

LC/MS/MS による嘔吐毒セレウリドの分析

梶田弘子 岩淵香織 藤井伸一郎 畠山えり子

Quantitative analysis of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus* by LC/MS/MS

Hiroko KAJITA, Kaori IWABUCHI, Shinichiro FUJII and Eriko HATAKEYAMA

(Research Inst. for Env. Sci. and Public Health of Iwate Pref.)

要 旨

高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) を用いて *Bacillus cereus* による嘔吐型食中毒の原因毒素であるセレウリドの定量法を検討した。本法による試料 4 種 (米飯、チャーハン、マカロニグラタン、スキムミルク) の回収率は 71.7~90.6%、相対標準偏差は 16.3%以下、検出下限値は 1ng/g であった。食品に嘔吐毒産生菌を接種し経時的にセレウリド量を測定したところ、30 保存の場合、18 時間後に食中毒を発症させるレベルのセレウリドが産生された。

Key words: セレウス菌 *Bacillus cereus*, 嘔吐毒 emetic toxin, セレウリド cereulide, 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 LC/MS/MS

緒 言

Bacillus cereus は土壌など自然環境に広く分布し、食品を汚染する機会が多く、衛生的に取り扱われなかった場合、食品の腐敗や変敗を起こすことが知られている¹⁾。*Bacillus cereus* による食中毒は、エンテロトキシンによる下痢型とセレウリドによる嘔吐型があり、わが国においては嘔吐型が多く報告されている。嘔吐型食中毒を確定するにあたっては原因食品から分離株の毒素産生能の確認とセレウリドを検出することが重要である。セレウリドの検出法として HEp-2 細胞の空胞化変性を観察する生物学的検査法²⁾があるが、培養に数日要し簡便性、迅速性に欠ける。今回、当センターにおける健康危機管理体制強化を目的として、LC/MS/MS によるセレウリドの迅速分析法を検討するとともに、食品に嘔吐毒産生菌を接種しセレウリド産生能について検討した。

実験方法

1. 試料及び試薬

試料: 市販の米飯 (真空レトルトパック製品) 冷凍食品であるチャーハン、マカロニグラタンおよびスキムミルクを用いた。

使用菌株: 嘔吐型食中毒由来 *B.cereus* 菌 (セレウリド産生陽性)

使用培地: NGKG 寒天基礎培地

標準品: セレウリド標準品はバイオコントロール研究所製の精製セレウリド (1mg 当量/mL)、内部標準物質として CALBIOCHEM 社製のバリノマイシンを用いた。

標準溶液: セレウリドは標準品 1mL を 95%メタノール溶液で 10mL とし、標準溶液 (100 µg/mL) を調製した。バリノマイシンは標準品 10mg を精秤、メタノールに溶解して 10mL とした。検量線作成および添加回収試験は 95%メタノール溶液で適宜希釈したものを使用した。

固相抽出用カートリッジカラム: Waters 社製 Oasis HLB (60mg) を用い、メタノール 5mL、50%メタノール溶液で順次コンディショニングしたものを用いた。

除粒子フィルター：ADVANTEC社製
DISMIC-13HP (0.2 μm)

2. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent社製 1100シリーズ、質量分析装置：Applied Biosystems社製 API4000

3. HPLC条件

分析カラム：Agilent社製 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.5 μm, 2.1 I.D. × 50mm)、カラム温度：60、移動相：A液0.1%ギ酸、B液メタノール、グラジエント条件：0分(A:B=20:80) 2~10分(A:B=5:95) 10.01~13分(A:B=80:20) 13.01~16分(A:B=20:80)、流速：0.2mL/min、注入量：10 μL

4. MS条件

イオン化：エレクトロスプレーイオン化(ESI) ポジティブモード、分析モード：Multiple Reaction Monitoring(MRM)モード、イオンスプレー電圧：5.5kV、イオンソース温度：700

