

ELISA 法を用いて測定したトリガイ軟体部毒量と公定法毒力との関係

尾崎 仁, 中西雅幸

Relationship between toxicity of paralytic shellfish poison in *Fulvia mutica* estimated by mouse bioassay and quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (PSP-ELISA)

Hitoshi Ozaki and Masayuki Nakanishi

During May and August 2012, the toxicity of paralytic shellfish poison PSP in *Fulvia mutica* from Miyazu Bay was measured and compared using the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay (PSP-ELISA). A statistical significant correlation was observed between the value estimated by bioassay and that quantified by PSP-ELISA. The value estimated by the PSP-ELISA method was 4.6nmol/g, corresponding to the regulation limit determined by the mouse bioassay. PSP-ELISA may be useful as a screening assay of PSP toxicity in *Fulvia mutica* exceeding the designated quarantine limit in Kyoto Prefecture.

キーワード: トリガイ, 麻痺性貝毒, ELISA 法, 公定法, HPLC 法

二枚貝類は麻痺性貝毒プランクトンである *Gymnodinium catenatum* や *Alexandrium* 属などを摂餌することにより毒化することがある。これを人が食べると中毒症状を起し、最悪の場合は死に至ることもあるため、迅速に二枚貝の毒化状況を把握し、毒化貝の出荷防止に努めることが重要である。

現在、二枚貝の生産海域では有毒プランクトンの発生状況の調査、マウス試験（以下、公定法という）による貝毒検査により、毒化した二枚貝が市場に流通することを防止し、安全性が確保されている（野口ら, 2004; 大島ら, 2007）。

しかし、公定法は分析コストが高く時間もかかる等の問題がある。このため、公定法の前段階におけるスクリーニング検査法として、高感度かつ安価であり、多検体を迅速に処理できる ELISA 法がヒオウギガイやマガキなどの二枚貝で実用化されつつある（鈴木, 2015; 向井, 2008）。スクリーニング検査として用いる指標値は、二枚貝や麻痺性貝毒プランクトンの種類によって異なることから、出荷される二枚貝の種類に応じた指標値を設定する必要がある。

京都府では、養殖トリガイ *Fulvia mutica* は「京のブランド産品」の認証を受けて「丹後とり貝」として出荷されているが、貝毒検査には公定法のみを用いているため、このようなスクリーニング検査法の開発が待たれていた。

本研究では、一般財団法人新日本検定協会製の麻痺性貝毒分析キット Skit ELISA for PSP（以下、ELISA キットという）を用いて毒化したトリガイの毒量を定量し、公定法による毒力と比較した。その結果、トリガイについて、初めて ELISA 法による麻痺性貝毒の有無を判断す

るスクリーニング指標値を明らかにしたので報告する。

材料および方法

試料液の調製 試料には、2012年5月9日から8月9日の間、若狭湾西部海域の宮津湾 (Fig. 1) のトリガイ養殖漁場において、麻痺性貝毒による毒化が認められたトリガイの軟体部を用いた (Table 1)。公定法および ELISA 法に供する試料液は、トリガイ 5 個体分の可食部を 1 検体として、食品衛生検査指針理化学編麻痺性貝毒検査法 (社団法人日本食品衛生協会, 2005) に従って 22 検体を調製した。試料液の調製は、一般財団法人新日本検定協会に依頼した。

ELISA 分析液の調製および毒量測定 トリガイから抽出した試料液を ELISA キットで分析するための調製は、ELISA キットの取扱説明書^{*1}に従って行った。毒量

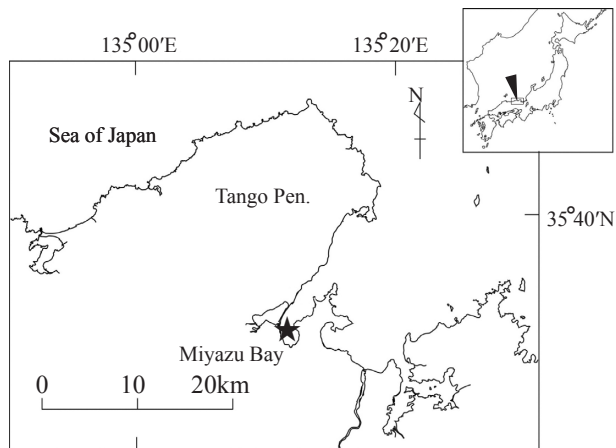


Fig. 1 Sampling site in Miyazu Bay.

