

BSPE 00110-131-3

홍합類의 有毒成分에 關한 研究

Studies on the Toxic Substance of
Mussel (*Mytilus* sp.)

1987. 2.

韓國科學技術院
海洋研究所

提 出 文

海洋研究所長 貴下

本 報告書를 “ 糞便類의 有毒成分에 關한 研究 ” 課題의 最終報告書로 提出합니다.

1987年 1月 31日

韓國科學技術院 海洋研究所

研究責任者：錢 重 均

要 約 文

I. 題 目

홍합類의 有毒成分에 關한 研究

II. 研究開發의 目的 및 重要性

계속되는 臨海工團의 增加 및 急激한 都市化에 따른 産業廢水나 生活廢水는 결국 바다의 環境을 變化시키고, 바다에 사는 生物의 生態에 影響을 미치게 된다. 각종 海洋生物은 重金屬과 같은 有害한 物質을 蓄積하여 間接적으로 人間의 健康을 위협하는 것은 물론이고, 海洋生態의 變化로 이제까지 安全하였던 種類가 有害·有毒한 種類로 變하기도 한다. 이 점에서 今年 4月 釜山에서 發生하였던 홍합류에 의한 廢船處理場 人夫들의 食中毒事故(15名이 中毒되어 그 중 2名은 死亡)는 公衆衛生上 重要한 點을 內包하고 있다.

本 研究는 이들 食中毒事故의 原因을 究明하므로써, 海洋資源의 食糧極大化 및 國民健康의 增進을 위한 基礎資料의 提供을 目的으로 한다.

III. 研究開發의 內容 및 範圍

痲痺性貝毒(Paralytic Shellfish Poison : PSP)은 單一成分이 아니라 十數種이 現在 確認되고 있다. 이 中에서 問題의 홍합은 어느 種類의 毒成分을 含有하고 있는가를 確認하는데 注力하였다. 즉, 홍합이 갖고있는 有毒成分을 이온크로마토그라피 等으로 精製를 하고, 얻어진 部分精製毒을 電氣泳動, 薄層크로마토그라피 및

高性能液體크로마토그래피法으로 同定하였다.

IV. 研究開發結果 및 活用に 對한 建議

國內에서는 아직껏 PSP가 確認되지는 않았으나 本 研究에 의하여 처음으로 國內産貝類에 PSP가 含有되어 있는 것이 밝혀지게 되었다. 그러나 이 結果만으로 國內産 모든 貝類가 有毒하다고는 말할 수 없으므로 貝類 全般에 걸쳐 스크리닝이 수행되어야 할 것이다.

Summary

Studies on the Toxic Substance of Mussel. (*Mytilus* sp.)

Joong-Kyun JEON

Korea Ocean Research and Development Institute
385 block, Sadong, Ansan, Kyonggi-do 171-14, Korea

Attempts were made to search the cause of food poisoning in which 15 persons were intoxicated and two died by ingesting the mussel *Mytilus* sp. from Pusan, Korea.

The mid-gut glands of the mussel collected, soon after the poisoning (early in April, 1986) were extracted with acidified 80% ethanol. The extract was defatted three times with dichloromethane, filtered through a Diaflo ultrafiltration membrane YM-2 (cut-off limit; < 1,000 daltons), and then purified by chromatography on Bio-Gel P-2. The toxic fractions obtained were analysed by cellulose acetate strip electrophoresis, thin-layer chromatography on Whatman LHP-K plate, and ion-pairing HPLC analyses.

The results showed that the fractions contained GTX₁₋₄ as the major component, together perhaps PX₁₋₂. It was concluded from these results that the poisoning was caused by the PSP which had accumulated in the mussel.

目 次

第1章 緒 論	1
第2章 材料 및 實驗方法	2
第1節 材 料	2
第2節 實驗方法	2
第3章 結 果	7
第1節 毒性과 毒의 消長	7
第2節 毒의 諸性狀과 同定	8
第4章 考 察	12
第5章 結 論	14
參考文獻	15

Contents

CHAPTER 1. INTRODUCTION	1
CHAPTER 2. MATERIALS and METHODS	2
Section 1. Materials	2
Section 2. Methods	2
CHAPTER 3. RESULTS	7
Section 1. Toxicity of mussel	7
Section 2. Identification of mussel toxin	8
CHAPTER 4. DISCUSSION	12
CHAPTER 5. CONCLUSION	14
REFERENCES	15

List of Table

Table 1. Toxicity of mussel collected at Pusan	7
--	---

List of Figures

Fig. 1. Procedures for purification of mussel toxin	3
Fig. 2. Schematic diagram of HPLC system	5
Fig. 3. Electrophoresis of mussel toxin, along with authentic toxins	8
Fig. 4. Thin-layer chromatography of mussel toxin, along with authentic toxins	9
Fig. 5. High performance liquid chromatography of some fractions of mussel toxin, along with authentic toxins...	11

