

厚生労働科学研究費補助金（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

鈴木 敏之 中央水産研究所 水産物応用開発研究センター長

研究要旨：市販のフグの子糠漬け製品に含まれるテトロドトキシシン（TTX）類の含量を明らかにするため、正確な値付け手法によって開発・調製した分析用標準毒を用いて、二枚貝類に含まれる麻痺性貝毒及びテトロドトキシシンに対し妥当性の確認された超高速液体クロマトグラフィー-質量分析法（UHPLC/MS/MS）による定量分析を試みた。妥当性確認のため、フグの子糠漬け試料に濃度既知の TTX 加え、前処理を行い、添加回収試験を実施した結果、TTX の回収率は 87% となり、本法がフグの子糠漬け製品の試料に対しても十分な精度を有していることがわかり、UHPLC/MS/MS 分析は、二枚貝類に対してだけでなく、フグの子糠漬けに対しても妥当性が確認された。国内で製造されるフグの子糠漬け製品を異なる製造業者（6 業者）から購入し、妥当性の確認された本分析法を用いて TTX および類縁体の含量を調べた。また、過去に調べられた TTX 類縁体のマウス比毒性値を参考に毒性等価係数（TEF）を設定するとともに、マウス比毒性値のない TTX 類縁体に対しては構造の類似性から外挿して TEF を設定し、TTX 類縁体の含量から毒力を換算した。その結果、いずれの製造業者で製造されたフグの子糠漬け試料も、換算した毒力は無毒と見なされる 10 MU/g 以下であることが明らかとなった。

本研究で調製した正確に定量した TTX 調整液（溶媒：0.1%酢酸液）並びに、食品衛生検査指針・マウス検定法で使用されるフグ粗毒原液を用いて、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「マウス毒性試験」（溶媒対照群は設置、腹腔内投与）を行い、両者のマウスユニット（MU）を求めた。あらかじめ TTX 濃度が測定された a)市販の生化学用 TTX、b)定量 NMR 法により正確に定量した TTX 調整液、並びに c)コモンフグ抽出物、それぞれ 0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 相当の濃度に調整し、ddY 雄性マウス（4 週齢）に 1 ml 腹腔内投与し MU を求めた。その結果、コモンフグ抽出物は、正確に定量した TTX 調整液と比較し、82% の毒力であることが明らかとなった。

11-oxoTTX、4-epiTTX、11-norTTX-6(S)-ol をフグやイモリ、および化学反応生成物から高度に精製し、LC/MS や NMR で純度を確認し、活性測定に十分な純度の類縁体を調製した。また、これらの TTX 類縁体について、 ^1H NMR スペクトル測定による定量(qNMR)を行った。さらに、これらの TTX 類縁体を用いて、電位依存

性ナトリウムチャンネル阻害活性を評価するため、マウス神経芽細胞腫 Neuro 2A を用いた比色法と、同細胞を用いたホールセルパッチクランプ法での評価について検討した。

分担研究者

渡邊 龍一・中央水産研究所・主任研究員

内田 肇・中央水産研究所・任期付研究員

松嶋 良次・中央水産研究所・主任研究員

及川 寛・中央水産研究所・グループ長

北嶋 聡・国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長

朝倉 宏・国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部長

山下 まり・東北大学大学院農学研究科・教授

此木 敬一・東北大学大学院農学研究科・准教授

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 10MU/g の規制値を設けてリスク管理がなされている。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。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、（1）qNMR による TTX や TTX 類縁体

の正確な定量法を開発し（H30）、（2）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）により比較し明らかにする。（R1, 2）。（3）TTX 類縁体の毒性評価については、qNMR などによって正確に値付けした類縁体を用いて、ナトリウムチャンネル阻害試験などにより、TTX に対する比毒性を評価する（R1, 2）。（4）TTX を対象とした LC/MS/MS 法を用いて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（R1, 2）。（5）以上の知見に基づき、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 10MU/g の基準値の妥当性について検証する（R2）。

B. 研究方法

B-1. フグ糠漬けに含まれる TTX や TTX 類縁体含量を定量

B-1-1. フグの子糠漬け試料における TTX の添加回収試験

二枚貝類に対して妥当性が確認された UHPLC/MS/MS 法について、フグの子糠漬けに対しても適用可能であるか調べるため、添加回収試験を行った。

フグの子糠漬け試料は、国内で製造する 6 業者 (A, B, C, D, E, F) から 5 試料ずつ (計 30 試料) 購入した。購入した試料は使用するまで冷蔵保管 (0℃) した。

フグの子糠漬け試料 (3 個体分) は開封後、卵巣の膜をはがし、フグの子 (卵) のみを取り出して均質になるようによく混ぜたのち 5 g を 50 ml コニカルチューブに取り分けた。

次に、50 ml コニカルチューブに取り分けたフグの子 5 g に対し、昨年度調製した分析用標準毒 (1 µg TTX/ml) を 2 ml 添加し、3 ml の 1% 酢酸溶液を添加して、ホモジナイザーで破碎し、遠心分離 (10000 ×g, rt, 10 min) により上清を得た。得られた上清 1 ml に対し、5 µl のアンモニア水 (25%) を添加し、良く攪拌した。このように調製した試料は、グラファイトカーボンを充填した固相抽出カートリッジ (1% 酢酸含有 20% アセトニトリル 3 ml, 0.025% アンモニア水 3 ml で前平衡化させたもの) に 0.4 ml を負荷し、次いで蒸留水 0.7 ml でカートリッジを洗浄し、1% 酢酸含有 20% アセトニトリル 2 ml にて毒を溶出して回収したのち、アセトニトリルで 4 倍希釈したものを分析用試料とした。なお、TTX 非添加区 (対照区) については、フグの子糠漬け試料から得た 5 g の卵に対し、5 ml の 1% 酢酸溶液を添加して上記と同様に処理し調製した。UHPLC/MS/MS での TTX の定量には、昨年度調製した分析用標準毒を用いた。また、TTX および TTX 類縁体検出のための LC/MS/MS 条件は以下の通りである。LC 装置には Nexera XR (Shimadzu)、MS 装置には QTRAP4500 (SCIEX) を用いた。分析カラムには、Waters 社製の Acquity UPLC BEH Amide カラム (2.1

