

3) ムシロガイ科キンシバイ *Nassarius glans* に起因する食中毒事例

—テトロドトキシン及びその類縁体—

福島 孝兵 村川 弘 吉田 達雄 吉元 秀和 飛野 敏明

要旨

2008年7月に県内で小型巻貝であるキンシバイ *Nassarius glans* 摂食による食中毒が発生し、患者は一時心肺停止に陥る重篤な症状であった。調理済みキンシバイ 3 個体、患者血清 2 検体、尿 1 検体及び吐物を拭き取った紙 1 検体からフグ毒であるテトロドトキシン (以下, TTX と略す) をそれぞれ 15.6, 5.4, 5.3 $\mu\text{g/g}$, 6.83, 0.82, 35.9 ng/ml , 220 $\text{ng}/(15.86\text{g 中})$ 検出した。また、個体から類縁体である 5,6,11-trideoxyTTX, 11-deoxyTTX, 4epiTTX, 11-oxoTTX を検出した。

キーワード：キンシバイ、フグ毒、テトロドトキシン、類縁体

はじめに

自然毒による食中毒は、細菌性食中毒等に比べ発生件数は少ないが、症状が重く死亡率が高いことが特徴として挙げられる。

2008年7月に県内で小型巻貝であるムシロガイ科キンシバイ *Nassarius glans* (図1) 摂食による食中毒が発生した。摂食者4名中1名が発症し、一時心肺停止に陥る重篤な症状であった。TTXが調理残品・患者血清・尿・吐物を拭き取った紙から検出され、TTXを原因物質とするキンシバイ摂食による食中毒と断定された。TTXは、Naチャンネルをブロックし、神経伝達を遮断する強力な神経毒である。1964年Mosherらにより両性類であるカリフォルニアイモリ *taricha torosa* の毒が TTX であること¹⁾が報告されて以降、ツムギハゼ *Gobius criniger*、ヒョウモンダコ *Hapalochlaena maculosa*、トゲモミジ (ヒトデ) *Astropecten polyacanthus* 等、フグ以外の動物から次々と TTX が検出された^{2)~4)}。フグによる食中毒は、毎年のように発生し、死者も出ているが、巻貝による中毒事故は非常に珍しいケースである。過去に、比較的大型の巻貝であるバイ *Babylonia japonica* やボウシュウボラ *Charonia sauliae* で食中毒が発生し、

原因物質は同じく TTX であったことが報告されている^{5)~7)}。



図1. キンシバイ (上: 殻付き, 下: 調理済み中身)

小型巻貝によるTTX中毒事故は2007年7月に長崎市で初めて発生し^{8),9)}、本県の事例は2例目である。一方、中国・台湾等では多数発生しており、死亡者も出ている¹⁰⁾。

国内では珍しいケースであり、概要を報告するとともに、毒成分について若干の知見を得たので併せて報告する。

食中毒事故の概要

1 探知

医療機関から貝を摂食した者が、貝毒による食中毒様症状を呈しているとの連絡が、管轄保健所にあった。

2 発生状況及び症状

摂食者4名(男2名,女2名)。年齢構成は、65歳以上3名,5歳児1名。午前9時から10時半までにキンシバイを摂食し,そのうち1名が同日午前11時から正午にかけて口唇部・舌のしびれ,呼吸困難,運動麻痺等の症状を呈し医療機関に救急搬送された。患者はキンシバイを6~8個摂食しており,他の者は内臓を除き4~5個摂食している¹⁶⁾。

長崎県橘湾におけるキンシバイ毒性は,総じて非常に高く,最高毒力は内臓で10,200MU/gに達している。毒力分類上最高である「猛毒」に該当する個体いくつも見られる。また,内臓の毒力は季節変動が激しく冬場には著しく減少している⁹⁾。

実験方法

1 検体

調理(水洗後,塩で洗い,醤油・砂糖を加え沸騰させ10分程度煮る)済みキンシバイ3個体(3.2g,3.3g,3.0g),患者血清(入院直後採血・2日後採血),患者尿(入院2日後採取),患者吐物を拭き取った紙(15.86g)

