

201131049A

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

食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池原 強

平成24(2012)年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告		
食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究	-----	1
池原 強		
II. 分担研究報告		
1. 食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究	-----	1 2
安元 健		
2. 沖縄産シガテラ魚の毒蓄積実態に関する研究	-----	1 5
玉那覇 康二		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	2 9
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	3 0

# I. 総括研究報告

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）  
（総括）研究報告書

食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究

研究代表者 池原 強 長崎大学 客員研究員

研究要旨

シガテラはサンゴ礁域に生息する魚類に起因する自然毒食中毒であり、年間2～6万人の被害が推定されている。我が国では沖縄県で多く発生しており、近年は他県での発生も増加している。また、輸入魚の検査に分析法が必要となるが、定量法開発に必要な標準毒のないことが障害となっていた。さらに、原因毒のシガトキシン類（CTXs）は、渦鞭毛藻によって生産され、食物連鎖によって移行するので、個体変化と地域差が大きく、有毒魚の蒐集も困難だった。そこで、本研究では、シガトキシン毒組成既知の標準毒混合試料と主要成分の精製標準毒を作製し、LC・MS/MS分析法によるCTXsの同定・定量法を確立する事を目的とする。

平成23年度は以下の4項目の検討を行った。①シガテラ毒魚の蒐集：シガテラ魚は大型の肉食魚が有毒率・毒力ともに高いとされるので、各漁協、卸売業者などに依頼し、バラフェダイ、バラハタなどの大型個体を中心に蒐集した結果、全魚種総個体数54個体、総重量約330 kgのシガテラ魚を確保した。②シガテラ魚の処理法の検討：シガトキシン類が熱安定性なことに着目して、魚体を丸ごとオートクレーブ処理し、筋肉部位を骨・皮から分離する方法を検討した。その結果、従来の生鮮筋肉使用の場合と比べ、解凍や筋肉回収のための時間が4～5分の1程度に短縮され作業効率を著しく高めることができた。また、オートクレーブ処理試料でも、シガトキシン類の損失や組成変化に問題はなく、筋肉各部の含量に大差がないことを確認した。③シガテラ毒の有無の検査：蒐集した魚40個体について、オートクレーブ処理後、筋肉部位各5 gから抽出・簡易精製し、LC・MS/MSによるCTXs分析を行った。その結果、CTXsが検出された個体数は37個体（92.5%）であった。魚種・サイズを限定したことで、CTXs標準毒混合試料作製に必要な原材料を効率よく確保することが出来た。④試料作製の検討：沖縄産シガテラ魚主要成分であるこれら3成分を含む抽出物を順次作製・蓄積している。精製法としては、溶媒分配後のフロリジル、C18逆相カラム処理

が有効なことを確認した。さらに2・3回のカラムクロマト処理を追加すれば、混合毒標準品としての使用が可能な純度に到達している。この研究によって、シガテラ中毒診断の確定、有毒固体のスクリーニング、食物連鎖解明、さらには、輸入魚や魚肉加工品の検査が可能になり、国内試験研究機関への供給や、中毒検体の抽出液を分析機関に送ることで迅速な分析が可能になることから、シガテラ研究、中毒予防・診断に貢献できる。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

安元 健  
日本食品分析センター・学術顧問

玉那覇 康二  
沖縄県衛生環境研究所・衛生科学班長

研究協力者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

吉野 敦  
(株)トロピカルテクノセンター・部員

廣瀬 美奈  
(株)トロピカルテクノセンター・部員

與儀 健太郎  
(株)トロピカルテクノセンター・研究補助員

佐久川さつき  
沖縄県衛生環境研究所・主任研究員

大城 直雅  
沖縄県環境生活部・主任技師

## A. 研究目的

熱帯・亜熱帯域の魚類は、食物連鎖を介して有毒渦鞭毛藻が産生する毒シガトキシン

類 (ciguatoxins、CTXs) を蓄積し、食中毒 (シガテラ) の原因となる。国内では、従来の主発生地である沖縄から九州・本州沿岸域にまで拡大しており、食品衛生上の問題となっている。世界的にも水産物流通の拡大・多様化によって発生地が拡大し、推定患者数は毎年 2~6 万人に達している。シガテラ分析は、我が国を含む多くの国でマウス毒性試験法が用いられているが、問題が多いため機器分析などへの移行が望まれている。しかし、CTXs 標準品の入手が困難であるため、代替法の研究および普及が進まないのが現状である。本研究の目的は、CTXs 毒組成既知の標準毒混合試料と CTXs 主要成分の標準毒を作製し、LC-MS/MS 分析法による CTXs の同定・定量法を確立することにある。

