

学 位 論 文 題 名

下痢性貝毒検査への機器分析法の導入に関する研究

学位論文内容の要旨

二枚貝が蓄積する有毒プランクトン由来の毒成分のうち、ヒトに下痢や嘔吐、腹痛を起こさせる脂溶性毒群を下痢性貝毒と分類している。その検査はマウス検定法で行われており、中腸腺からのアセトン抽出物を体重 16~20g の♂マウスの腹腔内に投与し、24 時間後の死亡数を数える。3 匹投与中 2 匹以上が死亡した場合に“下痢性貝毒陽性”と判定され、その毒量を 1 マウス単位としている。検査が開始されて以降、日本では下痢性貝毒による大規模な食中毒は発生しておらず、マウス検定法は食用二枚貝の検査法として有効に機能してきた。

しかし、その一方でマウス検定法は、貝毒以外の毒成分でもマウスが死亡すること、結果が陰性と陽性の二つしかないことから、下痢性貝毒成分に対する定性・定量能力に乏しく、偽陽性の可能性や精度管理の困難さが指摘されてきた。また、マウス検定法は、動物福祉に対しても十分に配慮された手法ではない。このため、下痢性貝毒成分を理化学的な方法で測定する代替法が検討され、機器分析法、酵素固定化免疫測定法、酵素阻害法など、様々な測定技術を用いる方法の開発が進められている。

しかし、下痢性貝毒成分を理化学的な方法で測定することが、現行のマウス検定法の代替となるかどうかについては十分な検討が必要である。なぜなら、現行法は脂溶性毒成分の有無を確認するためのスクリーニング法としての機能を有しているからである。現在の下痢性貝毒検査法は、脂溶性貝毒検査法を基本としている。脂溶性貝毒検査法が開発された当時、二枚貝がプランクトン由来の脂溶性毒成分を蓄積する場合があることは明らかとなっていたが、その化学構造は不明であった。そのため、検査法は脂溶性の成分をできるだけ広く回収し、毒性の有無を簡易に判定することを目的としていた。現行のマウス試験法は、手順は脂溶性貝毒検査法とほぼ同じであり、下痢性貝毒成分の精製操作が付加されていないため、“脂溶性毒成分の有無を確認す

るためのスクリーニング法である”ことを認識する必要がある。それゆえ、理化学的な方法による下痢性貝毒検査の代替を検討する場合には、このスクリーニング機能に留意することが重要である。

種々の機器分析法の中で、高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) は、前処理が容易で定性・定量能力も高く、高感度で複数の成分を一斉かつ迅速に定量できることから、下痢性貝毒成分を測定するための手法として最も有力であると考えられる。しかし、これまでの LC/MS による下痢性貝毒検査の代替に関する研究では、現行のマウス検定法が“脂溶性毒成分のスクリーニング法”であることをふまえた上で、その導入が討議されたことはない。

本研究は、現行のマウス検定法が“脂溶性の毒成分のスクリーニング法”であるという認識に基づいて、食用二枚貝の下痢性貝毒検査への LC/MS の適正な導入について論じることを目的とし、以下の項目について検討した。(1) 毒性物質の個別評価法としての LC/MS 分析法の優位性 (第 2 章)。(2) 毒性物質のスクリーニング法としてのマウス検定法の優位性 (第 3 章)。(3) 貝毒検査における偽陽性発生の可能性 (第 4 章)。得られた結果は以下の様に要約される。

- (1) 下痢性貝毒検査に LC/MS を導入することにより、極めて簡易な前処理だけで、北海道産ホタテガイの中腸腺に含有される下痢性貝毒成分の詳細な組成を明らかにすることが可能となった。LC/MS は既知下痢性貝毒成分を個別に測定するための有効な方法であるが、比毒性を基に測定値をマウス単位へ変換して毒量を評価した結果、試料が有する毒量を過大評価してしまうことが明らかとなった。すなわち、機器測定値による評価とマウス検定法の結果を対比させることは困難であることが明らかになった。LC/MS を下痢性貝毒試験に導入するには、成分毎に基準値を設定し管理する個別評価法による検査に移行する必要があると考えられる。
- (2) ホタテガイの下痢性貝毒試験において、通常とは異なる症状を呈したマウスが観察された。その症状および試料抽出液の色調から、クロロフィル代謝物ピロフェオホルバイドの光増感作用による光過敏の発症が疑われた。問題の中腸腺試料とその前後に採取された中腸腺試料のピロフェオホルバイド含量の測定、および、発症条件確認のためのマウス比較実験から、問題の症状がピロフェオホルバイドによるマウ

