

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のための研究

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 敏之

令和2(2020)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のための研究 -----	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のための研究 -----	16
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のための研究 -----	23
北嶋聡・朝倉宏	
3 . テトロドトキシンのリスク管理のための研究 -----	36
山下まり・此木敬一	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	42

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

テトロドトキシンのリスク管理のための研究

研究代表者又は研究分担者

鈴木 敏之 中央水産研究所 水産物応用開発研究センター長

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

本研究で調製した正確に定量した TTX 調整液（溶媒：0.1%酢酸液）並びに、食品衛生検査指針・マウス検定法で使用されるフグ粗毒原液を用いて、両者の TTX 濃度を一致させるよう調整した上で、食品衛生検査指針「マウス毒性試験」（溶媒対照群は設置、腹腔内投与）を行い、両者のマウスユニット（MU）を求めた。あらかじめ TTX 濃度が測定された a)市販の生化学用 TTX、b)定量 NMR 法により正確に定量した TTX 調整液、並びに c)コモンフグ抽出物、それぞれ 0.40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  相当の濃度に調整し、ddY 雄性マウス（4 週齢）に 1 ml 腹腔内投与し MU を求めた。その結果、コモンフグ抽出物は、正確に定量した TTX 調整液と比較し、82% の毒力であることが明らかとなった。

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

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

#### 分担研究者

渡邊 龍一・中央水産研究所・主任研究員

内田 肇・中央水産研究所・任期付研究員

松嶋 良次・中央水産研究所・主任研究員

及川 寛・中央水産研究所・グループ長

北嶋 聡・国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長

朝倉 宏・国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部長

山下 まり・東北大学大学院農学研究科・教授

此木 敬一・東北大学大学院農学研究科・准教授

#### A. 研究目的

フグの安全性確保については、現行のフグに係る規制の遵守により食中毒の発生を防止している。さらに、フグ卵巣の糠漬けなどについては 10MU/g の規制値を設けてリスク管理がなされている。しかし、基準値についての科学的な妥当性については十分に検証されていない。毒性試験で利用する標準毒は、正確な濃度決定（値付け）が必要であるが、TTX において正確な値付け法は未だに開発されていない。近年、定量核磁気共鳴法（qNMR）が国際単位系（SI）トレーサブルな高精度測定法である「一次標準測定法」の候補として検証が続けられており、下痢性貝毒オカダ酸群などの値付け法として有望であることが報告されている。そこで本研究では、（1）qNMR による TTX や TTX 類縁体

の正確な定量法を開発し（H30）、（2）正確に定量した TTX を用いて、TTX 濃度を合わせた上で、この溶解液と、マウス検定法で使用される TTX を含むフグ粗毒原液（肝、卵巣、筋肉由来）由来の調整液との急性毒性のハザード（毒力）を、マウス毒性試験（腹腔内投与及び経口毒性）により比較し明らかにする。（R1, 2）。（3）TTX 類縁体の毒性評価については、qNMR など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（R1, 2）。（4）TTX を対象とした LC/MS/MS 法を用いてフグ糠漬けに含まれる TTX や TTX 類縁体含量を定量して、わが国のフグに係る規制の妥当性を確認する（R1, 2）。（5）以上の知見に基づき、フグ卵巣の糠漬けなど長期間塩蔵処理することにより人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの部位を対象とした 10MU/g の基準値の妥当性について検証する（R2）。

#### B. 研究方法

##### B-1. フグ糠漬けに含まれる TTX や TTX 類縁体含量を定量

##### B-1-1. フグの子糠漬け試料における TTX の添加回収試験

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## B-2. 動物試験による TTX の毒性評価

定量 NMR 法により正確に定量した TTX 調整液 (溶媒: 0.1% 酢酸液) ならびに、食品衛

生検査指針でのマウス検定法で使用されるフグ粗毒原液 (肝、卵巣、筋肉由来) を用いて、両者の TTX 濃度を一致させるよう調整した上で、食品衛生検査指針での「マウス毒性試験」(急性) (腹腔内投与) (群構成、週齢などは食品衛生検査指針でのマウス検定法に準ずる。ただし、溶媒対照群はおく) をおこない、両者のマウスユニットを求めることによる毒力比較をおこなった。被験物質は以下のとおりである。

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

カタログ番号: 206-11071

ロット番号: LKG5746

純度: 95.7 % [HPLC]

②本研究課題で開発した定量 NMR 法により正確に定量した TTX

TTX: 1.012 mg/ml (3.173 mM)

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

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

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

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

③コモンフグ粗毒素原液の調整

(1) フグ検体

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

が異なっていた。

## (2) 粗毒素原液の調製

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

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

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

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

## (倫理面への配慮)

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

## B-3. TTX類縁体の毒性評価

### B-3-1. TTX類縁体の精製

4-*epi*TTXと11-oxoTTXは、含有動物由来の試料から精製した。まず過去にフグやイモリからTTX類を抽出し、粗精製した画分から、TTX用LC/MSや蛍光HPLCを用いて分析した。これらの類縁体を比較的多く含む画分から、主として弱酸性陽イオン交換カラムと親水性相互作用液体クロマトグラフィー(HILIC)カラムを用いて目的物を分取し、溶出フラクションをLC-MSと蛍光HPLCで分析し、目的物を精製した。11-norTTX-6(*S*)-olは、まず、化学反応でTTXから誘導した。既知の反応を用いて、TTXをH<sub>5</sub>I<sub>6</sub>で酸化して11-norTTX-6,6-diolとし、その後NaBH<sub>4</sub>で還元し、11-norTTX-6(*S*)-olと11-norTTX-6(*R*)-olの混合物を得て、その混合物から11-norTTX-6(*S*)-olを上記の液体クロマトグラフィーで精製した。さらに、量を確保するために11-norTTX-6(*S*)-olはフグからも精製した。

