

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：「雑種ふぐの発生状況およびふぐの流通状況の把握」では、昨年度の宮城県気仙沼市および北海道稚内市の雑種漁獲状況調査（それぞれ雑種混獲率 12.923%および0.085%）に引き続き、今年度は石川県輪島市、秋田県秋田市・男鹿市、北海道神恵内村・初山別村で同様の調査を行った（それぞれ 0.148%、1.952%、0.050%）。今年度調査により、国内の主な天然ふぐ水揚げ地における雑種混獲状況が明らかになった。各水揚げ地において、雑種は漁獲後、水産加工会社等に購入された後、ふぐ処理者の監督の下で排除されていた。日本沿岸域で採取されたふぐおよび雑種ふぐ計 68 検体について、各個体を組織ごと（皮、筋肉、精巢、卵巣、肝臓）に分けて、テトロドトキシン（TTX）群を LC/MS/MS で分析した。日本沿岸域で採取されたフグおよび雑種ふぐについて、分析試料を調製し、機器分析によって各組織に含まれる TTX 類の毒力を算出した。その結果から、可食部位を判別した。皮については、トラフグ×マフグ（0.3-72.9 MU/g）、トラフグ×ゴマフグ（57.6 MU/g）、ゴマフグ×ショウサイフグ（0.1-55.9 MU/g）、ゴマフグ×マフグ（35 MU/g）が 10 MU/g を超過しており、可食部位として適さないことが明らかになった。コモンフグ×ショウサイフグ（3.8 MU/g）については個体数が少なく、判断できなかった。筋肉については、トラフグ×マフグ（0-10.6 MU/g）、ゴマフグ×ショウサイフグ（2.2-12.7 MU/g）が 10 MU/g を超過しており、可食部位として適さないことが明らかになった。ただし、これら雑種ふぐは一度冷凍してから腑分け作業を行っており、皮などの解凍の際、ドリップとともに隣接する組織から毒が移行した可能性が考えられる。精巢はいずれの雑種フグでも 10 MU/g 以下であった。卵巣と肝臓ではコモンフグ×ショウサイフグを除いて、いずれの種でも 10 MU/g を超過しており、可食部位として適さないことが明らかになった。

「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」では、北海道で採取されたホタテガイ、ならびに東北地方で採取されたホタテガイやカキ、アカガイなどの二枚貝について、公定法に従って調製した抽出液をマウスに投与し、毒力を求めた。また、同一試料を用いて、LC/MS/MS に適した分析試料を調製して、分析した。前年度の事業成果で、マウス毒性試験と機器分析法のそれぞれで求めた毒力に乖離があったため、分析する二枚貝種の範囲を広げて、さらに分析サンプル数も増加して、マウス毒性試験と機器分析法（LC/MS/MS）により求めたそれぞれの毒力の相関を調べた。ホタテガイに加えて、カキやアカガイなど分析する二枚貝種の範囲を広げて、マウス毒性試験の結果と機器分析の結果を調べた結果、二枚貝全体では近似曲線の傾きが 1 ではなく、0.5 程度まで低下した結果となり、前年度と同様の結果となった。そこで、ホタテガイを除いた二枚貝種で同様に相関を調べたところ、近似曲線の傾きは 0.85 となり、比較的よい一致が見られた。クロマトグラムや毒力を経時的に精査した結果、毒化してから時間が経過するほどに二枚貝代謝物 M-toxins の影響が高くなる傾向が見られた。このことから、ホタテガイ分析においては二枚貝代謝物 M-toxins の毒性を評価して毒性等価係数を求める必要があることが明らかと

なった。機器分析の際に必要な貝毒分析標準品については、主要な C1/2,GTX1-4,dcGTX2/3,neoSTX,dcSTX,STX の計 11 成分が考えられた。地域性のある毒としては、GTX5, GTX6 が考えられ、それらを含めると 13 成分となる。このほかに、二枚貝代謝物 M1、M3、M5 が必要な標準品として考えられる。本事業では、TTX を規制値付近まで含む二枚貝検体を確認するには至っていない。今後、TTX による中毒リスクについて更なる検討が必要である。

「汎用性の高い植物性自然毒の分析法の確立」では、食中毒の発生件数や死亡事例が多い 5 キノコ群（ツキヨタケ、カキシメジ、ドクツルタケ、カエントケ、ニセクロハツ）に含まれる低極性の毒成分および指標成分を定量するための分析法 1 について、目標とする判定基準（ML）を 1 mg/kg に設定し、検出限界（LOD）を評価したところ、全 7 成分で $LOD \leq 0.1 \text{ mg/kg} (= ML \cdot 1/10)$ となり、Codex の評価基準を満たした。また、シイタケとブナシメジを用いて 1 mg/kg での添加回収試験を実施したところ、絶対検量線で定量した 6 機関の平均添加回収率は 80-110%、HorRat ≤ 2 となり、Codex の評価基準を満たした。選択性を考慮に入れ、定量限界を 1 mg/kg に設定することで、正確な定性と定量が可能な汎用性の高い方法として有効であることが確かめられた。一方、アセタケ属などの幅広いキノコ群に含まれるムスカリンとテングタケ属などのキノコに含まれるアミノ酸型の毒成分を定量するための分析法 2 については、当初、APDS 試薬を誘導體化試薬として用いる予定であったが、シイタケを用いて添加回収試験を実施したところ、選択性と真度に問題があった。そこで、APDS と同じヒドロキシスクシンイミジルカルバメート型のアミノ酸誘導體化試薬である TAHS と AQC も検討に追加し、選択性や真度を見ながら分析法を再構築した。未市販の標準品の化学合成として、令和 3 年度に合成したニセクロハツのシクロプロピルアセチル-(R)-カルニチンに続き、令和 4 年度は、カキシメジのウスタル酸の合成に取り組んだ。全 10 工程の合成経路のうち、7 工程までを文献どおりの収率で進めることができ、重要な合成中間体である Phlebiarubrone を得た。

「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」では、R3 年度は、植物性自然毒のうちキノコ毒に着目し、令和 2 年までの 30 年間に厚生労働省へ報告されたキノコが原因と疑われる食中毒事件について、原因キノコの種類、発生時期や地域などの傾向を解析した。また、厚生労働省 HP「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整理し、更新版の全体の枠組み（統一様式や記載すべき項目）を決定した。R4 年度は、昨年度に決定した枠組みを踏まえて更新に必要な写真とその他の資料を収集し、次年度での完了を目指して更新作業を進めているところである。その中で、現行版の問題点を検討した際の聞き取りにおいて、写真及び毒成分の化学構造式の未掲載や不明瞭さが特に指摘されたことから、その改善には特に留意した。さらに、厚生労働省からの要請を受けて、台湾で生産されているアカマダラハタ (*Epinephelus fuscoguttatus*) とタマカイ (*E. lanceolatus*) を交配した養殖ハタのシガテラリスクについて検討した結果、リスクは極めて低いとの結論に至った。

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

松嶋 良次・水産技術研究所・グループ長

内田 肇・水産技術研究所・研究員

渡邊 龍一・水産技術研究所・主任研究員

小澤 眞由・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、ふぐ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、天然ふぐ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。雑種ふぐ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ふぐについて、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、雑種ふぐ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、雑種ふぐ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（以下、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、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. 雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握

調査地において水揚げされた選別前の天然ふぐ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ふぐの個体数を数える。種類不明ふぐの一部については、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、水揚げ地市場からふぐ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、また購入したふぐの鑑別が可能であれば鑑別を行い、雑種ふぐ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ふぐの DNA 試料（右胸鰭のエタノール固定試料）よりゲノム DNA を磁性ビーズまたはアルカリ法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ふぐ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。

東京都内に流通するふぐについては、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ふぐ検体を収集し、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。

ふぐ毒の分析は以下のように行った。北海道、秋田、宮城、茨城、千葉、神奈川で採取されたふぐおよび雑種ふぐ 68 検体について、皮、筋肉、精巣、肝臓、卵巣の各組織に腑分けした。腑分け前に一部冷凍した検体もあった。本事業で分析した検体について表 1-1 に示す。ふぐおよび雑種ふぐの皮、筋肉、精巣、肝臓については、組織 2.00 g に対し、0.1% 酢酸溶液 8 ml を添加し、ホモジナイズした。それを沸騰湯浴中で加温し、放冷して室温程度まで冷却後、遠心分離

して上清を回収し、適宜希釈して、機器分析に供した。

卵巣組織 2.00 g に対し、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。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 群の含量を算出した。

TTX の定量には、先の事業で調製し、定量 NMR にて値付けした TTX 標準物質を用いた。そのほかの類縁体については、東北大学山下教授より提供していただいたコモンフグ卵巣の活性炭処理液に含まれる成分を指標に定量した。

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。比較のため、別事業で行っているホタテガイ以外の二枚貝の分析データも合わせて検討する。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、特定物質であるサキシトキシン（STX）については、二枚貝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 標準品が必要か否かについて検証する。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。その他二枚貝についても同様とした。HILIC-MS/MS分析に供するホタテガイを含めた二枚貝試料は、*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提供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は当所が所有する標準液を用いた。C3/4は選択的反応モニタリング (SRM) トランジションを複数チャンネル設定し、確認検出を行った。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Oshima (1995) 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。

* Oshima, *J. AOAC int.* (1995) 78, p528.

B-3. 汎用性の高い植物性自然毒の分析法の確立

B-3-1. 分析対象化合物

試験室間妥当性評価の分析対象化合物としたキノコ毒 (または指標成分) 7成分を表2および図1に示した。

B-3-2. 試料

添加回収試験にシイタケ及びブナシメジ (生、市販品 (菌床栽培品)) を用いた。

B-3-3. 試薬・試液

α -アマニチン、ファロイジン (富士フィルム和光純薬 (株) 製)、 β -アマニチン、 γ -

アマニチン (Enzo Life Sciences 社製) の標準品 4成分は、メタノールに溶解し 100 μ g/mL の標準溶液を調製した。サトラトキシシン H (CAYMAN CHEMICAL 社製) の標準品は、アセトニトリルに溶解し 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。ニセクロハツの指標成分である CPAC は、既報¹⁾に基づき、化学合成したものを分取HPLCにより精製し、NMRにより構造を確かめたものを、200 μ g/mL のメタノール溶液として用いた。これらの7成分を混合し、メタノールにより希釈して、10 μ g/mL の混合標準溶液を調製した (キノコ毒7種混合標準溶液)。

内部標準は、安定同位体標識化合物のイソバレリル L-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)、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 μ g/mL の標準原液を調製した。これら3種の内部標準溶液を混合して、メタノールにより希釈し、10 μ g/mL の混合標準溶液を調製した (3種内部標準混合溶液)。これを希釈して 100 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) 製または富士フィルム和光純薬 (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) Matsuura, M., Kato, S., Saikawa, Y., Nakata, M. and Hashimoto, K. *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 602–608 (2016).

