

第7章
自然毒

総論

天然に存在する動植物のなかには、有毒な成分を含むものがある。これらは日常摂取する食品中に取り込まれているおそれがあり、食品衛生上の問題を生ずる。

自然毒による食中毒で動物性の主なものは、貝毒とフグ毒であり、一方、植物性の主なものは、きのこ毒である。これらの自然毒による食中毒は、ほとんどが急性症状を示すが、ワラビの成分のように慢性毒性を示す成分もある。

自然毒の原因物質は、化学的物質による食中毒と異なり、単一成分で存在するものは少なく、複合成分として存在するものが多い。そのため、原因物質の分離精製が困難で、化学構造が明らかにされていないものがある。また明らかにされていても、複雑な構造をもち、不安定で、含量もきわめて微量のものが多く、分析標準品の作出が困難なので化学分析の障害となる。

また、自然毒の含有量は、生育場所、季節などによって、変動が大きく、個体による差も大きい。

食品衛生法では、これらの主な食中毒について試験法が定められている。

試験法には、理化学的試験法と生物学的試験法がある。しかし、動物毒では理化学的な方法での分析は困難な場合が多いので、生物学的試験法が多く用いられている。

本章では、自然毒を動物毒と植物毒に分けて、わが国で食品衛生上問題となる主なものについて、その試験法を記載した。

動物毒は、フグ毒、記憶喪失性貝毒、麻痺性貝毒、下痢性貝毒、アザスピロ酸、シガテラ、テトラミン、およびそのほかの魚介毒（ベネルーピン、パリトキシン、アオブダイ毒）について記載した。また、大型海藻による中毒は他の海産毒との関連もあるので、解説に加えた。

植物毒は、きのこ毒、青梅、豆類などのシアン（青酸）化合物、高等植物起源の急性毒性物質および高等植物起源の特殊毒性物質について記載した。

なお、貝毒を主体とする動物毒については、経口投与実験による毒性の再評価が世界的に求められている。食品中の許容値が変更される可能性があることを付記する。

試 験 法

A 動物毒

1. フグ毒

わが国では、フグは古くから賞味されてきた。しかし、フグが持つ強力な毒は多くの死者を含む食中毒を引き起こしてきた。現在でも食中毒の死者の数に占めるフグ中毒による犠牲者の割合は大きく、平成 10～23 年の食中毒による死者の 34.1% を占めている。フグの毒性はフグの種類、産地、季節によって異なり、また、同一海域で同時期に捕獲された同一種においても、無毒に近いものから猛毒の個体までその毒性は著しい個体差を示す。したがって、食中毒を防ぐためには、フグ毒に関する十分な知識と、それに基づく適切な処理を欠くことができない。これまでに報告されているフグ中毒のほとんどが、家庭で調理したフグの消費など、これらを欠いた場合に起こっている。日本近海のフグの衛生確保については厚生省環境衛生局長通知環乳第 59 号（昭和 58 年 12 月 2 日）が出され、食用に供することができるフグの種類と部位が定められている。フグ毒の法的規制に関する資料やフグの名称と鑑別法は厚生省生活衛生局乳肉衛生課により取りまとめられ出版されている^{文献1)}。

フグ毒テトロドキシンの化学構造は、1964 年に津田ら、平田ら、Woodward らのグループによって独立して図 7-1 のように決定された。

通知では個別の毒性試験により有毒でないことを確認すれば、食品として良いとされている。フグ毒は 10 MU/g 以下を無毒として取り扱う^{文献1)}。

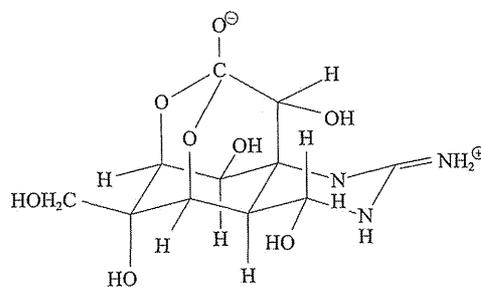


図 7-1 テトロドキシンの構造式

マウス検定法^{解説法1~6)} (参考法)

① 試料の調製

まず、文献1)に掲載された写真および特徴(体色、斑紋、棘の有無など)と照合して種の同定を行う。できれば専門家の協力を求めることが望ましい。試験に供する試料は、検体のフグから各種臓器、組織を解剖用の鋭利なはさみやメスを用いて採取する。凍結された試料の場合は、プラスチックで包んで水に直接触れないようにしたのち、流水中で急速解凍してから採取する。この際、完全に解凍したのち試料の採取を行うと組織中の毒が他の組織に移ることがあり、種によっては皮に含まれる多量の毒が筋肉に移行するので注意を要する。したがって、凍結試料の場合は半解凍の状態を試料を採取する必要がある。採取した試料ははさみで細切したのち、乳鉢でよくすりつぶす。磨碎物10gをビーカーに入れ、0.1%酢酸溶液25mLを加え、沸騰浴中でときどきかくはんしながら10分間加熱する。冷却後、減圧ろ過する。ろ紙上の残渣を0.1%酢酸溶液で反復洗浄し、ろ液と洗液を合わせて50mLに定容する。この抽出液1mLは原臓器、組織の0.2gに相当する。この粗毒原液は速やかに動物実験に供することが望ましいが、ポリエチレン容器に移して密栓し、 -20° 以下で凍結保存することができる。

皮以外の組織では、乳鉢に代えてホモジナイザーを用いて磨砕を行ってもよい。皮、肝臓、卵巣の抽出液のろ過は著しく困難なことが多いので、加熱抽出した磨碎物を冷却後遠沈管に移し、遠心分離で抽出液を採る。遠沈管中の残渣を0.1%酢酸溶液で洗い、再度遠心分離を行って、抽出液と洗液を合わせて50mLに定容する。その際に、遠心分離液の表層に分離したゼラチン様物質や脂質は抽出液に含めない。

検体の臓器や組織が少量で10gを得ることができない場合は、上記の方法に準じて抽出液の量を減じて行う。なお、低毒力の試料の測定のために、洗液の量を減らしたり、抽出液を濃縮することは、精度の低下を招くので好ましくない。

② マウス毒性試験

試験動物としては生後4週、体重19~21gの健康な雄マウス(ddY系)を使用する。まず、予備試験として、粗毒原液1mLをそれぞれ2尾のマウスの腹腔内に注射し、致死時間の平均値を秒単位で測定する。河端らの作成したフグ毒の致死時間-マウス単位換算表(表7-1)を参照して粗毒原液1mL中の毒量を換算する。この値に基づいて、マウスが10分前後で死亡するような濃度に希釈液を調製し、本試験に用いる。希釈には蒸留水を用いる。

