

表5

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

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
バラインフルエンザウイルス1型	2
バ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	バラインフルエンザウイルス1型	1
ライノウイルス	バ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6

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) 愛知衛研

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7

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8

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9

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  
 全検体数 38検体  
 少なくとも1種類の病原体が検出された検体数 32検体(陽性検体と称する)  
 対象患者 RSV感染疑い呼吸器感染症  
 対象患者数 38名(男、女)、0才～5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
RSV	19
アデノウイルス	3
ポリオ2型	2
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10

## 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、失腕 髄液検査にて、炎症所見あり	男 髄膜炎 男 脳症 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 (0/8)	0 (0/1)	0(0/4)
咽頭スワブ	0 (0/3)	1 (1.7%, 1/6) ライノ 1	検体なし	0(0/2)
便	検体なし	0 (0%, 0/3)	検体なし	0(0/1)

表11

### 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12

### 中枢神経感染症検体における検出結果

番号	愛知	山口	福岡	大阪
1	GA4	GA4	GA4	GA4
2	GA14	GA14	GA14	GA14
3	E25	E25 85%	E25	E25
4	EV71	EV71	EV71	シグナルあり
5	E6	E6	E6	E6
6	GA6	GA6	GA6	GA6
7	E30	E30	E30	E30
8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	CB3	CB3	CB3	CB3
12	CB1	CB1	CB1	CB1
13	CB2	CB2	CB2	CB2
14	CB5	CB5	CB5	シグナルあり
15	CB3	CB3	CB3	CB3
16	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17	E6	E6	E6	E6
18	CB2	CB2	CB2	CB2
19	N.D.	N.D.	CB2	N.D.
20	GA4	GA4	GA4	GA4

• 4衛研間での一致率  
85% (17/20)

• 不一致例3例の原因は  
検出感度差であると  
考えられる

No.19のND vs CB2  
福岡法は予備実験では  
EVの検出感度が高い

• 無菌性髄膜炎、脳炎・脳症  
各10検体

表13

### 呼吸器感染症検体における検出結果(愛知検体)

番号	愛知	山口	福岡	大阪	
21	N.D.	N.D.	N.D.	ND	<input checked="" type="checkbox"/> 元検体結果に加え 新たなウイルスが検出 されたもの
22	CB4	HCoVNL63, CB4	CB4	CB4	<input checked="" type="checkbox"/> 元検体ウイルスを検出 できなかったもの
23	PIV2	PIV2	PIV2	PIV2	<input checked="" type="checkbox"/> 元検体ウイルスを検出 できず、他のウイルスを 検出したもの
24	N.D.	RV-A	N.D.	RV-A	
25	N.D.	N.D.	N.D.	ND	
26	Ad5	HCoVNL63, Ad5	Ad5	Ad5	
27	Ad3	Ad3	Ad3	Ad3	
28	Ad2	Ad2	Ad2	Ad2	
29	Flu A	Flu A	FluA	FluA	
30	RSV, Boca	RSV, Boca	RSV	RSV	
31	Ad2	Ad2	Ad2	Ad2	
32	Flu B	Flu B	N.D.	FluB	
33	Ad3	Ad3	Ad3	Ad3	
34	Flu B	Flu B, HCoVNL63	N.D.	FluB	
35	RV-A	hMPV, RV-A	RV-A	RV-A	
36	N.D.	hMPV	N.D.	hMPV	
37	RSV	RV-A	RSV	RV-A	
38	RSV	RSV	RSV	RSV	
39	RSV	RSV	RSV	RSV	
40	RSV	RSV	RSV	RSV	

