

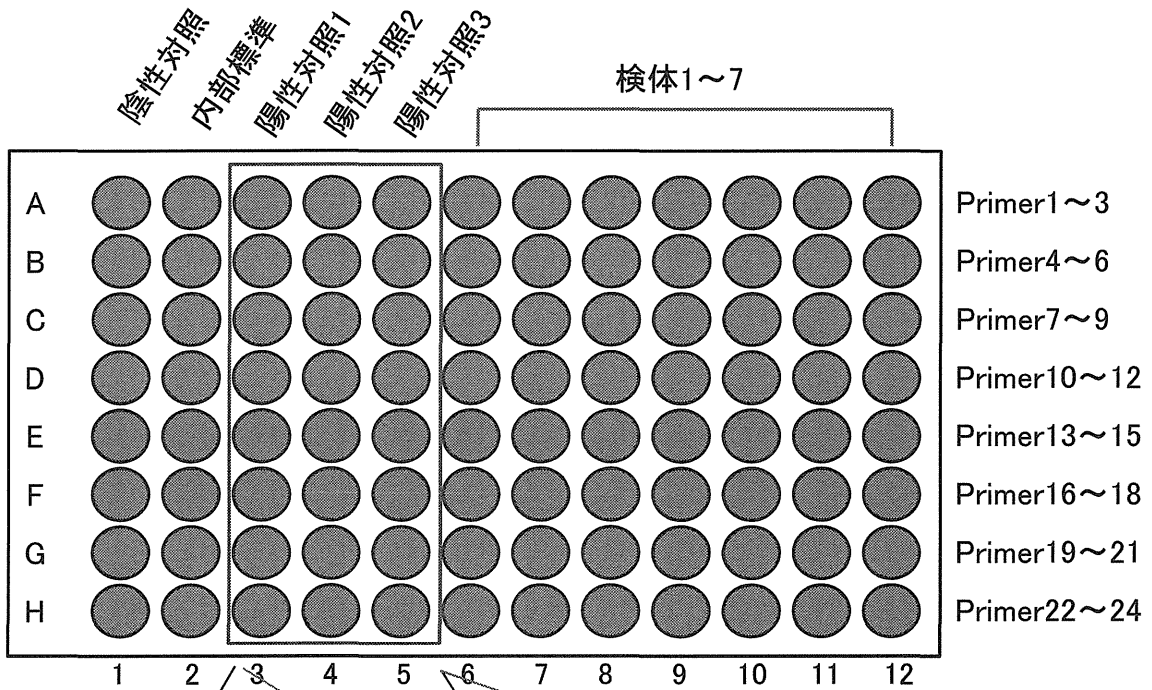
表5-3 培養法とRFBS24V法の比較

(3) 原因物質不明の事例

行政対応 取扱	行政結果 原因物質	原因 物質	菌分離			RFBS24結果				
			1	2	3	1	2	3	4	5
感染症	腸管出血性大腸菌O157	不明	(EHEC) 1/1			astA 1/1				
感染症		不明	ND			S. aureus 1/2				
食中毒	原因不明	不明	NT			ウェルシュ 1/2				
食中毒	原因不明	不明	NT			eae 1/2				
食中毒	原因不明	不明	NT			eae 1/2				
食中毒	ウェルシュ菌	不明	NT			ウェルシュ 3/4	eae 2/4	St. aureus 1/4	astA 1/4	
食中毒	原因不明	不明	NT			DAEC 1/2				
食中毒	黄色ブドウ球菌	不明	ND			astA 4/7	S. aureus 2/7	B. cereus ces 1/7	B. cereus nhe 1/7	
食中毒	クドア・セプトンブクター タ	不明	(セレウス) 1/2 (ウェルシュ) 1/2			B. cereus nhe 1/2				
有症苦情	不明	不明	C. jejuni 1/6 Salmonella 1/6			astA 2/6				
有症苦情		不明	ウェルシュ 1/4			ND				
有症苦情	不明	不明	ND			ND				
有症苦情		不明	ND			C. coli 1/2	astA 1/2			
有症苦情		不明	S. aureus 1/5 (B. cereus) 2/5 (ウェルシュ) 1/5			astA 2/5	eae 1/5	STh 1/5		
有症苦情		不明	(S. aureus) 2/3			astA 3/3	daaD 1/3			
有症苦情		不明	(ウェルシュ) 2/5 S. aureus 1/5			astA 3/5	A. hydro 3/5			
有症苦情		不明	(セレウス) 1/4 (ウェルシュ) 1/4			C. jejuni 4/4	astA 3/4	eae 1/4	A. hydro 1/4	
有症苦情		不明	(セレウス) 1/4 (S. aureus) 2/4			astA 1/4	A. hydro 1/4			
有症苦情		不明	(セレウス) 1/3 (ウェルシュ) 1/3			astA 2/3				
有症苦情		不明	S. aureus 1/2			ND				
他県食中毒関連調査		不明	ND			astA 1/1				
不明		不明	NT			astA 1/5	DAEC 1/5			
不明		不明	NT			eae 1/5	astA 1/5			

	菌分離			RFBS24結果				
	1	2	3	1	2	3	4	5
Noro(-)				aggR 1/40	astA 1/40	S. aureus 1/40		

図1 RFBS24システム ウェルの配置



	RFBS24IVの陽性対照配置図			RFBS24Vの陽性対照配置図		
	第3列	第4列	第5列	第3列	第4列	第5列
	陽性対照1	陽性対照2	陽性対照3	陽性対照1	陽性対照2	陽性対照3
A set	<i>Cl. Perfringens</i>	<i>P. alcalifaciens</i>	ETEC(LT)	<i>Cl. Perfringens</i>	<i>P. alcalifaciens</i>	EHEC(<i>stx2</i>)
B set	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>trh</i> positive <i>V. parahaemolyticus</i>	EHEC(<i>stx1</i>)	<i>C. jejuni</i>	<i>trh</i> positive <i>V. parahaemolyticus</i>
C set	<i>L. monocytogenes</i>	emetic <i>B. cereus</i>	<i>V. cholerae</i>	ETEC(LT)	emetic <i>B. cereus</i>	<i>V. cholerae</i>
D set	ETEC (ST)	EPEC(<i>eae</i>)	enterotoxigenic <i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	EPEC(<i>eae</i>)	enterotoxigenic <i>B. cereus</i>
E set	EAEC (<i>aggR</i>)	EHEC(<i>stx1</i>)	<i>S. aureus</i>	<i>C. coli</i>	EAEC (<i>aggR</i>)	<i>S. aureus</i>
F set	<i>tdh</i> positive <i>V. parahaemolyticus</i>	EHEC(<i>stx2</i>)	<i>Pl. shigelloides</i>	ETEC (ST)	<i>tdh</i> positive <i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Pl. shigelloides</i>
G set	EAEC (<i>astA</i>)	EIEC, <i>Shigella</i> spp.	<i>A. hydrophila</i>	EAEC (<i>astA</i>)	EIEC, <i>Shigella</i> spp.	<i>A. hydrophila</i>
H set	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Salmonella</i> spp.	DAEC (<i>daaD</i>)	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Salmonella</i> spp.	DAEC (<i>daaD</i>)

