

3) フグによる食中毒事例について

吉元 秀和 飛野 敏明 濱田 寛尚 吉田 達雄 村川 弘

はじめに

平成 18 年から平成 22 年までの 5 年間で、本県において、フグ毒(テトロドトキシン、以下「TTX」という)による食中毒が 3 件、患者が 3 名発生している。平成 14 年には、死亡事故も発生している。全国では過去 5 年間に食中毒事故として 147 件、患者 218 名、死者が 7 名発生しており¹⁾、致死率の高い食中毒である。健康危機発生時においては、事後の適切な対応のためにも、早期の原因物質の特定が望まれる。本県でフグによる食中毒が発生し、吐物及び患者血清が当所に搬入された事例について、当所で行った健康危機管理対応について報告する。

事故の概要

喫食時刻：午後 8 時頃

発症時刻：翌日午前 3 時頃

飲食状況：釣った魚とフグ(種類不明)の卵巣のみを一緒に煮て喫食。

喫食者：2 名

有症者：2 名(喫食者と同じ)

患者 A：足腰が立たず、痺れ有り。嘔吐(3 回)

患者 B：症状有。軽症(詳細不明)。

喫食日翌日午前 3 時 30 分頃、両者共に医療機関を受診。B は当日帰宅し、翌日より就労。A は入院し、2 日後に退院。

当所には、患者受診日翌日、午後 0 時 15 分頃に本県健康危機管理課から 1 報があり、同日午後 1 時 25 分頃、管轄保健所より、A の吐物及び両者の血清(約 2ml)が搬入された。

実験方法

1 検体

患者吐物(A)、患者血清(A,B:共に約 2ml、診療時採取)

2 試薬

標準品：TTX(和光(株)製) 1mg を水 10ml に溶かし、標準原液とした。TTX 類縁体は、東北大学、山下まり教授より分与していただいた標準を元に、2 次標準を作成して使用した。

その他の試薬：特級、HPLC 用を用いた。

3 装置及び分析条件

1) 高速液体クロマトグラフ(HPLC)

HPLC 装置：Waters 社製 Waters2795

分析カラム：東ソー株式会社製 TSKgel Amide-80(2.0 × 150mm, 5µm)、注入量：5µl、カラム温度：25℃、移動相：水：アセトニトリル：500mM ギ酸アンモニウム(pH5.5)=29:70:1 のイソクラティック

2) タンデム型質量分析計(MS/MS)

MS/MS 装置：Waters 社製 Quattro Premier

イオン化法：ESI(ポジティブ)、分析モード：MRM

TTX 定量イオン：[TTX:320 (TTX 分子量)+H>162]

TTX 定性イオン：[TTX:320 (TTX 分子量)+H>302]

併せて、当所にて確認可能な TTX 類縁体についても、既報²⁾及び山下³⁾、Syoji ら⁴⁾、Nakagawa ら⁵⁾の方法を参考に、各 TTX 類縁体のプロトン付加体(M+H)をプレカーサーイオンに、共通するフラグメントイオンである m/z:162 をプロダクトイオンに設定した表 1 の条件にて確認を行った。

表 1 TTX 類縁体確認イオン及び予想保持時間

| TTX類縁体 | 検出イオン | 予想保持時間(min) | 相対保持時間 |
|--------------------|---------|-------------|--------|
| 5,6,11-trideoxyTTX | 272>162 | 5.6 | 0.34 |
| dideoxyTTX | 288>162 | 7.0 | 0.43 |
| 5-deoxyTTX | 304>162 | 10.3 | 0.63 |
| 11-deoxyTTX | 304>162 | 11.0 | 0.67 |
| 4,9-anhydroTTX | 302>162 | 11.4 | 0.70 |
| 11-norTTX-6(S)-ol | 290>162 | 12.8 | 0.79 |
| tetorodonic acid | 320>162 | 13.4 | 0.82 |
| 4-epiTTX | 320>162 | 14.5 | 0.89 |
| 11-norTTX-6(R)-ol | 290>162 | 16.6 | 1.02 |
| 6-epiTTX | 320>162 | 17.8 | 1.09 |
| 11-oxoTTX | 336>162 | 22.0 | 1.35 |

