

平成 28 年度

修士論文

超臨界水酸化反応によるふぐ含毒部位の
オンサイト処理に関する研究

2017 年 1 月 27 日 提出
(2017 年 2 月 14 日 改訂)

東京大学大学院新領域創成科学研究科
環境システム学専攻 大島研究室
47-156686 松本 栄祐
指導教員 大島 義人 教授

目次

目次.....	- 1 -
第1章 緒言	- 4 -
1-1 ふぐについて	- 4 -
1-1-1 ふぐ	- 4 -
1-1-2 ふぐ毒テトロドトキシシン	- 5 -
1-1-3 ふぐの取り扱い	- 6 -
1-2 超臨界流体、超臨界水について	- 7 -
1-2-1 超臨界流体、超臨界水	- 7 -
1-2-2 超臨界水酸化反応	- 8 -
1-3 研究目的	- 10 -
1-3-1 研究目的と研究方針	- 10 -
1-3-2 ふぐ含毒部位を超臨界水で処理することのメリット	- 10 -
第2章 実験方法	- 16 -
2-1 実験に用いたサンプル、試薬、装置、備品	- 16 -
2-2 超臨界水処理実験	- 16 -
2-2-1 超臨界水処理本実験	- 16 -
2-2-2 超臨界水処理予備実験	- 16 -
2-3 分析方法	- 18 -
2-3-1 元素分析	- 18 -
2-3-2 テトロドトキシシンの分析	- 18 -
2-3-3 固形分量測定	- 18 -
2-3-4 溶存有機炭素/全窒素測定	- 18 -
2-3-5 定性分析	- 19 -
2-3-6 酢酸量の定量	- 19 -
2-3-7 アンモニア量の定量	- 19 -
2-3-8 気体回収および気体の定性定量分析	- 20 -
2-4 用語の定義	- 21 -
第3章 実験方法、および、分析方法の検討	- 33 -
3-1 テトロドトキシシンの分析方法	- 33 -
3-1-1 テトロドトキシシンの抽出	- 33 -
3-1-2 HPLC-UV によるテトロドトキシシンの分析	- 34 -

3-1-3 HPLC-FD によるテトロドトキシンの分析	- 34 -
3-2 固形分量の測定方法	- 36 -
3-3 トラフグ内臓サンプルの分析結果	- 37 -
3-3-1 TTX 量と固形分量の測定結果	- 37 -
3-3-2 元素分析の結果	- 37 -
3-4 まとめ	- 38 -
第4章 テトロドトキシンの分解挙動	- 55 -
4-1 テトロドトキシン単体の分解挙動	- 55 -
4-1-1 反応の時間依存性	- 55 -
4-1-2 酸化剤量の影響	- 55 -
4-1-3 反応生成物の定性	- 57 -
4-2 天然トラフグ内臓中のテトロドトキシンの分解挙動	- 58 -
4-2-1 反応の時間依存性	- 58 -
4-2-2 反応温度の影響	- 58 -
4-2-3 酸化剤の影響	- 59 -
4-2-4 夾雑なピークの由来	- 60 -
4-2-5 部位の違いによる分解挙動の違い	- 61 -
4-3 まとめ	- 62 -
第5章 天然トラフグ内臓組成固形分の分解挙動	- 72 -
5-1 炭素原子の分解挙動	- 72 -
5-1-1 反応の時間依存性	- 72 -
5-1-2 反応温度の影響	- 73 -
5-1-3 酸化剤量の影響	- 73 -
5-1-4 部位の違いによる分解挙動の違い	- 74 -
5-1-5 物質収支の確認	- 74 -
5-2 窒素原子の挙動	- 76 -
5-2-1 反応の時間依存性	- 76 -
5-2-2 反応温度の影響	- 77 -
5-2-3 酸化剤量の影響	- 77 -
5-2-4 部位の違いによる分解挙動の違い	- 78 -
5-3 まとめ	- 79 -
第6章 結言	- 97 -

6-1 総括	- 97 -
6-2 今後の課題と展望	- 98 -
参考文献	- 100 -
謝辞	- 104 -

第 1 章 緒言

1-1 ふぐについて

1-1-1 ふぐ

ふぐ（学名：Tetraodon、英名：Pufferfish）は 4 本の強靱な歯と膨らむ姿、そして、多くの種においてその体内に毒を有していることが特徴的な魚である^[1]。学術的にはフグ目と大別され、その中でも一般的にフグ類と呼ばれるのは、モンガラカワハギ亜目のイトマキフグ科とハコフグ科、フグ亜目のウチワフグ科、フグ科、ハリセンボン科の魚のことを指す。ふぐは世界の温帯～熱帯の海水域に広く分布しており、一部の種は淡水や汽水域にも生息している。また、日本近海では約 70 種が分布しており、その内の約 20 種が食用として認められている^[2]。食用では特に高級魚として知られるトラフグが有名で、卵巣や肝臓に強毒を有するも、その身は独特な歯応えと淡白な味わいで旨みがあり、また、白子や皮、ヒレ等も様々な料理で食すことができ、古くから日本人に親しまれている。

歴史的には、縄文時代の貝塚からスズキやタイと共にフグ科の骨が見つかっており、その頃から好んで食されていたことが推察される^[3]。その後、安土桃山時代になり、豊臣秀吉が朝鮮出兵を行った際（1592～1598 年）。九州に参集した兵の間でふぐを食べて中毒死する者が相次いだため、秀吉は『河豚食用禁止の令』を發布し、ふぐ食を禁止した。この禁令は江戸時代まで続き、ふぐを食した家には家名断絶等の厳しい処分が科せられた。しかし、一方でふぐのことを歌った川柳や俳句が多くあるところを見ると、庶民の間では食べ続けられていたことが窺える。そして、明治時代になり、初代内閣総理大臣の伊藤博文が下関で偶然食べたふぐの旨さに感動し、山口県の一部地域に限ってふぐの食用を認めたとされている。こうして下関市内ではふぐ料理屋が増え、次第に東京にフグを輸送して販売する店も現れるようになり、やがて全国でフグ解禁となった。現在のような各都道府県の免許制度が定められたのは第二次世界大戦後である。^[1,4]

そして現在、日本におけるふぐの漁獲量は、養殖量と輸入量を合わせると年間約 2 万 t におよび、世界有数のふぐ生産・消費国であると言える。^[5]

1-1-2 ふぐ毒テトロドトキシン

幾つかの種のふぐはその体内に毒を有している。その主成分はテトロドトキシン (Tetrodotoxin : TTX) という難分解性かつ毒性の高い化学物質^[6]であり、ふぐの毒は TTX とその類縁体からなる^[7,8]。以下、TTX と TTX 類縁体を総称してふぐ毒と呼ぶ。

ふぐ毒の第一次生産者は細菌であると考えられており、それらを出発点として、食物連鎖の過程でふぐ毒を持つ生物種が存在していると推測される^[9]。そのため、TTX を含まない飼料で育てた養殖のふぐは毒化しない。ふぐにとって TTX はホルモンのような作用を示すと考えられており、自ら好んで食べるだけではなく、免疫力を高め、病気や寄生虫から身を守っていると考えられている。実際に、ふぐに TTX を含む飼料を与え育てると、そのコントロールに比して、生存率、成長率が上昇したという結果が出ている^[10]。なお、ふぐ自体は TTX に対して耐性を持っているため、自身の毒で中毒になることはないが、人為的に過剰量の TTX を投与すると中毒する。

ふぐ毒は神経毒で、興奮性細胞膜上に分布する Na⁺チャネルの働きを選択的に阻害し、刺激の伝達妨げることで作用する^[11,12]。すなわち、TTX を摂取すると、神経系が麻痺し、呼吸ができなくなってしまうために死亡してしまう。現在においても、特効薬や拮抗薬は発見されていない。一方で、TTX は習慣性の無い毒であることから臨床への応用についても期待がされており、研究がなされている^[9]。また、TTX は自然毒の中では比較的分子量でかつ毒力も安定性も高いといった特徴も持っており、化学物質としても非常に興味深い物質である。

TTX の研究は 1890 年に東京帝国大学の高橋順太郎教授によって始められ^[13]、1909 年に田原良純教授 (東京帝国大学) によって世界で初めて単離・命名がなされた^[14]。しかし、田原の方法により得られた毒はわずか LD₅₀ 4.1 mg /kg (現在の致死量 LD₅₀ 8~9 µg/kg から換算すると約 0.2%の毒含量) で、構造解析を行うには程足りず、構造決定は難航を極めた。その後、約半世紀近くが経ち、1964 年に平田義正 (名古屋大学)、津田恭介 (東京大学)、Robert Burns Woodward (Harvard University) の 3 グループが独立に構造を決定し、同年京都で開催された IUPAC 国際天然物化学会議において発表がなされた^[15]。また、全合成に関しては、1972 年に当時名古屋大学助教授だった岸義人がラセミ体での全合成に成功している。TTX の化学構造式とマテリアルデータ^[16]をそれぞれ図 1-1 および表 1-1 に示す。

1-1-3 ふぐの取り扱い

1-1-1、1-1-2 で述べたように、その危険な性質のために、ふぐの取り扱いについて地方自治体ごとに条例等で取り決めがなされている。例えば、含毒部位の廃棄に関して、東京都では、ふぐ料理屋等から発生したふぐ含毒部位は非浸透性の容器で厳重に管理をした後、専門の業者に委託して焼却処理を行い、その後、苛性ソーダで中和をし、最終的には埋め立て処理を行うことが義務付けられている^[17]。しかし、この方法では、管理の手間が煩わしいだけでなく、有害な薬品の使用や埋め立て処分に伴う環境負荷、盗難や焼却処理場までの輸送に伴う毒物の流出のリスクがあるという問題が挙げられる。そのため、ふぐ含毒部位のオンサイト（発生源での）処理が望まれる。

1-2 超臨界流体、超臨界水について

1-2-1 超臨界流体、超臨界水

超臨界流体 (Supercritical fluid) とは、一般に臨界温度、臨界圧力を越えた比凝縮性高密度流体と定義される^[18]。そして、超臨界水 (Supercritical water) とは臨界点 (温度 374 °C、圧力 22.1 MPa) 以上の水のことを指す^[19]。

通常、物質は温度、圧力といった環境条件や、分子間力と運動エネルギーのバランスによって、固体、液体、気体といった状態で存在し、温度と圧力を高めていくとやがて臨界点に達する。この臨界点を超えた相状態の流体を超臨界流体と呼び、水の場合特に超臨界水と呼ぶ。臨界点は物質に固有の値であり、超臨界状態では液相と気相の区別が付かなくなり、気液界面も消失する。この条件域の水は液体と同程度の密度を持ちながら、気体に匹敵する運動エネルギーを持ち、凝集力と拡散力が近い値となるため、気体と液体の間のような、常温常圧の水とは異なる性質を示す^[20]。水の相図と超臨界流体の密度および輸送物性をそれぞれ図 1-2 と表 1-2 に示す。

臨界点近傍の亜臨界域を含めた高温高压流体の物理的性状の特徴を議論すると、溶解度や熱伝導度、拡散係数等の密度に依存する物性が温度や圧力の微小な変化によって連続的かつ大きく変化するという特徴があることが挙げられる。加えて水の場合、温度や圧力の変化に伴い水素結合の状態が変わるため、水分子の構造に変化が起こり、誘電率やイオン積等の値も大きく変化するという特徴を持つ^[18,20]。図 1-3 に 25 MPa における温度と密度、誘電率、イオン積の関係を、図 1-4 に 400 °C における圧力と密度、誘電率、イオン積の関係を示す。イオン積は 25 MPa の時、300 °C 付近の亜臨界域で極大を取り、400 °C 付近では急激に低下する。そのため、亜臨界域では酸塩基触媒反応が優位になるが、超臨界状態ではラジカル反応が優位に進行するといったことが起こる。また、誘電率は温度の増加と共に低下し、臨界点付近では有機溶媒と同程度まで低くなるため、常温常圧の水では溶解し切れない有機化合物等の無極性物質を溶解し易くなる。

更に、上述した特徴以外にも、液体に比べ低粘性かつ高拡散性であるため、多孔質構造や微細構造への浸透性に優れていること^[21]や、温度・圧力条件を操作することで物性を連続的に制御できるため、水という単一の溶媒の中で様々な反応を連続的に制御することが可能であること^[22]、そして、その水は自然界に豊富に存在し、安価かつ毒性の低い物質であるので、超臨界水を用いたプロセスは有機溶媒等を用いる場合に比べて環境や健康に悪影響を及ぼすリスクの少ないプロセスであること等、超臨界流

体、および、超臨界水は多方面に応用が期待される非常に多くの魅力的な特徴を持っている。それらの特徴を踏まえて、超臨界水は後述する超臨界水酸化反応による有害廃棄物の処理や、有機合成、材料合成、資源・エネルギー回収、分離・抽出等様々な分野での研究や応用がなされており、環境調和型・持続可能社会を目指す上で期待される技術である。

1-2-2 超臨界水酸化反応

超臨界水中での酸化反応は超臨界水酸化反応と呼ばれる。超臨界水を反応場として用いる技術は米国の Modell (Modar 社) が特許を取得^[23]した 1980 年頃から盛んに研究されるようになり、中でも超臨界水酸化反応は基礎的な検討から応用に至るまで、これまで最も多く取り上げられている研究分野の一つである。その反応の特徴を以下にまとめる。

1. 超臨界水中での反応は、熱運動が激しいだけでなく、液相と気相が均一相を形成し、有機物と酸素が溶け易くなるため、湿式酸化において律速となる相間の移動が律速とならず、反応が高速かつ高効率に進む^[24]。
2. 超臨界水酸化反応では基本的に、有機化合物を水と二酸化炭素にまで反応させることが可能であり、窒素、硫黄、塩素、リンといったヘテロ原子をそれぞれ対応する無機酸にまで酸化することができる。そのため、通常焼却処理で問題となるダイオキシンや SO_x、NO_x 等の有害なガスを排出せず^[25,26]、大型の処理施設が不要で、小型の装置設計が可能である。すなわち、オンサイト処理に適用することができる。
3. 水を反応場とするため、水分を多く含むような反応物に対して、脱水に掛かるエネルギー等のロスがない^[27]。
4. 空気中での燃焼反応と違い、比熱の大きい水が大量に存在する中での反応なので、急激な温度上昇や爆発が起こる危険性が少ない。また、反応が完全な閉鎖系で進行するため、反応物および反応生成物の漏洩等のリスクも少ない。

以上のような特徴から、超臨界水酸化反応を用いた廃棄物処理は次世代型の処理システムとして盛んに研究されている分野であり、これまでに化学兵器や汚染土壌、PCB類の処理等の研究例^[28-30]が報告されている。また当研究室においても、過去に超臨界水による医療廃棄物のオンサイト処理について報告している^[31]。

しかし、以上のような優れた特徴を有する反面、超臨界水酸化技術の実用化の例はまだ多くない。その原因として、技術的な課題や、経済的な問題があると言える。超臨界水処理技術は反応器の腐食や塩の析出による管の閉塞等の問題があり^[32]、それに伴い管理の手間や費用がかさむため、実用化の障壁が高いと考えられる。しかしながら、環境調和型・持続可能型社会の実現へ向けた超臨界水技術の可能性は大きく、今後の技術革新に期待がなされる。

1-3 研究目的

ふぐ含毒部位の特性と超臨界水酸化反応の特徴から、超臨界水をふぐ含毒部位の処理に応用できるのではないかと着想し、本研究では超臨界水酸化反応によるふぐ含毒部位のオンサイト処理システムの提案を目指した。本処理システムの提案には様々な情報が必要と考えられるが、既往の研究で超臨界水中でのふぐ含毒部位の挙動について報告された例は無く、まずはラボスケールでの基礎的な知見の取得が重要であると考えられる。

1-3-1 研究目的と研究方針

上述の背景を踏まえ、本研究では超臨界水中でのふぐ含毒部位の分解挙動を解明することを目的とした。

研究方針としては、廃棄物の無害化と減容化の観点から、ふぐ含毒部位中の TTX と固形分の完全消失を目標とし、それらの分解挙動の条件依存性について実験的に検討を行った。具体的には様々な条件の下で実験を行い、反応の時間依存性、反応温度の影響、酸化剤量の影響、組成の違いによる分解挙動の違い等の点から考察を行った。また、ふぐ含毒部位の超臨界水処理実験に伴う各種分析方法の検討を行った。

1-3-2 ふぐ含毒部位を超臨界水で処理することのメリット

1-1,1-2 で述べたふぐ含毒部位の特性と超臨界水の特徴から、超臨界水を用いてふぐ含毒部位を処理することによって期待されるメリットを以下に示す。

1. 超臨界水処理を利用することによって、ふぐ含毒部位のオンサイト処理を可能にするため、ふぐから排出される含毒部位を発生時点で発生場所にて処理することができる。そのため、煩雑な管理の手間を省くことができる。
2. ふぐ含毒部位をオンサイトで処理することにより、ふぐ含毒部位の漏洩や盗難、処理場までの輸送に伴う毒の流出リスクを低減できる。
3. ふぐ含毒部位の処理場までの輸送を必要としないため、交通事故のリスクがなくなる。

4. もし、超臨界水のみでふぐ含毒部位を処理することができれば、苛性ソーダでの中和や埋め立て処分等の後処理を必要としなくなるため、それらに伴う環境負荷を低減することができると期待される。
5. ふぐ含毒部位は含水率の高い廃棄物であるため、水を反応場とする超臨界水中では脱水等に掛かるエネルギーロスがない。

1-2-2 で述べたように、上記以外にも超臨界水酸化処理法には SO_x 、 NO_x 等の有害なガスを排出しないといったような、一般的に焼却処理と比較した際のメリットがある。

また、トータルでのコストを計算するにはライフサイクルでの正確な計算を行う必要はあるが、本処理システムには、ふぐ含毒部位の処理場までの輸送や脱水に掛かるエネルギーやコスト、薬品の使用や埋め立てに掛かるコストの低減の可能性があると期待される。超臨界水酸化処理はコスト面で不利だと言われている^[33]が、もし仮にコストダウンに成功すれば、一般に高級食品とされているふぐ食の普及拡大に繋がると期待される。

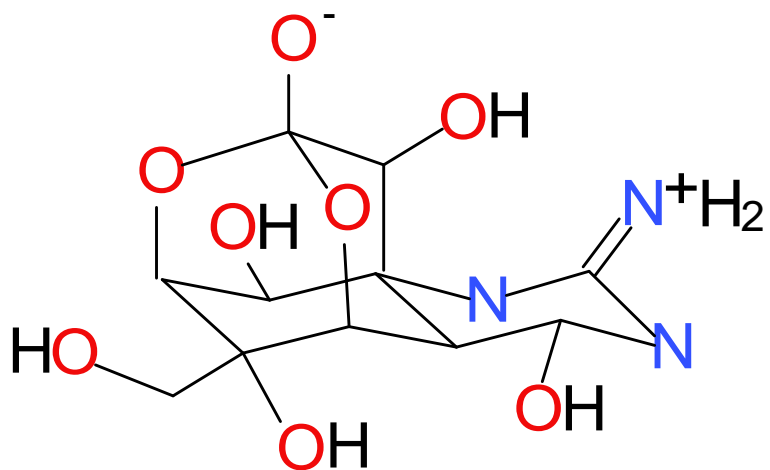


図 1-1 テトロドトキシンの構造式

表 1-1 テトロドトキシンのマテリアルデータ

テトロドトキシンのマテリアルデータ	
分子式	$C_{11}H_{17}N_3O_8$
平均分子量	319.27
CAS	4368-28-9
融点・凝固点	220 °C
比旋光度	$[\alpha]_D^{25} = -8.64^\circ$ (c = 8.55 希酢酸)
LD ₅₀ (マウス)	
静脈内投与	8.7 µg/kg-body weight
腹腔内投与	10 µg/kg-body weight
皮下投与	11.5 µg/kg-body weight
ヒト致死量	1~2 µg

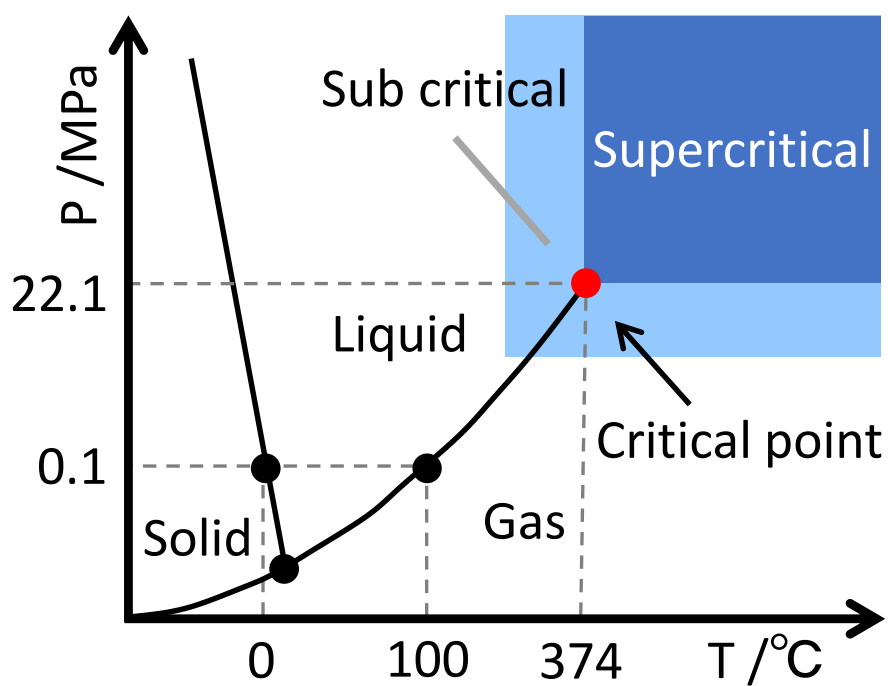


図 1-2 水の相図

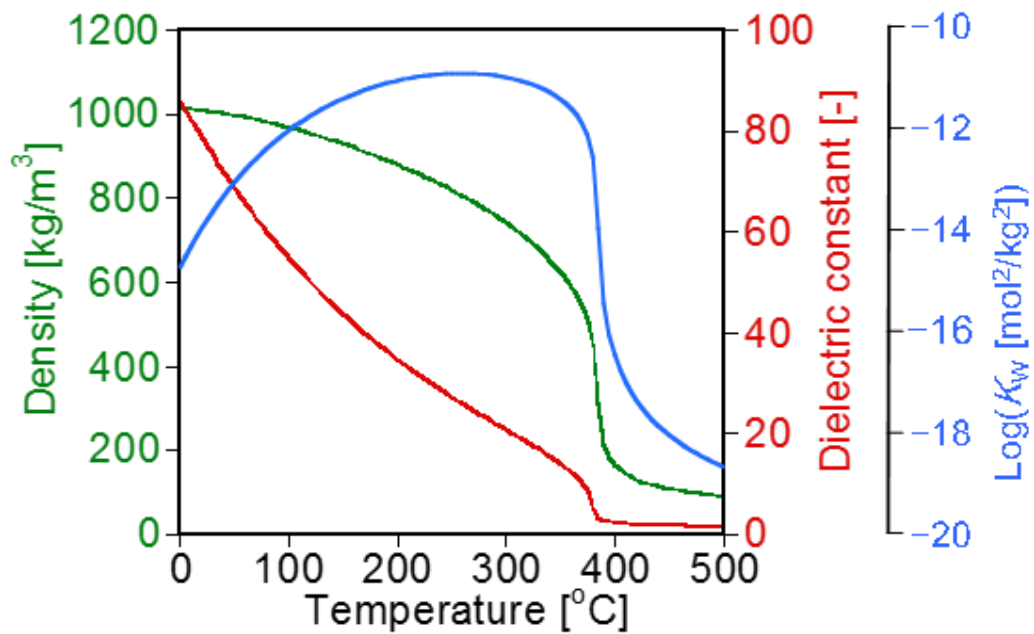


図 1-3 25 MPa における温度と密度、誘電率、イオン積の関係

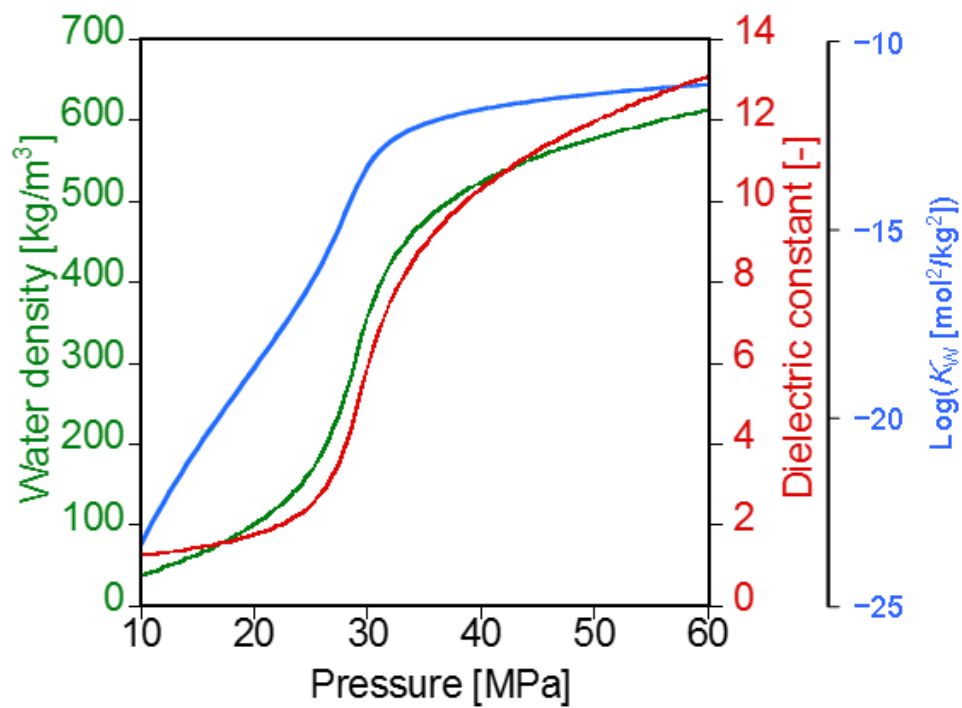


図 1-4 400 °C における圧力と密度、誘電率、イオン積の関係

表 1-2 超臨界流体の輸送物性 ^[21]

