

201234025B

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～24年度 総合研究報告書

研究代表者 池原 強

平成25(2013)年 5月

目 次

| | | |
|------------------------|-------|---|
| I. 総合研究報告 | | |
| 食品中の毒素産生微生物及び試験法に関する研究 | ----- | 1 |
| 研究代表者 池原 強 | | |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 8 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 9 |

I . 総合研究報告

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）
（総合）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、熱帯・亜熱帯域に生息する魚類に起因する自然毒食中毒である。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。さらに、原因毒のシガトキシン類は、有毒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、本研究の目的は、CTXs毒組成既知の標準毒混合試料（H23年度）とCTXs主要成分の標準毒を作製し（H24年度）、LC-MS分析法によるCTXsの同定・定量法を確立することにある。

平成23～24年度にかけて以下の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。その結果、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。②有毒個体の蒐集：沖縄諸島で代表的なシガテラ魚81個体446.7 kgの試料魚を蒐集した。バラフェダイ、バラハタ、アカマダラハタでは92～100%の個体にCTX1Bが検出された。ただし、筋肉の毒含量は低く、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。③シガテラ魚の処理法の検討とシガテラ毒の有無の検査、CTXsの抽出・精製：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、抽出・精製のためのシガテラ魚の処理法を検討した結果、従来の4～5分の1程度に処理時間を短縮し、作業効率を著しく高めることができた。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。④純度・含量の検定：CTX1BとCTX3Cの精製品については、¹H NMRとLC-MSで純度を検定し、単一であることを確認した。

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。今後は、作製した標準毒の研究機関への配布や分析依頼への対応及び、バリデーション等がスムーズに行えるように各機関の協力体制を構築する予定である。

H23 年度

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

与儀 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

H24 年度

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

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

大城 直雅

国立医薬品食品衛生研究所・室長

A. 研究目的

シガテラは、熱帯・亜熱帯域に生息する魚類に起因する自然毒食中毒である。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。さらに、原因毒のシガトキシン類は、有毒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、本研究の目的は、CTXs 毒組成既知の標準毒混合試料（H23 年度）と CTXs 主要成分の標準毒を作製し（H24 年度）、LC-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 シガテラ毒魚の蒐集

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拘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沖縄県で蒐集した。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エダイ、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。

③ シガテラ魚の処理法の検討とシガテラ毒の有無の検査、CTXs の抽出・精製

蒐集魚は、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。また、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。さらに、冷凍保存された魚体を解凍せずに効率的に抽出する方法として、オートクレーブ処理を検討した。

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。

④ 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、¹H 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。

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 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。

主な蒐集魚

- ・バラフェダイ 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 (イッテンフェダイ、イシガキダイなど) 12 個体 (総重量 70.5 kg)

全魚種総個体数 81 個体、総重量 446.7 kg のシガテラ魚を蒐集した。

③ シガテラ魚の処理法の検討とシガテラ毒の有無の検査、CTXs の抽出・精製

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°C、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。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。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。

④ 純度・含量の検定

CTX1B と CTX3C の精製品については、¹H NMR と LC-MS で純度を検定し、単一であることを確認した。

D. 考察

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、雑食性のインガキダイは低極性 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。

シガテラ毒魚の蒐集においては、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。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ンガキダイの主要毒 CTX3C については、精製標準品が得られ、¹H 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。

E. 結論

全魚種総個体数 81 個体、総重量 446.7 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時間を従来の 4~5 分の 1 程度に短縮し、作業効率を著しく高めることができた。蒐集した魚について、LC/MS/MS による分析を行った結果、92.5% の個体で 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。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。

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、平成 24 年度は、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。毒組成の解明によって、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。

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) 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) 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)

3) 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)

4) 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)

5) 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.)

