

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）
（総合）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 鈴木 敏之 水産技術研究所水産物応用開発部長

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

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、フグの子糠漬けに適した前処理法を検討し、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。フグの子糠漬けに適した前処理法の見直しでは、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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）（各群 3 匹）を行い、急性毒性における LD_{50} 値の推定と無毒性量の算出を行った。実験結果からは LD_{50} 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、急性毒性はやや強かった。

TTX 類縁体の毒性を評価するために、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する方法を確立し、LC-MS や NMR で純度を確認した。高純度で精密に定量した TTX 類縁体（11-oxoTTX, 4-*epi*TTX, 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 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-*epi*TTX を加えた 3 種の類縁体については、ヒト電位依存性 Na^+ チャンネルタイプ 1.2 (h Na_v 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、 Na_v 阻害活性を調査した。

分担研究者

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
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
大城 直雅・国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部
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、(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。(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。(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。(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。

B. 研究方法

B-1. 定量 NMR 法の開発と TTX の正確な濃度決定

製造元が異なる 4 社から TTX 酢酸塩 1mg を 2 本と TTX クエン酸塩 1mg を各 2 本の計 4 本を購入した。それぞれを 1ml の 4% 重酢酸/重水溶液に溶解し、そのうちの 0.6ml を NMR による定量に使用し、残りの約 0.4ml を希釈して LC/MS/MS 分析に供した。なお、NMR を用いた定量では、39.05mM のマレイン酸(4% 重酢酸/重水溶液に溶解)を外標準とし、PULCON 法で定量したが、2次元 NMR スペクトルを測定し、定量には他シグナル

とよく分離しているものを選択した。この方法を用いて、各試薬の TTX と TTX 類縁体含量を求めた。分析には、Bruker 社製の AVANCE III 800 (^1H : 800 MHz)を用いた。また、安定性の検討では NMR チューブに入れた TTX 溶液を 4°Cにて一年近く保存し、定期的に TTX の含量を求めた。

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

B-2. フグ糠漬けに含まれる TTX や TTX 類縁体含量を定量

B-2-1. 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を試みたが、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、抽出溶媒の最適化のため、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も既報 (*J. Chromatogr. A* 1387 (2015), p1-12) と同様とし、カートリッジに一定量の 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。

次に、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。

また、試料を Sep-pak AC2 に負荷した際、蒸留水によりカートリッジを洗浄するが、通水する水量を最適化した。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-2-2. フグの子糠漬け試料における TTX の添加回収試験

B-2-1 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 5g に対し、今年度新たに調製した標準毒 (2.613 mM) を 13 ml と 0.5%酢酸溶液を 20 ml 添加して、ホモジナイザーで破碎したのち、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 0.4ml は、活性炭を充填した固相抽出カートリッジ (Sep-pak AC2 を 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 にて溶出して毒を回収した。回収した試料は、アセトニトリルで 2 倍希釈し分析用試料とした。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 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とした。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-2-3. 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ものを用い、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、濃度が不明な成分については、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。また、マウス比毒性値のない類縁体については、構造が類似する成分の比毒性値を用いた。以下に暫定的に設定した TEF を示す。

TTX:	1,	4- <i>epi</i> TTX:	0.16,	4,9-anhydroTTX:	0.02,	5-deoxyTTX:	0.03,	11-deoxyTTX:	0.14,	11-nor-TTX-6-ol:	0.17,	<u>5,11-dideoxyTTX:</u>	<u>0.02,</u>	6,11-dideoxyTTX:	0.02,	5,6,11-trideoxyTTX:	0.01,	<u>4-<i>epi</i>-5,6,11-trideoxyTTX:</u>	<u>0.01,</u>	<u>4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX:</u>	<u>0.01,</u>	<u>4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX:</u>	<u>0.01.</u>
------	----	--------------------	-------	-----------------	-------	-------------	-------	--------------	-------	------------------	-------	-------------------------	--------------	------------------	-------	---------------------	-------	---	--------------	--	--------------	---	--------------

(下線は類似する構造の毒性値を用いた成分を示す)

