

# Na<sup>+</sup>チャンネル阻害物質測定用センサの実用化に向けた基礎条件の検討

仲手川 恒・臼井 一茂

Fundamental Study on Tissue Biosensor for Determination Na<sup>+</sup>channel Blocker

Hisashi NAKATEGAWA\*, Kazushige USUI\*

## はしがき

アサリやマガキなど食用二枚貝が毒化し、麻痺性貝毒の原因となる渦鞭毛藻類のプランクトンは、近年全国で発生が確認され、その発生海域も広域化傾向にある。

また、毒化した貝類が流通しないように、年間数十件の出荷規制が行われ<sup>1,2)</sup>、漁業生産に大きな被害を及ぼすことがある。

本県では二枚貝の漁業生産は盛んではなく、また貝毒原因プランクトンの大量発生等が周辺海域で確認されていないこともあり、貝類の毒化現象の報告は見られない。しかし、東京湾は国内でも最大級の赤潮発生海域とされ<sup>3)</sup>、相模湾も発生件数は増加傾向にあり、近年、本県でも二枚貝類の養殖試験を実施している地区もあることから、今後貝毒原因プランクトンの発生による毒化現象が懸念される。

現在、貝毒の検査にはマウス法やHPLC法等が使われているが、漁業生産現場において毒化前にその傾向を把握でき、極微量の毒を簡便且つ迅速に測定できる装置の開発が求められている。

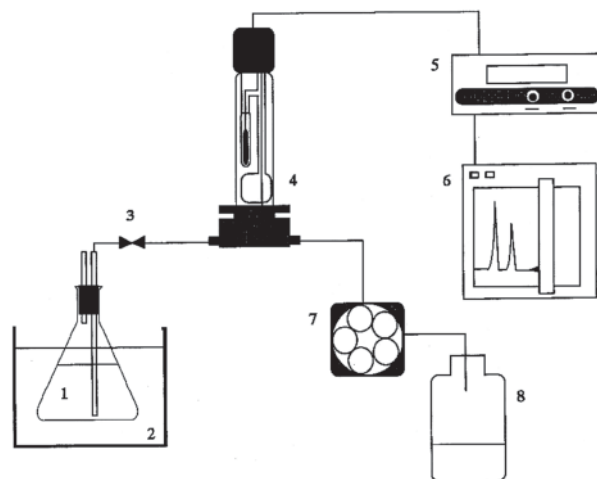
麻痺性貝毒であるサキシトキシン等は、生体膜に含まれるNa<sup>+</sup>チャンネルの機能阻害を起し、Na<sup>+</sup>の透過を妨げる。特にカエルの膀胱膜にはNa<sup>+</sup>チャンネルが多数存在することが知られており、入手が容易であり大きく取り扱い易いことから、カエル膀胱膜を用いたバイオセンサでの測定が試みられている<sup>4)</sup>。その特徴として、極微量の貝毒が測定可能であることから、貝毒原因プランクトンの初期出現の早期発見や、大量発生等の予知が可能と考えられる。

本報は、測定法として確立していないNa<sup>+</sup>チャンネル阻害物質測定機器の開発に向けて、センサの実用化のための最適な測定条件について検討した。

## 方 法

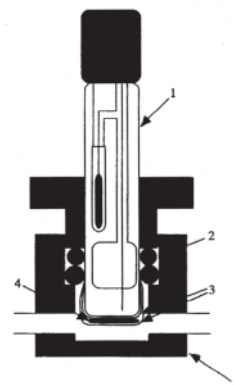
Na<sup>+</sup>チャンネル阻害物質測定用センサは、Naイオン電極、塩分濃度計、エレクトロメーター、レコーダー、マイクロチューブポンプから構成され(図1)、千<sup>4)</sup>の報

告と異なりNa電極には、セルロース膜を付けずに膀胱膜をセンサに広げて装着し、Oリングで固定してフローセルに装着した(図2)。また、装置全体を静電マット上に配置し、株式会社イオン電極研究所社製の改良型エレクトロメーターを使用した。



1. 緩衝液 2. 恒温槽 3. 注入口 4. Na<sup>+</sup>電極 5. エレクトロメーター  
6. レコーダー 7. ペリスタポンプ 8. 廃液槽

