

2) LC-MS/MS による血清中テトロドトキシン分析法の検討

島 絵里子 田村香菜 門田健太郎 青木 愛 今辻麻美

要 旨

フグによる食中毒は、他の食中毒に比べ致死率が高く、迅速で的確な検査が求められる。しかし、従来の分析法であるマウス検定法¹⁾は、マウス管理の煩雑さや動物愛護の観点に課題があり、高感度かつ迅速な機器分析法の検討が各地で進められている^{2~6)}。食中毒発生時には、原因究明のために食品残品だけでなく、血清等の生体試料の分析も必要となる。当所では、既に LC-MS/MS による食品中のテトロドトキシン分析法について報告しており⁷⁾、今回、新たに血清中の分析法を構築したので報告する。

キーワード : LC-MS/MS, テトロドトキシン, 血清, フグ毒, 食中毒

はじめに

フグによる食中毒は、食後 20 分から 3 時間程度の短時間で現れるとされ⁸⁾、重症の場合は呼吸困難を起こし、他の食中毒に比べ致死率（患者数のうちの死亡者数の割合）が高いことが特徴である。そのため、迅速かつ的確な検査体制の構築が求められている。しかし、食品衛生検査指針に示されているフグ毒（テトロドトキシン）の分析法はマウス検定法¹⁾であり、マウス管理の煩雑さや動物愛護の観点に加え、高感度や迅速化の面からも、機器分析法の導入が各地でなされている^{2~6)}。

当所では、LC-MS/MS の機種変更に伴い、令和 5 年度所報において、マウスを使用しない LC-MS/MS を用いた食品中のテトロドトキシン分析法を報告した⁷⁾。一方で、実際の食中毒発生時には、食品残品が得られない場合や原因究明の精度向上のため、血清等の生体試料を分析する必要が生じる。そこで、本研究では、血清中のテトロドトキシン分析法について新たに検討を行った。

分析方法

1. 試薬等

1.1 標準品

テトロドトキシン（生化学用）は富士フィルム和光純薬（株）製を用いた。

1.2 その他試薬等

酢酸（試薬特級）、アセトニトリル（HPLC 用）、ギ酸（LC/MS 用）は富士フィルム和光純薬（株）製を用いた。

1.3 標準溶液等の調製

標準原液は、標準品 1 mg を水で 10 mL に定容し、100 µg/mL とした。添加回収試験用標準溶液は、標準原液を水

で適宜希釈した。検量線用標準溶液は、0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 及び 10 ng/mL となるよう標準原液を 0.1%酢酸で適宜希釈した。

2. 添加回収試験

フグによる食中毒患者の血清中テトロドトキシン濃度の報告^{9~11)}を参考に、健康な人の血清に 10 ng/mL となるよう添加回収試験用標準溶液を添加し、30 分放置したものを試料とした。試料に 0.1%酢酸を加えて 40 倍希釈し、ボルテックスミキサーで十分に攪拌して限外ろ過を行った。限外ろ過は報告^{4, 12)}を参考に Amicon Ultra-4 10kDa（Merk 社製）を用いた。ろ液を 0.2 µm のシリンジフィルター（Agilent Technologies 社、水系/非水系（兼用））に通し、試験溶液とした。試験は 5 併行で実施した。

3. 装置

Waters 社製の LC-MS/MS 装置にて分析を行った。

LC: ACQUITY UPLC H-Class Plus

MS/MS : Xevo TQ-XS

結果及び考察

1. 分析条件の検討

1.1 測定イオン等

既報⁷⁾のとおり測定した。条件を表 1 に示す。

1.2 カラム

既報⁷⁾と同様に HILICpak VC-50 2D 用いて検討を行った。

なお、当該カラムを血清分析に連続使用すると、徐々にピークがブロードしていき、カラムへの汚れの付着が疑われた。そのため、0.5%アンモニア水/アセトニトリル (9:1)

で 75 分洗浄を行ったところ、ピーク形状が改善し、当該洗浄方法は有効であることが確認された。

1.3 移動相

既報⁷⁾のとおり、まず A 液 0.1%ギ酸、B 液アセトニトリルの比率を 60 : 40 としてアイソクラティック分析を行ったが、血清中テトロドトキシンのピークはブロードであった。ピーク形状の改善を目的として、A 液のギ酸濃度について検討した。装置への負荷を考慮し、ギ酸を 0.1~0.5% の範囲で変更したところ、ギ酸濃度が高いほど良好な形状が得られ、0.5%ギ酸で最も良好なピークが得られた。

次に、この条件を用いて A : B の比率を 70 : 30 に変更したところ、ピーク形状はさらにシャープになったが、溶出時間が早まり、テトロドトキシンの前に夾雑物のピークが出現し、定量が困難となった。以上の結果から、A 液を 0.5%ギ酸、B 液をアセトニトリルとし、A : B の比率を 60 : 40 とする条件を採用した。

