

ふぐの子糠漬け中に含まれるテトロドトキシン類の機器分析

糸田 将太,^{1,2} 渡邊 龍一,² 小澤 眞由,² 内田 肇,² 松嶋 良次,²
及川 寛,² 福島 英登,¹ 松宮 政弘,¹ 山下 まり,³ 鈴木 敏之^{2*}

(2022年10月24日受付, 2022年12月29日受理, 2023年5月3日J-STAGE早期公開)

¹日本大学生物資源科学部, ²(国研)水産研究・教育機構 水産技術研究所, ³東北大学大学院農学研究科

Chemical analysis of tetrodotoxins in foods made using pufferfish ovaries pickled
in salt and rice-bran

SHOTA ITODA,^{1,2} RYUICHI WATANABE,² MAYU OZAWA,² HAJIME UCHIDA,²
RYOJI MATSUSHIMA,² HIROSHI OIKAWA,² HIDEITO FUKUSHIMA,¹ MASAHIRO MATSUMIYA,¹
MARI YOTSU-YAMASHITA³ AND TOSHIYUKI SUZUKI^{2*}

¹Nihon University, College of Bioresource Sciences, Fujisawa, Kanagawa 252-0880, ²Japan Fisheries Research and Education Agency, Fisheries Technology Institute, Yokohama, Kanagawa 236-8648, ³Tohoku University, Graduate School of Agricultural Science, Sendai, Miyagi 980-8572, Japan

Food made by pickling pufferfish ovaries in salt and rice-bran is a tradition in Ishikawa Prefecture in Japan. The food is manufactured in two stages: curing in salt for a year and pickling in rice-bran for one or two years. Since pufferfish ovaries contain the potent neurotoxin tetrodotoxin (TTX), a toxicity test is implemented by mouse bioassay and only food that contains less than the quarantine limit (10 MU/g) are marketed. However, testing by instrument analysis is internationally accepted for inspections for marine biotoxins including TTX. In the study, we developed a pretreatment method for TTX suitable for instrument analysis in food containing a large amount of salt, and then used the method to assess the level of TTX in food. Our experiments revealed that an activated charcoal cartridge is useful as the pretreatment method for TTXs in pufferfish ovaries: the recovery test of TTX using the food was 90%. We used the developed method to assess the level of TTX in commercially available foods made using pufferfish ovaries.

キーワード: HILIC/MS/MS, 活性炭カートリッジ, 親水性相互作用クロマトグラフィー-タンデム質量分析法, テトロドトキシン, ふぐの子糠漬け

ふぐの子糠漬け^{1,2)}はゴマフグ *Takifugu stictonotus* の卵巣を原料とし、塩漬けと糠漬けの工程を経て製造され、石川県の伝統食品として珍重されている。ゴマフグの卵巣には、個体差はあるものの神経毒であるテトロドトキシン (tetrodotoxin: TTX) が多量に含まれるため、一般には食用は認められていない。この卵巣を先ほどの2工程で処理することで、卵巣の持つ毒力を食用可能なレベルである規制値 (10 MU/g) 以下にまで低減させることができる。ふぐの子糠漬けは、毒性試験を実施して規制値未満である場合に限り喫食と販売が認められている。

塩漬けと糠漬けを経ることで、ゴマフグ卵巣内に多量

に存在する TTX が食用可能なレベルにまで低減する減毒機構については、小沢³⁾や小林ら⁴⁾が報告するように漬け込み期間中における TTX の希釈と均質化、または微生物による分解の可能性が考えられている。しかし、減毒に最も有効に作用している因子の解明には至っていない。²⁾

近年、生鮮二枚貝に含まれる麻痺性貝毒と TTX を対象に、親水性相互作用液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (HILIC-MS/MS) が開発されている。⁵⁾ この方法ではグラファイトカーボンを充填したカートリッジを用い、それに二枚貝に含まれる TTX および貝毒成分を一旦吸着させ、次にカートリッジを洗浄して脱

