

THE CHEMICAL TIMES

2025 No.3 (通巻277号)

ISSN 0285-2446

特 集

毒素分析の最新動向

02

**FAO/WHO合同食品添加物専門家会議(JECFA)で
評価された食品汚染カビ毒とその分析法**

東京農業大学／国立医薬品食品衛生研究所 小西 良子

09

ボツリヌス毒素の特徴、治療への応用と分析法

東京農業大学 鳥居 恭司

16

麻痺性貝毒の機器分析法に関する研究の最新動向

国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所 渡邊 龍一



KANTO CHEMICAL CO., INC.

FAO/WHO合同食品添加物専門家会議 (JECFA)で評価された 食品汚染カビ毒とその分析法

Mycotoxins evaluated by Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)
and their Analytical Methods

小西 良子

Yoshiko Sugita-Konishi

東京農業大学 客員教授 / 国立医薬品食品衛生研究所 名誉所員

Tokyo University of Agriculture (Visiting Professor) / National Institute of Health Sciences (Honorary Member)

KEYWORD ▶

カビ毒

JECFA

分析法

はじめに

01

2022年の岩手県産南部小麦のデオキシニバレノール(DON)汚染事例や2024年の紅麹を原料とする健康食品による健康被害など、近年カビ毒が食品衛生分野で話題に上ることが多くなってきている。改めてカビ毒という汚染物質の特徴を挙げると、①カビ毒を産生するカビはある程度限られているが、環境中に多く存在すること、②熱に強く、分解されにくいこと、③発がん性をはじめ多くの健康被害を引き起こすこと、などがある。これらの特徴から、農作物や家畜飼料が汚染された場合、加工品に残存し健康への影響が問題となる。農作物の汚染状況に関して、近年の気候変動などの影響でカビ毒の被害が増加していることもあり、世界的にみると経済的損失は年間数十億ドル程度と算出されている。そのため、カビ毒の汚染による健康被害を守るため、CODEX委員会では、重要な健康リスクがあり国際的な貿易上の問題があるカビ毒に対して最大基準値(Maximal Level:ML)を設けている。この基準値は科学的根拠に基づき定められているが、科学的根拠を提供しているのがFAO/WHO合同食品添加物専門家会議(JECFA)である。すなわちリスク分析の役割からみるとJECFAはリスク評価機関であり、CODEX委員会はリスク管理機関ということになる。

本稿では、カビ毒のリスク評価機関であるJECFAで現在までに評価されたカビ毒を中心に解説するとともに、日本でバリデーションが終了している分析法について紹介したい。

ODEX委員会とJECFAとは

02

CODEX委員会は国連食糧農業機関(FAO)と世界保健機関(WHO)により1963年に設立され、加盟185カ国、およびEUが加盟している国際政府間組織である。消費者の健康保護、食品の公正な取引の保証が主目的であり、食品に関する国際規格や規範の策定を行っている。また、これらの基準は世界貿易機関(WTO)の衛生植物検疫措置の適用に関する協定(SPS協定)で国際基準として位置づけられている。一方、JECFAは1956年に国際的な食品安全確保を目的としてFAO/WHOのもとに設立され、食品添加物、カビ毒、自然毒、動物用医薬品の残留物、食品中で生成する有害物質等のリスク評価を担っている専門家集団である。CODEX委員会は政府機関であるためさまざまな利害関係が生じるが、JECFAはそれぞれの国の利害関係とは無関係に、科学的根拠のみで公平なリスク評価を行う機関といえる。図1に示したように、JECFAがリスク評価したものをCODEX委員

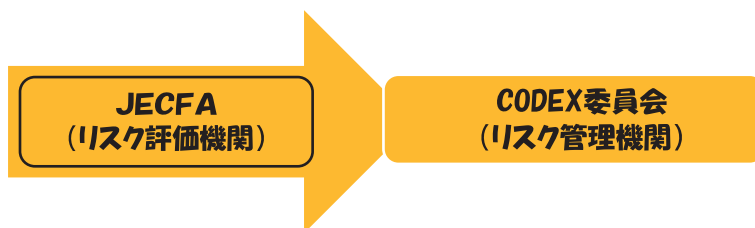


図1 JECFAとCODEX委員会の関係

会で基準値設定を行うというプロセスを踏む。CODEX基準値は国際的な基準値となるため、多くの国で準拠すべき基準となる。言い換えればJECFAで評価されたカビ毒がCODEX基準値になる可能性が高いということである。もし国際基準が定められているにも関わらず当事国での基準がなかった場合には、規格外(消費者の健康保護が担保されない)食品が輸出入される恐れがある。そのため日本ではCODEX基準値を尊重しており、これらを参考にしながら、食品衛生法、農薬取締法、飼料安全法などの策定を行っている。なお、日本ではリスク評価機関(食品安全委員会)とリスク管理機関(消費者庁、厚生労働省、農林水産省)を経て基準値および分析法が決められている。

JECFAで評価されたカビ毒(表1参照) 03

JECFAでは、世界的に汚染が広がり、健康被害が危惧されるカビ毒に関して、CODEX委員会からの依頼も踏まえて公平なリスク評価を行っている。言い換えれば、国際的に問題にならなければJECFAでは評価されないのである。一つの例としてトリコテセン系カビ毒の一つであるニバレノール(NIV)がある。このカビ毒は日本では麦類に汚染が検出されている。同じ仲間にデオキシニバレノール(DON)があるが、DONは世界的に汚染が多いことからJECFAで評価されている。NIVは地域性が高いカビ毒で、日本では国産麦でのDONとNIVの汚染が問題となる。そのため、食品安全委員会でリスク評価がなされ一日耐容摂取量(TDI)を0.4 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ と定めている。近年EUでも問題になり、欧州食品安全機関(EFSA)においてリスク評価を行っているが、食品安全委員会のリスク評価を参考にしており、日本より緩めのTDIを設定している。

ここでは国際基準を念頭にJECFAでの評価が終わっているカビ毒に限ってその概要を紹介していく。なお、それぞれのカビ毒のPMTDI(暫定耐容摂取量)は表1に示した。

3-1. アフラトキシン(AFs)

アフラトキシン(AFB1、AFB2、AFG1、AFG2)は、*Aspergillus*属が産生するカビ毒である。人の肝臓に発がん性があり、中でもアフラトキシンB1が最も強い発がん性を有する。JECFAではいままでも6回評価を行っているが、表1には最近の2007年および2016年の評価を載せた。それによるとアフラトキシン類による健康リスクを低減するため、摂取量を可能な限り低減すべきとなっている。特に、B型肝炎表面抗原陽性者では、陰性者に比べて肝がん発症率が30倍高いことから、アフラトキシン類の摂取量を減らすことが肝がんリスク低減に有効であると勧告している。また遺伝毒性があるためTDIは設定できないとしている。

内閣府食品安全委員会(食安委)では2009年および2013年にリスク評価を行っており、JECFAと同じ評価内容であるが、日

本に輸入される落花生においてAFB1以外のAFグループの汚染率が高くなる傾向があるため、いままでのAFB1のみの規制ではなくAFB1、AFB2、AFG1、AFG2の4種類を総アフラトキシンとして基準値を設定する必要があるとしている。

3-2. アフラトキシンM1 (AFM1)

AFB1の代謝産物であるAFM1は、飼料を介して牛乳に汚染する。AFsと同じく遺伝毒性を有するため、TDIは設定できない。JECFAでは最悪のシナリオから提案された0.05および0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のAFM1の最大基準値案では予測される肝臓がんの追加リスクは非常に小さいと結論している。近年JECFAで取り入れられた曝露マージン(MOE)によるリスク評価では、AFB1のBMLD10(ベンチマークドーズ:10%の影響が現れる信頼区間下限値)を170 $\text{ng}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ としている。

食安委では2013年に食品健康影響評価を行い、飼料中のAFB1および乳中のAFM1の汚染は、合理的に達成可能な範囲で出来る限り低いレベルに抑えるべきであるとしている。

3-3. オクラトキシンA(OTA)

OTAは、*Aspergillus*属菌および*Penicillium*属菌が産生するカビ毒である。腎臓および肝臓に毒性を有しており、動物実験では発がん性も報告されている。バルカン諸国においての人の腎障害との関係も疑われている。JECFAでは、ブタの腎機能低下に基づいて、無影響量(LOEL)が8 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ であり、安全率500を適用して、PTWIを112 $\text{ng}/\text{kg bw}/\text{week}$ に設定した。また、5または20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の最大基準値の使用がOTAへの食事曝露に影響を与える可能性は低いと結論付けた。これを受けてCODEX基準値は小麦・大麦・ライ麦を対象に5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と設定された。

JECFAは週当たりのPMTDIを設定しているが、食安委では2014年に評価を行い、非発がん毒性に関するPMTDIを16 $\text{ng}/\text{kg bw}/\text{day}$ 、発がん性に関するPMTDIを15 $\text{ng}/\text{kg bw}/\text{day}$ と設定した。現在、厚生労働省 薬事・食品衛生審議会において小麦および大麦を対象に5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の基準値案を食安委に提出しており、最終段階となっている。

3-4. パツリン(PAT)

主に*Penicillium*属菌が産生するカビ毒でリンゴに多く汚染することが知られている。発見の経緯は抗生物質としてであったが、動物実験等で毒性が強いことが明らかになったことからカビ毒として分類された。毒性としては消化管の出血、潰瘍などが動物実験では認められるが、ヒトでの食中毒事例はない。JECFAではラットの体重減少を指標にPMTDを0.4 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ と設定した。食安委では2003年、厚生労働省 薬事・食品衛生審議会のパツリンのPTDIを0.4 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ と設定するとの評価結果を妥当と考えるとしている。

3-5. フモニシンB1、B2、B3 (FBs)

*Fusarium*属菌が産生するフモニシンは比較的新しく発見されたカビ毒で、1988年に構造が決定された。ウマの白質脳症やブタの肺水腫など家畜への健康影響があるが、ヒトにおいてはとうもろこし加工品を主食としている地域において、新生児の神経管への催奇形性を示すとの報告がある。また、動物実験では発がん性が認められている。JECFAは、FB1、FB2、およびFB3の単独または組み合わせで2 µg/kg bw/dayというグループPMTDI

を設定した。また、2016年の会議ではAFsとFBsへの共曝露も評価した。動物実験では前腫瘍性病変または肝細胞癌の発症におけるAFsとFBsの共曝露の相加的または相乗効果を示すエビデンスはあるが、現在、ヒトでのそのような影響に関するデータは入手できなかったとしている。食安委では2017年に行った評価においてJECFAと同様にFB1、FB2、およびFB3の単独または合計で2 µg/kg bw/dayと設定した。

表1 JECFAで評価したカビ毒と内閣府食品安全委員会のリスク評価

カビ毒	評価年	耐容摂取量	URL	食品安全委員会の評価	
バツリン	44回(1995年)	PMTDI 0.4 µg/kg bw/day	https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/37246/WHO_TRS_859.pdf?sequence=1	2003年	PMTDIを0.4 µg/kg bw/dayに設定
アフラトキシン	68回(2007年) 83回(2016年)	摂取量は合理的に可能な限り低いレベルに減らす必要がある。 確立されていない遺伝毒性発がん物質	https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/42142/WHO_TRS_884.pdf?sequence=1	2009年	アフラトキシンは遺伝毒性が関与すると判断される発がん物質であり、食品からの総アフラトキシンの摂取は合理的に達成可能な範囲で出来る限り低いレベルにするべきである。汚染実態調査の結果、BG グループの汚染率が近年高くなる傾向が見られていることを考慮すると、総アフラトキシンの基準値を設定する必要がある。
ゼアラレノン	53回(2000年)	ゼアラレノンおよびその代謝物(α-ゼアラノールを含む)のPMTDI 0.5 µg/kg bw/day	https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/42378/WHO_TRS_896.pdf?sequence=1		
アフラトキシンM1	56回(2002年)	遺伝毒性発がん物質、BMDL ₁₀ 570 ng/kg	https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/42448/WHO_TRS_906.pdf?sequence=1	2013年	乳中のアフラトキシンM1の汚染は、合理的に達成可能な範囲で出来る限り低いレベルに抑えるべきである。
オクラトキシンA	68回(2007年)	許容摂取量: PTWI:112 ng/kg bw/week	https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/43870/9789241209472_eng.pdf?sequence=1	2014年	非発がん毒性に関するPMTDIを16 ng/kg bw/day、発がん性に関するPMTDIを15 ng/kg bw/dayと設定
アフラトキシン	68回(2007年)	摂取量:確立されていない、遺伝毒性発がん性物質。許容HBsAg陽性者における発がんリスクが高いことが再確認され、特にHBV感染率の高い地域ではアフラトキシン摂取の削減が肝がん予防に重要である	https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/43870/9789241209472_eng.pdf?sequence=1		
デオキシニバレノール	72回(2011年)	DONおよびアセチル化代謝物のPMTDI:1 µg/kg bw/day(グループPMTDI);ARfD: DON およびアセチル化代謝物に対して 8 µg/kg bw	https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44514/WHO_TRS_959_eng.pdf?sequence=1	2010年 /2018年	DONのTDIを1 µg/kg bw/dayに設定
ステリグマトシステイン	83回(2016年)	遺伝毒性があるため許容摂取量が決められず。BMDL10(ラット)は160 µg/kg	https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/254893/9789241210027_eng.pdf?sequence=1#page=120		
アフラトキシン	83回(2016年)	慢性肝疾患と発育阻害の発生率が、アフラトキシンとフモニシンの共曝露が、バイオマーカー研究で確認されている。BMDL10 170 ng/kg	https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/43870/9789241209472_eng.pdf?sequence=1	2009年	アフラトキシンは遺伝毒性が関与すると判断される発がん物質であり、食品からの総アフラトキシンの摂取は合理的に達成可能な範囲で出来る限り低いレベルにするべき
4,15-ジアセトキシシトルペノール(DAS)	83回(2016年)	DAS、T-2、HT-2毒素 許容摂取量 60 ng/kg bw/day(グループPMTDI)	https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/254893/9789241210027_eng.pdf?sequence=1#page=54		
フモニシン(FBs)	83回(2016年)	フモニシン(FB1、FB2及びFB3の単独又は合計)TDI:2 µg/kg bw/day(グループPMTDI)	https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/254893/9789241210027_eng.pdf?sequence=1#page=69	2017年	フモニシン(FB1、FB2及びFB3の単独又は合計)のグループTDIを2 µg/kg bw/day
アーゴットアルカロイド(EA)	91回(2022年)	PMTDI: 0.4 µg/kg bw/day	https://www.who.int/publications/i/item/9789240054585		
T-2、HT-2、DASトキシシズ	93回(2022年)	T-2、HT-2、およびDAS(グループARfD) 320 ng/kg bw、DAS、T-2、HT-2毒素(グループ PMTDI) 25 ng/kg bw/day 2016年のPMTDIは撤回された。	https://www.who.int/publications/i/item/9789240068452		

