

# 貝毒発生監視調査事業

増養殖環境課 鈴木 怜

## 1 はじめに

麻痺性貝毒とは、アサリやカキ、ヒオウギガイ等の二枚貝類が、強力な神経毒を有する渦鞭毛藻類を摂餌し、これらの毒が体内、特に中腸線に蓄積して毒化する現象である。原因種としては、*Gymnodinium catenatum*や*Alexandrium*属等が知られ、毒化した貝をヒトが食すると、30分程度で麻痺の中毒症状が現れ、最悪の場合死に至ることがある。高知県内では、平成13～15年にかけて野見湾で、平成22～24年にかけて宿毛湾で規制値を超える麻痺性貝毒が検出され、出荷自主規制措置が講じられる等、水産業に大きな影響を及ぼしている。

現在、貝毒検査は高知県衛生研究所において公定法であるマウスアッセイ法で実施されているが、安全性試験用の指定されたマウス（週齢、系統等）が必要、結果がでるまでに時間がかかる、分析コストが高い等の問題があり、検査海域を細かく設定する、原因種が多く出現した場合に臨時で検査をする等の漁業現場の実態に即した検査が困難な状況にある。加えて、世界的に動物試験に対する風当たりは強くなっており、EUでは下痢性貝毒の検査が化学的方法に変更されることが決まっている。

近年、迅速、高感度、安価なELISA法による麻痺性貝毒分析技術が実用化され、他府県ではすでにスクリーニングに用いるための試験が行われている。本法によるスクリーニングで、マウスアッセイ法検査にかかる労力と経費を軽減でき、また、より多くの監視定点を設定できる等モニタリング精度も向上すると考えられる。しかし、麻痺性貝毒は20以上からなる複合毒であり、各成分によって毒力は100倍以上も異なる<sup>1)</sup>。ELISA法では、毒力ではなく毒の総濃度を測定するため、毒の成分によっては過大評価又は過小評価をまねくことになる。また、毒の組成は毒化原因となるプランクトンの多様性を反映して各海域によって大きく異なるため<sup>2)</sup>、各海域で毒の濃度から推定毒力に変換するための係数を検討する必要がある。

そこで、本事業は、ELISA法を用いた貝毒分析の結果をマウスアッセイ法と比較し、本県海域における変換係数を作成すること及び本法が本県の貝毒発生監視体制に適用可能か検討することを目的とした。

## 2 方法

### (1) 供試サンプル

サンプルは平成24年度に麻痺性貝毒が規制値を超えた宿毛湾のヒオウギガイを中心に、20検体を用いた（表1、図1）。

### (2) 麻痺性貝毒成分の抽出

麻痺性貝毒成分の抽出は公定法であるAOAC法に従って実施した。概略は以下のとおりである。

- ①二枚貝サンプルに同量の0.1M塩酸を加えてホモジナイズし、5分間煮沸
- ②放冷後、サンプル0.5g/抽出液1mlの濃度になるように精製水で調整
- ③3,000×g 10分で遠心分離して懸濁物を除去

また、ヒオウギガイの中腸腺は多くの油分を含んでいることから、衛生研究所では、マウスに対する油分の影響を除外するために遠心分離後の上澄みをろ過処理（Advantec No.5C）

