

4)LC/MS/MS及びPCR-RFLP法を用いたフグ中毒原因究明へのアプローチ

福島 孝兵 飛野 敏明

はじめに

自然毒による食中毒は、発生件数こそ毎年全体の1割程度と少ないが、症状が重く死亡率が高いことが特徴として挙げられる。中でも、フグ毒による食中毒では、毎年死亡者が出ている状況である¹⁾。

現在、フグ毒の公定法²⁾はマウス法である。個体差を少なくするため、数日飼育し、体重が19~21gのddY系マウスを使用するようになってきているが、精度が低く、結果が出るまで4~5日要してしまう。さらに、麻痺性貝毒等と区別できない。そのため、高速液体クロマトグラフ蛍光検出法やガスクロマトグラフ質量分析法³⁾等の機器分析法が開発され、近年は液体クロマトグラフ(タンデム型)質量分析(以下、LCMS(MS)と記す)法が報告されている^{4,5)}。

また、フグに起因する食中毒が起きた場合、原因種の特定は、その後の再発防止策をとる上で非常に重要である。フグについては、厚生労働省通知⁶⁾のとおり、食して良い種、部位、漁獲海域が定められている。種の同定は、主に形態学的になされているが、食中毒の場合、切り身や汁等の状態が多いため、形態学的には困難である場合が多い。近年は分子生物学が発達し、種の同定法としても応用され様々な手法が開発されている。石崎らは、ポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型(以下、PCR-RFLPと記す)法により、有毒種であるドクサバフグを含む日本近海産6種のフグ及び沖縄近海産9種のフグの判別に成功している^{7,8)}。食中毒の際、外部形態で判断できるものが残されていない場合、有用な手法となる可能性があり、実際の食中毒で応用された事例もある⁹⁾。

今回、フグによる食中毒が発生した場合、迅速に原因を究明し、より効果的な再発防止策を実施するためLC/MS/MSによるテトロドトキシン(以下、TTXと記す)の分析法及びフグ11種のPCR-RFLP法による判別法を検討したので報告する。

実験方法

LC/MS/MS法

1 試薬

標準品：TTX(和光(株)製)1mgを水10mLに溶かし、適宜0.1%酢酸で調製した。

その他の試薬：特級、HPLC用を用いた。

2 試料

トラフグ

3 装置及び分析条件

1)高速液体クロマトグラフ(以下、HPLCと記す)

HPLC装置:Waters社製 Waters2795

分析カラム:Waters社製 Atlantis HILIC Silica(4.6 × 150, 3 μm), 注入量:20 μL, カラム温度:40 °C, 移動相:A液(水), B液(メタノール), C液(500mM酢酸アンモニウム):イソクラティック(A液:28%, B液:70%, C液:2%)

2)タンデム型質量分析計(以下、MS/MSと記す)

MS/MS装置:Waters社製 Quattro Premier

イオン化法:ESI, 分析モード:MRM(ポジティブ), 定量イオン:320[M+H]⁺>162, 定性イオン:320>302, Capillary電圧:0.5kV, Source Temperature:120 °C, Desolvation Temperature:350 °C, Cone Gass Flow:50 L/h, Desolvation Gass Flow:1000 L/h

4 直線性

標準系列0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100ng/mLを調製し、直線範囲を確認した。

5 特異性

トラフグ肝臓、卵巣抽出液を上記条件で測定し、妨害ピークの有無を確認した。

PCR-RFLP法

1 試料

トラフグ、マフグ、カラスフグ、ヒガンフグ、コモンフグ、ナシフグ、シヨウサイフグ、クサフグ、ゴマフグ、シマフグ、シロサバフグ(以下、トラ、マ、カラス、ヒガン、コモン、ナシ、シヨウサイ、クサ、ゴマ、シマ、シロサバと記す)(種の同定は、日本産魚類検索第2版¹⁰⁾により行った)

