健康危害要因となりうる食品中の化学物質に関する研究

笹本　剛生[a]，中村　耕[f]，浅倉　弘幸[g, j]，木村　圭介[b]，武森　真由美[c]，小林　麻紀[d]，
鈴木　淳子[f]，内本　勝也[i, n]，清水　雅子[f]，阿部　朋弘[i, q]，荒金　眞佐子[f]，中嶋　順一[f]，高橋　美佐子[f]，
市川　瑶子[f]，植村　望美[f]，鈴木　郁雄[f]，清水　聖子[f]，浦出　朋子[f]，坂牧　成恵[c]，貞升　友紀[c]，萩野　賀世[b]，
清水　本武[g, m]，寺井　朗子[b]，観　公子[b]，田端　節子[b]，大貝　真実[b]，柳原　碧[b]，田中　智哉[b]，富澤　早苗[d]，
田村　康宏[d]，八巻　ゆみこ[d]，増渕　珠子[d]，岩越　景子[h, l]，中川　由紀子[d]，増田　諒子[h, o]，須藤　将太[h]，
小鍛冶　好恵[d]，酒井　奈穂子[d]，上條　恭子[d]，林　真輝[d]，大谷　陽範[d]，小池　裕[d]，馬場　糸子[h, l]，相澤　正樹[h]，
吉川　聡一[d]，長谷川　恵美[h, k]，中島　崇行[d]，渡邊　趣衣[d]，大町　勇貴[d]，森田　有香[d]，鈴木　仁[f]，中野　久子[b]，
門間　公夫[c]，小林　千種[c]，大塚　健治[d]，橋本　常生[d]，新藤　哲也[h, p]，守安　貴子[e]，

平成27～29年度に実施された重点研究「健康危害要因となりうる食品中の化学物質に関する研究」の概要について報告する．本重点研究はヒトに健康危害を引き起こす恐れのある化学物質について，迅速かつ簡便に検査可能な手法を確立して健康危害の原因究明と被害拡大防止に資することを目的とし，5題の個別研究課題から構成され研究が進められた．主な成果として「山菜と誤認しやすい有毒植物の鑑別方法に関する研究」では複数の有毒植物についてフローサイトメトリーや走査型電子顕微鏡を用いた迅速かつ簡便な鑑別法を確立した．「PCR法による有毒動植物鑑別法の検討」では，DNAシークエンス法やPCR-RFLP法等の様々な遺伝子学的手法を用いて有毒動植物の鑑別が可能となった．「有毒動植物中の有毒成分分析法の検討」では，LC-MS/MSを用いた有毒動植物中の有害化学物質の分析法を確立し，検査体制の強化を図った．「食品中エリスリトール等の糖アルコール分析法の検討及び低カロリー食品中の含有量調査」ではHPLC及びLC-MSを用いた食品中の糖アルコールの分析法を開発し，市販の加工食品119試料について糖アルコールの含有量実態調査を行った．「食品への農薬混入を想定した迅速検知法の検討」では，中毒量の農薬が存在するか否かを簡易迅速かつ安全に検査可能な手法を確立した．

キーワード：有毒動植物，フローサイトメトリー，走査型電子顕微鏡，DNAシークエンス法，PCR，LC-MS/MS，
シガトキシン，テトロドトキシン，ヒスタミン，アミグダリン，エリスリトール，マルチトール，ラクチトール，農薬，迅速検知法

---

[a] 東京都健康安全研究センター食品化学部
169-0073　東京都新宿区百人町3-24-1
[b] 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科
[c] 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
[d] 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科
[e] 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部
[f] 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部医薬品研究科
[g] 当時：東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科
[h] 当時：東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科
[i] 当時：東京都健康安全研究センター薬事環境科学部医薬品研究科
[j] 現所属：東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
[k] 現所属：東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科
[l] 現所属：東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
[m] 現所属：東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科
[n] 現所属：東京都健康安全研究センター広域監視部食品監視第一課
[o] 現所属：東京都健康安全研究センター広域監視部薬事監視指導課
[p] 現所属：東京都健康安全研究センター精度管理室
[q] 現所属：東京都福祉保健局健康安全部薬務課
163-8001 東京都新宿区西新宿2-8-1

はじめに

自然界に存在する天然物に加え，近代の化学工業によって合成された無数の化学物質は，人類に多大な恩恵をもたらし，現代生活において，化学物質は衣・食・住そして医療においても欠かすことのできないものとなっている．反面，これらの化学物質の中にはヒトに対して毒性を有し，時には重篤な食中毒を引き起こす化学物質も知られている．有毒植物に含まれるアルカロイドやフグ毒等は古くから知られている自然毒であるが，毎年散発的ながら誤食による食中毒が発生している．また，糖アルコールのように食品添加物の中にも摂取量によっては健康に影響を及ぼすものも存在する．さらには，食品への農薬の意図的混入事件の発生は，食品メーカーのフードディフェンスへの取り組み強化への契機ともなった．

これら化学物質に起因する健康危害は，事前に予測することや，消費者自身が予防することは極めて困難であり，原因となる食品（動植物）の鑑別，もしくは迅速かつ正確に有毒成分を検知し，当該食品を速やかに市場から排除することが最大の対策と考えられる．そのためには，過去の事例や健康リスクを勘案し，現状では鑑別や検知が困難な有毒動植物や化学物質について，迅速かつ正確な鑑別，検知方法を構築することが必要である．そこで本重点研究では，以下の5名の担当者が各個別研究課題について取り組んだ．

1. 中村　耕：山菜と誤認しやすい有毒植物の鑑別方法に関する研究
2. 浅倉弘幸：PCR法による有毒動植物鑑別法の検討
3. 木村圭介：有毒動植物中の有毒成分分析法の検討
4. 武森真由美：食品中エリスリトール等の糖アルコール分析法の検討及び低カロリー食品中の含有量調査
5. 小林麻紀：食品への農薬混入を想定した迅速検知法の検討

天然化合物（自然毒）を対象とする研究では，個別課題1及び2において複数の手法を用いた有毒動植物の鑑別方法の開発を行うとともに，個別課題3では原因化学物質を機器分析により検出する方法を検討し，多角的に有毒動植物を検知可能な手法を検討し，健康危害発生時の迅速かつ確実な検査体制構築を図った．一方，合成化合物である食品添加物及び農薬を対象とする個別課題4及び5においては，HPLC及びLC-MS/MSを用いた多成分一斉分析を基本として分析方法を検討し，健康危害が発生している場合を想定し，定量分析はもちろんのこと，マススペクトル解析による定性分析も短時間に実施可能な検査方法を構築することを目標とした．

個別研究課題の内容と成果

1. 山菜と誤認しやすい有毒植物の鑑別方法に関する研究

1) 目的

食用植物と誤認しやすい有毒植物による食中毒の発生の際には，迅速かつ正確な植物鑑別が求められるが，幼植物や裁断された葉片については，植物形態による鑑別が困難なことが多い．そのため，食中毒事例が多い数種の有毒植物について，より迅速・簡便な鑑別方法として，核DNA含量を測定するフローサイトメトリー（以下FCM）による鑑別及び走査型電子顕微鏡（以下SEM）を用いた微細形態鑑別について検討を行った．

2) 方法

(1) 実験材料　有毒植物：ドクゼリ1種，ヒガンバナ亜科植物6種，チョウセンアサガオ類 6種，イヌサフラン・スズラン類3種，バイケイソウ類5種，トリカブト類2種，合計23種の有毒植物を供した（Table 1）．

比較植物：セリ，ニラ，オクラ，ギョウジャニンニク，トウギボウシ，コバギボウシ，ニリンソウ，ゲンノショウコ，モミジガサ，合計9種の比較植物を実験に供した（Table 1）．なお，トウギボウシ，コバギボウシについては，以下ギボウシ類と記載する．

(2) FCMによる鑑別　Table 1の実験材料について，chopping 法[1] により，FCMを行い，相対的核DNA含量を測定した．FCMは約1 cm^2 の新鮮な葉片を用いて，プロイディーアナライザーCyFlow PA型（Partec GmbH, Germany）により，4’,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩（DAPI） 蛍光強度を測定した．

(3) 微細形態観察による鑑別　SEM（日立:TM-3000）により，実験材料の葉と鱗茎，蕾と果実の表面及び横断面の観察を行い，それぞれの形態の違いから，有毒植物の鑑別点について検討した．

3) 結果及び考察

(1) FCMによる鑑別　FCMは，標準試料を基準として有毒植物及び比較植物を同時に測定し，両者の核DNA含量を相対的に算出した．その結果，ドクゼリとセリについては，核DNA含量の差異による鑑別が可能であった(Fig.1)．標準試料としてハマスゲ（*Cyperus rotundus*）を用い，標準試料の相対的核DNA含量を1.00とした場合，ドクゼリは2.85，セリは4.46であった．その他の有毒植物と比較植物は，同一条件下（検出器の電圧・シグナル増幅値等）における測定が困難であり，FCMによる鑑別は不可能であった．

(2) 微細形態観察による鑑別　ドクゼリとセリ：ドクゼリとセリは，小葉の鋸歯や微細突起及び表皮細胞の形状が異なっていた．

ヒガンバナ亜科植物とニラ：ヒガンバナ亜科植物の葉と鱗茎の横断面には，シュウ酸カルシウムの束針晶が検出されたが（Fig.2-A，B），ニラの葉と鱗茎の横断面からは束針晶が検出されなかったため（Fig.2-C，D），シュウ酸カルシウム結晶の有無が鑑別点として有効であった．

