

厚生労働省科学研究費補助金研究報告書表紙

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
テトロドキシンのリスク管理に関する研究

平成30年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 敏之

令和元(2019)年 5月

厚生労働省科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I . 総括研究報告	
テトロドトキシンのリスク管理に関する研究 -----	1
鈴木 敏之	
II . 分担研究報告	
1 . テトロドトキシンのリスク管理に関する研究 -----	15
渡邊龍一・内田肇・松嶋良次・及川寛・鈴木敏之	
2 . テトロドトキシンのリスク管理に関する研究 -----	23
北嶋聡・大城直雅	
3 . テトロドトキシンのリスク管理に関する研究 -----	37
山下まり・此木敬一	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	41

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に関する研究

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：マウスに対するテトロドトキシシン（TTX）の腹腔内投与毒性や急性経口毒性を明らかにするために必要な TTX 標準毒の正確な値付け手法の開発（定量 NMR 法）と分析用標準毒の調製、フグやフグ糠漬けに含まれる TTX とその類縁体含量を測定できる迅速な LC/MS/MS 法を開発した。動物試験に使用する TTX 試薬を購入したところ、カプリル酸が約 30%含まれていたため、これを除去し、濃度を開発した定量 NMR にて決定し、動物試験用 TTX 溶液を調製した。

TTX の毒性評価試験として、本年度は予備実験として TTX 市販品を用いて動物試験用投与液を調製（溶媒：0.1%酢酸液）し、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、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 $\mu\text{g/kg}$ ）（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 匹全例の死亡が認められた。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半数致死量（LD50 値）は、300 以上 500 未満 $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ 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。

TTX 類縁体の毒性を評価するために、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する方法を確立し、LC-MS や NMR で純度を確認した。さらに、TTX 類縁体のナトリウムチャンネル阻害活性を評価する方法を検討し、マウス神経芽細胞腫 Neuro 2A を用いて、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。

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。(H31, 32)、(3)TTX 類縁体の毒性評価については、qNMR などで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(H31)、(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(H32)、(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(H32)。

B. 研究方法

B-1 定量 NMR 法の開発と TTX の正確な濃度決定

製造元が異なる 4 社から TTX 酢酸塩 1mg を 2 本と TTX クエン酸塩 1mg を各 2 本の計 4 本を購入した。それぞれを 1ml の 4% 重酢酸/重水溶液に溶解し、そのうちの 0.6ml を NMR による定量に使用し、残りの約 0.4ml を希釈して LC/MS/MS 分析に供した。なお、NMR を用いた定量では、39.05mM のマレイン酸(4% 重酢酸/重水溶液に溶解)を外標準とし、PULCON 法で定量したが、2次元 NMR スペクトルを測定し、定量には他シグナルとよく分離しているものを選択した。この方法を用いて、各試薬の TTX と TTX 類縁体含量を求めた。分析には、Bruker 社製の AVANCE III 800 (^1H : 800 MHz)を用いた。また、安定性の検討では NMR チューブに入れた TTX 溶液を 4 にて一年近く保存し、定期的に TTX の含量を求めた。

購入した 4 社の製品のうち、最も純度の高いものを選び、毒性評価用とした。毒性評価用とした試薬の一部について NMR にて純度を調べたところ、カプリル酸が 30%近く混入していることが判明した。そこで、グラファイトカーボン固相抽出カートリッジ、次いで、ODS 固相抽出カートリッジにてカプリル酸を除去した。このように処理した TTX 溶液を NMR で定量し、動物試験用試薬として来年度の実験で使用する。

TTX および TTX 類縁体検出のための LC/MS/MS 法を検討した。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。検討した LC/MS/MS 法を用いて、NMR 定量に用いた TTX 試薬内に類縁体が含まれているか調べた。また、4,9-anhydroTTX と 4-epiTTX については、化学誘導した TTX 混合溶液を用いて検量線を作成し、TTX に対する相対モル感度を求めた。

B-2 動物試験による TTX の毒性評価

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を実施した。本年度は予備実験として市販品の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)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。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。

B-3 TTX 類縁体の毒性評価

TTX 類縁体の精製では、4-epiTTX と 11-oxoTTX は、含有動物由来の試料から精製する方が化学反応で調製するより効率がよいと考えられた。そのため、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、これらの類縁体を比較的多く含む画分を見出した。次にその画分から、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 H₅I₀₆ 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 を上述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。

以上の手法により精製した 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試験を確立するために、精製 Neuro2A 細胞に対して電気生理学的手法の一つであるホールセル記録法を適用し、電位依存性ナトリウムチャンネルに対する TTX 類縁体の阻害効果を調査した。

C. 研究結果

C-1-1 TTX の定量 NMR 法の開発

TTX は溶液中で hemilactal 体と 10,7-lactone 体の化学平衡状態にある。また、TTX は酸性度を上げることで、4,9-anhydroTTX および 4-epiTTX に容易に変換する。そのため、溶液中では 4 成分の混合液として存在している。市販の TTX 試薬を 4 種購入し、それぞれを重酢酸/重水溶媒 1 ml に溶解し、NMR スペクトルを測定した。その結果、TTX 酢酸塩(2 種)では不純物の混入は認められなかった。一方、TTX クエン酸塩(2 種)では、カウンターイオンとしてのクエン酸以外に、グリセロールの混入が認められた。このシグナルは、TTX の Lactone 体の H11 プロトンと一部重なっていたため、毒性評価用には用いないこととした。また、TTX 由来シグナルを調べると、

Hemilactal 体のシグナルが強く観測され、次いで 10,7-lactone 体、ごく微量ながら 4,9-anhydroTTX が観測された。なお、このときには、4-epiTTX 由来のシグナルを認めることはできなかった。これら成分を含んだ TTX 溶液について HSQC と HMBC 測定を行い、ピーク同定を行った。さらに、HSQC スペクトルから、ピーク同士の重なりなどを調べ、TTX 含量を測定するのによいシグナルを選別した。その結果、TTX の総量は、hemilactal 体と 10,7-lactone 体が重なった H-4a 位 (δ_{H} : 2.35 ppm) が適していると判断した。また、10,7-lactone 体の比率を求めるためには、H-8 位 (10,7-lactone, δ_{H} : 4.45 ppm) が適していた。なお、hemilactal 体の比率を求めるための分離したシグナルは見つけられなかったため、TTX 総量から 10,7-lactone 体の含量を差し引くことで求めることとした。4,9-anhydroTTX については、H-4a 位 (δ_{H} : 2.94 ppm) と H-8 位 (δ_{H} : 4.63 ppm) が適していると判断した。上記シグナルを使って、外標準法である PULCON にて定量し、各含量を求めた。その結果、ラベル表示値が 1 mg であったのに対し、NMR 定量で求めた含量は、780-880 μg 相当であった。このことから、ラベル値は過剰評価となっていることが判明した。また、各成分の比率は、hemilactal 体が 73-78%、10,7-lactone 体が 19-21%、4,9-anhydroTTX が 2-7% であった。

C-1-2 4-EpiTTX の調製と混合溶液の定量 NMR 法の開発

TTX 溶液を測定しただけでは、4-epiTTX を認めることはできなかったため、化学誘導によって 4-epiTTX を調製し、4 種混合溶

液を使い、再度 HSQC スペクトルを測定し、シグナル同士の重複がないか検討した。重溶媒に溶解している TTX 試薬 約 0.8 mg を グラファイトカーボン固相抽出カートリッジで処理し、過剰のクエン酸を除去した。溶媒を除去したのち、0.1mM リン酸緩衝液 ($\text{pH}7.0$) 0.8 ml に溶解し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 45 時間加温した。その後、反応液を再度グラファイトカーボン固相抽出カートリッジで処理し、溶出液を凍結乾燥し、再び、1 ml の重溶媒に溶解した。その結果、4-epiTTX 由来のシグナルと思われる H-4 (δ_{H} : 5.14 ppm) が出現した。また、HSQC スペクトルから H-4a (δ_{H} : 2.85 ppm) を認めた。これらを 4-epiTTX を定量する際のシグナルに選抜した。また、これらシグナル以外に HSQC 上で 3 つのクロスピーク (4-epiTTX 由来) を新たに認め、それらが、定量に用いるシグナルと重複していないことを確認した。これにより再度 NMR スペクトルを見直すと、0.3-1.0% の 4-epiTTX が混在していることが判明した。

C-1-3 動物試験用および分析用 TTX 溶液の調製

以上の結果から、TTX 酢酸塩が動物試験用および分析用 TTX 標準液として適していると判断した。そこで、新たに、TTX 酢酸塩(ラベル保証値: 25mg 相当)を購入して、NMR スペクトルを測定したところ、約 30% のカプリル酸が混入していることが分かった。そこで、TTX 溶液をグラファイトカーボン固相抽出カートリッジ、次いで ODS 固相抽出カートリッジで処理し、カプリル酸の除去を行った。その結果、以下の成分・含量を含む溶液 (9ml) を調製し、国立医薬品食品衛生研