2 試薬

標準品:TTX(和光(株)製)1mgを水10mlに溶かし,適宜0.1%酢酸で調製した。

その他の試薬:特級,HPLC用を用いた。

3 装置

高速液体クロマトグラフ(以下,HPLCと略す)

HPLC装置:Waters社製 Waters2795

タンデム型質量分析計(以下,MS/MSと略す)

MS/MS装置:Waters社製 Quattro Premier

イオン化法:ESI(+),分析モード:MRM(multiple reaction monitoring),Product ion scan, Capillary 電圧:0.5kV, SourceTemperature:120°C, DesolvationTemperature:350°C

Cone Gass Flow:50 ℓ/h, Desolvation Gass Flow:1000 ℓ/h

4 分析条件及び試験溶液の調製

1) TTXの定量及び定性

i) 分析条件

分析カラム等は既報¹¹⁾のとおり行った。

定量:各試料を適宜希釈し,標準添加法で行った。

定性:コリジョンエネルギー(CE)を25,30,35Vと変化させ,プロダクトイオンスキャンによりスペクトル及び開裂変移を確認することにより行った。

ii) 試験溶液の調製

調理済みキンシバイ

殻付きのものは殻をはずし,中身を全量細切後,ホモジナイズし,公定法¹²⁾に従い抽出を行った。冷却後,ろ紙でろ過し,残渣を反復洗浄した後,全量50mlに定容した。適宜希釈し,限外ろ過(クラボウ社製:CENTRICUT(分画1万))した。

患者血清及び尿

0.1%酢酸で50倍に希釈し,限外ろ過した。

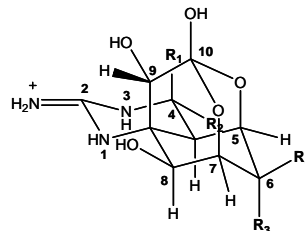
患者吐物を拭き取った紙

吐物が付いた部分(全量15.86g)を約300mlの0.1%酢酸に浸し,混和粉碎後,ろ紙でろ過し,全量を500mlに定容した。

2) TTX類縁体の分析

i) 分析条件

Nakagawaらの方法¹³⁾に準拠して実施した。測定イオンは,山下¹⁴⁾,Syojiら¹⁵⁾の文献を参考に各TTX類縁体(図2)のプロトン付加体をプレカーサーイオンに, m/z :162(図3)をプロダクトイオンに設定しMRM測定を行った。ピークが確認されたものについては,プロダクトイオンスキャン測定を行い,スペクトルを確認した。



	[M+H] ⁺ (m/z)	R1	R2	R3	R4
11-norTTX-6(S)-ol	290	H	OH	OH	H
11-norTTX-6(R)-ol	290	H	OH	H	OH
11-deoxyTTX	304	H	OH	OH	CH ₃
TTX	320	H	OH	OH	CH ₂ OH
4-epiTTX	320	OH	H	OH	CH ₂ OH
6-epiTTX	320	H	OH	CH ₂ OH	OH
11-oxoTTX	336	H	OH	OH	CH(OH) ₂

