

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14930

研究課題名(和文) フグ肝毒性分析チップの開発を通じた新次元食品科学分野の開拓

研究課題名(英文) Development of Poison Analysis Chip for Puffer Fish Liver and Exploration of New Food Science Field

研究代表者

川井 隆之 (Kawai, Takayuki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：60738962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：フグ肝臓は美味だが有毒なテトロドトキシン(TTX)を含むため、食用とされない。一方で養殖フグでは肝臓にTTXを含まないことが経験的に知られており、オンサイトでフグ肝臓中のTTX含有量を測定して無毒を証明できれば、今まで無駄になっていた食品の有効利用が可能になると期待される。本研究では、キャピラリー電気泳動(CE)と非接触型電気伝導度検出器(C4D)を用いた小型ポータブル分析装置を開発し、テトロドトキシンを定量的に分析することに成功した。またCEと高感度な質量分析(MS)で肝臓中のTTXの分布を計測したところ、同一組織内でも10倍以上の濃度差があることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、美味だが可食とされてこなかったフグ肝臓をオンサイトで無毒と証明し、食用利用することができる道筋が開かれた。近年食用が禁止されたサバフグ類や養殖フグでは肝臓にTTXを含まないことが経験的に知られているため、非常に美味で貴重な食材が無駄となっていたが、本手法により有効利用が可能になり、新たな水産業価値を創出することに繋がると期待される。また本手法はフグ肝臓以外の食材等にも利用可能であり、将来的にあらゆる食べ物の有毒性をチェックして安全安心な社会を実現することにも繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Puffer fish liver is known to be delicious but contains quite toxic tetrodotoxin (TTX) and is inedible. Oppositely, farm-raised puffer fish has no TTX. If we could quantify TTX and certify no toxicity on site, such discarded food would be utilized as beneficial food.

In this study, capillary electrophoresis (CE) and capacitively coupled contactless conductivity detector (C4D) were coupled to develop portable TTX analysis device, which was successfully employed for TTX quantitation. We also employed CE coupled with sensitive mass spectrometry (MS) and measured localization of TTX in puffer fish liver. We found more than 10-times different concentration of TTX within the same liver tissue for the first time.

研究分野：分析化学

キーワード：テトロドトキシン フグ キャピラリー電気泳動 質量分析 非接触型電気伝導率検出器 オンサイト分析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生きるということは食べるということであり、人々は食に多大な関心を持っている。日本は世界トップクラスの食先進国であり、どこでも安く安全に美味しい食事を得ることができるが、これは既存食品の組み合わせ・クオリティ向上に過ぎず、抜本的に新しい食文化が生まれる兆候はない。ものづくり分野でハイクオリティな製品を提供してきた日本が、発展途上国の技術向上により世界での優位性を失ったように、食分野でも日本の優位性が将来的に喪失することは避けられない。従って新たな価値の食文化を先進的に開拓し、日本が常に世界をリードしていく必要がある。

新次元の食品開発においては前人未踏の食材を試行する必要があるが、食文化は極めて保守的・排他的であり、未知食材は「ゲテモノ」と呼ばれ中々社会に許容されない。例えば納豆が存在しない世界では、一般大衆には受け入れがたいであろう。食材の安全性が確保されて初めて一部の先進的な人間が試食して価値を認め、10~100年のスパンで徐々に普及することで初めて食文化への浸透が可能になる。このプロセスを加速するためには安全性を確保するための技術開発が最重要課題となる。

そこで危険な非一般的食品モデルとしてフグ肝に着目した。フグ肝はテトロドトキシン (TTX) と呼ばれる猛毒を有するが (*Toxins*, 2014, 6, 693), 食通の間では極めて美味であると知られており、実際に大分県などでは伝統的にフグ肝を無毒化して食用としてきた (瀏祐一博士論文, 1999, 長崎大学, 博(海)甲第 159 号)。養殖フグは経験的に全臓器が無毒であることが判明しており、佐賀県などは「フグ肝特区」申請による食品提供を模索しているが、科学的な毒蓄積メカニズム解明が不十分として厚生労働省・自治体は昭和 58 年の規制通知 (フグの衛生確保について) を維持し、肝の提供を依然として禁止している。この解決のためには上記通知の例外項目「個別の毒性検査」を実施する必要がある、実用上は微量 TTX をオンサイトで高感度・高速に分析する必要がある。

