

作成日：2020年 3月 31日

更新日： 年 月 日

# 麻痺性貝毒簡易分析キットによる スクリーニング法導入マニュアル version 1

このマニュアルは、水産研究・教育機構中央水産研究所（代表機関）・北海道立衛生研究所・北海道立総合研究機構水産研究本部中央水産試験場・岩手県水産技術センター・大阪府立環境農林水産総合研究所・大分県農林水産研究指導センター水産研究部・熊本県水産研究センター・日水製薬株式会社が参画した農林水産省「安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業（課題名：麻痺性貝毒の機器分析法の高度化及びスクリーニング法の開発）」で得られた成果を元に作成した。

# 麻痺性貝毒簡易分析キットによるスクリーニング法導入マニュアル

## 目 次

1. はじめに .....	3
2. 簡易分析キットの概要と操作方法	
(1) 簡易分析キットの構成 .....	4
(2) 測定用抽出試料の調製方法 .....	4
(3) 簡易分析キットの操作方法 .....	5
(4) 分析結果の判定 .....	5
(5) 簡易分析キットの反応性の特徴.....	7
(6) 画像解析を利用した判定部ラインの数値化 .....	7
3. 簡易分析キットによるスクリーニング法導入のための検討事項	
(1) 抽出試料マトリクスの影響の検討 .....	9
(2) 測定試料の希釈倍率の設定 .....	10
(3) スクリーニングレベルの設定 .....	10
(4) 現場サンプルの分析による検証 .....	11
4. 国内各地のスクリーニング法導入にむけた検討事例	
(1) 北海道 .....	12
(2) 岩手県 .....	16
(3) 大阪府 .....	20
(4) 大分県 .....	41
(5) 熊本県 .....	45
別添資料	
麻痺性貝毒簡易分析キット (MT テスト イムノクロマト-PSP 「ニッスイ」) 説明書 (製品添付文書)	

## 1. はじめに

農林水産省消費・安全局により、2015年3月、「生産海域における貝毒の監視及び管理措置について（26 消安第 6073 号）」が通知され、その補完として「二枚貝等の貝毒のリスク管理に関するガイドライン\*」（以下ガイドライン）が制定された。当通知により、貝毒のリスク管理にスクリーニング法を導入することが可能となった。2017年度から開始された農林水産省の「安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業（課題名：麻痺性貝毒の機器分析法の高度化及びスクリーニング法の開発）」では、麻痺性貝毒のリスク管理に使用することを目指して麻痺性貝毒簡易分析キットを開発し、MTテスト イムノクロマト-PSP「ニッスイ」（以下キット）として2019年2月より市中供給を開始した。本マニュアルは、委託事業の成果をもとに、本簡易分析キットをスクリーニング法として導入するための手引きとして作成した。

\*<http://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/gyokai/busitu/sizendoku/attach/pdf/index-9.pdf>

## 2. 簡易分析キットの概要と操作方法

### (1) 簡易分析キットの構成

本キットは免疫クロマト法を原理とした、麻痺性貝毒検出用の簡易分析キットである。本キットはテストプレートと検体希釈液から構成されている（図1）。テストプレートは検体を添加する検体添加部、判定を行う判定部、検体名等を記入するID部から構成され、さらに判定部は、麻痺性貝毒の判定を行う試験部（T）、試験の成立を判断する対照部（C）からなっている（図2）。



図1. MTテスト イムノクロマト-PSP「ニッセイ」の構成

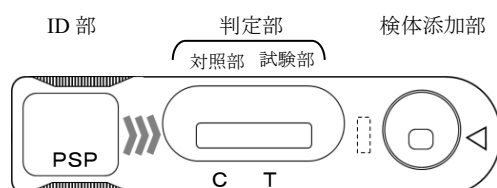


図2. テストプレート各部の名称

### (2) 測定用抽出試料の調製方法

#### A. 二枚貝の測定用抽出試料の調製

二枚貝試料をキットで分析する場合、測定用抽出試料の調製は公定法であるマウス試験における抽出法（厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知「貝毒の検査等について」（昭和55年7月1日、環乳第30号））に準じた以下の方法で抽出する。

- 1) 二枚貝むき身を細切後にホモジナイズし、等量の塩酸（0.1 mol/L）を添加する。
- 2) pH2~4 であることを確認（範囲外の場合は濃度の高い塩酸で調整）したのちに、沸騰水中で加熱抽出（5分間）する。
- 3) 加熱抽出した試料を遠心分離して得た上清を測定用抽出試料とする。なお、遠心分離が出来ない場合は、キット分析に必要な抽出液量が少量であるため、静置して得られる上清部分を使用しても同様の結果が得られる。

## B. 麻痺性貝毒原因プランクトンを含む海水試料の測定用抽出試料調製

原因プランクトンの1細胞に含まれる麻痺性貝毒成分は低濃度であることから、海水試料中の麻痺性貝毒成分をキット分析で検出するためには、海水試料をプランクトンネットなどでろ過濃縮し、その後に抽出処理して測定用抽出試料とする必要がある。以下に調製方法を示す。

1) 1Lの海水試料をオープニングが15 µm以下のプランクトンネットで10 mL程度までろ過濃縮する\*。

2) ろ過濃縮した海水試料に等量の0.2 M酢酸を添加し、超音波破碎機等で細胞を破壊して測定用抽出試料とする。超音波破碎機等がない場合は、試料を凍結・解凍するか、短時間加熱して細胞を破壊する。

\*100倍に濃縮した海水試料では、*Alexandrium tamarense* が5-10 cells/mLの場合に検出可能（及川ら、水産技術, 6 (2), 161-167, 2014）。

### (3) 簡易分析キットの操作方法

キット分析の際は、二枚貝の測定用抽出試料は付属の希釈液で20倍以上に、貝毒原因プランクトンを含む海水試料の測定用抽出試料は5倍以上に希釈し、そのうち100 µlをテストプレートの検体添加部に添加して、20分後に判定部に出現する赤いラインにより判定を行う。ただし、分析時のキットの反応性は麻痺性貝毒成分の量と種類により左右される（2. (4) 参照）。そのため、付属の希釈液での希釈に際しては、目的に沿った希釈倍率を検討したうえで適切な希釈倍率を用いることが必要である（3. (2) 参照）。

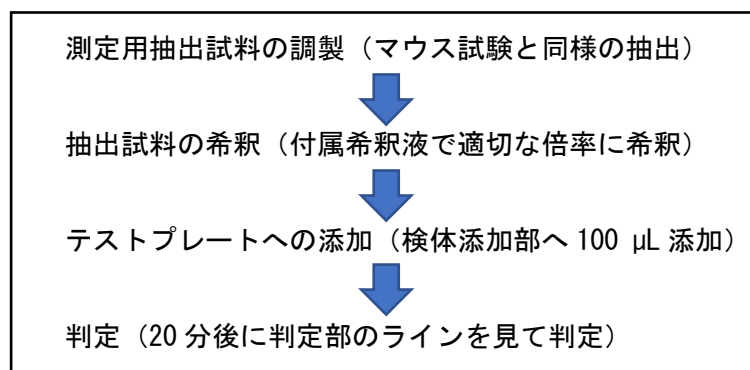


図3. キット分析の操作フロー

### (4) 分析結果の判定

テストプレートの検体添加部に希釈液で希釈した測定用抽出試料を添加して20分後に判定を行う。判定部の対照部(C)に赤いラインが出現していることで正しく反応が進んだことを確認する。試験部(T)のラインは測定液中の毒成分量が多くなるにしたがい薄くなり、高い毒量の測定液ではラインが確認できなくなる(図4)。毒成分を含まない測定試料では

対照部 (C) と試験部 (T) の両方に赤いラインがはっきりと出現する (図5)。反応が正常に進んでいない場合にはは対照部 (C) にラインが現れない (図6)。有毒および無毒の二枚貝試料を本キットにより分析した際の判定部の写真を図7に示した。

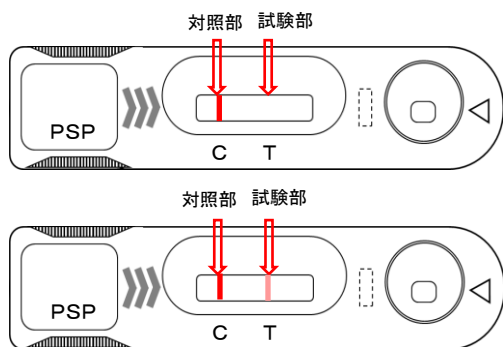


図4. 測定液中に麻痺性貝毒成分が含まれる場合の判定部のライン

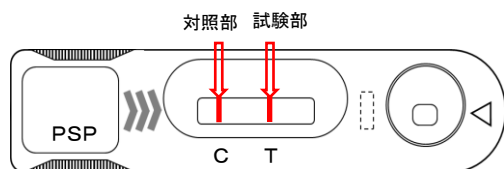


図5. 測定液中に麻痺性貝毒成分が含まれない場合の判定部のライン

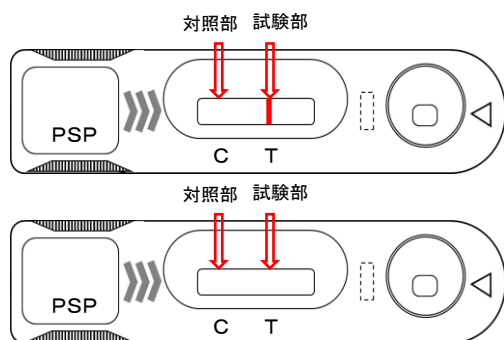


図6. 反応が正常に進んでない場合の判定部のライン

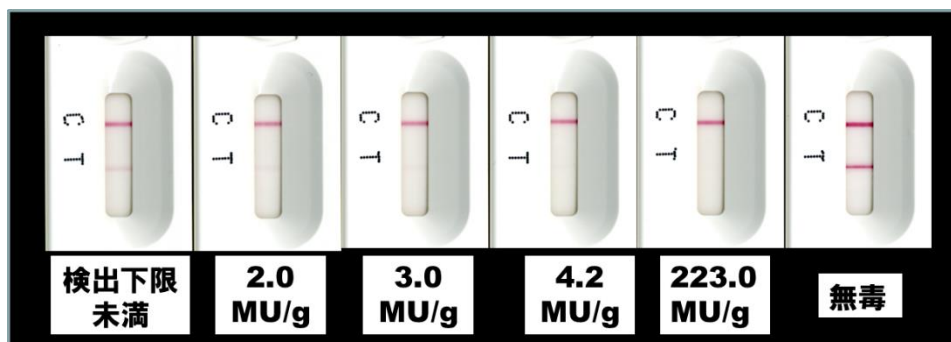


図7. 簡易分析キットによる二枚貝抽出液の分析例

(目視判定 無毒 : ++、検出下限未満 : +、2.0MU/g : ±、その他 : -)

(5) 簡易分析キットの反応性の特徴

麻痺性貝毒成分は、サキシトキシンとその類縁体を総称するものであり、麻痺性貝毒成分には多数の成分が知られている。国内の麻痺性貝毒原因プランクトンや毒化した二枚貝にも多数の成分が含まれており、毒化原因となったプランクトンや、毒化した二枚貝の種類が異なれば、測定試料に含まれる麻痺性貝毒成分の組成も異なる。本キットは、国内で検出される主要な麻痺性貝毒成分の多くに反応性を持つが、反応性の強さは成分により異なる(表1)。本キットは、測定試料に含まれる毒成分の量により試験部(T)に出現するラインの色調が異なるとともに、毒成分の組成によっても試験部(T)のラインの色調が異なる可能性がある。

表1. 各種の麻痺性貝毒成分に対する簡易分析キットの反応性

Toxin Concentration	GTX1/4	GTX2/3	dcGTX2/3	GTX5	GTX6	C1/2
2000nM	±	NT	NT	NT	NT	NT
1000nM	+	NT	NT	NT	±	NT
500nM	++	NT	NT	NT	+	NT
250nM	++	NT	NT	NT	++	NT
20nM	NT	-	±	±	NT	-
10nM	NT	±	±	+	NT	-
5nM	NT	+	++	++	NT	±
2.5nM	NT	++	++	++	NT	++
0nM	++	++	++	++	++	++

試験部(T)のラインの濃さ: - < ± < + < ++      NT: 未試験

(5) 画像解析を利用した判定部ラインの数値化

簡易分析キットでは目視による判定が基本となるが、分析直後のテストプレートをスキャナー等で撮影し、撮影画像を薄層クロマトグラフィーや電気泳動ゲルの画像を解析するソフト(市販ソフト: JustTLC、フリーソフト: ImageJ など)を用いて解析し、ラインの濃淡を数値化することが可能である。図8に JustTLC による解析例を示したが、テストプレートの画像(図8上)のうち判定部を選択して解析すると、クロマトグラム(図8下)が得られる。このクロマトグラムでは左側ピークが対照部(C)のライン、右側のピークが試験部(T)のラインを示している。解析ソフトでは赤く塗りつぶされたピーク面積を数値として求めることができるので、ラインの濃淡を数値として比較することが可能となる。また、対照部(C)のラインが、異なる試料間でも同様な濃度で発色することから、異なる環境で撮影した画像を解析したデータ、異なるソフトで解析したデータ、異なる条件で撮影した画像を解析したデータなどについても、試験部(T)の数値を対照部(C)の数値で除した T/C 値を用いることで、ある程度の比較が可能である。

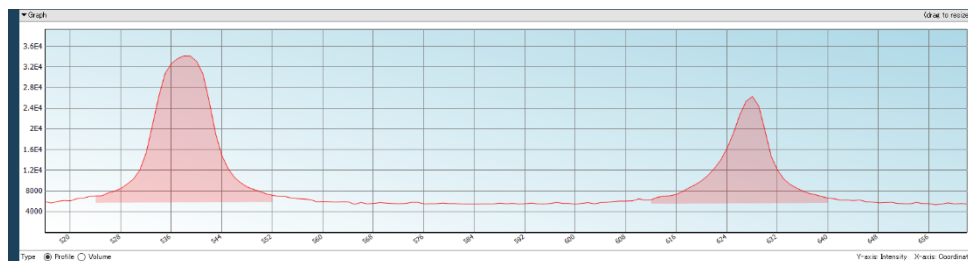


図8. 簡易分析キットの対照部 (C) と試験部 (T) の判定ラインの JustTLC による解析  
上：解析に用いたテストプレートの画像  
下：対照部 (C) と試験部 (T) の画像部分を解析して得られるクロマトグラム



### 3. 簡易分析キットによるスクリーニング法導入のための検討事項

農林水産省消費・安全局による通知（26 消安第 6073 号）では、規制値よりも確実に毒量が低い検体を効率的に判別する目的で、公定法であるマウス試験法以外の方法をスクリーニング法として導入することが可能とされている（下記参照）。スクリーニング法を導入するには、規制値より低い値をスクリーニングレベルとして設定し、スクリーニング法ではこのスクリーニングレベルを確実に判定することが求められる。判定の結果、スクリーニングレベルを超える可能性があるとは判定された場合は、必要に応じて公定法等で検査を行い、規制値を超える毒量であるか確定する。一方、スクリーニング法によりスクリーニングレベルを超えないと判定されればマウス試験法などの検査をせずに出荷することが可能である。したがって、スクリーニング法の導入には、適切なスクリーニングレベルを設定し、簡易測定法によりスクリーニングレベルを確実に判定することが求められている。

