

2.2. ELISA を用いた麻痺性貝毒の 初期毒化モニタリングシステムの構築とその応用

- 川邊 揚一郎（三重県保健環境研究所 衛生研究課 主任研究員）
大市 真梨乃（旧所属 三重県保健環境研究所 衛生研究課 主任研究員
現所属 三重県津保健所 微生物検査課 主任）
森 康則（三重県保健環境研究所 衛生研究課 主査研究員）
吉村 英基（三重県保健環境研究所 衛生研究課 主幹研究員兼課長）

【研究目的】

海洋中の渦鞭毛藻により産生され貝に蓄積する麻痺性貝毒は、蓄積段階で変化を受けることが多く多成分かつ複雑な組成を示すことが知られている¹⁾。このように毒化した貝を摂食すると神経系食中毒が起こり得る。現在、我が国で実施されている麻痺性貝毒のモニタリングは公定法であるマウス試験法が使用されているが、動物愛護の倫理的観点からはマウス使用を最小限とする試験方法への転換が望まれている。本研究では、迅速性、費用、精度に優れる ELISA 法等を用い、麻痺性貝毒による食中毒防止のために毒化の初期をモニタリングできるシステムの構築と有用性について検証することを目的とする。

【研究の必要性】

我が国における、動物実験等に係る規制は昭和 48 年の議員立法による「動物の保護及び管理に関する法律」の制定に始まる。その後、「動物の愛護及び管理に関する法律」への名称変更を経て、平成 17 年 6 月の改正²⁾により、これまで規定されていた Refinement（苦痛の軽減）に関する規定に加え、Replacement（代替法の利用）及び Reduction（動物使用数の削減）に関する規定、所謂 3R の原則が盛り込まれた。さらに、この改正を受け文部科学省からもこの 3R の原則に則った「基本指針」³⁾が定められ大学を含む研究機関等に対し適用されることとなった。

また、三重県は伊勢湾と太平洋に面し、カキやヒオウギガイなどの二枚貝養殖が盛んであるが、これらの海域では春先から夏にかけて、プランクトン（海産渦鞭毛藻）によってつくられるサキシトキシン（Saxitoxin, STX）とその同属体群による麻痺性貝毒（Paralytic Shellfish Poison, 以下 PSP）が、その捕食者である貝に移行し蓄積する場合がある。高濃度の PSP を含む二枚貝をヒトが摂食した場合、口唇、四肢の麻痺はもとより、劇症の場合は呼吸麻痺によって死に至ることもある。

現在、一般に毒化した二枚貝による健康被害の防止のため、貝毒発生時期にマウスを用いる貝毒検査（公定法のマウス試験法（Mouse Bioassay 法、以下 MBA 法）⁴⁾とプランクトン検鏡が実施されている。規制値（4MU/g）を超えた毒力が検出された場合は、漁獲した二枚貝の出荷規制措置がとられている。その場合、続く毎週の MBA 法により毒力が 3 回連続して規制値以下と確認された場合に出荷規制措置が解除される。しかし、動物実験

は動物愛護の倫理的観点から、国内外で抑制潮流にあり、貝毒検査の方法も先に示した 3R の原則に配慮した改善の必要があると考える。

これまで、プランクトン検鏡の結果から毒化を予想して MBA 法に要するマウスを準備する必要があったが、プランクトン検鏡結果と MBA 法による毒力には相関性はあるものの、必ずしも結果が一致しないことがあり、マウスの事前準備数の削減が困難な状況にあった。

本研究において有効性検証の対象とする ELISA 法は、プランクトン検鏡より高精度に毒化の予兆を捉えることができるため、ポストカラム蛍光 HPLC 法⁵⁾よりも迅速に分析結果を得ることができる。また、この ELISA 法に併せてイムノクロマト法を原理とした麻痺性貝毒検出用の簡易キットによる分析法も併用することでより精度の高い低濃度の毒化初期モニタリングシステムを構築できる可能性がある。これらにより、MBA 法によるマウス使用数の適正化と削減を図るとともに、より効果的な食中毒未然防止に貢献する。

【研究計画】

MBA 法で規制値以上の PSP が検出されたことにより出荷規制を経験したマガキ (*Crassostrea gigas*) 試料を、毒が含まれていないブランク試料で段階的に希釈し、実験用の毒化試料を調製する。これらの実験用の毒化試料を、ELISA 分析及びイムノクロマト法を原理とした PSP 検出用の簡易キットによる分析を行い、ELISA 分析及び簡易キットによる分析が、麻痺性貝毒のスクリーニング法として適切に機能するかどうかを検証する。

