

平成 28 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品中の微生物試験法の開発及びその実効性・妥当性評価に関する研究
研究代表者 五十君 静信（東京農工大学）

分担研究報告書

食中毒毒素試験法の検討：セレウス菌嘔吐毒素セレウリド試験法の検討

分担研究者	鎌田 洋一	（岩手大学農学部 共同獣医学科）
協力研究者	松田 りえ子	（国立医薬品食品衛生研究所 食品部）
	森 曜子	（公益社団法人 日本食品衛生協会）
	大城 直雅	（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）
	藤田 和弘	（日本食品分析センター 多摩研究所）
	福沢 栄太	（日本食品分析センター 彩都研究所）
	佐藤 信彦	（日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター）
	佐野 勇氣	（日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター）
	橋田 規	（日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター）

セレウリドはセレウス菌が食品内に産生する環状ドデカデブシペプチドで食中毒危害性を有する。平成 26 年度よりセレウリド試験法の確立を試みている。対象食品に炊飯済み米飯を選択した。定量法に LC-MS/MS を採用した。セレウリド添加炊飯済み米飯からのメタノールおよび含水メタノールによる抽出と、前処理カラムの平衡状態とカラム添加物のメタノール濃度を一致させる処理を行い、LC-MS/MS で分析した。セレウリド添加検体の質量スペクトルから、定量に適したイオンを選抜し、試験法の性能を評価した。非添加検体からはセレウリドの検出と定量を阻害するシグナルは検出されず、特異性が確認された。炊飯済み米飯にセレウリドを 5 ng/g の濃度で添加した試料を用い、その試料を 1 日 2 併行、5 日間分析し、試験法の性能を評価した。その結果から、真度、精度及び定量限界を推定した。真度 94%、併行精度 0.8%~3.7%、室内精度 2.0%~8.6%、定量限界（室内精度の標準偏差に 10 を乗じたもの）0.9 ng/g~4.0 ng/g の性能が推定された。以上から、炊飯済み米飯を対象としたセレウリド試験法を確立できたと考える。

A. 研究目的

セレウス菌食中毒には2つの型がある^{1,2)}。下痢を示すものと、嘔吐が主症状になっている型の2種類で、我が国では嘔吐を主症状とする食中毒のみが発生すると認識されている。嘔吐型のセレウス菌食中毒は、同菌が産生する低分子ペプチドが、直接の嘔吐誘発の原因物質になっている。同ペプチドはセレウリドと呼称される。セレウリドはセレウス菌が食品内で増殖する際に産生される、分子量11153.00の環状デプシペプチドである。セレウリドには強い耐熱性を示す。100℃のみならず、オートクレーブ処理においても失活しない。セレウリドは上述したように、食品内で増殖したセレウス菌が合成、分泌する。同菌を原因と疑う食中毒が起こった際には、食品内のセレウリドを検出する必要がある。食品中のセレウス菌食中毒危害性を評価する場合も同様である。感度のよい検査法が必要になる。

セレウリドの検出法には数種ある。毒性的に最も適切なものは、その嘔吐毒性を検知することである。嘔吐はヒトや霊長類では容易に観察されるが、ラットやマウスなど、普及している実験動物は嘔吐を示さない。例外はスunksで、学名 *Suncus mirinum*、ジャコウネズミの別名がある。スunksはセレウリドに対し、明瞭な嘔吐反応を示す。残念なことにスunksは実験動物会社から購入するほど我が国には普及しておらず、試験法に採用には不適切状態にある。動物実験の場合にしばしば観察される、ばらつ

