

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・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」

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 梶田 弘子 (岩手県環境保健研究センター 保健科学部)
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)
橘田 規 (日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター)

研究要旨：セレウス菌は農産物を汚染し、米飯、チャーハン、焼き飯などが原因の嘔吐型食中毒を引き起こす。症状発現物質は耐熱性ドデカデブシペプチドであるセレウリドで、広く食中毒危害性を有する。加熱によって菌が死滅してもセレウリドは残存し、そのため、食品中の危害性を保持し続ける。標準セレウリドが市販流通、安定供給されるようになった。質量分析装置を用いてのセレウリド試験法の策定を試みた。パックライスからのメタノールによる抽出法、平衡化した前処理カラムと同一のメタノール濃度になるようにした検体のカラム添加、LCのグラディエント条件、およびMS/MSの条件を検討した。その結果、無添加パックライス中に妨害イオンが検出されず、優良な絶対検量線が得られた。試験法の性能評価を行った結果、十分に利用可能な試験法の策定が可能となった。今後、食品のセレウリドに対する安全性の検証やセレウス菌食中毒原因食品からのセレウリド検出に、本法が利用されることを望む。

A . 研究目的

セレウス菌はグラム陽性の好気性桿菌で、嘔吐を引き起こす毒素を食品内に産生する。同毒素はセレウリドと呼称される。セレウリドは分子量 1,153 の耐熱性デブシ酸ペプチドで、食品加工中の加熱で失活しない。従って、一度産生されたセレウリドは、軽減減弱することなく食品中に残存する。

セレウリドの試験方法には、動物や細胞を用いたバイオアッセイ、質量分析装置を用いた機器分析法がある¹⁾。セレウリドの毒性を試験する方法論としては、その毒性である嘔吐症状を観察するのが病因論的に最も優れている。しかし、嘔吐現象はヒト、およびサルで観察されるもので、実験小動物ではスunks(ジャコウネズミ、*Suncus murinus*)に限定される。我が国においてスunksは、一部の研究機関が限定的に保有しており、まったく普及していない。従って、セレウリドを試験する際、動物実験を適応することが出来ない。また、動物実験の特徴として、比較的高濃度・高容量の対象検体が必要であること、微量分析できないこと、動物の個体差が大きいことがあげられ、食品中のセレウリドを試験する方法に動物実験を応用することには、相当の疑問がある。

セレウリドで処理を受けた HEp-2 細胞では、細胞質内に空胞が形成されることが示されていて、この空胞変性は、セレウリド特異的であることが証明されている^{1, 2, 3)}。セレウリドの Hep-2 細胞への影響

の作用点は細胞内のミトコンドリアであり、ミトコンドリアの膨化が細胞質内の空胞形成の本体であることも明らかになっている。一方、ミトコンドリアへの作用が嘔吐現象を誘発するものであるとは考えられず、同細胞における空胞変性が嘔吐現象に直接関連しないことも事実で、HEp-2 細胞を用いてセレウリド試験法を策定するという観点からは、その意義は一定のレベルで留まる。

機器分析技術が格段に進歩した現在、質量分析装置は、各種の物質の試験法に幅広く応用され、多くの成果を上げている。セレウリドは、4種類のデブシ酸およびアミノ酸が、3回繰り返し直列に配置され、かつ、それが環状構造をとっている³⁾。この単純でかつ複雑なセレウリドの構造が、セレウリドの有機化学合成を困難にしてきたが、最近、2社の化学試薬メーカーがその合成を成功させ、さらに、市販し、標準物として永続的に供給されるようになった。標準セレウリドは、和光純薬工業株式会社、および、林純薬工業株式会社から販売されている。

