

### 第3章 西日本で発生したアオブダイ中毒様食中毒の原因物質

第1章で述べたように、最近、西日本でハタ科魚類、ブダイ科魚類およびハコフグ科魚類によるアオブダイ中毒様食中毒が相次いで発生した。しかしながら、わが国では、アオブダイ以外の魚類による同様の報告はない。

熱帯ならびに亜熱帯海域に生息するハタ科魚類やアオブダイの近縁種であるナンヨウブダイ（アオブダイ）*S. gibbus* はシガテラ魚として知られている（Hashimoto ら, 1969 b, c; Chungue ら, 1977a, b）。一方、ハコフグ *O. immaculatus* やウミスズメ *L. diaphana* には魚類に対して毒性を示すパフトキシシ（pahutoxin）の存在が明らかとなっている（Thomson, 1964; Boylan と Scheuer, 1967; Thomson, 1968）。しかしながら、いずれもアオブダイ中毒の原因物質と同様の PTX 様物質の存在に関する知見はない。

そこで、第1章第2, 3 および4 節で述べたアオブダイ中毒様食中毒の原因物質解明の一助として、ハタ科魚類およびハコフグ科魚類による中毒の原因食品の残品、ならびにブダイ科魚類中毒については販売店舗より入手した原因食品と同一ロットとされているブダイ *C. japonicus* の毒性および毒の性状について検討した。

## 第1節 高知県産ハタ科魚類の毒性と毒の性状

本節では、高知県で発生したハタ科魚類中毒の原因物質の解明を目的とし、その原因食品の残品について、PTX 様物質を対象として毒性および毒の性状を調べた。他方、同残品について、シガトキシン (ciguatoxin: CTX) を対象とした検討を加えた。

### 試料および方法

#### 試料

試料は、中毒患者の家庭より入手した原因食品の残品（高知県柏島ハタ科魚類の筋肉）を用いた。試料は、入手後、直ちに凍結し、長崎大学水産学部水産食品衛生学研究室へ送付し、試験液の調製に供するまで $-25^{\circ}\text{C}$ で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

#### 1. PTX 様物質を対象とした検討

##### 試験液 (1-ブタノール画分) の調製

第2章第4節の試験液の調製法と同様に行い、マウス毒性試験ならびに溶血活性試験に供した。

##### マウス毒性試験

本試験は、第2章第1節のマウス毒性試験法と同様に行った。

##### 溶血活性試験

本試験は、第2章第1節の溶血活性試験法と同様に行った。

#### 2. CTX を対象とした検討

##### 試験液 (メタノール画分) の調製

試験液の調製は、食品衛生検査指針理化学編（厚生省環境衛生局監修，1991c）シガテラ

検査法に準拠した。

試料 240 g にアセトン 700 ml を加えて 3 分間ホモジナイズし、減圧濾過して濾液を抽出液とした。残渣については、同様の操作を 2 回繰り返して濾液を合一した。抽出液を減圧濃縮後、蒸留水：ジエチルエーテル（1：2）による溶媒分画に付した。ジエチルエーテル画分については、減圧濃縮して 90%メタノール：n-ヘキサン（1：2）で脱脂後、メタノール画分を試験液とした。

### マウス毒性試験

試験には ddY 系の雄で体重が 17 - 20 g のマウスを用いた。1 投与量に対しては、1 群 3 尾のマウスを用い、投与してから 24 時間後のマウスの生死を観察し、3 尾ともあるいは 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た。毒力の表示は、フグ中毒や PSP 中毒と同様に検体 1 g に含まれる毒力 (MU/g) で行った。ただし、CTX を対象とした本試験の 1 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る。

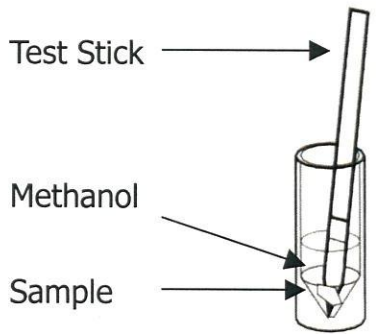
### Cigua-Check 試験

CTX 簡易検出キット Cigu-Check™ (Oceanit Test System) のマニュアル (Fig. 16) に準拠した。

試料 (0.02 g) を 30 倍量のメタノールに試験片とともに 20 分間浸漬させた。得られた試験片を抗 CTX 抗体と 10 分間反応させ、CTX 含有量を求めた。

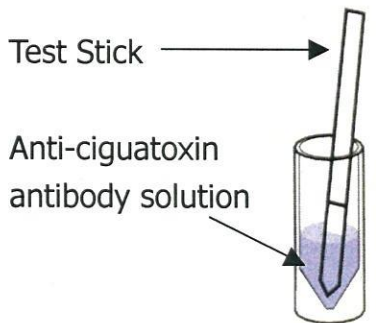
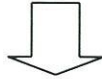
### 結果および考察

1-ブタノール画分を投与したマウスは、1 時間程経過すると徐々に呼吸困難や痙攣を呈したのち、嗜眠状態となり、約 24 時間後に死亡した (0.5 MU/g)。さらに、本画分はマウス赤血球に対して、インキュベート 1 時間において試料濃度  $10^{-1}$  g/ml で  $6.35 \pm 1.34\%$  と若干の溶血活性を示したが、試料濃度  $10^{-2}$  g/ml 以下では 2% 未満であった (Fig. 17)。一方、試料濃度  $10^{-2}$  g/ml においてインキュベート 4 時間で  $5.54 \pm 0.547\%$ 、6 時間で  $10.4 \pm 0.131\%$  と上昇し、8 時間では  $21.3 \pm 0.846\%$  を示し、試料濃度  $10^{-1}$  g/ml ではいずれのインキュベート時間においても 80% 以上の遅延性溶血活性を示した (Fig. 17)。さらに、試料濃度  $10^{-2}$



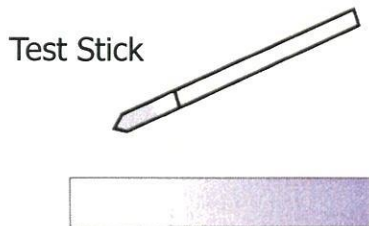
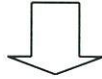
Step 1:

Tweezers was used to place rice-grain-sized samples of fish meat into a vial containing methanol. Plastic Test Stick was placed in a vial and waited for 20 min.



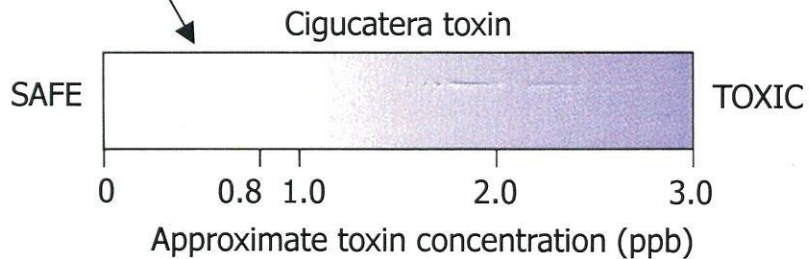
Step 2:

Test Stick was removed and air dried for 15-20 min. Test Stick was placed in a vial containing anti-CTX antibody solution and waited for 10 min.