チョウセンアサガオ類とオクラ：チョウセンアサガオ類の蕾（がく片）とオクラの果実における表面の毛状突起の形状が異なっていた．

イヌサフラン・スズラン類とギョウジャニンニク：イヌ

Table 1. Plant Materials used in the Experiment

	Scientific Name	Japanese Name	Parts used for Differential Identification
	Cicuta virosa	Dokuzeri	Leaves
	Oenanthe javanica	Seri	〃
Amaryllidoideae plants	*Narcissus tazetta* var. *chinensis*	Suisen	Leaves, Bulbs
	N. pseudonarcissus	Rappazuisen	〃
	N. tazetta var. *tazetta*	Fusazakizuisen	〃
	Leucojum aestivum	Sunoufuleiku	〃
	Lycoris radiata	Higanbana	〃
	Zephyranthes candida	Tamasudare	〃
	Allium tuberosum	Nira	〃
Groups of *Datura*	*Datura meteloides*	Amerikachousen-asagao	Buds
	D. wrightii	Kechousen-asagao	〃
	D. metel	Chousen-asagao	〃
	D. metel 'Floreplena'	Yaechousen-asagao(purple flower)	〃
	D. stramonium var. *chalybea*	Youshuchousen-asagao	〃
	Brugmansia suaveolens	Kidachichousen-asagao	〃
	Abelmoschus esculentus	Okura	Fruits
Colchicum autumnale and Groups of *Convallaria*	*Colchicum autumnale*	Inusafuran	Leaves, Bulbs
	Convallaria majalis var. *majalis*	Doitsusuzuran	Leaves
	C. majalis var. *manshurica*	Suzuran	〃
	Allium victorialis subsp. *platyphyllum*	Gyoujaninniku	Leaves, Bulbs
Groups of *Veratrum*	*Veratrum album* subsp. *oxysepalum*	Baikeisou	Leaves
	V. stamineum	Kobaikeisou	〃
	V. nigrum	—	〃
	V. maackii var. *parviflorum*	Aoyagisou	〃
	V. maackii var. *reymondianum*	Shurosou	〃
Groups of *Hosta*	*Hosta sieboldiana*	Tougiboushi	〃
	H. sieboldii var. *sieboldii f.spathulata*	Kobagiboushi	〃
Groups of *Aconitum*	*Aconitum japonicum* subsp. *Maritimum*	Tukubatorikabuto	Leaves
	A. chinense	Hanatorikabuto	〃
	Anemone flaccida	Nirinsou	〃
	Geranium thunbergii	Gen-noshouko	〃
	Parasenecio delphiniifolias	Momijigasa	〃

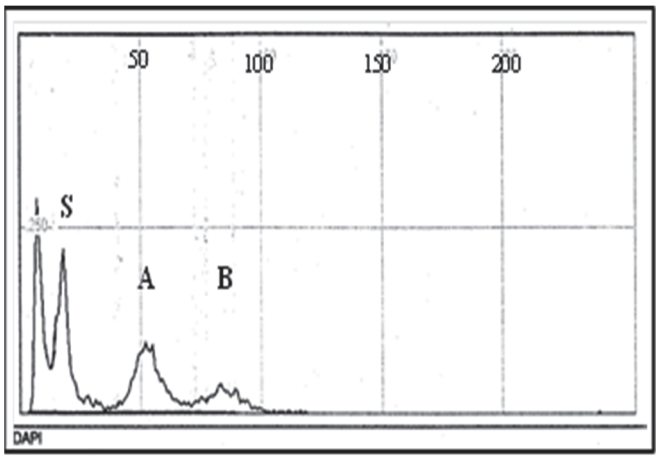

Fig.1. Differential Identification of *Cicuta virosa* by Flow Cytometry

S, standard (*Cyperus rotundus*) (relative nuclear DNA content : 1.00);A, *Cicuta virosa* (relative nuclear DNA content : 2.85); B, *Oenanthe javanica* (relative nuclear DNA content : 4.46).

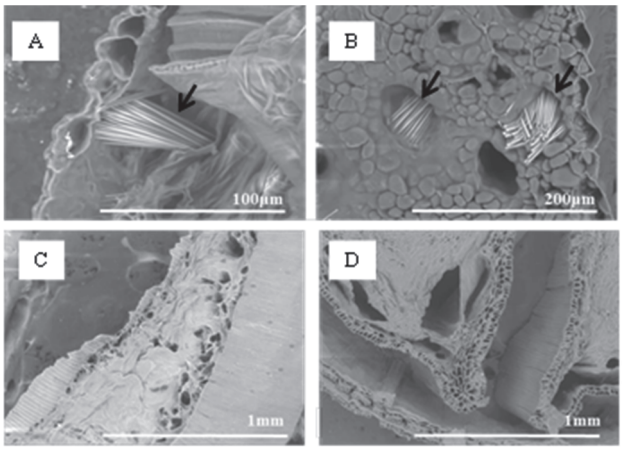

Fig. 2. Differential Identification of Amaryllidoideae Plants by the Presence of Crystal of Calcium Oxalate.

Leaves: A, *Narcissus tazetta* var. chinensis; C, *Allium tuberosum*. Bulbs : B, *Narcissus tazetta* var. chinensis; D, *Allium tuberosum*. Arrow, the presence of crystal of calcium oxalate.

サフラン・スズラン類の表皮細胞の細胞壁には，はしご状模様が観察されなかったが，ギョウジャニンニクの葉の表皮細胞の細胞壁には観察された．葉のはしご状模様の形態観察と，シュウ酸カルシウムの結晶の有無及び鱗茎内のデンプン粒の形態の違いが鑑別点として有効であった．

バイケイソウ類とギボウシ類：バイケイソウ類の葉脈上には突起が認められず，ギボウシ類の葉脈上には特徴的な突起が認められたため，バイケイソウ類との鑑別点として有効であった．

トリカブト類とニリンソウ他：トリカブト類の葉は，葉脈以外無毛であったが，葉脈上に特徴的な弓状の毛状突起が認められた．一方，ニリンソウは葉先以外ほぼ無毛で，葉脈上も無毛であり，ゲンノショウコは全面に多数の毛状突起が認められた．また，モミジガサは細長い毛状突起が認められ，トリカブト類の毛状突起の形態とは異なっていた．

4)成果の活用と今後の課題

本研究で得られた成果は，有毒植物のドクゼリ，スイセン他のヒガンバナ亜科植物，イヌサフラン，スズラン，ドイツスズラン，チョウセンアサガオ類，バイケイソウ類，トリカブト類の喫食が原因と推定される食中毒が発生した場合，その原因究明のために活用できる．

今後もさらに異なる野生種や異なる採取時期，有毒部位について，鑑別方法を研究する必要がある．

5)文献

1) Galbraith D., Harkins K., Maddox J., *et al.*: *Science*, **220**, 1049-1051, 1983.

6)発表実績

1) 中村　耕，荒金眞佐子，中嶋順一，他：山菜と誤認しやすい有毒植物の鑑別方法に関する研究，日本薬学会第137年会（仙台），2017.

2.　PCR 法による有毒動植物鑑別法の検討

1) 目的

有毒動植物の誤食による食中毒発生時，原因動植物の迅速な鑑別が必要である．しかし，残品が少量の場合や調理・加工などにより形態が保持されていない場合は鑑別が困難である．そこで，様々な有毒動植物による食中毒事例発生時に有用であると考えられる DNA 塩基配列情報を用いた鑑別法の検討を行った．さらに，有毒動植物をより特異的かつ迅速に鑑別が可能な PCR 法等の検討を行った．有毒植物ではナス科植物のうち，有毒成分としてヒヨスチアミンやアトロピン，スコポラミンなどのトロパンアルカロイドを産生するチョウセンアサガオ類やハシリドコロ等を対象とした．有毒動物については複数のフグを同時に検出可能な簡易迅速鑑別法について検討した．

2) 方法

(1) ダイレクトシークエンス法による有毒動植物種の同定　動物はミトコンドリア DNA，植物は葉緑体 DNA 及びリボソーム DNA の ITS1 領域に設計されたユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い，増幅産物をシークエンス反応により塩基配列を決定した．得られた塩基配列から相同性検索を行い，種を同定した．

(2) ナス科トロパンアルカロイド産生有毒植物の簡易迅速検出　ナス科トロパンアルカロイド産生有毒植物（以下ナス科有毒植物）には，ヒヨスチアミンからスコポラミンに変換する酵素であるヒヨスチアミン-6β-ヒドロキシラーゼ（H6H）を保有しており，H6H をコードする遺伝子はナス科有毒植物に固有の遺伝子である．そこで，H6H 遺伝子検出プライマーを設計し，PCR 法の検討を行った．

試料にはナス科有毒植物（チョウセンアサガオ属植物 6 種，キダチチョウセンアサガオ属植物 2 種，ハシリドコロ，ヒヨス及びベラドンナ），その他ナス科植物（ナス，トマト，ジャガイモ，タバコ等），ナス科有毒植物と間違えられる食用植物（フキノトウ，ゴボウ，オクラ等）を用いた．試料から DNA を抽出し，設計したプライマーを用いて PCR による H6H 遺伝子領域の増幅を行った後，アガロースゲル電気泳動により増幅産物を確認した．

さらに，各ナス科有毒植物のリボソーム DNA の ITS1 領域及び葉緑体 matK 遺伝子領域を増幅後，制限酵素 BtsαI，BmgBI 及び DraI による制限酵素処理反応を行い，アガロース電気泳動により切断パターンを比較する PCR-RFLP 法について検討した．

