

事業区分	経常研究(基盤)	研究期間	平成 28 年度～平成 30 年度	評価区分	事後評価
研究テーマ名 (副題)	食中毒起因マリトキシンの迅速スクリーニングに関する研究 (マリトキシンに起因する食中毒に対し、迅速な原因究明手法を確立するための研究)				
主管の機関・科(研究室)名	研究代表者名	環境保健研究センター 生活化学科 辻村和也			

<県総合計画等での位置づけ>

長崎県総合計画	人が輝く長崎県 2.一人ひとりをきめ細かく支える (3)安全・安心な消費生活の実現 (4)食の安全・安心の確保
長崎県科学技術振興ビジョン	第 3 章 長崎県の科学技術振興の基本的な考え方と推進方策 2-2 安全・安心な県民生活の基盤を支える施策 ・食の安全・安心への対応
環境保健研究センター運営計画	【重点目標4:安全・安心な生活の確保を目指す】 ① 農産物、水産物等食品中の農薬、化学物質等の迅速分析法の確立に関する研究 ② 健康被害原因物質(化学物質)の究明に関する研究

1 研究の概要(100 文字)

食中毒原因を迅速に特定・推定するための自然毒精密質量ライブラリーを作成し、死亡例のあるマリトキシンの検出を機器分析及び細胞毒性手法を用い検討する。	
研究項目	① 食中毒起因自然毒の精密質量データベース作成 ② 機器分析によるパリトキシ及びテロドトキシンの迅速分析法の確立 ③ 動物細胞株によるパリトキシンの検出法の検討

2 研究の必要性

1) 社会的・経済的背景及びニーズ	<p>「食中毒」の発生原因として、「細菌性食中毒」、「ウイルス性食中毒」、「化学物質」及び「自然毒」の大きく 4 つが挙げられる。その中で、「自然毒」の食中毒全体に占める割合は、約 3%(厚生労働省 平成 26 年度食中毒統計資料)と低いが、症状の重篤化が問題である。過去 10 年間で、「自然毒」による食中毒は 30 件あるがフグ毒(テロドトキシ: TTX 等)やパリトキシ(PTX)や PTX 様物質のような海洋性自然毒(マリトキシ)を有する海洋性動物に起因する事例は 26 件、全体の 9 割を占め、死亡事例が 5 件発生している。加えて、地球温暖化等の海洋環境の変化を背景に、これまで日本では問題になっていなかった種類のマリトキシ保有魚介類の出現が懸念され、それに伴う食中毒発生も危惧される。</p> <p>以上のことから、食品衛生学的に、「自然毒」特にマリトキシを迅速かつ網羅的に探索・検出、もしくは推定できる方法の開発や検索システムの構築は急務である。</p>
2) 国、他県、市町、民間での実施の状況または実施の可能性	<p>フグ毒や貝毒を中心としたマリトキシ分析は、マウスによるバイオアッセイが主な手法であり、その評価は、マウスユニット(MU)という単位で評価する。しかしながら、この方法は、全体的な毒性把握ができるが、操作性、検体処理能力、動物愛護、迅速性、感度、精度等の問題が指摘されている。</p> <p>マウス試験代替法として、LC-MS/MS や HPLC 蛍光法等を用いる機器分析法とマウス培養神経細胞株等の培養動物細胞株を用いる培養細胞法が研究されている。いずれも、マウス試験に比べ、操作の簡便性や検体処理能力に優れて、動物愛護への配慮も可能である。機器分析法では、迅速性に優れ、感度・精度が高く、毒成分の特定能は高いが、未知物質に対応できず、生体活性を反映できない。一方、培養細胞法は、マウス試験同様、生体活性を反映でき、未知物質にも対応可能であるが、迅速性、感度、精度は機器分析法に劣る。これら代替法は、互いの利点、欠点を補完できる関係にあるが、事例の多くは、理化学、細胞生物学と適応可能分野が異なるため、それぞれが単独の研究事例でしか報告されていない。本研究のように、「食中毒起因自然毒の精密質量データベース作製」、「機器分析による迅速分析法開発」及び「動物細胞株による検出法検討」といった理化学、細胞生物学の両分野を複合的に研究し、それを自然毒迅速スクリーニング法開発へ適応する取り組みは、大変有用である。</p> <p>また、研究実施の要件に検体確保がある。当センターでは、過去の TTX 食中毒事例の検体を保管してい</p>

