

研 究 報 告 編

I 報 文

藻場におけるブルーカーボンに関する研究 —魚群探知機を用いたアマモ場面積測定を試み—

粕谷 智之, 橋本 京太郎

一般に流通しているゴムボートと魚群探知機を用いて、大村湾におけるアマモ場面積の測定を行った。海底より20 cm以上の高さがある反応をアマモとした結果、判別精度は84%であり、魚群探知機は大村湾におけるアマモ場面積の調査手法として有効であることが明らかとなった。湾内の江上浦、琴海、三浦の3地点でアマモの分布を調べた結果、分布面積はおよそ3~20 haであった。また、魚群探知機のアマモと思われる反応の出現頻度から被度を求め、アマモの実勢面積を算出した結果、0.49~4.47 haであった。本調査では、アマモは水深8~9 mの地点に分布していることが明らかとなった。これらの水深は、同湾のアマモに関する既知の生息限界水深 (6.3 m) よりも深く、アマモ場はより広く分布している可能性がある。

キーワード：大村湾、炭素貯留量、音響、ブルーカーボンクレジット

はじめに

近年、地球温暖化の原因となる二酸化炭素 (CO₂) の吸収源として、海洋の藻場が注目されている¹⁾。藻場は海洋生物の産卵場として、また稚仔の生育場としての機能も有し、海洋の生態系の中で重要な役割を果たしていると考えられている²⁾。代表的な藻場として、アマモなどの海草で構成されるもの (アマモ場) と、ホンダワラなどの海藻で構成されるもの (ガラモ場)、アラメやカジメなどで構成されるもの (アラメ場)、マコンブなどで構成されるもの (コンブ場)、などが挙げられる。長崎県においては、藻場は外海にはアラメ場やガラモ場が、内湾にはアマモ場がある³⁾

海草や海藻などの海洋生態系内に吸収・貯留された炭素はブルーカーボンと呼ばれ、藻場のブルーカーボン貯留能力については様々な藻場で調査研究されており⁴⁾、単位面積当たりのCO₂吸収量は、アマモ場で4.9 t-CO₂/ha/年、ガラモ場で2.7 t-CO₂/ha/年、アラメ場で4.2 t-CO₂/ha/年、コンブ場で10.3 t-CO₂/ha/年と推計されている⁵⁾。本県は島が多いため海岸線距離が長く、藻場も多いことから、潜在的なブルーカーボン貯留場が多く存在している可能性がある。

藻場のブルーカーボンを定量するためには、分布面積のみならず、被度から実勢面積を求める必要があるが、藻場は海面目視などで観察可能な水深よりも深い場所にも存在している可能性もある。水深があるエリアでは水中ドローンやダイバーによる潜水目視による調査手法があるが、これらはコストが掛かるうえに、広範囲の調査には適していない。その他の手法としては、魚群探知機を用いた藻場調査の報告事例があり⁶⁾、こ

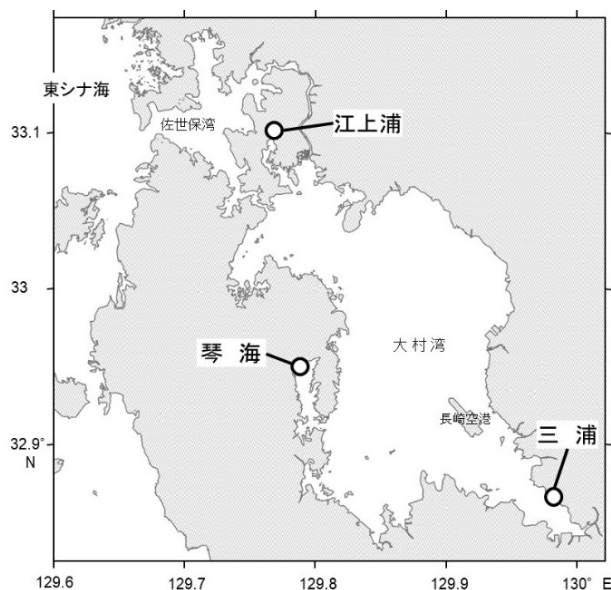


図1 調査地点

れならば広範囲を短時間で調査できるメリットがある。

長崎県環境保健研究センター (以下、センター) では、閉鎖性水域の調査用として、ゴムボートと船外機、魚群探知機、ハンディGPSなどを保有している。ゴムボートは全長3 m未満、船外機は2馬力以下のもので、いずれもレジャーなどでも利用されている、船舶操縦免許などを持たなくても使用できるものである⁷⁾。また、魚群探知機は一般に流通しているものである。本研究では、これらの機材を用いてアマモ場を調査して判別精度を求めるとともに、実勢面積の算出を行った。

表1 アマモ場調査に使用した主な機材リスト

器材名	メーカー、規格など
ゴムボート	アキレス製 ECU4-942(全長2.7 m), LF-295WB(全長2.95 m)
船外機	ホンダ製 BF2(2馬力) JMO製 SP-1(1馬力)
魚群探知機	ホンデックス製 PS-80GP(周波数200 kHz)
ハンディGPS	ガーミン製 Venture HC
デジタルビデオカメラ	ソニー製 HDR-XR500V キャノン製 iVHS HF M31
水中撮影用防水ケース	ソニー製 SPK-HCB(水深 5 mまで使用可能)

