

資料

LC-MS/MSによるセレウリドの迅速分析法の検討及び
食中毒事例におけるセレウリドの定量Examination of Rapid Analysis Method of Cereulide by LC-MS/MS and
Quantitation of Cereulide in Food Poisoning Cases山下 清 佳 上 村 晃 秀 本 田 俊 郎
二 石 大 介¹ 下 島 浩 幸

1 はじめに

セレウス菌による食中毒には嘔吐型と下痢型があり、わが国で発生するセレウス菌食中毒のほとんどは嘔吐型である。その嘔吐型の原因はセレウリド（以下「CER」という。）である。CERの検査方法としては、HEp-2細胞に対する空胞化変性活性を測定する方法が知られているが、この方法は細胞の培養に日数を要し再現性が低いなどの問題がある。他にもCER合成酵素遺伝子を対象にしたPCR法もあるが、PCR法は遺伝子の有無を確認するもので、CERが実際に産生されているかが確認できない。

これまで本県のセレウス菌による食中毒検査では、残品などからセレウス菌を分離・培養後、セレウス菌が 10^6 cfu/g以上検出し、この菌がCER合成酵素遺伝子を対象としたPCRにてCER産生菌であることを確認する方法で特定を行っており、最短でも3日以上はかかり迅速性に欠けるうえ、CER産出はあくまで推測であり確認はできない状況にあった。

現在、CERをLC-MS/MSで短時間に分析する方法が報告¹⁾されており、食中毒の迅速な原因究明への活用が期待されている。

今回、LC-MS/MSを用いた分析法を検討し、2019年8月に本県で発生したセレウス菌による食中毒の残品や嘔吐物を用いたCER検査を行い、併せてCER産出再現試験も実施したので報告する。

2 経緯

2.1 食中毒事例への対応

2019年8月に本県で起きた食中毒事例は症状等の疫学的調査より、セレウス菌CERによる食中毒が強く疑われた。この時、当センターでは、LC-MS/MS測定によるCER検出が可能であったことから、食品衛生検査指針¹⁾を参考にした「従来法」で検査を実施した。しかしながら、精製に時間がかかったうえ、添加回収の回収率も若干低かったため、新たに迅速分析法を検討した。

2.2 食中毒事例概要

8月7日に消防署から、スポーツ合宿中に嘔吐等の食中毒様症状を呈した複数名を病院に緊急搬送するとの通報が保健所にあった。保健所で調査したところ、合宿の参加者49名（選手48名、コーチ1名）中選手22名が7日の朝食後、数時間で嘔吐等の症状を呈した。なお、この22名の有症者は全員同一の食事を喫食し、残りの無症者は別の食事を喫食していた。

7日の朝食の米飯は前日（6日）の朝に炊いたもので、約24時間常温放置されていた。

患者の情報については表1のとおり。

表1 患者情報

喫食者	22名
有症者	22名（発症率：100%）
年齢	12～14歳
性別	男性のみ
症状	嘔吐 82%
	腹痛 82%
	嘔気 77%
	悪寒 36%
	頭痛 36%
	下痢 27%
	痙れん 14%
	その他 5%（発熱・倦怠感・脱力感等）
潜伏時間	1～4時間

1 退職（2020年3月）

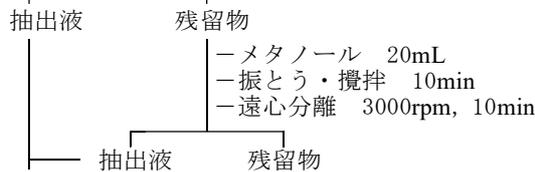
表2 LC/MS/MSの測定条件

分析カラム	: 関東化学(株)製 Mightysil RP-18 GP (内径2.1mm, 長さ50mm, 粒径3μm)
流速	: 0.2mL/min
注入量	: 10μL
カラム温度	: 40℃
移動相	: A) 5mmol/L酢酸アンモニウム水溶液 : B) 5mmol/L酢酸アンモニウムメタノール溶液
グラジェント条件	: 80 (0分) →80 (2分) →100 (10分) (B%) →100 (13分) →20 (13.1分) →20 (17分) →80 (17.1分) →80 (20分)
イオン化法	: エレクトロスプレーイオン法 (ESI)
イオンスプレー電圧	: 5.5kV (ポジティブ)
イオンソース温度	: 600℃
測定モード	: MRM (Multiple Reaction Monitoring)
測定イオン	: 1171.6 > 1126.0 : 1171.6 > 172.6

