参考資料７

生食監発0830第１号
平成28年８月30日

内閣府食品安全委員会事務局評価第二課長　殿

厚生労働省医薬・生活衛生局
生活衛生・食品安全部監視安全課長
（公　　印　　省　　略）

食品健康影響評価に係る補足資料の提出について

平成28年６月９日付け府食第396号「食品健康影響評価に係る補足資料の提出依頼について」で資料の提出依頼がありました件について、別添１のとおり当省回答を提出いたします。

また、佐賀県及び佐賀県事業者から平成28年８月30日付けで回答がありましたので別添２のとおり送付いたします。



別添１

２.「フグの衛生確保について」(昭和 58 年 12 月２日　環乳第 59 号　厚生省環境衛生局長通知及び環境衛生局乳肉衛生課長通知、以下「第 59 号通知」という。)において、フグの個別の毒性検査により、毒量がおおむね 10MU/g 以下であることを確認した製品のみを販売等する場合は、食品衛生法第６条第２号のただし書に該当しない食品として販売等が認められないものの限りではないとしている。第 59 号通知が定める 10MU/g の科学的根拠を示していただきたい。また、実験動物を用いた急性毒性等の毒性学的な科学的知見があれば、あわせて示していただきたい。

（回答）

フグによる食中毒の発生を防止し、全国一律にフグ規制を行うことを目的として、昭和 55 年から厚生省（当時）が鑑別法、毒性等に関する研究を行うとともに、「有毒魚介類に関する検討委員会」（委員長：阿部宗明）を設置してフグの衛生対策について総合的な検討を行い、関係都道府県と協議の上、昭和 58 年 12 月２日環乳第 59 号「フグの衛生確保について」を通知した。

提出資料１に示した「日本産フグの中毒学的研究」(昭和 19 年 12 月７日発刊)によると、人の最小致死量は約 200,000MU とされ、１MU は、「原臓器１g が殺し得るフランス・マウスの g 数」とされている。また、提出資料２～４によると、「有毒魚介類に関する検討委員会」の委員が AOAC 法における「麻痺性貝毒の試験法」を参考に試験法を見直した際に、１MU を「体重 20g のマウスを 30 分で死亡させる毒量」とし、人の最小致死量は約 10,000MU とした。
【厚生労働省提出資料１～６】

また、フグの毒性について厚生省で実施した研究に関する論文、当時に検討された可能性のある関連文献等、実験動物を用いた急性毒性等の毒性学的な科学的知見については提出資料に記載する。
【フグの毒性：厚生労働省提出資料１、７～19】
【実験動物を用いた急性毒性等：厚生労働省提出資料 20】

７．蛍光 HPLC による TTX の検出は、食品の安全性検査方法という観点では、食品の安全性を測る行政検査に値する信頼性確保がなされていない可能性が指摘されている。また、HPLC で使用する TTX についても、認証標準物質（CRM）が存在されていないと指摘されているが、食品の安全性を確認するための試験として、今回提案されている HPLC 法を TTX 検出法として用いることの妥当性について、貴省の見解を伺いたい。

また、科学的に妥当性が確認された分析法ではあっても、客観的に信頼できるデータを得るためには、検査室における精度管理及び検査室の第三者認証が求められる。本件で TTX を分析する検査室の資格要件について、どのような基準を設ける予定であるか貴省の見解を伺いたい。

（回答）

＜HPLC 法を TTX 検出法として用いることの妥当性について＞

TTX の分析法としての蛍光 HPLC 法は専門家の研究において、多くの実績があり、技術的に確立している。このため、性能評価をし、精度管理等の検査の品質保証を適切に行うことにより、信頼性の確保は可能と考える。

また、CRM については、食品中の添加物や農薬等の分析を行う際、CRM の使用は要件としていない。しかし、下痢性貝毒については、添加物や農薬等の工業用製品と異なり、標準品は小規模での生産となること、また、原料に含まれる夾雑物により純度等の品質が異なる可能性があることから、CRM を指定した。下痢性貝毒と同様の事例であるかについて十分精査したい。

＜TTX を分析する検査室の資格要件について＞

今回の佐賀県及び佐賀県内事業者の提案は、個体毎の検査によって有毒でないことを確認した養殖トラフグの肝臓を提供するという内容である。

現行の制度では、食品衛生法第 26 条（検査命令）等により、食品衛生法違反のおそれが相当程度高いものについて、検査により食品衛生法に違反しないことが認められた場合に限って販売等を認めるという枠組みがある。

今回の提案に関する検査室の資格要件については、現行の枠組みやリスク評価の結果も踏まえて検討する必要がある。

参考）食品衛生法

第二十六条　都道府県知事は、次の各号に掲げる食品、添加物、器具又は容器包装を発見した場合において、これらを製造し、又は加工した者の検査の能力等からみて、その者が製造し、又は加工する食品、添加物、器具又は容器包装がその後引き続き当該各号に掲げる食品、添加物、器具又は容器包装に該当するおそれがあり、食 品衛生上の危害の発生を防止するため必要があると認めるときは、政令で定める要件及び手続に従い、その者に対し、当該食品、

添加物、器具又は容器包装について、当該都道府県知事又は登録検査機関の行う検査を受けるべきことを命ずることができる。

一　第六条第二号又は第三号に掲げる食品又は添加物

二　第十一条第一項の規定により定められた規格に合わない食品又は添加物

三　第十一条第一項の規定により定められた基準に合わない方法により添加物を使用した食品

四　第十一条第三項に規定する食品

五　第十六条に規定する器具又は容器包装

六　第十八条第一項の規定により定められた規格に合わない器具又は容器包装

2　厚生労働大臣は、食品衛生上の危害の発生を防止するため必要があると認めるときは、前項各号に掲げる食品、添加物、器具若しくは容器包装又は第十条に規定する食品を製造し、又は加工した者が製造し、又は加工した同種の食品、添加物、器具又は容器包装を輸入する者に対し、当該食品、添加物、器具又は容器包装について、厚生労働大臣又は登録検査機関の行う検査を受けるべきことを命ずることができる。

3　厚生労働大臣は、食品衛生上の危害の発生を防止するため必要があると認めるときは、生産地の事情その他の事情からみて第一項各号に掲げる食品、添加物、器具若しくは容器包装又は第十条に規定する食品に該当するおそれがあると認められる食品、添加物、器具又は容器包装を輸入する者に対し、当該食品、添加 物、器具又は容器包装について、厚生労働大臣又は登録検査機関の行う検査を受けるべきことを命ずることができる。

4　前三項の命令を受けた者は、当該検査を受け、その結果についての通知を受けた後でなければ、当該食品、添加物、器具又は容器包装を販売し、販売の用に供するために陳列し、又は営業上使用してはならない。

5　前項の通知であつて登録検査機関がするものは、当該検査を受けるべきことを命じた都道府県知事又は厚生労働大臣を経由してするものとする。

6　第一項から第三項までの規定による厚生労働大臣又は登録検査機関の行う検査を受けようとする者は、検査に要する実費の額を考慮して、厚生労働大臣の行う 検査にあつては厚生労働大臣が定める額の、登録検査機関の行う検査にあつては当該登録検査機関が厚生労働大臣の認可を受けて定める額の手数料を納めなければならない。

7　前条第三項から第五項までの規定は、第一項から第三項までの検査について準用する。

厚生労働省提出資料一覧

1) 谷巌：日本産フグの中毒学的研究．帝国図書，東京（1945).

2) 厚生省環境衛生局監修「食品衛生検査指針Ⅱ食品別」．日本食品衛生協会，pp 231-240(1976).

3) 河端俊治，戸田敦夫，松本恵子，原田禎顕：食品衛生研究「輸入魚類乾製品からのフグ毒の検出事例」．食品衛生協会，pp 827-837(1981-10).

4) 日本薬学会編「衛生試験法・注解（1980)」、金原出版株式会社，1983

5) 福田得志、谷巌：日本医学及び健康保険「河豚中毒調書（第三報)」．日本医学健康保険社，3258 号、2739(1941).

6) Official methods of analysis of *the* AOAC, 12th edition, AOAC, 1975.

7) 橋本芳郎:ナシフグの毒性. 日本水産学会誌, 第 16 巻第 2 号, pp43-45(1950).

8) 東京都市場衛生検査所：フグの毒性について－臓器別－．事業概要昭和 51 年版，pp79-87(1976).

9) 原田禎顕:台湾産フグの種別と毒性に関する二, 三の知見. 食品衛生学雑誌, vol.20, No.6，pp437-441(1979).

10) 塩見一雄，山中英明，菊池武昭，河端俊治，阿部宗昭，北浜喜一：中国産サンサイフグ（新称）及びクロサバフグ（新称）の毒性について．魚(UO), 第 31 号，pp21-27(1980).