6) 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)

7) 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)

8) 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. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|---------------------|----|---------|----------------|
| 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 | 53 | 445-450 | 2011 |
| Yogi, K.; Sakugawa, S.; Oshiro, N.; Ikehara, T.; Sugiyama, K; Yasumoto, T. | Determination of ciguatera fish poisoning in the Pacific by LC-MS | <i>J. AOAC</i> | | | 2013, accepted |
| | | | | | |

III. 研究成果の刊行物・別刷

P-59 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

(TTC^a、沖縄衛環研^b、東北大院理^c、食品分析セ^d)

○與儀健太郎^{a,b}、大城直雅^b、佐久川さつき^b、平間正博^c、安元健^d

はじめに

シガテラ (CFP: Ciguatera Fish Poisoning) は自然毒による食中毒としては世界最大の規模を有し、国内でも南西諸島を中心に毎年発生している。原因毒であるシガトキシン類 (CTXs) は、渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* により産生され、食物連鎖を介し肉食魚へと生物濃縮される¹⁾。これまで仏領ポリネシア産試料から確認された CTXs には 20 以上の同族体があり、基本骨格の環構成の違いから CTX1B タイプと CTX3C タイプに大別できる (図 1)²⁾。しかし、これまで国内 CFP の原因成分は未解明であった。

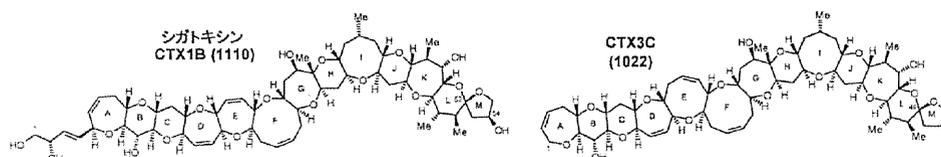


図 1. 仏領ポリネシア産魚類の代表的シガトキシン 2 成分の構造³⁾

シガテラ分析の公定法であるマウス毒性試験 (MBA) は、結果のばらつきが大きく、迅速性や特異性に欠け、動物愛護の観点からも問題とされている。また、MBA では多量の試料 (筋肉 240 g) を必要とするので、魚肉中に極微量しか含まれない CTXs に対応する高感度分析法が望まれた。しかし、機器分析に必要な標準毒や ELISA 分析適用に必要な毒組成情報は得られていなかった。本研究では、高感度かつ選択性に優れた LC-MS/MS による CTXs 一斉分析法の開発と、国内シガテラ魚の毒組成解明を目的とした。

1. シガトキシン類一斉分析法の確立

LC-MS/MS による CTXs 分析について検討したところ、MRM 分析においてプリカーサーイオン/プロダクトイオン共に CTXs に特異的・安定的な $[M+Na]^+$ を選択することで、感度良く分析することが可能であった。一斉分析における CTXs 標準品は、化学合成による CTX1B、CTX3C、51-hydroxyCTX3C⁴⁾、天然試料の精製によって得られた 52-*epi*-54-deoxyCTX1B、54-deoxyCTX1B、CTX4A、CTX4B、2-hydroxyCTX3C、2,3-dihydroxyCTX3C、49-*epi*CTX3C、*M-seco*-CTX3C、*M-seco*-CTX4A/B、*M-seco*-CTX3C methyl acetal^{2),5)}、および CTXs と同じく *G. toxicus* によって産生される類似ポリエーテル成分のガンビエロール、ガンビエロール A、B⁶⁾ を使用した。一部、正確な秤量を行っていない成分については定性分析用標準品とした。一斉分析クロマトグラムを図 2 に示す。移動相はギ酸アンモニウム緩衝液とメタノールのグラジエント分析を行い、計 16 成分の分析時間は 14 分とした。検出下限値 ($S/N > 3$)、定量下限値 ($S/N > 10$) はそれぞれ、0.25 pg、1 pg であった。

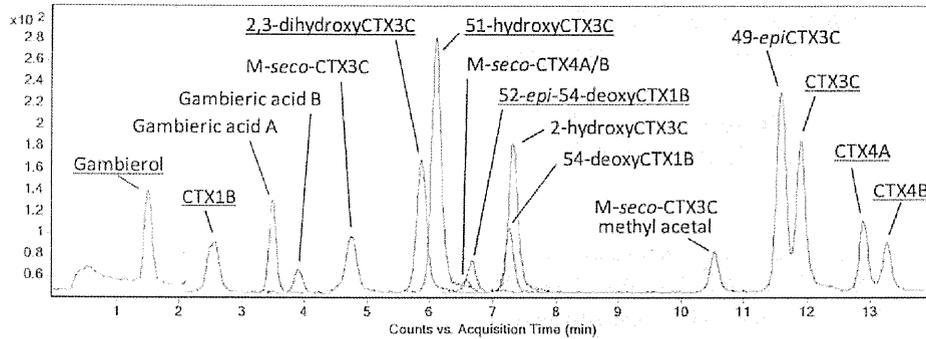


図2. 標準毒の一斉分析 MRM クロマトグラム (下線の成分は 1 ng/ml)

