

テトロドキシンのリスク管理のための研究

分担研究報告書

分担研究課題 「フグ毒TTX標準品とフグ粗毒原液の毒力の「マウス毒性試験」
（急性）（腹腔内及び経口投与）による比較」

課題番号 H30-食品-一般-005

研究分担者	北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
研究協力者	高橋祐次	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	栗形麻樹子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	大久保佑亮	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	齊藤洋克	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	國吉杏子	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	大城直雅	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	岡田由美子	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キシシン（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、食品衛生検査指針化学編2015・マウス検定法で示される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の基準値の妥当性を検証し、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年度は、市販の生化学用TTX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行った。1.82 MUと予想されたTTXの0.40 µg/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 µg/kg）（各群3匹）を実施した。実験結果からは半数致死量（LD₅₀値）は、300以上500未満µg/kgと求められ、この点、欧州食品安全機関（EFSA）の報告書では232～532 µg/kg、別途RTECS（Registry of Toxic Effects of Chemical Substances）情報では334 µg/kgと、ほぼ同様な結果を報告しており、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。

令和元年（平成31年）度は、中央水産研究所由来の別課題「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、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。予めTTX濃度が測定されたa)市販の生化学用TTX、b)中央水産研究所由来のTTX調整液、並びにc)コモンフグ抽出物（国立衛研・食品衛生管理部で抽出及び濃度・純度測定を実施）それぞれ0.40 µg/ml相当の濃度に調整し、ddY雄性マウス（4週齢）に1ml腹腔内投与しMUを求めた結果（1MUは0.22 µg TTXとされるため、投与液中には2MUが含まれると試算）それぞれ2.17、2.68及び1.74となり（致死時間のメディアン（5サンプル中）はそれぞれ、08:17、07:09、11:02（分：秒））、一見するとコモンフグ抽出物は、中央水産研究所のものと比較し、65%の濃度のTTXしか含まれていないように推察された。その後、各投与液中のTTX濃度をLC-MS/MS分析により測定したところ、それぞれ、0.43、0.49及び0.38 µg/mLとなり、コモンフグ抽出物は、中央水産研究所のものと比較し、78%相当の濃度のTTXしか含まれていないことが明らかとなった。この結果から再度濃度換算を実施し比較したところ、コモンフグ抽出物は、中央水産研究所由来の高純度の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。以上の結果から、TTXの毒力比較を精査する際には、試料からのTTXの純度確保に資する前抽出法の改良と共に、TTX異性体含有量の確認が必要不可欠であり、各異性体の毒力については今後、TTXへの換算値を考慮する等して明確化する必要があると考えられた。

令和2年度は、フグ毒摂取経路である経口投与による、常法のマウス急性毒性試験をおこない（系統、週齢、性等は食品衛生検査指針と同じとする）急性毒性における無毒性量の算出を試み、EFSAの報告におけるTTXのARfDとの比較、或いはTTXの現行のフグに係る10 MU/g規制値について検証することで科学的根拠に基づくリスク評価のための基礎資料を提供する予定である。

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(食品衛生検査指針理化学編2015)。

B . 研究方法

平成30年度は、食品衛生検査指針に記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」(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。

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、濾液を合一して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)。このTTXは、中央水産研究所より下記の情報を得ている。すなわち「フナコシ(Latoxan)のものを使用している。約19 mgのTTXに対してモル比で約30%近いカプリル酸が混入していたため、グラファイトカーボンカートリッジ、次いでODS固相抽出カートリッジにて除去した。定量NMRにより求めた最終的な濃度は以下の通りである。

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-epiTTX: 0.025 mg/ml (0.078 mM)
Caprylic acid: 0.005 mg/ml (0.033 mM)
(溶媒:1% 酢酸溶液)

したがって、10%程度のTTX異性体が多く含まれていることとなる。

酢酸(カタログ番号:01021-03、グレード:精密分析用(for trace analysis)、関東化学)

