

資料

フグ中毒事例におけるLC/MS/MSによるテトロドトキシン分析

下堂 蘭 栄 子 西 村 修 一¹ 大小田 修 司²
福司山 郁 恵 岩 屋 あまね 榎 元 清 美
佐久間 弘 匡

1 はじめに

フグ毒による食中毒は、全国で毎年30件程度発生し、患者の症状が重篤化する事例が多い。最悪の場合、患者が死亡することから食品衛生上問題となっており、関係機関では住民に注意喚起を行っている。

鹿児島県のフグによる過去の食中毒事例は、1962年から2009年までの間で10件、患者数22名、うち死亡者2名となっている。

2008年10月及び2009年10月には、フグ毒による食中毒が本県内で連続して発生し、当センターに患者が喫食した残品のフグ毒検査依頼があった。

フグ毒テトロドトキシン（以下「TTX」という。）の公定法¹⁾は、マウス試験法であるが、マウスの入手までに時間を要し、マウスの体重管理が必要となるなど管理が煩雑であり、また、生物学的試験に伴う分析精度などの問題がある。一方、理化学的試験法ではLC/MSやLC/MS/MSによる分析法^{2),3)}がいくつか報告されている。

今般のフグ中毒事例に際し、マウス試験法と並行して、LC/MS/MSによるTTX分析を、赤木らの報告³⁾を参考に実施し、緊急時に対応したのでその結果を報告する。

2 事例概要

2.1 事例1

2008年10月10日、夫が釣ったフグを妻が自宅で調理し、味噌煮にして、夫婦2名で食べたところ、妻が直後から舌のしびれを訴え、病院を受診した。その後、夫もしびれ、嘔吐の症状を呈した。釣った本人が図鑑でドクサバフグを指し示したことからドクサバフグと推定された。

（以下「事例1」という。）

2.2 事例2

2009年10月5日、知人からもらったフグを妻が調理し、煮付けにして、夫婦2名で食べたところ、2名とも舌のしびれを呈し、近くの病院を受診した。その後、妻は症状が重く、救急病院へ緊急搬送された。フグは、保健所職員の鑑別によりドクサバフグと確認された。（以下「事例2」という。）

3 方法

3.1 試料

事例1では味噌煮のうち、筋肉と内臓（部位不明）を、事例2では煮付け（筋肉、内臓含む）を用いた。

3.2 試薬及び試液

標準品：TTXは和光純薬工業株式会社製を使用した。標準品を水で溶解し10mLとし、適宜0.1%酢酸で希釈し、標準溶液とした。

ODSミニカラム：C18ミニカラムは、ジーエルサイエンス(株)製InertSep C18(1g)をあらかじめメタノール5mL、水10mLでコンディショニングして使用した。

その他の試薬：すべて特級品あるいはHPLC用を使用した。

3.3 装置

高速液体クロマトグラフは、Agilent Technologies 社製1100シリーズを使用した。

質量分析装置は、Applied Biosystems 社製API2000を使用した。

3.4 測定条件

LC/MS/MSの測定条件は、表1のとおり。

1 鹿児島県保健福祉部生活衛生課
2 鹿児島県熊毛支庁屋久島事務所

〒890-8577 鹿児島市鴨池新町10-1
〒891-4311 鹿児島県熊毛郡屋久島町安房650

表1 LC/MS/MSの測定条件

分析カラム	: SeQuantZIC pHILIC (内径2.1mm, 長さ100mm, 粒径5μm)	
流速	: 0.2mL/min	
注入量	: 10μL	
カラム温度	: 40℃	
移動相	: A: アセトニトリル in 0.1% ぎ酸 : B: 0.1% ぎ酸	
グラジェント条件	: 0min(A: B= 70 : 30) →5min (70 : 30) →10min (0 : 100) →25min (0 : 100)	
イオン化モード	: エレクトロスプレーイオン化ポジティブ	
イオンスプレー電圧	: 5.5kV	
イオンソース温度	: 500℃	
測定モード	: MRM	
Q1 (m/z)	320.0	(m/z)
Q3 (m/z)	162.4	(m/z)
D P	: 51V	
C E	: 57V	