塩した後、有機溶媒を含む溶出溶媒で TTX および貝毒成分を再び溶出させる前処理方法を採用している。この方法は、単一試験室および複数試験室で妥当性が確認されており、^{6,7)} 欧州連合 (EU) 域ではこの方法を公定法に加える動きもある。ただし、日本やアジアなどでよく喫食されるフグやフグを利用した加工食品には適用された例がない。国内におけるふぐ毒検査は、マウス毒性試験が参考法として食品衛生検査指針理化学編⁸⁾に採用されている。今後、TTX を含めた海洋生物毒の検出方法は機器分析法に移行するのが世界的な流れとなっており、塩類を多量に含むふぐ加工食品にも利用できる前処理方法を開発できれば、マウス毒性試験から機器分析法への移行も容易となる。そこで本研究では、フグを利用した加工食品、中でも多量の塩類を含むふぐの子糠漬けを対象に、HILIC-MS/MS に適した前処理方法を開発することを目的とする。また、ふぐの子糠漬け製品に検討した前処理方法を適用し、食品中に含まれる TTX 類の濃度を明らかにすることを目的とする。

材料と方法

材料と試薬 ふぐの子糠漬けは、石川県にある 6 つの製造業者より市販品を各 5 検体ずつ (計 30 試料) 購入した。また、添加回収試験に用いた TTX citrate-free (1 mg) には Funakoshi (Latoxan 社) のものを用いた。添加試験に際し、予め、DSS- d_6 (関東化学) を外部標準とする定量核磁気共鳴法 (Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy, qNMR) にて TTX 濃度を精確に測定し、標準溶液として用いた。⁹⁾ 活性炭およびグラファイトカーボンカートリッジには Sep-Pak Plus AC2 (400 mg, Waters) と ENVI-Carb (250 mg/3 mL, Supelco), Hypercarb (200 mg/3 mL, Thermo-fisher scientific), Bond Elut Carbon (250 mg/6 mL, Agilent) を用いた。各種試験に使用したアセトニトリル (LC/MS 用) やメタノール (LC/MS 用)、酢酸 (精密分析用) は関東化学、エタノール (特級) は富士フィルム和光純薬、25%アンモニア水 (LC/MS 用) は Sigma-Aldrich 社から購入した。TTX 類縁体 (4-*epi*TTX, 4,9-anhydroTTX, 5-deoxyTTX, 11-deoxyTTX, 6,11-dideoxyTTX, 5,11-dideoxyTTX, 5,6,11-trideoxyTTX, 11-norTTX-6(S)-ol) は、それらを含むコモンフグ *Takifugu flavipaterus* 卵巣抽出液の活性炭処理液¹⁰⁾ を使用して定量した。前述の処理液には含まれるが濃度決定のされていない 4-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX と 4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX, 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX は、TTX と同等のモル応答があるものと仮定して、TTX を基準に定量した。

抽出・前処理法の検討 前処理法の検討には、TTX 標準溶液あるいはふぐの子糠漬け抽出液を用い、基本と

なる抽出・前処理法は Boundy *et al.* の報告した方法⁵⁾ に従って、種々検討を行い改良した。最終的に確立した前処理方法を以下に示す。まず、ふぐの子糠漬け試料である卵巣 100 g 程度の塊をほぐし、卵粒を取り出して均質に混ぜた。次に、均質にした卵粒 5.00 g を 50 mL 遠沈管に採取した。そこに、0.5% 酢酸溶液 20 mL を加え、ホモジナイザー (ULTRA-TURRAX) にて卵粒を 5 分間破砕し、95°C 以上の湯浴中で 5 分間加熱抽出した。水冷後、遠心分離 (10000×g, 室温, 10 min) して得られる上清を回収した。この上清 1.0 mL を 1.5 mL マイクロチューブに分取し、25%アンモニア水を 5 μ L 添加して攪拌し、試料溶液とした。前処理用カートリッジには、1%酢酸を含む 50%メタノール溶液 5 mL、次いで 0.025%アンモニア水 5 mL で平衡化した Sep-Pak Plus AC2 (400 mg, Waters) をあらかじめ準備し、これに試料溶液 0.4 mL を負荷した。脱塩処理は、蒸留水 1.4 mL にてカートリッジ先端から液滴ができる速度で洗浄した後、エアージした。溶出は、1%酢酸を含む 20%メタノール溶液 2 mL (溶出液 1)、次いで 1%酢酸を含む 50%メタノール溶液 2 mL (溶出液 2) で行った。溶出の際、溶出溶媒ごとにエアージした。溶出液 1 と 2 は混合して、良く攪拌した。この混合溶出液 0.1 mL をアセトニトリル 0.1 mL で 2 倍希釈し、分析試料とした。

