

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）
総括研究報告書

自然毒等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 環境・応用部門長

研究要旨：2021年度は、宮城県気仙沼市および北海道稚内市において現地調査を行い、それぞれ9種1834個体および1種1179個体を調査した結果、雑種混獲率はそれぞれ13.348%および0.085%であった。また両市共に、雑種は漁獲後、純粋なフグと区別されずに水産加工会社等に購入された後、各加工会社等においてフグ処理者の監督の下で排除されていた。なお、DNAによる雑種判別の結果、ゴマフグ×ショウサイフグ、ショウサイフグ×コモンフグ、およびトラフグ×マフグの3つの組み合わせの雑種が判別された。東京都内に流通するフグの調査において、東京都中央卸売市場内に搬入され、外観から雑種フグが疑われたため、卸売流通から除外されたフグ生体計21検体を収集・確保し、これらの画像並びに漁獲地域等の情報を収集・整理した。魚種鑑別結果との照合から21検体中15検体が雑種と判定され、その内訳はトラフグとマフグの雑種が9検体、ゴマフグとショウサイフグの雑種が6検体であった。宮城県気仙沼沖で採取されたフグおよび雑種フグの各組織を用いて、テトロドトキシン（TTX）の添加回収試験を実施した。谷口らの方法（2021）を参考に、組織重量の4倍量の抽出溶媒を添加し、ホモジナイズ、加熱処理を経て、遠心分離によって得た上清を適宜希釈し、親水性相互作用カラムを用いた液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（HILIC-MS/MS）で分析し、回収率を算出した。雑種フグ（ゴマフグ×ショウサイフグ）の各組織（皮と筋肉、精巣、卵巣、肝臓）を対象とした。その結果、皮と筋肉、精巣、肝臓については、概ね真度70–120%の範囲内に収まった。一方、卵巣については約180%と大幅に超えた。そこで、食品衛生検査指針に記載されているフグ毒（参考法）である、2回抽出法を試したところ、適切な真度に収まったことから、卵巣のみ2回抽出法を適用することとした。同様の結果がゴマフグでも得られた。

国際的に妥当性が評価された、HILIC-MS/MSを用いて、産業上重要な水産物であるホタテガイを分析し、マウスを用いた動物試験法（MBA）との相関性（88検体）を調べた。その結果、MBAの結果に対し、HILIC-MS/MS法の結果は半分程度（近似曲線の傾き：0.42）の毒力を示した。その傾向は高毒力の試料ほど顕著であった。決定係数は0.72と正の相関を示した。こうした毒力の乖離要因として、二枚貝代謝物M-toxinsの影響（毒性は未解明）が考えられた。分析に必要な標準品について検討した結果、現在市販されている16成分のうち、dcNEO、C3/C4を除いた13成分は必ず必要であることが判明した。また、化学兵器であるサキシトキシン（STX）を分析する際に標準品が必要かどうか検証するため、その組成比、毒力比を調べた。毒組成では4.0-47.4%の範囲で、毒力比では6.0-58.5%を占めており、STX標準品を用いて正確に定量する必要があることが明らかになった。最後に、ホ

タテガイ中腸腺からテトロドトキシン (TTX) を検出したが、その毒力は最大でも可食部で 0.005 MU/g と非常に低いものであった。既報ではホタテガイのほかにアカザラガイが著量の TTX (~4.0 MU/g) を持つことが報告されており、さらなる調査が必要である。

有毒植物や有毒キノコに含まれる植物性自然毒による食中毒が発生した際に、地方衛生研究所 (地研) は保健所と協力して原因究明にあたる。地研にとって有用な分析法の開発は、中毒原因の迅速な特定と正確なリスク評価を可能とし、新たな食中毒対策につながることを期待される。有毒植物に含まれる毒成分については、令和 2 年度までに国内の食中毒事例全般に対応することが可能な多成分分析法を構築した。一方、有毒キノコに含まれる毒成分の有用な分析法は未だ確立されていない。そこで、本研究では、主に国内での食中毒発生件数が多いキノコや死亡事例が多いキノコを対象として、含有毒成分を化学的性質により 2 系統に分類し、液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) による分析法を確立することを目的に次の 2 つの検討を行った。低極性のキノコ毒の分析法の開発 (分析法 1) では、国内で食中毒発生件数が多いツキヨタケや死亡事例が多いドクツルタケなどの有毒キノコに含まれる低極性のキノコ毒 9 成分を対象とする分析法を開発した。しいたけを用いた添加回収試験を実施したところ、8 成分の真度が 85-98% と良好な結果が得られたことから、本法は有毒キノコによる食中毒の原因究明に有用な分析法であると考えられた。高極性のキノコ毒の分析法の開発 (分析法 2) では、国内で食中毒発生件数が多いテングタケにはイボテン酸などのアミノ酸やムシモールなどのアミン類が含まれる。こうした高極性のキノコ毒を対象として、プレカラム誘導体化 LC-MS/MS による新たな分析法を検討した。アミノ酸分析試薬である 3-アミノピリジル-*N*-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート (APDS) をプレカラム誘導体化試薬として用いたところ対象成分は迅速に誘導体化され、逆相クロマトグラフィーで保持可能な誘導体化物として高感度に分析することが可能であった。

我が国における自然毒による食中毒の傾向について理解を深め、効果的な予防策の策定に役立てるため、平成 3 年から令和 2 年の 30 年間に厚生労働省へ報告された植物性自然毒のキノコを原因とする食中毒事件について調査し、発生件数/患者数の経年変化、発生地域、発生時期、原因施設等の傾向を解析した。また、厚生労働省ホームページに掲載されている「自然毒のリスクプロファイル」が作成されてから 10 年が経過しており、その間に新しい知見が報告されているなど、見直しが必要な状況である。そのため、本分担研究において自然毒のリスクプロファイルの更新作業を行っている。

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

松嶋 良次・水産技術研究所・グループ長
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・研究員
朝倉 宏・国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部長
高橋 洋・水産大学校・生物生産学科准教授
辰野 竜平・水産大学校・食品科学科講師
南谷 臣昭・岐阜県保健環境研究所・食品安全検査センター専門研究員
登田 美桜・国立医薬品食品衛生研究所・安全情報部第三室長

A. 研究目的

本研究では、フグ毒をはじめとした動物性自然毒やきのこを含む有毒植物など植物性自然毒に係る知見を収集・整理し、関係事業者に効果的な対策を提供するとともに、消費者に対して正確な情報提供を行うことを目的とする。

動物性自然毒においては、天然フグの主要な水揚げ地において、漁獲および流通状況の調査を行う。雑種フグの出現状況については、提案者の先行研究により、山口県や島根県の海域に出現したフグについて、分子マーカーを用いて種・雑種の割合を明らかにするとともに、雑種フグに含有されるテトロドトキシン(TTX)を部位別にHPLC法により調べた例が報告されている¹⁾。本研究では、調査対象海域を広げ、主要な水揚げ地を調査対象として、先の研究で開発した分子マーカーを用いて種・雑種の割合を明らかにする。また、雑種フグの部位別毒性については、LC-MS/MS法を用いることにより、TTXに加えて主要な類縁体についても把握することにより、正確な毒性評価を行う。麻痺性貝毒については、国際的に妥当性が評価されているLC-MS/MS法²⁾を国内で効果的に利用するために、主要生産海域のホタテガイなどの主要二枚貝種の毒組

成をこのLC-MS/MS法により明らかにし、現在の貝毒検査の公定法であるマウス毒性試験との相関について検証するとともに、国内麻痺性貝毒検査において、検査対象とすべき麻痺性貝毒群を絞り込む。

植物性自然毒については、中毒発生時に保健所と協力して原因究明にあたる地方衛生研究所(地研)にとって有用な分析法を開発する。先の厚生労働科学研究(H30-食品一般-008)において高等植物及びキノコの毒成分を対象とした分析法を検討し、高等植物については国内の中毒事例全般に対応することが可能な、迅速かつ簡易な一斉分析法を構築した。一方、キノコの毒成分の有用な分析法は未だに確立されていないため、国内での中毒事例が多いキノコ、致死性の高いキノコの毒成分の分析法を優先的に確立する。

自然毒による食中毒の予防策を効果的かつ効率的に講じるために、本研究では、主に植物性自然毒(キノコ・高等植物)を原因とする食中毒を対象に、その発生の実態や原因等を調査して傾向を解析する。また、厚生労働省ホームページに掲載されている「自然毒のリスクプロファイル」について、全般的な更新を行う。更に、消費者に向けた自然毒に関する情報提供の方法について検討し、効果的だと期待される方法を提案する。

