

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 29 年度分担研究報告書

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

新規の抗テトロドトキシン (TTX) ポリクローナル抗体を作製し、これを用いて高感度かつ特異的にフグ毒 TTX とその関連成分を分析可能な ELISA キットを作製した。昨年度、1,2-エタンジチオール(EDT)を用いてスカシガイヘモシアニン(KLH)に TTX を導入したハプテン抗原 (KLH-EDT-TTX) をウサギに免疫することにより、高い抗体価を持つ抗血清が得られることを確認した。本年度は追加したウサギに同抗原を接種し、多量の抗血清を確保するとともに、抗血清から得た抗 TTX ポリクローナルと、新たに調整したビオチン標識 TTX を用いて ELISA キットを作製した。同キットで各 TTX 関連成分(TTX, 4-epiTTX, 11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTX)標品を分析したところ、本キットがこれら種々の TTX 関連成分を検出できることを確認した。加えて、コモンフグ各部位の抽出液を本キットで分析し、HPLC 蛍光法の結果との相関についても検討した。

A. 研究目的

フグ毒テトロドトキシン(TTX)に対する抗体が、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 しか導入できず、優良な抗 TTX ポリクローナル抗体を得ることはできない。現在市販されている TTX 検出用の ELISA キットには、上記のような抗原をマウスに摂取し、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、これを培養することにより得られるモノクローナル抗体が用いられている。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-oxoTTX 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。

昨年度、1,2-エタンジチオール(EDT)を用いてスカシガイヘモシアニン(KLH)に TTX を導入したハプテン抗原 (KLH-EDT-TTX) をウサギに免疫することにより、高い抗体価を持つ抗血清が得られることを確認した。本年度はさらに免疫するウサギを追加し多量の抗血清を確保するとともに、抗血清から得た抗 TTX ポリクローナル抗体と、新たに調整したビオチン標識 TTX を用いて TTX 分析用の ELISA キットを作製し、本キット上での種々の TTX 関連成分の挙動を調べた。加えて、同キットを用いて三陸産コモンフグの抽出液の毒含量を調べ、その性状を確認した。

B. 研究方法

(1)新規抗原のウサギへの免疫と抗体価の測定

昨年度の 2 羽に加え、新たに 3 羽のニュージールランドホワイト種のウサギ(KLH-EDT-TTX No.3 ~No.5)に、FCA で乳化した KLH-EDT-TTX 抗原 (毎回 0.3mg/羽)を隔週で皮下接種した。隔週で 5mL ずつ採血して得た血清の一部(100 μ L)に PBS で希釈した等量の TTX 標品溶液(2~25 μ M)を混合し 30 分間静置した後、NMWL 10K の限外遠心

デバイス(Nanosep Omega, Pall Life Science)を用いて得たる液中の TTX を、HPLC 蛍光法(Yotsu et al.,1989)で分析定量した。抗体価は血清 1mL あたりの TTX 吸収量として算出した。

(2) 抗血清の TTX 関連成分に対する親和性

KLH-EDT-TTX No.2 のウサギから、免疫 7 回目(免疫開始約 4 か月後)に採血して得た抗血清 100 μ L に、いずれも PBS に対して 10 μ M に調製した TTX 標品 (Wako)、4-epiTTX、4,9-anhTTX、11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTX 溶液それぞれ 100 μ L を混合した。これらとは別に、同濃度の TTX 関連成分の PBS 溶液 100 μ L を、等量の PBS と混合して対照区とした。これらを室温で 30 分間静置した後、Nanosep 10K OMEGA (PALL Life Sciences) を用いて限外ろ過し、ろ液中の上記成分の濃度を HPLC 蛍光法で分析・定量した。

5,6,11-trideoxyTTX は HPLC 蛍光法でピークが得られないため、LC-QTOFMS (TripleTOFTM5600+、ABSciex) で本成分の準親イオンピーク (m/z 272.124) の増減を観測することにより定量し、抗血清のそれぞれの関連成分に対する親和性を検討した。HPLC 蛍光法ならびに LC-QTOFMS の分析条件を以下に記す。

HPLC 蛍光法 (Yotsu et al.,1989、一部改変)

蛍光検出系 : FP-2020 Plus (Jasco)

Ex 365 nm / Em 510 nm

移動相ポンプ : PU-2080 Plus (Jasco)、0.4 mL/min

反応液ポンプ : PU-2080 Plus (Jasco)、0.4 mL/min

HPLC カラム : J-Pak Symphonia C18 (Jasco)、5 μ m、4.6 \times 150 mm

反応コイル : ステンレス製、 ϕ 0.5 mm \times 2 m、120 $^{\circ}$ C

インジェクター : P/N 7725i (Rheodine)、loop vol20 μ L

移動相 : 0.06M HFBA/0.05M 酢酸アンモニウム (pH 5.0)

反応液 : 4 M NaOH

比較標準 : TTX (15.2 μ M)、6-epiTTX (9.5 μ M)、4-epiTTX (12.8 μ M)、4,9-anhTTX (11.1 μ M) の混合液/0.03 M 酢酸