表 7-1 フグ毒の致死時間-マウス単位 (MU) 換算表*

致死時間	MU	致死時間	MU	致死時間	MU
分：秒		分：秒		分：秒	
4：00	5.62	40	2.53	13：00	1.42
05	5.40	50	2.46	15	1.40
10	5.19	7：00	2.39	30	1.38
15	5.00	10	2.33	45	1.36
20	4.82	20	2.27	14：00	1.34
25	4.66	30	2.22	30	1.33
30	4.50	40	2.17	15：00	1.30
35	4.36	50	2.12	30	1.28
40	4.23	8：00	2.08	16：00	1.26
45	4.10	15	2.01	30	1.24
50	3.99	30	1.96	17：00	1.23
55	3.88	45	1.91	30	1.21
5：00	3.77	9：00	1.86	18：00	1.19
05	3.68	15	1.81	30	1.18
10	3.58	30	1.77	19：00	1.17
15	3.50	45	1.74	30	1.15
20	3.42	10：00	1.70	20：00	1.14
25	3.34	15	1.67	30	1.13
30	3.26	30	1.64	21：00	1.12
35	3.19	45	1.61	30	1.11
40	3.13	11：00	1.58	22：00	1.10
45	3.07	15	1.56	30	1.09
50	3.01	30	1.53	23：00	1.08
55	2.95	45	1.51	30	1.08
6：00	2.89	12：00	1.49	24：00	1.07
10	2.79	15	1.47	30	1.06
20	2.70	30	1.45	25：00	1.05
30	2.61	45	1.43		

* 表 7-1 および表 7-2 は河端・小林の表

本試験では、まず、希釈試験液各 1 mL をマウス 2 尾の腹腔内に注射し、致死時間を測定する。マウスが 10 分程度で死亡した場合は、さらに 1～3 尾のマウスを追加し致死時間の測定を行う。希釈液での致死時間が 7～13 分の間にない場合は、粗毒原液または第 1 回希釈液を用いて希釈をやり直す。

フグ毒を注射されたマウスはしばらく静止したのち、急に走り出す。次第によろめくようになり、やがて急に飛び跳ねながら反転し、四肢を激しくけいれんさせ、大きくあえぐ。やがてあえぎが小さく、間隔も長くなり死亡する。死亡の判定は呼吸の停止で行う。

③ 毒力の計算と表示

本試験で得られた 3～5 尾のマウスの致死時間を、生存したマウスを含めて短いほうから順

に並べ、中央致死時間 (mean death time) を求める。得られた中央致死時間から表 7-1 によって毒量 (マウス単位; mouse unit (MU)) を算出する。やむを得ず 19 g 以下または 21 g 以上 (23 g 以上は使用しない) のマウスを使用した場合は、それぞれのマウスの致死時間から表 7-1 によって MU を求め、さらにマウス体重-マウス単位補正表 (表 7-2) を用いて MU の補正を行う。この補正した MU の中央値をもって、その希釈液の毒量を示す。なお、1 MU とは体重 20 g のマウスを 30 分で死亡させる毒量と定義され、テトロドトキシン^{解説注6)} 0.22 μg に相当する。得られた MU に希釈倍率を乗じ、原検体 1 g あたりの MU を求める。

例えば、10 g の臓器から得た 50 mL の粗毒原液について 2 尾のマウスで予備試験を行い、中央致死時間が 5 分 15 秒であったとすると、粗毒原液の毒力は約 3.5 MU/mL である。表 7-1 から約 2 倍に希釈すれば、10 分前後で死亡することが予測される。そこで 2 倍希釈液を調製し、本試験を行って中央致死時間 10 分 15 秒を得たとすれば、希釈液の毒力は 1.67 MU/mL である。希釈倍率が 2、抽出比が 5 であるので、毒力は次のように計算される。

$$\text{原検体 1 g の毒力} = 1.67 \times 5 \times 2 = 16.7 \text{ MU}$$

表 7-2 マウス体重-マウス単位補正表

マウス体重 (g)	MU
12.0	0.60
12.5	0.63
13.0	0.65
13.5	0.68
14.0	0.70
14.5	0.73
15.0	0.75
15.5	0.78
16.0	0.80
16.5	0.83
17.0	0.85
17.5	0.88
18.0	0.90
18.5	0.93
19.0	0.95
19.5	0.98
20.0	1.00
20.5	1.03
21.0	1.05
21.5	1.08
22.0	1.10

