

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
（分担）研究報告書

食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
－国際動向を踏まえた麻痺性貝毒の機器分析法の確立－

研究分担者 土方悠希 愛知県衛生研究所 医動物研究室 主任
研究協力者 長谷川晶子 愛知県衛生研究所 医動物研究室 室長

要旨：麻痺性貝毒（Paralytic Shellfish Toxins、PSTs）は、Saxitoxin（STX）を基本骨格として C トキシンやゴニオトキシン（GTX）など約 70 種類の類縁体が知られている。近年 M-toxin と呼ばれる 11-hydroxy STX 類縁体が PST 代謝物として報告され、現在、M1～M12 の 12 種類が提唱されている。しかし、M-toxin 類は毒性や含有量が明らかになっていない現状にある。プランクトンの種類や貝種によって蓄積する M-toxin の種類が異なるが、愛知県のアサリは C1 および C2 の代謝物である M1 や M3 を含有している。

本研究では、M-toxin 類の毒性を明らかにすることを目的としている。今年度は、Neuro2A 細胞を用いたアッセイ法に供する M1 を得るため、アサリからの M1 の精製技術を確立した。

また、アッセイ法の最適化をテトロドトキシン（TTX）、decarbamoyl STX（dcSTX）、neoSTX を用いて行った。最適化された条件下において、不斉全合成された M2 について毒性評価を実施したところ、他麻痺性貝毒成分と同様、電位依存性 Na⁺チャネル阻害作用があることを確認した。

今後、確立した精製法による M1 の単離を行い、毒性評価を実施する。また、単離や不斉全合成によって得られた M1 以外の M-toxin 類について毒性を明らかにしていく予定である。

A. 研究目的

麻痺性貝毒（Paralytic Shellfish toxins, 以下 PSTs）は、*Alexandrium* 属などの有毒渦鞭毛藻が主に産生する強力な神経毒であり、プランクトンフィーダーである二枚貝の毒化の原因となっている。また、一部のカニなどの甲殻類が毒化することも確認されており、食物連鎖によって移行するものと考えられている。

PSTs は、Saxitoxin（STX）を基本骨格として C トキシンやゴニオトキシン（GTX）などを代表成分とし、その decarbamoyl 体なども含め約 70 種類の類縁体が知られている。さらに、近年では、M-toxin と呼ばれる 11-hydroxy STX 類縁体が PSTs 代謝物として報告され、Quilliam らによって M1～M12 の 12 種類が提唱されている。しかし、M-toxin 類

は、毒性や含有量が明らかになっていない現状がある。

我が国の食品衛生法における公定法は、マウス毒性試験法 (Mouse Bioassay, MBA) が採用されており、規制値が 4 MU/g に定められている。現在、HPLC や LC-MS/MS を用いた機器分析法による代替法の検討がなされているが、いくつかの課題が存在する。

例としては、STX が化学兵器禁止法において特定物質に指定されているため標準品の確保が容易でないこと、M-toxin 類を含む PSTs 類縁体の標準品が発売されていないため定性および定量が出来ないこと、またその毒性が不明であることなどが挙げられる。

麻痺性貝毒に毒化した二枚貝(ホタテガイやアカザラガイなど)について、マウス毒性試験による毒力と LC-MS/MS から得られた毒値 (測定対象成分: C1, C2, GTX1~6, STX, TTX) から換算した毒力とが、一部乖離する結果となった (令和4年度 本事業成果、渡邊ら)。また、分担者らは、愛知県のアサリにおいて、主要成分の C トキシンに加えて、その代謝物である M1 が蓄積していることを確認した。また、毒力を考察したところ、高濃度に蓄積した M1 が毒力に寄与し、出荷規制値 4 MU/g を超過させる可能性を報告している (土方ら、愛知県衛生研究所所報 2022)。このことより、試料中に含まれる M-toxin 類が、他の PSTs 成分と同様に毒力を有する可能性が示唆されている。LC-MS/MS で M-toxin 類を未測定とした場合、試料中の毒力を大幅に過小評価し、食の安全性が