第 1 章 緒 論

홍합, 큰가리비 및 굴 등의 二枚貝는 때때로 毒化하여 中毒을 일으킨다. 이러한 PSP 中毒은 美國과 캐나다를 비롯하여 유럽, 東南아시아, 日本 等地에서 問題를 일으키고 있으며, 特히 美國과 캐나다에서 이를 重視하여 일찍부터 이에 關한 研究를 遂行하였다. (Halstead 1978, Hashimoto 1979)

PSP 中毒은 홍합에 의한 것이 많아, 처음에는 mytilotoxin 혹은 mussel poison 등으로 부르기도 하였으나 Schuett and Rapoport (1962)가 개조개屬의 *Saxidomus giganteus*에서 毒을 分離·精製하여 saxitoxin (以下 STX로 略함)으로 命名한 뒤, 이 用語가 널리 사용하게끔 되었다. 그러나 最近의 많은 研究에 의하여 PSP에는 STX의 單一成分뿐 아니라 十數種類의 유도체가 관여하고 있음을 알게 되었다. (Shimizu *et al.* 1975 a, 1975 b, 1976, 1978 b, Oshima *et al.* 1976, 1978, Hall *et al.* 1980, 清水 1980, Kobayashi and Shimizu 1981, Noguchi *et al.* 1981, 1983, Onoue *et al.* 1981, 1983, Wichmann *et al.* 1981a, 1981b, Harada *et al.* 1982, 1983, 野口 1983).

PSP는 死亡率이 매우 높고, 低分子物質로서 毒性이 대단히 강하여 成人의 致死量이 1 mg 정도이며, 또한 藥理學的 性質 등이 복어毒(Tetrodotoxin: 以下 TTX로 略함)과 매우 흡사하다(Hashimoto 1979).

最近 國內에서는 PSP에 의한 것으로 의심되어지는 中毒이 몇 차례 發生하기는 하였으나 그 原因에 대해서는 자세히 알 수 없었다. 그러나 지난 4月初에 釜山近郊의 廢船處理場에서 廢船에 붙어있는 홍합類를 먹고 作業人夫 15名이 食中毒을 일으켜 그 중 2名이 死亡하는 事故가 發生하여 社會의 注目을 끌게 되었다.

本 研究는 이 事故의 原因을 究明하고, 有毒成分의 有無 및 組成을 밝히기 위하여 遂行하였다.

第 2 章 材料 및 實驗方法

第 1 節 材 料

試料인 흥합類는 中毒事故가 發生한 直後와 約 1 個月後에 事故地域에서 採集되어 研究所內에 凍結貯藏(-20°C)된 것을 使用하였다. 毒性試驗에 使用하고 남은 試料는 毒의 分離 및 精製에 使用하였다.

第 2 節 實驗方法

毒性檢査

上記 試料들을 半解凍한 後, 中腸腺 만을 摘出하여 「日本食品衛生指針Ⅱ」의 PSP 定量法에 따라 測定하였다. (Kawabata 1978). 즉, 中腸腺을 막자사발에 넣어 0.1 N 鹽酸으로 加熱抽出한 뒤, 遠心分離하여 얻어진 上登液中 1 ml를 마우스 (ddY 系統, 體重 18 ~ 20 g, ♂)의 腹腔內에 注射하고 死亡하기까지의 生存時間을 測定하여 毒力으로 換算하였다. 1 MU(mouse unit)는 抽出液 1 ml를 注射하여 마우스가 15 分에 死亡하는 毒力を 나타낸다.

毒의 部分精製

흥합類의 中腸腺에서 有毒成分을 抽出하여 精製하는 過程을 그림 1 에 나타내었다. 豫備實驗 結果, 毒은 PSP 일 가능성이 컸기 때문에 毒性檢査에 쓰고 남은 試料를 使用하여 Noguchi *et al.*(1986)의 方法을 약간 變形한 方法으로 精製하였다. 各 精製過程中에 있어서 毒成分의 確認은 마우스를 利用한 bioassay 法, 薄層

