

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 6月25日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07556

研究課題名(和文) 琉球列島におけるシガテラ毒魚の年齢と成長が毒性に及ぼす影響評価

研究課題名(英文) Evaluation of toxicity of age and growth of ciguatera poison fish in the Ryukyu Archipelago

研究代表者

立原 一憲 (TACHIHARA, Katsunori)

琉球大学・理学部・准教授

研究者番号：70264471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：琉球列島におけるバラフエダイ、バラハタ、ドクウツボの年齢と成長を解析し、各年齢と体重におけるシガテラ毒の含有量を分析した。その結果、寿命は、バラフエダイ79歳、バラハタ20歳、オジロバラハタ15歳、ドクウツボ25歳であった。いずれの種も高齢魚・大型魚ほどシガトキシンの含有量が多い傾向が認められた。バラフエダイでは、体長500mm、体重4kg、年齢20歳以上になると強毒個体が出現し、宮古諸島のものが特に高い値を示した。バラハタとオジロバラハタでは、強毒個体は、いずれも1個体のみであった。ドクウツボでは、強毒個体は出現せず、大量摂取しなければ中毒を発症する恐れは少ないと判断された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the age and growth of *Lutjanus bohor*, *Valiola louti*, *V. albimarginata* and *Gymnothorax javanicus* in the Ryukyu Archipelago and analyzed the content of ciguatoxin in each age and body weight. As a result, lifespan was 79 years old: *L. bohor*, 20 years old: *V. louti*, 15 years old: *V. albimarginata*, and 25 year old: *G. javanicus*. In all species, the tendency of ciguatoxin content tended to be higher as for older fish and larger fish. In *L. bohor*, virulent individuals appeared when the body length was 500 mm, the body weight was 4 kg, aged 20 or over, and those of the Miyako Islands showed particularly high values. In *V. louti* and *V. albimarginata*, virulent individuals were only one individual. In *G. javanicus*, virulent individuals did not appear and it was judged that there was little risk of developing intoxication unless you intake a large amount.

研究分野：魚類学

キーワード：シガテラ中毒 バラフエダイ バラハタ ドクウツボ 琉球列島 年齢と成長 シガトキシン、

1. 研究開始当初の背景

熱帯・亜熱帯海域では、複数の魚類がシガテラ毒を持ち、多くの食中毒被害を引き起こしている。沖縄県では、食中毒防止のため、バラフエダイやイッテンフエダイの商取引を禁止しているが、イシガキダイやバラハタ類などは、毒化する率が低いとされ、普通に水揚げされ、食用に供されている。しかしこれらの中にもシガテラ毒をもつ個体があり、不定期にシガテラ中毒を引き起こしている。これらは、市場での慣例として大きいサイズで毒化する可能性が高いとされているが、サンゴ礁性魚類は大きさと年齢に相関が少なく、大型魚が危険なのか、高齢魚が危険なのかは定かではない。本申請では、シガテラ毒魚の正確な年齢査定と成長様式を解析し、シガテラ毒の蓄積が、体サイズ依存か年齢依存かを明らかにし、中毒対策のマニュアルを作成する。

2. 研究の目的

琉球列島には多種多様なサンゴ礁性魚類が生息し、食用として市場に水揚げされている。それらの中には、バラハタやオジロバラハタのようにシガテラ中毒を引き起こす可能性のある魚類も交じっている。シガテラ中毒は、藻類である渦鞭毛藻が産生するシガトキシンとその類縁化合物(シガテラ毒)が蓄積された魚類を摂食することによって発生する食中毒のことである。シガテラ毒は、食物連鎖によって魚類に蓄積され、これらの魚類を摂食することによってシガテラ中毒が発生する。沖縄では、原則として商取引が禁止されているバラフエダイが、小型個体(3kg以下)は安全であるとして食用に供されることも珍しくない。一方、普通にセリにかけられ、広く食用に供されているバラハタ類のうち、体色異常個体(黒変個体:コールタールと呼ばれている)は、シガテラ中毒を起こすとされ、セリから外され、すべて廃棄されている。しかし、この黒変個体は、体の一部が黒化したものから、体全体が黒いものまでバラエティーに富んでいる。これらの体サイズや体色変異の程度が実際にシガテラ毒の蓄積量と相関があるか否かを科学的に調べた例はない。

