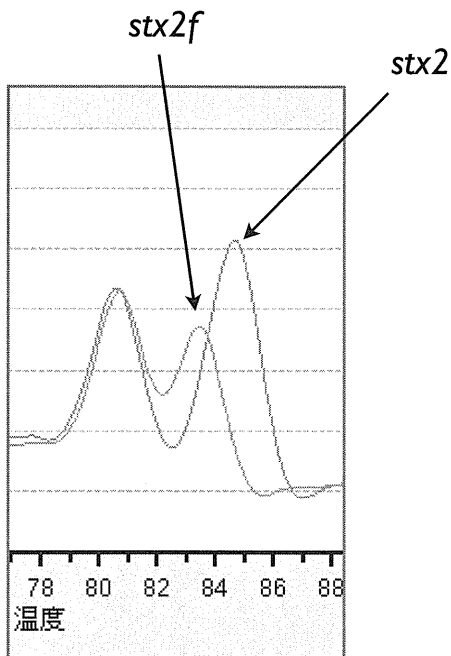


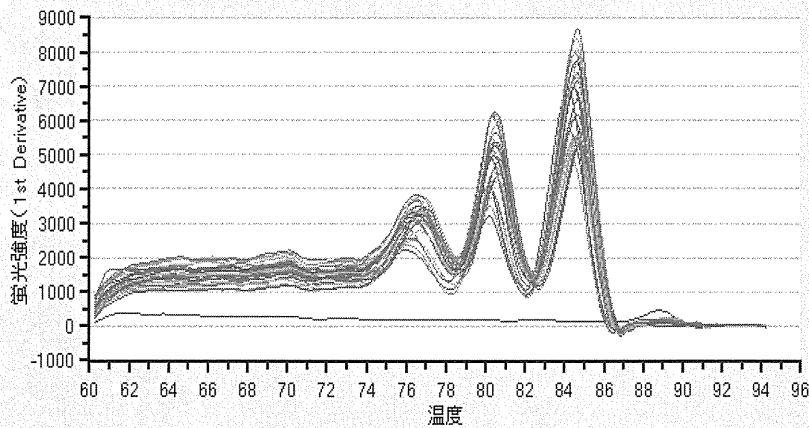
図5 stx2とstx2fの融解曲線の違い



stx2fはstx2よりもTm値が若干低くなった。

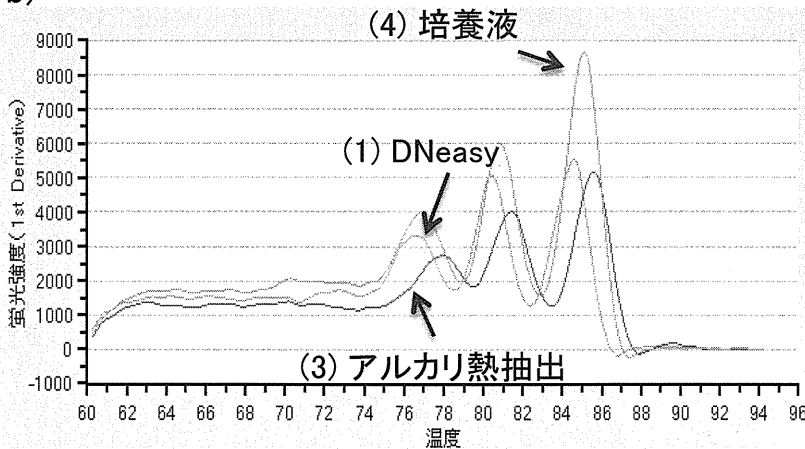
図6 DNA抽出法による融解曲線の違い

a)



a)は (1) DNeasy, (2) TE煮沸法, (5) 培養液のTEによる10倍希釈に対するreal-time multiplex PCRの融解曲線。ほぼ一致している。

b)



b)は (1) DNeasy, (3) アルカリ熱抽出, (4) 培養液に対するreal-time multiplex PCRの融解曲線。これらはTm値が若干異なり、一致しないことがある。

厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理対策研究事業)

平成23年度研究報告書

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、
及び疫学機能の強化に関する研究

分担報告書(ウイルス部門)

主任研究者	調 恒明	山口県環境保健センター	所長
分担研究者	高橋和郎	大阪府立公衆衛生研究所	副所長
協力研究者	皆川洋子	愛知県衛生研究所	所長
	山下照夫	愛知県衛生研究所	ウイルス研究室長
	千々和勝己	福岡県保健環境研究所	微生物部長
	世良暢之	福岡県保健環境研究所	ウイルス課長
	吉富秀亮	福岡県保健環境研究所	研究員
	濱岡修二	山口県環境保健センター	研究員
	加瀬哲男	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課長
	山崎謙治	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課主任研究員
	倉田貴子	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課研究員
	中田恵子	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課研究員

研究概要

研究目的:今年度は H22 年度に性能を評価した迅速網羅的診断法(呼吸器ウイルスおよびエンテロウイルス)を用いて臨床検体について応用し、その性能を評価することを目標とした。研究方法:研究協力4衛研において呼吸器感染症および中枢神経感染症患者検体に対して、作製した網羅的迅速マルチプレックス PCR 診断法を用いて病原体の検出を行い、検出率等を検討する。結果および考察:小児呼吸器感染症の 235 検体について、1種類以上の病原体が検出された陽性率は約 60-80%、また、1, 2種類のウイルスが検出された割合はそれぞれ 80-100, 10-20%と既報と同等な値であった。陽性率が低値の場合もみられたが、その原因は対象患者の内容が異なること、検出方法(機器、器具)の差異などが考えられる。髄膜炎の場合では、髄液、咽頭スワブ、便からの検出率はそれぞれ、約 10-20, 20-25, 30-50%であった。また、患者検体中少なくとも1種類の検体から病原体が検出された陽性率は 27% (20/69)であった。既報の検出率と比較すると遜色ないものと考えられる。脳炎、脳症の場合では、髄液からエンテロウイルスが検出された例はなく、症例数も少ないため、さらに症例数を増やし検討する必要がある。以上より、各衛研で本方法を用いた臨床検体での病原体の検出率は既報と同等な検出率であり、方法論的にはその性能について大きな問題はないと判断される。