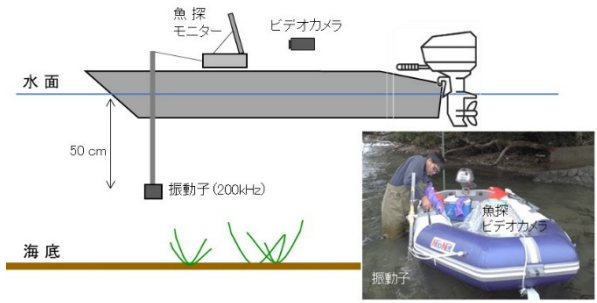


図2 調査器材概要

材料と方法

藻場の調査は、ガラモ場などよりもCO₂吸収量が高いアマモ場を対象とした。調査エリアは、環境省による調査³⁾でアマモ場が確認されている、大村湾内の江上浦(佐世保市)、三浦(大村市)、琴海(長崎市)の3エリアである(図1)。

調査は2023年8月～2024年2月にかけて、各エリア2回ずつ行った。調査に使用した機材は表1のとおりである。魚群探知機の振動子は航行する際に発生する気泡の影響を軽減するために、棒の先端に取り付け、水深50 cmの位置となるよう舷側に固定した(図2)。

予めハンディGPSに設定した調査ルートに沿って(図3)、ゴムボートを船速3ノット(約5.4 km/h)以下で走らせ、魚群探知機のモニターに映し出される海底から

のエコー画像を、デジタルビデオカメラに記録した。エコー画像は航走中に目視でも観察し、海底から20 cm以上の高さがある反応物が多く見られた地点のいくつかでは、停船して、水中ビデオカメラによる海底観察(図4)、または、熊手による反応物の採集を行い、アマモの有無を確認した(図5)。ハンディGPSで船の位置を1分ごとに記録し、観測終了後、センターでコンピュータに位置データを取り込み、エクセルファイルに変換した。

魚群探知機のモニターの映像確認はセンターで行った。大村湾のアマモ場は、繁茂期は6月から9月で、冬期は地上部の草体は減少するが⁸⁾、調査エリアの底質は砂泥で、岸沿いを除き海藻類などが生えている可能性は低い。そこで、ビデオ映像を再生し、海底から20 cm以上ある反応物が1分間に1つ以上出現した場合はアマモありと判定し、1分間に移動した画像内の

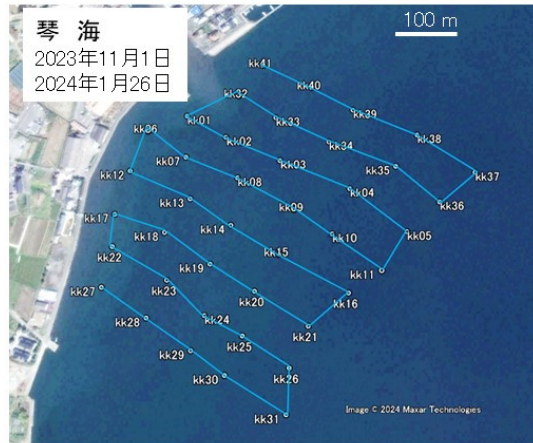
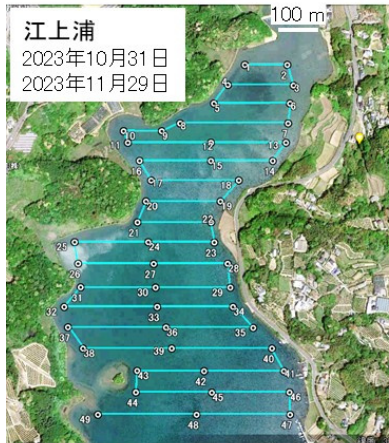


図3 GPSに設定した調査ルート例(実線)。海況などによりコースを変更した。写真中の日付は調査実施日である。衛星写真はGoogle Earthから引用。

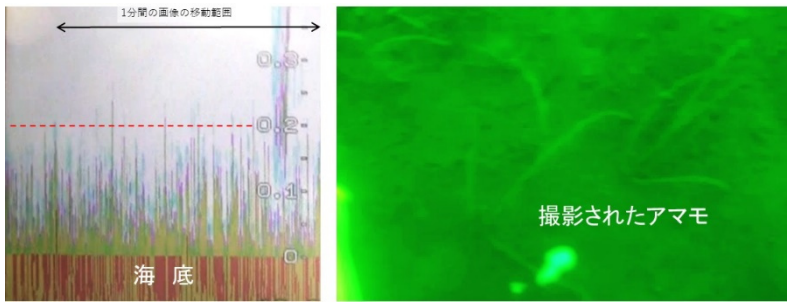


図4 2024年1月26日に琴海で実施した魚探によるアマモ場観測結果の一例(水深 5 m)。写真左:魚探のエコー画像。写真中の赤点線は海底から20cmの高さ、黒実線は1分間の画像の移動範囲を表す。画像は右から左へ移動していく。この時の被度は1と判定した。写真右:左写真のエコー画像の地点で撮影された海底のアマモの様子。

出現頻度から被度を推定した。一般に、被度はコドラートなどを用いた直接観察では、被度1(0<<5%)、2(5< <25%)、3(25< <50%)、4(50< <75%)、5(75< <100%)の5段階に分けられる⁹⁾。本研究では、直接観察ではないことから、アマモと判定したエコーの出現頻度は被度1(0<<25%)、3(25< <100%)の2段階とした。映像に記録された時間とハンディGPSに記録された時間と航走ルートから、被度と位置情報を同期させ、QGISを使用して面積を算出した。



図5 熊手の底引きによって採取されたアマモ

結果と考察

1 判別精度

被度3以上と判定された地点のいくつかで、水中にビデオカメラを下ろして観察した結果、江上浦では5地点中3地点でアマモが確認された(判別精度3/5、すなわち60%)。一方、琴海や三浦では殆どの地点で確認することができなかった。調査を行ったエリアの最大水深は、江上浦では4 m弱であるのに対して、琴海や三浦では9 m前後に達した。水深のある所では、アマモが生えていたとしても、泥の巻き上げやビデオカメラの視野角の影響で映っていない可能性がある。そこで、長さ10mのロープを結び付けた熊手に錘をつけ、海底を引きずることによってアマモの有無を調べた(図5)。

