

201234025A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池原 強

平成25(2013)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	7
安元 健	
2. 魚介類食中毒シガテラのLC-MS/MS分析法に関する研究	13
玉那覇 康二	
3. シガテラ魚の毒組成と分析用標準毒の作製に関する研究	21
宮良 恵美	
4. 精製された標準毒の生物学的特性の検討	33
鈴木 穂高	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷	40

# 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

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2~10万人に達している。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、精度や迅速性、動物愛護など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。そこで、本研究では、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分析法によるCTXsの同定・定量法を確立することを目的とする。

平成24年度は以下の4項目の検討を行った。①毒組成の解明：沖縄、宮崎、南鳥島、ハワイで漁獲された8種の代表的シガテラ魚の毒組成を解明した。沖縄のフエダイ類、ハタ類ではCTX1Bを主体とし、54-deoxy類縁体が共存した。南鳥島産のバラフエダイとハワイ産のカンパチではCTX1B型とCTX3C型が共存していた。イシガキダイの毒組成は特異的で、沖縄では非酸化型のCTX4A/4Bを主体とし、宮崎産試料ではCTX3Cとその酸化体が主体であった。沖縄諸島の各地や過去20年間に蒐集した魚の毒組成は一定していた。この結果、沖縄諸島ではCTX1B型が、九州以北ではCTX3C型の標品が必要と判断された。②CTXsの抽出・精製：沖縄産試料魚の抽出物は、液-液分配、フロリジル、ODSによる処理を行った。一方、過去の低純度と判断された試料からも、CTX1Bのdeoxy体、CTX3Cの酸化体を微量ながら得ることができた。最も重要なCTX1BとCTX3Cは、0.1 mg前後の精製品を得ることができた。LC-MSに使用するCTX標準液は100 ppb (100 ng/mL)以下の濃度で良いので、現段階での精製品でも有用である。③純度・含量の検定：CTX1BとCTX3Cの精製品については、

<sup>1</sup>H NMRとLC-MSで純度を検定し、単一であることを確認した。④精製された標準毒の生物学的特性：精製した標準毒の生物学的特性について調べるため、マウスによる毒性試験を行い、半数致死量(LD50)を算出した。

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、輸入魚や魚肉加工品の検査が可能になる。国内試験研究機関への供給や、中毒検体を分析機関に送ることで迅速な分析が可能になり、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

宮良 恵美  
琉球大学・助教

鈴木穂高  
国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官

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

大城 直雅  
国立医薬品食品衛生研究所・室長

與儀 健太郎  
琉球大学・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

真保栄 陽子

沖縄県衛生環境研究所 研究員

#### A. 研究目的

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。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 毒組成の解明

シガテラ原因毒23成分の中で必要な標準毒を選定するためには毒組成の解明が必要である。国内の代表的シガテラ魚の毒組成を14種の標準毒を使用し、LC-MS分析法によって明らかにする。分析用試験液の作製法、試料採取部位の検討も行う。

### ② CTXsの抽出・精製

CTXsの精製は既報の方法に加えて大量処理用の逆相充填剤と容量可変の自作型充填カラムを使用することによって効率化を達成する。また、過去の研究では毒の検出にマウス毒性試験が用いられたが、LC-MS法によって迅速・正確な検出を可能にする。このような精製法の向上によって、これまでは不適と判断されて放置されていた低純度・低含量試料を回収し、その活用を図る。

### ③ 純度・含量の検定

微量成分を含む全成分を精製することは困難なので、組成と含量が明らかにされた主要毒標準混合物を作成する。一方、沖縄地方で重要なCTX1Bと沖縄以外の地域で発生するイシガキダイの主要毒CTX3Cについては、精製標準品を作成する。純度の検定は、<sup>1</sup>H NMRとLC-MS分析で行う。超微量試料なので含量の決定については検討する。

### ④ 精製された標準毒の生物学的特性

CTX1Bはシガテラ毒の主要な毒素成分であり、また、本研究班で精製した標準毒の中で比較的保有量に余裕があることから、本研究班で分離・精製したCTX1Bを用いて生物学的特性を検討するため、マウスによる毒性試験を行い、半数致死量(LD50)を算出した。マウスは日本エスエルシーより3.5~4週齢、雄のICRマウスを購入した。方法は、食品衛生検査指針にあるシガテラのマウス毒性試験法に従った。動物実験に関しては、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験倫理委員会の承認を受け、実施した。LD50は、ロジット(logit)法とプロビット(probit)法という2つの方法で計算した結果を示した。また、LD50の計算や用量一致死曲線の作図には統計ソフトR version 2.14.0を用いた。

