

# パリトキシン及びパリトキシン様毒の検出技術に関する研究

衛生化学部 ○中村 麻羽、鈴木 郷\*1、溝添 暁子\*2  
高山 清子、落合 克紀

## 1 はじめに

パリトキシン（以下、PTX という。）は、アオブダイやハコフグ等に含まれる自然毒であり、これに起因した食中毒が全国的に見られている。1953年から2024年にかけても少なくとも48例の報告があり、患者総数は148名、うち8名が死亡している<sup>1)</sup>。

一般に、PTX 及び PTX 様毒の分析は、LC-MS/MS 分析法やマウス試験法により行われている。LC-MS/MS 分析法は既知物質である PTX のみの検出が可能である。一方、マウス試験法は PTX 及び PTX 様毒の両者の検出が可能であるものの、検出感度の低さや倫理的観点の課題から代替法の開発が望まれており、その一つとして培養細胞を用いた分析法が提案されている。

本県では令和2、3、6年度、原因物質が PTX 又は PTX 様毒と疑われる食中毒が発生し、LC-MS/MS 分析を試みたが原因の特定には至らなかった。

そこで本研究では、PTX 及び PTX 様毒の検出技術を確立することを目的として、LC-MS/MS 分析の技術蓄積による精度向上を図るとともに、細胞培養法を用いた分析についても検討を行い、基盤技術を開発した。

## 2 対象

### 1) PTX 検出技術の開発

日南市の漁港で水揚げされ、PTX が不検出であることを確認したアオブダイを検体とした。

### 2) PTX 様毒の検出

本県で令和2、3、6年度に発生した原因物質が PTX 様毒と疑われる食中毒検体を用いた。

## 3 方法

### 1) LC-MS/MS 分析の精度向上

#### ア 使用器具の検討及び精製工程の改良

- ・ガラス製1種類、ポリプロピレン製（以下、PP製という。）4種類、ポリメチルペンテン製（以下、PMP製という。）1種類の遠沈管にPTX標準品を添加し、3時間の吸着試験を実施した。
- ・ヘキサンを用いた精製工程時に $-80^{\circ}\text{C}$ で10分間の冷却を行い、遠心分離後2層の分離度を目視により確認した。

#### イ 添加回収試験

PTX 標準品を 30 ng/g となるように添加したアオブダイを用いて、添加回収試験を実施した。なお、試験は3併行で実施し、試験結果の繰り返し精度を相対標準偏差（以下、RSD という。）で評価した。

### 2) 細胞培養法を用いた検出法の開発

細胞はヒト胎児横紋筋肉種（以下、RD-A 細胞という。）を使用した。 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$  阻害剤である Ouabain 処理で細胞毒性阻害を示すことにより定性的に判定した。細胞の生死は、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (CK12、同仁化学) を用い、死細胞から放出された乳酸脱水素酵素の活性を測定することにより判断した。なお、試験は3併行で実施し、結果は平均値で示した。

#### ア PTX 検出条件の検討

細胞数及び培養時間を決定した。

#### イ PTX 及び PTX 様毒の検出

---

\*1 現 都農食肉衛生検査所 \*2 現 日南保健所

- ・PTX 標準品を添加したアオブダイ（筋肉）を加熱抽出後 RD-A 細胞に添加し、定性試験を実施した。
- ・食中毒3検体（筋肉）を加熱抽出後 RD-A 細胞に添加し、定性試験を実施した。

#### 4 結果と考察

##### 1) LC-MS/MS 分析の精度向上

使用器具の検討では、PMP 製遠沈管の回収率が最も良好であった（表 1）。精製工程の改良では、冷却の工程を加えることで、水・メタノール層とヘキサン層が短時間で分離された。添加回収試験では、筋肉、肝臓検体のどちらにおいても良好な回収率が得られ、繰り返し精度は許容基準±20%を満たした（表 2、3）。

遠沈管をガラス製から PMP 製へ変更したことで PTX の器具への吸着が軽減されたと考えられる。また、操作の簡便化により作業時間の短縮及び操作精度の変動が小さくなった可能性がある。

##### 2) 細胞培養法を用いた検出法の開発

RD-A 細胞を  $2.5 \times 10^4$  cells/well プレートに播種後、増殖培地を加え 24 時間培養する条件が最適であった<sup>2)</sup>（図 1）。PTX 定性試験では細胞暴露濃度 7.5 ng/ml（30 ng/g 筋肉）以上の検出が可能であったが（図 2）、食中毒検体を用いた PTX 様毒の定性試験では、3 検体全てにおいて不検出であった（図 3）。

PTX は細胞培養法で検出されたが、PTX 様毒は細胞への致死活性を示さなかったことから、PTX 様毒が PTX とは異なる毒性メカニズムを有している可能性がある。一方、本試験における検出感度の限界や抽出工程における毒素の損失により不検出に至った可能性も否定できない。

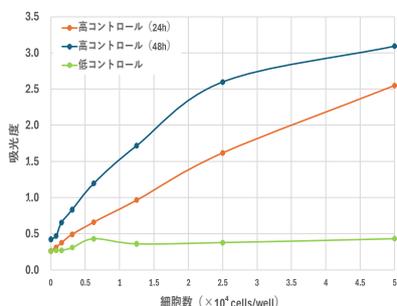


図 1 培養条件の検討結果

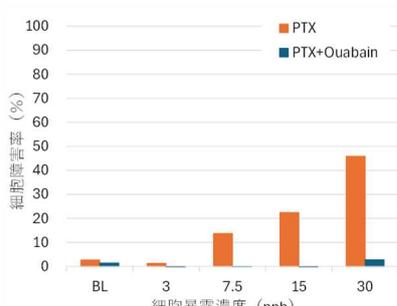


図 2 PTX 定性試験結果

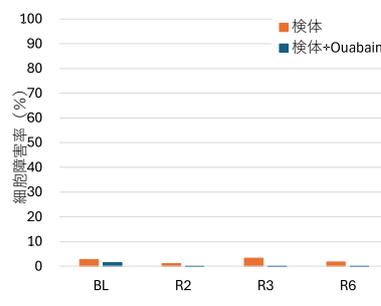


図 3 PTX 様毒定性試験結果

表 1 吸着試験結果

遠沈管の種類	回収率 (%) (n=3)	平均値 (%)
ガラス製	35.3~50.7	41.7
PP製1	46.0~66.7	54.7
PP製2	52.0~59.0	56.4
PP製3	46.0~69.0	58.9
PP製4	69.3~84.3	74.4
PMP製	70.3~97.3	86.3

表 2 添加回収試験（筋肉）

実施年度	回収率 (%)	RSD (%)
H26~R3(n=5)	17.2~116.8	—
R7(n=3)	69.1~96.5	17.28

表 3 添加回収試験（肝臓）

実施年度	回収率 (%)	RSD (%)
H26(n=1)	56.7	—
R7(n=3)	86.7~128.3	19.58

#### 5 まとめ

本調査により、LC-MS/MS 分析法による PTX 検出技術の精度が向上した。さらに、細胞培養法によるアオブダイ筋肉中から PTX を検出できる条件を開発した。今後は、細胞培養法による PTX 及び PTX 様毒の検出技術を向上させるための抽出方法等を検討し、PTX 様毒を検出できる体制を整備する予定である。

#### 参考文献

- 1) 厚生労働省. 自然毒のリスクプロファイル. [https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal\\_det\\_03.html](https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_det_03.html) (2025年12月24日アクセス可能).
- 2) 同仁化学研究所. Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いる測定. 細胞増殖測定細胞染色プロトコル 2023 ; 4(1) : 12-14