決定した LC-MS/MS の条件を表 2 に示す。

1.4 遠心条件

当部では検討開始当初、高速遠心機を保有していなかったため、3,500 rpm・10 分間で限外ろ過の検討を行った。しかし、この条件ではろ液の回収率が不十分であったため、遠心時間を 10 分ずつ延長したところ、40 分間の遠心でろ液を 80%以上回収することができた。一方、添加したテトロドトキシンの回収率は 60%程度と低く、限外ろ過では可能な限り全量のろ液を回収する必要があると考えられた。なお、40 分以上遠心してもろ液量に大きな変化は認められなかった。

その後、高速遠心機を導入し、7,500 G・20 分間で遠心を行ったところ、ほぼすべてのろ液を回収できた。そこで、これ以降の操作はこの条件で実施することとした。

1.5 試料の希釈

マトリックスの影響により、限外ろ過によるろ液量の低下や分析時の溶出時間の若干の遅延が見られたため、試料を限外ろ過する前の希釈溶液及び希釈倍率について検討した。希釈溶液については、0.1%及び 2%酢酸を用いて比較したが、酢酸濃度によるピーク形状や回収率への影響はほとんど認められなかった。そのため、既報⁷⁾と同様に 0.1%酢酸を用いることにした。希釈倍率については、0.1%酢酸で 10、20 及び 40 倍に希釈したものを分析し、比較した。その結果、10 倍希釈ではテトロドトキシンのピークの前に夾雑ピークが出現して定量が困難となった。20 倍以上の希釈では夾雑ピークの影響をほとんど受けなかったが、ベースライン改善及びマトリックスの影響を低減させるために、40 倍希釈することとし、S/N 比 10 以上の十分な感度のピークを得られた。

1.6 試験溶液

試料溶液の組成については、移動相の組成に近づけた方がピーク形状が改善されるとの報告¹³⁾から、既報⁷⁾では、試験溶液及び検量線用標準溶液を水:アセトニトリル (1 : 1) で希釈して調製していた。しかし、血清試料については、1.3 で述べたように移動相中のギ酸濃度を高めた条件を用いたため、試験溶液にアセトニトリルを含めると、カラム保持に影響が生じ、標準溶液に比べて溶出時間が遅くなった。そこで、最終溶液にはアセトニトリルを加えず、0.1%酢酸のみで希釈したところ、このような溶出遅延は認められなかった。そのため、試験溶液の調製には 0.1%酢酸を用いることとした。なお、検量線用標準溶液についても、同様に 0.1%酢酸で希釈して調製した。

決定した分析フローを図 1 に示す。

1.7 注入量

2~10 μ L の範囲で注入量を検討したところ、注入量を 5 μ L 以上にした場合、これより少ない注入量と比べてピーク形状に大きな違いはなかったが、試験溶液の溶出時間が標準溶液よりも若干遅れた。そこで、注入量は 5 μ L 未満とし、S/N 比 10 以上の十分な感度が得られたことから、マトリックスの影響を低減させるため、注入量を 3 μ L とした。

決定した LC-MS/MS の測定条件を表 2 に示す。

2. 検量線

マトリックスによるイオン化阻害等の影響を確認するために、マトリックスとなる血清を試験溶液と同様に調製し、このマトリックスを添加したテトロドトキシシ 10 ng/mL 標準溶液と添加していない 10 ng/mL 標準溶液を測定した。その結果、マトリックス添加標準溶液において顕著なイオン化阻害等は認められなかったため、絶対検量線法を用いた。検量線を図 2 に示した。

検量線は 0.05~10 ng/mL の範囲において良好な直線性を示し、決定係数 0.9999 以上であった。

3. 添加回収試験

試料中濃度 10 ng/mL となるよう血清にテトロドトキシシ標準溶液を添加し、添加回収試験を 5 併行で実施したところ、平均回収率は 101.1%、標準偏差 0.007、併行精度 2.6 RSD%であった。

添加回収試験におけるテトロドトキシシ標準溶液及び試験溶液のクロマトグラムを図 3 に示す。なお、試験溶液中のテトロドトキシシのピークは、S/N 比が 10 以上あり、十分な感度が得られた。

表1 測定イオン等

Ch	Compound name	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (eV)
1	Tetrodotoxin	320.01	162.02	62	36
2	Tetrodotoxin	320.01	301.65	62	22

表2 LC-MS/MS 測定条件

LC	ACQUITY UPLC H-Class Plus (Waters社製)
Analytical Column	HILICpak VC-50 2D (2.0 mm i.d.×150 mm, 5 μm, Shodex)
Temperature	40°C
Mobile Phase	(A) 0.5%HCOOH aq: (B) CH ₃ CN=60 : 40
Flow Rate	0.2 mL/min
Injection Volume	3 μL
MS/MS	Xevo TQ-XS (Waters社製)
Ionization	ESI(positive)
Analysis Mode	MRM
Capillary Voltage	0.5 kV
Source Temperature	150°C
Desolvation Temperature	400°C
Cone Gas Flow	150 L/hr
Desolvation Gas Flow	800 L/hr



