

2) LC-MS/MS によるセレウリドの迅速分析法の開発

八木一真 山口奈穂*¹ 小林将英*² 福島宏暢*³

要 旨

セレウス菌による嘔吐型食中毒の原因毒素であるセレウリドについて、LC-MS/MS による迅速分析法の開発を行った。本分析法について、食品を用いた妥当性評価ガイドラインに準拠した妥当性評価試験、及び人工吐しゃ物を用いた添加回収試験を実施したところ、双方とも良好な結果が得られた。このことから、本分析法は食品のみならず生体試料においても有効な手法であることが示された。

キーワード：セレウリド，LC-MS/MS，妥当性評価，人工吐しゃ物，生体試料

はじめに

セレウス菌の食中毒は、臨床症状により下痢型と嘔吐型に分類され、国内で発生する食中毒の大半が嘔吐型である。この嘔吐型食中毒を引き起こすとされる原因毒素がセレウリド（以下「CER」という。）であり、原因食品として穀物類や複合調理食品が大部分を占め、中でもチャーハンやピラフ等での報告が最も多い¹⁾。市場に流通する加工食品、調理食品等の汚染状況を調べた報告²⁾によると、セレウス菌による汚染率は 10.2%、うち CER 産生株は 4.9%とセレウス菌は食品中に広く分布し、そのうちの数%が CER 産生能を持つことが明らかとなっている。

全国におけるセレウス菌による食中毒は、過去 10 年間（2012 年から 2021 年）で 56 件、患者数 774 名³⁾であり、頻発する食中毒ではないが、本県においては、2001 年に保育所主催の餅つき大会で提供されたあん入り餅を原因とし、総患者数 300 名を超える大規模な食中毒⁴⁾が発生、また期間を置いて 2016 年にも飲食店で提供された昼食が原因で発生している。

代表的な CER の検査法として、Hep-2 細胞空胞化試験⁵⁾が挙げられるが、この試験の問題点は結果判定までに時間を要し、熟練者による手技が必要であることに加え、再現性が悪い点等が挙げられる。

近年、Hep-2 細胞空胞化試験の代替法として高感度かつ、高選択性の LC-MS/MS を用いた CER の分析法の報告⁶⁻⁹⁾がなされている。そこで、本県においても今後発生しうるセレウス菌による食中毒を見据え、検査体制強化を目的に LC-MS/MS を用いた CER の迅速分析法の構築を行った。また、本法について、「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」¹⁰⁾（以下「ガイドライン」という。）に基づく妥当性評価試験を行い、加えて、患者検体として吐しゃ物を分析することを想定し、人工吐しゃ物を用いて添加回収試験を実施したところ、双方とも良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試薬等

CER 標準液（50 µg/mL メタノール溶液）は、富士フィルム和光純薬（株）製を用いた。

固相カラムは、GL Sciences 社製の InertSep HLB FF (200 mg/20 mL) を用いた。

メタノール（以下「MeOH」という。）（HPLC 用）、アセトニトリル（以下「ACN」という。）（HPLC 用）、酢酸アンモニウム、ペプシン（1:10000、豚胃粘膜由来）、塩酸（特級）：富士フィルム和光純薬（株）製

塩化ナトリウム（特級）：関東化学（株）製

0.1%ペプシン含有人工胃液：塩化ナトリウム 2.0 g、塩酸 7.0 mL、ペプシン 1.0 g に水を加えて 1,000 mL としたものを。

2. 検用試料

市販のチャーハン及びあん入り餅をフードプロセッサで細切したもの。チャーハンは冷凍食品を電子レンジで加熱したものをを用いた。いずれの食品も CER 不検出の試料（以下「ブランク試料」という。）である。

結果と考察

*¹ 現健康福祉部健康局薬務衛生課 *² 現熊本県食肉衛生検査所 *³ 現環境生活部環境局環境保全課

1. LC-MS/MS の測定条件の検討

まず、MS 部の測定条件を決定するため、CER 標準溶液をインフュージョンにより直接 MS 部に導入し、イオン化条件を検討した。ポジティブイオンモードで優位に観測されたアンモニウム付加体である m/z 1170.9 をプリカーサーイオンとし、プロダクトイオンは、感度及び選択性の高い m/z 1125.7 を定量イオンとして設定し、また定性イオンは 3 つ選択し、条件を最適化した (表 1)。

