フグ毒検査法における抽出操作の簡素化と抽出比の検討

谷口香織,¹ 高尾秀樹,² 阿部敬子,³ 辰野竜平,⁴ Gregory N. Nishihara,⁵
阪倉良孝,¹ 高谷智裕,¹ 荒川 修^{1*}

(2020年3月30日受付, 2020年5月14日受理, 2020年8月25日J-STAGE 早期公開)

¹長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科, ²株式会社まんてん, ³株式会社日立ハイテクサイエンス,
⁴(国研)水産研究・教育機構 水産大学校, ⁵長崎大学海洋未来イノベーション機構環東シナ海環境資源研究センター

Simplification of extraction procedure and evaluation of extraction ratio in
pufferfish toxin examination method

KAORI TANIGUCHI,¹ HIDEKI TAKAO,² KEIKO ABE,³ RYOHEI TATSUNO,⁴
GREGORY N. NISHIHARA,⁵ YOSHITAKA SAKAKURA,¹ TOMOHIRO TAKATANI¹
AND OSAMU ARAKAWA^{1*}

¹Graduate School of Fisheries and Environmental Sciences, Nagasaki University, Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, ²Manten Corporation, Nabeshima-machi, Saga 849-0936, ³Analytical Application Engineering Section Tokyo 1, Hitachi High-Tech Science Corporation, Chuo, Tokyo 104-0041, ⁴National Fisheries University, Japan Fisheries Research and Education Agency, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, ⁵Institute for East China Sea Research, Organization for Marine Science and Technology, Nagasaki University, Taira-machi, Nagasaki 851-2213, Japan

We compared two extraction methods for pufferfish toxin: the method described in “Standard Methods of Analysis in Food Safety Regulation” (official method), and an alternative in which the procedures of the official method were simplified (simple method). Mainly the livers of *Takifugu rubripes* were extracted with the two methods, and the amount of tetrodotoxin (TTX) in each extract was quantified by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FL). In general, the results of the simple method were about 10–20% higher than those of the official method. A strong positive correlation between the values determined by the simple method (y) and that of the official method (x) was detected; the fitted regression line and 90% confidence interval could be expressed as $y = (1.21 \pm 0.033)x - (1.36 \pm 1.29)$, where the extraction ratio [ratio of (extractant + sample) to the sample] was 3 to 6. Non-toxic cultured *T. rubripes* livers spiked with known concentrations of TTX were extracted by the simple method, and TTX as well as 4-*epi*TTX and 4,9-anhydroTTX converted from TTX were quantified by HPLC-FL. As a result, the recovery rate was 82.7 to 119%, which satisfied the reference value of the guidelines in Japan.

キーワード：オキナワフグ, 高速液体クロマトグラフ蛍光検出, 食品衛生検査指針, テトロドトキシン, トラフグ

日本ではフグを食用としてきた長い歴史があり, トラフグ属, サバフグ属などのフグ科魚類は水産資源として重要であるが, 多くの種が強力な神経毒テトロドトキシン (TTX) を保有しており, これによるヒトの食中毒も多い。^{1–3)} TTX はフグのみがもつ毒とされていたが, 1964 年にイモリの毒が TTX と同定⁴⁾されて以来, 多様

な水生生物に TTX が見出され,^{1,2)} さらに, フグは孵化時から無毒の餌を用いて飼育すると無毒になるが,^{5,6)} そのような無毒個体に TTX を経口投与すると毒化すること,^{7,8)} 元来, 海洋細菌が TTX を産生していること,⁹⁾ などが順次明らかにされ, フグの毒化は細菌から始まる食物連鎖由来と考えられるようになった。¹⁾ 近年, 特に

ヨーロッパでは、巻貝による TTX 中毒が突発したほか、二枚貝からも微量の TTX が検出され、食品衛生上の重大なリスクとして問題視されている。¹⁰⁾

フグの毒性には大きな種差や個体差、地域差、季節変動がみられる。^{1,11-14)} そのため、厚生労働省は「フグの衛生確保について」の通知を出し、食用可能なフグの種類と部位、漁獲海域を定めるとともに、各都道府県条例等でフグを取り扱うことができる施設と人を制限し、その安全性を確保している。この通知は、それまでのフグ食の実績やフグ中毒に関する疫学的情報に加え、谷が 1945 年に発表した「日本産フグの毒力表」¹⁵⁾ (フグ種毎に各部位の最高毒力を‘無毒’(<10 マウス単位 (MU)/g)、『弱毒’ (10-100 MU/g)、『強毒’ (100-1000 MU/g)、『猛毒’ (>1000 MU/g) に分類した表) に基づいて策定されたものであるが、近年、熱帯・亜熱帯海域に生息するドクサバフグの日本沿岸での出現と食中毒の発生、¹⁶⁾ フグの高毒性化、¹⁷⁾ 自然交雑種の頻出¹⁸⁾ など新たな問題も生じており、今後もフグや関連有毒生物の毒性スクリーニングは TTX のリスク管理上必須と考えられる。