A. 研究目的

地方衛生研究所が健康危機管理事例に対処するために必要な網羅的な迅速検査方法、およびそれらや既存の核酸増幅法の精度管理法を確立し、検査機能の強化、充実を計ることを目的とする。

今年度は H22 年度に性能を評価した迅速網羅的診断法(呼吸器ウイルスおよびエンテ

ロウイルス)を用いて臨床検体について応用し、その性能を評価することを目標とする。

B. 研究方法

研究協力4衛研において呼吸器感染症および中枢神経感染症患者検体に対して、作製した網羅的迅速マルチプレックス PCR 診断法を用いて検査を行い、検出率等を検討する。

C. 研究結果

1. 呼吸器感染症

福岡県保健環境研究所

対象(表1):

呼吸器感染症(気管支喘息を含む)と診断された小児85名(男49,女36、平均年齢3歳2か月)

PCR法による検出結果(表2):

1種類以上の病原体が検出された陽性率は64%(54/85)であり、1および2種類の病原微生物が検出された割合は、それぞれ91%(49/54)、9.3%(5/54)であった。検出頻度の高い微生物はライノウイルス、マイコプラズマ、RSウイルスであった。

愛知県衛生研究所

対象(表3):

呼吸器感染症と診断された小児48名(男29,女19、平均年齢3歳8か月)

PCR法による検出結果(表3):

1種類の病原体が検出された陽性率は17%(8/48)であった。2種類以上のウイルスが検出された症例は認めなかった。検出頻度の高い微生物はヒトメタニューモウイルスであった。

山口県保健環境センター

対象(表4):

呼吸器感染症と診断された小児64名(男26,女38、平均年齢3歳8か月)

PCR法による検出結果(表4, 5):

1種類以上の病原体が検出された陽性率は81%(52/64)であり、1および2、3種類の病原微生物が検出された割合は、それぞれ90%(47/52)、7.7%(4/52)、1.9%(1/52)であった。検出頻度の高い微生物は、単独検出の場合、ヒトメタニューモウイルス、マイコプラズマであり、2種類検出の場合はアデノウイルス(3/4)であった。3種類検出された1検体では、ライノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、パラインフルエンザウイルス3が検出された。

大阪府立公衆衛生研究所

対象(表6):

RSV感染疑い呼吸器感染症と診断された小児38名(男26,女38、平均年齢3歳8か月)

PCR法による検出結果(表6):

1種類以上の病原体が検出された陽性率は84%(32/38)であり、1および2種類の病原微生物が検出された割合は、それぞれ81%(26/32)、19%(6/32)であった。検出頻度の高い微生物は、単独検出の場合、RSV、アデノウイルスであり、2種類検出の場合は全例RSVが検出された。

2. 中枢神経感染症

(1)脳炎、脳症

対象(表7):

脳炎、脳症と臨床診断された患者総計26例(福岡3例、愛知17例、山口1例、大阪5例、山口を除き全例小児例)

PCR法による検出結果:

脳炎、脳症患者26例において、髄液16検体からエンテロウイルスが検出された例はなく、咽頭スワブ11検体中1検体からライノウイルスが検出された。便4検体は陰性であった。

(2)無菌性髄膜炎

対象(表8):

無菌性髄膜炎と臨床診断された患者総計69例(福岡8例、愛知34例、山口6例、大阪21例、全例小児例)

PCR法による検出結果:

髄液からの検出率は福岡13%(1/8、エコー7)、愛知14%(4/28、すべてCB4)、山口17%(1/6、CB1)、大阪50%(2/4、全てCB4)であった。咽頭スワブからの検出率は愛知25%(2/8、CA16、E71)、大阪19%(4/21、CB4(2件)、E3、ライノウイルス)であった。便からの検出率は愛知58%(7/12、E71(4件)、CB4、E6、E30)、大阪27%(3/11、CB1、CB4、E3)であった。各衛生研究所において、少なくとも1種類の検体で陽性となった率は、福岡13%(1/8)、愛知35%(12/34)、山口17%(1/6)、大阪29%(6

/21)であった。

同一患者で2種類の検体から病原体が検出された症例では、検出された病原体は同一種であった。同様に3種類すべてから同一の病原体が検出された症例は認められなかった。

3. 研究過程において遭遇した本PCR法の問題点(表9)

1)PCR産物の電気泳動において、hMPVのバンドと同じ位置にヒト由来遺伝子の増幅産物を認める症例があった。臨床検体によってはPCRでの非特異増幅反応が多い場合があり、特にnested PCRでよく見られた。

2)呼吸器病原体の半数はSingle PCRで行っているが、やや感度が低い場合がある。Single PCRで陰性であった6検体中4検体でnested PCRを行うとAdenovirusを検出した。Single PCRのみで病原検索ができなかった場合はnestedで検索可能な場合がある。

D. 考察

1. 呼吸器感染症

研究協力4衛研において小児呼吸器感染症の検体、それぞれ約40-80検体について、1種類以上の病原体が検出された陽性率は約60-80%であった。一衛研では陽性率は低値であった。その原因は不明であるが、可能性として対象患者の内容(外来、入院等、臨床症状の差異など)が異なることや、検出方法(機器、器具)の差異などが考えられる。

