

厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）
（総括・分担）研究報告書

テトロドトキシンのリスク管理のための研究

研究代表者又は研究分担者

北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部
大城直雅 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

本分担研究では、正確に定量したフグ毒テトロドトキシン（TTX）を用いて、TTX濃度を合わせた上で、この溶解液（溶媒：0.1%酢酸：マウス検定法の場合と同一）と、マウス検定法で使用される TTX を含むフグ粗毒原液（肝、卵巣、筋肉由来）由来の調整液との急性毒性のハザード（毒力）を、マウス毒性試験（腹腔内投与及び経口毒性）により比較検討し、以下の本研究全体の目標に貢献する事を目的とする。すなわち、フグ卵巣の糠漬けなど長期間塩蔵処理することにより人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの部位を対象とした 10 マウスユニット(MU)/g の基準値の妥当性について検証し、必要に応じてより合理的な基準値を提案する事を念頭に置いた。

平成 30 年度（今年度）は、市販の生化学用テトロドトキシンの溶液（溶媒：0.1%酢酸液）を ddY 雄性マウス（4 週齢）に腹腔内投与した際の、マウスユニット算出法の検討をおこなった。1.82 MU と予想された TTX の 0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の投与液を用いて検討した結果、この毒力は 1.92 MU と算出され、概ね予想される結果が得られた。

また 7 週齢のマウスを用いて、強制経口投与による用量設定予備実験（0, 100, 300, 500, 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）（各群 3 匹）を実施した。その結果、500 および 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では、各 3 匹全例の死亡が認められた。一方、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下の投与群では死亡例が認められなかった。したがってこの実験結果からは半数致死量（LD₅₀ 値）は、300 以上 500 未満 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と考えられた。この点、欧州食品安全機関（EFSA、European Food Safety Authority）の報告書では、経口投与における TTX の LD₅₀ 値を 232～532 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と、ほぼ同様な結果を報告している。別途 RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances) 情報では、マウス（系統、性別や週齢は不明）経口投与による TTX の LD₅₀ 値を 334 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と報告しており、この結果も当方の実験結果と合致する。したがって、TTX の経口投与による LD₅₀ 値は、再現性が高いものと推察された。

来年度以降は、別課題「1. フグ毒 TTX の qNMR 法の開発と標準毒の調製」から提供された TTX 調整液（溶媒：0.1%酢酸液）ならびに、食品衛生検査指針でのマウス検定法で使用されるフグ粗毒原液（肝、卵巣、筋肉由来）を用いて、両者の TTX 濃度を一致させるよう調整した上で、食品衛生検査指針での「マウス毒性試験」（溶媒対照群は設置する）をおこない、両者のマウスユニットを求めることによる毒力比較をおこなう予定である。進捗に応じて、フグの無毒部分（皮膚など）への TTX 添加実験による投与影響も考慮し、この結果も比較検討する予定である。

A．研究目的

フグの安全性確保については、現行のフグに係る規制（処理等により人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類、部位等）の遵守により食中毒の発生を防止している。さらに、フグ卵巣の糠漬けなどについては10 MU/gの規制値を設けてリスク管理がなされている（フグの衛生確保について（昭和58年12月2日環乳第59号）。しかし、基準値についての科学的な妥当性については十分に検証されていない。

近年、二枚貝からフグ毒テトロドトキシン（TTX）が検出され、EUにおいて貝類のTTXのリスク評価が行われ、TTXのリスクは国際的に注目されるようになってきている。欧州食品安全機関（EFSA）が取りまとめた報告書では、既往知見であるヒトに対する最低致死用量が2 mgであることに疑問が示された。その一方で、マウス腹腔内投与毒性における半数致死量（LD₅₀）を9～12.5 μg/kg、経口投与におけるLD₅₀を232～532 μg/kgと推定し、また「単回経口投与の際の無気力状態（apathy）という一般状態変化を指標」とした急性参照用量（ARfD）を0.25 μg/kgBWと導出し、貝類を400グラム喫食した場合のヒトに対し有害な影響をもたらさない貝肉中の含有量を44 μgTTX等量/kg貝肉と推定している。ARfDとは、ヒトがある物質を24時間以内に経口摂取した場合に、健康に悪影響を示さないと推定される一日当たりの摂取量である。この報告書では、今後、解明すべき研究項目として、二枚貝などにおけるTTXの汚染状況や蓄積動態の解明、分析用TTX標準物質の製造、調理によるTTXの分解動態、TTXやその類縁体の急性経口毒性の解明などがあげられている。

毒性試験で利用する標準毒は、正確な濃度決定（値付け）が必要であるが、TTXにおいて正確な値付け法は未だに開発されていない。近年、定量核磁気共鳴法（qNMR）が国際単位系（SI）トレーサブルな高精度測定法である「一次標準測定法」の候補として検証が続けられており、下痢性貝毒オカダ酸群などの値付け法として有望であることが報告されている。

そこで本研究では、主としてqNMRによるTTX

やTTX類縁体の正確な定量法を開発し、正確に定量したTTXを用いて毒力を評価し、一方で、TTXを対象としたLC/MS/MS法を用いてフグやフグ糠漬けに含まれるTTXやTTX類縁体含量を定量して、わが国のフグに係る規制の妥当性を確認する。すなわち、フグ卵巣の糠漬けなど長期間塩蔵処理することにより人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの部位を対象とした10マウスユニット（MU）/gの基準値の妥当性について検証し、必要に応じてより合理的な基準値を提案する。

本分担研究では特に、正確に定量したTTXを用いて、TTX濃度を合わせた上で、この溶解液（溶媒：0.1%酢酸：マウス検定法の場合と同一）と、マウス検定法で使用されるTTXを含むフグ粗毒原液（肝、卵巣、筋肉由来）由来の調整液との急性毒性のハザード（毒力）を、マウス毒性試験（腹腔内投与及び経口毒性）により比較検討し、以下の本研究全体の目標に貢献する事を目的とする。すなわち、フグ卵巣の糠漬けなど長期間塩蔵処理することにより人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの部位を対象とした10 MU/gの基準値の妥当性について検証し、必要に応じてより合理的な基準値を提案する事を最終的な目標として検討を進めることとした。なお、1 MU（体重20gの雄性ddYマウスを腹腔内投与にて30分で死亡させる量）は、TTX 0.22 μgに相当すると考えられている（食品衛生検査指針）。

