

資料

フグ食中毒発生時における検査対応のあり方について

臼井 力 茶屋 真弓 松岡 さゆり
清川 由樹 吉田 純一 西 宣行¹

1 はじめに

フグ食中毒の多くは、フグ毒テトロドトキシシン（以下「TTX」という。）によって痺れや麻痺などが起こる。また、重症の場合は死亡事例もみられる。そのため、健康危機管理の科学的・技術的中核機関である当センターには、緊急時の迅速な検査対応が要求される^{1), 2)}。

今回、健康危機管理の科学的・技術的中核機関としてフグ食中毒発生時における検査対応のあり方について考察するにあたり、鹿児島県の過去のフグによる食中毒事例における検査対応状況を整理した。また、2015年11月にフグ食中毒が発生し検査対応にあたった。さらに、健康危機管理の検査機能強化を図る目的で健常者の尿を用いてTTX分析を試みたので併せて報告する。

2 事例概要と検査対応

2.1 事例概要

本県のフグ食中毒の発生状況は、1962年から2015年までの間で12件、患者数24名、うち死者数2名となっている（表1）。ほとんどの事例が釣りや知人から譲り受けてフグを入手し、家庭で調理喫食して、痺れ、嘔吐、麻痺等の症状を呈している。

2015年11月1日に鹿屋市在住の男性（60代）が肝属郡東串良町の海岸でフグ2匹を釣り上げ、トラフグと思い自宅に持ち帰り、同日20時頃フグの内臓を取り出さないまま丸焼き（塩焼き）にして、筋肉部のみ喫食した。翌日3時頃から腰、口唇の痺れ、嘔吐等の症状を呈し、病院に救急搬送された（事例12）。

2.2 検査対応

事例1から事例6までは食中毒調査時に食品残品が無い等、フグ毒を検査するための試料の確保が困難であったため、当センターで検査を実施することができなかった。

その後、事例8、事例10では、LC-MS/MSの導入もあ

り、食品残品について機器分析と動物試験を実施している³⁾。また、事例12では、フグ中毒患者由来の生体試料について機器分析を実施した。

3 方法

3.1 試料

事例12のTTX分析試料に患者の嘔吐物（5.79g）を用いた。事例12の分析にあたり、シロサバフグの筋肉を添加回収用試料に用いた。尿中のTTX分析には、健常者の尿を添加回収試験用試料に用いた。

3.2 試薬及び試液

標準品：TTXは、和光純薬工業(株)製を使用した。標準品を水で溶解し10mLとし、適宜0.1%酢酸で希釈し、標準溶液とした。

ODSミニカラム：C18ミニカラムは、ジーエルサイエンス(株)製InertSep C18 (1g)をあらかじめメタノール5mL、水10mLでコンディショニングして使用した。

その他の試薬：酢酸（特級）、メタノール（HPLC用）及びアセトニトリル（LC/MS用）は、関東化学(株)製を用いた。

3.3 装置及び器具

高速液体クロマトグラフは、(株)島津製作所製Prominenceシリーズを使用した。送液ポンプはLC-20AD、オートサンプラーはSIL-20ACHT、カラムオーブンはCTO-20ACを用いた。質量分析装置は、エービーサイエックス社製4000QTRAPを使用した。