表14

### 呼吸器感染症検体における検出結果 山口検体

呼吸器感染症検体		山口検体		
番号	山口	愛知	福岡	大阪
1	PIV1	PIV1	PIV1	PIV1
2	PIV2	PIV2	PIV2	PIV2
3	PIV3	PIV3	PIV3	PIV3
4	PIV3	PIV3	PIV3	PIV3
5	FluA	FluA	FluA	FluA, RV-C
6	Flu B, Ad1	N.D.	N.D.	FluB, RV-A
7	hMPV	hMPV	hMPV	hMPV
8	RSV	RSV	RSV	RSV
9	hMPV, Ad5	hMPV, Ad-C	hMPV, Ad5	hMPV, Ad5, RV-A
10	hMPV	hMPV	hMPV	hMPV
11	RSV, RV-C	RSV, DG43, RV-C	RSV	RSV, RV-C
12	RV-A	hMPV, RV-A	N.D.	RV-A
13	Mycoplasma	Mycoplasma	N.D.	ND
14	Mycoplasma	Mycoplasma	Mycoplasma	ND
15	RV-A, Boca	RV-A	Boca	RV-A
16	Ad1	Ad1	Ad1	Ad1
17	Ad5	Ad-C	Ad5 or 5	Ad5
18	Ad3	Ad3	Ad3, FluA	Ad3
19	Boca	Boca	Boca	ND
20	hMPV/Boca	hMPV, Ad1	hMPV, Ad1	hMPV, Ad1

- 元検体結果に加え  
新たなウイルスが検出  
されたもの
- 元検体ウイルスを検出  
できなかったもの
- 元検体ウイルスを検出  
できず、他のウイルスを  
検出したもの

表15

## 呼吸器感染症検体における検出結果 福岡検体

呼吸器感染症検体		福岡検体		
番号	福岡	愛知	山口	大阪
1	N.D.	N.D.	Ad1	ND
2	N.D.	N.D.	RV A, Boca	RV-G
3	RV-A, Boca, PIV3	PIV3, RV-A, Boca	PIV3, RV-A, Boca	RV-A, Boca, PIV3
4	RV-A	RV-A	RV A	RV A
5	Boca	Boca	Boca	Boca
6	RV-A	RV-A	RV A	RV A
7	EV68, Ad2	Ad2, EV68	EV68, Ad2	EV68, Ad2
8	RSV	RSV	RSV	RSV
9	HCoV NL63	HCoV NL63	HCoV NL63	HCoV NL63
10	RV-G, HCoV OC43	RV-G	RV G, HCoV OC43	RV-G
11	Mycoplasma	Mycoplasma	Mycoplasma	Mycoplasma
12	HCoV NL63, RSV	RSV, HCoV NL63	RSV, RV, HCoV NL63	RSV, RV-E
13	RV-G, Boca	RV-G, Boca	RV-G, Boca	RV-G
14	RV-G, Ad2	RV-G, Ad2	RV G, Ad2	RV-G, Ad2
15	ND	ND	FluA	ND
16	HCoV OC43	ND	ND	ND
17	RV-A	RV-A	RV A	RV-A
18	RV-A	RV-A	RV A	RV-A
19	Mycoplasma	RV-G, Myca	RV G/Mycoplasma	RV-G
20	ND	ND	ND	ND

元検体結果に加え  
新たなウイルスが検出  
されたもの

元検体ウイルスを検出  
できなかったもの

元検体ウイルスを検出  
できず、他のウイルスを  
検出したもの

表16

## 呼吸器感染症検体における検出結果(大阪検体)

呼吸器感染症検体 番号	大阪検体			
	大阪	愛知	福岡	山口
1	RV-A	N.D.	N.D.	N.D.
2	ND	ND	ND	ND
3	ND	RV-A	ND	RV-A
4	ND	PIV3	ND	PIV3
5	ND	ND	ND	ND
6	CB5	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND
10	ND	CB5	ND	CB5
11	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	N.D.
13	ND	ND	ND	N.D.
14	EV7	N.D.	N.D.	N.D.
15	ND	ND	ND	ND
16	ND	Mycoplasma	ND	Mycoplasma
17	ND	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND	ND
19	RV-A	ND	ND	EV7
20	RSV	ND	ND	ND

元検体結果に加え  
新たなウイルスが検出  
されたもの

元検体ウイルスを検出  
できなかったもの

元検体ウイルスを検出  
できず、他のウイルスを  
検出したもの

表17

## 呼吸器感染症検体における検出率(%)

検体	4衛研一致		愛知			山口			福岡			大阪		
	検出 可能	完全 一致	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
愛知	80	55				95	65	30	85	85	0	90	80	15
山口	60	45	85	75	10				70	65	10	70	60	20
福岡	80	60	90	85	5	95	70	25				75	70	15
大阪	70	55	75	55	20	75	55	25	75	75	0			
平均	73	54	84	78	12	88	63	27	77	75	3	78	70	17