予想保持時間は、TTX を 16.3min とした場合。

相対保持時間は、TTX を 1 とした場合。

4 試験溶液の調製

吐物について、抽出操作は公定法⁶⁾に準拠し、図 1 の分析フローに従い操作を行った。血清については、図 2 の分析フローに従い操作を行った。



図1 吐物分析フロー



図2 血清分析フロー

5 添加回収試験

吐物については, TTX が含まれていないマトリックスを入手できなかったため, 分取した吐物検体 10g に, 250ng/ml の TTX を 1ml 添加し, 回収試験を行った。血清については, 健常者の血清を用いて試料中濃度が 0.2ng/ml となるよう TTX を添加し, 試験に供した。

6 検量線

標準原液を 0.1%酢酸で希釈し 0.02, 0.1, 0.5, 1, 5, 10ng/ml の 6 点調製し, 絶対検量線法にて行った。

結果及び考察

1 TTX の定量及び定性

医療機関からフグ毒中毒の疑いがあるとの届出があったことから, TTX を中毒原因物質と推定し, 分析を行った。A の吐物の固形部分及び液体部分から, それぞれ 130.75, 218.10ng/g, 医療機関での診療時に採取された A, B 両者の血清から, それぞれ 2.70, 0.26 ng/ml の TTX が検出された。検量線は, 0.02 ~ 10ng/ml の範囲において良好な直線性を示し, R^2 は 0.999 以上であった。吐物固形, 液体及び血清について添加回収試験を行ったところ, それぞれ 93.4, 103.2 及び 90.5% であり良好な結果が得られた。吐物・血清からの TTX 検出の報告は少ないが, 過去の報告では, 吐物が 1.04 ~ 16.2 μ g/g ($n=4$)⁷⁻⁹⁾, 血清が 0.82 ~ 26.4ng/ml ($n=14$)^{2), 10-12)} とある。この中には, 発症者の喫食 10 時間後における血清中の TTX 濃度が 4.5nM (1.4ng/ml) であったとの報告¹²⁾もあり, A の診療時に採取した血清 (喫食 7.5 ~ 8 時間後) の TTX 濃度 (2.70ng/ml) が, 十分に発症する濃度であることが確認できた。

今回, TTX 標準品, 患者吐物抽出液, 患者血清の MRM クロマトグラムが一致していること (図 3) TTX 標準品及び吐物抽出液の m/z : 320 をプレカーサーイオンとする各 CE におけるプロダクトイオンが一致していること (図 4) 患者吐物において TTX 類縁体のうち, 溶液中で TTX と平衡状態にある 4-epiTTX 及び 4,9-anhydroTTX¹³⁾ と推定されるピークが見られ, TTX に対する相対保持時間が表 1 と一致したこと (図 5) から, フグ毒中毒であると判断した。なお, 図 3 ~ 5 について, 吐物固形と液体とは同等の結果を示したので, 吐物液体のみのデータを掲載している。

2 TTX 類縁体の確認

TTX 類縁体は, プロダクトイオンスキャンによる確認はできなかったが, MRM モニタイオンでは, 4-epiTTX, 4,9-anhydroTTX とともに 2 次標準と保持時間が一致したことから, 両方とも検出を確認した。

Nakamura ら¹⁴⁾ の報告を元に考えると, TTX に対する 4-epiTTX, 4,9-anhydroTTX の比毒力はそれぞれ 0.156 及び 0.020 であり, 4,9-anhydroTTX については, 比毒力が 0.002 との報告¹⁵⁾ もある。吐物 (液体) について今回得られた TTX に対するクロマトグラムの面積比は 4-epiTTX は 6.3%, 4,9-anhydroTTX は 8.0% と低く, また, 同一濃度におけるそれぞれのクロマトグラムの面積比は, TTX : 4-epiTTX : 4,9-anhydroTTX = 10 : 3 : 4 であった。これらを元に推定すると, TTX の毒力に対する 4-epiTTX 及び 4,9-anhydroTTX の毒力は