## B. 研究方法

以下の 4 項目の検討を行った。

### ① シガテラ毒魚の蒐集

沖縄で発生した化学性食中毒の 7 割がシガテラであり、すべて食物連鎖高位の肉食魚で発生している。これまでの知見では主にバラフェダイ、バラハタ、イッテンフエダイ、

アカマダラハタによる食中毒事例が多いので、これらの魚種を中心に蒐集し、入手の難易、有毒個体出現率、毒含量、毒組成を解明し、原料としての適否を判定した。今回は、有毒魚を効率的に蒐集するために各漁協、漁連、卸売業者や釣具店（釣り愛好者）などに依頼し、以下の魚種の大型個体（重量限定）を中心に蒐集を行った。

- ・ イッテンフエダイ（1kg 以上）
- ・ バラハタ（2kg 以上）
- ・ バラフエダイ（4kg 以上）
- ・ アカマダラハタ（10kg 以上）
- ・ コクハンアラ（5kg 以上）
- ・ イシガキダイ（3kg 以上）

#### ② シガテラ魚の処理法の検討

蒐集した魚は、処理・測定まで冷凍庫（-30℃）で保存し、鱗・皮・骨の効率的除去法、内臓、背部・腹部・尾部筋肉等の抽出への適性等の処理法について検討した。

#### ③ シガテラ毒の有無の検査

魚肉試料の一部を抽出し、固相抽出による前処理後に LC-MS/MS 分析を行って CTXs 保有個体の選別を行った。

#### ④ 試料作製の検討

シガトキシン類抽出・精製法の改善を図り、かつ、作出標準品の形態を各成分の単品とするか高度精製混合品とするかについて検討を行った。

### C. 研究結果

#### ① シガテラ毒魚の蒐集

シガテラ魚は大型の肉食魚が有毒率・毒力ともに高いとされる。今回は、有毒魚を効率的に蒐集するために各漁協、漁連、卸売業者などに魚種、サイズを限定して依頼し、以下に示す魚種、個体数のシガテラ魚を確保できた。

- ・ バラフエダイ 18 個体（総重量 118.1 kg）
- ・ バラハタ 13 個体（総重量 33.9 kg）
- ・ アカマダラハタ 6 個体（総重量 70.5 kg）
- ・ コクハンアラ 5 個体（総重量 41.4 kg）
- ・ その他（イッテンフエダイ、イシガキダイなど） 12 個体（総重量 70.5 kg）

全魚種総個体数 54 個体、総重量 334.4 kg のシガテラ魚を蒐集した。魚種、個体別の重量を表 1 に示す。次年度以降の蒐集に向けて漁業者との連携も確立した。

#### ② シガテラ魚の処理法の検討

従来は、冷凍保存されたシガテラ魚を流水解凍後に解体して骨、鱗、皮等を取り除き、抽出材料となる筋肉部位を回収していた。今回、シガトキシン類が熱安定性なことに着目して、魚体を丸ごとオートクレーブ処理（120℃、3 時間）し、筋肉部位を手でほぐして回収する方法を検討した（図 1）。その結果、従来法の生鮮筋肉使用の場合と比べ、解凍や筋肉回収のための時間が 4～5 分の 1 程度に短縮され作業効率を著しく高めることができた。また、オートクレーブ処理試料でも、問題無くシガトキシン類を検出可能であること及び筋肉の腹背尾部の含量に大差がないことを確認した。さらに、加熱による

蛋白の変性は、抽出液の減圧濃縮時の発泡や溶媒分配時のエマルジョン形成を減少させ、大量処理に効果的であった。

### ③ シガテラ毒の有無の検査

蒐集した魚 40 個体について、オートクレーブ処理後、筋肉部位各 5 g を抽出・簡易精製し（抽出・精製スキームを図 2 に示す）、LC-MS/MS による CTXs 分析を行った。その結果、CTXs が検出された個体数は 37 個体（92.5%）であった。魚種別では、バラフエダイでは 14 個体中 13 個体（92.9%）に CTXs を検出し、そのうち 8 個体（57.1%）はマウス法で陽性に達する毒量の CTX1B が含まれていた。また、バラハタ、アカマダラハタでは、それぞれ 13 個体中 12 個体（92.3%）、6 個体中 6 個体（100%）に CTXs を検出、うち 8 個体（61.5%）、4 個体（66.7%）にマウス法で陽性に達する毒量の CTX1B を認めた。

### ④ 試料作製の検討

沖縄産シガテラ魚は CTX1B 同族体を持つことが解明されているが、今回蒐集したシガテラ魚も同じ毒組成であることを確認し、主要成分である CTX1B、52-*epi*-54-deoxyCTX1B、54-deoxyCTX1B を含む抽出物を順次作製・蓄積している。また、毒成分比率は魚種特異的であることの確証を得たので、これを踏まえ精製および標準毒混合試料の調製を行う。CTXs 毒組成と含量が決定された標準毒混合試料作製に適した抽出、精製法としては、溶媒分配後の、フロリジル、C18 逆相カラム処理が有効なことを確認した。抽出・精製スキームを図 3 に示

