

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

テトロドトキシンのリスク管理のための研究

研究代表者又は研究分担者

渡邊 龍一 水産技術研究所 主任研究員

内田 肇 水産技術研究所 任期付研究員

松嶋 良次 水産技術研究所 主任研究員

及川 寛 水産技術研究所 グループ長

鈴木 敏之 水産技術研究所 部長

研究要旨:市販のフグの子糠漬け製品に含まれるテトロドトキシン（TTX）類の含量を明らかにするため、ふぐの子糠漬けに適した前処理法を開発し、正確な値付け手法によって開発・調製した分析用標準毒を用いて、二枚貝類に含まれる麻痺性貝毒及びテトロドトキシンに対し妥当性の確認された超高速液体クロマトグラフィー-質量分析法（UHPLC/MS/MS）による定量分析を試みた。

まず、ふぐの子糠漬けに適した前処理法を開発した。二枚貝に対して妥当性確認のとれた前処理法では TTX の回収率が約 35%程度と低いことが判明した。そこで、活性炭を充填した固相カートリッジ（Seppak AC2）を使用した前処理法を開発した。当該分析方法の妥当性確認のため、フグの子糠漬け試料に濃度既知（10MU/g 相当）の TTX を一定量加え、添加回収試験を行った。対照区として TTX を添加しないフグの子糠漬け試料についても TTX 含量を調べ、TTX 添加区から TTX 非添加区を差し引いた分析値は平均 1,864 ng/g tissue（回収率：86%）であった。新たに開発した前処理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を確認した。

次に、国内で製造されるフグの子糠漬け製品を異なる製造業者（6 業者）から購入し、妥当性の確認された本分析法を用いて TTX および類縁体の含量を調べた。その結果、1 社を除き、残りの 5 社すべての製造業者で製造されたフグの子糠漬け試料の換算毒力は無毒と見なされる 10 MU/g を上回るものであった。そこで、マウス毒性試験を実施したところ、マウス毒性は検出されたが、すべて 10MU/g 未満であり、食品衛生法で規制される違反検体ではなかった。機器分析法はマウス毒性試験よりも塩類の影響を受けにくいため、フグの子糠漬けを分析すると今回のような結果が予測されるので注意が必要である。

## 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 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、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。また、規制値を上回る毒力が検出された場合には、それら検体についてはマウス毒性試験を実施し、規制値を超えているかどうか最終的に判断した。

## B. 研究方法

### 1. フグの子糠漬けに適した前処理法の開発

二枚貝類に対して妥当性が確認されたグラファイトカーボンカートリッジを用いた前処理法であるが、今年度実施した際には回収率が 32% と低かったため、新たに前処理法を開発することにした。

まず、抽出溶媒の最適化を行った。一定

量のふぐの子糠漬け卵粒に対し、等倍量から 6 倍量までの 1%酢酸を添加し、それらの TTX 含量を調べた。

続いて、固相カートリッジの探索を行った。検討に用いたのは、グラファイトカーボンを充填した固相カートリッジ (Envicarb, Supelco, 250mg/3ml; Hypercarb, Thermofisher scientific, 200mg/3ml; Bond elut Carbon, Agilent, 250mg/3ml) と活性炭を充填した固相カートリッジ (Sep-pak plus AC2, Waters, 400 mg) の計 4 つを検討した。いずれの固相カートリッジに対する処理操作は昨年度 (*J.Chromatogr.A* 1387 (2015), p1-12) と同様とした。これらに一定量の TTX を添加し、非吸着画分、1%酢酸を含む 20%アセトニトリル、1%酢酸を含む 40%アセトニトリル画分それぞれの回収率を調べた。

さらに、非吸着画分への溶出が最も低かった Sep-pak plus AC2 を用いて、溶出条件の検討を行った。すなわち、一定量の TTX を添加し、1%酢酸を含む 20%有機溶媒 (アセトニトリル、メタノール、エタノール、イソプロパノール) で溶出し、次いで、1%酢酸を含む 40%アセトニトリルまたは 1%酢酸を含む 50%有機溶媒 (メタノール、エタノール、イソプロパノール) で溶出し、それぞれの画分に含まれる TTX 含量を調べた。

最後に、試料を Sep-pak AC2 に負荷した際、カートリッジを洗浄するが、その時の蒸留水量を最適化した。具体的には、洗浄に使用する蒸留水の量を 1.0ml、1.4ml、2.0ml と変えていき、MS クロマトグラムでの各成分の挙動やピーク形状、回収率などを指標に決めた。

## 2. フグの子糠漬け試料における TTX の添加回収試験

B.1. で開発した前処理法が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 (AB 社、AR 社、AC 社、Y 社、T 社、H 社) 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°C) した。

フグの子糠漬け試料 (H 社、4 個体分) は開封後、卵巣の膜をはがし、フグの子 (卵粒) 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、今年度新たに調製した標準毒 (2.613 mM) を 13 ml 添加し、20 ml の 0.5% 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。このように調整した試料は、活性炭を充填した固相抽出カートリッジ: Sep-pak AC2 (1% 酢酸含有 50% メタノール 5 ml, 0.025% アンモニア水 5 ml で前平衡化させたもの) に 0.4 ml の抽出液を負荷し、次いで蒸留水 1.4 ml でカートリッジを洗浄し、1% 酢酸含有 20% メタノール 2 ml で溶出し、エアージェット後、1% 酢酸含有 50% メタノール 2 ml にて毒を溶出して回収した。最後にアセトニトリルで 2 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、20

ml の 0.5% 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 150 mm) 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.* (*J.Chromatogr.A*, 1387, 2015, p1) の方法を参考に調製した。カラム温度は 80°C 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、コリジョンエナジー (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 2170 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。

### 3. 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調べた。

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のを用い、その他の主要な TTX 類縁体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。

規制値を超えるものが検出された場合に限り、各製造業者 1 検体ずつをマウス毒性試験に供し、ふぐの子糠漬け試料の実際のマウス毒力を調べることで違反検体であるかどうか調べた。

## C. 研究結果

### 1. フグの子糠漬けに適した前処理法の開発

ふぐの子糠漬け 5.00g に対し、等倍量から 6 倍量の 1%酢酸を添加して得られる TTX 含量を調べた。その結果、等倍量添加時の 852 ng/g から緩やかに増加し、4 倍量添加時には 1015 ng/g に達した。5 倍(1083 ng/g)、6 倍量(1094ng/g)でもわずかに増加したが、4 倍量以上では統計的に有意な差はなかった。そこで、ホモジナイズのしやすさや、分析試料調製時の希釈倍率等を考慮し、4 倍量が最適と判断した。

次に、ふぐの子糠漬けに含まれる TTX を効率よく吸着する固相抽出カートリッジの検討を行った。二枚貝に対し妥当性が確認されている Envi-Carb は非吸着画分に 52% が溶出した。同様に、グラファイトカーボンを充填した Bond elut Carbon では 13%が、Hypercarb では 54%が非吸着画分に TTX を検出したため、本試験には適していないと判断した。残る活性炭を充填したカートリッジである Sep-pakAC2 は非吸着画分には 0.2%しか溶出せず、その後の 1%酢酸を

含む 20%アセトニトリルで 15%、さらに 1%酢酸を含む 40%アセトニトリルで 18% の TTX 溶出を確認した。溶出面分における TTX の回収は低かったが、効率よく TTX を吸着することから Sep-pakAC2 による前処理について検討した。

Sep-pakAC2 による TTX の溶出条件の最適化の結果、非プロトン性溶媒であるアセトニトリルでは 33%程度しか溶出しなかったのに対し、プロトン性溶媒であるメタノール、エタノールで高い回収率が認められた。そのうち、1%酢酸を含む 20%メタノールで 66%、次いで、1%酢酸を含む 50%メタノールで連続して溶離させた結果、19% の回収率が得られ、両者を合わせて、85%の回収率が得られた。このことから、溶出溶媒にはメタノールを用い、2 段階溶出させることにした。なお、1%酢酸を含む 50%メタノールを用いた 1 回溶出では 50%程度しか回収できなかった。

さらに、試料を負荷した後、カートリッジカラムを洗浄する蒸留水の量について検討した。その結果、蒸留水 1.4ml で洗浄することで、5,6,11-trideoxyTTX のピーク形状の改善、TTX の十分な保持が得られ、脱塩効果も高いことから、1.4ml とした。

本研究で開発した前処理法の手順は以下のとおりである。

フグの子糠漬け(卵巣の塊)を卵膜と卵粒とに分け、卵粒は均質になるようにスパーテルで良く攪拌した。そこから、卵粒 5.00g を 50ml 遠沈管に採取し、0.5%酢酸 20ml を加え、5 分間良くホモジナイズした。5 分間の加温抽出 (95°C) を行い、氷冷したのち、遠心分離 (10000xg, rt, 10min) して上清を得た。上清 1ml に対し、25%アンモニア水

5μl を加え、良く攪拌した。この上清液 0.4ml を、予め 1%酢酸を含む 50%メタノール 5ml と 0.025%アンモニア水 5ml で前平衡化した Sep-pak AC2 に負荷した。そこに、蒸留水 1.4ml にてカートリッジを洗浄・脱塩して、最後にエアーパージした。溶出は、1%酢酸を含む 20%メタノール 2ml、1%酢酸を含む 50%メタノール 2ml でそれぞれ行い、両溶出液は合わせて回収した。なお、溶出溶媒を変える際はエアーパージを行った。混合溶出液 0.1ml をアセトニトリル 0.1ml で 2 倍希釈して、分析用試料とした。

