

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(令和2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

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、本年度はシアン化合物等天然有害物の代表として、シアン配糖体であるリナマリ(キャッサバに含まれる)及びアミグダリン(ピワ、アーモンド等に含まれる)の分析法の開発、並びに前年度に検討したカーバメート系農薬分析法及び重金属分析法の改良検討を行った。シアン配糖体、カーバメート系農薬の分析のための前処理方法は、令和元年度に開発・公表した有機リン系農薬のものと同じとし、LC-MS/MS 条件を最適化することで人体試料中 500 ng/mL のシアン配糖体及び 50 ng/mL のカーバメート系農薬 16 種を検出する方法を開発した。重金属については、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)装置を使用することで、人体試料中 100 ng/mL のヒ素、鉛、及び 6 価クロムを検出する方法を確立した。

A. 研究目的

食品テロ等の毒物等混入事件が発生した場合、地方衛生研究所(地衛研)は保健所等の関係部局との緊密な連携の下、原因解明のため食品のみならず被害者の人体(血液・尿等)試料の検査も迅速に行うことが必要である。しかし、人体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。

毒物等混入事件発生の際には、より迅速かつ簡便な試料調製が重要である。また、通常の実験業務を中断して人体試料分析を開始する必要が想

定されるが、農薬、重金属等、使用された毒物によって適切な分析法が異なることから、比色法等による一次スクリーニングで毒物の種類を大別した後 GC-MS、LC-MS/MS 等による原因物質特定のための分析法を組み合わせ、図 1 に示すような体系的な毒物検査手法を開発し標準化することが必要と考えた。H30 年度有機リン系農薬 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。令和元年度は LC-MS/MS による人体試料中 47 種の有機リン系農薬分析法を開発した他、LC-MS/MS によるカーバメ

ート系農薬 17 種の分析法の検討、並びに、比色法に基づく市販の簡易キットを用いた有機リン系農薬及び重金属の分析法を検討した。令和 2 年度は、研究計画に従いシアン化合物等天然有害物としてシアン配糖体に焦点を当て、キャッサバ等に含まれるリナマリ、ピワ・アーモンド等に含まれるアミグダリンの LC-MS/MS による分析法を検討した。加えて、LC-MS/MS によるカーバメート系農薬 17 種の分析法の改良検討、及び固相抽出又は誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) を用いた重金属の分析法について検討した。

B. 研究方法

(1) 対象化合物、農薬、及び重金属

シアン配糖体はリナマリ及びアミグダリンの 2 種を、カーバメート系農薬はオキサミル等購入可能な 17 種 (表 3) を対象とした。重金属はヒ素 (As、三酸化二ヒ素として)、鉛 (Pb、塩化鉛として)、亜鉛 (Zn、塩化亜鉛として)、六価クロム (Cr⁶⁺、クロム酸カリウムとして) の 4 種について検討した。

(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℃ 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℃ で、残り 5 本を -20℃ 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℃ の水浴で加温してから実験に用いた。

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) シアン配糖体の分析

・前処理法

血液試料又は人工尿試料は、使用直前に 40℃ の水浴で 10 分間加温してから用いた。血液又は人工尿 250 µL をマイクロチューブにとり、2 倍量 (500 µL) のメタノール又はアセトンを加えヴォルテックスミキサーで 20 秒間攪拌した後、冷蔵庫 (4℃) で 10 分間静置した。12,000 ×g, 4℃ で 10 分間遠心分離し、上清の一部をコスモスピンプフィルター H (ナカライテスク社製) にて限外ろ過して得られたろ液を試料溶液として LC-MS/MS 分析に供した。

・分析試料

対象化合物無添加の水、血液、又は人工尿を前処理して得た試料溶液をブランク試料とし、ブランク試料にシアン配糖体各 167 ng/mL となるよう添加したものをマトリックス標準溶液とした。

水、血液、又は人工尿にシアン配糖体各 500 ng/mL となるよう添加したものを前処理し、得た溶液を添加回収試験試料とした (水は空試験)。各試料中のリナマリ、アミグダリン濃度は、絶対検量線法により求めた。