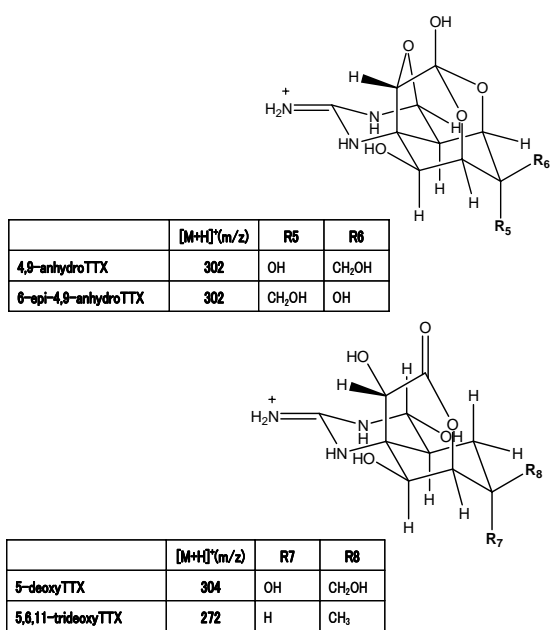


図 2.TTX 類縁体構造式

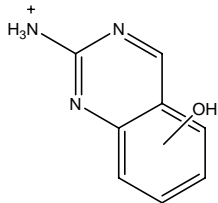


図 3.フラグメントイオン m/z :162

ii) 試験溶液の調製 調理済みキンシバイ

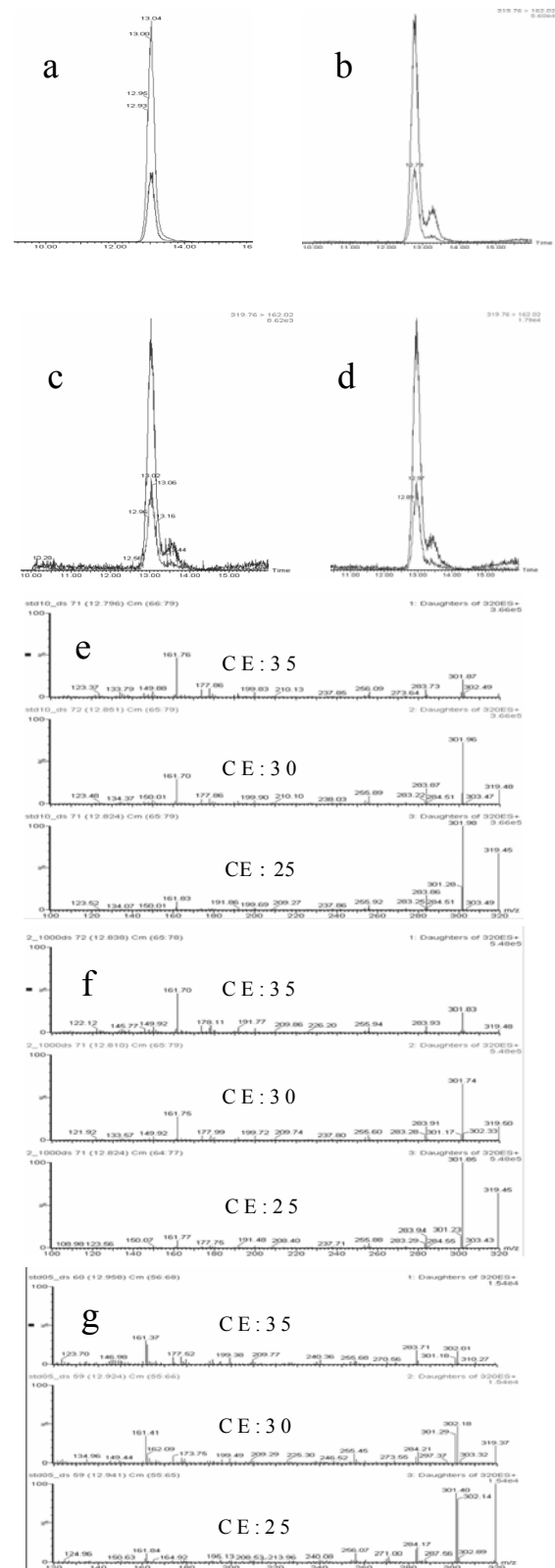
4.1). ii) のとおり, 全量 50ml に定容後, 適宜希釈し, C18(Varian 社製:Bond Elute(500mg,6ml))カートリッジに 4ml 負荷し, 最初の 2ml を捨て, 残りの 2ml をとり, 限外ろ過し試験溶液とした。

結果及び考察

1 TTX の定量及び定性

貝毒による食中毒ということで届出があったが, 摂食したものが巻貝であったこと, 本県水産研究センターの貝毒産生プランクトン監視結果等から, サキシトキシン等の貝毒ではなく, フグ毒である TTX を中毒原因物質と推定し分析を行った。調理済みキンシバイ 3 個体それぞれから 15.6, 5.4, 5.3 μ g/g, 患者入院時血清及び入院 2 日後血清から 6.83, 0.82 ng/ml, 入院 2 日後尿から 35.9 ng/ml, 患者吐物を拭き取った紙から 220 ng(15.86g 中)の TTX を検出し, 本事例はムシロガ