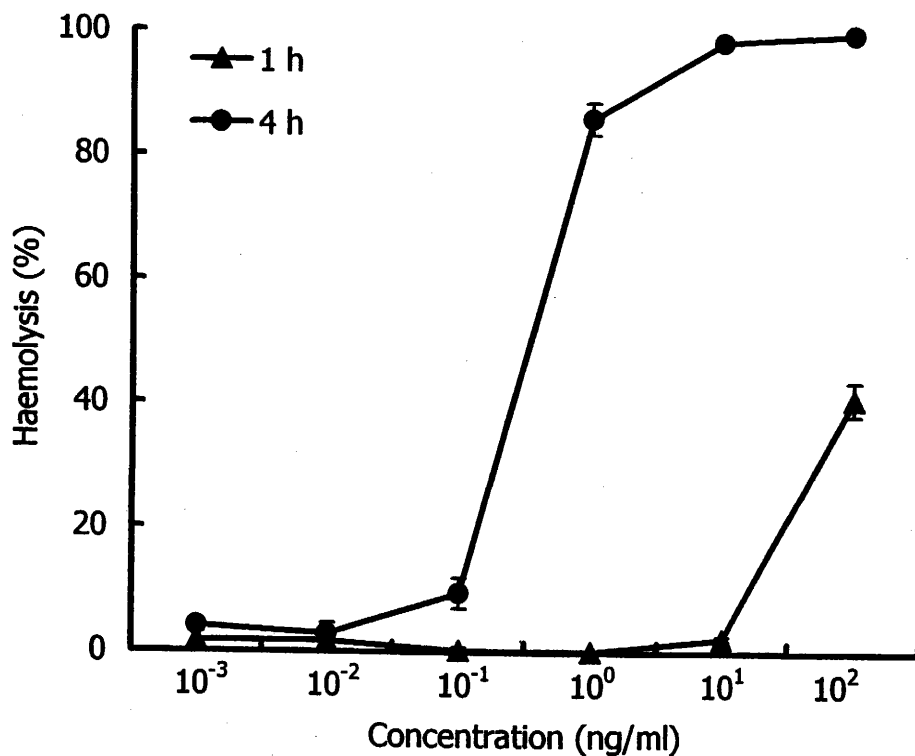
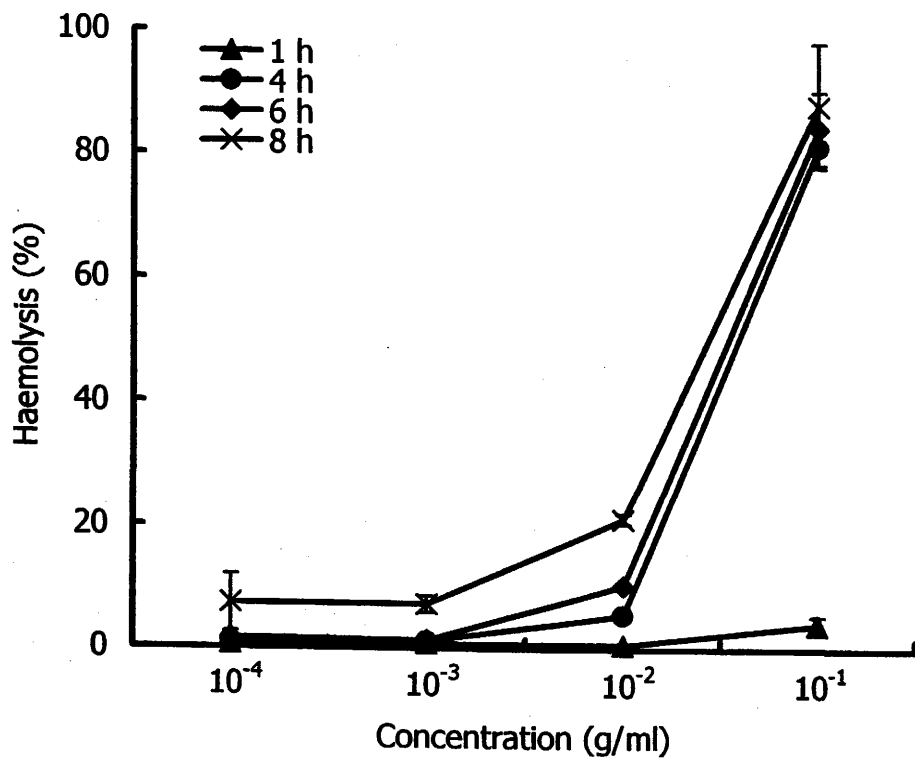


Step 3:

Test Stick was removed, rinsed in tap water and compared to color chart below. Purple color on the end of Test Stick indicated the presence of CTX poison.



**Fig. 16. A brief procedure adopted for Cigua-Check test.**



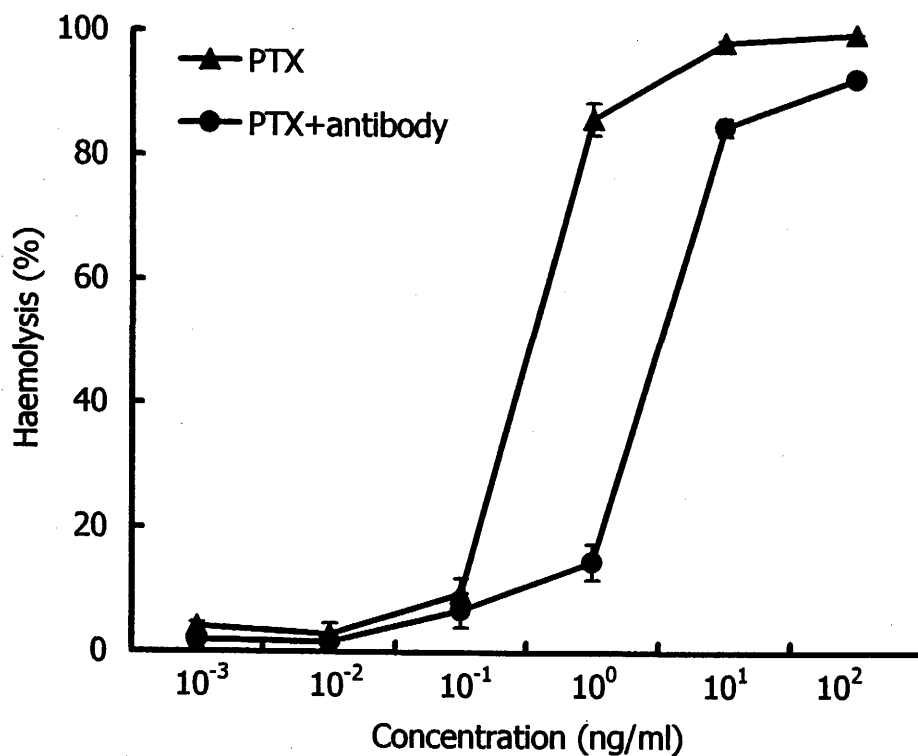
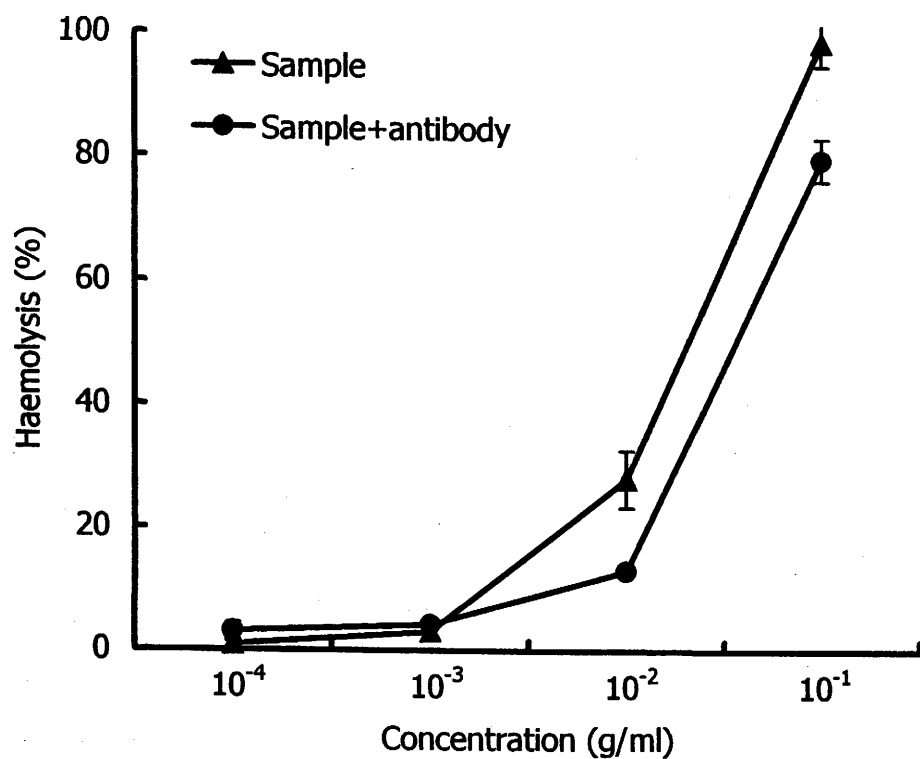
**Fig. 17. Delayed haemolysis by the toxin in the 1-butanol layer from *Epinephelus* sp. (upper) and PTX standard (lower).**