## C. 研究結果

### ① 毒組成の解明

沖縄、宮崎、南鳥島、ハワイで漁獲された8種の代表的シガテラ魚の毒組成を解明した。沖縄のフェダイ類、ハタ類ではCTX1Bを主体とし、54-deoxy類縁体が共存した。南鳥島産のバラフェダイとハワイ産のカンパチではCTX1B型とCTX3C型が共存していた。イシガキダイの毒組成は特異的で、沖縄では非酸化型のCTX4A/4Bを主体とし、宮崎産試料ではCTX3Cとその酸化体が主体であった。沖縄諸島の各地や過去20年間に蒐集した魚の毒組成は一定していた。

## ② CTXs の抽出・精製

沖縄産試料魚の抽出物は、液・液分配、フロリジル、ODS による処理を行った。一方、過去の低純度と判断された試料からも、CTX1B の deoxy 体、CTX3C の酸化体を微量ながら得ることができた。最も重要な CTX1B と CTX3C は、0.1 mg 前後の精製品を得ることができた。LC-MS に使用する CTX 標準液は 100ppb (100 ng/mL) 以下の濃度で良いので、現段階での精製品でも有用である。

## ③ 純度・含量の検定

CTX1B と CTX3C の精製品については、<sup>1</sup>H NMR と LC-MS で純度を検定し、単一であることを確認した。定量（値づけ）の方法や、小分けする標準毒の量、形態（乾燥・溶液）等については検討を続行する。

## ④ 精製された標準毒の生物学的特性

得られた LD50 値は、ロジット法で暫定 30.61±1.09ng/mouse、95%信頼区間で暫定 28.48~32.74ng/mouse であり、プロビット法では暫定 30.80±1.13ng/mouse、95%信頼区間で暫定 28.59~33.01ng/mouse であった。ただし、後述するが、この LD50 値については数倍の誤差があることが考えられるので、取り扱いには注意していただきたい。

## D. 考察

### (1) 毒組成

今回の毒組成分析で、沖縄で代表的なシ

ガテラ魚のいずれの魚種からも、CTX1B および 54-deoxy 類縁体が検出された。毒量の多少はあるものの、その毒組成比は魚種ごとに一定しており、肉食性であるフェダイ類では CTX1B を主体とし、ハタ類では 54-deoxyCTX1B の割合が高く、主成分とする魚種もあった。一方で、雑食性のイシガキダイは低極性 CTXs (CTX4A および CTX4B) も含有する独特の毒組成であった。また、今回解析した各地の試料は毒組成に顕著な地域差が認められ、検出された CTXs 組成から、沖縄諸島では CTX1B 型が、九州以北では CTX3C 型の標品が必要と判断された。今回調製した標準毒はそれぞれの地域をカバーしており、LC-MS/MS などによる検査を可能にする。

### (2) 標準毒

今回得られた標準毒は、一般的な試薬に比べると微量であるが、LC-MS/MS に使用する CTX 標準液は 100 ppb (100 ng/mL) 以下の濃度で良いので、現段階での精製品でも有用である。さらに、沖縄地方で重要な CTX1B と沖縄以外の地域で発生するイシガキダイの主要毒 CTX3C については、精製標準品が得られた。

### (2) 標準毒の生物学的特性

本分担研究において、CTX1B の LD50 値は暫定 30.6~8ng/mouse 程度と算出された。しかし、CTX1B の LD50 値については Murata らが 7ng/mouse (350ng/kg)、Lewis らが 5ng/mouse (250ng/kg) と報告しており、

これらの報告の信頼性は高い。一方、本分担研究で得られたLD50値は、その4~6倍も高い値であり、マウスの個体差や手技による差、精製したCTX1Bの純度等を考慮しても、とても正しい値とは考えられない。これらの結果から、従来、基準として用いた合成品の信頼性に疑義が生じた。反面、本研究班で調整した標準品のLC/MS定量値を採用すれば文献値に近似する。精確な定量については、現在、検討中であり、その結果を待ってLD50値を補正の上、報告したいと考えている。

