

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「小規模な食品事業者における食品防御の推進のための研究」
分担研究報告書（平成30年度）

国立医薬品食品衛生研究所における人体（血液・尿等）試料中の
毒物の検査手法の開発と標準化（1）

研究分担者 穂山 浩（国立医薬品食品衛生研究所）
研究協力者 田口 貴章（国立医薬品食品衛生研究所）
研究協力者 岡部 信彦（川崎市健康安全研究所）
研究協力者 赤星 千絵（川崎市健康安全研究所）
研究協力者 岸 美紀（川崎市健康安全研究所）

研究要旨

毒物等混入事件時に健康被害が発生した場合の人体（血液・尿等）試料中の毒物の検査方法を開発し標準化するため、本年度は有機リン系農薬 8 種と代謝物 1 種について HPLC 及び LC-MS/MS を用いた分析法について検討した。人体試料のモデルとして、市販のヒト全血と人工尿を用いた。種々の検討の結果、HPLC による尿中農薬分析法として、検出限界尿中濃度 0.25 µg/mL (≒ 250 ppb) のものを確立できた。LC-MS/MS での人体試料中農薬分析法として、血中の検出限界濃度が 10 又は 50 ng/mL、検出限界濃度 10 ng/mL の場合は定量限界濃度 50 ng/mL、尿中の検出限界濃度は 10 ng/mL、定量限界濃度は農薬 1 種を除き 50 ng/mL という方法を確立できた。

A. 研究目的

毒物等混入事件時に健康被害が発生した場合は、食品のみならず曝露された人に対する検査も迅速に行うことが必要であり、これには保健所や行政機関での対応が不可欠である。しかし、人体（血液・尿等）試料中の毒物の検査方法は十分には開発されておらず、また標準化されていないことから、平成30年度は有機リン系農薬及びカルバメート農薬等の農薬を、平成31年度はヒ素及び重金属を、平成32年度はシアン化合物等天然有害物を対象として検査方法の開発と標準化に取り組む予定である。

人体試料中の毒物等、特に農薬等を高感度に分析するには LC-MS/MS や GC-MS/MS が最適だと思われるが、分析機関の通常業務で当該機器を別目的で使用している状態から緊急の分析へ分析法を変更するには時間がかかり、迅速な分析が困難となる可能性が高い。よって、同じ試料に対してもいくつかの分析方法を構築し、その定量限界等を提示することは有用な知見となる。先行研究として、川崎市健康安全研究所にて、ヒト全血及び人工尿に添加した農薬 6 種の GC-FPD (Flame Photometric Detector: 炎光光度検出器) を用いた分析法が検討されていた。この成果も含め、本研究

においては HPLC 及び LC-MS/MS を用いた人体試料中の毒物等検出方法を検討し、図 1 に示す分析フローの作成を目標とした。

B. 研究方法

(1) 対象農薬

H30 年度検討予定の有機リン系農薬及びカルバメート農薬のうち、有機リン系農薬 6 種（ジメトエート (Dmet)・ジクロルボス (DDVP)・マラチオン (MLT)・フェニトロチオン (MEP)・エディフェンホス (EDDP)・プロチオホス (PTF)) 及び代謝物 2 種（ジメチルリン酸 (DMP)・ジエチルリン酸）について、先行研究において既に検討されていた。本研究では上記農薬及び代謝物に、アセフェート (AP)、メタミドホス (MMP) の 2 種と代謝物としてマラオキシソン (MLX) を加えて検討することとした。尚、ジエチルリン酸は購入不能だったため、本研究においては分析対象外とした。

(2) 人体試料

血液はコスモ・バイオ株式会社が販売するヒト全血 A 型（個体別、品番 12081445、450 mL [1 バッグ]）を、国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理審査を受け、条件付き承認を得た後で購入した。購入後、未開封のバッグを 4°C で約 1 か月保管した後、約 50 mL ずつ 10 本のバイアルに分注し、5 本を 4°C で、残り 5 本を -20°C で保管した。使用直前に、冷蔵保管のものから必要量を取り、40°C の水浴で加温してから実験に用いた。

