報 文

イオンクロマトグラフィーによる巻貝(軟体動物)中
テトラミンの分析及び調理による消長

(平成 11 年 8 月 10 日受理)

新 藤 哲 也*¹ 牛 山 博 文*¹ 観 公 子*¹ 齋 藤 寛*²
桑 原 康 裕*³ 上 原 真 一*¹ 安 田 和 男*¹Determination of Tetramine in Gastropods (Mollusca) by Ion Chromatography
and the Effect of CookingTetsuya SHINDO*¹, Hirofumi USHIYAMA*¹, Kimiko KAN*¹, Hiroshi SAITO*²,
Yasuhiro KUWAHARA*³, Shin-ichi UEHARA*¹ and Kazuo YASUDA*¹(*¹The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho,
Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan; *²National Science Museum, Tokyo:
3-23-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan; *³Hokkaido
Abashiri Fisheries Experimental Station: 31, Masuura,
Abashiri-shi, Hokkaido 099-3119, Japan)

In order to evaluate poisoning by tetramine by means of analysis of the remaining gastropods in a food-poisoning case, a method for highly sensitive determination of tetramine by ion chromatography (IC) was developed.

Tetramine was extracted from gastropods with MeOH, defatted with *n*-hexane, cleaned up by using an ion pair reagent and a Sep-Pak C18 cartridge, and then subjected to IC. Recoveries of tetramine spiked at 1 mg/g in gastropods were more than 90%. The limit of quantitation was 10 µg/g. The remaining gastropods (boiled in soy sauce) in this food-poisoning case were *Neptunea lamellosa*. The contents of tetramine in the gastropods were at the levels of 0.34 mg in salivary gland, and 3.1 mg in meat. The intake of the patient in this case was supposed to have been about 10 mg, which is a sufficient amount to cause tetramine poisoning.

The diffusion percentage of tetramine from salivary gland of gastropods (*N. polycostata*) after boiling (97°C) in water for 10 minutes was 35% to meat, 1% to internal organs and 11% to broth. This result suggested that tetramine poisoning might be suspected on the basis of analysis of broth, etc., if no sample of the salivary gland of remaining gastropods is available.

(Received August 10, 1999)

Key words: 巻貝 gastropods; 唾液腺 salivary gland; テトラミン tetramine; 食中毒 food-poisoning; イオンクロマトグラフィー ion chromatography; 調理 cooking; クリイロエゾボラ *Neptunea lamellosa*; エゾボラ *Neptunea polycostata*

緒 言

寒海に生息する肉食性巻貝のうち、エゾバイ科の数種のは唾液腺にテトラミン(CH₃)₄N⁺を含有し、これを喫食した人に頭痛、めまい、視覚異常及び嘔吐等の症状を起すことが知られている^{1)~4)}。

テトラミンは巻貝の唾液腺に局在する^{1), 2), 5)}といわれて

いるが、唾液腺は外套膜を切開しないと除去することはできない。また、東北及び北海道などの産地以外では巻貝にテトラミンが含まれていることはあまり知られていないため、唾液腺を切除せずに喫食し、中毒を起こした例がしばしば報告されている^{6), 7)}。

都内では昭和 59 年 12 月に小料理屋で巻貝の刺身を喫食した男性が約 30 分後に四肢痙攣、呼吸困難等の症状を呈した事例⁸⁾があった。平成 9 年にも赤ツブと称して販売されていた巻貝を醤油で煮たものを、自宅で 3 個ずつ喫食した親子 2 名が、食後 1 時間半後に物が二重に見える、焦点が合わないなどの目の異常を呈した事例⁹⁾があった。

*¹ 東京都立衛生研究所: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1*² 国立科学博物館新宿分館: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-23-1*³ 北海道立網走水産試験場: 〒099-3119 北海道網走市鱒浦 31