#### E. 結論

シガテラ食中毒対策を講ずる上で、マウス毒性試験の代替法としてLC-MS/MS分析法の活用・普及が期待されるが、それに必要な毒組成情報や調製法に関する基礎資料および主要成分のCTX標準試料を得ることができた。特に重要なCTX1BとCTX3Cについては精製標準品を一定量得た。

本分担研究で算出したLD50値は現在、報告されている値よりも数倍高い値となり、本研究班で用いている合成品を標品とした定量値の信頼性に疑義を生じる結果となった。正しいLD50値については、精確な定量結果を待って後日、論文等の形で発表したいと考えているので、本報告書のLD50値が暫定的な値であることに、重ねて注意をお願いしたい。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yogi, K.; Sakugawa, S.; Oshiro, N.; Ikehara, T.; Sugiyama, K.; Yasumoto, T. Determination of toxins involved in ciguatera fish poisoning in the Pacific by LC-MS. *J. AOAC* **2013**, accepted.

##### 2. 学会発表

- (1) 與儀健太郎、佐久川さつき、大城直雅、池原強、平間正博、安元健 「国内シガテラ魚の毒組成とアオブダイ中毒検体の分析」 第26回海洋生物活性談話会 2012.5.12-13 (鹿児島)
- (2) Yogi, K.; Sakugawa, S.; Oshiro, N.; Ikehara, T.; Yasumoto, T. "First Endeavor Toward Preparation of Ciguatoxin Standards Based on Toxin Profiles of Fish in Japan Achieved by Detailed LC-MS/MS Analysis" 15th International Conference on Harmful Algae (ICHA) 2012.10.29-11.2 (Korea)
- (3) Yasumoto, T.; Yogi, K.; Oshiro, N. "Determination of Toxins Involved in Ciguatera and Related Seafood Poisoning in the Pacific" 2012 Annual Meeting of the Pacific NW Section of



AOAC Int. 2012.6.18-22 (WA, U.S.A.)

(4) 安元健 「海産自然毒中毒の最近の動向」 第 71 回日本マイコトキシン学会  
学術講演会 2012.7.6 (沖縄)

(5) 與儀健太郎、池原強、佐久川さつき、大城直雅、安元健 「国内シガテラ魚の毒組成とLC-MS/MS分析標準品の作出」 平成  
25年度日本水産学会春季大会  
2013.3.26-30 (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

## 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得た。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。さらに、過去の低純度と判断された試料からも主要 CTX 標準毒を得ることができた。

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<sup>1)</sup>。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魚処理・精製に関する技術・資料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) 毒組成の解明

シガテラ原因毒 23 成分<sup>1)</sup>の中で、分析に必要な標準毒を選定するためには、毒組成の解明が必要である。各地のシガテラ魚の毒組成を 14 種の標準毒を使用し、LC-MS/MS 分析法<sup>2)</sup>によって明らかにする。

- ・ 沖縄の代表的シガテラ魚：バラフエダイ、バラハタ、アカマダラハタ、イッテンフエダイ、コクハンアラ、イシガキダイ
- ・ 宮崎産イシガキダイ
- ・ 南鳥島産バラフエダイ
- ・ ハワイ産カンパチ抽出物

## (2) 標準毒の調製

渦鞭毛藻が産生した毒は魚体内で酸化された酸化型 CTX として蓄積されるので、一部の成分を除いては培養によって得ることができない。また、毒を産生する渦鞭毛藻は世界的な探査にもかかわらず数株が存在するのみであり、本事業で有毒株の探索を行うことは得策でない。そこで、標準毒の作出に必要な有毒個体を、国内では恒常的にシガテラが発生している沖縄県で蒐集し、合わせて魚種別の有毒個体出現率、毒力、毒組成の解明を行う。

CTXs の精製は、既報の方法に加えて大量処理用の逆相充填剤と容量可変の自作型充填カラムを使用することによって効率化を達成する。また、過去の研究では毒の検出にマウス毒性試験が用いられたが、LC-MS/MS 法によって迅速・正確な検出を可能にする。このような精製法の向上によって、これまでは不適と判断されて放置されていた低純度・低含量試料を回収し、その活用を図る。

