

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

デカルバモイルサキシトキシンによる麻痺性貝毒検査法の標準化

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	佐藤 繁	北里大学海洋生命科学部応用生物化学講座
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	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
研究協力者	中谷 実	青森県環境保健センター
研究協力者	柴田めぐみ	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
協力研究者	國吉 杏子	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

麻痺性貝毒はサキシトキシン(STX)とその関連成分の総称で、これまでに毒化貝や原因微細藻から 20 を超える関連成分が分離されている。STX は「化学兵器禁止法」に規定される特定物質であり、その製造、使用は著しく困難な状況にある。Codex 規格 (CODEX STAN 234-1999) では、STX 群の化学分析法の性能基準が設定され、麻痺性貝毒の毒性評価法として、マウス毒性試験法 (AOAC 959.08) とレセプターバインディング法 (AOAC 2011.27) がタイプIVとして示されている。いずれの方法も STX を比較標準物質として使用しているため、日本での導入は困難な状況にある。その代替標準毒として有望なデカルバモイルサキシトキシン (dcSTX) を大量調製し、わが国の麻痺性貝毒試験法の標準化について検討した。dcSTX の基準変換係数 (Conversion Factor、CF 値) を求め、定期的にマウスに投与し、実施者によるばらつきを検討したところ、STX、dcSTX とも大きなばらつきは無く、安定した CF 値が得られた。また、AOAC 959.08 法と dcSTX により有毒試料を分析した結果、同等の値が得られ、dcSTX が STX の代替として有効であることが示された。

A. 研究目的

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poisons, PSP) はサキシトキシン (STX) とその関連成分の総称である。これまでに毒化した貝や産生微細藻から 20 を超える関連成分が分離され、その構造が決定されている。STX は「化学兵器の開発、生産、貯蔵及び使用の禁止並びに廃棄に関する条約」(通称「化学兵器禁止条約」) の国内実施法である「化学兵器禁止法」(平成 7 年 4 月 5 日法律第 65 号) に規定される特定物質であり、その製造、使用は著しく困難な状況にある。

Codex 規格 (CODEX STAN 234-1999) では、STX 群の化学分析法の性能基準が設定され、麻

痺性貝毒の毒性評価法として、マウス毒性試験法 (AOAC 959.08) とレセプターバインディング法 (AOAC 2011.27) がタイプIVとして示されている。いずれの方法も STX を比較標準物質として使用しているため、日本での導入は困難な状況にある。

デカルバモイルサキシトキシン (dcSTX) は STX と同様、化学的に安定で比毒性が高く、STX の代替標準毒の第一候補とされているが、毒化貝や原因微細藻にはほとんど含まれておらず、その確保が急務となっている。現在のところ dcSTX は有毒ラン藻を培養して得られる C1、C2 を、数段階の反応を経て変換することにより調製され

ている (Watanabe et al., 2011)。この方法では、dcSTX のほか、ゴニオトキシン (GTX) 2、GTX3 および GTX5 などの様々な成分の HPLC 分析用標準毒が得られる反面、マウス毒性試験用などで必要となる dcSTX を多量に確保するには不向きである。我々は、日本沿岸で発生する PSP の主成分であり毒化した二枚貝から多量に確保できる GTX 群を出発物質とし、GTX 群が 2-メルカプトエタノール (ME) と塩基性条件下で安定な結合体を形成することを応用して (Sato et al., 2000)、高収率で大量の dcSTX を調製する方法を開発した (佐藤ら 2016、特開 2016-204270)。

また、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法が AOAC 959.08 の代替として使用可能か評価するために、同一施設、同一条件下で検討した。前年度は実施者を 1 名としたが、今年度は実施者 4 名で行った。

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) 試料

dcSTX は、(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 (以下、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、群の中に 19 g 未満のマウスがいる場合はその群すべて体重補正を行った。21 g 以上のマウスは使用していない。