## 2. フグの子糠漬け試料における TTX の添加回収試験

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。

フグの子 5g に対し、10MU/g 相当になるように TTX を添加して、その回収率を調べた (n=3)。その結果、TTX 添加区の分析値は  $3944 \pm 306$  ng TTX/g tissue (7.8% rsd)、TTX 非添加区は  $2080 \pm 79$  ng TTX/g tissue (3.8% rsd) であり、実際の TTX 回収量は 1864 ng TTX/g tissue であった。TTX 添加の理論値は 2170 ng/g tissue であることから回収率は 86%であり、良好な結果が得られた。新たに開発した活性炭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 TTX 群のピークと重ならないことが明らかとなった。以上の結果から、Sep-pak AC2 を用いた本前処理法は、

フグの子糠漬けのように塩分含量が高い試料に対しても有効であることが明らかとなった。

### 3. 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と毒力の算出

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オンラインを介して購入した。

フグの子糠漬けは開封後、ゴマフグ卵巣から取り出して均質化した卵粒 5 g 取り、0.5%酢酸にて 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を示した (図 1)。そこで、そのうちの一社 (AR) の結果を代表例として説明する。

比毒性が最も高い TTX は、1558 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、5,6,11-trideoxyTTX: 2236 ng/g tissue、4-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX: 1804 ng/g tissue、4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX: 1536 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 3 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: 1558 ng TTX eq./g tissue、次いで 5,6,11-trideoxyTTX: 22 ng TTX eq./g tissue、4-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX: 18 ng TTX eq./g tissue、4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX: 15 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、1652 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国内試験法として一般的であり、マウス致死毒力単位であるマウスユニット (MU) により食品の安全性が評価されている。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 7.5 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、H 社: 3960 ng TTX eq./g tissue (18.0 MU/g)、AC 社: 2872 ng TTX eq./g tissue (13.1 MU/g)、Y 社: 3611 ng TTX eq./g tissue (16.4 MU/g)、T 社: 2296 ng TTX eq./g tissue (10.4 MU/g)、AB 社: 3009 ng TTX eq./g tissue (13.7 MU/g) であった。製造業者の製品で換算した毒力は一社を除き、すべて 10 MU/g 以上であることがわかった (図 2)。

そこで、規制値を上回った検体のうち、各製造業者 1 検体を使って、マウス毒性試験に供した。その結果、いずれも規制値 (10MU/g) 未満であった。

#### 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 86% 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。

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、1652~3960 ng TTX eq./g tissue (7.6~18 MU/g)であった。食品衛生検査指針に示された、安全性が確認されたフグとされる毒力 (10 MU/g 以下) であることが確認できたものは1社のみで、残りの5社についてはすべて規制値を上回っていた。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にはないと考えられる。機器分析で規制値を超える検体を対象にマウス毒性試験を実施したが、すべて規制値未満であり、違反検体はなかった。

フグの子糠漬けが規制値を上回るという事例は、旧東海区水産研究所の小沢によって報告されている。小沢 (1987) はマウス毒性試験に与える塩分の影響を調べており、塩濃度が高くなるほど、マウス毒力は低下し、塩分 5.0%では 60%程度まで低下することを報告している。小林ら (2003) の検討でも、塩の影響により、毒力は 55%程度まで低下することが報告されている。今回 UHPLC/MS/MS を実施した検体ではほぼすべての製造業者で規制値を上回っており、これは、塩の影響をマウス毒性試験よりも受けにくいと考えられる。機器分析に移行する際にはこの点を考慮して適切な基準値を定める必要がある。

国内で安全と見なされる規制値 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、いずれの製品も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。

## E. 結論

二枚貝に対して妥当性が確認された UHPLC/MS/MS 分析法は本年度のフグの子糠漬け製品に対して、TTX の回収率が 32%と低く、使用に耐えるものではなかった。そこで、新たに活性炭を充填した固相カートリッジを用いた前処理法を開発したところ、TTX の添加回収試験における回収率は 86%と良好であった。

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、1社を除き、残りの5社すべてで、換算した毒力は国内で安全と見なされる毒量(10MU/g)以上であることを確認した。そこで、マウス毒性試験を実施し、食品としての安全性が確保されているか確認したところ、いずれも 10MU/g 以下であり、現状の検査法では問題ないことが判明した。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い。今後、機器分析法を用いたフグ毒検査に移行した場合には、マウス毒性試験と違い、塩類の影響を受けにくいいため、規制値を超えることも予測される。機器分析法を検査法に定める場合には、適切な規制値について

検討する必要がある。

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

糸田将太、渡邊龍一、内田肇、松嶋良次、及川寛、松宮政弘、山下まり、鈴木敏之. ふぐの子糠漬け中に含まれるテトロドトキシン類の分析. 日本水産学会誌 (in preparation)

2. 学会発表

○渡邊龍一・糸田将太・内田肇・松嶋良次・及川寛・松宮政弘・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前処理法の開発, 令和3年度日本水産学会春季大会, 2021年3月（東京・オンライン開催）

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



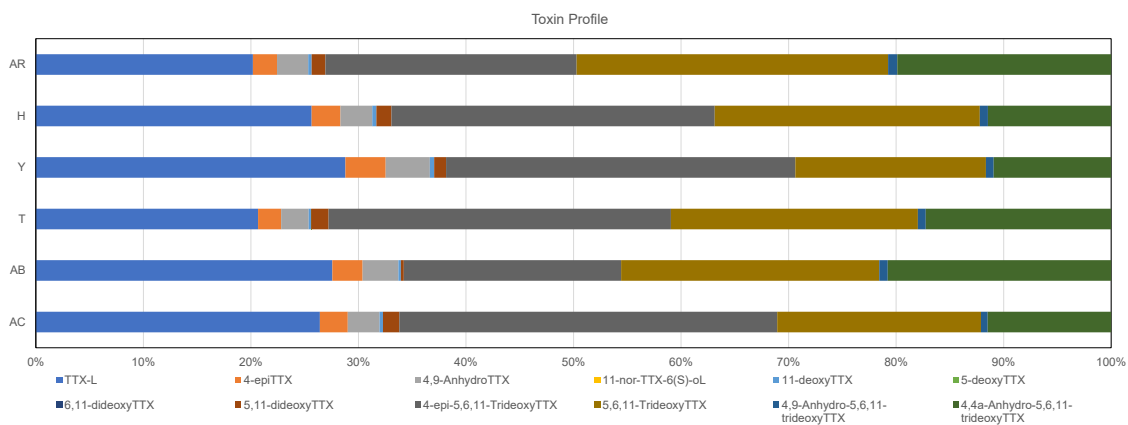


図 1：製造業者別の TTX 類の毒組成比較

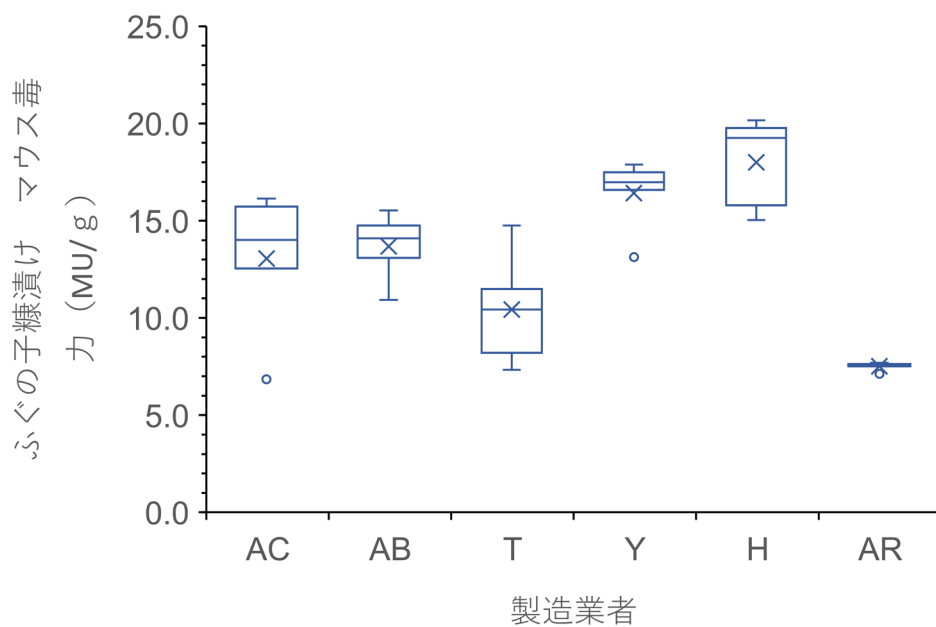


図 2：機器分析法で測定された製造業者別のふぐの子糠漬けに含まれる TTX 類のマウス毒力

## テトロドト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、食品衛生検査指針理化学編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。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ことを目的として検討した。この際、昨年度の実験結果からの反省から、TTX の異性体の影響を考慮する必要がないように、無毒のフグ皮膚抽出物等由来の溶媒を用いて、正確に定量した TTX の「添加実験」により行った。

まず、中央水産研究所由来の正確に定量した TTX 調整液（溶媒：0.1%酢酸液）（1 MU は 0.22  $\mu\text{g}$  TTX とされるため、調整した実際の投与液中には 2MU が含まれると試算）及び、無毒のフグ皮膚抽出物を溶媒としたもの、両者について、添加実験により、両者のマウスユニットを求めた。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、それぞれ 1.89 及び 1.59 となり（致死時間のメディアン（5 サンプル中）はそれぞれ、09:32 及び 11:33（分：秒））、一見すると腹腔内投与の場合、無毒のフグ皮膚抽出物を溶媒とすると、マウスユニットは 84%程度少なくなる（毒力が弱くなる）ように推察された。