B-3-4. 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。

・ 機関①: Exion LC AD (Sciex)–5500+ QTRAP Activated (Sciex)

・ 機関②: Exion LC AD (Sciex)–5500+ QTRAP Activated (Sciex)

・ 機関③: Exion LC AD (Sciex)–5500+ QTRAP Activated (Sciex)

・ 機関④: LC-20A (SHIMADZU)–API4000QTRAP (Sciex)

・ 機関⑤: Exion LC AC (Sciex)–QTRAP4500 (Sciex)

・ 機関⑥: ACQUITY UPLC I class plus (Waters)–Xevo TQ-XS (Waters)

B-3-5. LC-MS/MS 測定条件

分析対象化合物としたキノコ毒 7 成分および内部標準 3 成分の LC-MS/MS 測定条件を表 3-1~3-4 および図 2 に示した。6 機関のうち機関①-⑤は Sciex 社の MS/MS、機関⑥は Waters 社の MS/MS であったことから、分析条件はそれぞれを代表して機関①および機関⑥の分析条件を示した。

分析カラムは、Waters 社製の XBridge Shield RP18 (2.1 mm ϕ \times 150 mm, 3.5 μ m) 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。

B-3-6. 試験溶液の調製

分析法 1 の試験溶液調製法を Scheme 1 に示した。

B-3-6.1. 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 $\times g$ 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。

B-3-6.2. 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 $\times g$ 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、60%メタノール溶液を用いて、以下のとおり定容したものを試験溶液とした。バイアルは不活性処理済みガラス製バイアルを用いた。

<機関①-③>

・ 試験溶液の定容量: 10 mL

・ 3 種内部標準混合溶液: 60%メタノール溶液、100 ng/mL、1 mL

<機関④-⑥>

・ 試験溶液の定容量: 5 mL

・ 3 種内部標準混合溶液: 60%メタノール溶液、100 ng/mL、0.5 mL

B-3-7. 定量

3 種内部標準混合溶液が 10 ng/mL とするように加え、0.2%TCA 含有 60%メタノール溶液 (機関①-③) または 0.4%TCA 含有 60%メタノール溶液 (機関④-⑥) により、0.1-50 ng/mL の標準溶液を調製した。それぞれ 5 μ L (機関⑥は 2 μ L) 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。内部標準の割り当ては表 2-1 または表 2-3 に従った。

B-3-8. 機器分析の検出限界 (LOD) および定量限界 (LOQ) の推定

B.7. 定量で作成した検量線について、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、LOD に近い濃度の試験溶液を選択して 7 回繰り返し測定し、ピーク面積の標準偏差 (σ) を求めた。LOD は $3\sigma/a$ により、LOQ は $10\sigma/a$ により算出した。

B-3-9. 試験室間妥当性評価の実施方法と添加回収試験

粉碎均質化したシイタケおよびブナシメジを 5 g ずつ 50 mL のポリプロピレン製遠心沈殿管に量り採り、-20℃以下で冷凍保管した。ブランク試験用に各 1 本ずつと、添加回収試験用に各 2 本ずつ、計 3 本ずつを-18℃以下で各機関に配布した。キノコ毒 7 種混合標準溶液 (10 µg/mL) および 3 種内部標準混合溶液 (10 µg/mL) も-18℃以下で各機関に配布した。

試料を解凍後、キノコ毒 7 種混合標準溶液 (10 µg/mL) を 0.5 mL 添加、混和して 30 分間静置して添加試料とした (添加濃度: 1 mg/kg)。各機関 2 回併行の添加回収試験を行い、B.7. 定量で作成した検量線で定量した結果を報告した。同時にブランク試験 1 試行を行い、定量を妨害するピークの有無を確認し、そのピーク面積を報告した。

B-3-10. 試験室間妥当性評価の評価項目と評価基準

目標とする判定基準 (ML) を食品中の濃度として 1 mg/kg に設定した。

LOD、LOQ、平均添加回収率、室間精度 (HorRat 値) の 4 項目は、Codex の手順書²⁾に記載されている評価基準により評価した。Codex の評価基準がない選択性と併行精度は、厚生労働省通知の妥当性評価ガイドライン³⁾ (以下、ガイドライン) の評価基準により評価した。

²⁾ CODEX ALIMENTARIUS

COMMISSION PROCEDURAL

MANUAL 27th ed. (2019).

³⁾ 厚生労働省通知「「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(改正:平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号)。

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

「自然毒のリスクプロファイル」は厚労省 HP に掲載予定のため、厚労省の食中毒担当部署 (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。「交配種のシガテラ中毒リスクにかかる検討」については、文献調査により検討した。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果と考察

C-1. 雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握

石川県輪島市における現地調査においては、2022 年 4 月 25 日および 27 日に底曳網で漁獲された計 1002 個体を鑑別した。その結果、各個体は 2 種 (マフグ、ショウサイフグ) 1001 個体と雑種と思われる種類不明ふぐ 1 個体に分けられた。種類不明ふぐについて、DNA マーカーによる種・雑種判別を行ったところ、純粋なマフグと判別された。これらの結果から、輪島市の調査における雑種の混獲率は 0% と推計された。なお、2022 年に石川県において延縄で漁獲され、トラフグとして石川県調理師会会員の店舗に納品された個体の中にトラフグ×マフグの雑種第一世代 (F1) 3 個体が発見されている。

秋田県秋田市・男鹿市における現地調査においては、2022 年 5 月 16~19 日に定置網で漁獲された計 679 個体を鑑別した。その結果、各個体は 5 種 (ショウサイフグ、ゴマフグ、マフグ、ヒガンフグ、トラフグ) 666 個体と雑種と思われる種類不明ふぐ 13 個体に分けられた。種類不明ふぐについて、DNA マーカーによる種・雑種判別を行ったところ、6 個体がトラフグ×マフグの F1、1 個体がゴマフグ×ショウサイフグの F1、1 個体がゴマフグ×マフグの F1、1 個体がトラフグ×マフグのトラフグ方向への戻し交雑

(BC)、1 個体がトラフグ×ゴマフグのトラフグ方向への BC、3 個体が純粋なゴマフグと判別された。これらの結果から、秋田県秋田市・男鹿市における雑種の混獲率は 1.47%と推計された。

北海道初山別村・神恵内村における現地調査においては、2022 年 6 月 8～10 日に定置網で漁獲された計 2000 個体を鑑別した。その結果、各個体は 1 種（マフグ）と雑種と思われる種類不明ふぐ 6 個体に分けられた。種類不明ふぐについて、DNA マーカーによる種・雑種判別を行ったところ、3 個体が純粋なマフグ、2 個体がトラフグ×マフグの F1、1 個体がゴマフグ×マフグのマフグ方向への BC と判別された。これらの結果から、北海道初山別村・神恵内村における雑種の混獲率は 0.15%と推計された。なお、2022 年に北海道において定置網で漁獲され、マフグとして稚内市内の水産加工業者に納品された個体の中にトラフグ×マフグの雑種第一世代（F1）1 個体が発見されている。

宮城県気仙沼市における現地調査においては、2022 年 7 月 14 日および 15 日に定置網で漁獲された計 4949 個体を鑑別した。その結果、各個体は 7 種（マフグ、シマフグ、クサフグ、ショウサイフグ、ヒガンフグ、ゴマフグ）と雑種と思われる種類不明ふぐ 1258 個体に分けられた。種類不明ふぐについて、DNA マーカーによる種・雑種判別を行ったところ、675 個体がゴマフグ×ショウサイフグの F1、132 個体がゴマフグ×ショウサイフグのショウサイフグ方向への BC、5 個体がゴマフグ×ショウサイフグのゴマフグ方向への BC、2 個体がゴマフグ×ショウサイフグの雑種第二世代（F2）、3 個体がコモンフグ×ショウサイフグの F1、441 個体が純粋なショウサイフグと判別された。これらの結果から、宮城県気仙沼市における雑種の混獲率は 16.5%と推計された。

石川県輪島市、秋田県秋田市・男鹿市、

北海道初山別村・神恵内村、および宮城県気仙沼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ふぐは選別されることなく水産加工業者等に購入され、加工施設内でふぐ処理者の監督下で選別・排除されていた。各施設のふぐ処理者の配置は、1 名から数名とまちまちだった。

各地点で採集された個体、水産加工会社などから提供された個体、および国立医薬品食品衛生研究所より提供された豊洲卸売市場に搬入時に雑種疑いで除外された個体のうち、DNA マーカーにより雑種と判別された計 98 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。

今年度実施された 4 地点および昨年度実施された 2 地点における調査結果から、漁獲された天然ふぐ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明らかになった。雑種の混獲率は宮城県気仙沼市において高く（13.35～16.50%）、天然ふぐの漁獲量の多い石川県や北海道においては低かった（0～0.15%）。また、石川県と北海道の中間的な位置にある秋田県では雑種の混獲率は 0.15%だった。石川県と北海道ではほぼマフグのみの漁獲であり、そのような場所では雑種は極めて少ない傾向があった。一方、ショウサイフグとゴマフグの雑種が多い宮城県では雑種の混獲率が突出して高い。また、石川県、秋田県、および神奈川県水産技術センターより試料の提供があった神奈川県（浦賀水道）などにおいて、トラフグを主な対象とする漁業の漁獲物に、比較的多くの雑種が含まれている可能性が示唆された。以上のように、昨年度および今年度の調査により、天然ふぐの主な水揚げ地における雑種ふぐの混獲率が明らかになった。

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ことが明らかになった。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すると共に、多数の遺伝子座を用いてそれらの正確な判別クラス判別を実施する必要があると考えられる。

