ロブスター、カニ、セイヨウトコブシ、ホヤなども毒化し、食中毒の原因となる事例も報告されている。ロブスターやカニなどの甲殻類は、毒化した二枚貝を捕食して毒化する。

CODEXの「活及び生鮮二枚貝の規格 (CODEX STAN 292-2008)」では、化学構造に基づき5つの貝毒グループに分類している。すなわち、サキシトキシン (saxitoxin; STX) 群、オカダ酸 (okadaic acid; OA) 群、ドゥモイ酸 (domoic acid; DA) 群、ブレベトキシン (brevetoxin; BTX) 群、アザスピロ酸 (azaspiracid; AZA) 群である。これらに加えて、近年、フグ毒として知られるテトロドトキシン (tetrodotoxin; TTX) 群がニュージーランドやヨーロッパの一部の海域の二枚貝から検出され^{1), 2)}、ヒト

の健康被害が懸念され始めている。そのため、TTX群も貝毒として追加することが国際的な議論となり始めている。TTXによるヒトへの作用機序や中毒症状は、STX群と同様である。中毒症状と各毒群を対応させると、以下のようになる。

- (i) 麻痺性貝中毒 (paralytic shellfish poisoning; PSP): STX群 (TTX群)
- (ii) 下痢性貝中毒 (diarrhetic shellfish poisoning; DSP): OA群, AZA群
- (iii) 記憶喪失性貝中毒 (amnesic shellfish poisoning; ASP): DA群
- (IV) 神経性貝中毒 (neurotoxic shellfish poisoning; NSP): BTX群

前述したように、麻痺性貝中毒の原因毒としてTTXが追加される可能性もあるが、現状ではSTX群のみが麻痺性貝毒として扱われている。本稿では、貝毒の規制値と監視体制について解説し、化学構造に基づき分類される貝毒5群について、化学的性状と代表的な機器分析法を中心に紹介する。

2. 貝毒の規制値と監視体制

CODEXの「活及び生鮮二枚貝の規格 (CODEX STAN 292-2008)」で示されている貝毒5群の基準値を表1に整理した。貝毒の検査法は、多くの国々で動物検査法である

表1. CODEX「活及び生鮮二枚貝の規格」(CODEX STAN 292-2008)で定められた貝毒の最大基準値 (mg/kg可食部)

	mg/kg
サキシトキシン (STX) 群	≤0.8 mg (2HCL) サキシトキシン当量
オカダ酸 (OA) 群	≤0.16 mg オカダ酸当量
ドゥモイ酸 (DA) 群	≤20 mg ドゥモイ酸
ブレベトキシン (BTX) 群	≤200 マウスユニットまたは当量
アザスピロ酸 (AZA) 群	≤0.16 mg

* 連絡先 tsuzuki@affrc.go.jp

国立研究開発法人水産研究・教育機構 中央水産研究所:
〒236-8648 横浜市金沢区福浦2-12-4

マウス毒性試験が採用されてきた。しかし、近年、機器分析法を中心にさまざまな分析手法が開発され、その結果、非動物試験法により二枚貝の毒力を検査、監視している国が増えている。わが国で問題となっている貝中毒は下痢性貝中毒と麻痺性貝中毒であるが、2015年3月に厚生労働省から発出された「食安発0306第1号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知」により、下痢性貝毒の規制値が0.05 MU/g可食部から0.16 mgOA当量/kg可食部へと改正され、マウス毒性試験法に代わりLC-MS/MS法が公定法となった。MU (mouse unit) とは、マウス毒性試験における致死毒性である。その結果、旧公定法であるマウス毒性試験により検出されてきた脂溶性貝毒であるペクテノトキシン (pectenotoxin; PTX) 群やイエットトキシン (yes-sotoxin; YTX) 群は規制対象外となり、OA群のみが規制されることになった。一方、麻痺性貝毒については、わが国ではマウス毒性試験を公定法として採用しており、規制値は4 MU/g可食部である。この規制値はCODEX基準値である0.8 mgSTX当量/kg可食部とほぼ等しい。表1に示す貝毒5群の中でOA群、AZA群、DA群は機器分析法が多く国で採用されつつある。また、STX群についてもEUなどでは公定法として機器分析法を採用することを検討している。それぞれの毒群にはさまざまな異性体や類縁体が存在するため、機器分析法で検査する際、異性体や類縁体の毒性等価係数 (Toxicity Equivalent Factor; TEF) が必要になる。TEFとは、“主要毒の1つの毒性を基準と

したときに、他の異性体や類縁体の毒性の強さを相対的に表した換算係数”と定義され、通常0-1の間の値で示される。欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority; EFSA)³⁾ や大島のSTX群の毒性データ⁴⁾ に基づくTEFを表2にまとめた。現在、FAO/WHO専門家会議において、TEFについて検討しており、近々、報告書が公表され、CODEX規格として採用される見通しである。CODEX規格としてTEFが設定されることにより、貝毒の機器分析法の標準化がさらに進むことになる。

わが国では、貝毒による食中毒を防ぐために、二枚貝生産海域から流通に至る段階的な監視体制が整備されている (図1)。生産海域においては、都道府県の水産関係試験研究機関により有毒プランクトンの監視が行われている。有毒プランクトンの主な監視対象種は、麻痺性貝毒生産種では *Alexandrium* 属と *Gymnodinium* 属有毒プランクトン、下痢性貝毒生産種では *Dinophysis* 属有毒プランクトンである。これらの有毒プランクトンの監視は、生産海域における二枚貝の毒化を事前に予察し、二枚貝の監視を強化するうえで重要な情報となっており、有毒プランクトンの出現情報は、水産サイドの試験研究機関や行政部局により公表され、二枚貝生産者に直接伝えられることもある。一方、定期的な二枚貝の貝毒検査により、規制値を超える毒力が検出された二枚貝については、生産者による出荷自主規制措置が講じられる。原則として、3週連続で規制値を下回った場合に限り、二枚貝の出荷が再開されるが、二枚貝種により、自主規制期間が短くなる場合もある。出荷前の自主検査については、農林水産省の通知により、以前は公定法であるマウス毒性試験による検査が必要であったが、2015年以降、農林水産省の新ガイドライン「二枚貝

表2. 国際的に広く受け入れられている毒性等価係数 (TEF)

毒群	類縁体	EFSA* ¹ TEF	Oshima relative toxicity values (MU/ μ mole)* ²
OA群	OA	1.0	
	DTX1	1.0	
	DTX2	0.6	
STX群	STX	1.00	1
	neoSTX	1.00	0.92
	GTX1	1.00	0.99
	GTX2	0.4	0.36
	GTX3	0.6	0.64
	GTX4	0.7	0.73
	GTX5	0.1	0.064
	GTX6	0.1	
	C1	—	0.006
	C2	0.1	0.0096
	C3	—	0.013
	C4	0.1	0.058
	dcSTX	1.0	0.51
	dcNeoSTX	0.4	
	dcGTX2	0.2	0.15
	dcGTX3	0.4	0.38
AZA群	AZA1	1.0	
	AZA2	1.8	
	AZA3	1.4	

*¹ 欧州食品安全機関

*² Oshima (1995) より

生産海域 (二枚貝の毒化予察)

生産海域 (二枚貝の監視)

流通

図1. 二枚貝の貝毒監視体制

等の貝毒リスク管理に関するガイドライン」が制定され、機器分析法や簡易測定法を含めたさまざまな手法を用いることが認められている。市場に流通した二枚貝については、食品衛生法の下で公定法による監視が行われている。