(3) マルチプレックスリアルタイム PCR 法によるフグ種の鑑別　14 種類のフグを試料に用い，A（クロサバフグ，シロサバフグ，ヨリトフグ），B（トラフグ，カラス，マフグ），C（アカメフグ，クサフグ，ヒガンフグ），D（ゴマフグ，ショウサイフグ，ナシフグ），E（コモンフグ，シマフグ）の A～E の 5 つのグループに分けた．ミトコンドリア cytochrome b 遺伝子領域内に各グループごとに特異的に増幅し，さらにグループ内の各フグの増幅産物の Tm 値が異なるようにもう一方のプライマーを設計した．1 試料につき 5 種類の各グループのプライマーを用いて SYBR Green によるリアルタイム PCR による増幅反応後，融解曲線解析を行った．

3) 結果及び考察

(1) ダイレクトシークエンス法による有毒動植物種の同定　ミトコンドリア DNA や葉緑体 DNA に設計されたユニバーサルプライマーを用いることで広範な動植物種の鑑別が可能であった．実際に搬入された食中毒事例において鑑別を試み，植物ではスイセンやチョウセンアサガオ，クワズイモ，動物ではフグやシガテラなどの鑑別を行うことができた．

食中毒の原因となり得る動植物は種類が多く，多岐に渡る．よって，ミトコンドリアや葉緑体のユニバーサルプライマーを用いたダイレクトシークエンス法は，様々な食中毒事例に適応できるため，有用な方法であると考えられる．

(2) ナス科トロパンアルカロイド産生有毒植物の簡易迅速検出　H6H 遺伝子検出プライマーを用いた PCR の結果，ナス科有毒植物では増幅されたが，他のナス科植物及びナス科有毒植物と間違えられる食用植物では増幅されなかった．

リボソーム DNA の ITS1 領域の PCR-RFLP 法の結果，キダチチョウセンアサガオ属植物 2 種のみ BtsαI により切断された．葉緑体 matK 遺伝子領域の PCR-RFLP 法の結果，チョウセンアサガオ属植物 6 種のみ BmgBI により切断され，また，ハシリドコロのみ制限酵素 DraI によって切断された．

H6H 遺伝子検出プライマーを用いた PCR により，ナス科有毒植物の迅速な検出が可能となった．また， PCR-RFLP 法により，ナス科有毒植物のうちチョウセンアサガオ類及びハシリドコロの分別が可能となった．

(3) マルチプレックスリアルタイム PCR 法によるフグ種の鑑別　各グループのプライマーが標的とするフグを鋳型にした増幅曲線の立ち上がりは，その他のグループよりも早かった．さらに，グループ内のフグの増幅産物の Tm 値が異なることから，融解曲線によってグループ内のどのフグが増幅したか区別することができた（Fig. 3）．本法は SYBR Green を用いたマルチプレックスリアルタイム PCR 法であるため，簡易迅速かつ低コストの鑑別法である．

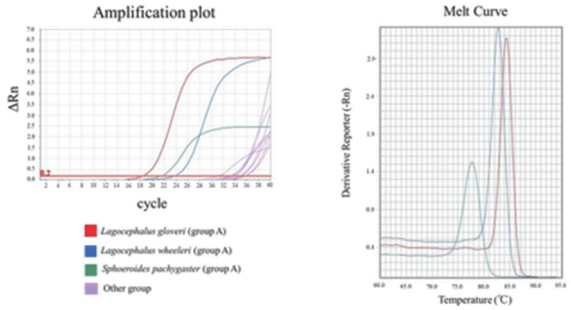

Fig. 3. Amplification Plot and Melting Curve of Group A

4) 成果の活用と今後の課題

ダイレクトシークエンス法による鑑別法は，実際の食中毒事例において適応でき，原因究明の一助となった．また，少量の試料からでも可能であることから，食品中の苦情異物の同定に用いることもできた．

しかし，ダイレクトシークエンス法は様々な動植物種が混在している状態では検出困難であり，また，結果までに時間を要する．そこで個々の動植物種を特異的かつ迅速に検出可能なリアルタイム PCR 法等の検討を進めていく．フグについては，雑種が増加しており，雑種フグは両親とは異なる毒性の分布を持つ可能性が示唆されている [1]．ミトコンドリアは母系遺伝であるため，cytochrome b などのミトコンドリア上の遺伝子を標的とした場合，雑種フグの判別を行うことはできない．そこで今後は雑種フグの鑑別を可能とする方法について検討する必要がある．

5) 文献

1）Takahashi, H., Toyoda, A., Yamazaki, T., et al.: Asymmetric hybridization and introgression between sibling species of the pufferfish Takifugu that have undergone explosive speciation.　*Marine biology* , **164**(4), 90. 2017.

6) 発表実績

1) 浅倉弘幸，木村圭介，観 公子，門間公夫，笹本剛生：DNA 分析法を用いた食品中苦情異物の同定法の検討，第 52 回全国衛生化学技術協議会年会（静岡）2015.
2) 浅倉弘幸，木村圭介，観 公子，中村 耕，荒金真佐子，守安貴子，笹本剛生：ヒヨスチアミン-6β-ヒドロキシラーゼ遺伝子によるナス科トロパンアルカロイド産生有毒植物の鑑別，日本食品衛生学会 第 112 回学術講演会（北海道）2016.
3) 浅倉弘幸，萩野賀世，寺井朗子，大貝真実，柳原碧，木村圭介，田中智哉，観 公子，笹本剛生：マルチプレックスリアルタイムPCR法によるフグ鑑別法の検討，日本食品衛生学会 第113回学術講演会（東京）2017.

3. 有毒動植物中の有毒成分分析法の検討

1) 目的

トリカブトやバイケイソウなどの植物やフグ，毒キノコなどに含まれる自然毒による中毒は，厚生労働省に報告されている事例だけで毎年100 件以上発生している[1,2]．特に，ここ数年は有毒植物による中毒の発生が多く，毎年のように死者が出ている状況である．自然毒による食中毒の特徴として，動植物中に含まれている天然有毒化学物質を喫食により直接摂取するため，発症時間が短く（喫食中から数時間で発症），身体に重篤な症状を呈することも多く，また発生件数に占める死亡率も非常に高いことがあげられる．これまで，このような有毒動植物による中毒事件では，有毒成分の標準品の入手が難しかったことから，喫食したものの残品をもとに，その形態の特徴などから原因物質（動植物）の推定を行ってきた．この方法の問題点として，加熱調理等により形態の変化を受けることが多く，また，吐物などでは原形をとどめていない場合もあり，鑑別が困難なことがあった．

しかし近年，各種有毒成分の標準品の販売が開始されてきたことや，LC-MS/MSなどの高精度な分析機器の整備も進み，有毒成分を理化学的手法で検出する環境が整いつつある．そこで，本研究では，毒性発現の主体となる毒性成分の標準品を入手し，それを用いた機器分析法（LC-MS/MS法）について検討し，中毒事件発生時の原因物質究明を可能とすることを目的とした．

2) 方法

食中毒事例の多いもののうち，標準品が市販等により入手可能なものについて調査し，入手した．次に，標準品が入手できたもののうち，中毒事例の多いものについて，順次機器分析法を検討した．分析には LC-MS/MS を用い，各有毒成分の質量情報を元に，MS 条件の検討（MRM 条件等）と HPLC における分離条件（移動相，カラム）に

ついて検討を行った．また，必要に応じ，妥当性評価試験を実施した．

3) 結果及び考察

(1) 標準品の入手　食中毒事例の多いもののうち，有毒植物系のものとして，ジャガイモ（ソラニン，チャコニン），スイセン・ヒガンバナ（リコリン，ガランタミン），バイケイソウ（ベラトリン，ジェルビン，プロトベラトリン等），トリカブト（アコニチン，メサコニチン），ドクウツギ（ツチン），ヒョウタン（ククルビタシン類），ピロリジジンアルカロイド類を，マリントキシン系のものとして，麻痺性貝毒（ゴニオトキシン類），下痢性貝毒（オカダ酸，ディノフィシストキシン-Ⅰ，Ⅱ），記憶喪失性貝毒（ドウモイ酸），脂溶性貝毒（アザスピロ酸，イエッソトキシン等），テトラミン，シガトキシン（CTX-3C）パリトキシンの標準品を購入した．これらのうち各種貝毒についてはNational Research Center of Canada社製の認証標準物質を，その他のものについては試薬特級もしくは生化学用を入手した．

(2) 有毒植物中有毒成分分析法の検討　中毒（有症苦情を含む）事例の発生したスイセン（リコリン，ガランタミン），チョウセンアサガオ（アトロピン，スコポラミン），と中毒事例の多いジャガイモ（ソラニン，チャコニン）について分析法の検討を行った．試料にメタノールを加えホモジナイズし遠心分離後，上清液をろ過した．ろ液はメタノールで適宜希釈するか必要に応じて固相抽出カラムで精製と溶媒留去した後，メタノールで再溶解して試験溶液とした（Fig. 4）．これらの試験溶液をTable 2の条件にてLC-MS/MS分析したところ，いずれの化合物とも良好な結果が得られた．

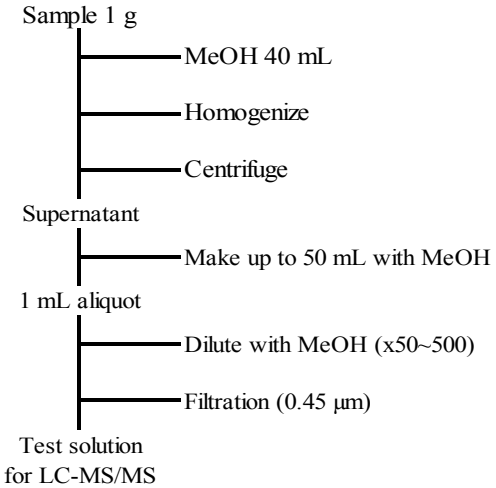

Fig. 4. Sample Preperation Method for Plant Toxins

(3) シガトキシン分析法の検討　築地市場において販売規制対象魚であるバラハタが誤って販売された事例が発生したことを受け，與儀らの方法をもとにシガトキシンの分析法を検討した[3]．試料にアセトンを加えホモジナイズと遠心分離後，減圧濃縮した．これにエーテルを加え振とう後，エーテル層を取り濃縮乾固した．残渣に90%メタノールを加え溶解後，ヘキサンで洗浄した．メタノール層を濃縮後，再溶解しフロリジル及びPSAカラムにより精製を行い，アセトニトリル及びメタノールで回収し，濃縮乾固後，メタノールで再溶解したものを試験溶液とした（Fig. 5）．その結果，回収されたバラハタからはシガトキシンは検出されなかった．しかし，築地市場より入手したバラハタ，バラフエダイ，ギンガメアジ等について分析を行ったところ5個体からシガトキシンを検出した(Table 3).

