

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：47407

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700857

研究課題名(和文)食用魚介類を対象とした新規パリトキシン評価法の確立

研究課題名(英文)A new method to evaluate palytoxin content in sea foods

研究代表者

相良 剛史(Sagara, Takefumi)

尚絅大学短期大学部・その他部局等・講師

研究者番号：60353132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、数種の細胞株を用いてパリトキシンを対象とした毒性評価に適した株の検討を行ったところ、ラットC6グリオーマ細胞が最適であり、LDHの放出を指標とすればより高感度な検出が可能となることが明らかとなった。また、アオブダイ有毒検体から調製した試験液は培養細胞を用いた毒性試験に適用可能であった。さらに、本試験液をLC-MS分析に供したところ、m/z 327.6、1352.3および1360.3のマスキロマトグラムにおいてピークを検出したが、夾雑物の影響が大きく不明瞭なピーク形状であったため、パリトキシンまたはパリトキシン関連物質に由来するピークであると断定するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：In this project, I investigated to develop a new method using cultured cell to evaluate palytoxin content. As the results, a rat C6 glioma cell was suitable to use for a toxic evaluation for the palytoxin, furthermore I conclude that the method of detection by LDH release was sensitive. In addition, the method was applicable to the test solution that I prepared from toxic specimen *Scarus ovifrons*. On the other hand, peaks were detected in chromatogram of m/z 327.6, 1352.3 and 1360.3 in LC-MS analysis of the test solution. However did not come to conclude that it was the peak to originate from palytoxin or a palytoxin-like substance because the influence was inarticulate peak shape.

研究分野：食品学

キーワード：パリトキシン C6グリオーマ細胞 PC12細胞 LC-MS アオブダイ ハコフグ

1. 研究開始当初の背景

近年、日本ではパリトキシンまたはパリトキシン様物質を原因とする食中毒(パリトキシン様中毒)が続発している。ごく最近では、ウミスズメの喫食による死者を伴う食中毒が発生し、その原因物質にパリトキシン様物質が疑われ、深刻さを増している。日本では、パリトキシン様中毒はアオブダイのみが引き起こす特殊な食中毒であったが、現在は、厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知「アオブダイの取扱いについて」(平成9年10月7日、衛乳第281号)により、アオブダイの販売や輸入は自粛され、その食中毒も収束していた。しかしながら、2000年10月に高知県で高級魚である“クエ”により集団食中毒が発生し、その中毒原因物質がパリトキシン様物質であることが判明したことから、パリトキシン様中毒はアオブダイのみの問題ではなくなった。また、宮崎県や長崎県、三重県ではハコフグまたはウミスズメによるパリトキシン様中毒と酷似した食中毒が頻発し、最近では死亡者も出ているが、未だ原因物質の特定には至っていないため、食品の安心・安全確保の観点から、早期原因究明が望まれている。さらに、元来、亜熱帯域に生息していたパリトキシン保有魚(ソウシハギ)が、瀬戸内海や玄界灘など日本沿岸で相次いで漁獲されていることから、パリトキシン中毒の拡大が懸念されている。一方、海外に於いても地球的規模で多種多様な魚介類にパリトキシンの存在が報告されている。EUでは、パリトキシンによる二枚貝の毒化が多数報告され、本毒によるヒト健康被害が頻発していることから、既に幾つかの研究グループにより、貝毒に加えヒト健康リスク管理を踏まえたパリトキシンのモニタリングシステムの構築を視野に入れた研究が活発化している。

このような状況の下、研究代表者はこれまでに有毒魚介類からのパリトキシン検出を試みた。しかしながら、パリトキシン様食中毒の原因となっている有毒魚介類から得た試験液は、マウスに対しパリトキシンと同様の作用を及ぼすものであったが、LC-MS分析によりパリトキシンそのものが検出されることはなかったため、中毒原因物質の本体はパリトキシンと類似の構造をもつ別の物質(パリトキシン類縁体)であると推測された。実際に、パリトキシン様食中毒の原因となっている有毒魚介類からパリトキシンそのものが検出された報告例はない。その中毒原因物質を明らかにするために活性画分の分離を試みたが、パリトキシンは細胞に対する生理活性が極めて高く、それと同等の生理活性を持つであろうパリトキシン類縁体は有毒魚介類にもごく微量しか含まれていないため、検出は極めて困難であり、パリトキシン様食中毒の問題を解決するまでには至らなかった。そこで、細胞の生理機能を指標とする高感度な検出法すなわち培養細胞を用いたスクリーニング法の樹立が必要不可欠と考え

