

フグ食中毒事例におけるLC/MS/MSによるテトロドキシンの分析

秦野真澄 難波江芳子*¹ 東 忠英*² 岡 裕三*³
武智拓郎 小笠原光憲*⁴ 大瀬戸光明*⁵ 井上博雄

Determination of Tetrodotoxin by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry in the Case of Puffer Fish Poisoning

Masumi SHINNO, Yoshiko NABAE*¹, Tadahide HIGASHI*², Yuuzou OKA*³,
Takurou TAKECHI, Mitsunori OGASAWARA*⁴, Mitsuaki OSETO*⁵, Hiroo INOUE

In the case of puffer fish poisoning, Tetrodotoxin (TTX) in patients' urine and puffer fish was determined using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The mass spectral acquisition was performed in the positive mode by applying multiple reaction monitoring (MRM). In LC separation, TTX was able to retain without the aid of an ion pair reagent by using Atlantis™ HILIC Silica column. TTX levels of three cases were 24-240ng/mL in patients' urine, in which a puffer fish liver remained in one case contained TTX of 11.5µg/g. TTX was detected in the patient's urine with the serious symptom, 13 days later of hospitalization.

Keywords : Tetrodotoxin, LC/MS/MS, Puffer Fish

はじめに

テトロドキシン(TTX)は、神経細胞や筋細胞に存在しているナトリウムチャンネルを抑制することで、神経や筋肉を麻痺させる強力な自然毒であり、フグなど多くの生物が保有している。

フグを原因食品とする食中毒事件は、件数は少ないものの死亡率が高く、愛媛県(松山市を含む)では平成10年から平成19年までの10年間で、12件(患者15名、うち死者2名)発生している。

TTXの分析法は、公定法¹⁾としてマウス毒性試験法があるが、マウスの入手及び管理等の問題もあり、迅速な検査の実施は難しい。一方、フグ食中毒事例においては、原因食品の入手が困難な場合もあり、患者尿からのTTX

検出例も報告されている²⁻⁴⁾。

そこで、直接TTXを分析する方法として、高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を使用し、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(HILIC)カラムを用いて、尿中のTTXの迅速分析法を検討し、既報⁵⁾で報告した。

今回、平成17年度から県内で発生したフグ食中毒事例において、同法による分析を実施したので報告する。また、1事例については、患者尿中のTTX分析を継続的に実施したので併せて報告する。

材料と方法

1 試料

フグ食中毒患者の尿、食品残品(コモンフグ肝臓、トラフグ皮)を使用した。

2 試薬等

TTX標準品は和光純薬工業株式会社製生化学用を

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

*1 現八幡浜保健所 *2 現四国中央保健所

*3 現宇和島保健所 *4 現保健福祉部薬務衛生課

*5 元愛媛県立衛生環境研究所

使用した。

標準原液は標準品1mgを精製水に溶解し20mLとした。

標準溶液は適宜80%アセトニトリル水溶液で希釈して使用した。

その他の試薬は、和光純薬工業株式会社製高速液体クロマトグラフ用あるいは試薬特級を使用した。

ODSカートリッジは、Waters社製 Sep-Pak Vac 6cc (500mg) C18カートリッジをあらかじめメタノール5mL及び精製水10mLでコンディショニングして使用した。

グラファイトカーボンカートリッジは、GL Sciences社製グラファイトカーボンパウダー1gをVarian社製 BOND ELUT RESERVOIR (6mL)に充填し、あらかじめ精製水10mLでコンディショニングして使用した。

3 装置

高速液体クロマトグラフはAlliance 2695 (Waters社)を、質量分析計はMicromass Quattro micro API (Waters社)を用いた。

