

フグ毒検査キットの開発とフグの毒性評価

研究分担者 佐藤 繁 北里大学海洋生命科学部応用生物化学講座

研究要旨

フグ類の消費は従来、西日本などに限られていたが、これまでフグ類を利用していなかった北日本沿岸部などでも近年、特産品として天然フグ類を商品化しようとする動きがある。いっぽう、Kodama et al. (1984) は、三陸沿岸で漁獲されるコモンググやヒガンフグの筋肉が高い毒性を示すことを報告している。このようにフグ類の毒性は同種のものであっても産地によっても大きく異なることから、食用可能とされてきたフグ類についても産地ごとに毒性を調べることが急務となっている。フグ毒は従来、マウス試験法や HPLC 蛍光法などで定量されてきたが、これらの方法では多数検体に対応することは困難である。本研究は、高感度かつ特異的にフグ毒テトロドトキシンとその関連成分を分析するための ELISA 法を開発するために、新規の抗ポリクローナル抗体を作成し、その性状を調べたものである。

A. 研究目的

谷(1945)は、フグ食を伝統とする西日本各地の沿岸を中心に、朝鮮半島や台湾を含む海域で漁獲されるフグ類の毒性を精力的に調査し、毒を高濃度に蓄積する部位が種ごとに異なることを明らかにした。現在、食品衛生法ならびに「フグの衛生確保について」(厚生省環境衛生局長通知 環乳第 59 号)により食用可能なフグの種類と部位が定められているが、これは主として谷(1945)の調査結果に基づくものである。

フグ類の毒性は産地によって大きな違いがあると考えられている。Kodama et al. (1984) は三陸沿岸で漁獲されるヒガンフグ *Takifugu pardalis* およびコモンググ *T. poecilonotus* には、筋肉が 100 MU/g を超える高い毒性を示す個体が高頻度で出現することを報告している。このようにフグ類の毒性は同種のものであっても産地によっても大きく異なることから、食用可能とされてきたフグ類についても産地ごとに毒性を調べることが急務となっている。フグ毒は従来、マウス試験法や HPLC 蛍光法などで定量されてきたが、これらの方法では多数検体に対応することは困難である。本年度本研究では、高感度かつ特

異的にフグ毒テトロドトキシン(TTX)とその関連成分を分析するための ELISA 法を開発するために、新規の抗ポリクローナル抗体を作成し、その性状を調べたものである。

TTX に対する抗体はこれまで複数の研究の研究グループによって開発されてきた。これらの抗体はいずれも、Johnson et al. (1964) のサキシトキシン抗原の作成法を応用し、TTX のグアニジノ基をキャリアタンパク質のアミノ基とホルムアルデヒドを用いて架橋した抗原を用いて作成されている。この方法では、キャリアタンパク分子にごく少量の TTX しか導入できないため、TTX に特異的に親和性を示す抗体を生産する B 細胞を選択し、これを培養して得られるモノクローナル抗体が主として用いられてきた。フグ等の有毒生物には TTX の他、種々の関連成分が含まれており、11 位が酸化された 11-oxo 体などかなり毒性の高い成分も見いだされている。TTX に対するモノクローナル抗体は、TTX そのものには高い親和性を示すものの、これら関連成分にはほとんど交差反応を示さない。

Yotsu-Yamashita et al. (2005) は、TTX の関連成分である 4,9 アンヒドロテトロドトキシン

(4,9anh-TTX)が、システインなどの生物チオールと反応し、チオールの硫黄原子が TTX の 4 位に導入された結合体を形成することを報告している。予備的に調べたところ、システインだけでなく、様々なチオール化合物が、4,9anh-TTX と反応し、結合体を形成することを確認した。このことは、適当なチオール化合物を用いることにより、キャリアタンパク質に効率よく、多数の TTX 分子を導入できること、およびこれをウサギなどに免疫することにより、これまで作成が困難であった TTX に対するポリクローナル抗体を得ることが可能となったことを意味する。以下、4,9anh-TTX を出発物質とする TTX とキャリアタンパク質の結合体、およびこれを用いて得られたポリクローナル抗体の性状等について記載する。