す。さらに 2-3 回のカラムクロマト処理を追加すれば、混合毒標準品としての使用が可能な純度に到達している。次年度以降は処理量を拡大し、各機関への長期間の供給を可能にする。標準毒の重量検定は最も困難な課題であるが、蛍光比色法で解決できる見込みである。

## D. 考察

今回、蒐集魚の魚種・サイズを限定したことで、CTXs 標準毒混合試料作製に必要な原材料を効率よく確保することが出来た。本標準毒混合試料を活用した LC-MS/MS 分析法は、迅速、高精度、高感度な多成分一斉分析を可能にする。また、検体量が少なくてすみ、検液の調製・郵送も簡易に行えるので、これまで検出困難だった食中毒発生時の少量検体でも対応可能となる。標準毒混合試料の使用によって、シガテラ中毒原因の確定、有毒個体のスクリーニングが可能になるばかりでなく、現在は未解明な九州・本州沿岸部での食物連鎖関連毒化要因の追跡、動物実験による吸収・代謝等の動態解析が可能になる。

また、海外では輸入冷凍魚にシガテラ毒汚染によると疑われる被害が出ているが、我が国でこれまで実施が困難だった輸入魚や魚肉加工製品の実際検査が可能となる。毒組成の地域差の解明は、将来予想される ELISA 法の適否の判断資料として重要であろう。シガテラ毒による食中毒予防と中毒の拡大防止全般に大きく貢献することが期待できる。

## E. 結論

平成 23 年度は、54 個体(総重量 334.4 kg)のシガテラ魚を蒐集した。抽出・精製のためのシガテラ魚の処理法を検討し、従来の 4～5 分の 1 程度に処理時間を短縮するなど、作業効率を著しく高めることができた。蒐集した魚 40 個体について、筋肉部位各 5 g から抽出液を作製し、LC-MS/MS による分析を行った結果、37 個体 (92.5%) で CTXs が検出されたことから、CTXs 標準毒混合試料作製に必要な原材料を効率よく確保することが出来た。CTXs 毒組成と含量が決定された標準毒混合試料作製に適した抽出、精製法としては、溶媒分配後のフロリジル、C18 逆相カラム処理が有効なことを確認した。さらに 2-3 回のカラムクロマト処理を追加すれば、混合毒標準品としての使用が可能な純度に到達している。次年度は処理量を拡大し、純度の向上及び各成分の重量検定法の検討を行うと共に、各試験研究機関への供給を可能にする。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 與儀健太郎, 大城直雅, 佐久川さつき, 平間正博, 安元健. 「標準毒の作出・使用による国内シガテラ魚の精密分析と魚種・地域特性の解明」第 53 回天然有機化合物討論会講演要旨集 pp.445-450 (2011)

##### 2. 学会発表

- 1) 佐久川さつき、與儀健太郎、大城直雅、池原強、玉那覇康二、平間正博、安元健 「LC-MS/MS によるシガトキシン類の分析とシガテラ魚の毒組成について」第 102 回日本食品衛生学会 2011.9.30 (秋田)
- 2) 與儀健太郎、池原強、佐久川さつき、大城直雅、平間正博、安元健 「沖縄産シガテラ魚の毒組成と標準試料作製の検討」平成 24 年度日本水産学会春季大会 2012.3.29 (東京)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



魚種	個体重量	採集地	備考
アカマダラハタ	11.5kg	宮古・八重山	オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 201g 筋肉 2490.3g
	13kg		オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 124g 筋肉 3681.7g
バラハタ	2.2kg	宮古・八重山	オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 16g 筋肉 869.6g
	2.4kg		オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 7.1g 筋肉 977.4g
	2.2kg		オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 16g 筋肉 826.6g
	2.5kg		オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 13.4g 筋肉 917.2g
	4.2kg		オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 14.6g 筋肉 1466.7g
	3.0kg		オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 42.3g 筋肉 1173g
バラフエダイ	9.2kg	宮古・八重山	オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 69.4g 筋肉 2725g
	5.7kg		オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 57g 筋肉 1875g
	10.6kg		オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 104.5g 筋肉 2391.1g
バラハタ	2kg	宮古・八重山	オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 16.5g 筋肉 690.5g
イッテンフエダイ	1.2kg	与那城	オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 9.7g 筋肉 463.3g
コクハンアラ	5.82Kg	宮古・八重山	11-cig-001(5.82Kg)切り身にして保存
	6.6Kg		11-cig-002(6.6Kg)切り身にして保存
	5.86Kg		11-cig-003(5.86Kg)切り身にして保存
	8.7Kg		11-cig-004 切り身にして保存
バラフエダイ	2.3kg	伊江島	オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 10g 筋肉 1070g
バラハタ	3kg	国頭	オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 31.9g 筋肉 968.4g
バラハタ	2.6kg	慶良間・宮古・八重山	オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 20.2g 筋肉 1020.6g
バラハタ	2.5kg	慶良間・宮古・八重山	オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 10.7g 筋肉 864.6g
バラハタ	2.4kg	慶良間・宮古・八重山	オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 25.3g 筋肉 912.5g
バラハタ	2.8kg	慶良間・宮古・八重山	オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 13g 筋肉 935.4g
バラハタ	4.1kg	慶良間・宮古・八重山	オートクレーフ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 29.4g 筋肉 1516.6g