2 ミトコンドリアDNA(以下、mtDNAと記す)の抽出

凍結保存した試料筋肉部位数10mgを使い捨てカッターで削り取り、よく細切し試料とした。その試料から、DNeasy Tissue Kit(QIAGEN社製)を用いてDNAを抽出した。操作手順は、添付してある方法に従って実施した。

3 PCR反応

2で抽出した全DNA中のmtDNAを鋳型とし、16S rRNA及びシトクロームb(以下、cyt bと記す)領域のタ

ターゲット部分のPCRを行った。プライマーは、石崎ら⁷⁾に従い、16s rRNA 領域(16Sar L, 16Sbr H), cyt b 領域(L14841, H15149)を使用した。プライマー塩基配列は、表1のとおりである。PCRは、鋳型DNA 2.5 μl, 10 × buffer(TaKaRa) 2.5 μl, 2.5mM dNTP(TaKaRa) 2 μl, 20pmol/μl 各プライマー 0.75 μl, DNAポリメラーゼ(ExTaqHS(TaKaRa))0.125 μl, 滅菌水 16.375 μl, 全量 25 μl の反応系で行った。PCR反応条件は、表2に示す。その後、各領域目的部分がきちんと増幅されていることを確認するため、2%アガロースゲルで電気泳動を行った。電気泳動時のマーカー(以下、Mと記す)は、100 bp DNA Ladder Markerを使用した。

表1.プライマー塩基配列

16s rRNA領域	
5' 3'	CGCCT GTTTA TCAAA AACAT
3' 5'	CCGGT CTGAA CTCAG ATCAC GT
Cyt b領域	
5' 3'	CCATC CAACA TCTCA GCATG ATGAA A
3' 5'	CCCTC AGAAT GATAT TTGTC CTCA

表2.PCR 反応条件

98	10sec
55	30sec
72	60sec
Cycle 35	

4 制限酵素処理

16S rRNA 及び cyt b 領域について、塩基配列が GenBank/EMBL/DDBJ (URL:http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.ht a)に登録されているフグを検索し、登録されているものについて、各領域で検索プログラムによりフグ種間で異なる塩基配列部分を検索した。同時に、登録されている塩基配列をもとに NEBcutter(URL:http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php)で使用できる制限酵素を検索した。両情報から、異なる塩基配列部分に使用できる制限酵素を検索した。使用した制限酵素は、*Hae*, *Mbo*, *Hinf*, *Dde*, *Sml*, *Bfa* (New England Biolabs 社製)である。

PCR産物を各制限酵素の最適温度で、一晚反応を行った。制限酵素反応系内容は、表3のとおりである。反応後、2%アガロースゲルで電気泳動を行い、バンドパターンを確認した。

表3.制限酵素処理反応系内容

PCR産物	5 μl
10 × 反応buffer	2 μl
制限酵素	0.5 μl
水(滅菌水)	12.5 μl
Total	20 μl

結果及び考察

LC/MS/MS法

フグ毒である TTX は、プラスとマイナスの電荷を持

つ両性物質である。そのため、近年の LC/MS(MS)法で用いられる手法は、イオン対や親水クロマトグラフィーを用いたものとなっている。今回、ShodexNN414-2D, TSK-GEL Amide80, SeQuant ZIC-pHILIC, Atlantis HILIC Silica の4種のカラムを比較検討したが、感度が良かった Atlantis HILIC Silica を採用した。

また、0.01~100ng/ml の範囲では、良好な直線性を示し、相関係数は 0.999 以上であった。

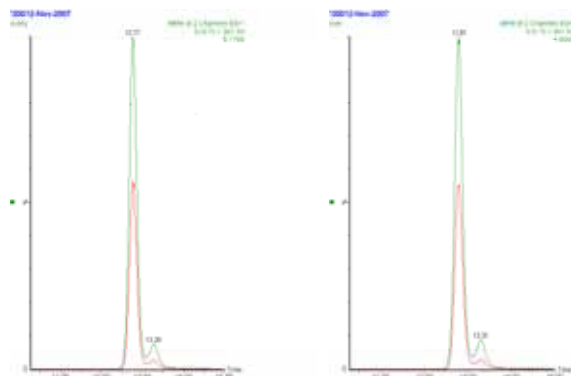


図1.TTXのクロマトグラム(左:トラ卵巣抽出物,右;トラ肝臓抽出物)