#### 【参考】スクリーニング法（二枚貝等の貝毒のリスク管理に関するガイドライン）

「公定法又はそれと同等以上であることが確認された検査法による検査よりも多くの検体を効率的に検査することが可能となるよう、毒量が規制値よりも確実に低い検体を判別するためのスクリーニング法を導入することができる。スクリーニング法を使用する場合には、規制値より確実に低いと判定できるレベル（スクリーニングレベル）を設定する。このレベルを超える場合は、毒量が規制値を超える可能性があるため、必要に応じて公定法等で検査結果を確認する。」

そこで、本キットを用いたスクリーニングを現場に導入するには、

- 1) 二枚貝抽出のマトリクスによる影響の評価
- 2) 各種毒力の抽出試料による希釈倍率の検討
- 3) スクリーニングレベルの設定
- 4) 現場サンプルの分析による検証

といった検討を行い、設定したスクリーニングレベルを確実に判定できることを確認する必要がある。また、これらの検討は毒化原因藻ごと、二枚貝種ごとに必要となるほか、貝種や原因藻が同じであっても、海域により含まれる麻痺性貝毒成分の組成が大きく異なる場合には、海域ごとの検討も必要となる。

#### （1）抽出試料マトリクスの影響の検討

スクリーニング対象とする二枚貝種の無毒の抽出液を、付属の希釈液で 20 倍以上に希釈して分析し、対照部（C）と試験部（T）に赤いラインが明瞭に現れるか確認する。二枚貝の抽出試料は、マウス試験で無毒（検出限界以下）とされても、少量の麻痺性貝毒成分を含む場合がある。ここでの検討に使用する抽出試料は、そのような少量の麻痺性貝毒成分も含む

ことがないよう、毒成分の有無を機器分析で確認した試料、あるいは長期間にわたり貝毒原因藻にさらされておらず、麻痺性貝毒成分を含む可能性のない二枚貝の抽出試料を使用する。キット分析の結果、対照部（C）および試験部（T）の両方に赤いラインが明瞭に現れた場合、以降の検討に進む。赤いラインが明瞭に現れない場合は、当該二枚貝抽出液により反応阻害が生じていると思われることから、当初より希釈倍率を上げて対照部（C）と試験部（T）に赤いラインが明瞭に現れる希釈倍率を確認し、以降の検討についてはそれより高い希釈倍率で行う。

なお、これまでに、ホタテガイ、マガキ、アサリ、アカガイ、トリガイ、ヒオウギ、ホッキガイ、タイラギ、ナミガイ（市場名白ミル）では反応阻害は確認されていない。

## （２）測定試料の希釈倍率の設定

簡易分析キットでは、判定したい毒力（＝スクリーニングレベル）より低い毒力では試験部（T）に赤いラインが現れ、それより高い毒力ではラインがほぼ見えない状態となる希釈倍率を設定する必要がある。

このような希釈倍率を設定するため、

1. スクリーニング法を導入する海域で、対象となる二枚貝種から得られた測定用抽出試料で、スクリーニングレベルを前後した毒力（マウス試験で求めた毒力）のものを複数用意する。
2. 用意した測定用抽出試料について、付属の希釈液で各種の希釈倍率に希釈し、簡易キットで分析する。
3. 判定したい毒力（＝スクリーニングレベル）より低い毒力で試験部（T）に赤いラインが現れ、それより高い毒力でラインがほぼ見えない状態となる希釈倍率を見いだす。

という手順が必要となる。

しかし、1. に示したような各種の毒力を示す測定用抽出試料を準備することが難しい場合は、スクリーニングレベルより高い毒力の測定用抽出試料を、無毒の測定用抽出試料で希釈して、各種の毒力に相当する測定用抽出試料を調製し、同様な検討を行う。詳細は、「4. 国内各地のスクリーニング法導入にむけた検討事例」を参考にされたい。

## （３）スクリーニングレベルの設定

スクリーニングレベルの設定の際に、最も考慮すべきは、マウス試験の毒力が4 MU/gを超えるものを誤って4 MU/g未満と判定してしまう偽陰性（キットでスクリーニングレベル以下とされたにもかかわらずマウス試験毒力値が4 MU/gを超えている事例）が生じないようにすることである。そのため、スクリーニングレベルは規制値である4 MU/gより低いレベルに設定し、設定したスクリーニングレベルで簡易キットによる判定が可能であることが必要である。（２）における希釈倍率の検討の結果をもとに、規制値以下の毒力値で、な

おかつキットで確実に判定できる毒力値をスクリーニングレベルに設定する。繰り返しになるが、偽陰性の可能性がない、安全なスクリーニングレベルを設定することが重要である。

なお、農林水産省委託事業では、2 MU/g をスクリーニングレベルとしてホタテガイ、マガキ、アサリ、アカガイ、トリガイ、ヒオウギについて各種検討を行った。(4.(1)～(7))。

#### (4) 現場サンプルの分析による検証

スクリーニング法を導入する海域で採取されマウス試験を行った二枚貝抽出試料について、並行してキット分析を行い、マウス試験の毒力と簡易分析キットでの判定に齟齬がないか、多くの試料で検証する。問題があった場合には、試料に含まれる麻痺性貝毒成分の量や毒組成を調べて、その原因を明らかにするとともに、偽陰性が起こる危険性を検討し、必要に応じ、判定基準やスクリーニングレベルの設定を見直す。

#### 4. 国内各地のスクリーニング法導入にむけた検討事例

農林水産省委託事業では、国内の複数の海域で、異なる麻痺性貝毒原因プランクトンで毒化した二枚貝について、本キットによるスクリーニング法導入のための検討を行った。本キットによるスクリーニング法の検討を進めるにあたっては、これらの事例が参考になる。

##### (1) 北海道

噴火湾で *Alexandrium tamarense* を原因藻として毒化するホタテガイについて、スクリーニング法を導入することを目的として、簡易分析キットによる測定時の希釈倍率を検討するとともに、スクリーニングレベルを検討した。

##### 1) 希釈倍率の検討

噴火湾海域で毒化し、食品衛生法規制値の 4 MU/g を超過した有毒ホタテガイ（マウス毒力：7.7 MU/g）および同一海域で採取された無毒ホタテガイ（マウス毒力：不検出）試料を使用した。無毒ホタテガイ試料は、HPLC 法による成分分析においても麻痺性貝毒成分は不検出であった。この無毒ホタテガイの測定用抽出液と、噴火湾東部海域で 2015 年に毒化し、マウス毒力が 7.7 MU/g の測定用抽出液を表 1 に示す割合で混合し、各毒力に相当するホタテガイ抽出液を調製した。

表 1. 希釈倍率検討用の測定用抽出液の調製方法

調製した試料の毒力	毒化ホタテガイ試料 (7.7 MU/g) の割合	無毒ホタテガイ試料 の割合
1 MU/g 相当	1	6.7
2 MU/g 相当	1	2.85
3 MU/g 相当	1	1.567
4 MU/g 相当	1	0.925
5 MU/g 相当	1	0.54

このように得た測定用抽出液を付属の希釈液で 20 倍～100 倍に希釈して簡易分析キット (Lot 180711) により分析した。図 1 にキット分析の判定部の写真を示すが、無毒試料 (0 MU/g 相当) ではすべての希釈倍率において対照部 (C) および試験部 (T) に明瞭なラインが形成されたことを確認し、抽出マトリクスが判定に影響することがないと確認できた。麻痺性貝毒を含む測定用抽出液では、2 MU/g 相当の抽出液では、40 倍～80 倍の希釈では試験部 (T) のラインが薄れていたのに対して、100 倍の希釈ではラインが明瞭に確認できる。一方、1 MU/g 相当の抽出液では 80 倍以上の希釈倍率において、試験部 (T) のラインが明瞭に確認できた。

また、ラインの濃淡を数値化したデータを表 2 に示した。0 MU/g 相当の試料ではすべての希釈倍率で、1 MU/g 相当の試料では 80 倍以上の希釈倍率で試験部 (T) の数値が高く

なっていた。また、2 MU/g 相当の試料では、40 倍～80 倍の希釈倍率で試験部 (T) の数値が低くなっており、ともに目視での判定を支持する結果が得られた。

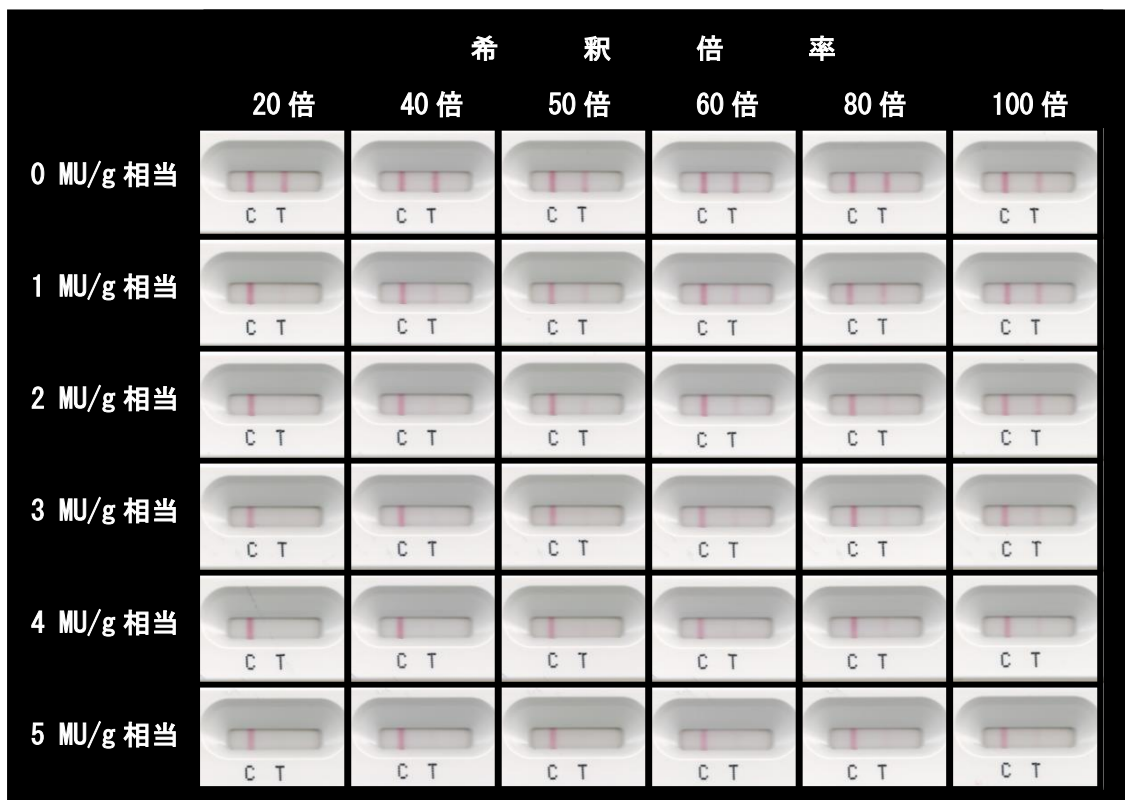


図1. ホタテガイの毒力別試料におけるキット分析

表2. ホタテガイ測定用抽出液の判定部ラインの目視判定および数値化データ

			希釈倍率					
			20倍	40倍	50倍	60倍	80倍	100倍
0 MU/g 相当	試験部 (T) の目視判定		++	++	++	++	++	++
	判定部 ラインの 数値	対照部 (C)	8134	10636	9092	10737	9349	11508
		試験部 (T)	6398	9875	4782	8058	7605	5084
		T/C	0.787	0.928	0.526	0.751	0.813	0.442
1 MU/g 相当	試験部 (T) の目視判定		±	+	+	+	++	++
	判定部 ラインの 数値	対照部 (C)	9609	9930	6510	9237	6948	8957
		試験部 (T)	615	1538	1702	2196	3788	4527
		T/C	0.064	0.155	0.262	0.238	0.545	0.505
2 MU/g 相当	試験部 (T) の目視判定		—	±	+	+	+	++
	判定部 ラインの 数値	対照部 (C)	8126	8964	8568	9333	7188	7115
		試験部 (T)	166	656	871	1585	1431	3615
		T/C	0.020	0.073	0.102	0.170	0.199	0.508
3 MU/g 相当	試験部 (T) の目視判定		—	—	±	±	+	+
	判定部 ラインの 数値	対照部 (C)	6046	9746	5949	6479	9459	7699
		試験部 (T)	40	480	542	1025	1374	2091
		T/C	0.007	0.049	0.091	0.158	0.145	0.272
4 MU/g 相当	試験部 (T) の目視判定		—	—	±	±	±	+
	判定部 ラインの 数値	対照部 (C)	9175	11231	6208	6197	8381	7733
		試験部 (T)	36	436	259	450	918	1129
		T/C	0.004	0.039	0.042	0.073	0.109	0.146
5 MU/g 相当	試験部 (T) の目視判定		—	—	—	±	±	±
	判定部 ラインの 数値	対照部 (C)	5910	9369	6060	5422	6695	6454
		試験部 (T)	2	442	33	257	686	825
		T/C	0.000	0.047	0.005	0.047	0.102	0.128

## 2) スクリーニングレベル (仮) の設定

1) で行った希釈倍率の検討において、2 MU/g 相当の試料では希釈倍率が 40 倍～80 倍の範囲で試験部 (T) のラインが薄くなっていた。また、1 MU/g 相当の試料では、希釈倍率が 80 倍以上で試験部 (T) のラインが明瞭に確認できた (図1)。さらに、数値化したデータでは 80 倍以上でラインが濃くなっていることがわかった (表2)。以上より、希釈倍率を 80 倍として分析することで、2 MU/g 以上の毒力の試料については偽陰性なく判定することが可能と考えられ、2 MU/g をスクリーニングレベルとしてさらに検討を進めることとした。

## 3) 現場試料での検証

北海道沿岸海域において採取したホタテガイ（可食部）235 検体について、マウス毒性試験を行うとともに、希釈倍率 80 倍で本キットにより分析した。その結果、マウス毒力が不検出の試料では試験部（T）のラインが明瞭に確認できたが、2.0 MU/g 以上の試料では試験部（T）にラインが薄く確認されるか、もしくはラインが確認できなかった（図 2）。

