

平成 25 年度健康危機管理模擬訓練における アトロピン及びスコポラミンの分析事例について

徳島県立保健製薬環境センター

中西 淳治・浅川 和宏・佐々木 智理・豊成 美香*・堤 泰造

Analytical study on atropine and scopolamine in health crisis management simulation training

Junji NAKANISHI, Kazuhiro ASAKAWA, Tomori SASAKI, Mika TOYONARI and Taizou TSUTSUMI

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

チョウセンアサガオの混入を想定した食中毒模擬訓練において、含有する自然毒成分であるアトロピン及びスコポラミンをガスクロマトグラフ質量分析法（以下「GC/MS」という。）、薄層クロマトグラフィー（以下「TLC」という。）及び高速液体クロマトグラフィー（以下「HPLC」という。）により分析し、迅速に定性・定量することができた。

Key words : チョウセンアサガオ Datura, アトロピン Atropine, スコポラミン Scopolamine

I はじめに

平成25年10月31日に地方衛生研究所全国協議会近畿ブロックで開催された健康危機事象模擬訓練に参加した。この訓練は、「調理加工食品（みそ汁）にごぼうと間違えて混入したチョウセンアサガオを原因とする食中毒が発生した」という（訓練参加者には知らされない）想定のもと、原因物質を究明するものであった。

チョウセンアサガオは、毒性成分としてアトロピン及びスコポラミンなどのトロパンアルカイドを含有し、全草が有毒であり、根はゴボウ、つぼみはオクラ、種子はゴマ、葉はモロヘイヤなどに酷似していることから誤食する食中毒事例が毎年全国で報告されている¹⁾。

徳島県ではチョウセンアサガオによる食中毒事例は過去に発生しておらず、検査方法の SOP 等は整備されていなかったが、今回の訓練では衛生試験法・注解 2010²⁾、富山県薬事研究所報³⁾及び北海道衛生研究所報⁴⁾等を参考にアトロピン及びスコポラミンの分析を GC/MS, TLC 及び HPLC を用いて実

施し、迅速に結果を得ることができたので報告する。

GC/MS はライブラリー検索によるスクリーニング法として、TLC は迅速・簡便法として定性に使用した。また、HPLC は一般的で汎用性の高い分析法として定量に使用した。

II 訓練の概要

訓練全体の概要、状況及び結果等については、「平成 25 年度 地域保健総合推進事業「地方衛生研究所の検査研究機能の強化及び疫学情報連携ネットワーク体制の構築」事業報告書」で詳細に報告されている⁵⁾。本報では当センターでの実施概要について述べる。

1 訓練の構成

- (1) 保健所からの「情報」（模擬訓練事務局（堺市衛生研究所）からメールが送信される）と「検体」（模擬訓練事務局から宅配便で送付される）に基づいて実施する。
- (2) 開始情報（時刻）を除き、情報発信の時刻、情報回数、検体数（追加検体の有無）については知らされない。
- (3) 各参加機関は、情報を参考に機関ごとの判断で検査を

*現 東部保健福祉局

実施する。

(4) 検査結果は、当日中（又は翌日）に模擬訓練事務局に報告する。

2 訓練の経緯

(1) 模擬訓練情報の概要

模擬訓練当日に情報として、以下のメールを随時受信した。なお、実際のメール内容から要点を抜粋している。

【メール1】

20名のグループが公設のキャンプ場で朝ごはんの自炊を始め、7時ごろから食事を摂った。食後約1時間あたりから体調不良を訴える者が出始め、約10人が症状を訴えている。収容先のC病院から管内の保健所に食中毒の疑いありとの連絡があった。保健所職員が関係者のもとに聞き取りに走っている。食中毒に備えた検査対応の準備をしておいてほしい。

【メール2】

詳しい調査の結果、食後約1時間あたりから数名に下痢、嘔吐が見られた。また、数人がめまい、ふらつきを起こした。さらに続々とめまいを起こす者が出てきて、患者が計17人となった。さらに1時間後には、意識もうろうになる者なども出てきた。