現在、日本では、食品衛生検査としてフグ等の毒性を測定する場合、食品衛生検査指針理化学編 (以下、“検査指針”) に記載の「参考法」¹⁹⁾ が用いられている。「参考法」では、薄い酢酸溶液で毒を抽出し、マウス毒性試験でその毒力を測定するが、抽出操作が煩雑で作業効率が悪く、多数の試料や少量の試料の毒性スクリーニングには不向きである。そのため、基礎研究の分野では、一般に「参考法」に記載された抽出法 (以下、“公定法”) の操作を簡素化した抽出法 (以下、“簡便法”) が用いられているが、これまで公定法と簡便法により得られる定量値の関係は不明であった。また、簡便法では試料量に応じて多様な抽出比 (試料に対する試料と抽出溶媒の総量の割合) が用いられるが、抽出比と抽出効率の関係に関する知見もほとんどない。本研究では、近年特にヨーロッパで問題視され、日本でも新たな問題が浮上している TTX のリスク管理に資するため、主に天然トラフグ肝臓を用いて、公定法と簡便法により得られる定量値の関係を検証するとともに、抽出比と抽出効率の関係にも検討を加え、さらに無毒養殖トラフグ肝臓への TTX 添加実験により簡便法の有効性を示した。TTX の定量にあたっては、マウス毒性試験より精度が高く、マトリクスの影響もほとんど受けない高速液体クロマトグラフ蛍光検出 (HPLC-FL)²⁰⁾ を使用した。

材料と方法

TTX 標準溶液 富士フイルム和光純薬工業 (株) 製 tetrodotoxin (生化学用 1 mg) の全量を 0.1% 酢酸に溶解して 10 mL に定容したものを TTX 標準原液とし、

マウス毒性試験¹⁹⁾ で毒力を標定後、0.1% 酢酸で適宜希釈したものを TTX 標準溶液とした。TTX の 1 MU は、体重 20 g のマウスを 30 分で死亡させる毒力と定義されており、TTX 220 ng に相当する。¹⁹⁾

フグ試料 抽出法の検討には、遠州灘で漁獲された天然トラフグ *Takifugu rubripes* 10 個体の肝臓 (当該部位の平均重量±標準偏差: 113±38 g, 以下同じ)、ならびに沖縄県西表島で採取したオキナワフグ *Chelonodon patoca* 4 個体の皮 (7.9±1.5 g) および別の 4 個体の筋肉 (9.1±1.2 g) を使用した。肝臓は、前述のマウス毒性試験で予備的におおよその毒力を測定し、比較的高毒力 (70-180 MU/g) であった 4 個体については、個別に均質化したものを試料 (Nos. 1-4) とした。残りの 6 個体 (<3-50 MU/g) については、個別に均質化した後に適宜混合・再均質化して約 20 MU/g および約 5 MU/g の試料 (No. 5 および 6) を調製した。筋肉と皮については、試料量が少なかったため、2 個体分を合一、均質化してそれぞれ 2 濃度の試料を調製した。一方、TTX 添加実験では、2015 年に (株) 萬坊で囲い養殖 (陸上養殖) したトラフグ 1 個体の無毒肝臓²¹⁾ (313 g) を用いた。

肝臓を用いた抽出法の検討 天然トラフグ肝臓より調製した試料 (Nos. 1-6) から、以下のとおり、それぞれ公定法 (抽出比 5 相当) と簡便法 (抽出比 2-6) で TTX を抽出し、その定量値 (公定法では残渣を除いた抽出液を、簡便法では残渣+抽出液を定容量として試料 1 g 当たりの TTX 量を計算するため、以下算定値という) を比較した。

1. 公定法の抽出操作 検査指針の「参考法」¹⁹⁾ に準じて、試料 (Nos. 1-6) 各 5 g に 2.5 倍量 (12.5 mL) の 0.1% 酢酸を添加して 10 分間加熱抽出し、遠心分離 (2300×g, 20 分間) 後の上清と残渣の洗液を合わせ、5 倍量 (25 mL) に定容して抽出液 (抽出比 5 相当) とした (Fig. 1a)。参考法では、試料中の毒がすべて抽出液に移行したものとみなして毒量を算定する¹⁹⁾ ため、残渣に毒が残留していると、その分、毒量が低く見積もられることになる。また、残渣を洗浄する際には、上清の他の容器への採取、残渣と洗液を再度遠心分離するなどの操作が必要である。

