

資 料

LC-MS/MS による生団子中のセレウリドの定量とその留意点について

南谷臣昭, 野田万希子, 原 信行, 菅原吉規*, 白木康一,
中村昌司, 永井宏幸, 小林香夫, 大塚公人

要 旨

平成 22 年に発生したみたらしだんごを原因とする嘔吐型のセレウス菌による食中毒において, 原因となった生団子半製品中に含まれるセレウリドの含量を LC-MS/MS により定量した. 既報に従い, 等量の水を加えてペースト状に均質化した試料からメタノールによりセレウリドを抽出し, Oasis HLB (60 mg) により精製した. Oasis HLB の洗浄溶媒を 80%メタノールから 70%メタノールにしたところ, 回収率が 54.4%から 101.3%に向上し良好な回収率が得られた. LC-MS/MS の測定は, 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液と 5 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液の 2 液によるグラジエント法により行い, セレウリドのアンモニウム付加体イオンをプリカーサーイオンとしてマルチプルリアクションモニタリング (MRM) 測定を行った. 生団子中のセレウリドの定量値は, HEp-2 細胞空胞化試験の結果に比べ平均約 17 倍大きな値となった. この原因としては, 抽出溶媒の違いと, LC-MS/MS 法で用いた標準溶液の濃度の 2 つの要因が考えられた.

キーワード: セレウス菌, 嘔吐毒, セレウリド, LC-MS/MS, HEp-2 細胞空胞化試験

1 はじめに

平成 22 年 8 月 29 日から 30 日にかけて, 東京都府中市内の施設が調理, 販売したみたらしだんごを原因食品とする嘔吐型セレウス菌による食中毒が発生した. 原因のみたらしだんごの原材料は岐阜県内に製造施設を有する食品会社が製造した生団子半製品であることが判明し, 9 月 2 日に食品衛生法に基づき, 当該製造施設の営業の停止と原因食品の生団子の回収が命じられた. 東京都が当初行った調査では, 患者の嘔吐物, および糞便, 残品の生団子から嘔吐毒産生遺伝子をもつセレウス菌が検出され, 中毒の原因が確定された.

一方で, より詳細な食中毒の原因究明を行うため, 製造施設から採取した生団子からのセレウス菌分離を岐阜県飛騨保健所で行うとともに, 原因毒素であるセレウリドの定量依頼が当研究所にあった. そこで, 食中毒が発生した 8 月後半に製造された, 製造日の異なる 5 検体について, 生団子中に含まれるセレウリドの定量を行った.

嘔吐毒のセレウリドは, 12 個のアミノ酸とオキシ

酸が環状につながった, デブシペプチド [cyclo(D-*l*-Leu-D-*l*-Ala-L-*l*-Val-L-Val)₃] であり¹⁾, 同じくドデカデブシペプチドのバリノマイシンと同様, カリウムイオノフォアとして細胞膜上の電位を脱分極させる生理活性を有する²⁾. セレウリドの定量法としては, ヒト咽頭がん由来の細胞である HEp-2 細胞の空胞化変性活性を判定するバイオアッセイ法と, 液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) によりセレウリドを定量する理化学的試験法の 2 つが主なものとして知られている³⁾.

今回我々は, 梶田ら⁴⁾が 2007 年に報告した分析法をもとに, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて, 製造施設から採取した生団子半製品中のセレウリドの定量を行った. その中で, LC-MS/MS の移動相の選択, 固相抽出カートリッジの洗浄溶媒について若干の改良を試みた. また, LC-MS/MS で分析した検体と同一の検体について, 名古屋市衛生研究所に HEp-2 細胞空胞化試験⁵⁾を依頼した. この両者の試験法で得られた定量値を比較することで明らかとなった, セレウリドの LC-MS/MS

測定における留意点について述べる。

2 実験方法

2.1 試薬および試料

セレウリド標準溶液：(有)バイオコントロール研究所製の精製セレウリド（1 mg 当量/ml）を標準原液として、メタノールにより 1000 倍希釈して、1 µg/ml の標準溶液を調製した。これを、95%メタノール溶液により希釈して用いた。