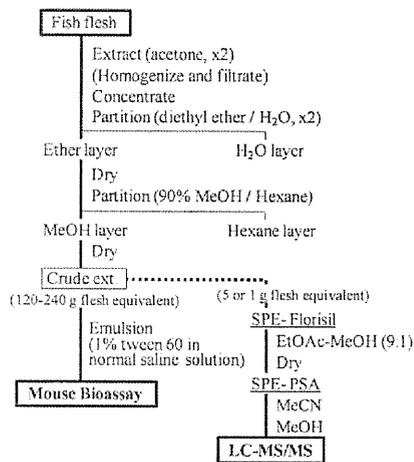


図3. MBA 抽出工程と LC-MS/MS 分析の前処理

魚肉の抽出は、シガテラ公定法であるマウス毒性試験法⁷⁾に準じて行い、得られた粗抽出物について、固相抽出による前処理法の検討を行った。その結果、1-5 g 相当量の魚肉抽出物について、フロリジルおよび PSA カートリッジカラムによる簡易処理により LC-MS/MS 分析用試験液を調製できることがわかった (図3)。これにより、MBA で陰性とされた魚肉試料でも 20 pg/g 程度の CTX1B が検出可能であった (図4)。

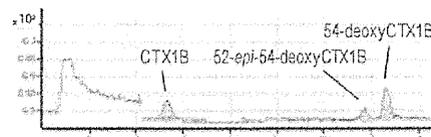


図4. MBA 毒性非検出魚肉でも微量 CTXs を検出した (5 g/ml)

2. 国内で発生したシガテラ原因魚の毒組成

沖縄、宮崎、茨城で発生した CFP の原因食品について分析した。

沖縄で近年発生した CFP⁹⁾の原因食品の魚 6 種全てから、CTX1B とその同族体の 4 成分を検出した (図5)。CTX1B は 1 種を除いて主成分であった。一方、CTX3C とその同族体は確認されなかった。

宮崎で発生した CFP の原因魚イシガキダイについては、PSA による前処理が適用できなかったため、ODS カートリッジカラムで簡易精製を行い試験液とした。沖縄の食中毒検体とは対照的に、宮崎 CFP 検体からは CTX3C とその同族体のみが検出された。さらには、茨城で食中毒の原因となった南鳥島産バラフエダイからは、CTX1B および CTX3C 両タイプの同族体 8 成分を検出した (図6)。

従来は、*G. toxicus* からのみ検出され、毒の生合成前駆体と見なされていた M-seco 体が、多数の魚肉試料から初めて検出された。M 環は酸性条件下で容易に環化する