HILIC-MS/MS によるふぐの子糠漬けに含まれる TTX 分析 ふぐの子糠漬けに含まれる TTX 類の分析には、Watanabe *et al.* によって報告された分析条件を用いた。⁹⁾ 定量には、TTX を qNMR により濃度決定し、段階希釈して調製した標準溶液により検量線 (2.0–63.3 ng/mL) を作成した。そのほかの類縁体については、コモンフグ卵巣抽出液の活性炭処理液を二次標準として用いた。¹⁰⁾ 前述の処理液には含まれるが濃度決定がされていない類縁体については、設定した選択的反応モニタリング (SRM) イオンチャンネルで検出されたピークを、TTX と同等のモル応答があるものと仮定して、TTX の検量線から TTX 類縁体の濃度 (ng/g) を求めた。TTX 類縁体の濃度 (ng TTX eq./g) は、得られた TTX および類縁体の濃度 (ng/g) に EFSA で示されている毒性等価係数 (Toxicity equivalency factors, TEFs) を乗じて計算した。¹¹⁾ TTX 類縁体の TEF は、TTX を 1 とした時に、4-*epi*TTX (TEF: 0.16), 4,9-anhydroTTX (0.02), 5-deoxyTTX (0.03), 11-deoxyTTX (0.14), 6,11-dideoxyTTX (0.02), 5,6,11-trideoxyTTX (0.01), 11-norTTX-6(S)-ol (0.17) となる。なお、TEF が示されていない TTX 類縁体については、異性体などの類似化合物から推定した。こうして推定した TTX 類縁体の TEF は、5,11-dideoxyTTX (TEF: 0.02), 4-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX (0.01), 4,9-anhydro-5,6,11-trideoxy

TTX (0.01), 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX (0.01) とした。ふぐの子糠漬けに含まれる総濃度は, TTX 類縁体の濃度の総和として求めた。

結 果

前処理法の開発 ふぐの子糠漬けに含まれる TTX を検出するための前処理法は, Boundy *et al.*⁵⁾ の方法を参考に改良した。⁵⁾ 抽出溶媒量を検討するため, ふぐの子糠漬け (卵粒) 5.00 g に対し, 等倍量から 6 倍量までの 1% 酢酸溶液を添加し, 検出される TTX 濃度 (ng/g) を調べ, 抽出溶媒の最適化を行った。その結果, TTX 濃度は等倍量添加時 (841 ng/g) から緩やかに増加し, 4 倍量 (20 mL) で抽出した際には 1005 ng/g を検出し, 4 倍量から 6 倍量までの値は統計的に優位な差はみられなかった (電子付録, Fig. S1)。この結果から抽出溶媒量は, 分析時の希釈倍率やホモジナイズのしやすさなどを考慮して, 4 倍量に設定した。

次に, TTX を効率よく保持する活性炭およびグラファイトカーボンカートリッジを検討した。TTX 標準溶液を各種カートリッジに負荷し, 非吸着画分および 1% 酢酸を含む 20% アセトニトリル, 次いで 1% 酢酸を含む 40% アセトニトリルにより溶出して TTX 濃度を調べた (Fig. 1)。その結果, グラファイトカーボンを充填した Hypercarb や ENVI-Carb では, 添加量の 50% 近くが非吸着画分に検出されたことから, TTX の保持には適していないことが明らかになった。また, グラファイトカーボンを充填した Bond Elut Carbon では 70% 近い

