

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「マリントキシンのリスク管理に関する研究」

平成 28 年度分担研究報告書

デカルバモイルサキシトキシンによる麻痺性貝毒試験法の評価

研究分担者	大城 直雅	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	山本 明美	青森県環境保健センター
研究協力者	工藤 志保	青森県環境保健センター
研究協力者	中谷 実	青森県環境保健センター
研究協力者	増田 幸保	青森県環境保健センター
研究協力者	木村 淳子	青森県環境保健センター
研究協力者	鈴木 達也	(一財)食品薬品安全センター秦野研究所
研究協力者	高坂 典子	(一財)食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

麻痺性貝毒検査として国際的に実施されている方法に AOAC OM 959.08 があり、これはサキシトキシン (STX) を生物試験標準化のための標準品として用いる方法である。わが国では、STX は「化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律」に規定された特定物質であり、所持等に制限があるため、試験法としての普及が困難である。そこで、規制対象外であるデカルバモイルサキシトキシン (dcSTX) を STX の代替標準品として使用可能か評価することを目的とした。dcSTX と STX について、同一施設・同一条件で併行してマウスアッセイを実施し、その毒性を比較することにより、同等性を確認した。

平成 28 年度は STX と併行して dcSTX で基準変換係数 (Conversion Factor、CF 値) を求め、その後定期的にマウス 5 匹に投与し、CF 値の変動を調査したところ、STX と同様に dcSTX も安定した CF 値が得られた。さらに、dcSTX を塩酸で希釈しマウス投与を実施し、同溶液についての安定性を LC-MS/MS で確認した。

A. 研究目的

麻痺性貝毒検査として CODEX 委員会では、AOAC OM 959.08 をタイプ 1 に位置づけている。これはサキシトキシン (STX) 標準溶液により生物試験の標準化を行うもので、毒性を STX 当量で評価する。既知濃度の STX 溶液を繰り返し投与することにより、マウス単位 (MU) から STX 当量を算出するための変換係数 (Conversion Factor、CF 値) を求める。すなわち、CF 値は 1 MU に相当する STX 量 (μg) を意味する。わが国では、STX は「化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律」に規定された特定物質であり、所持等に制限があるため、標準的試験法として普及することは困難である。そこで、規制対象外であるデカルバモイルサキシトキシン (dcSTX) を用いた麻痺性貝毒試験方法が、AOAC OM 959.08

の代替として使用可能か評価するために、同一施設、同一条件下で dcSTX による試験法について検討した。

なお、青森県環境保健センターは STX の使用許可を得ている施設であり、STX を用いた実験等はすべて、同センターにおいて実施した。

B. 研究方法

1. 供試試料

dcSTX は、(一財)食品薬品安全センター秦野研究所において外部精度管理調査で使用している $2.35 \mu\text{mol/L}$ dcSTX 酢酸溶液 (STX 二塩酸塩に換算して $0.45 \mu\text{g/mL}$) を使用した。

STX は、FDA より供与された $100 \mu\text{g/mL}$ STX 二塩酸塩 塩酸溶液を使用した。

マウスは日本 SLC 株式会社より購入した 4 週

齢の ICR 系雄マウスを 2 日間順化して使用した。マウスの体重は 19~21 g のものを概ね使用し、マウス体重が 19 g 未満の場合は体重補正を行った。体重 21 g 以上のマウスは使用していない。

2 . 基準 CF 値の比較

AOAC OM 959.08 に準じて、STX および dcSTX について基準 CF 値を求めた。

1 日目に 1 mL の腹腔内投与による致死時間の中央値が 5~7 分に入る希釈濃度を 2 濃度調製した。希釈液には 0.003 M 塩酸を使用した。各濃度について 10 匹のマウス群に 1mL ずつ腹腔内投与し、体重と致死時間を測定し、致死時間の中央値から Sommer の表を用いて溶液の毒力 (MU/mL) を求めた。各希釈液の濃度 (FDA-STX $\mu\text{g/mL}$) を、求めた毒力 (MU/mL) で除して CF 値 (FDA-STX $\mu\text{g/MU}$) を求めた。