雑種ふぐ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ふぐ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、ふぐ処理者の監督下で雑種ふぐが排除されていたことから、調査した範囲では、雑種ふぐ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ふぐ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。なお、今年度の調査では、少なくとも石川県や北海道では、トラフグとマフグの雑種が水産加工業者などに搬入され、排除されていることが明らかになっている。トラフグを主な対象とする延縄漁では、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。そのため、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。

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ふぐ検体を確保し、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。

東京都内に流通するふぐについて、令和 4 年度に外部形態に基づき交雑の疑いがあると判断されたふぐ計 38 個体を収集した。その内訳は、外見上で識別した結果ではあるが、ショウサイフグとゴマフグ 12 個体、トラフグとマフグ 9 個体、トラフグとショウサイフグ 4 個体、クサフグとショウサイフグ 3 個体、クサフグとショウサイフグ 2 個体、シマフグとマフグ、ゴマフグとショウサイフグ、およびショウサイフグとコモンフグ各 1 個体であった。また、外部形態上の特徴からトラフグと断定するに至らなかったのが 5 個体あり、うち 2 個体は養殖ふぐであった。(表 1-2)。漁獲海域は宮城県 (12 個体)、神奈川県 (11 個体)、千葉県 (10 個体)、長崎県 (2 個体)、福島県 (1 個体)、愛媛県 (1 個体)、青森県 (1 個体) で、主に東日本を中心とした太平洋沿岸であった。

雑種ふぐにおける各組織が喫食可能であるかを判断するため、各組織に含まれる TTX 含量を調べた。その結果、皮ではコモンフグ×ショウサイフグを除き、10 MU/g を上回る検体が複数認められた。例外となった本検体は 1 検体しか入手できなかったため、判断を保留した。トラフグは一般に皮は喫食可能と定められている。本調査で分析したトラフグ×マフグ、トラフグ×ゴマフグの個体では、10 MU/g を超える検体が多く認められ、辰野らが報告しているように、有毒部位の性質が雑種ふぐに継承されていることが明らかとなった。

筋肉については、トラフグ×マフグ、トラフグ×ゴマフグの雑種フグで 10 MU/g を超える検体が認められた。データを精査すると、これらの検体は腑分け前に一度冷凍していたため、保管中にドリップとともに皮から筋肉への毒の移行が起こったものと推察した。一方、生鮮状態で腑分けした検体からは、10 MU/g を超える TTX は検出されなかった。

精巢については、いずれの雑種ふぐも 10

MU/g を超える検体は認められなかった。ただし、コモンフグの精巢は喫食不可と定められている。これとの雑種であるコモンフグ×ショウサイフグは雌一頭しか入手できなかったため、この雑種ふぐにおける可食の判断については保留とした。

卵巣については、いずれの雑種ふぐも 10 MU/g をはるかに上回る結果となり、純種と同様、喫食は不可と判断した。

肝臓については、コモンフグ×ショウサイフグを除く雑種ふぐにおいて、10 MU/g をはるかに上回る毒力が検出されたため、喫食不可であると判断するのが適切と思われる。一方、コモンフグ×ショウサイフグは 1 頭しか入手できなかったため、個体数を増やした分析を行い、判断する必要がある。

検体数が比較的多く入手できたトラフグ×マフグとゴマフグ×ショウサイフグについて、毒性の雌雄差について検討した。トラフグ×マフグにおける皮、生殖腺、肝臓においていずれも雌の方が毒力が高かった。しかし、バラツキが大きく、統計的な有意差は認められなかった。ゴマフグ×ショウサイフグにおける皮については、雌雄差は認められなかったが、生殖腺と肝臓において、違いが認められ、雌の方が毒力が高かった。

毒性の組織分布について調べると、トラフグ×マフグの雌では、生殖腺と肝臓でほぼ全体の毒力が説明できた。ゴマフグ×ショウサイフグの雌では、生殖腺の割合が高く（～80%）、肝臓の割合は低かったが、この 2 組織でほぼ個体の毒力を説明できた。トラフグ×マフグの雄では、肝臓でほぼ全体の 8 割の毒力を説明できた。ゴマフグ×ショウサイフグの雄では、肝臓の割合が高く（～70%）、皮の割合は低かったが、この 2 組織でほぼ個体の毒力を説明できた。

TTX の類縁体も含めた毒力組成では、いずれの雑種ふぐでも雌雄差に関係なく、TTX が全体の 84%以上を占めた。これは、

毒力を把握する際に、TTX のみで十分モニタリングできることを示唆している。

TTX 類縁体の毒組成について雑種ふぐ間で比較してみると、マフグ、トラフグ×マフグ、ゴマフグ×マフグの雌において、5,6,11-trideoxy TTX の割合が 60%以上あった。この物質は最近になって、ふぐの誘引物質として報告されている物質である。雑種ふぐ雄における 5,6,11-trideoxy TTX の割合は 20-30%と低かった。また、組織における 5,6,11-trideoxy TTX 含量を調べてみると、卵巣に多く 60-80%近くを蓄積していることが明らかになった。マフグの雌で本毒を選択的に摂取または蓄積・変換している可能性が考えられる。

雑種ふぐを北海道、宮城、秋田、茨城、千葉、神奈川と様々な地域から採取したが、地域差は認められなかった。

また、体重による毒力との関係についても調べてみたが、相関は得られなかった。

C-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を主とした二枚貝（全 548 検体）を分析した。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。

2022 年度は北海道・東北地方のホタテガイ計 370 検体を分析した。その他別事業で実施した二枚貝類（アカガイ、アカザラガイ（中腸腺）、ムラサキイガイ、マガキ、マボヤ、トゲクリガニ、イワガキ、アサリ、エゾシカゲガイの全 9 種 178 検体）も同様に、MBA および HILIC-MS/MS で分析した。MBA による毒力は、2.0 MU/g -625 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 0.64 となり、MBA の方が HILIC-MS/MS の分析値よりも約 2 倍近く高いマウス毒力を示した。決

定係数は 0.85 であった。ホタテガイのみの近似曲線を作成すると、傾きが 0.61 (決定係数: 0.86) となり、二枚貝全体と相違はないが、ホタテガイを除く二枚貝類で近似曲線を作成すると、傾きが 0.84 (決定係数: 0.89) となり、MBA の結果とほぼ一致した。このことから、ホタテガイのみが、代謝物 M-toxins の影響を大きく受けていることが明らかになった。その他二枚貝ではそれほど M-toxins の影響はないと思われる。

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事例があるが、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、MBA と HILIC-MS/MS の毒力を縦軸に採り、サンプル番号を横軸にプロットした図を作成し、規制値との関連を調べた。

MBA と HILIC-MS/MS がともに 4 MU/g 未満の試料数は、70 試料(全体の 13%)であった。また、MBA と HILIC-MS/MS がともに 4 MU/g 以上の試料数は、374 試料(全体の 68%)であった。これによって、HILIC-MS/MS では、81%が正確に規制値で判断できることが判明した。残る 19%のうち、9% (50 試料) は疑陽性 (MBA で 4 MU/g 未満かつ HILIC-MS/MS で 4 MU/g 以上) であり、10% (54 試料) が疑陰性 (MBA で 4 MU/g 以上かつ HILIC-MS/MS で 4 MU/g 未満) と判断した。これらの結果より、一定数の疑陰性が生じることが明らかになった。ただし、この疑陰性も MBA で 12 MU/g 以上の試料はほぼすべてが HILIC-MS/MS で規制値以上と判断し、例外は 1 試料のみであった。

今年度は、同一地点の試料 (ホタテガイ中腸腺と可食部) を経時的に追跡したデータも取得した。ホタテガイ中腸腺を分析したところ、ホタテガイが高毒化する初期ご

ろまでは、MBA と HILIC-MS/MS の毒力はよく一致していた。毒化中期ごろから MBA と HILIC-MS/MS の毒力とに乖離が生じ、毒化後期になるとその乖離も小さくなり、良く一致する傾向が見られた。中腸腺を使用した貝毒監視は MBA の感度不足を補うために使用されてきたが、HILIC-MS/MS による貝毒監視は高感度検出が可能なので、可食部相当で実施するのが良いと思われる。

以上より、MBA と HILIC-MS/MS の分析結果が乖離している理由として、前年度と同様に、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。

特定物質である 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。2022 年度の北海道と東北地方の二枚貝を分析した結果では、毒組成に占める STX の割合は 2.4% - 64.9% (平均: 11.8%) の範囲であり、毒力に占める STX の割合は 3.6% - 83.9% (平均: 15.6%) であった。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明らかになった。この点に関しては、STX の鏡像異性体が、天然型 STX の代替として利用できることを実証しており、STX 鏡像異性体の普及が望まれる。

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、最大でも中腸腺 1g 当たり、1 MU 未

満であった。このことから、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も考えられるが、本結果においては TTX の寄与率は低いと言える。ただし、アカザラガイを別事業で測定し、TTX 量を調べたところ、約 1.2 MU/g-中腸腺 (最大値) で検出した。既報のような高毒力の試料は見つからなかったが、ホタテガイと比較して、同程度かそれ以上の TTX 蓄積能があることが推定される。

C-3. 汎用性の高い植物性自然毒の分析法の確立

C-3-1. 分析対象化合物と目標とする ML

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、カエンタケとなっている⁴⁾。分析法 1 の分析対象化合物とした 7 成分は、これらの有毒キノコのうちクサウラベニタケとカキシメジ以外のものに対応しており、致死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。

食中毒の発生件数が多いカキシメジの毒成分のウスタル酸は、市販の標準品が入手できなかったため、今回実施した試験室間妥当性評価の分析対象化合物に含めなかったが、令和 3 年度に実施した分析法の検討の際に、日本大学の早川教授から提供された合成品を用いて、1 機関での添加回収試験を実施したところ、良好な添加回収率と併行精度が得られている (添加濃度 0.5 mg/kg (n=3), 添加回収率 85.1%, 併行精度 4.2% (内部標準 (2, 2'-ビフェニルジカルボン酸) 補正あり); 添加回収率 82.0%, 併行精度 1.7% (内部標準補正なし))。また、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

の原因となるムスカリンとされるが、後者については、現在検討中の高極性のキノコ毒の分析法の対象化合物 (分析法 2) としている。

食中毒時の原因究明において、中毒残品に含まれる毒成分の濃度とその摂食量から、毒成分の摂取量を推定して、中毒の原因かどうかを判断することが、化学分析の目的である。しかし、中毒残品中の毒成分の濃度は、事例ごとに大きく異なる上、各毒成分の最小毒性量 (LOAEL) について、十分な知見が得られているわけではない。したがって、中毒原因かどうかを判断する基準 (ML) をどこに設定するかということは議論のしようがない。しかし、これまでに植物性自然毒中毒において、未調理の中毒残品に含まれる毒成分の量は 10 mg/kg 以上となることが多く、調理済み残品においても、0.1 mg/kg 以上となる事例が多いことから、ML の目標値を 1 mg/kg、LOD の目標値を 0.1 mg/kg 以下に設定して試験室間妥当性評価を実施した。

⁴⁾ 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).

