

食品衛生対策事業

LC-MS/MS による食品中のテトロドトキシン分析法の検討

古井真理子 藤井愛実* 松淵亜希子

食中毒発生時には被害拡大防止のため、迅速な原因究明が求められる。今回、フグ食中毒の原因物質であるテトロドトキシンについて、LC-MS/MS を用いた迅速な分析法を検討した。その結果、フグ筋肉などでは無毒とされる目安である、テトロドトキシン 2.2 $\mu\text{g/g}$ の濃度で十分な感度が得られ、定量分析が可能であった。また、油分などの夾雑物が多く含まれる唐揚げの場合においても、定性分析は可能と考えられた。検討した本法を用いて、分析対象を市販のフグ加工品や、フグを各部位に分けたもの及びその模擬調理品に広げて分析を行ったところ、本法が十分に適用可能であることを確認した。LC-MS/MS による本分析法はフグ食中毒時における原因究明の一つとして有用な方法であり、速やかな行政対応に寄与できると考えられる。

1. はじめに

フグ食中毒の原因物質であるテトロドトキシン (tetrodotoxin : TTX) は、主としてフグ科魚類がもつ神経毒である。フグ毒中毒は、食後 20 分から 3 時間程度で痺れや麻痺などの症状が現れ、重症の場合には呼吸困難で死亡することがある¹⁾。

全国の発生状況は、平成 24 年から令和 3 年の過去 10 年間で事件数 281 件、患者数 253 名、死者数 4 名となっている²⁾。

フグ毒中毒は、一般消費者が釣ったフグを自ら調理することによる家庭料理が原因になることが多い¹⁾。その毒の強さはフグの種類と部位によって異なるため、食用可能なフグの種類と部位が定められている³⁾。

フグ毒の検査は、食品衛生検査指針⁴⁾に参考法として、マウス検定法が示されている。マウスの致死時間から毒量を測定する方法で、体重 20 g のマウスを 30 分間で死亡させる毒量を 1 MU (マウスユニット : TTX 0.22 μg に相当) と定義し、フグ毒の強さが 10 MU/g 以下の場合には食用に供しても健康を害するおそれがないと判断される。

しかし、常時マウスを飼養していない場合はマウスの調達に時間がかかる上、サキシトキシンなど麻痺性貝毒との判別が困難である。

食中毒発生時には、被害拡大防止のため、迅速な原因究明が求められる。近年、マウスを使用しない高感度かつ高選択性を有する LC-MS/MS (液体クロマトグラフタンデム質量分析計) を用いた TTX 分析法が報告されている^{5,6)}。

今回、当センターにおいても LC-MS/MS による TTX 分析法を検討し、市販のフグ加工品や、フグを各部位に分けたもの及びその模擬調理品について分析を行ったので、その概要を報告する。

2. 方法

2.1 標準品

標準品は、富士フイルム和光純薬 (株) 製のテトロドトキシン (生化学用, 1 mg) を用い、全量を超純水に溶解し、標準原液 (1 mg/mL) としたのち、0.1% 酢酸水溶液で希釈し、標準溶液 (100 $\mu\text{g/mL}$) を調製した。

2.2 添加回収試験

試料はフグの筋肉、液体フグだし、フグ唐揚げを粉砕・均一化して用いた。10 MU/g に相当する 2.2 $\mu\text{g/g}$ となるよう標準溶液を添加し、添加回収試験を行った (n=3)。なお、ブランク試料から TTX が微量検出された場合は、差し引いて回収率を算出した。

2.3 県内流通フグ加工品試料

試料は、令和 2~3 年度に秋田県内で流通していた 8 種類のフグ加工品 (フグオイル漬け、フグ白子ムース、フグぞうすい、液体フグだし、ゴマフグジャーキー、マフグ唐揚げ、マフグ筋肉及びゴマフグ精巢) を粉砕・均一化して用いた (n=1)。なお、フグオイル漬け、フグ白子ムース、フグぞうすい

*生活環境部生活衛生課

及び液体フグだしは数種類のフグが混合したものであった。

2.4 フグ部位別試料及び模擬調理品試料

試料は、令和3年6月21日に秋田県で水揚げされたゴマフグ(雄, 雌), ショウサイフグ(雌), シマフグ(雄), シロサバフグ(雄)を用いた。用いたフグの写真を図1に示す。



図1 試料に用いたフグ

フグを7部位(筋肉, 尾ビレを除くヒレ, ヒレを除く皮, 精巣又は卵巣, 肝臓, 頭・骨・尾ビレ, その他の内臓)に分け, 未調理又はゴマフグの場合は表1のとおり調理も行い, 粉碎して試料とした(n=1)。

