

博士論文

牛乳中の細菌性毒素の分析法開発と実態調査

Development of the novel quantification for bacterial
toxins in cow's milk

2023年8月

小池 裕

目次

要旨.....	3
ABSTRACT.....	7
第1章 緒論.....	11
第2章 液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計(LC-MS/MS)によるセレウ リド(CRL)定量法の確立.....	22
2-1. 緒言.....	22
2-2. 材料および方法.....	22
2-3. 結果および考察.....	27
2-4. まとめ.....	33
第3章 LC-MS/MSによる黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)定量法の確 立と適応拡大.	36
3-1. 緒言.....	36
3-2. 材料および方法.....	36
3-3. 結果および考察.....	41
3-4. まとめ.....	48
第4章 牛乳等に含まれるCRLおよびSEAの実態調査.....	52
4-1. 序論.....	52
4-2. 材料および方法.....	53
4-3. 結果および考察.....	54
4-4. まとめ.....	55
第5章 総括.....	56
謝辞.....	60
引用文献.....	61
図表(Figure および Table).....	69

要旨

牛乳は古くから高栄養食品として人々の健康を支えてきた。しかしながら、牛乳は動物由来食品であるため、細菌性毒素の汚染を完全に防除することができず、セレウス菌が産生するセレウリド(CRL)や黄色ブドウ球菌が産生するエンテロトキシン A(SEA)が牛乳に残留したことで、大規模な集団食中毒事件が発生してきた。CRL と SEA を同定かつ定量する個別試験法にはそれぞれの課題があり、改良が必要であった。特に、鑑別が必要な 2 つの細菌性毒素を測定できる信頼性の高い分析法が求められていた。本研究の目的は、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、牛乳中 CRL と SEA を同一の条件で連続して測定し、再現性高く定量するとともに、簡単かつシンプルな前処理法を構築することとした。

LC-MS/MS による牛乳中の CRL の同定および定量法を開発した。酸性化によるタンパク質沈殿法によって牛乳中の CRL を濃縮し、アセトニトリルによる 2 回の抽出で回収した。これらの組み合わせにより、牛乳から夾雑成分を除去し、固相精製を用いたクリーンアップステップを省略した。さらに、再現性の良い測定と検出器を清浄に保つために、抽出溶液をメタノールで 10 倍に希釈した。その結果、フラグメンテーションへの干渉を最小限に抑え、プロダクトイオンスペクトルによる CRL の同定が可能となった。加えて、夾雑成分の影響を-4%とす

ることで、より簡便な外部標準検量線を採用し、正確な定量値を得た。開発した本法について、牛乳を対象試料に妥当性評価を行った。CRL を 2 濃度(10、50 ng/g)で添加し、1 試験者が 1 日 3 併行 5 日間の回収試験を実施した。その結果、本法は十分な選択性を有しており、真度 91-94%、併行精度 2-5%、室内精度 5-6%であった。定量下限値(LOQ)は 2 ng/g に設定できた。各パラメータは農薬等の試験法開発に使用される厚生労働省ガイドライン基準に適合し、本法が試験検査に適応できる分析性能を有していることを確証した。さらに、LOQ のプロダクトイオンスペクトルにおいて、標準品との一致率は 70%以上であり、LOQ まで確実かつ精確に同定・定量する本法の有用性を確証した。本研究は再現性の高い CRL スクリーニング法を開発し、従来の個別法と併用することで真度の検証とといった運用を提案した。

(Koike, H., *et al.* Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 35:2424-2433. 2018)

SEA の安定同位体標識ペプチドを内部標準物質として用い、LC-MS/MS により牛乳中の SEA 定量法を開発した。本研究ではトリプシン消化した SEA 由来ペプチドを測定することで、牛乳中の SEA を確実かつ精確に同定・定量する。まず、SEA 由来ペプチドを 3 つ選定し、SEA 全体の 10%以上のアミノ酸配列を網羅することで、LC-MS/MS を使用して未知タンパク質を同定するための基準を

満たす同定性能を確保した。次に、CRL と同じ LC 条件の適用を検証した結果、これらペプチドを十分に分離できることから、2 つの細菌性毒素を効率よく迅速に鑑別できることとなった。前処理では、牛乳中の SEA を pH 調整とトリクロロ酢酸（TCA）沈殿法の 2 段階のプロセスで採集した。pH 調整によってカゼインを取り除き、SEA を選択的に濃縮した。TCA 沈殿法では、特別な器具を使用せずに SEA と他のタンパク質を分別した。また、酵素とタンパク質の比率を最適化することで、トリプシン消化効率を最大かつ安定化した。さらに、脱塩操作によって、分離を阻害する夾雑成分を取り除き、SEA 由来ペプチドの保持時間を保証し再現性を高めた。開発した本法について、牛乳を対象試料に妥当性評価を行った。SEA を 2 濃度(50、100 ng/g)で添加し、1 試験者が 1 日 3 併行 5 日間の回収試験を実施したところ、十分な選択性を有しており、真度 80-82%、併行精度 13-14%、室内精度 13-18%であった。定量下限値は 10 ng/g に設定できた。各パラメータは農薬等の試験法開発に使用される厚生労働省ガイドライン基準に適合し、本法が試験検査に適応できる分析性能を有していることを確認した。本研究は LC-MS/MS によるペプチド測定に特化した前処理法を開発することで、先行研究よりも高精度かつガイドライン基準を満たす信頼性の高い SEA 定量法を確立した。

(Koike, H., *et al.* Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.

36:1098-1108. 2019)

開発した分析法を生乳に応用するため、生乳の代替となる特別牛乳を用いて添加回収試験を実施した。CRL 10 ng/g を添加した結果 (n=3) では、回収率 81.1%、RSD1.6%であった。SEA 50 ng/g を添加した試験 (n=3) では、回収率および RSD はそれぞれ 78.8%および 9.1%であった。本法の妥当性を検証した結果、十分な結果が得られた。さらに、CRL および SEA の実残留量の調査を実施した。東京都内で採取または購入した生乳 14 検体および低温殺菌牛乳 8 検体に本法を適用した。いずれの試料からも対象毒素である CRL と SEA を検出しなかった。

以上のことから、本研究は CRL と SEA の 2 つの細菌毒素を同一の LC-MS/MS 条件で連続して測定できる分析法を開発した。また、簡便な前処理法による精確かつ再現性の高い定量が可能となった。開発した本法を東京都内の実態調査に適用し、流通する牛乳類に定量下限値以上の CRL と SEA の残留がないことを確認した。開発した本法が食中毒の病因物質の同定や健康被害の防止に寄与するとともに、本研究が牛乳の品質保証や食品衛生における検査体制の強化に貢献することが期待される。

ABSTRACT

Cow's milk is a highly nutritious food and has supported human health. However, because the cow's milk is an animal-derived food, it is not completely free from bacterial toxins. Cow's milk contaminated by cereulide (CRL) produced by *Bacillus cereus* and staphylococcal enterotoxin type A (SEA) produced by *Staphylococcus aureus* caused extensive outbreaks of gastroenteritis. The individual methods for identifying and quantifying CRL and SEA had their own problems and needed to be improved. Furthermore, there is a need for an analytical method capable of measuring two bacterial toxins that require differentiation. The aim of this study was to reliably identify the presence of CRL and SEA in cow's milk under identical conditions using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). An accurate quantitative method was also developed with easy and simple sample preparations.

The presence of CRL in cow's milk was identified and quantified using our validated method with LC-MS/MS. CRL was concentrated using protein acid-precipitation and extracted from the precipitate by using acetonitrile twice. The combination of protein acid-precipitation and extraction sufficiently eliminated the matrix compounds from the milk and a further clean-up step utilising solid-phase extraction could be omitted. For robustly measuring the samples and keeping the MS devices clean, the extraction solution

was diluted 10-fold using methanol. Owing to the minimisation of the interferences caused by fragmentation patterns, multiple reaction monitoring information-dependent acquisition-enhanced product ion spectra enabled the characterisation and identification of CRL. Besides the matrix effect (−4%), an external solvent calibration curve was adapted for accurate quantification. The method was validated using fortified recovery tests, at two concentrations (10 and 50 ng/g), using three samples daily on five different days based on the Japanese guidelines. This new method exhibited good accuracy ranging from 91% to 94%. The relative standard deviations (RSD) of repeatability ranged from 2% to 5%, and the RSD of within-laboratory reproducibility ranged from 5% to 6%. These standard deviations satisfied the criteria for the Japanese validation guidelines. The limit of quantification (LOQ) was estimated to be 2 ng/g. On the product ion spectra at the LOQ level, the library match was satisfactory with a purity fit value of >70%. Thus, this study developed a practical screening method for quantifying CRL and proposed an operation model with conventional individual methods for verifying the trueness.

SEA contaminant was quantified in cow's milk by LC–MS/MS with the use of a stable isotope-labelled peptide of SEA as an internal standard. SEA was cleaned up in a two-step process that included pH control and trichloroacetic acid (TCA) precipitation. The pH control phase eliminated other proteins. TCA precipitation cleaned up SEA without

special equipment. An appropriate enzyme-to-protein ratio maximised tryptic digestion. A desalting process guaranteed the stable retention of SEA-digested peptides. The coverage of amino-acid sequences (>10%) clearly identified the toxin's presence. SEA was accurately quantified using LC-MS/MS based on a multiple-reaction monitoring mode. The developed method was validated based on spiked recovery tests at 50 and 100 ng/g conducted with three samples collected on a daily basis for five days based on Japanese validation guidelines. The new method exhibited good accuracy which ranged from 80% to 82%. The RSD of repeatability were 13–14% and the RSD of within-laboratory reproducibility were 13–18%. These standard deviations satisfied the criteria of the Japanese validation guidelines. The LOQ was estimated to be 10 ng/g. By optimizing a sample preparation method for peptide analysis by LC-MS/MS, this study established an accurate reliable method for SEA quantification according to the criteria of the guideline.

To verify the applicability of the developed methods to raw milk, a fortified test using a special milk sample as an alternative was tested. In the fortified tests using the milk samples with 10 ng/g CRL ($n = 3$), the recovery and RSD were 81.1% and 1.6%, respectively. In fortified tests using the milk samples with 50 ng/g SEA ($n = 3$), the recovery and RSD were 78.8% and 9.1%, respectively. The suitability of the methods was

tested and gave satisfactory results. Additionally, a survey of the actual residues of CRL and SEA was conducted. The developed method was applied to 14 raw milk and 8 milk samples pasteurised using the low-temperature, long-time process and collected in Tokyo. None of the samples was found to contain the target toxin.

In this study, an analytical method that can measure the two bacterial toxins, CRL and SEA, was developed using the same condition via LC-MS/MS. An accurate and reliable quantitative method was also developed with easy and simple sample preparations. The developed method was applied to a survey in Tokyo, and it was confirmed that there were no residues of CRL and SEA in cow's milk samples. The developed method is expected to contribute to the identification of causative agents of food poisoning and the prevention of health hazards. Furthermore, it is expected that this study has contributed to the quality assurance of cow's milk and the strengthening of the inspection system in food hygiene.

第1章 緒論

本論文の対象は、細菌性毒素であるセレウリド(cereulide, CRL)と黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A(staphylococcal enterotoxin type A, SEA)である。液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)を用いた牛乳中の CRL と SEA の分析法を開発することを目的としている。

1-1. 牛乳中の細菌性毒素分析の必要性

世界中で生産・消費されている牛乳は歴史のある畜産物の1つであり(Flannery, 1965)、高い栄養価を有している食品である。均質な白い液体である牛乳は加工しやすく、食の多様性を生み出し、人類の生活を豊かにしている。日本をはじめ、アメリカやEU、オーストラリア等においては、一般細菌数や大腸菌数を乳の規格基準として設定し、その安全性を厳格に管理している(Okada, 2021); ([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2016)。酪農業では、搾乳時または製造流通工程における衛生管理を徹底し、さらに、牛乳の生産から消費工程においては、10℃以下の低温管理を徹底することで、環境由来のセレウス菌や乳房炎の原因菌である黄色ブドウ球菌の増殖と汚染拡大を防除している(Evanowski *et al.*, 2020); (Feldmann *et al.*, 2006); (Paludetti I *et al.*, 2018.)。

しかしながら、牛乳は動物性食品であるため、原料由来の微生物汚染を完全に防ぐことは難しく、世界各国で細菌性食中毒の原因食品となっている(Okada, 2021)。特に日本では、セレウス菌や黄色ブドウ球菌が増殖時に産生・放出する細菌性毒素の残留した牛乳等の喫食が食中毒事件を引き起こし、その際には数百人または 1 万人を超える患者数が報告されている(Okada, 2021); (Asao *et al.*, 2003)。このような大規模な集団食中毒事例が発生した際には、病因物質を特定するために、牛乳中の細菌性毒素を分析し、その存在の有無を証明する必要がある。加えて、平常時から流通する牛乳中の細菌性毒素をモニタリングし、その安全性を保障することは、飲食による被害を防止し国民の健康生活の維持増進につながる。これらの理由から、細菌性毒素の分析は食品衛生および公衆衛生学的に重要である。

1-2. 牛乳へのセレウス菌の混入と CRL 分析法の課題

セレウス菌(*Bacillus cereus*)は環境中に広く存在し、感染症の原因となることが知られており、国内の食中毒統計に病因物質として記載されている病原体である([MHLW] Ministry of Health Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2021)。本菌による食中毒は嘔吐型と下痢型に分類され、日本では嘔吐型の発生が主に報告されている(Okada, 2021); ([MHLW] Ministry of Health Labour and Welfare, Tokyo,

Japan., 2021)。嘔吐型のセレウス菌食中毒においては、セレウス菌によって産生された細菌性毒素(CRL)が食品を汚染し、嘔吐や腹痛を引き起こす(Okada, 2021); ([MHLW] Ministry of Health Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2021)。過去の食中毒事例から経口摂取でのCRLの最小発症量は約1 µg/ヒトと推定されている(Andersson *et al.*, 2007); (Ueda, 2013)。CRLは非リボソームペプチド合成酵素によって合成されるドデカデブシペプチド[D-*O*-Leu-D-Ala-L-*O*-Val-L-Val]₃である(Agata *et al.*, 1995); (Ehling-Schulz *et al.*, 2006); (Marxen *et al.*, 2015)。CRLの構造と特性をFigure 1に示す。この環状ペプチドは消化酵素や極端なpH条件、さらには121℃、90分の熱にも耐性がある(Agata *et al.*, 1995)。CRLは物理化学的に安定した嘔吐毒であり、調理後にセレウス菌が死滅していても、毒素が残存して食中毒が生じる例が報告されている(松木 *et al.*, 2021)。従って、セレウス菌の検出ではなく、症状を引き起こすCRLの検出が必要である。

CRL を産生するセレウス菌は生乳および牛乳の中に存在することが報告されている(Cui *et al.*, 2016); (Shimajima *et al.*, 2020)。牛乳の加工において一般的である殺菌処理によって細菌は死滅するが、芽胞が残存する場合がある(Scheldeman *et al.*, 2006)。生き残った芽胞は、ほとんどあるいは全く競合することなく、出芽・増殖して嘔吐毒素を産生することができる。加えて、耐寒性のセレウス菌は7℃以下での保管中にも増殖できるので(Scheldeman *et al.*, 2006)、冷蔵保存している

牛乳中でも CRL を産生する可能性がある。食の安全を守るためにも、牛乳中の CRL の有無を確認できる分析法が求められている。

CRL の分析には、様々な生物学的試験が開発されてきた。生物学的試験としては、イノシシ精子の運動性を利用した細胞毒性試験(Andersson *et al.*, 2007)や Caco-2 細胞(Rowan *et al.*, 2001)、チャイニーズハムスター卵巣細胞(Beattie and Williams, 1999)、HEp-2 細胞(Stark *et al.*, 2013)、ラット肝細胞(Kawamura-Sato *et al.*, 2005)の細胞培養を用いた毒性試験がある。バイオアッセイに基づくこれらの方法は、力価 titer といった単位を用いて毒素活性(生体への影響)を評価できるが、症状の原因となる CRL を検出することができない。また、これらの生物学的手法は CRL の有無を判断する定性的な手法であり、残存する CRL がどの程度あるかを定量できない。

そこで、CRL を直接検出し定量するために 液体クロマトグラフ-質量分析計 (liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS)やタンデム質量分析計(tandem mass spectrometry, MS/MS)を用いた化学的手法が開発された(Biesta-Peters *et al.*, 2010); (Kroteń *et al.*, 2010); (Delbrassinne *et al.*, 2012); (Yamaguchi *et al.*, 2013); (Decleer *et al.*, 2016)。これらの既報では、MS システムを選択反応モニタリング (selected reaction monitoring, SRM)モードで使用し、LC で分離しきれなかった夾雑成分と CRL を区別することによって、食品に含まれる数 ng/g の CRL を再現

性高くかつ短時間で検出することができる。一方で、前処理工程での損失やイオン化効率を補正し、より正確に定量するために、安定同位体識標した CRL($^{13}\text{C}_6$ -CRL)や CRL と類似した構造を持つバリノマイシンを内部標準物質として利用している。CRL の内部標準物質として、 $^{13}\text{C}_6$ -CRL がバリノマイシンよりも正確に各工程を補正できるという報告があり (Rønning *et al.*, 2015)、 $^{13}\text{C}_6$ -CRL の使用が一般的になっている (Bauer *et al.*, 2010); (Zuberovic Muratovic *et al.*, 2014); (in 't Veld *et al.*, 2019)。しかしながら、 $^{13}\text{C}_6$ -CRL は 特注品であり、入手や管理・維持が難しい。日常的に牛乳中の CRL を監視し、かつ食中毒事件への対応可能な検査体制を構築するためには、ランニングコストは抑えつつ LC-MS/MS が持つ検出精度を維持した定量法、つまりスクリーニング法が求められている。

1-3. 牛乳への黄色ブドウ球菌の混入と SEA 分析法の課題

黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)は牛の乳房炎の起因菌であり、タンパク質の毒素であるエンテロトキシン A-E (classical SEs) およびエンテロトキシン様タンパク質 SEG-SE/Y (newer SEs)を産生し毒性を発揮する病原体である (Fisher *et al.*, 2018)。これらのタンパク質毒素の中でも特に SEA は食中毒に関与する毒素の中で最も頻繁に遭遇する毒素であると報告されている (Shimizu *et al.*, 2000); (Yan *et al.*, 2012)。日本では、1980 年から 1995 年の 16 年間に発生した黄色ブド

