

ELISA法を用いた麻痺性貝毒プランクトンの毒量測定

尾崎 仁, 中西雅幸

Determination of paralytic shellfish toxicity of naturally occurring dinoflagellates using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (PSP-ELISA) method

Hitoshi Ozaki and Masayuki Nakanishi

Temporal variation in the toxicity of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* is reported from western Wakasa Bay between July and December in 2014. Toxicity of *G. catenatum* reached ND-135 fmol PD-STXeq./cell, with toxicity increasing after November, coinciding with a decrease in water temperature. Even during seasons in which cell toxicity was low, as few as 100 *G. catenatum* cells were needed to quantify toxicity using the PSP ELISA method. We recommend this technique be researched further to more fully appreciate its limits in this sort of application.

キーワード：麻痺性貝毒 (PSP) *Gymnodinium catenatum* ELISA法 細胞内毒含有量

麻痺性貝毒は、トリガイやイワガキ等をはじめとする二枚貝類が有毒プランクトンの一種である *Gymnodinium catenatum* や *Alexandrium* 属などを摂食することにより貝が毒化する現象又はその毒をいう。二枚貝の毒化に対応した監視体制が国内で確立されていなかった1979年以前は、毒化した二枚貝の摂食による食中毒が全国で発生し、深刻な問題としてその対応が求められてきた。現在では、海水中の有毒プランクトンの細胞数密度を指標とした毒化予察の体制と二枚貝の毒力の監視体制が全国的に実施され、市場に流通した二枚貝による中毒事例の報告はほとんどない(大島, 濱野, 2007)。一方、二枚貝養殖の生産現場では依然として有毒プランクトンの出現に伴う二枚貝の毒化は減少していない。また、有毒プランクトンが産生する毒は、水温の影響により毒量が大きく変動するため、細胞数密度の情報のみから二枚貝の毒化予察を行うことには限界がある(安井, 2008)。麻痺性貝毒原因種である *G. catenatum* は夏季と冬季では細胞当たりの毒量の変動が大きいことが報告されており(宮村, 2007)、このことが細胞出現密度に基づく毒化予察を困難にしている一因と考えられる。京都府における本種による二枚貝の毒化予察の精度向上を図るためには、本種の細胞内毒含有量を正確に把握する必要がある。貝毒の毒量分析には、これまでは機器分析による高速液体クロマトグラフィー法(以下、HPLC法という)が一般的に用いられている。しかし、HPLC法による分析は大量の細胞数が必要であり、コストが高いことが指摘されている^{*1}。近年、麻痺性貝毒の毒量を分析するための手法としてELISA法が開発され、本手法を用いた麻痺性貝毒原因

プランクトンの監視などへの応用が検討されている(及川ら, 2014)。ELISA法はHPLC法に比べ低コストで、より感度の高い分析が可能とされている^{*1}。そこで、本研究では、新たな分析手法であるELISA法を用いて *G. catenatum* の1細胞当たり毒量を分析し、本法の有効性が確認されたので報告する。

材料及び方法

***G. catenatum* 細胞の採集** 2014年7月11日から12月1日の期間に、若狭湾西部海域の舞鶴湾、栗田湾および宮津湾(Fig. 1)の二枚貝養殖漁場において北原式採水器を用いて、合計11回の採水を行った(Table 1)。採水時には、多項目水質計Hydro-LoggerMS5(環境システム株式会社製)を用いて採水層に当たる水深3~10

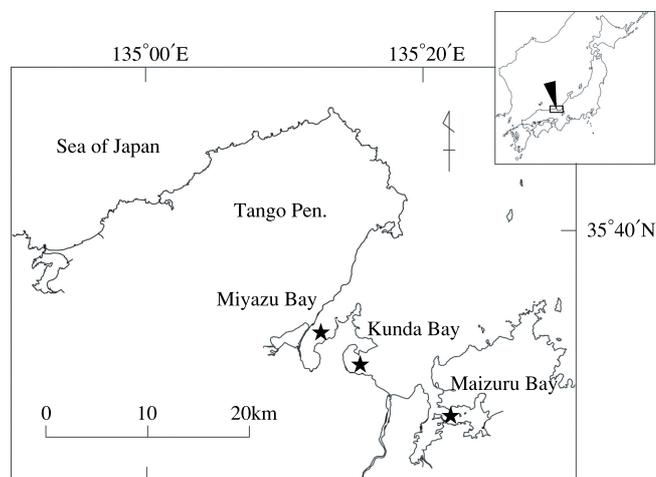


Fig. 1 Sampling sites : Maizuru, Kunda and Miyazu Bays.