x 150mm) を用いた。移動相は、麻痺性貝毒の高速分析法として報告されている Boundy et al. の方法を参考に調製した。カラム温度は 80℃とし、分析試料の注入量は 4 µL とした。MRM のイオンチャンネルは次のとおりである。TTX, 4-epiTTX and 6-epiTTX: m/z 320.1/162.0 (51 eV), m/z 320.1/302.0 (33 eV) and m/z 320.1/60.0 (33 eV), 4,9-anhydroTTX: m/z 302.0/162.0 (51 eV) and m/z 302.0/256.0 (33 eV), 5,6,11-trideoxyTTX: m/z 272.0/254.0 (33 eV) and m/z 272.0/162.0 (51 eV), 5-deoxyTTX and 11-deoxyTTX: m/z 304.0/286.0 (33 eV), m/z 304.0/162.0 (51 eV) and m/z 304.0/176.0 (33 eV), 11-norTTX-6-ol: m/z 290.0/272.0 (33 eV) and m/z 290.0/162.0 (51 eV), 11-oxoTTX: m/z 336.1/162.1 (51 eV) and m/z 318.1/162.1 (51 eV), 6,11-dideoxyTTX: m/z 288.1/224.0 (33 eV), 5,11-dideoxyTTX: m/z 288.1/162.1 (51 eV)。Declustering potential は 106V とした。なお、コリジョンエネルギー (カッコ内の数値) を併せて示した。

TTX の回収率は、分析試料中の TTX 量の理論値である 400 µg/g tissue に対して、TTX 添加区の分析結果から対照区の分析結果を差し引いて得られる TTX 量分析値の割合として求めた。

B-1-2. フグの子糠漬け試料における TTX およびその類縁体含量の測定および毒力の算出

異なる 6 つの製造業者が製造した糠漬け製品の TTX 類の含量を妥当性が確認された UHPLC/MS/MS 法により調べて毒力に換算し、

フグ毒に対して安全と見なされる毒力 (10 MU/g) を超えるものがないか比較した。

試料は、先述の TTX 非添加区と同様の処理により調製した。UHPLC/MS/MS における分析用標準品は、TTX に関しては本事業で製造したものを、その他の成分については東北大学から恵与されたコモンフグ卵巣活性炭抽出液に含まれる TTX 類縁体の成分濃度を基に算出した。なお、該当する成分濃度がない場合は、TTX と同等の MS 応答性があるものとして定量した。また、毒性等価係数 (TEF) は、過去に得られた TTX 類縁体のマウス比毒性値に基づいて、TTX を 1 として暫定的に設定した。なお、マウス比毒性値のない類縁体については類似する構造から外挿した。以下に暫定的に設定した TEF を示す。 TTX: 1, 4-*epi*TTX: 0.16, 4,9-anhydroTTX: 0.02, 5-deoxyTTX: 0.03, 11-deoxyTTX: 0.14, 11-nor-TTX-6-ol: 0.17, 5,11-dideoxyTTX: 0.02, 6,11-dideoxyTTX: 0.02, 5,6,11-trideoxyTTX: 0.01, 4-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX: 0.01, 4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX: 0.01, 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX: 0.01. (下線は類似する構造から外挿した成分を示す)

毒力は、UHPLC/MS/MS 法にて得られた TTX およびその類縁体の濃度に対し、上記の TEF を乗じて求めた。製品自体が持つ総毒力は、TTX 及びその類縁体の毒力の総和として表し、この値が 10MU/g を超えているかどうかを調べた。

B-2. 動物試験による TTX の毒性評価

定量 NMR 法により正確に定量した 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った。被験物質は以下のとおりである。

①テトロドトキシシン (tetrodotoxin, TTX) (生化学用); 分子量 319.27, CAS No. 4368-28-9, 富士フイルム和光純薬(株)

カタログ番号: 206-11071

ロット番号: LKG5746

純度: 95.7 % [HPLC]

②本研究課題で開発した定量 NMR 法により正確に定量した TTX

TTX: 1.012 mg/ml (3.173 mM)

(Lactone 体: 21.44%、Hemilactal 体: 78.56%)

4,9-anhydro TTX: 0.08 mg/ml (0.265 mM)

4-*epi*TTX: 0.025 mg/ml (0.078 mM)

Caprylic acid: 0.005 mg/ml (0.033 mM) (溶媒: 1% 酢酸溶液)

③コモンフグ粗毒素原液の調整

(1) フグ検体

国産天然コモンフグ皮部位 (NIHS-puf-150051②, NIHS-puf-150091①, NIHS-puf-150091③, NIHS-puf-191019) を用いた。このうち、NIHS-puf-150091①及び NIHS-puf-150091③は同一魚体由来であるが採取部位

が異なっていた。

(2) 粗毒素原液の調製

食品衛生検査指針理化学編 2015 に記載されるマウス検定法に従い、コモンフグ粗毒源液を調製した。但し、NIHS-puf-150051②、NIHS-puf-150091①及び③については検体量が2 gしか確保できなかったため、抽出量を1/5に減じた。NIHS-puf-191019からの粗毒素についてはマウス検定法である下記の方法により抽出した。

試料10 gに0.1%酢酸25 mLを加え、ホモジナイズ(5,000 rpm、5分)後に沸騰水浴中で10分間加熱した。放冷後、遠心分離(13,420×g、10分)し、上清を回収して50 mLメスシリンダーに移して0.1%酢酸水で50 mLに定容したものを粗毒源液(検体0.2 g相当/mL)とした。これをポリプロピレン製遠沈管に移し、使用するまで-30°Cで保存した。