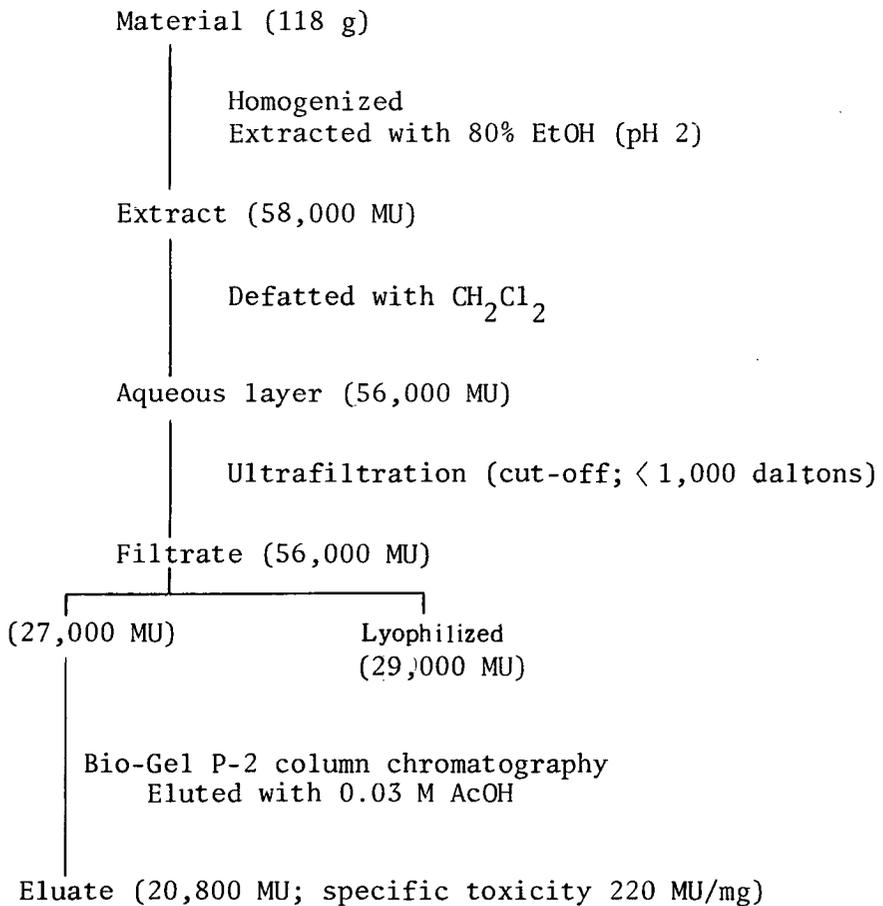


Fig. 1. Procedures for purification of mussel toxins.

크로마토그래피 (Thin-Layer Chromatography : 以下 TLC로 略함), 電氣泳動分析 및 高性能液體크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography : 以下 HPLC로 略함) 에 의하였다.

試料인 中腸腺 (약 118 g) 에 鹽酸으로 pH 2 로 調節한 80 % 에탄올을 3 倍量 加하여 5 分間 均質化하였다. 이를 6,000 × g 로 10 分間 遠心分離하여 上澄液

을 얻었다. 殘液을 같은 方法으로 2回 더 抽出하고 遠心分離한다. 얻어진 上澄液을 모두 합하여 40 °C에서 減壓濃縮하였다. (總毒量 58,000 MU). 이 濃縮液을 dichloromethane 으로 脫脂한 다음 앞서와 같이 減壓濃縮하였다. (總毒量 56,000 MU). 이 濃縮液을 다시 Amicon의 Diaflo ultrafiltration membrane YM-2(cut-off limit : <1,000 daltons)를 사용한 限外濾過를 行하였다. 毒性은 濾液에서만 確認되었다. (總毒量 56,000 MU). 얻어진 濾液中 一部는 凍結乾燥하여 保管하고, 나머지 (約 27,000 MU에 상당)를 Bio-Gel P-2 (minus 400 mesh) 칼럼 (ϕ 2.6 × 90 cm)에 吸着시켜 0.03 N 酢酸을 使用하여 겔여과크로마토그래피를 行하였다. 溶出된 有毒畫分을 모아 凍結乾燥하고, 이 部分精製된 毒 (總毒量 20,800 MU, 比毒性 220 MU/mg)을 使用하여 以下の 電氣泳動, TLC 및 HPLC로 毒成分의 同定을 行하였다.

電氣泳動 (Electrophoresis)

電氣泳動은 5 × 18 cm의 셀룰로스 아세테이트膜 (Chemetron, Italy)를 支持體로 하고, 緩衝液에 0.08 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.7)을 使用하여 0.8 mA/cm width의 電流로 30分間 泳動하였다. 泳動을 마친 膜은 冷風乾燥하고, 1% 過酸化水素를 噴霧하여 110 °C에서 加熱한 뒤 365 nm의 UV lamp下에서 螢光을 觀察하였다.

TLC

TLC에는 LHP-K plates (Whatman, 美國)를 使用하였으며, pyridine-ethyl acetate-acetic acid-water (15:5:3:4)의 溶媒系에서 展開하여 冷風乾燥後 電氣泳動과 같은 方法으로 發色하고 螢光을 觀察하였다.

HPLC

毒成分의 HPLC에 의한 同定은 東京大學의 橋本周久教授에게 依賴하였으며, 分析시스템의 概要는 그림 2와 같다. (Nagashima *et al.* 1986).