冷却卓上遠心機は、(株)コクサン製H-30Rを使用した。

遠心フィルターは、メルクミリポア社製Amicon ウльтра-4 10Kデバイスを使用した。

メンブランフィルターは、アドバンテック社製DISMIC-13HP045ANを使用した。

1 南薩地域振興局保健福祉環境部

〒897-0001 南さつま市加世田村原2-1-1

表1 鹿児島県のフグによる食中毒事例概要

事例	発生日月 (発生場所)	摂食者数/患者数/死者数	主な症状	原因食品/フグ種	摂取場所/入手経路	検査対応/試料
1	1962/ 8/13 (鹿児島市)	3 / 3 / 1	麻痺, けいれん, 言語障害	味噌煮/不明	家庭/釣り	* 1
2	1978/ 1/25 (鹿児島市)	5 / 1 / 1	不明	フグ料理/不明	家庭/販売店	* 1
3	1994/ 3/ 3 (阿久根市)	3 / 2 / 0	痺れ, 嘔吐, 呼吸困難	刺身, 味噌煮/シマフグ	船/譲渡	実施せず
4	1995/ 5/19 (田代町)	7 / 6 / 0	痺れ, 嘔吐, 麻痺	味噌煮/センニンフグ	家庭/譲渡	実施せず
5	1996/11/10 (加世田市)	2 / 1 / 0	嘔吐, 言語障害, 呼吸困難	刺身/ショウサイフグ	家庭/釣り	実施せず
6	1999/10/20 (串木野市)	2 / 2 / 0	嘔吐, 麻痺, 意識消失, 呼吸停止	味噌煮/ドクサバフグ	家庭/譲渡	実施せず
7	2003/ 5/ 3 (鹿児島市)	1 / 1 / 0	痺れ, 嘔吐, 意識消失	空揚げ/不明	家庭/釣り	* 2
8	2008/10/10 (日置市)	2 / 2 / 0	痺れ, 嘔吐, 臥床	味噌煮/ドクサバフグ	家庭/釣り	機器分析, 動物試験/食品残品
9	2008/10/16 (東串良町)	2 / 2 / 0	痺れ, 嘔吐, 臥床	味噌煮/不明	家庭/不明	実施せず
10	2009/10/ 5 (いちき串木野市)	2 / 2 / 0	痺れ, 麻痺, 臥床	煮付け/ドクサバフグ	家庭/譲渡	機器分析, 動物試験/食品残品
11	2011/ 2/18 (曾於市)	2 / 1 / 0	痺れ, 嘔吐, 麻痺, 呼吸困難	煮付け/不明	家庭/釣り	実施せず
12	2015/11/ 2 (鹿屋市)	1 / 1 / 0	痺れ, 嘔吐, 臥床	塩焼き/不明	家庭/釣り	機器分析/患者嘔吐物

表中の下線部 _____ は推定を示す * 1 : 詳細な記録無し * 2 : 鹿児島市保健所が対応した事例

3. 4 LC-MS/MS測定条件

測定条件は, 表2のとおり。

表2 LC-MS/MSの測定条件

分析カラム	: SeQuantZIC pHILIC (内径2.1mm, 長さ100mm, 粒径5µm)
流速	: 0.2mL/min
カラム温度	: 40℃
注入量	: 10µL
移動相	: A : 0.1% 酢酸含有アセトニトリル : B : 0.1% 酢酸水溶液
グラジエント条件	: 0min (A : B=70 : 30) →5min (70 : 30) →10min (0 : 100) →25min (0 : 100)
イオン化モード	: ESI (positive)
イオンスプレー電圧	: 5.5kV
イオンソース温度	: 600℃
測定モード	: MRM
Q1 (m/z)	: 320
Q3 (m/z)	: 302 (定量イオン), 162 (定性イオン)
DP	: 91V
CE	: 35V

3. 5 試験溶液の調製

3. 5. 1 フグ筋肉および嘔吐物

試料は既報³⁾ およびマウス試験法⁴⁾ を参考にしてTTXを抽出した。抽出物は, ODSミニカラムに通して0.45µmメンブランフィルターでろ過し, 試験溶液とした (図1)。

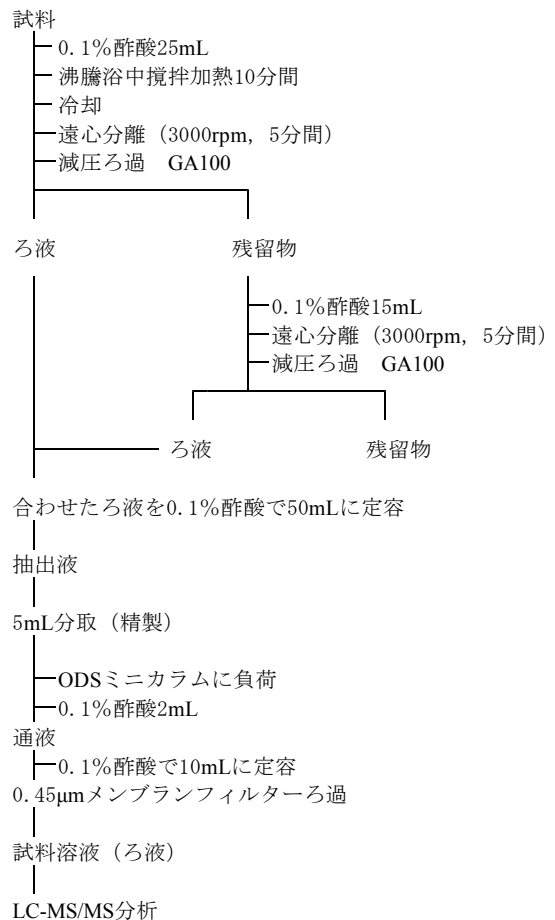


図1 試験フロー (フグ筋肉及び嘔吐物)