2. 簡便法の抽出操作 各試料 5, 3, 2, および 2 g に 1, 2, 4, および 5 倍量 (5, 6, 8, および 10 mL) の 0.1% 酢酸を添加して 10 分間加熱抽出後、総量を 2, 3, 5, および 6 倍量 (10, 9, 10, および 12 mL) に定容して遠心分離 (2300×g, 20 分間) 後の上清を抽出液 (それぞれ抽出比 2, 3, 5, および 6) とした (Fig. 1b および Table 1)。簡便法では、検査指針に記載の「麻痺性貝毒検査法」²²⁾ と同様に、抽出・遠心分離後の上清 (抽出液) と残渣に、試料中の毒が均等に分布している

Fig. 1 Extraction procedures of the official method (a) and simple method (extraction ratio 5) (b). In the official method combined supernatant was made up to 25 mL, whereas in the simple method a mixture of extractant and sample was made up to 10 mL.

Table 1 Amount of sample and extractant used in each extraction ratio (ExR) of the simple method

	ExR 2	ExR 3	ExR 5	ExR 6
Sample (g)	5	3	2	2
Extractant (mL)	5	6	8	10
Made-up volume (mL)	10	9	10	12

ものとみなして毒量を算定する。残渣への毒の残留を予め考慮しているので、毒の分布に偏りがなければ毒量が低く見積もられることはない。また、残渣の洗浄操作が省かれるので、作業効率も向上する。

3. 抽出液の前処理 公定法と簡便法で得た各抽出液については、固相抽出による前処理を行った。すなわち、既報²³⁾に準じて予めメタノール 5 mL および 0.1% 酢酸 10 mL でコンディショニングした C18 カートリッジ (BOND ELUT JR-C18 500 mg, アジレント・テクノロジー[®]製) に抽出液を負荷しつつ、カートリッジからの流出液のうち初めの 0.5 mL 程度を廃棄し、残りの流出液を採取した。本処理では、脂溶性の夾雑成分は固相に保持されるが、TTX は保持されず、処理前後で溶液中の TTX 濃度は変化しない (予備実験における無毒の肝臓抽出液に添加した TTX の回収率 98.9%, 相対標準偏差 0.76%, $n=6$)。さらに、メンブランフィルター (ADVANTEC[®] DISMIC-13HP045AN, 東洋濾紙[®]製) でろ過したものを試験液とし、後述の HPLC-FL で

TTX を定量した。

筋肉および皮を用いた抽出法の検討 オキナワフグの筋肉と皮の各試料 1 g より、前述の公定法と簡便法によりそれぞれ抽出比 5 相当および抽出比 5 の抽出液を調製し、固相抽出による前処理はせず直接メンブランフィルターでろ過したものを試験液として、HPLC-FL で TTX を定量した。

肝臓を用いた TTX 添加実験 簡便法の有効性を確認するため、無毒の養殖トラフグ肝臓を用いて以下の手順で TTX 添加実験を行った。

1. TTX 添加試料の調製 均質化した無毒の肝臓各 3 g に 386 MU/mL の TTX 標準液をマイクロシリンジで 39, 78, および 155 μ L 添加し, 5, 10, および 20 MU/g の TTX 添加試料を, 193 MU/g の TTX 標準液を 31 μ L 添加し, 2 MU/g の添加試料を調製した。同様に, 均質化した無毒の肝臓各 2 g に 386 MU/mL の TTX 標準液を 26 および 52 μ L 添加し, 5 および 10 MU/g の TTX 添加試料を, 96.5 MU/g の TTX 標準液を 41 μ L 添加し, 2 MU/g の添加試料を調製した。いずれも, 再均質化し, 約 30 分間室温で放置した。

2. 添加 TTX の抽出 今回使用した肝臓試料からは多量の脂質が分離したため, 簡便法に脂質を除去する操作を追加した方法により TTX を抽出した。すなわち, 3 g の TTX 添加試料には 2 倍量 (6 mL), 2 g の TTX 添加試料には 4 倍量 (8 mL) の 0.1% 酢酸を加えて 10 分間加熱抽出し, 遠心分離 (2300 $\times$ g, 20 分間) 後, パ

