

[調査研究]

フグ喫食患者における血清中のテトロドトキシン分析

理化学課 食品担当 志岐 寿子¹、森脇 尚乃、坂元 俊介¹、大窪 かおり、吉村 博文²
 (¹現環境センター、²現鳥栖保健福祉事務所)

[はじめに]

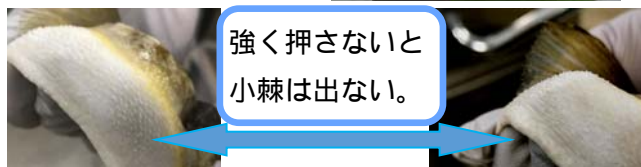
平成30年3月に佐賀県内でフグの喫食による食中毒患者が発生した。喫食したフグはコモンフグと推定され、喫食部位は筋肉と卵巣を味噌汁に調理したものであった。患者は当初重症で人工呼吸器等による救急処置が施される状態であり、治療に当たった医療機関では患者の経過に合わせてテトロドトキシン(TTX)の血中濃度をモニターするため数時間ごとに採血を行っていた。採血は喫食から2.5時間後から開始され、患者の回復期に相当する36時間後まで実施された。その後、医療機関から管轄保健福祉事務所を經由して、患者血清中のTTX検査が当所へ依頼された。

この際には液体クロマトグラフ/タンデム型四重極質量分析計(LC/MS/MS)によるTTX分析を実施し、検体からTTXを検出することができたが、試料量は各2mLという少量であり、前処理によるロスを最小に留めて結果を出す必要があった。これを受けて試料が十分に確保できない場合にも迅速分析を可能とする手法の確立を目指し、キャピラリー電気泳動/タンデム型四重極質量分析計(CE/MS/MS)による測定条件の検討を行ったので報告する。

[フグの鑑別]

喫食したフグの調理残品から種の鑑別を行った。

当該検体は尾びれが欠損した状態であったが、30cm以上の大きさ、体側腹縁を縦に走る黄色



強く押さないと
小棘は出ない。

い帯が鮮明かつ皮膚表面の小棘が観察されたことから、コモンフグと推定された。コモンフグは肉が弱毒、卵巣は猛毒¹⁾とされる。

[LC/MS/MSによるフグ喫食患者の血清中TTX分析]

1. 試料

患者血清6検体(喫食後 2.5,10,15,20,24,36 時間に採血されたもの)

2. 方法

(1) 前処理²⁾

血清 1.5mL に 0.1%酢酸 3.5mL をポリプロピレン製遠沈管に採取し、100℃で5分加熱後、3,500rpmで10分遠心分離した。

上清を3000分画のフィルターで10,000rpmで20分間限外ろ過を行い試験溶液とした。

(2)装置及び分析条件

○LC部 Agilent1200

・カラム:ZIC-HILIC 2.1×100mm 粒径 3.5 μm
(Merck 社製)

・カラム温度:40℃

・移動相:A 0.1%ギ酸+2.5mM ギ酸アンモニウム
含有 5%アセトニトリル/95%水
B アセトニトリル

・グラジエント条件 A:B(time)

A0:B100(0 min)→A0:B100(5 min)→

A100:0(5.1 min)-A100:B0(15 min)-

A0:B100(20 min)

・流量:0.2mL/min ・注入量:1 μL

○MS部 Agilent6460(MS/MS)

・イオン化:AJS-ESI, (Positive)

[調査研究]

- ・乾燥ガス: N₂, 350°C, 10L/min
- ・ネブライザー: N₂, 50psig
- ・キャピラリー電圧: 4000V
- ・フラグメンター電圧: 150V
- ・シースガス: 400°C, 12L/min
- ・MS 計測モード: MRM
- ・定量イオン: 320→162 定性イオン: 320→302

3. 結果

検量線は 0.5ng/mL～100ng/mL の範囲で良好な直線性が得られた(図1)。

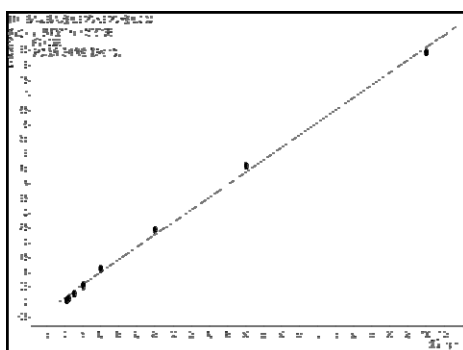


図 1 LC/MS/MS 検量線

定量の結果、血清中 TTX 濃度は喫食後 2.5 時間後 12.7ng/mL から 15 時間後に 5.1ng/mL となるまでは、比較的急速に、それ以降は緩やかな減衰傾向を示した(図 2)。