微量成分を含む全成分を精製することは困難なので、組成と含量が明らかにされた主要毒標準混合物を作製する。一方、最も重要な CTX1B と CTX3C については精製標準品を作製する。純度の検定は、 $^1\text{H-NMR}$  と LC-MS/MS 分析で行う。

## C. 研究結果

### (1) 毒組成の解明

沖縄、宮崎、南鳥島、ハワイで漁獲されたシガテラ魚の毒組成を解明した。沖縄のフェダイ類、ハタ類では CTX1B を主体とし、

54-deoxy 類縁体が共存した。南鳥島産のバラフェダイとハワイ産のカンパチでは CTX1B 型と CTX3C 型が共存していた。イシガキダイの毒組成は特異的で、沖縄では非酸化型の CTX4A/4B を主体とし、宮崎産試料では CTX3C とその酸化体が主体であった。沖縄諸島の各地や過去 20 年間に蒐集した魚の毒組成は一定していた。

### (2) 標準毒の調製

今回沖縄で蒐集した代表的なシガテラ魚のほぼ全ての試料から CTX1B を検出した。ただし、筋肉中の毒含量は低く、CTX1B が 1 ppb を超える個体は少数であった。このため、精製の最終段階に達する前に各成分を同定・定量し、二次標品として使用可能な状態とした。

一方、過去の低純度と判断された試料からも、CTX1B の deoxy 体、CTX3C の酸化体を微量ながら得ることができた。最も重要な CTX1B と CTX3C は、0.1 mg 前後の精製品を得ることができた。

CTX1B と CTX3C の精製品については、 $^1\text{H-NMR}$  と LC-MS/MS により純度を検定し、単一であることを確認した。図 1 および図 2 に NMR スペクトルおよび LC-MS クロマトグラムを示す。

## D. 考察

### (1) 毒組成

今回解析した各地の試料は毒組成に顕著な地域差が認められ、検出された CTXs 組成から、沖縄諸島では CTX1B 型が、九州以北では CTX3C 型の標品が必要と判断された。

今回調製した標準毒はそれぞれの地域をカバーしており、LC-MS/MS などによる検査を可能にする。

## (2) 標準毒

今回得られた標準毒は、一般的な試薬に比べると微量であるが、LC-MS/MS に使用する CTX 標準液は 100 ppb (100 ng/mL) 以下の濃度で良いので、現段階での精製品でも有用である。さらに、沖縄地方で重要な CTX1B と沖縄以外の地域で発生するイシガキダイの主要毒 CTX3C については、精製標準品が得られた。

## E. 結論

沖縄産シガテラ魚から LC-MS/MS 分析に使用可能な二次標品を得た。また、精製法の向上により、過去の低純度と判断された試料から主要 CTXs が調製可能であった。特に重要な CTX1B と CTX3C については精製標準品を一定量得た。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yogi, K.; Sakugawa, S.; Oshiro, N.; Ikehara, T.; Sugiyama, K.; Yasumoto, T. Determination of toxins involved in ciguatera fish poisoning in the Pacific by LC-MS. *J. AOAC* **2013**, accepted.

### 2. 学会発表

- 1) Yasumoto, T.; Yogi, K.; Sakugawa, S.;

Ikehara, T. "Determination of Toxins Involved in Ciguatera and Related Seafood Toxins" Seminar on Emerging Toxins (EURLMB) 2012.5.21-22 (Spain)

- 2) Yasumoto, T.; Yogi, K.; Oshiro, N. "Determination of Toxins Involved in Ciguatera and Related Seafood Poisoning in the Pacific" 2012 Annual Meeting of the Pacific NW Section of AOAC Int. 2012.6.18-22 (WA, U.S.A.)

- 3) 安元健 「海産自然毒中毒の最近の動向」 第 71 回日本マイコトキシン学会 学術講演会 2012.7.6 (沖縄)

- 4) Yogi, K.; Sakugawa, S.; Oshiro, N.; Ikehara, T.; Yasumoto, T. "First Endeavor Toward Preparation of Ciguatoxin Standards Based on Toxin Profiles of Fish in Japan Achieved by Detailed LC-MS/MS Analysis" 15th International Conference on Harmful Algae (ICHA) 2012.10.29-11.2 (Korea)