PTDI:暫定耐容一日摂取量

ARfD:急性参照量

BMDL10 :ベンチマークドーズ 10% 値(10%の毒性発現頻度に対する信頼上限曲線における用量の信頼下限値)

3-6. ゼアラレノン(ZEN)

ZENは*Fusarium*属菌が産生するカビ毒であり、おもにブタの感受性が高く、生殖障害を発症する。また、ZENはエストロゲン作用があり、内分泌かく乱物質の一つである。遺伝毒性については陰性とされている。JECFAでは、ZENの安全性は最も感受性の高い種であるブタにおいてホルモン作用を及ぼさない用量に基づいて評価できると結論付け、ZENとその代謝物の合計のPMTDIを 0.5 $\mu\text{g/kg bw/day}$ と設定した。食安委では評価されていない。

3-7. ステリグマトシスティン(STC)

STCは*Aspergillus*属菌が産生するカビ毒である。AFsの前駆体であることから、遺伝毒性があり、PMTDIは設定されていない。JECFAでは曝露マージン(MOE)を評価するアプローチを使用し、リスク評価を行っている。BMDL₁₀を0.16 $\text{mg/kg}\cdot\text{bw}$ として、成人のMOEを算出すると、上限(UB)と下限(LB)の仮定に基づく平均推定値で9,400から530,000を超える範囲であった。上限のシナリオでは4,700~270,000の範囲であった。一般的にMOEが10,000を超えれば、発がんリスクは極めて低くなると判断される。CODEX委員会で基準値の設定が議論されたが時期尚早という結論であった。

食安委では評価されていないが、農林水産省の調査によって、国内の穀類乾燥調製施設内にはSTCを産生するカビが広く生息している可能性があることが報告されている。

3-8. T-2トキシシン(T-2)、HT-2トキシシン(HT-2)およびジアセトキシシルペノール(DAS)

T-2、HT-2およびDASは、*Fusarium*属菌の産生するトリコテセン系カビ毒であり、その中でも毒性の高いタイプAに分類される。JECFAでは、これら3つのカビ毒は構造的にも類似しており、同様の毒性作用があると判断された。症状は嘔吐下痢だけでなくT-2の汚染した穀類を摂取することで、ヒトにおいて白血球減少が起こり死者を出した食中毒事例がある。JECFAはこれらの3つを合わせてグループ急性参考量(ARfD)を320 $\text{ng/kg}\cdot\text{bw}$ とした。2016年のDASの評価時にグループTDIとして60 ng/kg bw/day を決定したが、その後2022年に25 ng/kg bw/day に改定している。食安委では評価されていない。

3-9. デオキシニバレノール(DON)

DONは、*Fusarium*属菌の産生するトリコテセン系カビ毒に属するが、比較的毒性が弱いタイプBのカビ毒である。同じタイプにNIVが存在する。DONは世界的に汚染が広がっており、植物体の中でアセチル化DONを産生する。アセチル化DONはヒトや動物の消化管内でDONに転換するため、その毒性はDONの毒性と同等であるとJECFAは結論付けている。この決定に基づき、JECFAはDONとアセチル化DONを合わせてグループPMTDIを1 $\mu\text{g/kg bw/day}$ と設定した。また、嘔吐などのARfD値を8 $\mu\text{g/kg}\cdot\text{bw}$ とした。

食安委は、2010年にNIVとともに評価を行い、それぞれの

PMTDI を発表しているが、厚生労働省がDONの基準値を策定するときに諮問を受けて再評価をしている(2019年)。

3-10. 麦角アルカロイド(EA)

EAは、小麦などの穀類に寄生した麦角菌(*Claviceps purpurea*など)が作る「麦角」と呼ばれる黒い角状の固まりの中に含まれている。EAには多種類の類縁体が存在しているので、毒性の評価はグループPMTDIとして設定している。EAによる中毒は、中世ヨーロッパでは、非常に激しい手足の痛みを伴うことから「聖アントニウスの業火」として恐れられ、致死率も高かった。JECFAはグループPMTDIを0.4 $\mu\text{g/kg bw/day}$ とし、グループARfDもPMTDIと同じ値にした。

国内では、農産物規格規程において麦類の麦角粒の取り扱い決められている。CODEX委員会においては、麦角粒及び麦角の混入率の最大基準値を、小麦は0.05%、デュラム小麦は0.5%と設定しているが、食安委では評価が行われていない。

CODEX基準値と食品衛生法

04

表2に、現在までにCODEX委員会で最大基準値が設定されたカビ毒、および食品衛生法で基準値が定められたカビ毒をリストアップした。CODEX委員会ではPAT、AFs、AFM1、OTA、FBs(B1、B2、B3)、DONの6種類のカビ毒に最大基準値として特定の食品を対象に設定されている。これはCODEX基準値の原則に、「消費者の総暴露量への寄与率が高い食品のみに設定すべきで、消費者が十分に保護されるものであるべき」とあるからである。対象になった食品はそれぞれのカビ毒において国際的にみて寄与率の高い食品であるということである。しかし対象食品は国レベルでは、その国にあった食品になるべきである。

食品衛生法では、PAT、AFs、AFM1、DONの4種類に基準値が設定されている。なかでもAFsは全食品が対象となっており、検査には困難な食品もあるが消費者が十分に保護されるものであるといえる。OTAの基準値も近い将来策定されることから、コーデックス規格とのギャップは少なくなってきたが、AFsやDONに関しては、CODEX委員会では乳幼児食品に対して基準値が設けられているにもかかわらず、日本では設けられていない。

分析法について

05

次にカビ毒の分析法について紹介する。食品衛生法で基準値のあるカビ毒に関しては、基準値を策定するときにその分析法も共に通知法等で発出している。いまだで発出した通知法は、表2に挙げたので参考にしてほしい。その中の「トウモロコシ中の総

アフラトキシンの試験法について」はカビ毒の迅速簡易測定法に対して初めてクライテリアを示したものであり、カビ毒での初めての迅速簡易測定法の通知法である。その後、DONでもこのクライテリアに従って迅速簡易測定法が使われている。また、食品衛生法で基準値が設定されていないが、JECFAおよびCODEX委員会で評価または審議が行われたカビ毒に関しては、厚生科学研究費で分析法の確立とその分析法を用いた実態調査が行われている。ここでは、2007年と2014年にCODEX委員会で最大基準値が設定されたOTAとFBs (B1+B2+B3)、2016年の

JECFAで評価されたSTC、2022年に評価された麦角アルカロイド、T-2、HT-2およびDASの分析法について紹介する。LC-MS/MSの条件には表3にまとめた。

5-1. OTAの分析法 (OTAとDONの同時分析法)

OTAの分析法は、DONとの同時分析法として令和4年度度の厚生科学研究費 (厚労科研費) において小麦での検討が行われている。

それによると小麦破碎物25.0 gに抽出溶媒アセトニトリル:メ

表2. カビ毒のCODEX最大基準値と食品衛生法による基準値

CODEX最大基準値				食品衛生法での基準値			
カビ毒	対象食品	基準値	備考	対象食品	基準値	分析法/備考	
パツリン	リンゴ果汁	50 μg/kg		リンゴ果汁	50 μg/kg	パツリンの試験法について（平成15年12月15日、食安基発第1215001号） https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00ta6162&dataType=1&pageNo=1#:~:te	
総アフラトキシン	加工原料用落花生	15 μg/kg		すべての食品	10 μg/kg	・総アフラトキシンの試験法について（平成23年8月16日、食安発0816第1号） https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tb7561&dataType=1&pageNo=1 ・トウモロコシ中の総アフラトキシンの試験法について（平成23年8月16日、食安監発0816第7号） https://www.shodex.com/themes/custom/ja/pdf/autoprep/kosou/b/230816taflatoxinkani.pdf	
	加工原料用木の実（アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ、殻無しブラジルナッツ）						
	直接消費用木の実（アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ、殻無しブラジルナッツ）	10 μg/kg					
	直接消費用乾燥いちじく						
	加工向けのトウモロコシ穀粒	15 μg/kg					
	トウモロコシのフラワー、ミール、セモリナ及びフレーク	10 μg/kg					
	玄米	20 μg/kg					
	精米	5 μg/kg					
	加工向けのソルガム穀粒	10 μg/kg					
	乳児用穀類加工品	10 μg/kg					（基準値は販売されている商品全体（消費用に水戻しや調製をしていないもの）へ適用）
	（乳児（12か月まで）及び幼児（12～36か月）向けのすべての穀類加工品に適用）						
乳児（6～12か月）及び幼児用穀類加工品	5 μg/kg	（基準値は販売されている商品全体（消費用に水戻しや調製をしていないもの）へ適用）					
（乳児（6～12か月）及び幼児（12～36か月）向けの食料援助用の穀類加工品に適用）							
アフラトキシンM1	牛乳	0.5 μg/kg		牛乳	0.5 μg/kg	乳に含まれるアフラトキシンM1の試験法について（平成27年7月23日、食安発072第5号、 https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tc1153&dataType=1&pageNo=1 ）	
オクラトキシンA	小麦、大麦、ライ麦	5 μg/kg		大麦・小麦	5 μg/kg	近々決定予定	
デオキシニバレノール	加工向けの穀類（小麦、大麦、トウモロコシ）	2 mg/kg	「加工向け」とは、食品原材料として使用される前、さもなくば食用としての加工又は提供の前に、DON濃度を低減する追加の加工/処理を受けることが意図されているものを指す。加盟国は、濃度を低減する加工を規定できる。	小麦玄麦	1 mg/kg	デオキシニバレノールの試験法について（令和3年9月30日、生食発0930第2号） https://www.mhlw.go.jp/content/11135200/000838886.pdf	
	小麦、大麦又はトウモロコシを原料とするフラワー、ミール、セモリナ及びフレーク	1 mg/kg					
	乳幼児用穀類加工品	0.2 mg/kg	基準値は販売されている商品全体（消費用に水戻しや調製をしていないもの）へ適用				
フモニシン	未加工のとうもろこし穀粒	4000 μg/kg					
	とうもろこしのフラワー及びミール	2000 μg/kg					

タノール:水(1:1:2)200 mLを加え、30分間振盪することで抽出を行い、遠心分離し上清を得る。精製にはイムノアフィニティークラムを用い、メタノール:酢酸(49:1)でDONとOTAを溶出させる。窒素乾固後、残渣をアセトニトリル:水:酢酸(30:70:1)1.0 mLで溶解したものをLC-MS/MSで測定する。

多機関共同試験による妥当性評価では、DONの添加回収率は、97.0~98.3%、併行相対標準偏差(RSDr)は2.5~3.3%、室間再現相対標準偏差(RSDR)は8.3~10.1%、HorRatは0.4~0.5の範囲であった。OTAの回収率は、83.8~90.3%、RSDrは3.1~3.7%、RSDRは16.0~19.7%、HorRatは0.7~0.9の範囲に収まっていた。自然汚染検体での妥当性は現在検討中である。

5-2. FBs (B1、B2、B3)の分析法

国立衛生研究所による多機関共同試験(11機関)の結果から確立された分析法である。

抽出は検体25 gに対し抽出溶媒メタノール:水(3:1)100 mLを加え、15分間振とう後、遠心分離により上清を得る。前処理として強塩基性陰イオン交換体ミニカラムを用いる。カラムに負荷したのち、抽出溶媒メタノール:酢酸(99:1)14 mLを入れ、FBsを溶出させる。窒素乾固後、残渣をアセトニトリル:水(50:50)1.0 mLで溶解し、LC-MS/MSで測定する。

妥当性試験結果は、回収率の平均値はFB1で79.7~85.2%、FB2で78.6~92.8%、FB3で79.0~83.1%であり、HorRatは、FB1では0.3~0.6、FB2では0.5~1.4、FB3では0.4~1.2で

あった。いずれも妥当性試験のクライテリアを満たしていた。

5-3. STCの分析法

令和元年度の厚労科研で行われた実態調査の目的で確立された分析法である。抽出は、試料(米、小麦粉(国産及び海外)など)25 gにアセトニトリル:水(85:15)100 mLを加え、30分間振盪し、遠心分離により上清を得る。精製はイムノアフィニティークラム(堀場製作所社製 AFLAKING)を用いる。アセトニトリルで溶出し、窒素乾固したのちアセトニトリル0.5 mLおよび蒸留水0.5 mLを加えて溶解しLC-MS/MSで測定する。

妥当性評価結果は、0.5 µg/kg添加群における回収率は92.0~106.8%であり、標準偏差は5.4%以下であった。5 µg/kg添加群における回収率は90.7~101.2%であり、標準偏差は5.5%以下であった。

5-4. タイプAトリコセン系化合物(T-2、HT-2およびDAS)の分析法

令和元年度厚労科研費で行われた実態調査の目的で確立された分析法である。固体試料を25 g量りとり、アセトニトリル:水(85:15)100 mLを加え、30分間振とうし、遠心後、上清を得る。精製は多機能カラムを用いる。液体試料の精製は固相カートリッジを用い、窒素乾固後アセトニトリル:水(1:9)0.5 mLで溶解したものをLC-MS/MSに供する。