きも問題となるだろう³⁾。

オートクレーブしたセレウリド食中毒事例分離セレウス菌培養液中に、空胞化誘導活性が特異的に見られる⁴⁾。空胞化誘導反応は特異的ではあるが、種々問題を抱えている。セレウリド処理後に誘導されたHEp-2細胞質中の空胞を検出するには、観察技術と経験が必要になる。懸濁したHEp-2細胞を培養容器にいれ、そこに2倍段階希釈したセレウリド含有検疫を一定量加えた後、24時間程度培養し、その後、容器中の細胞を100個以上観察し、空胞出現の有無を確認する。その反応は、連続的に希釈したセレウリドを加えているにもかかわらず、一定のセレウリド濃度範囲のみで空胞化が観察される。この現象の説明はまだなされていない。培養細胞技術と空胞化観察経験の良否がセレウリド濃度を決定してしまう。本法は我が国では一部の研究機関で実施できるのが現状である。

質量分析装置を用いてセレウリドを分析する方法がある。イオン化したセレウリドを検出する方法であり、物質同定の手法としては、非常に優秀な方法になる。しかし、機器が高価であることや、食中毒細菌を取り扱う試験者には機器分析の経験が少ない傾向があり、その利用に逡巡がある。さらに、質量分析装置では、絶対的な標準物質が必要で、これまで開発されてきた方法では、セレウリドに類似した構造を持つイオノフォアであるバリノマイシンが用いられてきた。最も優れた標準物質が、セレウリ

ド自体であることは言うまでもない。

セレウリドは、デプシ酸およびアミノ酸 4 種類が 3 回繰り返され、かつ、閉鎖した環状構造をとっている。この構造が原因で、セレウリドは長く有機化学合成がされてこなかった。2013 年になり、試薬企業から市販されるようになった。この状況から、本分担研究において、昨年度は、2 社のセレウリドが標準物質として適応可能かどうか、LS/MS/MS を用いて検証し、その有用性を確認した。

バックライスを検査対象食品として構築した、セレウリド試験法の概要を図 1 に示す。LC/MS/MS 部分は別記する。本法で、添加回収実験を行った。その結果、40%弱から 85%程度の回収率で、全体として低かった。室内精度も 27%と不足だった（平成 26 年度報告書）。

LC-MS/MS が高価な機器であるため、その汎用性が危惧される。そのため、LC/MS を用いて、セレウリドの試験法の開発を試みた。試験対象やセレウリド抽出法、前処理カラム法は LC/MS/MS を用いての場合と同様であった。検討の結果、装置を汚染する物質の洗浄が完璧には行えず、長い検討を必要とすることが明らかになった（平成 27 年度報告書）。

本年度は、試験に用いる機器を LC-MS/MS とし、セレウリドの抽出法、前処理カラムへの添加条件、LC における溶媒グラディエント条件について検討し、セレウリド試験法を確立した。

B. 研究方法

B-1. セレウリド、バックライス

セレウリドは、和光純薬工業株式会社から購入した。バックライスは、炊飯済み室温保存の市販品を用いた。

B-2. バックライスへのセレウリド接種と抽出

バックライスを 25 g 秤量し、ホモジナイザーカップに移した。メタノール溶解セレウリド(125 ng/mL)を 1 mL、バックライスに数か所ドロップした。暗所で 60 分放置した。この添加により 5 ng セレウリド/g バックライスが形成される。

B-3. セレウリドのメタノールによる抽出方法検証

1 回目のメタノールによる抽出後、2 回目以降の抽出を、A 液：メタノール及び水混液 (7 : 3) または、B 液：メタノール及び水混液(95:5)で実施した場合で比較した。以下に手順を示す。

- ① 試料 (バックライス) 25 g を採取した (A 液及び B 液 各 N=2, 計 4 本)。
- ② セレウリド標準溶液 (500 ng/mL) 2.5 mL をそれぞれの試料に添加した。試料の 5 か所以上の部位に滴下し (バックライスとして 50 ng/g 相当), 60 分間, フタを開けた状態でドラフト内に静置した。