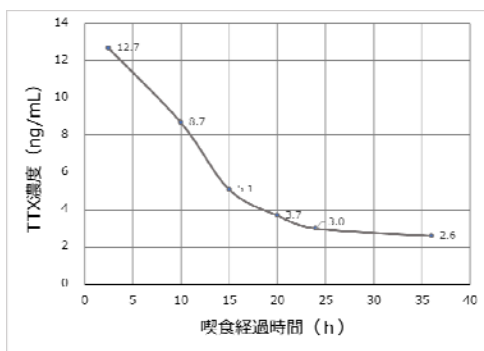
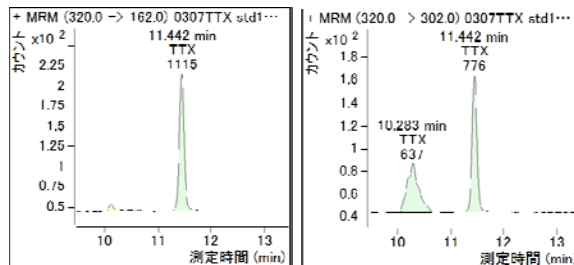


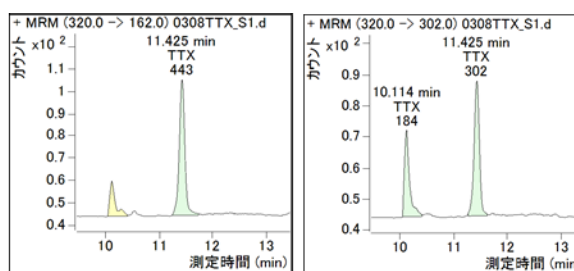
図 2 血清中 TTX 濃度の経時変化

患者は受診当初人工呼吸器等による救急処置が必要であったが、36 時間後には人工呼吸器が外されその後回復したということで、概ねそれを裏

付ける結果となった。また、血清中 TTX の MRM クロマトグラムについても、ピーク感度は S/N が 10 以上で測定ができた。(図 3)



【10ng/mL 標準溶液】



【喫食 2.5 時間後の血清】

図 3 TTX の MRM クロマトグラム

[CE/MS/MS による血清中 TTX 分析の検討]

1. 方法

(1) 添加回収試験

健康者の血清を用いて血清中濃度が 10 および 50ng/mL となるように TTX を添加した。

(2) 前処理

血清 0.4mL を 3000 分画のフィルターで 10,000rpm、20 分間限外ろ過を行い試験溶液とした。(図4)

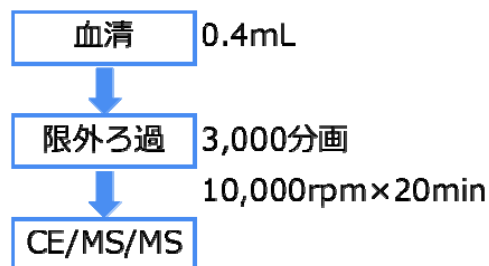


図4 CE 用前処理フロー

[調査研究]

(3)装置及び分析条件

- CE部 Agilent G7150A
- ・キャピラリー:50 μm×100mm(オーテック社製)
- ・シース液:0.5%ギ酸 50%メタノール
- ・泳動液:1M ギ酸
- ・電圧:30KV ・電流:50 μA
- ・注入:50mbar×10sec

○MS部 LC/MS/MSと同一

(4)検量線

TTX 標準品 1mg を水 10mL に溶解し標準原液とし、1M ギ酸で希釈し 10、25、50 及び 100ng/mL の標準溶液を調製し、絶対検量線法により測定した。

2.結果

検量線については、図5のとおり良好な直線性を示した(相関係数>0.997)。

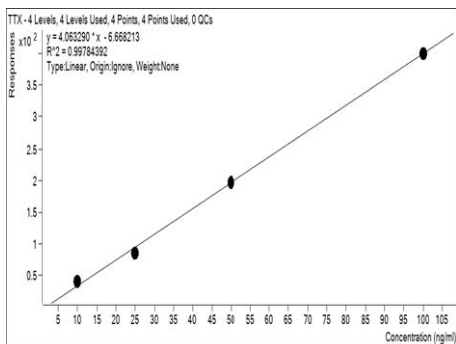
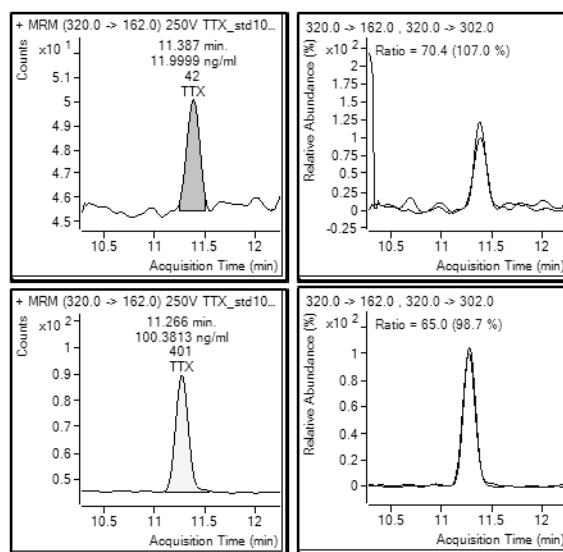