5. 検量線の作成

得られたクロマトグラムのピーク面積から、内部標準法により作成した検量線を用いてセレウリド濃度を求め試料中の含量を算出した。

6. 試験溶液の調製

米飯、チャーハンおよびマカロニグラタンは蒸留水を等量混合しフードプロセッサーを用いペースト状になるまで磨砕均一化した試料5gを50mLポリプロピレン遠沈管に採取した。スキムミルクの場合、1g採取し、メタノール20mLを加え、10分間振とう抽出した。抽出液を3,000rpmで10分間遠心分離した後、上清をナス型フラスコに採取し、40以下で減圧濃縮を行い、メタノールを留去した。乾固した場合、50%メタノールを2mL添加し超音波により溶解、水分等残留物が残った場合は、メタノールを等量混合したものを各々Oasis HLB(60mg)に負荷した。50%メタノール3mL、80%メタノール3mLで洗浄後、95%メタノール3mLで溶出した。溶出液を50条件下で窒素気流による濃縮操作を行い、95%メタノールで1mLに定容後、除粒子フィルターを通したものをLC/MS/MS試験溶液とした。

7. セレウリド産生試験

B.cereus 菌陰性を確認した市販のグラタンとスキムミルクに滅菌蒸留水を各々4倍量と9倍量添加しストマッカーで1分間の処理を行なった。嘔吐型食中毒由来の*B.cereus* 菌をグラタンには10cfu/mL、スキムミルクには30cfu/mLを接種して20および30で培養し、培養開始時(0時間)、18、42および50時間後にセレウス菌数とセレウリド量を測定した。菌数測定は食品検査指針²⁾に基づいて実施し、10⁸CFU/mL以上になった時点で菌数測定を省略した。なお、セレウリド測定試料は121、15分間滅菌処理したものをを用いた。

結果及び考察

1. LC/MS/MS条件

セレウリドおよびバリノマイシン標準溶液をそれぞれインフュージョン法により直接MS部に導入し、

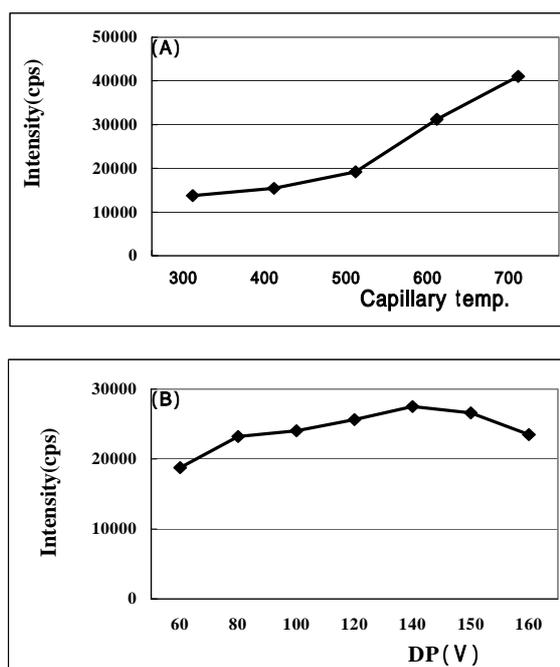


Fig.1 Comparison of intensity of cereulide(100ng/mL)
(A) Capillary temperature
(B) Declustering potential

イオン化条件を検討した。両物質ともプロトン付加分子[M+H]⁺とアンモニア付加分子[M+NH₄]⁺が観測されたため、イオン強度が相対的に高い[M+NH₄]⁺を定量用イオンのプリカーサーイオンに選択した。これらのプリカーサーイオンについて最も感度が強く得られたプロダクトイオンを定量用し、さらにセレウリドについては、次いで高感度だ

ったプロダクトイオンを確認用に選択することで、より選択性の高い測定が可能となった。温度およびデクラスター電圧(DP) は、Fig.1に示したように700、140Vにおいて感度をもっとも良好であった。各物質のパラメーターをTable 1に示した。HPLC条件はカラム温度を40 に設定した場合、溶出時間が遅くピークもテーリングが著しかった。そこで、カラム温度を今回使用したカラムの許容上限温度である60 に設定したところ、Fig.2に示したようにシャープなピークが得られ感度も向上した。