A: 20検体中での元検体結果を検出した正解率  
 B: 20検体中での元検体結果に対する完全一致率  
 C: 元検体結果に加え新たにウイルスが検出された検体の率

表18

## 呼吸器感染症検体におけるウイルス別検出一致率

ウイルス	検出率	3衛研 一致率	ウイルス	検出率	3衛研 一致率
PIV-1	100 (3/3)	100 (1/1)	Corona	83 (5/6)	50 (1/2)
PIV-2	100 (6/6)	100 (2/2)	Rhino	79 (33/42)	92 (11/12)
PIV-3	100 (9/9)	100 (3/3)	Mycoplasma	67 (8/12)	25 (1/4)
Flu A	100 (6/6)	100 (2/2)	Boca	58 (12/21)	29 (2/7)
hMPV	100 (12/12)	100 (4/4)	Flu B	56 (5/9)	0 (0/3)
Adeno	92 (33/36)	62 (9/14)	Entero	50 (6/12)	50 (2/4)
RSV	83 (25/30)	80 (8/10)	Corona C43	17 (1/6)	0 (1/2)

表19

4衛研における各ウイルスに対する検出感度の特徴  
(呼吸器検体を用いた検討)

検出感度	山口	福岡	愛知	大阪
高い	RV(5), Boca(4) CoVNL63(3) Myco(2), EV(2) hMPV(2), Ad(2) Flu A,B, RSV HCoVOC43 PIV3	HCoVOC43(2) FluA, Boca EV	Myco(2) CoVNL63 Boca, RV PIV3, EV hMPV	RV(9) EV(2) RSV FluB hMPV
低い	Ad-1	RV-5 FluB(2)	なし	Myco(3) Boca(2) RSV CoVNL63



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」  
分担研究総合報告書（平成 22-24 年度）

「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フグ、スイセン、トリカブト及びチョウセンアサガオについて、その有毒成分テトロドトキシン、リコリン、アコニチン、メサコニチン及びアトロピン、スコポラミンの LC-MS/MS による迅速一斉試験法を検討し、19 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段を構築した。

研究協力者

滝川義明、畠山えり子、高橋 悟、菅原  
隆志（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）  
伊能 睿、丹野瑳喜子、大村外志隆、石  
井里枝、野崎なおみ（埼玉県衛生研究所）  
玉井拙夫、岡部英男、藤巻照久、中村廣

志、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、森下智雄、後藤智  
美（愛知県衛生研究所）  
金田誠一、平田宏之、寺田久屋、谷口 賢、  
小野田絢（名古屋市衛生研究所）  
緒方勇人、南谷臣昭（岐阜県保健環境研  
究所）

井端泰彦、有菌直樹、茶谷祐行、土田貴正、大藤升美、野澤真里奈（京都府保健環境研究所）

織田 肇、山本容正、木村明生、赤坂 進川津健太郎（大阪府立公衆衛生研究所）

田窪良行、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、毛利文彦、佐想善勇（姫路市環境衛生研究所）

島田美昭、山本康司、橋爪 崇、久野恵子、高良浩司、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）

岸本寿男、山本 淳、肥塚加奈江、浦山豊弘、赤木正章（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）

古家 隆、森岡浩文（宮崎県衛生環境研究所）

仲宗根民男、西浜寛治、宮城俊彦、玉那覇康二、玉城宏幸、佐久川さつき、國仲奈津子、真保栄陽子（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（田中）徳子、佐藤麻衣（神戸市環境保健研究所）

## A. 研究目的

地研は地域保健対策を効果的に推進し、公衆衛生の向上・増進並びに地域及び広

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/syokuhu/04.html>, 2001-2009) の10年間では細菌による食中毒の発生件数の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。