2) 基準 CF 値の比較

基準 CF 値とは通常試験をチェックする際の標準点となるもので、この値を用いて STX 換算値を算出する。AOAC 959.08 に準じて、STX および dcSTX について以下のようにして基準 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 3 mmol/L 塩酸を使用した。各濃

度について 10 匹のマウス群に 1 mL ずつ腹腔内投与し、体重・致死時間を測定し、その中央値から 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 (dcSTX の場合は STX 二塩酸塩に換算した濃度、以下 FDA-STX $\mu\text{g/mL}$) を、求めた毒力 (MU/mL) で割って CF 値 (dcSTX の場合は STX 二塩酸塩に換算した毒力、以下 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 匹のマウス群に投与し、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 匹のマウス群に投与し、同様に CF 値を求めた。

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。本試験は、昨年度と同一の投与者 1 名が実施した。

3) CF 値の変動確認

AOAC 959.08 ではマウス感受性変動等を確認するため、定期的に CF 値のチェックを行うこととなっている。それに準じて、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 5 匹のマウス群に投与した。

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) で割って CF 値 (FDA-STX $\mu\text{g/MU}$) を求め、その変動を確認した。

昨年度は 1 名で実施したが、今年度は投与者による変動を確認するため、昨年度と同一の投与者を含む 4 名で実施した。

4) 陽性管理試料の標準化毒値の比較

自家調製し値付けした陽性管理試料 (ホタテガイ有毒検体) 分析を 1 回/月分析し、その結果から求めた STX および dcSTX による基準 CF 値ならびに秦野研究所が実施している外部精度管理 (以下、外部精度管理法) における dcSTX を使用した基準 CF 値を掛けて STX 換算した標準化毒値を求め、値を比較した。

外部精度管理法における基準 CF 値は、秦野研究所のプロトコルに従い dcSTX により求めた。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 3 濃度調製した。①1 日で実施、②希釈液に水を使用、③各 10 匹のマウス群に投与し、計 30 匹から得られた 3 個の CF 値の平均値を基準 CF 値とする 3 点が当センターで実施している AOAC 959.08 と異なる点である。なお、実施日には STX についても 5 匹のマウス群に投与し CF 値を確認した。

陽性管理試料はホタテガイむき身全体の均質化試料であり、その 100 g に同量の 0.1 mol/L 塩酸を加え加熱抽出した上澄み液を試験原液とした。試験原液を 5 匹のマウス群に 1 mL ずつ腹腔内投与し、体重・致死時間を測定し、その中央値から Sommer の表を用いて溶液の毒力 (MU/mL) を求め、各基準 CF 値より STX 換算した標準化毒値を求めた。

C. 研究結果

1) 基準 CF 値の比較

STX および dcSTX で AOAC 959.08 に準じて基準 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、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。その結果、昨年度とほぼ同等の値であった。

2) 実施者の違いによる CF 値の変動

昨年度と同一の投与者を含む 4 名によるマウスアッセイから得られた CF 値の変動を表 2 に示す。dcSTX、STX とも、平成 29 年 11 月および平成 30 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、表 1 に示した基準 CF 値より若干高い値となった。

また、STX を使用した AOAC 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。本年度は 4 名で実施したため手技によりばらつきが大きくなることは想定されたが、dcSTX の CF 値は、基準 CF 値の $\pm 20\%$ (0.140 ~ 0.210 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$) 範囲内に収まった。一方、STX の CF 値は 1 月実施時に 5 匹投与で基準 CF 値の $\pm 20\%$ (0.150 ~ 0.225 $\mu\text{g/MU}$) 範囲内に収まらず、新たに CF 値を決定することとなった。

