

LC-MS/MS によるフグ組織中のテトロドトキシン分析法の検討

Study on Analytical Method of Tetrodotoxin in Pufferfish by LC-MS/MS

藤井 良昭 加賀 岳朗 上田友紀子
上野 健一 久保田晶子*¹ 西村 一彦

Yoshiaki FUJII, Takero KAGA, Yukiko UEDA, Ken-ichi UENO
Akiko KUBOTA and Kazuhiko NISHIMURA

Key words : tetrodotoxin (テトロドトキシン) ; pufferfish (フグ) ; LC-MS/MS (高速液体クロマトグラフ質量分析計)

緒 言

フグ摂食による食中毒は、文禄・慶長の役（1592～1598年）の際に河豚食用禁止の令が出されるなど、古くから知られている¹⁾。最近10年間（2010～2019年）でも毎年20件程度の食中毒が発生し、死亡者も報告されるなど²⁾、食品衛生上の重要な問題の一つである。フグ食中毒の主な原因物質はテトロドトキシン（TTX）であり、人の致死量は約1～2 mg、毒量換算で3,000～10,000 マウスユニット（MU）程度と推定されている¹⁾。フグ毒の検査については、食品衛生検査指針³⁾に参考法としてマウス毒性試験法が示されている。この試験法は、毒性を評価する確実な方法であるが、常時早急な対応が可能な検査態勢を確保するにはマウス常備が必要であることに加え、動物実験に伴う倫理上の問題やマウス個体差等に由来する分析精度の問題がある。このため、近年、TTXの分析に高感度かつ高選択性を有するLC-MS/MSを用いた試験法が報告され⁴⁻⁷⁾、マウス毒性試験法との相関性が示される^{5,7)}など、その有用性が報告されている。

今回我々は、早急な対応が要求されるフグ食中毒発生時に適した迅速なTTX検査法の確立を目的として、LC-MS/MSによるフグ組織中のTTX分析法を検討したので報告する。

方 法

1. 試料

札幌市内の小売店で購入したマフグ筋肉（刺身）、トラフグ筋肉及び皮（刺身）を用いた。

2. 試薬及び試液

テトロドトキシン標準品には、Abcam plc製の生化学用Tetrodotoxin citrateを用いた。この標準品1 mgに超純水1 mLを加えて溶解した後、0.1%酢酸溶液を加えて10 mLに定容したものを標準原液（100 µg/mL）とした。

試薬は、富士フィルム和光純薬（株）製LC/MS用のアセトニトリル（以下、ACN）、酢酸、Honeywell製LC/MS用の酢酸アンモニウム（以下、AAt）を用いた。水はオルガノ（株）製PURE LAB flex-UVで精製したもの及び富士フィルム和光純薬（株）製LC/MS用を用いた。ポリエステル綿は手芸用を購入し、使用前に2%酢酸溶液で洗浄してから用いた。

3. 装置及び分析条件

LCはAgilent Technologies製1260 Infinity LC、MS/MSはAgilent Technologies製6495 Triple Quad LC/MSを用いた。LC分析カラムはジーエルサイエンス（株）製Inert-Sustain Amide（3.0 µm、2.1×100 mm）を用いた。カラム温度は40℃、移動相はA液10 mmol/L AAt、B液ACNのグラジエント溶出とし、その条件は40% B液（0 min）－20% B液（5-10 min）－40% B液（13-23 min）とした。流量は0.3 mL/minで、試料注入量は3 µL、イオン化モードはESI（+）、測定モードは多重反応モニタリング（MRM）、測定イオンは定量 m/z 320.2→162.1（コリジョンエネルギー（CE）=44 eV）、定性 m/z 320.2→302.2（CE=24 eV）、60.2（CE=44 eV）とした。