回収率が得られたものの 13% が非吸着画分に溶出しており, これ以上の改善が見込めないことから検討から除外した。最終的に, 活性炭を充填した Sep-Pak Plus AC2 が低回収率ではあったものの, 非吸着画分に TTX はほとんど検出されなかったことから, 本カートリッジを前処理用カートリッジとして選択し, TTX 標準品を用いて溶出条件を検討した。溶出は, 1% 酢酸を含む 20% の各種有機溶媒 (アセトニトリル, メタノール, エタノール, イソプロパノール), 次いで 1% 酢酸を含む 40% アセトニトリルまたは 1% 酢酸を含む 50% 各種有機溶媒 (メタノール, エタノール, イソプロパノール) で行い, TTX の回収率を求めた (Fig. 2)。その結果, アセトニトリル, イソプロパノールでは TTX の回収率が低かった。一方, メタノールやエタノールでは比較的に回収率が高く, 1% 酢酸を含む 20% メタノール溶液で TTX 回収率が 66% に達した。次の溶出に用いた 1% 酢酸を含む 50% メタノール溶液での回収率を含めると, 計 84% の回収率に達した。一方, 溶出手順を簡略化するために, 1% 酢酸を含む 50% メタノール溶液を用いた 1 段階溶出を試みたが, 回収率は 55–60% と低かったため, 2 段階溶出することにした。なお, 2 段階溶出をする際にエアージェをせずに TTX を溶出させるよりも, エアージェを工程に含めた方が最終的な回収率は高かった。

続いて, カートリッジを洗浄し脱塩する際に使用する蒸留水の量を, MS クロマトグラムにおける TTX 類のピーク形状を指標に, 最適化した。蒸留水による脱塩で

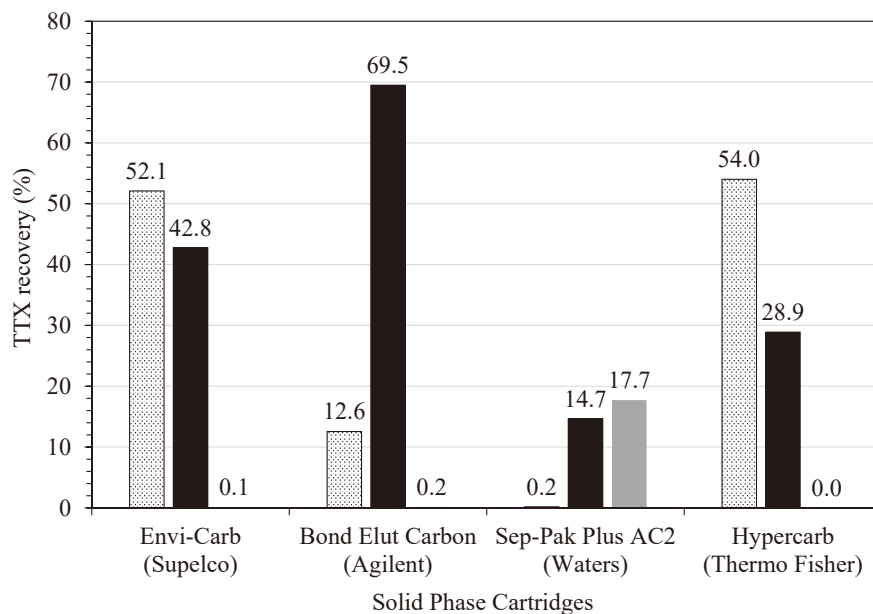


Fig. 1 Recovery yields of TTX in fractions eluted from several solid phase cartridges using a matrix-free TTX solution. Dotted bar, passing fraction; black filled bar, fraction eluted by 20% acetonitrile containing 1% acetic acid; gray filled bar, fraction eluted by 40% acetonitrile containing 1% acetic acid.