次いで、上記と同じ投与液（2 種）について、7 週齢の ddY 雄性マウスを用いて強制経口投与による急性毒性試験（0, 100, 300, 500, 700  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）（各群 3 匹）をおこない、急性毒性における LD<sub>50</sub> 値の推定と無毒性量の算出をおこなった。実験結果からは LD<sub>50</sub> 値は、0.1 %酢酸液を溶媒としたものは、500 以上 700 未満  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と求められ、無毒のフグ皮膚抽出物を溶媒とした方は、300 以上 500 未満  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と求められ、経口投与の場合、腹腔内投与の場合と逆に、無毒のフグ皮膚抽出物を溶媒とした方が、死をエンドポイントとした急性毒性が強いことがわかった。この点、欧州食品安全機関（EFSA）の報告書では 232~532  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （Aba1 らの報告では 232 mg/kg 体重）、別途 RTECS（Registry of Toxic Effects of Chemical Substances）情報では 334  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と、後者の方とほぼ同じな結果を報告していることとなる。

他方、急性毒性における無毒性量は、無気力状態（apathy）という一般状態変化を指標に、両方の場合ともに、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重の投与により、3 例中 1 例で、投与約 30 分後から 20 分程度、無気力状態（apathy）が認められたため、最小毒性量（LOEL）は 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重と考えられた。Aba1 らの報告では無毒性量（NOEL）が 75 mg/kg 体重 [125  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重では 9 匹中 9 匹で Apathy が認められている]であり、本検討結果と同程度であった。

以上のことから、正確に定量した TTX 調整液を用い、EFSA の報告における TTX の ARfD との比較した結果（経口投与の場合）、溶媒が 0.1 %酢酸液あるいは無毒のフグ皮膚抽出物、いずれの場合でも、同程度であることが明らかとなり、本検討結果は、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目的に叶うものと考えられる。

## 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20 gの雄性ddYマウスを腹腔内投与にて30分で死亡させる量）は、TTX 0.22 µgに相当すると考えられている（食品衛生検査指針理化学編2015）。

## B. 研究方法

平成30年度は、食品衛生検査指針に記載されるマウス検定法にしたがった予備実験、すなわちフグ粗毒原液ではなく、市販の生化学用テトロドトキシン（95.7%）の溶液（溶媒：0.1%酢酸液）をddY雄性マウス（4週齢）マウスに腹腔内投与した際の、マウスユニット（MU）算出法の検討をおこなった（以降、MU算出予備実験）。また7週齢のマウスを用いて、強制経口投与による用量設定予備実験を実施した（以降、経口投与用量設定予備実験）。

平成31年（令和元年）度は、別課題「1. フグ

毒TTXのq NMR法の開発と標準毒の調製」から提供されたTTX調整液(溶媒:0.1%酢酸液)ならびに、食品衛生検査指針でのマウス検定法で使用されるフグ粗毒原液\* (肝、卵巣、筋肉由来)を用いて、両者のTTX濃度を一致させるよう調整した上で、食品衛生検査指針での「マウス毒性試験」(急性)(腹腔内投与)(群構成、週齢などは食品衛生検査指針でのマウス検定法に準ずる。ただし、溶媒対照群はおく)をおこない、両者のマウスユニットを求めることによる毒力比較をおこなった。

令和2年度は、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ことを目的として検討した。この際、昨年度の実験結果からの反省から、TTXの異性体の影響を考慮する必要がないように、無毒のフグ皮膚抽出物等由来の溶媒を用いて、正確に定量したTTXの「添加実験」により行った。

\*: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をビーカーに採取し、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

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]

②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(研究代表者、現水産研究・教育機構水産技術研究所環境・応用部門長)より入手済みである(平成31年1月29日)。このTTXは、フナコシ(Latoxan)より販売されるTTX約19 mgに対し、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ものである。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)

#### 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%、富士フィルム和光純薬(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)。

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)、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フグ抽出液(皮膚由来)を使用した。

令和2年度は、中央水産研究所由来の正確に定量したTTX調整液(溶媒:0.1%酢酸液)と、予めTTXが含まれていないとわかっているフグ抽出液(皮膚由来)を使用して、TTX調整液の添加実験により、溶媒を0.1%酢酸液とした場合と、無毒のフグ抽出液(皮膚由来)との毒力比較を検討した。

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100 gあたり1 ml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時からの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には、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、H31年度及びR2年度のMU算出予備実験用ならびに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分にあつたため、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。

#### B-6: LC-MS/MSによる投与液中TTXの定量分析

##### (1) 測定条件

装置は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。以下に測定条件の詳細を示す。

カラム: InertSustain Amide (3 µm, 2.1×75 mm)

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 °C

アイソクラティック分析: 71%B (15 min)

流速: 0.4 mL/min

注入量: 5 µL

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

ドライガス: N<sub>2</sub>, 300°C, 12 L/min

ネブライザー: N<sub>2</sub>, 55 psi

シーガス: N<sub>2</sub> (380°C, 11 L/min)

キャピラリー電圧: 3,500 V

ノズル電圧: 500 V

フラグメンター電圧：135V  
 コリジョンエネルギー：35 eV  
 コリジョンガス：N<sub>2</sub>  
 測定モード：MRMモード  
 モニターイオン：下記参照

化合物名	モニターイオン m/z
TTX	320 > 162
4- <i>epi</i> TTX	320 > 302
	320 > 60
5-deoxyTTX	304 > 162
11-deoxyTTX	304 > 162
4,9-anhydroTTX	302 > 162
6, 11-dideoxyTTX	288 > 162
	288 > 224
5, 6, 11-trideoxyTTX	272 > 162
4- <i>epi</i> -5, 6, 11-trideoxyTTX	272 > 162
	336 > 318
11-oxo-TTX	336 > 162
	336 > 136

## (2) 検量線の作成

検量線作成には中央水研由来のqNMRにより正確に定量されたTTX標準毒(参照「B-1:被検物質」)を使用した。これを0.1%酢酸で希釈してTTX濃度が1.3, 2.5, 5.0, 10, 20, 40 ng/mLの標準溶液を調製し、これに同量の0.1%酢酸含有アセトニトリルを加えて混合したものを測定液とした。測定は各濃度2回ずつ行い、ピーク面積値の平均を縦軸、濃度を横軸とした検量線を作成した。

## (3) 測定液の調製

2種のマウス投与液、すなわち中央水研由来の正確に定量したTTX標準毒を0.1%酢酸で希釈したもの(投与液Aとする)と無毒コモング抽出液(皮膚由来)で希釈したもの(投与液Bとする)について次のように測定液を調製した。投与液AおよびBは共にTTX濃度が約0.40 μg/mLとなるように調製された(参照「B-2:投与液の作製」)ものであるため、これを検量線の範囲内(1.3~40.0 ng/mL)となるよう0.1%酢酸水で20倍に希釈した。この希釈液を限外ろ過し、得られたろ液に同量の0.1%酢酸含有アセトニトリルを加えて混合した後、0.2 μmのフィルター(PVDF)に通し、これを測定液とした。

## (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: 腹腔内投与によるMU算出実験(TTX調整液の添加実験により、溶媒を0.1%酢酸液とした場合と、無毒のコモンフグ抽出液(皮膚由来)との毒力比較)：

中央水産研究所由来の正確に定量したTTX調整液(溶媒：0.1%酢酸液)(1 MUは0.22 μg TTXとされるため、調整した実際の投与液中には2MUが含まれると試算)及び、無毒のフグ皮膚抽出物を溶媒としたもの、両者のマウスユニットを添加実験により求めた。ddY雄性マウス(4週齢)に1ml腹腔内投与しMUを求めた結果、それぞれ1.89及び1.59となり(致死時間のメディアン(5サンプル中)はそれぞれ、09:32及び11:33(分:秒))、一見すると腹腔内投与の場合、無毒のフグ皮膚抽出液を溶媒とすると、マウスユニットは84%程度少なくなる(弱くなる)ように推察された。この結果を、別添資料1として別添に示す。

したがって繰り返しとなるが、腹腔内投与の場合、TTX量が同じであっても、溶媒が0.1%酢酸液の場合と比較し、無毒のフグ皮膚抽出液を溶媒とすると、マウスユニットは84%程度少なくなる(毒力が弱くなる)ように推察され、この原因としては、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、この理由として、TTXの組織分布が、0.1%酢酸液の場合の方が速やかであり、したがって相対的に毒力が強くなる可能性が示唆された。ただし両者の毒力の差は84%程度であるため、桁違いの差ではないことに留意する必要がある。

C-2: 強制経口投与によるマウス急性毒性におけるLD<sub>50</sub>値の推定と無毒性量の算出(TTX調整液の

添加実験により、溶媒を0.1%酢酸液とした場合と、無毒フグ抽出液（皮膚由来）との毒力比較）：

7週齢のddY雄性マウスを用いて強制経口投与による急性毒性試験（0, 100, 300, 500, 700 µg/kg）（各群3匹）をおこない、急性毒性におけるLD<sub>50</sub>値の推定と無毒性量の算出をおこなった。実験結果からはLD<sub>50</sub>値は、0.1%酢酸液を溶媒としたものは、500以上700未満 µg/kg、と求められ、無毒のフグ皮膚抽出物を溶媒とした方は、300以上500未満 µg/kgと求められ、経口投与の場合、腹腔内投与の場合と逆に、無毒のフグ皮膚抽出物を溶媒とした方が、死をエンドポイントとした急性毒性が強いことがわかった。しかし、その差は桁違いに大きな差ではないことに留意が必要である。この点、欧州食品安全機関（EFSA）の報告書では232～532 µg/kg（Abalらの報告では232 mg/kg体重）、別途RTECS（Registry of Toxic Effects of Chemical Substances）情報では334 µg/kgと、後者、すなわち無毒のフグ皮膚抽出物を溶媒とした場合と、ほぼ同等の結果を報告していることとなる。

