

(参考文献)

- 1) Yasumoto, T. Chemistry, etiology, and food chain dynamics of marine toxins. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **2005**, *81*, 43–51.
- 2) 大城直雅. 魚類の毒 (4) : シガテラ毒. 食品衛生研究, **2010**, *60*, 37–45.
- 3) 佐竹真幸. “シガテラ”. 食品衛生検査指針理化学編. 厚生労働省監修. 東京, (社)日本食品衛生協会, 2005, pp. 691–695.
- 4) Oshiro, N.; Yogi, K.; Asato, S.; Sasaki, T.; Tamanaha, K.; Hiramata, M.; Yasumoto, T.; Inafuku, Y. Ciguatera incidence and fish toxicity in Okinawa, Japan. *Toxicon* **2010**, *56*, 656–661.
- 5) 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.

表1. シガテラ事例1の摂食状況および症状

患者	摂食状況		症状
	刺身	塩煮	
男性	片側半身3/4	頭部	水様性下痢(20回)、吐き気、嘔吐(3回)、気分不良、歩行困難、血圧低下(30/70mmHg)、徐脈、口のしびれ、下肢のかゆみ
妻	片側半身1/4	中骨	軽い腹痛、水様性下痢(5回)、吐き気、嘔吐(3回)、全身のかゆみ、ドライアイスセンセーション
母	無	少量の魚肉	軽い腹痛、水様性下痢(2回)、吐き気

表2. シガテラ事例2の摂食状況および症状

患者	摂食状況	症状
女性	1日目夕食:味噌汁一杯(魚肉1欠片) 2日目昼食:味噌汁一杯(頭部1/4と魚肉1欠片)	気分不良、舌のしびれ、吐き気、嘔吐(1回)、脱力感、けん怠感、臥床、血圧低下、関節の痛みとしびれ
息子の嫁	1日目夕食:味噌汁一杯(魚肉2欠片) 2日目昼食:摂食無	気分不良、吐き気、頭痛、脱力感、舌のしびれ、筋肉痛、腰痛、下肢の痛み、下痢
娘	1日目夕食:味噌汁一杯(魚肉1、2欠片) 2日目昼食:味噌汁一杯(魚肉1、2欠片)	舌のしびれ、気分不良、四肢のしびれ、腹痛、吐き気、血圧低下

表3. シガテラ検体のLC-MS/MS測定結果、マウス毒性換算値およびマウス毒性試験結果

事例	検体番号	CTXs	LC-MS/MS測定結果 (ng/g)	マウス毒性値 換算合計 (MU/g)	マウス毒性試験結果 (MU/g)
1	12-CFP-001	CTX1B	4.31	0.64	0.4
		52- <i>epi</i> -54deoxyCTX1B	0.4		
	12-CFP-002	CTX1B	9.64	1.46	—*
		52- <i>epi</i> -54deoxyCTX1B	1.11		
	12-CFP-003	CTX1B	1.08	0.15**	0.1
		52- <i>epi</i> -54deoxyCTX1B	<0.25		
2	12-CFP-004	CTX1B	4.61	0.68	—*
		52- <i>epi</i> -54deoxyCTX1B	0.25		
	12-CFP-005	CTX1B	2.62	0.37**	0.2
		52- <i>epi</i> -54deoxyCTX1B	<0.25		