るとともに、公設研究機関であることから、食中毒発生時の検体を入手でき、且つ、TTX 及び PTX 標準品及び生体試料や毒魚検体の入手体制は確保している。

ハード面では、高感度定量分析機器である LC-MS/MS が整備されている。加えて、危険ドラッグ対応で、標準品が存在しない未知物質についても精密質量数等を元に構造類推可能な高精度定性機器である四重極飛行時間型高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-Q/TOF) も整備されている。培養細胞株を用いる検出法開発においても、必要機器である CO₂ インキュベーター、クリーンベンチ及びプレートリーダーが整備されており、併せて十分なハード整備環境下にある。

研究体制として、マリトキシンでは国内の実績がある長崎大学水産学部をはじめ、国立医薬品食品衛生研究所、地衛研と協力連携をとる。

3 効率性(研究項目と内容・方法)

研究項目	研究内容・方法	活動指標		H	H	H	単位
				28	29	30	
①	データベースライブラリー搭載自然毒選定及び情報入力(組成式、精密質量数、フラグメント等)	自然毒数	目標	30			物質
			実績	37	1	9	
②	PTX 及び TTX の抽出法・分析条件検討(マトリクス: 魚肉、貝肉、血清、尿)	マトリクス数	目標	2	2		種類
			実績	3	1		
	実検体又は模擬検体での検証	検証数	目標		5		検体
			実績	18	1		
③	条件検討(細胞選定、培養条件、暴露条件、検出条件)	検討条件数	目標		3	1	条件
			実績		1	3	
	食品検体及び魚での検証	検証数	目標			5	検体
			実績			16	

1) 参加研究機関等の役割分担

- ・長崎大学 水産学部: 自然毒に関する情報、実試料分析及び結果考察(研究項目①②③)
- ・国立医薬品食品衛生研究所及び地方衛生研究所: マリトキシンに関する情報、分析検体協力(研究項目①②)

2) 予算

研究予算 (千円)	計 (千円)	人件費 (千円)	研究費 (千円)	財源			
				国庫	県債	その他	一財
全体予算	31,264	24,048	7,216				7,216
28年度	10,484	8,016	2,468				2,468
29年度	10,488	8,016	2,472				2,472
30年度	10,292	8,016	2,276				2,276

※ 過去の年度は実績、当該年度は現計予算、次年度以降は案

※ 人件費は職員人件費の見積額

(研究開発の途中で見直した事項)

研究事前評価委員会時、研究項目②として、テトロドトキシン(TTX)については、患者血清及び尿、パリトキシン(PTX)については、アオブダイ喫食事例のある部位(魚肉)、血清及び尿中分析法開発とその適用について計画していたが、PTX について血清及び尿等生体移行情報が無いため、本研究では魚肉のみの分析法開発とした。

一方、研究立案後に TTX を含有する巻貝(キンシバイ貝)による食中毒事例が発生した。当該事例が全国で3例目、その内2例が長崎県で地域性のあることから、当該キンシバイ貝食中毒の分析法開発とその詳細解析に取組んだ。

そのため、研究項目②「PTX 及び TTX の抽出法・分析条件検討」の活動指標を魚肉、血清、尿の「3」に加え貝肉を加えた「4」とした。よって TTX については、貝肉、血清、尿(3)を、パリトキシンについては魚肉(1)について当該研究項目②を実施した。

4 有効性

研究項目	成果指標	目標	実績	H 28	H 29	H 30	得られる成果の補足説明等
①	データベースライブラリー搭載自然毒数	30	47	37	1	9	魚毒及び貝毒を含むマリントキシン及び国内発生事例の多い植物性自然毒の構造、精密質量数をデータベース化。標準品若しくは毒を持つ生体入手時は、リテンションタイム情報も搭載する。
②	PTX 及び TTX 機器分析手法確立及び改良	5	4	3	1		食中毒で想定される 4 種類のマトリクス：魚肉、貝肉、血清、尿で迅速スクリーニング法確立を TTX 及び PTX で行う。
③	培養細胞株による PTX 検出法プロトタイプ作成	1	2			2	方法を作成し、標準品若しくは毒を有するとされる個体による検証
—	研究成果の情報提供	1	3		2	1	関連学会及び論文発表等(項目①-③)