スツールピペットで脂質層を除去した。その後、水層と残渣の混合物を一旦攪拌して、それぞれ3倍量(9 mL)と5倍量(10 mL)に定容し、再度遠心分離して抽出比3および5の抽出液を調製した。

3. 試験液の調製 前述の方法に準じて各抽出液をC18カートリッジで前処理後、メンブランフィルターでろ過したものを試験液とし、後述のHPLC-FLでTTXを定量した。本実験では、相対保持時間から4-*epi*TTXおよび4,9-anhydroTTXと判断されるピーク^{20,23-26)}が検出されたため、TTXと併せてこれらの類縁体も定量し、添加TTX量に対する比率を求めて回収率とした。

HPLC-FL 分析 HPLC システム Chromaster®5000 シリーズ(移動相用ポンプ:5160, 反応液用ポンプ:5110, カラムオープン:6310, 冷却付オートサンブラ:5280, 反応ユニット:5510, (株)日立ハイテクサイエンス製)を使用し、Table 2に示す条件で各試験液のTTX量を測定した。定量はTTX標準溶液に対して得られたピーク面積から絶対検量線法により行った。試験液のTTX濃度が検量線の範囲を超える場合は、0.1%酢酸で適宜希釈後、再度分析した。4-*epi*TTXと4,9-anhydroTTXについては、TTXと蛍光強度が同等とみなしてTTXの検量線から定量値を求めた。

統計解析 公定法のTTX量算定値と簡便法(抽出比2-6)のTTX量算定値を比較するため、統計解析ソフトR(バージョン3.4.3, Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna)を用いて統計解析を行った。まず、線形回帰分析により、簡便法の抽出比毎に公定法と簡便法の平均算定値の相関をみたうえで、共分散分析(ANCOVA)により各抽出比間の差の検定を行った。次に、有意差が認められなかった簡便法の抽出比3, 5, 6の算定値については、同一の母集団から得られたものとみなし、これらの全算定値を用

いて、個々の算定値のばらつきを考慮した解析を行った。すなわち、ブートストラップ法により、公定法の算定値の母集団から無作為に1セットの算定値をサンプリングして線形回帰分析に用いた。この操作を1000回繰り返して、傾きと切片各1000個の値を得たうえで、それらの平均値と標準誤差を求めた。

結 果

肝臓を用いた抽出法の検討 公定法と簡便法で抽出した場合の平均TTX量算定値(MU換算値)をTable 3に示す。各試料につき、公定法(抽出比5相当)と簡便法の各抽出比の平均算定値を比較したところ、総じて公定法より簡便法の平均算定値の方が高かった。

公定法の算定値と簡便法の算定値をより詳細に比較するため、統計解析を行った。まず、簡便法の抽出比毎に、公定法の平均算定値(x)と簡便法の平均算定値(y)の相関をみたところ、いずれも強い正の相関を示し、回帰式と相関係数($n=6$)は、 $y=1.13x-4.44$, $r=0.994$ (抽出比2), $y=1.19x-1.44$, $r=0.998$ (抽出比3), $y=1.20x-0.80$, $r=0.999$ (抽出比5), および $y=1.25x-2.93$, $r=0.999$ (抽出比6)となった。回帰式の傾きには、抽出比が大きいほど大きくなる傾向が見られたが、統計解析の結果、抽出比3-6の間では有意差は認められなかった。一方、抽出比2については、他の抽出比との間で回帰式の傾きに有意差が認められた(ANCOVA, $p<0.01$)。そこで、抽出比2を除き、抽出比3-6の全算定値を用いて、個々の算定値のばらつきを考慮した解析を行った。公定法の算定値を x 、簡便法の算定値を y として、ブートストラップ法を用いたシミュレーションにより回帰直線とその95%信頼区間を求めたところ、回帰式は $y=(1.21\pm0.033)x-(1.36\pm1.29)$ となり、簡便法の算定値の方が公定法の算定値より抽出比3以上で $21\pm3.3\%$ 高くなることが示された(Fig. 2)。

Table 2 HPLC-FL operating conditions

Parameter	Setting
Column	Mightysil RP-18GP (250 mm×4.6 mmφ, 5 μm, Kanto Chemical Co., Inc.)
Guard column	Mightysil RP-18GP (5 mm×4.6 mmφ, 5 μm, Kanto Chemical Co., Inc.)
Mobile phase	2% Acetonitrile containing 2 mmol/L sodium 1-heptanesulfonate and 20 nmol/L acetic acid and sodium acetate (pH 4.0)
Flow rate	1 mL/min
Column temperature	25°C
Reaction solution	4 mol/L sodium hydroxide solution
Flow rate	1 mL/min
Reaction temperature	110°C (9 m×5 mmφ)
Excitation wavelength	384 nm
Emission wavelength	505 nm
Injection volume	20 μL