*1 佐藤繁. 2011. 貝毒分析研修会テキスト「麻痺性貝毒の簡易測定法」

Table 1 Sampling data for and toxicity of *G. catenatum* from Maizuru, Kunda and Miyazu Bays, 2014

Date	Locality	Water Temperature (°C)	Sampling cells (cells)	Amount of toxin per cell (fmol PD-STXeq./cell)		
				Mean	SD	
11-Jul	Maizuru	24.9	242	34	37.5	3.5
			107	41		
13-Aug	Maizuru	26.2	179	33	—	—
			11	ND		
21-Aug	Miyazu	25.3	408	13	13.7	2.3
			150	18		
			221	10		
1-Sep	Maizuru	26.1	332	19	22.3	3.9
			286	27		
			251	30		
			373	13		
2-Sep	Miyazu	26.0	252	12	13.3	1.3
			350	12		
			426	16		
3-Sep	Kunda	25.7	200	42	—	—
2-Oct	Maizuru	24.0	155	21	—	—
6-Oct	Kunda	23.3	101	27	31.7	14.1
			66	10		
			136	58		
30-Oct	Kunda	20.0	80	53	—	—
5-Nov	Maizuru	19.8	163	86	80.5	5.5
			280	75		
1-Dec	Miyazu	18.0	109	135	—	—

mの水温を1 m毎に測定し、その平均値を求めた。ELISA法による毒量検定が成立するのに十分な量の*G. catenatum*細胞（以下、細胞という）を採集するため、採水した海水を10 μ l目合のナイロンメッシュを用いて約1,000倍に濃縮した。分析のための検体は、検出された毒量の妥当性を判断するために、原則的に1回の採水当たり複数作成することとした。ただし、中には十分な細胞数が得られなかった事例もあり、最終的に合計23検体を得た（Table 1）。各検体の細胞数は11~426 cellsであった（Table 1）。

試料液の調製 試料液の調製は、濃縮海水から直接プランクトンを分取する方法で行った（大島、濱野、2007）。低吸着性の10 μ lチップを装着したマイクロピペットを用いて、実体顕微鏡下で細胞を数計しながら数 μ lの濃縮海水とともに吸い上げ、0.1 M HClを添加した1.5 mlチューブ（以下、HClチューブという）内へ入れた。これを何回か繰り返し、分取した細胞の入ったHClチューブの重量からHClチューブの重量を差し引き、濃縮海水重量（mg）を求めた。濃縮海水重量1 mgの容量を1 μ lとみなし、当初のHCl濃度（0.1 M）が計算上0.05 Mになるよう精製水若しくは0.1 M HClを加えた（社団法人日本食品衛生協会、2005）。濃度調整を行った試料は、定量するまでの間、-20°Cで凍結保存した。

試料液の調製では、数百 μ lの少量の海水を使用することから、この海水中の毒量についても分析した。

11月5日に舞鶴湾で採水された海水を試料に供した。

ELISA分析液の調製 市販の麻痺性貝毒分析キット Skit ELISA for PSP（一般財団法人新日本検定協会製、以下、キットという）で分析するための試料液の調製は、一般財団法人新日本検定協会の資料に従った（Fig.2）。100°Cに設定したアルミブロック付きホットドライバスを用いて、試料液を10分間加熱して細胞を崩壊させた後、氷冷した。その後、室温において3,000 rpmで5分間遠心分離を行い、上清を得た（以下、抽出原液という）。キットの試薬A（1 Mリン酸バッファ）を精製水で1/10に希釈した希釈液160 μ lに抽出原液40 μ lを加えて分析液とした。

ELISA法による毒量測定 細胞の麻痺性貝毒（以下、PSPという）の毒量分析をキットの取扱説明書*2に従って行った。分析液50 μ lをキットのマイクロプレートのウェルに分注し、抗原抗体吸着、発色操作を行い、マイクロプレートリーダー（株式会社プラクティカル製）で波長450 nmの吸光度を測定した。キットの比較標準液（PD-STX）を段階希釈したものを同様に発色させ、濃度と吸光度からSkit ELISA for PSP Calculation sheetを用いて検量線を作成した。この検量線を用いて、吸光度から分析液のPSP濃度を求めた。なお、マイクロプレート上での分析については、精度管理のため1分析液および1標準液濃度につき、3ウェルを使用し、その平均値を求めた。また、標準液の検量線の適用範囲は、最も低濃度の毒量1 nMから高濃