表1 供試サンプル

No.	採取地点	採取日	種類	マウスアッセイ結果
1	宿毛湾	H24.5.9	ヒオウギガイ	300MU/g
2	宿毛湾	H24.5.28	ヒオウギガイ	240MU/g
3	宿毛湾	H24.6.11	ヒオウギガイ	120MU/g
4	宿毛湾	H24.6.25	ヒオウギガイ	180MU/g
5	宿毛湾	H24.7.9	ヒオウギガイ	190MU/g
6	宿毛湾	H24.8.6	ヒオウギガイ	130MU/g
7	宿毛湾	H24.8.20	ヒオウギガイ	130MU/g
8	宿毛湾	H24.9.3	ヒオウギガイ	96MU/g
9	宿毛湾	H24.9.10	ヒオウギガイ	40MU/g
10	宿毛湾	H24.9.19	ヒオウギガイ	29MU/g
11	宿毛湾	H24.9.24	ヒオウギガイ	47MU/g
12	宿毛湾	H24.10.2	ヒオウギガイ	23MU/g
13	宿毛湾	H24.10.9	ヒオウギガイ	30MU/g
14	宿毛湾	H24.10.16	ヒオウギガイ	17MU/g
15	足摺港	H24.5.11	ヒオウギガイ	7.2MU/g
16	足摺港	H24.6.7	ヒオウギガイ	4.4MU/g
17	浦ノ内湾	H24.4.9	アサリ	<1.75MU/g
18	浦ノ内湾	H24.5.14	アサリ	<1.75MU/g
19	浦ノ内湾	H24.6.11	アサリ	<1.75MU/g
20	浦戸湾	H24.4.9	アサリ	<1.75MU/g

※マウスアッセイ結果は、ヒオウギガイは中腸腺の値、アサリは可食部の値

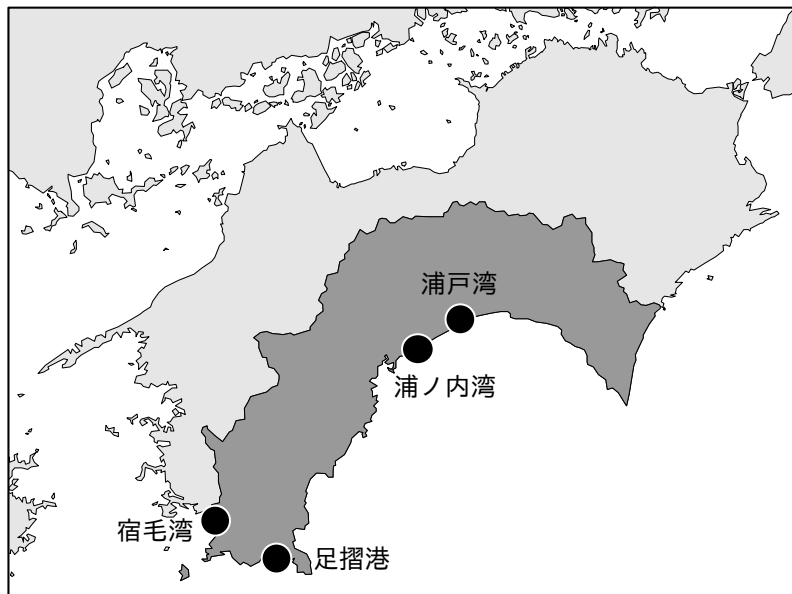


図1 サンプル採取地点

している。そのため、本事業で用いる抽出液に関しても同様の処理を行った。

### (3) 麻痺性貝毒の分析

麻痺性貝毒のELISA分析には一般財団法人 新日本検定協会の麻痺性貝毒検出用分析キット SKitを用いた。試薬の調整、操作方法、測定及び計算に関してはキットに付属している説明書に従った。

### 3 結果と考察

#### (1) 宿毛湾

宿毛湾で採取されたヒオウギガイの中腸腺 14 サンプルを分析に供した（表 1、No.1~14）。

本分析を行う前に衛生研究所で検査が実施されており、その結果、中腸腺の最高毒力は 300MU/g であった。日本で毒化する多くの二枚貝類の主成分は GTX 群であり、その中でも GTX1-4 が多く検出されている<sup>1,2)</sup>。GTX1-4 の比毒性は 0.892~2.468MU/nmol であることから<sup>1,2)</sup>、宿毛湾で毒化したヒオウギガイの主成分も GTX1-4 であったと仮定すると、300MU/g は 121.6~336.3nmol/g に相当する。本分析で用いたキットの分析範囲の上限は 20nM (≒ 16.8nmol/g) (検量線作成時に使用する標準品の最高濃度) であることから、分析は 1 検体につき希釈なし及び 10 倍希釈の 2 段階で、また、毒力の高かったサンプル（表 1、No.1~8）に関しては 20 倍希釈も加えて 3 段階で実施した。