- ③ 水 25 mL を加え、ホモジナイザーを用いて 1 分間均質化した。
- ④ メタノール 100 mL を加えてホモジナイズ、遠心分離、GF ろ過を行い、ろ紙をメタノール 5 mL×2 回で洗浄して洗液をろ液と合わせ、メタノールで 200 mL に定容した。・・・抽出液 1
- ⑤ 残留物に A 液または B 液 50 mL を加えてホモジナイズ、遠心分離、GF ろ過を行い、ろ紙を A 液または B 液 5 mL×2 回で洗浄して洗液を合わせた後、ナス型フラスコに分取した。・・・抽出液 2
- ⑥ ⑤と同様・・・抽出液 3
- ⑦ ⑤と同様・・・抽出液 4
- ⑧ 抽出液 1 はその一部をシリンジフィルターでろ過し、試験溶液とした。
- ⑨ 遠心分離後の上澄み液を、ガラス繊維ろ紙を用いてろ過した。ろ液は上記全量フラスコに回収後、水で正確に 250 mL とし、よく混合して試験液とした。
- ⑩ 試験液 10 mL を共栓付試験管に正確に量り取り、水を 5 mL を正確に加えて混合し、カートリッジカラムへの負荷用試料とした。

B-4. HLB カラムによる前処理

- ① あらかじめメタノール 3 mL、メタノール及び水混液 (1 : 1) 3 mL の順にカラムに通してカラムを平衡化した。
- ② 負荷用試料全量 (15 mL) をカラムに負荷した。
- ③ メタノール及び水混液 (1 : 1) 試料の

入っていた試験管を 3 mL で共洗いし、洗液をカラムに負荷した。流出液を捨てた。

- ④ メタノール及び水混液 (7 : 3) 3 mL でカラムを洗浄した。流出液を捨てた。
- ⑤ メタノール及び水混液 (95 : 5) 3 mL でセレウリドを溶出させ、溶出液を得た。
- ⑥ 窒素気流下でのアルミブロック恒温槽 (50°C)、あるいはロータリーエバポレーターを用いて、溶出液を濃縮乾固させた。
- ⑦ 残留物 (試料 1 g 相当) にメタノールを正確に 1 mL 加えて溶解し、シリンジフィルターでろ過し、試験溶液とした。

B-5. LC-MS/MS によるセレウリドの検出と定量

① 検量線用標準溶液の調製

アンプルを開封し、セレウリド標準液 (50 µg/mL) 400 µL を、40 mL 全量フラスコに正確に量り取り、メタノールを加え、正確に 40 mL とした (セレウリド標準溶液 (500 ng/mL))。本溶液は、適宜の容量に分け、-20°C 以下で密閉保存する。本溶液をメタノールで希釈して 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 及び 10 ng/mL の濃度の検量線用標準溶液を調製した。

② 検量線の作成

検量線用標準溶液を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成する。絶対検量線とする。

③ 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、検量線から試料中のセレウリド濃度を求める。

④ 測定条件例

高速液体クロマトグラフ：UltiMate3000
[Thermo Scientific 製]

タンデム型質量分析装置：QTRAP 4500
[SCIEX 製]

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル
(内径 2.1 mm、長さ 50 mm、粒子径 3.5 μ
m) (Zorbax Eclipse XDB-C18)

カラム温度：40°C

流量：0.2 mL/min

移動相：A；0.1 vol% ギ酸及び 10 mmol/L
ギ酸アンモニウム水溶液

B；0.1 vol% ギ酸及び 10 mmol/L ギ酸ア
ンモニウム含有メタノール溶液

グラジエント条件；0 ~ 2 min (A:B=20:80)

→ 16 min (A:B=5:95)

→ 16.01 ~ 20 min (A:B=20:80)

注入量：1~10 μ L

イオン化モード：ESI (+)

イオン源温度：700°C

イオン化電圧：5.0 kV

プリカーサーイオン： m/z 1171 (アンモ
ニウム付加体)

プロダクトイオン： m/z 172 (定量用)、
 m/z 357、 m/z 314 (確認用)

結果を表 1 及び 2 に示した。両試験室の
結果はほぼ一致しており、1 回目のメタノ
ール（試料に均一化のために先に水を添加
はしているが）で 90%前後の回収が得られ
た。また、2 回目以降については、抽出液に
よる差はないと考えられた。本結果から、
操作性を考慮して A 液を採用し、抽出回数
は 3 回とすることとした(表 1、2)。