日本におけるシガテラ中毒は、平成元年~22年の間に、毎年1~8件、合計78件の報告がある。その原因魚種の内訳をみると、バラハタ類(16件:20.5%)、次いでイッテンフエダイ(12件:15.4%)、バラフエダイ(11件:14.1%)の順である。発生都道府県は、沖縄(70件)が最も多く、全体の約90%を占めている。このようにバラハタ類は、シガテラ中毒を起こす最重要原因魚種となっており、その対策が急務となっている。私たちの研究室では、これまで数多くのサンゴ礁海域で水揚げされる水産重要種の年齢査定を行い、その寿命や成熟最小体長・最少年齢などを明

らかにしてきた。その結果、サンゴ礁性魚類の中には、ある年齢に達すると成長が停滞する種が多く、これらの種では体サイズが単純に年齢を反映しているとは限らないことが明らかとなりつつある。例えば、予備調査によると、バラフエダイは、極めて高齢(60歳以上)になり、20歳以降では成長が停滞し、体サイズから年齢を推定することは不可能である。水産重要種種の生活史の研究で市場を訪れると、市場関係者や漁業者から、体サイズ、年齢、季節、体色変異、肥満度がシガテラ毒魚類の毒化とどのように関係するのかを調べてほしいという要請を再三受けてきた。

そこで本研究では、毎月、沖縄県下の市場でバラフエダイ・イッテンフエダイ・バラハタ・オジロバラハタなどシガテラ中毒の原因となっている魚種を購入し、耳石による年齢査定を行い、正確な成長曲線を算出する。同時に、各個体の筋肉と内臓に含まれるシガテラ毒の量を測定し、体サイズおよび年齢がシガテラ毒の蓄積とどのような関係にあるのか、従来、漁業者が慣例的に安全だとしている体重3kg以下のバラフエダイの毒性が本当に低いのか、体色が黒化したバラハタ(コールタール)が本当に強いシガテラ毒性を示すのか、痩せた個体(肥満度の低い個体)は本当に危険なのかを明らかにし、科学的根拠に基づいたマニュアルを作成する。同時に、標本個体の胃内容物を精査し、餌生物を可能な限り下位の分類群まで同定後、各餌生物がシガテラ毒を持っているか否かの測定を行う。その結果、シガテラ毒を持つと判定された餌生物に関しては、さらにそれら餌生物の胃内容物を解析し、どのような食物連鎖を経てシガテラが蓄積されていくのかを明らかにしたい。シガテラ毒魚は、東南アジアや太平洋島嶼国では頻繁(3000~5000件/年の報告があるが、これは全発症数の10~20%と推定されている)に中毒を引き起こしている。地球の温暖化に伴い、今後、琉球列島のみならず日本本土でもシガテラ中毒発症の危険性が増加する可能性が強く危惧される。本申請は、シガテラ毒の蓄積パターンを対象となる魚類の生活史特性と関連付けて詳細に解析する初めての試みであり、食の安全を守る上でもきわめて重要な研究である。

3. 研究の方法

(1) 標本の収集:毎月、琉球列島各地の市場からバラフエダイ・イッテンフエダイ・バラハタ・オジロバラハタを購入した。購入した標本はすべて冷蔵して研究室に持ち帰り、全個体から耳石、胃、生殖腺、筋肉、肝臓を摘出した。バラハタ類の中には体色が黒変した個体(市場ではコールタールと総称)があり、これらはシガテラ毒を有するとされ、すべて廃棄処分されている。この黒変個体は、

その程度に差があり、全身が黒いものから黒斑が点在するもので様々である。この黒変個体を漁業者から直接購入し、体色変異をいくつかの段階に分けて区分した。いずれの種も市場に水揚げされない小型個体については、フィールド調査により、刺網、巻網、釣獲などを駆使して採集した。