標準セレウリドの安定的供給があれば、各種の試験法を精密化できる。その中で、物質同定力が非常に優秀な質量分析装置は、「標準物」の適応に最も大きな恩恵を受ける。

日本で発生したセレウス菌食中毒の原因食品は、米飯およびチャーハン・ピラフといった米飯関連食品がほとんどを占める^{1, 2)}。本分担研究では、市販パックライ

スを検体として、上記の合成セレウリドを標準物として用い、質量分析装置によるセレウス菌嘔吐毒素セレウリドの試験法確立を目的とし、平成 26～28 年度にかけて検討した。最終的に性能が確認された試験法を策定した。

B . 実験方法

B-1. セレウリド、パックライス

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

B-2. パックライスへのセレウリド接種と抽出

パックライスを薬餌でよく攪拌した後、25 g 秤量し、ホモジナイザーカップに移した。メタノールに溶解したセレウリド (125 ng/mL) を 1 mL (5 ng セレウリド / g パックライス) パックライスに数か所ドロップした。暗所で 60 分放置した。

B-3. セレウリドの抽出と濃縮

パックライスにメタノール、含水メタノールを加え、攪拌後、ガラスろ紙あるいは遠心分離法で液体を回収し、セレウリドを抽出した。抽出は数回反復した。

ロータリーエバポレーターあるいは窒素ガスの噴射で抽出液を濃縮した。

B-4. 質量分析装置 LC-MS/MS あるいは LC-MS によるセレウリドの検出と定量

LC-MS/MS による分析例を以下に挙げる。

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

・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

・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)

LC-MS による分析例を以下に挙げる。

・機種: LC 部; Acquity UPLC [Waters 製]

・MS 部; Xevo TQ [Waters 製]

・カラム: Mightysil RP-18 GP, 2.0 mm

×50 mm, 3 μm[関東化学製]

・移動相:

A液; 0.1 vol%ギ酸及び10 mMギ酸アンモニウム溶液

B液; メタノール

・グラジエント:

A : B (20 : 80) 0 min

A : B (5:95) 2 min 10 min リニア

アグラジエント

A : B (80 : 20) 10.01 min

A : B (80 : 20) 10.01 min 13 min

A : B (20 : 80) 13.01 min

A : B (20 : 80) 13.01 min 16 min

保持

・カラム温度: 50

・流量: 0.2 mL/min

・注入量: 5 μL

・キャピラリー電圧: ESI(+); +3000 V

・イオン源温度: 150

・脱溶媒ガス温度: 600

・コーンガス流量: 窒素 50 L/Hr

・脱溶媒ガス流量: 窒素 1200 L/Hr

・コリジョンガス: アルゴン、0.15 mL/min

・設定質量数等:

プリカーサイオン(m/z): 1171

プロダクトイオン(m/z): 1126, 172, 357, 314

B-5. 試験法の性能評価

LCのクロマト、およびMSのマススペクトルを解析し、試験法の適否を評価した。さらに、添加回収実験による性能評価を行った。

C. 結果

C-1. LC-MS/MSによるセレウリド試験法の検討

和光純薬工業株式会社が供給するセレウリドを、LC/MS/MSで測定し、定性イオンとしてm/z 171.7、および定量イオンとしてm/z 1126.0はSN比10以上の良好なクロマトグラムが得られた。m/z356.8は不十分なSN比のクロマトグラムを示した。林純薬工業株式会社製のセレウリドも、同様の結果を示した。和光製および林製のセレウリド、それぞれについて、メタノールで0.01~10 ng/mLに希釈し、LC/MS/MSで測定、ピーク面積から絶対検量線を作製した。いずれのメーカーのセレウリドの検量線も、 r^2 0.9999と良好な直線性を示した

5 ng/gになるようにセレウリドをパッケージに添加し、静置後抽出、カートリッジカラムによるクリーンアップを行ったのち、LC/MS/MSによるセレウリドの定量を行った。3回実験を行った。定量イオンにおける分析値は2.66~2.80 ng/g、回収率は53.1~55.9%であった。