ウ球菌食中毒事件のうち、89%以上の頻度で SEA は関与していたとの報告がある(Shimizu *et al.*, 2000)。SEA は約 27 kDa の単純タンパク質であり、100°C、20 分の熱や強酸性環境下でも安定である (Asao *et al.*, 2003); (Evenson *et al.*, 1988); (Thomas *et al.*, 2007); (Fisher *et al.*, 2018)。SEA の立体構造と特性を Figure 2 にまとめた。SEA は熱や pH の変化に耐性を持つため、菌体死滅後にも毒素が残存して中毒を引き起こすことが懸念される。実際に低脂肪乳中に残留した SEA による大規模集団食中毒事例では、黄色ブドウ球菌が検出されないにもかかわらず、SEA は検出された(Asao *et al.*, 2003)。経口摂取による SEA の最小発症量は様々な濃度が報告されている。(Gilquin *et al.*, 2017)は、50 µg 以上の SEA がヒト(体重 70 kg)に対して毒性があるとする一方、(Asao *et al.*, 2003)は、経口摂取した SEA 20~100 ng が消化器症状を引き起こしたと報告している。この事例では(Asao *et al.*, 2003)、低脂肪乳中の SEA はごく微量であり、0.1~1.6 ng/g の濃度範囲であった。SEA の毒性評価や牛乳の安全性を確保するためには、食中毒事例で報告された濃度まで SEA を定量できる分析法が必要である。

食品中の SEA 検出法として汎用されているのは、抗原抗体反応を用いた酵素免疫吸着法(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)や逆受身ラテックス凝集反応法(Reversed Passive Latex Agglutination, RPLA)といった免疫学的手法である(Park and Szabo, 1986); (Jørgensen *et al.*, 2005); (Nouri *et al.*, 2018)。EU の公定法

(Hennekinne *et al.*, 2007)では、ELISA による SEA 検出に先立ち、2 段階の前処理、すなわち pH 調整と透析を行う。pH 調整は、さらに 2 つのステップ、酸性化と中和化で構成されている。酸性化では、牛乳に酸を加え遠心分離を行い、SEA を含む上澄液と主要な乳タンパク質(カゼイン)を沈殿させ分離する。中和化では、上澄液から pH 調整によって壊れたタンパク質等を除去する。さらに 24 時間以上の透析をクリーンアップとして用いる。前処理を 2 段階にすることで、牛乳中の SEA 検出下限値を 0.1 ng/g に設定できるという感度に関する利点がある一方で、測定完了までの期間が数日と長くなる不利な点がある。この EU 公定法の信頼性については、牛乳中の SEA 10 ng/g を正確に検出できないといった報告がある(Nia *et al.*, 2016)。(Nia *et al.*, 2016)は ELISA 等の免疫学的手法を用いて牛乳中の SEA 10 ng/g を検出する技能試験を実施し、取りまとめている。参加した試験所 17 機関のうち、8 機関(47%)で SEA は同定されず、偽陰性となった。従って、EU 公定法は再現性が充分でないと考えられる。日本においては ELISA および RPLA が検出法の主流であり、EU 公定法の前処理および検出原理も同様であることから、EU 公定法と共通の限界があると考えられる。そこで、試験検査の再現性と信頼性を高め、精確な検出下限値を担保するために、検出原理の異なる新たな SEA 定量法が求められていた。

上述の限界を打開するために、質量分析計(MS)による SEA 検出法が代替手段

として開発されてきた(Brun *et al.*, 2007); (Dupuis *et al.*, 2008)。MS を用いたタンパク質の網羅的分析をおこなうプロテオミクス分野においては、相対定量法が発展した後により厳密な定量的な方法が用いられるようになった。このような経緯から後者の定量には「絶対定量」という用語がプロテオミクス分野では使われる。この「絶対定量」は、分析化学分野においては「定量」に相当する。本論文では、MS による SEA の定量とはプロテオミクス分野における相対定量のことではなく絶対定量のことを指すものとする。(Brun *et al.*, 2007)および (Dupuis *et al.*, 2008)の研究で開発された方法では、*in vitro* で合成した安定同位体標識を全長に施した SEA を用いた定量法(protein standard absolute quantification, PSAQ 法)に従って、検出・定量する。PSAQ 法では、試料毎に変化する抽出効率とトリプシン消化効率を補正した定量値の算出が可能である。しかし、SEA のような毒性があるタンパク質の分析では、安定同位体標識したタンパク質も毒物とみなされ、測定に用いる場合であっても厳密な管理が必要とされることから、食品安全管理の実務上で利用することが著しく困難である。さらに、全長を安定同位体標識したタンパク質の合成には、数百万円の費用が必要となる。こうした中、同位体標識を一部に施した(stable isotope-labelled internal standard, SIIS)ペプチドを LC-MS/MS 測定するタンパク質の定量法(absolute quantification, AQUA 法)が注目されてきた。AQUA 法では、タンパク質をトリプシン消化し特徴的なアミノ

酸配列を持つペプチドを測定するため、対象とするタンパク質は破壊されている。つまり、AQUA 法を用いれば毒素である SEA を壊して、安全に検出することができる。さらに、LC-MS/MS 測定の SRM モードと AQUA 法を組み合わせることで、タンパク質の検出と定量ができると考えられている(Marx, 2013)。これらの技術(AQUA 法および SRM モード) を牛乳中の SEA 分析に適用した報告がある (Muratovic *et al.*, 2015); (Andjelkovic *et al.*, 2016)。これらの方法では、算出される定量値は大きくばらつき、再現性の相対標準偏差(relative standard deviation of repeatability, RSDr)の値は 9~30%となっている。定量値の大きなばらつきは試料ごとの検出下限値を曖昧とし、検査結果の信頼性を削ぐ要因となる。前述の 2 論文では、透析や限外濾過等を用いた操作を行い、試料を濃縮している。こうした濃縮方法は試料由来の夾雑成分による干渉を受けやすく、試験溶液を一定に保つことができない。これらの要因を改良し、ばらつきを抑えた高精度かつ再現性の高い SEA 定量法の開発が喫緊の課題となっている。

1-4. CRL と SEA 分析における測定条件の共通化と性能評価の重要性

CRL と SEA は乳を汚染・残留する可能性がある主要な細菌性毒素であり共存することがある。CRL と SEA は熱と酸に耐性があるため(Agata *et al.*, 1995); (Asao *et al.*, 2003)、セレウス菌や黄色ブドウ球菌を生菌として分離できない場合、嘔吐

や腹痛といった臨床症状では鑑別できない。従って、ある特定の乳試料について衛生管理上の分析をする際には CRL と SEA を鑑別しながら両者共に定量することが望ましい。しかしながら、これまでのところ、CRL と SEA の分析法は LC-MS/MS を用いた個別の試験法であり、特性の異なる 2 つの細菌性毒素は同一の測定条件で分析されていない。LC 条件や MS の温度を一定に保つことで、複数のサンプル中の CRL および SEA を連続して測定し、データ採取における時間を短縮できる。実務的には、LC の移動相交換と MS の温度変更時間を省き、労力を削減した効率的な測定が期待できる。そこで、本研究では、LC-MS/MS の測定条件を共通化することを目的とした。さらに、開発した CRL や SEA の定量法の再現性に関して、それぞれの分析性能を評価し保証する必要がある。公定法を用いても再現性のある結果を得ることは難しい現状では、従来の方法や他機関と比較する以前に、開発した定量法を試験所内で性能保証することがまず第一に重要と考えて併行精度と室内精度を指標に評価することとした。

1-5. 本論文の目的

本研究は、LC-MS/MS を用いて 2 種の細菌性毒素(CRL と SEA)を同一の条件で連続して測定し再現性高く定量することを目的とする。本研究では、牛乳中の CRL(第 2 章)、SEA(第 3 章)への適した分析法開発を試み、その性能を評価した。

さらに、開発した分析法を牛乳および生乳に適用し、2種の細菌性毒素の残留実態を調査した(第4章)。総括では各章で得られた知見をまとめ、本研究の意義を結論付けた。

第2章 LC-MS/MS による CRL 定量法の確立

2-1. 緒言

第1章で述べたとおり、セレウス菌が産生する嘔吐毒である CRL の定量は食中毒発生時および牛乳中のモニタリング検査等に行われると考えた。しかしながら、従来の方法は定性能や簡便性、信頼性に課題があり、新たな定量法開発が重要である。本章では、LC-MS/MS による CRL の定量法を開発し、それについて詳述する。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 試料

分析条件の検討および妥当性評価には、東京都内に流通する市販の牛乳(国産)を用いた。

2-2-2. 標準品

標準品として、CRL 標準溶液(メタノール溶解、50 $\mu\text{g/mL}$, Fujifilm Wako Pure Chemical Corp., Osaka, Japan)を使用した。CRL の取扱いについては、手袋や個人用保護具の使用といった病原体等への標準予防策を徹底した。また、CRL に触れた器材や器具は漂白剤で処理し毒素を破壊した。

2-2-3. 試薬

超純水(抵抗値 $>18\text{ M}\Omega$)は Milli-Q water system(Merck, Billerica, USA)を用いて作製した。アセトニトリル(HPLC grade)、 1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液(LC/MS grade)、99%ギ酸(LC/MS grade)、塩酸(HCl, reagent grade)およびメタノール(HPLC grade)は Fujifilm Wako Pure Chemical Corp.のものを用了。

2-2-4. 標準原液および標準溶液

CRL の標準品($50\text{ }\mu\text{g/mL}$)をメタノールで希釈し、 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製し標準原液とした。標準原液は分析まで 4°C で保存し、1 年間安定であった。

メタノールを用いて標準原液を調整希釈し、最終濃度 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ の標準溶液を調製した。この標準溶液を添加回収試験および検量線作成に使用した。メタノールを用いて標準溶液を段階希釈し、検量線用標準溶液を調製し、最終濃度を 0.1, 0.25, 0.5, 2.5, 5.0 ng/g とした。

2-2-5. 前処理

前処理の概要を Figure 3 に示す。まず、牛乳 25.0 g を 50 mL の遠沈管に秤量した。試料の pH を 5 mol/L HCl で 3.5 ± 0.5 に調整した。試料を $3200\times g$ 、 4°C で 15 分間遠心分離し、上清を除去した。沈査に 20 mL のアセトニトリルを加えた後、混合物を激しくボルテックスし、 $12000\times g$ 、 4°C で 15 分間遠心分離した。上清を綿栓濾過し、新しい遠沈管に回収した。残りの沈査を 20 mL のアセトニト

リルに加え、前述の抽出を再度行った。上清を先の抽出液と合わせ、アセトニトリルで 50 mL に定容した。この抽出液のうち 100 μ L をメタノールで 10 倍に希釈した。希釈溶液を 1.5 mL マイクロチューブに移し、12000 \times g、4°C で 5 分間遠心分離した。得られた上清を試験溶液として、LC-MS/MS 測定に用いた。

2-2-6. イオン化効率への影響評価

夾雑成分によるイオン化効率への影響は、次のように算出した。まず、CRL を添加していないブランクの牛乳を Figure 3 に従って抽出した試験溶液に CRL が検量線の各濃度と等しくなるように加えた。この牛乳由来成分を含む標準溶液と牛乳由来成分を含まない標準溶液を LC-MS/MS を用いて測定し、以下の式から夾雑成分による影響率を求めた。

$$\text{夾雑成分による影響率} = (\text{Sm}/\text{Se} - 1) \times 100$$

Sm：牛乳由来成分を含む標準溶液から得られた検量線の傾き

Se：牛乳由来成分を含まない標準溶液から得られた検量線の傾き

国際的なガイドライン(SANTE/11813/2017., 2018)では、夾雑成分による影響率は $\pm 20\%$ 以内を許容範囲としており、この基準値と比較し、イオン化効率への影響を評価した。

2-2-7. 測定法

LC 条件：分離は AQUITY UPLC H-Class system (Waters Co., Milford, MA) 装置

を用いて実施した。分析カラムは YMC Triart C18 カラム(2.1 mm i.d. ×100 mm, 3 μm, YMC Co. Ltd, Kyoto, Japan)を接続した。移動相には、0.1%ギ酸含有 1 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液(A)および 0.1%ギ酸含有メタノール(B)を用いた。グラジェントは次の条件とした；まず 95:5 の A/B 混合溶液を 1 分間維持した。次に B 相の濃度を 14 分間で 45%まで上昇し、その後 0.1 分で 95%まで上昇させた。これを 10 分間維持した。最後に、移動相を初期状態に戻し、6 分間再平衡化を行った。カラム温度は 45°C、流速は 0.3 ml/min、注入量は 2 μL とした。

MS/MS 条件：MS 検出器は QTRAP 5500 (Sciex, MD, USA)を使用した。MS/MS のイオン化はエレクトロスプレーイオン化法(electrospray ionization, ESI)のポジティブで行い、設定したパラメータを Table 1 に示す。本論文で使用する MS 検出器(Sciex 社製)では、SRM モードを多重反応モニタリング(multiple reaction monitoring, MRM)モードというが、日本質量分析学会の用語集(日本質量分析学会 2020.)に基づき、SRM の統一表記とした。さらに、最適化した CRL の SRM トランジションを Table 2 に示す。また、プロダクトイオンスキャンを得るために、SRM-information dependent acquisition (SRM-IDA)モードを用いた。スキャンスピードは $m/z = 100$ から 550 までを 10000 Da/s に設定した。Q0 トラップはオン、LIT フィルタタイムは 100 ms に設定した。プロダクトイオンスペクトルの取得時には、10 eV 幅で 3 つの衝突エネルギー(73、83、93 eV)を用いた。SRM お

よび SRM-IDA モードは同一のサイクル内で行った。

2-2-8. 妥当性評価試験

開発した分析法の精確さ(Accuracy)は、厚生労働省が定めた「食品中の残留農薬分析法バリデーションガイドライン」([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2010)に準拠して評価した。Figure 4 に示す 4 つの性能パラメータ、選択性(selectivity)および真度(回収率、trueness)、精度(precision)、定量下限値(limit of quantification)を次の実験系から求め、ガイドラインの基準値と比較した。

CRL が検出されないことを本法で確認した牛乳 25.0 g に 250 μ L の標準溶液を添加し、ボルテックスで混和した後、Figure 3 に示す手順に従って試験溶液の調整を行った。2 種類の濃度(10 および 50 ng/g)を用いて、一日 3 試行を 5 日間行った。これら 15 の試行について、同一日の 3 試行を 1 群とする 5 群から成る構造として一元配置分散分析を実施した。真度，併行精度，室内精度については、厚生労働省のガイドラインの定義に基づいて([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2010)、以下の式で算出した。

$$\text{真度}(\%) = (\text{試験結果}(n=15) \text{ から得た総平均}) / (\text{添加濃度}) \times 100$$

$$\text{併行精度(RSD, \%)} = \sigma_r / (\text{試験結果}(n=15) \text{ から得た総平均}) \times 100$$

$$\text{室内精度(RSD, \%)} = \sqrt{\sigma_r^2 + \sigma_d^2} / (\text{試験結果}(n=15) \text{ から得た総平均}) \times 100$$

σ_r : 得られた定量値(n=15)の併行標準偏差

σ_d : 各日における試験結果(n=3)の平均を 1 つの値とみなし、

5 日間の標準偏差

求めた真度および併行精度、室内精度を Figure 4 に示す厚生労働省のガイドライン([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2010)の基準値に照らし、それぞれが適合しているかを判断した。

選択性は次に示す 5 つの異なる牛乳を分析することにより決定した。同メーカーのロットが異なる成分無調整牛乳 2 検体、メーカーが異なる成分無調整牛乳 3 検体を用いた。定量下限(limit of quantification)は、最終濃度が 0.1、0.2、0.5、1、2、5 ng/g になるように試料に CRL を添加し、S/N 比が 10 を超える最小の濃度とした。

2-3. 結果および考察

2-3-1. 測定条件の確立

CRL はアンモニウムイオンに高い親和性を持つことが知られている (Delbrassinne *et al.*, 2012)。MS/MS パラメータを最適化した結果、CRL のアンモニウムイオン付加体 $[M+NH_4]^+$ である m/z 1170.7 に最も強いイオン強度を認めた。このアダクトイオンを CRL のプリカーサーイオンに設定した。さらにプロダクトイオンを選定するため、MS/MS スキャンを実施した。 (Bauer *et al.*, 2010)

の結果と一致する CRL に特徴的な 6 つのプロダクトイオンを観測した(Table 2)。最もイオン強度が強い m/z 1170.7→1125.7 を定量イオンに、他 5 つのプロダクトイオン (m/z 1170.7→172.2, 314.2, 357.2, 385.2 and 499.4) を定性イオンとした。国際的なガイドライン(Codex Alimentarius., 2014); (SANTE/11813/2017., 2018)では、LC-MS/MS で物質を同定するためには、プリカーサー1 個とプロダクトイオン 2 個が必要としている。本研究では、この基準を満たしており、CRL を確実に同定することが可能である。Figure 5 は(A)CRL 標準溶液(0.5 ng/g)と(B)CRL 10 ng/g を添加した試料から得られた LC-MS/MS クロマトグラムである。CRL の高い特異性と良好な感度が得られており、両者の保持時間にずれはなかった。

CRL の同定性能を高めるため、SRM-IDA モードによるプロダクトイオンのスキャン(m/z 1170.7→100-550) を取得した。 m/z 1170.7 に着目したプロダクトイオンスペクトルを Figure 6 に示す。衝突エネルギーを最適化し、 m/z 100-550 とした結果、定性に用いる 5 つのプロダクトイオン(m/z 1170.7→172.2, 314.2, 357.2, 385.2 and 499.4)の感度を高めた。Figure 6A は(Bauer *et al.*, 2010)と一致して得られた 5 つのプロダクトイオンの構造を示す。標準品(Figure 6B)とスパイクサンプル(Figure. 6C)のターゲット MS/MS スペクトルをライブラリ検索機能のアルゴリズムを利用し比較したところ、毒素の同定は 98.7%の一致率であった。分析の日常検査では、一致率 70%以上が同定のカットオフ値として定めてられている

((Lynch *et al.*, 2010); (Xing *et al.*, 2016)。プロダクトイオンスキャンによる高い一致率は牛乳中の CRL を確実に同定できることを示した。さらに、これらの結果は、牛乳中の夾雑成分が CRL のフラグメンテーションパターンに大きな影響を与えないことを明らかにした。

2-3-2. 前処理

乳中の細菌性毒素を抽出する手段として、(Hennekinne *et al.*, 2007)は pH 調製によるタンパク質沈殿を報告している。この報告では、牛乳に酸を加え遠心分離することで、カゼイン等の主要なタンパク質と水分を分離し、対象とする毒素を濃縮している。そこで、この方法を改良し、牛乳中から CRL を高率に抽出する前処理法の開発を進めた。

