

# 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

浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美, 大島律子\*, 石井 学\*\* (衛生化学科),  
\*細菌科, \*\*美作保健所

【調査研究】

## 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

Study for Rapid Analysis Method of Natural Poisons by LC/MS/MS

### (3) Instrumental Analysis of Blowfish Poison

浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美, 大島律子\*, 石井 学\*\* (衛生化学科),  
\*細菌科, \*\*美作保健所

Toyohiro Urayama, Kanae Koeduka, Masaaki Akaki, Masami Kitamura,  
Ritsuko Ohata\*, Manabu Ishii\*\* (Department of Food and Drug Chemical Research),

\*Department of Bacteriology, \*\*Mimasaka Health Center

## 要 旨

食中毒発生時には、原因究明のため早く検査結果を出すことが求められており、毎年発生している自然毒による食中毒に対し、LC/MS/MSを用いた迅速分析法を検討したので報告する。

[キーワード：自然毒、ふぐ毒、テトロドトキシン、LC/MS/MS法]

[Key words : Natural Poisons, Blowfish Poison, Tetrodotoxin, LC/MS/MS]

## 1 はじめに

ふぐの有毒部位の喫食などの動物性自然毒による食中毒は毎年発生している。

ふぐによる食中毒は致死率が高く、迅速な検査が求められている。しかし、食品衛生法に定められているフグ毒の分析法はマウス検定法<sup>1)</sup>であり、当センターではマウスを常備していないため、迅速な対応は困難である。

そこで、今回、マウスを使用せずLC/MS/MSを用いた機器分析による迅速分析法を検討したので報告する。

筋肉、肝、皮を分離し、3体を部位毎に混合したものを使用した。(倉敷市提供試料①とする)

また、倉敷市から提供された倉敷市提供試料①と同種のフグ1体(玉野市沖で採取) (写真4)を筋肉、肝、卵巣に分離して分析した。(倉敷市提供試料②とする)

## 2 実験方法

### 2.1 分析対象物質

ふぐ中毒は、厚生労働省が公表している過去の食中毒発生事件一覧<sup>2)</sup>によると全国で毎年20件程度発生しており、県内でもほぼ毎年発生があり、当センターにおいても度々検査を実施している。

そこで、今回、マウスを使用しないふぐ毒の機器分析法の検討が必要なことから、その主成分であるテトロドトキシンを分析対象項目として選定した。

### 2.2 試料

添加回収試験には、有毒部位を除去して市販されているフグ(ショウサイフグ及びサバフグ)、トラフグの皮(市販品)を選定した。(写真1~3)

濃度測定用の実試料として、倉敷市から提供された食中毒(平成23年11月発生)の検査残品(フグ頭部3体)から



写真1 サバフグ (市販品)



写真2 ショウサイフグ (市販品)



写真3  
トラフグの皮 (市販品)



写真4  
玉野市沖合で採取したヒガンフグ (メス)  
(倉敷市提供試料②) 12cm, 46.77g

## 2.3 試薬等

- 1) テトロドトキシン標準品：Latoxan社製（自然毒共同研究から提供されたもの）、和光純薬製（生化学用）
- 2) 0.45  $\mu\text{m}$ メンブランフィルター：Millex-LH, 0.45  $\mu\text{m}$ , 13mm（Millipore社製）
- 3) 限外ろ過フィルター：Amicon Ultra-4 遠心式フィルターユニット, 10kDa（Millipore社製）

## 2.4 装置及び測定条件

### 1) LC

HPLC：島津製 LC-20A 高圧グラジエントシステム  
カラム：Waters社製 Atlantis HILIC, 3  $\mu\text{m}$ , 2.1mm  $\times$  150mm

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：A液（0.1%ギ酸水溶液）、

B液（アセトニトリル）

グラジエント条件：A/B=5/95（0 min） $\rightarrow$ 60/40  
（0.1-6 min） $\rightarrow$ 85/15（6.1-10min）  
 $\rightarrow$ 5/95（13-18min）

移動相流量：0.2mL/min

試料注入量：5  $\mu\text{L}$

### 2) MS/MS

MS：Applied Biosystems製 API3200 QTrap

インターフェース：Turbo V source

測定法：MS/MSモード

イオン化モード：ESI positive mode

イオン源温度：600 $^{\circ}\text{C}$

イオン化電圧：5500V

測定イオン（precursor ion $>$ product ion）：

（定量）320.1 $>$ 302.1,

（確認）320.1 $>$ 162.3, 320.1 $>$ 284.1

## 2.5 前処理操作

自然毒共同研究<sup>3)</sup>で実施された操作を参考に、次のとおり前処理した。

粉碎した試料10gを100mL栓付ガラス遠沈管に取り、0.1%酢酸25mLを加え3分間ホモジナイズした。なお、皮試料は、試料10gを乳鉢で磨砕し、100mL栓付ガラス遠沈管に移し、0.1%酢酸25mLを加えた。また、倉敷市提供試料①及び②では、試料量が10gに満たなかったため2g以上を許容とした。