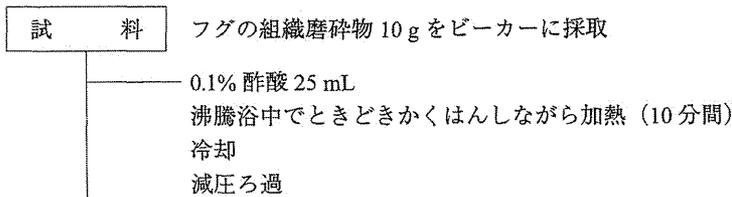
解説

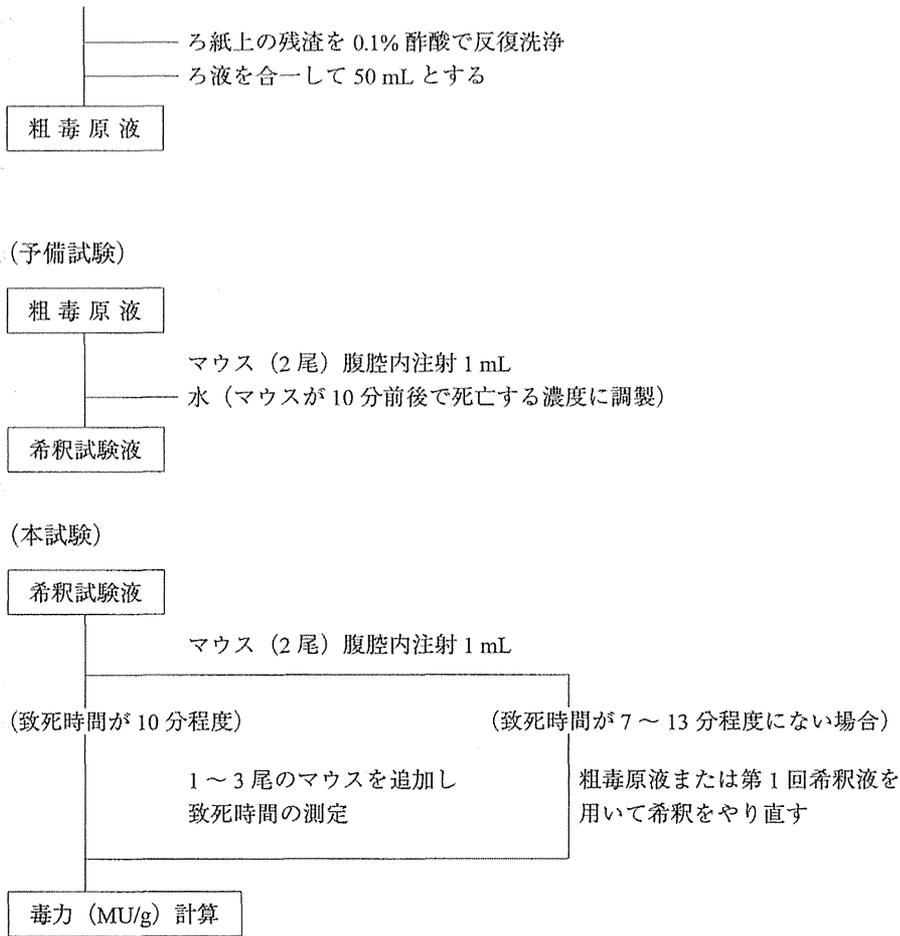
① 試験法の概要

テトロドトキシンは弱酢酸性溶液中で安定なため、検体の 0.1% 酢酸抽出物をマウス腹腔内投与し、その致死時間から、致死時間-マウス単位 (MU) 換算表を基に毒量を求める方法である。

② 操作のフローチャート

(抽出)





③ 注解および留意点

- 1) ここに記した試験法では、毒力が 5 MU/g 以下の検体を測定することはできない。しかし、毒力が 10 MU/g 以下の場合には食用に供しても健康を害するおそれがないと判断されるので、本試験法の定量限界でも実用上支障はない。熱帯産のフグの場合、フグ毒テトロドキシンのほかに別項で述べる麻痺性貝毒の一成分サキトキシンがしばしばかなりの濃度で混在するので、マウス試験の結果には注意を要する^{文献2)}。しかし、日本産フグの場合、麻痺性貝毒の含量はテトロドキシニンに比べ著しく小さく、マウス試験の結果にはほとんど影響を与えない。
- 2) 表 7-3 に「フグ毒の衛生確保について」の環境衛生局長通知環乳第 59 号（昭和 58 年 12 月 2 日）に採用されている、処理などにより人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類および部位を示す。
- 3) 熱帯・亜熱帯海域には筋肉部に高い毒性を持つドクサバフグが生息する。本種は

近年、日本の沿岸域や東シナ海でもしばしば漁獲されており、表7-3に記載のシロサバフグやクロサバフグと形態的に類似しているため、判別には注意を要する。また、ドクサバフグと同様、筋肉部に毒性があるといわれるコモンドマシが黄海および東シナ海において漁獲されるサンサイフグに混入することがある。これら食用不適のフグの衛生対策については、環境衛生局長通知環乳第68号（昭和57年10月22日）、環乳第59号（昭和58年12月2日）、環境衛生局乳肉衛生課長通知環乳第60号（昭和58年12月2日）などに記載されている。

- 4) 表7-3のナシフグの取扱いについては、昭和58年の厚生省通達（環乳第59号）を一部改正した厚生省生活衛生局長通知（平成7年12月27日環乳第270号）が出され、長崎県および熊本県周辺の限定された海域で漁獲されたナシフグについて、有毒部位の毒が筋肉へ移行することがないように適切な措置をしたのちに販売などが認められる食品として取り扱うことが定められた。
- 5) 塩蔵品や乾製品を通常の方法で抽出すると、多量の塩やエキス分が混入し、マウス毒性試験が実施できないことがある。このような場合には、以下の処理により粗毒原液中の塩やエキス分を除いた検液を調製し、マウス毒性試験を実施する。すなわち、粗毒原液を低濃度のカセイソーダ液（0.1 M程度が望ましい）でpH7前後に調整したのち、活性炭カラム（10×150 mm）に通して毒を吸着させ、30 mLの蒸留水でカラムを洗って塩や不純物を除く。次いで、20%のエタノールを含む1%酢酸水溶液50 mLで毒を溶出し、溶出液を減圧下で乾固し、残渣を蒸留水に溶解して検液を調製する。ただしこの場合、測定値の精度は低下する。次項6)に記載した高速液体クロマトグラフィーでは塩類などによる妨害は少ない。
- 6) テトロドトキシンは酢酸溶液では比較的安定であるが、中性溶液での加熱、アルカリや強酸溶液中では不安定である。したがって、フグから海水中に放出された毒は比較的短時間のうちに分解される。含水アルコールを除く有機溶媒にはほとんど不溶である。アルカリ溶液中で加熱するとC9塩基と呼ばれるアミノキナゾリン誘導体に分解されるので、GC-MSで確認することができる^{文献3)}。また、アルカリでの短時間の加熱では強い蛍光をもつ分解物を生成し、この反応を利用した蛍光-高速クロマトグラフィーが開発されている^{文献4)}。さらにLC-MSもしくはLC-MS/MSによる分析法が開発されている^{文献5,6)}。逆相分配系のLCカラムを使用する場合は移動相に添加するイオン対試薬の濃度によっては著しくMSによる検出感度が低下するので注意を要する。これらの機器分析を用いることにより、フグやフグ毒をもつそのほかの生物に存在するテトロドトキシンの同族体を精度よく分離、定量することができる。

表7-3 処理などにより人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類および部位

科名	種類(種名)	部位		
		筋肉	皮	精巢
フグ科	クサフグ	○	—	—
	コモンフグ	○	—	—
	ヒガンフグ	○	—	—
	ショウサイフグ	○	—	○
	ナシフグ	○	—	○
	マフグ	○	—	○
	メフグ	○	—	○
	アカメフグ	○	—	○
	トラフグ	○	○	○
	カラス	○	○	○
	シマフグ	○	○	○
	ゴマフグ	○	—	○
	カナフグ	○	○	○
	シロサバフグ	○	○	○
	クロサバフグ	○	○	○
	ヨリトフグ	○	○	○
サンサイフグ	○	—	—	
ハリセンボン科	イシガキフグ	○	○	○
	ハリセンボン	○	○	○
	ヒトヅラハリセンボン	○	○	○
	ネズミフグ	○	○	○
ハコフグ科	ハコフグ	○	—	○

