

培養細胞を用いたパリトキシン毒性試験法の検討

誌名	愛知県衛生研究所報
ISSN	05157803
著者名	林,瑞那 秦,眞美 館井,浄子 長谷川,晶子 藤浦,明 皆川,洋子
発行元	愛知県衛生研究所
巻/号	61号
巻号補足	
掲載ページ	p. 31-38
発行年月	2011年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



調 査 研 究

培養細胞を用いたパリトキシン毒性試験法の検討

林 瑞那、秦 眞美、舘井浄子、長谷川晶子、藤浦 明、皆川洋子

要 旨

パリトキシンはアオブダイ等の食用魚に含まれる自然毒であり、その強い毒性から食品衛生上問題視されている。一般にパリトキシンの検出にはマウス試験が用いられているが、検出感度の低さや倫理的な観点から、代替法の開発が望まれている。

そこで今回、培養細胞を用いたパリトキシン毒性試験法の構築を試みた。細胞株、培地、曝露時間等を検討した結果、H9C2 細胞を用いた場合、曝露開始から最短 3 時間で十分な感度(IC_{50} : 121 ng/mL)で検出できた。今後、更なる検討を加えることによって、パリトキシンを特異的に検出する方法の開発が期待される。

キーワード：パリトキシン、細胞毒性試験、食中毒

序 文

海洋性自然毒(マリントキシン: marine toxin)による食中毒は一般的に致死率が高く、直近 10 年間(2001~2010 年)の日本におけるマリントキシン食中毒による死者数は、全食中毒による死者数の約 40%を占めている¹⁾。代表的なマリントキシン食中毒を引き起こすフグは、販売・提供にあたり各都道府県の条例による取締りを受けている。

近年、日本において、マリントキシンの 1 種であるパリトキシン(palytoxin: PTX)様毒による中毒被害が増大しており、関心が高まっている²⁾。PTX 様毒中毒の致死率は 4~5%程度とフグ中毒に匹敵する高さとなっている³⁾。

PTX を含む毒魚には、アオブダイやソウシハギ等が知られているが、これら魚類は自

ら PTX を産生するのではなく、植物プランクトンである渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属の産生する毒素が食物連鎖による生物濃縮の結果、魚類の体内に蓄積するものと考えられている。地球温暖化による海水温上昇などの影響から、元来熱帯や亜熱帯海域に生息する *Ostreopsis* 属が日本沿岸にも広く分布するようになったことが、日本での PTX 様毒被害の増大原因であると推察される²⁾。

ところで魚介類の含むマリントキシンの毒力測定は、マウスを用いた試験により行うことが多く、フグ毒や麻痺性貝毒では公定法に採用されている。PTX においても、30 年以上も前からマウス試験法による毒力測定が行われ、現在においても日本食品衛生協会の推奨する唯一の方法となっている^{4),5)}。しかしマリントキシンのマウス試験法には、特異性の低さ、マウスの感受性

の低さ、マウスの個体差等による検査結果の不安定さ⁶⁾、そして倫理的な問題等の難点が指摘されている。PTXは他のマリントキシンに比べてマウスの感受性が低いため²⁾、マウス試験法に替わる検出法の早急な開発が望まれる。

一方マリントキシンの化学的若しくは免疫学的検出法として、液体クロマトグラフィー蛍光検出法(HPLC-FLD)等の機器分析法や酵素免疫測定法(ELISA)の開発が進められており、PTXへの応用報告もなされている^{7),8)}。これらの分析法は感度や特異性の点で優れているが、生体活性を確認するという観点からは、マウス試験法に替わるものとはいえない。

生体活性を反映しながら実験動物を用いない試験法として、培養細胞を用いるマリントキシン検出法が注目されている^{9),10)}。当所でも、麻痺性貝毒、maitotoxin(シガテラ毒)、tetrodotoxin(フグ毒)において培養細胞を用いる試験法の実用化に取り組み^{11)~13)}、試験に要する時間や検出感度が実用に堪えることを確認し、マウス試験法に替わる生物試験法としての有用性を検討してきた。

