

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	熱帯性魚類食中毒シガテラのリスク評価のための研究 (課題番号：1403) (研究期間：平成26年度～平成27年度)
主任研究者名	研究者名：大城 直雅 所属機関：国立医薬品食品衛生研究所

シガテラはシガトキシン類を原因物質とする世界最大規模の魚類による自然毒食中毒で、主に熱帯・亜熱帯の海域で採取された魚類を喫食することで発生する。シガトキシン類（CTXs）は*Gambierdiscus*属の渦鞭毛藻（微細な藻類）が産生し、食物連鎖によって渦鞭毛藻から藻食動物、肉食魚へと伝搬される。そのため、魚類の毒性は、魚種、生息海域によって大きく異なり、さらには個体間の差も著しい。シガテラが多発地域は南太平洋の島嶼国で、日本では沖縄・奄美地方から毎年発生報告があるが、近年本州から九州にかけての太平洋沿岸域で採取された魚類による事例の報告も散見される。本研究では、シガテラのリスク評価に必要な科学的情報を収集するために、以下の項目について取組んだ。

1) シガテラ発生実態の解析

シガテラに特化した食中毒調査票を作成し、沖縄県で発生した食中毒等事例において調査した。その結果、本調査票がシガテラの食中毒調査実施時に有益であることが示され、沖縄県において併用されることになった。本調査票はシガテラ以外の自然毒による食中毒調査票を作成する際のプロトタイプとなるものである。さらに、国内で発生したシガテラについて症状及び原因魚等の傾向に関して有用な知見を得ることができた。

2) シガトキシン類の解析手法開発

沖縄で漁獲されたシガテラの原因魚であるバラフエダイ、バラハタ等の魚肉をLC-MS/MS分析した結果、CTXsの含量や組成と生物学的データ（魚種、採取地、体長、体重、年齢）との関係性が見いだされた。またCTXs含量の多い試料は、入手が極めて困難なCTXs標準品調製用として使用した。

3) 沿岸海域の生物における汚染実態の解明

本州沿岸域で採取した魚類、藻類、藻食動物についてLC-MS/MSによるCTXs分析を実施したが、いずれの試料からもCTXsは検出されなかった。海外試料としてトリニダード・トバゴ、台湾、タイ、フィリピン及びフィジーの市場で入手した魚類試料についてもCTXs分析した結果、フィジー産の3試料のみからCTXsが検出された。

4) シガトキシン類の毒性評価

天然試料から調製されたCTX1BとCTX3Cについて、マウスへの腹腔内投与と経口投与での毒性を検討した。両物質とも投与経路による毒性に大きな違いはないのが特徴であった。CTX1Bを投与したマウスの致死時間は24時間以内であったが、CTX3Cは数日後に死亡するものもあった。そのためCTX3Cを含む試料の毒性を評価する際には、過小評価を防ぐために24時間以上の経過観察が必要と考えられた。

5) シガトキシン類のリスク評価、リスク管理アプローチの検討

シガテラのリスク評価に関する情報をFAO、EFSA及びフランスから収集した。FAO及びEFSAではデータ不足が指摘されており、フランスの評価は地域限定的データに

基づくため、日本への適用は慎重に検討する必要がある。沖縄県で発生した疫学データを基に暫定的ARfD（急性参照用量）を推定した。また、リスク管理に関する情報をFAO、EU、米国及び豪州から入手し、日本への適用の可能性を検討した。

2年間という期間であったが、シガテラのリスク評価に必要な科学的情報を得ることができた。また、食中毒調査票など、今後も継続的に科学的データを収集するシステムを構築することができた。さらに、シガテラのリスク評価に必要な課題等についても提案した。このように評価に必要なデータを収集し、枠組みを作ることができたが、評価の際の不確実性を少なくするために、継続的な疫学データの収集が必要と思われる。なお、本課題で実施した手法や結果、課題は、将来必要となる他の自然毒のリスク評価にも応用できるものである。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	熱帯性魚類食中毒シガテラのリスク評価のための研究 (研究期間：平成26年度～平成27年度)
主任研究者名	所属：国立医薬品食品衛生研究所 氏名：大城 直雅（研究課題番号：1403）

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成26年度～平成27年度

2 研究目的

本研究では、わが国におけるシガテラの発生実態を調査するとともに、原因物質のシガトキシン類（CTXs）の機器分析法の確立、日本沿岸海域に生息する生物のCTXs汚染実態・毒性調査、動物における毒性評価、海外でのリスク評価・管理状況に関する情報調査を行い、今後のリスク評価に必要な科学的知見を包括的に得ることを目的とする。

「シガテラ（CFP）」は、世界最大規模（推定患者数2～6万人/年）の自然毒食中毒である。原因物質のCTXsは、付着性の渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属が産生し、食物連鎖によって藻食動物からヒトが食する肉食魚へと伝搬蓄積される。

わが国では、熱帯域に属する沖縄県及び鹿児島県奄美地方を中心に毎年発生し、その報告数には増加の傾向が見られるとされる。また、近年、本州沿岸域においても、大型のイシガキダイによるCFPの発生報告や原因渦鞭毛藻の分布が確認されるなど、地球温暖化による海水温度の上昇と相まって、CFPのリスクが全国的に高まっていることが示唆される。さらに、香港やマカオ、中国本土では南太平洋の諸島国からの輸入魚に起因するCFPが急増し、これまで症例の報告がなかった欧州でも新たにCFPが発生したことから、他国の食品安全担当機関ではCFPへの対策が開始されている。

以上のように、わが国でのCFPのリスクがこれまで以上に懸念され、関心も高まっている。しかしながら、その対策への具体的な行政措置等はなされていないのが現状である。また、過去に食品安全委員会の自ら評価案件になったことがあるが、その際は情報不足と判断され、評価には至らなかった。

従って、わが国で毎年発生しているCFPのリスク低減化のためには、わが国での発生実態、原因物質CTXsの分析法、日本沿岸に生息する魚介類中の分布・濃度、毒性等に関する知見を可能な限り入手した上で、得られた情報をもとにわが国の実態に基づくリスク評価を行う必要がある。しかしながら、食品安全委員会の自ら評価案件の検討会でもCFPは評価のための情報が不足していると判断されたことから、現時点では、リスク評価を行うには科学的知見が不十分な状況である。

本課題では、CFPのリスク評価を行うにあたり不足しているデータを入手するた

めの研究を行うものである。得られた科学的知見は、今後の食品安全委員会でのリスク評価を容易にし、さらには CFP のリスク低減化のためのリスク管理オプションの考察及び優先順位付けにも役立つものである。

3 研究体制

研究項目	個別課題	研究担当者名（所属機関名）
シガテラ発生実態の解析	1)シガテラ発生時の調査票の作成 2)シガテラ症例の調査 3)シガテラに関する文献調査	登田美桜（国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部）
シガトキシン類の解析手法開発	1)シガトキシン分析法の検討 2)シガトキシン類の標準試料等の調製 3)シガトキシン類の汚染度調査	大城直雅（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）
沿岸海域の生物における汚染実態の解明	1)シガテラ発生地域における魚類等の汚染状況調査 2)シガテラ原因魚採捕集域における生物汚染調査 3) <i>Gambierdiscus</i> 属等の渦鞭毛藻培養株確立	石川輝（三重大学大学院 生物資源学研究科）
シガトキシン類の毒性評価	1)シガトキシンの摂取経路と毒性に関する研究 2)シガトキシンのマウス・バイオアッセイに関する研究 3)シガトキシンの代謝、体内分布に関する研究	鈴木穂高（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）
シガトキシン類のリスク評価、リスク管理アプローチの検討	1)諸外国のシガトキシン類のリスク評価の収集、解析 2)各国のシガテラリスク管理措置に関する情報の収集解析 3)我が国のリスク評価の試行 4)リスク評価上の主たるデータギャップの特定とデータ収集の優先順位付及びそれらの収集戦略の検討	豊福肇（山口大学大学院 総合獣医学部）

4 倫理面への配慮について

臨床・疫学研究等、個人情報等の適切な取扱いについては、国立医薬品食品衛生研究所倫理審査委員会規定及び協力研究者等の所属機関における同様な規定等に基づき実施する。

動物を用いる実験については、国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規程及び協力研究者等の所属機関における同様な規定等に基づき実施する。

II 研究内容及び成果等

1 各研究項目の内容及び成果

(1) 研究項目名：シガテラ発生実態の解析

我が国では、シガテラ（CFP）は亜熱帯域に属する沖縄県及び鹿児島県奄美地方を中心に毎年発生し、その報告数には増加の傾向が見られる¹⁾。また、近年、本州沿岸域においてもCFPを疑う事例の発生報告や*Gambierdiscus*属の分布が確認され、CFPのリスクが全国的に高まっていることが示唆されることから^{1,2)}、食品安全上の問題としては今後優先的に対策が求められる課題の一つである。しかしながら、我が国におけるCFPの発生実態の全体像は不明であり、CFP発症の中毒量や中毒患者を特定するための症状等も明確にされておらず、リスク評価に必要な科学的知見が十分ではないために、対策への具体的な行政措置等はなされていないのが現状である。本課題では、我が国におけるCFPの発生実態を解明するための情報を入手し、内閣府食品安全委員会におけるリスク評価に必要な科学的知見を得ることを目的とした。調査を行うにあたり、国立医薬品食品衛生研究所及び沖縄県衛生環境研究所の「研究倫理審査委員会」での審査・承認を受けた。

【文献】

- 1) 登田美桜, 畝山智香子, 豊福 肇, 森川 馨 (2012) わが国における自然毒による食中毒事例の傾向(平成元年～22年). 食品衛生学雑誌 53:105-120.
- 2) 大城直雅 (2015) シガテラ毒. 松浦啓一・長島裕二編著, 毒魚の自然史. 北海道大学出版会, 113-134.

1) 個別課題名：シガテラ発生時の調査票の作成

研究担当者名：登田美桜（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者：佐久川さつき（沖縄県衛生環境研究所）

久高 潤（沖縄県衛生環境研究所）

仲間幸俊（沖縄県衛生環境研究所）

高嶺朝典（沖縄県衛生環境研究所）

本個別課題では、シガテラ（CFP）症例情報の入手及び蓄積のために、CFP発生時に使用する調査票を作成し、地方自治体等の現場担当者の意見を踏まえた上で完成させることを目的とした。

厚生労働省は、食中毒の発生状況の把握と解明のため、食中毒発生時には当該地域の地方自治体を中心となり系統的な調査を行って食中毒事件表等を作成し、それらを

衛生行政（食品衛生対策）のための基礎資料とした上で食中毒統計を毎年作成している。その食中毒統計作成は、食中毒統計作成要領（平成6年12月28日衛食第218号、最終改正：平成24年12月28日食安監発1228第1号）に基づくものとされている。その中に保健所長が作成するものとして食中毒調査票（様式第一：昭和55年10月1日厚生1-1-3-11）があり、症状の有無を確認して記載すべきとされているのは「下痢、発熱、嘔気、悪寒、嘔吐、倦怠感、裏急後重（りきゅうこうじゅう：しぶり腹）、麻痺、臥床、暖気（あいき：げっぷ）、頭痛、戦慄、腹痛、脱力感、痙れん、眼症状、その他の症状」である。しかしながら、CFPを含む自然毒による食中毒では、ここに示されていない循環器系症状や温度感覚異常（ドライアイスセンセーション）のように一般的な病原性微生物・ウイルス性食中毒とは異なる特殊な症状を生じることが多い。それらの症状は、これまでの食中毒調査では「その他の症状」として記載された場合もあるが、症状の確認時に見落とししていたり、記入漏れにつながっている可能性が考えられる。さらに、これまでの食中毒調査票ではリスク評価において急性参照用量（ARfD）や耐容摂取量（TDI等）を算出するのに必要となる患者の体重が記録されないという問題点もある。従って、本研究では、CFPの症状を的確に調査できリスク評価に必要な情報を得られるような調査票の作成を検討した。

まずSPC (Secretariat of the Pacific Community)のフィールドガイド¹⁾ 及びEFS Aの報告書等²⁻⁶⁾、並びに国内で発生したCFPの症状を参考にシガテラ調査票（案）を作成し、その実用性について現場で実際に調査にあたる沖縄県内の保健所職員の意見を聴いた上で完成版の「シガテラ調査票（別添1）」とした。

本研究期間中に発生したCFPの調査には、作成した「シガテラ調査票」を用いた。

【文献】

- 1) Ciguatera field reference guide, SPC (Secretariat of the Pacific Community) 2005, by Dominique Laurent, Being Yeeting and Jean-Paul Gaudechoux
- 2) FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 80: Marine Biotoxins, FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2004.
- 3) Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Ciguatera toxin group, EFSA Journal 2010; 8(6):1627
- 4) Ciguatera fish poisoning: a review. RIVM Report No 388802021., De Fouw JC, Van Egmond HP and Speijers GJA, 2001.
- 5) Risk profile: ciguater toxins in seafood, NZ ESR Mar. 2007
- 6) Ciguatera fish poisoning: treatment, prevention and management, Friedman MA, et.al., Mar Drugs. 2008;6(3):456-79.

2) 個別課題名：シガテラ事例の調査

研究担当者名：登田美桜（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者：佐久川さつき（沖縄県衛生環境研究所）

久高 潤（沖縄県衛生環境研究所）

仲間幸俊（沖縄県衛生環境研究所）

高嶺朝典（沖縄県衛生環境研究所）

本研究では、我が国のシガテラ（CFP）多発地域である沖縄県で発生したCFPについて次の3つの調査の実施を目的とした。沖縄県以外の地域については、本調査期間中にCFPが発生したとの情報がなく調査票を用いた調査の機会が得られなかったため調査を実施できなかった。

- ① 過去の食中毒届出事例の調査
- ② 研究期間中に発生した食中毒事例の調査（「シガテラ調査票」を用いた調査）
- ③ 食中毒の届出がされていない過去の事例調査（医師、漁業組合への聞き取り）

① 過去の食中毒届出事例の調査

本研究期間より以前に沖縄県において食品衛生法に基づき調査したCFPについて、患者数、原因魚の種類、症状、シガトキシン類（CTXs）検査結果等を調査し、原因食品の喫食量をもとにCTXs摂取量の推定を行った。対象としたCFPは、昭和62年から平成25年に沖縄県で発生した事例のうち、沖縄県衛生環境研究所で原因食品中のCTXsの検査を行った事例で、かつ、同所において食中毒調査票等の詳細な記録がある事例とした。なお、食中毒調査票等とは、沖縄県食中毒処理要領で定める各種調査票（第1号～第14号様式）及び調査した食品衛生監視員が作成した記録のことである。

本研究の調査対象として得られた事例は29件で、患者数は有症者の総数113名、無症者の総数27名、症状の有無が確認できなかった者が1名であった。

原因魚の種類は、和名等の記載で9種類、方言名記載で4種類、および魚種不明の計15種類の記載があり、主な魚種は、イッテンフエダイ、バラハタ、バラフエダイ、イシガキダイ及びウツボ類であった。

CFPの症状は、主に、下痢、嘔吐などの消化器系、しびれ、かゆみ、温度感覚異常、関節痛などの神経系、血圧低下、徐脈などの循環器系であった。有症者113名の症状の延べ件数は702件であり、CFPの主な症状である神経系が244件、消化器系が216件、循環器系が12件であった。また、これらに分類されないその他の症状は232件であった（別添表1）。

神経系症状のうち、口唇から喉にかけての痛み、しびれ、かゆみ等を温度感覚異常に含め、有症者総数に対する各症状の発症率を求めたところ、温度感覚異常（約66%）、下痢（約63%）、倦怠感（約50%）、脱力感（約43%）、吐き気（約42%）が高率であった（別添表2）。また、症状の発症順位が記録されていた有症者78名のうち、初発症状として消化器系が出現した者は41名、神経系が出現した者は16名、その他の症状が出現した者は21名であり、症状の中でも初期には消化器症状を生じている傾向が見られた（別添表3）。

沖縄県におけるCFPの主な症状は、神経系、消化器系、その他であり、循環器系の症状の発症率は低率となった。しかし、今回の調査対象事例で用いられていた従来の食中毒調査票の症状の項目は、主に病原性微生物を原因とする事例を想定して作成されたものであり、徐脈、血圧低下などの循環器系の症状は予め記載されていないことから、循環器系の記録が少なくなった可能性がある。