魚群探知機でアマモの有無を判定したと同時に、熊手を投入した結果、19地点中16地点で、アマモの有無の結果が一致し(表2)、判別精度は84%であった。魚群探知機による藻場有無の判別精度は70~90%であることから⁹⁾、本手法は大村湾におけるアマモ場調査に有効であることが明らかとなった。

表2 魚群探知機によるアマモの有無判定結果と熊手採取結果の比較。カッコ内の日付は調査日、網掛け部分は魚探反応と一致しなかったサンプルを表す。

海域	サンプル番号	魚探反応	熊手採集
		有:○ 無:×	採れた:○ 採れなかった:×
江上浦 (2023年11月29日)	1	○	○
	2	○	○
	3	×	×
	4	○	○
	5	○	×
	6	○	×
	7	○	○
	8	○	○
	9	×	×
琴海 (2024年1月26日)	10	×	×
	11	○	○
	12	○	○
	13	○	○
	14	×	×
	15	×	×
	16	○	×
	17	○	○
	18	○	○
	19	○	○

2 アマモ場面積

魚群探知機によるアマモ場面積の観測結果を図6に示す。江上浦では、調査したエリア内のアマモ分布面積は20.37 haであった。この内、被度1の面積は16.51 ha、被度3の面積は3.86 haであった。被度1の被覆割合は0<<25%、被度3では25< <100%であることから、中央の値をそれぞれ12.5%と62.5%とすると、江上浦のアマモの実勢面積は4.47 haと算出された。

同様に琴海におけるアマモの実勢面積を算出した。琴海は、調査したエリア内のアマモ分布面積は15.43 haであった。この内、被度1の面積は15.03 ha、被度3の面積は0.40 haであり、実勢面積は2.12 haと算出され



図6 アマモ場面積測定結果。薄い緑の網掛けは被度1、濃い緑の網掛けは被度3と判定されたエリアである。点は船の位置、実線は魚群探知機の測深値から求めた等深線を表す。測深値については、潮位による補正は行っていない。衛星写真はGoogle Earthから引用。

た。また、三浦では、調査したエリア内のアマモ分布面積は3.16 haで、被度1の面積は2.97 ha、被度3の面積は0.19 haであったことから、実勢面積は0.49 haと算出された。

本調査において、アマモが確認された最大水深は、江上浦では4 m、琴海および三浦では8~9 mであった。赤澤ら¹⁰⁾は、アマモの補償点光量(30 $\mu\text{mol} \cdot \text{photons}/\text{m}^2/\text{s}$ ¹¹⁾となる水深から、大村湾におけるアマモの生育限界水深を6.3 mと推定した。本研究によって、大村湾におけるアマモは水深8~9 mにも分布していることが明らかとなったことから、同湾のアマモ場は従来考えられていたよりもさらに広い可能性がある。

おわりに

近年、温室効果ガスの削減に加えて、やむを得ず排出される量に見合った温室効果ガス削減活動に投資する、つまりは海藻が吸収するCO₂を、CO₂を削減しきれない企業が買い取るというシステムである、クレジット化されたブルーカーボンの取り引き(例えば、Jブルークレジット制度^{® 12)})が発展しつつある。クレジットの認証申請では、藻場再生や保全の活動によってどれくらい藻場面積が増加したかなどの効果検証が必要となる。本研究で用いた器材は、一般に流通している比較的安価なものであることから、小規模な団体による

取り組みになどで利用しやすく、温暖化対策の促進に寄与すると考えられる。

参考文献

- 1) 国立研究開発法人 水産研究・教育機構:海草・海藻藻場のCO₂貯留量算定ガイドブック, (2023).
- 2) 朝倉邦友:藻場・干潟ビジョンの策定, 水産工学, **55**, 51-57(2018).
- 3) 環境庁自然保護局:藻場(長崎県), 第4回自然環境保全基礎調査 海域生物環境調査報告書(干潟、藻場、サンゴ礁調査), (1994).
- 4) 杉村佳寿, 他:博多港におけるブルーカーボンオフセット制度の創設と今後の展望, 土木学会論文集G(環境), **77**, 31-48(2021).
- 5) 桑江朝比呂, 他:浅海生態系における年間二酸化炭素吸収量の全国推計, 土木学会論文集B2(海岸工学), **75**, 10-20(2019).
- 6) 南 憲吏, 他:音響手法を用いた来留見ノ瀬周辺におけるガラモ場の分布推定, 日本水産学会誌, **78**, 171-179(2012).
- 7) 国土交通省:小型船舶操縦免許の制度, https://www.mlit.go.jp/maritime/maritime_mn10_000006.html, 国土交通省ホームページ(2024年5月30日アクセス).

- 8) 橋本京太郎: 大村湾におけるアマモ場の炭素貯留量の測定, *長崎県環境保健研究センター所報*, **68**, 112-114 (2022).
- 9) 水産庁: 広域藻場モニタリングの手引き, https://www.jfa.maff.go.jp/j/gyoko_gyozyo/g_gideline/, 水産庁ホームページ (2024年6月10日アクセス).
- 10) 赤澤貴光, 他: 藻場における水環境の改善に関する研究, *長崎県衛生公害研究所報*, **50**, 76-78 (2004).
- 11) 平岡喜代典, 他: 葉上浮泥と葉上付着物によるアマモの分布下限深度への影響, *第38回日本水環境学会年会講演集*, 158 (2004).
- 12) ジャパンブルーエコノミー技術協同組合: Jブルークレジット認証申請の手引き -ブルーカーボンを活用した気候変動対策 - Ver.2.2.1, https://www.blueeconomy.jp/files/jbc2022/20230331_J-BlueCredit_Guideline_v2.2.1.pdf, ジャパンブルーエコノミー技術研究組合ホームページ (2024年6月10日アクセス).