コモンフグ粗毒素原液の調整

(1) 試薬

酢酸(特級)、高速液体クロマトグラフ用アセトニトリル、ギ酸(LC/MS用、約99%)は和光純薬工業株式会社製、水はMerck Millipore社製Milli-Q Integral 5で製造した超純水を用いた。分析標準品のTTX標準品は富士フィルム和光純薬(株)製(テトロドトキシン、細胞生物学用)を用いた。同標準品は0.1%酢酸水で希釈し、Laboratorio CIFGA S.A.製の認証標準物質(CRM-03-TTXs)で値付けしたものをTTX標準液とした。

(2) フグ検体

国産天然コモンフグ皮部位(NIHS-puf-150051)

, NIHS-puf-150091 , NIHS-puf-150091 , NIHS-puf-191019) を用いた。このうち、NIHS-puf-150091 及びNIHS-puf-150091 は同一魚体由来であるが採取部位が異なっていた。

(3) 粗毒素原液の調製

食品衛生検査指針理化学編2015に収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-150051、NIHS-puf-150091 及び については検体量が2 gしか確保できなかった為、抽出液量を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 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 で保存した。

B-2 : 投与液の作製

平成30年度の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%、富士フイルム和光純薬(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・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1 mLとした。

平成31年度のMU算出における溶媒は、0.1%酢酸溶液(pH3.5)(酢酸:カタログ番号:01021-03、グレード:精密分析用(for trace analysis) 関東化学) コモンフグ抽出物(皮膚由来)の場合には、予めTTXが含まれていないとわかっているコモンフグ抽出液(皮膚由来)を使用した。

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用の場合は、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

H30年度のMU算出予備実験用ならびにH31年度のMU算出用には、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分で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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）につき3匹ずつ、計5群、15匹とした。

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す。

分析カラム：InertSustain Amide (2.1 \times 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： N_2 (300, 11 L/min)

ネブライザー： N_2 (55 psi)

シースガス： N_2 (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： N_2

測定モード：MRM

モニターイオン： 下記参照

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SCANモード及び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
定量にあたっては外部標準法を採用した。粗毒源液（または投与液）0.5 mLを限外ろ過（10 kDa）し、ろ液を0.1%酢酸で適宜希釈後、同量の0.1%酢酸含有アセトニトリルを加え、PVDF膜でろ過（0.2 μm ）したものを測定液とした。クロマトグラムの面積値から検量線を使って測定液の濃度を求め、そこに希釈度を掛けて粗毒原液（または投与液）の濃度を決定した。

化合物名	トランジション
TTX, 4- <i>epi</i> TTX	m/z 320 > m/z 162
5-deoxyTTX	m/z 304 > m/z 162
11-deoxyTTX	m/z 304 > m/z 162
4,9-anhydroTTX	m/z 302 > m/z 162
6,11-dideoxyTTX	m/z 288 > m/z 162
5,6,11-trideoxyTTX, 4- <i>epi</i> -5,6,11-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

検量線の作成にあたっては、TTX標準液を0.1%酢酸で希釈して0.69、1.38、2.8、5.5、11 ng/mLの5濃度を調製後、各液に同量の0.1%酢酸含有アセトニトリルを加え、検量線の測定液とした。クロマトグラムの面積値と濃度から、検量線を作成した。

また、本年度はマトリクスの影響が疑われる粗毒原液に対し、次のように標準添加法による定量を実施した。粗毒抽出液を0.1%酢酸で適宜希釈して試験液とし、これをバイアル瓶4本に100 μL ずつ分注した。うち1本は0.1%酢酸400 μL を添加してブランク液とし、残り3本にはTTX標準液（11 ng/mL）をそれぞれ50、100、200 μL 添加すると共に、更に0.1%酢酸を加えて容量を500 μL

とすることで TTX 添加濃度 0、1.1、2.2、4.4 ng/mL (各 500 μ L) の検量線用測定液を調整した。各液を LC-MS/MS 測定し、添加濃度とピーク面積値に基づき検量線を作成した。検量線の X 切片の絶対値をブランク液 (添加濃度 0 ng/mL) 中の TTX 濃度と見做し、各試験溶液の TTX 濃度を算出した上で希釈度を乗じて粗毒原液中の TTX 濃度を求めた。