健康な3人に、保健所職員が聞き取ったところ、20名の朝ごはんのメニューは、白ごはん、目玉焼き、大根おろし、味付けのり、みそ汁であった。

みそ汁は大鍋で調理した。みそ汁の具材は各人が持ち寄ったもので、それらは、たまねぎ、じゃがいも、にんじん、大根、ごぼう、ネギ、豆腐、きのこであった。

みそ汁の具材はすべて食べつくし、鍋の底に汁が若干残っているのみであった。

保健所から、みそ汁の残品を検体1として搬送するので、衛生研究所で原因究明にあたってほしいとの連絡があった。

【メール3】

各自が持ち寄った具材は、きのこことごぼう以外は、スーパーで買い求めたものであった。きのこはキャンプ場近くのおばさんからもらったもので、保健所職員がキャンプ場管理人に見てもらったところ、ヒラタケであった。一方、ごぼうは家の庭で家人が採って置いていたものを持参したものであった。本人に聞いたところ、まだ残りが自宅にあることが判った。

保健所職員が、当事者の自宅に急行し、残品の確認と提供をお願いした。提供されたごぼうを、検体2として改めて検査を依頼する。

【メール4】

自宅訪問した保健所職員が、ごぼうの採れた場所を教してもらったところ、チョウセンアサガオが生えており、その根

幹をごぼうと誤認して採ったことが判明した。

(2) タイムスケジュール

9:00	模擬訓練開始、開始情報【メール1】を受信
9:05	健康危機対策本部の設置 通常、食中毒調査（検査）を行う担当は、保健科学（微生物、ウイルス）、製薬衛生（食品理化学）の両担当であるが、徳島県立保健製薬環境センター健康危機管理実施要領に従って、すべての担当（総務企画、大気環境、水質環境を加えて）の課長及び幹部職員が招集され、【メール1】の内容（食中毒発生時の状況を記載）を周知し、次の情報（【メール2】）が届くまで待機する。シナリオから推定される原因物質の検討を開始した。
9:15	【メール2】を受信、同時に検体1（みそ汁）が届く
9:20	【メール1】及び【メール2】の内容に沿って、逐次検討し、原因物質の大まかな推定（絞り込み）を行い、検査方針を決定
9:45	検査開始（検体1）
11:50	【メール3】を受信、本部員召集、内容を検討し、以後の検査方針を決定
13:00	検体2（誤採取植物根）の搬入、検体2の検査開始
15:30	検体1からアトロピン及びスコポラミン検出、健康危機対策本部へ報告（速報）
16:30	検体2からアトロピン及びスコポラミン検出、健康危機対策本部へ報告（速報）
16:45	健康危機対策本部へ検査結果を報告後、立案・決裁
17:00	模擬訓練事務局へ結果報告（報告後、【メール4】を受信）

(3) 検討結果

【メール1】及び【メール2】に基づく検討結果は、次のとおりであった。

- ① 感染症、微生物起因食中毒の可能性は低い。
- ② 水系感染症（飲料水由来）の可能性は低い。
- ③ 有害物質を含む大気の吸引、接触あるいは有害物質が混入した飲料水の摂取の可能性は低い。
- ④ 患者グループが摂食した食品中には、症状を発現する可能性が否定できない食材として「きのこ」「ごぼう」が含まれていた。

(4) 検査方針

【メール1】及び【メール2】の検討結果から次の検査方針を決定した。

- ① 「きのこ」については、有毒成分の標準品を保有していないので、きのこ成分については理化学的検査ができない。また、検体が「きのこ」の場合は、専門機関に鑑定を依頼する。
- ② 「ごぼう」類似植物（特にチョウセンアサガオ等の誤食が全国的に発生していること）の誤食の可能性が高い。
- ③ その後の追加情報が得られるまでの間、検体1の三分の一（50g）を使用して、トロパンアルカロイドの抽出を実施する。