### B-3-2. TTX類縁体の定量

上記のように、高純度に精製した4-*epi*TTX、11-oxoTTX、11-norTTX-6(*S*)-olは、別課題で開発した方法(Watanabe et al., 2019)を参考に、<sup>1</sup>H NMRで定量することを試みた。それぞれの類縁体を、4% CD<sub>3</sub>COOD/D<sub>2</sub>Oに溶解し、内径5 mmのNMR tubeにいれて、液高3.5 cmとした。外部標準として、中央水研で調製し定量したTTX標品1ug/μLを、同様に5 mmのNMR tubeにいれ、液高3.5 cmとしてそれぞれ<sup>1</sup>H NMRスペクトルを測定し、各シグナルの積分値を比較した。

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

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

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

#### B-3-4. 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験(電気生理実験)

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

### C. 研究結果

#### C-1. フグ糠漬けに含まれる TTX や TTX 類縁体含量を定量

##### C-1-1 フグの子糠漬け試料における TTX の添加回収試験.

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

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



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

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

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

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

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

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

### C-2. 動物試験による TTX の毒性評価

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

a) 市販の生化学用 TTX、b) 定量 NMR 法により正確に定量した TTX 調整液、ならびに c) コモンフグ抽出物 (皮膚由来)、それぞれ 0.40  $\mu$ 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  $\mu$ g TTX とされているので、1 ml 投与するので MU は 2 となるはず)、それぞれ、2.0、2.2 及び 1.8 となった。したがって、コモンフグ抽出物 (皮膚由来) は、正確に定量した TTX 調整液と比較し、82% の毒力であることが明らかとなった。

### C-3. TTX 類縁体の毒性評価

#### C-3-1. TTX 類縁体の精製

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

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

11-*nor*TTX-6(S)-olの調製では、TTX粗精製物(1-2 mg)をH<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>で酸化し、処理後に<sup>1</sup>H NMRとHR-ESI/MSを測定して反応を確認した。反応ではNaBH<sub>4</sub>による還元反応も既報通り進むことを蛍光HPLCやLC/MSで確認した。反応物は活性炭とHILICカラムなどによる精製を行い、上述と同様に純度を確認した。また、フグ卵巣からも精製し、純度98%の11-*nor*TTX-6(S)-olが約100 µg得ら

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

### C-3-2. 類縁体のNMR定量

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

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

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

### C-3-4. 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験(電気生理実験)

理化学研究所より、マウス神経芽細胞腫Neuro 2Aを譲渡して頂き、所有の電気生理実験装置にて電位依存性ナトリウムチャンネルの観測に成功した。標品として、TTXに対する感受性を評価した結果、IC<sub>50</sub>(濃度)は文献記載値に近く、観測系の確立を確認した。溶液調製から感受性評価を終えるまで最大1-2時間前後となり、分解を含む化合物の構造変換が生じる可能性を極力、抑えられると判断した。

## D. 考察

### D-1. フグの子糠漬けの毒性評価

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

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

もそれと矛盾しない結果が得られた。

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

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

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

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

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

#### D-3 TTX 類縁体の毒性評価

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

#### E. 結論

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

妥当性が確認できた。

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

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

#### F. 健康危険情報

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

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ryuichi Watanabe, Masato Tanioka,

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

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

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

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

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

## 2. 学会発表

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

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

Tokyo, Japan

3) 北嶋 聡：シックハウス(室内空気汚染)対策に関する研究-シックハウス症候群レ

ベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測-, 環境科学会, 2019 年会 (2019.9.13.)名古屋

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

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

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

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

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

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

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

年会, (2019. 6. 28.) 徳島

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

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

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

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

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

1 6) 伊藤史織，國吉杏子，大野祐美，岩

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

年度大会, 2020年3月26日 口頭

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

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

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

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

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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



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

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

## B. 研究方法

### 1. フグの子糠漬け試料における TTX の添加回収試験

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

フグの子糠漬け試料は、国内で製造する 6 業者 (油与商店 (十字屋製品として)、あら与、有限会社 荒忠商店、有限会社 安新、任孫商店、原清商店) から 5 試料ずつ (計 30 試料) 購入した。購入した試料は使用するまで冷蔵保管 (0 ) した。

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

次に、50 ml コニカルチューブに取り分けたフグの子 5 g に対し、昨年度調製した分析用標準毒 (1 □g TTX/ml) を 2 ml 添加し、3 ml の 1% 酢酸溶液を添加して、ホモジナイザーで破碎し、遠心分離 (10000 ×g, rt, 10 min) により上清を得た。得られた上清 1 ml に対し、5 □l のアンモニア水 (25%) を添加し、良く攪拌した。このように調整した試料は、グラファイトカーボンを充填した固相抽出カートリッジ (1% 酢酸含有 20% アセトニトリル 3 ml, 0.025% アンモニア水 3 ml で前平衡化させたもの) に 0.4 ml を負荷し、次いで蒸留水 0.7 ml でカートリッジを洗浄し、1% 酢酸含有 20% アセトニトリル 2 ml にて毒を溶出して回収したのち、アセトニトリルで 4 倍希釈したものを分析用試料とした。なお、TTX 非添加区 (対照区) については、フグの子糠漬け試料から得た 5 g の卵に対し、5 ml の 1% 酢酸溶液を添加して上記と同様に処理し調製した。UHPLC/MS/MS での TTX の定量には、昨年度調製した分析用標準毒を用いた。また、TTX および TTX 類縁体検出のための LC/MS/MS 条件は以下の通りである。LC 装置には Nexera XR (Shimadzu)、MS 装置には QTRAP4500 (SCIEX) を用いた。分析カラムには、Waters 社製の Acquity UPLC BEH Amide カラム (2.1 × 150mm) を用いた。移動相は、麻痺性貝毒の高速分析法として報告されている Boundy *et al.* の方法を参考に調製した。カラム温度は 80 とし、分析試料の注入量は 4 μL とした。MRM のイオンチャンネルは次のとおりである。TTX, 4-*epi*TTX and 6-*epi*TTX:  $m/z$  320.1/162.0 (51 eV),  $m/z$  320.1/302.0 (33 eV) and  $m/z$  320.1/60.0 (33 eV), 4,9-anhydroTTX:  $m/z$