イ科キンシバイ *Nassarius glans* 摂食による TTX 食中毒と断定された。キンシバイ抽出液, 患者血清, 尿の MRM クロマトグラム及びプロダクトイオンスペクトル開裂変移を図 4 に示す。



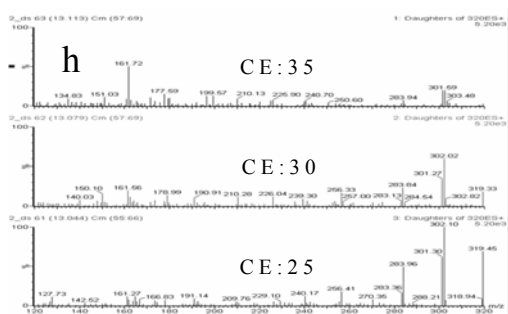


図4.TTXのMRMクロマトグラム及びプロダクトイオンスキンスペクトル変移 (a,e:TTX 標準 10ng/ml, g:TTX 標準 0.5ng/ml, b・f:キンシバイ抽出液, c・h:患者血清, d:患者尿)

TTXの最小致死量・最小急性中毒量は、それぞれ 2, 0.2mgと推定されている¹⁷⁾。分析結果から今回患者は TTXを0.107~0.376mg程度摂取したと推定されるが、極端に高濃度のTTXが内臓に偏在しているものや1個体で致死量を超えるものも存在するため^{8),9)}、推定量以上摂取している可能性も高い。

また、食中毒が発生し残品が残っていない場合、患者血清や尿等の臨床検体が有用な試料となりうる。TTXはほとんど代謝・分解せず、大部分が尿から排泄される¹⁸⁾¹⁹⁾との報告があり、TTX中毒時には特に尿が有用である。血清・尿からのTTX検出の報告はまだ少ないが、血清が0.9~26.4ng/ml(n=16)、尿が14~211ng/ml(n=17)であり、最高13日経過後の尿から検出されている²⁰⁾⁻²⁵⁾。

2 TTX 類縁体の分析

TTXの類縁体は、これまで数多く単離されている²⁶⁾。Shoji,Yotsu-Yamashitaらは、TTX類縁体のMS/MS開裂パターンを調べ、TTX類縁体は共通してm/z:162のフラグメントイオンを与えることを報告している¹⁴⁾¹⁵⁾。よって[(各TTX類縁体の分子量)+H]⁺>162を測定イオンとし、MRMで測定を行った。個体1のトータルイオンクロマトグラム(TIC)を図5に示す。

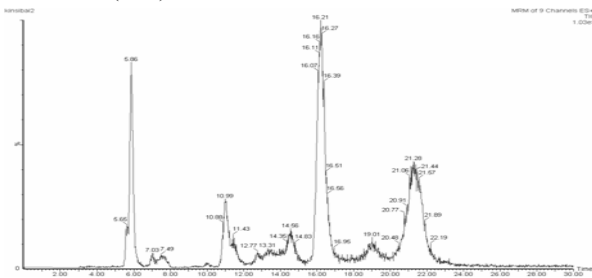


図5.キンシバイ抽出液(個体1)のMRM測定([各TTX類縁体分子量+H]⁺>162) TIC.

Nakagawaら¹³⁾が報告している各TTX類縁体の相対保持時間(RT)と比較し、個体1から5,6,11-trideoxyTTX, 11-norTTX-6(S)-ol, anhydroTTX, 11-deoxyTTX, 4-epiTTX, TTX, 個体2, 3から5,6,11-trideoxy-TTX, 4-epiTTX, TTXに相当するRTにピークが確認された。また、比較しているNakagawaらの文献には含まれないが、個体1から相対保持時間的に[M+H]⁺:288のdideoxy体と個体1, 2, 3から[M+H]⁺:336の11-oxoTTXと推定されるピークが確認された(図6)。