C-2. LC-MSによるセレウリド試験法の検討

セレウリドの検量線をLC-MSで作製した。1.0から10 ng/mlの範囲で、 $R^2=0.996$ の直線性を示した。溶媒のメタノールを注入した際のマススペクトルでは、アンモニウムイオン付加状態のセレウリドのm/z=1170付近に物質は検出されなかった。

一方、セレウリド注入時には、 $m/z=1171$ のイオンシグナルが観察された。しかしながら、夾雑イオンも多く検出され、セレウリドイオン検出は出来るものの、機器分析評価上は、疑問の残るところとなった。

$M/z=1171$ のシグナルを標的にセレウリドのバックライスへの添加回収実験を行った。回収率 81.2 から 90% を示した。本成績を基に、その妥当性を検証した。真度（回収率）86.3%、併行精度 RSD 2.2 %、および室内精度 RAD 4.2% を示した。この結果は、標的イオンを対象にすれば、LC-MS を用いてセレウリドの検出が可能であることを示すが、上述のように、セレウリドイオンの周囲に検出される夾雑イオンの存在は、機器分析の評価上、問題であることは否定できない。

C-3. 改良した LC-MS/MS によるセレウリド試験法の検討

図 1 に改良したセレウリド試験法のフローチャートを示した。改良法では、バックライスからのメタノールによる抽出と、前処理カラムへの検体の添加条件、および、適正な LC グラディエント条件を検討した。バックライスから 100%メタノールによる抽出後、含水メタノール(70%)による 3 回の抽出法を選抜した。抽出液を濃縮することなく希釈して 50%メタノールで平衡化した前処理カラムに添加する方法を採用した。その後、LC-MS/MS 分析を行った。

セレウリドを添加しないバックライスを分析（1 日 2 回分析を 1 日実施）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。

同一の添加試料（セレウリドを 5 ng/g の濃度で添加したバックライス）を、1 日 2 回分析を 5 日間繰り返した。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。

D. 考察と結論

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、市販のバ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 26 年度分担研究報告書）。

試験法の発展性も勘案し、LC-MS によるセレウリドの検出定量法を検討した。シングル MD ではあるが、セレウリドイオン特異的なシグナルは検出され、今後の LC-MS の利用の可能性はあるものの、セレウリドイオンの周辺に夾雑イオンが多数検出され、その制御が重要と判断された（平成 27 年度分担研究報告書）。周辺夾雑イオンの制御は機器管理で解決できることではあるものの、イオンの特異性という面では、MS/MS によるイオン検出原理の有

利性は非常に大きく、試験法への適合度から、MS/MS を試験法に用いることにした。

メタノール抽出条件、前処理カラムへの検体添加条件、LC-MS/MS の LC グラディエント条件を検討した。セレウリド無添加パックライスからは、妨害ピークは検出されなかった。LC クロマトではセレウリドの単一ピークが検出された。マススペクトルを検証したが、セレウリドイオン周辺に検出を妨害するイオンはなかった。この試験法の定量限界は 0.9 ng/g ~ 4.0 ng/g を示した。

改良した LC-MS/MS によるセレウリド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の範囲 (10 ng/g : 60-115 %) 内だった。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。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、本試験法は十二分に使用可能であることが示された。

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 以上のセレウリドが検出されている⁴⁾。本法の定量限界は