Table 1. Compound-specific MS/MS Parameters

		MRM transition		DP ¹⁾	CE ²⁾	CXP ³⁾
		(m/z)	(m/z)			
Cereulide	Quantitation	1170.8	1125.8	140	50	10
	Confirmation 1	1170.8	1126.2	140	50	10
	Confirmation 2	1170.8	1153.8	140	40	15
	Confirmation 3	1170.8	1083.2	140	55	12
Valinomycin	Quantitation	1128.6	1083.5	140	50	15

¹⁾ Decustering potential

²⁾ Collision energy

³⁾ Collision exit potential

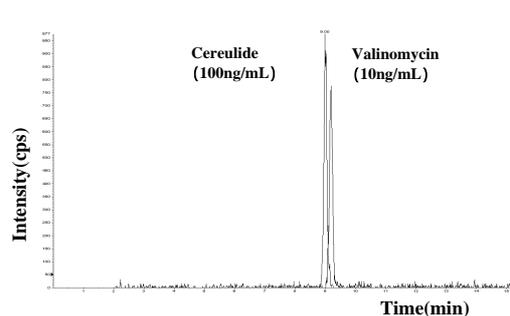


Fig.2 MRM chromatograms of standard solution

3 カラム保持能に及ぼすメタノール濃度の影響
セレウリドは水への溶解性が低いことから (LogKow 5.96) HLB カラムによる精製操作における至適メタノール濃度を検討した。メタノール濃度を0、30、50、60、70、80、90 および100%に調整したセレウリド標準溶液を LCMS/MS で測定するとともに、HLB カラムに負荷し保持能について検討した。Fig.3 に示すように、90%、100%ではセレウリドはカラムに保持されず溶出し、また、0%、30%ではセレウリドの溶解性が低くなるため、適さないことが分かった。そこで、負荷液および洗浄液のメタノール濃度は50~80%の範囲に調整することとした。

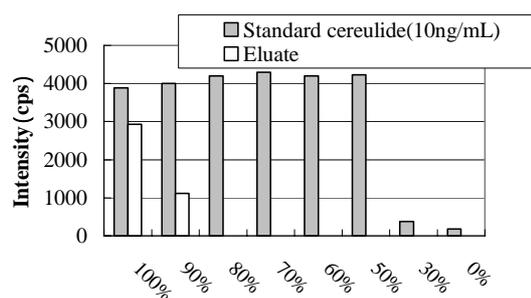


Fig.3 Effect of the methanol concentration on the intensity of standard cereulide

4. 添加回収試験

検量線は1から500ng/mLの範囲で良好な直線性 ($R^2=0.9988 \sim 1.0000$) を示した。添加回収試験は各試料にセレウリド標準溶液を5ng/g および50ng/g となるように添加し、試行数5回で試験を行なった。Table 2 に示したように、回収率は71.7~90.6%、相対標準偏差6.0~16.3%と良好な結果が得られた。

松岡ら³⁾は平成13年に熊本市内の保育園で発生した嘔吐型食中毒事例において原因食品からセレウリドがそれぞれ160ng/g、640ng/g 検出されたと報告しており、品川⁴⁾はセレウリドの発症最少毒素量を1μg/ヒトと報告している。本法による検出下限 ($S/N \geq 3$) は1ng/gであったことから、食中毒発症レベルの検出が十分可能と考えられた。今回、LCMS/MSによる方法とHEp-2細胞による生物学的検査法の比較については検討しなかったが、川村ら⁵⁾は測定結果が一致したと報告している。LCMS/MSを用いることで高感度分析が可能となり、食品中のセレウリドの有無が検体搬入当日に判明することから、より迅速な行政対応ができるものと考えられる。

Table 2. Recoveries of cereulide from rice, fried rice, gratin and skim milk

Sample	Recovery (%) ¹⁾	
	Fortification level (ng/g)	
	5	50
Rice	81.7 ± 12.0	90.6 ± 6.4
Fried rice	89.1 ± 15.2	74.6 ± 6.0
Gratin	80.8 ± 16.3	71.7 ± 15.5
Skim milk	88.6 ± 12.1	78.3 ± 6.4

1) Mean ± S.D. (n=5)

