

## ヒョウタンによる食中毒事例について

山口瑞香\* 野村千枝\* 清田恭平\* 梶村計志\*

平成 25 年 7 月 2 日に大阪府内の小学校で、授業にて栽培したヒョウタンを喫食した児童 16 名が腹痛、吐気、嘔吐等の食中毒症状を呈した。この食中毒の原因は、ヒョウタンに含まれる植物性自然毒の一種で苦み成分であるククルビタシン類であると考えられた。そこで、試料をアセトンで抽出し、液液分配で精製を行った後、ククルビタシン類の一種であるククルビタシン B を高速液体クロマトグラフィー/質量分析計(LC-MS)等を用いて分析した。その結果、検体のヒョウタンからククルビタシン B が検出され、食中毒の原因物質であると推定された。

キーワード：ヒョウタン、ククルビタシン、高速液体クロマトグラフィー/質量分析計

Key words: gourd, cucurbitacin, LC-MS

ヒョウタンなどのウリ科植物には、植物性自然毒の一種で苦み成分であるククルビタシン類が含まれている。ククルビタシン類には多くの種類が存在し、過去の食中毒事例ではククルビタシン B または D が検出されている<sup>1)~3)</sup>。

平成 25 年 7 月 2 日に大阪府内の小学校で、授業にて栽培した非食用のヒョウタンを生のまま小さくスライスし、教員 1 名と児童 28 名が喫食した。その後、児童 16 名が腹痛、吐気、嘔吐等の食中毒症状を呈した。後の調査で、児童らは喫食時に強い苦味・辛味を感じたが飲み込んだと証言した。この食中毒の原因物質がククルビタシン類であると考え、過去の食中毒で検出事例のあるククルビタシン B の分析を実施した。

### 実験方法

#### 1 試料

喫食残品および同一圃場から採取した千成ヒョウタン、対照品としてキュウリおよびゴーヤーを使用した。

#### 2 試薬等

##### 2-1 標準品

ククルビタシン B：和光純薬工業(株)製を用いた。

##### 2-2 標準溶液等

標準品 5 mg をメタノールで溶解して全量を 10 mL とし標準原液とした(500 µg/mL)。LC-MS 測定では標準原液をメタノールで希釈し、0.1~2 µg/mL の標準溶液を作成した。TLC 測定では 1 スポットあたり 1、2.5、5 µg となるよう標準原液を希釈した。

##### 2-3 試薬等

酢酸エチル、ヘキサン、アセトン：和光純薬工業(株)製 残留農薬分析用、メタノール：和光純薬工業(株)製 HPLC 用、アセトニトリル：和光純薬工業(株)製 LC/MS 用、ギ酸アンモニウム：和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。

#### 3 装置

(株)島津製作所製 Prominence UFLC および LCMS-2020 を使用した。

#### 4 測定条件

##### 4-1 LC-PDA/MS 条件

分析カラム：CERI L-Column ODS (2.1x150 mm、5 µm)、カラム温度：40°C、流速：0.2 mL/min、注入量：5 µL、移動相：A 液；10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 B 液；ア

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

Food-poisoning Outbreak Caused by Gourd

by Mizuka YAMAGUCHI, Chie NOMURA, Kyohei

KIYOTA and Keiji KAJIMURA

セトニトリル、グラジエント条件：B 液 50-50%(5 min), 50-90%(5 min)。

イオン化モード：ESI(+)、測定モード：SIM、m/z：576(定量イオン), 581(確認イオン)、PDA 測定波長：230 nm。

#### 4-2 TLC 条件

プレート：Merck Millipore製シリカゲル60F254、展開溶媒：クロロホルム/酢酸エチル(1:1)またはクロロホルム/メタノール(10:1)。

### 5 試験溶液の調製

大城らの報告<sup>1)</sup>を参考に試験溶液の調製を行った。細切した試料 5 g を量りとり、アセトン 10 mL を加えてホモジナイズ後、毎分 5,000 回転で 5 分間遠心分離を行い、上清をろ過してナスフラスコに採取した。残留物にアセトン 10 mL を加えて振とう後、同様に遠心分離して先の上清と合わせた。40°C以下で減圧濃縮し、酢酸エチル 5 mL を加えた。この液を 50 mL 遠心チューブに移して振とう後、5,000 回転で 5 分間遠心分離した。酢酸エチル層を採取し、下層に酢酸エチル 5 mL を加えて同様の操作を行い、先の酢酸エチル層と合わせた。酢酸エチル層を 40°C以下で減圧乾固し、残留物を 90%メタノール 5 mL で溶解した。この液を 50 mL 遠心チューブに移し、ヘキサン 5 mL を加えて