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-3. 動物試験による TTX の毒性評価

B-3-1. 被検物質

①テトロドトキシシン (tetrodotoxin, TTX) (生化学用); 分子量319.27、CAS No. 4368-28-9、富士フイルム和光純薬(株)を、予備実験用に使用した。

カタログ番号 : 206-11071

ロット番号 : LKG5746

純度 : 95.7 % [HPLC]

②正確に定量したTTX

本実験用では「1. フグ毒TTXのq NMR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)

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-3-2. 投与液の作製

中央水産研究所(現 水産技術研究所)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-3-3. 投与方法

マウス毒性(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 デイスポシリンジ、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-3-4. 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-3-5. 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-4. TTX類縁体の毒性評価

TTX類縁体の精製では、4-*epi*TTXと11-oxoTTXは、含有動物由来の試料から精製する方が化学反応で調製するより効率がよいと考えられた。そのため、まず過去にフグやイモリからTTX類を抽出し、粗精製した画分から、TTX用LC/MSや蛍光HPLCを用いて分析し、これらの類縁体を比較的多く含む画分を見出した。次にその画分から、主として弱酸性陽イオン交換カラムと親水性相互作用液体クロマトグラフィー(HILIC)カラムを用いて目的物を分取し、溶出フラクションをLC-MSと蛍光HPLCで分析し、目的物を精製した。11-norTTX-6(*S*)-olは、まず、化学反応で

TTXから誘導した。既知の反応を用いて、TTXをH₅IO₆で酸化して11-norTTX-6,6-diolとし、その後NaBH₄で還元し、11-norTTX-6(*S*)-olと11-norTTX-6(*R*)-olの混合物を得て、その混合物から11-norTTX-6(*S*)-olを上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-4-1. 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、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¹H 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¹H NMRで定量した。

B-4-2. マウス神経芽細胞腫Neuro2AとOuabain, Veratridineを用いたNa_v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_v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_v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_v阻害活性を測定した。

B-4-3. 電気生理実験によるNa_v阻害試験

ヒト電位依存性Na⁺チャネルタイプ1.2 (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、11-oxoTTX, 11-norTTX-6(S)-ol, 4-epiTTXの活性を測定した。

B-4-4. 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-1-1. TTXの定量NMR法の開発

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

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

C-1-2. 4-EpiTTXの調製と混合溶液の定量NMR法の開発

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

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

C-1-3. 動物試験用および分析用 TTX 溶液の調製

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

国立医薬品食品衛生研究所で来年度実施する動物試験用原液とした。

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

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

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

調製後は-20°Cのフリーザーにて保管した。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

C-1-5. TTX 溶液の安定性試験

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

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

C-2. フグ糠漬けに含まれる TTX や TTX 類縁体含量を定量

C-2-1. 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%酢酸を添加して抽出される 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、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。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。既存の溶出条件における 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 による前処理を検討することとした。

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 1.4 ml 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、1.4 ml 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 5 μ l 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。

C-2-2. 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 5 g 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-2-3. 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、濃度で比較すると 3 番目に高い濃度の成分であった。得られた各成分の濃度に先述の 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-3. 動物試験による TTX の毒性評価

C-3-1. 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-3-2. 強制経口投与によるマウス急性毒性における LD₅₀ 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (各群 3 匹) を行い、急性毒性における LD₅₀ 値の推定と無毒性量の算出を行った。実験結果からは LD₅₀ 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。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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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、この結果から最小毒性量 (LOAEL) は 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重と考えられた。

C-4. TTX 類縁体の毒性評価

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 ¹H NMR, LC-MS, 蛍光 HPLC で純度を確認した。LC-MS で他の低活性の類縁体が微量 (2% 程度) に検出されたが、どの分析方法でも TTX は検出されず、4-*epi*TTX の純度は約 98% と考えられ、活性測定に支障ないと判断した。また、4-*epi*TTX は、COSY, TOCSY, HSQC, HMBC スペクトルも測定し、これまで帰属されていなかった化学平衡体の lactone 型の NMR シグナルの帰属も行い、hemilactal 型