Table 2. LC-MS/MS Condition for Detection of Plant Poison

Table 2. LC-MS/MS Condition for Detection of Plant Poison

Apparatus	Waters UPLC H-Class + TQ-S
Column	AQCUITY UPLC HSS PFP (2.1mm i.d. x 150 mm, 1.8μm, Waters)
Column temperature	40 °C
Mobile phase	A = 0.1% Formic acid B = MeOH (add. 0.1% Formic acid)
Gradient	A:B 9:1→5min→9:1→12min→2:8→20min
Flow rate	0.4 mL/min
Injection volume	2 μL
Ionization	ESI (+)
Desolvation gas temperature	500 °C
Desolvation gas flow rate	1000 L/h
Capillary voltage	3.0 kV
Cone gas (Flow rate)	N_2 (150 L/h)
Cone voltage	40 V
Source temperature	150 °C
Collision energy	50 eV
MRM transition	228 > 112,119,147,177 (lycorine) 228 > 155,183,196,213 (Galantamine)

(4) テトラミン分析法の検討　バイ貝等の肉食性巻貝に含まれるテトラミン（唾液腺毒）による食中毒事例の発生を受け，テトラミンの分析法を検討した．試料にメタノールを加え，ホモジナイズ後遠心分離し，上清液をメタノールにより適宜希釈し試験溶液とした（Fig. 6）．分析にはLC-MS/MSを用い，移動相には10 mmol/Lギ酸アンモニウム加メタノール・アセトニトリル(9:1)を，カラムにはAtlantis HILIC Silica(φ2.1 mm×150 mm，粒子径3 μm，日本Waters社製)を用いた(Table 4)．試料には唾液腺の他，貝殻中に残っていた内臓（黒いワタ）を用いたが，夾雑成分の影響を受けることなく分析が可能で，中毒検体からテトラミンを検出した．

(5) プロスタグランジンE2分析法の検討　オゴノリが関与したと思われる有症苦情事例において，プロスタグランジンE2の分析法を検討し対応した．細切した試料に水を加えホモジナイズした後，水で全量を20 mLとした．試料（海藻）由来の酵素を失活させるため，沸騰水浴中で緑変するまで加温したものと，未加熱のものを試験溶液として，LC-MS/MSによりプロスタグランジンE2の分析を行ったが，いずれの試料からも検出されなかった．これまで，わが国ではオゴノリの生食による食中毒が数例発生し死者も出ている．その原因物質として，オゴノリ中のプロスタグランジンE2の関与が疑われていたため，分析を行ったが検出されなかった．一方，海外では紅藻類の持つ有毒成分（ポリカバノシド類，アプリシアトキシン類）による事件も発生していることから[4,5]，これらの分析法も検討する必要がある．

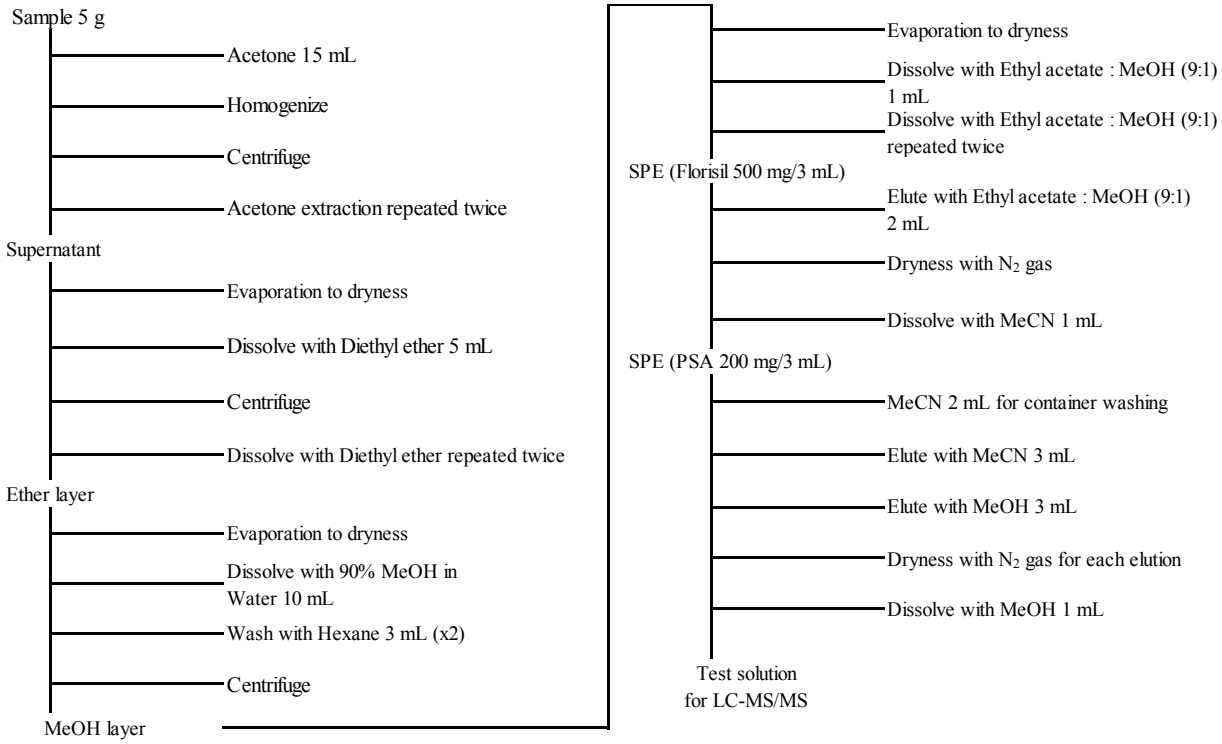

Fig. 5. Pretreatment Method for Ciguatoxin (CTXs)

Table 3. CTXs Analysis Result of Fishes in Tsukiji Fish Market

Species	Catch Area	Total CTXs (ng/g)	CTX1B eq※1 (ng/g)
Lutjanus bohar	Unknown	0.348	0.242
Variola louti	Unknown	0.014	0.014
Lutjanus bohar	Kii-katsuura	0.149	0.091
Lutjanus bohar	Unknown	0.089	0.089
Lutjanus bohar	Kii-katsuura	0.362	0.127

※1 Converted by TEF of EFSA (2010)

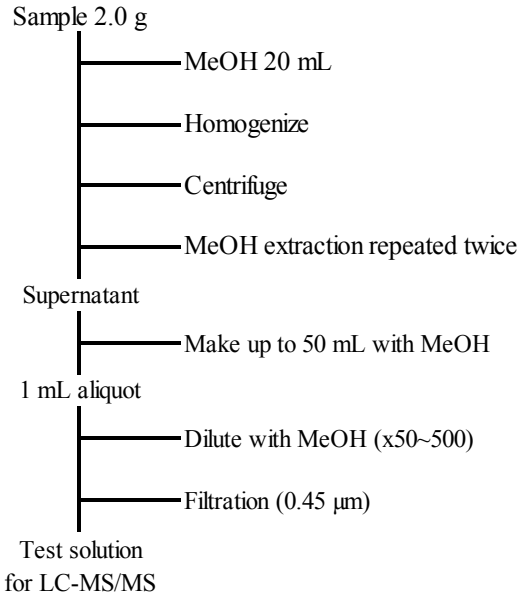

Fig. 6. Sample Preperation Method for Tetramin

Table 4. LC-MS/MS Condition for Detection of Tetramin

Apparatus	Waters UPLC H-Class + TQ-S
Column	Atlantis HiLiC Silica (2.1mm i.d. x 150 mm, 3μm, Waters)
Column temperature	40 ℃
Mobile phase	A = 10 mmol/L Ammonium formate B = MeOH : MeCN (9:1) (add. 10 mmol/L Ammonium formate)
Gradient	A:B 1:9→2 min→1:9→10 min→6:4→18min
Flow rate	0.2 mL/min
Injection volume	2 μL
Ionization	ESI (+)
Desolvation gas temperature	500 ℃
Desolvation gas flow rate	1000 L/h
Capillary voltage	3.0 kV
Cone gas (Flow rate)	N_2 (150 L/h)
Cone voltage	40 V
Source temperature	150℃
Collision energy	50 eV
MRM transition	74.1 > 42.1, 58.1

(6) プレカラム誘導体化法によるヒスタミン分析法の検討 ヒスタミン等不揮発性腐敗アミンについて，o-フタルアルデヒドを用いたプレカラム誘導体化法による迅速分液法の検討を行った．細切した試料10 gに水を加えホモジナイズした後，20%トリクロロ酢酸 10mLを加え転倒混和し，水で全量を100 mLとした．この一部を取り，0.02 mol/L塩酸で適宜希釈し，内部標準物質として1.7-ジアミノヘプタン溶液を添加し試験溶液とした．蛍光誘導体化にはo-フタルアルデヒドを，検出器には蛍光検出器と質量分析計を用いた．その結果，ヒスタミン，チラミン，カダベリン，プトレシンでは回収率，再現性共に良好な結果が得られた．従来のダンシルクロライドによる誘導体化法に比べ，本法では半分の時間で定量結果が出せるため，中毒事件発生時には有効だと考えられる．しかし，スペルミジン