・LC-MS/MS 装置条件

LC 条件

装置: Acquity UPLC H-Class (Waters 社)、
カラム: Acquity UPLC BEH C18 (1.7 µm),

2.1 x 100 mm (Waters 社)、

温度: 40℃、

移動相: A) 0.1% 酢酸水溶液、

B) アセトニトリル

グラジエント : 0 min: 10%B, 5 min: 45%B,

6 min: 95%B, 10 min: 95%B,

11 min: 10%B, 15 min: 10%B

流速: 0.2 mL/min、

注入量: 1.0 μ L。

MS/MS 条件

装置: Xevo TQ-S micro (Waters)、

イオン化: ESI、

Acquisition: MRM モード、

Capillary voltage: 0.4 kV、

Source temperature: 150 °C、

Desolvation temperature: 600 °C、

Cone gas flow: 50 L/hr、

Desolvation gas flow: 1,200 L/hr、

Cone voltage (CV) and Collision energy (CE): マニュアル操作で最適化した。プリカーサーイオン及び定量イオンの m/z は表 3 に示した。

(4) カーバメート系農薬の分析

・前処理法

上述のシアン配糖体分析の方法と同じ。・分析試料対象化合物無添加の水、血液、又は人工尿を前処理して得た試料溶液をブランク試料とし、ブランク試料にカーバメート系農薬各 16.7 ng/mL となるよう添加したものをマトリックス標準溶液とした。

水、血液、又は人工尿にカーバメート系農薬各 50 ng/mL となるよう添加したものを前処理し、得た溶液を添加回収試験試料とした (水は空試験)。各試料中の農薬濃度は、絶対検量線法により求めた。

・LC-MS/MS 装置条件

LC 条件

装置: Acquity UPLC H-Class (Waters 社)、

カラム: Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μ m)、

2.1 x 100 mm (Waters 社)、

温度: 40 °C、

移動相: A) 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液、

B) 5 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液

グラジエント : 0 min: 15%B, 1 min: 40%B、

9 min: 95%B, 14 min: 95%B、

15 min: 15%B, 20 min: 5%B

流速: 0.2 mL/min、

注入量: 1.5 μ L。

MS/MS 条件

装置: Xevo TQ-S micro (Waters)、

イオン化: ESI (+)、

Acquisition: MRM モード、

Capillary voltage: 0.75 kV、

Source temperature: 150 °C、

Desolvation temperature: 600 °C、

Cone gas flow: 50 L/hr、

Desolvation gas flow: 1,000 L/hr、

Cone voltage (CV) and Collision energy (CE):

Quanpedia (Waters 社)に登録の条件、又は IntelliStart (Waters 社)で最適化した条件を使用。プリカーサーイオン及び定量イオンの m/z は表 2, 3 に示した。

(5) 人工尿中ヒ素又は 6 価クロムの固相抽出と水質検査用簡易キットによる分析

・前処理法

水又は人工尿試料は、使用直前に 40 °C の水浴で 10 分間加温してから用いた。水又は人工尿 250 μ L をマイクロチューブにとり、1,000 μ L の 100 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.5) を加えヴォルテックスミキサーで 30 秒間攪拌した。12,000 \times g, 4 °C で分間遠心分離し、上清全量を、予め 3 mol/L 硝酸 5 mL、水 5 mL、100 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.5) 5 mL でコンディショニングした InertSep ME-2 カラム (30 mg/1 mL) に負荷し、通過液を回

収した。遠心分離後沈殿に 500 μ L の 100 mM 酢酸アンモニウムを加えヴォルテックスミキサーで 30 秒間攪拌した。12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C で分間遠心分離し、上清全量を、上の InertSep ME-2 カラムに負荷し、通過液を回収し 1 回目通過液と合わせた。InertSep ME-2 カラムを 100 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.5) 1 mL で洗浄した後、3 mol/L 硝酸 2 mL と 1 mL で順次溶出し、溶出液を合わせた。

・分析試料

水または人工尿にヒ素又は 6 価クロムを 10 μ g/mL (= 10 ppm)となるよう添加したものを人体試料とした。ヒ素の分析には、InertSep ME-2 の通過液に水を加え 30 mL に定容したものを試料溶液とした。6 価クロムの分析には、InertSep ME-2 の溶出液に水を加え 5 mL に定容したものを試料溶液とした。(水は空試験。)

対象重金属を添加しない人工尿を同様に前処理して得た通過液 (ヒ素) または通過液 (6 価クロム) に、ヒ素又は 6 価クロムの標準溶液 (100 mg/L) 25 μ L を加え水で定容したものを人工尿マトリックス標準溶液とした。各試料中の金属濃度は、絶対検量線法により求めた。

・比色分析

定量分析には、パックテストヒ素 (低濃度) 又はパックテスト 6 価クロム、並びにパックテスト専用の分光光度計、デジタルパックテスト・マルチ SP を用いた (いずれも共立理化学研究所製)。