Table 3 Mean TTX amount (MU/g, $n=3$) of pufferfish (wild *Takifugu rubripes*) liver samples determined by the official method and simple method

Sample No.	Official method		Simple method							
	ExR 5 equiv.		ExR 2		ExR 3		ExR 5		ExR 6	
	Mean TTX amount (MU/g)	RSD (%)	Mean TTX amount (MU/g)	RSD (%)	Mean TTX amount (MU/g)	RSD (%)	Mean TTX amount (MU/g)	RSD (%)	Mean TTX amount (MU/g)	RSD (%)
1	184	3.0	210	2.4	213	5.2	225	3.1	225	5.6
2	178	5.0	205	5.3	219	3.3	215	1.8	226	2.7
3	138	4.6	136	3.9	158	2.2	160	1.3	166	1.1
4	71.9	0.97	70.0	7.6	80.6	0.47	82.4	2.8	83.8	2.2
5	21.0	5.5	23.7	4.3	26.6	4.2	27.4	1.7	25.3	3.6
6	5.14	9.6	5.49	9.5	4.96	2.3	6.36	2.3	4.44	7.6

ExR: extraction ratio

Fig. 2 Statistical analysis of the relationship between TTX amounts determined by the official method and simple method using the data of extraction ratio 3 (open triangles), 5 (open squares), and 6 (open diamonds) (the symbols indicate mean values). The bootstrap method was used to sample one set of values from the official method to be used in the linear regression. This was repeated 1000 times, to provide 1000 estimates of the slope and intercept. The mean values and standard errors gave the regression line (black line) with 95% confidence interval (area between two gray lines) [$y = (1.21 \pm 0.033)x - (1.36 \pm 1.29)$].

回帰式の y 切片が負になったことは、低毒量の試料では、公定法で検出できても簡便法では検出できない場合や公定法より簡便法の算定値が低くなる場合があることを示している。

しかしながら、高毒量の試料ほど公定法の算定値に対する簡便法の算定値が高くなる傾向がみられた (Table 2) ので、それにより y 切片が負になったものと推察された。そこで、‘無毒’ないし‘弱毒’域 (100 MU/g未満)¹⁵⁾のデータに限定し、改めて前述同様に回帰式を求めたところ、 $y = (1.14 \pm 0.016)x + (0.75 \pm 0.79)$ となった。すなわち、この領域では y 切片は正の値をと

Table 4 Mean TTX amount and RSD ($n=3$) of pufferfish (wild *Chelonodon patoca*) muscle and skin samples determined by the official method and simple method

Tissue	Sample No.	Official method		Simple method		
		Mean TTX amount (MU/g)	RSD (%)	Mean TTX amount (MU/g)	RSD (%)	Relative TTX amount*
Muscle	1	72.4	0.60	77.7	1.8	1.07
	2	60.3	3.4	63.1	4.0	1.05
Skin	1	1060	6.9	1090	2.9	1.02
	2	220	7.7	250	11	1.13

* The ratio of TTX amount determined by the simple method to that determined by the official method

り、簡便法の算定値の方が公定法の算定値より抽出比3以上で $14 \pm 1.6\%$ 高くなることが示された。

皮と筋肉を用いた抽出法の検討 公定法と簡便法 (抽出比5) により得られた平均 TTX 量算定値を Table 4 に示す。筋肉と皮の場合も、簡便法による測定値の方が公定法より 2–13% 高い結果となった。なお、皮では、抽出液が低温でゲル状になったため、オートサンプリング内設定温度を上げ 30℃ とする処置を行う必要があった。

肝臓を用いた添加実験 添加実験における HPLC–FL クロマトグラムの例を Fig. 3 に示す。TTX 標準溶液の測定では TTX のみを検出したが (Fig. 3a), 試験液の測定では TTX に加え、相対保持時間から 4-*epi*TTX および 4,9-anhydroTTX と判断されるピーク^{20,23–26)} が出現した (Fig. 3b)。TTX 標準溶液を測定した際の本法の検出下限値 (S/N 3) は 0.06 MU/mL, 定量下限値 (S/N 10) は 0.21 MU/mL であった。これらを肝臓試料中の濃度に換算すると、それぞれ抽出比3で 0.19 MU/g および 0.64 MU/g, 抽出比5では 0.32 MU/g および 1.1 MU/g に相当した。

Fig. 3 Typical HPLC-FL chromatograms of TTX standard solution (2 MU/mL) (a), pufferfish (cultured *Takifugu rubripes*) liver sample spiked with TTX (10 MU/g) (b), and blank liver sample (c).