今回、培養細胞を用いたPTX検出法の実用性評価のため、いくつかの検討を行った。

材料と方法

1. トキシン

PTX標準品(161-15131, 和光純薬)を蒸留滅菌水(Deionized Sterile Distilled Water、ニッポンジーン)に溶解してストック溶液(10 μ g/mL)を作成のうえ小分けし、-20℃で凍結保存した。使用時には必要量のみを融解して12段階の2倍希釈系列を作成し、後述する毒性試験における最終濃度(ng/mL)が0.244、0.488、0.977、1.95、3.91、7.81、15.6、31.3、62.5、125、250、500となるように調製した。

2. 細胞

培養細胞株として、ラット心臓横紋筋由来H9C2細胞(ECACC:88092904)およびマウス神経芽細胞腫由来Neuro2a細胞(ECACC:89121404)を検討した。CO₂インキュベーターを用いて、5%CO₂ 37℃の条件下に培養した。

3. 培地

培地、血清、培地添加試薬は、いずれもInvitrogen社製品を用いた。

継代培養用には、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640に各々最終濃度が10% fetal bovine serum、100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin、1 mM Sodium Pyruvateとなるよう添加した培地を用いた。

毒性試験用の培地として、RPMI1640、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose、DMEM Low Glucoseのいずれかを、血清及び添加試薬を加えない状態で用いた。

4. トキシンの毒性試験(図1)

培養細胞を用いたPTXの毒性試験は、当所において麻痺性貝毒等で実施経験のある方法^{11)~13)}およびPTXを用いた報告⁹⁾に倣い、以下の系で行った。なお、同一の実験を3ウェル並行で行い、各ウェルの実測値の算術平均を測定値とした。

I 前培養

96ウェル平底マイクロプレート(353072、Falcon)に細胞を播種し、継代培養用の培地100 μ Lで24時間培養した。なお特に断り書きのない場合は、24時間培養後にsubconfluentとなる生細胞数(H9C2細胞は 2.5×10^4 /ウェル、Neuro2a細胞は 5×10^4 /ウェル)を播種した。生細胞の計数は色素排除法により行い、0.4% Trypan Blue Stain(15250-061、GIBCO)を細胞液と1:1の割合で混合して計測した。