しかし TTX は分析が難しく、オンサイト化学分析システムは未だ実現されていない。これは、有機溶媒フリーで高感度分析を実現する小型のポータブル分析装置が存在しないからである。一般的な TTX 分析法として液体クロマトグラフィーが挙げられるが、分離のために人体に有害なアセトニトリルやメタノールなどの有機溶媒が必要であり、料理人がキッチンで使うような利用方法は不可能である。また高圧ポンプが必要なことから装置サイズも大型にならざるを得ず、ポータブル装置として運用することが難しい。そこで本研究では有機溶媒が不要で小型化が可能なキャピラリー電気泳動 (CE) に注目した。TTX をオンサイトで CE 分析するためには小型な検出器が必要であるが、非接触電気伝導度検出 (C4D) はイオンを汎用的に検出できるため TTX にも応用可能であると期待される。また感度が不足した場合でも、川井の開発した高感度 CE 技術を用いることで従来比で最大 10,000 倍もの高感度化と高分離を実現できる (*Anal. Chem.* 2010, 82, 6504 など)。これらの技術を融合することで、TTX のオンサイト化学分析を世界で初めて実現できると着想した。

2. 研究の目的

申請者の独自 CE 分析技術を用いて TTX オンサイト分析を可能な分析システムを開発することで安全性を確保し、フグ肝食用化を実現することを目標に設定した。この分析システム基盤を構築するため、(1) TTX 化学分析システムの開発、(2) ポータブル分析装置の検証およびフグ肝毒性試験の実践、以上 2 点を課題として設定した。

3. 研究の方法

(1) CE 分析には、Molax 社製溶融石英キャピラリー (内径/外径 = 50/360 μm , 全長 60-90 cm) を用いた。分析メソッドの開発には、全自動 CE 装置 (Sciex 社製 PA-800 plus, PA-800, もしくは P/ACE MDQ) によって試料の濃縮・分離を行った。泳動液には 10%酢酸を用い、濃縮には large-volume dual preconcentration by isotachopheresis and stacking (LDIS) 法を用いた。検出には eDAQ 社製 C4D 検出器 ER125 を用いた。質量分析 (MS) では nanoESI イオン源 (ESI 電圧 2400 V) を三連四重極 (TQ) MS (SCIEX 社製 Q-TRAP 5500) に接続し、Q1/Q3 の m/z 値をそれぞれ 320.2/301.6 に設定して分析を行った。

(2) フグ肝分析では、淡路島で採取されたコモンフグ (*Takifugu poecilonotus*) およびヒガンフグ (*Takifugu pardalis*) から肝臓を摘出し、凍結後 1-2 mm 角の立法体に切断し、ホモジナイザーで破碎して TTX を抽出した。ポータブル分析システムの開発では、アタッシュケース内にキャピラリーやバイアルなどを配置し、松定プレジジョン社製小型高圧電源 (HVBT-10N-5) に 5V モバイルバッテリーを接続して 10 kV の高電圧を発生させ、電気泳動を実施した。

4. 研究成果

(1) まず市販の CE 装置を用いて TTX 分析条件の検討を行った。TTX 標品を用いて CE-C4D 分析を行ったところ、電気伝導度の低い 10%酢酸のような酸性泳動液を用いて TTX に正電荷を付与することで C4D による検出を実施することができた。検出下限は 10 ppm (10 mg/L) 程度であり、良好な感度を実現した。しかしフグ肝中の TTX 濃度を測定するためには、最低でも 10 MU/g (2 mg/L = 2 ppm) 以下の検出感度が必要であり、さらなる高感度化が必要であった。そこで、高効率に大量の試料を濃縮できる新規オンライン試料濃縮技術「LDIS 法」を新規に開発した (*J. Chromatogr. A* **2018**, 1565, 138)。LDIS 法は生体試料に多量に含まれる塩夾雑成分による性能低下が少なく、前処理に制限があるオンサイト分析に適した手法である。これにより最大 200 倍程度 TTX を濃縮することに成功し、検出下限 50 ppb (50 µg/L) を実現した。計算上フグ肝中の TTX 濃度を測定でき、さらに小型化が可能な分析条件が決定した。