1 および2種類の病原体が検出された割合は、それぞれ80-100、10-20%と既報と同等な値であった。大部分の検体から1種類の病原体が検出され、これらが起因微生物と考えられるが、今回は血清診断を行っておらず推測の域を出ない。2、3種類の微生物が検出された場合では、予想されたように持続潜伏感染するアデノウイルスが比較的高頻度で検出された。しかしどの微生物が起因しているのかは血清診断を必要とする。

呼吸器感染症の約10%がボカウイルスによるものであるとの報告が多いが、今回の200検体ほどの結果では検出されなかった。この原因としてPCR法の感度がまだ十分高くないことや、検体採取の時期の違い(ボカウイルスは冬季に多い)などによるものと考えられる。これを克服するためには、さらに症例数を増やし検討する必要があると考えられる。

2. 中枢神経感染症

(1)脳炎、脳症

髄液16検体からエンテロウイルスが検出された例はなく、咽頭スワブ11検体中1検体からライノウイルスが検出された。脳炎、脳症の原因としてエンテロウイルスを含め種々の微生物があげられているが、今回は髄液の検体数も少なく検出されなかった。咽頭スワブ1検体からライノウイルスが検出されたが、本疾患への病原性の観点からは血清診断を行う必要があると考えられる。

(2)無菌性髄膜炎

髄液、咽頭スワブ、便からの病原体検出率はそれぞれ、約10-20、20-25、30-50%であり、一部を除いて既報と同様な検出率であった。また、4衛研全体で患者検体中少なくとも1種類の検体から病原体が検出された陽性率は29%(20/69)であった。既報の検出率と比較すると遜色ないものと考えられる。髄液から検出された病原体は原因病原体と診断可能であるが、咽頭スワブ、便から検出されたものは確定的でない場合もあり、ペア血清による血清診断が必要である。しかし本PCR法を用いて病原診断へ繋がったことは重要な点である。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1

呼吸器感染症 (福岡衛研)			
対象	サーベイランス	呼吸器感染症	全体
	咽頭炎、上気道炎、下気道炎のいずれかの症状を呈する患者	喘息または喘鳴症状を呈する小児	
患者数	30 (男20,女10)	55 (男29,女26)	85 (男49,女36)
平均年齢	2歳2か月 (0歳2か月～12歳0か月)	3歳8か月(0歳10か月～11歳0か月)	3歳2か月

表2

呼吸器感染症 1種類以上の病原体が検出された陽性率 64% (54/85)

全被検検体数 85 検体
少なくとも1種類の病原体が検出された検体数 54検体(陽性検体と称する)

福岡衛研

① 単独の微生物が検出された検体数		
微生物名		陽性数
アデノ1型		1
アデノ2型		1
RSウイルス		8
ヒトメタニューモウイルス		6
パラインフルエンザウイルス1型		2
パラインフルエンザウイルス3型		2
ライノウイルス		13
コロナウイルス		2
マイコプラズマ・ニューモニエ		10
A型インフルエンザ		1
B型インフルエンザ		3
総計		49
陽性検体数中の割合(%)		90.7%

② 2種類の微生物が検出された検体数 (呼吸器感染症)		
微生物名	微生物名	陽性数
ライノウイルス	パラインフルエンザウイルス1型	1
ライノウイルス	パラインフルエンザウイルス3型	1
ライノウイルス	アデノウイルス2型	1
ライノウイルス	マイコプラズマ・ニューモニエ	1
ヒトメタニューモウイルス	マイコプラズマ・ニューモニエ	1
	総計	5
陽性検体数中の割合(%)		9.3%

表3

愛知衛研

呼吸器感染症 1種類以上の病原体が検出された陽性率 17% (8/48)

全検体数 48 検体

少なくとも1種類の病原体が検出された検体数 8検体(陽性検体と称する)

対象疾患:上気道炎32、インフルエンザ様疾患4、下気道炎12

対象患者数:48名(男29、女19)、0才~12才(平均3.8才)

単独の微生物が検出された検体数

微生物名	陽性数
ヒトメタニューモウイルス	5
B型インフルエンザウイルス	2
RSウイルス	1
総計	8
陽性検体数中の割合(%)	100%

表4

山口衛研

呼吸器感染症 1種類以上の病原体が検出された陽性率 81% (52/64)

全検体数 64 検体

少なくとも1種類の病原体が検出された検体数 52検体(陽性検体と称する)

対象疾患 呼吸器感染症と診断

対象患者数 64名(男26、女38) 平均年齢 3歳8月(男 3歳5月、女 3歳10月)

単独の微生物が検出された検体数

微生物名	陽性数
Parainfluenza virus 1	1
Parainfluenza virus 3	3
Parainfluenza virus 4	1
Influenza virus A	3
Influenza virus B	4
Respiratory syncytial virus	3
Human metapneumovirus	19
Mycoplasma Pneumoniae	5
Adenovirus	4
Rhinovirus	4
総計	47
陽性検体数中の割合(%)	90%

(47/52)

表5

山口衛研

呼吸器感染症

2種類の微生物が検出された検体数

微生物名	微生物名	陽性数
Adenovirus	Rhinovirus	2
Influenza virus B	Human metapneumovirus	1
Adenovirus	Parainfluenza virus 4	1
	総計	4
陽性検体数中の割合(%)		7.7% (4/52)

3種類の微生物が検出された検体数

微生物名	微生物名	微生物名	陽性数
Parainfluenza virus 3	Human metapneumovirus	Rhinovirus	1
		総計	1
陽性検体数中の割合(%)			1.9%

(1/52)

表6

大阪公衛研

呼吸器感染症

1種類以上の病原体が検出された陽性率 84% (32/38)

