資　料

山形県におけるＣ型インフルエンザウイルスの分離状況(2014)

田中 静佳, 的場 洋平, 青木 洋子, 矢作 一枝, 水田 克巳

Detection and Antigenic Analysis of Influenza C virus from Patients in Yamagata Prefecture(2014)

by Shizuka TANAKA, Yohei MATOBA, Yoko AOKI, Kazue YAHAGI and Katsumi MIZUTA

2014年1月から12月の1年間に山形県内の医療機関で採取された咽頭拭い液および鼻汁1957検体について山形県感染症動向調査に基づきウイルス分離を行ったところ,22検体からＣ型インフルエンザウイルスが分離された.分離は4月から8月の期間に集中し, A型,B型インフルエンザのシーズンが終息した春に流行するというこれまでの傾向が続いていることが確認された.またＣ型インフルエンザウイルス分離株の抗原性解析により, 2014年はSao Paulo/82系統からKanagawa/76系統へと流行株が変わっていることが明らかとなった.

Key Words : Ｃ型インフルエンザウイルス (influenza C virus), 抗原解析

Ⅰ　はじめに

Ｃ型インフルエンザウイルス（FluC）は小児における上気道炎の起因ウイルスの１つである．一般的に症状は軽度であるとされているが,気管支炎や肺炎などの下気道炎を引き起こすことも知られている[1)].

当所では山形県感染症発生動向調査事業に基づき,急性ウイルス性呼吸器疾患の発生状況を把握することを目的にウイルスの分離,同定を実施している.

今回,2014年の調査におけるFluCの分離状況,ならびに分離株の抗原性について検討を行った.

Ⅱ　材料及び方法

1. 調査対象

2014年1月から12月までに県内医療機関を受診した患者から採取された鼻咽頭ぬぐい液および鼻汁1957検体を対象とした.

2. ウイルスの分離・同定

ウイルス分離はHEF,HEp-2,VeroE6,MDCK,RD18S,GMKの6種類の細胞を用いた96wellマイクロプレート法により実施した[2)].FluCの分離はMDCK細胞での細胞変性効果の確認と,0.8 %モルモット血球および0.5 %ニワトリ血球を用いた血球凝集試験で判定し（図１）,Conventional RT-PCR法で同定を行った.

３．FluCのConventional RT-PCR法

ウイルス培養上清からHigh Pure Viral RNA kit（Roche）を使用してRNAを抽出後, PrimeScript RT Master Mix（タカラバイオ）を使用して逆転写反応を行った．PCRはNS遺伝子をターゲットとするMatsuzakiらのプライマー[3)]を用いて実施した.

4.抗原解析

抗原解析はFluCの表面蛋白であるヘマグルチニンエステラーゼ(HE)に対するモノクローナル抗体をプローブとし,0.5%ニワトリ血球を用いた血球凝集抑制(HI)試験により実施した[4) 5)].

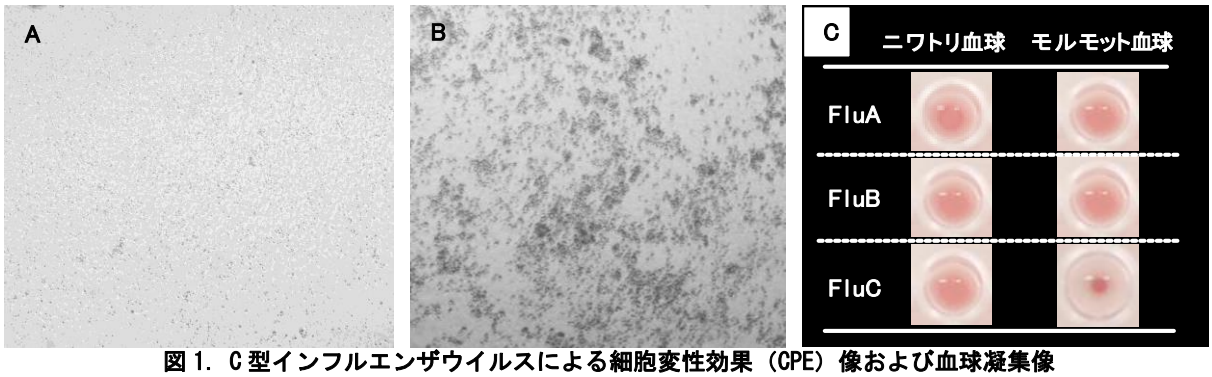


図 1. C 型インフルエンザウイルスによる細胞変性効果（CPE）像および血球凝集像

A.MDCK 細胞（検体未接種,×100）B. FluC による CPE が現れた MDCK 細胞（×100）C.インフルエンザウイルスによる血球凝集像

Ⅲ　結果

1．FluC の分離状況

2014 年 1 月から 12 月までに 22 検体から FluC が分離された.月別の分離状況を図 2 に示す. 分離は 4 月から始まり 5 月をピークとして 8 月まで毎月続き,この期間に 21 株が分離された.以降は 9 月から 11 月まで分離はなく,12 月に散発的に 1 件分離されたのみであった.分離数が最も多かった 5 月における分離率は 7.6 %（11 株/145 検体）であった.

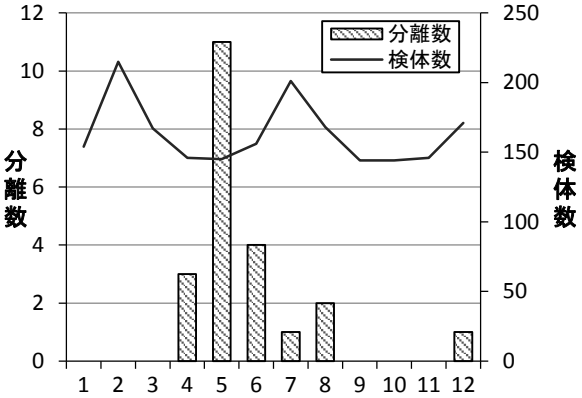


図 2.C 型インフルエンザウイルス月別分離状況

2．抗原解析

分離された 22 株について抗 HE モノクローナル抗体を用いて抗原解析を行った.分離代表株の HI 試験結果の一例を表 1 に示す.抗原性既知の参照株と分離株の抗原共通性を各抗 HE モノクローナル抗体に対する反応パターンで比較すると,2014 年分離株は J14 のみに強く反応し,U4,U9,U1 に対してはほとんど反応しない点で Kanagawa/76 系統と共通する 14 株と,J14,U4,U9,U1 のいずれにも反応を示す点で Sao Paulo/82 系統と共通する 8 株に大別された[6)](図３).

表 1. 抗モノクローナル抗体を用いた HI 試験結果

分離株	HE系統	HI価 J14	U4	U9	U1
参照株					
C/Kanagawa/1/76	Kanagawa/76	512000	40	160	<20
C/Yamagata/2/2010	Sao Paulo/82	64000	1600	64000	128000
C/Yamagata/29/2012	Sao Paulo/82	64000	3200	64000	128000
2014年分離株					
C/Yamagata/13/2014	Kanagawa/76	1024000	40	640	<20
C/Yamagata/14/2014	Kanagawa/76	512000	20	320	<20
C/Yamagata/16/2014	Kanagawa/76	1024000	40	320	<20
C/Yamagata/35/2014	Kanagawa/76	512000	40	160	<20
C/Yamagata/6/2014	Sao Paulo/82	16000	1600	16000	16000
C/Yamagata/33/2014	Sao Paulo/82	25600	1600	32000	32000

Ⅳ　考察

2014 年の調査において 22 株の FluC が分離された.うち 21 株は 4 月から 8 月に集中して分離されており,この時期に FluC の地域的な流行があったと推測された.我々のこれまでの調査により,山形県における FluC の流行は 1 年おき偶数年の,A 型,B 型インフルエンザのシーズンが終息した春に発生する傾向があることがわかっている[7)]. 2013/2014 シーズンのインフルエンザの流行の終盤頃から始まった今回の流行は,2012 年以来 2 年ぶりの発生であり, この傾向から予測された通りであった（図３）.

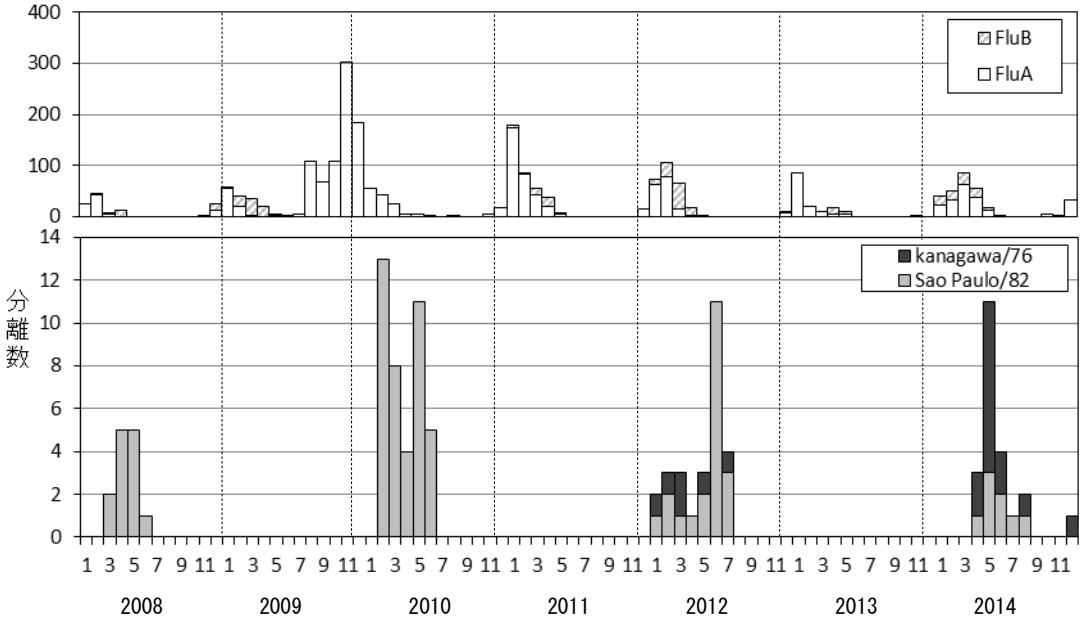


図 3. インフルエンザウイルスの月別分離数(2008－2014)