たことが、本研究の端緒となった。

2. 研究の目的

近年、我が国ではパリトキシンまたはパリトキシン様物質が原因と推測される食中毒が続発しているが、俠雑物の多い魚介類中に極微量に含まれる生理活性の高い有毒物質を同定するのは困難であるため、原因物質の真相解明には至っていない。一方、国内外においてパリトキシンを対象とする培養細胞を用いたアッセイ法に関する研究が進められつつあるが、いずれの研究もパリトキシン標準品のみを対象としているため、生の試料から試験液を調製しなければならない魚介類のスクリーニング法としての評価系の樹立はなされていない。そこで本研究では魚介類の食品としての安全性を確保し国民の健康の保護を図るために、多数の試料の安全性を一括して評価できる培養細胞の機能変化を指標とする新規パリトキシン毒性スクリーニング法の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) パリトキシン評価に適した細胞株の検討
ラットグリオーマ細胞(C6細胞)に対するパリトキシンの作用について検討を行った。すなわち、10%熱失活牛血清、5%馬血清、100 unit/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、0.25 µg/ml アンフォテリシン、および50 µg/ml ゲンタマイシンを含むDMEMで前培養したC6細胞を24ウェル平底マイクロプレートに播種し、0.5%牛血清、100 unit/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、0.25 µg/ml アンフォテリシン、および50 µg/ml ゲンタマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で24時間前培養を行った。次いで、濃度調整したパリトキシン標準品(和光純薬工業)を添加して、24、48および72時間のインキュベーションを行い、インキュベーション後の培地を2%のニュートラルレッド(NR)を含むDMEMに交換して2時間静置した。その後、細胞からNRを1%酢酸-50%エタノールで抽出して、540 nmの吸光度を測定することにより細胞の生残率を求めた。

(2) パリトキシン検出に有効な細胞機能の検討

ラット副腎褐色細胞腫由来PC12細胞を用いてパリトキシン検出に有効な細胞機能を検討した。すなわち、10%熱失活牛血清、5%馬血清、100 unit/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、0.25 µg/ml アンフォテリシン、および50 µg/ml ゲンタマイシンを含むDMEMで前培養したPC12細胞を24ウェルまたは96ウェル平底マイクロプレートに播種し、0.5%牛血清、100 unit/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、0.25 µg/ml

アンフォテリシン、および 50 µg/ml ゲンタマイシンを含む DMEM で 24 時間前培養を行った。次いで、濃度調整したパリトキシン標準品を添加して、24 時間インキュベーションを行い、市販のアッセイキットを用いた LDH 測定(Roche)および MTT アッセイ(SHIGMA)を行った。

(3)パリトキシン評価法の妥当性確認

PC12 細胞を用いる細胞毒性試験法にアオブダイ有毒検体および天然ハコフグから調製した試験液を適用して有効性の検討を行った。アオブダイ有毒検体の肝臓および天然ハコフグの肝臓のそれぞれに 3 倍量の酢酸酸性 75%エタノール(pH 3.5)を加えてホモジナイズ(15,000 rpm, 5 分間)し、遠心分離(8,000 G, 4, 15 分間)して上清を得た。沈殿物については、同様の抽出操作を 2 回繰り返して上清を合一した。合一した抽出液をロータリーエバポレーターにより減圧濃縮して酢酸を除去し、蒸留水に定溶して等量のジエチルエーテルで 2 回脱脂した。得られた水層を減圧濃縮後、等量の 1-ブタノールによる溶媒分画に付し、得られた 1-ブタノール画分を濃縮乾燥後に蒸留水に溶解して試験液とした。(2)の同様の方法により前培養した PC12 細胞に段階希釈したアオブダイ有毒検体の肝臓および天然ハコフグの肝臓から調製した試験液を添加して、24 時間インキュベーションを行い、インキュベーション後の培地を 2%のニュートラルレッド (NR) を含む DMEM に交換して 2 時間静置した。その後、細胞から NR を 1%酢酸-50%エタノールで抽出して、540 nm の吸光度を測定することによりそれぞれの細胞の生残率を求めた。