【実施内容・結果】

本研究では、2021 年冬期に尾鷲海域の白石湖で採取され、MBA 法で規制値超過 (31MU/g) を示したため、出荷規制が行われた時のマガキに着目した。この採取点のマガキについて 2021 年 2~3 月の約 1 か月の間に毎週採取され、MBA 法で毒化から検出限界値未満 (not detected, 以下 ND) へと継時変遷したマガキ試料 5 検体 (マガキ 1~5) と、その約 1 年後に MBA 法で ND であった同一海域のマガキ試料 1 検体 (マガキ 6) を検討の対象とした。採取点である白石湖の位置を図 1 に示す。

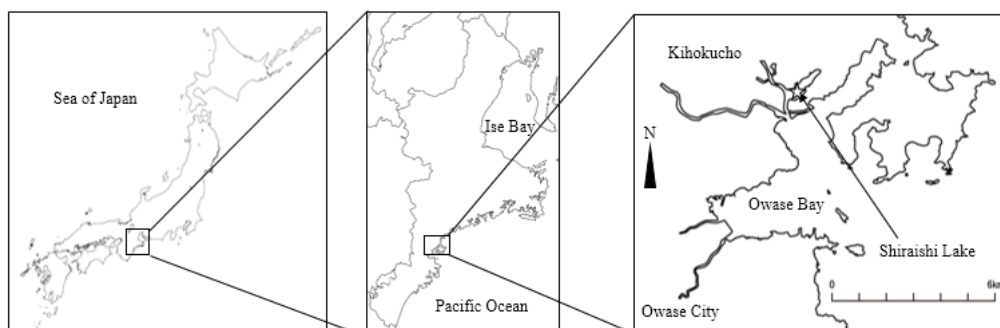


図 1. 採取点となった尾鷲海域の白石湖
採取点である白石湖は尾鷲湾の北部に位置する湖である。図中に星(☆)で示す。

事前に、当研究所においてポストカラム蛍光 HPLC 法による毒組成分析により、代表的な PSP であるデカルバモイルゴニオトキシン-2 と -3 (Decarbamoylgonautoxins-2 and -3, dcGTX2 & 3) の影響が無いと判断された 2021 年 4 月に鳥羽海域で採取されたマガキ試料

をブランク試料とした。そして、白石湖で毒化が見られたマガキ試料（マガキ 2）を、このブランク試料で希釈して 0MU/g、1MU/g、2MU/g、3MU/g、4MU/g、5MU/g 相当の実験用の毒化試料を調製した。これらの実験用の毒化試料を対象に、ELISA 分析及びイムノクロマト法を原理とした麻痺性貝毒検出用の簡易キットによる分析を行った。ELISA 分析には、Skit ELISA for PSP（一般財団法人新日本検定協会）（以下、Skit ELISA）を用い実験用毒化試料及びマガキ 1～6 の分析を実施した。マガキ 1～4 については定量上限の範囲に入るように適切な希釈倍率を設定した。分析結果を図 2 及び表 1 に示す。

イムノクロマト法を原理とした麻痺性貝毒検出用の簡易キットによる分析には、MT テスト イムノクロマト-PSP「ニッスイ」（日水製薬株式会社）（以下、MT テスト）を使用した。本キットは、検体中の PSP の含有量に応じて、テストプレート中のラインが呈色することから、目視や画像解析による PSP の定性や定量の可能性を検討できる。MT テスト用テストプレートの模式図を図 3 に示す。MT テストについては、まず熊本県の報告⁶⁾を参考にスクリーニング可能な適切な希釈倍率の探索を実施した。結果の判定は目視によった。ラインの呈色強度を ++（非常に明瞭なライン）、+（明瞭なライン）、±（弱いライン）、-（ライン無し）の 4 水準で評価した。また、更に目視評価後 5 分以内に判定部をスキャナー（brother MFC-L2750DW）でカラー画像、JPEG 形式で取り込み、画像解析ソフト（SWEDAY JustTLC）でラインの呈色強度を解析した。その後、画像解析により定量化された呈色強度の値を用いて MT テストのテストプレートの試験部（T）の呈色強度値と対照部（C）の呈色強度値の比（T/C 比）を算出した。1MU/g から 2MU/g にかけて試験部（T）の最も明瞭なラインの消失が確認された 150 倍を適切な希釈倍率に設定した。この結果を表 2 に示す。