5 セレウリド産生試験

セレウリド産生試験の結果を Fig.4 および 5 に示した。食品に接種した *B.Cereus* の菌数は 30 保存では 18 時間後にはグラタン 2.8×10^8 CFU/mL、スキムミルク 1.3×10^8 CFU/mL に増え、セレウリド濃度はグラタン $52 \mu\text{g/mL}$ 、スキムミルク $2.3 \mu\text{g/mL}$ であった。20 保存では 18 時間後の菌数は 10^5 オーダーでセレウリドは検出されず、42 時間後にグラタン 2.4×10^8 CFU/mL、スキムミルク 1.4×10^8 CFU/mL に達し、セレウリドはそれぞれ $87.6 \mu\text{g/mL}$ 、 $16 \mu\text{g/mL}$ であった。その後、セレウリド濃度は横ばい傾向となり、試料の種類によって産生されるセレウリド濃度は異なっていたが、希釈倍率の違いが影響したものと思われる。今回の試験により、保存温度によってはずか一日でセレウリドが産生され、嘔吐型食中毒を発症させるセレウリド濃度になることが示された。

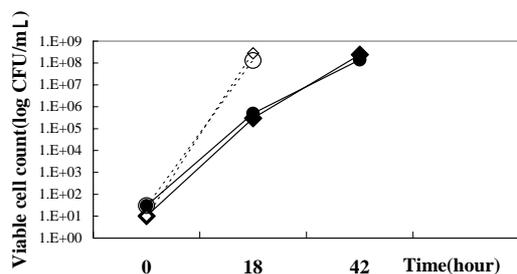


Fig.4 Time course of viable cell count of *B.cereus* inoculated into foods
 ,Guratin, 20 ; ,Guratin, 30
 ,Skim milk,20 ; ,Skim milk,30

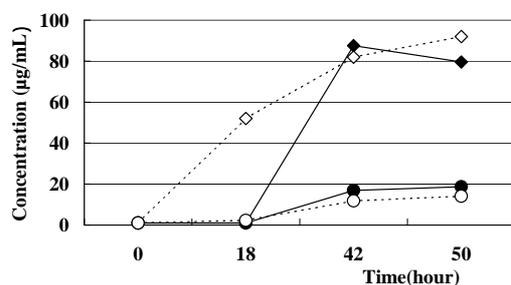


Fig.5 Concentrations of cereulide in foods after incubation
 ,Guratin, 20 ; ,Guratin, 30
 ,Skim milk,20 ; ,Skim milk,30

まとめ

B.Cereus による嘔吐型食中毒の原因毒素であるセレウリドについて、LC/MS/MS による迅速分析法を検討した。

- 1 .HLB カラム精製における負荷液のメタノール濃度は 50~80% が適していた。
- 2 .本法による検出下限値 ($S/N = 3$) は 1ng/g であった。
- 3 .5 および 50ng/g 濃度の添加回収試験では、71.7~90.6% の回収率を示し、相対標準偏差は 6.0~16.3% であった。
- 4 20 および 30 条件でセレウリド産生試験を実施したところ、30 保存の場合、18 時間後には食中毒を発症させるレベルのセレウリドが産生されていた。
- 5 .今回、LC/MS/MS によるセレウリドの迅速分析法を確立したことにより、検体搬入当日に推定原因食品からのセレウリド検出が可能となり、当センターにおける健康危機管理体制の強化を図ることができた。

参考文献

- 1) 五十君静信, 2. 食中毒細菌と検査法, 臨床病理レビュー特集第 136 号, 10-18 (2006) .
- 2) 厚生労働省監修“ 食品衛生検査指針: 微生物編”, 東京, (社) 日本食品衛生協会, 2004, p.266-280 .
- 3) 松岡由美子ら: あん入り餅を原因とする嘔吐型セレウス菌による食中毒事例, 感染症週報, 4(14), 6-7 (2002) .
- 4) 品川邦汎: 近年注目されている食品媒介感染症 (食中毒を含む) とその対応, Health & Meat'05, 62-73 (2005) .
- 5) 川村久美子ら, : High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry を用いた *Bacillus cereus* セレウリド (嘔吐毒) 検出法の検討, 日本臨床微生物学雑誌, 15(2), 68-76 (2005) .