3. 5 試験溶液の調製

公定法¹⁾に準拠し、図1試験フローのとおりを実施した。

試料溶液は、0.1%酢酸で適宜希釈し、0.45μmメンブランフィルターでろ過し、LC/MS/MSへ、10μL注入した。

試料 10.0g

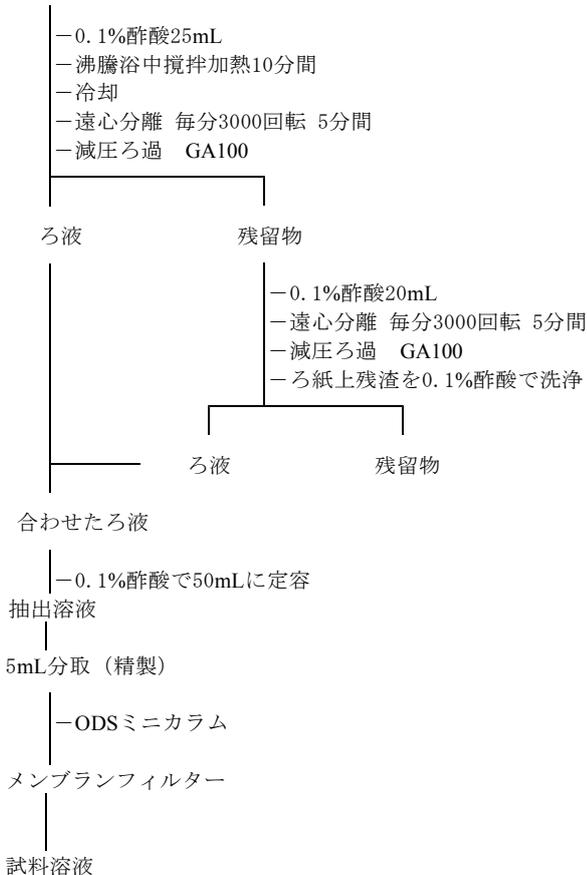


図1 試験フロー

また、添加回収試験を行う試料には、フグの検体が確保できなかったため、さばの味噌煮を用い、試料中濃度1.0μg/gとなるようTTXを添加し、試験に供した。

3. 6 マウス試験法

公定法¹⁾に準拠し、図1試験フローで得られた抽出溶液を、マウスの腹腔内に注射し、用量一致死時間曲線で抽出溶液中の毒量を換算する予備試験を実施した。ついで、マウスが10分前後で死亡するように適宜、抽出溶液を希釈したものを3尾のマウスに注射し、その中間致死時間から毒量を算出した。

4 結果及び考察

4. 1 MS/MSの条件

インターフェースには、極性化合物のイオン化に適したエレクトロスプレーイオン化法を選択し、測定はMRMモードとした。

TTX標準溶液1.0μg/mLを用いて、インフュージョン法による最適化を行った。TTXの分子にプロトンが付加したm/z320が感度よくみられ、その次に水脱離イオンであるm/z302が確認された。

m/z320[M+H]⁺をプレカーサーイオンとし、プロダクトイオンは、一番感度のよいm/z162を選択した。DP値は51Vで、CE値は57Vで一番感度が高かった。

次にフローインジェクションを用いて、イオンソースの最適化を行い、イオンスプレー電圧、イオンソース温度等の条件を表1のとおりとした。

4. 2 LCの条件

カラムは、赤木らの報告²⁾を参考にTTXの保持にイオンペア試薬を必要としない親水性相互作用クロマトグラフィカラムのHILICカラムを使用した。

移動相は、アセトニトリルと0.1% ぎ酸を用いた。

グラジェント条件は表1のとおりとした。アセトニトリルにも0.1% ぎ酸を添加することで良好なピークが得られた。

4. 3 精製方法の検討

検体がいずれも煮付けで、ゼラチン様物質や脂質が多かったため、精製はODSミニカラムとn-ヘキサンを用いて検討した。

添加回収試験用検体を用いて、図1試験フローのとおり0.1%酢酸で50mLに定容した抽出溶液5mLをODSミニカラムに負荷する方法と、n-ヘキサン2mLを加えて、振とう後、遠心分離して水層を得る方法である。どちらと

も90%以上の回収率が得られたが、ODSミニカラムのピーク形状がよかったので、本法では、ODSミニカラムによる精製を用いた。

4. 4 検量線

0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で良好な直線性（相関係数 $r=0.999$ 以上）が得られた。（図2）

定量下限値は0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、試料中濃度に換算すると0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。フグ毒は、10MU/g（TTXとして2.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ ）未満では無毒とされており、この定量下限値はそれを十分下回る値であった。