- 注) 1. 本表は、有毒魚介類に関する検討委員会における検討結果に基づき作成したものであり、ここに掲載されていないフグであっても、今後、鑑別法および毒性が明らかになれば追加することもある。
2. 本表は、日本の沿岸域、日本海、渤海、黄海および東シナ海で漁獲されるフグに適用する。ただし、岩手県越喜来湾および釜石湾ならびに宮城県雄勝湾で漁獲されるコモンフグおよびヒガンフグについては適用しない。
3. ○は可食部位。
4. まれに、いわゆる両性フグといわれる雌雄同体のフグが見られることがあり、この場合の生殖巣はすべて有毒部位とする。
5. 筋肉には骨を、皮にはヒレを含む。
6. フグは、トラフグとカラスの中間種のような個体が出現することがあるので、これらのフグについては、両種とも○の部位のみを可食部位とする。

【参考文献】

- 1) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課編：三訂日本近海産フグ類の鑑別と毒性，2003，中央法規出版
- 2) S. Sato, et al. : *Toxicon*, **38**, 1101 (2000)

- 3) 末永和之：日法医誌, 32, 97 (1978)
- 4) M. Yotsu, et al. : *Agri. Biol. Chem.*, 53, 893 (1989)
- 5) Y. Shoji, et al. : *Annal. Biochem.*, 290, 10 (2001)
- 6) 山下まり：バイオサイエンスとインダストリー, 66, 624 (2008)

2. 記憶喪失性貝毒（ドウモイ酸）

ドウモイ酸については、食品衛生法上の基準値などは設定されていないが、Codex では 20 mg/kg が基準値として設定されている。

1987年秋、カナダ東岸のプリンスエドワード島で、養殖ムラサキガイを原因とする食中毒が発生し、3名の死者を含む100名以上の患者が報告された。患者は下痢や嘔吐などの食中毒症状に加え、記憶喪失や方向感覚の障害などの特徴的な症状を示したことから、本中毒は記憶喪失性貝中毒（Amnesic Shellfish Poisoning；ASP）と名づけられた。中毒原因物質はアミノ酸の一種のドウモイ酸と同定された。本物質は同海域に生息する羽状目珪藻 *Pseudo-nitzschia multiseries*（以前は *Nitzschia pungens* f. *multiseries* と呼ばれていた）によって高度に産生され、この珪藻を食べた貝が毒化することが明らかになった。カナダや米国ではいち早く監視体制を確立し、貝の可食部のドウモイ酸含量が 20 µg/g (20 ppm) を超えると出荷規制を行った。そのため、欧米では貝類の毒性がこの規制値を超えることが少なからずあるにもかかわらず、大きな ASP の報告はない。この規制値は国際的に採用されている。ドウモイ酸はムラサキガイ、カキ、ホタテガイ、マテガイなどの貝類ばかりでなくカニ（ダンジネスクラブ）やアンチョビーなどの魚類からも検出され、魚類を餌とする海鳥や海獣（トド）の大量へい死の原因となることが報告された。ASP原因珪藻の分布も広がり、*P. multiseries* に加え、*P. australis* や *P. seriata* などもドウモイ酸を高度に生産し上記動物の毒化原因藻となり得ることが報告されている。

わが国ではこれまで ASP の報告はまったくない。しかし、わが国においても原因藻である *P. multiseries* の存在が知られており、ムラサキガイやホタテガイにもときに微量の毒が検出されることがある。わが国では魚介類のドウモイ酸の検査は義務付けられてはいないが、記憶喪失性貝中毒を防止するためには輸入貝類など必要に応じて検査することが重要である。EPA のほか、スイスおよびノルウェー（平成 19 年 4 月 12 日通知）へ貝類を輸出する際にはドウモイ酸の検査が必須である。

ドウモイ酸はマウスの腹腔内投与では LD50 が 4 mg/kg と麻痺性貝毒サキシトキシン (PSP) の 1/1,000 程度の低い急性毒性を示す。投与量が 2 mg/kg を超えるとスクラッチングシンドロームと呼ばれる後ろ足で耳を掻く特徴的な症状を示すので、麻痺性貝毒の検査の際に検出される可能性もあるが、定量性や測定感度の低さからドウモイ酸のマウスアッセイによる分析は現時点

[参考文献]

- 1) Y. Oshima : *J. AOAC Int.*, 78 (2), 795 (1995)

4. 下痢性貝毒

下痢性貝中毒は、1976年6月に東北地方の太平洋沿岸で発生した食中毒をきっかけに発見された。当初は、それまでよく知られていた麻痺性貝毒が水溶性であるのとは異なり、脂溶性であったため脂溶性貝毒といわれていたが、中毒の主徴な症状にちなんで下痢性貝毒（下痢性貝中毒）と命名された^{文献1)}。

中毒の主症状は、消化器系障害の下痢、嘔吐、腹痛である。貝の毒化期（6～9月）が、腸炎ビブリオ発生期と重複するので、誤認しないよう留意する。原因毒は熱安定で非水溶性なので、通常の加熱調理には安定で除去しにくい。ただし、毒は中腸腺に局在しているので、大型の貝では、この部分を除けば中毒を回避できる。貝の毒化は、前記3. 麻痺性貝毒と同様に有毒渦鞭毛藻の発生によって起こる。毒化する貝は二枚貝に限られ、ホタテガイ、ムラサキイガイによる中毒事例が多い。次いで、アサリ、チョウセンハマグリ、コタマガイ、アカザラガイ、イガイなどで毒化が認められている。

国内での貝の毒化海域は、北海道から九州沿岸に及んでいるが、東北、北海道沿岸などでの毒化が最も顕著である。毒化期は初夏から秋にわたり、4月中旬～5月にかけて毒化を開始、6～7月にピークを迎え、9～10月に消失するのが一般的である。米国を含めた外国での発生事例が増加しているが、ヨーロッパ大西洋岸でとくに多い。

下痢性貝毒はポリエーテル化合物で、骨格構造からオカダ酸（OA）群、ペクテノトキシン（PTX）群、イエットトキシン（YTX）群の3群に分類される（図7-5）^{文献2)}。