次に、原因魚の種類に応じて生じる症状に違いがあるのかを検討した。原因魚をフ

エダダイ科、ハタ科、イシダイ科、ウツボ科、ブダイ科、ニザダイ科に分類し、それぞれ事例の神経系、消化器系、循環器系、その他の症状の件数と患者数に対する発症率を算出したところ、フエダイ科では神経系症状が出現した者が約23%、消化器系が出現した者が約40%であったが、ハタ科では神経系症状が約42%、消化器系が約24%と逆転した結果となり、原因魚の種類に応じて症状が異なる可能性が示唆された(別添表4)。

さらに、CTXsの摂取量を算出するために刺身を喫食していた患者28名を選択し、その詳細を別添表5にまとめた。汁物や煮付けとして原因魚を喫食している場合には一杯/一皿分に含まれる魚肉の重量が不明でありCTXsの摂取量を算出できないことから、本研究では刺身の喫食者を選択した。CTXsの摂取量は、原因魚の魚肉喫食量(重量)及びCTXs検査結果から推定し、魚肉喫食量は沖縄県内で一般的に食されている刺身一切れ当たりの重量をもとに刺身一切れ12 gと仮定して算出した。なお、原因魚を刺身だけでなく汁物及び煮付け等の加熱調理品とともに喫食した者が19名いたが、加熱調理品からの魚肉摂取重量が不明であるため、これら19名については「刺身からの摂取量以上」と表記した(別添表5)。結果として、対象患者28名のうち原因魚を刺身のみで喫食した者は8名であった。このうち無症状者は2名であり、CTXsの摂取量はそれぞれ約4 MU(約28 ng CTX1B当量: 1 MU=7 ng CTX1B当量)、120 MU(840 ng CTX1B当量)であった。安元^{7,8)}によると、CTXsのヒト最小発症量は10 MU(70 ng CTX1B当量)としている。従って、この最小発症量^{7,8)}を参考にすると、CTXsの摂取量が120 MU(840 ng CTX1B当量)と推定された無症者は、ヒト最小発表量の10倍以上のCTXsを摂取したことになる。この無症状者がシガトキシン類の推定摂取量が多かったのにもかかわらず発症しなかった理由として、喫食した魚が体重約13 kgの大型のバラフエダイであったことから、魚肉におけるCTXsの分布に偏りがあった可能性、記録されたよりも実際の魚肉摂取量が少なかった可能性が考えられた。一方、刺身のみを喫食した発症者のうちCTXsの摂取量が最も少なかったのは12 MUであった。この量は、先の安元^{1,2)}が報告した最小発症量の範囲に当てはまる。近年、自然毒に関するリスク評価において、急性毒性については、喫食後24時間又は一日以内に発症しない(有害影響が見られない)と考えられる自然毒(ハザード)の最大摂取量として急性参照用量(ARfD: mg/kg体重)を設定している。本調査で得られた最小発症量は12 MUであったが、体重の記録がなく正確なARfDを算出するには至らなかった(注: 文部科学省データに示された女性平均体重に基づく算出については、後述の個別項目「シガトキシン類のリスク評価、リスク管理アプローチの検討」に記載)。また、刺身以外の煮付けや汁物などを摂取した事例が多いことから、魚肉喫食量がわかりにくい加熱調理品からのCTXs摂取量の推定方法の検討が今後必要であることが示唆された。

以上のように、沖縄県で過去に発生したCFPに関する記録である食中毒調査票等を調査することにより、CFPの症状及び原因魚の種類の傾向、並びにCTXsの推定摂取量についての知見を得ることができた。しかしながら、従来使用されている食中毒調査票ではCFPで生じる循環器症状や温度感覚異常などの症状が十分には記録されていない可能性が示唆された。また、自然毒に関するリスク評価を行うには、症状の他に患者の体重、飲酒などの情報も必要となるが、従来の食中毒調査票ではそれらの情報は記録されていなかった。従って、CFPの症例をよりの確に調査し、その調査結果をリス

ク評価に利用できるようにするためにはCFPの特徴的な症状を明確に記録できる専用の調査票が必要であることが確認された。このような状況を踏まえ、本個別項目では先に述べたように「シガテラ調査票」を作成し、本研究期間中（平成26、27年）に沖縄県で発生した事例についてはその専用調査票を用いて調査を実施した。詳細は次に述べる。

【文献】

- 1) シガテラ, 安元 健, 医学の歩み 1980; 112: 886-892
- 2) T. Yasumoto, (2005) Chemistry, etiology, and food chain dynamics of marine toxins., *Proc. Jpn Acad, Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 81:43-51

② 研究期間中に発生した食中毒事例の調査（「シガテラ調査票」を用いた調査）

本研究期間中（平成26、27年）に沖縄県で発生したCFP事例について、本研究で作成した「シガテラ調査票」を用いて調査を実施した。

調査は、まず沖縄衛生環境研究所（以下、沖縄衛研とする）の研究者が、沖縄県内でCFPの届出・苦情等相談があった場合には沖縄衛研に知らせていただくよう県内の各保健所長に協力を依頼した。該当する事例が発生した際は、通常の食中毒処理の一環としてシガテラ調査票を用いた調査もしていただくよう管轄保健所長に依頼して調査を行った。

本研究期間中にはCFPが3事例発生し、これらの事例についてシガテラ調査票を用いて調査を実施した。患者数は成人12名で全員が有症であった。この12名の詳細を別添表6にまとめた。

症状の延べ件数は59件で、神経系が約27%、消化器系が約34%、その他が約36%、循環器系が約3%と過去事例と同様の傾向となり、確認された症状としては水を口に含んだ時に刺すような感じ、腹痛、下痢、脱力/倦怠感が多かった。発症時間は喫食後2～30時間であり、要入院であったのは3名であった。患者の中には継続的（約3～6日間）な症状を報告している者もあり、それらの症状は手足・口のしびれ、疲れやだるさ、かゆみであった。12名中5名がCFPのことを知っていた。

12名全員が原因魚を煮付け（アラ煮）、汁物などの加熱調理品を喫食していることから、魚肉摂取重量が不明でCTXs摂取量の正確な推定が出来ず、先に述べた①過去の食中毒届出事例の調査と同じく刺身一切れ12 gと仮定した上で刺身に由来するCTXsの摂取量をもとに「刺身からの摂取量以上」と表記した。

本研究で作成した「シガテラ調査票」では、CFPに特徴的な消化器系、神経系症状について、その有無をチェック形式で記入するようになっており、循環器系症状を判断する心拍数、血圧などの記入欄も設けている。また、原因食品の種類、調理方法、喫食量の記入欄に加えて喫食者の体重、飲酒歴等の記入欄もある。これらすべてが1枚の書面に収められている。これを使用した現場担当者の食品衛生監視員からはCFPの症例情報の確認をしやすいだけでなく記入にも簡便であるとの意見を得ており、その有用性と実用性が確認された。ただし、今回の調査において「その他」の症状として「脱力感」及び「筋肉痛」が複数記録されており、この二つの症状については今後調査票を

改訂する際に症状のチェック項目に追加すると良い。本研究期間に得られた沖縄県におけるCFPの傾向をもとに、さらに改良をすることで、CFPをよりの確に把握できる調査票にすることができる。このシガテラ調査票の考え方は他の自然毒による食中毒についても応用でき、それぞれに特徴的な症状や影響因子を考慮して作成すれば現場担当者にとってもリスク管理者/評価者にとっても有用な調査票になると考えられる。

また、今回の調査で得られた大きな課題は、患者による原因魚の喫食量が正確に把握できなかったことである。煮付けや汁物などの加熱調理品の場合には杯/一皿分に含まれる魚肉の重量を知ることが難しいことから、調査の際に実物大の写真や模型等を患者に見せて答えやすくする工夫など、おおよその喫食量を推定できるようにするための改善が求められる。さらに、本調査期間中に3事例、12名分の症例情報が得られたが、CFPのリスク評価の参考資料とするにはより詳細な症例情報が必須であり、症例数は多い方が望ましい。従って、継続的に調査を行うこと、また調査対象地域を拡大することによって症例数を増やすことが今後の課題となる。さらに調査により得られた詳細な症例情報を、将来的に診断基準作成の基礎資料として利用できるようにすることも課題の一つである。

③ 食中毒の届出がされていない過去の事例調査（医師、漁業組合への聞き取り）

沖縄県の漁業組合および医療機関を対象に、CFPと類似した症状を経験した人がいないか質問し、CFPが疑われる事例の存在が確認できた後に調査への協力を依頼した。医療機関において対象者の存在が確認された場合には担当医師を通じて、漁業組合では組合を通じて個人情報を知り得ない状態にした上で「シガテラ調査票」を記入していただく形式で調査を行った。

この調査で得られたのは8症例であり、その詳細を別添表7にまとめ、症状の内訳を別添表8、初発症状（報告のあった7症例）の内訳を別添表9に示した。症状では関節痛と四肢のチクチクする感じやしびれ、下痢が最も多かった。また、先に述べた沖縄の過去の事例調査では報告されていない味覚異常も比較的多かった。初発症状では下痢、嘔吐及び腹痛といった消化器症状が多く、この傾向は沖縄の過去の事例調査と一致していた。さらに、1ヶ月以上症状が継続した症例では、関節痛や皮膚のかゆみといった神経系症状を呈していた。

今回の調査から、沖縄県内のCFP事例は食中毒として公式に報告された事例のみならず潜在的にはより多く発生していることが示唆される。このような調査にはローカルネットワーク作りや多忙な医師に依頼することの難しさなどもあり、届出のない事例を発掘するためには調査計画の改善が求められる。

3) 個別課題名：シガテラに関する文献調査

研究担当者名：登田美桜（国立医薬品食品衛生研究所）

海外におけるシガテラ（CFP）の発生状況及び原因魚種等の関連情報を入手することを目的に、①ウェブサイトの提供情報の調査、②学術文献の調査を行った。

① ウェブサイト調査

国際機関及び諸外国の公的機関のウェブサイトを対象に、どのようなCFP関連資料が公表されているかを調査し、別添表10にまとめた。

CFPの概要をまとめた報告書及びリスク評価報告書としては、国連食糧農業機関（FAO2004）、世界保健機関（WHO1984）、NZFSA（2007）、EFSA（2010）、RIVM（2001）及びSPC（2005）が公表され、うち最新はEFSAの評価書であった。他に、WHO及び諸外国ではCFPに関してQ&Aなどの消費者が理解しやすい形式で注意喚起を行っていた。SPC（Secretariat of the Pacific Community）は、Institute of Research for Development（IRD）と共同で最新知見のレビューに基づきフィールドガイドを作成し公表している（冊子版もある）。藻類の採集についての写真付き手順書、現場で使用することを目的とした症例報告様式、及びバックグラウンドデータ調査質問票についても紹介している。本研究では、シガテラ調査票の作成にあたりSPCの症例報告様式及びバックグラウンドデータ調査質問票を参考にしている。

② 文献調査

学術文献検索サイト（PubMed-MeSH、Google scholar、BioMed Central、SciFinders、医中誌、CiNii Articles）において「ciguatoxin」「ciguatera」キーワード検索を行った上で、EFSA（2010）、RIVM（2001）、FAO（2004：Marine Biotoxins）の評価書、及びNZFSAリスクプロファイル（2007）に記載された参考資料を追加し、CFP関連文献の一覧を作成した。ただし、Google scholarでの検索については2010年以降（EFSA評価書以降を対象とする）を対象とした。洋書及び会議録も検索されたが、内容が確認できず入手も困難と考えられたため対象外とした（一部、文献として報告されていない国内の症例報告は含めた）。また、CFPに関する記載はあるもののマリントキシン全体に関するレビューも対象外とした。次に、表題及び要旨をもとに内容に応じて、レビュー（総論、評価書、その他雑多）、ヒト症例及び疫学調査、動物試験（投与試験、LD50、動態等）、薬理作用（イオンチャンネルへの作用、*in vitro*試験等）、治療、汚染実態（魚種別の分布等）、検査法（化学分析、細胞アッセイ等：ただし免疫測定を除く）、免疫測定、気候との関係（海水温の関連等）、産生藻類、合成、に分類した。しかし、ヒト症例及び疫学調査に関連した文献調査を主目的に上記の検索サイトを選択したため、産生藻類及び合成に関する調査は十分できていない。従って、これら二つの分類項目を除く関連文献一覧を（別添2）に示した。複数の分類項目にまたがる場合には重複しないようにどちらかに含めている。また、米国疾病予防管理センター（CDC）のMMWRが文献としてJAMAに掲載されており、それについては重複するがそのまま残してある。

自然毒の関連文献に共通していることであるが、動物試験の報告が少なく、OECDガイドラインやGLPに従った試験の報告がない。これは標準品を多量に得ることや分析が難しいという問題による。さらに症例報告や疫学調査報告は多数あるものの、リスク評価において最小毒性量（LOAEL）をもとにARfDを算出するのに必要な原因魚の喫食量、CTXs濃度、症状及び体重がセットで報告された文献は非常に限られている。

今回の文献調査では網羅的に調べることとし、情報の質（ピアレビューの有無等）ま

では確認していない。リスク評価に利用する際はその情報の質及び妥当性を判断していただきたい。

(2) 研究項目名：シガトキシン類の解析手法開発

1) 個別課題名：シガトキシン分析法の検討

研究担当者名：大城直雅（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者：佐久川さつき（沖縄県衛生環境研究所）

長谷川晶子（愛知県衛生研究所）

円谷健（大阪府立大学大学院）

シガテラ毒の検査法であるマウス・バイオアッセイは、感度、精度、大量の供試使用を必要とし、また動物愛護の観点からも代替法の開発が求められているため、LC-MS/MS 法、細胞毒性試験法等の分析法について、協力研究者の協力を得て検討した。

魚肉試料を Yogi et al.¹⁾の LC-MS/MS 法で分析した際に、一部の試料において LC-MS/MS 分析の妨害となるピークが確認された。そのため、魚肉試料の精製法を検討し、シリカゲルまたは C18 カートリッジカラムによる精製を追加することで夾雑ピークを除去できることをみいだした。本法の妥当性を評価するために、個別課題 2) で調製した CTX1B、52-*epi*-54-deoxyCTX1B および 54-deoxyCTX1B の混合物を 0.03 ng/g 程度（FDA や EFSA の指針値は 0.01 ng CTX1B 当量/g）になるよう魚肉に添加した試料を調製し、精製したものを分析した結果、十分な真度が得られなかった。その要因については、CTXs の化学的挙動は明らかになっていない部分が多く、それに加えて極微量であることにより、試料や添加した CTXs 混合物に含まれる夾雑物によるマトリクス効果や精製に用いたカートリッジカラムへの吸着などが考えられた。添加する CTXs 混合物の調製法や、魚肉試料の精製法を検討した結果、微量な CTXs がカートリッジカラムに吸着していることが推定された。そこで、2-プロパノールや 1-プロパノール等、CTXs の溶解度があがる溶媒を検討し、真度の改善策をみいだすことができた。今後の課題としてさらに改良を加えて分析法の妥当性を確認することが必要である。なお、LC-MS/MS による分析法の妥当性については、0.16 および 0.32 ng/g を添加した時に良好な回収率を得られることが確認されているが¹⁾、これらの濃度で妥当性を確認した場合、貴重な CTXs 標準品を大量に消費してしまうため、事業実施期間の関係上、大まかな傾向を確認することを優先し、Yogi et al.¹⁾の方法により、個別課題 3) シガトキシン類の汚染度調査および、研究項目名 (3) 沿岸海域の生物における汚染実態の解明における各種試料の分析を実施した。

マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞とウワバイン (O) とベラトリジン (V) を用いた系では、Na⁺チャネル毒性を特異的に検出できる。すなわち、O/V 添加時に細胞毒性を示し、O/V 無添加では毒性を示さない場合に試料中に Na⁺チャネル毒性があることになる。この系を用いて CTX1B と CTX3C の Na⁺チャネル毒性を比較した。その結果、CTX1B と CTX3C は、O/V 無添加時に細胞毒性を示さなかったため、細胞毒性は低く、Na⁺毒性を特異的に検出できることが確認された。CTX1B 及び CTX3C の IC₅₀ はそれぞれ、1.8 ng/mL 及び 12 ng/mL であった。IC₅₀ 値から算出した CTX1B に対する CTX3C の比毒性は 0.14 であり、この値を用いて比毒性換算を行うと、両物質

は近似したシグモイド曲線を示した。

Gambierdiscus 属培養株の培養藻体 12 株の藻体を購入し、Yogi et al.¹⁾に従って処理したものを LC-MS/MS 分析に供したが、既知の CTXs は検出されなかった。一方、Neuro2a 細胞による分析では、12 株中 7 株が Na⁺チャネル毒性をもつことが判明した。Na⁺チャネル毒性を示す物質が CTXs であるか確認は取れていないが、Na⁺チャネル毒性のある CTXs 前駆体等の未知物質が含まれている可能性が示唆される。*Gambierdiscus* 属は増殖が遅く培養が容易ではないため、大量培養には年単位での長期を要するため、事業期間内に Na⁺チャネル毒性物質を単離し構造決定することは困難と判断した。これまで、わが国沿岸海域から採取された *Gambierdiscus* 属からは CTXs 産生株は確認されていないが、この手法により *Gambierdiscus* 属やその他の海洋生物をスクリーニングすることで、わが国における CFP の起源と魚類の毒化システムを解明できる可能性が示された。

なお、免疫学的手法による分析法については、ELISA キットの生産が本事業期間中に間に合わなかったため検討できなかった。

【文献】

- 1) Yogi K, Sakugawa S, Oshiro N, Ikehara T, Sugiyama K, Yasumoto T (2014) Determination of Toxins Involved in Ciguatera Fish Poisoning in the Pacific by LC/MS. J AOAC Int 97:398-402.