Study on blue carbon in seaweed beds: Measuring eelgrass (*Zostera marina*) beds using a fish finder

Tomoyuki KASUYA, Kyotaro HASHIMOTO

Using an inflatable boat and a fish finder, we measured the area of eelgrass (*Zostera marina*) beds in Omura Bay. Acoustic signals >20-cm in height from the seabed were identified as eelgrass, with an accuracy of 84%, indicating that a fish finder is an excellent instrument available for this purpose. At areas adjacent to Egamiura, Kinkai, and Miura in the bay, the eelgrass distribution area was ~3–20 ha. Based on the eelgrass coverage estimated using the occurrence frequency of acoustic signals for a minute, the net area of eelgrass was calculated to be 0.49–4.47 ha. In this study, eelgrass was also found to be distributed at depths of 8–9 m, which was deeper than those reported previously, suggesting a wider distribution of eelgrass beds in Omura Bay.

Key words: Omura Bay, Carbon storage, Acoustic method, Blue carbon credit

指定薬物検査目的で試買した植物片製品における 医薬品成分の検出事例

松尾 広伸, 吉村 裕紀, 辻村 和也

長崎県では、違法薬物の流通防止のため、指定薬物成分の混入の可能性がある植物片等の製品やいわゆる健康食品の買上調査を行っている。検査においては、対象成分を含め、違法性の疑いがある成分について広くスクリーニング分析を行う体制をとっている。

令和元年度及び令和2年度に行った、指定薬物成分の混入の可能性がある製品の買上調査にて、植物片3製品のスクリーニングの結果から、エフェドリン類の含有が示唆され、マオウを含有するいわゆる無承認無許可医薬品であることが疑われた。そこで、複数の質量分析計で詳細に分析を行ったところ、全ての製品から医薬品成分エフェドリン、プソイドエフェドリン、メチルエフェドリンを含むエフェドリン類5成分を検出した。さらに、これらの成分がマオウ由来であるか確認するために、PCRを行ったところ、3製品中1製品で、マオウ特異的塩基配列のPCR増幅が確認された。

キーワード：指定薬物、無承認無許可医薬品、エフェドリン、LC-MS、GC-MS、PCR

はじめに

長崎県では、違法薬物の流通防止のため、指定薬物成分の混入の可能性がある植物片等の製品やいわゆる健康食品の買上調査を行っている。検査においては、対象成分を含め、違法性の疑いがある成分について広くスクリーニング分析を行う体制をとっている。そのため、指定薬物は含有していないが、いわゆる無承認無許可医薬品と疑われる製品が検知される場合がある。医薬品に該当する成分本質(原材料)については、「専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト」に規定されているが、植物由来として規定されている成分も多い。そのような成分が含まれていることが疑われる製品においては、成分の含有に加え、植物由来の成分であることを示すことが求められる場合がある。

令和元年度及び令和2年度に行った、指定薬物成分の混入の可能性がある植物片等の製品の買上調査にて、植物片3製品から医薬品成分エフェドリン、プソイドエフェドリン、メチルエフェドリンを含むエフェドリン類5製品が検出された。さらに、これらの成分がマオウ由来のものであるか検討を行ったため、その内容を報告する。

材料および方法

1 試料

インターネットで買い上げた植物片3製品(R1-1, R1-2, R2-1)

2 試薬

エフェドリン(E)、プソイドエフェドリン(PE)、メチルエフェドリン(ME)、ノルエフェドリン(NE)、ノルプソイドエフェドリン(NPE)はメルク(株)製のメタノール溶液、メタノールは関東化学(株)製のLC-MS/MSグレード、tert-ブチルメチルエーテル、PFPAは富士フィルム和光純薬(株)製、MSTFAはジーエルサイエンス(株)製を用いた。

3 機器

GC-MSは、アジレント・テクノロジー(株)製7890A/5985C GC/MSD、LC-Q/TOFMSは、Waters製Xevo G2-XS Qtof、LC-TQMSは、アジレント・テクノロジー(株)製1290/6460Aを使用した。

4 前処理

既報¹⁾を参考に、フィンガーマッシャーを用いて磨砕した検体0.05 gをとり、tert-ブチルメチルエーテルを加え混和し、乾固させたのちメタノールに転溶した。適宜メタノールを用いて希釈し、試験溶液とした。

5 違法性のある成分のスクリーニング

GC-MS及びLC-Q/TOFMSによるスキャン分析を行

表1 LC-TQMS定量トランジション

成分	Precursor Ion	Product Ion	
		定量	確認
E	166.1	148.1	115.1, 91.1
PE	166.1	148.1	115.1, 91.1
ME	180.1	162.2	46.2, 43.1
NE	152.1	134.1	117.1, 115.1
NPE	152.1	134.1	115.1, 91.1

い、既製 (Cayman, SWGDRUG, NIST) 及びin-house (GC用、LC用) のデータベースを用いて成分含有の有無を確認した。GC、LCの分析条件は指定薬物検査のものを用いた²⁾。

6 エフェドリン類の分析

(1) GC-MSによる定性分析

既報^{1, 3, 4)}を参考に、E及びPEはMTFA誘導体を、NE及びNPEはPFPA誘導体を調製し、MEは誘導体化せず測定した。カラムはDB-5MS-DG (30 m x 0.250 mm, 0.25 μm, Agilent Technologies)、イオン化はEI (70 eV)、注入口温度250℃、注入モードはMEのみスプリットレス注入、他はスプリット注入 (1:10)を行った。昇温条件は70℃ (2 min)- (10℃/min)-280℃(5 min)とした。