-lactone 型の比率も決定できた。

11-oxoTTX は LC-MS と 蛍光 HPLC で 純度 を 確認 した 結果、TTX や 他 の 類 縁 体 は 検 出 さ れ ず、98% 以 上 の 純 度 で あ る と 思 わ れ た。¹H NMR も 測 定 し、TTX 類 縁 体 以 外 の 不 純 物 は 少 量 検 出 さ れ た が、TTX や 類 縁 体 は 検 出 さ れ な か っ た。な お、11-oxoTTX は、存 在 比 の 高 い 化 学 平 衡 体 の hemilacta 型 で も ¹³C NMR の デー タ の 報 告 が な く、存 在 比 の 低 い 10,7-lactone 型 は 存 在 が 報 告 さ れ て い な い が、今 回 得 ら れ た 純 品 で は 検 出 さ れ て お り、COSY, TOCSY, HSQC, HMBC スペクトル も 測 定 し 詳 細 に 解 析 し、こ れ ら の NMR デー タ を 新 た に 取 得 で き た。

11-norTTX-6(S)-ol の 調 製 で は、TTX 粗 精 製 物 (1-2 mg) を H₅IO₆ で 酸 化 し、処 理 後 に ¹H NMR と HR-ESI-MS を 測 定 し て 反 応 を 確 認 し た。反 応 で は NaBH₄ に よ る 還 元 反 応 も 既 報 通 り 進 む こ と を 蛍 光 HPLC や LC-MS で 確 認 し た。反 応 物 は 活 性 炭 と HILIC カ ラ ム な ど に よ る 精 製 を 行 い、上 述 と 同 様 に 純 度 を 確 認 し た。ま た、フ グ 卵 巣 か ら も 精 製 し、純 度 98% の 11-norTTX-6(S)-ol が 約 100 µg 得 ら れ た。以 上 の よ う に、活 性 測 定 に 十 分 な 純 度 の 類 縁 体 を 予 定 ど お り 順 調 に 調 製 で き た。

C-4-1. マウス神経芽細胞腫 Neuro2A と Ouabain, Veratridine を用いた比色法による Na_v阻害活性の測定 (Neuro2A assay)

IC₅₀ (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-4-2. 電気生理実験による Na_v阻害試験

IC₅₀ (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-4-3. 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. 定量 NMR 法の開発と TTX の正確な濃度決定

TTX は 溶 液 中 で 最 大 4 成 分 の 混 合 と し て 存 在 し て い る。NMR スペクトル上では、TTX hemilactal 体 が 最 も 多 く 存 在 し て い た が、液 体 ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー で は hemilactal 体 と 10,7-lactone 体 と を 分 離 す る こ と は で き な い。そ の た め、NMR に よ る 定 量 を 行 う 際 に は、hemilactal 体 と 10,7-lactone 体 と の 混 合 シ グ ナ ル を 与 え る H-4a 位 を 用 い る こ と と し た。ま た、定 量 NMR に よ っ て 得 ら れ た TTX 含 量 と ラ ベ ル 保 証 値 と の 間 に 齟 齬 が 生 じ て い る こ と が 判 明 し た。こ れ は 正 確 な 毒 性 評 価 を 行 う う え で 重 要 な 知 見 で あ る。今 回 評 価 し た い ず れ の 市 販 TTX も ラ ベ ル 保 証 値 は 過 大 評 価 と な っ て お り、い ず れ の 試 薬 会 社 か ら 購 入 し て も 同 様 の 傾 向 が あ る こ と が 分 か っ た。こ れ ら の 知 見 に 加 え て、本 年 度 は TTX 分 析 用 標 準 品 を 作 製 し た。こ れ は 国 内 で は SI ト レ ー サ ブ ル な 手 法 を 用 い て 値 付 け さ れ た TTX の 最 初 の 例 で あ る。計 100 本 を 調 製 し た の で、複 数 の 機 関 に 配 布 す る こ と も 可 能 と な り、中 毒 事 例 の 確 認 の 際 に 有 効 に 活 用 さ れ る も の と 思 わ れ る。