(6) 血液中ヒ素の分析法検討

・前処理法

水又は血液試料は、使用直前に 40 $^{\circ}$ C の水浴で 10 分間加温してから用いた。水又は血液 250 μ L をマイクロチューブにとり 2 倍量 (500 μ L) のメタノールを加えヴォルテックスミキサーで 20 秒

間攪拌した後、冷蔵庫 (4 $^{\circ}$ C) で 10 分間静置した。12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離し、上清を全量、ナスフラスコに移した。ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した後、水 29 mL を加え、1 分間の超音波処理後、ポア径 0.45 μ m のシリンジフィルターでろ過したものを水で 29 mL に定容し、パックテストの試料溶液とした。

・分析試料

水又は血液にヒ素 10 μ g/mL となるよう添加したものを前処理し、得た溶液を添加回収試験試料とした (水は空試験)。各試料中のヒ素濃度は、絶対検量線法により求めた。

・比色分析

定量分析には、パックテストヒ素 (低濃度)、及びデジタルパックテスト・マルチ SP を用いた。

(7) 重金属の ICP-MS による分析

・前処理法

水又は人工尿試料は、使用直前に 40 $^{\circ}$ C の水浴で 10 分間加温してから用いた。水又は人工尿 200 μ L を石英製分解容器に量りとり、硝酸 (1.42) 5 mL、過酸化水素水 2 mL を加えた。試料を含む石英製分解容器を TFM 製分解容器に入れ、マイクロ波分解装置で分解した。放冷後、試料溶液をポリプロピレン製容器に移し、内部標準溶液を加え、水で 50 mL に定容し試料溶液として ICP-MS 分析に供した。

・分析試料

ヒ素、鉛、6 価クロムを含む金属混合標準溶液無添加の水、血液試料、又は人工尿試料を前処理して得た試料溶液をブランク試料とし、ブランク試料の調製途中で金属混合標準溶液を各 4 ng/mL となるよう添加したものをマトリックス標準溶液とした。

水、血液試料、又は人工尿試料に金属混合標準溶液を各 100 ng/mL となるよう添加したものを前処理し、得た溶液を添加回収試験試料とした（水は空試験）。各試料中の農薬濃度は、内部標準法により求めた。

C. 研究成果

(1) シアン配糖体の分析

水試料（空試験）、血液試料、尿試料から、メタノール又はアセトンを用いた添加回収試験の結果を表 1 に示した。また、試料マトリックスの測定への影響について検討するため、添加回収試験における回収率 100%相当濃度（167 ng/mL）に調製したマトリックス添加標準溶液を測定し、その実測値の回収率 100%相当濃度に対する比をマトリックス効果として評価した（表 1）。

リナマリンは、メタノールで抽出すると水試料の回収率 97.1%、並行精度 5.6%と良好な結果であり、マトリックス効果も 1.03 であり抽出操作による測定への影響はないと判断された。しかし、血液試料、尿試料の回収率はそれぞれ 32.7%、32.1%と低く、並行精度もそれぞれ 19.6%、15.1%であったことから、人体試料中濃度の正確な定量は困難であることが示唆された。マトリックス効果はそれぞれ 0.27、0.33 と低い値であり、回収率の低さは人体試料に含まれる成分によると考えられる。

これに対してアセトン抽出では、水試料、血液試料、尿試料すべての回収率が 0%であり、いずれのマトリックス添加標準溶液からもリナマリンを検出することはできなかった。よって、リナマリンの検出にアセトンは適用不可と判断した。

アミグダリンは、メタノールでの回収率は水試料 100.6%、血液試料 66.0%、尿試料 57.5%であり、並行精度はいずれも 5.0%以下であった。メタノー

ル抽出でも、人体試料からの回収率が低かったが、マトリックス効果（それぞれ 0.99、0.59、0.55）によるものと考えられた。

アセトンでの回収率は水試料 111.3%、血液試料 82.3%、尿試料 57.1%であり、並行精度はそれぞれ 5.2%、2.4%、2.9%、マトリックス効果はそれぞれ 1.06、0.71、0.56 であり、メタノールより高感度に検出できることが示唆された。

尚、回収率真度をマトリックス効果で除した補正真度を表 2 に示した。リナマリンのアセトン抽出を除き、補正真度は 94.3~121.1%であった。人体試料中成分の他に、測定を妨害する要因はないと考えられる。

(2) カーバメート系農薬の分析

水試料（空試験）、血液試料、尿試料から、メタノールを用いた添加回収試験の結果を表 4 に、アセトンを用いての結果を表 5 に示した。また、試料マトリックスの測定への影響について検討するため、添加回収試験における回収率 100%相当濃度（16.7 ng/mL）に調製したマトリックス添加標準溶液を測定し、その実測値の回収率 100%相当濃度に対する比をマトリックス効果として評価した（表 4, 5）。