注入量 : 10 μ L、over load injection

LC-QTOFMS

カラム : Atlantis HILIC (Waters)、3 μ m、2.1 \times 150 mm

移動相 A : アセトニトリル

移動相 B : 10 mM ギ酸アンモニウム (pH 4.0)

流速 : 0.2 mL/min

注入量 : 5 μ L

CE : 30 \pm 10

Gradient : 0 min (B : 20 %) \rightarrow 15 min (B : 60 %) \rightarrow 16 min (B : 60 %) \rightarrow 16.1 min (B : 20 %) \rightarrow 19 min (B : 20 %)

測定モード : positive TOF-MS

(3) ビオチン標識 TTX の作成

(+)-ジチオスレイトール(DTT)と TTX の結合体の凍結乾燥物 (3.4 μ mol) を、2 mL の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、これに上述のビオチンラベル化剤 4 mg (7.6 μ mol) を添加して攪拌した後、室温で 2 時間静置した。反応混合液を水で充填した Bio-Gel P-2 のカラム (1.5 \times 12 cm)に供し、カラムを水 100 mL で洗浄した後、0.2 M AcOH で溶出する画分を 10 mL ずつ 50 本分取した。0.2 M AcOH 溶出画分を直結方式の HPLC 蛍光法で分析し、蛍光ピークを与える画分を合一して凍結乾燥した。凍結乾燥粉末を秤量した後、0.1 % AcOH に溶解し、一部を TripleTOFTM5600+ (ABSciex)で分析した。分析の諸条件を以下に記す。

溶媒 (流速) : 水 (0.2 mL/min)

注入量 : 5 μ L

測定モード : positive TOF-MS モード

(4) 特異抗体の精製

水で洗浄した EAH-Sepharose 4B (GE-Health care)10 mL に、PBS 10 mL と GMBS(二価性架橋試薬、Dojindo)56 mg を溶解した DMSO 2.5 mL との混合液を添加し懸濁した。室温で 20 分間静置した後、懸濁物を ϕ 25 \times 100 mm のガラスカラムに洗いこみ、50 mL の水で 4 回洗浄した後、PBS 50 mL を流して未反応の GMBS を除去した。このカラムに、DTT-TTX 凍結乾燥物 (14 μ mol) を PBS 30 mL に溶解して添加混合し、室温で 1 時間、ときどき攪拌しながら静置した。カラムに水 100 mL を流した後、容積比で 1 % のメルカプトエタノールを含む PBS 100 mL を流して未反応のマレイミド基をマスクし、次いで水 100 mL と PBS100mL を順次流して TTX をリガンドとするアフィニティークロマトグラフ用樹脂を作製した。樹脂を直径 10mm のガラスカラムに 30mL まで充てんし、KLH-EDT-TTX No.3 ウサギ抗血清

(14回目、全採血) 7.5 mL から得た硫酸沈殿物を PBS7.5mL に溶解して添加した。60 mL の PBS でカラムを洗浄した後、0.1 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.7) で溶出する画分を 2 mL ずつ 30 本分取した。溶出液は、あらかじめ 1.0 M Tris を 400 μ L ずつ分注した試験管に捕集した。分光光度計 (Jasco, V-550) を用いて各画分の 280 nm の吸光度を測定し、TTX に対する特異抗体を分離した。分離した抗体は合一して PBS を加えて 17 mL とし、ProClin 300 を 6 μ L 添加混合して 5 $^{\circ}$ C で保存した。

(5) TTX 分析用 ELISA キットの試作と性状確認

作製した抗 TTX 精製抗体を、0.9 % NaCl/0.01 M Tris-HCl (pH 8.2) を用いて 100 倍に希釈し、96 穴の ELISA プレート (F96 Maxisorp^m Thermo Scientific) の各 well に 100 μ L ずつ分注した。プレートを 5 $^{\circ}$ C で一晩静置した後、PBS で well を 1 回洗浄した。水で 1 % 濃度 (w/w) に希釈したブロックエースを各 well に 350 μ L ずつ分注し、さらに 5 $^{\circ}$ C で一晩静置した後、各 well を 0.05 % (w/v) の界面活性剤 (Tween 20) を添加した PBS (以下 PBST) で 2 回洗浄した。

TTX 関連成分 (TTX, 4-epiTTX, 11-oxoTTX, 5,6,11-trideoxyTTX) 各標品をそれぞれ 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) で希釈して 1、3、10、30、100、300、1,000 nM 濃度の溶液を調製した。これら TTX 関連成分の希釈液を 50 μ L ずつ各 well に分注し、次いで 2 nM に希釈したビオチン標識 TTX を 50 μ L ずつ分注して軽く攪拌した。これらに加えて TTX 関連成分を含まない 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 50 μ L と 2 nM ビオチン標識 TTX 50 μ L を添加した well (Bound 100 % = B100)、およびビオチン標識 TTX の代わりに 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) を添加した well (Bound 0 % = Bo) を作製した。プレートを 37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした後、well 内の溶液を捨て、プレートを PBST で 1 回洗浄した。これに PBS で 2,000 倍に希釈した HRP-streptavidin (Molecular Biology Grade, 1mg/mL, KPL) を各 well に 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした。well 内の溶液を捨て、プレートを PBST で 3 回洗浄した後、水 10 mL に溶解した Sigma-Fast tablets (OPD-H₂O₂, Sigma) を各 well に 100 μ L ずつ分注した。発色を確認しながら 37 $^{\circ}$ C で 5 ないし 10 分間インキュベートした後、