302.0/162.0 (51 eV) and  $m/z$  302.0/256.0 (33 eV), 5,6,11-trideoxyTTX:  $m/z$  272.0/254.0 (33 eV) and  $m/z$  272.0/162.0 (51 eV), 5-deoxyTTX and 11-deoxyTTX:  $m/z$  304.0/286.0 (33 eV),  $m/z$  304.0/162.0 (51 eV) and  $m/z$  304.0/176.0 (33 eV), 11-norTTX-6-ol:  $m/z$  290.0/272.0 (33 eV) and  $m/z$  290.0/162.0 (51 eV), 11-oxoTTX:  $m/z$  336.1/162.1 (51 eV) and  $m/z$  318.1/162.1 (51 eV), 6,11-dideoxyTTX:  $m/z$  288.1/224.0 (33 eV), 5,11-dideoxyTTX:  $m/z$  288.1/162.1 (51 eV)。Declustering potential は 106V とした。なお、コリジョンエネルギー(カッコ内の数値)を併せて示した。

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

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

異なる 6 つの製造業者が製造した糠漬け製品の TTX 類の含量を妥当性が確認された UHPLC/MS/MS 法により調べて毒力に換算し、フグ毒に対して安全と見なされる毒力 (10 MU/g) を超えるものがないか比較した。

試料は、先述の TTX 非添加区と同様の処理により調製した。UHPLC/MS/MS における分析用標準品は、TTX に関しては本事業で製造したものを、その他の成分については東北大学から恵与されたコモフグ卵巣活性炭抽出液に含まれる TTX 類縁体の成分濃度を基に算出した。なお、該当する成分濃度

がない場合は、TTX と同等の MS 応答性があるものとして定量した。また、毒性等価係数 (TEF) は、過去に得られた TTX 類縁体のマウス比毒性値に基づいて、TTX を 1 として暫定的に設定した。なお、マウス比毒性値のない類縁体については類似する構造から外挿した。以下に暫定的に設定した TEF を示す。TTX: 1, 4-*epi*-TTX: 0.16, 4,9-anhydroTTX: 0.02, 5-deoxyTTX: 0.03, 11-deoxyTTX: 0.14, 11-nor-TTX-6-ol: 0.17, 5,11-dideoxyTTX: 0.02, 6,11-dideoxyTTX: 0.02, 5,6,11-trideoxyTTX: 0.01, 4-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX: 0.01, 4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX: 0.01, 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX: 0.01。(下線は類似する構造から外挿した成分を示す)

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

## C. 研究結果

### 1. フグの子糠漬け試料における TTX の添加回収試験

フグの子糠漬けは、一般には食用不可とされるゴマフグの卵巣を塩漬けと糠漬けの工程を経て製品化される石川県の伝統食品である。ゴマフグの卵巣には TTX が含まれており、本糠漬け製品において TTX が消失する理由については微生物による分解と塩析によるものの二通りが考えられてきた。しかし、現在では長らく塩漬けされる過程で、塩析効果により TTX が卵外へ浸出し、浸出

液を交換するために消失すると考えられている。一方、本糠漬け製品には多量の塩が含まれており、これが分析用試料調製（前処理）の際の妨げになることから、TTX を糠漬け製品に添加してその回収率を調べる必要がある。

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

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

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

ただし、金沢市の製造業者に関しては百貨店から委託製造された製品を購入した。

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

まず、比毒性が最も高い TTX は、538 ng/g tissue であった。それ以外の成分は、全体に占める割合の高い成分から、4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX: 20,912 ng/g tissue、次いで 5,6,11-trideoxyTTX: 2,393 ng/g tissue、さらに 4-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX: 1,272 ng/g tissue であった。以上の結果から、TTX は比毒性は高いものの、成分濃度で見ると 5 番目に多い成分であった。得られた成分濃度に先述の TEF を乗じて TTX 相当量の毒力を求めると、毒力が強い成分から順に、TTX: 538 ng TTX eq./g tissue、次いで 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX: 209 ng TTX eq./g tissue、さらに、5,6,11-trideoxyTTX: 32 ng TTX eq./g tissue であった。また、各成分の毒力を加算して総毒力を求めると、825 ng TTX eq./g tissue であった。国際的に毒力は TTX 相当量として表されるが、国内では TTX についてはマウス毒性試験が行われており、マウスユニット（MU）換算した方が理解しやすいと思われる。そこで、1 MU あ

たり 0.22  $\mu$ g TTX として計算すると、この試料の毒力は 3.8 MU/g となった。その他の製造業者については総毒力についてのみ示すが、原清商店：771 ng TTX eq./g tissue (3.5 MU/g)、荒忠商店：1526 ng TTX eq./g tissue (6.9 MU/g)、安新：793 ng TTX eq./g tissue (3.6 MU/g)、任孫商店：981 ng TTX eq./g tissue (4.5 MU/g)、油与：1087 ng TTX eq./g tissue (4.9 MU/g)であった。いずれの製造業者の製品も換算した毒力は 10 MU/g 以下であることがわかった。