11) 加納碩雄，野口玉雄，小山絹江，橋本周久：シロアミフグおよびクマサカフグの毒性の検討．日本水産学雑誌，vol.48, No.4，pp591(1982)．

12) T. Matsui，S. Hamada，K. Yamamori：Local Variation of Toxicity of the Puffer Fish *Fugu niphobles*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries，vol.48, No.8，pp1179(1982).

13) 加納碩雄，野口玉雄，上村俊一，橋本周久：三陸産ヒガンフグの毒性．食品衛生学雑誌，vol.25, No.1，pp24-29(1983).

14) 加納碩雄，野口玉雄，丸山純一，橋本周久：東京都中央卸売市場に入荷したヒガンフグの毒性．日本水産学雑誌，vol.50, No.6，pp985-990(1984).

15) M. Kodama, T. Ogata, K. Kawamukai, Y. Oshima, T. Yasumoto : Toxicity of Muscle and Other Organs of Five Species of Puffer Collected from the Pacific Coast of Tohoku Area of Japan. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries，50(4)，pp703-706(1984).

16) 加納碩雄, 野口玉雄, 丸山純一, 橋本周久 : センニンフグ *Pleuranacanthus sceleratus* の毒性．日本水産学雑誌，vol.50, No,12，pp2139(1984).

17) 加納碩雄, 野口玉雄, 大塚正人, 橋本周久 : カラス *Fugu rubripes chinensis* とトラフグ *Fugu rubiripes* の毒力の比較．食品衛生学雑誌，vol.25，No.5，pp436-439，(1984).

18) 加納碩雄, 野口玉雄, 丸山純一, 上村俊一, 橋本周久 : 三陸産ゴマフグ Fugu stictonotus の毒．日本水産学雑誌，vol.51，No.1，pp121-125(1985).

19) 加納碩雄，銭重均，佐藤之紀，丸山純一，野口玉雄，橋本周久：東京湾産ショウサイフグの毒性，食品衛生学雑誌，vol.26，No.5，pp489-495(1984).

20) SEAFOOD and FRESHWATER TOXINS –PHARMACOLOGY, PHYSIOLOGY, and DETECTION, Third Edition, CRC Press, pp248-253(2014).

別添２

写

平成２８年 8 月 30 日

厚生労働省医薬・生活衛生局
生活衛生・食品安全部監視安全課長　様

佐賀県政策部長　落合　裕二

株式会社萬坊
代理人弁護士　木村　道也

食品健康影響評価に係る補足資料の提出について（回答）

平成２８年６月１４日付け生食監発第０６１４第４号で依頼のありました標記の件について、別添のとおり提出します。

食品安全委員会専門調査会　資料要求等　回答

厚生労働省から評価要請のあった諮問事項について評価をするに当たり、第 39 回かび毒・自然毒等専門調査会で指摘された以下の事項について、補足資料を提出されたい。

【提案の趣旨】

- **本件は、厚生省「第 59 号通知」（後述の項目２．の記載参照）の１．（１）にある「個別の毒性検査により有毒でないことを確認した上で販売等」を行うものであること。その安全性をより確実なものにするための方法として、養殖から検査、提供までを一事業者において一貫して行うという、養殖トラフグ肝臓の可食化に関する管理システムを構築するものであること。**
- **したがって、養殖段階における「細菌による毒化の可能性がないこと」を前提とする提案ではないこと。**
- **本提案では、肝臓を 10 分割して各部位の毒力を測定後、有毒肝臓 16 個体のデータに基づいて統計処理を行い、R4 部位の毒力が他の部位に比べて有意に高いことを示している。さらに一部または全部位が無毒であった肝臓 26 個体のデータも加え合計 42 個体について高度な統計解析を行い、R4 部位の毒量測定値のレベルを検出下限以下とすることで、個体の最大毒量が 10 MU/g 以下であることが限りなく 100%に近い確率となることを示していること（確率的安全性評価の結果、R4 部位の毒量が 3.85MU/g の場合、個体の最大毒力が 10MU/ｇ以下である確率は 99.9999%であることが示されている）。**
- **本提案に関しては、フグ毒研究や食品安全管理の専門家で構成される「佐賀県におけるトラフグ肝の可食化に関する第三者評価委員会」において審議を重ねた結果、妥当との評価を受け、厚生労働省への提案に至ったものであること。**

１．本件については、佐賀県及び佐賀県内事業者からの提案を受けて厚生労働省から要請されたものであり、動物用医薬品・残留農薬・食品添加物・遺伝子組換え食品等と同様に、企業等からの申請に基づき、リスク管理機関から要請を受けて食品健康影響評価を行う企業等申請品目に当たるものと考えられる。企業等申請品目に係る食品健康影響評価は、企業等の特定の利害関係者が存在することから、本提案に関する、過去に提出したデータ及び今後提出予定のデータにおいては、GLP に関する以下の項目について示していただきたい。

（１）GLP に適合した試験を実施したか否か

A. GLP 試験ではない。

（２）GLP に適合した試験を実施していない場合、信頼性が確保されている検査データであることを示す根拠

A. 本提案に関し、提案者側で実施した試験について、以下のとおり説明する。

ア）萬坊養殖トラフグの分析データ（肝臓 5,999 個体、卵巣 139 個体）

［(資料１）1981 - 2015 年度：毒性試験数（萬坊陸上養殖ほか)］

［試験実施機関・実施者］

（2001－2005 年度）長崎大学

野口玉雄教授、荒川修助教授ほか（肩書きは当時）

（2006－2015 年度）東京医療保健大学、同大学院

野口玉雄教授ほか

［実施方法］

（実験計画）萬坊（佐賀県唐津市）において陸上養殖（開放性循環水槽）にて養殖したトラフグの肝臓について、毎年検査に供する検体数を、試験実施機関と萬坊が協議のうえ決定する。

（試験実施）萬坊はトラフグ肝臓を試験実施機関に冷凍状態にて送り、野口教授らが食品衛生検査指針に則ってマウス検定法により毒性検査を実施している。

（※）結果は、試験実施機関から萬坊に報告され、その内容を野口教授らが論文等で発表している。

イ）天然トラフグの毒性分布について［提案書 p.95-99］

［試験実施者］長崎大学大学院　荒川修教授、高谷智裕教授、阪倉良孝教授

株式会社萬坊

［実施機関］長崎大学

［実施方法］

（試験設計）長崎大学と萬坊により策定し、準備

（肝臓の分割方法、生と冷凍の肝臓の取扱い、前処理方法、
マウス毒性試験、試験の進め方、分担）

（試験実施）肝臓の分割、抽出液の調製、マウス毒性試験

→　萬坊、マウス毒性試験担当者（長崎大学大学院生）

※2 人以上の体制で実施

データの集積と検証、今後の試験についての確認作業

→　長崎大学、萬坊等で実施

データの確定　→　萬坊にてダブルチェックで確認の後、統計解析

※長崎大学が統計手法を指導、結果を確認

論文作成　→　長崎大学の指導による

ウ）高速液体クロマトグラフィー蛍光分析法によるトラフグ肝臓中のテトロドトキシン分析下限値［提出文献 No.37］

［試験実施者］長崎大学大学院　荒川修教授、高谷智裕教授、株式会社萬坊
［実施機関］長崎大学
株式会社日立ハイテクサイエンス　大阪営業所　サイエンスソリューションラボ大阪
（＊当時は、株式会社　日立ハイテクノロジーズ　関西支店　関西アプリケーションラボラトリ）
［実施方法］
（実験計画）長崎大学と萬坊が協議し策定
（試験実施）トラフグ肝臓抽出液、HPLC 分析試料及び TTX 標準溶液の調製・標定
→　長崎大学にて実施
マウス毒性試験
→　マウス毒性試験担当者（長崎大学大学院生）が実施
HPLC 蛍光分析（装置セッティング、操作、測定、波形処理等）
→　日立の技師が実施
測定結果の分析、計算等及び資料まとめ
→　萬坊でダブルチェック、その後、長崎大学が確認のうえ挙証資料として取りまとめ