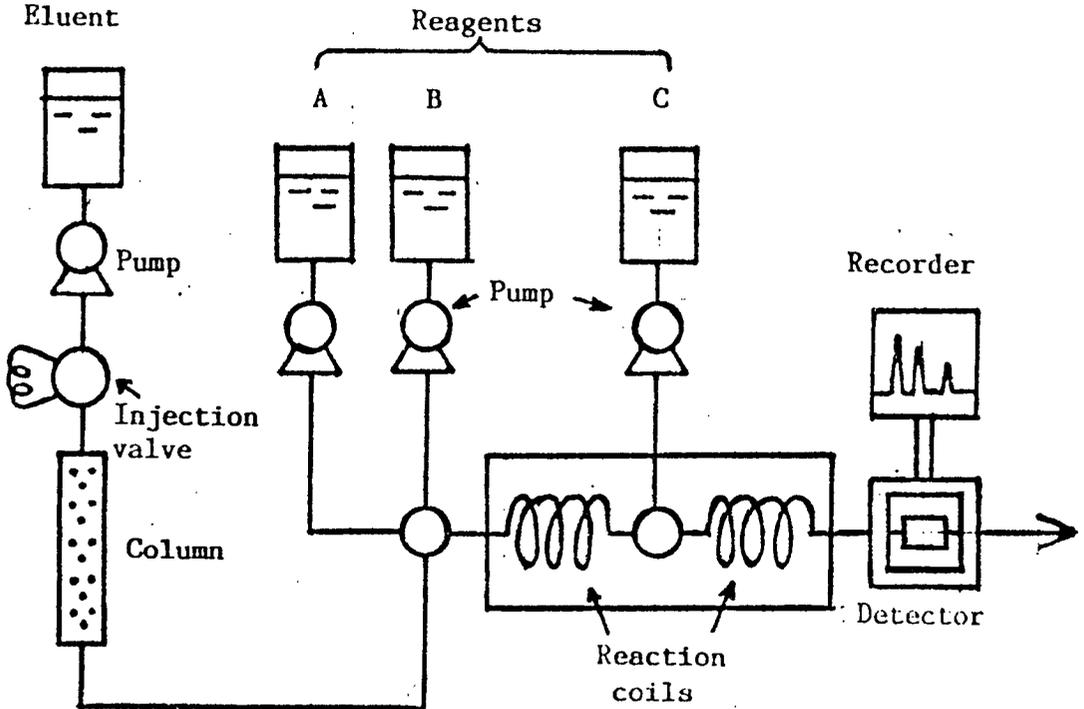


Fig 2. Schematic diagram of HPLC system

分析에는 silica ODS 칼럼 (AM-314, 山村化學, 日本)을 使用하며, ion-pairing 試藥으로는 heptanesulfonic acid (HSA)를 使用한다. 移動相에는 2 mM HSA를 포함한 0.05 M 磷酸鹽緩衝液 (pH 7.0)과 메탄올의 混液 (99:1)을 使用하며, 分離된 各 成分은 3 種類의 反應液 (A: 0.05 M periodic acid, B: 0.2 N KOH plus 1M ammonium formate in 50% formamide, C: 1% chloroaceta-

aldehyde in 1M citrate buffer (pH 4.0) 과 차례로 65°C의水槽內에서反應시켜 螢光化하여 檢出한다. 螢光檢出의 波長은 Ex.336nm, Em.390nm에서 行한다.

標品 毒

比較를 위해 使用된 PSP의 標品 및 TTX標品은 東京大學農學部水產化學研究室의 橋本周久 教授로 부터 提供받았다.

第 3 章 結 果

第 1 節 毒性和 毒의 消長

採集한 홍합類의 毒性檢査의 結果를 表 1 에 나타내었다.

Table 1. Toxicity of mussel collected at Pusan

Date of collection	Toxicity* (MU/g)
3 April, 1986	490
30 April, 1986	19

* Toxicity of the mid-gut glands.

中毒發生 直後의 試料의 毒性은 490 MU/g 中腸腺으로 높았으며, 이는 成人의 致死量을 3,000 MU (Hashimoto 1979)라 할 때 中腸腺을 약 7 g, 즉 5~6個의 試料만 攝取하여도 致死할 수 있는 양에 해당한다. 이 毒性値는 外國의 *Mytilus* sp. 에 비해 다소 높은 편에 속한다 (Hashimoto *et al.* 1976, Okaichi *et al.* 1977, Mebs *et al.* 1978, Noguchi *et al.* 1978, Shimizu *et al.* 1978, White and Maranda 1978, Oshima *et al.* 1982).

毒性은 그 後에도 완전히 消失되지 않고 남아 4月 30日의 試料에서도 19 MU/g 中腸腺이나 檢出되어, 이를 可食部의 毒性으로 換算해도 美國, 캐나다, 日本 等地에서 定한 規制值인 4 MU/g 可食部 (또는 80 μ g/100 g 可食部) (Hashimoto 1979)보다 여전히 높은 값이었다.

第 2 節 毒의 諸性狀과 同定

試料의 中腸腺으로 부터 有毒成分을 抽出하여 各種 分離操作과 精製를 거쳐 最終的으로 比毒性이 220 MU/mg인 白色粉末 약 90 mg을 얻었다. 이것은 原料로부터 약 180 倍나 精製한 것이다. 이를 使用하여 毒의 組成 및 同定을 調査하였는데, 우선 電氣泳動의 結果를 그림 3에 나타내었다.