##### 1) 希釈なし

分析結果を表 2 に示した。抽出液中の貝毒成分が多すぎたため、ほぼ全てのサンプルで分析範囲の上限を超えており、正確な測定ができなかった。

表2 ELISA分析結果（宿毛湾、希釈なし）

No.	MU/g	希釈倍率 (A)	分析結果		
			測定値		換算値 (A×B) nmol/g
			nM	nmol/g (B)	
1	300	1	66.9	56.3	56.3
2	240	1	68.8	58.0	58.0
3	120	1	52.5	44.2	44.2
4	180	1	54.0	45.5	45.5
5	190	1	50.8	42.8	42.8
6	130	1	39.9	33.6	33.6
7	130	1	60.3	50.8	50.8
8	96	1	35.4	29.8	29.8
9	40	1	28.3	23.9	23.9
10	29	1	33.4	28.1	28.1
11	47	1	42.7	36.0	36.0
12	23	1	22.2	18.7	18.7
13	30	1	18.8	15.9	15.9
14	17	1	19.3	16.3	16.3

##### 2) 10 倍希釈

分析結果を表 3 に示した。毒力がおおよそ 150MU/g 以下のサンプルに関しては 10 倍希釈で分析範囲内に収まり、正確な測定ができたと考えられた。しかし、毒力が 150MU/g を超えるサンプルに関しては、10 倍希釈でも測定値が分析範囲の上限を超えており、正確な測定ができなかった。

##### 3) 20 倍希釈

分析結果を表 4 に示した。毒力がおおよそ 150~200MU/g 以下のサンプルに関しては 20 倍希釈で分析範囲内に収まり、正確な測定ができたと考えられた。しかし、毒力が 200MU/g を超えるサンプルに関しては、20 倍希釈でも測定値が分析範囲の上限を超えており、正確な測定ができなかった。

表3 ELISA分析結果（宿毛湾、10倍希釈）

No.	MU/g	希釈倍率 (A)	分析結果		
			測定値		換算値 (A×B) nmol/g
			nM	nmol/g (B)	
1	300	10	57.1	48.1	480.9
2	240	10	33.3	28.0	280.4
3	120	10	30.4	25.6	255.7
4	180	10	15.9	13.4	134.1
5	190	10	26.7	22.5	224.8
6	130	10	17.5	14.8	147.6
7	130	10	8.9	7.5	74.6
8	96	10	7.2	6.1	60.9
9	40	10	8.0	6.7	67.2
10	29	10	4.6	3.9	38.5
11	47	10	4.8	4.0	40.1
12	23	10	4.6	3.9	39.0
13	30	10	2.4	2.0	19.9
14	17	10	1.3	1.1	11.1

表4 ELISA分析結果（宿毛湾、20倍希釈）

No.	MU/g	希釈倍率 (A)	分析結果		
			測定値		換算値 (A×B) nmol/g
			nM	nmol/g (B)	
1	300	20	50.9	42.9	857.6
2	240	20	30.5	25.7	514.0
3	120	20	24.2	20.4	407.2
4	180	20	13.4	11.2	224.8
5	190	20	9.4	7.9	158.8
6	130	20	7.8	6.6	131.2
7	130	20	6.2	5.2	103.8
8	96	20	4.7	4.0	79.4

分析を行う前に 20 倍希釈で分析できるとの試算を行ったが、実際にはそれ以上の希釈が必要となった。その要因としては、宿毛湾で毒化したヒオウギガイの毒の主成分が GTX1-4 ではなかった可能性が考えられる。例えば、長崎県のマガキでは他海域ではあまり検出されない GTX5,6 が毒の大部分を占めるという極めて特異的な組成が示されている<sup>2)</sup>。GTX5 の比毒性は 0.16MU/nmol、GTX6 は 0.18MU/nmol であることから、宿毛湾におけるヒオウギガイの毒成分が GTX5,6 であったと仮定すると、300MU/g は 1666.6～1875.0nmol/g に相当する。そのため、本キットで正確な分析を行うには 100 倍以上の希釈が必要と考えられる。そこで、20 倍希釈で測定値が分析範囲の上限を超えていたサンプル No.1～3 に関して 100 倍希釈し、再分析を行った。

