

調査研究の目的

1 LC-MS/MS分析の精度向上

- ・検体からの抽出方法・条件の検討
- ・LC-MS/MS分析条件及び回収率の向上

2 細胞培養法を用いた検出法の開発

- ・先行事例を参考に分析条件等の検討

PTX及びPTX様毒の検出技術の確立

7

調査研究の目的

1 LC-MS/MS分析の精度向上

- ・検体からの抽出方法・条件の検討
- ・LC-MS/MS分析条件及び回収率の向上

2 細胞培養法を用いた検出法の開発

- ・先行事例を参考に分析条件等の検討

PTX及びPTX様毒の検出技術の確立

8

対象

- ・ 魚種
アオブダイ
- ・ 採取場所
日南の漁港
- ・ 部位
筋肉、肝臓



成魚：額にコブ
幼魚はコブがなく
他種と判別が難しい

9

PTX抽出：従来法

試料+メタノール

↓
ホモジナイズ

↓
遠心分離

↓
精製：ヘキササン×2

↓
精製：クロロホルム×2

↓
濃縮・定容

↓
LC-MS/MS

- ・ 課題
 - ▶ 時間 : 2日
 - ▶ 回収率 : 60%程度
- ・ 検討
 - 操作性・回収率向上
 - ▶ 使用器具(遠沈管)
 - 回収率向上
 - ▶ 精製工程

10

使用する遠沈管の検討

抽出・精製工程における
遠沈管の使用：3時間

3時間の吸着試験

対象：ガラス製×1
PP製×4
PMP製×1

	材質	回収率 (n=3)
従来法	ガラス	42%
A社	PP	55%
B社	PP	56%
C社	PP	59%
D社	PP	74%
E社	PMP	86%

11

精製工程の検討



- ・ 従来法
 - 遠心分離 約1,200 G 5分
 - 分離度 低い
(泡沫発生)
- ・ 改良法
 - 冷却 -80°C 10分
 - 遠心分離 3,000 G 2分
 - 分離度 向上

2層の境界線

12

従来法と改良法の比較

	従来法	改良法
使用器具	ガラス器具	PMP製遠沈管 (クロロホルム対応)
ホモジナイズ	ポリロン ホモジナイザー	超音波
遠心分離	約1,200 G	3,000 G
精製:ヘキサン	—	-80°C冷却
抽出・精製工程	2日	1日
回収率	筋肉・肝臓:60%	筋肉:86%、肝臓:107%

13

調査研究の目的

1 LC-MS/MS分析の精度向上

- ・検体からの抽出方法・条件の検討
- ・LC-MS/MS分析条件及び回収率の向上

2 細胞培養法を用いた検出法の開発

- ・先行事例を参考に分析条件等の検討

PTX及びPTX様毒の検出技術の確立

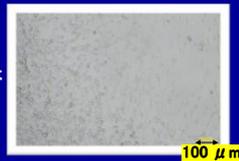
14

先行研究

長崎県環境保健研究センター

RD-A細胞株(ヒト胎児横紋筋肉腫)を使用
アオブダイ肝臓から、EU基準(貝可食部の
PTX推定許容値30 ng/g相当)を検出できる
手法を確立

- ・ RD-A細胞株を培養、細胞の確保
- ・ 検査手順の検討



光学顕微鏡より

15

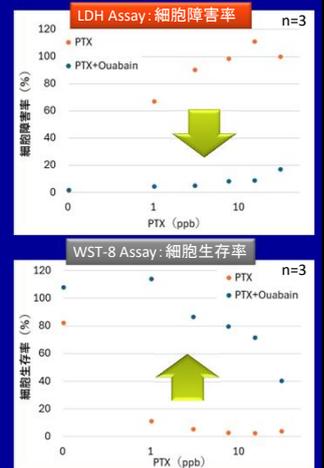
PTXの検出(標準品)

<使用キット>

- ・LDH Assay: 死細胞の指標
- ・WST-8 Assay: 生細胞の指標

<条件>

- ・使用培地: 細胞増殖用培地
No.104
- ・培養期間: 24 h(1日)
- ・細胞数: 25,000 cells/well
- ・ウアバイン: 10 mM(5 μL/well)
- ・試料添加量: 60 μL/well



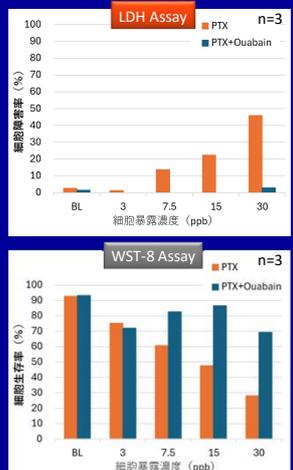
16

PTXの検出(添加試験)

<抽出フロー>

- 筋肉1.0 g
- ←PBS(-)4 mL
- 加温(100°C 20分)
- 遠心分離(2200 rpm 10分)
- 上層
- フィルター(滅菌)
- 暴露試料(0.25 g/mL)

30 ng/g(筋肉)の
検出が可能

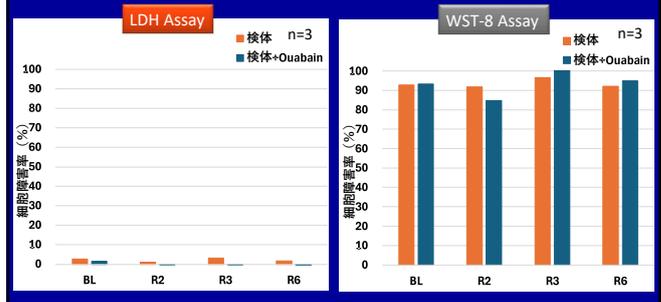


17

食中毒検体を使用したPTX様毒の検出

本県で令和2,3,6年度に発生した原因物質がPTX様毒
と疑われる食中毒3検体を検査した。

▶ 不検出



18

まとめ

<LC-MS/MS分析法>

使用器具や精製工程の改良等を行うことで、
抽出時間を短縮し、回収率の向上を実現

<細胞培養法を用いた検出法>

PTX: 30 ng/g(筋肉)の検出が可能であったが、
より高感度での検出を実現するには抽出
方法等の検討が必要

PTX様毒: 食中毒疑いの3検体を検査した結果、
不検出であったが、先行研究と同じ
結果であり、再確認できた