RFBS24IVおよびRFBS24VのA~H setの検出遺伝子組み合わせ

—陽性対照検出配置図による—

厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理対策研究事業)

平成 24 年度 分担研究報告書

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、
及び疫学機能の強化に関する研究

分担報告書(ウイルス部門)

主任研究者	調 恒明	山口県環境保健センター	所長
分担研究者	高橋和郎	大阪府立公衆衛生研究所	副所長
協力研究者	皆川洋子	愛知県衛生研究所	所長
	山下照夫	愛知県衛生研究所	ウイルス研究室長
	安達啓一	愛知県衛生研究所	主任
	千々和勝己	福岡県保健環境研究所	微生物部長
	世良暢之	福岡県保健環境研究所	ウイルス課長
	吉富秀亮	福岡県保健環境研究所	研究員
	村田祥子	山口県環境保健センター	専門研究員
	濱岡修二	山口県環境保健センター	専門研究員
	加瀬哲男	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課長
	山崎謙治	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課主任研究員
	倉田貴子	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課研究員
	中田恵子	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課研究員
	上林大起	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課研究員

研究概要

1. 研究目的:今年度は本研究で作製したマルチプレックス PCR 診断法が各地衛研で同程度の精度で機能するか否かを臨床検体を用いて性能評価を行うことを目的とした。研究方法:中枢神経感染症検体は愛知衛研が所有する 20 検体の抽出 RNA を各地衛研へ配布し、呼吸器感染症検体は各 4 地衛研が呼吸器感染症の咽頭、鼻腔スワブ 20 検体から核酸を抽出し、各地衛研へ配布後本検出法で同定する。結果: 1. 中枢神経系感染症: 20 検体の EV 検査において 4 地衛研での一致率は 85%(17/20)であった。不一致例 3 例の原因は検出感度差と考えられた。2. 呼吸器感染症:各地衛研の検体に対して他の 3 衛研がともに検出可能であった検体の一致率は愛知、山口、福岡、大阪の検体についてそれぞれ 80, 60, 80, 70% (平均 73%)であった。また、3 衛研間における PCR 法結果の完全一致率は愛知、山口、福岡、大阪検体では、それぞれ 55, 45, 60, 55% (平均 54%)であった。ウイルス別の 4 地衛研間での検出一致率は、一致率が 100%であったものはラインフルエンザウイルス、A 型インフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、80%以上のはアデノウイルス、RS ウイルス、コロナ NL63、70%代はライノウイルス、60%代はマイコプラズマ、50%代はポカウイルス、B 型インフルエンザ、エンテロウイルス(EV)であり、10%代の低値のものはコロナ C43 であった。考察:各地衛研の呼吸器感染症検体に対しての 3 衛研がともに検出可能であった一致率は 73%とやや低い値であった。この解釈として、各地衛研での検出感度の差は上下 10 倍以内の範囲ではあるが、検体中に十分なウイルス遺伝子量が存在すれば検出は容易であるものの、比較的少量しか存在しない場合は、検出感度の差が検体からのウイルスの検出の可否に影響したことが考えられる。今後、本マルチプレックス PCR 法を導入する場合、検出感度の確認と高度化は望ましい。特に低検出率であったコロナ C43, EV, B 型インフルエンザ、ポカウイルスの検出感度は高く設定することが望ましい。

A. 研究目的

地方衛生研究所が健康危機管理事例に対処するために必要な網羅的な迅速検査方法、およびそれらや既存の核酸増幅法の精度管理法を確立し、検査機能の強化、充実を計ることを目的とする。

今年度は本研究で作製したマルチプレックス PCR 診断法が各地衛研で同程度の精度で機能するか否かを臨床検体を用いて性能評価を行う。

B. 研究方法

1. 中枢神経感染症

愛知衛研が所有する 20 検体の抽出 RNA を各地衛研へ配布後、本検出法で同定する。検出感度の差が認められることが想定され、低感度の場合、それを克服する方法を検討し実証を試みる。

2. 呼吸器感染症

各4地衛研が呼吸器感染症の咽頭、鼻腔スワブ 20 検体から核酸を抽出し、各地衛研へ配布後本検出法で同定する。

3. 本研究で確立させた網羅的迅速検査法を広く他の衛研においても応用可能とすべく、感染研の病原体診断マニュアルの一部に掲載する。感度に影響する細部の条件などを詳細に情報提供する。

C. 研究結果

1. 中枢神経系感染症(表1)

20 検体のEV検査において4地衛研での一致率は 85%(17/20)であった。山口衛研は完全一致、福岡衛研は全てを検出し、さらに検体19では新たにCB2を検出した。福岡の予備的検出感度試験ではEVの検出感度が愛知より高かった。大阪の検出率は 90%(18/20)であった。不一致例 3 例の原因は検出感度の差によるものと推測さ

れた。

2. 呼吸器感染症

各地衛研の検体に対する他の3衛研の検出結果を表3-6に示し、その検出率のまとめを表7に示す。各地衛研の検体に対して他の3衛研がともに検出可能であった検体の一致率は、愛知、山口、福岡、大阪の検体についてそれぞれ 80, 60, 80,70% (平均 73%)であった。また、3衛研間における PCR 法結果の完全一致率は愛知、山口、福岡、大阪検体では、それぞれ 55, 45,60,55% (平均 54%)であった。ウイルス別の4地衛研間での検出一致率は、一致率が 100%であったものはパラインフルエンザウイルス、A 型インフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、80%以上のはアデノウイルス、RS ウイルス、コロナ NL63、70%代はライノ、60%代はマイコプラズマウイルス、50%代はボカウイルス、B 型インフルエンザウイルス、EV であり、10%代の低値のものはコロナ C43 であった。(表7)。

