

グロリオサ塊茎中の自然毒成分（コルヒチン） 含有量検査に係る精度管理について

影山 温子・平松 佐穂^{*1)}・徳橋 慎介^{*2)}・福田 武史^{*3)}・中島 安基江^{*4)}
市川 恵子^{*5)}・赤木 正章^{*6)}・寺田 正史^{*7)}・藤井 千津子^{*8)}
安永 恵^{*9)}・中西 淳治^{*10)}・宇川 夕子^{*11)}
古田 和美・荒尾 真砂・川崎 敏久

Regarding the quality control related to the inspection of natural poison
component (colchicines) in tubers of Gloriosa.

Atsuko KAGEYAMA, Saho HIRAMATSU^{*1)}, Shinsuke TOKUHASHI^{*2)}, Takeshi FUKUTA^{*3)},
Akie NAKASHIMA^{*4)}, Keiko ICHIKAWA^{*5)}, Masaaki AKAKI^{*6)}, Masafumi TERADA^{*7)},
Chizuko FUJII^{*8)}, Megumi YASUNAGA^{*9)}, Junji NAKANISHI^{*10)}, Sekiko UKAWA^{*11)},
Kazumi FURUTA, Masa ARAO, Toshihisa KAWASAKI

【要旨】 平成27年度と平成28年度に地方衛生研究所全国協議会地域保健総合推進事業の一環として、中国・四国ブロック内の地方衛生研究所9機関を対象に、グロリオサ塊茎中に含まれるコルヒチンの検査にかかる精度管理を実施した。平成27年度は塊茎の乾燥試料、平成28年度は塊茎を用いた調理試料を使用した。その結果、全ての機関で問題なくコルヒチンの定性を行うことができた。また、定量面でも概ね良好な結果が得られた。

key words : LC/MS/MS, コルヒチン, グロリオサ, 精度管理
LC/MS/MS, Colchicine, Gloriosa, quality control

I はじめに

平成26年度から、地方衛生研究所全国協議会地域保健総合推進事業「地域における健康危機管理体制確保のための地方衛生研究所の連絡協力の推進並びに検査精度の向上及び疫学情報機能の強化」が、実施されることになった。

当該事業のうち、検査精度の向上と研究所間の連携強化を目指すための精度管理事業は、地域ブロックごとに理化学部門で実施することになっている。高知県では中国四国支部事務局として、平成27年度に、各地方衛生研究所からの要望も聞き合わせたうえで「グ

ロリオサ塊茎中の自然毒成分（コルヒチン）検査」のテーマで、塊茎の実植物乾燥試料を用いて精度管理を実施した。また、平成28年度はグロリオサの塊茎を用いて「すまし汁」を調製し、調理品中の自然毒成分（コルヒチン）検査について精度管理を実施した。

コルヒチンは種なしスイカ作りに用いられる他、医療用としてリウマチや痛風の治療薬としても有用である。しかし、毒性が強く下痢や嘔吐などの副作用があり、過量に摂取すると呼吸不全により死亡することもある。グロリオサの塊茎は、ヤマイモ等に酷似しており（写真1）、当県でも平成18年に誤食による食中毒死亡事例が発生している¹⁾。

*1) 高知県医事業務課 *2) 高知県健康対策課 *3) 鳥取県衛生環境研究所 *4) 広島県立総合技術研究所保健環境センター *5) 広島市衛生研究所 *6) 岡山県環境保健センター *7) 岡山市保健所衛生検査センター *8) 山口県環境保健センター *9) 香川県環境保健研究センター *10) 徳島県立保健製薬環境センター *11) 愛媛県立衛生環境研究所

写真1 グロリオサ塊茎



コルヒチンの検査方法は公定法として示されていないが、HPLCやLC/MS/MSを使用した定量方法が報告されている²⁾⁻⁵⁾。

そこで、本精度管理事業では検査方法等の指定はせず、各機関が決定した方法で検査を実施した。

その結果、検査方法等を統一していないにもかかわらず、定性・定量両面で良好な結果が得られたので、その実施内容及び実施結果を報告する。

II 事業実施内容

1. 目的

中国・四国ブロック内の地方衛生研究所における検査技術の強化及び研究所間の連携を図る。

2. 参加機関

鳥取県衛生環境研究所
 広島県立総合技術研究所保健環境センター
 広島市衛生研究所
 岡山県環境保健センター
 岡山市保健所衛生検査センター
 山口県環境保健センター
 香川県環境保健研究センター
 徳島県立保健製薬環境センター
 愛媛県立衛生環境研究所