担保できない可能性がある。よって、M-toxin 類の構造確認や毒性評価、二枚貝中における定性および定量が重要となる。

以上の背景から、本研究では、M-toxin 類の毒性を明らかにすることを目的としている。今年度は、Neuro2A 細胞を用いたアッセイ法に供する M1 を得るため、アサリから M1 の精製技術を確立することとした。また、アッセイ法の最適化をフグ毒テトロドトキシン (TTX, Tetrodotoxin)、decarbamoyl STX (dcSTX)、neoSTX を用いて行った。特定物質に指定されている STX は入手できないので、STX と同じ作用標的を持ち、毒性が同程度である TTX を代替 STX として用いた。TTX における細胞毒性値は複数報告されており、手法の最適化を行う上で良い基準物質となる。最適化された条件下において、長澤らによって不斉全合成された M2 の毒性評価を実施した。

B. 研究方法

(1) M-toxin 類の単離技術の確立

Numano S., Yotsu-Yamashita M. *et al.*, *chemosphere*, 2021 を基にし、一部改良した方法とした。精製の原料は、愛知県で麻痺性貝毒に毒化したアサリ可食部全体 (むき身全体) とした。まず、アサリの希塩酸抽出液を活性炭に通過させ、限外ろ過を行い粗抽出液を得た。次に、ゲル濾過のカラムに粗抽出液を通し、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) である TSKgel amide80 で精製をした。

(2) 毒性評価法の最適化および M2 の

毒性評価

Na⁺チャネル阻害活性の確認を目的とした細胞毒性試験を実施するにあたり、Neuro2A アッセイを行った。

まず、マウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞株及び実験培地の選択、試薬 (Ouabain および Veratridine) の混合比及びその反応時間について試験条件の最適化の検討をした。検討用の試験液として TTX、neoSTX および dcSTX を用いた。

次に、最適化した条件において、東京農工大学の長澤教授らによって不斉全合成された M2 を Neuro2A アッセイで評価した。

C. 研究結果と考察

(1) M-toxin 類の単離技術の確立

方法に従って、アサリから M1 の単離および精製を行ったところ、TSKgel-amide80 の最終精製後にアミノ酸の溶出が認められた。LC-MS/MS による解析の結果、アミノ酸はアルギニンであると判明した。そこで、M1 およびアルギニンを含む検液を、別の HILIC カラムに通すことで分離に成功した。

次年度以降、確立した精製条件を用いて、毒性評価用の M1 の精製を行う予定である。

(2) 毒性評価法の最適化および M2 の毒性評価

Neuro2A の細胞株選定では、2つの株を対象とした。複数回試験をした際のデータの安定性、継代した際の細胞増殖能を比較し、細胞株を決定した。

毒性試験には RPMI 培地を使用し、細胞内に Na⁺流入を活性化する試薬 (Ouabain および Veratridine) の混合比を変更し、TTX を参照試薬として毒性評価条件を検討した。試薬については、Veratridine と比較して Ouabain のほうが、濃度に対する細胞毒性の影響が大きいため、Veratridine の濃度を一定とし、添加する Ouabain の濃度を 1.0~5.0mM で変更した複数の試薬混合比において試験を実施し、条件の最適化を行った。TTX の 50% 効果濃度 (EC₅₀) は 2.50 ± 0.31 nM であった。Yotsu-Yamashita M. *et al.*, *Toxicon*, 2003 において TTX の EC₅₀ は 4.60 ± 0.70 nM と報告されており、近い値が得られたため最適化ができたと考えられた。同条件において、NeoSTX 及び dcSTX について毒性評価を行ったところ、それぞれの EC₅₀ は 3.10 ± 0.43 nM と 22.39 ± 3.37 nM であり、PSTs 成分について毒性評価を出来ることを確認した。

M-toxin 類のうち、GTX2&3 の代謝物と提唱されている M2 についての細胞毒性を評価したところ、EC₅₀ 値が 139.27 ± 36.68 nM であり、TTX や neoSTX、dcSTX の毒力よりも低かったが、電位依存性 Na⁺チャネル阻害作用を有する成分であることを確認した。(Fig.1)

D. 結論

令和 6 年度の研究では、アサリからの M1 の単離技術の確立を行った。細胞毒性試験による M-toxin 類の毒性評価を行うため、TTX 等成分を用いた試

験条件の検討を行い、最適化を行った。

合成M2標準品について、検討した試験条件で毒性評価を行い、他のPSTs成分と同様に、電位依存性Na⁺チャネル阻害作用による毒性があることを確認した。今後、当事業で単離及び合成したM-toxin類を用いて毒性評価を行う予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