(5) 追加情報による検査方針

- ① 【メール3】の受信、検体2の搬入の結果、「きのこ」を鑑定したわけではないが、可能性は低い。
- ② 「ごぼう」は、他の植物を誤採取した可能性が高い。
- ③ みそ汁とともに誤採取植物根についてもトロパンアルカロイドの検査を実施する。

Ⅲ 検査方法

1 検体

検体1：みそ汁

検体2：誤採取植物根

2 試薬等

硫酸アトロピン標準品は、和光純薬工業(株)製（特級）、臭化水素酸スコポラミン標準品は、和光純薬工業(株)製（一級）を使用した。

メタノール、アセトニトリル、蒸留水は、関東化学(株)製（HPLC用）、ジエチルエーテル、無水硫酸ナトリウムは、関東化学(株)製（残留農薬試験・PCB試験用）を使用した。

その他の試薬は、和光純薬工業(株)製又は関東化学(株)製（特級）を使用した。

薄層板は、シリカゲル薄層板（TLC ガラスプレートシリカゲル 60（20×20 cm）：MERCK 社製）を4分割（10×10 cm）して用いた。

ドラーゲンドルフ試薬は、衛生試験法・注解2010に記載されている方法²⁾を参考に調製した。

3 標準溶液

標準原液（5000 µg/mL）は、硫酸アトロピンと臭化水素酸スコポラミンをそれぞれメタノールに溶かして調製した。標準溶液（1000 µg/mL）は、標準原液をメタノールで希釈して調製した。混合標準溶液（100 µg/mL，50 µg/mL）は、標準溶液を混合してメタノールで調製した。

4 測定条件及び操作法

GC/MSの測定条件は、平間らの方法⁴⁾、HPLCの測定条件は、横田らの方法³⁾を参考にした。TLCの操作法は衛生試験法・注解2010に記載されている方法²⁾を参考にした。

(1) GC/MS

装置：6890N 及び 5973N（Agilent Technologies 社製）

カラム：DB-1MS（0.2 mm i.d.×30 m，0.25 µm）（J&W Scientific 社製）

カラム温度：80 °C（1 min hold）→5 °C/min→190 °C（15 min hold）→10 °C/min→310 °C（10 min hold）

キャリアガス：He（0.7 ml/min）

注入口温度：200 °C，スプリットレス 注入量：1 µL

インターフェイス温度：280 °C

イオン化法：EI法（SCAN：m/z 40-700）

イオン源温度：230 °C 四重極温度：150 °C

(2) HPLC

装置：LC-2000（日本分光(株)製）

カラム：Inertsil ODS-3（4.6 mm i.d.×250 mm，3 µm）（GL Sciences 社製）

移動相：リン酸二水素カリウム 6.8 g を水 900 mL に溶かし トリエチルアミン 10 mL を加え、リン酸で pH 3.5 に調整した後、水を加えて 1000 mL とした液／アセトニトリル混合溶液（9：1）

流量：0.9 mL/min カラム温度：20 °C 注入量：10 µL

測定波長：210 nm

(3) TLC

展開溶媒：メタノール：アンモニア水（200:3）

試料塗布：薄層板の下端から 2 cm の位置に、両端から 1 cm 離してスポットした。標準溶液（5000 µg/mL）は、2 µL，試験溶液は、含有量が未知のため 5 µL，10 µL，20 µL の3つをスポットした。