#### 4) 100 倍希釈

分析結果を表 5 に示した。全サンプルが分析範囲内に収まり、正確な測定ができたと考えられた。

表5 ELISA分析結果（宿毛湾、100倍希釈）

No.	MU/g	希釈倍率 (A)	分析結果		
			測定値		換算値 (A×B) nmol/g
			nM	nmol/g (B)	
1	300	100	7.5	6.4	635.5
2	240	100	5.5	4.6	462.2
3	120	100	3.6	3.0	299.4

## 5) 宿毛湾まとめ

各希釈段階の分析結果を総合すると表6のとおりとなった。

宿毛湾のヒオウギガイを分析する場合、希釈なしでは低毒力のサンプルにおいても分析範囲の上限を超えるため、全サンプルで10倍以上の希釈が必要となった。マウスアッセイ法でおおよそ150MU/g以下の毒力のサンプルに関しては、10倍希釈と20倍希釈を比較しても測定値に大きな差はなく、10倍希釈で良いと考えられた。また、150～200MU/g程度の毒力のサンプルに関しては20倍希釈が、200MU/g以上の毒力のサンプルに関しては100倍希釈が必要と考えられた。

表6 宿毛湾ELISA分析結果

No.	MU/g	希釈倍率 (A)	分析結果		
			測定値		換算値 (A×B) nmol/g
			nM	nmol/g (B)	
1	300	100	7.5	6.4	635.5
2	240	100	5.5	4.6	462.2
3	120	100	3.6	3.0	299.4
4	180	20	13.4	11.2	224.8
5	190	20	9.4	7.9	158.8
6	130	10	17.5	14.8	147.6
7	130	10	8.9	7.5	74.6
8	96	10	7.2	6.1	60.9
9	40	10	8.0	6.7	67.2
10	29	10	4.6	3.9	38.5
11	47	10	4.8	4.0	40.1
12	23	10	4.6	3.9	39.0
13	30	10	2.4	2.0	19.9
14	17	10	1.3	1.1	11.1

ここでサンプル3に関して、マウスアッセイ法では120MU/gという値であったが、ELISA法による分析値は299.4nmol/gであり、サンプル2（ELISA法：462.2nmol/g、マウスアッセイ法：240MU/g）とサンプル4（ELISA法：224.8nmol/g、マウスアッセイ法：180MU/g）の間の濃度が示された。ヒオウギガイは長期間毒を保持すると考えられており、例えば、大分県で毒化したヒオウギガイに関して、貝毒原因種が低密度で推移していたにもかかわらず、1ヶ月後でも50%以上の毒が蓄積していたことが報告されている<sup>3)</sup>。サンプル2と3が採取された間隔は約2週間であることから（図2）、その短期間で毒力が半減したとは考えにくい。そのため、サンプル3のマウスアッセイ法の結果は、マウスのコンディション等の影響により毒力が低く示された可能性や何らかの理由でELISA分析に供したサンプルの毒化の程度が低かった可能性が考えられた。そのため、サンプル3の結果は、関連の分析から除外した。