Table 1. Operating Conditions for the Determination of Tetramine by IC

Column	Dionex Ion pac CS12A (250×4 mm i.d.), cation-exchange column
Eluent	10 mmol/L H ₂ SO ₄ -acetonitrile (1 : 1)
Column temp.	30°C
Flow rate	0.8 mL/min
Detector	Conductivity
Sample size	50 µL
Suppressor	CSRS (Cation auto suppressor)
(regenerant)	40 mmol/L (tetraethylammonium hydroxide)

テトラミンの分析法はこれまでに藤井らによる比色法⁵⁾及び橋爪らによる HPLC による方法¹⁰⁾のほか、マウスを用いた方法、NMR による方法など^{11)~14)}が報告されている。しかし、いずれも生の巻貝のテトラミンを多く含む唾液腺を分析対象としており、テトラミンの検出感度が低い。そのため、中毒事例において巻貝残品が少量の場合あるいは調理されている場合には、中毒原因物質と思われるテトラミンの含有量は少なく、その検出は困難である。

そこで、著者らはテトラミンを感度良く分析するため、抽出及びクリーンアップ方法を検討し、イオンクロマトグラフィー (IC) を用いた高感度な分析法を開発した。

更に、作成した分析法を用いて、中毒事例における巻貝残品の分析を行い、中毒量の推定を行った。

また、巻貝を煮た場合の唾液腺中のテトラミンの可食部及び煮汁などへの移行についても併せて検討した。

実験方法

1. 試料

平成9年に起きた中毒事例の巻貝残品（醤油で煮たもの）であるエゾバイ科クリイロエゾボラ (*Neptunea lamellosa*) 及び都内の鮮魚店で市販されていた同科巻貝であるエゾボラ (*Neptunea polycostata*) 殻付きを試料とした。

2. 試薬

- 1) テトラミン標準品：テトラメチルアンモニウムヒドロキシド (Sigma 社製)
- 2) ドデシル硫酸ナトリウム：イオンペアクロマトグラフィー用 (東京化成工業 (株) 製)
- 3) 固相抽出カラム：Bond Elut LRC C18 10 cc/500 mg (Varian 社製)
- 4) IC 用除去液：1 mol/L テトラブチルアンモニウムヒドロキシド溶液 (Aldrich 社製) を水で希釈し、40 mmol/L 溶液として用いた。

アセトニトリルは HPLC 用、その他試薬は特級を用いた。

3. 装置

イオンクロマトグラフ：DIONEX DX-500 (株) ダイオネクス社製

4. IC 条件

IC 条件は Table 1 に示した。

Sample 10 g (whole in case of salivary gland)

add 30 mL of MeOH
reflux at 80°C for 30 min (2 times)
filtrate
evaporate to dryness

Residue

add 30 mL of water
defat with *n*-hexane (50 mL×2)

Aqueous layer

evaporate to dryness

Residue

dissolve 5 mL of 10 mmol/L sodium dodesyl sulfate (SDS) solution

1 mL

pass through Bond Elute C18 (500 mg) cartridge
wash with 10 mL of water
elute with 6 mL of MeOH-0.1 mol/L HCl (1 : 1)

Eluate

evaporate to dryness

Residue

dissolve in 2 mL of water

Ion chromatography (IC)

Scheme 1. Isolation of tetramine from gastropods

5. 分析方法

5.1 抽出

巻貝中のテトラミンの抽出方法を Scheme 1 に示した。

巻貝から分離した唾液腺、可食部及び内臓各 1~10 g (唾液腺は全量) をそれぞれ細切した。ここで、内臓は腸及び中腸腺を含む茶褐色の部分、可食部は唾液腺及び内臓を除いた筋肉部分とした。試料にメタノール 30 mL を加えて 80°C で 30 分間還流し、ろ過した。この操作を 2 回繰り返し、ろ液を合わせた後、40°C で減圧乾固した。残留物に水 30 mL を加えて溶解した後、*n*-ヘキサン 50 mL で 2 回脱脂し、水層を減圧乾固した。残留物を 10 mmol/L ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液 5 mL に溶解し、粗抽出液とした。