C-3-2. 試験溶液の調製

試験溶液の定容量は、測定機器の測定感度に応じて、10 mL (0.01 g sample/mL、機関①-③) と 5 mL (0.02 g sample/mL、機関④-⑥) の 2 つを選択した。それぞれ、試験溶液の組成は、0.2%TCA 含有 60%メタノールと 0.4%TCA 含有 60%メタノールになっていると仮定して、検量線用の標準溶液はこれらの溶媒を希釈溶媒として調製した。

C-3-3. 機器分析の LOD および LOQ の推定

6 機関のうち機関①-⑤は Sciex 社の MS/MS、機関⑥は Waters 社の MS/MS であった。7 成分のうち、アマニタトキシン類の 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(+)) とネガティブモード (ESI(-)) の両極性で分析が可能であった。しかし、アマニタトキシン類の測定感度は、Sciex 社の MS/MS では ESI(-) が優れていたのに対して、Waters 社の MS/MS では ESI(+) が優れていたため、機関①-⑤は ESI(-) を、機関⑥は ESI(+) を採用した (表 2-1 および 2-3)。その他の 3 成分はいずれの機関も ESI(+) が適していた。

6 機関の機器分析の LOD および LOQ を表 3 に示した。LOD は、いずれの機関も 0.1 mg/kg を満たしていた。LOQ は、機関⑥のイルジン S において、0.4 mg/kg とやや高かったが、その他の機関は 0.2 mg/kg を下回り、ML に対して十分に低い LOQ を担保することが可能であった。

Codex の評価基準は、ML 1 mg/kg に対して、 $LOD \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ 、 $LOQ \leq 0.2 \text{ mg/kg}$ であるが、機関⑥のイルジン S の LOQ を除き、問題ないと考えられた。

C-3-4. 試験室間妥当性評価

C-3-4.1. 選択性

選択性の評価結果は、機関①-③と機関④-⑥で大きく異なっていた。機関①-③は Sciex 社の同一機種である。測定感度は、同じく Sciex 社の機器を使用した機関④と⑤よりも良好ではあるが、クロマトグラムのベースラインが高くノイズも大きかった。したがって、機関①-③については、ブランク試料のクロマトグラムにおいて、明らかな妨害ピークを認めた CPAC 以外について、分析対象化合物の保持時間付近のノイズについても、ピークと誤認するおそれがある場合はシグナルとみなし、ピーク面積を算出した (表 4-1 および 4-2)。一方で、機関④-⑥では、ベースラインが低く、CPAC 以外の成分でノイズをピークと誤認するおそれはなかった。

シイタケとブナシメジについて、ガイドラインに基づき、選択性を評価した結果を表 4-1 および 4-2 に示した。機関①-⑥のい

ずれも、シイタケおよびブナシメジで、CPAC の保持時間付近に妨害ピークが認められたが、その大きさは、目標とした ML の 1 mg/kg に相当するピーク面積の 1/10 未満となった。

機関①-③では、機器分析の LOQ が 0.2 mg/kg 以下となったが、シイタケのブランク試料で、機関①の□-アマニチン、機関②のα-アマニチンがガイドラインの許容範囲を超えていた。LOQ を ML の 1 mg/kg に設定した場合は、ガイドラインの許容範囲内であったことから、LOQ を 1 mg/kg に設定することとした。

C-3-4.2. 添加回収率

ML の 1 mg/kg における 6 機関の平均添加回収率は、内部標準補正がない場合、シイタケで 82.2-96.1%、ブナシメジで 85.8-96.8% となった (表 5-1 および 5-2)。また内部標準補正を行った場合は、シイタケで 78.0-93.0%、ブナシメジで 80.0-95.6% となった (表 5-3 および 5-4)。

Codex の評価基準は添加濃度 1 mg/kg で 80-110% であるが、内部標準補正を行った場合にシイタケのイルジン S で 78.0% となり、唯一評価基準を下回った。内部標準は、各毒成分の個別の分析法に関する文献^{5), 6)} や化学構造の類似性等を考慮して選択した。イルジン S は適切な内部標準がなく、アマニタトキシン類の内部標準として用いたバージニアマイシン B を仮に選択したが、今回の結果からは適切な内部標準とはいえず、より適切な内部標準が求められる。

⁵⁾ Nomura, M., Suzuki, Y., Kaneko, R., Ogawa, T., Hattori, H., Seno, H. and Ishii, A. *Forensic Toxicol.* **30**, 185-192 (2012).

⁶⁾ Ohta, H., Watanabe, D., Nomura, C., Saito, D., Inoue, K., Miyaguchi, H., Harada, S. and Aita, Y. *Forensic Toxicol.* **39**, 101-113 (2021).

C-3-4.3. 併行精度

MLの1 mg/kgにおける6機関の併行精度 (RSDr) は、内部標準補正がない場合、シイタケで 2.6-6.4%、ブナシメジで 2.0-9.7%となった (表 5-1 および 5-2)。また内部標準補正を行った場合は、シイタケで 3.6-10.8%、ブナシメジで 2.9-8.2%となった (表 5-3 および 5-4)。

ガイドラインの目標値は添加濃度 1 mg/kg で 10%未満であるが、内部標準補正を行った場合にシイタケのサトラトキシシン H で 10.8%となり、目標値をやや上回ったが、それ以外は良好な結果であった。

C-3-4.3. 室間精度

MLの1 mg/kgにおける6機関の室間精度 (RSDr) は、内部標準補正がない場合、シイタケで 7.5-21.5%、ブナシメジで 7.4-18.7%となった (表 5-1 および 5-2)。また内部標準補正を行った場合は、シイタケで 11.5-27.1%、ブナシメジで 7.6-22.2%となった (表 5-3 および 5-4)。

Codex の評価基準は、添加濃度 1 mg/kg で HorRat 値 \leq 2 であり、いずれの場合も評価基準を満たした。

C-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-4-1. 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

自然毒のリスクプロファイルの更新にあたり、昨年度の分担研究において、現行版の問題点を洗い出した上で厚労省担当部署と協議し、更新作業の優先課題として、様式や記載項目の統一、より鮮明で特徴を捉えた写真の掲載、現行版で写真が未掲載のものについての入手・掲載、新しい知見の反映、引用・参考資料の記載、が挙げられた。現在、必要な写真と資料を入手しつつ更新作業を進めている最中であり、令和 5 年度の研究事業での完成を目指している。

C-4.2. 台湾産養殖ハタのシガテラリスクについて

厚生労働省からの要請により、今年度の分担研究において、台湾で生産されているアカマダラハタとタマカイを交配した養殖ハタのシガテラリスクについて検討した。

C-4.2.1. 経緯

現在、台湾において生産されているアカマダラハタ (*Epinephelus fuscoguttatus*) とタマカイ (*E. lanceolatus*) の交配種 (通称: 龍虎ハタ) の日本への輸出が要望されている。同交配種は親魚にシガテラ毒魚として我が国への輸入が禁止 (食品衛生法第 6 条第 2 号) されているアカマダラハタを用いていることから、本研究班においてその安全性について調査・検討を行った。交配種の生産についての概要は以下のとおりである。

- 1) 雄のタマカイと雌のアカマダラハタ (いずれも養殖) を人工授精により交配して得た稚魚を陸上養殖にて幼魚まで育成し、陸上又は海上養殖にて成魚に育成。
- 2) 交配種は特有の体色と縞模様を有しており、アカマダラハタをはじめ他のハタ科の魚と視覚的に識別が可能。
- 3) 陸上養殖は台湾沿岸の海水を砂層ろ過した後、沈殿や生物ろ過により浄化して使用。
- 4) 餌は主に人工配合飼料を使用しているほか、成魚の養殖において一部生き餌 (シガテラ毒魚分布海域外のサバ) を使用。
- 5) 交配種のシガトキシシン検査 (マウス試験及び ELISA) は陰性^{1) 2)}。2021 年の生産量は約 8,000 トンで、ほぼ中国や香港等に輸出。これまでにシガテラ中毒の報告なし。

C-4.2.2. 交配種のシガテラ中毒リスクにかかる検討項目

1) シガテラ毒魚の毒化機構

調査方法として、FAO/WHO 合同専門家会議によりまとめられた「Report of the

Expert Meeting on Ciguatera Poisoning (2018)』³⁾を中心にこれまでに報告されている知見を調べた。シガテラ中毒の原因毒であるシガトキシン (CTX) は底生有毒渦鞭毛藻類である *Gambierdiscus toxicus* により産生されることが明らかにされている²⁾。*G. toxicus* は約 20 年間にわたり本属唯一の種であったが、近年、16 種 (*G. australes*, *G. balechii*, *G. belizeanus*, *G. caribaeus*, *G. cheloniae*, *G. carpenteri*, *G. carolinianus*, *G. excentricus*, *G. pacificus*, *G. polynesiensis*, *G. scabrosus*, *G. toxicus*, *G. silvae*, *G. lapillus*, *G. honu*, *G. jejuensis*) に再分類されている。さらに、これらの中から新たに *Fukuyoa* 属が再分類され、現在では 20 種を超える種が *Gambierdiscus* 属と *Fukuyoa* 属に含まれている。現在、シガテラ中毒原因毒として知られている CTX 群を産生する種は、新たに分類された種の中の *G. polynesiensis*, *F. palulensis* の 2 種である³⁾。シガテラ中毒の原因毒である CTX 群は、大型肉食魚に加えて、藻食魚、巻貝などからも検出されている。大型肉食魚の毒化は、(1) 有毒藻類が付着した海藻などを摂餌して CTX 群を蓄積した小型藻食魚や (2) CTX 群を蓄積した巻貝などの餌生物を通じた食物連鎖により CTX 群を蓄積することにより起きるとされている。