エ）HPLC 蛍光法とマウス毒性試験による天然トラフグ肝臓中の TTX 測定値との相関
［（資料 2）高速液体クロマトグラフィー蛍光法とマウス毒性試験による天然トラフグ中のテトロドトキシン測定値の相関］
［試験実施者］長崎大学大学院　荒川修教授、高谷智裕教授、株式会社萬坊
［実施機関］長崎大学
株式会社　日立ハイテクサイエンス　大阪営業所　サイエンスソリューションラボ大阪
（＊当時は、株式会社　日立ハイテクノロジーズ　関西支店　関西アプリケーションラボラトリ）
［実施方法］
（実験計画）長崎大学と萬坊が協議し策定
（試験実施）トラフグ肝臓抽出液、HPLC 分析試料及び TTX 標準溶液の調製・標定、
HPLC 蛍光分析（装置セッティング、操作、測定、波形処理等）
→　長崎大学にて実施
マウス毒性試験
→　マウス毒性試験担当者（長崎大学大学院生）が実施
HPLC 蛍光分析（装置セッティング、操作、測定、波形処理等）
→　日立の技師が実施
測定結果の分析、計算等及び資料まとめ

→　萬坊でダブルチェック、その後、長崎大学が確認のうえ挙証資料として取りまとめ

以上のとおり、提案者が提出している検査データについては、いずれも提案者が単独で試験を実施して得られたものではなく、関係者の指導や協議のもとで進められ、まとめられたものであることを申し添える。

【提出資料】

（資料 1）1981-2015 年度：毒性試験数（萬坊陸上養殖ほか）

（資料 2）高速液体クロマトグラフィー蛍光法とマウス毒性試験による天然トラフグ中のテトロドトキシン測定値の相関

【フグ毒の検出方法について】

2．「フグの衛生確保について」（昭和 58 年 12 月 2 日　環乳第 59 号　厚生省環境衛生局長通知及び環境衛生局乳肉衛生課長通知、以下「第 59 号通知」という。）において、フグの個別の毒性検査により、毒力がおおむね 10MU/g 以下であることを確認した製品のみを販売等する場合は、食品衛生法第 6 条第 2 項のただし書に該当しない食品として販売等が認められないものの限りではないとしている。第 59 号通知が定める 10MU/g の科学的根拠を示していただきたい。また、実験動物を用いた急性毒性等の毒性学的な科学的知見があれば、あわせて示していただきたい。

3．食品衛生検査指針（理化学編）に 1 MU＝テトロドトキシン（以下、TTX という。）0.22 μg の記載はあるが、根拠文献等については触れられていない。1 MU が TTX0.22 μg に相当するとしている根拠となる科学的知見を示していただきたい。

A. 根拠は、国立予防衛生研究所 河端俊治博士執筆の資料 3「食品衛生検査指針（厚生省環境衛生局監修, 1978)」フグ毒（p. 232-240）によると捉えている。河端博士は、九州帝国大学 谷巌教授による長年のフグ中毒疫学調査結果（「日本産フグの中毒学的研究」（1945;帝国図書））に基づき、ヒト（体重 50 kg）に対する TTX の最小致死量を約 10,000 MU［ddY 系（オス）（厚生省予防衛生研究所作製株）20 g 体重への腹腔内投与による MU 単位］＝2,200 μg、すなわち 1 MU＝0.22μg としている。

【提出資料】

（資料 3）食品衛生検査指針（厚生省環境衛生局監修；1978）抜粋

4．一年に 2 回、蛍光 HPLC 法とマウスバイオアッセイ（以下、MBA という。）を比較するとしているが、詳細な実施規定を示していただきたい。

A. 実施規定については、外部機関と調整して今後作成する予定であるが、実施時期を設定し、年 2 回、食品衛生法上の登録検査機関によるマウス検定法での相互チェックを行うこととしている。

５．使用予定の蛍光 HPLC 法について、測定方法の詳細とその参照文献、標準作業手順書等の具体的な作業手順について示していただきたい。また、TTX の社内合格基準を検出下限値以下と設定しているが、提案された方法で養殖されたトラフグの肝臓から検出される TTX を測定する、分析機器の検出下限値及び定量下限値のデータを示していただきたい。

A. 分析条件は次のとおりである（[提出文献 No.37]「高速液体クロマトグラフィー蛍光分析法によるトラフグ肝臓中のテトロドトキシン分析下限値」）。参照文献として、[提出文献 No.30]「T. Yasumoto, T. Michishita: Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography. Agric. Biol. Chem. 49, 3077-3080 (1985)」を挙げる。

検出器	L-2485 形　蛍光検出器（日立製）
励起波長	384 nm
蛍光波長	505 nm
ポンプ	L-2130 形　ポンプ（デガッサ®）（日立製）
移動相	2.0 mmol/L 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム、10 mmol/L りん酸二水素アンモニウム、10 mmol/L りん酸水素二アンモニウム (pH7.0)
流速	1.0 ml/min.
分析カラム	Puresil™C18 (5 μm,4.6 mmφ×250 mm)　（Waters 社製）
カラム温度	25 ℃
反応槽温度	110 ℃（0.5 mmφ×10 m、テフゼル）
反応試薬	4 mol/L 水酸化ナトリウム
反応試薬流速	1.0 ml/min.
注入量	50 μL

外部の機器を使用して取得したデータが、資料 4「HPLC クロマトグラム（TTX 分析下限値）」である。通常、検出下限はトラフグ肝臓試料の分析結果を基に SN 比等から算出する。当時の分析では、このような計算による方法では求めず、トラフグ肝臓のブランク試料に、実際に TTX を添加し、どの程度まで検出できるかを検証した。

提示したクロマトグラムは、トラフグ肝臓のブランク試料に TTX を加え、1.17MU/g においても検出は可能であることを示したものである。

この結果から、1.2MU/g の検出は可能ととらえ、現時点での検出下限の目安としている。

なお、本提案の準備段階では、外部機関の機器を使用してデータを取得してきた。HPLC の感度、精度等は使用する機器により異なるので、提案が認可された後、萬坊に実際に導入された機器を用いて予備的に分析を行った後に、実施規定や基準を作成する予定である。

【提出資料】

（資料 4）HPLC クロマトグラム（TTX 分析下限値）

6．これまでに実施した、提案された方法で養殖されたトラフグの TTX に係る MBA、機器分析試験等の個々の検査データ（検査法、検査対象の由来（天然トラフグ、養殖トラフグの別等（網生け簀養殖、陸上養殖（陸上養殖の場合、その養殖場所）の別等））、検査部位（肝臓、肝臓内の部位、卵巣等その他の組織の別等）、検出下限値及び（機器分析の場合）定量下限値とその算出方法、実測値等を含む）を全てお示しいただきたい。また、そのうち、以下についても別途整理の上、示していただきたい。

A. 2001～2015 年度における、萬坊での陸上養殖（佐賀県唐津市）によるトラフグの検査データは資料 1 のとおりである。検査は全て MBA によるが、2007 年、2008 年、2009 年、2011 年に行った検査の一部については、MBA よりも高感度の LC - MS 法も併用して分析を行っている。

なお、網生け簀養殖に関しては、

1982～1983 年福井、鹿児島、和歌山県産計 85 個体の生殖腺 <10 MU/g

［(資料 5) 斎藤俊郎ら: 養殖トラフグの毒性とテトロドトキシン抵抗性. 日水誌, 50, 1573-1575 (1984) ］、

1990 年鹿児島県産 40 個体の腸 <0.1 MU/g、生殖腺、胆嚢、腎臓、心臓、脾臓 <5 MU/g、

2001 年熊本県産 5 個体の生殖腺を含む内臓 <2 MU/g、

2002 年長崎県産 11 個体の生殖腺や生殖腺を含む内臓 <2 MU/g

［(資料 6) 野口玉雄ら: 囲い養殖法により養殖されたトラフグの毒性. 食衛誌, 45, 146-149 (2004) ］

という試験データがあり、このうち一部について、LC-MS 法を併用して分析を行った結果においても毒が検出されていないことを申し添える。

【提出資料】

（資料 1）1981-2015 年度：毒性試験数（萬坊陸上養殖ほか）

（資料 5）斎藤俊郎ら：養殖トラフグの毒性とテトロドトキシン抵抗性．日水誌,50,1573-1575（1984）

（資料 6）野口玉雄ら：囲い養殖法により養殖されたトラフグの毒性．食衛誌,45,146-149（2004）

（1）提案された方法で養殖されたトラフグの肝臓及びその他組織（卵巣等）について、過去に検査した総数及び毒化した例の有無

A. 肝臓：5,999 個体（2001～2015 年度）、卵巣：139 個体（2004、2009、2010 年）を検査、いずれも有毒ではない（10MU/g 未満）。

（２）（１）で毒化した例がある場合、その個体数、各個体の月齢、TTX の分布及び蛍光 HPLC 法又は LC-MS/MS 若しくは MBA により測定された TTX 測定値