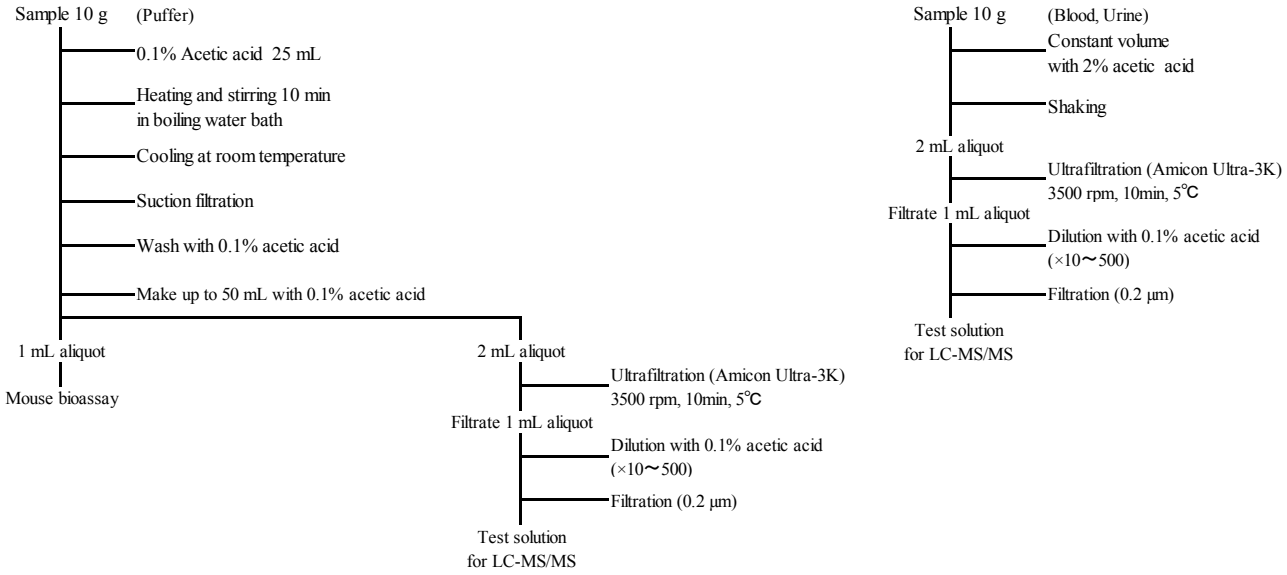

Fig. 7. Sample Preperation Method for Tetrodotoxin (TTX)

の回収率が低く，カラム精製などによる夾雑成分の除去についても今後検討が必要である．

(7) テトロドトキシン分析法の検討　フグ中毒の疑いがある食中毒事例に対し，LC-MS/MS法によるテトロドトキシンの分析法を検討した．細切した試料10 gに0.1%酢酸25 mLを加え，沸騰水浴中で加温しながら10分間撹拌した．室温まで冷やした後，吸引ろ過し（残渣は0.1%酢酸で再度洗浄），ろ液を合わせ，0.1%酢酸で全量を50 mLとした

(8) アミグダリン及びシアン化合物分析法の検討　ビワ等バラ科植物中の種子に含まれるアミグダリン及びシアン化合物の試験法を検討した．細切したびわ種加工品1 gにメタノールを加え超音波抽出（10分，2回）をした後，遠心分離により得られた上清液をメタノールで適宜希釈し，アミグダリン分析用の試験溶液とした．分析にはLC-MS/MSを用いた．一方，シアン化合物の分析にはシアン豆の分析法（ピリジンカルボン酸・ピラゾロン法）を適用したが，発色後の液が濁ったため比色定量ができなかった．特に，ベンズアルデヒド臭の強いもので濁りが強くなる傾向があった．そこで，水蒸気蒸留後の発色工程をピリジン・カルボン酸法で行ったところ，濁りも出ず良好な結果が得られた．本法を用いて市販されているビワ加工品を分析したところ，基準値を超えるシアン化合物を検出した．

4) 成果の活用と今後の課題

(1) 成果の活用　東京都内で発生している有毒動植物による食中毒・有症苦情事件に本研究の成果を活用できる．また，下痢性貝毒，アミグダリン，シアン化合物の分析法については，妥当性評価を行っていることから，広域監視部で行っている行政検体の検査にも活用可能である．

(2) 今後の課題　自然毒の標準品について，まだ入手ができていないものもあるため，今後も継続的に入手していく必要がある．また，市販されていないものも多く，これらについては有毒動植物そのものから成分を抽出し，LC-Q/TOFによる精密質量測定とNMRによる構造推定を行い，粗精製物の形で保存しておくのも一つの手段と考える．また，麻痺性貝毒やフグ毒のように，マウス試験法が公定法になっているものについても，スクリーニング法として機器分析法を検討し活用することは，動物愛護におけるマウスの使用数を減らすことにもつなげられるため，今後も検討を続けていきたい．

5) 文献

1) 厚生労働省：食中毒統計資料，https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html（2018年7月24日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある）

2) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル，http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/poison/index.html（2018年7月24日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある）

3) Yogi, K., Oshiro, N., Inafuku, Y., *et. al.*: Analytical Chemistry, **83**, 8886-8891, 2011.

4) Nagai, H., Yasumoto, T., Hokama, Y.: Toxicon, **34**, 753-761, 1996.

5) Ito, E., and Nagai, H.: Toxicon, **36**, 1913-1920, 1998.

6) 発表実績

1) 木村圭介，浅倉弘幸，観　公子，他：LC-FL及びLC-MS/MS法による不揮発性腐敗アミン類の一斉分析法，日本食品衛生学会第110回学術講演会（京都），2015.

2) 木村圭介，大城直雅，永井宏史，他：東京都内で発生したオゴノリの関与も疑われた有症事例，日本食品衛生学会第112回学術講演会（函館），2016.

3) 木村圭介，浅倉弘幸，観　公子，他：化学物質及び自然毒による食中毒及び有症苦情事件例（平成26年），東京健安研セ年報，**66**，165-170，2015.

4) 木村圭介，浅倉弘幸，観　公子，他：化学物質及び自

然毒による食中毒及び有症苦情事件例（平成27年），東京健安研セ年報，**67**，155-161，2016.
5) 木村圭介：東京都における化学物質による食中毒への対応事例，第54回全国衛生化学技術協議会年会（奈良），2017.
6) 木村圭介：沖縄以外で水揚げされた魚肉試料のシガトキシン分析，シガトキシン関連資料展示記念ワークショップ（仙台），2017.
7) 木村圭介：LC-MS/MS法による下痢性貝毒分析法（妥当性評価と分析事例），国協議会関東甲信静支部第30回理化学研究部会総会・研究会 （神奈川），2018.
8) 木村圭介：自然毒による中毒事例とその分析技術，日本薬学会第138年回（金沢），2018.
9) 木村圭介，浅倉弘幸，観 公子，他：化学物質及び自然毒による食中毒及び有症苦情事件例（平成28年），東京健安研セ年報，**68**，143-150，2018.

4. 食品中エリスリトール等の糖アルコール分析法の検討及び低カロリー食品中の含有量調査

1) 目的

近年，成人病予防やダイエットブームを背景に，低カロリーやゼロカロリーの飲料及び食品が多く販売されている．これらの食品にはエリスリトール，D-ソルビトール，キシリトール，マルチトール等の糖アルコールが使用されている場合が多い．糖アルコールは，いずれも大量に摂取することにより，緩下作用を引き起こす場合がある．しかし，糖アルコールの分析法はエリスリトール，マルチトール及びラクチトールについて未整備であり，また，国内で流通している食品における糖アルコールの含有量も詳しく調査されていない．そこで，これらの糖アルコールの分析法を確立するとともに，食品に含まれる糖アルコールの含有量調査を行うことを研究目的とした．

2) 方法

(1) HPLC 及び LC-MS を用いた分析法の確立　糖アルコールのうち，D-ソルビトール，D-マンニトール及びキシリトールについては，既に著者らが分析法を確立し，清涼飲料水等の分析を行っている [1]．この方法を参考に，まだ分析法が確立されていないエリスリトール，マルチトール及びラクチトールについて，HPLC による定量法及び LC-MS による確認法を開発することとした．

(2) 市販食品の含有量実態調査　市販の飲料や食品119検体を試料として，エリスリトール，マルチトール，D-ソルビトール，キシリトール，D-マンニトール及びラクチトールの6種糖アルコールについて含有量実態調査を行った．試料の内訳は砂糖代替品6，飲料30，アイスクリーム2，生菓子22，菓子53，調味料3及びソーセージ等3検体である．

3) 結果及び考察

(1) 前処理方法の検討　市販の紅茶，ゼリー，ラムネ菓子，チョコレート及びクッキーを用いて，抽出方法の検討を行った．飲料は水・エタノール抽出，菓子類については水による超音波抽出後エタノールを加えて定容した．脂質の多いクッキーについては，75%エタノールを加え超音波処理し，氷水冷却後遠心分離する操作を 3 回繰り返して抽出を行った．この抽出方法を用いて，あらかじめ糖アルコールを検出しないことを確認した試料に 50 及び 10 mg となるように混合標準溶液を添加し，添加回収試験を行ったところ，いずれの試料でも回収率 83%以上，変動係数 6.1%以下と良好な結果を得ることができた．

(2) HPLC 及び LC-MS 条件の検討　分析法が整備されていないエリスリトール，マルチトール及びラクチトールについて検討を行った．HPLC を用いた定量法は，カラムにスルホン酸型ポリスチレン系カチオン交換樹脂（Pb 型）充填カラム，移動相に水を用いる条件と，カラムにアミノ基結合型カラム，移動相にアセトニトリル-水を用いる条件の 2 つを使い分け，示差屈折検出器により行った．この方法により，既に分析法を確立している D-ソルビトール，D-マンニトール及びキシリトールと合わせて 6 種糖アルコールの定量が可能となった (Fig. 8).