2) 毒化した親魚から生まれた稚魚の毒化可能性

南台湾で発生したシガテラ中毒事例では、バラクーダ (カマス) の魚卵を喫食したことによる中毒事例が報告されている。さらに、喫食した魚卵は 0.05 MU/g の毒力を有していたことが CTX 検査法であるマウス試験により確認された⁴⁾。こうした事例から、アカマダラハタの魚卵にも CTX が蓄積されるリスクはあり、毒化した親魚から生まれた稚魚が CTX を有するリスクもある。一方、メダカ (*Oryzias latipes*) の胚にシガト

キシン (CTX3C) を 0.1-0.9 ppb の濃度で投与することにより発育異常が観察され、1.0-9.0 ppb の濃度では顕著な孵化異常が観察されており、サンゴ礁魚が毒化することによりその繁殖に影響を及ぼしている可能性が示唆されている⁵⁾。

いずれにせよ、交配種の親魚である雌のアカマダラハタ (*Epinephelus fuscoguttatus*) と雄のタマカイ (*E. lanceolatus*) は、いずれも養殖により得られたものとされており、その過程で餌の管理がなされていれば卵に CTX を蓄積するリスクは低いと考えられる。

3) シガテラ毒魚の交雑種の毒化可能性

「Report of the Expert Meeting on Ciguatera Poisoning (2018)」³⁾によると、これまでに 425 種以上の魚介類がシガテラ中毒に関与したことが報告されているが、本報告書では、シガテラ毒魚の交雑種に関する記述はなかった。シガテラ毒魚の交雑種の分子生物学的な判別法に関する研究例は極めて少なく、シガテラ毒魚の交雑種の判別は困難であることから、本報告書においてシガテラ毒魚として報告された魚種の中には、シガテラ毒魚の交雑種が含まれている可能性は排除できない。

2019 年以降に公表された学術論文を検索したところ、シガテラ毒魚の交雑種に関する論文が 1 件見つかった⁶⁾。この論文によると、2016 年に米国ヴァージン諸島沖で複数の交雑魚が捕獲され、その中に高級魚として地域で珍重されている Yellowtail snapper (*Ocyurus chrysurus*) とシガテラ毒魚として喫食が制限されている Schoolmaster snapper (*Lutjanus apodus*) の交雑種が含まれていることが明らかになった。シガテラ毒魚の交雑種の同定はゲノム解析により行われた。また、神経芽腫細胞毒性試験により、Yellowtail snapper から 0.019 ppb のカリビアンシガトキシン (C-

CTX) が検出されたのに対して、交雑種からは 0.038 ppb の C-CTX が検出された。LC/MS/MS により、有毒試料から C-CTX-1 が検出されたことから、細胞毒性試験の毒力は C-CTX-1 等量と考えられる。本研究で報告された交雑魚から検出された毒力は、米国 FDA のガイダンスレベルである 0.1 ppb C-CTX-1 eq.を下回っていた。

今後、交雑種の判別手法が開発され普及し、調査研究が進むことにより、シガテラ毒魚の交雑種の出現や交雑種から CTX 群が検出される事例は増えると思われる。

4) 毒化要因を排除した環境で養殖された交配種の毒化可能性

これまでの知見に鑑みて、養殖された交配種については、餌の中に CTX が含まれていなければ毒化する可能性は極めて低い。一方、飼育海水に混入した有毒藻類による養殖魚の毒化リスクについての知見は極めて少ないが、米国ハワイ沖の大規模沖合養殖施設で飼育されている養殖魚ヒレナガカンパチ *Almaco Jack (Seriola rivoliana)* をオープンケージで飼育した事例では、*Gambierdiscus* 有毒藻類が平均で 142 細胞 / g 藻類の密度で当該養殖海域に出現しても養殖魚から CTX 群は検出されないことが報告されており、シガテラ海域においてもオープンケージで飼育した養殖魚の毒化リスクは極めて低いと結論付けている⁷⁾。飼育海水に混入した有毒藻類による養殖魚の毒化リスクについては、原因渦鞭毛藻は付着性であり、飼育環境下の囲い等に付着する可能性はあるが、養殖魚は肉食性であり有毒藻類を直接摂餌する可能性は低く、養殖交配種が毒化する可能性は低いと考えられる。

台湾において陸上養殖されている交配種については、(1) 台湾沿岸の海水を砂層ろ過した後、沈殿や生物ろ過により浄化して使用し、また(2) 餌は主に人工配合飼料が

使用されているほか、一部の成魚の養殖において使用されている生き餌もシガテラ毒魚分布海域外の魚であるとされており、これらの管理が適切に行われている限りは、CTXにより毒化するリスクは低いと考えられる。また、既に十分な食経験もあり、シガテラ中毒事例も報告されていないことから、シガテラ中毒の懸念は極めて低いと言える。

E. 結論

E-1. 雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握

雑種ふぐの発生状況には地域差があり、その原因として主な漁獲対象種や漁法の違いがあげられる。漁獲物の大半をマフグが占める天然ふぐの主な水揚げ地では雑種の混獲率が低く、それ以外の種を対象とする水揚げ地での雑種の発生が高い傾向がある。従って、次年度はマフグ以外の種の水揚げ地における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、その割合や毒性をより詳細に明らかにしていく必要がある。

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ふぐ計 38 個体を確保し、これらの採取海域、次期、外部形態上の特徴などの情報を収集・整理した。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ふぐ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。

トラフグとの雑種においては、皮はトラフグで喫食可能であっても雑種ふぐになると交雑相手の皮が有毒部位である場合には、その性質が継承され、可食に適さないことが明らかになった。皮が可食部位となっているシマフグがトラフグの交雑相手の場合は、喫食可能部位となる可能性も考えられる。その他の雑種ふぐは、可食部位が同じふ

ぐ同士の交配のため、そのままの形質を受け継いでいるものと思われる。本年度は試料が入手できず、十分な可食判定ができなかった、コモンフグとショウサイフグの交配雑種については試料数を増やして分析し、精巢の可食可能性について評価する必要があるものと思われる。

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およびその他二枚貝類（計 548 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 で求めた毒力の約半分程度であり、昨年度と同様の傾向を認めた。しかし、今年度はその他二枚貝類も測定し、それらは MBA と比較的良好一致を示したことから、ホタテガイ特有の問題であることが明らかになった。両手法（MBA と HILIC-MS/MS）の検査結果が乖離した要因として、ホタテガイに比較的多く含まれる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。

特定物質である 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（～85%）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。この点に関しては、当研究班で STX 鏡像異性体が天然型 STX と同様に使用可能であることを立証しており、STX 鏡像異性体の普及が望まれる。

北海道・東北地方のホタテガイに含まれる TTX 含量は極めて少なく、1 MU/g 未満であることから、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・地域によっては著量の TTX を含む場合もあるので、貝種・地域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

食中毒の発生件数や死亡事例が多い 4 キノコ群（ツキヨタケ、ドクツルタケ、カエントケ、カキシメジ）に含まれる毒成分 8 成分とニセクロハツの指標成分であるシクロプロピルアセチル-(R)-カルニチン（CPAC）の 9 成分の分析法として開発した分析法 1 について、市販の標準品が入手可能であった 7 成分を用いて、6 機関による試験室間妥当性評価を実施した。目標として設定した ML 1 mg/kg に対して、LOD ≤ 0.1 mg/kg (= ML · 1/10)、シイタケとブナシメジを用いた 1 mg/kg での添加回収試験の平均添加回収率は、絶対検量線で定量した場合 82.2-96.8%、HorRat 値 ≤ 2 となり、Codex の評価基準を満たした（表 6）。選択性を考慮に入れ、定量限界を 1 mg/kg に設定することで、正確な定性と定量が可能な汎用性の高い方法として有効であることが確かめられた。

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

「自然毒のリスクプロファイル」は一般消費者に限らず、研究者、地方自治体、メディアなどの情報源にもなっており、ユーザーの裾野はとても広い。例えば、地方自治体の HP では、食中毒に関する情報提供のページで自然毒のリスクプロファイルを参考資料として紹介しリンクを貼っているところも多い。また、食中毒が発生した際は、メディアが自然毒のリスクプロファイルの写真を転載しているのをよく目にする。食品衛生の研究者の会合では、参考にしていないとの発言が出る一方で、記載内容について修正が必要なのではないかとの指摘も耳にすることがある。本分担研究で全般的な更新を行うことによって、消費者をはじめとした多くの人にとって、より有用な参考資料になることが期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Qiushi Li, Dorothea Lindtke, Carlos Rodríguez-Ramírez, Ryo Kakioka, Hiroshi Takahashi, Atsushi Toyoda, Jun Kitano, Rachel L. Ehrlich, Joshua Chang Mell and Sam Yeaman. 2022. Local adaptation and the evolution of genome architecture in threespine stickleback. *Genome Biology and Evolution*. DOI: 10.1093/gbe/evac075

2) Yoshiyasu Machida, Hiroshi Takahashi, Tetsuya Tsuruta and Akira Goto. 2022. Effect of salinity on nest building behaviour in the nine-spined stickleback *Pungitius sinensis*. *Journal of Fish Biology*. DOI: 10.1111/jfb.15264

3) 辰野竜平, 吉川廣幸, 井野靖子, 福田翼, 古下学, 岸本謙太, 木下政人:トラフグ *Takifugu rubripes* 成熟個体におけるテトロドトキシン蓄積の雌雄差. *日本水産学会誌*, 88(4), 294-299. DOI: 10.2331/suisan.22-00007

2. 学会発表

1) Yo Yamasaki, Tomoyuki Kokita, Koki Kato, Asato Irifune, Mitsuki Kuroda, Hiroshi Takahashi, Yoshiyasu Machida, Asano Ishikawa, Mikiko Tanaka, Seiichi Mori, Atsushi Toyoda, Jun Kitano. Determinism and contingency in the genetic basis of parallel armor plate evolution of sticklebacks. *Congress of the European Society for Evolutionary Biology*. Prague Congress Centre, Prague, Czech Republic. August, 2022.