それぞれ 3.2%, 0.04~0.4% であり, TTX からみたこれら類縁体の影響は無視できるものと考えられた。吐物

(固形) も同様の結果であった。なお, 他の類縁体は検出されなかった。

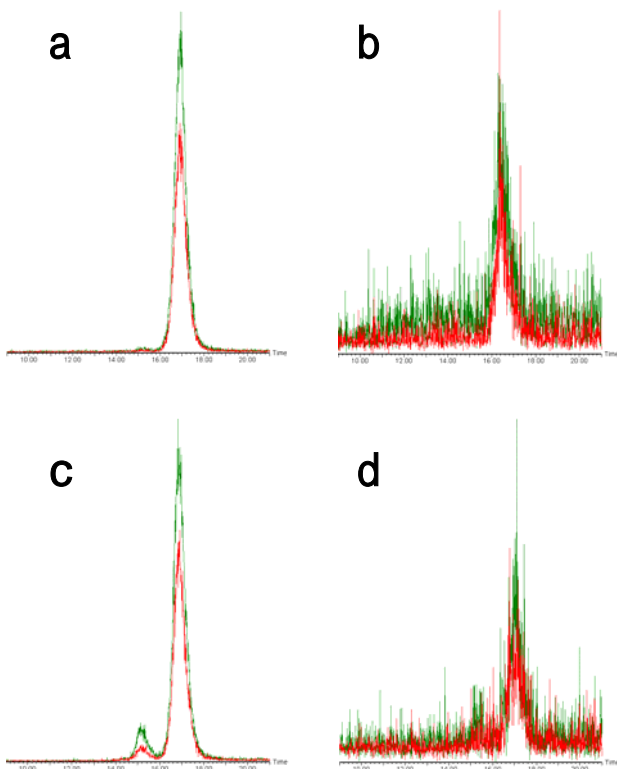


図3 MRM クロマトグラム (a: TTX 標準品 5ng/m, b: TTX 標準品 0.1ng/m, c: 患者吐物 (液体), d: 患者血清)

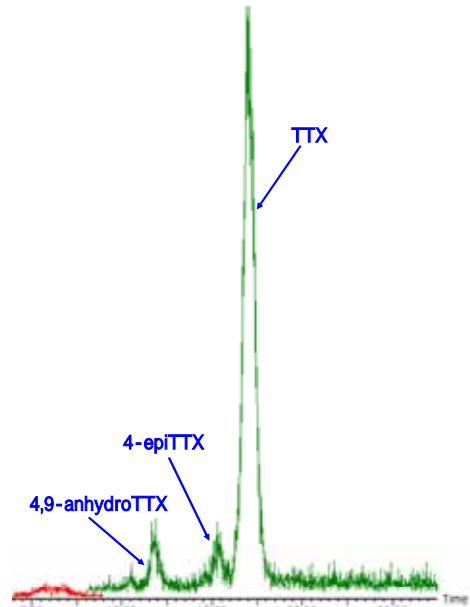


図5 吐物 (液体) 抽出液のトータルイオンクロマトグラム ([TTX 及び各 TTX 類縁体分子量+H⁺] >162)