表 1-1 シガテラ魚蒐集リスト

魚種	個体重量	採集地	備考
クロホシフエダイ	1.3kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 44g 筋肉 476.9g
	0.8kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 5.1g 筋肉 333.8g
	1.2kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 16.6g 筋肉 526.2g
	1.2kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 10.6g 筋肉 536.3g
	1.5kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 9.2g 筋肉 671.9g
イシガキダイ	3.6kg	宮古・八重山	オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 33.0g 筋肉 770.9g
バラフエダイ	8.4kg	平安座	オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 108g 筋肉 2912g
ミーバイ (ユダヤ)	13.9kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 127.1g 筋肉 4380g
ミーバイ (ユダヤ)	14.1kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 160.1g 筋肉 4545.3g
赤仁ミーバイ	9.6kg	宮古・八重山	オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 34.2g 筋肉 3815.6g
バラフエダイ	6.0kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 22.8g 筋肉 1692.2g
イッテンフエダイ	1.3kg	国頭・安田産	オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 5.3g 筋肉 487.8g
バラフエダイ	8.5kg	国頭・安田産	オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 61.3g 筋肉 2580.8g
バラフエダイ	4.8kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 44.5g 筋肉 1647.4g
	7.5kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 47.7g 筋肉 2173.8g
	8.4kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 51.5g 筋肉 2618.3g
	5.9kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 14g 筋肉 2461.4g
	7kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 19.6g 筋肉 1834.4g
	5.3kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 37.9g 筋肉 2131.2g
	8.4kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 22.7g 筋肉 2610.3g
	4.7kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 27.8g 筋肉 2013.1g
ゴマフエダイ	8.6kg		オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 54.5g 筋肉 3022.1g
イシガキダイ	3.3kg		A C処理済 肝臓 27.6g 筋肉 939.7g
	3.7kg		A C処理済 肝臓 23.3g 筋肉 1219.5g
アカマダラハタ	5kg	慶良間	オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 62.1g 筋肉 1805.9g
	13kg	慶良間	オートクレーブ <sup>®</sup> 処理済 肝臓 64.9g 筋肉 3846.9g