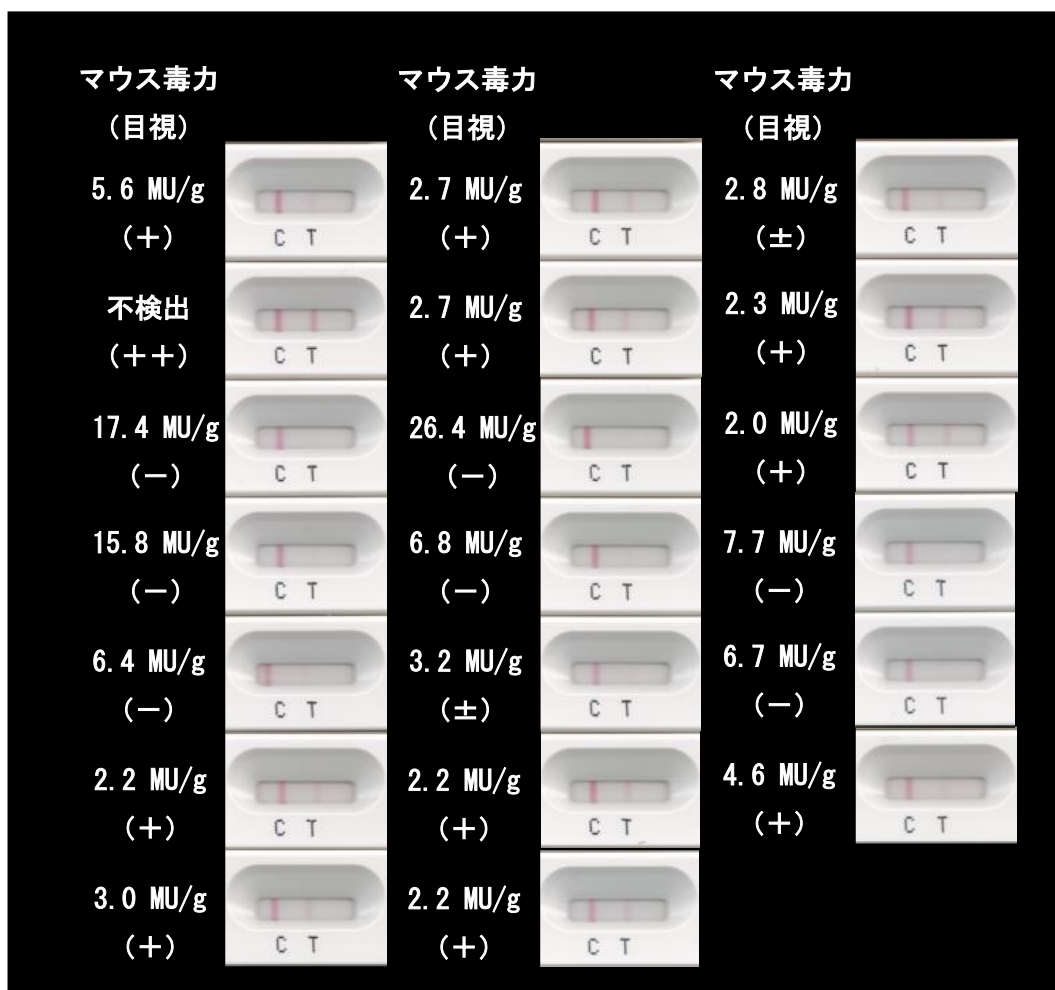


図 2. 北海道産ホタテガイのキットによる分析（マウス毒力：2 MU/g 以上の陽性検体）

これまでのところ、2.0 MU/g より高い毒力の試料はすべて試験部（T）のラインが薄く確認されるか、またはラインが確認できず、2.0 MU/g 以上の試料を基準値未満と判定する偽陰性は認められないという結果が得られた。引き続き、現場海域でのデータ蓄積を進めるが、キット分析時の希釈倍率 80 倍とすることで、北海道沿岸海域のホタテガイについて、2 MU/g をスクリーニングレベルとして本キットによるスクリーニング法を導入することが可能と考えられた。

## (2) 岩手県

大船渡湾で *Alexandrium tamarense* を原因藻として毒化するホタテガイについて、スクリーニング法を導入することを目的として、簡易分析キットによる測定時の希釈倍率を検討するとともに、スクリーニングレベルを検討した。

### 1) 希釈倍率の検討

大船渡湾では無毒ホタテガイを確保できなかったため、2018年に山田湾で採取されたものを無毒ホタテガイとして使用した。なお無毒ホタテガイ試料は機器分析（蛍光 HPLC 分析法）による分析でも麻痺性貝毒成分に該当するピークは検出されなかった。この無毒ホタテガイの測定用抽出液と、大船渡湾で2017年に毒化し機器分析による分析結果から換算したマウス検査の毒力が 18.6MU/g の測定用抽出液を表1の割合で混合し、各毒力に相当するホタテガイ抽出液を調製した。

表1 希釈倍率検討用の測定用抽出液の調製方法

調製した試料 の毒力	毒化ホタテガイ試料 (18.6 MU/g)の割合	無毒ホタテガイ試料 の割合
5 MU/g 相当	1	2.72
4 MU/g 相当	1	3.65
3 MU/g 相当	1	5.2
2 MU/g 相当	1	8.3
1 MU/g 相当	1	17.6

このように得た測定用抽出液を付属の希釈液で2倍～100倍に希釈して簡易分析キット（Lot 180711）により分析し、表2に判定結果を示す。無毒試料ではすべての希釈倍率で対照部（C）および試験部（T）でははっきりとラインが形成されたことを確認し、抽出マトリクスが判定に影響することがないと確認できた。

麻痺性貝毒を含む測定用抽出液では、3 MU/g 以上の毒力に相当する抽出液で60倍の以下の希釈の場合に試験部（C）のラインがはっきりと確認できないのに対して、80倍以上の希釈では試験部（T）にラインがはっきりと確認出来た。一方、2 MU/g 相当の抽出液では、40倍以上の希釈倍率で試験部（T）のラインがはっきりと確認出来た。

ラインの濃淡を数値化したデータを表3～表5に示した。表3の4 MU/g 相当の試料および表4の3 MU/g 相当の試料では、40倍および20倍の希釈倍率、表5の2 MU/g 相当の試料では20倍の希釈倍率で試験部（T）の数値が低くなっていた。また、表3～表5で弱いラインが形成される土の C/T 比は 0.063～0.190 の範囲であり平均 0.114 となった。



表2 ホタテガイの希釈倍率の検討結果

毒値 (MU/g)	希釈倍率				
	20	40	60	80	100
5 MU/g 相当	—	—	—	±	±
4 MU/g 相当	—	±	±	±	+
3 MU/g 相当	±	±	±	+	+
2 MU/g 相当	±	+	+	+	+
1 MU/g 相当	±	+	+	+	+

凡例) + : ライン形成、± : 弱いライン、— : ラインなし

表3 ホタテガイ測定用抽出液 (4 MU/g 相当) の判定部ラインの目視判定および数値化データ

希釈倍率	ライン濃淡の 目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
100	+	10955	3419	0.312
80	±	9935	1890	0.190
60	±	10463	1647	0.157
40	±	10363	767	0.074
20	—	8425	466	0.055

表4 ホタテガイ測定用抽出液 (3 MU/g 相当) の判定部ラインの目視判定および数値化データ

希釈倍率	ライン濃淡の 目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
100	+	12099	4271	0.353
80	+	11445	3729	0.326
60	±	9792	1712	0.175
40	±	8830	666	0.075
20	±	11049	706	0.064

表5 ホタテガイ測定用抽出液（2 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ

希釈倍率	ライン濃淡の 目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部 (C)	試験部 (T)	T/C
100	+	10015	4225	0.422
80	+	11911	4233	0.355
60	+	10013	2937	0.293
40	+	13377	1992	0.149
20	±	8488	537	0.063

## 2) スクリーニングレベルの設定

岩手県では、毎年度、漁業関係者が協議して貝毒の自主対策を決めている。令和元年度以降もこれまでと同様に殻付き出荷用のホタテガイは3 MU/g 以上で出荷自粛を講じる方針である。

4 MU/g を超えた場合：自主規制

3 MU/g 以上～4 MU/g 未満：検体採捕日から検査結果判明日まで自粛

2 MU/g 以上～3 MU/g 未満：貝毒原因プランクトンの出現状況に応じて自粛検討

1) で行った希釈倍率の検討では、はっきりとラインが形成される++とラインが形成される+を陽性と判定すると、40倍希釈で2 MU/g と3 MU/g を区別して判定できることから、スクリーニングレベルを3 MU/g とした。

## 3) 現場試料での検証

大船渡湾の他、岩手県沿岸の他の海域において自主検査を実施した試料について、2) で検討したスクリーニングレベル 3MU/g 付近の試料について検査機関の協力を得て実証試験をした結果、偽陽性はあるものの概ね40倍の希釈倍率で判定可能であった（表6）。

以上のことから、大船渡湾を含む岩手県沿岸で *Alexandrium tamarense* を原因藻として毒化するホタテガイについては、スクリーニングレベル 3MU/g として40倍の希釈倍率で判定可能と考えられた。

表6 ホタテガイの希釈倍率の検討結果

海域	毒値 (MU/ g)	希釈倍率					備考
		20	40	60	80	100	
南部海域	4.1	—	—	—	—		下降期
大船渡湾西部	2.1	—	±	+	+		上昇期
三陸町	2.3	±	±	+	+	+	上昇期
釜石湾	3.8		—	±			下降期
釜石湾	2.8		+	+			下降期
釜石湾	3.1		—	—			下降期
釜石湾	2.8		—	±			下降期
釜石湾	2.3		—	±			下降期

凡例) + : ライン形成、± : 弱いライン、— : ラインなし、空欄 : 未測定

### (3) 大阪府

#### 1. 大阪湾で毒化したアサリにおけるスクリーニング法の検討

大阪湾で *Alexandrium tamarense* を原因藻として毒化するアサリについて、スクリーニング法を導入することを目的として、簡易分析キットによる測定時の希釈倍率を検討するとともに、スクリーニングレベルを検討した。

##### 1) 希釈倍率の検討

大阪湾では無毒アサリを確保できなかったため、2018年に広島湾で採取されたものを無毒アサリとして使用した。なお無毒アサリ試料はHPLC法による分析でも麻痺性貝毒成分に該当するピークは検出されなかった。この無毒アサリの測定用抽出液と、大阪湾で2014年に毒化しマウス検査の毒力が11 MU/gの測定用抽出液を表1の割合で混合し、各毒力に相当するアサリ抽出液を調製した。

表1 希釈倍率検討用の測定用抽出液の調製方法

調製した試料 の毒力	毒化アサリ試料 (11 MU/g) の割合	無毒アサリ試料 の割合
4 MU/g 相当	1	1.75
2 MU/g 相当	1	4.5
1 MU/g 相当	1	10

このように得た測定用抽出液を付属の希釈液で40倍～400倍に希釈して簡易分析キット(Lot 180711)により分析した。図1にキット分析の判定部の写真を示すが、無毒試料ではすべての希釈倍率で対照部(C)および試験部(T)ではっきりとラインが形成されたことを確認し、抽出マトリクスが判定に影響することがないと確認できた。麻痺性貝毒を含む測定用抽出液では、2 MU/g以上の毒力に相当する抽出液で40倍および60倍希釈の場合に試験部(C)のラインが確認できないのに対して、80倍以上の希釈では試験部(T)にラインが僅かに確認出来る。一方、無毒あるいは1 MU/g相当の抽出液では60倍以上の希釈倍率で試験部(T)のラインが確認出来た。

また、ラインの濃淡を数値化したデータを表1～表4に示した。表2の2 MU/g相当の試料では、40倍および60倍の希釈倍率で、4 MU/g相当の試料では40倍～100倍の希釈倍率で試験部(T)の数値が低くなっていた。また、無毒試料では全ての希釈倍率で試験部(T)の数値が同様な高い数値となっており、ともに目視での判定を支持する結果が得られた。

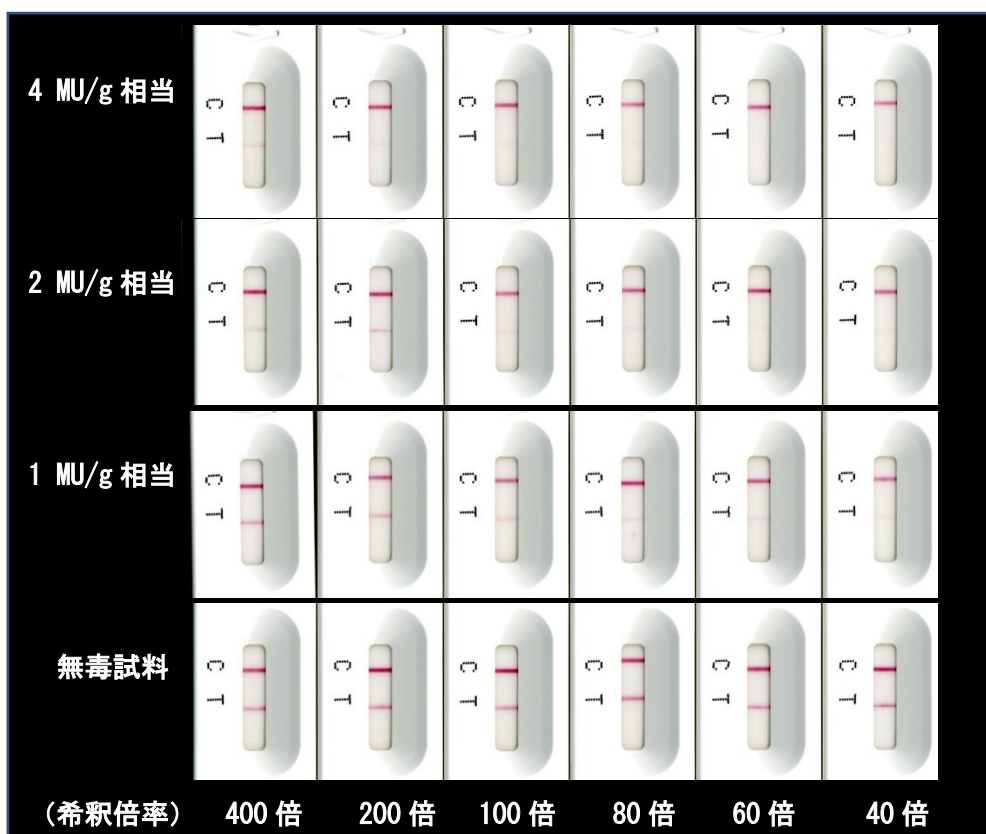


図 1. 無毒および各種の毒力に調製したアサリの測定用抽出試料のキット分析

表 1 アサリ測定用抽出液 (4 MU/g 相当) の判定部ラインの目視判定および数値化データ

希釈倍率	ライン濃淡の 目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部 (C)	試験部 (T)	T/C
400	+	14686480	1742400	0.119
200	+	13283240	1210880	0.091
100	±	11925760	831480	0.070
80	-	9527400	628640	0.066
60	-	11959320	363480	0.030
40	-	8937560	328920	0.037

表2 アサリ測定用抽出液（2 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ

希釈倍率	ライン濃淡の 目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部 (C)	試験部 (T)	T/C
400	+	15852480	2168320	0.137
200	++	15051280	3068000	0.204
100	+	9574080	1113680	0.116
80	±	11666120	1179840	0.101
60	-	14917480	653720	0.044
40	-	11268600	468360	0.042