C-2. 試験法の性能評価

セレウリドを添加しないパックライスを
分析（1 日 2 回分析を 1 日実施）し、妨害
ピークの有無を確認した。無添加区からは
セレウリドのピークは検出されず、選択性
に問題はないと考えられた。

分析者 1 名が同一の添加試料（セレウリ
ドを 5 ng/g の濃度で添加したパックライ
スを、分析手順に従って、分析機関にお
いて、1 日 2 回分析を 5 日間繰り返す。得
られた測定結果を用いて、試験室毎に一元
配置分散分析により解析し、真度、併行精
度および室内精度を算出した。添加回収試
験の結果、真度は 94.3%及び 94.5%を示し
た。また、精度を HORRAT_r で評価したとこ
ろ、いずれも 2 以下であった。また、定量
限界(室内精度の標準偏差に 10 を乗じたも
の) 0.9 ng/g~4.0 ng/g の性能が推定され
た(表 3)。

C. 研究結果

C-1 パックライスに添加したセレウリド
へのメタノールによる抽出効果の検証

D. 考察

LC/MS/MS を用いてのセレウリド試験法

の確立を試みた。平成 26 年度に検討をしたものの、市販のパックライスへのセレウリド添加回収試験を実施した結果は、室内精度が悪く、回収率は 40 %を下回ることもあった（平成 27 年度報告書）。その際の問題点として、①メタノールによる抽出、②抽出液の濃縮法、③濃縮物のメタノール濃度と平衡化した前処理カラムのメタノール濃度の不一致、④LC 部分の溶媒グラディエントが考えられていた。

今年度はパックライスからのメタノール抽出方法を 2 種類設定し、それぞれの結果を検討比較して、結果に基づいた抽出法を選抜した。検討した 2 種類は、100%メタノール抽出の後、A液（含水 70%メタノール）あるいはB液（95%メタノール）それぞれ 3 回抽出した。結果、セレウリド抽出率は A液では 99.6%~102%、B液では 97.5%~100.1%と、差が認められなかった。この結果に基づき、試験法には、取扱い易いA液の含水 70%メタノールとした。この検討により、セレウリドの米飯からの抽出工程に関し、結果に基づいた抽出法となった。

前処理カラムは 50%メタノールで平衡化する。通常は上記抽出物を濃縮し、カラムに添加するが、この度は、濃縮操作は行わず、抽出液に水を加えて 50%メタノール濃度とし、それを前処理カラムに添加した。この行程は、試験実施の時間と手間を短縮し、かつ、メタノール濃度をカラムと検体で一致させ、セレウリドの回収率の安定化に貢献していると考えられた。

平成 26 年度にセレウリド試験法を LC-MS/MS で検討した際、結果に問題はなかったが、LC に適応する有機溶媒のグラディエント組成が一般的なものでなかった。求めるセレウリドの検出ピークが、グラディエント終了後に設定されていたため、今年度は、グラディエント条件を変更し、ピークがグラディエント中に出現できるように調整した。本試験法は機器分析部門が使用する可能性が高く、同部門の専門家に違和感を与えない条件になったと推察する。

指定検査機関の 2 試験所において、勘案したセレウリド試験法を試行した。LC およびマススペクトルの成績を示す(図 1~6)。

試験法の性能評価を行った。添加回収試験の結果、真度は 94.3%及び 94.5%とコーデックス委員会の手続きマニュアル（手続きマニュアル）の範囲（10 ng/g : 60-115 %）内であり、国内の農薬等の妥当性評価ガイドラインの範囲（70-120%）も満たしていた。また、精度を $HORRAT_r$ で評価したところ、いずれも 2 以下であり、手続きマニュアルの範囲内であり、国内の農薬等の妥当性評価ガイドラインの範囲（ RSD_r : <25 %、 RSD_{rw} : <30 %）も満たしていた。この分析結果から、本試験法の性能が評価され、十二分に使用可能であることが示された。