平成 24 年度はトリカブト毒及びチョウセンアサガオ毒の LC-MS/MS による迅速試験法を検討した。

確立した試験法の精度管理及び適応性を検証するため、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。

いずれも、良好な結果が得られ、健康危機管理への迅速、的確な対応へ有効な手段を構築したので、報告する。

## 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 による自然毒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

1) 平成 22 年度：フグ毒の毒作用の主成分であるテトロドトキシン (TTX:  $C_{11}H_{17}N_3O_8$ , MW:319.3) を分析対象物質とした。ふぐ毒は TTX とその多くの同族体が知られている。図 1 はその一例を示したが、毒作用の主物質は TTX で毒性も最も強い。また、同族体の標準品の入手は困難であることから、TTX とした。

2) 平成 23 年度：スイセンなどの有毒成分リコリン ( $C_{16}H_{17}NO_4$ , MW:287.3) を分析対象物質とした。構造式を図 2 に示した。

3) 平成 24 年度：トリカブトの有毒成分アコニチン( $C_{34}H_{47}NO_{11}$ , MW:645.74)、メサコニチン( $C_{33}H_{45}NO_{11}$ , MW:631.72)、チョウセンアサガオの有毒成分アトロピン( $C_{17}H_{23}NO_3$ , MW:289.37)、スコポラミン( $C_{17}H_{21}NO_4$ , MW:303.35)を分析対象物質とした。構造式を図 3～図 6 に示した。

#### 2.1.2 LC-MS/MS 装置

- 1) Triple QUAD5500 (ABSciex)
- 2) API4000Qtrap (ABSciex)
- 3) API3200QTrap (ABSciex)
- 4) API3000 (ABSciex)
- 5) API2000 (ABSciex)
- 6) TSQ Quantum Discovery Max (ThermoFisher SCIENTIFIC)
- 7) Xevo (Waters)
- 8) Xevo TQ (Waters)
- 9) Xevo TQD (Waters)
- 10) Premier (Waters)
- 11) 6210TOF-MSD (Agilent Technologies)
- 12) 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies)
- 13) Micromass Quattro Ultima Pt (JASCO)

#### 2.1.3 試験溶液の調製及び LC-MS/MS 測定例

- 1) LC-MS/MS によるフグ毒 (テトロドトキシン) 試験法及び操作条件例を scheme 1 に示す<sup>1~4)</sup>。
- 2) LC-MS/MS によるスイセン毒 (リコリン) 試験法及び操作条件例を scheme 2 に示す<sup>5~8)</sup>。
- 3) LC-MS/MS によるトリカブト毒 (アコニチン、メサコニチン)、チョウセンアサガオ毒 (アトロピン、スコポラミン) 試

験法及び操作条件例を scheme 3 に示す<sup>9,10)</sup>。

#### 2.1.4 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で実施した。
- 2) 回収試験：無添加を1試行、添加を5試行とした。
- 3) 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。
- 4) 定量方法：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。

### 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：273 件
- 2) 魚類：88 件 (ふぐ毒 71, シガテラ 9 など)
- 3) 貝・蟹類：37 件 (麻痺性 15, テトラミン 14 など)
- 4) キノコ：62 件
- 5) 山野草：37 件
- 6) 栽培植物：32 件
- 7) 海藻：1 件
- 8) その他 (ヒスタミンなど)：16 件

#### 2. LC-MS/MS による自然毒迅速試験法の共同試験結果と試験法の妥当性評価について

- 1) フグ毒 (テトロドトキシン) 試験法の結果を表 1 に示した<sup>2~4)</sup>。

平均回収率は 98.4%、室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) は 10.7%、HorRat 値 0.8 であった。

2) スイセン毒 (リコリン) 試験法の結果を表 2 に示した<sup>7,8)</sup>。

平均回収率は 94.7%、室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) は 7.2%、HorRat 値 0.81 であった。

3) トリカブト毒 (アコニチン、メサコニチン)、チョウセンアサガオ毒 (アトロピン、スコポラミン) 試験法の結果を表 3 ~ 表 6 に示した<sup>10)</sup>。

平均回収率はアコニチン 97.8%、メサコニチン 98.2%、アトロピン 103.5%、スコポラミン 97.7%、室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) はアコニチン 8.2%、メサコニチン 6.8%、アトロピン 10%、スコポラミン 9.9%、HorRat 値はそれぞれ 0.89、0.74、1.1、1.1 であった。

