

下関のふく通信 No. 20

発行：下関のふく共同研究機関

## その二十 簡易的なフグ毒測定手法の提案

### 1. はじめに

下関のふく通信 No. 11 では「フグ毒の測り方」というタイトルで①マウス毒性試験法「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」、②機器分析法「高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の精密な機械を使って微量な毒の量を測定する方法」、③細胞毒性試験法「生きた培養細胞（ネズミなどの動物から採取し、実験室内で増やした細胞）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」、④ELISA法「抗原抗体反応を利用した分析方法」について、それぞれの方法の概要を説明しました。今回は、これらの方法の中から簡易的なフグ毒測定方法として知られているELISA法の詳細をご説明します。

### 2. ELISA法とは

私たちの体の中には、外部から侵入した病原体やがん細胞など体の中の異物を攻撃する「免疫系」というシステムを持っています。抗原となる病原体が体に侵入するとそれに特異的に結合できる抗体ができます。抗体は抗原に結合することによって抗原の病原性を弱めることで体の防御を行います。この抗体が抗原に特異的に結合する仕組みを「抗原抗体反応」と呼んでいます。



図1. 抗原抗体反応

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) 法は、この抗原抗体反応を利用した分析手法です。フグ毒のテトロドトキシン (TTX) を抗原としてウサギやネズミなどの実験動物に注射すると、動物の体の中で TTX に対する抗体が

できます。この抗体と抗原となる TTX との結合を利用して TTX の量を測定することができます。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。現在、国内で購入できるフグ毒検査キットは、図 2 に示すように数種類ありますが、すべて海外からの輸入品に頼っており、入手するのに時間を要し、非常に高額な点が利用者にとって普及の妨げとなっています。今回は、その市販のフグ毒検査キットの仕組みと操作について紹介します。



図 2. 市販の ELISA キット

### 3. ELISA キットの仕組みと操作手順

ELISA キットの反応は、マイクロウェルプレート（図 3 A）と呼ばれる実験器具を使用して行います。マイクロウェルプレートは、多数のウェルと呼ばれるくぼみのついたプレートで、ウェルの数は、6、12、24、96、384 などがあり、実験の用途によって使い分けます。フグ毒の ELISA キットでは 96 ウェルプレートが使われています。マイクロウェルプレートによる反応結果は、反応液の発色の濃淡の違いとして表れ、マイクロプレートリーダー（図 3 B）と呼ばれる測定機器を利用してその発色の違いを数値化します。



図 3. A. マイクロウェルプレート      B. マイクロプレートリーダー

以下に ELISA キットの操作手順（図 4）を説明します。

<操作手順>

- 手順 1. マイクロウェルプレートウェル中に試料と酵素標識抗体を加え反応させます。この時、酵素標識抗体は試料中の TTX またはウェルの底に予めコーティングされた TTX と結合します。酵素標識抗体とは、発色基質と反応して発色するように、酵素を結合させた抗体です。
- 手順 2. ウェル中の反応液を吸い出し、洗浄液を加え洗います。この時、ウェルに吸着された TTX と結合した抗体だけウェル中に残り、それ以外は洗い出されます。
- 手順 3. 発色基質を加え酵素反応によって発色させます。この時、発色の濃淡がウェル中に残った酵素の量、つまり試料中の TTX の量になります。
- 手順 4. マイクロプレートリーダーで発色の濃淡を読み取ります。

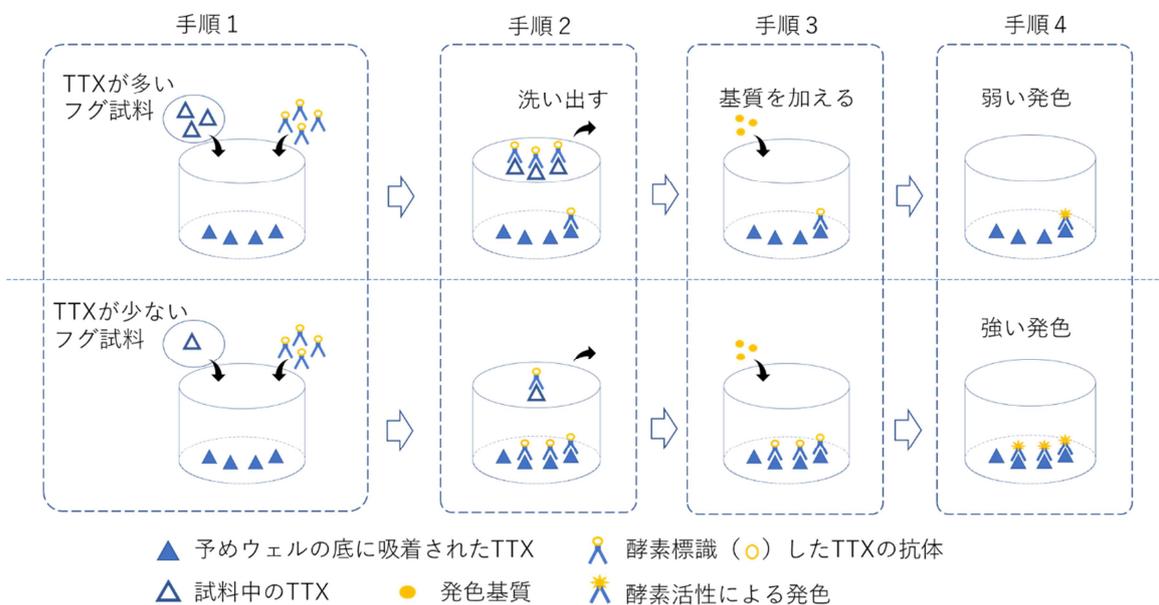


図 4. ELISA キットの操作手順と原理

試料中の TTX の量によって反応液の発色の濃淡が変化するため、濃度既知の TTX による標準液から作成した標準曲線 (図 5 左: TTX 濃度と吸光度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。図 5 において、 $B$  は各濃度の標準液の吸光度 (試料が吸収した光の量)、 $B_0$  は TTX  $0 \mu\text{g/mL}$  の標準液の吸光度を表しています。