表3 アサリ測定用抽出液（1 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ

希釈倍率	ライン濃淡の 目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部 (C)	試験部 (T)	T/C
400	++	15146160	5169760	0.341
200	++	11492440	4650920	0.405
100	+	10524440	2521440	0.240
80	+	15026200	1068800	0.071
60	+	12174440	1605720	0.132
40	±	9262880	1002520	0.108

表4 アサリ測定用抽出液（無毒）の判定部ラインの目視判定および数値化データ

希釈倍率	ライン濃淡の 目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部 (C)	試験部 (T)	T/C
400	++	14000920	6212800	0.444
200	++	18790640	7474720	0.398
100	++	18275360	7000440	0.383
80	++	14648840	9183360	0.627
60	++	15853280	6793360	0.429
40	++	17849640	8146600	0.456

## 2) スクリーニングレベル（仮）の設定

1) で行った希釈倍率の検討では、2 MU/g および 4 MU/g 相当の測定用抽出試料で希釈

倍率が 40 倍および 60 倍で試験部 (T) のラインがほとんど見えなくなっていた。また 1 MU/g 相当の試料では、希釈倍率が 40 倍および 60 倍で試験部 (T) のラインが確認できた。さらに数値化したデータでは 60 倍で僅かにラインが濃くなっていることがわかった。以上より、希釈倍率を 60 倍として分析することで、2 MU/g より低い毒力の試料については偽陰性無く判定することが可能と考えられ、2 MU/g を仮のスクリーニングレベルとしてさらに検討を進めることとした。

### 3) 現場試料での検証

大阪湾において 2016 年 (図 2) および 2018 年 (図 3) に採取したアサリについて、マウス試験を行うとともに、希釈倍率 60 倍で本キットにより分析した。その結果、2016 年に採取したアサリではマウス毒力が不検出および 2.2 MU/g の試料では僅かに試験部 (T) のラインが確認できたが、3.2 MU/g 以上の毒力の試料では試験部 (T) にラインは確認出来なかった。2018 年採取のアサリは、全て 2.0 MU/g 以上の毒力であったが、2.0 MU/g の試料で僅かにラインが確認できたほかは、試験部 (T) にラインは確認できなかった。これまでのところ 4 MU/g より高い毒力の試料はすべて試験部 (T) にラインは確認されず、4 MU/g 以上の試料を規制値以下と判定する偽陰性はないという結果が得られた。引き続き現場海域でのデータ蓄積を進めるが、キット分析時の希釈倍率 60 倍とすることで、大阪湾のアサリについて 2 MU/g をスクリーニングレベルとして本キットによるスクリーニング法を導入することが可能と考えられた。

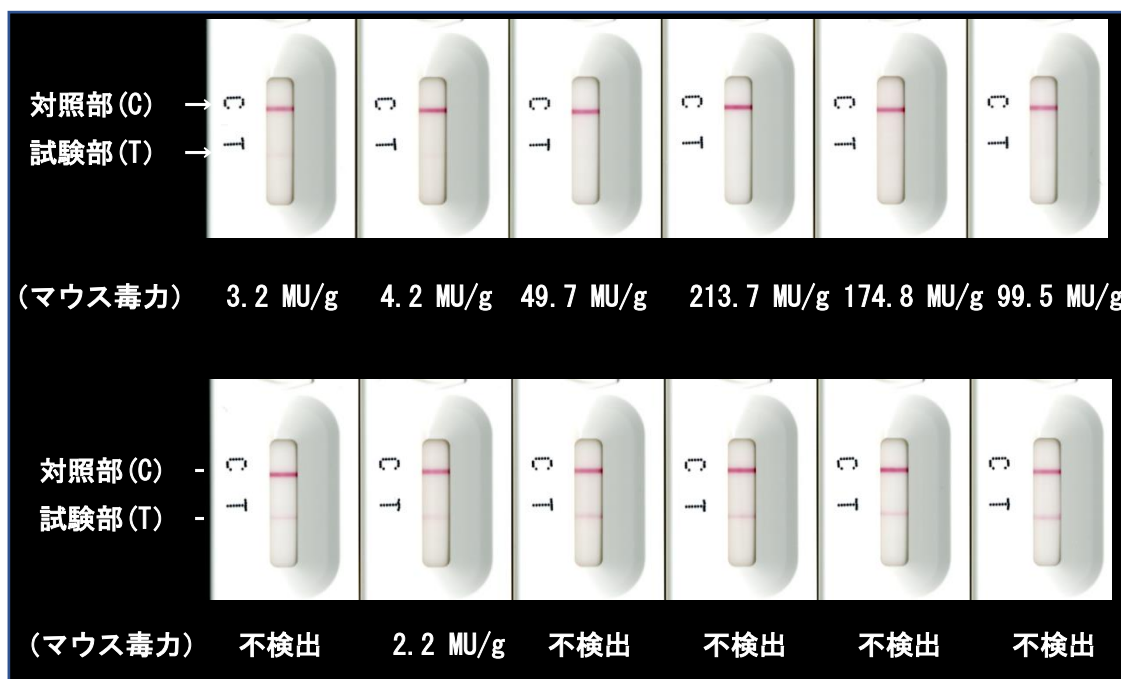


図 2 2016 年に大阪湾で採取したアサリのキットによる分析

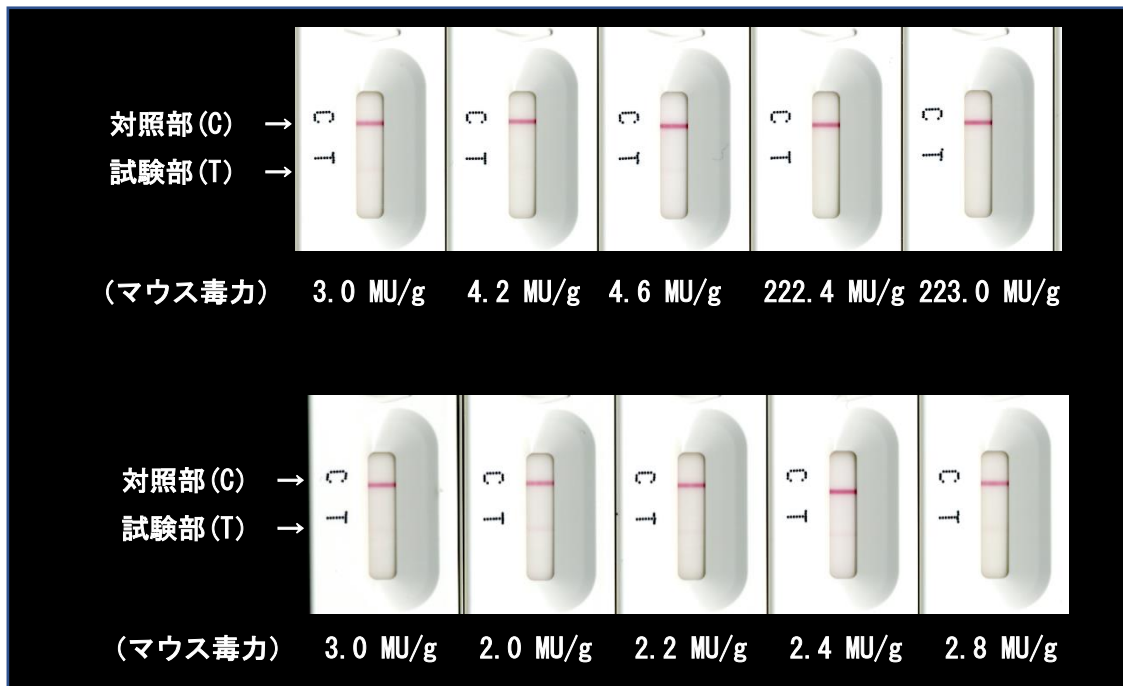


図3 2018年に大阪湾で採取したアサリのキットによる分析

## 2. 大阪湾で毒化したアカガイにおけるスクリーニング法の検討

大阪湾で *Alexandrium tamarense* を原因藻として毒化するアカガイについて、スクリーニング法を導入することを目的として、簡易分析キットによる測定時の希釈倍率を検討するとともに、スクリーニングレベルを検討した。

### 1) 希釈倍率の検討

大阪湾では HPLC 法でピークが検出されない無毒アカガイを確保できなかったため、2010年に採取されたサンプル（HPLC法で 0.46 MU/g）を蒸留水で 1/2 希釈したものを無毒抽出液として使用した。なお同抽出液については事前に 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 に希釈したものをイムノクロマトキットで分析し、原液では試験部（T）の発色が薄く T/C 比が低くなったものの、1/2 以上の希釈で試験部（T）と対照部（C）の比（T/C 比）が高位で安定したため、1/2 希釈液をもって無毒サンプルに代えた。この無毒アカガイの測定用抽出液と、大阪湾で 2014 年に毒化したアカガイについて、毒化前期（ピーク前）と毒化後期（規制解除前）の、マウス試験の毒力がそれぞれ 11.45 MU/g, 5.13 MU/g の 2 サンプルについて測定用抽出液を表 1 の割合で混合して 4 MU/g に相当する試料を調整し、さらに前述の無毒アカガイ抽出液で 1/2, 1/4 に希釈することで 2MU/g 相当、1 MU/g 相当の試料を調整した。前期と後期に分けたのは、貝毒のスクリーニングが自主規制開始と終了に適用される可能性と、山本・及川（2017）によりアカガイでは毒化期間中の毒成分が大きく変化する可能性を考慮したためである。



表 1 希釈倍率検討用の測定用抽出液の調製方法

調整した試料の毒力	調整したアカガイ試料 の割合	無毒アカガイ試料 の割合
前期(11.45MU/g)	1	1.86
後期(5.13MU/g)	1	0.28

このように得た測定用抽出液を付属の希釈液で 50 倍～120 倍に希釈して簡易分析キット (Lot 180711) により分析した。図 1 に毒化前期のキット分析の判定部の写真を示すが、無毒試料ではすべての希釈倍率で対照部 (C) および試験部 (T) ではっきりとラインが形成されたことを確認し、抽出マトリクスが判定に影響することがないと確認できた。麻痺性貝毒を含む測定用抽出液では、4 MU/g の毒量に相当する抽出液で 100 倍希釈まで試験部 (T) のラインが確認出来ず、120 倍で薄いラインが発現した。また、2 MU/g の毒力に相当する抽出液では 50 倍および 60 倍希釈の場合に対照部 (C) のラインが確認できないのに対して、80 倍以上の希釈では試験部 (T) にラインが僅かに確認出来る。一方、無毒あるいは 1 MU/g 相当の抽出液では 50 倍以上の希釈倍率で試験部 (T) のラインが確認出来た。

また、前期においてラインの濃淡を数値化したデータを表 2～表 5 に示した。表 3 の 2 MU/g 相当の試料では、60 倍の希釈倍率で、4 MU/g 相当の試料では 50 倍～100 倍の希釈倍率で試験部 (T) の数値が低くなっていた。また、無毒試料では全ての希釈倍率で試験部 (T) の数値が同様な高い数値となっており、ともに目視での判定を支持する結果が得られた。

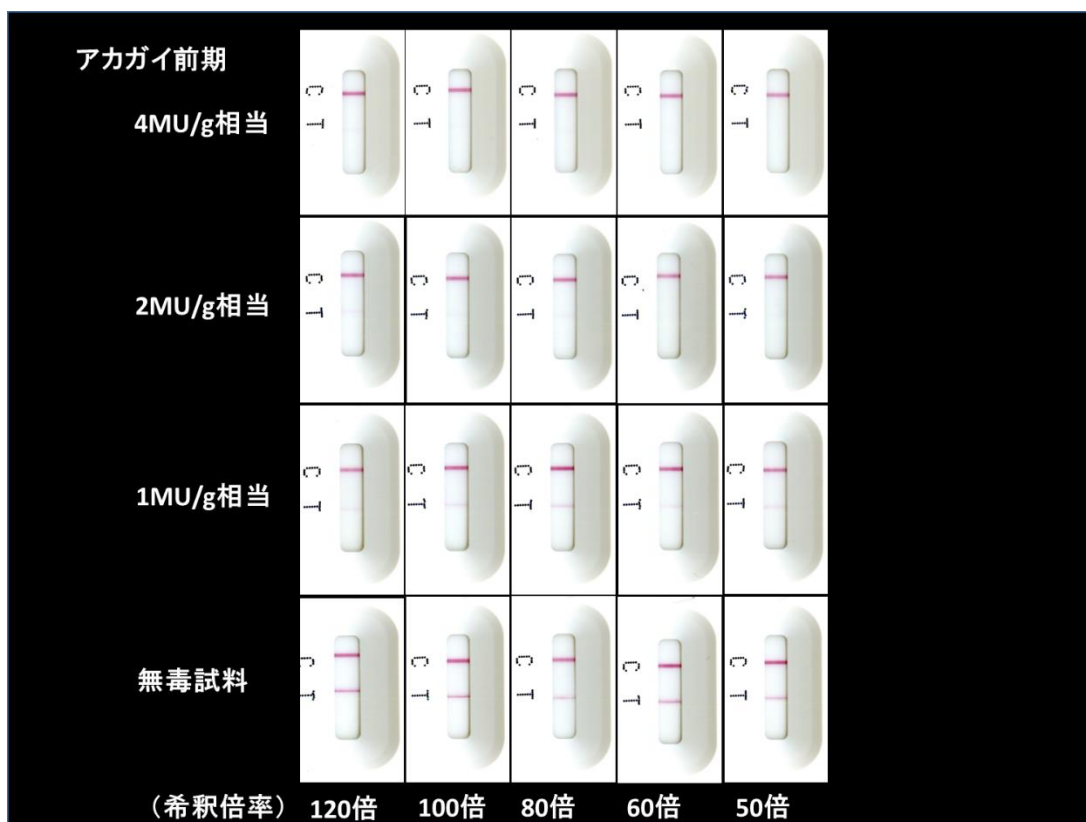


図1. 無毒および各種の毒力に調製したアカガイの測定用抽出試料のキット分析(前期)

表2 アカガイ測定用抽出液(4 MU/g相当)の判定部ラインの目視判定および数値化データ(前期)

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
120	±	7503	209	0.0278
100	—	7469	82	0.0110
80	—	7718	66	0.0085
60	—	7147	15	0.0020
50	—	6277	17	0.0026

表3 アカガイ測定用抽出液（2 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（前期）

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
120	+	7436	301	0.0405
100	±	7893	140	0.0178
80	±	7612	357	0.0468
60	-	5693	15	0.0026
50	-	6419	118	0.0184

表4 アカガイ測定用抽出液（1 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（前期）

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
120	+	4462	254	0.0569
100	+	5911	596	0.1009
80	++	7344	831	0.1131
60	+	6383	332	0.0521
50	±	4860	360	0.0740

表5 アカガイ測定用抽出液（無毒）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（前期）

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
120	++	5235	2955	0.5645
100	++	6604	2646	0.4006
80	++	5000	1277	0.2555
60	++	6995	2343	0.3349
50	++	6795	1702	0.2505

