

LC/MS/MSによるナシフグ中のテトロドトキシンの分析について

Analysis of Tetrodotoxin in Pear Puffer by LC/MS/MS

石川 順子 森 香織 安永 恵 氏家 あけみ 西岡 千鶴
 Junko ISHIKAWA Kaori MORI Megumi YASUNAGA Akemi UJIKE Chizuru NISHIOKA

要 旨

フグ毒(テトロドトキシン)の分析方法は、マウスを用いた生物学的試験法が公定法として定められているが、マウスの入手、管理等の問題があり中毒時の迅速な対応が困難な場合がある。今回、ナシフグの皮、筋肉を試料としてLC/MS/MSによる分析を行い、公定法と比較したところ、マウスユニット換算のテトロドトキシンの含有量とLC/MS/MSにより得られた値には相関があることが推察された。このことにより生物学的検査の迅速な対応が困難な場合LC/MS/MSによる分析は有用と考えられる。

キーワード：ナシフグ テトロドトキシン LC/MS/MS

I はじめに

フグ毒(テトロドトキシン, 以下TTXという。)は強力な神経毒であり、香川県においても平成10年から22年までに6件(患者11名, うち死者2名)のフグ毒による食中毒が発生している。

食用とされるフグの種類は種々あり、ナシフグについては毒性が論議されていたが、平成10年に香川県及び岡山県の瀬戸内海域で漁獲されたものについて、筋肉部分は安全性が確認され販売が解禁された。その後、毎年毒性についてモニタリング検査が実施されている。

平成23年4月に発生したフグ毒による食中毒が疑われた事例を契機に、ナシフグの皮、筋肉及び前述の食中毒事例(疑い)に係る検体を試料としてLC/MS/MSによる分析を行い、公定法であるマウス単位法との比較を行った。

II 方法

1 試料

平成15, 23年に実施したナシフグのモニタリング検査に供したナシフグ(筋肉・皮)及び平成23年に発生したフグ毒による食中毒が疑われた事例に係る検体(フグの筋肉)を試料とした。

2 試薬等

標準品: TTXは、和光純薬工業(株)製を使用した。

標準原液: 標準品1mgを水で溶解し10mlとした。
 標準溶液: 適宜80%アセトニトリル水溶液で希釈して使用した。

その他の試薬: 和光純薬工業(株)製高速液体クロマトグラフ用または試薬特級を使用した。移動相のアセトニトリルはシグマアルドリッチ社製のLC/MS用を使用した。

3 装置および測定条件

装置: 高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC/MS/MS)は、Waters社ACQUITY TQD UPLCを使用した。

測定条件: LC/MS/MSの測定条件を表1に示した。

表1 LC/MS/MSの測定条件

分析カラム	Waters社 ACQUITY UPLC BEH HILIC 1.7 μ m (2.1 \times 50mm)
ガードカラム	Waters社 ACQUITY UPLC BEH HILIC VanGuard Pre-Column 1.7 μ m (2.1 \times 5mm)
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
移動相	A-0.1%ギ酸, B-アセトニトリル
流速	0.2ml/min
グラジエント条件	0min(A:B=5:95) \rightarrow 0.01min(60:40) \rightarrow 5min(20:80) \rightarrow 10min(20:80) \rightarrow 12min(5:95) \rightarrow 14min(5:95)
注入量	5 μ l
イオン化法	ESI(+)
デソルベーション温度	350 $^{\circ}$ C
検出方法	MRM
プレカーサーイオン	m/z 320
プロダクトイオン	m/z 162
コーン電圧	48V
コリジョンエネルギー	38V

4 試料溶液の調製

公定法¹⁾により、次のように試料を調製した。ナシフグ(皮は細切, 筋肉は磨砕) 10g をビーカーに入れ, 0.1%酢酸溶液 25ml を加え, 沸騰浴中で時々攪拌しながら 10 分間加熱し, 冷却後, 減圧ろ過した。ろ紙上の残渣を 0.1%酢酸溶液で反復洗浄し, ろ液と洗液を合わせて 50ml に定容したものを試料溶液とした。