他方、急性毒性における無毒性量は、無気力状態（apathy）という一般状態変化を指標に、両方の場合ともに、100 µg/kg体重の投与により、3例中1例で、投与約30分後から20分程度、無気力状態（apathy）が認められたため、この結果から最小毒性量（LOAEL）は100 µg/kg体重と考えられた。したがって、一般状態変化を指標にした場合は、両者の溶媒の差に顕著に影響を受けないことが明らかとなった。この結果を、別添資料2として別添に示す。

欧州食品安全機関（EFSA）の報告書が引用しているAbalらの報告（Paula Abalら（2017）、Toxins（Basel）9（3）：75. doi：10.3390/toxins9030075.）では無毒性量（NOAEL）は、75 mg/kg体重 [125 µg/kg体重では9匹中9匹でApathyが認められている]であり、本検討結果と同程度であった。

#### C-3: LC-MS/MSによる投与液中TTXの定量分析

本分析法の検出下限（LOD,  $S/N > 5$ ）は0.32 ng/mL、定量下限（LOQ,  $S/N > 10$ ）は0.63 ng/mL

で、検量線は良好な直線性を示した。LC-MS/MSによる定量分析の結果、投与液A、B中のTTX濃度はそれぞれ0.37 µg/mL及び0.45 µg/mLと試算された（別添資料3,4）。この数値はTTX標準毒の値付け値を基にTTX濃度が0.40 µg/mLとなるように調製されたもの踏まえると妥当であると考えられた。なお、投与液A、B間で僅かながら認められたTTX濃度の差異はフグ皮膚抽出物に含まれる夾雑物の差異が測定時のイオン化促進等に影響した可能性が考えられる。但し、同差異はTTX濃度として大きなものではなく、評価にあたっての明確な差異になるものではないと思われる。

なお、皮や筋肉以外の部位で評価を行う際には、こうした夾雑物の影響がより大きくなる可能性を視野に入れ、前処理として固相カートリッジカラムを追加する等の対応が必要となるかもしれない。

#### 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。

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し）、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との比較をおこなった。

まず、中央水産研究所由来の正確に定量したTTX調整液（溶媒：0.1%酢酸液）及び、無毒のフグ皮膚抽出物を溶媒としたもの、ddY雄性マウス（4週齢）を用いて定法通り腹腔内投与により、両者のマウスユニットを求めた。その結果、それぞれ1.89及び1.59となり（致死時間のメディアン（5サンプル中）はそれぞれ、09:32及び11:33（分：秒）、一見すると腹腔内投与の場合、無毒のフグ皮膚抽出液を溶媒とすると、マウスユニットは84%程度少なくなる（毒力が弱くなる）ように推察された。この差は、腹腔内投与後のTTXの組織分布が前者の方が速やかであることが原因である可能性が考えられたが、この毒力の差は、84%程度両者に桁違いな差が生じている訳ではないことにも留意が必要である。

次いで、上記と同じ投与液（2種）について、7週齢のddY雄性マウスを用いて強制経口投与による急性毒性試験（0, 100, 300, 500, 700 µg/kg）（各群3匹）をおこない、急性毒性におけるLD<sub>50</sub>値の推定と無毒性量の算出をおこなった。実験結果からはLD<sub>50</sub>値は、0.1%酢酸液を溶媒としたものは、500以上700未満 µg/kgと求められ、無毒のフグ皮膚抽出物を溶媒とした方は、300以上500未満 µg/kgと求められ、経口投与の場合、腹腔内投与の場合と逆に、無毒のフグ皮膚抽出物を溶媒とした方が、死をエンドポイントとした急性毒性が強いことがわかった。この点、欧州食品安全機関（EFSA）の報告書では232~532 µg/kg（Aba1らの報告では232 mg/kg体重）、別途RTECS（Registry of Toxic Effects of Chemical Substances）情報では334 µg/kgと、後者の方とほぼ同じな結果を報告していることとなる。

他方、急性毒性における無毒性量は、無気力状態（apathy）という一般状態変化を指標に、両方の場合ともに、100 µg/kg体重の投与により、3例中1例で、投与約30分後から20分程度、無気力状態（apathy）が認められたため、最小毒性量（LOAEL）は100 µg/kg体重と考えられた。Aba1らの報告では無毒性量（NOAEL）が75 mg/kg体重〔125 µg/kg体重では9匹中9匹でApathyが認められている〕であり、本検討結果と同程度であった。

以上のことから、正確に定量したTTX調整液を用い、EFSAの報告におけるTTXのARfDとの比較した結果（経口投与の場合）、溶媒が0.1%酢酸液あるいは無毒のフグ皮膚抽出物いずれの場合でも、同程度であることが明らかとなり、本検討結果は、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目的に叶うものと考えられる。

E. 健康危機情報  
なし

F. 研究発表

1. 論文発表

登田美桜、北嶋 聡： シリーズ：日本毒性学会との連携 マリンバイオトキシン；フグ毒のリスク評価について、中毒研究（Jpn J Clin Toxicol），2021；34：58-62. [ISSN: 0914-3777]

2. 学会発表

高橋祐次、種村健太郎、相崎健一、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロドトキシンの中枢影響評価、第47回日本毒性学会学術年会（2020.6.29.）オンライン

北嶋 聡、食品トキシコゲノミクスと毒性予測、第18回食品安全フォーラム（2020.11.27.）

國吉杏子、大城直雅、朝倉 宏、LC-MS/MSによるフグ加工製品のテトロドトキシン分析、日本食品衛生学会第116回学術講演会（2020.11.24-12.08、オンライン）。

その他： 本研究に関する学会発表（シンポジウム）として、2020年6月29日（月）（開催1日目）に開催された（オンライン開催）、第46回日本毒性学会学術年会（年会長：広瀬 明彦 先生、国立医薬

品食品衛生研究所 安全性予測評価部)において、日本中毒学会との合同シンポジウム「海産毒リビジテッド2.0」(オーガナイザー:北嶋 聡(国立医薬品食品衛生研究所 毒性部)、杉田 学(順天堂大学医学部附属練馬病院 救急・集中治療科))を開催

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 腹腔内投与により、MUを求めることによる毒力比較の結果：

中央水産研究所由来の正確に定量した TTX 調整液（溶媒：0.1%酢酸液）及び、無毒のフグ皮膚抽出物を溶媒としたもの、両者のマウスユニットを、添加実験により求めた。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. 水研由来テトロトキシン水溶液(溶媒:0.1%酢酸溶液)					
予備試験					
0.40 ug/ml	体重	致死時間	投与時刻	致死時刻	
1	21.8	0:10:04	13:28:08	13:38:12	⑤
2	22.3	0:09:39	13:47:04	13:56:43	④
本試験					
0.40 ug/ml	体重	致死時間	投与時刻	致死時刻	
3	21.3	0:09:32	13:49:09	13:58:41	③
4	21.3	0:09:05	13:51:58	14:01:03	②
5	21.3	0:08:29	13:55:47	14:04:16	①
B. 水研由来テトロトキシン水溶液(溶媒:陰性・希釈用抽出液)					
予備試験					
0.40 ug/ml	体重	致死時間	投与時刻	致死時刻	
1	21.5	0:12:31	14:07:00	14:19:31	⑤
2	21.3	0:09:33	14:08:20	14:17:53	①
本試験					
0.40 ug/ml	体重	致死時間	投与時刻	致死時刻	
3	20.0	0:09:57	14:20:35	14:30:32	②
4	21.8	0:12:30	14:22:04	14:34:34	④
5	20.8	0:11:33	14:23:50	14:35:23	③
MEMO					
<ul style="list-style-type: none"> <li>・1mlテルモシリンジ(プラスチック)+26G注射針</li> <li>・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。</li> <li>・観察は蓋なしのケージに入れて行った。(3つ準備する)</li> </ul>					
結果					
		MU(表7-1より)	MU(表7-2で補正)		
A		1.77	1.89		
B		1.53	1.59		