(2) 年齢と成長の解析：摘出した耳石の短径、長径、重量を計測後、樹脂に包埋し、ダイヤモンドカッターにより薄層切片を作成した。この切片を顕微鏡下で観察し、各耳石に刻まれた不透明体の輪紋数を計数した。同時に耳石縁辺が不透明である個体の割合を算出し、輪紋の形成時期を明らかにした。これらの結果を von Bertalanffy の成長式に代入し、種毎、雌雄毎の成長曲線を推定した。

(3) 成熟と産卵期の推定：定期出下生殖腺から生殖腺指数を算出するとともに薄層切片を作成し、各種の最少成熟体長・成熟様式・産卵期を明らかにした。

(4) 胃内容物解析による餌生物の特定：摘出した胃の内容物を可能な限り下位の分類群まで同定し、餌生物組成を明らかにした。

(5) シガトキシンの測定：シガトキシン量は、雌雄、月、体長クラスター、年齢クラスター、体色変異クラスター毎に解析した。シガトキシンの含有量の解析は、国立医薬品食品衛生研究所と沖縄県衛生環境研究所に依頼した。シガトキシンの分析方法は、以下のとおりである。

抽出用溶媒にアセトン、ジエチルエーテル、メタノール、ヘキサンの特級を使用する。固相抽出および LC 移動相にはメタノール、酢酸エチル、アセトニトリル、蒸留水、ギ酸の HPLC 用グレードを用い、ギ酸アンモニウムは特級を使用する。標準品は、天然試料から単離・同定された CTX1B、52epi-54-deoxyCTX1B、54-deoxyCTX1B、CTX4A、CTX4B、Mseco-CTX4A/B、CTX3C、49e pi CTX3C、2-hydroxyCTX3C、2,3-dihydroxyCTX3C、51-hydroxy-CTX3C、Mseco-CTX3C、Mseco-CTX3C methyl acetal およびガンビエロールを使用する。試験液の調製：各試料につき筋肉 5 g を採肉し、アセトン 15 mL でホモジナイズ、遠心分離 (3,000 rpm、10 min)、上澄みの濃縮を 2 回繰り返す。濃縮液 (1 mL 以下) をジエチルエーテル 5 mL により 2 回再抽出する。エタノール層の濃縮残さを 90%メタノール 1.5 mL に溶解し、ヘキサン 3 mL による脱脂後、濃縮乾固し抽出物を得る。抽出物を酢酸エチル-メタノール (9 : 1) に溶解し、ジーエルサイエンス社製 InertSep FL-PR (500 mg) に通液させ (4 mL) 窒素気流下で濃縮乾固する。残さをアセトニトリル溶液として InertSep PSA (200 mg) に負荷し (3 mL) 続いてメタノール 3 mL により溶出する。アセトニトリルおよびメタノールにより溶出した分析対象物を濃縮固定後、それぞれメタノール 1 mL に調製し、必要に応じ希釈して試験液とする。分析装置：アジレント・テクノロジー社製の

Agilent 1200 LC システムおよび Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムを用いる。LC 条件：分析対象物の重なりを最小にし、かつ短時間での分析を維持したまま、移動相の初期濃度、勾配、最終濃度の調整により、試料中マトリクスによる分析への影響を低減する条件を検討する。移動相には 5 nmol/L ギ酸アンモニウムおよび 0.1% (v/v) ギ酸を含む蒸留水 (A) とメタノール (B) を用い、73%B から 90%B まで 11 分間リニアグラジエントを行い 4 分間保持する。カラムはアジレント・テクノロジー社製の Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1×50 mm、1.8 μm) を 40 に維持し使用する。移動相の流速は 0.4 mL/min、試験液の注入量は 5 L とする。MS 条件：イオン源に Agilent Jet Stream サーマルグラジエントフォーカシング技術を備えたエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法により、ダイナミック MRM モードで測定を行う。得られたクロマトグラムのピーク積分値を CTXs 標準品との比較により定量する。