*1 一般財団法人新日本検定協会. 2014. 麻痺性貝毒検出用分析キット Skit ELISA for PSP 取扱説明書.

Table 1 Sampling data for *Fulvia mutica* collected from Miyazu Bay during 2012 and toxicity values obtained via mouse bioassay and PSP-ELISA

No	Date	Shell length ±S.D. (mm)	Toxicity by mouse bioassay method (MU/g)	Amount of toxin by ELISA method		
				Measured value (nmol/g)	Estimated value corresponding to 4MU/g (nmol/g)	Estimated value corresponding to 2MU/g (nmol/g)
1	9-May	74.3±1.6	17.4	17.5	5.2	2.8
2	15-May	75.6±1.8	12.6	13.1	8.2	4.3
3		76.5±3.1	18.7	17.9	9.3	5.1
4		76.3±4.1	19.8	25.1	11.5	5.5
5	18-May	75.6±2.3	16.0	25.4	10.2	6.1
6		75.5±3.5	16.0	24.7	6.3	3.2
7		75.1±2.9	17.1	19.8	4.6	2.5
8	24-May	79.6±0.8	13.0	15.1	5.4	2.8
9		74.3±3.5	9.8	11.8	5.9	3.4
10		77.4±2.2	11.6	14.7	7.0	4.7
11		86.8±1.5	11.5	9.0	6.3	4.2
12	31-May	81.3±1.5	13.1	19.5	10.5	5.2
13	7-Jun	82.9±1.4	6.9	11.9	8.0	4.6
14	14-Jun	83.6±2.0	15.8	22.1	5.6	3.0
15	21-Jun	82.4±2.7	9.9	12.0	4.7	2.7
16	28-Jun	85.2±2.5	9.8	13.4	6.4	4.1
17	5-Jul	81.6±1.4	12.5	15.5	6.2	2.7
18	12-Jul	81.6±1.4	4.4	7.9	9.8	5.1
19	19-Jul	79.0±5.1	4.8	7.6	5.4	3.1
20	26-Jul	82.3±1.8	11.7	9.9	10.3	5.6
21	2-Aug	88.6±0.9	13.4	7.7	9.0	4.8
22	9-Aug	88.2±2.7	9.6	5.1	6.0	3.0

測定は、分析液 50 µl をキットのマイクロプレートのウェルに分注し、抗原抗体吸着および発色操作を行い、マイクロプレートリーダー（株式会社プラクティカル製）で波長 450 nm の吸光度を測定した。キットの標準液 (PD-STX) を段階希釈したものを同様に発色させ、濃度と吸光度からキット付属の Calculation sheet を用いて検量線を作成した。この検量線を用いて、吸光度から分析液の毒量を求めた。検量線の測定は、最低濃度の毒量 1 nM から最高濃度の 20 nM の範囲内で行った。なお、毒量が多く、検量線の適用範囲を超えた場合には、検量線の 1 nM ~ 20 nM の範囲に納まるように試薬 I (1M リン酸バッファ) を用いて希釈を行った。また、測定誤差を少なくするため、1 分析液および 1 標準液濃度につき 3 ウェルを使用し、その平均値を求めた。

公定法による毒力測定および HPLC による毒成分分析
同一検体での ELISA 法による毒量 (nmol/g) と公定法による毒力 (MU/g) との関係性を調べるため、ELISA 法で用いた 22 検体の試料液を用いて公定法により毒力を分析した。公定法の分析は、社団法人日本食品衛生協会 (2005) により行うこととし、一般財団法人新日本検定協会に依頼した。また、ELISA 法で分析した毒量値をスクリーニング検査の指標として用いるためには、公定法による出荷規制値である 4MU/g 前後における両者の関係を調べる必要がある。そのため、公定法により 4MU/g 以上を示した検体については、4MU/g 前後を含めそれ以上と以下の毒力となるように希釈を行い、その希釈された分析液について ELISA 法による毒量を分析した。