(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)」。

C. 研究結果及び考察

C-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) :

予め TTX濃度が測定された a) 市販の生化学用 TTX、b) 中央水産研究所由来の純度の高い TTX調整液、ならびに c) コモンフグ抽出物 (皮膚由来) (国立衛研・食品衛生管理部由来) 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 投与するのでは MU は 2 となるはず) それぞれ 2.17、2.68 及び 1.74 となり、一見すると コモンフグ抽出物は、中央水産研究所のものと比較し、65% の濃度の TTX しか含まれていないように推察された。なお致死時間のメディアン (5 サンプル中) はそれぞれ、08:17、07:09、11:02 (分:秒) であった。この結果を、別添資料 1 として別添に示す。

その後、各投与液中の TTX 濃度について、国立衛研・食品衛生管理部にて LC-MS/MS による分析により測定したところ (それぞれ 0.40 μ g/ml のはず) それぞれ、0.43、0.49 及び 0.38 μ g/ml となり、コモンフグ抽出物 (皮膚由来) は、中央水産研究所のものと比較し、78% 相当の濃度の TTX しか含まれていないことが明らかとなった (生化学用のものは 88%)。

この LC-MS/MS による分析による TTX の濃度を元にあらためて 0.40 μ g/ml となるよう換算したと

ころ、各 MU は、(2.17 \times 0.4/0.43)、(2.68 \times 0.4/0.49) 及び (1.74 \times 0.4/0.38) という計算からそれぞれ、2.0、2.2 及び 1.8 となった。したがって、TTX 量が同じであっても、コモンフグ抽出物 (皮膚由来) は、中央水産研究所由来の純度の高い 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。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。コモンフグ由来抽出物の TTX 異性体の含有量については未決定であるが、純度の高い TTX 調整液中には TTX 異性体が 10% 程度含まれている。この点、TTX と比較し、TTX 異性体の毒力が換算できなければ、サンプル間で正確に比較できないこととなる。

以上の結果から、TTX の毒力比較を精査する際には、TTX の純度とともに、各 TTX 異性体の含有量と、各異性体の毒力については今後、TTX への換算値を考慮するなどの検討により、明確化する必要があるものと考えられた。

< 毒力換算に関する参考となる考え方 >

この毒力換算に関する参考となる考え方として、類似するものとして、ダイオキシン類の場合の毒性等量 (TEQ : Toxic Equivalent) の考え方を挙げることができる。ダイオキシン類の異性体の数は約 230 種類もあり、この内、毒性が顕著なものは 29 種類存在する。それらの毒性の強さは、異性体の種類によって異なる。そこで、最も毒性が強い 2,3,7,8-TCDD の毒性を 1 として他のダイオキシン類の異性体の毒性の強さを換算した係数 (毒性等価係数 (TEF : Toxic Equivalency Factor)) が用いられており、多くのダイオキシン類の量や濃度のデータは、この TEF を用いてダイオキシン類の毒性を足し合わせた値 (通常、毒性等量 (TEQ : Toxic Equivalent) という単位で表現) が用いられている。例えば、1,2,3,4,6,7,8-HpCDD、2,3,7,8-TCDF の TEF 値はそれぞれ、0.01 及び 0.1 である。

