

## 健康危機事案を想定した模擬訓練結果(2020年度)

松永 尚子, 吉村 裕紀, 松尾 広伸, 山口 恵里果, 谷口 香織, 辻村 和也

### Training Results of Assuming Food Poisoning Outbreak (2020)

Naoko MATSUNAGA, Hiroki YOSHIMURA, Hironobu MATSUO, Erika YAMAGUCHI,  
Kaori TANIGUCHI and Kazunari TSUJIMURA

キーワード:健康危機管理、食中毒、リコリン、TLC、LC-QTOF/MS

Key words: health crisis management, food poisoning, lycorine, TLC, LC-QTOF/MS

#### はじめに

近年の健康危機は、健康食品事件や残留農薬の含まれた食品の流通、生物毒など多様で高度な対応を要するものに変容してきている。このような健康危機事案に的確に対応するため、地方衛生研究所の位置づけについては「地域保健対策の推進に関する基本的な指針(平成6年12月1日厚生省告示第374号)」の中で、「地方衛生研究所は、地域における健康危機管理の科学的・技術的中核となる機関として機能の充実強化を図ること、他地方衛生研究所等の関係機関と連携体制の構築を図ること」とされている。

こうした状況を踏まえて、地方衛生研究所全国協議会九州支部(以下、九地研と略)では、2006年2月に「九州ブロック地方衛生研究所広域連携マニュアル」を策定し、情報の共有、試験検査・技術研修の相互支援等広域連携を行い、地域保健総合推進事業の一環として九地研会員で毎年原因不明の健康危機事案を想定した毒性物質の定性・定量検査の模擬訓練を実施している。

当センター生活化学科でも本訓練に参加し健康危機管理における理化学検査体制の強化を図っている。本報告では、2020年度の実施内容と当センターの結果について報告する。

#### 実施方法

##### 1 実施期間

2020年11月2日～11月27日

##### 2 検体

事務局より送付された液体(豚汁)約50g

##### 3 実施体制

模擬訓練の進行調整役として訓練責任者を配置し、実施要領に従い演習を行った。

##### 4 シナリオ概要

社宅自治会が、敷地内の大清掃(草刈り・農薬散布)後に中庭で昼食会を開いた。昼食会では、おにぎり、豚汁等を調理し、飲み物等も準備した。共通食である豚汁の食材のうち、ニンジン、タマネギ、ジャガイモ等は複数の知人から譲受したものであった。豚汁等を喫食した複数名が、喫食後30分程度から気分不良、吐き気、おう吐などの症状を呈し、病院を受診した。病院の医師が食中毒と判断し、保健所に通報し、保健所から地衛研に検査依頼がなされたという設定であった。また、原因物質のために必要と思われる情報については適宜質問し追加情報を入手した。

##### 5 原因物質の探索および特定

###### (1) 候補物質の選定

喫食状況、患者症状、発症時間などの健康被害の特徴と除草剤散布の状況から、原因物質候補を選定し、その試験法等について情報収集を行った。

###### (2) 定性分析

(1)で選定した物質の含有を確認するために、薄層クロマトグラフィー(TLC)法、高速液体クロマトグ

ラフィ - 四重極飛行時間型質量分析 (LC/QTOF/MS)法およびガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)法による定性分析を実施した。また、選定された候補物質以外の物質についても、LC/QTOF/MS法およびGC/MS法を用いて探索した。高速液体クロマトグラフ - 四重極飛行時間型質量分析装置として、ウォーターズ株式会社製 Waters ACQUITY UPLC I-CLASS / Xevo G2-XS QTOF、ガスクロマトグラフ - 質量分析装置としてアジレントテクノロジー株式会社製 7890A/5975C GC/MSDを使用した。

### (3) 定量分析

(2)の定性分析で確認された物質について、LC/QTOF/MS法による定量分析を実施した。

### (4) 毒性量の推定、検証

候補物質の毒性量について、定量分析の結果から算出した含有量と毒性に関する文献等の情報と比較検討した。

## 6 模擬訓練事業結果検討会

模擬訓練後に結果検討会がWEB開催され、他機関との結果比較や演習時の課題等情報の共有を行った。

## 結果と考察

### 1 原因物質の探索および特定

#### (1) 候補物質の選定

原因物質候補として、タマネギと誤食したスイセンの有毒成分であるリコリン、ガランタミン、ジャガイモの有毒成分であるソラニン、有機リン系除草剤のグリホサートを選定した。