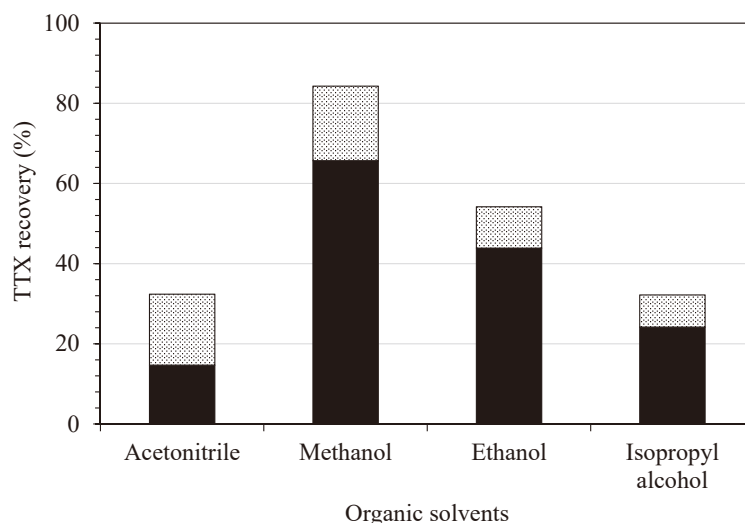


Fig. 2 Total recovery yields of TTX in fractions from Sep-Pak Plus AC2 by two-step elution. *Black filled bar*, recovery yield of TTX in fractions eluted by 20% organic solvents (acetonitrile, methanol, ethanol, and isopropanol) containing 1% acetic acid; *dotted bar*, recovery yield of TTX in fractions eluted by 40% acetonitrile or 50% organic solvents (methanol, ethanol, and isopropanol) containing 1% acetic acid.

は、蒸留水の量を増やすことにより脱塩効率は上がるが、カートリッジに吸着された TTX の一部が通過液に漏出し、定量性が下がる。脱塩に用いる蒸留水の量を検討した結果、1.4 mL とすることにより、効率的な脱塩と良好なピーク形状が得られることが明らかになった。

LC-MS/MS 分析では、試料マトリクスにより、定量対象とする被検体のイオン化促進あるいはイオン化抑制が常に懸念され、これはマトリクス効果と呼ばれている。このマトリクス効果は、カートリッジによる前処理や溶媒希釈により抑制することができる。本研究では、ふぐの子糠漬け抽出液に対してカートリッジによる前処理を行い、得られた溶出液を HILIC-MS/MS に供するための希釈倍率について、マトリクス効果を考慮して設定した。溶出液を 1% 酢酸を含む 35% メタノールで段階希釈し、2 倍から 64 倍希釈液まで調製した。それらを HILIC-MS/MS で分析し、得られたピーク面積に希釈倍率を乗じて比較した (Fig. 3)。その結果、いずれの希釈倍率においてもほぼ等しいピーク面積が得られ、マトリクス効果が生じていないことが明らかになった。従って、希釈倍率は最も高感度に検出と定量が可能な 2 倍希釈に設定した。最終的に確立した前処理法を用い、ふぐの子糠漬けに規制値である 10 MU/g 相当量の既知濃度の TTX を添加し、添加回収試験を実施した。規制値に相当する TTX 添加量 2170 ng/g に対し、実際に検出した TTX 濃度は平均 1944 ± 215 ng/g であった。このことから、回収率は $90 \pm 10\%$ ($n=3$) となり、良好であることが分かった。なお、TTX 類縁体のそれぞれに対応した標準毒がないため、Sep-Pak Plus AC2 にお