## 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

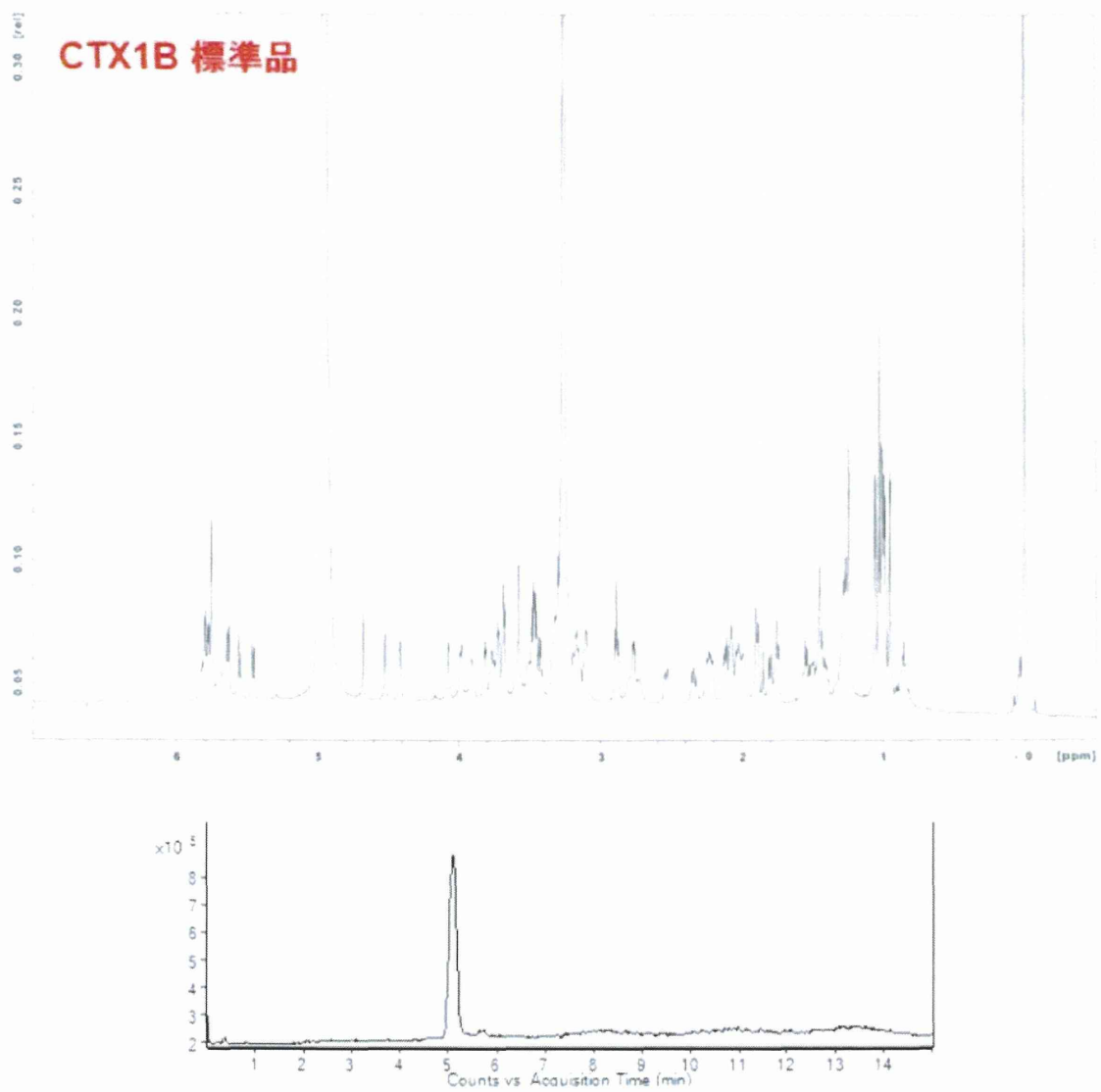


図1. CTX1B標準品の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルおよびLC-MSクロマトグラム (SCAN)