また、NIHS-puf-150051及びNIHS-puf-150091の抽出は以下の手順で行った。

試料2 gに0.1%酢酸8 mLを加え、ホモジナイズ(11,000 rpm、1秒×10回)後、沸騰水浴中で10分間加熱した。放冷後、遠心分離(13,420×g、15分)を行い、上清を回収し0.1%酢酸で10 mLに定容したものを粗毒原液(検体0.2 g相当/mL)とした。これをポリプロピレン製遠沈管に移し、使用するまで-30°Cで保存した。

(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、下記の所属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-3. TTX類縁体の毒性評価

B-3-1. TTX類縁体の精製

4-*epi*TTXと11-oxoTTXは、含有動物由来の試料から精製した。まず過去にフグやイモリからTTX類を抽出し、粗精製した画分から、TTX用LC/MSや蛍光HPLCを用いて分析した。これらの類縁体を比較的多く含む画分から、主として弱酸性陽イオン交換カラムと親水性相互作用液体クロマトグラフィー(HILIC)カラムを用いて目的物を分取し、溶出フラクションをLC-MSと蛍光HPLCで分析し、目的物を精製した。11-norTTX-6(*S*)-olは、まず、化学反応でTTXから誘導した。既知の反応を用いて、TTXをH₅I₆で酸化して11-norTTX-6,6-diolとし、その後NaBH₄で還元し、11-norTTX-6(*S*)-olと11-norTTX-6(*R*)-olの混合物を得て、その混合物から11-norTTX-6(*S*)-olを上記の液体クロマトグラフィーで精製した。さらに、量を確保するために11-norTTX-6(*S*)-olはフグからも精製した。

B-3-2. TTX類縁体の定量

上記のように、高純度に精製した4-*epi*TTX、11-oxoTTX、11-norTTX-6(*S*)-olは、別課題で開発した方法(Watanabe et al., 2019)を参考に、¹H NMRで定量することを試みた。それぞれの類縁体を、4% CD₃COOD/D₂Oに溶解し、内径5 mmのNMR tubeにいれて、液高3.5 cmとした。外部標準として、中央水研で調製し定量したTTX標品1 µg/µLを、同様に5 mmのNMR tubeにいれ、液高3.5 cmとしてそれぞれ¹H NMRスペクトルを測定し、各シグナルの積分値を比較した。

B-3-3. 電位依存性ナトリウムチャンネル(Na_v)阻害試験(Neuro2A細胞を用いた比色法)

4-*epi*TTX、11-oxoTTX、11-norTTX-6(*S*)-

olは、簡便なマウス神経芽細胞腫Neuro2A細胞を用いた比色法により、電位依存性ナトリウムチャンネルに対する阻害作用を評価することをまず検討した。方法は既報の通りである(Saruhashi et al., 2016, Toxicol)。すなわち、 Na_v を発現しているNeuro2A細胞に、 Na_v 活性化剤のveratridine (VTD)と Na^+/K^+ ATPase阻害剤のOuabainを加えて、細胞内の Na^+ 濃度が過剰になる条件下に細胞をおき、24時間後に、ホルマザン試薬のWST-8を加えて細胞生存率を計測する方法である。TTXなどの Na_v 阻害剤を加えることにより、細胞生存率が上昇するため、それを指標に Na_v 阻害活性を評価する。本方法では、特に4-*epi*TTXは中性条件で、化学的な不安定性により、高活性のTTXに変換することが懸念されるため、4-*epi*TTXについて、本方法の条件下で、どの程度TTXに変換するかをTTX用蛍光HPLCを用いて検討した。実際に上記の試験終了後(24時間37度放置、WST-8を添加してさらに2時間37度放置後)、4-*epi*TTXを最終濃度1 μM 加えた細胞培養液を抜き取り、濾過後にTTX用蛍光HPLCに供して培地中のTTX類を分析した。

B-3-4. 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験(電気生理実験)

電位依存性ナトリウムチャンネルには9つのサブタイプが存在し、 $\text{Na}_v1.1$ - 1.9 と分類されている。複数のサブタイプが発現するNeuro2A細胞に対してTTX類縁体の作用を調べることは仮にTTX類縁体にサブタイプ選択生が見られる場合、 Na_v への作用を見逃す可能性がある。そこで、 $\text{Na}_v1.5$ 、 $\text{Na}_v1.8$ 、 $\text{Na}_v1.9$ の3つのサブタイプを除く他6つのサブタイプの293T細胞への発現を試みることにし、各 Na_v サブタイプの観測にも成功した。

C. 研究結果

C-1. フグ糠漬けに含まれる TTX や TTX 類縁体含量を定量

C-1-1 フグの子糠漬け試料における TTX の添加回収試験.

フグの子糠漬けは、一般には食用不可とされるゴマフグの卵巣を塩漬けと糠漬けの工程を経て製品化される石川県の伝統食品である。ゴマフグの卵巣には TTX が含まれており、本糠漬け製品において TTX が消失する理由については微生物による分解と塩析による拡散の二通りが考えられてきた。現在では、長らく塩漬けされる過程で、塩析効果により TTX が卵外へ浸出し、浸出液を交換するために消失すると考えられている。一方、本糠漬け製品には多量の塩が含まれており、これが分析用試料調製(前処理)の際の妨げになることから、TTX を糠漬け製品に添加してその回収率を調べる必要がある。