D. 考察

各地衛研の呼吸器感染症検体に対しての3衛研がともに検出可能であった一致率は 73%とやや低い値であった。この解釈として、各地衛研での検出感度の差は上下 10 倍以内の範囲ではあるが、検体中に十分なウイルス遺伝子量が存在すれば検出は容易であるものの、比較的少量しか存在しない場合は、検出感度の差が検体からのウイルスの検出の可否に影響したことが考えられる。今後、本マルチプレックス PCR 法を導入する場合、検出感度の確認と高度化は望ましい。特に低検出率であったコロナ C43、EV、B 型インフルエンザ、ボカウイルスの検出感度は高く設定することが望ましい。

F. 研究発表

なし

表1

中枢神経感染症検体における検出結果

番号	愛知	山口	福岡	大阪
1	CA4	CA4	CA4	CA4
2	CA14	CA14	CA14	CA14
3	E25	E25 95%	E25	E25
4	EV71	EV71	EV71	N.D.
5	E6	E6	E6	E6
6	CA6	CA6	CA6	CA6
7	E30	E30	E30	E30
8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	CB3	CB3	CB3	CB3
12	CB1	CB1	CB1	CB1
13	CB2	CB2	CB2	CB2
14	CB5	CB5	CB5	N.D.
15	CB3	CB3	CB3	CB3
16	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17	E6	E6	E6	E6
18	CB2	CB2	CB2	CB2
19	N.D.	N.D.	CB2	N.D.
20	CA4	CA4	CA4	CA4

- 4衛研間での一致率
85% (17/20)
- 不一致例3例の原因は
検出感度差であると
考えられる
No.19のND vs CB2
福岡法は予備実験では
EVの検出感度が高い
- 無菌性髄膜炎、脳炎・脳症
各10検体
N.D.:不検出

表2

呼吸器感染症検体における検出結果(愛知検体)

番号	愛知	山口	福岡	大阪
21	N.D.	N.D.	N.D.	ND
22	CB4	HCoVNL63, CB4	CB4	CB4
23	PIV2	PIV2	PIV2	PIV2
24	N.D.	RV-A	N.D.	RV-A
25	N.D.	N.D.	N.D.	ND
26	Ad5	HCoVNL63, Ad5	Ad5	Ad5
27	Ad3	Ad3	Ad3	Ad3
28	Ad2	Ad2	Ad2	Ad2
29	Flu A	Flu A	FluA	FluA
30	RSV, Boca	RSV, Boca	RSV	RSV
31	Ad2	Ad2	Ad2	Ad2
32	Flu B	Flu B	N.D.	FluB
33	Ad3	Ad3	Ad3	Ad3
34	Flu B	Flu B, HCoVNL63	N.D.	FluB
35	RV-A	hMPV, RV-A	RV-A	RV-A
36	N.D.	hMPV	N.D.	hMPV
37	RSV	RV-A	RSV	RV-A
38	RSV	RSV	RSV	RSV
39	RSV	RSV	RSV	RSV
40	RSV	RSV	RSV	RSV

- 元検体結果に加え
新たなウイルスが検出
されたもの
- 元検体ウイルスを検出
できなかったもの
- 元検体ウイルスを検出
できず、他のウイルスを
検出したもの

表3

呼吸器感染症検体における検出結果 山口検体

呼吸器感染症検体		山口検体		
番号	山口	愛知	福岡	大阪
1	PIV1	PIV1	PIV1	PIV1
2	PIV2	PIV2	PIV2	PIV2
3	PIV3	PIV3	PIV3	PIV3
4	PIV3	PIV3	PIV3	PIV3
5	FluA	FluA	FluA	FluA, RV-C
6	Flu B, Ad1	N.D.	N.D.	FluB, RV-A
7	hMPV	hMPV	hMPV	hMPV
8	RSV	RSV	RSV	RSV
9	hMPV, Ad5	hMPV, Ad-C	hMPV, Ad5	hMPV, Ad5, RV-A
10	hMPV	hMPV	hMPV	hMPV
11	RSV, RV-C	RSV, DC43, RV-C	RSV	RSV, RV-C
12	RV-A	hMPV, RV-A	N.D.	RV-A
13	Mycoplasma	Mycoplasma	N.D.	ND
14	Mycoplasma	Mycoplasma	Mycoplasma	ND
15	RV-A, Boca	RV-A	Boca	RV-A
16	Ad1	Ad1	Ad1	Ad1
17	Ad5	Ad-C	Ad5 or 5	Ad5
18	Ad3	Ad3	Ad3, FluA	Ad3
19	Boca	Boca	Boca	ND
20	hMPV/Boca	hMPV, Ad1	hMPV, Ad1	hMPV, Ad1

元検体結果に加え
新たなウイルスが検出
されたもの

元検体ウイルスを検出
できなかったもの

元検体ウイルスを検出
できず、他のウイルスを
検出したもの

表4

呼吸器感染症検体における検出結果 福岡検体

呼吸器感染症検体		福岡検体		
番号	福岡	愛知	山口	大阪
1	N.D.	N.D.	Ad1	ND
2	N.D.	N.D.	RV A, Boca	RV-C
3	RV-A, Boca, PIV3	PIV3, RV-A, Boca	PIV3, RV-A, Boca	RV-A, Boca, PIV3
4	RV-A	RV-A	RV A	RV A
5	Boca	Boca	Boca	Boca
6	RV-A	RV-A	RV A	RV A
7	EV68, Ad2	Ad2, EV68	EV68, Ad2	EV68, Ad2
8	RSV	RSV	RSV	RSV
9	HCoV NL63	HCoV NL63	HCoV NL63	HCoV NL63
10	RV-C, HCoV DC43	RV-C	RV C, HCoV DC43	RV-C
11	Mycoplasma	Mycoplasma	Mycoplasma	Mycoplasma
12	HCoV NL63, RSV	RSV, HCoV NL63	RSV, RV, HCoV NL63	RSV, RV-B
13	RV-C, Boca	RV-C, Boca	RV-C, Boca	RV-C
14	RV-C, Ad2	RV-C, Ad2	RV C, Ad2	RV-C, Ad2
15	ND	ND	FluA	ND
16	HCoV DC43	ND	ND	ND
17	RV-A	RV-A	RV A	RV-A
18	RV-A	RV-A	RV A	RV-A
19	Mycoplasma	RV-C, Myco	RV C/Mycoplasma	RV-C
20	ND	ND	ND	ND