表1 調理方法(ゴマフグ)

部位	調理名	調理内容
ヒレ	ヒレ酒	ヒレを40℃で150分間乾燥させ, グリルで3分間焼き, 80℃に加熱した15%エタノールに3分間浸漬する
皮	湯引き	沸騰させた水道水約1kgで, 皮100gを1分間ゆでる
卵巣	塩漬け	卵巣を, 重量の10%の塩化Naで24時間漬ける
	卵巣の塩漬け焼き	上記の卵巣の塩漬けをグリルで10分間焼く
肝臓	肝醤油	沸騰させた水道水約500gで, 肝臓50gを1分間ゆでた後, ゆでた肝臓40gと醤油40gを混和する
	肝ゆで	沸騰させた水道水約200gで, 肝臓50gを3分間ゆでる
頭・骨・尾ビレ	アラ汁	沸騰させた水道水約800gで, 頭・骨・尾ビレ200gを1分間煮る

2.5 前処理法及び測定条件

試料の前処理法を図2に, LC-MS/MSの測定条件を表2に示す。

なお, カラムに試料中の夾雑物が残存しないよう, 試料を数回測定後, 超純水 20 µL を注入し, B液: 0% (0 min) → 0% (54 min) → 100% (55 min) → 100% (70 min), 流速 0.3 mL/min の条件でカラム内を洗浄し, その後平衡とピーク強度の確認として, 2.0 ng/mL 標準液を3回繰り返し測定してから次の試料を測定した。

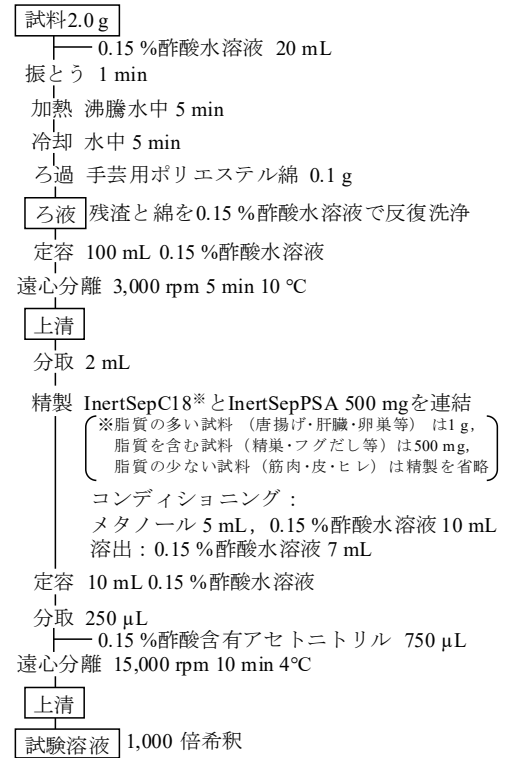


図2 前処理法

表2 測定条件

LC-MS/MS装置	QTRAP4500 (AB SCIEX)
カラム	Atlantis HILIC Silica (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 µm)
移動相	A液 (超純水: アセトニトリル: メタノール=95:4:1混液) B液 (0.05% 酢酸, 10 mM 酢酸アモニウム含有, 超純水: アセトニトリル: メタノール=45:44:11混液)
グラジエント条件	B液: 100% (0 min) → 100% (3.5 min) → 0% (4 min) → 0% (10 min) → 100% (11 min) → 100% (32 min)
流速	0.2 mL/min
カラム温度	40℃
注入量	5 µL
イオン化法	ESI (+)
測定モード	Scheduled MRM
イオン源温度	500℃
イオン源電圧	5000 V
測定イオン (m/z)	定量 320.0 > 302.1, 定性 320.0 > 161.9

3. 結果及び考察

3.1 検量線及び定量下限

1.0 ng/mL ~ 50 ng/mL の範囲(7点)で, ピーク面積による絶対検量線を作成した結果, 良好な直線性(相関係数 0.999 以上)が得られた。1.0 ng/mL で S/N 比 10 以上を確認できたことから, この値を定量下限値とした。

3.2 添加回収試験

平均回収率は、フグ筋肉が 84.3% (相対標準偏差 4.5%)、液体フグだしが 101.0% (4.8%)、フグ唐揚げが 59.1% (5.9%) であった。妥当性評価ガイドライン⁷⁾を参考とし、フグ筋肉と液体フグだしは回収率の目標値である 70%~120% の範囲内であり、添加した 10 MU/g 相当で定量性を確認した。夾雑物が多く含まれるとみられるフグ唐揚げは目標値を下回ったが、TTX 検出の有無の判断は可能と考えられた。