表 1-2 シガテラ魚蒐集リスト



図1 シガテラ魚のオートクレープ処理と筋肉部位の回収

シガテラ魚分析サンプルの調製

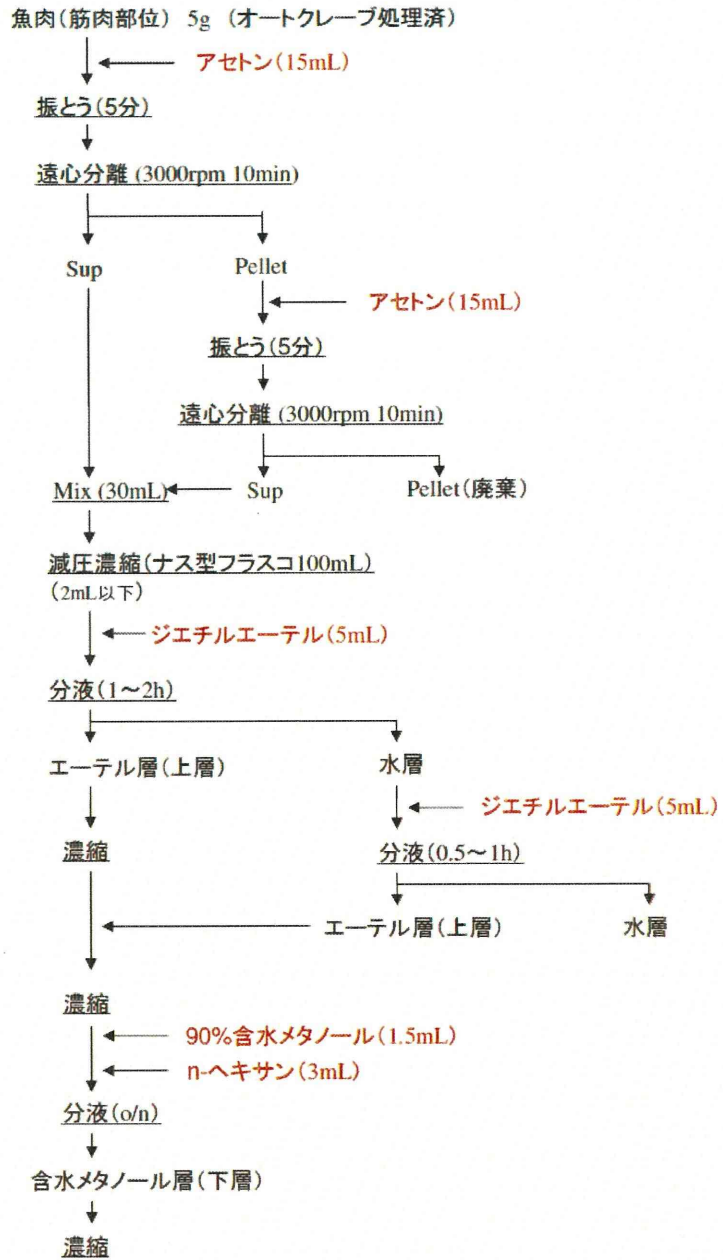


図 2-1 魚肉試料からの CTXs 分析サンプル調製法

### 粗抽出物のLC-MS/MS分析用前処理

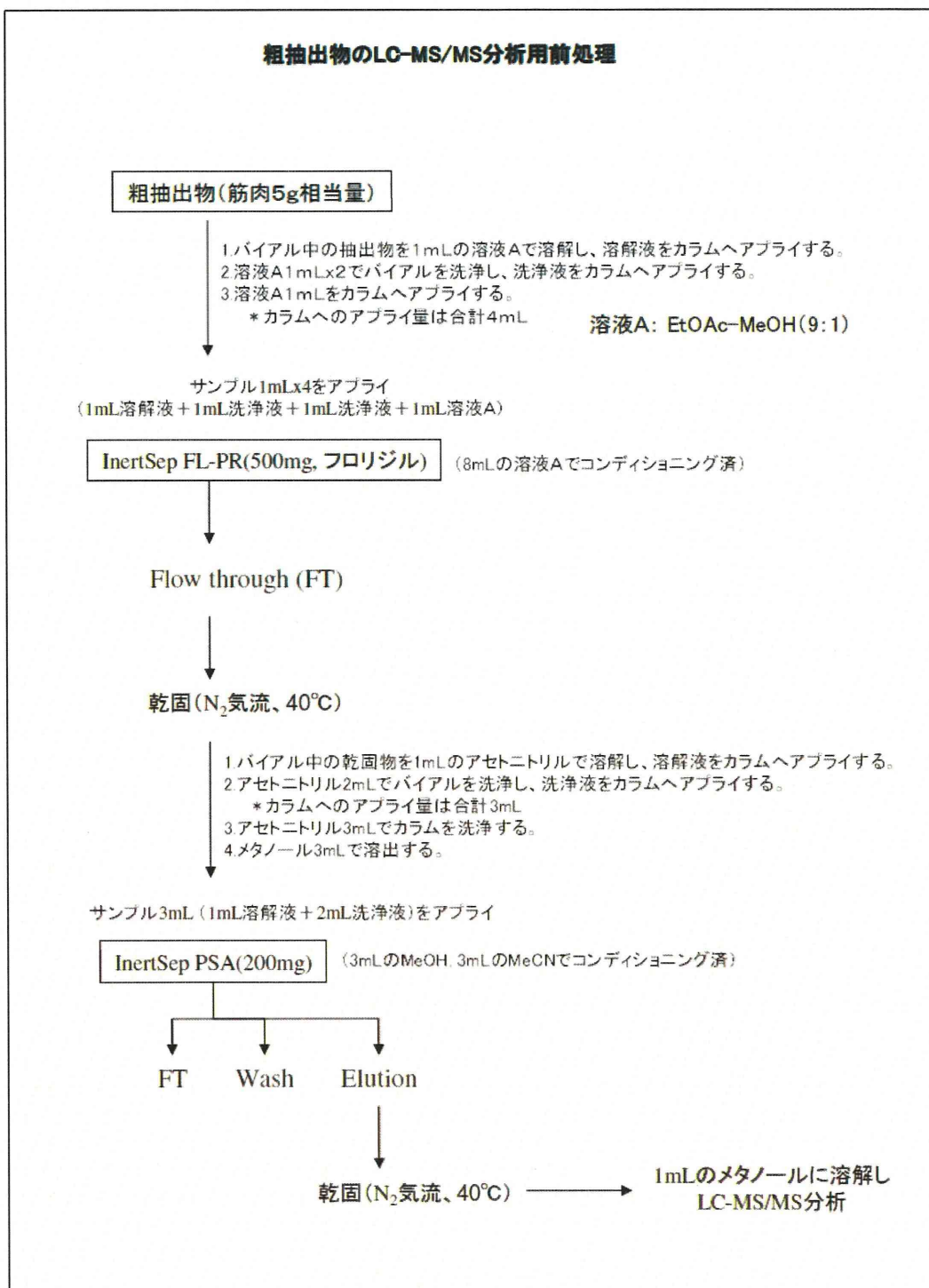


図2-2 魚肉試料からのCTXs分析サンプル調製法

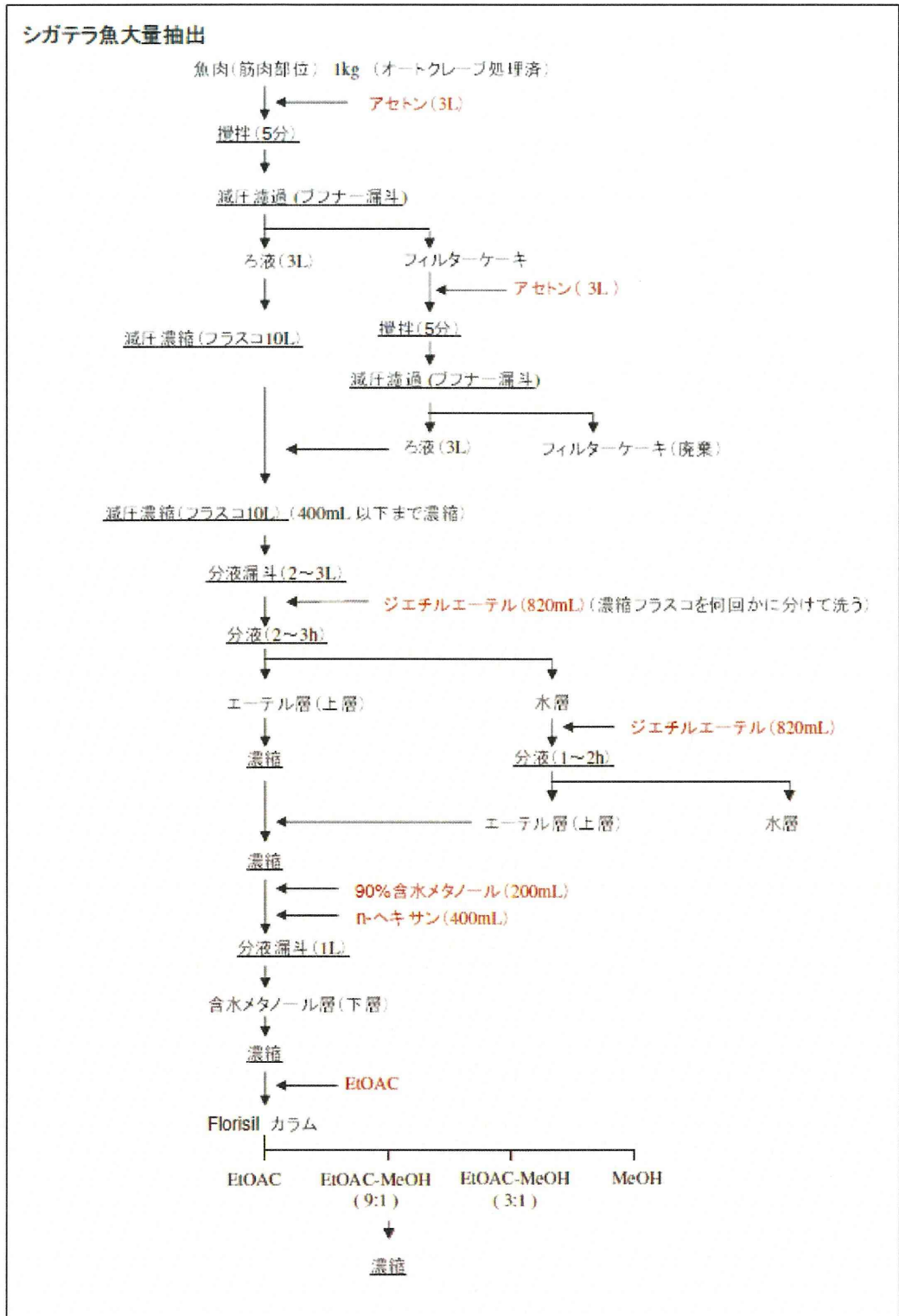


図3 シガテラ魚筋肉試料からの CTXs の大量抽出・精製スキーム

## II. 分担研究報告

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）  
分担研究報告書

食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究

研究分担者 安元 健 財団法人 日本食品分析センター 学術顧問

研究要旨

サンゴ礁域の魚類に蓄積される毒シガトキシン類について、LC-MS/MS 分析法による同定・定量法の確立および普及を目指して、標準毒調製の検討を行った。主に必要とされる標準毒は魚類中に存在するので、シガテラ魚を蒐集し標準毒の原料とした。各個体の毒組成および毒含量を明らかにし、抽出処理法に改良を加えて主要シガテラ毒を含む抽出物を作製した。さらに、混合標準品として使用可能にするため、精製を進め純度の向上を図った。