#### D. 考察

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

も試料調製の際に抽出に使用する抽出溶媒の量を増やすことで回収率を向上させることが可能と考えられた。

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

本事業では、マウスに対する比毒性から TEF を見積もった。この際、フグの子糠漬け製品に最も多く含まれていた 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX の TEF を 5,6,11-trideoxyTTX の 0.01 と同等に、高めに見積もった。4,9-anhydroTTX が TTX の 2%程度まで毒力が低下することから、4, 4a 位で脱水している 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX も同様に、5,6,11-trideoxyTTX の 1 - 2% 程度と考えると、実際はもっと小さい TEF (e.g : 0.001~0.0001) になると思われ、全体としての毒力は 2-3 割程度低下することになり、総毒力への寄与を考えると主要毒は TTX と考えてよいと思われる。しかし、含量の多い 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX の TEF はこれまで正確に評価されておらず、今後の課題と考えてい

る。また、フグ毒の分析が UHPLC/MS/MS のような機器分析法に代わった場合、毒力への寄与を考慮して、どの成分を定量する必要があるかが重要な問題となるだろう。

国内で無毒と見なされる 10 MU/g 以下の毒力に対し、EFSA では二枚貝に含まれる TTX の基準値を 44  $\mu$ g TTX eq./kg tissue (400 g 消費した場合のヒトに対して可逆的な効果を生じない濃度として)と定めている。これをフグの子糠漬け製品に適用した場合、最も少ない TTX 含量を示した原清商店の製品でさえ流通が不可になってしまう。フグの子糠漬け製品は塩蔵・嗜好品であり、一回に食する量は二枚貝と比べて非常に少ないことから、EFSA の基準値をフグの子糠漬け製品にそのまま適用するのは好ましくないと考える。なお、フグは採取海域や種によって TTX 以外に麻痺性貝毒を有する場合がある。今回試料としたフグの子糠漬けについて一試料のみこの点について調べたが、既知の麻痺性貝毒は検出されなかった。

#### E. 結論

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

また、国内の 6 つの異なる業者により製造されたフグの子糠漬け試料を購入

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

#### F. 健康危険情報

研究分担者のため割愛

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

##### 2. 学会発表

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

2020年3月（東京）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



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（LD<sub>50</sub>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LD<sub>50</sub>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(LD<sub>50</sub>)を9~12.5 µg/kg、経口投与におけるLD<sub>50</sub>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<sup>\*</sup>(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。

<sup>\*</sup>: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  $\mu\text{m}$ )

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  $\mu\text{L}$

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

ドライガス： $\text{N}_2$  (300, 11 L/min)

ネブライザー： $\text{N}_2$  (55 psi)

シースガス： $\text{N}_2$  (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： $\text{N}_2$

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  $\mu\text{m}$ ）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  $\mu\text{L}$ ずつ分注した。うち1本は0.1%酢酸400  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ 添加すると共に、更に0.1%酢酸を加えて容量を500  $\mu\text{L}$

とすることで TTX 添加濃度 0、1.1、2.2、4.4 ng/mL (各 500  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ g/ml のはず) それぞれ、0.43、0.49 及び 0.38  $\mu$ 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  $\mu$ 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、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ドトキシンのリスク評価に関する国際的動向 - マウスユニットと急性参照用量 -,第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.26.)徳島