水試料からの回収試験（空試験）は、保持時間が 10 分以降の 4 種の回収率が 70%未満となったが、その他 13 種の回収率は 97.8 から 104.1%であった（表 4）。水からメタノールで前処理して得た空試験試料のマトリックス効果は 17 種すべて 0.91 から 1.05 の範囲であり、溶媒混合標準溶液中の強度と同程度であった。

血液試料の添加回収試験での回収率は、メソミルが 164.1%でチオジカルブは 0%であった。空試験で回収率の低かった 4 種、アラニカルブ、ベン

フラカルブ、フラチオカルブ、カルボスルファンはそれぞれ 96.9%、95.7%、13.4%、66.8%であり、その他は 94.7%から 103.7%の範囲の値であった。アラニカルブ、ベンフラカルブはと良好な回収率であり、カルボスルファンも 70%未満であったものの、空試験の回収率よりは高かったが、フラチオカルブのみ、空試験よりさらに低い回収率となった(表 4)。血液試料のマトリックス効果は、メソミルが 1.66 と高かった一方、チオジカルブが 0.04 と極めて低い値で、フラチオカルブも 0.78 と低かった。他は 0.92 から 1.07 の範囲に収まった。

尿試料からの回収率は、チオジカルブ、ベンフラカルブ、フラチオカルブ、カルボスルファンがそれぞれ 53.2%、60.5%、52.1%、39.0%であったが、他は 82.2%から 119.5%の範囲であった。アラニカルブを含む、空試験で回収率の低かった 4 種すべて、空試験より高い回収率であった(表 4)。尿試料のマトリックス効果は、チオジカルブが 0.73 と少し低かったが、他は 0.92 から 1.11 の範囲に収まった。

カルバメート系農薬には、メタノールよりアセトンに易溶なものがあること、並びに、生化学研究での酵素精製においてアセトン沈殿による濃縮操作を行うことがあることから、抽出溶媒としてアセトンについても検討した。

水試料からの回収試験(空試験)では、メタノール抽出と同様、保持時間が 10 分以降のアラニカルブ、ベンフラカルブ、フライオカルブ、カルボスルファンはそれぞれ 70.2%、38.3%、44.3%、22.5%であり、98.7%から 113.7%の範囲の値となった他の化合物に比べると低い回収率であったが、メタノール抽出より高い値となった(表 5)。水からアセトンで前処理して得た試料のマトリックス効果は 1.16 から 1.26 であり、17 種全てのカ

ーバメート系農薬の強度が、溶媒混合標準溶液中の強度の 1.2 倍程度に増強され、回収率の高さと相関が認められた。

血液試料からの回収率は、0%であったチオジカルブを除くと 921%から 200.0%の範囲となり、13 種化合物が 120%を超える結果となった。特にメソミルは 200%と極めて高い回収率が示された(表 5)。血液試料をアセトンで前処理したもののマトリックス効果は、メソミルが 1.29 と高く、チオジカルブは 0.99、カルボスルファンが 0.96 と低かったが、他は 1.13 から 1.25 の範囲の値であり、メタノール抽出ほど大きな差異ではなかった。

尿試料からの回収率は空試験の回収率と類似の傾向があり、ベンフラカルブ、フラチオカルブ、カルボスルファンがそれぞれ 64.1%、62.6%、36.4%と低値であったが、アラニカルブを含む他の 14 種は 88.2%から 112.1%の範囲であった(表 5)。尿試料のマトリックス効果はオキシミルが 1.05 と低く、カルボスルファンが 1.35 と高かった。他は 1.11 から 1.26 の範囲に収まった。

(3) 人工尿中ヒ素又は 6 価クロムの固相抽出と水質検査用簡易キットによる分析

令和元年度の検討において、ヒ素、鉛、亜鉛、6 価クロムのための水質検査用簡易キット「パックテスト」の血液試料又は尿試料への適用可否を検討したが、血液試料は全て適用不可、尿試料は 6 価クロムのみ不可と判断した。令和 2 年度は、無機元素分析用キレート樹脂を用いた固相抽出とパックテストを組み合わせた分析法を検討した。

血液試料は、多検体同時処理用器具での操作中、人体試料が器具内に飛散してしまうことが判明したため、感染リスクの上昇を危惧し、本検討方

法の使用は不可とした。

尿試料は、多検体同時処理用器具での操作中に試料が飛散することはなかった。鉛及び亜鉛は、固相抽出における溶出液が、パックテストの呈色を妨害することが判明し、使用不可と判断した。