物性	気体	超臨界流体	液体
密度[$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$]	0.6~2	300~900	700~1600
拡散係数[$10^{-9}\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$]	1000~4000	20~700	0.2~2
粘度[$10^{-5}\text{Pa}\cdot\text{s}$]	1~3	1~9	200~300
熱伝導率[$10^{-3}\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$]	1	1~100	100
動粘度[$10^{-7}\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$]	100	1~10	10

第 2 章 実験方法

本章では各実験および分析方法の詳細を記す。

2-1 実験に用いたサンプル、試薬、装置、備品

実験に用いたサンプル、試薬、装置、備品の情報を表 2-1、表 2-2 に示す。

2-2 超臨界水処理実験

本節では超臨界水処理実験の実験方法について述べる。

2-2-1 超臨界水処理本実験

超臨界水酸化反応による廃棄物処理や排液処理は、通常、温度 400~650 °C、圧力 25~30 MPa の範囲で行われることが多い^[26,34,35]。本研究ではそれらの既往の研究を参考に実験方法と実験条件を決定した。反応装置図と実験条件をそれぞれ図 2-1 と表 2-3 に示す。超臨界水処理の実験には回分式の反応器とサンドバスを用いた。反応器の材質は比較的耐食性が高く、安価で汎用性の高い SUS316 (Swagelok 製) を選定した。

反応器の中に水とサンプルと必要に応じ酸化剤として 30 %過酸化水素水を封入し、高温状態のサンドバスに投入することによって反応器内を所定の時間、高温高圧状態とした。なお、反応器内の温度はサンドバスの温度で設定し、圧力は反応器内に充填する水の量で調整した。また、実験で使用したトラフグ内蔵サンプルは全て使用前に乳鉢で磨り潰し、ホモジナイズ (均質化) したものを使用した。

反応後は冷水で急冷し、反応器温度が常温に戻ったことを確認した後、サンプルを回収した。回収したサンプルは必要に応じて希釈を行い、分析機器保護のため 0.2 μm の PTFE 膜で濾過を行ってから分析に供した。

2-2-2 超臨界水処理予備実験

超臨界水処理実験を行うに先駆け、予備実験として、サンドバスに反応器を投入してから、反応器内温度が所定の温度に至るまでの時間を実験的に検討した。実験装置

図を図 2-2 に示す。所定の温度での圧力が 25 MPa となるように反応器内に水を充填し、図 2-1 の回分式反応器のキャップの代わりに熱伝对付きのキャップを接続した反応器をサンドバスに投入し、サンドバス外の温度計でその反応器内温度を観測した。サンドバス温度をそれぞれ 400 °C、500 °C に設定した際の反応管内の温度上昇の結果を図 2-3 に示す。400 °C の実験では、サンドバス投入後約 1 分が経過した時点で、500 °C の実験ではサンドバス投入後約 2 分が経過した時点で反応器内温度がそれぞれの温度に達することを確認した。

2-3 分析方法

各分析方法について述べる。

2-3-1 元素分析

本研究で使用了天然トラフグ内臓サンプルの元素分析（CHNS 分析）は東京大学大学院理学系研究科化学専攻有機元素分析室に依頼した。なお、分析は全自動元素分析装置 vario MICRO cube（エレメンタール社製）を用いて行われた。

2-3-2 テトロドトキシンの分析

TTX 標準品、トラフグ内臓サンプルおよび処理液中の TTX の分析は必要に応じて TTX の抽出操作を行った後、高速液体クロマトグラフ-蛍光検出器（High Performance Liquid Chromatograph – Fluorescent Detector : HPLC-FD）で行った。測定方法の詳細は 3-1 で述べる。

2-3-3 固形分量測定

実験に使用したトラフグ内臓サンプルおよび処理液中に残存している固形分の量を測定するために、本研究では常圧加熱乾燥法と呼ばれる方法を一般的な条件から本研究の実験スケールに合わせてスケールダウンした方法で行った。測定方法の詳細は 3-2 で述べる。

2-3-4 溶存有機炭素/全窒素測定

容液中の溶存有機炭素（Total Organic Carbon : TOC）の測定には TOC-5000A および TOC-V CPN を用いた。また、容液中に溶存している全窒素（Total Nitrogen : TN）の測定には環境安全研究センターの TOC-V CPN を使用した。表 2-4 にそれらの仕様と操作条件を示す。

なお、2つのTOC計の機器間差については同一サンプルを測定することで事前に調査した。温度400℃、圧力25MPaで酸化剤を完全酸化量論の2.6倍（卵巣）および3.5倍（肝臓）量添加して5分間超臨界水酸化処理したトラフグ卵巣および肝臓サンプルを2つのTOC計により測定した際のTOC値のばらつきは共に3%であったため、機器間の測定誤差は無視できるものとして扱った。

2-3-5 定性分析

超臨界水処理後の処理液の定性分析には環境安全研究センターのガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS：Gass Chromatograph/Mass Spectrometry）を用いた。GC/MSの仕様および操作条件を表2-5、2-6に示す。

2-3-6 酢酸量の定量

超臨界水処理後の処理液中の酢酸量の定量には高速液体クロマトグラフ紫外可視分光光度計（High Performance Liquid Chromatograph – UltraViolet/Visible Detector：HPLC-UV）を用いた、装置の仕様と操作条件を表2-7、2-8に示す。

また、TTXの分析にもHPLC-UVを用いようとしたが、感度の問題から分析が困難であったため、結果的に利用しなかった。詳しくは3-1-2で述べる。

2-3-7 アンモニア量の定量

超臨界水処理後の処理液中のアンモニアの定量にはインドフェノール青吸光光度法を基本原理とするポータブル簡易全窒素全りん計（TPN-10）＋アンモニア測定試薬キット（東亜ディーケーケー製）を用いた。

2-3-8 気体回収および気体の定性定量分析

超臨界水酸化処理の気体回収の検討の実験方法および実験条件をそれぞれ図 2-4、表 2-9 に示す。

超臨界水処理サンプルの気体回収については、図 2-1 の回分式反応器のキャップの代わりに 1/16 inch 管でバルブを繋ぎ、バルブをサンドバスの外に出るようにして、反応器をサンドバスに投入した。反応後、反応器を常温に戻した後に、バルブをガスバッグに繋いで排ガスを回収した。回収後の気体は GC-TCD によって分析した。GC-TCD の仕様と操作条件をそれぞれ表 2-10 と 2-11 に示す。分析した気体の体積から物質量の換算は以下に示すファンデルワールスの状態方程式を用いた。なお、1/16 inch 管分の体積は反応管全体の 1 %であり、誤差として無視した。

・ ファンデルワールスの状態方程式

$$(P + a/V^2)(V - b) = RT$$

P : 圧力 1 [atm]

V : 体積 [L/mol]

R : 気体定数 0.0820574 [L・atm/K・mol]

T : 温度 293.15 [K]

a : ファンデルワールス係数 (CO₂ : 3.610, CO : 4.29) [atm・L⁶/mol²]

b : ファンデルワールス係数 (CO₂ : 1.453, CO : 3.95) [10⁻²L³/mol]

2-4 用語の定義

以下において本研究で使用する用語を説明する。

・ 転化率 (Conversion)

転化率とは、反応前後においてある物質が変化する割合のことを示し、以下の式で定義した。

$$\text{Conversion} = 1 - \frac{\text{amount of substance after reaction}}{\text{amount of substance before reaction}}$$

Conversion [-]

amount of substance after reaction : 反応後のある物質の量 [mol]

amount of substance before reaction : 反応前のある物質の量 [mol]

・ 炭素収率 (Carbon yield)

炭素収率とは、ある物質の反応前の全炭素量に対する、反応後に回収したサンプルの残存固形分中、処理液中および気中に存在している炭素量の合計の割合を表す。なお、5-1-5 の検討以外の分析については、排ガスの分析を行っておらず、残存固形分中と処理液中の炭素量の和を反応前の全炭素量で除した値を炭素収率として、物質収支の取れていない部分を無機化された炭素量であると仮定をおいた。

$$\text{Carbon yield} = \frac{\text{C in solid} + \text{C in liquid} (+ \text{C in gas})}{\text{C all before reaction}}$$

Carbon yield [-]

C all before reaction : 反応前のサンプル中の全炭素量 [mol]

C in solid: 反応後の残存固形分中の炭素量 [mol]

C in liquid: 反応後の処理液の有機体炭素量 [mol]

C in gas: 反応により無機化された炭素の量 [mol]

表 2-1 本研究で用いたサンプルおよび備品一覧（その 1）

サンプル名および試薬名	産地および製造元
1 天然トラフグ卵巣及び肝臓	三重県産
2 養殖トラフグ卵巣及び肝臓	愛媛県産
3 蒸留水	蒸留装置アクエリアス RFD240HA (ADVANTEC製) にて精製
4 テトロドトキシン, フグ由来	和光純薬工業株式会社
5 過酸化水素[過酸化水素水(30%)]	和光純薬工業株式会社
6 酢酸	和光純薬工業株式会社
7 ジクロロメタン (塩化メチレン)	和光純薬工業株式会社
8 水酸化ナトリウム 粒状	和光純薬工業株式会社
9 水酸化カリウム 粒状	和光純薬工業株式会社
10 塩酸	和光純薬工業株式会社
11 炭酸ナトリウム[炭酸ナトリウム (無水)]	和光純薬工業株式会社
12 炭酸水素ナトリウム (重炭酸ナトリウム)	和光純薬工業株式会社
13 りん酸	関東化学株式会社
14 りん酸二水素カリウム (りん酸一カリウム)	和光純薬工業株式会社
15 りん酸水素二ナトリウム[りん酸二ナトリウム	和光純薬工業株式会社
16 過塩素酸[過塩素酸(60%)]	和光純薬工業株式会社
17 エタノール	和光純薬工業株式会社
18 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム	和光純薬工業株式会社
19 フタル酸カリウム	関東化学株式会社
20 硝酸カリウム	関東化学株式会社
21 アセトニトリル	シグマアルドリッチジャパン合同会社
22 アンモニア測定試薬キット	東亜ディーケーケー

表 2-1 本研究で用いたサンプルおよび備品一覧（その 2）

	製品番号	等級	純度
1			
2			
3			
4	207-15901	細胞生物学用	テトロドトキシン1 mg あたりくえん酸緩衝剤5 mg 含有
5	081-04215	試薬特級	30.0 ~ 35.5 %
6	017-00256	試薬特級	99.7+% (Titration or Subtracting Method)
7	135-02441	試薬特級	min. 99.5 %
8	198-13765	試薬特級	min. 97.0 %
9	168-21815	試薬特級	min. 85.0 %
10	080-01066	試薬特級	35.0 ~ 37.0 %
11	197-01581	試薬特級	99.8+% 質量分率(Na ₂ CO ₃)(After Ignition)(Titration)
12	199-01301	試薬特級	99.5 ~ 100.3 % (Titration)
13	32187-00	特級	>85.0%(T)
14	169-04245	試薬特級	min. 99.5 %
15	197-02865	試薬特級	min. 99.6 %
16	166-00713	試薬特級	60.0 ~ 62.0 %（質量分率）(HClO ₄)
17	057-00451	試薬特級	min. 99.5 %
18	082-05921	イオンペアクロマトグラフ用	99.0+% (HPLC), 98.0+% (容量分析)(乾燥後)
19	32311-20	特級	99.8% ~ 100.2%(T)
20	32365-20	特級	>99.0%(T)
21	34888-2.5L	高速液体クロマトグラフィー用	≥99.9% (GC)
22	0BB00009		

表 2-2 本研究で用いた装置および備品一覧

品目	製品名	製造元
サンドバス	TK-3T	マツキ科学
ドライオーブン	FS-320	ADVANTEC
回分式反応器	1/2 inch SUS316管 + 1/2 inch SUS316キャップ	
反応管	ブライト・アニール・チューブ316SS	Swagelok
キャップ	キャップ	Swagelok
精密濾過膜（0.2 μ m PTFE膜	LG 0.20 μ m	Merck Millipore
限外濾過フィルター	Amicon Ultra-4（分画分子量：10000）	Merck Millipore
アルミ容器	手付アルミカップ（上部径51 下部径45 深さ12）	アズワン
pH試験紙	UNIV（ユニバーサル）	東洋濾紙
排ガス捕集用ガスバッグ	アルミニウム 100 mL ガスバッグ	ジーエルサイエンス

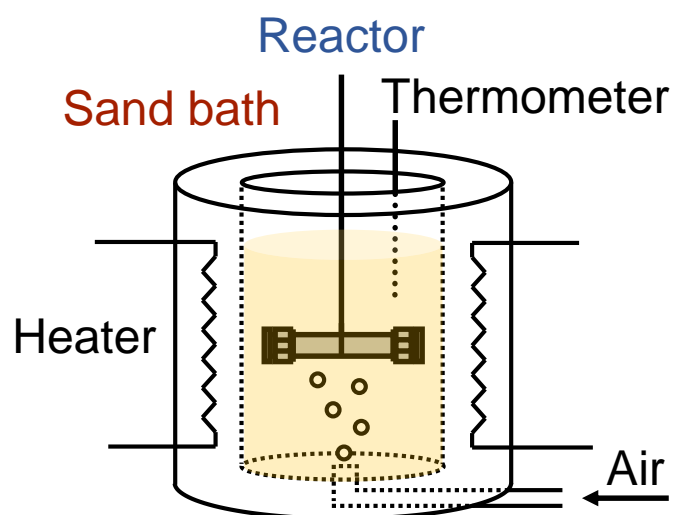


図 2-1 サンドバスと回分式反応器

表 2-3 超臨界水処理実験の実験条件

反応器	SUS316製 回分式反応器 (容積：10.0 mL)	
温度	400 or 500 °C	
圧力	25 MPa	
サンプル	TTX標準品 50 mg/L	
	天然トラフグ卵巣 100 mg	
	天然トラフグ肝臓 100 or 50 mg	
酸化剤	30% H_2O_2 aq ^{※1} 完全酸化量論の	1.0 or 0 倍 (TTX標準品)
		2.6 or 0.9 or 0 倍 (卵巣)
		3.5 or 1.2 or 0 倍 (肝臓)
反応時間	1, 5, 10 min ^{※2}	

※1 TTX 標準品については、TTX と助溶剤として添加されているくえん酸緩衝剤の双方中の有機体炭素を全て CO_2 まで反応させるのに必要な供給酸素量を完全酸化量論の等倍と定義した。また、トラフグ内臓サンプルについては、卵巣および肝臓中の有機体炭素、有機体窒素、有機体硫黄をそれぞれ全て CO_2 , N_2 , SO_4^{2-} まで反応させるのに必要な供給酸素量を完全酸化量論の等倍と定義した。

※2 400 °C の場合、サンドバス投入後約 1 分で、500 °C の場合、サンドバス投入後約 2 分で反応器内が各温度に達することを実験的に確認し、それぞれその時間が経過した時点を反応時間の 0 分と定義した。なお、検討実験の詳細は 2-2-2 で述べる。

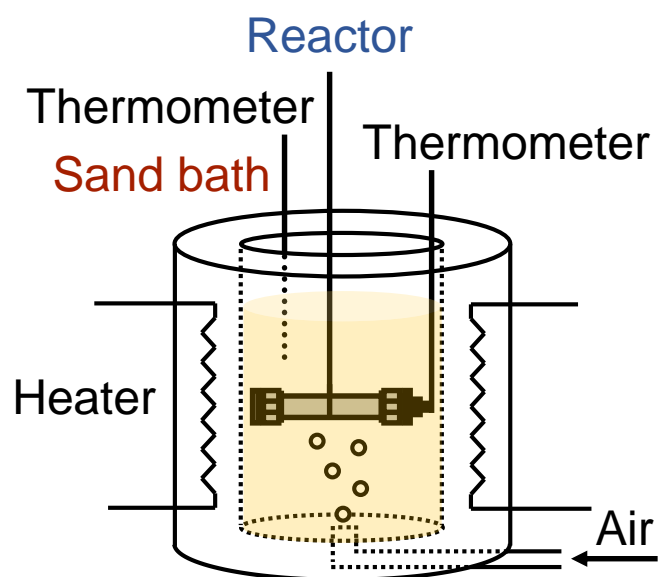


図 2-2 サンドバスと熱電対を接続した回分式反応器

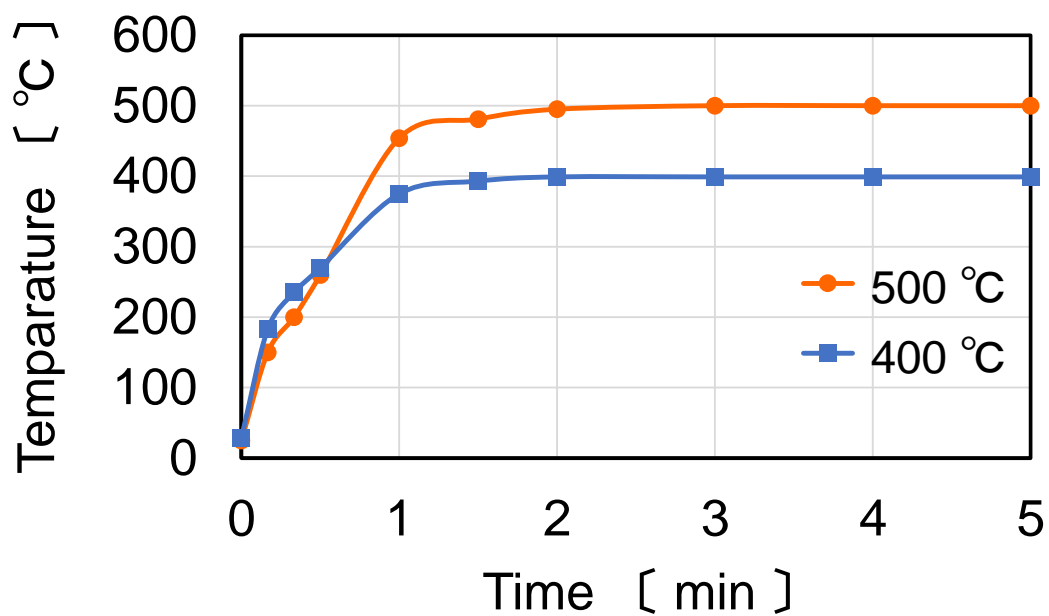


図 2-3 本研究で使用した回分式反応器の温度の伝播具合

表 2-4 TOC 計および TOC/TN 計の仕様と操作条件

分析機器	製品名	製造元
全有機炭素計（TOC計）	TOC-5000A	島津製作所 SHIMADZU
キャリアガス：空気	空気	鈴木商館
キャリアガス流量	150 mL/min	
全有機炭素/全窒素計（TOC/TN計）	TOC-V CPN	島津製作所 SHIMADZU
キャリアガス：空気	Natural gas	-
キャリアガス流量	130 mL/min	

表 2-5 GC/MS の仕様

分析機器	製品名	製造元
ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)	GCMS-QP2010	島津製作所 SHIMADZU
検出器：質量分析計 (Mass spectrometer)	GCMS-QP2010	島津製作所 SHIMADZU
カラム：一般分析用	InerCap Pure WAX	GL-Science
キャリアガス：ヘリウム	高純度ヘリウムガス	日本ヘリウム

表 2-6 GC/MS の操作条件

分析条件			
GC		MS	
カラムオープン温度	100.0 °C	イオン源温度	250 °C
気化室温度	250.0 °C	インターフェース温度	250 °C
昇温条件	100 °Cで5 min ホールド → 10 ° C/min で14 min 昇温 → 240 ° Cで10 min ホールド	検出器電圧	チューニング結果 からの相対値
注入モード	スプリット	イオン化モード	ESI
カラム		測定モード	スキャン
長さ	30.0 m	マイクロスキャン幅	0 u
膜厚	0.25 µm		
内径	0.25 mm ID	溶媒溶出時間	0 min
キャリアガス: ヘリウム		測定時間	29 min
制御モード	線速度		
圧力	100.2 kPa	開始m/z	33
全流量	17.7 mL/min	終了m/z	500
カラム流量	1.34 mL/min		
線速度	43.0 cm/sec		
ページ流量	3.0 mL/min		
スプリット比	10		

表 2-7 HPLC-UV の仕様

分析機器	製品名	製造元
高速液体クロマトグラフ (HPLC-UV)		
統括装置	LC-Net II /ADC	日本分光 JASCO
オートサンプラー	AS-950	日本分光 JASCO
ポンプ	PU-980	日本分光 JASCO
デガスター	DG-2080-53	日本分光 JASCO
カラムオープン	CO-965	日本分光 JASCO
カラム1：イオン排除クロマトグラフ	Shim-pack SPR-H 250 mm×7.8 mm i.d.	島津製作所 SHIMADZU
ガードカラム1	Shim-pack SPR-H(G) 50 mm×7.8 mm i.d.	島津製作所 SHIMADZU
検出器：紫外可視分光光度計 (UV-V)	UV-970	日本分光 JASCO

表 2-8 HPLC-UV の操作条件

操作条件	
移動相	4 mmol/L 過塩素酸水溶液
移動相流量	0.6 mL/min
サンプル注入量	10 µL
カラム	Shimpak (Shimadzu 島津製作所製)
カラムオープン温	40 °C
検出波長	210 nm

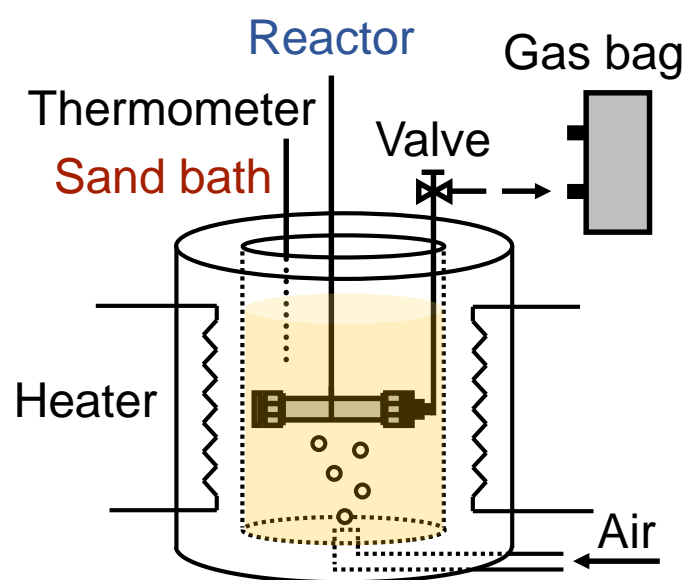


図 2-4 サンドバスと回分式反応器と気体回収装置

表 2-9 気体回収検討の際の超臨界水酸化処理実験の実験条件

反応器	SUS316製 回分式反応器 (容積 : 10.0 mL)	
温度	400 °C	
圧力	25 MPa	
サンプル	天然トラフグ卵巣 100 mg	
	エタノール 15.8 µg ^{※1}	
酸化剤	30% H_2O_2 aq ^{※2} 完全酸化量論の	2.6 倍(卵巣)
		3.0 倍(エタノール)
反応時間	1, 5 min ^{※3}	

※1 エタノールのサンプル量は、添加する酸化剤の量を 3.0 倍に設定するために、そこから逆算して決定した。

※2 トラフグ卵巣サンプルについては、卵巣中の有機体炭素、有機体窒素、有機体硫黄をそれぞれ全て CO_2 , N_2 , SO_4^{2-} まで反応させるのに必要な供給酸素量を完全酸化量論の等倍と定義した。エタノールについては、エタノール中の有機体炭素を全て CO_2 まで反応させるのに必要な供給酸素量を完全酸化量論の等倍と定義した。

※3 400 °C の場合、サンドバス投入後約 1 分で反応器内が各温度に達することを実験的に確認し、その時間が経過した時点を実験時間の 0 分と定義した。

表 2-10 GC-TCD の仕様

分析機器	製品名	製造元
ガスクロマトグラフ (GC-TCD)	GC-8A	島津製作所 SHIMADZU
検出器：熱伝導度検出器 (Thermal Conductivity Detec	GC-8A	島津製作所 SHIMADZU
カラム：無機ガス分析用	SHINCARBON ST	信和化工
キャリアガス：ヘリウム	高純度ヘリウムガス	日本ヘリウム
記録計	C-R6A	島津製作所 SHIMADZU