続いて CE-MS を用いた超高感度 TTX 分析法の開発を行った。フグ肝中の TTX 分布については、その結合タンパク質 pufferfish saxitoxin and tetrodotoxin binding protein (PSTBP) を抗体染色した例や (*Toxicon* **2013**, 72, 23), TTX を直接抗体染色した例 (*Mar. Drugs* **2015**, 13, 756) が報告されている。しかし前者は TTX を直接測定しておらず、後者についても TTX は前処理で組織から流出しているため信頼性が低い。従って、最小限の前処理で高い信頼性をもって局所の TTX を定量解析できる高感度分析システムが必要である。そこで本研究では、高感度分析法として知られるシーストレス型 CE-MS に LDIS 濃縮法を組み合わせた超高感度 TTX 分析システムを開発した。MS には高感度な TQ/MS を用いた。最適化の結果、図 1 のように僅か 10 pM の TTX であってもシャープで明瞭なピークとして検出することができた。検出下限 (S/N = 3) は 1.6 pM (510 pg/L) であり、2020 年 5 月末時点で世界最高感度の TTX 分析法である。これにより、フグ肝僅か 2.6 ng からでも TTX を検出することができる感度を実現した。これは細胞一個と同程度の量であり、本手法によりこれまで未知だった肝臓中の詳細な TTX 分布が解明され、科学的な TTX 蓄積メカニズムが解き明かすための大きな一歩になると期待される。

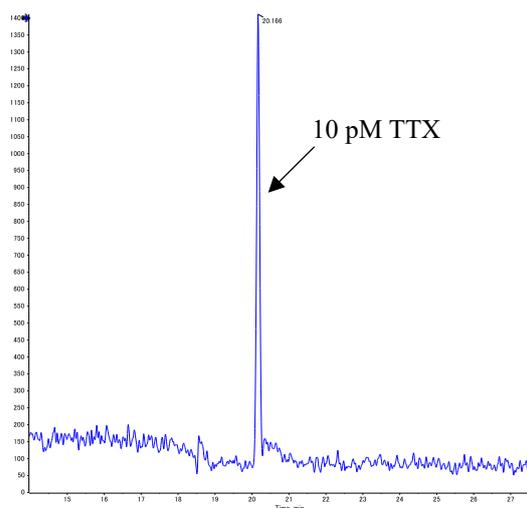


図 1. 10 pM TTX の LDIS-CE-TQ/MS 分析。

(2) (1)で開発したシステムを用いてフグ肝サンプルの測定を行った。淡路島において捕獲されたコモンフグおよびヒガンフグから水揚げ後 12 時間以内に肝臓を摘出して凍結し、これを約 1 mm の立方体角に切断・破碎して解析を行った。その結果、CE-MS において極めて高いピークとして TTX が検出された。しかし、同一肝臓組織から 100 以上の肝臓片試料を作成して分析したところ、最大で 10 倍以上の TTX 濃度差が存在することが判明した。従って将来的にオンサイトでフグ肝を分析して食用に提供する場合、採取する部位を適切に選択しなければ中毒リスクを防げない可能性がある。個体数やフグ種をより拡大して検討すべき事項であるが、今後オンサイトでの安全性試験を実施する上で注意すべき極めて重要な情報である。これは LDIS-CE-TQ/MS の高感度性を活かして初めて得ることができたものであり、本研究成果として非常に重要なものである。

