

[ノート]

LC-MS/MS を用いた魚肉，ヒト血清及び尿中のパリトキシン分析法の検討

吉岡 直樹^{1*} 宮原 一隆² 風見 眞紀子¹

Determination of Palytoxin by LC-MS/MS in Fish Meat, Human Serum and Urine

Naoki YOSHIOKA^{1*}, Kazutaka MIYAHARA² and Makiko KAZAMI¹

¹*Health Science Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health Science,
1819-14 Kanno, Kanno-cho, Kakogawa 675-0003, Japan*

²*Fisheries Technology Institute, Hyogo Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry
and Fisheries*

Palytoxin (PTX) is one of the most potent marine toxins and has a large and complex chemical structure. We investigated the quantification of PTX in fish meat, human serum and urine using LC-MS/MS. PTX in fish meat was purified by extraction with 50% methanol and washing with n-hexane and chloroform. PTX in human serum and urine was extracted with acetonitrile. The recoveries of PTX spiked into fish muscle (0.01 µg/g), human serum (0.1 µg/mL) and human urine (0.05 µg/mL) were 70.4%, 87.6% and 88.5%, respectively ($n=5$). The limits of quantitation (LOQ) were 0.0025 µg/g (fish muscle), 0.025 µg/mL (human serum) and 0.020 µg/mL (human urine). This method was applied to the analysis of the remaining food sample from the food poisoning case and the serum and urine samples of the patients. The results showed that PTX was below the LOQ in all samples.

I はじめに

パリトキシン (PTX) は腔腸動物であるスナギンチャク類 (*Palythoa* spp.) から単離された毒であり，渦鞭毛藻が産生し，食物連鎖により魚類等に蓄積すると考えられている^{1,2}。PTX は，魚類であるモンガラカワハギやソウシハギ，フィリピン産のカニから検出されたという報告はある³が，日本で流通している食用魚介類からの機器分析による PTX の検出例はないと言われている³。

一方，日本においては，アオブダイやハコフグ，ハタ科魚類を原因とし，横紋筋融解症を主症状とする「パリトキシン様毒」による食中毒が発生している⁴。これら

の毒は PTX に性状が似ている部分もあるが，詳細は未だ明らかになっていない。

今回，LC-MS/MS による魚肉，ヒト血清及び尿中の PTX の分析法を検討した。また，令和 2 年に兵庫県内で発生し，横紋筋融解症等の症状から「パリトキシン様毒」によるものと推定された，ハタ科魚類の喫食を原因とする食中毒について，確認の目的で調理残品，患者血清及び尿中の PTX の分析を行ったので報告する。

II 材料と方法

1. 試料

魚肉として市販のマダラ筋肉を用いた。ヒト血清はコスモバイオ製ヒト血清 (プール) を用い，尿は健常人の尿を用いた。

¹兵庫県立健康科学研究所 健康科学部

* 〒675-0003 兵庫県加古川市神野町神野 1819-14

²兵庫県立農林水産技術総合センター 水産技術センター

2. 試薬及び試液及び器具

2.1 標準品及び標準原液

パリトキシン標準品は和光純薬製生化学用を用い、その構造式をFig.1に示した。この標準品100 µgを50%メタノールに溶解して2 mLとし、50 µg/mL標準原液を調製した。これを50%メタノールで希釈し検量線用標準溶液(0.001~0.5 µg/mL)を作成した。

