ノート

オートクレーブ加熱による麻痺性貝毒の変化

(平成 10 年 11 月 30 日受理)

村上りつ子*¹ 山本和則*¹ 野口玉雄*²

Changes of Paralytic Shellfish Poison by Autoclaving

Ritsuko MURAKAMI*¹, Kazunori YAMAMOTO*¹ and Tamao NOGUCHI*²(*¹Ibaraki Prefectural Institute of Public Health: 993-2, Kasaharacho, Mito 310-0852, Japan;*²Faculty of Fisheries, Nagasaki University: 1-14, Bunkyo-machi,
Nagasaki 852-8131, Japan)

Paralytic shellfish poison (PSP)-contaminated bivalves, the surf clam *Pseudocardium sachalinensis* and hard clam *Meretrix lamarckii*, were extracted with water and each extract was divided into several portions, which were adjusted to various acidic pH values and autoclaved at 120°C for up to 120 min. Irrespective of the species, the extract adjusted to pH 5 or 6 lost most of the toxicity when autoclaved for 15 min, whereas at pH 3, the extract maintained its toxicity level throughout the autoclaving. HPLC analysis demonstrated that regardless of pH, each extract exhibited a PSP composition differing from the initial one when autoclaved for 15 min. The extract showed no more changes in PSP composition at longer periods of autoclaving, even when the toxicity level was decreased at near-neutral pH.

The present results indicate that the stability of PSP during autoclaving is pH-dependent and that PSP components or gonyautoxins 1~4 may attain mutual equilibria during 15 min of autoclaving. A mixture of purified gonyautoxins gave essentially the same results as did the extracts.

(Received November 30, 1998)

Key words: 麻痺性貝毒 (PSP) paralytic shellfish poison (PSP); オートクレーブ加熱 autoclaving; pH pH; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 二枚貝 bivalves

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poison; PSP) はある種のプランクトンが産生する毒で、二枚貝などに蓄積し、ヒトが誤食するとしばしば死に至ることから食品衛生上恐れられている魚介毒の一つである。PSP は通常の加熱ではある程度安定であるが、オートクレーブ加熱^{1), 2)} や缶詰加工^{3)~7)} などにより大幅な減毒が可能であるといわれている。しかし、PSP は多成分からなり、成分によって熱に対する安定性が異なることも考えられる。一方、PSP の安定性は pH に依存することも知られているが、既往の諸研究ではこの点の検討が十分行われていない。

このような状況に鑑み、本研究では、PSP により毒化したウバガイとチョウセンハマグリとから粗 PSP 溶液を調製し、種々の pH において 120 分間のオートクレーブ加熱を行い、その間における毒力及び PSP 組成の変化を追跡し、若干の知見を得たので以下に報告したい。

実験方法

1. 材料

茨城県久慈浜で 1996 年 4 月に採取したウバガイ *Pseudocardium sachalinensis* 20 個体及び 1995 年 4 月に同県鹿嶋で採取したチョウセンハマグリ *Meretrix lamarckii* 50 個体を用いた。各二枚貝から中腸腺を摘出して合一した後、使用するまで -40°C に凍結貯蔵した。

*¹ 茨城県衛生研究所: 〒310-0852 水戸市笠原町 993-2*² 長崎大学水産学部: 〒852-8131 長崎市文教町 1-14

Table 1. Operating Conditions of HPLC for Paralytic Shellfish Poison (PSP)

Column	: Silica ODS column (Mightysil RP-18, 4.6×250 mm)
Temperature	: Ambient temperature
Mobile phase for PXs	: 1 mmol/L tetrabutyl ammonium phosphate-acetic acid (pH 5.8)
	for GTXs: 2 mmol/L HSA/10 mmol/L ammonium phosphate (pH 7.1)
	for STXs: 2 mmol/L HSA/10 mmol/L ammonium phosphate (pH 7.3): acetonitrile (100:5)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Post column reaction	
Reagents: (A)	0.05 mol/L periodic acid
	(B) 0.2 mol/L KOH plus 1 mol/L ammonium formate /50% formamide
Flow rate: (A):(B)=1:1	1.0 mL/min
Reaction	: 10 m Teflon tubing (0.25 mm i.d.)
Detection	: Excitation 336 nm, Emission 392 nm