妥当性試験結果では、DAS、T-2、およびHT-2の回収率は101~111%、RSDr 1.6~7.7%、RSDRは5.3~8.2%、HorRat

表3 LC-MS/MSの条件

カビ毒	DONおよびOTAの同時分析	FBs (B1+B2+B3)	STC	T-2、HT-2およびDASの同時分析	麦角アルカロイド
分析カラム	InertSustain Swift C18 HP 2.1×150 mm, 3 µm	オクタデシルシリル化シリカゲル(Inertsil ODS-4 3×50 mm, 2 µm)	InertSustain C18 2.1×150 mm, 3 µm	Inertsil ODS-3 2.1×150 mm, 3 µm	Phenomenex Gemini C6-Phenyl (3.0 µm, 100 mm × 2.0 mm) ガードカラム Phenomenex Gemini C6-Phenyl (4.0 mm × 2.0 mmID)
カラム温度	40 °C	40 °C	40°C	40°C	30 °C
移動相	A: 0.1%ギ酸水溶液 B: 0.1%ギ酸含有アセトニトリル	A: 0.1% ギ酸水溶液、 B: アセトニトリル	A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム B メタノール	A: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム B: メタノール	A:カルバミン酸アンモニウム水溶液 B:アセトニトリル
分離条件	0分 A 90% B 10% 6分 A 10% B 90% 9.5分まで保持	0分 A 75% B 25% 5分 A 50% B 50% 8分 A 50% B 50% 10分 A 75% B 25%	0分 A 60% B 40% 13分 A 10% B 90%	0分 A 50% B 50% 8分 A 10% B 90% 11分まで保持	0分 A 90% B 10% 6.0分 A 90% B 10% 9.0分 A 10% B 90% 20.0分 A 10% B 90% 22.1分 A 55% B 45%、
流速	0.2 mL/分	0.2 ml/分	0.2 mL/分	0.2 mL/分	0.1 mL/mL
注入量	5 µL	5 µL	10 µL	2 µL	10 µL
イオン化	ESI (+)	ESI(+)	ESI(+)	ESI(+)	ESI(+)
モニタリングイオン	DON 297 > 249, 203 OTA 404 > 239, 102	FB1 722 > 344, 352 FB2 706 > 336, 354 FB3 706 > 336, 354	325 > 281	T-2 484 > 305, 215 HT-2 442 > 215, 187	ET, ETI 548 > 223, 208 EA, EAI 563 > 223, 208 EY, EYI 576 > 223, 208 EM, EMI 610 > 223, 208 ES, ESI 326 > 223, 208 EC, ECI 582 > 223, 208 EM, EMI 610 > 223, 208
URL	https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/report_pdf/202224026A-buntan1_0.pdf	参考文献 ¹⁾	https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/report_pdf/2019yoshinari-buntan.pdf	https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/report_pdf/2019yoshinari-sokatsu.pdf	https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/kabidoku/tyosa/attach/pdf/index-26.pdf

は0.2～0.3であり、クライテリアを満たしていた。

5-5. 麦角アルカロイド類の分析法

農林水産省が委託した分析機関が、ドイツ連邦リスクアセスメント研究所の「Analytik und Vorkommenvon Mutterkornalkaloiden in ausgewählten Lebensmitteln」を参考に作成した分析法である。代表的な麦角菌である *Claviceps purpurea* が産生する以下 12 種類の麦角アルカロイド類(エルゴクリスチン(ET)、エルゴクリスチニン(ETI)、エルゴタミン(EA)、エルゴタミニン(EAI)、エルゴクリプチン(EY)、エルゴクリプチニン(EYI)、エルゴメトリン(EM)、エルゴメトリニン(EMI)、エルゴシン(ES)、エルゴシニン(ESI)、エルゴコルニン(EC)及びエルゴコルニニン(ECI))を分析対象としている。

抽出は、分析用試料20.00 gに冷蔵した抽出液(酢酸エチル:メタノール:アンモニア水=75:5:7(v/v/v)) 100 mLを加えて、振とう器で45分間かくはんし、一部を遮光遠心チューブに移して遠心分離し上清を得る。前処理は塩基性アルミナカートリッジカラムを用い、流出液2.0 mLを窒素乾固し、残渣アセトニトリル:カルバミン酸アンモニウム水溶液=5:5(v/v)) 2.0 mLを加えて、超音波で10分間溶解したあと、LC-MS/MSに供する。

平均添加回収率およびRSDはクライテリアの許容範囲に収まっていた。

セン系カビ毒の配糖体や代謝産物など食品に本体のカビ毒とともに汚染するものも対象になっていくと考えられる。また、それらの複合汚染も飛躍的に多くなっている。分析法の確立には、標準物質の入手可能性が重要であり、次に回収率、精度、再現性の向上を目指した妥当性試験の実施が推奨されている。今後、複合汚染に対応するためのマルチマイコトキシン分析法の確立にも注目していきたい。

参考文献

1. T. Yoshinari, et al., Inter-Laboratory Study of an LC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of Fumonisin B1, B2 and B3 in Corn. Food Hyg. Saf. Sci., 2013, 54, 266 – 276.
2. 小西良子, FAO / WHO 食品添加物合同専門家会議 (JECFA) のマイコトキシン規制への役割, マイコトキシン, 2009, 59, 1, 29-33.
3. 国立保健医療科学院, H26 年度厚生科学研究費分担研究報告書「モリニホルミンの分析法」カビ毒の汚染実態調査エンニアチンとビューベリンの分析法 https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/report_pdf/202199006A-buntan1_29.pdf (参照 2025-04.30)

受理日: 2025 年 6 月 6 日

今後着目すべきカビ毒

06

気候変動や異常気象などの影響から、農作物の抵抗力が減少しカビ毒汚染のリスクが高まっていると同時に、カビ毒の汚染分布に変化がみられる。2024年に飼料会社が発表した世界のカビ毒汚染分布地図によると各地域においての穀物汚染の割合は、北アメリカでは77%(主流はDON、FBs、ZEN)、中央アメリカでは複合汚染として87%、ヨーロッパで49%(主流はDON、FBs)、アジアでは79%(主流はDON、AFL)、中東地方では56%(主流はDON、FBs)、アフリカでは複合汚染として72%である。近年の特徴として、2種類以上の複合汚染が増加していることおよび新興カビ毒としてエンニアチン(ENs)、ビューベリン(BEA)やモリニホルミン(MON)が穀類から比較的高く検出されていることが挙げられる。これらのカビ毒の汚染実態および分析法に関しては、厚生科学研究で行われているので、参考にさせていただきたい。

おわりに

07

本稿では、誌面の関係からJECFAで評価がされているカビ毒に限ってその分析法を紹介したが、今後は新興カビ毒やトリコテ

ボツリヌス毒素の特徴、治療への応用と分析法

Characteristics, therapeutic application, and analytical methods of botulinum toxins

鳥居 恭司
Yasushi Torii

東京農業大学農学部動物科学科 教授
Department of Animal Science, Tokyo University of Agriculture (Professor)

KEYWORD ▶

ボツリヌス毒素

ボツリヌス毒素療法

ボツリヌス毒素の分析法

はじめに

01

ボツリヌス毒素はグラム陽性偏性嫌気性細菌である *Clostridium botulinum* および関連する細菌種によって産生されるタンパク毒素であり、ヒトや動物で致死性のボツリヌス症を引き起こす。毒素は抗原性の違いによりA-G型の7つの血清型に分類される。本毒素は自然界で最も強力な毒性を持っているが、微量を投与することで様々な疾患の治療に有用である。今回、ボツリヌス毒素の特徴、治療への応用、毒素の分析法について紹介する。

ボツリヌス毒素について

02

2-1. ボツリヌス毒素の性状

ボツリヌス毒素は毒作用の本体である分子量150 kDaの神経毒素と分子量の異なる無毒成分が結合した複合体毒素の形で、菌体が溶菌する際に放出される。無毒成分は複数のタンパク質から構成され、その組み合わせにより分子量が異なる。複合体毒素にはM毒素(約300 kDa)、L毒素(約500 kDa)およびLL毒素(約900 kDa)の3種類がある¹⁾。A型菌は3種類の毒素を、B、C、D型菌はMおよびL毒素を、E、F型菌はM毒素のみを、G型菌

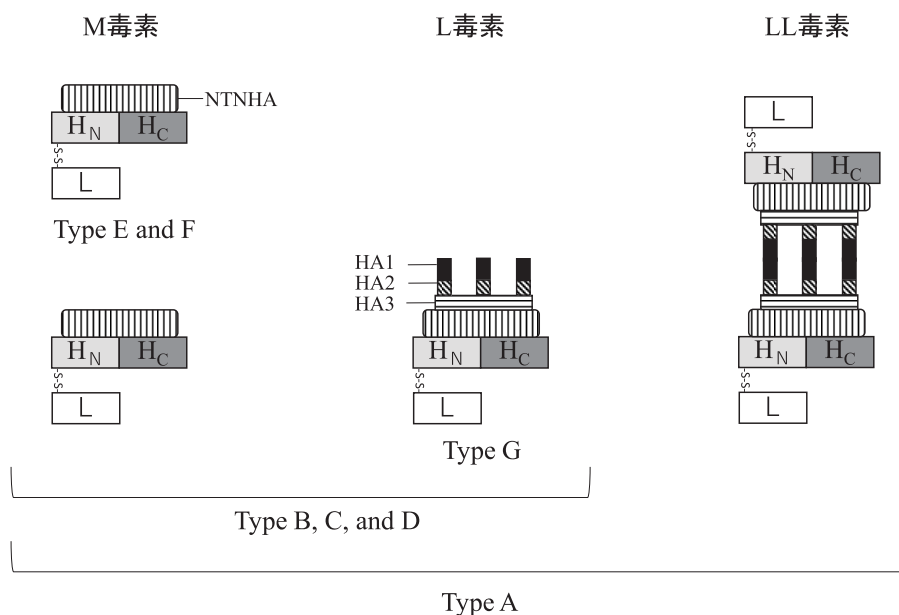


図1 ボツリヌス毒素の構造

L:毒素軽鎖、H_c:毒素重鎖N末端側領域、H_c:毒素重鎖C末端側領域
NTNHA:無毒成分、HA:血球凝集素

はL毒素のみをそれぞれ産生する(図1)。M毒素は神経毒素に血球凝集素を持たない無毒成分であるNTNHA(non-toxic non-hemagglutinin)が直接結合する。L毒素はM毒素のNTNHAに血球凝集素(hemagglutinin: HA)が結合している。NTNHAに結合するHAはHA1、HA2およびHA3の3つのコンポーネントから構成されている。また、LL毒素はHA3の部分で2つのL毒素が結合した構造をしている。

神経毒素は菌体内で150 kDaの1本鎖のポリペプチドの形で産生される。AおよびB型菌において、神経毒素は同時に産生されるタンパク分解酵素により培養液中で毒素分子内に開裂が生じ、50 kDaの軽鎖および100 kDaの重鎖の2本鎖構造に変化する。このとき、毒素の活性が数倍から数百倍に上昇する活性化現象が認められる。タンパク分解酵素を産生しないE型菌の神経毒素は未活性で産生されるが、毒素が腸管内に到達するとトリプシンのような消化酵素により活性化され、2本鎖構造に変化することで毒性を発現する。毒性の発現には神経毒素全体が必要であることが分かっている。実験的に軽鎖と重鎖を還元処理して分離した場合、単離された軽鎖、重鎖はそれぞれ動物に対して毒性を示さない。

神経毒素は3つのドメインから構成されていることが結晶構造の解析から明らかとなっている。これらのドメインは毒素が神経細胞に特異的に結合し、細胞内侵入、細胞質内への移行、細胞質内の標的タンパク質の修飾など、一連の毒性発現過程でそれぞれ機能を持つ。軽鎖は細胞質内での毒素発現活性、重鎖N末端側領域(H_N)には細胞内以降に関わる脂質二重膜にチャネル形成を行う活性、重鎖C末端側領域(H_C)には受容体への結合活性があることから、それぞれ毒性ドメイン、チャネル形成ドメイン、結合ドメインと呼ばれている。 H_C は毒素の受容体であるポリシアロガングリオシド(PSG)および神経タンパク質受容体への結合に関

与する。 H_N は軽鎖が細胞質内に入るまで活性を保持するのに機能している。軽鎖は活性中心に亜鉛が結合しているメタロプロテアーゼである。

ボツリヌス毒素は血清型で分類されているが、近年の分子遺伝学による研究により同じ血清型の菌でも産生する神経毒素のアミノ酸配列が有意なレベルで違いがあることが明らかとなった。これはサブタイプと呼ばれ、現在41のサブタイプが特定されている、例えばA型ではA1-A8の8つのサブタイプに分かれており、サブタイプ間の神経毒素のアミノ酸配列は3-15%の違いが認められている²⁾。このような毒素のアミノ酸配列の違いは標的細胞への結合、細胞への侵入効率、軽鎖の活性、効果の持続時間、サブタイプ間の特異抗体に対する中和効率などに違いを生じさせることが明らかになっている。

CおよびD型については、CおよびD型毒素をそれぞれ産生する菌だけでなく、軽鎖および H_N はC型、 H_C はD型に非常に類似したアミノ酸配列であるC/Dモザイク毒素を産生するC/D型菌、軽鎖および H_N はD型、 H_C はC型に非常に類似したアミノ酸配列であるD/Cモザイク毒素を産生するD/C型菌が存在している。また、新型の血清型毒素としてH(F/A)型が報告されたが、軽鎖はF5型、重鎖はA型に非常に類似したアミノ酸配列であるF/A型毒素を産生することが明らかになっている³⁾。

2-2. ボツリヌス神経毒素の神経筋接合部における作用メカニズム

神経毒素は神経筋接合部に非常に特異的に作用する。神経毒素による作用メカニズムは、①神経終末への結合、②エンドサイトーシス、③小胞内の酸性化、④軽鎖の細胞質内への移行、⑤SNAREの切断による神経伝達物質の放出阻害の5つの段階に分けられる(図2)^{1,4)}。