呼吸器感染症		単独の微生物が検出された検体数	
全検体数	38検体	微生物名	陽性数
少なくとも1種類の病原体が検出された検体数		RSV	19
32検体(陽性検体と称する)		アデノウイルス	3
対象患者	RSV感染疑い呼吸器感染症	ポリオ2型	2
対象患者数	38名(男、女)、0才~5才(平均3.8才)	ライノウイルス	1
		ポカウイルス	1
		総計	26
		陽性検体数中の割合(%)	81%

2種類の微生物が検出された検体数(呼吸器感染症)

微生物名	微生物名	陽性数
RSV	アデノウイルス	2
RSV	ライノウイルス	2
RSV	コクサッキーB4	2
	総計	6
陽性検体数中の割合(%)		19%

表7

脳炎・脳症におけるエンテロウイルスの検出状況				
	福岡	愛知	山口	大阪
患者数	3	17	1	5
	男 脳症疑い・歩行障害 女 脳症を有する無菌性髄膜炎 男 脳炎	脳症11、脳炎6	男 脳炎・無菌性髄膜炎疑い 発熱39.7℃ 頭痛、髄膜炎、脳炎、失語、失聴 髄液検査にて、炎症所見あり	男 髄膜炎 男 脳症 男 脳炎疑い 男 脳炎疑い 女 脳炎疑い
平均年齢(歳)	2.7歳	5.1歳	21歳	5.0歳
陽性検体数	髄液	0 (0/3)	0 (0/1)	0(0/4)
	咽頭スワブ	0 (0/3)	1 (1.7%, 1/6) ライノ 1	0(0/2)
	便	検体なし	0 (0%, 0/3)	0(0/1)

表8

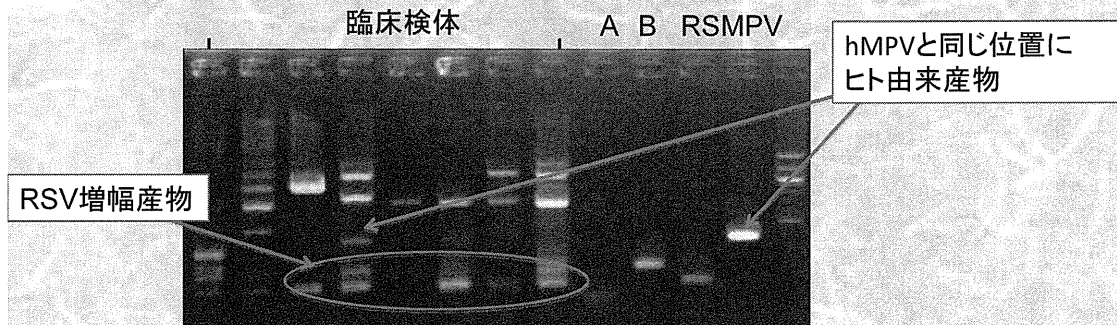
無菌性髄膜炎におけるエンテロウイルスの検出状況					
	福岡	愛知	山口	大阪	
患者数	8	34	6	21	
平均年齢(歳)	4.9歳	3.9歳	2.7歳	11か月	
陽性検体数	髄液	1 (13%, 1/8) エコー7	4 (14%, 4/28) CB4(4)	1 (17%, 1/6) CB1	2 (50%, 2/4) CB4 (2)
	咽頭スワブ	検体なし	2 (25%, 2/8) CA16, E71	検体なし	4 (19%, 4/21) CB4 (2), E3, Rhino
	便	検体なし	7 (58%, 7/12) E71(4), CB4, E6, E30	検体なし	3 (27%, 3/11) CB1, CB4, E3
	少なくとも1種類の検体で陽性となった症例数	1 (13%, 1/8)	12 (35%, 12/34)	1 (17%, 1/6)	6(29%, 6/21)

表9

本PCR法の問題点

1. hMPVと同じ位置にヒト由来遺伝子の増幅産物が認められる

- 臨床検体によっては非特異反応多い
- nested PCRで特によく見られる



2. Single PCRはやや感度が低い

- 呼吸器ウイルスに対してnested PCRを行うと、陰性であった6検体中4検体でAdenovirusを検出する
- 1stPCRのみで病原検索ができなかった場合はnestedで検索可能

平成 23 年厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)

「地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、
その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究」
分担研究報告書

「健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の
構築と精度管理に関する研究」

研究分担者 田中 敏嗣 (神戸市環境保健研究所)

研究要旨:

地方衛生研究所(地研)は公衆衛生の向上・推進と共に地域及び広域における健康危機管理の科学的、技術的中核としての機能を保持すること、試験検査とその精度管理能力や疫学調査能力などの水準を確保することが求められている。

健康危機関連化学物質特に自然毒による健康危機管理事例は毎年のように死者が出るなど食品衛生上極めて重要な課題である。しかし、発生頻度や地域性など様々な要因から経験や専門性が乏しく多くの地研で対応に苦慮しているのが現状である。

本研究では地研の連携やネットワークを活用し、全国の地研での自然毒による食中毒の事例や試験法をデータベースに集積し、情報の共有を図り、迅速な対応への有効なツールの構築、推進を図った。また、自然毒の中で、毎年のように中毒事例が報告されるスイセンについて、その有毒成分リコリンの LC-MS/MS による迅速試験法を検討し、17 地研による精度管理を実施することにより、健康危機管理への迅速、的確な対応へ有効な手法を構築した。

研究協力者

滝川義明、高橋悟 (岩手県環境保健研究センター)

阿彦忠之、笠原義正、和田章伸 (山形県衛生研究所)

丹野瑳喜子、石井里枝 (埼玉県衛生研究所)