HSA: 1-heptanesulfonic acid, PX: protogonyautoxin, GTX: gonyautoxin

Table 2. Changes in the Toxicity of Surf Clam Extract (MU/mL) by Autoclaving at Various pH

pH	Time of autoclaving (min)				
	0	15	30	60	120
3	20.3±0.6	21.8±2.5	20.8±1.2	21.5±2.0	19.8±2.0
4	22.5±0.8	19.0±2.4	15.5±1.3	15.8±1.6	8.1±1.6
5	16.2±2.1	7.2±0.1	ND	ND	ND
6	16.0±1.1	ND	ND	ND	ND
Control (pH 5.8)	17.0±0.6	ND	ND	ND	ND

ND: not detected. Values are represented as mean±S.D. (n=3).

2. PSP 標品及び一般試薬

HPLC による PSP 組成分析の標準品としては、水産庁より配布された protogonyautoxin (PX) 1, 2 及び gonyautoxin (GTX) 1~4 混合液を用いた。オートクレーブ加熱試験には和光純薬工業(株)製 GTX1~4 混合液を用いた。

その他、HPLC 用又は特級試薬を使用した。

3. 実験方法

各二枚貝の中腸腺に2倍量の水を加えてホモジナイズした。10分間の超音波処理に付した後、3,000×gで10分間遠心分離を行い上清を得た。上清各5mLにそれぞれpH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0の1mol/L酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(酢酸塩緩衝液)を加えて全量を10mLとし、これを試験溶液とした。そのほか、酢酸塩緩衝液の代わりに水を用いたものを対照とした。対照液のpHは5.8であった。これらの溶液から各2mLずつをとり、アルミシールバイアル瓶に入れてゴム栓を施した後、アルミシールをかぶせて巻き締めした。重量を測定した後オートクレーブの中に入れ、120℃でそれぞれ15, 30, 60, 120分間加熱した。加熱終了後、放冷して再び重量を測定し、加熱前と重量変化のないことを確認後、水で10倍に希釈して以下の試験を行った。他方、GTX1~4標品の場合、溶液を水で10倍に希釈したものについても同様の処理を施し、HPLC分析に供した。

3.1 毒性試験

公定法のマウスアッセイ法⁹⁾に準じ、毒力を測定した。ただし、体重20gのddY系雄マウス3匹を用いて得られた平均値を毒力値とした。

3.2 PSP 成分組成分析

PSP組成については、Table 1に示す条件のHPLC^{9), 10)}により分析した。得られたPSP各成分の量を、比毒性値¹¹⁾を用いて毒力値(MU/mL)に換算した。

実験結果及び考察

オートクレーブ加熱前後の試験溶液入りのアルミシールバイアル瓶の重量に変化はみられなかった。

1. 中腸腺抽出液中PSPの変化

ウバガイの中腸腺抽出液のオートクレーブ加熱に伴う毒性変化をマウスアッセイによって調べた結果をTable 2に、pH 3.0において種々の時間オートクレーブ加熱した後のHPLC分析の結果をFig. 1に示す。オートクレーブ加熱中におけるPSP毒性の変化はpHに大きく依存した(Table 2)。pH 3では、当初の試験液の毒力は20.3 MU/mLであったが、15~120分間の加熱後の毒力値も19.8~21.8 MU/mLとほとんど変わらなかった。なお、HPLCプロファイル(Fig. 1)を基に加熱前の各PSP成分の濃度を前記のように、比毒性値を用いて毒力値に換算したところ、PX1は0.1, PX2は2.3 MU/mL, GTX1, 2, 3, 4はそれぞれ6.9, 0.8, 5.2,

Fig. 1. Time-dependent changes in PSP profile of surf clam extract by autoclaving at pH 3.0

a) Before autoclaving

b~e) After autoclaving for 15 min (b), 30 min (c), 60 min (d) and 120 min (e)