表 2-11 GC-TCD の操作条件

操作条件	
キャリアガス流量	55 mL/min
カラムオープン温度	120 °C
試料気化室温度	140 °C
検出器温度	140 °C
電流	100 mA

第3章 実験方法、および、分析方法の検討

3-1 テトロドトキシンの分析方法

TTX の分析方法の公定法はマウス試験とされているが^[36]、近年は機器分析技術の発達により HPLC や GC/MS 等による高精度分析技術が開発されている。中でも LC/MS、LC/MS/MS を使った分析が高感度かつ高精度であるため主流となってきた^[37,38]。また、マウス試験では化学物質の一般毒性を評価することは可能であるが、生物試験故、感度や精度が高くないことに加え、TTX の厳密な分析は行えないという問題がある。そのため、本研究では TTX の分解挙動の確認に機器分析による分析手法を行うこととした。その中で、GC/MS 程の分析前処理の煩雑さ^[39]がなく、LC/MS 程の高価な機器に頼らない分析手法である HPLC-UV および、HPLC-FD を用いた分析手法について検討した。

3-1-1 テトロドトキシンの抽出

卵巣や肝臓中の TTX を測定するためには前処理として TTX の抽出操作を行わなくてはならない。本研究においても、超臨界水処理前後のトラフグ内臓サンプル中の TTX の分析に関して、機器分析の前処理として TTX 抽出操作を行った。TTX 標準品およびその超臨界水処理サンプルに関しては抽出操作を行わずに機器分析を行った。

TTX 抽出に関しては、1909 年に東京帝国大学の田原良純教授が TTX の抽出に成功^[44]して以来、これまで多くの研究者がその抽出方法に改良を加えてきたが^[45]、現在では厚生労働省監修の食品衛生検査指針理化学編^[36]に記されている参考法という方法が公定法とされている。また、研究者の間では簡易法と呼ばれる参考法を簡便にした方法が用いられることもある。しかし、本研究では実験で得られるサンプルが非常に少ないことから、その簡易法を更にスケールダウンした方法による TTX 抽出を検討した。各抽出法を図 3-1、3-2 にまとめる。なお、TTX 抽出に掛ける超臨界水処理前のサンプルが 1 g であるのに対して、超臨界水処理後のサンプルが反応生成物全量（処理液中に含有されているトラフグ内臓の量は 100 mg）であるのは、実験で使ったトラフグサンプルの TTX 定量分析の測定誤差を小さくする目的と、TTX 抽出に使用するサンプル量をおおよそ 1 g で統一するためである。

3-1-2 HPLC-UV によるテトロドトキシンの分析

通常、TTX 自体は UV 吸収を示さないため、本項では、既往の研究^[40]を参考に、TTX をアルカリ分解することによって生成される 2-Amino-6-hydroxymethyl-8-hydroxyquinazoline（通称：C₉-base）という物質に誘導体化を行って検出する方法を採った。C₉-base の化学構造式を図 3-3 に示す。C₉-base の作成方法は図 3-4、3-5 の通りである。まずはじめに、C₉-base の吸収波長を求めるために UV-VIS による測定を行った。C₉-base の UV 吸収を図 3-6、3-7 に示す。その結果、文献^[40]で報告されている値とほぼ等しい 278 nm 付近に僅かながらの UV 吸収が見られた。この結果を元に HPLC-UV による定量分析を行った。HPLC-UV の分析条件を表 3-1 と表 3-2 に示す。HPLC-UV による測定は分析条件を変更して行ったが、分析条件 1、2、共に検出感度が低く、本研究で扱う濃度域では分析が困難であった。その後も C₉-base の UV 吸収が水酸化ナトリウムの UV 吸収と被った可能性等を考慮して、水酸化ナトリウムの代わりに水酸化カリウムを用いてアルカリ分解を行った場合の分析等を検討したが、HPLC-UV での分析は困難である判断したため、次の項で記す HPLC-FD による分析方法を検討することにした。

3-1-3 HPLC-FD によるテトロドトキシンの分析

HPLC-FD による TTX の分析について、UV 吸収同様に、TTX 自体は蛍光性を示さない。そのため、こちらについても TTX をアルカリで分解し、蛍光性を示す物質である C₉-base に誘導体化を行ってから蛍光検出器で検出する方法を採った。しかし、蛍光検出器内部にはガラス製の部品が使われている箇所があり、アルカリの流入による検出器の劣化が危惧された。そこで、本研究では既往の研究^[41,42]を参考にした上で、分析装置を組み、検出器保護のために最後にアルカリを塩酸で中和する操作を加えた。分析装置図を図 3-8 に示す。

この分析方法で TTX 標準品を測定してみたところ、高感度で検出することができた。次に、励起波長、および、蛍光波長の最適条件を求めるために励起波長、蛍光波長をそれぞれ固定して、蛍光波長、励起波長の最大波長を求める検討を行った。その結果を図 3-9、3-10 に示す。文献で報告されていた値^[41,42]とは若干のずれがあったが、本分析法で最大の検出強度を取った励起波長 370 nm、蛍光波長 500 nm という条件で以後

分析を行うこととした。最終的な分析条件とその条件で測定した TTX 標準品のピークを表 3-3 と図 3-11 に示す。また、同一サンプル (TTX 標準品) の連続測定により、測定精度の確認を行った結果を図 3-12 に示す。

なお、本手法による TTX の定量下限は 0.1 mg/L であり、トラフグのサンプルだと、0.4 µg-TTX/100mg-トラフグ (肝臓の場合 97.4 %、卵巣の場合 98.9 %の TTX 分解量に相当する) までの TTX を確認することができる。仮に定量下限値まで TTX を分解できたとすると、処理液を約 10 L 摂取してはじめてヒト致死量に達する。そのため、処理液中の TTX が定量下限値を下回っていれば、処理液の TTX 中毒のリスクは十分に低いと考えられる。

3-2 固形分量の測定方法

食品中の固形分量もとい水分量の測定には常圧加熱乾燥法という方法が一般に用いられている。常圧加熱乾燥法とはあるサンプルに対して一定時間加熱乾燥を行うことで、その水分を飛ばし、その減量からサンプル中の水分量もとい固形分量を求める手法であり、通常、2~3 g のサンプルに対して、温度 100~135 °C の範囲で 1~5 時間程度（魚類は概ね 105 °C で 5 時間）の加熱乾燥を行う^[43]。しかし、この通常の常圧加熱乾燥法はサンプル量と時間を要すものであるため、本研究の実験スケールには不向きである。そこで、本研究ではサンプル量の節約と実験時間の短縮を目的として、常圧加熱乾燥法を本研究の実験スケールに合わせてスケールダウンすることを検討した。

通常は上部の直径 55 mm、底部の直径 50 mm、深さ 25 mm、厚さ 0.2~0.3 mm 程度、ふたの深さは約 10 mm で、そのうち 5 mm ぐらいが容器にはまるようになっているアルミ製の秤量皿を用いて、サンプル 2~3 g に対して 5 時間の加熱乾燥を行うところ、本研究では図 3-14 に示すようなディスプレイザブルのアルミカップ（上部の直径 51 mm、底部の直径 45 mm、深さ 12 mm、厚さ 0.1 mm 程度）とアルミホイルの蓋を用いて、サンプル 100 mg に対してドライオープン中で 105 °C、2 時間の加熱乾燥を行った。その後、恒量であることを確認するため 30 分の追加加熱乾燥を行い、秤量皿を常温に戻した後、電子天秤によって秤量し、その減量からサンプル中の固形分量を求めた。

常圧加熱乾燥法の一般的な条件で用いられる秤量皿の写真と、本研究で用いた秤量皿および測定風景の写真をそれぞれ図 3-13 と図 3-14 に示す。また、それらの測定条件のまとめを表 3-4 に示す。

3-3 トラフグ内臓サンプルの分析結果

3-3-1 TTX 量と固形分量の測定結果

3-1、3-2 で検討した分析方法により分析した本研究で使⽤したトラフグサンプルの分析結果を表 3-5 に示す。また、文献で報告^[44,45]されているトラフグの内臓組成を図 3-15 に示す。

本分析法によって測定した結果は既往の研究で報告されている値^[10,44-47]と比較しても標準的な結果であった。なお、測定誤差を減らすために測定は 3 回⾏い、平均値を取った。

3-3-2 元素分析の結果

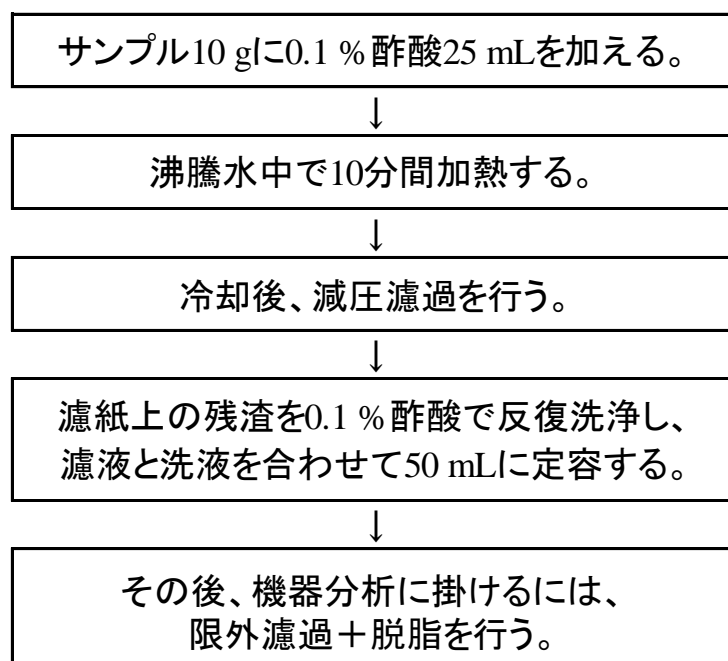
本研究で使⽤したトラフグサンプルの元素分析の結果を図 3-16 に示す。また、そこから計算により水分を除外した卵巣および肝臓固形分の元素組成を図 3-17 に示す。超臨界⽔処理実験において残存した固形分の中の炭素量の算出は、その残存固形分の常圧加熱乾燥後の残存固形分が図の水分を除外した元素組成であると仮定して求めた。

3-4 まとめ

第3章では、本研究に合わせた分析を行うために、TTX 分析と固形分量測定について分析方法の検討を行った。

1. TTX 分析に関しては、まず TTX の抽出について、公定法である参考法を簡略化した簡易法を、本研究の実験スケールに合わせてスケールダウンした方法で行った。また、TTX の定量分析について、検出器保護の理由から、既往の研究で報告されている HPLC-FD 分析の分析装置に一部改良を加えた。
2. 固形分量測定に関しては、一般的な条件から本研究の実験スケールに合わせてスケールダウンしただけでなく、より簡便かつ安価に行える測定方法を考案した。
3. 以上の分析方法によって測定したトラフグ内臓サンプルの測定結果は文献で報告されている値と概ね一致していた。

参考法



簡易法

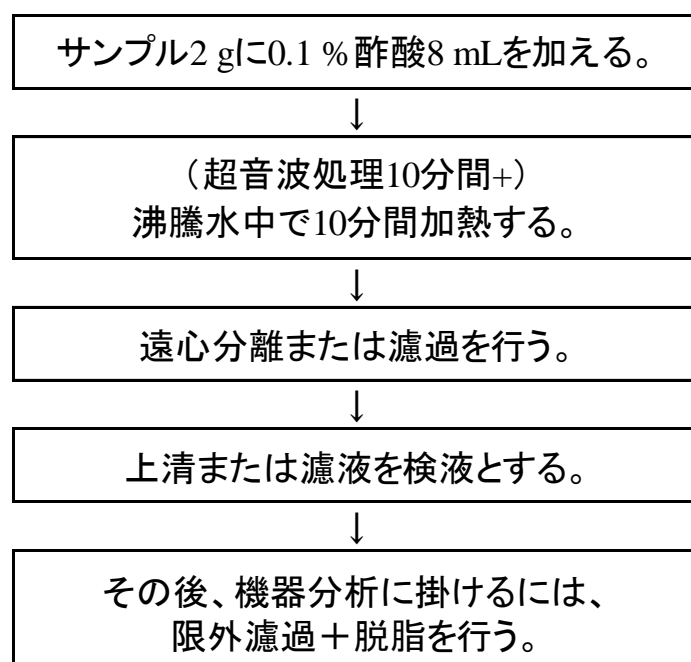
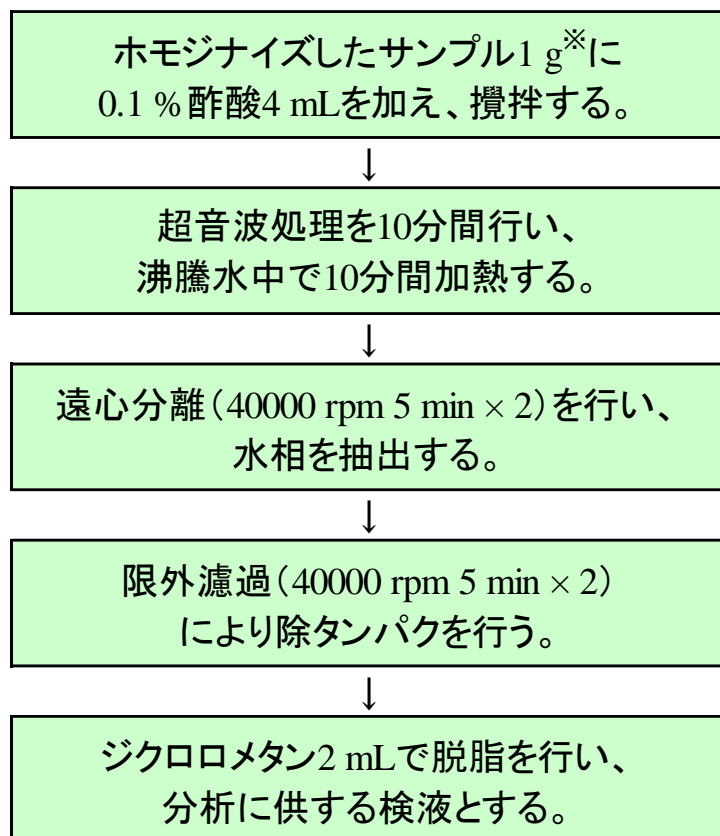


図 3-1 TTX 抽出方法(参考法と簡易法)

本研究



※ 超臨界水処理後のサンプルに関しては、反応生成物全量をサンプル 1 g の代わりに用いた。

図 3-2 TTX 抽出方法 (本研究)

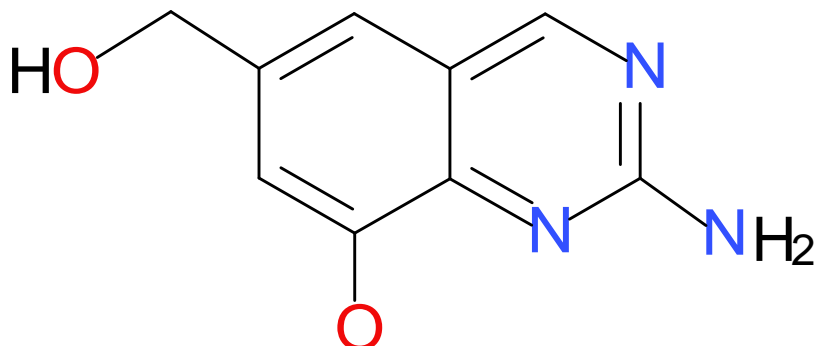


図 3-3 C₉-base の構造式

C₉-base 作成方法 (UV-VIS, HPLC-UV 測定用)

100 mg/L の TTX 溶液 100 μL を 2 mol/L の水酸化
ナトリウム水溶液で 10 mL にメスアップする。



沸騰水中で 45 分間加熱する。

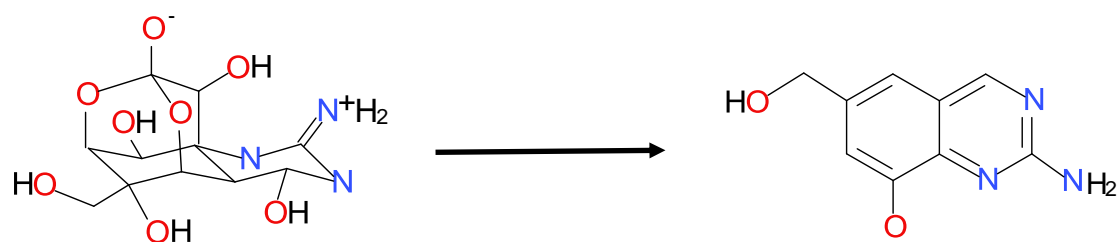


常温に戻した後、分析に供した。

図 3-4 C₉-base の作成方法 (UV-VIS, HPLC-UV 測定用)

TTX

C9-base



Heating with strong base

図 3-5 TTX とアルカリのアルカリ分解による C₉-base の生成

表 3-1 HPLC-UV の分析条件 1

分析条件	
移動相	酸性りん酸緩衝液(80 %)+アセトニトリル(20 %)
移動相流量	0.5 mL/min
サンプル注入量	10 µL
カラム	Finepak SIL C18S
カラムオープン温度	40 °C
検出波長	280 nm

表 3-2 HPLC-UV の分析条件 2

分析条件	
移動相	蒸留水(90 %)+アセトニトリル(10 %)
移動相流量	0.5 mL/min
サンプル注入量	10 µL
カラム	Finepak SIL C18S
カラムオープン温度	40 °C
検出波長	278 nm

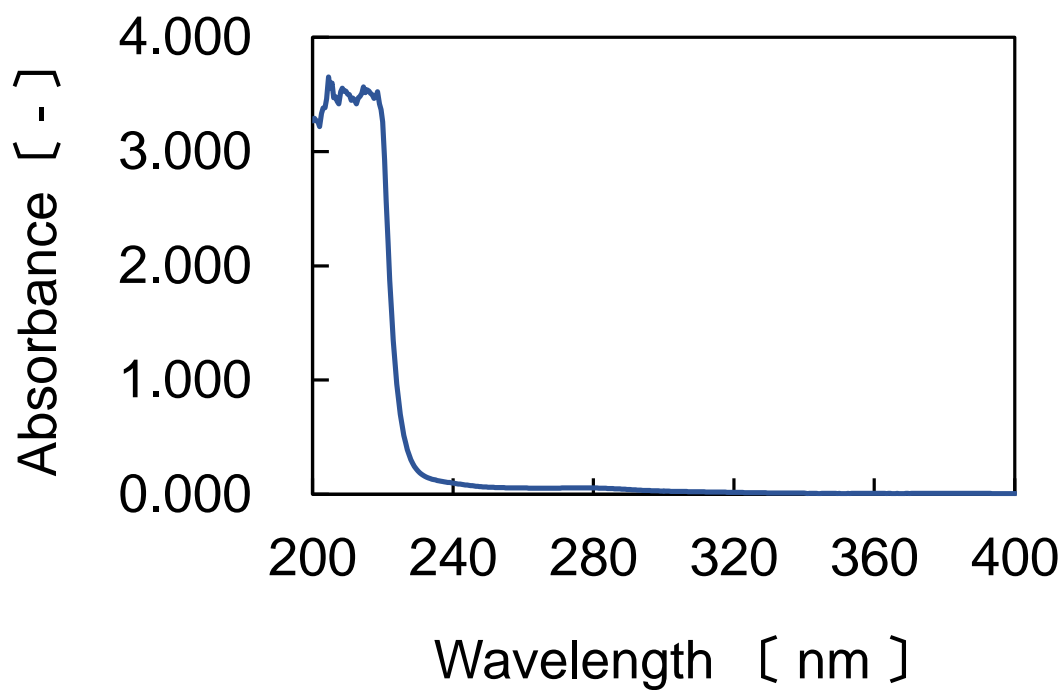


図 3-6 C9-base の UV 吸収波長

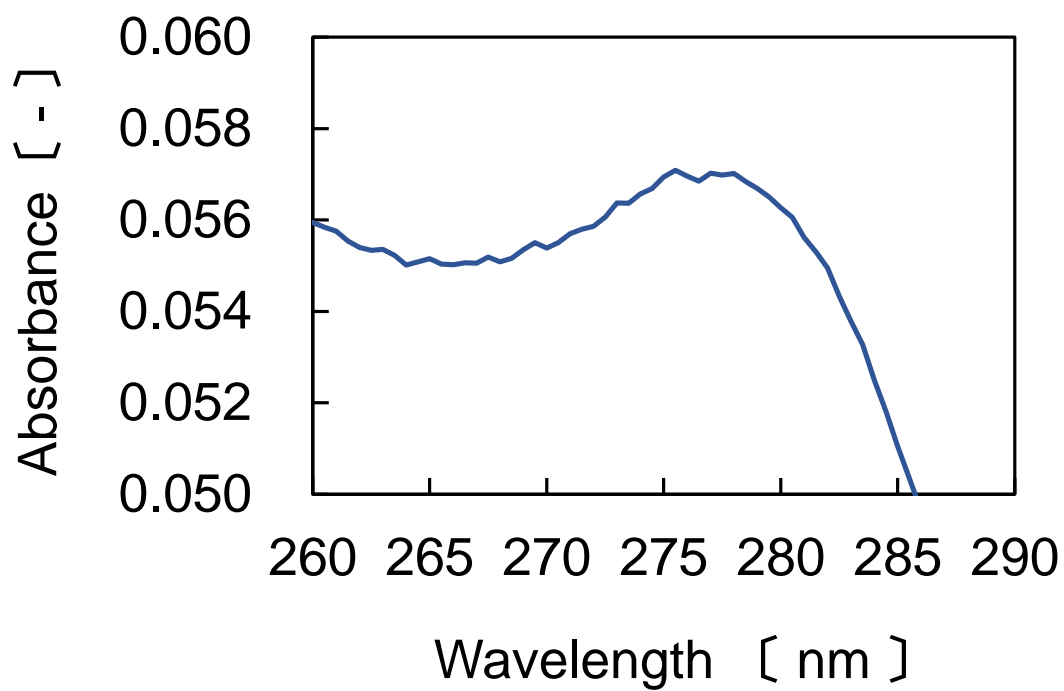


図 3-7 C9-base の UV 吸収波長 (拡大版)