図5 CE/MS/MS 検量線

また、標準溶液 50ng/mL の3回繰り返し測定では相対標準偏差は4%であった。

標準溶液(10ng/mL)のエレクトロフェログラムを図6に示す。ピーク感度はS/Nが10以上で十分に測定可能であった。回収率は約100%であった。添加試料のエレクトロフェログラムを図7に示す。10ng/mL~100ng/mL では妨害も少なく測定可能であった。しかしながら、5ng/mL ではピークの検出は困難であった。

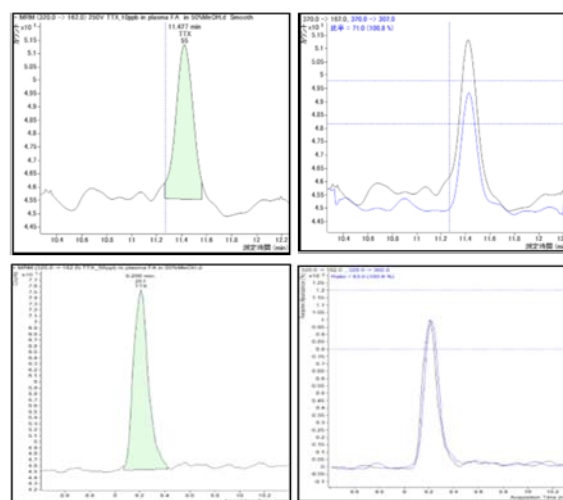


(上:10ng/mL 下:100 ng/mL 濃度)

図6 標準液のエレクトロフェログラム(MRM)

表1 血液中 TTX 濃度と測定可能範囲⁴⁾

濃度 ng/mL	経過	LC/MS/MS	CE/MS/MS
2.5~10	有症	○	×
10~25	有症	○	○
25~100	中等度 ~重度	○	○
>100	致命的	—	○



(上:10ng/mL 下:50ng/mL 濃度の添加試料)

図7 添加試料のエレクトロフェログラム(MRM)

[調査研究]

[考察]

今回の事例は、患者の回復が遅いため血中 TTX 濃度が減少しているかを確認したいとの依頼内容であったが、搬入されたサンプルは数 mL と試験に余裕のあるものではなく、微量の試料にも対応した分析法を準備することも重要であると思われた。CE では、電荷のあるもののみが測定対象となることから TTX 分析に適用可能な条件を検討した。LC 用前処理で実施した除タンパクを省略し、注入量が数 nL と少量で測定が可能であった。LC/MS/MS より少量の検体でも測定可能かつ前処理時間が短縮できる点では有用である。

測定濃度範囲は、10ng/mL～100ng/mL では妨害も少なく測定可能であった。しかしながら、5ng/mL ではピークの検出は困難となり、低濃度の測定条件について課題が残った。

添加回収試験は、健常者血清に 10ng/mL 及び 50ng/mL になるよう TTX を添加して行ったところ、いずれも約 100% の良好な回収率を得ることができた。しかし、CE ではキャピラリー内壁と試料分子が電気的に吸着し、検出ができなくなったり添加回収試験が不良となる場合があり、キャピラリーの選択については注意が必要である。

表1に血液中の TTX 濃度とそれぞれの経過の重症度⁴⁾及び各機器における測定可能な濃度範囲を示した。実際にこのケースの患者の回復経過と血清濃度の減衰においても同様な傾向が見られ、血清濃度が 10ng/mL を超えている場合、救急処置が必要な容態の目安となりうると考えられる。以上のことから現状では、100ng/mL 以上の致死的になりうる場合は迅速な測定が可能な CE/MS/MS の有用性が高く、回復期の経過観察には低濃度の測定が可能な LC/MS/MS を利用するような適切な使い分けが必要となる。一般的に、フグ喫食患者における TTX の分析を実施する場合、生体中の尿、血液、喫食残品等の検体は、検査機関が分析に必要な量を確保できない場合も考

えられ、今後も検討を継続したい。

[謝辞]

フグの鑑別に際し、多大な御教示をいただきました国立科学博物館・松浦啓一先生及び長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科・荒川修先生に深謝の意を表します。

[参考文献]

- 1) 塩見一雄, 長島裕二, 新・海洋動物の毒ーフグからイソギンチャクまでー成山堂書店(2013)
- 2) 吉元秀和ら, 熊本県保健環境科学研究所報, 40,50-53(2010)
- 3) 赤木浩一, 畑野和広, 福岡市保健環境研究所報, 98-100(2006)
- 4) 鈴木修, 屋敷幹雄, 薬毒物分析実践ハンドブック, じほう(2002)