文献

- 1) Fisheries Science (2019) 85:237–245, <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1265-7>
- 2) J. Chromatogr. A (2015) 1387:1-12, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.01.086>

B. 研究方法

B-1. 雑種フグの発生状況及びフグの流通状況の把握

1.1 主要な水揚げ地における調査

調査地において水揚げされた選別前の天然フグについて外部形態に基づき種・雑種鑑別を行い、種組成および雑種と思われる種類不明フグの個体数を数える。種類不明フグの一部については、生鮮状態で毒性試験用に皮、筋肉、肝臓、および生殖腺に腑分けし、各組織の重量を測定した後、冷凍で実験室まで持ち帰る。また、水揚げ地市場からフグを購入した水産加工業者等において聞き取り調査を行い、また購入したフグの鑑別が可能であれば鑑別を行い、雑種フグの流通状況を調査する。

実験室において、雑種と思われる種類不明フグのDNA試料（右胸鰭のエタノール固定試料）よりゲノムDNAを磁性ビーズを用いた精製法により抽出する。抽出したゲノムDNAを鋳型として、日本産トラフグ属魚類11種の種特異的遺伝マーカーの一塩基多型 (SNPs) をTaqManアッセイにより遺伝子型決定し、種・雑種判別を行う。種・雑種判別結果に基づき、現地調査における種類不明フグの個体数などから雑種の混獲率を推計する。また、各雑種個体から腑分けされた4部位（皮、筋肉、肝臓、生殖腺）の冷凍試料から、食品衛生検査指針理化学編（2015）に準じた方法で毒の抽出を行い、得られた抽出液を毒性評価用に水産技術研究所に送付する。

1.2 東京都中央卸売市場における調査

東京都中央卸売市場に搬入される際、雑種が疑われ、卸売流通から除外されたフグ検体を収集し、各魚体の画像を撮影した。また、各検体に関わる情報として水揚海域や年月日等の情報を入手し、これらを紐づけて整理した。

各検体を冷凍状態で、本研究班で遺伝学的手法を用いて魚種判別を担当する分担研究者・高橋洋博士（水産大学校）宛に送付した。

1.3 TTX の LC-MS/MS 分析

福井県沖で採取されたゴマフグと宮城県気仙沼沖で採取されたショウサイフグおよび雑種フグ（ゴマフグ×ショウサイフグ）の各組織を TTX の添加回収試験に用いた。ゴマフグの組織では筋肉と肝臓、精巣を、ショウサイフグでは筋肉と肝臓、皮を、雑種フグでは筋肉と肝臓、精巣、卵巣、皮を用いた。なお、ゴマフグの皮と卵巣組織は著量の TTX を含んでいたため、また、ショウサイフグの生殖巣は試料量が少なかったため、添加回収試験は実施しなかった。

TTX の添加回収試験（試験法 1）は次のように実施した。フグおよび雑種フグの各組織 2.00 g に対し、TTX を 10 MU/g (2.2 mg/kg) になるよう添加した。そこに、0.1 % 酢酸溶液 8 ml（組織重量に対して 4 倍容）を添加し、ホモジナイズした。それを 95 °C 以上の湯浴中で加温し、氷冷して室温程度まで冷却後、遠心分離して上清を回収した（TTX 添加区）。TTX 非添加区は、TTX を添加せずに同様の操作を行って抽出した抽出液を用いた。それらを適宜希釈して、HILIC-MS/MS 分析に供した。得られた分析結果から TTX の回収量を求め、回収率を算出した。

TTX の添加回収試験（試験法 2）は次のように実施した。フグおよび雑種フグの卵巣組織 2.00 g に対し、TTX を 10 MU/g (2.2 mg/kg) になるよう添加した。そこに、0.1 % 酢酸溶液 9 ml を添加し、ホモジナイズした。それを 95 °C 以上の湯浴中で加温し、氷冷して室温程度まで冷却後、遠心分離して上清を 20 ml メスフラスコに回収した。生じた残渣に 0.1 % 酢酸溶液 9 ml をもう一度添加し、懸濁後、遠心分離して上清を先ほどと同様のメスフラスコに回収し、20 ml に定容した。TTX 非添加区も同様に抽出した。それらを適宜希釈して、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) -MS/MS 分析に供した。得られた分析結果から TTX の回収量を求め、回収率を算出した。

B-2. 国際的に妥当性が評価された LC-MS/MS 法による国内貝毒検査法の確立

ホタテガイの主要な生産海域である北海道及び東北地方の本二枚貝について、マウス毒性試験 (MBA) と HILIC-MS/MS による分析を行い、両者の相関性を明らかにする。各成分の総毒力に対する寄与度から国内で入手可能な標準品について必要性を検証する。また、化学兵器であるサキシトキシン (STX) については、二枚貝における毒組成に占める割合および毒力に占める割合をそれぞれ求め、STX 標準品が必要かどうか検証する。さらには、ホタテガイに含まれるテトロドトキシン (TTX) について、その含量から規制対象とすべきか検証する。

MBA と HILIC-MS/MS に供するホタテガイホモジネートは、日本食品検査でホモジネートを調製後、一部を MBA に使用し、一部を HILIC-MS/MS に使用した。試料は、ホタテガイ可食部全体あるいは中腸腺とした。HILIC-MS/MS 分析に資するホタテガイ試料は、既報 (J. Chromatogr. A 1387 (2015) p1-12) に従い、抽出・前処理を行った。HILIC-MS/MS 分析は、先述の論文を参考に、水産技術研究所所有の質量分析装置を最適化した方法で行った。分析に用いた標準物質は、カナダの NRC 製認証標準物質 14 成分 (C1/2, GTX1-6, dcGTX2/3, NEO, dcNEO, dcSTX, TTX) を用いた。dcGTX1/4 はニュージーランドのコースロン研究所から恵与されたものを用いた。それらは段階的希釈列を作製し、5-7 点のポイントを使い検量線を作成した。STX は当所所有のものを用いた。C3/4 は標準毒が入手できなかったが、他の毒と同様に選択的反応モニタリング (SRM) トランジションを設定し、定性検出を可能とした。二枚貝代謝物である既知の M-toxins についても、既存の SRM トランジションで概ね検出で

きるため、条件設定の最適化を行わず、データ解析ソフトウェアにてデータ処理を行った。HILIC-MS/MS で分析すると試料に含まれる麻痺性貝毒成分の毒濃度 (nmol/g) が得られるため、それに既報 (Oshima, *J. AOAC int.* (1995) 78, p528-532) によって算出されたモル毒力 (MU/ μ mol) を乗じることで、マウス毒力 (MU/g) に換算した。また、MBA に供するホタテガイ試料は、食品衛生検査指針に記載されている麻痺性貝毒検査法 (公定法) に従って調製した。

B-3. 汎用性の高い植物性自然毒の分析法の確立

B-3-1. 低極性のキノコ毒の分析法の開発 (分析条件 1)

1.1 分析対象化合物

分析対象化合物としたキノコ毒 (または指標成分) 9 成分とした。

1.2 試料

添加回収試験にシイタケ (生、市販品 (菌床栽培品)) を用いた。

1.3 試薬・試液

α -アマニチン、 β -アマニチン、 γ -アマニチン、ファロイジンの 4 成分の標準品は、市販品をメタノールに溶解し 100 μ g/mL の標準溶液を調製した。イルジン S は林純薬工業 (株) 製の 1000 μ g/mL メタノール溶液を用いた。カエンタケのサトラトキシン H およびサトラトキシン H 12', 13'-ジアセテートは Agilent technologies 社の滝埜博士から提供された 100 μ g/mL のアセトニトリル溶液を用いた。カキシメジのウスタル酸は、日本大学の早川教授から提供された合成品 (Hayakawa et al. (2008))¹⁾ から調製した 33 μ g/mL のメタノール溶液を用いた。ニセクロハツの指標成分である CPAC は、松浦らの報告 (Matsuura et al. (2016))²⁾ に基づき、化学合成したもの (後述) を分取

HPLCにより精製し、200 µg/mLのメタノール溶液として用いた。

内部標準として、安定同位体標識化合物のイソバレリル-(R)-カルニチン-d9 塩酸塩 (Cambridge Isotope Laboratories 社製)、バージニアマイシン B (Santa Cruz Biotechnology 社製)、2, 2'-ビフェニルジカルボン酸 (東京化成工業 (株) 製)、ジアセトキシシルペノール (富士フィルム和光純薬 (株) 製) を用いた。ジアセトキシシルペノールはアセトニトリルに、その他の化合物はメタノールに溶解して 200 µg/mL の標準原液を調製した。これら 4 種の内部標準溶液を混合して、60%メタノールにより希釈し、50 ng/mL の混合標準溶液を調製して、試験溶液と検量線用標準溶液の調製に使用した。