岡部英男、藤巻照久、脇ますみ、熊坂謙一 (神奈川県衛生研究所)

皆川洋子、林留美子、後藤智美 (愛知県

衛生研究所)

平田宏之、寺田久屋、谷口賢、小野田絢 (名古屋市衛生研究所)

有菌直樹、茶谷祐行、土田貴正、野澤真里奈 (京都府保健環境研究所)

山本容正、木村明生、川津健太郎 (大阪府立公衆衛生研究所)

引石文夫、山口之彦 (大阪市環境科学研究所)

田中智之、神藤正則、福田弘美（堺市衛生研究所）

山村博平、三橋隆夫、吉岡直樹（兵庫県立健康生活科学研究所）

山内光晴、佐想善勇（姫路市環境衛生研究所）

島田美昭、久野恵子、高井靖智（和歌山県環境衛生研究センター）

森野吉晴、浦崎美和、小田美紀、北尾拓也（和歌山市衛生研究所）

岸本壽男、山本 淳、肥塚加奈江、浦山豊弘（岡山県環境保健センター）

調 恒明、立野幸治、三浦 泉、吹屋貞子（山口県環境保健センター）

西浜寛治、玉那覇康二、佐久川さつき、國仲奈津子（沖縄県衛生環境研究所）

川上史朗、上田泰人、矢野昌弘、杉浦義紹、大久保祥嗣、山口葉子、佐藤徳子（神戸市環境保健研究所）

A. 研究目的

地方衛生研究所（地研）は地域保健対策を効果的に推進し、公衆衛生の向上・増進及び地域及び広域における健康危機管理の科学的、技術的中核としての機能を保持すること、試験検査とその精度管理能力や疫学調査能力などの水準を確保することを求められている。

健康危機関連化学物質特に自然毒による健康危機管理事例は細菌性食中毒に比べ件数、患者数は多くないが、毎年のように死者が出るなど食品衛生上極めて重要な課題である。

厚生労働省の食中毒発生事例統計 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>, 2001-2009) の 10 年間では

細菌による食中毒の発生件数が 11,033 件に比べ自然毒は 1,189 件で全体の 7.3% である。しかし、死者数では細菌による 21 人（件数に対する割合：0.19%）に対し、自然毒による死者数は 40 人で件数に対する割合は 3.4% で 17 倍と極めて高い。また、魚毒、貝毒などの動物性自然毒とキノコ毒、植物毒などの植物性自然毒による発生頻度に地域差があり、前者が西日本、後者が東日本に多い傾向が認められる。

このように、発生頻度や地域性など様々な要因から地研の日常的な業務として行っているところは少なく、事例が発生すると経験や専門性が乏しいことからその対応に苦慮しているのが現状である。

本研究では、地研の連携やネットワークを活用し、同様の事例の再発に備えるため、全国の地研が中毒事例の情報を共有することが重要であることから、自然毒による食中毒の事例や試験法のデータベース集積を推進した。

さらに、食中毒の原因物質の究明は再発防止や治療、対策等にとって極めて重要な課題であり、かつその迅速性が求められる。

近年、農薬のポジティブリスト制度導入等により地研に高性能な微量分析装置である液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) の整備が図られている。この機器は自然毒のような水溶性あるいは難揮発性物質の測定において有効であることから、この LC-MS/MS を用いて自然毒の迅速試験法を検討し、地研間での精度管理及び適応性について検証した。

平成 22 年度は動物性自然毒のフグ毒に

ついて、LC-MS/MS による迅速試験法について検討し、良好な結果が得られた。

平成 23 年度はスイセンなどに含有する植物毒リコリンの LC-MS/MS による迅速試験法を検討した。

スイセンはユリ目ヒガンバナ科ヒガンバナ属に分類される植物で、外観よりニラやノビル等と誤食されることが多く、わが国では毎年食中毒が報告されている。タマスダレもヒガンバナ科タマスダレ属に属し、スイセンと同様の食中毒を呈す。平成 14 年以降における我が国でのスイセン及びタマスダレによる食中毒事件例を表 1. に示す（厚生労働省 HP 食中毒発生事例(速報)：<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#4-3>）。

有毒成分はアルカロイドの一種リコリン (Lycorine) で、中毒症状は吐き気、発熱、しびれ、苦み等である。リコリンの試験法は TLC 法等が報告されているが、健康危機管理の一環として、迅速な検査体制の強化が求められていることから、迅速で微量分析が可能な LC-MS/MS を用いたリコリンの試験法を検討した。確立した試験法の精度管理及び適応性を検証するため、17 地研による共同試験を実施し、試験法の妥当性を評価した。

B. 研究方法

1. 自然毒による中毒事例の集積

地方衛生研究所職員専用ホームページにある既存のデータベース「自然毒中毒事例情報システム」を活用し、事例の集積と情報共有を図る。

1) 操作の手順

- ・ システムにログインする。

- ・ 基本情報を入力し、登録する。
- ・ 試験結果詳細を入力し、登録する。
登録済みデータは登録した地研は修正することができる。他の地研は加筆、修正はできない。
- ・ 入力項目と最大文字数は次の通りである。
自然毒分類：リストから選択
衛研名：自動的に付与
報告者：全角 40, 半角 80
件名：全角 50, 半角 100
原因食品：全角 50, 半角 100
症状：全角 500, 半角 1000
摂食者数：半角数字 6
発症者数：半角数字 6
死亡者数：半角数字 6
試験概要：全角 200, 半角 400
文献：全角 150, 半角 300
備考：全角 100, 半角 200
画像情報：bmp, jpg, gif 形式