このように、それぞれの試験法の回収率及び室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) いずれも良好な結果が得られた。

また、Horwitz 式の Thompson 修正式で算出される予測室間再現相対標準偏差 ( $PRSD_R$ ) に対する  $RSD_R$  の比である HorRat 値は全ての物質において、国際的な評価値 2 (AOAC 1.5) 以下であり、満足のいく分析精度が得られ、今回共同試験を実施した LC-MS/MS による自然毒の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すべて約 2 時間で毒性物質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。

## 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 時間で自然毒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

1) 矢野昌弘ら：LC-MS/MS を用いたテロドトキシシン (TTX) 迅速分析法の妥当性評価，第 48 回全国衛生化学技術協議会年会講演集，104-105 (2011)

2) 山口葉子ら：LC-MS/MS を用いたスイセン毒 (リコリン) 迅速分析法の妥当性評価，第 49 回全国衛生化学技術協議会年会講演集，130-131 (2012)

3) 矢野昌弘ら：LC-MS/MS を用いた植物毒 (トリカブト及びチョウセンアサガオ毒) 迅速分析法の妥当性評価，第 50 回全国衛生化学技術協議会年会講演集，(2013) 予定

## F. 知的所有権の取得状況

なし

## G. 文献

1) 矢野昌弘ら：LC/MS/MS を用いたフグ毒

の迅速分析, 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 168-169 (2009)

2) 「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」(研究代表者: 山口県環境保健センター所長 調恒明) に基づく分担研究報告「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」(分担研究者: 神戸市環境保健研究所長 田中敏嗣) 47-57 (2010)

3) 矢野昌弘ら: LC-MS/MS を用いたテトロドトキシン(TTX) 迅速分析法の妥当性評価, 第 48 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 104-105 (2011)

4) 矢野昌弘ら: LC-MS/MS を用いたテトロドトキシン(TTX) の迅速分析と精度管理, 神戸市環境保健研究所報, 39, 48-53 (2011)

5) 上田泰人ら: スイセンの LC/MS/MS 分析について, 神戸市環境保健研究所報, 36, 60-61 (2008).

6) 上田泰人ら: スイセン等のリコリン分析, 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 172-173 (2009)

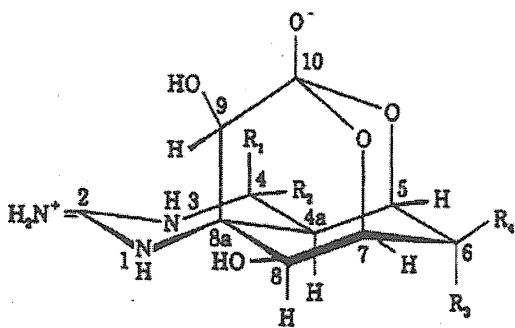
7) 山口葉子ら: LC-MS/MS を用いたスイセン毒(リコリン) 迅速分析法の妥当性評価, 第 49 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 130-131 (2012)

8) 「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」(研究代表者: 山口県環境保健センター所長 調恒明) に基づく分担研究報告「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」(分担研究者: 神戸市環境保健研究所長 田中敏嗣) 47-57 (2012)

9) 久野恵子ら: 健康危機管理に対応した自然毒一斉分析法の検討(有毒植物および毒きのこ 19 成分), 第 48 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 118-119 (2011)

10) 「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」(研究代表者: 山口県環境保健センター所長 調恒明) に基づく分担研究報告「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」(分担研究者: 神戸市環境保健研究所長 田中敏嗣) (2013) 作成中



*1	R1	R2	R3	R4	毒性 ( $K_0$ ) *2
Tetrodotoxin (TTX)	H	OH	OH	CH <sub>2</sub> OH	1 (1.8)
4-epiTTX	OH	H	OH	CH <sub>2</sub> OH	(68)
6-epiTTX	H	OH	CH <sub>2</sub> OH	OH	1/6 (39)
11-deoxyTTX	H	OH	OH	CH <sub>3</sub>	1/7 (37)
11-norTTX-6(R)-ol	H	OH	H	OH	1/7 (31)
11-norTTX-6(S)-ol	H	OH	OH	H	1/5 (23)
11-oxoTTX	H	OH	OH	CH(OH) <sub>2</sub>	(1.5)