* 検体魚肉量が少量であったため、マウス毒性試験は実施していない。

** CTX1B含量のみを、マウス毒性値に換算した

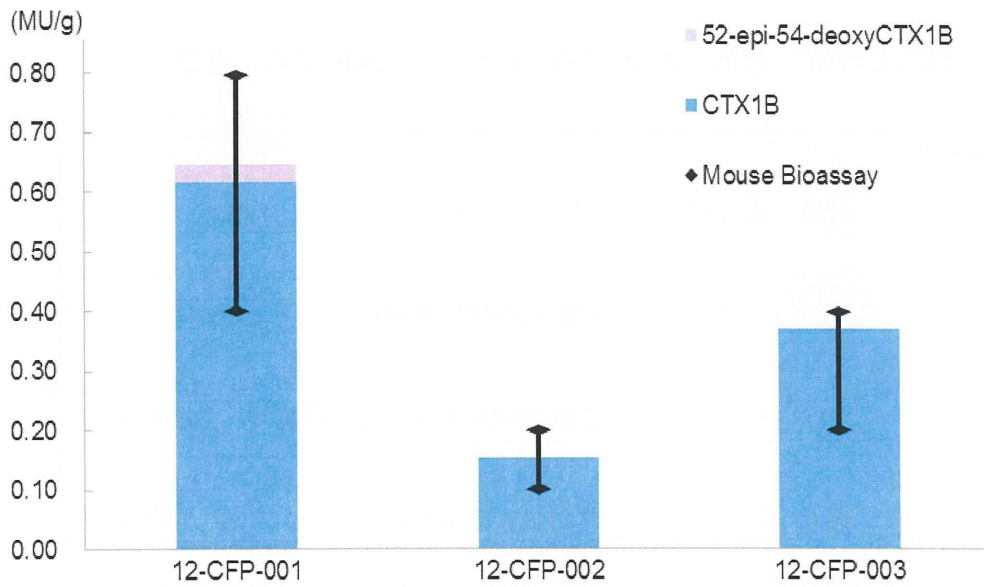


図. シガテラ検体の LC-MS/MS 測定結果とマウス毒性試験結果の相関

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

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

研究分担者 宮良 恵美 琉球大学医学部保健学科 助教

協力研究者

與儀 健太郎 琉球大学医学部保健学科 技術員

佐久川 さつき 沖縄県衛生環境研究所 主任研究員

池原 強 長崎大学医歯薬学総合研究科 客員研究員

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

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（CTXs）についての機器分析などの開発および普及が必要である。そのためには標準毒が必須となるが、CTXs 標準品は入手が非常に困難である。本研究の目的は、シガテラ魚の毒組成解析およびCTXs 分析用標準品の作製により、LC-MS/MS 分析によるCTXs 同定・定量法を確立することにある。蒐集したシガテラ魚を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、地域および魚種に特異的な毒組成を確認した。CTXs 含量の高いシガテラ魚試料は標準試料作製のための原料とし、筋肉抽出物を各種クロマトグラフィーにより精製した。その結果、主要毒であるCTX1B 試料および54-deoxyCTX1B/epi 混合試料が得られた。これらは、LC-MS/MS 分析に使用可能であり、二次標品としての活用が期待できる。

B. 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。症状は消化器系、循環器系、神経系と多岐にわたり、重症例では数ヵ月から1年以上に及ぶ^{1), 2)}。国内では亜熱帯域に属する沖縄県を中心に毎年発生しており、食品衛生上の問題となっている。また、近年では九州から本州にかけての太平洋沿岸域でも散発している。

食中毒への対応や予防には原因物質を明らかにする必要があるが、これまで成分の特定はなされてこなかった。シガテラの診断においても、特徴的的症状であるドライアイセンサーションと呼ばれる温度感覚異常と、魚の摂食歴に基づいて行われている現状がある²⁾。

原因毒となるシガトキシン類 (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¹⁾。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、代替分析法開発の大きな障害となっている。

本研究は、食中毒防止対策や正確な医療診断に資するため、LC-MS/MS分析によるCTXsの同定・定量法の確立および普及を目指し、シガテラ魚の毒組成解析および分析用標準毒の作製を目的とした。

B. 研究方法

(1) 試料

これまで沖縄県衛生環境研究所で蓄積されたデータ^{2), 3)}を基に、昨年度より蒐集している沖縄で代表的なシガテラ魚を用いた。また、沖縄衛環研で保管している過去の食中毒検体および研究試料³⁾についても毒組成解析に使用した。

- ・バラフエダイ *Lutjanus bohar*
- ・バラハタ *Variola louti*
- ・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*
- ・イッテンフエダイ *Lutjanus monostigma*

(2) シガテラ魚のスクリーニング

蒐集したシガテラ魚試料について、各個体筋肉の一部を使用し、LC-MS/MS分析による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・調製

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⁴⁾に準じて行った。ただし、試料量は240 g から5 gへ変更し、使用する有機溶媒量も比例的に減じた。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。

LC-MS/MS分析へ供するため、得られた粗抽出物を既報⁵⁾に準じて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3)

(2)-2. LC-MS/MS分析

LC-MS/MS分析は既報⁵⁾の一斉分析法に準じて行ったが、一部検討・改良を加えた。

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

グラジエント：73% B (0 min) → 90% B
(11 min) → 90% B (15 min)

流速：0.4 mL/min

試験液注入量：5 μL

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、
(gambierol) 24 eV

MRMトランジション：[M + Na]⁺ → [M +
Na]⁺

標準品は天然試料より単離・構造決定されたシガトキシン類13成分⁶⁾および関連成分のガンビエロール⁶⁾を適宜調製し使用した。(図1、2)

(3) 大量抽出およびCTXs精製

LC-MS/MS分析により選別したシガテラ魚の筋肉について、アセトン抽出、エーテル抽出、ヘキサン脱脂を順次行い、得られた粗抽出物を各種クロマトグラフィーにより繰り返し精製した。

カラムの充填剤は、順相クロマトグラフィーではフロリジル、逆相クロマトグラフィーではODS、サイズ排除クロマトグラフィーではHW-40を主に使用した。

図4に抽出・精製スキームを示す。

C. 研究結果

(1) LC-MS/MS分析法

グラジエント条件の検討およびMSの調整などにより、検出下限値 (S/N > 3)、定量下限値 (S/N > 10) を改善した。

CTX1B標準品

検出下限値：0.1 pg

定量下限値：0.5 pg

(1回のカラム注入量として)