腸管から吸収あるいは注射によって体内に入った毒素は神経

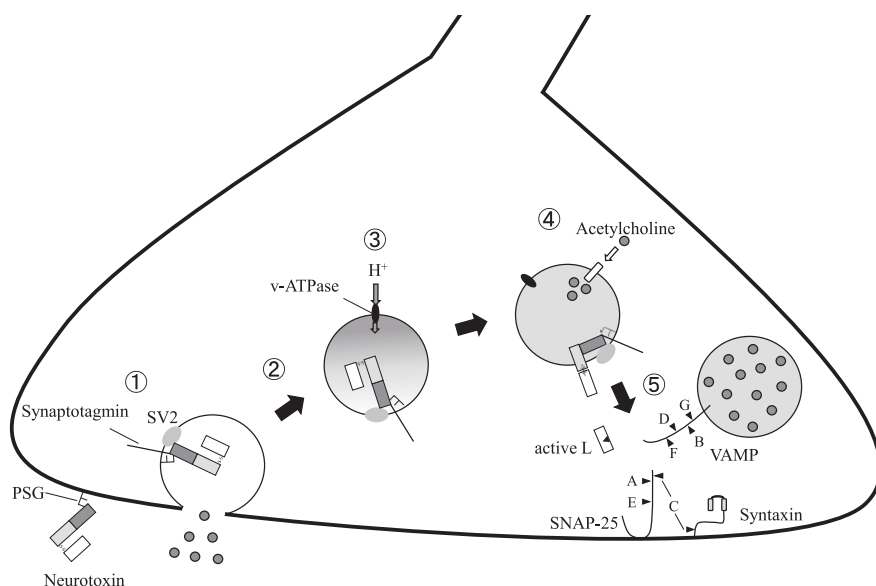


図2 ボツリヌス毒素の神経終末での作用メカニズム

- ① H_C 領域はシナプス前膜のポリシアロガングリオシド(PSG)受容体に結合し、続いてタンパク質受容体に結合する。
- ② 毒素はシナプス小胞内に取り込まれる。
- ③ v-ATPaseによる小胞の酸性化(灰色化)が神経伝達物質の蓄積を促進する。
- ④ 毒素のプロトン化により、軽鎖は H_N 領域の助けを借りて細胞質へ移行する。
- ⑤ 細胞質において、軽鎖はメタロプロテアーゼ活性を示す。B型、D型、F型、G型毒素はVAMPを切断し、A型およびE型毒素はSNAP-25を切断し、C型毒素はSNAP-25とシンタキシンの両方を切断する。

周囲液区画に到達し、毒素のHcが神経終末のシナプス前膜のPSGに結合する。その後、シナプス小胞の神経伝達物質の開口放出の際に、小胞とシナプス前膜の融合が起こると小胞内腔が細胞外に露出され、小胞内腔に存在する神経タンパク質受容体に毒素のHcが結合する。神経タンパク質受容体は、A、D、EおよびF型毒素はシナプス小胞タンパク質2 (SV2)、BおよびG型はシナプトグミンであることが明らかになっている。C型は神経タンパク質受容体が認められておらず、PSGとの相互作用が報告されている⁵⁾。

シナプス小胞内の受容体に結合した毒素はエンドサイトーシスによって神経細胞内に取り込まれる。軽鎖の細胞質内への移行はv-ATPaseプロトンポンプにより小胞内が酸性化(pH4.5-6)されることによって生じ、H_Nが小胞の膜と結合してチャネルを形成する。軽鎖はこのチャネルを介して膜を貫通して神経細胞の細胞質内に移行する。この細胞質内への移行時に軽鎖とH_NのS-S結合が還元され、軽鎖が分離される。

軽鎖はシナプス小胞内の神経伝達物質をシナプス前膜から放出する際に必要なSNAREタンパク質を特異的に分解する。SNAREタンパク質はシナプス小胞に存在しているv-SNAREとシナプス前膜に存在しているt-SNAREに大きく分けられる。このv-SNAREとt-SNAREが結合し、トランスSNARE複合体を形成し、融合孔を形成することでシナプス小胞内の神経伝達物質が放出される。軽鎖が切断するSNAREタンパク質は毒素型によって異なっており、AおよびE型はt-SNAREの一種のSNAP-25を、B、D、FおよびG型はv-SNAREの一種のシナプトブレビン (Vesicle-associated Membrane Protein :VAMP) を、C型はt-SNAREの一種のSNAP-25およびシンタキシンをそれぞれ切断する。軽鎖はSNAREタンパク質を切断することで、SNARE複合体の形成を阻害し、結果としてシナプス小胞から神経伝達物質の放出が阻止される。

ボツリヌス毒素は近年の研究により、運動神経の神経筋接合部だけでなく、筋紡錘に対して脊髄への求心性線維の興奮を減少させる作用⁶⁾、感覚神経への作用^{7, 8)}、中枢神経への作用^{9, 10)}など様々な作用を持つことが報告されている。

ボツリヌス毒素の治療への応用

03

3-1. ボツリヌス毒素製剤の開発の歴史と現在

ボツリヌス毒素の治療への応用の構想は1822年にドイツの詩人で地区の医務官であったJustinus Kernerが始めに報告したとされている。Kernerはソーセージによるボツリヌス症の研究から、ボツリヌス症を引き起こした毒素(当時は同定されていなかった)が運動・自律神経系の興奮を軽減・遮断することから、この毒素を少量用いることで、「交感神経(当時の概念では神経機能全般を示す)の過剰活動・過興奮性」また「発汗の亢進および粘液の異常分泌」をおさえることが出来ると考えた¹¹⁾。この毒

素は強力な毒性から、第二次世界大戦中にはアメリカをはじめとする各国で生物兵器として研究された。アメリカではアメリカ陸軍施設で研究が行われ、1946年にCarl LamannaがHall株由来のA型ボツリヌス毒素の結晶化を報告した。さらに第二次世界大戦後の1957年にJames Duffが毒素精製法の改良を報告し、Edward Shantzが大量生産させる方法を見いだした。1965年にDaniel Drachmanがヒヨコの筋肉にShantzの毒素を投与すると麻痺および萎縮を示すことを報告した。この報告を受けて眼科医のAllan Scottはこの毒素が斜視の治療に使用出来るのではないかと考えてShantzと共同研究をはじめ、1960～70年代に多くの研究がなされた。それらの研究を受けて1979年にアメリカ食品医薬品局(FDA)は毒素の臨床試験の承認を行った。1980年にScottは斜視患者に対する毒素の治療成績を発表し、その後も眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、頸部・体肢のジストニアなどに対しても治療を試みた。1989年にFDAはA型ボツリヌス毒素(Oculinum[®] 現在のBotox[®](AbbVie社))を斜視、眼瞼痙攣、12歳以下の片側顔面麻痺の治療薬として承認した。その後ボツリヌス療法が世界中で急速に普及し、2017年8月現在Botox[®]は90カ国以上で販売されている。当初はShantzが製造した毒素を使用していたが、普及するにつれ毒素に対する中和抗体産生や薬理効果が無効になる患者が認められるなどの問題が生じた。このため、2度にわたって製法を改良し現在では当初の約5倍タンパク比活性が高い製剤(4.8 ng/100 U)となっている。また、他社でもボツリヌス毒素製剤が開発され販売されている。ヨーロッパではイギリスでCentre for Applied Microbiology and ResearchでA型毒素が開発され1990年にヨーロッパでDysport[®](Ipsen社)が承認されて2022年現在90ヶ国以上で販売されている(日本国内未承認)。Botox[®]およびDysport[®]は複合体毒素であり、NTNHAおよびHAが含まれている。ドイツのMerz社はBotox[®]の当初の問題であった毒素に対する中和抗体産生、効果無効事例の低減を目指して、神経毒素のみ(150 kDa)を製剤としたXeomin[®]を開発し、2005年にドイツで承認され、現在世界各国で使用されている。その他A型毒素として、中国では蘭州生物製品研究所が衡力[®] BTXA、韓国ではMedytox社のMeditoxin[®]、Hugel社のBotulax[®]、Daewoong社のNabota[®]、ロシアではMicrogen社のRelatox[®]などが開発されている¹⁸⁾。B型毒素については、アイルランドのElan社が開発し、2000年にFDAからMYOBLOC[®]、2001年にヨーロッパでNeuroBloc[®]の名前で承認された(日本国内における販売名はNerBloc[®])。B型毒素はA型毒素に対する効果無効事例の患者にも有効であると考えられる。また、B型毒素は自律神経に対する効果および鎮痛作用が、運動神経に対する効果に比べて比較的大きいとされている。しかし、ヒトはB型毒素に対する感受性が低いため、Botox[®]との比較では多くの毒素量が必要になる。現在、日本国内において販売されているボツリヌス毒素製剤はBotox[®]/Botox Vista[®]、Xeomin[®]およびNerBloc[®]である。それぞれの製剤の特徴を表1に記載した。

現在世界で治療薬として販売されている毒素はA型ではA1

型、B型ではB1型の毒素である。日本国内において、A1型とはアミノ酸配列の異なるA2型の毒素を使用した製剤が開発中である。このA2型毒素製剤は神経毒素のみ(150 kDa)の製剤であり、サルを用いた試験ではA1型毒素よりも筋弛緩効果が強く、安全性に優れている結果が得られている¹²⁾。ヒトにおいても臨床研究として痙攣患者にA1あるいはA2型毒素を投与したところ、A2型毒素はA1型毒素よりも効果が強く、投与部位に留まりやすいという結果が得られている¹³⁾。今後、開発が進み治療に応用されていくと考えられる。

それ以外の血清型の毒素がヒトの治療で使用出来るか複合筋活動電位を用いて検討された¹⁴⁾。その結果、C型毒素はA型毒素と同様の神経筋伝達抑制効果および作用期間を持ち、EおよびF型毒素は早期に神経筋伝達抑制効果がなくなり回復することが明らかとなった。C型毒素は今後A1毒素同様に筋弛緩効果による治療薬として開発される可能性がある。また、E型毒素については、脳内投与による中枢神経への効果(てんかん等)が認められており、治療に応用される可能性がある。

3-2. ボツリヌス毒素製剤の薬理作用の発現と消失

毒素は筋肉内に投与されると直ちに神経終末への取り込みが

始まり、数時間以内に大部分が神経終末に取り込まれる。薬理作用は神経終末に取り込まれた後に徐々に発現し、臨床効果として確認出来るのは2-3日後であることが多い。臨床効果は投与から1-2週間で安定し、A型毒素製剤の場合数ヶ月間持続する。なお、高温環境では効果が低下することが報告されている。以前は毒素が作用した神経終末は永久に機能を失い、近傍から側枝が出て新たな神経筋接合部が形成されることで機能回復が生じると考えられていた。しかし、現在では元の神経接合部が再開通し、一時的に形成され機能を代行していた神経筋接合部はその後退縮して失われることが明らかとなっている。

筋弛緩効果の持続期間は毒素型、投与量、投与神経部位によって異なり、毒素型ではA型～C型>B型～D、F、G型>E型の順に効果の持続が長いと報告されている^{1, 14, 15)}。E型毒素の持続時間が短いのはE型毒素の軽鎖の神経細胞内半減期が1-2日であり、新しいSNAP-25が合成されると効果がなくなることが要因とされている。A型毒素の軽鎖は神経細胞内の分解酵素を回避する作用を持っていることで効果の持続が長く続くとされている。A型毒素の軽鎖の活性は*in vitro*の神経細胞では最大1年間、*in vivo*の中枢神経では最大5ヵ月持続する。投与量については、より多く用量を投与することで細胞内に多くの軽鎖が取り込

表1 日本国内で承認されているボツリヌス毒素製剤の比較

	Botox [®] / Botox Vista [®]	Xeomin [®]	NerBloc [®] (MYOBLOC [®] / NeuroBloc [®] *1)
一般名	OnabotulinumtoxinA	IncobotulinumtoxinA	RimabotulinumtoxinB
メーカー名	AbbVie (USA)	Merz (Germany)	US WorldMed (USA)
菌株	Hall A	Hall A	Bean
毒素型	A1	A1	B1
分子量	900 kDa complex	150 kDa	700 kDa complex
製剤形態	Vaccuum-dried powder for reconstitution	Freeze-dried powder for reconstitution	Ready to use solution
保存温度と有効期間	2-8℃ 36 months	Room temperature 36 months	2-8℃ 24 months
pH	7.4	7.4	5.6
賦形剤	In 100 U vial: HSA 500 µg NaCl 900 µg	In 100 U vial: HSA 1 mg Sucrose 5 mg	HSA 500 µg Succinate 10 mM NaCl 100 mM
Unit/ vial	50, 100	50, 100, 200	2500 (1000, 2500, 10000 ^{*2})
タンパク量/ vial	4.8 ng / 100 U	0.44 ng / 100 U	55 ng / 2500 U
Clinical activity in relation to Botox	1	1	1:40-1:50

HSA: human serum alblmin
*1 USAあるいはEUの製品名
*2 USAとEUの製品

まれ、持続時間が長くなると考えられる。また、投与神経部位については、A型毒素を骨格筋に投与した場合3-4ヵ月持続するのに対し、自律神経系コリン作動性神経終末は約1年持続すると報告されている¹⁾。

3-3. ボツリヌス毒素治療の適応症

ボツリヌス毒素による治療は神経内科領域を中心に応用が拡大しており、近年では泌尿器科、皮膚科領域など様々な疾患の治療に用いられている¹⁾。日本国内で承認されている治療薬は、A型毒素のBotox[®] (Botox Vista[®]を含む)、Xeomin[®]、B型毒素のNerBloc[®]である。適応症は①骨格筋緊張亢進症、②平滑筋緊張亢進症、③分泌腺の緊張亢進症、④美容、⑤痛み到大別される(図3)。①骨格筋緊張亢進症は、多くの運動異常症が含まれており、海外では臨床研究として様々な疾患の治療に使用されている。日本国内では一部の疾患について承認され保険適応で使用されている。Botox[®]では眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙攣性斜頸、上肢痙縮、下肢痙縮、2歳以上の脳性麻痺患者における下肢痙縮に伴う尖足、斜視および痙攣性発声障害について承認されている。Xeomin[®]は上肢痙縮、NerBloc[®]は痙攣性斜頸で承認されている。その他の疾患として、ジストニア、振戦、書痙、舞蹈病などの不随意運動などにも効果が認められるとの報告がある。②平滑筋緊張亢進症については、消化管や尿路についての疾患で使用