展開操作：展開溶媒を約 7.5 cm 展開後、30 分間放置

検出法：ドラーゲンドルフ試薬を噴霧し呈色させ、標準溶液の R_f 値及び呈色と比較

5 試験溶液の調製

(1) 検体1：みそ汁

衛生試験法・注解2010に記載されている方法²⁾を参考に図1のとおり操作を実施した。

(2) 検体2：誤採取植物根

横田らの方法³⁾を参考に図2のとおり操作を実施した。

Ⅳ 検査経緯及び検査結果

1 検査方法の選定

最近の食品中のアトロピン及びスコポラミンの分析では LC/MS/MS を用いた迅速定量法^{6),7)}が提案され、また、

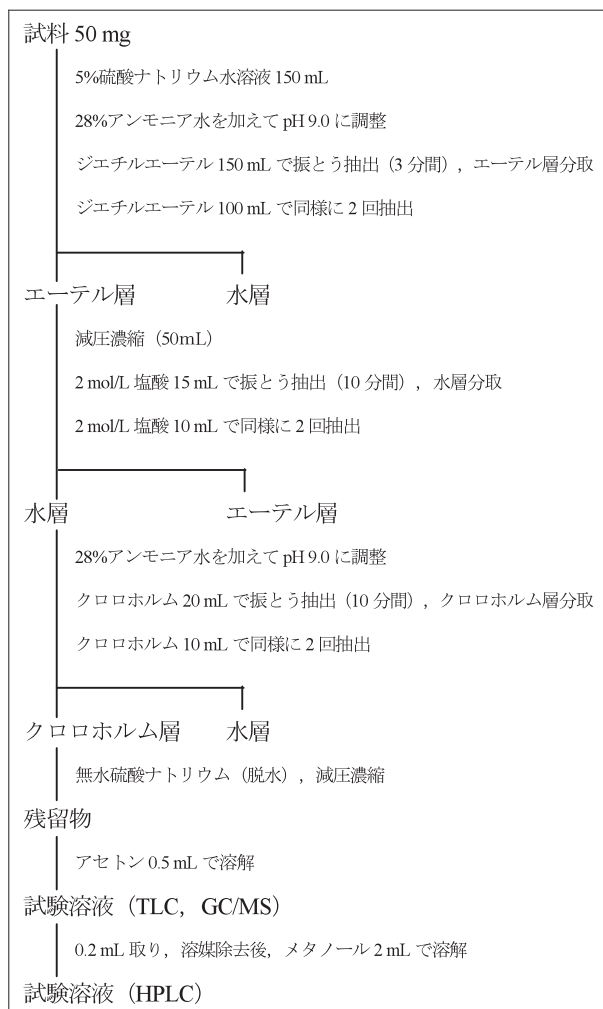


図1 試験溶液調製フロー (みそ汁)

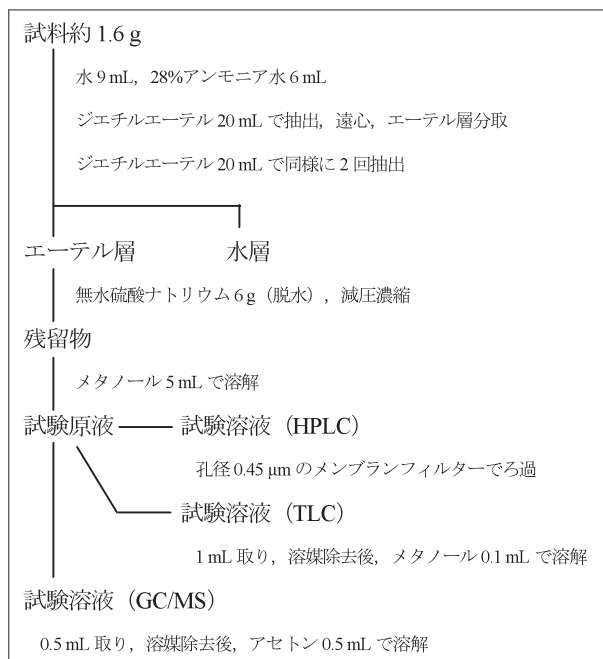


図2 試験溶液調製フロー (誤採取植物根)

GC/MS/MS 及び LC/MS/MS は測定使用中であり, 模擬訓練に使用できなかった。

一方, TLC は, 医薬部外品等の承認試験等でルーチン的に実施しており, 複数種類の薄層板が使用可能な状態で保管されていたため, 定性試験に使用することとした。

HPLC は, 模擬訓練に使用可能な状態であったため定量試験に用いた。

さらに, 指定薬物分析担当者から「指定薬物分析中に同時にアトロピンを検出した事例」が北海道衛生研究所で報告されている⁴⁾との情報提供があったため, 急遽 GC/MS による分析を先行させることにした。