【抽出】

試料: 5.0g

- (添加回収試験は標準溶液添加: 30分程度放置)
- メタノール 20mL
- 振とう・攪拌 10min
- 遠心分離 3000rpm, 10min



- 50%メタノール 3mL

試料抽出液

【精製】

- 精製カラム (Oasis HLB VAC RC (60mg, 20mL))
- メタノール 5mLを注入 (コンディショニング)
- 50%メタノール 5mLを注入 (コンディショニング)
- 試料抽出液を全量負荷
- 50%メタノール 3mLで洗浄
- 70%メタノール 3mLで洗浄
- 95%メタノール 3mLで溶出

- 溶出液
- 減圧濃縮乾固
- メタノール 1mL
- 0.2μmフィルターでろ過

試験溶液

LC-MS/MS

図1 試験フロー (従来法)

3 方法

3.1 LC-MS/MSを用いたCERの迅速分析法の検討

3.1.1 試料

試料には、購入した市販品の高温加熱殺菌済みのパックごはん、甘酒、冷凍食品の炒飯及び焼きそばを使用した。ただし、甘酒は、妥当性評価のみに使用した。

3.1.2 試薬

CER標準品は富士フィルム和光純薬(株)製 (50μg/mLメタノール溶液) を用い、メタノールで適宜希釈して標準溶液とした。

アセトニトリル、メタノール (LC/MS用)、ギ酸及び酢酸アンモニウム溶液は富士フィルム和光純薬(株)製を、メタノール (HPLC用) は関東化学(株)製を、ヘキサン (残留農薬用・PCB用) はキシダ化学(株)製を用いた。

固相抽出カラムはジーエルサイエンス(株)製InertSep C18 (1g, 6mL), InertSep PLS II (265mg, 20mL), InertSep HLB FF (200mg, 20mL) 及びウォーターズ社製のOasis HLB VAC RC (60mg, 20mL) を用いた。

3.1.3 装置

高速液体クロマトグラフは、(株)島津製作所製 Prominence LCシリーズを、質量分析装置は、AB Sciex社製4000QTRAPを使用した。

3.1.4 測定条件

測定条件及び測定イオンは表2に示すとおり。

3.1.5 検量線の作成

標準溶液をメタノールで希釈し、0.25~100ng/mLの検量線用標準溶液を調製した。

3.1.6 試験溶液の調製

均一化を容易にするために各試料に等量の水を加えてよく混合した。これを5.0g (試料2.5g相当量) 採取して試料とし、図1の「従来法」で調製した。

3.1.7 妥当性評価のための実験計画

分析結果の信頼性を確保するため国が定めた「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²⁾」(以下「ガイドライン」という。)を参考に、2濃度で分析者1名が1日2併行5日間、妥当性評価を行うこととした。

CERの添加濃度は、1度の食事で対象試料を約200g摂

取したと仮定した場合に推定されているCERの人における最小発症量 $1\mu\text{g}^3$)に相当する試料中濃度 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ よりさらに低い $1/5$ 量の $1\mu\text{g}/\text{kg}$ と、実際の食中毒の際に分析したCER濃度に近い $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ の2濃度でそれぞれ実施した。

各ブランク試料に、2濃度の標準溶液を添加し、30分以上経過した後、抽出・精製操作を行った。

3. 2 食中毒事例におけるセレウリドの定量検査

3. 2. 1 検体及び試料の調製方法

(1) 残品の米飯

釜に残っていた米粒を集めたところ全量で 5.2g しかなかったことから、微生物検査は 5.2g (全量)に滅菌生理食塩水 45mL を加え、ストマッカー処理して用いた。なお、LC-MS/MS検査はストマッカー処理した試料のうち 10.0g (実質の米飯量 1.04g)を用いた。