2) 個別課題名：シガトキシン類の標準試料等の調製

研究担当者名：大城直雅（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者：佐久川さつき（沖縄県衛生環境研究所）

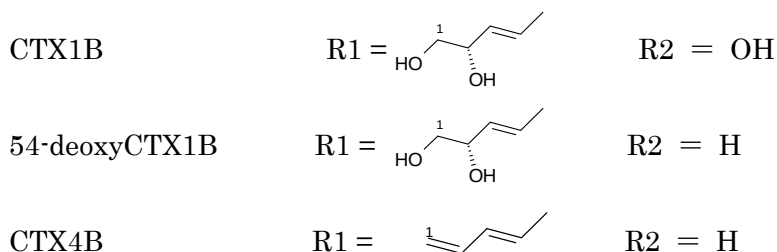
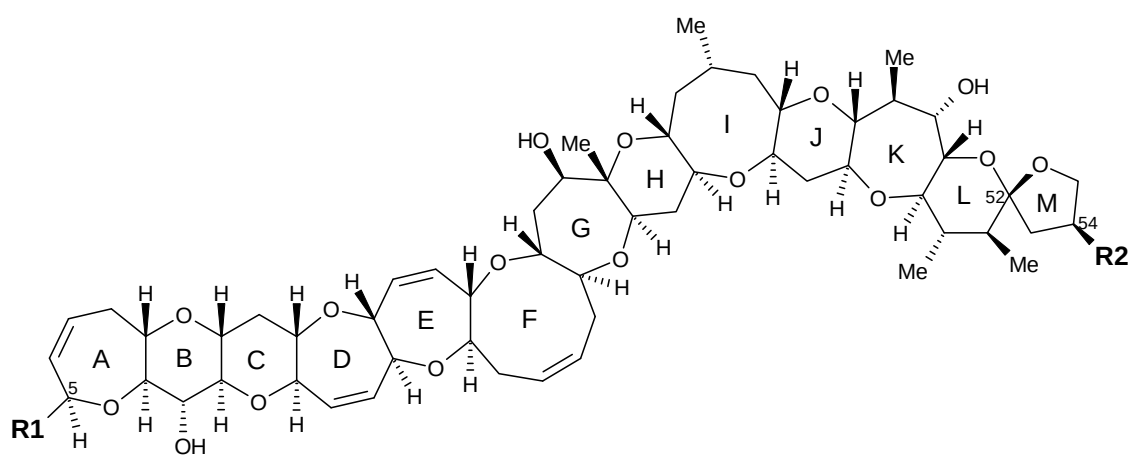
CTXs は分子量 1,000 を超える巨大な有機化合物である（図 1、2）。Hirama et al.¹⁾ によって、CTX3C の全合成が達成されたが、構造が複雑で多くの反応ステップを必要とするため商業的生産は期待が出来ない。また、中毒の原因食品中に含まれる CTXs 量も ppb レベルと極めて少ないため、魚肉などの天然試料から CTXs を単離し、工業的に標準品を生産することも困難である（最も毒性が高いと考えられているドクウツボの内臓 124 kg から単離された CTX1B は 350 µg）²⁾。そのため、CTXs の標準品の入手は極めて限定的であり、分析法の開発や評価に必要な標準物質、標準試料の調製について検討する。具体的には他の研究項目との連携を図りながら、海外も含めた有毒試料の収集に努め、CTXs の精製法を検討した。

標準品の代替品については、有毒魚肉試料から食品衛生検査指針理化学編 2015 に準じて抽出物を調製し、順相及び逆相のカートリッジカラムによる粗精製、中圧液体クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーによる精製により、CTX1B (40 ng)、54-deoxyCTX1B (2 ng) および、52-*epi*-54-deoxyCTX1B (3 ng) をそれぞれ調製した。得られた量が 2~40 ng と少ないため、LC-MS/MS による分析でマトリクス効果がない事を確認すれば、LC-MS/MS 分析用の標準品として使用可能と考えられる。また、フィジー産のドクウツボからは、CTX3C と 49-*epi*-CTX3C が検出された。これまで CTXC3C 系列を含有する試料は保有していなかったため、標準品調製

用試料として位置づけることができる。カリブ海の CFP の原因物質とされている、カリビアンシガトキシシン (C-CTX-1) を入手し、Yogi et al.³⁾で一斉分析が可能であることを確認した。このことで CTXs の地域特性を知るうえで、わが国における C-CTX 汚染実態を把握することが可能となった。

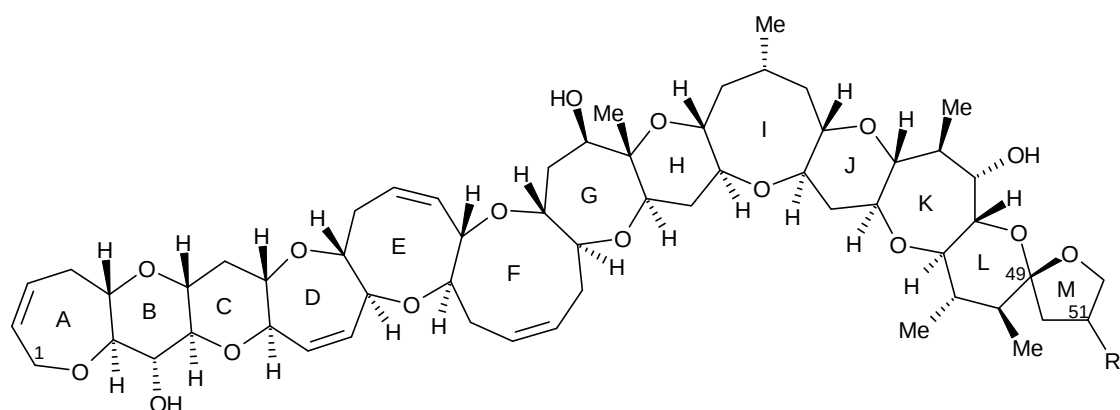
さらに、一般財団法人日本食品分析センターの安元健東北大学名誉教授らによってトレーサブルな値付けがなされた CTX1B および CTX3C の標準品を入手した。この標準品をもとに調製した CTXs や CTXs 含有魚肉試料に含まれる CTXs について値付けし、二次標準品として調製できる。

本事業で得られた CTXs 標準品や各種魚肉試料は国立衛研に冷凍保管されており、リスク評価にかかる国内外からの需要に応じていきたい。



CTX4A 52-*epi*-CTX4B

図 1. シガトキシシン 1 B 系列の構造式



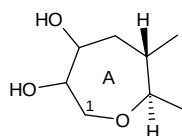
CTX3C

R = H

51-hydroxyCTX3C

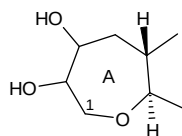
R = OH

2,3-dihydroxyCTX3C



R = H

2,3,51-trihydroxyCTX3C



R = OH

図 2. シガトキシン 3 C 系列の構造式

【文献】

- 1) Hirama M, Oishi T, Uehara H, Inoue M, Maruyama M, Oguri H, Satake M (2001) Total Synthesis of Ciguatera toxin CTX3C. Science 294:1904-1907.
- 2) Yasumoto T (2001) The Chemistry and Biological Function of Natural Marine Toxins. Chem Rec 1:228-242.
- 3) Yogi K, Sakugawa S, Oshiro N, Ikehara T, Sugiyama K, Yasumoto T (2014) Determination of Toxins Involved in Ciguatera Fish Poisoning in the Pacific by LC/MS. J AOAC Int 97:398-402.

3) 個別課題名： シガトキシン類の汚染度調査

研究担当者名： 大城直雅（国立医薬品食品衛生研究所）

シガテラ（CFP）の代表的原因魚種であるバラフエダイ 126 個体、バラハタ 68 個

体の筋肉試料について LC-MS/MS 法により CTXs を分析した（表 1）。CTXs 組成は CTX1B、54-deoxyCTX1B、52-*epi*-54deoxyCTX1B の 3 物質であり、低極性類縁体や CTX3C 系列類縁体は検出されなかった。バラフェダイの場合、CTX1B の割合が高く、毒性の主要な部分をしめていると考えられた（図 3）。また、MBA で有毒と判定された個体はすべて 20 歳以上であり、無毒と判定された 52 個体中 49 個体から CTXs が検出された。一方、バラハタの場合は 54-deoxyCTX1B、52-*epi*-54deoxyCTX1B の割合が高く（図 4）、毒性に寄与していることが示唆された。両種とも体長、体重、年齢の増加に対して CTXs の検出率および含有濃度が上昇する傾向が認められた（図 5）。沖縄産イシガキダイ 5 個体についても分析を実施したが、いずれの試料からも CTXs は検出されなかった（表 1）。太平洋で発生する CFP の原因物質として基本骨格の異なる CTX1B 系列と CTX3C 系列が報告されている。沖縄県および奄美群島においては、CTX1B 系列のみが検出されている¹⁻³⁾。一方で、平成 10 年に宮崎県で発生した食中毒の原因魚（宮崎産イシガキダイ）の主要物質は CTX3C 系列で、平成 18 年に茨城県で発生した食中毒の原因魚（南鳥島産バラフェダイ）からは CTX1B 系列と CTX3C 系列の両方が含まれていた¹⁾。そのため、CTXs の組成には地域特性があると考えられており、本研究によって初めて、奄美よりも北の海域で採取された魚（大隅地方産）が CTX1B 系列だけを持つことが判明した。今後、九州以北（以東）の魚類の CTXs 組成について調査が望まれる。

食中毒検体について、LC-MS/MS 法と Neuro2a 細胞による毒性試験で分析した結果、CTXs 含量の値に差が出た。これについては、分析対象外の CTXs の存在等が考えられるが、今後の検討としたい。

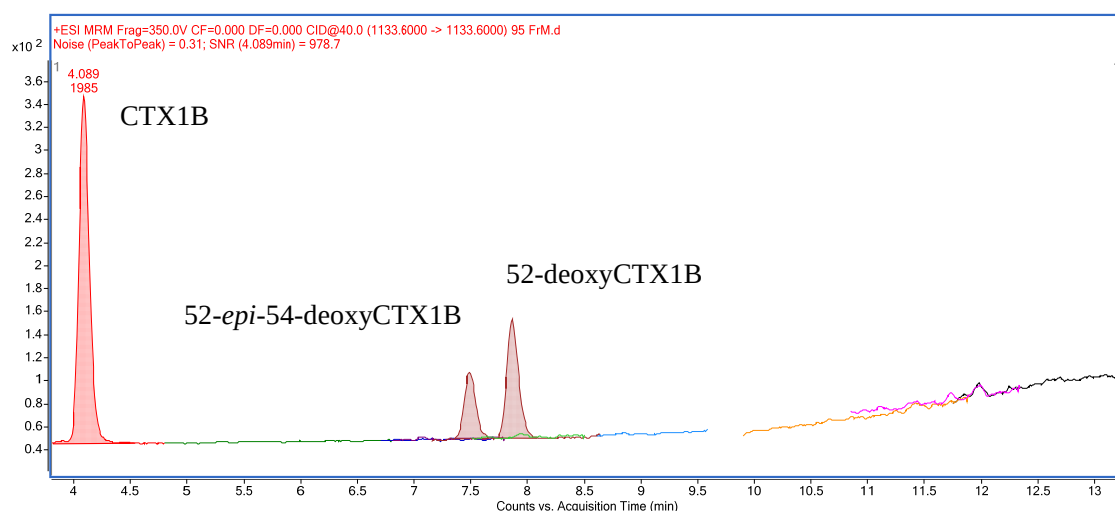


図 3. バラフェダイ筋肉の LC-MS/MS クロマトグラム の例

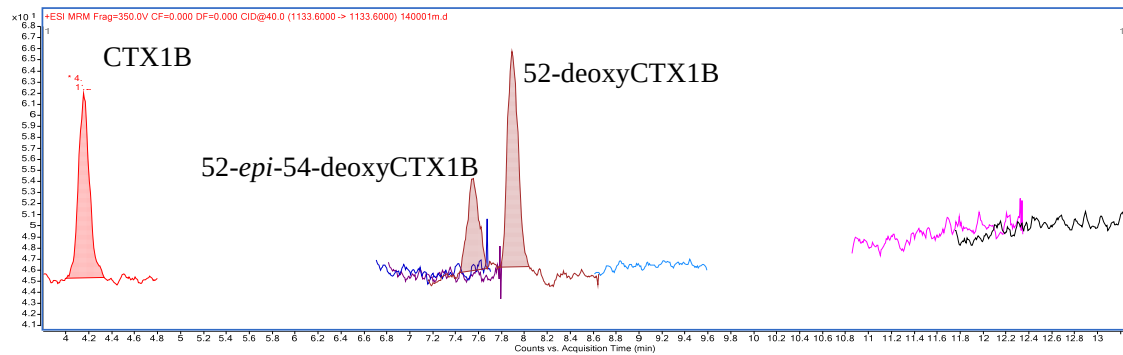


図 4．バラハタ筋肉の LC-MS/MS クロマトグラムの例

表 1．汚染度調査に使用した魚肉試料の分析結果

魚種	採取地	供試試料数	CTX 含量 (ng/g)		
			>0.2	0.002-0.02	<0.002
バラフェダイ	沖縄	122	5	91	26
	鹿児島	2	0	1	1
	産地不明	2	1	1	0
バラハタ	沖縄	60	1	28	31
	鹿児島	8	0	2	6
イシガキダイ	沖縄	5	0	0	5

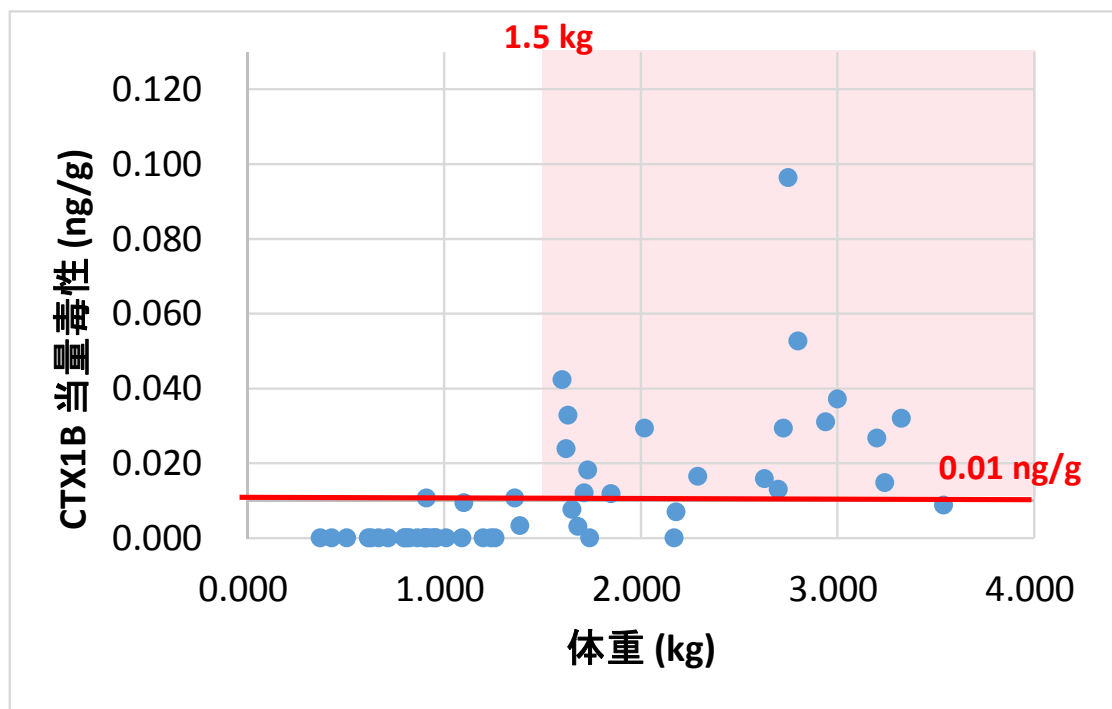


図 5．バラハタの体重と毒性の関係

【文献】

- 1) Yogi K, Oshiro N, Inafuku Y, Hirama M, Yasumoto T (2011) Detailed LC-MS/MS Analysis of Ciguatoxins Revealing Distinct Regional and Species Characteristics in Fish and Causative Alga from the Pacific. Anal Chem 83:8886–8891.
- 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 (2013) 奄美大島・加計呂麻島におけるシガテラ原因魚の毒組成解析. 食品衛生学雑誌 54:385-391.
- 3) Yogi K, Sakugawa S, Oshiro N, Ikehara T, Sugiyama K, Yasumoto T (2014) Determination of Toxins Involved in Ciguatera Fish Poisoning in the Pacific by LC/MS. J AOAC Int 97:398-402.

