

## LC/MS/MSによるテトロドトキシンの分析事例

保健科学部  
立野幸治, 數田行雄, 藤原美智子, 吹屋貞子

### はじめに

ふぐによる食中毒事件発生時に当センターでは、行政部門からの依頼により従前からマウス検定法<sup>1)</sup>により検査を行っているところである。

しかし、ふぐによる食中毒が疑われる事件の調査において食材の残品等が確保しにくい事例等もあることから患者尿などの検査実施への行政部門の要望もあり、近年LC/MS/MS（高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析装置）を使用したテトロドトキシンの分析事例<sup>2), 3)</sup>が報告されていることから、当センターが保有しているLC/MS/MS（API2000）によるテトロドトキシンの分析法を検討し、平成19年1月から平成20年3月に本県で発生したふぐによる食中毒事例4件においてマウス検定法と同時にテトロドトキシンを分析したので報告する。

### 方法等

#### 1. 試料

平成19年1月から平成20年3月に本県で発生したふぐによる食中毒事例4件におけるふぐ組織残品及び患者尿、吐物を用いた。

#### 2. 試薬等

テトロドトキシンの標準品：和光純薬工業(株)製  
標準原液：テトロドトキシンの標準品1mgを水で溶解し10mLとした。

標準溶液：標準原液を0.1%酢酸で適宜希釈して使用した。

C18固相カラム：Waters製Sep-Pak Vac6cc(1g)をあらかじめメタノール10mL、水10mLでコンディショニングしたものを用いた。

HILIC固相カラム：SeQuant製ZIC-HILIC SPE(1g)をあらかじめ水10mL、アセトニトリル10mL及び80%メタノール10mLでコンディショニングしたものを用いた。

水：和光純薬工業(株)製超純水

その他の試薬：すべて特級品あるいはLC/MS用を用いた。

#### 3. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent社製Agilent 1100シリーズ

質量分析装置：Applide Biosystems社製API2000

#### 4. マウス検定法

体重20g前後の雄マウス(ddY系)を使用し、ふぐ組織、吐物においては0.1%酢酸により抽出し、マウス検定により毒力を算出した。

患者尿は、70℃水浴上で減圧濃縮後、酢酸酸性メタノール（メタノール100mLに20mLの酢酸を添加したもの）を5倍量加えて還流冷却器を付け、70℃で30分間加熱し、ろ過して抽出液とした。（2回繰り返し）これを加熱減圧してメタノールを除去し水を加えた後、エーテルで脱脂し、再度加熱減圧してエーテルを除去した。元の患者尿の10~20倍濃度の試験液を作成し、マウス検定により毒力を算出した。

### 5. LC/MS/MSによるテトロドトキシンの分析法

#### (1) 試験溶液の調製

ふぐ組織、患者尿、血液からの試験溶液の調製は赤木ら<sup>2)</sup>の方法に準じた。（図1 検査検体からの試験溶液の調製フロー）

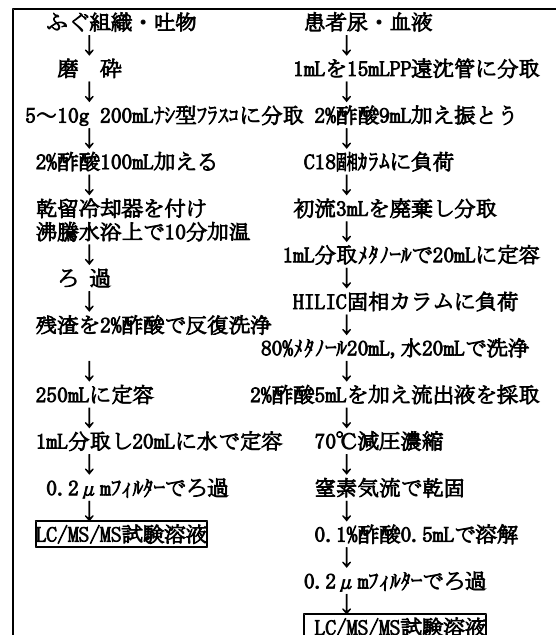


図1 検査検体からの試験溶液の調製フロー

#### (2) LC/MS/MS測定条件

MS/MS条件については、テトロドトキシンの標準溶液 $1\mu\text{g/mL}$ 及び $0.1\mu\text{g/mL}$ を用いてインフージョン及びFIA（フローインジェクションアナリシス）によりMRM測定の最適化を行った。