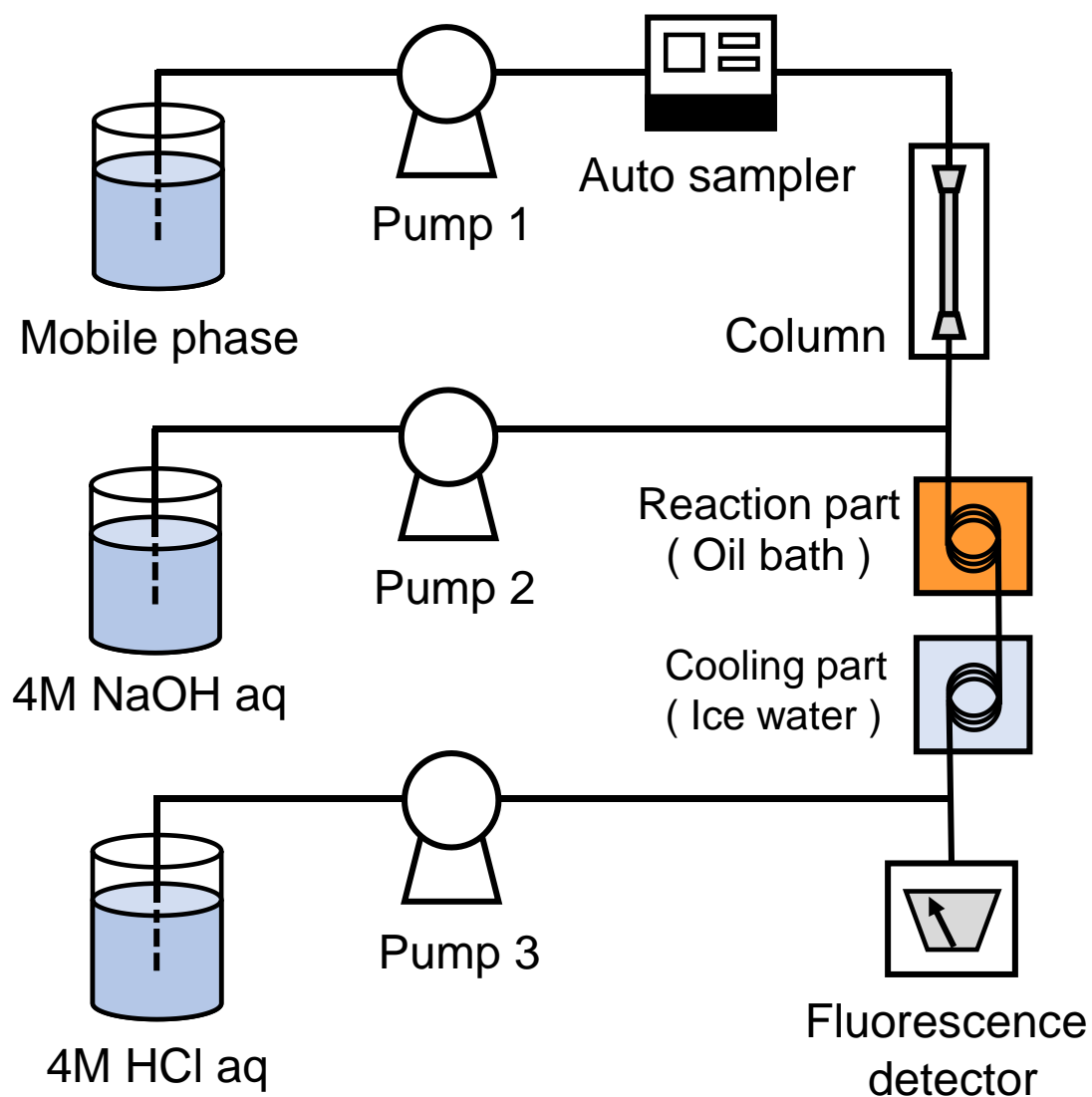


図 3-8 HPLC-FD の分析装置図

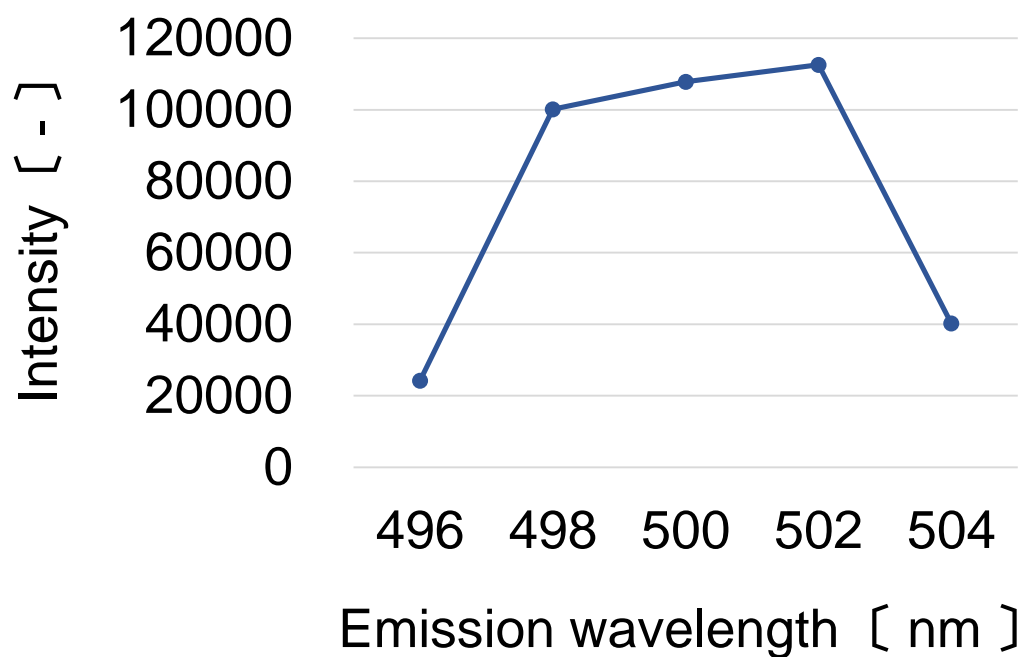


図 3-9 励起波長を 400 nm で固定した時の蛍光波長の検出強度

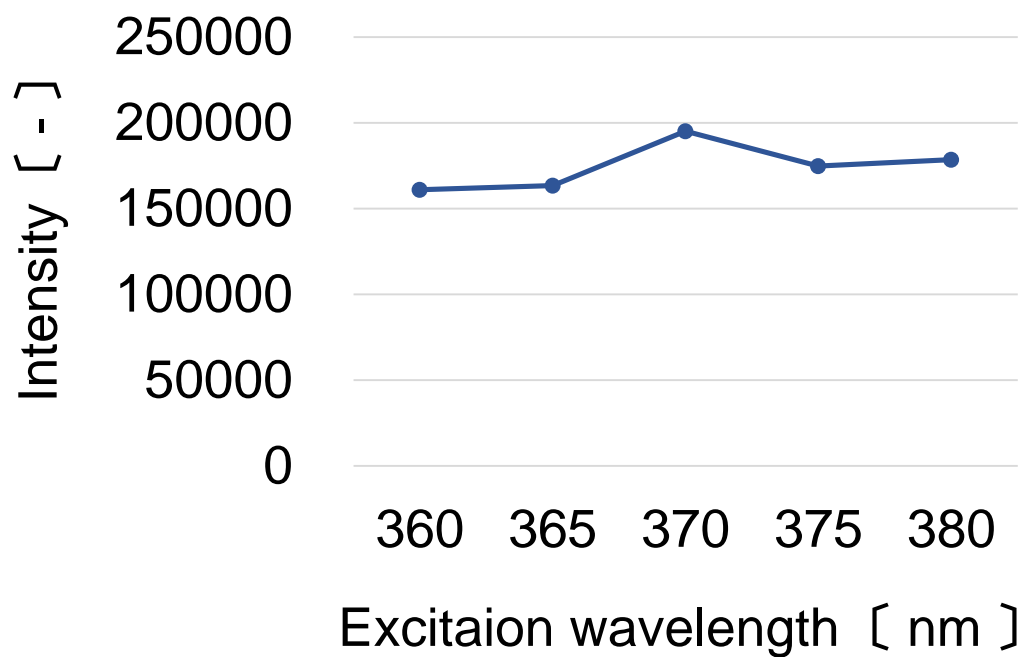


図 3-10 蛍光波長を 500 nm で固定した時の励起波長の検出強度

表 3-3 HPLC-FD の分析条件

分析条件	
移動相	1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムを2mM含む 0.05M中性りん酸緩衝液(99 %) +アセトニトリル(1 %)
移動相流量	0.5 mL/min
アルカリ溶液	4 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液
アルカリ溶液流量	0.5 mL/min
中和溶液	4 mol/L 塩酸水溶液
中和溶液流量	0.5 mL/min
サンプル注入量	40 μ L
カラム	Crestpak C18S(JASCO日本分光製)
カラムオープン温度	40 °C
反応部	PTFEチューブ
温度	100 °C
長さ	10 m
内径	0.25 mm
冷却部	PTFEチューブ
温度	0 °C
長さ	1 m
内径	0.25 mm
励起波長	370 nm
蛍光波長	500 nm

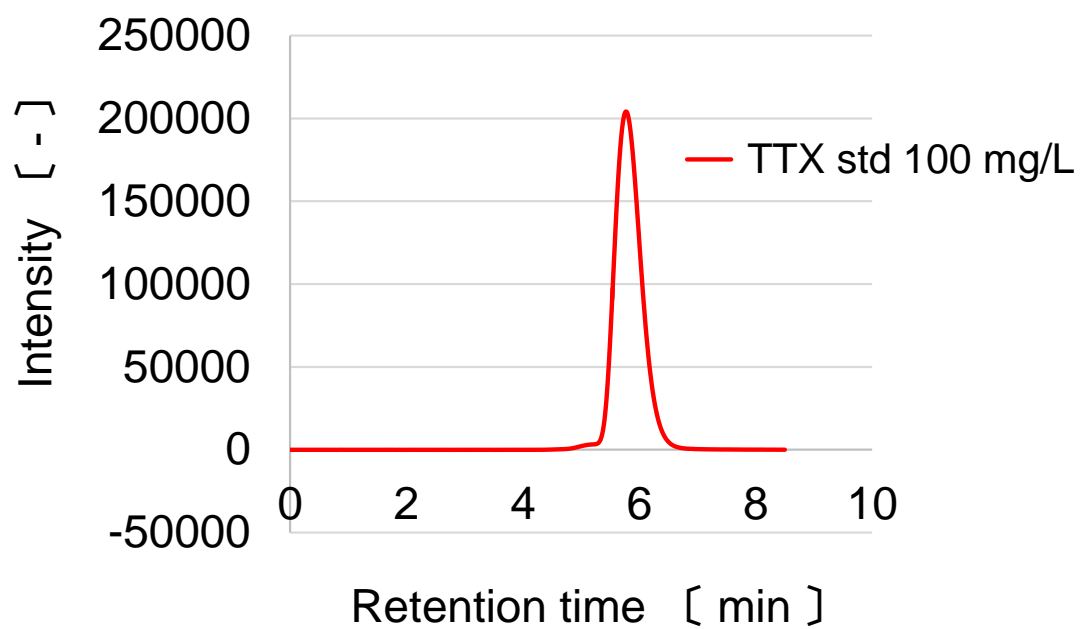
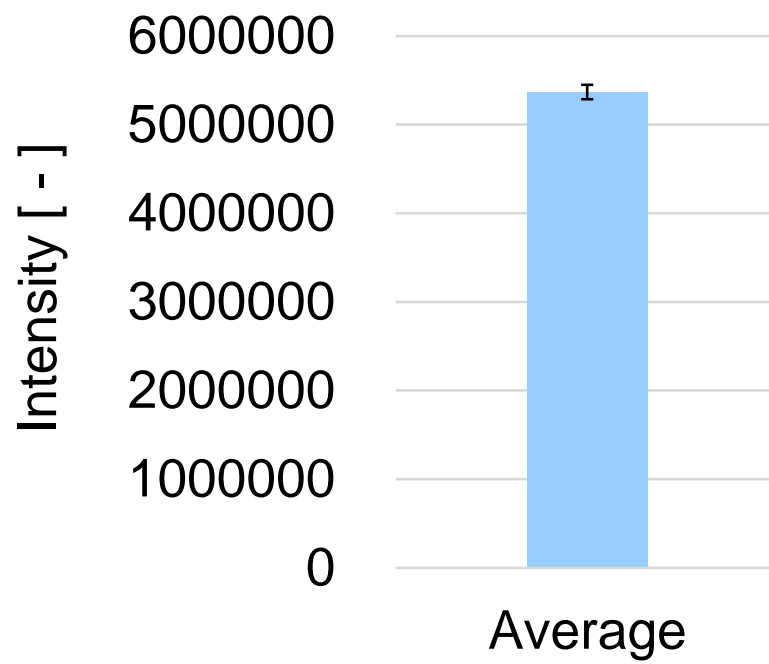


図 3-11 TTX 標準品の TTX 蛍光クロマトグラム



※ エラーバーは標準誤差を示す。

図 3-12 測定精度の確認



図 3-13 通常の秤量皿



図 3-14 本研究で代用したアルミ容器と測定の様子

表 3-4 常圧加熱乾燥法の測定条件

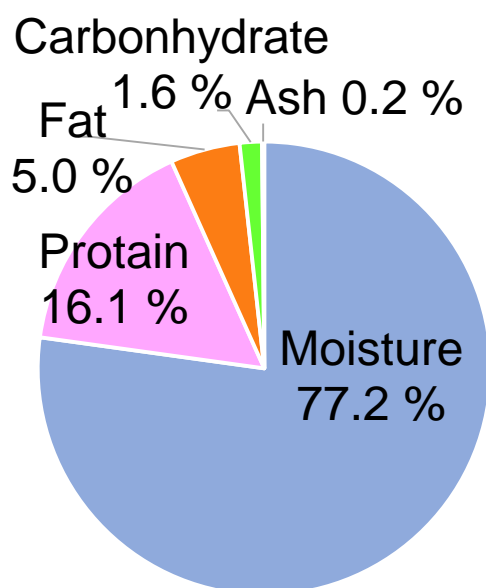
	一般的な条件	本研究
秤量皿	アルミ製秤量皿	アルミカップ
上部径	55 mm	51 mm
底部径	50 mm	45 mm
深さ	25 mm	12 mm
厚さ	0.2~0.3 mm	0.1 mm程度
蓋	アルミ製秤量皿	アルミホイルカバー
深さ	10 mm	—
サンプル量	2~3 g	100 mg
加熱乾燥時間	5 時間	2 + 0.5 時間

表 3-5 本研究で使用したトラフグ内臓サンプル中の TTX 量と固形分量測定結果

	ovary 100 mg (卵巣)	liver 100 mg (肝臓)
Amount of TTX	32.6 ± 2.1 µg	15.4 ± 0.5 µg
Amount of solid content	22.7 ± 0.1 mg	74.0 ± 0.2 mg

※ ±の値は標準誤差を示す.

卵巢



肝臓

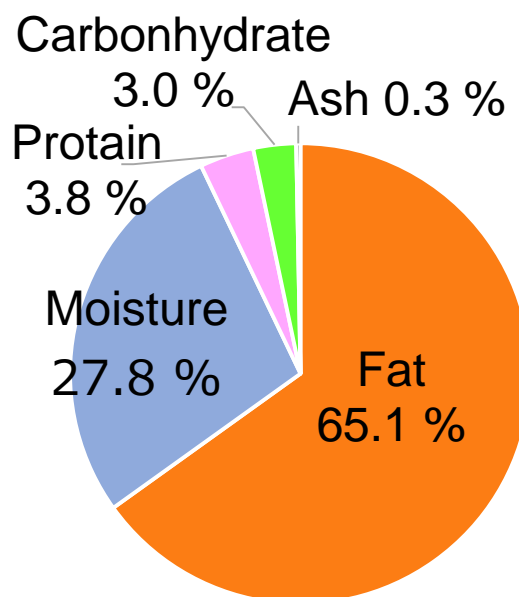


図 3-15 トラフグ卵巢（左）と肝臓（右）の成分組成（文献値）

卵巢

肝臓

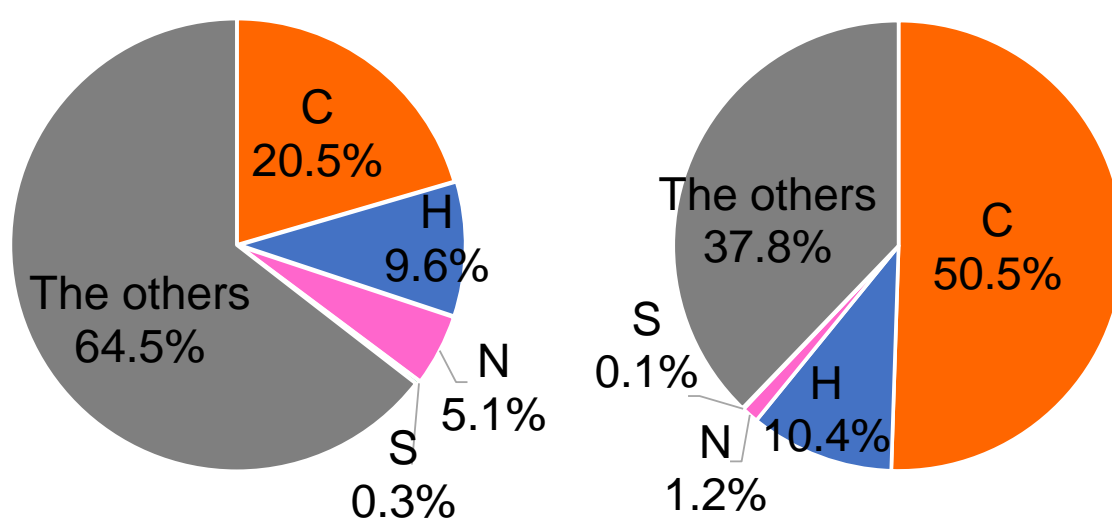


図 3-16 トラフグ卵巢の元素組成（左）と
計算により水分を除外して算出した卵巢固形分の元素組成（右）

卵巢

肝臓

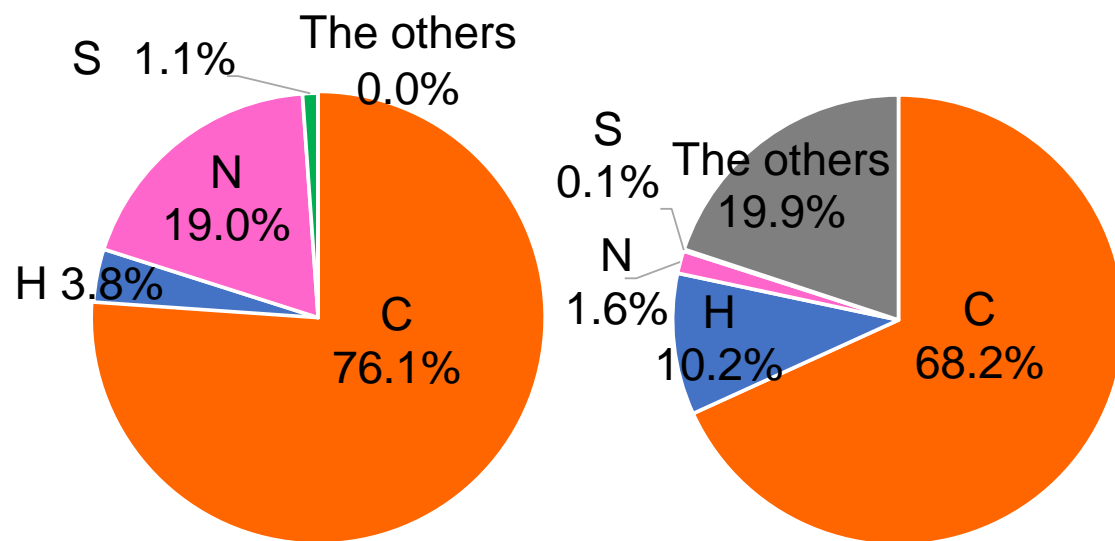


図 3-17 トラフグ肝臓の元素組成（左）と
計算により水分を除外して算出した肝臓固形分の元素組成（右）

第4章 テトロドトキシンの分解挙動

本章ではふぐ毒の主成分であるテトロドトキシンの超臨界水中での分解挙動について検討を行った。

4-1 テトロドトキシン単体の分解挙動

まずはじめに、超臨界水中での反応によって TTX 単体がどのような挙動を示すのか、分解することは可能なのかを実験的に検討した。実験条件を表 4-1 に示す。温度圧力条件に関しては、一般に、酸化剤量の増加や温度・圧力の上昇に伴い、分解反応の促進が期待されるが、本研究では省エネルギーの観点や安全への配慮から超臨界状態の条件域の中では比較的低温度・低圧力の条件を設定した。

4-1-1 反応の時間依存性

HPLC-FD 分析による、温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 1.0 倍量添加した場合の超臨界水酸化処理前後の TTX 蛍光クロマトグラムを図 4-1 に示す。1 分間以上の超臨界水酸化反応によって、TTX が完全に消失し、他の物質に転化することを確認した。

4-1-2 酸化剤量の影響

続いて、酸化剤添加量の低減が酸化反応における分解挙動に及ぼす影響を検討するため、4-1-1 の実験条件において、酸化剤無添加の条件で実験を行った。HPLC-FD 分析による、酸化剤が無い場合の TTX 標準品の超臨界水処理前後の TTX 蛍光クロマトグラムを図 4-2 に示す。酸化剤の有無に関わらず、1 分間以上の超臨界水処理によって、TTX が完全に消失し他の物質に転化することを確認した。

この結果を受けて、反応が熱分解あるいは加水分解で進行したのか、それとも反応器内に混入した溶存酸素および空気中の酸素の影響による酸化反応が進行したのかを検討した。反応管内の酸素量を計算した結果を表 4-2 に示す。なお、空気中由来の酸素量は温度 25 °C、気圧 1 atm として反応器内に封入された酸素の体積をファンデルワ

ールスの状態方程式によって物質質量に換算した。また、蒸留水中の溶存酸素量は温度 25 °C、気圧 1 atm で O₂ がヘンリーの法則に従うと仮定して求めた。このことから、今回の実験条件下では反応器内に封入された空気中由来の酸素が TTX の完全酸化量論の約等倍量あったため、酸化反応が進行した可能性が示唆された。この反応の詳細なメカニズムを調べるためには、少なくとも TTX 標準品サンプルの添加濃度をあげる必要があると考えられた。

ファンデルワールスの状態方程式とヘンリーの法則を以下に示す^[48]。

- ・ ファンデルワールスの状態方程式

$$(P + a/V^2)(V - b) = RT$$

P : 圧力 1 [atm]

V : 体積 [L/mol]

R : 気体定数 0.0820574 [L・atm/K・mol]

T : 温度 298.15 [K]

a : ファンデルワールス係数 (O₂ : 1.364) [atm・L⁶/mol²]

b : ファンデルワールス係数 (O₂ : 3.19) [10⁻²L³/mol]

- ・ ヘンリーの法則

$$[O_2] = (PO_2 \times \rho_{O_2}) / KO_2$$

[O₂] : 溶存酸素濃度 [mol/L]

PO₂ : 酸素の分圧 21[kPa]

ρ_{O₂} : 酸素の質量モル濃度 0.99709 [kg/L]

KO₂ : O₂ のヘンリー定数 (温度 25 °C、気圧 1 atm の時) 7.92×10⁴ [kPa・kg/mol]

4-1-3 反応生成物の定性

続いて、超臨界水酸化反応によって分解した TTX がどのようなものになったのかを検討した。まずはじめに、TTX が完全分解されたのかどうかを確認するために処理液中の TOC を測定した。TOC 測定の結果による、4-1-1 の条件で行った実験の処理液の TOC 転化率を図 4-3 に示す。10 分間の超臨界水酸化反応において 3 割程度の TOC が処理液中に残存することが分かった。そこで、その TOC の内訳を調べるために、GC/MS による定性分析を行った。その結果、酢酸が生成していることを確認した。酢酸は超臨界水酸化反応においては難分解性と報告^[49]されている物質であり、今回の実験条件下では処理液中に残存したと考えられる。しかし、本実験で得られた超臨界水処理サンプルは希薄かつ少量であるため、詳細な分析は困難であった。より高感度な分析や詳細な分解メカニズムの解明は今後の課題であると言える。

4-2 天然トラフグ内臓中のテトロドトキシンの分解挙動

天然トラフグ卵巣中に含有されている TTX の超臨界水中での分解挙動について検討を行った。また、部位間の差異を検討するために天然トラフグ肝臓を用いて卵巣と同様の実験を行った。実験条件を表 4-3 に示す。温度圧力条件に関しては 4-1 同様に、省エネルギーや安全への配慮等の観点から超臨界状態の条件域の中では比較的低温・低圧力の条件を設定した。

4-2-1 反応の時間依存性

まずはじめに、温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 2.6 倍量添加した場合のトラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプル中の TTX の分解挙動について述べる。

HPLC-FD 分析による、天然トラフグ卵巣の超臨界水酸化処理前後の TTX 蛍光クロマトグラムを図 4-4 に示す。参考のため、TTX 標準品のクロマトグラムも示してある。TTX の分解挙動に関して、1 分間以上の超臨界水酸化処理によって TTX は完全に消失し、他の物質へ転化することを確認した。

4-2-2 反応温度の影響

また、4-2-1 の実験条件から反応温度を 500 °C に変えて実験を行った場合にも、TTX が完全に消失するかの確認を行った。

HPLC-FD 分析による、温度 500 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 2.6 倍量添加した場合のトラフグ卵巣の超臨界水酸化処理の TTX 蛍光クロマトグラムを図 4-5 に示す。TTX の分解挙動に関して、400 °C の実験同様に 1 分間以上の超臨界水酸化処理によって TTX は完全に消失し、他の物質へ転化することを確認した。

4-2-3 酸化剤の影響

次に、酸化剤添加量の低減が酸化反応における分解挙動に及ぼす影響を検討するため、4-2-1の実験条件において、酸化剤無添加の条件で検討を行った。

HPLC-FD 分析による、酸化剤を添加しなかった場合の天然トラフグ卵巣の超臨界水処理前後の TTX 蛍光クロマトグラムを図 4-6 に示す。参考のため、TTX 標準品のクロマトグラムも示してある。TTX の分解挙動に関して、酸化剤を添加しなかった場合には、10 分間の超臨界水処理において、複数の夾雑なピークと共に TTX 残存の可能性を示唆するピークが確認された。酸化剤添加量の減少と共に、天然トラフグ卵巣中の TTX の分解速度が減少することを確認した。しかしながら、反応時間の経過と共に分解生成物のピークが大きく出てきており、分解反応が経時的に進行していると考えられた。4-1 の結果と比較すると、タンパク質等の内臓組成が存在することにより、TTX の分解反応が妨げられる可能性が示唆された。

また、TTX の分解が超臨界水中での反応によって起こっているのかを確認するため、天然トラフグの卵巣と酸化剤を混ぜただけのサンプルの TTX 量を測定する実験を行った。実験は、ホモジナイズした天然トラフグ 100 mg に対して、通常、超臨界水処理実験の際に加えている蒸留水（過酸化水素水と合わせて 1.7 mL）と酸化剤として 30% 過酸化水素水を完全酸化量論の 2.6 倍量添加し、攪拌して 1 時間放置したものを、TTX 抽出操作を行った後に HPLC-FD で分析した。

酸化剤と混ぜただけの卵巣サンプルの TTX 蛍光クロマトグラムを図 4-7 に示す。TTX のピークが確認され、TTX 転化率は -0.055 [-] となった。転化率が負の値となった理由は測定誤差の範囲といえ、実質の転化率は 0 であると考えられる。このことから、天然トラフグ卵巣中の TTX の分解は酸化剤のみの影響ではなく、超臨界水中での反応によるものであることが示唆された。

4-2-4 夾雑なピークの由来

4-2-3 で観測された複数の夾雑なピークが TTX 由来なのか、それとも、卵巣組成由来なのか調べる検討を行った。本検討には、一般に無毒とされている養殖のトラフグの卵巣を用いて、4-2-3 の天然トラフグの卵巣と同様の実験・分析条件で、超臨界水処理+TTX 抽出+HPLC-FD 分析を行った。