精製に用いたカートリッジは Agilent Technologies 社製の Captiva EMR-Lipid (3 mL、300 mg) を使用した。

10%(w/v)トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液はナカライテスク (株) 製の特級試薬を用いて調製した。その他試験溶液の調製および LC-MS/MS 測定に用いた有機溶媒は、市販の残留農薬試験用または LC-MS 用を用いた。

1.4 装置

LC-MS/MS 装置は以下の高速液体クロマトグラフトリプル四重極タンデム質量分析計を用いた。

・ACQUITY UPLC System (Waters 社製) -API4000 (Sciex 社製)

1.5 LC-MS/MS 測定条件

分析カラムは、Waters 社製の XBridge Shield RP18 (2.1 mm φ × 150 mm, 3.5 µm) を用い、0.05%ギ酸溶液とメタノールの 2 液グラジエントによる RPLC により分析を行った。質量分析のイオン化は、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法で行った。

1.6 試験溶液の調製

1.6.1 抽出

試料 5.0 g を 50 mL のポリプロピレン製遠心沈殿管に量り採り、10%TCA 溶液 10 mL およびメタノール 10 mL を加えて 2 分間ホモジナイズした後、常温、2,000×g で 5 分間遠心分離し、上清を採り、メタノールを加えて正確に 50 mL とした。

1.6.2 精製

抽出液を 2 mL 採り、Captiva EMR-Lipid カートリッジに負荷し、常温、1,000×g で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てた。さらに抽出液 1 mL を負荷し、同様に遠心分離して得られた溶出液を採り、4 種内部標準混合溶液 (50 ng/mL) を 1 mL 加えた後、60%メタノールにより 5 mL に定容したものを試験溶液とした (0.02 g sample/mL)。バイアルは不活性処理済みガラス製バイアルを用いた。

1.7 定量

4 種内部標準混合溶液が 10 ng/mL となるように加え、0.4%TCA 含有 60%メタノール溶液により、5–200 ng/mL の標準溶液を調製した。それぞれ 5 µL を LC-MS/MS に注入して絶対検量線法または内部標準法により定量値を求めて比較した。

1.8 添加回収試験

粉碎均質化したシイタケ 5 g にキノコ毒 9 成分を以下の濃度になるように添加、混和して 30 分間静置した後、3 または 5 回併行の添加回収試験を行い、真度と併行精度を求めた。

- ・イルジン S、α-アマニチン、β-アマニチン、γ-アマニチン：2 µg/g
- ・ファロイジン、サトラトキシシン H、サトラトキシシン H 12', 13'-ジアセテート：1 µg/g
- ・ウスタル酸：0.5 µg/g

B-3-2. 高極性のキノコ毒の分析法の開発 (分析条件 2)

2.1 分析対象化合物

分析対象化合物としたキノコ毒 15 成分は以下のとおりである。高極性の毒成分であるコリン、ムスカリン、イボテン酸、ムシモール、アリルグリシン、プロパルギルグリシン、アガリチン、ジロミトリンの 8 成分に加え、分析条件 1 の対象成分の 9 成分のうち、市販の標準品が入手できなかったサトトラトキシシン H 12', 13'-ジアセテートおよびウスタル酸の 2 成分を除く 7 成分を加えた。

2.2 試薬・試液

ニセクロハツの指標成分である CPAC 以外は市販品を用いた。高極性の 8 成分はメタノール・水 (1:1) 混液に溶解し 100、500、または 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準原液を調製した。低極性の 7 成分の標準溶液は 1.3 試薬・試液に示すとおり調製した。

また、内部標準として、安定同位体標識化合物のアラニン-d4 (Sigma-Aldrich 社製) を用いた。メタノール・水 (1:1) に溶解し 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準溶液を調製した。

誘導体化には、富士フィルム和光純薬 (株) 製の APDS 試薬 (APDSTAG) およびホウ酸緩衝液 (APDSTAG Wako Borate Buffer) を用いた。APDS 試薬 100 mg を LC-MS 用アセトニトリル 5 mL に溶解して 20 mg/mL の溶液を調製し、4°C で保存して用いた。

その他試験溶液の調製および LC-MS/MS 測定に用いた有機溶媒は、市販の残留農薬試験用また LC-MS 用を用いた。

2.3 装置

LC-MS/MS 装置は以下の高速液体クロマトグラフトリプル四重極タンデム質量分析計を用いた。

・ ExionLC AD (Sciex 社製) -Triple Quad 5500+ ・ QTRAP Ready (Sciex 社製)

誘導体化反応に用いたヒートブロックは、Thermo Fisher Scientific 社製の Reacti-Therm を用いた。

2.4 LC-MS/MS 測定条件

分析カラムは、Phenomenex 社製の Luna PFP(2) (2 mm ϕ \times 150 mm, 3 μm) を用い、0.01%ギ酸含有 5 mM ギ酸アンモニウム溶液とメタノールの 2 液グラジエントによる RPLC により分析を行った。質量分析のイオン化は、ESI 法で行い、予想される溶出時間帯のみを測定する Scheduled MRM を用いた。

2.5 誘導体化反応

分析対象とした 16 成分 (内部標準のアラニン-d4 を含む) のうち、アミノ酸類 (イボテン酸、アリルグリシン、プロパルギルグリシン、アガリチンおよびアラニン-d4) とアミン類 (ムシモール) の 6 成分は、分子内のアミノ基を APDS 法により誘導体化した上で分析した。アミノ基を有しない他の 10 成分と合わせ、16 成分の混合標準液を 80% メタノール溶液により調製し、1.5 mL の不活性処理済みガラス製バイアル中に 100 μL 分取した。これにホウ酸緩衝液 300 μL および APDS 溶液 100 μL を加えて、スクリーキャップでフタをして密閉し、ヒートブロックで 55°C、10 分間加温して誘導体化した。反応液を室温に戻した後、0.2%ギ酸含有 60%メタノール溶液 500 μL を加えて試験溶液とした。

2.6 SRM 条件の最適化

APDS 誘導体化物 (APD-M) の SRM 条件の最適化は、2.5 誘導体化反応により、各成分の 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準溶液を誘導体化して得られた試験溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をメタノールで 100 倍希釈した後、シリンジポンプによるインフュージョンにより質量分析計に導入して行った。誘導体化物のプロトン付加分子 ($[\text{APD}\cdot\text{M}+\text{H}]^+$) に相当するプリカーサーイオンが、 $m/z Mm+121$ (Mm : 分析対象化合物のモノアイソトピック質量) として検出されたことを確認後、定量用として $Mm+121 > 121$ 、確認用として $Mm+121 >$

M_{m+1} の2つのトランジションを選択してSRM条件を最適化した。

イボテン酸とアガリチンの $M_{m+121} > 121$ と $M_{m+121} > M_{m+1}$ のトランジションはインフュージョンにより最適化できなかったため、PFPカラムを用いて得られたクロマトグラムにより最適化を実施した。分離カラムはMerck社製のコアシェル型PFPカラム、Supelco Ascentis Express F5 (2.1 mm ϕ \times 150 mm, 3 μ m) を用いた。1 μ g/mL の標準溶液を誘導体化した試験溶液 (100 ng/mL) をPFPカラムにより分離し、Declustering potential (DP) を30-100 Vまで、Collision energy (CE) を20-110 Vまで、それぞれ10 Vずつ変えて誘導体化物のピークの面積値を比較することにより、最適なDPとCEを設定した。

その他のSRMトランジションについてはPFPカラムで分離したピークについて、プロダクトイオンスペクトルから候補を探索し、CEを20-110 Vまで10 Vずつ変え、プロダクトイオンの強度が最大となるCEを設定した。

各誘導体化物について、定量用で1つ、確認用で3つの合計4つのトランジションを設定した。なお、インフュージョンにより最適化できなかったトランジションのCollision exit potential (CXP) は一律10 Vに設定した。

誘導体化しない10成分のSRM条件の最適化は、標準原液をメタノールまたはメタノール・水 (1:1) 混液で適宜希釈したものをインフュージョンにより質量分析計に導入し、定量用と確認用の2つのトランジションを設定した。

2.7 機器分析の検出限界および定量限界の推定

16成分の混合標準液を、80%メタノール溶液で希釈して1、2.5、5、10、25、50、100、250 ng/mLの8濃度の標準溶液を調製し分析した (誘導体化後の試験溶液の濃

度は0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10、25 ng/mL)。各濃度に対するクロマトグラムのピーク面積をプロットし、最小二乗法による直線回帰して得られた検量線の傾き (a) を求めた。さらに、各濃度のクロマトグラムから、検出限界に近い濃度の試験溶液を選択して6回繰り返し測定し、ピーク面積の標準偏差 (σ) を求めた。検出限界は $3\sigma/a$ により、定量限界は $10\sigma/a$ により算出した。検量線の相関係数 (R) は、誘導体化後の濃度として1、2、5、10、20、50 ng/mLの6濃度からなる検量線から算出した。

B-3-3. CPACの化学合成

松浦らの報告 (Matsuura et al. (2016))²⁾ に基づき、シクロプロピル酢酸とL-カルニチン (いずれも東京化成工業 (株) 製) から脱水縮合反応により合成した。これを分取HPLCにより精製した後、重水中、22°Cで¹H-NMRスペクトルを測定した。装置は日本電子 (株) 製のJEOL ECA-500を用いた。

文献

- 1) Hayakawa, I., Watanabe, H. and Kigoshi, H. *Tetrahedron*, **64**, 5873-5877 (2008).
- 2) Matsuura, M., Kato, S., Saikawa, Y., Nakata, M. and Hashimoto, K. *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 602-608 (2016).