1) 従来技術・先行技術と比較した新規性、優位性

申請課題について、以下の表に内容(項目)ごとに、新規性及び優位性をまとめた。

内容(項目)	独創点 (新規点) 優位点	先行技術	本研究
①食中毒起因自然毒の精密質量データベースライブラリー作成	・マリントキシン含む様々な自然毒の包括的スクリーニング検出により、危機管理時、標準品がなくとも物質の探索又は推定が可能。 →迅速な対応○ →類縁体含む網羅的探索○	精密質量データベースライブラリーの技術はあるが、自然毒、特にマリントキシンへの対応は不十分。	本研究では、より検出精度をあげるため、標準品が無いものは、現在文献でのみ情報のあるマリントキシン類縁体の構造、精密質量数をデータベースライブラリー化する。
②LC-MS/MS によるパリトキシン及びテトロドトキシン迅速分析法の確立及び改良	・PTX の生体試料分析法は、無い。また TTX 微量生体検体(100 µL 以下)での分析法は無い(通常 1-2 mL)。 →危機管理で優位○	・TTX では LC-MS 法で多くの報告有。ただし、生体試料使用量は数 mL。 ・衛生化学的 PTX 分析報告はほとんど無。	本研究では、生体試料については、検体量 100 µL 以下を目指す。
③動物細胞株によるパリトキシン検出法の検討	・培養細胞株用いた手法 →包括的な毒性確認○ →操作性、反応性、処理能○ →動物愛護○ →メカニズムが同じ PTX 様物質の検出可能性大(②との組み合わせ)	・マウスバイオアッセイ中心 ・包括的な毒性確認○ ・操作性、反応性、処理能× ・動物愛護× ・特異性及び感度×	PTX 検出に有効なほ乳類培養細胞株を選択する。PTX 様物質と同作用機序を検出対象とする。 ②との連携により PTX と PTX 様物質の区別の可能性を検討する。

2) 成果の普及

■研究成果の社会・経済・県民等への還元シナリオ

健康危機管理を担当する地方衛生研究所において、被害の拡大防止を図るために、一刻も早く分析結果を関係機関に提供することは重要な課題である。本研究により開発された手法は、危機管理時、迅速な原因究明と有害性の把握に有効ツールとなる。今後対象物質の充実が必要であるが、それがクリアできれば、長崎県の周辺海域における毒化魚貝類実態調査が可能になり、中長期的にも、長崎県独自の実態に合致した新たなリスク管理体制の整備が可能になる。

水産業保護の観点では、マリントキシンは、長崎県が出している「魚介類販売施設における HACCP^{※8} 手法導入の手引き」の化学物質危害のひとつにも挙げられており、その対応としても本研究で確立した分析法等は適用可能と考える。このことは、安全で信頼できる県内水産物の供給体制の確保にもつながるものと考え、衛生化学の技術が産業保護及び推進に寄与できる可能性がある研究といえる。

医療面への寄与では、確立した微量生体試料の分析法は、自然毒食中毒患者の残毒確認に適用できる可能性があり、治療・処置への貢献が期待できる。

■研究成果による社会・経済・県民等への波及効果(経済効果、県民の生活・環境の質の向上、行政施策への貢献等)の見込み

本研究は、九州を含む地方衛生研究所等に対しても、先駆的な役割を果たすことが可能である。また、学会発表や論文発表することで、対外的に認められる県の研究機関となりうる。更に、その他の有害物質データも蓄積していけば、このデータベースを保持する当センターは県内における健康被害原因化学物質情報の拠点となりうる。そうすることで、被害拡大を抑え、県民の有害性リスクを軽減し、県民の支持・信頼性が獲得でき、安心して安全な生活の実現が期待できる。このことは、センターの運営理念でもある。

(研究開発の途中で見直した事項)

研究事前評価委員会時、研究項目②として、テトロドトキシン(TTX)については、患者血清及び尿、パリトキシン(PTX)については、アオブダイ喫食事例のある部位(魚肉)、血清及び尿中分析法開発とその適用について計画していた。しかしながら、フグ以外で TTX を含有する巻貝(キンシバイ貝)による食中毒事例が発生した。当該事例は、全国で3例目であり、その内2例が長崎県で起こっている地域性のある事例であり、対象物質が TTX と当該研究対象でもあったため、PTX 生体試料中分析検討にかかる労力を、キンシバイ貝食中毒の解析に割り当て、優先的に本研究成果を適用してその詳細解析に取り組んだ。

その結果、「②PTX 及び TTX 機器分析手法確立及び改良」の数値目標「5(TTX:2(血清、尿)、PTX:3(魚肉、血清、尿)」に対し、実績「4(TTX:3(貝肉、血清、尿)、PTX:1(魚肉)」とした。