4. 研究成果

初年度：バラフエダイの生活史解明とシガトキシン蓄積量

バラフエダイ *Lutjanus bohar* は、既知のフエダイ属魚類の中で最も寿命が長いことが明らかとなり、今回得られた最長齢は、雄 68 歳、雌 79 歳であった。雌雄ともに 20 歳まで成長した後、成長がほぼ停滞した。最大到達体長は、雄がわずかに大きかったが、成長係数、始原成長指数など、成長曲線に雌雄差はなかった。バラフエダイの成長曲線は次式で表された。

雄： $L_t = 625 \times \{1 - \exp[-0.12 \times (t + 1.09)]\}$

雌： $L_t = 610 \times \{1 - \exp[-0.11 \times (t + 1.18)]\}$

バラフエダイの生殖腺指数は、4 月から上昇し、雄では 5~8 月、雌では 5~9 月に高い値を示し、5~9 月が産卵期であると推定された。本種の食性 (N%) は、魚類 75%、カニ類 13%、頭足類 6%、多毛類 6% であった。

バラフエダイのシガトキシン含有量は、体長 260~675 mm (年齢 3~79 歳) の範囲で出現した。検出された毒量は、最大 0.647ng CTX1B eq./g であった。毒量の内訳は、無毒個体 48%、弱毒個体 13%、有毒個体 34%、強毒個体 4% であった。体長と毒性の関係は、大型ほどシガトキシンを持つ個体の割合が増加し、強毒は、体長 500 mm 以上の個体のみから出現した。年齢と毒性の関係を見ると、無毒個体は、加齢に伴い減少する半面、強毒個体が 20 歳以降に出現し始めた。強毒個体は、体重 4kg 以上の個体からのみ出現した。ゴマフエダイの肥満度は、2.37~3.83 であり、肥満度が低い個体ほど毒量が増す傾向が認められた。有毒個体は、ランダムに多くの場所から出現したが、強毒個体は、宮古島諸島で採集されたもののみに見られた。これらのことを総合的に判断すると、体サイズによって

食品として利用できる安全値を設定することは不可能であり、バラフエダイの流通は、全面的に禁止することが望ましいと判断された。

2 年度：バラハタとオジロバラハタの生活史解明とシガトキシン蓄積量

バラハタ *Variola louti* とオジロバラハタ *V. albimarginata* の寿命は、バラハタ 20 歳、オジロバラハタ 15 歳であった。前種は 7 歳まで、後種は 6 歳まで急速に成長した後、成長が停滞した。生殖腺指数の変化と組織学的観察から、産卵期はバラハタが 4~10 月、オジロバラハタが 5~11 月と推定された。成熟最小標準体長（年齢）は、バラハタが 333 mm（4 歳）、オジロバラハタが 184 mm（2 歳）と推定された。両種の成長曲線は次式で表された。

バラハタ： $L_t = 530.5 \times \{1 - \exp[-0.19 \times (t + 1.4)]\}$

オジロバラハタ： $L_t = 306.510 \times \{1 - \exp[-0.23 \times (t + 1.7)]\}$

シガトキシンが検出された個体は、バラハタでは全体の 55.4%（82/148）を占めた。毒性は、重の増加に伴って増加する傾向があり、2,500 g 以上になると強毒個体が出現した。同様に、オジロバラハタでは 47.1%（66/140）を占め、体重 500 g 以上になると強毒個体も出現した。強毒個体は、両種ともに 1 個体ずつしか出現せず、シガトキシン含有量の最大値は、両種ともに 0.2ng CTX1B eq./g であった。バラハタ類の毒性は、それほど高くなく、中小型個体に関しては一度に大量に摂取しない限り、シガテラ中毒を発症する可能性は低いと判断された。しかし、脂溶性であるシガトキシンは、調理法（鍋物など）によっては危険が増す可能性が示唆された。今回の結果から、漁業者の間で言われている“オジロバラハタはシガテラ中毒にならない”というのは、毒性の強さを反映したのではなく、オジロバラハタがバラハタより小型であることに起因することが明らかとなった。市場関係者の間で“コールドール”と呼ばれる黒変個体は、“毒性が強い”と言われていたが、正常個体と毒性に差は認められなかった。