沸騰水浴中で、10分間加熱抽出した。冷却後吸引ろ過し（3,000rpmで10分間遠心分離し、上澄みを吸引ろ過した後、固形分を少量の0.1%酢酸で洗い込んで吸引ろ過し、更にろ紙を洗浄するために少量の0.1%酢酸を加えてろ過した）、0.1%酢酸を加えて50mLに定容し、抽出溶液とした。

抽出溶液から200  $\mu\text{L}$ 分取し、0.1%酢酸を加えて5 mLとし、0.45  $\mu\text{m}$ メンブランフィルターでろ過した後、3,500  $\times$ g、5 $^{\circ}\text{C}$ で10分間限外ろ過し、0.20  $\mu\text{m}$ メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

マウス試験は、マウス検定法<sup>4)</sup>により抽出溶液を適宜希釈し、体重20グラムのマウスに腹腔注射して毒力を求めた。

## 2.6 標準液の調製

テトロドトキシン標準品1mgを0.1%酢酸で10mLにメスアップしたものを100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準液とした。

## 2.7 検量線

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準液を0.1%酢酸で順次希釈し、0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500ng/mLの検量線溶液を調製した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 クロマトグラムと検量線

LC/MS/MSクロマトグラムを図1に、検量線を図2に示す。シャープなピークのクロマトグラムが得られ、0.2~500ng/mLの範囲で $r^2=0.9996$ の良好な直線が得られた。

### 3.2 添加回収試験結果

結果を表1に示す。平均回収率はトラフグ皮への添加が66.8%であったが、サバフグ筋肉への添加は76.2%であり、サバフグ筋肉の結果は、厚生労働省の妥当性評価ガイドライン<sup>4)</sup>の値を参考にすると、真度の目標値である70~120%の範囲内であった。

### 3.3 標準品の違いによる定量値の違い

標準品の違いによる定量値の違いを確認するため、2社の標準品を用い、それぞれ検量線溶液を作成し測定した。

W社の標準品で作成した検量線でL社の標準品を定量したところ、W社製と比較してL社の標準品は約25%濃度が低いことが判明した。（表2）

原因として、L社製の方が購入が1年古いこと、L社製はクエン酸フリーなのに対しW社製がクエン酸緩衝剤含有であることが関係していると考えられたが、真の原因は不明であった。

なお、W社の標準品で定量した値がマウス検定法での値とほぼ一致していたことから、以下の結果はW社の標準品で定量した値で考察した。

### 3.4 無害とされる範囲内での検出について

添加用検体として購入した市販のショウサイフグの筋肉から低濃度のテトロドトキシンが検出された。LC/MS/MS法では10.7MU/gとなり、無毒とされる目安である10MU/gを上回ったが、マウス検定法では7.1MU/gであった。現在はマウス検定法を用いて判断するため、当該ふぐは無毒で