TTX の場合もこうした換算値を使用し、TTX 異性体の毒力を加味した TTX 換算量を求めることを換

討した方がよいとも考える。

C-2: コモンフグ粗毒原液中のTTX濃度定量分析

(1) 投与液中TTX濃度の定量分析

TTX標準液で作成した検量線は0.63~11 ng/mLの範囲で良好な直線性を示し、定量下限値は0.69 ng/mLであった。粗毒原液の定量結果として、NIHS-puf-191019 は 0.002 µg/mL、NIHS-puf-150051 は 55.1 µg/mL、NIHS-puf-150091 は 227.9 µg/mL、NIHS-puf-150091 は180.3 µg/mLとなった(表1)。NIHS-puf-191019はTTX以外にトランジションが320>60(溶出時間2分)を示すピークのみ検出された。NIHS-puf-150051、NIHS-puf-150091 およびNIHS-puf-150091 はTTX以外にトランジションと溶出順位から、4-epiTTX、4-epi-5,6,11-trideoxyTTX、5,6,11-trideoxyTTXおよび4,9-anhydroTTXと推定される類縁体が検出された(図1)。1 MUは体重20 gのマウスを30分で死亡させる毒量と定義され、TTX 0.22 µgに相当する。このことからNIHS-puf-191019の魚肉あたりの毒力は0.044 MU/gとなり、食品衛生検査指針で示される基準値未満(<10 MU/g)であったことから、投与液を調製する際の希釈用抽出液とした。TTX濃度が高いNIHS-puf-150051、NIHS-puf-150091 およびNIHS-puf-150091 は添加用粗毒原液候補とした。

(2) 投与液のTTX定量分析

選定した投与液A、B及びCを0.1%酢酸で100倍希して定量分析した。その結果、各投与液中のTTX濃度は投与液Aが0.43 µg/mL、Bが0.49 µg/mL、Cが0.38 µg/mLとなった。1 MUはTTX 0.22 µgに相当することから、魚肉あたりの毒力は、投与液Aが2.15 MU/g、Bは2.47 MU/g、Cは1.90 MU/gと換算された(表2)。これらの値はマウス検定による毒力と比較すると顕著な差がないことから、類縁体の有無や溶媒の違いがマウス毒性に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。クロマトグラムから投与液AはTTX以外に夾雑物のピークは検出されず高純度と推定された。一方、投与液Bは

4-epiTTXと4,9-anhydroTTXと推定される類縁体が僅かに検出されたほか、投与液CはTTX以外に4-epiTTX、4-epi-5,6,11-TrideoxyTTX、5,6,11-TrideoxyTTX及び4,9-anhydroTTXと推定される類縁体が検出された(図2)。Yotsu-Yamashita et al.(1999)では、RBA法(レセプターバインディングアッセイ法)を用いてTTX類の活性比較を行っており、TTXに対する同活性比は、4-epiTTXが約1/38、4,9-anhydroTTXは約1/100倍と報告されている。従って、投与液A、B及びCのマウス毒性に顕著な差異が見られなかったことは、本供試試料に含まれていたTTX以外の類縁体の毒性が低いためと想定される。

(3) 粗毒液中のマトリクスの影響について

LC-MS/MS分析は選択性に優れる反面、試料によってはマトリクスの影響でイオン化阻害を受け易く、標準液との間でイオン化効率に差が生じることがある。そこで、マトリクスの影響が疑われる粗毒原液(NIHS-puf-150051、NIHS-puf-150091 およびNIHS-puf-150091)について標準添加法を実施し、外部標準法と比較してイオン化への影響を検討した。結果として、NIHS-puf-150051 は標準添加法で112.8 µg/mL、外部標準法ではその半量の55.1 µg/mLとなり、イオン化抑制が確認された。NIHS-puf-150091 とNIHS-puf-150091 は標準添加法でそれぞれ172.6 µg/mL、132.6 µg/mLであったが、外部標準法では227.9 µg/mL、180.3 µg/mLとなりイオン化促進が確認された(表3)。

NIHS-puf-150051とNIHS-puf-150091は同一魚種(コモンフグ)ではあるが、マトリクスのイオン化への影響は異なるものであった。今回、外部標準法を用いて定量する際には粗毒原液を10,000~50,000倍に希釈したが、依然としてマトリクスの影響が残っていることが明らかとなった。このような検体に対して標準添加法は有効ではあるが、操作が煩雑であり、多検体を分析する場合には適さないと思われる。また、一検体あたり、標準液を添加した測定液を複数準備する必要があり、標準品消費量が増加するため、実効性に

は乏しいと言える。今後、LC-MS/MSによる定量分析を行うにあたってのマトリックスの影響低減を目標として、固相抽出カラム等を用いた前処理の追加や分析条件は検討すべき課題の一つになると思われる。

