

植物プランクトン由来の神経毒の高感度定量法の開発と それによる毒性のモニタリング

A sensitive method for the quantification of neurotoxins produced by phytoplankton
and its use for toxin monitoring in marine environment

研究代表者 広島大学生物生産学部 講師 浜崎 恒二

Lecturer, Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University

Koji HAMASAKI

The tissue culture bioassay (TCBA) using the mouse neuroblastoma cell line, which combined with an assessment of cell viability by the use of a new type of sulfonated tetrazolium salt, WST-1, was applied for the quantitative measurement of paralytic shellfish toxins produced by the marine phytoplankton *Alexandrium tamarense*. The toxicities obtained from this method expressed statistically significant correlation to those obtained from the high performance liquid chromatography (HPLC) measurement, although the values from WST-1-TCBA was 1.1 times as large as those from HPLC. This method was applied for the toxin monitoring of the *Alexandrium tamarense* bloom occurred in Hiroshima Bay in 1998. This may be the first report that significant correlation between cellular toxicity and ambient ammonium concentration has been shown in natural environment.

1. 研究目的

天然において最も強力な神経毒の一種である麻痺性貝毒（サキシトキシン STX、ゴニオトキシン GTX）は、ある種の植物プランクトンによって生産され、ホタテ、カキ、ムラサキイガイなどに餌として取り込まれ蓄積していく。毒の蓄積量が多くなると、これを摂食した人間を死に至らしめる場合もあり、食品衛生上の問題となる。近年この植物プランクトンの分布域が、世界各地で急速に拡大しているため、毒化機構の解明と原因プランクトンの動態予測は重要な研究課題である。毒化の予測には、(1) 植物プランクトンの増殖モデル、(2) 毒の生産モデル、(3) 貝の毒化モデルといった複数のモデルを統合しなければならぬと考えられる。(1)についてはすでに多くの研究がなされ、いくつかのモデルが提唱されているが、(2) (3)については、未だ十分な情報が得られておらずモデルの構築には至っていない。こうした中で、実際の海洋環境における毒性の詳細かつ高感度なモニタリングは、毒の生産モデル構築のために必要不可欠であると考えられるが、従来のマウスアッセイ法では感度が低く、HPLC法では毒性を直接測定していないため、これまで十分な成果が得られてこなかった。広島湾においても、1992年より毎年4~5月にかけて麻痺性貝毒を産生

する植物プランクトン *Alexandrium tamarense* が発生し、貝類の毒化を引き起こしている。

そこで本研究では、フグ毒定量用に開発されたマウス神経芽細胞を用いる方法を、麻痺性貝毒定量法として適用することを検討する。さらに、この方法を使って、広島湾における *A. tamarense* の毒性モニタリングを行い、本種の生息環境条件や生活史形態等と毒性との関係を明らかにすることを目的とする。

2. 研究経過

2.1. 方法

マウス神経芽細胞を用いたバイオアッセイ法 (WST-1-TCBA 法)

細胞膜に Na⁺チャンネルをもつ神経芽細胞に、細胞内への Na⁺の流入を促進する試薬ベラトリジンと、細胞外への Na⁺の排出を阻害する試薬ウアバインを同時に加えると、Na⁺の一方的な流入と蓄積によって細胞は膨張死してしまう。この時、Na⁺チャンネルに対する特異的結合性をもつフグ毒（テトロドトキシン TTX）や麻痺性貝毒を加えると、細胞内への Na⁺の流入を阻害することによって、ベラトリジンとウアバインの作用に対して拮抗的に働き、細胞は膨張死を免れ生存し続ける。この時の細胞の生存率から毒量を推定することができる。原法は、Kogure

et al.(1988)によって考案されたが、ここではフグ毒定量用として改良された方法(WST-1-TCBA法)を適用した(Hamasaki et al. 1996)。

マウス神経芽細胞 Neuro2A を 37°C、10%牛胎児血清、1%抗生物質混液(Antibiotic Antimycotic Solution, SIGMA)を含む RPMI1640 培地で培養した。培養した細胞をトリプシン処理によって集め、96穴マイクロプレートに分注し1晩培養後、バイオアッセイに使用した。アッセイでは、スタンダード(TTX 又は STX)希釈列もしくはサンプル抽出液と同時に、ウアブイン、ベラトリジンそれぞれ、1mM、0.05mM となるように加えた。さらに24時間培養後、テトラゾリウム塩 WST-1 (Cell Counting Kit, Dojindo)を用いて生存細胞を染色し、マイクロプレートリーダーによって測定された吸光度を指標として生存率を評価した。既知濃度のスタンダード希釈列の用量-反応曲線からサンプルの毒性値を推定した。実際の麻痺性貝毒サンプルには、STX 以外にも複数の成分が含まれているが、ここでは毒性値を STX 当量として表した。