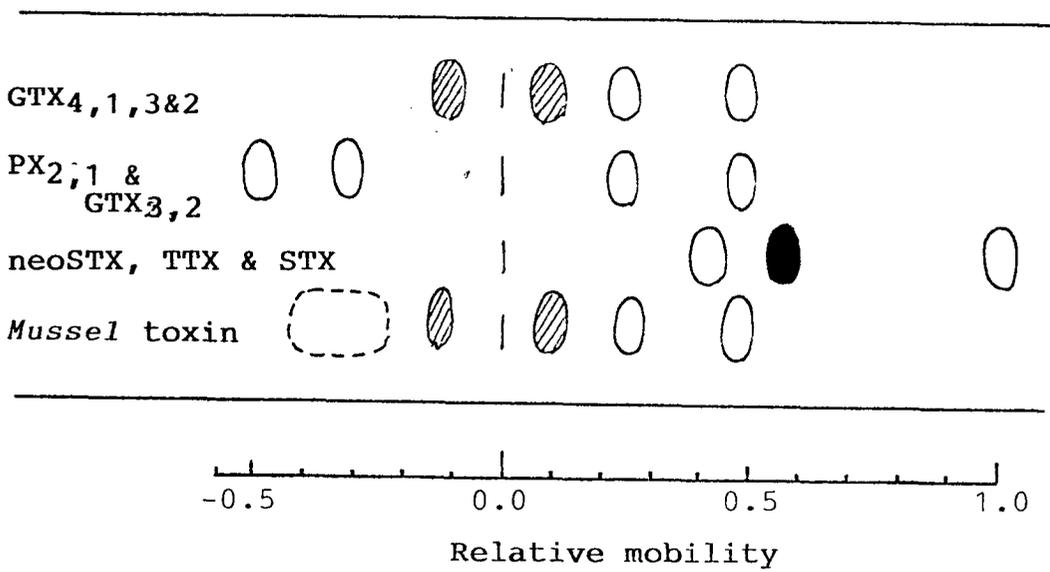


Fig. 3. Electrophoresis of mussel toxin, along with authentic toxins.

Electrophoresis was performed on 5 x 18 cm cellulose acetate strips (Chemetron) in 0.08 M Tris-HCl buffer (pH 8.7) at 0.8 mA/cm width for 30 min. After the run, the strips were sprayed with 1% H₂O₂, followed by heating at 110°C for 5 min. The toxins were visualized under UV lamps (365 nm).

- Blue fluorescence; ⊗ greenish yellow fluorescence
- Yellow fluorescence.

電氣泳動에 있어서 試料의 毒은 4個의 명확한 spot 와 1個의 broad 한 band 로 檢出되었다. STX의 相對移動度(Relative mobility : 以下 Rm이라 略함)를 1.00 으로 하였을 때, 이들 4成分의 Rm와 螢光色은 各各 - 0.07 과 갈황색, 0.07 과 갈황색, 0.25 와 청색, 0.48 과 청색으로, 이들은 각기 gonyautoxin (以下 GTX라 略함) 4, 1, 3 및 2와 Rm와 螢光色이 아주 잘 一致하였다. 한편, band 成分은 Rm가 - 0.20 ~ - 0.45 인데 이 위치는 protogonyautoxin(以下 PX라 略함) 1과 2가 檢出되는 곳으로 PX成分이 試料에 함유되어 있음을 나타내고 있다. Band 로 나타난 것은 精製가 充分치 못하여 不純物이 混在하고 있기 때문일 것으로 생각된다. 한편, 試料에서는 STX이나 neosaxitoxin (以下 neo STX로 略함)에 對應하는 spot 는 檢出되지 않았다.

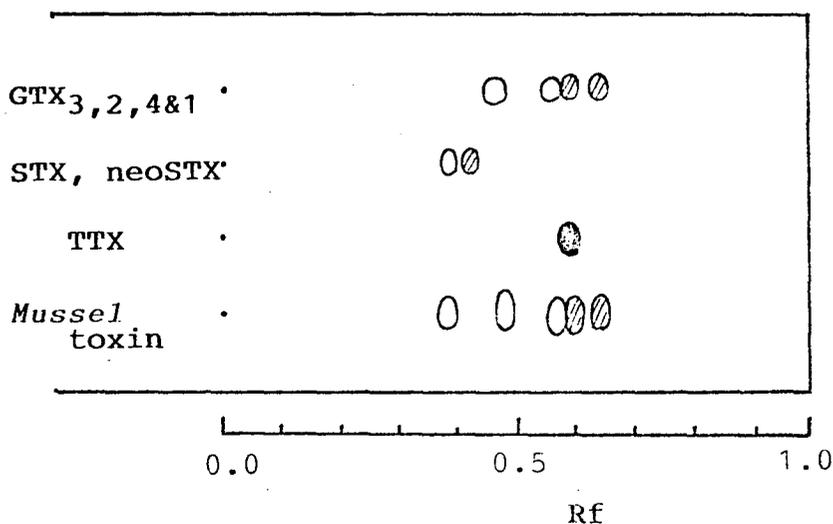


Fig. 4. Thin-layer chromatography of mussel toxin, along with authentic toxins.

Thin-layer chromatography was performed on silica gel LHP-K plates (Whatman) using a solvent system of pyridine-ethyl acetate-acetic acid-water (15:5:3:4). After development toxins were detected as in electrophoresis (see legend in Fig. 3)

TLC의 결과를 그림 4에 나타내었다. 檢出된 5成分中 Rf가 0.46, 0.56, 0.59 및 0.65의 成分은 各各 GTX3, 2, 4 및 1과 Rf와 螢光色이 잘 一致하였다. 한편 Rf 0.38의 成分은 STX와 Rf는 근사하지만 螢光色이 달랐다.