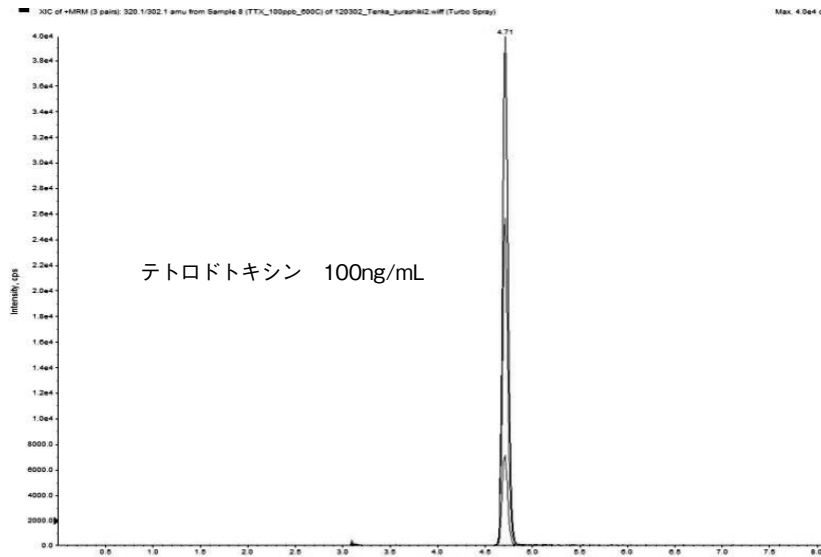


図1 テトロドトキシンのLC/MS/MSクロマトグラム

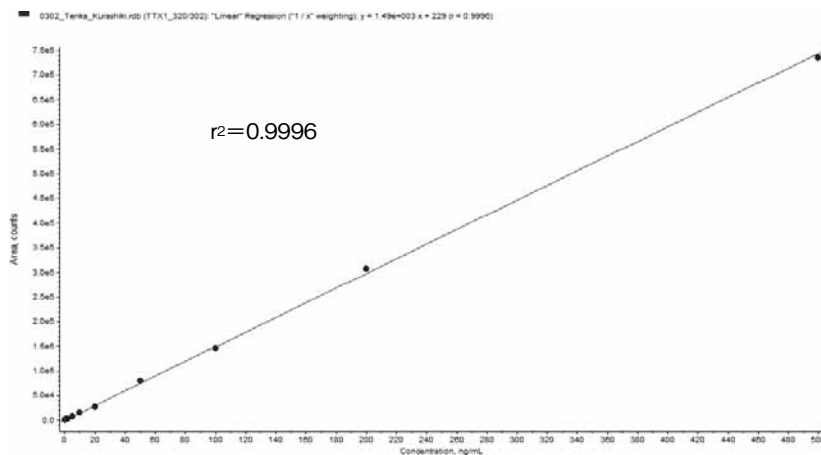


図2 テトロドトキシンの検量線(0.2~500ng/mL)

表1 テトロドトキシンの添加回収試験結果

	平均回収率(%)	相対標準偏差(%)
サバフグ筋肉・添加 (n=2)	76.2	3.2
トラフグ皮・添加 (n=2)	66.8	6.0

標準品添加量：10MU/g=2.2μg/g

表2 標準品の違いによる定量値の違い

	定量値 (ng/mL)		比(L/W)	平均
	L社標準品	W社標準品		
200ppb	153	195	0.78	0.75
100ppb	76.5	103	0.74	
50ppb	39.2	50.8	0.77	
20ppb	14.4	20.7	0.70	
10ppb	7.79	9.76	0.80	
5ppb	3.64	5.18	0.70	

あると判断されたが、添加回収試験のブランク試料としては適切でなかったため、添加回収結果は棄却し、検討に用いなかった。

### 3.5 部位別測定での筋肉からの検出について

部位別測定結果を表3に示す。倉敷市提供試料②では筋肉と肝がほぼ同等の濃度となった。これは、丸体のまま冷凍・解凍を繰り返したことで、有毒部位の毒が筋肉に移行したと考えられた。

### 3.6 マウス検定法との測定値の比較

結果を表3に示す。LC/MS/MS法とマウス検定法の比

は0.979~1.51倍であり、ほぼ同じ値かLC/MS/MS法が高くなる結果であった。

なお、今後検討が進み、無毒とされる目安である10MU/g付近ではLC/MS/MS法の方が高くなるのが統計的に証明されれば、LC/MS/MS法で10MU/g以下であれば、マウス検定法を用いなくても無毒であると判断する活用方法が考えられた。

表3 テトロドトキシンの部位別濃度測定及びLC/MS/MS法とマウス法の濃度比較

		検体量 (g)	定容量 (mL)	抽出液毒力 (MU/mL)		LC/MS/MS /マウス法	検体の毒力(MU/g)	
				LC/MS/MS	マウス法		LC/MS/MS	マウス法
倉敷市 提供① (調理 残渣)	筋肉	5.20	50	1.92	1.75	110%	18.4	16.8
	肝	6.97	50	24.0	23.7	101%	172	170
	皮	10.04	50	9.89	10.1	97.9%	49.2	50.3
倉敷市 提供② (玉野 市沖)	筋肉	6.98	50	7.30	5.92	123%	52.3	42.4
	肝	2.28	50	2.54	2.34	109%	55.7	51.3
	卵巣	2.13	50	16.6	15.3	108%	390	359
ショウサイフグ・筋肉		10.00	50	2.14	1.42	151%	10.7	7.1
サバフグ・添加①		—	50	1.12	<1	—	—	—
標準品1.5MU		—	50	1.50	1.47	102%	—	—

(注) LC/MS/MS法での毒力は、テトロドトキシンの定量値を1MU/g=0.22µg/gで換算した値。

#### 4 まとめ

ふぐ毒テトロドトキシンについて、LC/MS/MSを用いた機器分析により、マウスを使用しない迅速分析を検討し、次のことがわかった。

- 1) テトロドトキシンを高感度かつ迅速に分析でき、筋肉への添加回収試験結果も良好な結果であった。
- 2) マウス検定法との毒力の比較で低濃度の一部の検体を除き、値はほぼ一致していた。
- 3) ふぐ毒の分析では、検体の保存において、検体の個体を丸体のまま冷凍してはいけないという従来の機器分析にはなかった注意が必要であった。

今後も、対象物質の追加、定量性の向上等について研究していく予定である。

#### 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，661-666，2005
- 2) <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 3) 地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立とその精度管理の実施及び疫学機能の強化に関する研究・分担研究健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究，厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業），平成22年度総括・分担研究報告書，47-57，2011
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて，食安発第1115001号，平成19年11月15日，2007