

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 水産技術研究所 環境・応用部門 水産物応用開発部長

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（TTX）類の含量を明らかにするため、フグの子糠漬けに適した前処理法を開発し、二枚貝類に含まれる麻痺性貝毒及びテトロドトキシ（TTX）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。本年度は、フグの子糠漬けに適した前処理法を検討し、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、この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。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安全と見なされる 10 MU/g を上回るものであった。一方、マウス毒性試験では、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。マウス毒性試験は塩類の影響により毒力を過少評価するため、このことが影響したと推察される。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。しかし、他の部位は 2 個体以上が有毒となり、厚生労働省の通知により、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。

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、両者について、マウス毒性 (MU) を調べた。ddY 雄性マウス（4 週齢）に 1 ml 腹腔内投与しマウス毒性を求めた結果、それぞれ 1.89 及び 1.59 となり、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、マウス毒性は 84%程度となり、毒力が弱くなることが観察された。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）を行い、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行った。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  $\mu\text{g}/\text{kg}$  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、急性毒性はやや強かった。

高純度で精密に定量した TTX 類縁体 (11-oxoTTX, 4-epiTTX, 11-norTTX-6(S)-ol) 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行い、既報の同試験の結果と比較した。さらに、この 2 種に 4-epiTTX 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 (h $\text{Na}_v1.2$ ) 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。

#### 研究分担者氏名・所属研究機関名及

##### び所属研究機関における職名

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  
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

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, R2)。(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, R2)。(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

#### 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

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, R2)。(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、ロットによりばらつきがみられるため、新たに前処理法を検討した。

まず、抽出溶媒の最適化を行った。一定量のフグ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 (Envi-Carb, 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

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 1.0 ml、1.4 ml、2.0 ml 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。

#### B-1-2. フグの子糠漬け試料における TTX の添加回収試験

B-1-1 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℃) 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、エアーパージ後、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 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.* (*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 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。

### B-1-3. 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 類縁体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ものを扱い、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、フグ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。

## B-2. 動物試験によるTTXの毒性評価

### B-2-1. 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正確に定量したTTX

本実験用では「1.フグ毒TTXのqNMR法の開発と標準毒の調製」で調製した正確に定量されたTTXを用いた。このTTXは、フナコシ(Latoxan)より販売されるTTX約19mg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-*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)

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-2-2. 投与液の作製

中央水産研究所で調製した正確に定量したTTX調整液(溶媒: 0.1 % 酢酸液)と、あらかじめ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)を用いて、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-2-3. 投与方法

MU算出予備実験用には、マウスに、用時調整した被検物質投与液を、1 ml用プラスチック製注射筒（テルモ ディスポシリンジ、SS-01T ツベル 1 ml、テルモ）および26G注射用針（テルモ注射針、NN-2613S、161125D、テルモ）を用いて腹腔内投与を実施した。

なお、経口投与用用量設定予備実験用の場合には、金属製胃ゾンデ(KN-348、夏目製作所)と同様のシリンジにて強制経口投与を実施した。

### B-2-4. 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、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 °C、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。

なお、経口投与用用量設定予備実験用の場合では、同系統7週齢のマウスを用いて検討した。

### B-2-5. 実験群の構成

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分にあったため、本試験の最初の2匹が省略されたためである）の計2群、5匹とした。

経口投与用予備実験用には、各投与用量（0, 100, 300, 500, 700 µg/kg）につき3匹ずつ、計5群、15匹とした。

### （倫理面への配慮）

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記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. 活性測定に用いた4-*epi*TTX, 11-*oxo*TTX, 11-*nor*TTX-6(S)-olの純度確認と定量

活性測定に用いた4-*epi*TTX, 11-*oxo*TTX, 11-*nor*TTX-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-3-2. 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 $\text{Na}_v$ 阻害活性を調べる方法である(K. Kogure et al., *Toxicon*, 1988, 26, 191-197, M. Yotsu-Yamashita et al., *Toxicon*, 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 $\text{Na}_v$ 阻害活性を測定した。一方、4-epiTTX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、 $\text{Na}_v$ 阻害活性を測定した。