添加試料の定量結果を Table 5 に示す。TTX 本体の回収率は、抽出比 3 で 74.5–95.0%，抽出比 5 で 82.7–102%，相対標準偏差 (RSD) は、抽出比 3 で 5.3–12%，抽出比 5 で 0.2–11% であった。類縁体を加えた回収率については、設定濃度 2 MU/g の抽出比 5 では 4-*epi*TTX と 4,9-anhydroTTX がともに検出下限値未満であったため、TTX 本体の回収率と同じ結果となったが、それ以外では、抽出比 3 で 92.9–118% (RSD : 6.2–12.7%)，抽出比 5 で 117–119% (RSD : 0.9–10.5%) であった。

考 察

本研究により、簡便法で得られる毒量算定値は、公定法で得られる毒量算定値と強い正の相関を示し、かつ公定法より肝臓で 14–21%，筋肉と皮で 2–13% 程度高く見積もられることが示された。したがって、公定法による既得データと厳密に比較する場合は補正が必要になるものの、抽出法の差異によって偽陰性が生じる心配はな

く、簡便法で得られた毒量算定値を食品のリスク管理上の TTX 含有実態の基礎データとして用いても、ほとんど問題はないものと考えられる。肝臓の場合、公定法の算定値を x ，簡便法（抽出比 3–6）の算定値を y とした際の回帰式は $y = (1.21 \pm 0.033)x - (1.36 \pm 1.29)$ で、 y 切片が負となった。しかしながら、‘無毒’ないし‘弱毒’域のデータに限定して求めた回帰式 ($y = (1.14 \pm 0.016)x + (0.75 \pm 0.79)$) では y 切片が正となることから、10 MU/g に満たない‘無毒’域の試料であっても簡便法を適用して差し支えないものとする。

抽出比に関しては、抽出比 2 の場合、抽出比 3 以上に比べて有意に低い毒量算定値となることが本研究により初めて示された。公定法と簡便法の毒量算定値の関係を示す回帰式の傾きは、抽出比が大きいくほど大きくなる傾向が見られたことから、抽出比が大きいくほど試料から抽出溶媒への抽出効率が高くなるものと推察されるが、統計解析では抽出比 2 のみ他の抽出比との有意差が認められた。その差はそれほど大きなものではないが、厳密には抽出比 3 以上より毒量が低く見積もられることになるため、少なくとも肝臓では抽出比 2 による抽出は避けた方がよいものと思われる。一方、皮では、抽出比 5 でも抽出液が低温でゲル状になった。含有するゼラチン質などの影響と推察される。また、オートサンプリング庫内設定温度を上げて分析カラムに過大な圧力負荷がかかるケースもみられたため、抽出比は 5 未満を避けた方が望ましいであろう。

添加実験において、TTX 添加試料から 4-*epi*TTX および 4,9-anhydroTTX と判断されるピークが検出され、これらの類縁体を加えた回収率は、TTX 本体のみの場合より総じて 20% 程度高い値となった。TTX，4-*epi*TTX，および 4,9-anhydroTTX はフグ組織抽出液や酸溶液中で相互に変換し、一定の割合（酸溶液中では概ね TTX : 4-*epi*TTX : 4,9-anhydroTTX = 8:1:1）で存在することが知られている。²⁴⁾ 本研究では、両類縁体の存在比は必ずしも一定ではなく、抽出比 5 では抽出比 3 より特に 4-*epi*TTX の存在比が小さくなる傾向がみられた。その原因として、抽出液の pH や試料由来マトリクス濃度の影響が考えられるが、この点については今後さらに検討する必要がある。いずれにせよ、今回の実験では、均質化した肝臓、あるいはその抽出液中で添加した TTX の 2 割程度が類縁体に変換したものと推察される。今回、TTX 本体の回収率、類縁体を加えた回収率は、ともに下痢性貝毒（オカダ酸群）の食品衛生検査に関するガイドライン（平成 27 年 3 月 6 日食安基発 0306 第 4 号・食安監発 0306 第 2 号、医薬食品局食品安全部基準審査課長通知・医薬食品局食品安全部監視安全課長通知）の目標値である 70–120% を満たすものであった。一方、RSD は、一部で精度の目標値である 10

Table 5 Results of TTX spike recovery test using non-toxic pufferfish (cultured *Takifugu rubripes*) livers