HPLC-FD 分析による天然トラフグ卵巣と養殖トラフグ卵巣の超臨界水処理前後の TTX 蛍光クロマトグラムを図 4-8 に示す。超臨界水処理前の養殖トラフグからは顕著な蛍光ピークは検出されなかったが、その超臨界水処理後のサンプルからは天然トラフグの超臨界水処理サンプルとは形状が異なりはするものの保持時間 8 分前後に山をもつピークが観測された。このことから、天然トラフグを酸化剤無しで超臨界水処理した際の夾雑なピークは全てが TTX 由来ではなく、幾分かはタンパク質等の卵巣組成に起因するものであることが考えられた。

養殖トラフグ卵巣の超臨界水処理サンプルのピークが天然トラフグ卵巣の超臨界水処理サンプルのピークと比較して形状が異なる理由については、そのピークが共に同じ卵巣組成から分解してできたもののピークではあるが、そもそもタンパク質等の卵巣組成はその構造が複雑であり、単純構造の物質にまで分解されない限りはそれぞれの卵巣組成分解物の蛍光性や存在量が異なるため、ピークは出たが、クロマトグラムの形状が異なると考えられる。

また、超臨界水処理前の養殖トラフグからは検出されなかったピークが超臨界水処理後のサンプルから検出されたことに関しては、共に分析の前処理として限外濾過による除タンパク操作を行っているため、通常、タンパク質等の検出は考えられないが、超臨界水処理後のサンプルには限外濾過膜を透過するサイズにまで分解された物質が存在するため、蛍光検出器で検出されたと考えられる。

4-2-5 部位の違いによる分解挙動の違い

組成の違いによる分解挙動の違いを検討するため、トラフグ肝臓を用いて卵巢と同様の実験を行った。

まず、温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 3.5 倍量添加した場合の肝臓の超臨界水酸化処理サンプル中の TTX の分解挙動について述べる。HPLC-FD 分析より、肝臓および卵巢の超臨界水処理後サンプルの TTX 蛍光クロマトグラムを図 4-9 に示す。肝臓の 1 分間の処理サンプルで若干のピークが確認されたものの、5 分、10 分では TTX の残存を示すピークは観測されず。完全に消失して他の物質へ転化したことを確認した。卵巢の実験結果と比較した際の大きな違いは見られなかった。

また、上述した実験条件から、反応温度を 500 °C に変えた場合と、酸化剤を添加した場合の処理サンプルの TTX 蛍光クロマトグラムをそれぞれ図 4-10 と 4-11 に示す。こちらの結果においても、組成の違いによる TTX 分解挙動の顕著な違いは見られなかった。

4-3 まとめ

第4章では、超臨界水中での TTX 単体およびふぐ含毒部位中の TTX の分解挙動について検討した。

1. TTX の分解挙動に関して、温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量を添加した場合には、TTX 単体、卵巣および肝臓中の TTX は共に 1 分間以上の超臨界水酸化反応によって完全に消失し、他の物質へ転化することを確認した。
2. 温度 400 °C、圧力 25 MPa で酸化剤を添加しない場合には卵巣と肝臓で共に 10 分間の超臨界水処理によっても複数の夾雑なピークと共に TTX の残存の可能性を示唆するピークが検出された。
3. 2.の夾雑なピークの全てが TTX 由来ではなく、タンパク質等の内臓組成に由来していることが示唆された。
4. トラフグの内臓と酸化剤を混ぜただけのサンプルの TTX 分析結果から、超臨界水中でのトラフグ内臓中の TTX の分解は酸化剤のみの影響ではなく、超臨界水酸化反応によるものであることが裏付けられた。

表 4-1 TTX 標準品の実験条件

反応器	SUS316製 回分式反応器 (容積 : 10.0 mL)
温度	400 °C
圧力	25 MPa
サンプル	TTX標準品 50 mg/L
酸化剤	無し
	30% H_2O_2 aq: 完全酸化量論の等倍 ^{※1}
反応時間	1, 5, 10 min ^{※2}

※1 TTX と助溶剤として添加されているくえん酸緩衝剤の双方中の有機体炭素を全て CO_2 まで反応させるのに必要な供給酸素量を完全酸化量論の等倍と定義した。

※2 サンドバス投入後約 1 分で反応器内温度が 400 °C に達することを実験的に確認し、その時間が経過した時点を反応時間の 0 分と定義した。

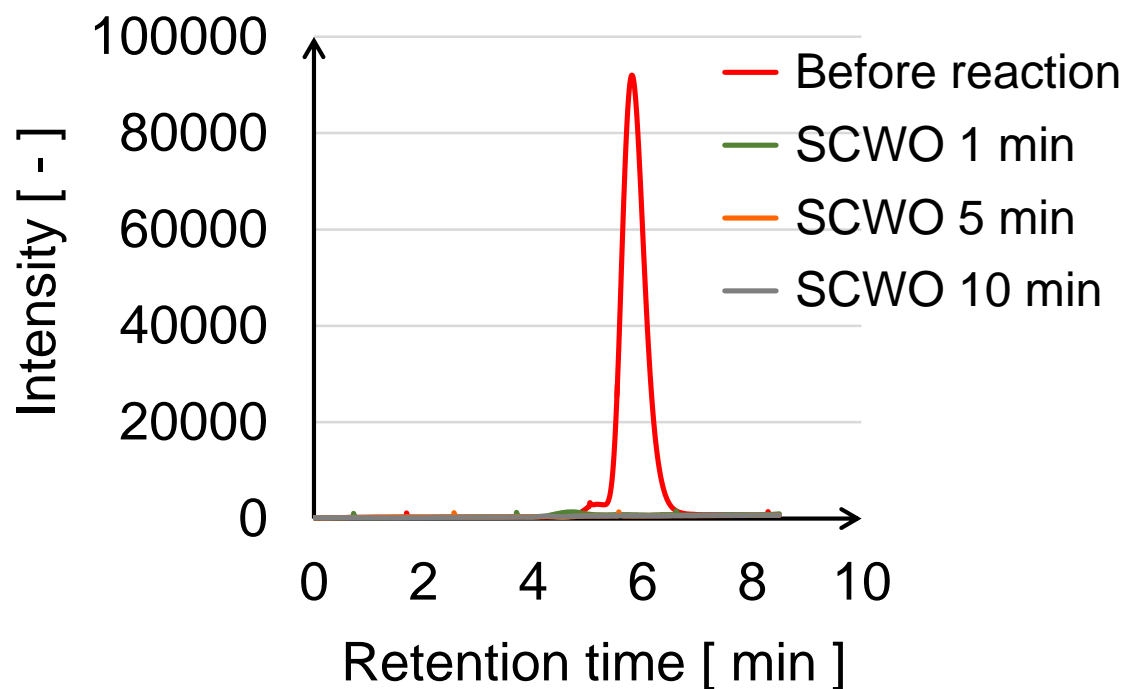


図 4-1 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の等倍量添加した場合の TTX 標準品の超臨界水酸化処理前後サンプルの TTX 蛍光クロマトグラム

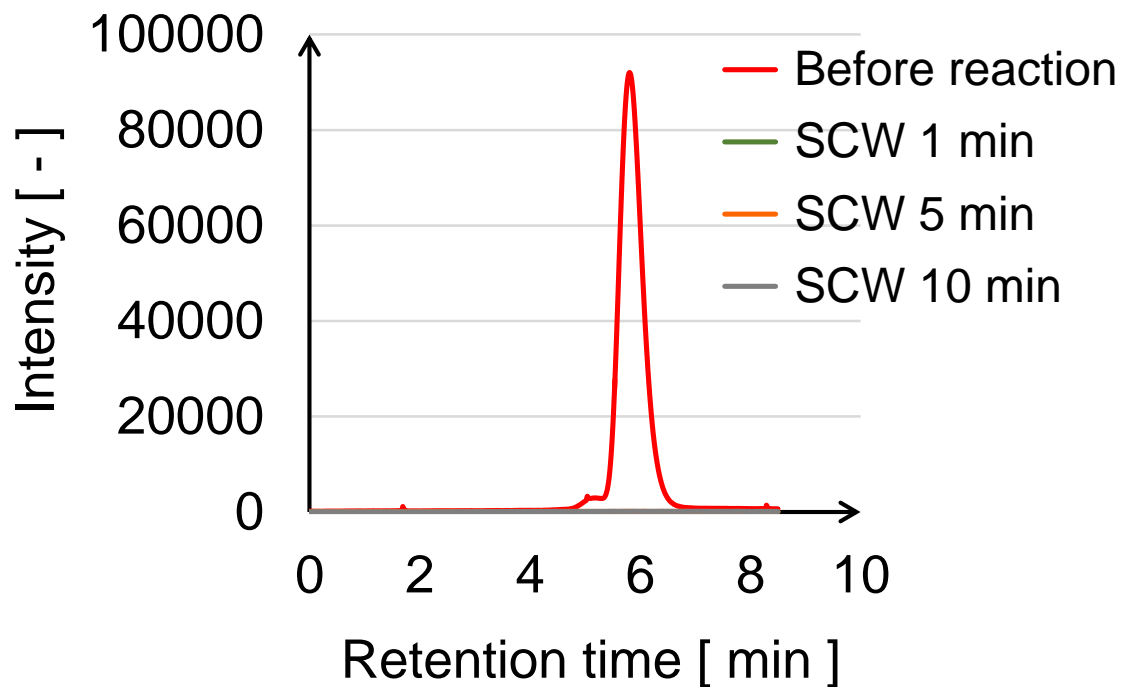


図 4-2 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を添加しなかった場合の TTX 標準品の超臨界水処理前後サンプルの TTX 蛍光クロマトグラム

表 4-2 反応器内供給酸素量

酸素供給源	O ₂ [mol]
酸化剤（30% H ₂ O ₂ ）由来酸素量	6.4×10 ⁻⁵
反応器内空気中の酸素量	6.0×10 ⁻⁵
蒸留水中（1.7mL）の溶存酸素量	4.3×10 ⁻¹⁰

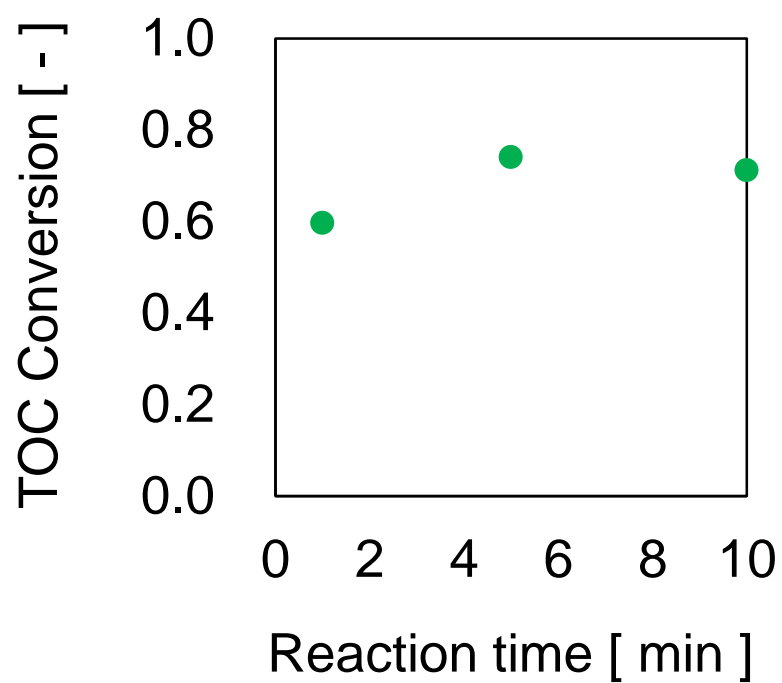


図 4-3 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の等倍量添加した場合の
TTX 標準品の超臨界水酸化処理前後サンプルの TOC 転化率

表 4-3 天然トラフグ内臓の超臨界水処理実験の実験条件

反応器	SUS316製 回分式反応器 (容積 : 10.0 mL)	
温度	400 or 500 °C	
圧力	25 MPa	
サンプル	天然トラフグ卵巣 100 mg 天然トラフグ肝臓 100 or 50 mg	
酸化剤	30% H_2O_2 aq ^{※1} 完全酸化量論の	2.6 or 0 倍 (卵巣) 3.5 or 0 倍 (肝臓)
反応時間	1, 5, 10 min ^{※2}	

※1 トラフグ内臓中の有機体炭素、有機体窒素、有機体硫黄をそれぞれ全て CO_2 , N_2 , SO_4^{2-} まで反応させるのに必要な供給酸素量を完全酸化量論の等倍と定義した。

※2 400 °C の場合、サンドバス投入後約 1 分で、500 °C の場合、サンドバス投入後約 2 分で反応器内が各温度に達することを実験的に確認し、それぞれその時間が経過した時点を反応時間の 0 分と定義した。

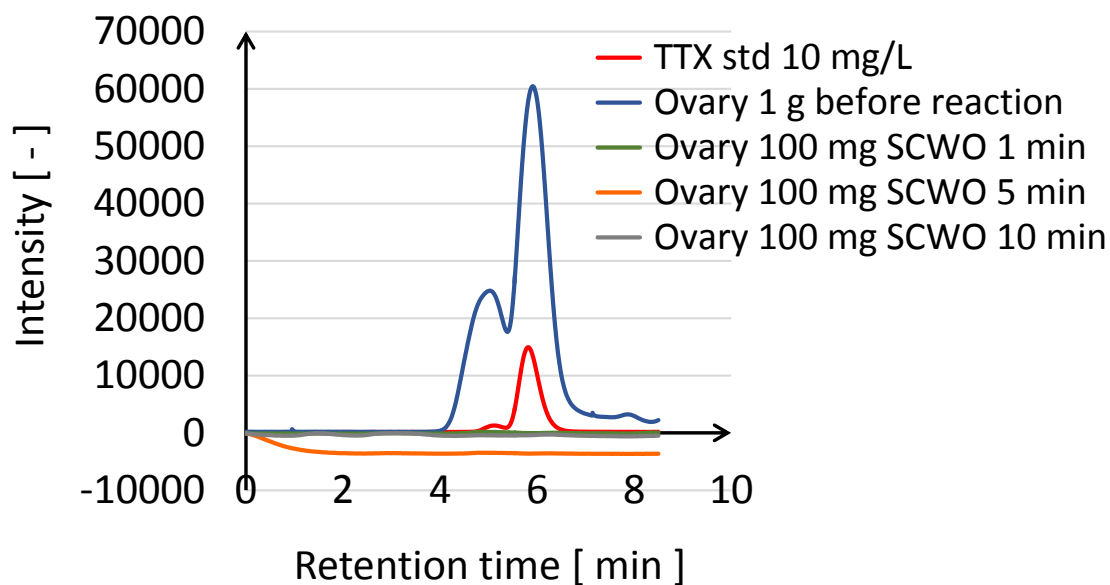


図 4-4 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 2.6 倍量添加した場合の天然トラフグ卵巢の超臨界水酸化処理前後サンプルの TTX 蛍光のクロマトグラム

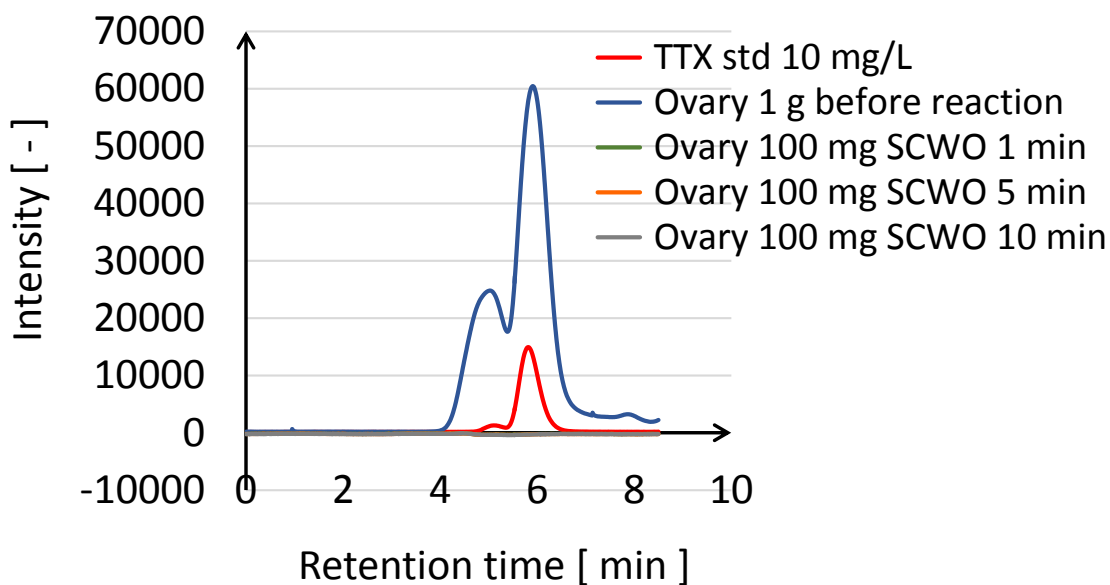


図 4-5 温度 500 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 2.6 倍量添加した場合の天然トラフグ卵巢の超臨界水酸化処理前後サンプルの TTX 蛍光のクロマトグラム

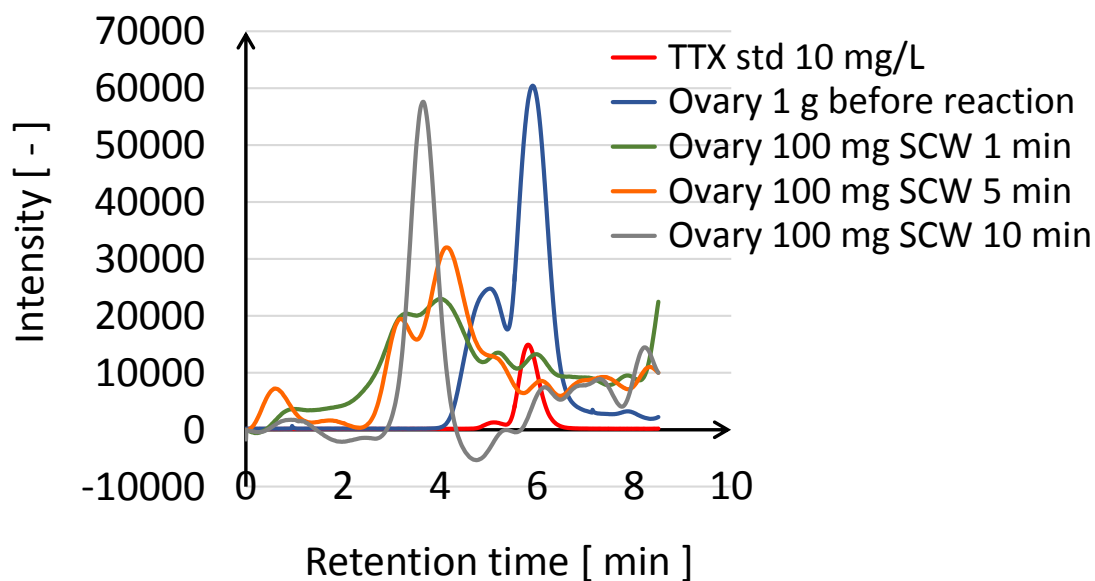


図 4-6 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を添加しなかった場合の天然トラフグ卵巢の超臨界水処理前後サンプルの TTX 蛍光のクロマトグラム

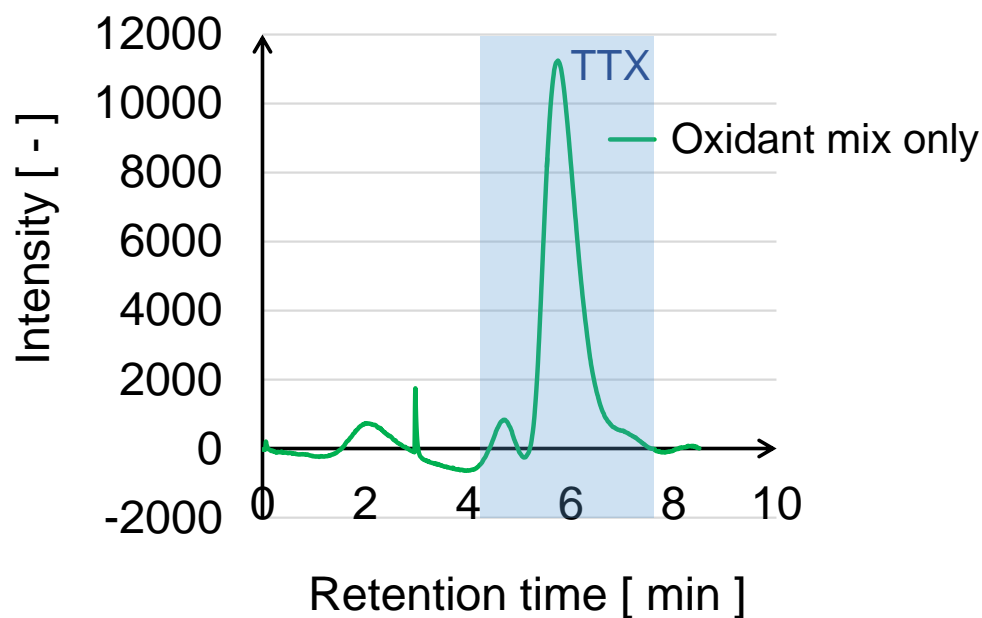


図 4-7 酸化剤と混ぜて放置しただけの天然トラフグ卵巢 100 mg 中の TTX 蛍光クロマトグラム

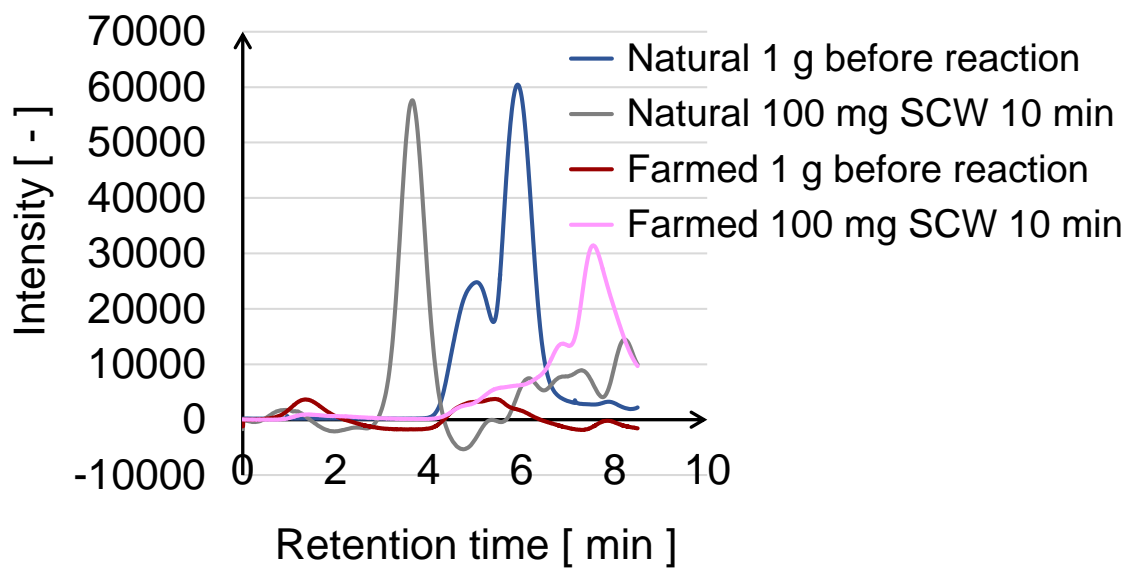


図 4-8 卵巣の超臨界水処理前後サンプル中の TTX 蛍光クロマトグラム
(天然トラフグと養殖トラフグの比較)

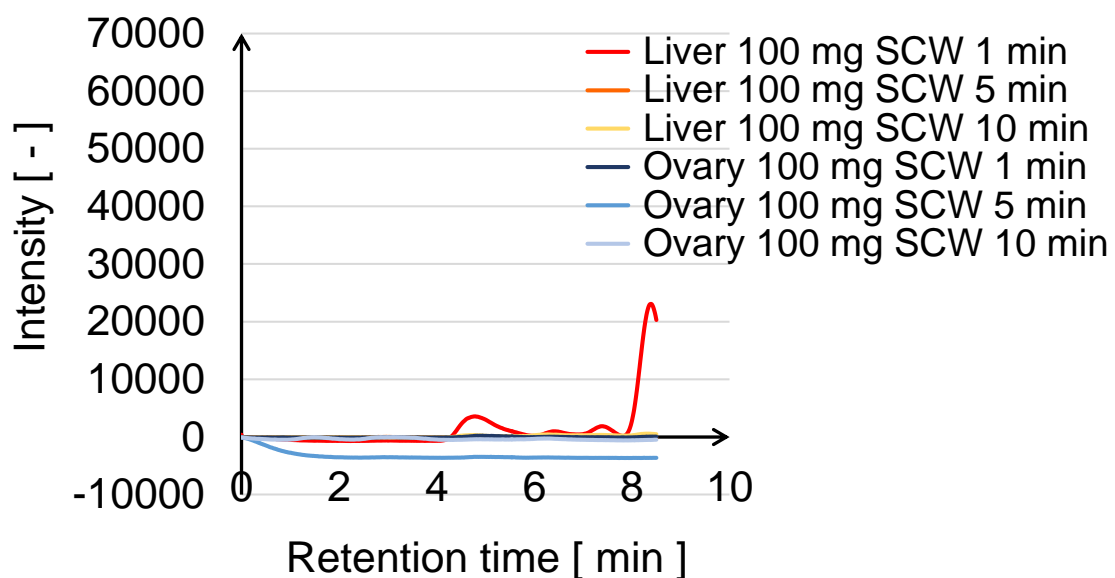


図 4-9 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量添加した場合
の天然トラフグ内臓の超臨界水酸化処理サンプルの TTX 蛍光クロマトグラム
(肝臓と卵巣の比較)