元検体結果に加え
新たなウイルスが検出
されたもの

元検体ウイルスを検出
できなかったもの

元検体ウイルスを検出
できず、他のウイルスを
検出したもの

表5

呼吸器感染症検体における検出結果(大阪検体)

呼吸器感染症検体 番号	大阪検体			
	大阪	愛知	福岡	山口
1	RV-A	N.D.	N.D.	N.D.
2	ND	ND	ND	ND
3	ND	RV-A	ND	RV-A
4	ND	PIV3	ND	PIV3
5	ND	ND	ND	ND
6	CB5	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND
10	ND	CB5	ND	CB5
11	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	N.D.
13	ND	ND	ND	N.D.
14	EV7	N.D.	N.D.	N.D.
15	ND	ND	ND	ND
16	ND	Mycoplasma	ND	Mycoplasma
17	ND	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND	ND
19	RV-A	ND	ND	EV7
20	RSV	ND	ND	ND

- 元検体結果に加え新たなウイルスが検出されたもの
- 元検体ウイルスを検出できなかったもの
- 元検体ウイルスを検出できず、他のウイルスを検出したもの

表6

呼吸器感染症検体における検出率(%)

検体	4衛研一致		愛知			山口			福岡			大阪		
	検出可能	完全一致	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
愛知	80	55				95	65	30	85	85	0	90	80	15
山口	60	45	85	75	10				70	65	10	70	60	20
福岡	80	60	90	85	5	95	70	25				75	70	15
大阪	70	55	75	55	20	75	55	25	75	75	0			
平均	73	54	84	78	12	88	63	27	77	75	3	78	70	17

A: 20検体中での元検体結果を検出した正解率
 B: 20検体中での元検体結果に対する完全一致率
 C: 元検体結果に加え新たにウイルスが検出された検体の率

表7

ウイルス	検出率	3衛研 一致率	ウイルス	検出率	3衛研 一致率
PIV-1	100 (3/3)	100 (1/1)	Corona NL63	83 (5/6)	50 (1/2)
PIV-2	100 (6/6)	100 (2/2)	Rhino	79 (33/42)	92 (11/12)
PIV-3	100 (9/9)	100 (3/3)	Mycoplasma	67 (8/12)	25 (1/4)
Flu A	100 (6/6)	100 (2/2)	Boca	58 (12/21)	29 (2/7)
hMPV	100 (12/12)	100 (4/4)	Flu B	56 (5/9)	0 (0/3)
Adeno	92 (33/36)	62 (9/14)	Entero	50 (6/12)	50 (2/4)
RSV	83 (25/30)	80 (8/10)	Corona C43	17 (1/6)	0 (1/2)

表8

検出感度	山口	福岡	愛知	大阪
高い	RV(5), Boca(4) CoVNL63(3) Myco(2), EV(2) hMPV(2), Ad(2) Flu A,B, RSV HCoVOC43 PIV3	HCoVOC43(2) FluA, Boca EV	Myco(2) CoVNL63 Boca, RV PIV3, EV hMPV	RV(9) EV(2) RSV FluB hMPV
低い	Ad-1	RV-5 FluB(2)	なし	Myco(3) Boca(2) RSV CoVNL63

厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)

「地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、
その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究」

平成 24 年度 分担研究報告書

「健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の
構築と精度管理に関する研究」

研究分担者 田中 敏嗣 (神戸市環境保健研究所)

研究要旨:

地方衛生研究所(地研)は公衆衛生の向上・推進と共に地域及び広域における健康危機管理の科学的、技術的中核としての機能を保持すること、試験検査とその精度管理能力や疫学調査能力等の水準を確保することが求められている。

健康危機関連化学物質、特に自然毒による健康危機管理事例は毎年のように死者が出る等食品衛生上極めて重要な課題である。しかし、発生頻度や地域性等様々な要因から経験や専門性が乏しく多くの地研で対応に苦慮しているのが現状である。

本研究では地研の連携やネットワークを活用し、全国の地研での自然毒による食中毒の事例や試験法をデータベースに集積し、情報の共有を図り、迅速な対応への有効なツールの構築、推進を図った。また、自然毒の中で、毎年のように中毒事例が報告されるトリカブト及びチョウセンアサガオについて、その有毒成分アコニチン、メサコニチン及びアトロピン、スコポラミンの LC-MS/MS による迅速一斉試験法を検討し、19 地研による精度管理を実施することにより、健康危機管理への迅速、的確な対応へ有効な手段を構築した。

研究協力者

滝川義明、高橋悟、菅原隆志 (岩手県環境保健研究センター)

阿彦忠之、笠原義正、和田章伸 (山形県衛生研究所)

大村外志隆、石井里枝、野崎なおみ (埼玉県衛生研究所)

岡部英男、中村廣志、脇ますみ、熊坂謙

一 (神奈川県衛生研究所)

皆川洋子、森下智雄、後藤智美 (愛知県衛生研究所)

平田宏之、寺田久屋、谷口 賢、小野田絢 (名古屋市衛生研究所)

緒方勇人、南谷臣昭 (岐阜県保健環境研究所)