究所で来年度実施する動物試験用原液とした。

TTX 1.012 mg/ml
4,9-anhydroTTX 0.080 mg/ml
4-epiTTX 0.025 mg/ml
カプリル酸 0.005mg/ml

また、NMR 用に調製した TTX 溶液（重溶媒）0.1 ml を 1%酢酸にて 100ml に定容した。よく混合したのち、1ml ずつ 2ml ガラスバイアルに分注した。これを LC/MS/MS 分析用 TTX 標準品とした。TTX 等の濃度は以下の通りである。

TTX 1.012 µg/ml
4,9-anhydroTTX 0.080 µg/ml
4-epiTTX 0.025 µg/ml

調製後は -20 のフリーザーにて保管した。

C-1-4 フグ糖漬け内の TTX とその類縁体を検出するための LC/MS/MS 分析法の開発

調製した分析用 TTX 標準品を用い、LC/MS/MS のイオン源とイオンチャンネルを最適化した。その結果、declustering potential は 106V であり、m/z 320/162 の時、コリジョンエネルギーは 51eV、m/z 320/302 の時、33eV であった。これを参考にして、MS 3 で m/z162 を設定する成分については、コリジョンエネルギー 51eV を適用し、それ以外のチャンネルを設定する場合には 33 eV を適用した。この条件で、コモング卵巣抽出液の活性炭処理物をアセトニトリルで 4 倍希釈したのち、分析に供したところ、

12 成分(4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX, 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX, 4-epi-5,6,11-trideoxyTTX, 5,6,11-trideoxyTTX, 5,11-trideoxyTTX, 6,11-trideoxyTTX, 5-trideoxyTTX, 11-trideoxyTTX, 11-norTTX-6(S)-ol, 4,9-anhydroTTX, 4-epiTTX, TTX) を検出することに成功した。

この条件を用いて、購入した市販 TTX 4 種を測定したところ、NMR で検出した 3 成分以外検出されなかった。

さらに、TTX 溶液を段階希釈したものを調製し、それらを分析して縦軸にピーク強度を、横軸にはラベル表示値と定量 NMR で求めた値とを用いた 2 種の検量線を作成して比較した。その結果、検量線の傾きは、ラベル表示値を用いたものが低かったことから、ラベル表示値は過大評価となっていることが裏付けられた。これにより、定量 NMR では適正に評価できることが判明した。

最後に、4-epiTTX を含む TTX 混合溶液を段階希釈して、それらを LC/MS/MS 法で分析した。各成分について検量線を作成し、TTX に対する 4,9-anhydroTTX と 4-epiTTX の相対モル感度(RMR)を求めた。その結果、TTX の感度を 1 とすると、4epiTTX で 0.73、4,9-anhydroTTX で 0.46 であった。従って、次の式を使うことで、それら類縁体をより正確に概算できることが分かった。

$$C_{tox} = ([PA]_{tox} / [PA]_{TTX}) \times (C_{TTX} / RMR)$$

C_{tox}: 類縁体の濃度、[PA]: ピーク面積、C_{TTX}: TTX の濃度、RMR: 相対モル感度

なお、これにより 4,9-anhydroTTX の TTX

総量に占める割合を求めると、定量 NMR で求めた値と比較的よく一致した。

C-1-5 TTX 溶液の安定性試験

TTX 酢酸塩を重溶媒に溶解した TTX 溶液を定期的に、外標準法である PULCON で定量した。解析ソフトウェアには Topspin 3.5 p17 を用いた。外標準には、39.05mM のマレイン酸を用いた。なお、TTX 溶液は NMR チューブに入れ 4 で保管し、キャップからの溶媒揮発を抑えるため、テフロンシールとパラフィルムで保護した。

その結果、保管 44 週後で、TTX が若干増加しており、溶媒の揮発によるものと思われる。しかし TTX には変化無く一年近く分解しないことが確認できた。

C-2-1 マウス毒性 (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を実施した。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 µg/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 µg/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 µg/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 µg/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。

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 µg/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。

C-2-2 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 µg/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 µg/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 µg/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 µg/kgと考えられた。EFSAの報告書では、経口投与におけるTTXのLD₅₀値を232~532 µg/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LD₅₀値を334 µg/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。

100 µg/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)。

C 3 1 TTX 類縁体の毒性評価：TTX 類縁体の精製

4-*ep*/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-oxoTTX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-*ep*/TTXは90 µg、11-oxoTTXは30 µgを精製した。4-*ep*/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-*ep*/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-*ep*/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-oxoTTX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-oxoTTX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-norTTX-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-norTTX-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。この3つの化合物について、これ以上多くの量を精製することは困難と考えられ、次年度からの活性測定は、今回精製した分を使用して行う予定である。

C 3 2 TTX 類縁体の毒性評価：電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験の確立

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、 IC_{50} (濃度) は文献記載値に近く、観測系の確立を確認した。溶液調整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 定量 NMR 法の開発と TTX の正確な濃度決定

TTX は溶液中で最大 4 成分の混合として存在している。NMR スペクトル上では、TTX hemilactal 体が最も多く存在していたが、液体クロマトグラフィーでは hemilactal 体と 10,7-lactone 体とを分離することはできない。そのため、NMR による定量を行う際には、hemilactal 体と 10,7-lactone 体との混合シグナルを与える H-4a 位を用いることとした。また、定量 NMR によって得られた TTX 含量とラベル保証値との間に齟齬が生じていることが判明した。これは正確な毒性評価を行ううえで重要な知見である。今回評価したいずれの市販 TTX もラベル保証値は過大評価となっており、いずれの試薬会社から購入しても同様の傾向があることが分かった。これらの知見に加えて、本年度は TTX 分析用標準品を作製した。これは国内では SI トレサブルな手法を用いて値付けされた TTX の最初の例である。計 100 本を調製したので、複数の機関に配布することも可能となり、中毒事例の確認の際に有効に活用されるものと思われる。

今回、コモンフグ卵巣抽出液の活性炭処

理物を使い、LC/MS/MS 法で TTX 各種類縁体が検出できることを確認した。このことから次年度実施するフグ糠漬け内の TTX および類縁体検索にも本法が有効に活用できると考えられる。また、4,9-anhydroTTX と 4-epiTTX の相対モル感度を求め、概算できるようにしたが、これにより、正確にフグ糠漬けの毒力を評価できるようになると思われる。

D-2 動物試験による TTX の毒性評価

本年度は市販品生化学用 TTX を用いてマウス毒性算出予備実験や経口投与用量設定予備実験を実施した。得られた値は既往の知見と概ね一致したため、本試験法の再現性が検証された。次年度は本研究で正確に値付けされた TTX 標準物質を用いた実験を実施するため、正確なマウス毒性や経口投与毒性を得られることが期待できる。

D-3 TTX 類縁体の毒性評価

TTX 類縁体を精製し、化学的データを蓄積するとともに、マウス神経芽細胞腫 Neuro 2A を用いて、電気生理実験装置にて電位依存性ナトリウムチャネルの観測に成功したため、次年度の類縁体毒性評価の基礎的知見を整備することができた。

E. 結論

定量 NMR 法の外標準法である PULCON 法を用いて TTX およびその類縁体を精確に定量できる手法を開発した。精確に値付けされた TTX 溶液を使い、分析用標準品および毒性評価用試薬を調製した。また、TTX の安定性を評価し、溶液状態で 1 年近く安定であることが判明した。フグ糠漬けに含まれる

TTX 各種類縁体を検出できる LC/MS/MS 分析法を開発した。

平成 30 年度(今年度)は、市販の生化学用テトロドトキシン(富士フィルム和光純薬)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や強制経口投与の場合の用量設定予備実験(0, 100, 300, 500, 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (各群 3 匹))を実施した。得られた毒性試験の結果は既往の知見とよく一致したことから、TTX のマウス毒性値や経口投与による LD₅₀ 値は、再現性が高いものと推察された。

TTX 類縁体を精製するとともに、マウス神経芽細胞腫 Neuro 2A を用いて、電気生理実験装置にて電位依存性ナトリウムチャネルの観測に成功した。

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, Toshiyuki Suzuki. Quantitative ¹H-NMR Spectroscopy for Preparation of Certified Reference Material Tetrodotoxin, *J. Agri. Food Chem.*

Submitted.

2) 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.

3) 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.

4) Dietrich Mebs, Mari Yotsu-Yamashita, Werner Pogoda, Joseph Vargas Alvarez, Raffael Ernst, Gunther Köhler, Stefan W. Toennes, Lack of alkaloids and tetrodotoxin in the neotropical frogs *Allobates* spp. (Aromobatidae) and *Silverstoneia flotator* (Dendrobatidae). *Toxicon* 152, 103-105, 2018.

5) Mari Yotsu-Yamashita, Yuuma Nagaoka, Koji Muramoto, Yuko Cho and Keiichi Konoki, Pufferfish Saxitoxin and Tetrodotoxin Binding Protein (PSTBP) Analogues in the Blood Plasma of the Pufferfish *Arothron nigropunctatus*, *A. hispidus*, *A. manilensis*, and *Chelonodon patoca*, *Mar. Drugs* 16(7), 224, 2018.

6) Dietrich Mebs, Max Lorentz, Mari Yotsu-Yamashita, Daniela C. Rößler, Raffael Ernst, Stefan Lötters, Geographic range expansion of tetrodotoxin in amphibians - First

record in *Atelopus hoogmoedi* from the Guiana Shield, *Toxicon*, 150, 175-179, 2018.