(2) 嘔吐物 (2人分)

両検体とも砂や紙まみれであったが、微生物検査にはそのまま用いた。

LC-MS/MS検査は、 5.0g (砂等を含む)に滅菌生理食塩水 20mL えストマッカー処理した試料 10.0g (実質の嘔吐物等の量 2.0g)を用いた。

3. 2. 2 検査方法

(1) 微生物検査

選択培地に各試料を分離培養した。セレウス菌の選択培地にはNGKG培地を使用し、 30°C で48時間培養した。その後、CER合成酵素遺伝子を対象としたPCR法でCERの産出が可能な菌であるか判定した。

(2) LC-MS/MSによるCER検査

1) 事例発生当初:「従来法」で実施

試料 10.0g (実質の米飯量 1.04g)及び嘔吐物 10.0g (実質の嘔吐物量約 2.0g)を用いて、図1の前処理方法で検査を実施した。同時に米飯による添加回収試験を $n=2$ で実施した。添加濃度は $1\mu\text{g}/\text{kg}$ とした。

また、図1の「従来法」で実施した際もLC-MS/MS検査での迅速化をはかるため、ミニカラム精製を実施していない減圧濃縮乾固前の抽出液を用いて、LC-MS/MS検査を実施した。

2) 後日:検討した迅速分析法で実施

冷凍保存していた試料(残品の米飯のみ)を用いて、検討した迅速分析法(以下、「改良法」という。)(図2)により再検査を行った。

添加回収試験を $n=2$ で実施した。添加濃度は $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ とした。

3. 3 米飯でのCER産出再現試験

CER産出条件は、保健所の聞き取り調査によると、冷房の設定温度 $20\sim 25^\circ\text{C}$ の部屋で24時間放置していたとすることで放置温度が不明だったため、梶田らの産出実験結果⁴⁾及び当日の気温等を参考に設定した。梶田らの実験では「米飯」ではなく「グラタン」であったが、 20°C で18時間培養してもセレウス菌は $10^5\text{cfu}/\text{mL}$ しか増殖せず、CERは検出しなかったとの結果であった。当日(6日)の天気は、朝は曇り、昼過ぎからは快晴となり、最低気温 24.2°C 、最高気温 32.9°C 、翌日(7日)は朝から快晴で、最低気温 26.7°C であった。

そこで、培養条件を 24°C 24時間と 30°C 24時間の2条件とした。(セレウス菌の至適発育温度は 32°C)

3. 3. 1 試料

(1) 市販の米飯(高温加熱殺菌済みのパックごはん)

(2) 食中毒事例より分離したCER産出セレウス菌

3. 3. 2 試料の培養条件及び調製方法

菌($1.1\times 10^6\text{cfu}/\text{g}$)を米飯にまんべんなく付着させ、それぞれ 24°C 及び 30°C で24時間培養した。