上段：A、B 型インフルエンザウイルス（FluA,B）の分離数,下段：FluC の月別系統別分離数（Tanaka et ら[6]を引用・改変）

FluC は HE の抗原性の違いにより 6 つの系統（Taylor/47,Kanagawa/76,Mississippi/80,Yamagata/81,Aichi/81,Sao Paulo/82）に分類され,山形県においてはこれまでに Taylor/47 系統を除く 5 つの系統の FluC が分離されている.Sao Paulo/82 系統は 2006 年から 2012 年まで流行の主流株となっていた[7].しかし,2014 年は Kanagawa/76 系統の分離が優勢となり,流行株の系統が交代していることが明らかとなった.山形県における流行株の交代は 2002 年に Yamagata/81 系統から Kanagawa/76 系統へ,2006 年に Kanagawa/76 系統から Sao Paulo/82 へと,過去 2 回確認されている[7].特に 2002 年とそれに続く 2004 年には Kanagawa/76 系統による大きな流行が確認されている[3]ことから,今後も調査を継続し発生動向を注視する必要がある.

V 文献

1) Matsuzaki Y et al. Clinical features of influenza C virus infection in children. J Infect Dis. 2006;193: 1229-35.

2) Mizuta K. et al. Analysis of monthly isolation of respiratory viruses from children by cell culture using a microplate method:a two-year study from 2004 to 2005 in Yamagata,Japan. Jpn.J.Infect.Dis. 2008;61:196-201.

3) Matsuzaki Y et al. A nationalwide epidemics of influenza C virus infection in Japan 2004. J Clin Microbiol. 2007;45:783-8

4) Matsuzaki Y et al. Antigenic and genetic characterization of influenza C viruses which caused two outbreaks in Yamagata City, Japan in 1996 and 1998. J Clin Microbiol. 2002;40:422-429

5) Sugawara K et al. Construction of an antigenic map of the haemagglutinin-esterase protein of influenza C virus.J Gen Virol. 1993;74:1661-6

6) Tanaka S et al. The dominant antigenic Group of influenza C infections changed from C/Sao Pauo/378/82-lineage to C/Kanagawa/1/76-lineage in Yamagata, Japan in 2014. Jpn J Infect Dis 2015;68:166-168

7) Matsuzaki Y et al. Epidemiological information regarding the periodic epidemics of influenza C virus in Japan (1996-2013) and the seroprevalence of antibodies to different antigenic groups. J Clin Virol. 2014;61:87-93

資　料

ヒスタミン測定キットを利用した水産調理加工品中のヒスタミン分析法検討

太田 康介

Studies on Determination of Histamine in Marine Products Using Histamine Measuring Kit

By Kosuke OTA

水産調理加工品に含まれるヒスタミンの分析法として，蛍光誘導体化後に高速液体クロマトグラフで分析する方法をはじめとし，様々な方法が報告されている．そのうち，生魚等を試料とした場合において迅速にヒスタミンの定量が可能なヒスタミン測定キットが市販されている．このキットを用いて水産調理加工品に含まれるヒスタミンの分析を行うため，精製工程を追加して添加回収試験を行ったところ，生魚だけでなく水産調理加工品でもヒスタミンの回収率は90%以上と良好であった．

Key Word：ヒスタミン，ヒスタミン測定キット，添加回収試験，精製

Ⅰ　はじめに

ヒスタミンによる食中毒は摂食直後から数時間以内に発疹，頭痛，吐き気などの症状を呈する食中毒であり，原因食品のほとんどは魚類やその加工品，調理品である．また，原因食品を調理方法で比較すると焼きものが全体の約60%を占め，生ものは7%にすぎなかった[1)]という報告がある．

当所では，食品衛生検査指針理化学編(2005)に高速液体クロマトグラフ法(B)(参考法)法[2)]として掲載されているダンシルクロライドでの蛍光誘導体化後に高速液体クロマトグラフで分析する方法(以下，DC誘導体化-HPLC法)を採用し,ヒスタミンによる食中毒が疑われる検体の検査を行っている[3)]．しかし，当該分析法の前処理は煩雑であり,数時間を要する．

この他にヒスタミンの分析方法として，食品衛生検査指針理化学編(2015)掲載の高速液体クロマトグラフ法(定性・定量)(B)(参考法)[4-6)]，液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計[7-9)]やヒスタミン測定キットなどを用いる方法がある．

このうち，ヒスタミン測定キットによるヒスタミンの定量は迅速かつ簡便な手法であり，他の分析法のように高額な機器を必要としないというメリットがある．一方で，調理加工品や発酵食品などを試料とした場合には色素や酸化還元物質などの影響を受けるため使用できない．そこで，ヒスタミン測定キットでの通常処理に精製工程を追加し，ヒスタミンの定量を試みた．

Ⅱ　材料および方法

1 試料

市販のサバ（生，干物，照り焼き），ナンプラーを用いた．サバはあらかじめ細切，均一化したものを試料とした．また，生サバ５ｇに対してベニバナのメタノール抽出物（以下，ベニバナエキス）を１ｇの比率で添加し，均一化したものも試料とした．

2 試薬

ヒスタミン二塩酸塩（特級），オクタンスルホン酸

ナトリウム（鹿 1 級），メタノール(HPLC 用)は関東化学製，りん酸水素二ナトリウム･12 水和物(特級)，りん酸二水素ナトリウム・2 水和物(特級)，25 %アンモニア水（有害金属測定用），1M 塩酸（容量分析用）は和光純薬製，EDTA・2Na・$2H_2O$(純度 99.5 %)は同仁化学研究所製を用いた．水はヤマト科学製 Autostill WA770 および東洋製作所製 RUF424BB で精製した超純水を用いた．ODS ミニカラムには MEGA BE-C18(1000 mg，6 mL)，強陽イオン交換ミニカラムには Bond Elut SCX(500 mg，3 mL)を用いた（以上，Agilent Technologies 社製）．ヒスタミン測定キットはキッコーマンバイオケミファ製のチェックカラーヒスタミン（以下，キット）を用いた．なお，キット付属のマニュアルは版数 201141 を参照した．ヒスタミン二塩酸塩を 0.1M 塩酸に溶解することで 1000 ppm としたものを標準原液とし，これを 0.1M 塩酸で希釈し，100 ppm としたものを添加用標準液として用いた．

3 装置

紫外可視分光光度計は島津製作所製 UV-2500PC を用い，10 mm 角の石英セルを使い，波長 470 nm での吸光度測定，および波長 800 - 400 nm の吸収スペクトル測定を行った．冷却遠心分離機は久保田製作所製 5922 を用いた．

4 試験溶液の調製

4．1 前処理

キット付属のマニュアルに従って抽出を行った．試料 1g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管にはかりとり，0.1M EDTA 水溶液 24 mL を加え，沸騰水中で約 20 分間加熱した．氷冷の後，スパチュラで細かくほぐしてから冷却遠心機にて 5 分間（10 krpm，5℃）遠心分離し，上澄み液をろ紙(No.5C)にてろ過し，そのろ液を抽出液とした．

4．2 精製

ODS ミニカラムを用いた精製は DC 誘導体化-HPLC 法での精製方法に準じて行った．すなわち，メタノール 10 mL，水 5 mL，0.05M オクタンスルホン酸ナトリウム水溶液 5 mL であらかじめコンディショニングした ODS ミニカラムに，試料 5 mL と 0.1M オクタンスルホン酸ナトリウム 5 mL をよく混ぜ，さらに塩酸で pH1.5 付近に調整したものを負荷した．続いて，ミニカラムを水 10 mL で洗浄した後，60 %メタノール水溶液 10 mL で溶出させた．溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮，窒素ガスにより乾固させたのち，0.1M EDTA 水溶液 5 mL に溶解させた．

タンデム固相抽出法での精製は既報[8)]に準じて行った．すなわち，ODS ミニカラムの下に SCX ミニカラムを連結させ（以下，タンデム固相カラム），メタノール 5 mL，水 5 mL，100 mM りん酸緩衝液 5 mL であらかじめコンディショニングした．このタンデム固相カラムに，抽出液 10 mL と 100mM りん酸緩衝液 10 mL をよく混ぜたものを負荷した後，50mM りん酸緩衝液 10mL で洗浄を行った．ここで，ODS ミニカラムと SCX ミニカラムの連結をはずして SCX ミニカラムのみとし，さらに 25mM りん酸緩衝液 10 mL，水 10 mL，メタノール 10 mL で洗浄を行った．溶出は 25 % アンモニア水・メタノール(5:95)10 mL で行い，得られた溶出液はロータリーエバポレーターで濃縮，窒素ガスにより乾固させたのち，0.1M EDTA 水溶液 10 mL に溶解させた．

4．3 ヒスタミンの定量

キット付属のマニュアルに従い，遮光しながら水浴中(37 ℃)で 15 分間反応をさせ，分光光度計にて吸光度の測定を行った．

Ⅲ　結果および考察

キットを使い，5 種類の試料（生サバ，サバ干物，サバ照り焼き，ナンプラー，ベニバナエキス添加生サバ)についてヒスタミンの添加回収試験(n=3)を行った．平均回収率は生サバで 90 %以上となったが，サバ干物とサバ照り焼きは約 70 %，ナンプラーは約 50 %，ベニバナエキス添加生サバでは吸光度が 1 を超えてしまったため測定不可能であった(表 1)．これは，食品由来の色素や油分などの影響と考えられたため，精製工程の追加を検討した．

