

LC-MS/MS によるテトロドトキシン分析法の改良

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保健科学課

Improvement of Tetrodotoxin Analysis by LC-MS/MS

Shiori MASUDA, Hideki SATO, Junko TSUNEMATSU,
Tomoya YANO and Miki MATSUNAGA

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

フグ類による食中毒発生時に迅速に対応するため、テトロドトキシンの分析法を確立しているが、LC-MS/MS を用いた現行分析法ではいくつか課題があるため改良を検討した。まず、カラム圧の上昇による液漏れの発生である。これは HILIC カラムの種類を、GL サイエンス社製 InertSustain Amide カラムに変更することで改善した。次に、試料のマトリックスによる選択性及び回収率の低下の問題である。選択性については、尿試料で妨害ピークが認められたため、グラジェント条件及び流速を変更して対象ピークの溶出を遅らせた。また、回収率については前述の条件に加え、注入量を少量に変更したことで改善した。これらの改善措置を踏まえ、試料としてフグ筋肉並びにヒトの血清及び尿を用いて、それぞれ定量下限濃度となるようにテトロドトキシン標準品を添加し、3 併行で添加回収試験を行った結果、全ての試料で選択性、真度及び併行精度いずれも良好な結果が得られた。なお、添加回収試験に用いる試料として、人の血清試料を常時確保することは困難なため、代替品として冷凍保存可能な市販の正常ヒト血清を入手し、突発事案発生時にも検査可能な体制を整備した。

Key Words : テトロドトキシン tetrodotoxin, フグ puffer-fish, 血清 serum, 尿 urine, 親水性相互作用クロマトグラフィー hydrophilic interaction chromatography, 高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 LC-MS/MS

1 はじめに

全国におけるフグ類の食中毒は、過去 10 年間（平成 24 年～令和 3 年）で年間 13～29 件発生し、死亡事例も報告（厚生労働省フグによる食中毒発生状況 <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000094363.html>）されるなど、食品衛生上極めて重要な事例である。

病因物質の主成分であるテトロドトキシン（以下、「TTX」とする。）の分析法には、公定法¹⁾のマウスを用いた生物学的試験法があるが、分析精度が低いことに加え、マウスの管理が煩雑で緊急時の対応が難しく、また、動物愛護の観点からも代替法の開発が望まれている。近年は LC-MS/MS を用いた理化学的試験法が普及しており、福岡市でも高極性化合物の保持に有効な親水

性相互作用クロマトグラフィーカラム（以下、「HILIC カラム」とする。）を用いた LC-MS/MS による TTX 分析法²⁾を報告し、その後改良を加えて検査体制を確立している。しかし、現行分析法ではカラム圧の上昇による測定不良、試料のマトリックスによる選択性及び回収率の低下の問題があるため、LC-MS/MS の測定条件を検討した。

また、フグ食中毒事例においては、食品残品が試料となるが、喫食済みの場合、廃棄されている場合など、原因食品の入手が困難なケースがある。そのため、患者の血清及び尿は検査試料として極めて有用である。添加回収試験に用いるブランク試料として、ヒトの血清試料を常時確保することは困難なため、代替品として冷凍保存可能な市販の正常ヒト血清を入手し、突発事案発生時に迅速に検査可能な体制を整備したので併せて報告する。

MS部 ; エービー・サイエックス社製QTRAP6500+

2 実験方法

2.1 試料

試料はフグ筋肉（市販品）並びにヒトの血清及び尿とした。血清は冷凍保存可能な凍結乾燥品の正常ヒト血清（Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. 製）を入手し、凍結乾燥粉末全量を 2 mL の蒸留水に溶解し、タンパク質濃度 60.0 mg/mL として使用した。尿は健常なヒトの尿を用いた。いずれの試料も TTX を含まないことを確認した。

2.2 標準品・試薬等

標準原液：富士フィルム和光純薬社製 TTX 標準品を用いた。標準品 1 mg を超純水に溶解し、100 mg/L とした。

添加回収用標準溶液：標準原液を超純水で希釈し、10 ng/mL, 100 ng/mL, 1,000 ng/mL を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液を 2% 酢酸で希釈し、0.05 ~ 1 ng/mL の範囲内で段階的に調製した。

アセトニトリル：日本ハネウェル社製 LC-MS 用を用いた。

ギ酸：富士フィルム和光純薬社製 LC-MS 用を用いた。

無水酢酸：富士フィルム和光純薬社製特級を用いた。

2% 酢酸：無水酢酸を蒸留水で希釈して調製した。

蒸留水：アドバンテック東洋社製 RFD240 により製造した蒸留水を用いた。

超純水：アドバンテック東洋社製 RFU666HA により製造した超純水を用いた。

2.3 装置・器具等

遠心機：久保田製作所製 フロア型冷却遠心機 S700FR

超音波洗浄器：アズワン社製 MCS-10

遠心フィルターユニット：MILLIPORE 社製 Amicon Ultra-4 centrifugal filter device, 15 mL, 10,000 MWCO.