最終年度：ドクウツボの生活史とシガトキシン蓄積量

ドクウツボ *Gymnothorax javanicus* の寿命は、25 歳であった。雌雄ともに加齢に従って、緩やかに成長し続けた。ドクウツボの成長曲線は、次式で表された。

雄： $L_t = 3601.2 \times \{1 - \exp[-0.02 \times (t + 5.74)]\}$

雌： $L_t = 1899.4 \times \{1 - \exp[-0.06 \times (t + 0.88)]\}$

ドクウツボの生殖腺指数は、4、6~8 月に高い値を示した。生殖腺の組織学的観察と合わせて考えると、本種の産卵期は 4~8 月と推定された。

シガトキシンが検出された個体は、全体の 27.7%（18/65）であり、その含有量は、0.013~0.053 ng CTX1B eq./g であった。全長が大きくなるに従い、有毒個体の割合が増加し、

全長 1,200mm 以上になると、有毒個体の割合が 55%を超えた。シガトキシンの含有量は、いずれの個体も低く、最も毒性の強い個体でも、1.5kg 以上摂取しないとシガテラ中毒を発症する危険性はないと判断された。しかし、煮物など調理方法によっては、危険性が増す可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 11 件）

大城直雅・大久保博英・伊藤茉美・國吉杏子・小島尚・立原一憲・朝倉宏・安元健 .2018. ドクウツボ筋肉および肝臓のシガトキシン類分析 .2018 .日本食品化学学会 第 24 回総会・学術大会 .東京ビックサイト（東京都・江東区）

大久保博英・伊藤茉美・國吉杏子・小島尚・立原一憲・朝倉宏・安元健・大城直雅 . 2017. LC-MS/MS によるドクウツボのシガトキシン類分析 . 第 113 回 日本食品衛生学会学術講演会 . タワーホール船堀（東京都・江戸川区）.

伊藤茉美・立原一憲 .2017 . 琉球列島におけるウツボ科魚類の年齢と成長 .2017 年度日本魚類学会 .北海道大（北海道・札幌市）

西村美桜・長沢寛弥・國吉杏子・小西良子・大城直雅・立原一憲 .2016 .シガテラ毒魚オジロバラハタの年齢と成長 , 成熟 , 食性 .平成 28 年度日本魚類学会年会 .岐阜大学（岐阜県・岐阜市）

Oshiro, N., S. Sakugawa, K. Kuniyoshi, R. Murata¹, K. Tachihara, T. Yasumoto. 2015. 4C-MS analysis of ciguatoxins in fish and other marine organisms collected off the coast of Japan. Fifth Joint Symposium and AOAC Task Force Meeting Marine & Freshwater Toxins Analysis (Spain).

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 . 2015 . 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（京都府・京都市）.

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 . 2015 . 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 . 帝京大学（東京都・板橋区）

西村美桜・渡邊美遥・小西良子・國吉杏子・

大城尚雅・立原一憲．シガテラ毒魚バラハタの年齢と成長，成熟，食性．2015．2015年度日本魚類学会年会．近畿大学（奈良県・奈良市）

渡辺美遥・村田龍・西村美桜・安元健・立原一憲・久高潤・佐久川さつき・小西良子・大城直雅．2014．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．2014 年度日本食品衛生学会．金沢大学（石川県・金沢市）

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．2014．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の分析．2014 年度日本食品衛生学会．金沢大学（石川県・金沢市）

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．2014．2014 年度日本水産学会秋季大会．九州大学（福岡県・福岡市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
琉球大学理学部 立原研究室 HP アドレス
<http://ichiba.geocities.jp/teamichiba/>

6．研究組織

(1)研究代表者

立原 一憲 (TACHUHARA, Katsunori)
琉球大学・理学部・准教授
研究者番号：40264471

(2)研究分担者

なし
(3)連携研究者
大城 直雅 (OHSHIRO, Naoya)
国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・第二室長
研究者番号：20507032
(4)研究協力者
林田 宜之 (HAYASHIDA, Noriyuki)
西村 美桜 (NISHIMURA, Mio)
伊藤 茉美 (ITO, Mami)