検出限界については、食中毒事例の食品中のセレウリド濃度がその考察に役にたつ。緒言で述べたように、これまで報告されたセレウリド濃度は正確ではないが、検出感度の考察には有効と考える。安形らによる

と、嘔吐型セレウス食中毒の原因食のうち、米飯では数 10 ng/g 以上のセレウリドを検出している⁵⁾。この試験法の定量限界は 0.9 ng/g~4.0 ng/g を示した。報告されたセレウリド濃度から考え、試行したセレウリド試験法は十二分に検出感度を担保していると考えられる。図 7 にセレウリド試験法の流れを示す。本試験法はその性能が評価され、広く使用可能であることが示された。今後、本法が普及し、食中毒患者喫食品中のセレウリド濃度の正確な数値が測定され、蓄積してゆくことが望まれる。その結果、一般食品におけるセレウリドの食中毒危害性も評価が可能になると考える。

E. 参考文献

- 1) 獣医公衆衛生学教育研修協議会 編 「獣医公衆衛生学 I」セレウス菌、pp. 157-159. 文永堂出版、東京、2014.
- 2) 山中英明、藤井建夫、塩見一夫. 食品衛生学第三版、恒星社厚生閣、東京、2012.
- 3) Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M, A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus*

cereus. FEMS Microbiol. Lett. 129, 17-20, 1995.

- 4) Agata N, Mori M, Ohta M, Suwan S, Ohtani I, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. FEMS Microbiol Lett. 121:31-34, 1994.
- 5) Agata M, Ohta M, Yokoyama K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various food. Inter. J. Food Microbiol. 73, 23-27, 2002.

F. 研究発表

なし。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案取得

なし。

3. その他

なし。

表 1 A 試験機関が実施したセレウリドのメタノールによる抽出

抽出ステップ	抽出液種	セレウリド回収率 (%)			
		A 液		B 液	
		1	2	1	2
1	メタノール 100 mL	89.4	93	87.3	92.4
2	混液 50 mL	8.2	7.4	7.8	5.8
3	混液 50 mL	1.7	1.6	2	1.6
4	混液 50 mL	0.4	0.4	0.4	0.4
合 計		99.6	102.4	97.5	100.1

表 2 B 試験機関が実施したセレウリドのメタノールによる抽出

抽出ステップ	抽出液種	セレウリド回収率 (%)			
		A 液		B 液	
		1	2	1	2
1	メタノール 100 mL	93.1	92.7	90.8	91.1
2	混液 50 mL	7.3	5.3	4.9	4.8
3	混液 50 mL	1.3	1	1.4	1.7
4	混液 50 mL	0.3	0.3	0.5	0.4
合 計		102	99.3	97.5	98

表 3 実施したセレウリド試験法の真度及び精度

試験室	添加 濃度 (ng/g)	真度 (回収 率) (%)	併行精度 (RSD _r) (%)	室内精度 (RSD _{rw}) (%)	LOQ ^a (ng/g)	HORRAT _r ^b
A	5	94.5	0.8	2.0	0.9	0.2
B	5	94.3	3.7	8.6	4.0	0.8

^a室内精度の標準偏差 (SD) の 10 倍として算出した。

^b実測値(RSD_{rw})/計算値(PRSD_{rw})

なお、計算値は Horwitz 修正式を 2 で除し、“PRSD_{rw} = 11”として算出した。

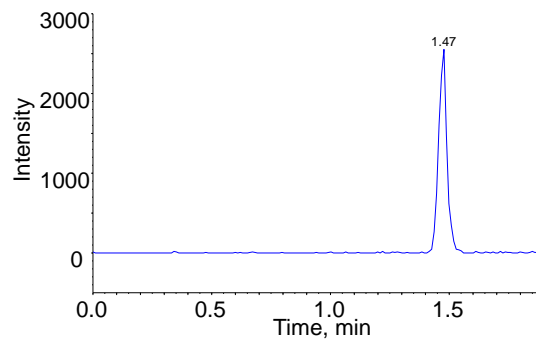


図1 セレウリド0.5 ng/mLのクロマトグラム例 (m/z 1171→172)