そこで、フグの子 5 g に対し、2 μg の TTX を添加して (400 ng TTX/g tissue) その回収率を調べた (n=3)。その結果、TTX 添加区の分析値は 1472 ± 35 ng TTX/g tissue (2.4% *rsd*)、TTX 非添加区は 1125 ± 57 ng TTX/g tissue (5.1% *rsd*) であり、実際の TTX 回収量は 347 ng/g tissue であった。TTX 添加の理論値は 400 ng/g tissue であることから回収率は 87%であり、良好な結果が得られた。グラファイトカーボンカートリッジを利用した前処理によって、効率よく脱塩できることがその要因と考えられた。また TTX およびその類縁体のクロマトグラムにおいて、定量を妨害するような夾雑物由来のピークが定量用ピークと重なっていないことが明らかとなった。以上の結果から、二枚貝類に対して妥当性の確認された

UHPLC/MS/MS 法は、フグの子糠漬け試料に対しても有効であることが明らかとなった。

C-1-2. フグの子糠漬け試料における TTX およびその類縁体含量の測定および毒力の算出

フグの子糠漬け製品は主に石川県で製造されており、白山市美川地区に主に製造業者が集中している。本事業では美川地区にある製造業者 5 社と金沢市の製造業者 1 社を合わせた計 6 業者からフグの子糠漬け試料を購入した。ただし、金沢市の製造業者に関しては百貨店から委託製造された製品を購入した。

フグの子糠漬けは開封後、ゴマフグ卵巣の端を細断したものを 5 g 取り、卵塊から TTX 類を抽出し前処理後、分析に供した。購入した 6 つの製品を分析した結果、どの製造業者の製品も類似した毒組成、毒力を示した。そこで、そのうちの 1 社 (B) の結果を代表例として説明する。

まず、比毒性が最も高い TTX は、538 ng/g tissue であった。それ以外の成分は、全体に占める割合の高い成分から、4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX: 20,912 ng/g tissue、次いで 5,6,11-trideoxyTTX: 2,393 ng/g tissue、さらに 4-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX: 1,272 ng/g tissue であった。以上の結果から、TTX は比毒性は高いものの、成分濃度で見ると 5 番目に多い成分であった。得られた成分濃度に先述の TEF を乗じて TTX 相当量の毒力を求めると、毒力が強い成分から順に、TTX: 538 ng TTX eq./g tissue、次いで 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX: 209 ng TTX eq./g tissue、さらに、5,6,11-trideoxyTTX: 32

ng TTX eq./g tissue であった。また、各成分の毒力を加算して総毒力を求めると、825 ng TTX eq./g tissue であった。国際的に毒力は TTX 相当量として表されるが、国内では TTX についてはマウス毒性試験が行われており、マウスユニット (MU) 換算した方が理解しやすいと思われる。そこで、1 MU あたり 0.22 μ g TTX として計算すると、この試料の毒力は 3.8 MU/g となった。その他の製造業者については総毒力についてのみ示すが、F: 771 ng TTX eq./g tissue (3.5 MU/g)、C: 1526 ng TTX eq./g tissue (6.9 MU/g)、D: 793 ng TTX eq./g tissue (3.6 MU/g)、E: 981 ng TTX eq./g tissue (4.5 MU/g)、A: 1087 ng TTX eq./g tissue (4.9 MU/g) であった。いずれの製造業者の製品も換算した毒力は 10 MU/g 以下であり、基準値以下であることが明らかになった。

C-2. 動物試験による TTX の毒性評価

C-2-1. MU 算出実験 (TTX 濃度を同一とした際の、正確に定量した TTX 調整液とフグ粗毒原液との毒力比較)

a) 市販の生化学用 TTX、b) 定量 NMR 法により正確に定量した TTX 調整液、ならびに c) コモンフグ抽出物 (皮膚由来)、それぞれ 0.40 μ g/ml の濃度に調整し、ddY 雄性マウス (4 週齢) に 1 ml 腹腔内投与し MU を求めた結果 (1 MU は 0.22 μ g TTX とされているので、1 ml 投与するので MU は 2 となるはず)、それぞれ、2.0、2.2 及び 1.8 となった。したがって、コモンフグ抽出物 (皮膚由来) は、正確に定量した TTX 調整液と比較し、82% の毒力であることが明らかとなった。

C-3. TTX 類縁体の毒性評価

C-3-1. TTX 類縁体の精製

4-*epi*TTXはコモンフグ卵巣およびシリケンイモリの皮膚由来粗精製画分に、11-*oxo*TTXはスジモヨウフグの皮膚由来の粗精製画分に比較的高濃度で存在していた。そのため、上述の方法で液体クロマトグラフィーを繰り返し行い、4-*epi*TTXは90 µg、11-*oxo*TTXは30 µgを精製した。4-*epi*TTXは¹H NMR, LC/MS, 蛍光HPLCで純度を確認した。LC/MSで他の低活性の類縁体が微量(2%程度)に検出されたが、どの分析方法でもTTXは検出されず、4-*epi*TTXの純度は約98%と考えられ、活性測定に支障ないと判断した。また、4-*epi*TTXは、COSY, TOCSY, HSQC, HMBCスペクトルも測定し、これまで帰属されていなかった化学平衡体のlactone型のNMRシグナルの帰属も行い、hemilactal型-lactone型の比率も決定できた。

11-*oxo*TTXはLC/MSと蛍光HPLCで純度を確認した結果、TTXや他の類縁体は検出されず、98%以上の純度であると思われた。¹H NMRも測定し、TTX類縁体以外の不純物は少量検出されたが、TTXや類縁体は検出されなかった。なお、11-*oxo*TTXは、存在比の高い化学平衡体のhemilacta型でも¹³C NMRのデータの報告がなく、存在比の低い10,7-lactone型は存在が報告されていないが、今回得られた純品では検出されており、COSY, TOCSY, HSQC, HMBCスペクトルも測定し詳細に解析し、これらのNMRデータを新たに取得できた。

11-*nor*TTX-6(S)-olの調製では、TTX粗精製物(1-2 mg)をH₅IO₆で酸化し、処理後に¹H NMRとHR-ESI/MSを測定して反応を確認した。反応ではNaBH₄による還元反応も既報通り進むことを蛍光HPLCやLC/MSで確認した。反応物は活性炭とHILICカラムなどによる精製を行い、上述と同様に純度を確認した。また、フグ卵巣からも精製し、純度98%の11-*nor*TTX-6(S)-olが約100 µg得ら