有菌直樹、茶谷祐行、大藤升美、野澤真

里奈（京都府保健環境研究所）
山本容正、木村明生、川津健太郎（大阪府立公衆衛生研究所）
引石文夫、山口之彦（大阪市環境科学研究所）
田中智之、神藤正則、福田弘美（堺市衛生研究所）
山村博平、三橋隆夫、吉岡直樹（兵庫県立健康生活科学研究所）
毛利文彦、佐想善勇（姫路市環境衛生研究所）
山本康司、久野恵子、高良浩司（和歌山県環境衛生研究センター）
森野吉晴、浦崎美和、小田美紀（和歌山市衛生研究所）
岸本寿男、肥塚加奈江、浦山豊弘、赤木正章（岡山県環境保健センター）
調 恒明、立野幸治、吹屋貞子（山口県環境保健センター）
古家 隆、森岡浩文（宮崎県衛生環境研究所）
宮城俊彦、玉那覇康二、佐久川さつき、國仲奈津子、真保栄陽子（沖縄県衛生環境研究所）
川上史朗、上田泰人、矢野昌弘、杉浦義紹、大久保祥嗣、山口葉子、佐藤徳子、佐藤麻衣（神戸市環境保健研究所）

A. 研究目的

地研は地域保健対策を効果的に推進し、公衆衛生の向上・増進並びに地域及び広域における健康危機管理の科学的、技術的中核としての機能を保持すること、試験検査とその精度管理能力や疫学調査能力等の水準を確保することを求められている。

健康危機関連化学物質、特に自然毒による健康危機管理事例は細菌性食中毒に比べ件数、患者数は多くないが、毎年のように死者が出る等食品衛生上極めて重要な課題である。

厚生労働省の食中毒発生事例統計 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokucu/04.html>, 2001-2009) の10年間では細菌による食中毒の発生件数の11,033件に比べ自然毒は1,189件で全体の7.3%である。しかし、死者数では細菌による21人（件数に対する割合：0.19%）に対し、自然毒による死者数は40人で件数に対する割合は3.4%で17倍と極めて高い。また、魚毒、貝毒等の動物性自然毒とキノコ毒、植物毒等の植物性自然毒による発生頻度に地域差があり、前者が西日本、後者が東日本に多い傾向が認められる。

このように、発生頻度や地域性等様々な要因から地研の日常的な業務として行っているところは少なく、事例が発生すると経験や専門性が乏しいことからその対応に苦慮しているのが現状である。

本研究では、地研の連携やネットワークを活用し、同様の事例の再発に備えるため、全国の地研が中毒事例の情報を共有することが重要であることから、自然毒による食中毒の事例や試験法のデータベース集積を推進した。

さらに、食中毒の原因物質の究明は再発防止や治療、対策等にとって極めて重要な課題であり、かつその迅速性が求められる。

近年、農薬のポジティブリスト制度導入等により地研に高性能な微量分析装置である液体クロマトグラフ・タンデム型

質量分析計(LC-MS/MS)の整備が図られている。この機器は自然毒のような水溶性あるいは難揮発性物質の測定において有効であることから、このLC-MS/MSを用いて自然毒の迅速試験法を検討し、地研間での精度管理及び適応性について検証した。

平成22年度は動物性自然毒のフグ毒について、LC-MS/MSによる迅速試験法について検討し、良好な結果が得られた。

平成23年度はスイセン等に含有する植物毒リコリンのLC-MS/MSによる迅速試験法を検討し、良好な結果が得られた。

平成24年度はトリカブト毒及びチョウセンアサガオ毒のLC-MS/MSによる迅速試験法を検討した。

トリカブトはキンポウゲ目キンポウゲ科トリカブト属に分類される植物で、外観からニリンソウやモミジガサ等と誤食されることが多く、わが国では毎年食中毒が報告されている。チョウセンアサガオはナス目ナス科チョウセンアサガオ属に分類される植物で、外観から根はゴボウ、開花前のつぼみはオクラ、葉はモロヘイヤ、アシタバ等、種子はゴマと誤食されることが多く、わが国では毎年食中毒が報告されている。平成15年以降における我が国でのトリカブト類及びチョウセンアサガオ類による食中毒事件例を表1および表2に示す(厚生労働省HP過去の食中毒事件一覧：

<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#4-3>)。

トリカブトの有毒成分はアルカロイドの一種アコニチン(Aconitine)、メサコニチン(Mesaconitine)等で、中毒症状は口

唇や舌のしびれに始まり、次第に手足のしびれ、嘔吐、腹痛、下痢、不整脈、血圧低下等をおこし、呼吸不全に至って死亡することもある。チョウセンアサガオの有毒成分はトレパンアルカロイドの一種アトロピン(Atropine)、スコポラミン(Scopolamine)等で、中毒症状は口渇、瞳孔散大、意識混濁、心拍促進、興奮、麻痺、頻脈等である。アコニチン等の植物毒の試験法は多数報告されているが、健康危機管理の一環として、迅速な検査体制の強化が求められていることから、迅速で微量分析が可能なLC-MS/MSを用いたトリカブト有毒成分のアコニチン、メサコニチン及びチョウセンアサガオ有毒成分のアトロピン、スコポラミンの植物毒4物質の一斉試験法を検討した。確立した試験法の精度管理及び適応性を検証するため、19地研による共同試験を実施し、試験法の妥当性を評価した。

B. 研究方法

1. 自然毒による中毒事例の集積

地方衛生研究所職員専用ホームページにある既存のデータベース「自然毒中毒事例情報システム」を活用し、事例の集積と情報共有を図る。

1) 操作の手順

- ・ システムにログインする。
- ・ 基本情報を入力し、登録する。
- ・ 試験結果詳細を入力し、登録する。
登録済みデータは登録した地研は修正することができる。他の地研は加筆、修正はできない。
- ・ 入力項目と最大文字数は次の通りである。

自然毒分類：リストから選択
衛研名：自動的に付与
報告者：全角 40, 半角 80
件名：全角 50, 半角 100
原因食品：全角 50, 半角 100
症状：全角 500, 半角 1000
摂食者数：半角数字 6
発症者数：半角数字 6
死亡者数：半角数字 6
試験概要：全角 200, 半角 400
文献：全角 150, 半角 300
備考：全角 100, 半角 200
画像情報：bmp, jpg, gif 形式

2. LC-MS/MS によるアコニチン等 4 物質の迅速一斉試験法の開発検討

2.1 実験方法

2.1.1 分析対象物質

トリカブトの有毒成分アコニチン ($C_{34}H_{47}NO_{11}$, MW:645.74)、メサコニチン ($C_{33}H_{45}NO_{11}$, MW:631.72)、チョウセンアサガオ有毒成分アトロピン ($C_{17}H_{23}NO_3$, MW:289.37)、スコポラミン ($C_{17}H_{21}NO_4$, MW:303.35) を分析対象物質とした。構造式を図 1~図 4 に示した。