バリノマイシン標準溶液：和光純薬工業(株)製のバリノマイシン（生化学用：min. 85.0%(HPLC)）を 10 mg 精秤し、メタノールに溶解して 10 mL として、1000 µg/ml の標準原液を調製した。これをメタノールにより 1000 倍希釈して、1 µg/ml の標準溶液を調製し、さらに 95%メタノール溶液により希釈して用いた。

試薬：移動相の調製に、和光純薬工業(株)製メタノール（LC-MS 用）、超純水（LC-MS 用）、1 mol/L 酢酸アンモニウム（HPLC 用）、ギ酸（LC-MS 用）及び、関東化学(株)製の酢酸アンモニウム（特級）を用いた。試験溶液の調製に、和光純薬工業(株)製メタノール（LC-MS 用）を用いた。

試料：製造施設から採取した生団子半製品（平成 22 年 8 月 21 日～9 月 1 日製造の 5 検体）。添加回収試験には、市販の生団子を用いた。

2.2 装置

振とう機：東京理化器械(株)製の MMV-1000W を用いた。

遠心分離装置：(株)クボタ製作所製のユニバーサル冷却遠心機 5930 を用いた。

液体クロマトグラフ／タンデム質量分析計（LC-MS/MS）：Agilent 製 1200 システム—AB サイエックス製 4000QTRAP を用いた。また、窒素自動発生装置として、アネスト岩田サービス(株)製オイルフリースクロールコンプレッサ SLP-221EBD を用いた。

2.3 LC-MS/MS 測定条件

LC 分離用カラムはインタクト製 Cadenza CD-C18（2.0 mm×150 mm, 3 µm）を用い、カラム恒温槽で 50°C に維持した。移動相は、5 mM 酢酸アンモニウム水溶液（移動相 A）、5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液（移動相 B）のグラジエントモードで送液した。LC グラジエントモードは、A/B(20/80)初

期条件より、2 分間で(0/100)とした。その後、13 分間(0/100)で保持し、3 分間(80/20)でカラムを洗浄し、初期条件に戻して 10 分間安定化した。流速は、0.2 mL/min に設定し、注入量は 10 µL とした。

MS/MS のイオン化法は、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）のポジティブモードを採用した。イオン化の条件は、イオンスプレー電圧 5.5 kV、イオンスプレー温度 600°C、ネブライザーガス 50 psi、デイスolvベーションガス 80 psi、カーテンガス 20 psi とした。コリジョンガスには窒素を用い、その流量は 4 psi に設定した。

セレウリドのイオンの検出は、マルチプルリアクションモニタリング（MRM）により行った。アンモニウム付加体イオンをプリカーサーイオンとし、プロダクトイオンは、強度の高かった 5 種類のイオンを選択した。表 1 に各トランジション条件を示した。

表 1 MRM トランジション条件

Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP* (V)	CE* (V)	CXP* (V)
1170.7	1125.7	140	53	32
1170.7	1107.6	140	58	30
1170.7	940.6	140	63	26
1170.7	698.5	140	73	18
1170.7	556.5	140	71	14

* DP:Declustering Potential CE:Collision Energy

CXP:Collision Exit Potential

2.4 試験溶液の調製

生団子試料を秤量し、等量の水を加えてフードミルによりペースト状になるまで混和均質化した。この均質化試料を 5 g 精秤し、50 mL ポリプロピレン遠沈管に入れ、メタノール 20 mL を加え 10 分間振とう抽出を行った。抽出液を 3000 rpm で 10 分間遠心分離して、上清を 100 mL の梨型フラスコに集めた。残渣はさらにメタノール 20 mL を加えて混和均質化し、同様に遠心分離を行って、上清を先の上清と合わせた。これを、40°C 以下で減圧濃縮して、メタノール及び水を除去し、残留物に 50%メタノール溶液 2 mL を加えて超音波洗浄器中でフラスコ内壁に付いた残留物を溶解した。これを、あらかじめメタノ

ール5 mLおよび50%メタノール5 mLによりコンディショニングした固相抽出ミニカラム (Waters 製 Oasis HLB Vac RC, 60 mg) に負荷し, 50%メタノール溶液3 mL, 70%メタノール溶液3 mL にて順次洗浄した後, メタノール3 mL で溶出した. 溶出液を40°C以下で減圧濃縮し, 残留物を95%メタノール溶液2 mLで溶解し, ディスクフィルター (MILLIPORE 製 Millex-LG, PTFE, 0.20 μ m) を通過させて試験溶液とした.