調製された試験溶液は, GC/MS, TLC でほぼ同時に操作されたが, TLC の結果を待たず, GC/MS ライブラリー (wiley 8th) での照合からアトロピン及びスコポラミンの検出が判明した (その後標準液測定による保持時間の確認を行った)。

2 GC/MS による分析

(1) 分析条件

指定薬物分析条件と同様の条件で測定した。したがって, 上記論文に記載されたアトロピン及びスコポラミンの保持時間に近い時間帯で検出されることが期待できた。

(2) みそ汁試験溶液の結果

保持時間 37.35 分と 41.89 分にピークが検出された。前者のピークのマススペクトルはライブラリー中のアトロピンのマススペクトルとほぼ一致した。また, 後者のピークのマススペクトルはライブラリー中のスコポラミンのマススペクトルとほぼ一致した (図 3)。また, ともに分子イオン (M^+) が確認できた。

(3) 誤採取植物根試験溶液の結果

保持時間 36.36 分と 41.46 分にピークが検出された。みそ汁の検査結果と同様であった (図 4)。

3 TLC による分析

(1) 薄層板の選定

シリカゲル薄層板は, 2 種類 (①単一板②蛍光剤添加) が使用可能であったが, ドラージェンドルフ試薬によるアトロピン等の発色時, 蛍光剤がどのように影響するか不明であったため, 単一板を使用し, 試験溶液のスポット量を変えて展開した。

(2) みそ汁の TLC 結果

アトロピン標準溶液は Rf 値が 0.26, スコポラミン標準溶液は Rf 値が 0.69 の位置に単一のスポットを認めた。試験溶液 5 μL, 10 μL, 20 μL は全て, 標準溶液と同様の位置にスポットが見られ, Rf 値は, 0.26, 0.69 と標準溶液と同じ値だった。また, スポットの呈色は, 標準溶液, 試験溶液ともに橙色で同じ色調だった (図 5)。

LC/MS/MS による精度管理⁸⁾ が実施されているが, 訓練当日, 当センターでは農産物中の残留農薬分析を実施しており,

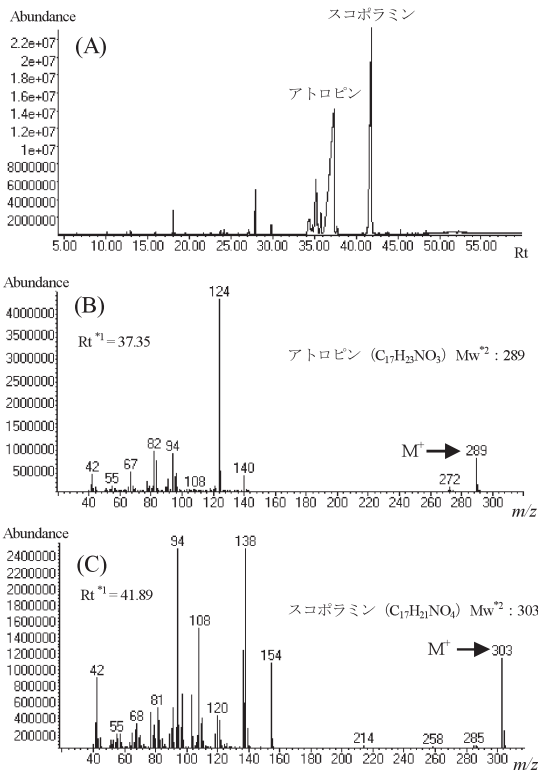


図3 GC/MS の TIC とマススペクトル (みそ汁)
 (A)Total Ion Chromatogram (TIC), (B)アトロピンのマススペクトル, (C)スコポラミンのマススペクトル