B-4. 植物性自然毒の食中毒の発生動向調査及び「自然毒のリスクプロファイル」更新

B-4-1. キノコを原因とする食中毒

厚生労働省監修 (平成10年以前は厚生労働省監修) の「全国食中毒事件録 (平成3~令和2年版)」及び厚生労働省ホームページの食中毒統計資料 (最終確認: 令和3年9月) にて公表された食中毒事件のうち、植物性自然毒 (キノコ) を原因とする事件を抽出して本研究の調査対象とした。また、下記を補足資料として参考にした。

食中毒の傾向解析にあたり、発生地域については厚生労働省へ食中毒事件の報告を行った自治体が属する都道府県とした。

食品衛生学雑誌（平成33年33巻～令和2年62巻）に掲載された「食中毒等事件例」
全国地方衛生研究所等の年報
全国地方自治体の報道発表資料

B-4-2. 自然毒のリスクプロファイル

厚生労働省HPに掲載している「自然毒のリスクプロファイル」について、食中毒の担当部署（医薬・生活衛生局食品監視安全課）と協議しつつ更新作業を進めることとした。

（倫理面への配慮）

特になし。

C. D. 研究結果及び考察

C, D-1. 雑種フグの発生状況及びフグの流通状況の把握

1.1 主要な水揚げ地における調査

（結果）

気仙沼市における現地調査においては、2021年7月7日に4ヶ統の定置網で漁獲された計1843個体を購入し鑑別した。その結果、各個体は9種（ショウサイフグ、ゴマフグ、コモンフグ、マフグ、シマフグ、ヒガンフグ、トラフグ、クサフグ、クロサバフグ）1597個体と雑種と思われる種類不明フグ246個体に分けられた。種類不明フグ17個体について、DNAマーカーによる種・雑種判別を行ったところ、1個体がコモンフグ×ショウサイフグの雑種第一世代（F1）、1個体がコモンフグ、5個体がゴマフグ×ショウサイフグの雑種第二世代（F2）もしくは戻し交雑（BC）、10個体がゴマフグ×ショウサイフグのF1であった。また、現地で鑑別した純粋なショウサイフグ、ゴマフグ、コモンフグ、およびマフグを無作

為に46個体抽出し、DNAマーカーによる種・雑種判別を行ったところ、すべての個体が外部形態に基づく鑑別結果と矛盾しなかった。これらの結果から、気仙沼調査における雑種の混獲率は13.348%と推計された。

稚内市における現地調査においては、2021年8月6日および7日に底曳網および1ヶ統の定置網で漁獲された計1179個体を鑑別した。なお、底曳網で漁獲された528個体を購入し、定置網で漁獲された651個体は現地の水産加工会社の加工現場で選別前のもを鑑別した。その結果、各個体は1種（マフグ）1178個体と雑種と思われる種類不明フグ1個体に分けられた。種類不明フグ1個体について、DNAマーカーによる種・雑種判別を行ったところ、マフグ×トラフグのF1だった。これらの結果から、稚内調査における雑種の混獲率は0.085%と推計された。

気仙沼市および稚内市における雑種の流通状況の調査では、いずれの市場でも雑種フグは選別されることなく水産加工業者等に購入され、加工施設内でフグ処理者の監督下で選別・排除されていた。各施設のフグ処理者の配置は、1名から数名とまちまちだった。

判別された雑種計17個体の腑分け試料（皮、筋肉、肝臓、生殖腺）より、食品衛生検査指針理化学編（2015）に準じた方法で毒の抽出を行い、得られた抽出液を毒性評価用に水産技術研究所に送付した。

（考察）

2地点における調査結果から、漁獲された天然フグの種構成や雑種の混獲状況は地域によって大きく異なることが示唆された。従って、今後は調査対象海域を拡げ、地域的な傾向があるのかどうかを調べていく必要がある。また、今回8月に行われた稚内市における調査では、漁獲されたマフグは非繁殖期であり、発達した精巣または

卵巣を有していなかった。従って、天然フグの主要な漁獲地である北海道において、次年度は繁殖期における調査を追加で行う必要があると考えられる。

今回、宮城県気仙沼市の調査結果から、ショウサイフグとゴマフグの雑種の中に、F1よりもさらに進んだ雑種（F2やBC）個体が相当数混じっている可能性が示された。このことは、2012年から2014年にかけて、茨城県や福島県沖で両種の雑種が大量発生した際の、雑種のほとんどはF1であるという結果とは大きく異なる。従って、気仙沼市における調査個体数を増やし、F2やBCといった雑種後代の出現状況および毒性を明らかにしていく必要があると考えられる。

雑種フグの流通状況の調査では、混獲された雑種フグは、市場において純粋なフグに混じって選別されずに販売され、水産加工業者等に購入されていた。水産加工業者等では、フグ処理者の監督下で雑種フグが排除されていたことから、調査した範囲では、雑種フグが処理された状態で食品として流通することは無いと思われる。一方、今回調査したのは底曳網や定置網の漁獲物であり、高級魚であるトラフグを除くマフグ等のフグが中心であったことから、トラフグを主な対象とする延縄漁などで、雑種がどれだけ混獲されているかは不明である。延縄漁では、市場等に水揚げする前に漁業者が雑種を排除する場合も多く、またトラフグは高価なため定量的に買い取って調査する事はできないため、雑種の漁獲・流通状況を把握するためには、鑑別能力の優れた延縄漁の漁業者の協力を得て混獲率を調査するなど、何らかの手立てを講じる必要がある。1.2 東京都中央卸売市場における調査

（結果）

令和3年度に計21検体の雑種疑いフグを収集した。その内訳は、外観として、ト

ラフグの交雑疑いが13検体、ショウサイフグの交雑疑いが4検体、ゴマフグの交雑疑いが3検体、コモンフグの交雑疑いが1検体であった。これらは1検体を除き、関東近郊の海域で漁獲されたものであった。

本研究班の分担研究者である水産大学校高橋洋博士による魚種鑑別結果から、計21検体のうち、雑種と判定されたものは15検体であり、その内訳はトラフグ×マフグの雑種が9検体であり、ゴマフグ×ショウサイフグの雑種が6検体であった。後者については、茨城県または千葉県で水揚げされたものであった。雑種が疑われたものの、魚種鑑別結果から雑種ではないと判定された検体の内訳は、トラフグが4検体、マフグ及びコモンフグが各1検体であった。

（考察）

本研究では、卸売市場に搬入される際に雑種が疑われ、卸売流通から除外されたフグ検体を確保し、これらの雑種疑いの根拠となった外観等について整理を行った。水産大学校における種・雑種判別結果との照合を通じ、7割以上の検体が雑種であることが確認され、外観による魚種鑑別の重要性が改めて示された。

雑種と判別された検体では、トラフグ×マフグの雑種が最も多く認められた。トラフグ属魚類については雑種が多く存在することが既知であるが、実際の卸売市場に搬入される過程で認められたことはこうした状況が現時点においても発生している状況を裏付けるものと考えられる。更にトラフグの雑種と疑われたにもかかわらず、トラフグと判別された検体も複数認められたことは、こうした魚種の外観に関する情報を更に詳細に収集し、周知していく必要性を提起していると考えられる。また、コモンフグ×ショウサイフグの雑種については、親潮が流れ込む海域でのみ認められていた。この状況についても近年報告が

なされているが、同雑種フグの生息域が拡大するおそれもある状況にあることから引き続き調査を行う必要性があると考えられる。

1.3 TTX の LC-MS/MS 分析

(結果と考察)