3) 陽性管理試料の標準化毒値の比較

自家製の陽性管理試料 (STX による値付け値: 639 μg STX 当量/kg) を 1 回/月分析し、その結果と 3 つの基準 CF 値から求めた標準化毒値 (STX 換算値) を比較した結果を表 3 に示す。dcSTX による基準 CF 値は、両者とも 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 つの方法で dcSTX により求めた基準 CF 値は近い値であったことから、STX 換算した標準化毒値はほぼ同等であった。STX 基準 CF 値による標準化毒値と比較すると、ほぼ同等であったが dcSTX により求めた標準化毒値のほうが若干低い値を示した。なお、外部精度管理法のマウスアッセイにおいては、19~21 g についても体重補正を行ったが、補正の有無で結果に影響はなかった。

D. 考察

基準 CF 値と 1 回/週で 11 週間実施した CF 値の平均は、STX で 0.201 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$ (基準 CF 値の 1.07 倍: 変動範囲 94.7 % - 120.7 %)、dcSTX で 0.185 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$ (基準 CF 値の 1.06 倍: 変動範囲 90.9 % - 118.9 %) であり、ともに基準 CF 値より高い傾向となった。これは接種者が 4 名で実施していることも一因として考えられたが、その変動係数は STX で 7.8 %、dcSTX で 8.8 % であり、複数人で実施してもばらつき無く使用できることが示唆された。

また、dcSTX の AOAC OM 959.08 により求めた基準 CF 値と外部精度管理法により求めた基準 CF 値はほぼ同等の値であった。dcSTX の基準 CF 値による標準化毒値は、STX の基準 CF 値による標準化毒値と比べると若干低い傾向はあるもののその値は値付け値 (639 μg STX 当量/kg) の 86.4 % ~ 105.2 % の値であった。

E. 結論

AOAC 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。今年度は昨年度と同様の試験を 4 名で実施し、複数人の投与者によるばらつき幅を検討したが、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。

Codex 規格における麻痺性貝毒の許容量は 800 μg STX 当量/kg である。有毒検体である自家製陽性管理試料を分析した結果、dcSTX による試験法

はAOAC 959.08と同等であることが示唆された。

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

中谷実・山本明美・工藤志保・増田幸保・木村淳子・大城直雅・鈴木達也・高坂典子（2017）麻痺性貝毒試験における代替標準品に係る比較試験. 第54回全国衛生化学技術協議会年会.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 AOAC 959.08 による STX と dcSTX の基準 CF 値比較 (平成 29 年度) (投与者 : A)

		STX				dcSTX			
溶液調製日	マウス 投与日	STX	中央	毒値の	CF 値	STX	中央	毒値の	CF 値
		濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	致死 時間	中央値 (MU/mL)		換算濃度 (FDA-STX $\mu\text{g/mL}$)	致死 時間	中央値 (MU/mL)	
2017/11/9	2017/11/9	0.312	5'48"	1.652	0.188	0.281	5'51"	1.636	0.171
2017/11/9	2017/11/9	0.322	5'25"	1.770	0.181	0.290	6'08"	1.568	0.184
2017/11/9	2017/11/10	0.312	5'33"	1.725	0.180	0.281	5'50"	1.640	0.171
2017/11/9	2017/11/10	0.322	5'59"	1.604	0.200	0.290	5'59"	1.604	0.180
2017/11/10	2017/11/10	0.312	5'28"	1.752	0.178	0.281	5'53"	1.628	0.172
2017/11/10	2017/11/10	0.322	6'00"	1.600	0.201	0.290	5'49"	1.646	0.176
基準 CF 値 (CF 値の平均値) ($\mu\text{g/MU}$)		0.188				0.175			

表2 マウスアッセイによる CF 値の変動 (平成 29 年度) (STX と dcSTX は同日投与)