III 結果及び考察

今回, フグ毒が原因物質と疑われる食中毒事例があり, 公定法により分析した結果, フグ毒は検出されなかった。しかし, 公定法はマウスの入手等迅速な対応が困難な場合があり, 化学的試験法でも対応することが望ましいため, LC/MS/MS による分析条件の検討を行った。分析条件の検討に用いる試料は, 毎年モニタリング検査を実施していることから, ナシフグを用いることとした。

赤木²⁾, 秦野³⁾らの方法を参考に, 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ーカラムを選択し, 0.1%ギ酸とアセトニトリルでグラジエント条件を検討し, それらの結果から, 表 1 の測定条件を得た。検量線は, 0.5~20ng/ml の範囲で直線性が得られた。(定量限界 0.5ng/ml, S/N=17)

ナシフグの皮を試料として得た各希釈溶媒における測定結果を表 2 に示した。

表 2 各希釈溶媒における TTX の測定結果

	公定法 TTX換算値 ($\mu\text{g/g}$)	80%アセトニ リル×200 ($\mu\text{g/g}$)	0.1%酢酸 in80%アセト ニリル×200 ($\mu\text{g/g}$)	0.1%酢酸 in50%アセト ニリル×200 ($\mu\text{g/g}$)	10000g5分遠心 0.1%酢酸×20 0.1%酢酸in80%ア セトニリル×10 ($\mu\text{g/g}$)
皮A	6.6	3.6	2.9	2.9	2.0
皮B	6.2	3.9	3.3	1.7	2.0
皮C	20.6	9.4	9.6	7.4	6.2
皮D	75.2	69.5	51.0	37.0	64.5
皮E	34.5	24.6	21.4	14.6	25.2
皮F	17.3	10.2	5.6	4.5	3.2
皮G	89.1	93.0	81.5	59	66.5
皮H	40.3	26.8	16.6	12.6	15.6
皮I	24.0	18.0	15.0	11.4	15.0
皮J	84.3	66.5	64.0	48.5	52.0
皮K	39.6	26.2	17.4	12.2	11.2
皮L	98.6	102	87.0	68.0	60.0

公定法であるマウス単位法で得られた TTX 換算値と, LC/MS/MS による測定値は相関があると推察された。公定法により得られた TTX 換算値に比較的近い

値であった 80%アセトニトリル水溶液を希釈溶媒として使用することとした。

ナシフグの筋肉及び皮について測定した結果を表 3 に示した。定量限界は $0.5\mu\text{g/g}$ であった。フグ毒は 10MU/g (TTX として $2.2\mu\text{g/g}$) 未満では無毒とされており, 食中毒事例における分析には支障がないと推察された。添加回収試験については, 無毒とされる濃度レベルで実施することとした。TTX が検出されていないフグの皮から調製した試料溶液に添加濃度が 400ng/ml になるように添加し, 80%アセトニトリル水溶液で 200 倍希釈し測定した。回収率は 50~70% (n=5) であり, 平均 58% であった。

表 3 ナシフグ(皮・筋肉)中の TTX の測定結果

	公定法		LC/MS/MSに よる測定値 ($\mu\text{g/g}$)
	(MU/g)	TTX換算値 ($\mu\text{g/g}$)	
筋肉1	ND	ND	ND
筋肉2	ND	ND	ND
筋肉3	ND	ND	ND
筋肉4	ND	ND	ND
筋肉5	ND	ND	ND
皮1	ND	ND	ND
皮2	30	6.6	3.6
皮3	ND	ND	ND
皮4	ND	ND	ND
皮5	ND	ND	0.6
皮6	ND	ND	0.7
皮7	28	6.2	3.9
皮8	94	20.6	9.4
皮9	342	75.2	69.5
皮10	157	34.5	24.6
皮11	79	17.3	10.2
皮12	405	89.1	93.0
皮13	183	40.3	26.8
皮14	109	24.0	18.0
皮15	383	84.3	66.5
皮16	180	39.6	26.2
皮17	448	98.6	102.0