4 測定条件

測定条件を表1に示した。

5 試験溶液の調製

尿からのTTXの抽出は、公定法¹⁾の注解に記載の塩蔵品や乾製品の抽出方法を参考にして行った。

患者尿 0.5mLを、ODSカートリッジの下にグラファイト

表1 測定条件

カラム: Atlantis TM HILIC Silica (Waters社) (2.1mm i.d. × 150mm, 5 μm)
ガードカラム: Atlantis TM HILIC Silica (Waters社) (2.1mm i.d. × 10mm, 5 μm)
移動相: A; 0.1%ギ酸, B; アセトニトリル グラジエント条件: B; 0-0.01min 95-40% 0.01-6min 40%
カラム温度: 40°C
流速: 0.2 mL/min
注入量: 5 μL
イオン化モード: ESI positive
測定モード: MRM
キャピラリー電圧: 0.5kV
コーン電圧: 42V
プレカーサーイオン: m/z 320
コリジョンエネルギー電圧: 38 (24)V
プロダクトイオン: m/z 162 (302)
()は定性用イオン
イオン源温度: 120°C
デゾルベーション温度: 350°C
デゾルベーションガス流量: 600L/hr
コーンガス流量: 50L/hr

カーボンカートリッジを直列に接続した2連カートリッジに負荷した後、精製水 30mLで洗浄した。グラファイトカーボンカートリッジに吸着している成分を20%エタノール含有1%酢酸水溶液 20mLで溶出させた後、減圧乾固し、残留物を80%アセトニトリル水溶液で10mLに定容し、0.45 μm (事例2, 3は0.2 μm)メンブランフィルターでろ過したものをLC/MS/MS測定用試験溶液とした。

食品からのTTXの抽出は、公定法¹⁾の試料の調製を参考にして行った。

食品残品であるコモンフグ肝臓、トラフグ皮をそれぞれはさみで細切したのち、5gをビーカーに入れ、0.1%酢酸溶液 25mLを加え、沸騰浴中でときどき攪拌しながら10分間加熱した。冷却後減圧ろ過し、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。さらに100倍希釈し、0.45 μmメンブランフィルターでろ過したものをLC/MS/MS測定用試験溶液とした。

結果及び考察

1 測定条件、精製方法(尿)の検討

測定条件、精製方法(尿)の検討結果は、既報⁵⁾のとおりである。検量線は、0.5~100ng/mLの範囲で良好な直線性を示し、相関係数は0.999以上であり、尿中のTTXの検出限界は10ng/mLであった。

2 精製方法(食品)の検討

食品中のTTX濃度は、尿中のTTX濃度と比較して高いこと、また迅速な分析が求められるため、抽出した後は希釈のみの簡易な前処理を行い、測定を実施した。試料由来のマトリックス成分によりイオン化が抑制されたり促進されたりすることが懸念されたが、試料を精製した後の残留物に標準溶液を添加し確認したところ、高倍率の希釈であったため、この影響を回避することが可能であった。

食品中のTTXの検出限界は0.5 μg/gであった。この検出限界をマウス単位(MU)に変換すると(変換係数: 0.22 μg/MU)約2.3MU/gとなり、毒力が10MU/g以下の場合には食用に供しても健康を害するおそれがない¹⁾とされているので、フグ食中毒事例においては支障のない検出限界であると思われた。

3 フグ食中毒事例におけるTTXの患者尿分析結果

TTXの患者尿分析結果を表2に示した。

事例1は既報⁵⁾でも報告したが、発症16時間後の尿中濃度は78ng/mL、発症19時間後の尿中濃度は24ng/mLであった。

表2 TTXの患者尿分析結果

	入院期間 (日間)	年齢	性別	尿採取時間 (発症からの時間)	結果 (ng/mL)	症状
事例1	3	50代	男	16	78	唇, 手足指先の しびれ, 吐気
				19	24	
事例2	20	60代	男	24.5	240	四肢のしびれ, 呼吸障害, 意識障害
事例3	3	60代	男	27	79	吐気, 嘔吐, 手足口の麻痺