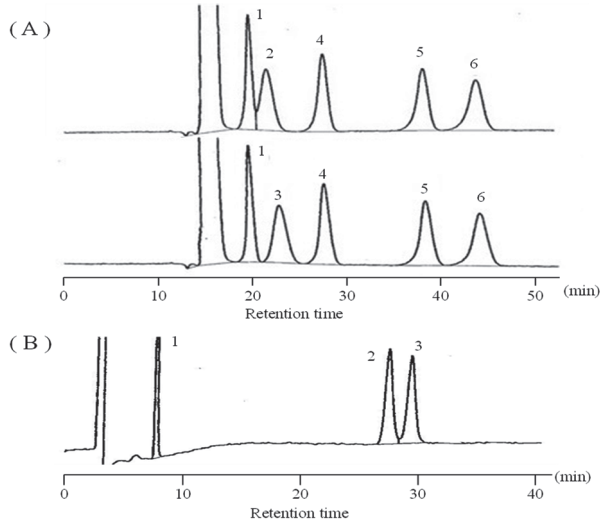

Fig. 8.　HPLC Chromatogram of Sugar Alcohols Standard Solution　(2 mg/mL)

1：Erythritol, 2：Maltitol, 3：Lactitol,
4：D-Mannitol, 5：Xylitol, 6：D-Sorbitol

Operating conditions:

(A) Column : ULTRON PS-80P (8.0 mm i.d.×300 mm, 10 μm),
Mobile phase : water

(B) Column : Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm),
Mobiles phase : acetonitrile-water（4 : 1）

LC-MS による確認法については，カラムとしてアミノ基結合型カラム，移動相としてアセトニトリル-酢酸アンモニウム溶液を用いることで，SCAN モードにより，エリスリトール，マルチトール及びラクチトールのイオンを確認することができた (Fig. 9).

(3) 市販食品の含有量実態調査　調査の結果，糖アルコールの含有量はそれぞれ最大でエリスリトール 990 g/kg，マルチトール 730 g/kg，D-ソルビトール 930 g/kg，キシリトール 710 g/kg，D-マンニトール 66 g/kg，ラクチトール

170 g/kg であった．砂糖代替品を除くと，糖アルコールは菓子に多く含有されていた．一日に摂取する量の目安表示や「一度に多量に食べるとお腹が緩くなることがある」といった注意喚起の表示は，菓子 53 検体中 45 検体で確認された．どちらの表示もない 8 検体の中には，D-ソルビトールの含有量が 1 kg あたり 930 g のものや，マルチトールの含有量が 1 kg あたり 370 g のものがあったが，一粒が小さいタブレット菓子やチョコレートであるため，多量摂取の可能性は低いと考えられた．本調査により，これまで詳しく調査されていなかった国内流通食品における糖アルコールの含有量について，基礎データを得ることができた (Table 5).

4) 成果の活用と今後の課題

糖アルコールの新たな分析法が確立され，行政検査の体制を構築することができた．今後は，単体での標準品の入手が難しい還元パラチノース等の糖アルコールについて，さらに分析法の検討を行い，行政検査の充実を図っていく．

5) 文献

1) 新藤哲也，貞升友紀，鈴木敬子，他：食衛誌, **54**, 358-363, 2013.

6) 発表実績

1) 湯浅真由美，坂牧成恵，貞升友紀，他：食品中エリスリトール，マルチトール及びラクチトールの HPLC 定量法ならびに LC-MS 確認法，第 110 回日本食品衛生学会学術講演会（京都），2015.
2) 武森真由美, 坂牧成恵, 貞升友紀，他：食品中エリスリトール，マルチトール，ラクチトール及びトレハロースのHPLC定量法ならびにLC-MS/MS確認法，食衛誌, **59**, 99 -105, 2018

.

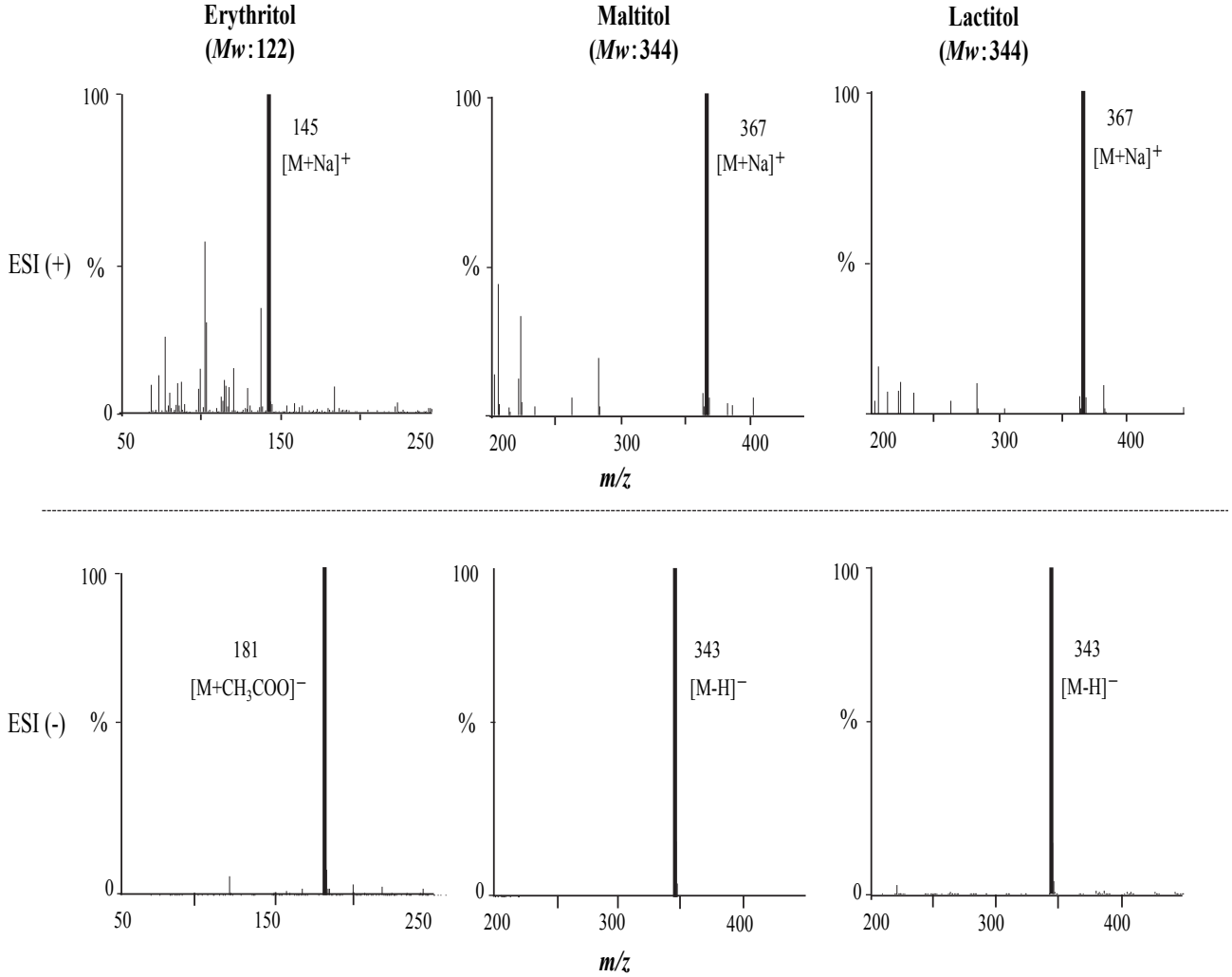

Fig. 9. Mass Spectra of Sugar Alcohols Standard Solution (100 μg/mL)
Operating conditions: Column :Unison UK-Amino (2.0 mm i.d.×150 mm, 3.0 μm),
Mobile phase : 2 mmol/L Ammonium acetate - Acetonitrile (15 : 85)

Table 5. Content of Sugar Alcohol in Commercially Available Foods

Sample	No.of sample	Erythritol		Maltitol		D-Solbitol		Xylitol		D-Mannitol		Lactitol	
		No.of positive	Content (g/kg)	No.of positive	Content (g/kg)	No.of positive	Content (g/kg)	No.of positive	Content (g/kg)	No.of positive	Content (g/kg)	No.of positive	Content (g/kg)
Sugar substitute	6	4	10-980	2	430-580	1	19	0	ND	0	ND	0	ND
Beverage	30	14	4-120	5	15-190	5	7-45	0	ND	0	ND	0	ND
Ice cream	2	1	110	1	45	1	7	0	ND	0	ND	0	ND
Sweets	22	11	21-120	7	10-150	7	5-19	0	ND	0	ND	0	ND
Confectionery	53	5	9-990	37	7-730	26	6-930	21	4-710	8	6-66	3	77-120
Seasoning	3	1	130	2	37-120	2	39-120	0	ND	0	ND	0	ND
Others*	3	1	100	2	9-220	2	6-13	0	ND	0	ND	0	ND