(2) LC-Q/TOFMSによる定性

既報⁵⁻⁶⁾を参考に測定条件を設定した。カラムはACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 μm, Waters)を使用した。イオン化はESI positive、測定モードはMSe (m/z:100-800)、移動相A: 10 mM ぎ酸アンモニウムpH 3、移動相B: メタノール、流速0.4 mL/min、グラジエントはA:B=95:5 (0-8 min)→10:90 (8-13 min)→95:5 (13-15 min)とした。

(3) LC-TQMSによる定性及び定量

カラムおよび移動相はLC-Q/TOFMSと同様の条件とした。イオン化はAJS ESI positive、測定モードはMRMとした。トランジションを表1に示した。検量線範囲について、Eは50-500 ng/mL、PEは10-500 ng/mL、ME、NEおよびNPEは1-100 ng/mLとした。

7 PCRによるマオウ含有の確認

これら成分の由来としてマオウを疑い、既報⁷⁾を参考にプライマー(表2)を設計し、PCRによる確認を行った。

表2 PCRプライマー配列

Forward primer	Reverse primer
EphX2 : ttggatccttctctcttcttg (22 mer)	EphZ4 : gcatttctatgtttggcatg (21 mer)
EphX3 : tataaggaatttgaaatgatgatg (24 mer)	EphZ5 : gggatgatgacttggct (19mer)

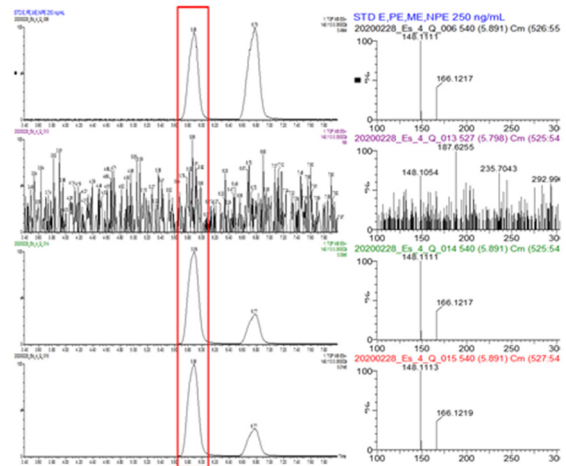


図1 LC-Q/TOFMSにて測定したエフェドリンのクロマトグラムおよびMSスペクトル a) 標準溶液 250 ng/mL b) 操作ブランク c) 検体R1-1 d) 検体R1-2

表3 エフェドリン類定量値範囲 (n=4, 製品中含量の単位: μg/g)

検体		E	PE	ME	NE	NPE
R1-1	最小値	145	42.6	8.54	5.73	5.47
	最大値	870	197	70.4	26.5	15.2
R1-2	最小値	791	170	26.5	24.6	18
	最大値	1157	589	104	55.9	118
R2-1	最小値	1010	234	49.7	95.1	49.5
	最大値	1990	595	83.9	156	120

結果および考察

1 違法性のある成分のスクリーニング

GC-MSにてエフェドリン、LC-Q/TOFMSにてメチルエフェドリンの含有が示唆された。

2 エフェドリン類の分析

(1) GC-MS及びLC-Q/TOFMSによる定性

検体の抽出液と標準溶液の分析結果を比較し、全ての成分について、溶出時間とMSスペクトルが一致した。図1にLC-Q/TOFMSにより測定したエフェドリンのデータを示した。

(2) LC-TQMSによる定性及び定量

定量結果を表3に示した。採取箇所の違いにより定量値のばらつきが認められたが、全ての成分が確認された。エフェドリンについては全ての検体で約1 mg/g相当の含有が確認された。

3 PCRによるマオウ含有の確認

1検体(R2-1)のみマオウ特異的塩基配列のPCR増幅が確認された(表4)。当該検体は他の検体より定量値が高く、マオウ含量の違いにより結果に差が生じた可能性があるが、他の検体にマオウが入っていない、または当該手法が最適でない可能性もあり、今後PCRプライマー再設計等の検討が必要であると考えられた。

表4 PCR確認結果

Primer (理論増幅長bp)	試料		
	R1-1	R1-2	R2-1
EphZ5+EphX2 (254 bp)	×	×	◎
EphZ5+EphX3 (181 bp)	×	×	◎
EphZ4+EphX3 (205 bp)	×	×	◎

×:増幅無し、◎:明確な増幅あり

まとめ

植物片製品から医薬品成分であるエフェドリン、プソイドエフェドリン、メチルエフェドリンが検出された。また、これらの製品からはノルエフェドリン、ノルプソイドエフェドリンも検出され、結果は医薬品成分の検出として薬務行政室に報告し、「医薬品成分が検出された製品について」として報道発表された。その後マオウ特異的塩基配列をターゲットにしたPCRにより、一部製品においてその存在が示唆された。

今回、指定薬物検査の依頼があった検体から医薬品成分が検出されたことで、検査項目に分析対象を絞らず幅広く分析を行うことが、違法性のある製品を排除する上で有用であると考えられた。