はじめにDC蛍光誘導体化-HPLC法での精製法を試みた．試料としてベニバナエキス 0.2 g を 0.1M EDTA 水溶液 25 mL に溶解したものを用いた．試料溶液を 5 mL 分取し，20 %トリクロロ酢酸水溶液 1 mL，0.1M オクタンスルホン酸ナトリウム 5 mL を添加し混和した後，ODS ミニカラムによる精製を行った．すなわち，ODS ミニカラムに試料を負荷し，水で洗浄後，60 %メタノール水溶液で溶出させ，溶出液は濃縮乾固後に，0.1M EDTA 水溶液 5 mL に溶解させた．これを分光光度計で吸収スペクトルを測定した．その結果，精製後の吸光度は精製前よりわずかに低くなったが，キットでの測定波長 470 nm 付近の吸光度は 1 をはるかに超えていた(図 1)．これは 60 %メタノール水溶液で溶出させる際に，ODS ミニカラムに保持されていた色素も溶出されてしまったためと考える．

そこで，タンデム固相抽出法での精製法 [4-6] を試みた．この精製方法は，逆相系カラムである ODS ミニカラムの下部に強陽イオン交換カラムである SCX ミニカラムを連結させたタンデム固相カラムを使い精製を行うものである．SCX ミニカラムでイオン交換により保持させた化合物はアンモニウムイオンと競合させることで溶出させるため，溶出を行う前に水やメタノールでミニカラムを洗浄できることから，より幅広い夾雑物を除去できることが期待された．試料はベニバナエキス 0.2 g を 0.1M EDTA 水溶液 25 mL に溶解したものを用いた．これを 10 mL 分取し，100mM りん酸緩衝液(10 mL)とよく混和させた後，タンデム固相抽出法による精製を行った．すなわち，ODS ミニカラムと SCX ミニカラムを連結させたものに試料を負荷し，50mM りん酸緩衝液での洗浄後に ODS ミニカラムを外して SCX ミニカラムだけとした後，25mM りん酸緩衝液，水，メタノールでの洗浄後，25 %アンモニア水・メタノール(5:95)で溶出させた．溶出液は濃縮乾固させたのち，0.1M EDTA 水溶液 10 mL に溶解させた．これを分光光度計にて吸収スペクトルの測定を行った．その結果，精製前と比較して精製後の波長 470 nm 付近の吸光度は著しく低下し，超純水と同等の吸収スペクトルが得られた(図 1)．

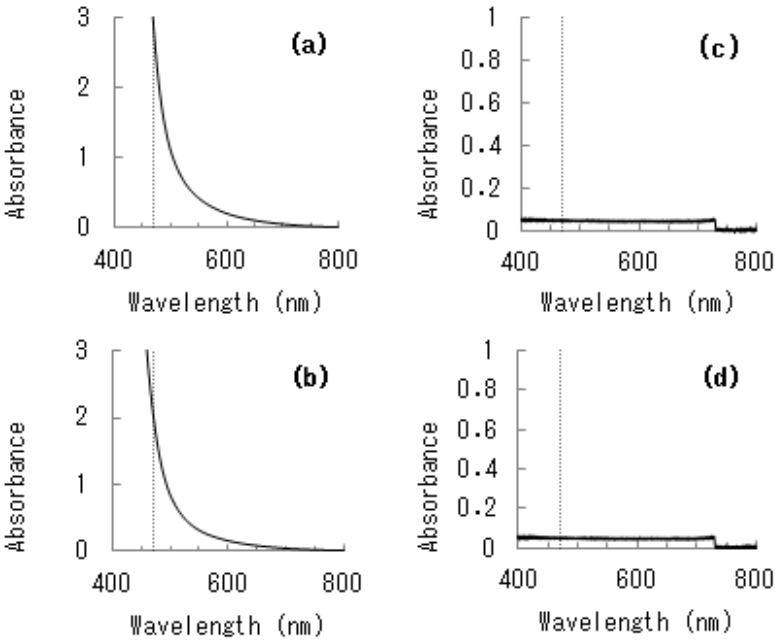


図 1.　ベニバナエキス添加 EDTA 水溶液（試料溶液）の精製前後，および超純水の吸収スペクトル

(a)試料溶液．(b)試料溶液を ODS ミニカラムで精製し濃縮乾固後に 0.1M EDTA 水溶液に溶解，(c)試料溶液をタンデム固相抽出法で精製し濃縮乾固後に 0.1M EDTA 水溶液に溶解，(d)超純水

ベニバナにはカルタミン，サフロミン A，サフロミン B 等が含まれており，これらの色素の極大吸収波長はキットでの測定波長の比較的近傍にある．しかし，今回検討したタンデム固相抽出法を適用することで，キットでの分析が可能になるような精製効果が得られることが示唆された．

そこで，実際に抽出後にタンデム固相抽出法での精製を追加して，キットを用いたヒスタミンの添加回収試験(n=3)を行った．試料として生サバ，サバ干物，サバ照り焼き，ナンプラー，ベニバナエキス添加生サバを用いた．その結果，

表 1 ヒスタミン測定キットによる添加回収試験

試料		添加量	平均回収率(%) (n=3)	
			通常法	改良法 [a]
サバ	生		91.2	97.4
	干物		72.3	91.4
	照り焼き	100 μg	72.3	90.1
	ベニバナエキス添加		– [b]	95.5
	ナンプラー		48.9	92.2

[a] 通常法にタンデム固相抽出法による精製を追加した方法

[b] ”–“は測定不可であったことを意味する

全ての試料で回収率 90 %を超えた(表 1).

以上のことから，本手法を用いることで水産調理加工品もキットでの測定対象となりうることが示唆された.

しかし，ヒスタミン以外の不揮発性アミンもこの食中毒の原因として関与している可能性も考えられている[10]ため，不揮発性アミンの迅速な一斉分析法の検討を引き続き行いたいと考える.

Ⅳ 文献

1) Toda, M. Yamamoto, M., Uneyama, C., Morikawa, K. Histamine food poisonings in Japan and other countries. Bulletin of National Institute of Health Sciences, 127, 31-38(2009).

2) 厚生労働省監修. 食品衛生検査指針理化学編 2005.東京,日本食品衛生協会,2005,pp.621-630

3) 「食中毒の発生状況-平成 26 年」2014 年 12 月 26日更新 山形県ホームページ(http://www.pref.yamagata.jp/ou/kankyoenergy/020071/05/05-01.html) (2015 年 8 月現在)

4) Awazu,K., Nomura, C., Yamaguchi, M., Obana, H. Determination of histamine in fish and fish products by tandem solid-phase extraction. Shokuhin Eiseigaku Zasshi(J. Food Hyg. Saf. Sci.), 52, 199-204(2011).

5) Kikuchi,H. ,Tsutsumi, T., Matsuda, E. Parformance evaluation of a fluoresceamine-HPLC method for determination of histamine in fish and fish products. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Saf. Sci.), 53, 121-127(2012).

6) 食品衛生検査指針理化学編 2015. 東京，日本食品衛生協会，2015，pp. 791-794

7) Kakigi, Y., *et al*. Quantification of non-volatile amines in beer using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometer. Bunseki Kagaku, 60, 157-162 (2011)

8) Takizawa, Y., Shoji, M., Chiba, Y., Okura, Y. Examination of the quick analysis method of the histamine. Annual Report of Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment, 32, 73-76(2014)

9) G. Sagratini, *et al*. Simultaneous determination of eight underivatised biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 132, 537-543(2012).

10) EFSA Panel on Biological Hazards(BIOHAZ). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Journal, 9, 2393, 1-93(2011)

資　料

LC-MS/MS を用いた不揮発性アミンの一斉分析法の検討

佐藤 陽子，太田 康介，笠原 義正

Studies on Simultaneous Analysis of Non-volatile Amines by LC-MS/MS

By Yoko SATO, Kosuke OTA and Yoshimasa KASAHARA

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフを用いた食品中の不揮発性アミンの分析は誘導体化が必要なため，前処理に長時間を要する．そこで，誘導体化を必要としない高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計を用いて不揮発性アミン５種の一斉分析を検討した．生サバを対象として検討したところ，ヒスタミンを含めた５種の不揮発性アミンは分析可能で，添加回収試験では 92.2－119 %の回収率であった．

Key Word：ヒスタミン,不揮発性アミン,食中毒,LC-MS/MS

Ⅰ　はじめに

平成 26 年 9 月に山形県内でヒスタミン(Him)が原因と疑われる食中毒が発生し，当所において検査を実施した．検査方法は食品衛生検査指針の参考法[1)]にしたがい蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ(HPLC-FL)を用いHimを含め5種類の不揮発性アミンの一斉分析を実施した.しかし,この検査法は抽出，精製後，ダンシルクロライドにより誘導体化する過程が含まれ前処理に長時間を要する．そこで，選択性の高い高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いて誘導体化を必要としない一斉分析法について検討した．

生サバを用いた添加回収試験を指標に HPLC-FL 法と LC-MS/MS 法を比較した．同時に，サバの干物及び照焼きについても検討した．

Ⅱ　材料および方法

1.　試料

市販の生サバ，サバの干物及び照焼きをフードプロセッサーで細切，均質化後冷凍保存したものを解凍して用いた．

2.　装置

HPLC-FL は日本分光製Galliver1500 シリーズを用いた．LC-MS/MS は Agilent 社製 1100 シリーズ(LC)及び AB SCIEX 社製 API2000(MS/MS)を用いた．