7) Nozomi Ueyama, Keita Sugimoto, Yuta Kudo, Ken-ichi Onodera, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Toshio Nishikawa, Mari Yotsu-Yamashita, Spiro Bicyclic Guanidino Compounds from Pufferfish, Possible Biosynthetic Intermediates of Tetrodotoxin in Marine Environments, *Chemistry, a European Journal*, 24, 7250-7258, 2018,

2. 学会発表

1) 谷岡真里・渡邊龍一・内田肇・松嶋良次・及川寛・松宮政弘・鈴木敏之: テトロドトキシンの定量 NMR 法の開発と類縁体における相対モル感度の算出, 平成 30 年度日本水産学会秋季大会, 2018 年 9 月 16 日 (広島)

2) 渡邊龍一・谷岡真里・内田肇・松嶋良次・及川寛・松宮政弘・鈴木敏之: フグ毒テトロドトキシンの定量 NMR, 定量 NMR クラブ 第 7 回会合, 2018 年 12 月 14 日 (東京)

3) 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

4) 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.)

5) 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

6) 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.)

7) 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.)

8) 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

9) 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

10) Naomasa OSHIRO, Hiroya NAGASAWA, Mio NISHIMURA, Kyoko KUNİYOSHI, 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

1 1) 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.

1 2) 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.

1 3) 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.

1 4) 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.

1 5) 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

1 6) 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

1 7) 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.

1 8) 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.

1 9) 山下まり 2018 年度農芸化学会東北支部シンポジウム 天然有機化合物が拓く新研究展開 2018.6.30 秋田大学地方創生センター 2 号館 大セミナー室 化学的手法による海産毒の生合成経路の推定 (招待講演)

2 0) 塚本匡顕, 千葉雪絵, 若森 実, 日高將文, 山田智士, 角替俊輔, 長 由扶子, 榊原 良, 今津拓也, 所 聖太, 佐竹佳樹, 安立昌篤, 西川俊夫, 山下まり, 此木敬一 第 60 回天然有機化合物討論会、テトロドトキシン類縁体に対する電位依存性ナトリウムチャネルの感受性評価、福岡県久留米市 2018.9.26-9.28 (ポスター)

2 1) 山下まり 「第 22 回天然薬物の開発

と応用シンポジウム」日本薬学会生薬天然物部会 2018.10.7-8 熊本大学薬学部(熊本市) 中間体を基盤とした海産毒の生合成研究(特別講演)

22) 山下まり 仙台青葉学院短期大学講演会、海洋生物毒の謎に迫る 2018.10.29 (招待講演)

23) Mari Yotsu-Yamashita, Nozomi Ueyama, Keita Sugimoto, Yuji Yaegashi, Yuta Kudo, Ken-ichi Onodera, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Toshio Nishikawa, Identification of seven possible biosynthetic intermediates of tetrodotoxin in marine environments isolated from pufferfish, ICHA 2018 2018.10.21-26 Nantes, France, 18th International conference on Harmful Algae, Nantes, France 25th October, 2018. (Selected, Oral)

24) 杉本敬太、工藤雄大、宮坂忠親、安立昌篤、長 由扶子、此木敬一、千葉親文、西川俊夫、山下まり、テトロドトキシン推定生合成中間体のテトロドトキシン含有生物への投与、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

25) 沼野 聡、工藤雄大、長 由扶子、此木敬一、山下まり、東日本で養殖したホタテガイ中の LC-MS/MS による麻痺性貝毒分析、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

26) 工藤雄大、長 由扶子、此木敬一、山下まり、陸上由来のテトロドトキシン新規類縁体、生合成関連化合物の構造と生理活性、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

27) 山田智士、安達栞菜、長 由扶子、山下まり、此木敬一、長澤和夫、電位依存性ナトリウムチャンネルに対するサキシトキシン誘導体の阻害活性評価、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

28) 春日政人, Clyde Gorapava Puilingi, 角替俊輔、中崎敦夫、長 由扶子、西川俊夫、此木敬一、山下まり、ソロモン諸島産の海洋生物中の Na_v 阻害活性物質の探索、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

29) 山下まり、佐藤恭佳、工藤雄大、長由扶子、此木敬一、高純度テトロドトキシン類縁体の調製と定量(仮題)、2019 年度日本水産学会春季大会、2018/3、東京海洋大学、口頭

30) 星 美波、安達栞菜、山田智士、大木麻菜、石塚 颯、此木敬一、山下まり、長澤和夫、C11 位に着目した新規サキシトキシン誘導体の合成及びパッチクランプ法を用いた Na チャンネル阻害活性評価、日本化学会 第 99 春季年会 2019/3 ポスター

31) Tadaaki Tsukamoto, Yukie Chiba, Shunsuke Tsunogae, Tomoshi Yamada, Yuko Cho, Ryo Sakakibara, Takuya Imazu, Shouta Tokoro, Yoshiki Satake, Yuki Ishikawa, Yoshiki Nakane, Masaatsu Adachi, Atsuo Nakazaki, Toshio Nishikawa, Minoru Wakamori, Mari Yotsu-Yamashita, Keiichi Konoki, Sensitivity of the voltage-gated sodium channel subtypes, $Na_v1.1$ to $Na_v1.7$, against guanidine-containing natural products and their analogues. Frontier Research on Chemical Communications, The MEXT Grant-in aid for Scientific Research on innovative Area, The 1st International Symposium on Chemical Communication, Hitotsubashi Hall, National Center of Sciences Building (Tokyo) 9-10th January, 2019 (Poster).

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

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に関する研究

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：マウスに対するテトロドトキシンの腹腔内投与毒性や急性経口毒性を明らかにするために必要な TTX 標準毒の正確な値付け手法の開発と分析用標準毒の調製、フグやフグ糠漬けに含まれる TTX とその類縁体含量を測定できる迅速な LC/MS/MS 法を開発した。まず、TTX 標準毒の正確な値付け手法の開発では、非破壊分析法であり、かつ SI トレサブルな定量法である NMR 装置を用いて、プロトンシグナルが水素核数に比例するような、外部標準を用いた定量測定条件を設定した。TTX のスペクトル上で良く分離した H4a 位のシグナルを見つけ、値付けに用いた。また、TTX は最大 4 成分（TTX 10,7-lactone 体、TTX hemilactal 体、4,9-anhydroTTX、4-epiTTX）の混合溶液となるため、この混合溶液を調製し、定量に用いることのできるシグナル（TTX hemilactal 体を除く）を見出した。動物試験に使用する TTX 試薬を購入したところ、カプリル酸が約 30%含まれていたため、これを除去し、濃度を NMR にて決定した動物試験用 TTX 溶液を国立医薬品食品衛生研究所に引き渡した。値付けに用いた溶液の一部を使い、酢酸溶液で希釈した LC/MS/MS 用分析標準品を調製した。また、TTX の溶液安定性（4）を一年近くにわたって調べたところ、比較的安定であった。また、東北大学から TTX 類縁体（約 10 成分）を含んだコモング活性炭抽出液を恵与いただき、超高速液体クロマトグラフィーを用いた LC/MS/MS 法を開発した。これにより次年度実施するフグ糠漬け内の TTX 分析が可能となった。また、この分析法を用いて、TTX 混合溶液の 4,9-anhydroTTX と 4-epiTTX の相対モル感度を求めたところ、それぞれ 0.46 と 0.73 であった。これにより、標準品のない類縁体の定量が可能となった。

A. 研究目的

フグの安全性確保については、現行のフグに関わ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 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のが実情である。

そこで、マウスに対する腹腔内投与毒性や急性経口毒性を明らかにすることを目的とし、テトロドトキシン (TTX) 標準毒の正確な値付け手法の開発と分析用標準毒の調製、フグやフグ糠漬けに含まれる TTX とその類縁体含量を測定できる迅速な LC/MS/MS 法を開発する。

B. 研究方法

製造元が異なる 4 社から TTX 酢酸塩 1mg を 2 本と TTX クエン酸塩 1mg を各 2 本の計 4 本を購入した。それぞれを 1ml の 4% 重酢酸/重水溶液に溶解し、そのうちの 0.6ml を NMR による定量に使用し、残りの約 0.4ml を希釈して LC/MS/MS 分析に供した。なお、NMR を用いた定量では、39.05 mM のマレイン酸(4% 重酢酸/重水溶液に溶解)を外標準とし、PULCON 法で定量したが、2次元 NMR スペクトルを測定し、定量には他シグナルとよく分離しているものを選択した。この方法を用いて、各試薬の TTX と TTX 類縁体含量を求めた。分析には、Bruker 社製の AVANCE III 800 (^1H : 800 MHz)を用いた。また、安定性の検討では NMR チューブに入れた TTX 溶液を 4 にて一年近く保存し、定期的に TTX の含量を求めた。

購入した 4 社の製品のうち、最も純度の

高いものを選び、毒性評価用とした。毒性評価用とした試薬の一部について NMR にて純度を調べたところ、カプリル酸が 30%近く混入していることが判明した。そこで、グラファイトカーボン固相抽出カートリッジ、次いで、ODS 固相抽出カートリッジにてカプリル酸を除去した。このように処理した TTX 溶液を NMR で定量し、動物試験用試薬として国立医薬品食品衛生研究所に引き渡した。