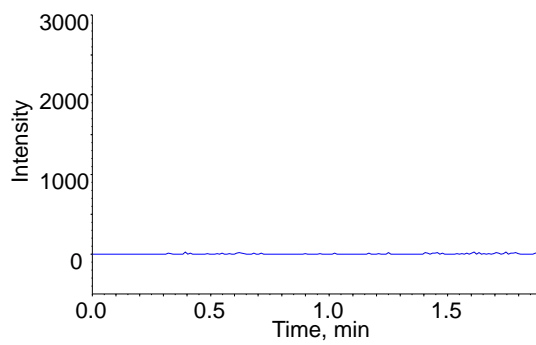


図2 無添加パックライスのクロマトグラム例 (m/z 1171→172)

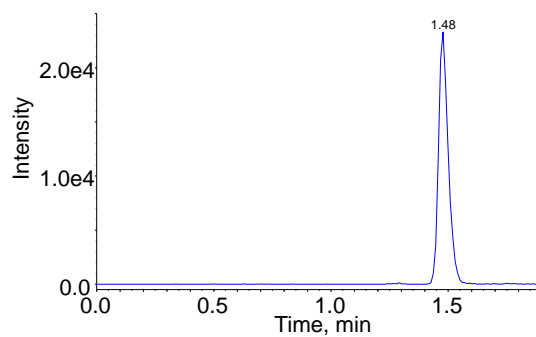


図3 セレウリド添加回収試験のクロマトグラム例 (m/z 1171→172)

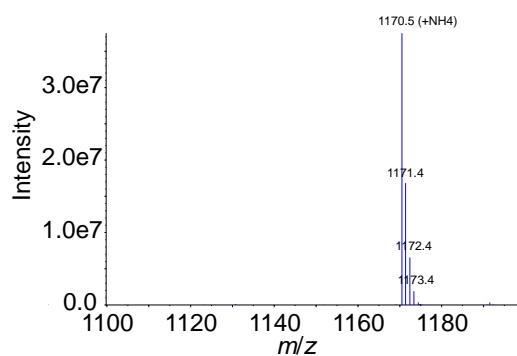


図4 セレウリドのマススペクトル スキャン範囲 m/z 500~1500
測定条件：ESI (+)、イオン導入孔収束電圧：41 V

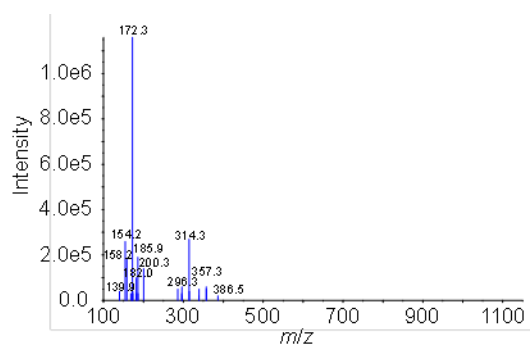


図5 セレウリドのプロダクトスキャンスペクトル プリカーサーイオン m/z 1171
測定条件：ESI (+)、イオン導入孔収束電圧：41 V、コリジョンエネルギー：117 eV