B. 研究方法

(1) 試料

岩手県大船渡魚市場に水揚げされたコモングとマフグ、および神奈川県藤沢市新江ノ島水族館で展示飼育中に死亡したトラフグの凍結魚体(計 20 Kg)を、5 倍量の 0.1M 酢酸とともにホモジナイズし、沸騰浴中で 20 分間加熱した。熱浸ホモジネートを氷冷し、No.2 のろ紙で自然ろ過した。得たる液を 4M NaOH で pH 6.0 に調整し、活性炭、Bio-Gel P-2 および Bio-Rex 70 各カラムクロマトグラフィーで順次精製して TTX および 4,9anh-TTX を単離した。

(2) 抗原の作成

凍結乾燥した 4,9anh-TTX(30 μ mol)を、300 mg の(±)ジチオスレイトール(DTT)を含む 0.05 M リン酸カリウム緩衝液(pH 8.0)20mL に溶解し、37 で 30 分間静置した。反応混合液を Bio-Gel P-2 カラム(1.5 x 10 cm)に添加して、水 100ml でカラムを洗浄後、0.2 M 酢酸(AcOH)で溶出する画分を 10 mL ずつ捕集した。0.2 M AcOH 溶出画分に含まれる TTX と DTT の結合体(DTT-TTX)を集めて凍結乾燥し、Sato et al. (2014)の方法に従って市販の二価性架橋試薬(GMBS, Dojindo)を導入した牛血清アルブミン(BSA, 10 mg, Sigma, RIA grade)と合わせて 10 mL の 0.05 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)中で 2 時間、室温で静置した。反応混合液を 0.03 M AcOH 1 L に対して 3 回、次いで水 1 L に対して 3 回透析した。透析内液を PBS(-)で 30 mL に定容し、抗原溶液(BSA-DTT-TTX, 0.3 mg/mL)とした。

これとは別に、1,2-エタンジチオール(EDT, Aldrich, 90+%)300 μ L を 10 mL の DMSO に溶解し、これをさらに 40 mL の 0.05 M リン酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0)と混合した溶液に、凍結乾燥した 4,9anh-TTX 30 μ mol を溶解し、37 で 30 分間静置した。反応混合物に等量の酢酸エチルを加えて 3 回抽出し、水相(下層)を減圧濃縮した。これを Bio-Gel P-2 のカラムに添加して上記と同様に、生成した EDT と TTX の結合体(EDT-TTX)を分離した。これを GMBS で処理してマレイミド基を導入したスカシガイヘモシアニン(KLH, 10 mg, Bioscience, Immunological grade)と合わせて 10 mL の 0.05 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)中で 2 時間、室温で静置した。反応混合液を 0.03 M AcOH 1 L に対して 3 回、次いで水 1 L に対して 3 回透析した。透析内液を PBS(-)で 30 mL に定容し、抗原溶液(KLH-EDT-TTX, 0.3 mg/mL)とした。

(3) TTX 関連成分および TTX 結合体の分析

溶液中の TTX, 4,9anh-TTX は、Yotsu et al. (1989)の HPLC 蛍光法を用いて分析・定量した。2 種のチオールと TTX の結合体(DTT-TTX, EDT-TTX)および、抗原(BSA-DTT-TTX, KLH-EDT-TTX)中の結合 TTX 量は、上記の HPLC 蛍光法から分析用カラムを外し、反応液(4 M NaOH)と混合・加熱処理で得られる生成物の蛍光強度(Ex 365 nm, Em 510 nm)を TTX 標品のそれと比較することにより算出した。

(4) 免疫

2 種の抗原(BSA-DTT-TTX, KLH-EDT-TTX)溶液をそれぞれ 2 羽のウサギに対して毎回、1 羽につき 1 mL ずつ隔週で約 7 ヶ月間、皮下接種した。それぞれのウサギから約 10 mL ずつ採血して血清を作成し、抗体価を測定した。抗体価は次の手順で算出した。すなわち、血清 200 μ L と TTX 標品の PBS 溶液(TTX 濃度:2 ~ 25 μ M)200 μ L を混合して 30 分間静置した後、NMWL 10k の限外遠心デバイス(Nanosep 10k Omega, Pall Life Science)を用いて得たる液中の TTX 濃度を上述の HPLC 蛍光法で分析した。血清に替えて PBS を用いて同様に限外ろ液を調製し、TTX 濃度を算出した(CTRL)。血清の抗体価は、以下の通り算出した。

$$\begin{aligned} \text{抗体価(血清 1mL あたりの TTX 吸収量)} &= \\ &= [(CTRL \text{ ろ液中の TTX}) - (\text{血清} + \text{TTX ろ液中の TTX})] \times 2 (\mu\text{M}) \end{aligned}$$