A. いずれも有毒ではない（10MU/g 未満）。

（３）（２）のうち、TTX が社内合格基準を超え、不合格となった肝臓の数量

A. いずれも有毒ではない（10MU/g 未満）。

（４）提案された方法で養殖されたトラフグの肝臓の R4 部位について、提案された検査方法で測定を行った全てのデータ（検出下限値以下の検体も含む）

A. 食提供を目的とした検査方法である R4 部位を検査した試験的モニタリングは実施していない。

ただし、（株）萬坊で養殖したトラフグの肝臓を HPLC-FL 法で分析した場合の肝臓抽出液中の妨害ピークを調査したデータがある。検体数は 8、肝臓の一部を切取り、抽出液を調製し、C18 でクリーンアップした後、ろ過して分析したデータである。分析条件は「高速液体クロマトグラフィー蛍光分析法によるトラフグ肝臓中のテトロドトキシン分析下限値」［提出文献 No.37］と同じである。

【提出資料】

（資料 7）養殖トラフグ肝臓の HPLC-FL 分析概要

（５）提案者である萬坊株式会社が実施している試験（提出文献 No.37）について、検査部位と検査検体数

A. 検査部位については、特定の部位を採取したものではない。また、検査検体数は 1 である。

（６）機器分析試験について、TTX の添加回収試験により回収率及び再現性を確認したデータ

A. 今回の提案が認められた後、検査機器を導入し、バリデーションとして、添加回収ブランク試験を実施する予定である。

７．蛍光 HPLC による TTX の検出は、食品の安全性検査方法という観点では、食品の安全性を図る行政検査に値する信頼性確保がなされていない可能性が指摘されている。また、HPLC で使用する TTX についても、認証標準物質（CRM）が存在しないと指摘されているが、食品の安全性を確認するための試験として、今回提案されている HPLC 法を TTX 検出法として用いることの妥当性について、貴省の見解を伺いたい。

また、科学的に妥当性が確認された分析法ではあっても、客観的に信頼できるデータを得るためには、検査室における精度管理及び検査室の第三者認証が求められる。本件で TTX を分析する検査室の資格要件について、どのような基準を設ける予定であるか貴省の見解を伺いたい。

８．測定試料の保存及び調整方法、測定機器の機種及び取扱方法、測定結果の解析方法などの妥当性について、年１、２回は専門的な知識を有する外部機関の確認を受けるとしているが、具体的に、誰がどのように確認する予定なのか。

A. 現在のところ未調整であるが、以下のとおり想定しているところである。

（設備装置導入後、肝食運用開始前）

a. 分析機器と分析方法バリデーション

→　検査の目的を果たせることを確認するため、分析機器と分析方法（添加回収ブランク試験の実施）について妥当性を確認する。（実施機関：萬坊、機器メーカー）

b. 管理システム運用

→　管理システム（管理手順、作業手順、教育プログラム等）が手順書通りに運用できるかを現場において確認する。（実施機関：専門的な知識を有する外部機関）

（肝食運用開始後）

c. 年１，２回の妥当性確認・測定試料の保存及び調製方法、測定機器の機種及び取扱方法、測定結果の解析方法などの妥当性

→　日常検査や分析バリデーション（添加回収ブランク試験を含む）についての記録の監査や試験の査察等を想定している。（実施機関：外部機関）

d. 年２回のマウス検定法での相互チェック（実施機関：食品衛生法上の登録検査機関）

e. 管理システムの運用については、佐賀県が監視指導を実施する。

以上のとおり、肝食の運用にあたっては、予め管理システムの運用について外部機関の確認を受けることとしており、また、運用開始後も定期的に外部機関による監査や佐賀県による監視指導を受けることにより適正な実施を確保していくこととしている。

９．MBA と蛍光 HPLC 法について、相関を示す検査データは提出文献 No.31 にあるトラフグの肝臓４検体が確認できるが、それ以外に MBA と蛍光 HPLC 法の相関を示すデータがあれば示していただきたい。

A. 萬坊により「高速液体クロマトグラフィー蛍光分析法とマウス毒性試験による天然トラフグ肝臓中のテトロドトキシン測定値の相関」の検証を行っている（今回、資料 2 を提出）。以下の Fig.5 が検証結果であり、このうち、左端のグラフが、HPLC 蛍光法とマウス毒性検査との相関である。

HPLC 法による測定値は TTX 本体のみのピーク面積から算出した。マウス試験を Y 軸に取った場合、マウス毒性試験と HPLC-FL 法による測定値の相関式は Y=1.1004X、相関係数は 0.994、個体数は 16 個体であった。

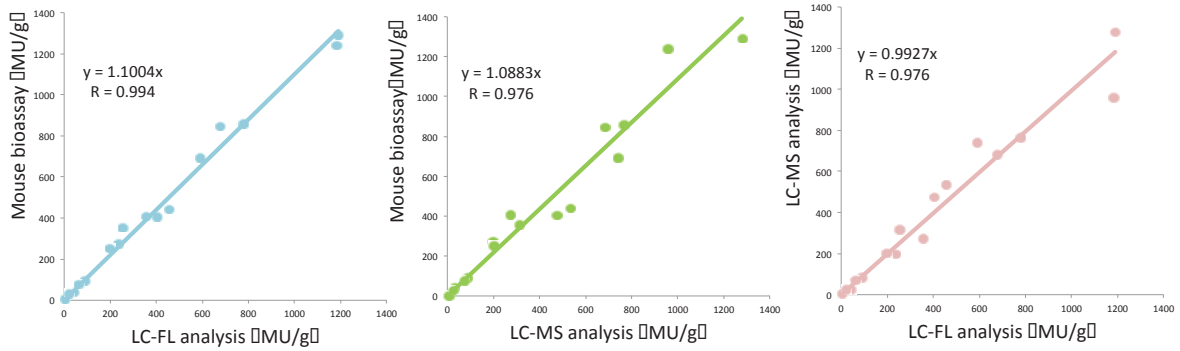


Fig. 5. Comparison between the toxicity scores by MBA and TTX amounts by LC-FL or LC-MS.

【提出資料】

（資料 2）高速液体クロマトグラフィー蛍光分析法とマウス毒性試験による天然トラフグ肝臓中のテトロドトキシン測定値の相関

１０．養殖トラフグの肝臓において、提案された方法で実施される検査に用いる検査部位である R4 部位が、他の部位と比較して相対的に毒性が高いことについて、以下の項目について示していただきたい。

（１）解剖学的及び組織化学的に、R4 部位に相対的に毒性が高いことを示す説明可能な検査データ又は科学的知見

A. 解剖学的及び組織化学的に説明できるデータはない。

（２）提出された文献「天然トラフグ肝臓の毒性分布」において、16 検体の個体ごとの各部位（L1～5 及び R1～5）における TTX 測定値

A. 資料 8 で、着色したセルに示された TTX 測定値がこれにあたる。

【提出資料】

（資料 8）TTX 分布データ

（３）肝臓における部位間のばらつきのみならず、個体間のばらつきを考慮した解析や考察結果

A. 提案者が提出した資料「天然トラフグの毒性分布」（提案書 p.95-99）において、トラフグ肝臓の「R4 部位」が、統計的に有意に毒性が高いことを示した件について、統計解析による検証を行った（統計数理研究所）。そこでは部位間のみならず個体間のばらつきも考慮したうえで検証を行った結果、R4 の相対毒力が他の部位と比べて平均的に高いという提案者の報告が支持される結論が得られている（提案書 p.152-157 参考文献 3「トラフグ肝臓の食品安全性評価について」）。

（４）（２）の文献及び当該文献のデータを用いて算出した統計学的解析による結果以外に、トラフグの肝臓内の TTX の毒性の分布を示した検査データ又は科学的知見

A. 渕は、トラフグ 6 個体、カラス 1 個体、コモンフグ 3 個体について肝臓の毒性分布を調べ、トラフグとカラスの肝臓では消化管側と反対の下端部位の毒力が他の部位と比較して低値を示したと報告している［(資料 9) 渕祐一: 第 3 章第 1 節 有毒肝臓における毒の分布. “西日本産フグの毒性に関する研究”, 長崎大学博士論文, pp. 79-84 (1999) ］。

しかしながら、低毒力の下端が肝臓全体に占める割合は僅か（1.3～6.5%）で、他の部位の毒力変動は測定誤差の範囲内と述べている。

【提出資料】

（資料 9）西日本産フグの毒性に関する研究（抜粋）

１１．提案においては、養殖トラフグの肝臓から TTX が検出された場合は、再分析を行うとしている。不合格となった肝が再分析又は再々分析により合格となり得る理由をご教示いただきたい。また、再分析又は再々分析により合格し得るという検査方法の妥当性について示していただきたい。さらに、養殖トラフグの肝臓における、毒性の個別検査の第 1 段階で、いずれかの肝が基準値を超過した場合、第 2 段階としてロット内（同一の養殖槽内）の全ての個体の肝を再分析するのかご教示いただきたい。