2) 梁田椋也・楠永 楓・高橋 洋. キタ

ノトミヨにおける卵サイズの遺伝基盤の解明. *日本魚類学会年会*. 大阪公立大学杉本キャンパス, 2022年9月.

3) 高橋 洋・柿岡 諒. 日本産トラフグ属魚類全11種 (*Takifugu spp.*) の種・雑種判別マーカーの開発. *日本魚類学会年会*. 大阪公立大学杉本キャンパス, 2022年9月.

4) 登田美桜: 食中毒の原因となる有毒植物の近年の傾向、第44回日本中毒学会学術集会・教育講演、Web開催、2022年7月.

3. 著書

4. 行政関係者向け説明会

1) 令和4年度「地域保健総合推進事業」地方衛生研究所地域ブロック専門家会議(理化学部門)、麻痺性貝毒の機器分析法および簡易分析キットの概要、令和4年10月14日、青森県観光物産館アスパム9階津軽、約20名、地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部衛生科学研究部会部会長、概要: 二枚貝が毒化する仕組みから、現在の貝毒監視体制に触れ、AOAC法となっているプレカラム・ポストカラム蛍光化法並びに質量分析を用いた方法、簡易分析キットについて概要を説明した。

2) 友澤潤子、南谷臣昭、岩附綾子、竹内浩、吉村英基、谷口賢、吉岡直樹、野村千枝、山口瑞香、阿部尚仁、鈴木敏之、登田美桜: わが国の主な有毒きのこの多成分分析法、第59回全国衛生化学技術協議会年会、川崎市、2022年10月

3) 南谷臣昭: 健康危機管理事案を想定した植物毒の一斉分析について、令和4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/京都市、2022年11月

4) 登田美桜：自然毒食中毒に関する情報ネットワークについて、令和4年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静ブロック会議、Web開催、2022年8月

5) 登田美桜：植物性自然毒に関する最近の話題、令和4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／京都市、2022年11月

5. その他

1) 高橋 洋. トラフグ属魚類の種・雑種判別技術. 水産界 1659号 (2023年4月号) : 36-37 (2023)

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

表 1-1 本事業で分析に供したフグおよび雑種ふぐの試料情報

種	性別		試料情報	
	雌	雄	標準体長 (mm)	体重 (g)
トラフグ×マフグ	14	16	213-410	327-3355
ゴマフグ×ショウサイフグ	10	12	165-272	134-751
ゴマフグ×マフグ	1	0	326	682
トラフグ×ゴマフグ	1	0	365	1209
コモンフグ×ショウサイフグ	0	1	173	175
トラフグ	1	3	214-320	342-1478
マフグ	2	1	300-335	752-1108
ゴマフグ	1	2	212-305	252-916
ショウサイフグ	1	0	212	290
コモンフグ	2	0	163-205	105-314

表 1-2. 雑種疑いふぐ検体に関わる成績概要

試料番号	管理番号	採集地	採集年月	観察記録・意見	外観から予想された交雑状況	種鑑別結果 (SNPs) *	mtDNA 結果
1		愛媛県	2022年3月	背中と腹に小棘あり (全体ではない)。ヒレはうっ血し赤いが、黄色味がかかる。体側中央に黄帯ある。しま模様が途切れている。	シマフグ×マフグ?		
2		神奈川県	2022年3月	トラフグ様。白斑が頭まである。棘はある。黄帯は口元～胸鰭手前まで明瞭。	トラフグ×マフグ?		
3		神奈川県	2022年3月	トラフグ様。白斑が頭まである。棘はある。黄帯は口元～胸鰭手前まで明瞭。	トラフグ×マフグ?		
4		千葉県	2022年4月	ゴマフグ様。棘は全くなく、尻ビレは黄色。シヨウサイフグの模様に類似。	ゴマフグ×シヨウサイフグ?		
5		神奈川県	2022年7月	クサフグ様。棘なし、尾ビレ下端が白色。	クサフグ×シヨウサイフグ?		
6		神奈川県	2022年7月	クサフグ様。棘なし、尾ビレ下端が白色。	クサフグ×シヨウサイフグ?		
7		神奈川県	2022年7月	クサフグ様。棘なし、尾ビレ下端が白色。	クサフグ×シヨウサイフグ?		
8		神奈川県	2022年7月	クサフグ様。棘なし、尾ビレ下端が若干白色。	クサフグ×シヨウサイフグ?		
9		神奈川県	2022年7月	クサフグ様。棘なし、尾ビレ下端が若干白色。	クサフグ×シヨウサイフグ?		
10		宮城県	2022年8月	シヨウサイフグ様。尻ビレが黄色。背側、腹側に痕跡様の弱い棘あり。尾ビレ下端が黄色。	シヨウサイフグ×ゴマフグ?		
11		宮城県	2022年8月	シヨウサイフグ様。尻ビレが黄色。背側、腹側の一部がザラつくが明確な小棘とはいえない	シヨウサイフグ×ゴマフグ?		
12		宮城県	2022年8月	シヨウサイフグ様。尻ビレが黄色。背側、腹側の一部がザラつくが明確な小棘とはいえない	シヨウサイフグ×ゴマフグ?		
13		宮城県	2022年8月	シヨウサイフグ様。尻ビレが黄色。腹側に弱い小棘あり。	シヨウサイフグ×ゴマフグ?		
14		宮城県	2022年8月	シヨウサイフグ様。尻ビレが黄色。棘はない。	シヨウサイフグ×ゴマフグ?		
15		宮城県	2022年8月	シヨウサイフグ様。尻ビレが黄色。棘はない。	シヨウサイフグ×ゴマフグ?		
16		宮城県	2022年8月	シヨウサイフグ様。尻ビレが黄色。背側、腹側の一部がザラつくが明確な小棘とはいえない	シヨウサイフグ×ゴマフグ?		
17		宮城県	2022年8月	シヨウサイフグ様。尻ビレが黄色。背側、腹側の一部がザラつくが明確な小棘とはいえない	シヨウサイフグ×ゴマフグ?		
18		宮城県	2022年8月	シヨウサイフグ様。尻ビレが黄色。棘はない。	シヨウサイフグ×ゴマフグ?		
19		宮城県	2022年8月	シヨウサイフグ様。尻ビレが黄色。棘はない。	シヨウサイフグ×ゴマフグ?		
20		宮城県	2022年9月	トラフグ様。口ばし付近に薄い黄帯あり	トラフグ×マフグ?		

21	宮城県	2022年9月	ショウサイフグ様。尻ビレが黄色、棘が薄く、ざらつく程度	ショウサイフグ×ゴマフグ？
22	神奈川県	2022年10月	マフグとして入荷。体側に黄帯、尻ビレは紅色。白い縁取りがある大黒斑あり	トラフグ×マフグ？
23	青森県	2022年10月	トラフグ様。背に棘がほんの一部弱いものがある。腹は全体に棘があるが弱い。くちばし付近、尻ビレに薄黄色の線。	トラフグ×マフグ？
24	千葉県	2022年11月	黄帯あり。背、腹に棘なし。顔に茶褐色斑点模様。大黒斑あり。尻ビレ黄色	トラフグ×ショウサイフグ？
25	千葉県	2022年11月	体表の模様はショウサイフグ様だがコモンフグにも類似。黄帯あり。棘なし。尾ビレは白色	ショウサイフグ×コモンフグ？
26	千葉県	2022年11月	ショウサイフグ様、黄帯なし。尻ビレは淡黄色。棘なし。模様がゴマフグに類似	ショウサイフグ×ゴマフグ？
27	千葉県	2022年12月	トラフグ様、模様はショウサイフグに類似。大黒斑あり。背、腹に弱い棘あり。黄帯あり	トラフグ×ショウサイフグ？
28	長崎県	2023年1月	トラフグ様。棘あり。大黒斑に加え小黒斑多め。尻ビレ白色。くちばし近く少し黄色い	トラフグの交雑種？
29	長崎県	2023年1月	トラフグ様。棘あり。大黒斑に加え小黒斑多め。尻ビレ白色。	トラフグの交雑種？
30	福島県	2023年1月	トラフグ様。棘あり。大黒斑に加え小黒斑多め。尻ビレ白色。	トラフグの交雑種？
31	千葉県	2023年1月	トラフグ様。棘あり。大黒斑に加え小黒斑多め。尻ビレ白色。	トラフグの交雑種？
32	千葉県	2023年1月	背の棘は弱く、腹は極弱。大黒斑の辺縁は白色。尻ビレは白だが少し黄色。黄帯あり。顔の模様はショウサイ、背中模様はトラフグ幼魚様。トラフグ様。棘、大黒斑あり。尻ビレは白色。	トラフグ×ショウサイフグ？
33	千葉県	2023年1月	背や大黒斑から尾ビレに向かって白スポットが多数。トラフグの幼魚に類似するが顔の模様まで白斑が多数ある。	トラフグ×ショウサイフグ？
34	千葉県	2023年2月	トラフグ様。棘あり。大黒斑に加え、小黒斑多め。尻ビレ白色。白地が緑色（濃い）	トラフグの交雑種？
35	神奈川県	2023年2月	トラフグ様。背・腹の棘は弱い。大黒斑あり。尻ビレ白色。黄帯あり。	トラフグ×マフグ？
36	神奈川県	2023年2月	トラフグ様。背・腹の棘は弱い。大黒斑あり。尻ビレ白色。黄帯あり。	トラフグ×マフグ？
37	神奈川県	2023年2月	トラフグ様。背・腹の棘は弱い。大黒斑あり。尻ビレ白色。黄帯あり。	トラフグ×マフグ？
38	千葉県	2023年3月	トラフグ様。背・腹の棘は弱い。大黒斑あり。尻ビレ白～レモン色。黄帯あり。吻～尾ビレに黄帯あり。	トラフグ×マフグ？

*BC, 戻し交配 (Back Cross) ; F1, 雑種第1代.