3. サキシトキシン (saxitoxin; STX) 群

①化学的性状

北米や欧州では古くから知られている貝毒である。最初に構造が解明された毒成分はサキシトキシン (saxitoxin; STX) である (図2)。化学構造は1975年にX線結晶解析法で決定された⁵⁾。その後、多数の類縁体が発見され、現在、30種類以上の類縁体が知られており、麻痺性貝毒と総称されている。いずれも水溶性である。中性・酸性溶液中では比較的安定であるが、塩基性条件下では極めて不安定で速やかに分解される。中性・酸性溶液中では、熱にも安定であり、通常の加熱調理では完全に分解されることは

ない。代表的なSTX群の化学構造を図2に示す。特徴的な構造は、陽イオンとなる2つのグアニウム基 ($=\text{NH}_2^+$) と12位の飽水型ケトンである。成分によっては陰イオン性の硫酸エステルや*N*-スルホン基を有する。STX群は、生体膜上の電位依存性ナトリウムチャンネルに可逆的に作用し、ナトリウムイオンの流入を遮断することで毒性を発現する⁶⁾。グアニウム基を有することやナトリウムチャンネルを阻害する作用などから、フグ毒テトロドトキシシンに類似することが注目されてきた。サキシトキシン (STX) に代表される13位カルバモイル毒 ($\text{R}_4 = -\text{CONH}_2$) はフグ毒テトロドトキシシンに匹敵する非常に強い毒力を示す。13位の脱カルバモイル毒 ($\text{R}_4 = \text{H}$) はカルバモイル毒と比較すると毒力は同程度か若干弱い。13位に*N*-スルホカルバモイル基が結合した*N*-スルホカルバモイル毒 ($\text{R}_4 = -\text{CONHSO}_3^-$) は毒力が非常に弱い。*N*-スルホカルバモイル基がナトリウムチャンネルとの親和性を

Toxins:	R1:	R2:	R3:	R4:	比毒性 (MU/μmol)
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	-CONHSO ₃ ⁻	15
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	-CONHSO ₃ ⁻	239
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	-CONH ₂	2468
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	-CONH ₂	892
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	-CONH ₂	1584
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	-CONH ₂	1803
GTX5	H	H	H	-CONHSO ₃ ⁻	160
GTX6	OH	H	H	-CONHSO ₃ ⁻	180
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	-H	1617
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	-H	1872
STX	H	H	H	-CONH ₂	2483
neoSTX	OH	H	H	-CONH ₂	2295
dcSTX	H	H	H	-H	1274

図2. サキシトキシン群の化学構造と比毒性*

* 1 μmolの毒がマウスを殺す毒量 (マウスユニット; MU)。

13位側鎖部の付加と分解

11位硫酸エステル基の還元的脱離

N1位水酸基の還元

11位硫酸エステル基の平衡化

図3. 海洋生物体内で起るサキシトキシン群の変換

阻害することが、弱い毒性に結びついていると推定されている。

STX群は*Alexandrium*属や*Gymnodinium*属の有毒藻類により生産される。わが国で二枚貝の毒化原因種とないうる主要種は、*Alexandrium tamarense*, *Alexandrium catenella*, *Alexandrium tamiyavanichii*, *Gymnodinium catenatum*の4種である。フィリピンなど熱帯地方では、*Pyrodinium bahamense* var. *compressa*が毒化原因種となっている。STX群を生産する有毒渦鞭毛藻類や蓄積する海洋生物内での変換や分解などに関する知見を示す⁷⁾(図3)。13位側鎖への硫酸基の付加には、渦鞭毛藻酵素⁸⁾が関与しており、脱離にはバカガイやサラガイの二枚貝酵素^{9), 10)}が関与している。N-スルフォカルバモイル基は化学的に不安定であるため、強酸性下(pH 2以下)でカルバメート毒群に、中性pHで脱カルバモイル毒群に変換される⁷⁾。11位硫酸エステル基の還元的脱離¹¹⁾やN-1位水酸基の還元も二枚貝体内で進行しているものと思われる。11位硫酸エステル基の異性化は、化学的に進行する平衡化反応である。有毒プランクトンではβ型が酵素により優先的に合成されるためα型よりも多いが、二枚貝体内に移行するとより化学的に安定なα型が増加し、最終的にα:β型の平衡点である3:1程度の比率となることが認められている¹²⁾。こうしたさまざまな反応により、毒化原因プランクトンと二枚貝の毒組成は異なることが多い。

②中毒症状と中毒事例

中毒症状はフグ中毒と似ており、死亡率が高い神経性の症状を起こす。通常食後30分程度で唇、舌、顔面のしびれに始まり、しびれおよび麻痺が首、腕、四肢に広がる。頭痛、嘔吐、運動失調、言語障害、浮遊感を示すことがあり、重篤となると呼吸麻痺で死亡する。回復すれば後遺症はない。ヒトの経口摂取では、一人当たり144~1,660 μg STX当量では軽症、456~12,400 μg STX当量では致死

中毒が報告されている¹³⁾。

STX群は最も古くから知られている貝毒であり、1790年にロシアの探検隊がアラスカでイガイを食べて約100名が死亡した事例が最初の記録とされている。二枚貝の毒化や中毒事例もアメリカ大陸東西海岸、ヨーロッパなどの北半球冷温水域、台湾、韓国、香港、メキシコ、チリ、アルゼンチン、オーストラリア、ニュージーランドなどほぼ世界中で確認されている。わが国では1948年に愛知県豊橋市でアサリにより12名の患者が報告されて以来、これまでに約20件約170名以上(うち死亡4名)の患者が記録されている。かつては北海道や東北沿岸域の二枚貝が主に毒化していたが、1990年代以降、全国に広がりを見せている。わが国では、二枚貝の貝毒監視体制が全国的に整備されているため、流通した二枚貝による食中毒事例は極めてまれであるが、最も警戒を要する貝毒である。

③分析法

LC-FLD (Fluorescence detection: FLD) 法

LC-FLD法は、特異性、感度ともに高く、研究用、検査用に普及しており、プレカラム法¹⁴⁾とポストカラム法^{14), 15)}とに分けられる。図4に大島により報告されたポストカラム法の装置の概要を示す。STX群は水溶性化合物であり、電化を0, +1, +2で帯びているため、逆相カラムには全く保持されない。しかし、移動相にSTX群が有するイオン性官能基と相反するイオン性試薬(ペアーイオン試薬)を添加し、試薬と相互作用を生じさせることにより、非極性基を導入した一分子のような挙動を与えることができる。イオン性官能基として、ヘプタンスルホン酸ナトリウムやリン酸テトラブチルアンモニアを添加することにより、本来逆相カラムに保持されない化合物でも保持されるようになり、分離が可能になる。3種類の移動相を用いることにより、電荷の異なるすべての主要成分を分離定量することが可能である(図5)。検出はカラムの出口

図4. ポストカラム蛍光HPLC装置

に過ヨウ素酸を加え、加熱した反応コイルに導入することにより、貝毒化合物をピリミドプリンに変換し、さらに酸を加えることにより、ラクタム環を形成させて、ラクタム環の発する蛍光を検出している（図4）。カナダでは、ホタテガイやアサリ、イガイ、カキを対象として妥当性確認がなされたポストカラム法¹⁵⁾が2011年から貝毒モニタリングに導入されている。一方、プレカラム法は、あらかじめ前処理により蛍光誘導体を調製し、HPLCで分離検出する手法である。毒成分によっては、酸化剤で蛍光物質へ誘導する際、複数の蛍光物質が生じるため、試料の前処理やデータ解析が煩雑になる場合があり、多数の陽性検体の検査には向かない。しかし、毒が検出される頻度が低い海域においては、有用な手法として受け入れられている。イギ

リスでは、2006年から貝毒モニタリングにプレカラム法を導入している¹⁶⁾。

LC-MS/MS法

LC-MS分析のイオン化法として一般的に用いられている電子スプレーイオン化法（Electrospray Ionization; ESI）は、LC分離において揮発性移動相しか利用できない。したがって、不揮発性のイオン性試薬を含むポストカラムLC分離条件をSTX群のLC-MS分離条件として用いることはできない。こうしたことから、STX群を対象としたLC-MS法の開発は困難とされてきた。近年、親水性相互作用クロマトグラフィー（hydrophilic interaction liquid chromatography; HILIC）が注目されているが、HILICの特徴は、逆相モードと同じ水/有機溶媒系の移動

図5. ポストカラム蛍光HPLC法により得られるSTX群のクロマトグラム

カラム: Mightysil RP8GP (4.6 i.d.×150 mm). 移動相: (1) C毒群, テトラブチルアンモニウム塩 (1 mM) pH 5.8 (2) GTX群, 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (2 mM)/10 mM リン酸塩, pH 7.1 (3) STX, neoSTX, dcSTX, 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (2 mM)/30 mM リン酸アンモニウム, pH 7.1-アセトニトリル (100:5, v/v). 流速: 0.8 mL/min.