試料に含まれる麻痺性貝毒の成分とその組成を調べるため、公定法と同検体を用いて HPLC-FD 法^{*2} により毒

成分を分析した。分析は一般財団法人新日本検定協会に依頼した。

プランクトン調査 麻痺性貝毒の原因プランクトンを特定し、その出現状況を把握するため、2012 年 3 月 5 日から 8 月 15 日の間に、宮津湾における供試貝の垂下層である水深 6 m とその上下の水深 3 m および 10 m の各層で北原式採水器を用いて、合計 24 回の採水を行った。採水した海水 1.5 ~ 2.5L を 10 µm 目合のナイロンメッシュを用いて 50 ~ 200 倍に濃縮した。濃縮海水中の麻痺性貝毒原因種である *Gymnodinium catenatum* および *Alexandrium* 属ならびにその他の貝毒原因種を顕微鏡下で同定後、その出現数を計数板を用いて計数した。

結 果

トリガイの毒量測定 公定法による毒力および ELISA 法による毒の定量結果を Table 1 に、それらの変化を Fig. 2 に示した。なお、Fig. 2 では、複数の検体を得られた 5 月 15 日、18 日および 24 日の値は、各日の平均値で示した。公定法による毒力は 4.4 ~ 19.8 MU/g であり、全て 4 MU/g 以上であった。5 月に採取した検体では 9.8 ~ 19.8 MU/g、6 月で 6.9 ~ 15.8 MU/g、7 月で 4.4 ~ 12.5 MU/g、8 月で 9.6 ~ 13.4 MU/g であった。

ELISA 法による毒量は、5 月に採取した検体では 9.0 ~ 25.4 nmol/g、6 月で 11.9 ~ 22.1 nmol/g、7 月で 7.6 ~ 15.5 nmol/g、8 月で 5.1 ~ 7.7 nmol/g であった (Table 1)。5 月から 7 月中旬における公定法の毒力と ELISA 法の毒量との増減はほぼ同様の傾向を示したが、7 月下旬以降、両法の測定値には顕著な差異が見られた (Fig. 2)。

HPLC 分析による毒組成 各検体から検出された毒

*2 大島泰克. 2011. 貝毒分析研修会テキスト「麻痺性貝毒 HPLC 分析法」.

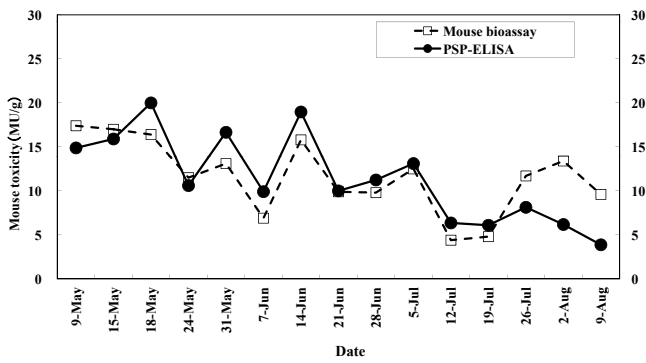


Fig. 2 Variations in toxicity levels of *Fulvia mutica* during 2012 assessed via mouse bioassay and PSP-ELISA.

成分は、C1 + C2, GTX5 + 6, dcGTX2 + 3, STX 群 (neoSTX, dcSTX, STX), GTX1 + 4, GTX2 + 3 であった (Fig. 3)。なお、Fig. 3 には 5 月 15 日、18 日および 24 日の検体は各日の平均値を示した。毒成分の組成は、C1 + C2 の割合が最も高く (29 ~ 44%)、次いで GTX5 + 6 (24 ~ 38%)、dcGTX2 + 3 (7 ~ 24%)、STX 群 (6 ~ 15%)、GTX1 + 4 (2 ~ 7%)、GTX2 + 3 (1% 未満) の順であった。毒成分組成の推移では、7 月以降は C1 + C2, GTX5 + 6, GTX1 + 4 の割合が低下し、dcGTX2 + 3 と STX 群の割合が増加した。