*2 一般財団法人新日本検定協会. 2014. 麻痺性貝毒検出用分析キット Skit ELISA for PSP取扱説明書

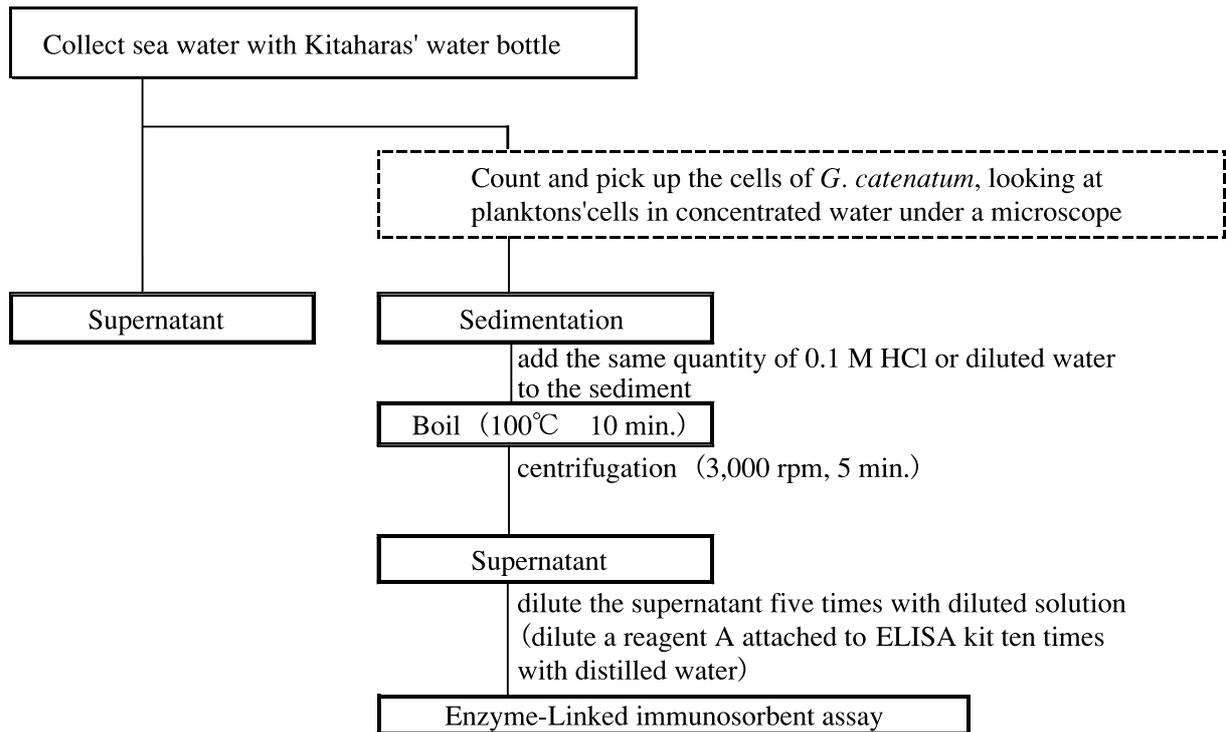


Fig. 2 Method used to prepare toxic quantities from *G. catenatum* cells (Shin Nihon Kentei Kyokai, 2013).

度20 nMとした。

結 果

濃縮海水から分取および計数した細胞の1細胞当たり毒量の定量結果をTable 1およびFig. 3に示した。Table 1には同一の濃縮海水から得られた複数検体の毒量の平均値および標準偏差も示した。試料液の調製を行うための数百 μ lの海水中からは毒は検出されなかった。このことから、今回の分析では細胞分取に伴う少量の海水中には麻痺性貝毒は含まれないものと判断した。各湾での毒量は、舞鶴湾ではND~86 fmol PD-STXeq./cell, 栗田湾では10~58 fmol PD-STXeq./cell および宮津湾では10~135 fmol PD-STXeq./cellであった。月別にみると、7月(24.9 $^{\circ}$ C)は34~41 fmol PD-STXeq./cell, 8月(25.3~26.2 $^{\circ}$ C)はND~33 fmol PD-STXeq./cell, 9月(25.7~26.1 $^{\circ}$ C)は12~42 fmol PD-STXeq./cell, 10月(20.0~24.0 $^{\circ}$ C)は10~58 fmol PD-STXeq./cell, 11月(19.8 $^{\circ}$ C)には75~86 fmol PD-STXeq./cell, 12月(18.0 $^{\circ}$ C)には135 fmol PD-STXeq./cellの毒が定量された。なお、同一海水による複数の検体の毒量は、10月6日の栗田湾の検体では多少の変動が見られたが、他の検体では大きな変動はなく安定していた。全ての検体について、水温と1細胞当たり毒量の関係をFig.4に示した。毒量は、18 $^{\circ}$ Cのときに135 fmol PD-STXeq./cellと最も高く、19.8 $^{\circ}$ Cのときに53~86 fmol PD-STXeq./cell, 23 $^{\circ}$ C以上ではND~58 fmol PD-STXeq./cellであった。