れた。以上のように、活性測定に十分な純度の類縁体を予定どおり順調に調製できた。

C-3-2. 類縁体のNMR定量

TTXのH4aシグナルの積分値と、各類縁体のH4aシグナルの積分値を比較することにより、上記の3類縁体を定量できた。Hemilactal型とlactone型のH4aシグナルが分離している場合は、それぞれを測定して合計を定量値とした。

C-3-3. 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験(Neuro2A細胞を用いた比色法)

本方法で、安定なTTX類縁体を評価できることはこれまでの実績からもわかっている。しかし、蛍光HPLCによる分析結果から、4-*epi*TTXは、本試験条件の計26時間37度細胞培養液(RPMI1640 10% FBS)中放置後に、0.7%しか残存せず、57%がTTXに変換し、他は回収できていないか、非活性型のテトロドトキシン酸タイプの化合物に変換したと思われた。このことから、本方法では、4-*epi*TTXの活性試験として適さないことが示された。そこで、短時間で結果がでる電気生理実験に供する必要があることが確認された。

C-3-4. 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験(電気生理実験)

理化学研究所より、マウス神経芽細胞腫Neuro 2Aを譲渡して頂き、所有の電気生理実験装置にて電位依存性ナトリウムチャンネルの観測に成功した。標品として、TTXに対する感受性を評価した結果、IC₅₀(濃度)は文献記載値に近く、観測系の確立を確認した。溶液調製から感受性評価を終えるまで最大1-2時間前後となり、分解を含む化合物の構造変換が生じる可能性を極力、抑えられると判断した。

D. 考察

D-1. フグの子糠漬けの毒性評価

フグの子糠漬けは、一般には食用不可とされるゴマフグの卵巣を塩漬けと糠漬けの工程を経て製品化される石川県の伝統食品である。先にも述べたが、本糠漬け製品には多量の塩が含まれており、これが分析用試料調製（前処理）の際の妨げになることから、TTX を糠漬け製品に添加してその回収率を調べた。その結果、TTX の回収率は 87% と良好な結果を与え、フグの子糠漬け製品についても UHPLC/MS/MS の妥当性が確認された。この回収率をさらに上げるためには、フグの子重量と等量で加えている 1%酢酸溶液を 2 倍量以上加え、塩の影響を抑えることが有効と考えられる。UHPLC/MS/MS の検出感度を考えると、1%酢酸溶液を 3 倍量程度までは添加可能であると考えられる。予備検討として、2 倍量の 1%酢酸を加えて試料調製したところ、TTX の分析値は 1 倍量添加の 114%となった。この予備検討の結果からも試料調製の際に抽出に使用する抽出溶媒の量を増やすことで回収率を向上させることが可能と考えられた。

次に、国内の製造業者から購入したフグの子糠漬け製品に含まれる TTX 含量は、771~1526 ng TTX eq./g tissue (3.5~6.9 MU/g)であった。これは食品衛生検査指針に示された、無毒のフグとされる毒力 (10 MU/g 以下)であることが確認できた。一般に市場に流通しているフグの子糠漬け製品は、事前に石川県予防医学協会の検査を受け、規制値以下であることを確認したのち、検印シールを付けて販売している。そのため、基本的には規制値以上のものが出回ることはないと考えられ、今回の分析結果で

もそれと矛盾しない結果が得られた。

本事業では、マウスに対する比毒性から TEF を見積もった。この際、フグの子糠漬け製品に最も多く含まれていた 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX の TEF を 5,6,11-trideoxyTTX の 0.01 と同等に、高めに見積もった。4,9-anhydroTTX が TTX の 2%程度まで毒力が低下することから、4,4a 位で脱水している 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX も同様に、5,6,11-trideoxyTTX の 1-2% 程度と考えると、実際はもっと小さい TEF (e.g. : 0.001~0.0001) になると思われ、全体としての毒力は 2-3 割程度低下することになり、総毒力への寄与を考えると主要毒は TTX と考えてよいと思われる。しかし、含量の多い 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX の TEF はこれまで正確に評価されておらず、今後の課題と考えている。また、フグ毒の分析が UHPLC/MS/MS のような機器分析法に代わった場合、毒力への寄与を考慮して、どの成分を定量する必要があるかが重要な問題となるだろう。

国内で無毒と見なされる 10 MU/g 以下の毒力に対し、EFSA では二枚貝に含まれる TTX の基準値を 44 µg TTX eq./kg tissue (400 g 消費した場合のヒトに対して可逆的な効果を生じない濃度として)と定めている。これをフグの子糠漬け製品に適用した場合、最も少ない TTX 含量を示した F の製品でさえ流通が不可になってしまう。フグの子糠漬け製品は塩蔵・嗜好品であり、一回に食する量は二枚貝と比べて非常に少ないことから、EFSA の基準値をフグの子糠漬け製品にそのまま適用するのは好ましくないと考えられる。なお、フグは採取海域や種によ

って TTX 以外に麻痺性貝毒を有する場合があります。今回試料としたフグの子糠漬けについて一試料のみこの点について調べたが、既知の麻痺性貝毒は検出されなかった。

D-2. MU 算出実験 (TTX 濃度を同一とした際の、正確に定量した TTX 調整液とフグ粗毒原液との毒力比較)

コモンフグ抽出物 (皮膚由来) は、正確に定量した TTX 調整液と比較し、82%の毒力であったが、この原因としては、TTX 以外の TTX 異性体の含有量の差、あるいは溶媒の差 (無毒のコモンフグ皮膚抽出物由来) が関与する可能性が考えられた。しかし、コモンフグ抽出液がマウス毒性に及ぼす影響は少ないと推察された。