図1 Na<sup>+</sup>チャンネル阻害物質測定用センサシステム



1. Na<sup>+</sup>電極 2. Oリング 3. 透析膜 4. カエル膀胱膜 5. フローセル  
図2 Na<sup>+</sup>センサ電極

カエル膀胱膜は、国産の食用ウシガエルを飼育し、その都度撲殺し膀胱膜を取り出した。保存液はNaCl 16.87g、1M KCl 2.5ml、0.1M CaCl 220ml、0.5M HEPES 4ml、0.003% NaN<sub>3</sub>を混合し、NaOHでpH7.2に調製したものを、カエルの生息温度（常温）に調製し脱血処理を行った。緩衝液はNaCl濃度の異なる1、3、5、8%に0.1MのCH<sub>3</sub>COOHを含む溶液を用いた。pHはNaOH及びKOHによりpH5.0に調製した。測定時には、緩衝液の液温を30℃にし、流速を0.8ml/minとした。試料は（財）日本食品分析センター製造の貝毒標準品のneoSTXを用い、50μlのマイクロシリンジで送槽チューブに注射し測定を行った。

## 結 果

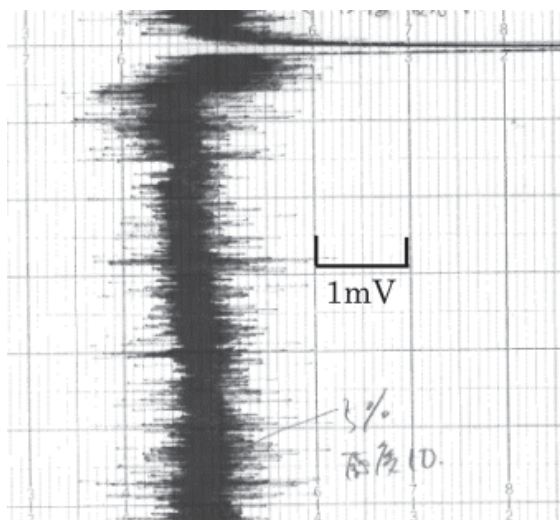
### 1. 膀胱膜の機能維持

ウシガエルの膀胱膜は温度変化に敏感であり、保存液との温度差が大きいと白濁や縮みが生じるため、センサとして用いることは不可能であった。そこで、室温の保存液に3～5時間ほど浸漬し膀胱膜の脱血を促進することにより、薄く広げてNaセンサに装着することが可能と

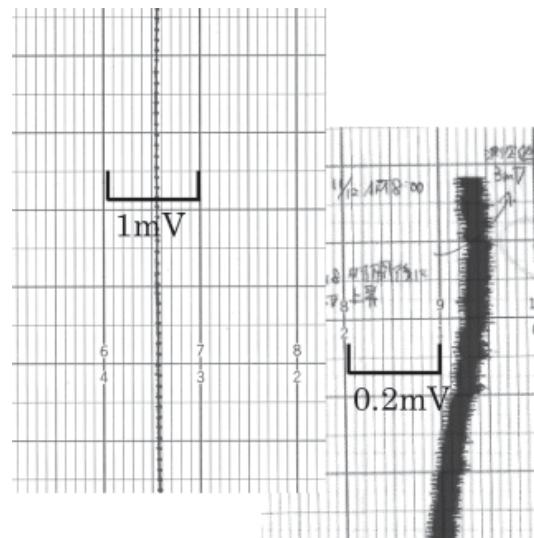
なった。また、センサを緩衝液が通過するフローセルに取り付けた後、測定値のベースラインが安定するまでに数時間を要した。一方、緩衝液内にCaや防腐処理のためのNaN<sub>3</sub>を加えると、Naの排出によるものと思われるセンサ値の低下が速やかに起こり、測定センサとしての機能を果たさなくなった。上記の条件により抽出を行っても、カエルの生理状態等により検出不能となる場合があった。

### 2. ベースラインの安定化

膀胱膜の内外の電位差を測定するガラス電極は、微量の電気を検知する性質を持つため、測定値の出力機器や緩衝液の温度調整に用いる電気機器等の影響を大きく受けた。さらに、実験室内の湿度低下により発生する静電気の影響も見られた。そこで対処として装置自体を静電マット上に据え置き、電極部分を絶縁処理した改良型エレクトロメーターを使用した。電極ベースラインの振幅の平均値は2mVから0.08mVに縮小し（図3）微量濃度の検知に必要な0.1mVを下回った。また、緩衝液のpH調整にNaOHを用いるとベースラインが不安定になる場合が生じたため、安定していたKOHを用いることとした。