前処理の第一段階である酸性化によるタンパク質沈殿後の CRL の挙動を確認した。その結果、疎水性の CRL は牛乳中の主要なタンパク質とともに沈殿していた。沈査から CRL を抽出するために、有機溶媒であるアセトニトリルとメタノールを比較し、最適な抽出溶媒を決定した。Figure 7 に示すように、アセトニトリル 20 mL を用いた場合、メタノールと比較して CRL の回収率が向上した。アセトニトリルを用いた回収率をさらに向上させるために、溶媒の量と抽出回数を検討した。40 mL のアセトニトリルは抽出効率に明確な影響を与えなかったが、20 mL 抽出を 2 回行うことで回収率は 100%近くまで上昇し、RSD を 2%

と低減できた。よって、アセトニトリルを用いた抽出 2 回を採用した。

一方、牛乳以外の食品(お米やその他の加工品)から CRL を抽出する際には、メタノールを抽出液に用いている(Bauer *et al.*, 2010); (Decleer *et al.*, 2016)。こうした抽出では、食品に由来する様々な物質(脂質や色素等)が CRL の正確な LC-MS/MS 測定を妨害する。この妨害を低減するために、アセトニトリルによる固相精製や遠心分離によるろ過、*n*-ヘキサンを用いた脱脂を利用した精製工程が必要であった。本研究では、タンパク質酸沈殿とアセトニトリルによる抽出を組み合わせることで、牛乳に由来する夾雑成分を除去した。さらに、より夾雑成分を低減し多検体の連続測定するために、メタノールを用いた希釈工程(希釈率 10 倍)を検討した。ブランク牛乳の夾雑成分量を比較したトータルイオンスキャン(total ion scan, TIC)の結果を Figure 8 示す。抽出液をメタノールで 10 倍に希釈することで、夾雑成分を除去し、メタノール溶媒と同程度のイオン強度を得ることができた。一連の前処理によるイオン化効率の影響(抑制または増強)を評価するために、夾雑成分による影響率を求めた。牛乳の夾雑成分による影響率は-3.6%であり、(SANTE/11813/2017., 2018)に認められている許容範囲である $\pm 20\%$ 以内であった。これらのことは、本分析法では、CRL の定量への影響が小さいことを示した。つまり、精製工程を省略し、牛乳中の CRL 定量に適応できることが示された。

CRL の検量線用標準溶液の 5 濃度(0.1, 0.25, 0.5, 2.5, 5.0 ng/g)に対し、ピーク面積値とそれぞれプロットし、検量線を作製した(Figure 9)。検量線は直線性を示し、相関係数は 0.998 であった。また、夾雑成分による影響率は-3.6%であり、牛乳に由来する夾雑成分存在下でも、検量線の傾きは変化しなかった。これらのことは、本分析法下では、CRL の定量に対して、夾雑成分の影響が少ないことを示した。従って、標準溶液による検量線(外部標準検量線)を CRL の定量に適用できることが示された。

2-3-3. 妥当性評価試験

日本では、食品や医薬品の安全性評価の信頼性を確保するため、国あるいは都道府県や政令指定都市設置の衛生研究所、又はその他の登録検査機関は設備や機器、組織、試験の手順等に関する適正管理運営基準(Good laboratory practice, GLP)に基づいた動物用医薬品や農薬等の検査を実施することが定められている([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2004)。取得した分析データが、国際的に活用されるためには、科学的かつ客観的に信頼できる GLP に則って取得したデータであることを証明する必要がある。このためには、「妥当性確認された分析法」を用いることが必須条件である(SANTE/11813/2017., 2018); ([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2010)。本研究では、厚生労働省のガイドライン([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare,

Tokyo, Japan., 2010)に準拠して妥当性評価を行った。

2-3-3-1. 選択性

牛乳に CRL 10 ng/g を添加していないときの典型的な LC-MS/MS クロマトグラムを Figure 10A に示す。CRL と同じ保持時間において、夾雑ピークや可視できるシグナル(S/N 比>3)は検出されなかった。つまり、本分析条件では牛乳に由来する夾雑成分は CRL の定性および定量に影響しないことが示され、その選択性はガイドライン([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2010)の基準に適合した。

2-3-3-2. 真度(回収率)および精度

本分析法を用いたときの CRL の真度および精度を算出した結果を Table 3 に示す。真度 90.5%から 94.0%、併行精度 4.7%以下、室内精度 5.6%以下であり、いずれのパラメータも Figure 4 に示す厚生労働省ガイドライン([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2010)の基準(真度 70~120%、併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)に適合した。

2-3-3-3. 定量下限値

本分析法で得られた CRL のピーク前後のベースラインに対して、S/N 比が 10 を超えた濃度(定量下限値)を求めた。その結果、定量下限値は 2 ng/g であった。定量下限値での添加回収試験(n=5)を行った結果、回収率および併行精度はそれ

ぞれ 83.9%、6.6%であった。Figure 10 に定量下限値の標準溶液(B)および添加した牛乳(C)の LC-MS/MS クロマトグラムを示す。これらの結果から、本分析法は牛乳中の CRL を定量下限値まで精確に定量できることが実証された。

牛乳の摂取量と CRL の最小発症量(1 μ g)を基に、本分析法の定量下限値を考察する。日本における牛乳の摂取量は一人当たり約 200 mL と推定されている(独立行政法人 農畜産業振興機構, 2015)。つまり、CRL 5 ng/g に汚染された牛乳を約 200 g 摂取すると発症することが想定される。すなわち、本分析法は症状を引き起こす牛乳中の CRL を十分に検出できる性能を有していることが示された。なお、本研究の応用性が既に実証されている。(Shimajima *et al.*, 2020)は、日本の牛乳から CRL を産生するセレウス菌を分離し、本研究の方法で LC-MS/MS 法で CRL を定量した。セレウス菌が産生した CRL のプロダクトイオンスペクトルは標準品のそれと一致し、牛乳中 CRL を 3~80 ng/g と定量した。牛乳の摂取量 200 mL とした際、CRL の最小発症量を超える濃度を本法は検知可能であり、健康被害を起こしうる CRL の検出および定量に応用可能であることが示された。

2-4. まとめ

本章では、LC-MS/MS を用いた測定による牛乳中に残留する CRL の分析法について検討した。

本分析法の特徴は次の 4 点である。

- ① 牛乳に由来する夾雑成分の干渉を抑えたことで、CRL に特異的なプロダクトイオンスペクトルを取得した。標準溶液から得られるスペクトルと比較することで、一致率 70%以上の基準を満たし、CRL を確実に同定することが可能となった。
- ② 牛乳中の CRL をタンパク質酸沈殿法で濃縮し、アセトニトリルを用いて抽出した。この組み合わせによって、牛乳由来の複雑な夾雑成分を大幅に除去した。その結果、煩雑な精製の工程を省略した。
- ③ 牛乳の夾雑成分によるイオン化効率への影響は-4%であり、許容範囲($\pm 20\%$ 以内)であるため、内部標準物質を用いる検量線法よりも簡便な外部標準検量線を採用し、精確な定量値を得ることが可能となった。
- ④ 厚生労働省が通知されている「残留農薬等試験法の妥当性評価ガイドライン(改訂)」 ([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2010)に則って、本分析法に対して妥当性を評価した。評価項目である「選択性、真度および精度、定量下限値」は設定された基準に適合したので、本分析法を実際の試験検査に適応可能となった。

本章では、牛乳から抽出した試験溶液を LC-MS/MS 測定に用いることができる定量法を構築した。緒論 1-2 で述べた”日常的に牛乳中の CRL を監視し、かつ食中毒事件への対応可能な検査体制を構築するためには、ランニングコストは

抑えつつ LC-MS/MS が持つ検出精度を維持した定量法、つまりスクリーニング法が求められている”という課題について、以下の観点から、達成できたと考えられる。実用上重要となる費用に関しては、既報の類法 (Bauer *et al.*, 2010); (Yamaguchi *et al.*, 2013); (Zuberovic Muratovic *et al.*, 2014); (in 't Veld *et al.*, 2019)が安定同位体標識または固相カラムを要するところ本法ではこれらを要せず凡そ 1/3 の費用と抑えた。加えて、既報の類法では、煩雑であった前処理や内部標準物質による検量線作成を簡略化し、簡便とした。一般的に、煩雑さや工程の多さはばらつきの原因となり、ばらつきが蓄積することで、試験系全体の再現性が低くなる。開発した前処理法の簡便さは本法の再現性を高める一因となっていると判断した。本章で開発した分析法の性能は国際的に求められる水準([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2010); (Codex Alimentarius., 2014); (SANTE/11813/2017., 2018)に照らして上述のように適合している。これらの性能評価は行政検査に求められる GLP に適合しており、実際に本分析法は東京都健康安全研究センターでの食品衛生検査業務に採用されている(2023 年 8 月時点)。今後、本法は実用的なスクリーニング法として使用可能である。さらに、安定同位体標識標品を用いることで、必要に応じて真度の検証を実施するという運用が考えられる。

第3章 LC-MS/MS による SEA 定量法の確立と適応拡大

3-1. 緒言

第1章で述べたとおり、黄色ブドウ球菌が産生する代表的な細菌性毒素である SEA の定量は食中毒発生時および牛乳のモニタリング検査等に行われると考えた。しかし、従来の方法は定性能と信頼性に課題があり、新たな定量法開発が重要である。さらに、鑑別すべき CRL の定量法における LC 条件や MS の温度を共通化することで、複数のサンプル中の CRL および SEA を連続測定することは有用である。本章では、LC-MS/MS による SEA の定量法を開発し、それについて詳述する。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 試料

2-2-1 と同様に、分析条件の検討および妥当性評価には、東京都内に流通する市販の牛乳(国産)を用いた。

3-2-2. 標準品

SEA の標準品として、Sigma-Aldrich Inc. (Saint Louis, MO, USA)のものを使用した。SEA の取扱いについては、手袋や個人用保護具の使用といった病原体等への標準予防策を徹底した。また、SEA に触れた器材や器具は漂白剤で処理

し毒素を破壊した。

SIIS ペプチド(アミノ酸配列 SELQGTALGNL**K**)は Sigma-Aldrich Inc.の特注品を用いた。C 末端のリジン(**K**)を安定同位体標識したため、質量差は 8 Da である。トリプシン(proteomics grade)は Promega Biotech (Stockholm, Sweden)のものを用いた。

3-2-3. 試薬および器具

超純水、アセトニトリル、ギ酸アンモニウム溶液、ギ酸、塩酸、メタノールは 2-2-3 と同様のものを用いた。

酢酸(99.5%, LC/MS grade)、炭酸水素アンモニウム(proteomics grade)、ジチオスレイトール(DDT, reagent grade)、エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム(EDTA-2Na, reagent grade)、エタノール(SAJ grade)、塩酸グアニジン (生化学 grade)、ヨードアセトアミド(IAA, proteomics grade)、水酸化ナトリウム(NaOH, reagent grade)、100% (w/v)トリクロロ酢酸溶液(TCA, 生化学 grade)および 99%トリフルオロ酢酸溶液(TFA, HPLC grade)は、Fujifilm Wako Pure Chemical Corp.のものを用いた。

DC protein assay キットは Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)のものを用いた。また、GL-Tip SDB チップは GL sciences Inc. (Tokyo, Japan)のものを用いた。0.1% (v/v) TFA 溶液は、100 μ L の TFA を 100 mL の水に混和し調製した。100

mmol/L 炭酸水素アンモニウム溶液(pH 8)は、炭酸水素アンモニウム 0.79 g を水 100 mL に溶解させ、調製した。0.1%ギ酸は、100 μ L のギ酸を 100 mL の水に混和し調製した。20% (v/v) TCA 溶液は、20 mL の TCA を 80 mL の水に混和し調製した。0.1%ギ酸含有アセトニトリルは、100 μ L のギ酸を 100 mL のアセトニトリルに混和し調製した。

3-2-4. 標準原液および標準溶液

SEA の標準品(乾燥粉末 100 μ g)を、(Bao *et al.*, 2012)に従って、2 mL の 0.1% (v/v) TFA 溶液に溶解し、50 μ g/mL の濃度に調製し標準原液とした。標準原液は分析まで-80°Cで保存し、1 年間安定であった。

添加用に SEA 標準溶液を、100 mmol/L 炭酸水素アンモニウム溶液(pH 8)を用いて標準原液を希釈し、最終濃度 6.25 μ g/mL に調製した。SEA 標準溶液は-20°C で 1 週間保存した。

この標準溶液を添加回収試験および検量線作成に使用した。0.1%ギ酸を用いて標準溶液を段階希釈し、検量線用標準溶液を調製し、最終濃度を 100, 250, 500, 1000, 2500 ng/g とした。

SIIS ペプチド(乾燥粉末 1 nmol)を 1 mL の水に溶解し、1 nmol/mL (1.24 μ g/mL) としたものを用いた。

3-2-5. SEA に由来するペプチドの選択方法

国際的なタンパク質データベースである UniProt Knowledgebase (UniProt, 2019) から、SEA のアミノ酸配列を取得した。Skyline ソフトウェア (MacLean *et al.*, 2010)を用いて、アミノ酸配列をトリプシン消化し、SEA に由来するペプチドのリストを作成した。そして、SEA に由来するペプチドを以下の手順で選定した (Kamiie *et al.*, 2008); (Lange *et al.*, 2008); (Steen and Mann, 2004) ; (i) MS による測定ができる 8 から 20 個のアミノ酸配列であること、(ii) 翻訳後修飾や一塩基多型がなく、アルギニン (R) または K の連続配列がない、(iii) トリプトファン (W)、メチオニン (M)、システイン (C)、ヒスチジン (H) 残基を持つペプチドを除く、(iv) 6 個以上のアミノ酸配列を BlastP 解析した。

3-2-6. 前処理

SEA の前処理の概要を Figure 11 に示す。まず、牛乳 25.0 g を 50 mL の遠沈管に秤量した。試料の pH を 5 mol/L HCl で 3.5 ± 0.5 に調整した。試料を $3200 \times g$ 、 4°C で 15 分間遠心分離し、上清を新しい遠沈管に取り分け、pH を 5 mol/L NaOH で 7.5 ± 0.1 に調整した。試料を $3200 \times g$ 、 4°C で 15 分間遠心分離し、上清を新しい遠沈管に取り分けた。試料に等量の 20% TCA 溶液を加え、 4°C で 30 分間静置した。試料を $12000 \times g$ 、 4°C で 5 分間遠心分離し、上清を廃棄した。沈査に 5 mL のエタノールを加え、タッピングし、 $12000 \times g$ 、 4°C で 5 分間遠心分離した。上清

を廃棄し、得られた沈査に 5 mL の混合溶液(pH 8.5 の 100 mmol/L トリス塩酸、7 mol/L グアニジン塩酸および 10 mmol/L EDTA)を加え、タンパク質抽出溶液とした。

200 μ L のタンパク質抽出溶液を 1.5 mL エッペンドルフチューブに取り、(Mawuenyega *et al.*, 2003)に従って、タンパク質の還元・アルキル化を行った。変性させたタンパク質を 100 μ L の 1.2 mol/L 尿素含有 0.1 mol/L トリス塩酸(pH 8)に再溶解させ、トリプシンを加えた。この時、トリプシン量：総タンパク質量の比を 1 : 100 となるように調製し、37°Cで一晩(16~18 時間)振とうした。試料に 2 μ L のギ酸を加え、トリプシン消化を停止し、これをペプチド溶液とした。

0.1%ギ酸含有アセトニトリル 100 μ L、次に 0.1%ギ酸 100 μ L を用いてコンデューショニングしておいた GL-Tip SDB にペプチド溶液を全量負荷した。続いて、0.1%ギ酸を用いて洗浄し、減圧下(10 mmHg)で 3 分間吸引乾燥した。保持させたペプチドは 0.1%ギ酸含有アセトニトリル 100 μ L を用いて溶出させ、1.5 mL エッペンドルフチューブに回収した。

この溶出液を乾固した後、残渣を 0.1%ギ酸 100 μ L に溶解し、試験溶液とした。溶出液を HPLC バイアルに入れ、これに SIIS ペプチドを最終濃度 6 ng/g となるように加えたものを試験溶液とした。このように調製した試験溶液を LC-MS/MS 測定に用いた。

3-2-7. 測定法

LC-MS/MS 条件は、2-2-7 と同様に実施した。最適化した SEA に由来する 3 つのペプチドおよび SIIS ペプチドのアミノ酸配列と SRM トランジションを Table 4 に示す。

3-2-8. 妥当性評価試験

SEA が検出されないことを本法で確認した牛乳 25.0 g に 250 μ L の標準溶液を添加し、ボルテックスで混和した後、Figure 11 に示す手順に従って試験溶液の調整を行った。2 種類の濃度(50 および 100 ng/g)を用いて、一日 3 試行を 5 日間行った。得られた結果を一元配置分散分析し、各性能パラメータを求め、ガイドラインの基準 ([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2010)と比較した。定量下限値は、最終濃度が 2、5、10、25 ng/g になるように試料に SEA を添加し、S/N 比が 10 を超える最小の濃度とした。

3-3. 結果および考察

3-3-1. ペプチドの選択と測定条件の確立

1 つのタンパク質をトリプシン消化すると、数十から数百のペプチドが生成される(Picotti *et al.*, 2008)。多様なペプチドを高感度かつ特異的に LC-MS/MS 測定する際には、ターゲットとするペプチドの選択が重要となる(Marx, 2013)。

UniProt Knowledgebase 検索の結果、一般的な SEA である ETXA_STAAU (Accession No. P020L2)を選択した。257 個のアミノ酸からなる配列を Figure 12A に示す。

この配列を基に、ペプチドを選択し、SEA に由来する 3 つのペプチドを選択した。選択したペプチドを Figure 12A の太字で表し、全体の配列におけるペプチドの位置を Figure 12A に示す。SEA に由来する 3 つのペプチドの合計アミノ酸数は 34 個であり、全体の 257 個のうち 13%をカバーしている。LC-MS/MS を使用して未知タンパク質を同定するための基準として、World Anti-Doping Agency Laboratory Committee (World Anti-Doping Agency Laboratory Committee., 2010)はアミノ酸のカバー率 10%以上を設けている。本研究で設定した SEA に由来する 3 つのペプチドはこの基準を十分に満たしており、国際水準に一致して SEA を同定可能となっている。

さらに、LC-MS/MS 測定における各パラメータを最適化した結果を Table 4 に示す。Figure 12B に代表的なペプチドとそのプロダクトイオンの構造を示す。1 つのペプチドに対して、構造の明確な 4 つのトランジションを設定することで、ペプチドを確実に検出することが可能である。ペプチドの保持時間やピーク形状、イオン比を比較し、SEA を定量するためのペプチドを SELQG TALGNLK に決定し、さらなる検討を進めた。