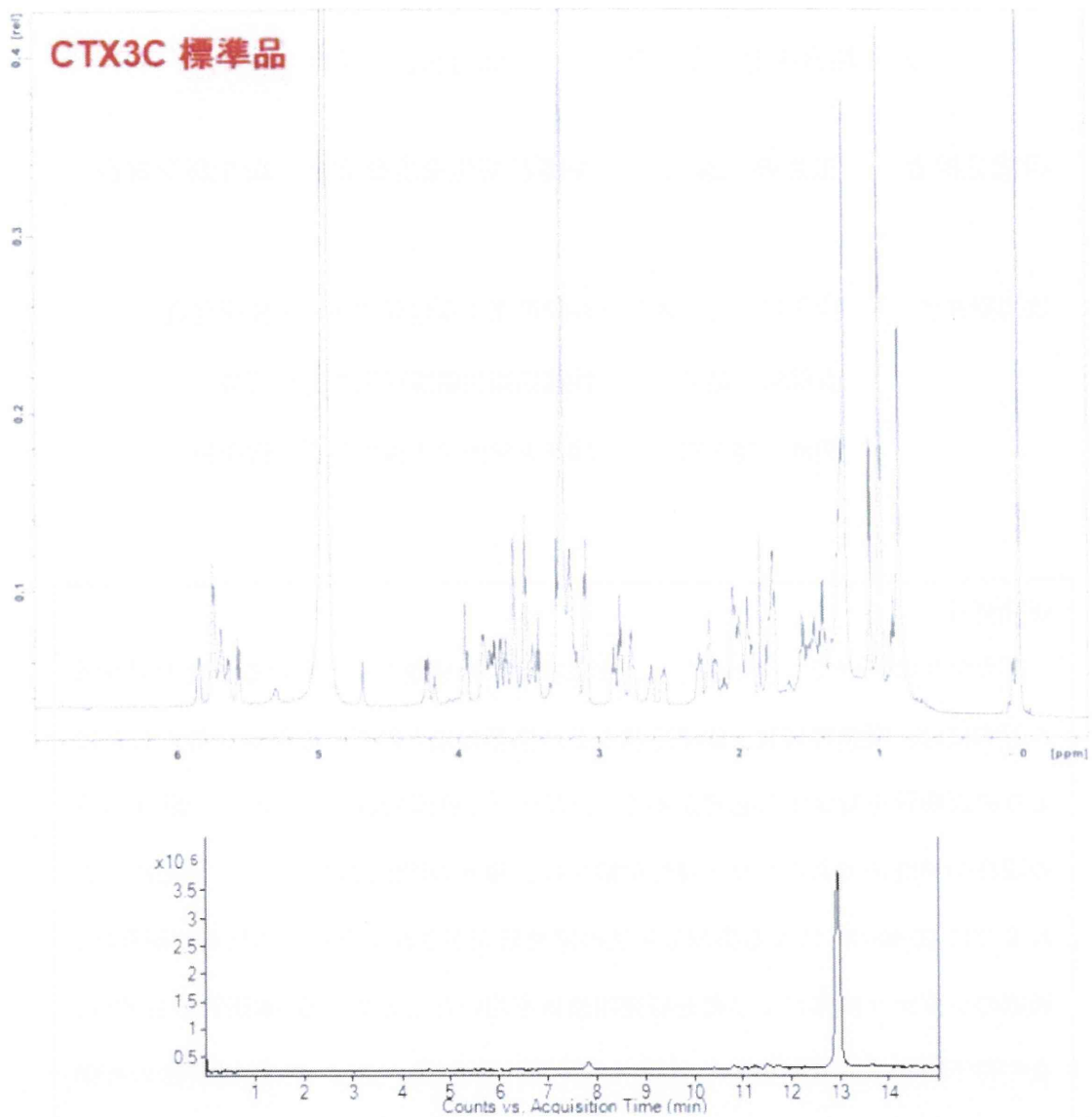


図2. CTX3C標準品の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルおよびLC-MSクロマトグラム (SCAN)



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

魚介類食中毒シガテラのLC-MS/MS分析法に関する研究

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

真保栄 陽子 沖縄県衛生環境研究所 研究員

與儀 健太郎 琉球大学医学部保健学科 技術員

研究要旨

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。食中毒原因の追求には、喫食等調査、臨床症状などの情報収集と解析、原因食品等の分析により原因物質を特定する必要がある。シガテラの原因物質シガトキシン類 (CTXs) の現在の検査法であるマウス毒性試験法は、種々の問題点がある。このため、これまでに LC-MS/MS による機器分析法の開発研究がされてきた。これらの研究は、過去のシガテラ検体および調査研究用検体を用いたものである。本研究の目的は、食中毒予防対策に資するため、実際の食中毒検体を用いて LC-MS/MS 分析法の有効性を検討することとした。沖縄県で発生したシガテラについて、LC-MS/MS 分析法と公定法の結果を比較したところ、LC-MS/MS 分析法がマウス毒性試験法を補完または代替する可能性が示唆された。