B．研究方法

平成30年度は、食品衛生検査指針に収載されるマウス検定法にしたがった予備実験、すなわちフグ粗毒原液ではなく、市販の生化学用テトロドトキシン（95.7%）の溶液（溶媒：0.1%酢酸液）をddY雄性マウス（4週齢）マウスに腹腔内投与した際の、マウスユニット（MU）算出法の検討をおこなった（以降、MU算出予備実験）。また7週齢のマウスを用いて、強制経口投与による用量設定予備実験を実施した（以降、経口投与用量設定予備実験）。

平成31年（令和元年）度は、別課題「1.フグ毒TTXのqNMR法の開発と標準毒の調製」から提供

されたTTX調整液(溶媒:0.1%酢酸液)ならびに、食品衛生検査指針でのマウス検定法で使用されるフグ粗毒原液*(肝、卵巣、筋肉由来)を用いて、両者のTTX濃度を一致させるよう調整した上で、食品衛生検査指針での「マウス毒性試験」(急性)(腹腔内投与)(群構成、週齢などは食品衛生検査指針でのマウス検定法に準ずる。ただし、溶媒対照群はおく)をおこない、両者のマウスユニットを求めることによる毒力比較をおこなう予定である。進捗に応じて、フグの無毒部分(皮膚など)へのTTX添加実験による投与影響も考慮する。

令和2年度は、前年度に引き続き「1. フグ毒TTXのq NMR法の開発と標準毒の調製」から提供されたTTX調整液(溶媒:0.1%酢酸液)ならびに、食品衛生検査指針でのマウス検定法で使用されるフグ粗毒原液(肝、卵巣、筋肉由来)を用いて、両者のTTX濃度を一致させるよう調整した上で、フグ毒摂取経路である経口投与による、常法によるマウス急性毒性試験をおこない(系統、週齢、性などは食品衛生検査指針の場合のものと同じとするが、溶媒対照群は設置する)急性毒性における無毒性量の算出を試みる予定である。

さらに、EFSAの報告におけるTTXのARfDとの比較をおこない、あるいはTTXの現行のフグに係る10 MU/g規制値について検証し、必要に応じて科学的な根拠に基づく新たなリスク評価のための基礎資料を提供する。

*:粗毒原液の抽出法(食品衛生検査指針):フグの組織磨砕物10 gをピーカーに採取し、0.1%酢酸25 mLの中で、沸騰浴中でときどきかくはんしながら加熱(10分間)その後、冷却、減圧濾過によりろ紙上の残渣を0.1%酢酸で反復洗浄し、濾液を合して50 mLとする。

B-1: 被検物質

テトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX) (生化学用); 分子量319.27、CAS No. 4368-28-9、富士フィルム和光純薬(株)を、予備実験用に使用した。

カタログ番号: 206-11071

ロット番号 : LKG5746

純度 : 95.7 % [HPLC]

なお本実験用である別課題「1. フグ毒TTXのq NMR法の開発と標準毒の調製」から提供された正確に定量されたTTXは、鈴木敏之先生(中央水産研究所 水産物応用開発研究センター センター長)より入手済みである(2019年・平成31年1月29日)。

B-2: 投与液の作製

MU算出予備実験用には、溶媒は0.1%酢酸とし、酢酸(試薬特級・医薬品試験用、012-23325、Lot APL3147、純度100.0%、富士フィルム和光純薬(株)を注射用蒸留水(日本薬局方 大塚蒸留水、K7L82、大塚製薬)にて希釈した。投与に際しては、まず1 mgのテトロドトキシンを1 mlの注射用蒸留水に溶解させ(1 mg/ml原液)これを0.1%酢酸液にて適宜希釈し、1.82 MUと予想(1 MU = テトロドトキシン 0.22 µgとした場合)されるTTX投与液[0.40 µg/ml]を作製した。投与容量は、食品衛生検査指針に従い、マウス1匹あたり1 ml(腹腔内投与)とした。この理由は、食品衛生検査指針でのマウス検定法では、はじめの試験(予備試験)で、致死時間が7~13分程度になるように濃度を調製し希釈する必要があるためである(2.39~1.42 MU = テトロドトキシン 0.53~0.31 µg)。

なお、経口投与用用量設定予備実験用にも、同様に調整し(溶媒:0.1%酢酸)投与容量は、マウス体重100gあたり1mlとした。

B-3: 投与方法

MU算出予備実験用には、マウスに、用時調整した被検物質投与液を、1 ml用プラスチック製注射筒(テルモ ディスポシリンジ、SS-01T ツベル 1 ml、テルモ)および26G注射用針(テルモ注射針、NN-2613S、161125D、テルモ)を用いて腹腔内投与を実施した。

なお、経口投与用用量設定予備実験用の場合には、金属製胃ゾンデ(KN-348、夏目製作所)と同様のシリンジにて強制経口投与を実施した。

B-4：使用動物

MU算出予備実験用には、食品衛生検査指針でのマウス検定法に従い、4週齢の雄性ddYマウス(日本SLC)を購入後、翌日に一般状態を確認し、体重別層化無作為抽出法により群分けをおこない、20匹から選別し、一つの試験に供した。動物は、マウス用 IVC 個別換気式ケージシステム (W19.7×L34.0×H13.8 cm、ポリエチレンテレフタレート製インナーケージ使用) にて群飼育 (4 匹/ケージ) し、室温23±1、湿度50±5%、換気回数15回/時間、照明12時間 (8時～20時) 点灯、12時間 (20時～8時) 消灯という環境下、ケモハザード対応の動物飼育室で飼育した。また、餌はCRF-1固形飼料 (オリエンタル酵母工業) を与え、水は水道水を給水ビンにて自由摂取させた。日内変動を考慮し、午前10時から20分間以内に投与を終了した。

なお、経口投与用量設定予備実験の場合では、同系統7週齢のマウスを用いて検討した。

B-5：実験群の構成

MU算出予備実験用には、食品衛生検査指針のマウス検定法に従い、1) 予備試験用に2匹、2) 本試験用に3匹 (この匹数は、予備試験で致死時間が7～13分にあったため本試験の最初の2匹が省略されたためである) の計2群、5匹とした。

経口投与予備実験用には、各投与用量 (0, 100, 300, 500, 700 μg/kg) につき3匹ずつ、計5群、15匹とした。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成27年4月版)」。