C. 研究結果

(1) 新規抗原の性状

BSA-DTT-TTX 抗原では、キャリアタンパク質 (BSA) に対して TTX の結合量は重量比で約 14 %、KLH-EDT-TTX では KLH に対して TTX の結合量は重量比で約 6 %と算出された。

(2) 抗体価の推移

1) BSA-DTT-TTX 抗原

BSA-DTT-TTX 抗原を免疫したウサギでは、2羽いずれとも免疫開始前の抗体価 (血清 1 mL あたりの TTX 吸収量) は 0.34 nmol であった。抗体価は免疫開始後から徐々に上昇し、6ヶ月後にそれぞれ 1.58, 2.41 nmol に達した。

2) KLH-EDT-TTX 抗原

KLH-EDT-TTX 抗原を免疫した2羽では、免疫開始前の抗体価それぞれ 0.29, 0.36 nmol であった。抗体価は免疫開始2ヶ月後から急激に上昇した。1羽は4ヶ月後に死亡した。残り1羽の抗体価は、6ヶ月半の全採血の時点で 24.50 nmol に達した。

(3) TTX 関連成分に対する交差反応

有毒フグから分離した TTX, 4epi-TTX および 4,9anh-TTX、ならびに TTX 標品から Wu et al. (1996) に従って過酸化水素/硫酸第1鉄で TTX を処理して得られる 11oxo-TTX および三陸産コモンフグ卵巣から部分精製したデオキシ体 (5,6,11-trideoxyTTX) を、KLH-EDT-TTX を免疫したウサギから得た血清と混合したところ、4,9anh-TTX を除く各成分とも、TTX とほぼ同程度の吸収が確認された。

D. 考察

2種の抗原、BSA-DTT-TTX と KLH-EDT-TTX をウサギに免疫したところ、血清の TTX に対する抗体価には大きな違いが認められた。すなわち、KLH-EDT-TTX は、BSA-DTT-TTX に比較してキャリアタンパク分子に対する TTX 結合量は少ないものの抗体価は大きく上昇し、既報 (Sato et al., 2014) の抗麻痺性貝毒ポリクローナル抗体作成の際の抗体価と同程度の水準に達した。この違いが、結合に用いたジチオールによるものか、キャリアタンパク質の違いによるものかは不明である。得た抗 KLH-EDT-TTX ウサギ抗体を用いて、ELISA キットを試作中である。

E. 結論

1,2-エタンジチオール(EDT)を 4,9-アンヒド

ロテロドトキシシン(4,9anh-TTX)に作用させ、TTX と EDT の結合体を作成した。これを、マレイミド基を導入したスカシガイヘモシアニンに導入して調製した抗原をウサギに隔週で 14 回免疫することにより、TTX に対するポリクローナル抗体を得た。同抗体は TTX だけでなく、11oxo-TTX や 4epi-TTX などの関連成分にも親和性を示すことを確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 著書・総説

1) 佐藤 繁, 松浦啓一: シボリキンチャクフグ・ナミダフグ/フグを知って中毒防止, 食と健康 2016; 通巻 710: 30-31.

2) 佐藤 繁, 松浦啓一: シッポウフグ・アマミホシゾラフグ/フグを知って中毒防止, 食と健康 2016; 通巻 709: 30-31.

3) 佐藤 繁, 松浦啓一: シマキンチャクフグ・タキフグ/フグを知って中毒防止, 食と健康 2016; 通巻 709: 48-49.

3. 学会発表

1) 佐藤 繁, 藤田沙和衣, 森 美貴, 犬童優華, 佐伯富貴, 高石鈴香: デカルバモイルサキシトキシシンの大量調製法. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 29 年 3 月.

2) 高石鈴香, 小杉英信, 安元 剛, 小檜山篤志, 佐藤 繁: 新規抗原を用いて作製した抗フグ毒ポリクローナル抗体の性状. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 29 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 佐藤 繁, 藤田紗和衣, 森 美貴(発明者): デカルバモイルサキシトキシシン及びその類縁体の製造方法, 特開 2016-204270, 2016 年 12 月 8 日公開.