(3) 研究項目名：沿岸海域の生物における汚染実態の解明

1) 個別課題名：シガテラ発生地域における魚類等の汚染状況調査

研究担当者名：石川輝（三重大学大学院）

実際にシガテラ（CFP）が発生した国内外の地域において、多くの魚類を採集、あるいは購入して研究項目（2）「シガトキシン類の解析手法開発」で確立した分析方法により汚染状況を調査することを目的としたが、微量分析に伴う低回収率のため、妥当性が確認できなかったため、Yogi et al.¹⁾により傾向を把握することとした。

平成26年度は、三重県南部沿岸域よりイシガキダイ 13 個体を採捕した。LC-MS/MS 分析の結果、CTXs は検出されなかった。さらに、国外では CFP 頻発地域であるフィジー共和国に赴き、共同研究体制の構築を図り、魚類を収集し日本へ持ち込むための手順を検討した。

平成27年度においては、6月に、三重大学練習船勢水丸による種子島への調査航海において、同島沿岸域に生息するオジロバラハタ 1 個体、アザハタ 1 個体、オオモンハタ 1 個体、イトフエフキ 1 個体、カンパチ 2 個体を釣りにより採集した。LC-MS/MS 分析の結果、オジロバラハタから微量の CTX1B 系列が検出された。また、海外から魚類を得る目的で、平成27年9月初旬に台湾を訪ね、基隆市内の魚市場において、バラハタ、オジロバラハタ、ハタ系魚類、フエダイ系魚類を購入した。さらに台湾においては、漁業会社を通して、CFP 指定魚種を収集するルートを構築することができた。これにより将来、同国から貴重な魚類試料を継続的に得ることができるものと期待される。これらに加えて、平成27年10月中旬にはフィジー共和国を訪ね、各地域からバラハタやバラフエダイ、イッテンフエダイ等の様々な魚類試料を収集した。これまでに得られた試料は、汚染状況の解明のための分析に供した。その他海外試料として、トリニダード・トバゴ、タイ、フィリピンより魚類を入手し、LC-MS/MS 法により分析に供した（表2～7）。

表2. 分析に供した海外試料一覧（トリニダード・トバゴ：H27年2月）

種名	分析結果
クラカケヒラアジ	検出されず

アオハタモドキ	検出されず
オオサワラ	検出されず
海産ナマズの一種	検出されず

表 3. 分析に供した海外試料一覧（フィリピン：H27 年 2 月）

種名	分析結果
カマス属	検出されず
シモフリフエフキ	検出されず
ミゾレブダイ	検出されず
ヒメアイゴ	検出されず
ヒメアイゴ	検出されず
モヨウハタ	検出されず
オジロバラハタ	検出されず

表 4. 分析に供した海外試料一覧（台湾：H27 年 9 月）

種名	分析結果
バラハタ	検出されず
バラハタ	検出されず
オジロバラハタ	検出されず
オジロバラハタ	検出されず
アカマダラハタ	検出されず
フエダイ属	検出されず

表 5. 分析に供した海外試料一覧（タイ：H27 年 9 月）

種名	分析結果
クロホシフエダイ	検出されず
クロホシフエダイ	検出されず
コクテンヒレハタ	検出されず
オオモンハタ	検出されず
コクテンヒレハタ	検出されず
ミナミフエダイ	検出されず
マハタ属	検出されず
ヨコシマサクラ	検出されず

表 6. 分析に供した海外試料一覧（フィジー：H27 年 10 月）

種名	分析結果
ゴマフエダイ	検出されず
イッテンフエダイ	検出されず
スジアラ	検出されず

スジアラ	検出されず
スジアラ	検出されず
フェダイ属	検出されず
アズキハタ	検出されず
バラハタ	検 出
バラハタ	検 出
ヒメジ属	検出されず
スジアラ	検出されず
スジアラ	検出されず
ニセクロホシフェダイ	検出されず
ニセクロホシフェダイ	検出されず
ニセクロホシフェダイ	検出されず
バラフェダイ	検出されず
アカマダラハタ	検出されず
ドクウツボ	検 出

表 7. CTXs 含有魚肉試料（フィジー産）中の CTXs 組成と含有量（暫定値*）

化合物名	魚 試 料 名		
	バラハタ	バラハタ	ドクウツボ
CTX1B	0.04	0.08	<0.002 ng/g
52- <i>epi</i> -54-deoxyCTX1B	0.03	0.09	<0.002 ng/g
54-deoxyCTX1B	0.1	0.4	<0.002 ng/g
49- <i>epi</i> -CTX3C	<0.002 ng/g	<0.002 ng/g	0.04 ng/g
CTX3C	<0.002 ng/g	<0.002 ng/g	0.04 ng/g

* 秤量により値付けした標準品を使用しているため、暫定値とした。

トレーサブルな標準品により含有量を確定する必要がある。

分析の結果、フィジー産のバラハタ 2 個体およびドクウツボ 1 個体から CTXs が検出されたが、その他の魚種、地域からは検出されなかった（表 2～6）。なお、検出下限は 0.002 ng/g であった。バラハタ 2 個体は島の南部で採取されたもので、CTXs 組成は CTX1B、54-deoxyCTX1B および、52-*epi*-54deoxyCTX1B の 3 物質であり（表 7）、沖縄・奄美地方のバラハタ組成²⁾と同じであった。バラハタの CTXs 組成については、本種特有のものなのか、地域性があるのか、さらなる調査が必要である。また、島の北部で採取されたドクウツボからは CTX3C と 49-*epi*-CTX3C が検出され（表 7）、高極性 CTXs や CTX1B 類縁体は検出されなかった。CTXs は食物連鎖で伝搬され、その過程で代謝により低極性類縁体から高極性類縁体へ変換され、毒性も強くなると考えられている。これまでドクウツボは食物連鎖の上位にあるため、CTX1B などの高極性類縁体の抽出試料として用いられてきたため³⁾、今回の結果はとても興味深い。また、バラハタは CTX1B 系列のみ、ドクウツボは CTX3C 系列のみと、CTXs 組成が異

なる結果が得られ、これらの要因が魚種特異的なものなのか、地域特異的なものなのか今後の研究に期待したい。

CFP 発生地域における魚類等の汚染状況を詳細に把握するためには、今後、国内外におけるさらなる試料の収集が必要である。

【文献】

- 1) Yogi K, Sakugawa S, Oshiro N, Ikehara T, Sugiyama K, Yasumoto T (2014) Determination of Toxins Involved in Ciguatera Fish Poisoning in the Pacific by LC/MS. J AOAC Int 97:398-402.
- 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 (2013) 奄美大島・加計呂麻島におけるシガテラ原因魚の毒組成解析. 食品衛生学雑誌 54:384-391
- 3) T. Yasumoto (2005) Chemistry, etiology, and food chain dynamics of marine toxins. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 81:43-51

2) 個別課題名：シガテラ原因魚採捕海域における生物汚染調査

研究担当者：石川輝（三重大学大学院）

シガテラ（CFP）原因魚が実際に採捕された三重県沿岸等の海域において、藻類、草食動物、肉食魚等を採集、あるいは購入して研究項目（2）「シガトキシン類の解析手法開発」で確立した分析方法により汚染状況を季節的に調査することを目的とした。

本研究期間を通して、以前、CFP 原因魚が採捕された三重県南部沿岸海域においてスキューバダイビングにより、ウニ等の藻食動物を周年にわたり（計 104 個体）採集した。また、三重県志摩市や南伊勢町の地元の漁協を通じてアワビやサザエを周年にわたり（それぞれ合計 36 個体と 28 個体）購入した。以上に加えて、平成 26 年 9 月ならびに平成 27 年 8 月と 9 月には、CFP 原因魚が実際に採捕された海域に隣接する三重県志摩市浜島町地崎の藻場においてマクサやウミトラノオ、ウスカワカニノテといった紅藻や褐藻をそれぞれ 100～700 g 採集した。これらの藻体表面にはシガテラ毒を生産する可能性がある *Gambierdiscus* 属細胞が多数付着しているため、海藻表面に付着する全ての粒状有機物を剥離して、それらを遠心分離によって濃縮しペレット（8 試料、湿重量約 1 g）を作成した。以上の様々な種類の試料について、汚染状況を確認するため LC-MS/MS 分析に供した。

ウニ類は、殻を割り、液体部分と個体部分にわけ、採取時期と海域が同じ個体を合一し、均質化したものを試料とした（4 試料を分析）。サザエ及びアワビは CTXs を蓄積する可能性が高いと考えられる中腸腺を採取し、採取時期と海域が同じ個体を合一し、均質化したものを試料とした（サザエ 18 試料、アワビ 6 試料を分析）。

LC-MS/MS 分析の結果、いずれの試料からも CTXs 類縁体は検出されなかった（検出下限: 0.005 ng/mL）。本州沿岸域における CFP の食中毒報告はなく、また、*Gambierdiscus* 属の生息密度も低かったため（次項参照）、CFP が発生するのに適した環境ではなかったことが考えられる。今回の調査結果から CTXs の存在を証明することは出来なかったが、本州沿岸域において CFP が散発的に発生していることを考慮する

と、広大な沿岸域でホットスポット的に存在することも考えられる。

本事業は 2 年間という短期間の調査であったため、今後は、このような試料を三重県沿岸だけでなく CFP 原因魚が採捕された他の海域からも継続的に調査することが、生物汚染状況のさらなる解明のために必要である。

3) 個別課題名：*Gambierdiscus* 属等の渦鞭毛藻培養株確立

研究担当者：石川輝（三重大学大学院）

シガテラ（CFP）原因魚が実際に採捕された三重県沿岸等の海域における海藻に付着している渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属を単離して、三重大学内の実験室で培養株を確立したのち大量培養し、それら細胞を研究項目（2）「シガトキシン類の解析手法開発」での方法による毒量分析に供することを目的とした。

海水温が *Gambierdiscus* 属の生育に適している平成 26 年 9 月ならびに平成 27 年 8 月と 9 月に三重県志摩市浜島町地崎の藻場から得た海藻の藻体試料に付着する *Gambierdiscus* 属細胞の単離を試みた。しかし、得られた海藻試料に付着していた本属細胞は極めて少なかった（平成 26 年度は各藻体に <1 細胞/g 藻体湿重であり平成 27 年度はどの藻類からも検出されなかった）。そのため、培養株の確立には至らなかった。沖縄とは異なり本州沿岸域においては *Gambierdiscus* 属の増殖に適した環境が複数年の長いスパンをもっているか、あるいはホットスポット的なごく限られた海域があることが推定される。今後、CFP が発生した際に原因魚が採取された海域を集中的に調査することにより、原因生物を特定し、発生要因を解明することが可能になると考えられる。なお、三重大学大学院・生物資源学研究科・生物海洋学研究室内の実験室内には、本研究以前に同海域から夏場に得た海藻試料をもとに確立した本属の培養株があるため、その株の大量培養を試みたが成功しなかった。ただし、その培養液を用いてペレットを作成し毒分析に供したが、CTXs は検出されなかった。

CFP 原因魚が実際に採捕された海域の藻場に生息する *Gambierdiscus* 属がどの程度のシガテラ毒を有しているのかを把握することは極めて重要であるため、今後も、現場から単離した細胞をもとに大量培養し、毒分析を行う必要がある。

（4）研究項目名：シガトキシン類の毒性評価

1) 個別課題名：シガトキシンの摂取経路と毒性に関する研究

研究担当者名：鈴木穂高（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）

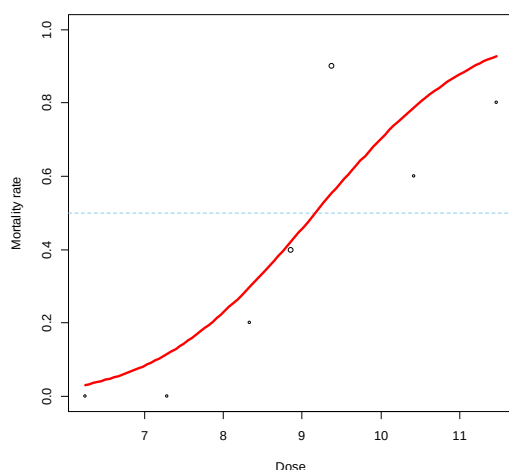
体重 17～20g の ICR の雄マウスを 219 匹用いて、CTX1B の腹腔内投与による半数致死量(LD50)値、経口投与による LD50 値、CTX3C の腹腔内投与による LD50 値、経口投与による LD50 値を決定した。CTX1B の腹腔内投与による LD50 値決定では 45 匹中 21 匹死亡、CTX1B の経口投与による LD50 値決定では 44 匹中 19 匹死亡、CTX3C の腹腔内投与による LD50 値決定では 70 匹中 24 時間後までに 30 匹死亡、1 週間後までに 44 匹死亡、CTX3C の経口投与による LD50 値決定では 24 時間後までに 86 匹中 19 匹死亡、1 週間後までに 61 匹死亡という結果であった。

厚生労働省の「自然毒のリスクプロファイル：魚類：シガテラ毒」によれば、腹腔内投与による LD50 値は CTX1B では 0.35 µg/kg と報告されているが、本研究では若干

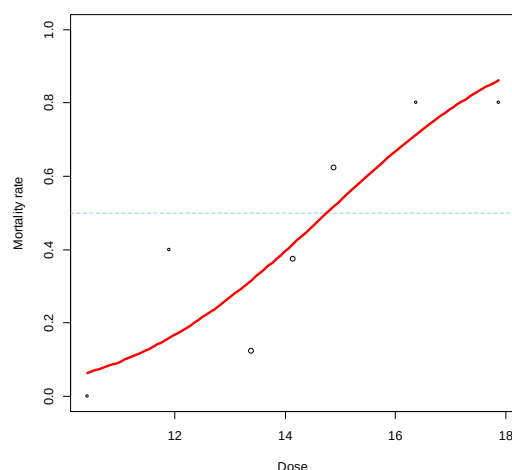
高めの $0.47 \mu\text{g/kg}^*$ 、CTX3C では $1.3 \mu\text{g/kg}$ と報告されているが、若干低めの $1.1 \mu\text{g/kg}^*$ であった。一方、経口投与による LD50 値については現在までに報告がないが、CTX1B の経口投与による LD50 値は $0.76 \mu\text{g/kg}^*$ 、CTX3C では $1.6 \mu\text{g/kg}^*$ と、経口投与による LD50 値が腹腔内投与による LD50 値の 1.5 倍程度と差が比較的小さい傾向が認められた。このことは CTXs の吸収の高さを示していると思われ、現行のマウス・バイオアッセイが有効な評価系であることを証明することができた。また、CTX1B と CTX3C ではマウスの死亡経過が異なっており、CTX1B ではマウスの生死は投与 24 時間後までに判明するのに対し、CTX3C では投与 5 日目くらいまでマウスの死亡が確認された。このことから、CTX3C の LD50 値については投与 24 時間後までのものと、投与 1 週間後までのものを別々に算定した。CTX3C の腹腔内投与による投与 24 時間後までの LD50 値は $1.1 \mu\text{g/kg}^*$ だが、1 週間後までの LD50 値は $0.96 \mu\text{g/kg}^*$ であり、経口投与では 24 時間後までが $1.6 \mu\text{g/kg}^*$ なのに対し、1 週間後まででは $1.2 \mu\text{g/kg}^*$ であった。マウスは下痢を示す個体もあり、行動性が著しく低下する等、明らかに体調不良を示していた。死亡後にマウスを解剖すると、腸管内に液体の貯留が認められる他は、特に著変は見られなかった。