ゴマフグの組織では、筋肉と肝臓、精巣を対象に試験法 1 により添加回収実験を実施した。その結果、筋肉での TTX の回収率は 110% であり、肝臓で 129.6%、精巣で 96.2% であった。いずれの組織も概ね良好な回収率が得られた。次にショウサイフグの組織では、筋肉と肝臓、皮を対象に実施した。その結果、筋肉での TTX の回収率は 113.6%、肝臓では 78.0%、皮では 126.1% と、このフグでも概ね良好な回収率を得ることができた。雑種フグでは筋肉と肝臓、皮、精巣、卵巣を対象とした。その結果、筋肉での TTX 回収率は 98.4%、肝臓で 100.0%、皮で 92.5%、精巣で 100.1%、卵巣で 178.9% であった。卵巣を除く、すべての組織において一回抽出法で十分な回収率が得られることが判明した。大幅に回収率の高かった卵巣組織については、抽出液を添加し、加熱処理をした後の遠心分離で回収できる液量が本来であれば 8 ml 程度あるものが、3 ml 程度しか回収されないことが影響していると推察された。卵巣組織の膨潤の影響と思われる。そこで、2 回抽出法である食品衛生検査指針に記載されたフグ毒(参考法)を検討することとした。雑種フグの卵巣組織とゴマフグの肝臓組織で行った TTX の添加回収試験(試験法 2)の結果、雑種フグの卵巣における TTX の回収率は 94.4%、ゴマフグ肝臓では 89.0% であり、両組織とも適切な回収率の範囲内に収まった。従って、雑種フグおよびフグの卵巣組織については、食品衛生検査指針に記載された 2 回抽出法を適用することとした。

C, D-2. 国際的に妥当性が評価された

LC/MS/MS 法による国内貝毒検査法の確立 (研究結果と考察)

北海道・東北地方の二枚貝を分析した結果、北海道と東北地方で相関性データ等に大きな違いは見られなかったため、データ解析では一緒に処理した。必要に応じてデータの一部を北海道のみ、あるいは東北地方のみとして報告する。

2021年度は北海道・東北地方のホタテガイ計88検体を分析した。MBAによる毒力は、2.0 MU/g -180 MU/gまでの範囲であった。それらについて得られたMBA毒力とHILIC-MS/MSから換算したマウス毒力との相関を調べた。その結果、近似曲線の傾きは0.42となり、MBAの方がHILIC-MS/MSの分析値よりも2倍近く高いマウス毒力を示した。決定係数は0.72であった。北海道や東北地方のホタテガイでは可食部を用いた場合は 4 MU/gを規制値、2.0 MU/gを監視強化として扱っている場合があるが、可食部に占める中腸腺の割合は10%程度のため、中腸腺を使用した分析では20 MU/gで監視強化、40 MU/gで規制値付近となる。そこで、より監視強化および規制値に近いマウス毒力の範囲(0 MU/g-45 MU/g)で近似曲線を作成したところ、傾きは0.52(決定係数:0.65)とやや改善したものの、やはりMBAの毒力がHILIC-MS/MSの分析結果の2倍程度であることには変わりなかった。5 MU/g付近まではMBAと同程度の値を示すものの、それ以上の高毒力になるとMBAの方がHILIC-MS/MSよりも高い結果となった。本調査研究では、二枚貝代謝物であるM-toxinsと推定されるピークが複数検出された。検出した成分は、M1, M3, M5-HA, M4, M10であった。このうち確実に同定できたのは、M1, M3, M5-HAの3成分であり、M4, M10は推定成分である。二枚貝代謝物であるM-toxinsについては、STXを基準とした毒性等価係数は不明であり、かつ、認

証標準物質が市販されていないため、その濃度および毒力を算出することはできない。そこで、M-toxins (M1, M3, M5-HA, M4) のピーク面積とMBA毒力との間に相関性がみられるかどうか調べたところ、近似曲線の決定係数は0.91と非常に高い正の相関を示した。このことは、MBA毒力が高いほど、M-toxins のピーク面積が大きくなっており、それら成分濃度が高い、あるいは毒力への寄与があることを示唆している。従って、MBAとHILIC-MS/MSの分析結果が乖離している理由として、二枚貝代謝物M-toxinsの影響が推測された。MBA毒力に対して、M-toxins の関与が相当量認められる場合、これら成分についても、機器分析の際には認証標準物質が必要になる。

化学兵器であるSTXを分析に使用する場合、経済産業省への使用許可申請が必要となる。そこで、STXを分析用標準品として扱う必要があるかどうか、ホタテガイにおける毒組成と毒力に占める割合を調べ、検証することとした。東北地方のホタテガイを分析した結果では、毒組成に占めるSTXの割合は4.0% - 47.4% (平均: 16.3%) の範囲であり、毒力に占めるSTXの割合は6.0% - 58.5% (平均: 24.7%) であった。北海道でも同様の傾向にあった。このことから、STXの占める割合が高い試料も存在するため、他の毒による代替検量線を使用した定量測定は不確実といえる。従って、STXの標準物質を使い、正確に定量する必要があることが判明した。

ホタテガイに含まれるTTX量を調べた結果、可食部試料からはTTXが検出されなかったが、中腸腺試料からは微量ながらTTXを検出した。マウス単位に換算したところ、中腸腺1g当たり、0.1 MUにも達していなかった。北海道・東北地方のホタテガイについてはTTX量の年変動や季節変動についても確認をする必要があるが、本

結果においてはTTXの寄与率は低いと言える。ただし、アカザラガイのように極端に高い毒力を持つ場合もあるので、貝種についてはさらなる精査が必要である。

C, D-3. 汎用性の高い植物性自然毒の分析法の確立

(研究結果と考察)

C, D-3-1. 低極性のキノコ毒の分析法の開発

(分析条件1)

日本において過去の食中毒発生件数が最も多いキノコはツキヨタケで、次いでクサウラベニタケ、カキシメジとなっており、現在もこの3種のキノコの誤食による食中毒が毎年数多く発生している。また、過去の食中毒の死亡事例は、ドクツルタケが最も多く、次いでシロタマゴテングタケ、ニセクロハツ、カエントケとなっている(登田ら、(2012))¹⁾。分析対象化合物とした9成分は、これらの有毒キノコのうちクサウラベニタケ以外のものに対応しており、致命的な食中毒事例をはじめ、多くの事例に対応することが可能であると考えられる。なお、クサウラベニタケの毒成分は、消化器症状の原因となる溶血性タンパク質や神経症状の原因となるコリンやムスカリンとされるが、後者については後述する高極性のキノコ毒の分析法の対象化合物としている。

分析対象化合物とした9成分は、誘導体化やイオンペア試薬を用いることなく、RPLCで分析することが可能であった。分析条件については、先の厚生労働科学研究(H30-食品-一般-008)において最適化しており、今回、有毒植物の多成分分析に用いた前処理法を応用して添加回収試験を実施した。

1.1 添加回収試験の結果

シイタケを用いて0.5・2 µg/gの濃度で添加回収試験を実施した結果、内部標準補正を行わない場合、CPACを除く8成分で真

度は 81-87%、併行精度は 1.7-10.1RSD% となった。内部標準補正を行った場合、真度は 8 成分いずれも向上し、85-98% となった。併行精度は 3.1-9.0RSD% となり、成分によっては定量値のバラツキが大きくなったが、いずれも 10% 以下となり内部標準補正が有効であることが示された。

アマニトキシシン類の 4 成分 (α -アマニチン、 β -アマニチン、 γ -アマニチンおよびファロイジン) は、ESI のポジティブモード (ESI(+)) でも分析が可能であった。しかし、ネガティブモード (ESI(-)) に比べて測定感度が低く、特に α -アマニチン、 β -アマニチン、 γ -アマニチンの場合は検量線や定量値のバラツキが大きくなる傾向が見られたため、ESI(-)での分析条件を採用した。

CPAC の真度は内部標準補正の有無に関わらず 69%で、70%を下回る低値となったが、指標成分としてニセクロハツを同定する目的としては十分であると考えられた。しかし、シイタケのブランク試料のクロマトグラムにおいて、CPAC の保持時間付近に定量および確認の両トランジション (244 > 85 および 244 > 185) で夾雑ピークが確認され、選択性に問題があると考えられた。定量トランジションのクロマトグラムではブランク試料のピーク面積が 1 $\mu\text{g/g}$ の添加試料に対して 3.1%と小さかったものの、夾雑ピークは高感度に検出された。ニセクロハツの同定に用いるためには、閾値の設定や他のトランジションや分析カラムを用いた確認方法を工夫する必要があると考えられた。