5.1 MU/mL, 総毒力は 20.4 MU/mL となり, マウスアッセイによる毒力とはほぼ一致した。しかし, 15 分加熱後の PSP 組成は大きく変化した。すなわち, PX がほとんど消失する一方, GTX 1, 2 はそれぞれ 12.1 MU/mL (1.8 倍), 4.6 MU/mL (5.8 倍) と大幅増を示し, 逆に GTX 3, 4 はそれぞれ 3.3 MU/mL (0.6 倍), 2.2 MU/mL (0.4 倍) と著しく減少した。なお, GTX1 と GTX3 の間に 2 つのピークが出現した。その正体は今のところ不明であるが, マウスアッセイによる毒力が加熱前の値とはほぼ一致することから無毒の成分の可能性が大きい。他方, pH 4.0 の場合には, 当初の毒性が時間とともに減少し, 120 分後には約 1/3 となった。pH 5 の場合は 30 分で, pH 6 の場合には 15 分で早くも不検出となった。これらの結果は PSP のオートクレーブ加熱における安定性が明らかに pH 依存性であることを示している。Fig. 1 にみるように, ウバガイの pH 3 における PSP プロファイルは加熱時間を 30 分以上に延長したときも特段の変化はみられず, 15 分加熱で PX 成分の対応する GTX 成分への変化, 並びに GTX 成分相互間に平衡が成立したことを示唆した。pH 4.0 では, 加熱時間の延長に伴って毒性は減少したが, この場合でも GTX 成分の相互比率はほぼ一定のままであった (図省略)。

なお, チョウセンハマグリの中腸腺抽出液を用いた場

合にも, 上記のウバガイの場合とほぼ同じ結果が得られた (図省略)。

2. GTX1~4 標品の変化

GTX1~4 標品の混合液をオートクレーブ加熱したときの組成の変化について, 上記とはほぼ同様の手法で検討した。結果を Fig. 2 に示す。

pH 3.0 では, 加熱前の GTX 1, 2, 3, 4 の濃度はそれぞれ 12.3, 3.3, 2.0, 1.0 MU/mL で, 換算総毒性は 18.6 MU/mL であった。15~120 分加熱しても, 組成, 換算総毒性ともにほとんど変わらなかった。ウバガイなどからの PSP 粗抽出液では 15 分間の加熱で組成の大幅な変化がみられたのに対し, 加熱前と加熱後で組成とくに相違が認められなかったのは, 標品混合物中の GTX 成分間の平衡が加熱前にすでに成立していたためであろう。pH 4.0 でも, 前述の粗抽出液でみられた, GTX1, 2 の大幅な増加などの組成の変化はみられず, 加熱時間とともに GTX1, 2 が減少し, それに伴い換算総毒性も減少したが, 120 分後も 11.8 MU/mL の換算総毒性を示した。pH 5.0 以上では加熱による変化がより速やかであった。これら PSP 標品混合液で得られた結果は, 前述の粗抽出液での結果と比べ, 加熱前後での組成の変化はみられず, PSP 減少速度は若干遅いように思われたなど多少相違もみられたが, 両者は明らかに pH に依存した同様の減毒パターンを示した。

Fig. 2. Effects of autoclaving time and pH on the toxicity of a mixture of purified GTXs

以上述べたように、PSPは、中性付近では、粗抽出液でも標品でも120℃のオートクレーブ加熱で比較的短時間に減毒された。しかし前記のように、pH 3, 4といったより酸性の条件下ではPSPは安定性を増し、120℃で120分間加熱しても顕著な減毒はみられなかった。

PSPは、構造的に多様な多成分からなるため、その安定性も多様性を示すと考えられる。一般に、PSPは酸性下では安定といわれている。しかし、STXは低pHでは安定であるが、GTXは加熱により11位の硫酸エステルがソルボリシスを起こし分解すると考えられ、必ずしもGTX群の毒にはあてはまらない¹²⁾。一方、酸性下での加熱により、PXなどの低毒性成分は対応する高毒性成分に容易に変換する。このようなことから、PSPによって汚染された貝類などの加熱による減毒化は、一様には行かず、貝の種類や、部位、又は加熱方法によって異なってくると考えられる。