および  $10^{-1}$  g/ml における本活性は、抗 PTX 抗体により抑制された (Fig. 18)。また、本画分はヒト赤血球に対しても、試料濃度  $10^{-1}$  g/ml において遅延性溶血活性  $19.5 \pm 0.852\%$  を示し、本活性はウワバインにより  $7.29 \pm 0.895\%$  にまで抑制された (Fig. 19)。これらの諸性状は、第 2 章第 1 および 3 節で述べたアオブダイ毒ならびに PTX と酷似していた。

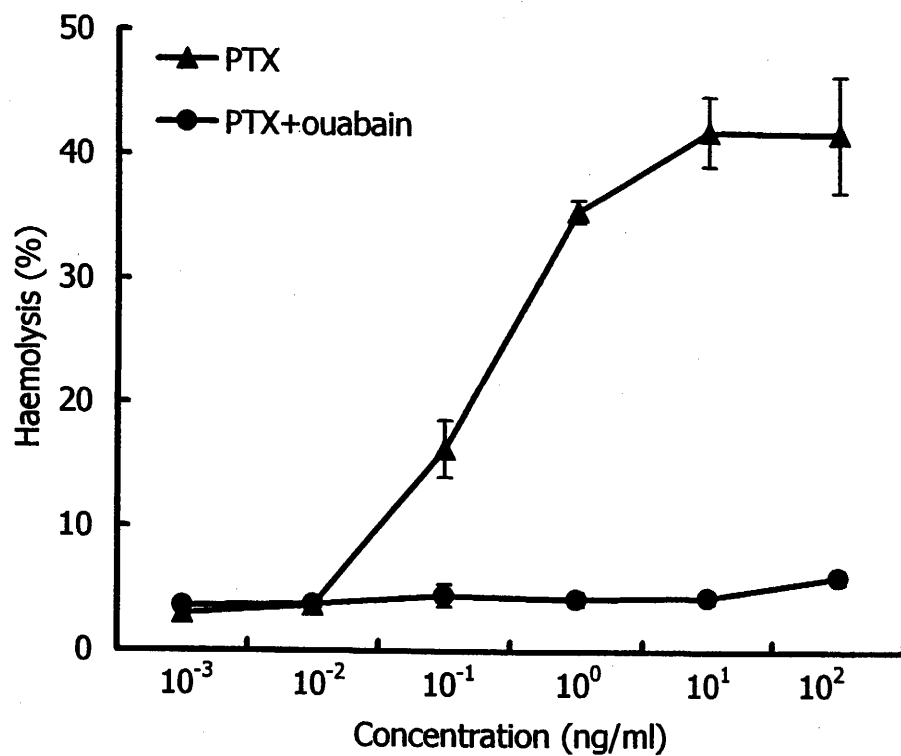
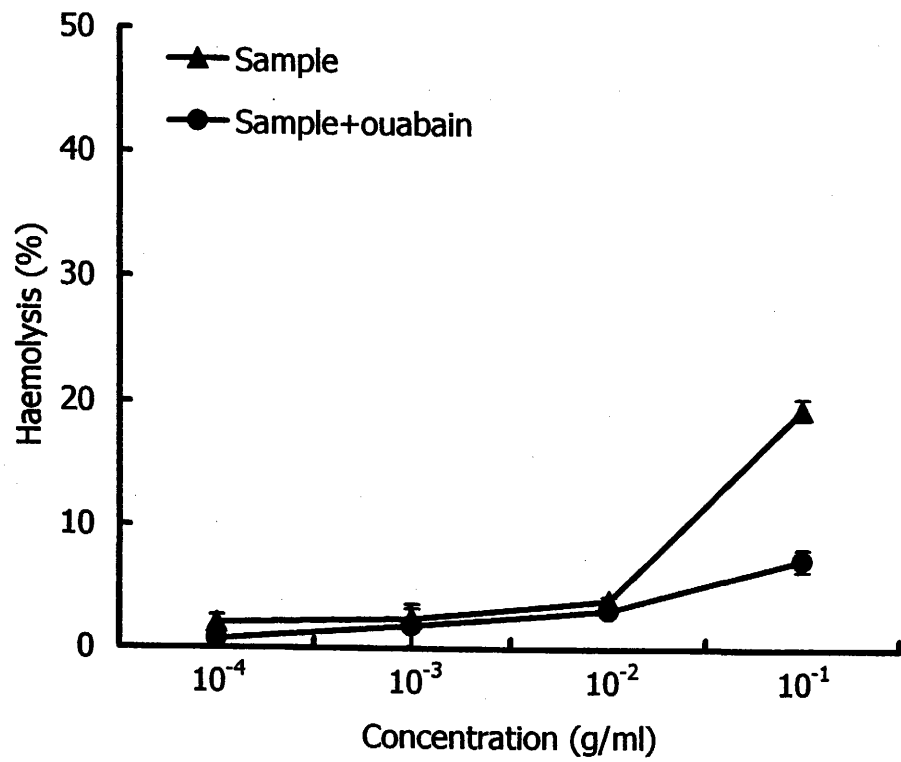
他方、メタノール画分にはマウス毒性はみられず (CTX 換算で 0.025 MU/g 未満)、CTX 含有量も 0.8 ppb 未満であった。