続いてポータブル CE-C4D 装置を開発してフグ肝由来試料を分析したところ、フグ肝由来夾雑物ピークが TTX ピークと重複し、明確なピークとして検出できないケースが多くあった。固相抽出などの前分画処理を行えば容易に解決可能な課題であったが、オンサイト応用という出口を考慮すると前処理は簡便であることが望ましい。そこで、小型 UV 光源と小型 UV スペクトル検出器を光ファイバーで結合し、その間にキャピラリーをサンドイッチすることで小型の CE-UV 検出システムを開発した (図 2)。これを、キャピラリー上に C4D 検出器とタンデムに配置することで、多次元スペクトルデータから TTX ピークを分離することを試みた。その結果、TTX を直接的に UV 検出することは困難であったが、複数の夾雑成分を UV 検出することに成功した。C4D エレクトロフロログラムデータから UV データで得られた夾雑成分を差し引くことで、より正確な TTX 定量を実施できる可能性が示唆された。

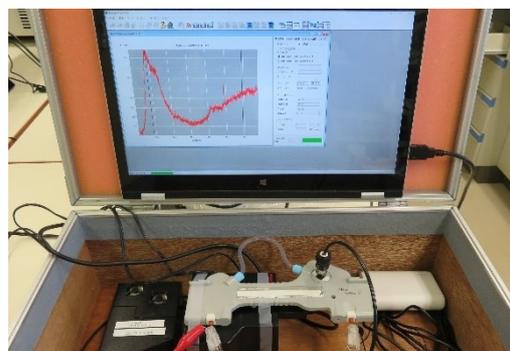


図 2. 開発したポータブル CE 分析装置のロボットタイプ機。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawai Takayuki, Ota Nobutoshi, Okada Kaori, Imasato Akiko, Owa Yuri, Morita Makiko, Tada Misa, Tanaka Yo	4. 巻 91
2. 論文標題 Ultrasensitive Single Cell Metabolomics by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry with a Thin-Walled Tapered Emitter and Large-Volume Dual Sample Preconcentration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 10564 ~ 10572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b01578	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 KAWAI Takayuki	4. 巻 67
2. 論文標題 Development of a Sensitive Trace Bioanalysis System Using Microscale Flow Control and Electrophoresis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BUNSEKI KAGAKU	6. 最初と最後の頁 599 ~ 606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunsekikagaku.67.599	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawai Takayuki, Ota Nobutoshi, Imasato Akiko, Shirasaki Yoko, Otsuka Koji, Tanaka Yo	4. 巻 1565
2. 論文標題 Profiling of N-linked glycans from 100 cells by capillary electrophoresis with large-volume dual preconcentration by isotachopheresis and stacking	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 138 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2018.06.034	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 川井 隆之
2. 発表標題 超高感度キャピラリー電気泳動法の開発と組織微小環境のオミックス分析
3. 学会等名 日本分析化学会 第69年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川井 隆之
2. 発表標題 超高感度キャピラリー電気泳動 - 質量分析法の開発と一細胞メタボローム分析への応用
3. 学会等名 日本分析化学会 第80回分析化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川井 隆之
2. 発表標題 超高感度キャピラリー電気泳動を用いた微量オミックス分析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会・第70回日本電気泳動学会総会 合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川井 隆之
2. 発表標題 キャピラリー電気泳動を用いた微量生体試料分析
3. 学会等名 第38回 キャピラリー電気泳動シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川井 隆之
2. 発表標題 超高感度CE-MSを用いた一細胞メタボローム・プロテオーム分析
3. 学会等名 第6回バイオ関連シンポジウム 若手フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Kawai
2. 発表標題 Quantitative Single Cell Metabolomics by CE-MS
3. 学会等名 17th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE2017) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川井 隆之
2. 発表標題 超高感度CE-MS分析システムによる極微量オミックス解析
3. 学会等名 日本化学会 第97春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayuki Kawai
2. 発表標題 Ultra-sensitive Capillary Electrophoresis for Single Cell Omics Research
3. 学会等名 Pittcon 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayuki Kawai
2. 発表標題 Ultra-sensitive CE-LIF/MS System for Single Cell Omics Research
3. 学会等名 16th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE2016) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Takayuki Kawai
2. 発表標題 High performance CE-MS system for single cell analysis
3. 学会等名 32nd International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis (MSB 2016) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----