2 M HCl を各 well に 100 μ L ずつ分注して反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, iMark) を用いて 490 nm の吸収を測定した。以上の操作は、各成分の各濃度ごとに 3 連で行い、各濃度の 490 nm の吸光度の平均値を求めて対数軸横軸の濃度に対して吸光度平均値を縦軸にとり、阻害曲線を作製した。

TTX 関連成分に加え、当研究室で毒化貝から単離して凍結保存している麻痺性貝毒成分ゴニオトキシン (GTX) 1,4 (GTX1 と GTX4 の平衡混合物)、GTX2,3 (GTX2 と GTX3 の平衡混合物)、ネオサキントキシン (neoSTX)、デカルバモイルサキントキシン (dcSTX) および C1C2 (C1 と C2 の平衡混合物) 各標品をそれぞれ、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) を用いて 1、3、10、30、100、300、1,000 nM となるように希釈した。以下、前述の手順で作製した抗 TTX 抗体を固相化したプレート上で同様に、麻痺性貝毒成分の交差性を検討した。

(6) 試作キット上での有毒フグ抽出液の分析

2017 年 10 月に大船渡市魚市場で入手したコモンフグ 3 個体を試料とした。個体ごとに皮、筋肉、肝臓、消化管、生殖腺 (全て精巢) の 5 部位に分け、ショウサイフグは個体ごとに肝臓を取り出し、それぞれ食品衛生検査指針 (2015) に従ってフグ毒検査用の希酢酸熱浸抽出液を調製した。これら抽出液を上記の HPLC 蛍光法および LC-QTOFMS で分析した。さらに 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) で 1000 倍に希釈した検液を、上記の ELISA キットで分析した。

C. 研究結果

(1) 抗体価の推移

KLH-EDT-TTX 抗原を免疫した 5 羽のウサギから得た抗血清の抗体価の推移を図 1 に示した。1 羽は免疫開始 4 ヶ月後に死亡したが、残り 4 羽の抗体価 (血清 1 mL あたりの TTX 吸収量) は、免疫化し 6 ヶ月半後の全採血の時点で 4.0~24.5 nmol に達した。

(2) TTX 関連成分に対する交差反応

有毒フグから分離した TTX, 4-epiTTX, 4,9-anhTTX, 5,6,11-trideoxyTTX、ならびに TTX を Wu et al. (1996) に従って過酸化水素/硫酸第 1 鉄で処理して作成した 11-oxoTTX を、KLH-EDT-

TTX 抗原を免疫したウサギ (No.2) から 7 回目の採血で得た血清と混合し交差性を調べたところ、4,9-anhTTX を除く各成分ともに、TTX とほぼ同程度の吸収が確認された (図 2)。

(3) ビオチン標識 TTX

図 3 にビオチン標識 TTX 溶液を Triple TOFTM 5600+ で分析した際のスペクトルを示した。計算値の m/z : 491.1723 および 981.3368 によく一致する分子イオンピーク $[M+2H]^{++}$: 491.1707 および $[M+H]^+$: 981.3337 が観測された。

(4) 精製抗体の作成

図 4 に、TTX 結合セファロースカラムによる抗血清の分離を示した。グリシン塩酸緩衝液により Nos. 34 ~40 の画分に、TTX に対する特異抗体と思われる成分が溶出した。用いた KLH-EDT-TTX No.3 ウサギの全採血 (14 回目) で得た抗血清の、1 mL あたりの TTX 吸収量は 3.97 nmol であり、アフィニティーカラム処理前には全量で 14.9 nmol の TTX に対する特異抗体 (M_w 160,000 の IgG と想定) が含まれていたことになる。一方、アフィニティーカラムからグリシン塩酸緩衝液で溶出して得た溶液の、280 nm の吸光度は 0.235 であった。すなわち精製抗体溶液 1 mL あたり 1.05 nmol、全量 17 mL 中には 17.9 nmol の IgG が含まれており、抗血清 7.5 mL 中に含まれていた抗体量 (14.9 nmol) とよく一致した。精製抗体溶液の一部に対して TTX 標品の吸収試験を実施したところ、溶液 1 mL あたり 0.56 nmol の TTX に対する特異抗体が含まれているという結果を得た。すなわちグリシン塩酸緩衝液の酸性 (pH 2.7) により、特異抗体のおよそ 50% が変性せずに回収されていることを確認した。

(5) 試作した ELISA キットの性状

図 5 に TTX 関連成分の抗体固相化プレート上での阻害曲線を示した。添加した TTX の濃度が高くなるに従って、発色値が低下した。4-epiTTX、11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTX も同様の結果を与えた。これら成分は 3~100 nM の範囲で直線的に発色値が低下し、いずれも 1,000 nM を添加した well は、Bo の well と同程度の、無色に近い発色値を示した。IC50 値は TTX が 30 nM 付近、4-epiTTX が 50 nM 付近、11-oxoTTX が 50 nM 付近、5,6,11-trideoxyTTX が 100 nM 付近であった。

