

(ノート)

## PSP-ELISA (麻痺性貝毒簡易検査キット) を導入した 佐賀県における貝毒モニタリング体制の検討

河口真弓・川津健太郎\*<sup>1</sup>・吉田幸史・野口浩介\*<sup>2</sup>・首藤俊雄

### A Shellfish Monitoring System at Saga pref. for Paralytic Shellfish Toxins Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (PSP-ELISA)

Mayumi KAWAGUCHI, Kentaro KAWATSU\*<sup>1</sup>, Yukifumi YOSHIDA,  
Kohsuke NOGUCHI\*<sup>2</sup> and Toshio SHUTO

食用二枚貝の麻痺性貝毒は、食品衛生上大きな問題で、水産業の経営にも大きく影響する。このため、佐賀県では二枚貝の安全性を確保することを目的とし、海域ごとの *Alexandrium* 属、*Gymnodinium catenatum* などの二枚貝毒化原因プランクトン調査およびマウス毒性試験法 (以下「公定法」) とポストカラム蛍光化HPLC<sup>1)</sup> (以下「HPLC」) を用いた貝毒検査による貝毒モニタリングを実施し、毒化した二枚貝の市場流通を防止している。

近年、当県のカキ養殖漁業者が増加傾向にあるため、貝毒検査の検体数が年々増加し、それに伴う作業量の増大や検査結果の遅延が問題となっている。

そこで、本研究では簡便かつ迅速な測定が可能な酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) を当県の貝毒モニタリング体制に導入することを目的とし、当県における毒化二枚貝類について、大阪府立公衆衛生研究所が開発したELISAキット (以下PSP-ELISA)<sup>2)</sup>、公定法およびHPLCによる測定結果を比較し、PSP-ELISAの有用性を検討した。

#### 材料および方法

##### 1. 試料

検査に用いた二枚貝は、2014年1月～2015年1月にかけて佐賀県内2海域 (AおよびB海域) で採取した天然および養殖マガキと天然アサリを用いた (表1)。試験液の調製の前処理として、二枚貝のむき身全体 (中腸線を含む) をホモジナイズし、試料とした。

なお、毒化原因プランクトンは、後述するPSP-ELISAの

代替標準品は *Alexandrium* 属<sup>3)</sup>、その他試料は *Alexandrium* 属および *G.catenatum* であった<sup>4)</sup>。

表1 供試サンプル

| NO. | 採取日        | 海域 | 養殖<br>天然 | 種類  | NO. | 採取日        | 海域 | 養殖<br>天然 | 種類  |
|-----|------------|----|----------|-----|-----|------------|----|----------|-----|
| 1   | 2014/01/06 | A  | 養殖       | マガキ | 11  | 2014/12/29 | B  | 養殖       | マガキ |
| 2   | 1/06       | B  | 養殖       | マガキ | 12  | 12/29      | A  | 養殖       | マガキ |
| 3   | 1/07       | A  | 天然       | マガキ | 13  | 2015/01/05 | B  | 養殖       | マガキ |
| 4   | 1/07       | A  | 天然       | アサリ | 14  | 1/05       | A  | 養殖       | マガキ |
| 5   | 11/10      | B  | 養殖       | マガキ | 15  | 1/13       | B  | 養殖       | マガキ |
| 6   | 11/10      | A  | 養殖       | マガキ | 16  | 1/13       | A  | 養殖       | マガキ |
| 7   | 11/26      | B  | 養殖       | マガキ | 17  | 1/19       | B  | 養殖       | マガキ |
| 8   | 11/26      | A  | 養殖       | マガキ | 18  | 1/19       | A  | 養殖       | マガキ |
| 9   | 12/22      | B  | 養殖       | マガキ | 19  | 1/26       | B  | 養殖       | マガキ |
| 10  | 12/22      | A  | 養殖       | マガキ | 20  | 1/26       | A  | 養殖       | マガキ |

##### 2. 試験液調製

###### 1) HPLCおよびPSP-ELISA

試料を10g秤量し、0.1N塩酸を10mL加えて10分間煮沸抽出した。冷却後、7,000×gで10分遠心し、得られた上清を、あらかじめメタノール10mLと蒸留水10mLでコンディショニングしたセップパックプラスC18 (ウオーターズ社製) で固相抽出した。その後、アミコンウルトラ0.5 (メルク株式会社製) により14,000×gで20分遠心し、その通過液をHPLC分析およびPSP-ELISAに供した。