最も重要なものはOA群で、OA、ジノフィシストキシン-1（DTX1）に代表され末端にカルボキシル基を有する。OAとDTX1は強い下痢原性と、タンパク質脱リン酸化酵素2A（PP2A）の阻害、発がん促進作用、細胞毒性などを示し、中毒症状の主原因と考えられている。DTX3は、OA、DTX1の7位の水酸基に脂肪酸がエステル結合したもので、二枚貝の代謝物である。また、末端のカルボキシル基にさまざまなジオールがエステル結合した10以上の化合物が報告されている^{文献2)}。これらのエステル類はPP2A阻害作用を示さない。

PTX群は約20の類縁体が報告されており、マウス腹腔内投与で致死活性や強い肝臓毒性が確認されているが、顕著な下痢原性は認められていない。YTX群は約20の類縁体が報告されており、マウス腹腔内投与で致死活性を示すが、経口投与では下痢原性も含めて、顕著な毒性は認められていない。そのため、OA群を下痢性貝毒とし、PTX群やYTX群を脂溶性毒として区別することもある^{解説注1)}。

下痢性貝毒を含む貝類について可食部で0.05 MU/gを超えるものの販売が禁止されている（厚生省環境衛生局長通知：環乳第29号（昭和55年7月1日））。

下痢性貝毒検査法 (公定法) *1, 文献3)

① 検体の採取および運搬

検体としては、貝類の殻付きのもの、むき身、外とう膜およびこれらをさらに調理、加工したものの等があるが、当該ロットを代表する十分な検体数を採取する必要がある。1検体を構成する貝の数はできるだけ個体差をなくし、かつ、予備の試料を確保するために十分な個数で*2 少なくとも200g以上(殻付きのものにあつてはむき身相当量、缶詰等で容器包装に入れられたものにあつては、その内容量でそれぞれ200g以上が得られる個数)を採取する。

採取した検体は合成樹脂製の袋等適当な容器に入れ、生鮮検体にあつては冷蔵し、凍結検体にあつては凍結状態のまま、その他のものにあつては、加工品等常温で品質の変化がないと思われるものを除き、冷蔵し速やかに検査機関に搬入する*3。

ただし、検査機関が遠隔地等であつて、速やかに搬入できない場合は、加工品等常温で品質の変化がないと思われるものを除き、合成樹脂製の袋等適当な容器に入れ凍結し輸送す

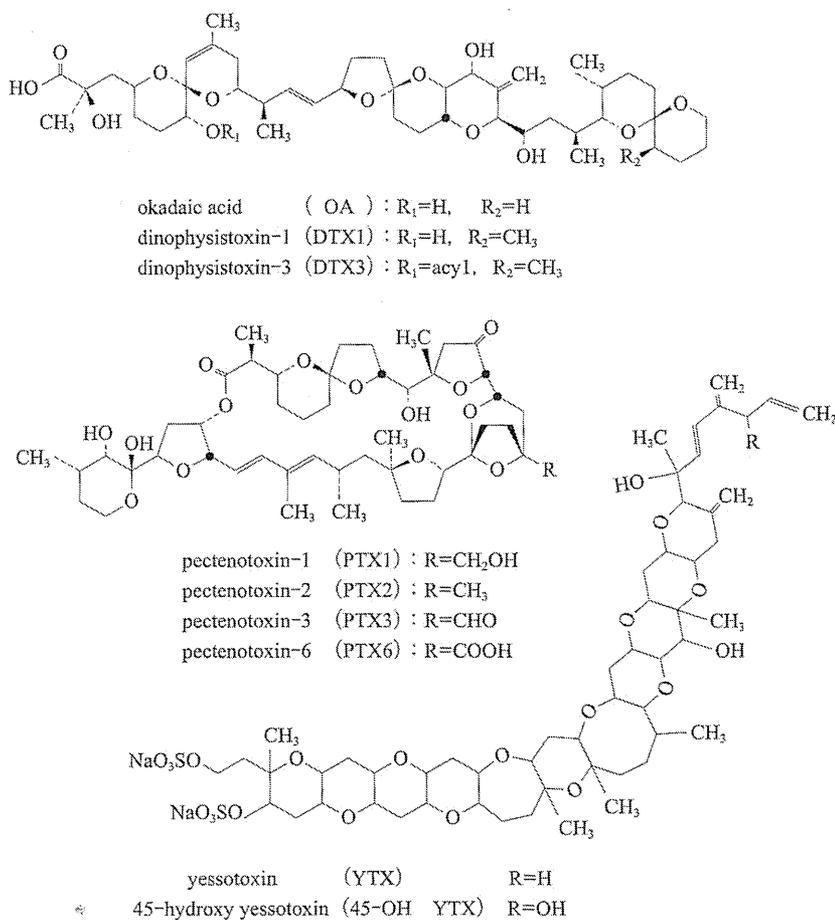


図7-5 下痢性貝毒の化学構造式

る 解説注1)。

この場合、殻付きのものにあつては(3)試料の調製の項に掲げる方法により開殻および水切りをした後凍結し、生鮮のむき身等で外部に水分の付着しているものにあつては、同項に掲げる方法により水切りをした後、凍結して輸送する。

② 試料の調製

1. 生鮮の殻付きの検体は、ナイフなどで閉殻筋(貝柱)を切って開殻し、むき身を調製する。この場合殻を開くために熱や薬品を用いてはならない。また閉殻筋以外の組織特に中腸腺を傷つけないように注意する。

このようにして得たむき身および既にむき身となっている検体は目の細かい金網など 解説注2) にのせ、約5分間水切りを行ったのち4または5により試料を調製する。

2. 凍結した殻付きの検体は、室温で半解凍の状態にし前記の方法でむき身を得る。このようにして得たむき身および既にむき身の状態で凍結してある検体(検体輸送のためあらかじめ検査用に水切りを行った後に凍結したものを除く。)は外部に付着している氷片を取り除き、軽く水をふき取った後に4または5により試料を調製する。

なお、検体の輸送のためあらかじめ検査用に水切りを行った後に凍結してある検体については、その全部についてそのまま4または5により試料を調製する。

3. 外とう膜の乾製品等1および2以外の検体は、その全部をそのまま5により試料とする *4。
4. ホタテガイ、アカザラ、ムラサキイガイ、カキ等のむき身であつて中腸腺のみを切り取ることが可能なものにあつては、当該むき身の重量をあらかじめ測定した後、中腸腺をていねいに切り取り、当該中腸腺のみを細切混和し試料とする *5-7。
5. 中腸腺のみを切り取ることが困難なむき身等4の検体以外の検体にあつては、その全部を細切混和し試料とする。この場合、乾製品等ホモジナイズが困難なものはできるだけ細切混和の後試料とする 解説注3)。