参考文献

- 1) 日本化学会編：食品衛生検査指針 理化学編 2015, pp.917-920, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京(2015).
- 2) 辻村, 他: 指定薬物の検査結果(2018年度), *長崎県環境保健研究センター所報*, 64, 138-139 (2018).
- 3) Guro F, Günter G., Investigation of the silylation of ephedrines using N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Nov 25; 811(2):201-8 (2004).
- 4) Emilia M, Manuela P, Roberta P, Piergiorgio Z, Simona P., A rapid and simple procedure for the determination of ephedrine alkaloids in dietary supplements by gas chromatography-mass spectrometry., *J Pharm Biomed Anal.* Aug 28;41(5):1633-41(2006)
- 5) Mark C Roman., Determination of Ephedrine Alkaloids in Botanicals and Dietary Supplements by HPLC-UV., *JAOAC Int.* 87(1): 1-14 (2004).
- 6) 安藤, 他: 超高速液体クロマトグラフータンデム質量分析計(LC-MS-MS)を用いた覚醒剤中の残存エフェドリン類の分析方法の検討について, *関税中央分析所報*, 57, 103-107 (2017).
- 7) Natascha T , Ikhlas A K, Zhiqiang P, Brian E., The use of polymerase chain reaction (PCR) for the identification of ephedra DNA in dietary supplements., *Planta Med.* Feb;72(3):241-7 (2006).

A report on the detection of pharmaceutical ingredients in plant fragment products purchased to survey illegal drugs

Hironobu MATSUO, Hiroki YOSHIMURA and Kazunari TSUJIMURA

Nagasaki Prefecture conducts purchase inspections of products such as plant fragments and “health foods” that may be contaminated with certain designated drug ingredients to prevent the distribution of illegal drugs. For the inspections, a system is in place to conduct a broad analytical screening of the ingredients suspected to be illegal, including the target ones.

During the inspections of purchased products conducted in the first and second fiscal years for the possibility of contamination with designated drug ingredients, the screening of three plant fragments suggested that they contained ephedrine. It was suspected that they were “unapproved and unlicensed” drugs containing mallow. Therefore, we conducted a detailed examination using several mass spectrometers and detected five ephedrine components, including the pharmaceutical ingredients ephedrine, pseudoephedrine, and methylephedrine, in all products. Furthermore, PCR confirmed these components to be derived from Mao. PCR amplification of Mao-specific nucleotide sequences was confirmed in one of the three products.

Key words: illegal drug, pharmaceutical ingredients, Ephedrine, LC-MS, GC-MS, PCR

LC-MS/MSによる食品中不揮発性腐敗アミン類の一斉分析法の検討

松尾 広伸, 谷口 香織, 辻村 和也

食中毒発生時の迅速な原因究明を目的として、LC-MS/MSを用いた食品中の不揮発性腐敗アミン類8成分の一斉分析法の確立に向け、条件の検討を行った。確立した分析法において、鮮魚および調理品を用いて添加回収試験を行ったところ、食中毒の原因となる成分であるヒスタミンおよびチラミンにおいては、それぞれ回収率は、82.6～95.1%、100～109%、その他6成分中5成分で、回収率は50～200%の範囲であり、食中毒時の原因究明としては、十分な回収率であると考えられた。さらに、本分析法を過去の食中毒試料および温度管理し作製した疑似食中毒試料に適用したところ、全ての試料から、食中毒を引き起こしうると考えられる濃度のヒスタミンを検出し、さらに、その他7成分についても、全ての試料からいずれかの成分を定量できた。これらから、食中毒時の不揮発性腐敗アミン類の迅速一斉分析法として、本手法は有効であると考えられた。

キーワード：不揮発性腐敗アミン類、ヒスタミン、食中毒、LC-MS/MS

はじめに

ヒスタミン(HA)は、鮮度の低下等により魚体中のアミノ酸が変化することによって生じる不揮発性アミン類(NVA)であり、アレルギー様食中毒の原因となる。その他のNVAとして、チラミン(Tyr)は、チーズやアルコール飲料等に多量に含まれた場合に、頭痛や血圧上昇の原因となる可能性が知られている。

HAは加熱しても分解されないため、一度産生されると、加熱調理がなされた食品であっても、食中毒の原因となる。登田らの調査¹⁾によると、HA食中毒事例における生ものの割合は7%であり、多くの場合、鮮度の落ちた魚類を加熱調理することで、食中毒が引き起こされていると考えられる。そのため、食中毒の原因究明の際には、生魚だけではなく、調理品においても、迅速かつ正確にHAを分析できることが重要である。

また、HAのみならず、その他のNVAは、同時に摂取された場合、HAの作用を増強する可能性が報告されている¹⁾ため、これらを把握することも食品衛生上重要である。

長崎県では平成30年度に2件、平成31年度に1件、給食施設からHAが原因と疑われる食中毒が発生しており、HA食中毒に対応する体制の充実が必要と考えられた。そこで、本研究においては、生魚および食中毒事例の多い調理品において、HA、Tyr、プトレシン(Ptr)、カダベリン(Cad)、スペルミジン(Spe)、アグマチン(Agm)、2-フェニルエチルアミン(PhA)、

トリプタミン(Try)を分析対象として、NVAの一斉分析法の検討を行ったため、報告する。

材料および方法

1 試料

大村市内のスーパーマーケットで購入したブリ、マグロ、サバを細切・均一化して試料とした。

2 試薬・器具

標準品は、HA二塩酸塩は関東化学(株)製、チラミン塩酸塩(食品分析用)、プトレシン二塩酸塩(食品分析用)、カダベリン二塩酸塩(食品分析用)、スペルミジン三塩酸塩、2-フェニルエチルアミン、トリプタミンは富士フィルム和光純薬(株)製、アグマチン硫酸塩は東京化成工業(株)製を用いた。

その他の試薬は、アセトニトリル(LC-MS用)、ギ酸(特級)は関東化学(株)製、1mol/L ギ酸アンモニウム溶液は富士フィルム和光純薬(株)製を用いた。

精製水は、富士フィルム和光純薬(株)製を用いた。

器具は、セラミックホモジナイザはアジレント・テクノロジー(株)製の50 mL用、遠心分離フィルター(0.45 μ L)はsystech(株)製、フィルターバイアル(0.20 μ L)はGVSジャパン(株)製を用いた。