* : Sausage, Marmalade, and Umeboshi, ND : <4 g/kg

5. 食品への農薬混入を想定した迅速検知法の検討

1) 目的

近年，食品への意図的な農薬混入事例が発生している．それに伴う中毒事例として，2007年～2008年には中国産冷凍餃子のメタミドホス混入事件や中国産冷凍野菜のジクロルボス混入事件，さらに2013年～2014年には複数の冷凍食品にマラチオンが混入される事件が発生している．混入事例発生時には迅速な検査を行うことにより速やかに原因を特定し，適切な初動措置による早期治療及び健康被害の未然防止が重要となる．この事例の特徴として，きわめて高濃度が検出されることであり，当該食品からは有機リン系農薬が最大30,000 g/kgという高濃度で検出されている．また，これらの中毒事例は日常の残留農薬分析と異なり，その測定濃度レベルは10,000倍以上であり，現在実施している残留農薬分析法では加工食品が対象となる混入事例に適用することが困難であり，分析機器への負荷も大きいため，混入農薬を迅速に検知できる試験法の開発が必要とされている．さらには加工食品が対象であるため，食品衛生法に基づく規格基準検査法を適用することが難しい．そこで，本研究では健康危害を引き起こす濃度レベルを想定し，様々な加工食品中の農薬を簡便かつ確実に検知する方法を確立し，農薬に起因する健康危害発生時に迅速に検査対応できる体制の構築を目的とした．

2) QuEChERS法の適用検討

2013年に国内産冷凍食品から高濃度のマラチオンが検出された事件では，QuEChERS法による「農産物中における残留農薬迅速試験法」[1]を改良して対応した[2]．試料からマラチオンをアセトニトリルで抽出し，脱水，緩衝及び塩析作用を有する塩類を添加した後，固相3層カラムによる精製を行うものであり，マラチオンに近い物性を示す有機リン系農薬にも適用可能な検出法であると考えられた．そこで，マラチオン以外の有機リン系農薬12種（クロルピリホス，クロルピリホスメチル，ダイアジノン，ジクロルボス，ジメトエート，エチオン，イソキサチオン，メチダチオン，フェントエート，ホサロン，ピリミホスメチル及びトリアゾホス）について本迅速検出法の適用を検討した．

(1) 試料　試料は東京都内で市販されていた冷凍食品8種（コロッケ，いんげん，グラタン，焼きおにぎり，ぎょうざ，ピザ，ドリア及びほうれんそう）を用いた．

(2) GC-FPDにおける測定時間短縮化の検討　12種の農薬を良好に分離できるようGC-FPDの昇温条件を検討し，15分で測定することが可能となった．その結果，抽出からGC-FPD測定終了までの検査時間は，一検体あたり50分となり約1/2に短縮できた．

(3) 添加回収試験結果　試料中濃度で0.1 mg/kgとなるよう添加したときの回収結果は，ジクロルボスで濃縮乾固が原因と思われる回収率低下はあったものの， 58.1～114.0%，併行精度は0.2～14.6%であり，厚生労働省事務連絡[3] で示されている目標値の回収率50～200%及び併行精度30%未満を達成した．

3) アセトンを抽出溶媒として用いた迅速法検討

油脂を多く含んだ食品の抽出においては，脂質溶解性の低いアセトニトリルを用いた場合，脱脂工程を大幅に簡略化でき，前処理時間の短縮が図られる利点がある．しかし，その一方では，脂溶性の高い低極性農薬における抽出が不十分となる可能性やLogPowが3.5未満の化合物は抽出効果が低下するとの報告がある[4]．混入事例発生時には迅速性とともに多くの農薬を検知できることが求められる．そこで，広範囲にわたるLogPow値の化合物を抽出可能なアセトンを抽出溶媒に用いる迅速法を検討することとした．また，一斉に測定でき，化合物の特定も可能なGC-MS及びLC-MS/MSを測定機器に用いることとした．

(1) 試料　植物性，動物性及び動植物混合の食品の中から代表的な10食品を選択した（インスタントラーメン，ハクサイキムチ，ウナギ蒲焼，乾燥エビ，コンビーフ，プロセスチーズ，バター，冷凍ギョウザ，レトルトカレー及びワイン）．

(2) 対象農薬　関東化学工業製の農薬混合標準液45，48，54，55，58，63，70，73，77，78及び79を混合し，このうち毒物，劇物急性毒性の高い農薬及び混入事例のある農薬等286農薬を検討対象とした．

(3) GC-MSにおける測定時間短縮化の検討　通常のGC-MS分析では，各農薬を測定カラムで精度よく分離を

させるために測定に時間を要し，1日に測定できる検体数に限りがあった．そこで，迅速分析用のGCカラム（VF-5ms Rapid-MS (0.53mm i.d.× 10m, 0.25μm)，Agilent社製）を用いて分析時間の短縮化を検討したところ，測定時間を約15分と迅速性を高めることができた．

(4) 脱脂及び精製方法の検討　迅速性を高めるため，分散固相抽出による脱脂を検討した．各固相（C_{18}，フロリジル，GC，PSA，シリカゲル，Zsep）を試料のアセトン抽出溶液5 mLに加えてボルテックスで混和し，遠心分離後に4 mLを分取し，濃縮乾固後に残留物重量を測定した．その結果，フロリジルが脂質の多いチーズ及びバターの脂質を含む残留物重量の60%以上を除去することが可能であった．

次にミニカラムによる精製を検討したところ，C_{18}及びGCミニカラムの組合せが最も多くの農薬を回収でき，精製効果が高かった．

(5) 方法　試料2.00 gに水2 mL（インスタントラーメン及び乾燥エビは4 mL）を加え，ボルテックスで撹拌し，アセトン10 mLを加えてホモジナイズ後，9,000 rpmで3分間遠心分離した．上澄液を分取し，残さに水1 mLを加え，ボルテックスで混和した後，アセトン7 mLを加え同様に操作し，得られた上澄液を合わせアセトンで20 mLに定容した．その抽出液5 mLを採り，フロリジルを加え，ボルテックスで混和した後9,000 rpmで3分間遠心分離した．上澄液を4 mL採り，濃縮後，C_{18}及びGCミニカラムに負荷してアセトニトリル・トルエン（3：1）10 mLで溶出・濃縮し，GC-MS測定用試料溶液はアセトン・*n*-ヘキサン（1：1）4 mLに溶解した．その0.5 mLを採り，メタノール1 mLに置換してLC-MS/MS測定用試料溶液とした．

(6) 添加回収試験　試料中濃度1 mg/kgとなるように各食品に添加し，回収試験を実施した．その結果，ほとんどの食品で目標値を達成した．しかし，レトルトカレーでは，目標値を達成する農薬数の割合が41.3%と少ない傾向が認められた（Table 6）．レトルトカレーでの回収率は目標値の範囲ではあるが，併行精度が30%を超えている農薬の割合が55.6%と多かった．これは，カレーのスパイスによる影響が大きいものと考えられた．目標値を達成した農薬数の割合は少ないものの，概ね混入レベルは測定可能であり，農薬を検知することは十分可能であった．また，100試料以上の連続分析を行ったがメンテナンスを必要とする分析機器の感度低下はみられなかった．

(7) 希釈効果の検討　混入農薬事例は極めて高濃度であることから，簡易・迅速及び分析機器への負担軽減のため，希釈によるマトリックス（食品由来の夾雑成分）の影響の軽減が可能か検討した．

QuEChERS法，アセトン抽出迅速法及びアセトン抽出液の10,000倍希釈溶液でのマトリックスの影響を標準溶液の面積比及びGC-MSのクロマトグラム（Fig.10）を比較したところ，油脂や色素及び調味量等を多く含有する加工食品であっても混入レベルであれば希釈により迅速に分析することが十分可能であり，機器への負担も通常の測定レベルまで軽減できることがわかった．

Table 6. Result of Recovery Test

Sample	Ratio of the number of pesticides(%)			
	< 50%[1)]	50〜200% (RSD < 30%)	50〜200% (RSD > 30%)	> 200%
Instant noodles	8.4	89.9	1.7	0
Kimchi	7.0	93.0	0	0
Broiled eel	3.1	95.5	1.0	0.3
Dried shrimp	6.3	76.2	16.4	1.0
Corned beef	12.6	83.6	2.8	1.0
Processed cheese	7.3	91.3	0.3	1.0
Butter	1.0	99.0	0	0
Freezing Chinese dump	3.1	76.9	18.9	1.0
Retort pouched curry	2.8	41.3	55.6	0.3
Red wine	12.2	87.4	0.3	0

1)Recovery

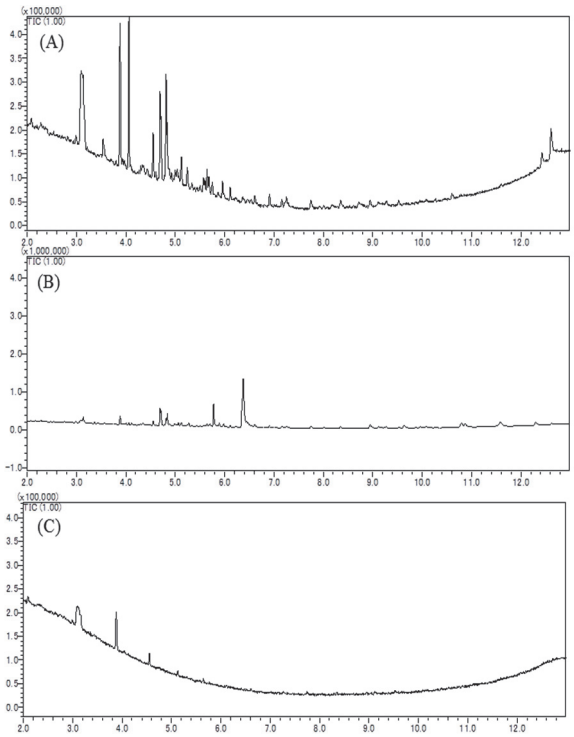

Fig. 10. GC-MS SCAN Chromatograms of Retort Pouched Curry Blank

(A) Sample solution of QuEChERS,　(B) Sample solution,
(C) 10,000-fold diluted acetone extract solution

4) 成果の活用と今後の課題

簡易・迅速な検知試験法の確立により，農薬に起因する健康危害発生時に迅速対応可能な検査体制を構築することができた．また，抽出溶液を希釈するのみでマトリックスの影響を軽減できることが判明したことから，混入レベルであれば希釈により迅速に分析することが可能であり，通常の測定レベル以上に機器への負担も軽減できる可能性がわかった．抽出後に希釈を行うだけで，測

定することが可能となれば，迅速化を図れるばかりでなく，試薬やミニカラム等の経費削減も行うことができる．さらに，機器への負担が軽減でき，メンテナンス等の経費の削減も可能と思われる．今後は，各分析機器での農薬の感度確認を行い，様々な加工品でのマトリックスの影響を確認する必要がある．

5) 文献

1) 岩越景子，田村康宏，大塚健治，他：第106回日本食品衛生学会学術講演会要旨集，107, 2013.
2) 田村康宏，中川由紀子，大塚健治，他：東京健安研セ年報，**65**，103-106，2014
3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡：加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について，平成25年3月26日
4) Sugitate, K., Nakamura, S., Saka, M., *et al. J. Agric. Food. Chem.* **60**, 10226-10234, 2013.