図6. HILIC LC-MS/MS法により得られるSTX群のクロマトグラム

カラム: Xbridge amide column (2.1 i.d.×150 mm). 移動相: (A) 蒸留水/20 mM 酢酸 (B) アセトニトリル-蒸留水 (99:1, v/v)/20 mM 酢酸. 溶離: 100% B→5 min, 100% B→65% B→25 min, 65% B→5 min, 100% B→5 min. 流速: 0.3 mL/min.

相を用いて、親水性固定相に水溶性、あるいはイオン性化合物を相互作用させることにより分離する点であり、高極性化合物の分離にアセトニトリルなど有機溶媒比の高い移動相を用いることにより、LC-MS分析で一般的に用いられているESI法による高感度検出が容易になる。この分離モードの利用により、2005年にSTX群のHILIC LC-MS/MS法が初めて報告された¹⁷⁾。HILICの分離は順相クロマトグラフィーであり、極性の低い化合物から高い化合物の順に溶出するが、イオン交換相互作用による保持も大きく影響するため、被検体の溶出順は複雑である。図6にHILICを利用したSTX群のLC-MS/MS分離例¹⁸⁾を示す。HILICを用いた麻痺性貝毒のLC-MS/MSにおいて、実試料の分析では、試料由来のマトリクスによるイオン化効率の低下が大きな問題であった。前処理条件やHILICによる分離条件の検討により、プランクトン試料¹⁸⁾の分析や二枚貝試料¹⁹⁾の分析が可能となっており、STX群を対象としたHILIC LC-MS/MS法は実用化の領域に達しつつある。本法の利点は、STX群に加えてテトロドトキシン(tetrodotoxin; TTX)群も検出できる点である。近年、ニュージーランドやヨーロッパの一部の海域の二枚貝からTTXが検出された事例が報告されており^{1), 2)}、TTX群も麻痺性貝毒として追加される可能性が出てきている。HILIC LC-MS/MS法はSTX群とTTX群の同時分析法としても注目されており、国際的な標準法となる可能性がある。

4. オカダ酸(okadaic acid; OA)群

①化学的性状

OA群は多数のエーテル結合を分子内に有するポリエーテル化合物で脂溶性毒である^{20), 21)}。この群にはジノフィシストキシン(dinophysistoxin; DTX)群も含まれ、12成分を超える類縁体が報告されている(図7)。OAとDTX1が代表的な毒で強力な下痢原性を有する²²⁾。また、DTX2やDTX3にも下痢原性が確認されており²³⁾、これらの毒が一般に下痢性貝毒と呼ばれる毒である。これらの毒はメタノール、アセトン、クロロホルム、ジクロロメタンのような有機溶媒に高い溶解性を示す。OA群は、セリン/スレオニンプロテインホスファターゼ(serine/threonine protein phosphatase 1 and 2A; PP1, PP2A)に結合し、プロテインホスファターゼ作用を阻害する²⁴⁾。PP2AおよびPP1の阻害作用により、リン酸化タンパク質が過剰に蓄積され、細胞の調節機能に支障をきたし、このことがOAの毒性に関与していると考えられている。また、T84細胞およびCaco2細胞の単層培養細胞シートを用いた実験では、OA群により腸管における細胞間隙を介する傍細胞経路の透過性が増加することが示されており、OA群の下痢原性に関与しているのは、傍細胞経路の透過性の増加であることが示唆されている²⁵⁾。さらに、OA群には発がん促進作用があることも知られている²⁶⁾。一方、OA群のマウスに対する経口投与による病理学的観察では、小腸における液体の貯留、粘膜固有層の損傷が観察される²²⁾。

図7. オカダ酸群の化学構造

有毒渦鞭毛藻 *Dinophysis fortii*, *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. norvegica* など世界各地の *Dinophysis* 属プランクトンからOA, DTX1, DTX2が主要毒として検出されており^{27)~29)}、二枚貝毒化原因種として特定されている。また、まれではあるが、カニなどの二枚貝捕食生物が毒化した二枚貝を摂食することにより毒化することもある³⁰⁾。7位水酸基に脂肪酸がエステル結合したDTX3は二枚貝の代謝物であり³¹⁾、*Dinophysis* 属有毒プランクトンが生産するOA, DTX1, DTX2が前駆体である。DTX3に結合している主要脂肪酸はパルミチン酸(16:0)、ミリスチン酸(14:0)、パルミトレイン酸(16:1)などであるが、そのほかの脂肪酸エステルも二枚貝から検出されるため³²⁾、DTX3はOA, DTX1, DTX2の7位脂肪酸エステルの総称である。DTX3の極性はOAやDTX1と比較してさらに低く、含水メタノール-ヘキサンによる液-液分配により、OAやDTX1は含水メタノール層に分配されるのに対して、DTX3群の多くはヘキサン層に分配される。このほ

図8. オカダ酸群のアルカリ加水分解

か、一部の *Prorocentrum lima* やニュージーランド産 *D. acuta* からは、1位カルボキシル基にさまざまなジオールが結合したOA ジオールエステル群も検出される^{33)~35)}。DTX3やOA ジオールエステルはアルカリ加熱条件下でDTX1やOAに加水分解される(図8)。この反応はDTX3やOA ジオールエステルを一括分析する際に有効であり、わが国の公定法を含め、多くの国の検査法にアルカリ加水分解処理が採用されている。

②中毒症状と中毒事例

毒化した二枚貝をヒトが摂取すると下痢(92%)、吐き気(80%)、嘔吐(79%)、腹痛(53%)などの症状を発症する³⁶⁾。通常、発熱は見られず、腹痛も腸炎ビブリオよりも軽度である。摂食から発症までの時間は短く、70%の患者が4時間以内に発症している。安静にしていれば2、3日で回復し、死亡事例や後遺症はない。ヒトの最低発症量は12 MUと推定されており、下痢原性のあるOAとDTX1に換算すると、それぞれ48、38 µgとなる。一方、エステル型の毒であるDTX3やOA ジオールエステルはPP2Aに対する阻害作用が極めて低い。また、マウス腹腔内投与毒性もOAやDTX1と比較して弱い。しかし、DTX3により汚染された食品による下痢性中毒事例も複数報告されており^{37)~39)}、下痢を発症した中毒患者の便から、DTX1のみが検出されたことにより、DTX3は摂食後、加水分解され遊離毒となる可能性が指摘されている⁴⁰⁾。こうした事例により、エステル毒のヒトに対する中毒リスクは、OAやDTX1など遊離毒と比較して同等と評価することが妥当と考えられている。

OA群による中毒は、1976と1977年に東北地方沿岸でムラサキガイの摂食により発生した貝中毒が最初の事例であり、下痢性貝毒による中毒として世界で最初に報告された事例である³⁶⁾。わが国の下痢性貝毒による中毒事例として、昭和51年6月から58年8月まで、国内では1135名