従来：振幅範囲 2mV



改良：振幅範囲 0.08mV

図3 装置の改良に伴うベースラインの安定化

### 3. 緩衝液の調整

緩衝液の塩分濃度調整及びKOHによるpH調整を行い、試料としてneoSTXを測定したところ、塩濃度の異なる2種類の緩衝液によって、定量的な測定を行うことができた。第一に5% NaCl-0.1M CH<sub>3</sub>COOH (pH5.0) 緩衝液により、neoSTXが33.5～335fM/Lの濃度範囲で測定できた。また、8% NaCl-0.1M CH<sub>3</sub>COOH (pH5.0) 緩衝液により、neoSTXが3.35～33.5fM/Lの濃度範囲で測定できた。それぞれの測定結果を図4、5に示す。2種類の緩衝液による測定において、濃度と検出値との間に高い相関を得ることができR<sup>2</sup>乗値は0.9を超えていた。

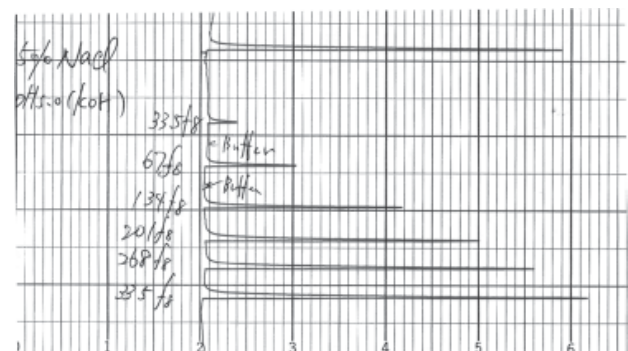


図4 強度の異なる毒に対する検出状況

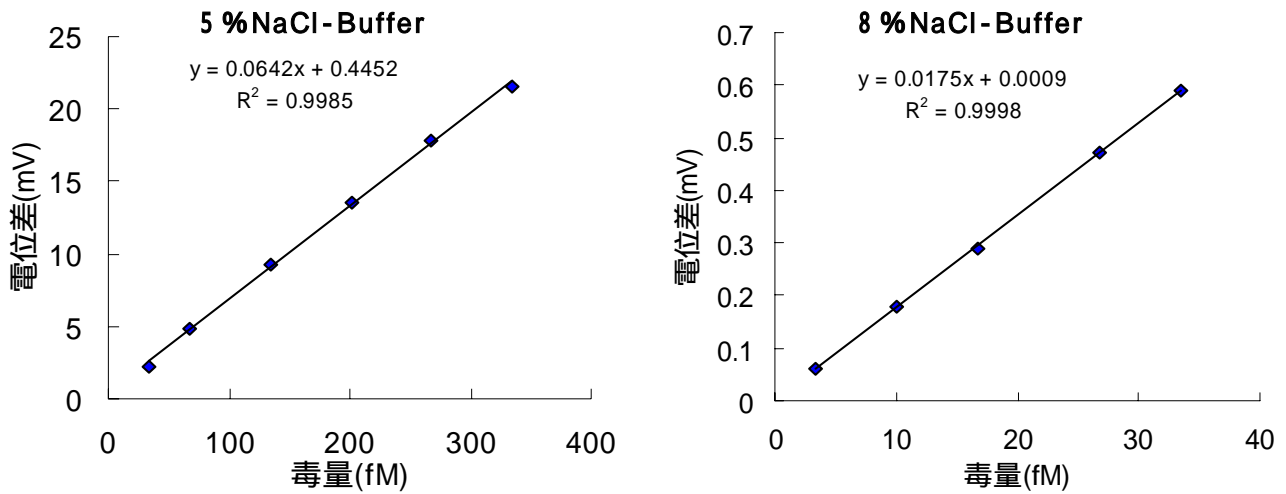


図5 毒量と電位差の関係（左：5%NaCl緩衝液使用時、右：8%使用時）

### 考 察

これまでに、カエル膀胱膜を利用したセンサの開発は、複数の研究者により取り組まれてきた。千<sup>4)</sup>は緩衝液の調整により5 fg (fg = 10<sup>-15</sup>g) という極めて微量の毒量を繰り返し測定することに成功しており、膀胱膜の長期保存についても検証している。しかしながら、再現的な測定に課題が残っており、他の機関でも成功の事例は乏しい。本報は、装置の実用化に向けて、Na<sup>+</sup>チャンネル阻害物質の検出条件の再構築に取り組み、低濃度のneoSTXの検出に成功した。

装置に用いたガラス電極は、その特性として微量の静電気に大きく反応するため、湿度が低下した際に発生する静電気や装置に用いた機器等の影響を受け、ベースラインの振幅が大きくなりノイズが現れていた。今回、装置自体を静電マット上に据え置き、電極部分の絶縁処理を施した改良型エレクトロメーターを用い、接続するコード等にも同様の処理を施すことにより、ベースラインの安定化が図られ検出条件を向上させることができた。今までの測定では、ベースラインの安定度は湿度等の外的な環境条件に大きく左右されることがあり、測定値の変化がノイズよりも小さいと、検出不能となる場合があった。しかし、この改良を施すことにより微細な電位差の識別が確認でき、微量のneoSTXの検出が可能となった。