実際に、肝臓、卵巣抽出液を上記条件で測定し、妨害なく TTX を検出することができた(図1)。

PCR-RFLP法

PCR反応について、16S rRNA, cyt b 領域共に、目的とする約 610, 360bp のバンドが確認できた(図2, 3)。ただし、16S rRNA 領域のショウサイについては、バンドが確認できなかった。プライマー部分に変異があるためか PCR 反応がうまくいかなかったためか等を含め、再度実験検討を行う必要がある。まず、16S rRNA 領域で使用できる制限酵素を検索し *Bfa*, *Dde*, *Hinf*, *Sml* の適用を試みた。個別に *Bfa*, *Sml* 処理することにより、11種を3種、他2群に判別することができた(図4~6)。だが、16S rRNA 領域は相同性が高いため、これ以上判別することは困難であった。

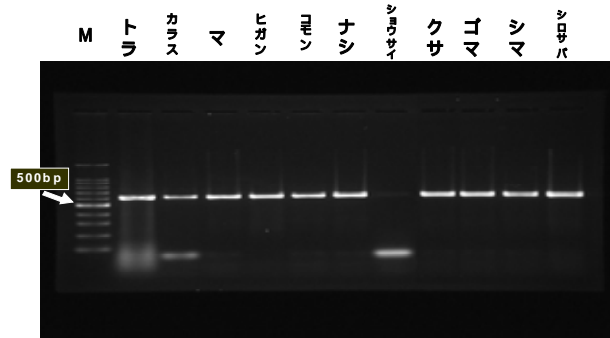


図2.16S rRNA領域PCR反応産物アガロース電気泳動

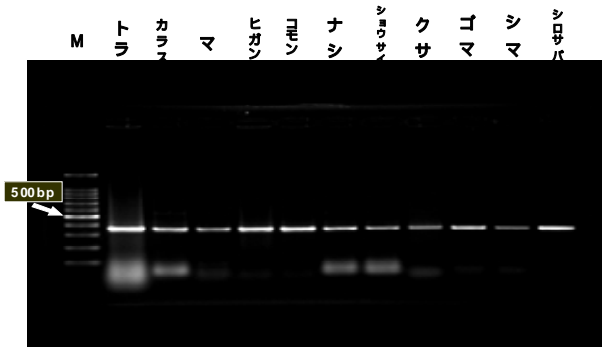


図3. cytb領域PCR反応産物アガロース電気泳動

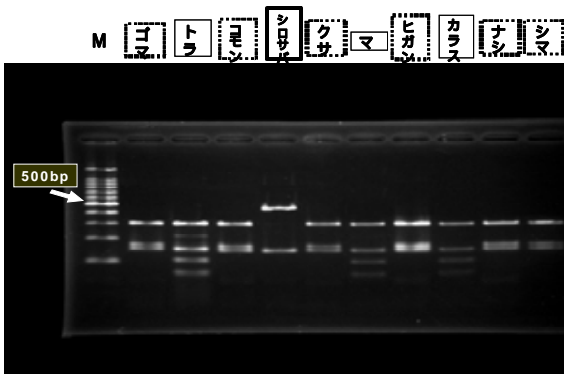


図4. 16S rRNA領域制限酵素(*Bfa*)処理

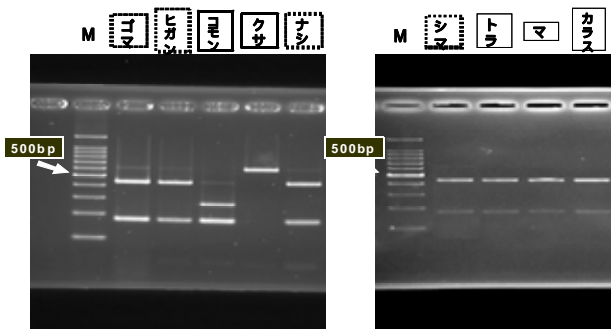


図5. 16S rRNA領域制限酵素(*Sma*)処理

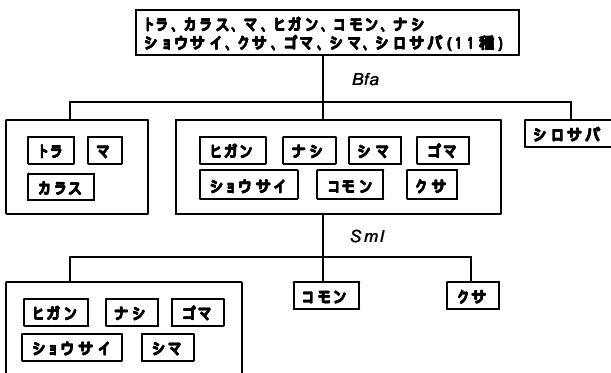


図6. 16S rRNA領域判別フロー

次に, cytb領域で使用できる制限酵素を検索し, *Hae*, *Mbo*, *Hinf* の適用を試みた。3種の制限酵素を個別に処理することにより, 11種を6種, 他2群に判別することができた(図7~10)。他2群中カラスとクサは, 16S rRNA領域で判別することができる。ショウサイとゴマについては, 判別することができなかった。また, トラについては *Mbo* 処理で塩基配列情報から予想されるバンドパターンと違うものが得られた。これは, シマ・ゴマ・ショウサイのDNAのコンタミが考えられる。