###### 2) 公定法

民間検査機関に依頼し、実施した。

##### 3. 麻痺性貝毒の定量

###### 1) HPLC

分析は、Oshima<sup>1)</sup>らの方法に準じた。標準品は国立研究開発法人水産研究・教育機構から配付されたものを使用した。

\* 1 大阪府公衆衛生研究所感染症部細菌課

\* 2 現 佐賀県農林水産部水産課

## 2) PSP-ELISA

大阪府立公衆衛生研究所が開発したPSP-ELISA<sup>2)</sup>を使用し、分析は篠崎ら (2013)<sup>9)</sup> の方法に準じた。

検量線作成のための標準品は、毒化が確認された海域の二枚貝試験液 (2013年4月8日B海域採取, 天然アサリ 20.9MU/g (公定法)) を代替標準として用いた。代替標準は蒸留水で0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0MU/g に希釈し, 0.0 MU/g (Tween 20-PBS, Sigma社製) を含めた計6系列で実施した。なお, 代替標準および試験液は, 検出可能領域に合わせて200倍 (約0.5~2.0MU/g), 600倍 (約1.0~4.0 MU/g) または900倍 (約2.0~8.0MU/g) にTween 20-PBS で希釈し, PSP-ELISAに供した。

なお, 発色した各ウェルの吸光度はマイクロプレートリーダー (Multiskan FCペイシックモデル, サーモフィッシャー社製) を用いて450nmの波長で測定し, 付属ソフトで作成した4パラメーターロジスティック曲線から試験液の毒力を定量した。

## 3) 公定法

民間検査機関に依頼し実施した。

# 結 果

## 1. 代替標準品と試料の貝毒成分組成 (HPLC)

PSP-ELISAで使用した代替標準と試料について, HPLCにより麻痺性貝毒成分を分析し, 毒力比に換算した結果を示す (表2)。

PSP-ELISAは, 標準品と試料の麻痺性貝毒成分の組成が近ければ高い精度が期待される。しかしながら, 貝毒成分の組成は, 毒化原因プランクトンや, 環境要因, さらに, 二枚貝の種類により変化するため, 完全に試料と同じ組成の標準品を用意することは不可能である。

代替標準では, GTX1 (33%), C2 (22%), GTX4 (18%) およびneoSTX (15%) が主な成分であった。試料について平均値では, C2 (平均35%), GTX1 (平均19%), GTX3およびdcGTX3 (平均15%) が高い値を示した。しかし, 試料ごとに見ると, C2では0~72%, GTX1では0~68%など, バラつきは大きくなった。

## 2. 公定法, PSP-ELISA, およびHPLCの相関性

公定法, PSP-ELISA, およびHPLCによる貝毒量の定量結果について示す (表3)。また, 公定法, PSP-ELISAおよびHPLCの全てを実施した13検体について, 相関をそれぞれ示す (図1)。なお, 公定法の検出限界値である2.0 MU/g未満であるものは, 「2.0MU/g」としてプロットした。

今回の検討では, 公定法との相関は, HPLCよりPSP-ELISAの方が良いという結果になった。

## 3. まとめ

貝毒成分の組成は, 試料によっては今回用いた代替標準と大きく異なっていたものの, PSP-ELISAで比較的良い相関が得られた。また, 麻痺性貝毒の規制値である4.0MU/g周辺の結果を見ても, 公定法で規制値を超えている場合は, PSP-ELISAでもほぼ同様の値を示しており, いわゆる“検査漏れ”はなかった。しかし, PSP-ELISAは標準品と試料との毒組成の類似性によって精度が左右されるため, PSP-ELISAによる検査結果のみで貝毒モニタリングを実施することは避けるべきである。すなわち, PSP-ELISAによる検査結果のみで判断するのではなく, スクリーニング検査として導入<sup>9)</sup>することで, 簡便かつ迅速な対応が可能な貝毒モニタリング体制とすることが可能である。

また, 今回の試験では, 代替標準品とその他試料の貝毒原因プランクトン組成が異なることや, 二枚貝類はマガキとアサリのみ結果であることなどから, 今後ともデータの蓄積が必要である。