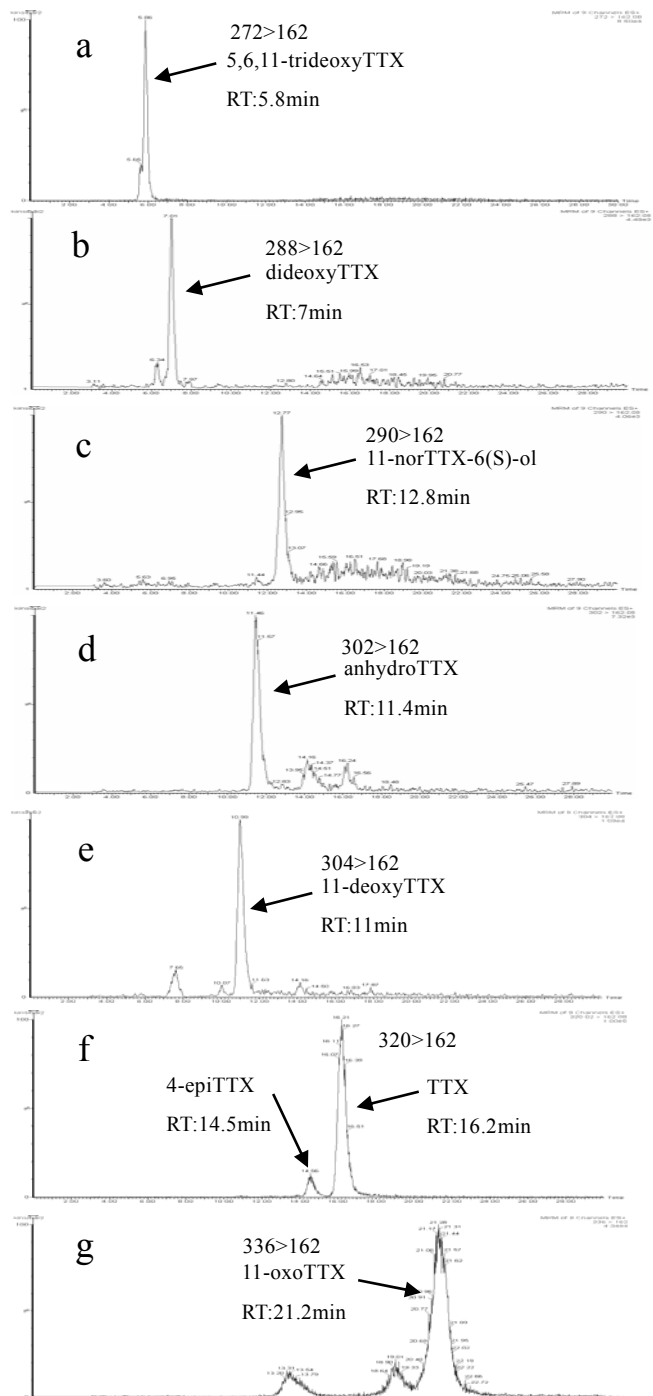
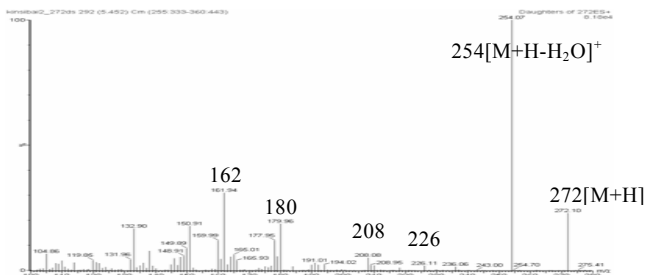


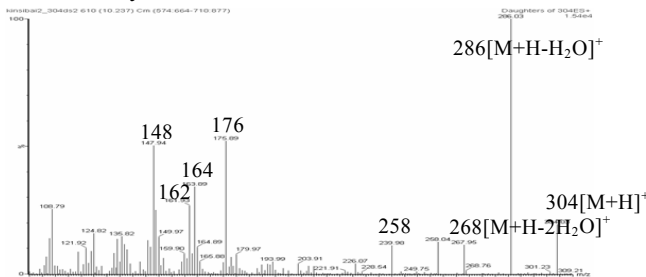
図6. MRMクロマトグラム (a:5,6,11-trideoxyTTX(272>162, RT5.8min), b:dideoxyTTX(288>162, RT7min), c:11-norTTX-6(S)-ol(290>162, RT12.8min), d:anhydroTTX(302>162, RT11.4min), e:11-deoxyTTX(304>162, RT11min), f:4-epiTTX, TTX(320>162, RT14.5, 16.2min), g:11-oxoTTX(336>162, RT21.2min)).*推定