0.2 μm メンブレンフィルター：アドバンテック東洋社製 13HP020AN

300 mL フラスコ：ガラス製

200 mL 比色管：ガラス製

PP 製遠沈管：エッペンドルフ社製 コニカルチューブ (50 mL 容, 15 mL 容)

バイアル：ジーエルサイエンス社製 1.5 mL 褐色目盛り付き PP 製バイアル

LC-MS/MS :

LC部 ; エービー・サイエックス社製 EXION LC AD SYSTEM

2.4 測定条件

LC-MS/MS の測定条件（改良分析法）を表 1 に、対象化合物の測定イオン等を表 2 に示す。

2.5 定量

検量線用標準溶液、各試験溶液 5 μL を LC-MS/MS へ注入し、ピーク面積値を用いた絶対検量線法で TTX を定量した。

2.6 試験溶液の調製

2.6.1 フグ筋肉

試料 5 g を 300 mL フラスコに量り取り、2% 酢酸 100 mL を加え、沸騰水浴で 10 分間抽出した後、2% 酢酸で 200 mL に定容したものを抽出液とした。抽出液を 1 mL 分取し、2% 酢酸で 25 mL にし、0.2 μm メンブレンフィルターでろ過したものを試験溶液とした。分析フローを図 1 に示す。

2.6.2 血清

試料 1 mL を 15 mL 容 PP 製遠沈管に量り取り、2% 酢酸で 10 mL にした後、遠心フィルターユニットに分取し、3,000 rpm で 10 分間遠心機にて遠心ろ過を行ったものを抽出液とした。抽出液を 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過したものを試験溶液とした。分析フローを図 2 に示す。

2.6.3 尿

試料 100 μL を 15 mL 容 PP 製遠沈管に量り取り、2% 酢酸で 10 mL にした後、遠心フィルターユニットに分取し、3,000 rpm で 10 分間遠心機にて遠心ろ過を行ったものを抽出液とした。抽出液を 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過したものを試験溶液とした。分析フローを図 3 に示す。

2.7 マトリックス効果の確認

各試料を用いて調製した試験溶液 900 μL と 10 ng/mL 検量線用標準溶液 100 μL を混合し、1 ng/mL マトリックス添加標準溶液とした。これと同濃度の検量線用標準溶液に対するピーク面積比を求めて、試料マトリックスの分析への影響を確認した。

2.8 添加回収試験

2.8.1 フグ筋肉

フグ筋肉試料に添加回収用標準溶液を定量下限である 0.1 μg/g になるように添加し、30 分間放置後、上記 2.6.1 に従い、3 併行で試験溶液を調製した（以下、「フグ筋肉 REC」とする。）。

2.8.2 血清

血清試料に添加回収用標準溶液を定量下限である 1 ng/mL になるように添加し, 30 分間放置後, 上記 2.6.2 に従い, 3 併行で試験溶液を調製した (以下, 「血清 REC」とする.) .

2.8.3 尿

尿試料に添加回収用標準溶液を定量下限である 10 ng/mL になるように添加し, 30 分間放置後, 上記 2.6.3 に従い, 3 併行で試験溶液を調製した (以下, 「尿 REC」とする.) .

表1 LC-MS/MS測定条件 (改良分析法)

分析カラム	ジーエルサイエンス社製 InertSustain Amide (2.1 mm×100 mm, 3 μm)
流速	0.4 mL/min
注入量	5 μL
カラム温度	40 °C
移動相	A液: 0.1%ギ酸水 B液: アセトニトリル
グラジエント条件	B液: 95% (0 min) →50% (8 min) →50% (10 min) →95% (10.01 min) →95% (15 min)
測定モード	MRM
イオン化モード	ESI (+)
カーテンガス (CUR)	30 psi
脱溶媒温度 (TEM)	550°C
ネブライザーガス (GS1)	70 psi
ターボガス (GS2)	60 psi
コリジョンガス (CAD)	9 psi
イオンスプレー電圧 (IS)	5,500 V

表2 対象化合物の測定イオン等

No.	化合物名	保持時間 (min)	Q1(m/z)	定量イオン			確認イオン		
				Q3(m/z)	DP(V)	CE(V)	Q3(m/z)	DP(V)	CE(V)
1	TTX	8.9	320.1	162.2	44	51	302.3	44	30