SEA と CRL を同一の測定条件で分析するため、第 2 章に示した LC-MS/MS 条件を SEA に由来する 3 つのペプチドに応用できるかを検証した。これまでの報告(Muratovic *et al.*, 2015); (Andjelkovic *et al.*, 2016))では、SEA に由来するペプチドを 0.1%ギ酸水と 0.1%ギ酸含有アセトニトリルのグラジエントにて分離してきた。この水性移動相に 1 mmol/L のギ酸アンモニウムを添加したところ、SEA に由来する 3 つのペプチドの分離に干渉はみられなかった。そこでさらに、有機溶媒の移動相として、0.1%ギ酸含有アセトニトリルと 0.1%ギ酸含有メタノールを比較した。0.1%ギ酸含有メタノールを用いたところ、ピーク高さ・面積の増加を認めた。Figure 13 に SEA 標準溶液(A)と SEA 添加試料(B)の代表的なクロマトグラムを示す。保持時間の一致と良好なピーク形状が得られ、良好な分離を行うことができた。そこで、HPLC の移動相として、0.1%ギ酸含有 1 mmol/L ギ酸アンモニウム水と 0.1%ギ酸メタノールを採用した。したがって、第 2 章にて CRL に用いた LC 条件を用いて、SEA に由来する 3 つのペプチドを測定可能となった。

3-3-2. 前処理

SEA の前処理には、pH 調整と透析が用いられてきた(Hennekinne *et al.*, 2007; Andjelkovic *et al.*, 2016)。これらの前処理方法で用いられる透析は一晩あるいは丸 2 日間の作業時間を要する。(Muratovic *et al.*, 2015)は、透析を限外濾過に変更

し時間短縮を図った。しかし、限外濾過膜にタンパク質が吸着しやすいことに起因して、処理後のサンプル量が大きくばらつくという問題があった。そこで、本研究では、タンパク質を選択的に集める TCA 沈殿法を採用した。その結果として、pH 調整後の上澄液から SEA を採集することができた。また、タンパク質を沈殿・再溶解することで、水に溶解しやすい微小な脂質(マイクロミセル)や色素といった夾雑成分を除去することができた。さらに、再溶解する液量を 5 mL と定めることで、従来の方法よりも正確な前処理が可能となった。

本法の検出対象は、SEA をトリプシン消化して生じたペプチドである。従って、トリプシンによる消化効率が SEA 検出感度を左右する。一般的に、酵素と基質の量比である酵素基質比が酵素反応速度を決定づけることが知られており (Stryer, 1988)、トリプシン消化効率においても同様である (Northrop, 1922)。加えて、牛乳中にトリプシン消化効率に干渉する夾雑成分が含まれていた場合には、検出対象としたペプチドの産生量が低下すると考えられた。以上のことを踏まえ、酵素基質比 1:25, 1:50, 1:100 (w/w) の 3 条件についてトリプシン消化効率を検証することとした。SEA 100 ng/g を添加した牛乳を用いて、各酵素基質比において、n=3 でトリプシン消化を施し、LC-MS/MS 測定した。定量に用いるペプチドと SIIS ペプチドのピーク面積比および併行精度を Table 5 に示す。各比率において、ピーク面積比において、 $\pm 20\%$ 以上の差はなかった。また、バックグラウン

ドノイズの顕著な増加はみられなかった。つまり、牛乳中のタンパク質や夾雑成分による阻害や干渉作用は認められず、トリプシン消化効率は安定していたと判断した。検討した3条件の中で、ピーク面積比の併行精度が最小の4%であった酵素基質比 1:100 を採用し、さらなる検討を進めた。

ペプチド溶液を3回連続して LC-MS/MS 測定した際に、SEA に由来する3つのペプチドの各保持時間が安定せず、(SANTE/11813/2017., 2018)の基準値である保持時間 ± 0.1 分以内を超え、変動した。この原因として、緩衝液に含まれる様々な塩類や比較的短いペプチドが LC カラムの分離を妨害していると推察した。このような妨害を回避するために、GL-Tip SDB を用いた脱塩処理の効果を検討した。Figure 14 に牛乳の TIC (m/z 55~650)を示す。脱塩処理を施さないペプチド溶液(A)および脱塩処理を施した試験溶液(B)のクロマトグラムを比較すると、脱塩処理をすることでベースライン上の断続的なスパイクが除去された。TIC 上の変化はバックグラウンドイオンの減少、すなわち測定を妨害する夾雑成分の減少を表している。さらに、試験溶液を LC-MS/MS 測定すると、SEA に由来する3つのペプチドにみられた保持時間の変動はなくなり、安定した測定が可能となった。

SEA に由来するペプチド(SELQGTALGNLK)と同じ物理化学的な挙動を示す SIIS ペプチドの回収率を用いて、脱塩処理工程による損失を評価した。SIIS ペ

プチドを添加したブランク溶液(6 ng/g, n=3)の回収率および併行精度は、92.6% および 0.9% であった。以上の結果から、再現性のある測定を可能にする脱塩処理を実施することとした。

SIIS ペプチドを内部標準物質として、SEA に由来するペプチド (SELQGTALGNLK)の検量線を作成した(Figure 15)。SEA に由来するペプチドと SIIS ペプチドの濃度比を x 軸とし、ピーク面積比を y 軸として、プロットした結果、検量線は直線性を示し、相関係数は 0.995 であった。各標準点において、イオン比は Table 4 に示す値の $\pm 20\%$ 以内であった。これらのことから、検量線の範囲において、SEA を精確に定量可能であることが示された。

3-3-3. 妥当性評価試験

2-2-3 と同じく市販の牛乳について、本分析法の妥当性評価を行った。

3-3-3-1. 選択性

SEA の標準品および SEA 10 ng/g を添加した牛乳、ブランクサンプルの典型的な LC-MS/MS クロマトグラムを Figure 16 に示す。SEA と同じ保持時間において、夾雑ピークや可視できるシグナル(S/N 比 >3)は検出されなかった。つまり、本分析条件では牛乳に由来する夾雑成分は SEA の定性および定量に影響しないことが示され、その選択性はガイドラインの基準([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2010)に適合した。

3-3-3-2. 真度(回収率)および精度

本分析法を用いたときの SEA の真度および精度を算出した結果を Table 6 に示す。真度 79.6%から 82.4%、併行精度 14.1%以下、室内精度 18.4%以下であり、いずれのパラメータも Figure 4 に示す厚生労働省ガイドラインの基準 ([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2010)に適合した。

3-3-3-3. 定量下限値

本分析法で得られた SEA のピーク前後のベースラインに対して、S/N 比が 10 を超えた濃度(定量下限値)を求めた。その結果、定量下限値は 10 ng/g であった。定量下限値での添加回収試験(n=5)を行った結果、回収率および併行精度はそれぞれ 78.8%、9.1%であった。緒論 1-3 で述べたように、SEA の毒性評価や牛乳の安全性確保のためには食中毒事例で報告された濃度まで SEA を定量できることが分析法に求められる。このことに関して、既報の SEA 最小発症濃度は 0.1-1.6 ng/g である(Asao *et al.*, 2003)。本法の定量下限値はこれを上回ることから、さらなる感度向上が必要である。一方で、類報に比較した場合には、定量下限値に関して進展があった。汎用されている SEA 検出法は抗原抗体反応を用いる ELISA や RPLA といった定性法または半定量法である (Park and Szabo, 1986); (Jørgensen *et al.*, 2005); (Nouri *et al.*, 2018)。これらの定性/半定量法に基づく SEA の毒性作用量は本研究の方法のような定量法とは真度と精度の観点から質的には異なるも

のである。定性法または半定量法を測定原理とする過去の SEA の毒性作用量として、20～100 ng (Asao *et al.*, 2003)や 1 µg (Food and Drug Administration, 2012)、50 µg (Gilquin *et al.*, 2017)としているとの報告があり、これらと日本における牛乳の1回あたりの摂取量 200 mL(農畜産業振興機構 2015)を踏まえ、SEA の発症濃度を再計算すると、0.1～250 ng/g と広い濃度範囲となる。一方で、(Nia *et al.*, 2016)は ELISA 法では牛乳中の SEA 10 ng/g を正確に検出できないと報告しており、これまでに報告されてきた SEA の発症濃度は定まっているとは言えない。今後、定量法である本法と従来の方法を組合せ、食中毒事例の SEA 残留濃度を求めることで、精確な発症濃度が明らかとなることが期待される。

3-4. まとめ

本章では、LC-MS/MS を用いた測定による牛乳中に残留する SEA の分析法について検討した。

本分析法の特徴は次の 5 点である。

- ① 本法は、特異的な SRM トランジションによって、SEA に由来する 3 つのペプチド断片を確実に検出する。その結果、タンパク質全体のアミノ酸配列を 10% 以上カバーすることで、国際的な基準(World Anti-Doping Agency Laboratory Committee., 2010)を満たし、牛乳中の SEA を同定可能である。

- ② CRL 測定時と同じ LC 条件によって、SEA に由来するペプチドを分離し、MS/MS に導入できることを突き止めた。これにより、鑑別すべき細菌性毒素を同一の LC-MS/MS 条件で分析可能となった。
- ③ 牛乳中の SEA を pH 調整と TCA 沈殿法の 2 段階のプロセスで抽出・精製した。pH 調整では、牛乳中の主たるタンパク質であるカゼインを除去した。TCA 沈殿法では、サンプル量を整えることでばらつきを抑え、SEA を選択的に収集した。
- ④ トリプシン消化効率を最大化することで、測定対象の SEA に由来するペプチドを最大限に得た。さらに、脱塩工程を取り入れ、SEA 消化ペプチドの再現性のある分離を実現した。トリプシン消化に付随する工程を最適化し、正確な定量につながる安定したパフォーマンスを確保した。
- ⑤ 厚生労働省から通知されている「残留農薬等試験法の妥当性評価ガイドライン(改訂)」([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2010) に則って、本分析法に対して妥当性を評価した。評価項目である「選択性、真度および精度、定量下限値」は設定された基準に適合したので、本分析法を実際の試験検査に適応可能となった。

本章では、牛乳から抽出した試験溶液を LC-MS/MS 測定に用いることができる定量法を構築した。一連の性能評価は行政検査に求められる GLP に適合して

おり、2-4 と同様に本分析法は東京都健康安全研究センターでの食品衛生検査業務に採用されている(2023 年 8 月時点)。高精度かつ再現性の高い SEA 定量法が存在しないという問題(緒論 1-3)を、本研究で解決することができたことについて、その要因を考察した。本法は pH 調整後の上澄液から SEA を採集かつ濃縮するために、TCA 沈殿法を採用した。選択的に集めたタンパク質を再溶解し定容することで、試験溶液量を安定させ、前処理工程における再現性を高めた。前述の 2 報(Muratovic *et al.*, 2015); (Andjelkovic *et al.*, 2016)は ELISA 等の免疫学的手法で用いられた前処理に類する方法で実施している。具体的には透析と限外濾過を用いている。抗体を結合させ検出する免疫学的手法では、非可逆的な構造変化を伴った前処理操作では、検出感度が低下してしまうため、SEA の特徴的あるいは抗体結合部位の立体構造を維持する比較的マイルドな手法をとる場合が多い。一方、抗体が結合できないほど SEA が壊れていても、ペプチドのアミノ酸配列が保存されていれば本法は SEA として検出できる。測定の精度について、前述の 2 報では併行精度を指標として 9~30%であったのに対して本研究は 13~14%であり、ばらつきを約半分とする格段の進歩があり、室内精度と共に妥当性評価ガイドラインの基準範囲に収まっている。検出器の特性を把握し、LC-MS/MS にてペプチドを検出することに特化した前処理法を開発することで、先行研究よりも高精度かつ再現性の高い SEA 定量法を確立することができたと考

えた。

一般論として、同一試料中に分析対象物質が複数ある場合、試料保存・前処理・検出までの各工程が出来るだけ共通であることが望ましい。本研究では開発した CRL 定量法と SEA 定量法の前処理は個別工程であり、CRL と SEA の前処理工程を共通化できなかった理由として、次の 3 点を考えている。第一に、CRL と SEA は分子量が著しく異なる。Figure 1 および 2 が示すように、CRL は SEA の約 1/27 の分子量である。第二に、CRL はリソソームに依存しない環状ペプチドである。CRL は一般的なペプチド結合を持たない特徴的なペプチドであり、タンパク質ではない。第三に、CRL は真核生物では使われない D 体のアミノ酸を含んでおり、単純タンパク質である SEA と似て異なる物質である。こうした特性の違いは pH 調整や TCA 沈殿法といった前処理工程内で均一に作用しなかった可能性があり、CRL と SEA の前処理工程を完全に共通化できなかったと考えた。

しかしながら、本研究は試料保存と LC-MS/MS 条件を共通化した定量法を組み立てることができ、従来の個別試験法よりも格段の進歩があった。本研究を活用し、牛乳中の CRL と SEA を対象とした統合的な定量法が構築できると考えられた。

第4章 牛乳等に含まれる CRL および SEA の実態調査

4-1. 序論

本章では、開発した 2 つの分析法を用いた CRL と SEA の残留実態調査について、述べる。

分析法の開発においては、その妥当性を評価するために、測定対象を添加した牛乳を用いた。一方で、CRL と SEA が牛乳および生乳を汚染した食中毒事例が、日本で報告されている (Okada, 2021); (Asao *et al.*, 2003)。つまり、原因食品と汚染源を特定するためには、分析可能な食品は牛乳と生乳の両者であることが望ましい。そして、牛乳と生乳は次の 3 点が異なる。第一に、生乳は未加熱のため、牛乳よりも豊かな細菌叢を有している(Quigley *et al.*, 2013)。第二に、牛乳は熱殺菌処理により酵素活性が比較的均一であるが、生乳は様々である(Quigley *et al.*, 2013)。第三に、牛乳は脂肪球の大きさが均質化されているのに対して、生乳は均質化されていない(Argov-Argaman. 2019)。こうした成分の違いはごく微量に残存する CRL と SEA に干渉し、前処理工程や LC-MS/MS 測定に影響を与える可能性がある。このため、開発した分析法が生乳に対して適応できるか評価する必要がある。

日本国内において、未殺菌の生乳は販売流通していない。食品として入手が難しい生乳の代わりとして、ある特殊な牛乳を考えた。乳等省令（乳及び乳製品

の成分規格等に関する省令) では、特別牛乳さく取処理業の許可を受けた施設で製造された無調整牛乳で販売されるものを特別牛乳としている ([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2016)。特別牛乳には、厳格な製造方法基準(特別牛乳搾取処理業の許可を受けた施設で搾取)と成分規格(無脂乳固形分 8.5%以上や乳脂肪分 3.3%以上等)が定められている。特別牛乳の1つは厳密管理の下で搾乳され、熱殺菌とホモジナイズ等の工程を経ずに製造・販売されている。この特別牛乳の細菌叢や酵素活性、脂肪球は生乳のそれらと類似していることから、代替試料として、開発した分析法が生乳に適応できるかを検証した。そして、本研究では、流通している牛乳と原材料である生乳を対象に、CRL および SEA の残留の有無を調査した。

4-2. 材料および方法

4-2-1. 試料

生乳の代替試料として、東京都内に流通する市販の特別牛乳(未殺菌およびノンホモジェナイズ)を用いた。

2-2-1 と同様に、実態調査には、東京都内に流通する市販の牛乳(国産)8 検体を用いた。また、東京都内にある乳製品製造所からサンプリングした生乳(未殺菌)14 検体を実態調査に用いた。実態調査用の試料を分析する際には、添加回収

サンプルを試行数 1 あるいは 2 で設け、前処理および測定 of 工程管理指標とした。

4-2-2. 分析法および生乳への適応性評価

第 2 章および第 3 章で開発した分析法が生乳に適応可能かを試行数 3 で添加回収試験を行い、その結果を評価した。まず、秤量した特別牛乳(25.0 g)に、2-2-8 および 3-2-8 と同様に CRL 10ng/g、SEA 50 ng/g を同時に添加し、前処理を行った。1 つのサンプルから CRL および SEA 分画を得て、試験溶液を同一の LC-MS/MS 条件で測定することで、回収率および併行精度を算出し、評価した(Figure 17A)。分析法の適応性評価基準を厚生労働省のガイドライン([MHLW] Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan., 2010)の一部である回収率 70~120%、併行精度 25%未満とした。

4-3. 結果および考察

4-3-1. 特別牛乳での添加回収試験結果

本分析法を特別牛乳に用いたときの典型的な LC-MS/MS クロマトグラムを Figure 17B に示す。この時、CRL の回収率および併行精度は 81.1%、1.6%であり、SEA の回収率および併行精度は 78.8%、9.1%であった。特別牛乳由来の夾雑成分が CRL と SEA の分析を干渉または妨害した場合、回収率の増減やばらつき

が大きくなることが想定された。1つのサンプルから得た CRL および SEA 分画の回収率ならびに精度は、それぞれの単独分析時の回収率ならびに精度と比較し、大きく違わなかった。従って、同時添加において、CRL および SEA はそれぞれに干渉しないと判断し、本分析法を生乳にも適応することとした。

4-3-2. 実態調査結果

いずれの検体からも CRL と SEA は検出されなかった。また、同日に実施した工程管理用の添加回収サンプルにおける回収率は 70～120%の範囲内であった。実態調査を実施する際にも、分析の品質は管理されており、定量下限値までは信頼性の高い結果を保証した。

4-4. まとめ

本章では、開発した 2 つの分析法を生乳に適応可能かどうかを検証し、CRL と SEA の残留実態調査を実施した。

検証および調査結果の要点は次の 2 つである。

- ① 生乳の代替として用いた特別牛乳を対象として、CRL と SEA の添加回収試験を行った。牛乳を試料とした結果と同等の結果が得られ、開発した 2 つの分析法の対象試料を生乳に拡大することが可能となった。
- ② 開発した 2 つの分析法を用いて、市販牛乳 8 検体および生乳 14 検体に対し、

残留実態調査を行ったところ、いずれの検体からも定量下限値以上の CRL と SEA は検出されなかった。

本章では、共通化した LC-MS/MS の測定条件を用いて牛乳等に含まれる CRL と SEA の検査が可能であることを本研究で実証した。

第5章 総括

本研究では、牛乳中に残留する細菌性毒素の分析法を提示した。対象とする細菌性毒素はセレウス菌が産生する CRL および黄色ブドウ球菌が産生する SEA とした。

CRL および SEA といった細菌性毒素は牛乳を汚染し、大規模集団食中毒を引き起こしてきた。これらの原因毒素を牛乳から同一の LC-MS/MS 条件で分析する方法はなく、個別の試験法を用いて対応してきた。CRL の個別法は定性能と簡便性、信頼性といった問題があり、試験実施の障壁となっていた。また、SEA の個別法はばらつきや揺らぎが大きく、定性能と信頼性が乏しかった。各々の個別法が持つ課題を解決し、CRL と SEA を同一の LC-MS/MS 条件で分析できる方法が必要であった。