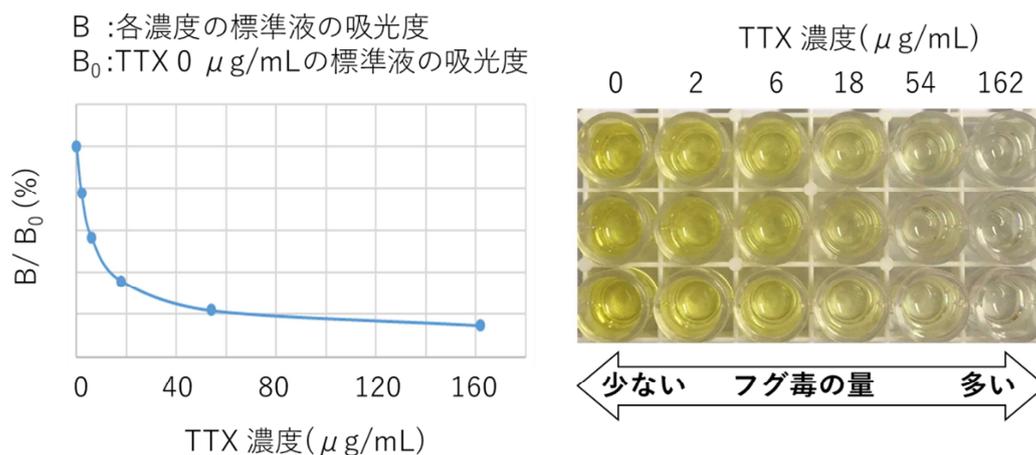


図5. ELISA キットによる TTX の検出例

#### 4. 水産大学校での取り組み

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、消費者の安全が確保されています。しかし、食中毒が発生した場合、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の測定のための優れた分析法の開発が必要とされています。そのため、水産大学校では、Neuro2a 細胞を利用した細胞毒性試験法、TTX 抗体を利用した ELISA 法やイムノクロマトキットを利用した方法等、複数の分析法によって迅速にフグ毒の検査ができる体制を構築しています。しかし、ELISA キットやイムノクロマトキットはその供給を海外製品に依存しているため、価格や品質、分析精度等多くの課題があります。そこで、水産大学校では、これらの課題を解決するために新たな簡易的な TTX 分析法の開発に取り組んでいます。今後、国内産の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)



受賞しました！！

水産大学校水産学研究科 修士課程2年生の高岡 佑多さんが、1月10日、島根県の松江で開催された日本知能情報ファジィ学会中国・四国支部大会で中国・四国支部奨励賞を受賞しました。高岡さんに、研究のこと、将来のことを伺いました。詳しい研究の内容は改めてふくニュースで取り上げるとして、まずは伺った話をお伝えします。

写真 表彰状を持つ高岡 佑多さん

**\*おめでとうございます。大会ではどのようなことを発表したのですか**  
「ありがとうございます。」

熟練の仲卸に勤務するふぐ処理師に協力を依頼し、トラフグ、マフグ、ヒガンフグなど、7種類のフグの身欠きを作ってもらいました。その冷蔵品の0時間（競りから3時間）、24時間後、48時間後、72時間後のK値（鮮度の指標）と色彩の変化を測定し、魚種ごとのK値と色彩変化速度の関係を表すモデルを作成し、身欠きとなった魚種と鮮度を明らかにするモデルを作り、その結果を発表しました。」

**\*鮮度が変化する速度は魚種によって違うのですか？**

「種類によってというより、扱いの違いが出ているように思います。トラフグのように高級な種類は丁寧に扱われているので、そもそものスタート時点のK値が低いのです。ところが、安価で刺身というよりは唐揚げや鍋で食べることの多いシロサバフグなどではどうしても扱いが粗くなり、高い値をとるようです。」



**\*ところで、実験で使ったふぐのその後は？**

「(ずばり) いただきます。刺身で。K値で20ぐらいまでなら刺身で十分美味しいです。72時間でも20を超えることはあまりないのです。」

**\*実験でいろいろなふぐを使われていますが、どのふぐが美味しかったですか？**

「やはり、トラフグです。でも、もう一生分のトラフグを食べてしまった感じですよ」

（なんとうらやましい！！後で彼の書いた論文の一部を見せてもらいましたが、トラフグを天然と養殖併せて180尾、他の種類もそれぞれ90尾を実験で使ったとのこと。「一生分」というのも領けます）

**\*3月で卒業ですが、その後の予定は？**

「海に橋をかけたり、港をつくったりする建築会社の研究所に就職が決まっています。海と関係する仕事です。横浜に住む予定です」

（福岡出身の高岡さんは、はじめて一人暮らしをするそうです。研究対象はこれまでのフグとはちがいますが、ものの見方、データのとり方、報告のまとめ方など、これまで勉強してきたことを活かして頑張りたいと思います。）