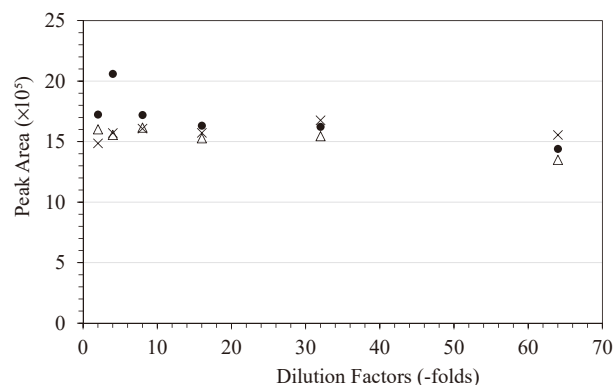


Fig. 3 Matrix effect of the analytical samples prepared by serial dilution. *Black filled circle*, Run 1; *cross*, Run 2; *triangle*, Run 3.

ける回収率については今後の検討が必要である。

HILIC-MS/MS によるふぐの子糠漬けに含まれる TTX 分析 ふぐの子糠漬け市販品を前述の方法により前処理し、HILIC-MS/MS により分析した。得られた濃度 (ng/g) に TEF を乗じて TTX 換算し、総濃度 (ng TTX eq./g) を求めて、箱ひげ図を作成した (Fig. 4)。規制値 10 MU (マウスユニット)/g は、1 MU 当たり 220 ng TTX とすると、⁸⁾ 2200 ng TTX/g に相当する。6 つの製造業者それぞれのふぐの子糠漬けに含まれる TTX 類の平均濃度 ($n=5$) は、A 社で 2879 ± 824 ng TTX eq./g, B 社で 3020 ± 394 ng TTX eq./g, C 社で 2301 ± 644 ng TTX eq./g, D 社で 3618 ± 418 ng TTX eq./g, E 社で 3969 ± 529 ng TTX eq./g, F 社で $1658 \pm$

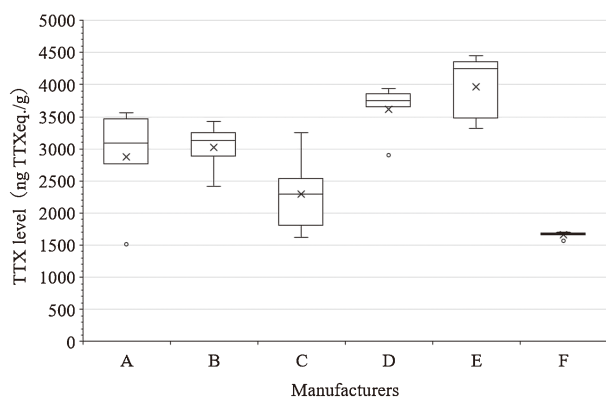


Fig. 4 Box-and-whisker plot of TTX concentration (ng TTX eq./g) in foods made using pufferfish ovaries pickled in salt and rice-bran by six manufacturers. Cross denotes the mean mouse toxicity ($n=5$) and circle denotes outliers.

50 ng TTX eq./gであった。今回機器分析を行った結果、1社のみが規制値未満であり、その他5社は規制値以上であった。活性炭カートリッジである Sep-Pak Plus AC2 を用いた場合の TTX 類縁体の各回収率は不明であるが、分析によって得られた結果によると、毒組成における6社の平均では、4-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX ($28.8 \pm 5.8\%$) が最も多く、次いで TTX ($24.9 \pm 3.6\%$)、5,6,11-trideoxyTTX ($22.9 \pm 4.1\%$)、4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX ($15.3 \pm 4.5\%$) の順であった。なお、前者3成分はいずれも同等程度含まれており主要成分であった。検出した TTX 類に TEF を乗じて濃度 (ng TTX eq./g) に換算すると、いずれの製造業者においても概ね 95% 以上が TTX の寄与によるものであった。