6) 発表実績

1) 増渕珠子，大塚健治，富澤早苗，他：緊急時における冷凍食品中有機リン系農薬の迅速検出法，東京健安研セ年報，**67**，137-142，2016.
2) 小林麻紀，酒井奈穂子，上條恭子，他：食品へ混入された高濃度農薬の迅速分析への取組，平成28年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部理化学研究部会研究会（埼玉），2017.
3) 小林麻紀，酒井奈穂子，大町勇貴，他：食品中混入農薬迅速検知法の検討，第106回日本食品衛生学会学術講演会（東京），2017.

総　括

本重点研究では，食品中の化学物質に起因する健康危害発生時に迅速な検査対応を可能とすることを目的として，5題の個別課題について3年間にわたる研究を実施し，多くの成果が得られた．

山菜等の食用植物と誤認しやすい有毒植物の食中毒発生の際には，迅速かつ正確な植物鑑別が求められるが，幼苗期植物体や裁断された葉片等は，形態による鑑別が困難なことが多い．そのため，有毒植物について，フローサイトメトリーや走査型電子顕微鏡を用いた迅速な鑑別法を確立することを目的として本研究を行った．フローサイトメトリーの結果，ドクゼリとセリの核DNA含量が同一領域にあったため，フローサイトメトリーによる鑑別が可能であった．また，走査型電子顕微鏡による鏡検の結果，ドクゼリとセリの葉部の微細突起の外部形態が異なることが明らかとなった．ヒガンバナ亜科植物については，ニホンズイセン，ヒガンバナ等の葉部及び鱗茎中には，胃腸障害等の中毒症状の原因となるシュウ酸カルシウムの針状結晶が確認されたが，食用とされる比較植物のニラには検出されなかったため，鑑別点として有効であることが判明した．

一方，原因食品が原形をとどめていない場合には形態による鑑別は困難となる．そこで，動物ではミトコンドリア DNA を，植物では葉緑体 DNA 及びリボソーム DNA を用いた DNA シークエンス法による有毒動植物の鑑別法について検討を行った．様々な食中毒事例において，DNA シークエンス法により動物ではフグやバラハタ，植物ではスイセンやクワズイモなどの広範な動植物種について鑑別が可能となった．さらに，より迅速かつ特異的な鑑別法として PCR 法での検討を行った．PCR 法ではナス科植物のトロパンアルカロイド産生有毒植物を検出するプライマーを作製し，ナス科有毒植物の迅速な検出を可能とした．また，PCR-RFLP 法によるナス科有毒植物のチョウセンアサガオ類とハシリドコロの鑑別を可能にした．さらに，リアルタイム PCR 法によるフグ鑑別法を構築し，フグ種の簡易迅速な鑑別が可能となった．

さらに，原因食品が加熱調理された場合などでは形態や遺伝子学的鑑別が困難な場合もある．そこで，動植物中の有毒成分の標準物質を入手し，LC-MS/MS による有毒成分分析法を検討した．その結果，植物毒ではリコリン，ガランタミン，アトロピン，スコポラミン，ソラニン，チャコニン，魚貝毒では，シガトキシン，テトラミン，テトロドトキシン等の機器分析が可能となった．

食品添加物を対象とした研究では，HPLC 及び LC-MS を用いた食品中の糖アルコールの分析法を開発した．食品の種類に応じた抽出方法を検討した結果，紅茶，ラムネ菓子，ゼリー，チョコレート及びクッキーにおける回収率は 83%以上，変動係数 6.1%以下となった．HPLC 分析では，スルホン酸型ポリスチレン系カチオン交換樹脂充填カラムとアミノ基結合型カラムを用いることで，6 種糖アルコールの定量が可能となった． LC-MS では，カラムにアミノ基結合型カラムを用い SCAN モードにより確認を行うことができた．また，市販の加工食品 119 検体を試料とし，糖アルコールの含有量実態調査を行い，国内流通食品における糖アルコール含有量の基礎データを得ることができた．

農薬を対象とした研究では，食品への農薬混入による健康被害事例に対応するため，簡易で迅速な分析法について検討を行った．過去には加工食品に農薬を意図的に混入する事件が発生していることから，加工食品を対象に 286 農薬について添加回収試験を行った．その結果，添加回収率はおおむね 50～200%であり，中毒量の農薬が存在するか否かを簡易迅速に判定することが十分可能であった．

以上の研究成果は，既に実際の試験検査に活用されている．しかしながら，ヒトへの健康影響が懸念される化学物質は無数に存在すると言っても過言ではなく，引き続き様々な化学物質の検査体制整備を進めることが必要

である．一方で化学物質に囲まれて生活している現代社会においては，常にそのリスクと背中合わせであることを強く認識し，関連する情報収集を継続することも重要であろう．

Research project on chemical substances in food that can cause health hazards

Takeo SASAMOTO[a], Kou NAKAMURA[a], Hiroyuki ASAKURA[a], Keisuke KIMURA[a], Mayumi TAKEMORI[a], Maki KOBAYASHI[a], Junko SUZUKI[a], Katsuya UCHIMOTO[a], Masako SHIMIZU[a], Tomohiro ABE[b, c], Masako ARAGANE[a], Jun'ichi NAKAJIMA[a], Misako TAKAHASHI[a], Yoko ICHIKAWA[a], Nozomi UEMURA[a], Ikuo SUZUKI[a], Seiko SHIMIZU[a], Tomoko URADE[a], Narue SAKAMAKI[a], Yuki SADAMASU[a], Kayo HAGINO[a], Motomu SHIMIZU[a], Akiko TERAI[a], Kimiko KAN[a], Setsuko TABATA[a], Mami OGAI[a], Midori YANAGIHARA[a], Tomoya TANAKA[a], Sanae TOMIZAWA[a], Yasuhiro TAMURA[a], Yumiko YAMAKI[a], Tamako MASUBUCHI[a], Keiko IWAKOSHI[a], Yukiko NAKAGAWA[a], Ryoko MASUDA[a], Shota SUTO[b], Yoshie KOKAJI[a], Naoko SAKAI[a], Kyoko KAMIJO[a], Masaki HAYASHI[a], Harunori OTANI[a], Hiroshi KOIKE[a], Itoko BABA[a], Masaki AIZAWA[b], Souichi YOSHIKAWA[a], Emi HASEGAWA[a], Takayuki NAKAJIMA[a], Shui WATANABE[a], Yuuki OMACHI[a], Yuka MORITA[a], Jin SUZUKI[a], Hisako NAKANO[a], Kimio MONMA[a], Chigusa KOBAYASHI[a], Kenji OTSUKA[a], Tsuneo HASHIMOTO[a], Tetsuya SHINDO[a], and Takako MORIYASU[a]

We report a summary of the emphasis research project conducted at the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health between 2015 and 2017. This project comprised five individual studies. The aim of "Methods for the rapid identification of poisonous plants commonly mistaken for wild vegetables" was to establish rapid identification methods based on flow cytometry or scanning electron microscopy. "Investigation of the use PCR to identify toxic animals and plants" investigated method to identify species through the DNA sequence analysis of the mitochondrial DNA in animals or chloroplast and ribosomal DNA in plants. "Development of methods for the analysis of toxic components in toxic animals and plants" examined the application of LC-MS/MS analysis to standard products of toxic components in animals and plants. "Investigation of sugar alcohol analysis methods such as for erythritol in foods, and surveillance of their content in low calorie foods" developed a method for the analysis of six sugar alcohols in foods using HPLC and LC-MS and used this to obtain basic data on the sugar alcohol contents in domestic distribution foods through analyses of 119 samples of commercially available processed foods. "Development of a rapid method to detect food contamination by pesticides" developed a simple and rapid method for the determination of pesticide contamination in processed food, which can be used to judge whether processed foods are contaminated with pesticides to a potentially harmful level.

Keywords:toxic animal and plant, flow cytometry, scanning electron microscopy, DNA sequence, PCR, LC-MS/MS, ciguatoxin, tetrodotoxin, histamine, amygdalin, erythritol, maltitol, lactitol, pesticide, rapid detection method

[a] Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan
[b] Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out
[c] The Tokyo Metropolitan Government Bureau of Social Welfare and Public Health
Health and Safety Division Pharmaceutical Affairs Section,
2-8-1, Nish-ishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-8001, Japan