種類	自己評価	研究評価委員会
事前	<p>(27 年度) 評価結果 (総合評価段階: S)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・必要性 S 本県は、海洋資源と密接な関係にあり、海産物のマリントキシンによる食中毒が起こるリスクは高く、過去に死亡例もあり、食品衛生上、これら食中毒は拡大防止に努めるべき課題である。 そのため、原因物質を迅速且つ正確に究明する手法開発は、県民の健康維持や食の安全・安心の観点から、必要不可欠である。 ・効率性 S マリントキシンにおいては、長崎大学水産学部が全国的にも先進大学である。本研究では、効率的な実施のため、研究代表者を当該大学の客員研究員とし、効率的に研究に取り組む体制をとっている。その他の機関との協力体制として、国立医薬品食品衛生研究所及び地衛研と情報収集や分析検体の面で連携する。加えて、生体試料分析・細胞培養評価手法確立の面で九州大学の協力を得て効率よく研究を行う。 また、食品や医薬品中の有害化学物質検査・研究で培った当センターの分析技術及び機器を活用して研究を実施する。 ・有効性 A 本研究が目指す検出法は、過去の事例を踏まえるとともに、同じ海域の近隣県で起こったマリントキシン食中毒分布の変化に、いかに早く、正確に原因究明するかにある。地方衛生研究所の果たす健康危機管理対応には、迅速な原因究明と有害性の把握に網羅的有効ツールとなる。また、培養細胞株による手法は、動物愛護の観点はもとより、包括的な毒性確認、操作性、反応性、処理能の面で、マウスを使う方法より優位である。 水産業保護の観点では、マリントキシンは、長崎県が出している「魚介類販売施設における HACCP 手法導入の手引き」の化学物質危害のひとつにも挙げられており、その対応としても本研究で確立した分析法等は適用可能と考える。 ・総合評価 S 本研究は、水産県長崎において、県民の安全・安心な生活を脅かし、引いては産業にも影響を及ぼしかねない食中毒起因マリントキシンにターゲットを絞り、その研究成果に即効性を期待できるものである。また、応用性もあり、本法を用いマリントキシン実態調査そ 	<p>(27 年度) 評価結果 (総合評価段階: A)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・必要性 S 地球温暖化等により海洋環境の変化は著しく、海産物による食中毒対策は、本県ではマリントキシンによる死亡例も発生しており、非常に重要である。本県は水産県でもあり、本研究成果は経済や医療への効果も期待され、必要性の高い課題である。 ・効率性 A 新しいスクリーニング検査法の開発であるが、大学等との協力体制が整えられており、相乗的な効果も期待される。 目標は 30 成分となっているが、データベースとしては少ない。 ・有効性 A データベースを構築することは、食中毒の原因調査に有効である。他の機関とのデータ共有について、国などと連携して検討すること。水産物の毒化プロセス究明についても検討して欲しい。 ・総合評価 A 迅速な検出法の開発により、マリントキシンの実態を解明し、県内水産物の安全・安心確保につながる本研究は、水産業の推進、県民の健康を衛るうえで有効な研究である。原因(食物連鎖による毒化)対策につながる研究となることを期待している。

	れに続きリスク管理体制の整備が期待できる。更に、HACCP にも貢献が期待でき、将来的に安全で信頼できる県内水産物の供給体制の確保にもつながるものと考え、衛生化学の技術が産業保護及び推進に寄与できる可能性がある研究といえる。	
	対応	対応 データベース作成目標は 30 成分であるが、研究を進めていく中で、可能な限り数を増やすことを検討していく。
途 中	(一年度) 評価結果 (総合評価段階: 一) ・必要性 一 ・効率性 一 ・有効性 一 ・総合評価 一	(一年度) 評価結果 (総合評価段階: 一) ・必要性 一 ・効率性 一 ・有効性 一 ・総合評価 一
	対応	対応
事 後	(元年度) 評価結果 (総合評価段階: A) ・必要性 A 長崎県は、離島を含め、海に囲まれた海洋県のため、海洋資源と密接な関係にある。その反面、海洋生物に起因する海洋性自然毒(マリトキシン)による食中毒が起こるリスクは高く、食品衛生上、これら食中毒の迅速な原因究明及び拡大防止は、行政機関として努めるべき課題である。 その中で食中毒起因マリトキシンの迅速スクリーニング手法を確立することは、科学的見地から県民の健康を守る上で意味のある必要性の高い研究であり、環境保健研究センターの重要な任務である。 ・効率性 B 当該研究を効率的に実施する鍵は、「最新の情報収集」と「研究対象物質及び検体魚の確保」である。全国的にもマリトキシンの先進大学である長崎大学水産学部荒川・高谷両教授の研究室に客員研究員として在籍し、これら両方の課題について対応できる効率的な研究体制をとった。 加えて、全国の地方衛生研究所が集う全国衛生化学技術協議会や食品衛生学会及び水産学会国際シンポジウムに参加し、国内外の研究機関から最新の情報収集に努めた。また、県水産部、県内の漁業共同組合の協力の下、研究対象魚を効率よく収集できた。 以上により、当初目標とした活動指標をほぼ達成で	(元年度) 評価結果 (総合評価段階: A) ・必要性 A 水産県である本県は、海洋性自然毒による食中毒が発生するリスクが高く、食中毒起因マリトキシンの迅速スクリーニング法を確立することは、食中毒の迅速な原因究明及び拡大防止の観点から、必要性の高い研究であった。 ・効率性 A 他の研究機関との連携により、効率的な研究体制が構築できた。生体試料中のマリトキシンの機器分析法については確立できなかったものの、自然毒精密質量ライブラリー作成については目標以上の物質データベースが作成できており、効率性は高い。