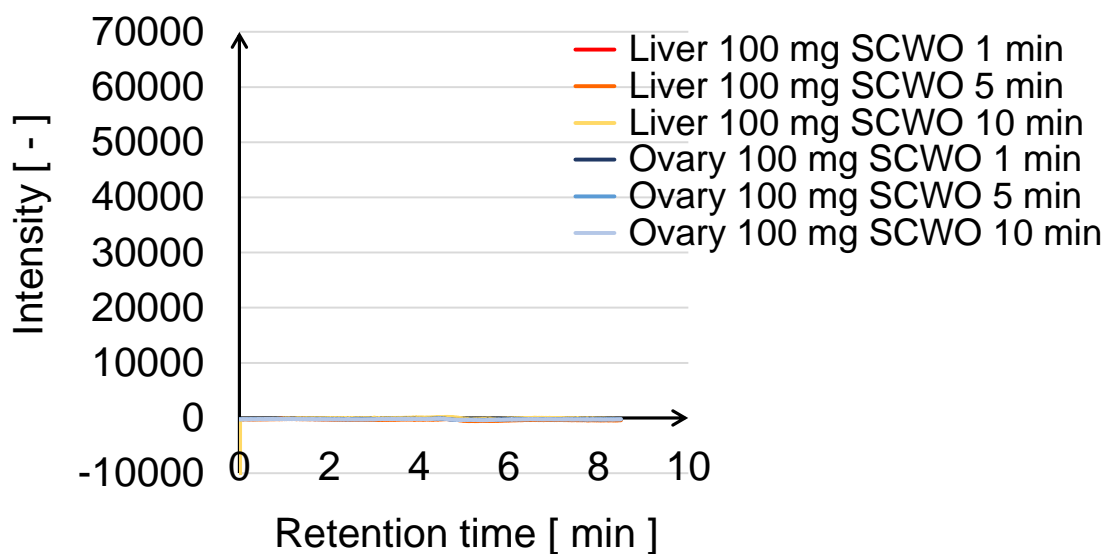


図 4-10 温度 500 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量添加した場合の天然トラフグ内臓の超臨界水酸化処理サンプルの TTX 蛍光クロマトグラム (肝臓と卵巣の比較)

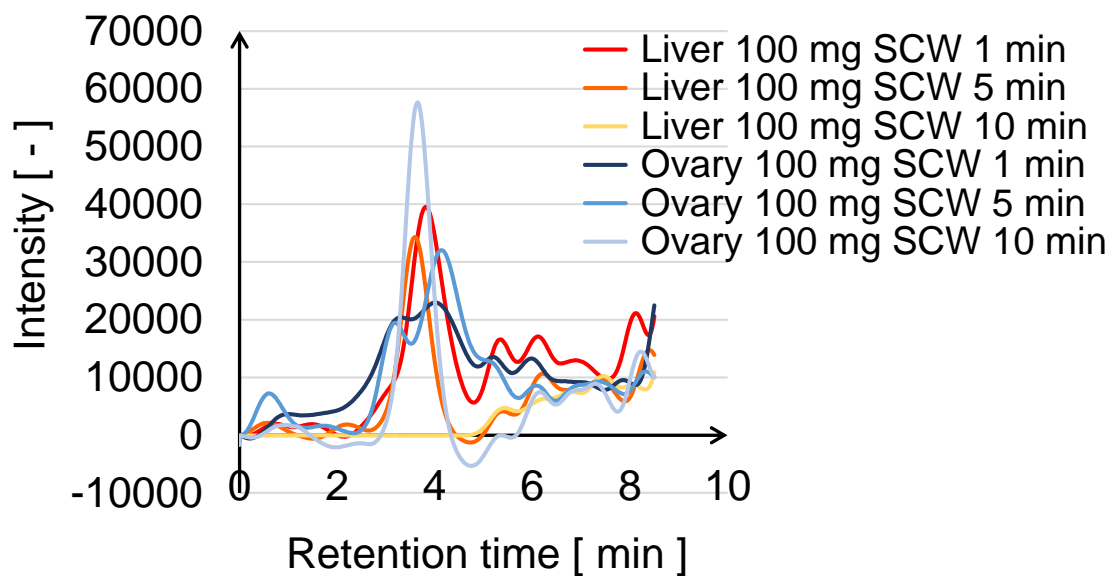


図 4-11 酸化剤無添加の場合の天然トラフグ内臓の超臨界水処理サンプルの TTX 蛍光クロマトグラム (肝臓と卵巣の比較)

第5章 天然トラフグ内臓組成固形分の分解挙動

本章では超臨界水中における天然トラフグの内臓組成固形分の分解挙動について検討した。実験条件を表 5-1 に示す。

5-1 炭素原子の分解挙動

内臓組成固形分の分解に関して、固形分中の主成分である炭素原子の挙動を分解の指標とし、その分解挙動について実験的に検討した。

5-1-1 反応の時間依存性

まずはじめに、温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 2.6 倍量添加した場合のトラフグ卵巣の超臨界水酸化処理の結果について述べる。

卵巣組成固形分の分解挙動に関して、固形分量測定と TOC 測定の結果よりまとめた卵巣の超臨界水酸化処理サンプルの炭素収率を図 5-1 に示す。1 分間以上の反応によって固形分は完全に消失し、他の物質へ転化することを確認した。卵巣組成の分解物および TTX の分解物の一部は処理液中に残存しており、物質収支の取れていない部分が二酸化炭素等の無機ガスになったと仮定すると、分解反応は経時的に進行し、10 分間の反応で炭素原子は 95.6 %が無機化された計算となる。

また、処理液の組成に関して、GC/MS による定性分析を行った結果、酢酸と微量のアセトアミドが検出された。トラフグ卵巣の超臨界水酸化処理 (5 min) サンプルの Total Ion Chromatogram : TIC を図 5-2 に示す。続けて、HPLC-UV による処理液中の酢酸の定量を行った。その結果と TOC 測定の結果からまとめた TOC に占める酢酸の炭素原子の割合を図 5-3 に示す。この結果より、処理液中の溶存有機炭素に占める酢酸の割合は経時的に増加し、10 分間の反応では溶存有機炭素の 85.8 %が酢酸であることを確認した。酢酸は超臨界水酸化反応において難分解物質と報告がなされている物質^[49]であり、今回の実験条件で処理液中に残存したと考えられる。一方、TOC の物質収支が取れていない部分に関しては、一部がアセトアミドであり、残りはその他の物質の存在の可能性が示唆された。なお、処理液の pH は反応時間によらず 7.0 であった。

5-1-2 反応温度の影響

次に、反応温度の上昇に伴う反応の促進効果について検討するため、5-1-1の実験条件から温度を 500 °C に変更した条件で実験を行った。

卵巣組成固形分の分解挙動に関して、固形分量測定と TOC 測定の結果よりまとめた卵巣の超臨界水酸化処理 (500 °C) サンプルの炭素収率を図 5-4 に示す。トラフグ卵巣組成中の固形分は 400 °C の場合と同様に、1 分間以上の超臨界水酸化処理によって完全に消失し、他の物質へ転化することを確認した。物質収支の取れていない部分が二酸化炭素等の無機ガスになったと仮定すると、1 分間の超臨界水酸化処理で卵巣組成を 99.6 %、10 分間で 99.8 % 無機化することに成功した。反応温度の上昇に伴う分解反応の促進効果を確認することができた。

5-1-3 酸化剤量の影響

続いて、酸化剤添加量の低減が酸化反応における分解挙動に及ぼす影響を検討するため、5-1-1の実験条件において、酸化剤添加量を完全酸化量論の約等倍の 0.9 倍および無添加の条件で検討を行った。

卵巣組成固形分の分解挙動に関して、固形分量測定と TOC 測定の結果よりまとめた酸化剤添加量を 2.6 倍、0.9 倍、0 倍と変化させた場合の卵巣の超臨界水処理サンプルの炭素収率を図 5-5 に示す。酸化剤を全く添加しなかった場合には、10 分間の反応において固形分が残存し、酸化剤を 0.9 倍量添加した場合は、1 分間の超臨界水酸化処理においてわずかに固形分が残存する結果となった。

また、処理液の組成に関して GC/MS による定性分析から、処理液中にはアセトアミドおよび酢酸やプロパン酸、ブタン酸等の複数の有機酸が存在することを確認した。トラフグ卵巣の超臨界水処理 (酸化剤無し 5 min) サンプルの Total Ion Chromatogram : TIC を図 5-6 に示す。保持時間約 5~16 分の間に出ている微小なピークがそれらのアセトアミドおよび有機酸のピークである。5-1-1の結果と比較すると、酸化剤添加量の減少と共に卵巣組成固形分の分解速度が減少することを確認した。なお、処理液の pH は時間によらず 7.0 (酸化剤無し)、6.0~7.0 (酸化剤 0.9 倍) であった。

5-1-4 部位の違いによる分解挙動の違い

続いて、組成の違いによる分解挙動の違いを検討するため、トラフグ肝臓を用いて卵巣と同様の実験を行った。

まず、固形分量測定と TOC 測定の結果よりまとめた温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を添加しない場合の肝臓と卵巣の超臨界水処理サンプルの炭素収率を図 5-7 に示す。その結果、酸化剤を添加しなかった場合には、卵巣に比べ肝臓の方が分解され易いことが分かった。これはタンパク質を多く含む卵巣に比べ、脂質を主成分とする肝臓の方が融点が低く溶け易いため^[44,45]、反応が速く進行したことが理由の一つとして考えられた。卵巣と肝臓の組成を図 5-10 に示す。なお、処理液の pH は時間によらず 7.0 であった。

一方、圧力 25 MPa で酸化剤を完全酸化量論の 3.5 倍（卵巣では 2.6 倍量）量添加した場合のトラフグ肝臓の超臨界水酸化処理サンプルの炭素収率は 400 °C においても 500 °C においても、卵巣と比べて大きな差は見られなかった。400 °C と 500 °C の炭素収率をそれぞれ図 5-8、5-9 に示す。肝臓と卵巣の間に差が見られなかった理由については、卵巣、肝臓、共に反応開始 1 分間以内に難分解性物質である酢酸まで反応が進行したために、その後の反応速度に大きな差が見られなかったと推測される。なお、処理液の pH は時間によらず 4.0~5.0 であった。卵巣に比べ pH の値が低い理由は酸化剤添加量の影響であると考えられる。

5-1-5 物質収支の確認

これまでの検討において、炭素収率のグラフの物質収支が取れていない部分を無機化されたと仮定をおいて議論を行ってきたが、この項では本当にそうであるかを検討した。

実験は通常の超臨界水酸化処理後の残存固形分と処理液の分析に加え、排出ガスの回収と分析を行った。実験方法および分析方法は 2-3-8 の通りである。なお、今回は CO と CO₂ のみについて解析を行った。解析に関して、定量した気体の体積からその物質質量への換算はファンデルワールスの状態方程式^[48]を用いて行った。残存固形分量測定、TOC 測定、GC-TCD 分析による無機化された炭素原子を含むトラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプルの物質収支を図 5-11 に示す。物質収支を図に示す。なお、10

分でのデータがない理由は液漏れによる実験の失敗が続き、反応生成物を回収できなかったためである。結果は物質収支が半分程度に留まる結果となった。この理由に関しては、前後の実験で液漏れ等の失敗が続いたことから、回収できた気体の関しても、ある程度の回収ロスが生じた可能性があると考えられた。また、4-2 の検討と実験条件は同じであるにも関わらず、1 分間の超臨界水酸化処理で固形分が残存しており、炭素収率も高かったことから、温度勾配や圧力損失が生じていたため、精確な実験が行われていなかった可能性が示唆された。

そこで本実験手法が精確に行われているかの検討を行うために、2-3-8 の実験条件でトラフグ卵巣の代わりにエタノール標準品を用いて実験・分析を行った。エタノールの超臨界水酸化処理サンプルの物質収支を図 5-12 に示す。結果は 9 割程度の回収ができており、実験は概ね精確に行われていたと考えられた。

以上の検討から、今回の検討結果のみでは、トラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプルの物質収支が取れていない部分を全て無機ガスであると結論付けることは難しかったが、気体回収の実験方法の見直しによって精確な物質収支を示すことができると期待される。物質収支の確認に関する検討は引き続き今後の課題であると言える。

5-2 窒素原子の挙動

内臓組成固形分の分解に関して、卵巣組成固形分中では炭素に次ぐ含有量であり、また、超臨界水酸化反応においてもしばしば反応中間体および最終生成物として存在し、生物や環境に対して影響を与えることがある窒素原子の分解挙動についても実験的に検討した。

5-2-1 反応の時間依存性

まずはじめに、温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 2.6 倍量添加した場合のトラフグ卵巣の超臨界水酸化処理の結果について述べる。

卵巣組成固形分の分解挙動に関して、固形分量測定と TN 測定の結果よりまとめた卵巣の超臨界水酸化処理サンプルの炭素収率を図 5-13 に示す。1 分間以上の反応によって固形分は完全に消失し、他の物質へ転化することを確認した。卵巣組成の分解物および TTX の分解物の一部は処理液中に残存しており、物質収支の取れていない部分が窒素等の無機ガスになったと仮定すると、分解反応は経時的に進行し、10 分間の反応で窒素原子は 68.0 %が無機化された計算となる。

また、処理液の組成に関して、アンモニア測定キットによる処理液中のアンモニアの定量を行った。その結果と TN 測定の結果からまとめた TN に占めるアンモニアの窒素原子の割合を図 5-14 に示す。この結果より、処理液中の全窒素に占めるアンモニアの割合は経時的に増加し、10 分間の反応では全窒素の 64.4 %がアンモニアであることを確認した。アンモニアは超臨界水酸化反応において難分解物質と報告^[50,51]がなされている物質であり、今回の実験条件で処理液中に残存したと考えられる。一方、5-1-1 でも述べたように、GC/MS 分析より、処理液中からアセトアミドが検出されており、TN の物質収支が取れていない部分に関しては、一部がアセトアミドであり、残りはその他の物質の存在の可能性が示唆された。

5-2-2 反応温度の影響

次に、反応温度の上昇に伴う反応の促進効果について検討するため、5-2-1の実験条件から温度を 500 °C に変更した条件で実験を行った。

卵巣組成固形分の分解挙動に関して、固形分量測定と TN 測定の結果よりまとめたトラフグ卵巣の超臨界水酸化処理（500 °C）サンプルの窒素収率を図 5-15 に示す。結果は 400 °C の場合と比較して大きな差は見られなかった。

一方、TN に占めるアンモニア中の窒素原子量を図 5-16 に示す。処理液中の全窒素の挙動に関しては、400 °C の場合と比較して、顕著な差は見られなかったが、500 °C の方が TN に占めるアンモニアの割合が高くなっていることから、反応温度の上昇に伴い、反応中間体であるの含窒素有機化合物の酸化反応が促進されたことが示唆された。

5-2-3 酸化剤量の影響

続いて、酸化剤添加量の低減が酸化反応における分解挙動に及ぼす影響を検討するため、5-2-1の実験条件において、酸化剤添加量 0.9 倍の条件で実験を行った。

卵巣組成固形分の分解挙動に関して、固形分量測定と TN 測定の結果よりまとめた酸化剤添加量を 0.9 倍にした場合の卵巣の超臨界水処理サンプルの窒素収率を図 5-17 に示す。酸化剤を 0.9 倍量添加した場合では、5-1-3 でも述べたように、1 分間の超臨界水酸化処理においてわずかに固形分が残存しており、窒素収率に関しては、酸化剤を 2.6 倍添加した場合と比較すると、酸化剤添加量の減少と共に卵巣組成固形分の分解速度が減少することを確認した。

5-2-4 部位の違いによる分解挙動の違い

続いて、組成の違いによる分解挙動の違いを検討するため、トラフグ肝臓を用いて卵巣と同様の実験を行った。

まず、固形分量測定と TN 測定の結果よりまとめた温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 3.5 倍量（卵巣では 2.6 倍量）添加した場合のトラフグ肝臓の超臨界水酸化処理サンプルの窒素収率を図 5-18 に示す。結果は卵巣と比較して大きな差は見られなかった。

一方、上記の実験条件から反応温度を 500 °C に変えて行った実験の結果を図 5-19 に、酸化剤の添加量を 1.2 倍量（卵巣では 0.9 倍量）に変えて行った実験の結果を図 5-20 に示す。こちらに関しても、卵巣との間に大きな差は見られなかった。これは卵巣、肝臓、共に反応開始 1 分間以内に難分解性物質であるアンモニアまで反応が進行したために、その後の反応速度に大きな差が見られなかったと推測される。

なお、肝臓の超臨界水処理サンプルの窒素収率の値が上下している理由については、そもそもの肝臓中の窒素含有量は卵巣の 1/5 程度である 1.2 %と微量であることに加え、TN 測定の際、TOC 測定と同時に行う都合上、サンプル希釈操作を必要としたため、TN の実測値は 1~2 mg/L 程度と非常に低い値での分析となったため、実質の TN 濃度は 1 分、5 分、10 分で同程度であるにも関わらず、値が大きくぶれたように見えたと考えられる。

5-3 まとめ

第5章では、超臨界水中でのふぐ含毒部位固形分の分解挙動について検討した。

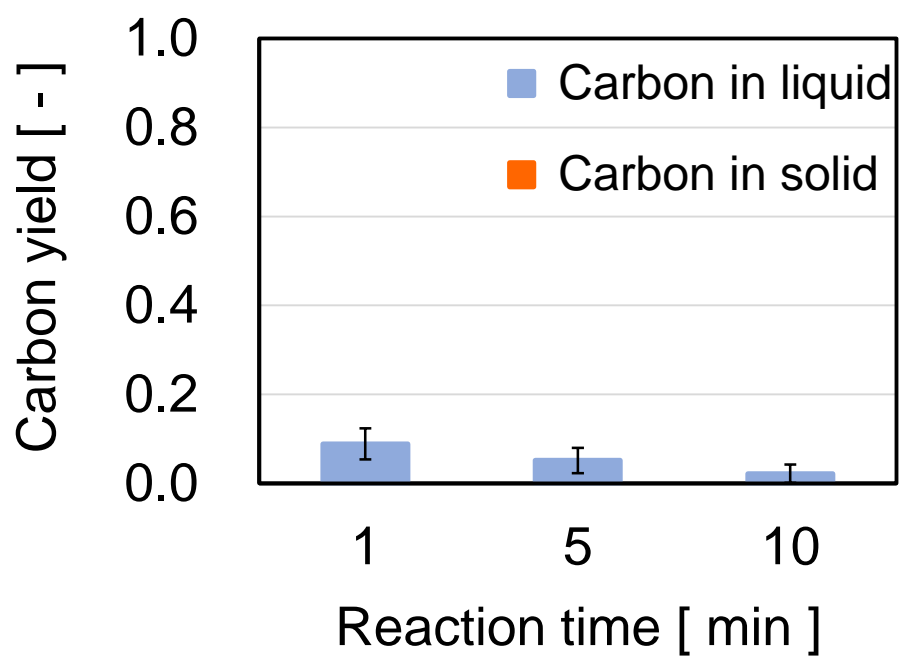
1. 内臓組成固形分の分解挙動に関して、温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量を添加した場合には、卵巣、肝臓、共に 1 分間以上の超臨界水酸化処理によって固形分は完全に消失し、他の物質へ転化することを確認した。
2. 酸化剤を添加した場合の処理液中の溶存有機炭素の主成分は酢酸であり、全窒素の主成分はアンモニアであることが分かった。処理液中の物質収支が取れていない部分については、一部は微量のアセトアミドであり、残りの部分はその他の物質の存在の可能性が考えられた。また、酸化剤を添加しない場合には複数の有機酸が検出された。
3. 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を添加しない場合には、卵巣に比べ肝臓の方が分解され易いことが分かった。これはタンパク質を多く含む卵巣に比べ、脂質を主成分とする肝臓の方が融点が低く溶け易いため、反応が速く進行したことが理由の一つとしてと考えられた。
4. 内臓組成固形分の分解挙動に関して、温度 500 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 2.6 倍量を添加した場合には、1 分間の超臨界水酸化処理によって卵巣組成を 99.6 %、10 分間で 99.8 %無機化することに成功した。

表 5-1 実験条件

反応器	SUS316製 回分式反応器 (容積 : 10.0 mL)	
温度	400 or 500 °C	
圧力	25 MPa	
サンプル	天然トラフグ卵巣 100 mg	
	天然トラフグ肝臓 100 or 50 mg	
酸化剤	30% H_2O_2 aq ^{※1} 完全酸化量論の	2.6 or 0.9 or 0 倍(卵巣)
		3.5 or 1.2 or 0 倍(肝臓)
反応時間	1, 5, 10 min ^{※2}	

※1 トラフグ内臓中の有機体炭素、有機体窒素、有機体硫黄をそれぞれ全て CO_2 , N_2 , SO_4^{2-} まで反応させるのに必要な供給酸素量を完全酸化量論の等倍と定義した。

※2 400 °C の場合、サンドバス投入後約 1 分で、500 °C の場合、サンドバス投入後約 2 分で反応器内が各温度に達することを実験的に確認し、それぞれその時間が経過した時点を反応時間の 0 分と定義した。



※ エラーバーは標準誤差を示す。

図 5-1 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 2.6 倍量添加した場合の天然トラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプルの炭素収率

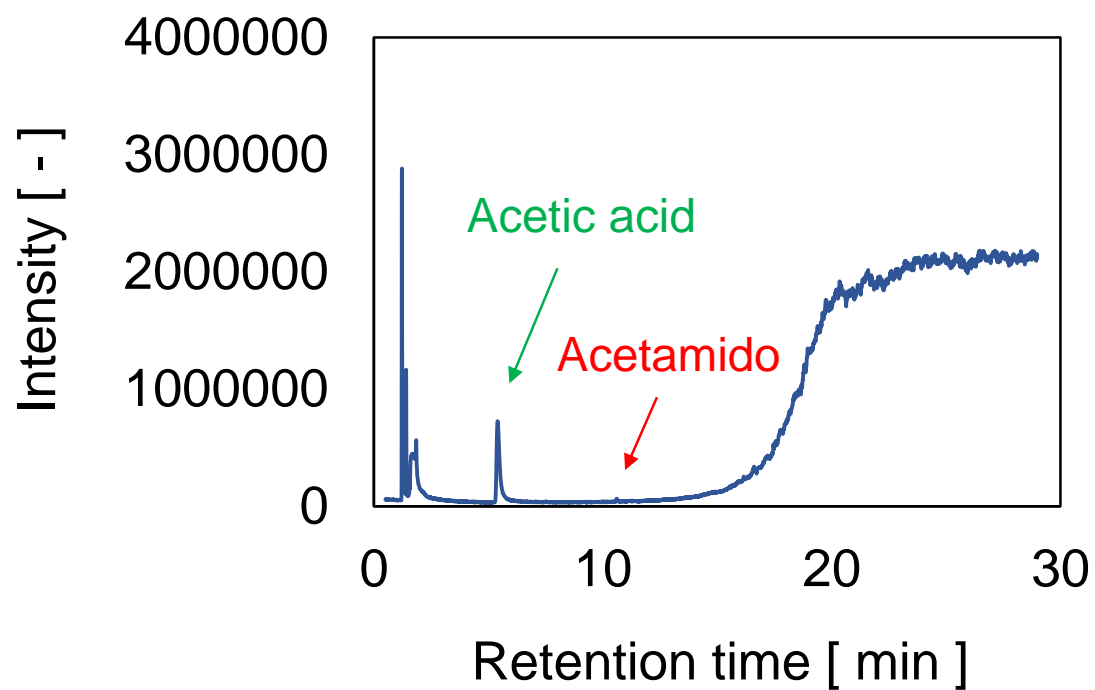


図 5-2 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 2.6 倍量添加した場合の
トラフグ卵巣の超臨界水酸化処理前後サンプルの TIC