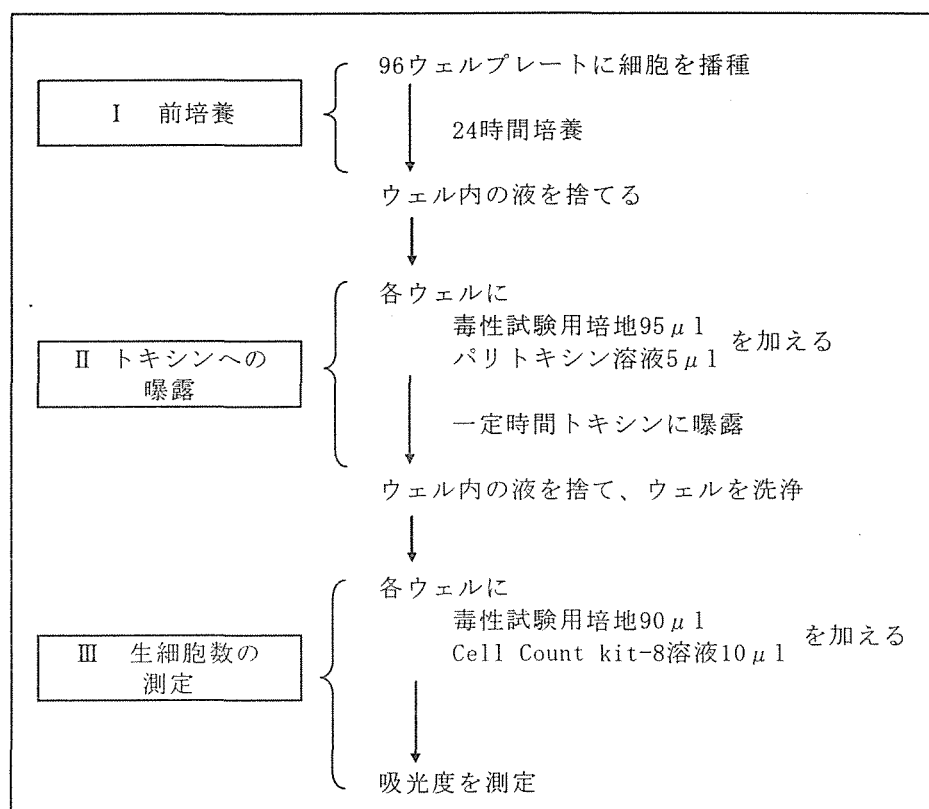


図1 培養細胞を用いた毒性試験の概略

II トキシンへの曝露

前培養で用いた培地を捨てた後、各ウェルに試験用培地 $95 \mu\text{L}$ と、PTX 溶液または蒸留滅菌水を $5 \mu\text{L}$ 加えた。マイクロプレートミキサー (NS-P、井内盛栄堂) 上で 3 ～ 5 秒攪拌してから、 $5\% \text{CO}_2$ 37°C の条件下で一定時間 PTX への曝露を行った。なお特に断り書きのない場合は、試験用培地には RPMI1640 を用いた。

III 生細胞数の測定

各ウェルの細胞の生存率の測定は、細胞内脱水素酵素活性に基づいて生細胞数を測定する Cell Counting Kit-8 (CK04、同仁化学) を用いて行った。II の操作の後ウェル内の液を捨てて、 $50 \mu\text{L}$ の試験用培地でウェルを 2 回洗浄した後、試験用培地 $90 \mu\text{L}$ と Cell Counting Kit-8 溶液 $10 \mu\text{L}$ を各ウェルに加えて、 $5\% \text{CO}_2$ 37°C の条件下で 1 時間培養して呈色反応を行った。その後、マイクロプレートリーダー (Model 680、

Bio-Rad) にて測定波長 450 nm 、参照波長 620 nm での吸光度を測定した。

IV 解析

各ウェルの吸光度は、そのウェル内の生存細胞数にほぼ比例する。そこで、II において PTX 溶液 $5 \mu\text{L}$ の代わりに水 $5 \mu\text{L}$ を加えたウェルでの吸光度を 100% とし、各ウェルの吸光度のパーセンテージを求め、これをそのウェルでの細胞の生存率とした。

また、細胞の生存率を PTX 濃度 (log) に対してプロットした半対数グラフから、細胞生存率が 50% になる濃度を IC_{50} (50% 細胞障害率) として算出した。

結果と考察

1. 培養細胞株の検討 (図 2)

当所で経験のある H9C2 細胞および Neuro2a 細胞を用いたマリントキシンの毒性試験の検討^{11)～13)} 成果を参考に、今回も H9C2 細胞と Neuro2a 細胞を用いて PTX への