きた。その中でも、通常では標準品の入手が非常に難しい自然毒標品について、目標を上回る 47 物質の収集及び LC-QTOF 分析し、データベース作成のための分析情報取得ができた。

しかしながら、全国的に稀有で長崎県特有のキンシバイ貝中毒を優先して解析したことが理由では有るが、当初予定していた PTX の生体試料中の機器分析法については、事例・生体移行情報が殆ど無いこと、感度等技術的な問題の解決を効率的に進められず、確立まで至らなかった。

・有効性 A

行政との連携は、研究終了後の適応を想定していたが、研究立ち上げから終了まで海洋生物起因の化学性食中毒が発生し、研究と行政依頼検査を併行して実施する、より実践的な研究活動となった。

特に、全国で 3 例、その内 2 例が長崎県で起きている稀有で長崎県特有の有毒巻貝(キンシバイ)食中毒事例について、研究項目①②の成果を適用することで、主要な毒成分の TTX だけでなく、毒性のある TTX 類縁体の関与を解明できた。加えて今まで殆どデータの無い中毒発生から意識回復までの患者血清中のテトロドトキシン経日的プロファイルも取得でき、今後の同様事例発生の際の参考となる知見を得ることができた。当該成果は、日本食品衛生学会及び水産学会国際シンポジウムで発表するとともに、食品衛生学会誌に論文発表し、食品衛生学分野の発展への有効性が評価され論文賞を受賞し、長崎県だけでなく広く情報発信し、TTX 研究分野の推進に貢献できた。

研究項目③については、PTX と PTX 様物質の類似の有害活性をターゲットにした培養細胞株を用いる検出法のプロトタイプが構築できた。これは、PTX 検出だけでなく、構造不明の PTX 様物質検出法として、将来アオブダイ等の中毒の知見を得るのに有効な手段になることが期待できると考える。

以上、各研究項目の成果指標について、目標に対する成果は、一部研究項目②について、上記巻貝中毒の解析を優先したため見直しを行ったが、ほぼ目標を達成した。なお、アオブダイ 10 検体は多方面の協力により効率よく収集できたが、PTX もしくは PTX 様物質の含有が疑われる検体は無かった。今後も引き続き本研究で確立した手法で調査を続ける。

・総合評価 A

健康危機管理対策は、細菌、ウイルス及び化学物質が原因で起こりうる食中毒による健康被害を未然に防止し、県民の健康維持や食の安全・安心の確保のために必要な県生活衛生行政施策の一つである。

本研究では、発生すると危篤性の高い化学性食中毒、特に海洋県長崎県で起こりうるマリントキシンの検査体制の基盤整備に繋がる成果が得られた。今後

・有効性 A

他機関では実施されていない分析法の確立や、臨床検体を用いたテトロドトキシン濃度の経日的プロファイルの取得など、新たな知見が得られた。

・総合評価 A

食中毒原因を迅速に特定・推定するための自然毒精密質量ライブラリーの作成、機器分析によるテトロドトキシン及びパリトキシンの迅速分析法の確立により、マリントキシンの検査体制の基盤整備につながる研究成果が得られており、概ね計画を達成した。

	<p>更に当該分野の研究を進めることで、迅速な原因究明と有害性の把握、健康被害の拡大防止体制の強化が期待でき、県民の安心で安全な生活を実現できると考える。また、将来的には、衛生化学分野での当該技術は、安全で信頼できる県内水産物の供給体制の確保、リスク管理へのつながりも期待できる。</p>	
	対応	対応