A. HPLC 分析において、装置が正常に作動していても、装置の定期点検を行っていても、TTX が入っていない試料においてゴーストピークが TTX 保持時間に検出される可能性が否定できない。

ゴーストピークの要因としては、「分析装置の流路の汚染」「移動相の変質」「別の物質が偶然 TTX 検出位置に溶出」「分析カラムが汚染」などが考えられることから、ゴーストピークが現れたら再度分析を行い異常なデータではないか確認を行うことは必要である。

このため、第三者評価委員会における議論において、装置器具点検や分析条件確認後の再分析を認めていただいたところであり、TTX が入っている試料は必ず検出されることから、再分析の結果、不合格の肝臓を合格と判定することはないといえる。

なお、いずれかの肝が基準値を超過した場合は、基準値を超過した肝を対象に再分析を行うが、同日取り上げたすべての肝について判定保留として提供は行わないものである。

１２．提案においては、養殖トラフグの肝臓から TTX が検出された場合は、再分析を行う手順が示されており、これは偽陽性である可能性を想定しているものと考えられるが、TTX が存在しているにも関わらず、TTX が検出されない偽陰性がある可能性について、どのように整理しているのかご教示いただきたい。

A. 事前に装置が正常に稼働していることを確認（※）するため、これまでの検査において偽陰性が出たことは無い。

なお、再分析については、先述のとおり「ゴーストピーク」の可能性を排除できないため想定しているものである。

（※）TTX の標準溶液を分析して検出と再現性を確認。ブランク試料となる 0.1%酢酸など TTX の入っていない試料を分析して不検出であることを確認。

感度が悪くなって LOD が高くなる場合は、メンテナンスに切り替える予定である（目安としては、萬坊がこれまで行った試験分析において検出可能であった下限値 1.2MU/g（抽出比 3）を考えている。ただし、実際に食提供における検査では抽出比 5 とするため数値が変わる可能性があることを申し添える）。

１３．今後、より精度が高い分析機器を使用する場合、検出下限値及び定量下限値が低くなる可能性があることが指摘されている。このことについて、どのように整理しているのかご教示いただきたい。

A. 本提案の準備段階では、外部機関の機器を使用してデータを取得してきた。HPLC の感度、精度等は使用する機器により異なるので、提案が認可された後、萬坊に実際に導入された機器を用いてバリデーションを実施する。

［提出文献 No.37］「高速液体クロマトグラフィー蛍光分析法によるトラフグ肝臓中のテトロドトキシン分析下限値」の 2 頁 4 項に、LOQ（0.08 MU/ml，SN 比 10）と LOD（0.03 MU/ml，SN 比 3）を記載している。ただし、これは 0.1%酢酸を溶媒とする標準溶液の分析から算出した値である。肝臓抽出試料の場合は、夾雑成分の影響で、LOD と LOQ は高くなる。

また、蛍光法での検出感度が上がっている分、TTX と同じ保持時間に微小の夾雑成分が検出される可能性もあり、この夾雑成分ピークの大きさについて把握するためにも必ず複数個体の分析を実施する予定である。

TTX と同じ保持時間に検出される夾雑成分のピーク（ブランクピーク）が看過できない場合は、分析条件や前処理条件を再度検討して夾雑成分の除去を行う。しかし、除去が困難である場合は、ブランクピークとして TTX 換算量を算出し、TTX 量から差し引く方法もあり、これは JIS K 0124:2011 高速液体クロマトグラフィー通則に記載されている。

１４．事業者の店では、一人一食当たり最大どの程度の量のトラフグの肝臓を提供することを想定しているのか示していただきたい。

A. 現在、確定しているメニューは 1 人前 20 g の肝刺しであり、お客様に提供した肝の番号またはロット番号は手順書や記録にて追跡できる仕組みにしている。また、現状のレストランへの来客者数や検査能力から考えてお客様へ提供できる肝の量を考慮しても、１人分 20 g と試算しており、当面の提供量として予定している。

無毒を確認した肝であるが、国により新たに総量規制が示された場合、これを守り１人分の量を制限する。

現段階で、提供量を制限（例えば、一人一皿まで）することもできなくはないが、国の総量規制の基準がない以上、その設定は難しいところがあると捉えている。

【TTX 類縁体について】

１５．トラフグ又はその他のフグの肝臓における TTX の類縁体については、トラフグ等から検出される量は微量だが、科学的に TTX と平衡状態であり、4-エピ-TTX やヒドロ TTX が TTX に変換する可能性が指摘されている。このことについて、以下の項目について示していただきたい。

（１）トラフグの肝臓及びその他の組織における TTX 類縁体と TTX の含有量及びその割合に関する科学的知見又はこれらの類縁体について測定したことがある場合、その測定データ

A. 資料 10「TTX 類縁体について」及び関連論文（資料 10 - 論文 1～16）を提出する。

【提出資料】

（資料 10）TTX 類縁体について

（資料 10－論文 1～16）※詳細は「提出資料リスト」参照

（２）トラフグの肝臓及びその他の組織における TTX 類縁体と TTX 毒性の強さの比に関する科学的知見又はこれらの類縁体について測定したことがある場合、その測定データ

A. TTX 類縁体の毒力は deoxytetrodotoxin 84.5 μg/kg が最高で、TTX 8.22 μg/kg の約 1/10 の毒性で他はほとんど毒性を示さない［(資料 11) 松居 隆, 酒井 浄: テトロドトキシン, 医学のあゆみ, 112, 852-860 (1980) ］。

また、以下は、資料 10「TTX 類縁体について」の抜粋である。

なお、以下の文中及び表 1 に示す論文番号「2,3・・・」は、「資料 10 - 論文 2,3・・・」に対応するものである。

「　各類縁体の毒性を表 1 にまとめた。マウス毒性については、LD_{50}、LD_{99}、MLD が混在しており、厳密に言えば直接比較することはできないが、概ね表の数値が各類縁体の毒性を反映している（数値が小さいほど毒性が強い）と考えてよい。すなわち、この表で見る限り、TTX の毒性が最も強く、次いで 6-deoxyTTX で TTX の 1/3、11-norTTX-6(*S*)-ol で 1/5、6-*epi*TTX で 1/6、4-*epi*TTX、11-deoxyTTX、11-norTTX-6(*R*)-ol で 1/7（Na チャネル阻害活性でみた場合、11-deoxyTTX は 1/62）程度の毒性ということになる。トラフグ属フグでは、これら中程度の毒性の類縁体は微量にしか検出されず [2-6]、一方、比較的多く検出される類縁体

（4,9-anhydroTTX、6,11-dideoxyTTX、5,6,11-trideoxyTTX）[2-6] は、いずれも毒性が非常に弱い（それぞれ TTX の 1/54、1/42、1/75）ので、これら TTX 類縁体が全体の毒性に寄与する割合はきわめて低いと考えられる。11-oxoTTX について、Na チャネル阻害作用が TTX の 4～5 倍強いとする報告もあるが [16]、トラフグ属フグからはほとんど検出されない（ヒガンフグで未検出、コモンフグ卵巣でごく微量の検出例あり）[3,4]。いずれにしても、トラフグ属フグの主要毒成分は常に TTX であり [2-6]、TTX が未検出にもかかわらず、類縁体の毒性のみで規制値を上回ることはあり得ないと考える。　」

表 1　TTX 類縁体の毒性

TTX 類縁体	マウス毒性 LD_{50}, LD_{99}, or MLD (μg/kg)	Na チャネル阻害活性 EC_{50} (nM)	論文番号
TTX	10 LD_{50}	2.1	3, 7
4-*epi*TTX	70 -*		8
4,9-anhydroTTX	540 -*		8
6-*epi*TTX	60 LD_{50}		9
4-CysTTX	>140 MLD		10
5-deoxyTTX	>320 LD_{99}		11
6-deoxyTTX		6.5	3
11-deoxyTTX	71 LD_{50}	130	3, 9
5,11-deoxyTTX	>550 MLD		4
6,11-deoxyTTX	420 LD_{50}	400	3, 12
5,6,11-trideoxyTTX	750 MLD		13
11-norTTX-6(*S*)-ol	54 LD_{50}		14
11-norTTX-6(*R*)-ol	70 LD_{99}		6
11-oxoTTX	120 MLD		15

* 論文中では、食品衛生検査指針のマウス毒性試験で求めた「lethal potency」と記載されている。

【提出資料】

（資料 10）TTX 類縁体について

（資料 11）松居 隆, 酒井 浄: テトロドトキシン, 医学のあゆみ, 112, 852-860 (1980)