そこで第2章では、牛乳中の CRL の分析法について検討した。解決すべきであった3課題を以下に列記し、さらに、本研究でどのように解決したか記した。

- ① 高い再現性：プロダクトイオンスペクトルを取得することで、LC-MS/MS

による CRL の特異的な同定が可能となった。CRL を定量下限値まで確実に精確に定量することができる。

- ② 簡便性：前処理にタンパク質酸沈殿法とアセトニトリルによる抽出を用いることで、牛乳由来の夾雑成分を除去し、精製工程を省略した。

- ③ 信頼性確保：妥当性評価ガイドラインの基準にすべて適合した。

第3章では、牛乳中の SEA の分析法について検討した。解決すべきであった3課題を以下に列記し、さらに、本研究でどのように解決したか記した。

- ① 高い再現性：SEA に由来する3つのペプチド断片を LC-MS/MS で検知することで、SEA のアミノ酸配列を10%以上カバーし、同定する。定量下限値まで SEA を確実に精確に定量することができる。

- ② 簡便性：第2章で開発した CRL の分析法と同じ LC 条件を用いて、SEA に由来するペプチドが分離され、MS/MS にて検知可能であることを見出した。これにより、鑑別すべき CRL と SEA を同一の LC-MS/MS 条件で連続的に測定可能となり、実務的な時間と労力を低減した。

③ 信頼性確保：妥当性評価ガイドラインの基準にすべて適合した。

本研究では、今まで同一条件で測定および検査できなかった異なる細菌性毒素、CRL および SEA の分析法を開発した。

第4章では、各分析性能が妥当性評価ガイドラインの基準を満たし信頼性が高い本分析法を用いて、牛乳類22検体の実態調査を行ったところ、いずれの検体からもCRL および SEA を検出しなかった。再現性および信頼性の高い本分析法は調査した牛乳類に定量下限値以上のCRL と SEA がないことを示した。

以上のことから、本研究で開発した分析法と調査結果は牛乳の品質保障と食品衛生における検査体制の強化に寄与すると期待される。さらに、開発した分析法は食中毒の病因物質特定や健康被害の予防につながると考えられる。

今後の重要課題としては、従来法との定量値比較と別な試験所での本分析法を性能評価だと考えられる。本分析法を普及しつつ施設間の精度分析を行うことで、画一的な検査の実現が期待できる。さらに、本研究の成果を起点として対象可能な細菌性毒素等を拡充することで、牛乳を汚染する有害物質の網羅的分析・解析系の確立が期待される。

本論文における研究成果の一部を以下に公表した。

1. Koike, H., Kanda, M., Hayashi, H., Matsushima, Y., Ohba, Y., Nakagawa, Y., Nagano, C., Sekimura, K., Hirai, A., Shindo, T., Kamiie, J., Sasamoto, T., Hashimoto, T.: Identification and quantification of cereulide in cow's milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 35:2424-2433, 2018.
2. Koike, H., Kanda, M., Hayashi, H., Matsushima, Y., Ohba, Y., Nakagawa, Y., Nagano, C., Sekimura, K., Hirai, A., Shindo, T., Otsuka, K., Kamiie, J., Sasamoto, T., Hashimoto, T.: Quantification of staphylococcal enterotoxin type A in cow's milk by using a stable isotope-labelled peptide via liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 36:1098-1108, 2019.

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤な御指導を賜りました麻布大学獣医学部 准教授 吉岡亘先生に心から感謝の意を表します。また、議論を通じて多くの示唆を頂いた同部 教授 上家潤一先生、教授 森田幸雄先生、講師 杉田和俊先生に心より感謝いたします。

本研究に対し、学位申請の機会を与えていただきました東京都健康安全研究センター所長 吉村和久氏、食品化学部部長 笹本剛生氏、同部残留物質研究科科长 横山知子氏、同部 副参事研究員 神田真軌氏に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり協力いただきました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各位に心から感謝いたします。

終わりに臨み、日頃から温かい応援と激励をくれる家族に感謝します。

ありがとうございました。

引用文献

1. Flannery, K.V., 1965. The Ecology of Early Food Production in Mesopotamia: Prehistoric farmers and herders exploited a series of adjacent but contrasting climatic zones. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, **147**(3663), pp. 1247-1256.
2. Okada, Y., 2021. Microbial hazards, hygiene indicators and testing methods in milk and dairy products. *Journal of the National Institute of Public Health*, **70**(2), pp. 107-115.
3. [MHLW] MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, Tokyo, Japan. 2016. *Milk and Milk Products Concerning Compositional Standards, etc. Ordinance No.109*.
4. Evanowski, R.L., Kent, D.J., Wiedmann, M. and Martin, N.H., 2020. Milking time hygiene interventions on dairy farms reduce spore counts in raw milk. *Journal of dairy science*, **103**(5), pp. 4088-4099.
5. Feldmann M, Zimmermann A, Hoedemaker M., 2006. Influence of milking technique, milking hygiene and environmental hygiene parameters on the microbial contamination of milking machines. DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift. **113**(7), pp. 274-281.
6. Paludetti, L.F., Kelly, A.L., O'Brien, B., Jordan, K., Gleeson, D. 2018. The effect of different precooling rates and cold storage on milk microbiological quality and composition. *J Dairy Sci.* **101**(3):1921-1929.
7. Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H. and Kozaki, S., 2003. An Extensive Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Due to Low-Fat Milk in Japan: Estimation of Enterotoxin A in the Incriminated Milk and Powdered Skim Milk. *Epidemiology and infection*, **130**(1), pp. 33-40.
8. [MHLW] MINISTRY OF HEALTH LABOUR AND WELFARE, Tokyo, Japan. 2021. Food Poisoning Statistics.
Available: https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhi_n/syokuchu/04.html
9. Andersson, M.A., Hakulinen, P., Honkalampi-Hämäläinen, U., Hoornstra, D., Lhuguenot, J., Mäki-Paakkanen, J., Savolainen, M., Severin, I., Stammati, A., Turco, L., Weber, A., Von Wright, A., Zucco, F. and Salkinoja-Salonen, M., 2007.

- Toxicological profile of cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin, in functional assays with human, animal and bacterial cells. *Toxicon*, **49**(3), pp. 351-367.
10. Ueda, S., 2013. Food poisoning and testing for *Bacillus cereus*. *Chem Times.*, **2**, pp. 11-18.
 11. Agata, N., Ohta, M., Mori, M. and Isobe, M., 1995. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters*, **129**(1), pp. 17-19.
 12. Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M. and Scherer, S., 2006. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiology*, **6**(1), pp. 20.
 13. Marxen, S., Stark, T.D., Rüttschle, A., Lühheenn, G., Frenzel, E., Scherer, S., Ehling-Schulz, M. and Hofmann, T., 2015. Depsipeptide Intermediates Interrogate Proposed Biosynthesis of Cereulide, the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*. *Scientific Reports*, **5**(1), pp. 10637.
 14. 松木, 悦子, 木元, 大, 岡寄, 里美, 花房, 牧子, 岸野, 美, 森本, 奈々 and 佐藤, 朱理, 2021. おからが原因と思われた老人福祉施設のセレウス菌食中毒事例について : 全国食品衛生監視員研修会受賞演題. 食品衛生研究 = Food sanitation research, **71**(11), pp. 47-53.
 15. Cui, Y., Liu, Y., Liu, X., Xia, X., Ding, S. and Zhu, K., 2016. Evaluation of the Toxicity and Toxicokinetics of Cereulide from an Emetic *Bacillus cereus* Strain of Milk Origin. *Toxins*, **8**(6), pp. 156.
 16. Shimojima, Y., Kodo, Y., Soeda, K., Koike, H., Kanda, M., Hayashi, H., Nishino, Y., Fukui, R., Kuroda, S., Hirai, A., Suzuki, J. and Sadamasu, K., 2020. Prevalence of Cereulide-Producing *Bacillus cereus* in Pasteurized Milk. *Shokuhin eiseigaku zasshi*, **61**(5), pp. 178-182.
 17. Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S. and Heyndrickx, M., 2006. *Bacillus* sporothermodurans and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of applied microbiology*, **101**(3), pp. 542-555.
 18. Rowan, N.J., Deans, K., Anderson, J.G., Gemmell, C.G., Hunter, I.S. and Chaithong, T., 2001. Putative Virulence Factor Expression by Clinical and Food

Isolates of *Bacillus* spp. after Growth in Reconstituted Infant Milk

Formulae. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(9), pp. 3873-3881.

19. Beattie, S.H. and Williams, A.G., 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Letters in applied microbiology*, **28**(3), pp. 221-225.
20. Stark, T., Marxen, S., Rüttschle, A., Lücking, G., Scherer, S., Ehling-Schulz, M. and Hofmann, T., 2013. Mass spectrometric profiling of *Bacillus cereus* strains and quantitation of the emetic toxin cereulide by means of stable isotope dilution analysis and HEp-2 bioassay. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **405**(1), pp. 191-201.
21. Kawamura-Sato, K., Hiramata, Y., Agata, N., Ito, H., Torii, K., Takeno, A., Hasegawa, T., Shimomura, Y. and Ohta, M., 2005. Quantitative Analysis of Cereulide, an Emetic Toxin of *Bacillus cereus*, by Using Rat Liver Mitochondria. *Microbiology and immunology*, **49**(1), pp. 25-30.
22. Biesta-Peters, E.G., Reij, M.W., Blaauw, R.H., In 't veld, P.H., Rajkovic, A., Ehling-Schulz, M. and Abee, T., 2010. Quantification of the emetic toxin cereulide in food products by LC-MS using synthetic cereulide as a standard. *Appl Environ Microbiol*, **76**(22), pp. 7466-7472.
23. Kroteń, M.A., Bartoszewicz, M. and Swiecicka, I., 2010. Cereulide and Valinomycin, Two Important Natural Dodecadepsipeptides with Ionophoretic Activities. *Polish journal of microbiology*, **59**(1), pp. 3-10.
24. Delbrassinne, L., Andjelkovic, M., Dierick, K., Denayer, S., Mahillon, J. and Van loco, J., 2012. Prevalence and levels of *Bacillus cereus* emetic toxin in rice dishes randomly collected from restaurants and comparison with the levels measured in a recent foodborne outbreak. *Foodborne Pathogens and Diseases*, **9**(9), pp. 809-814.
25. Yamaguchi, M., Kawai, T., Kitagawa, M. and Kumeda, Y., 2013. A new method for rapid and quantitative detection of the *Bacillus cereus* emetic toxin cereulide in food products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Food microbiology*, **34**(1), pp. 29-37.
26. 日本質量分析学会, 2020. マススペクトロメトリー関係用語集 第4版 (www 版). https://www.mssj.jp/publications/pdf/MS_Terms_2020.pdf

27. Decler, M., Rajkovic, A., Sas, B., Madder, A. and De Saeger, S., 2016.
Development and validation of ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry methods for the simultaneous determination of beauvericin, enniatins (A, A1, B, B1) and cereulide in maize, wheat, pasta and rice. *Journal of Chromatography A*, **1472**, pp. 35-43.
28. Rønning, H.T., Asp, T.N. and Granum, P.E., 2015. Determination and quantification of the emetic toxin cereulide from *Bacillus cereus* in pasta, rice and cream with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, **32**(6), pp. 911-921.
29. Bauer, T., Stark, T., Hofmann, T. and Ehling-Schulz, M., 2010. Development of a Stable Isotope Dilution Analysis for the Quantification of the *Bacillus cereus* Toxin Cereulide in Foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, **58**(3), pp. 1420-1428.
30. Zuberovic Muratovic, A., Tröger, R., Granelli, K. and Hellenäs, K., 2014.
Quantitative Analysis of Cereulide Toxin from *Bacillus cereus* in Rice and Pasta Using Synthetic Cereulide Standard and ¹³C₆-Cereulide Standard—A Short Validation Study. *Toxins*, **6**(12), pp. 3326-3335.
31. In 't veld, P.H., Van Der Laak, L.F.J., Van zon, M. and Biesta-Peters, E.G., 2019.
Elaboration and validation of the method for the quantification of the emetic toxin of *Bacillus cereus* as described in EN-ISO 18465 - Microbiology of the food chain – Quantitative determination of emetic toxin (cereulide) using LC-MS/MS. *International journal of food microbiology*, **288**, pp. 91-96.
32. Fisher, E.L., Otto, M. and Cheung, G.Y.C., 2018. Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning. *Frontiers in microbiology*, **9**, pp. 436.
33. Shimizu, A., Fujita, M., Igarashi, H., Takagi, M., Nagase, N., Sasaki, A. and Kawano, J., 2000. Characterization of *Staphylococcus aureus* Coagulase Type VII Isolates from Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks (1980–1995) in Tokyo, Japan, by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**(10), pp. 3746-3749.
34. Yan, X., Wang, B., Tao, X., Hu, Q., Cui, Z., Zhang, J., Lin, Y., You, Y., Shi, X. and Grundmann, H., 2012. Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains

Associated with Food Poisoning in Shenzhen, China. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(18), pp. 6637-6642.

35. Evenson, M.L., Ward hinds, M., Bernstein, R.S. and Bergdoll, M.S., 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International journal of food microbiology*, **7**(4), pp. 311-316.
36. Thomas, D., Chou, S., Dauwalder, O. and Lina, G., 2007. Diversity in *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Chemical immunology and allergy*. Basel, Switzerland: S. Karger AG, pp. 24-41.
37. Gilquin, B., Jaquinod, M., Louwagie, M., Kieffer-Jaquinod, S., Kraut, A., Ferro, M., Becher, F. and Brun, V., 2017. A proteomics assay to detect eight CBRN-relevant toxins in food. *Proteomics (Weinheim)*, **17**(1-2), pp. 1600357-n/a.
38. Park, C.E. and Szabo, R., 1986. Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, and D in foods. *Canadian journal of microbiology*, **32**(9), pp. 723-727.
39. Jørgensen, H.J., Mathisen, T., Løvseth, A., Omoe, K., Qvale, K.S. and Loncarevic, S., 2005. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS microbiology letters*, **252**(2), pp. 267-272.
40. Nouri, A., Ahari, H. and Shahbazzadeh, D., 2018. Designing a direct ELISA kit for the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in raw milk samples. *International journal of biological macromolecules*, **107**(Pt B), pp. 1732-1737.
41. Hennekinne, J.A., Guillier, F., Perelle, S., De Buyser, M.L., Dragacci, S., Krys, S. and Lombard, B., 2007. Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. *Journal of applied microbiology*, **102**(5), pp. 1261-1272.
42. Nia, Y., Rodrigues, M., Zeleny, R., Herbin, S., Auvray, F., Fiebig, U., Avondet, M., Munoz, A. and Hennekinne, J.A., 2016. Organization and ELISA-Based Results of the First Proficiency Testing to Evaluate the Ability of European Union

- Laboratories to Detect Staphylococcal Enterotoxin Type B (SEB) in Buffer and Milk. *Toxins*, **8**(9), pp. 268.
43. Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M., Thomas, D., Court, M., Vandenesch, F. and Garin, J., 2007. Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Molecular & cellular proteomics*, **6**(12), pp. 2139-2149.
 44. Dupuis, A., Hennekinne, J.A., Garin, J. and Brun, V., 2008. Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. *Proteomics (Weinheim)*, **8**(22), pp. 4633-4636.
 45. Marx, V., 2013. Targeted proteomics. *Nature methods*, **10**(1), pp. 19-22.
 46. Muratovic, A.Z., Hagström, T., Rosén, J., Granelli, K. and Hellenäs, K., 2015. Quantitative Analysis of Staphylococcal Enterotoxins A and B in Food Matrices Using Ultra High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *Toxins*, **7**(9), pp. 3637-3656.
 47. Andjelkovic, M., Tsilia, V., Rajkovic, A., De Cremer, K. and Van Loco, J., 2016. Application of LC-MS/MS MRM to Determine Staphylococcal Enterotoxins (SEB and SEA) in Milk. *Toxins*, **8**(4), pp. 118.
 48. SANTE/11813/2017., 2018. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. Document No. SANTE/11813/2017.
 49. [MHLW] MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, Tokyo, Japan. 2010. Director notice; guideline for the validation of analytical methods for agricultural chemical residues in food. Syoku-An No. 1224.
 50. CODEX ALIMENTARIUS., 2014. Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. CAC/GL 71–2009.
 51. Lynch, K.L., Breaud, A.R., Vandenberghe, H., Wu, A.H., Clarke, W. 2010. Performance evaluation of three liquid chromatography mass spectrometry methods for broad spectrum drug screening. *Clin Chim Acta*, **411**(19-20), pp.1474-1481.
 52. Xing, Y., Meng, W., Sun, W., Li, D., Yu, Z., Tong, L., Zhao, Y. 2016. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of 21 mycotoxins in Radix Paeoniae Alba by

- ultra-high performance liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry and QuEChERS for sample preparation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 15(1031), pp. 202-213.
53. [MHLW] MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, Tokyo, Japan. 2004. Director notice; 食品衛生検査施設における検査等の業務管理について. SyokuAnKan No. 0323007.
 54. Quigley, L., O'sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Cotter, P.D., 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology reviews*, **37**(5), pp. 664-698.
 55. Argov-Argaman, N. 2019. Symposium review: Milk fat globule size: Practical implications and metabolic regulation. *Journal of dairy science*, **102**(3), pp. 2783-2795.
 56. 独立行政法人 農畜産業振興機構, 2015. 平成 28 年度 牛乳・乳製品の消費動向に関する調査.
 57. Bao, K.D., Letellier, A. and Beaudry, F., 2012. Analysis of Staphylococcus enterotoxin B using differential isotopic tags and liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomedical chromatography*, **26**(9), pp. 1049-1057.
 58. Uniprot. 2019. UniProt Knowledgebase. Available: <https://www.uniprot.org>
 59. MacLean B., Tomazela D.M., Shulman N., Chambers M., Finney G.L., Frewen B., Kern R., Tabb D.L., Liebler D.C., MacCoss M.J., 2010. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*, **26**(7), 966-968.
 60. Mawuenyega, K.G., Kaji, H., Yamuchi, Y., Shinkawa, T., Saito, H., Taoka, M., Takahashi, N. and Isobe, T., 2003. Large-scale identification of *Caenorhabditis elegans* proteins by multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of proteome research*, **2**(1), pp. 23-35.
 61. Kamiie, J., Ohtsuki, S., Iwase, R., Ohmine, K., Katsukura, Y., Yanai, K., Sekine, Y., Uchida, Y., Ito, S. and Terasaki, T., 2008. Quantitative Atlas of Membrane Transporter Proteins: Development and Application of a Highly Sensitive Simultaneous LC/MS/MS Method Combined with Novel In-silico Peptide Selection Criteria. *Pharmaceutical research*, **25**(6), pp. 1469-1483.