0.02 ng/mL~5 ng/mL間の6濃度における検量線の直線性は、0.999以上と良好であった。

(2) 沖縄産シガテラ魚の毒組成

沖縄産シガテラ魚は、地域や年代に関わらずいずれもCTX1B、54-deoxyCTX1B、52-*epi*-54-deoxyCTX1Bを含有し、各成分の比率は一定の魚種特異性を示した。イシガキダイのみは特異な毒組成（CTX4AおよびCTX4B）を示した。図5に各魚種の毒組成比率を示す。

(3) 分析用標準試料の作製

蒐集したシガテラ魚について、LC-MS/MS分析結果から毒含量の高かった個体は以下のとおりであった。

- ・バラフエダイ 13個体 (95.6 kg)
- ・バラハタ 10個体 (28.3 kg)
- ・アカマダラハタ 6個体 (70.5 kg)

これらの筋肉部位についてCTXs標準試料の原料とし、図4に示すように抽出・精製を行った。その結果、①CTX1B試料(19.9 μg)、②52-*epi*-54-deoxyCTX1Bおよび54-deoxyCTX1Bの混合試料(3.4 および8.2 μg)が得られた。図6に各試料のクロマトグラムを示す。

D. 考察

これまでに沖縄県で報告されているシガテラの原因魚種は、そのほとんどが肉食魚であり、大型個体ほど有毒率が高く、毒力も強い傾向がある³⁾。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、肉食性であるフエダイ類では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(図5)。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(図5)。

シガテラの原因となるシガトキシン類は、*Gambierdiscus*属渦鞭毛藻により産生される低極性CTXsが、食物連鎖により魚に移行・蓄積される過程で酸化を受け、毒性がより増強される^{1),6)}。すなわち、沖縄周辺海域ではCTX4A/4Bを優先的に産生する渦鞭毛藻の生息が推定され、これらが食物連鎖の過程で54-deoxyCTX1B類、CTX1Bへと変換され毒性が強くなることで、より多くのシガテラ食中毒の原因となっていると考えられる。

このことを裏付けるように、今回分析対象とした沖縄海域の代表的なシガテラ魚では、沖縄県各地、過去20年間の試料で、CTX1B同族体の毒組成に変化は無く、成分比も一定であった(図5)。このことから、沖縄周辺海域に関連する試料では、CTX1B同族体(図1)の監視が最も重要であると判断される。

一方で、宮崎産のイシガキダイはCTX3C同族体(図2)が主体であり、南鳥島産のバラフエダイとハワイ産のカンパチではCTX1B同族体とCTX3C同族体が共存していた⁵⁾。このことから、各地に生息する*Gambierdiscus*属渦鞭毛藻の系統の違いが推定され、産生するCTXsのタイプが異なると考えられる。ただし、沖縄以外の海域については、これから多くの試料の分析データの積み重ねが必要である。分析に際しては、それぞれの海域ごとに必要な標準毒が

異なることが示唆される。

今回、標準試料の調製では、精製の最終段階に達する前に各成分を同定・定量し、分析用の二次標品として使用可能な状態とした(図6)。さらに精製を進めれば、標準毒としてより汎用性が高まるが、沖縄産シガテラ魚筋肉中の毒含量は低く(ppb以下)、純品を得るのは現実的ではなかった。しかしながら、国内で蒐集したシガテラ魚からシガトキシン類が確保可能であることを示した。今回調製したCTX1B試料および54-deoxyCTX1B混合試料は、LC-MS/MS分析や関連試験での活用が期待できる。

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3成分のCTX標準試料を得ることができた。

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) 與儀健太郎, 大城直雅, 松田聖子, 佐久川さつき, 松尾敏明, 安元健 「奄

美群島におけるシガテラ原因魚の毒組成解析」(投稿中)

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) 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)

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

toxins. *Chem. Rec.* **2001**, *1*, 228–242.