【フグの毒化機構について】

１６．現時点までに明らかになっているフグの毒化機構に関する科学的知見について整理し、示していただきたい。

A. 2001－2015 年度の 15 年間にわたって、萬坊の陸上養殖水槽において無毒の餌で養殖されたトラフグの肝臓を毎年、卵巣は 2004 年、2009 年、及び 2010 年それぞれ合計 5999 個体及び 139 個体採取してマウス試験法で TTX 毒性を測定した結果、いずれも無毒であったことから、無毒の餌でフグを養殖すれば毒化しないというこれまでの主張が 15 回肯定された。

他方、Itoi ら［提出文献 No.36］によると天然クサフグが有毒ヒガンフグの卵を喫食していることからクサフグが食物連鎖によって毒化する事実として示した。

フグの毒化機構が食物連鎖によるとの説に対して Noguchi ら［提出文献 No.1］は無毒トラフグに各種濃度のフグ毒を含む餌料を与えると毒量依存的に無毒トラフグが毒化することをすでに示している。

前回の諮問以降、フグが食物連鎖を介して毒化している点については、前述の Itoi らの報告以外、特段新たな知見は見出されていないが、逆に言えば、この点を否定するような新事実もない。有毒餌生物を介してフグ体内に取り込まれた TTX の動態や蓄積機構については、東京海洋大学のグループの肝臓組織切片を使った研究［提出文献 No.6-9, 25］や薬物速度論的なモデルを用いた研究等［提出文献 No.10, 11, 17］、長崎大学のグループの生体フグへの毒投与実験に基づく研究等［提出文献 No.8, 12-16］があり、フグ体内に取り込まれた TTX は血液を介してまず肝臓に特異的に取り込まれること、その後は皮や卵巣に移行するが、その様式は種や成長、成熟段階により異なること、などが示されている。

また、フグ血漿中に存在する TTX 結合性タンパク質（PSTBP）に着目した研究［提出文献 No.18-20, 22］や TTX 蓄積関連遺伝子の探索を試みた研究［提出文献 No.21, 23-25］などもあるが、まだ決定的な知見は得られていない。

１７．TTX 産生細菌として、フグより *Vibrio alginolyticus* 等の *Vibrio* 属、*Serratia marcescens* 等の *Serratia* 属及び *Pseudomonas* 属等が分離されたという報告がある。また、紅藻類より TTX 産生細菌として、*Alteromonas* 属並びに *Schewanalla* 属が分離されたという報告もあるが、TTX の生合成メカニズム等についての詳細は不明である。TTX の生合成メカニズム等について、上記のような TTX 産生細菌に関する最新の科学的知見を整理し、示していただきたい。

A. 非常に多様な TTX 産生細菌が TTX 保有生物や海底泥などから分離されているが、継代培養により TTX 産生能を失うため、TTX 生合成経路やそれに関わる遺伝子等の特定には至っていない［提出文献 No.32, 33］。

１８．麻痺性貝毒にはサキシトキシン（STX）の他、ゴニオトキシン（GTX）やトキシン C1、C2 があり、後者は、日本の有毒藻類などが生産する主な麻痺性貝毒である。トラフグの肝臓（提案された方法で養殖されたトラフグの肝臓を含む）における、これら（STX、GTX、C1、C2 等）の麻痺性貝毒の蓄積に係る科学的知見又は麻痺性貝毒を測

定したことがある場合、その測定データを示していただきたい。

A. 麻痺性貝毒（PSP）についてはその産生は有毒プランクトン（*Alexandrium* 属、その他）によるが、これまで知られている毒化機構は、まず有毒プランクトンが発生し、ついでこれを食べるプランクトンフィーダー二枚貝が毒化し、それを食べる食物連鎖上位の魚が毒化する食物連鎖が確立されている。

萬坊は玄界灘の海水を殺菌濾過して採水しているので養殖水槽に有毒プランクトンが混入する恐れはまずない。あったとしてもトラフグはプランクトンを摂取しないので飼育水槽内でのトラフグの PSP の毒化はあり得ない。また、玄界灘で PSP 産生プランクトンが発生した例は知られていない。

以上に加え、以下の理由により、TTX が未検出にもかかわらず、養殖フグが PSP で毒化することはありえないと考える。

- **マウス毒性試験では PSP も TTX と同様に検出されるが、これまで調査した養殖フグ 10000 個体以上（萬坊の陸上養殖フグ 5999 個体を含む）からマウス毒性が検出されたことはない。すなわち、これまで養殖トラフグが PSP で毒化した例はない。**
- **天然トラフグから PSP が検出された例もない。**
- **トラフグ属では、ヒガンフグ、コモンフグ、ナシフグから PSP（STX）が検出されているが、いずれも微量（共存する TTX の 0.01～数%程度）である**

［(資料 12) M. Kodama et al.: Occurrence of saxitoxin and other toxins in the liver of the pufferfish *Takifugu pardalis*. Toxicon, 21, 897-900 (1983)］

［(資料 13) Nakamura et al.: Occurrence of saxitoxin in puffer fish. Toxicon, 22, 381-385 (1984)］

［(資料 10 - 論文 2) J. Jang, M. Yotsu-Yamashita: Distribution of tetrodotoxin, saxitoxin, and their analogs among tissues of the puffer fish *Fugu pardalis*. Toxicon, 48, 980-987 (2006)］。

- **Nagashima et al.［提出文献 No.6］と Matsumoto et al.［提出文献 No.7］は、肝臓切片を用いた in vitro 実験により、トラフグ肝臓は TTX を顕著に取り込むが、他の一般魚同様 PSP（STXs）は取り込まないことを示している。すなわち、仮に養殖水槽に PSP 産生渦鞭毛藻が混入し、それをトラフグが摂取したとしても（前述のとおり、そのようなことはありえないが)、PSP を蓄積するリスクはない（あっても他の一般魚と同程度)。**

【提出資料】

（資料 12）M. Kodama et al.: Occurrence of saxitoxin and other toxins in the liver of the pufferfish *Takifugu pardalis*. Toxicon, 21, 897-900 (1983)

（資料 13）Nakamura et al.: Occurrence of saxitoxin in puffer fish. Toxicon, 22, 381-385 (1984)

（資料 10 - 論文 2）J. Jang, M. Yotsu-Yamashita: Distribution of tetrodotoxin, saxitoxin, and their analogs among tissues of the puffer fish *Fugu pardalis*. Toxicon, 48, 980-987 (2006)

【提案のトラフグの陸上養殖について】

１９．提案されたトラフグの養殖で実際に使用されている飼料について、以下の項目について示していただきたい。

（１）飼料の成分組成（飼料の原材料、配合比等）

A. 資料 14 のとおりである。

【提出資料】

（資料 14）黒潮フロート品質証明

（２）飼料の由来（魚介類、海藻類が含まれる場合にはその採取海域等）

A. 資料 14，15 のとおりである。

【提出資料】

（資料 14）黒潮フロート品質証明

（資料 15）メロード産地証明

（３）飼料成分の恒常性を確保する（あるいは品質を確認する）ための具体的方法

A. 品質証明書及び産地証明を取り寄せて養殖場に保管するように手順書（提案書 p.23「養－参考 1-3 餌料」）に規定している（3.2 餌料の購入と保管（2））。

（４）飼料の滅菌・殺菌の有無（有の場合、その詳細）

A. 殺菌は実施していないが、メロードは最終的に水道水で洗浄し、また、メロードと黒潮フロートともに異物が無いことを目視で確認したことを記録（提案書 p.15「様式 Y 参 1 飼育記録」）して給餌することを、（３）と同じ手順書に規定している（3.3 餌料の使用と異物の確認（3）（5）（6））。

（５）飼料の TTX による汚染状況を示す検査データ

A. 一部餌料についてマウス毒性試験を実施して無毒を確認している（資料 1「1981-2015 年度：毒性試験数（萬坊陸上養殖ほか）」の表下のコメント）。

（（資料 16）「大貫和恵，野口玉雄，荒川修．開放系循環水槽において養殖されたトラフグ肝臓の無毒確認とその脂質中の機能性成分．日食化誌，16，157-162（2009）．」の p.159 に 2006 年から 2008 年に使用された餌料について無毒を確認した旨を記載）

【提出資料】

（資料 16）大貫和恵，野口玉雄，荒川修．開放系循環水槽において養殖されたトラフグ肝臓の無毒確認とその脂質中の機能性成分. 日食化誌, 16, 157-162（2009）

２０．提案されたトラフグの養殖で実際に導入する種苗について、以下の項目について示していただきたい。

（１）導入種苗に関する情報
（卵の由来や種苗導入時の週齢等が記載されている生産履歴書等）

A．一例として、資料 17「種苗生産履歴書 H26」を添付する。種苗を購入した時には、販売元より種苗生産履歴書を手に入れ、内容を確認して保管することとしている（提案書 p.12「養－参考 1-1 トラフグ養殖管理 4.2 種苗の受入れ（2）」参照）。