Spiked amount	Extraction ratio	Toxin component	Mean detected amount (nmol/g)	Mean recovery (%)	RSD (%)
2 MU/g (1.38 nmol/g)	5	TTX	1.14	82.7	10.5
		4- <i>epi</i> TTX	—		
		4,9-anhydroTTX	—		
		Total	1.14	82.7	10.5
	3	TTX	1.18	85.9	10.5
		4- <i>epi</i> TTX	0.16	11.8	
		4,9-anhydroTTX	0.13	9.2	
		Total	1.48	107	9.7
5 MU/g (3.45 nmol/g)	5	TTX	3.45	100	1.9
		4- <i>epi</i> TTX	0.23	6.6	
		4,9-anhydroTTX	0.38	10.4	
		Total	4.06	117	2.1
	3	TTX	3.27	95.0	5.3
		4- <i>epi</i> TTX	0.37	10.6	
		4,9-anhydroTTX	0.45	12.2	
		Total	4.09	118	6.2
10 MU/g (6.89 nmol/g)	5	TTX	7.02	102	0.2
		4- <i>epi</i> TTX	0.45	6.6	
		4,9-anhydroTTX	0.81	11.1	
		Total	8.28	119	0.9
	3	TTX	6.42	93.2	12.3
		4- <i>epi</i> TTX	0.70	10.1	
		4,9-anhydroTTX	0.84	11.5	
		Total	7.96	115	12.7
20 MU/g (13.8 nmol/g)	3	TTX	10.3	74.5	8.5
		4- <i>epi</i> TTX	1.0	7.4	
		4,9-anhydroTTX	1.6	11.0	
		Total	12.9	92.9	6.6

All data were obtained by $n=3$.

—, less than detection limit

%を超過した。抽出時に脂質を除去する操作を追加したことが、RSDが大きくなった一因と思われる。この点についてはさらに検討する必要があるが、簡便法（抽出比3および5）はフグ毒検査の抽出法として有効であり、精度管理をより厳密に行うことができれば、食品衛生検査の手法としても十分に適用可能と考えられる。

以上、本研究により、簡便法で得られる毒量算定値は、公定法で得られる毒量算定値より1-2割程度高く見積もられること、抽出比は3以上が望ましいこと、簡便法は、フグや関連有毒生物の毒性スクリーニングなどにおいて、多数の試料から迅速に試験液を調製する方法として有効であること、などが示された。

謝 辞

本研究は、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」(H27-食品一般-009)により実施したものである。統計解析にご協力いただいた長崎県総合水産試験場の長谷川隆真博士、マウス毒性試験、試料調製にご協力いただいた長崎大学水産学部水産食品衛生学研究室の学生諸氏をはじめ関係各位に深謝する。

文 献

- 1) Noguchi T, Arakawa O. Tetrodotoxin-distribution and accumulation in aquatic organisms and cases of human intoxication. *Marine Drugs* 2008; **6**: 220-242.