均一化のため、この各温度で培養した米飯 5.0g に生理食塩水 45mL を加えて米粒が潰れるまでストマッカー処理したものを試料とした。

3. 3. 3 LC-MS/MSによるCERの分析

図2の「改良法」を用いて実施した。

4 結果及び考察

4. 1 LC-MS/MSを用いたCERの迅速分析法(「改良法」)の検討

4. 1. 1 LC-MS/MSの条件検討

インフュージョンによりCER標準溶液($100\text{ng}/\text{mL}$)を直接MS部に導入し、CERのイオン化を確認した。八津川らの測定条件⁵⁾を参考に $2\text{mmol}/\text{L}$ 酢酸アンモニウム含有 0.1% ギ酸水溶液と $2\text{mmol}/\text{L}$ 酢酸アンモニウム含有 0.1% ギ酸メタノール溶液 $1:1$ で希釈したCER標準溶液を導入した場合は、生成するCERのプロトン付加体($[\text{M}-\text{H}^+]$)とCERのアンモニウム付加体($[\text{M}-\text{NH}_4^+]$)の割合が導入量で異なり不安定であった。そこで、 $5\text{mmol}/\text{L}$ 酢酸アンモニウム水溶液と $5\text{mmol}/\text{L}$ 酢酸アンモニウムメタノール溶液 $1:1$ で希釈したCER標準溶液を導入したところ、安定してアンモニウム付加体($[\text{M}-\text{NH}_4^+]$)が優勢に観察された。

この結果を踏まえ、LC-MS/MS分析における移動相を

5mmol/L酢酸アンモニウム水溶液と5mmol/L酢酸アンモニウムメタノール溶液とし、表2の条件でCERのピーク確認を行った。

4. 1. 2 検量線の直線性及び装置の検出限界と定量下限について

検量線は日を変えて5回作成したところ、相関係数は全て0.999以上であった。

検量線の最低濃度の0.25ng/mLを7回繰り返し測定し、得られた測定値の標準偏差から装置検出限界及び装置定量下限を求めたところ、それぞれ、0.04ng/mLと0.14ng/mLであった。

また、検量線の最低濃度においてS/N比を求めたところ、全てS/N比 ≥ 10 を満たしていたため、定量下限値は0.1ng/gとした。

4. 1. 3 試験溶液の調製（前処理方法）の検討

従来法では、前処理方法として精製カラムにOasis HLBを用いていた。しかしながら、油脂分が多い食品は精製カラムが詰まり精製に時間を要した。また、食品の水分含有量に影響されるためと推測されたが、回収率にバラツキがあり、特にごはんでその傾向が顕著に表れた。

そこで、精製カラムをOasis HLBと類似のジーエルサイエンス(株)製InertSep C18 (1g, 6mL), InertSep PLS II (265mg, 20mL)及びInertSep HLB FF (200mg, 20mL)に変更して試みた。その結果、InertSep C18はCERを強く吸着し再抽出できず、CERの精製には適さなかった。一方、InertSep PLS IIやInertSep HLB FFは充填量や充填剤の径を変更したことで、詰まりは解消できたが、いずれのカラムもOasis HLBと同じ結果であった。

そこで、精製カラムを使用しない液液分配法で前処理を検討することにした。

当初、除タンパク効果があるアセトニトリルを使用した液液分配を一考したが、標準品がメタノール溶液であることと移動相にもメタノールを使用していることを考慮し、メタノールによる液液分配を実施した。

CERは、水、メタノール及びヘキサン混合液による抽出操作においてヘキサン層に抽出される。また、メタノールは親水性が高いため、メタノールにヘキサンもよく溶解するが、水が存在することによりメタノールへ溶解するヘキサン量を抑制することができた。

さらに、食品中のCERが高濃度であった際は、検査の迅速性を考慮し、精製せず抽出のみ実施した抽出溶液でLC-MS/MS分析するため、抽出時の夾雑物の除去方法についても検討を行った。

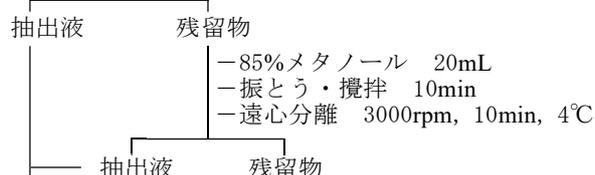
抽出に使用する溶液は、メタノールのみの場合も、水分の比率を高く（50%メタノール）した場合も、余計な夾雑物が抽出液に移行するため、70～85%メタノールで抽出を行うこととした。食品を均一化するために水を加えているため、1回目の抽出には100%メタノールを用い、2回目の抽出には85%メタノールを用いた。また、低温下で遠心分離を行い、油脂を固化させて抽出液への移行を抑制した。

