

下関のふく通信 No. 11

発行：下関のふく共同研究機関

## その十一 フグ毒の測り方

### 1. はじめに

フグ毒中毒の原因物質はテトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX) と呼ばれる毒物質です。フグ以外にも魚類や貝類などの海の生き物は様々な毒をもっており、これらの魚介毒は海洋自然毒と呼ばれています。海洋自然毒を含む水産食品の取り扱い、食品衛生法第6条第2号の規定に基づき規制されています。フグについては厚生労働省によって「処理などにより人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類及び可食部位」が定められており、有毒なフグを食用とするための基準が示されています。しかし、フグ毒は国内において毎年何件かの中毒例が報告され、死亡例も多い致死率の高い食中毒原因物質です。食中毒事例が発生した場合は、その原因物質の同定と含量の測定が必要であることからフグ毒を測定するための分析法の開発は重要な研究課題となっています。国内では、フグ毒をはじめとするほとんどの魚介毒の測定には生きたマウス (ネズミ) に毒を与えてマウスが死ぬまでの時間から毒の量を推定する方法 (マウス毒性試験法) が用いられてきました。そのため、マウスに対する致死力の強さで毒性を表し、「マウスユニット (MU)」と呼ばれる単位が使われています。しかし、近年、動物愛護に加えて、高特異性、高感度、迅速化を目指した新たな分析法の開発が進み、マウス毒性試験法からの脱却が急速に進んでいます。フグ毒の分析法としては、液体クロマトグラフィーや質量分析器などを利用した機器分析法や培養細胞を利用した細胞毒性試験法、フグ毒の抗体を利用した ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) 法などの実用化が進められています (表1)。そこで本稿では、細胞毒性試験法を中心にマウス毒性試験法を含めたこれらフグ毒測定方法の概要について紹介します。

表1 フグ毒測定方法と定量下限値の比較

測定方法	定量下限値
マウス毒性試験法	5.0 MU/g (1.1 $\mu$ g TTX/g)
機器分析法 (LC-MS/MS 法)	0.05~2.27 MU/g (0.01~0.5 $\mu$ g TTX/g)
細胞毒性試験法	1.36 MU/g (0.3 $\mu$ g TTX/g)
ELISA 法	1.0 MU/g (0.2 $\mu$ g TTX/g)

## 2. マウス毒性試験法

マウス毒性試験法は、毒の有無を知りたいフグの魚肉部位から酢酸水溶液中で加熱しながら毒抽出液を作製し、その抽出液をマウスの腹腔内に注射し、マウスが死亡するまでにかかった時間から毒の量を求めます。体重 20g のマウスを 30 分間で死亡させる毒量を 1 マウスユニット (1MU) と定義し、フグ組織 1g 当たり 10MU を超えるものは食用不適とされています。マウスユニットをフグ毒の原因物質である TTX の重量に換算すると、10MU は  $2.2 \mu\text{g}$  程度になります。マウス毒性試験法の検出限界 (測定可能な最小量) は  $5\text{MU/g}$  ( $1.1 \mu\text{g/g}$ ) です。検査のためのマウスの入手や維持管理などの面から中毒時の迅速な対応が困難な場合があり、検出感度や結果の再現性、動物愛護の観点等から様々な課題が生じています。このようなことから、近年、欧米を中心に動物実験廃止の動きがあり、国内でも機器分析法や細胞毒性試験法、ELISA 法など代替法の開発が検討されています。

## 3. 機器分析法

機器分析法は、高額な機械を使って実際の毒物質の量を測定する方法です。使用する機械によって測定原理が異なります。詳しい説明は省きますが、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を利用した HPLC-蛍光検出法や高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた方法などが開発され、汎用されています。機器分析法による TTX の定量限界は  $0.01 \sim 0.5 \mu\text{g/g}$  との報告例があり、測定結果とマウス毒性試験法の結果はよく一致することが示されています。分析機器の技術開発によって、今後も感度や分析精度の向上が期待されています。

## 4. 細胞毒性試験法

細胞毒性試験法は、生きた培養細胞 (ネズミなどの動物から採取された細胞を実験室内で増えるようにした細胞) を使ってその細胞が死滅する割合から毒の量を推定する方法です。TTX は、細胞のナトリウムチャンネル (細胞膜に存在し、細胞内へナトリウムイオンを選択的に流入させる働きを持つ小さな孔構造を形成するタンパク質) の働きを選択的に阻害する神経毒であることが知られていることから、培養細胞のナトリウムチャンネル阻害を指標にしたフグ毒解析技術が国内外で開発されています。アメリカ医薬品食品安全局 (FDA) によっても推奨されている分析方法であり、国内では愛知県衛生研究所などの研究報告例があります。毒性試験に使用する培養細胞はマウス神経芽細胞腫由来細胞 (Neuro2a) です。TTX は細胞内へのナトリウムの流入を阻害する作用をもちますが、同じナトリウムチャンネルに対してその反対の作用 (ナトリウムの流入