			STX				dcSTX			
マウス 投与日	投 与 者	STX	中央	毒値の	CF 値	STX	中央	毒値の	CF 値	
		濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	致死 時間	中央値 (MU/mL)		換算濃度 (FDA-STX $\mu\text{g/mL}$)	致死 時間	中央値 (MU/mL)		(FDA-STX $\mu\text{g/MU}$)
1	2017/11/16	B	0.322	6'09"	1.564	0.205	0.290	6'14"	1.544	0.187
2	2018/1/11	C	0.312	5'43"	1.678	0.185	0.281	5'50"	1.640	0.171
3	2018/1/18	D	0.322		※	0.201	0.290	6'58"	1.395	0.207
4	2018/1/25	A	0.322	5'46"	1.664	0.193	0.281	6'46"	1.427	0.196
5	2018/2/1	C	0.322	5'32"	1.730	0.186	0.290	5'24"	1.776	0.163
6	2018/2/8	A	0.312	5'28"	1.752	0.178	0.290	5'57"	1.612	0.179
7	2018/2/15	D	0.312	6'47"	1.425	0.218	0.290	6'19"	1.524	0.190
8	2018/2/22	C	0.312	6'03"	1.588	0.196	0.281	6'20"	1.520	0.184
9	2018/3/1	A	0.312	7'06"	1.374	0.227	0.281	6'01"	1.596	0.176
10	2018/3/8	D	0.322	6'00"	1.600	0.201	0.281	7'17"	1.345	0.208
11	2018/3/15	C	0.322	6'00"	1.600	0.201	0.281	5'27"	1.758	0.159
12	2018/3/22	D	0.322	6'49"	1.419	0.226	0.281	6'51"	1.389	0.202
CF 値の平均値 ($\mu\text{g/MU}$)		0.201				0.185				
CF 値の標準偏差 ($\mu\text{g/MU}$)		0.016				0.016				
CF 値の室内変動 (%)		7.8				8.8				
最小 CF 値 ($\mu\text{g/MU}$)		0.178				0.159				
最大 CF 値 ($\mu\text{g/MU}$)		0.227				0.208				

※5 匹投与で基準 CF 値の $\pm 20\%$ (0.150 ~ 0.225 $\mu\text{g/MU}$) 範囲内に収まらず、AOAC 959.08 に従い CF 値を決定した。

表3 各基準CF値から求めたSTX換算標準化毒値の比較

				AOAC 959.08						外部精度管理法	
				STX			dcSTX			dcSTX	
マウス 投与日	投 与 者	中央 致死 時間	毒値の 中央値 MU/mL	基準	<参考> 当日	標準化	基準	<参考> 当日	標準化	基準	標準化
				CF値	CF値	毒値	CF値	CF値	毒値	CF値	CF値
				μg/MU	μg/MU	STX μg/kg	FDA- STX μg/MU	FDA- STX μg/MU	FDA-STX μg/kg	FDA- STX μg/MU	FDA-STX μg/kg
2017/1/12	A	5'56"	1.616	0.185	0.172	597	0.171	0.198	552	0.180	581
2017/2/9	A	5'41"	1.686	0.185	0.187	623	0.171	0.167	576	0.180	606
2017/3/9	A	5'47"	1.658	0.185	0.221	613	0.171	0.171	567	0.180	596
2017/11/16	B	5'27"	1.758	0.188	0.205	661	0.175	0.187	615	0.173	608
2018/1/11	C	5'00"	1.920	0.188	0.185	721	0.175	0.171	672	0.173	664
2018/2/8	A	5'55"	1.620	0.201	0.178	651	0.175	0.179	567	0.173	560
2018/3/8	D	5'31"	1.735	0.201	0.201	697	0.175	0.208	607	0.173	600
標準化毒値の平均値 (STX μg/kg)				652			594			602	
標準化毒値の標準偏差 (STX μg/kg)				45			41			32	
標準化毒値の室内変動 (%)				6.9			7.0			5.3	
最小値 (μg/MU)				597			552			560	
最大値 (μg/MU)				721			672			664	

秦野研究所実施 外部精度管理

2016/10/20 実施 投与者：D 基準CF値：0.180 FDA-STXμg/MU (同日実施STXのCF値：0.185μg/MU)

2017/10/19 実施 投与者：C 基準CF値：0.173 FDA-STXμg/MU (同日実施STXのCF値：0.175μg/MU)

※標準化毒値は基準CF値を用いて算出した。当日のCF値は参考として示した。