続いて、LC 部の条件設定を行った。移動相に用いる溶媒は、既報^{6)~9)}では MeOH を用いていたが、溶出力が強く、分析時間の短縮及び感度上昇が見込まれる ACN にて検討を行った。また、CER が ODS カラムにより保持されることが既報^{6)~9)}により報告されていることから、分離用カラムは Waters 社製の ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1×50 mm, 1.7 μm) を用いることとし、グラジエント条件、移動相中の酢酸アンモニウム濃度及び注入量等の検討を行った。

以上の検討から最適条件を探索し測定した結果、グラジエント条件を表 2 とし、LC-MS/MS 測定条件を表 3 にしたところ、保持時間約 5.5 分付近に良好なピークが認められた (図 1)。

表 1 CER の MS/MS 最適化条件

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (V)
Ceruleide (C ₅₇ H ₉₆ N ₆ O ₁₈)	1170.9	1125.7	66	38
		698.4	66	52
		741.4	66	48
		940.5	66	46

表 2 グラジエント条件

Time (min)	A液 (%)	B液 (%)	C液 (%)
0	75	10	15
1	75	10	15
6	99	1	0
10	99	1	0
10.1	75	10	15
15	75	10	15

表 3 LC-MS/MS 測定条件

LC 部	ACQUITY UPLC H-Class Plus (Waters 社製)
Analytical Column	ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1×50 mm, 1.7 μm) (Waters社製)
Temperature	60°C
Mobile Phase	A : ACN B : 100 mM 酢酸アンモニウム含有水 C : 水
Gradient	表2参照
Flow Rate	0.4 mL/min
Injection Volume	3 μL
MS/MS 部	Xevo TQ-XS (Waters 社製)
Capillary Voltage	0.5 kV
Source Temperature	150°C
Desolvation Temperature	400°C
Cone Gas Flow	150 L/hr
Desolvation Gas Flow	800 L/hr
Ionization	ESI(positive)
MRM	表1参照

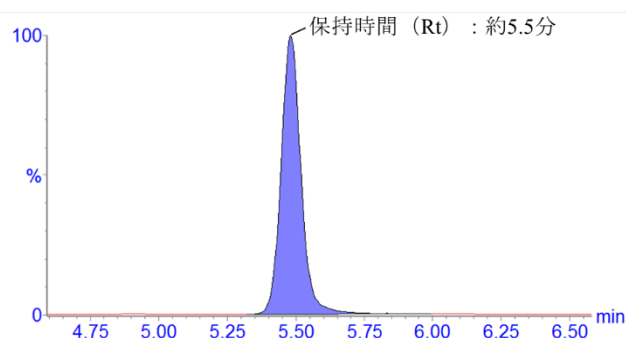


図 1 CER のクロマトグラム

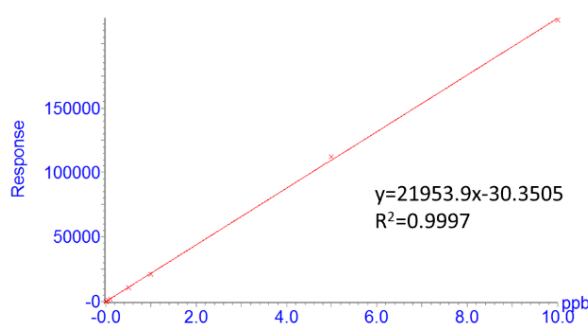


図 2 CER の検量線

2. 検量線の評価

定量範囲を確認するため、CER 標準溶液を 100%ACN で希釈して調製した 0.005~10 ng/mL の検量線用標準溶液を本条件で測定し、得られた検量線を図 2 に示した。測定範囲 0.005~10 ng/mL の範囲において良好な相関 ($R^2 \geq 0.999$) 及び直線性が得られ、定量限界に対応する