(参考文献)

- 6) Yasumoto, T. Chemistry, etiology, and food chain dynamics of marine toxins. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **2005**, *81*, 43–51.
- 7) 大城直雅. 魚類の毒 (4) : シガテラ毒. 食品衛生研究, **2010**, *60*, 37–45.
- 8) Oshiro, N.; Yogi, K.; Asato, S.; Sasaki, T.; Tamanaha, K.; Hirama, M.; Yasumoto, T.; Inafuku, Y. Ciguatera incidence and fish toxicity in Okinawa, Japan. *Toxicon* **2010**, *56*, 656–661.
- 9) 佐竹真幸. “シガテラ”. 食品衛生検査指針理化学編. 厚生労働省監修. 東京, (社)日本食品衛生協会, 2005, pp. 691–695.
- 10) Yogi, K.; Oshiro, N.; Inafuku, Y.; Hirama, 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.
- 11) Yasumoto, T. The chemistry and biological function of natural marine

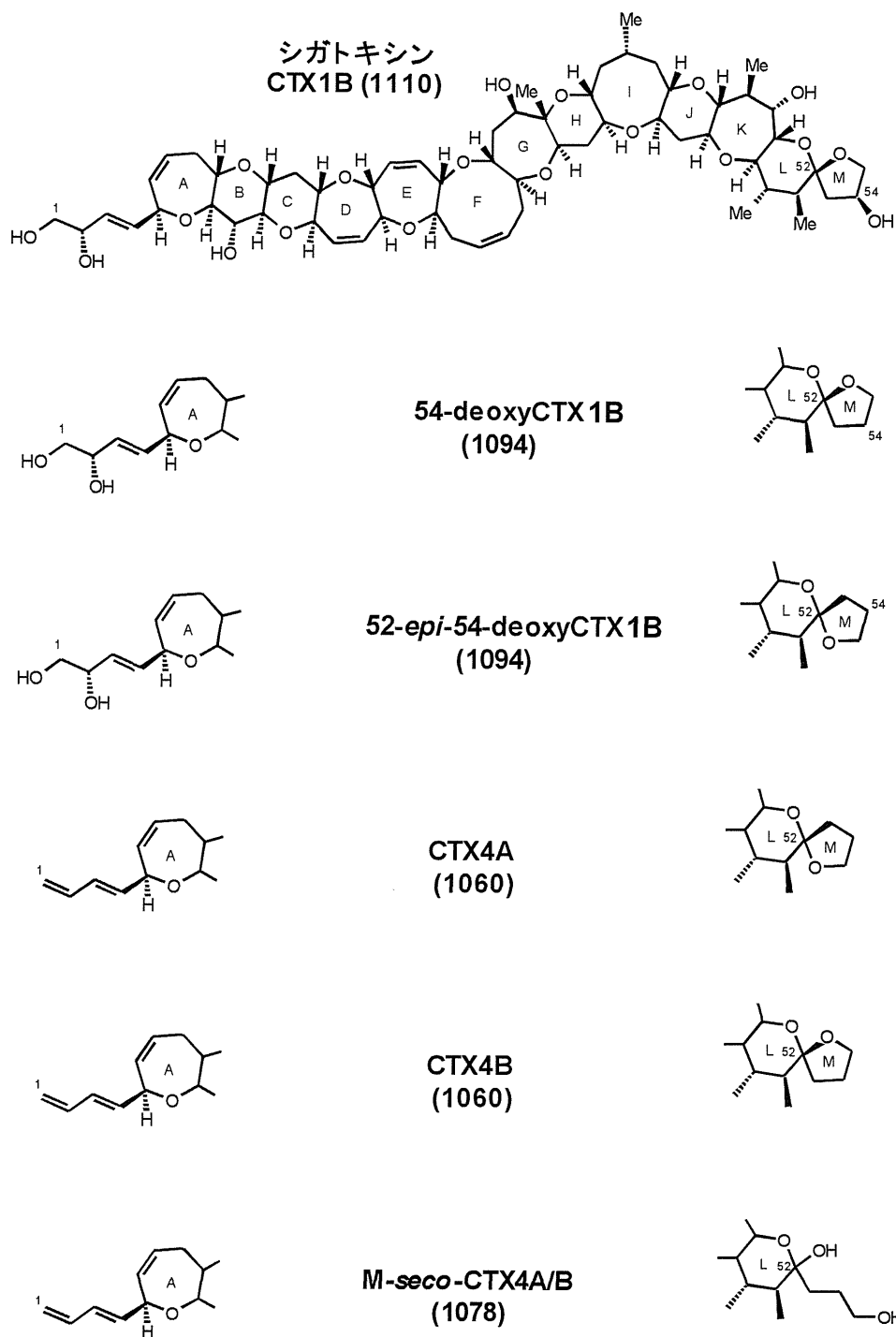


図1. シガトキシン類の構造 (CTX1B 同族体)