5.2 クリーンアップ及び試験溶液の調製

固相抽出カラムをメタノール 5 mL、次いで 10 mmol/L SDS 溶液 10 mL でコンディショニングした。これに粗抽出液 1 mL を負荷し、水 10 mL で洗浄した後、メタノール-0.1 mol/L 塩酸混液 (1 : 1) 6 mL で溶出した。溶出液を減圧乾固した後、残留物を水 2 mL に溶解し、試験溶液とした。

5.3 定量

Table 1 に示した IC 条件によりテトラミン標準品 (0~50 ppm) の 10 mmol/L SDS 溶液を用いて検量線を作成し、これを用いて試料中のテトラミン含有量を算出した。

結果及び考察

1. IC 条件

巻貝中にはテトラミンと類似した構造をもつコリンを含

Fig. 1. Ion chromatogram of standard solution
a: choline (50 $\mu\text{g/mL}$), b: tetramine (50 $\mu\text{g/mL}$)

有することが知られている¹¹⁾。ICにおいてカルボキシル基を官能基としても一般的な陽イオン交換カラムであるIon pac CS12Aと移動相として陽イオン分析に汎用されるメタンスルホン酸を用いた場合、その濃度を10~40 mmol/Lまで変化させても両者を分離することはできなかった。

そこで、移動相に硫酸-アセトニトリル混液を用いて検討を行った。その結果、移動相を10 mmol/L 硫酸-アセトニトリル(1:1)とし、サプレッサーに40 mmol/L テトラブチルアンモニウムヒドロキシドを除去液として用いたところ、テトラミンとコリンを良好に分離することができた。

Fig. 1 にテトラミン及びコリンの標準溶液のクロマトグラムを示した。

2. テトラミンの加熱による安定性

メタノール抽出の際の還流操作及び調理加工におけるテトラミンの加熱時の安定性を調べた。

テトラミン 500 ppm 標準溶液 5 mL を各 50 mL のメスフラスコに入れ、沸騰水(97°C)中で1, 2, 5, 10, 20, 30 及び 60 分間それぞれ加熱した後、直ちに氷水を用いて室温まで冷却し、水で 50 mL としたときのテトラミン量を測定した。加熱前のテトラミン量に対する割合(%)をFig. 2 に示した。

テトラミンは60分間の加熱でも90%以上が残存していることから、熱に対して安定であることが確認された。

3. 試験溶液調製法の検討

3.1 脱脂操作の回収率への影響

橋本ら¹²⁾は試験溶液の調製法として、試料をメタノールで還流抽出後、メタノールを留去し、水に溶解した後、更にエーテル脱脂を行っている。しかし、水に溶解しているテトラミンの一部がエーテル層に移行し、回収率に影響を与えることが考えられたため、テトラミンの50 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液 30 mL を用いて、エーテル 50 mL で2回脱

Fig. 2. Heat stability of tetramine at 97°C

脂したところ、回収率が約80%に低下することが分かった。

そこで、エーテルに代えて*n*-ヘキサンを用いたところ、テトラミンの*n*-ヘキサン層への移行はみられず、ほぼ100%の回収率が得られた。

以上のことから*n*-ヘキサンによる脱脂を行うこととした。

3.2 クリーンアップ

メタノール抽出物は*n*-ヘキサンによる脱脂のみではアミノ酸及びタンパク質などが残存し、特に可食部や内臓の試料及び調理された試料ではICで分析する際に妨害となる物質が除去できないため、高感度な分析を行うことが困難であった。そこで、前処理カラムによるクリーンアップについて検討を行った。

3.2.1 固相抽出カラム

テトラミンのイオン性に着目し、陽イオン交換樹脂を充てんしたBond Elut LRC PRS (プロピルスルホン酸)¹⁵⁾を用いて、テトラミン 500 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液 1 mL を負荷し、メタノールなど各種溶離溶媒で溶出を試みたが、保持力が強すぎてテトラミンを溶出することはできなかった。また、これ以外の種々のイオン交換カラムについても検討を行ったが良好な結果は得られなかった。