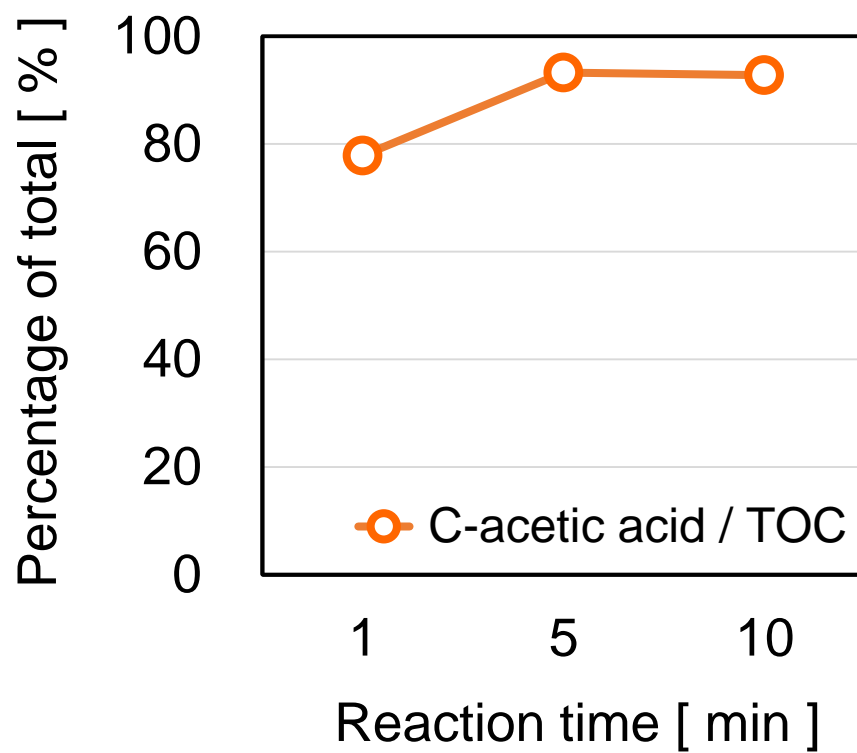
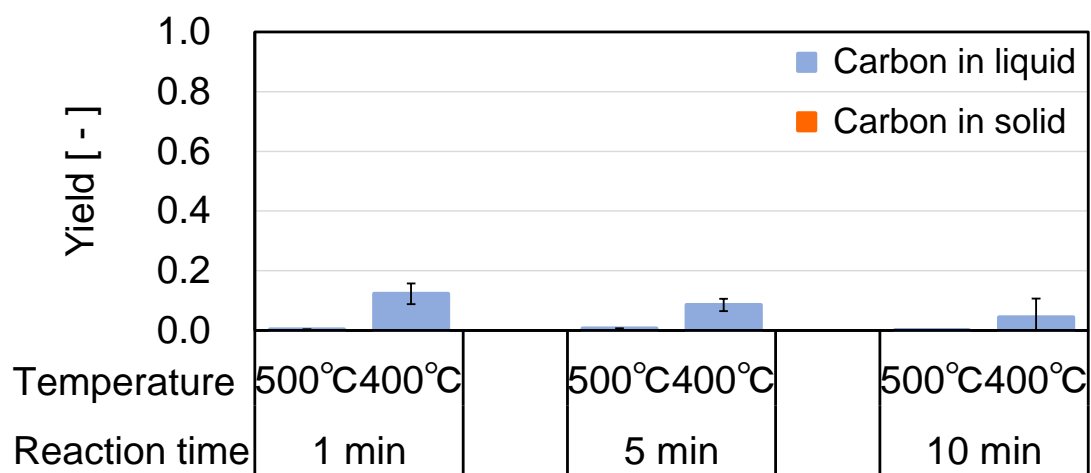
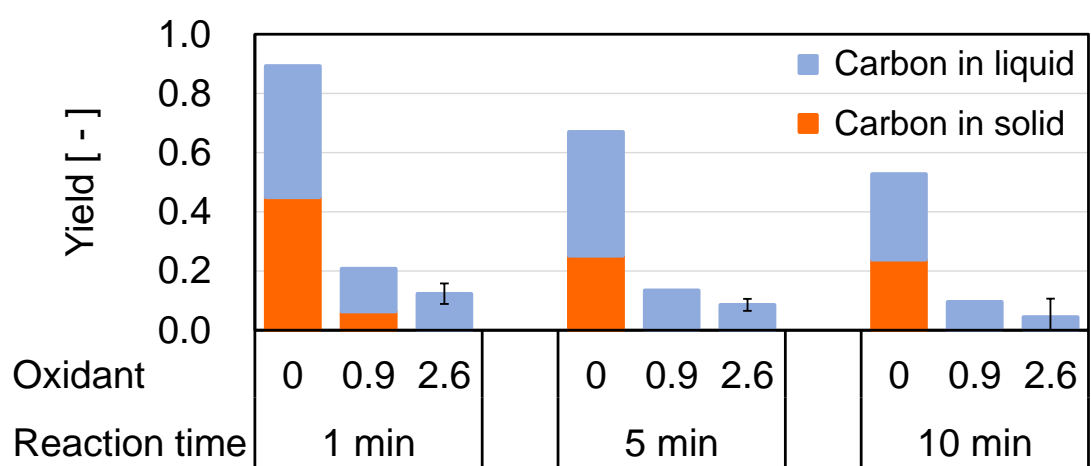


図 5-3 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 2.6 倍量添加した場合の
トラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプルの TOC に占める酢酸中の炭素原子の割合



※ エラーバーは標準誤差を示す。

図 5-4 圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量添加した場合のトラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプルの炭素収率（500 °C と 400 °C の比較）



※ エラーバーは標準誤差を示す。

図 5-5 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 0, 0.9, 2.6 倍量添加した場合のトラフグ卵巣の超臨界水処理サンプルの炭素収率（酸化剤量の比較）

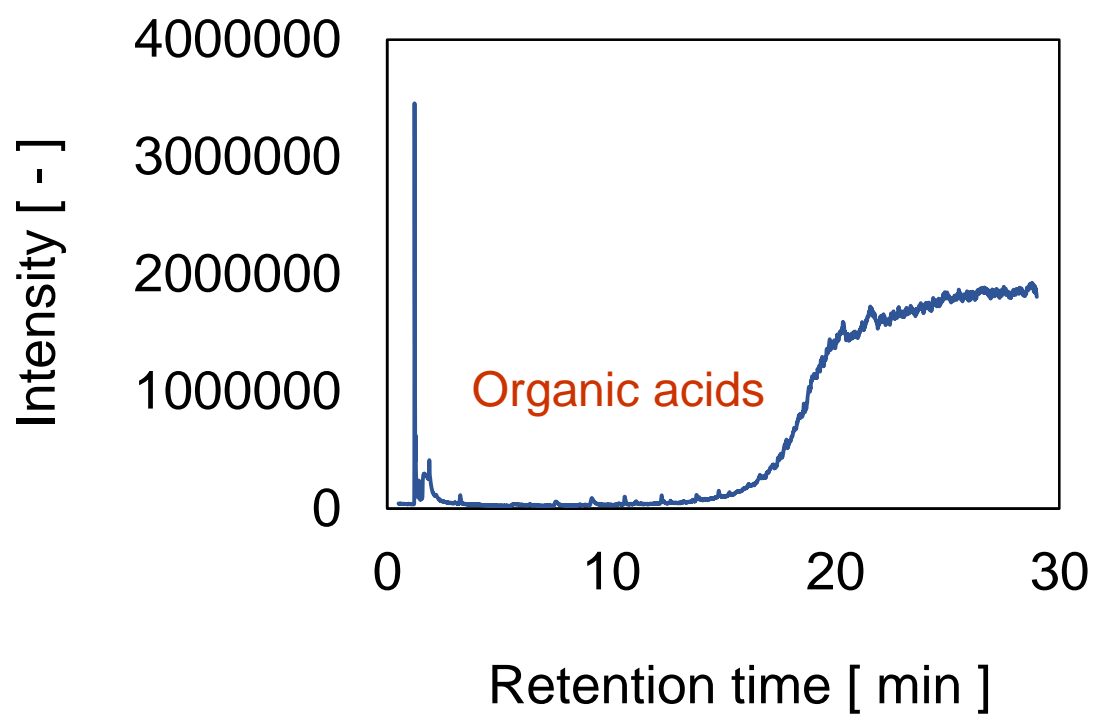


図 5-6 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を添加しなかった場合の
トラフグ卵巣の超臨界水処理前後サンプルの TIC

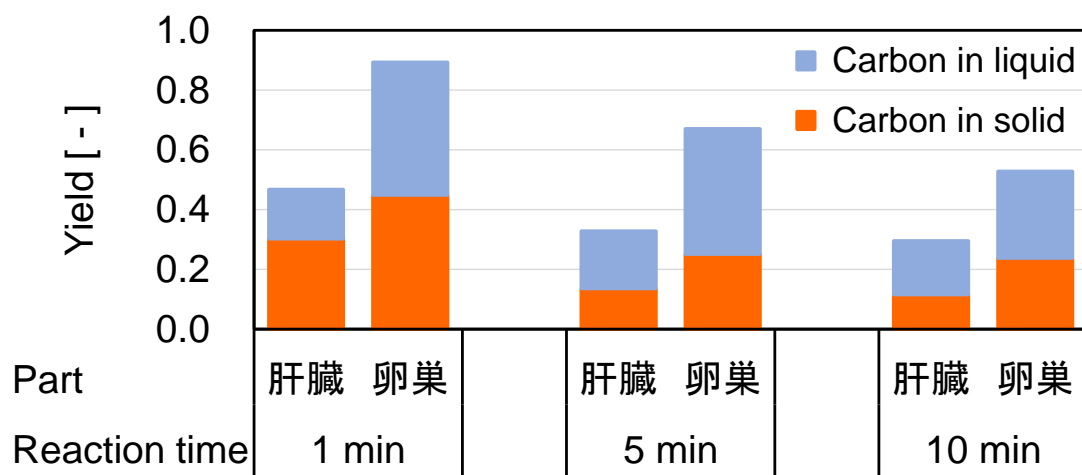
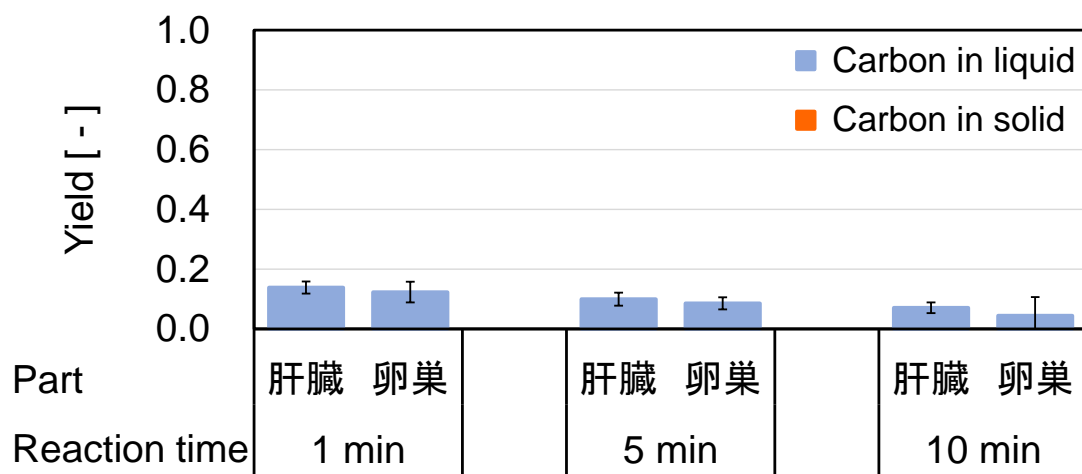


図 5-7 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を添加しなかった場合の
トラフグの超臨界水処理サンプルの炭素収率（肝臓と卵巣の比較）



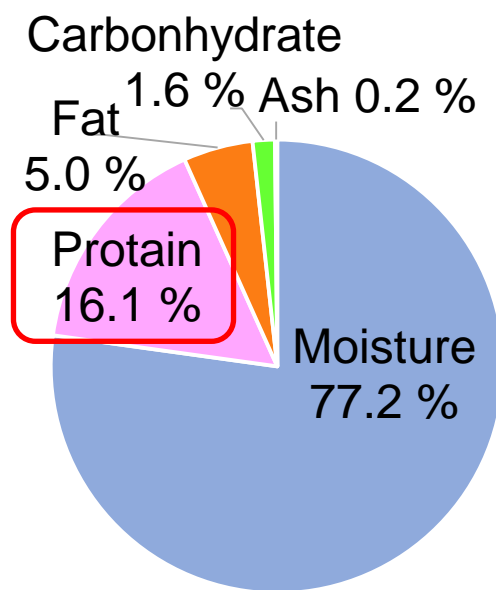
※ エラーバーは標準誤差を示す。

図 5-8 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量添加した場合
のトラフグの超臨界水酸化処理サンプルの炭素収率（肝臓と卵巣の比較）



図 5-9 温度 500 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量添加した場合のトラフグの超臨界水酸化処理サンプルの炭素収率（肝臓と卵巣の比較）

卵巢



肝臓

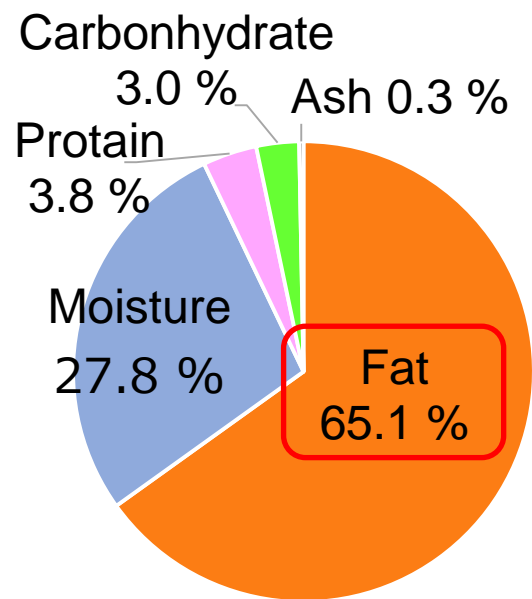


図 5-10 トラフグ卵巢（左）と肝臓（右）の成分組成（文献値）

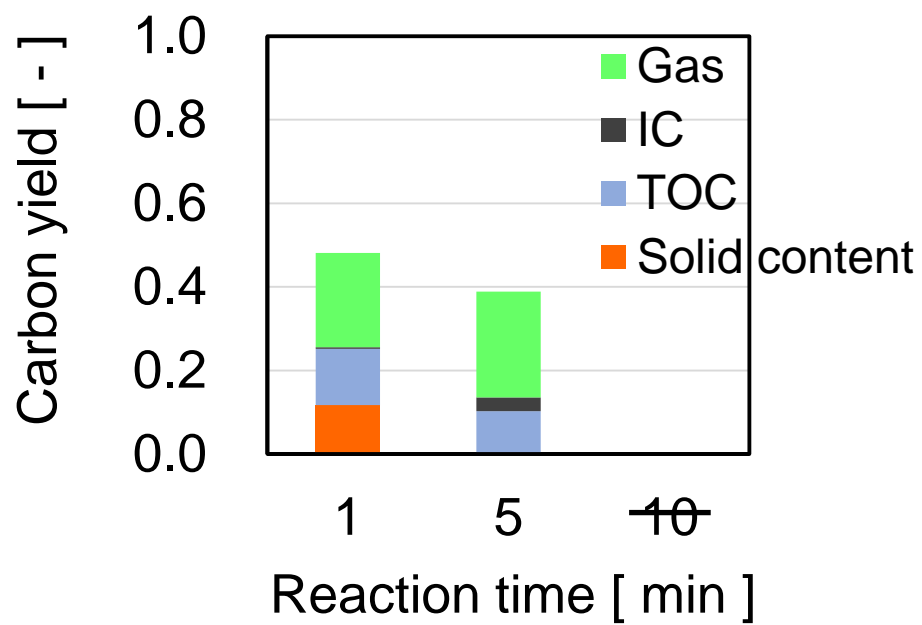


図 5-11 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 2.6 倍量添加した場合の無機炭素を含むトラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプルの炭素収率

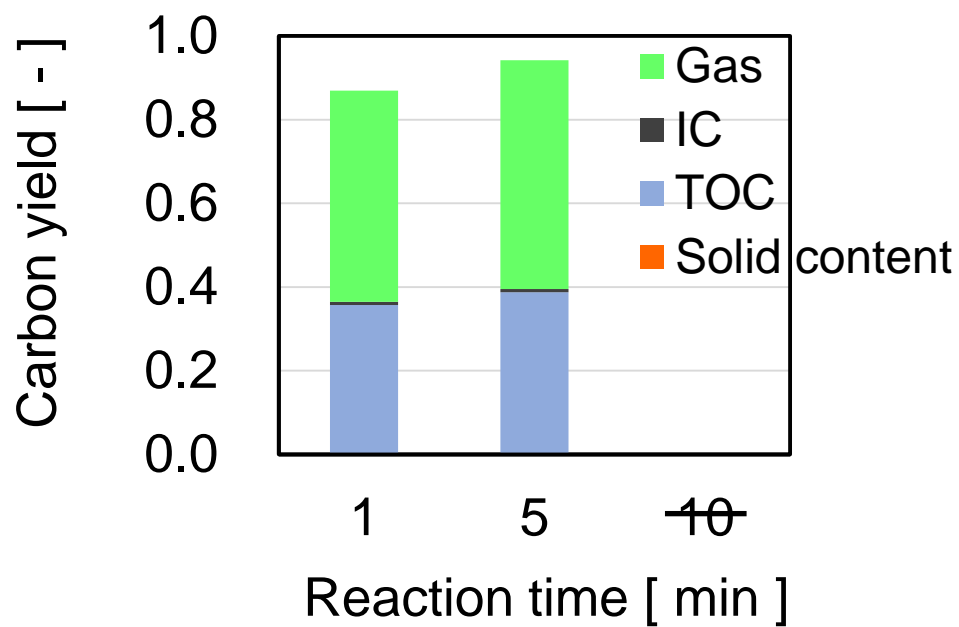
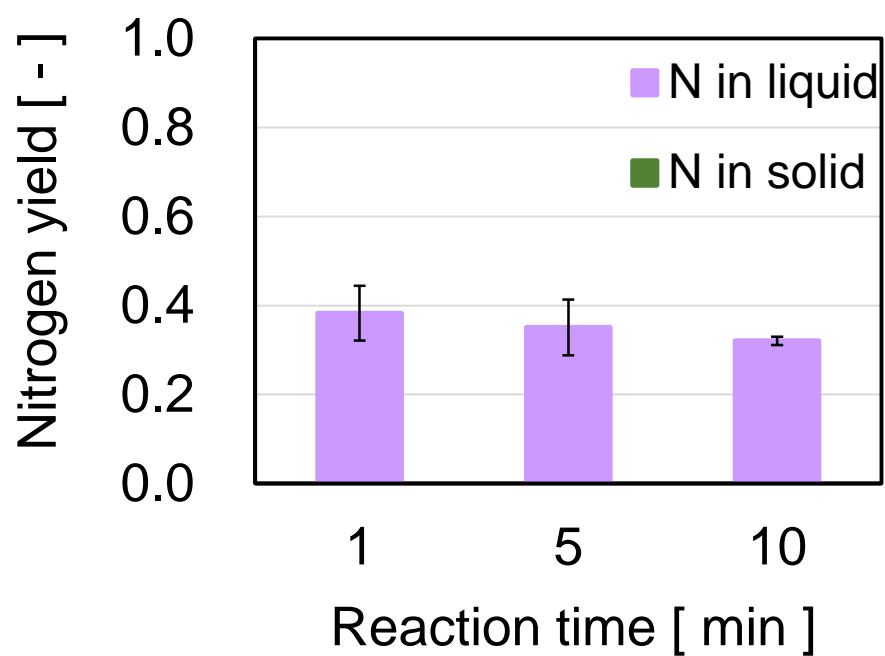


図 5-12 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量添加した場合の無機炭素を含むエタノールの超臨界水酸化処理サンプルの炭素収率



※ エラーバーは標準誤差を示す。

図 5-13 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量添加した場合
トラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプルの窒素収率

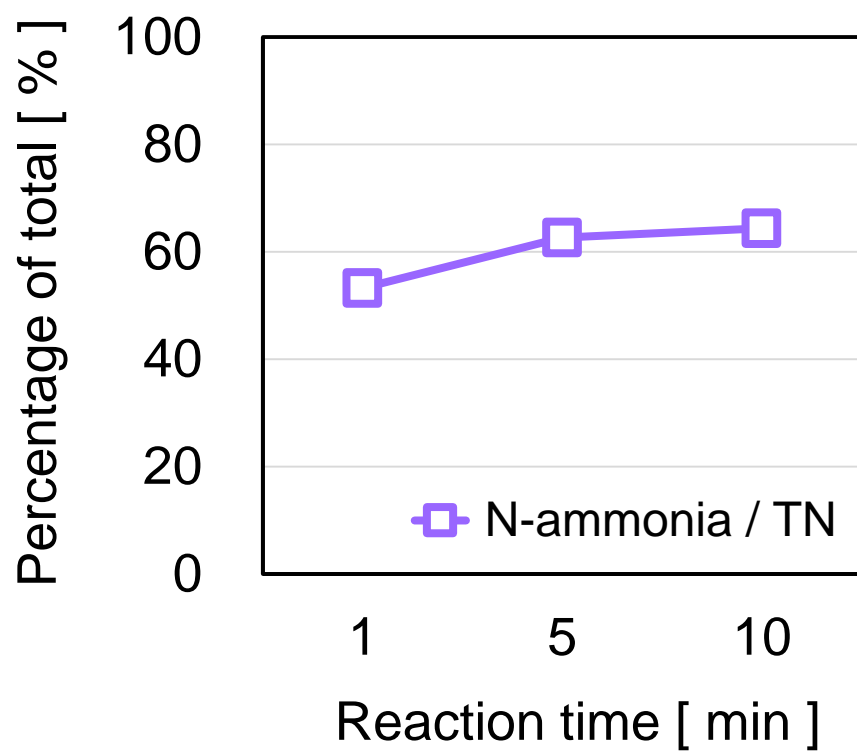
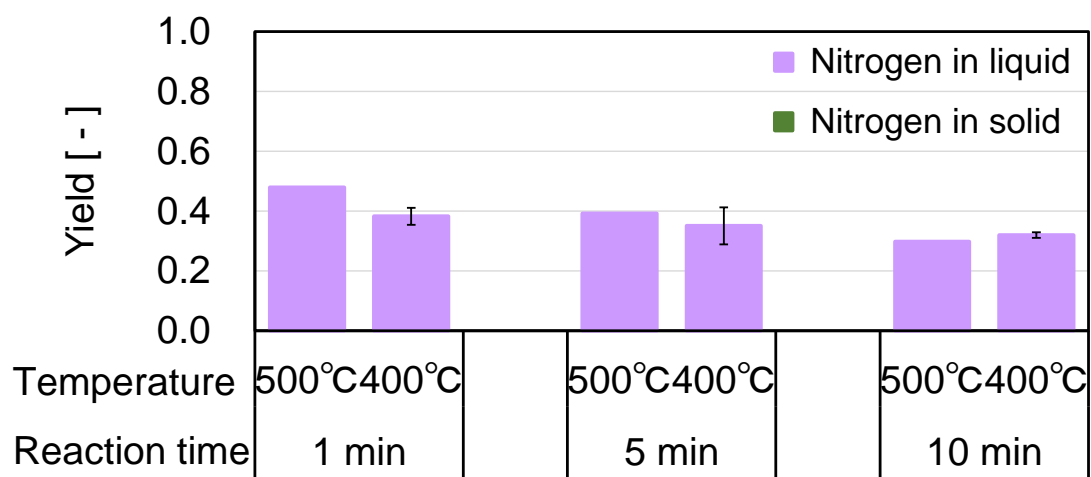


図 5-14 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量添加した場合のトラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプル中の TN に占めるアンモニア中の窒素原子の割合



※ エラーバーは標準誤差を示す。

図 5-15 圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量添加した場合の
トラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプルの窒素収率（500 °C と 400 °C の比較）