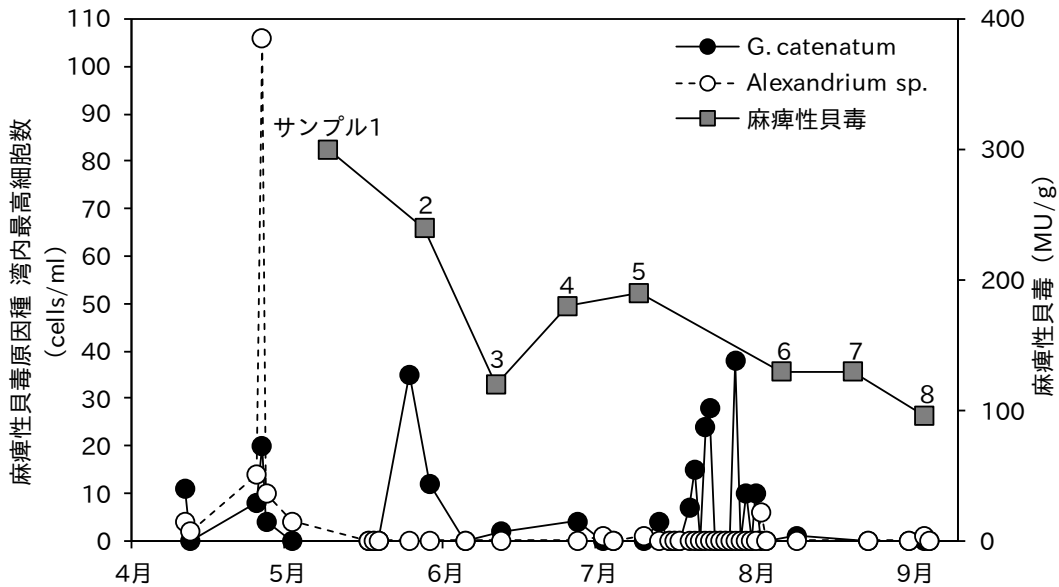


図2 宿毛湾におけるヒオウギガイ中腸腺の毒力の推移（5～9月）

ELISA 法によって分析したヒオウギガイ中腸腺の貝毒濃度とマウスアッセイ法によって分析した毒力の相関を調べたところ、 $R^2=0.8353$  と良い相関が見られた（図3）。そのため、宿毛湾におけるヒオウギガイに関しては、ELISA 法で毒力を推定できる可能性が高いと考えられた。また、変換式は推定毒力（MU/g） $=0.4468 \times$  毒濃度（nmol/g） $+43.635$  であった。

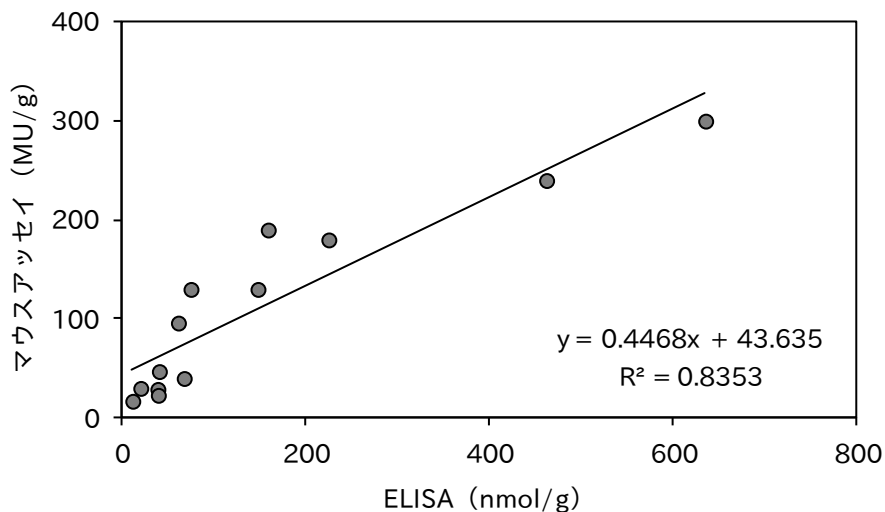


図3 ELISA 法とマウスアッセイ法の相関

ここで、マウスアッセイの結果が 200MU/g 以下の値のサンプルに着目すると、それ以上の値のサンプルと別の相関があるように見られた。そこで、200MU/g 以下のサンプルに関して相関を分析したところ、決定係数（ $R^2$ ）に大きな差はなかったが、y 切片の値が 43.635 から 13.364 に低下した（図4）。基本的に、 $0\text{MU/g}=0\text{nmol/g}$ （y 切片=0）が理想的と考えられることから（ELISA 法の方がマウスアッセイ法より感度が高いため、 $0\text{MU/g}=0\text{nmol/g}$  にはならないとも考えられるが）、毒化の程度の低いサンプルと高いサンプルは、分けて考える必要があるかもしれない。今後、分析検体数を増やしたうえで検討したい。