3. 5. 2 尿

試料の抽出および分析は、赤木ら⁵⁾の方法を参考に実施した(図2, 表2)。

試料1mLを15mLプラスチック製遠沈管に採り、2%酢酸9mLを加え攪拌後、超音波照射処理を5分間行った。抽出液全量をODSミニカラムに負荷し、最初の通液3mLを廃棄し、残りの通液を得た。遠心フィルターを用い限外ろ過(3500rpm, 5°C, 20分間)し、ろ液1mLを50mLナス型フラスコに採り、メタノール20mLを加え、40°C以下で減圧濃縮し、窒素を吹き付け乾固した後、0.1%酢酸0.5mLに溶解し、0.45μmメンブランフィルターでろ過して試験溶液とした。

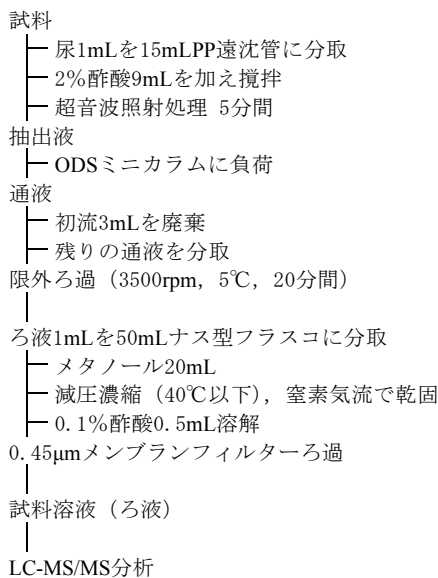


図2 試験フロー(尿)

3. 6 添加回収試験

3. 6. 1 フグ筋肉

シロサバフグの筋肉中0.22, 1.1及び2.2μg/gとなるようにTTX標準溶液を添加し、本法(図1)に従って操作して、真度を求めた。

3. 6. 2 尿

尿中0.01及び0.1μg/mLとなるようにTTX標準溶液を添加し、本法(図2)に従って操作して、真度及び併行精度を求めた。

3. 7 検量線

0.001~1.0μg/mLの範囲で検量線用標準溶液を調製したものを10μLをLC-MS/MSに注入し、ピーク面積法により絶対検量線を作成した。

4 結果及び考察

4. 1 MS/MSの条件

インターフェースには、極性化合物のイオン化に適したESIポジティブモードを選択し、測定モードはMRMとした。

インフュージョン法による最適化を行った結果、TTX(モル質量319)のm/z320(プロトン付加分子), m/z302(水脱離イオン), m/z162が確認された。

プレカーサーイオンをm/z320とし、CE値を35Vにした場合、m/z302の強度(Intensity, cps)が高く、既報³⁾の条件より感度が良かったため、m/z302を定量用イオンとした。また、m/z162を定性用イオンとした(表2)。

4. 2 検量線

0.001~1.0μg/mLの範囲で良好な直線性(相関係数r = 0.9998)が得られた(図3)。

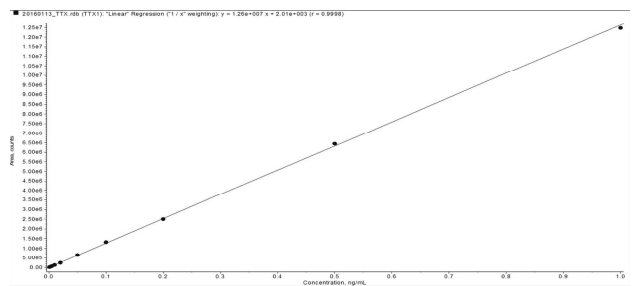


図3 検量線

4. 3 添加回収試験

本法(図1)により、あらかじめTTXが検出されないことを確認したシロサバフグの筋肉に0.22, 1.1及び2.2μg/gのTTXを添加し、回収率を求めた(表3)。すべての添加濃度で回収率が88%以上と良好であった。