次に、TTX 分析用標準品の調製と、TTX および TTX 類縁体の LC/MS/MS 分析法の開発を行った。分析用標準品としては、NMR 測定にも用いた試料から 0.1ml を正確に量りとり、1% 酢酸溶液で 100ml に定容したものをを用いた。これらは 2ml ガラスバイアルに 1ml ずつ分注し、分析用標準品を 100 本調製した。

東北大学から恵与いただいたコモンフグ卵巣抽出液の活性炭処理液を使い、TTX および TTX 類縁体検出のための LC/MS/MS 法を検討した。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-*ep*TTX and 6-*ep*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、括弧内の数値は、コリジョンエネルギーを示す。

この条件を用いて、NMR 定量に用いた TTX 試薬内に類縁体が含まれているか調べた。また、4,9-anhydroTTX と 4-epiTTX については、化学誘導した TTX 混合溶液を用いて検量線を作成し、TTX に対する相対モル感度を求めた。

C. 研究結果

1. TTX の定量 NMR 法の開発

TTX は溶液中で hemilactal 体と 10,7-lactone 体の化学平衡状態にある。また、TTX は酸性度を上げることで、4,9-anhydroTTX および 4-epiTTX に容易に変換する。そのため、溶液中では 4 成分の混合液として存在している。

市販の TTX 試薬を 4 種購入し、それぞれを重酢酸/重水溶媒 1 ml に溶解し、NMR スペクトルを測定した。その結果、TTX 酢酸塩 (2 種) では不純物の混入は認められなかった。一方、TTX クエン酸塩 (2 種) では、カウンターイオンとしてのクエン酸以外に、グリセロールの混入が認められた。このシグナルは、TTX の Lactone 体の H11 プロト

ンと一部重なっていたため、毒性評価には用いないこととした。また、TTX 由来シグナルを調べると、Hemilactal 体のシグナルが強く観測され、次いで 10,7-lactone 体、ごく微量ながら 4,9-anhydroTTX が観測された。なお、このときには、4-epiTTX 由来のシグナルを認めることはできなかった。これら成分を含んだ TTX 溶液について HSQC と HMBC 測定を行い、ピーク同定を行った。さらに、HSQC スペクトルから、ピーク同士の重なりなどを調べ、TTX 含量を測定するのによいシグナルを選別した。その結果、TTX の総量は、hemilactal 体と 10,7-lactone 体が重なった H-4a 位 (δ_{H} : 2.35 ppm) が適していると判断した。また、10,7-lactone 体の比率を求めるためには、H-8 位 (10,7-lactone, δ_{H} : 4.45 ppm) が適していた。なお、hemilactal 体の比率を求めるための分離したシグナルは見つけれなかったため、TTX 総量から 10,7-lactone 体の含量を差し引くことで求めることとした。4,9-anhydroTTX については、H-4a 位 (δ_{H} : 2.94 ppm) と H-8 位 (δ_{H} : 4.63 ppm) が適していると判断した。上記シグナルを使って、外標準法である PULCON にて定量し、各含量を求めた。その結果、ラベル表示値が 1 mg であったのに対し、NMR 定量で求めた含量は、780-880 μg 相当であった。このことから、ラベル値は過剰評価となっていることが判明した。また、各成分の比率は、hemilactal 体が 73-78%、10,7-lactone 体が 19-21%、4,9-anhydroTTX が 2-7%であった。

2. 4-EpiTTX の調製と混合溶液の定量 NMR 法の開発

TTX 溶液を測定しただけでは、4-epiTTX を認めることはできなかったため、化学誘導によって 4-epiTTX を調製し、4 種混合溶液を使い、再度 HSQC スペクトルを測定し、シグナル同士の重複がないか検討した。

重溶媒に溶解している TTX 試薬約 0.8 mg をグラファイトカーボン固相抽出カートリッジで処理し、過剰のクエン酸を除去した。溶媒を除去したのち、0.1mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 0.8 ml に溶解し、37 °C で 45 時間加熱した。その後、反応液を再度グラファイトカーボン固相抽出カートリッジで処理し、溶出液を凍結乾燥し、再び、1 ml の重溶媒に溶解した。その結果、4-epiTTX 由来のシグナルと思われる H-4 (δ_{H} : 5.14 ppm) が出現した。また、HSQC スペクトルから H-4a (δ_{H} : 2.85 ppm) を認めた。これらを 4-epiTTX を定量する際のシグナルに選抜した。また、これらシグナル以外に HSQC 上で 3 つのクロスピーク (4-epiTTX 由来) を新たに認め、それらが、定量に用いるシグナルと重複していないことを確認した。これにより再度 NMR スペクトルを見直すと、0.3-1.0% の 4-epiTTX が混在していることが判明した。

3. 動物試験用および分析用 TTX 溶液の調製

以上の結果から、TTX 酢酸塩が動物

試験用および分析用 TTX 標準液として適していると判断した。そこで、新たに、TTX 酢酸塩 (ラベル保証値: 25mg 相当) を購入して、NMR スペクトルを測定したところ、約 30% のカプリル酸が混入していることが分かった。そこで、TTX 溶液をグラファイトカーボン固相抽出カートリッジ、次いで ODS 固相抽出カートリッジで処理し、カプリル酸の除去を行った。その結果、以下の成分・含量を含む溶液 (9ml) を調製し、国立医薬品食品衛生研究所に引き渡した。

TTX 1.012 mg/ml
4,9-anhydroTTX 0.080 mg/ml
4-epiTTX 0.025 mg/ml
カプリル酸 0.005mg/ml

また、NMR 用に調製した TTX 溶液 (重溶媒) 0.1 ml を 1% 酢酸にて 100ml に定容した。よく混合したのち、1ml ずつ 2ml ガラスバイアルに分注した。これを LC/MS/MS 分析用 TTX 標準品とした。TTX 等の濃度は以下の通り。

TTX 1.012 $\mu\text{g/ml}$
4,9-anhydroTTX 0.080 $\mu\text{g/ml}$
4-epiTTX 0.025 $\mu\text{g/ml}$

調製後は -20 °C のフリーザーにて保管した。

4. フグ糖漬け内の TTX とその類縁体を検出するための LC/MS/MS 分析法の開発

調製した分析用 TTX 標準品を用い、LC/MS/MS のイオン源とイオンチャネルを最適化した。その結果、declustering potential は 106V であり、m/z 320/162 の時、コリジョンエネルギーは 51eV、m/z 320/302 の時、33eV であった。これを参考にして、MS3 で m/z162 を設定する成分については、コリジョンエネルギー 51eV を適用し、それ以外のチャネルを設定する場合には 33 eV を適用した。この条件で、コモング卵巣抽出液の活性炭処理物をアセトニトリルで 4 倍希釈したのち、分析に供したところ、12 成分 (4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX, 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX, 4-epi-5,6,11-trideoxyTTX, 5,6,11-trideoxyTTX, 5,11-trideoxyTTX, 6,11-trideoxyTTX, 5-trideoxyTTX, 11-trideoxyTTX, 11-norTTX-6(S)-ol, 4,9-anhydroTTX, 4-epiTTX, TTX) を検出することに成功した。

この条件を用いて、購入した市販 TTX4 種を測定したところ、NMR で検出した 3 成分以外検出されなかった。

さらに、TTX 溶液を段階希釈したものを調製し、それらを分析して縦軸にピーク強度を、横軸にはラベル表示値と定量 NMR で求めた値とを用いた 2 種の検量線を作成して比較した。その結果、検量線の傾きは、ラベル表示値を用いたものが低かったことから、ラベル表示値は過大評価となっていることが裏付けられた。これにより、定量 NMR では適正に評価できることが判明した。

最後に、4-epiTTX を含む TTX 混合溶液を段階希釈して、それらを LC/MS/MS 法で分析した。各成分について検量線を作成し、TTX に対する 4,9-anhydroTTX と 4-epiTTX の相対モル感度 (RMR) を求めた。その結果、TTX の感度を 1 とすると、4epiTTX で 0.73、4,9-anhydroTTX で 0.46 であった。従って、次の式を使うことで、それら類縁体をより正確に概算できることが分かった。

$$C_{\text{tox}} = ([\text{PA}]_{\text{tox}} / [\text{PA}]_{\text{TTX}}) \times (C_{\text{TTX}} / \text{RMR})$$

C_{tox}: 類縁体の濃度、[PA]: ピーク面積、C_{TTX}: TTX の濃度、RMR: 相対モル感度

なお、これにより 4,9-anhydroTTX の TTX 総量に占める割合を求めると、定量 NMR で求めた値と比較的によく一致した。

5. TTX 溶液の安定性試験

TTX 酢酸塩を重溶媒に溶解した TTX 溶液を定期的に、外標準法である PULCON で定量した。解析ソフトウェアには Topspin 3.5 pl7 を用いた。外標準には、39.05mM のマレイン酸を用いた。なお、TTX 溶液は NMR チューブに入れ 4 で保管し、キャップからの溶媒揮発を抑えるため、テフロンシールとパラフィルムで保護した。