3 前処理方法

前処理方法について、図1に示す。

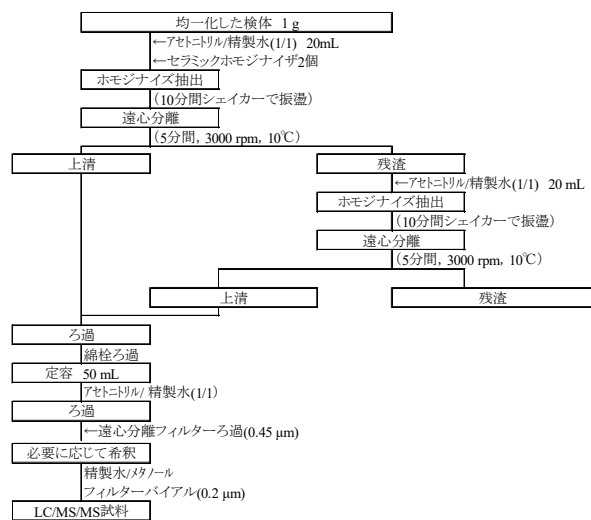


図1 前処理フロー

4 装置および分析条件

LC-MS/MSは、アジレント・テクノロジー（株）製 1260/6460Aを用いた。

(1) LC条件

- ・カラム：RESTEK（株）製 Allure PFP Propyl (2.1×150 mm, 5 μm)
- ・カラム温度：40 °C
- ・流速：0.2 mL
- ・移動相：A液：0.1%ギ酸、B液：ギ酸/ 1Mギ酸アンモニウム/メタノール(0.1/2/100)
- ・グラジエント条件：B10%(0-5 min)-B10→90%(5-10 min)-B90%(10-15 min)-B10%(15-20 min)
- ・注入量：1 μL

(2) MS/MS条件

- ・イオン化法：AJS（Agilent Jet Stream）-ESI
- ・極性：ポジティブ
- ・測定モード：MRM
- ・イオン源温度：350°C
- ・シーガス温度：350°C

化合物ごとのプリカーサーイオン(Q1)、プロダクトイオン(Q3)、フラグメンター電圧および衝突エネルギー(CE)については表1に示した。

表1 MRM分析における条件

化合物	Q1>Q3(定量) (m/z)	Q1>Q3(確認) (m/z)	フラグメンター 電圧(V)	CE(定量) (eV)	CE(確認) (eV)
HA	112>95	112>68	80	13	21
Tyr	138>121	138>77	80	29	7
Ptr	89>72	89>30	110	9	21
Cad	103>86	103>41	80	5	21
Spe	146>72	146>112	80	7	13
Agm	313>72	313>60	72	13	9
PhA	122>105	122>77	72	9	33
Try	161>144	161>117	72	25	7

結果および考察

1 MS/MS条件の検討

MS/MSトランジション、フラグメンター電圧およびCEは、Masshunter Optimizer(アジレント・テクノロジー株式会社)を用いて最適化し、最も強度の高いMS/MSトランジション、フラグメンター電圧およびCEの組み合わせを測定条件として選定した。

2 LC条件の検討

NVAは高極性塩基性化合物であることから、通常条件でのODSカラムではカラムに保持させることが難しい。そのため、HILICカラムを用いた報告^{2)~3)}がこれまで多くなされている。今回は、アルカリ性移動相条件下でのODSカラム、HILICカラム、マルチモードカラム、PFPカラムに分類される計6種のカラムを用いて、移動相条件を変えながら、検討を行った。アルカリ性移動相を用いたODSカラムおよびHILICカラムにおいては、Cad、Ptr、Speが溶出しにくい、もしくはピーク形状がブロードであり、マルチモードカラムにおいては、Speのピーク形状がブロードであった。PFPカラムにおいては、ギ酸のみの条件においては、PhAとTyrが溶出しなかったが、ギ酸アンモニウムを添加することで、これらが溶出するようになり、また、全体的にピーク形状の改善が確認できた。さらに、アセトニトリルからメタノールに有機溶媒を変更することで、分離の改善が確認できた。これらのことから、PFPカラムを選定した。定量範囲を確認したところ、全ての対象化合物について、5~100 ng/mLの範囲内で、決定係数R² ≥ 0.99の良好な直線性を確認した。

3 前処理方法の検討

食中毒発生の際は、迅速な対応が求められるため、簡便な前処理方法が望ましい。そこで、アセトニトリルによる除タンパク効果を期待して、抽出溶媒はアセトニトリル/水(1/1)として、セラミックホモジナイザを用いた粉碎抽出を2回繰り返すのみの、簡便な抽出方法を採用した。試料によっては、フィルターバイアルに通す際に、強い抵抗がある場合があったため、その前に遠心分離フィルターろ過を追加したところ、改善が見られた。

FAO/WHO合同専門家会議は、HAの経口摂取によるNOAELである健康な成人1人あたり50 mgを食中毒の発症の閾値としており、1食あたりの最大喫食量250 gを基に、有害な影響が認められない

表2 添加回収試験の結果

成分	サバの切り身		ブリの切り身		サバの竜田揚げ		ブリの照り焼き	
	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
HA	87.7	7.3	82.6	1.7	88.4	5.1	95.1	2.4
Tyr	106	4.6	100	0.8	110	1.8	110	0.7
Ptr	69.5	13.3	90.9	2.1	68.4	7.9	80.2	4.7
Cad	70.9	7.8	88.7	1.7	70.7	5.3	79	2.0
Spe	87.4	15.9	44.5	6.9	27.1	23.6	42.5	33.3
Agm	91.9	6.1	87.4	3.2	83.3	4.7	95.3	2.9
PhA	123	13.2	97	0.5	118	1.4	118	1.4
Try	131	23.5	97	0.6	119	0.5	118	1.3