Ion-pairing HPLC에 의한 分析結果를 그림 5에 나타내었다. 홍합毒에서는 5個의 peak가 檢出되었는데, 그 중 保持時間(Retention time)이 11.3分, 13.3分, 16.1分 및 18.7分の 4成分은 GTX4, 1, 3 및 2와 保持時間이 잘 一致하였다. 한편, 保持時間 7.0分の 成分은 PX成分으로 여겨지며, 이는 電氣泳動의 結果를 뒷받침하고 있다.

電氣泳動, TLC 및 HPLC에 의한 分析結果를 綜合해 볼 때, 釜山의 홍합類에서 檢出된 毒成分은 PSP이며, GTX 1~4를 主成分으로 하며 PX 1~2를 副成分으로 하는 것이 確認되었다.

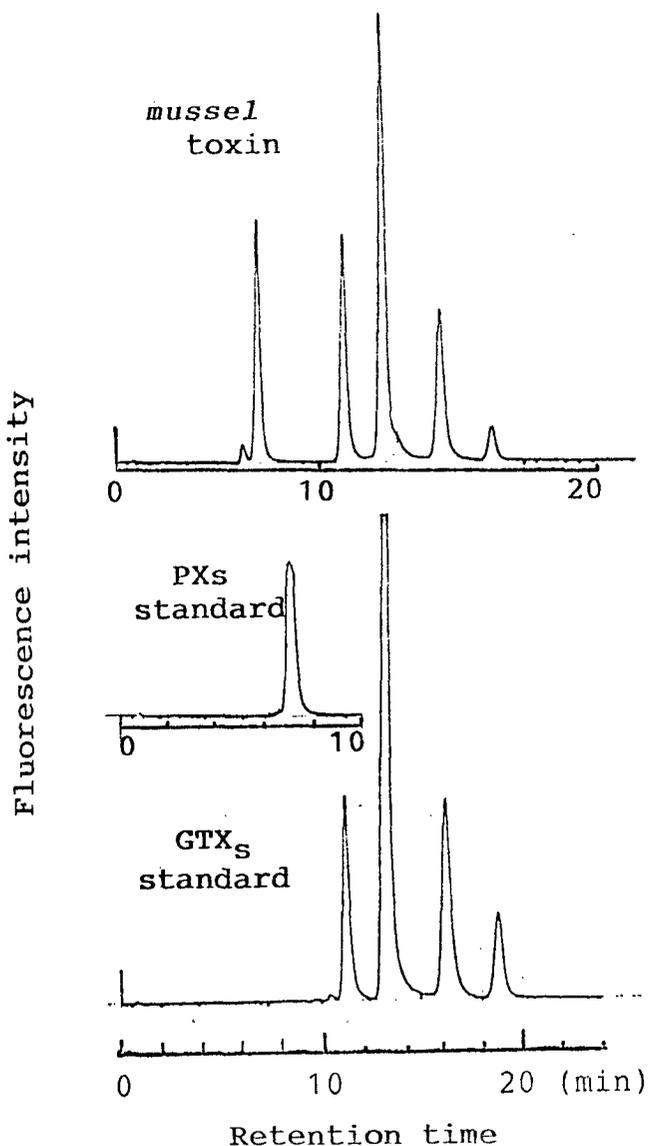


Fig. 5. High performance liquid chromatography of some fractions of mussel toxin, along with authentic toxins.

Reverse-phase HPLC was carried out on an AM-314 (YMC) column (0.6x30cm), using heptanesulfonic acid as an ion-pairing reagent, with 1% MeOH-0.05M potassium phosphate (pH 7.0). The periodate reagent (Sullivan *et al.* 1983) was used to detect PSP. The fluorogenic reaction was performed at 65°C for 0.7 min. The fluorophors formed were monitored at 390 nm with 336 nm excitation.

第 4 章 考 察

앞서 밝힌대로 홍합類의 毒成分은 PSP였으며, GTX1-4가 主成分이었고 PX1-2가 副成分이었다. 이들 PX成分은 GTXs에 비해 毒性이 한자리 정도 낮는데, 酸加水分解 등으로 쉽게 GTX成分으로 변하게 되므로 毒性도 따라서 增加하게 된다. 금번 홍합類에서 이 PX成分이 檢出되었기 때문에今後 各種 貝類의 毒性스크리닝을 수행하는데 있어 留意해야 할 것으로 생각된다. 關係해서 美國알래스카產 진주담치도 同一地域의 개조개屬의 *Saxidomus giganteus*와 달리 GTX 1-5를 主成分으로 하고 있으며(Shimizu *et al.* 1978), 低毒性의 PX成分은 주로 먹이生物인 *protogonyaulax* spp.의 플랑크톤(Hall *et al.* 1980, Kobayashi and Shimizu 1981)이나 굴(Onoue *et al.* 1983)에서 檢出되고 있다.