濃度 (0.005 ng/mL, 以下「下限値」という。) から得られるピークの S/N 比を求めたところ、ガイドラインで示されている定量限界の指標値 (S/N 比 ≥ 10) を満たしていたため、0.005~10 ng/mL の範囲において定量可能であることを確認した。

3. 前処理法の検討

食品試料を対象として前処理法の検討を行った。用いる抽出溶媒は既報^{6)~9)}を参考とし、MeOHを用いることにした。

試料 1.00g を採取し、MeOH 10 mL を加え、振とう後 (5 min) 遠心 (3,000 rpm, 5 min) し、上清をガラスロート (11G2) でろ過し回収した。さらに、残渣に MeOH 5 mL を加えて、同様の操作を行い、上清を合わせて MeOH で 15 mL に調製したものを抽出液とした。

続いて、精製法の検討を行った。LC-MS/MS による分析では、試料中に含まれる夾雑成分の影響で分析対象成分のイオン化が促進又は抑制される (以下「マトリックス効果」という。) ことにより、測定値に影響を与える可能性があるため、マトリックス効果を見逃す程度の精製が必要である。当所においては、危機管理検査時に希釈法¹¹⁾を選択する機会が多いが、試料中に含有する CER の濃度は数 ppb~数 ppm 程度と低い傾向にある³⁾。希釈法を用いると 10,000 倍程度の希釈が必要であり、試料中の CER 濃度が下限値を下回るおそれがあることから、希釈法は選択せず、操作も比較的簡便である固相抽出を選択し、精製法の構築を行った。

食品試料の前処理法としてポリマー系カートリッジの Oasis HLB を用いた報告^{6)~9)}がされているが、油脂分の多い検体の場合、目詰まりを生じることがある。そこで、充填剤の粒子径が大きく、通液性が改善された目詰まりの生じにくい GL Sciences 社製の InertSep HLB FF (200 mg/20 mL) で精製条件の検討を行った。

まず、負荷する際に用いる溶媒及びその組成を検討した。既報によると CER は HLB カラムにおいて、MeOH 濃度 50~80% の範囲で保持されることが確認されている⁶⁾。また、MeOH 試料抽出液を濃縮乾固後、70% 以下の MeOH 濃度で再溶解させると油脂分の多い試料では不溶物が目詰まりの原因となったことが報告されている⁸⁾。そこで、試料抽出液を濃縮乾固及び再溶解等の操作は行わず、また試料中に含有する CER 濃度がわずかであることを想定し、抽出液全量をカラムに負荷することとした。これらを考慮した結果、負荷する際の溶媒組成は 75%MeOH に設定し、MeOH 抽出液 15mL に水を 5 mL 添加し、20 mL 全量を負荷することとした。なお、n=5 で 0.5 ng/mL 標準溶液 (溶媒 : 75%MeOH) を 20 mL 負荷し、溶出挙動を確認したところ、CER は溶出しなかった。

続いて、洗浄液及び溶出液に用いる溶媒及びその組成を検討した。LC 移動相に用いる溶媒と試験溶液を統一するため、洗浄液及び溶出液は ACN で検討した。事前に 75%MeOH 10 mL でコンディショニングした固相カ

ラムに 0.5ng/mL 標準溶液 (溶媒 : 75%MeOH) を 20 mL 負荷後、段階的に濃度割合を変化させた ACN 液を 10 mL 通液した際の各々の溶出挙動を図 3 に示した。CER が全く溶出しない濃度は 50%ACN 以下であり、80%ACN で回収率が 97.3% となり、80% 以上でほぼ全量溶出できることが明らかとなった。そこで、洗浄液を 50%ACN 10mL、溶出液を 100%ACN 10 mL とし、100%ACN で 10 mL に定容し、フィルターろ過 (0.2 μm) したものを試験溶液とした。図 4 に詳細な分析フローを示す。