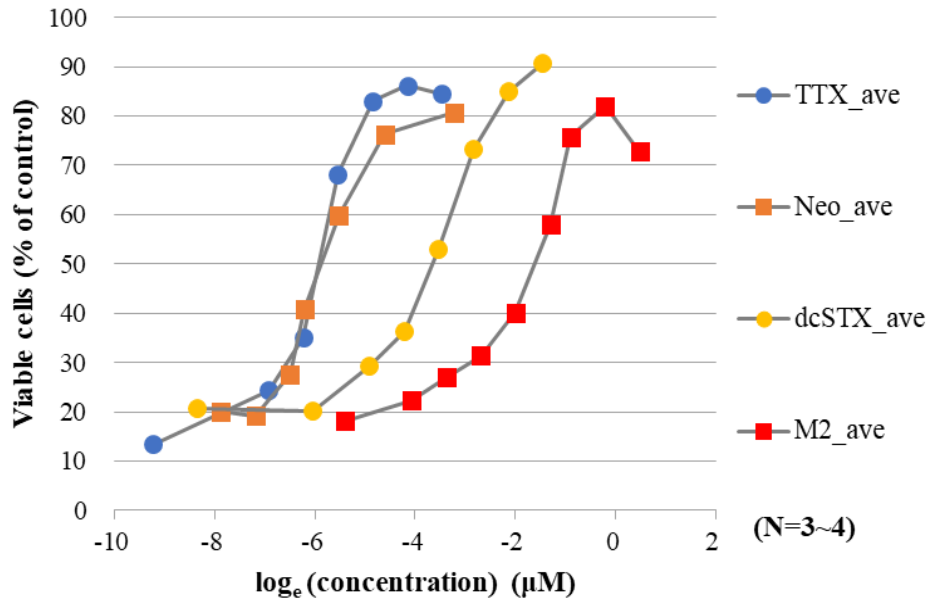
土方悠希、長谷川晶子、沼野 聡、渡邊龍一、小澤眞由、内田肇、松嶋良次、鈴

木敏之、安井善宏、愛知県産アサリにおける M-toxins の蓄積時期と PSTs 成分との関連性、第 61 回全国衛生化学技術協議会年会 (2024、大阪)

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

a)



b)

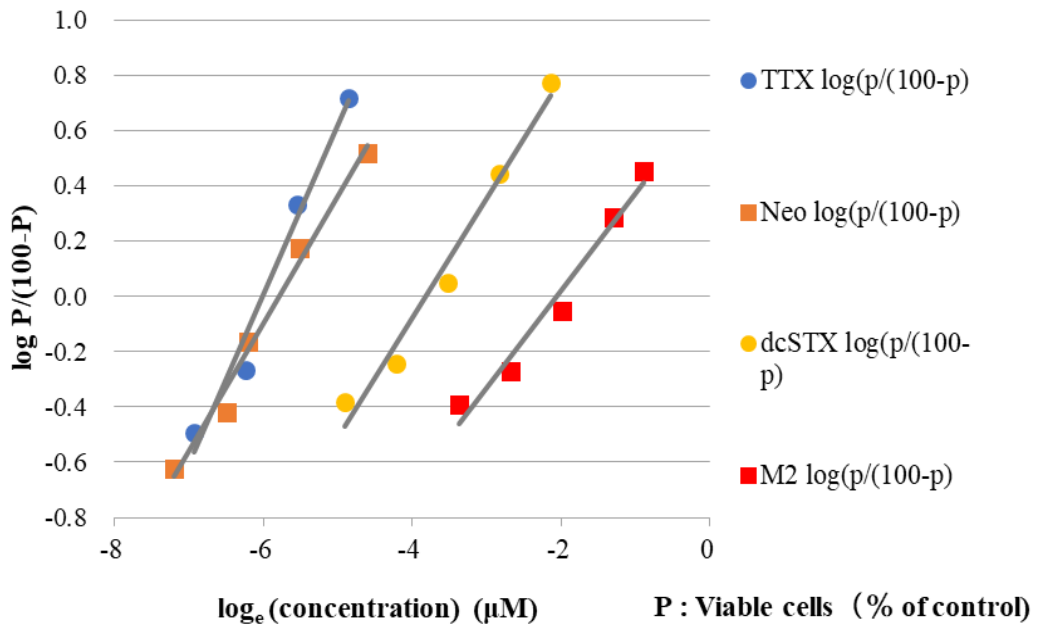


Fig.1 Neuro2A アッセイから得られたシグモイド曲線

a) Viable cells (% of control), b) Hill plot of log_e p/(100-p)