3.　標準品

ヒスタミン二塩酸塩，チラミン塩酸塩，カダベリン二塩酸塩は関東化学製，プトレシンは和光純薬工業製，スペルミジン三塩酸塩は MP Biomedicals 社製を用いた．Him，チラミン(Tym)，カダベリン(Cad)，プトレシン(Put)，スペルミジン(Spd)は 1000 μg/mL となるように，それぞれ 0.1 M 塩酸に溶解し標準原液とした．混合標準溶液は各標準原液から 0.1 M 塩酸:アセトニトリル(2:8)で希釈して調製し用いた．

4.　測定条件

4.1 HPLC-FL 条件

LC カラムは Inertsil ODS-SP 4.6 mm i.d.×250 mm，5 μm (GL Science 社製) を用い，カラム温度は 40 ℃とした．移動相には A 液:アセトニトリル-水(6:4)，B 液:アセトニトリル-水(7:3)のグラジエント条件(100 %A 液(0 min)→100 %A 液(23 min)→0 %A 液(24 min)→0 %A 液(39 min)→100 %A 液(40 min))で溶出を行った．移動相流量は 1.0 mL/min，試料注入量は 10 μL とした．検出波長は励起波長 325 nm，蛍光波長 525 nm とした．

4.2 LC-MS/MS 条件

LC カラムは CAPCELL CORE PC 2.1 mm i.d.×150 mm, 2.7 μm（資生堂製）を用い，カラム温度は 40 ℃とした．移動相は A 液:アセトニトリル-100 mM ギ酸アンモニウム(pH 3.0)(9:1)，B 液:10 mM ギ酸アンモニウム(pH 3.0)のグラジエント条件(90 %A 液(0 min)→90 %A 液(1 min)→10 %A 液(10 min)→90 %A 液(10 min))による溶出を行った．移動相流量は 0.25 mL/min，試料注入量は 5 μL とした．MS/MS のイオン源には ESI(positive)を用い，イオンスプレー電圧は 4200 V，イオン源温度は 500 ℃に設定した．測定は MRM モードで行い，定量イオン(*m/z*)は 112→95(Him)， 138 → 121(Tym),103 → 86(Cad),89 → 72(Put),146→72(Spd)とした．

5. 試験溶液の調製

5.1 HPLC-FL 法

試料 5.0 g を食品衛生検査指針の参考法[1)]にしたがい試験溶液を調製した(Fig.1)．

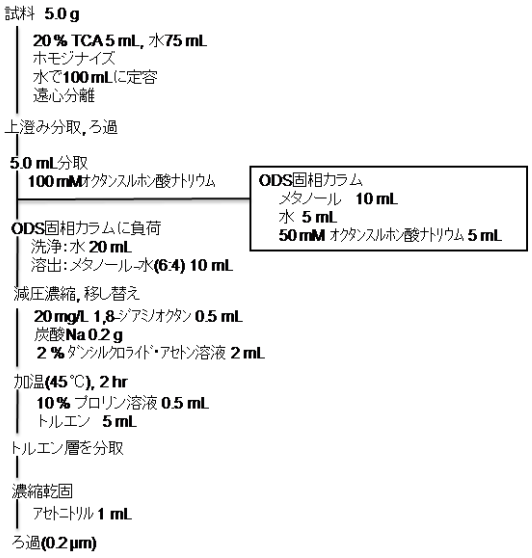


Fig.1 HPLC-FL 法の試験溶液調製法

5.2 LC-MS/MS A 法

試料 5.0 g を HPLC-FL 法と同様の操作により抽出して精製し得られた溶液を濃縮乾固後，誘導体化せず 0.1 M 塩酸-アセトニトリル(2:8)2 mL に溶解した．この溶液を 1 mL 分取し同溶媒で 25 mL に定容，0.2 μm のメンブランフィルターを通し試験溶液とした(Fig.2)．

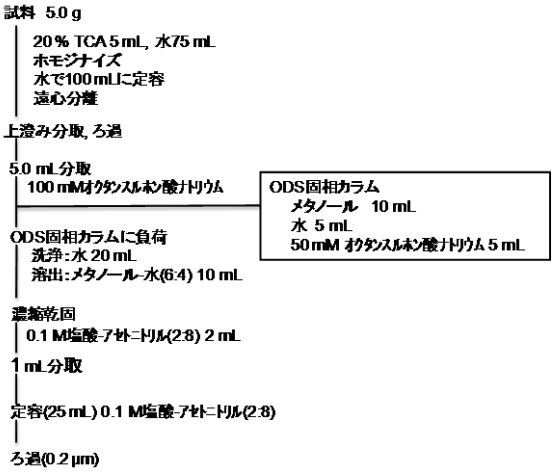


Fig.2 LC-MS/MS A 法の試験溶液調製法

5.3 LC-MS/MS B 法

試料 2.0 g を 50 mL 目盛付遠沈管に採り，抽出溶媒 30 mL を加えホモジナイズ後，50 mL に定容した．これを撹拌し静置後，遠心分離を行った．この上澄み液 1.0 mL を分取し 0.1 M 塩酸-アセトニトリル(2:8)で 20 mL に定容，0.2 μm のメンブランフィルターを通し試験溶液とした[2-6)] (Fig.3)．

抽出溶媒の検討は，①1.3 %トリクロロ酢酸水溶液，②1.5 %トリフルオロ酢酸水溶液(TFA aq.)-アセトニトリル(15:85)，③0.1 M 塩酸-アセトニトリル(2:8)及び④0.1 M EDTA・2Na 水溶液(pH 8)の 4 種を用いて行った．抽出溶媒②，③，④を使用した場合ホモジナイズ後の定容(50 mL)にそのまま抽出溶媒を用いたが，①の場合は精製水を用いた．

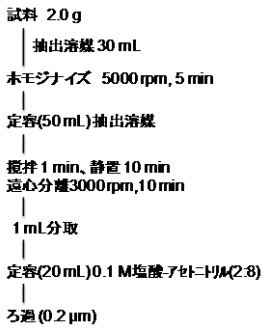


Fig.3 LC-MS/MS B 法の試験溶液調製法

Ⅲ 結果および考察

1. 試験溶液の溶媒の検討

水-メタノールの比率を水，(2：8)，(5：5)，(8：2)，メタノールに調製し，同様に 0.1 M 塩酸-メタノール，水-アセトニトリル及び 0.1M 塩酸-アセトニ

トリルについても同じ比率で調製し混合標準溶液を作成し，各アミンのピーク高及び形状を比較した．Spd についてはどの溶媒を用いても良好なピーク形状は得られなかった．Spd 以外のアミンでは 0.1 M 塩酸-アセトニトリル(2:8)を用いた場合に良好なピークが得られため，これを試験溶液の溶媒とした．

2. 試験溶液調製方法の検討

生サバにアミン濃度が各々100 μg/g となるよう標準溶液を添加し，LC-MS/MS 法と HPLC-FL 法の回収率を比較した(Table 1)．

LC-MS/MS A 法では，各アミンの回収率は 86.3-105 %と良好な結果が得られた．この方法は抽出,精製する過程は HPLC-FL 法と同じであるが,誘導体化を行わず測定するため，前処理に要する時間は短縮できる．

LC-MS/MS B 法では,ホモジナイズ後,遠心分離し,上澄みを希釈し試験溶液とする方法である．この方法では固相カラムによる精製過程及び誘導体化がないため，操作が HPLC-FL 法及び LC-MS/MS A 法に比べ簡便で迅速に検査結果を得ることができる．抽出溶媒に②0.1 M 塩酸-アセトニトリル(2:8)を用いたときの各アミンの回収率は 92.2-119 %と他溶媒を使用した場合に比べ良好であった．

3.添加回収試験

次に食中毒検体として想定されるサバの干物及び照焼きを用いて添加回収試験を行った．アミン濃度は各々100 μg/g となるよう試料に添加した．各アミンの回収率は干物では 95.7-111 %，照焼きでは 49.1-98.2 %であった (Table 2)．照焼きで回収率が低かった要因は調味料や油分等の夾雑物が多いため，イオン化の抑制が生じたものと考えられる．

なお，Him に限れば回収率は干物では 101 %，照焼きでは 77.8 %と残留農薬等の妥当性評価ガイドラインの真度の目標値 70-120 %の範囲内であった．

また，今回用いた Him の検量線では標準溶液の最小濃度が 12.5 ppb なので，これは LC-MS/MS B 法の試料濃度に換算すると 6.25 ppm になる．これは HPLC-FL 法の Him の定量限界 20 ppm[1)]に比べても感度が良い．なお，この最小濃度(12.5 ppb)での S/N 比は 356 と定量限界の目安となる S/N 比 10 よりも十分大きい．

文献 [7)]によると食品中の Him 濃度が 50-100 ppm で感受性の高いグループは食中毒をおこす可能性が指摘されているが，現在，国内では食品中の Him 濃度の基準値は設定されていない．しかし，Him による食中毒の原因究明のためには多様な食品が検体として想定されるため，夾雑物の多い調理品でも一斉分析が可能となるよう分析法の検討が必要と考える．