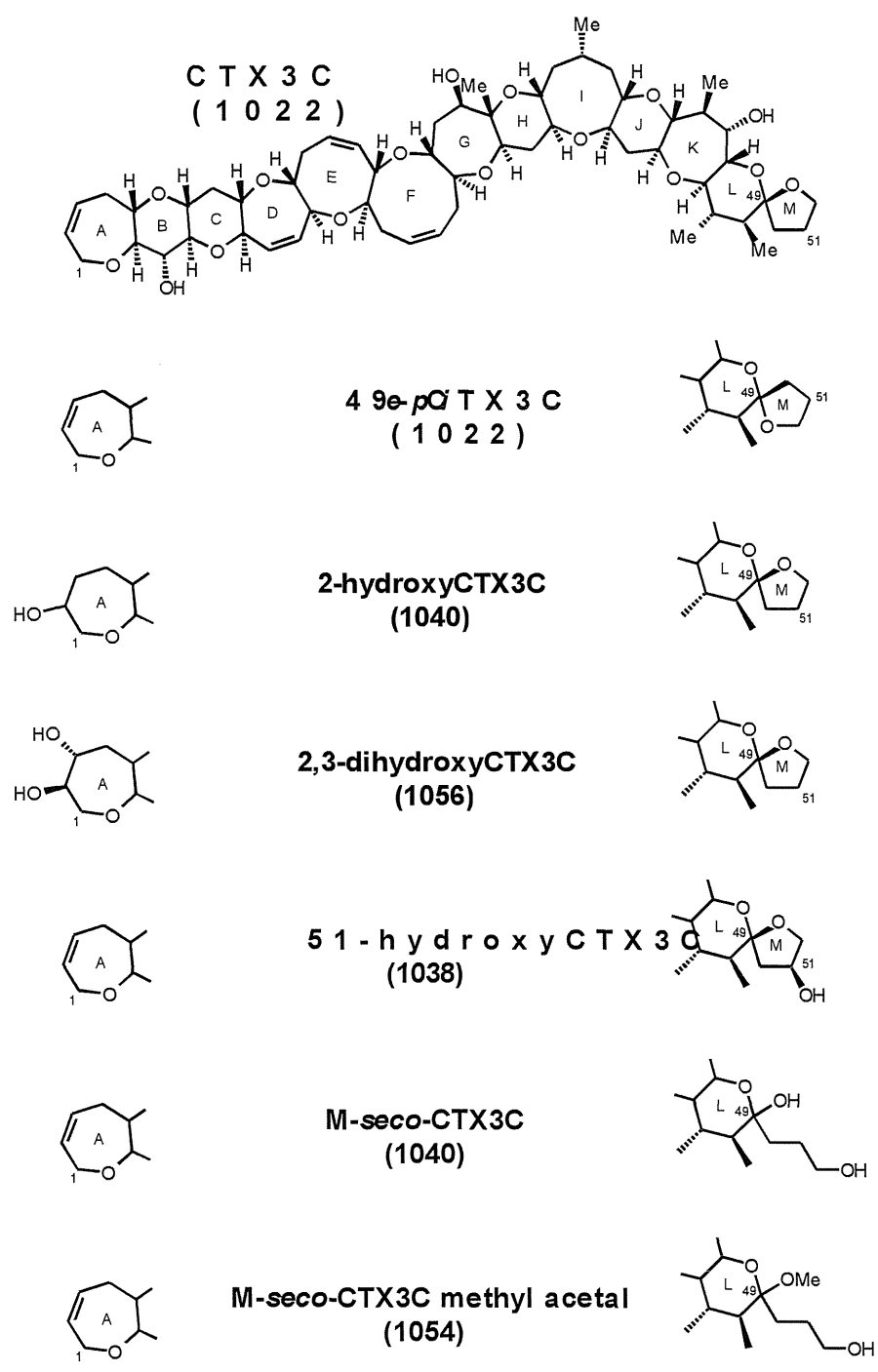


図2. シガトキシン類の構造 (CTX3C 同族体)