県内における太陽光発電可能量の推計

地球科学部 工藤 浩、白藤 周司

1. はじめに

二酸化炭素など温室効果ガスの排出を削減するため、風力発電や太陽光発電などの自然エネルギーの利用が進められている。しかしながらこうした自然エネルギーは気象に左右され、発電量が不安定であることが欠点のひとつとしてあげられる。さらに風力発電は立地が限られ、1基当たりの価格が高額になることなども欠点である。

一方、太陽光発電は気象すなわち日照によって発電量が変化する点で不安定なエネルギーであることは同様であるが、夏季の高温時に冷房需要が増加し電力需要がピークに達することを考えれば、日照の強い日に発電量が増加することにより買電需要のピークカットに大きな効果をもたらすことが期待できる。また、家庭から事業所まで規模に応じた設備を設置できること、市街地でも設置できることなどから、今後さらに普及を図るべき自然エネルギーの利用法といえる。

このため本論では、県内に導入されている太陽光発電設備とその場所の日射量との関係を明らかにして、さらに日射量と日照時間の関係からアメダス観測地点における太陽光発電可能量を推計して、地域における潜在量の相違を検討した。

2. 日射量と発電量

太陽光発電設備を導入し、併せて日射量も観測している病院、高校など県内6施設の観測データから日射量と発電量の関係を求めた。各施設の規模が異なることから、発電量は発電能力1kWあたりの量で示す。

日射量と発電量の関係の一例を図-1および2

に示した。日射量は夏季に大きく冬季に小さくなる季節変化を示し、発電量もこれに追従して同様の傾向を示す(図-1)。このため、日射量あたりの発電量はほぼ0.21~0.22(kWh/MJ/m²・月)と一定の値を示している。

ただし、冬季(12月~2月)にこの関係が大きく崩れる現象が見られる(図-2)。これは積雪により太陽光パネルが覆われ、日射があっても発電しない状況があることによると考えられる。また、7、8月を中心に発電効率が若干低下する傾向が見られる。これは発電パネル表面の温度が上昇すると発電効率が低下する(一定レベルを超えると急激に低下する。)太陽電池の特性によるものと見られるが、その影響は大きくない。

こうした特殊な事例が見られるものの、対象施設全体(施設のより観測期間が異なる。)で見ると図-3に示したように日射量と発電量との間には極めて高い相関が見られる。

3. 日射量と日照時間

県内の気象観測においては日射量を測定しているところはごくわずか、数多く配置されているアメダス観測地点では日照時間のデータしか手に入らない。

このため、盛岡地方気象台の観測による盛岡での2002年から2006年までの日射量と日照時間の関係を図-4に示した。精度は幾分低下するものの、一定の関係が見て取れる。

この関係式からB病院における発電実績と推計値を図-5に示した。推計値は実績値の年平均値900kWhに対して848kWhと6%ほど低い値となっ

た。春および秋の値はおおむね一致するものの、推計値は夏前後の時期に実績値を下回った。これは、例えば、梅雨の時期には日照時間がゼロの日もあるが、だからといって暗闇ではなくある程度の日射は得られることによると考えられる。

また、冬季には逆に推計値が実績値を上回っている。これは前述のとおり、発電パネルが積雪に覆われる場合があることのほか、冬季には一定の日射時間があっても日射は弱いことなどによると考えられる。

4. アメダス観測地点の発電量推計

前述の推計法により、県内アメダス観測 31 地点の 2002 年から 2006 年の年間日照時間からその地点での太陽光発電可能量を推計し、その結果を発電量の大きい順に並べて表 - 1 に示した。

この表から、推計発電量は 1020 kWh から 560 kWh と大きな差があることがわかった。また、推計発電量の大きい地域は沿岸部に多く、少ない地域は山間部に多いことがわかった。

ただし、山間部では日照が山にさえぎられる時間帯があることが推測されるが、前述の通り、この時間帯でも日射量はゼロになるわけではなくある程度の発電量は期待できると考えられる。