当所は、試料の調製、検査及び結果の集計を担当した。

3. 実施期間

平成27年9月1日(火)から10月30日(金)
 平成28年9月1日(木)から10月31日(月)

4. 検査対象

自然毒成分コルヒチン(グロリオサ塊茎)

5. 試料の調製及び配布

(1) 平成27年度

自然毒成分コルヒチン陽性試料は実植物部位であるグロリオサの塊茎を用い、陰性試料には長イモを用いた。

試料の調製方法等は次のとおりである。

① グロリオサ塊茎(試料B)

当県農業技術センターの保有するグロリオサ塊茎を譲り受け、細切後凍結乾燥させ高速ミルで粉碎したものを試料とした。

② 長イモ(試料A)

グロリオサ塊茎と同様の方法で試料調製した。

配布の際は内容物を明示せず試料A及び試料Bとし、標準品のコルヒチンを併せて参加機関に冷蔵便で送付した。

(2) 平成28年度

陽性試料はグロリオサの塊茎を用い、陰性試料にはメイクインを用いてそれぞれすまし汁を調製し調理試料とした。

試料の調製方法等は次のとおりである。

① グロリオサ塊茎(試料A)

当県農業技術センターの保有するグロリオサ塊茎を譲り受け、皮をむき短冊切りにした。既製品のだし醤油を9倍希釈しだし汁200mLをビーカーで沸騰後、具材として短冊切りにした塊茎を30gと刻みネギ2gを加え5分間加熱した。その後、麩を3個加えて調理試料とした。

② メイクイン(試料B)

グロリオサ塊茎と同様の方法で調理試料を調製した。

配布の際は各々試料をねじ口ポリ容器に封入し、試料A及び試料Bとして、標準品のコルヒチンを併せて参加機関に冷蔵便で送付した。

6. 実施方法

検査方法(前処理等)、併行回数、測定機器、測定条件等は統一せず各参加機関が任意に決定したうえで、配布した標準品を用いて試料A及び試料Bを実施期間内に分析(定量・定性)することとした。

III 結果

1. 当所での検査(平成27年度、平成28年度)

1. 1 試薬等

標準品: コルヒチン(純度97%、ACROS社製)

抽出溶媒: メタノール (LC/MS用、和光純薬工業 (株) 製)

定量イオン (コリジョンエネルギー):
 m/z 400.1 > 400.3 (10eV)
 確認イオン (コリジョンエネルギー):
 m/z 400.1 > 295.1 (30eV)

1. 2 分析条件

(1) 装置 (平成27年度、28年度)

液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計
 : Waters製LC2795/JASCO
 International(株)製
 Micromass Quattro Ultima™ Pt

(2) 測定条件 (平成27年度、平成28年度)

① 分離部 (LC部)

LCカラム: Inertsil ODS-4 (GL Sciences社製)
 (2.1 mm × 150mm, 3 μm)
 カラム温度: 40°C
 移動相: A液 5mmol/L酢酸アンモニウム
 B液 5mmol/L酢酸アンモニウムメタノール溶液
 分離条件: A:B = 40 : 60 (0→13min)
 流量: 0.2mL/min
 注入量: 5 μL

② 検出部 (MS/MS部)