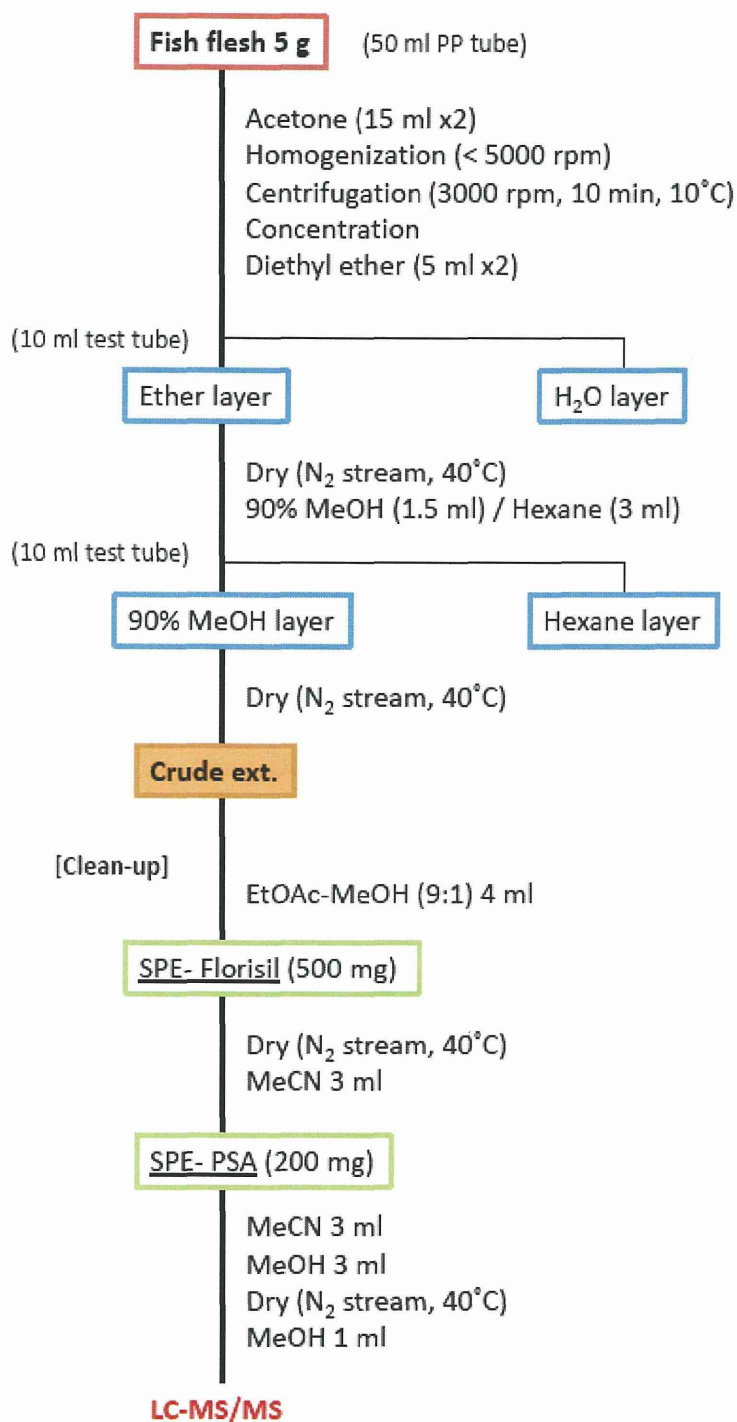


図3. 魚肉試料の抽出および分析用試験液調製スキーム

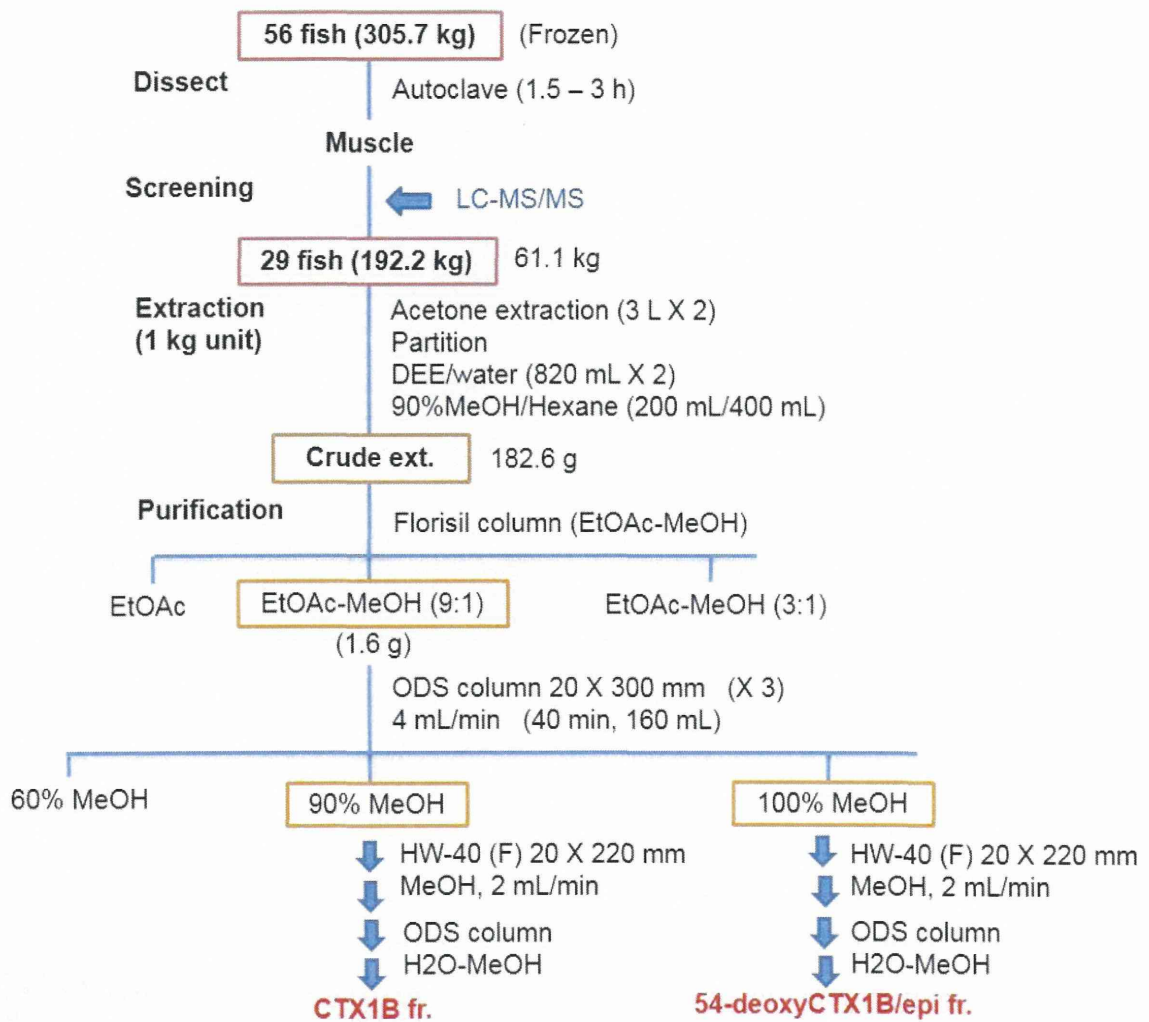


図4. 魚肉試料の抽出および精製スキーム

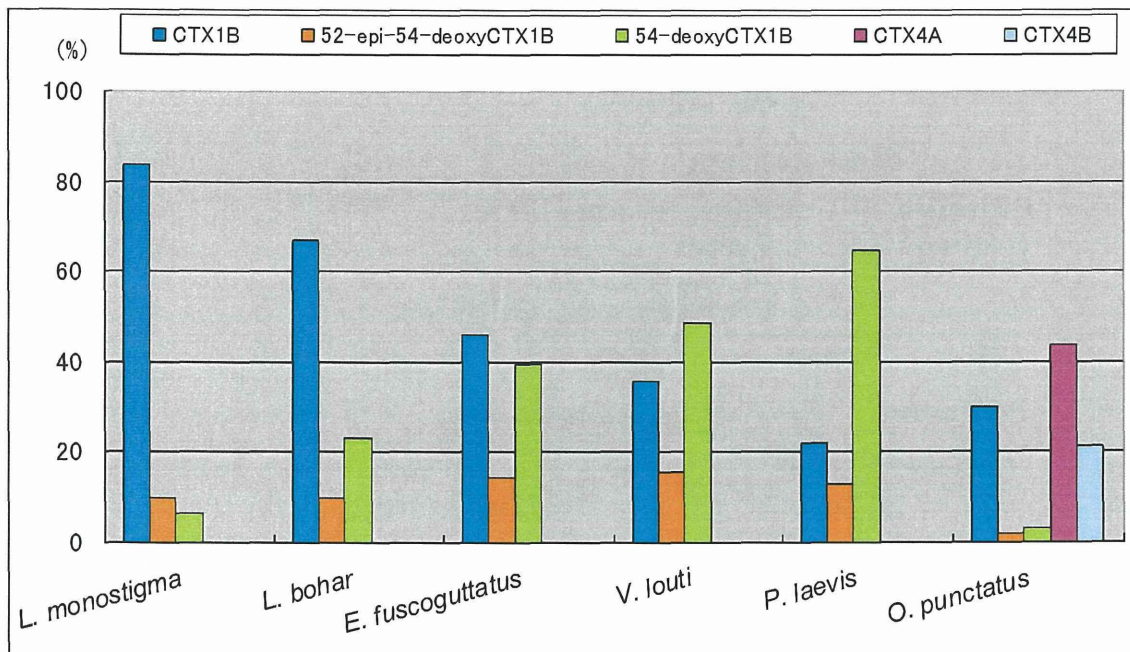


図5. 沖縄産シガテラ魚の毒組成比率

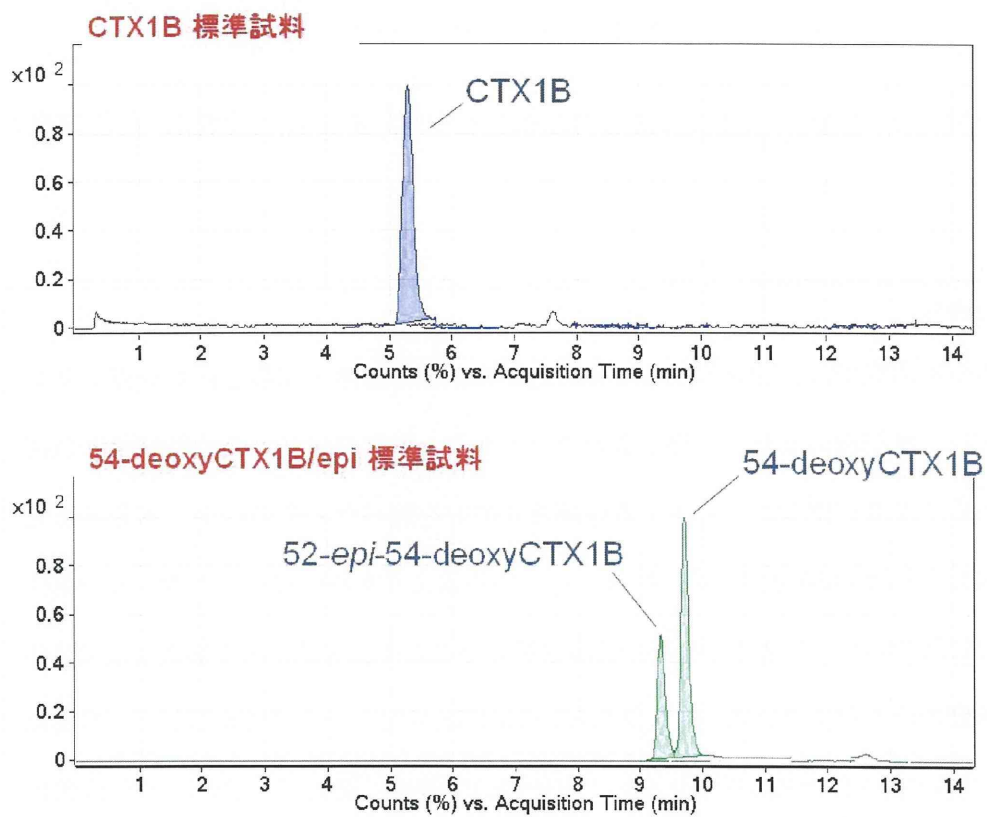


図6. 分析用標準試料のクロマトグラム

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

分担研究：精製された標準毒の生物学的特性の検討

分担研究者 鈴木穂高 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 主任研究官

研究要旨

本分担研究では、昨年度からの本研究班において分離・精製されたシガトキシン (CTXs) 標準毒のうち、主要な毒素成分であり、本研究班で比較的保有量に余裕のある CTX1B に関して、その半数致死量 (LD50) を調べた。その結果、本分担研究で求められた LD50 値は現在、報告されている値よりも数倍高い値となった。現在までに報告されている LD50 値の信頼性が高いことや、本研究班で作成した CTX1B の純度の高さ等を考えると、数倍も高い LD50 値が出ることは考えられず、本研究班で用いている合成物を標品とした定量値の信頼性に疑義が生じた。本分担報告書において報告する LD50 値は上記のように暫定的な値であり、精確な定量結果を待って補正するつもりである。本報告書内の LD50 値の取り扱いについてはくれぐれもご注意をお願いしたい。