Ⅳ 文献

1) 食品衛生検査指針理化学編，厚生労働省監修，日本食品衛生協会，東京，2005，p.621-630
2) 山本圭吾,木本聖子,森居京美，城山二郎：LC-MS/MS による魚介類中ヒスタミン分析法の検討，奈良県保健環境研究センター年報，44，53-57(2009)
3) 吉田達雄 他：水産物中ヒスタミン分析の検討，熊本県保健環境科学研究所，40，20-24(2010)
4) 大月史彦,肥塚加奈江,林隆義,山本淳:LC/MS/MS を用いた不揮発性腐敗アミンの一斉分析法の検討,岡山県環境保健センター年報,34,99-103(2010)
5) 多田裕之,南谷臣昭,神山恵里奈,河村博：LC-MS/MS によるキノコ及び魚介類の中毒成分迅速分析法，岐阜県保健環境研究所報，21,1-7(2013)
6) 瀧澤裕,庄司美加,千葉美子，大倉靖：LC-MS/MS による不揮発性アミン類迅速分析法,第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 講演集，174-175(2013)
7) 登田美桜,山本都,畝山智香子,森川肇:国内外におけるヒスタミン食中毒，国立医薬品食品衛生研究研報告，127，31-38(2009)

Table 1. 添加回収試験の結果

調製方法	平均回収率(%)※				
	Him	Tym	Cad	Put	Spd
HPLC-FL 法	102	97.9	96.9	96.9	88.7
LC-MS/MS A 法	105	87.2	90.4	86.2	98.9
LC-MS/MS B 法					
①1.3 % トリクロロ酢酸水溶液	116	100	91.2	87.5	124
②0.1 M 塩酸-ｱｾﾄﾆﾄﾘﾙ(2:8)	112	105	92.4	92.2	119
③1.5 % TFA aq.-ｱｾﾄﾆﾄﾘﾙ(15:85)	119	90.8	85.1	63.5	119
④0.1 M EDTA･2Na 水溶液	21.1	101	34.9	0	23.4

※添加濃度 各アミン 100 μg/g, n=3

Table 2. 添加回収試験の結果

試料	平均回収率(%)※				
	Him	Tym	Cad	Put	Spd
干物	101	104	109	111	95.7
照焼き	77.8	98.2	50.9	76.3	49.1

※添加濃度 各アミン 100 μg/g, n=3

資　料

自然毒による食中毒事例（2014 年）

長岡 由香，笠原 義正

Food Poisoning by Natural Toxins in Yamagata Prefecture in 2014

By Yuka NAGAOKA and Yoshimasa KASAHARA

2014 年に山形県内で発生した自然毒による食中毒事例は 6 件であった．これらは，すべて植物性自然毒であり，原因物質としては，スイセンによる食中毒 1 件，ツキヨタケによる食中毒 4 件，ハイイロシメジによる食中毒 1 件であった．

そのうち当研究所に検査依頼のあった事例は 3 件であった．この 3 件は，いずれもキノコの調理品を喫食し，吐き気，嘔吐，腹痛，下痢等の症状を呈した事例である．残品について，高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC-MS/MS) により分析した結果，いずれもツキヨタケの誤食による食中毒と判明した．

その他の 3 件については，残品の形態的特徴等で判定可能であったため，検査依頼がなかった．

Key Word：食中毒，自然毒，植物性自然毒，ツキヨタケ，illudin S

Ⅰ　はじめに

自然毒による食中毒事例において，理化学的検査が必要な場合は，食品安全衛生課又は管轄保健所長から依頼を受け，当所で原因物質の調査を行っている．

2014 年，自然毒による食中毒は 6 件発生しており(Table 1)，そのうち，植物性自然毒のツキヨタケによる食中毒 3 件について検査依頼があり実施した．それらの検査概要について報告する．

事例の概要は，保健所及び食品安全衛生課による調査報告からまとめた．当所で調査を行った分析条件や結果については，当所の検査報告書からまとめた．

Ⅱ　事例の概要

事例１：ツキヨタケの煮物による食中毒

10 月 9 日，医療機関から保健所に，キノコによる食中毒を疑う患者 2 人が受診した旨の連絡があった．保健所が調査したところ，10 月 8 日に山林でキノコを採取し，午後 7 時頃自宅で調理し食べたところ，喫食者 5 人中 4 人が午後 8 時頃から吐き気，嘔吐を呈し，医療機関を受診した．入院患者はなかった．

事例２：ツキヨタケの炒め物による食中毒

10 月 13 日，医療機関から保健所に，キノコによる食中毒を疑う患者 2 人が受診した旨の連絡があった．保健所が調査したところ，同日に山林でキノコを採取し，午後 1 時 30 分頃自宅で調理し食べたところ，喫食者 3 人中 2 人が午後 8 時頃から吐き気，嘔吐，下痢，腹痛を呈し，医療機関を受診した．その後の報告による発症者数は 3 人であった．入院患者はなかった．

事例３：販売されたムキタケにツキヨタケが混入したことによる食中毒

10 月 17 日，山形県内の果実野菜販売業の店舗において購入したムキタケを，10 月 18 日午前 9 時頃から調理し食べたところ，喫食者 2 人中 2 人が午前 10 時頃から吐き気，嘔吐，倦怠感の症状を呈した．患者は仙台市在住であり，医療機関受診者は 1 人，入院患者数は 1 人であった．10 月 19 日，仙台市の管轄保健所から山形の販売店舗管轄保健所に調理済み残品（ツキヨタケのお吸いもの）が搬入され，山形の保健所から検査依頼があった．また，食中毒患者が食したムキタケと同一と考えられるキノコは，その他 3 店舗で販売されており，販売者が自主回収を行った．他に発症報告はなかった．同日，山形の販売店舗管轄保健所により，当該食品を購入した飲食店がありツキヨタケ混入の疑いがあるとの理由で調理品が回収された．その調理品 2 検体（喫食者なし）について検査依頼があった．

Ⅲ　材料及び方法

1．試料

事例 1 は，調理済み残品 1 検体を均質化して試料とした．事例 2 は，未調理品及び調理済み残品をそれぞれ均質化して試料とした．事例 3 は，仙台市の食中毒検体 1 検体及び飲食店調理品 2 検体をそれぞれ均質化して試料とした．

2．標準品

ツキヨタケからメタノールエキスを作成し，これを各種クロマトグラフィーで分離精製し，illudin S を単離した [1]．Illudin S を 5.0 mg 秤量し，5.0 mL のメタノールに溶解したものを適宜希釈して標準溶液とした．

3．抽出及び精製

試料 5.0 g を量り，メタノール 50 mL を加えてホモジナイズした．これをろ過後減圧濃縮して，10 %メタノール 20 mL に溶解し，メタノール 5 mL，水 5 mL でコンディショニングを行った Oasis HLB に負荷した．20 %メタノール 5 mL で洗浄後，メタノール 5 mL で溶出した．これを減圧濃縮し，メタノール 1 mL に溶解して試料溶液とした．試料量が 5 g に満たない場合には全量はかりとった．

4．分析条件

装置は，高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC-MS/MS)（高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズ，質量分析計：AB Sciex 社製 API 2000）を用いた．

既報 [2] に従い LC-MS/MS を次の条件で測定した．分析カラムは Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d. ×150 mm，5 μm)を用い，カラム温度は 40 ℃，移動相は 5 mM ギ酸アンモニウム：メタノール (7：3)，移動相流速は 0.2 mL/min とした．イオン化法は ESI(Positive)，ターボガス温度は 450 ℃，試料注入量は 5 μL とした．定量用モニタリングイオンは(m/z)：265→217，確認用モニタリングイオンは(m/z)：265→201 とした．

Ⅳ　結果及び考察

本法における illudin S の定量限界は 0.28 μg/g である [1]．検査依頼は，illudin S が検出されるかどうかの定性試験であったが，定量限界を超えた検体について，検出と判定した．

事例 1 の検体からは illudin S が検出された (定量値：28 μg/ g)．事例 2 の検体は，未調理品及び調理済み残品のどちらからも illudin S が検出された．(未調理品定量値：1067 μg/ g，調理済み残品定量値：106 μg/ g)．事例 3 の仙台市の食中毒検体からは illudin S が検出された (定量値：1 μg/ g)．飲食店調理品 2 検体からは検出されなかった．

山形県内において，ツキヨタケによる食中毒は頻繁に発生している．ムキタケ，ヒラタケ等の食用キノコと形態が似ていることが誤食の原因と考えられる．

ツキヨタケに関しては中毒症状とそれを引き起こす illudin S の量の正確な知見は無いが，illudin S として 1 mg 以上の摂食により中毒が起こると推定されている [1)].

2014 年は，ツキヨタケによる食中毒は 4 件発生し，そのうちの 3 件について理化学的検査を行った．1 件は残品の形態的特徴等で判定可能であったため，検査依頼がなかった．

調理品の場合，illudin S は，煮汁にも移行している．事例 1 及び事例 3 における illudin S の定量値が低い理由は，食中毒検体が具材のみであり，illudin S の多くが汁に移行していたためと推定される．また，事例 3 の飲食店調理品については，検体に煮汁も含まれていたが検出されなかったことより，ツキヨタケが混入していなかったと考えられる．食中毒の原因物質の理化学的検査において，検体が調理品の場合，可能であれば煮汁も共に回収してもらうように依頼することが必要と考えられる．

自然毒の食中毒は，事例 1 及び事例 2 のように，採取者が家庭内で調理し誤食することで発生する場合が多い．しかし，事例 3 のように，市場流通品の食用キノコに有毒キノコが混入した場合，被害が広域に発生する危険性がある．今回の発症者は 1 家族 2 人であったが，被害を最小限にするためにも，迅速な原因物質の究明を行うことが必要である．

V 文献

1) 笠原義正ら：LC/MS/MS によるツキヨタケおよび食中毒原因食品中の illudin S の分析，食品衛生学雑誌，50，167-172，(2009)

2) 和田章伸，笠原義正：ツキヨタケの中毒成分 illudin S の LC/MS/MS による分析，山形県衛生研究所報，43，1-5，(2010)