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

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

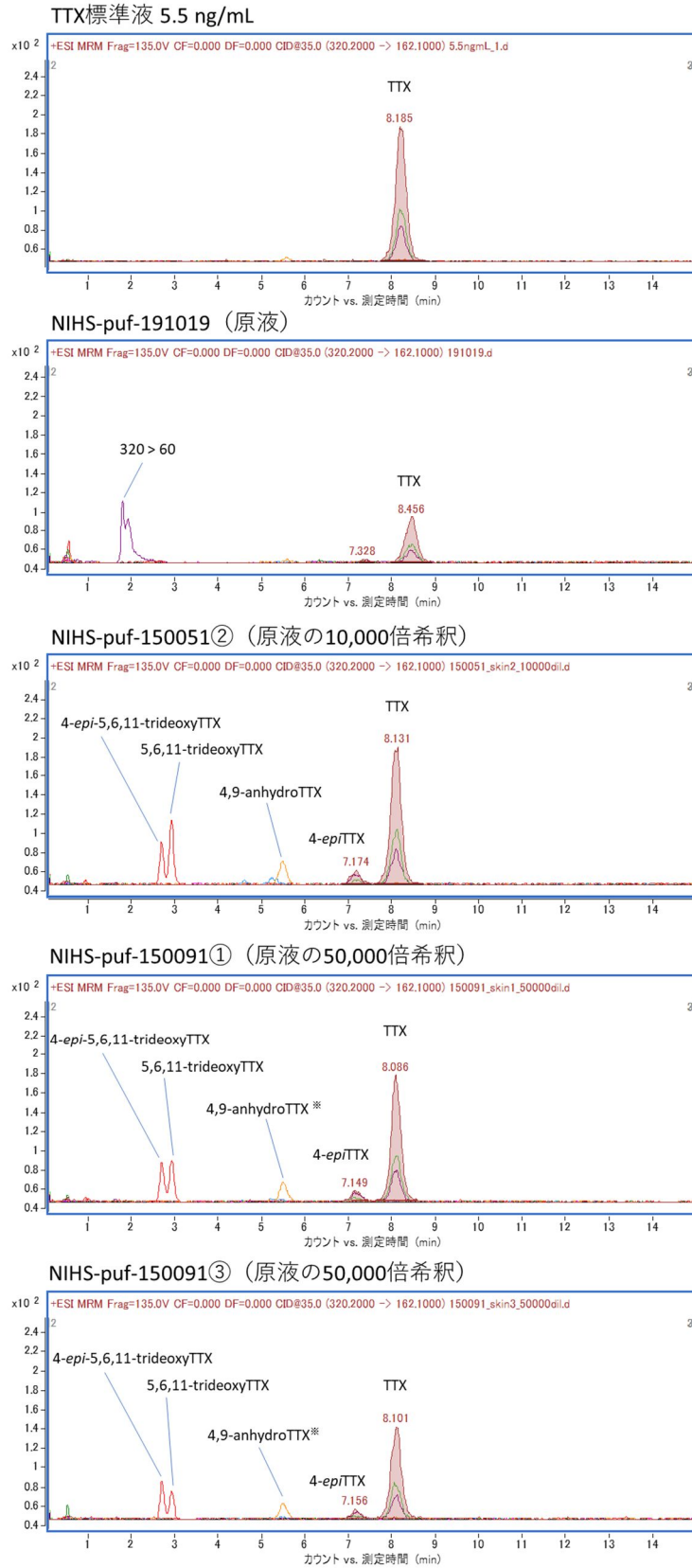


図 1 . 粗毒原液から調製した測定液の LC-MS/MS クロマトグラム

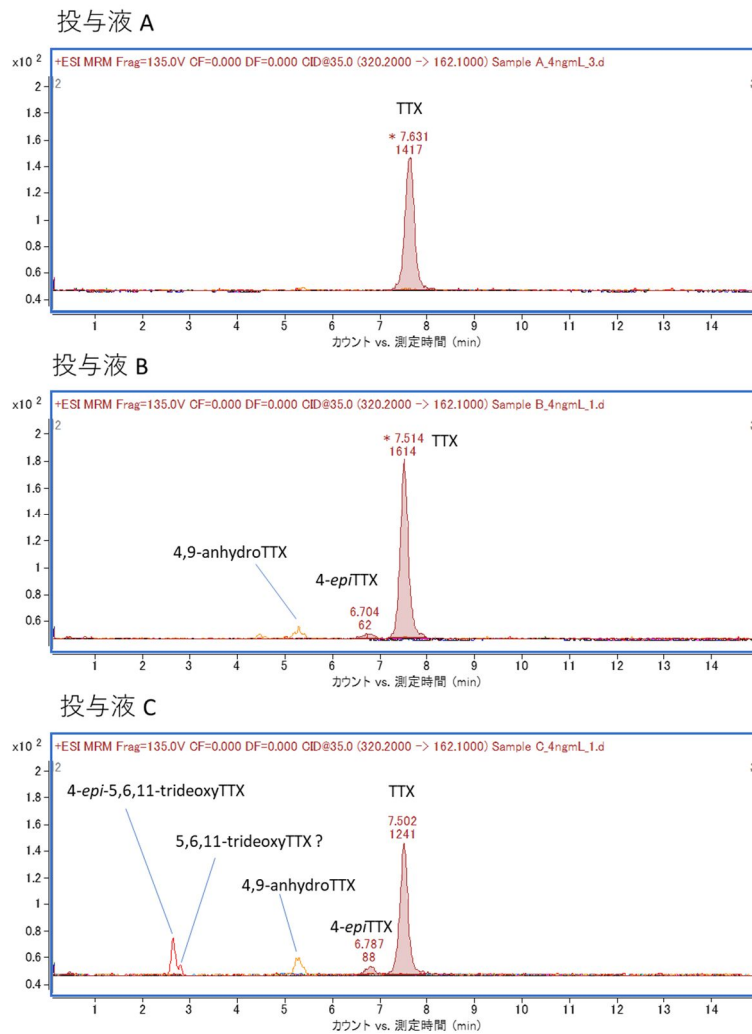


図 2 . マウス投与液の 100 倍希釈液の LC-MS/MS クロマトグラム

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。

令和元年度（今年度）は、さらに 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し、LC-MS や NMR で純度を確認し、活性測定に十分な純度の予定していた類縁体を調製した。また、これらの TTX 類縁体について、TTX 標品を外部標準として、<sup>1</sup>H NMR スペクトル測定による定量(qNMR)を行った。さらに、これらの TTX 類縁体を用いて、電位依存性ナトリウムチャンネル阻害活性を評価するため、マウス神経芽細胞腫 Neuro 2A を用いた比色法と、同細胞を用いたホールセルパッチクランプ法での評価について検討した。

## 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した。まず過去にフグやイモリから TTX 類を抽出し、粗精製した画分から、TTX用LC/MSや蛍光HPLCを用いて分析した。これらの類縁体を比較的多く含む画分から、主として弱酸性陽イオン交換カラムと親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) カラムを用いて目的物を分取し、溶出フラクションをLC-MSと蛍光HPLCで分析し、目的物を精製した。11-norTTX-6(*S*)-olは、まず、化学反応でTTXから誘導した。既知の反応を用いて、TTXをH<sub>5</sub>I<sub>0</sub><sub>6</sub>で酸化して11-norTTX-6,6-diolとし、その後NaBH<sub>4</sub>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: TTX類縁体の定量