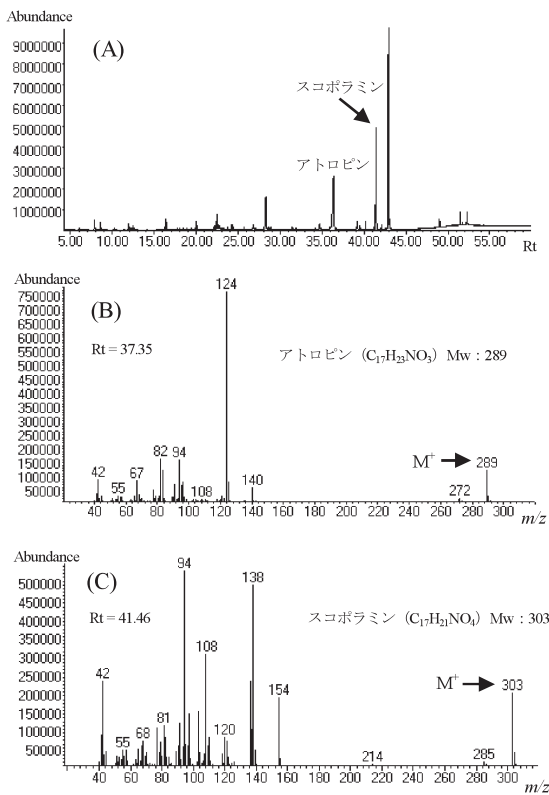


図4 GC/MS の TIC とマススペクトル (誤採取植物根)
 (A)Total Ion Chromatogram (TIC), (B)アトロピンのマススペクトル, (C)スコポラミンのマススペクトル

*1 Rt: 保持時間 *2 Mw: 分子量

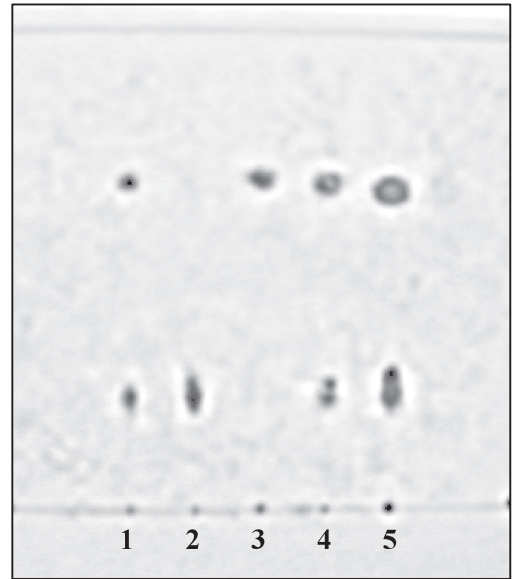


図5 薄層クロマトグラム (みそ汁)
 1: 試験溶液 5 μ L, 2: アトロピン標準溶液, 3: スコポラミン標準溶液, 4: 試験溶液 10 μ L, 5: 試験溶液 20 μ L

(3) 誤採取植物根の TLC 結果

アトロピン標準溶液は Rf 値が 0.25, スコポラミン標準溶液は Rf 値が 0.69 の位置に単一のスポットを認めた。試験溶液 5 μ L のアトロピンのスポットは不明瞭だったが, 試験溶液 10 μ L, 20 μ L は全て, 標準溶液と同様の位置にスポットが見られ, Rf 値は 0.26, 0.70 と標準溶液とほぼ同じ値だった。試験溶液 5 μ L のアトロピンのスポットが不明瞭だったのは, アトロピン近辺では夾雑物質があることが想定される。また, スポットの呈色は標準溶液, 試験溶液ともに橙色で同じ色調だった (図6)。

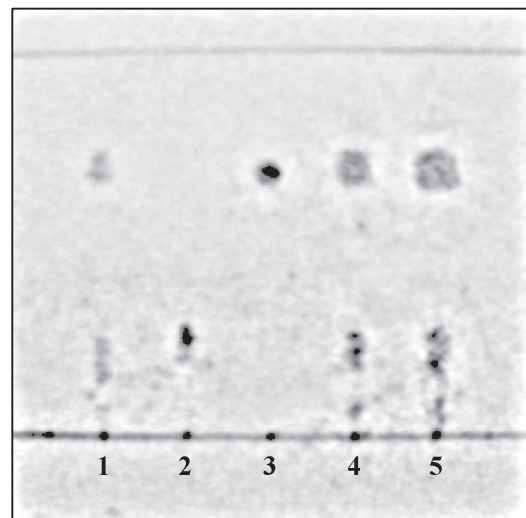


図6 薄層クロマトグラム (誤採取植物根)
 1: 試験溶液 5 μ L, 2: アトロピン標準溶液, 3: スコポラミン標準溶液, 4: 試験溶液 10 μ L, 5: 試験溶液 20 μ L