表2 分析対象化合物と対応する主な有毒キノコ
 (分析法1、カキシメジのウスタル酸を除く)

Group	No.	化合物名	CAS No.	主なキノコ種
1	1	シクロプロピルアセチル- (<i>R</i>)-カルニチン		ニセクロハツ
2	2	イルジン S	1149-99-1	ツキヨタケ
3	3	サトラトキシン H	53126-64-0	カエンタケ
4	4	α -アマニチン	23109-05-09	ドクツルタケ
	5	β -アマニチン	21150-22-1	シロタマゴテングタケ
	6	γ -アマニチン	21150-23-2	
	7	ファロイジン	17466-45-4	

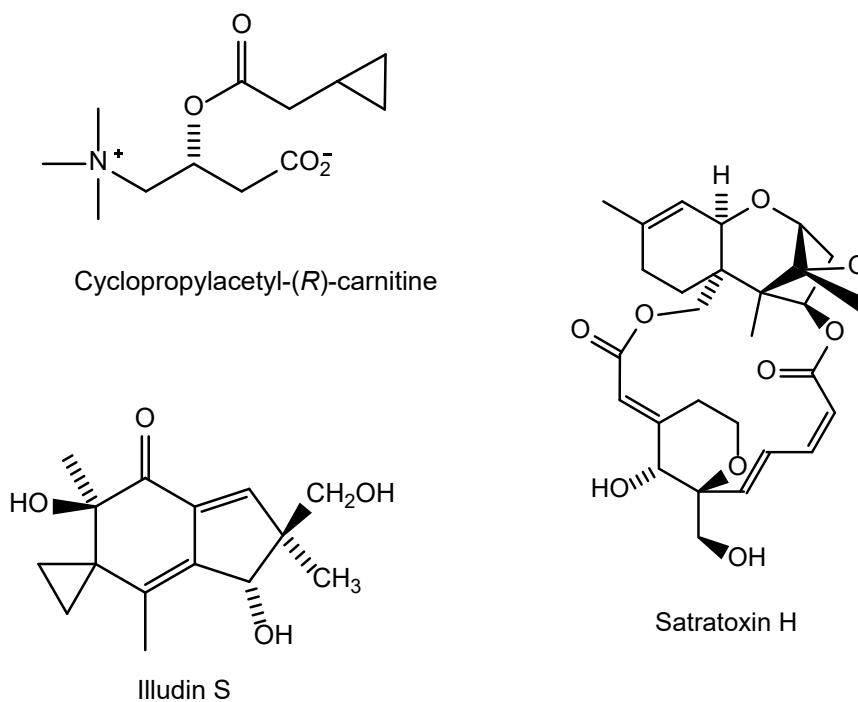
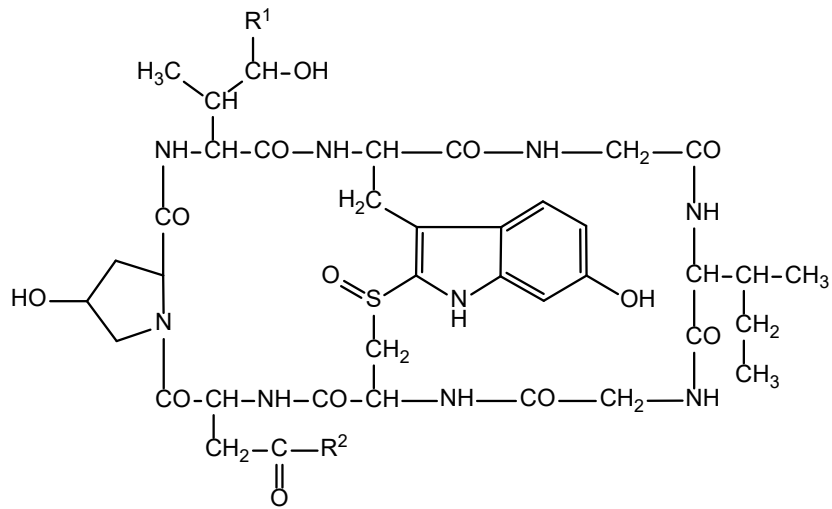
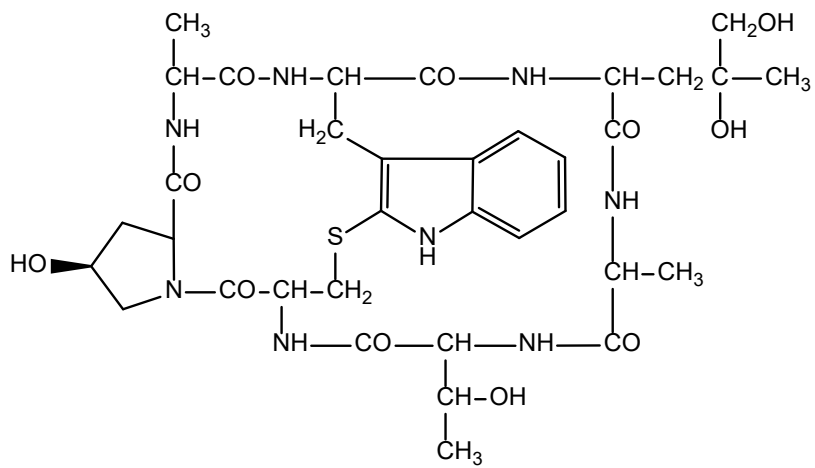


図1 分析対象化合物の化学構造 (分析法1)



$R^1 = \text{CH}_2\text{OH}, R^2 = \text{NH}_2$ α -Amanitin
 $R^1 = \text{CH}_2\text{OH}, R^2 = \text{OH}$ β -Amanitin
 $R^1 = \text{CH}_3, R^2 = \text{NH}_2$ γ -Amanitin



Phalloidin

図 1 分析対象化合物の化学構造 (分析法 1) (つづき)

表 3-1 有毒キノコの毒成分の保持時間、SRM トランジション条件および内部標準の割り当て（分析法 1、機関①、保持時間順）

No.	化合物名 (和名)	化合物名 (英名)	分子式	分子量	モノアイソトピック 質量	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサー イオン	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	内部標準
1	シクロプロピルアセチル- (R)-カルニチン	Cyclopropylacetyl-(R)- carnitine	C ₁₂ H ₂₇ NO ₄	243.30	243.1471	3.5	+	[M+H] ⁺	244.3	85.1	46	29	14	イソバレリルカルニチン-d9
									244.3	185.0	46	19	10	
2	α-アマニチン	α-Amanitin	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₄ S	918.97	918.3542	5.0	-	[M-H] ⁻	917.3	899.4	-135	-38	-21	バージニアマイシンB
									917.3	917.5	-135	-8	-19	
3	β-アマニチン	β-Amanitin	C ₃₉ H ₅₃ N ₉ O ₁₅ S	919.96	919.3382	5.4	-	[M-H] ⁻	918.3	900.5	-135	-42	-21	バージニアマイシンB
									918.3	918.5	-135	-10	-23	
4	イルジンS	Illudin S	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264.32	264.1362	5.4	+	[M+H] ⁺	265.1	217.2	41	13	14	バージニアマイシンB
									265.1	247.2	41	11	14	
5	γ-アマニチン	γ-Amanitin	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₃ S	902.97	902.3593	5.5	-	[M-H] ⁻	901.4	883.5	-140	-38	-15	バージニアマイシンB
									901.4	901.5	-140	-8	-19	
6	ファロイジン	Phalloidin	C ₃₅ H ₄₈ N ₈ O ₁₁ S	788.87	788.3163	6.8	-	[M-H] ⁻	787.3	743.4	-145	-44	-11	バージニアマイシンB
									787.3	787.5	-145	-10	-13	
7	サトラトキシシン H	Satratoxin H	C ₂₉ H ₃₆ O ₉	528.59	528.2359	8.8	+	[M+H] ⁺	529.4	231.3	81	25	12	ジアセトキシシルペノール
									529.4	245.2	81	23	14	

上段：定量トランジション、下段：確認トランジション

表 3-2 内部標準の SRM トランジション条件（分析法 1、機関①、保持時間順）

No.	化合物名 (和名)	化合物名 (英名)	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサー イオン	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	備考
IS1	イソバレリル L-カルニチン-d9	Isovaleryl L-carnitine-d9	4.0	+	[M+H] ⁺	255.3	85.1	51	31	14	シリンジスパイク
IS2	ジアセトキシ シルペノール	Diacetoxy- scirpenol	7.4	+	[M+NH ₄] ⁺	384.2	307.2	56	17	18	シリンジスパイク
IS3	バージニアマイシン B	Virginiamycin B	9.3	+	[M+H] ⁺	867.4	663.4	106	37	22	シリンジスパイク
						865.3	177.2	-120	-58	-3	

表 3-3 有毒キノコの毒成分の保持時間、SRM トランジション条件および内部標準の割り当て（分析法 1、機関⑥、保持時間順）

No.	化合物名 (和名)	化合物名 (英名)	分子式	分子量	モノアイソトピック 質量	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサー イオン	Q1	Q3	Cone (V)	Coll (eV)	内部標準
1	シクロプロピルアセチル- (R)-カルニチン	Cyclopropylacetyl-(R)- carnitine	C ₁₂ H ₂₁ NO ₄	243.30	243.1471	3.5	+	[M+H] ⁺	244.3	85.1	20	20	イソバレルリルカルニチン-d9
									244.3	185.0	20	10	
2	α-アマニチン	α-Amanitin	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₄ S	918.97	918.3542	5.0	+	[M+H] ⁺	919.6	86.2	50	60	バージニアマイシンB
									919.6	919.6	50	20	
3	β-アマニチン	β-Amanitin	C ₃₉ H ₅₃ N ₉ O ₁₅ S	919.96	919.3382	5.4	+	[M+H] ⁺	920.6	86.3	40	60	バージニアマイシンB
									920.6	920.6	40	30	
4	イルジンS	Illudin S	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264.32	264.1362	5.4	+	[M+H] ⁺	265.0	95.0	15	10	バージニアマイシンB
									265.1	217.2	15	10	
5	γ-アマニチン	γ-Amanitin	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₃ S	902.97	902.3593	5.5	+	[M+H] ⁺	903.5	86.1	50	50	バージニアマイシンB
									903.5	903.5	50	10	
6	ファロイジン	Phalloidin	C ₃₅ H ₄₈ N ₈ O ₁₁ S	788.87	788.3163	6.8	+	[M+H] ⁺	789.3	86.2	50	50	バージニアマイシンB
									789.3	753.3	50	20	
7	サトラトキシ H	Satratoxin H	C ₂₉ H ₃₆ O ₉	528.59	528.2359	8.8	+	[M+H] ⁺	529.4	231.3	50	30	ジアセトキシスシルペノール
									529.4	245.2	50	20	