\*1 : <http://www.mhlw.go.jp/topic/syokuchu/poison/index.html>

\*2 : 山下まり、臨床検査、53、707-711 (2009)、 $K_0$  : ラットシナプス膜との解離定数

図1. テトロドトキシシン及び同族体の構造と毒性

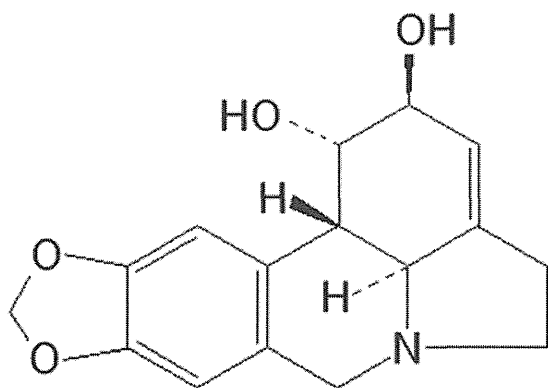


図2. リコリンの構造式

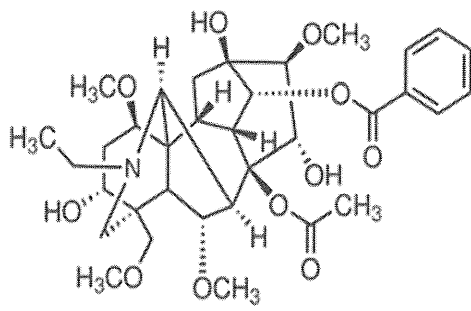


図 3. アコニチンの構造式

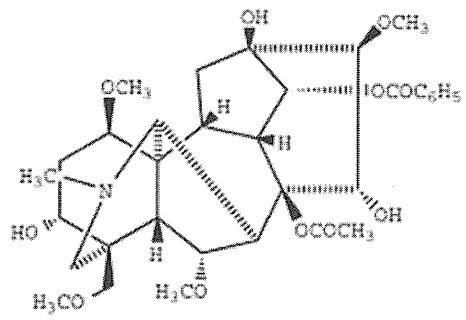


図 4. メサコニチンの構造式

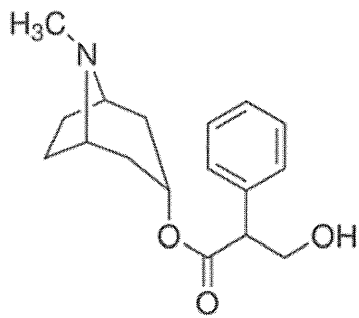


図 5. アトロピンの構造式

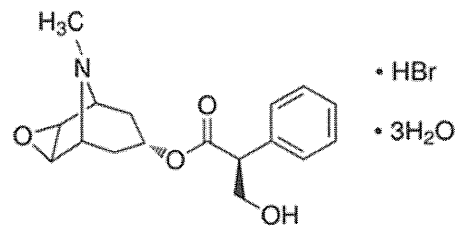
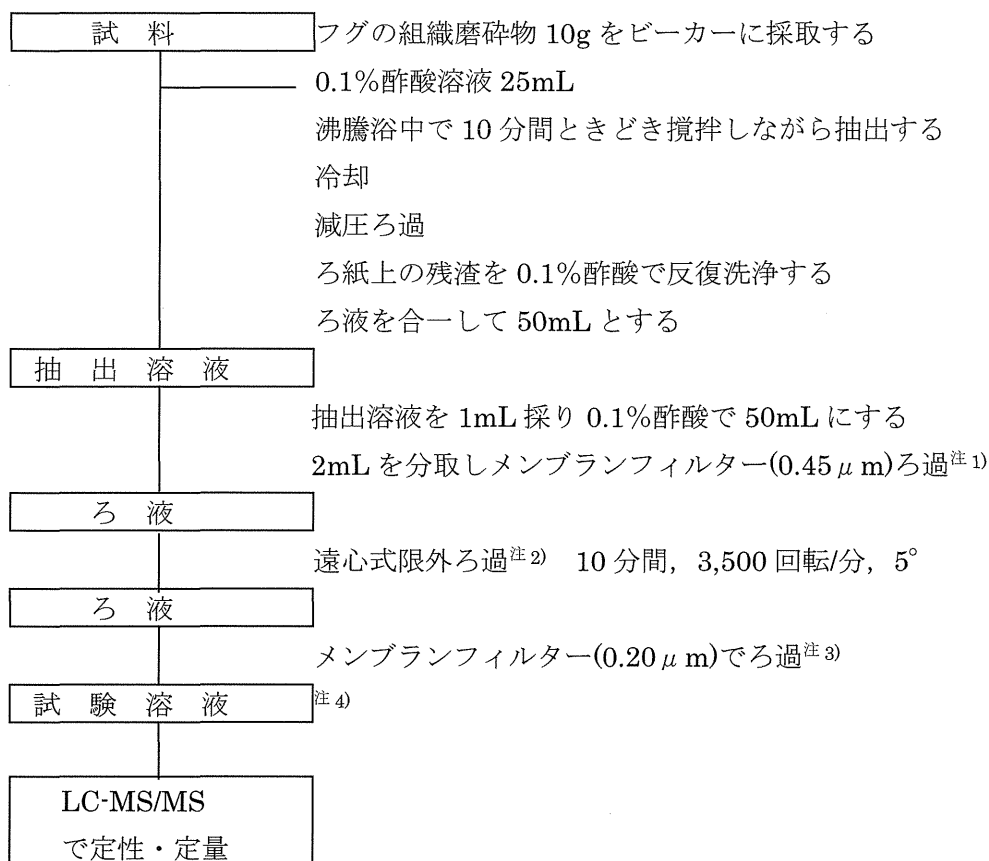