それらについてプロダクトイオンスキャンを行った(図7)。5,6,11-trideoxyTTXについてはP.Rodriguezら²⁴⁾, Syoujiら¹⁵⁾の報告しているスペクトルとほぼ一致した。11-deoxyTTXについては, Syoujiら¹⁵⁾の報告しているスペクトルと比較し, 主なイオンである m/z :286, m/z :268, 特有のイオンである m/z :258及び特徴的なイオンである m/z :164, m/z :148を持っている。各イオン毎の相対的な強度比が弱冠異なるが, CE, MS/MSの機種及びインフュージョン測定可否かの違いによるものと考えられる。4-epiTTXについては, TTXとスペクトルがほぼ一致した。11-oxoTTXについては, O.R.Pires Jrら²⁷⁾の報告しているスペクトルとほぼ一致した。その他の類縁体と推定されるピー

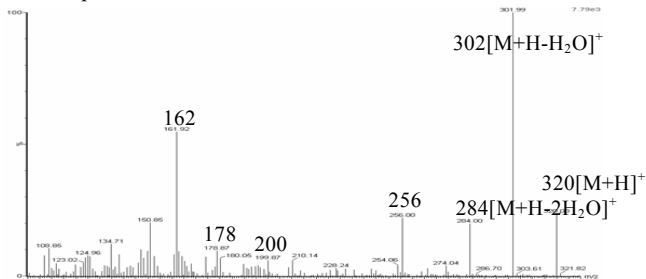
●5,6,11-trideoxyTTX



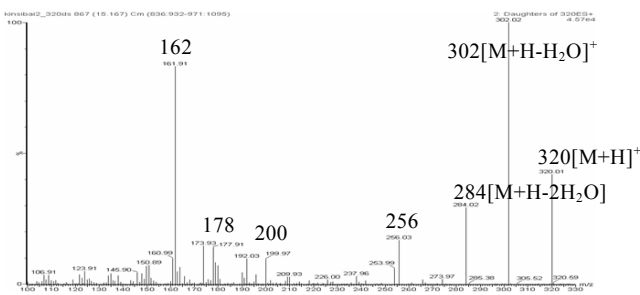
●11-deoxyTTX



●4-epiTTX



●TTX



●11-oxoTTX

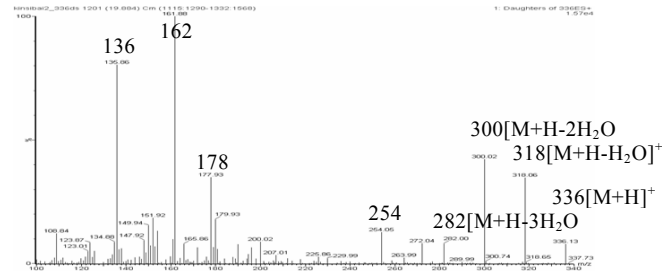


図7.プロダクトイオンスキャン測定によるスペクトル (上段から: 5,6,11-trideoxyTTX($[M+H]^+$:272), 11-deoxyTTX($[M+H]^+$:304),4-epiTTX($[M+H]^+$:320),TTX($[M+H]^+$:320), 11-oxoTTX($[M+H]^+$:336) .)

クについては,スペクトルを確認することができなかった。

5,6,11-trideoxyTTXは, M.Yotsu-Ymashitaらによってコモンフグ *fugu poecilonotus* から初めて単離・構造決定され²⁸⁾, TTXの生合成あるいは代謝経路における重要な中間体と考えられている。毒性については, 約3倍の濃度でTTXの半分の毒性程度であるとの報告がある²⁴⁾が, 他のTTX類縁体の存在及び影響の有無が文献からでは不明確である。少なくとも1/6以下であることは間違いない。Naチャンネルへの親和性はほとんどない²⁹⁾との報告もある。11-deoxyTTXは T.Yasumotoらによってシンケンイモリ *cynops ensicauda* から, 4-epiTTXは M.Nakamuraらによってフグから, 11-oxoTTXは S.S.Khoraらによってコクテンフグ *Arothron nigropunctatus* から単離・構造決定された^{30)~32)}。C11の水酸基からO(酸素)が外れた11-deoxyTTXは, TTXに比べNaチャンネル阻害作用が約1/100になり³³⁾, 4-epiTTXはTTXに比べ比毒性はかなり弱く, 比含量も小さい³¹⁾。逆に, 11-oxoTTXはTTXに比べ約4~5倍強い³⁴⁾。単純にTTXに対する比毒性が4~5倍とはならないだろうが, 少なくともTTXと同等以上である可能性が高い^{9),29),34)}。