2.1.2 試料

あらかじめアコニチン等 4 物質が不検出であることを確認したゴボウを添加回収試験用試料とした。

2.1.3 試薬

1) アコニチン標準品は Sigma-Aldrich 社製アコニチン (純度 95%)、メサコニチン標準品は松浦薬業(株)製メサコニチン (純度 98%)、アトロピン標準品は

Sigma-Aldrich 社製アトロピン (純度 99%)、スコポラミン標準品は Sigma-Aldrich 社製スコポラミン臭化水素酸塩三水和物 ($C_{17}H_{21}NO_4 \cdot HBr \cdot 3H_2O$, MW:438.31) (純度 98%) を用いた。

2) アコニチン標準溶液はアコニチン 5mg をメタノール 10mL に溶解し標準原液とした (この液 1mL はアコニチン 500 μ g を含む)。メサコニチン、アトロピン及びスコポラミン標準溶液は試薬メーカーに依頼していずれも溶媒はメタノールを用い、濃度が各々 500 μ g/mL、2000 μ g/mL、2000 μ g/mL となるように調製し各標準原液とした。スコポラミン標準品はスコポラミン臭化水素酸塩三水和物であるので、スコポラミンとして 2000 μ g/mL となるように調製した。アコニチン標準原液 4mL、メサコニチン標準原液 4mL、アトロピン標準原液 1mL、スコポラミン標準原液 1mL を正確に量り、混合標準溶液とした (この液 1mL はアコニチン 200 μ g、メサコニチン 200 μ g、アトロピン 200 μ g、スコポラミン 200 μ g を含む)。混合標準溶液をメタノールで希釈し、検量線用混合標準溶液とした。

3) ろ過は GFP (桐山製作所社製) を用いた。

4) メンブランフィルターは Millex-LG4 (0.20 μ m) (Millipore) を用いた。

5) LC 用カラム：

Scherzo SM-C18 (Imtakt)

Inertsil ODS-3 (GL Sciences)

L-column ODS (CFERI)

XTerra MS C18 (Waters)

を用いた。

2.1.4 装置

- 1) Triple QUAD5500 (ABSciex)
- 2) API4000Qtrap (ABSciex)
- 3) API3200QTrap (ABSciex)
- 4) API3000 (ABSciex)
- 5) API2000 (ABSciex)
- 6) TSQ Quantum Discovery Max
(ThermoFisher SCIENTIFIC)
- 7) Xevo(Waters)
- 8) Xevo TQMS (Waters)
- 9) Xevo TQD (Waters)
- 10) 6210TOF-MSD (Agilent Technologies)
- 11) 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies)
- 12) Micromass Quattro Ultima Pt (JASCO)

2.1.5 試験溶液の調製

- 1) 細切した試料 5g を正確に量り採る。
- 2) メタノール 20mL を加え、ブレンダーで3分間抽出する。
- 3) GFP ろ紙を用いて吸引ろ過を行う。残渣についてもう一度抽出し、ろ液を合わせる。
- 4) ろ液をメタノールで 100mL に定容し、抽出溶液とする。
- 5) 抽出溶液 2mL をとり、メタノールで 50 倍に希釈する。(抽出溶液を、メタノールで適宜希釈する。)
- 6) 5) 溶液の 2mL をメンブランフィルター (0.20 μ m) に通し、LC-MS/MS 用試験溶液とする。

2.1.6 LC-MS/MS 測定

LC 用カラムにより分離したアコニチン等 4 物質を 2.1.4 に示した装置を用い測定した。18 機関は LC-MS/MS、1 機関は

LC-TOF/MS を用いた。移動相は 10mmol/L ギ酸アンモニウム及びメタノールあるいは 5mmol/L 酢酸アンモニウム及び 5mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール混液を使用し、濃度勾配法で分離し、LC-MS/MS で測定した。測定条件の一例を表 3 および表 4 に示す。

2.1.7 複数機関による共同試験

- 1) 試験機関数：協力研究者に示した機関の 19 機関で実施した。
- 2) 回収試験の添加濃度：試料 5g に混合標準溶液 1.0mL を加え 40 μ g/g となるように添加した。
- 3) 試験回数：無添加を 1 試行、添加を 5 試行とした。
- 4) 検量線：機器の感度を検討し、異なる濃度 5 点の直線性が得られる範囲で定量した。
- 5) 定量方法：メタノールで調製した標準溶液を用い定量した。さらに、マトリックス効果を検証するため、マトリックス標準液と比較した。マトリックス効果が認められた機関の結果はマトリックス標準液による補正も可能とした。

共同試験は平成 24 年 8 月より 12 月に実施した。

2.1.8 本法の適応性試験について

和歌山県内で採取したトリカブト及びチョウセンアサガオの根、葉及び茎について本法によりアコニチン等の分析を行い、その適応性を検討した。

C. 結果及び考察

1. 自然毒による中毒事例の収録件数

- 1) 収録総件数：273 件
- 2) 魚類：88 件（ふぐ毒 71, シガテラ 9, 等)
- 3) 貝・蟹類：37 件（麻痺性 15, テトラミン 14 等)
- 4) キノコ：62 件
- 5) 山野草：37 件
- 6) 栽培植物：32 件
- 7) 海藻：1 件
- 8) その他（ヒスタミン等）：16 件

2. LC-MS/MS によるアコニチン等 4 物質の迅速試験法の開発検討

1) 試験溶液の調製方法

平成 23 年度に実施したリコリン試験法が良好な結果が得られたことから、アコニチン等 4 物質についても同じ方法を用いた。本法はメタノール抽出後、希釈、メンブランフィルターろ過を行う方法で、簡便で迅速性に優れている。

2) LC 及び LC-MS/MS 条件の検討

LC 分離カラムについて分離能及び保持時間を比較検討した結果、2.1.3 の 5) に示す ODS 系及び多機能系カラムが適応可能であった。

また、移動相については、10mmol/L ギ酸アンモニウム及びメタノール系あるいは 5mmol/L 酢酸アンモニウム及び 5mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール系共に良好な分離を示した。