されている。こちらも日本国内では一部の疾患について承認され、Botox[®]では過活動膀胱における尿意切迫感・頻尿および切迫性尿失禁、神経因性膀胱による尿失禁について承認されている。その他の疾患として、前立腺肥大、アカラシアなどにも効果が認められるとの報告がある。③分泌腺の緊張亢進症については、日本国内ではBotox[®]で重度の原発性腋窩多汗症で承認されている。その他、手掌の多汗症、唾液分泌過多症などにも効果が認められるとの報告がある。④美容については、1987年に「顔面の皺」を目立たなくする効果が発見され、現在では美容目的の使用がボツリヌス毒素製剤の非常に大きい市場となっている。日本国内ではBotox Vista[®]が眉間・目尻の表情皺に対する投与で承認されているが、保険適用外である。その他の前額部の皺、咬筋(えらの張り)の萎縮、腓腹筋の萎縮などにも効果があり使用されている。この分野については医師による個人輸入で海外の様々な製剤が使用されている。⑤痛みについては、頸部ジストニアの治療事例で報告され、筋緊張異常症に合併する痛みの緩和に効果があることが明らかとなった。その後、緊張型頭痛、片頭痛などの治療にも応用されるようになり、片頭痛についてはアメリカでは治療薬として承認されている。その後様々な疾患で臨床研究が行われており、背部痛、神経因性疼痛、三叉神経痛などにも効果が認められるとの報告がある。

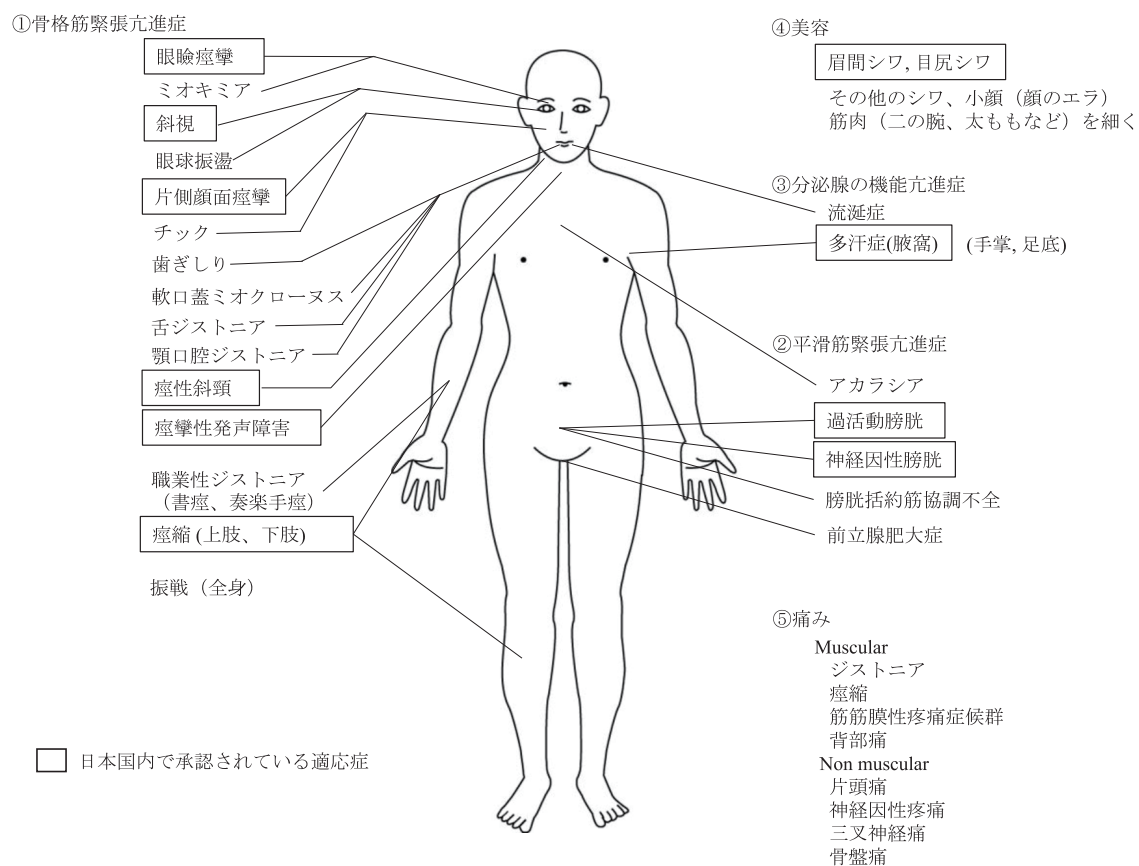


図3 ボツリヌス毒素製剤の主な適応症

ボツリヌス毒素の分析法

04

ボツリヌス毒素の分析については、食品、臨床検体からのボツリヌス毒素の検出、ボツリヌス毒素製剤の活性評価などの目的で用いられている^{16, 17)}。食品、臨床検体には様々な物質が含まれている状態でボツリヌス毒素を検出する必要があるため、できるだけ高感度の方法で分析を行う必要がある。これに対し、ボツリヌス毒素製剤の活性評価では製品の安全性と有効性を確保するために、毒素の活性を正確に測定する必要がある。ボツリヌス毒素は3つの領域それぞれの活性(受容体への結合、シナプス小胞に対するチャンネル形成による軽鎖の神経細胞質への移行、細胞内基質の切断)がともに有効であることを評価する必要がある。現在、最も高感度で信頼性が高く、世界的に実施されている分析法は、マウスの腹腔内に毒素を投与するマウスバイオアッセイである。この方法は1—10 pg/mLの毒素を検出できる高感度な方法であり、ボツリヌス毒素特有の症状である呼吸麻痺を示して死亡することを確認する方法である。非常に優れた方法であるが、マウスの系統ならびに個体差による毒素に対する感受性の違い、試験実施者や施設間差によるばらつきが大きいという問題がある。さらに、この方法は動物愛護の観点からも問題であることから、世界的な動物試験代替法会議が行われ、現在様々なボツリヌス毒素活性の測定法が検討されている(表2)。現在検討されている代替測定法について以下に紹介する。

Physical Methodとして、イムノアッセイ(sandwich ELISA)、Mass Spectrometry(MS)などがある。これらの方法は毒素分子全体を評価できる測定系であり、毒素を早期(数時間)に感度良く検出可能であるが、活性毒素と不活化毒素の区別がつかないという問題がある。

Functional Methodとして、Endopeptidase Assay、Cell-Based Assayなどがある。Endopeptidase Assayは軽鎖が切断する基質の切断産物を検出するものである。切断産物を

MS、Endopep-ELISA、Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Assayなどで評価する。毒素のうち軽鎖の活性のみを評価するものである。

Cell-Based Assayは培養神経細胞に毒素を添加し、細胞内の基質を軽鎖が切断した産物を評価する試験である。切断産物の検出は細胞溶解物を用いてウェスタンブロット、ELISA、免疫蛍光法などを用いて測定する。毒素の神経細胞への侵入および軽鎖の活性を評価できるものである。現在、Botox[®]を製造しているAllergan社(現AbbVie社)では、ヒト神経芽腫SiMa細胞株を用いたCell-Based Assayを開発した¹⁸⁾。この方法はSiMa細胞に毒素を作用させ、細胞を溶解させた後にECL-ELISAで評価する。現在FDAでも認可されている方法であり、AbbVie社ではこのCell-Based Assayとマウスバイオアッセイを併用して毒素製剤の活性評価を行っている。Cell-Based Assayを応用して、神経伝達物質の放出阻害も評価できるようにラジオアイソトープや蛍光標識した物質をマーカーとして用い、基底状態およびKClで脱分極したときの放出物質を評価する方法が検討されている。これらの方法はマウスバイオアッセイ法に匹敵する感度をもつが、培養神経細胞の維持やアッセイ感度の適切な再現性の保証など高度な技術が必要である。

in vivo、*ex vivo*の試験として、マウス横隔膜神経標本法、ラット複合筋活動電位測定法などがある。これらの方法はマウスバイオアッセイ同様に毒素の3つの領域の活性を評価できる試験系である。マウス横隔膜神経標本法は横隔膜と横隔神経標本に毒素を作用させ横隔膜の収縮抑制を評価する試験法である。マウスバイオアッセイの呼吸麻痺を定量的に評価できる試験系である。しかし、再現性を得るために高度な技術が必要である。ラット複合筋活動電位測定法は、筋線維が収縮することで発生する複合筋活動電位を利用するものである。臨床における毒素製剤を用いた治療で患部における毒素の効果を評価する方法を応用したものであり、毒素の筋弛緩作用を定量的に評価できる試験系である。比較的簡便にできる試験系であり、A、C型などではマ

表2 ボツリヌス毒素の代表的な分析方法

	分析法	検出時間	毒素型	感度 (pg/mL)
Physical Method	sandwich ELISA	6-7h	A-F	2-176
	Mass spectrometry	5-8h	A-F	0.1-1
Functional Method	Endopeptidase Assay (ELISA based or MS based)	7-8h	A-G	0.1-1000
	Cell-Based Assay	3-5day	A-E	0.55-1500
<i>ex vivo</i>	マウス横隔膜神経標本	5-9h	A-F	1-10
<i>in vivo</i>	マウスバイオアッセイ	4day	A-F	1-10
	ラット複合筋活動電位測定	2day	A-F	0.1-10

ウスバイオアッセイよりも感度良く測定が可能である。

以上、ボツリヌス毒素の分析法は様々な方法が開発されているが、現状まだマウスバイオアッセイが主流の方法となっている。今後も代替法についてさらに検討が進むと考えられる。

おわりに

05

ボツリヌス毒素は非常に高い毒性を有し、致死性のボツリヌス症を引き起こす。この毒素は非常に効率よく神経細胞内に侵入して神経伝達障害を起こすという特徴があり、これを生かして現在では世界中で様々な疾患の治療に使用されている。市販されているボツリヌス毒素製剤は現在のところA1およびB1型毒素が利用されているが、今後他の血清型およびサブタイプの毒素の研究が進むことで、それぞれの毒素の特徴を生かして様々な疾患の治療に応用されていく可能性がある。また、ボツリヌス毒素の分析法は毒素の3つの領域の活性が有効であることを評価する必要があり、世界的にマウスバイオアッセイで評価が行われている。動物愛護の観点もあり、今後も技術の進歩とともに適切な代替法が提案されることが考えられる。

参考文献

1. M. Pirazzini, O. Rossetto, R. Eleopra, and C. Montecucco. Botulinum neurotoxins: biology, pharmacology, and toxicology. *Pharmacol. Rev.* 2017, 69, 200-235.
2. C. Mazuet, C. Legeay, J. Sautereau, L. Ma, C. Bouchier, P. Bouvet, and M. R. Popoff. Diversity of group I and II *Clostridium botulinum* strains from France including recently identified subtypes. *Genome Biol. Evol.* 2016, 8, 1643-1660.
3. S. R. Kalb, J. Baudys, B. H. Raphael, J. K. Dykes, C. Lúquez, S. E. Maslanka, and J. R. Barr. Functional characterization of botulinum neurotoxin Serotype H as a hybrid of known Serotypes F and A (BoNT F/A). *Anal. Chem.* 2015, 87, 3911-3917.
4. D. A. Tehran and M. Pirazzini. Novel botulinum neurotoxins: exploring underneath the iceberg tip. *Toxins*. 2018, 10, 190.
5. K. Tsukamoto, T. Kohda, M. Mukamoto, K. Takeuchi, H. Ihara, M. Saito, and S. Kozaki. Binding of *Clostridium botulinum* type C and d neurotoxins to ganglioside and phospholipid. novel insights into the receptor for *Clostridial* neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 35164-35171.
6. R. L. Rosales and D. Dressler. On muscle spindles, dystonia and botulinum toxin. *Eur. J. Neurol.* 2010, 17 (Suppl 1), 71-80.
7. N. Akaike, Y. Ito, M. C. Shin, K. Nonaka, Y. Torii, T. Harakawa, A. Ginnaga, S. Kozaki, and R. Kaji. Effect of A2 type botulinum toxin on spontaneous miniature and evoked transmitter release from the rat spinal excitatory and inhibitory synapses. *Toxicon*. 2010, 58, 1315-1326.
8. C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, N. García-Sanz, and A. Ferrer-Montiel. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 25665-25672.
9. 加藤啓子, 幸田知子, 小崎俊司. ボツリヌス毒素によるてんかんの治療. *Brain Nerve*. 2009, 61, 939-948.
10. M. Caleo, F. Antonucci, L. Restani, and R. Mazzocchio. A reappraisal of the central effects of botulinum neurotoxin type A: by what mechanism. *J. Neurochem.* 2009, 109, 15-24.
11. F. J. Erbguth. Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Mov. Disord.* 2004, Suppl. 8, S2-6.
12. Y. Torii, M. Sasaki, M. C. Shin, N. Akaike, and R. Kaji. Comparison of efficacy and toxicity between botulinum toxin subtypes A1 and A2 in cynomolgus macaques. *Toxicon*. 2018, 153, 114-119.
13. R. Kaji. Clinical differences between A1 and A2 botulinum toxin subtypes. *Toxicon*. 2015, 107, 85-88.
14. R. Eleopra, V. Tugnoli, R. Quatrala, O. Rossetto, and C. Montecucco. Different types of botulinum toxin in humans. *Mov. Disord.* 2004, 19 Suppl 8, S53-59.
15. P. G. Foran, N. Mohammed, G. O. Lisk, S. Nagwaney, G. W. Lawrence, E. Johnson, L. Smith, K. R. Aoki, and J. O. Dolly. Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B, C1, E, and F compared with the long lasting type A. Basis for distinct durations of inhibition of exocytosis in central neurons. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 1363-1371.
16. 国立健康危機管理研究機構. ボツリヌス症. 2012. <https://id-info.jihs.go.jp/relevant/manual/010/botulism121207.pdf>
17. C. Rasetti-Escargueil and M. R. Popoff. Recent developments in botulinum neurotoxins detection. *Microorganisms*. 2022, 10, 5, 1001.
18. E. Fernandez-Salas, J. Wang, Y. Molina, J. B. Nelson, B. P. S. Jacky, and K. R. Aoki. Botulinum neurotoxin serotype a specific Cell-Based potency assay to replace the mouse bioassay. *PLOS ONE*. 2012, 7, 2, e49516.