上段：定量トランジション、下段：確認トランジション

表 3-4 内部標準の SRM トランジション条件（分析法 1、機関⑥、保持時間順）

No.	化合物名 (和名)	化合物名 (英名)	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサー イオン	Q1	Q3	Cone (V)	Coll (eV)	備考
IS1	イソバレルリル L-カルニチン-d9	Isovaleryl L-carnitine-d9	4.0	+	[M+H] ⁺	255.3	85.1	30	20	シリンジスパイク
IS2	ジアセトキシ スシルペノール	Diacetoxy- scirpenol	7.4	+	[M+NH ₄] ⁺	384.2	105.0	20	30	シリンジスパイク
IS3	バージニアマイシン B	Virginiamycin B	9.3	+	[M+H] ⁺	867.4	134.0	40	30	シリンジスパイク

カラム	XBridge Shield RP18 (Waters) 2.1 × 150 mm, 3.5 μm		
移動相	(A) 0.05%ギ酸 (B) メタノール		
グラジエント	Time/min	A (%)	B (%)
	0	90	10
	10	0	100
	12	0	100
	12.1	90	10
	20	90	10
流速	0.2 mL/min		
カラム温度	40°C		
注入量	5 μL		

イオン源
(Sciex社製
Turbo-Vソース)

Parameter \ Porarity	ESI(+)	ESI(-)
Curtain gas (psi)	30	30
Collision gas (psi)	9	9
Ion Spray Voltage (V)	5000	-4500
Temperature (°C)	300	300
Ion Source Gas1 (psi)	60	60
Ion Source Gas2 (psi)	60	60

• 機関①-③はESI (+)/(-) switchingモード

イオン源
(Waters社製
UniSprayイオン源)

Parameter \ Porarity	ESI(+)
Capillary (kV)	0.5
Source Offset (V)	30
Source Temperature (°C)	150
Desolvation Temperature (°C)	600
Cone Gas Flow (L/hr)	200
Desolvation Gas Flow (L/hr)	1000
Collision Gas Flow (mL/min)	0.17
Nebuliser Gas Flow (bar)	7

• 機関⑥の設定

図 2 液体クロマトグラフおよび MS イオン源の条件 (分析法 1)

表 4-1 6 機関の選択性 (シイタケ)

No.	Compound name	Lab ①					Lab ②					Lab ③				
		Peak area (cps)					Peak area (cps)					Peak area (cps)				
		BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria
1	CPAC	85870	366900	○	1223000	○	32820	237800	○	792667	○	129689	910674	○	3035578	○
2	Illudin S	0	4495	○	14983	○	1083	9287	○	30957	○	0	7293	○	24309	○
3	Satratoxin H	0	17030	○	56767	○	252	8018	○	26727	○	0	28880	○	96265	○
4	α-Amanitin	5234	2647	×	8823	○	1711	4593	○	15310	○	0	8415	○	28051	○
5	β-Amanitin	1522	5411	○	18037	○	3428	3405	×	11350	○	750	5341	○	17803	○
6	γ-Amanitin	0	8887	○	29623	○	2817	5645	○	18817	○	4322	7724	○	25746	○
7	Phalloidin	0	31320	○	104400	○	501	19010	○	63367	○	0	26316	○	87720	○

No.	Compound name	Lab ④					Lab ⑤					Lab ⑥				
		Peak area (cps)					Peak area (cps)					Peak area (cps)				
		BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria
1	CPAC	5150	49566	○	165221	○	45263	371545	○	1238484	○	194773	1891187	○	6303958	○

MHLW Criteria: (LOQ ≤ ML · 1/3) BL peak ≤ ML peak · 1/10

(LOQ > ML · 1/3) BL peak ≤ LOQ peak · 1/3

表 4-2 6 機関の選択性 (ブナシメジ)

No.	Compound name	Lab ①					Lab ②					Lab ③				
		ピーク面積(cps)					ピーク面積(cps)					ピーク面積(cps)				
		BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria
1	CPAC	301400	366900	○	1223000	○	21690	237800	○	792667	○	122796	910674	○	3035578	○
2	Illudin S	0	4495	○	14983	○	1009	9287	○	30957	○	0	7293	○	24309	○
3	Satratoxin H	0	17030	○	56767	○	405	8018	○	26727	○	0	28880	○	96265	○
4	α-Amanitin	0	2647	○	8823	○	1996	4593	○	15310	○	92	8415	○	28051	○
5	β-Amanitin	0	5411	○	18037	○	1429	3405	○	11350	○	82	5341	○	17803	○
6	γ-Amanitin	354	8887	○	29623	○	1583	5645	○	18817	○	1306	7724	○	25746	○
7	Phalloidin	0	31320	○	104400	○	862	19010	○	63367	○	0	26316	○	87720	○

No.	Compound name	Lab ④					Lab ⑤					Lab ⑥				
		ピーク面積(cps)					ピーク面積(cps)					ピーク面積(cps)				
		BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria
1	CPAC	0	49566	○	165221	○	31745	371545	○	1238484	○	139101	1891187	○	6303958	○

MHLW Criteria: $(LOQ \leq ML \cdot 1/3)$ BL peak \leq ML peak \cdot 1/10

$(LOQ > ML \cdot 1/3)$ BL peak \leq LOQ peak \cdot 1/3

表 5-1 6 機関の添加回収率、併行精度、室間精度および HorRat 値（シイタケ、内標補正なし）

No.	Compound	Mean Recovery(%)	Codex criteria	Repeatability (RSD _r (%))	MHLW criteria	Reproducibility (RSD _R (%))	HorRat value	Codex criteria
1	CPAC	93.1	○	6.1	○	20.3	1.3	○
2	Illudin S	82.2	○	6.2	○	21.5	1.3	○
3	Satratoxin H	89.6	○	4.1	○	7.5	0.5	○
4	α-Amanitin	93.2	○	6.2	○	12.3	0.8	○
5	β-Amanitin	91.3	○	2.6	○	11.1	0.7	○
6	γ-Amanitin	96.1	○	6.4	○	12.5	0.8	○
7	Phalloidin	91.7	○	4.2	○	9.4	0.6	○

Codex criteria: 80-110%

MHLW criteria: < 10%

Codex criteria: ≤ 2

表 5-2 6 機関の添加回収率、併行精度、室間精度および HorRat 値（ブナシメジ、内標補正なし）

No.	Compound	Mean Recovery(%)	Codex criteria	Repeatability (RSD _r (%))	MHLW criteria	Reproducibility (RSD _R (%))	HorRat value	Codex criteria
1	CPAC	96.8	○	2.6	○	18.7	1.2	○
2	Illudin S	85.8	○	4.0	○	16.2	1.0	○
3	Satratoxin H	88.8	○	2.0	○	6.1	0.4	○
4	α-Amanitin	90.4	○	9.7	○	13.3	0.8	○
5	β-Amanitin	94.3	○	6.1	○	12.3	0.8	○
6	γ-Amanitin	96.6	○	4.1	○	17.7	1.1	○
7	Phalloidin	89.7	○	2.0	○	7.4	0.5	○

Codex criteria: 80-110%

MHLW criteria: < 10%

Codex criteria: ≤ 2

表 5-3 6 機関の添加回収率、併行精度、室間精度および HorRat 値（シイタケ、内標補正あり）

No.	Compound	Mean Recovery(%)	Codex criteria	Repeatability (RSD _r (%))	MHLW criteria	Reproducibility (RSD _R (%))	HorRat value	Codex criteria
1	CPAC	93.0	○	6.7	○	19.1	1.2	○
2	Illudin S	78.0	✕	6.7	○	27.1	1.7	○
3	Satratoxin H	88.9	○	10.8	✕	14.5	0.9	○
4	α-Amanitin	90.0	○	6.7	○	16.1	1.0	○
5	β-Amanitin	88.4	○	3.6	○	15.1	0.9	○
6	γ-Amanitin	92.7	○	7.0	○	15.8	1.0	○
7	Phalloidin	88.3	○	4.2	○	11.5	0.7	○

Codex criteria: 80-110%

MHLW criteria: < 10%

Codex criteria: ≤ 2

表 5-4 6 機関の添加回収率、併行精度、室間精度および HorRat 値（ブナシメジ、内標補正あり）

No.	Compound	Mean Recovery(%)	Codex criteria	Repeatability (RSD _r (%))	MHLW criteria	Reproducibility (RSD _R (%))	HorRat value	Codex criteria
1	CPAC	95.6	○	3.2	○	18.2	1.1	○
2	Illudin S	80.0	○	5.4	○	22.2	1.4	○
3	Satratoxin H	90.5	○	2.9	○	8.1	0.5	○
4	α-Amanitin	87.4	○	8.2	○	11.5	0.7	○
5	β-Amanitin	91.3	○	5.5	○	13.5	0.8	○
6	γ-Amanitin	93.9	○	4.6	○	16.6	1.0	○
7	Phalloidin	87.2	○	3.3	○	7.6	0.5	○

Codex criteria: 80-110%

MHLW criteria: < 10%

Codex criteria: ≤ 2

表 6 試験室間妥当性評価 結果のまとめ

Analyte:	CPAC, illudin S, satratoxin H, α , β , γ -amanitin, phalloidin
Matrix:	Mushroom (<i>Shiitake</i> and <i>Bunashimeji</i>)
Internal standard	Isovaleryl L-carnitine-d9 (for CPAC) Diacetoxyscirpenol (for satratoxin H) Virginiamycin B (for α , β , γ -amanitin, phalloidin and tentatively for illudin S)
ML:	1 mg/kg
LOD:	≤ 0.1 mg/kg (= ML \cdot 1/10)
LOQ:	≤ 1 mg/kg (= ML)
Selectivity:	BL peak area \leq LOQ peak area \cdot 1/3
Recovery:	80-110% (except for illudin S of <i>Shiitake</i> , IS (+) (78.0%))
Repeatability:	RSD _r < 10% (except for satratoxin H of <i>Shiitake</i> , IS (+) (10.8%))
Reproducibility:	HorRat value ≤ 2