その結果、保管 44 週後で、TTX が若干増加しており、溶媒の揮発によるものと思われた。しかし TTX には変化無く一年近く分解しないことが確認できた。

D. 考察

TTX は溶液中で最大 4 成分の混合として存在している。NMR スペクトル上では、TTX hemilactal 体が最も多く存在していたが、液体クロマトグラフィーでは hemilactal 体と 10,7-lactone 体とを分離することはできない。そのため、NMR による定量を行う際には、hemilactal 体と 10,7-lactone 体との混合シグナルを与える H-4a 位を用いることとした。また、定量 NMR によって得られた TTX 含量とラベル保証値との間に齟齬が生じていることが判明した。これは正確な毒性評価を行ううえで重要な知見である。今回評価したいずれの市販 TTX もラベル保証値は過大評価となっており、いずれの試薬会社から購入しても同様の傾向があることが分かった。これらの知見に加えて、本年度は TTX 分析用標準品を作成した。これは国内では SI トレーサブルな手法を用いて値付けされた TTX の最初の例である。計 100 本を調製したので、複数の機関に配布することも可能となり、中毒事例の確認の際に有効に活用されるものと思われる。

今回、コモンフグ卵巣抽出液の活性炭処理物を使い、LC/MS/MS 法で TTX 各種類縁体が検出できることを確認した。このことから次年度実施するフグ糠漬け内の TTX および類縁体検索にも本法が有効に活用できると考えられる。また、4,9-anhydroTTX と 4-epiTTX の相対モル感度を求め、概算できるようにしたが、これにより、正確にフグ糠漬けの毒力を評価できるようになると思われる。

E. 結論

外標準法である PULCON 法を用いて TTX およびその類縁体を精確に定量できる手法を開発した。精確に値付けされた TTX 溶液を使い、分析用標準品および毒性評価用試薬を調製した。また、TTX の安定性を評価し、溶液状態で 1 年近く安定であることが判明した。フグ糠漬けに含まれる TTX 各種類縁体を検出できる LC/MS/MS 分析法を開発した。

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.
Quantitative ¹H-NMR Spectroscopy for Preparation of Certified Reference Material Tetrodotoxin, *J. Agri. Food Chem.*
Submitted.

2. 学会発表

○ 谷岡真里・渡邊龍一・内田肇・松嶋良次・及川寛・松宮政弘・鈴木敏之：テトロドトキシンの定量 NMR 法の開発と類縁体における相対モル感度の算出, 平成 30 年度日本水産学会秋季大会, 2018 年 9 月 16 日 (広島)

○ 渡邊龍一・谷岡真里・内田肇・
松嶋良次・及川寛・松宮政弘・鈴木
敏之：フグ毒テトロドトキシンの
定量 NMR , 定量 NMR クラブ第 7
回会合 , 2018 年 12 月 14 日 (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

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、富士フイルム和光純薬(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。

経口投与用予備実験用には、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見られた。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 flavipaterus*, 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：

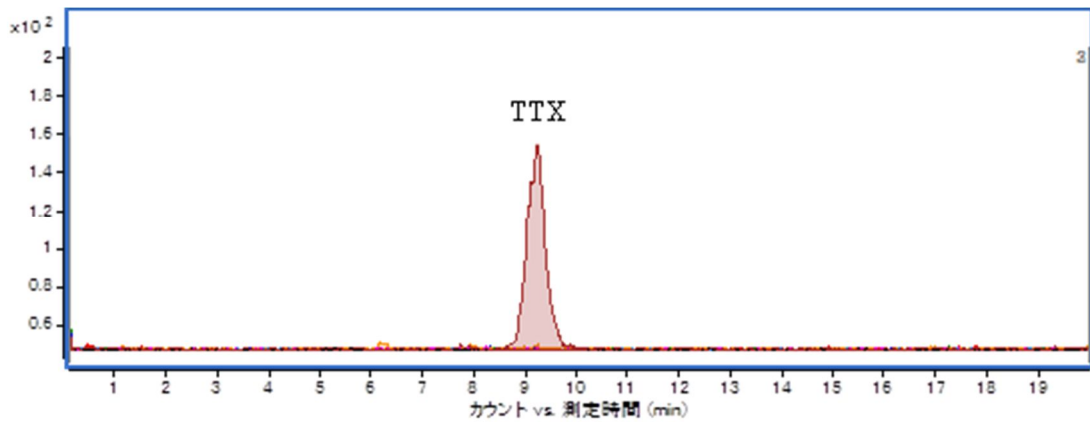
7週齢のマウスを用いて、TTXの強制経口投与による用量設定予備実験(0, 100, 300, 500, 700 µg/kg)(各群3匹)を実施した際の結果のまとめ(投与容量は10 ml/kg体重)。半数致死量は、300以上500未満 µg/kgと考えられた

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

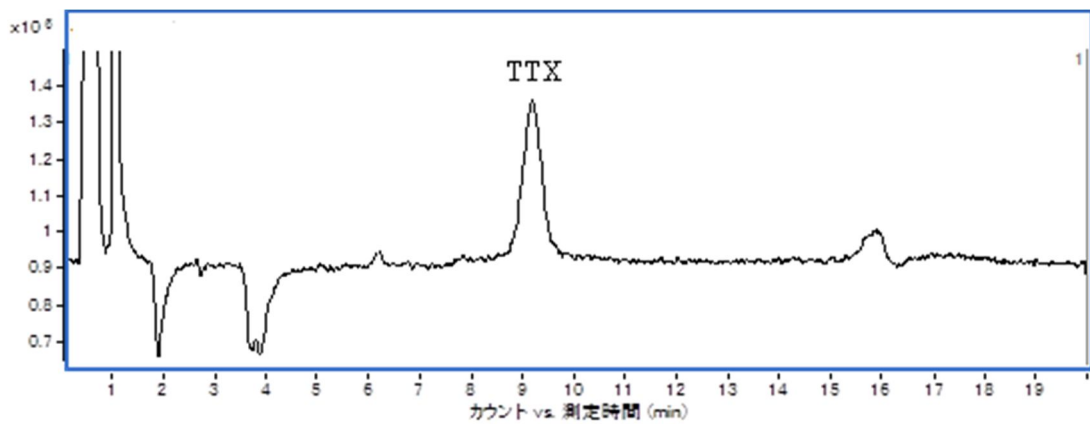
Apathy : 目を開けたまま斜めに横たわる(自発運動低下)(なお音には反応し、ケージ内マウスはお互いに離れている)

別添資料3 投与液の LC-MS/MS 分析結果：

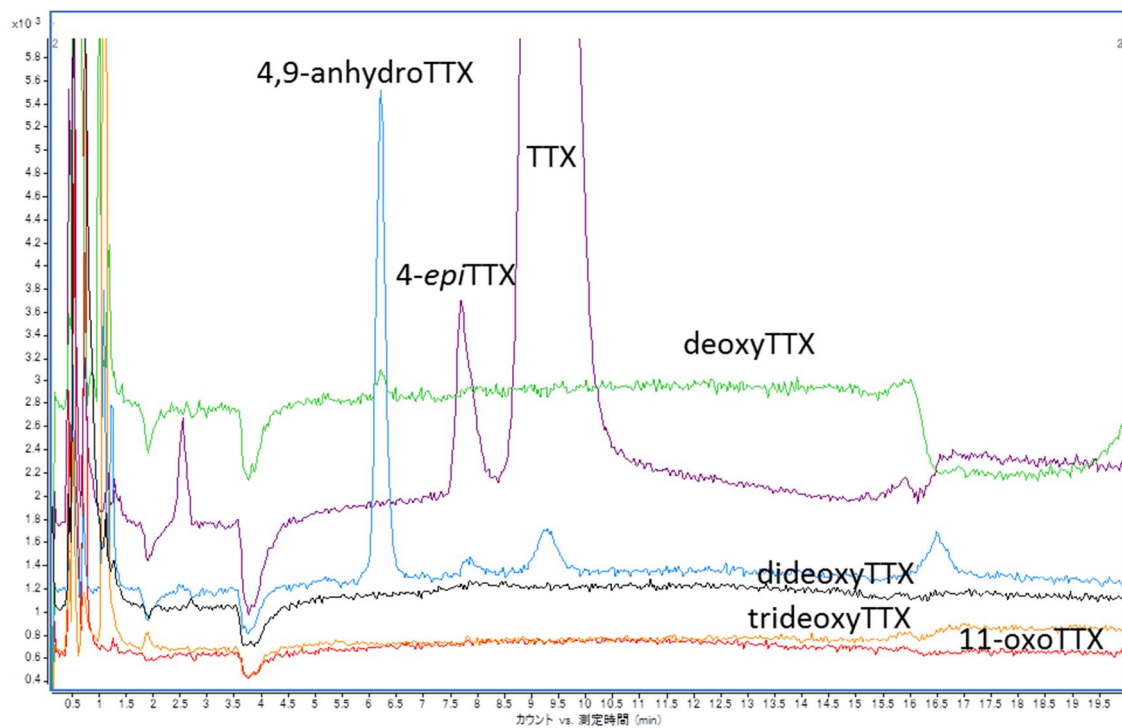
マウス投与実験に使用した投与液を希釈し、LC-MS/MS 分析に供した結果



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)