イオン化法: ESI (+)
 分析モード: MRMモード
 キャピラリー電圧: 3kV
 イオン源温度: 120°C
 乾燥ガス温度: 300°C

【凍結乾燥粉碎試料】

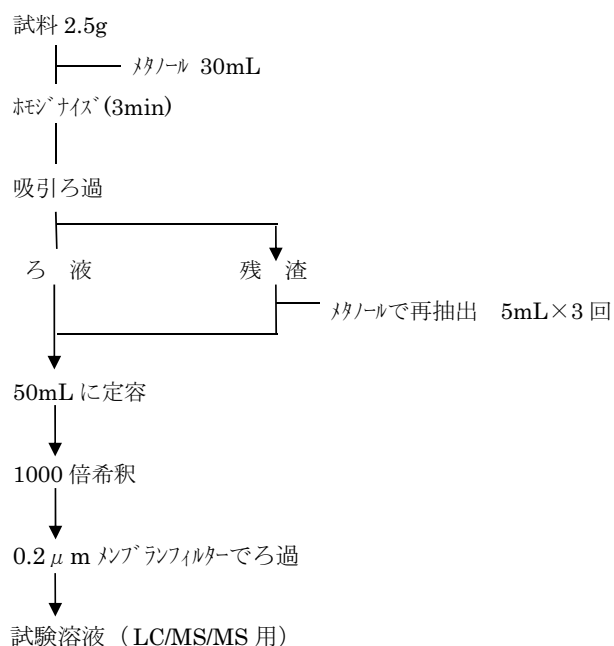


図1 試験溶液の抽出フロー図

(3) 試験溶液の調製

抽出方法は宅間らの方法¹⁾を参考にし、試験は5併行で行った。

① 平成27年度

凍結乾燥した試料を用いて抽出を行った。図1にそのフローを示した。

② 平成28年度

調製したすまし汁を均質化した試料を用いて抽出を行った。図2にそのフローを示した。

【調製試料(すまし汁)】

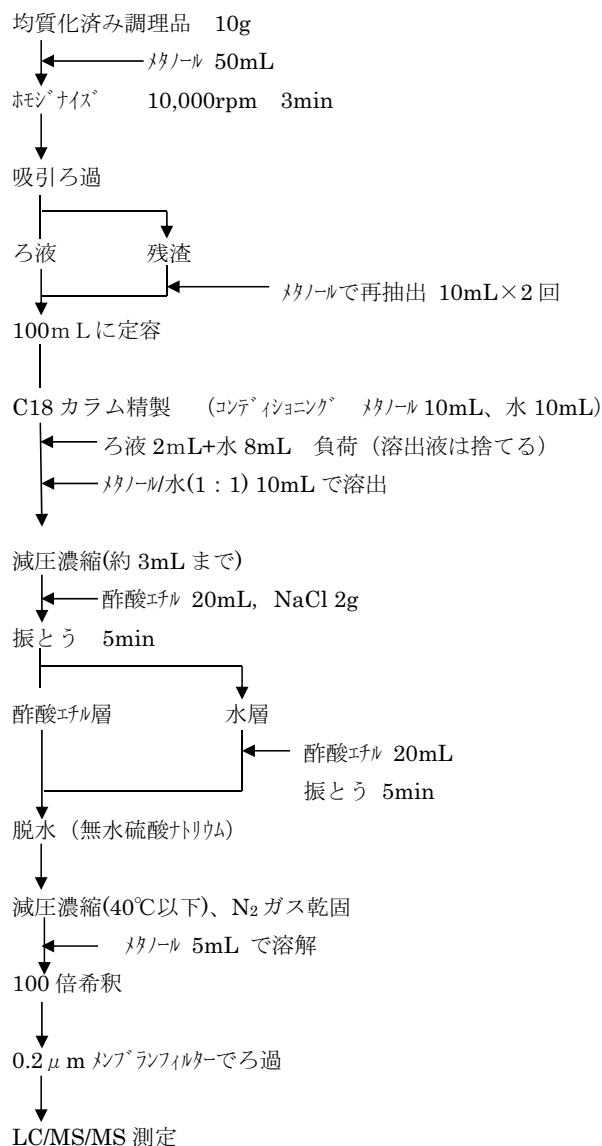


図2 調製試料 (すまし汁) 抽出フロー

1.3 分析結果

(1) クロマトグラムと検量線（平成27年度、28年度）

図3にコルヒチン標準溶液（100ng/ml）及び図4に陽性試料のクロマトグラム（m/z; 400.1>400.3）を示した。

陽性試料の定量イオン、確認イオン共にコルヒチン標準溶液のリテンションタイムと一致し、陽性試料からコルヒチンを検出できた。また、検量線は5-400 ng/mlの範囲で $r^2=0.998317$ の直線性が得られた（図5）。