図 6. スコポラミン臭化水素酸塩三水和物の構造式



Scheme 1. LC-MS/MS によるフグ毒 (テトロドトキシン) 試験法



(操作条件例)

カラム<sup>注5)</sup>: ZIC-HILIC(Merck Sequant) (内径 2.1mm, 長さ 150mm, 粒径 3.5  $\mu$ m)

カラム温度: 40°

移動相<sup>注6)</sup>: 0.1%ギ酸: アセトニトリル=7:3

流速: 0.2mL/分

注入量: 5  $\mu$ L

イオン化モード: ESI-positive

測定法: MRM

モニターイオン: プリカーサーイオン: 320

プロダクトイオン : 302 (162, 77)

注入量: 5  $\mu$ L

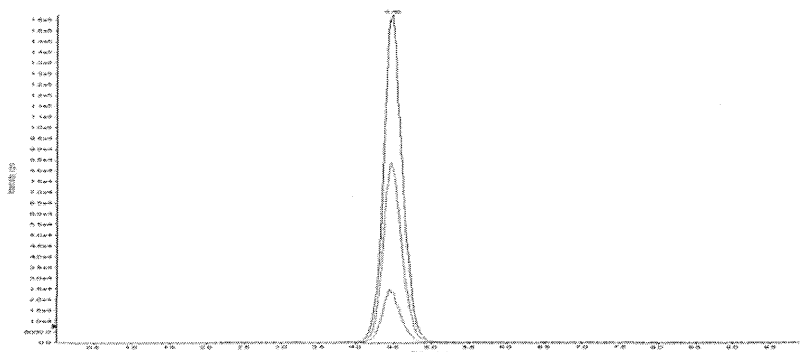
[注]

1) Merck 社製 MerckMillipore 親水性 PTFE(孔径 0.45  $\mu$ m)等が使用できる.