A. 研究目的

シガテラは、熱帯・亜熱帯域のサンゴ礁に生息する魚介類による自然毒食中毒で、

年間数万人の患者が推定されている世界最大規模の食中毒である。国内では沖縄県を中心に毎年発生しており、近年では九州お

よび本州の太平洋沿岸でも散発事例が見られる。主な症状は下痢、嘔吐などの消化器系、口唇や四肢のしびれ、温度感覚異常（ドライアイスセンセーション）などの神経系、血圧低下、徐脈などの循環器系である<sup>1),2)</sup>。

シガテラの原因毒シガトキシン類（CTXs）検査の現在の公定法は、食品衛生検査指針記載のマウス毒性試験法であり、多量の魚肉検体を必要とする<sup>3)</sup>。食中毒の原因追及には、喫食状況等調査、臨床症状の情報収集および解析とともに、原因物質の分析を行い、原因食品、原因物質の特定を行う。しかし、シガテラの場合、食品残渣が少ないことから検査が実施できない事例が多く、その場合は喫食状況等調査、臨床症状の情報により、シガテラ（推定）として報告されている。

また、マウス毒性試験法は、迅速性、特異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おり、これまでにLC-MS/MSによる機器分析法の開発研究がされている。これらの研究は過去の食中毒検体および買上調査検体を分析し、その当時のマウス毒性試験結果と比較している<sup>4),5)</sup>。

本研究は、食中毒原因物質の特定、予防対策に資するため、LC-MS/MS分析法の有効性を検討することを目的とした。

## B. 研究方法

平成24年中に沖縄県で発生したシガテラ食中毒2事例の検体を用い、LC-MS/MS分析によるCTXsの定性・定量を行い、その結果を食中毒検査として実施したマウス毒性試

験法と比較した。

### (1) 食中毒事例の概要

#### (1)-1 事例1

平成24年7月9日、男性が魚1尾を譲り受け、三枚におろし、片側半身を刺身に、あらは塩煮調理し、残りの半身は冷蔵保管した。刺身と塩煮を夕食時に家族3名で摂食したところ、翌日未明頃から水様性下痢、吐き気、嘔吐など発症し、医療機関を受診した。本事例の摂食状況および症状を表1に示す。

#### (1)-2 事例2

平成24年8月下旬に祖母が離島在住の息子から魚を譲り受け、8月25日に、この魚を三枚におろし、片側半身とあらを娘に譲った。この女性は26日にあらを味噌汁に調理し、息子家族3名、娘家族2名とともに喫食した。27日未明から夕方にかけて、女性、嫁、娘が気分不良、舌のしびれなどから発症し、医療機関を受診した。本事例の摂食状況および症状を表2に示す。

### (2) 材料

事例1の検体は患者宅に残っていた中毒原因魚の片側半身（12-CFP-001、総重量270g）、原因食品塩煮の廃棄物残渣（12-CFP-002、総重量217g）および中毒原因魚と同時に釣った同じ種類の魚で、釣った本人が冷凍保管していた魚（12-CFP-003、総重量1054g）を使用した。12-CFP-001および12-CFP-003から筋肉140gを、12-CFP-002から筋肉39gを採取した。

事例2の検体は患者女性宅に残っていた中毒原因魚の頭部一部（12-CFP-004、総重

量74 g)、ぶつ切りにされた切り身(12-CFP-005、総重量435 g)を使用した。12-CFP-004は筋肉9.4 gを、12-CFP-005は筋肉250 gを採取した。

### (3) CTXs分析

各検体の筋肉の一部を抽出・精製し、LC-MS/MS分析によるCTXsの定性・定量を行った。

#### (3)-1. 抽出・調製

魚の筋肉検体は、食品衛生検査指針記載のマウス毒性試験法<sup>3)</sup>に準じて粗抽出物を調製した。ただし、各検体の筋肉量に応じて使用する有機溶媒量も減量した。