D-3 TTX 類縁体の毒性評価

活性試験に用いるために、高度に精製した 4-*epi*TTX、11-*oxo*TTX、11-*nor*TTX-6(*S*)-*ol* を HPLC/MS/MS 法を用いて定量した。また、Neuro2A 細胞を用いた比色法による電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験の実験条件において、4-*epi*TTX の安定性について調べ、本実験の条件下ではほぼ残存することができず、56%が TTX に変換していた。このことから 4-*epi*TTX は、短時間で結果をだすことができる、電気生理実験で活性評価することが必要である。

E. 結論

二枚貝に対して妥当性確認のとれた UHPLC/MS/MS 分析法について、フグの子糠漬け製品に対する妥当性を確認するため、フグの子糠漬け試料を用いて TTX 添加回収試験を実施したところ、回収率は 87% と良好な結果を与えフグの子糠漬け製品についても

妥当性が確認できた。

また、国内の 6 つの異なる業者により製造されたフグの子糠漬け試料を購入し、上記の UHPLC/MS/MS 法により TTX 含量・毒力を調べ、TEF から毒力を換算した。その結果、いずれの製品も換算した毒力は国内で無毒と見なされる 10MU/g 以下であることを確認した。これまでに、製造許可を有する業者の製造するフグの子糠漬け製品による中毒事例はなく、今回の分析結果もすべて無毒とされる毒力の基準を満たしており、現状で安全性は確保されていると考えられる。

さらに、国内の 6 つの異なる業者により製造されたフグの子糠漬け試料を購入し、上記の UHPLC/MS/MS 法により TTX 含量・毒力を調べ、TEF から毒力を換算した。その結果、いずれの製品も換算した毒力は国内で無毒と見なされる 10MU/g 以下であることを確認した。これまでに、製造許可を有する業者の製造するフグの子糠漬け製品による中毒事例はなく、今回の分析結果もすべて無毒とされる毒力の基準を満たしており、現状で安全性は確保されていると考えられる。

F. 健康危険情報

TTX の経口毒性は極めて高く青酸カリの数百倍と言われているが、毒劇法や労安法等で規制対象として指定されている訳ではない。しかし、実験では最大限の注意を払い、毒劇物に匹敵する扱いや管理を行う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ryuichi Watanabe, Masato Tanioka,

- Hajime Uchida, Ryoji Matsushima, Hiroshi Oikawa, Masahiro Matsumiya, Mari Yotsu-Yamashita, and Toshiyuki Suzuki, Quantitation of tetrodotoxin and its analogues with a combination of liquid chromatography–tandem mass spectrometry and quantitative ¹H-NMR Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 2019, 67, 46, 12911–12917.
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.9b06380>
- 2) Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.: CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis. *Mol Pharmacol*, 96(5): 600–608, 2019.
- 3) Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Yoko H.: Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.
- 4) 北嶋 聡, エディトリアル: ドーピングの中毒学・毒性学-序文-, 中毒研究 (*Jpn. J. Clin. Toxicol.*) 32: 373–374. 2019.
- 5) Yuta Kudo and Mari Yotsu-Yamashita, Isolation and biological activity of 8-epitetrodotoxin and the structure of a possible biosynthetic shunt product of tetrodotoxin, Cep-226A, from the newt, *Cynops ensicauda popei*, *Journal of Natural Products*, 82, 1656–1663, 2019.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.9b00178>
- 6) Yukari Maeno, Ryuta Terada, Yuichi Kotaki, Yuko Cho, Keiichi Konoki, and Mari Yotsu-Yamashita, Possible biosynthetic products and metabolites of kainic acid from the red alga, *Digenea simplex*, and their biological activity, *Journal of Natural Products*, 82, 1627–1633, 2019.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.9b00128>
- 7) Takashi Minowa, Yuko Cho, Yasukatsu Oshima, Keiichi Konoki and Mari Yotsu-Yamashita, Identification of a Novel Saxitoxin Analogue, 12 β -Deoxygonyautoxin 3, in the Cyanobacterium, *Anabaena circinalis* (TA04), *Toxins* 2019, 11, 539
<https://doi.org/10.3390/toxins11090539> (open access)
- 8) Satoshi Numano, Yuta Kudo, Yuko Cho, Keiichi Konoki and Mari Yotsu-Yamashita, Temporal Variation of the Profile and Concentrations of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxin in the Scallop, *Patinopecten yessoensis*, Cultured in a Bay of East Japan, *Mar. Drugs*, 2019, 17(12), 653;
<https://doi.org/10.3390/md17120653> (open access)
- 9) Kanna Adachi, † Tomoshi Yamada, † Hayate Ishizuka, Mana Oki, Shunsuke Tsunogae, Noriko Shimada, Osamu Chiba,

Tatsuya Orihara, Masafumi Hidaka, Takatsugu Hirokawa, Minami Odagi, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita, Kazuo Nagasawa (‡contributed equally to this work), Synthesis of C12 - keto saxitoxin derivatives with unusual inhibitory activity against voltage-gated sodium channels, *Chem. Eur. J.*, 2020, 26, 2025-2033.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/chem.201904184>

10) Dietrich Mebs, Mari Yotsu-Yamashita, Katharina Hartmann, Christine Elbert, Richard Zehner, Stefan W. Toennes, Revisited - Failure of tetrodotoxin to protect red-spotted newts, *Notophthalmus viridescens*, from endoparasites, *Toxicon*, 2020, 178, 77-81.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.02.026>

2. 学会発表

1) 渡邊龍一・内田肇・松嶋良次・及川寛・鈴木敏之：ふぐの子糠漬けに含まれるテトロドトキシンの分析，令和2年度日本水産学会春季大会，2020年3月（東京）

2) 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

3) 北嶋 聡：シックハウス(室内空気汚染)対策に関する研究-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-, 環境科学会, 2019 年会 (2019.9.13.)名古屋