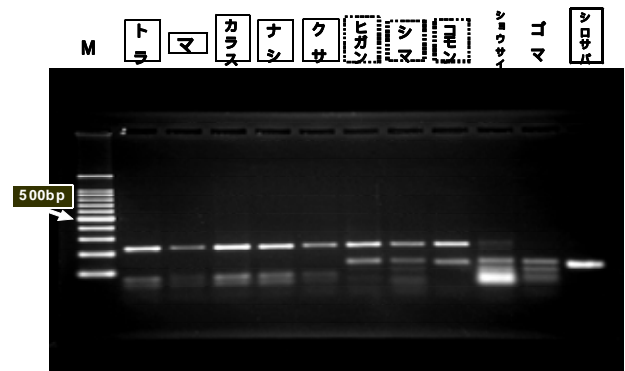


図7. cytb領域制限酵素(*Hae*)処理

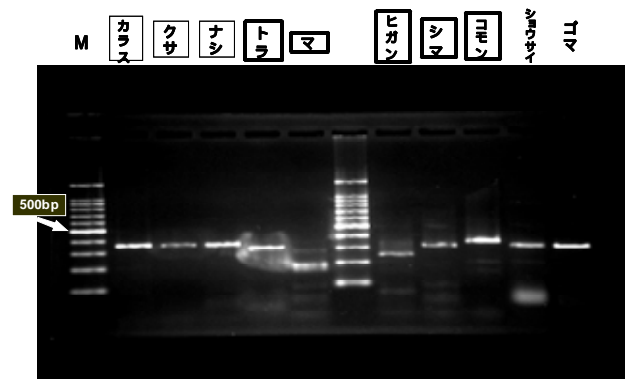


図8. cytb領域制限酵素(*Mbo*)処理

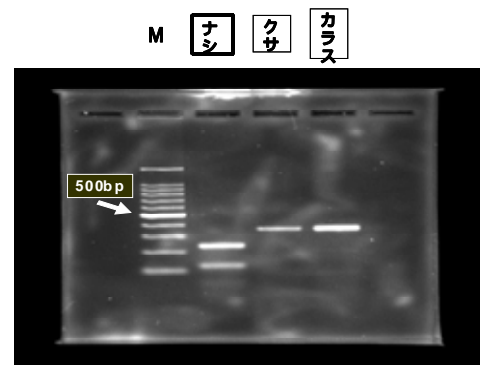


図9. cytb領域制限酵素(*Hinf*)処理

両領域を合わせ、11種中8種はPCR-RFLP法でほかと判別することができた。患者の記憶や少量の残品等の情報とともに種の同定・推定に有力な情報となると考えられる。

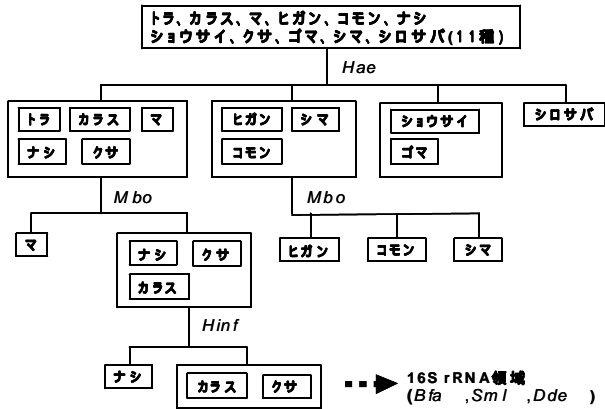


図10. cyt b領域判別フロー

まとめ

分離カラムに Atlantis HILIC Silica を用い、良好な感度を得ることができた。また、定量・定性用イオントレースとともに、トラ卵巣・肝臓抽出物では妨害物質はなく、LC/MS/MS法で測定することができた。

また、mtDNAの16S rRNA及びcyt b領域を標的としたPCR-RFLP法により、11種中8種のフグをほかと判別することができた。

これらの結果から、フグによる食中毒が発生した場合、1~2日でTTXを測定でき、検体が数10mg残存していれば、mtDNAを抽出し種を同定できる可能性がある。これにより、迅速な原因究明、より効果的な再発防止策の実施に寄与できるものと考えられる。

謝辞

PCR-RFLP法の技術研修をしていただいた沖縄県衛生環境研究所の大城直雅氏、フグの試料を提供していただいた本県健康危機管理課の樋口義則氏及び水産研究センターの大塚徹氏、技術指導及び機器等の使用を快諾していただいた当所微生物科学部の八尋俊輔氏始め微生物科学部の方々に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ：食中毒・食品監視関連情報