アオブダイ以外の海産魚類における PTX もしくは PTX 様物質の存在は、カワハギ科ソウシハギ *A. scripta* (Hashimoto, 1969c)、モンガラカワハギ科モンガラカワハギ *M. vidua* (Fukui ら, 1987)、アジ科モロ *D. macrosoma* (Kodama ら, 1989) で知られている。また、Kodama ら (1989) によるとモロ *D. macrosoma* は PTX 様物質と CTX が共存していることを見出し、Hashimoto ら (1969c) は南西諸島産アカマダラハタやバラハタに CTX が存在していることを報告している。しかしながら、高知県で発生した中毒事例の原因魚類からは、CTX は検出されなかったことから、本事例の原因魚類であるハタ科魚類はアオブダイ毒に極めて類似した PTX 様物質のみを保有していると考えられた。

以上、本節では、ハタ科魚類 *Epinephelus* sp. に PTX 様物質が存在していたことを強く示唆するとともに、高知県で発生したハタ科魚類中毒の原因物質は、PTX 様物質であると推察した。



**Fig. 18. Suppression of haemolytic activity of the toxin in the 1-butanol layer from *Epinephelus* sp. (upper) and PTX standard (lower) by anti-PTX antibody.**



**Fig. 19. Suppression of haemolytic activity of the toxin in the 1-butanol layer from *Epinephelus* sp. (upper) and PTX standard (lower) by ouabain.**



## 第2節 三重県産ブダイ科魚類の毒性と毒の性状

本節では、三重県で発生したブダイ科魚類中毒の原因物質の解明を目的とし、原因食品と同一魚種とされたブダイ科魚類について、PTX 様物質を対象として毒性および毒の性状を調べた。他方、同魚類について、CTX を対象とした検討を加えた。

### 試料および方法

#### 試料

試料は、店舗より入手した中毒原因魚類と同一とされた三重県産ブダイ *C. japonicus* (Fig. 5) 2 検体 (試料 A および B) を用いた。試料は、入手後、直ちに凍結し、長崎大学水産学部水産食品衛生学研究室へ送付し、試験液の調製に供するまで  $-25^{\circ}\text{C}$  で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

#### 1. PTX 様物質を対象とした検討

##### 試験液 (1-ブタノール画分) の調製

試料を筋肉および肝臓に腑分け後、得られた各部位につき、本章第1節の試験液の調製法に従って試験液を調製し、マウス毒性試験ならびに溶血活性試験に供した。

##### マウス毒性試験

本試験は、第2章第1節のマウス毒性試験法と同様に行った。

##### 溶血活性試験

本試験は、第2章第1節の溶血活性試験法と同様に行った。

ただし、インキュベート時間は、1 および 4 時間とした。

## 2. CTX を対象とした検討

### 試験液（メタノール画分）の調製

筋肉および肝臓につき，本章第 1 節の試験液の調製法と同様に行い，マウス毒性試験に供した。

### マウス毒性試験

本試験は，本章第 1 節のマウス毒性試験法と同様に行った。

### Cigua-Check 試験

本試験は，本章第 1 節の Cigua-Check 試験法と同様に行った。

## 結果および考察

いずれの試料にもマウスに対する致死活性は認められなかったが (Table 10)，試料 A の筋肉より得られた 1-ブタノール画分を投与したマウスは，2-3 時間経過すると軽度の嗜眠状態に陥った。また，本画分は，マウス赤血球に対して試料濃度  $10^{-1}$  g/ml で  $30.5 \pm 1.52\%$  と若干の遅延性溶血活性を示し (Fig. 20)，本活性は抗 PTX 抗体により  $25.1 \pm 2.21\%$  に減少したが (Fig. 21)，本活性因子は，ヒト赤血球に対しては溶血活性を示さなかった。他の 1-ブタノール画分については，マウスならびにヒト赤血球に対する溶血活性は認められなかった。しかしながら，マウスが呈した症状やマウス赤血球に対する性状から，試料 A の筋肉には，微量ながらアオブダイ毒と同様の PTX 様物質含まれていることが示唆された。

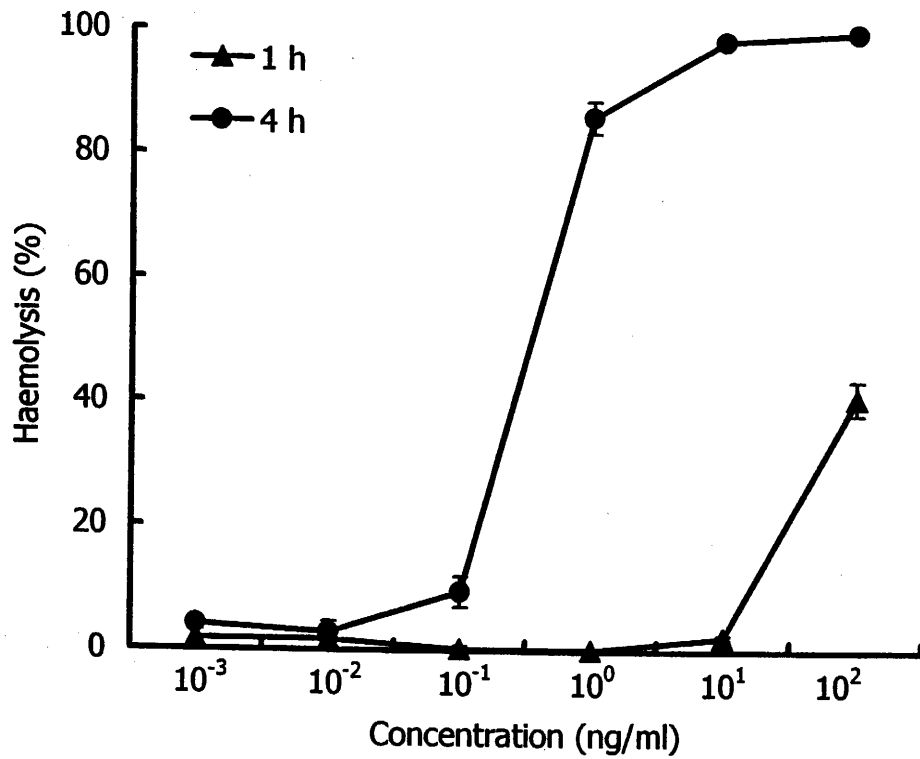
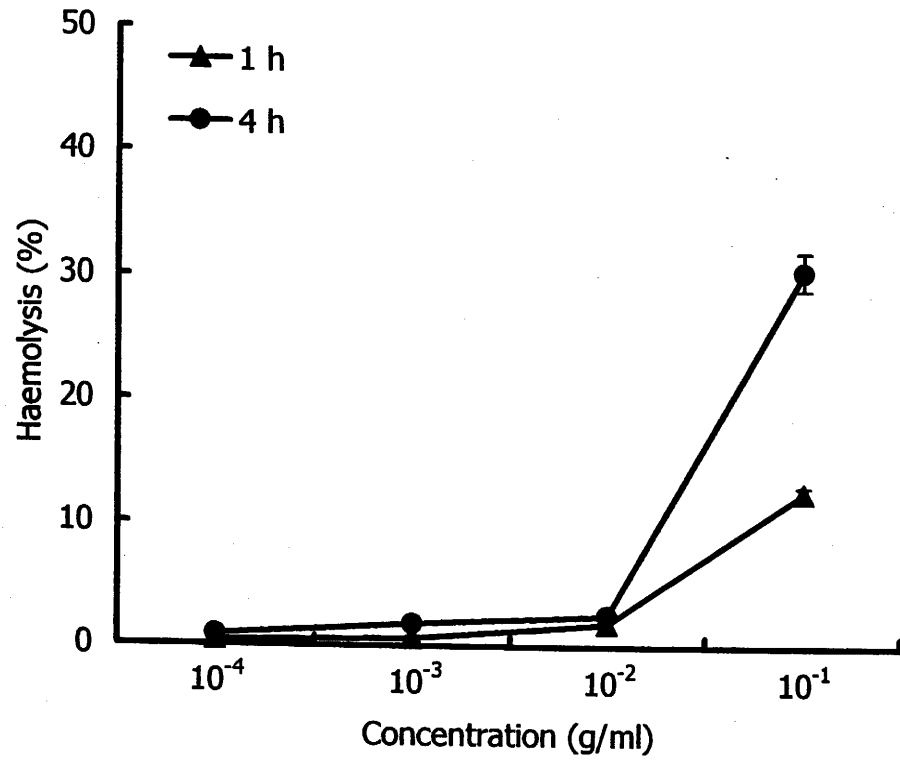
他方，いずれのメタノール画分にもマウス毒性はみられず (CTX 換算で  $0.025$  MU/g 未満)，CTX 含有量も  $0.8$  ppb 未満であった。