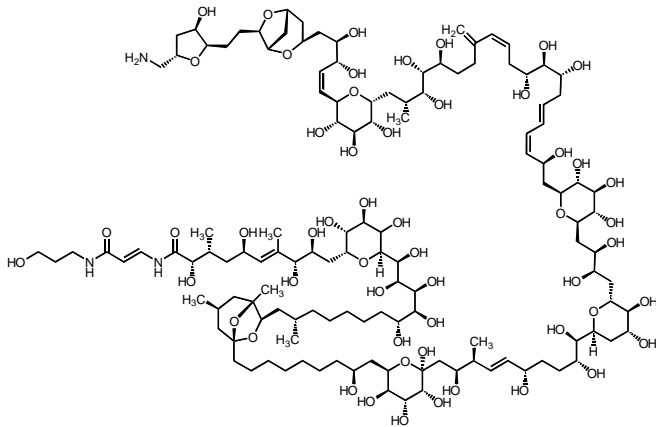


Fig.1 Chemical structure of palytoxin

2.2 その他の試薬

ギ酸(LC/MS用)は富士フィルム和光純薬製を用い、クロロホルム(高速液体クロマトグラフ用)は和光純薬製、メタノール及びアセトニトリル(LC/MS用)、*n*-ヘキサン(残留農薬試験・PCB試験用)は関東化学製を用いた。

3. 装置及び測定条件

ブレンダーはWaring製7012S, ホモジナイザーはIKA製ULTRA-TURRAX T25を使用し、遠心機は日立工機製CF6RN及びCT15REを使用した。振とう機はTAITEC製SR-2DS, ロータリーエバポレーターはBÜCHI製R-200を用いた。LC-MS/MSはAB SCIEX製ExionLC及びQTRAP 4500を使用した。Table 1にLC-MS/MSの測定条件を示した。

4. 試験溶液の調製

4.1 魚肉試料

魚肉(筋肉)試料をブレンダーで均一化し、そのうちの5 gをポリプロピレン製50 mL遠沈管(以下、遠沈管)に入れ、50%メタノール45 mLを加えて、1分間ホモジナイズして抽出した。この抽出液をメスフラスコに移し、50%メタノールで50 mLに定容した。これを別の遠沈管に移して遠心分離(3000 rpm, 5分)後、上清20 mLをさらに別の遠沈管に取り、*n*-ヘキサンを20 mL加え、振とう機を用いて5分間振とうし、遠心分離(3000 rpm, 5分)した後、上層(ヘキサン層)を除去した。この操作を再度行い、得られた下層に水5 mLを添加した。次に、これにクロロホルム20 mLを加えて振とう機を用いて5分間振とうし、遠心分離(3000 rpm, 5分)した後、下層(クロロホルム層)を除去した。この操作を再度行い、得られた上層をロータリーエバポレーターで約1 mLまで濃縮し、90%メタノールで2 mLに定容したものを、LC-MS/MS試験溶液とした。

Table 1 LC-MS/MS operating conditions

LC parameters	Column	Agilent Technologies Poroshell 120 EC-C18 (100 mm×3.0 mm, 2.7 µm)
	Mobile phase	A: 50mM formic acid, B: acetonitrile
	Gradient elution	A:B=95:5(0 min)→95:5(3 min)→5:95(18 min) →5:95(20 min)→95:5(20.01 min)→95:5(30 min)
	Flow rate	0.30 mL/min
	Column temperature	40°C
	Injection volume	5 µL
	Divorter valve	Waste out (0–10 min, 12–30 min)
	(Only serum and urine sample)	To MS (10–12 min)
	MS parameters	Ionization mode
Curtain Gas		10 psi
Collision Gas		8 psi
IonSpray Voltage		4500 V
TurboIonSpray teperature		200°C
Ion Source Gas 1		80 psi
Ion Source Gas 2		70 psi
Ionization parameters of analyte		
Quantifier	Q1: 1340.59, Q3: 326.90 (DP: 1 V, CE: 37 V, CXP: 14 V)	
Qualifier	Q1: 1331.56, Q3: 327.10 (DP: 101 V, CE: 37 V, CXP: 14 V)	

4.2 血清試料

血清試料0.1 mLに水0.15 mLを加えて混合し、アセトニトリルを加えて1 mLに定容し、ボルテックスミキサーで混合し(30秒)、超音波処理(1分)を行った。これをマイクロチューブに移して、遠心分離(12000 rpm, 5分)し、得られた上層をLC-MS/MS試験溶液とした。

4.3 尿試料

尿試料0.25 mLにアセトニトリルを加えて1 mLに定容し、ボルテックスミキサーで混合した(30秒)。これをマイクロチューブに移して、遠心分離し(12000 rpm, 5分)、得られた上層をLC-MS/MS試験溶液とした。