表3 シロサバフグ筋肉のTTX添加回収試験結果

添加濃度 (μg/g)	平均検出濃度 (μg/g)	平均回収率(真度) (%)
0.22 (n=2)	0.20	90
1.1 (n=2)	0.96	88
2.2 (n=2)	1.98	90

4. 4 患者嘔吐物のTTX分析

事例12で食中毒調査時に確保できた患者嘔吐物を本法(図1)に従ってTTX分析を行った。その結果、患者嘔吐物から0.29μg/gのTTXが検出された(図4)。当センターでは、これまで生体試料の分析を行ったことがなかったが、今回、患者嘔吐物からTTXが検出され、病因物質

の特定につなげることができた。

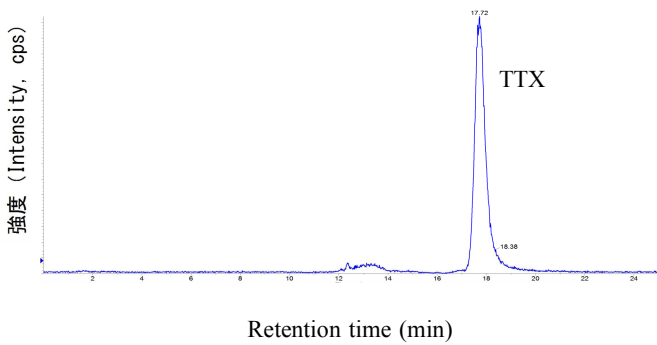


図4 嘔吐物（20倍希釈液）のMRMクロマトグラム

4. 5 尿を用いたTTX分析の検討

健康危機管理の検査機能強化を図る必要性から、食中毒調査時に食品残品や患者嘔吐物の確保が困難な場合でも対応できるよう、健常者の尿を用いてのTTX分析の可能性を検討した。

分析の結果、尿中のTTXピークは、TTX標準液のピーク保持時間と比べ若干短くなり、ピーク高さは半分程度であった（図5）。これは尿中の塩類がイオン化阻害やピーク形状の悪化に影響していると思われる⁵⁾、抽出時の精製法を検討する必要がある。

尿中のTTXピークについて、MS/MS条件のCE値を3段階に変えてEPIモード分析を行い、MS/MSスペクトルを得て標準溶液と比較したところ、TTXのプレカーサーイオンであるm/z320、そのプロダクトイオンであるm/z162, m/z302を確認できた（図6）。

この結果から、ピーク面積を用いて定量して真度及び併行精度を求めた。0.01 μ g/mL添加の回収率（真度）79%，併行精度5.3%，0.1 μ g/mL添加では回収率（真度）84%，併行精度1.6%と良好な結果が得られた（表4）。

秦野ら⁶⁾は入院13日目の患者尿から0.014 μ g/mLのTTXを検出したと報告しており、今後、患者の喫食状況等が不明で、食品残品や患者嘔吐物の確保が困難な場合でも、患者尿があれば数時間で病因物質を特定することが可能と思われる。

表4 尿中のTTX添加回収試験結果

添加濃度 (μ g/mL)	平均検出濃度 (μ g/mL)	平均回収率(真度) (%)	併行精度 (%)
0.01 (n=5)	0.0079	79	5.3
0.1 (n=5)	0.0840	84	1.6