第 1 章第 3 節で述べたように，中毒原因食品を販売した店舗では，それ以外に 48 個体のブダイ科魚類を販売したが，本事例以外に同様の中毒が発生していないことから，それらの毒性は個体差が著しいことが推察され，本研究の結果もそれによるものと考えられた。

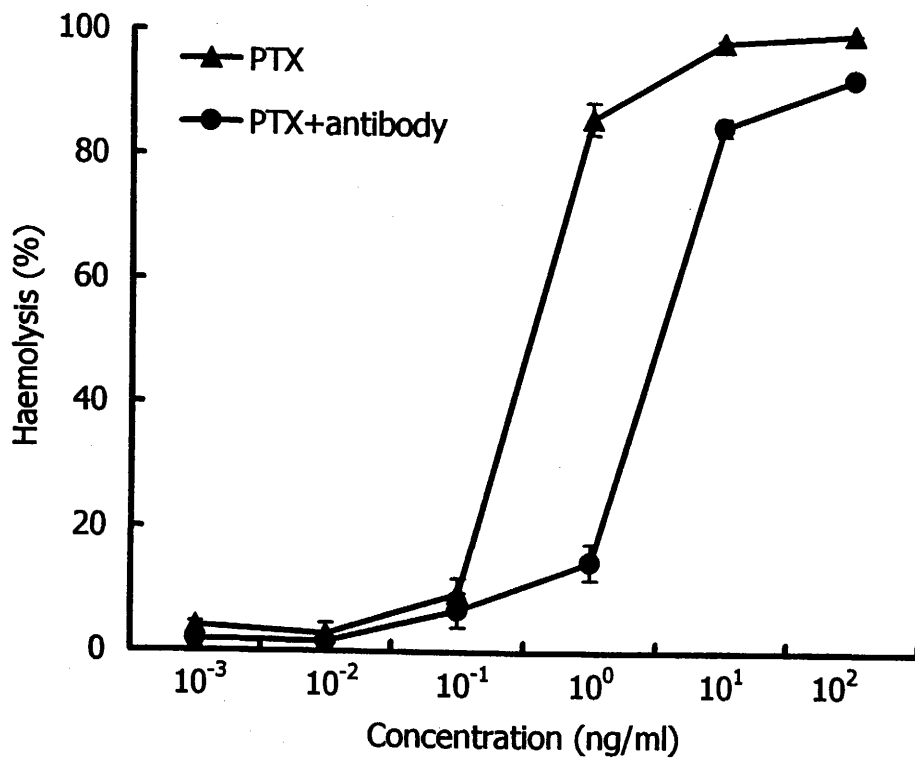
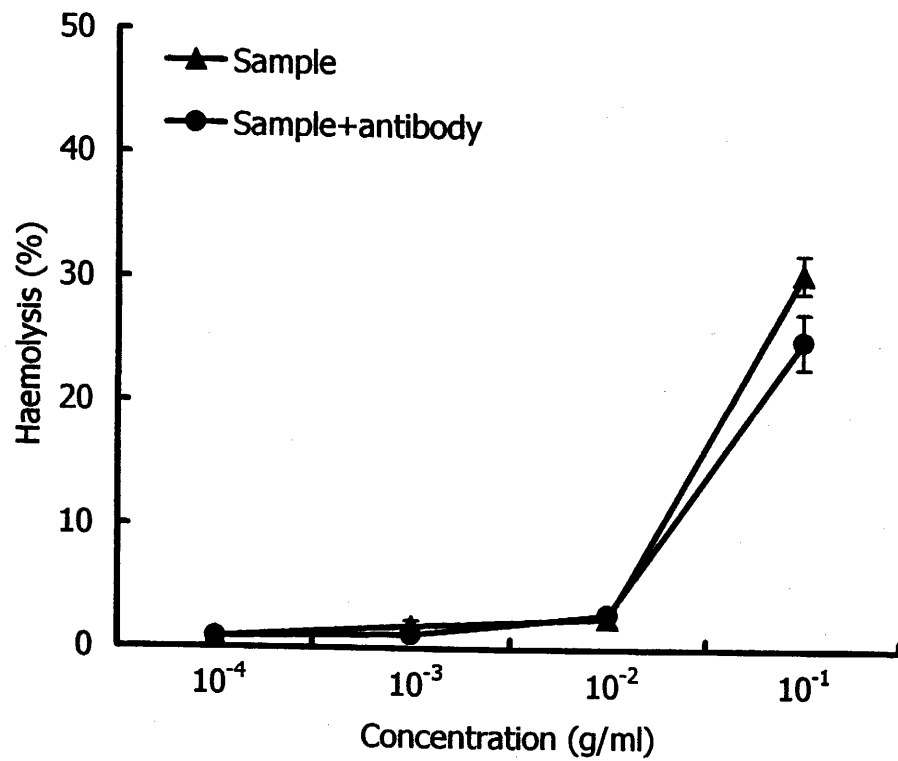
以上，本節では，ブダイ *C. japonicus* に PTX 様物質の存在を示唆するとともに，三重で発生したハタ科魚類中毒の原因物質は，PTX 様物質である可能性が推察された。

**Table 10. Toxicity of *C. japonicus* from Mie Prefecture, Japan**

Sample	Body length (mm)	Body weight (g)	Toxicity (MU/g)	
			Muscle	Liver
A	300	790	< 0.5	< 0.5
B	330	810	< 0.5	< 0.5



**Fig. 20. Delayed haemolysis by the toxin in the 1-butanol layer from *C. japonicus* (upper) and PTX standard (lower).**



**Fig. 21. Suppression of haemolytic activity of the toxin in the 1-butanol layer from *C. japonicus* (upper) and PTX standard (lower) by anti-PTX antibody.**

### 第3節 三重県産ハコフグ科魚類の毒性と毒の性状

本節では、三重県で発生したハコフグ科魚類中毒の原因物質の解明を目的とし、その原因食品の残品について、PTX 様物質を対象として毒性および毒の性状を調べた。他方、同残品について、TTX を対象とした検討を加えた。