5. マトリックス効果の検討

PTX 1 µg/mL標準溶液0.1 mLに50%メタノールを加えて1 mLに定容したもの(0.1 µg/mL溶媒標準溶液)と、同様にPTX 1 µg/mL標準溶液0.1 mLにブランク試料(魚肉、ヒト血清及び尿)から調製した試験溶液を加えて1 mLに定容したもの(0.1 µg/mLマトリックス標準溶液)を作製し、LC-MS/MSで分析した。

6. 添加回収試験

魚肉試料、血清試料、尿試料にそれぞれPTX 0.1 µg/mL標準溶液を0.5 mL、PTX 0.25 µg/mL標準溶液を0.04 mL、PTX 0.25 µg/mL標準溶液を0.05 mL添加し、試験溶液を調製した。添加量は、それぞれ試料あたり0.01 µg/g、0.1 µg/mL、0.05 µg/mL相当である。

III 結果及び考察

1. 測定条件の検討

PTXの測定条件は、Suzukiらの条件⁵⁾を参考とした。Suzukiらは、PTX(精密質量:2678.48)の定量イオンとして1331>327を用いていたが、今回PTX標準溶液でLC/MSイオン化条件の最適化を行ったところ、 $[M+2H-H_2O]^{2+}$ と推測されるプリカーサーイオンのトランジション1331.6>327.1より、 $[M+2H]^{2+}$ と推測される1340.6>326.9の方が高感度であったため、後者を定量イオン、前者を確認イオンとして用いた。また、分析カラムとして、C8カラムの代わりに汎用性の高いC18カラムを、移動相はアセトニトリル-ギ酸アンモニウム水溶液を用いて検討した結果、PTXの良好なピーク形状が得られた。検量線は0.001~0.5 µg/mLの範囲で直線性が見られた($R^2=0.999$)。

2. 試験溶液調製法の検討

2.1 魚肉試料

魚肉試料からの試験溶液調製法は、Suzukiらの方法⁵⁾を参考とした。本分析法における試料マトリックスの影響を調べるために、PTXの0.1 µg/mLマトリックス標準溶液と0.1 µg/mL溶媒標準溶液のLC-MS/MSのピーク面積を比較すると、1.06(溶媒標準溶液を1とする)であり、顕著なマトリックス効果は見られなかった。

市販のマダラ筋肉にPTXを0.01 µg/g相当添加した時のLC/MSクロマトグラムをFig.2に示した。添加回収率は70.4±6.9%($n=5$)であり、良好な結果が得られた。また定量限界値は0.0025 µg/g($S/N=10$)と算出された。

2.2 血清試料

ヒト血清からのPTX分析の報告は、文献を調査した範囲では見られなかったが、Batesらはサングを誤食したPTX中毒の疑いのあるイヌ血液からの分析例を報告⁶⁾しており、本分析法を試験溶液調製の参考とした。

当初、血清に直接アセトニトリルを加えて除タンパクを行うと、血清由来のタンパク質が大きな塊となって沈殿しPTXの回収率は低下した。しかし血清0.1 mLに水0.15 mLを加えて2.5倍に希釈し、アセトニトリルを加えてから超音波処理を行うと、沈殿は細かくなり、回収率は改善した。また血清試料では、魚肉試料のような n -ヘキサンやクロロホルム洗浄による精製を行っておらず、血清試料からのマトリックスの影響が、低い回収率の原因の1つだと考えられた。そこで、血清試料からのマトリックスの影響を低減するために、LCからMS検出器につながる流路切り替えバルブを、PTXの保持時間付近の10~12分間のみMS検出器(0~12分及び12分~30分は廃液)とすると回収率は改善した。その結果、PTXの0.1 µg/mLマトリックス標準溶液と0.1 µg/mL溶媒標準溶液のLC-MS/MSのピーク面積を比較すると、1.08(溶媒標準溶液を1とする)であり、顕著なマトリックス効果は見られなくなった。