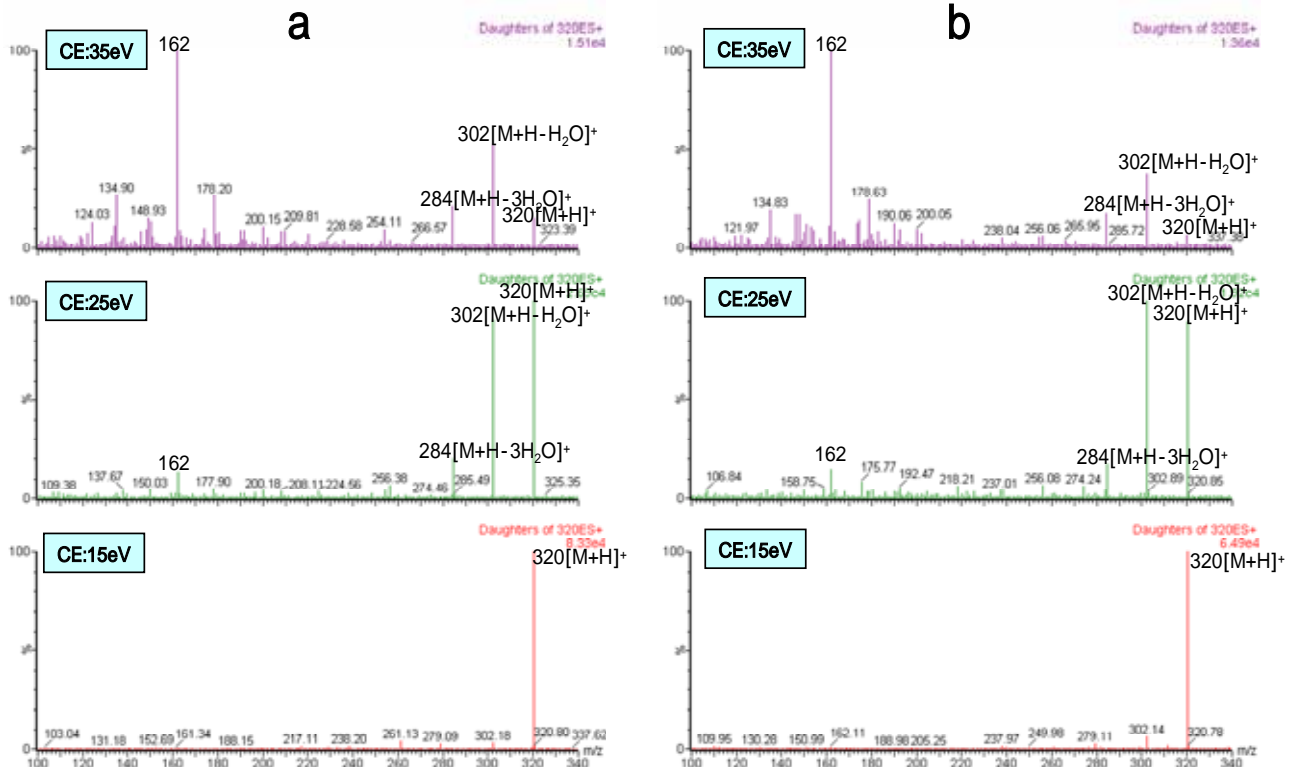


図4 m/z:320 をプレカーサーイオンとする各 CE におけるプロダクトイオン (a: TTX 標準品 5ng/m, b: 患者吐物 (液体))

3 試料希釈によるマトリックスの影響

今回、マトリックスによるイオン化への影響を少なくするため、吐物、血清共に、採取した試料を最終的に50倍希釈したものを試験溶液として用いた。そこで、希釈率によるイオン化への影響を確認するため、図1,2の分析フローに準拠し操作を行い、希釈率の違いによるマトリックスの影響を確認した。吐物については5~100倍に、血清については10~100倍に段階的に希釈した試験溶液を用いた。各試験溶液について、【(TTXのクロマトグラム面積値)×(希釈倍率)】で補正值を求めた。50倍に希釈した試験溶液の計算結果で各々の結果値を除し、比較した。その結果を図6に示す。