#### (2) 定性分析

検体及びブランク試料として市販の豚汁(ホモジナイザーで均一化したもの)約0.5 g(GC/MS用は5 g)を採取しアセトニトリルもしくはメタノール20 mLを加えて振とう(300回/分、10分間)し、0.2 μm遠心分離用フィルターチューブで遠心分離(3500 rpm、5分間)後、ろ過した。上清を分取し必要に応じ窒素パーージ(GC/MS用は減圧濃縮)で濃縮し試料溶液とした。

リコリンのTLCによる分析は南谷らの報告<sup>1)</sup>に準じて表1の条件で行った。その結果、リコリン標準液(リコリン塩酸塩一水和物(東京化成工業株式会社製)をメタノールで適宜希釈して調製)と同一の位置に検出した(図1)。また、LC/QTOF/MSの低エネルギー

モードの測定結果、検体抽出液からリコリン標準液と同じ保持時間(約2.2分)にピークが確認され、そのピークにm/z:288.1234のスペクトルが検出された。これは理論上のリコリンのプロトン付加体の精密質量数と比較し質量精度2 ppm以下であった(図2、3)。また、高エネルギーモードで検出されたマススペクトルもリコリン標準液と一致していた。GC/MSによる測定およびライブラリー探索の結果においても、リコリン標準液のスペクトルパターンと酷似し、その保持時間はリコリン標準液と一致していることを確認した。

一方、その他の候補物質であるガランタミン、ソラニン、グリホサートおよびその他原因物質になりうる物質はいずれの分析でも含有が確認できなかった。

以上のことから、原因物質をリコリンと断定した。

表1 TLC測定条件

薄層板	HPTLC Silica gel 60F <sub>254</sub> 10 × 10 (メルク社製)
展開溶媒	酢酸エチル/メタノール/2%アンモニア水(17/2/1, v/v/v)
滴下量	各10 μL(25倍濃縮のものは20 μL)
検出波長	365 nm

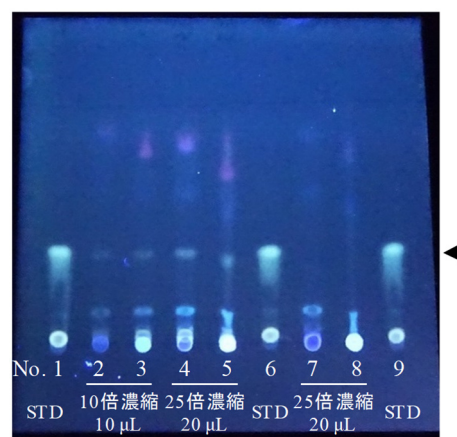


図1 リコリンのTLC結果

1,6,9: リコリン標準溶液(1000 ppm)10 μL、2,4: アセトニトリル抽出液、3,5: メタノール抽出液、7: ブランク(市販の豚汁、アセトニトリル抽出液)8: ブランク(市販の豚汁、メタノール抽出液)、NO.1,6,9:  $R_f=0.39$ 、No.2,3,4:  $R_f=0.38$ 、No.5:  $R_f=0.35$

#### (3) リコリンの定量分析

食品衛生検査指針<sup>2)</sup>の「リコリン」の試験法を参考に、定量用試料(n=3)、リコリン標準液添加試料(n=2、試料中濃度200 μg/g)、ブランク

試料として市販の豚汁を用いて図4のとおり各試料溶液を調製した。定量に用いたLC/QTOF/MS条件は表2に示す。定量には低エネルギーモードで取得したデータを用い、プロトン付加体 ( $m/z=288.1236$ )により解析した。検量線を図5に示す。0.1 ~ 100 ng/mLの範囲で決定係数0.9925 (相関係数0.9962) の良好な直線が得られた。定量の結果、検体抽出液中のリコリン濃度は49.7  $\mu\text{g/g}$ であった。添加回収率は95.4%であったことから前処理操作による損失はほとんどないと判断した。