B-6：投与液中TTX濃度の定量分析

マウスへの投与実験に使用したTTX投与液 (B-2に記載) に含まれるTTXをLC-MS/MSで定量分析し

た。装置にAgilent Technologies社製の高速液体クロマトグラム-トリプル四重極型質量分析計 (LC: Agilent 1290 Infinity、MS: Agilent 6460 Triple Quad MS) を使用した。以下に測定条件を示した。

分析カラム: InertSustain Amide (2.1 × 75 mm, 3 μm)

移動相A: 水 (0.25 mMギ酸、2.5 mMギ酸アンモニウム)

移動相B: 95%アセトニトリル (0.25 mMギ酸、2.5 mMギ酸アンモニウム)

カラム温度: 45

アイソクラティック分析: 71%B (15分間)

流速: 0.4 mL/min

注入量: 5 μL

イオン源: ESI (Agilent Jet Stream, Positive)

ドライガス: N₂ (300、12 L/min)

ネブライザー: N₂ (55 psi)

シースガス: N₂ (380、11 L/min)

キャピラリー電圧: 3,500 V

ノズル電圧: 500 V

フラグメンター電圧: 135V

コリジョンエネルギー: 35 eV

コリジョンガス: N₂

測定モード: MRM

モニターイオン: m/z 320 > m/z 302

m/z 320 > m/z 162

m/z 320 > m/z 60

また、投与液中にTTX以外の類縁体が存在するか確認するために、SCANモードおよびSIMモードでの測定を行った。

SCANモードの測定範囲: m/z 250-350

SIMモードのモニターイオン

TTX, *epi*TTX: m/z 320

deoxyTTX: m/z 304

anhydroTTX: m/z 302

dideoxyTTX: m/z 288

trideoxyTTX: m/z 272

11-oxo-TTX: m/z 336

TTX投与液 (0.40 μg/mLに調製した0.1%酢酸溶液) を0.1%酢酸水で2倍希釈し、次いで80%アセトニト

リル(0.1%酢酸)で10倍希釈、さらに50%アセトニトリル(0.1%酢酸)で4倍希釈したものをMRM測定用溶液(マウス投与液の80倍希釈液)とした。

定量分析に使用した標準溶液は、Laboratorio CIFGA S.A.製の認証標準物質(CRM-03-TTXs)で値付けしたTTX溶液(富士フィルム和光純薬工業株式会社製、細胞生物学用、蒸留水で希釈したもの)を使用し、投与液と同様に測定液を調製した。

B-7: TTX溶液の安定性試験

マウスへの投与実験に際し、溶液中のTTXの安定性及び類縁体への変換を明らかにするために、-30、4、および25の遮光条件下で保存し、LC-MS/MS分析に供した。LC-MS/MS測定はSCANおよびMRMはモードとし、B-6記載の条件下で行った。SCANモードの測定範囲は m/z 250-350、MRMモードのモニターイオンとして以下を設定した。

TTX, <i>ep</i> /TTX :	m/z 320 > m/z 162
deoxyTTX :	m/z 304 > m/z 162
anhydroTTX :	m/z 302 > m/z 162
dideoxyTTX :	m/z 288 > m/z 162
trideoxyTTX :	m/z 272 > m/z 162
11-oxo-TTX :	m/z 336 > m/z 318
	m/z 336 > m/z 162
	m/z 336 > m/z 136

TTX標準品として、富士フィルム和光純薬工業株式会社製(テトロドトキシン、細胞生物学用、1 mg、クエン酸含有; 以下、Wako-TTX)およびLatoxan社製(TETRODOTOXIN, Citrate free、1 mg; 以下、Latoxan-TTX)を用いた。Wako-TXを超純水に溶解し10mLに調製したものをWako-TTX原液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)とした。これを超純水で希釈して0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液を調製し、0.5 mLずつガラス製褐色バイアルに小分けし、アルミホイルで遮光したものを各温度条件下で保存した。Latoxan-TTXを0.1%酢酸に溶解し10 mLに調製したものを、Latoxan-TTX原液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)とした。これを0.1%酢酸で希釈して0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液を調製し、0.5 mLずつガラス製褐色バイアルに小分けし、アルミホイルで遮光したものを各温度条件下

で保存した。各条件下で保存した溶液を80%アセトニトリル(0.1%酢酸含有)で2倍希釈したものをSCANモードでの測定に供し、これをさらに50%アセトニトリル(0.1%酢酸含有)で20倍希釈したものをMRMモードでの測定に供した。

C. 研究結果及び考察

C-1: MU算出予備実験:

食品衛生検査指針でのマウス検定法にしたがった予備実験、すなわちフグ粗毒原液ではなく、市販の生化学用テトロドトキシン(95.7%)の溶液(溶媒:0.1%酢酸液)を4週齢のddY雄性マウスに腹腔内投与した際の、マウスユニット(MU)算出法の検討をおこなった。この際、0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のTTX溶液を使用した。この理由は、食品衛生検査指針でのマウス検定法では、はじめの試験(予備試験)で、致死時間が7~13分程度になるように投与液を希釈する必要があるためである。なお、1 MUをテトロドトキシン 0.22 μg とした場合、0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TTX溶液をマウスに1 ml投与すると、1.82 MUと予想された。

予備試験では、0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のTTX溶液を体重がそれぞれ19.7および19.9 gのマウスに腹腔内投与(マウス1匹あたり投与容量1 ml)したところ、両マウス共に投与後7分で数回跳び上がり、その後それぞれ投与8分42秒および8分15秒後に死亡した(呼吸停止)。

この結果を受け、本試験では、体重がそれぞれ20.7、20.4および20.5 gのマウスに予備試験と同様に、0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のTTX溶液を腹腔内投与したところ、それぞれ投与後6、8および12.5分で数回跳び上がり、その後それぞれ投与6分55秒、9分00秒および13分37秒後に死亡した(呼吸停止)。

したがって、計5匹の中央致死時間は、投与8分42秒後となった。食品衛生検査指針でのマウス検定法における表7.1よりMUは1.92 MUと算出された。以上の結果を、別添資料1として示す。

食品衛生検査指針でのマウス検定法に記載がある通り、1 MUをテトロドトキシン 0.22 μg とした場合、0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を1 ml投与すれば、1.82 MUと予想されたが、MU算出予備実験の結果からは