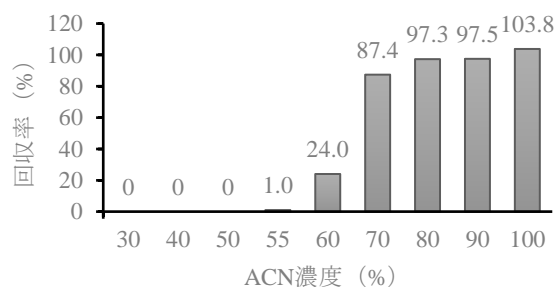


図 3 ACN 濃度に対する CER の溶出挙動

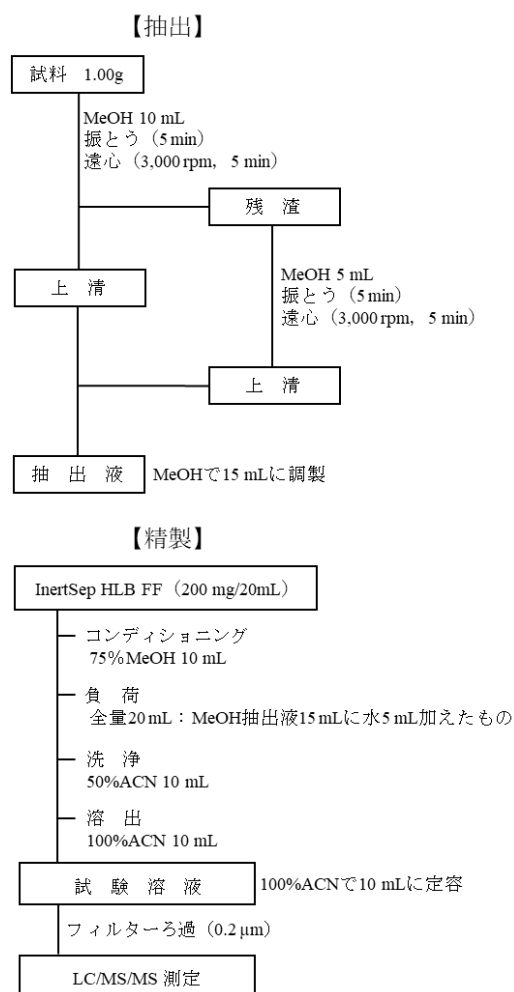


図 4 CER の分析フロー

また、固相抽出は固相と対象物質との相互作用を利用する手法であり、通液速度が速いと対象物質が保持されずに固相を通過することがあり、再現性不良の原因となる。そこで、負荷時は 1 mL/min、洗浄及び溶出時は 2 mL/min を超えない速度で通液することとした¹²⁾。

4. マトリックス効果検証

田口らの手法¹³⁾を参考に、ブランク試料を用いてマトリックス効果の検証を行った。前処理後の試験溶液に標準溶液を加え、1 ng/mL に調整したものをマトリックス標準溶液とし、同濃度の溶媒標準溶液とピーク面積値を比較し、溶媒標準溶液のピーク面積値に対するマトリックス標準溶液のピーク面積値の比率を百分率で示したものをマトリックス効果 (%) とした。分析は、並行 2 日間、各日 5 回行い、ピーク面積値の平均を使用した。その結果、チャーハンは 1 日目 95.4%、2 日目 94.9%、あん入り餅は 1 日目 107.9%、2 日目 108.9% となり、前処理後の試験溶液のマトリックス効果は無視できる程度であると判断した。

5. 食品試料を用いた妥当性評価試験

本法の妥当性を評価するために、ブランク試料を用いて、ガイドラインに基づいた妥当性評価試験を実施した。分析者 3 名による 2 併行 2 日間の添加回収試験を行い、選択性を評価するとともに真度、併行精度及び室内精度を算出した。濃度は 1 濃度とし、添加量は CER のヒト最小発症量 1 µg⁴⁾を考慮し、原因食品 100 g を摂取すると仮定した濃度 10 ng/g となるように標準溶液を添加後、30 分静置させた。