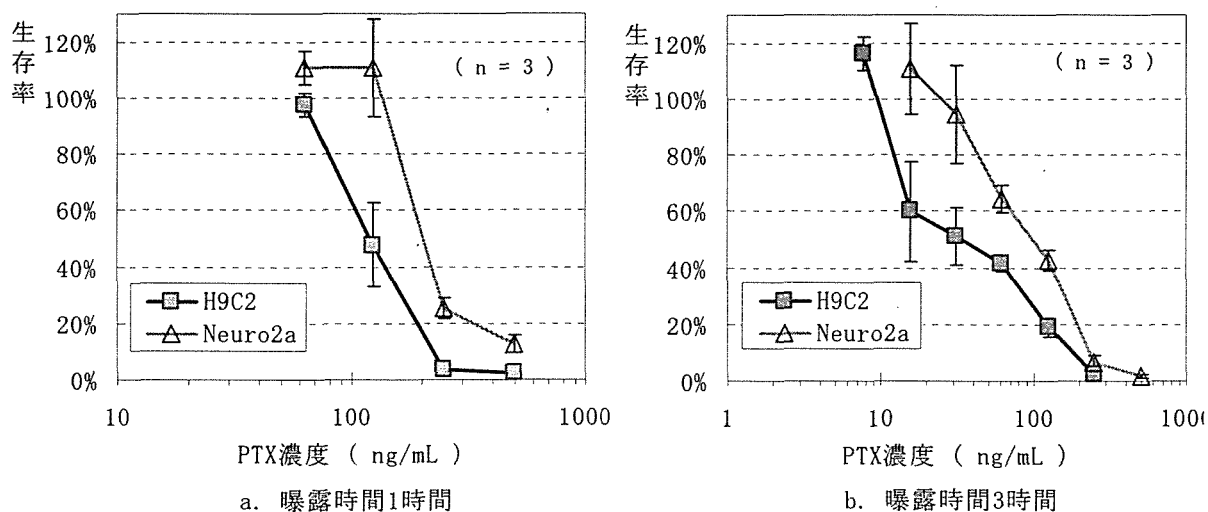


図2 培養細胞株の比較

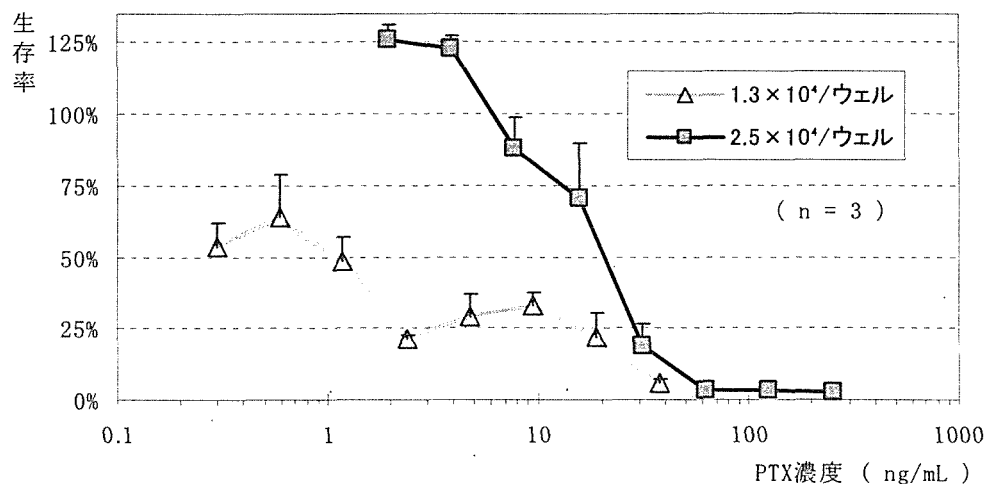


図3 細胞密度の比較

感受性の比較を行った。PTX への曝露時間は1時間および3時間を検討した。

H9C2 細胞の IC_{50} 値 (ng/mL) は1時間:121、3時間:33.8であり、Neuro2a 細胞では1時間:204、3時間:99.1であった。H9C2 細胞の方が Neuro2a 細胞よりも感受性が高く、以後の実験は H9C2 細胞を用いた。

2. 播種細胞密度の検討(図3)

前培養で播種する H9C2 細胞数について、 1.3×10^4 /ウェルと 2.5×10^4 /ウェルとで比較を行った(曝露時間:6時間)。前培養で 1.3×10^4 /ウェルの播種では PTX に高い感