2.5 添加回収試験

市販の生団子に添加濃度0.01 μ g/gとなるようにセレウリド標準溶液を添加した.

2.6 HEp-2 細胞空胞化試験⁵⁾

LC-MS/MS で測定したものと同一試料5検体の検査を名古屋市衛生研究所に依頼した.

3 結果および考察

3.1 LC-MS/MS の移動相溶媒の検討

セレウリドとバリノマイシンを, 梶田らの報告⁴⁾に従い, 0.1%のギ酸溶液とメタノールの2液のグラジエントモードによりLCで分離した上で, Q1 スキ

ャン測定を行って生成するプリカーサーイオンを検証したところ, 両物質のプロトン付加体とアンモニウムイオン付加体が検出され, セレウリドのアンモニウムイオン付加体に対するプロトン付加体の割合は, ピーク高さにして16.4%であった (図1 (A)). 一方で, 今回我々が採用した, 5 mM 酢酸アンモニウム溶液と5 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液の2液によるグラジエントモードでQ1 スキャン測定を行ったところ, 生成するイオンはほぼすべてアンモニウムイオン付加体として検出され, プロトン付加体のピーク高さはその1/100を下回った (図1 (C)).

0.1%ギ酸溶液を移動相として用いることで, セレウリドとバリノマイシンの分離度が改善した (図1 (B)). しかし, 川村ら⁶⁾の報告においては, 2つのイオン付加体の割合が一定でないことが, 定量値の正確性および安定性などに影響する可能性が示唆されている. この影響を回避するため, 5 mM 酢酸アンモニウム溶液と5 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液の2液によるグラジエントモードを採用し, セレウリドのアンモニウムイオン付加体を主に