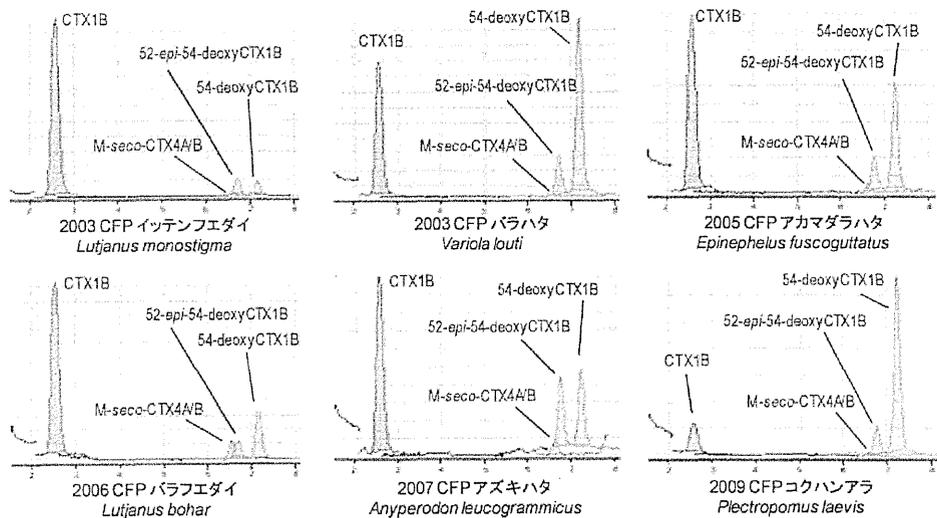


図 5. 沖縄で発生したシガテラ原因魚の毒組成

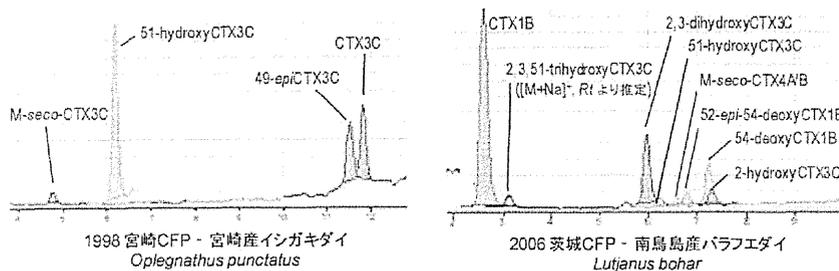


図 6. 宮崎および茨城で発生したシガテラ原因魚の毒組成

3. 沖縄の代表的シガテラ魚の毒成分比率

沖縄近海の各地で漁獲されたシガテラ魚⁸⁾の筋肉毒組成について、種特异性、地域変異および個体変異を検討した。図 7 に示すように、毒成分比率には大きな種内あるいは地域変動は無く、毒組成の種特异性を支持した。

54-deoxyCTX1B はハタ類に比較的多く検出され、特にコクハンアラでは主成分であった。CTXs は酸化により毒性が増す傾向があるが、図 7 は魚体内蓄積過程における C54 位の酸化に関する魚種間の差を示し、興味深い。

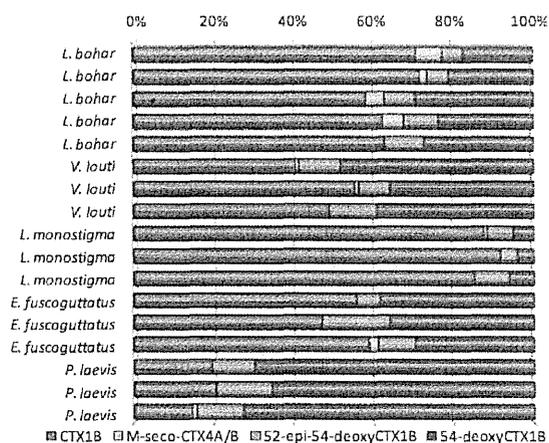


図 7. 沖縄産シガテラ魚筋肉の CTXs 比率

4. LC-MS/MS 定量値とマウス毒性との比較

LC-MS/MS 定量値を毒性換算し、MBA 結果と比較した。比毒性は、CTX1B: 7 ng/MU、52-*epi*-54-deoxyCTX1B: 14 ng/MU とした。54-deoxyCTX1B および M-*seco*-CTX4A/B については、毒性データが無いため除いた。図5に示した沖縄 CFP 検体に、0.05~0.4 MU/g のマウス毒性を確認したが、LC-MS/MS 分析結果と良好な相関を示した(図8)。また、沖縄近海で漁獲されたパラフェダイについても、LC-MS/MS 定量値はマウス毒性と矛盾しないことを確認した(図9)。