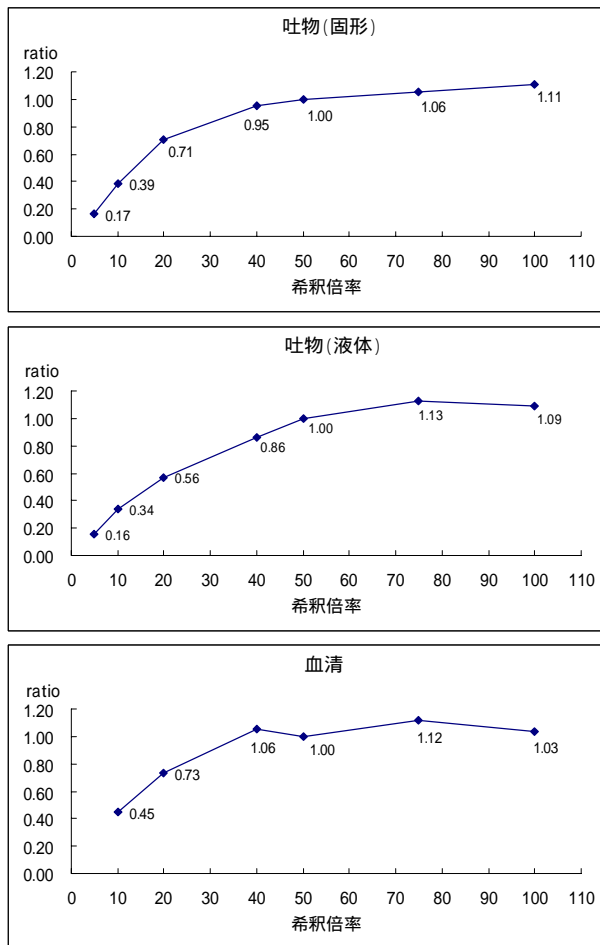


図6 希釈倍率によるマトリックスの影響

補正值が低いほど、マトリックスによる影響が大きいと考えられる。図6の結果及び添加回収試験結果から、迅速な対応が求められる際、吐物、血清共に50倍以上希釈すればマトリックスの影響を十分小さくできると考えられ、今事例での希釈倍率(50倍)は非常に妥当なものであったことが確認できた。

まとめ

Aの吐物の固形部分及び液体部分からそれぞれ130.75, 218.10ng/g、診療時に採取したA, B両者の血清から、それぞれ2.70, 0.26ng/mlのTTXが検出された。さらに、TTX類縁体のうち、溶液中においてTTXと平衡状態にある4-epiTTX及び4,9-anhydroTTXが確認でき、TTX検出を再確認する結果となった。

今回の事例においては、試験担当者間で分析試料の前処理班と分析機器の調整及び測定班を分担し、検体搬入当日午後8時20分にTTX検出確認の速報を出し、翌日午前9時には、定量結果を報告できた。迅速な対応ができたと考えられる。今後とも、食中毒例の多い原因物質から、分析法を整え、健康危機発生時に活かす必要があると考えられる。

文献

- 1) 厚生労働省ホームページ
(<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#4-3>)
- 2) 福島孝兵, 村川弘, 吉田達雄, 吉元秀和, 飛野敏明: 熊本県保健環境科学研究所報, 38, 33-39 (2008)
- 3) 山下まり: バイオサイエンスとインダストリー, 66 (11), 624-626 (2008).
- 4) Shoji Y, Yotsu-Yamashita M, Miyazawa T, Yasumoto T: *Anal. Biochem.*, 290, 10-17 (2001).
- 5) Nakagawa T, Jang J, Yotsu-Yamashita M: *Anal. Biochem.*, 352, 142-144 (2006).
- 6) 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)
- 7) 森岡浩文, 山本雄三, 黒木泰至, 田中重雄: 宮崎県衛生環境研究所年報, 17, 58-61 (2005).
- 8) 森崎澄江, 溝腰利男, 山下秀門: 大分県衛生環境研究センター年報, 36, 39-42 (2008).
- 9) 福岡県保健環境研究所年報, 35, 16 (2007).
- 10) Akaki K, Hatano K: *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.*, 47(2), 46-50 (2006).
- 11) Rodriguez P, Alfonso A, Vale C, Alfonso C, Vale P, Tellez A, Botana LM: *Anal. Chem.*, 80, 5622-5629 (2008).
- 12) Ysai YH, Hwang DF, Cheng CA, Hwang CC, Deng JF: *Journal of Chromatography B*, 832, 75-80 (2006)
- 13) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, 294-301 (2010).
- 14) Nakamura M, Yasumoto T: *Toxicol.*, 23(2), 271-276 (1984).
- 15) 松居隆, 大塚幸, 酒井浄: *YAKUGAKU ZASSHI*, 120(10), 825-837 (2000)