受性を示したが、生存率のグラフが安定しないため定量的検出には不向きであると思われる。

2.5×10^4 /ウェルの播種では前培養終了後に subconfluent(約80% confluent)となるが、 1.3×10^4 /ウェルの播種では前培養終了後に約50% confluentとなる。50% confluent 程度では細胞の状態が不安定であるために、 1.3×10^4 /ウェルの播種では生存率のグラフが安定しないものと推測された。再現性の高い PTX の定量には、前培養後に subconfluent となる程度の播種が適

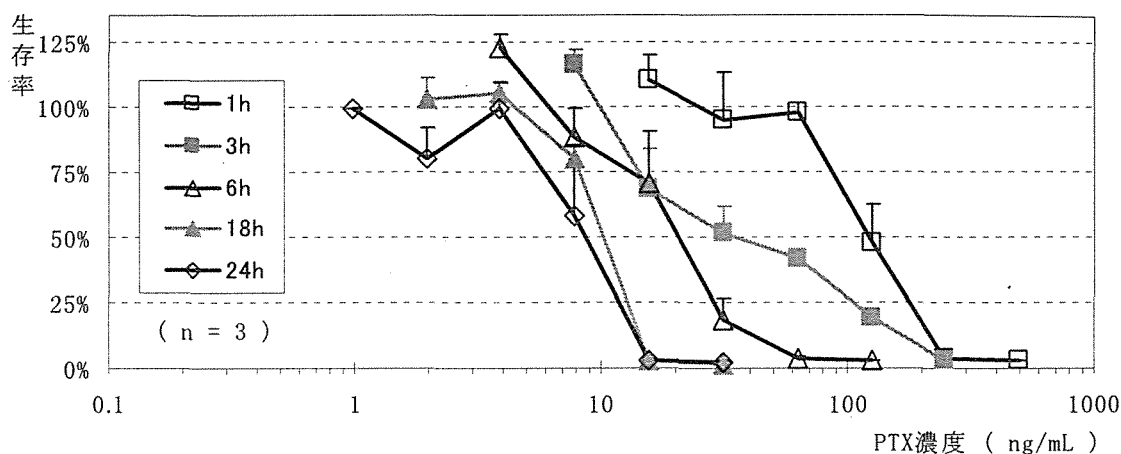


図4 曝露時間の比較

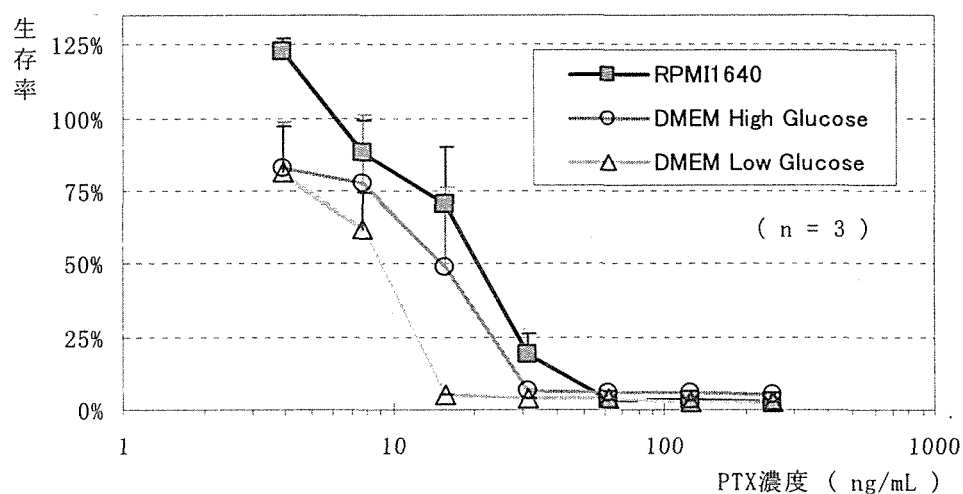


図5 培地の比較

当であると考えられた。以後の実験は 2.5×10^4 /ウェルの播種で行った。

3. トキシンへの曝露時間の検討(図4)

