

参考資料 3

生食監発1108第3号
平成28年11月8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9月30日付け府食第620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」で補足資料の提出依頼がありました件について、佐賀県及び佐賀県事業者から平成28年11月8日付けで回答がありましたので別添のとおり送付いたします。





平成28年11月8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10月3日付け生食監発第1003第2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。

なお、別添資料のうち「提出資料2 表 結果の比較 (肝臓中の TTX 濃度)」については、論文発表予定のデータが含まれており、公にすることにより「競争上の地位」を「害するおそれがある」ものと考えられることから非公開でお取扱いただきますようお願い申し上げます。

【食品安全委員会 かび毒・自然毒等専門調査会からの要求事項】

「1. 平成 28 年 8 月 30 日付け生食監発 0830 第 1 号「食品健康影響評価に係る補足資料の提出について」による回答の別添 2、佐賀県及び佐賀県事業者から提出された平成 28 年 8 月 30 日付けの回答において、佐賀県提出資料 1 の養殖トラフグ（陸上養殖）の部位別毒性の表において、肝臓の毒性（MU/g）の結果が、<2 または<8 と記載されている。また、佐賀県提出資料 8 においては、各部位の毒力 TTX（MU/g）の結果が、<3.0 と記載されている。

これらの値については、マウス試験法の検出下限値であると考えてよいか。また、それぞれどのような試験方法により行われたのか、詳細な手順について御教示いただきたい。」

【回答】

これらの値については、マウス試験法による検出下限値である。提出資料 1 及び 8 に示された結果に係る試験法の手順について、以下に示す。

<提出資料 1：1981 - 2015 年度：毒性試験数（萬坊陸上養殖ほか） >

（試験手順について）

2001 年度～2006 年度の肝臓試料（約 300 g/個体）について、凍結状態の肝臓は、流水中で解凍後、冷蔵状態の肝臓は、そのまま用いた。試料は、個体別にそれぞれ計 5 か所（門脈を上にした状態で上部、中心部、下部、及び裏内部（2 か所））から均一に 2 g ずつ計 10 g をハサミで秤取した。その後、フグ毒試験法（食品衛生検査指針Ⅱ、1991 年発行）に従って、等量（10 ml）の 0.1%酢酸水溶液とともに三角フラスコ（栓付）に入れて均一化し、10 分間加熱したものを吸引ろ過して得たる液を試験液とした。供試試料全てについて上記のように試験液をそれぞれ調製し、以下のマウス毒性試験を行った。上記より得た各試験液につき、1 ml ずつ各 2 匹の ddY 系マウス（雄、体重 18～21 g）の腹腔内に投与し、30 分間経過観察をしたが、全て死亡しなかった。この結果から、全ての試料の毒性を、<2 MU/g と判定した。

本試験では、AOAC の麻痺性貝毒（PSP）試験法に記載された検出限界（2 MU/g；提出資料 1 参照）にならない、TTX の検出限界を低くするため、試験液をそのまま用いた。

2007 年度以降については、原則として、試料総数の 1 割を上記のように個体別に試験したが、いずれも<2MU/g であった。そのため、残りの試料については、4 個体の試料につき、上記のように 2 g ずつ計 10 g を秤取し、それら（計 40 g）を合一して十分に均一化した後、そこから 10 g を秤取し、1 つの試料（合一試料）として上記同様に試験液を調製して、毒性試験した。得られたすべての試験液につき、1ml ずつ各 2 匹の ddY 系マウス（雄、体重 18～21 g）に投与した結果、死亡しなかったため、全ての合一試料の毒性を<8 MU/g、個体別試験の結果を<2 MU/g と判定した。

なお、一部の試験液については、マウス毒性試験より検出限界が 1/20 低い LC/MS（定量限界値：0.05 µg TTX/ml）でも毒性を分析し、以下のとおり無毒を確認した。

2007 年：個体別試料（n=1）<0.1 MU/g 4 個体合一試料（n=1）<0.4 MU/g

2008 年：個体別試料（n=1）<0.1 MU/g 4 個体合一試料（n=1）<0.4 MU/g

2009 年：個体別試料（n=1）<0.1 MU/g 4 個体合一試料（n=1）<0.4 MU/g

【提出資料 1】AOAC PSP 試験法 検出限界

（「検査指針に準じた方法」について）

食品衛生検査指針Ⅱのフグ毒試験法に従い、0.1%酢酸で加熱抽出したが、試験液の調製については AOAC の PSP 試験法の考え方に準じて行った。検査指針に記載されているマウス検定法（参考法）は、試料中の TTX を試料の 2.5 倍量の 0.1%酢酸へ加熱抽出し、試料を除いた抽出液と試料残渣の洗液を合わせて、分取した試料の 5 倍量に定容する方法である。一方、AOAC 法は、試料中の PSP を、0.1 M 塩酸を加えた混合試料全体へ加熱抽出し、試料を含めて定容する方法である。ここで PSP を TTX、0.1 M 塩酸を 0.1%酢酸と読み替えれば、「試料中の TTX を、0.1%酢酸を加えた混合試料全体へ加熱抽出し、試料を含めて定容する方法」ということになる。毒の検出限界を可能な限り低くするため、AOAC 法と同様に抽出比 2（試料：0.1%酢酸=1：1）とした。ただし、加熱後の定容は行わず、混合試料 20 g（試料 10 g + 0.1%酢酸水溶液 10 ml \approx 10 g）から得た試験液 1 ml \approx 1 g は、試料 0.5 g に相当するとみなした。また、検査指針は個別別試験で記載されているが、2007 年度以降は、試料数が多いので、無毒を確認するだけでなく、試験液の数を減らす方向で 4 個体を合一して試験した。以上の点が検査指針とは異なっていることから、“公定法に準じた”と表現した。