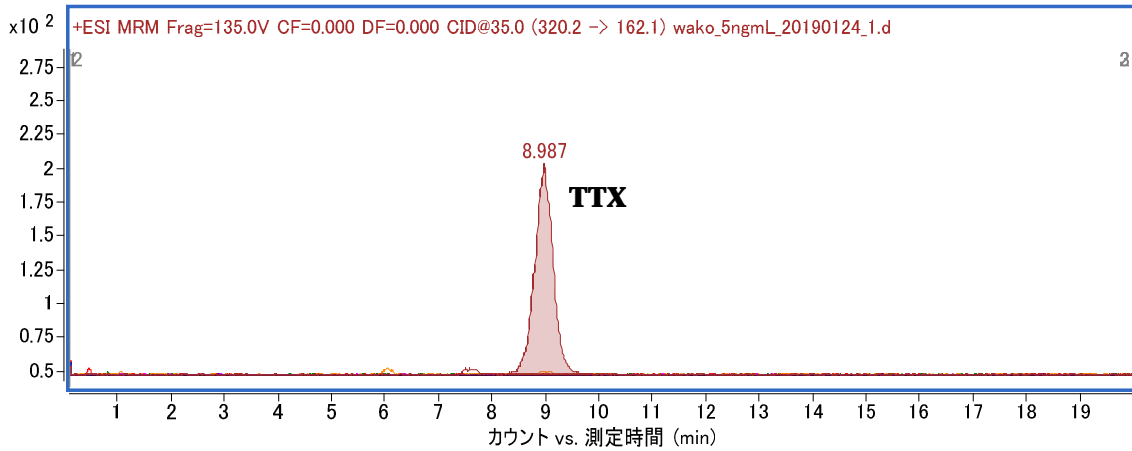
投与液の LC-MS/MS (SCAN モード) クロマトグラム



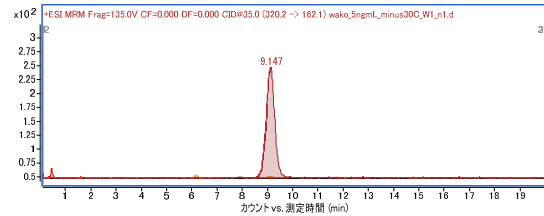
投与液の LC-MS/MS (SIM モード) クロマトグラム

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：

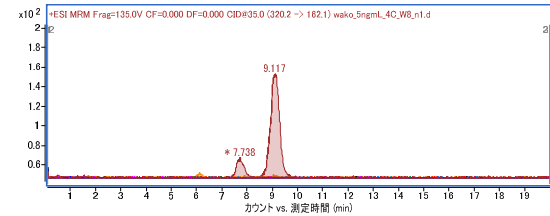
Wako-TTX (クエン酸含有)：蒸留水で 0.2 μg/mL に調製し、遮光保存
調製直後



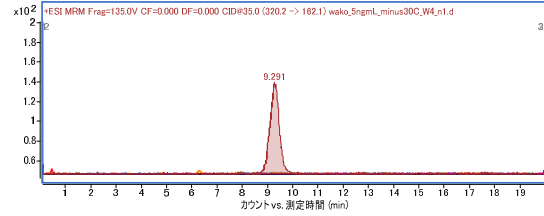
-30 保存 (1 週間後)



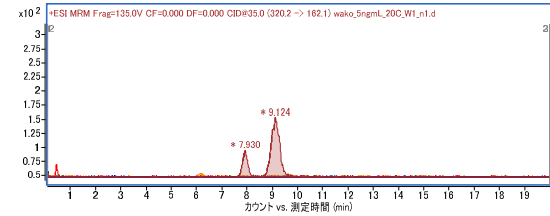
4 保存 (8 週間後)



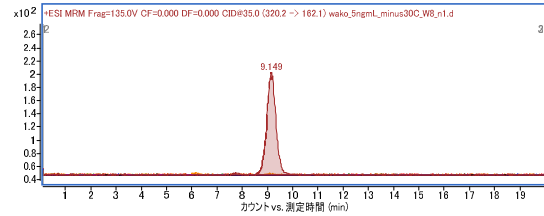
-30 保存 (4 週間後)



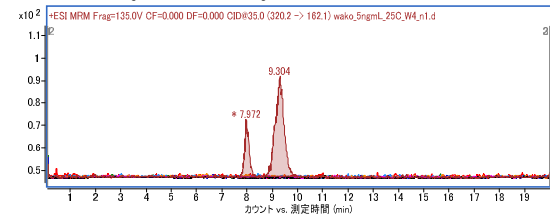
25 保存 (1 週間後)



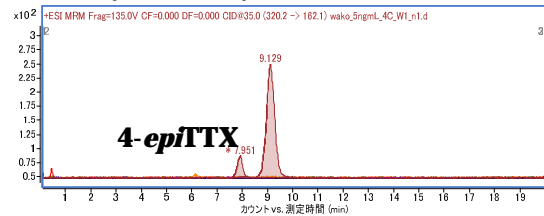
-30 保存 (8 週間後)



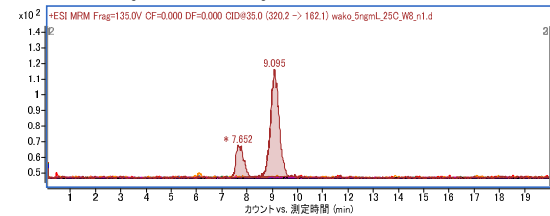
25 保存 (4 週間後)



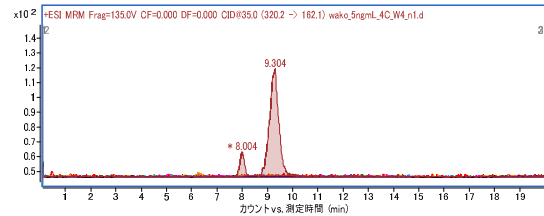
4 保存 (1 週間後)



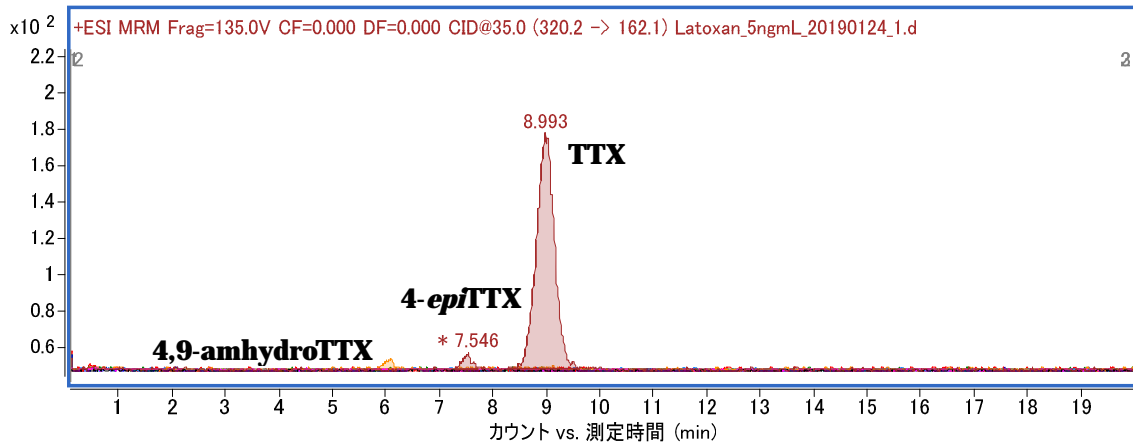
25 保存 (8 週間後)



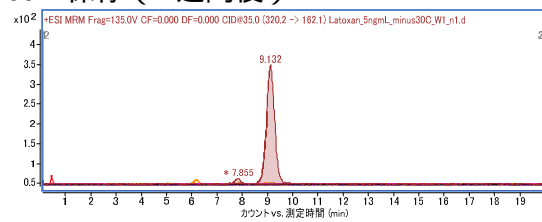
4 保存 (4 週間後)



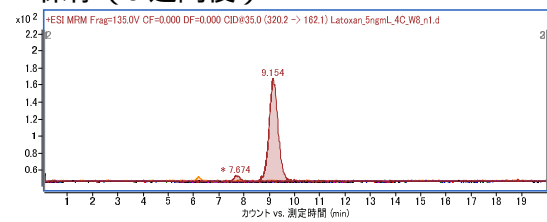
Latoxan-TTX (クエン酸不含): 0.1%酢酸で 0.2 $\mu\text{g/mL}$ に調製し、遮光保存
調製直後



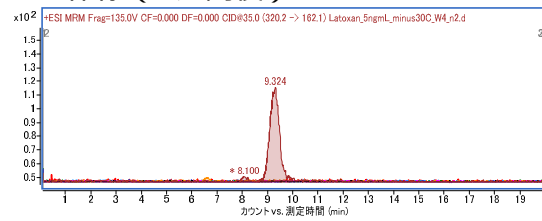
-30 保存 (1 週間後)



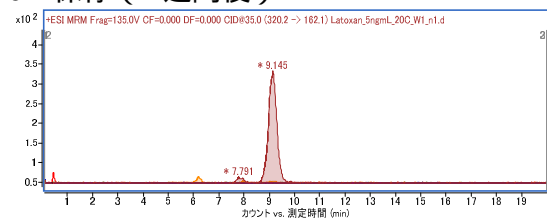
4 保存 (8 週間後)