また、クロマトグラム上では、妨害ピークもみられなかった。

本法で得られたTTX標準溶液1.0ppm、事例1の筋肉及び内臓のMRMクロマトグラムを図3に示す。

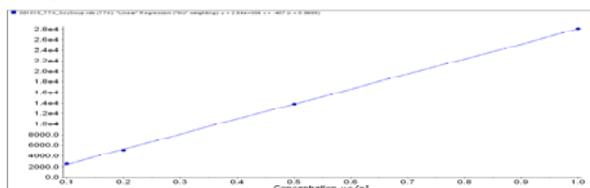
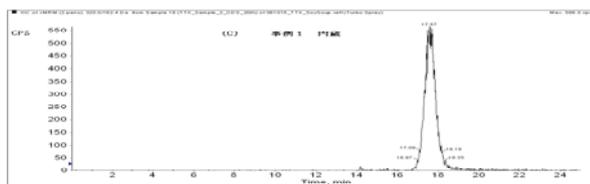
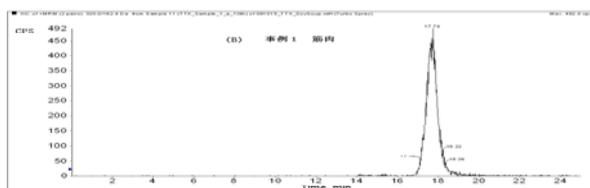
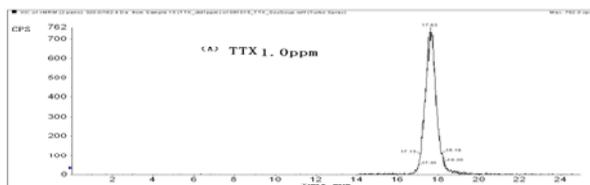


図2 TTXの検量線



- (A) TTX標準溶液1.0ppm
- (B) 事例1 筋肉 10倍希釈液
- (C) 事例1 内臓 20倍希釈液

図3 TTXのMRMクロマトグラム

試料溶液を10~20倍に希釈して測定したので、試料由来のイオン化抑制などの影響は受けなかったと考えられる。

4. 5 添加回収試験

さばの味噌煮を用い、試料中濃度が1.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ となるようにTTXを添加し、試験に供した。

回収率は92.5%と良好であった。

4. 6 マウス試験法との比較

事例1、事例2における残品のLC/MS/MSによる分析結果とマウス試験法による結果は、表2のとおりである。

1MUは体重20gのマウスを30分で死亡させる毒量で、TTXとして約0.22 μg に相当するとされている。マウス試験法による結果をTTX濃度として換算すると、LC/MS/MSの分析結果とほぼ同等であった。

事例1では、マウスを入手するまでの間に、LC/MS/MSによる分析を実施することができたので、マウス試験法の予備試験で希釈倍率を検討する際、ある程度の目安とすることができ、結果報告までの時間短縮につながった。

事例2では、マウス試験法のあとに、LC/MS/MSによる分析を実施した。マウス試験法の結果を裏付ける有効なデータとなった。

表2 フグ中毒事例の分析結果

	LC/MS/MS TTX ($\mu\text{g}/\text{g}$)	マウス試験法	
		毒量 (MU/g)	TTXとして換算 ($\mu\text{g}/\text{g}$)
事例1 味噌煮	筋肉	31.4	26.6
	内臓	68.8	71.9
事例2 煮付け	26.8	129	28.3

5 まとめ

フグ中毒事例に際し、マウス試験法と並行して、LC/MS/MSによる分析を実施して以下のことがわかった。

- 1) 赤木らの報告³⁾を参考にし、イオンペア試薬を必要としない親水性相互作用クロマトグラフィーカラムを使用した本法により、LC/MS/MSによるTTX分析を迅速に実施することができた。
- 2) 検量線は0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で良好な直線性（相関係数 $r=0.999$ 以上）が得られた。
- 3) 定量下限値は0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、試料中濃度に換算すると0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。フグ毒は、10MU/g（TTXとして2.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ ）未満では無毒とされており、この定量下限

値はそれを十分下回る値であった。

- 4) 試料溶液を10～20倍に希釈したので、試料由来のイオン化抑制の影響は見られなかった。回収率も92.5%と良好であった。
- 5) LC/MS/MSによる分析結果とマウス試験法による結果を比較すると、ほぼ同等の値であった。熱帯産フグの場合は、フグ毒に麻痺性貝毒の成分も混在するとされ、マウス試験法の結果には注意を要する¹⁾が、今回の2つの事例では、LC/MS/MSによる分析を実施することで、マウス試験法を実施する際の目安とすることができ、また、マウス試験法の結果データの確認をすることができた。
- 6) 本法は、感度も良く、選択性の高いLC/MS/MSを用いたMRMモードの測定法であり、マウス試験法に比べて、短時間で結果報告をすることができる。緊急を

要するフグ中毒事例では、現在の公定法に代わり得る十分有効な試験法であると思われる。

参考文献

- 1) 厚生労働省監修；食品衛生検査指針・理化学編，社団法人日本食品衛生協会，661～666，(2005)
- 2) 堀江正一，石井里枝，他；LC/MSによるフグ毒テトロドキシンの分析，食衛誌，**43**，234～238 (2002)
- 3) 赤木浩一，畑野和広；親水性相互作用クロマトグラフィーを用いたLC/MS/MSによるテトロドキシンの分析，福岡市保健環境研究所報，**32**，98～100 (2006)