H9C2 細胞における、PTX への曝露時間(1、3、6、18、24 時間)を比較した。IC₅₀ 値 (ng/mL)は1時間:121、3時間:33.8、6時間:20.5、18時間:10.2、24時間:8.6であった。曝露時間を長くするほど検出感度は高まるといえる。ただし曝露時間を24時間以上に延長した場合、トキシンを加えないウェルにおいても細胞が過密となり生存率が安定しない危険性があるため、24時間の曝露が最も感度良く PTX を検出できる

と考えられた。曝露時間が1時間の場合の IC₅₀ 値は 121 ng/mL であったが、ヒトが中毒症状を起こすのはおよそ $4 \mu\text{g}$ 以上の PTX を摂取した場合との報告に基づけば¹⁴⁾、曝露時間1時間で検出感度に不足はないと思われた。

なお、この試験法を検体に実用する際には必ずしも開始時に曝露時間を設定する必要はなく、検体への1時間の曝露の後に実体顕微鏡で細胞の生存率を観察した上で、より検出感度を高めるために曝露時間を延長するか、生細胞数の測定に移るかを選択することが可能である。

表 1 DMEM High Glucose と DMEM Low Glucose の組成の違い

	DMEM High Glucose	DMEM Low Glucose	RPMI1640(参考)
D-Glucose (g/L)	4.5	1.0	2.0
Sodium Pyruvate (g/L)	0	0.11	0

4. 試験用培地の検討(図 5)

RPMI1640、DMEM High Glucose、DMEM Low Glucose の 3 種類の処方を比較検討した(曝露時間: 6 時間)。IC₅₀ 値は RPMI1640 で 20.5 ng/mL であるのに対し、DMEM High Glucose では 15.2 ng/mL、DMEM Low Glucose では 9.0 ng/mL であった。

表 1 に示すとおり、DMEM High Glucose と DMEM Low Glucose の組成¹⁵⁾の主要な違いは D-Glucose 濃度である。H9C2 細胞においては、DMEM Low Glucose よりも DMEM High Glucose で培養した場合の方が、低酸素刺激に対して抵抗性を示すとの報告がある¹⁶⁾。今回の PTX 試験に用いた H9C2 細胞も、グルコースの豊富な環境の方が抵抗性を示したと推察された。

試験用培地としては RPMI1640 を使用できるが、DMEM Low Glucose の IC₅₀ 値は RPMI1640 のおよそ半値であったため、より検出感度を必要とする場合には DMEM Low Glucose を用いるのが良いと考えられた。

5. まとめと今後の課題

H9C2 細胞を用いた細胞毒性試験を応用して PTX 検出を試みた結果、既報の貝毒^{11)~13)}と同程度に実施可能と考えられた。H9C2 細胞は前培養後に subconfluent となる 2.5×10^4 /ウェルの播種が適当であり、試験用培地には細胞の継代にも用いる RPMI1640 の使用が適当であった。PTX への曝露時間は 1 時間で十分な感度(IC₅₀: 121 ng/mL)で検出できたため、本試験は前培養開始から最短 27 時間(前培養 24 時間、曝露時間 1 時間、呈色反応 1 時間、培地の除去や吸光度の測定・解析等 1 時間)で結果が得られる。

HPLC-FLD 等の機器分析法や ELISA 法と比較すると、培養細胞を用いる検出法は生体活性のスクリーニング機能を有する点や、緊急検査に対しても培養細胞と標準品を備えていれば当日中に開始できる点、さらに高価な機器や抗体の準備を必要としない点で優れている。一方、特異性の面では劣っているため、今後 ELISA 法など PTX 特異的な検出法との並行実施等を検討する必要がある。