#### 試料および方法

##### 試料

試料は、中毒患者の家庭より入手した原因食品（三重県産ハコフグ科魚類の皮）(Fig. 7) を用いた。試料は、入手後、直ちに凍結し、長崎大学水産学部水産食品衛生学研究室へ送付し、試験液の調製に供するまで $-25^{\circ}\text{C}$ で保存し、供試の際、流水中で急速解凍した。

#### 1. PTX 様物質を対象とした検討

##### 試験液（1-ブタノール画分）の調製

試験液の調製は、本章第1節の試験液の調製法と同様に行い、溶媒分画後の1-ブタノール画分をマウス毒性試験および溶血活性試験に供した。

##### マウス毒性試験

本試験は、第2章第1節のマウス毒性試験法と同様に行った。

##### 溶血活性試験

本試験は、第2章第1節の溶血活性試験法と同様に行った。

ただし、インキュベーション時間は、1および4時間とした。

#### 2. TTX を対象とした検討

##### 試験液（水面分A）の調製

試験液の調製は、食品衛生検査指針理化学編フグ毒検査法（厚生省環境衛生局監修、

1993) に準拠した。

試料に 0.1% 酢酸溶液を加えて沸騰水浴中で 5 分間加熱抽出し、氷水中で急冷後、5,000 g で 10 分間遠心分離し、得られた上清を試験液とした。

#### マウス毒性試験

試験には ddY 系の雄で体重が 19 - 21 g のマウスを用いた。1 投与量に対しては、1 群 3 尾のマウスを用い、試験液 1 ml をマウスの腹腔内に投与し、特有の症状である歩行困難、運動不能後横臥、呼吸困難等を経て死に至るまでの時間を秒単位で計測した。毒量の算出には、TTX の致死時間-MU 換算表を用いた。なお、TTX の 1 MU は、体重 20 g のマウス 1 匹を 30 分間で死亡させる毒量を示す。

#### LC/MS (liquid chromatography/mass spectrometry) 分析

本節の 1. PTX 様物質を対象とした検討の試験液の調製法により得られた水画分 B を Sep-Pak C18 カートリッジカラム (Wako) により処理し、その溶出液について TTX 群を対象とした LC/MS 分析に供した。

本分析は、alliance LC/MS システム (Waters) で行なった。

LC において、カラムには Puresil C18 (4.6×250 mm) (Waters) を用いた。移動相には 30 mM ヘプタフルオロ酪酸を含む 1 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0) を用い、流速を 1 ml/min とした。MS は、エレクトロスプレー法によりイオン化して測定した。また、Dissolvation 温度は 120°C、Ion source block 温度は 350°C、Cap 電圧は 30 V に設定した。その際の溶出液の流速は約 0.2 ml/min に調整した (Table 11)。

#### 結果および考察

原因食品から得られた 1-ブタノール画分および水画分 A のいずれにもマウスに対する致死活性はみられなかった (1-ブタノール画分は 0.5 MU/g 未満、水画分 A は 2 MU/g 未満)。

1-ブタノール画分は試料濃度  $10^{-1}$  g/ml において、マウス赤血球に対して 90% 以上の遅延性溶血活性を示し (Fig. 22)、本活性は抗 PTX 抗体により抑制された (Fig. 23)。さらに、本画分はヒト赤血球に対してウワバインにより僅かに抑制される遅延性溶血活性を示した

## **Table 11. Condition of LC/MS analysis**

**LC/MS system:** Waters ZMD-MK II

### **Condition of LC**

Column: Puresil C18 (4 x 250 mm) Waters

Mobile phase: 30 mM heptafluorobutyric acid

-1 mM ammonium acetate buffer (pH 5.0)

Flow rate: 1.0 ml/min

### **Condition of MS**

Ionization: ESI (positive)

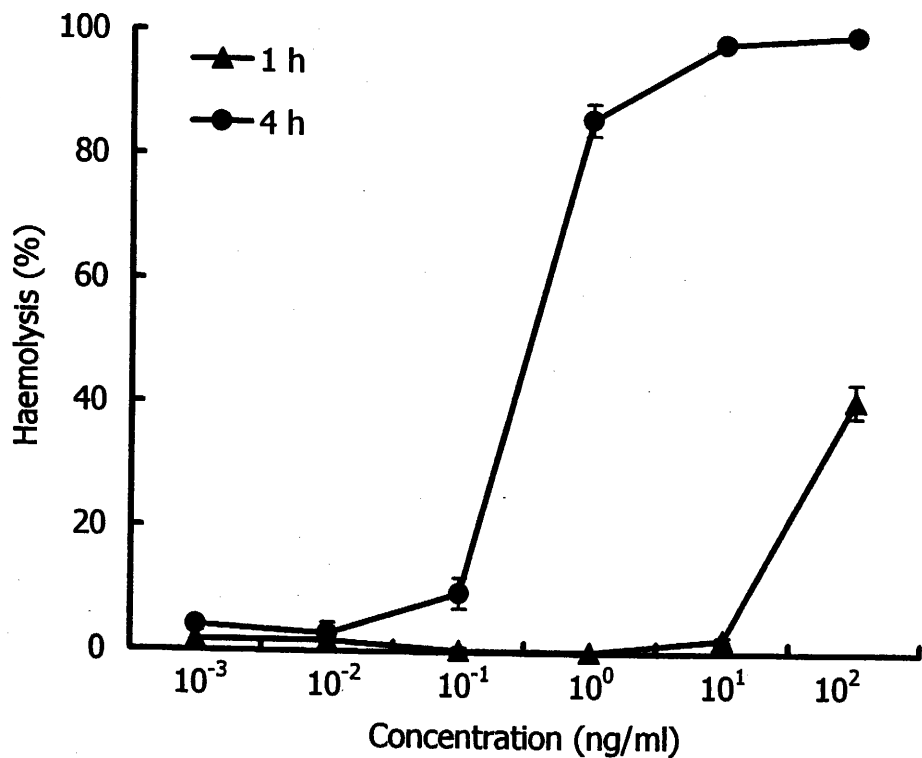
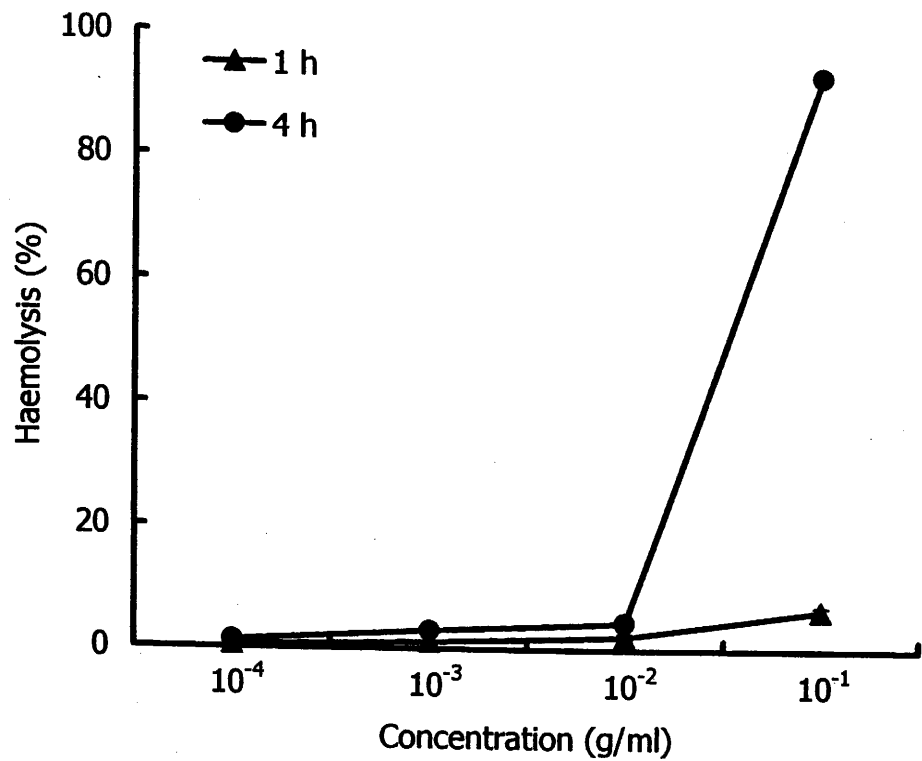
Dissolution temperature: 120°C