今回の事例において, キンシバイ中の11-oxoTTXのTTXに対するクロマトグラム面積比は89, 86, 100%だ

った。標準品がないため定量できなかったが、total毒性に影響すると考えられる。キンシバイは総毒力の6~7割をTTXが占め、残余毒力の相当部分を11-oxoTTXが占めるとの報告がある⁹⁾。total毒力を把握するにはマウス試験の方が良いかもしれないが、迅速性等に欠ける。今後、機器分析する場合は、11-oxoTTX等の比毒性が高い類縁体を含め、各類縁体もモニターする必要があると考える。

また、貝類からの11-deoxyTTXの検出及びキンシバイからの5,6,11-TrideoxyTTXの検出は初めてである。

まとめ

調理済みキンシバイ 3 個体それぞれから 15.6, 5.4, 5.3 μ g/g, 患者入院時血清及び入院 2 日後血清から 6.83, 0.82ng/ml, 入院 2 日後尿から 35.9ng/ml, 患者吐物を拭き取った紙から 220ng(15.86g 中)の TTX を検出し、食中毒原因物質を特定することができた。

また、血清及び尿について、0.1%酢酸で 50 倍に希釈し、限外ろ過することで非常に簡便・迅速に TTX を検出することができた。

さらに、キンシバイ個体 1 より TTX 類縁体である 5,6,11-trideoxyTTX, 11-deoxyTTX, 4-epiTTX, 11-oxoTTX を、個体 2, 3 より 5,6,11-trideoxyTTX, 4-epiTTX, 11-oxoTTX を検出した。貝類からの 11-deoxyTTX の検出及びキンシバイからの 5,6,11-TrideoxyTTX の検出は初めてである。

機器分析で TTX 食中毒における検体試料の毒力を把握する場合、TTX に対する比毒性が高い 11-oxoTTX 等を含め、各類縁体も測定対象とし定量する必要がある。しかし、市販標準品がないため、今後、整備が望まれる。

文献

- 1) Mosher.H.S., Fuhrman.F.A., Buchwald.H.D., Fischer.H.G : *Science.*, **144**, 1100 (1964) .
- 2) T.Noguchi and Y.Hashimoto : *toxicon.*, **11**, p.305-307 (1973) .
- 3) Sheumack.D.D., Howden.M.E.H., I.Spence and Quinn.R.J. : *Science.*, **199**, p.188-189 (1978) .
- 4) T.Noguchi : *Jpn.Toxicol.EnvIRON.HaELth.*, **39**, p81-93 (1993) .
- 5) T.Noguchi, J.Maruyama, Y.Ueda, K/Hashimoto and T.Hrada : *Bull.Japan.Soc.Sci.Fish.*, **47**(7), p.909-913 (1981) .
- 6) T.Yasumoto, Y.Oshima, M.Hosaka and S.Miyakoshi : *Bull.Japan.Soc.Sci.Fish.*, **47**(7), p929-934 (1981).