今 回、コ モ ン フ グ 卵 巣 抽 出 液 の 活 性 炭 処 理 物 を 使 い、LC/MS/MS 法 で TTX 各 種 類 縁 体

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

D-2. 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、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-3. 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 LD₅₀ 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 (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、本検討結果である最小毒性量 (LOAEL) 100 µg/kg 体重と同程度であった。

D-4. 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、LD₅₀ 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

定量 NMR 法の外標準法である PULCON 法を用いて TTX およびその類縁体を精確に定量

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

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 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り

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考えられる。

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) Ryuichi Watanabe, Masato Tanioka, Hajime Uchida, Ryoji Matsushima, Hiroshi Oikawa, Masahiro Matsumiya, Mari Yotsu-Yamashita, Toshiyuki Suzuki. Quantitative ¹H-NMR Spectroscopy for Preparation of Certified Reference Material Tetrodotoxin, J. Agri. Food Chem. 67, 12911-12917, 2019.

- 2) Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoko Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.
- 3) Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, Kitajima S, Shibutani M, Furukawa S, Hirose A., Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N,N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt. *Fund Toxicol Sci* 5: 167-170, 2018.
- 4) Dietrich Mebs, Mari Yotsu-Yamashita, Werner Pogoda, Joseph Vargas Alvarez, Raffael Ernst, Gunther Köhler, Stefan W. Toennes, Lack of alkaloids and tetrodotoxin in the neotropical frogs *Allobates* spp. (Aromobatidae) and *Silverstoneia flotator* (Dendrobatidae). *Toxicon* 152, 103-105, 2018.
- 5) Mari Yotsu-Yamashita, Yuuma Nagaoka, Koji Muramoto, Yuko Cho and Keiichi Konoki, Pufferfish Saxitoxin and Tetrodotoxin Binding Protein (PSTBP) Analogues in the Blood Plasma of the Pufferfish *Arothron nigropunctatus*, *A. hispidus*, *A. manilensis*, and *Chelonodon patoca*, *Mar. Drugs* 16(7), 224, 2018.
- 6) Dietrich Mebs, Max Lorentz, Mari Yotsu-Yamashita, Daniela C. Rößler, Raffael Ernst, Stefan Lötters, Geographic range expansion of tetrodotoxin in amphibians - First record in *Atelopus hoogmoedi* from the Guiana Shield, *Toxicon*, 150, 175-179, 2018.
- 7) Nozomi Ueyama, Keita Sugimoto, Yuta Kudo, Ken-ichi Onodera, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Toshio Nishikawa, Mari Yotsu-Yamashita, Spiro Bicyclic Guanidino Compounds from Pufferfish, Possible Biosynthetic Intermediates of Tetrodotoxin in Marine Environments, *Chemistry, a European Journal*, 24, 7250-7258, 2018,
- 8) 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 ¹H-NMR Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 2019, 67, 46, 12911-12917.
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.9b06380>
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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>
- 1 2) 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>
- 1 3) Takashi Minowa, Yuko Cho, Yasukatsu Oshima, Keiichi Konoki and Mari Yotsu-Yamashita, Identification of a Novel Saxitoxin Analogue, 12 β -Deoxygonyautoxin 3, in the Cyanobacterium, *Anabaena circinalis* (TA04), *Toxins* 2019, 11, 539 <https://doi.org/10.3390/toxins11090539> (open access)
- 1 4) 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)
- 1 5) 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>
- 1 6) 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>
- 1 7) 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)
- 1 8) 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]
- 1 9) Mari Yotsu-Yamashita, Gunther Köhler, Dietrich Mebs,* Polypedates Leucomystax (White-lipped Tree Frog) Toxicity. *Herpetological Review*, 2020, 51, 822-823.
- 2 0) 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)
- 2 1) 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.

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

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

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

4) 北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測と情動認知行動解析、第 45 回日本毒性学会学術年会(2018.7.18.)

5) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk

between PPAR α and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018.7.6-10) Chicago, USA

6) 菅野 純、小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—、第 45 回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

7) 夏目やよい、相崎健一、北嶋 聡、水口賢司、菅野 純、TargetMine による標的予測、第 45 回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

8) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

9) Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

1 0) Naomasa OSHIRO, Hiroya NAGASAWA, Mio NISHIMURA, Kyoko KUNIYOSHI, Toshiaki TANIGAWA, Yoshiko SUGITA-KONISHI, Katsunori TACHIHARA, Hiroshi ASAKURA, Takeshi YASUMOTO. LC-MS Analysis of ciguatoxins in *Variola louti* collected off the Japanese Waters, 52nd UJNR Toxic Microorganisms Panel Scientific meeting, (2018.04.24) 川崎市

1 1) Naomasa Oshiro, Kyoko Kuniyoshi,

Shigeyoshi Yamamoto, Takuma Yamada, Ayano Hotta, Takafumi Suzuki, Noriko Sugita, Keiichi Matsuura, Akie Nakashima, Yoichi Anzai, Hiroshi Asakura. Analysis of tetrodotoxin in flesh of a pufferfish, Takifugu flavipterus, collected from the Seto Inland Sea, Japan, 18th International Conference on Harmful Algae (ICHA2018), (2018. 10. 21-26) Nantes, France.

1 2) Naomasa Oshiro, Hirohide Okubo, Mami Ito, Kyoko Kuniyoshi, Takashi Kojima, Katsunori Tachihara, Hiroshi Asakura, Takeshi Yasumoto. Determination of Ciguatoxins in the Moray Eel *Gymnothorax javanicus* from Okinawa and Amami Islands, Japan, 18th International Conference on Harmful Algae (ICHA2018), (2018. 10. 21-26) Nantes, France.

1 3) Mika Nagae, Tomoji Igarashi, Kyoko Kuniyoshi, Naomasa Oshiro, Takeshi Yasumoto. A single validation study on matrices-insensitive test procedure for quantitative analysis of the Pacific type ciguatoxins in fish, 18th International Conference on Harmful Algae (ICHA2018), (2018. 10. 21-26) Nantes, France.

1 4) Takeshi Tsumuraya, Takeshi Sato, Naomasa Oshiro, Masahiro Hirama, Ikuo Fujii, Highly Sensitive and Practical Fluorescent Sandwich ELISA for Ciguatoxins, 18th International Conference on Harmful Algae (ICHA2018), (2018. 10. 21-26) Nantes, France.

1 5) 松田りえ子, 荒川史博, 納屋隆行, 大城直雅. ホタテガイ中オカダ酸分析技能試験プログラムの開発及び統計学的評価, 日本食品衛生学会第 114 回学術講演会, (2018. 11. 15-16) 広島市 .

1 6) 中島安基江, 福原亜美, 井原紗弥香, 安部かおり, 大城直雅. 瀬戸内海産コモンフグの毒性調査, 第 55 回全国衛生化学技術協議会年会, (2018. 11. 29-30) 横浜市.

1 7) 永山敏廣, 高取聡, 根本了, 藤本啓, 高橋正幸, 村上太郎, 大城直雅, 小木曾基樹, 小島尚, 高野伊知郎, 松木宏晃, 三宅司郎, 宮下隆, 望月直樹. 衛生試験法・注解 高速液体クロマトグラフィーによるコルヒチンまたは下痢性貝毒の定性および定量(新規), (2019. 03. 20-23) 日本薬学会第 139 年会, 千葉市.

1 8) 大城直雅. 海産生物毒の規制と検査, 日本薬学会第 139 年会 一般シンポジウム S65 衛生試験法・注解シンポジウム 食品にかかわるレギュレーションと実際, (2019. 03. 20-23) 千葉市.