LC-MS/MS の測定条件では、プリカーサーイオンとしてアコニチン 646、メサコニチン 632、アトロピン 290、スコポラミン 304、プロダクトイオンとしてアコニチン 586、105、77、368、526、メサコニチン 572、105、77、354、540、アトロピン 124、

93、77、103、スコポラミン 138、156、103、77 が定量、確認イオンとして良好であった。

3) 標準溶液の直線性：機種別の検出感度の違いにより、各機関が用いた濃度は異なるが、2~100 ng/mL の範囲で直線性が得られた。

4) マトリックス効果の検討：LC-MS/MS 測定において、食品中のマトリックスによってイオン化が影響される場合がある。また、使用機種によっても異なることからマトリックス影響について検討した。

1 機関においては、マトリックス標準溶液/溶媒標準溶液の比率がアコニチン 1.73、メサコニチン 1.76、アトロピン 1.70、スコポラミン 1.63 と 4 物質共通して高く、マトリックス影響が大きく認められた。

その他の機関では、アコニチン 0.93~1.24、メサコニチン 0.91~1.24、アトロピン 0.80~1.18、スコポラミン 0.92~1.14 となった。したがって、マトリックス影響が認められた場合は、適宜溶媒標準溶液の検量線を用いず、マトリックス検量線で定量を行った。

5) 検出限界：機種により検出限界は異なったが S/N=3 として、アコニチン 0.004~5.5pg、メサコニチン 0.005~12pg、アトロピン 0.005~9.1pg、スコポラミン 0.008~7.9pg が担保された。

6) 19 機関による共同試験結果について平均値の 3 シグマ処理を行ったところ、アトロピンについては 1 機関が除外された。添加回収試験 5 試行の個々の機関の測定結果について、平均値、回収率及び併行精度を表 5、表 7、表 9 および表 11 に示した。

各機関の回収率はアコニチン 85.4%~111.6%、メサコニチン 85.4%~109.9%、アトロピン 85.3%~126.4%、スコポラミン 75.1%~115.9%であった。各機関の併行精度はアコニチン 0.7%~6.2%、メサコニチン 0.7%~5.4%、アトロピン 1.1%~6.1%、スコポラミン 0.8%~4.8%であった。

7) 共同試験による機関間(室間)の結果を表6、表8、表10および表12に示した。平均回収率はアコニチン 97.8%、メサコニチン 98.2%、アトロピン 103.5%、スコポラミン 97.7%、併行相対標準偏差(RSD_r)はアコニチン 3.2%、メサコニチン 3.0%、アトロピン 2.9%、スコポラミン 2.4%、室間再現相対標準偏差(RSD_R)はアコニチン 8.2%、メサコニチン 6.8%、アトロピン 10%、スコポラミン 9.9%であった。また、Horwitz 式の Thompson 修正式で算出される予測室間再現相対標準偏差($PRSD_R$)に対する RSD_R の比である HorRat 値はアコニチン 0.89、メサコニチン 0.74、アトロピン 1.1、スコポラミン 1.1 であった。HorRat が全ての物質において、国際的な評価値 2 (AOAC 1.5) 以下であり、満足のいく分析精度が得られた。今回共同試験を実施した LC-MS/MS によるアコニチン等 4 物質の迅速一斉試験法の妥当性が確認された。

今回検討した LC-MS/MS による迅速試験法は約 2 時間でアコニチン等 4 物質を定量することができ、また、精度管理も良好な結果であったことから、健康危機管理への迅速、的確な対応に有効な手段として活用が期待される。

また、久野らの発表(健康危機管理に対応した自然毒一斉分析法の検討-有毒植

物およびきのこ 19 成分、第 48 回全国衛生化学技術協議会年会講演要旨集)による和歌山県内で採取した トリカブト及びチョウセンアサガオの葉及び鱗茎について本法により分析を行った結果を表 13 に示した。トリカブトの根からアコニチンが $200 \mu\text{g/g}$ 、メサコニチン $2000 \mu\text{g/g}$ 、チョウセンアサガオの根からアトロピン $140 \mu\text{g/g}$ 、スコポラミン $310 \mu\text{g/g}$ 等が検出された。

このように精度よく自然物からアコニチン等 4 物質の測定が可能であり、迅速試験法としてその適応性が認められた。

D. 結論

1. 既存のデータベース地方衛生研究所職員専用ホームページにある「自然毒中毒事例情報システム」を活用し、全国各地研での自然毒による食中毒の事例や試験法をデータベースに集積し、情報の共有を図り、健康危機管理への迅速な対応に資するツールの構築、推進を図った。

2. LC-MS/MS を用いて約 2 時間でトリカブト等の有毒成分アコニチン等 4 物質が定量できる迅速試験法を開発し、その精度管理の実施により迅速、的確な健康危機管理対応に有効な手段を構築した。

E. 研究発表

1. 学会発表

久野恵子、高井靖智、橋爪崇、山東英幸(和歌山県環境衛生研究センター):健康危機管理に対応した自然毒一斉分析法の検討-有毒植物およびきのこ 19 成分、第 48 回全国衛生化学技術協議会年会、長野、

2011年11月10-11日

F. 知的所有権の取得状況

なし

表 1. トリカブト類による食中毒事例（平成 15 年～24 年、厚生労働省）

発生 月日	発生場所	原因食品	原因施設	摂食 者数	患者 数	死者 数
15. 4. 10	秋田県	トリカブトのおひたし	家庭	2	2	0
15. 4. 14	山形県	トリカブト	家庭	3	3	1
15. 4. 21	国内不明	トリカブト	採取場所	7	5	0
15. 5. 3	北海道	トリカブト	家庭	不明	4	0
15. 5. 17	山形県	トリカブト	家庭	1	1	0
15. 6. 8	山形県	トリカブト	その他	1	1	0
15. 8. 20	北海道	トリカブト	その他	不明	1	0
16. 4. 16	大阪府	トリカブト	家庭	5	5	0
16. 5. 7	山形県	トリカブト（5/7、家庭の食事）	家庭	3	1	0
16. 7. 20	山形県	トリカブト（7/20、家庭食事）	家庭	3	3	0
17. 4. 15	山形県	トリカブト	家庭	4	4	0
17. 4. 17	北海道	山菜おひたし（トリカブト）	家庭	1	1	0
17. 4. 30	青森県	トリカブトのおひたし	家庭	1	1	0
17. 5. 4	神奈川県	トリカブト（推定）	家庭	1	1	0
18. 4. 21	青森県	和え物（トリカブト）	家庭	6	6	1
18. 5. 6	山形県	トリカブト	家庭	2	2	0
19. 5. 24	青森県	有毒山野草（推定トリカブト）	家庭	2	2	0
20. 4. 11	山形県	トリカブト（推定）	家庭	1	1	0
20. 4. 12	秋田県	トリカブトのおひたし	家庭	3	3	0
21. 4. 20	秋田県	トリカブトのおひたし	家庭	2	2	0
22. 3. 21	愛知県	トリカブト	家庭	2	1	0
22. 4. 8	新潟県	ヤマトリカブトのおひたし	家庭	3	2	0
22. 4. 24	北海道	トリカブト	家庭	2	2	0
23. 4. 19	北海道	エゾトリカブト	家庭	1	1	0
24. 6. 4	北海道	トリカブト（野草で作った団子）	家庭	2	1	0