- 7) H.Narita, T.Noguchi, J.Maruyama, Y.Ueda, K.Hashimoto, Y.Watanabe and K.Hida : *Bull.Japan.Soc.Sci.Fish.*, **47** (7), p.935-941 (1981) .
- 8) 酒井國嘉, 川原るみ子, 竹嶋直樹, 奥野武文, 芦塚三雄, 長島裕二, 松本拓也, 荒川修 : 平成 19 年度地域保健総合推進事業 第 2 回全国自然毒中毒研修会抄録集, p.38-40.
- 9) S.Taniyama, Y.Isami, T.Matsumoto, Y.Nagashima, T.Takatani and O.Arakawa : *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.*, **50**(1), p.22-28 (2009) .
- 10) 高谷智裕, 荒川修, 野口玉雄 : *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.*, **46**(3), J208-J209 (2005) .
- 11) 福島孝兵, 飛野敏明 : 熊本県保健環境科学研究所報, **37**, p.90-93 (2007).
- 12) 厚生労働省監修 : “食品衛生検査指針・理化学編”, p661-666 (2005), (日本食品衛生協会).
- 13) T.Nakagawa, J.jang, M.Yotsu-Yamashita : *Anal.Biochem.*, **352**, p.142-144 (2006).
- 14) 山下まり: バイオサイエンスとインダストリー, **66**(11), p.624-626 (2008).
- 15) Y.Shoji, M.Yotsu-Yamashita, T.Miyazawa and T.Yasumoto : *Anal.Biochem.*, **290**, p.10-17 (2001).
- 16) 市田弘美 : *Shokuhin Eiseigaku zasshi.*, **50**(2), J197-J198 (2009).
- 17) T.Noguchi, J.S.M.Ebesu : *J.Toxicol.Toxin.Rev.*, **20**(1), p.1-10 (2001).
- 18) C.Y.Kao : *Pharm.Rev.*, **18**(2), p.1015-1016 (1966).
- 19) Y.H.Tsai, D.F.Hwang, C.A.Cheng, C.C.Hwang, J.F.-Deng : *J.Chromatography B*, **832**, p.75-80 (2006).
- 20) 秦野真澄, 難波江芳子, 友岡美智代, 東忠英, 岡裕三, 小笠原光憲, 大瀬戸光明, 井上博雄 : 愛媛衛環研年報, **8**, p.17-20 (2005).
- 21) 高田久美代, 山田圭一, 石川憲司, 小川博美 : 広島県保健環境センター研究報告, **9**, p.27-30 (2001).
- 22) 秦野真澄, 難波江芳子, 東忠英, 岡裕三, 武智拓郎, 小笠原光憲, 大瀬戸光明, 井上博雄 : 愛媛衛環研年報, **10**, p.14-17 (2007).
- 23) K.Akaki, K.Hatano : *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.*, **47**(2), p.46-50 (2006) .
- 24) P.Rodriguez, A.Alfonso, C.Vale, C.Alfonso, P.Vale, A.Tellez and L.M.Botona : *Anal.Chem.*, **80**, p.5622-5629 (2008).
- 25) 福島孝兵, 村川弘, 吉田達雄, 吉元秀和, 飛野敏明: 日本薬学会 衛生薬学・環境トキシコロジー講演要旨集, p250 (2008).
- 26) M.Yotsu-Yamashita : *J.Toxicol.Toxin.Rev.*, **20**(1),

- p.51-66 (2001).
- 27) O.R.Pieres Jr, A.Sebben, E.F.Schwartz, C.Bloch Jr, R. A.V.Morales, C.A.Schwartz : *Toxicol.*, **42**, p.563-566 (2003).
- 28) M.Yotsu-Yamashita, Y.Yamagishi and T.Yasumoto : *J. Tetrahedron Lett.*, **36**(51), p.9329-9332 (1995).
- 29) M.Yotsu-Yamashita, A.Sugimoto, A.Takai and T.Yasumoto : *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **289**, p.1688-1696 (1999).
- 30) T.Yasumoto, M.Yotsu, M.Murata, H.Naoki : *J.Am.Chem.Soc.*, **110**(7), p.2344-2345 (1988).
- 31) M.Nakamura and T.Yasumoto : *Toxicol.*, **23**, p.271-276 (1985).
- 32) S.S.Khora, T.Yasumoto : *Tetrahedron Lett.*, **30**(33), p.4393-4394 (1989).
- 33) L.Yang, C.Y.Kao and T.Yasumoto : *Toxicol.*, **30**, p.635-643 (1992).
- 34) B.Q.Wu, L.Yang, C.Y.Kao, S.R.Levinson, M.Yotsu-amashita and T.Yasumoto : *Toxicol.*, **34**, p.407-416 (1996).