ELISA 法と公定法の相関関係 本研究に供したトリガイ 22 検体について、公定法によって求めた毒力と ELISA 法によって求めた毒量の関係を Fig. 4 に示した。両者には正の相関関係が認められた ($Y=1.1263X+0.7375$, $r=0.745$, $P<0.05$)。全ての検体で 4 MU/g 以上であったことから、4 MU/g 付近とその前後の点が得られるよう希釈した分析液を ELISA 法により毒量を分析し、検体ごとに得られた毒力と毒量の関係を直線回帰させた結果を Fig. 5 に示した。その結果、公定法の 4 MU/g に相当する ELISA 毒量値の最大は 11.5 nmol/g、最小は 4.6 nmol/g であった。

貝毒原因プランクトンの出現状況 3 月 5 日から 8 月 17 日に採集されたプランクトンについて、麻痺性貝毒原因種とその他の貝毒原因種に分けて出現状況を Table 2 に示した。麻痺性貝毒原因種は *Gymnodinium catenatum* のみが出現し、*Alexandrium* 属は全く認められなかった。その他の貝毒原因プランクトンは、下痢性貝毒原因種である *Dinophysis* 属が確認された。

考 察

二枚貝の毒化は、単一種および複数種の麻痺性貝毒プランクトンによる場合があり、これまで単一種による事例が多いとされたが、近年では複数種による報告も見られている (国立研究開発法人水産総合研究センター瀬戸内

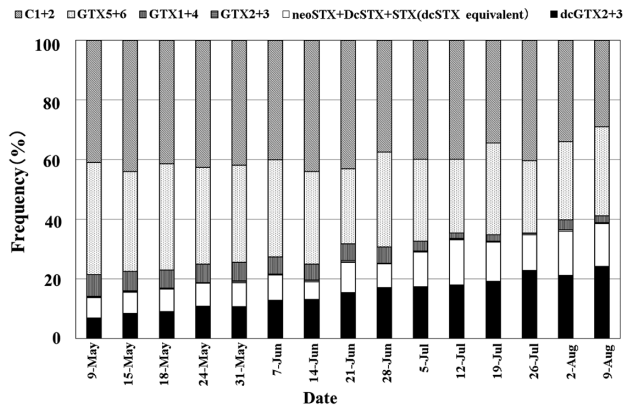


Fig. 3 Variations in the relative abundance (mol %) of each toxin from *Fulvia mutica* during 2012.

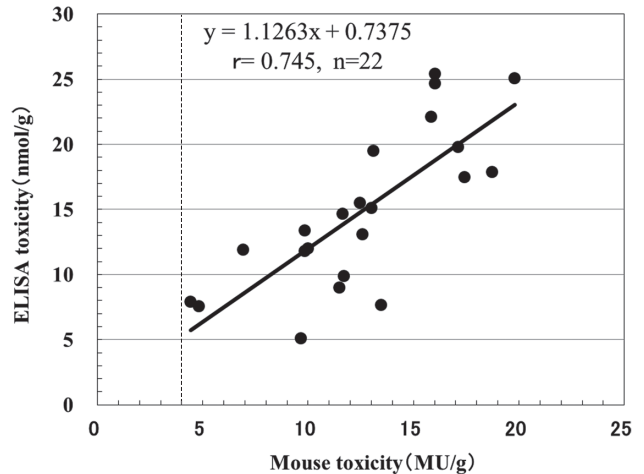


Fig. 4 Relationships between toxicity values for *Fulvia mutica* estimated via mouse bioassay and quantified by PSP-ELISA. Dashed line indicates the regulation limit of 4MU/g.