Table 1　2014 年に発生した自然毒による食中毒事例の概要

発生	発症時間	発症者数	喫食者数	原因食品	症状	原因物質	
5 月	30 分後	4	4	スイセンの葉	吐き気、嘔吐、腹痛	スイセン	
10 月	1 時間後	4	5	ツキヨタケの煮物	吐き気、嘔吐	ツキヨタケ	※
10 月	1 時間半後	3	3	ツキヨタケの炒め物	吐き気、嘔吐、下痢、腹痛	ツキヨタケ	※
10 月	直後	4	5	ツキヨタケの煮物	吐き気、嘔吐、下痢	ツキヨタケ	
10 月	1 時間後	2	2	ツキヨタケのお吸い物	吐き気、嘔吐、倦怠感	ツキヨタケ	※
10 月	不明	1	10	ハイイロシメジの焼物	下痢、嘔吐	ハイイロシメジ	

※：検査依頼のあった事例（依頼のなかった事例は残品の形態鑑定で判定した）

資　料

ツキヨタケ中の中毒成分 illudin S の含有量および塩蔵による消長

大河原 龍馬，和田 章伸，笠原 義正

Concentration of illudin S in *Omphalotus guepiniformis* and its reduction by salting

by Ryuma OKAWARA,　Akinobu WADA and Yosimasa KASAHARA

ツキヨタケ中の illudin S 含有量は子実体が大きくなるほど増加するが，ある重量で減少に転じることが分かった．また，石突の黒紫色のシミの部分に毒があり，これを取り除くと中毒しないという伝承は，illudin S を定量することにより否定された．さらに，塩蔵による毒抜きを検討したところ，半分に切断したツキヨタケの場合では，1ヶ月間の塩蔵により illudin S 残存率が 0.4 %となったが，サンプル調製の際の切り方で残存率が変わる可能性が示唆された．

Key Words: ツキヨタケ *Omphalotus guepiniformis*, イルジンS　illudin S, 塩蔵　salting

Ⅰ　はじめに

ツキヨタケ（*Omphalotus guepiniformis*）による食中毒は毎年のように発生しているが，これは食用のヒラタケ，ムキタケ，シイタケなどと形態が似ていることが原因と考えられる．これを誤食すると30分から3時間で嘔吐，腹痛，下痢などの症状を呈する．

厚生労働省の統計によると，全国のツキヨタケ中毒の件数は平成12年から平成26年までの15年間で296件である[1]．これはキノコによる食中毒の発生件数の約4割を占める．我々は既にツキヨタケの食中毒原因物質の illudin S について固相抽出を用いた前処理法および高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた定量法を確立した[2]．

前報[2]ではこの方法を用いてツキヨタケの採取地域の違いによる illudin S 含有量の差について検討を行った．今回はツキヨタケの子実体の大きさまたは部位の違いについて検討を行った．また，毒キノコについて「塩蔵すると毒が抜ける」，「干して乾燥すれば食べられる」，「ナスと一緒に調理すると食べられる」等といったような言い伝えが全国的に知られている[3]．さらに，以前我々が行ったアンケート調査からも同様に，キノコを毒抜きして食べるかという問いに対して「水に浸す」，「塩蔵をする」ことで食するという回答があった[4]．そこで塩蔵による減毒について真偽のほどを検証した．

Ⅱ　材料および方法

1.　試料

2009年，2010年および2013年に山形県鶴岡市田麦俣および西川町志津に自生していたツキヨタケを採取し，-20 ℃で凍結保存したものを用いた．

2.　試薬

標準品 ： illudin S は前報[2]に従い，ツキヨタケから分離精製したものを用いた．標準溶液は illudin S を 5 mg 秤量し，5 mL のメタノールに溶解したものを適宜稀釈したものを用いた．

試薬 ： ギ酸およびギ酸アンモニウムは関東化学㈱製の特級，メタノールは関東化学㈱製の高速液体クロマトグラフィー用を使用した．　食塩は食用の市販品を用いた．

固相カートリッジ：Waters社製Oasis HLB 6 cc (500 mg) を用いた．使用前にメタノール 5 mL 及び水 5 mL を用いてコンディショニングを行った．

3. 装置

LC-MS/MS ： 高速液体クロマトグラフはAgilent社製Agilent 1100シリーズを用いた．質量分析計は㈱エービーサイエックス社製API2000を用いた．

4. 測定条件

LC-MS/MSは前報[2)]に従って，移動相を5 mMギ酸アンモニウム-メタノール（7:3）とした．定量用モニタリングイオン(*m/z*)を265 → 217，確認用モニタリングイオン(*m/z*)を265 → 201とした．

5. 試料溶液の調製

細切したツキヨタケ5 gを量り取り，メタノール50 mLを加えてホモジナイズした後，ろ過した．ろ液を減圧濃縮後，10％メタノールで溶解し，Oasis HLBに負荷した．20％メタノール5 mLで洗浄後，メタノール5 mLで溶出させた．これを減圧濃縮し，メタノール1 mLで溶解して0．45 µmのメンブレンフィルターを通し試料溶液とした．

6. 検量線および定量

Illudin Sを1，5，10，25 µg/mlになるように調製し，その5 µLをLC-MS/MSに注入した．測定で得られたクロマトグラムからピーク面積を求め，絶対検量線法により検量線を作成した．

7. 塩蔵によるilludin Sの消長

食用きのこと間違われやすい大きさのツキヨタケ(25.3 g～33.3 g)を，ツキヨタケの重量に対して1.5～2倍の重量の食塩と混合して一定期間塩漬けを行った後に，流水で24時間塩抜きした菌体について「5. 試料溶液の調製」にしたがい試料溶液を作成した．

Ⅲ 結果および考察

1. 子実体の大きさの違いによるilludin S含有量の差

2009年9月に山形県鶴岡市田麦俣で採取した様々な大きさのツキヨタケについて，それぞれのilludin S含有量を測定した．ツキヨタケの重量は20～50 gを中心に2．2～120．3 gであった（30個）．その結果，子実体1個当たりのilludin S含有量は0.018～32.57 mgであった(Figure 1)．子実体が大きくなるほど，そこに含まれるilludin Sは増加していくが，約70 gを超えると減少傾向に転じることが分かった． このことから，ツキヨタケがある程度まで成長するとilludin Sの生産が行われなくなることが示唆される．

さらに，発生する倒木の違いによってilludin S含有量に差があるのかどうか見るために，倒木ごとに分けてツキヨタケを採取し，illudin S含有量を測定した．測定には2010年に西川町志津で採取したものを用いた．このツキヨタケはそれぞれ隣接する3本の倒木（倒木A, B, Cとする）に自生していた．よって，場所，時期，気象条件等は同様である．

その結果，子実体1個当たりのilludin S含有量は重量の大きい個体ほど大きくなることは同様であるが，その増え方に一定の傾向は見られなかった．しかし，70 g以上のツキヨタケを採取できなかったので，Fig.1に示したようなilludin Sの減少は確認できなかった(Figure 2)．

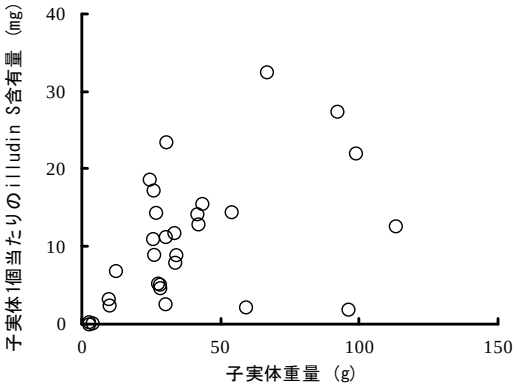
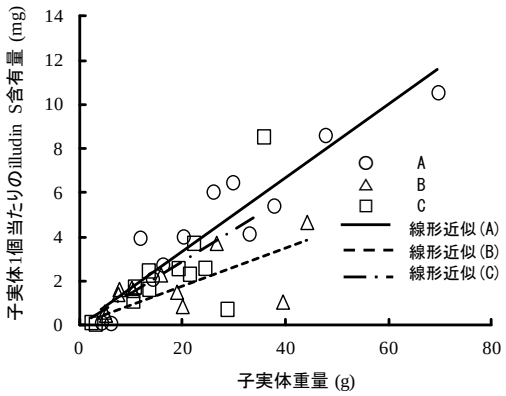


Fig. 1. 様々な大きさのツキヨタケ中のilludin S



A
B
C

Fig.2. illudin S contents in Omphalotus guepiniformis of different tree growing

2. 部位の違いによる illudin S 含有量の差

ツキヨタケの柄の基部に位置する石突の中央部には黒紫色のシミがあり，他の食用キノコとツキヨタケとを判別する最大の特徴とされている．聞き取り調査によれば，この黒紫色のシミの部分に毒があるとされている．したがって石突の部分を取り去れば中毒しないと言われている．そこで，黒紫色のシミの部分に illudin S が集まっているのか，また，それ以外には含まれていないのか検討を行った．

試料は 2009 年 9 月に鶴岡市田麦俣および 2013 年 10 月に西川町志津で採取したツキヨタケを用いて，おのおの黒いシミを含む石突部分，傘の部分，傘と石突の中間の柄の部分の３つの部位に分けて，illudin S 含有量を測定した．

測定の結果，鶴岡市田麦俣のツキヨタケでは石突に含まれる単位重量当たりの illudin S 含有量は傘の 4.1 倍であり，西川町志津では 2.4 倍，柄についてはそれぞれ傘の 1.9 倍，1.2 倍であった．すなわち，いずれも石突，柄，傘の順に多かった(Table1)．一柳らは菌糸体で illudin S が生産され，子実体発生時に吸い上げられて蓄積されることを示唆している[5]．これらのことから，シミの部分に毒が集まるというよりも，菌糸体から石突を通して子実体全体に illudin S が供給されていると考える．したがって，菌糸体に近い石突部分のほうが単位重量当たりの illudin S 含有量が大きくなり，先端に行くほど illudin S が稀釈されて小さくなっていくものと考えられる．