4 HPLCによる分析

混合標準溶液 (100 µg/mL) を HPLC で測定した結果、保持時間 9.10 分にスコポラミン、19.29 分にアトロピンを検出した。みそ汁の試験溶液では、保持時間 9.12 分と 19.29 分にピークが検出された。誤採取植物根の試験溶液では、保持時間 9.11 分と 19.29 分にピークが検出された (図7)。

また、50 µg/mL と 100 µg/mL の混合標準溶液を用いて定量した結果、みそ汁からは、アトロピン 9 µg/g、スコポラミン 10 µg/g、誤採取植物根からは、アトロピン 190 µg/g、スコポラミン 300 µg/g を検出した。

みそ汁の試験溶液は、精製度が高く、混合標準液 (100 µg/mL) と同様のクロマトグラムだった。誤採取植物根の試験溶液では、スコポラミンのピークの近傍に夾雑物質を認められたが、分離が良好だったので定量が可能であった。食品によっては夾雑物質のピークが、目的物質のピークと重なり、HPLC では定量できず、LC/MS/MS の測定が必要な場合も想定される。

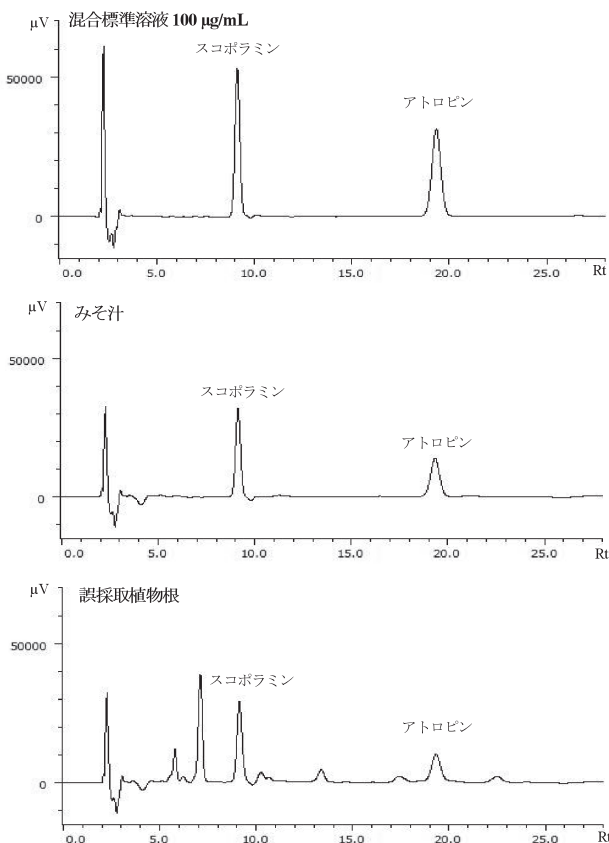


図7 混合標準溶液 100 µg/mL 及び試験溶液 (みそ汁、誤採取植物根) のクロマトグラム

5 検査結果の評価 (訓練)

今回、ごぼう (誤採取植物根) の摂取量について訓練 (シナリオ) で設定されていないので、みそ汁中からの摂取量の

みで食中毒との関連を考察するのは適切ではないと考えられる。しかし、今回のみそ汁の含有量 (アトロピン 9 µg/g、スコポラミン 10 µg/g) は、食品が異なるものの 2006 年に沖縄県で起きた食中毒事例⁹⁾での含有量 (アトロピン 4.3 µg/g、スコポラミン 14.0 µg/g) に匹敵する。仮にみそ汁のみの摂取によっても上記食中毒事例と同様の 100 g 程度摂取すると中毒症状を呈する可能性が否定できないと判断した。