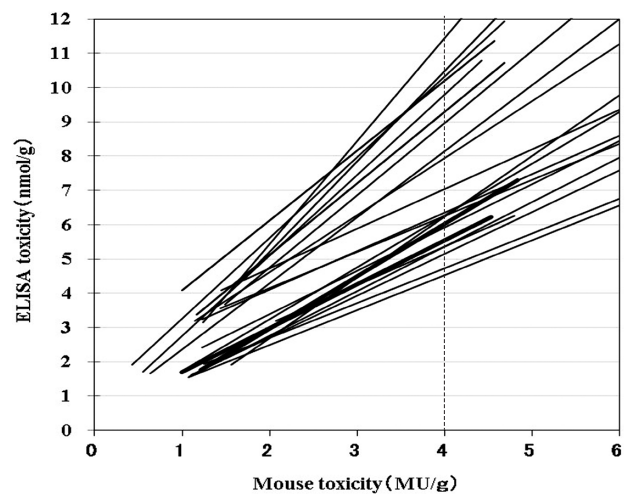


Fig. 5 Regression lines for 22 samples using dilutions adjusted to a toxicity of ~4 MU/g. Dashed line indicates the regulation limit of 4MU/g.

Table 2 Abundance of toxic dinoflagellates in Miyazu Bay during 2012

Date	Species of PSP toxic dinoflagellate		Species of other toxic dinoflagellates
	<i>G.catenatum</i>	<i>Alexandrium</i> spp.	
5-Mar	++	—	+
14-Mar	—	—	++
21-Mar	+	—	++
12-Apr	+	—	—
16-Apr	—	—	++
23-Apr	—	—	++
1-May	—	—	++
7-May	—	—	++
14-May	—	—	+
21-May	—	—	+
24-May	—	—	—
31-May	—	—	+
7-Jun	—	—	++
14-Jun	++	—	+
15-Jun	—	—	+
21-Jun	+	—	+
28-Jun	++	—	++
5-Jul	++	—	+
12-Jul	+++	—	++
19-Jul	—	—	+
26-Jul	—	—	+
2-Aug	—	—	++
9-Aug	+++	—	+
17-Aug	++	—	+

— : ND
 + : >ND
 ++ : >100cells/L
 +++ : >1,000cells/L

海区水産研究所, 2011, 2012)。本府で出現する麻痺性貝毒原因プランクトンは、主に *Gymnodinium catenatum* と *Alexandrium* 属の2種であり、本研究では、麻痺性貝毒の原因種としては *G. catenatum* が確認され、それ以外の種は全く出現しなかった (Table 2)。このことから、宮津湾のトリガイが毒化した原因種は *G. catenatum* と判断した。本種による二枚貝の毒化は、本府以外に大分県猪串湾 (宮村, 2007) や高知県宿毛湾 (鈴木, 2015) でヒオウギガイの事例がある。大分県のヒオウギガイ中腸腺では12月から4月に毒化が認められており、時期は異なるものの毒成分は本研究と同じで、その構成も類似していた。一方、高知県のヒオウギガイ中腸腺では5月から9月に毒化が認められており、毒成分は本研究と同じであったが本研究で7~24%を占めた dcGTX2+3 が、7月以降には40%以上を占めるなど毒成分の構成が異なった。このように、*G. catenatum* により毒化した二枚貝では、毒成分はほぼ同じであったが、大島ら (2007) が指摘する麻痺性貝毒原因種により毒化した二枚貝の毒成分の構成は貝種、海域および季節などにより異なること

を支持した。

本研究では、宮津湾のトリガイについて ELISA 法と公定法の分析値には正の相関が認められ、 $Y=1.1263X+0.7375$ ($n=22, r=0.745$) の関係式を得ることができた (Fig. 4)。また、公定法の出荷規制値である 4 MU/g に相当する ELISA 法による指標値は 4.6 ~ 11.5 nmol/g の範囲と推定された (Fig. 5)。

7月下旬および8月上旬には ELISA 法による毒量と公定法による毒力に顕著な差が見られた (Fig. 2)。麻痺性貝毒は成分によって毒性の強さが大きく異なると言われており (野口ら, 2004)、STX 群 (neoSTX, dcSTX, STX), GTX1 + 4, dcGTX2 + 3, GTX2 + 3 は強毒成分であり、C1 + C2, C3 + C4, GTX5 + 6 は弱毒成分であるとされている (大島, 2008)。HPLC による毒の成分分析結果 (Fig. 3) では、上述した4種の強毒成分の割合は6月頃までは30%未満であったが、7月以降には増加する傾向がみられ、8月2日および9日には40%前後に達した。8月の検体で ELISA 法と公定法との分析値に差がみられたのは、毒成分に対する感度が両法で異なるこ