2. LC-MS/MS によるリコリンの迅速試験法の開発検討

2.1 実験方法

2.1.1 分析対象物質

スイセンなどの有毒成分であるアルカロイドの一種リコリン ($C_{16}H_{17}NO_4$, MW:287.3) を分析対象物質とした。構造式を図 1 に示した。

2.1.2 試料

あらかじめリコリンが不検出であることを確認したニラの葉を添加回収試験用試料とした。

2.1.3 試薬

1) リコリン標準品はSigma-Aldrich社製リコリン塩酸塩 ($C_{16}H_{17}NO_4M \cdot HCl$, MW:323.77, 純度98%)、BIOMOL社製リコリン塩酸塩(純度98%)、またはEnzo Life Sciences社製リコリン塩酸塩(純度98%)を用いた。

2) 標準溶液はリコリン塩酸塩10mgをメタノール20mlに溶解し標準原液とする(この液1mlはリコリン443.69 μ gを含む)。標準原液11.27mlを正確に量り、メタノールを加えて100mlとし、標準液とする(この液1mlは、リコリン50 μ gを含む)。標準液をメタノールで希釈し、検量線標準溶液とした。

3) ろ過はGFP(桐山製作所社製)を用いた。

4) メンブランフィルターはMillex-LG4(0.20 μ m)(Millipore)を用いた。

5) LC用カラム:

TSK-GEL ODS-80Ts(東ソー)

Inertsil ODS-3(GL Sciences)

Xbridge(Waters)

Xterra MS C18(Waters)

ZIC-HILIC(SeQuant)

Mightysil RP-18 GP(関東化学)

Ascentis C18(Supelco)

Scherzo SM-C18(Imtakt)

Cadenza-CD-C18(Imtakt)

L-column ODS(CFRI)

を用いた。

2.1.4 装置

1) API4000Qtrap(ABSciex)

2) API3200QTrap(ABSciex)

3) Triple QUAD5500(ABSciex)

4) API2000(ABSciex)

5) TSQ Quantum Discovery Max
(ThermoFisher SCIENTIFIC)

6) Xevo TQ(Waters)

7) Premier(Waters)

8) TQD(Waters)

9) 6210TOF-MSD(Agilent Technologies)

10) 6460 Triple Quad LC/MS(Agilent Technologies)

11) Micromass Quattro Ultima Pt(JASCO)

2.1.5 試験溶液の調製

1) 細切した試料5gを正確に量り採る。

2) メタノール20mLを加え、ブレンダーで3分間抽出する。

3) GFPろ紙を用いて吸引ろ過を行う。残渣についてもう一度抽出し、ろ液を合わせる。

4) ろ液をメタノールで100mLに定容し、抽出溶液とする。

5) 抽出溶液2mLをとり、メタノールで50倍に希釈する。

6) 4)溶液の2mLをメンブランフィルター(0.20 μ m)に通し、LC-MS/MS用試験溶液とする。

2.1.6 LC-MS/MS測定

LC用カラムにより分離したリコリンを2.1.4に示した装置を用い測定した。16機関はLC-MS/MS、1機関はLC-TOF/MSを用いた。移動相は5mmol/L酢酸アンモニウム含有水及び5mmol/L酢酸アンモニウム含有メタノールあるいは0.1%ギ酸及びアセトニトリルの混液を使用し、アイソクラティックあるいは濃度勾配法で分離し、LC-MS/MSで測定した。測定条件の一例を表2、3に示す。

2.1.7 複数機関による共同試験

- 1) 試験機関数：協力研究者に示した機関の17機関で実施した。
- 2) 回収試験の添加濃度：リコリン標準溶液を50.0 μ g/gを添加した。
- 3) 試験回数：無添加を1試行、添加を5試行とした。
- 4) 検量線：機器の感度を検討し、異なる濃度5点の直線性が得られる範囲で定量した。
- 5) 定量方法：メタノールで調製した標準溶液を用い定量した。さらに、マトリックス効果を検証するため、マトリックス標準液と比較した。マトリックス効果が認められた機関の結果はマトリックス標準液による補正も可能とした。

共同試験は平成23年8月より12月に実施した。

2.1.8

本法の適応性試験について

兵庫県内で採取したスイセン及びヒガンバナの葉及び鱗茎について本法によりリコリンの分析を行い、その適応性を検討した。

C. 結果及び考察

1. 自然毒による中毒事例の収録件数

- 1) 収録総件数：255件
- 2) 魚類：80件（ふぐ毒66、シガテラ9など）
- 3) 貝・蟹類：36件（麻痺性16、テトラミン12など）
- 4) キノコ：59件

- 5) 山野草：36件
- 6) 栽培植物：30件
- 7) 海藻：1件
- 8) その他（ヒスタミンなど）：13件

2. LC-MS/MSによるリコリンの迅速試験法の開発検討

1) 抽出溶媒及び抽出回数の検討：メタノール及び水によるリコリンの抽出効率を検討した結果、両溶剤共に同様の抽出率を示したため、ろ過等操作の迅速性から抽出溶媒としてメタノールを採用した。また、スイセンの葉をメタノールで抽出する回数について検討した。1回目51%と低い値であったが、2回目で80%以上が抽出されたことから、健康危機管理に求められる迅速性の観点も考慮して、2回抽出とした。