考 察

ふぐの子糠漬けに含まれる TTX 類を検出するための前処理法を検討し、ふぐの子糠漬けに含まれる TTX 類を HILIC-MS/MS により定量した。その結果、1社を除き、残りの5社すべてで規制値である 10 MU/g (2200 ng/g) を上回る濃度が検出された。一方、用いたふぐの子糠漬けは市販品であり、公定法であるマウス毒性試験では規制値を超えていないはずである。食品衛生検査指針理化学編にあるマウス毒性試験(参考法)⁸⁾では、塩蔵品等については抽出液を中和後、活性炭カラムに供し、1%酢酸を含む20%エタノール溶液で溶出するよう指示されており、また、この前処理では精度が低下する旨記載がある。今回我々の行った前処理の検討によると (Fig. 2)、活性炭カラムからの溶出にはメタノールが最も適しており、エタノールを用いた場合、50%程度しか回収できなかつた。マウス毒性試験(参考法)による塩蔵品等の前処理は、本研究で検討した活性炭カー

トリッジを用いたメタノールによる溶出と溶出条件は類似しており、塩蔵品に含まれる TTX 類の回収率は不十分である可能性が危惧される。従って、この前処理を行い、マウス毒性試験を実施していると仮定すると、マウス毒力は半分程度となり、規制値以下となる可能性がある。仮に抽出液そのものを試験検液として用いた場合には、抽出液に含まれる多量の塩類によってマウス毒力を過小評価することになる。³⁾将来的に機器分析に移行した場合、機器分析では塩類等による影響をマウス毒性試験よりも受けにくいいため、今回のように規制値を上回る結果になる可能性が考えられる。

ふぐの子糠漬けを HILIC-MS/MS にて測定すると、TTX が全濃度 (ng TTX eq./g) の 95% 以上を占める主要毒であった。毒組成に着目すると、4-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX と TTX, 5,6,11-trideoxyTTX, 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX の4成分で全体の約 90% を占めていた。毒組成の観点から上記4成分の監視が必要だが、TTX を除けば、それらの TEF は極めて低いと予想され、総濃度への寄与 (<5%) も低い。また、主要毒は TTX であることや現在供給可能な標準物質は TTX のみであることを考えると、機器分析による監視は TTX のみで実施することも可能である。

塩類を含む試料中の TTX を質量分析装置により検出する際の前処理方法はいくつか報告されている。ヒトの血清と尿を対象に親水性相互作用を利用した HILIC カートリッジを用いた方法¹²⁾とヒト尿を対象に ODS カートリッジとグラファイトカーボンカートリッジを連結させた方法¹³⁾である。秦野ら¹³⁾の報告にあるように、単にグラファイトカーボンカートリッジを用いただけでは TTX の回収率 (55-87%) はそれほど高くなく、ODS カートリッジによるマトリクスの吸着工程を入れるだけで TTX の回収率が向上した例もある。ただし、本研究で用いた、ふぐの子糠漬けのような塩類を多量に含む加工食品を対象とした機器分析の報告例はない。

麻痺性貝毒や TTX を含む生鮮二枚貝を対象に、グラファイトカーボンを充填した ENVI-Carb カートリッジを用いた前処理法が採用されている。⁵⁾室内および室間妥当性試験が終了し、本カートリッジを用いた TTX の回収率は 100% 近いものであったが、ふぐの子糠漬けには二枚貝よりも多量の塩類があるためか、TTX の回収率は低かった。種々のカートリッジを検討した結果、グラファイトカーボンカートリッジよりも活性炭カートリッジの方が効率よく TTX を吸着し、良好な回収率が得られることが明らかになった。TTX の溶出には極性の高いプロトン系溶媒であるメタノールを用いた2段階溶出が適していた。マトリクスの影響については、調べた希釈倍率の範囲内ではイオン化抑制やイオン化促進のどちらも認められず、活性炭カートリッジで処理する

ことにより、効率よく質量分析に影響するような成分を除去できたものと考えられる。なお、本研究では検討を行わなかった Bond Elut Carbon も詳細な条件検討をすることで、Sep-Pak Plus AC2 カートリッジに匹敵する回収率を示す可能性も考えられる。