の中毒患者が報告されている⁴¹⁾。中毒原因となった主な二枚貝は、ホタテガイ、ムラサキガイ、コタマガイであるが、イガイやアサリによる中毒事例も報告されている。昭和47年から59年までの統計によると、フグ中毒以外の動物性自然毒食中毒の原因食品別発生状況では、上位3位はホタテガイ、コタマガイ、ムラサキガイであり、いずれも下痢性貝毒によるものである⁴¹⁾。昭和53年に発出された「ホタテガイ等の貝毒について」(水産庁長官通達)、「貝類による食中毒の防止について」(旧厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知)などの行政措置により、国内の貝毒監視・検査体制が整備され、近年、市場に流通した二枚貝による下痢性貝毒による中毒事例はほとんど報告されていない。平成元年から22年の間に国内で発生した下痢性貝毒中毒事例は3件のみであり、合計7名の患者が報告されているに過ぎない⁴²⁾。一方、海外の事例であるが、スペイン、フランス、ノルウェーなどヨーロッパ大西洋岸を中心にムラサキガイによる食中毒が発生し、数千名を超える中毒患者が報告されている。チリ、オーストラリア、ニュージーランドなど南半球でも二枚貝の毒化が認められ、世界的な問題となっている。ノルウェーではカニによる数百人規模の食中毒が発生している³⁰⁾。

③分析法

LC-MS (LC-MS/MS) 法

OA群やその他の脂溶性貝毒のLC-MSやLC-MS/MS分析において、分離はC8やC18などの逆相分配系セミミクロカラムが用いられ、移動相として蒸留水-アセトニトリルに酢酸、ギ酸、酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウムなどを添加した酸性移動相が用いられてきた^{43)~47)}。MS検出は、ESI法による検出が一般的である。酸性移動相を用いることにより、OA群が有するカルボキシル基の解離が抑制され、カラムへの保持能が向上し選択性が高まる。その結果、ピーク形状がシャープになり、検出感度が向上する。最近では、塩基性条件下においても化学的に安定、かつ強い保持力を有するクロマト担体が開発され、塩基性移動相を用いたOA群の分析例も報告されている⁴⁸⁾。酸性移動相と比較すると塩基性移動相ではカルボキシル基のイオン化効率が向上するため、より高感度な検出が可能である。MS検出では、陽陰両モードによる検出が可能であるが、定量分析では陰イオンモードによりOAやDTX1の[M-H]⁻を選択する Selected Ion Monitoring (SIM)により二枚貝の毒を選択的に定量できる⁴⁹⁾。OA群は分子量が800以上であり、この領域では夾雑物の検出も少なく、SIMでも比較的良好なクロマトグラムが得られる(図9)。また、LC-MS/MSではOA・DTX1の[M-H]⁻をQ1で選択し、コリジョンセルQ2で不活性ガスと衝突させることにより分子イオンを開裂させ、生じたフラグメントイオン m/z 255をQ3で選択する Multiple Reaction Monitoring (MRM) 検出により、高感度かつ選択性が高い検出が可能である。このイオンチャンネルは、OA群の陰イオンモードでの定量分析において、一般的に選択されているイオン

チャンネルである。このMRM条件がわが国の公定法でも採用されている。わが国では、OA群の公定法として2015年以降、LC-MS/MSが採用されているが、通知法では、OAやDTXを対象とした前処理により、OA群を特異的に分析する手法となっており、移動相は酸性移動相である。図10は筆者らが報告したMRM LC-MS/MS条件²⁹⁾により、毒化したホタテガイ抽出物をアルカリ加水分解して得られたOA群のクロマトグラムである。夾雑物のピークはほとんど検出されず、良好なクロマトグラムが得られる。DTX2はわが国の二枚貝から検出された事例はないが、OAと同じMRMイオンチャンネルから検出され、OAよりも保持時間が遅いため、OAのMRMイオンチャンネル

図9. オカダ酸群とその他脂溶性貝毒ペクテノトキシン、イェットキシン群のSIM L/MSクロマトグラム

カラム: Hypersil-BDS-C8 (2.0 i.d.×50 mm). 移動相: (A) 蒸留水/2 mM ギ酸アンモニウム, 50 mM ギ酸 (B) アセトニトリル-蒸留水 (95:5, v/v)/2 mM ギ酸アンモニウム, 50 mM ギ酸. 溶離: 20%B→100% B→10 min, 100%B→15 min. 流速: 0.2 mL/min.

からOAに遅れてピークが検出される場合には、DTX2を疑う必要がある。

LC-MSやLC-MS/MSによるOA群の定量において懸念される問題は、試料マトリクスによるイオン化阻害やイオン化促進であり、測定値が真値から大きく外れることがあり、マトリクス効果と呼ばれている⁵⁰⁾。マトリクス効果を低減させるための測定条件や前処理法の検討は、下痢性貝毒の分析のみならず、LC-MSやLC-MS/MSにおける一般的な課題である。EUのSOPや一定基準の妥当性が確認されたLC-MS/MS法^{51)~54)}では、無毒の二枚貝抽出液に毒を添加して調製したマトリクス検量線を用いることにより、マトリクス効果を加味した定量法を採用している。また、カートリッジカラムによる前処理などもマトリクス効果に対して有効である^{55), 56)}。さらに、超高速液体クロマトグラフィー (Ultra-performance liquid chromatography; UPLC) による分離はマトリクス効果の低減に有効であることが報告されている^{57), 58)}。最新のMS検出器は極めて高感度であるため、抽出試料をメタノールなどで希釈することにより、マトリクスの影響を低減させる希釈法が有効である。

LC-MS/MSは定量分析法にとどまらず、OA群の構造解析法としても極めて優れた手法である⁴⁷⁾。陽イオンモードにより得られるスペクトル情報は、陰イオンモードにより得られるそれよりも豊富である (図11)。LC-MS/MSは極めて高感度であるため、さまざまなスキャンモードを駆使し、フラグメントイオンを解析することにより、僅かな試料から未知の類縁体を容易に検出し、構造解析をすることができる^{35), 47)}。

LC-FLD法

LC-MSやLC-MS/MSのほかに機器分析法として、プレ

図10. ホタテガイ抽出物のアルカリ加水分解物のMRM LC-MS/MSクロマトグラム

カラム: Hypersil-BDS-C8 (2.0 i.d.×50 mm). 移動相: (A) 蒸留水/2 mM ギ酸アンモニウム, 50 mM ギ酸 (B) アセトニトリル-蒸留水 (95:5, v/v)/2 mM ギ酸アンモニウム, 50 mM ギ酸. 溶離: 20%B→100%B→10 min, 100%B→15 min. 流速: 0.2 mL/min.

図 11. ジノフィシトキシシン 1 の LC-MS/M フラグメントイオン
(上) 陽イオンモード, (下) 陰イオンモード

図 12. オカダ酸群蛍光誘導体のカラムスイッチング自動前処理分析システム

カラム LC-FLD 法がある。この手法は OA 群が有するカルボキシル基に蛍光化試薬 9-アンスリルジアゾメタンを反応させ、蛍光誘導体を調製し、HPLC で分離定量する方法である⁵⁹⁾。高感度であるため、貝毒原因プランクトンの検索などに威力を発揮してきたが、試料の前処理が煩雑であることが難点であった。こうした煩雑な前処理を自動化した、カラムスイッチング自動前処理法も開発されている⁶⁰⁾ (図 12, 13)。質量分析法とは異なり、試料マトリクスの影響も受けないなどの利点もあり、装置も LC-MS や LC-MS/MS と比較すると安価である。二枚貝のモニタリング法として十分に利用可能な手法である。