一方、尿は、「JIS T 3214:2011 ぼうこう留置用カテーテル」に記載の組成（表 1）の人工尿を調製し使用した。

(3) HPLC による分析条件検討

対象農薬等のうち Dmet・DDVP・MLT・MEP・EDDP・PTF の 6 種農薬について、各々終濃度 100 µg/mL となるよう調製した混合標準溶液（共にメタノール溶液）を調製し、移動相、グラジエント条件、カラム、注入量等を種々検討した。

人体試料は人工尿のみ用いて前処理法を検討した後、6 種農薬混合標準液を加え定量限界について検討した。

(4) LC-MS/MS による分析条件検討

対象農薬 8 種（MMP・AP・Dmet・DDVP・MLT・MEP・EDDP・PTF）及び代謝物 MLX について、各々終濃度 1 µg/mL となるよう調製した混合標準溶液（共にメタノール溶液）を調製し、移動相、グラジエント条件、カラム、注入量等を種々検討した。

人体試料はヒト全血又は人工尿を用いて前処理法を検討した後、9 種農薬等混合標準液を加え回収率及び定量限界について検討した。

C. 研究結果

(1) HPLC による分析条件

検出器には多波長検出器を用いた。6 種農薬中 4 種は 210 nm の吸光度で検出する必要があるため、移動相には酸等を添加せず検討した。

前処理としてシリンジフィルター又は前処理用限外濾過ユニットの利用を検討したが、低～中極性の化合物がろ過膜に吸着した。少なくとも目視において人工尿は清澄だったため、本検討においては前処理せずに分析し、以下の条件とした。

LC 条件

装置：Acquity UPLC H-Class (Waters)
カラム：Acquity UPLC BEH C18,
2.1 x 100 mm (Waters)
温度：40 °C
移動相：A)水、B)アセトニトリル
グラジエント条件：0 min-5%B,
1 min-5%B, 3 min-45%B,
8 min-45%B, 10 min-95%B,
11 min-95%B, 12 min-5%B,
17 min-5%B
流速：0.3 mL/min
検出器：多波長検出器
測定波長：210 nm (Dmet, DDVP, MLT,
PTF)、260 nm (MEP, EDDP)
注入量：1.5 µL

添加回収試験に相当するものとして、水、人工尿、メタノールに 6 種混合標準原液を添加し、HPLC に注入した。添加後濃度は 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 ng/µL の 6 点とし、それぞれ検量線を作成し比較した (図 2)。

メタノールでは全ての農薬で $r^2=0.99$ 以上の良好な直線性が確認されたが、水では PTF、人工尿では DDVP, MLT, MEP, EDDP, PTF で $r^2=0.99$ を下回る結果となった。特に PTF は、水、人工尿で希釈した同じサンプルを連続で注入してもばらつきが大きく定量は困難であると判断した。DDVP は、人工尿のみ面積値が低く検出された。MLT, MEP, EDDP はメタノール溶液に比べ水、人工尿中ともに、同程度の面積値低下が観察された。

得られた結果から、PTF 以外は、尿中濃度 0.25 µg/mL (≒ 250 ppb) まで検出可能と考えられた。

(2) LC-MS/MS による分析条件

検出器にはタンデム四重極型質量分析計 (MS/MS) を用いた。目的化合物がイオン化すれば検出できるため、分解能向上を意図し移動相にギ酸等を添加した。最終的に、分析装置条件は以下の通りとした。

LC 条件

装置：Acquity UPLC H-Class (Waters)
カラム：Acquity UPLC BEH C18,
2.1 x 100 mm (Waters)
温度：40 °C
移動相：A) 0.1% ギ酸水溶液、B)0.1%
ギ酸含有アセトニトリル溶液
グラジエント条件：0 min-5%B,
1 min-5%B, 3 min-45%B,
8 min-45%B, 10 min-95%B,
11 min-95%B, 12 min-5%B,
17 min-5%B
流速：0.3 mL/min
検出器：多波長検出器
測定波長：210 nm (Dmet, DDVP, MLT,
PTF)、260 nm (MEP, EDDP)
注入量：1.5 µL

MS 条件

装置：Xevo TQ-S micro
イオン化：ESI (+)
Acquisition: MRM
Capillary voltage: 0.75 kV
Cone voltage: 50 V
Desolvation temp.: 600 °C
Desolvation gas flow: 1000 L/Hr
Cone gas flow: 50 L/Hr

定量用 m/z :