4) 北嶋 聡、近藤一成：ゲノム編集技術応用食品の現状と課題，日本食品化学学会第35回食品化学シンポジウム，(2019.11.8.)東京

5) 登田 美桜、北嶋 聡：フグ毒として知られるテトロドトキシンのリスク評価に関する国際的動向-マウスユニットと急性参照用量-，第46回日本毒性学会学術年会，(2019.6.26.)徳島

6) 種村 健太郎，北嶋 聡，菅野 純：発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討～，第46回日本毒性学会学術年会，(2019.6.26.)徳島

7) 小野 竜一，相崎 健一，北嶋聡，菅野 純：Percellome プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響，第46回日本毒性学会学術年会，(2019.6.26.)徳島

8) 菅野 純，北嶋 聡，相崎 健一，小野 竜一：Percellome トキシコゲノミクスのエピジェネティクス基盤 -「新型」反復曝露試験の解析-，第46回日本毒性学会学術年会，(2019.6.28.)徳島

9) 夏目 やよい，相崎 健一，北嶋 聡，Samik GOSH，北野 宏明，水口 賢司，菅野 純：Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測，第46回日本毒性学会学術年会，(2019.6.28.)徳島

10) 種村 健太郎，北嶋 聡，菅野 純：低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在～，第46回日本毒性学会学術

年会, (2019. 6. 28.) 徳島

1 1) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno : Cross Talks among PPAR α , SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019), (2019. 7. 16.) ハワイ

1 2) Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi : Evaluation of Exosomes as Toxic Biomarkers, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019), (2019. 7. 17.) ハワイ

1 3) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura : The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019), (2019. 7. 17.) ハワイ

1 4) 國吉杏子、大城直雅、佐野友春、朝倉宏、安元健：魚肉標準物質（シガテラ毒）の調製検討，日本食品化学学会第 25 回総会・学術大会，2019 年 6 月 6 日 長野

1 5) 國吉杏子，大城直雅，佐野友春，木村圭介，朝倉宏，安元健：シガトキシン混合標準溶液と魚肉標準物質の作製，第 115 回日本食品衛生学会学術講演会，(2019. 10. 3) 東京

1 6) 伊藤史織，國吉杏子，大野祐美，岩

屋あまね，佐久川さつき，小島尚，円谷健，平間正博，安元健，大城直雅，朝倉宏：ELISA によるシガトキシンの検出，日本食品衛生学会第 115 回学術講演会，2019 年 10 月 3-4 日東京

1 7) 前野優香理、小瀧裕一、寺田竜太、長由扶子、此木敬一、山下まり：第 30 回万有仙台シンポジウム神経興奮物質カインイド類の生合成中間体の同定及び生理活性評価，2019. 6. 29 ポスター

1 8) Yuko Cho, Shigeki Tsuchiya, Takuo Omura, Kazuhiko Koike, Hiroshi Oikawa, Keiichi Konoki, Yasukatsu Oshima and Mari Yotsu-Yamashita : Metabolomic study of saxitoxin biosynthesis in dinoflagellates using ^{15}N -labelled sodium nitrate as a nitrogen source, Gordon research conference, Mycotoxins and Phycotoxins, June 16 - 21, 2019, Stonehill College, 320 Washington Street, Easton, MA, US. Poster.

1 9) Yukari Maeno, Yuichi Kotaki, Ryuta Terada, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita : Identification of biosynthetic intermediates of amnesic shellfish toxin domoic acid and anthelmintic compound kainic acid Gordon research conference, Mycotoxins and Phycotoxins, June 16 - 21, 2019, Stonehill College, 320 Washington Street, Easton, MA, US. Poster.

2 0) 角替俊輔、此木敬一、山下まり、八代田陽子、村田道雄、Charles Boone, Jason Moffat : Crip Screening による Maitotoxin の作用標的分子探索、新学術領域化学コミュニケーションのフロンティア, 第三回若手シンポジウム, 2019. 6. 26 大