DP : Declustering Potential CE : Collision Energy

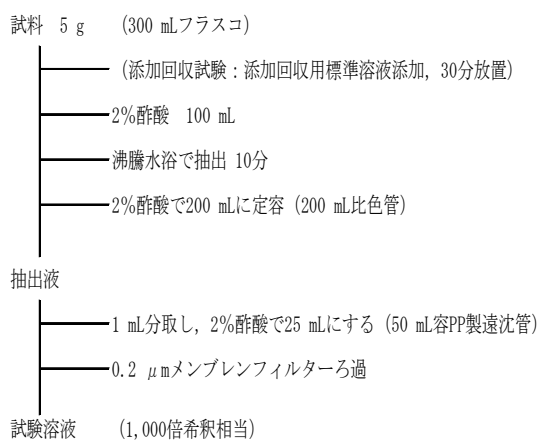


図1 フグ筋肉試料の試験溶液調製法

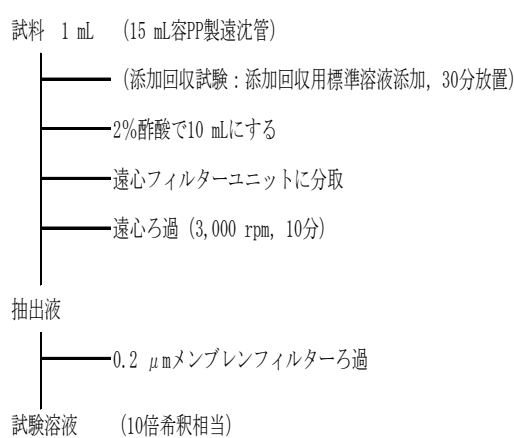


図2 ヒト血清試料の試験溶液調製法

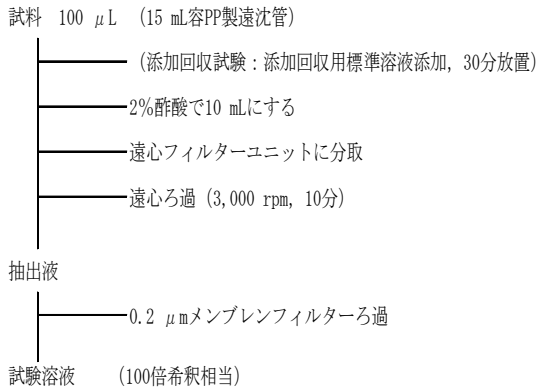


図3 ヒト尿試料の試験溶液調製法

3 結果及び考察

3.1 LC条件の検討

3.1.1 カラムの検討

現行分析法では SeQuant 社製 ZIC-pHILIC (2 \times 50 mm, 3 μ m) を使用したが, カラム圧が上昇し, カラム接続部分における液漏れが高い頻度で発生したため, カラムの変更を検討した. 今回, ジーエルサイエンス社製 InertSustain Amide (2.1 \times 100 mm, 3 μ m) を選択し分析したところ, カラム圧は最大でも 11 MPa 程度となり, 液漏れの発生が解消した.

3.1.2 グラジエント条件の検討

尿中の TTX 分析では塩類によるイオン化阻害やピーク形状の悪化が報告されており^{2~3)}, 現行分析法においても選択性及び回収率の低下が課題となった. 現行分析法の流速及びグラジエント条件(表3)では, 標準溶液で保持時間 4.5 分に TTX ピークが確認されたが, 尿試料では同時間に妨害ピークが認められたため, 測定条件を表1のとおり変更した. その結果, 対象ピークの保持時間を遅らせることができ, 選択性が改善した. クロマトグラムを図4に示す.

さらに, 現行分析法(表3)に比べ, 改良分析法(表1)では全ての添加回収試料でピーク面積値が大きくなり, 回収率が改善した. 結果を表4に, クロマトグラムを図5に示す. なお, 改良分析法での血清(図5D)のみ別日で測定し, 標準溶液で保持時間 8.1 分に TTX ピークを確認した.