これまで、シガテラの臨床症状や臨床経過が多様なのは、多数の類縁体が存在し、その毒性の違いによるものと考えられてきた。今回認められた CTX1B と CTX3C の毒性発現経過の違いはその一端を支持する結果であり、食中毒事例が発生した際に、原因食品の CTXs 組成と症状のバリエーションや継続性等を比較検討することが重要と思われる。

CTX1B の腹腔内投与による LD₅₀(~24h)



CTX1B の経口投与による LD₅₀(~24h)



CTX3C の腹腔内投与による LD₅₀(~120h) CTX3C の経口投与による LD₅₀(~120h)

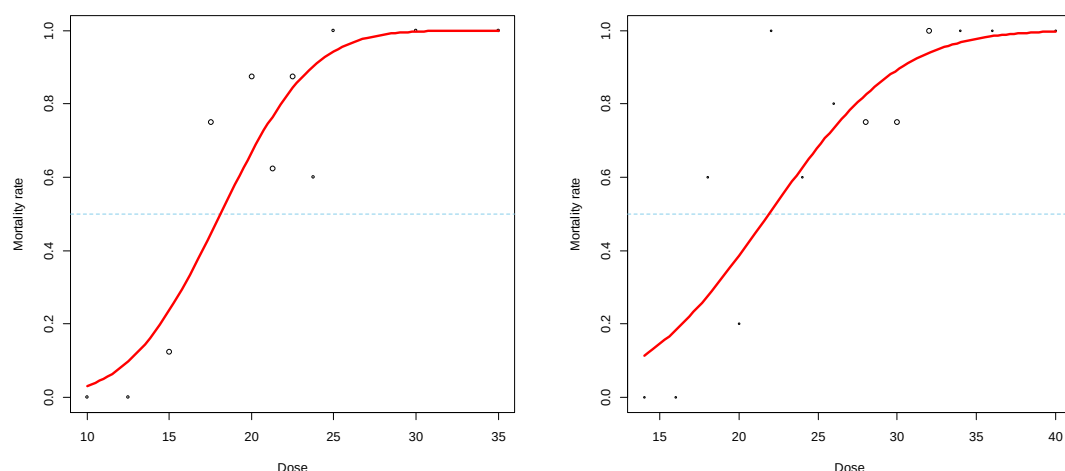


図 6. CTXs の用量-致死曲線

*LD₅₀ 算出に使用した CTX1B 及び CTX3C の濃度については、トレーサブルな標準品で値付けをする必要があるため、暫定値である。なお、腹腔内投与と経口投与に用いた標準品は同一のものであるため、両者の比較に影響はない。

2) 個別課題名：シガトキシンのマウス・バイオアッセイに関する研究

研究担当者名：鈴木穂高（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者：佐久川さつき（沖縄県衛生環境研究所）

現在、食品衛生検査指針にシガテラ毒の検査法としてマウス・バイオアッセイ (MBA) が参考法として記載されている。この方法ではマウスに検体を腹腔内投与し、24 時間後のマウスの生死で判定することとなっている。しかし、上述したように、CTX1B と CTX3C による死亡経過に大きな差があることが示唆されたため、CTX1B と CTX3C 投与後のマウスの経時的観察を行った。CTX1B に関しては投与 24 時間後以降に死亡する個体はほとんど見られないが、CTX3C に関しては投与 24 時間以降、5 日後くらいまで死亡する個体が認められた。現在、食品衛生検査指針に参考法として記載されている方法では投与 24 時間後の生死で判定することとなっているが、この方法だと CTX1B の毒性については適切に評価されているが、CTX3C の毒性を過小評価している可能性があることが明らかとなった。現在、沖縄・奄美で発生しているシガテラの原因魚は肉食魚であり、毒性の中心は CTX1B 系列の高極性 CTXs であることが明らかになっている^{1,2)}

沖縄で発生した食中毒 2 事例の原因食品 3 検体について、MBA と LC-MS/MS 分析の結果を比較した。LC-MS/MS 分析により検出されたのは CTX1B、52-*epi*-54-deoxyCTX1B 及び 54-deoxyCTX1B の 3 物質で、定量結果を基に TEF によって CTX1B 当量に変換後、MBA の結果と比較したところ、両者の値はほぼ一致しており、沖縄産試料については、LC-MS/MS 法による分析がリスク評価の上で有効であることが示さ

れた。

【文献】

- 1) Yogi K, Sakugawa S, Oshiro N, Ikehara T, Sugiyama K, Yasumoto T (2014) Determination of Toxins Involved in Ciguatera Fish Poisoning in the Pacific by LC/MS. J AOAC Int 97:398-402.
- 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 (2013) 奄美大島・加計呂麻島におけるシガテラ原因魚の毒組成解析. 食品衛生学雑誌 54:384-391

3) 個別課題名：シガトキシンの代謝、体内分布に関する研究

研究担当者名：鈴木穂高（国立医薬品食品衛生研究所）

上記2)の個別課題名：シガトキシンのマウス・バイオアッセイに関する研究における経時観察で生じた死亡直後の個体について、死亡個体については死亡時間を記載した後、死体を凍結保存した。生存個体については1週間の経過観察終了後に安楽死し、死体を凍結保存した。

CTX3Cを投与して死亡したマウス肝臓を採取し、LC-MS/MS分析に供した。供試試料は2個体で、多量投与（致死時間6時間15分）及び、少量投与（致死時間96時間）とした。CTX3Cを21.5ng投与したマウス肝臓からはCTX3Cが検出されたがCTX3Cを17.2ng投与した投与マウスからは検出されなかった。投与したCTX3Cがマウスの体内で代謝され、より毒性の強い51-hydroxyCTX3Cなど酸化型のCTX3C系列に変換されると考えられたが、標準品を所有するCTX3C類縁体（CTX3C、51-hydroxyCTX3C、2,3-dihydroxyCTX3C）は検出されなかった。一方、CTX3Cに水酸基が3つ付加した2,3,51-trihydroxyCTX3CやM環が開いたM-secoCTX3Cなどの[M+Na]⁺に一致するピークが両方のマウスから同程度の量が検出された。2,3,51-trihydroxyCTX3C及び、M-secoCTX3Cの毒性は、未だ明らかではないが、マウスの体内での代謝により酸化されている可能性が示唆された。これらのピークの体内分布や関連物質等の確認が必要であるが、標準品が無いため本事業での検討はこれで終了とした。これらのピークを同定するためには、CTX3Cを化学変換し、標準品を調製することが必要である。また、動物試験には大量のCTX3Cを調製する必要があるが、現実的ではない。そのため、今後同様な実験を行うことは困難であると判断し、試料を保冷凍管し、標準品調製法を検討した後に、精査することとした。

（5）研究項目名：シガトキシン類のリスク評価、リスク管理アプローチの検討

1) 個別課題名：諸外国のシガトキシン類のリスク評価の収集、解析

研究担当者名：豊福肇（山口大学大学院）

EFSA、FDA等の政府機関が実施し、公表したリスク評価及び諸外国における科学論文に発表されているリスク評価を収集し、論文等の記載内容を分析することにより、これらのリスク評価アプローチの解析、各情報の整理及びデータソースの確認、並びに用いているデータの解析等を行った。また、EFSAの担当者を訪問し、ARfD

が設定できなかった理由等詳細を調査した。

海外との共同研究（検体提供を含む）の足掛かりを作るため、カリビアン公衆衛生庁（Caribbean Public Health Agency）及びフィリピン漁業水生リソース局（Bureau of Fisheries and Aquatic Resources）を訪問し、協力を要請した。

さらに、フランスの研究チームが公表した文献¹⁾の急性参照用量（ARfD）設定プロセスを基に、著者からのヒアリングを踏まえ、得られた知見を整理した。

今回調査に供したリスク評価の選考基準を満たしているか、表8に示した。

表8．EFSA 及び FAO によるリスク評価

評価基準/リスク評価	EFSA,2010 ²⁾	FAO 2004a ³⁾	FAO 2004b ⁴⁾
ア．リスク評価の目的（リスク管理上の質問）が明確であること	△記述はあるが、あまり明確ではない	△Risk Profile の性質が大	○
イ．評価のアプローチが標準的で、Codex のリスク分析のガイドラインに一致していること	○	△ 要素自体はカバーしている	○
ウ．我が国のリスク評価に有用な評価であること	○	○	○

【EFSA²⁾】

CTX-group toxins の急性毒性から、CONTAM パネルは急性参照用量（ARfD）を設定することを目指したが、実験動物及びヒトの中毒事例双方において、非常に限られた定量的データしか入手できなかったため、CONTAM パネルは経口 ARfD を設定することは困難であると結論つけた。

その一方、太平洋の CFP の患者は 0.1-5 µg P-CTX-1/魚肉 kg の魚を喫食して発症しているとし、CONTAM パネルは軽度な症状を起こす最小の魚肉中の濃度 0.1 µg equivalents of P-CTX-1/kg に uncertainty factor 10 を適用し、魚肉中濃度 0.01 µg equivalents of P-CTX-1/kg であれば、感受性の個人であったとしても、健康被害を起こさないであろう濃度とした。また、この濃度は魚に存在するすべての CTX-group toxins を対象にするとした。

実際に EFSA の担当者を訪問し、ARfD が設定できなかった理由等詳細を調査したところ、患者の体重及び喫食量のデータが入手できなかったことから NOAEL、LOAEL の設定を断念したとのことであった。

【FAO³⁾】

Pacific ciguatoxin (P-CTX-1)を 0.1 µg/kg のレベルで含む魚の消費により軽度な CFP 症状を呈する者がいる。Caribbean ciguatoxin (CCTX-1) は極性が弱いので、P-CTX-1 に比べ 10 倍毒性は低い。一回の食事で魚を 500 g 喫食すると仮定し、ヒトの体重を 50 kg とした場合、これは 0.001 µg/kg bw (=LOAEL)となる。この数値はある人には影響を起こす、あまり有毒ではない魚を大量に喫食したとの仮定から得ら

れたもので、その 10 倍、すなわち 0.01 µg/kg bw のレベルが、ほとんどのヒトに有毒なレベルと考えられる。

Lehane and Lewis³⁾は太平洋のほとんどの CFP の症例では 0.1-5 nmol P-CTX-1/kg を含む魚、それは約 0.1-5 µg/魚肉 kg に相当する CTX を含有する魚の喫食と関係していると記録している。

かれらはまた、最小発症量 0.05µg、また 0.001 µg/kg 体重 (0.1 µg/kg の CTX-1 を含む魚 500 g を体重 50kg の人が喫食すると仮定) とし、この濃度で 10 人中 2 人を発症させるとしている。この 10 倍濃度 (0.5 µg、または 50kg の人に 0.01 µg/kg) はほとんどのヒトに対し毒性があり、シガテラ魚を 300g 喫食すると簡単に発症に必要な量をばく露されることになる。仮に魚 1kg 中に 0.1 µg/kg P-CTX-1 に安全係数 (ヒト間のばらつき: ×2、喫食量のばらつき: ×2、検査法のばらつき: ×2) を適用させると、安全な魚は 0.01µg/kg P-CTX-1 としている。

【FAO⁶⁾】

アウトブレイクデータから、Lehane²⁾は LOAEL は成人でおよそ 50 ng (成人体重 50 kg)、すなわち 1 ng/kg 体重であった。しかし、詳細に記述された 1 事例において、6 人の米軍の軍人が魚肉 1g 中におよそ 20ng CTX を含む魚を喫食 5-8 時間後、6 人全員が吐き気、嘔吐、水様性下痢及び腹部痙攣を発症し、なかには四肢のしびれまたは口の周りの知覚異常、心拍数異常低下(除脈) 及び知覚異常、頭皮のチクチク感を起こしたと報告している⁷⁾。

シガテラ毒の用量が増加すると、ヒト及び動物で心臓血管系の重篤性が増加すると報告がある⁸⁾

しかし、Arcilaherrera et al.⁹⁾は喫食した魚中の toxin の量と症状の重篤性及び持続期間に関連性は見られなかったと報告している。また、反復ばく露により、より重篤で、長期間の症状がおきことは良く認識されていると報告している。

【海外機関からの情報の収集結果】

トリニダード・トバゴでは、スーパーマーケット及び漁師から直接魚を購入し、持ち帰った。

フィリピンでは、同国の Bureau of Fisheries and Aquatic Resources の研究者が参加する IAEA 主催の RIA 法によるトレーニングの情報を入手した。また、マニラ近郊の市場において、外部形態からシガテラの原因になりうると考えられる魚試料を蒐集した。

EFSA は CTX-group toxins に数回ばく露された場合、それが数か月離れてばく露されても蓄積効果がありえるため、ARfD が適切にヒトの健康を守るとは限らないと結論づけた¹⁾。しかし、我が国の沖縄での調査では頻回ばく露による蓄積効果はあるともないとも結論付けることはできなかった。従って、ARfD だけでは公衆衛生の保護の上で不十分と結論つけるにはまだデータが不十分であると考ええる。

今後の課題として、反復ばく露による症状の影響、正確な喫食量と汚染濃度の把握に加え、先行研究等で示唆されているアルコールの存在で CTXs に対する反応と期間

が増加するとの報告があることから飲酒との CFP 発症との関係および、CTXs により胎児の動きに影響があるという報告があることから妊娠と発症との関係についての情報の集積が必要である。

【文献】

- 1) Hossen V, Soliño L, Leroy P, David E, Velge P, Dragacci S, Krysz S, Flores Quintana H, Diogène J (2015) Contribution to the risk characterization of ciguatera: LOAEL estimated from eight ciguatera fish poisoning events in Guadeloupe (French West Indies). *Environ Res* 143(Pt B):100-8 .
- 2) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (2010) Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish –Emerging toxins: Ciguatera group. *EFSA Journal* 8:1627.
- 3) FAO (2004) Marine Biotoxins. FAO Food and Nutrition paper 80.
- 4) FAO (2004) Application of risk assessment in the fish industry
- 5) Lehane L and Lewis R (2000) Ciguatera: recent advances but the risk remains. *J Food Microb* 61:91-125.
- 6) Lehane L (1999) Ciguatera fish poisoning: a review in a risk-assessment framework: Animal Health Science and Emergency Management Branch, National Office of Animal and Plant Health.
- 7) Poli MA, Lewis RJ, Dickey RW et al. (1997) Identification of Caribbean ciguatera toxins as the cause of an outbreak of fish poisoning among U.S. soldiers in Haiti. *Toxicon* 35:733-741.
- 8) Katz AR, Terrell-Perica S, Sasaki DM (1993) Ciguatera on Kauai: investigation of factors associated with severity of illness. *Am J Trop Med Hyg* 49:448-454.
- 9) 12. Arcila-Herrera H, Castello-Navarrete A, Mendoza-Ayora J et al. (1998) [Ten cases of Ciguatera fish poisoning in Yucatan]. *Rev Invest Clin* 50, 149-152.