(4) 致死活性成分の分析

(3)で調製したアオブダイ有毒検体の試験液を LC - MS 分析に供した。カラムには、Mightysil RP-18 (2.0-250 mm, 関東科学) を用いた。移動相には、3 種類の移動相 (移動相 A: 純水、移動相 B: 100%アセトニトリル、移動相 C: 0.1%ギ酸 (pH 2.5)) を用いた。流速 0.25 ml/min、移動相 A を 85%、移動相 B を 10%、移動相 C を 5%の割合で分析を開始し、リニアグラジエントにより 7 分後に移動相 B を 50%、移動相 C を 50%とした。次いで、10 分間は移動相 B を 95%と移動相 C を 5%とし、さらに 15 分間には移動相 A を 85%、移動相 B を 10%、移動相 C を 5%に設定し、分析時間は 32 分間とした(表 1)。検出には、Waters 社製 ZMD2000 検出器を用いた。エレクトロスプレーイオン化 (ESI) を用い、パリトキシンに特徴的なフラグメントイオンである m/z 327.7、1352.3 および 1360.3 でモニターした。

表 1 LC-MS 分析条件

HPLC : Waters Alliance 2695				
Column	: Mightysil RP-18 GP Φ2.0×250 mm, KANTO CHEMICAL			
Column temp.	: 35°C			
Mobile phase	: A: Milli-Q B: Acetonitrile C: 0.1% formic acid			
	time(min)	A	B	C
	0.00	85.0	10.0	5.0
	7.00	0.0	50.0	50.0
	7.01	0.0	95.0	5.0
	17.00	0.0	95.0	5.0
	17.01	85.0	10.0	5.0
	32.00	85.0	10.0	5.0
Injection volume	: 20 µL			
Flow rate	: 0.25 mL/min			
MS : Waters ZMD 2000				
Ionization	: ESI ⁺ (positive)			
Desolvation temp.	: 350°C			
Source block temp.	: 120°C			
Cone voltage	: 50 V			

(5) 筋肉細胞を用いたパリトキシン検出法の検討

パリトキシン中毒およびアオブダイ中毒に共通の主症状が横紋筋融解症であることから、ラット下肢骨格筋細胞を用いたパリトキシン検出法の検討を行った。すなわち、樹立したラット下肢骨格筋培養細胞に 5%牛血清、4.4 µl/ml アンフォテリシン、および 2.5 µl/ml ゲンタマイシンを含む DMEM を添加した後、遠心分離 (500 G, 10 分間) した。得られた沈殿に 5%牛血清、4.4 µl/ml アンフォテリシン、2.5 µl/ml ゲンタマイシン、5.0 µl/ml ITS-X、0.1 µl/ml 上皮細胞成長因子(EGF)および 0.1 µl/ml 線維芽細胞増殖因子(FGF)を含む DMEM を添加し CO₂ インキュベーター (37 °C, 5% CO₂) で 72 時間培養した。その後、マトリゲルでコーティングしたウェルに細胞を播種して 2 週間培養を行い、濃度調整したパリトキシン標準品(和光純薬工業)を添加してインキュベーションを行い、1、4、8、12、24 および 48 時間後の培地中のクレアチニンキナーゼ(CK)を臨床化学自動分析装置 (SP-4420)により測定するとともに細胞形態の観察を行った。