62. Lange, V., Picotti, P., Domon, B. and Aebersold, R., 2008. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular systems biology*, **4**, pp. 222.
63. Steen, H. and Mann, M., 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature reviews molecular cell biology*, **5**(9), pp. 699-711.
64. Picotti, P., Lam, H., Campbell, D., Deutsch, E.W., Mirzaei, H., Ranish, J., Domon, B. and Aebersold, R., 2008. A database of mass spectrometric assays for the yeast proteome. *Nature methods*, **5**(11), pp. 913-914.
65. WORLD ANTI-DOPING AGENCY LABORATORY COMMITTEE., 2010. WADA Technical Document–TD2010IDCR/Version 1.0.
66. Stryer, L., 1988. Biochemistry, 3 rd ed. New York, USA: W. H. Freeman and Company.
67. Northrop, J.H., 1922. DOES THE KINETICS OF TRYPSIN DIGESTION DEPEND ON THE FORMATION OF A COMPOUND BETWEEN ENZYME AND SUBSTRATE. *The journal of general physiology*, **4**(5), pp. 487-509.
68. Food and Drug Administration. 2012. Staphylococcus aureus. In: Anonymous The Bad Bug Book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. 2nd ed., 87–91.
69. García-Calvo, J., Ibeas, S., Antón-García, E., Torroba, T., González-Aguilar, G., Antunes, W., González-Lavado, E. and Fanarraga, M.L., 2017. Potassium-Ion-Selective Fluorescent Sensors To Detect Cereulide, the Emetic Toxin of *B. cereus*, in Food Samples and HeLa Cells. *ChemistryOpen*, **6**(4), pp. 562-570.

Figure 1

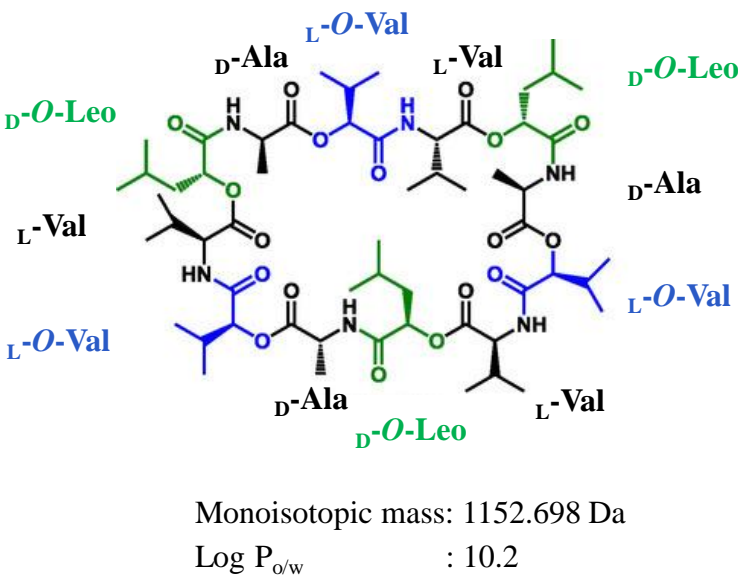
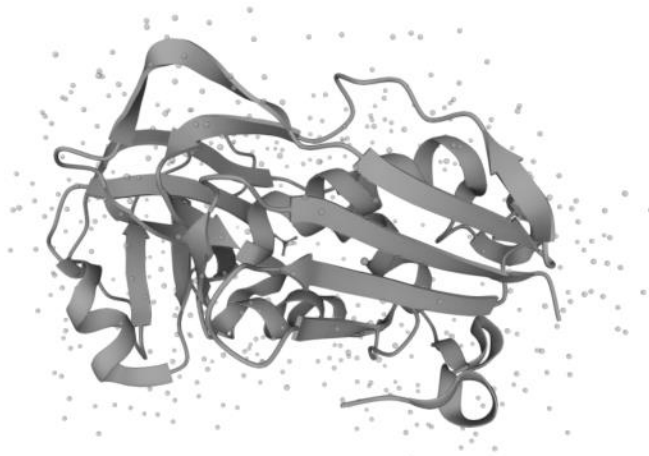


Figure 1. Structure and features of CRL. Adapted from “Chemical structures of cereulide” by García-Calvo et al. 2017.

Figure 2



Accession No.: P020L2

Gene : *entA*

Monoisotopic mass: 27.1 kDa

Figure 2. Structural image and features of SEA. Adapted from UniProt Knowledgebase, available: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0A0L2/entry>

Figure 3

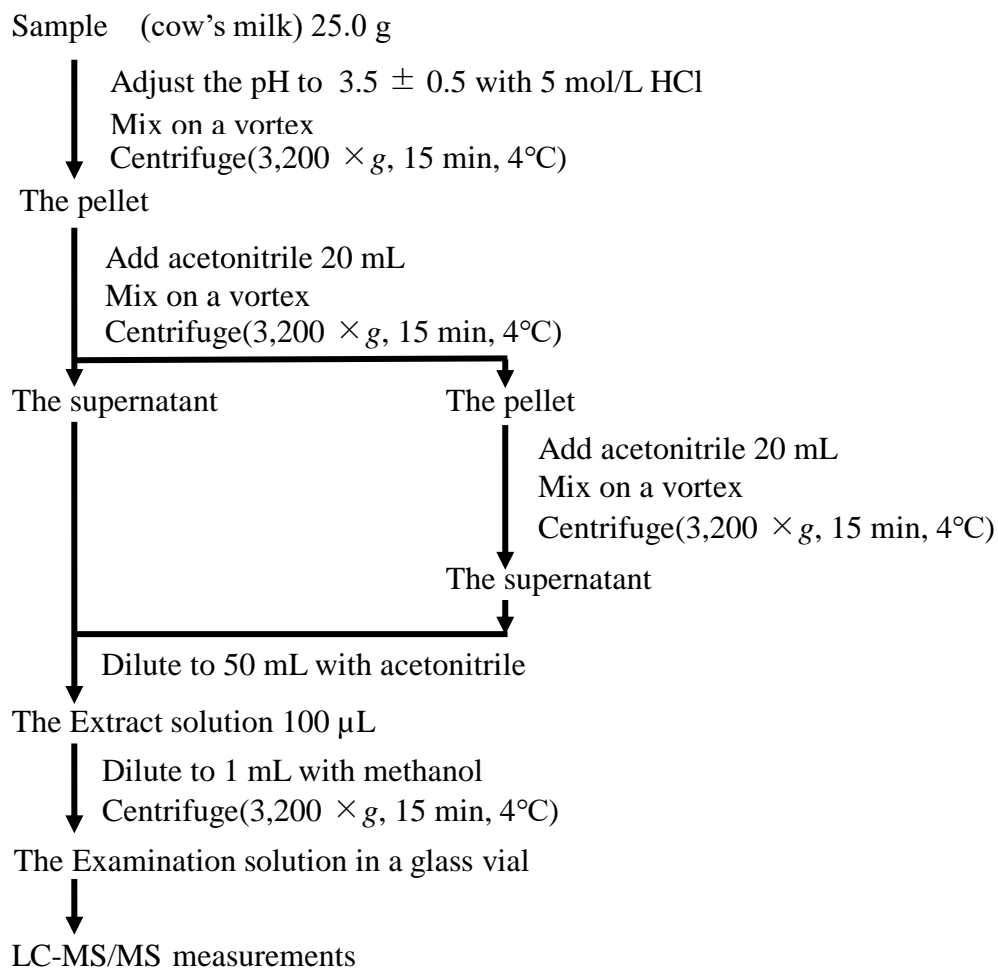


Figure 3. Sample preparation method for analysis of CRL.

Figure 4

Performance characteristics of single-laboratory validation study			
1. Selectivity			
2. Trueness (Recovery)			
3. Precision			
-1. Repeatability			
-2. Within-laboratory reproducibility			
4. Limit of Quantification			
Selectivity:			
Good separation of the peaks of target compounds from the peaks of matrix.			
Trueness, Precision			
Fortification level (ng/g)	Trueness (%)	Precision	
		Repeatability (RSD, %)	Within-laboratory reproducibility (RSD, %)
≤ 1	70-120	30 >	35 >
$1 < X \leq 10$	70-120	25 >	30 >
$10 < X \leq 100$	70-120	15 >	20 >
Limit of Quantification: Signal-to-Noise ≥ 10 .			

Figure 4. Criteria of performance characteristics of validation study in the guidelines of Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare.

Figure 5

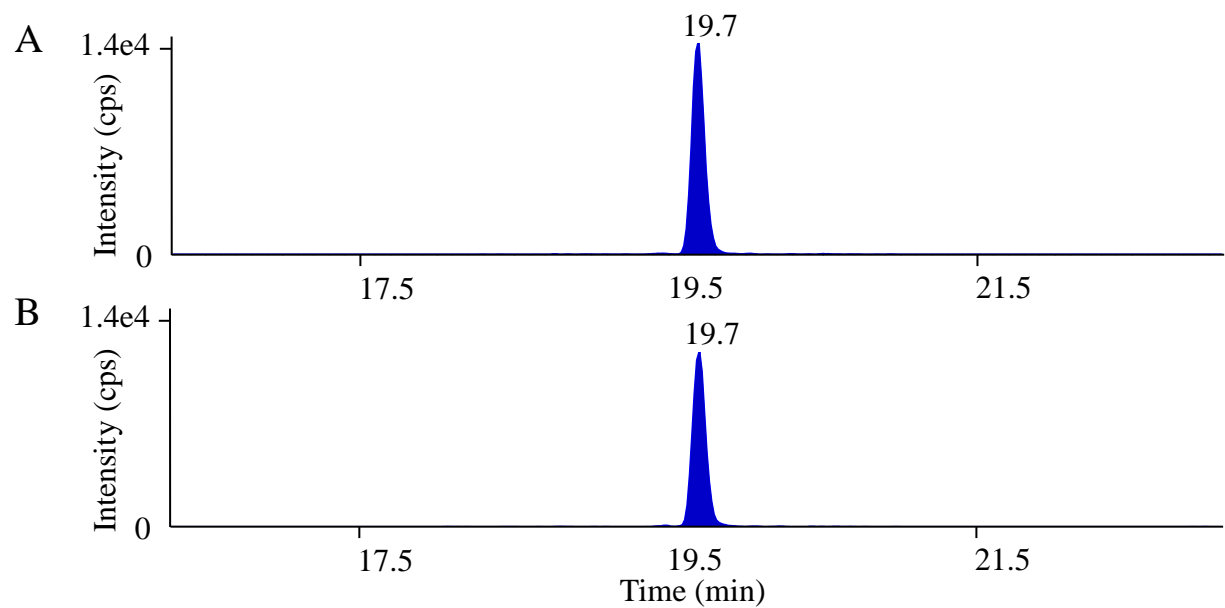


Figure 5. 1. LC-MS/MS chromatograms (m/z 1170.7 \rightarrow 1125.7) of (A) CRL standard solution (0.5 ng/g), and (B) the sample spiked with CRL at 10 ng/g (0.5 ng/g in the vial).

Figure 6

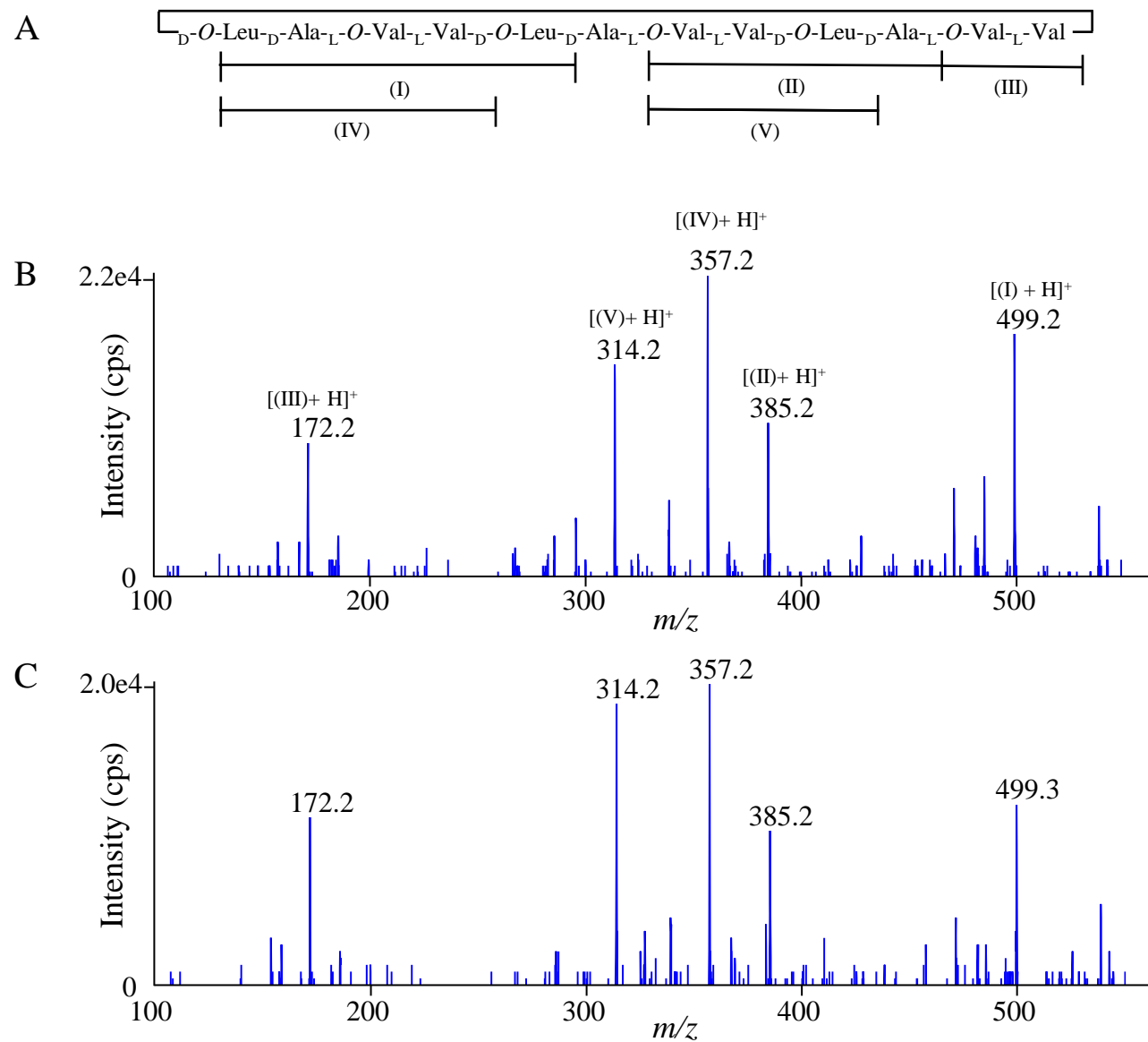


Figure 6. (A) The scheme shows proposed fragmentation pattern with tentative structures for the product ion of CRL. The fragmentation pattern was adapted in Bauer et al.(2010). Results of the product ion spectra analysis of m/z 1170.7 in (B) CRL standard solution (0.5 ng/g) and (C) a sample spiked with CRL at 10 ng/g (0.5 ng/g in the vial).

Figure 7

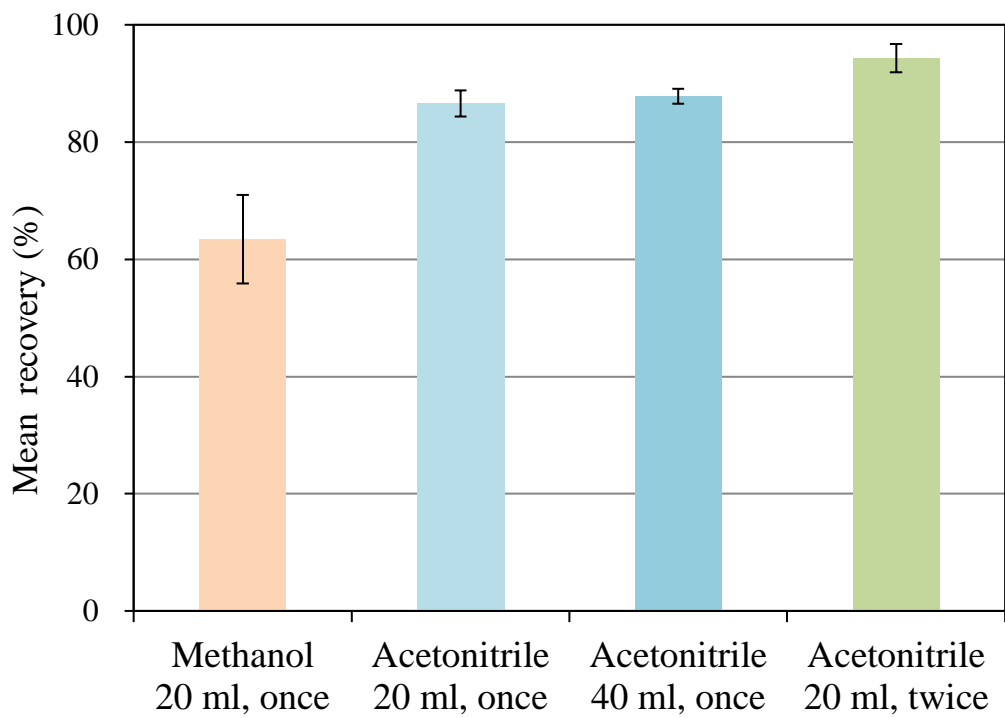


Figure 7. Comparison of the recoveries of CRL among the different extraction procedures. Error bars indicate the RSD values of repeatability (n = 3).