これに対して、麻痺性貝毒関連成分を添加した場合には、高濃度であっても発色値の低下は見られなかった (図 6)。

(6) 試作キット上での有毒フグ抽出液の分析

コモフグの皮や筋肉、肝臓、消化管、精巣では、ELISA で検出される毒含量が、HPLC 蛍光法で検出される毒含量を上回る傾向が認められた。これら試料には、LC-QTOFMS で 5,6,11-trideoxyTTX などのデオキシ体が多量に含まれていることを確認した (図 7 および図 8)。

D. 考察

本研究で作成した抗 TTX ポリクローナル抗体および、これを用いて作製した ELISA キットは様々な TTX 関連成分を検出可能である (図 9)。試作した ELISA キットは、TTX に匹敵する活性を持ち、キンシバイ等に高濃度で見いだされている 11-oxoTTX や、TTX の前駆体として想定されている 5,6,11-trideoxyTTX も検出できる。すなわち本抗体は、マウス試験法に替わる毒の簡易分析法としてだけでなく、TTX 関連成分による生物の毒化機構を解明するための、極めて有用なツールとなるものと考えられる。

引用文献

Sato S, Takata Y, Kondo S, Kotoda A, Hongo N, Kodama M (2014): Quantitative ELISA kit for paralytic shellfish toxins coupled with sample pretreatment. *JAOAC Int.* 97:339-44.

Yotsu M, Endo A and Yasumoto T (1989): An improved tetrodotoxin analyzer. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 893-895.

Wu BQ, Yang L, Kao CY, Levinson SR, Yotsu-Yamashita M and Yasumoto T (1996): 11-oxo-tetrodotoxin and a specifically labelled 3H-tetrodotoxin. *Toxicon*, **34**, 407-416.

E. 結論

これまで複数の研究グループによって開発が試みられてきた TTX 検出用の ELISA キットは、TTX 以外の関連成分はほとんど検出することはできない。これらキットに使用されている抗 TTX 抗体は、Johnson et al. (1964) の方法に従っ

て、TTX など関連成分のグアニジノ基をアルデヒドを用いてキャリアタンパク分子のアミノ基と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結合する TTX 分子の数は極めて限られており、優れた抗 TTX ポリクローナル抗体を得ることはできなかった。本研究は、Yotsu-Yamashita et al. (2005) および Sato et al. (2014) の知見をもとに、新たにキャリアタンパク分子に多数の TTX 分子が結合したハプテン抗原を作製し、毒性が高い 11-oxoTTX を含む、様々な TTX 関連成分に反応する新規の抗 TTX ポリクローナル抗体を開発した。さらにこれを用いて組み立てた ELISA キットが TTX、4-epiTTX、11-oxoTTX および 5,6,11-trideoxyTTX などの TTX 関連成分を特異的に検出できることを確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Suzuka Takaishi, Ko Yasumoto, Atsushi Kobiyama and shigeru Sato (2017) Haptenic properties of tetrodotoxin conjugated to carrier proteins by using dithiol reagents. Proceedings in: International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, No. 11001.

http://www.jsfs.jp/office/annual_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html

2) Md Shaheed Reza, Atsushi Kobiyama, Toshiaki Kudo, Janaira Rashid, Kazuho Ikeo, Yuri Ikeda, Yuichiro Yamada, Daisuke Ikeda, Nanami Mizusawa, Shigeru Sato, Takehiko Ogata, Mitsuru Jimbo, Shinnosuke Kaga, Shiho Watanabe, Kimiaki Naiki, Yoshimasa Kaga, Satoshi Segawa, Katsuhiko Mineda, Vladimir Bajic, Takashi Gojibori and Shugo Watabe (2017) The implication of the datasets obtained from periodic surveys on the microbial community by

metagenomic analysis in evaluating the marine ecosystem. Proceedings in: International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, No.08002.

http://www.jsfs.jp/office/annual_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html

3) Shugo Watabe, Md Shaheed Reza, Atsushi Kobiyama, Kazuho Ikeo, Jonaira Rashid, Yuri Ikeda, Yuichiro Yamada, Daisuke Ikeda, Nanami Mizusawa, Shigeru Sato, Takehiko Ogata, Mitsuru Jimbo, Toshiaki Kudo, Shinnosuke Kaga, Shiho Watanabe, Kimiaki Naiki, Yoshimasa Kaga, Satoshi Segawa, Katsuhiko Mineta, Vladimir Bajic and Takashi Gojibori (2017) Periodic survey by metagenomic analysis on the marine microbial communities in an enclosed bay locating at Sanriku coast off northern Japan in the Pacific Ocean. Proceedings in: International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, No.08003.

http://www.jsfs.jp/office/annual_meeting/meeting-program/85th/proceeding/proceedings.html

2. 著書・総説

なし

3. 学会発表

高石鈴香・小杉英信・安元 剛・小檜山篤志・佐藤 繁 (2017) 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講演要旨集 p 113, 口頭発表.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