後期の試料については30倍～80倍に希釈して簡易分析キット（Lot 180711）により分析した。図2に毒化後期のキット分析の判定部の写真を示す。無毒試料は前期と同じ試料である。麻痺性貝毒を含む測定用抽出液では、4 MU/gの毒量に相当する抽出液では40倍希釈で試験部（T）の薄いラインが発現した。また、2 MU/g～無毒に相当する抽出液ではすべての希釈率で試験部（T）にラインが僅かに確認出来た。後期においてラインの濃淡を数値化し

たデータを表6～表9に示した。表7の2 MU/g 相当の試料では、30 倍～40 倍の希釈倍率で、表6の4 MU/g 相当の試料では30 倍～60 倍の希釈倍率で試験部 (T) の数値が低くなっていた。また、無毒試料では全ての希釈倍率で試験部 (T) の数値が同様な高い数値となっており、ともに目視での判定を支持する結果が得られた。

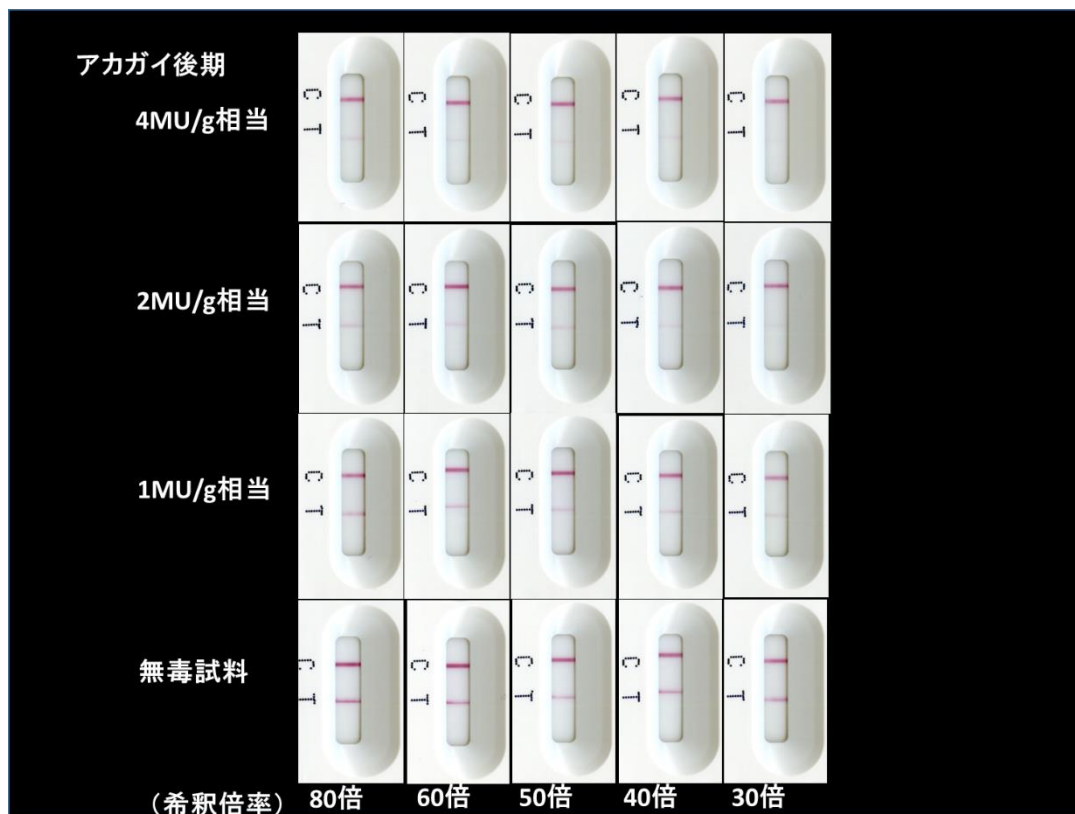


図2. 無毒および各種の毒力に調製したアカガイの測定用抽出試料のキット分析(後期)

表6 アカガイ測定用抽出液 (4 MU/g 相当) の判定部ラインの目視判定および数値化データ (後期)

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
80	+	7965	1069	0.1341
60	±	8673	576	0.0664
50	±	8895	593	0.0666
40	—	6770	435	0.0643
30	—	6566	194	0.0296

表7 アカガイ測定用抽出液（2 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（後期）

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
80	++	5668	938	0.1655
60	+	7484	667	0.0891
50	+	5503	694	0.1261
40	±	5827	357	0.0613
30	±	5264	331	0.0630

表8 アカガイ測定用抽出液（1 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（後期）

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
80	++	5662	1839	0.3248
60	++	6863	1649	0.2403
50	++	7018	1167	0.1663
40	++	6294	1007	0.1600
30	+	4343	743	0.1711

表9 アカガイ測定用抽出液（無毒）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（後期）

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
80	++	7635	4114	0.5388
60	++	8089	2705	0.3344
50	++	6551	1834	0.2800
40	++	6037	2802	0.4641
30	+	5575	2637	0.4730

## 2) スクリーニングレベル (仮) の設定

1) で行った希釈倍率の検討では、アカガイ前期の抽出液で 2 MU/g で 60 倍、4 MU/g 相当の測定用抽出試料で希釈倍率が 100 倍で試験部 (T) のラインがほとんど見えなくなっていた。また 1 MU/g 相当の試料では、希釈倍率が 50 倍以上の希釈率で試験部 (T) のラインが確認できた。さらに数値化したデータでは 50~60 倍でラインが濃くなっていることがわかった。以上より、希釈倍率を 50 倍として分析することで、2 MU/g より低い毒力の試料については偽陰性(規制値 4 MU/g より高い毒力の試料を誤って 4 MU/g 未満と判断すること)無く判定することが可能と考えられた。前期のスクリーニングでは規制値を超える前の漁獲物を早期に把握する目的から、2 MU/g を仮のスクリーニングレベルとしてさらに検討を進めることとした。

一方、アカガイ後期の抽出液では 4 MU/g 相当の測定用抽出試料で 40 倍希釈から試験部 (T) のラインが確認された。後期のスクリーニングにおいては規制値を下回る直前ないし直後の漁獲物を把握することが目的となるため、4 MU/g を仮のスクリーニングレベルとしてさらに検討を進めることとした。

## 3) 現場試料での検証

大阪湾において 2013 年、2014 年、および 2015 年に採取したアカガイについて、マウス試験を行うとともに、前期と後期に分けて希釈倍率 50 倍 (前期 (図 3)、後期 (図 4)) と 80 倍 (前期 (図 5)、後期 (図 6)) で本キットにより分析した。その結果、50 倍希釈のアカガイ前期では概ね 3 MU/g を上回る試料では試験部 (T) にラインは確認出来なかった。一方、後期では概ね 4 MU/g 以上の試料で試験部 (T) のラインは消失していたが、2014 年の 10 月および 2015 年の 7 月の試料で 4 MU/g を上回っているにも関わらず薄いラインが確認出来た。また、80 倍希釈では前期では概ね 3.5 MU/g を上回る試料で、後期では 4 MU/g を上回る試料で試験部 (T) にラインは確認出来なかった。

これまでのところ、アカガイ前期においては 50 倍、80 倍希釈とも 4 MU/g を上回る試料はすべて試験部 (T) にラインは確認されず、4 MU/g 以上の試料を規制値以下と判定する偽陰性はないという結果が得られた。引き続き現場海域でのデータ蓄積を進めるが、キット分析時の希釈倍率 50 倍とすることで、大阪湾のアカガイについて 2 MU/g をスクリーニングレベルとして本キットによるスクリーニング法を導入することが可能と考えられた。一方、後期では時期が進むにつれ判定が不安定となる可能性が示唆された。アカガイでは原因プランクトン衰退後も体内での毒成分の変換により STX の割合が増加することが明らかになっている (山本・及川 2017)。毒成分の変化を考慮したキットの運用については、さらなるデータの蓄積と体制の検討が必要である。

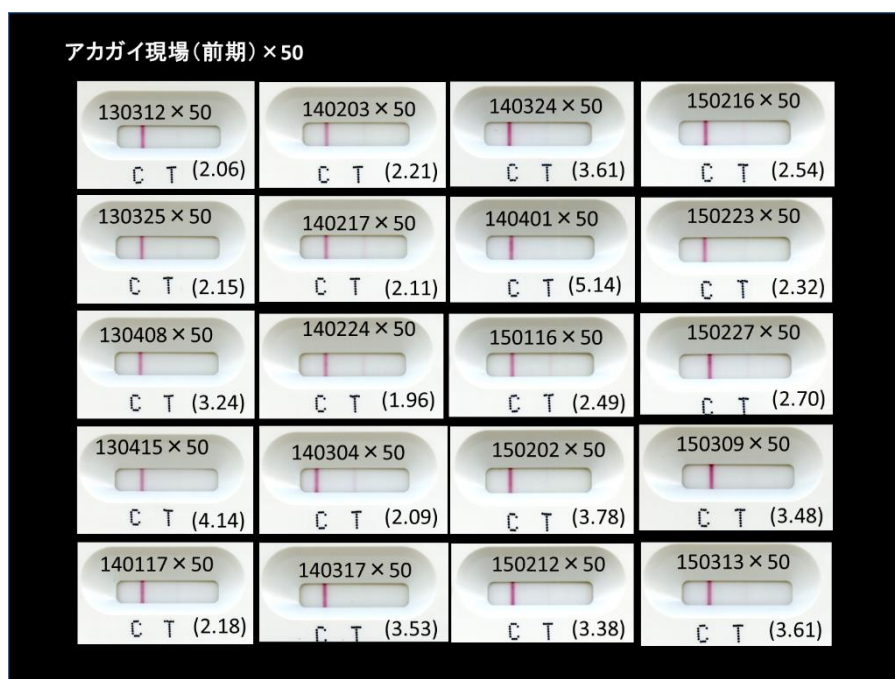


図3 2013年～2015年に大阪湾で採取したアカガイのキットによる分析(前期50倍希釈、  
( )内はマウス毒量)。



図4 2013年～2015年に大阪湾で採取したアカガイのキットによる分析(後期50倍希釈、  
( )内はマウス毒量)。

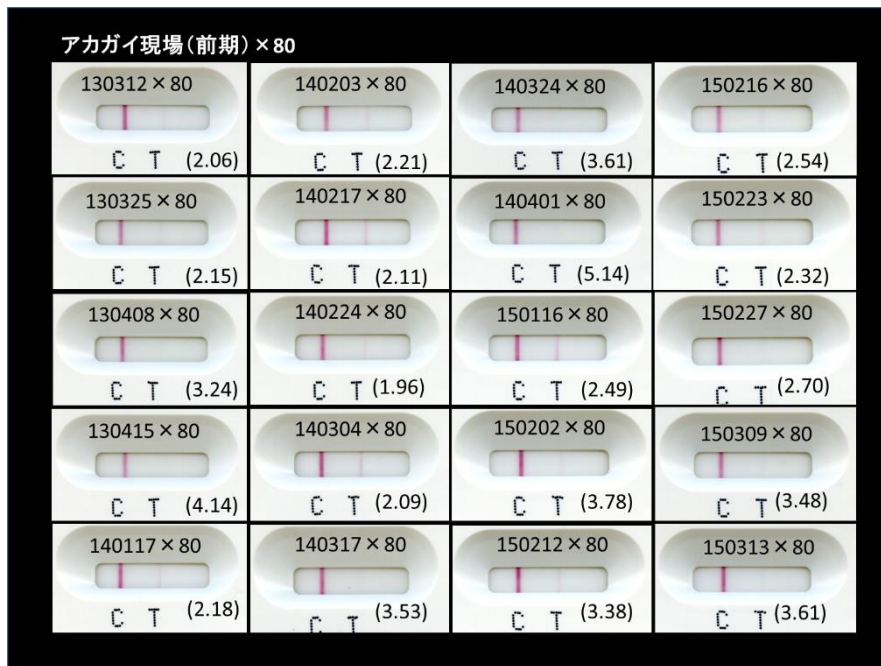


図5 2013年～2015年に大阪湾で採取したアカガイのキットによる分析(前期80倍希釈、  
( )内はマウス毒量)。



図6 2013年～2015年に大阪湾で採取したアカガイのキットによる分析(後期80倍希釈、  
( )内はマウス毒量)。



### 3. 大阪湾で毒化したトリガイにおけるスクリーニング法の検討

大阪湾で *Alexandrium tamarense* を原因藻として毒化したトリガイについて、スクリーニング法を導入することを目的として、簡易分析キットによる測定時の希釈倍率を検討するとともに、スクリーニングレベルを検討した。

#### 1) 希釈倍率の検討

無毒抽出液には 2015 年に大阪湾で採取されたサンプル（HPLC 法で無毒）を使用した。この無毒トリガイの測定用抽出液と、大阪湾で 2014 年に毒化したトリガイについて、毒化前期（ピーク前）と毒化後期（規制解除前）の、マウス試験の毒力がそれぞれ 10.14 MU/g、10.75 MU/g の 2 サンプルについて測定用抽出液を表 1 の割合で混合して 4 MU/g に相当する試料を調整し、さらに無毒トリガイ抽出液で 1/2、1/4 に希釈することで 2 MU/g 相当、1 MU/g 相当の試料を調整した。前期と後期に分けたのは、貝毒のスクリーニングが自主規制開始と終了に適用される可能性と、アカガイと同様毒化期間中の毒成分が変化する可能性を考慮したためである。

表 1 希釈倍率検討用の測定用抽出液の調製方法

調整した試料の毒力	調整したトリガイ試料の割合	無毒トリガイ試料の割合
前期(10.14MU/g)	1	1.54
後期(10.75MU/g)	1	1.69

このように得た測定用抽出液を付属の希釈液で 50 倍～120 倍に希釈して簡易分析キット（Lot 180711）により分析した。図 1 に毒化前期のキット分析の判定部の写真を示すが、無毒試料ではすべての希釈倍率で対照部（C）および試験部（T）ではっきりとラインが形成されたことを確認し、抽出マトリクスが判定に影響することがないと確認できた。麻痺性貝毒を含む測定用抽出液では、4 MU/g の毒量に相当する抽出液で 100 倍希釈まで試験部（T）のラインが確認出来ず、120 倍で薄いラインが発現した。また、2 MU/g の毒力に相当する抽出液では 50 倍から 60 倍で試験部（T）にラインが僅かに確認出来る。一方、無毒あるいは 1 MU/g 相当の抽出液では 60 倍以上の希釈倍率で試験部（T）に濃いラインが確認出来た。

また、前期においてラインの濃淡を数値化したデータを表 2～表 5 に示した。表 3 の 2 MU/g 相当の試料では、50 倍～60 倍の希釈倍率で、4 MU/g 相当の試料では 50 倍～100 倍の希釈倍率で試験部（T）の数値が低くなっていた。また、無毒試料では全ての希釈倍率で試験部（T）の数値が高い数値となっており、ともに目視での判定を支持する結果が得られた。