これまで、PSP組成が低毒性成分のみからなるカキの1例及び主成分がGTX1~4であるホタテガイ及びカキなどのPSPについて、オートクレーブ処理又は缶詰加工などでかなり減毒されることが報告されている^{1), 3~7)}。しかし、この時の液性はいずれも中性付近と思われ、より酸性といった場合についての検討はされていない。一方、宮澤ら⁵⁾は、pH 4~9の各pHにおいて、沸騰水浴上6時間の加熱を行い、GTX1~4からなるPSPを持つ毒化カキよりオイスターソース製造時の

減毒を検討した結果、酸性側ではかなりの毒性が残存したと報告している。本研究では、PSP組成が低毒性成分PXとGTX1~4が主成分として混在していたウバガイとチョウセンハマグリについて、これまでの報告で十分減毒可能であるとされた120℃、120分間のオートクレーブ加熱による毒性及びPSP組成の変化を検討したが、酸性域ではPX成分は消失するもののGTXは消失せず、GTX1~4間で一種の平衡関係を生じ減毒はできなかった。このことから、GTXの個々の成分の安定性の差異に加えて、GTX成分間の相互比率もPSPの安定性に関わるものであることが示唆された。本結果は、缶詰加工などの際には、毒成分組成とpH条件に十分注意すべきことを示している。

他方、加熱によってPSPの減毒を行う際には、水分の損失などによってPSP濃度が変化する恐れがある。Lawrenceら¹³⁾は、PSPをもつロブスターの肝臓を茹でたり、蒸したりの調理を行うことによってPSPの減少を認めたが、これは、PSPが化学的に分解されたのではなく、水分の損失に伴って起こったものであったと報告している。本研究では、PSP溶液入りのアルミシールバイアル瓶について、加熱前後に重量変化のないことを確認したことから、中性域での減毒はPSPの分解によるものと思われた。

文 献

- 1) Nagashima, Y., Noguchi, T., Tanaka, M., Hashimoto, K.: J. Food Sci. 56, 1,572~1,575 (1991).
- 2) Prakash, A., Medcof, J. C., Tennent, A. D.: Fish. Res.

- Board Can. Bull. No. 177, 1~87 (1971).
- 3) 野口玉雄, 上田要一, 尾上義夫, 河野迪子, 小山絹江, 橋本周久, 妹尾芳郎, 三島 進: 日水誌. **46**, 1,273~1,277 (1980).
 - 4) 野口玉雄, 上田要一, 尾上義夫, 河野迪子, 小山絹江, 橋本周久, 妹尾芳郎, 三島 進: 日水誌. **46**, 1,339~1,344 (1980).
 - 5) 宮澤啓輔, 浅川 学, 野口玉雄: 食衛誌. **36**, 35~41 (1995).
 - 6) 高田久美代, 水田満里, 門田達尚: 食衛誌. **35**, 624~630 (1994).
 - 7) 水田満里, 高田久美代, 門田達尚, 米田達雄, 山内慎也: 食衛誌. **36**, 423~427 (1995).
 - 8) 厚生省生活衛生局監修: “食品衛生検査指針 (理化学編)” p. 300~305 (1991) 日本食品衛生協会.
 - 9) Nagashima, Y., Maruyama, J., Noguchi, T., Hashimoto, K.: Nippon Suisan Gakkaishi, **53**, 819~823 (1987).
 - 10) Oshima, Y.: J. AOAC Int. **78**, 528~532 (1995).
 - 11) Shimizu, Y.: “Progress in the Chemistry of Organic Natural Products” Vol. 45, Herts, W., Griesebach, H., Kirby, G. W., eds. **45**, p. 235~264 (1984) Springer-Verlag, Wien.
 - 12) 清水 譲: 化学と生物 **18**, 792~799 (1980).
 - 13) Lawrence, J. F., Maher, M., Watoson-Wright, W.: Toxicon **32**, 57~64 (1994).