5. まとめ

太陽光発電の実績と日射量の関係、および日射量と日照時間の関係を利用してアメダス観測地点の日照時間から発電量を推計して検証したところ、実績値よりわずかに下回るものの、ほぼ推計が可能であることがわかった。

この推計方法により県内アメダス観測地点の発電可能量を推計したところ、地域によって大きな違いがあることがわかった。

沿岸部では比較的大きな発電量が得られることから、こうした地域においては太陽光発電の普及を図っていくことが重要である。

一方、推計発電量が比較的小さい地域は山間部であるが、こうした地域では木質バイオマスの活用が考えられる。

このように自然エネルギーの活用においては、地域の特性によって利用を図るべき資源が異なることから、今後、さらに地域の特性を調べ、その地域にふさわしい自然エネルギーの利用方法を模索していく必要がある。

図 - 1 日射量と発電量(A施設、H16・17年度)

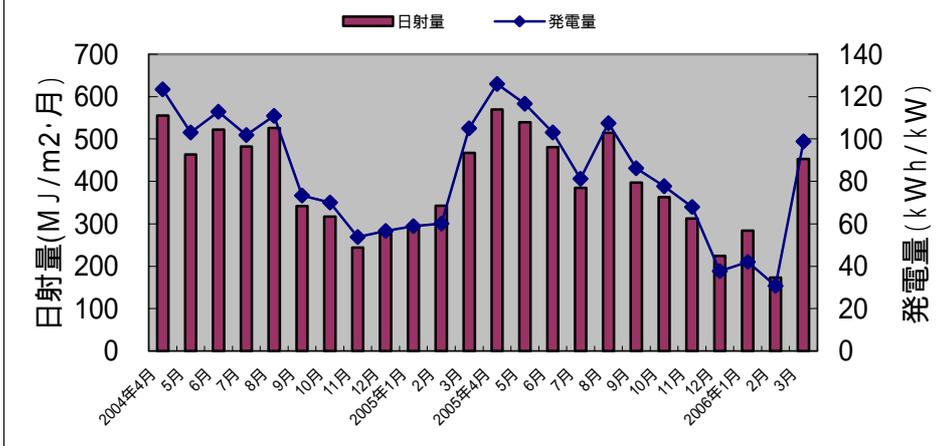


図 - 2 日射量あたりの発電量(A高校)

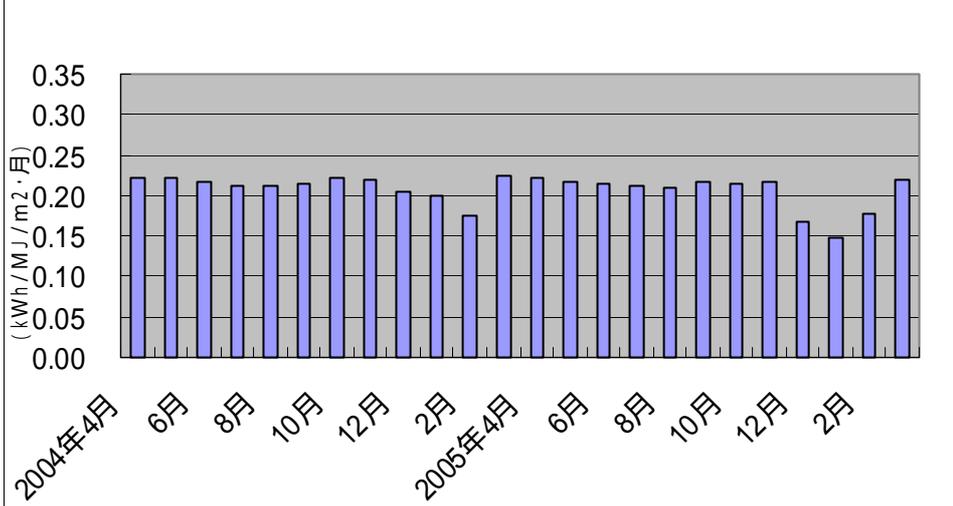


図 - 3 日射量と発電量の相関(30日換算値)