表3 NVA含有試料での検証の結果

検体	平均検体中濃度(μg/g)							
	HA	Tyr	Ptr	Cad	Spe	Agm	PhA	Try
疑似食中毒検体①(サバの切り身)	1660	954	585	1430	-	113	626	86.7
疑似食中毒検体②(マグロの切り身)	8970	-	-	500	-	-	3.50	-
サバの味噌煮	299	34.4	4.50	62.1	-	40.5	3.91	-
サバのフライ	1310	21.4	9.7	119	5.94	18.6	2.37	-
イワシのすり身揚げ	1610	236	10.6	202	-	267	39.3	3.13

とされる食品中HAの最大濃度を200 μg/g (原単位はmg/kg)と定めている⁴⁾。この最大値が200 μg/gであることを考慮して、ブリの筋肉およびブリの照焼を用いて、それぞれの抽出液の100倍希釈液にNVA8成分の混合標準液を40 ng/gになるよう添加後、分析を行い、マトリクス効果の検証を行った。マトリクスによる定量値への大きな影響は確認されず、本前処理法においては、抽出液を100倍以上希釈することで、生魚および調理品の定量分析が可能であると考えられた。

4 分析方法の検証

(1) 添加回収試験

HAのCODEXの衛生・取扱い基準値である200 μg/gになるように、NVA8成分を、ブリおよびサバの切り身、ブリの照焼、サバのフライに添加し、添加回収試験(試行回数n=5)を行った。試料の種類は、食中毒事例の多い食品から選定し、調理品については、WEB上の一般的と考えられるレシピを用いて調理した。結果を表2に示す。NVAの内、有毒な作用が確認されている、HAは82.6~95.1%、Tyrは100~109%であり、良好な結果が得られた。その他のNVAについては、Spe以外は、50~200%の範囲を満たしていた。各並行精度も、Spe以外は概ね良好な値を得られた。HAとTyr以外のNVAは単独の毒性は確

認されておらず、スクリーニングとして大まかな濃度が把握できれば十分であり、Speについては、食中毒における検出事例は少なく優先度は低いため、食中毒時の原因究明のための分析法としては、有用であると考えられた。

(2) NVA含有試料での検証

サバおよびマグロの切り身を26℃で4日間保存したものを、疑似食中毒試料とした。これらと過去の食中毒時の残食品3試料について、確立した分析法を適用した。結果を表3に示す。全ての試料から、食中毒を引き起こしうると考えられる濃度のHAを検出し、さらに、その他7成分についても、全ての試料からいずれかの成分を定量できた。これらのことから、本分析法によって、HAやTyrといった毒性のあるNVAの定量に加え、それ以外のNVAのHAの毒性増強作用の把握が可能であると考えられた。

まとめ

食中毒時の迅速な原因究明を目的として、LC-MS/MSを用いた食品中の不揮発性腐敗アミン類8成分の一斉分析法の検討を行った。確立した分析法において、生魚および調理品を用いて添加回収試験を行ったところ、食中毒の原因となる成分であるHAおよびTyrにおいては、それぞれ回収率は、82.6

～95.1%、100～109%、その他6成分中5成分で、回収率は50～200%の範囲であり、食中毒時の原因究明としては、十分な回収率であると考えられた。さらに、本分析法を過去の食中毒試料および作成した疑似食中毒試料に適用したところ、全ての試料から、食中毒を引き起こしうると考えられる濃度のHAを検出し、さらに、その他HAの作用を増強する可能性がある7成分についても、全ての試料からいずれかの成分を定量できた。これらから、食中毒時の不揮発性腐敗アミン類の迅速一斉分析法として、本手法は有効であると考えられた。

参考文献

- 1) 登田, 他: 国内外におけるヒスタミン食中毒, *国立衛研報*, **127**, 31-38 (2009).
- 2) 西名, 他: LC/MS/MSを用いた食品中不揮発性腐敗アミン類の迅速一斉分析法の検討, *熊本県保健環境科学研究所報*, **44**, 38-47

(2014).

- 3) 宇川, 他: 食品中のヒスタミン等不揮発性アミン類等の一斉分析法の検討, *愛媛衛環研年報*, **20**, 6-9 (2017).
- 4) 5) FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization], *Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report, Italy, FAO and WHO, 2013, 126 p.* (ISBN 978-92-5-107849-5)

Simultaneous Analysis of Nonvolatile Putrefactive Amines in Foods by LC-MS/MS

Hironobu MATSUO, Kaori TANIGUCHI and Kazunari TSUJIMURA

We investigated a simultaneous LC-MS/MS-based analytical method for eight non-volatile putrefactive amines in foods to rapidly determine the cause of food poisoning. When the established analytical method was tested using raw fish and cooked products, the recovery of histamine and tyramine, which are the components that cause food poisoning, ranged from 82.6 to 95.1% and 100 to 109%, respectively. The recoveries of 5 out of 6 other components ranged from 50 to 200%. These recovery rates were considered sufficient for determining the cause of food poisoning. Furthermore, as a result of analyzing food poisoning specimens that had been stored and mock food poisoning samples that had been prepared using this method, histamine was detected in all samples at concentrations that could potentially cause food poisoning. In addition, one among the other seven non-volatile putrefactive amine components was also detected and quantified in all samples. These results suggest that this method is effective as a rapid simultaneous analytical method for nonvolatile putrefactive amines involved in food poisoning.

Key words: Non-volatile Putrefactive Amines、Histamine、Food poisoning、LC-MS/MS