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 法と WST-1-TCBA 法の比較

WST-1-TCBA 法の定量性を確認するために、HPLC 法による定量値との比較を行った。1992年~1997年にかけて広島湾で分離された *A. tamarensis* 5株(ATHS-92,94,95, ATKR-96,97)を f/2 培地で培養した(12L/12D、280 μ mol m⁻² sec⁻¹、17°C)。集めた細胞を超音波破碎し、0.1%酢酸で麻痺性貝毒を抽出した。簡易カラム(SEP-PAK C₁₈, Waters)で部分精製した後、HPLC 法と WST-1-TCBA 法で分析した。WST-1-TCBA 法では、毒性が未知であるため5段階の希釈サンプル(1:1, 1:3, 1:9, 1:27, 1:81)について分析を行い、20~80%の相対吸光度を示すサンプルを用いて毒性値を推定した。

HPLC 分析は、Nagashima et al. (1987)の方法で行い、複数の麻痺性貝毒成分のうち GTX1-4、STX、neoSTX、C1、C2 を定量した。得られた定量値(mol)は、各成分の比毒性(MU/ μ mol)を用いてマウスユニット(MU)に換算し二つの方法による値を比較した。

自然環境中での毒性のモニタリング

調査は、1998年4月から6月まで週に1-4回の頻

度で広島湾の一部である呉港、音戸の瀬戸において行った(Fig.1)。植物プランクトンは、20ℓの表層水を採水して逆濾過法によって濃縮後、遠心して集めた。集めたサンプル中の *A. tamarensis* を一定量計数し、全細胞数を推定した。サンプルを研究室に持ち帰った後、麻痺性貝毒を抽出し、WST-1-TCBA 法によって毒量を測定した。また、抽出用サンプルとは別にとったホルマリン固定サンプルを検鏡し、植物プランクトンの種組成を調べた。環境要因として、水温、クロロフィル濃度、栄養塩濃度を測定した。クロロフィルは、海水を GF/F フィルターで濾過した後、ジメチルホルムアミドによって抽出し、ターナー蛍光光度計を用いて定量した。栄養塩については、オートアナライザー(Bran-Lubbe)を用いて硝酸、亜硝酸、アンモニア、リン酸の濃度を測定した。

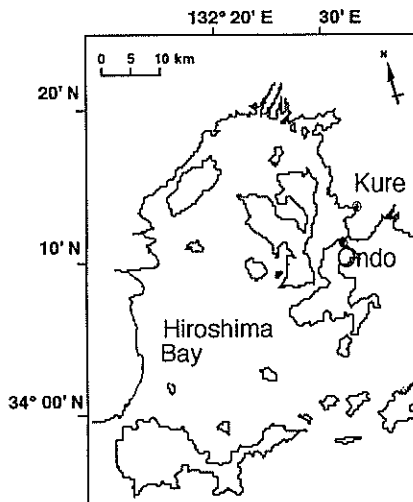


Figure 1. Sampling locations in Hiroshima Bay

2.2.結果と考察

WST-1-TCBA 法

TTX 定量用に最適化された条件をそのまま用いて STX スタンダードの分析を行った。その結果、TTX とほぼ同様の S 字状の用量-反応曲線が得られた(Fig.2)。この時の STX の半阻害濃度は約 16 nM であり、従来のマウスアッセイの 100 倍程度の測定感度であると推測された。また、*A. tamarensis* 抽出液の測定において、夾雑物の影響による吸光度の過大評価が見られた。これは、脱水素酵素によるテト

ラゾリウム塩の還元反応が、非特異的に促進されるためと考えられる。その影響を除くために、適当なコントロールサンプルの設定による吸光度の補正、あるいは簡易カラムによる前処理が必要であることがわかった。

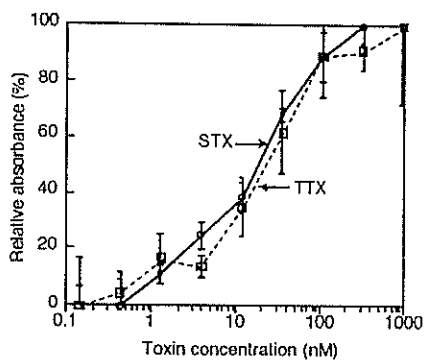


Figure 2. Dosage-response curve of STX and TTX in the WST-1-TCBA method.