A. 研究目的

南方産魚類が食物連鎖を介してシガトキシン類(CTXs)を蓄積し、食中毒を惹起するシガテラは、自然毒起因の食中毒としては世界最大の規模(2-10 万人/年：CDC)である。日本国内では主要発生地は沖縄から九州・本州沿岸部へと拡散傾向にあり、対策の重要性が指摘された(2008 年日本水産学会春季大会)。本研究は、高感度・高精度の LC/MS/MS 分析法の確立と、標準毒混合試料の調製を目的とする。

B. 研究方法

シガトキシン試料およびシガテラ試料処理・精製に関する技術・データ等を研究分担者へ提供し、精製および分析に関する指導を行い、本研究事業を円滑に推進させる。

(1) 試料中 CTXs の分析

現有する主要シガトキシン類 (CTX1B、52-*epi*-54-deoxyCTX1B、54-deoxyCTX1B、CTX3C、51-hydroxyCTX3C、CTX4A、CTX4B) <sup>1)</sup>を適宜調整し使用することで、既に条件設定した LC-MS/MS による一斉分析を行った <sup>2)</sup>。蒐集したシガテラ魚試料中の毒組成および毒含量を測定し、試料の選別を行い、標準毒の原料とした。

(2) 標準毒の調製

標準毒の原料となるシガテラ魚試料について、オートクレーブ処理の検討を行った。また、抽出物精製の検討にはフロリジル、HP-20、ODS 等各種カラムクロマトグラフィーを使用した。



## C. 研究結果

### (1) 試料中 CTXs の分析

今回蒐集した沖縄産シガテラ魚のほとんどの個体から CTXs を検出した (92.5%)。主要成分は CTX1B とその同族体 (52-*epi*54-deoxyCTX1B および 54-deoxyCTX1B) であった。また、魚種特異的な毒成分比率を確認した。

### (2) 標準毒の調製

凍結保存された試料の処理にオートクレーブを導入したことで、作業の効率化およびその後の抽出操作の簡便化が図れた。CTXs を含む抽出物の作製後、各種カラムクロマトグラフィーによる精製を進め、フロリジルおよび ODS カラム処理が有効であることを確認した。さらに数回のカラムクロマト処理を追加すれば、混合標準品として使用が可能な純度に到達している。

## D. 考察

標準毒の作出は、シガトキシン類分析法の確立および普及に不可欠であり、シガテラ研究および食中毒防止対策にも貢献する。今後は、各試験研究機関への標準毒の供給を可能とするため、処理量の拡大と純度の向上および重量検定法の検討が必要である。

## E. 結論

研究遂行のため必要なシガトキシン試料の提供および試料処理・精製に関して指導を行った。

蒐集したシガテラ魚試料について毒組成を明らかにし、これを原料とした標準毒の調製を実施した。抽出物のカラムクロマト処理により、CTX1B およびその同族体 (52-*epi*54-deoxyCTX1B、54-deoxyCTX1B) の混合標準毒試料を精製した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 與儀健太郎, 大城直雅, 佐久川さつき, 平間正博, 安元健. 「標準毒の作出・使用による国内シガテラ魚の精密分析と魚種・地域特性の解明」第53回天然有機化合物討論会講演要旨集 pp.445-450 (2011)

### 2. 学会発表

- 1) 佐久川さつき、與儀健太郎、大城直雅、池原強、玉那覇康二、平間正博、安元健 「LC-MS/MSによるシガトキシン類の分析とシガテラ魚の毒組成について」 第102回日本食品衛生学会 2011.9.30 (秋田)
- 2) 與儀健太郎、池原強、佐久川さつき、大城直雅、平間正博、安元健 「沖縄産シガテラ魚の毒組成と標準試料作製の検討」平成24年度日本水産学会春季大会 2012.3.29 (東京)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(参考文献)

1) Yasumoto, T. The chemistry and biological function of natural marine toxins. *Chem. Rec.* **2001**, *1*, 228-242.

2) Yogi, K.; Oshiro, N.; Inafuku, Y.; Hiramata, M; Yasumoto, T. Detailed LC-MS/MS analysis of ciguatoxins revealing distinct regional and species characteristics in fish and causative alga from the Pacific. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8886–8891.