- 2) 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、2005、p.661-666
- 3) Nagashima, Y. et al: *Anal. Biochem.*, **175**, 258(1988).
- 4) Horie M., Kobayashi S., Shimizu N., Nakazawa H: *Analyst*, **127**, 755-759(2002)
- 5) 赤木浩一・畑野和広:第92回食品衛生学会講演要旨集, p25 A-3(2006)
- 6) 「フグの衛生確保について」(昭和58年12月2日付け環乳第59号厚生省環境衛生局長通知)
- 7) 石崎松一郎, 長島裕二, 寺山誠人, 河野博, 藤田清, 塩見一雄:日本水産学会 講演要旨集, 288(2003)
- 8) Shoichiro Ishizaki, Yasuhiro Yokoyama, Naomasa Oshiro, Natsuko Teruya, Yuji Nagashima, Kazuo Shiomi, Shugo Watabe. *Comparative Biochemistry and Physiology*, PartD1, 139-144(2006)
- 9) 大城直雅, 松田聖子, 盛根信也, 玉那覇康二, 上原隆, 平良健康, 永井宏史, 石崎松一郎:第92回食品衛生学会講演要旨集, p24 A-2(2006)
- 10) 中坊徹次編: "日本産魚類検索 全種の同定 第2版", p1418, (東海大学出版会)