4 . 研究成果

(1)パリトキシン評価に適した細胞株の検討

パリトキシン標準品の C6 細胞に対する致死活性は 72 時間培養において顕著となり、0.1 nM 以下の濃度では生残率の低下は見られなかったものの、1 nM 以上では 0 ~ 28.4% の生残率となった(図 1)。C6 細胞の IC₅₀ (50% 細胞障害率) 値は 24 時間 : 3.44 nM (9.22 ng/ml)、48 時間 : 2.14 nM (5.74 ng/ml)、72 時間 : 0.54 nM (1.45 ng/ml)であり、いずれの曝露時間においても PC12 細胞の 24 時間 : 8.10 nM (21.7 ng/ml)、48 時間 : 3.02 nM (8.09 ng/ml)、

72 時間：4.08 nM (8.09 ng/ml)よりも低くなったことから(図 2)、C6 細胞は PC12 細胞よりもパリトキシンに対する感受性が高いことが明らかとなった。

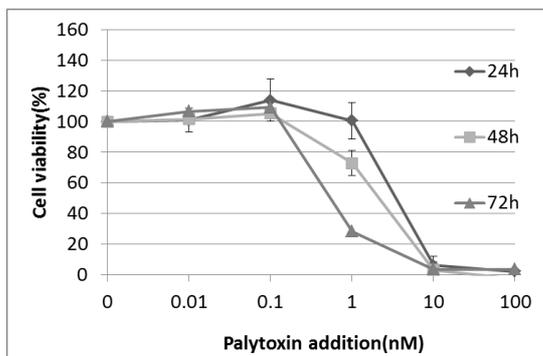


図 1 パリトキシン標準品添加による C6 細胞の生残率

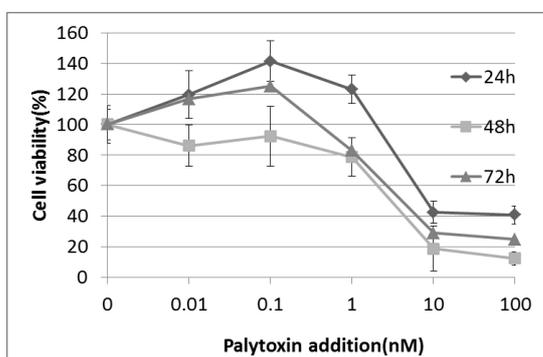


図 2 パリトキシン標準品添加による PC12 細胞の生残率

(2) パリトキシン検出に有効な細胞機能の検討

PC12 細胞を培地のみで 24 時間インキュベーションすると、細胞に含まれていた LDH の平均 37.8%が培地に放出されていた。また、パリトキシンを 0.1、1 および 10 nM となるように曝露してインキュベーションすると、それぞれ 37.8、39.7 および 105.2% の LDH が培地に放出された。PC12 細胞からの LDH 放出に対するパリトキシンの 50%効果濃度(ED₅₀)は 2.84 nM (7.61 ng/ml)となり、NR 法により求めた PC12 細胞の IC₅₀ の 2.85 倍の感度となった。一方、MTT アッセイでは PC12 細胞にパリトキシンを 0.01、0.1、1、10 および 100 nM となるよう 24 時間曝露した際の細胞生残率は、88.2、90.2、87.7、18.4 および 12.1%となり、IC₅₀ は 3.50 nM (9.38 ng/ml)となった。

(3) パリトキシン評価法の妥当性確認

アオブダイ有毒検体の肝臓試験液および天然ハコフグ肝臓試験液の PC12 細胞に対する 24 時間インキュベーション時の IC₅₀ 量は 2.41 g 試料相当量(図 3)および 0.78 g 試料相

当量(図 4)であった。この致死活性がパリトキシンに由来するものであれば、アオブダイ有毒検体の肝臓には 9.04 ng/試料 g、天然ハコフグ試料の肝臓には 27.0 ng/試料 g 相当量のパリトキシンが含まれていたことになり、これはパリトキシン様食中毒を引き起こす可能性がある 0.5 MU (4.5 ng) /可食部 g を上回る値となった。