0.9 ~ 4.0 ng/g だったので、食中毒事例品についても、本法の利用は可能だろう。

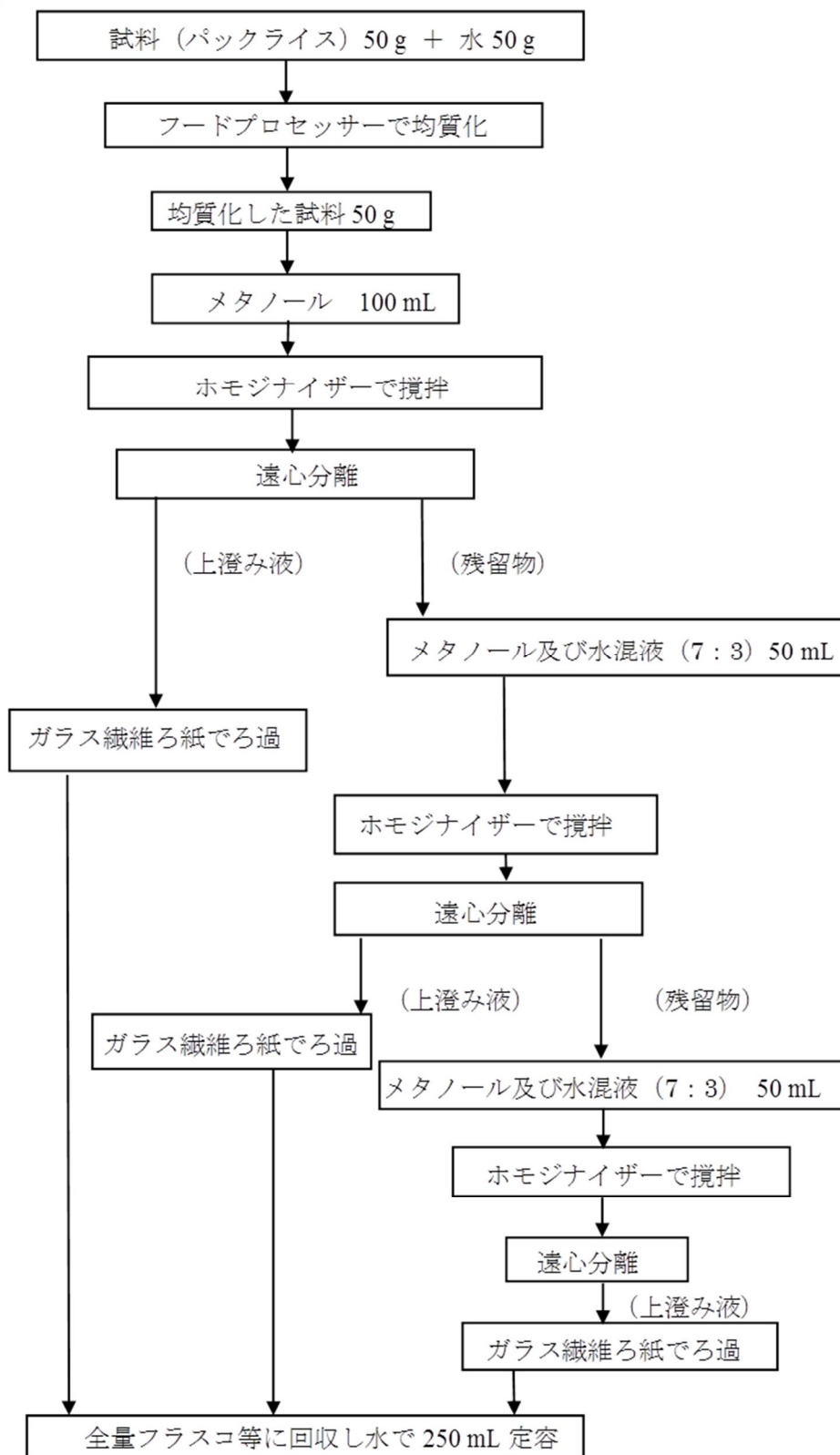
図 1 に改良した LC-MS/MS によるパックライス中のセレウリド試験法を示す。今後、本法が参考となり、パックライス以外の食品への適応、さらには、嘔吐型セレウス菌食中毒事例食品への応用を期待する。

E . 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, 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.
- 4) Agata M, Ohta M, Yokoyama K.
Production of *Bacillus cereus*
emetic toxin (cereulide) in various
food. Inter. J. Food Microbiol. 73,
23-27, 2002.