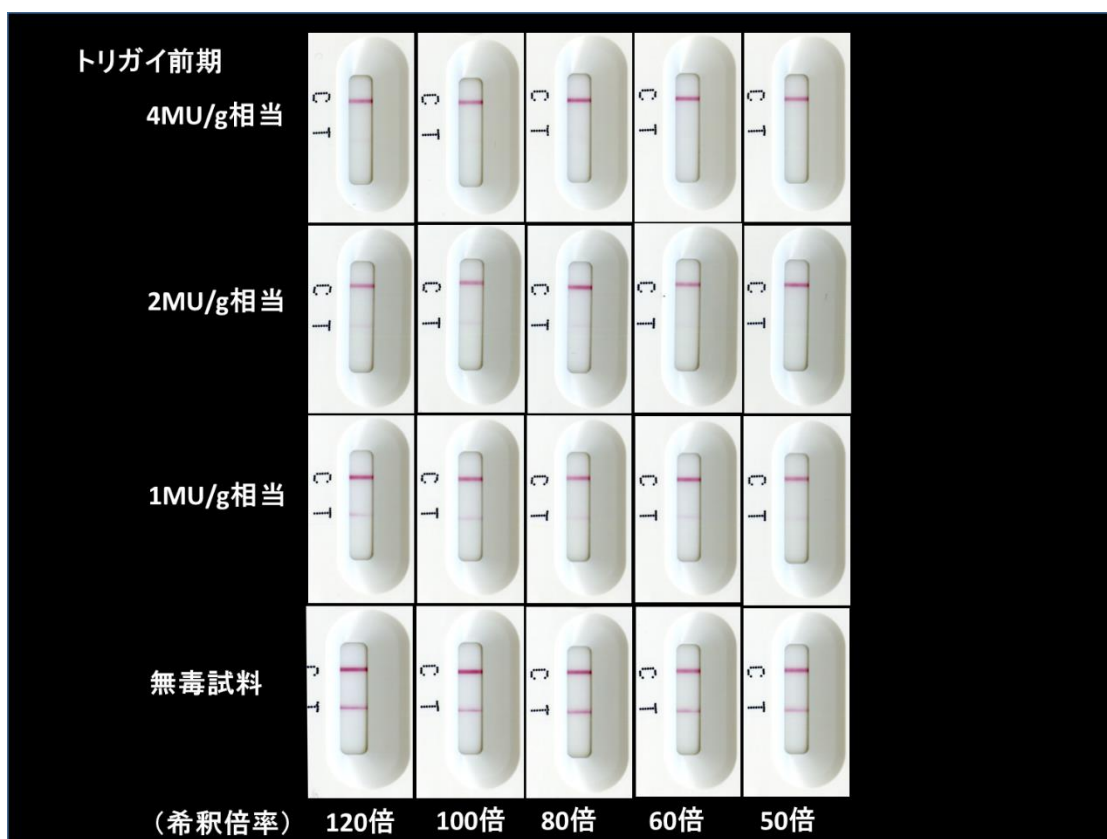


図 1. 無毒および各種の毒力に調製したトリガイの測定用抽出試料のキット分析（前期）

表 2 トリガイ測定用抽出液（4 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（前期）

希釈倍率	ライン濃淡 の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化 データ		
		対照部 (C)	試験部 (T)	T/C
120	±	6630	296	0.0447
100	—	6280	134	0.0213
80	—	8218	79	0.0097
60	—	7632	34	0.0044
50	—	6067	113	0.0186

表3 トリガイ測定用抽出液（2 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（前期）

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
120	+	5285	405	0.0767
100	+	4646	304	0.0654
80	+	7602	303	0.0399
60	±	4782	137	0.0286
50	±	6293	140	0.0222

表4 トリガイ測定用抽出液（1 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（前期）

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
120	+	8681	1154	0.1329
100	+	7253	940	0.1296
80	+	5655	577	0.1021
60	+	7674	588	0.0767
50	±	5923	386	0.0651

表5 トリガイ測定用抽出液（無毒）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（前期）

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
120	++	7770	3127	0.4025
100	++	7905	2319	0.2933
80	++	6625	3258	0.4918
60	++	5586	2300	0.4118
50	++	5768	2312	0.4008

後期の試料についても50倍～120倍に希釈して簡易分析キット（Lot 180711）により分析した。図2に毒化後期のキット分析の判定部の写真を示す。無毒試料は前期と同じ試料である。麻痺性貝毒を含む測定用抽出液では、4 MU/gの毒量に相当する抽出液の場合120倍希釈で試験部（T）の薄いラインが発現した。また、2 MU/gに相当する抽出液では60倍希釈で試験部（T）の薄いラインが発現した。後期においてラインの濃淡を数値化したデータを

表6～表9に示した。表7の2 MU/g相当の試料では、80倍の希釈倍率で、表6の4 MU/g相当の試料では50倍～80倍の希釈倍率で試験部(T)の数値が低くなっていた。また、無毒試料では全ての希釈倍率で試験部(T)の数値が同様な高い数値となっており、ともに目視での判定を支持する結果が得られた。

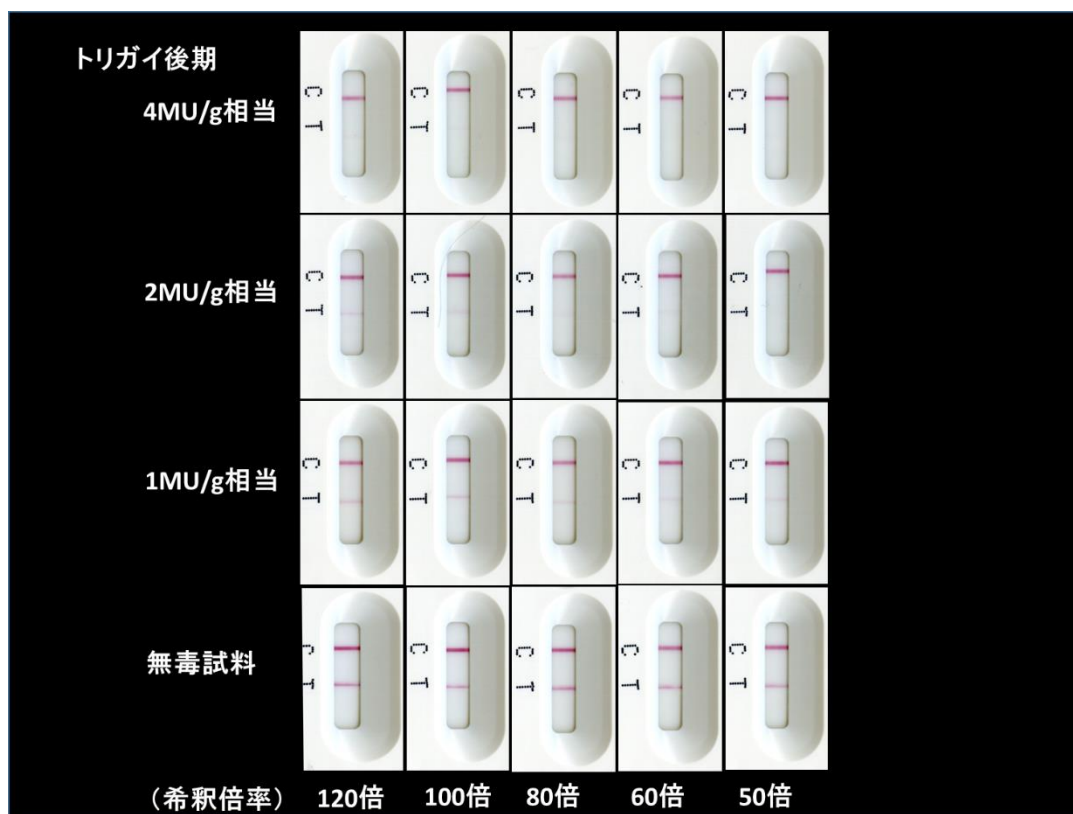


図2. 無毒および各種の毒力に調製したトリガイの測定用抽出試料のキット分析（後期）

表6 トリガイ測定用抽出液（4 MU/g相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（後期）

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
120	±	6203	230	0.0371
100	±	6813	232	0.0340
80	—	6457	135	0.0209
60	—	4991	78	0.0156
50	—	7453	79	0.0106

表7 トリガイ測定用抽出液（2 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（後期）

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
120	+	7076	703	0.0993
100	+	7092	739	0.1041
80	±	4985	185	0.0370
60	±	6400	350	0.0547
50	-	6399	129	0.0202

表8 トリガイ測定用抽出液（1 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（後期）

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
120	++	5751	1397	0.2430
100	++	7927	1206	0.1522
80	++	5615	678	0.1208
60	+	6990	556	0.0795
50	+	7819	649	0.0831

表9 トリガイ測定用抽出液（無毒）の判定部ラインの目視判定および数値化データ（後期）

希釈倍率	ライン濃淡の目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
120	++	7770	3127	0.4025
100	++	7905	2319	0.2933
80	++	6625	3258	0.4918
60	++	5586	2300	0.4118
50	++	5768	2312	0.4008

## 2) スクリーニングレベル（仮）の設定

1) で行った希釈倍率の検討では、トリガイ前期の抽出液で 2 MU/g で 50～60 倍、4 MU/g 相当の測定用抽出試料で希釈倍率が 100 倍で試験部 (T) のラインがほとんど見えなくなっていた。また 1 MU/g 相当の試料では、希釈倍率が 50 倍以上の希釈率で試験部 (T) のラインが確認できた。さらに数値化したデータでは 50～60 倍でラインが濃くなっていることがわかった。以上より、希釈倍率を 50 倍として分析することで、2 MU/g より低い毒力の試料については偽陰性（規制値 4 MU/g より高い毒力の試料を誤って 4 MU/g 未満と判断すること）無く判定することが可能と考えられた。前期のスクリーニングでは規制値を超える前の漁獲物を早期に把握する目的から、2 MU/g を仮のスクリーニングレベルとしてさらに検討を進めることとした。

一方、トリガイ後期の抽出液でも 4 MU/g 相当の測定用抽出試料で 100 倍希釈から試験部 (T) のラインが確認された。後期のスクリーニングにおいては規制値を下回る直前ないし直後の漁獲物を把握することが目的となるため、4 MU/g を仮のスクリーニングレベルとしてさらに検討を進めることとした。

## 3) 現場試料での検証

大阪湾において 2013 年、2014 年、および 2015 年に採取したトリガイについて、マウス検査を行うとともに、前期と後期に分けて希釈倍率 50 倍（前期（図 3）、後期（図 4））と 80 倍（前期（図 5）、後期（図 6））で本キットにより分析した。その結果、50 倍希釈のアカガイ前期では概ね 3 MU/g を上回る試料では試験部 (T) にラインは確認出来なかった。また、後期においても 2.91 MU/g 以上の試料で試験部 (T) のラインは消失していた。80 倍希釈では前期、後期とも 4 MU/g を上回る試料で試験部 (T) にラインは確認出来なかった。

これまでのところ、アカガイ前期においては 50 倍、80 倍希釈とも 4 MU/g を上回る試料はすべて試験部 (T) にラインは確認されず、4 MU/g 以上の試料を規制値以下と判定する擬陰性はないという結果が得られた。引き続き現場海域でのデータ蓄積を進めるが、キット分析時の希釈倍率 50 倍とすることで、大阪湾のトリガイについて 2 MU/g をスクリーニングレベルとして本キットによるスクリーニング法を導入することが可能と考えられた。また、後期においても前期と同様の反応性であった。毒化後半のスクリーニングはマウス試験へ移行する時期を見極めて、安全性を確保しつつ早期に解除することが目的となるため、キット分析の希釈倍率をより高い 80 倍にすることで、大阪湾のトリガイについて 4 MU/g をスクリーニングレベルとして本キットによるスクリーニング法を導入することが可能と考えられた。なお、本キットによる毒化後半のスクリーニングは、マウス毒性試験を開始する時期を判断するためのものであり、4 MU/g のスクリーニングレベルを下回ると判断された場合にマウス毒性試験を開始して、その結果により出荷自主規制解除の判断することが必要となる。