この溶液の毒力は1.92 MUと算出され、ほぼ予想通りの結果が得られたものとする。

来年度（令和元年度）は、別課題「1. フグ毒 TTXのq NMR法の開発と標準毒の調製」から提供されたTTX調整液（溶媒：0.1%酢酸液）ならびに、食品衛生検査指針でのマウス検定法で使用されるフグ粗毒原液（肝、卵巣、筋肉由来）を用いて、両者のTTX濃度を一致させるよう調整した上で、食品衛生検査指針での「マウス毒性試験」（溶媒対照群は設置する）をおこない、両者のマウスユニットを求めることによる毒力比較をおこなう予定である。進捗に応じて、フグの無毒部分（皮膚など）へのTTX添加実験による投与影響も考慮し、この結果も比較検討する。

今年度（平成30年度）の計画は、予定よりも遅れた。この遅れの主な理由は、動物実験は所属研究機関の指針を遵守して行うことから、動物実験計画につき承認を得る必要があるが、この手続きに、当初の予想をさらに超えて時間がかかったためである。すでに承認を得ており（2018年・平成30年12月7日に承認）、今後は、円滑な進捗を行えるものとする。

C-2: 経口投与用量設定予備実験:

7週齢の ddY 雄性マウスを用いて、強制経口投与の場合の用量設定実験を実施した。7週齢である理由は、MU 算出予備実験の際の余剰動物を用いたためである。市販の生化学用テトロドトキシン（95.7 %）の溶液（溶媒：0.1%酢酸液）を7週齢の ddY 雄性マウスに強制経口投与（0, 100, 300, 500, 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）（各 $n=3$ ）した際の急性毒性（一般状態、致死量ならびに致死時間）を観察した。

500（投与52分に1匹、2時間後に2匹死亡）および700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群（各投与44分、43分および1時間後に死亡）では、各3匹全例で死亡が認められた。死亡する2分程度前に数回跳び上がりが認められた。一方、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下の投与群では死亡例が認められなかった。したがってこの実験結果からは LD_{50} 値は、300以上500未満 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と考えられた。EFSA の報告書では、経口投与における TTX の LD_{50} 値を232~532 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とあり、ほぼ

同様な結果を報告している。別途 RTECS 情報では、マウス（系統、性別や週齢は不明）経口投与による TTX の LD_{50} 値を 334 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と報告しており、この結果も当方の実験結果と合致する。したがって、TTX の経口投与による LD_{50} 値は、再現性が高いものと推察された。

100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で、投与約20分後に、EFSA の報告書に記載のある ARfD の算出根拠となった無気力状態 (apathy) と推察される一般状態の変化を観察した。すなわち、目を開けたまま自発運動が低下し、斜めに横たわる状態である（なお音には反応し、ケージ内の複数のマウスは離れている）。以上の結果を、別添資料2として示す。

C-3: 投与液中TTX濃度の定量分析

マウスへの投与実験に使用した投与液を80倍に希釈し、MRMモードで3回測定した平均値は3.87 ng/mL であったため、投与液中のTTX濃度を0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と決定した。なお、投与液中にはTTX以外の類縁体として溶出順位から推定された微量の4,9-anhydroTTXおよび4-epiTTXが検出された。これらのピーク面積値はそれぞれ51,400および34,600でありTTXのピーク面積値（4,760,000）の1%程度であったため、マウス毒性への寄与は小さいものと考えられた。なお、LC-MS/MS測定結果としてSCANモードおよびMRMモードのクロマトグラムを別添資料3に記載した。

C-4: TTXの安定性

マウスへ投与する投与液中のTTXの安定性およびTTX類縁体への変換状況を確認するために、Wako-TTXおよびLatoxan-TTXを25、4および-30で保存し、1週間、4週間、8週間後にLC-MS分析した。なお、各試料のクロマトグラムを別添資料4に記載した。

Wako-TTX

調製直後の溶液ではTTX以外の類縁体として4-epiTTXおよび4,9-anhydroTTXが痕跡程度に検出されたが、TTXのピークに比較して極めて低いことから毒性への影響は少ないものと考えられ

る。

-30 保存では8週間経過後もTTX以外の類縁体への変換は確認されなかった。

4 および25 保存では1週間後に4-*epi*TTXが検出され、8週間後までTTXとのピーク面積値比はほぼ一定であった。

Latoxan-TTX

調製直後のクロマトグラムからWako-TTXと比較して4-*epi*TTXおよび4,9-anhydroTTXの割合が高く純度としてはWako-TTXよりも低いことが確認された。

-30 保存4 保存および25 保存のいずれでも8週間経過後も4,9-anhydroTTXおよび4-*epi*TTXの大幅な増加は確認されずWako-TTXよりも安定であることが確認された。

以上のことより、TTXは0.1%酢酸溶液中で保存すれば、長期間にわたり安定であることが確認された。

D. 結論

平成30年度(今年度)は、市販の生化学用テロドトキシン(富士フイルム和光純薬)の溶液(溶媒:0.1%酢酸液)をddY雄性マウス(4週齢)に腹腔内投与した際の、マウスユニット算出法の検討をおこなった。1.82 MUと予想されたTTXの0.40 $\mu\text{g/ml}$ の投与液を用いて検討した結果、この毒力は1.92 MUと算出され、ほぼ予想通りの結果が得られたものとする。

また同系統7週齢のマウスを用いて、強制経口投与の場合の用量設定予備実験(0, 100, 300, 500, 700 $\mu\text{g/kg}$)(各群3匹)を実施した。その結果、500および700 $\mu\text{g/kg}$ 投与群では、各3匹全例で死亡が認められた。一方、300 $\mu\text{g/kg}$ 以下の投与群では死亡例が認められなかった。したがってこの実験結果からはLD₅₀値は、300以上500未満 $\mu\text{g/kg}$ と考えられた。この点、EFSAの報告書では、経口投与におけるTTXのLD₅₀値を232~532 $\mu\text{g/kg}$ と、ほぼ同様な結果を報告している。別途RTECS情報では、マウス(系統、性別や週齢は不明)経口投与によるTTXのLD₅₀値を334 $\mu\text{g/kg}$ と報告しており、この結果も当方の実験結果と合

致する。したがって、TTXの経口投与によるLD₅₀値は、再現性が高いものと推察された。

来年度(令和元年度)は今年度の結果を受け、別課題「1.フグ毒TTXのqNMR法の開発と標準毒の調製」から提供されたTTX調整液(溶媒:0.1%酢酸液)ならびに、食品衛生検査指針でのマウス検定法で使用されるフグ粗毒原液(肝、卵巣、筋肉由来)を用いて、両者のTTX濃度を一致させるよう調整した上で、食品衛生検査指針での「マウス毒性試験」(溶媒対照群は設置する)をおこない、両者のマウスユニットを求めることによる毒力比較をおこなう予定である。進捗に応じて、フグの無毒部分(皮膚など)へのTTX添加実験による投与影響も考慮し、この結果も比較検討する予定である。

E. 健康危機情報
なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoko Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. Commun Biol 2, Article number: 57, 2019.

Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, Kitajima S, Shibutani M, Furukawa S, Hirose A., Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N,N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt. Fund Toxicol Sci 5: 167-170, 2018.

2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on_Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of neurobehavioral toxicity. OpenTox Asia Conference 2018 (2018.5.24.) Tokyo, Japan

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測と情動認知行動解析、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.18.)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between PPAR and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018.7.6-10) Chicago, USA

菅野 純、小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析 ヒストン修飾を中心に、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

夏目やよい、相崎健一、北嶋 聡、水口賢司、菅野純、TargetMineによる標的予測、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

Naomasa OSHIRO, Hiroya NAGASAWA, Mio NISHIMURA, Kyoko KUNIYOSHI, Toshiaki TANIGAWA, Yoshiko SUGITA-KONISHI, Katsunori TACHIHARA, Hiroshi ASAKURA, Takeshi YASUMOTO. LC-MS Analysis of ciguatoxins in *Variola louti* collected off the Japanese Waters, 52nd UJNR Toxic Microorganisms Panel Scientific meeting, (2018.04.24) 川崎市

Naomasa Oshiro, Kyoko Kuniyoshi, Shigeyoshi Yamamoto, Takuma Yamada, Ayano Hotta, Takafumi Suzuki, Noriko Sugita, Keiichi Matsuura, Akie Nakashima, Yoichi Anzai, Hiroshi Asakura. Analysis of tetrodotoxin in

flesh of a pufferfish, *Takifugu flavipterus*, collected from the Seto Inland Sea, Japan, 18th International Conference on Harmful Algae (ICHA2018), (2018.10.21-26) Nantes, France.

Naomasa Oshiro, Hirohide Okubo, Mami Ito, Kyoko Kuniyoshi, Takashi Kojima, Katsunori Tachihara, Hiroshi Asakura, Takeshi Yasumoto. Determination of Ciguatoxins in the Moray Eel *Gymnothorax javanicus* from Okinawa and Amami Islands, Japan, 18th International Conference on Harmful Algae (ICHA2018), (2018.10.21-26) Nantes, France.

Mika Nagae, Tomoji Igarashi, Kyoko Kuniyoshi, Naomasa Oshiro, Takeshi Yasumoto. A single validation study on matrices-insensitive test procedure for quantitative analysis of the Pacific type ciguatoxins in fish, 18th International Conference on Harmful Algae (ICHA2018), (2018.10.21-26) Nantes, France.

Takeshi Tsumuraya, Takeshi Sato, Naomasa Oshiro, Masahiro HIRAMA, Ikuo Fujii, Highly Sensitive and Practical Fluorescent Sandwich ELISA for Ciguatoxins, 18th International Conference on Harmful Algae (ICHA2018), (2018.10.21-26) Nantes, France.

松田りえ子, 荒川史博, 納屋隆行, 大城直雅. ホタテガイ中オカダ酸分析技能試験プログラムの開発及び統計学的評価, 日本食品衛生学会第114回学術講演会, (2018.11.15-16) 広島市.

中島安基江, 福原亜美, 井原紗弥香, 安部かおり, 大城直雅. 瀬戸内海産コモンフグの毒性調査, 第55回全国衛生化学技術協議会年会, (2018.11.29-30) 横浜市.

永山敏廣, 高取聡, 根本了, 藤本啓, 高橋正幸,

村上太郎， 大城直雅， 小木曾基樹， 小島尚， 高野伊知郎， 松木宏晃， 三宅司郎， 宮下隆， 望月直樹． 衛生試験法・注解 高速液体クロマトグラフィーによるコルヒチンまたは下痢性貝毒の定性および定量(新規)， (2019.03.20-23) 日本薬学会第 139 年会， 千葉市．

大城直雅． 海産生物毒の規制と検査， 日本薬学会第 139 年会 一般シンポジウム S65 衛生試験法・注解シンポジウム 食品にかかわるレギュレーションと実際， (2019.03.20-23) 千葉市．

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

別添資料1 MU算出予備実験の結果：

食品衛生検査指針でのマウス検定法に従い、市販の生化学用テトロドキシンの溶液（溶媒：0.1%酢酸液）を ddY 雄性マウス（4 週齢）に腹腔内投与した際の、マウスユニット算出法の検討をおこなった（1.82 MU と予想された 0.40 µg/ml の濃度の TTX 溶液を使用）

「予備試験」の結果

動物番号	体重 (g)	致死時間と死亡時間の順位	一般状態など
1	19.7	8:42	投与7分後に跳び上り(跳躍)
2	19.9	8:15	投与7分後に跳び上り(跳躍)

「本試験」の結果

動物番号	体重 (g)	致死時間と死亡時間の順位	一般状態など
3	20.7	6:55	投与6分後に跳び上り(跳躍)
4	20.4	9:00	投与8分後に跳び上り(跳躍)
5	20.5	13:37	投与12.5分後に跳び上り(跳躍)