2 日目に、前日に調製した 2 濃度の希釈液を、各 10 匹のマウスに投与し、同様に CF 値を求めた。

また、新たに前日と同濃度になるよう 2 濃度の希釈液を調製し、各 10 匹のマウスに投与し、同様に CF 値を求めた。

STX と dcSTX について、各 60 匹のマウスを使用し、得られた 6 個の CF 値の平均値を求め、これを基準 CF 値とした。

数値の取扱いについては、Sommer の表の補間値は四捨五入により小数第 3 位まで求めた値を使用した。他の計算値は小数第 4 位を切り捨て第 3 位までとした。

3 . マウスアッセイによる CF 値の変動確認

AOAC OM 959.08 に準じて、1 mL の腹腔内投与による致死時間の中央値が 5~7 分に入る希釈濃度 (1 濃度) について、1 回 / 週の頻度でマウス 5 匹に投与した。

検液 1 mL ずつ腹腔内投与し、溶液の毒力 (MU/mL) を求めた。希釈液の濃度 (FDA-STX $\mu\text{g/mL}$) を、求めた毒力 (MU/mL) で除して CF 値 (FDA-STX $\mu\text{g/MU}$) を求め、その変動を確認した。

4 . dcSTX 希釈液の安定性確認

マウスアッセイによる CF 値の変動を確認した dcSTX の塩酸希釈液 (2.35 $\mu\text{mol/L}$ dcSTX 溶液 20 mL + 希釈溶液 12 mL) について、調製当日、3

日後、1 週間後、2 週間後、4 週間後、6 週間後に以下の条件で LC-MS/MS 分析した。

また、同一希釈率の水希釈液 (2.35 $\mu\text{mol/L}$ dcSTX 溶液 10 mL + 水 6 mL) についても同一条件で LC-MS/MS 分析した。

【LC 部】

装置 : waters ACQUITY UPLC I-Class、分析カラム : waters ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1 \times 100 mm、粒径 1.7 μm)、移動相 A : 2.0 mM ギ酸アンモニウム-3.6 mM ギ酸、移動相 B : 95% MeCN 含有 2.0 mM ギ酸アンモニウム-3.6 mM ギ酸、グラジエント分析 : A% (min) 10 % (0 min) 30 % (2 min) 60 % (9 min) 10 % (9-12min)、測定時間 : 12 分間、カラム温度 : 40、流速 : 0.2 mL/min、注入量 : 2 μL

【MS 部】

装置 : Waters Xevo TQ-S micro、イオン化 : ESI (Positive)、Desolvation gas : N_2 (600、1000 L/hr)、Cone gas : N_2 (150 L/hr)、コリジョンガス : Ar、Source Temp. : 150、コーン電圧 : 5 V

【MRM 条件】保持時間 : 6.2 分

	Precursor ion	Product ion	Cone (V)	Collision (eV)
dcSTX	257	239	5	15
	257	222	5	20
	257	180	5	20

分析は n=3 で実施し、 m/z 239 を定量イオンとした定量分析の面積値を求め、その平均面積値で評価した。

C. 研究結果

1 . 基準 CF 値の比較

dcSTX および STX で基準 CF 値を求めた結果を表 1 に示す。dcSTX の濃度については、STX 換算濃度 (FDA-STX $\mu\text{g/mL}$) で示した。これは、(一財) 食品薬品安全センター 秦野研究所の dcSTX 酢酸溶液に示された STX 二塩酸塩換算濃度 (0.45 $\mu\text{g/mL}$) より換算した値である。

2 . マウスアッセイによる CF 値の変動

マウスアッセイによる CF 値の変動結果を表 2 に示す。dcSTX、STX とともに、平成 29 年 1 月から 3 月にかけて 1 回 / 週で実施した CF 値の平均は 0.168 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$ および 0.180 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$ となり、表 1 に示した基準 CF 値 (dcSTX 0.171

FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$ 、STX 0.185 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) とほぼ同等であった。

また、STXを使用したAOAC OM 959.08では「求めたCF値は基準CF値の $\pm 20\%$ におさまらなければならない。20%を超える変動はマウス感度または手技の明瞭な変動を示している。」とされているが、今回実施したdcSTXのCF値は0.150~0.198 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$ (平均値0.168 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) となり、基準CF値 (0.171 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) の $\pm 20\%$ (0.136 ~ 0.205 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) 範囲内におさまった。