受理日：2025年5月27日

麻痺性貝毒の機器分析法に関する研究の最新動向

Recent trends in chemical analysis
for the detection of saxitoxin and its analogues in marine organisms

渡邊 龍一
Watanabe Ryuichi

国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所環境・応用部門水産物応用開発部 安全管理グループ長
Seafood safety and Technology Division, Environment and Fisheries Applied Research Department,
Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency,
National Research and Development Agency (Group Leader)

KEYWORD ▶

麻痺性貝毒

機器分析

標準物質

化学合成

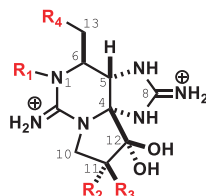
はじめに

01

四方を海に囲まれたわが国の沿岸域では、多種多様な魚介類に恵まれ、私たちの食卓を彩っている。魚介類は、私たちの貴重なたんぱく質源でもある。冷凍・冷蔵技術の発達や流通網の整備などが進み、日常的に様々な魚介類を喫食できるようになっているが、ヒスタミンのような化学物質やノロウイルス、有害微生物

を原因とする食中毒のリスク管理は食の安全上重要な課題である。さらに、水産物特有の自然毒のリスク管理は魚介類の安全な喫食において必須である。例えば、フグが有するテトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX) は強力な神経毒であるが、フグを安全に喫食するために、フグ調理師資格制度など、わが国古来の食経験に基づく独自のリスク管理体制が整備されている。また、私たちが身近に食している二枚貝は麻痺性貝毒 (Paralytic shellfish toxins, PSTs) や下痢性貝毒 (Diarrhetic shellfish toxins,

表1 二枚貝に含まれる麻痺性貝毒の主要な化学構造とその毒性等価係数



Toxins	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	CODEX TEF
STX	H	H	H	-OCONH ₂	1
neoSTX	OH	H	H	-OCONH ₂	2
dcSTX	H	H	H	-OH	0.5
dcneoSTX	OH	H	H	-OH	0.2
GTX1	OH	OSO ₃ ⁻	H	-OCONH ₂	1
GTX2	H	OSO ₃ ⁻	H	-OCONH ₂	0.4
GTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	-OCONH ₂	0.6
GTX4	OH	H	OSO ₃ ⁻	-OCONH ₂	0.7
GTX5	H	H	H	-OCONHSO ₃ ⁻	0.1
GTX6	OH	H	H	-OCONHSO ₃ ⁻	0.05
dcGTX2	H	OSO ₃ ⁻	H	-OH	0.2
dcGTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	-OH	0.4
C1	H	OSO ₃ ⁻	H	-OCONHSO ₃ ⁻	0.01
C2	H	H	OSO ₃ ⁻	-OCONHSO ₃ ⁻	0.1
C3	OH	OSO ₃ ⁻	H	-OCONHSO ₃ ⁻	0.01
C4	OH	H	OSO ₃ ⁻	-OCONHSO ₃ ⁻	0.1

DSTs)などを有することがあり、二枚貝の毒化原因プランクトンの監視、およびこれと連動した独特な貝毒の監視体制が整備されていることにより、安全な二枚貝を食べることができていることはあまり知られていない。本稿では、貝毒検査を実施する際の麻痺性貝毒検査法に関する最近の動向について紹介したい。

麻痺性貝毒の化学と二枚貝の毒化機構に基づく貝毒監視体制

02

麻痺性貝毒は、三環性のグアニジン骨格を基本として、4か所以上の置換基の組み合わせにより、現在60種類以上の成分が単離・構造決定されている。その中で顕著な毒性を有し、かつ二枚貝において含量の高い成分となると約15成分に限られる。表1には、現在、欧州食品安全機関(European Food Safety Authority, EFSA)が検査対象としている成分の化学構造をリスト化したものを示す¹⁾。これら毒の作用標的は電位依存性ナトリウムチャンネルであり、細胞内へのナトリウムイオンの流入を遮断することで毒性を発現する。毒成分によって作用標的への親和性が異なるため、毒力に強弱が生じ、それらはSTXを1とした時の相対毒力として表され、毒性等価係数(Toxicity equivalency factors, TEFs)と呼ばれる。主に、細胞サイズとして約20–40 μm の*Alexandrium*属や*Gymnodinium*属が二枚貝の毒化原因プランクトンであるが、これらは前述した主要毒成分を6–10種類ほど生産している。これらは細胞分裂を繰り返し海水中の密度が高くなると、養殖海域にいる二枚貝は毒化し、毒は貝の体内で代謝を受け、10–15成分ほどの多成分PSTsとして二枚貝に蓄積される。そして、ヒトが毒化二枚貝を食することにより、食中毒が発生する。ヒトへの症状は、主に口唇のしびれに始まり、運動や言語に障害が生じたのち呼吸困難となり、最悪の場合、死に至る。治療薬はなく、胃洗浄や人工呼吸器の装着などの対症療法が有効な治療法である。安全な二枚貝を提供するため、わが国では、二枚貝の毒化機構に基づき、生産海域で二枚貝の毒化原因プランクトンの発生状況を調査しており、原因プランクトンの発生が認められると、月に一回から週に一回といったように貝毒検査の頻度をあげるようになっている。現在の麻痺性貝毒検査法はマウス毒性試験(Mouse bioassay, MBA)であり、動物を用いた試験法となる。規制値は4 MU/g(MU:マウスユニット、1 MUは体

重20 gの雄マウスを15分で死に至らしめる毒量と定義されている)であり、これ以下であれば、市場に流通させて良いこととなっている。市場に流通した二枚貝は、公設試験研究機関等によって収去検査が実施され、毒化二枚貝が市場に流通していないか監視されている。一方、規制値を超える場合は、生産者による自主規制措置が講じられ、原則として3週連続で規制値を下回ることを条件に出荷が再開される。

麻痺性貝毒の機器分析法

03

麻痺性貝毒を検出・定量する方法は種々あるが、ここでは諸外国で導入が進んでいる分析装置を利用した方法を取り上げたい。機器分析法には(1)プレカラム蛍光誘導体化HPLC法²⁾、(2)ポストカラム蛍光誘導体化HPLC法^{3,4)}、(3)液体クロマトグラフィー–タンデム質量分析法(LC/MS/MS法⁵⁾)の3法がある。プレカラム法およびポストカラム法ともに Association of Official Analytical Chemists(AOAC)に収載されている。LC/MS/MS法については、国際的な試験室間共同試験をAOAC法に則った形で実施しているが、J.AOAC int.への掲載にとどまっている。

プレカラム法では、PSTsを含んだ二枚貝抽出液に酸化剤(過酸化水素あるいは過ヨウ素酸)を加え、蛍光誘導体に変換させたのち(図1)、その反応液をカラムで分離して個々の成分を検出・定量する方法である。この方法の利点は、装置構成として蛍光検出器を備えたHPLCが必要になるが、それ以外に特別な装置を必要としないことである。ただし、誘導した蛍光化合物が安定ではないことや、各成分から誘導される蛍光化合物が単一ではなく複数の場合もあること、分離が不十分なものもあることから、一部の毒で定量計算が複雑になる。本法はAOAC OMA 2005.06として収載されており、EUと英国で導入されている。

ポストカラム法では、PSTsを含んだ二枚貝抽出液に簡単な前処理を行い、それをHPLCに供する。両親媒性イオンペアを含む移動相と逆相カラムを用いたイオンペアークロマトグラフィーにより分離させたのち、酸化剤(過ヨウ素酸)との反応により蛍光誘導体へと導き、酸によってラクタム環を形成させることで、プレカラム法よりも高い蛍光強度を持つ蛍光化合物へと誘導して定量

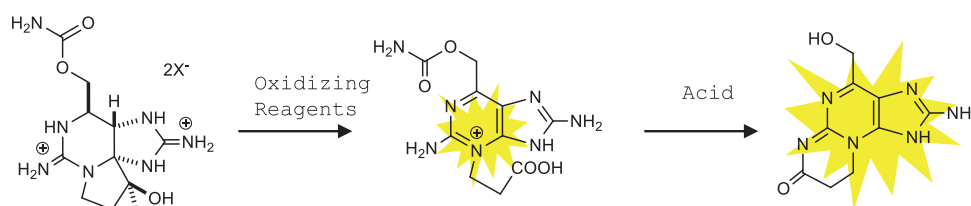


図1 麻痺性貝毒の蛍光誘導化反応

する(図1)。ただし、主要成分を一斉分離することができないため、分子の電荷に応じて2回または3回に分けて分析する必要がある。この方法の利点は、分離条件は異なるものの、ほぼ全主要成分をイオンペアクロマトグラフィーで分離できるため、正確に個々の毒の濃度を測定できる点である。しかし、ポストカラムの反応系を構築する必要があるなど、プレカラム法よりも装置構成が複雑になる。本法は、AOAC OMA 2011.02として収載されており、カナダで導入されている。近年、HPLC法の欠点であった3群分析による多検体分析にかかる長時間の煩雑な分析を、超高速液体クロマトグラフィーを利用して、4液グラジエントポンプの自動切換えと、超高速分離により、簡便かつ短時間分析を可能とした方法が報告されている⁶⁾。

LC/MS/MS法では、PSTsを含んだ二枚貝抽出液を、グラファイトカーボンを用いて簡単な前処理を行い、親水性相互作用能を有するアミドカラムを用いて毒成分を分離後、質量分析部にて検出・定量する。装置構成は比較的単純であるが、装置の導入や維持費用が高額になる。また、後述するが、二枚貝に含まれるTTXも同時検出できることが利点でもある。本法は、AOACに収載していないが、AOACの国際的な試験室間共同試験ガイドラインに準拠した形で実施しており、ニュージーランドで導入されている。公定法として多くの国々で採用されている動物検査法(MBA)とも比較的相関が高いことが知られている。

各分析法の特徴について述べてきたが、最後に機器分析移行に関する世界の動向に目を向けてみる。欧州連合(EU)は2019年1月から域内の麻痺性貝毒検査法をMBAから機器分析法へと移行した。国内への影響としては、2020年10月にEUから「検疫および植物検疫に関する措置(Sanitary and Phytosanitary measures, SPS)」に関する通報がなされ、2021年10月から施行となった。そのため、日本からEUへホタテガイ等を輸出する場合の麻痺性貝毒検査は、機器分析法で行う必要が生じている。下痢性貝毒検査法では、Codex規格に沿った形で、2017年、国内の貝毒検査法が機器分析法に完全移行した。麻痺性貝毒検査法では、下痢性貝毒と比較して考慮すべき事項が複数あるため、機器分析法への移行に際して慎重な検討が必要と思われる。これらの点にも触れながら、以下で説明したい。

麻痺性貝毒の標準物質調製に関する研究 04

麻痺性貝毒は上述した通り、多成分系で構成されていることに加え、特定物質(化学兵器の原料)であるサキシトキシン(Saxitoxin, STX)が含まれる。多成分系であるがゆえに、多くの標準物質が必要となる。現在、EFSA が機器分析で対象としている成分は16成分に及ぶ¹⁾。こうした多成分を標準物質として調製する方法を確立することに加え、STXは経済産業省によって特定物質として厳しく規制されているため、海外で市販されているSTX標準物質とそれを含んだ標準物質も輸入には許可が必要で

あり、実質的に入手はできないと言える。STXは貝毒検査における必須の検査対象成分であるため、公設試験研究機関や民間検査機関等が導入する際にSTX標準物質が入手できない事態が生じる。仮に入手できたとしても、経済産業省は非常に多くの検査機関を管理する必要がある。このようにわが国では、STX標準物質の取り扱いが困難であることから、鏡像異性体に着目して、天然型と同等の分析特性の解明に取り組んだ。

4-1. 藻類培養と化学合成による各種類縁体の調製法の開発

機器分析法を運用していくためには、まず、麻痺性貝毒の標準物質の製造技術の確立が重要であり、世界的には、藻類培養に基づく手法により調製されている。当機構においても、藻類培養と化学変換を組み合わせた麻痺性貝毒標準物質調製法を開発した(図2)。基本的には最も官能基修飾されているC1/C2を原料にしてゴニオトキシン(Gonyautoxin, GTX)群やSTX群へと誘導するものであり、それらの変換は一部を除き、ほぼ定量的に進行する⁷⁾。この手法は藻類の培養と毒の単離、変換に基づいており、必要量を得るために時間とコストがかかる。

一方で、化学合成による手法の開発では東京農工大学の長澤らのグループは重要鍵中間体の開発に成功しており、多様な類縁体合成を可能としている⁸⁾。化学合成法は一部合成が困難なものもあるが、比較的短期間かつ多成分を大量に調製できる利点がある。国内での麻痺性貝毒標準物質の供給を考えた場合、将来的には藻類培養による供給を極力減らし、化学合成による手法を開発していくことが、切れ目のない標準物質供給と検査体制の維持を可能にすると考えられる(図3)。この時、万が一のSTX混入を避けるため、いずれの類縁体も毒性のない鏡像異性体を調製することは重要なポイントとなる。

昨今、TTXが食用二枚貝から機器分析によって検出されて問題となっている。規制対象とするかどうかは審議会等での議論を必要とするが、将来的にTTXの認証標準物質(certified reference material, CRM)も揃えるべき成分となりうる。TTXは不斉全合成が達成されているが⁹⁾、「国民保護法施行令第28条第10号に規定する生物剤及び毒素」に指定されており、報告等が必要である。こちらも鏡像異性体を調製し、毒性および分析化学的な同等性を明らかにすることで、毒性のないTTXのCRMを供給できる可能性がある。

毒物質の標準物質として、無毒の鏡像異性体を用いた例は筆者が知る限りなく、有意義な挑戦と考える。

4-2. 定量核磁気共鳴法を用いた麻痺性貝毒をはじめとする濃度決定法の開発

麻痺性貝毒は、極めて高い吸湿性を持ち、また乾燥やアルカリに弱く、水溶液にのみ溶解する化学的性質から、取り扱いが難しい化合物である。この物質の正確な定量は極めて困難で、過去には元素分析で濃度を決定する方法が用いられていた³⁾。2005年になると、核磁気共鳴装置(NMR)を用いて、外部標準による海洋生物毒の濃度決定法¹⁰⁾が報告され、NMRが実用レベルで精