中央致死時間： 8:42 （体重 19.7 g）

表 7.1 より 1.92 MU と算出した （以下の表は表 7.1 より抜粋）

致死時間	MU
8:30	1.96
8:33	1.95
8:36	1.94
8:39	1.93
8:42	1.92
8:45	1.91

なお表 7-2 で体重補正をした場合は、 $1.92 \times 0.99 = 1.90$ MU となる

別添資料2 経口投与用量設定予備実験の結果：

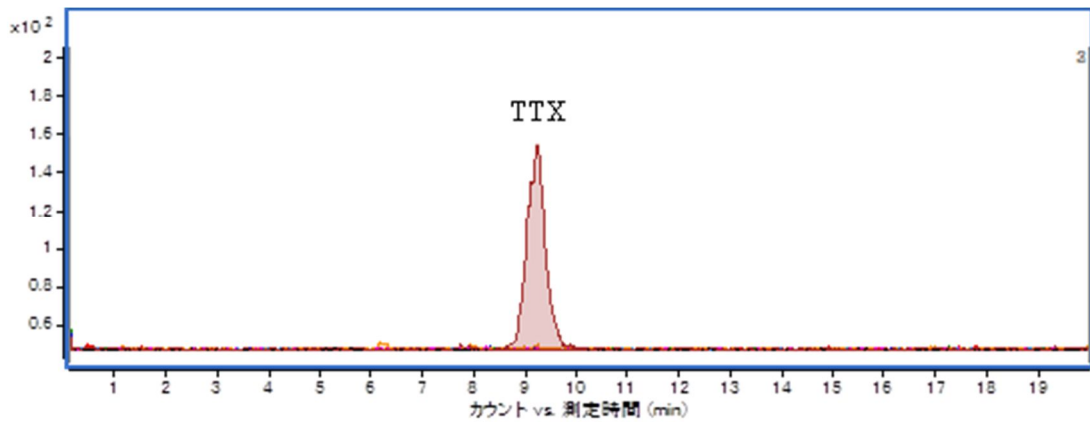
7週齢のマウスを用いて、TTXの強制経口投与による用量設定予備実験(0, 100, 300, 500, 700 µg/kg)(各群3匹)を実施した際の結果のまとめ(投与容量は10 ml/kg体重)。半数致死量は、300以上500未満 µg/kgと考えられた

群(ug/kg)	動物番号	体重(g)	投与時刻	一般状態の変化など
0	1	38.9	14:08	
	2	39.2	-	
	3	38.8	14:09	
100	4	41.0	14:10	投与後14分(1/3) 16分(3/3) Apathy
	5	37.3	14:11	
	6	34.0	14:11	投与後38分 活動回復、48分 3/3 リカバリー 摂餌あり
300	7	38.9	14:12	投与後11~12分 14分(3/3) (20分(1/3)) Apathy
	8	42.0	14:13	投与後39分 チェーンストーク型呼吸(Apathy中)
	9	50.3	14:13	投与後1時間 3/3 回復
500	10	40.0	14:14	投与後10-11分(1/3) 13分(2/3) 14分(3/3)、(18分(2/3)) Apathy
	11	38.6	14:14	投与後39分 チェーンストーク型呼吸(Apathy中)
	12	39.4	14:14	No.11 投与後51分跳躍、52分死亡 (No.10及び12 投与後約2時間で死亡確認)
700	13	40.3	14:15	投与後7分20秒 自発低下、8分 横たわり、9分30秒(3/3) Apathy
	14	38.9	14:15	投与後39分 チェーンストーク型呼吸(Apathy中)
	15	39.2	14:16	No.14 投与後40分死亡確認、No.13 投与後43分跳躍 44分死亡、No.15 投与後1時間3分跳躍、1時間5分死亡

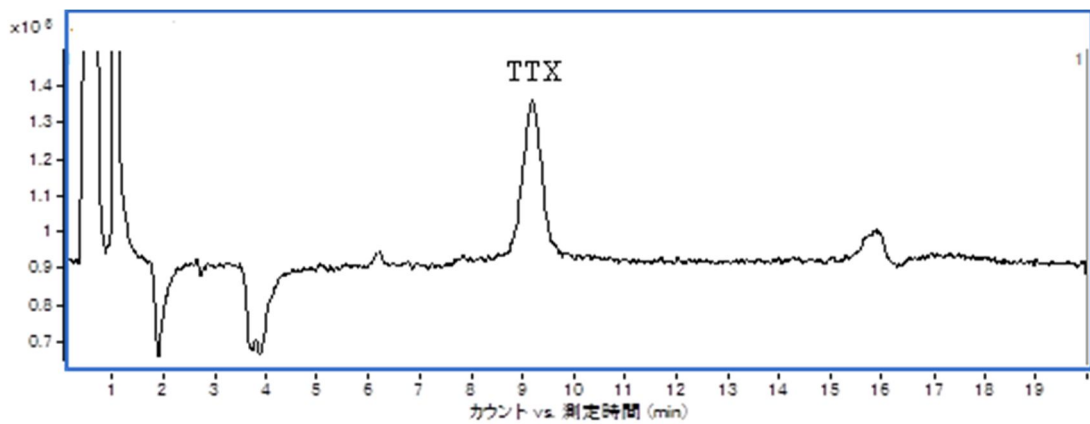
Apathy : 目を開けたまま斜めに横たわる(自発運動低下)(なお音には反応し、ケージ内マウスはお互いに離れている)