表3 現行分析法の流速及びグラジエント条件

流速	0.3 mL/min
グラジエント条件	B液: 85% (0 min) \rightarrow 50% (8 min) \rightarrow 85% (8.1 min) \rightarrow 85% (15 min)

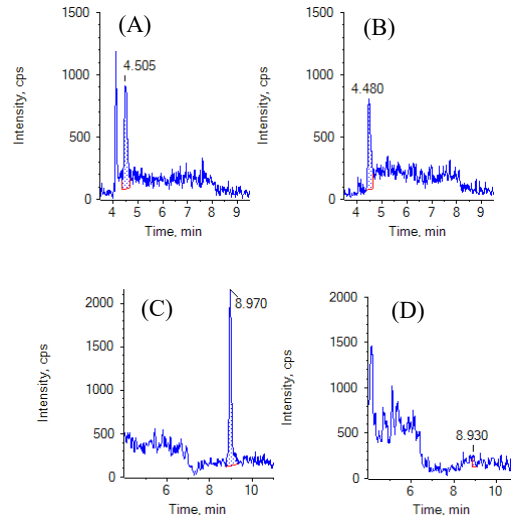


図4 0.05 ng/mL 検量線用標準溶液及び尿試料のクロマトグラム

- (A)現行分析法で測定した標準溶液
- (B)現行分析法で測定した尿試料
- (C)改良分析法で測定した標準溶液
- (D)改良分析法で測定した尿試料

表4 回収率の比較

試料	回収率 (%)	
	現行条件 (表3)	改良条件 (表1)
フグ筋肉	52	80
血清	68	111
尿	79	94

3.1.3 注入量の検討

表1の測定条件における適切な注入量を 5, 10, 20 μ L で検討した結果, 注入量 5 μ L で良好な形状かつ S/N 比が 10 以上の十分な感度のピークが得られた. クロマトグラムを図6に示す. マトリックス効果低減のためにも, 今回検討した最小量である 5 μ L を注入量とした.

3.2 検量線

0.05~1 ng/mL の範囲で直線性が確認でき, 決定係数は 0.999 以上であった. 検量線を図7に示す.

3.3 マトリックス効果の確認

フグ筋肉並びにヒトの血清試料及び尿試料のタンパク質, 塩等マトリックス成分によるイオン化の抑制又は促進の影響を調べた. 結果を表5に示す. ピーク面積比は 0.80~0.96 であり, フグ筋肉で若干イオン化抑制の傾向が見られたが, 分析への影響はほとんどないと考えられた.

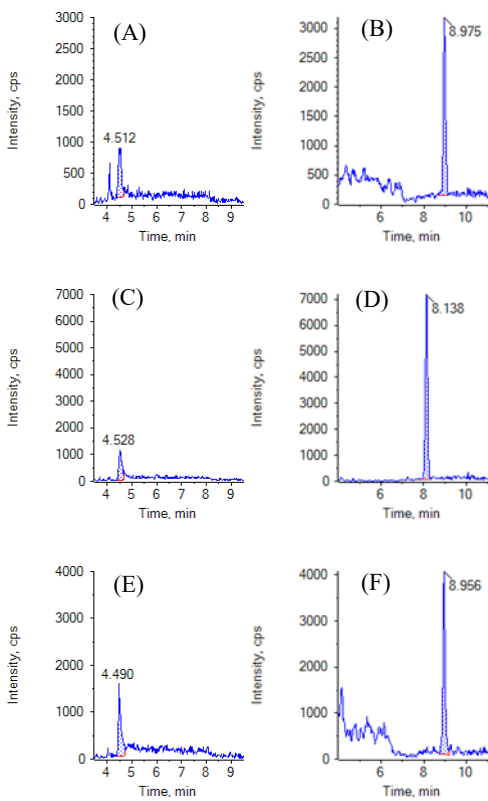


図5 現行分析法及び改良分析法における各試料のクロマトグラム

- (A) 現行分析法で測定したフグ筋肉 REC
- (B) 改良分析法で測定したフグ筋肉 REC
- (C) 現行分析法で測定した血清 REC
- (D) 改良分析法で測定した血清 REC
- (E) 現行分析法で測定した尿 REC
- (F) 改良分析法で測定した尿 REC

3.4 添加回収試験結果

「加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法」⁴⁾における性能評価パラメータに準じて、選択性、真度（回収率）及び併行精度を評価した。表6に性能評価パラメータにおける目標値等を、表7に結果を、図8に各試料及び添加回収試験により得た試験溶液のクロマトグラムを示す。全ての試料において選択性、真度及び併行精度いずれも目標値等を満たした。