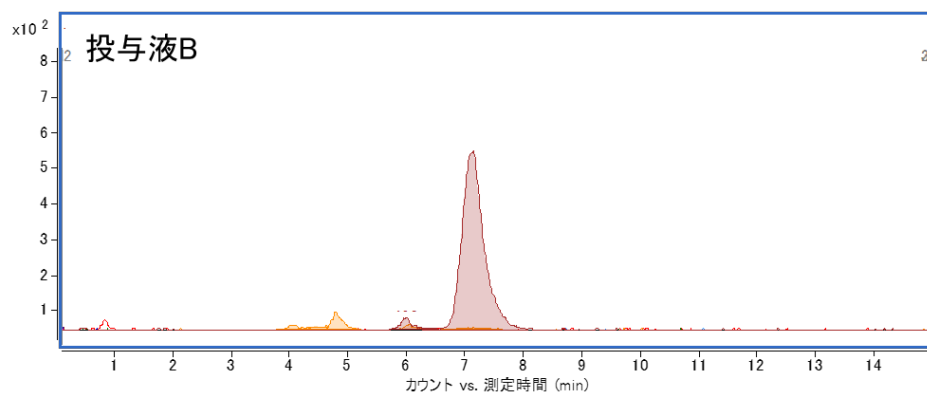
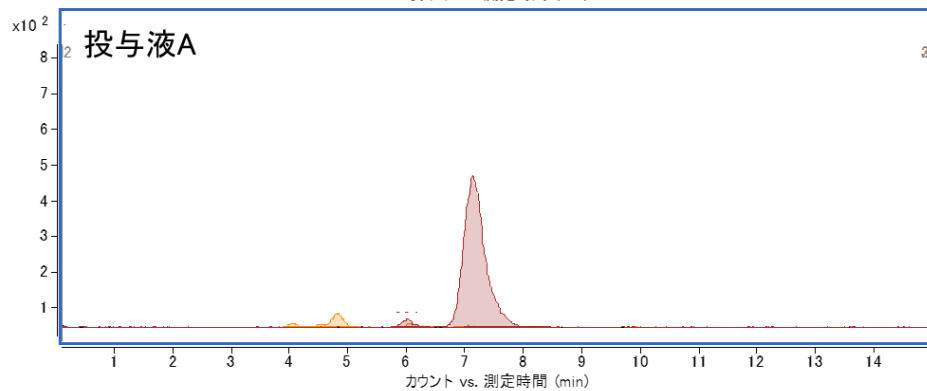
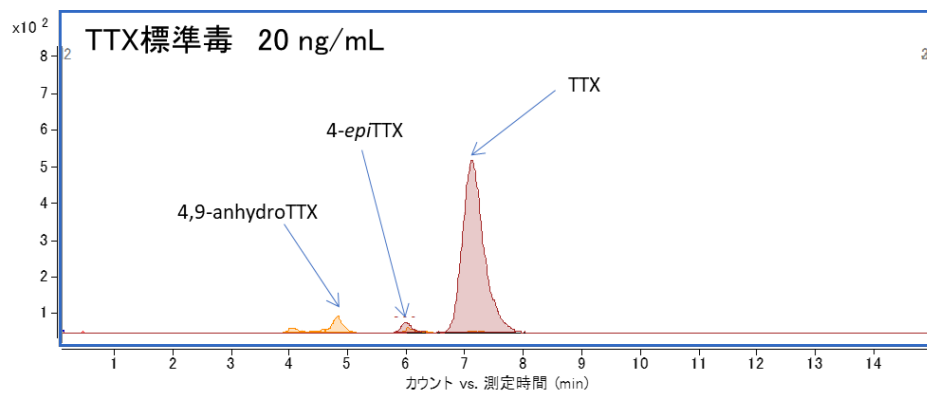
別添資料2 マウスへの強制経口投与による、LD<sub>50</sub>値の推定と無毒性量の算出による毒力比較（一般状態の変化と致死）：

7週齢の ddY 雄性マウスを用いて強制経口投与による急性毒性試験（0, 100, 300, 500, 700 µg/kg）（各群3匹）を実施し、急性毒性におけるLD<sub>50</sub>値の推定と無毒性量の算出をおこなった。

A. 水研由来テトロキシン水溶液(溶媒:0.1%酢酸溶液)					
群(ug/kg)	ID	BW(g)	投与時間	所見	備考
0	1	40.0	13:42		
	2	44.8	13:42		
	3	40.3	13:42		
100	4	40.8	13:44		
	5	40.4	13:44		
	6	42.9	13:44	14:25 アバシー 14:40 回復	
300	7	40.0	13:45	13:58 アバシー 14:23 チューンストーク呼吸 14:46 回復	
	8	39.5	13:45	13:58 アバシー 14:18 活動↑ 14:20 アバシー 14:46 回復	
	9	41.7	13:46	13:58 アバシー 14:13 活動↑ 14:20 アバシー 14:23 チューンストーク呼吸 14:46 回復	
500	10	37.8	13:47	13:56 アバシー 14:27 活動↑ 14:31 アバシー 14:58 回復	
	11	38.3	13:47	13:58 アバシー 14:12 活動↑ 14:31 アバシー 14:58 回復	
	12	44.0	13:47	13:56 アバシー 14:14 活動↑ 14:31 アバシー 14:58 回復	
700	13	45.6	13:48	13:58 アバシー 14:40 ジャンプ 14:41 死亡	投与後53分 死亡
	14	44.4	13:48	13:56 アバシー 14:06 ジャンプ 14:07 死亡	投与後19分 死亡
	15	39.5	13:49	13:58 アバシー 14:21 活動↑ 14:30 アバシー	
1/2					
B. 水研由来テトロキシン水溶液(溶媒:陰性・希釈用抽出液)					
群(ug/kg)	ID	BW(g)	投与時間	所見	備考
0	16	44.5	13:51		
	17	41.1	13:51		
	18	38.1	13:51		
100	19	38.3	13:52		
	20	41.5	13:52		
	21	42.1	13:53	14:01 アバシー 14:16 活動↑ 14:21 アバシー 14:44 回復	
300	22	40.6	13:53	14:08 アバシー 15:00 回復	
	23	41.3	13:53	14:03 アバシー 14:17 活動↑ 14:19 アバシー 15:00 回復	
	24	39.9	13:54	14:00 アバシー 15:00 回復	
500	25	43.4	13:54	13:59 アバシー 14:25 ジャンプ 14:26 死亡	投与後32分 死亡
	26	40.2	13:55	14:00 アバシー 14:44 暴れる 14:45 死亡	投与後50分 死亡
	27	44.6	13:55	14:00 アバシー 15:15 苦しもうに動く 15:17 死亡	投与後1時間22分 死亡
700	28	42.1	13:55	14:00 アバシー 14:13 活動↑ 14:31 アバシー 16:40 苦しもうに動く 16:42 死亡	投与後2時間47分 死亡
	29	41.4	13:56	14:00 アバシー 14:16 活動↑ 14:28 アバシー 15:20 ジャンプ 15:11 死亡	投与後1時間15分 死亡
	30	40.6	13:56	14:00 アバシー 14:39 ジャンプ 14:41 死亡	投与後45分 死亡

別添資料3. 投与液AおよびBの定量値及びLC-MS/MSクロマトグラム.

投与液	測定の繰返し	TTX ピーク面積値	測定液 (ng/mL)	投与液(原液) ( $\mu\text{g/mL}$ )	投与液(原液) 平均 ( $\mu\text{g/mL}$ )
A	1	10,902	18.65	0.37	0.37
	2	10,734	18.36	0.37	
	3	10,805	18.48	0.37	
B	1	13,360	22.85	0.46	0.45
	2	13,277	22.71	0.45	
	3	13,183	22.55	0.45	



令和2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）

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）

分担研究報告書

フグ卵巣糠漬けの主原料であるゴマフグにおけるテトロドトキシン定量検出

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	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
	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

## 研究要旨

フグ卵巣糠漬けの主原料であるゴマフグ *Takifugu stictonotus* の筋肉、卵巣、肝臓および皮における TTX 含量を LC-MS/MS により定量し、組織当たりのマウス毒力 (MU/g) に換算したところ、全ての個体で筋肉は無毒であったが、他の部位は少なくとも2個体以上が有毒となり、厚労省通知にて、ゴマフグの筋肉は可食部位とされる一方、皮や卵巣は不可食部位とされている現行の規制体制を支持する結果が得られた。今回分析した卵巣は全体として毒性が弱かったが、TTX 含量は多様性も認められた。こうした個体間での多様性の背景には、漁獲地域や季節等が主な影響要因と目されることから、継続的かつ網羅的な調査の必要性を提唱するものと考えられる。

### 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<sup>1)</sup>において処理等により人の健康を損なうおそれが無いと認められるフグの種類と部位を定めることで食中毒の発生を防止している。さらに、フグの卵巣の糠漬けなどは10 MU/gの規制値を設けてリスク管理がなされている。平成31年度の本研究事業の別分担研究報告において、フグ卵巣の糠漬け製品を TTX 標準毒 (H30年度に qNMR により値付けされたもの) を標準物質とした LC/MS/MS で定量検出を行ったところ、いずれの製品も規制値以下であったとの報告がある。フグ卵巣糠漬け製品の主原料はゴマフグ *Takifugu stictonotus* とされ、これまでにマウス毒性試験を通じ、皮及び卵巣粗抽出液ではマウス毒性が確認されていること<sup>2)~4)</sup>から、これらは不可食部位として上述の通知にて示されている、一方、当該魚種における TTX 分布を機器分析により定量的に調査した報告は見当たらないことから、本年度は LC-MS/MS によりゴマフグの部位別の TTX 含量を qNMR で正確に値付けした TTX 標準毒を用いて定量した上で、マウス毒性を計算式により推定したので報告する。

### B. 研究方法

#### (1) 試薬

抽出用の酢酸 (特級) は富士フィルム和光純薬株式会社製、移動相用のアセトニトリルは関東化学株式会社製の LC/MS 用、ギ酸は富士フィルム和光純薬社製の LC/MS 用および 1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液は富士フィルム和光純薬社製の高速液体クロマトグラフ用を用いた。水は Merck Millipore 社製 Milli-Q Integral 5 で製造した超純水を使用した。測定用標準品には水産技術研究所環境・応用部門にて精製され、qNMR で正確に定量された TTX 標準毒 (TTX: 1.012 mg/mL, 4,9-anhydroTTX 0.080 mg/mL, 4-epiTTX: 0.025 mg/mL) を用いた。