ホモジナイザーはIKA社製ULTRA-TURRAX T 25 basic、S 25 N-18 Gシャフトジェネレータを用いた。

4. 試験溶液の調製

試料2.50 gをPP製50 mL遠沈管に秤取した。2%酢酸溶液15 mLを加えてホモジナイズした後、2%酢酸溶

*¹ 現 北海道空知総合振興局保健環境部保健行政室試験検査課

液 10 mL でホモジナイザーのシャフトを洗浄し、その洗浄液を合わせた。この抽出液を沸騰浴中でときどきかくはんしながら 10 分間加熱した。冷却（水冷）した後、3,300 rpm で 5 分間遠心分離し、上清をろ過した（ポリエステル綿使用）。0.1% 酢酸溶液で残さを反復洗浄し、ろ液を合わせた後、0.1% 酢酸溶液で 50 mL に定容した。4℃、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清 200 μ L を採り、ACN-水-酢酸（75:25:0.1）混液で 10 mL に定容した。この溶液を 4℃、15,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上清を試験溶液とした。

5. 検量線

標準原液（100 μ g/mL）を 0.1% 酢酸溶液で希釈して 10 μ g/mL の標準溶液を調製した。この標準溶液を ACN-水-酢酸（75:25:0.1）混液でさらに希釈し、0.1~4.0 ng/mL の範囲で検量線を作成した。

6. 添加回収試験

マフグ筋肉、トラフグ筋肉及び皮を対象に 2.2 mg/kg（10 MU/g 相当）及び 1.1 mg/kg（5 MU/g 相当）となるように標準溶液を添加して概ね 30 分間静置した後、回収試験を行った（ $n=5$ ）。

結果及び考察

1. 試験溶液の調製方法

1) 抽出溶媒の検討

フグ組織からの TTX 抽出溶媒として、食品衛生検査指針³⁾では 0.1% 酢酸溶液が示されている。しかし、0.1% 酢酸溶液よりも 2% 酢酸溶液で高い回収率が得られたとの報告もある^{6,7)}。そこで、トラフグ筋肉を対象に 0.1 及び 2% 酢酸溶液を抽出溶媒に用いて添加回収試験を行った。その結果、2% 酢酸溶液では抽出液にゲル状物質が多くなり、ろ過速度の低下が認められたが、回収率は 0.1% 酢酸溶液では 71%、2% 酢酸溶液では 82% と、後者の方が高かったことから、2% 酢酸溶液を抽出溶媒に用いることとした。

2) 精製方法の検討

フグ組織からの抽出液の精製として、限外ろ過⁴⁾や固相抽出⁸⁾による精製法などが報告されている。しかし、今回は迅速な分析法を確立するため、限外ろ過フィルターや固相抽出カートリッジを用いず、ACN による除タンパク法を検討した。マフグ筋肉、トラフグ筋肉及び皮の抽出液に TTX 標準溶液を添加し、それぞれ ACN 濃度が 50、60、70、80、90% となるように ACN を加えてかくはんした後、遠心分離することで除タンパクを行い、上清を ACN-水-酢酸（50:50:0.1）混液で 100 倍希釈した溶液を LC-MS/MS で分析し回収率を確認した（図 1）。その結果、ACN を加える前の抽出液は薄く白濁していたが、ACN 濃度を 60% 以上とすることで白色固形物が析出し、抽出液の濁りが減少した。ACN 濃度は高いほど析出量が多くなり、除タンパク効果が認められた。しかし、ACN 濃度 90% では TTX の回収率が大きく低下した。このため、除タンパ

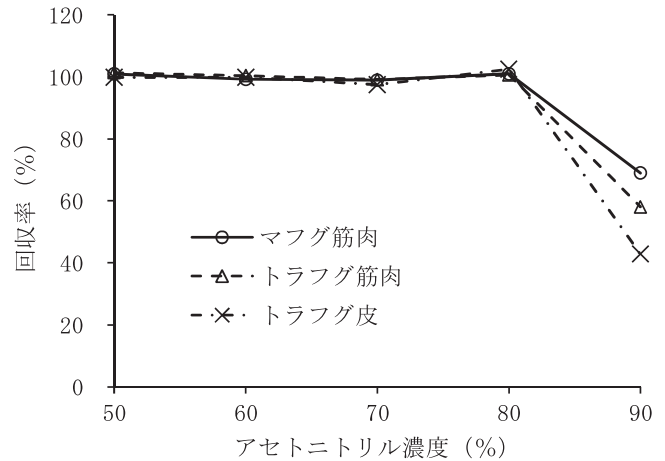


図 1 除タンパク工程におけるアセトニトリル濃度の影響

クの際の ACN 濃度は、除タンパク効果が認められ、かつ回収率の低下が認められなかった 70% 及び 80% の中間濃度 75% とすることとした。なお、TTX の回収率低下は、沈殿物に TTX が吸着または取り込まれたことが原因と考えられ、除タンパク時の ACN 濃度に加えて試料の夾雑物量にも影響を受けることが推察された。そこで、除タンパクを行う際には沈殿物を減らすことが重要と考え、ACN による除タンパクを行う前に抽出液を遠心分離し懸濁性夾雑物を除去することとした。