5. ドウモイ酸 (domoic acid; DA) 群

①化学的性状

紅藻ハナヤナギから駆虫成分として単離・構造決定され

図 13. カラムスイッチング自動前処理システムにより得られるオカダ酸蛍光誘導体のクロマトグラム

たアミノ酸であるドウモイ酸 (domoic acid; DA)⁶¹⁾ は、1987 年に発生したカナダの食中毒事件で中毒原因物質として特定され貝毒として知られるようになった⁶²⁾。水溶性

図14. ドウモイ酸群の化学構造

であるが、含水アルコールにも溶解する。類縁体として、紅藻マクリから発見され駆虫成分として利用されたカイニン酸 (KA) がある。DAはイソドウモイ酸A-Hなどの異性体が存在するが (図14)、二枚貝から検出される主要毒はDAである。多くの異性体は、紫外線照射や加熱処理により生じた成分と推察されている。羽状目珪藻 *Pseudonitzschia* 属の10種類を超えるプランクトンがDAを生産することが確認されており、二枚貝毒化原因種である。原因毒であるDAが高レベルで検出される種は *P. multi-series*, *P. australis*, *P. seriata* である⁶³⁾。そのほかに *Nitzschia navis-varingica* や *Amphora coffeaeformis* などの底生性ケイ藻からもDAが検出される。DAやKAは神経伝達物質の興奮性アミノ酸であり、脳の神経伝達物質 (グルタミン酸) 受容体のカイニン酸 (KA) 型に作用する。DAはこの作用においてKAよりも2~3倍強力、グルタミン酸よりも数十倍強力であることが知られている¹³⁾。DAが脳に進入した場合、海馬、視床、扁桃体細胞のグルタミン酸受容体に結合し、カルシウムイオンが細胞内へ大量に流入し細胞死が起こり、記憶喪失を発症すると考えられている。

②中毒症状と中毒事例

ヒトの経口毒性は、60~110 mgで発症し、135~295 mgで重篤となると推測されている⁶⁴⁾。主症状は、食後3~6時間内に嘔吐、腹痛、下痢の初期症状が発症し、

図15. ドウモイ酸のLC/DADクロマトグラム (上) とUVスペクトル (下)

カラム: Mightysil RP18GP (4.6 i.d.×150 mm). 移動相: アセトニトリル-ギ酸-蒸留水 (9:0.2:90.8, v/v). 流速: 1.0 mL/min.

意識の混沌、見当識喪失、記憶喪失が見られる。高齢者に重症者が多く、重症者に見られる記憶喪失が特徴的な症状である。

1987年の11月から12月にかけて、カナダ大西洋岸のプリンス・エドワード島東部で養殖ムラサキイガイにより145名が中毒症状を訴え、107名が記憶喪失性貝中毒と診断された⁶⁵⁾。3名が死亡、一部の患者に記憶障害等の後遺症が残った。重篤患者は12名おり、この中で65歳以上の患者は8名であった。1990年にはオレゴン州でマテガイなどの二枚貝が毒化し、貝類を食べたペリカンが大量に死亡している。1991年には、ワシントンの沿岸域で原因毒であるDAにより汚染されたマテガイの摂食により、記憶喪失性貝中毒様の患者が発生している⁶⁴⁾。わが国では一部の海域で二枚貝からDAが検出されるが毒量は極めて低く⁶⁶⁾、ヒトの中毒事例は報告されていない。

③分析法

LC-UV法

DA検査における公定法は、DAの分子内二重結合を紫外外部検出計で検出するLC法である⁶⁷⁾。酸を含むアセトニトリル-水系の移動相が用いられ、紫外波長242 nmで検出される。図15に多波長検出器 (Diode Array Detector; DAD) を用いたDAのLC/DADクロマトグラムおよびUV

図16. ドウモイ酸, アザスピロ酸, プレベトキシンの MRM LC-MS/MS クロマトグラム

カラム: Hypersil-BDS-C8 (2.0 i.d.×50 mm). 移動相: (A) 蒸留水/2 mMギ酸アンモニウム, 50 mMギ酸 (B) アセトニトリル-蒸留水 (95:5, v/v)/2 mMギ酸アンモニウム, 50 mMギ酸. 溶離: 5%B→100%B→10 min, 100%B→10 min. 流速: 0.2 mL/min.

スペクトルを示す。DAD検出では、保持時間に加えて、UVスペクトルによる同定が可能となり、より精度が高い同定が可能である。

LC-MS/MS法

下痢性貝毒OA群とほぼ同じLC条件により、MRM検出を行うことにより、他の毒群を含めた一斉分析が可能である (図16)。

6. プレベトキシシ (brevetoxin; BTX) 群

①化学的性状

ニュージーランドで発生した食中毒で原因となった二枚貝からプレベトキシシ (brevetoxin; BTX) 類縁体が発見されたことにより^{68), 69)}, BTXが神経性貝中毒の原因毒として確定された。10種類以上の類縁体が報告されているが、基本骨格によりBTX A型とBTX B型に大別される (図17)。これらは共にメタノールなどの有機溶媒に溶解性を示す脂溶性である。エーテル環がハシゴ状に連なった特異な構造を持ち下痢性貝毒OA・DTX群やシガテラ魚毒と類似しているが、このような構造が明らかになった初めての天然化合物であり、魚類の大量斃死をもたらす魚毒成分として特定された化合物として有名である^{70), 71)}。BTX B⁷¹⁾, BTX A⁷²⁾ が培養した有毒渦鞭毛藻 *Karenia brevis* (旧 *Gymnodinium breve*) から発見され、強力な魚毒成分として注目されてきた。

*K. brevis*はBTX A, BTX Bを含め、少なくとも9種類のBTXを生産することが確認されている。二枚貝はBTXをBTX B⁶⁸⁾, BTX B⁶⁹⁾などに代謝して蓄積する。魚毒性では、BTX AとBTX Bのゼブラフィッシュに対する最小

図17. プレベトキシシ群の化学構造

致死濃度はそれぞれ3, 16 ppbであり、BTX Aが最も強い。患者の神経性症状は、毒がナトリウムチャンネルに選択的に吸着し、細胞内へのナトリウムイオンの流入を活性化させるために発現する。ナトリウムイオンの流入を阻害する麻痺性貝毒やフグ毒テトロドトキシシとは逆の作用をする。

②中毒症状と中毒事例

主症状は四肢、顔面の痺れ、掻痒感、知覚異常、冷温感覚の逆転など感覚系神経症状、倦怠感、頭痛、筋肉痛などの全身性中枢神経症状である。また、吐き気、腹痛、下痢、嘔吐などの消化器系症状を伴うこともある。冷温感覚の逆転などの症状はシガテラ魚中毒と類似するが、シガテラ魚中毒が回復に長期間要するのに対して、通常1~2日で回復する。ヒトの死亡事例はない。海風が強い気象条件では、毒が飛沫に含まれエアロゾルとして運ばれ、呼吸器傷害などヒトへの健康被害も報告されている。

メキシコ湾を中心に、有毒渦鞭毛藻 *K. brevis*の赤潮により魚類や多くの海洋生物が斃死することは古くから知られていた。1962年、米国フロリダ州沖で赤潮に汚染された二枚貝により神経症状を主とする食中毒が発生している⁷²⁾。本中毒は、麻痺性貝中毒に次いで古くから知られている貝中毒である。1992年にはニュージーランド北島の北東岸を中心に280名を超える中毒患者が発生している⁷³⁾。また、1996年にはフロリダ半島西岸において、*K. brevis*の赤潮により希少生物として保護されているマナティー149頭が死亡する事件が発生している⁷⁴⁾。わが国では二枚貝からBTX群が検出された事例はなく、ヒトの中毒事例は報告されていない。