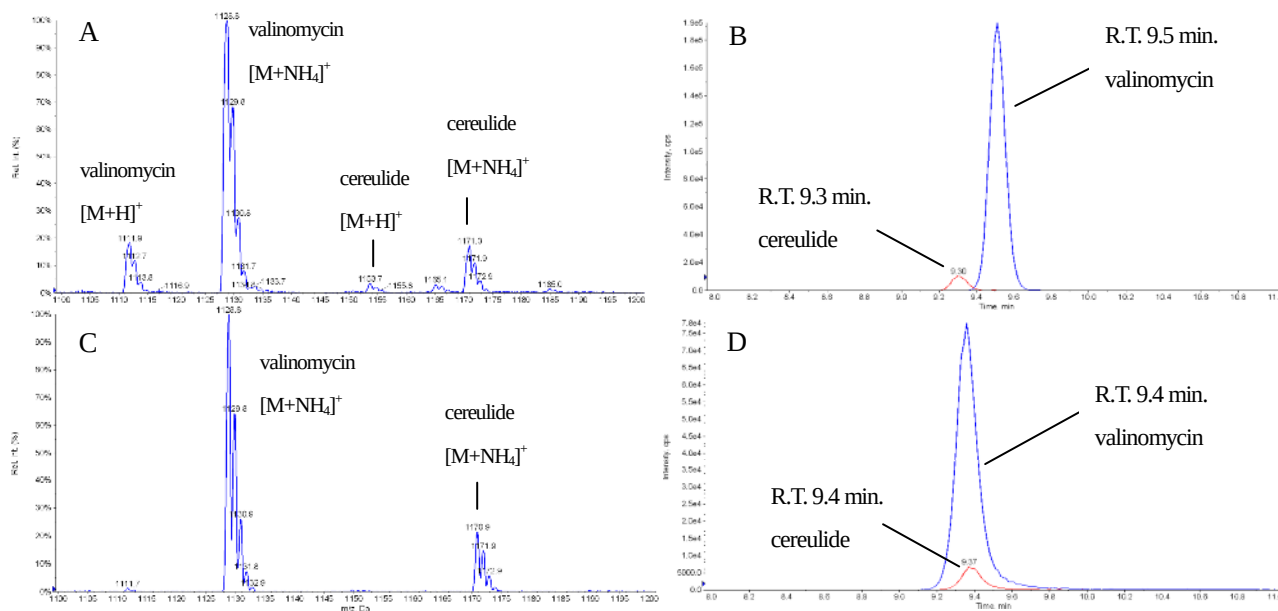


図1 (A), (C) :セレウリドとバリノマイシンのQ1 スキャンスペクトル(スキャン範囲 m/z 1100-1180)
 (B), (D) :セレウリドとバリノマイシンのMRM クロマトチャート
 (A), (B)の移動相: 0.1% ギ酸 / メタノール
 (C), (D)の移動相: 5 mM 酢酸アンモニウム / 5 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール

形成させることにより 定量を行った (図 1 (D)).

また、既報⁶⁾で行っているバリノマイシンによる内部標準補正は行わず、セレウリド標準による絶対検量線により定量を行った。

3.2 固相抽出ミニカラムの洗浄溶媒と添加回収率

梶田らの報告に従い、生団子試料に 0.01 µg/g となるようにセレウリド標準溶液を添加したものを分析したところ、添加回収率は 54.4%と低率であった。この原因として、固相抽出ミニカラムの洗浄溶媒 (80%メタノール) により、セレウリドが流出していることが考えられたため、洗浄溶媒を再検討した。50 ng/ml のセレウリド溶液 (50%メタノール溶液) 2 mL を Oasis HLB Vac RC ミニカラムに負荷し、50%メタノール 3 mL で洗浄後、10%ずつメタノール濃度を上げて、その溶出液中に含まれるセレウリド量を定量した (表 2)。

表 2 Oasis HLB Vac RC ミニカラム (60 mg) に負荷したセレウリドの溶出パターン

Methanol conc.*	Elution volume (mL)	Recovery (%)
loaded solution	2	0
50%	3	0
60%	3	0
70%	3	0.3
80%	3	69.9
90%	3	33.3
100%	3	3.3

*50 ng/ml のセレウリド溶液を 2 mL 負荷し、その後 3 mL ごとにメタノールの濃度を 10%ずつ上げて溶出した。

メタノール濃度が 70%まではセレウリドの溶出量は全体の 0.3%であったが、80%メタノール 3 mL に含まれるセレウリド量は 69.9%となった。このことから、80%メタノールで洗浄することにより、セレウリドが流出する可能性が示唆された。よって、抽出液負荷後のミニカラムの洗浄は、50%メタノール 3 mL、70%メタノール 3 mL とした。メタノール濃度を 80%から 70%に変更することで、添加回収率は平均 101.3%と向上した (n=3, 室内精度 RSD 11.5%)。

3.3 生団子回収品の定量結果—LC-MS/MS 法と

HEp-2 細胞空胞化試験との比較

製造施設に残っていた生団子のセレウリド分析結果を表 3 に示した (食中毒の原因となった生団子は、平成 22 年 8 月 27 日と 8 月 28 日に製造された製品である)。

表 3 生団子から検出されたセレウリド量

Production dates	Cereulide content (ng/g)		(a)/(b)
	(a)LC-MS/MS analysis	(b)HEp-2 cell assay*	
2010 . 8. 21	10000	640	15.6
8.27	7300	320	22.8
8.28	11000	640	17.2
8.31	1800	80	22.5
9. 1	1300	160	8.1

*名古屋市衛生研究所の試験結果

検査を行った 5 検体いずれからでも、セレウリドが検出された。LC-MS/MS 法と HEp-2 細胞空胞化試験の定量値を比較すると、両者の値に相関性はあるものの、8.1~22.8 倍 (平均 17.1 倍) LC-MS/MS の値が大きくなっていた。

HEp-2 細胞空胞化試験においては、試料からセレウリドをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) によりストマッカー処理したが、LC-MS/MS 法では等量の水を加えてペースト状とした試料に、メタノールを加えてセレウリドを抽出する。この抽出方法の違いが、定量値の差となっていると考えられた。そこで生団子に PBS を加えてストマッカー処理した抽出液中に含まれるセレウリド量を LC-MS/MS により定量し、LC-MS/MS 法のメタノール抽出液中に含まれるセレウリド量と比較したところ、LC-MS/MS 法のメタノール抽出液に含まれるセレウリド量がストマッカー処理した後の PBS 中に含まれるセレウリド量の 4 倍となった。しかし、この抽出方法の違いだけでは、両方法の定量値が平均約 17 倍異なることを説明できない。