次に、得られた希釈倍率を用いて 0MU/g、1MU/g、2MU/g、3MU/g、4MU/g、5MU/g 相当の毒化試料及びマガキ 1～6 の分析を実施した。最終的な結果を図 4 及び表 3 に示す。

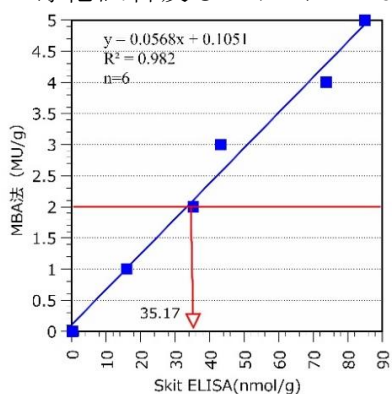


図 2. MBA 法と Skit ELISA の関係(マガキ)

0～5MU/g 相当毒化試料(n=6)の散布図、検量線及び決定係数を示す。規制値(4MU/g)の半分の濃度である 2MU/g 相当毒化試料の PSP 濃度は 35.17nmol/g であった。

表 1. PSP 用 Skit ELISA による分析結果

試料名	希釈倍率	MU/g(MBA 法)	PSP 濃度(Skit ELISA)	
			nmol/g(測定値)	nmol/g(換算値)
マガキ 1(2021.2.2)	50	31	7.13	356.66
マガキ 2(2021.2.9)	20	8.1	4.82	96.35
マガキ 3(2021.2.16)	5	<1.8(ND)	4.02	20.10
マガキ 4(2021.2.24)	2	<1.8(ND)	4.75	9.51
マガキ 5(2021.3.2)	1	<1.8(ND)	6.19	6.19
マガキ 6(2022.2.8)	1	<1.8(ND)	5.23	5.23

定量上限は 10nM の標準溶液を使用した場合の PSP 濃度の分析値(7.17nmol/g)、定量下限は 0nM のブランク溶液を使用した場合の PSP 濃度の分析値(0.15nmol/g)。試料名のマガキの()内の日付は MBA 法の検査開始日を示す。

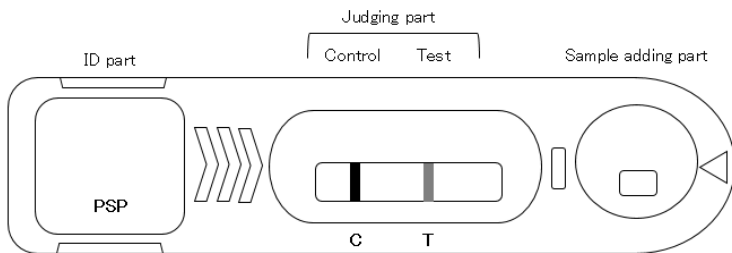


表 2. MT テスト イムノクロマトを用いた希釈倍率の検討結果

		希釈倍率			
		100 倍	150 倍	200 倍	250 倍
0MU/g	試験部(T)の目視強度	++	+	++	++
	T/C	0.544	0.219	0.420	0.398
1MU/g	試験部(T)の目視強度	-	±	±	±
	T/C	0.180	0.122	0.195	0.244
2MU/g	試験部(T)の目視強度	-	-	±	-
	T/C	0.134	0.115	0.128	0.105
3MU/g	試験部(T)の目視強度	-	-	-	-
	T/C	0.111	0.083	0.158	0.100
4MU/g	試験部(T)の目視強度	-	-	-	-
	T/C	0.098	0.104	0.112	0.091
5MU/g	試験部(T)の目視強度	-	-	-	-
	T/C	0.093	0.088	0.105	0.070

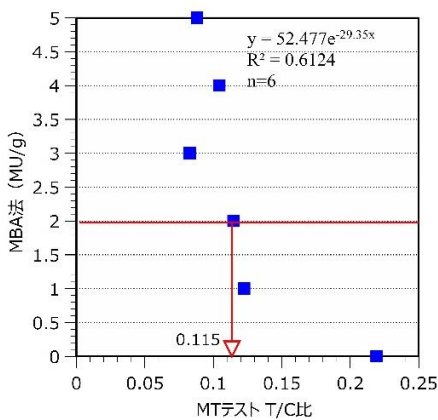


図 4. MBA 法と MT テストの関係(マガキ)