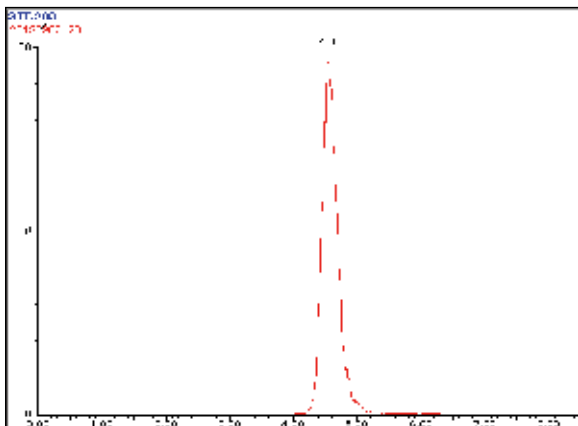


図3 クロマトグラム（標準品）

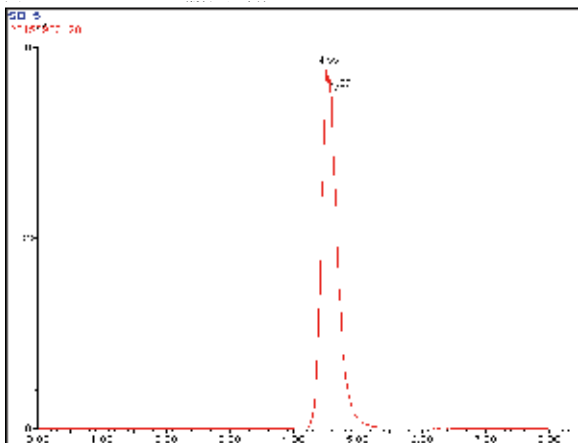


図4 クロマトグラム（陽性試料）

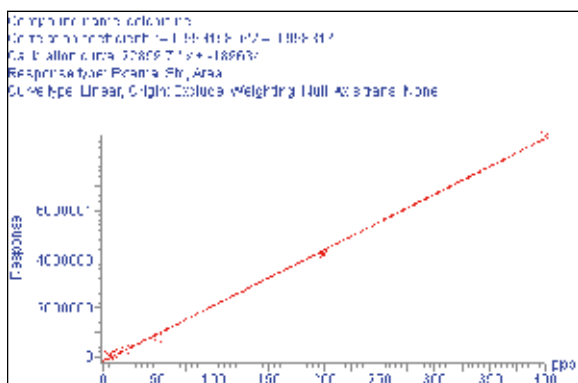


図5 検量線

(2) 定量結果

① 平成27年度

陽性試料について5 併行でコルヒチンの定量を行った。結果は平均値3.15mg/g、相対標準偏差（RSD）は9.4%であった。宅間らの報告¹⁾ではグロリオサ（ハウス栽培、露地栽培及び市販品）塊茎中のコルヒチンの濃度を分析した結果、0.03~0.18%含有しており、植物の個体差や今回の試料が凍結乾燥品（凍結乾燥により約3倍（重量36.9%）濃縮される）であったことを考慮すると良好な結果だと考えられる。

② 平成28年度

陽性試料について3 併行ですまし汁中のコルヒチンの定量を行った。結果は平均値74 μg/g、相対標準偏差（RSD）は11.7%であり、ややばらつきが見られた。

2. 精度管理事業実施結果

全ての参加機関の結果を検査結果報告書（一覧表）として平成27年度を表1に、平成28年度を表2に示した。

(1) 所要日数

平成27年度は1日から7日、平成28年度は2日から10日とどの機関も短期間で検査を終えていた。

(2) 測定機器

測定使用機器はLC/MS/MSが9機関、LC/QToF/MSが1機関であった。

(3) 試験溶液の調製

① 平成27年度

いずれの機関も抽出溶媒はメタノールを使用しており、抽出回数は1回~4回、抽出方法はホモジナイズや超音波抽出と機関により様々であった。

また、精製にC18カラムを用いた機関が1機関あり、他の9機関は精製を実施していなかった。

② 平成28年度

前処理において、7機関が試料全体を均質化し、2機関が実と汁に分けて処理、1機関は汁の上ずみを処理した。いずれの機関も抽出溶媒はメタノールを使用しており、抽出回数は1回~4回、抽出方法はホモジナイズや超音波抽出と機関により様々であった。

また、精製にC18カラムを用いた機関が5機関、限外ろ過が1機関、精製を実施しなかった機関が4機関あった。

(4) 定量方法

全ての機関が絶対検量線法により定量を実施して

表1 平成27年度精度管理結果の概要

	結 果
試料調製時含有量	コルヒチン：平均値 3.15mg/g (変動係数：9.4%)
定性結果	試料A：コルヒチン不検出 (10機関) 試料B：コルヒチン検出 (10機関)
定量結果 (コルヒチン含有量/検査試料 g)	平均値：2.96 mg/g 範 囲：2.45~3.55mg/g
検出限界濃度	範 囲：0.0005~0.2mg/g
検査所要日数	1日 (1機関), 2日 (6機関), 3日 (1機関) 5日 (1機関), 7日 (1機関)
検査試行回数	2回 (2機関), 3回 (4機関), 5回 (3機関), 6回 (1機関)
検体秤取量	0.5g (1機関), 1g (4機関), 2g (4機関), 2.5g (1機関)
抽出溶媒	メタノール (10機関)
抽出液の精製	実施せず (9機関), C18 ミニカラム精製 (1機関)
測定機器	LC/MS/MS (9機関), LC/QToF/MS (1機関)
定量方法	絶対検量線法 (10機関)
使用 (LC) カラム	ODS 系カラム (8機関), ODS 系多機能カラム (2機関)
LC 移動相	酢酸アンモニウム：メタノール (6機関), 酢酸アンモニウム：アセトリル (1機関) ギ酸アンモニウム：メタノール (2機関), ギ酸アンモニウム：アセトリル (1機関)