PSP의 起源에 대해서는 有毒渦鞭毛源인 *protogonyaulax* spp.가 주로 관여하는 것으로 알려져 있으나, 금번의 PSP中毒 發生海域에서도 上記의 플랑크톤이 檢出되었는지는 確認할 수 없었다. 다만 과거에 이 地域付近에서 有毒플랑크톤이 確認되지 않았기 때문에(Lee and Cho, 1985),今後 이에 關係해서도 檢討되어야 할 것으로 생각된다.

毒化時期는, 문제의 船舶이 慶南 忠武 앞 玉浦海上에서 3年間 放置되어 있다가 1986年 2月末에 釜山の 處理場으로 옮겨졌기 때문에, 옮겨진 以後에 船舶에 붙어 있던 貝類가 毒化하였을 可能性이 크다. 그러나 釜山으로 옮겨지기 直前に 毒化하였을 可能性도 전혀 排除할 수는 없을 것이다. 한편, 홍합類는 다른 貝類에 비하여 毒의 體內蓄積과 消失이 빠르며(Hashimoto 1979), 事故發生 1個月後에도 試料에서 規制値以上の 毒性이 檢出되었기 때문에 3月中에 毒化하였을 可能性이 높다고 생각되어진다. 事故가 發生한 海域에서는 과거에 금번과 유사한 中毒이 전혀

發生하지 않았는데, 이처럼 갑자기 PSP中毒이 發生하게 된 理由로서는 生態系의 變化를 생각할 수 있다. 즉, 事故海域은 작은 灣으로, 最近 灣入口에 防波堤를 築造하였기 때문에, 이로 인하여 이제껏 원활하였던 灣內의 海水交換이 不良해져 前에는 없었거나 낮은 濃度로만 存在하였던 有毒플랑크톤이 새롭게 또는 짧은기간내에 濃縮되어 貝類를 毒化시켰을 수도 있다. 關係해서 시가테라(ciguatera)의 發生에는 교량설치나 준설 등에 의한 生態系變化가 關係한다고 한다(Hashimoto 1979).

홍합類는 맛이 담백하고 값이 저렴하여 널리 食用되고 있는데, 慶南一帶에서는 垂下養殖에 의해서나 굴養殖場의 副産物로서 많이 얻어지고 있다. 이처럼 값싸게 얻어지는 貝類의 食品安全性 및 食品資源化를 確保하기 위해서는 國內産 各種貝類의 毒化狀況 등을 보다 廣範圍하게 調査해 나가야 할 것이며, 아울러 이들 貝類의 毒化原因의 究明과 함께 毒成分의 生化學的 特性 등에 關係해서도 檢討되어야 할 것이다.

第 5 章 結 論

지난 4月初釜山에서 있었던 홍합類에 의한 中毒事故의 原因은 PSP이었다. 主成分은 GTX1-4 이었고, 副成分으로는 低毒性成分인 PX1-2가 檢出되었다.

國內에서도 PSP가 確認되었기 때문에, 이들의 毒化原因의 究明 및 各種貝類의 毒化狀況 등에 관하여 檢討되어야 할 것이다.

References

- 野口玉雄, 1983. 麻痺性貝毒, 衛生化學 29, 10-15.
- 清水讓. 1980. 赤潮毒 - *Gonyaulax* の生産する麻痺性貝毒を中心に. 化學と生物18, 792-799.
- Hall, S., P. B. Reichardt and R.A. Neve. 1980. Toxins extracted from an Alaskan isolate of *Protogonyaulax* sp. Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 649-653.
- Halstead, B. W. 1978. Invertebrates. p. 41-261. In Poisonous and Venomous Marine Animals of the World, revised ed. The Darwin Press Inc., New Jergey, U.S.A.
- Harada, T., Y. Oshima and T. Yasumoto. 1982. Structure of two paralytic shellfish toxins, gonyautoxin V and VI, isolated from a tropical dinoflagellate, *Pyrodinium bahamense* var. *compressa*. Biol. Chem. 46, 1961-1964.
- Harada, T., Y. Oshima and T. Yasumoto. 1983. Natural occurrence of decarbamoyl saxitoxin in tropical dinoflagellate and bivalves. Agric. Biol. Chem. 47, 191-193.
- Hashimoto, Y. 1979. Marine Toxins and Other Bioactive Marine Metabolites, Japan Scient. Soc. Press, Tokyo, Japan.
- Hashimoto, Y., T. Noguchi and R. Adachi. 1976. Occurrence of toxic bivalves in association with the bloom of *Gonyaulax* sp. in the Owase Bay. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 42, 671-676.