A. 研究目的

現在、我が国ではシガテラの検査に公定法は定められていない。しかし、食品衛生検査指針にはマウスを用いた毒性試験法が参考法として記載されており、食中毒検査、食品検査などに用いられている。本研究班においては、LC-MS/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して、昨年度よりシガトキシン標準毒の

分離・精製を行ってきたが、LC-MS/MS 分析法による CTXs の分析の有用性を示すためには、現行のマウスを用いた毒性試験法との比較が必要である。そこで本分担研究では、作成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) を算出することとした。

B. 研究方法

CTX1Bは本研究班で分離・精製したものをを用いた。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選択した。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。すなわち、17~20gのICR系統の雄マウスの腹腔内に試験液1mLを注射し、24時間後の生死で判定した。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

各用量で用いたマウスの数、死亡したマウスの数、致死率について表1に示した。それらの値をプロットし、導き出した用量一致死曲線について、図1(ロジット法)と図2(プロビット法)に示した。2つの計算方法による結果の違いはほとんど見られなかった。

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

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(参考文献1)が7ng/mouse(350ng/kg)、Lewisら(参考文献2)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

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

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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. Murata M, Legrand A M, Ishibashi Y,
Fukui M, Tasumoto T.

J Am Chem Soc, 112, 4380-4386 (1990).

2. Lewis R J, Sellin M, Poli M A, Norton
R S, MacLeod J K, Sheil M M.

Toxicol, 29, 1115- 1127 (1991)

表 1 各投与量の CTX1B 腹腔内投与による致死率

投与量(ng)	例数(匹)	死亡数(匹)	致死率(%)
38.50	5	4	80.0%
35.00	5	3	60.0%
31.50	10	9	90.0%
29.75	10	4	40.0%
28.00	5	1	20.0%
24.50	5	0	0.0%
21.00	5	0	0.0%