2) 個別課題名：各国のシガテラリスク管理措置に関する情報の収集解析

研究担当者名：豊福肇（山口大学大学院）

諸外国（米国 FDA、欧州 DG SANCO、オーストラリア農務省等）が行っているリスク管理のアプローチとその背景を調査し、我が国のリスク管理の実施に参考となる科学的知見を整理し、また我が国への適用にあたっての課題の抽出を行った。

また、ハワイ州保健部を訪問し、CFP 発生情報、リスク管理措置等についてヒアリングした。

【米国 FDA】

米国ではハワイ州、フロリダ州及びプエルトリコで患者が発生しているとの報告があったが、なぜ、シガテラ（CFP）に対し Action Level が設定された理由については文献では見つけることができなかった。なお、CTXs の定量的なレベルを設定していた規制機関は調査した限り、米国 FDA のみであった。

CTXs の対策レベル(Action Level)は以下のとおり。

太平洋産魚類：0.01ppb P-CTX-1 当量（注 P-CTX-1：CTX1B）

カリブ海産魚類：0.1ppb C-CTX-1 当量（注 C-CTX-1：カリビアンシガトキシン-1）

①Hazard and Control Guide（FDA）

米国 FDA が Seafood HACCP のプラン作成を支援するために作成した Hazards and Control ガイドにおいて、CFP に関連する可能性がある魚種リストとともに、次のようなシガテラハザードの CCP の管理基準、モニタリング、改善措置の例を示している。

管理基準：シガテラ毒に関して州から警告が出されている地域及び科学的知見によってシガテラ毒に関して問題があると指摘されている地域で漁獲された魚類でないこと。

モニタリング：受領した従業員が、漁獲地域をロットごとに漁獲した漁師に尋ねる。

改善措置：漁獲地域を変更したことの証拠を得るまで、（管理基準を満たしていない魚を）供給した業者の供給品の使用を拒否する。

太平洋ではマイルドな CFP アウトブレイクは 1 ng P-CTX-1/体重 Kg のばく露後発生しているとの Lehane and Lewis¹⁾の報告を基にし、一回喫食量を 500 g、成人 50 kg と仮定し、50 ng/500 g fish = 100 ng/1 kg fish = 0.1 ppb となり、これにヒトの喫食量の不確実性、残品検査のアッセイの不確実性、個々のヒトのリスクファクターを考慮し安全係数 10 を適用して 0.01 ppb P-CTX-1 当量を未満であれば安全であるとした。同様にカリビアンについては、Vernoux and Lewis²⁾が閾値として 1.0 ppb C-CTX-1 を推定し、これに安全係数 10 を適用し 0.1 ppb C-CTX-1 当量を安全なレベルとした。1998 から 2008 年に米国で発生した 109 の CFP アウトブレイクのばく露量をレビューした結果、示唆された Action Level と一致していた²⁾。

②Guidance for Industry: Purchasing Reef Fish Species Associated with the Hazard of Ciguatera Fish Poisoning

FDA は、珊瑚礁に生息する魚種を取り扱う一次加工業者向けに、CFP リスクの低減を支援するためのガイダンスを提供している。ただし、このガイダンスに法的強制力はない。

【EU】

現在、EU には CTX-group toxins に対する規制値は存在しない。これは EU 海域で漁獲された魚で CFP が報告されたのが 2000 年になってからということが影響していると考えられる。しかし、現在の EU 規則のもとで、CTXs 等ヒトの健康に危害を与えるバイオトキシン魚の製品を市場で販売してはならないという規定になっている。（Regulation 853/2004/EC; Regulation 854/2004/EC）。

【フランス領ポリネシア】

フランス領ポリネシアでは、疫学調査から CFP の原因となることが多い以下の魚類の販売は違法とされている。

- ・ハタ科：スジアラ、マダラハタ
- ・フエダイ科：バラフエダイ、イッテンフエダイ、ナミフエダイ
- ・ベラ科：メガネモチノウオ
- ・カマス科：オニカマス（ドクカマス）
- ・ニザダイ科：サザナミハギ
- ・ウツボ科：全てのウツボ
- ・モンガラカワハギ科 全てのモンガラカワハギ

【オーストラリア】

クリーンズランド州の Platypus 湾では、CFP のインパクトを減らすため、Spanish mackerel (*Scomberomorus commersoni*: サワラの一種) 及び barracuda (*Spyraena jello*: カマスの一種) の漁獲を禁止している。

ウツボ (moray eel)、chinaman (*Symphorus nematophorus*: イトヒキフエダイ)、red bass (*Lutjanus bohar*: バラフエダイ) および paddletail fish (*Lutjanus gibbus*: センネンダイ) 等のサンゴ礁エリアに生息する肉食魚類は CFP のキャリアと考えられ、オーストラリアの規制当局によって販売は禁止されている⁴⁾。

【ニュージーランド】

ニュージーランドには CTXs に関する法的な規制は存在しない。オークランドの公衆衛生局は熱帯地域からの大型魚の個人輸入を禁止しようとしたが実施されていない。同局は消費者にどのように CFP を防ぐか、以下のようなアドバイスを提供している：

- ・ 2.5Kg 以上の熱帯のサンゴ礁エリアで漁獲された魚を喫食または販売しないこと。
- ・ 次のような魚種で大型魚の輸入、販売または喫食をさけること； grouper（ハタ類）、sea bass（フエダイの仲間）、barracuda（カマスの仲間）snapper（フエダイ類）、mackerel（サバの仲間）、及び coral trout（スジアラの仲間）。
- ・ 魚を十分に洗浄すること
- ・ サンゴ礁エリアの大型魚は少量喫食すること
- ・ CTX が蓄積している魚の卵巣、魚卵、頭部または内臓は喫食しないこと。

(http://www.arphs.govt.nz/publications/Advice_Publications/FS/2002/FS_Dec02.pdf).

【FAO⁵⁾】

CFP の章で紹介されているリスク管理措置としては以下のとおり

“CFP は主に世界中のトロピカルな地域で起こっており、EU、特に北部ヨーロッパでの発生は散发例である。従って、流行地域ではない国々においては、流行地域から

輸入される大型の肉食魚中の CTXs の存在を分析する管理措置で十分と考えられるとしている。

CTXs については、いくつか特化した規則も存在する。分析で陽性となった魚は市場から排除する。また、検査をせずに、ある特定地域で漁獲された、特定の魚種、特定の大きさの魚の販売を制限している国もある。

魚が大型になるほど、また老齢になるほど、CTX を蓄積してより毒性が高くなると考えられる。サンゴ礁エリアに生息する肉食魚類は一般的に CFP のキャリアと考えられ原則的に市販は禁止されている。

ハザードはフードチェーンにおける蓄積と関連しており、海水中の藻類と関連付けることは困難である。CTXs 産生渦鞭毛藻の分布密度からその海域の魚が CTXs を蓄積しているか否かを予測することはできないと考えられている。”としている。

【FAO⁶⁾】

CFP の章で紹介されているリスク管理措置のオプションとして次のようなものが示されている。：

- ・サイクロンシーズンやサンゴがダメージを受けた後は サンゴ礁にすむ魚は漁獲しない。漁業部局がサンゴ礁の状態を監視する。
- ・ハイリスクエリアからのサンゴ礁にすむ魚の輸入を禁止する。

上記 2 つの戦略を実施することにより、このハザードに対するばく露が消滅するので、リスクを排除することができるはずである。しかし、現実にはサンゴ礁エリアでの漁獲は行われ、地域の住民の間では CFP は発生し続けている。また、サンゴ礁にすむ魚中の CTX の汚染率のデータがない。

検査キットを購入する予算を獲得し、漁業組合の協力のもと、漁獲される魚中の CTX の汚染率及び濃度を測定するプロジェクトを行い、CTX のホットポイントを特定する作業を行う。もしこのホットスポットがサンゴ礁のダメージ及びその他の因子と関連性があれば、年間の特定の時期、場所のサンゴ礁にすむ魚の漁獲、販売または喫食を禁止することができるかもしれない。

【米国ハワイ州】

2015 年 12 月、ハワイ州政府の保健部を訪問して調査し、CFP の発生件数、主な発生地域、原因が判明している魚等の情報を入手した。1999 年から 2003 年では、年平均 53 人の患者が発生しており、その間、CFP 報告例の原因魚種上位 10 種は次のとおりであった。

1. roi (peacock grouper: *Cephalopholis argus* アオノメハタ)
2. kale (gold ring surgeonfish: *Ctenochaetus strigosus* ニザダイの仲間)
3. ulua (large jacks mixed spp. : 大型のアジの仲間)
4. papio (small jacks mixed spp. : 小型のアジの仲間)
5. seabass (spp uncertain : 種不明)
6. palani (eyestripe surgeonfish : *Acanthurus dussumieri* ニセカンランハギ)
7. uku (green jobfish : *Aprion virescens* アオチビキ)

8. weke (goatfish : アカヒメジの仲間)

9. wahanui (smalltoothed jobfish : *Aphareus furca* イシフエダイ)

10. ufu (parrotfish : ブダイの仲間)

ハワイ州では魚種の販売禁止等の措置はとっていないが、行政指導に基づき、営業者はこのような魚種の販売を控えているとのことであった。サンゴ礁エリアの魚を販売する場合には CFP が発生していない漁獲海域であり、信頼できる漁業者から購入するよう指導している。また、ほとんど事例は釣り人によるレクリエーション活動の結果であることから、釣り人、船を出す者等への教育が大事であるとしている。また、CFP 調査用の質問票を入手した。喫食履歴として魚種、漁獲場所及び日、漁獲したものでなければ入手先を記載していた。また、魚のどこを喫食したか、おおよその重量、症状は胃腸炎、神経系、心疾患系、一般、その他と CFP に特異的な症状も挙げられて、本研究班が沖縄県で使用しているものに類似していた。(以下参照)

【日本における魚種の制限】

検疫所で食品衛生法第 6 条違反として輸入が禁止されている魚種は次のとおりである。(シガテラ毒魚の取扱いについて、平成 13 年 1 月 22 日事務連絡)

食品衛生法第 6 条違反と判断している魚種 (10 種)

- ・アカマダラハタ
- ・アマダレドクハタ
- ・バラハタ
- ・アオノメハタ
- ・オジロバラハタ
- ・マダラハタ
- ・バラフエダイ
- ・フエドクタルミ (ヒメフエダイ)
- ・オニカマス
- ・オオメカマス

条件付きで輸入を認めている魚種 (8 種 : 輸出国側の特定海域内で捕獲された同種が常食され、かつ食中毒の発生がないこと及びシガトキシンの 検査を実施し無毒であることが証明されれば輸入を認める。)

- ・キツネフエフキ
- ・イッテンフエダイ
- ・ニセクロホシフエダイ
- ・アオチビキ
- ・ナミフエダイ
- ・アカマツダイ
- ・ハマフエダイ

シガテラ毒魚ではないこと、現地で一般に食用とされ食中毒が発生していないことの書類提出があれば輸入を認める。

- ・コブフエダイ

その他の魚種については、個別に判断

また、東京都市場衛生検査所長通知による指導（販売自粛）対象の魚介類（シガテラ関係）は次のとおりである。

- ・バラハタ
- ・アカマダラハタ
- ・バラフエダイ
- ・ヒメフエダイ
- ・オジロバラハタ
- ・マダラハタ
- ・カスミアジ
- ・イッテンフエダイ
- ・ドクウツボ
- ・ギンガメアジ
- ・ムネアカクチビ
- ・サザナミハギ
- ・キツネフエフキ
- ・イトヒキフエダイ

一般的には同一魚種で魚のサイズが大きくなるにつれ、毒性も上昇すると考えられていたが、必ずしもそうではないという論文も発表されている⁷⁾。また、ヒトの発症は魚の喫食量、魚中の CTX 濃度、ヒトの感受性（過去の CTX へのばく露履歴を含む）等によって大きく影響される。

3) で述べるようにデータが不足しているため、米国 FDA の Action level 以外には基準値等が設定されている国は少ない。また、定量的な検査法も国際的に妥当性確認された検査法は調査した限り存在しない。従って、頻繁に CFP の原因となる魚種の販売禁止、あるいは魚種と魚の大きさを組み合わせた流通販売禁止が CFP のリスクが高い地域や国で実施されているリスク管理措置である。

また、同じ魚種でも必ずしもすべての魚が CTX を高濃度に含むわけではないところがリスク管理の困難さを増している。

各国のリスク管理状況から、魚種による食品衛生法第 6 条第 2 号の判断、または基準値設定あるいは漁獲海域の制限というリスク管理の選択肢を考えた場合、以下の事項が今後の課題として挙げられる。

- ・正確で、迅速な魚種の鑑定法の確立
- ・真の漁獲地のトレースバックを可能とするシステム
- ・安全/危険な採捕海域の指定
- ・ランダムモニタリングを可能とする検査法
- ・cell based assays (CBA) or receptor binding assay (RBA)
- ・CFP の発生率
- ・低濃度の CFP の蓄積は健康影響（LOAEL や重篤性）に影響するのか？

・毒化を促進（高濃度蓄積）に関与する因子の特定

【文献】

- 1) Lehane L and Lewis R (2000) Ciguatera: recent advances but the risk remains. J Food Microb 61:91-125.
- 2) Vernoux JP, Lewis RJ (1997) Isolation and characterisation of Caribbean ciguatoxins from the horse-eye jack (*Caranx latus*). Toxicon 35, 889-900.
- 3) Dickey RW, Plakas SM (2010) Ciguatera: a public health perspective. Toxicon 56, 123-136.
- 4) RIVM, de Fouw C, van Egmond H et al. (2001) Ciguatera Fish Poisoning : A Review. RIVM Report 388802 021. Bilthoven, Netherlands: National Institute of Public Health and the Environment.
- 5) FAO (2004) Marine Biotoxins. FAO Food and Nutrition paper 80.
- 6) FAO (2004) Application of risk assessment in the fish industry
- 7) Gaboriau M, Ponton D, Darius HT et al. (2014) Ciguatera fish toxicity in French Polynesia: size does not always matter. Toxicon 84, 41-50.

3) 個別課題名：我が国のリスク評価の試行

研究担当者名：豊福肇（山口大学大学院）

研究項目 1 および研究項目 5 の個別課題 1) で得られたデータ及び沖縄での疫学調査結果を基に、単回ばく露の急性毒性の指標である急性参照用量 (ARfD) の設定を試みるとともに、研究班で収集した沖縄県での疫学調査データを用い、LOAEL または NOAEL の設定というリスク評価の枠組みに合わせて整理した。

【沖縄での疫学調査】

本研究の一部として実施された沖縄での疫学調査で、CTX の推定摂取量が判明して、かつ発症者中で推定摂取量が最も低かった事例は 31 才女性で、CTX 推定摂取量が 12MU=84ng、バラハタ刺身 10 枚＝刺身 1 切れ 12g と仮定すると 120 g を喫食し、倦怠感及び両足の温度感覚異常を発症した事例があった。文科省データによるこの女性の年齢の女性の平均体重 51kg を用いると、この女性から LOAEL は、1.61 ng CTX1B eq./kg bw と設定できる。

ヒトの体重を 60 g、LOAEL から NOAEL に変換するのに安全係数 3 を用いると

NOAEL=0.54 ng CTX1B eq./kg bw⇒ 32.0 ng CTX1B eq./ヒト

喫食量を 100g、200g、300g、400g と仮定した場合、魚中の濃度はそれぞれ、320.0、160、106.6、80 ng CTX1B eq./Kg fish となる。

実際に沖縄県で報告された食中毒事例残品中における CTX の濃度の最低は 700 ng CTX1B/kg 魚であり、320 ng CTX1B/kg fish であっても、CFP アウトブレイクは防ぐことは可能とは考えられるが、その一方で 700 ng/kg 魚の魚を 100 g 以上喫食しても発症しなかった者もいることから、厳しすぎると考える漁業関係者もいるであろう。その一方で米国 FDA の Action level は 10 ng/kg 魚と低いもので、現在の限られたデータのなかで、基準値を設定する場合、どの数値が公衆衛生を守れて、かつ食品取引に

不必要な介入をしない値かを推定することは困難であると考えられた。

【フランスグループのリスク評価】

フランス領西インドの CFP の流行地 Guadeloupe において、2010～2012 年、フランスの食中毒システムを通して報告されたシガテラ中毒 35 件、患者 87 名を用いた報告であり、患者すべてが Guadeloupe 海域で採れた魚を喫食していた。詳細な調査ができたのは 12 中毒事例、41 名の患者のみであった。患者の年齢は 3～71 歳、症状は感覚異常 dysesthesias(72%、温度感覚異常)および、手足の知覚異常 paresthesis(64%、特に手足のチクチク感)、下痢（少なくとも一日に 3 回以上の液状便）は 67%で報告、腹部痙攣(64%)を伴う。他の報告された症状として、嘔吐(56%)、全身の脱力感(44%)、吐き気(22%)、皮膚疾患特に腫脹(28%)およびそう痒 itching(19%)であった。患者の 50 %は 100～200 g の魚を喫食していた。患者が喫食した残品があり、魚種が判明した事例では原因魚種は *Lutjanus* (フエダイ属 8 例)、*Caranx* (ギンガメアジ属 3 例)および *Mycteroperca* (ハタ科の 1 属 1 例)であった。潜伏期間は魚喫食後 2～9.5 時間であった。CFP の調査を強化し、魚の喫食量及び残品の分析を行ったほか、CFP に特化した質問票を作成し、患者数、発症日、特定された症状、症状の重篤性、回復するまでの時間、可能なら喫食魚量、患者の個人情報（年齢、性別、体重）を収集した。

疫学調査の結果、発症者のなかで、最も CTX へのばく露が少なかった 52 歳の男性の体重 (87 kg)、喫食量 (100 g)、魚中の CTXs 濃度 (0.0421 mg P-CTX-1eq/kg) から、LOAEL として 48.4 pg P-CTX-1eq./kg bw、4.2 ng P-CTX-1 eq./人を設定した。

なお、他の事例で、58.5 および 64.2 pg P-CTX-1eq./kg bw で発症していた。また、この LOAEL は U.S.FDA guidance levels for CTXs (0.1 mg C-CTX-1eq.kg および 0.01 mg P-CTX-1 eq./kg fish)とも整合性が認められたとしている¹⁾。

フランスの論文¹⁾では LC-MS/MS 分析の結果、Caribbean ciguatoxin congener C-CTX-1 が主たるトキシンであるのに、Pacific-CTX1 (CTX1B) 標準液を使用した Neuro-2A アッセイを用いて定量しているが、その科学的正当性に若干疑問が残る。沖縄の事例に比べ、Guadeloupe の LOAEL は一桁以上低い。その一因になる可能性のある患者の反復ばく露について著者に直接質問したが、このデータセットにおいて、その情報は得られなかった。

フランス : LOAEL 48.4 pg CTX1B eq./kg bw、 4.2 ng CTX1B eq.