3.3 フグ試料中の TTX 濃度

県内で流通していたフグ加工品の TTX 濃度は、表 3 のとおり、すべて 10 MU/g 相当 (TTX2.2 µg/g) 以下であった。

フグ部位別試料の TTX 濃度は表 4 のとおりであり、食用部位である筋肉、精巢からは TTX は検出されなかった。毒があるとされる卵巣や肝臓では種類毎に TTX 含量が大きく異なっていた。また、シマフグとシロサバフグのヒレ及び皮は可食部位であるが 10 MU/g 相当を超える値であった。これは、運搬時に排卵しているゴマフグの雌と同じ箱に入れられたため、卵とヒレや皮が接してしまい、汚染されたことが原因と推察された。

表 3 フグ加工品試料の TTX 濃度 (MU/g 相当)

加工品名	結果	加工品名	結果
フグオイル漬け	—	ゴマフグジャーキー	—
フグ白子ムース	—	マフグ唐揚げ	—
フグぞうすい	—	マフグ筋肉	—
液体フグだし	—	ゴマフグ精巢	—

「—」は10 MU/g相当以下 (TTX : ≤ 2.2 µg/g)

表 4 フグ部位別試料の TTX 濃度 (MU/g 相当)

種類 部位	ゴマフグ (雄) ※卵巣のみ雌	ショウサイ フグ (雌)	シマフグ (雄)	シロサバ フグ (雄)
筋肉	—	—	—	—
ヒレ	91.7	138.4	18.1	15.1
皮	186.0	441.7	25.1	13.7
精巢	—	—	—	—
卵巣	529.3*	3433.9	—	—
肝臓	438.6	1537.0	277.8	—
頭・骨・ 尾ビレ	—	27.7	10.9	—
他内臓	149.7	154.2	30.9	—

網掛けは可食部位
「—」は10 MU/g相当以下 (TTX : ≤ 2.2 µg/g)

表 5 のゴマフグの非可食部位模擬調理の結果では、TTX が高濃度に検出されたものもあり、調理による低毒化は困難であり、従来言われているとおり、加熱などの調理では無毒化されないということが裏付けられた。

表 5 ゴマフグ模擬調理品試料の
TTX 濃度 (MU/g 相当)

部位	料理名	結果
ヒレ	ヒレ酒	—
皮	湯引き	76.3
卵巣	塩漬け	574.1
	卵巣の塩漬け焼き	597.4
肝臓	肝醬油	211.8
	肝ゆで	77.5
頭・骨・尾ビレ	アラ汁	—

「—」は10 MU/g相当以下 (TTX : ≤ 2.2 µg/g)

4. まとめ

LC-MS/MS による食品中の TTX 分析法を検討した。フグ筋肉などでは無毒とされる 10 MU/g 相当 (TTX2.2 µg/g) の濃度で十分な感度及び定量性が確認された。夾雑物が多く含まれる唐揚げの場合においても、検出の有無の判断は可能と考えられた。

また、本分析法はフグ加工品、水揚げフグ、フグ調理品において適用可能であり、秋田県内で流通していたフグ加工品は無毒とされる 10 MU/g 相当以下であった。

本法は、フグによる食中毒が疑われる事例が発生した際には、有用な分析法であると考えられる。

謝辞

フグを提供いただいた秋田県水産振興センター総務企画室 中林信康室長に感謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル：魚類：フグ毒：詳細版，URL. https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_det_01.html [accessed August 3, 2022].
- 2) 厚生労働省：フグによる食中毒発生状況。URL. <https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000924130.pdf> [accessed August 3, 2022].
- 3) 厚生労働省：フグの衛生確保について，昭和 58 年 12 月 2 日，環乳第 59 号

- 4) 佐藤繁, 児玉正昭: フグ毒, 食品衛生検査指針理化学編 2015, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京, 2015, pp. 813-820.
- 5) 藤井良昭他: LC-MS/MS によるフグ組織中のテトロドトキシン分析法の検討, 北海道衛生研究所報, **70**, 2020, 45-47.
- 6) 浦山豊弘他: LC/MS/MS を用いた自然毒の迅速分析法の検討 (3) ふぐ毒の危機分析, 岡山県環境保健センター年報, **37**, 2013, 133-136.
- 7) 厚生労働省: 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について, 平成 22 年 12 月 24 日, 食安発 1224 第 1 号.