血清にPTXを0.1 µg/mL相当添加した時のLC/MSクロマトグラムをFig.3に示した。添加回収率は87.6±3.9%($n=5$)であり、良好な結果が得られた。また定量限界値は0.025 µg/mL($S/N=10$)と算出された。

2.3 尿試料

尿試料からのPTX分析の報告も、文献を調査した範囲では見られなかったが、血清試料からの調製法を参考にした。尿試料では、アセトニトリルによる除タンパクの際に生成する沈殿の量は少なく、水による希釈操作と超音波処理は省略した。またLC/MSの流路切り替えバルブ

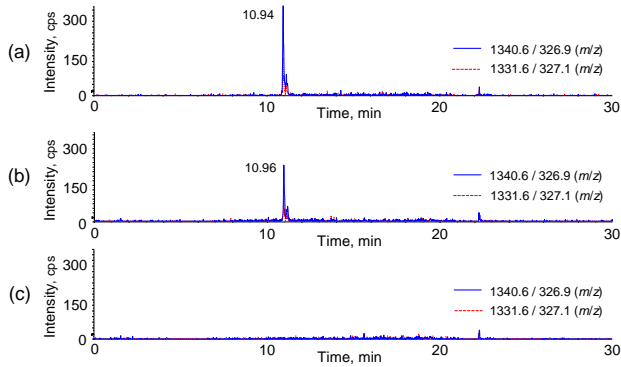


Fig.2 Typical LC-MS/MS chromatograms obtained from 0.01 µg/mL PTX standard solution (a), fish sample fortified with 0.01 µg/g (b) and blank fish sample (c)

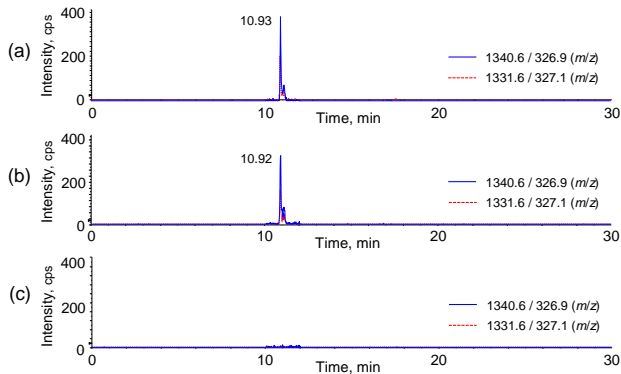


Fig.3 Typical LC-MS/MS chromatograms obtained from 0.01 µg/mL PTX standard solution (a), human serum sample fortified with 0.1 µg/mL (b) and blank serum sample (c)

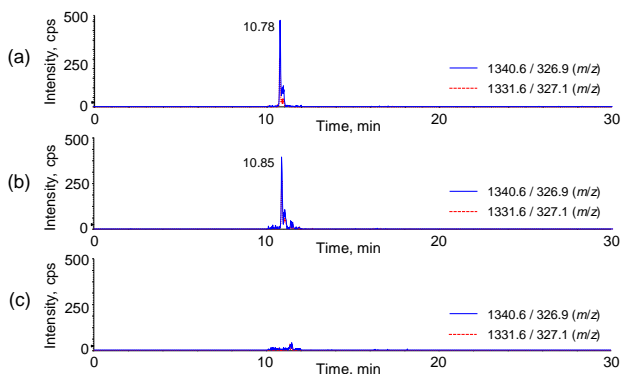


Fig.4 Typical LC-MS/MS chromatograms obtained from 0.0125 µg/mL PTX standard solution (a), human urine sample fortified with 0.05 µg/mL (b) and blank urine sample (c)

も血清試料と同様に10~12分間のみMS検出器とした。

試料マトリックスの影響を調べるための、PTXの0.1 µg/mLマトリックス標準溶液と0.1 µg/mL溶媒標準溶液のLC-MS/MSのピーク面積の比較では、0.98 (溶媒標準溶液を1とする)であり、顕著なマトリックス効果は見られなかった。

尿にPTXを0.05 µg/mL相当添加した時のLC/MSクロマトグラムをFig.4に示した。添加回収率は $88.5 \pm 4.8\%$ ($n=5$)であり、良好な結果が得られた。また定量限界値は0.020 µg/mL ($S/N=10$)と算出された。