Biesta-Peters ら⁷⁾ は、同濃度のセレウリドとバリノマイシンを LC-MS により測定した場合、セレウリドのピーク面積がバリノマイシンより 10.3%高い値となると報告している。彼らが用いたバリノマイ

シンは、Sigma-Aldrich 製で、その純度が min. 90%(HPLC)であることを考慮すると、セレウリドとバリノマイシンの LC-MS 上の感度差はほとんどないと考えられた。そこで、シングル MS のスキャン分析と同等である Q1 (第一四重極) スキャン測定を実施することで、バリノマイシンを標準として今回我々が使用したバイオコントロール研究所製の精製セレウリドの濃度を推定した。標準原液から調製した 10 ng 当量/ml のセレウリド標準溶液と 10 ng/ml のバリノマイシン標準溶液とを Q1 スキャンにより測定し、セレウリドとバリノマイシンのアンモニウムイオン付加体のモノアイソトピック質量にあたるピーク面積値を比較した (図2)。

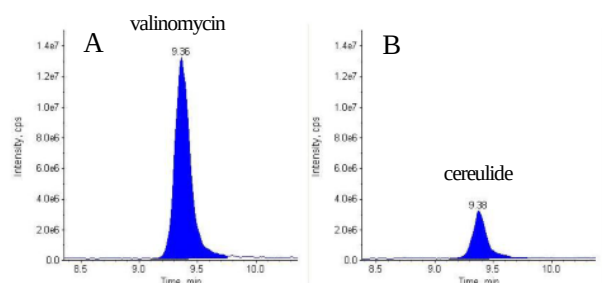


図2 (A) 10 ng/ml バリノマイシンのマスクロマトグラム (m/z 1127.8–1129.3)

(B) 10 ng 当量/ml のセレウリドのマスクロマトグラム (m/z 1169.8–1171.3)

バリノマイシンに対するセレウリドのピーク面積比: 0.213

バリノマイシンに対するセレウリドの面積は 0.213 であり、バリノマイシンの純度が 85.0% であったとして、バリノマイシンに対する同濃度のセレウリドの面積比は 0.18 となった。このことは、今回使用した精製セレウリドを標準原液として用いた場合、定量値が真値に比して 5.6 倍大きくなるということを意味する。表3の LC-MS/MS 測定結果にこの面積比を乗じて補正したものを表4に示した。

今回用いた精製セレウリドは、HEp-2 細胞の空胞化を観察する生物活性測定により毒素力価測定を行い、1 mg 当量/ml と値付けされている。HEp-2 細胞の空胞化変性活性はセレウリドに包含されているイオン種により異なるとも言われている。そのため、包含されているイオン種に関係なくセレウリドの総

量を測る手法である LC-MS/MS や LC-MS の定量値と、HEp-2 細胞の空胞化試験の結果とが一致しないことはあり得る。

また、HEp-2 細胞空胞化試験は、サンプルの2倍段階希釈列をマイクロプレート上に作製し、細胞の空胞化が確認された最大の希釈数に、検出感度 (5 ng/mL) を乗じて試料中の毒素の濃度を求める半定量法である。このため、値付けされた濃度が真値の 1/2~2 倍の範囲内で変動する点に留意する必要がある。

表4 生団子中のセレウリド量の LC-MS/MS による分析結果 (表3 (a)の値に 0.18 を乗じた値)

Production dates	Cereulide content (ng/g)
2010. 8. 21	1800
8.27	1300
8.28	1900
8.31	320
9. 1	240

以上により、HEp-2 細胞空胞化試験と LC-MS/MS の定量値の違いは、抽出溶媒の違いという試験法に由来する原因と、LC-MS/MS 測定に使用した標準溶液濃度の問題という2つの要因により説明できる。現在、セレウリドの標準物質は市販されていないため、正確な定量値を得るためには、化学合成により標準物質を準備する^{7), 8)}か、あるいは菌株培養液から、より高純度のセレウリドを精製して標準物質とするかいずれかの方法が望まれる。