3 . dcSTX 希釈液の安定性

dcSTXの希釈液に0.003 M塩酸を使用し、マウス投与を行った。この溶液および同一希釈率の水希釈液をLC-MS/MSで定期的に分析した結果を表3に示す。溶液調製日の平均面積値を1とし、その比で増減を確認した(図1)。

LC-MS/MSはHPLCに比べると面積値の再現性は悪いことが知られている。4週間後の結果が他と比べて大きく異なっているが、これは本分析に使用したLC-MS/MSが専用機ではなく、残留農薬等の分析も行っているため、機器の状態により感度変動がみられたためと考えられる。

なお、マウス投与に使用する溶液量を勘案し、溶液調製3日後および1週間後のマウス投与は実施していない。

D. 考察

基準CF値と平成29年1月から3月に1回/週で11週間実施したCF値の平均は、STXとdcSTXで同様であり、dcSTXは長期間使用しても再現性が得られる物質であることが確認できた。また、CF値の変動の幅もAOAC OM 959.08で示された基準CF値の $\pm 20\%$ より狭い、 $\pm 16\%$ (0.143 ~ 0.198 FDA-STX $\mu\text{g}/\text{MU}$) 範囲内におさまった。

LC-MS/MS分析によるdcSTX希釈液の安定性確認は、4週間後の値を除くと塩酸希釈では0.991~1.099であり、水希釈では0.916~1.094であった。よって、少なくとも6週間の保管では塩酸希釈でも水希釈でも分解による損失はないと考えられる。この溶液の安定性については、引き続き検討する予定である。

E. 結論

AOAC OM 959.08 に準じて dcSTX により生物試験の標準化を行うことを検討した。今年度は、0.003 M 塩酸溶液で希釈したものについて基準CF値を求め、その後定期的にマウスアッセイを行ったが、dcSTX は STX と同様の挙動を示し、生物試験の標準化に使用できることが示唆された。

国際的には麻痺性貝毒の許容量は 800 μg STX eq/kg と規定されており、今後は、有毒検体を用いて dcSTX による試験法と AOAC OM 959.08 の同等性を検討する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 dcSTX と STX の基準 CF 値比較

		dcSTX				STX			
溶液調製日	マウス 投与日	STX 換算濃度 (FDA-STX μg/mL)	中央 致死 時間	毒力の 中央値 (MU/mL)	CF 値 (FDA-STX μg/MU)	STX 濃度 (μg/mL)	中央 致死 時間	毒力の 中央値 (MU/mL)	CF 値 (μg/MU)
2016/12/15	2016/12/15	0.281	5'53"	1.63	0.172	0.312	5'43"	1.68	0.185
2016/12/15	2016/12/15	0.290	5'32"	1.73	0.167	0.322	5'18"	1.81	0.177
2016/12/15	2016/12/16	0.281	5'20"	1.80	0.156	0.312	5'54"	1.62	0.192
2016/12/15	2016/12/16	0.290	5'45"	1.67	0.173	0.322	5'32"	1.73	0.186
2016/12/16	2016/12/16	0.281	6'20"	1.52	0.184	0.312	5'37"	1.71	0.182
2016/12/16	2016/12/16	0.290	5'56"	1.62	0.179	0.322	5'36"	1.71	0.188
基準 CF 値 (CF 値の平均値) (μg/MU)					0.171				0.185