別添資料3 投与液の LC-MS/MS 分析結果：

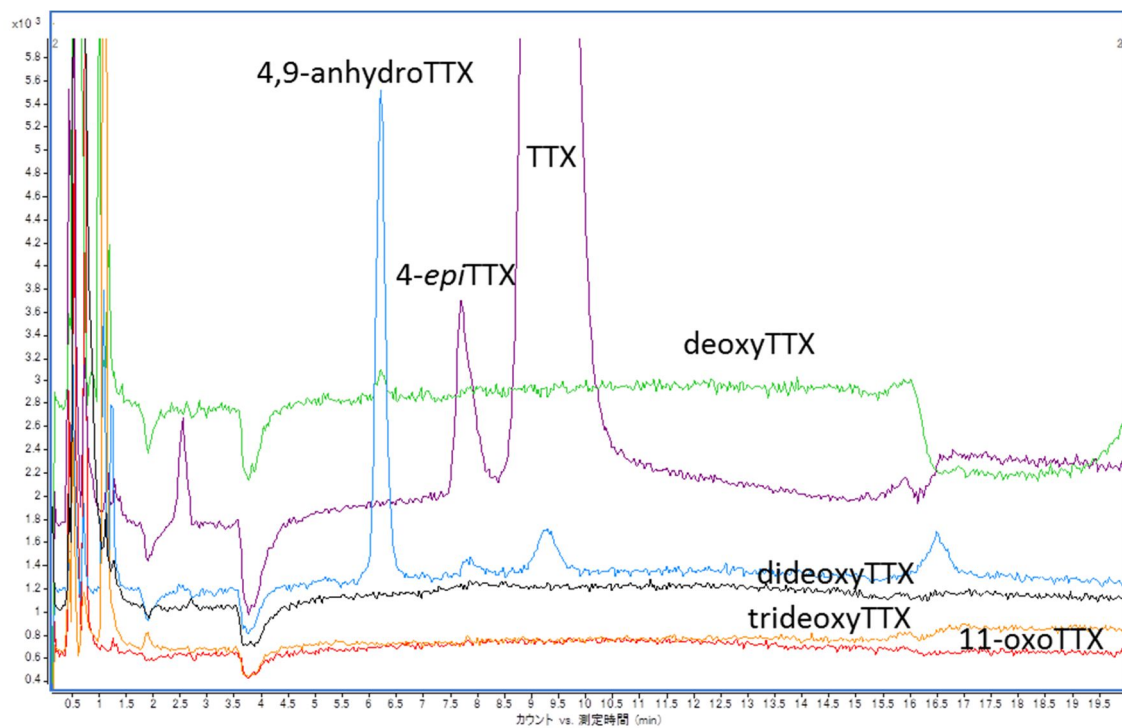
マウス投与実験に使用した投与液を希釈し、LC-MS/MS 分析に供した結果



投与液の LC-MS/MS (MRM モード) クロマトグラム (TTX の定量分析結果)



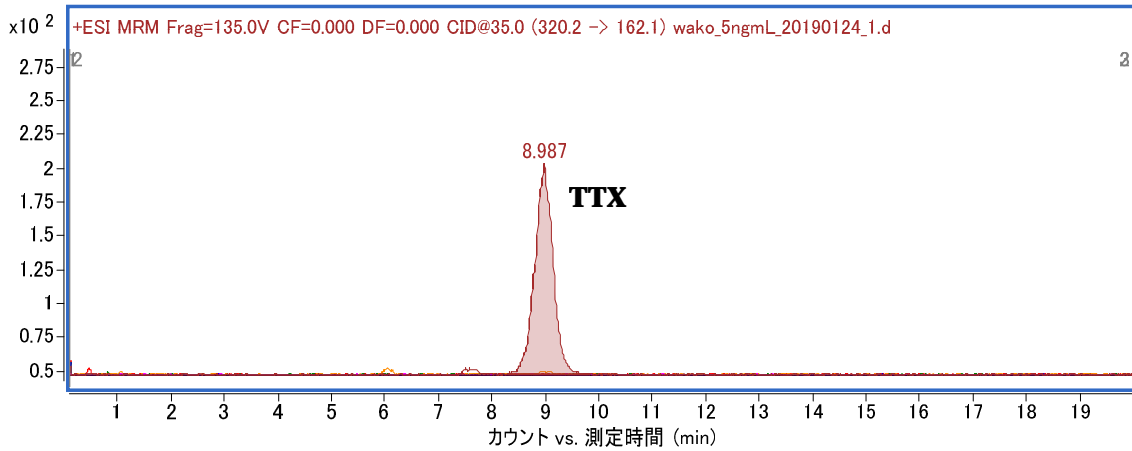
投与液の LC-MS/MS (SCAN モード) クロマトグラム



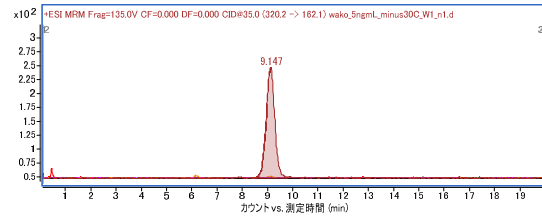
投与液の LC-MS/MS (SIM モード) クロマトグラム

別添資料4 各条件下で保存した TTX 溶液の LC-MS/MS 分析結果：

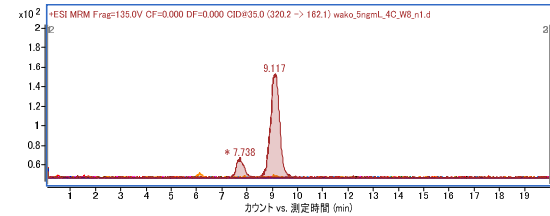
Wako-TTX (クエン酸含有)：蒸留水で 0.2 μg/mL に調製し、遮光保存
調製直後



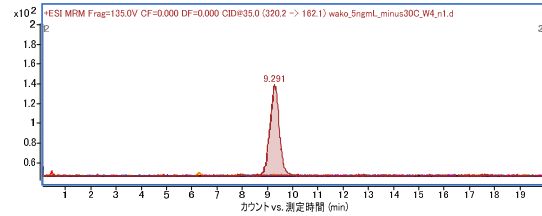
-30 保存 (1 週間後)



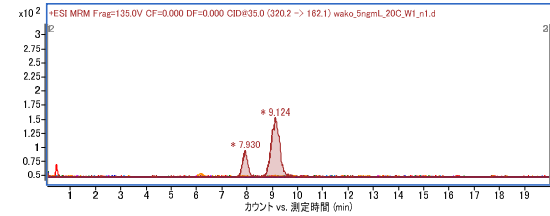
4 保存 (8 週間後)



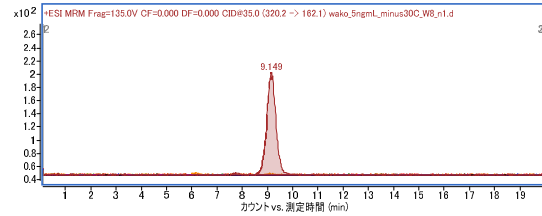
-30 保存 (4 週間後)



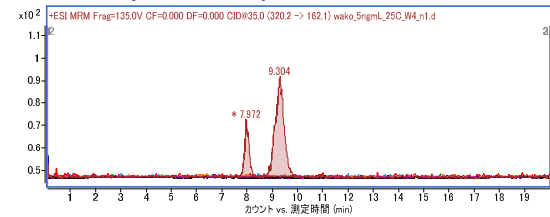
25 保存 (1 週間後)



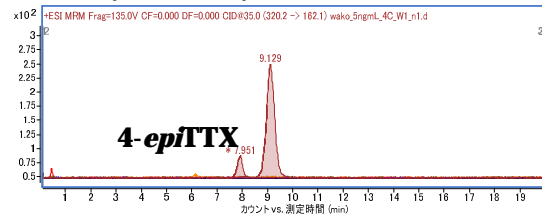
-30 保存 (8 週間後)