ス光過敏症であることが本研究において初めて確認された。この光過敏症は、直接症状を観察できるマウス検定法でなければ検知されない事例である。ピロフェオホルバイドは下痢性貝毒ではないが、食中毒の原因となりうる物質である。マウス検定法は、下痢性貝毒以外の毒性物質も広く検出できる点で優れたスクリーニング法であることが示された。海外では、アザスピロ酸など既知下痢性貝毒成分以外の新規脂溶性毒成分を原因とする食中毒が報告されている。食用二枚貝の安全性確認には、新規毒成分を検出するための検査も必要であるが、LC/MS だけでは対応は難しく、マウス検定法によるスクリーニングが有用であると考えられる。

- (3) 配偶子形成のために肥大したホタテガイ中腸腺の脂質は、全脂肪酸のほぼ 50%を 20:5 が占めるという特徴をもっていた。遊離状態の 20:5 はマウスに対する毒性が強いことから、肥大中腸腺は偽陽性を発生させる危険性が高い試料である。しかし、実際に検出された遊離脂肪酸は微量であり、検査結果は陰性になる可能性が高い。これまで、マウスを用いた下痢性貝毒試験法は遊離多価不飽和脂肪酸による偽陽性の発生が問題点の一つと考えられてきたが、生鮮試料を用いて適正に検査が実施されれば、偽陽性が発生する危険性は低いと思われる。

本研究の成果から、今後の下痢性貝毒検査法について以下のことが強調される。下痢性貝毒マウス検定法は毒成分のスクリーニング法として有用であるが、今後新たな貝毒成分が検出される可能性があることを考えると、LC/MS による既知下痢性貝毒成分の個別測定は現行法の完全な代替とはならない。一方、現行のマウス検定法では、急性毒性以外の毒性への対応、精度管理の導入、動物福祉への対応の問題がある。これらの解決には、定性・定量能力に優れ、既知貝毒成分を詳細に測定できる LC/MS 分析法の導入が必要である。

食用二枚貝の安全性確認検査を適正に行うためには、下痢性貝毒検査とは別に、新規貝毒成分を検出するための海域監視体制が必要となる。監視は国または地方自治体が主体となり、適切な海域区分のもと定期的に行われなければならない。監視の結果、新規貝毒成分が検出されなければ、その海域内の漁協が水揚げ期間に行う自主検査は既知下痢性貝毒のみを測定する。新規貝毒成分の検出には、現状ではマウス検定法を使用せざるをえないが、既知下痢性貝毒と区別するために LC/MS との併用が必須とな

る。一方、既知下痢性貝毒の検査では、マウス検定法ではなく、既知下痢性貝毒成分の基準値を設定し、基準を満たしていることをLC/MSにより確認することが望まれる。上記検査体制の構築によりマウス使用数を削減でき、かつ下痢性貝毒成分に対して定性的・定量的な検査が可能となる。また下痢性貝毒検査に精度管理を導入することが可能となる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 板 橋 豊

副 査 教 授 宮 下 和 夫

副 査 教 授 酒 井 隆 一

副 査 博 士 高 橋 健 一（北海道立衛生研究所）

学 位 論 文 題 名

下痢性貝毒検査への機器分析法の導入に関する研究

下痢性貝毒検査に使用されるマウス検定法は、食用二枚貝の検査法としてこれまで有効に機能してきた。しかし一方で、マウス検定法は貝毒以外の毒成分でもマウスが死亡すること、結果が陰性と陽性の二つしかないことなどから偽陽性の可能性や精度管理の困難さが指摘されてきた。このため今日、機器分析法、酵素固定化免疫測定法、酵素阻害法などの代替法の開発が進められている。本研究は、食用二枚貝の下痢性貝毒検査への高速液体クロマトグラフィー/質量分析法(HPLC/MS)の適正な導入について論じることを目的とし、毒性物質の個別評価法としてのHPLC/MS分析法の優位性、毒性物質のスクリーニング法としてのマウス検定法の優位性、及び貝毒検査における偽陽性発生の可能性について検討したものである。得られた結果は以下の様に要約される。