いた。(定量イオン：m/z 400)

(5) 定性・定量結果

① 平成27年度

全ての機関が陽性試料 (試料B) からコルヒチンを検出、陰性試料 (試料A) からは不検出と適正に判定できた。

また、定量結果については2.45-3.55mg/g、平均値は2.96mg/gであり、当所の結果と近似しており、全機関で定量結果に大きな測定差異は無かった。

② 平成28年度

全ての機関が陽性試料 (試料A) からコルヒチンを検出し、陰性試料 (試料B) からは不検出と適正に判定できた。定量結果については51.5 μg/g-153 μg/gであった。塊茎の部分や個体により含有量に差が認められることより、定量結果の単純な比較はできなかったが、全機関中毒性ありとの判定ができた。

3. 参加機関の意見・感想等

今回の精度管理事業に参加した機関の意見・感想を次に示す。本事業が有意義なものであったことがうか

がえる意見が多かった。

- ・今後も継続して実施していきたい。
- ・自然毒の検査は日常的に行っている検査ではないため、他機関と定量値の比較を行うことで検査技術についての確認ができ、大変有意義であった。また、他機関の分析方法や測定条件等については、今後の業務の参考としたい。
- ・他機関と比較し、保持時間の変動がやや大きいため、室内温度や機器の調整等について改善を検討していきたい。
- ・調理品の検査についての一定の評価ができ、今後の検査対応の一助となる有意義なものであったと感じた。
- ・自然毒食中毒は発生頻度が低く、検査未経験の場合も多いので、自然毒を対象とした本精度管理事業は大変有意義であった。
- ・コルヒチンの分析は初めてで苦勞したが、他機関の分析方法、条件等が確認でき、参考となった。
- ・ガーデニングブームでコルヒチンを含有する観賞用植物が身近に増えているように感じていたので、測定の機会を得られたのは良かった。

表2 平成28年度精度管理結果の概要

項目	結果
定性結果	試料A：コルヒチン検出（10機関） 試料B：コルヒチン不検出（10機関）
定量結果（コルヒチン含有量／検査試料g）	範囲：51.5～153 μ g/g
調理試料に使用した グロリオサ塊茎中のコルヒチン 含有量(mg/g)	範囲：596～2440 μ g/g * 調理試料送付時に高知県で測定。
当該調理試料内コルヒチン 含有量の中毒性	中毒性有と判定（10機関） 範囲：29g～84gの量（約お椀一杯分のお汁）を経口摂取することで死にいたる。
検査所要日数	2日（2機関）、3日（4機関）、4日（1機関）、5日（2機関）、10日（1機関）
検査試行回数	2回（2機関）、3回（6機関）、5回（2機関）
検体秤取量	1g（2機関）、2g（2機関）、5g（3機関）、10g（3機関）
調理試料の均質化	調理試料全体を均質化（7機関）、具と汁に分けて検査（2機関）、 汁の上ずみを検査（1機関）
抽出溶媒	メタノール（10機関）
抽出液の精製	C18 ミニカラム精製（5機関）、限外ろ過（1機関）、実施せず（4機関）
測定機器	LC/MS/MS（9機関）、LC/Qtof/MS（1機関）
定量方法	絶対検量線法（10機関）
使用（LC）カラム	ODS系カラム（7機関）、ODS系多機能カラム（3機関）
LC移動相	酢酸アモニウム：メタノール（5機関）、酢酸アモニウム：アセトリル（1機関） ギ酸アモニウム：メタノール（3機関）、ギ酸アモニウム：アセトリル（1機関）

- ・本事業に参加することで、未対応となっている自然毒の検査について、一定の評価を得ることができ緊急時の検査対応に活用できる有意義なものであると感じた。
- ・調理品では各機関の検査方法に違いが見られた。実際の調理形態は様々であり、その都度試料に応じた対応を求められるため、検査手順等を確認する良い機会となった。