<提出資料 8：TTX 分布データ>

（試験手順について）

提出資料 8 記載の結果“<3.0”、“<4.0”、“<5.0”および“<6.0”はマウス試験法の検出下限値である。

挙証資料「天然トラフグ肝臓の毒性分布」（食品衛生学雑誌 2013 年 8 月号掲載）（提案書 p. 95～100）の「実験方法 2. 毒性試験」の試験液の調製と検出下限値の算出について詳細な手順を以下に示す。

1. 各部位をホモジナイズ後、試験管にホモジネート 4 または 5 g を秤量した。ホモジネート量が 4 g に満たない場合はホモジネート全量を秤量した。
2. ホモジネートの 2 倍量の 0.1%酢酸を加えて加熱抽出した。いったん冷却した後、ホモジネートを含め 3 倍量に 0.1%酢酸で定容した。（抽出比 3）
ただし、ホモジネート量が少ない場合、マウス試験に必要な試験液量を確保するため、3、4、または 5 倍量の 0.1%酢酸を加えて加熱抽出した。冷却した後、ホモジネートを含め 4、5 または 6 倍量に定容した。（それぞれの抽出比は 4、5 または 6）
3. 遠心分離後、上層に分離した脂質を取り除き、上清を分取して試験液とした。
4. 食品衛生検査指針理化学編フグ毒試験法より、1 MU とは体重 20 g のマウスを 30 分で死亡させる毒量と定義され、得られた MU に抽出比と希釈倍率を乗じて、試料 1 g あたりの MU を求めるとされている。
これより、抽出比 3、4、5 および 6 の試料において不検出であった場合は、1 MU に抽出比を乗じて、それぞれ 3.0、4.0、5.0 および 6.0 MU/g 未満とした。なお、この時の希釈倍率は 1 であった。

（「検査指針に準じた方法」について）

試験液は、食品衛生検査指針理化学編フグ毒試験法に従って、試料に 0.1%酢酸を加えて加熱抽出することで調製した。ただし、定容については AOAC の PSP 試験法に基づいて行ったため、「検査指針に準じた方法」と表現した。検出限界を低くするため、試料を含めて 3 倍量（抽出比 3）に定容したが、第三者評価委員会の指示に従い、提案書のフグ毒検査においては抽出比 5 へ変更する。

（抽出効率について）

天然のトラフグの肝臓 4 個体を試料とした。それぞれの個体を全量ホモジナイズして均一にし、連数 3 で、参

考法と AOAC 法を参考にした方法（改良法）で試験液を調製した。C18 固相抽出でクリーンアップ後、メンブランフィルターでろ過して分析試料とした。TTX の測定は高速液体クロマトグラフ蛍光検出法で実施した。

結果を別表（提出資料 2）に示す。参考法と比較して、改良法の抽出効率も同等以上であることを確認した。

【提出資料 2】結果の比較（肝臓中の TTX 濃度）

（ろ過について）

検査指針 661 頁に、「皮、肝臓、卵巣の抽出液のろ過は著しく困難なことが多いので、加熱抽出した磨砕物を冷却後遠沈管に移し、遠心分離で抽出液を採る。遠沈管中の残渣を 0.1%酢酸溶液で洗い、再度遠心分離を行って、抽出液と洗液を合わせて 50 ml に定容する。その際に、遠心分離液の表層に分離したゼラチン様物質や脂質は抽出液に含めない。」と記載されている。これに従い、ろ過の代わりに遠心分離を採用した。

〔補足〕

本毒性試験については、挙証資料「天然トラフグ肝臓の毒性分布」（提案書 p. 95～100）に示しているとおり、2012 年に日本近海で漁獲された天然トラフグの生肝臓 58 個体のうち、すべての部位でマウス毒性を示した 16 個体について毒性分布の分析を行った結果、すべての個体において R4 部位の毒性が最も高いということではないものの、R4 部位が有意に高い毒性を示すことが確認できたものである。

加えて、統計の専門機関により、部位別の毒量測定値が検出下限以下であったものを含めた 42 個体のトラフグ肝臓データについて、目的変数の打ち切り（検出下限によるデータ打ち切り）を考慮したトービット回帰モデルを用いて解析を行った結果、R4 部位が相対的に最も毒力が高いという、上記挙証資料の結論は支持されることが確認された。

以上を踏まえ、統計的な見地から、

「仮に R4 部位よりも毒性の高い個体があった場合においても、例えば R4 部位の毒力が 3.85 MU/g である場合、個体の最大毒力が 10 MU/g 以下となる確率が 99.9999%となること」（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」中、p.155 表 3 を参照）

などが示されるものであることを改めて申し添える。