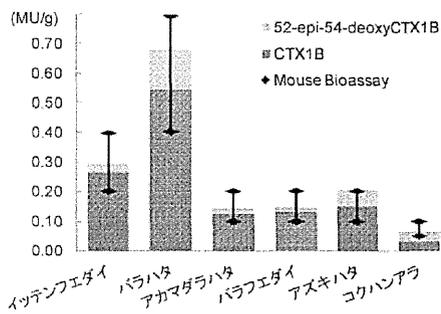


図8. 沖縄 CFP 原因魚の LC-MS/MS - マウス毒性相関

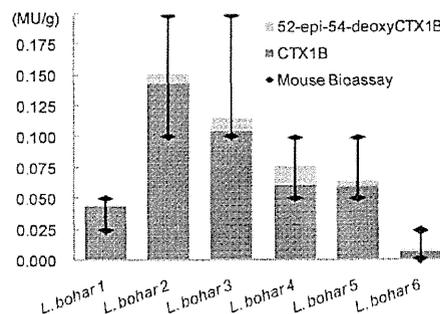


図9. 沖縄産パラフェダイの LC-MS/MS - マウス毒性相関

5. 渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* の毒組成

CTXs の起源生物である *G. toxicus* は日本沿岸でも広く分布しているが、これまでに国内で CTXs を産生する株は確認されていない。そこで、過去にランギロア環礁で採取され東北大で培養された株 (RGI-1) の抽出物を分析に供した。ODS カラムにより分離し、95% MeOH フラクションに CTXs を認めた。これまで確認されていた CTX3C や CTX4A、CTX4B などの低極性 CTXs などに加え、微量であるが酸化型の CTXs も複数の試料から検出した(図10)。

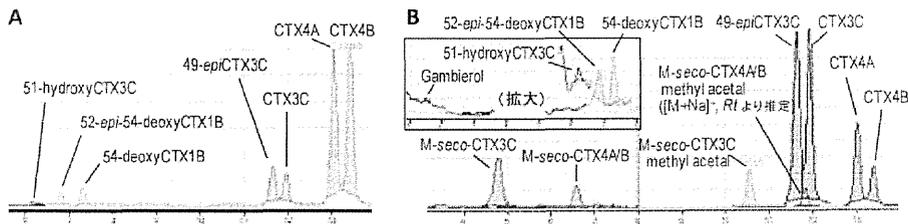


図10. *G. toxicus* (RGI-1 strain) 2試料の毒組成と酸化型 CTXs の検出

まとめ

LC-MS/MS による CTXs 一斉分析法の確立により、国内で発生した CFP の毒組

成を解明し、CTXs 組成に地域差および魚種差があることを認めた。また、微量ではあるが魚肉中に M-sec α -CTXs を、*G. toxicus* 抽出物中に酸化型の CTXs をそれぞれ初めて確認した。これらは、食物連鎖および代謝機構を知る上で重要な情報であり、その解明に向けて本分析法が有力なツールとなる。

また、今回明らかにされた国産魚の毒組成は、MBA 以外の分析法 (ELISA、LC-MS/MS) の適用について重要な情報を提供するものである。

謝辞

本研究の推進にご協力頂いた沖縄県衛生環境研究所の稲福恭雄元所長、玉城宏幸氏、玉那覇康二氏、(株)トロピカルテクノセンターの池原強博士、廣瀬美奈博士、吉野敦博士に深謝いたします。本研究は、文部科学省地域イノベーションクラスタープログラム・都市エリア型「マリンバイオ産業創出事業」、および一部、厚生労働科学研究費 (食品の安全確保推進研究事業) により実施した。

References

- 1) Yasumoto, T. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2005**, *81*, 43–51.
- 2) Yasumoto, T.; Igarashi, T.; Legrand, A.M.; Cruchet, P.; Chinain, M.; Fujita, T.; Naoki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4988–4989.
- 3) (a) Murata, M.; Legrand, A.M.; Ishibashi, Y.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8929–8931. (b) Satake, M.; Morohashi, A.; Oguri, H.; Oishi, T.; Hiramata, M.; Harada, N.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11325–11326. (c) Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1975–1978.
- 4) (a) Hiramata, M.; Oishi, T.; Uehara, H.; Inoue, M.; Maruyama, M.; Oguri, H.; Satake, M. *Science* **2001**, *294*, 1904–1907. (b) Inoue, M.; Miyazaki, K.; Uehara, H.; Maruyama, M.; Hiramata, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 12013–12018. (c) Inoue, M.; Miyazaki, K.; Ishihara, Y.; Tatami, A.; Ohnuma, Y.; Kawada, Y.; Komano, K.; Yamashita, S.; Lee, N.; Hiramata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9352–9354.
- 5) (a) Satake, M.; Ishibashi, Y.; Legrand, A. M.; Yasumoto, T. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *60*, 2103–2105. (b) Satake, M.; Fukui, M.; Legrand, A. M.; Cruchet, P.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1197–1198.
- 6) (a) Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 361–362. (b) Nagai, H.; Torigoe, K.; Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Hirota, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1102–1103. (c) Fuwa, H.; Goto, T.; Sasaki, M. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2211–2214.
- 7) 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.
- 8) Oshiro, N.; Yogi, K.; Asato, S.; Sasaki, T.; Tamanaha, K.; Hiramata, M.; Yasumoto, T.; Inafuku, Y. *Toxicon* **2010**, *56*, 656–661.