【提出資料】

（資料 17）種苗生産履歴書 H26

（２）TTX 検出の有無が確認できる検査データ及び検査時の種苗の週齢

A．当該検査データはない。種苗生産における卵の毒の影響については、以下のとおり考える。

「厚生労働省からの回答に対する意見（東京医療保健大学　野口玉雄、長崎大学水産学部　荒川修）」（2010.5 構造改革特区臨時提案再検討要請 提出資料）より抜粋

天然トラフグの卵巣は強毒（100 MU/g 以上 1000 MU/g 未満）とされている。しかしながら、受精卵 1 個の重量は 1 mg 程度であり、孵化仔魚 1 個体が卵から受け継ぐ総毒量は最高でも 1 MU 程度、すなわち食品衛生上まったく問題にならないレベルということになる。

筆者らは、富山県産天然トラフグ親魚雌雄 3 ペアから人工授精により得た受精卵、およびそれを孵化させて得た仔魚（それぞれ A 区、B 区、C 区）を用い、孵化後の経日的な毒の消長について調査した。その結果、1 g 当たりの毒量（LC/MS 分析により測定）は、受精卵より仔魚の方が軽いため一旦増加するが、その後は仔魚の体重増加に伴って急激に減少し、2 週間程度で検出限界レベルとなった（未発表データ；図 1）。

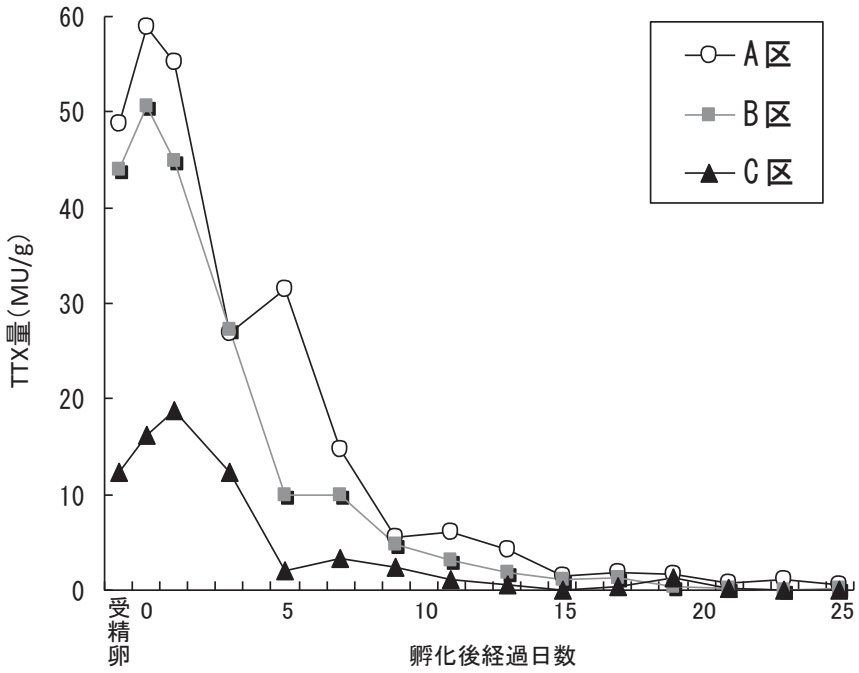


図１ トラフグ受精卵および仔魚の毒量の経日変化

すなわち、孵化直後はある程度の毒を保持していたとしても、新たな補給がない限り、この毒は 2 週間程度で事実上消失する。Nagashima ら[1)]も沖だし前の仔稚魚について同様の結果を報告している。

近年では、雌の親魚として養殖魚を使うこともある。この場合は、卵の段階から毒はないと考えられる。

以上のとおり、種苗生産に用いる卵の毒の影響は無視しうるものであり、「陸上循環養殖施設」で無毒のトラフグを恒常的に生産することが可能である。毒化機構に関しても食物連鎖説を支持する知見が得られており、当面、提供前に肝臓毒性を確実にチェックするシステムを導入することにより、食品としての安全性が 100%確保できるものと確信する。

参考文献

1) Y. Nagashima, I. Mataki, M. Toyoda, H. Nakajima, K. Tsumoto, K. Shimakura, K. Shiomi: Change in tetrodotoxin content of puffer fish *Takifugu rubripes* during seed production from fertilized eggs to juveniles. *FoodHyg. Saf. Sci.*, 51, 48-51 (2010)（資料 18）

【提出資料】

（資料 18）Y. Nagashima, I. Mataki, M. Toyoda, H. Nakajima, K. Tsumoto, K. Shimakura, K. Shiomi: Change in tetrodotoxin content of puffer fish *Takifugu rubripes* during seed production from fertilized eggs to juveniles. *FoodHyg. Saf. Sci.*, 51, 48-51 (2010)

（３）導入種苗における TTX 産生細菌の保有の有無が確認できる検査データ

A. 検査データはない。

２１．養殖に使用する海水について、以下の項目について示していただきたい。

（１）滅菌・殺菌方法及び滅菌・殺菌後の海洋細菌の除去率等の検査データ

A. 検査データはない。

（２）海水を濾過するためのフィルターの種類や孔径サイズ（ポアサイズ）

A. ① ポンプ室・・・砂濾過

※ 石英質の多い硬い砂で、経年劣化が少なく、長期にわたって安定した処理能力が得られるため、水道用砂ろ過にも使用されている（JWWAA103:2006）高品質なものである。有効径 0.6mm、均等係数 1.4

② 循環式養殖場

ドラム式フィルター・・・フィルター目合 100 ミクロン
一次濾過槽・・・サランロック® CS-100 を袋状に縫製
二次濾過槽・・・ 同 CS-100 10cm 角裁断、120ℓ
三次濾過槽・・・ 同 OM-150 5 枚重ね×3 段
CS-100 2 枚重ね×3 段

濾過材については以下のとおり

型番	サラン® 繊維太さ d(dtex)	厚み（mm）	目付 (kg/m2)	嵩密度 繊維＋ラテックス (kg/m3)	比表面積 (m2/m3)	空間率（%）
OM-150	600～1000d（670d～1100dtex）	50	3.3	65	360	96
CS-100	75d（83dtex）	10	0.5	50	740	97

（３）台風等により海水の採取海域の状態や養殖場の状況が変化する等、非常時に障害・損害が発生した場合の対応策

A. 海水の採取は、ポンプ室から 6 本のパイプが沖合約 50m の水深約 10m の海底に設置している架台に取り付けられ取水している。

取水場所は海底から約 1m 上のところにあり、6 本のパイプの先端は、1 本 1 本ゴミ除けのカバーが取り付けられている。

台風によって海面の上層部には汚れは生じるものの取水場所についてはきれいな海水が取水可能なため台風での影響は少ないと考える。

また、停電時には次の対応をとる。

① 養殖場・・・自家発電機が作動する

② 取水ポンプ場

ポンプ場からの海水の供給が止まるため、飼育槽への流水量を減らし、酸素供給を多くすることでの対応が可能である。

定期的な維持管理として、養殖場施設設備関連の業者と契約し、定期的にメンテナンスを実施しており、台風の後などは設備に問題がないか確認を行っている。

したがって、気象条件の影響を受けることなく運転ができるよう管理がなされている。

２２．提案方法の養殖で利用する砂はどのような砂を用いる予定なのか示していただきたい。また、それらの砂を使用することにより TTX 産生細菌が混入するリスクはないかどうか確認できる、検査データを示していただきたい。

A. 石英質の多い硬い砂で、経年劣化が少なく、長期にわたって安定した処理能力が得られるため、水道用砂ろ過にも使用されている（JWWAA103:2006）高品質なものである。

なお、TTX 産生細菌の混入リスクを確認できる検査データはない。

【その他】

２３．リスク管理措置に関する事項ではあるが、以下の項目について既に設定されているのであれば、示していただきたい。まだ設定されていないのであれば、貴省の見解を伺いたい。

（１）検査で、提案された方法で養殖されたトラフグの肝臓から TTX が検出された場合、養殖過程で毒化のメカニズムが働いている可能性が考えられるため、検査で TTX が検出された際の対応策や原因究明の方法（マニュアル等）

A. 提案書 **p.85**「危機管理対応マニュアル **1**，**1.2**③」において、「第 **3** 段階の分析により検出したピークが **TTX** であることが判明した場合、原因（養殖場での管理状況など）を調査し、専門家（長崎大学など）に依頼して **TTX** の発生原因の特定を行う。原因が明らかになるまでの間、ふく萬坊でのトラフグ肝提供を停止する。」としている。