ラン藻 *Anabaena circinalis* の大量培養

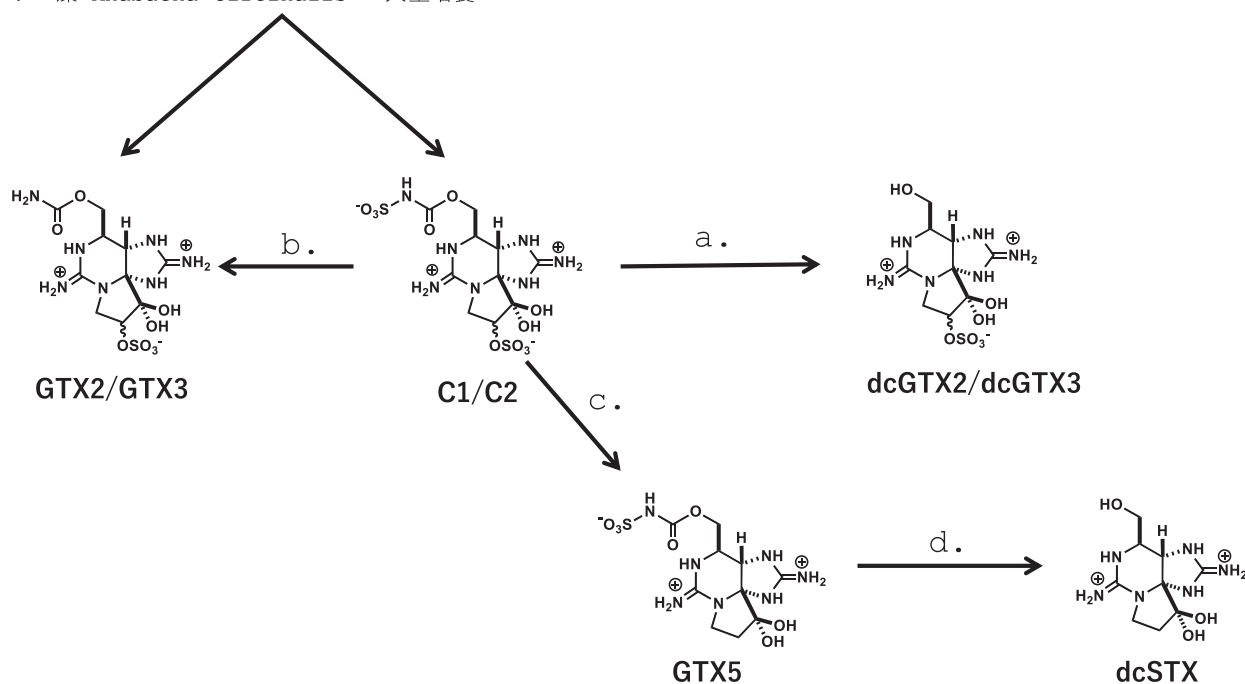


図2 藻類培養(左写真)と化学変換を活用した麻痺性貝毒類縁体の調製法

(a) 0.1 mol/L KPB (pH 7.0), 75 °C, 1 h, yield: ~40% (b) 0.1 mol/L HCl aq., 100 °C, 15 min, yield: 90%
(c) 1% DTT in 1% NH_4HCO_3 , 100 °C, 15 min, yield: 100% (d) 6 mol/L HCl, 110 °C, 3 h, yield: 100%

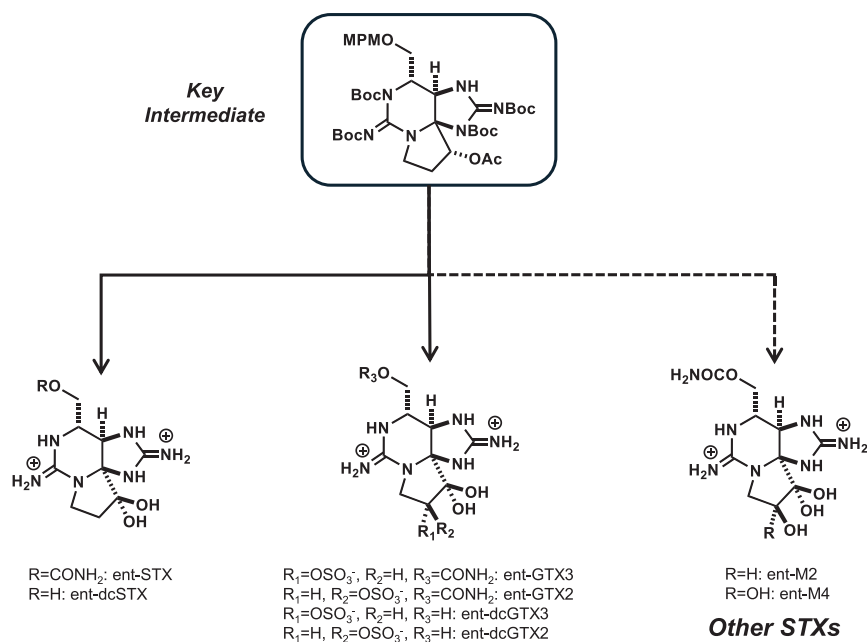


図3 重要鍵中間体を経由した各種鏡像異性体類の化学合成

確な濃度決定に使用できることが知られるようになった。この方法の良いところは、国際単位系に紐づけられたCRMを機器分析における標準物質として使うことで、定量した成分も国際単位系に紐づけることができる計量トレーサビリティが確保された分析法という点である。当初、私は、NMRを用いた濃度決定法として、内部標準に*tert*-butanolを用いた方法を開発し、GTX5とGTX6の定量に応用した。そして、濃度決定したGTX群をMBAに供し、マウス比毒性を算出した¹¹⁾。この方法の問題点は、単離した被検体物質を内部標準により汚染してしまうことである。毒の希少性などを鑑みて、外部標準法が望ましいと考え、PULCON (Pulse-length concentration determination) を取り入れた下痢性貝毒標準物質の開発に取り組んだ¹²⁾。この方法は、相反定理、すなわち、異なる溶液の二つのNMRスペクトル間のシグナル面積

にも相関関係が成り立つことを利用して定量するというものである¹³⁾。下痢性貝毒の一つであるオカダ酸は分子量が804であり、炭素鎖に結合した水素も多いが、複数の二重結合を分子内に有しているため、定量に必要な独立したシグナルが得やすかった。これらシグナルを使い、マレイン酸のCRMを用いた外部標準法の精確さを内部標準法 (基準は1,4-BTMSB-*d*₄) と比較し、本法による定量結果は、一般に精確性が高いとされる内部標準法とも遜色ない結果となることが明らかになった (表2)。こうした内部標準法や外部標準法を用いて、産業技術総合研究所計量標準総合センター (AIST/NMIJ) の協力のもと、下痢性貝毒のCRMの頒布に至った。これら技術開発を行い、麻痺性貝毒に対しても、外部標準法が適用できることを確認した。今後は開発した技術を使い、麻痺性貝毒のCRM調製を産総研と協力しながら実施

表2 オカダ酸を用いた内標法とPULCONの定量値の比較

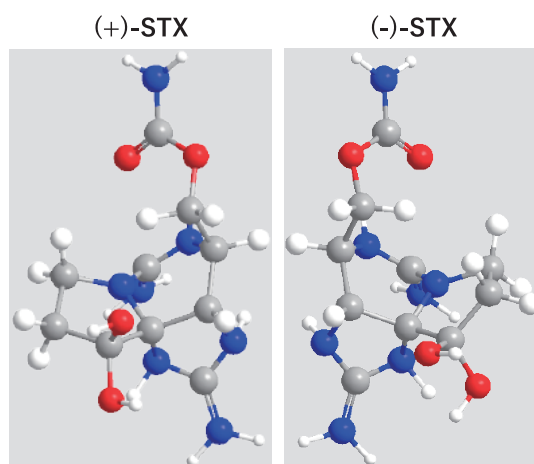
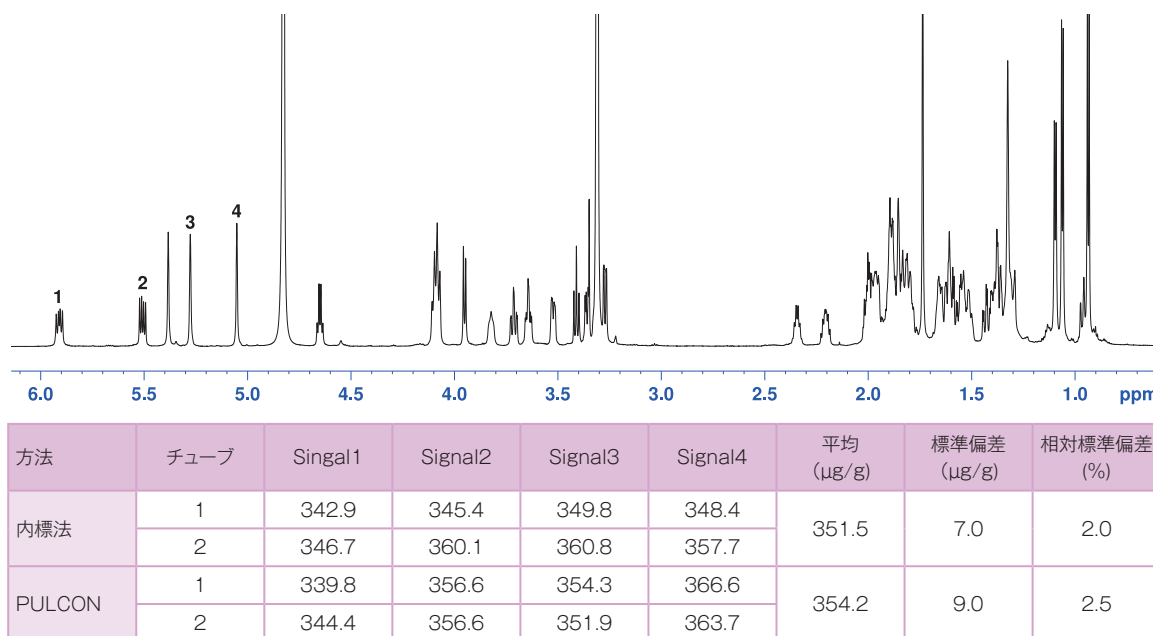


図4 サキトキシンの立体構造
(左)天然型STX、(右)非天然型STX

する予定である。

4-3. サキシトキシン鏡像異性体の利用開発

STXは前述した通り、特定物質に規定されており、機器分析法への移行の大きな障害となっていた。ハーバード大学の岸らのグループによる麻痺性貝毒の合成研究において、STX類縁体の一つであるデカルバモイルサキシトキシン (decarbamoylsaxitoxin, dcSTX) の鏡像異性体には毒性がないことが報告されている¹⁴⁾。これに着目し、STXにおいても同様に鏡像異性体に毒性がなければ、分析用の標準物質として安全に利用できるのではないかとこの着想に至った(図4)。そこで、麻痺性貝毒の不斉合成経験を有している東京農工大学の長澤らがSTX鏡像異性体 (*ent*-STX) を合成し、東北大学の山下・此木らはマウス神経芽細胞腫 (Neuro2A) を用いた毒性試験を実施した。その結果、基準としたTTXに比べ (STXと同程度の毒性を有する)、ナトリウムチャンネル阻害活性として7500倍程度弱い毒性を示した。また、生体への影響を調査するためMBAを実施し、20 μg (100 MU相当の *ent*-STX) を腹腔内投与したが、麻痺性貝毒様の症状は示さず、試験に供した5匹のマウス全てが生存したことから、急性毒性はないと判断した。

次に、*ent*-STXの物理化学的な特性に基づく、分析化学特性を調べた。正確に比較するため、合成された *ent*-STXは、DSS-*d*₆のCRMを外部基準に用いた定量核磁気共鳴法によって精確に濃度を規定したものを使用した。その結果、*ent*-STXは実験した濃度

範囲において良好な直線性を示し、STXと同等の近似曲線を示した。また、化合物の同定に使用されるMS/MS断片化パターンを比較したところ、開裂パターン及び生じたピーク強度は一致した。このことから、*ent*-STXはSTXと同等の分析化学特性を有していることが明らかになった¹⁵⁾(図5)。

上述した成果を経済産業省に提供し、省内並びに外部有識者による審議会で検討した結果、STX鏡像異性体については特定物質として扱わない (STXを含む場合はこの限りではない) 旨の通知が発出され、令和5年4月1日施行となった¹⁶⁾。現在、農林水産技術会議の委託プロジェクト研究「ホタテガイ等の麻痺性貝毒検査における機器分析導入に向けた標準物質製造技術の開発」において、国内で入手できないSTXとそれを含むネオサキシトキシン (neosaxitoxin, neoSTX) と dcSTX を対象に、それらの鏡像異性体の開発を進めている。この中で、*ent*-STXと *ent*-dcSTX の化学合成および濃度決定法はある程度終了しているため、近々標準物質の頒布を目指している。

麻痺性貝毒の機器分析法導入に向けた課題

05

機器分析法を国内に導入するにあたり、いくつか検討すべき課題がある。一つは、二枚貝に含まれるTTXである。1993年には既に国内二枚貝から検出され、その存在が報告されていたが¹⁷⁾、