12-CFP-001、12-CFP-003は140 gの筋肉の粗抽出物を作成後、120g相当量、5 g相当量(2本)に分け、マウス毒性試験用、LC-MS/MS分析用の粗抽出物とした。同様に12-CFP-005は筋肉250 gを抽出した後、240g相当量、5 g相当量(2本)に分け、マウス毒性試験用、LC-MS/MS分析用の粗抽出物とした。12-CFP-002、12-CFP-004については、筋肉5 gを処理し、LC-MS/MS分析用粗抽出物とした。

LC-MS/MS分析用試験液を調整のため、5 g相当量の粗抽出物を既報<sup>5)</sup>に準じて固相カートリッジカラムにより精製を行い、メタノール1 mLに溶解した。

#### (3)-2. LC-MS/MS分析

LC-MS/MS分析は既報<sup>5)</sup>の一斉分析法に準じた。

LC部

装置：Agilent 1200 LC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

グラジエント：78% B (0 min) → 88% B (11 min) → 88% B (15 min)

流速：0.4 mL/min

試験液注入量：5 μL

MS部

装置：Agilent 6460トリプル四重極LC/MSシステム

イオン源：ESI + Agilent Jet Stream、Positive

ドライガス：300°C、10 L/min

ネブライザー：50 psi

シースガス：400°C、11 L/min

キャピラリー電圧：5000 V

ノズル電圧：1000 V

フラグメンター電圧：350 V

コリジョンエネルギー：(CTXs) 40 eV、

MRMトランジション：[M + Na]<sup>+</sup> → [M + Na]<sup>+</sup>

標準品は、天然試料から単離精製・構造決定されたCTX 1 B、51-hydroxy3C、52-*epi*-54-deoxyCTX 1 B、54-deoxyCTX 1 B、およびCTX3Cを使用した。定量分析には、濃度が明らかなCTX 1 B、52-*epi*-54-deoxyCTX 1 Bを適宜調製し、使用した。

## C. 研究結果

### (1) LC-MS/MS分析法

LC-MS/MSによる分析の結果、全ての検体からCTX 1 B、52-*epi*-54-deoxyCTX 1 Bおよび54-deoxyCTX 1 Bを検出した。

各検体のCTXs含量およびマウス毒性換算値を表3に示した。CTX1B含量は1.08~9.64

ng/g、52-*epi*-54-deoxyCTX1B含量は0.25～1.11 ng/gであった。これらの含量について、マウス毒性値 1 MUあたりCTX1Bは7ng、52-*epi*-54-deoxyCTX 1 Bは14ngとして換算したところ、表のとおり0.15～1.46 MU/gとなった。なお、12-CFP-003および12-CFP-005の52-*epi*-54-deoxyCTX1Bの含量は定量下限値 (0.25 ng/g) 以下であったため、マウス毒性換算はしていない。

12-CFP-001、12-CFP-003および12-CFP-005のLC-MS/MS分析結果と食中毒検査として実施したマウス毒性試験結果の相関を図に示す。

#### D. 考察

シガテラ検査の現在の公定法であるマウス毒性試験法では、多量の魚肉検体からCTXsを抽出し、少量の投与液に調製し、その原液または希釈液を投与する<sup>3)</sup>。このため、貴重な食中毒検体を全量使用する可能性があり、検体量が少ない場合は検査が実施できない場合がある。

本研究では、マウス毒性試験用に前処理した粗抽出物の一部を精製し、LC-MS/MS分析した結果と食中毒検査として実施したマウス毒性試験の結果を比較したところ、良好な相関性が得られた(図)。公定法を実施する前にLC-MS/MS分析により毒性値を推定することにより、マウス毒性試験法を補完する可能性を示唆する。また、原因食品廃棄物中の少量の魚肉検体からCTXsを検出したことから、食品残渣の少ない事例の場合、公定法の代替法となる可能性を示唆する。

LC-MS/MS分析法をマウス毒性試験法の補完あるいは代替方法として普及するためには、CTXs標準品が不可欠である。シガテラ魚から抽出・調製したCTXs標準試料が活用されることを期待する。

#### E. 結論

平成24年中に沖縄県内で発生したシガテラについて、LC-MS/MS法と現在の公定法を比較したところ、LC-MS/MS法が公定法であるマウス毒性試験法を補完または代替する可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### 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