- (1) 下痢性貝毒検査にHPLC/MSを導入することにより、極めて簡易な前処理だけで、ホタテガイの中腸腺に含有される下痢性貝毒成分の詳細な毒組成を明らかにすることが可能となった。HPLC/MSは既知下痢性貝毒成分を個別に測定するための有効な方法であるが、比毒性を基に測定値をマウス単位へ変換して毒量の評価した結果、試料が有する毒量を過大評価してしまうことが明らかとなった。すなわち、機器測定値による評価とマウス検定法の結果を対比させることは困難であることを明らかにした。HPLC/MSを下痢性貝毒試験に導入するには、成分毎に基準値を設定し、管理する個別評価法による検査に移行する必要があることを指摘した。
- (2) ホタテガイの下痢性貝毒試験において、通常とは異なる症状を呈したマウスが観察された。その症状および試料抽出液の色調から、クロフィル代謝物ピロフェオホルバイドの光増感作用による光過敏の発症が疑われた。問題の中腸腺試料とその前後に採取された中腸腺試料のピロフェオホルバイド含量の測定と発症条件確認のためのマウス比較実験から、問題の症状がピロフェオホルバイドによるマウス光過敏症であることが本研究において初めて確認された。この光過敏症は、直接症状を観察できるマウス検定法でなければ検知されない事例であること、また、ピロフェオホルバイドは下痢性貝毒ではないが食中毒の原因となりうる物質であることから、マウス検定法は痢性貝毒以外の毒性物質も広く検出できる点で優れたスクリーニング法であることが示された。海外では、アザスピロ酸など既知下

痢性貝毒成分以外の新規脂溶性毒成分を原因とする食中毒が報告されている。こうしたことから、本研究では、食用二枚貝の安全性確認には新規毒成分を検出するための検査が必要であるが HPLC/MS だけでは対応は難しく、マウス検定法によるスクリーニングが有用であることを明らかにした。

- (3) 配偶子形成のために肥大したホタテガイ中腸腺の脂質は、全脂肪酸のほぼ 50% をエイコサペンタエン酸 (20:5) が占める特徴を有することを認めた。遊離状態の 20:5 はマウスに対する毒性が強いことから、肥大中腸腺は偽陽性を発生させる危険性が高い試料であるが、実際に検出された遊離脂肪酸は微量であり、検査結果は陰性になる可能性が高いことを示した。従来、マウスを用いた下痢性貝毒試験法は遊離多価不飽和脂肪酸による偽陽性の発生が問題点の一つと考えられてきたが、生鮮試料を用いて適正に検査が実施されれば、遊離脂肪酸含量は微量であることから、偽陽性が発生する危険性は低いことを明らかにした。
- (4) (1)～(3)の検討により、下痢性貝毒検査法について次のように結論した。下痢性貝毒マウス検定法は毒成分のスクリーニング法として有用であるが、今後新たな貝毒成分が検出される可能性があることを考えると HPLC/MS による既知下痢性貝毒成分の個別測定は現行法の完全な代替とはならない。一方、現行のマウス検定法では、急性毒性以外の毒性への対応、精度管理の導入、動物福祉への対応の問題は解決されない。これらの解決には、定性・定量能力に優れ既知貝毒成分を詳細に測定できる HPLC/MS 分析法の導入が必要である。

以上、本研究は、下痢性貝毒検査におけるマウス検査法と HPLC/MS 法の特徴を明らかにし、今後のあるべき下痢性貝毒検査法を提言したものであり、よって審査員一同は、申請者が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。