以上の結果から、今回改良した分析法は、フグ筋肉並びにヒトの血清及び尿中の TTX 分析に有効な方法であることが確認できた。

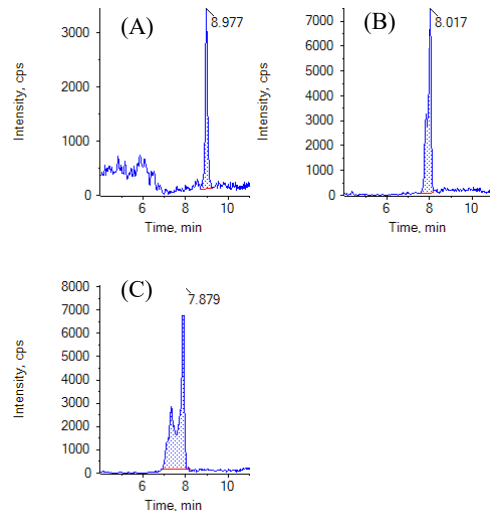


図6 血清 REC のクロマトグラム

- (A) 注入量 5 µL
- (B) 注入量 10 µL
- (C) 注入量 20 µL

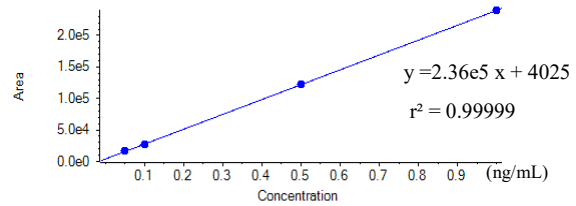


図7 検量線

表5 1 ng/mL 標準溶液でのピーク面積比

	フグ筋肉	血清	尿
面積比 (a/b) ※	0.80	0.96	0.91

※a:マトリックス添加標準溶液, b:検量線用標準溶液

表6 性能評価パラメータの目標値等

選択性	添加濃度に相当するピークの面積の1/3未満
真度（回収率）	50～200%
併行精度	30 RSD%未満

表7 添加回収試験結果 (n=3)

	選択性	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
フグ筋肉	○	80	3.8
血清	○	111	5.2
尿	○	94	11.3

4 まとめ

フグ筋肉並びにヒトの血清試料及び尿試料を, HILIC カラムを用いて LC-MS/MS で定量分析する方法を改良した. 分析法の性能評価として, 定量下限値 1 ng/g (1 ng/mL) での添加回収試験を行った結果, 全ての試料で, 選択性, 真度及び併行精度いずれも目標値等を満たした. 真度は 80~111%, 併行精度は 3.8~11.3% と良好な結果であった.

以上の結果から, 今回改良した分析法は, TTX の定量に有効な方法であることが確認できた. なお, 添加回収試験に用いる試料として, 人の血清試料を常時確保することは困難なため, 代替品として冷凍保存可能な市販の正常ヒト血清を入手し, 突発事案発生時にも検査可能な体制を整備した.

文献

- 1) 食品衛生検査指針理化学編: 公益社団法人日本食品衛生協会, 813~820, 2015
- 2) 赤木浩一, 他: 親水性相互作用クロマトグラフィーを用いた LC/MS/MS によるテトロドトキシンの分析, 福岡市保健環境研究所報, 32, 98~100, 2006
- 3) 臼井力, 他: フグ食中毒発生時における検査対応のあり方について, 鹿児島県環境保健センター所報, 17, 74~79, 2016
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡: 加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について, 平成 25 年 3 月 26 日

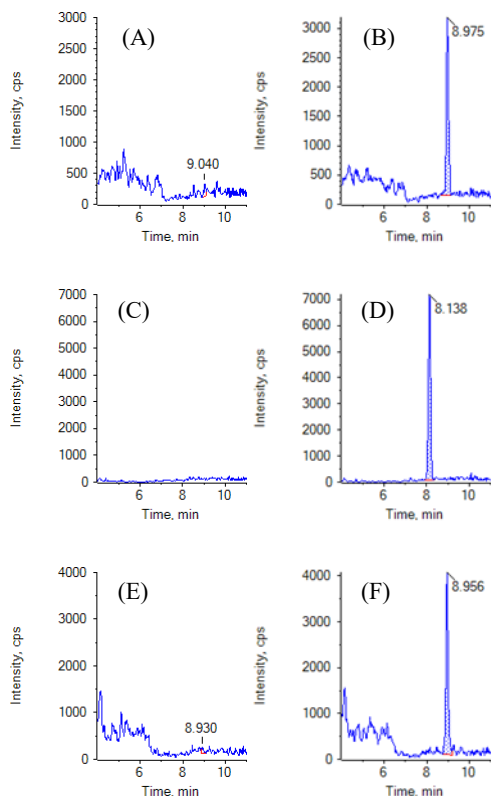


図 8 添加回収試験における各試料のクロマトグラム

- (A) フグ筋肉試料
 (B) フグ筋肉 REC
 (C) 血清試料
 (D) 血清 REC
 (E) 尿試料
 (F) 尿 REC