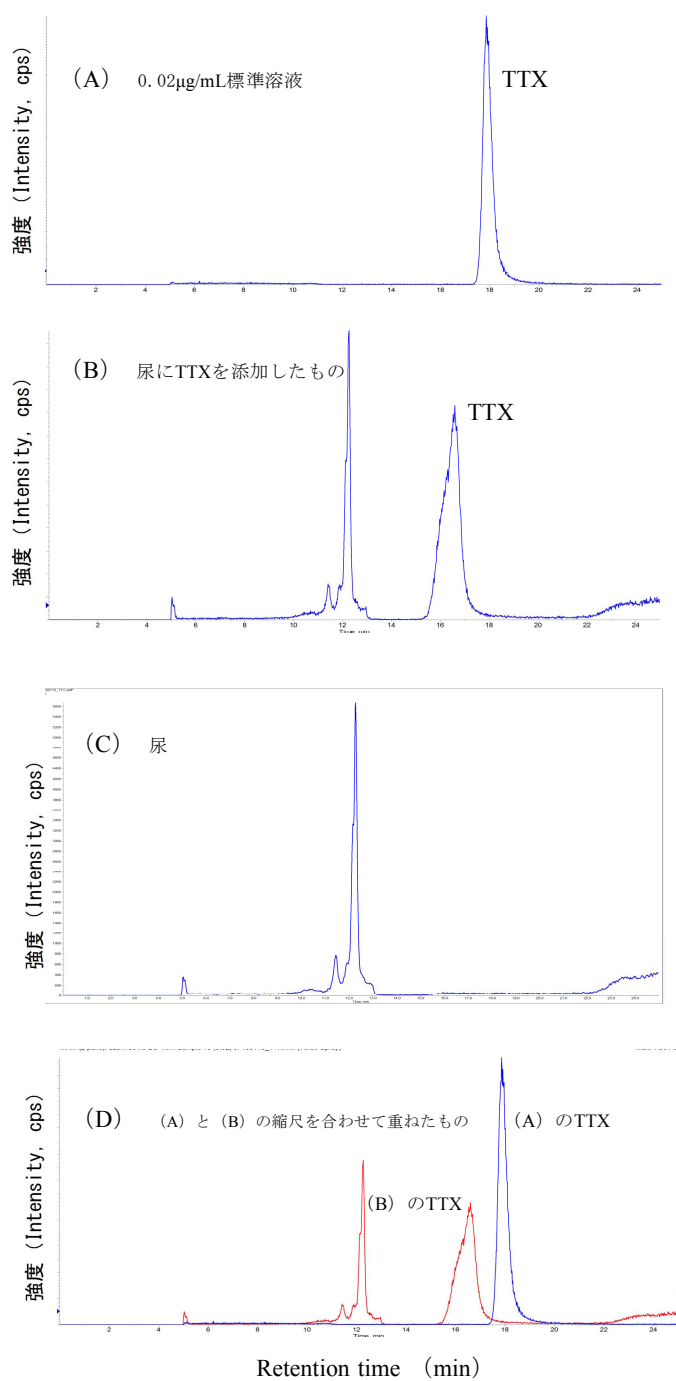


図5 尿中TTXのMRMクロマトグラム

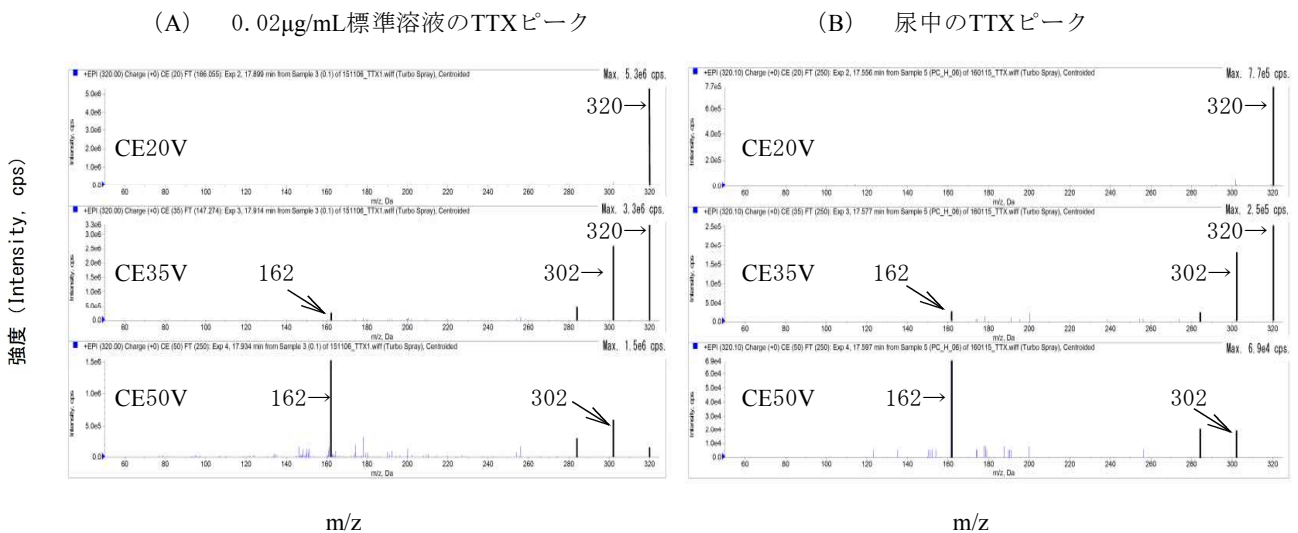


図6 EPIモード分析によるTTXのMS/MSスペクトル

4. 6 検査対応のあり方についての検討

これまで、本県のフグによる食中毒事例において、フグ毒を検査するための試料の確保が困難な場合には、臨床症状、喫食状況等で原因食品や病因物質を特定または推定することがほとんどであった。

2008年以降は、機器分析法を導入し、食品残品が確保できた場合には、機器分析や動物試験を実施し、フグ毒同定や毒性測定を行い、原因食品や病因物質の特定に寄与してきた。

事例12では、原因食品のフグ種は不明であったが、患者嘔吐物を分析したことで病因物質の特定に至った。

健康危機管理の検査機能強化を図る目的で尿中のTTX添加回収試験を実施した結果、精製法に検討の余地はあるものの、TTX分析法の定量性を確認することができた。

これらのことから、当センターにおける健康危機管理の科学的・技術的中核機関としての機能のあり方について、次のとおり考察した。

①データバンク機能として、過去の事例時の情報を収集・整理する。また、検査対応時の分析方法を蓄積する。

②検査機能強化として、新しい分析方法の導入や試料抽出法などの開発を行い、今後の新たな健康危機対応に備える。経験が不足する検査員でも検査対応可能とするため、インハウストレーニング等を行い検査技術の向上を図る。

③緊急時の検査として、試料が届き次第検査が開始できるように平常時から分析方法の確認及び試薬等の整備を行っておく。

そして、緊急時の検査対応結果を情報として蓄積し、今後の危機管理に活かす。つまり、①→②→③→①という持続的・継続的な健康危機管理の検査対応サイクルが