上記のように、高純度に精製した4-*epi*TTX, 11-oxoTTX, 11-norTTX-6(S)-olは、渡邊らがTTXのNMR定量法として報告した方法(Watanabe et al., 2019)を参考に、<sup>1</sup>H NMRで定量することを試みた。それぞれの類縁体を、4% CD<sub>3</sub>COOD/D<sub>2</sub>O に溶解し、内径5 mmのNMR tubeにいれて、液高3.5 cmとした。外部標準として、中央水 8 研で調製、定量したTTX標品1 μg/μLを、同様に5 mmのNMR tubeにいれ、液高3.5 cmとしてそれぞれ<sup>1</sup>H NMRスペクトルを測定し、各シグナルの積分値を比較した。

#### B-3: 電位依存性ナトリウムチャンネル(Na<sub>v</sub>)阻害試験(Neuro2A細胞を用いた比色法)

4-*epi*TTX, 11-oxoTTX, 11-norTTX-6(S)-olは、簡便なマウス神経芽細胞腫Neuro2A細胞を用いた比色法により、電位依存性ナトリウムチャンネルに対する阻害作用を評価することをまず検討した。方法は既報の通りである(Sarunashi et al., 2016, Toxicon)。すなわち、Na<sub>v</sub>を発現しているNeuro2A細胞に、Na<sub>v</sub>活性化剤のveratridine (VTD)とNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase阻害剤のOuabainを加えて、細胞内のNa<sup>+</sup>濃度が過剰になる条件下に細胞をおき、24時間後に、ホルマザン試薬のWST-8を加えて細胞生存率を計測する方法である。TTXなどのNa<sub>v</sub>阻害剤を加えることにより、細胞生存率が上昇するため、それを指標にNa<sub>v</sub>阻害活性を評価する。本方法では、特に4-*epi*TTXは中性条件で、化学的な不安定性により、高活性のTTXに変換することが懸念されるため、4-*epi*TTXについて、本方法の条件下で、どの程度TTXに変換するかをTTX用蛍光HPLCを用いて検討した。実際に上記の試験終了後(24時間37度放置、WST-8を添加してさらに2時間37度放置後)、4-*epi*TTXを最終濃度1 μM加えた細胞培養液を抜き取り、濾過後にTTX用蛍光HPLCに供して培地中のTTX類を分析した。

#### B-4: 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験(電気生理実験)

電位依存性ナトリウムチャンネルには9つのサブタイプが存在し、Na<sub>v</sub>1.1-1.9と分類されている。複数のサブタイプが発現するNeuro2A細胞に対してTTX類縁体の作用を調べることは仮にTTX類縁体にサブタイプ選択生が見られる場合、Navへの作用を見逃す可能性がある。そこで、Nav1.5、Nav1.8、Nav1.9の3つのサブタイプを除く他6つのサブタイプの293T細胞への発現を試みることにし、各Navサブタイプの観測にも成功した。

### 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<sup>1</sup>H 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。<sup>1</sup>H 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<sup>13</sup>C 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H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>で酸化し、処理後に<sup>1</sup>H NMRとHR-ESI-MSを測定して反応を確認した。反応ではNaBH<sub>4</sub>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。

#### C-2: 類縁体のNMR定量

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

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

本方法で、安定なTTX類縁体を評価できることはこれまでの実績からもわかっている。しかし、蛍光HPLCによる分析結果から、4-epiTTXは、本試験条件の計26時間37度細胞培養液(RPMI 1640 10% FBS)中放置後に、0.7%しか残存せず、57%がTTXに変換し、他は回収できていないか、非活性型のテトロドトキシン酸タイプの化合物に変換したと思われる。このことから、本方法では、4-epiTTXの活性試験として適さないことが示された。そこで、短時間で結果がでる電気生理実験に供する必要があることが確認された。

#### C-4: 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験 (電気生理実験)

理化学研究所より、マウス神経芽細胞腫Neuro 2Aを譲渡して頂き、所有の電気生理実験装置にて電位依存性ナトリウムチャンネルの観測に成功した。標品として、TTXに対する感受性を評価した結果、IC<sub>50</sub> (濃度) は文献記載値に近く、観測系の確立を確認した。溶液調製から感受性評価を終えるまで最大1-2時間前後となり、分解を含む化合物の構造変換が生じる可能性を極力、抑えられ

ると判断した。

#### D. 結論

令和元年度(今年度)は、活性試験に用いるために、高度に精製した4-epiTTX、11-oxoTTX、11-norTTX-6(S)-olを<sup>1</sup>H NMRスペクトルを用いて定量した。また、Neuro2A細胞を用いた比色法による電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験の実験条件において、4-epiTTXの安定性について調べ、本実験の条件下ではほぼ残存することができず、56%がTTXに変換していた。このことから4-epiTTXは、短時間で結果をだすことができる、電気生理実験で活性評価することが必要であることを確認した。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yuta Kudo and Mari Yotsu-Yamashita, Isolation and biological activity of 8-epitetradotoxin and the structure of a possible biosynthetic shunt product of tetrodotoxin, Cep-226A, from the newt, *Cynops ensicauda popei*, *Journal of Natural Products*, 82, 1656-1663, 2019.

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.9b00178>

Yukari Maeno, Ryuta Terada, Yuichi Kotaki, Yuko Cho, Keiichi Konoki, and Mari Yotsu-Yamashita, Possible biosynthetic products and metabolites of kainic acid from the red alga, *Digenea simplex*, and their biological activity, *Journal of Natural Products*, 82, 1627-1633, 2019.