沖縄 : LOAEL 1.61 ng CTX1B eq./kg bw、 82.1 ng CTX1B eq.

今後の課題としては、CTXs の毒性評価の指標として ARfD が妥当であるか、つまり、単一ばく露の影響だけでいいのか、複数、頻回ばく露の影響はあるのかを検討する必要がある。今回、ARfD の設定を試みたが、この精度を高めるためには LOAEL ではなく、NOAEL が設定できること望ましく、さらに患者の喫食量、魚中の CTXs の正確な濃度測定および患者の体重の把握が必要である。

また、フランスチームの論文¹⁾では頭部や内臓を少量喫食して発症した事例があることから、これらの部位の CTX 濃度が高いという先行研究の結果と一致していると考

察していた。

今後、我が国だけでなく、CFP 発生国でのデータを多く集めるためには、途上国でも、限られたトレーニングで迅速かつ簡便に実施できる検査法の開発が急務である。

今回、結果として CFP の流行地域との継続的なデータ収集協力体制は構築できなかった。これは、短期間の研究期間で、今までどこの先進国とも組んでいない途上国に赴いて、ゼロから疫学調査を行うためには、常駐の出向者が必要になること、魚種鑑別と魚中の CTX 分析技術の確立等、本研究事業できる範囲を大幅に超えていることが主な原因であり、継続的な調査研究が望まれる。

【文献】

- 1) Hossen V, Soliño L, Leroy P, David E, Velge P, Dragacci S, Krys S, Flores Quintana H, Diogène J (2015) Contribution to the risk characterization of ciguatoxins: LOAEL estimated from eight ciguatera fish poisoning events in Guadeloupe (French West Indies). Environ Res 143(Pt B):100-8 .

- 4) 個別課題名：リスク評価上の主たるデータギャップの特定とデータ収集の優先順位付及びそれらの収集戦略の検討

研究担当者名：豊福肇（山口大学大学院）

沖縄、フランス領インドでの調査とも、ARfD を設定するのに必要な情報としては患者の体重、過去の CTX へのばく露歴、正確な魚の喫食量及びその魚中の CTX 濃度のデータが必須である。また、CTX と飲酒の影響もデータが必要である。喫食量については、味噌汁で喫食した場合、お椀一杯にどのくらいの可食部が通常盛り付けられるかの推定が必要であろう。

また、患者が必ずしも医療機関を受診しないことが多いため、能動的サーベイランスによる患者の掘り起しが重要である。また、受診した医療機関においても、沖縄以外では CFP を正確に診断することは難しいため、臨床医に対する普及・啓発活動も必要と考える。また、消費者、釣り人、魚介類販売業や飲食店の事業者等への教育もリスク管理措置としては重要であろう。

研究項目（１）「シガテラ発生実態の解析」において、医師や漁業組合への聞き取り調査を実施した結果、食中毒として届出の無い事例が潜在することが明らかになった。このような能動的サーベイランスシステムを維持して、患者の発掘、CFP に特化した質問票を用いた患者調査を継続していくことが重要である。仮に暫定的 ARfD とそれに基づく規制値を設定したとしても、規制値の半分濃度程度の検出限界を有する信頼性のあり、かつ迅速で容易に実施できる検査法の確立が必要であろう。

2 研究全体の成果、考察及び結論

本研究課題については、2年間という短期間で、リスク評価の上で重要な知見を得ることができ、課題を整理した。また、本研究課題の成果は、シガテラ（CFP）だけにとどまらず、食中毒原因物質のリスク評価に必要な科学的情報収集体制を提案することができた。今後、関係各機関において、本研究課題の成果をプロトタイプとして位置づけて、リスク評価のみならず、リスク管理の施策に活用し展開していくことが望まれる。

国内のCFP多発地域である沖縄県で過去に発生したCFPの食中毒調査票を調査することにより、CFPの症状及び原因魚の種類の傾向、並びにCTXsの推定摂取量についての知見を得ることができた。しかしながら、従来型の食中毒調査票ではCFPで生じる循環器症状や温度感覚異常などの症状が十分には記録されていない可能性が示唆された。また、従来型の食中毒調査票では発症者の体重が記録されておらず、発症者一人当たりのシガテラ毒摂取量を算出出来たものの正確なARfDを算出するには至らなかった。従って、CFPの症例をよりの確に調査し、その調査結果をリスク評価に利用できるようにするためには、CFPの特徴的な症状、体重及び飲酒等の影響因子を明確に記録できる専用の調査票が必要であることが確認された。

本研究期間中にCFPの症例調査を行うにあたり、まずはCFP発生時に使用する「シガテラ調査票」を作成した。この調査票は、CFPに特徴的な症状を的確に調査できリスク評価に必要な情報を得られるような内容にしている。これを使用した現場担当者の食品衛生監視員からはCFPの症例情報の確認をしやすいだけでなく記入にも簡便であるとの意見を得ており、その有用性と実用性が確認された。このシガテラ調査票の考え方は他の自然毒による食中毒についても応用でき、それぞれに特徴的な症状や影響因子を考慮して作成すれば現場担当者にとってもリスク管理者/評価者にとっても有用な調査票になると考えられる。

「シガテラ調査票」を用いて平成26～27年に発生した3事例12名のCFP症例について調査した。症状については詳細な記録ができた。しかしながら、12名全員が原因魚を煮付け（アラ煮）、汁物などの加熱調理品を喫食しており、これらの加熱調理品の場合には一杯/一皿分に含まれる魚肉の重量が不明でありCTXs摂取量の正確な推定が出来なかった。CFPの原因魚は大型魚であることが多く、大抵は一匹の魚を刺身、煮物、汁物と様々に調理して喫食している。従って、これら加熱調理品のより正確な喫食量を推定できるようにすること、また様々な調理方法によるCTXs濃度の調査を行うことが今後の課題となる。

以上のように、発生時に使用するための「シガテラ調査票」を作成したことにより、リスク評価に利用するためのデータ収集が可能となった。国内でのCFP多発地域である沖縄県における過去のCFP調査と「シガテラ調査票」を用いた症例調査により、国内のCFPについておよその傾向は把握できたが、正確な喫食量が不明であるとともに「シガテラ調査票」で調査した症例数が少なかったためにARfDの算出には至らなかった。我が国の実態を踏まえたCFPのリスク評価を行うには、今後も継続的に調査を行うこと、また調査対象地域の拡大などにより症例数を増やすことが課題である。

リスク評価の上で、原因物質の分析は重要であるが、そのためには標準品の確保が

必須である。本研究課題実施中に、幸いにもトレーサブルな値付けがされた標準品を手に入れたことは大きい。これによって本課題で調製した標準品を二次標準品と位置付けて今後の汚染実態調査等への活用が期待される。LC-MS/MS による分析法は有効なリスク評価のツールであることが示された。CFP の代表的原因魚種であるバラフエダイおよびバラハタについて、CTXs 組成を明らかにし、毒化の傾向を示すことができた。さらに、N2a 細胞による Na⁺チャネル毒性の検出系は CTXs のリスク評価に有効であることが示された。今後、この系を用いた CTXs の起源の探索に期待が持てる。

本課題の成果として得られた標準品や分析手法は地方衛生研究所等の関係機関に対し積極的に提供し、リスク評価に必要な科学的情報の収集に寄与したい。

本州沿岸域の海洋生物から CTXs は検出されなかった。本州沿岸での CFP が散発的に発生していることを考えると妥当な結果と言える。沖縄とは異なり本州沿岸域においては *Gambierdiscus* 属の増殖に適した環境が複数年の長いスパンをもっているか、あるいはホットスポット的なごく限られた海域があることが推定される。今後、CFP が発生した際に原因魚が採取された海域を集中的に調査することにより、原因生物を特定し、発生要因を解明することが可能になると考えられる。

沖縄以外の魚類試料は分析に供した個体数が限られていたが、地域により検出状況に差がみられた。鹿児島や台湾で採取されたバラハタやバラフエダイからは CTXs が検出されず、フィジー産のバラハタ 2 個体は共に CTX1B の高極性類縁体が検出された。CFP の発生状況を勘案した時に矛盾はなく、地域により汚染度が異なることが考えられた。また、フィジー産のドクウツボから高極性類縁体や CTX1B 系列は検出されず、低極性類縁体の CTX3C と 49-*epi*-CTX3C が検出されたことはリスク評価の上でも興味深い。バラハタはフィジー本島の南部、ドクウツボは北部で採取された。フィジーの北部と南部で原因物質が異なる可能性または、バラハタが CTX3C 系列を含有しない可能性が示唆された。フィジーにおける CFP 症例の詳細な調査を含め、今後の継続的な調査によりこれらの要因が明らかになると考えられる。

CTX1B と CTX3C の LD₅₀ 値を比較し、比毒性を導き出すことができた。また、これら 2 物質の毒性は腹腔内投与と経口投与で大きな違いは無く、これまで実施されてきたマウス・バイオアッセイ (MBA) が有効な評価系であることを証明することができた。

致死量の CTX1B を投与したマウスはすべて 24 時間以内に死亡することを確認した。これは現行の MBA の判定時間が CTX1B に対して適切であることを証明する結果である。一方、CTX3C については 24 時間経過後も死亡する個体があり、現行の MBA では CTX3C の毒性が過少に評価される可能性が示された。これまでわが国で発生している CFP はほとんどが南西諸島で採取された肉食魚に起因するため、ほとんどの事例において本法によるリスク評価、リスク管理が可能であるが、イシガキダイなどの低極性 CTXs 類縁体をもつ雑食魚や藻食魚については、判定時間を長くするなどの考慮が必要である。

その要因を検討するため、死亡したマウスの肝臓抽出物について、CTX3C 系列の類縁体を対象に分析したが、関連物質を検出することは出来なかった。しかし、酸化

型 CTX3C 類縁体の可能性が示唆されるピークが検出されたため、未知の CTXs の存在の可能性が示唆される。これまで、CFP の臨床症状が多様なのは、多数の類縁体が存在し、その毒性の違いによるものと考えられてきた。CTX1B と CTX3C の毒性現れ方の違いはそのことを指示する結果であり、食中毒事例が発生した際に、原因食品の CTXs 組成と症状のバリエーションや継続性等を比較検討することが重要と思われる。

沖縄を中心に、疫学的情報を整理し、不確実性は多く含むが ARfD の試算を行った。しかし、フランスの研究チームがフランス領西インド諸島での疫学データから計算した ARfD と比べると、日本のそれはおよそ 40 倍程度大きかった。我が国で CFP が発生している魚種は限られており、それらに対し基準値を設定したり、その魚種の喫食を禁止するリスク管理措置は考えられるが、当該魚種だからといってすべての魚が CFP を起こすレベルの CTX を含有している訳ではない。貝毒のようなモニタリングを行って、特定の海域で、特定の時期に漁獲された特定の魚種を食品衛生法第 6 条違反として取り扱えるようにするため、もう少し発生要因と魚中の CTX 濃度、CFP 発生情報の収集が必要であると考ええる。

疫学情報のさらなる収集には、CFP 多発県である沖縄で、本研究で構築した CFP に特化した積極的サーベイランスの枠組みを維持することが必要である。幸い研究課題 1 で作成した調査票は、沖縄県で今後も活用される予定であるので、今後の情報蓄積に期待したい。また、本州沿岸域で CFP が発生した際には、同様な調査体制を導入することが望ましい。

海外でのデータ収集には、いずれの先進国からも支援を受けていない多発国において、フランスのチームが海外フランス領土で展開している様な体制構築が必要である。すなわち、中長期的視野の下で、現地への専門家派遣を含めた総合的な疫学調査、各種魚類の CTX 汚染調査等にかかる積極的な能力育成プログラムが必要であるが、本研究費の枠組みでは実現は困難であった。

CFP による健康被害のリスクについては、欧米を中心に重要課題と位置づけられており、リスク評価の取組も報告されている。しかし、限られた情報の中で各国とも苦労しており、明確な結論は保留されているのが現状である。このような状況の中、2 年間という限られた期間内に、本課題研究ではリスク評価に必要な科学的情報を得たことは大きな成果である。また、CFP のリスク評価に必要な課題を整理し、必要な体制を準備し提言できたことで、わが国の自然毒食中毒にかかるリスク評価の体制強化につながるものと思われる。本研究課題の成果が、関係各機関において活用されることを期待する。

Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト
なし
- 2 本研究を基にした学会発表の実績
 - 1) 林田宜之・大城直雅・立原一憲, シガテラ毒魚バラフエダイの年齢と成長, 成熟, 平成 26 年度公益社団法人日本水産学会秋季大会, 福岡市, 2014.09.19-22
 - 2) Oshiro, N., Aspects in Detection of Ciguatera Food Poisoning Toxins. Joint Workshop between Agri-Food Veterinary Authority of Singapore and Japan Food Research Laboratories for Analysis of Ciguatera Food Poisoning Toxins, Singapore, 2014.11.13-14.
 - 3) 風間美保・村田龍・林田宜之・佐久川さつき・久高潤・立原一憲・小島尚・安元健・大城直雅, 沖縄産バラフエダイおよびゴマフエダイの LC-MS/MS 法によるシガトキシン類分析. 第 108 回日本食品衛生学会学術講演会, 金沢市, 2014.12.03-06.
 - 4) 渡辺美遥・村田龍・西村美桜・佐久川さつき・久高潤・立原一憲・石崎直人・小西良子・安元健・大城直雅, 沖縄産バラハタおよびオジロバラハタの LC-MS/MS 法によるシガトキシン類分析, 第 108 回日本食品衛生学会学術講演会, 金沢市, 2014.12.03-06
 - 5) Naomasa Oshiro, Satsuki Sakugawa, Kyoko Kuniyoshi, Ryo Murata¹, Katsunori Tachihara, Takeshi Yasumoto, LC-MS analysis of ciguatoxins from fish and other marine organisms collected off the coast of Japan. Fifth Joint Symposium and AOAC Task Force Meeting, Marine & Freshwater Toxins Analysis, Baiona, Spain, 2015.06.14-17
 - 6) 大野祐美、風間美保、國吉杏子、佐久川さつき、林田宜之、立原一憲、小島尚、安元健、大城直雅. LC-MS/MS を用いたバラフエダイ筋肉のシガトキシン類分析の検討. 第 25 回体力・栄養・免疫学会大会, 東京都足立区, 2015.08.22-23.
 - 7) 富川拓海、國吉杏子、石川輝、小島尚、安元健、大城直雅, 本州沿岸生物からの LC-MS/MS によるシガトキシン類の探索. 第 25 回体力・栄養・免疫学会大会. 東京都足立区, 2015.08.22-23
 - 8) 西村美桜・渡辺美遥・小西良子・國吉杏子・大城直雅・立原一憲, シガテラ毒魚バラハタの年齢と成長, 成熟, 食性. 2015 年度日本魚類学会年会, 奈良市, 2015.09.04-07
 - 9) 富川拓海、國吉杏子、石川輝、小島尚、安元健、大城直雅, イシガキダイの LC-MS/MS によるシガトキシン類分析検討. 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 京都市, 2015.10.29-31.
 - 10) 佐久川さつき・登田美桜・仲間幸俊・高嶺朝典・豊福肇・大城直雅. 沖縄県における魚類食中毒シガテラの傾向, 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 京都市, 2015.10.29-31

- 11) 渡辺美遥、國吉杏子、佐久川さつき、高嶺朝典、小林直樹、小西良子、大城直雅, LC-MS/MS によるシガトキシン類分析法の改良検討. 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 京都市, 2015.10.29-31
- 12) 大野祐美、風間美保、國吉杏子、林田宜之、佐久川さつき、立原一憲、小島尚、安元健、大城直雅, バラフエダイ筋肉の LC-MS/MS 法による CTXs 類分析. 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 京都市, 2015.10.29-31
- 13) N Oshiro, Detection of ciguater toxins from marine creatures caught off Japanese waters by LC-MS. Pacifichem 2015, Honolulu, 2015.12.15-20
- 14) Toda, M., Sakugawa, S., Nakama, Y., Takamine, T., Toyofuku, H., and Oshiro, N., Trends of Ciguatera fish poisonings in Japan, Pacifichem 2015, Honolulu, 2015.12.15-20
- 15) 富川拓海・國吉杏子・石川輝・豊福肇・小島尚・大城直雅, 海外産魚類試料のシガトキシン類分析. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 港区, 2016.03.26-30.