# 文 献

- 1) Y.Oshima (1995) : Postcolumn derivatization liquid-chromatographic method for paralytic shellfish toxins. J. AOAC Int., 78, 528-532.
- 2) K. Kawatsu, Y. Hamano, A. Sugiyama, K. Hashizume, T. Noguchi, (2002) : Development and application of an enzyme immunoassay based on a monoclonal antibody against gonyautoxin components of paralytic shellfish poisoning toxins. J. Food Port., 65, 1304-1308.
- 3) 河口真弓・西山嘉乃・吉田幸史・野口浩介・煙草谷教正・江口泰蔵 (2014) : 2013年から2014年にかけて佐賀県仮屋湾で発生した *Alexandrium catenella* による二枚貝の毒化, 佐玄水セ研報, 7, 49-55.
- 4) 東一輝・河口真弓・吉田賢二・吉田幸史・首藤俊雄 (2017) : 2014年, 2015年および2016年にかけて佐賀県仮屋湾で発生した *Alexandrium* 属および *Gymnodinium catenatum* による二枚貝の毒化, 佐玄水セ研報, 8, 59-71.
- 5) 篠崎貴史・渡邊龍一・川津健太郎・櫻田清成・高日新也・上野健一・松嶋良次・鈴木敏之 (2013) : 麻痺性貝毒簡易検出キット (PSP-ELISA) を用いた貝毒モニタリングシステムの有効性, 食衛誌, Vol.54, No.6, 397-401.

表2 標準品と試料の貝毒成分別毒力比 (HPLC)

| NO.             | 貝毒量<br>(MU/g)      | 麻痺性貝毒成分別毒力比 (%) |    |      |      |      |      |        |        |        |
|-----------------|--------------------|-----------------|----|------|------|------|------|--------|--------|--------|
|                 | HPLC               | C1              | C2 | GTX1 | GTX2 | GTX3 | GTX4 | dcGTX2 | dcGTX3 | neoSTX |
| A <sup>*1</sup> | 15.7 <sup>*2</sup> | 1               | 22 | 33   | 2    | 3    | 18   | 0      | 5      | 15     |
| 1               | 5.3                | 3               | 0  | 43   | 0    | 33   | 0    | 2      | 9      | 10     |
| 2               | 6.2                | 1               | 0  | 27   | 14   | 27   | 10   | 2      | 7      | 12     |
| 3               | 5.2                | 0               | 10 | 30   | 0    | 36   | 14   | 7      | 3      | 0      |
| 4               | 11.1               | 0               | 12 | 52   | 0    | 0    | 32   | 0      | 3      | 0      |
| 5               | 0.5                | 2               | 14 | 0    | 0    | 50   | 0    | 0      | 35     | 0      |
| 6               | 0.6                | 1               | 22 | 0    | 0    | 28   | 0    | 0      | 49     | 0      |
| 7               | 0.4                | 6               | 55 | 0    | 0    | 5    | 0    | 0      | 33     | 0      |
| 8               | 1.6                | 4               | 58 | 0    | 0    | 14   | 3    | 0      | 21     | 0      |
| 9               | 1.2                | 2               | 37 | 0    | 0    | 16   | 0    | 9      | 37     | 0      |
| 10              | 6.6                | 7               | 72 | 0    | 0    | 3    | 2    | 3      | 9      | 4      |
| 11              | 29.0               | 2               | 23 | 68   | 0    | 3    | 0    | 1      | 0      | 3      |
| 12              | 17.5               | 2               | 28 | 61   | 0    | 2    | 1    | 2      | 0      | 5      |
| 13              | 22.9               | 3               | 32 | 54   | 0    | 7    | 2    | 1      | 0      | 2      |
| 14              | 27.6               | 3               | 37 | 48   | 0    | 4    | 1    | 1      | 0      | 6      |
| 15              | 6.8                | 6               | 49 | 0    | 11   | 20   | 1    | 2      | 11     | 0      |
| 16              | 8.4                | 7               | 47 | 0    | 10   | 14   | 2    | 7      | 13     | 0      |
| 17              | 2.4                | 12              | 66 | 0    | 0    | 10   | 0    | 5      | 7      | 0      |
| 18              | 3.5                | 10              | 56 | 0    | 0    | 13   | 0    | 10     | 12     | 0      |
| 19              | 0.7                | 10              | 40 | 0    | 8    | 10   | 0    | 14     | 18     | 0      |
| 20              | 0.7                | 8               | 39 | 0    | 0    | 9    | 0    | 17     | 28     | 0      |