LC条件については、赤木ら<sup>2)</sup>、秦野ら<sup>3)</sup>を参考にシカラム及び移動相溶媒条件等を検討した。

この結果、MS/MS条件及びLC条件について当センター保有機器で良好なピーク形状が得られた表1の測定条件とした。

表1 LC/MS/MS測定条件

質量分析装置	API2000
ソフトウェア	Analyst 1.41
イオン化法	ESI(+)
イオンスプレー電圧	4,500V
ターボガス温度	500℃
プレカーサーイオン	m/z 320
プロダクトイオン	
m/z	162(定量) (DP 56V CE 49eV)
m/z	302(定性) (DP 51V CE 33eV)
高速液体クロマトグラフ	Agilent 1100シリーズ
HPLCカラム	Atlantis HILIC Silica 2.1mm×150mm
カラム温度	40℃
流速	0.2 ml/min
注入量	10 $\mu\text{L}$
移動相	A液 0.1%酢酸 B液 アセトニトリル
グラジエント条件	
A:B(5:95)→0.1min→A:B(60:40) (Hold20min)	

図2にテトロドトキシン標準溶液10 ng/mL, 1 ng/mL, 健常者尿及びテトロドトキシシンが検出されないことを確認したふぐ肝にLC/MS/MS試験溶液最終濃度がそれぞれ100 ng/mL, 10 µg/gになるようテトロドトキシシンを添加し試験溶液の調製に従い操作して得られた試験溶液を上記条件で測定した典型的なクロマトグラムを示した。

特に顕著な妨害ピーク等は認めなかった。

実試料において、標準溶液に比べm/z 302/m/z 320において、ピークがよりシャープになるイオン化促進傾向が観測され、m/z 162/m/z 320では認められなかったためこれを定量に使用した。

検量線は、絶対検量線を用いた。

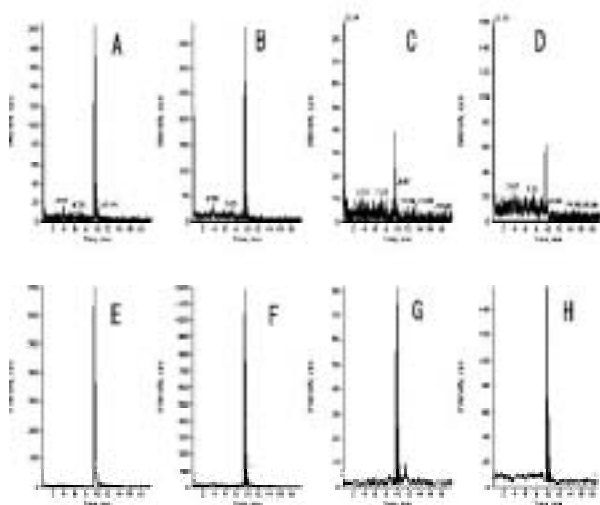


図2 テトロドトキシシンのMRMクロマトグラム

- A:テトロドトキシン標準10 ng/mL (m/z162/m/z320)
- B:テトロドトキシン標準10 ng/mL (m/z302/m/z320)
- C:テトロドトキシン標準1 ng/mL (m/z162/m/z320)
- D:テトロドトキシン標準1 ng/mL (m/z302/m/z320)
- E:健常者尿に100 ng/mL相当添加したもの (m/z162/m/z320)
- F:健常者尿に100 ng/mL相当添加したもの (m/z302/m/z320)
- G:ふぐ肝に10 ng/g相当添加したもの (m/z162/m/z320)
- H:ふぐ肝に10 ng/g相当添加したもの (m/z302/m/z320)

## 結果

表2に平成19年1月から本県で発生したふぐによる4例の食中毒事件<sup>4)</sup>の検体におけるマウス検定法及びLC/MS/MSによるテトロドトキシン分析法による検査結果一覧を示した。

食中毒事例1は、平成19年1月に発生し、飲食店が調理提供したマフグの肝臓等を喫食した5人のうち3人が、手のしびれ、意識障害、嘔吐を主症状とする食中毒に罹患したもので、患者尿3検体及び残品のふぐ皮、骨付着肉の計5検体の搬入を受け、検査を実施したものである。

患者尿については回復期のものであったせいか、マウス検定法では全検体陰性で、LC/MS/MS測定法では1検体からテトロドトキシシンを、0.18 µg/mL検出した以外是不検出であった。

ふぐ皮では、マウス検定法で208MU, LC/MS/MS測定法でテトロドトキシシンを、59.43 µg/g (270.1 MU相当) 検出した。骨付着肉は、マウス検定法陰性、LC/MS/MS測定法不検出であった。

食中毒事例2は、平成19年9月に発生し、自ら釣ったクサブリを自宅で調理し喫食した者が、口唇及び上半身のしびれを主症状とする食中毒に罹患したもので、患者尿、吐物の計2検体の搬入を受け、検査を実施したものである。

マウス検定法ではいずれも陰性で、LC/MS/MS測定法では患者尿からテトロドトキシシンを、0.03 µg/mL (0.1 MU相当) 検出したが、患者吐物是不検出であった。