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）  
分担研究報告書

沖縄産シガテラ魚の毒蓄積実態に関する研究

研究分担者 玉那覇 康二 沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班長

協力研究者

佐久川 さつき 沖縄県衛生環境研究所・主任研究員

大城 直雅 沖縄県環境生活部環境保全課・主任技師

研究要旨

魚類食中毒シガテラは国内でも毎年発生し、食品安全上の問題となっている。シガテラ対策の推進には、原因毒シガトキシン類について LC-MS/MS 分析による同定・定量法の確立および普及が必要である。そのためには標準毒が必須であるが、入手が非常に困難である。本研究では、シガテラ魚の毒蓄積実態を把握し、標準毒調製に関する基礎的知見を得ることを目的とした。沖縄でシガテラ魚とされる魚種の大型個体を中心に蒐集し、LC-MS/MS 分析により個体ごとの毒組成および毒含量を測定した。その結果、ほとんどの個体にシガトキシン類が蓄積されていることを明らかにし、その中でも健康被害をもたらす可能性がある毒量を持つ個体も高率であることが示唆された。また、分析したシガテラ魚試料は標準毒作製のための原料とした。

A. 研究目的

シガテラは年間数万人の患者が推定されている世界最大規模の自然毒による食中毒である。原因毒であるシガトキシン類（CTXs、図1および2）は渦鞭毛藻により産生され、食物連鎖により魚体内に移行・蓄積される<sup>1), 2)</sup>。国内でも沖縄を中心に毎年

発生しており、食品安全上の問題となっている。また、近年では九州から本州でも散发している状況がある。

シガテラ分析には、我が国を含む多くの国でマウス毒性試験法が採用されているが、特異性、迅速性および動物愛護の観点からも問題があるため、機器分析などへの移行

が望まれている。しかし、CTXs標準品の入手は非常に困難であるため、代替分析法の開発や食中毒防止対策への大きな障害となっている。

本研究は、CTXsのLC-MS/MS分析による同定・定量法の確立および普及を目指し、そのために必須となる標準毒作製の基礎資料として、国内シガテラ魚の毒蓄積および成分に関する実態を把握することを目的とした。

## B. 研究方法

### (1) シガテラ魚の蒐集

これまで沖縄県衛生環境研究所で蓄積したデータ<sup>3), 4)</sup>を元に、魚種、サイズを限定してシガテラ魚の蒐集を行った。沖縄でこれまで食中毒事例の多い魚種であるバラフエダイ *Lutjanus bohar*、バラハタ *Variola louti*、イッテンフエダイ *Lutjanus monostigma*、アカマダラハタ *Epinephelus fuscoguttatus*、コクハンアラ *Plectropomus laevis*、イシガキダイ *Oplegnathus punctatus*などを対象とし、バラフエダイは4 kg以上、バラハタ2 kg以上、アカマダラハタ10 kg以上など、高率で毒保有が見込める大型個体を中心に各漁協、漁連、卸売業者へ依頼し蒐集した。(参考資料1)

### (2) シガテラ毒の分析

蒐集したシガテラ魚試料について、それぞれ筋肉の一部を使用し、LC-MS/MS分析法<sup>5)</sup>によるCTXs保有個体の選別および毒含量の定量を行った。

#### (2)-1. 抽出

魚肉試料の抽出は、食品衛生検査指針記載のマウス毒性試験法<sup>6)</sup>に準じて行った。ただし、試料量は240 g から5 gへ変更し、比例的に使用する有機溶媒量も減じた。すなわち、魚肉5 gをアセトン15 mLで2回抽出(ホモジナイズ)し、遠心分離(3000 rpm, 10 min)により上清を得た。これをロータリーエバポレーターにより減圧濃縮した後、ジエチルエーテル5 mLにより2回再抽出した。エーテル層を窒素ガス吹き付けにより濃縮乾固したものを、さらに90%メタノール1.5 mLとヘキサン3 mLにより液液分配し、メタノール層を分取、風乾し粗抽出物を得た。(図4)

#### (2)-2. 試験液の調製

LC-MS/MS分析へ供するため、得られた粗抽出物を固相抽出により前処理した。フロリジルおよびPSAカートリッジカラム(InertSep、500 mgおよび200 mg、ジューエルサイエンス社)によりクリーンアップを行い、メタノール1 mLに溶解し試験液とした。(図4)

#### (2)-3. LC-MS/MS分析

シガトキシン類のLC-MS/MS一斉分析は既報に準じて行った<sup>5)</sup>。

装置：Agilent 1200 LCシステムおよびAgilent 6460トリプル四重極LC/MSシステム

カラム：ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 x 50 mm, 1.8 μm)、40°C

移動相：A = 5 mM ギ酸アンモニウムおよび0.1%ギ酸、B = メタノール