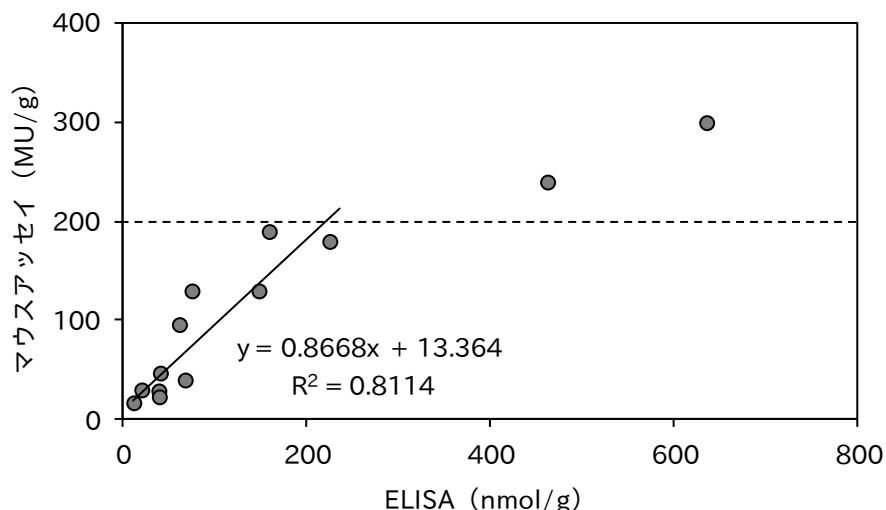


図4 200MU/g以下のサンプルにおけるELISA法とマウスアッセイ法の相関

## (2) 足摺港

土佐清水市足摺港で採取されたヒオウギガイの中腸腺2サンプルを分析に供した(表1、No.15~16)。分析は宿毛湾のサンプルと同様、1検体につき希釈なし及び10倍希釈の2段階で実施した。

### 1) 希釈なし

分析結果を表7に示した。全サンプルで分析範囲の上限を超えていた。

表7 ELISA分析結果(足摺港、希釈なし)

No.	MU/g	希釈倍率 (A)	分析結果		
			測定値		換算値 (A×B) nmol/g
			nM	nmol/g (B)	
15	7.2	1	30.2	25.4	25.4
16	4.4	1	24.7	20.8	20.8

### 2) 10倍希釈

分析結果を表8に示した。全サンプルが分析範囲内に収まり、正確な測定ができたと考えられた。しかし、換算値に関して、希釈なしでは21~25nmol/g、10倍希釈では19~20nmol/gとほとんど差はなく、希釈なしでも分析可能ではないかと考えられた。なお、相関に関しては、分析に供したサンプル数が少なかったため検討しなかった。

表8 ELISA分析結果(足摺港、10倍希釈)

No.	MU/g	希釈倍率 (A)	分析結果		
			測定値		換算値 (A×B) nmol/g
			nM	nmol/g (B)	
15	7.2	10	2.4	2.0	19.8
16	4.4	10	2.2	1.9	18.6

### 3) 足摺港まとめ

足摺港のサンプルに関しては、毒化の程度がかなり低かったにも関わらず(可食部換算で1.75未満)、やや高めの毒濃度が検出された。その要因としては、土佐清水沿岸では低密度な

がら麻痺性貝毒原因種が確認されていることから（赤潮等発生監視調査事業参照）、比毒性の低い毒成分を蓄積していた可能性が考えられた。例えば GTX5,6 であれば、20nmol/g 含まれていたとしても、3.2～3.6MU/g にしかならず、さらに可食部換算すると（おおよそ 1/10）、規制値を大幅に下回る。

### （3）浦ノ内湾・浦戸湾

浦ノ内湾及び浦戸湾で採取されたアサリの可食部 4 サンプルを分析に供した（表 1、No.17～20）。分析は希釈なしで実施した。その結果、全てのサンプルにおいて貝毒はほぼ検出されなかった（表 9）。

表9 ELISA分析結果（浦ノ内湾・浦戸湾、希釈なし）

No.	MU/g	希釈倍率 (A)	分析結果		
			測定値		換算値 (A×B) nmol/g
			nM	nmol/g (B)	
17	<1.75	1	0.01	0.01	0.01
18	<1.75	1	0.01	0.01	0.01
19	<1.75	1	0.01	0.01	0.01
20	<1.75	1	0.03	0.02	0.02