トラフグ試料の除タンパクした溶液を希釈せず LC-MS/MS 分析を行うと、マトリックス効果によるイオン化抑制が認められた。そこで、除タンパクと合わせて、75% ACN で希釈することによりマトリックス効果の抑制を試みた。TTX の定量下限目標値を、有毒判定の基準となる 10 MU/g の 1/10 濃度である 1 MU/g（0.22 μ g/g）とした場合、定量下限を測定可能な最大希釈量は、分析機器の感度から 50 倍希釈と推定された。マフグ筋肉、トラフグ筋肉及び皮の抽出液に対して、上記条件における試験溶液（マトリックス溶液）のマトリックス効果を検証した。なお、マトリックス効果は、標準溶液を ACN-水-酢酸（75:25:0.1）混液で希釈した場合のピーク面積に対するマトリックス溶液で希釈した場合のピーク面積の割合（面積率）で評価した。その結果、面積率は 99~102% であり、希釈によりマトリックス効果は十分に抑制されることが確認された。また、目標とした定量下限値よりも低い 0.2 μ g/g（0.9 MU/g）で S/N 10 以上を確認できたことから、この値を定量下限値とした。

2. 添加回収試験

マフグ筋肉、トラフグ筋肉及び皮を用いて添加回収試験を実施した結果を表 1 に示した。2.2 mg/kg 添加では真度 88~95%、併行精度は 0.8~3.1%、1.1 mg/kg 添加では真度 82~93%、併行精度 1.3~4.1% と、いずれの試料、濃度でも良好な回収率及び併行精度が得られた。

以上の検討結果より、本試験法は、フグ組織中の TTX を迅速かつ精度良く分析できる方法であり、フグ食中毒発

表1 添加回収試験結果

試料	添加濃度 (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
マフグ筋肉	2.2	88	1.5
	1.1	82	1.3
トラフグ筋肉	2.2	92	3.1
	1.1	84	4.1
トラフグ皮	2.2	95	0.8
	1.1	93	2.7

n=5

生時における早急な原因究明を行うための検査法として有用であると考えられる。

文 献

- 1) 社団法人日本食品衛生協会：食中毒予防必携第3版，社団法人日本食品衛生協会，東京，2013
- 2) 厚生労働省ホームページ：4. 食中毒統計資料，https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html（確認：2020年7月21日）
- 3) 佐藤 繁，児玉正昭：1. フグ毒．食品衛生検査指針理化学編 2015，社団法人日本食品衛生協会，東京，2015，pp.813-820
- 4) 矢野昌弘，上田泰人，田中敏嗣：LC-MS/MSを用いたテトロドトキシン（TTX）の迅速分析と精度管理．神戸市環境保健研究所報，39，48-53（2011）
- 5) 浦山豊弘，肥塚加奈江，赤木正章，北村雅美，大島律子，石井 学：LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討（3）ふぐ毒の機器分析．岡山県環境保健センター年報，37，133-136（2013）
- 6) 赤木浩一，畑野和広：LC/MS/MSによるフグ組織およびヒト血清・尿中のテトロドトキシンの分析．食衛誌，47，46-50（2006）
- 7) 立野幸治，藤原美智子，吹屋貞子，三浦 泉，仙代真知子，國吉香織，片山弘子：LC-MS/MSによるふぐ組織中のテトロドトキシン試験法の検討．山口県環境保健センター所報，53，68-70（2010）
- 8) Jang JH, Lee JS, Yotsu-Yamashita M: LC/MS Analysis of Tetrodotoxin and Its Deoxy Analogs in the Marine Puffer Fish Fugu niphobles from the Southern Coast of Korea, and in the Brackishwater Puffer Fishes Tetraodon nigroviridis and Tetraodon biocellatus from Southeast Asia. Mar. Drugs, 8, 1049-1058（2010）