本年度、厚生労働省では、フグ処理者の認定基準に関する通知を発出し、フグ処理方法の国内統一的な在り方を全国自治体に求めることとなった。今後のわが国におけるフグの製造加工、並びに喫食に係る安全性確保を更に推進するためには、実効性に富む、現行のマウスアッセイ法の適切性を科学的に評価することが、魚種毎の可食部位の明確化や衛生管理上の新たな改善点を抽出していく上で必要不可欠の事項と言える。また、TTX分布は魚種、捕獲海域、季節性等が大きな変動要因とされるが、わが国では従前よりフグ加工食品も食生活に取り入れられていることを踏まえると、食品製造加工段階において実施されているリスク管理策を裏付ける科学的根拠の創出も今後検討すべき課題と思われる。

D. 結論

令和元年(平成31)年度は、中央水産研究所由来の別課題「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、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」(溶媒対照群は設置する)(すなわち、腹腔内投与)をおこない、両者のマウスユニット(MU)を求めることによる毒力比較をおこなった。

コモンフグ抽出物(皮膚由来)は、中央水産研究所由来の純度の高い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。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。

このことから、TTXの毒力比較を精査する際には、

TTXの純度とともに、各TTX異性体の含有量と、各異性体の毒力については今後、TTXへの換算値を考慮するなどの検討により、明確化する必要があるものと考えられた。フグ由来粗毒原液にはマトリックスがTTX濃度想定に及ぼす影響も懸念されたことから、試料調整にあたっての前処理等も今後必要な課題と思われる。

令和2年度は、フグ毒摂取経路である経口投与による、常法の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)急性毒性における無毒性量の算出を試み、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予定である。また、進捗状況に応じて、フグの皮膚以外の部分(肝や卵巣等)由来の抽出物についても、毒力比較もおこなう予定である。

E. 健康危機情報 なし

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

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.

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: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(2019.9.13.)名古屋

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

登田 美桜、北嶋 聡、フグ毒として知られるテトロ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

種村 健太郎,北嶋 聡:フグ毒として知られるテトロ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

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

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

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

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

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno: Cross Talks among PPARα, 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

Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayash: Evaluation of Exosomes as Toxic Biomarkers, IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICT 2019), (2019.7.17.)ハワイ

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

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

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

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

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を求めることによる毒力比較の結果：

食品衛生検査指針でのマウス検定法に従い、a)市販の生化学用 TTX、b)中央水産研究所由来の TTX 調整液、ならびに c) コモンフグ抽出物（皮膚由来）(国立衛研・食品衛生管理部由来) それぞれ 0.40 μg/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。

A. 生化学用テトロトキシン(富士フイルム和光純薬(株))					MU(表7-1より)	MU(表7-2で補正)	
予備試験							
0.40 ug/ml	体重	致死時間	投与時刻	致死時刻			
1	21.7	0:09:28	10:17:00	10:26:28	⑤		
2	22.9	0:09:10	10:18:00	10:27:10	④		
本試験							
0.40 ug/ml	体重	致死時間	投与時刻	致死時刻			
3	23.0	0:07:13	10:58:02	11:05:15	①		
4	22.6	0:07:37	10:58:47	11:06:24	②		
5	21.6	0:08:17	10:59:30	11:07:47	③	2.01	2.17
B. 水研由来テトロトキシン水溶液							
予備試験							
0.40 ug/ml	体重	致死時間	投与時刻	致死時刻			
1	22.7	0:07:22	10:30:37	10:37:59	⑤		
2	22.0	0:07:17	10:31:34	10:38:51	④		
本試験							
0.40 ug/ml	体重	致死時間	投与時刻	致死時刻			
3	21.7	0:07:06	11:09:16	11:16:22	②		
4	21.9	0:07:02	11:10:13	11:17:15	①		
5	23.0	0:07:09	11:10:58	11:18:07	③	2.33	2.68
C. コモンフグ抽出物(国衛研・食品衛生管理部)							
予備試験							
0.40 ug/ml	体重	致死時間	投与時刻	致死時刻			
1	22.4	0:10:06	10:41:44	10:51:50	②		
2	21.9	0:11:02	10:42:52	10:53:54	③	1.58	1.74
本試験							
0.40 ug/ml	体重	致死時間	投与時刻	致死時刻			
3	22.1	0:14:34	11:19:39	11:34:13	④		
4	22.5	0:13:37	11:20:37	11:34:14	⑤		
5	22.3	0:08:08	11:21:22	11:29:30	①		
MEMO							
・1mlテルモシリンジ(プラスチック)+26G注射針							
・死亡確認は呼吸停止によって行う。死にそうになったら呼吸した時間を覚えて、最後に呼吸した時間を死亡時間とする。							
・観察は蓋なしのケージに入れて行った。(3つ準備する)							
結果							
	MU(表7-1より)		MU(表7-2で補正)				
A	2.01		2.17				
B	2.33		2.68				
C	1.58		1.74				