### （4）まとめ

今回、多くのサンプルを分析できた宿毛湾のヒオウギガイに関しては、ELISA 法による貝毒濃度とマウスアッセイ法による毒力との間に良い相関が認められ、ELISA 法で毒力を推定できる可能性が高いと考えられた。しかし、年によって推定毒力に変換するための係数が変化する可能性があるため、今後も分析を続けて、データを蓄積していく必要がある。

また、実際にスクリーニングを行う場合には、毒化の程度が未知のサンプルを分析することとなる。その場合、ヒオウギガイであれば、最低でも 10 倍、20 倍及び 100 倍希釈の 3 段階での分析が必要となり、その場合、1 回の分析に必要なウェル数は表 10 のとおりとなる。分析キットの価格は 96 ウェルで約 65,000 円であることから、1 サンプルあたりの分析コストはキットだけで 7,600～18,000 円となる（表 11）。マウスアッセイ法に必要なコストは 7,200～12,000 円であることから<sup>4,5)</sup>、ELISA 法の導入は経費の大幅な軽減にはつながらないと考えられた。また、分析時間に関しても、貝毒の抽出に始まり、試薬の調整、試料の前処理、測定とかなりの時間を要し、マウスアッセイ法と大差ないと思われた。しかし、分析キットはストックしておくことができるため急な検査に対応でき、また、分析に供するサンプル量が少なくてもよい等のメリットがあると考えられる。加えて、水産物の安全を守るという観点から、水産試験場が独自で貝毒検査をできる体制を構築することは、重要と思われる。

表10 分析に必要なウェル数

同時に分析する 検体数	検量線の作成に必要なウェル数 (6段階×3連)		検体の分析に必要なウェル数 (3段階×3連×検体数)	計
1	18	+	9	= 27
2	18	+	18	= 36
3	18	+	27	= 45
4	18	+	36	= 54
5	18	+	45	= 63
6	18	+	54	= 72
7	18	+	63	= 81
8	18	+	72	= 90



表11 1検体の分析に必要なコスト

同時に分析する 検体数	キットの価格 (円)		使用するウェル /全ウェル		検体数		1検体あたりのコスト (円)
1	65,000	×	27/96	÷	1	≒	18,281
2	65,000	×	36/96	÷	2	≒	12,188
3	65,000	×	45/96	÷	3	≒	10,156
4	65,000	×	54/96	÷	4	≒	9,141
5	65,000	×	63/96	÷	5	≒	8,531
6	65,000	×	72/96	÷	6	≒	8,125
7	65,000	×	81/96	÷	7	≒	7,835
8	65,000	×	90/96	÷	8	≒	7,617

#### 4 謝辞

本事業におけるサンプル採取に関しては、高知県中央漁業指導所 猪原 亮普及指導員、高知県土佐清水漁業指導所 谷 知宏技師、高知県宿毛漁業指導所 占部 敦史技師に協力して頂いた。また、麻痺性貝毒の抽出法については高知県衛生研究所 芦田 拓研究員に指導して頂いた。これらの方々に厚く御礼申し上げる。

#### 5 引用文献

- 1)野口玉雄，村上りつ子．「貝毒の謎―食の安全と安心―」成山堂書店，東京．2004.
- 2)大島泰克，濱野米一．麻痺性貝毒のモニタリング．「貝毒研究の最先端―現状と展望」(今井一郎，福代康夫，広石伸互編)恒星社厚生閣，東京．2007; 19-29.
- 3)宮村和良，馬場俊典．現場海域における貝毒モニタリングと二枚貝毒化軽減および毒化予察の試み．「貝毒研究の最先端―現状と展望」(今井一郎，福代康夫，広石伸互編)恒星社厚生閣，東京．2007; 130-146.
- 4)高知県衛生研究所聞き取り
- 5)新垣雄光．貝毒を迅速に分析する．ぶんせき 2008; 5: 236-237.