本法におけるマトリックス存在下での定量限界は、いずれの成分も 0.5 $\mu\text{g/g}$ 以下を担保していた。検量線の相関係数(R)は、CPAC を除く 8 成分で、内部標準補正の有無に関わらず 0.995 以上となり良好な結果が得られた。

本法は、食中毒の発生件数が多いキノコや死亡事例が多いキノコの食中毒の原因究

明に有用な分析法であることが示唆されたことから、今後、試験室間妥当性評価を実施し、分析法の汎用性を検証する。

C, D-3-2. 高極性のキノコ毒の分析法の開発

(分析条件 2)

キノコ毒には、ベニテングタケから単離されたムスカリンをはじめ、イボテングタケから単離されたイボテン酸やムシモールなど、低分子の高極性化合物が数多く存在する。前述のように、ムスカリンは日本の過去の食中毒発生件数が 2 番目に多いクサウラベニタケの毒成分の 1 つであるとともに、シロトマヤタケやオオキヌハダトマヤタケなどのアセタケ属のキノコをはじめとする広範囲のキノコに含まれる毒成分である。また、イボテン酸やムシモールは、過去の食中毒発生件数が多く報告されているテングタケをはじめとする一部のテングタケ属のキノコの主要な毒成分である。

特に日本では、キノコによる食中毒事例における、これらの低分子の高極性毒成分の含有実態は十分に把握されておらず、リスク評価のためのデータが不足している。先の厚生労働科学研究 (H30-食品-一般-008) においては、これらの高極性毒成分を親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) /MS/MS により分析する方法を検討したが、夾雑成分の影響のため、正確な同定、定量は困難であった。また、本年度の予備的な検討において、分析に影響を与えていると考えられた夾雑成分の無機塩類を除去するため、グラファイトカーボンカートリッジによる固相抽出を検討したが、分析対象化合物を回収することができず HILIC/MS/MS による分析法の開発を断念した。

今回検討に用いた APDS 法は、ほ乳類の血漿中に含まれる遊離アミノ酸のプレカラム誘導体化分析法として新保らが開発した方法である (Shimbo et al. (2009))²⁾。APDS 試薬は、分子内に活性カーバメートを有し

ており、アミノ酸をはじめ第 1 級アミンや第 2 級アミンなど、アミノ基の誘導体化を穏和な条件で迅速に進めることができる。また誘導体化物にイオン化効率の高いアミノピリジル基が含まれるため、質量分析計で高感度に検出できるという利点がある。APDS 試薬は現在、市販の試薬として入手可能であり、ヒトの血漿のアミノ酸メタボロミクスや食品中のアミノ酸の分析例も報告されている。

以上のことから、キノコ中毒発生時に低分子の高極性毒成分を質量分析により迅速かつ正確に定量するための汎用性の高い分析法として、APDS 法は有用性が高いと考え分析法の検討を行った。

2.1 誘導体化反応

誘導体化反応の操作は、富士フィルム和光純薬(株)が示す APDS 試薬(APDSTAG)の標準操作法に従った。

APDS 法で分子内のアミノ基が 1 つ誘導体化された場合、タンデム質量分析において誘導体化物のプロトン付加イオン ($[APD-M+H]^+$) に相当する $m/z Mm+121$ にプリカーサーイオンが検出され、ピリジルアミノカルボニル部位 ($[C_6H_5N_2O]^+$) に由来する $m/z 121$ のプロダクトイオンが特異的に生じる。分析対象化合物とした 15 成分のうち、誘導体化可能なアミノ基を有していると考えられたイボテン酸、ムシモール、アリルグリシン、プロパルギルグリシン、アガリチンの 5 成分は、誘導体化により、いずれも $Mm +121 > 121$ のトランジションでピークを検出することが可能であった。

誘導体化の操作は、比較的穏やかな条件で簡易、迅速に実施することが可能であったが、一般的に誘導体化の反応効率は試料マトリックスの影響を受けることが知られている。試料マトリックス存在下での誘導体化の反応時間や誘導体化試薬量の最適化は今後の検討課題である。

2.2 誘導体化物の SRM 条件の最適化

APDS 誘導体化物の SRM 条件の最適化はインフュージョン法で実施したが、APDS 試薬をはじめとする反応試薬の影響のため、イボテン酸やアガリチンでは得られた SRM トランジション条件が正確でなく、クロマトグラム上でピークを高感度に検出できなかった。そのためこれらの 2 成分は、DP と CE を変えてクロマトグラムのピーク面積を比較することにより最適化を行った。

また確認用トランジションの候補とした $Mm +121 > Mm+1$ は強度が小さかったため、プロダクトイオンスペクトルによりその他の候補も探索した。CE 20 V においては、アガリチンを除いてプリカーサーイオン ($[APD-M+H]^+$) が検出された。また、CE 50 V においては、3-アミノピリジンのプロトン付加分子 ($[C_5H_7N_2]^+$) に相当する $m/z 95$ や $m/z 78$ のプロダクトイオンがいずれの誘導体化物からも検出された。

アガリチンは CE 20 V において、 $[APD-M+H]^+$ の脱水イオンに相当する $m/z 370$ のプロダクトイオンが検出された。さらに、 $m/z 232, 256, 276$ にもプロダクトイオンが検出された。CE 50 V においては他の誘導体化物と同様に $m/z 95$ と $m/z 78$ のプロダクトイオンが検出されたが、 $m/z 77$ にも強度の高いプロダクトイオンが検出された。

以上の結果から、誘導体化物の SRM トランジションとして、定量用として $Mm +121 > 121$ 、確認用として $Mm +121 > Mm +121$ 、 $Mm +121 > Mm +1$ 、 $Mm +121 > 95$ (アガリチンの確認用は $Mm +121 > Mm +1$ 、 $Mm +121 > 232$ 、 $Mm +121 > 77$) の 4 つのトランジションを設定した。

2.3 分離条件の最適化

APDS 誘導体化物と低極性の毒成分を分析する場合は、C18 カラムを用いて RPLC により分析することが可能であったが、四級アミンを持つコリンやムスカリンは十分

に保持されなかった。そこで、分析カラムとしてカチオンの保持に優れた PFP カラムを採用し、APDS 誘導体化物に加え低極性の毒成分も同時に分析することとした。

β -アマニチンは α -アマニチンの分子内のアスパラギンがアスパラギン酸となった構造を持ち、モノアイソトピック質量は α -アマニチンよりも 0.984 大きい。その結果、トリプル四重極における β -アマニチンの SRM 測定においては、 α -アマニチンの第一同位体に由来するピークが出現し、両者をクロマトグラフィーにより分離しなければ、 β -アマニチンの正確な定量ができない。そこで、移動相Aのギ酸アンモニウムは 5 mM のまま、ギ酸濃度を 0、0.01、0.05、0.1%と変化させて、 α 、 β -アマニチンの分離度を確認したところ、ギ酸濃度が少ないほど両者の分離度は上がることが分かった。一方で、ギ酸を入れないとムスカリンをはじめとする他の成分のピークが広がったため、5 mM ギ酸アンモニウムにギ酸を 0.01%添加することとした (pH4.0)。この時の α 、 β -アマニチンの分離度 $R_s = 2.1$ となり完全分離の指標である $R_s = 1.5$ を上回っていた。

また、APDS誘導体化した6成分のうち、プロパルギルグリシン、ムシモール、アイルグリシンの3成分は分子量の差がそれぞれ1ずつ異なっている。 β -アマニチンの定量に α -アマニチンの第一同位体が影響するのと同様に、プロパルギルグリシンの第一同位体がムシモールに、ムシモールの第一同位体やプロパルギルグリシンの第二同位体がアイルグリシンに影響して定性や定量を妨害することを避けるため、十分に分離することが必要となる。こうした分離の問題を克服するために種々の分析カラムを検討した結果、最も適していた分析カラムはPhenomenex社製のLuna PFP(2) (2 mm $\phi \times 150$ mm, 3 μ m)であった。

2.4 検量線と検出限界および定量限界

以上最適化された分析条件により、分析対象化合物 16 成分を分析し、検量線を作成したところ、試験溶液 1-50 ng/mL の範囲で相関係数 (R) が 0.998 以上となり良好であった。

繰り返し測定による保持時間の変動はなかった。また、定量限界はイボテン酸が 2 ng/mL、イルジン S が 3 ng/mL、ジロミトリンが 5 ng/mL で、その他の成分が < 1 ng/mL となった。前処理の希釈率にもよるものの、食中毒残品の分析に必要な定量限界であると考えられた。

C, D-3-3. 化学合成による標準品の確保

毒成分の標準物質を確保することが困難であることは、キノコ毒のリスク評価にとって支障となっている。今回、過去の死亡事例が多く、近年も死者の発生が多いニセクロハツの指標成分である CPAC に着目して、化学合成により標準品を確保することとした。

合成法は松浦らの報告 (Matsuura et al. (2016)) に従い、シクロプロピル酢酸に塩化チオニルを加えて酸塩化物を生成させた後、L-カルニチンを加えて目的化合物を得た。重水中での $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは松浦らが報告した結果とよく一致し、純度の高い目的化合物が得られた³⁾。今後、ニセクロハツの食中毒事例が発生した場合に同定用の標準品として使用することが可能であることが示された。

文献

- 1) 登田美桜, 畝山智香子, 豊福肇, 森川馨. 食品衛生学雑誌, 53, 105-120 (2012).
- 2) Shimbo, K., Oonuki, T., Hirayama, K., Yahashi, A. and Miyano, H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, 1483-1492 (2009).
- 3) Matsuura, M., Kato, S., Saikawa, Y., Nakata, M. and Hashimoto, K. *Chem. Pharm. Bull.*, 64, 602-608 (2016).