とが影響したと考えられる。向井(2008)は、ELISA法および公定法の相関上の課題として、毒成分ごとに対するマウスの感受性とELISA法感度が異なる点を指摘した。トリガイを用いた本研究でも同様の結果が得られており、強毒成分であるSTX群およびdcGTX2+3などの割合が高くなると、ELISA法では毒力が過少に評価されることがあるため、スクリーニングとしての指標値を設定する場合には注意を要する。篠崎ら(2013)および藤原ら(2015)は、両法の差異を考慮して公定法の規制値4 MU/gに対し、より安全性を高めるために公定法の検出限界値である2 MU/gをスクリーニング指標値として提唱している。また、「二枚貝等の貝毒のリスク管理に関するガイドライン」*³では、ELISA法をスクリーニングとして用いる場合には、規制値以上の毒量の試料を20点以上検査し、2 MU/gの毒力値が監視強化を実施する目安として示されている。本府におけるトリガイの指標値を2 MU/gとした場合には、Fig. 5の結果からELISA毒量の最小値は2.5 nmol/gと推定された。篠崎ら(2013)は、マガキを対象にELISA法でスクリーニング指標値を設定しており、マガキの出荷の可否についてはスクリーニング指標値をもとにして、漁業関係者等への迅速な情報提供が可能となることを示唆している。本府においても、確実に「丹後とり貝」の出荷の安全性を確保するスクリーニングとして本手法を用いるためには、公定法の検出限界レベル2 MU/g相当のELISA毒量値である2.5 nmol/gを注意レベルの指標として用いることが重要である。また、本研究では10 MU/g以上の検体が多く、4 MU/g未満は既存の検体を希釈することにより推定したが、ガイドラインで示されている2~4 MU/g前後の検体を用いてELISA法により分析を行い、さらに精度向上を図る必要がある。

謝 辞

本試験を実施するにあたり、一般財団法人新日本検定協会 高田主席研究員からELISA法による毒量分析における技術指導およびHPLCによる機器分析を含め多大なる御指導と御協力をいただき厚く御礼申し上げます。また、国立研究開発法人水産総合研究センター中央水産研究所 鈴木グループ長および渡邊研究員からは、本論文の御校閲と御教授を賜り心から厚く御礼申し上げます。

文 献

藤原正嗣, 中西尚文, 保健環境研究所. 2015. 生産者による自主管理型の貝毒モニタリング体制の構築. 三重県水産研究所事業報告.12-13.
国立研究開発法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所.2011, 2012. 漁場環境保全関係研究開発推進会議「赤潮・貝毒部会」議事録. 13-16.

宮村和良, 2007. 猪串湾における有毒渦鞭毛藻 *Gymnodinium catenatum* の出現特性およびヒオウギガイ毒化の解明に関する研究. 大分県水試調研報, 1: 7-64.
向井宏比古. 2008. 熊本県沿岸域における麻痺性貝毒モニタリングへのスクリーニングとしてのELISA法(サキシトキシン定量キット)の利用について. 熊本県水産研究センター研究報告, 8: 73-79.
野口玉雄, 村上りつ子. 2004. 「貝毒の謎- 食の安全と安心-」. 1-55. 成山堂書店, 東京.
大島泰克. 2008. 麻痺性貝毒に関する化学・生化学的研究. 日水誌, 74: 767-771.
大島泰克, 濱野米一. 2007. 麻痺性貝毒のモニタリング. 「貝毒研究の最先端- 現状と展望」. 19-29. 恒星社厚生閣, 東京.
篠崎貴史, 渡邊龍一, 川津健太郎, 櫻田清成, 高日新也, 上野健一, 松嶋良次, 鈴木敏之. 2013. 麻痺性貝毒簡易検出キット(PSP-ELISA)を用いた貝毒モニタリングシステムの有効性. 食衛誌, 54: 397-401.
鈴木 怜. 2015. 貝毒発生監視調査事業. 高知県事業報告. 106-114.
社団法人日本食品衛生協会. 2005. 食品衛生検査指針理化学編, 3: 673-680.

*³ 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課. 2015. 二枚貝等の貝毒のリスク管理に関するガイドライン.