HPLC 法と WST-1-TCBA 法の比較

今回分析した5株の広島湾産 *A. tamarensis* からは、麻痺性貝毒成分のうち主に GTX1、GTX4、C1、C2 および微量の GTX2、GTX3 が検出され、STX と neoSTX は検出されなかった (Fig.3)。検出された各成分のモル量 ($\text{fmol}\cdot\text{cell}^{-1}$) に、それぞれの比毒性 (GTX1:2468、GTX2:892、GTX3:1584、GTX4:1803、C1:15、C2:239 $\text{MU}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) を乗じた後、これを合計したものを HPLC 分析による毒性値とした。二つの方法による毒性値は、おおむね近い値を示し統計学的に有意な相関を示した ($r=0.910$, $P<0.05$)。その回帰直線は、原点通過を仮定すると傾きが 1.1 となり、WST-1-TCBA 法は HPLC 法よりも 10% 程度高い毒性値を示す傾向にあることがわかった (Fig. 4)。HPLC のクロマトグラムには、スタンダードがないために分析の対象としなかった *decarbamoyl*-GTX2 ($1617 \text{ MU}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) や *decarbamoyl*-GTX3 ($1872 \text{ MU}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) と思われるピークが見られた。今回の HPLC 分析では、これらの高い比毒性を持つ麻痺性貝毒成分を計算に入れていないため、実際よりも毒性値が低く見積もられた可能性がある。従って、WST-1-TCBA 法による値の方が、実際の毒性値を反映していると考えられる。

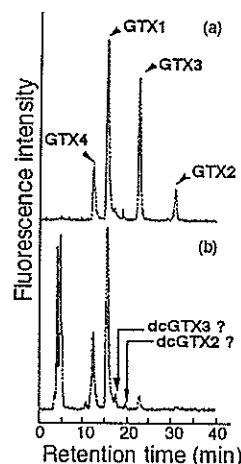


Figure 3. HPLC chromatograms of the GTX standard (a) and the extract from *A. tamarensis* ATKR-97.

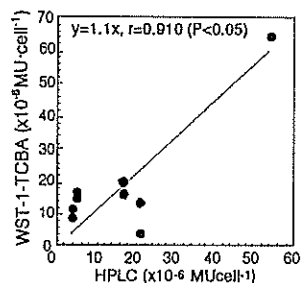


Figure 4. Comparison of *A. tamarensis* toxicity measured by WST-1-TCBA and HPLC.

自然環境中での毒性のモニタリング

A. tamarensis の細胞は、4/4 のサンプリング開始時より見られ、その細胞濃度はいったん減少した後、4/21 に再びピークとなった。その後、水温の上昇と共に漸減して呉港で 6/5、音戸で 5/22 以降には検出限界 ($0.3 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$) 以下となった (Table 1)。 *A. tamarensis* の細胞数は、全植物プランクトン細胞数の 10~80% を占めていた。また、細胞あたりの毒性値は、 $0.28\sim 224 \text{ pg}\cdot\text{cell}^{-1}$ と期間中大きく変動していた。このことから、毒化現象は単に細胞濃度、優占率のみならず、細胞あたりの毒性値にも大きく影響を受けることがわかる。毒性値は、同一株でも増殖フェーズや培養条件によって変動することが実験によって示されており、自然環境中でもその生息条件に左右されていることが示唆された。そこで、栄養塩濃度と毒性値の関係を検討した結果、アンモニア態窒

素濃度と有意な相関を示した (Fig. 5)。

Table 1. Environmental conditions, cell abundance and toxicity in the field monitoring of *A. tamarensis*.