- Kawabata, T. 1978. Assay method for paralytic shellfish poison. p. 240. *In* Food Hygiene Examination Manual Vol. 2. Japan Food Hygiene Association, Tokyo, Japan.
- Kobayashi, M. and Y. Shimizu. 1981. Gonyautoxin VIII, a cryptic precursor of paralytic shellfish poisons. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 827-828.
- Lee, J.H. and C.H. Cho. 1985. Check-list of marine planktonic algae in the Korean coastal waters. II. Dinophyceae. *Ocean Research* 7, 59-68.
- Mebis, D., B. Simon, H. Gemmer and W. Stille. 1978. Occurrence of shellfish poisoning in the Frankfurt area (West Germany). *Toxicon* 16, 98-99.
- Nagashima, Y., J. Maruyama, T. Noguchi and K. Hashimoto. 1987. Analysis of paralytic shellfish poison and tetrodotoxin by ion-pairing high performance liquid chromatography. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 53, in press.
- Noguchi, T., R. Adachi, M. Iguchi, H. Kamiya and K. Hashimoto. 1978. Occurrence of toxic bivalves in association with *Gonyaulax* planktons in Ise, Owase and Ofunato Bays. *ibid.* 44, 1245-1248
- Noguchi, T., O. Arakawa, K. Daigo and K. Hashimoto. 1986. Local differences in toxin composition of a xanthid crab *Atergatis floridus* inhabiting Ishigaki Island, Okinawa. *Toxicon* 24, 705-711.

- Noguchi, T., Y. Onoue, J. Maruyama, K. Hashimoto, S. Nishio and K. Ikeda. 1983. The new paralytic shellfish poisons from *Protogonyaulax catenella*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 49, 1931.
- Noguchi, T., Y. Ueda, K. Hashimoto and H. Seto. 1981. Isolation and characterization of gonyautoxin-1 from the toxic digestive gland of scallop *Patinopecten yessoensis*. *ibid.* 47, 1227-1231.
- Okaichi, T. and S. Nishio. 1977. Paralytic shellfish poisoning in eastern Seto Inland Sea. *ibid.* 43, 1251.
- Onoue, Y., T. Noguchi, J. Maruyama, K. Hashimoto and T. Ikeda. 1981. New toxins separated from oysters and *Protogonyaulax catenella* from Senzaki Bay, Yamaguchi Prefecture. *ibid.* 47, 1643.
- Onoue, Y., T. Noguchi, J. Maruyama, K. Hashimoto 1983. Two new toxins from oysters. J. Agric. Food Chem. 31, 420-423.
- Oshima, Y., W.E. Fallon, Y. Shimizu, T. Noguchi and Y. Hashimoto. 1976. Toxins of the *Gonyaulax* sp. and infested bivalves in Owase Bay. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 42, 851-856.
- Oshima, Y., Y. Shimizu, S. Nishio and T. Okaichi. 1978. Identification of paralytic shellfish toxins in shellfish

- from Inland Sea. *ibid.* 44, 395.
- Oshima, Y., T. Yasumoto, M. Kodama, T. Ogata, Y. Fukuyo and F. Matsuura. 1982. Features of paralytic shellfish poison occurring in Tohoku district. *ibid.* 48, 525-530.
- Schuett, W. and H. Rapoport. 1962. STX, the paralytic shellfish toxin degradation to a pyrrolopyrimidine. J. Am. Chem. Soc. 84, 2266.
- Shimizu, Y., M. Alam and W.E. Fallon. 1975 a. Purification and partial characterization of toxins from poisonous clams. p. 275-285. *In* V.R. LoCicero ed., Proceedings of the First International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms. The Massachusetts Sci. and Tech. Foundation, Wakefield, U.S.A.
- Shimizu, Y., M. Alam, Y. Oshima and W.E. Fallon. 1975 b. Presence of four toxins in red tide infested clams and cultured *Gonyaulax tamarensis* cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 731-737.
- Shimizu, Y., J. Buckeley, M. Alam, Y. Oshima, W. E. Fallon, H. Sakai, J. Miura, V.P. Gullo and K. Nakanishi. 1976. Structures of gonyautoxin-II and III from the east coast toxic dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. J. Am. Chem. Soc. 98, 5414-5416.

- Shimizu, Y., W.E. Fallon, J.C. Wekell, D. Gerber, Jr., and E.J. Schantz, Jr. 1978 a. Analysis of toxic mussels (*Mytilus* sp.) from the Alaskan Inside Passage. J. Agric. Food. Chem. 26, 878-881.
- Shimizu, Y., C.P. Hsu, W.E. Fallon, Y. Oshima, H. Sakai, I. Miura, V.P. Gullo and K. Nakanishi. 1978 b. Structure of neosaxitoxin. J. Am. Chem. Soc. 100, 6791-6793.
- Sullivan, J.J. and W.T. Iwaoka. 1983. High pressure liquid chromatographic determination of toxins associated with paralytic shellfish poisoning. J. Ass. Off. Analyt. Chem. 66, 297-303.
- White, A.W. and L. Maranda. 1978. Paralytic toxins in the dinoflagellate *Gonyaulax excavata* and in shellfish. J. Fish. Res. Board Can. 35, 397-402.
- Wichmann, C.F., G.L. Boyer, C.L. Divan, E.J. Schantz and H.K. Schnoes. 1981 a. Neurotoxins of *Gonyaulax excavata* and Bay of Fundy scallops. Tetrahedron Lett. 22, 1941-1944.
- Wichmann, C.F., W.P. Niemczura, H.K. Schnoes, S. Hall, P.B. Reichardt and S.D. Darling. 1981 b. Structures of two novel toxins from *Protogonyalax*. J. Am. Chem. Soc. 103, 6977-6978.