表 2. チョウセンアサガオ類による食中毒事例（平成 15 年～24 年、厚生労働省）

発生日	発生場所	原因食品	原因施設	摂食者数	患者数	死者数
15. 1. 21	京都府	チョウセンアサガオ	家庭	5	5	0
15. 10. 22	北海道	チョウセンアサガオ（推定）	家庭	3	3	0
16. 4. 15	長野県	チョウセンアサガオの根の油炒め	家庭	5	5	0
16. 7. 30	秋田県	チョウセンアサガオの実	家庭	2	2	0
16. 8. 6	愛媛県	チョウセンアサガオのつぼみ	家庭	1	1	0
16. 10. 7	鹿児島県	チョウセンアサガオの和え物	家庭	3	3	0
17. 4. 8	山形県	チョウセンアサガオの根の天ぷら	家庭	2	2	0
17. 4. 12	新潟県	チョウセンアサガオの根のきんぴら	家庭	1	1	0
17. 5. 26	岩手県	チョウセンアサガオの根	家庭	3	3	0
18. 6. 22	福岡県	チョウセンアサガオ	家庭	6	6	0
19. 3. 6	鹿児島県	コダチチョウセンアサガオ	家庭	2	2	0
19. 4. 29	岡山県	チョウセンアサガオの根を含むキノコ類	家庭	4	3	0
20. 12. 9	愛知県	チョウセンアサガオの根	家庭	2	2	0
21. 1. 5	兵庫県	チョウセンアサガオの根	家庭	2	2	0
21. 2. 3	福島県	チョウセンアサガオ（混ぜごはん）	家庭	4	4	0
22. 3. 5	愛知県	チョウセンアサガオ	家庭	2	2	0
23. 5. 31	岡山県	チョウセンアサガオ	家庭	2	2	0
23. 7. 5	北海道	チョウセンアサガオ類のお浸し及び炒め物	家庭	4	4	0
23. 12. 20	岡山県	チョウセンアサガオ（根）	家庭	2	2	0
23. 2. 18	島根県	チョウセンアサガオ（推定）	家庭	3	3	0
23. 4. 15	兵庫県	チョウセンアサガオの根	家庭	3	3	0
24. 3. 19	広島県	チョウセンアサガオの根（推定）	家庭	2	2	0

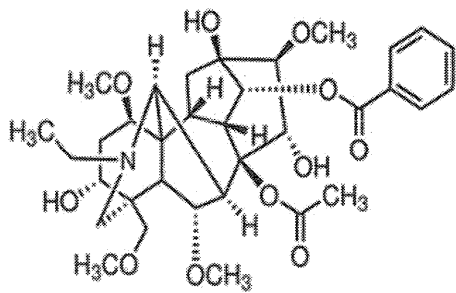


図 1. アコニチンの構造式

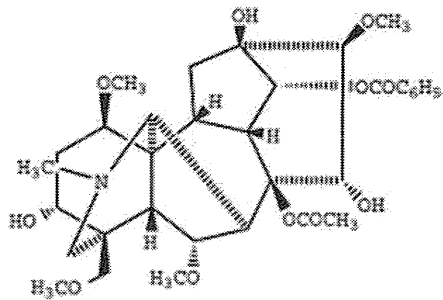


図 2. メサコニチンの構造式

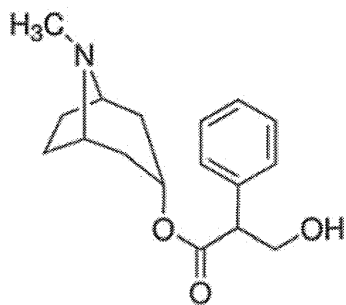


図 3. アトロピンの構造式

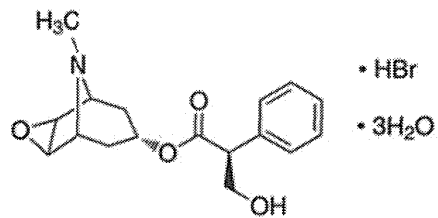


図 4. スコポラミン臭化水素酸塩三水和物の構造式

表 3. LC の測定条件

LC-Instrument : Shimadzu LC-20
 Column: Scherzo SM-C18 2.0mm×150mm, 3 μm
 Column temperature : 40°
 Injection volume : 5 μl
 Mobile phase : SolventB 60%(0-4min)-95%(10-15min)
 SolventA: 10mmol/L ammonium formate
 SolventB: methanol
 Mobile phase flow rate : 0.2mL/min

表 4. MS の測定条件

ESI, Positive Mode
 CurtainGas : 10Psi CollisionGas : 7Psi
 IonSprayVoltage: 5500V Temperature: 700°
 IonSourceGas1: 40Psi IonSourceGas2: 70 Psi

Analyte	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Dwell time (ms)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Aconitine	646.3	586.2	80	136	45	4
	646.3	77.1	80	136	129	4
	646.3	105.1	80	136	97	6
Mesaconitine	632.1	572.2	80	126	45	14
	632.1	77.2	80	126	127	12
	632.1	105	80	126	89	16
Atropine	290	124.1	80	86	35	8
	290	93	80	86	45	6
	290	77.1	80	86	83	4
Scopolamine	304	138	80	71	35	6
	304	156.1	80	71	25	6
	304	103.1	80	71	57	8