まず、図 5 に示すとおり、ブランク試料には CER の保持時間付近に妨害ピークは確認されなかった。

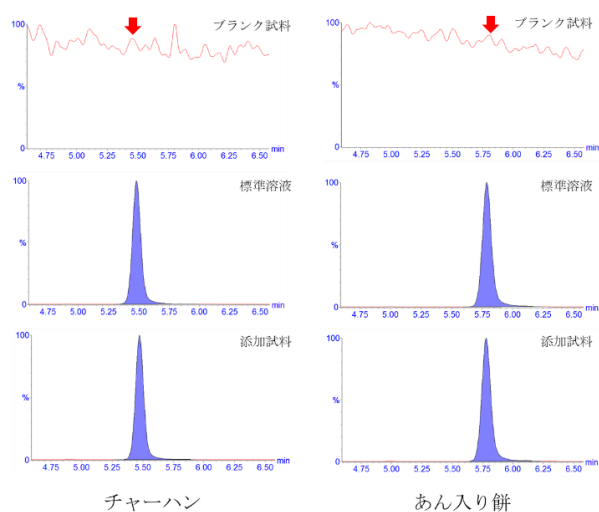


図 5 選択性の評価

次に、真度及び精度に関する結果を表 4 に示す。2 食品とも真度及び精度がガイドラインの目標値 (0.001 µg/g<添加濃度 ≤ 0.01 µg/g のとき : 真度 70~120%, 併行精度 < 25%, 室内精度 < 30%) を満たす良好な結果が得られたことから、本法の食品試料への有効性が示された。

表 4 妥当性評価試験結果

食品	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
チャーハン	90.2	2.6	2.8
あん入り餅	94.1	1.8	1.8

6. 人工吐しゃ物を用いた添加回収試験

本法の吐しゃ物への適用可否を評価するため、人工吐しゃ物を用いた添加回収試験を実施した。安藤らの報告¹⁴⁾を参考に、嘔吐型食中毒事例の原因食品として報告の多いチャーハンを用いて人工吐しゃ物の作成を行った。試料 10.0 g に 0.1% ペプシン含有人工胃液 50 mL を加え、恒温槽で 37°C に保ち、振とうさせながら反応させた。セレウス菌による嘔吐型食中毒の潜伏期間は 30 分~6 時間⁴⁾であり、ヒトにおける食物の胃内滞留時間は、平均して 2~3 時間、脂溶性食品等の消化しにくい食品は、4~5 時間程度である¹⁵⁾。これらのことを考慮し、反応開始後 3 時間後と 5 時間後の十分反応させた人工吐しゃ物に本法を適用し、添加回収試験による評価を行った。なお、山下らの吐しゃ物分析事例⁹⁾によると吐しゃ物中の CER 濃度は 0.070 µg/g 及び 0.091 µg/g と比較的低濃度での報告がなされているため、添加量は報告値よりもさらに低い 10 ng/g となるよう人工吐しゃ物に標準溶液を添加した。

結果は表 5 に示したとおり、回収率及び相対標準偏差も良好であったことから、胃液成分や食品分解物による著しい定量妨害はなく、吐しゃ物も適用できることが示唆された。

表 5 人工吐しゃ物を用いた添加回収試験結果

経過時間	回収率 (%)	回収率平均 (%)	相対標準偏差 (%)
3 時間	97.2, 97.5, 93.1	95.9	2.0
5 時間	96.0, 96.0, 96.4	96.1	0.1

7. 食中毒実試料を用いた分析

2016 年に本県で発生した事案について、冷凍保存 (-20°C) されていた患者検体 (吐しゃ物及び便) を本法により分析した。PCR 法で CER 合成酵素遺伝子陽性となった検体の分離培養菌は、Hep-2 細胞空胞化試験で陽性

と判定されており CER 産生株と判明している。保管する検体量がすべて 1 g 以下であったことから、検査時の採取量を 1 g 未満で設定し、本法により分析を行った。

結果を表 6 に示す。PCR 法で陽性となった検体全てから CER が検出された。定量値については、菌の培養検査時にペプトン加生食等で希釈した検体もあり、実際はより高濃度で CER が含有されると推測される。また、本法は検体量が 0.1 g 程度と微量であっても検査可能であることが明らかとなった。