MMP:	142.0 → 93.9
AP:	183.9 → 143.0
Dmet:	230.1 → 125.0
DDVP:	221.0 → 109.0
MLX:	315.0 → 98.9
MLT:	331.0 → 127.0
MEP:	278.0 → 109.1
EDDP:	311.0 → 109.0
PTF:	345.1 → 240.9

前処理法を種々検討した結果、「血液又は尿に 2 倍量のメタノールを加えて遠心分離した後、上清を限外濾過ユニット（コスモスピンフィルター H）でろ過して得られる溶液を分析試料とすることとした（図 3）。本処理方法に要する時間は約 25 分であり、十分迅速な調製方法であると考えられる。

添加回収試験を行うに当たり、農薬無添加の血液または人工尿を処理して得られるマトリックスに農薬を 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15, 20 ng/mL の各濃度となるよう加え、マトリックス検量線を作成した。

ヒト全血の検量線の r^2 は MEP, PTF 以外で 0.99 以上、MEP も 0.983 と良好なものが得られた。AP 以外は常に妨害ピークが検出された。妨害ピークの面積値を下回るピークはどの農薬のどの濃度でもなかったが、「妨害ピーク的面積値の 10 倍以上を与える実測濃度を定量限界」とし、Dmet, MEP の定量限界は 20 ng/mL 以上と判断した。また、PTF においては、同じ試料を 2 回分析して得られた面積値のばらつきが大きく良好な直線性を得られず、定量評価は不能であった。よって、本報告における濃度域（2.5 ~ 20.0 ng/mL）において、

Dmet, MEP, PTF は定性分析のみ可能であり、他の農薬等 6 種は定量限界 2.5 ng/mL と判断した。

添加回収試験として、血中濃度が 10 ng/mL 又は 50 ng/mL となるよう 9 種農薬等混合標準品をヒト全血に加え、上記方法で処理して得られた試料を分析した。添加回収試験は一度に 5 回行い、5 回の平均濃度（conc., ng/mL）と並行精度（RSD, %）を求めた。血液の 2 倍量のメタノールを加えるため、100%回収されるとすると試料溶液中の農薬濃度は 3.3 ng/mL となる。この濃度に対する試料溶液中の濃度の割合（%）を回収率とした。

血中濃度 10 ng/mL では、回収率が 0 ~ 58% 程度とかなり低かった（表 2）。特に、DDVP, PTF は算出された濃度が 0 ng/mL を下回ってしまったため、試料中濃度平均を 0 ng/mL とした。MEP は、分析 5 回中 2 回が 0 ng/mL となり並行精度の値が著しく高く算出された。農薬全種類において試料中濃度が検量線の最低濃度（2.5 ng/mL）を下回ったうえ並行精度も良好でなかった。一方、血中濃度 50 ng/mL では、PTF 以外、回収率、並行精度ともに十分な数値を得られた（表 2）。DDVP は回収率が低い傾向が認められるが、MMP, AP, MLX, MLT, EDDP については、本法で得られた試料溶液中に 16.7 ng/mL 前後、あるいはそれ以上の濃度として検出されたならば、その 3 倍の濃度（50 ng/mL 以上）で血中に存在していると想定でき、濃度推定可能と考えられる。

同様に、人工尿検量線は PTF と MEP の r^2 が 0.99 未満だった以外、良好な直線性を得られた。Dmet, MLX, MLT, MEP, EDDP には常に妨害ピークが検出された。妨害ピーク的面積値を下回るピークはどの農薬のどの濃度でもなかったが、「妨

害ピークの面積値の 10 倍以上を与える実測濃度を定量限界とする」ことから、Dmet の定量限界は 10 ng/mL、MEP の定量限界は 15 ng/mL と判断した。また、PTF においては、ヒト全血と同じく面積値のばらつきが大きく良好な直線性を得られず、定量評価は不能であった。よって、本報告における濃度域 (2.5 ~ 20.0 ng/mL) において、PTF は定性分析のみ可能であり、Dmet, MEP の定量限界は上記の通り、他の農薬等 6 種は定量限界 2.5 ng/mL と判断した。

添加回収試験は一度に 5 回行い、5 回の平均濃度 (conc., ng/mL) と並行精度 (RSD, %) を求めた。これら一連の作業を 2 回行った。人工尿の 2 倍量のメタノールを加えるため、100%回収されるとすると試料溶液中の農薬濃度は 3.3 ng/mL 又は 16.7 ng/mL となる。この濃度に対する試料溶液中の濃度の割合 (%) を回収率とした (表 3)。