2) LC及びLC-MS/MS条件の検討

LC分離カラムについて分離能及び保持時間を比較検討した結果、2.1.3の5)に示すODS系、HILIC及び多機能系カラムが適応可能であった。

また、移動相については、酢酸アンモニウム含有水及びメタノール系あるいは0.1%ギ酸及びアセトニトリル系共に良好な分離を示した。

LC-MS/MSの測定条件では、プリカーサーイオンとして288をプロダクトイオンとして147、119、91が定量、確認イオンとして良好であった。

3) 標準溶液の直線性：機種別の検出感度の違いにより、各機関が用いた濃度は異なるが、0.1~100 ng/mLの範囲で直線性が得られた。

4) マトリックス効果の検討：LC-MS/MS

測定において、食品中のマトリックスによってイオン化が影響される場合がある。また、使用機種によっても異なることからマトリックス影響について検討した。17 機関の結果はマトリックス標準溶液/溶媒標準溶液の比率が 0.915~1.035 とマトリックス影響が認められないことから、マトリックス検量線を用いず定量は溶媒標準溶液を用いて行った。

5) 検出限界：機種により検出限界は異なったが S/N=3 として 0.007~1.6pg が担保された。

6) 17 機関の添加回収試験 5 試行の測定結果について、平均値、回収率及び併行再現性 (RSD_r) を表 4 に示した

各機関の回収率は 81.0~104% でかつ RSD_r も良好な結果であった。

また、共同試験による機関間 (室間) の結果を表 5 に示した。回収率 95%、室間精度 (RSD_r) 7.2%、HorRat 値 0.81 でいずれも良好な値を示し、50µg/g 濃度の精度管理目標値 (回収率 70~120%、RSD_r 20%以下、HorRat 2.0 以下) の範囲内の結果が得られ、今回共同試験を実施した LC-MS/MS によるリコリン迅速試験法の妥当性が確認された。

今回検討した LC-MS/MS による迅速試験法は約 2 時間でリコリンを定量することができ、また、精度管理も良好な結果であったことから、健康危機管理への迅速、的確な対応に有効な手段として活用が期待される。

また、兵庫県内で採取した スイセン及びヒガンバナの葉及び鱗茎について本法により分析を行った結果を表 6 に示した。

試験した 6 種類の試料では 17~

2600µg/g のリコリンが検出された。葉より鱗茎に多くのリコリンが存在する傾向が認められたが、いずれにもほぼ同様レベル濃度のリコリンが検出された。

このように精度よく自然物からリコリンの測定が可能であり、迅速試験法としてその適応性が認められた。

D. 結 論

1. 既存のデータベース地方衛生研究所職員専用ホームページにある「自然毒中毒事例情報システム」を活用し、全国各地研での自然毒による食中毒の事例や試験法をデータベースに集積し、情報の共有を図り、健康危機管理への迅速な対応に資するツールの構築、推進を図った。

2. LC-MS/MS を用いて約 2 時間でスイセンの有毒成分リコリンが定量できる迅速試験法を開発し、その精度管理の実施により迅速、的確な健康危機管理対応に有効な手段を構築した。

E. 研究発表

1. 学会発表

上田泰人、田中敏嗣 (神戸市環境保健研究所) : スイセンの LC-MS/MS 分析について、第 46 回全国衛生化学技術協議会年会、盛岡、2009 年 11 月 12-13 日

F. 知的所有権の取得状況

なし

表1 スイセンによる食中毒事例（平成14年～23年、厚生労働省）

発生年月日	発生場所	原因食品	原因施設	摂食者数	患者数
14.4.30	新潟県	みそ汁のスイセン	家庭	4	4
14.5.1	新潟県	油炒めのスイセン	家庭	2	2
15.1.26	大分県	スイセンの葉	家庭	2	2
16.4.23	山形県	スイセン	家庭	2	2
16.11.30	兵庫県	スイセンの葉	家庭	3	3
18.6.2	新潟県	スイセンの油炒め	家庭	1	1
18.3.27	岩手県	スイセン	給食施設	10	5
18.5.15	北海道	スイセン	寄宿舍	9	9
18.5.24	北海道	スイセン	家庭	2	2
18.6.29	埼玉県	タマスダレ	学校	18	15
19.11.24	千葉県	スイセン	その他	72	32
20.5.14	山形県	スイセン	寄宿舍	5	5
20.12.5	茨城県	みそ汁のスイセン根	学校	12	5
21.4.28	兵庫県	ニホンスイセン葉	事業所	12	9
22.1.19	茨城県	みそ汁のスイセン根	家庭	2	2
22.3.31	福岡県	スイセン天ぷら	家庭	4	4
23.5.18	岩手県	スイセン	家庭	2	2

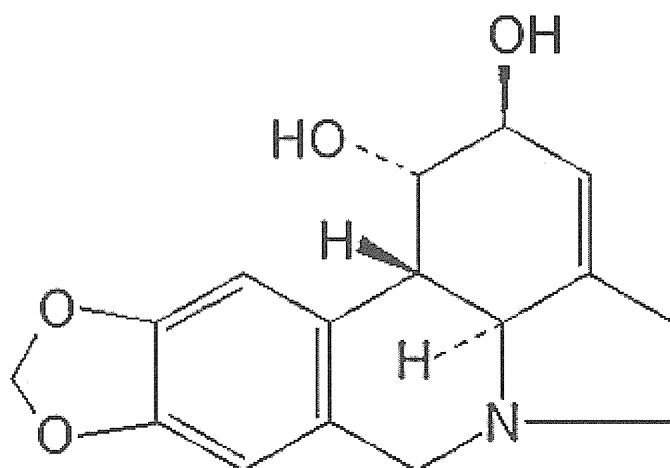


図1 リコリンの構造式

表 2. LC の測定条件

LC-Instrument : Shimadzu LC-20
 Column:Cadenza-CD-C18 2.0mm×150mm,3μm
 Column temperature : 40°
 Injection volumn : 5μl
 Mobile phase : SolventA:SolventB (4:6)
 SolventA:5mmol/L ammonium acetate 含有 water
 SolventB: 5mmol/L ammonium acetate 含有 methanol
 Mobile phase flow rate : 0.2mL/min