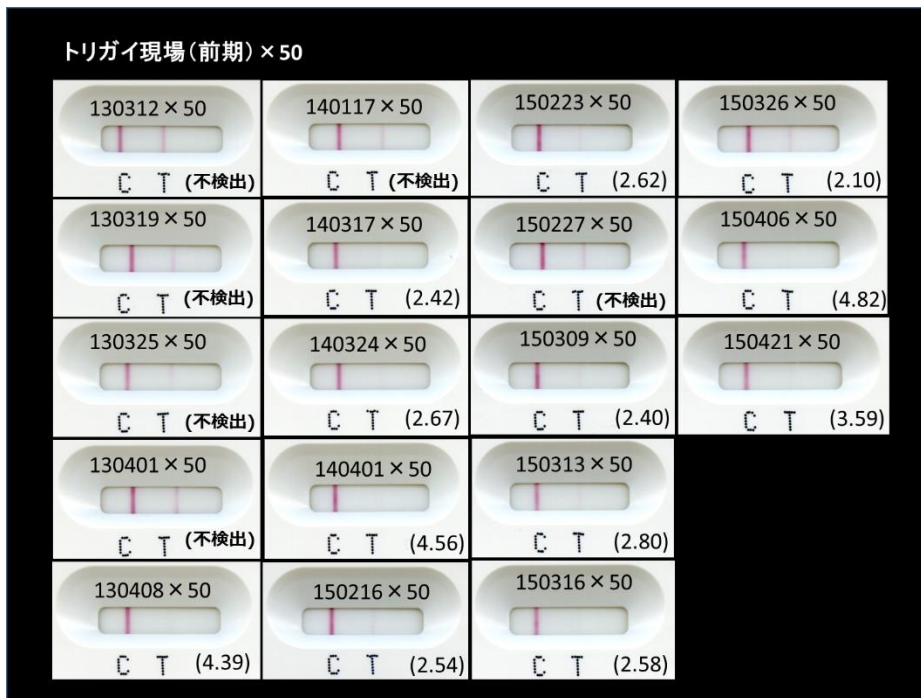


図3 2013年～2015年に大阪湾で採取したトリガイのキットによる分析(前期50倍希釈、  
( )内はマウス毒量)。

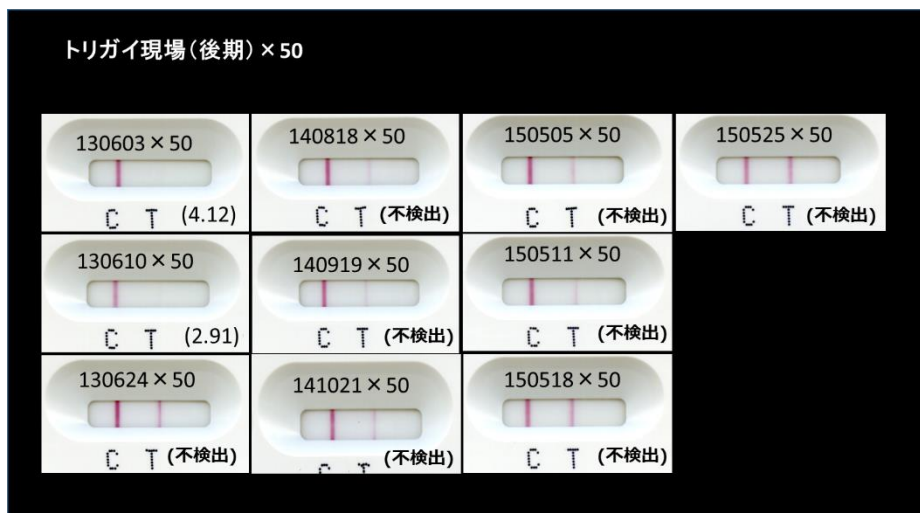


図4 2013年～2015年に大阪湾で採取したトリガイのキットによる分析(後期50倍希釈、  
( )内はマウス毒量)。



図5 2013年～2015年に大阪湾で採取したトリガイのキットによる分析(前期80倍希釈、  
( )内はマウス毒量)。

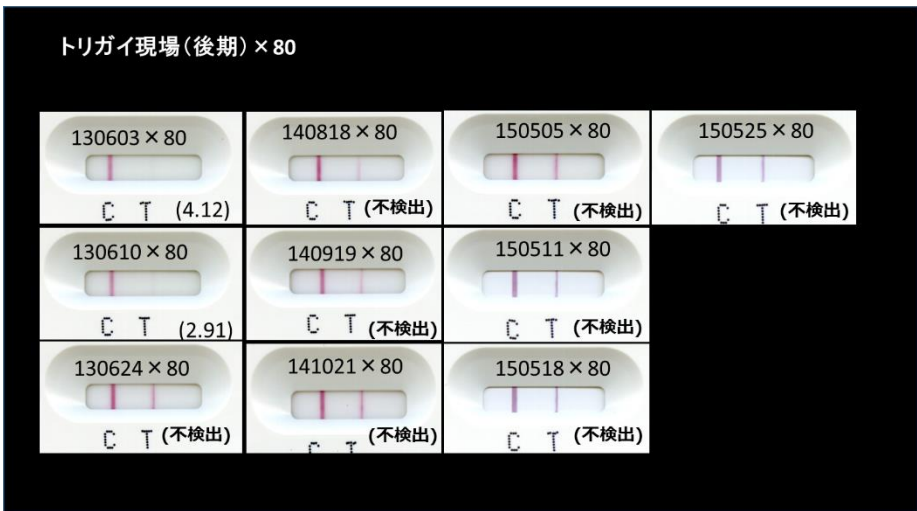


図6 2013年～2015年に大阪湾で採取したトリガイのキットによる分析(後期80倍希釈、  
( )内はマウス毒量)。



#### (4) 大分県

猪串湾で *Gymnodinium catenatum* を原因藻として毒化するヒオウギガイについて、2 MU/g 以下を確実に陰性判定できる新たなスクリーニング法を導入することを目的として、簡易分析キットによる測定時の希釈倍率を検討した。

##### 1) 希釈倍率及びスクリーニングレベルの検討

猪串湾では無毒ヒオウギガイを確保できなかったため、2017年に佐賀県で採取されたものを無毒試料として使用した。無毒試料はマウス毒性試験及びELISA法による分析でも麻痺性貝毒は検出されなかった。この無毒試料の測定用抽出液と、猪串湾で2017年に毒化し、マウス試験の毒力が4.89 MU/gの測定用抽出液を表1の割合で混合し、各毒力に相当するヒオウギガイ測定用抽出液を調製した。

表1 希釈倍率検討用の測定用抽出液の調製方法

調製した試料の毒力	毒化ヒオウギガイ試料 (4.89MU/g) の割合	無毒ヒオウギガイ試料の割合
1MU/g相当	100	389
2MU/g相当	200	289
3MU/g相当	300	189
4MU/g相当	400	89
5MU/g相当	1	0

上記の方法で得た測定用抽出液を付属の希釈液で100倍～500倍に希釈して簡易分析キット (Lot 002) により分析した。図1にキット分析の判定部の写真、表2に目視判定及びT/C値の結果を示す。

無毒試料ではすべての希釈倍率で対照部 (C) 及び試験部 (T) ではっきりとラインが形成されたことから、抽出マトリクスが判定に影響することがないことを確認した。

麻痺性貝毒を含む測定用抽出液では、1 MU/g 及び 2 MU/g の毒力に相当する抽出液で、200倍及び300倍において目視判定結果が異なることを確認した。さらに、数値化したデータでは、200倍に比べ300倍で1 MU/g 及び 2 MU/g の毒力における T/C 値の差が大きいことを確認した。

これらの結果から、希釈倍率を300倍で設定して分析を行うことで、2 MU/g 以下の毒力を確実に陰性判定できることが示唆された。

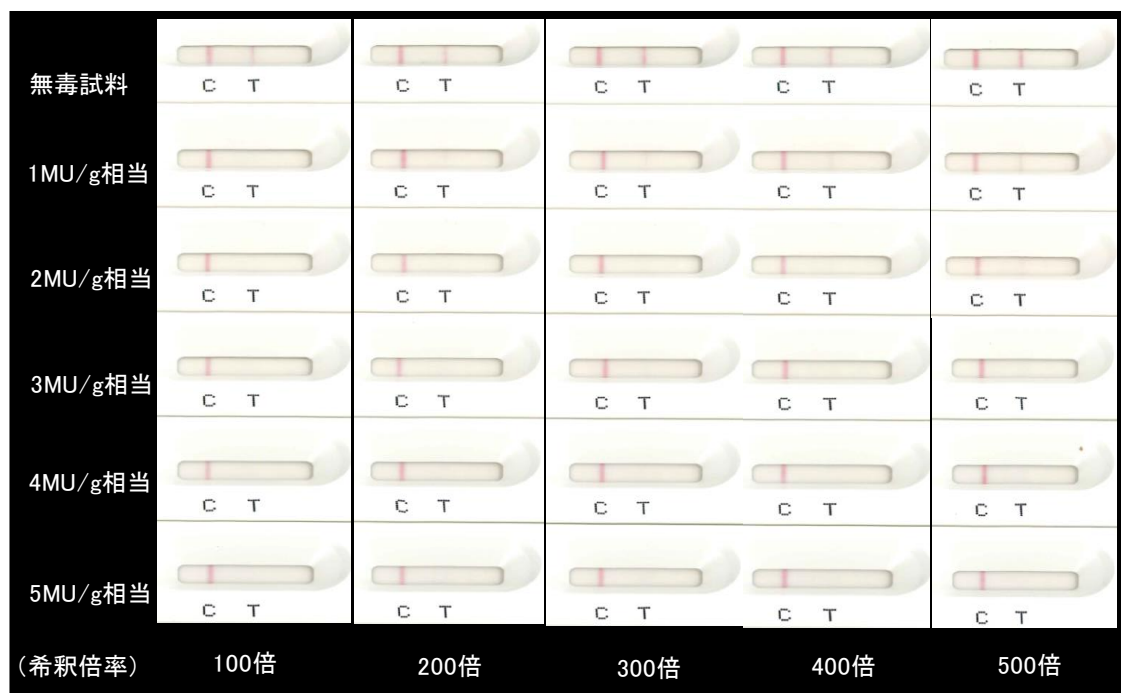


図1 無毒および各種の毒力に調製したヒオウギガイの測定用抽出試料のキット分析結果

表2 ヒオウギガイ測定用抽出液（無毒～5 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定及びT/C値

毒量	判定基準	希釈倍率				
		100	200	300	400	500
無毒試料	目視	++	++	++	++	+
	T/C値	0.49	0.51	0.54	0.66	0.71
1MU/g相当	目視	-	±	±	±	+
	T/C値	0.05	0.13	0.20	0.23	0.40
2MU/g相当	目視	-	-	-	±	+
	T/C値	0.06	0.09	0.09	0.14	0.23
3MU/g相当	目視	-	-	-	-	±
	T/C値	0.10	0.08	0.10	0.10	0.16
4MU/g相当	目視	-	-	-	-	-
	T/C値	0.09	0.05	0.14	0.12	0.13
5MU/g相当	目視	-	-	-	-	-
	T/C値	0.06	0.10	0.06	0.06	0.02

## 2) 現場試料での検証

猪串湾及び佐賀関において2017年に採取したヒオウギガイについて、マウス試験を行うとともに、希釈倍率300倍で本キットにより分析した。その結果、マウス毒力が1.9 MU/gの試料において僅かに試験部(T)でラインが確認できたが、2.3 MU/g以上の毒力の試料では試験部(T)にラインは確認出来なかった(図2)。T/C値とマウス毒力を比較したところ、

毒力の増加に伴い T/C 値は低下し ( $R^2=0.6316$ )、近似式 ( $y=0.389e^{-0.345x}$ ) から 2 MU/g 相当の毒力の T/C 値は 0.195 と算出された。スクリーニングレベルである 2 MU/g 相当の毒力の T/C 値を 0.195 と設定した場合、試験に供したサンプル 10 個体のうち、偽陽性及び偽陰性はともに認められなかった (図 3)。

また、猪串湾において 2016 年～2018 年に採取したヒオウギガイについて、ELISA 法を実施するとともに、希釈倍率 300 倍で本キットにより分析した。その結果、2.8 MU/g 以上の毒力の試料では試験部 (T) にラインは確認できなかった。マウス試験において導き出された 2 MU/g 相当の毒力の T/C 値を 0.195 と設定した場合、試験に供したサンプル 35 個体のうち、偽陽性は 3 個体、偽陰性は認められなかった (図 4)。

これらの結果を総合的に判断した結果、猪串湾のヒオウギガイについて 2 MU/g をスクリーニングレベルとして設定することで、本キットによるスクリーニング法を導入することが可能と考えられた。

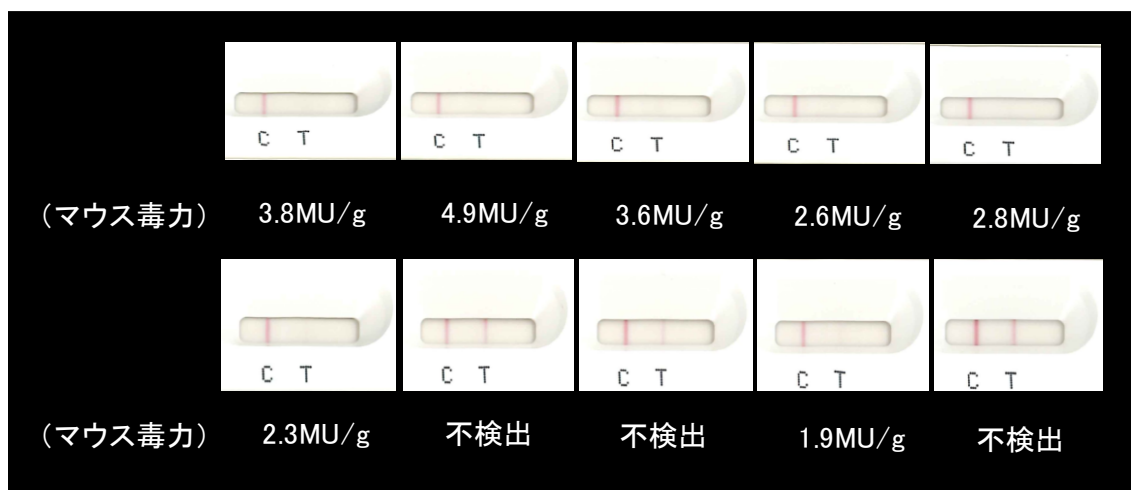


図 2 2017 年に猪串湾及び佐賀関で採取したヒオウギガイのキットによる分析

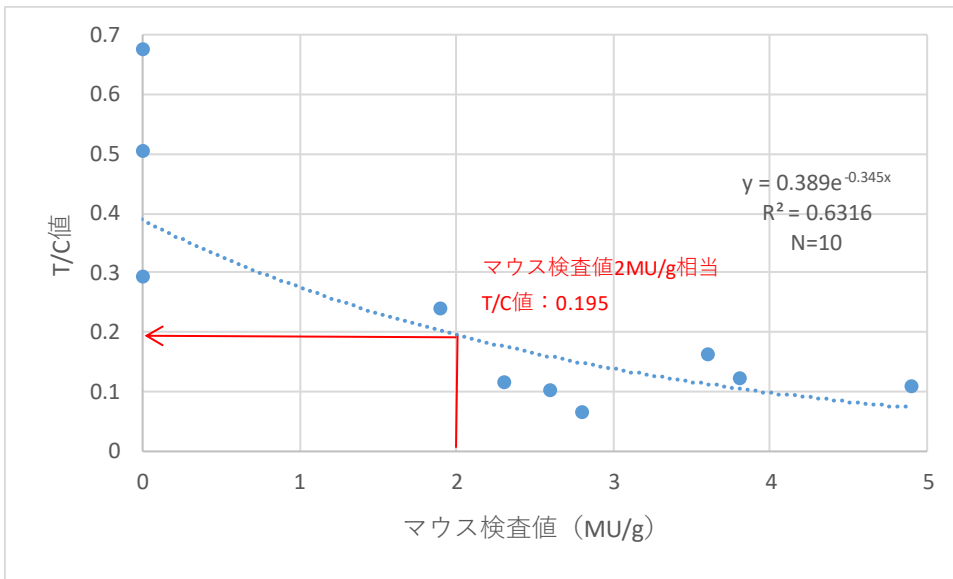


図3 ヒオウギガイのマウス検査とT/C値の関係

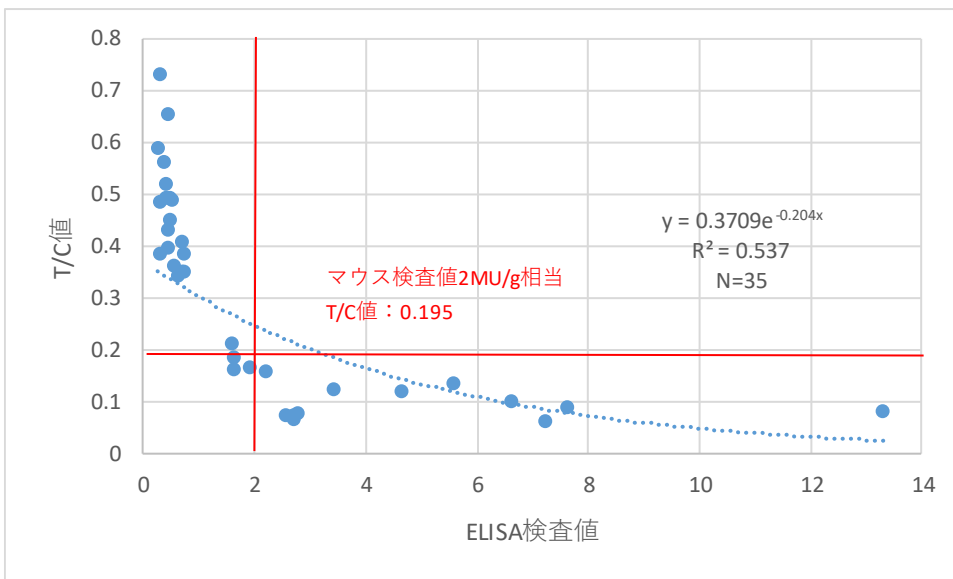


図4 ヒオウギガイのELISA検査とT/C値の関係

(5) 熊本県

1) 希釈倍率の検討

2014年に熊本県沿岸で採取され、HPLC法により検出限界以下のものを無毒マガキとして使用した。この無毒マガキの測定用抽出液と、熊本県沿岸で2015年に毒化しマウス試験の毒力が5.72 MU/gの測定用抽出液を表1の割合で混合し、各毒力に相当するマガキ抽出液を調製した。