#### (2) 材料

2020年11月に石川県で採取された天然のゴマフグ *Takifugu stictonotus* (雌、図1) 計5個体 (NIHS-puf-200001, NIHS-puf-200004, NIHS-puf-200006, NIHS-puf-200008, NIHS-puf-200013) を供試試料とした。漁獲したフグは冷凍状態で当研究室に搬入し、使用するまで -80℃ で保管した。

#### (3) 検量線作成

TTX 標準毒を 0.1% 酢酸で希釈して 1.25、2.5、

5.0、10、20 ng/mLの標準溶液を調製し、等量の0.1%含有アセトニトリルを加えて混合したものを測定液とした。測定は各濃度溶液2回ずつ行い、ピーク面積の平均値を縦軸、濃度を横軸とした検量線を作成した。

#### (4) 抽出液の調製

供試試料を流水中で半解凍し、体重、全長及び標準体長を記録後、直ちに筋肉、皮、肝臓、卵巣及びその他の部位に腑分けして各部位の重量を測定した(図2, 表1)。抽出は食品衛生検査指針(理化学編 2015)<sup>5)</sup>に記載されるフグ毒の抽出方法を一部改変して行った。各部位5.0 gを測り取り、ハサミで細切後、0.1%酢酸10 mLを加えてホモジナイズ(5,000 rpm, 3 min)した。沸騰水中で15分間加熱後、室温にて放冷させた後、遠心分離(13,420×g, 10 min)し、上清を更なる紙(No. 5C, ADVANTEC)を使ってろ過することで浮遊する細組織片を除去した。得られたろ液を0.1%酢酸で25 mLに定容し粗抽出液とした(粗抽出液は組織0.2 g/mL相当)。

#### (5) 測定液の調製

粗抽出液0.5 μLを限外ろ過(10 K, PALL Corporation)し、得られたろ液200 μLに同量の0.1%酢酸含有アセトニトリルを加えて混合し、更に0.2 μmのフィルター(PVDF)に通して測定液とした。測定液中のTTX濃度が検量線の最高濃度を超えた場合は50%アセトニトリル(0.1%酢酸含有)で適宜希釈して再測定した。測定液ごとに連続して3回ずつ測定した。

#### (6) LC-MS/MS測定条件

測定は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。TTX標準毒に含まれる4-epiTTXおよび4,9-anhydroTTXについては定性分析とした。また、その他の類縁体については、溶出順位を既報<sup>6)</sup>を参照することで推定した。この分析法のTTXの検出限界(LOD, S/N>5)は0.32 ng/mL、定量下限(LOQ, S/N>10)は0.63 ng/mLであった。

#### 【条件】

カラム: InertSustain Amide (3 μm, 2.1×75 mm)  
 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)  
 アイソクラティック分析: 71%B (15 min)  
 カラム温度: 45°C  
 流速: 0.4 mL/min  
 注入量: 5 μL  
 イオン源: ESI (+Agilent Jet Stream), Positive  
 ドライガス: N<sub>2</sub>, 300°C, 12 L/min  
 ネブライザー: N<sub>2</sub>, 55 psi  
 シースガス: N<sub>2</sub>, 380°C, 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: 135 V  
 コリジョンエネルギー: 35 eV  
 コリジョンガス: N<sub>2</sub>  
 測定モード: MRMモード  
 モニターイオン: 下表参照

化合物名	モニターイオン m/z
TTX	320 > 162
4-epiTTX	320 > 302
	320 > 60
5-deoxyTTX	304 > 162
11-deoxyTTX	304 > 162
4,9-anhydroTTX	302 > 162
6,11-dideoxyTTX	288 > 162
	288 > 224
5,6,11-trideoxyTTX	272 > 162
4-epi-5,6,11-trideoxyTTX	272 > 162
	336 > 318
11-oxo-TTX	336 > 162
	336 > 136

#### (7) 毒力換算と毒性評価

LC-MS/MS分析により部位ごとのTTX含量を求め、これを1 MU=TTX0.22 μgとして組織1 g当たりの毒力(MU/g)に換算し、毒力を次の4段階に区分して毒性を判定した: 9 MU/g以下(無毒)、10~99 MU/g(弱毒)、100~999 MU/g(強毒)、1,000以上(猛毒)。

### C. 研究結果及び考察

#### (1) 部位別毒性

・筋肉: 筋肉部位は何れも無毒で毒力の最高値は約0.2 MU/gであった(表2)。ゴマフグの筋肉は通

知の中で食用とできることが示されており、今回分析した個体でも無毒であることが示された。

・卵巣：5個体中2個体が無毒、3個体が弱毒で最高毒力は75 MU/gであった（表2）。フグの卵巣は10月、11月は殆ど無毒で、12月頃から急に有毒個体が多くなり強毒のものが多くなるとの報告がある<sup>7)</sup>。今回分析した個体は11月初旬に採取したものであることから、毒力の弱い個体が多かった可能性も考えられた。

・肝臓：5個体中3個体は無毒であり、1個体が弱毒、1個体が強毒と判定された。毒力の最低値は0.03 MU/g、最高値は229 MU/g（強毒）であり、他の部位と比較して個体差が大きかった（表2）。

・皮：5個体中3個体が無毒、2個体が弱毒であった。最高毒力は22 MU/gであった（表2）。

## （2）TTX類縁体

全ての個体の各部位でTTX以外に4-epiTTXおよび4, 9-anhydroTTXが検出された。TTXとこれらの類縁体は平衡関係にあるとされるが、ピーク面積値を単純に比較した場合、いずれの試料でもTTXが主成分であった。また、主に卵巣と皮で5, 6, 11-trideoxyTTXおよび5, 11-dideoxyTTXまたは6, 11-dideoxyTTXと推定されるピークが検出された（図3-1, 図3-2）。

## D. 結論

フグ卵巣糠漬けの主原料であるゴマフグ5個体の筋肉、卵巣、肝臓及び皮におけるTTX含量をLC-MS/MSにより定量し、組織当たりのマウス毒力(MU/g)に換算したところ、全個体で筋肉は無毒であったが他部位は少なくとも2個体以上が有毒と推定されるなど、筋肉が可食部位、皮や卵巣が不可食部位と区分される現行の規制体制の妥当性が確認された。卵巣では全体として毒性が弱かったが、TTX含量には多様性も見られた。今後、漁獲地域や季節等の影響要因を考慮した網羅的なモニタリング実施により解明される点と思われる。なお、卵巣の糠漬けのように有毒部位を原料とした伝統食品の製造加工にあたっては、原材料の衛生的取り扱いはもとより、伝統的技法を適切に遵守し、無毒化を確実に行うことが安全性確保

に必須であることは言うまでもない。

国内沿岸に棲息するフグは多様であり、近年では交雑種の増加も懸念されることも報告されているため、市場流通段階における有毒魚の判断基準や排除実態等については今後検討すべき事項と考えられる。

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## 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

## H. 参考文献

- <sup>1)</sup> 厚生省通知「フグの衛生確保について」. 昭和58年12月2日環乳第59号.
- <sup>2)</sup> 谷 巖. 日本産フグの中毒学的研究. 帝国図書. 1945. p. 55-57.
- <sup>3)</sup> 遠藤隆二. J. Toxicol. Sci. 9(Suppl I):1-11. 1984.
- <sup>4)</sup> 加納碩男ら. 三陸産ゴマフグ *Fugu stictonotus* の毒性. 日本水産学会誌. 51(1): 121-125. 1985.
- <sup>5)</sup> 公益社団法人日本食品衛生協会. 食品衛生検査指針 理化学編 2015.
- <sup>6)</sup> Puilingi CG et al. Tetrodotoxin and its analogues in the pufferfish *Arothron hispidus* and *A. nigropunctatus* from the Solomon islands: A comparison of their toxin profiles with the same species from Okinawa, Japan. Toxins. 7:3436-3454. 2015.
- <sup>7)</sup> 社団法人 山口県食品衛生協会: ふぐ - 正しい知識の普及啓発と“ふぐ中毒防止”のために (第11版)、2011.



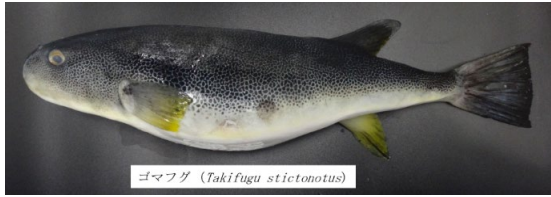


図 1. ゴマフグ *Takifugu stictonotus* 外観像

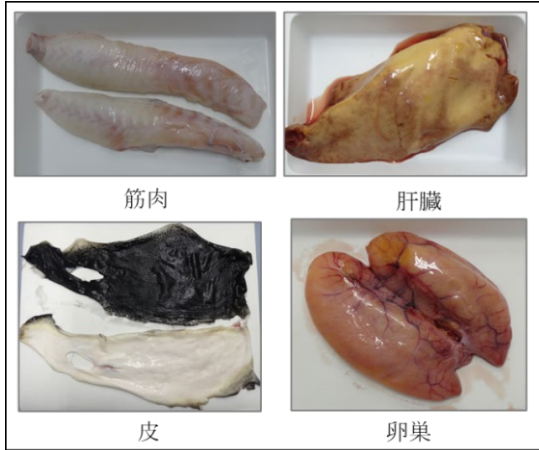


図 2. 供試試料の外観像 (例)

表 1. 供試ゴマフグ試料の概要.