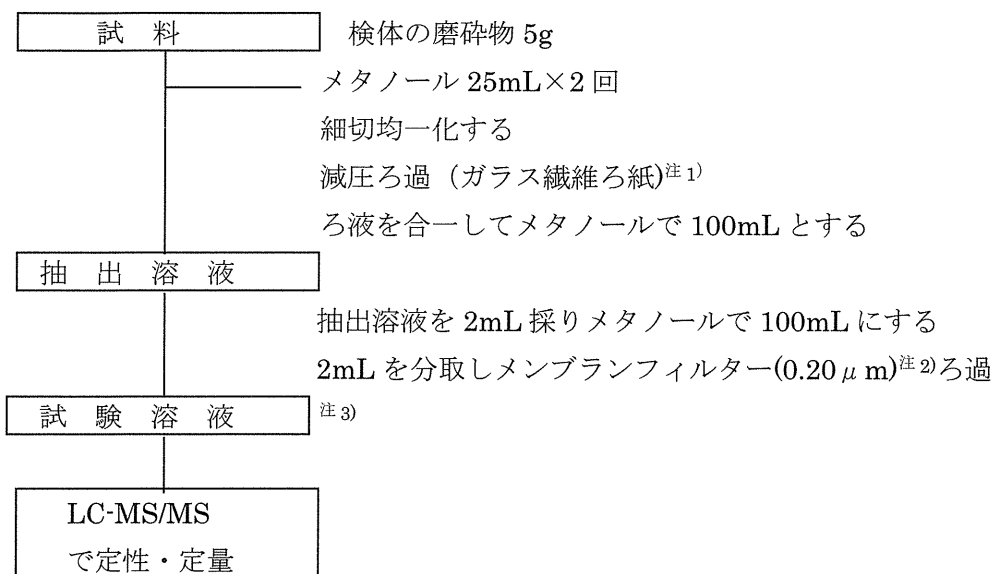
2) Merck 社製 MerckMillipore Amicon Ultra-4(10K)等が使用できる.

- 3) Merck 社製 MerckMillipore 親水性 PTFE(孔径 0.20  $\mu$  m)等が使用できる.
- 4) LC-MS/MS の感度および試料含量に応じて試料の希釈倍率および検量線用標準溶液の濃度範囲を調整する.
- 5) 市販カラムとして Atlantis HILIC Silica(Waters), Xbridge Amide(Waters), TSK gel Amide-80(東ソー), ZIC-pHILIC(Merck Sequant), Inertsil Diol(GL Sciences), Discovery HS F5(Sigma-Aldrich) 等が使用できる.
- 6) 移動相の条件は, 使用するカラム等により適宜変更する.

LC-MS/MS クロマトグラム : 標準溶液 (10ng/mL)



Scheme 2. LC-MS/MS によるスイセン毒（リコリン）試験法



〈操作条件例〉

カラム<sup>注4)</sup> : Cadenza CD-C18(Imtakt)(内径 2.0mm, 長さ 150mm, 粒径 3 μm)

カラム温度 : 40°

移動相<sup>注5,6)</sup> : 5mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 : 5mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール = 2 : 3

流速 : 0.2mL/分

注入量 : 5 μL

イオン化モード : ESI-positive

測定法 : MRM

モニターイオン : プリカーサーイオン : 288

プロダクトイオン : 147 (119, 177, 112)

[注]

- 1) 市販品として桐山製作所製 GFP 等が使用できる.
- 2) Merck 社製 MerckMillipore 親水性 PTFE(孔径 0.20 μm)等が使用できる.
- 3) LC-MS/MS の感度および試料含量に応じて試料の希釈倍率および検量線用標準溶液の濃度範囲を調整する.
- 4) 市販カラムとして Xbridge C18(Waters), XTerraMS C18(Waters), TSK-Gel ODS-80Ts(東ソー), Inertsil ODS-3 (GL Sciences), Mightysil RP-18 GP(関東化学), Ascetis C18(Sigma-Aldrich), L-column ODS(化学物質評価研究機構), Scherzo

SM-C18(Imtakt), ZIC-HILIC(Merck SeQuant)等が使用できる.

- 5) 移動相の条件は, 使用するカラム等により適宜変更する.
- 6) リコリンの付近に妨害が認められる場合は次の条件で解消されることがある.

A 液 : 5mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液 : 5mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液

時間	A 液 (%)	B 液 (%)
0	85	15
10	15	85
20	15	85

LC-MS/MS クロマトグラム : 標準溶液 (10ng/mL)