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

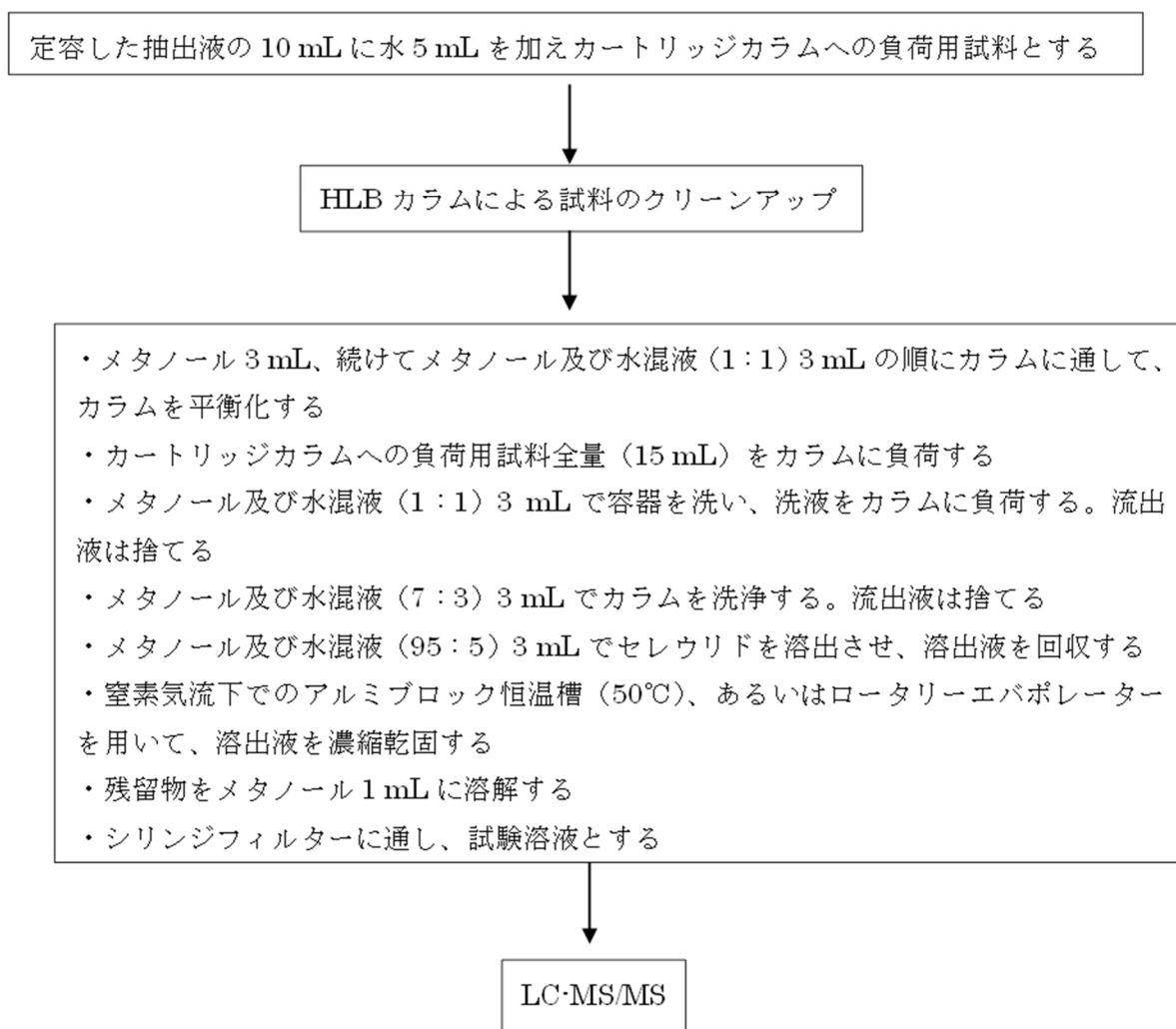


図1 セレウリド試験法のフローチャート