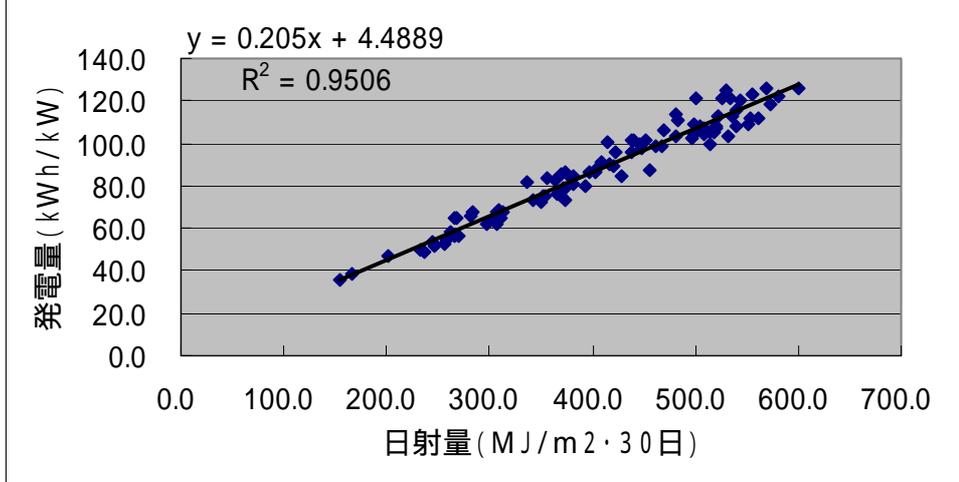


図 - 4 月別日照時間と全天日射量(盛岡、2002～2006年)

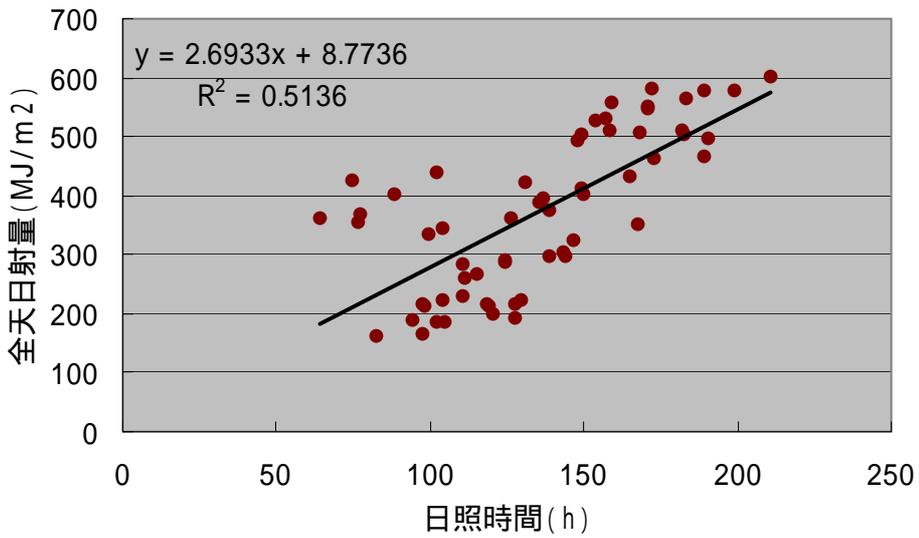


表 - 1 アメダス観測地点
の推計発電量

アメダス 観測地点	推計発電量 (k W h / 年)
宮古	1 , 0 1 9
山田	1 , 0 0 0
久慈	9 4 4
大船渡	9 3 6
小本	9 2 1
普代	9 1 3
盛岡	8 9 5
軽米	8 6 7
種市	8 5 3
釜石	8 4 9
千厩	8 4 5
好摩	8 3 0
二戸	8 2 4
葛巻	8 0 5
岩手松尾	8 0 5
山形	8 0 4
紫波	7 8 9
一関	7 8 4
奥中山	7 8 1
遠野	7 7 8
江刺	7 7 4
住田	7 7 3
雫石	7 6 7
荒屋	7 5 3
北上	7 3 8
若柳	7 1 2
藪川	7 0 4
大迫	6 3 7
区界	6 0 8
沢内	5 9 8
湯田	5 6 9