Date	Temp. (°C)	Chl-a (mg m ⁻³)	Nutrient (μM)				Abundance (cells ml ⁻¹)	Toxicity (pg cell ⁻¹)
			NH ₄	PO ₄	NO ₂	NO ₃		
Kure								
4-Apr	14.2	2.25					16	138
11-Apr	14.2	1.62					2.5	ND
12-Apr	15.3	3.44					5.1	36
15-Apr	14.4	2.76					10	10
17-Apr	15.5	7.81	1.4	0.13	0.40	3.6	18	23
19-Apr	16.0	9.49	0.40	0.052	0.18	0.26	7.4	11
21-Apr	14.8	18.9	ND	0.06	0.16	0.22	193	51
24-Apr		3.57	2.3	0.14	0.33	4.7	34	38
26-Apr	15.7	9.09	1.8	0.26	0.33	8.1	62	76
28-Apr	17.0	6.80	0.14	0.079	0.22	0.95	106	25
2-May	17.0	3.94	ND	0.13	0.13	0.45	7.5	20
5-May	16.0	3.39	1.4	0.18	0.19	4.0	9.9	4.5
9-May	17.5	5.04	0.58	0.076	0.20	1.4	14	0.34
15-May		3.33	1.5	0.16	0.21	3.8	2.2	ND
22-May	20.5	8.27	1.2	0.041	0.38	0.59	2.6	0.28
Ondo								
4-Apr	13.4	2.29					11	71
11-Apr	14.5	1.22					2.2	ND
12-Apr	13.7	2.66					2.0	11
15-Apr	13.6	3.33					3.9	21
17-Apr	14.5	4.45	ND	0.10	0.21	0.45	5.1	224
19-Apr	13.8	4.10	0.28	0.21	0.62	4.0	7.9	2.6
21-Apr	16.8	5.07	0.070	0.11	0.22	0.68	14	9.4
24-Apr		2.59	ND	0.059	0.18	0.60	9.2	76
26-Apr	14.4	3.26	0.003	0.19	0.16	1.4	13	33
28-Apr	17.0	3.54	ND	0.075	0.14	0.77	4.9	6.0
2-May	15.8	2.91	4.6	0.10	ND	ND	2.4	171
5-May	15.5	5.10	2.7	0.10	ND	ND	3.2	2.9
9-May	16.0	3.18	ND	0.086	0.17	0.14	2.4	ND
15-May		3.39	ND	0.14	0.32	0.88	1.7	ND
22-May	17.5	4.35	0.34	0.08	0.14	0.21	ND	ND

ND: not detected

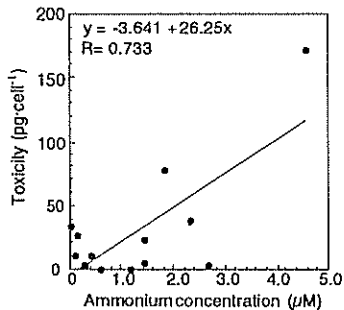


Figure 5. Relationship between ammonium concentration and toxicity of *A. tamarensis* in Hiroshima bay.

まとめ

1. TTX 定量用の WST-1-TCBA 法は、麻痺性貝毒にも適用できることがわかった。
2. WST-1-TCBA 法による *A. tamarensis* の毒性測定値は、HPLC 法の値と有意な相関を示すが、10%程度

高い値となった。

3. 自然環境中での *A. tamarensis* の毒性は大きく変動し (0.28~224 pg·cell⁻¹)、アンモニア態窒素濃度と有意な正の相関を示した。

引用文献

- Hamasaki, K. et al. (1996) *Toxicon* **34**, 490-495. Kogure, K. et al. (1988) *Toxicon* **26**, 191-197. Nagashima, Y. et al. (1987) *Nippon Suisan Gakkaishi* **53**, 819-823.

3. 研究成果

従来のマウスアッセイに比べ100倍程度高感度な麻痺性貝毒の測定法を確立し、自然環境中での有毒プランクトンの毒性を測定することによって、環境要因と毒性の関係を示すことができた。このような関係は、培養実験によって示されているが、実際の自然環境中で示されたのはおそらく初めてである。

4. 今後の課題と発展

今回検討した麻痺性貝毒の測定法は、本研究課題と並行して行った他の研究にも利用し成果が得られている。自然環境中での動物プランクトンの毒性のモニタリングでは、浮遊生態系における毒の移行を示唆する結果が得られた。また、室内実験では、培地へのアンモニア態窒素の添加による *A. tamarensis* 毒性値の上昇が観察された。将来的には、本法が貝毒測定キットとして広く実用化され、マウスアッセイに代わる公定法ともなることが期待される。今後、貝類試料への適用性や測定誤差、マウスアッセイとの比較等の検討を行う必要がある。

当初計画した生活史ステージや細胞周期の判別については、培養した *A. tamarensis* の細胞周期をフローサイトメータによって判別計数することはできたが、これを野外試料に應用するまでは至らなかった。現在も培養系で検討中である。

5. 発表論文リスト

1. The tissue culture bioassay combined with cell viability assessment using a sulfonated tetrazolium salt for paralytic shellfish toxins in the dinoflagellate *Alexandrium tamarensis*. Hamasaki, K., Takahashi, T., Nagashima, Y. *J. Plankton. Res.* (投稿中)
2. Toxin variability of the dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* isolated from Hiroshima Bay, Japan. Hamasaki, K., Horic, M., Taguchi, T. (投稿準備中)