Ion source block temperature: 350°C

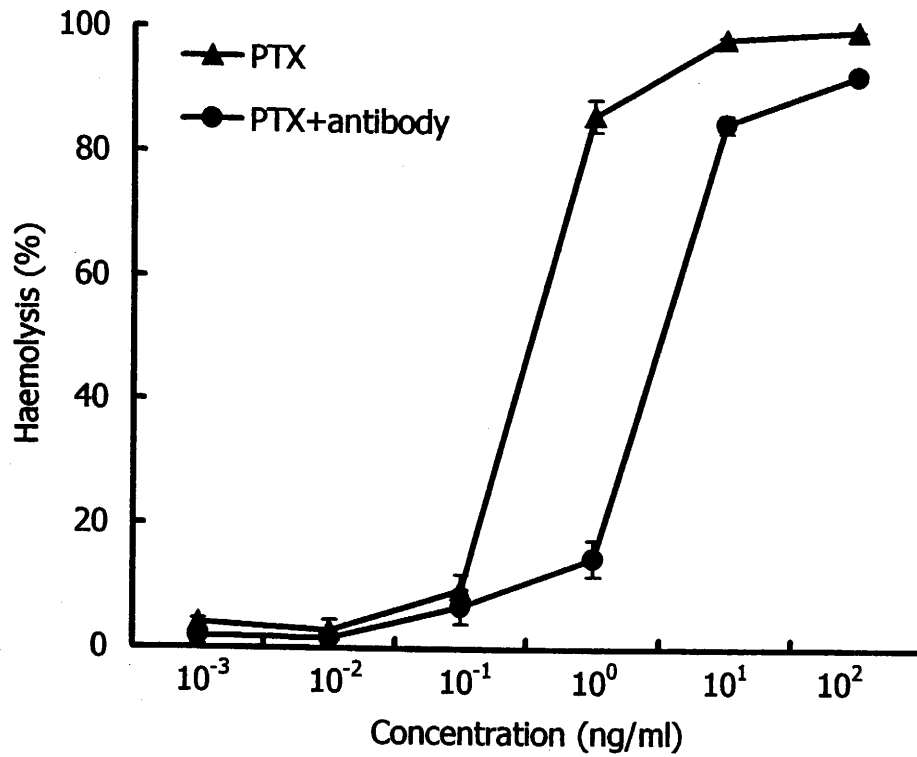
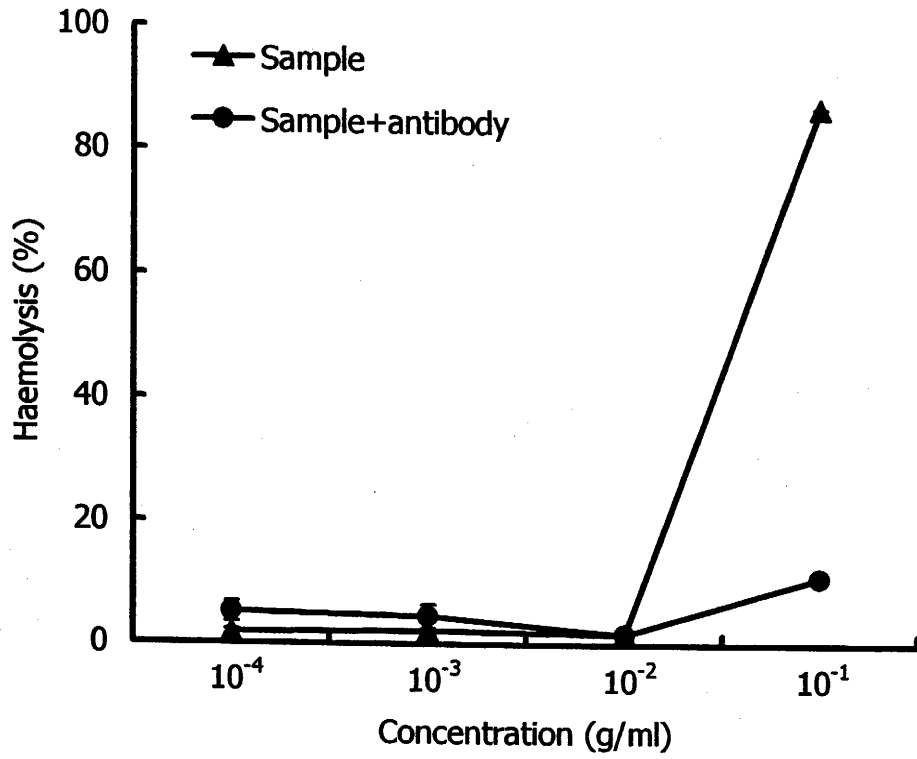
Cap voltage: 30 V

Flow rate: 0.2 ml/min





**Fig. 22. Delayed haemolysis by the toxin in the 1-butanol layer from ostraciid fish (upper) and PTX standard (lower).**