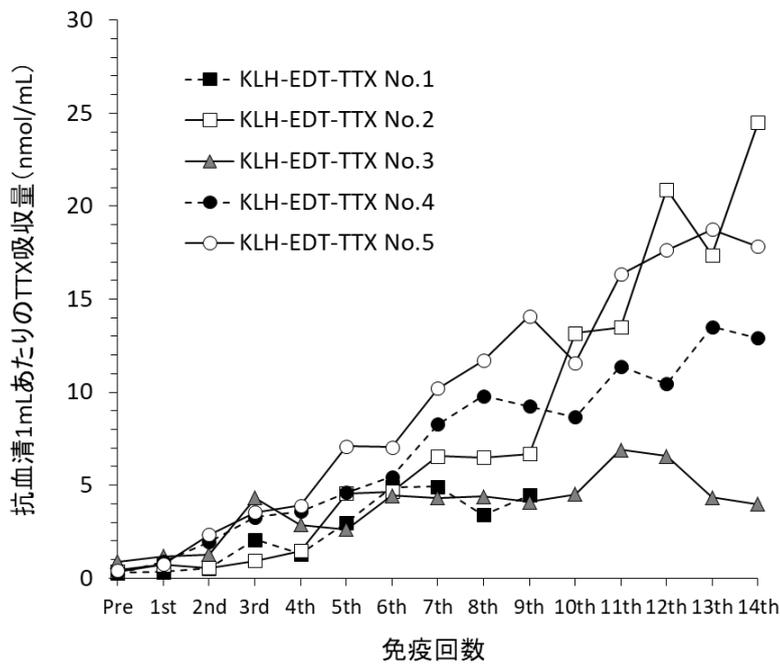


図 1 KLH-EDT-TTX を免疫したウサギの血清の抗体価の推移

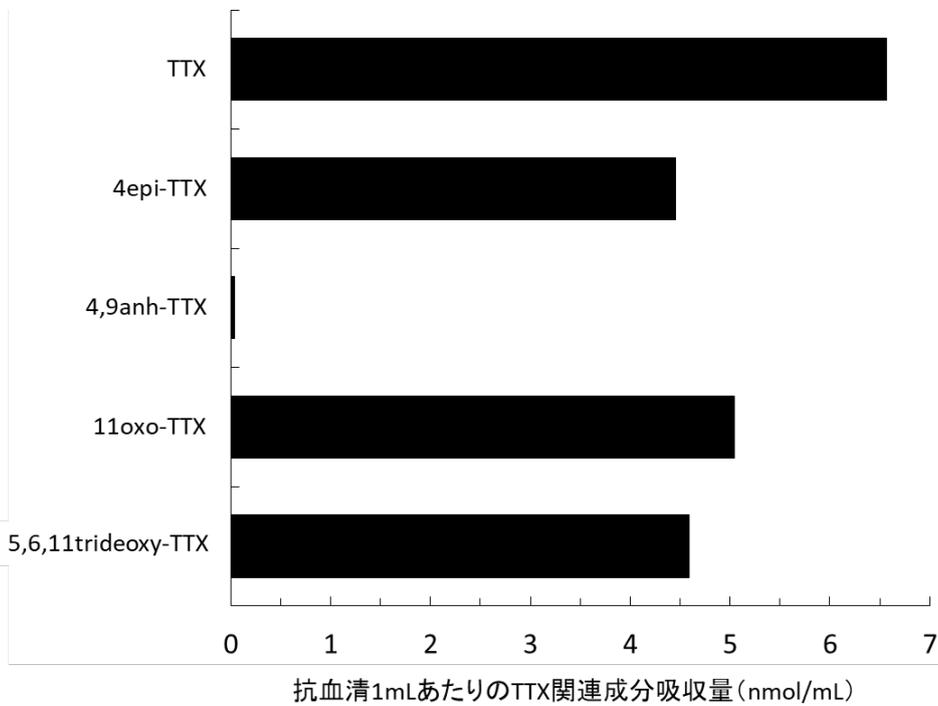