1 9) 山下まり 2018 年度農芸化学会東北支部シンポジウム 天然有機化合物が拓く新研究展開 2018. 6. 30 秋田大学地方創生センター 2 号館 大セミナー室 化学的手法による海産毒の生合成経路の推定 (招待講演)

2 0) 塚本匡頭, 千葉雪絵, 若森 実, 日高將文, 山田智士, 角替俊輔, 長 由扶子, 榊原 良, 今津拓也, 所 聖太, 佐竹佳樹, 安立昌篤, 西川俊夫, 山下まり, ○此木敬一 第 60 回天然有機化合物討論会、テトロドトキシン類縁体に対する電位依存性ナトリウムチャンネルの感受性評価、福岡県久留米市 2018. 9. 26-9. 28 (ポスター)

2 1) 山下まり 「第 22 回天然薬物の開発と応用シンポジウム」日本薬学会生薬天然物部会 2018. 10. 7-8 熊本大学薬学部 (熊本市) 中間体を基盤とした海産毒の生合成研究 (特別講演)

2 2) 山下まり 仙台青葉学院短期大学講演会、海洋生物毒の謎に迫る 2018. 10. 29 (招待講演)

2 3) Mari Yotsu-Yamashita, Nozomi Ueyama, Keita Sugimoto, Yuji Yaegashi,

Yuta Kudo, Ken-ichi Onodera, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Toshio

Nishikawa, Identification of seven possible biosynthetic intermediates of tetrodotoxin in marine environments isolated from pufferfish, ICHA 2018 2018. 10. 21-26 Nantes, France, 18th International conference on Harmful Algae, Nantes, France 25th October, 2018. (Selected, Oral)

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

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

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

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

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

29) 山下まり、佐藤恭佳、工藤雄大、長由扶子、此木敬一、高純度テトロドトキシン類縁体の調製と定量 (仮題)、2019 年度

日本水産学会春季大会、2018/3、東京海洋大学、口頭

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

31) Tadaaki Tsukamoto, Yukie Chiba, Shunsuke Tsunogae, Tomoshi Yamada, Yuko Cho, Ryo Sakakibara, Takuya Imazu, Shouta Tokoro, Yoshiki Satake, Yuki Ishikawa, Yoshiki Nakane, Masaatsu Adachi, Atsuo Nakazaki, Toshio Nishikawa, Minoru Wakamori, Mari Yotsu-Yamashita, Keiichi

Konoki, Sensitivity of the voltage-gated sodium channel subtypes, Nav1.1 to Nav1.7, against guanidine-containing natural products and their analogues. Frontier Research on Chemical Communications, The MEXT Grant-in aid for Scientific Research on innovative Area, The 1st International Symposium on Chemical Communication, Hitotsubashi Hall, National Center of Sciences Building (Tokyo) 9-10th January, 2019 (Poster).

32) 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)

33) 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

34) 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
- 3 5) 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 3 5 回食品化学シンポジウム, (2019. 11. 8.) 東京
- 3 6) 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
- 3 7) 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
- 3 8) 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
- 3 9) 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
- 4 0) 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
- 4 1) 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
- 4 2) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno: Cross Talks among PPAR α , 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
- 4 3) 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
- 4 4) 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
- 4 5) 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
- 4 6) 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
- 4 7) 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
- 4 8) 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 3 0 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
- 4 9) 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}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.

5 0) 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.

5 1) 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

5 2) 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

5 3) 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

5 4) 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

5 5) 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

5 6) 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

5 7) 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

5 8) 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

5 9) 安達栞菜, 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

6 0) 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

6 1) 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
6 2) 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

6 3) 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

6 4) 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

6 5) 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

6 6) 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

6 7) 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

6 8) 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

6 9) 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

7 0) 高柳優夏, 安達栞菜, 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

7 1) 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

7 2) 東海林 千容, 長 由扶子, 赤松 みちる, 安達 栞菜, 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

7 3) 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

7 4) 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

7 5) 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

7 6) 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 カマルディープカウアー, 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

77) 島田 紀子、長 由扶子、此木敬一、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

78) 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）

79) 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

80) 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.)

81) 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の分析。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)。

82) 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の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）

83) 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).