0~5MU/g 相当毒化試料(n=6)の散布図、検量線及び決定係数を示す。検量線と決定係数は指数近似を行ったため 0MU/g の値は除外して算出した。規制値(4MU/g)の半分の濃度である 2MU/g 相当毒化試料の T/C 比は 0.115 であった。

表 3. PSP 用 MT テストによる分析結果

試料名	希釈倍率	MU/g(MBA 法)	判定(MT テスト)	
			目視強度	T/C 比
マガキ 1(2021.2.2)	150	31	-	0.076
マガキ 2(2021.2.9)	150	8.1	-	0.070
マガキ 3(2021.2.16)	150	<1.8(ND)	-	0.120
マガキ 4(2021.2.24)	150	<1.8(ND)	±	0.232
マガキ 5(2021.3.2)	150	<1.8(ND)	±	0.222
マガキ 6(2022.2.8)	150	<1.8(ND)	-	0.105

図 3. MT テスト用テストプレートの模式図

MT テストは競合型の検出系であるため PSP 含有量が少ない程ラインの呈色強度は大きくなる。

目視強度は++:非常に明瞭なライン、+:明瞭なライン、±:弱いライン、-:ライン無し
の 4 水準で評価した。

1MU/g から 2MU/g にかけて最も明瞭なラインの消失が確認された 150 倍を適切な希釈倍率に設定した。

試料名のマガキの()内の日付は MBA 法の検査開始日を示す。目視強度は++:非常に明瞭なライン、+:明瞭なライン、±:弱いライン、-:ライン無し
の 4 水準で評価した。

【考察と今後の課題】

Skit ELISA の結果から、2MU/g 相当の毒化試料中の PSP 濃度 35.17nmol/g をスクリーニングレベルとして設定した場合は、MBA 法で規制値(4MU/g)以上となる検体を全てスク

リーニングすることが可能であった。また、MT テストの結果から、150 倍希釈における 2MU/g 相当の毒化試料の分析から得られた T/C 比 0.115 でスクリーニングした場合は、マガキ 6 については偽陽性となったが、偽陰性は認められず規制値 (4MU/g) 以上となる検体のスクリーニングは可能であった。

以上から、Skit ELISA 及び MT テストを用いることで、MBA 法で規制値 (4MU/g) 以上の毒力が検出された場合に、出荷自主規制解除に係る追加の MBA 法で用いられるマウスの使用数を削減することは可能と考えられる。加えて、解除以降も一定の期間は規制値以上の毒力が検出された時期に設定されたスクリーニングレベルを利用した毒化の初期モニタリングの有効性が示唆された。

課題として、毒化や毒組成の変動をもたらす要因は非常に多種多様で且つそれらが関連しながら自然界で常に変化し続けていると考えられるため、MT テストのマガキ 6 の結果のように一度設定したスクリーニングレベルが継時的に機能しなくなる可能性も考慮しなければならない。また、併せてなるべく複数の PSP 構成成分を対象とした毒組成分析データを蓄積することも重要と考えられる。

【謝辞】

本研究遂行にあたり、有益な技術的助言、ご支援を頂きました (一財) 新日本検定協会食品検査 G の高田義宜先生、日水製薬株式会社の柴原裕亮先生、水産研究・教育機構水産技術研究所の及川寛先生並びに松嶋良次先生につきましてここに記して深く感謝いたします。

【引用文献】

- 1) 大島泰克:麻痺性貝毒に関する化学・生化学的研究, 日本水産学会誌, 74 (5), 767-771, 2008.
- 2) 法律第 68 号 (2005) “動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律”平成 17 年 6 月 22 日.
- 3) 文部科学省告示第 71 号 (2006) “研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針”平成 18 年 6 月 1 日.
- 4) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知 “貝毒の検査法等について”昭和 55 年 7 月 1 日, 環乳第 30 号 (1980) .
- 5) 独立行政法人 水産総合研究センター “麻痺性貝毒 HPLC 分析法” 2013.
- 6) 水産研究・教育機構中央水産研究所“麻痺性貝毒簡易分析キットによるスクリーニング法導入マニュアル” 2020.

【経費使途明細】

使 途	金 額
・麻痺性貝毒検査キット	248,050 円
・実験用試薬類(0.1M 塩酸等)	5,368 円
・実験用器具類(チップ、マイクロチューブ、遮光遠沈管等)	48,620 円
合 計	302,038 円
大同生命厚生事業回助成金	300,000 円