次に、イオンペア試薬とBond Elut C18 カラムを組み

Fig. 3. Effect of methanol concentration on the elution percentage of tetramine from Bond Elute C18 cartridge
Tetramine added: 500 μ g, Elution volume: 10 mL

合わせたクリーンアップについて検討した。まず、イオンペア試薬としてオクタンスルホン酸ナトリウムを用い、Bond Elut C18 カラムをあらかじめメタノール 5 mL、次いで 10 mmol/L オクタンスルホン酸ナトリウム溶液 10 mL でコンディショニングした後、テトラミン 500 μ g を 10 mmol/L オクタンスルホン酸ナトリウム溶液 1 mL に溶解した液をこのカラムに負荷したところ、テトラミンをカラムに保持することができた。しかし、巻貝の抽出液を負荷した場合、その後の水による洗浄の過程でテトラミンが一部流出した。そこで、より保持力の強いイオンペア試薬である SDS を用いて同様の操作を行ったところ、テトラミンはカラムに保持され、水による洗浄過程での流出もみられず、良好な結果を得ることができた。

3.2.2 溶出溶媒

溶出液にはテトラミン及びイオンペア試薬の性質を考えてメタノール-0.1 mol/L 塩酸混液を用いることにした。Bond Elut C18 カラムにテトラミンを 500 μ g 負荷し、溶出液のメタノール濃度を 0, 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60 及び 80% とした場合のテトラミンの溶出率を調べた。Fig. 3 に示したようにメタノール濃度 40% 以上でテトラミンは完全にカラムから溶出した。一方、メタノール濃度が増加するに従い、妨害物質がより多く溶出する傾向がみられること及び操作性を考慮して、溶出溶媒のメタノール濃度は 50% (メタノール-0.1 mol/L 塩酸 (1:1) 混液) とした。また、溶出量を検討するため、カラムにテトラミンを 500 μ g 負荷し、メタノール-0.1 mol/L 塩酸 (1:1) 混液を 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 及び 10 mL とした場合のテトラミンの溶出率を調べた。Fig. 4 に示したようにテトラミンは 5 mL 以上で完全にカラムから溶出したため、溶出に用いるメタノール-0.1 mol/L 塩酸 (1:1) 混液は 6 mL とした。

以上のことから、クリーンアップはイオンペア試薬として SDS を用いて、Bond Elut C18 カラムに試料を負荷しテトラミンを保持させ、水で洗浄した後、メタノール-0.1 mol/L 塩酸 (1:1) 混液 6 mL で溶出することとした。

Fig. 4. Effect of eluent volume on the elution percentage of tetramine from Bond Elut C18 cartridge
Tetramine added: 500 μ g, Eluent: MeOH-0.1 mol/L HCl (1:1)

3.3 添加回収及び定量限界

可食部 5 g にテトラミンを 5 mg 添加し、本法に従って添加回収実験を行った結果、回収率は $91.8 \pm 3.03\%$ ($n=5$) であった。

また、本法における定量限界は試料 1 g 当たり 10 μ g であった。

本法はクリーンアップ方法並びに IC 条件の改良により、従来の比色法⁵⁾ (定量限界 200 μ g/g) 及び HPLC¹⁰⁾ (定量限界 300 μ g/g) と比較して 20 倍以上の感度を得ることができた。

4. 中毒検体のテトラミン含有量

都内で平成 9 年に起きたテトラミン中毒事例における巻貝残品 (煮たもの) について部位別のテトラミン含有量を調査した。赤ツブと称して販売されていたこの巻貝はエゾバイ科のクリイロエゾボラ (*Neptunea lamellosa*) と同定された。本法に従って中毒事例の巻貝 (煮たもの) の唾液腺、可食部及び内臓を分析した結果、Fig. 5 に示したとおり、醤油などによる妨害の影響はみられず、いずれも良好なクロマトグラムを得ることができた。巻貝中のテトラミン含有量を各部位別に Table 2 に示した。テトラミンは唾液腺から 340 μ g/g (貝 1 個当たり 0.34 mg)、可食部から 300 μ g/g (貝 1 個当たり 3.1 mg) 及び内臓から 99 μ g/g (貝 1 個当たり 0.55 mg) 検出された。