冬眠時期の体色が黒いカエルや、感染症等が原因で皮膚に内出血を起こしたカエルでは、neoSTXの測定が不可能であり、これはNa<sup>+</sup>チャンネルが正常に反応していないためと思われる。個体差が第一の原因ではなく、センサに装着し緩衝液を流すまでに、Na<sup>+</sup>チャンネルの立体構造が変化又は破壊され、Naの透過が阻害されたことが原因と考えられる。この立体構造の変化を把握するために、摘出前にNa<sup>+</sup>チャンネルに阻害物を付着させ機能を保持した構造で摘出し、緩衝液の塩濃度変化等により脱着させることが考えられる。阻害物としてneoSTX等

の毒を用いることもできるが、標準品の入手が困難なため代用品としてウアバイン等の利用を試みることが考えられる。仮に用いる膜によって反応の有無が生じるとすれば、本抽出法の実用化は難しい。反応条件の更なる吟味を行うと同時に、Na<sup>+</sup>チャンネルの指標化による機能点検を行う等の方法を検討し、常時センサとして使用可能なものとしていくことが必要である。

千<sup>4)</sup>の報告では、セルロース膜を膀胱膜の両面に挟み込んで試験を行っているが、セルロース膜だけを装着し、緩衝液にNa濃度の異なる緩衝液を注入したところ、Naセンサの反応が極端に低下したので、直接膀胱膜を装着することとした。しかし、微生物等からの保護ができないために、センサの寿命が極端に短くなり、同報告では数日間の測定が可能であるのに対し、今回は2日間しか測定はできなかった。超音波を用いた流路及び緩衝液の洗浄を行い、更に新たな保護法を策定し組み合わせることにより、測定期間を徐々に延長していくことは可能と考えている。

本研究では、千<sup>4)</sup>の報告と同レベル濃度の毒の検出と、相関の高い検量線の作成に成功した。しかし、時期により検出が困難な場合も見受けられ、より安定した測定条件の確立が必要である。本装置が実用化されると、貝毒プランクトンやフグ毒の簡便、迅速な測定手法が確立し、食品衛生分野に大きく貢献できるものと思われる。また、未利用海藻や、漢方薬の原料となる陸上植物を測定することで、神経細胞を刺激する未知の生理活性物質の発見に繋がる可能性も有り、医薬分野における応用的な利用も考えられる。

### 摘 要

麻痺性貝毒の原因となる貝毒プランクトンは全国各地で発生しており、アサリやマガキといった濾過食性の二枚貝類の毒化を引き起こす。毒化が基準値を超えると出荷規制が実施され、風評被害も加わり、二枚貝類漁業生

産に与える影響は大きい。貝毒プランクトンに含まれる毒は、Na<sup>+</sup>チャンネルの機能阻害を引き起こすことから、Na<sup>+</sup>チャンネルを高密度に含みかつ伸展性に富む、カエル膀胱膜を用いたNa<sup>+</sup>チャンネル阻害物質測定用センサが考えられている。しかし、現在までのところ実用化には至っていない。そこで、このセンサの実用化に向けた測定手法として、緩衝液の塩濃度、pH等の検討を行ったところ、neoSTXでは3.35 ~ 335 fMの間において、2種類の塩濃度の緩衝液で測定が可能であることが明らかになった。また、この手法の検出感度は高く、現在主流となっているマウスアッセイ法やHPLC法等よりも、簡便、迅速に極微量の試料を測定できることから、有害プランクトンの初期発生時の検出機器及び、食品中のTTXやSTX等の毒性測定機器等としての利用の可能性が示唆された。

#### 謝 辞

本研究の実施にあたり、種々ご教示いただきました東京水産大学の渡辺悦生教授に厚くお礼申し上げます。

#### 引用文献

- 1) 大島 泰克(1982): 有毒プランクトン - 発生・作用機構・毒成分, 恒星社厚生閣, 73-87.
- 2) 独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所(2002): 平成13年度漁場環境保全関係試験研究推進会議赤潮・貝毒部会議事要録.
- 3) 清水 誠(1997): 水産生物, 東京湾の生物誌, 築地書館, 24-44.
- 4) 千 柄洙(1998): カエル膀胱膜を利用したNa<sup>+</sup>チャンネル阻害物質測定用組織センサの開発とその応用に関する研究, 東京水産大学博士論文, 1-58.