③分析法

LC-MS/MS法

下痢性貝毒OA群とほぼ同じLC条件により、MRM検出を行うことにより、他の毒群を含めた一斉分析が可能である（図16）。

7. アザスピロ酸 (azaspiracid; AZA) 群

①化学的性状

アザスピロ酸 (azaspiracid; AZA) は、多数のエーテル結合を分子内に有するポリエーテル化合物で脂溶性毒である（図18）。AZA群はメタノール、アセトン、クロロホルム、ジクロロメタンのような有機溶媒に溶解性を示す。AZA1, AZA2, AZA3が主要毒であるが^{75), 76)}、これらのほかに35種類以上の類縁体が報告されている。AZAのマウスに対する経口投与による病理学的観察では、小腸における液体の貯留、粘膜固有層の損傷など下痢性貝毒OA・DTX群と同様の症状が観察される。さらに、肝臓の脂肪化、リンパ球の壊死などAZA特有の症状も観察される^{77), 78)}。OA群とは異なり、セリン／スレオニンプロテインホスファターゼ (serine/threonine protein phosphatase 1 and 2A; PP1, PP2A) に対する阻害作用はない。Azadinium spinosum など新種の小型鞭毛藻類がAZAを生産することが確認され、二枚貝毒化原因種であることが明らかにされている⁷⁹⁾。

②中毒症状と中毒事例

中毒主症状は、下痢、腹痛、嘔吐など消化器系症状で、下痢性貝中毒と似ている。ヒトの死亡事例はない。ヒトに対する最小作用量は23～86 µgと推定されている⁸⁰⁾。1995年にオランダでアイルランド北西岸産ムラサキイガイを原因とする食中毒が発生し、少なくとも8名の患者が確認されている⁷⁵⁾。1997年にはアイルランドでムラサキイガイを原因とする中毒事例が報告されている⁸¹⁾。少なくとも20～40名が中毒原因ムラサキイガイを摂食し、8名が発症して治療を受け、回復するまでに2～5日を要したことが報告されている。このときのAZA群の毒量は可食部あたり6 µg/gと報告されている。1998年には、アイルランド産ムラサキイガイを原因とする食中毒がイタリアで発生し、10名が中毒症状を発症した⁸¹⁾。また、同年、アイルランド産ムラサキイガイを原因とする中毒がフランスでも発生し、20～30名が中毒症状を発症した⁸¹⁾。このときの二枚貝のAZA含量は1.5 µg/gであった。2000年にはアイルランド産の凍結調理ムラサキイガイを原因とする中毒事例がイギリスでも報告され、12～16名が発症している⁸¹⁾。2008年にもフランスと米国でアイルランド産ムラサキイガイによる中毒事例が報告されている⁸¹⁾。フランスでは多数の中毒患者が、米国では2名の患者が報告されている。わが国では一部の海域で二枚貝の毒化事例が報告されているものの毒量は極めて低く（筆者非公開データ）、ヒトの中毒事例は報告されていない。

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
AZA1	H	CH ₃	H	H
AZA2	CH ₃	CH ₃	H	H
AZA3	H	H	H	H

図18. アザスピロ酸群の化学構造

③分析法

LC-MS/MS法

下痢性貝毒OA群とほぼ同じLC条件により、MRM検出を行うことにより、ほかの毒群を含めた一斉分析が可能である（図16）。EUのSOPや一定基準の妥当性が確認されたLC-MS/MS法^{51)～54)}も報告されている。

8. 今後の展望と課題

本稿で紹介した化学構造により分類した5群の貝毒は、いずれも国際的に規制対象となっている貝毒である。これらの貝毒はDAを除き、すべてマウス毒性試験が貝毒検査の公定法であった。しかし、現在では、これらの貝毒はすべてLC-MS/MS法やHPLC法などの機器分析法により、検査が可能である。さらに、毒性等価係数 (TEF) についても国際規格化が進められており、貝毒の機器分析法は、今後、国際的にも普及が進むと思われる。一方、わが国では、2015年から下痢性貝毒の公定法がマウス毒性試験からOA群を対象としたLC-MS/MS法に改正されたが、麻痺性貝毒については、今後もマウス毒性試験が公定法として利用されることになる。しかし、一部の国では麻痺性貝毒STX群を対象とした機器分析法が導入されており、STX群についても機器分析法の普及が各国で進むと思われる。わが国においても機器分析法への移行について、検討する時期がきていると思われる。

機器分析法を公定法として採用するためには、貝毒の認証標準物質 (Certified Reference Material; CRM) が必要である。貝毒CRMは現在、カナダの National Research Council (NRC) が製造した市販品が広く世界中で利用されているが、貝毒検査の標準品を海外の製品にのみ依存することは、在庫切れに伴う貝毒検査の停滞などのリスクを勘案すると望ましいことではない。わが国では、有毒藻類の大量培養によるOA群やSTX群の製造技術の開発が進められており⁸²⁾、精製した標準毒の値付け技術についても定量NMR法による値付け法に関する研究が進められている^{83), 84)}。これらの研究成果を用いて、下痢性貝毒OA群

については、国産CRMが2016年4月から市販されているが、麻痺性貝毒STX群についても国産CRMの開発が望まれる。また、OA群やSTX群のCRMを大量生産するためには、毒の抽出、精製技術の高度化も必要であり、こうした研究への取り組みも必要であろう。

謝 辞

本稿の執筆にあたり、貴重なデータや資料をご提供いただきました国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所の渡邊龍一博士、内田 肇博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

- McNabb, P. S., Taylor, D. I., Ogilvie, S. C., Wilkinson, L. A. A., Hamon, D. W. S., Peake, B. M. First detection of tetrodotoxin in the bivalve *Paphies australis* by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry with and without precolumn reaction. *J. AOAC Int.*, **97**, 325–333 (2014).
- Turner, A. D., Powell, A., Schofield, A., Lees, D. N., Baker-Austin, C. Detection of the pufferfish toxin tetrodotoxin in European bivalves, England, 2013 to 2014. *Eurosurveillance*, **20**(2), 2–8 (2015).
- EFSA. Marine biotoxins in shellfish — Summary on regulated marine biotoxins Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*, **1306**, 1–23 (2009).
- Oshima, Y. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.*, **78**, 528–532 (1995).
- Schantz, E. J., Ghazarossian, V. E., Schnoes, H. K., Strong, F. M., Springer, J. P., Pezzanite, J. O., Clardy, J. The structure of saxitoxin. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1238–1239 (1975).
- Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K., Scheuer, T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, **49**, 124–141 (2007).
- Oshima, Y. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms, Harmful Marine Algal Blooms, P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, C. Marcaillou (eds.), Lavoisier Publ., 1995, p. 475–480.
- Sako, Y., Yoshida, T., Uchida, A., Arakawa, O., Noguchi, T., Ishida, Y. Purification and characterization of a sulfotransferase specific to N-21 of saxitoxin and gonyautoxin 2+3 from the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **37**, 1044–1051 (2001).
- Lin, H. P., Cho, Y., Yashiro, H., Yamada, T., Oshima, Y. Purification and characterization of paralytic shellfish toxin transforming enzyme from *Mactra chinensis*. *Toxicon*, **44**, 657–668 (2004).
- Cho, Y., Ogawa, N., Takahashi, M., Lin, H. P., Oshima, Y. Purification and characterization of paralytic shellfish toxin-transforming enzyme, sulfocarbamoylase I, from the Japanese bivalve *Peronidia venulosa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1784**, 1277–1285 (2008).
- Sato, S., Sakai, R., Kodama, M. Identification of thioether intermediates in the reductive transformation of gonyautoxins into saxitoxins by thiols. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 1787–1789 (2000).
- Oshima, Y., Sugino, K., Itakura, H., Hirota, M., Yasumoto, T. Toxic marine phytoplankton, E. Granéli, B. Sundstrom, L. Edler, D. Anderson (eds.), Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves, Elsevier, 1990, p. 391–396.
- FAO ed. “Marine Biotoxins” Rome, Italy, 2004. (ISBN 95–5–105129–1)
- Turner, A. D., Hatfield, R. G., Rapkova, M., Algoet, M., Lees, D. N. Single-laboratory validation of a refined AOAC HPLC method 2005.06 for oysters, cockles and clams in UK shellfish. *J. AOAC Int.*, **93**, 1482–1493 (2010).
- van de Riet, J. M., Gibbs, R. S., Chou, F. W., Muggah, P. M., Rourke, W. A., Burns, G., Thomas, K. Quilliam, M. A. Liquid chromatographic post-column oxidation method for analysis of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, scallops, and oysters: single-laboratory validation. *J. AOAC Int.*, **92**, 1690–1704 (2009).
- Etheridge, S. M. Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives. *Toxicon*, **56**, 108–122 (2010).
- Dell’Aversano, C., Hess, P., Quilliam, M. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *J. Chromatogr. A*, **1081**, 190–201 (2005).
- Watanabe, R., Matsushima, R., Harada, T., Oikawa, H., Murata, M., Suzuki, T. Quantitative determination of paralytic shellfish toxins in cultured toxic algae by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam., Part A*, **30**, 1351–1357 (2013).
- Boundy, M. J., Selwood, A. I., Harwood, D. T., McNabb, P. S., Turner, A. D. Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction. *J. Chromatogr. A*, **1387**, 1–12 (2015).
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Yasumoto, G. K., Clardy, J. Diarrhetic shellfish toxins. Tetrahedron, **41**, 1019–1025 (1985).
- Yasumoto, T., Murata, M. Marine toxins, *Chem. Rev.*, **93**, 1897–1909 (1993).
- Terao, K., Ito, E., Yanagi, T., Yasumoto, T. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon*, **24**, 1141–1151 (1986).
- EFSA. Marine biotoxins in shellfish — Okadaic acid and analogues. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*, **589**, 1–62 (2008).
- Bialojan, C., Takai, A. 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem. J.*, **256**, 283–290 (1998).