回収率は、人工尿中濃度が 50 ng/mL であれば PTF 以外 100%前後となったが、10 ng/mL では 61 ~ 88 % であり、血液同様、添加濃度に依存する可能性が示唆された。並行精度は、PTF が両濃度で値が大きいが、前述の通り定量性の保証されない濃度域である。MEP で 3.5%程度と若干大きな値であったが、定量限界 15 ng/mL 付近だからだと考えられる。DDVP, 10 ng/mL の並行精度が 2 回目のみ大きな値を示したが、この理由については今後検証が必要である。これら以外の農薬の並行精度は良好であった。

以上、ヒト全血または人工尿における添加回収試験から得られた各農薬の定量限界及び検出限界を表 4 にまとめた。

D. 考察

本報告では、ODS カラムを用いた分析のみ記載した。代謝物のジメチルリン酸等、高極性農薬については HILIC カラム等、別の LC 分析条件を検討せねばならない。また、前処理方法では回収率が試料中濃度に依存する可能性、及び日間変動が比較的大きい可能性が示唆された。添加濃度の設定値を増やし、試行回数を増やすことでこれらの要因について詳細な検討が必要と考える。HPLC による分析法では前処理をせず、検出限界を尿中濃度 0.25 µg/mL (≒ 250 ppb) と判断したが、LC-MS/MS で確立した方法の血液及び人工尿試料について、多波長検出器での検出限界についても改めて検討したい。また当初の計画ではカルバメート農薬についても H30 年度に分析することとしていたが、LC-MS/MS の導入や実験作業の習熟等に想定以上の時間を要してしまったため、実行できなかった。これらについても H31 年度に検討する。

尚、ある農薬が血中に 50 ng/mL の濃度で検出された場合に、どの程度経口摂取したことになるか、考察する。成人の循環血液量は体重の約 1/13 に相当すると言われている。体重 60kg なら血液 4.6 kg ≒ 4.4 L となるので、血中農薬濃度が 50 ng/mL ならば

$$50 [\text{ng/mL}] \times 4.4 [\text{L}] = 220 [\mu\text{g}]$$

が全身の血液中に存在することになる。経口摂取した農薬の 10%が吸収され、さらに 90%が代謝され残り 10%が親化合物として残る場合、

$$220 [\mu\text{g}] \div 10 [\%] \div 10 [\%] = 22 [\text{mg}]$$

を経口摂取したと概算できる。現実的には、農

薬毎に吸収率、分布・代謝の様式等が異なるうえ、吸収・代謝のそれぞれに時間の要因も加わるため、より複雑な考察が必要になる。また尿に関しては、吸収・分布・代謝に加え排泄に関する知見も必要となるため、人体試料から摂取した農薬の量を推定するのは難しい。とはいえ、農薬摂取による症状の軽重は濃度に依存するため、人体試料中の農薬濃度、特に血中濃度が算出できる方法は非常に有意義である。

E. 結論

H30年度の検討として、有機リン系農薬等9種について、HPLCとLC-MS/MSによるヒト全血及び人工尿の分析法を検討した。

HPLCによる人工尿中農薬分析法として、検出限界を尿中濃度 0.25 µg/mL (≒ 250 ppb) のものを確立できた。

LC-MS/MSでの人体試料中分析法として、血中の検出限界濃度が10又は50 ng/mL、検出限界濃度10 ng/mLの場合は定量限界濃度50 ng/mL、尿中の検出限界濃度は10 ng/mL、定量限界濃度はPTFを除き50 ng/mLという方法を確立できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