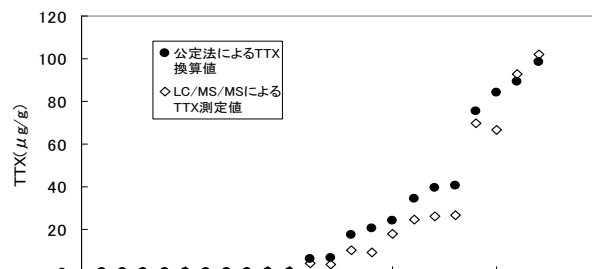


図 1 LC/MS/MS による TTX 測定値と公定法による TTX 換算値の相関

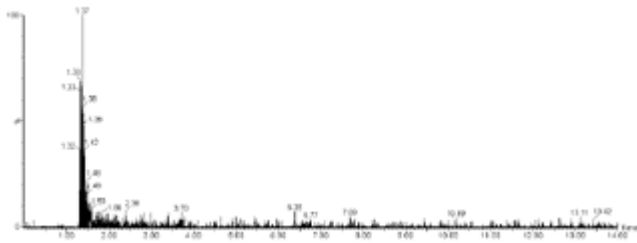


図2 添加回収試験 MRM クロマトグラム
(TTX 標準溶液 2 ng/ml)

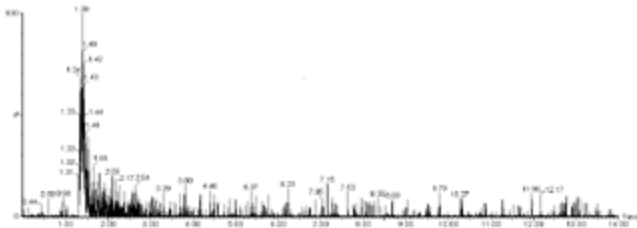


図3 添加回収試験 MRM クロマトグラム
(ナシフグ皮に TTX を 2 μg/g 相当添加し測定したもの)

また、表4に平成23年のフグ毒中毒事例(疑い)の検体を測定した結果を示した。公定法であるマウス単位法及びLC/MS/MSによる測定ともに、TTXは検出されなかった。

表4 フグ毒中毒事例(疑い)における
検体の測定結果

	公定法		LC/MS/MSによる測定値 (μg/g)
	(MU/g)	TTX換算値 (μg/g)	
フグ筋肉	ND	ND	ND
フグ筋肉	ND	ND	ND
フグ筋肉(加熱済み)	ND	ND	ND
フグ筋肉(加熱済み)	ND	ND	ND

IV まとめ

モニタリング検査に用いたナシフグの皮、筋肉及びフグ毒が原因物質と疑われる食中毒事例の検体について、LC/MS/MSを用い、TTXの分析条件の検討を行った。その結果、公定法であるマウス単位法で得られたTTX換算値と、LC/MS/MSによる測定値は相関があると推察され、無毒とされる濃度レベルでも比較的良好な分析結果が得られた。定量限界についても無毒と判断するのに支障がないと考えられた。フグ毒による食中毒発生時に迅速な対応が求められるとき、LC/MS/MSによる化学的分析はスクリーニング法として有用であると考えられる。

文献

- 1) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 理化学編 2005, 661-666, 社団法人日本食品衛生協会
- 2) 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によるテトロドトキシンの分析, 福岡市保健環境研究所報, 32, 98-100 (2006)
- 3) 秦野真澄, 難波江芳子, 東忠英, 岡裕三, 武智拓郎, 小笠原光憲, 大瀬戸光明, 井上博雄：フグ食中毒事例におけるLC/MS/MSによるテトロドトキシンの分析, 愛媛県立衛生環境研究所年報, 10, 14-17 (2007)