6 有機リン系農薬の添加

平成 25 年 12 月 13 日に堺市で開かれた「平成 25 年度地域保健推進事業近畿ブロック「健康危機事象模擬訓練」検証会において、みそ汁検体にアトロピン及びスコポラミンに加え、0.4 ppm のマラチオンが添加されていることが明らかになった。

当センターの検査はトロパンアルカロイドを抽出する目的で調製された試験溶液を測定したため、有機リン系であるマラチオンはアルカリ性では抽出されず検出されなかった。

今後、訓練時の検査方針を決定する際、考慮に入れるべき課題である。

V まとめ

訓練検体のみそ汁及び誤採取植物根 (チョウセンアサガオ) ともに GC/MS ライブラリー検索で一致、TLC で標準溶液と Rf 値が一致、HPLC で標準溶液の保持時間が一致したのでアトロピン及びスコポラミンと判断し、食中毒事例の原因物質と推定した。

チョウセンアサガオのアトロピン等の分析では LC/MS/MS を用いる例が多い^{6),7),8)}。しかし、訓練時、当センターでは LC/MS/MS は使用できる状態でなかった。

健康危機事象発生時には、未知試料の分析依頼に対し、手持ちの試薬類や機器等で迅速に対応しなければならない。しかし、使用予定の機器が他の用途に使用中 (あるいは故障中) であることを想定すると、いつも同様の条件で検査が可能とは限らず、そのため常に複数の検査方法を準備しておくことが賢明である。

今回の訓練では、当初予定外の GC/MS 測定 (ライブラリー検索) でアトロピン等の迅速同定が可能であり効率的な検査に有用であることが明らかとなった。

今後、自然毒分析を実施する上で、全ての毒成分の標準品を保有することが困難である以上、どのような毒成分が GC/MS 測定可能なのか (標準品を保有していなくてもライブラリー検索で定性確認が可能なのか) を検証整理しておくことが重要であると考えられる。

今回の訓練で、GC/MS、TLC 及び HPLC それぞれの特性を改めて再認識する機会を得て危機管理上有益であった。今後

も継続してこのような訓練に参加し、健康危機事象発生時に対応できる体制を整えることが課題である。

謝辞

本分析事例を執筆するにあたり、ご助言を頂きました堺市衛生研究所の神藤正則総括研究員をはじめ研究員の皆様に、感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 自然毒のリスクプロファイル：高等植物：チョウセンアサガオ，厚生労働省ホームページ
(http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/higher_det_11.html) (閲覧日：平成26年9月19日)
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2010， 2.2.2植物性自然毒 4) トロパン系アルカロイド（アトロピンおよびスコポラミン）， 273-275 (2010)
- 3) 横田 洋一 他：チョウセンアサガオ属のアルカロイドの分析について，富山県薬事研究所報， 34， 29-34 (2006)
- 4) 平間 祐志 他：平成21年度にインターネットで購入した植物系違法ドラッグ製品の成分分析，北海道衛生研究所報， 62， 15-20 (2012)
- 5) 平成25年度 地域保健総合推進事業「地方衛生研究所の検査研究機能の強化及び疫学情報連携ネットワーク体制の構築」事業報告書， 106-109
- 6) 山辺 真一 他：LC/MS/MSによる食品中のアトロピン，スコポラミンの迅速定量，岡山県環境保健センター年報， 31， 127-132 (2007)
- 7) 西村 修一 他：LC/MS/MSによる食品中のアトロピン及びスコポラミンの迅速定量法の検討，鹿児島県環境保健センター所報， 9， 104-109 (2008)
- 8) 矢野 昌弘 他：LC-MS/MSを用いた植物性自然毒迅速分析法の妥当性評価，第50回全国衛生化学技術協議会年会講演集， 128-129 (2013)
- 9) 大城 直雅 他：チョウセンアサガオに接木したナスによる食中毒事例，食品衛生学雑誌， 49， 376-379 (2008)