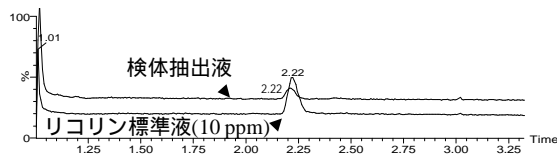


図2 リコリンの全イオンクロマトグラム

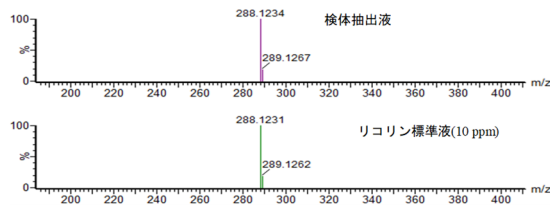


図3 リコリンのマスペクトル

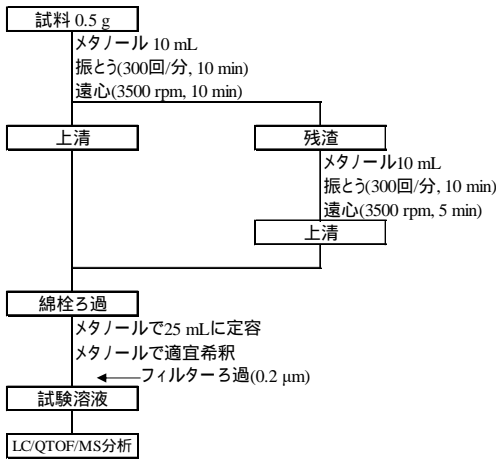


図4 試験溶液の調製法 (定量分析)

表2 LC-QTOF/MS分析条件

LC条件	
機器	Waters ACQUITY UPLC I-Class
分析カラム	XBridge C <sub>18</sub> , 3.5 $\mu\text{m}$ , 2.1 $\times$ 150 mm(Waters)
移動相	A:B=40:60(アイソクラティック) A 5 mMギ酸アンモニウムメタノール溶液 B 5 mMギ酸アンモニウム水溶液
カラム温度	40

流速	0.2 mL/min
注入量	5 $\mu\text{L}$
QTOF/MS条件	
機器	Waters Xevo G2-XS QTof
イオン化法	ESIポジティブモード
測定モード	MS <sup>E</sup> (データ非依存型スキャン)
キャピラリー電圧	2 kV
サンプルコーン電圧	40 V
コリジョンエネルギー	低エネルギー0V 高エネルギー15-35V(Ramp)
ソース温度	120
脱溶媒ガス温度、流量	500、1000 L/h
コーンガス流量	50 L/h
ロックスプレー	ロイシンエンケファリン(556.2771 m/z)
質量数測定範囲	m/z:50-800
スキャン時間	0.2秒

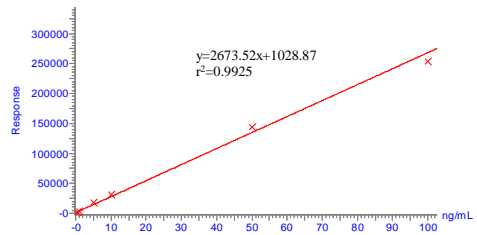


図5 リコリンの検量線(0.1 ~ 100 ng/mL)

#### (4) 毒性量の推定、検証

定量結果より、リコリンの有害量について検証した。豚汁100 gにスイセン根が16 g含まれると仮定すると、スイセン根のリコリン含有量は約310  $\mu\text{g/g}$ 、摂取量は4.97 mgと推定された。過去の食中毒事例におけるスイセン根のリコリンの含有量は約200  $\mu\text{g/g}$ との報告<sup>3,4)</sup>より値は妥当であると判断した。今回のリコリンの推定摂取量と健康被害の相関は、過去の食中毒事例において残品の濃度報告がないため判断できなかった。

#### (5) 模擬訓練事業結果検討会

結果検討会は、2021年2月25日にWEB開催された。模擬訓練事務局の結果報告書によると、食中毒の原因はスイセン鱗茎をタマネギと間違えたことによるものであり、原因物質はスイセンの毒成分であるリコリン、検体中のリコリン添加量は50  $\mu\text{g/g}$ であった。当センターの結果が原因物質としてリコリンと断定

し、定量結果の真度が99.4%であることから、定性、定量いずれにおいても分析の有効性が実証できた。

### まとめ

本訓練では、シナリオから原因物質を推定し情報収集、協議を繰り返しながら、複数の分析方法による定性、定量分析するという健康危機管理における検査体制を確認することができた。今後も幅広い視野を持って情報収集力と分析技術の向上に努め検査体制強化を図るとともに、九州ブロックの関係機関と連携・協力体制を維持していきたい。

### 参考文献

- 1) 南谷臣昭, 他: 誤食中毒における原因物質究明マニュアルに関する研究～食用ユリ近縁植物のアルカロイド(リコリン、ガランタミン、コルヒチン)分析～, 東海公衆衛生学会学術大会抄録集, 56, 41 (2010).
- 2) 食品衛生検査指針(理化学編) 2015, 928-931, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京 (2015).
- 3) 浦山豊弘, 他: LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討, 37, 125-128 (2013).
- 4) 茶屋真弓, 他: LC/MS/MSによる植物性自然毒の迅速一斉分析法の検討, 19, 67-71 (2018).