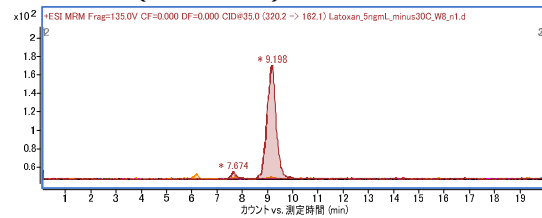
-30 保存 (4 週間後)



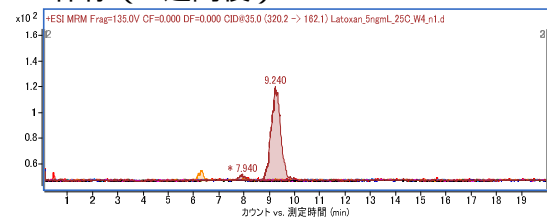
25 保存 (1 週間後)



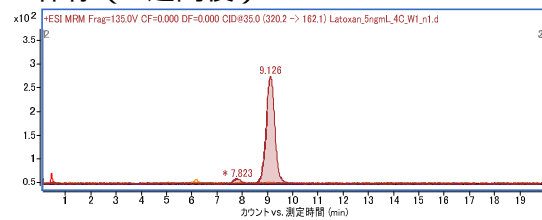
-30 保存 (8 週間後)



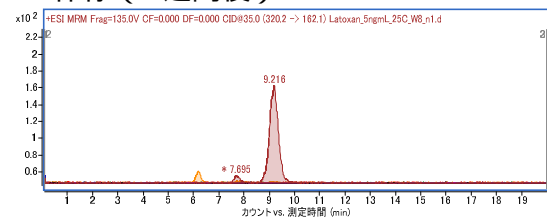
25 保存 (4 週間後)



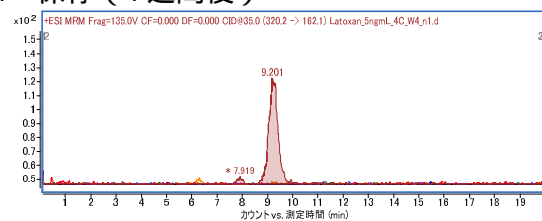
4 保存 (1 週間後)



25 保存 (8 週間後)



4 保存 (4 週間後)



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

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

研究要旨

本分担研究では、主要な TTX 類縁体である 11-oxoTTX、4-*epi*TTX、11-norTTX-6(*S*)-ol について、高度に精製した純品を調製し、それぞれの TTX 類縁体についてナトリウムチャンネル阻害活性を評価することを目的とする。

平成 30 年度（今年度）は、11-oxoTTX、4-*epi*TTX、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する方法を確立し、LC-MS や NMR で純度を確認した。また、11-oxoTTX や 4-*epi*TTX については、初めて lactone 型の NMR シグナルを観測し、hemilactal 型と lactone 型の存在比を決定し、lactone 型の NMR シグナルを帰属して化学的データも蓄積した。さらに、TTX 類縁体のナトリウムチャンネル阻害活性を評価する方法を検討し、マウス神経芽細胞腫 Neuro 2A を用いて、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。

A．研究目的

フグの有毒成分としては、テトロドトキシン (TTX) が主であるが、我々や他の研究者はフグから多くの TTX 類縁体を単離、構造決定してきた。欧州食品安全機関 (EFSA) が取りまとめた二枚貝の安全確保を主眼とした TTX に関する報告書でも、TTX 類縁体の活性について多くの記載があるが、活性の評価方法が様々で、直接比較しにくいものもある。TTX の類縁体の中で、特に 4-*epi*TTX や 4,9-anhydroTTX は TTX と化学的に平衡関係にあるため、溶液中で容易に変換する。そのため、高純度の精製した状態で生物活性を評価することは困難と考えられてきた。しかし、4-*epi*TTX は TTX とともにほぼ必ず含まれる類縁体であるので、正しく活性評価をする必要がある。TTX の主な生物活性として電位依存性ナトリウムチャンネル阻害活性が最もよく知られている。そこで、本研究では、4-*epi*TTX を高純度に精製して、電位依存性ナトリウムチャンネル阻害活性を調べることにした。

さらに、11-oxoTTX はこれまで TTX よりも強い活性を示すと評価されたことがある類縁体であり、11-noTTX-6(*S*)-ol はフグ中の主な類縁体であ

る。このことから、11-oxoTTX や 11-noTTX-6(*S*)-ol も高純度に精製して、4-*epi*TTX とあわせて、電位依存性ナトリウムチャンネル阻害活性を評価することを目的とした。

B．研究方法

B-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する方が化学反応で調製するより効率がよいと考えられた。そのため、まず過去にフグやイモリから TTX 類縁体を抽出し、粗精製した画分から、TTX 用 LC/MS や 蛍光 HPLC を用いて分析し、これらの類縁体を比較的多く含む画分を見出した。次にその画分から、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 H_2IO_6 で酸化して 11-norTTX-6,6-diol とし、その後 $NaBH_4$ 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を上述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-2: 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験の確立

TTX類縁体の精製Neuro2A細胞に対して電気生理学的手法の一つであるホールセル記録法を適用し、電位依存性ナトリウムチャンネルに対するTTX類縁体の阻害効果を調査した。

C. 研究結果及び考察

C-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-oxoTTX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-oxoTTX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-oxoTTX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-oxoTTXは、存在比の高い化学平衡体のhemilactal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-norTTX-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-norTTX-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。この3つの化合物について、これ以上多くの量を精製することは困難と考えられ、次年度からの活性測定は、今回精製した分を使用して行う予定である。

C-2: 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験の確立

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。溶液調整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. 結論

平成30年度(今年度)は、4-*epi*TTX 90 µg、11-oxoTTX 30 µg、11-norTTX-6(S)-ol 100 µgを約98%の純度で精製した。また、これまで決定されていなかった4-*epi*TTXと11-oxoTTXのhemilactal型-lactone型の比を決定し、¹³C NMRシグナルも含めてほぼ全てのシグナルの帰属をおこない、化学的データを蓄積した。これらの精製品は、今後の電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験を行うのために使用可能と思われる。また、マウス神経芽細胞腫Neuro 2Aを用いて、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。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Dietrich Mebs*, Mari Yotsu-Yamashita, Werner Pogoda, Joseph Vargas Alvarez, Raffael Ernst, Gunther Köhler, Stefan W. Toennes, Lack of alkaloids and tetrodotoxin in the neotropical frogs *Allobates* spp. (Aromobatidae) and *Silverstoneia flotator* (Dendrobatidae). *Toxicon* 152, 103-105, 2018.

Mari Yotsu-Yamashita*, Yuuma Nagaoka, Koji Muramoto, Yuko Cho and Keiichi Konoki, Pufferfish Saxitoxin and Tetrodotoxin Binding Protein (PSTBP) Analogues in the Blood Plasma of the Pufferfish *Arothron nigropunctatus*, *A. hispidus*, *A. manilensis*, and *Chelonodon patoca*, *Mar. Drugs* 2018, 16(7), 224.

Dietrich Mebs*, Max Lorentz, Mari Yotsu-Yamashita, Daniela C. Rößler, Raffael Ernst, Stefan Lötters, Geographic range expansion of tetrodotoxin in amphibians - First record in *Atelopus hoogmoedi* from the Guiana Shield, *Toxicon*, 2018, 150, 175-179.

Nozomi Ueyama, Keita Sugimoto, Yuta Kudo, Ken-ichi Onodera, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Toshio Nishikawa, Mari Yotsu-Yamashita*, Spiro Bicyclic Guanidino Compounds from Pufferfish, Possible Biosynthetic Intermediates of Tetrodotoxin in Marine Environments, *Chemistry, a European Journal*, 2018, 24, 7250-7258.