表1 希釈倍率検討用の測定用抽出液の調製方法

調製した試料 の毒力	毒化マガキ試料 (5.72 MU/g)の割合	無毒マガキ試料 の割合
4 MU/g 相当	1	0.4
3 MU/g 相当	1	0.9
2 MU/g 相当	1	1.9
1 MU/g 相当	1	4.7

このように得た測定用抽出液を付属の希釈液で150倍～500倍に希釈して簡易分析キットにより分析した。図1にキット分析の判定部の写真を示すが、無毒試料ではすべての希釈倍率で対照部(C)および試験部(T)ではっきりとラインが形成されたことを確認し、抽出マトリクスが判定に影響することがないと確認できた。麻痺性貝毒を含む測定用抽出液について、4 MU/g相当および3 MU/gの抽出液では、350倍、400倍の希釈倍率の場合に試験部(T)のラインを確認することができた。2 MU/g相当の抽出液では、希釈倍率200倍以上の場合に、また、1 MU/g相当および無毒の試料では、希釈倍率150倍以上のすべての試料において試験部(T)のラインを確認することができた。

ラインの濃淡を数値化したデータを表2～表6に示した。表2の4 MU/g相当の試料および表3の3 MU/g相当の試料では、希釈倍率350倍以上で試験部(T)の数値が高い値となっており、表4の2 MU/g相当の試料では、希釈倍率200倍以上で試験部(T)の数値が高い値となっていた。また、1 MU/g相当の試料(表5)、無毒の試料(表6)では、全ての希釈倍率で試験部(T)の数値が高い値となっており、ともに目視での判定を支持する結果であった。これらの結果から、本キットにより熊本県沿海のマガキ抽出液4～3 MU/g相当の試料を判定する場合には希釈倍率300倍、2 MU/g相当の試料を判定する場合には希釈倍率150倍が妥当であることが示された。

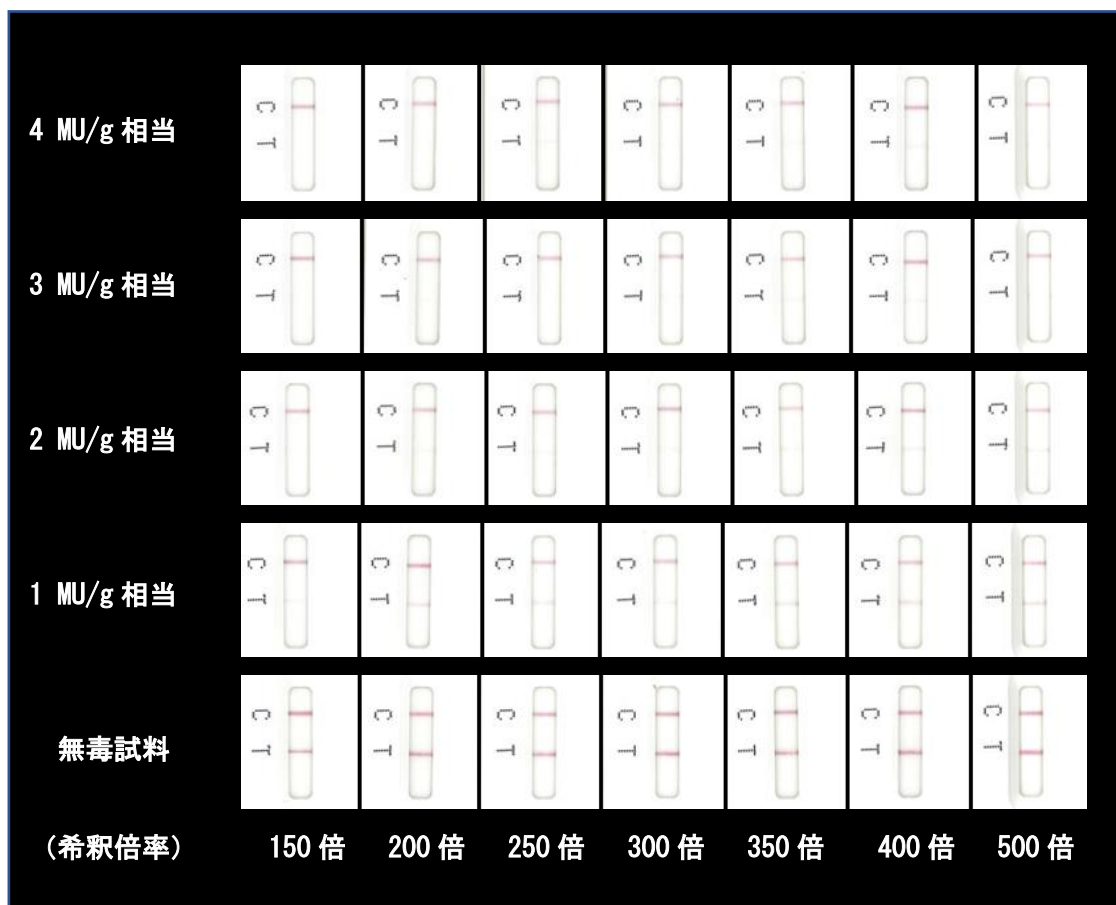


図 1. 無毒および各種の毒力に調製したマガキの測定用抽出試料のキット分析

表2 マガキ測定用抽出液（4 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ

希釈倍率	ライン濃淡の 目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
500	—	1477.627	14.121	0.010
400	±	3423.770	218.385	0.064
350	±	2252.749	181.556	0.081
300	—	2114.749	18.536	0.009
250		3272.255	266.678	0.081
200		2935.477	28.536	0.010
150		2981.456	19.536	0.007

表3 マガキ測定用抽出液（3 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ

希釈倍率	ライン濃淡の 目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
500	—	1837.213	6.121	0.003
400	±	3506.820	261.263	0.075
350	±	2123.870	215.435	0.101
300	—	2068.163	37.950	0.018
250	—	2822.698	32.536	0.012
200	—	2863.184	173.849	0.061
150	—	3409.284	28.536	0.008

表4 マガキ測定用抽出液（2 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ

希釈倍率	ライン濃淡の 目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部(C)	試験部(T)	T/C
500	±	1845.749	232.849	0.126
400	+	2822.749	292.678	0.104
350	+	1804.163	148.314	0.082
300	±	2739.991	141.142	0.052
250	±	2957.234	246.971	0.084
200	±	2824.184	238.971	0.085
150	—	2682.870	36.657	0.014

表5 マガキ測定用抽出液（1 MU/g 相当）の判定部ラインの目視判定および数値化データ

希釈倍率	ライン濃淡の 目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部 (C)	試験部 (T)	T/C
500	+	2368.749	946.920	0.400
400	+	2312.870	1031.456	0.446
350	+	2324.749	1128.870	0.486
300	+	2199.456	186.435	0.085
250	+	2378.163	699.335	0.294
200	+	3616.335	943.335	0.261
150	±	3187.527	210.849	0.066

表6 マガキ測定用抽出液（無毒）の判定部ラインの目視判定および数値化データ

希釈倍率	ライン濃淡の 目視判定	判定部ライン濃淡の数値化データ		
		対照部 (C)	試験部 (T)	T/C
500	+	4055.991	4720.577	1.164
400	+	3248.163	3683.284	1.134
350	+	3525.627	2991.456	0.848
300	+	3398.163	3577.991	1.053
250	+	3606.163	4014.355	1.113
200	+	4418.012	4804.205	1.087
150	+	4690.991	2968.406	0.633

## 2) スクリーニングレベルの設定

1) で行った希釈倍率の検討では、希釈倍率を 150 倍とした場合、2 MU/g 相当以上の毒力の試料で試験部 (T) のラインが見えなくなっていた。一方で、1 MU/g 相当の試料および無毒の試料では、試験部 (T) のラインが確認できていた。以上のことから、2MU/g 以上の毒力については、本キットによる判定が可能と考えられ、かつ 2 MU/g は規制値より十分に低い毒力であることから、スクリーニングレベルを 2 MU/g として、現場試料での検証を試みた。

## 3) 現場試料での検証

熊本県沿海で 2013 年から 2018 年にかけて採取したマガキについて、マウス検査により麻痺性貝毒が確認された 27 試料 (表 7) を、2) で設定したスクリーニングレベル (2 MU/g) で判定するため、希釈倍率を 150 倍として本キットで分析した。その結果、マウス毒力が 4 MU/g 以上であった 1 試料 (試料 No.1 : 37.21 MU/g) および 2 MU/g 以上 4 MU/g 未満であった 14 試料 (試料 No.2-15 : 3.80~2.01 MU/g) は、試験部 (T) でラインが確認できなかつ



た。また、マウス毒力が 2 MU/g 未満の 12 試料（試料 No.16-26）のうち、10 試料は試験部（T）でラインを確認できており、設定したスクリーニングレベル（2 MU/g）で判定することができた。

一方で、マウス毒力が 2 MU/g 未満であるが、試験部（T）にラインが現れず偽陽性と判断された 2 試料（試料 No.18、21）については、HPLC 法で分析した定量値から換算した毒力では、試料 No.18 は 3.13 MU/g、試料 No.21 は 2.41 MU/g であり、どちらもマウス検査の結果より高い毒力で 2 MU/g 以上であったため、本キットの試験部（T）でラインが現れなかったと考えられた。

今回の結果から、2 MU/g より毒力の高い試料はすべて試験部（T）にラインは確認されず、2 MU/g 以上の試料を規制値以下と判定する偽陰性はないという結果が得られた。このことから、キット分析時の希釈倍率を 150 倍とすることで、熊本県沿海のマガキについては本キットによるスクリーニング法を導入することが可能と考えられた。

表7 2013年～2018年に採取したマガキの公定法及び目視判定結果

No	公定法 (MU/g)	本キットでの 目視判定
1	37.21	—
2	3.80	—
3	3.57	—
4	3.52	—
5	3.50	—
6	3.39	—
7	3.19	—
8	2.67	—
9	2.40	—
10	2.38	—
11	2.31	—
12	2.29	—
13	2.17	—
14	2.15	—
15	2.01	—
16	1.99	±
17	1.98	±
18	1.98	—
19	1.96	+
20	1.96	±
21	1.95	—
22	1.94	±
23	1.91	±
24	1.90	±
25	1.89	±
26	1.83	+
27	1.81	±



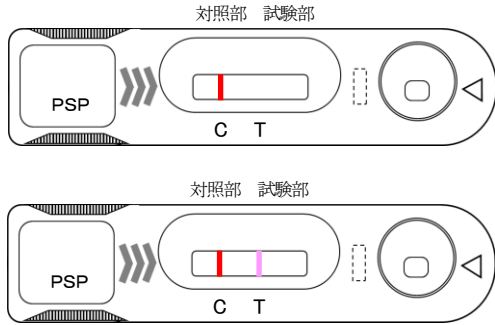
—— 測定結果の判定法 ——

〔測定結果の判定〕

測定溶液を滴下して20分経過後、判定部に現れる赤紫色ラインの有無で判定します。判定は以下の基準に従って実施してください。

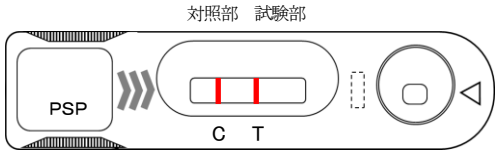
1) 陽性

下図のように試験部(T)にラインが全く出現しない、または弱いライン、かつ、対照部(C)にラインが出現した場合は麻痺性貝毒の毒成分が含まれていると判定します。



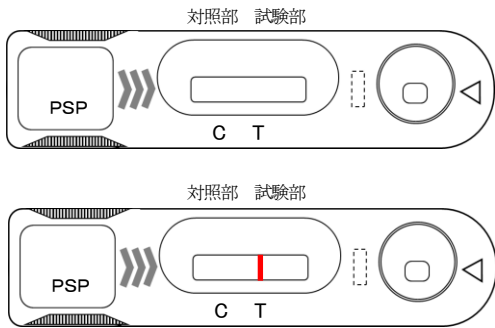
2) 陰性

下図のように試験部(T)および対照部(C)の両方に明瞭なラインが出現した場合は陰性と判定します。



3) 再検査

試験部(T)のラインの有無に関係なく対照部(C)にラインが出現しない場合は、測定が適切に行われていないことが考えられます。測定操作法を再度確認の上、再試験を行ってください。



—— 性能 ——

用法、用量欄の操作法により次の性能試験を行うとき以下の条件に適合します。

1. 検出感度

麻痺性貝毒 (ゴニトキシン 2&3 ; GTX2&3) として 20nM。

2. 特異性

本試薬は、GTX1&4、GTX2&3、デカルバモイル GTX2&3、GTX5、GTX6、C1&2 に反応性を示します(他の毒成分については未確認)。毒成分により反応性が異なります。

—— 使用上または取扱い上の注意 ——

1. 一般的な注意事項

- 1) この添付文書をよく読み、記載された操作法に従って使用してください。
- 2) 使用期限の過ぎた製品は使用しないでください。
- 3) 試薬類は凍結させないでください。
- 4) 試薬は全て常温 (15~25℃) に戻してから使用してください。
- 5) 反応時間は正確に行ってください。

2. 危険防止上の注意事項

- 1) 本キットの試薬類は、皮膚や粘膜、衣類等につけないでください。
- 2) 試薬が目や口に入った場合には、水で十分洗い流す等の応急処理を行い、必要があれば医師の手当を受けてください。

3. 廃棄上の注意事項

- 1) 使用後の試薬は、十分量の水で流して廃棄してください。
- 2) 使用後の試薬容器および使用した器具等の廃棄の際には、廃棄物に関する規定に従って適切に処理してください。
- 3) 試料抽出液は、酸性のため中和して廃棄してください。

—— 貯蔵方法・有効期間 ——

〔貯 法〕

冷所 (2~8℃) で保存してください。

〔有効期間〕

製造後12ヶ月。  
外箱に使用期限を表示してあります。

—— 包装単位 ——

MTテスト イムノクロマトーPSP「ニッスイ」 10テスト用 …………… Code 08629

—— 参考文献 ——

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知「貝毒の検査等について」(昭和55年7月1日、環乳第30号)

—— 問い合わせ先 ——

日水製薬株式会社 カスタマーサポート  
〒110-0005 東京都台東区上野 3-24-6  
TEL 03(5846)5707

製造 発売 元

**日 水 製 薬 株 式 会 社**

東京都台東区上野 3-24-6 〒110-0005 TEL 03(5846)5611 (代)

(9B03)