一方，単位重量当たりではなく傘，柄，石突おのおのに含まれる illudin S 含有量を見ると，傘の部分が最大であった．よって，シミ(石突)を除けば食べられるという言い伝えは否定される．

3. 塩蔵による illudin S 含有量の消長

山形県内の一部地域では，有毒キノコであるツキヨタケを塩蔵して毒抜きを行い食す習慣があったと言う．また，2005 年に実施した山形県内の食生活改善推進協議会会員を対象としたアンケート調査では，ツキヨタケを水に浸す，あるいは塩漬けにして毒抜きをして食すると回答した人が 2．8 %いた[4]．

塩蔵の方法は生のキノコを茹でた後流水にさらし，水切りした後に大量の塩で漬ける．さらに 1～3 ヵ月後に水にさらして塩抜きを行った後に調理に供すると言う．

今回，この塩蔵の過程において各段階でどの程度 illudin S が減少するかを検討するために，単位重量当たりの含有量を比較した．

そこで，塩漬け前の illudin S 含有量が分かっていなければならないので，ツキヨタケを細切して均一に混合し，その一部を塩漬け前の含有量とした．それ以外は 1 週間，1 ヶ月，2 ヶ月，3 ヶ月塩蔵した後に含有量を測定した．その結果，1 ヶ月後には微量になり，2 ヵ月後には検出されなかった(Table 2)．

Table 2. ツキヨタケの塩蔵による illudin S含有量の経時変化（細切）

塩蔵期間	単位重量当たりの含有量（μg/g）[a]
塩蔵前	130.37 ± 15.62
1週間	0.36 ± 0.37
1ヶ月	0.05 ± 0.05
2ヶ月	N.D.
3ヶ月	N.D.

a)平均値±標準偏差(n=4-5)

しかし実際に塩蔵して 3 ヶ月後に塩抜きしても中毒した事例があるので，illudin S が検出されないことは考えにくい．これは細切したために illudin S が流出して減少した可能性が高い．そのため，菌体の左右で含有量が変わらないことをあらかじめ確認したうえで，半分にして片方を定量し，もう一方を塩蔵して 1 週間後および 1 ヵ月後に illudin S を定量した．

その結果を Table3 に示した．半分にしたものは 1 ヵ月後

Table1. ツキヨタケの部位の違いによるilludin S 含有量の差

採取地	含有量(μg/g)[a]		
	傘	柄	石突
鶴岡市田麦俣[b]	291.8 ± 126.9	638.6 ± 98.4	1221.8 ± 462.0
西川町志津[c]	63.7 ± 23.8	131.1 ± 67.7	158.6 ± 87.8

a)平均値±標準偏差(n=4-5)
b)2009年採取(n=4)
c)2013年採取(n=5)

Table 3. ツキヨタケの塩蔵によるilludin S 含有量の経時変化

塩蔵期間	単位重量当たりの含有量 (μg/g)[a]	
	半分	細切
塩蔵前	401.7 ± 244.2	401.7 ± 244.2
1週間	1.24 ± 0.29	0.143 ± 0.175
1ヶ月	1.79 ± 1.49	0.005 ± 0.008

a)平均値±標準偏差(n=4-5)

に1.79 μg/gになり，細切したものは0.005 μg/gであった．細切したもののほうが半分にしたものと比較して含有量が小さくなったことから，細かく切断することでよりilludin Sが流出しやすくなる可能性が高い．したがって，今後はキノコを切断せずに塩蔵を評価する方法を検討する．

Ⅳ 文献

1) 厚生労働省：食中毒に関する情報，4 食中毒統計資料 (http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/index.html)

2) 和田章伸，笠原義正：ツキヨタケの中毒成分illudin SのLC/MS/MSによる分析，山形県衛生研究所報，43，1-5，2010

3) 登田美桜，畝山智香子，豊福肇，森川馨：わが国における自然毒による食中毒事例の傾向(平成元年～22年)，食品衛生学雑誌，53，105-121，2012

4) 笠原義正，伊藤健：健康と食べ物の言い伝えに関するアンケート調査，山形県衛生研究所報，39，25-33，2006

5) 一柳剛他：ツキヨタケ（*Omphalotus guepiniformis*）によるilludin Sの生産，日本きのこ学会誌，21(2)，98-102，2013

資　料

畜水産食品中の動物用医薬品におけるLC-MS/MS一斉分析法の妥当性評価

須貝 裕子

The validity value of the LC-MS/MS simultaneous analysis way in medical supplies for animals in the Livestock Products and Seafoods

By Hiroko SUGAI

畜水産食品中に残留する動物用医薬品を高速液体クロマトグラフ質量分析計により測定するために，「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」(以下，ガイドライン）に基づき妥当性評価を実施した．すなわち，移動相及び希釈倍率等に検討を加えた方法を用い，表面多孔性（コアシェル型）カラムを選定した場合，今回対象としたすべての食品，動物用医薬品においてガイドラインに適合する結果が得られた．

Key Words：動物用医薬品，畜水産食品，妥当性評価，LC-MS/MS

Ⅰ　はじめに

当所における残留動物用医薬品（以下，動物薬）検査は，「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）（以下，一斉法Ⅰ）」等により，紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）を中心に測定を実施してきたが，一斉法Ⅰは精製操作が十分ではなく，紫外線吸光度を指標にしているため，様々な目的外成分（夾雑成分）を含んでいる畜水産食品の測定には困難なことが多かった．

また，平成22年に「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」（以下，ガイドライン）が改正され，さらに平成25年12月14日以降はこのガイドラインに基づき，妥当性を確認したものでなければ検査対象とならないこととなった．このため，一斉法Ⅰにおける妥当性評価を実施したところ，ガイドラインで評価すべきパラメータのうち，特に「選択性」を満足しない成分がほとんどであった．

一方，高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）はHPLC-UVに比べて高感度であり，物質を質量の違いで特定するため同定能力に優れているが，夾雑成分が目的成分のイオン化に影響を及ぼすことが考えられる．

そこで，夾雑成分の影響を減らしLC-MS/MSにより測定を行うために，一斉法Ⅰに検討を加えた方法（以下，「検討法」という．）により，妥当性評価を行ったので報告する．

Ⅱ　材料と方法

LC-MS/MS 測定において夾雑成分の影響を減らすために，試験液を希釈する検討を行った．

1 対象食品及び対象成分

対象食品は鶏卵，養殖魚，生乳及び食鳥肉（鶏筋肉）であり，対象成分はチアベンダゾール(TBZ)，5-ヒドロキシチアベンダゾール(5-OH-TBZ)，ピリメタミン(PYR)，スルファジアジン(SDZ)，スルファメトキサゾール(SMXZ)，オキソリニック酸(OXA)，スルファメラジン(SMR)，オルメトプリム(OMP)，

スルファジミジン(SDD),スルファモノメトキシン(SMMX), スルファクロルピリダジン(SCPD), トリメトプリム(TMP), スルファキノキサリン(SQX), スルファジメトキシン(SDMX)及びフルベンダゾール(FBZ)の 14 項目（15 成分）である.

2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ（LC）は Agilent 社製 1200 シリーズ, タンデム型質量分析計（MS/MS）は AB SCIEX 社製 API2000 をそれぞれ用いた.

測定条件の検討内容を Table 1 に示した. 移動相は①から③の 3 種類, 試験液溶媒はアセトニトリル及び水の混合液（①から④）とし, 混合割合を変えて最も感度の高い組み合わせを検討した.

測定カラムは分離の良い表面多孔性充填剤（コアシェル型）カラム①及び従来型の全多孔性充填剤カラム②を用い, LC-MS/MS により測定を行った.

Table 1. LC-MS/MS 測定条件の検討

移動相
- ①A 液；0.05%ギ酸
  B 液；アセトニトリル
- ②A 液；5mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液
  B 液；アセトニトリル
- ③A 液；5mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液
  B 液；5mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール溶液

各グラジェント溶出

試験液溶媒
- ①アセトニトリル-水(1:9)
- ②アセトニトリル-水(2:8)
- ③アセトニトリル-水(3:7)
- ④アセトニトリル-水(4:6)

分析カラム
- ①資生堂社製 CAPCELLCORE C18 2.1mmi.d.×150mm
- ②Waters 社製 Atlantis®T3 2.1mmi.d.×150mm

3 定量限界

ここで, 動物薬のうち, 抗生物質や合成抗菌剤で残留基準値が定められていないものは,「残留してはならない」とされている. この場合, ガイドラインによる定量限界は, 定量限界相当の抽出液を添加した標準液又は添加サンプルにおいて S/N≧10 であることとされ, マトリックスの共存下における S/N 比を求める必要がある.

マトリックスの共存下ではイオン化に影響を与える可能性があるため, 希釈倍率は,「**2 装置及び測定条件**」の測定条件の検討で得られた条件を用いて, 定量限界相当の標準液の測定を行い, 目的成分のピークの S/N を求めて S/N≧10 である濃度範囲を算出し、マトリックスによる影響を考慮した上で決定した.

4 試験溶液の調製

一斉法 I においては脱脂操作に用いた溶媒（アセトニトリル-水(4:6)）がそのまま試験液溶媒となるが, これを変更する場合, 脱脂操作から溶媒を変更することが可能かどうか確認する必要がある. そこで, 試験液溶媒と同じ 4 種類の溶媒（①から④）により脱脂操作を行い, 最適となる条件を「検討法」とした.