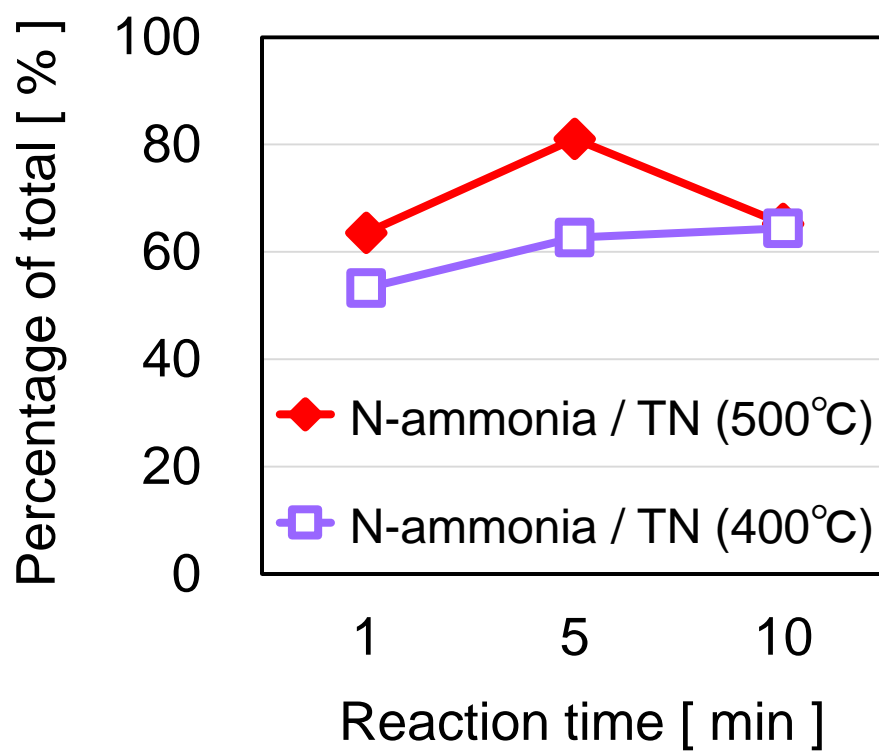
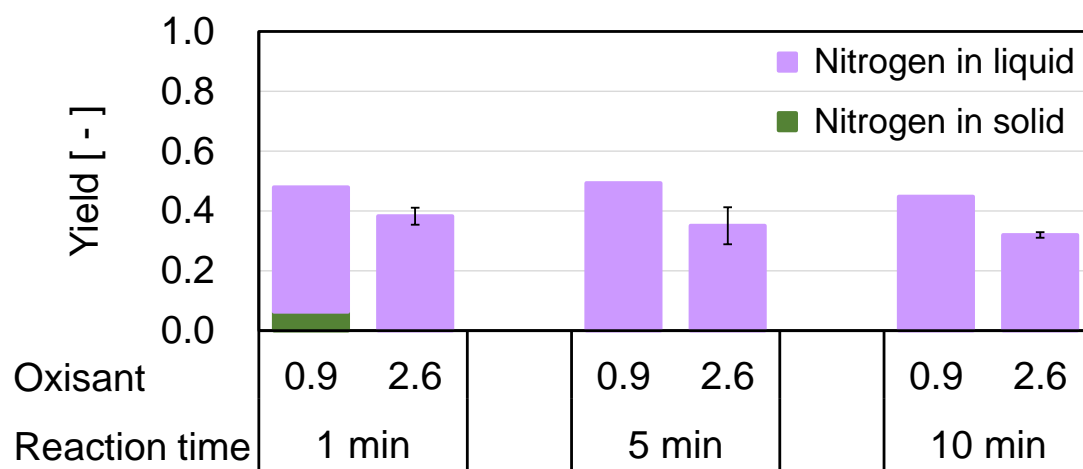
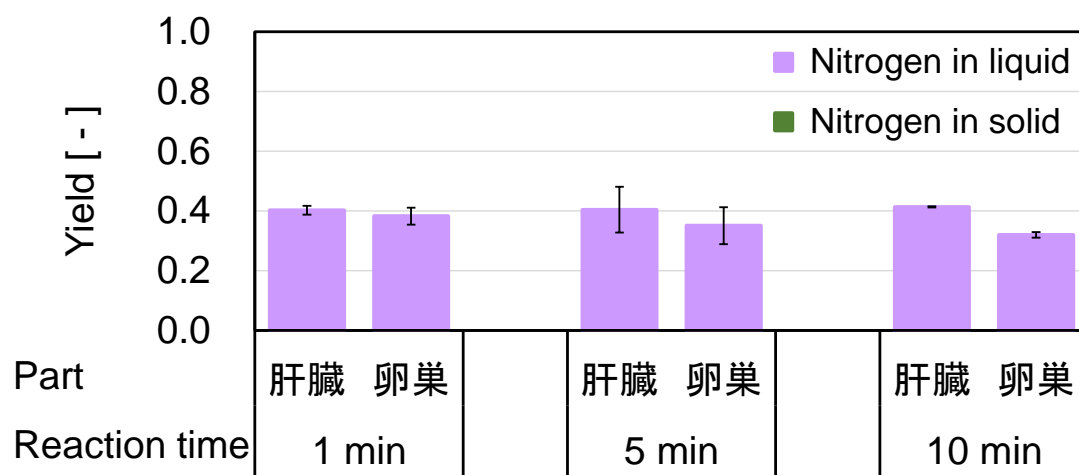


図 5-16 圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量添加した場合の
トラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプル中の TN に占める
アンモニア中の窒素原子の割合 (500 °C と 400 °C の比較)



※ エラーバーは標準誤差を示す。

図 5-17 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の 0.9, 2.6 倍量添加した場合トラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプルの窒素収率（酸化剤量の比較）



※ エラーバーは標準誤差を示す。

図 5-18 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量添加した場合のトラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプルの窒素収率（肝臓と卵巣の比較）

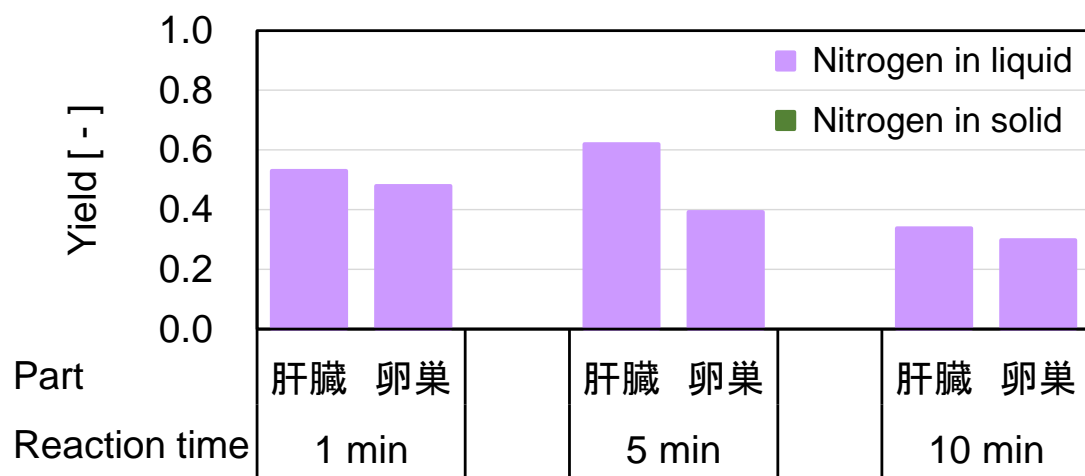


図 5-19 温度 500 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を完全酸化量論の約 3 倍量添加した場合のトラフグ卵巣の超臨界水酸化処理サンプルの窒素収率（肝臓と卵巣の比較）

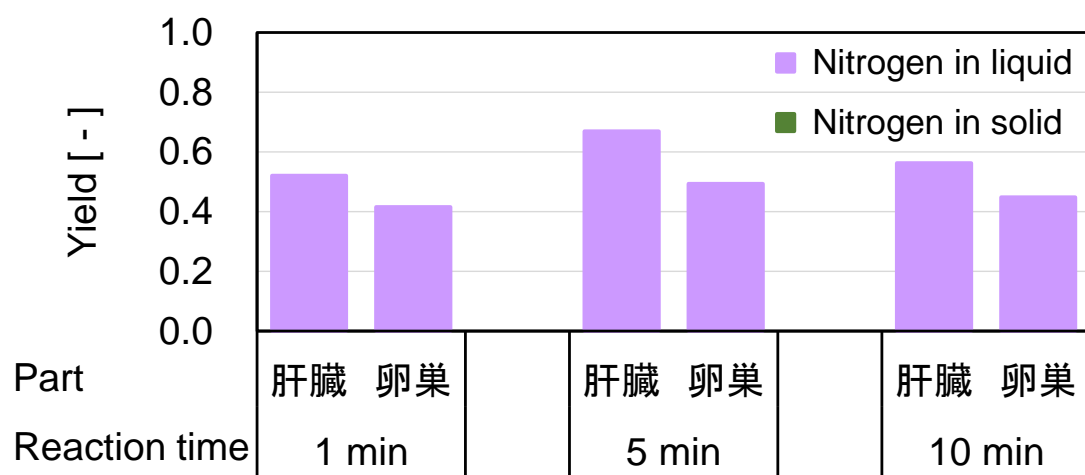


図 5-20 温度 400 °C、圧力 25 MPa、酸化剤を添加しなかった場合のトラフグ卵巣の超臨界水処理サンプルの窒素収率（肝臓と卵巣の比較）

第 6 章 結言

6-1 総括

本研究では、超臨界水中でのふぐ含毒部位の分解挙動の解明を目的として、ふぐ含毒部位中の TTX と固形分の分解挙動についての実験的な検討と、それに伴う分析方法の検討を行った。

以下に本研究の成果をまとめる。

1. 本研究の実験スケールに合わせた、短時間・省サンプルかつ簡便で安価な分析方法を考案した。
2. 超臨界水処理におけるふぐ含毒部位の分解挙動の条件依存性を初めて報告した。
3. 1 分間以上の超臨界水酸化処理によってふぐ含毒部位固形分とそこに含有される TTX の完全消失、および有機体炭素の 99.6 % の無機化が技術的に可能であることをラボスケールの検討で示した。

本研究の各検討の結果、超臨界水中でのふぐ含毒部位の分解挙動に関する基礎的な知見が得られた。トラフグ内臓組成および TTX の分解に関して、反応の時間依存性については、経時的に分解反応が進行すること、反応温度の影響については、反応温度の上昇と共に分解反応が促進されること、酸化剤量の影響については、酸化剤の量に応じて分解反応が促進または減速すること、組成の違いによる分解挙動の違いについては、反応条件によっては卵巣と肝臓の間に分解速度の違いが生じることを確認した。また、ふぐ含毒部位中の TTX と固形分の完全消失は酸化剤を転化した場合では可能であった。

6-2 今後の課題と展望

今後の展望としては、以下の項目の検討が挙げられる。

1. マウス試験等の生物試験による反応生成物の一般毒性の評価、
2. 規制等の法的な課題についての検討、
3. 本処理システムの実スケール・実条件での諸検討といった技術的な課題や実現可能性についての検討

本研究では、ふぐ含毒部位の超臨界水中での分解挙動について検討を行ったが、1-3で述べた処理システムの提案に至るまでには上記の項目の各検討が必要であると考えられる。毒性に関しては、TTXの分解挙動を調べ、条件によってはTTXが完全に消失することを確認したが、TTX分解生成物や内臓組成由来物質の毒性の発現が懸念される。そのため、マウス試験等の生物試験による反応生成物の一般毒性の評価が必要であると考えられる。また、実際の処理を想定した際の技術的な課題や法的な問題についての検討を行うことが本処理システムの提案には必要であると考えられる。

魚介類を中心として有毒部位を有する食品はふぐ以外にも多数存在することから、本研究で得られた知見はふぐのみに留まらず、他の有毒食品廃棄物に対しても基礎的知見として重要と考えられる。魚介類においてフグ以外の魚では、ゴンズイ、バラハタ、ハオコゼ、バラムツ、ハゼ、アイゴ、オニカサゴ、アオブダイ、バラフェダイ、フタツボ、シドクギョ、ドクウツボ、ヨダレハタ、バラハタ、ドクカマス等の魚が可食部は美味とされているが体内に毒を持つと言われている^[52,53]。特に、ツムギハゼはふぐ毒と同じTTXを有している。現在、それらに係る法規制等はないが、それらを捌いた際に排出される含毒部位の適切な管理および処理なくしては、ふぐ同様に毒の流出リスクがある。そのため、それらの含毒部位についても発生源での処理が望ましいと考えられる。

また、魚介類以外ではイモ類に野菜や果物の種子に毒を有しているケースが多い。例えば、ソラニンで知られるジャガイモの毒も強毒である。更に、カロテノイド、ビ

タミン B1, B2, C, E、ミネラルなどを豊富に含み、野菜の大様と呼ばれ、日本でも広く食される植物であるモロヘイヤも時期によっては種子、若葉、サヤ、茎等の部位が強心配糖体であるサポニンやストロフェチジンを含むため毒となり得る^[54]。モロヘイヤに関しては、人が中毒することもあるれば、家畜が中毒死した例等が報告されている^[55]。ここで紹介した以外にも、自然毒は無数に存在しており、その分毒の環境影響や生命に対するリスクがあり、有毒部位の処理が問題となる可能性がある。それらの処理を考えた際には、本研究で得られた知見が重要と考えられる。

参考文献

- [1] Manal R. Nader, Shadi Indary, and Layal Ephrem Boustany, The Puffer Fish *Lagocephalus Sceleratus* (Gmelin, 1789) In The Eastern Mediterranean, *EastMed TECHNICAL DOCUMENTS 10*, FAO **2012**
- [2] わが国の水産業、社団法人日本水産資源保護協会 **2002**
- [3] 小宮 孟、貝塚産魚類組成から復元する縄文時代中後期の東関東内湾漁撈
Anthropological Science (Japanese Series), **113** 119–137 **2005**
- [4] 国立科学博物館公式ホームページ『日本人のフグ食の歴史』
URL:<http://www.kahaku.go.jp/userguide/hotnews/theme.php?id=0001391489624495&p=3>
2016/10/11 アクセス
- [5] 平成 27 年 農林水産省 漁業・養殖業生産統計、2016 年 12 月 27 日公表
- [6] Noguchi T, Ebesu JSM: Puffer poisoning: epidemiology and treatment. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, **20** 1-10 **2001**
- [7] Munetomo Nakamura and Takeshi Yasumoto, TETRODOTOXIN DERIVATIVES IN PUFFER FISH, *Toxicon*, **23**(2) 271-276 **1985**
- [8] Mari Yotsu-Yamashita, Atsuko Sugimoto, Akira Takai, and Takeshi Yasumoto, Effects of Specific Modifications of Several Hydroxyls of Tetrodotoxin on Its Affinity to Rat Brain Membrane, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **289**(3) 1688-1696 **1999**
- [9] 松浦 系一、長島 裕二編著『毒魚の自然史』北海道大学出版会 **2015**
- [10] 野口 玉雄、総説マリントキシシン、日本水産学会誌 **69**(6) 895-909 **2003**
- [11] Toshio Narahashi, Takehiko Deguchi, Norimoto Urakawa and Yoshio Ohkubo, Laboratory of Applied Entomology, and of Veterinary PhaStabilization and rectification of muscle fiber membrane by tetrodotoxin, *American Journal of Physiology*, **198** 934-938 **1960**
- [12] Toshio Narahashi, PHARMACOLOGY OF TETRODOTOXIN, *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, **20**(1) 67-84 **2001**
- [13] 柿沢 寛、奥村 保明、平田 義正、フグ毒の抽出と構造、日本化学雑誌 **80**(12) 1483-1487 **1959**
- [14] 松居 隆、大塚 幸、酒井 浄、フグ毒研究の最近の進歩、薬学雑誌 **120**(10) 825-837 **2000**

- [15] 後藤 俊夫、フグ毒テトロドトキシンの構造決定と合成、The Chemical Society of Japan **28**(5) 435-439 **1980**
- [16] テトロドトキシン製品情報、和光純薬株式会社
- [17] 東京都ふぐの取扱い規制条例 昭和 61 年 03 月 31 日条例第 51 号
- [18] 荒井 康彦『超臨界流体のすべて』テクノシステム **2002**
- [19] Veriansyah Bambang, KIM Jae-Duck, Supercritical water oxidation for the destruction of toxic organic wastewaters: A review, *Journal of Environmental Sciences*, **19** 513–522 **2007**
- [20] 化学工学会超臨界流体部門編、超臨界流体入門、丸善 **2008**
- [21] 佐藤 政樹、荒井 康彦、超臨界流体中の反応特性とその応用、素材物性学雑誌 **11**(1) 67-74 **1998**
- [22] M. Modell, Processing methods for the oxidation of organics in supercritical water. US4338199 A **1982**
- [23] Helmut Schmieder and Johannes Abeln, Supercritical Water Oxidation: State of the Art, *Chemical Engineering & Technology*, **22**(11) **1999**
- [24] P. Kritzer, E. Dinjus, An assessment of supercritical water oxidation (SCWO) – Existing problems. Possible solutions and new reactor concepts. *Chemical Engineering Journal*, **83**(3) 207-214 **2001**
- [25] Suguna Yesodharan, Supercritical water oxidation: An environmentally safe method for the disposal of organic wastes, *CURRENT SCIENCE*, **82**(9) **2002**
- [26] P.E. Savage, S. Gopalan, T.I. Mizan, C. J. Martino, E. E. Brock, Reactions at Supercritical Conditions – Applications and Fundamentals., *AIChE Journal*, **41**(7) 1723-1778 **1995**
- [27] Philip A. Marrone, Scott D. Cantwell, and Darren W. Dalton, SCWO System Designs for Waste Treatment: Application to Chemical Weapons Destruction, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **44** 9030-9039 **2005**
- [28] B. S. Kocher, F. O. Azzam, and S. Lee. Single-stage remediation of contaminated soil-sludge. *Energy Source*, **17** 553–563 **1995**.
- [29] K. C. Swallow and W. R. Killilea. Comment on phenol oxidation in supercritical water: Formation of dibenzofuran, dibenzo-p-dioxin, and related compounds. *Environmental Science & Technology*, **26**(9) 1849–1850 **1992**
- [30] 立野 良、野々上 友也、大島 義人、超臨界水酸化法を用いた感染性医療廃棄物の新規無害化処理システムの開発、廃棄物資源循環学会論文誌 **20**(2) 111-118 **2009**

- [31] M. D. Bermejo and M. J. Cocero. Supercritical water oxidation: A technical review. *AIChE Journal*, **52**(11) 3933–3951 **2006**.
- [32] Yasunori Kikuchi, Kohjiro Kurata, Jun Nakatani, Masahiko Hirao, Yoshito Oshima, Analysis of supercritical water oxidation for detoxification of waste organic solvent in university based on life cycle assessment, *Journal of Hazardous Materials*, **194** 283–289 **2011**
- [33] Benjaporn Youngprasert, Kunakorn Poochinda, Somkiat Ngamprasertsith, Treatment of Acetonitrile by Catalytic Supercritical Oxidation in Compact-Sized Reactor, *Journal of Water Resource and Protection*, **2** 222-226 **2010**
- [34] S. F. Rice, Kinetics of Supercritical Water Oxidation-SERDP Compliance Technical Thrust Area. DTIC Document : **2001**
- [35] 厚生労働省監修 食品衛生検査指針 理化学編、661-666 **2005**
- [36] Yuki Shoji, Mari Yotsu-Yamashita, Teruo Miyazawa and Takeshi Yasumoto, Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Tetrodotoxin and Its Analogs: Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, Tandem Mass Spectrometry, and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Biochemistry*, **290** 10-17 **2001**
- [37] Y.H. Tsai, D.F. Hwang, C.A. Cheng, C.C. Hwang, J.F. Deng, Determination of tetrodotoxin in human urine and blood using C18 cartridge column, ultrafiltration and LC–MS, *Journal of Chromatography B*, **832** 75–80 **2006**
- [38] Shunsuke Kurono, Hideki Hattori, Osamu Suzuki, Takamichi Yamada & Hiroshi Seno, SENSITIVE ANALYSIS OF TETRODOTOXIN IN HUMAN PLASMA BY SOLID-PHASE EXTRACTIONS AND GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY, *ANALYTICAL LETTERS*, **34**(14) 2439–2446 **2001**
- [39] 岸 義人、田口 弘康、後藤 俊夫、平田 義正、テトロドトキシンとその誘導体から得られる 3 種の 2-アミノキナゾリン誘導体の構造、日本化学雑誌 **85**(9) **1964**
- [40] Takeshi Yasumoto & Michishita Tooru, Fluorometric Determination of Tetrodotoxin by High Performance Liquid Chromatography, *Agricultural and Biological Chemistry*, **49** (10) 3077-3080 **1985**
- [41] 渕 祐一、森崎 澄江、長田 忠、嶋崎 晃次、野口 玉雄、大友 信也、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、食品衛生学雑誌 **29**(5) 306-312 **1988**

- [42] 消費者庁 食品表示一元化情報 食品表示基準 別添 栄養表示関係
- [43] Takeshi Suzuki and Michizo Suyam, Free Amino Acids and Phosphopeptides in the Extracts of Fish Eggs, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **49**(11) 1747-1753 **1983**
- [44] M Moyen Uddin PK, Subodh Kumar Sarkar, Nurul Absar, ANALYSIS ON NUTRIENT CONTENTS OF DIFFERENT PARTS OF PUFFER FISH(TETRAODON CUTCUTIA) AND IT'S TOXICITY, *International Journal of Biological Sciences*, **20** 109-114 **2012**
- [45] 峯木 真知子、大貫 和恵、澤崎 絵美、小澤 啓子、西念 幸恵、五百蔵 良、野口 玉雄、陸上養殖された無毒化トラフグの肝臓の一般成分、脂肪酸組成とその利用、*Japanese Journal of Sensory Evaluation*, **13**(1) 23-30 **2009**
- [46] Toshio Saito, Tamao Noguchi, Teruo Harada, Osamu Murata and Kanehisa Hashimoto, Tetrodotoxin as a Biological Defense Agent for Puffers, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **51**(7) 1175-1180 **1985**
- [47] 千原 秀昭ら訳、アトキンス物理化学 (上) 、東京化学同人 **8** **2010**
- [48] Phillip E. SAVAGE AND MICHAEL A. SMITH, Kinetics of Acetic Acid Oxidation in Supercritical Water, *Environmental Science & Technology*, **29** 216-221 **1995**
- [49] William R. Killilea, K. C. Swallow, and Glenn T. Hong, The Fate of Nitrogen in Supercritical-Water Oxidation, *The Journal of Supercritical Fluids*, **5** 72-78 **1992**
- [50] Paul A. Webley, Jefferson W. Tester, and H. Richard Holgate, Oxidation Kinetics of Ammonia and Ammonia-Methanol Mixtures in Supercritical Water in the Temperature Range 530-700 °C at 246 bar, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **30** 1745-1754 **1991**
- [51] 山中 英明、魚介類の自然毒による食中毒の現状、食品衛生学雑誌 **27** (4) 343-353 **1986**
- [52] 安元 健、シガテラ-南方産魚類による食中毒-化学と生物 **10**(6) 369-375 **1972**
- [53] 合田 幸広、酒井 信夫、中村 高敏、穂山 浩、豊田 正武、モロヘイヤ種子中の主強心配糖体の同定、分析及び、マウスに対する経口毒性について、食品衛生学雑誌、**39**(4) 256-265 **1998**
- [54] 濱口 芳浩、平井 良夫、谷口 敦、合澤 正哲、牛のモロヘイヤ(*Corchorus olitorius* L.)種子中毒、日本獣医師会雑誌 **51** 407-410 **1998**

謝辞

本修士論文は東京大学大学院新領域創成科学研究科環境システム学専攻大島研究室において 2015 年 4 月から 2017 年 1 月までの 2 年間に渡り行った研究成果をまとめたものです。本研究を行うにあたり、非常に多くの方々にお世話になりました。

指導教員の大島義人教授には大変お世話になりました。研究面において、ゼミやディスカッションの場での確かなアドバイスを下さっただけでなく、自身の興味やアイデアを尊重して下さり、自由に研究をさせて頂きました。その中で研究に対する考え方を学ぶことや、研究の面白さを知ることができました。また、普段やお酒の席でも気軽に話して下さり、とても楽しく過ごさせて頂きました。大島研で学ぶことができた 2 年間、私にとって大変貴重な 2 年間となりました。心より感謝致します。井原智彦准教授には環境システム学専攻の教員としてだけではなく、副査としてお世話になりました。自身の中には無かった違った視点からのアドバイスを多く頂くことができ、大変勉強になりました。厚く御礼申し上げます。大友順一郎准教授にもお世話になりました。授業だけでなく、飲み会等でお話をさせて頂く機会が多くあり、いつも楽しくお話をさせて頂きました。また、一緒に飲めることを楽しみにしております。秋月信助教には研究から日頃の研究室生活まで大変お世話になりました。特に研究においては、実験の細かい操作から研究のまとめ方までお世話になりっぱなしでした。そして、この修士論文を書き上げるに際しても、直前まで手を掛けて下さり、大変お世話になりました。秋月先生なくては修士論文を提出することが出来ませんでした。心より感謝を申し上げます。

環境安全研究センターの布浦鉄兵准教授と澤井理助教に感謝を申し上げます。布浦鉄平准教授には分析機器を利用させて頂いただけでなく、廃棄物の捨て方等について相談に乗って頂きました。また、澤井理助教には分析方法の検討から親身になって相談に乗って頂いただけでなく、日頃から雑談にも付き合って頂きました。お二方に今一度感謝を申し上げます。東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所の菊池潔准教授にはふぐの基本的な取り扱いをご教示頂きました。東京海洋大学の長島裕二教授には TTX の抽出法から分析についてご教示頂きました。また、トラフグサンプルを提供して頂いた神奈川県ふぐ協会の田中光義副理事に厚く御礼を申し上げます。

大島・大友研究室のスタッフや先輩・後輩にも大変お世話になりました。伊藤通子さん、主原愛さん、根津友紀子さん、高坂文彦さん、下田絵里子さん、横哲さん、小城元さん、秘書の長尾玲圭さん、中村聡子さん、小川杏奈さんには日頃から仲良くさせ

て頂いただけでなく、研究室生活のあらゆる面でサポートして頂きました。心から感謝致します。また、同期の皆さんにも大変お世話になりました。若輩者の私ですが、一緒に学んで、一緒に遊んで、とても楽しい学生生活を送ることができました。心から感謝しています。これからも長い付き合いでいたいと思います。

最後に、これまでの長い学生生活をあらゆる面で支えてくれた両親・祖父母に感謝したいと思います。

本修士論文は自分一人の力ではなく、ここに書き切れないほど多くの方々の支えによって完成させることができました。今一度感謝の言葉を述べさせていただきます。本当にありがとうございました。

2017 年 2 月 14 日

松本 栄祐