を促進する作用)を有する物質にベラトリジン (Veratridine) があります。ベラトリジンは、ユリ科植物から発見された物質です。ベラトリジンを Neuro2a 細胞に作用させると細胞のナトリウムチャンネルが開きナトリウムの過剰流入が起こるため細胞が死んでしまいます。そこに TTX が存在するとナトリウムの流入が阻害されるため細胞の生存率が上がります。TTX の量に依存して細胞の生存率が変化するため、濃度既知の TTX による細胞生存率から作成した標準曲線 (図 1 左: TTX 濃度と細胞生存率の関係を示した基準のグラフ) を用いて TTX の量を計算で求めることができます。細胞生存率は、生細胞の生理活性 (生きている細胞の数) を測定する試薬を添加し、反応液の色の濃淡を比較することで求められます (図 1)。

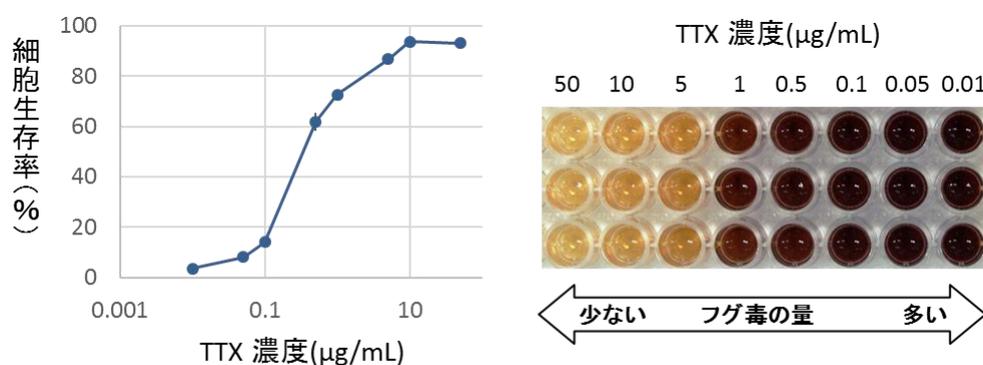


図1 細胞毒性試験法によるテトロドトキシンの検出例

## 5. ELISA 法

ELISA 法は、抗原抗体反応を利用した分析方法です。抗原抗体反応とは、生物が病気にならないための自己防衛反応のひとつです。体の外部から侵入した物質 (抗原) に対して、その物質に結合して排除するために体の中で作られるタンパク質が抗体です。抗原の種類によって決まった抗体が作られます。TTX を抗原として人工的に TTX に対する抗体を作製することができますので、この抗原 (TTX) と抗体の結合を利用して TTX の量を測定することができます。詳しい説明は省略しますが、抗原抗体反応の組み合わせによって直接法や間接法、サンドイッチ法、競合法等と呼ばれる方法があります。また、同様に抗原抗体反応を利用した検査法としてイムノクロマト法があります。TTX の検査キットとして ELISA 法を利用したキットやイムノクロマトキットなどが市販されています。非常に簡単な操作で1時間程度の短時間で TTX の検査が可能な点が長所となっていますが、国内で市販されているキットは輸入品に頼っており、入手するのに2ヵ月ほどを要し、購入価格が1キット当たり20~

25 万円程度と非常に高価な点が利用者にとって普及の妨げとなっています。国内の研究者によって TTX の抗体を利用したキットの開発が行われており、今後、安価なキットが利用可能になることを期待しています。

## 6. 水産大学校での取り組み

水産大学校では、Neuro2a 細胞を利用した細胞毒性試験法や ELISA 法によるキットを利用した方法によって TTX の検査ができる体制を構築しています。さらに、TTX をはじめ多くの海洋自然毒が細胞のナトリウムチャンネルを選択的に阻害する神経毒であることから、ナトリウムチャンネルを利用してこれら自然毒による機能阻害の分子メカニズムを明らかにする基礎研究が行われています。このような基礎研究は新たな TTX 検査方法の開発へと繋がり、これまで紹介してきた既存の検査方法に加えて、今後、新たな検査キットの開発が期待されます。

(水産大学校 池原 強)