8月13日に舞鶴湾で採集した2検体の分析では、179細胞を用いたときには33 fmol PD-STXeq./cellの毒が定量されたが、11 cellsのときには不検出(ND)であった。毒の検出が認められた細胞数の最も少なかった検体は、10月6日栗田湾で採集した66 cellsであった。

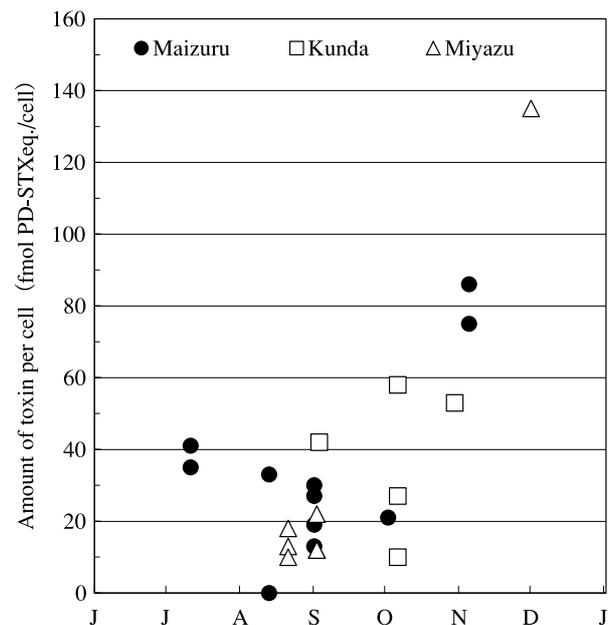


Fig. 3 Toxicity per natural *G. catenatum* cell from July to December 2014 in Maizuru, Kunda and Miyazu Bays (see legend).

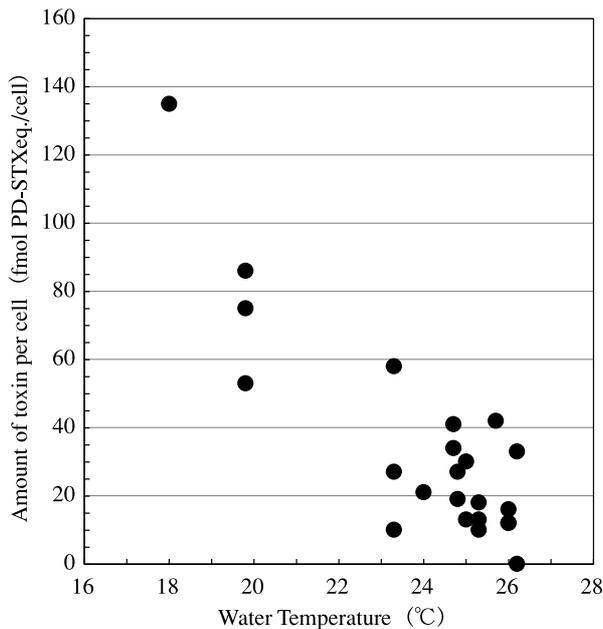


Fig. 4 Relationship between natural *G. catenatum* cell toxicity and water temperature from July to December 2014 in Maizuru, Kunda and Miyazu Bays.