TTX の一部はその他の類縁体である 4-*epi*TTX や 4,9-anhydroTTX への変換が知られている。^{9,14)} 今回実施した TTX 標準品を用いて、Sep-Pak Plus AC2 を使用した添加回収試験では、「下痢性貝毒 (オカダ酸群) の検査について」(平成 27 年 3 月 6 日食安基発 0306 第 3 号・食安監発 0306 第 1 号) で定める真度の目標値 70-120% に収まっており、また本前処理による TTX から他類縁体への変換は認められなかった。

以上より、高塩分を含むふぐの子糠漬け製品に対し、活性炭カートリッジを使用して、高回収率で TTX を回収できる前処理法を開発した。

謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費「テトロドトキシンのリスク管理のための研究」(H30-食品—一般-005) の助成を受けて実施されました。ここに謝意を示します。

文 献

- 1) 板垣英治. フグの子糠漬け. 化学と工業 2005; **58**: 1415-1418.
- 2) 荒川 修. フグの毒テトロドトキシシン—保有生物やフグ食文化との興味深い関わり合い—. 化学と教育 2017; **65**: 224-227.
- 3) Ozawa C. Toxicity of puffer roe pickled in rice-bran. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 1983; **24**: 258-262 (in Japanese with English abstract).
- 4) Kobayashi T, Kimura B, Fujii T. Possibility of toxin declination by microbiological metabolism during manufacture of puffer fish ovaries fermented with rice-bran. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2003; **69**: 782-786 (in Japanese with English abstract).
- 5) Boundy MJ, Selwood AI, Harwood DT, McNabb PS, Turner AD. Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction. *J. Chromatogr. A* 2015; **1387**: 1-12.
- 6) Turner, AD, McNabb PS, Harwood DT, Selwood AI, Boundy MJ. Single-laboratory validation of a multitoxin in ultra-performance LC-hydrophilic Interaction LC-MS/MS method for quantitation of paralytic shellfish toxins in bivalve shellfish. *J. AOAC int.* 2019; **98**: 609-621.
- 7) Turner AD, Dhanji-Rapkova M, Fong SYT, Hungerford J, McNabb PS, Boundy MJ, Harwood DT, Collaborators. Ultrahigh-performance hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the determination of paralytic shellfish toxins and tetrodotoxin in mussels, oysters, clams, cockles, and scallops: collaborative study. *J. AOAC int.* 2020; **103**: 533-562.
- 8) 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.
- 9) Watanabe R, Tanioka M, Uchida H, Matsushima R, Oikawa H, Matsumiya M, Yotsu-Yamashita M, Suzuki T. Quantitation of tetrodotoxin and its analogues with a combination of liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitative ¹H-NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2019; **67**: 12911-12917.
- 10) Yotsu-Yamashita M, Abe Y, Kudo Y, Riston-Williams R, Paul VJ, Konoki K, Cho Y, Adachi M, Imazu T, Nishikawa T, Isobe M. 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* 2013; doi:10.3390/md11082799.
- 11) 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, Steinkeller 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.
- 12) 赤木浩一, 畑野和弘. 親水性相互作用クロマトグラフィーを用いた LC/MS/MS によるテトロドトキシンの分析. 平成 18 年度福岡市保健環境研究所報 2006; **32**: 98-100.
- 13) 秦野真澄, 難波江芳子, 友岡美智代, 東 忠英, 岡 裕三, 小笠原光憲, 大瀬戸光明, 井上博雄. LC/MS/MS による尿中のテトロドトキシンの分析. 平成 17 年度愛媛県衛環研年報 2005; **8**: 17-20.
- 14) Taniguchi K, Takao H, Abe K, Tatsuno R, Nishihara GN, Sakakura Y, Takatani T, Arakawa O. Simplification of extraction procedure and evaluation of extraction ratio in pufferfish toxin examination method. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2020; **86**: 410-417 (in Japanese with English abstract).