3. 食中毒事例検体の分析

3.1 事例の概要

令和2年11月、兵庫県内の飲食店においてハタ科魚類 (当該魚は遺伝子解析による鑑定でハタ科魚類の交雑種と推定) を「紋クエ料理」として提供された食事の喫食者のうち14名が、筋肉の痛みや横紋筋融解症、ミオグロビン尿症等の症状を呈した。

3.2 分析結果

本事例の調理残品である魚肉 (筋肉部分1検体)、患者血清及び尿 (それぞれ8検体) を分析した結果、PTXはすべて定量限界値未満であった。

過去のハタ科魚類の喫食によるパリトキシン様中毒は、平成12年の高知県での魚種不明のハタ科魚類^{7,8)}、令和元年の東京都でのツチホゼリ (ハタ科) 等の例⁹⁾ 等が報告されている。パリトキシン様毒の本体は解明されていないが、今回分析した食中毒事例は患者の症状からパリトキシン様中毒によるものと推定された。

過去の事例においても自然毒の原因物質の特定は難しく、今後一層の微量定量法の検討及び原因物質の探索の必要性が示唆された。

IV 結論

LC-MS/MSを用いた魚肉、ヒト血清及び尿中のPTXの分析法を検討した。魚肉は50%メタノールで抽出し、*n*-ヘキサン及びブクロホルム洗浄により精製した。血清及び尿はアセトニトリルによる除タンパクのみで分析が可能であった。定量限界 ($S/N=10$) は、魚肉、血清、尿試料でそれぞれ、0.0025 µg/g、0.025 µg/mL、0.020 µg/mLと算出された。本分析法を用いて、中毒事例の調理残品、患者血清及び尿中のPTXの分析を行ったが、すべて定量限界値未満であった。

謝 辞

試料採取、情報収集していただきました兵庫県赤穂健康福祉事務所及び兵庫県生活衛生課の関係者の方々、並びに分析法に関して助言をいただきました宮崎県日向保健所 野中勇志課長、宮崎県衛生環境研究所 高山清子主査、国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 大城直雅室長に深謝致します。

文 献

- 1) 安元健：海産自然毒中毒の最近の傾向. *Mycotoxins*, **63**, 73-84 (2013)
- 2) 内藤裕史：中毒百科—事例・病態・治療— (改訂第2版). 南江堂, 東京, 488-489 (2001)
- 3) 相良剛史, 西尾幸郎：パリトキシン分析における留意点. *食衛誌*, **49**, J-189-J-190 (2008)
- 4) 谷山茂人, 高谷智裕：マリントキシンをめぐる動向3 魚類の毒(2)：パリトキシン様毒. *食品衛生研究*, **59**, 45-51 (2009)
- 5) Suzuki, T., Watanabe, R., Matsushima, R., Ishihara, K., Uchida, H., Kikutsugi, S., Harada, T., Nagai, H., Adachi, M., Yasumoto, T., Murata, M. LC-MS/MS analysis of palytoxin analogues in blue humphead parrotfish *Scarus ovifrons* causing human poisoning in Japan. *Food Addit. Contam. Part A*, **30**, 1358-1364 (2013)
- 6) Bates, N., Morrison, C., Flaig, L., Turner, AD. Paralytic shellfish poisoning and palytoxin poisoning in dogs. *Vet. Rec.*, **187**, e46 (2020)
- 7) 高橋朗：パリトキシン様物質による食中毒. *食衛誌*, **42**, J-300-J-302 (2001)
- 8) 山崎浩史, 西山謹吾, 片岡由紀子, 岡本健, 山崎史幹, 島津友一, 真鍋雅信：パリトキシン様物質による集団中毒. *日救急医学誌*, **14**, 211-214 (2003)
- 9) 木村圭介, 田中智哉, 観公子, 中野久子, 新藤哲也：化学物質及び自然毒による食中毒事件例(令和元年). *東京健安研七年報*, **71**, 173-180 (2020)

(令和4年2月1日受理)