重要であると考え（図7）。

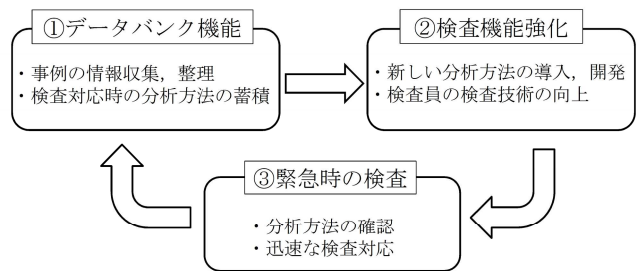


図7 健康危機管理の検査対応サイクル

5 まとめ

今回、過去のフグ食中毒発生状況と検査対応状況を整理することで、機器分析を用いて緊急時の検査に迅速に対応することができた。また、今後の健康危機管理体制の強化も図れた。

今後の課題として、更なる検査機能強化を図るため、また、効果的にフグ食中毒予防啓発を行うために、食中毒の原因となったフグ種を同定する必要がある。そのためには、DNA解析を用いたフグ種鑑別検査法の導入が必要不可欠である。また、フグの地域別分布調査や毒性調査などの基礎的な調査研究も必要である。

最後に、地域及び広域における健康危機管理の科学的・技術的中核機関として、検査対応サイクルを実行し、検査機能強化を図り、緊急時には迅速な検査対応を行っていきたいと考えている。

なお、本研究の一部は第58回鹿児島県公衆衛生学会（2016年5月、鹿児島市）において発表した。

参考文献

- 1) 地域保健対策検討会；地域保健対策検討会 中間報告，平成17年5月23日
- 2) 織田 肇，前田秀雄，他；健康危機管理のための地方衛生研究所のあり方（提言），平成19年3月
- 3) 下堂菌栄子，西村修一，他；フグ中毒事例におけるLC/MS/MSによるテトロドトキシン分析，本誌，11，98～101（2010）
- 4) 公益社団法人日本食品衛生協会；1. フグ毒，食品衛生検査指針 理化学編 2015，813～820（2015）
- 5) 赤木浩一，畑野和宏；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）
- 6) 秦野真澄，難波江芳子，他；フグ食中毒事例におけるLC/MS/MSによるテトロドトキシンの分析，愛媛県立衛生環境研究所報，10，14～17（2007）