2. 学会発表

山下まり 2018 年度農芸化学会東北支部シンポジウム 天然有機化合物が拓く新研究展開 2018.6.30 秋田大学地方創生センター2号館 大セミナー室 化学的手法による海産毒の生合成経路の推定 (招待講演)

塚本匡顕, 千葉雪絵, 若森 実, 日高將文, 山田智士, 角替俊輔, 長 由扶子, 榊原 良, 今津拓也, 所 聖太, 佐竹佳樹, 安立昌篤, 西川俊夫, 山下まり, 此木敬一 第60回天然有機化合物討論会、テトロドトキシン類縁体に対する電位依存性ナトリウムチャンネルの感受性評価、福岡県久留米市 2018.9.26-9.28 (ポスター)

山下まり 「第22回天然薬物の開発と応用シンポ

ジウム」日本薬学会生薬天然物部会 2018.10.7-8 熊本大学薬学部 (熊本市) 中間体を基盤とした海産毒の生合成研究 (特別講演)

山下まり 仙台青葉学院短期大学講演会、海洋生物毒の謎に迫る 2018.10.29 (招待講演)

Mari Yotsu-Yamashita, Nozomi Ueyama, Keita Sugimoto, Yuji Yaegashi, Yuta Kudo, Ken-ichi Onodera, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Toshio Nishikawa, Identification of seven possible biosynthetic intermediates of tetrodotoxin in marine environments isolated from pufferfish, ICHA 2018 2018.10.21-26 Nantes, France, 18th International conference on Harmful Algae, Nantes, France 25th October, 2018. (Selected, Oral)

杉本敬太、工藤雄大、宮坂忠親、安立昌篤、長由扶子、此木敬一、千葉親文、西川俊夫、山下まり、テトロドトキシン推定生合成中間体のテトロドトキシン含有生物への投与、日本農芸化学会2019年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

沼野 聡、工藤雄大、長 由扶子、此木敬一、山下まり、東日本で養殖したホタテガイ中の LC-MS/MS による麻痺性貝毒分析、日本農芸化学会2019年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

工藤雄大、長 由扶子、此木敬一、山下まり、陸上由来のテトロドトキシン新規類縁体、生合成関連化合物の構造と生理活性、日本農芸化学会2019年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

山田智士、安達栞菜、長 由扶子、山下まり、此木敬一、長澤和夫、電位依存性ナトリウムチャンネルに対するサキシトキシン誘導体の阻害活性評価、日本農芸化学会2019年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

春日政人, Clyde Gorapava Puilingi, 角替俊

輔、中崎敦夫、長 由扶子、西川俊夫、此木敬一、山下まり、ソロモン諸島産の海洋生物中の Na_v 阻害活性物質の探索、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

山下まり、佐藤恭佳、工藤雄大、長 由扶子、此木敬一、高純度テトロドトキシン類縁体の調製と定量(仮題)、2019 年度日本水産学会春季大会、2018/3、東京海洋大学、口頭

星 美波、安達菜菜、山田智士、大木麻菜、石塚 颯、此木敬一、山下まり、長澤和夫、C11 位に着目した新規サキシトキシン誘導体の合成及びパッチクランプ法を用いた Na チャネル阻害活性評価、日本化学会 第 99 春季年会 2019/3 ポスター

Tadaaki Tsukamoto, Yukie Chiba, Shunsuke Tsunogae, Tomoshi Yamada, Yuko Cho, Ryo Sakakibara, Takuya Imazu, Shouta Tokoro, Yoshiki Satake, Yuki Ishikawa, Yoshiki Nakane, Masaatsu Adachi, Atsuo Nakazaki, Toshio Nishikawa, Minoru Wakamori, Mari Yotsu-Yamashita, Keiichi Konoki*, Sensitivity of the voltage-gated sodium channel subtypes, $Na_v1.1$ to $Na_v1.7$, against guanidine-containing natural products and their analogues. Frontier Research on Chemical Communications, The MEXT Grant-in aid for Scientific Research on innovative Area, The 1st International Symposium on Chemical Communication, Hitotsubashi Hall, National Center of Sciences Building (Tokyo) 9-10th January, 2019 (Poster).

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

研究成果の刊行に関する一覧表

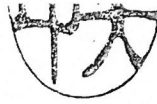
書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ryuichi Watanabe, Masato Tanio, Hajime Uchida, Ryoji Matsu- shima, Hiroshi Oikawa, Masahiro Matsumiya, Mari Yotsu-Yamashita, Toshiyuki Suzuki	Quantitative ¹ H-NMR Spectroscopy for Preparation of Certified Reference Material Tetrodotoxin	J. Agri. Food Chem.			
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			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
Dietrich Mebs, Mari Yotsu-Yamashita, Werner Pogoda, Joseph Vargas Alvarez, Raffael Ernst, Gunther Köhler, Stefan W. Toennes	Lack of alkaloids and tetrodotoxin in the neotropical frogs <i>Allobates</i> spp. (Aromobatidae) and <i>Silverstoneia flotator</i> (Dendrobatidae).	Toxicon	152	103- 105	2018

Mari Yotsu-Yamashita, Yuuma Nagao, Koji Murakami, Yuko Cho, and Keiichi Konoki,	Pufferfish Saxitoxin and Tetrodotoxin Binding Protein (PSTBP) Analogues in the Blood Plasma of the Pufferfish, <i>Arothron nigropunctatus</i> , <i>A. hispidus</i> , <i>A. manilensis</i> , and <i>Chelonodon patoca</i> ,	Mar. Drugs	16(7)	224	2018
Dietrich Mebs, Max Lorentz, Mari Yotsu-Yamashita, Daniela C. Röbber, Rafael Ernst, Stefan Lötters,	Geographic range expansion of tetrodotoxin in amphibians - First record in <i>Ateopos hoogmoedi</i> from the Guiana Shield	Toxicon	150	175-179	2018
Nozomi Ueyama, Keita Sugimoto, Yuta Kudo, Ken-ichi Onodera, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Toshio Nishikawa, Mari Yotsu-Yamashita	Spiro Bicyclic Guanine Compounds from Pufferfish, Possible Biosynthetic Intermediates of Tetrodotoxin in Marine Environments	Chemistry, a European Journal	24	7250-7258	2018



令和元年5月16日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発法人水産研究・教育機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 宮原 正典

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 平成30年度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）
- 研究課題名 テトロドトキシンのリスク管理のための研究（H30-食品-一般-005）
- 研究者名 （所属部局・職名）中央水産研究所水産物応用開発研究センター長
（氏名・フリガナ）鈴木 敏之・スズキ トシユキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合はその理由: COI委員会がなく規程整備も含め設置に期間を要するため。)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: 国立医薬品食品衛生研究所)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



厚生労働大臣 殿

令和元年5月16日

機関名 国立研究開発法人

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 宮原 正

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及びについて以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 平成30年度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）
- 2. 研究課題名 テトロドトキシンのリスク管理のための研究（H30-食品-一般-005）
- 3. 研究者名 （所属部局・職名）水産物応用開発研究センター 衛生管理グループ長
（氏名・フリガナ）及川 寛・オйкаワ ヒロシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （無の場合はその理由：COI委員会がなく規程整備も含め設置に期間を要するため。）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関：国立医薬品食品衛生研究所）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容： ）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



厚生労働大臣 殿

令和元年5月16日

機関名 国立研究開発法人水産研究・教育機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 宮原 正

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 平成30年度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）
2. 研究課題名 テトロドトキシンのリスク管理のための研究（H30-食品-一般-005）
3. 研究者名 （所属部局・職名）中央水産研究所 水産物応用開発研究センター 衛生管理グループ 主任研究員
（氏名・フリガナ）松嶋 良次 マツシマ リョウジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

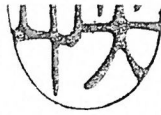
5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合はその理由: COI委員会がなく規程整備も含め設置に期間を要するため。)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: 国立医薬品食品衛生研究所)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

（留意事項） ・ 該当する□にチェックを入れること。
・ 分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



厚生労働大臣 殿

令和元年5月16日

機関名 国立研究開発法人水産研究・教育機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 宮原 正典

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況()管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 平成30年度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)
- 研究課題名 テトロドトキシンのリスク管理のための研究(H30-食品-一般-005)
- 研究者名 (所属部局・職名) 中央水産研究所水産物応用開発研究センター衛生管理グループ主任研究員
(氏名・フリガナ) 渡邊 龍一・ワタナベ リュウイチ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合はその理由: COI委員会がなく規程整備も含め設置に期間を要するため。)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: 国立医薬品食品衛生研究所)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



厚生労働大臣 殿

令和元年5月16日

機関名 国立研究開発法人水産研究・教育機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 宮原 正典

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 平成30年度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）
- 研究課題名 テトロドトキシンのリスク管理のための研究（H30-食品-一般-005）
- 研究者名 （所属部局・職名）中央水産研究所水産物応用開発研究センター衛生管理グループ任期付研究員
（氏名・フリガナ）内田 肇 ・ ウチダ ハジメ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （無の場合はその理由：COI委員会がなく規程整備も含め設置に期間を要するため。）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関：国立医薬品食品衛生研究所）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容：)

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 テトロドトキシンのリスク管理のための研究 (H30-食品-一般-005)
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品衛生管理部第二室・室長
(氏名・フリガナ) 大城 直雅・オオシロ ナオマサ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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
2. 研究課題名 テトロドトキシンのリスク管理のための研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部・部長
(氏名・フリガナ) 北嶋 聡・キタジマ サトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2019年 5月 20日

厚生労働大臣 殿

機関名 東北大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 大野 英男 印



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 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）
- 研究課題名 テトロドトキシンのリスク管理のための研究
- 研究者名（所属部局・職名） 東北大学大学院農学研究科・准教授
（氏名・フリガナ） 此木 敬一・コノキ ケイイチ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関： ）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （有の場合はその内容：研究実施の際の留意点を示した ）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2019年 5月 20日

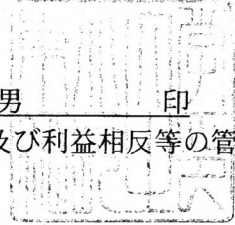
厚生労働大臣 殿

機関名 東北大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 大野 英男 印

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。



1. 研究事業名 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）
2. 研究課題名 テトロドトキシンのリスク管理のための研究
3. 研究者名 （所属部局・職名） 東北大学大学院農学研究科・教授
（氏名・フリガナ） 山下 まり・ヤマシタ マリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関： ）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （有の場合はその内容：研究実施の際の留意点を示した ）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。