2 名の患者がいずれも 3 個の貝を喫食していたことと、残品の唾液腺及び可食部中のテトラミン含有量を考え合わせると、今回の中毒事例ではそれぞれ約 10 mg のテトラミンを摂取したと考えられる。

テトラミンによるこれまでの食中毒ではその摂取量は 350~450 mg¹⁾、数 10 mg^{13), 16)}、50 mg 以上⁵⁾ 及び約 40 mg³⁾ とさまざまな報告があるが、今回の中毒事例からそれらよりも少ない約 10 mg でも発症することが推察された。

5. 煮た場合のテトラミンの挙動

巻貝は大型のものは刺身で喫食するが多いが、小ぶりのものは殻ごと煮て中身を喫食するが多いと考えられる。そこで、唾液腺に存在するテトラミンが煮ることに

Fig. 5. Ion chromatograms of sample solution (A) salivary gland, (B) meat and (C) internal organs of the remaining gastropods (boiled in soy sauce) in a food-poisoning case
a: tetramine

Table 2. Contents of Tetramine in the Remaining Gastropods (Boiled in Soy Sauce) in a Food-poisoning Case

Sample	Tetramine						
	Whole* (mg**)	Salivary gland		Meat		Internal organs	
		(mg**)	(μg/g)	(mg**)	(μg/g)	(mg**)	(μg/g)
<i>N. lamellosa</i> (Kuriroezobora)	4.0	0.34	340	3.1	300	0.55	99

*: Salivary gland, meat and internal organs
**: Total weight in the shell

より可食部などの他の部位に移行するか否かについて検討を行った。
あらかじめ可食部を一部切り取ってテトラミンを含まないことを確認したエゾボラ (*N. polycostata*) を 1 L の沸騰水 (97℃) 中で 10 分間加熱した後、巻貝の各部位及び煮汁中のテトラミン含有量を調べた。その結果、唾液腺から 3.5 mg、可食部から 2.3 mg、内臓から 0.092 mg 及び煮汁から 0.72 mg のテトラミンが検出された。テトラミンは加熱には安定であること及び唾液腺に局在していたと考えられることから、唾液腺に含まれていたテトラミンが加

熱により可食部に 35%、内臓に 1.4%、煮汁に 11% 移行したものと推定された (Table 3)。
この結果から、唾液腺のみにテトラミンを含有する巻貝でも、テトラミン含有量の多いものでは煮ることにより可食部に移行したテトラミンにより食中毒を起こす可能性もあると考えられた。また、食中毒発生時において巻貝の残品がない場合でも、煮汁などを分析することによりテトラミン中毒を推定することが可能であることが分かった。

Table 3. Diffusion Percentage of Tetramine from Salivary Gland of *N. polycostata* after Boiling (%)

	Diffusion percentage			
	Salivary gland	Meat	Internal organs	Broth
Before boiling	100	0	0	0
After boiling	53	35	1	11

Cooking method: boiling at 97°C for 10 min

ま と め

イオンクロマトグラフィー (IC) を用いた巻貝中テトラミンの高感度な分析法を開発し、食中毒事例の巻貝残品の分析により中毒量の推定を試みた。

1) 試料をメタノールで還流抽出し、*n*-ヘキサンによる脱脂及び固相抽出カラムを用いたクリーンアップを行った後、IC を用いてテトラミンを分析する方法を確立した。定量限界は試料 1 g 当たり 10 µg、回収率は 90% 以上と良好であった。