\*1 代替標準

\*2 公定法では20.9MU/g

表3 各分析法による麻痺性貝毒の定量値

| NO. | 貝毒量 (MU/g) |           |      | NO. | 貝毒量 (MU/g) |           |      |
|-----|------------|-----------|------|-----|------------|-----------|------|
|     | 公定法        | PSP-ELISA | HPLC |     | 公定法        | PSP-ELISA | HPLC |
| 1   | 3.4        | 5.2       | 5.3  | 11  | 22.9       | 16.2      | 29.0 |
| 2   | 4.3        | 6.2       | 6.2  | 12  | 6.3        | 7.5       | 17.5 |
| 3   | <2.0       | 1.3       | 5.2  | 13  | 33.8       | 32.0      | 22.9 |
| 4   | 2.9        | 1.9       | 11.1 | 14  | 38.5       | 44.9      | 27.6 |
| 5   | -          | 0.5       | 0.5  | 15  | 13.2       | 19.4      | 6.8  |
| 6   | -          | 0.5       | 0.6  | 16  | 14.9       | 24.0      | 8.4  |
| 7   | -          | 1.1       | 0.4  | 17  | 3.5        | 9.5       | 2.4  |
| 8   | -          | 1.9       | 1.6  | 18  | -          | 12.1      | 3.5  |
| 9   | 7.8        | 5.7       | 1.2  | 19  | -          | 2.0       | 0.7  |
| 10  | 8.3        | 7.8       | 6.6  | 20  | -          | 1.9       | 0.7  |

- : No Data

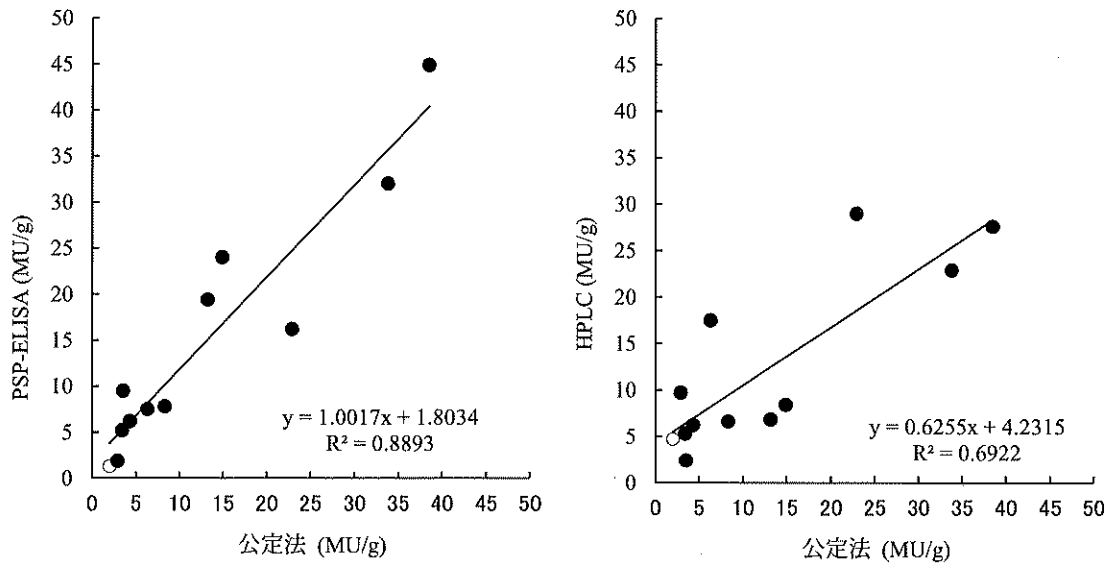


図1 公定法とPSP-ELISAおよびHPLCによる麻痺性貝毒量定量値の相関

なお、公定法で検出限界値2.0MU/g)未満であるものは、公定法定量値を2.0MU/gとした(O)。