有毒の個体を出さないための養殖工程における管理のポイントは、

①外来生物の除去（海水のろ過、殺菌）

②餌料管理

③侵入者による危害防止（フードディフェンス）

の３点であると考えており、検証は、海水と餌料中の **TTX** を検査することを想定している。

なお、外部機関による第３段階での分析においても **TTX** ピークを検出するような事態が発生した場合には肝食提供事業をやめる、というのが基本的なスタンスであることを申し添える。

（２）事業者の店で、天然のトラフグや、提案の方法で養殖されたトラフグ以外の養殖トラフグを、提供しないことを明らかにしたマニュアル等

A. 今回の提案に際しては、萬坊の全従業員が対外的に説明の必要な場面で的確に対応できるよう「萬坊従業員教育プログラム」、「全社対応 **Q&A**」（提案書 **p.123,124**）により教育を行っていくこととしている。

また、佐賀県におけるトラフグ肝の可食化に関する第三者評価委員会からの評価書中においても補足意見として以下の意見が付されている。

「今回の提案を妥当とする評価は、提案者が取り扱う養殖トラフグ及びそのシステムに限定したものであり、養殖トラフグの肝臓すべてに適用されるものではないこと。」

「提案者は『ふく萬坊』で養殖トラフグの肝臓の提供を行う場合は、『養殖トラフグの肝臓は安全』との誤解を与え、他の飲食店等で個別の毒性検査が行われていない養殖トラフグの肝臓が提供されることがないように正確な情報提供を行うこと。」

これを受け、その旨を飲食店内に掲示するなどして正確な情報提供を行う予定である（提案書 **p.109**「ふく－**1**　入庫出庫管理　重要規則」）。

[提出資料リスト]

(資料 1)
1981-2015 年度：毒性試験数（萬坊陸上養殖ほか）

(資料 2)
高速液体クロマトグラフィー蛍光法とマウス毒性試験による天然トラフグ中のテトロドトキシン測定値の相関

(資料 3)
食品衛生検査指針（厚生省環境衛生局監修；1978）抜粋

(資料 4)
HPLC クロマトグラム（TTX 分析下限値）

(資料 5)
斎藤俊郎ら：養殖トラフグの毒性とテトロドトキシン抵抗性.日水誌,50,1573-1575（1984）

(資料 6)
野口玉雄ら：囲い養殖法により養殖されたトラフグの毒性.食衛誌,45,146-149（2004）

(資料 7)
養殖トラフグ肝臓の HPLC-FL 分析概要

(資料 8)
TTX 分布データ

(資料 9)
西日本産フグの毒性に関する研究（抜粋）

(資料 10)
TTX 類縁体について

(資料 10－論文 1)　　※　4 月に提出した文献 No.31 と同一論文
渕祐一, 森崎澄江, 長田忠, 嶋崎晃次, 野口玉雄, 大友真也, 橋本周久: 高速液体クロマトグラフィーによる魚貝類中のテトロドトキシンの定量. 食衛誌, 29, 306-312 (1988).

（資料 10－論文 2）

J. Jang, M. Yotsu-Yamashita: Distribution of tetrodotoxin, saxitoxin, and their analogs among tissues of the puffer fish *Fugu pardalis*. Toxicon, 48, 980-987 (2006).

（資料 10－論文 3）

Y. Kudo, J. Finn, K. Fukushima, S. Sakugawa, Y. Cho, K. Konoki, M. Yotsu-Yamashita: Isolation of 6-deoxytetrodotoxin from the pufferfish, *Takifugu pardalis*, and a comparison of the effects of the C-6 and C-11 hydroxy groups of tetrodotoxin on its activity. J. Nat. Prod., 77, 1000-1004 (2014).

（資料 10－論文 4）

M. Yotsu-Yamashita, Y. Abe, Y. Kudo, R. Ritson-Williams, V.J. Paul, K. Konoki, Y. Cho, M. Adachi, T. Inazu, T. Nishikawa, M. Isobe: First identification of 5,11-dideoxytetrodotoxin in marine animals, and characterization of major fragment ions of tetrodotoxin and its analogs by high resolution ESI-MS/MS. Mar. Drugs, 11, 2799-2813 (2013).

（資料 10－論文 5）

J.H. Jang, J.S. Lee, M. Yotsu-Yamashita: LC/MS analysis of tetrodotoxin and its deoxy analogs in the marine puffer fish *Fugu niphobles* from the southern coast of Korea, and in the brackishwater puffer fishes *Tetraodon nigroviridis* and *Tetraodon biocellatus* from Southeast Asia. Mar. Drugs, 8, 1049-1058 (2010).

（資料 10－論文 6）

A. Endo, S.S. Khora, M. Murata, H. Naoki, T. Yasumoto: Isolation of 11-*nor*tetrodotoxin-6(*R*)-ol and other tetrodotoxin derivatives from the puffer *Fugu niphobles*. Tetrahedron Letters, 29, 4127-4128 (1988).

（資料 10－論文 7）

C.Y. Kao, F.A. Fuhrman: Pharmacological studies on tarichatoxin, a potent neurotoxin. J. Pharmacol., 140, 31-40 (1963).

（資料 10－論文 8）

M. Nakamura, T. Yasumoto: Tetrodotoxin derivatives in puffer fish. Toxicon, 23, 271-276, 1985.

（資料 10－論文 9）

T. Yasumoto, M. Yotsu, M. Murata: New tetrodotoxin analogues from the newt *Cynops ensicauda*. J. Am. Chem. Soc., 110, 2345-2347 (1988).

（資料 10－論文 10）

M. Yotsu-Yamashita, A. Goto, T. Nakagawa: Identification of 4-*S*-Cysteinyltetrodotoxin from the liver of the puffer fish, *Fugu pardalis*, and formation of thiol adducts of tetrodotoxin from 4,9-anhydrotetrodotoxin. Chem. Res. Toxicol., 18, 865-871 (2005).

（資料 10－論文 11）

M. Yotsu-Yamashita, B. Schimmele, T. Yasumoto: Isolation and structural assignment of 5-deoxytetrodotoxin from the puffer fish *Fugu poecilonotus*. Biosci. Biotechnol. Biochem, 63, 961-963 (1999).

（資料 10－論文 12）

J.H. Jang, M. Yotsu-Yamashita: 6,11-Dideoxytetrodotoxin from the puffer fish, *Fugu pardalis*. Toxicon, 50, 947-951 (2007).

（資料 10－論文 13）

M. Yotsu-Yamashita, Y. Yamagishi, T. Yasumoto: 5,6,11-Trideoxytetrodotoxin from the puffer fish, *Fugu poecilonotus*. Tetrahedron Letters,, 36, 9329-9332 (1995).

（資料 10－論文 14）

M. Yotsu, Y. Hayashi, S.S. Khora, S. Sato, T. Yasumoto: Isolation and structural assignment of 11-nortetrodotoxin-6(*S*)-ol from the puffer *Arothron nigropunctatus*. Biosci. Biotech. Biochem., 56, 370-371 (1992).

（資料 10－論文 15）

S.S. Khora, T. Yasumoto: Isolation of 11-oxotetrodotoxin from the puffer *Arothron nigropunctatus*. Tetrahedron Letters, 30, 4393-4394 (1989).

（資料 10－論文 16）

B.Q. Wu, L. Yang, C.Y. Kao, S.R. Levinson, M. Yotsu-Yamashita, T. Yasumoto: 11-Oxo-tetrodotoxin and a specifically labeled ^{3}H-tetrodotoxin. Toxicon, 34, 407-416 (1996).

（資料 11）

松居 隆, 酒井 浄: テトロドトキシン, 医学のあゆみ, 112, 852-860 (1980)

（資料 12）

M. Kodama et al.: Occurrence of saxitoxin and other toxins in the liver of the pufferfish Takifugu pardalis. Toxicon, 21, 897-900 (1983)

（資料 13）

Nakamura et al.: Occurrence of saxitoxin in puffer fish. Toxicon, 22, 381-385 (1984)

（資料 14）

黒潮フロート品質証明

（資料 15）

メロード産地証明

（資料 16）

大貫和恵，野口玉雄，荒川修．開放系循環水槽において養殖されたトラフグ肝臓の無毒確認とその脂質中の機能性成分．日食化誌，16，157-162（2009）

（資料 17）

種苗生産履歴書 H26

（資料 18）

Y. Nagashima, I. Mataki, M. Toyoda, H. Nakajima, K. Tsumoto, K. Shimakura, K. Shiomi: Change in tetrodotoxin content of puffer fish Takifugu rubripes during seed production from fertilized eggs to juveniles. FoodHyg. Saf. Sci., 51, 48-51 (2010)