IV 考 察

1. 本事業の検査試料は標準品を添加した試料ではなく、自然毒を含む実植物試料を用いたが、平成27年度のグロリオサの塊茎を均質化した試料では、定量について概ね良好な結果が得られた。平成28年度は個体差のある塊茎を用い、機関ごとに個別に調理した試料を用いたため、含有量に差が認められ、定量結果の単純な比較はできなかった。
2. 平成28年度の調理試料（すまし汁）は不均質な試料であったため、試料全体を均質化して定量した機関が多数であったが、実と汁に分けて定量、または汁のみ定量した機関もあった。中毒事例発生時は食品残品の有無を含め、様々な状況が想定される。今回同じ調理試料でも各機関の判断で異なる方法での前処理がなされていたことから、事例発生時を想定した処理手順を考える良い機会となったと考えられる。
3. コルヒチンのヒトにおける最小致死量は体重50kg

の場合4.3mgと言われている⁶⁾。今回配布した陽性調理試料はコルヒチン濃度 (51.5~153 $\mu\text{g/g}$) から換算すると、29~84gを食することで致死量となる中毒性を有していたことになる。自然毒を含有する可能性のある植物試料や生体試料を取り扱う際には、検査員保護のため十分に注意する必要がある。

4. 各参加機関が実施した何れの分析法も簡便かつ迅速に実施できる方法であり、分析条件の細部が異なっても同様な結果が得られたことから、各機関において非常に堅牢性の高い分析法を採用でき、またそれぞれの分析法は健康危機管理への迅速かつ的確な対応に有効であると考えられた。
5. 検査結果を集計し参加機関間で情報共有することにより、他の参加機関の検査状況の詳細を把握することができ、自所の分析法の修正等に有効活用できると考えられた。

V 今後の課題

1. 本事業では自然毒を含有する実植物試料としてグロリオサの塊茎を対象としたが、茎部等の他部位に関わる精度管理、また食材だけでなく食事残渣を対象とした精度管理の実施も必要と考えられる。
2. 健康危機管理対策の観点では、日常的な業務で使用するLCカラムや移動相による機器測定が可能となるよう、さらなる分析法の改良等も検討し、健康危機管理体制を構築することが重要となる。
3. 自然毒食中毒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など食品衛生上重要な課題であるものの、発生頻度や地域性などの要因から日常的な業務として行っている機関は少ない。このため、事例が発生すると経験や専門性が乏しいことから多くの機関が対応に苦慮していると思われ、若手研究員への技術継承の観点からも、本精度管理事業の継続的な実施が重要と考えられた。

VI まとめ

1. 本事業では、定量性よりも定性精度を中心に精度

管理を実施し、その結果、全ての機関において誤回答なくコルヒチンの定性を行うことができた。

2. 参加機関ごとに独自の分析法で実施したが、全機関がメタノール抽出→LC/MS/MS (LC/Qtof/MS) 測定を採用していた。
3. 参加機関に配布した調理試料に含まれるコルヒチン濃度は51.5~153 $\mu\text{g/g}$ で、すべての試料において中毒性を有していた。
4. 自然毒食中毒事例への迅速な対応は、衛生上重要な課題であるが、発生件数が少ないため経験事例が少なく、若手研究員への技術継承の観点からも、本精度管理事業の継続的な実施が重要と考えられた。
5. 本事業は地方衛生研究所の検査技術向上と研究所間の連携強化に資するものとなった。

謝辞

本精度管理事業を実施するにあたり、ご協力及びご助言をいただきました各参加機関御担当者の皆様に感謝申し上げます。

文献

- 1) 宅間 範雄ら：グロリオサによる食中毒事例－LC/MS/MSによるコルヒチンの分析－. 高知衛研所報 54, 41-45, 2008
- 2) 佐藤 正幸ら：有毒植物イヌサフラン調理品中のコルヒチン残留量. 道衛研所報 60, 45-48, 2010
- 3) 大藤 升美ら：LC-MS/MSによる自然毒の迅速試験法の評価について. 京都府保環研年報 58, 41-46, 2013
- 4) 立野 幸治ら：LC/MS/MSによる尿中植物性自然毒一斉分析手法の検討. 山口県環境保健センター所報 52, 54-57, 2009
- 5) 山崎 喜与子ら：イヌサフラン食中毒事例での緊急検査について. 静岡県環境衛生科学研究所報告 57, 37-40, 2014
- 6) 厚生労働省ホームページ：自然毒のリスクプロファイル：高等植物：イヌサフラン