③ 抽出

試料をブレンダー(ホモジナイザー)カップに移しこれに3倍量のアセトンを加え、最低2分間ホモジナイズする *8。次いで減圧下でろ過して抽出液を得る。残渣について試料の2倍量のアセトンを用いてさらに2回抽出し抽出液を合する *9。これをロータリーエバポレーターのフラスコに移し、アセトンが留去され表面に油状物質が分離してくるまで減圧濃縮を続ける *10。

この濃縮物をまず分液ロートに移し、器壁に付着した部分を100~200 mLのジエチルエーテルと少量の水を用いて分液ロートに洗い込み、エマルジョンを生成しない程度に軽く振とうした後、ジエチルエーテル層と水層に分け水層を除く。

次に使用したジエチルエーテルの約半量の蒸留水を用いてジエチルエーテル層を2回洗浄し

た後^{*11}、ジエチルエーテル層を300～500 mLのナス型フラスコに移し、減圧下でジエチルエーテルを留去して濃縮する^{*12}。さらに、この濃縮物をできるだけ少量のジエチルエーテルを用いて50 mLまたは100 mLのフラスコに移し、再び減圧下で溶媒を留去し濃縮する^{*13}。

④ 試験溶液の調製

濃縮物をすべて1% Tween 60 生理食塩水に懸濁させて目盛つき試験管に移す^{*14, 解説注4)}。この際中腸腺のみを試料とした場合にあっては②試料の調製4であらかじめ測定したむき身重量20 g当たりの液量が1.0 mL^{*15}となるように、その他の試料にあっては、当該試料重量20 g当たりの液量が、1.0 mLとなるように調製し、この懸濁液を試験溶液とする^{*16, *17}。

高単位の毒力を測定するときは、さきに調製した試験溶液をバイブレーターで振とうして均一な懸濁液とした後、その一部を分取し^{*18} 1% Tween 60 生理食塩水を用いて、まず4倍希釈液を調製し、さらに必要あればこの希釈液から同様に16倍の希釈液などを調製する。

⑤ マウス毒性試験

試験溶液またはその希釈液をバイブレーターを用いて均一な懸濁液とし、それぞれの0.5 mL又は1.0 mLを体重16～20 gの健康な ddY 系またはICR系雄のマウス各3匹の腹腔内に投与する^{*19, 解説注5, 6)}。

投与してから24時間後にマウスの生死を観察し1群3匹中2匹以上のマウスが死亡した最小投与量を求める。

⑥ 毒力の計算

下痢性貝毒の場合は体重16～20 gのマウスを24時間で死亡させる毒量を1マウス単位(MU)と定め、実際のマウス単位の計算は1群3匹中2匹以上が24時間以内で死亡した最小投与量および最大希釈倍数から次表7-6により求める^{*19}。

表7-6 投与量と毒力の関係(下痢性貝毒)

試験液	投与量 (mL)	試料相当量* (g)	毒力 (MU/g)
原液	1.0	20	0.05
	0.5	10	0.1
4倍希釈	1.0	5	0.2
	0.5	2.5	0.4
16倍希釈	1.0	1.25	0.8
	0.5	0.625	1.6

* 中腸腺のみを試料とした場合は、当該中腸腺を含むむき身相当量

[試験法原文の注]

*1 下痢性貝毒とは従来いわゆる脂溶性貝毒といわれていたもので、有毒プランクトンを捕食した二枚貝を人が摂食すると下痢を主徴とする食中毒を起こすことから、このように呼

ぶ。

原因プランクトンの一つとしては、*Dinophysis fortii* が確定しているが、その他に *Dinophysis acuminata* 等も疑われており、これについては、今後の研究成果に待たねばならない。(解説注7)