Toxin Profiles of Ciguateric Fish in Japan

Kentaro Yogi^{a,b}, Naomasa Oshiro^b, Satsuki Sakugawa^b,

Masahiro Hirama^c, Takeshi Yasumoto^d

(^aTropical Technology Center, ^bOkinawa Prefectural Institute of Health and Environment, ^cGraduate School of Science, Tohoku University, ^dJapan Food Research Laboratories)

Ciguatera (CFP: ciguatera fish poisoning) is a food poisoning of worldwide occurrence. We developed a sensitive determination method for the causative toxins employing the high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The use of 16 reference toxins prepared either by chemical synthesis or isolation from natural sources enabled to perform the accurate and simultaneous analysis. The method clarified toxin profiles in fish from different place in Japan for the first time. A good agreement was observed between the LC-MS/MS and mouse bioassay results. Detailed toxin analysis of fish and the causative alga, *Gambierdiscus toxicus*, from French Polynesia newly revealed the occurrence of M-*seco* toxins in fish flesh and oxidized toxins in *G. toxicus*. The new LC-MS/MS method is a promising tool not only for food safety but also to study the toxin dynamics during the food chain transmission.

Determination of toxins involved in ciguatera fish poisoning in the Pacific by LC/MS

Kentaro Yogi^a, Satsuki Sakugawa^b, Naomasa Oshiro^c, Tsuyoshi Ikehara^d, Kiminori Sugiyama^e, Takeshi Yasumoto^{f*}

^a Department of Health Sciences, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-0215, Japan

^b Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment, 2085 Aza-Ozato, Ozato, Nanjo, Okinawa 901-1202, Japan

^c National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

^d Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki, Nagasaki 852-8523, Japan.

^e Central Research Laboratory Nippon Suisan Kaisha, Ltd, 559-6 Kitanomachi, Hachioji-shi, Tokyo 192-0606, Japan.

^f Japan Food Research Laboratories, 6-11-10 Nagayama, Tama-shi, Tokyo 206-0025, and National Research Institute of Fisheries Science, 2-12-4 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-8648, Japan.

*Corresponding author:

FAX, +81-42-372-6893

E-mail, yasumotot@jfrl.or.jp

Abstract

Ciguatera fish poisoning (CFP) is the most extensive and difficult to control of the seafood poisonings. To facilitate monitoring of fish toxicity, toxin profiles were investigated by an LC-MS/MS method using 14 reference toxins on eight representative species of fish collected in four different areas of the Pacific. Snappers and groupers from Okinawa contained ciguatoxin-1B (CTX1B) and two deoxy congeners at variable but species-specific ratios, while red snapper, *Lutjanus bohar*, from Minamitorishima, and amberjack, *Seriola dumerili*, from Hawaii contained both CTX1B-type and ciguatoxin-3C (CTX3C)-type toxins. Spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*, from Okinawan waters contained mainly ciguatoxin-4A (CTX4A) and ciguatoxin-4B (CTX4B) but the same species caught at Miyazaki was contaminated primarily with the CTX3C-type toxins. Otherwise, the toxin profiles were consistently species-specific in fish collected from various locations around Okinawa over 20 years. The LC-MS/MS and mouse bioassay results agreed well, indicating the LC-MS/MS method as a promising alternative to the mouse bioassay. Pure CTX1B and CTX3C were prepared for use in future LC-MS/MS analysis.