- 25) Tripuraneni, J., Koutsouris, A., Pestic, L., De Lanerolle, P., Hecht, G. The toxin of diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability. *Gastroenterology*, **112**, 100–108 (1997).
- 26) Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamada, K., Murata, M., Yasumoto, T., Sugimura, T. Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Gan (Jpn. J. Cancer Res.)*, **79**, 1089–1093 (1988).
- 27) Lee, J. S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.*, **1**, 147–152 (1989).
- 28) Reguera, B., Pizarro, G. Planktonic dinoflagellates which contain polyether toxins of the old “DSP complex”. In: Botana, L.M. (ed.), *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology, and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 2008, p. 257–284.
- 29) Suzuki, T., Miyazono, A., Baba, K., Sugawara, R., Kamiyama, T. LC-MS/MS analysis of okadaic acid analogues and other lipophilic toxins in single-cell isolates of several *Dinophysis* species collected in Hokkaido, Japan. *Harmful Algae*, **8**, 233–238 (2009).
- 30) Torgersen, T., Aasen, J., Aune, T. Diarrhetic shellfish poisoning by okadaic acid esters from Brown crabs (*Cancer pagurus*) in Norway. *Toxicon*, **46**, 572–578 (2005).
- 31) Suzuki, T., Ota, H., Yamasaki, M. Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon*, **37**, 187–198 (1998).
- 32) Suzuki, T., Kamiyama, T., Okumura, Y., Ishihama, K., Matsushima, R., Kaneniwa, M. Liquid-chromatographic hybrid triple-quadrupole linear-ion-trap MS/MS analysis of fatty-acid esters of dinophysistoxin-1 in bivalves and toxic dinoflagellates in Japan. *Fish. Sci.*, **75**, 1039–1048 (2009).
- 33) Yasumoto, T., Seino, N., Murakami, Y., Murata, M. Toxins produced by benthic dinoflagellates. *Biol. Bull.*, **172**, 128–131 (1987).
- 34) Hu, T., Marr, J., S. W. de. Freitas, A., Quilliam, M. A., Walter, J. A., C. Wright, J. L., Pleasance S. New diol esters isolated from cultures of the dinoflagellates *Prorocentrum lim* and *Prorocentrum concavum*. *J. Nat. Prod.*, **55**, 1631–1637 (1992).
- 35) Suzuki, T., Beuzenberg, V., Mackenzie, L., Quilliam, M. A. Discovery of okadaic acid esters in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 1131–1138 (2004).
- 36) Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.)*, **44**, 1249–1255 (1978).
- 37) 野々村文雄, 岩田好博, 中屋謙一, 杉谷 哲, 山田不二造, 近藤和久, 円田辰吉, 臼井宗一, 井上 睦. 岐阜県で発生した下痢性貝毒による食中毒事例. *食衛誌*, **24**, 573–578 (1983).
- 38) Vale, P., Sampayo, M. A. de M. Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*, **37**, 1109–1121 (1999).
- 39) Vale, P., Sampayo, M. A. de M. First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicon*, **40**, 989–996 (2002).
- 40) García, C., Truan, D., Lagos, M., Santelices, J. P., Díaz, J. C., Lagos, N. Metabolic transformation of dinophysistoxin-3 into dinophysistoxin-1 causes human intoxication by consumption of O-acyl-derivatives dinophysistoxins contaminated shellfish. *J. Toxicol. Sci.*, **30**, 287–296 (2005).
- 41) 山中英明. 魚介類の自然毒による食中毒の現状. *食衛誌*, **27**, 343–353 (1986).
- 42) 登田美桜, 畝山智香子, 豊福 肇, 森川 馨. わが国における自然毒による食中毒事例の傾向 (平成元年～22年). *食衛誌*, **53**, 105–120 (2012).
- 43) Quilliam, M. A. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.*, **78**, 555–570 (1995).
- 44) Suzuki, T., Yasumoto, T. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of the diarrhetic shellfish —poisoning toxins okadaic acid, denophysistoxin-1 and pectenotoxin-6 in bivalves. *J. Chromatogr. A*, **874**, 199–206 (2000).
- 45) Quilliam, M. A. The role of chromatography in the hunt for red tide toxins. *J. Chromatogr. A*, **1000**, 527–548 (2003).
- 46) McNabb, P., Selwood, A. I., Holland, P. T. Multiresidue method for determination of algal toxins in shellfish: single-laboratory validation and interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, **88**, 761–772 (2005).
- 47) Suzuki, T., Quilliam, M. A. LC-MS/MS analysis of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, okadaic acid and dinophysistoxin analogues, and other lipophilic toxins. *Anal. Sci.*, **27**, 571–584 (2011).
- 48) Gerssen, A., Mulder, P. P., McElhinney, M. A., J. de Boer. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 1421–1430 (2009).
- 49) Suzuki, T., Jin, T., Shiota, Y., Mitsuya, T., Okumura, Y., Kamiyama, T. Quantification of lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in Japanese bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and comparison with mouse bioassay (MBA) as the official testing method in Japan. *Fish. Sci.*, **21**, 1370–1378 (2005).
- 50) Ito, S., Tsukada, K. Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins. *J. Chromatogr. A*, **943**, 39–46 (2002).
- 51) Stobo, A., Lacaze, J. P., Scott, A. C., Gallacher, S.,