表 3. MS の測定条件

ESI, Positive Mode
 CurtainGas : 20Psi CollisionGas : 8Psi
 IonSprayVolltage: 5000V Temperature: 450°
 IonSourceGas1: 80 Psi IonSourceGas2: 50 Psi

Q1	Q3	Time	DP	EP	CE	CXP
(m/z)	(m/z)	(msec)	(Volt)	(Volt)	(Volt)	(Volt)
288.1	147	250	81	10	39	10
288.1	119	250	81	10	53	8
288.1	176.9	250	81	10	31	12
288.1	112.1	250	81	10	33	8

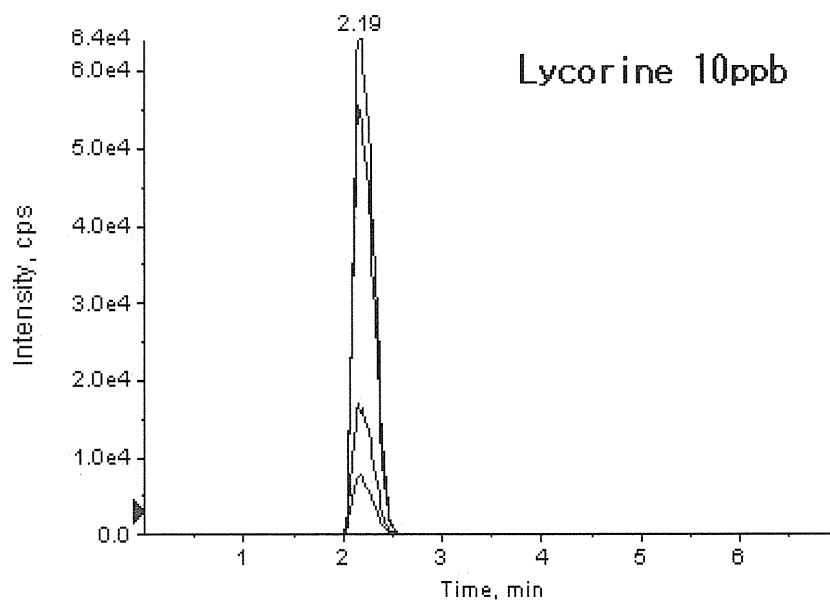


図2 リコリン標準溶液(10 μ g/mL)のLC-MS/MSクロマトグラム

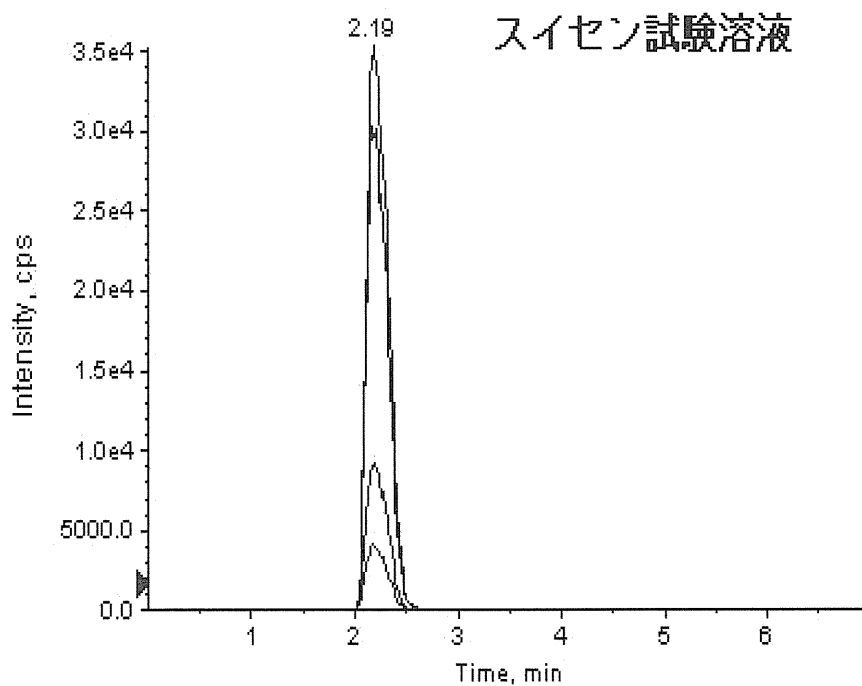


図3 スイセンの試験溶液のLC-MS/MSクロマトグラム

表 4 LC-MS/MS 迅速試験法によるリコリンの 17 機関の測定結果

機関	平均値 (μg/g)	回収率 (%)	RSDr (%)
A	46.8	94	2.2
B	50.0	100	0.5
C	50.0	100	0.6
D	52.1	104	1.6
E	46.8	94	2.2
F	49.8	100	3.2
G	45.8	92	0.6
H	46.8	94	3.6
I	40.5	81	4.7
J	48.5	97	3.7
K	50.5	101	0.4
L	49.6	99	3.7
M	41.1	82	4.6
N	49.0	98	1.1
O	47.9	96	2.2
P	45.8	92	0.6
Q	44.0	88	3.0

表 5 LC-MS/MS 迅速試験法によるリコリンの 17 機関共同試験結果

平均値 (μg/g)	回収率 (%)	RSDR (%)	HorRat
47.3	95	7.2%	0.81

表6 スイセン及びヒガンバナのリコリン測定結果

種 類	採取地	全長 cm	重さ g	葉 μg/g	鱗茎 μg/g
スイセン	明石	58	38	63	71
スイセン	明石	40	5.8	130	380
スイセン	明石	29	17	2300	2600
スイセン	丹波	77	38	17	55
ヒガンバナ	明石	45	47	46	330
ヒガンバナ	丹波	34	9.4	100	330