3 特許及び特許出願の数と概要
なし

4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）
なし

IV 主任研究者による申請時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 申請時に申告した達成目標

達成目標	評価結果	自己評価コメント
シガテラ発生実態の解析		
症例情報の入手蓄積のために、シガテラ発生時に使用する調査票を作成し、地方自治体等の現場担当者の意見を踏まえたうえで完成させる。	5	シガテラ発生時に利用できる「シガテラ調査票」を作成した。この調査票は、従来使用されてきた食中毒調査票では留意されていなかったシガテラに特徴的な症状に加えて、原因食品の喫食量、被害者の体重などリスク評価（特に ARfD 算出）に必要なデータを得やすいように工夫され完成度は高い。発生時調査で実際に使用した現場担当者の評判も良い。さらに、は他の動物性及び植物性自然毒にも応用できると考えられ、将来的には、様々な自然毒の健康影響評価に必要なデータ蓄積につながるものである。

作成した調査票案を地方自治体等の関係機関に配布し、シガテラ発生時には試行的に詳細情報を収集する。また、食中毒事件として届出のあった事例に関する情報を収集・精査して原因魚種、症状等を解析するとともに、我が国のシガテラ多発地域である沖縄県及び鹿児島県奄美地方を中心に聞き取り調査を行うことで届出されていない事例を発掘する。	5	国内のシガテラ多発地域である沖縄県における過去の事例調査、及び「シガテラ調査票」を用いた事例調査により、国内のシガテラについて症状及び原因魚等の傾向に関して多くの有用な知見を得ることができた。ただし、ほとんどの事例で大型魚を汁物（アラ汁）や煮物（アラ煮）にして喫食していたため患者の正確な喫食量が不明であったとともに「シガテラ調査票」で調査できた症例数が少なく、ARfDの算出には至らなかった。沖縄県以外の地域については、本調査期間中にシガテラが発生したとの情報がなく調査票を用いた調査の機会が得られなかったとともに、人脈作り及び時間的制約により聞き取り調査も実施できなかった。 今後、我が国の実態を踏まえたシガテラのリスク評価に向けて質・量ともに評価に十分と言える情報を得るにはさらなる継続的な調査を要する。
海外におけるシガテラの発生状況及び原因魚種等の関連情報を入手することを目的に、学術文献の調査を行う。	4	国際機関及び諸外国の公的機関のウェブサイトを対象に、どのようなシガテラ関連資料が公表されているかを調査した。また、シガテラ関連文献の調査を行い、内容に応じて分類した文献リスト一覧を作成した。当初目標していたよりも網羅的に検索しており、リスク評価を行う際は有用と言える。ヒト症例及び疫学調査に関連した文献の報告数は多かったものの、ARfDを算出できる充実したデータが紹介されている文献は非常に限られ、必要データを得るための前向き調査の実施の必要性が改めて確認できた。
シガトキシン類の解析手法開発		
シガテラ毒の検査法であるマウス・バイオアッセイは種々の問題があるため、	3	LC-MS/MS 法については極微量分析に伴う分析の困難さから、低濃度での分析の妥当性が確認できなかったが、精製法の改良により改善が見込まれる。先行

LC-MS/MS 法、細胞毒性試験法、抗シガトキシン抗体による免疫学的手法等の分析法について、協力研究者の協力を得て検討を行う。 検討した分析法について、食中毒原因食品、渦鞭毛藻やベクターに加えて、患者由来の臨床試料等を対象とした分析を検討する。これらの各手法および、試料の分析における妥当性評価を検討する。		研究でヒトの発症レベルの分析では有効性が確認されていたため、一部改変により分析を実施した。細胞毒性試験については、CTXs 探索及び分析系としての有効性が示された。
シガトキシン類の標準品は限られているため、分析法の開発や評価に必要な標準物質、標準試料の調製について検討する。具体的には他の研究項目との連携を図りながら、海外も含めた有毒試料の収集に努め、シガトキシン類の精製法を検討する。	5	魚肉抽出物等から CTX1B、54-deoxyCTX1B および、52- <i>epi</i> -54-deoxyCTX1B を調製した。またトレーサブルな値付けがされた CTX1B および CTX3C を入手したので、これで調製した CTXs を二次標品として使用可能となる。さらに、これまで所有していなかった C-CTX 標準品および CTX3C 系列を含有する試料を確保したため分析対象物質の拡充と供給が可能となった。
食中毒原因食品や患者の臨床試料、各種海産生物試料について汚染度調査を実施する。その際に、各種分析法による分析結果の比較検討も行う。	4	LC-MS/MS 分析の結果を基に、汚染実態の傾向をとらえることができた。
沿岸海域の生物における汚染実態の解明		
実際にシガテラ中毒が発生した国内外の地域において、できるだけ多くの魚類を採集、あるいは購入して研究項目 2 で確立した分析方法により汚染状況を調査する。	5	国内では、種子島沿岸において魚類を採集した。国外においては、トリニダード・トバゴ、タイ、台湾ならびにフィジーに赴き、多種の魚類サンプルを購入した。全体として国内外から予想以上の魚類サンプルを収集することができた。CTXs が検出されたのはシガテラの発生件数の多

		い、フィジー産のバラハタ 2 個体およびドクウツボのみで、その他の地域、魚種からは検出されなかった。
シガテラ原因魚が実際に採捕された三重県沿岸等の海域において、藻類、草食動物、肉食魚等を採集、あるいは購入して研究項目 2 で確立した分析方法により汚染状況を調査する。なお、この調査を季節的に継続して行ない、生物汚染が季節的に発生するかどうかについても検討する。	5	三重県南部沿岸域において、藻類、草食動物、シガテラ原因肉食魚(イシガキダイ)等を季節的に採集、あるいは購入した。全体として予想以上の生物サンプルを収集することができたが、いずれの試料からも CTXs は検出されなかった。
シガテラ原因魚が実際に採捕された三重県沿岸等の海域における海藻に付着している渦鞭毛藻 <i>Gambierdiscus</i> 属等を単離して、三重大学内の実験室で培養株を確立する。確立した株は毒量分析等に供する。	3	現場の藻場より得た海藻に付着する <i>Gambierdiscus</i> 属を単離し、株作成を試みたが成功するには至らなかった。実施期間中の <i>Gambierdiscus</i> 属の分布密度が低かったのが一因と考えられる。なお、本研究以前に単離・作成した株を用いて大量培養を試みたものの、大増殖させることはできなかった。ただし、その培養液を用いてペレットを作成し毒分析に供することはできた。
シガトキシン類の毒性評価		
シガトキシン類縁体のうち、高純度に分離された毒素成分についてそれぞれをマウスに腹腔内投与、経口投与、あるいはその他の経路により投与し、各毒素成分の半数致死量(LD50)を算出する。この検討によりリスク評価に重要な各成分間の比毒性を明らかにする。また、それぞれの致死時間や臨床症状など、	5	CTX1B と CTX3C について、腹腔内投与 (i.p.) と経口投与 (p.o.) による半数致死量 (LD50) 値を決定した。i.p. の値は既報の値と大きな違いはなかった。p.o. の値は今回初めて示された。i.p. と p.o. は差が小さい事をみいだした。致死経過時間について、CTX1B は 24 時間以内であったが、CTX3C については投与 5 日目までマウスの死亡が確認された。マウスは体調不良を示し行動性が著しく低下していた。死亡後にマウスを解剖すると、腸管内に液体の貯留が認められる他は、特に著変

毒性発現について病態生理学的な検討を行う。		は見られなかった。
現在、食品衛生検査指針にシガテラの検査法はマウス・バイオアッセイが参考法として記載されているが、その有用性の検証として、実際の食中毒原因食品と標準品とを用いてマウス・バイオアッセイを行い、結果の比較を行う。	4	沖縄で発生した食中毒 2 事例の原因食品 3 検体について、マウス・バイオアッセイ (MBA) と LC-MS/MS 分析の結果を比較した。LC-MS/MS 分析により検出されたのは CTX1B、52- <i>epi</i> -54-deoxyCTX1B 及び 54-deoxyCTX1B の 3 物質で、定量結果を基に TEF によって CTX1B 当量に変換後、MBA の結果と比較したところ、両者の値はほぼ一致しており、沖縄産試料については、LC-MS/MS による分析法がリスク評価の上で有効であることが示された。
シガトキシンをマウスに投与し、経時的に臓器や血液などを採取する。分離した臓器や血液などに含まれる毒素の量や種類 (代謝産物) について解析を行う。解析については他の研究分担者と協力して進めていく。	4	CTX3C を投与して死亡したマウス肝臓を LC-MS/MS 分析に供した。供試試料は 2 個体で、多量投与 (致死時間 6 時間 15 分) 及び、少量投与 (致死時間 96 時間) とした。多量投与マウスからは CTX3C が検出されたが少量投与マウスからは検出されなかった。また、投与した CTX3C がマウスの代謝により酸化型の CTX3C 系列に変換されと考えられたが、標準品を所有する CTX3C 類縁体 (CTX3C、51-hydroxyCTX3C、2,3-dihydroxyCTX3C) は検出されなかった。一方、CTX3C に水酸基が 3 つ付加した 2,3,51-trihydroxyCTX3C や M-seco-CTX3C などの [M+Na] ⁺ に一致するピークが両方のマウスから同程度の量が検出された。詳細な解析には時間を要するため試料を保冷凍管することとした。
シガトキシン類のリスク評価、リスク管理アプローチの検討		
EFSA、FDA 等の政府機関が実施し、公表したリスク評価及び諸外国における	4	FAO、EFSA、フランスのリスク評価手法、データソース、不確実性の元についての試料を入手し、ある程度解析できた。

科学論文に発表されているリスク評価を収集し、論文等の記載内容を分析することにより、これらのリスク評価アプローチの解析、各情報の整理及びデータソースの確認、並びに用いているデータの解析等を行う。必要に応じ、リスク評価者に対する直接面談等によるヒアリングを行い、リスク評価の詳細を調査する。その中で、我が国のリスク評価に利用可能なアプローチを探し、我が国への適用にあたっての課題の抽出及び不足データの洗い出しをする。 評価対象とするリスク評価の選定基準は次のとおりとする。 ア．リスク評価の目的（リスク管理上の質問）が明確であること イ．評価のアプローチが標準的で、Codex のリスク分析のガイドラインに一致していること ウ．我が国のリスク評価に有用な評価であること		
諸外国が行っているリスク管理のアプローチとその背景を調査し、我が国のリスク管理の実施に参考となる科学的知見を整理し、また我が国への適用にあたっての課題の抽出を行う。	4	リスク管理措置としては米国のように action level を設定している国、豪州等魚種を限定して販売禁止にしている国があった。 わが国にリスク管理を導入する場合には、海域、魚種、場合によっては魚の重量、採捕時期等、毒化に関するデータをもう少し積み上げ、漁業関係者等の利害関係者に対して管理措置選択の必要性を説明する必要があると考えられる。

1) で検討し、我が国に応用できそうと考えられたリスク評価をベースに、可能な限り我が国のデータを入力して、リスク評価を行い、その妥当性を検証する。(担当者が共同で研究を実施する)	3	海外のリスク評価資料に加えて沖縄での疫学データをもとに不確実性はあるものの、不確実性の内容を明示した上で、ARfD 提案を行った。また、リスク評価にあたっての今後の課題を示すことができた
3) での試行を踏まえ、リスク評価を実施する過程で、主なデータギャップを特定し、そのなかで、収集を急ぐべき優先順位をつけ、さらにその収集戦略について検討を行う。	3	ARfD を設定するのに必要な情報を提示した。その際に喫食量推定法の検討が必要である。情報の収集戦略として食中毒として報告の無い事例の掘り起しや、適切な臨床診断のため臨床医に対する普及啓発活動の必要性を示した。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

2 研究全体の自己評価

項 目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	4	各項目ともおおむね計画通り進行した。疫学調査については作成した調査票を沖縄県で採用してもらうことができ、今後のデータの蓄積が期待できる。 LC-MS/MS 法による分析については、FDA の示す 0.01 ng/g 程度の添加時の妥当性が取れなかったが、代表的シガテラ原因魚種について汚染実態の概要を把握できた。また、二次標準品の調製とその原料となる試料を確保することができた 汚染状況調査について、海外試料を蒐集しシガテラ多発地域とそれ以外の地域での違いが示された。 CTX1B と CTX3C の毒性評価で、投与経路による毒性に差が少ないことと両物質で作用の違いがあることが示された。 リスク評価アプローチについては、海外の情報を入手し、沖縄での疫学調査を基に限られた情報であるが ARfD を試算した。 2年間という限られた期間であったが、

		リスク評価に必要な知見が得られ、課題を整理することができた。
(2) 研究成果の有用性	4	本課題の成果は、疫学調査手法の開発や分析法の確立、汚染実態の解明、毒性評価等、新たに得られた知見をもとにリスク評価を試行することで、現時点で不足しているデータ・情報を明確化し、あらたな取組課題が明確になった。 シガテラに特化した調査票は沖縄県で採用されたため、リスク評価を意識したシガテラ症例の疫学情報蓄積に寄与すると思われる。 シガテラの分析法および標準品の調製は地方衛生研究所等の関係機関に積極的に提供し、基礎データの集積に寄与したい。 CTX1B 及び CTX3C の毒性評価結果は毒性等価係数 (TEF) 算出の根拠データとなる。また、多様な臨床像を示すシガテラの発症機構解明の基礎データになるものである。 リスク評価の試行で挙げられた課題等に対して取組むことでシガテラのリスク評価がより充実すると考えられる。 本課題の成果は、シガテラ以外の自然毒食中毒にかかる原因物質のリスク評価にも応用可能である。
総合コメント シガテラのリスクを評価するうえで必要な科学的データが、新たな知見として得られた。 食中毒調査票については、これまでの調査では得られなかったリスク評価、リスク管理に必要な情報が得られる形式となっており、今後も本調査票を用いた調査を継続する必要があると思われる。さらに、本調査票については、フグ毒や貝毒、植物毒を含めた自然毒食中毒のリスク評価に必要なデータ取得のための調査への応用が期待できる。そのため、本研究の成果については、リスク評価機関、リスク管理機関等、関係部局が連携し活用される事を期待する。 シガテラのように自然環境に大きく影響を受ける自然毒については、2年間という期間は短いため中長期的視野で取り組む必要があると思われる。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。