- 2) Noguchi T, Onuki K, Arakawa O. Tetrodotoxin poisoning due to pufferfish and gastropods, and their intoxication mechanism. *ISRN Toxicol.* 2011; doi:10.5402/2011/276939.
- 3) 登田美桜, 畝山智香子, 豊福 肇, 森川 馨. 我が国における自然毒による食中毒事例の傾向 (平成元年~22年). *食衛誌* 2012; **53**: 105-120.
- 4) Mosher HS, Fuhrman GJ, Fuhrman, FA, Fischer HG. Tarichatoxin-tetrodotoxin, a potent neurotoxin. *Science* 1965; **144**: 1100-1110.
- 5) Noguchi T, Arakawa O, Takatani T. Toxicity of pufferfish *Takifugu rubripes* cultured in netcages at sea or aquaria on land. *Comp. Biochem. Physiol. Part D* 2006; **1**: 153-157.
- 6) Matsui T, Sato H, Hamada S, Shimizu C. Comparison of toxicity of the cultured and wild puffer fish *Fugu niphobles*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1982; **48**: 253.
- 7) Yamamori K, Kono M, Furukawa K, Matsui T. The toxification of juvenile cultured kusafugu *Takifugu niphobles* by oral administration of crystalline tetrodotoxin. *J. Food Fyg. Soc. Japan* 2004; **45**: 73-75.
- 8) Honda S, Arakawa O, Takatani T, Tachibana K, Yagi M, Tanigawa A, Noguchi T. Toxification of cultured puffer fish *Takifugu rubripes* by feeding on tetrodotoxin-containing diet. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2005; **71**: 815-820.
- 9) Magarlamov TY, Melnikova DI, Chernyshev AV. Tetrodotoxin-producing bacteria: detection, distribution and migration of the toxin in aquatic systems. *Toxins* 2017; doi:10.3390/toxins9050166.
- 10) Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, Bignami M, Brüschweiler B, Ceccatelli S, Cottrill B, Dinovi M, Edler L, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom L (R), Nebbia CS, Oswald IP, Rose M, Roudot A-C, Schwerdtle T, Vleminckx C, Vollmer G, Wallace H, Arnich N, Benford D, Botana L, Viviani B, Arcella D, Binaglia M, Horvath Z, Steinkellner H, Manen M, Petersen A. Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA J.* 2017; doi:10.2903/j.efsa.2017.4752
- 11) 加納碩雄. 3. 脊椎動物におけるフグ毒の分布. 「フグ毒研究の最近の進歩」(橋本周久編) 恒星社厚生閣, 東京. 1988; 32-44.
- 12) Ikeda K, Emoto Y, Tatsuno R, Wang JJ, Ngy L, Taniyama S, Takatani T, Arakawa O. Maturation-associated changes in toxicity of the pufferfish *Takifugu poecilonotus*. *Toxicon* 2010; **55**, 289-297.
- 13) Itoi S, Ishizuka K, Mitsuoka R, Takimoto N, Yokoyama N, Detake A, Takayanagi C, Yoshikawa S, Sugita H. Seasonal changes in the tetrodotoxin content of the pufferfish *Takifugu niphobles*. *Toxicon* 2016; **114**: 53-58.
- 14) Gao W, Kanahara Y, Tatsuno R, Soyano K, Nishihara GN, Urata C, Takatani T, Arakawa O. Maturation-associated changes in internal distribution and intraovarian microdistribution of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu pardalis*. *Fish. Sci.* 2018; doi:10.1007/s12562-018-1209-2
- 15) 谷 巖. 「日本産フグの中毒学的研究」, 帝国図書, 東京. 1945.
- 16) Nagashima Y, Matsumoto T, Kadoyama K, Ishizaki S, Terayama M. Toxicity and molecular identification of green toadfish *Lagocephalus lunaris* collected from Kyushu coast, Japan. *J. Toxicol.* 2011; doi:10.1155/2011/801285
- 17) Nagashima Y, Matsumoto T, Kadoyama K, Ishizaki S, Taniyama S, Takatani T, Arakawa O, Terayama M. Tetrodotoxin poisoning due to smooth-backed blowfish *Lagocephalus inermis* and toxicity of *L. inermis* caught off the Kyushu coast, Japan. *Food Hyg. Saf. Sci.* 2012; **53**: 85-90.
- 18) Takahashi H, Toyoda A, Yamazaki T, Narita S, Mashiko T, Yamazaki Y. Asymmetric hybridization and introgression between sibling species of the pufferfish *Takifugu* that have undergone explosive speciation. *Marine Biol.* 2017; **164**: doi:10.1007/s00227-017-3120-2.
- 19) 児玉正昭, 佐藤 繁. 1. フグ毒. 「食品衛生検査指針理化学編」, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京. 2015; 813-820.
- 20) Yasumoto T, Michishita T. Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.* 1985; **49**: 3077-3080.
- 21) 野口玉雄, 高谷智裕, 荒川 修. 囲い養殖法により養殖されたトラフグの毒性. *食衛誌* 2004; **45**: 146-149.
- 22) 渡邊龍一, 大島康克. 3. 麻痺性貝毒. 「食品衛生検査指針理化学編」, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京. 2015; 827-835.
- 23) 瀧 祐一, 森崎澄江, 長田 忠, 嶋崎晃次, 野口玉雄, 大友 信, 橋本周久. 高速液体クロマトグラフィーによる魚介類中のテトロドトキシンの定量. *食衛誌* 1988; **29**: 306-312.
- 24) Nakamura M, Yasumoto T. Tetrodotoxin derivatives in puffer fish. *Toxicon* 1985; **23**: 271-276.
- 25) Shoji Y, Yotsu-Yamashita M, Miyazawa T, Yasumoto T. Electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs: liquid chromatography/mass spectrometry, tandem mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2001; **290**: 10-17.
- 26) Puilingi CG, Kudo Y, Cho Y, Konoki K, Yotsu-Yamashita M. Tetrodotoxin and its analogues in the pufferfish *Arothron hispidus* and *A. nigropunctatus* from the Solomon Islands: a comparison of their toxin profiles with the same species from Okinawa, Japan. *Toxins* 2015; **7**: 3436-3454.