図 2 TTX 関連成分の抗血清(KLH-EDT-TTX No.2, 14 週目)に対する親和性

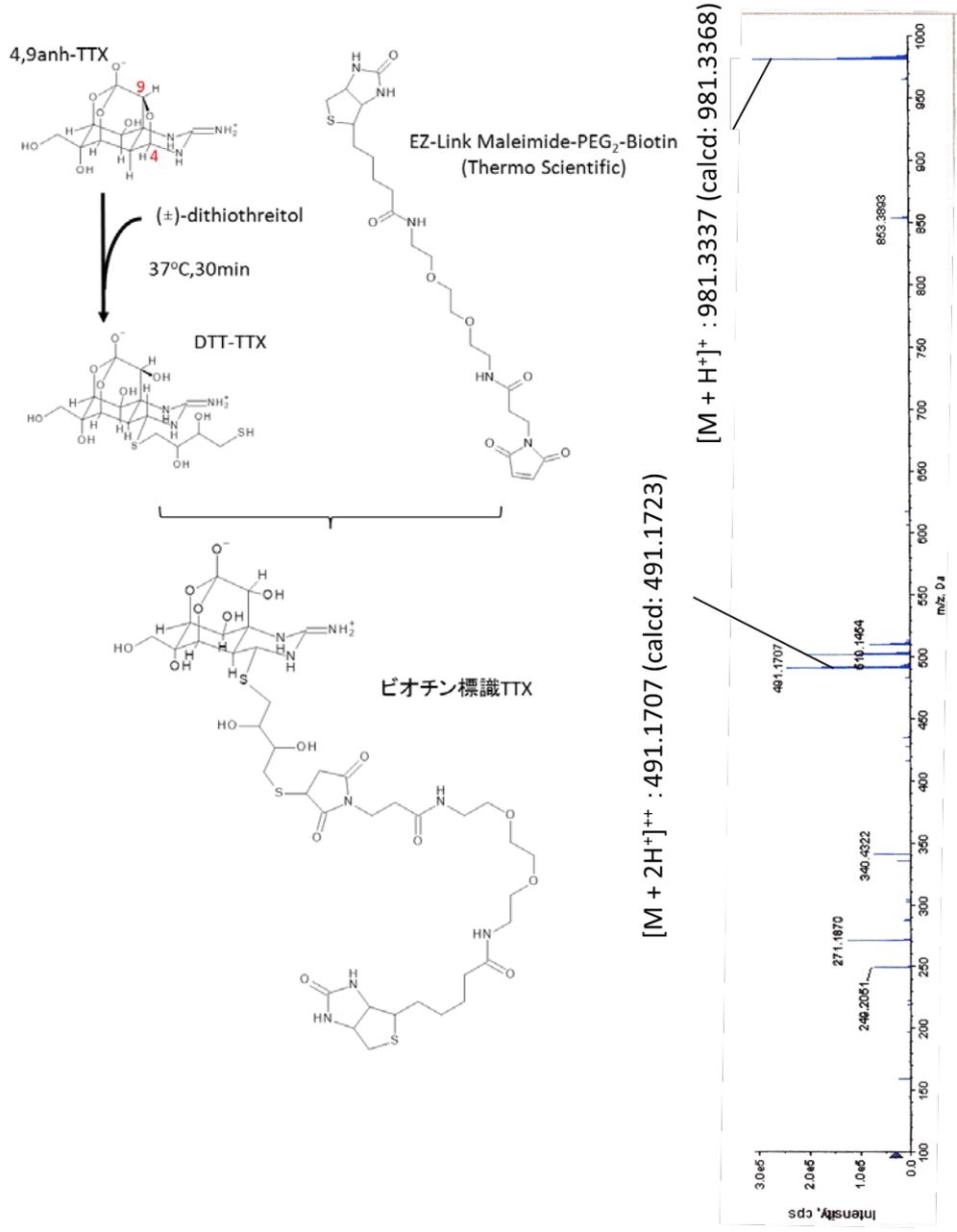


図3 ビオチン標識 TTX の調製法 (左) および TOFMS スペクトル (右)