表2 マウスアッセイによる CF 値の変動

		dcSTX				同日実施 STX			
マウス 投与日		STX 換算濃度 (FDA-STX μg/mL)	中央 致死 時間	毒力の 中央値 (MU/mL)	CF 値 (FDA-STX μg/MU)	STX 濃度 (μg/mL)	中央 致死 時間	毒力の 中央値 (MU/mL)	CF 値 (μg/MU)
1	2017/1/12	0.281	6'51"	1.41	0.198	0.312	5'19"	1.81	0.172
2	2017/1/19	0.281	5'54"	1.62	0.173	0.312	5'08"	1.87	0.166
3	2017/1/26	0.281	5'45"	1.67	0.168	0.312	5'30"	1.74	0.179
4	2017/2/2	0.290	5'43"	1.68	0.172	0.312	5'04"	1.90	0.164
5	2017/2/9	0.281	5'44"	1.67	0.167	0.312	5'46"	1.66	0.187
6	2017/2/16	0.290	5'41"	1.69	0.172	0.312	5'04"	1.90	0.164
7	2017/2/23	0.281	5'08"	1.87	0.150	0.303	5'02"	1.91	0.158
8	2017/3/2	0.281	5'20"	1.80	0.156	0.303	5'37"	1.71	0.177
9	2017/3/9	0.281	5'51"	1.64	0.171	0.303	7'09"	1.37	0.221
10	2017/3/16	0.281	5'40"	1.69	0.166	0.303	6'03"	1.59	0.190
11	2017/3/23	0.281	5'27"	1.76	0.159	0.303	6'30"	1.48	0.204
CF 値の平均値 (μg/MU)					0.168				0.180
CF 値の標準偏差 (μg/MU)					0.012				0.019
CF 値の室内変動 (%)					7.3				10.6
最小 CF 値 (μg/MU)					0.150				0.158
最大 CF 値 (μg/MU)					0.198				0.221

表3 dcSTX 塩酸希釈液および水希釈液の安定性 (LC-MS/MS 分析結果)

STX 換算濃度 (FDA-STX μg/mL)	dcSTX 塩酸希釈液				dcSTX 水希釈液		
	マウス投与日	CF 値 (FDA-STX μg/MU)	平均 面積値	面積比	平均 面積値	面積比	
溶液調製日	0.281	2017/2/9	0.167	1150417	1	1099934	1
3日後	0.281			1099984	0.956	1046680	0.952
1週間後	0.281			1075719	0.935	1008048	0.916
2週間後	0.281	2017/2/23	0.150	1140338	0.991	1116907	1.015
4週間後	0.281	2017/3/9	0.171	1554083	1.351	1638696	1.490
6週間後	0.281	2017/3/23	0.159	1264043	1.099	1203122	1.094

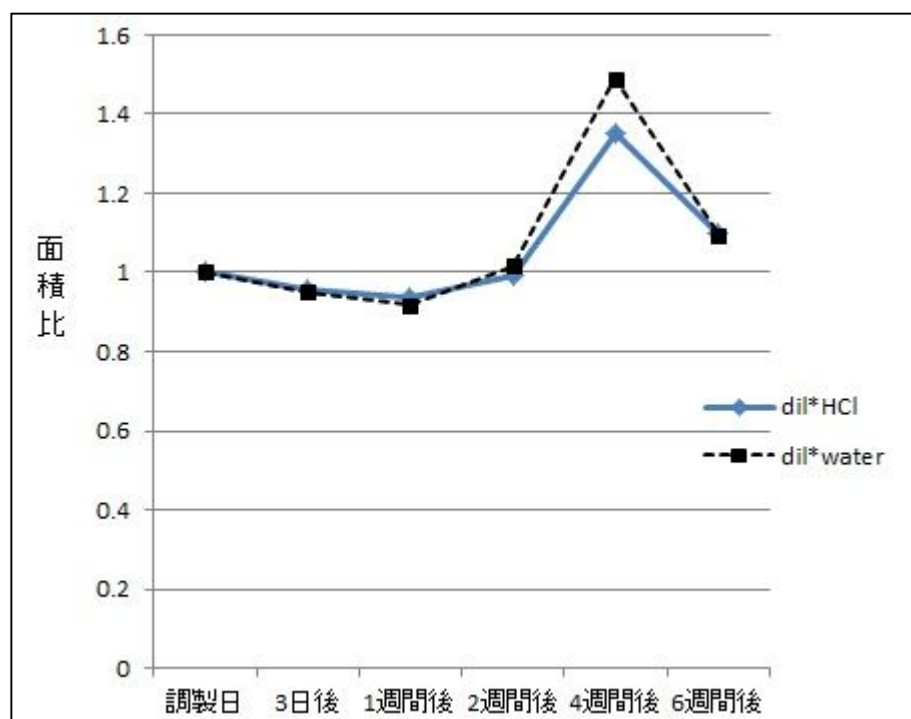


図1 dcSTX 希釈液の安定性