C, D-4. 植物性自然毒の食中毒の発生動向調査及び「自然毒のリスクプロファイル」更新

C, D-4-1. キノコを原因とする食中毒

1-1. 経年変化

平成3年から令和2年（30年間）に全国自治体から厚生労働省へ報告された植物性自然毒のキノコを原因とする食中毒事件は、合計で発生件数が1,385件、患者数が4,654名（うち死者数28名）であった。毎年10件以上の食中毒事件が報告されており、近年はやや減少傾向である。30年間の発生件数と患者数の平均値は46件、155名、中央値は41件、136名であった。ただし、最も発生件数が多かった平成10年は103件、431名、最も少なかった平成29年は16件、44名であり、年毎の変化が大きい。これは、野生キノコの生育が気候の影響を受けやすいことが一因として考えられる。

1-2. 地域及び原因施設

調査対象とした全ての都道府県で最低1件はキノコによる食中毒が報告されており、最多が新潟県の169件、次いで山形県133件、福島県108件、北海道93件、長野県91件であった。

福島県における発生件数の経年変化を調べた結果、福島県ではキノコによる食中毒が平成14年から毎年ほぼ5件以上報告され、平成22年には20件と他年に比べて異常に多発していた。しかし、平成23年には0件と顕著に減少し、その後も発生件数は少数で推移している。我が国では平成23年（2011年）に東日本大震災による福島第一原子力発電所事故が発生し、一部の地域では放射性物質への暴露を懸念して野生キノコの採取についても注意が呼びかけられていたことから、福島県におけるこの傾向には事故の発生が影響していると推測された。また、福島県に隣接する県における発生件数についても経年変化を解析し

たが、明確な傾向は見られなかった。

原因施設別の発生件数については、全体の約9割が家庭で発生しており、自ら又は家族が採取したもの、あるいは譲渡されたものを自宅で食していた。次いで多かったのは販売店、事業場であった。

1-3. 原因キノコ

食中毒の原因として報告されたキノコの種類について、30年間に発生件数が10件以上であったものを。まとめた結果、発生件数と患者数ともに最多はツキヨタケの519件、患者数2,080名であり、次いで発生件数が多い順にクサウラベニタケ、カキシメジ、ドクササコ、テングタケであった。上位2種（ツキヨタケ、クサウラベニタケ）のみで発生件数の全体の5割を超え、さらに上位5種まで含めると全体の約7割を占めていた。

食中毒の発生件数が上位5種のキノコについて、それぞれの地域別の発生件数について検証した。その結果、発生件数が多い順に、ツキヨタケでは新潟県が97件、山形県が65件、福島県が36件、クサウラベニタケでは山形県が31件、福島県が30件、茨城県と長野県が同じく23件、カキシメジでは福島県が21件、長野県が14件であった。一方、ドクササコによる食中毒は57件のうち新潟県が30件、テングタケは56件のうち北海道が23件で発生しており、これら2種のキノコは食中毒の発生地域が集中していることが特徴的であった。

平成3年から令和2年の間に死亡者が報告された食中毒事件をまとめた結果、調査した30年間で死亡者が報告されたのは24件、人数は28名であった。原因とされたキノコはドクツルタケが最多であり、次いでニセクロハツが多かった。死亡例が報告された原因キノコのうちドクツルタケ、シロタマゴテングタケ、タマゴテングタケ、タマゴタケモドキはいずれも毒性が高い環状ペプチドのアマニタトキシンを含み、1本の喫食でも致死的になると言われている。

本研究で対象にした期間には死亡者の報告はなかったが、それ以前には、同じくアマニトキシンを含むコレラタケ（ドクアジロガサ）による死亡も報告されていた。死者数がドクツルタケに次いで多かったニセクロハツは、有毒な成分として2-シクロプロペンカルボン酸を含んでおり、橋本らによると、マウス試験の結果をもとに、ヒトの感受性がマウスと同等と仮定した場合には直径6-7 cmのニセクロハツの子実体2-3本が致死量に相当すると報告されている²⁾。その他、カエнтаケは環状トリコテセン類を含み、毒性が高いため小指の先程度の喫食量でも致死的になると言われている³⁾。よって、これらの毒性が非常に高く致死的になりやすい毒成分を含むキノコについては特に注意を喚起すべきである。一方、致死的になることはまれだが、ツキヨタケやニガクリタケでも死亡が報告されている点にも留意すべきである。

次に、ドクツルタケ、シロタマゴテングタケ、ニセクロハツ、カエнтаケが原因とされた食中毒事件の発生地域をまとめた。30年間に発生した全ての食中毒事件を対象にしており、推定の事例、原因キノコが複数種の事例も含めた。ドクツルタケの栃木県4件、兵庫県2件、シロタマゴテングタケの栃木県2件、カエнтаケの新潟県2件を除き、他は1件ずつの発生であった。

1) 小野寺誠、藤田友嗣ら；中毒研究 26, 210-214, 2013

2) 橋本貴美子ら；化学と生物 47(9) 600-602 (2009)

3) 橋本貴美子；モダンメディア 64(9) 6-13 (2018)

1-4. 誤認したキノコ

有毒なキノコによる食中毒は、見た目がよく似た食用キノコとの誤認が主な発生要因である。そのため、30年間に報告された食中毒事件で原因とされた有毒なキノコと、患者らが採取しようとしていた（誤

認した）キノコをまとめた。

患者らが採取しようとしていたキノコには、以前（2010年頃）の図鑑では、食用にできる、あるいは生で食べれば毒とされていたが、キノコ研究の進展とともに有毒な成分の含有が確認されるなど、現在では食用にすべきでないと言われているキノコが含まれていた。中でもクロハツについては、毒性が高く死亡者も出ているニセクロハツと酷似していること、外国では有毒キノコとして扱われていることも、食べてはいけない理由として挙げられている⁴⁾。そのため、慣れていない人がキノコ狩りに図鑑を持参する際は、なるべく新版のものにする方が良く、そのことを周知する必要があると考えられた。

4) 今関六也、大谷吉雄、本郷次雄 編集、山溪カラー名鑑 日本のキノコ（2019年5月1日初版第4刷発行）、(株)山と溪谷社

1-5. 発生時期

平成3年から令和2年までのキノコによる食中毒の発生時期（月）の傾向をまとめた。その年の気候にもよるが、30年間の全体的な傾向としては、9月の中旬から増加し始め、10月にピークを迎え、11月中旬頃に向けて減少していた。しかし、キノコは種類ごとに適当な生育時期があり、その時期に応じた食中毒の発生状況や注意すべきキノコも異なるものと考えられる。そのため、発生件数が多かった上位5種のキノコについて個々の食中毒発生時期の傾向についてもまとめた。その結果、気候の変動による影響は想定されるものの、各キノコを原因とする食中毒の発生時期には次の傾向が見られた。

▶ ツキヨタケ：7月頃から食中毒の発生が報告され始め、9月後半から10月後半に向けて増加するが、11月には激減していた。図7には示していないが、4月にも1件報告されていた。

▶ クサウラベニタケ：7月、8月にも1件ずつ報告はあったが、複数報告されるのは9月前半からで、10月前半にピークを迎えて、11月に入るとほぼ報告されなくなっていた。また、2月にも1件報告されていた。