Figure 8

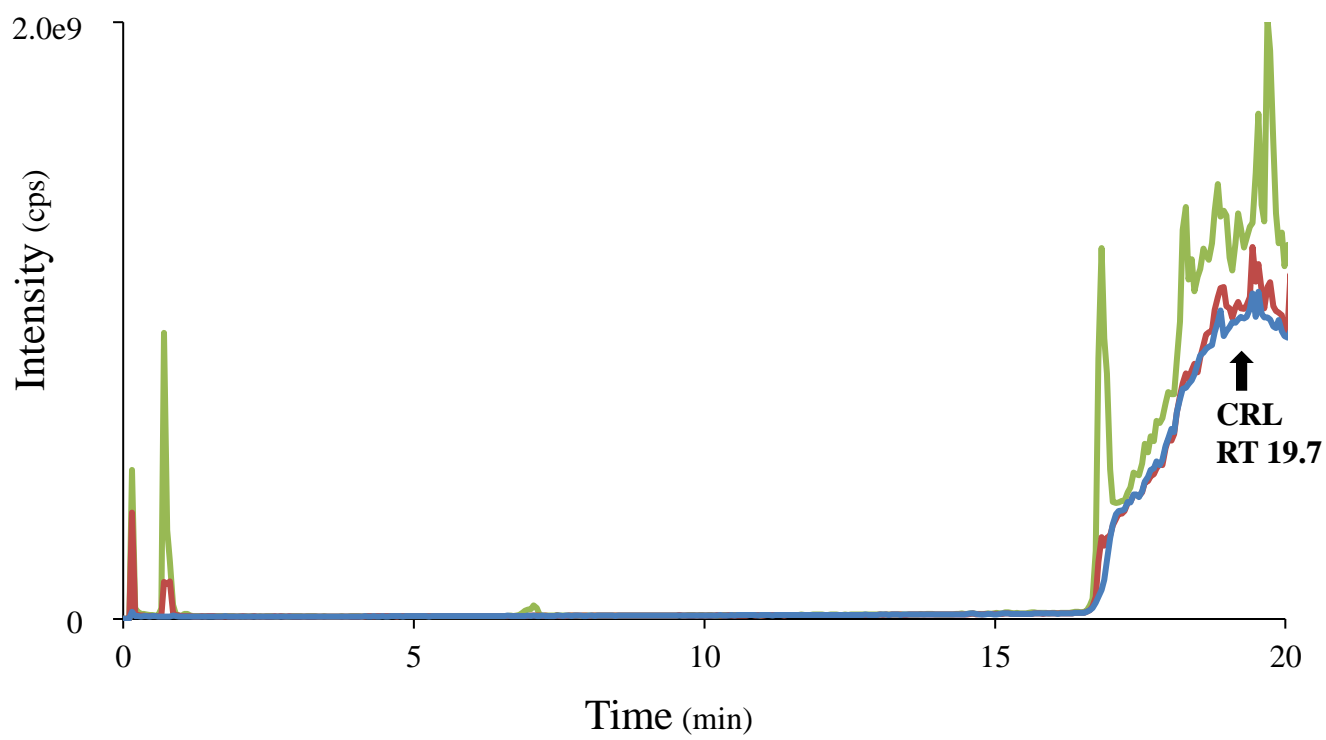


Figure 8. Total ion current chromatograms (TIC, m/z 600 to 1200); Blue line shows the TIC of the blank solution (methanol), red line indicates the TIC of the blank milk samples with the 10-fold dilution process, and green line indicates the TIC of the blank milk samples without the process.

Figure 9

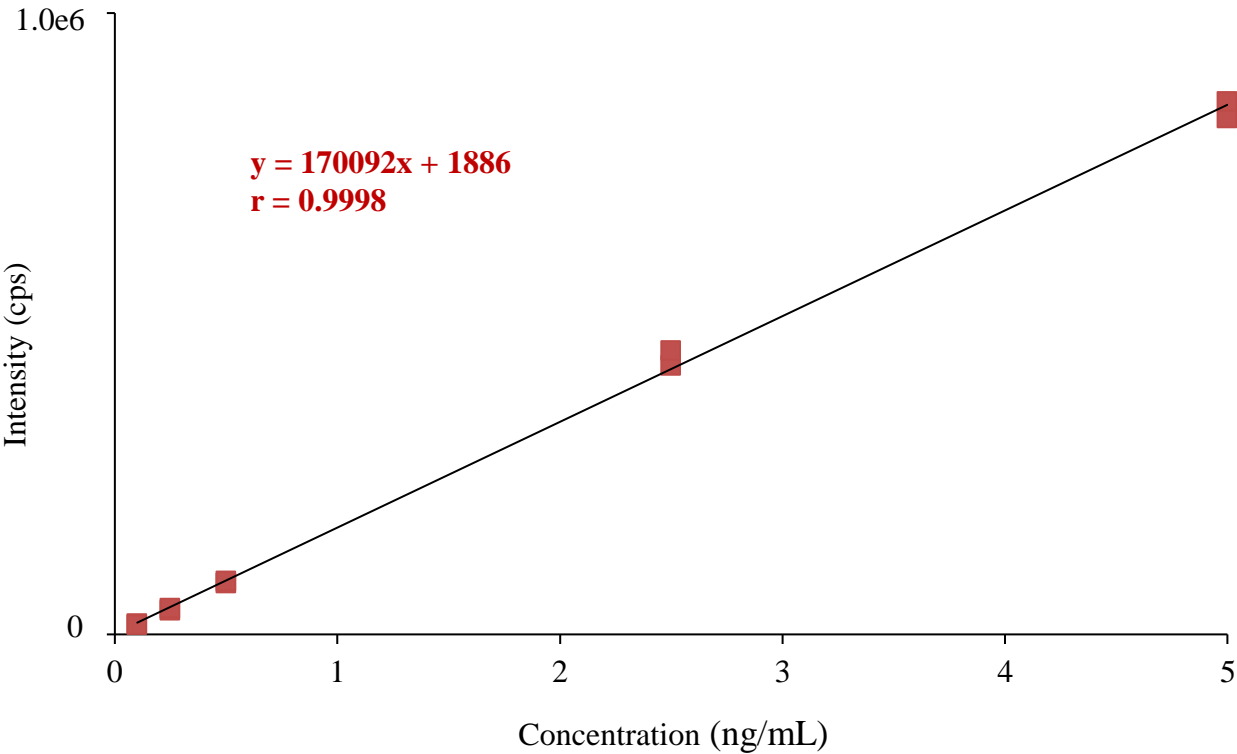


Figure 9. Calibration curve data from the standard solution of CRL. The calibration points (0.1, 0.25, 0.5, 2.5, and 5.0 ng/mL) were analyzed twice.

Figure 10

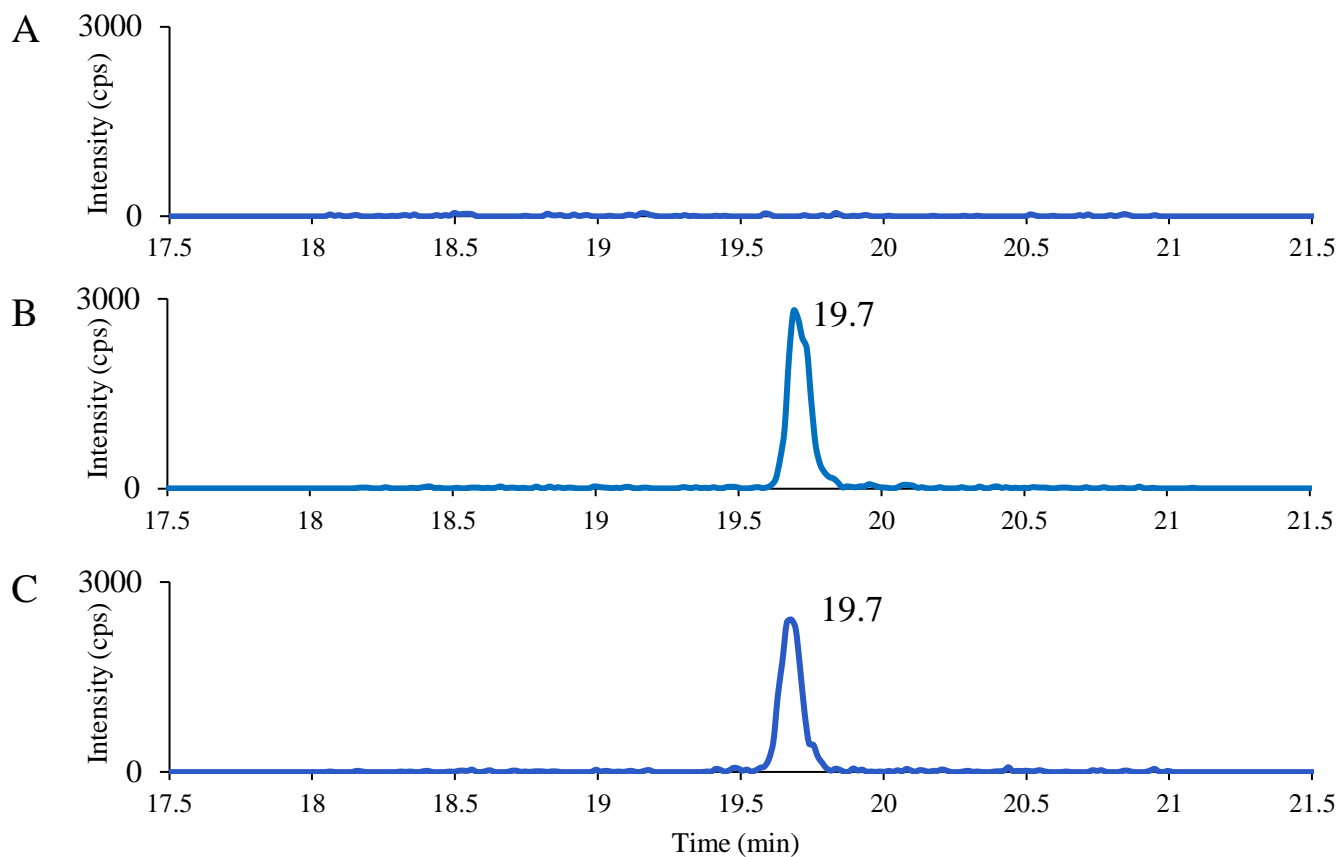


Figure 10. Chromatograms of the quantitative transition (m/z 1170.7/1125.7) in (A) the blank milk sample, (B) the standard solution of CRL 0.1 ng/g, and (C) spiked sample with CRL at the LOQ level (2 ng/g, 0.1 ng/g in the vial).

Figure 11.

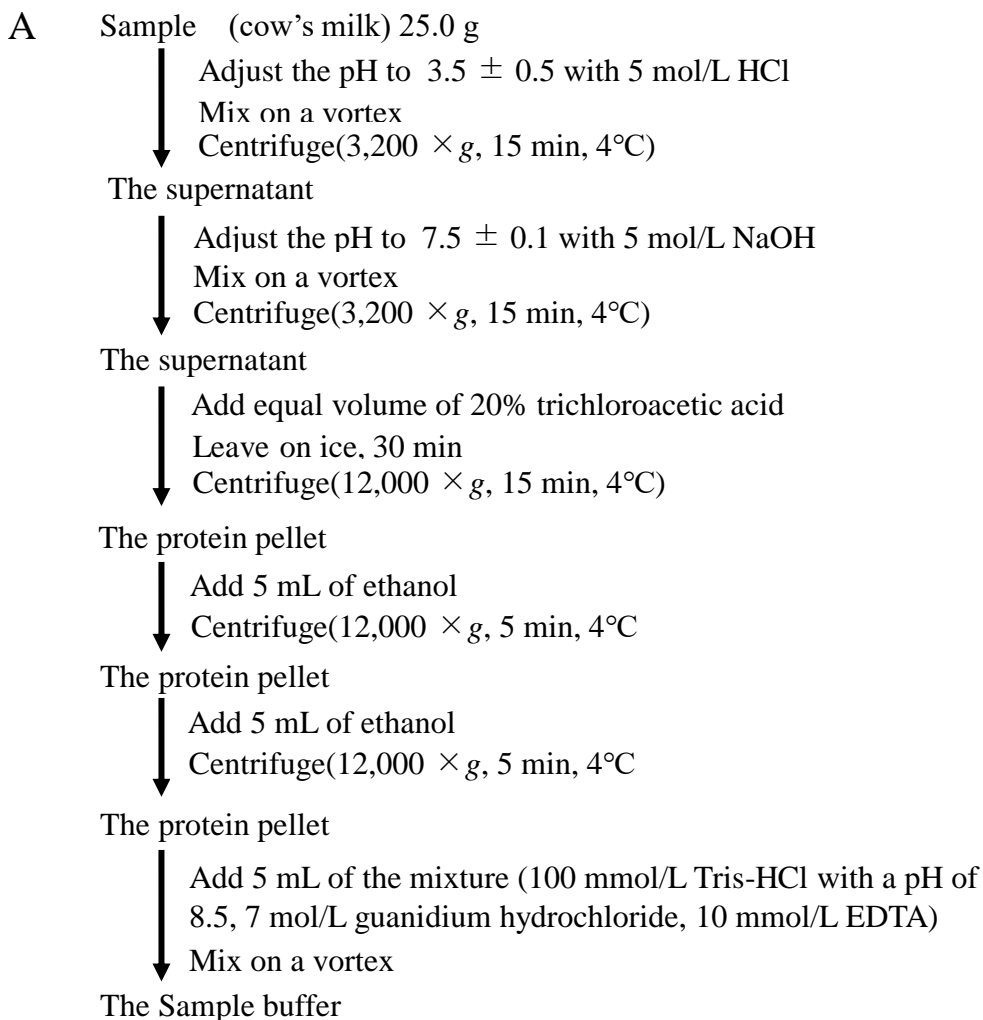


Figure 11. Sample preparation method for analysis of SEA; (A) The method of collecting protein and preparing for the sample buffer and (B) the method of trypsin digestion, desalting, and preparing for the Examination solution.

Figure 11

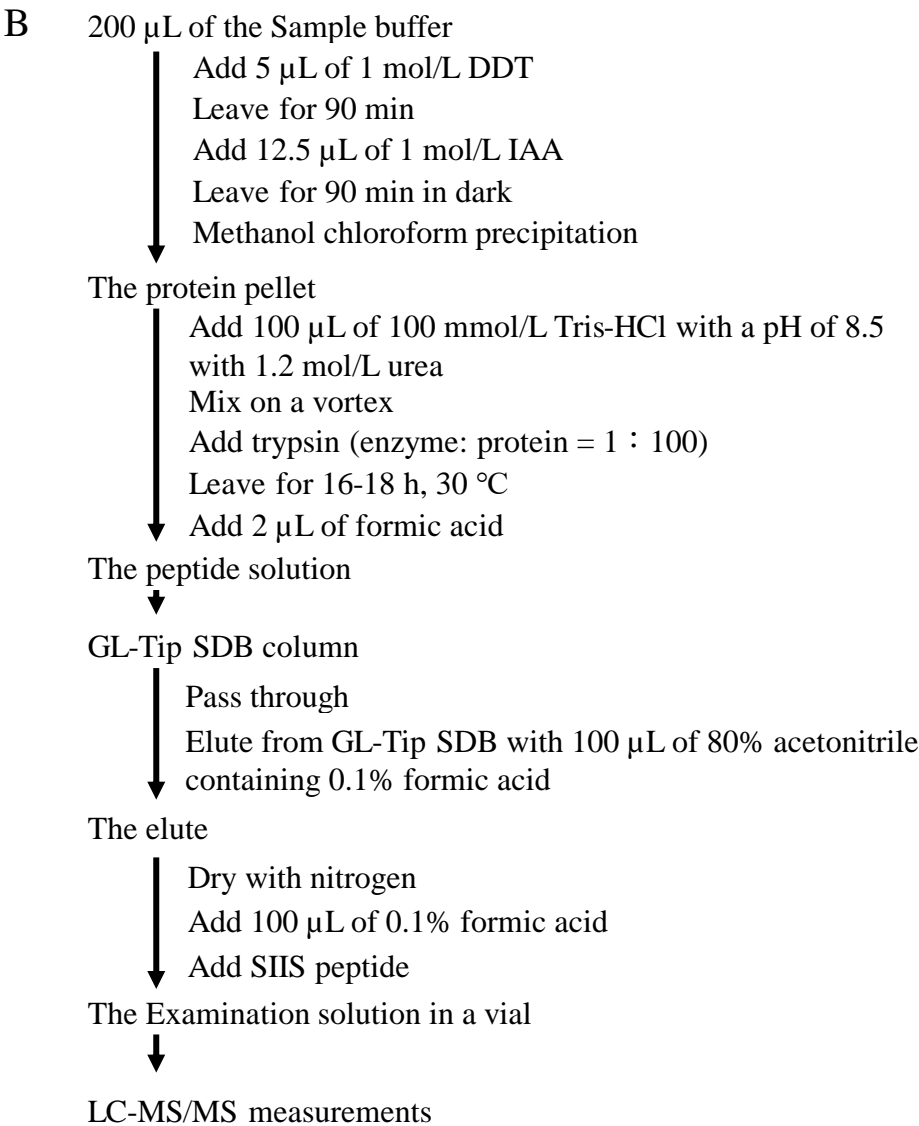


Figure 12

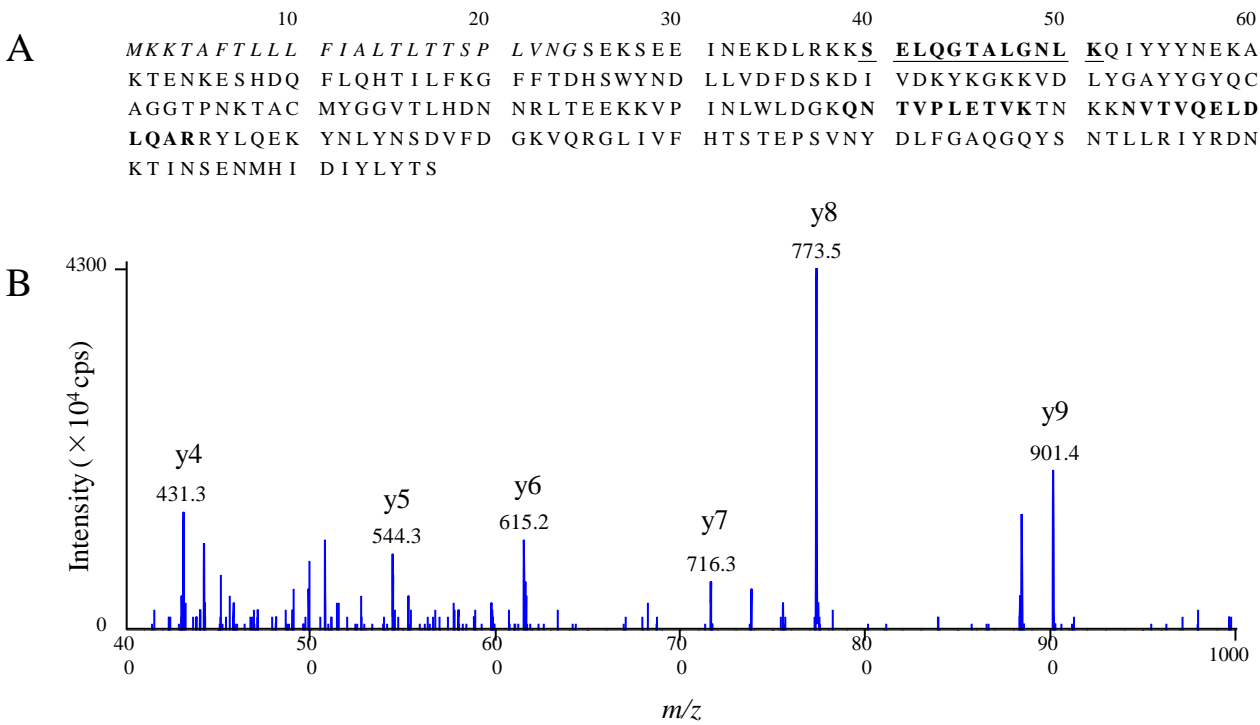


Figure 12. (A) Amino-acid-sequences of SEA; bold/underlined = selected peptide for AQUA; bold = selected peptides; italicised = signal peptide. (B) Product ion spectra elicited by the doubly protonated peptide (m/z 615.8/773.5 of SELQGTALGNLK) in the standard solution at a SEA concentration of 1000 ng/g.