表3 TTXの食品残品分析結果

	試料	結果 ($\mu\text{g/g}$)
事例1	コモンフグ 肝臓	11.5
	トラフグ 皮	検出せず

事例2は、入院期間が長く症状の重い患者であったが、発症24.5時間後の尿中濃度は240ng/mLであった。

事例3は、発症27時間後の尿中濃度が79ng/mLであった。

尿中濃度はその時の尿量に大きく影響されるが、今回の3事例の場合、症状の重い患者の尿中濃度が最も高濃度であった。

4 フグ食中毒事例におけるTTXの食品残品分析結果

TTXの食品残品分析結果を表3に示した。

食品残品が入手できたのは事例1のみで、他の事例では全て喫食または家族による廃棄の理由により入手することができなかった。このことから、患者尿は検査試料として極めて有用であると考えられる。食品残品のうちコモンフグ肝臓からは11.5 $\mu\text{g/g}$ 、トラフグ皮からは検出されなかった。

図1に標準溶液、フグ食中毒患者の尿及びコモンフグ肝臓のMRMクロマトグラムを示した。

5 フグ食中毒事例における患者尿中TTXの濃度及び排泄量の変化

事例2については、患者、病院、保健所の協力により、患者尿中のTTX分析を継続的に実施することができた。

図2に患者尿中TTXの濃度の変化を示した。

入院13日目の尿からも14 ng/mLのTTXを検出した。

図3に患者尿中TTXの排泄量の変化を示した。

午後と翌日午前のTTX濃度を平均し、朝記録された1日の尿量を掛けて概算のTTXの排泄量を算出した。尿中

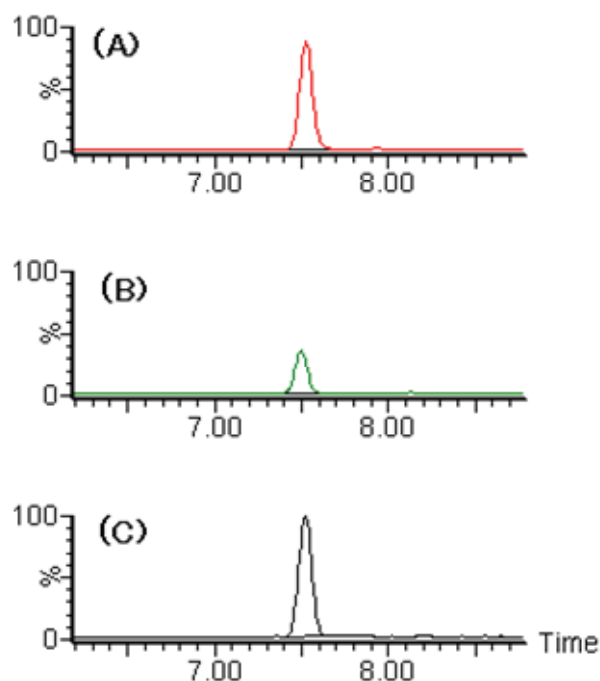


図1 MRMクロマトグラム (m/z 320→162)

- (A) TTX 標準溶液10ng/mL
- (B) フグ食中毒患者の尿(事例1, 発症16時間後)
- (C) コモンフグ肝臓

への排泄は本来なら緩やかなカーブになると思われるが、排泄を促進するために利尿剤を使ったので、その影響で最初に多くのTTXが排泄されたと考えられる。また、発症当日の尿は手に入れることができなかったため、当日の尿中の排泄量は不明であるが、喫食したフグの肝臓(3個)はヒトの最小致死量(約2mg)⁶⁾に近い量のTTXを含んでいたことが推察された。