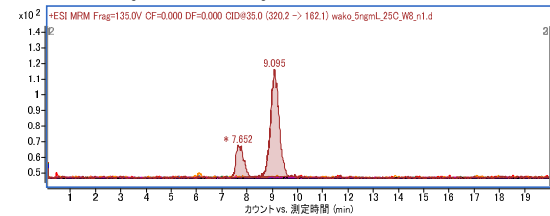
25 保存 (4 週間後)



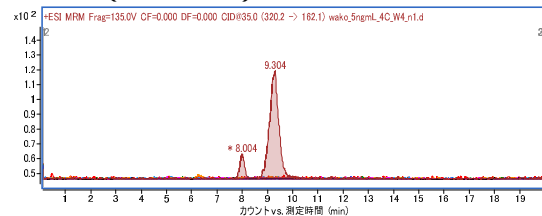
4 保存 (1 週間後)



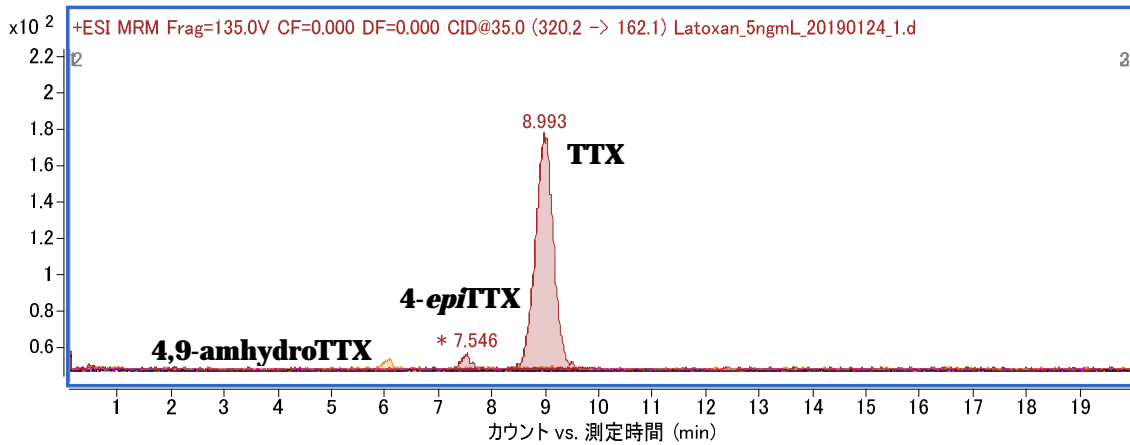
25 保存 (8 週間後)



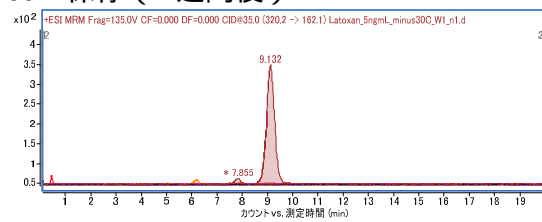
4 保存 (4 週間後)



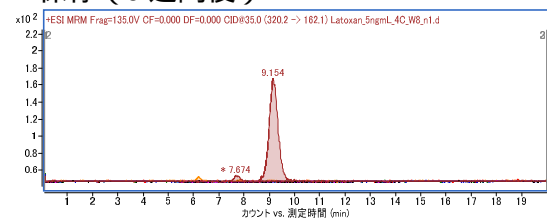
Latoxan-TTX (クエン酸不含): 0.1%酢酸で 0.2 $\mu\text{g/mL}$ に調製し、遮光保存
調製直後



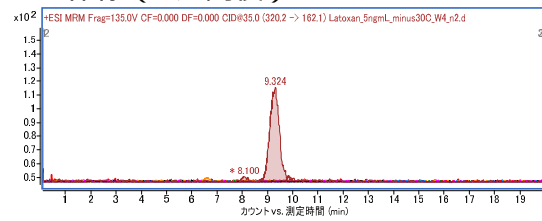
-30 保存 (1週間後)



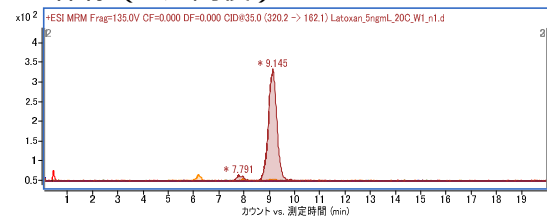
4 保存 (8週間後)



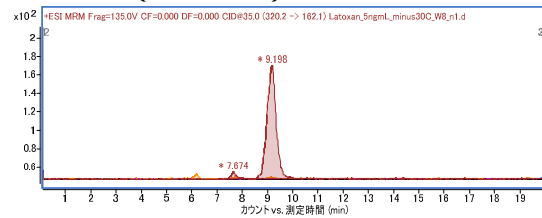
-30 保存 (4週間後)



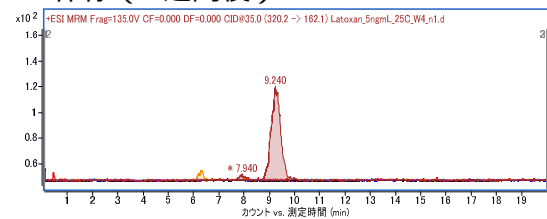
25 保存 (1週間後)



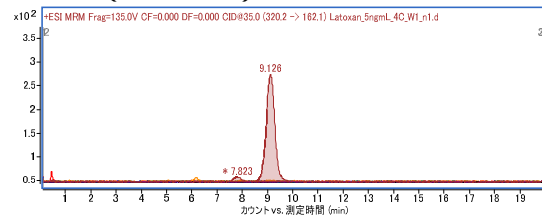
-30 保存 (8週間後)



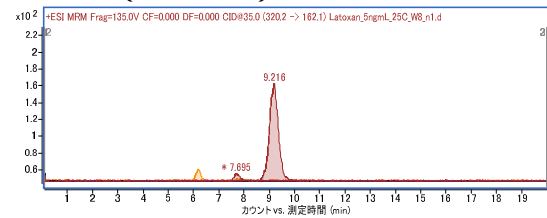
25 保存 (4週間後)



4 保存 (1週間後)



25 保存 (8週間後)



4 保存 (4週間後)