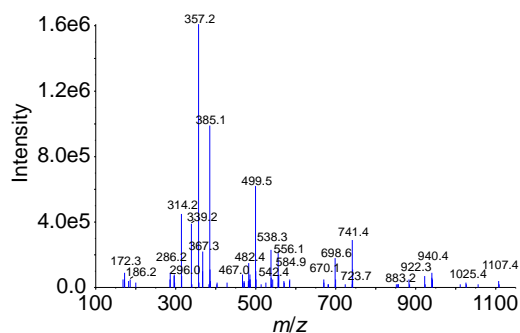
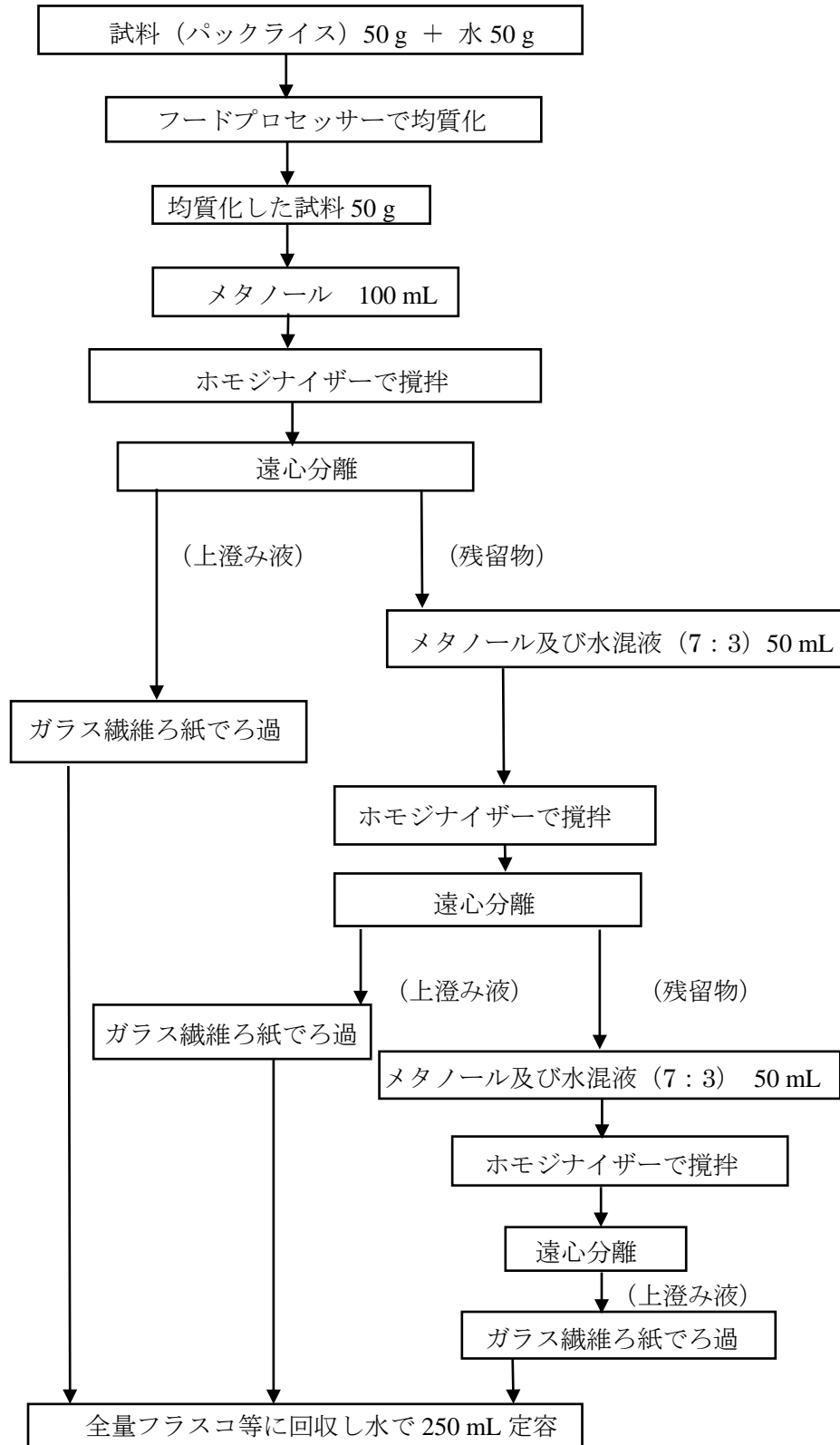


図6 セレウリドのプロダクトスキャンスペクトル プリカーサーイオン m/z 1171
測定条件：ESI (+)、イオン導入孔収束電圧：41 V、コリジョンエネルギー：75 eV