食中毒事例3は、平成19年12月に発生し、家族が釣ったフグ（種類未定）を自宅で調理し喫食した者が、口唇のしびれを主症状とする食中毒に罹患したもので、患者尿、患者血液の計2検体の搬入を受け、検査を実施したものである。

マウス検定法ではいずれも陰性で、LC/MS/MS測定法においてもいずれも不検出であった。

食中毒事例4は、平成20年3月に発生し、知人から入手したマフグを自宅で調理し喫食した者が、手足、口唇のしびれ、嘔吐を主症状とする食中毒に罹患したもので、ふぐ皮2検体、ふぐ筋肉2検体及び患者尿の計5検体の搬入を受け、検査を実施したものである。

マウス検定法では、ふぐ皮1検体から77.9MU, ふぐ筋肉1検体から26.5MU, 患者尿から0.3MU検出した。

LC/MS/MS測定法では、マウス検定法で77.9MUであったふぐ皮から9.7 µg/g (44MU相当), 陰性であったふぐ皮から0.44 µg/g (2MU相当) 検出した。ふぐ筋肉では、マウス検定法で26.5MUであったふぐ筋肉から2.72 µg/g (12.4MU相当), 陰性であったふぐ筋肉から0.04 µg/g (0.2MU相当) 検出した。患者尿からテトロドトキシシンを、0.14 µg/mL (0.6MU相当) 検出した。

## 考察

赤木ら<sup>2)</sup>, 秦野ら<sup>3)</sup>の方法を参考にLC/MS/MSを使用したMRM測定法によるテトロドトキシン分析法を検討し、4件のふぐ中毒事件の際搬入を受けたふぐ組織、患者尿等についてマウス検定法と同時に検査を実施した。

マウス検定法で陰性となった検体からもLC/MS/MS測定法ではテトロドトキシシンの検出が可能であった。

LC/MS/MS測定法では、検査検体が5検体程度の場合

表2 検査結果一覧

食中毒事例	検体名	マウス検定法結果	LC/MS/MS分析結果	備考
1	患者尿	陰性	0.18 $\mu\text{g/ml}$	0.8MU相当
1	患者尿	陰性	不検出	
1	患者尿	陰性	不検出	
1	ふぐ皮	208MU	59.43 $\mu\text{g/g}$	270.1MU相当
1	骨付着肉	陰性	不検出	
2	患者尿	陰性	0.03 $\mu\text{g/ml}$	0.1MU相当
2	患者吐物	陰性	不検出	
3	患者尿	陰性	不検出	
3	患者血液	未実施	不検出	
4	ふぐ皮	陰性	0.44 $\mu\text{g/g}$	2MU相当
4	ふぐ皮	77.9MU	9.70 $\mu\text{g/g}$	44MU相当
4	ふぐ筋肉	陰性	0.04 $\mu\text{g/g}$	0.2MU相当
4	ふぐ筋肉	26.5MU	2.72 $\mu\text{g/g}$	12.4MU相当
4	患者尿	0.3MU	0.14 $\mu\text{g/ml}$	0.6MU相当

尿、血液の定量限界：0.02  $\mu\text{g/ml}$   
 ふぐ組織等の定量限界：0.01  $\mu\text{g/g}$   
 1MU=テトロドトキシン0.22 $\mu\text{g}$ 相当として換算

合、ふぐ組織、尿等からの試験溶液の調製、標準溶液も含めた試験溶液のLC/MS/MS測定終了まで約4時間であり、早急に結果が求められる食中毒事件での対応において、同程度の時間で実施できるマウス検定法との併行検査により、確実な検査の実施に有用と考えられた。

しかし、マウス検定法の場合、常時指定された条件のマウスを飼育準備しておくことは、人的、金銭的経費を必要とし、負担となっている。

少数例ではあるがふぐ組織については、マウス検定法での毒力と、LC/MS/MS測定法によるテトロドトキシン測定結果から換算した毒力との相関が推定され、今後事例を積み重ねるとともにテトロドトキシン同族体の分析手法の検討を行う必要性が考えられた。

今回の4事例のうち2事例については、原因食材の確保が困難で患者尿等生体試料のみの検査となった。平素の医療機関と調査に当たる行政機関との連携により中毒事件等が疑われる場合、早期の採尿等による検査検体の確保が可能な体制の構築が望まれる。

#### 参考文献

- 1) 厚生労働省監修「食品衛生検査指針・理化学編」日本食品衛生協会，p. 661-666，2005
- 2) 親水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，赤木浩一ほか，(社)日本食品衛生学会第92回学術講演会要旨集，p. 25，2006
- 3) LC/MS/MSによるテトロドトキシンの分析，秦野真澄ほか，第42回全国衛生化学技術協議会年會講演集，p. 134-135，2005
- 4) 山口県食中毒事件録，山口県環境生活部生活衛生課