2) 今回の食中毒事例における巻貝残品はクリイロエゾボラ (*N. lamellosa*) であり、唾液腺から 0.34 mg、可食部から 3.1 mg のテトラミンが検出された。患者の喫食量から換算すると、約 10 mg のテトラミンを摂取した場合でも発症することが推察された。

3) 沸騰水 (97°C) 中における 10 分間加熱によりエゾボラ (*N. polycostata*) の唾液腺に存在していたテトラミンは可食部に 35%、内臓に 1%、煮汁に 11% 移行することが明らかとなった。

このことから、テトラミン中毒と思われる事例において、残品に唾液腺がない場合でも煮汁などを分析することにより中毒原因の推定が可能であることが示された。

本法は従来法に比べ高感度であり、中毒事例における巻貝残品の分析でも妨害の影響もなくテトラミンの定量が可能であった。

文 献

- 1) Hashimoto, Y. "Gyokairui No Doku (Marine toxins)", Tokyo, Gakkai Shuppan Senta, 1989, p. 24-26. (ISBN 4-7622-0114-6)
- 2) Sakazaki, T. "Syokucyudoku (Food-poisoning)", Tokyo, Chuohoki Shuppan, 1981, p. 472.
- 3) 東京都衛生局生活環境部 "魚介類のハンドブック" 1993, p. 24-25.
- 4) 日本中毒情報センター "改訂急性中毒処置の手引" 東京, 薬業時報社, 1994, p. 382-383.
- 5) Fujii, R., Moriwaki, N., Tanaka, Y., Ogawa, T., Mori, E., Saitou, M., Spectrophotometric determination of tetramine in carnivorous gastropods with tetrabromophenolphthalein ethyl ester. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **33**, 237-240 (1992).
- 6) 日本中毒情報センター "症例で学ぶ中毒事故とその対策" 東京, 薬業時報社, 1995, p. 214.
- 7) Narita, H., Makigai Ni Yoru Shokuchudoku (Food-poisoning by gastropods). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **26**, 549 (1985).
- 8) Ushiyama, H., Kan, K., Shindo, T., Yasuda, K., Tomomatsu, T., Outbreaks of food poisoning of chemical and naturally occurring toxicants in Tokyo (XIV). Tokyo Toritsu Eisei Kenkyujo Kenkyu Nenpou (Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.), **48**, 143-147 (1997).
- 9) Tamura, Y., Maki, T., Kan, K., Nagayama, T., Nishima, T., Outbreaks of food poisoning of chemical and naturally occurring toxicants in Tokyo (II). Tokyo Toritsu Eisei Kenkyujo Kenkyu Nenpou (Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.), **36**, 194-196 (1985).
- 10) Hashizume, K., Toda, C., Yasui, T., Nagano, H., Determination of tetramine in *Neptunea intersculpta* by high performance liquid chromatography. *Eisei Kagaku*, **33**, 179-184 (1987).
- 11) Saitoh, H., Oikawa, K., Determination of tetramethylammonium ion in shellfish by ion chromatography. *J. Chromatogr.*, **281**, 397-402 (1983).
- 12) Kungsuwan, A., Noguchi, T., Kuno, S., Hashimoto, K., Assay method for tetramine in carnivorous gastropods. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **52**, 881-884 (1986).
- 13) Eto, S., Isshiki, K., Momozono, Y., Yano, T., Sakuma, T., Miyazaki, A., Measurement of tetramine contents in shellfish, *Neptunea cumingii*. *Eisei Kagaku*, **35**, 476-478 (1989).
- 14) Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, P. H., Simultaneous identification and determination of tetramine in marine snails by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 705-707 (1989).
- 15) ジーエルサイエンス "最新固相抽出法ガイドブック" 東京, 1996, p. 148.
- 16) Noguchi, T., Asakawa, M., Hashimoto, K., Gyokairui Ni Yoru Chudoku (Poisoning by fish and shellfish). *Chudoku Kenkyu* (Jpn. J. Toxicol.), **2**, 145-152 (1989).