表 1 . LC-MS/MS による粗毒原液の定量結果 (外部標準法)

粗毒原液 No.	測定液の希釈度	粗毒原液 μg/mL	魚肉当たりの毒力 MU/g
NIHS-puf-150051	10,000	55.10	1,252
NIHS-puf-150091	50,000	227.94	5,180
NIHS-puf-150091	50,000	180.25	4,097
NIHS-puf-191019	1	0.0020	0.044

表 2 . マウス検定と LC-MS/MS 分析の結果比較

投与液	由来	マウス検定	LC-MS/MS分析	
		毒力 MU/g	定量値 (実測値) μg/mL	毒力換算値 MU/g
A	富士フィルム和光純薬(株)製 TTX標準品	2.17	0.43	2.15
B	中央水研由来 TTX調製液	2.68	0.49	2.47
C	フグ検体抽出液	1.74	0.38	1.90

表 3 . 外部標準法と標準添加法による定量値の比較

粗毒原液 No.	標準添加法	外部標準法
	μg/mL	μg/mL
NIHS-puf-150051	112.8	55.1
NIHS-puf-150091	172.6	227.9
NIHS-puf-150091	132.6	180.3

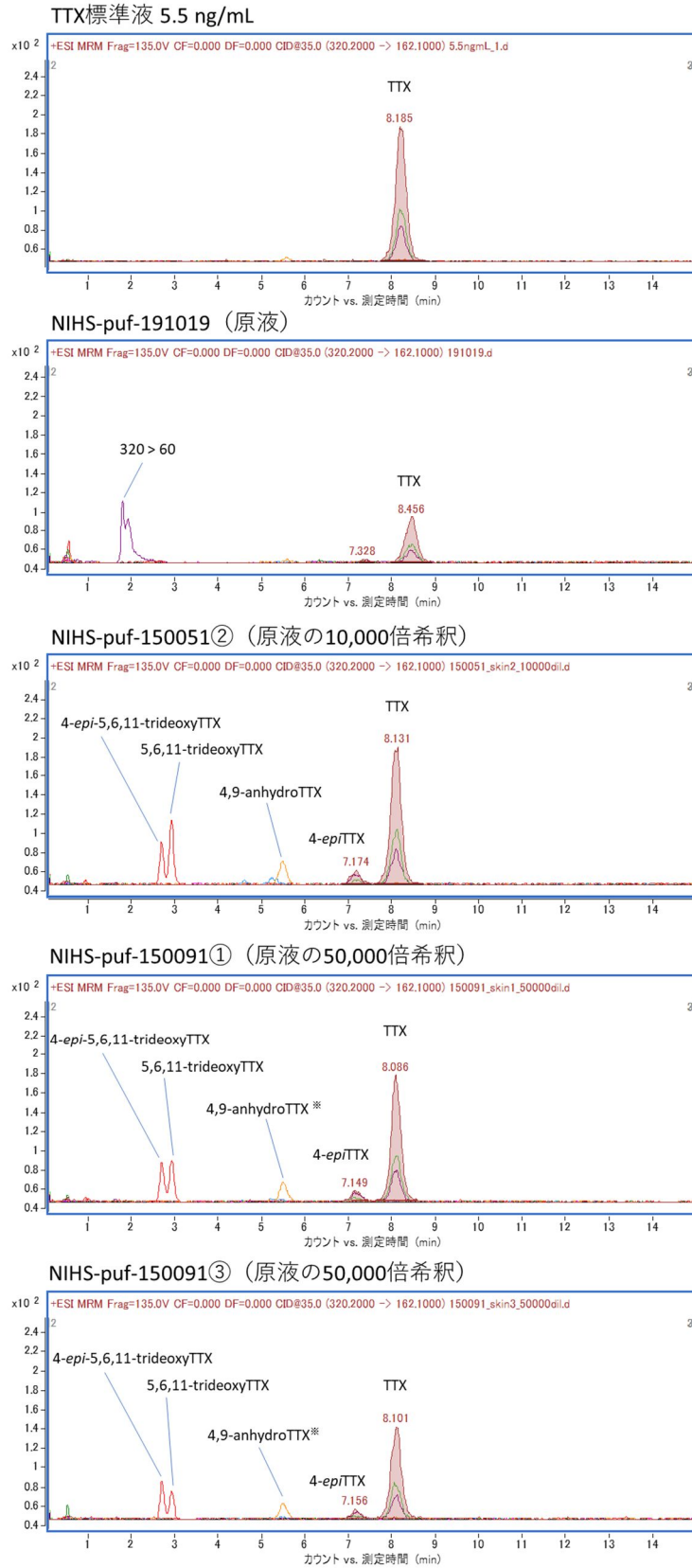


図 1 . 粗毒原液から調製した測定液の LC-MS/MS クロマトグラム

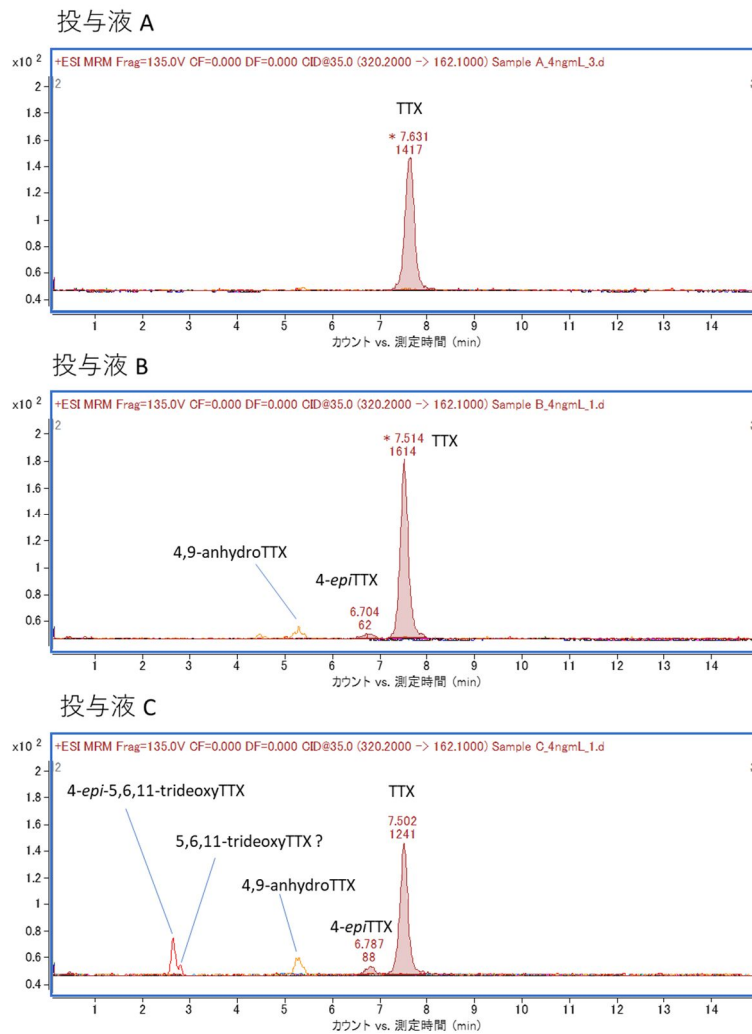


図 2 . マウス投与液の 100 倍希釈液の LC-MS/MS クロマトグラム