### B-3-3. 電気生理実験による $\text{Na}_v$ 阻害試験 ヒト電位依存性 $\text{Na}^+$ チャネルタイプ

1.2 (h $\text{Na}_v1.2$ )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、11-oxoTTX, 11-norTTX-6(S)-ol, 4-epiTTXの活性を測定した。

### B-3-4. 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、15-20g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. フグ糠漬けに含まれるTTXやTTX類縁体含量を定量

#### C-1-1. フグの子糠漬けに適した前処理法の開発

フグの子糠漬け 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(1094 ng/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、フグ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。溶出画分における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℃）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。

### C-1-2. 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。

### C-1-3. 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

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 µg 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。

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 含量を別途、国立衛研において 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。しかし、他の部位は 2 個体以上が有毒となり、厚生労働省の通知により、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。

## C-2. 動物試験による TTX の毒性評価

### C-2-1. 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 (現 水産技術研究所) で正確に定量した 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 1.7 MU 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 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））、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、マウス毒性は84%程度となり、弱くなった。

### C-2-2. 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）を行い、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行った。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、その差は大きな差ではなかった。

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。

### C-3. TTX類縁体の毒性評価

#### C-3-1. 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-3-2. 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-epiTTX 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-epiTTX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-3-3. 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. 考察

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

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。本糠漬け製品には多量の塩が含まれており、機器分析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、マウス毒性試験では塩の影響により毒力を過少評価していることを示唆している。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 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、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。

## D-2. 動物試験によるTTXの毒性評価

腹腔内投与の場合、TTX投与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物を溶媒とすると、マウス毒性は84%程度となり、毒力が弱くなることが明らかになった。この原因としては、無毒のコモンフグ皮膚抽出物由来の化合物が関与する可能性が考えられた。マウス毒性試験の腹腔内投与では、試料中の塩により毒力が緩和されることが報告されている。したがって、フグ抽出物中の塩により毒力が緩和された可能性がある。また、TTXの組織への分布速度が、0.1%酢酸液の場合の方が速やかであり、相対的に毒力が強くなる可能性も示唆された。

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場合には、0.1%酢酸溶液よりも急性毒性が強いことが明らかになった。しかし、その差は大きな差ではないことに留意が必要である。欧州食品安全機関(EFSA)の報告書では、マウスへの強制経口投与によるLD<sub>50</sub>値は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と報告されている。後者の値は本研究で得られた無毒のフグ皮膚抽出物を溶媒とした場合とほぼ同等である。

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(NOEL)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、本検討結果である最小毒性量 (LOAEL) 100 µg/kg 体重と同程度であった。

### D-3 TTX 類縁体の毒性評価

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 とした時の各類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 と大きな齟齬はなかった。

### E. 結論

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、現状の検査法では違反となら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、塩類の影響により毒力を過少評価するマウス毒性試験 (腹腔内投与) と異なり、機器分析法では正確に TTX の毒量を定量することができる。このため、マウス毒性試験の基準値をそのまま適用すると、規制値を超える検体が増える可能性が高い。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再度検討する必要がある。

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、経口投与の場合には溶媒が 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

に資するものとする。

TTX 類縁体の毒性評価では、食品衛生の観点から次のように結論づけることができる。11-oxoTTX は、TTX と同等かそれ以上の毒力を有する。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-*epi*TTX 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、注意が必要と思われる。

本研究で得られた結果は、機器分析法で TTX を検査する際に、極めて有益な知見である。

#### 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、毒劇法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) 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) 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]

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

4) 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)

5) 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.

6) 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.