図2に「改良法」の試験フローを示す。

【抽出】

試料5.0gに生理食塩水45mLを加えたもの：5.0g

- (添加回収試験は標準溶液添加：30分程度放置)
- メタノール 20mL
- 振とう・攪拌 10min
- 遠心分離 3000rpm, 10min, 4°C



【精製】

抽出液 ————— 50 μ L抜き出し

- 水15mL
 - ヘキサン5mL
 - メタノール350 μ L
 - 0.2 μ mフィルターでろ過
- 抽出溶液
- LC-MS/MS
- 振とう 10min
 - 遠心分離 3000rpm, 10min, 4°C

ヘキサン層

減圧濃縮乾固

- メタノール 1mL
- 0.2 μ mフィルターでろ過

試験溶液

LC-MS/MS ※適宜希釈

図2 試験フロー（改良法）

4. 1. 4 マトリックス効果の検証

マトリックス標準溶液（各試料を抽出・精製した試験溶液を使用して標準調整した溶液）と溶媒標準溶液を比較した。溶媒標準溶液を100%としたとき、精製カラムを使用した「従来法」と液液分配の「改良法」を比較したところ、同様の結果であった（図3）。なお、甘酒は妥当性評価にのみ用いたため、精製カラムとの比較は実施していない。



図3 各試料のマトリックス効果

4. 1. 5 妥当性評価

(1) 選択性

各ブランク試料ともCERのピーク付近に妨害するピークが無いことを確認した。

(2) 真度および精度

真度及び精度のガイドラインの目標値を表3に、今回検討を行った結果を表4に示す。

各試料とも真度が70~120%の範囲内であり、併行精度及び室内精度も目標値を満たした。また、高濃度含有の場合は、精製を実施しない抽出溶液でも良好な結果が得られた。

表3 真度及び精度の目標値

濃度 (µg/kg)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
1	70~120	25>	30>
1000	70~120	15>	20>

(3) 妥当性評価結果

選択性、真度、併行精度及び室内精度において全て目標値を満たしたため、適合とした。

表4 真度及び精度の結果

抽出溶液	試料	濃度 (µg/kg)	真度 (平均)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	
			[最低~最高] (%)			
試験溶液	ごはん	1	104.7 [97.8~111.6]	3.8	4.7	
		1000	107.0 [89.6~119.6]	3.2	9.7	
	炒飯	1	104.7 [97.8~111.6]	3.8	4.7	
		1000	108.0 [90.0~113.2]	2.2	9.3	
	焼きそば	1	96.0 [84.6~106.0]	4.0	7.6	
		1000	103.9 [93.6~119.4]	3.0	8.3	
	甘酒	1	93.8 [88.6~107.6]	5.0	6.0	
		1000	96.7 [85.2~114.6]	3.1	9.8	
	抽出溶液	ごはん	1000	90.5 [77.4~97.0]	5.4	6.6
		炒飯	1000	91.1 [82.6~98.2]	3.3	5.4
		焼きそば	1000	83.2 [70.0~97.3]	7.1	12.1
		甘酒	1000	92.7 [79.0~103.7]	4.2	8.3

4. 2 食中毒事例のセレウリドの定量検査結果

微生物検査で全ての検体からセレウス菌が検出され、PCRでCER合成酵素遺伝子の検査をした結果、CER産生菌であることを確認した。なお嘔吐物からのセレウス菌数測定は砂利等の異物混入のため実施しなかった。

LC-MS/MSによるCER検査は、検体搬入から2時間弱で、残品の米飯及び嘔吐物からCERを検出し、病因物質がCERであることを確定した。結果は表5のとおり。

また、喫食調査から米飯を1人あたり丼1杯 (約250g) 喫食しており、CER摂取量に換算すると約520~750µg/bodyであった。

表5 食中毒事例の検査結果

試料	微生物検査		LC-MS/MS分析			
			従来法		改良法	
			CER測定値 (µg/g)	添加回収 (%) n=2の平均	CER測定値 (µg/g)	添加回収 (%) n=2の平均
残品 (米飯)	陽性 6.0×10 ⁶ cfu/g	検出	2.079 [2.735]	70.0 [-]	3.004 [2.514]	108.1 [85.8]
嘔吐物A	陽性	検出	0.091	-	-	-
嘔吐物B	陽性	検出	0.070	-	-	-