考 察

本研究では、濃縮海水から細胞を計数しながら直接分取し、ELISA法により1細胞当たりの毒を定量することができた。分析に供した細胞数は11~426 cellsであり (Table 1), 8月13日に採水された11 cellsの検体は不検出であったが、他の検体は全て毒の定量が可能であった。これまでの毒量分析には一般的にHPLC法が用いられており、この方法の分析では本研究で用いた細胞数以上の5,000 cells/ml^{*3}が必要である。今回のELISA法による分析では、貝毒が検出された最小の細胞数は66 cellsであった (Table 1)。この細胞数での分析は1事例しかなかったため、66 cellsで安定した定量が可能かどうかの判断は困難である。本研究においては、約100 cells以上では全ての検体で毒の定量が出来たことから、ELISA法では細胞数が約100 cells以上であれば定量可能であることが明らかとなった。同一の濃縮海水から得られた複数検体の毒量の変動は小さく、安定した値が得られた。これらのことから、ELISA法は100 cells程度の少ない細胞数で、安定した定量が可能であり、*G. catenatum*による麻痺性貝毒の毒量を分析する手法として有効であることが示された。また、ELISA法に用いられている抗体は麻痺性貝毒成分をほぼ全て (99%) 認識する (高田私信) ため、1細胞当たりの毒を定量する手法としても有効であることが示された。

ELISA法により定量された1細胞当たり毒量は、水温25°C以上ではND~42 fmol PD-STXeq./cell, 20~25°C

では10~58 fmol PD-STXeq./cellおよび20°C未満では75~135 fmol PD-STXeq./cellであり、水温が低いほど増加する傾向が見られた (Fig.4)。大分県猪串湾では、HPLC法を用いた*G. catenatum*の1細胞当たりの毒量と水温との関係を調べた結果、水温の低下に伴い細胞内の毒量が増加する傾向が認められており、水温17°C以上では74~200 fmol/cellであったが、17°C以下では250~1,571 fmol/cellと大幅に増加したことが示された (宮村, 2007)。高谷 (2003) は、室内実験により本種を用いて水温別にHPLC法により毒量を調べ、水温21°Cでは77.6 fmol/cell, 18°Cでは87.5 fmol/cell, 15°Cでは239.7 fmol/cell, 12°Cで314.4 fmol/cellと培養温度が低いほど毒量が多くなることを報告した。これらの報告は、本種の毒量は水温により異なり、高水温では低く、低水温では高く推移することを示している。本研究の結果は、これらの報告と同様であることが明らかとなった。今後は、ELISA法の定量法としての有効性を検証するために、同一検体を用いて一般的な定量分析法であるHPLC法との相関を調べることが重要である。

上述したように、8月13日の採水で得られた2検体のうち、179 cellsの検体では33 fmol PD-STXeq./cellが定量されたが、11 cellsの検体では不検出であった (Table 1)。ELISA法による毒の定量では、感度の高い分析が可能といわれているが、高水温で毒量が低い時期には検体の細胞数を約100 cells以上にすることが明らかとなった。本研究では採水時の最低水温が18.0°Cであり、毒量の増加が指摘されている17°C以下 (宮村, 2007) の環境から採集された細胞の毒量は分析していない。低水温の毒量が高い時期にELISA法による効率的な分析を行うには、この時期の定量が可能となる最低細胞数を明らかにする必要があると考える。

本試験を実施するにあたり、本キットの販売及び製造元である一般財団法人新日本検定協会 高田主席研究員からELISA法による毒量分析における操作およびプランクトンからの毒の抽出に係る技術を含め多大なる御指導をいただき厚く御礼申し上げます。また、独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所 鈴木グループ長および渡邊研究員からは、本論文の御校閲と御教授を賜り心から厚く御礼申し上げます。

文 献

- 宮村和良. 2007. 猪串湾における有毒渦鞭毛藻 *Gymnodinium catenatum* の出現特性およびヒオウギガイ毒化の解明に関する研究. 大分県水試調研報, 1.7-64.
- 及川 寛, 山本圭吾, 長井 敏. 2014. 海水試料の毒量分析による麻痺性貝毒モニタリング手法の開発.

*3 大島泰克. 2011. 貝毒分析研修会テキスト「麻痺性貝毒HPLC分析法」

水産技術, **6(2)**: 161-167.

大島泰克, 濱野米一. 2007. 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」. 19-29. 恒星社
厚生閣, 東京.

社団法人日本食品衛生協会. 2005. 食品衛生検査指針理
化学編, **3**: 673-680.

高谷智裕. 2003. 九州沿岸海域における麻痺性貝毒に関
する研究. 長崎大学水産学部研究報告, **84**: 1-38.

安井久二. 2008. 貝毒の分析方法の最近の動向につい
て. 日本海洋生物研究所年報: 83-96.