5 妥当性評価

ガイドラインに基づき,妥当性評価を実施した. 添加濃度は, 鶏卵, 生乳及び食鳥肉においてはそれぞれの食品の残留基準値相当濃度, 養殖魚は複数の魚種の検査を実施しているため, 0.1ppm 及び 0.01ppm 相当の 2 濃度とした.

Ⅲ 結果および考察

1「検討法」

1.1 LC-MS/MS 測定条件

Table 1 により, 試験液の溶媒を変えて標準液の LC-MS/MS 測定を行ったところ, ①アセトニトリル-水(1:9)の標準液のピーク形状が最も良かった. 移動相においては,対象成分によって感度の良し悪しは異なっており,一概にどの移動相が良いとは言えなかったが,最も感度の小さい SDZ の S/N 比が最大となった移動相①を用いることにした. また, カラム①の方がカラム②に比べて感度が高かったため,カラム①を用いることにした（Table 2）.

希釈倍率については,移動相①において SDZ ピークが S/N≧10 となる濃度範囲を求めたところ, 20ng/ml 以上となり, 定量限界は 0.01ppm(一斉法 I においては 50ng/ml に相当)であるので, 2.5 倍まで希釈可能であることがわかった.

Table 2.　LC-MS/MS 測定条件

移動相	
A 液；0.05%ギ酸	
B 液；アセトニトリル　　グラジェント溶出	
試験液溶媒	
アセトニトリル-水(1:9)	
分析カラム	
資生堂社製 CAPCELLCORE C18 2.1mmi.d.×150mm	
測定温度	：40℃
注入量	：5μl
流速	：0.2ml/min
イオン化モード	：ESI ポジティブモード

1.2　抽出操作の検討

1.2.1　脱脂操作

LC-MS/MS 測定から試験液溶媒を①アセトニトリル-水(1:9)に変更することにしたが，一斉法Ⅰにおいては，脱脂操作に用いた溶媒がそのまま試験液となるため，脱脂操作から溶媒の変更が可能かどうかTable 1 に示す 4 種類の溶媒により検討した．その結果，水が多くなるにつれて夾雑成分が n-ヘキサン層に分配しにくくなることがわかり，一斉法Ⅰどおりのアセトニトリル-水(4:6)が最も良好であった．

1.2.2　希釈倍率

本検討には，新たな精製操作を加えたわけではないが，試験液を希釈することにより，試験液中の夾雑成分の割合を減らすことができた．

そこで，検討した条件により標準液を測定したところ，定量限界相当の標準液において 2.5 倍までの希釈が可能であることが分かったが，前述のⅡ-3 のとおり，マトリックス成分の影響を考慮して 2 倍に希釈することにした．

また，抽出操作において，最終試験液の量を 2 倍にすることが最も簡単であるが，脱脂工程における液液分配の際の層分離が不十分であることから，n-ヘキサンによる脱脂効果を上げるため，加える溶媒を 2ml，アセトニトリル飽和-n-ヘキサンを 1ml とし，遠心分離後にアセトニトリル-水層を 1ml 分取し，再度乾固してアセトニトリル-水(1:9)1ml に溶解し試験液とした（Fig.1）．

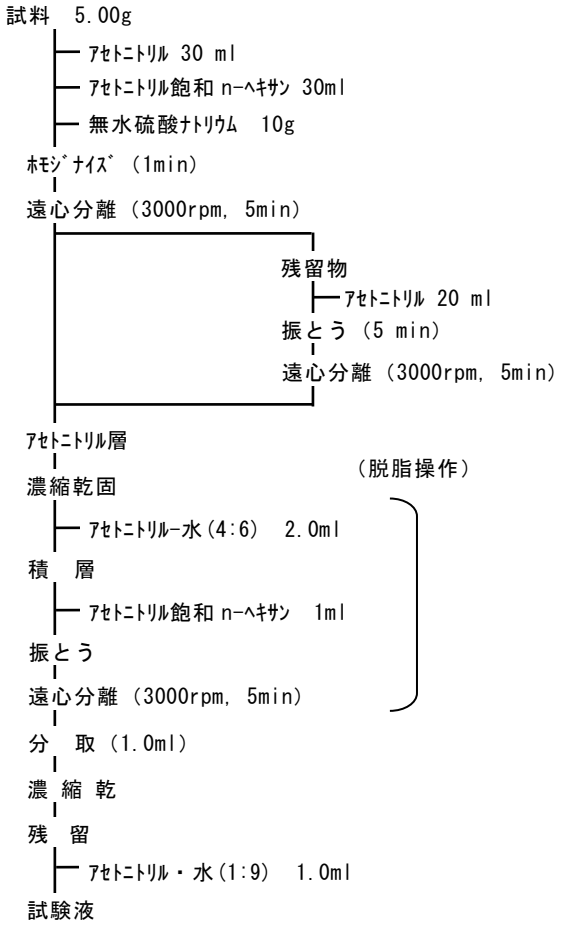


Fig.1.　「検討法」フローシート

2 妥当性評価

妥当性評価実施結果を Table 3 に示した．

2.1　各食品における「検討法」の効果

カラム①において「検討法」における妥当性評価の結果を一斉法Ⅰによる結果と比較した場合，一斉法Ⅰにおいては，ガイドラインに不適合であった動物薬が各食品では異なるものの，食鳥肉で 4 成分，他の 3 食品では 2 成分ずつあったのに対し，「検討法」ではすべての食品，動物薬でガイドラインに適合する結果が得られた．

2.2　カラムの比較

また，「検討法」による試験液を各々のカラムで測定した結果を比較すると，表面多孔性充填剤であるカラム①は，今回対象としたすべての動物薬がガイドラ

インに適合するという結果だった.

一方,全多孔性充填剤であるカラム②においては不適合となった動物薬成分が,鶏卵,生乳及び食鳥肉においてそれぞれ 2, 5 及び 1 成分あり,パラメータとしては真度や併行及び室内精度が適合していなかった.

カラム①及び②における充填剤の粒子径はそれぞれ 2.7μm及び 5μmであり,カラム①の方が小さいため,カラムの分離等の指標となる理論段数はカラム①の方が大きくなり,カラムの分離がよくなる.

また,表面多孔性充填剤(カラム①)はその構造から目的成分の拡散距離が短くなるため,理論段数は全多孔性充填剤(カラム②)の 1.5 倍になるといわれている.

以上のことから,カラム①の性能(ピークの分離等)が良くなり,イオン化の影響を受けにくくなるため,ガイドラインに適合する結果が得られたと考えられる.

Table 3. カラム①及び②により測定を実施した妥当性評価の結果((a);「検討法」,(b);一斉法Ⅰ)

動物薬成分	鶏卵 残留基準値(ppm)	鶏卵 試験法 (a) ①	鶏卵 試験法 (a) ②	鶏卵 試験法 (b) ①	養殖魚 試験法 (a) ①	養殖魚 試験法 (a) ②	養殖魚 試験法 (b) ①	生乳 残留基準値(ppm)	生乳 試験法 (a) ①	生乳 試験法 (a) ②	生乳 試験法 (b) ①	食鳥肉(鶏肉) 残留基準値(ppm)	食鳥肉(鶏肉) 試験法 (a) ①	食鳥肉(鶏肉) 試験法 (a) ②	食鳥肉(鶏肉) 試験法 (b) ①
TBZ	和として	○	○	○	○	○		和として	○	○	○	和として	○	○	×
5-OH-TBZ	0.1	○	×	×	○	○		0.10	○	○	×	0.05	○	○	○
PYR	含有せず	○	×	×	○	○		含有せず	○	○		0.05	○	○	×
SDZ	0.02	○	○	○	○	○	○	0.07	○	×	×	0.1	○	○	○
SMXZ	含有せず	○	○	○	○	○		含有せず	○	○	○	0.02	○	○	○
OXA	含有せず	○	○	○	○	○	○	含有せず	○	○	○	0.03	○	○	×
SMR	含有せず	○	○	○	○	○	×	含有せず	○	×	○	含有せず	○	○	○
OMP	含有せず	○	○	○	○	○	○	含有せず	○	○	○	0.1	○	○	○
SDD	0.01	○	○	○	○	○	×	0.025	○	○	○	0.10	○	○	○
SMMX	含有せず	○	○	○	○	○	○	含有せず	○	×	○	0.1	○	○	○
SCPD	含有せず	○	○	○	○	○		含有せず	○	×		含有せず	○	○	○
TMP	0.02	○	○	○	○	○	○	0.05	○	○	○	0.05	○	○	○
SQX	0.01	○	○	○	○	○	○	0.01	○	×	○	0.05	○	○	○
SDMX	1	○	○	○	○	○	○	0.02	○	○	○	0.05	○	○	○
FBZ	0.40	○	○	○	○	○		0.01	○	○	○	0.20	○	×	×

○;ガイドラインに適合成分, ×;ガイドラインに不適合成分, 斜線;妥当性評価未実施成分

Ⅳ まとめ

一斉法Ⅰに検討を加えた「検討法」により,4 食品,動物薬 14 項目(15 成分)について妥当性評価を実施した.「検討法」は n-ヘキサンによる脱脂効果を上げ,試験液を 2 倍に希釈することにより,夾雑成分の影響を減らすことを目的とした試験法である.この方法を用いることによって,LC-MS/MS 測定におけるイオン化の影響を抑えることができ,特に表面多孔性充填剤(コアシェル型)カラム①を用いた場合,4 食品,15 成分すべてにおいて妥当性評価に適合する結果が得られた.

今後は,脂質成分の多い食品やその部位についても「検討法」による妥当性評価を実施し,必要に応じて検討法に改良を加えながら,検査対象食品としていきたい.

Ⅴ 参考文献

1)「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)

2)「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」(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)