- Smith, E. A., Quilliam, M. A. Liquid chromatography with mass spectrometry detection of lipophilic shellfish toxins. *J. AOAC Int.*, **88**, 1371–1382 (2005).
- 52) Gerssen, A., Van Olst, E. H. W., Mulder, P. P. J., De Bore, J. In-house validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of lipophilic marine toxins in shellfish using matrix-matched calibration. *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, 3079–3088 (2010).
- 53) van den Top, H. J., Gerssen, A., McCarron, P., van Egmond, H. P. Quantitative determination of marine lipophilic toxins in mussels, oysters and cockles using liquid chromatography-mass spectrometry: inter-laboratory validation study. *Food Addit. Contam. Part A*, **28**, 1745–1757 (2011).
- 54) These, A., Klemm, C., Nausch, I., Uhlig, S. Results of a European interlaboratory method validation study for the quantitative determination of lipophilic marine biotoxins in raw and cooked shellfish based on high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Part I: collaborative study. *Anal. Bioanal. Chem.*, **399**, 1245–1256 (2011).
- 55) Goto, H., Igarashi, T., Yamamoto, M., Yasuda, M., Sekiguchi, R., Watai, M., Tanno, K., Yasumoto, T. Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **907**, 181–189 (2001).
- 56) Gerssen, A., McElhinney, M. A., Mulder, P. P., Bire, R., Hess, P., de Boer, J. Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 1213–1226 (2009).
- 57) Fux, E., McMillan, D., Bire, R., Hess, P. Development of an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins. *J. Chromatogr. A*, **1157**, 273–280 (2007).
- 58) Fux, E., Rode, D., Bire, R., Hess, P. Approaches to the evaluation of matrix effects in the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of three regulated lipophilic toxin groups in mussel matrix (*Mytilus edulis*). *Food Addit. Contam.*, **25**, 1024–1032 (2008).
- 59) Lee, J. S., Yanagi, T., Kenma, R., Yasumoto, T. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 877–881 (1987).
- 60) Uchida, H., Watanabe, R., Matsushima, R., Uchida, N., Nagai, H., Kamio, M., Murata, M., Yasumoto, T., Suzuki, T. A convenient HPLC method for detection of okadaic acid analogues as 9-amthrylmethyl esters with automated sample cleanup by column switching. *J. AOAC Int.*, **97**, 391–397 (2014).
- 61) 竹本常松, 醍醐皓二, 近藤嘉和. ハナヤナギの成分研究 (第8報) Domoic acidの構造論 その1. 薬学雑誌, **86**, 874–877 (1966).
- 62) Wright, J. L. C., Boyd, R. K., de Freitas, A. S. W., Falk, M., Foxall, R. A., Jamieson, W. D., Laycock, M. V., McCulloch, A. W., McInnes, A. G., Odense, P., Pathak, V. P., Quilliam, M. A., Ragan, M. A., Sim, P. G., Thibault, P., Walter, J. A., Gilgan, M., Richard, D. J. A., Dewar, D. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J. Chem.*, **67**, 481–490 (1989).
- 63) Lelong, A., Hegaret, H., Soudant, P., Bates, S. S. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia*, **51**, 168–216 (2012).
- 64) Todd, E. C. D. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning — A review. *J. Food Protection*, **56**, 69–83 (1993).
- 65) Perl, T. M., Bedard, L., Kosatsky, T., Hockin, J. C., Todd, E. C., Remis, R. S. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *N. Engl. J. Med.*, **322**, 1775–1780 (1990).
- 66) 橋本多美子, 西堀尚良, 西尾幸郎. 徳島県沿岸に生息する1992年産ムラサキイガイからドウモイ酸の検出. 四国大学紀要, **7**, 67–70 (1997).
- 67) Quilliam, M. A., Xie, M., Hardstaf, W. R. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. *J. AOAC Int.*, **78**, 543–554 (1995).
- 68) Ishida, H., Nozawa, A., Totoribe, K., Muramatsu, N., Nukaya, H., Tsuji, K., Yamaguchi, K., Yasumoto, T., Kaspar, H., Berkett, N., Kosuge, T. Brevetoxin B1, a new polyether marine toxin from the New Zealand shellfish, *Austrovenus stutchburyi*. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 725–728 (1995).
- 69) Murata, K., Satake, M., Naoki, H., Kaspar, H. F., Yasumoto, T. Isolation and structure of a new brevetoxin analogue, brevetoxin B2, from greenshell mussels from New Zealand. *Tetrahedron*, **54**, 735–742 (1998).
- 70) Lin, Y. Y., Risk, M., Ray, S. M., Engen, D. V., Clardy, J., Golik, J., James, J. C., Nakanishi, K. Isolation and structure of brevetoxin B from the “red tide” dinoflagellate *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium breve*). *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6773–6775 (1981).
- 71) Shimizu, Y., Chou, H. N., Bando, H., Duyne, G. V., Clardy, J. Structure of brevetoxin A (GB-1 toxin), the most potent toxin in the Florida red tide organism *Gymnodinium breve* (*Ptychodiscus brevis*). *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 514–515 (1986).
- 72) McFarren, E. F., Tanabe, H., Silva, F. J., Wilson, W. B., Campbell, J. E., Lewis, K. H. The occurrence of a ciguatera-like poison in oysters, clams and *Gymnodinium breve* cultures. *Toxicon*, **3**, 111–123 (1965).
- 73) Bates, M., Baker, M., Willson, N., Lane, L., Handford, A. Marine toxins and New Zealand shellfish. In: Proceedings of a workshop on research issue. Royal Society of New Zealand, 1993, p. 35–40.
- 74) Bossart, G. D., Baden, D. G., Ewing, R. Y., Roberts, B., Wright, S. D. Brevetoxicosis in manatees (*Trichechus manatus latirostris*) from the 1996 epizootic—Gross, histologic and immunohistochemical features. *Toxicol. Pathol.*, **26**, 276–282 (1998).
- 75) Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K. J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T. Azaspiracid, a

- new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. J. Am. Chem. Soc., **120**, 9967–9968 (1998).
- 76) Ofuji, K., Satake, M., McMahon, T., Silke, J., James, K. J., Naoki, H., Oshima, Y., Yasumoto, T. Two analogues of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. Nat. Toxins, **7**, 99–102 (1999).
- 77) Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Kurita, N., McMahon, T., James, K., Yasumoto, T. Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. Toxicon, **38**, 917–930 (2000).
- 78) Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Higashi, M., Harigaya, K., McMahon, T., Yasumoto, T. Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. Toxicon, **40**, 193–203 (2002).
- 79) Tillmann, U., Elbrachter, M., Krock, B., John, U., Cembella, A. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. Eur. J. Phycol., **44**, 63–79 (2009).
- 80) European Union/Sante et Consommateurs (EU/SANCO). 2001. Report of the meeting of the working group on toxicology of DSP and AZP, 21–23 May, 2001. Brussels.
- 81) Twiner, M. J., Hess, P., Doucette, G. J. “Azaspiracids, toxicology, pharmacology, and risk assessment”. In: Botana, L.M. (ed.), Seafood and Freshwater Toxins Third Edition. Pharmacology, Physiology, and Detection. CRC Press, Boca Raton, 2014, p. 823–855. (ISBN 9781466505148-CAT# K14551)
- 82) Suzuki, T., Watanabe, R., Yoshino, A., Oikawa, H., Uchida, H., Matsushima, R., Nagai, S., Kamiyama, T., Yamazaki, T., Kawaguchi, M., Yarita, T., Takatsu, A. Preparation of Diarrhetic Shellfish Toxins (DSTs) and Paralytic Shellfish Toxins (PSTs) by Large Algal Culture and Chemical Conversion. In: Mackenzie, L. (ed.), Proceedings of the 16th International Conference on Harmful Algae. Wellington, 2014, p. 34–39. (ISBN 978-87-990827-5-9)
- 83) Watanabe, R., Suzuki, T., Oshima, Y. Development of quantitative NMR method with internal standard for the standard solutions of paralytic shellfish toxins and characterisation of gonyautoxin-5 and gonyautoxin-6. Toxicon, **56**, 589–595 (2010).
- 84) Watanabe, R., Sugai, C., Yamazaki, T., Matsushima, R., Uchida, H., Matsumiya, M., Takatsu, A., Suzuki, T. Quantitative NMR by ERETIC2 Based on PULCON Methodology; Application to Quantification of Invaluable Marine Toxin, Okadaic Acid. Anal. Sci., submitted.