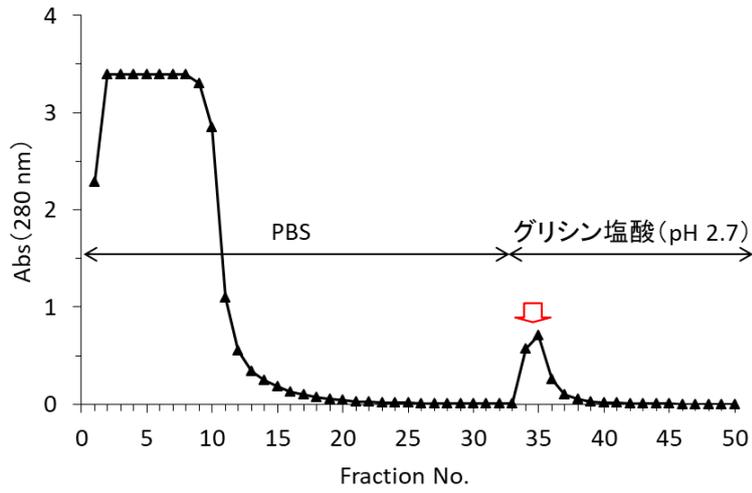


図4 TTX結合セファロースカラムによる特異抗体の精製

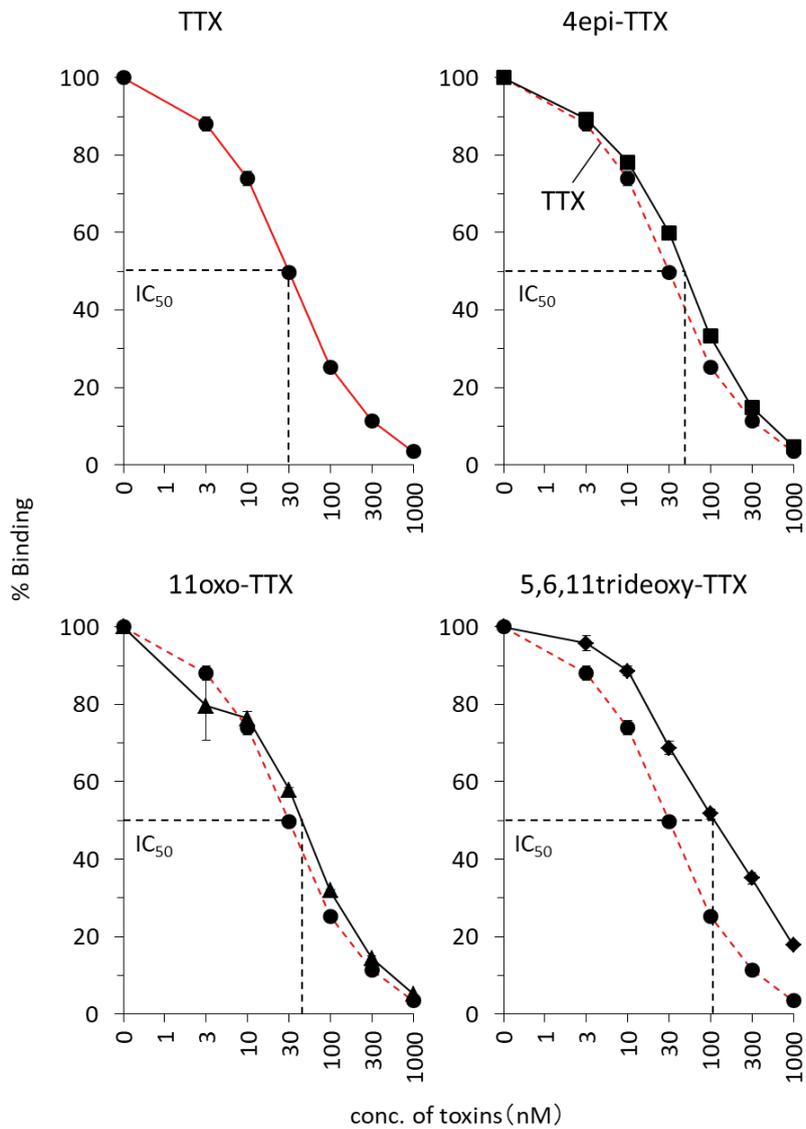


図5 試作キット上での TTX 関連成分各標品の分析

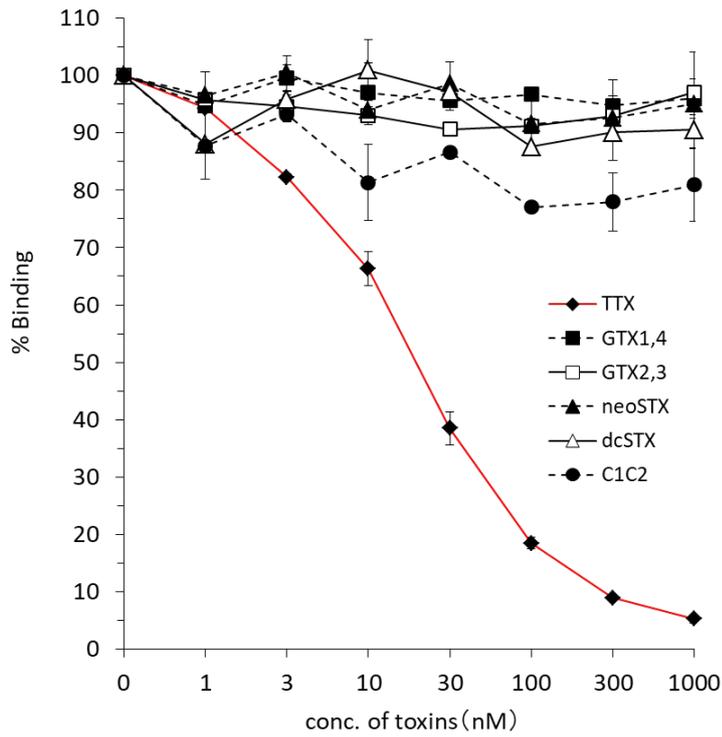


図6 試作キット上での麻痺性貝毒標品の分析

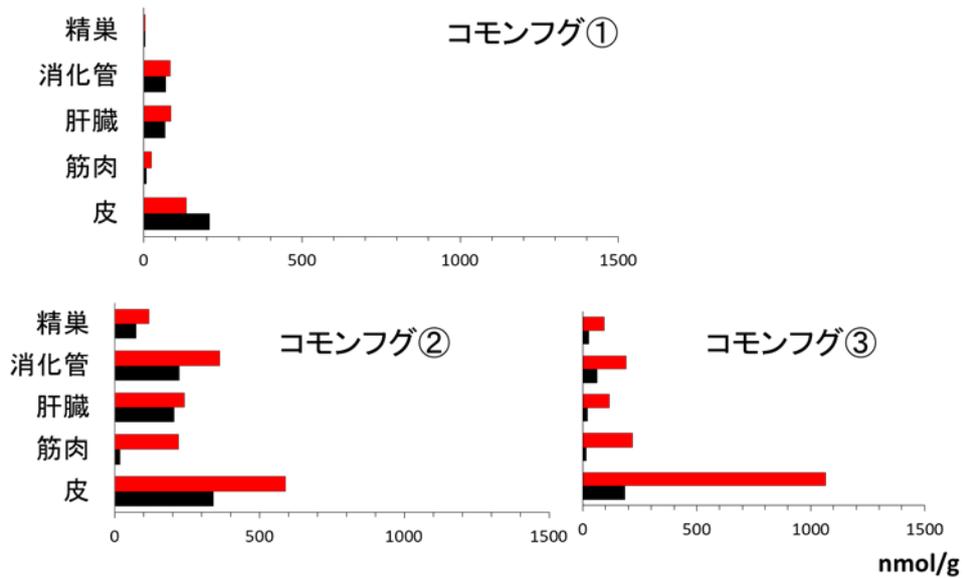


図7 コモンフグ各部位の毒含量(nmol/g)