しかし、いずれの方法も多くの手間と労力を要するため、Hagglom ら⁹⁾のように、バリノマイシンとセレウリドの LC-MS 測定における感度が近いことを利用して、バリノマイシンをセレウリド標準物質の代替として使用することも1つの手段であると考えられる。

4 まとめ

LC-MS/MS を用いるセレウリドの検出法は、その迅速性と簡便性において HEp-2 細胞空胞化試験などのバイオアッセイ法よりも優れている。しかし、定量

に際しては、現段階で入手可能な高純度のセレウリド標準物質がないため、バリノマイシンを標準物質としてLC-MSによりセレウリドの定量値をバリノマイシン当量として求める以外に確からしい定量値を求める手法がない⁹⁾。

今回我々は、標準として用いた精製セレウリドと市販のバリノマイシンを同濃度に調製し、Q1 スキャン測定により感度を比較して、精製セレウリドの真の濃度を推定した。その結果をもとに、セレウリドの定量値を補正して、食中毒の原因となった生団子中に含まれるセレウリドの真の含有量を推定した(表4)。あらかじめQ1 スキャンにより精製セレウリドの濃度を値付けしておけば、食中毒事案に対して、迅速に正確な値を提供することが可能となる。

今後、この手法により求められた定量値は、嘔吐型セレウス菌による食中毒において、毒素量と発症量の関係を明らかにする上で貴重な疫学的情報を提示するものとする。

謝 辞

HEp-2細胞空胞化試験を実施いただいた名古屋市衛生研究所の安形則雄氏に深く感謝いたします。また、本検討を行うにあたり、ご助言を賜りました名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学講座の岡本陽氏ならびに、大阪府公衆衛生研究所の山口瑞香氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I. and Isobe, M. : A novel dodecapeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells, *FEMS Microbiol. Lett.*, 121, 31-34, 1994.
- 2) Mikkola, R., Saris N.E.L., Grigoriev P.A., Andersson M.A. and Salkinoja Salonen M.S. : Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide, *Eur. J. Biochem.*, 263, 112-117, 1999.
- 3) 上田成子：食品衛生検査指針 微生物編，第2章 細菌 10 セレウス菌，日本食品衛生協会，266-282，2004.
- 4) 梶田弘子，岩渕香織，藤井伸一郎，畠山えり子：LC-MS/MSによる嘔吐毒セレウリドの分析，岩手県環境保健研究センター年報，7，75-78，2007.
- 5) Szabo, R. A., Speirs, J. I. and Akhtar, M. : Cell culture detection and conditions for production of a *Bacillus cereus* heat-stable toxin., *J. Food Prot.*, 54, 272-276, 1991.
- 6) 川村久美子，平間佑美，安形則雄，伊藤秀郎，太田 美智男：High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry 法を用いた *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，15，68-76，2005.
- 7) Biesta-Peters, E.G., Reiji, M.W., Blaauw, R. H., in't Veld, P.H., Rajkovic, A., Ehling-Shulz, M. and Abee, T. : Quantification of the emetic toxin cereulide in food products by liquid chromatography-mass spectrometry using synthetic cereulide as a standard., *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 7466-7472, 2010.
- 8) Isobe, M., Ishikawa, T., Suwan, S., Agata, N. and Ohta, M. : Synthesis and activity of Cereulide, a cyclic dodecadeptide ionophore as emetic toxin from *Bacillus cereus*., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 2855-2858, 1995.
- 9) Häggblom, M.M., Apetroaie, C., Andersson, M.A. and Salkinoja-Salonen, M.S. : Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions., *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2479-2483, 2002.

Quantification of the Emetic Toxin Cereulide in Rice Dumplings by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry — Point to Consider in the Analysis

Tomiaki MINATANI, Makiko NODA, Nobuyuki HARA, Yoshiki SUGAHARA*, Koich SHIRAKI,
Masashi NAKAMURA, Hiroyuki NAGAI, Yoshio KOBAYASHI, Kimihito OTSUKA

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:

1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu, 504-0838, Japan

**Gifu Prefectural Ceramics Research Institute:*

3-11, Hoshigadai, Tajimi, Gifu, 507-0811, Japan