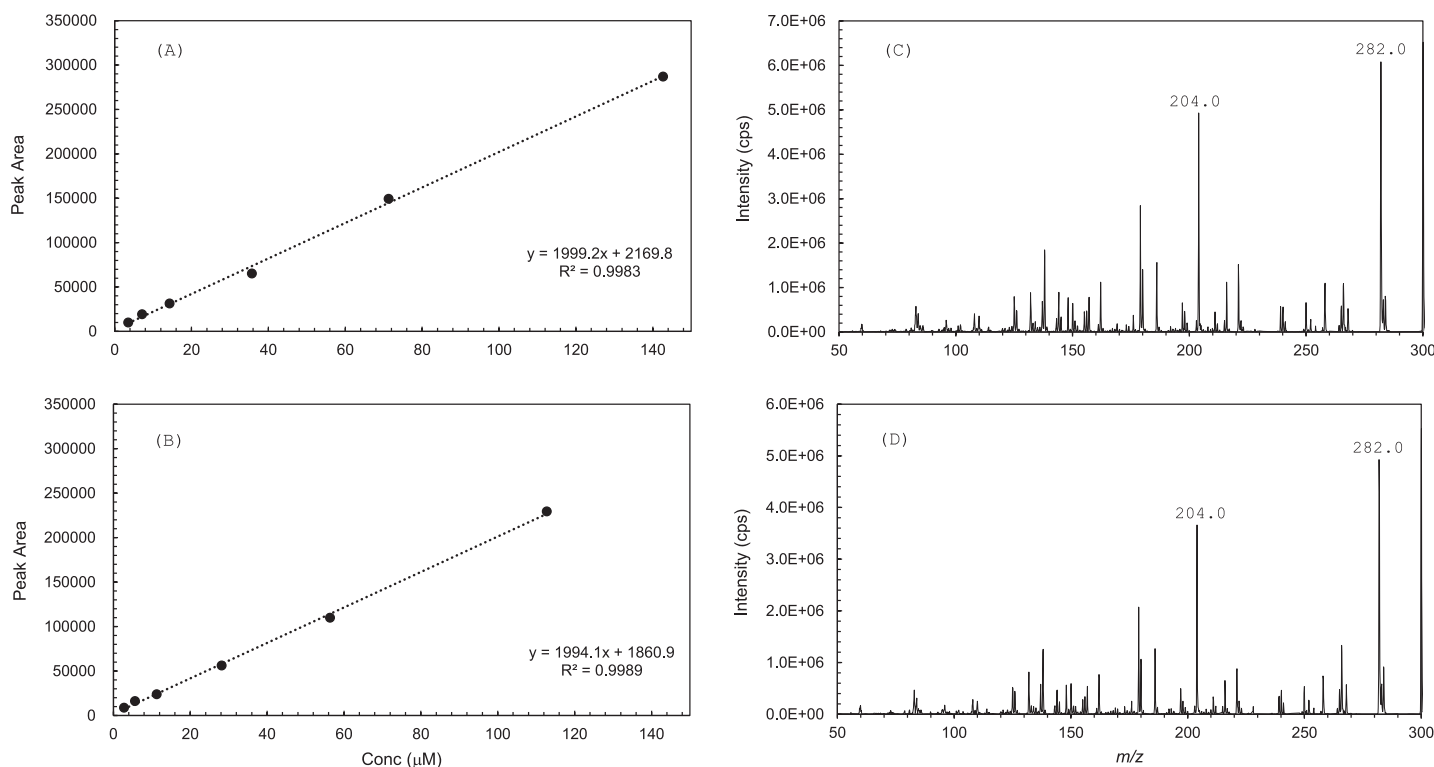


図5 STXと*ent*-STXの検量線 (左) とMS/MSスペクトル (右) の比較
(A, C) STX, (B, D) *ent*-STX

当時はそれほど注目されることはなかった。しかし、質量分析装置を用いた検出法の世界的な普及にともない、日本以外の国々からも二枚貝中のTTXの検出事例が報告され、注目されるようになった。なお、現行のPSTsを対象としたMBAでは、二枚貝に含まれる有毒成分を一括して評価しているため、TTXも同時に検出していると言える。ただし、PSTsを対象としたMBAとTTXを対象としたMBAでは、マウス毒力の設定基準および定義が異なるため、わが国の公定法であるPSTsのMBAにおいて、TTXはTTXとしてではなく、PSTsの一成分として評価されていると考えることができる。機器分析法を導入する場合には、個別にTTXを評価するのか、PSTsと合わせた毒量評価とするのか判断が難しいところであるが、従来のMBAによる検査結果を踏襲するとすれば、後者を選ぶことになる。

もう一つの懸案は、二枚貝代謝物M-toxinsの存在である(表3)。M-toxinsの化学構造は一部の成分しか明らかにされていない^{18, 19)}。また、毒性評価がなされておらず、今後の研究課題である。M-toxinsも含めた標準物質供給体制の構築も不可欠である。現在、上述した委託プロジェクト研究では、関東化学株式会社と富士フイルム和光純薬株式会社にも協力いただき、*ent*-STXの標準物質頒布体制の構築を目指している。さらに、GTX群など麻痺性貝毒の主要成分についても製造・供給できる体制を構築

する必要があるが、これについて技術的な課題はそれほど多くはない。

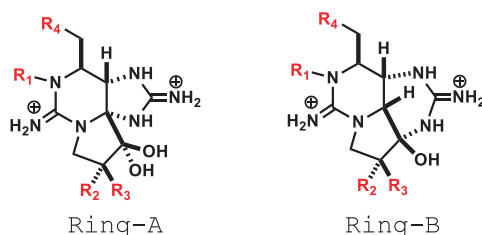
最後に、分析法の開発である。現行のアミドカラムを用いた方法は各成分を分離し定量することができるが、カラムの耐久性が逆相カラムと比較すると劣る。耐久性の向上が必須であるため、それ以外のカラムを用いた分析法も引き続き検討していきたい。

おわりに

06

麻痺性貝毒を検出するための動物を用いた検査法が導入されて以来、約40年が経過しようとしている。本動物試験法は十分機能しており、市場に流通した二枚貝を原因とする食中毒の発生事例はない。しかし、それを取り巻く環境は大きく変化し、検査に動物自体を用いない、あるいはその使用を減らすための代替検査法の開発や、分析装置または分析カラムの高性能化も相まって、動物を使用せずとも二枚貝に含まれる麻痺性貝毒を検出し、定量できる環境が整備されつつある。本稿で取り上げた麻痺性貝毒の機器分析法と、それを運用していくための標準物質の開発

表3 二枚貝に含まれる麻痺性貝毒代謝物の化学構造(一部推定含む)



Toxins	Ring	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
M1(<i>α</i>)	A	H	OH	H	-OCONHSO ₃ ⁻
M1(<i>β</i>)	A	H	H	OH	-OCONHSO ₃ ⁻
M2(<i>α</i>)	A	H	OH	H	-OCONH ₂
M2(<i>β</i>)	A	H	H	OH	-OCONH ₂
M3	A	H	OH	OH	-OCONHSO ₃ ⁻
M4	A	H	OH	OH	-OCONH ₂
M5-HA	B	H	OH	OH	-OCONHSO ₃ ⁻
M6-HA	B	H	OH	OH	-OCONH ₂
M7	A	OH	H	OH	-OCONHSO ₃ ⁻
M8	A	OH	H	OH	-OCONH ₂
M9	A	OH	OH	OH	-OCONHSO ₃ ⁻
M10	A	OH	OH	OH	-OCONH ₂

を通して、国内における新しい検査法を社会実装し、持続的に運用していける環境を醸成していきたい。

謝辞

07

本稿で紹介した研究の一部は、農林水産省「レギュラトリーサイエンス新技術開発事業」におけるプロジェクト研究「有毒藻類の培養による各種貝毒標準品の製造技術の確立」、厚生労働科学研究費 補助金(食品の安全確保推進研究事業)「自然毒等のリスク管理のための研究(課題番号:21KA1005)」, 厚生労働科学研究費 補助金(食品の安全確保推進研究事業)「食品中の自然毒等のリスク管理のための研究(課題番号:24KA1001)」, 農林水産技術会議の委託プロジェクト研究「ホタテガイ等の麻痺性貝毒検査における機器分析導入に向けた標準物質製造技術の開発(課題番号:JPJ012710)」中で実施された。また、本稿を校閲いただいた北里大学 鈴木敏之教授、東京農工大学 長澤和夫教授、産業技術総合研究所 山崎太一博士にお礼申し上げます。関係者各位に深く謝意を表します。

参考文献

1. EURLMB, EURLMB SOP for the analysis of Paralytic shellfish toxins (PST) by precolumn HPLC-FLD according to OMA AOAC 2005.06, https://www.aesan.gob.es/en/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/PST_OMA-AOAC2005-06_HPLC-FLD_EURLMB.pdf (2025年3月5日アクセス)
2. A. Turner, R. Hatfield, M. Rapkova-Dhanji, D. Norton, M. Algoet, D. Lees, Single-Laboratory Validation of a Refined AOAC HPLC Method 2005.06 for Oysters, Cockles, and Clams in UK Shellfish, *J. AOAC int.*, 2010, 93, pp.1482-1493.
3. Y. Oshima, Post-column derivatization HPLC method for the analysis of Paralytic shellfish toxins, *J. AOAC int.*, 1995, 78, pp528-532.
4. E. Hignutt, Jr., Suitability of Postcolumn Oxidation Liquid Chromatography Method AOAC 2011.02 for Monitoring Paralytic Shellfish Toxins in Alaskan Shellfish—Initial Pilot Study versus Mouse Bioassay and In-House Validation. *J. AOAC int.*, 2014, 97, pp.293-298.
5. M. J. Boundy, A. I. Selwood, D. T. Harwood, P. S. McNabb, A. D. Turner, Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction, *J. Chromatogr. A*, 2015, 1384, p1-12
6. R. Watanabe, M. Kanamori, H. Yoshida, Y. Okumura, H. Uchida, R. Matsushima, H. Oikawa, T. Suzuki, Development of Ultra-Performance Liquid Chromatography with Post-Column Fluorescent Derivatization for the Rapid Detection of Saxitoxin Analogues and Analysis of Bivalve Monitoring Samples. *Toxins*, 2019, 11, p573.
7. (a) R. Watanabe, T. Suzuki, Y. Oshima, Preparation of Calibration Standards of N1-H Paralytic Shellfish Toxin Analogues by Large-Scale Culture of Cyanobacterium *Anabaena circinalis* (TA04). *Marine Drugs*, 2011, 9(3), 466-477. (b) T. Suzuki, R. Watanabe, A. Yoshino, H. Oikawa, H. Uchida, R. Matsushima, S. Nagai, T. Kamiyama, T. Yamazaki, M. Kawaguchi, T. Yaita, A. Takatsu. Preparation of Diarrhetic Shellfish Toxins (DSTs) and Paralytic Shellfish Toxins (PSTs) by Large Algal Culture and Chemical Conversion. A. Lincoln MacKenzie [Ed]. *Marine and Freshwater Harmful Algae 2014. Proceedings of the 16th International Conference on Harmful*
8. O. Iwamoto, K. Nagasawa, Total Synthesis of (+)-Decarbamoylsaxitoxin and (+)-Gonyautoxin 3, *Org. Lett.* 2010, 12, pp2150-2153
9. N. Ohyabu, T. Nishikawa, M. Isobe. First asymmetric total synthesis of tetrodotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* 2003. 125. pp.8798-8805
10. I. W. Burton, M. A. Quilliam, J. A. Walter, Quantitative ¹H NMR with External Standards: Use in Preparation of Calibration Solutions for Algal Toxins and Other Natural Products, *Anal. Chem.* 2005, 77 (10), 3123-3131
11. R. Watanabe, T. Suzuki, Y. Oshima, Development of quantitative NMR method with internal standard for the standard solutions of paralytic shellfish toxins and characterisation of gonyautoxin-5 and gonyautoxin-6, *Toxicon*, 2010, 56, pp. 589-595
12. R. Watanabe, C. Sugai, T. Yamazaki, R. Matsushima, H. Uchida, M. Matsumiya, A. Takatsu, T. Suzuki, Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Based on PULCON Methodology: Application to Quantification of Invaluable Marine Toxin, Okadaic Acid. *Toxins*, 2016, 8(10), 294.
13. 「qNMR プライマリーガイド」ワーキンググループ, qNMR プライマリーガイド 基礎から実践まで, 共立出版, 2015, p58
14. C. Y. Hong, Y. Kishi, Enantioselective total synthesis of (-)-decarbamoylsaxitoxin, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, pp. 7001-7006.
15. R. Watanabe, Y. Takayanagi, O. Chiba, S. Itoda, H. Ishizuka, M. Odagi, M. Ozawa, H. Uchida, R. Matsushima, K. Konoki, M. Yotsu-Yamashita, K. Nagasawa, T. Suzuki. Nontoxic Enantiomeric Reference Materials for Saxitoxins. *Anal. Chem.* 2022, 94, pp.11144-11150.
16. 経済産業省, 「化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律」に係る特定物質の取扱いについて, https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/cwc/files/kaieihou_tokuteibushitsu_toriatsukai.pdf (2025年3月5日)
17. M. Kodama, S. Sato, T. Ogata, *Alexandrium tamarense* as a source of tetrodotoxin in the scallop *Patinopecten yessoensis*. Toxic phytoplankton blooms in the sea. 1993.
18. C. Dell'Aversano, J. A. Walter, I. W. Burton, D. J. Stirling, E. Fattorusso, M. A. Quilliam. Isolation and Structure Elucidation of New and Unusual Saxitoxin Analogues from Mussels. *J. Nat. Prod.* 2008, 71, pp. 1518-1523.
19. S. Numano, Y. Kudo, Y. Cho, K. Konoki, Y. Kaga, K. Nagasawa, M. Yotsu-Yamashita. Two new skeletal analogues of saxitoxin found in the scallop, *Patinopecten yessoensis*, as possible metabolites of paralytic shellfish toxins. *Chemosphere*, 2021, 278, p.130224.

受理日: 2025年6月2日

キーワード解説

■ カビ毒

植物病原菌であるかびや環境に生息するかびが産生する化学物質で、人や家畜に急性毒性および慢性毒性などの健康被害を起こすものを示す。かび毒のことを "マイコトキシン(mycotoxin)" ということもある。

■ ボツリヌス毒素

ボツリヌス毒素はボツリヌス菌および関連する細菌種によって産生されるタンパク毒素で、自然界で最も強力な毒性を示す。毒素は神経筋接合部に作用し神経伝達物質の放出を遮断することにより、筋肉の収縮を抑制し弛緩性麻痺を引き起こす。この毒素の特徴を利用して現在では様々な疾患の治療に応用されている。

■ 麻痺性貝毒

ある有毒プランクトンが生産し、三環性グアニジン骨格を有する強力な神経毒である。プランクトンが発生した海域に生息する二枚貝は毒化し、食中毒の原因となる。その症状は、口唇のしびれに始まり運動障害や呼吸困難などの症状を呈し重篤な場合は死に至る。安全な二枚貝が流通するように、監視体制が整備されており、国内で市場流通した二枚貝による食中毒の発生事例はない。

カビ毒分析用標準品

- カビ毒分析用食品組成標準試料 6品目
- 13C-カビ毒標準液 45品目
- カビ毒標準品 39品目
- カビ毒標準液 74品目
- カビ毒混合標準液 17品目



当社HPでは、ケミカルタイムス最新号、バックナンバーを公開しております。

ケミカルタイムス URL
<https://www.kanto.co.jp/times.html>

関東化学 URL
<https://www.kanto.co.jp/>

2次元バーコードはこちらです ▶▶▶



※無断転載および複製を禁じます。