

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

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  
鈴木 敏之 中央水産研究所 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。

まず、当該分析方法の妥当性確認のため、フグの子糠漬け試料に濃度既知の TTX を一定量（2 □g TTX/5 g tissue）加え、適宜前処理を行い、添加回収試験を行った。対照区として TTX を添加しないフグの子糠漬け試料についても TTX 含量を調べ、TTX 添加区での分析値が平均 1,472 ng/g tissue であったのに対し、対照区では平均 1,125 ng/g tissue であった。これらの結果と添加した TTX 量（理論値）から求めた TTX の回収率は 87%（347 ng TTX/g tissue）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。

次に、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。

- A. 研究目的
- フグの安全性確保については、現行のフグに関する規制の遵守により食中毒の発生を防止している。加えて、フグ卵巣の糠漬け

などについては 10MU/g 以下の毒力であれば無毒と見なし、食品としても良いとしてリスク管理がなされている。しかし、フグ毒には複数の類縁体が報告されており、機器分析で求めた TTX 類の含量と食品衛生上の判断基準となる毒力との関係については十分に検討されていないのが実情である。

そこで、市販のフグの子糠漬け製品に含まれるテトロドトキシン類の含量から毒力を求めることを目的とし、テトロドトキシン (TTX) 類標準毒の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、初めにフグの子糠漬けに含まれる TTX とその類縁体含量を迅速な UHPLC/MS/MS 法にて測定した。次に、得られた毒量値に、マウス比毒性値を参考にして設定した毒性等価係数 (TEF) を乗じて毒力を換算した。

## B. 研究方法

### 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 (油与商店 (十字屋製品として)、あら与、有限会社 荒忠商店、有限会社 安新、任孫商店、原清商店) 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 □g 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 □l のアンモニア水 (25%) を添加し、良く攪拌した。このように調整した試料は、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 × 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-*epi*TTX and 6-*epi*TTX: *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  $\mu$ g/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。

## 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を用い、その他の成分については東北大学から恵与されたコモ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。

## C. 研究結果

### 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ものの二通りが考えられてきた。しかし、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 □g 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  $1472 \pm 35$  ng TTX/g tissue（2.4% rsd）、TTX 非添加区は  $1125 \pm 57$  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。グラフィ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を眺めてみても、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。

## 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似たような毒組成、毒力を示した。そこで、そのうちの 1 社（あら与）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  $\mu$ 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、原清商店：771 ng TTX eq./g tissue (3.5 MU/g)、荒忠商店：1526 ng TTX eq./g tissue (6.9 MU/g)、安新：793 ng TTX eq./g tissue (3.6 MU/g)、任孫商店：981 ng TTX eq./g tissue (4.5 MU/g)、油与：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 以下であることがわかった。

#### D. 考察

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  $\mu$ g 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 含量を示した原清商店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る。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。

#### 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。

#### F. 健康危険情報

研究分担者のため割愛

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ryuichi Watanabe, Masato Tanioka, Hajime Uchida, Ryoji Matsushima, Hiroshi Oikawa, Masahiro Matsumiya, Mari Yotsu-Yamashita, Toshiyuki Suzuki. Quantitation of tetrodotoxin and its analogues with a combination of liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitative  $^1\text{H-NMR}$  Spectroscopy, *J. Agri. Food Chem.* 2019, 67, 46, 12911-12917.  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.9b06380>

##### 2. 学会発表

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)

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