赤 : ELISA 法、黒 : HPLC 蛍光法

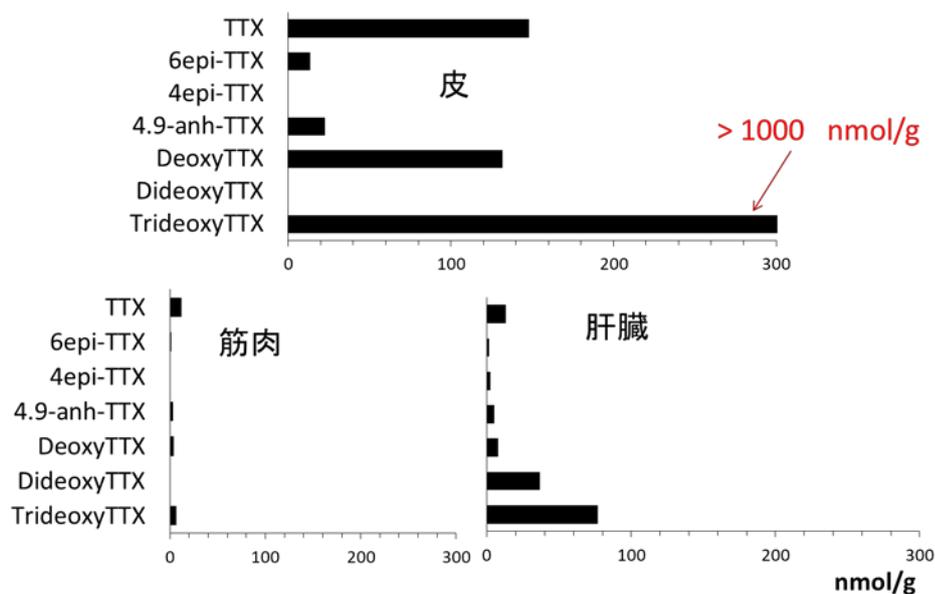


図 8 コモンブグ③の TTX 関連成分の LC-QTOFMS による分析

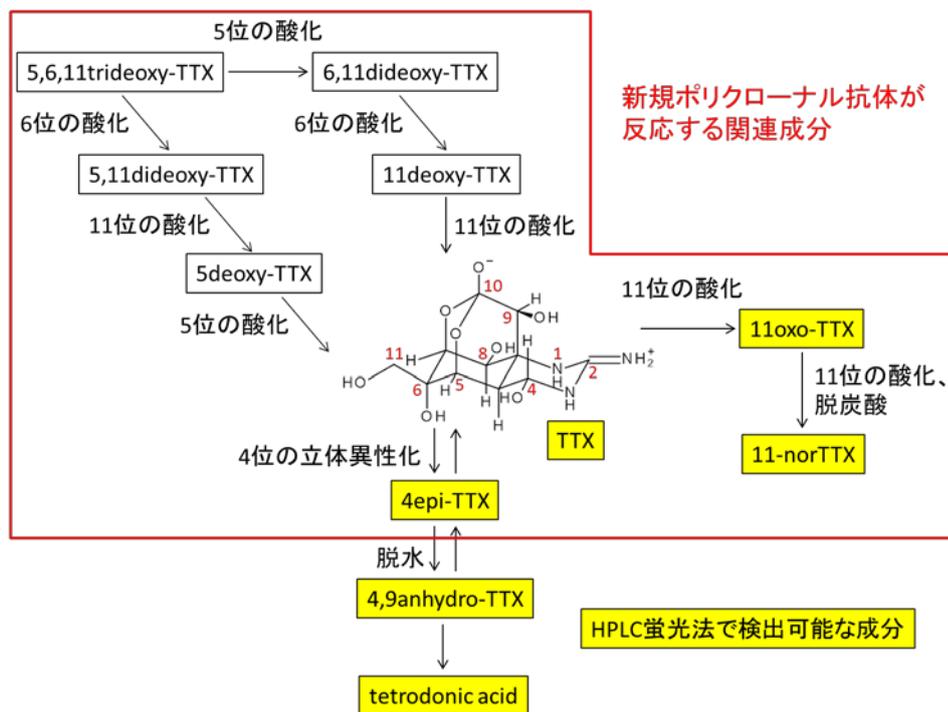


図 9 新規ポリクローナル抗体が反応すると考えられる TTX 関連成分 (赤枠内)