7) 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

- 1) 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）
- 2) 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
- 3) 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.)
- 4) 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)。
- 5) 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）
- 6) 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).
- 7) 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）
- 8) 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)

- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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，「合成サキシ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)
- 12) 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)
- 13) 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シ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)

その他： 本研究に関係する学会発表（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

**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

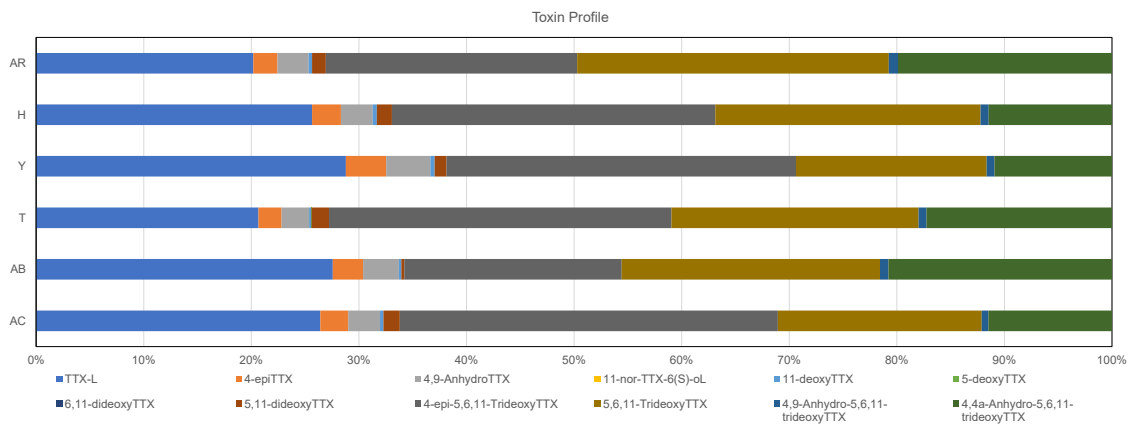


図 1：製造業者別の TTX 類の毒組成比較

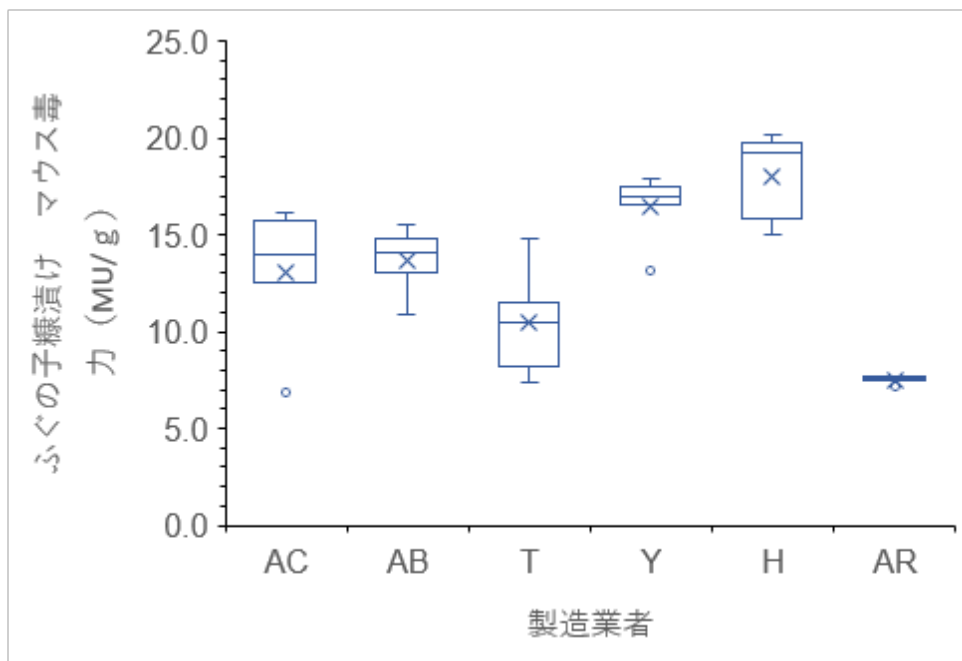


図 2：機器分析法で測定された製造業者別のフグの子糠漬けに含まれる TTX 類のマウス毒力