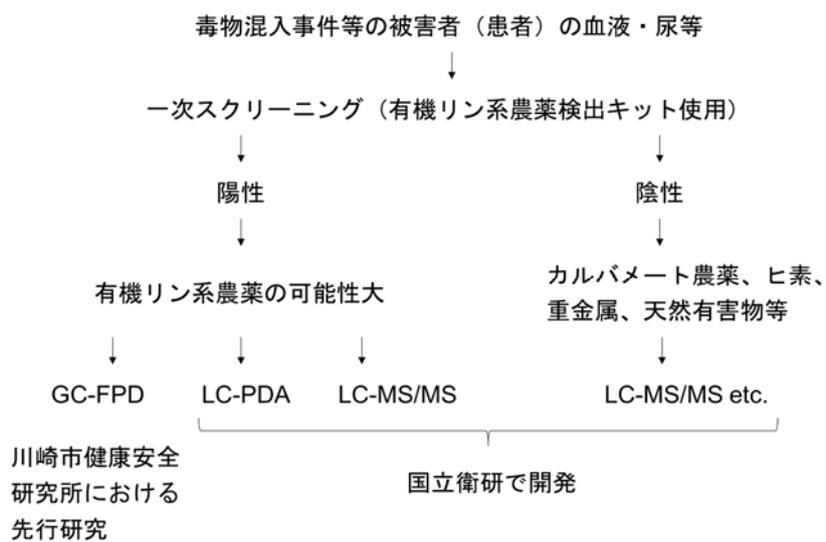


図 1. 本研究成果として作成する人体試料分析フロー（案）

表 1. 人工尿の組成

尿素	25.0 g
塩化ナトリウム	9.0 g
りん酸水素二ナトリウム（無水）	2.5 g
塩化アンモニウム	3.0 g
りん酸二水素カリウム	2.5 g
クレアチニン	2.0 g
亜硫酸ナトリウム（無水）	1.5 g
蒸留水	1.0 L

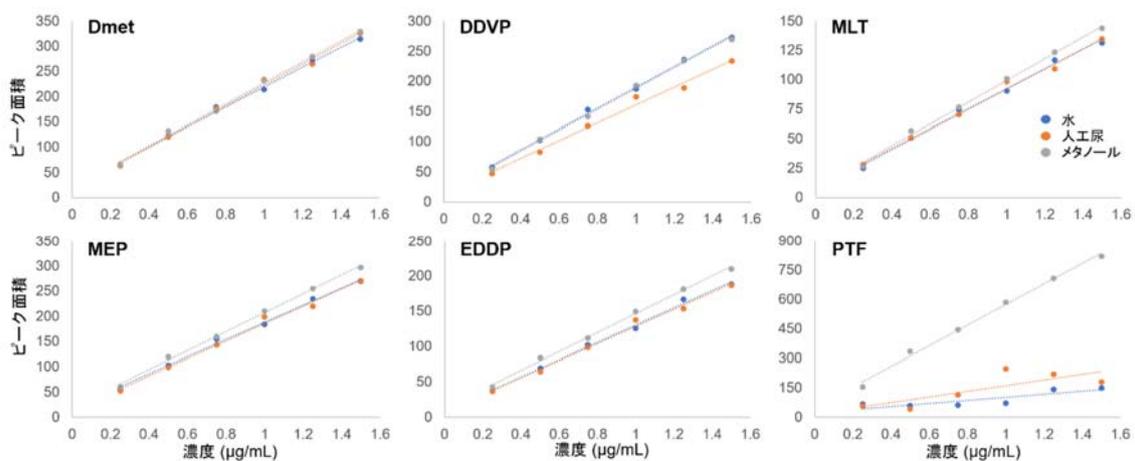


図 2. 水、人工尿、メタノールを用いて作成した農薬 6 種の検量線

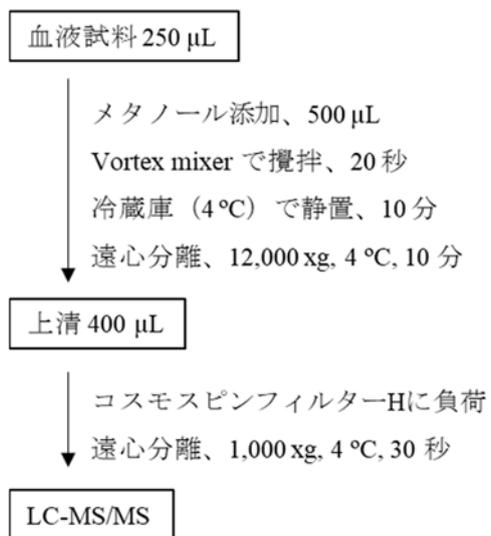


図 3. 血液試料の前処理ワークフロー

表 2. 血液への添加回収試験結果

農薬等	血中濃度 10 ng/mL				検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)
	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)				
MMP	0.998	1.91	57.9	1.7				
AP	0.997	2.17	65.8	1.9				
Dmet	0.998	1.31	39.7	6.8				
DDVP	0.996	0.00	0.0	-				
MLX	0.997	1.38	41.7	2.8				
MLT	0.997	1.92	58.1	3.2				
MEP	0.951	0.59	17.9	90.9				
EDDP	0.997	1.05	31.9	2.2				
PTF	0.987	0.00	0.0	-				