図1 分析フロー

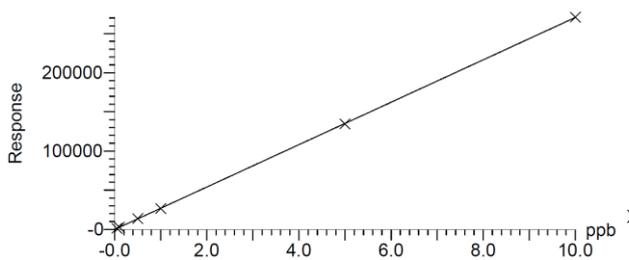


図2 検量線

まとめ

今回、フグ毒テトロドトキシンによる食中毒発生を想定して、血清中のテトロドトキシン分析条件を検討し、新たな分析条件を確立した。既報⁷⁾と同じカラムを使用し、同一条件から検討を開始したが、血清はフグ筋肉に比べてマトリックスの影響が大きく、移動相条件、希釈倍率、試験溶液の組成等複数の要因について再検討が必要であった。

確立した条件を用いて血清を対象に添加回収試験を実

施したところ、平均回収率は101.1%、併行精度2.6RSD%と良好な結果が得られ、当該分析法が患者血清中のテトロドトキシン定量分析に適用可能であることが示唆された。

実際のフグ毒による食中毒発生時には、本法を用いることで、患者血清からフグ毒の有無を迅速に確認することが可能になると考えられる。食品残渣が入手できない食中毒事例においても原因究明の重要な手がかりとなり、食中毒調査の迅速化及び精度向上に寄与することが期待される。

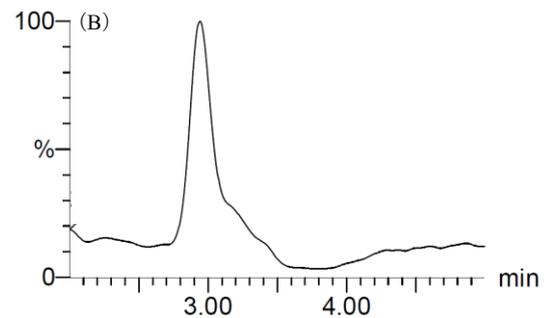
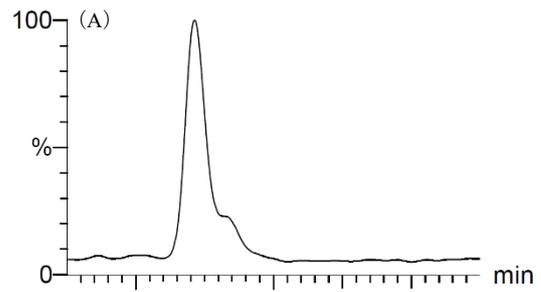


図3 テトロドトキシンのクロマトグラム

(A) 標準溶液 0.5 ng/mL, (B) 添加回収試験溶液

文献

- 1) 公益社団法人日本食品衛生協会：“食品衛生検査指針・理化学編”，p.813-820 (2015)，(公益社団法人日本食品衛生協会)。
- 2) 立野幸治，敷田行雄，藤原美智子，吹屋貞子：山口県環境保健センター所報，50，47-49 (2007)。
- 3) 下堂菌栄子，西村修一，大小田修司，福司山郁恵，岩屋あまね，榎元清美，佐久間弘匡：鹿児島県環境保健センター所報，11，98-101 (2010)。
- 4) 浦山豊弘，肥塚加奈江，赤木正章，北村雅美，大島律子，石井 学：岡山県環境保健センター年報，37，133-136 (2013)。
- 5) 古井真理子，藤井愛実，松渕亜希子：秋田県健康環境センター年報，17，34-37 (2021)。
- 6) 増田 栞，佐藤秀樹，常松順子，矢野智也，松永美樹：

福岡市保健環境研究所報, 48, 69-74 (2023).

- 7) 島 絵里子, 八木一真, 中原優子, 青木 愛, 門田健太郎, 田村香菜, 今辻麻美: 熊本県保健環境科学研究所報, 53, 57-59 (2023).
- 8) 厚生労働省: 自然毒のリスクプロファイル: 魚類: フグ毒
https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_det_01.html (2026 年 1 月閲覧).
- 9) 吉元秀和, 飛野敏明, 濱田寛尚, 吉田達雄, 村川 弘: 熊本県保健環境科学研究所報, 40, 50-53 (2010).
- 10) 志岐寿子, 森脇尚乃, 坂元俊介, 大窪かおり, 吉村博文: 佐賀県衛生薬業センター所報, 40, 17-20 (2018).
- 11) 辻村和也, 松尾広伸, 谷口香織, 吉村裕紀: 食品衛生学雑誌, 63(5), 182-189 (2022).
- 12) 大藤升美, 土田貴正, 野澤真里奈, 茶谷祐行: 京都府保健環境研究所年報, 58, 41-46 (2013).
- 13) Shodex HPLC Columns: アプリケーションデータ, 糖分析における試料溶解液の分離への影響 (NH2P-50 4E).
<https://www.shodex.com/ja/dc/03/02/45.html> (2026 年 1 月閲覧).