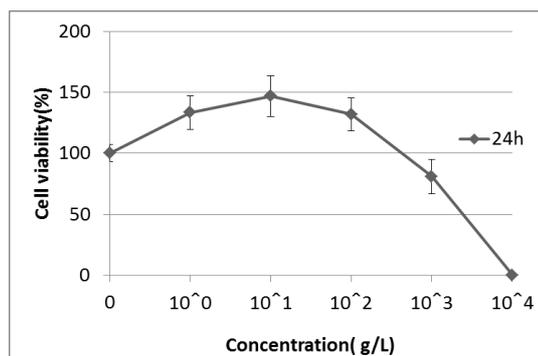


図 3 アオブダイ有毒検体の肝臓試料添加による PC12 細胞の生残率

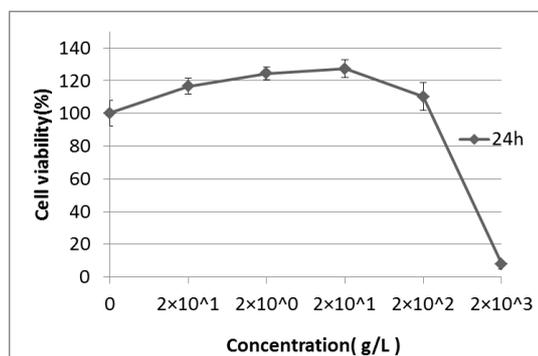


図 4 天然ハコフグ肝臓試料添加による PC12 細胞の生残率

(4) 致死活性成分の分析

アオブダイ有毒検体の肝臓由来の試験液を LC-MS 分析に供したところ、*m/z*327.6、1352.3 および 1360.3 のマスクロマトグラムにおいてピークを確認することが出来たが、夾雑物の影響が大きく不明瞭なピーク検出となったため、パリトキシンまたはパリトキシン関連物質に由来するピークであると判断するに至らなかった。

(5) 筋肉細胞を用いたパリトキシン検出法の検討

パリトキシン曝露 8~24 時間後において濃度依存的な CK 値の上昇がみられ、低濃度域における CK 値の上昇が最も顕著であった曝露 24 時間後での測定が最適であると思われる。また、パリトキシン曝露 8 時間後における細胞形態は 0.1 および 1 ng/ml 濃度区ではチューブ状であったが、10 ng/ml 濃度区ではチ

ユープ状の細胞と丸く縮まった細胞が混在しており、50 および 100 ng/ml 濃度区では細胞はさらに丸く、細胞膜が薄くなる様子が観察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Sagara T, Nishibori N, Itoh M, Morita K, Her S. Palytoxin causes nonoxidative necrotic damage to PC12 cells in culture. *J Appl Toxicol.*, 査読有, 33(2), 2013

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Morita, K., Hiroi, T., Sawaguchi, M., Kishibuchi, R., Itoh, M., Nishibori, N., Sagara, T., Her, S. and Lee, M.-S. Aqueous extract of *Spirulina platensis* induces elevation of BDNF mRNA levels through HO-1 expression in C6 glioma cells. *Neuroscience 2012*. Washington, DC, USA

2. 橋本多美子, 相良剛史, 西尾幸郎. PSP で毒化したカキの加熱調理操作における除毒効果. 日本食生活学会第 46 回大会, 平成 25 年 6 月 1 日, 淑徳大学 看護栄養学部

3. 橋本多美子, 畑中映理子, 江戸梢, 相良剛史, 西尾幸郎. 加熱調理による麻痺性貝毒含有カキの除毒とエキス成分の変化. 日本食生活学会第 49 回大会, 平成 26 年 11 月 29 日, IT ビジネスプラザ武蔵

4. 江戸梢, 西尾幸郎, 橋本多美子, 吉田恵, 相良剛史. 大阪湾に発生した有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* による食用二枚貝の毒化について. 日本食生活学会第 49 回大会, 平成 26 年 11 月 29 日, IT ビジネスプラザ武蔵

6. 研究組織

(1)研究代表者

相良剛史 (SAGARA TAKEFUMI)

尚絅大学短期大学部・食物栄養学科・講師
研究者番号：60353132

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

研究者番号：

研究者番号：