試料 ID	性別	体重 (g)	全長 (mm)	標準体長 (mm)	筋肉 (g)	皮 (g)	卵巣 (g)	肝臓 (g)
NIHS-puf-200001	雌	962	295	260	238	97	268	36
NIHS-puf-200004	雌	1,041	400	335	400	56	209	50
NIHS-puf-200006	雌	1,343	430	355	430	117	301	92
NIHS-puf-200008	雌	1,238	440	360	282	128	293	62
NIHS-puf-200013	雌	1,170	405	340	267	103	242	59

表 2. 部位別の毒力と毒性

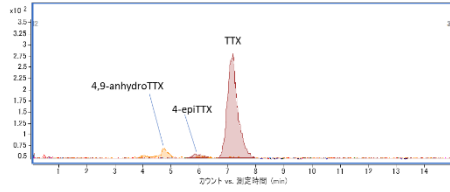
試料 ID	卵巣		肝臓		皮		筋肉	
	MU/g <sup>※1</sup>	毒性 <sup>※2</sup>	MU/g	毒性	MU/g	毒性	MU/g	毒性
NIHS-puf-200001	78	弱毒	229	強毒	22	弱毒	0.2	無毒
NIHS-puf-200004	3	無毒	0.03	無毒	3	無毒	<LOQ	無毒
NIHS-puf-200006	76	弱毒	50	弱毒	21	弱毒	0.2	無毒
NIHS-puf-200008	24	弱毒	0.6	無毒	11	無毒	0.06	無毒
NIHS-puf-200013	6	無毒	0.4	無毒	5	無毒	0.03	無毒

※1 毒力換算 : 1 MU = TTX 0.22 µg

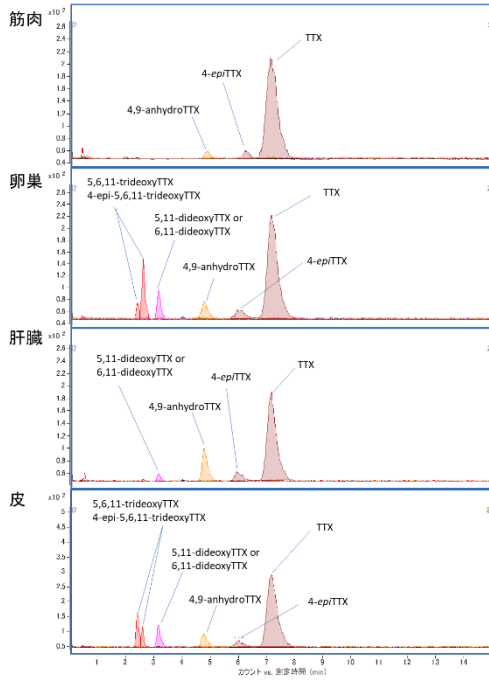
※2 毒性区分

無毒	9 MU/g以下
弱毒	10~99 MU/g
強毒	100~999 MU/g
猛毒	1,000 MU/g以上

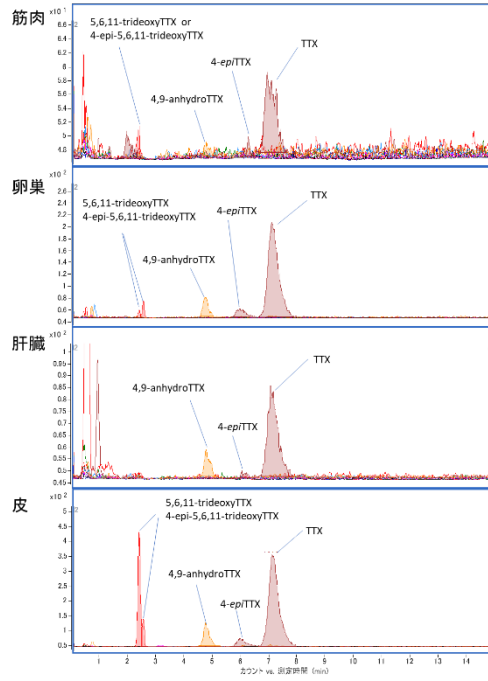
TTX標準毒 10 ng/mL



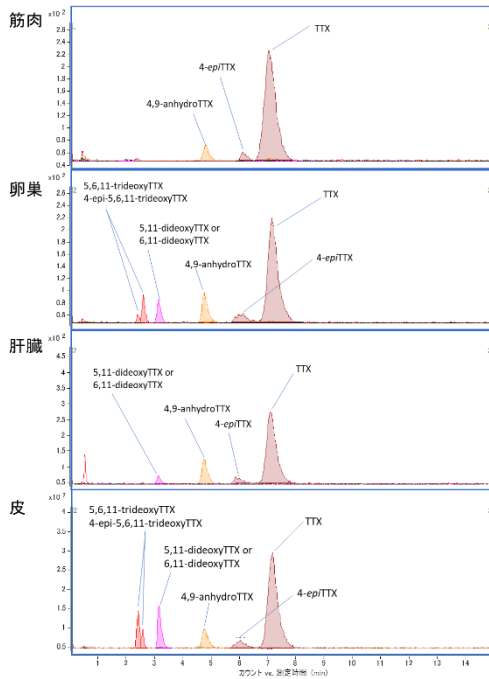
NIHS-puf-200001



NIHS-puf-200004



NIHS-puf-200006



NIHS-puf-200008

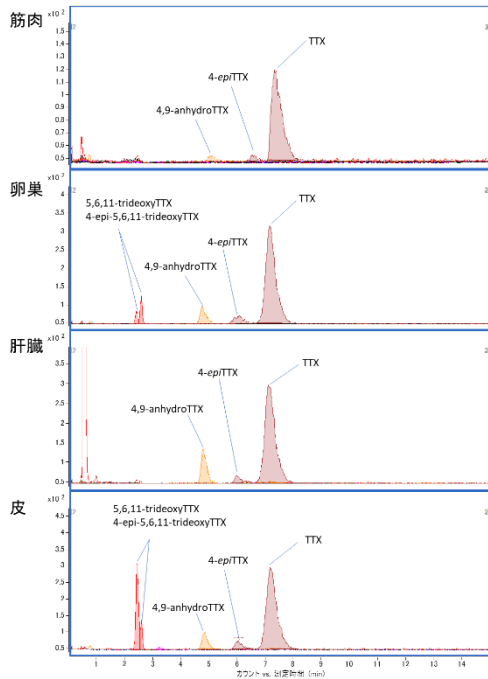
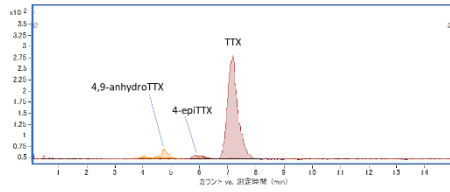


図 3-1. 測定液の MRM クロマトグラム

TTX標準毒 10 ng/mL



NIHS-puf-200013

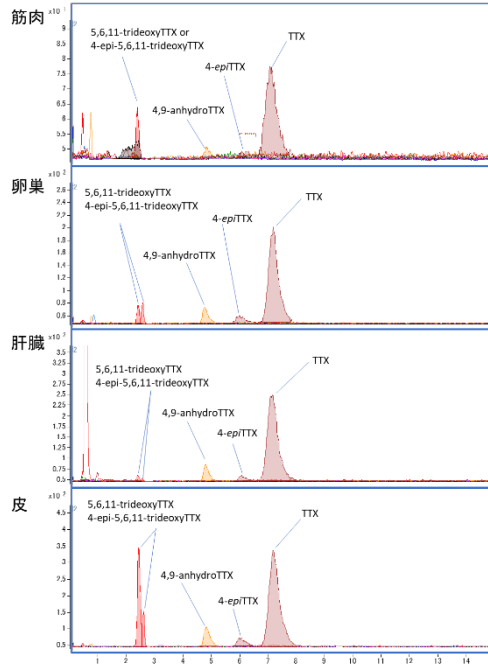


図 3-2. 測定液のMRM クロマトグラム

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、定量した純品を調製し、それぞれの TTX 類縁体について電位依存性ナトリウムチャンネル ( $\text{Na}_v$ ) 阻害活性を評価することを目的とする。

前年度までに、TTX 含有生物からの精製や化学反応で、高純度の 11-oxoTTX、4-*epi*TTX、11-norTTX-6(*S*)-ol を調製した。TTX 標品を外部標準として、これらの 3 種の TTX 類縁体を  $^1\text{H}$  NMR で定量すると同時に、純度を確認した。また、LC/MS でも純度を確認した。令和 2 年度は、これらの高純度で精密に定量した TTX 類縁体を用いて、ナトリウムチャンネル阻害活性を評価した。11-oxoTTX、11-norTTX-6(*S*)-ol は、マウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞を用いた比色法による  $\text{Na}_v$  阻害活性測定法で評価した。また、この 2 種の類縁体は、マウス腹腔内投与毒性試験もを行い、既報の同試験の結果と比較した（山下）。さらに、この 2 種に 4-*epi*TTX を加えた 3 種の類縁体については、ヒト電位依存性  $\text{Na}^+$  チャンネルタイプ 1.2 ( $\text{hNa}_v1.2$ ) を過剰発現させた 293T 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で、 $\text{Na}_v$  阻害活性を調査した（此木）。

A. 研究目的

フグの有毒成分としては、テトロドトキシシン (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 ( $\text{Na}_v$ ) 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、定量して、電気生理実験で初めて電位依存性ナトリウムチャ