表 6 食中毒実試料分析結果

種類	採取量	PCR結果	CER定量値 (ppb)	相対標準 偏差 (%)
便	100 μL	陽性	0.5 (n=1)	-
便	0.1 g	陽性	104.4* (n=3)	17.4
吐しゃ物	100 μL	陽性	59.7* (n=3)	2.8
吐しゃ物	0.6 g	陽性	1.1 (n=1)	-
便	0.1 g	陰性	-	-
便	100 μL	陰性	-	-

*n=3の平均値を示した

ま と め

セレウス菌による嘔吐型食中毒の原因毒素である CER の検出を目的として、MeOH による振とう抽出後、固相カラムにより精製し、LC-MS/MS で測定する迅速分析法の開発を行った。

本法の有用性を確認するために食品で妥当性評価試験を実施したところ、ガイドラインの基準を満たしその妥当性が確認された。また、患者検体として吐しゃ物を分析することを想定し、人工吐しゃ物に本法を適用したところ良好な結果が得られ、さらに食中毒実試料にも適用した結果、吐しゃ物及び便においても本法の有用性を示すことができた。

Hep-2 細胞空胞化試験は、結果判明までに最低 3 日以上時間を要するが、本法では検体の前処理から測定、解析までおよそ 2 時間程度と短時間で迅速性に優れ、さらに比較的操りも簡便であり、熟練した手技を必要とせず突発的に生じる食中毒に対応できることから、非常に有用な手法であることが示された。

文 献

- 1) 上田成子：THE CHEMICAL TIMES, 228 (2), 11-18 (2013) .
- 2) 新井輝義, 千葉隆司, 秋場哲哉, 門間千枝, 仲真晶子, 甲斐明美：東京都健康安全研究センター年報, 63, 173-179 (2012) .
- 3) 厚生省：令和 3 年食中毒発生状況, p29-32.
- 4) 国立保健医療科学院：健康被害危機管理事例データベース, No.457 あん入り餅を原因とする嘔吐型セレウス菌による食中毒事例－熊本市で初めて健康危機管理対策部が設置された事例－.
<https://www.niph.go.jp/h-crisis/archives/83323/> (2021 年 4 月閲覧) .
- 5) 公益社団法人 日本食品衛生協会：食品衛生検査指針微生物編2004, p266-282.
- 6) 梶田弘子, 岩渕香織, 藤井伸一郎, 畠山えり子：岩手県環境保健研究センター年報, 7, 75-78 (2007) .
- 7) 南谷臣昭, 野田万希子, 原 信行, 菅原吉規, 白木康一, 中村昌司, 永井宏幸, 小林香夫, 大塚公人：岐阜県保健環境研究所報, 19, 24-29 (2011) .
- 8) 八津川洋一, 飯田華子, 永田和子, 宮本雅史, 松田高博, 伊藤裕信, 中村宗知, 藤田和弘：食品衛生学雑誌, 52(5), 287-293 (2011) .
- 9) 山下清佳, 上村晃秀, 本田俊郎, 二石大介, 下島浩幸：鹿児島県環境保健センター所報, 21, 78-83 (2020) .
- 10) 「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について」(平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知) .
- 11) 西名武士, 飛野敏明, 宇梶徳史, 濱本 愛, 松本理世, 増永ミキ, 野田康平, 村川 弘：熊本県保健環境科学研究所, 44, 57-66 (2014) .
- 12) 日本ウォーターズ株式会社：「他では聞けないサンプル前処理の基礎と実践」.
https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/japan_jasis2014_1409051530_prep.pdf (2021 年 5 月閲覧) .
- 13) 田口貴章, 山下涼香, 成島純平, 岸 美紀, 赤星千絵, 岡部信彦, 穂山 浩：日本食品化学学会誌, 27 (1), 33-39 (2020) .
- 14) 安藤尚子, 村上友規, 立本行江：奈良県保健研究センター年報, 53, 48-51 (2018) .
- 15) 山下 光雄：調理科学, 23 (3), p.242-253 (1990) .