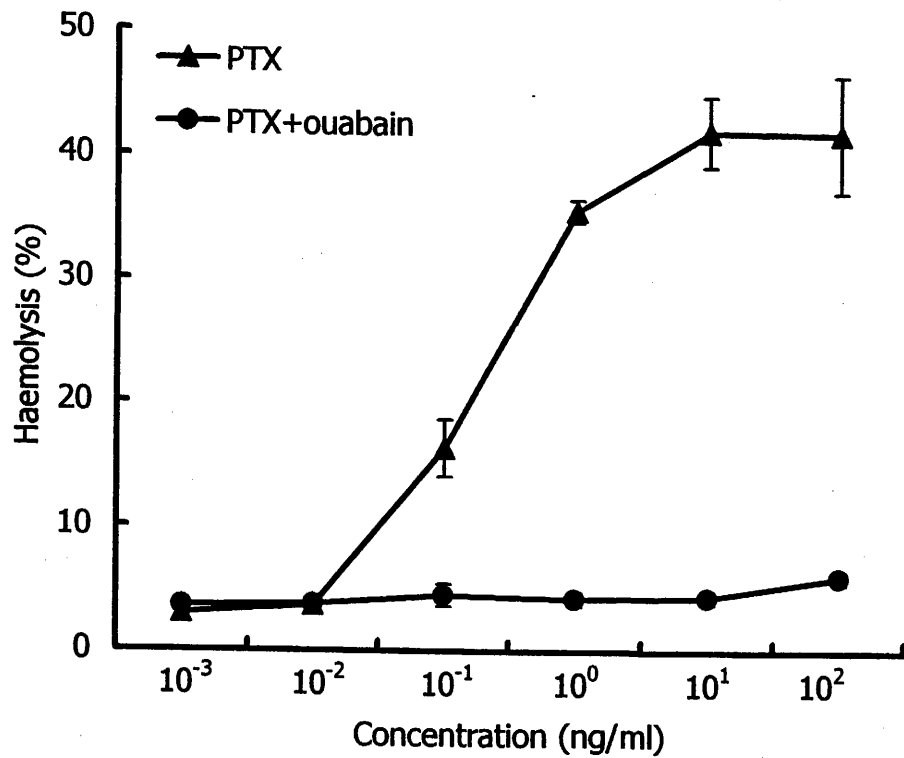
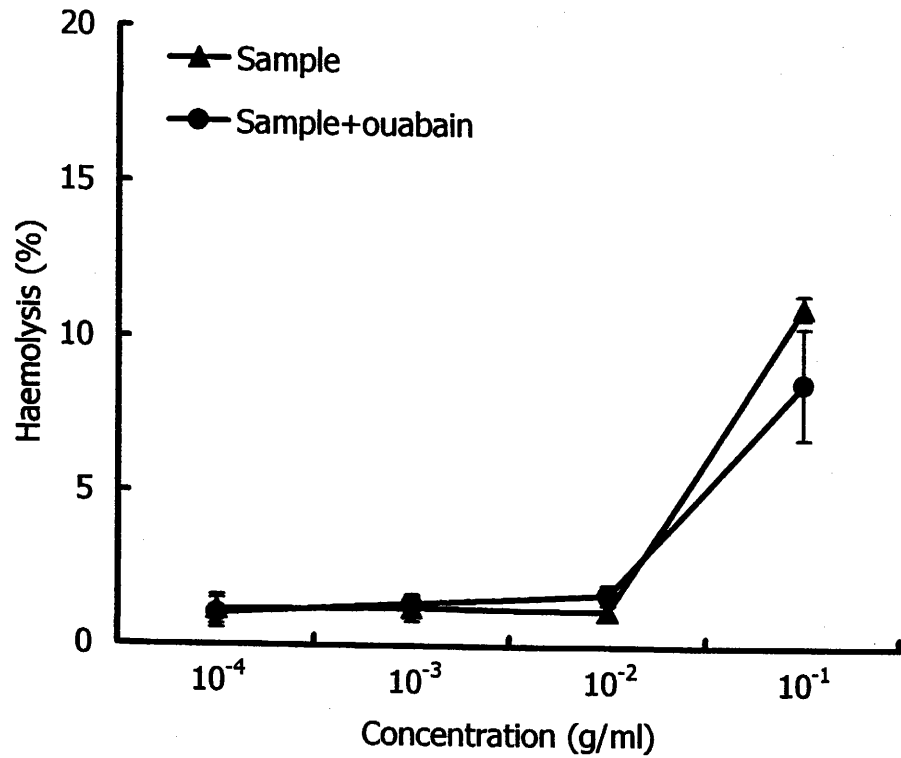


**Fig. 23. Suppression of haemolytic activity of the toxin in the 1-butanol layer from ostraciid fish (upper) and PTX standard (lower) by anti-PTX antibody.**

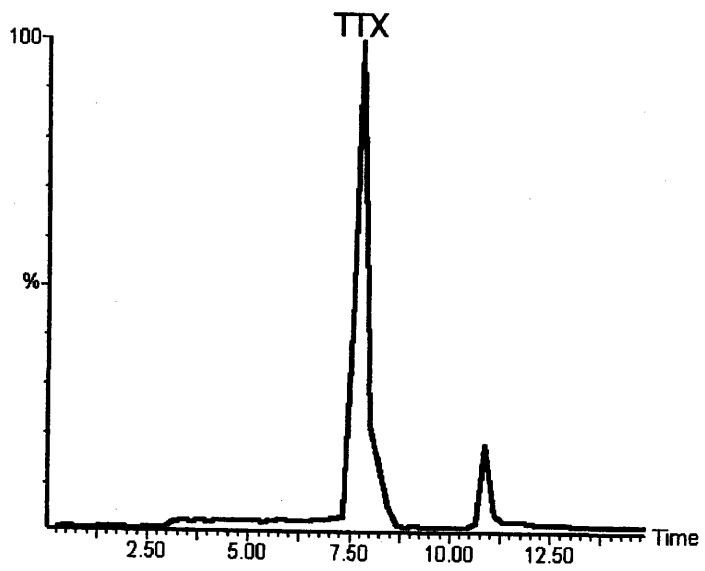
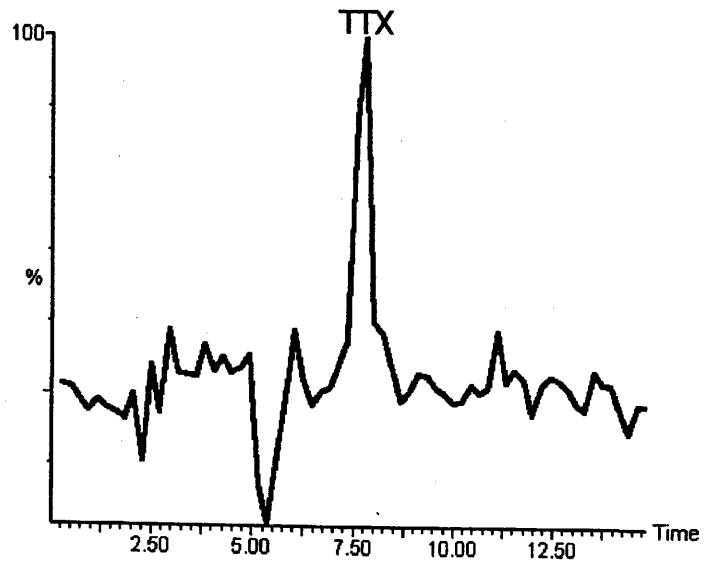
(Fig. 24)。他方、水画分 B については、LC/MS 分析により、 $m/z$  320 のクロマトグラムにおいて分子量 319 の微量の TTX (0.7 MU/g) が検出された (Fig. 25)。

一般にハコフグ科魚類は、溶血性と魚毒性を示すサポニンに類似したパフトキシン (pahutoxin) を保有していることが知られているが (Thomson, 1968), その溶血作用は PTX のそれとは異なる。また、試料から得られた水画分に微量の TTX が含まれていたが、食品衛生上、この値は無毒とされており、ヒトに対して中毒を引き起こす毒量ではなかった。

以上、本節では、ハコフグ科魚類に PTX 様物質が存在していたことを強く示唆するとともに、三重県で発生したハコフグ科魚類中毒の原因物質は、PTX 様物質であると推察した。



**Fig. 24. Suppression of haemolytic activity of the toxin in the 1-butanol layer from ostraciid fish (upper) and PTX standard (lower) by ouabain.**



**Fig. 25. Mass chromatograms of the toxin in the aqueous layer from ostraciid fish (upper) and authentic TTXs (lower).**