なお、これまでに得られた知見では下痢性貝毒で毒化した貝類はすべて二枚貝（ホタテガイ、アカガラ、ムラサキイガイ、イガイ、カキ）で、巻貝の報告例はない。

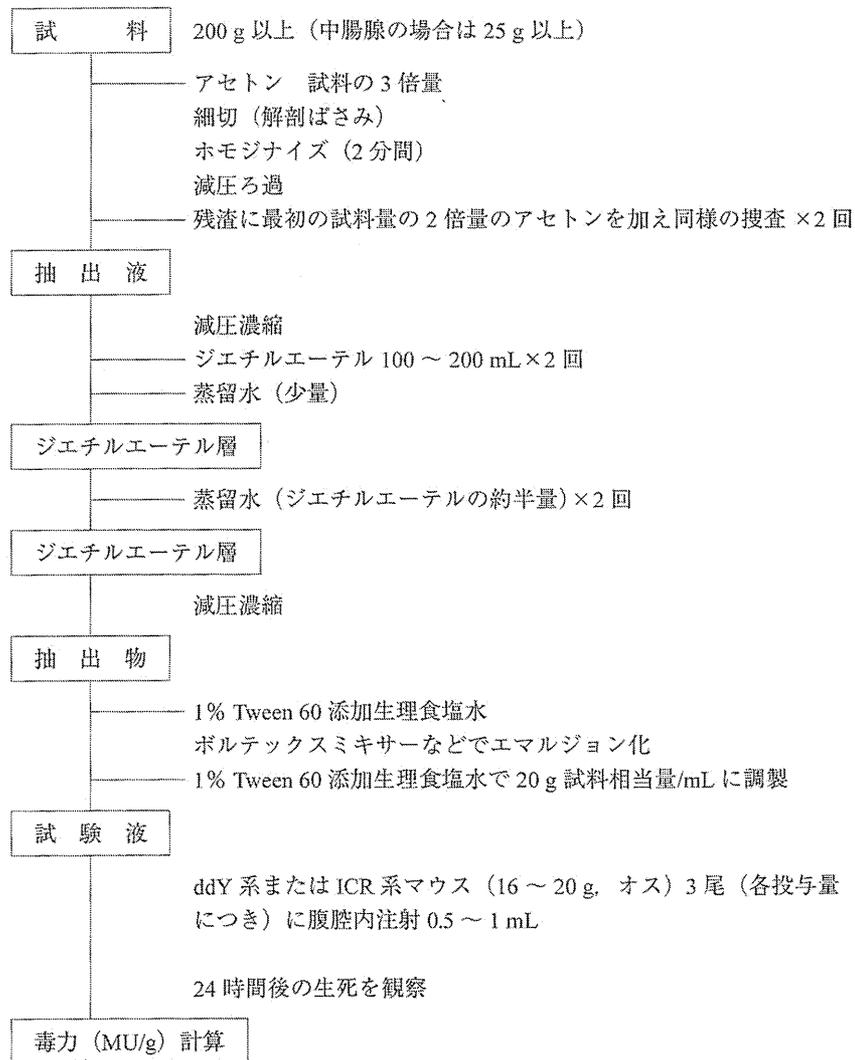
- * 2 ホタテガイ等の大型の貝にあっては、少なくとも5個以上とする
- * 3 検体には検体番号、検体名、採取年月日、採取場所等所要事項を記載する
- * 4 缶詰等容器包装に入れられたもので大容量の場合は開缶後固形物と液の重量を測定しておき、その割合に応じて必要量とる
- * 5 ホタテガイ等にあっては、下痢性貝毒が中腸腺に局在していることが明らかにされていることから、当該中腸腺について毒性試験を行いむき身全体の毒力を求めるものである。この場合中腸腺の個数としては5個以上重量としては25g以上を試料とする。
また、カキの中腸腺は軟弱でしかも生殖巣に埋まっているので、きれいに分離することは困難であるが、他組織の一部が付着してもよいからできるだけ中腸腺を完全にとるようにする。
- * 6 二枚貝の毒化状況等の調査の目的で中腸腺の毒力を検査する場合にあっては、あらかじめ中腸腺の重量を測定しておく必要がある。
- * 7 細切混和に当たっては、中腸腺がつぶれその内容物が細切台上に拡散しないよう注意する必要がある。
- * 8 ブレンダー（ホモジナイザー）のカップが試料および使用するアセトンの量にくらべて小さい場合は抽出を2度に分けて行う。
また、大型の二枚貝のむき身を抽出に供する場合、試料をミキサーにかけるか細切混和して均一化し、その200gを用いる。
- * 9 ろ液中に不溶物が多量に生成した場合には、再度減圧ろ過を行う
- * 10 アセトンを除去する際、著しく発泡して濃縮が困難となる場合は、少量の1-ブタノールを加え抑泡剤としてもよい
- * 11 この洗浄操作により、アセトン抽出時に混入した麻痺性貝毒および他の妨害物質を除去することができる。
- * 12 小型容器で濃縮する時に、濃縮物中に水分が含まれていると発泡、突沸の原因となりやすいので少量のエタノールを加えながら濃縮する。
- * 13 小容量のフラスコに移しかえるのは、以降の操作を容易にするためである
- * 14 最小目盛0.2 mL程度のものでよい
- * 15 二枚貝の毒化状況等の調査の目的で低毒力の中腸腺を検査する場合、中腸腺重量20g当たりの懸濁液量は5.0 mLを限度とする
それ以下の液量に調製することは困難なことが多く、誤差も大きいので実用的でない
- * 16 油状の濃縮物をできるかぎり目盛つき試験管に移した後、少量の1% Tween 60生理食塩水を加えて、激しく攪拌し懸濁して移す。この場合温浴で加温しパイプレーターを用いると操作が容易となる。
- * 17 その他の試料で0.05 MU/g以下の低単位の毒力を測定するとき、または毒の存在の有無を調べるときは、さらに高濃度の懸濁液を調製し、これを試験溶液としてもよい。
- * 18 ピペットあるいは注射器中で2層に分離することがあるので必要量をすばやく採取し、速やかに全量を排出または投与する。
- * 19 二枚貝の毒化等の調査の目的で中腸腺の毒力を検査する場合にあっては、次式により求

める。

$$\begin{aligned} & \text{中腸線 1g 当たりのマウス単位 (MU/g)} \\ & = (\text{試験溶液 (原液) (mL)} \times \text{希釈倍数}) / (\text{中腸腺 (g)} \times \text{投与量 (mL)}) \end{aligned}$$

解 説

① 操作のフローチャート



② 注解および留意点

- 1) しばらく凍結保存しても差し支えないが、採取より 1 か月以上経過した検体の場合は、毒力に顕著な誤差が生じることがある。

- 2) ペーパータオルでもよい。
- 3) 今までに部位別毒性が確認されていない種については、むき身全部を抽出試料とする。
- 4) まず、ナス型フラスコの壁面についている抽出物をエマルジョン化し、徐々に底面のほうへ進めていくとよい。最終調製量の1/2～1/3程度の量で全抽出物をエマルジョン化し、試験管に回収する。残物は0.5～1 mLの1% Tween 60 生理食塩水でナス型フラスコとピペットを洗いこみながら回収する。
- 5) 下痢性貝毒投与時のマウスの症状としては、運動不活発になり、呼吸に異常が見られることが多く、致死時間が長いこと（24時間以上のこともある）が特徴である。最小致死量の10倍の投与でも、マウスの死亡までに30分以上を要することが多い。マウスが顕著なけいれんや、跳躍を示して短時間（20分以内）で死亡した場合には、麻痺性貝毒の混入が疑われる。その場合は、抽出操作におけるジエチルエーテル層の水洗い操作をあと2回追加し、合計4回にして麻痺性貝毒を取り除く。
- 6) 遊離の不飽和脂肪酸はマウス腹腔内投与で致死活性を示す。特に、長期保存した検体ではトリグリセリドが加水分解され、遊離脂肪酸が増加する傾向にある。また、高度に濃縮した試験液を投与する際にも注意が必要である。
- 7) これまでに、*D. forti*, *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. norregica* など、世界各地の *Dinophis* 属から OA 群, PTX 群などが検出されている^{文献2)}。
- 8) 機器分析法としては、LC-MS/MS 法の開発が進められており^{文献4)}、すでに EU では二枚貝に含まれる OA 群, PTX 群, YTX 群のモニタリング検査法として採用されている。現在、移行期間のためマウス毒性試験法も併用されているが、2015 年以降マウス毒性試験法は廃止される^{文献5)}。
- 9) 機器分析用の OA, DTX1, DTX2, homo-YTX, YTX, PTX2 などの認証標準品は、カナダの NRC (National Research Council Canada) の Certified Reference Materials (CRM) program から入手できる。

[参考文献]

- 1) T. Yasumoto, *et al.*: 日本水産学会誌, **44**, 1249 (1978)
- 2) 鈴木敏之: 食品衛生研究, **59**, 15 (2009)
- 3) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知: 環乳第 37 号 (昭和 56 年 5 月 19 日)
- 4) T. Suzuki and Quilliam MA: *Anal Sci.*, **27**, 571 (2011).
- 5) Commission Regulation (EU) No 15/2011, Off J Eur Union, **54**, L6/3 (2011)
(<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:006:0003:0006:EN:PDF>)