(注) []内については、抽出溶液 (精製なし) でLC-MS/MS分析した結果

4. 3 米飯でのCER産出再現試験の結果及び考察

24℃で培養後の米飯のセレウス菌数は 5.4×10^5 cfu/gで、 10^6 cfu/g以上増殖せず、CERは検出しなかった(表6)。

30℃で培養後の米飯のセレウス菌数は 6.3×10^6 cfu/gであった。CER産出の結果は表6のとおり。

この産出再現試験で、保健所の調査では不明であった放置温度については、30℃近くまで上昇していたことが推測された。しかしながら、事例と同程度のCER産出量はなかった。これは、事例と同じ米飯量を確保できなかったという要因もあるが他にも温度及び時間以外にCER産出を促進させる要因があると推測された。特に搬入された検体の残品(米飯)は、かなり水分が多いものだったことから、水分量が影響していると示唆された。

表6 産出再現試験の結果

培養温度	セレウス菌数 (cfu/g)	CER測定値 (μ g/g)
24℃	5.4×10^5	検出せず
30℃	6.3×10^6	0.419 [0.435]

(注) []内については、抽出溶液(精製なし)でLC-MS/MS分析した結果

5 まとめ

1) CERの迅速分析法の検討結果

液液分配による精製方法を確立したことによって、精製カラムを使用することなく、油脂分等の夾雑物が多い試料についても分析が出来るようになった。

また、食品中のCER濃度が高濃度な場合は、抽出溶液でも分析が出来るようになり、さらに迅速になった。

今回、LC-MS/MSによるCERの迅速分析法を確立したことにより、検体搬入当日に検体からのCER検出が可能となり、当センターにおける検査体制の強化を図ることができた。

2) 食中毒事例の検査結果

当センターにおけるセレウス菌による嘔吐型食中毒の検査では、これまでCERの産出を推測することしかできなかったが、今回、残品と嘔吐物を分析した結果、CERを確認できたことから、CERによる食中毒と断定できた。

保健所の疫学調査とCERの定量結果から、患者のCER摂取量は約520～750 μ g/bodyであった。推定されているCERの人における最小発症量1 μ g/body³⁾を十分に超える量であった。また、少年らの体重を約45kgとすると11.5～16.6 μ g/kgの摂取となる。これは、トガリネズミ科のスクスに対する50%催吐量の実験結果である12.9 μ g/kg³⁾に相当する値となった。以上のように、嘔吐型セレウス菌による食中毒における毒素量と発症量の関係を明らかにする上で貴重な疫学的情報を提示することができた。

3) 米飯でのCER産出再現試験結果

24℃、24時間の培養では、セレウス菌を 10^6 cfu/g以上増殖させることができず、増殖には30℃近い温度が必要条件と推測された。また、セレウス菌が 10^6 cfu/g以上増殖しないとCERは産出しないことも確認した。

なお、セレウス菌の増殖とCERの産出には温度と時間の条件以外に、水分量も大きな要因になるのではないかと推測された。

参考文献

- 1) (公社)日本食品衛生協会；食品衛生検査指針 微生物編2015, 364～384
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知；食品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(食安発第1224号1号), 2010年12月24日
- 3) 上田成子；セレウス菌, 食中毒予防必携 第3版, 日本食品衛生協会, 115～125 (2013)
- 4) 梶田弘子, 岩渕香織, 他；LC-MS/MSによる嘔吐毒セレウリドの分析, 岩手県環境保健研究センター年報, 7, 75～78 (2007)
- 5) 八津川洋一, 飯田華子, 他；LC-MS/MSによる穀物加工食品および粉ミルク中のセレウリドの分析法, 食品衛生学雑誌, 52 (5), 287～293 (2011)