▶ カキシメジ：食中毒が報告される時期の傾向はツキヨタケによく似ており、9月後半から10月後半に向けて増加し、約7割（66/88件）が10月に発生していた。

▶ テングタケ：夏から秋にかけて生えるキノコのため、食中毒の発生時期も上記のキノコよりも比較的早い。6月から報告され始め、8月頃から増加し、9月後半から10月前半にピークとなり、その後減少していた。ただし、発生件数の多い北海道の事例みでは、8月下旬から10月上旬の間に発生していた。

▶ ドクササコ：上位5種のキノコの中では比較的遅い時期に食中毒の発生が報告されており、特に10月後半に多発していた（36/57件）。

C, D-4-2. 自然毒のリスクプロファイル

厚生労働省HPに掲載されている自然毒のリスクプロファイルについて、現行版の問題点を洗い出したところ、新規の知見が含まれていない、様式や記載項目が統一されていない、写真が未掲載のものがあるといったことなどが見直すべき点として挙げられた。それをもとに、厚生労働省担当部署と協議の上、更新版の方針を決定した。現在、更新作業が途中のため、報告は次年度以降に行うことにする。

E. 結論

E-1. 雑種フグの発生状況及びフグの流通状況の把握

1.1 主要な水揚げ地における調査

雑種フグの発生状況には地域差があり、全国的な実態把握と流通状況の調査が必要である。従って、次年度は調査対象地域を拡大し、卵巣や精巣が発達した個体が漁獲さ

れる繁殖期に調査を行っていく必要がある。また、雑種後代（F2 や BC）の増加が示唆されたゴマフグ×ショウサイフグの組み合わせについては、調査個体数を増やし、その割合や毒性を明らかにしていく必要がある。

1.2 東京都中央卸売市場における調査

本研究では、卸売市場に搬入された際に雑種が疑われ、流通から除外されたフグ計21尾（検体）を確保し、これらの疫学情報を収集・整理した。種・雑種判別結果との照合から、雑種が疑われた検体の約7割強は雑種であることが確認された。これら一連の検討を引き続き進めることで、食品流通から除外される雑種疑いフグの国内実態に関する理解を深め、更なる安全確保に寄与したい。

1.3 TTX の LC-MS/MS 分析

食品衛生検査指針に記載されたフグ毒（参考法）による分析試料の調製では、2回抽出を行う必要があるため、試料調製に時間を要する。一方、抽出液と残渣に均質にTTXが分散していると仮定して抽出を行う一回法では、多検体を処理するうえで時間の短縮が見込める。一回抽出法については、谷口ら（2021）による報告があり、皮と筋肉、肝臓、精巣の各組織で良好な回収率が得られている。ただし、卵巣については報告されていなかった。本研究では、雑種フグにおける皮と筋肉、肝臓、精巣、卵巣の各組織について一回抽出法を試し、卵巣を除くすべての組織で良好な回収率が得られることを再現した。卵巣については、従来からある二回抽出法が適していることが明らかになった。本結果を踏まえ、次年度以降は、雑種フグの組織分布を明らかにする予定である。

E-2. 国際的に妥当性が評価された LC-MS/MS 法による国内貝毒検査法の確立

北海道・東北地方のホタテガイ 88 検体を HILIC-MS/MS で分析し、MBA によって求めた毒力と相関性を調べた。その結果、HILIC-MS/MS で求めた換算毒力は MBA

で求めた毒力の半分程度であった。HILIC-MS/MS と MBA の結果が乖離した要因として、二枚貝代謝物である M-toxins の影響が考えられた。M-toxins の毒性等価係数 (TEF) は低いと推定されているが、M-toxins の毒力の影響についても検証する必要がある。

化学兵器である STX の取り扱いについては、それが毒組成や毒力組成に占める割合が高い (~50%) ため、代替検量線を用いるよりも STX そのものを用いて定量した方が良いと考えられる。

北海道・東北地方のホタテガイに含まれる TTX 含量は非常に少なく、0.1 MU/g にも満たないことから、その全体の毒力に占める割合は軽微なものと考えられる。しかし、貝種によっては著量の TTX を含む場合もあるので、貝種の違いを調べることは今後の検討課題である。

E-3. 汎用性の高い植物性自然毒の分析法の確立

主に国内での食中毒発生件数が多いキノコや死亡事例が多いキノコを対象として、含有毒成分を化学的性質により 2 系統に分類し、LC-MS/MS による分析法を確立することを目的に検討を行った。低極性のキノコ毒の分析法の開発では、国内で食中毒発生件数が多いツキヨタケや死亡事例が多いドクツルタケなどの有毒キノコに含まれる低極性のキノコ毒 9 成分を対象とする分析法を開発した。本法は有毒キノコによる食中毒の原因究明に有用な分析法であると考えられた。今後、分析法の妥当性を確認するために、試験室間妥当性試験を実施する。一方、高極性のキノコ毒の分析法の開発では、国内で食中毒発生件数が多いテングタケにはイボテン酸などのアミノ酸やムシモールなどのアミン類

が含まれる。こうした高極性のキノコ毒を対象として、プレカラム誘導体化 LC-MS/MS による新たな分析法を検討した。アミノ酸分析試薬である 3-アミノピリジル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート (APDS) をプレカラム誘導体化試薬として用いたところ対象成分は迅速に誘導体化され、逆相クロマトグラフィーで保持可能な誘導体化物として高感度に分析することが可能であった。今後、抽出、精製工程の検討、試料マトリクス存在下で最適な誘導化条件を検討する必要がある。

E-4. 植物性自然毒の食中毒の発生動向調査及び「自然毒のリスクプロファイル」更新

平成 3 年から令和 2 年の 30 年間に全国自治体から厚生労働省へ報告された植物性自然毒のキノコを原因とする食中毒事件について傾向をまとめた。野生キノコであるため、その生育が気候の影響を受けやすく、それに応じて食中毒の発生も左右されると想定されるが、今回、30 年間という長期間の食中毒事件を総合的に解析したことにより、原因とされたキノコ毎に食中毒の発生地域や時期について一定の傾向を見ることができた。これは、経験から何となく理解していた食中毒の傾向を裏付けるデータとして利用できるだろう。また、本分担研究で取り組んでいる「自然毒のリスクプロファイル」の更新作業にも役立てることができる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 竹下直彦, 近藤卓哉, 池田 至, 高橋 洋, 永田新悟, 星野和夫. 水温と塩分がアカメ未成魚の摂餌と成長に及ぼす影響. 水産

大学校研究報告. 2021. 70: 27-34.

- 2) 辰野竜平, 梅枝真人, 宮田祐実, 出口梨々子, 福田 翼, 古下 学, 井野靖子, 吉川廣幸, 高橋 洋, 長島裕二. 熊野灘産ムシフグ *Takifugu exascurus* の毒性. 食品衛生学雑誌. 2021. 62(1): 28-32.

2. 学会発表

- 1) 武藤望生・柿岡 諒・永野 惇・坪井健人・清水祐大・猪瀬周・清水洋平・川崎琢真・高橋 洋. メバル属魚類の接合後隔離と形態分化にかかわる遺伝領域の探索. 日本魚類学会年会. オンライン開催, 2021年9月.

- 2) Ryoya Yanada, Kaede Kusunaga, Hiroshi Takahashi. The genetic basis of egg size variation in ninespine stickleback, *Pungitius pungitius*. 26th Joint International Symposium between National Fisheries University and Pukyong National University. Online meeting. October, 2021.

- 3) 登田美桜: 植物性自然毒に関する最近の話題、令和3年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部自然毒部会、Web開催、2021年11月

- 4) 登田美桜: 植物性自然毒(毒キノコ、有毒植物)による食中毒について、第35回日本中毒学会東日本地方会教育講演、Web開催、2022年1月

3. 著書

- 1) Hiroshi Takahashi. 2022.1. Recent distributional shifts and hybridization in marine fishes of Japan. In Yoshiaki Kai, Hiroyuki Monomura, Keiichi Matsuura (Eds.), pp. 311-325. Fish Diversity of Japan: Evolution, Zoogeography, and Conservation. Springer, Singapore.

4. 行政関係者向け説明会

- 1) 南谷臣昭: 有毒植物による食中毒に対応するための一斉試験法の開発、第58

回全国衛生化学技術協議会年会部門別研究会(食品部門)、Web開催/名古屋市、2021年11月

- 2) 南谷臣昭: 有毒植物による食中毒への対応と予防対策について、令和3年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第34回理化学部会自然毒勉強会、書面開催/静岡市、2022年2月

5. その他

- 1) 高橋 洋. 海の温暖化によるフグの分布域北上と雑種の増加. ていち. 2022. 141: 88-100.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- (ア) 特許取得 なし
(イ) 実用新案登録 なし
(ウ) その他 なし