セレウリド試験法 フローチャート

1 : 均質化及び抽出



2 : クリーンアップ

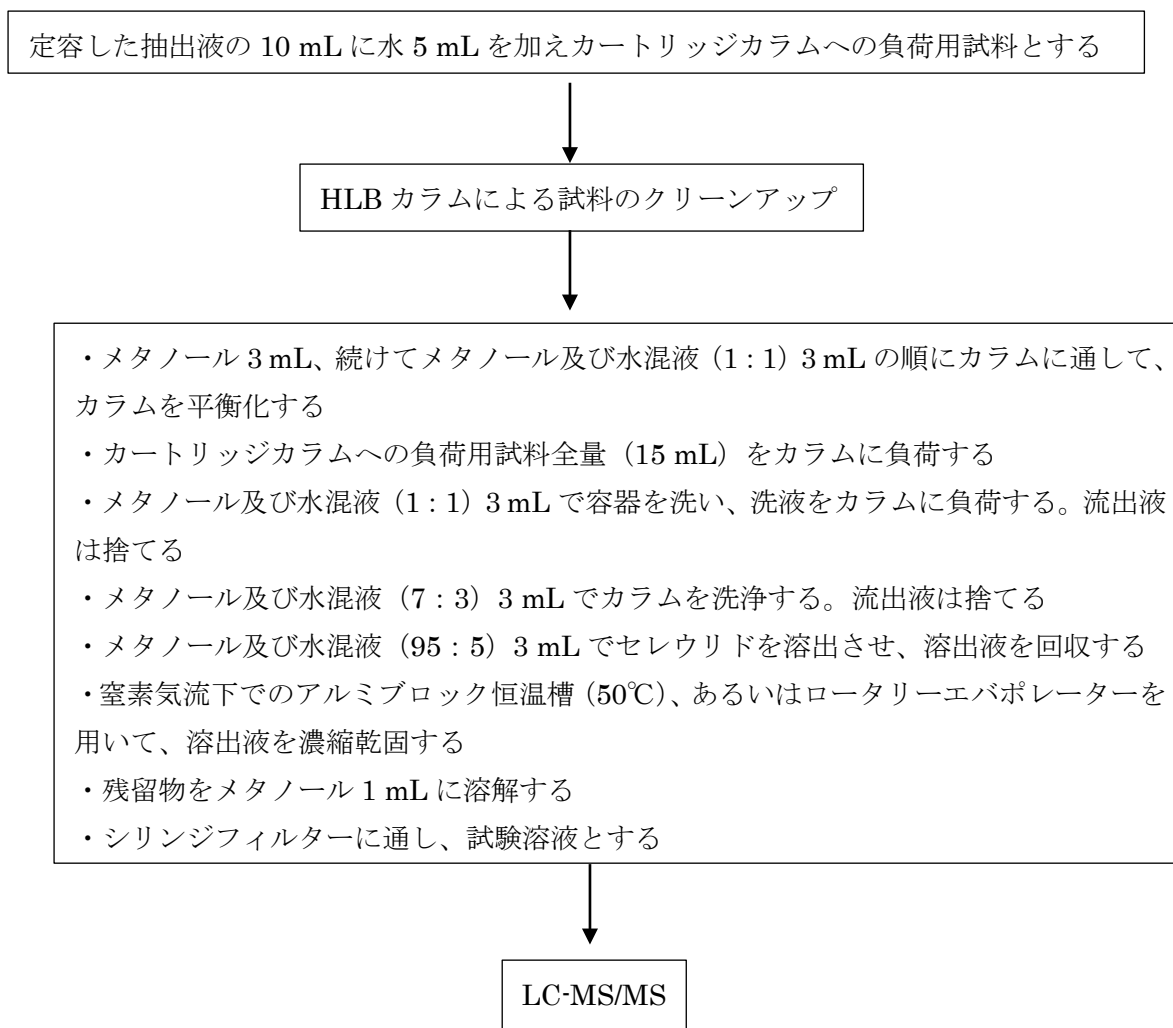


図7 セレウリド試験法のフローチャート