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.9b00128>

Takashi Minowa, Yuko Cho, Yasukatsu Oshima, Keiichi Konoki and Mari Yotsu-Yamashita, Identification of a Novel Saxitoxin Analogue, 12-Deoxygonyautoxin 3, in the Cyanobacterium, *Anabaena circinalis* (TA04), *Toxins* 2019, 11, 539

<https://doi.org/10.3390/toxins11090539> (open access)



Satoshi Numano, Yuta Kudo, Yuko Cho, Keiichi Konoki and Mari Yotsu-Yamashita, Temporal Variation of the Profile and Concentrations of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxin in the Scallop, *Patinopecten yessoensis*, Cultured in a Bay of East Japan, *Mar. Drugs*, 2019, 17(12), 653;  
<https://doi.org/10.3390/md17120653> (open access)

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

Kanna Adachi, ‡ Tomoshi Yamada, ‡ Hayate Ishizuka, Mana Oki, Shunsuke Tsunogae, Noriko Shimada, Osamu Chiba, Tatsuya Orihara, Masafumi Hidaka, Takatsugu Hirokawa, Minami Odagi, Keiichi Konoki,\* Mari Yotsu-Yamashita,\* Kazuo Nagasawa\* (‡ contributed equally to this work), Synthesis of C12 keto saxitoxin derivatives with unusual inhibitory activity against voltage gated sodium channels, *Chem. Eur. J.*, 2020, 26, 2025-2033.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/chem.201904184>

Dietrich Mebs, Mari Yotsu-Yamashita, Katharina Hartmann, Christine Elbert, Richard Zehner, Stefan W. Toennes, Revisited - Failure of tetrodotoxin to protect red-spotted newts, *Notophthalmus viridescens*, from endoparasites, *Toxicon*, 2020, 178, 77-81.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.02.026>

## 2. 学会発表

○前野優香理、小瀧裕一、寺田竜太、長由扶子、此木敬一、山下まり：第30回万有仙台シンポジウム神経興奮物質カイノイド類の生合成中間体の同定及び生理活性評価 2019.6.29 ポスター

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

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

○角替俊輔、此木敬一、山下まり、八代田陽子、村田道雄、Charles Boone, Jason Moffat: Crip Screening による Maitotoxin の作用標的分子探索、新学術領域化学コミュニケーションのフロンティア, 第三回若手シンポジウム, 2019.6.26 大阪大学豊中キャンパス大阪大学会館 口頭

○山下まり:テトロドトキシン類縁体の電位依存性 Na チャネル阻害活性と生合成経路の推定第46回日本毒学会学術年会,シンポジウム「海産毒リビジテッド」, 2019年6月26日 招待講演

○前野優香理、小瀧裕一、寺田竜太、長由扶子、此木敬一、山下まり:神経興奮物質カイノイド類の生合成中間体の同定及び生理活性評価, 第30回万有仙台シンポジウム, 2019年6月29日 poster

○山下まり:中間体に基づく海洋生物毒の生合成研究,東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教

室セミナー，2019年7月5日 招待講演

Kudo, Y. and Yotsu-Yamashita, M. : Identification of new analogs and putative biosynthetic intermediates of tetrodotoxin aimed at elucidating its biosynthetic pathway and structure activity relationship, 60th American Society of Pharmacognosy Annual Meeting, 2019 2019年7月13日 口頭

○Goto, M., Kikuchi, S., Okada, K., Cho, Y., Yotsu-Yamashita, M. and Konoki, K. : Screening of novel secondary metabolites from microorganisms associated with the marine sponge *Halichondria okadai*, Tohoku University's Chemistry Summer School, 2019年7月27日 Poster

○Yaegashi, Y., Ueyama, N., Kudo, Y., Cho, Y., Konoki, K. and Yotsu-Yamashita, M. : Isolation and structural elucidation of tetrodotoxin related compounds from pufferfish, Tohoku University's Chemistry Summer School, 2019年8月27日 Poster

宮坂忠親, 安立昌篤, 工藤雄大, 杉本敬太, 山下まり, 西川俊夫: テトロドトキシンの推定生合成中間体の全合成と絶対立体配置の決定, 第61回天然有機化合物討論会, 2019年9月11日 口頭

○安達菜菜, 石塚 颯, 山田智士, 日高將文, 広川貴次, 小田木 陽, 此木敬一, 山下まり, 長澤和夫: C11位炭素置換型サキシトキシン誘導体の合成と活性評価, 第61回天然有機化合物討論会, 2019年9月11日 poster

○前野優香理, 小瀧裕一, 寺田竜太, 長 由扶子, 此木敬一, 山下まり: ドウモイ酸とカイニン酸の新規関連化合物の単離 構造決定と生合成経路, 第61回天然有機化合物討論会, 2019年9月11日 poster

○沼野 聡, 加賀克昌, 工藤雄大, 山下まり: ホタテガイに含有する麻痺性貝毒の代謝物に関する研究, 第115回日本食品衛生学会学術講演会, 2019年10月4日 poster

○山下まり: 海洋生物毒の謎に迫る, 仙台青葉学院短期大学講演会, 2019年10月7日 招待講演

○赤松みちる, 長 由扶子, 此木敬一, 山下まり : 淡水産藍藻 *Anabaena circinalis* (TA04 株) における新規麻痺性貝毒類縁体の探索, 公益社団法人日本農芸化学会東北支部・第154回大会, 2019年11月9日

工藤雄大, 山下まり: LC-MS/MSを用いた抗マラリア活性天然物サリニポスチンの新規類縁体の探索, 公益社団法人日本農芸化学会東北支部・第154回大会, 2019年11月9日

○角替俊輔, Katherine Chan, Amy Hin Yan Tong, Kamaldeep Kaur Aulakh, Andrea Habsid, 八代田陽子, Jason Moffat, Charles Boone, 山下まり, 村田道雄, 此木敬一: Crispr スクリーニングによる maitotoxin の標的分子探索(1), 公益社団法人日本農芸化学会東北支部・第154回大会, 2019年11月9日口頭