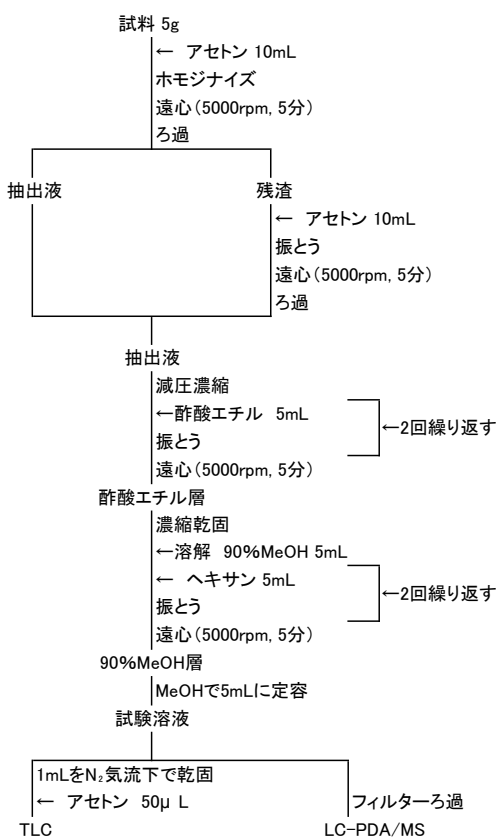


図1. 試験溶液の調製方法

振とう後、5,000 回転で 5 分間遠心分離した。90%メタノール層を採取し、さらにヘキサン 5 mL を加えて同様の操作を行った。90%メタノール層をメタノールにて 5 mL に定容し、試験溶液とした。この試験溶液をメンブランフィルターでろ過後、適宜希釈して LC-PDA/MS で測定した。

また、試験溶液 1 mL を N<sub>2</sub> 気流下で乾固し、アセトン 50 μL に溶解して 2 μL を TLC にスポットした(図 1)。

## 結果および考察

### 1 ヒョウタンの分析結果

LC-MS および LC-PDA 分析の結果、喫食残品および同一圃場から採取した千成ヒョウタンからククルビタシン B が検出された(表 1)。対照品のキュウリおよびゴーヤーからは検出されなかった。TLC においても、ヒョウタンからはククルビタシン B と一致する Rf 値のスポットが得られた。

表1. ククルビタシンB分析結果

	LC-MS結果 (μg/g)	LC-PDA結果 (μg/g)
喫食残品のヒョウタン	225	201
同一圃場のヒョウタン	235	229
対照品(ゴーヤー)	ND	ND
対照品(キュウリ)	ND	ND

ND:定量下限未満

### 2 LC-MS 条件の検討

大城ら<sup>1)</sup>は LC の移動相に 50%アセトニトリルを使用し、Na 付加体を測定イオンとして測定を行っていた。同様の移動相で測定を実施したが、十分な感度が得られなかった。Na 付加体の他にアンモニウム付加体が測定されたので、移動相にアンモニウム塩を加え、アンモニウム付加体を測定イオンとすることとした。これにより感度が向上し、安定してククルビタシン B の測定を行うことができた。

0.1~2 μg/mL の標準溶液を調製し、絶対検量線を作成した。決定係数( $r^2$ )=0.99 以上の良好な直線性が得られた。

定量下限は 0.1 μg/g とした。

### 3 添加回収試験

あらかじめククルビタシン B を含有しないことを確認したゴーヤーおよびキュウリ(各 n=3)に 1 μg/g の濃度となる

ようクルビタシン B を添加して分析を行った(表 2)。ゴーヤーでは良好な結果が得られたが、キュウリの回収率は 50%程度であった。同時測定した PDA の結果も同様であったため、キュウリでの抽出率が不良であったと考えられた。

表2. 添加回収試験結果

	測定機器	平均回収率(%)	RSD(%)
ゴーヤー	LC-MS	91	3
	LC-PDA	89	1
キュウリ	LC-MS	52	4
	LC-PDA	57	2

RSD: 相対標準偏差

#### 4 まとめ

食中毒の原因のヒョウタンからクルビタシン B を検出した。強い苦味・辛味および食中毒症状の原因はクルビタシンであることが推定された。

#### 謝辞

本分析にあたり、適切な助言を賜りました国立医薬品食品衛生研究所大城様、標準品を提供いただいた和歌山県環境衛生研究センター久野様に感謝の意を表します。

#### 参考文献

- 1) 大城直雅, 佐久川さつき, 沖縄県における化学物質と自然毒による食中毒および苦情事例—平成20 年度—. 沖縄県衛生環境研究所報, 43, p181-184 (2009)
- 2) 田村行弘, 真木俊夫他, 化学物質及び自然毒による食中毒事件例 (第1報)—昭和55年～昭和57年—. 東京衛研年報, 34, p171-177(1983)
- 3) 牛山博文, 観公子他, 化学物質及び自然毒による食中毒事件例 (第 17 報)—平成 11 年—. 東京衛研年報, 51, p166-169 (2000)