ネル阻害活性を調べることにした。

また、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-norTTX-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-norTTX-6(*S*)-ol も高純度に精製、定量して、Neuro2A 細胞と Ouabain/Veratridine を用いた方法と電気生理実験の 2 種類の方法で  $\text{Na}_v$  阻害活性を評価することを目的とした。さらに、11-oxoTTX のマウス腹腔内投与毒性 ( $\text{LD}_{99}$ ) は、初めて単離、構造決定された時に 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と報告されたが (Khora, S. S. and Yasumoto, T. Tetrahedron Lett., 1989, 30, 4393-4394.)、その後の結果から 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と報告した (Yotsu-Yamashita and Mebs, 2003, Toxicol, 41, 893-897.)。また、11-norTTX-6(*S*)-ol の毒性も確認するために、本研究で、11-oxoTTX および 11-norTTX-6(*S*)-ol のマウス腹腔内投与毒性試験を行い、既報のデータと比較した。

## B. 研究方法

B-1: 活性測定に用いた4-*epi*TTX, 11-oxoTTX, 11-norTTX-6(S)-olの純度確認と定量

活性測定に用いた4-*epi*TTX, 11-oxoTTX, 11-norTTX-6(S)-olは、前年度までに化学反応の生成物や、フグやイモリから高度に精製し、純度を<sup>1</sup>H NMRや高分解能LC/MSで確認した。いずれも98%以上の純度であり、渡辺らの方法(Watanabe, R. et al., J. Agric. Food Chem., 2019, 67, 12911-12917.)を用いて<sup>1</sup>H NMRで定量した。

B-2: マウス神経芽細胞腫 Neuro2A と Ouabain, Veratridineを用いたNa<sub>v</sub>阻害活性測定 (Neuro2A assay)

本法は、マウス神経芽細胞腫Neuro2Aに試験化合物とOuabain, Veratridineを同時に加えて培養し、細胞生存率を比色法で測定してNa<sub>v</sub>阻害活性を調べる方法である(K. Kogure et al., Toxicol., 1988, 26, 191-197, M. Yotsu-Yamashita et al., Toxicol., 2003, 42, 557-560)。11-oxoTTXと11-norTTX-6(S)-olは本方法での活性測定条件下でも化学的に安定であるので本方法でNa<sub>v</sub>阻害活性を測定した。一方、4-*epi*TTXは、本方法の測定条件下でTTXに変換することが認められたため、本方法では測定せず、電気生理実験でのみ、Na<sub>v</sub>阻害活性を測定した。

B-3: 電気生理実験によるNa<sub>v</sub>阻害試験

ヒト電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネルタイプ1.2 (hNa<sub>v</sub>1.2)を過剰発現させた293T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で、11-oxoTTX, 11-norTTX-6(S)-ol, 4-*epi*TTXの活性を測定した。

B-4: マウス腹腔内投与毒性試験(MBA)

TTX (NMRで定量), 11-oxoTTX, 11-norTTX-6(S)-olをそれぞれ、食品衛生検査指針理化学編2015, 813-820に記載のとおり、ddY系雄マウス、15-20 gを用いて、腹腔内投与を行い、川端、小林の致死時間毒性換算表により最小至死量を算出した。使用できるマウスの数が限られていたた

め、1濃度1-2匹に投与して求めた。

## C. 研究結果

C-1: マウス神経芽細胞腫 Neuro2A と Ouabain, Veratridineを用いた比色法によるNa<sub>v</sub>阻害活性の測定 (Neuro2A assay)

IC<sub>50</sub> (mean ± S.D., nM, n=3)として、TTX 8.4 ± 3.2, 11-oxoTTX 2.8 ± 1.2, 11-norTTX-6(S)-ol 196 ± 61 が得られた。

C-3: 電気生理実験によるNa<sub>v</sub>阻害試験

IC<sub>50</sub> (mean ± SEM, nM)として、TTX 11 ± 3, 4-*epi*TTX 180 ± 59 (n=4), 11-oxoTTX 9 ± 3 (n=5), 11-norTTX-6(S)-ol 513 ± 85 (n=3) が得られた。4-*epi*TTXの活性は、今回初めて電気生理実験で測定することができた。

C-4: マウス腹腔内投与毒性試験(MBA)

最小至死量 (μg/kg)は、TTX 10, 11-oxoTTX 20, 11-norTTX-6(S)-ol 26 であった。

## D: 相対活性と考察

Neuro2A assay、電気生理実験、マウス毒性試験(MBA)のそれぞれの結果で、TTXを1とした時の各縁体の相対活性値を表1に示した。

表1 各方法の相対活性値

	Neuro2A assay	電気生理	MBA
TTX	1.00	1.00	1.00
4- <i>epi</i> TTX	-	0.06	-
11-oxoTTX	3.03	1.22	0.50
11-norTTX-6(S)-ol	0.04	0.02	0.38

11-oxoTTXは、全ての方法でTTXと同等か、それ以上の高い活性をもつことが確認された。これは、既報の競合結合試験の結果(Yotsu-Yamashita, M. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999, 289, 1688-1696.)とも一致している。4-*epi*TTXは、初めて電気生理実験で評価することができ、活性はTTXの1/18であることが示された。既報の競合結合試験(上記)でもTTXの1/38であり、TTXの4位がエピ化すると、TTXの活性は著しく低下すること

を確認した。11-norTTX-6(S)-olは、Neuro2A assay、電気生理実験、競合結合試験で、それぞれTTXの1/23, 1/46, 1/13の活性であった。しかし、マウス毒性試験(Mouse Bioassay: MBA)では1/2.6で、マウス毒性試験では、比較的強い活性を示した。なぜ、この違いがあるのか、理由については、特定していない。なお、11-norTTX-6(S)-olのマウス毒性は、既報(Yotsu, M., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 1992, 56, 370-371.)でも、LD<sub>50</sub> 54 µg/kg であり、今回の最小致死量23 µg/kgと大きく違ってはいない。

## E. 結論

以上の結果を、食品衛生の観点から次のように結論づけた。11-oxoTTXは、これまでに食中毒事例のある巻貝のキンシバイや沖縄産のフグ中に高濃度で検出されているため、TTXと同等の注意が必要である。4-epiTTXの活性は低いが、中性溶液中でTTXに変換する危険性があることを、認識しておく必要がある。11-norTTX-6(S)-olは、TTXとともに各種フグから検出される一般的な類縁体であり、マウスに対する毒性は比較的高いことから、注意を要する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Mari Yotsu-Yamashita, Gunther Köhler, Dietrich Mebs,\* Polypedates Leucomystax (White-lipped Tree Frog) Toxicity. Herpetological Review, 2020, 51, 822-823.

Yuta Kudo, Charles Hanifin, Yuichi Kotaki, Mari Yotsu-Yamashita\*, Structures of N-hydroxy-type tetrodotoxin analogues and bicyclic guanidinium compounds found in toxic newts, Journal of Natural Products, 2020, 83, 9, 2706-2717. (Open access)

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.

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, Chemistry - A European Journal, 2020, 26, 2025-2033.

Satoshi Numano, Yuta Kudo, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Yoshimasa Kaga, Kazuo Nagasawa, and Mari Yotsu-Yamashita\*, Two new skeletal analogues of saxitoxin found in the scallop, Patinopecten yessoensis, as possible metabolites of paralytic shellfish toxins, Chemosphere, 2021, 278, 130224.

### 2. 学会発表

工藤雄大、Charles T. Hanifin、山下まり、「有毒イモリより得られた新規テトロドトキシン類縁体と推定生合成関連化合物の構造」、第31回万有仙台シンポジウム、2020年10月12日(ポスター、Web)

Mari Yotsu-Yamashita, American Society of Pharmacognosy, the Natural Product Science Webinars: "Prediction of biosynthetic pathways of tetrodotoxin and saxitoxin on the basis of the structures of their intermediates". 24th July, 2020 (Web, invited oral).

工藤雄大、Charles T. Hanifin、山下まり、「有毒イモリより得られた新規テトロドトキシン類縁体および環状グアニジノ化合物」、第62回天然有機化合物討論会 2020年9月22-24日(ポスター、Web)

八重樫優士、工藤雄大、上山希、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」、日本農芸化学会 2021年度仙台大会、2021年3月18-21日(Web)

善 瑞穂、工藤雄大、長由扶子、此木敬一、山下まり、「テトロドトキシン-タンパク質複合体作製のモデル反応と主生成物の構造決定」、日本農芸化学会 2021 年度仙台大会，2021 年 3 月 18-21 日 (Web)

工藤雄大、Charles T. Hanifin、山下まり、「アメリカ産テトロドトキシン含有イモリより得られた新規環状グアニジノ化合物」、日本農芸化学会 2021 年度仙台大会，2021 年 3 月 18-21 日 (Web)

千葉 修，山田 智士，角替 俊輔，島田 紀子，長由扶子，高柳 優夏，星 美波，安達 栞菜，石塚 颯，長澤 和夫，山下 まり，此木 敬一，「合成サキトキシン誘導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」，日本農芸化学会 2021 年度仙台大会，2021 年 3 月 18-21 日 (Web)

山下まり、八重樫優士、佐藤恭佳、杉本亜津子、長由扶子、此木敬一、工藤雄大、「テトロドトキシン類縁体のマウス毒性の再確認およびテトロドトキシンのアルカリ初期分解物の単離と構造」、令和 3 年度日本水産学会春季大会、2021 年 3 月 26 日-30 日 (Web)

高柳優夏、星 美波、安達栞菜、石塚 颯、千葉 修、山田智士、広川貴次、此木敬一、山下まり、長澤和夫、「C11 位に着目した新規サキトキシン誘導体類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 101 春季年会、2021 年 3 月 19-22 日 (Web)

#### 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