Figure 13

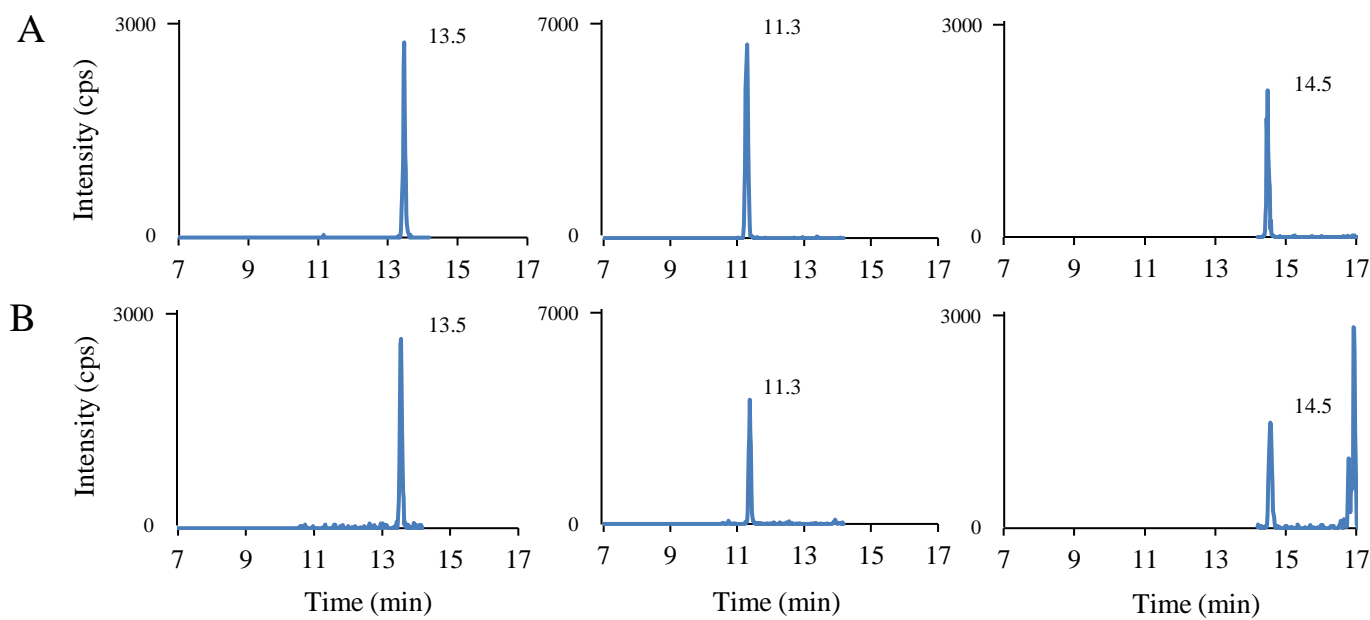


Figure 13. Comparison of sensitivity in LC–MS/MS chromatograms between (A) the standard solution of SEA 500 ng/g and (B) cow’s milk spiked with SEA at 50 ng/g (500 ng/g in the vial). Each of the peptides were eluted at the same retention time: (left) the quantitative transition (m/z 615.8/773.5 of SELQGTALGNLK), (middle) the transition (m/z 564.8/686.4 of QNTVPLETVK), and (right) the transition (m/z 693.4/972.5 of NVTVQELDLQAR)

Figure 14

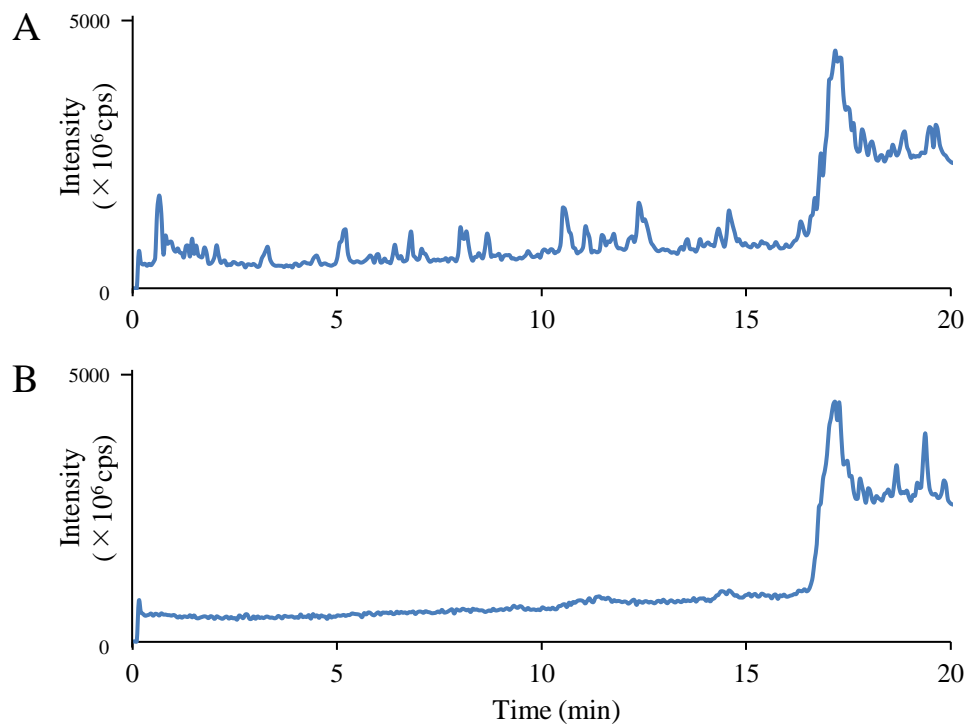


Figure 14. Total ion current chromatograms of blank milk samples (m/z 55 to 650) (A) without and (B) with the desalting process.

Figure 15

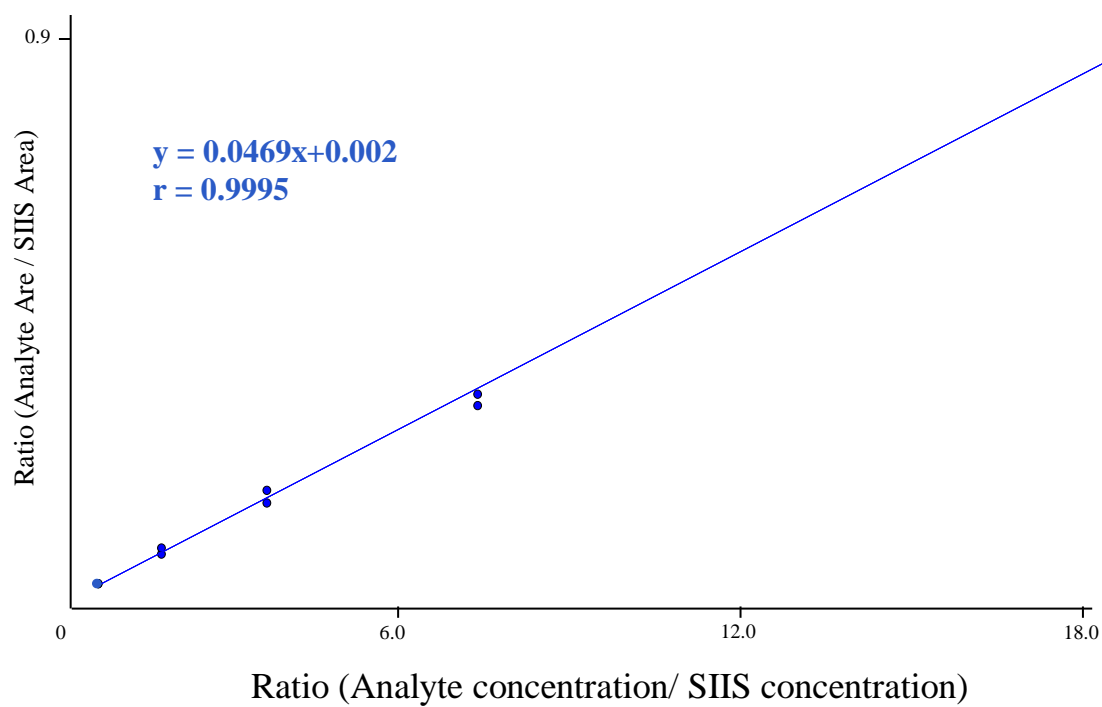


Figure 15. Calibration curve data from the standard solution of SEA peptides. The calibration points (100, 250, 500, 1000 and 2500 ng/mL) were analyzed twice.

Figure 16

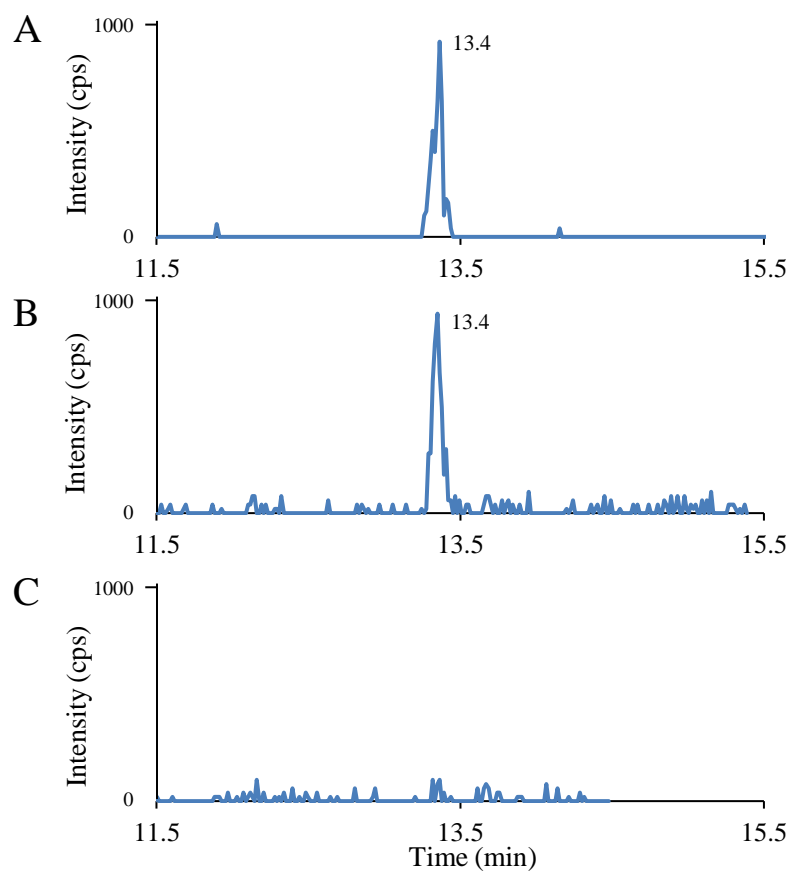


Figure 16. Chromatograms of the quantitative transition (m/z 615.8/773.5) in (A) the standard solution of SEA 100 ng/g, (B) spiked sample with SEA at the LOQ level (10 ng/g, 100 ng/g in the vial), and (C) the blank milk sample.

Figure 17

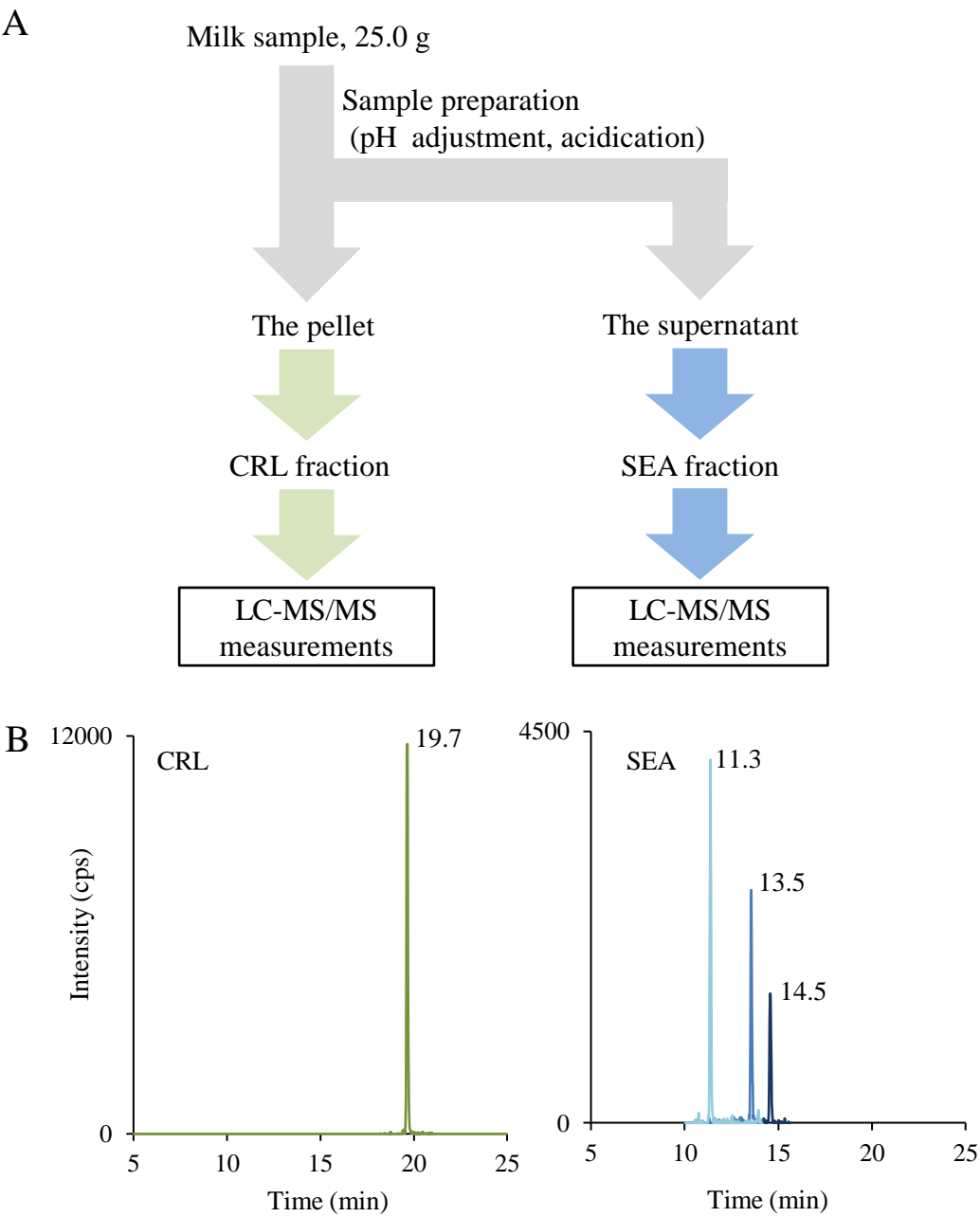


Figure 17. (A) Schematic drawing of the approach for the analysis of CRL and SEA in milk samples. (B) Typical LC-MS/MS chromatograms for the milk sample spiked with CRL 10 and SEA 50 ng/g: (left) CRL transition (m/z 1170.7/1125.7 at the retention time (RT) 19.7 min) and (right) SEA peptides transition (m/z 564.8/686.4 at the RT 11.3 min, m/z 615.8/773.5 at the RT 13.5 min, and m/z 693.4/972.5 at the RT 14.5 min).

Table 1. Parameters of MS/MS detector.

Ionisation mode	Positive-ion ESI*
Ion spray voltage	4500 V
Vaporiser temperature	600°C
Enhance potential	10 V
Curtain gas pressure	15 psi
Collision gas pressure	8 psi
Ion source gas pressure 1	40 psi
Ion source gas pressure 2	40 psi

*Electrospray ionasation

Table 2. MS/MS transitions and parameters for cereulide.

Retention time (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Declustering potential (V)	Collision energy (eV)	Collision cell exit potential (V)	Dwell time (msec)	Ion ratio * (%)
19.7	1170.7	1125.7**	96	51	8	80	-
		499.4		73	10	80	61.2
		385.2		75	16	80	44.9
		357.2		83	24	80	73.4
		314.2		85	10	80	59.3
		172.2		117	10	80	46.7

*The relative ion abundance ratio of each product ion for the standard solution (5.0 ng/g)

**Quantification ion

Table 3. Validation results for cereulide in cow's milk.

Fortification level (ng/g)	Trueness (%)	Precision		LOQ (ng/g)
		RSD _r * (%)	RSD _{WR} ** (%)	
10	94.0	4.7	5.6	2.0
50	90.5	2.4	4.7	

*RSD of repeatability

**RSD of within-laboratory reproducibility

Table 4. Summary of MS/MS transitions and parameters for tryptic peptides of SEA (Uni-Prot Accession No. P020L2).

Toxin	Position on protein	peptide sequence	charge state	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	ion	Retention time (min)	Declustering potential (V)	Collision energy (eV)	Ion ratio* (%)
	40-51	SELQGTALGNLK	2+	615.8	773.5**	y8	13.5	75	29	-
					431.3	y4		79	32	27.0
					716.4	y7		74	30	14.7
					544.3	y5		78	30	13.6
SEA	159-168	QNTVPLETVK	2+	564.8	686.4	y6	11.3	73	25	-
					886.5	y8		72	26	11.8
					347.2	y3		74	32	9.1
					785.5	y7		72	28	8.1
	173-184	NVTVQELDLQAR	2+	693.4	972.5	y8	14.5	86	31	-
					844.5	y7		86	33	45.8
					715.4	y6		86	32	37.5
					602.3	y5		86	36	27.4
SIIS peptide	-	SELQGTALGNLK***	2+	619.8	781.5	y8	13.5	73	32	-
					439.3	y4		78	36	30.7
					724.4	y7		77	31	14.7
					552.4	y5		75	27	14.9

*The relative ion abundance ratio of each product ion for the standard solution (SEA 1000 ng/g)

**Quantification ion

***Heavy-labelld Lysine (K)

Table 5. Trypsin-to-sample protein ratio

Trypsin-to-sample protein ratio	Signal-to-Noise	Area/IS	RSD _r *(%)
1: 25	650	1.11	5.8
1: 50	758	1.02	7.6
1:100	860	0.94	4.2

*RSD of repeatability

Table 6. Validation results for SEA.

Fortification level (ng/g)	Trueness (%)	Precision		LOQ (ng/g)
		RSD _r * (%)	RSD _{WR} ** (%)	
50	82.4	12.7	12.7	10.0
100	79.6	14.1	18.4	

*RSD of repeatability

**RSD of within-laboratory reproducibility