5. シガテラ毒

サンゴ礁が発達した熱帯・亜熱帯の海域では、本来は無毒な多数の魚が毒化し、シガテラと呼ばれる特異な食中毒の原因となることがある。

中毒症状としては、下痢や嘔吐などの消化器系障害、知覚異常や筋肉痛や関節痛そして搔痒感などの神経系症状、脈拍数や血圧の低下などの循環器障害が認められる。とくに、冷たいものに触れたときに、電氣的刺激のような痛みを感じる温度感覚異常はドライアイスセンセーションと呼ばれ、最も特徴的な症状である。軽症の場合は、神経症状のみを認めることが多い。致命率は低い、神経症状が長期間持続することが多い。世界的には毎年2～5万人の患者が発生していると推定されている。わが国では、沖縄県や鹿児島県奄美地方を中心に毎年発生が見られる。それ以外の地域では、熱帯・亜熱帯産の魚が持ち込まれて発生した事例が大部分であるが、沿岸魚による食中毒も散発している。毒かます（ドクカマス、オニカマス）については、通知により食品衛生法第6条第2号に該当するとして食用禁止措置が取られている^{解説注1)}。毒の本体はシガトキシンとその類縁体であり、熱安定な脂溶性の環状ポリエーテル化合物である^{解説注2)}。筋肉中の濃度より内臓の濃度が高いが、通常の食中毒は筋肉の摂食によって起きている。

なお、毒力が0.025 MU/gを超えるものは食用不適とされている。

マウス毒性試験法（参考法）

① 機器・試薬

(a) 機器・器具

細碎器（ホモジナイザー）

ロータリーエバポレーター

ブフナー漏斗

分液漏斗（300 mL または 500 mL, 200 mL）

ナス形フラスコ（2 L, 500 mL, 100 mL）

目盛付き試験管

ボルテックスミキサー

注射器（ツベルクリン用 26 G など）

(b) 試薬

アセトン（特級）

エーテル（特級）

n-ヘキサン（特級）

メタノール（特級）

1% Tween 60 液 (Tween 60 を 1% になるように生理食塩水に溶解)

② 試験液の調製

皮や骨を除いた筋肉 240 g を包丁で細切して細砕器に入れ、アセトン 700 mL を加えて 3 分間抽出を行う。ブフナー漏斗を用いて減圧ろ過する。ろ紙上のフィルターケーキを、同様の操作で再度抽出する。抽出液を合わせて減圧濃縮する。アセトンが留去されて水層表面に油が分離し始めると、非常に発泡しやすくなるので注意する。液量が 100 mL 以下になったと思われる時点で濃縮を止め、濃縮液を分液漏斗 (300 mL または 500 mL 容) に移す。濃縮フラスコに付着した油を、総量 200 mL のエーテルを数回に分けて洗い込みながら分液漏斗に加え、分配によりエーテル層を得る。水層を分液漏斗に戻し、エーテル 200 mL で再び抽出し、エーテル層を 1 回目の抽出液と合わせて減圧乾固する。分液漏斗を激しく振ると、頑固なエマルジョンを形成するので注意する。エマルジョンのために 2 層に分離しないときには、飽和食塩水を適量加えてもう一度振り直す。エーテル層を濃縮すると、含まれていた水が残り、表層に油が分離して発泡しやすくなる。いったん減圧を切り、エタノールを加えて水を共沸で除くとよい。減圧乾固したエーテル抽出物に 50 mL の 90% 含水メタノールと 100 mL の *n*-ヘキサンを加え、200 mL 容の分液漏斗に移し、分配を行う。下層の含水メタノール層をフラスコに移し、減圧乾固する。最後の段階で発泡しやすいので、エタノールを加えるとよい^{解説注3)}。

含水メタノールを乾固して得た粗毒画分に、2~3 mL の 1% Tween60 液を加え、ボルテックスミキサーなどを用いてエマルジョンとし^{解説注4)}、10 mL の目盛り付き試験管に移し、全量を 6 mL にして試験液とする。試験液 1 mL は検体魚筋肉の 40 g に相当する。

③ マウス腹腔内投与^{解説注5)}

試験には ddY または ICR 系の雄で体重が 17~20 g の範囲にあるマウスを用いる。1 投与量に対しては 1 群 3 尾のマウスを用いる。まず、試験液 1 mL ずつを 3 尾のマウス腹腔内に注射する。次いで、0.5 mL ずつを第 2 群のマウス 3 尾に投与する。試験液は静置すると直ちに水層と油層に分離するので、毎回よくかくはんし、均一なエマルジョンにして注射器に採取する。目盛り付き試験管内に残った試験液に 3 倍量の Tween 60 液を加えてエマルジョンとし、4 倍希釈試験液とする。希釈試験液の各 1 mL と 0.5 mL ずつを用いて、それぞれ 3 尾ずつのマウスの腹腔内に注射する。必要に応じて、16 倍、64 倍希釈液を同様に調製し、マウスに投与する。注射してから 24 時間後のマウスの生死を観察し、3 尾ともすべて、あるいは 3 尾中少なくとも 2 尾のマウスが死亡する最小濃度を求める^{解説注6)}。

④ 毒力の計算と表示

毒力の表示はフグ毒や貝毒の場合と同じく、検体 1 g 中に含まれる毒量 (MU/g) で行う。1 マウス単位 (MU) は、供試マウス 1 尾を 24 時間で死亡させる毒量と定義され、シガトキシン-1B (CTX1B) 7 ng に相当する。マウス毒性試験の結果から、表 7-7 に従って検体の毒力を算出する。検体の毒力が 0.025 MU/g を超えた場合は、食用に不適と判定する^{解説注7, 8)}。

表7-7 投与量と毒力の関係 (シガテラ)

試験液	投与量 (mL)	投与量相当検体量 (g)	検体毒力 (MU/g)
原液	1.0	40	0.025
原液	0.5	20	0.05
4倍希釈	1.0	10	0.1
4倍希釈	0.5	5	0.2

説

① 試験法の概要

魚肉中に含まれるシガトキシン類 (CTXs) は微量であるため、抽出物を濃縮し、40 g 魚肉相当量/mL の試験液を調製する。脂溶性の CTXs をマウス腹腔内投与するために、乳化剤 (Tween 60) を添加した生理食塩水でエマルジョン化し試験液を調製する。マウスへの投与後 24 時間の生死で判定する。

② 操作のフローチャート