文 献

- 1)厚生労働省: 食中毒統計資料(2011 年 2 月 10 日現在);<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 2)谷山茂人: パリトキシン様毒. 食品衛生研究, 59(8): 45-51, 2009.
- 3)厚生労働省: 自然毒のリスクプロファイル(2011 年 2 月 10 日現在);<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/index.html>
- 4)Teh YF, Gardiner JE: Partial purification of *Lophozozymus pictor* toxin. Toxicon, 12(6): 603-610, 1974.
- 5)社団法人 日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針 理化学編 2005.
- 6)Sauer UG: Animal vs. non-animal tests for the monitoring of marine biotoxins in the EU. ALTEX, 22(1): 19-24, 2005.
- 7)Bignami GS, Raybould TJ, Sachinvala ND, Grothaus PG, Simpson SB, Lazo CB, Byrnes JB, Moore RE, Vann DC: Monoclonal antibody-based enzyme-linked

- immunoassays for the measurement of palytoxin in biological samples. *Toxicon*, 30(7): 687-700, 1992.
- 8) Riobó P, Paza B, Franco JM: Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 566(2): 217-223, 2006.
- 9) Cañete E, Diogène J: Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2a) and neuroblastoma×glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. *Toxicon*, 52(4): 541-550, 2008.
- 10) Caillaud A, Yasumoto T, Diogène J: Detection and quantification of maitotoxin-like compounds using a neuroblastoma (Neuro-2a) cell based assay. Application to the screening of maitotoxin-like compounds in *Gambierdiscus* spp. *Toxicon*, 56(1): 36-44, 2010.
- 11) Okumura M, Tsuzuki H, Tomita B: A rapid detection method for paralytic shellfish poisoning toxins by cell bioassay. *Toxicon*, 46(1): 93-98, 2005.
- 12) Okumura M, Hasegawa A, Tohyama A: Simple and rapid cell-bioassay for maitotoxin, a natural marine toxin as a ciguatera fish poisoning toxin. AOAC International Annual Meeting, 2008.
- 13) 長谷川 晶子: 培養細胞を用いた海洋性自然毒検出法. *ぶんせき*, 11: 627-628, 2009.
- 14) Taniyama S, Mahmud Y, Terada M, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T: Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan. *Journal of Natural Toxins*, 11(4), 277-282, 2002.
- 15) invitrogen: 基本培地-哺乳類細胞培養基本培地. http://www.invitrogen.jp/gibco/basal_media.shtml.
- 16) Kim MH, Jung YS, Moon CH, Jeong EM, Lee SH, Baik EJ, Moon CK: Isoform-specific induction of PKC-epsilon by high glucose protects heart-derived H9c2 cells against hypoxic injury, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(1), 1-6, 2003.

A cytolytic assay for the measurement of palytoxin

Mizuna Hayashi, Mami Hata, Kiyoko Tachii,
Akiko Hasegawa, Akira Fujiura, Hiroko Minagawa

Marine toxins present in seafood are potential hazard for human through foodborne intoxication, frequently with lethal consequences. Palytoxin is one of the most potent marine toxins. Recently, the number of patient reports intoxicated with palytoxin increased in Japan. For effective public health practice, proper monitoring of palytoxin in seafood and its risk assessment are required.

The mouse bioassay is generally used for the quantification of palytoxin. However, this method is far from ideal, because of its low sensitivity, and the lack of specificity. The ethical problem regarding the use of experimental animals also exists. Therefore, alternative methods for the detection of palytoxin in seafood are now being sought.

Under these circumstances, we developed a cell-based assay for the detection and quantification of palytoxin by modifying one originally developed for maitotoxin. Our data demonstrated here indicated that the cytolytic assay using H9C2 cell line can detect palytoxin within 3 hours after exposure with sufficient sensitivity, and, if combined with another assay with higher specificity, may replace the mouse assay.

Key words: palytoxin, cell-based assay, food poisoning