84) 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の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）

85) 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の関連化合物」、日本農芸化学会 2021 年度仙台大会，2021 年 3 月 18-21 日(Web)

86) 善 瑞穂、工藤雄大、長由扶子、此木敬一、山下まり、「テトロドトキシンの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)

87) 工藤雄大、Charles T. Hanifin、山下まり、「アメリカ産テトロドトキシンの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)

88) 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、「合成サキトキシンの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)

89) 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、「テトロドトキシンの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)

90) 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の誘導体類

の合成及びナトリウムチャネル阻害活性評価」、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

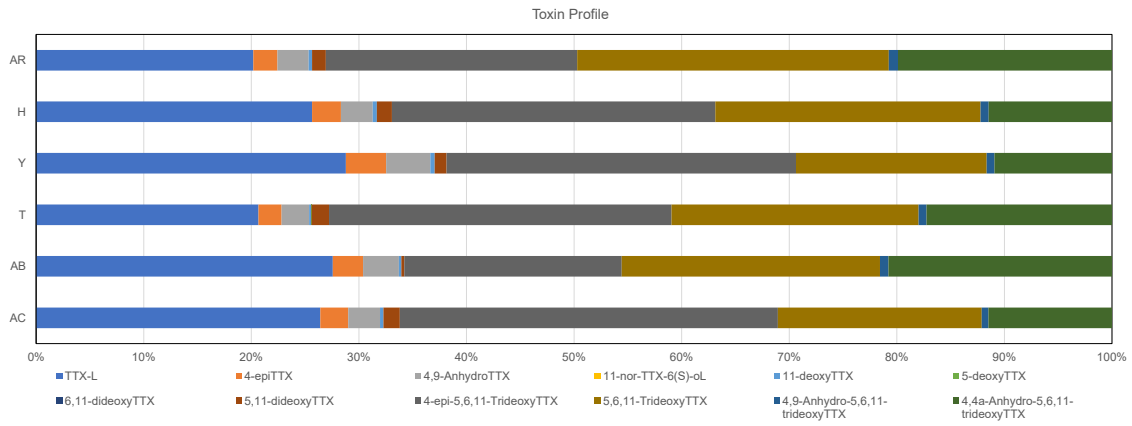


図 1：製造業者別の TTX 類の毒組成比較

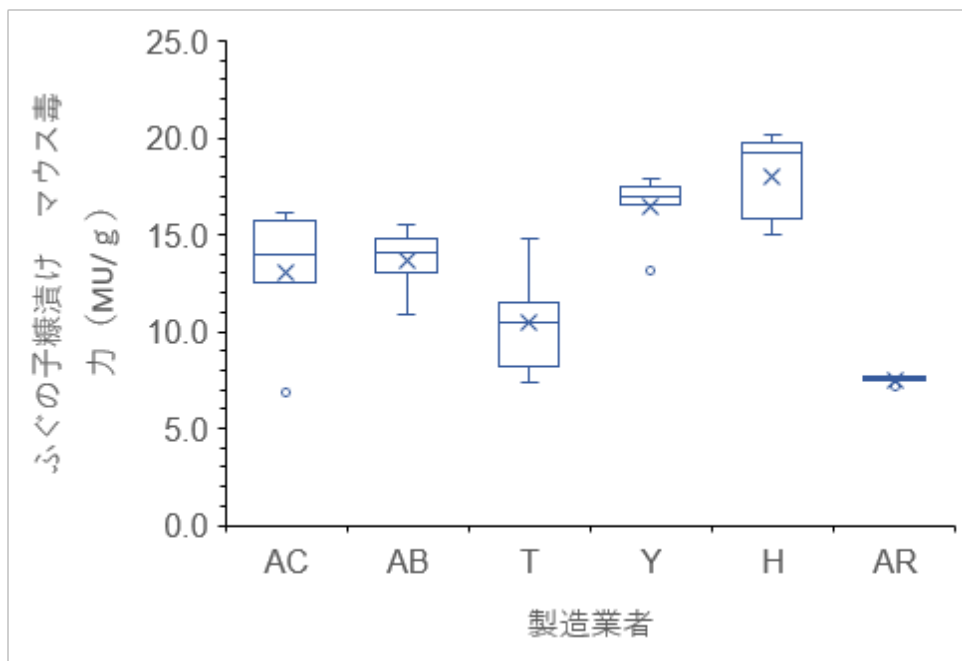


図 2：機器分析法で測定された製造業者別のフグの子糠漬けに含まれる TTX 類のマウス毒力