農薬等	血中濃度 50 ng/mL ①				血中濃度 50 ng/mL ②			
	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)
MMP	0.993	18.4	110.4	0.4	0.998	16.4	98.5	1.0
AP	0.990	19.0	113.9	0.8	0.998	17.1	102.7	0.7
Dmet	0.993	16.4	98.4	0.4	0.997	15.5	93.0	0.9
DDVP	0.993	14.4	86.1	0.7	0.998	12.5	75.0	1.6
MLX	0.993	17.2	102.8	1.2	0.997	15.8	94.6	1.5
MLT	0.994	19.9	118.9	0.6	0.998	15.6	93.4	4.0
MEP	0.983	16.5	98.7	2.0	0.984	14.3	85.6	5.7
EDDP	0.993	16.5	98.5	0.7	0.997	14.0	84.0	2.5
PTF	0.964	12.3	73.5	12.0	0.847	7.4	44.3	44.2

塗潰し: $r^2 < 0.99$, 試料中濃度 = 0, 回収率 < 80%, 又は RSD > 2%

表 3. 人工尿への添加回収試験結果

農薬等	人口尿中濃度 10 ng/mL ①				人口尿中濃度 10 ng/mL ②			
	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)
MMP	0.996	2.81	85.3	0.5	0.997	2.90	88.0	1.0
AP	0.993	2.16	65.3	1.1	0.997	2.89	87.5	0.8
Dmet	0.994	2.48	75.2	1.1	0.997	2.87	87.1	1.2
DDVP	0.992	2.20	66.5	1.2	0.997	2.53	76.6	5.5
MLX	0.993	1.85	55.9	1.6	0.996	2.55	77.2	1.3
MLT	0.994	2.06	62.3	1.3	0.997	2.59	78.5	1.7
MEP	0.992	2.65	80.2	12.4	0.989	2.63	79.8	7.9
EDDP	0.993	2.04	61.9	2.4	0.997	2.50	75.8	2.5
PTF	0.980	3.37	102.1	11.2	0.940	2.77	84.0	13.5

農薬等	人口尿中濃度 50 ng/mL ①				人口尿中濃度 50 ng/mL ②			
	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)	検量線 r^2	試料中濃度 平均 (ng/mL)	回収率 真度 (%)	並行精度 (RSD %)
MMP	0.996	17.6	105.3	0.6	0.997	16.7	99.9	0.8
AP	0.993	17.6	105.5	0.4	0.997	17.7	106.0	0.3
Dmet	0.994	17.7	105.8	0.7	0.997	17.6	105.5	0.5
DDVP	0.992	16.4	98.3	0.5	0.997	16.9	101.4	1.7
MLX	0.993	16.1	96.5	0.4	0.996	16.6	99.5	0.7
MLT	0.994	16.7	99.9	0.8	0.997	16.8	100.6	0.9
MEP	0.992	17.1	102.3	3.5	0.989	16.4	98.3	3.4
EDDP	0.993	16.2	96.7	1.1	0.997	15.7	94.3	1.2
PTF	0.980	12.5	74.9	8.3	0.940	11.9	71.4	10.8

塗潰し: $r^2 < 0.99$, 試料中濃度 = 0, 回収率 < 80%, 又は RSD > 2%

表 4. 各農薬の定量限界及び検出限界（血中濃度または人工尿中濃度として）

	血中濃度 (ng/mL)	
	定量限界	検出限界
MMP	50	10
AP	50	10
Dmet	-	10
DDVP	50	50
MLX	50	10
MLT	50	10
MEP	-	10
EDDP	50	10
PTF	-	50
注: 1 ng/mL ≒ 1 ppb		

	人工尿中濃度 (ng/mL)	
	定量限界	検出限界
MMP	50	10
AP	50	10
Dmet	50	10
DDVP	50	10
MLX	50	10
MLT	50	10
MEP	50	10
EDDP	50	10
PTF	-	10
注: 1 ng/mL ≒ 1 ppb		