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

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

沼野 聡, 加賀克昌, 工藤雄大, 山下まり: 岩手県

産ホタテガイの中腸腺に含有する麻痺性貝毒の分析, 第 56 回 全国衛生化学技術協議会年会, 2019 年 12 月 5 日 Poster

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

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

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

東海林 千容、長 由扶子、赤松 みちる、安達菜菜、石塚 颯、此木 敬一、長澤 和夫、山下 まり: 麻痺性貝毒サキシトキシンの推定生合成中間体の合成と有毒生物中の分析, 日本農芸化学会 2020 年度大会, 2020 年 3 月 26 日 口頭

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

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

長 由扶子、土屋 成輝、小池 一彦、此木 敬一、大島 泰克、山下 まり: コルヒチン存在下

の渦鞭毛藻サキシトキシン 生合成のメタボロミクス解析, 令和 2 年度日本水産学会春季大会, 2020 年 3 月 27 日 口頭

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

島田 紀子、長 由扶子、此木敬一: クロイソカイメン抽出物由来電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤の探索, 日本農芸化学会 2020 年度大会, 2020 年 3 月 28 日 口頭

## 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, Ka, Hajime Uchida, Ryoji Matsu- shima, Hiroshi Oikawa, Masahiro Matsumiya, Ma- ri Yotsu-Yamashita, Toshiyuki Suzuki.	Quantitation of tetrodotoxin and its analogues with a combination of liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitative <sup>1</sup> H-NMR Spectroscopy,	J. Agri. Food Chem.	67, 46	12911-12917.	2019
Kobayashi K, Kuzze 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	Article number: 57		2019
北嶋 聡	エディトリアル：ドーピングの中毒学・毒理学 - 序文 -	中毒研究 (Jpn. J. Clin. Toxicol.)	32	373-374.	2019
Yuta Kudo and Mari Yotsu-Yamashita	Isolation and biological activity of 8-epitetrodotoxin and the structure of a possible biosynthetic shunt product of tetrodotoxin, Cep-226A, from the newt, <i>Cynops ensicauda popei</i>	Journal of Natural Products	82	1656-1663	2019

Yukari Maeno, Ryuta Terada, Yuchi Kotaki, Yuko Cho, Keiichi Konoki, and Mari Yotsu-Yamashita	Possible biosynthetic products and metabolites of kainic acid from the red alga, <i>Digenea simplex</i> , and their biological activity	Journal of Natural Products	82	1627-1633	2019
Takashi Minowa, Yuko Cho, Yasuhiro Katsuta, Keiichi Konoki and Mari Yotsu-Yamashita	Identification of a Novel Saxitoxin Analog, 12-Deoxygonyautoxin 3, in the Cyanobacterium, <i>Anabaena circinalis</i> (TA04)	Toxins	11(9)	539	2019
Satoshi Numano, Yuta Kudo, Yuko Cho, Keiichi Konoki and Mari Yotsu-Yamashita	Temporal Variation of the Profile and Concentrations of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxin in the Scallop, <i>Patinopecten yessoensis</i> , Cultured in a Bay of East Japan	Mar. Drugs	17(12)	653	2019
Kanna Adachi, Tomoshi Yamada, Hayate Ishizuka, Mana Okui, Shunsuke Tsunogae, Noriko Shimada, Osamu Chiba, Tatsuya Orihara, Masafumi Hidaka, Takatsugu Hirokawa, Minami Odagi, Keiichi Konoki, * Mari Yotsu-Yamashita, * Kazuo Nagasawa* (‡ contributed equally to this work)	Synthesis of C12 ketone saxitoxin derivatives with unusual inhibitory activity against voltage-gated sodium channels	Chem. Eur. J.	26	2025-2033	2020
Dietrich Mebs*, Mari Yotsu-Yamashita, Katharina Hartmann, Christine Elbert, Richard Zehner, Stefan W. Tonnes	Revisited - Failure of tetrodotoxin to protect red-spotted newts, <i>Notophthalmus viridescens</i> , from endoparasites	Toxicon	178	77-81	2020



令和 2年 5月 28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発 XXXXXXXXXX 教育機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 宮原 正典

次の職員の令和元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 令和元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 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。



令和 2年 5月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発 XXXXXXXXXX 教育機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 宮原 正典

次の職員の令和元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 令和元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 衛生管理グループ長  
（氏名・フリガナ）及川 寛・オイカワ 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。



令和 2年 5月28日

厚生労働大臣

機関名 国立研究開発機関 教育機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 宮原 正典

次の職員の令和元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 令和元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）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 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。





令和 2年 5月 28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発 XXXXXXXXXX 教育機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 宮原 正 XXXXXXXXXX

次の職員の令和元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 令和元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 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。



令和 2年 5月 28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発 XXXXXXXXXX 教育機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 宮原 正典

次の職員の令和元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 令和元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  
（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 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。

機関名 国立医薬品  
 所属研究機関長 職名 所長  
 氏名 奥田 晴宏

次の職員の令和元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 (H30-食品-一般-005)
- 研究者名 (所属部局・職名) 食品衛生管理部・部長  
 (氏名・フリガナ) 朝倉 宏 ・ アサクラ 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 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。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏

次の職員の令和元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) 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 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。

令和2年4月17日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人東北大学

所属研究機関長 職名

氏名 総長 大野英男 印



次の職員の令和元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 令和元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） 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。

令和2年4月17日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人東北大学

所属研究機関長 職名

氏名 総長 大野英男 印



次の職員の令和元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 令和元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） 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。