まとめ

フグ食中毒事例において、LC/MS/MSによりTTXの分析を行った結果、次のことが明らかとなった。

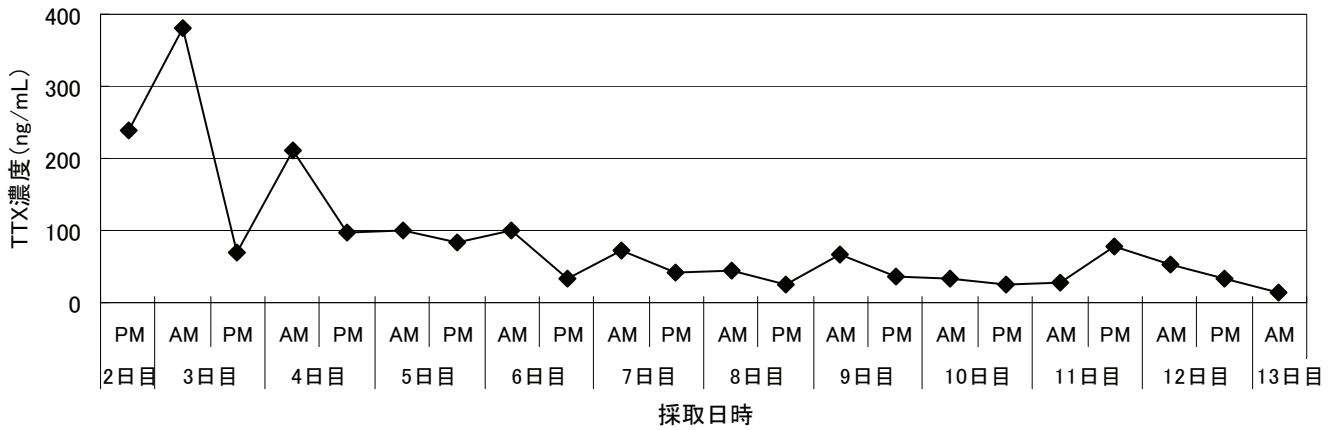


図2 患者尿中TTXの濃度の変化(事例2)

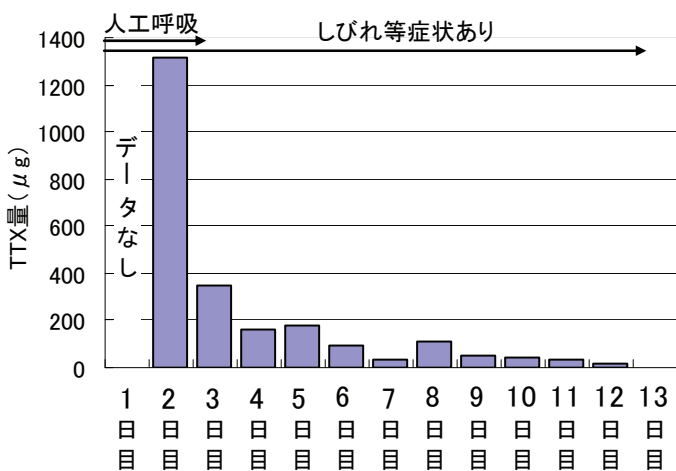


図3 患者尿中TTXの排泄量の変化(事例2)

1 フグ食中毒事例において患者尿中のTTX分析を行った結果、発症16～27時間後の尿中濃度は24～240ng/mLであった。尿中濃度はその時の尿量に大きく影響されるが、今回の3事例の場合、症状の重い患者の尿中濃度が最も高濃度であった。

2 フグ食中毒事例において食品残品が入手できたのは1事例のみであった。このことから、患者尿は検査試料として極めて有用であると考えられる。食品残品のうちコモン

フグ肝臓からは11.5 μg/g、トラフグ皮からは検出されなかった。

3 症状の重い患者(発症翌日の尿中のTTX濃度240ng/mL)の尿中TTX分析を継続的に実施した結果、入院13日目の尿からも14ng/mLのTTXを検出した。午後と翌日午前のTTX濃度を平均し、朝記録された1日の尿量を掛けて概算のTTXの排泄量を算出したところ、喫食したフグの肝臓(3個)はヒトの最小致死量(約2mg)に近い量のTTXを含んでいたことが推察された。

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(2005)
- 2) 石村勝之ほか:広島市衛研年報,15,87-89(1996)
- 3) 高田久美代ほか:広島県保健環境センター研究報告, 9,27-30(2001)
- 4) 赤木浩一ほか:食衛誌,47,46-50(2006)
- 5) 秦野真澄ほか:愛媛県立衛生環境研究所報,8,17-20 (2005)
- 6) 日本薬学会:衛生試験法・注解2005, 278-285, 金原出版株式会社(2005)