- 阪大学豊中キャンパス大阪大学会館 口頭
- 2 1) 山下まり : テトロドトキシン類縁体の電位依存性 Na チャネル阻害活性と生合成経路の推定第 46 回日本毒性学会学術年会, シンポジウム「海産毒リビジテッド」, 2019 年 6 月 26 日 招待講演
- 2 2) 前野優香理、小瀧裕一、寺田竜太、長由扶子、此木敬一、山下まり : 神経興奮物質カイノイド類の生合成中間体の同定及び生理活性評価, 第 30 回万有仙台シンポジウム, 2019 年 6 月 29 日 poster
- 2 3) 山下まり : 中間体に基づく海洋生物毒の生合成研究, 東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室セミナー, 2019 年 7 月 5 日 招待講演
- 2 4) Kudo, Y. and Yotsu-Yamashita, M. : Identification of new analogs and putative biosynthetic intermediates of tetrodotoxin aimed at elucidating its biosynthetic pathway and structure activity relationship, 60th American Society of Pharmacognosy Annual Meeting, 2019 2019 年 7 月 13 日 口頭
- 2 5) Goto, M., Kikuchi, S., Okada, K., Cho, Y., Yotsu-Yamashita, M. and Konoki, K. : Screening of novel secondary metabolites from microorganisms associated with the marine sponge *Halichondria okadai*, Tohoku University's Chemistry Summer School, 2019 年 7 月 27 日 Poster
- 2 6) Yaegashi, Y., Ueyama, N., Kudo, Y., Cho, Y., Konoki, K. and Yotsu-Yamashita, M. : Isolation and structural elucidation of tetrodotoxin related compounds from pufferfish, Tohoku University's Chemistry Summer School, 2019 年 8 月 27 日 Poster
- 2 7) 宮坂忠親, 安立昌篤, 工藤雄大, 杉本敬太, 山下まり, 西川俊夫 : テトロドトキシンの推定生合成中間体の全合成と絶対立体配置の決定, 第 61 回天然有機化合物討論会, 2019 年 9 月 11 日 口頭
- 2 8) 安達葉菜, 石塚 颯, 山田智士, 日高將文, 広川貴次, 小田木 陽, 此木敬一, 山下まり, 長澤和夫 : C11 位炭素置換型サキシトキシン誘導体の合成と活性評価, 第 61 回天然有機化合物討論会, 2019 年 9 月 11 日 poster
- 2 9) 前野優香理, 小瀧裕一, 寺田竜太, 長由扶子, 此木敬一, 山下まり : ドウモイ酸とカイニン酸の新規関連化合物の単離, 構造決定と生合成経路, 第 61 回天然有機化合物討論会, 2019 年 9 月 11 日 poster
- 3 0) 沼野 聡, 加賀克昌, 工藤雄大, 山下まり : ホタテガイに含有する麻痺性貝毒の代謝物に関する研究, 第 115 回日本食品衛生学会学術講演会, 2019 年 10 月 4 日 poster
- 3 1) 山下まり 海洋生物毒の謎に迫る, 仙台青葉学院短期大学講演会, 2019 年 10 月 7 日 招待講演
- 3 2) 赤松みちる, 長由扶子, 此木敬一, 山下まり : 淡水産藍藻 *Anabaena circinalis* (TA04 株) における新規麻痺性貝毒類縁体の探索, 公益社団法人日本農芸化学会東北支部・第 154 回大会, 2019 年 11 月 9 日
- 3 3) 工藤雄大, 山下まり : LC-MS/MS を用いた抗マラリア活性天然物サリニポスチンの新規類縁体の探索, 公益社団法人日本農芸化学会東北支部・第 154 回大会, 2019 年 11 月 9 日
- 3 4) 角替俊輔, Katherine Chan, Amy Hin Yan Tong, Kamaldeep Kaur Aulakh, Andrea Habsid, 八代田陽子, Jason Moffat, Charles Boone, 山下まり, 村田道雄, 此木敬一 : Crispr スクリーニングによる maitotoxin の標的分子探索 (1), 公

益社団法人日本農芸化学会東北支部・第154回大会, 2019年11月9日口頭

35) 角替俊輔, Katherine Chan, Amy Hin Yan Tong, Kamaldeep Kaur Aulakh, Andrea Habsid, 八代田陽子, Jason Moffat, Charles Boone, 山下まり, 村田道雄, 此木敬一: Crispr スクリーニングによる maitotoxin の標的分子探索 (2), 公益社団法人日本農芸化学会東北支部・第154回大会, 2019年11月9日 口頭

36) 此木敬一: 海洋天然毒の作用機序解明, 生物有機化学講演会, 九州大学理学部化学科 (2019年12月3日) 招待講演

37) 沼野 聡, 加賀克昌, 工藤雄大, 山下まり: 岩手県産ホタテガイの中腸腺に含有する麻痺性貝毒の分析, 第56回 全国衛生化学技術協議会年会, 2019年12月5日 Poster

38) 山下まり, 土肥裕花, 島田紀子, 岩崎浩太郎, 佐々木理, 川島悠岐, 此木敬一, 佐々木誠: 致死性海藻中毒原因物質ポリカバノシド類の作用機序, 科研費新学術領域研究 化学コミュニケーションのフロンティア 第6回公開シンポジウム, 2019年12月9日 Poster

39) 高柳優夏, 安達葉菜, 石塚 颯, 此木敬一, 山下まり, 小田木 陽, 長澤和夫: サキシトキシン類の非天然型エナンチオマーの合成及びナトリウムチャンネル阻害活性評価, 日本化学会 第100春季年会 (2020) , 2020年3月15日 Poster

40) 工藤 雄大, ハニフィン チャールズ, 小瀧 裕一, 山下 まり: 有毒イモリより得られた N-hydroxy 型テトロドトキシン類縁体の構造解析, 日本農芸化学会 2020 年度大会, 2020年3月26日 口頭

41) 東海林 千容, 長 由扶子, 赤松 みちる, 安達 葉菜, 石塚 颯, 此木 敬一, 長澤 和夫, 山下 まり: 麻痺性貝毒サキシトキシンの推定生合成中間体の合成と有毒生物中の分析, 日本農芸化学会 2020

年度大会, 2020年3月26日 口頭

42) 八重樫優士, 工藤雄大, 長由扶子, 此木敬一, 山下まり: フグ由来の新規テトロドトキシン関連化合物の単離と構造 , 日本農芸化学会 2020 大会, 2020年3月26日 口頭

43) 山下まり・佐藤恭佳・千葉 修・長由扶子・此木敬一: 高純度テトロドトキシン類縁体の定量と Nav 阻害活性, 令和2年度日本水産学会春季大会, 2020年3月27日 口頭

44) 長 由扶子, 土屋 成輝, 小池 一彦, 此木 敬一, 大島 泰克, 山下 まり: コルヒチン存在下の渦鞭毛藻サキシトキシン 生合成のメタボロミクス解析, 令和2年度日本水産学会春季大会, 2020年3月27日 口頭

45) 角替 俊輔, チャン キャサリン, トン エイミーヒンヤン, アウラク カマルディーブカウアー, ハスビド アンドレア, 松本 健, 八代田 陽子, モファット ジェイソン, ブーン チャールズ, 山下 まり, 村田 道雄, 吉田 稔, 此木 敬一: 超活性海洋天然有機化合物マイトトキシンの標的分子探索, 日本農芸化学会 2020 年度大会 , 2020年3月28日 口頭

46) 島田 紀子, 長 由扶子, 此木敬二, 山下まり: クロイソカイメン抽出物由来電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤の探索, 日本農芸化学会 2020 年度大会, 2020年3月28日 口頭

H. 知的財産権の出願・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