ヒ素の水試料からの回収率は 100.8%であったが、並行精度は 17.3%と良好でなかった(表 6)。尿試料からの回収率は 123.3%と水試料より高い値だったが、マトリックス効果は 1.26 であり、補正回収率は 97.9%と、並行精度 5.0%と合わせて良好な結果判断した。

6 価クロムの本検討方法による水試料からの回収率は 42.7%と低かった(表 6)。尿試料からの回収率は 25.3%とさらに低く、マトリックス効果 0.79 で補正しても 32.0%であった。

(4) 血液中ヒ素の分析法検討

血液試料を固相抽出で精製できなかったため、農薬やシアン配糖体の分析における前処理方法の改変を、ヒ素を対象として試みた。

血液 250 μ L に 2 倍量のメタノールを加え、遠心分離後の上清をロータリーエバポレーターで減圧留去し溶媒を除去した後、残渣を 29 mL の水に溶解する方法を考案し検討したが、水試料からの回収(空試験)でさえ回収率 77.5%、並行精度 19.2%と良好でなく、血液試料からの回収率は 19.3%、並行精度は 22.5 とさらに不良な結果となった。なお、溶媒留去後に加えた水の量(29 mL)は、パックテストの仕様に基づいて設定した。

(5) 重金属の ICP-MS による分析

誘導結合プラズマ質量分析法(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry、ICP-MS)は、アルゴンガスに高周波電力を印可して生成した誘導

結合プラズマ(Inductively Coupled Plasma)をイオン源に用い、プラズマによってイオン化された試料中の元素を質量分析計(MS)によって分離、検出する元素分析のための手法である。装置は高額であるが、様々な分野で汎用されている金属元素分析法であり、微量分析も可能であることから、人体試料中ヒ素、鉛、6 価クロムの分析を検討した。

ヒ素は、水試料、血液試料、尿試料のブランク試料からそれぞれ 0.7、0.9、0.3 ng/mL と極微量検出されたため、添加回収試験試料及びマトリックス添加標準溶液の測定値からブランク試料の濃度を引いた値を分析値とした。水試料(空試験)からの回収率は 99.7%、並行精度 3.5%であり、血液試料からは回収率 102.7%、並行精度 3.1%、尿試料からは回収率 102.2%、並行精度 3.1%と良好な結果であった(表 8)。マトリックス効果は 1.14 ~ 1.21 であり、わずかに感度が増強される傾向が認められた。

鉛は、水試料、血液試料、尿試料のブランク試料からそれぞれ 3.3、54.6、6.9 ng/mL の濃度で検出されたため、添加回収試験試料及びマトリックス添加標準溶液の測定値からブランク試料の濃度を引いた値を分析値とした。水試料(空試験)からの回収率は 98.2%、並行精度 2.7%であり、血液試料からは回収率 93.6%、並行精度 10.2%、尿試料からは回収率 94.2%、並行精度 3.4%であり、血液試料の並行精度が不良であった(表 8)。マトリックス効果は 1.10 ~ 1.13 であり、わずかに感度が増強される傾向が認められた。

6 価クロムは、水試料、血液試料、尿試料のブランク試料からそれぞれ 1.9、4.4、5.6 ng/mL の濃度で検出されたため、添加回収試験試料及びマトリックス添加標準溶液の測定値からブランク試

料の濃度を引いた値を分析値とした。水試料（空試験）からの回収率は 101.7%、並行精度 5.9%であり、血液試料からは回収率 98.8%、並行精度 6.1%、尿試料からは回収率 94.9%、並行精度 8.2%であり、並行精度がヒ素、鉛より高かった（表 8）。マトリックス効果は 1.10～1.13 であり、わずかに感度が増強される傾向が認められた。

D. 考察

(1) シアン配糖体の分析

水試料（空試験）、血液試料、尿試料から、メタノール又はアセトンを抽出溶媒としてリナマリン及びアミグダリンの添加回収試験を実施した（表 1）。人体試料からのリナマリンの抽出にアセトンは使用不可であることが判明した。メタノールは抽出溶媒として使用可能であるものの、回収率は低く、並行精度も良好でなかったが、それは血液試料または尿試料中成分のマトリックス効果によるリナマリンの分解、又はイオン化抑制によるものであり、補正真度が 121.1%、97.3%であることから（表 2）、その他に測定を妨害する要因はないと考えられる。よって、人体試料中 500 ng/mL 程度であれば、メタノール抽出によりリナマリンを検出可能と判断した。

一方、人体試料中のアミグダリンは、アセトン、メタノールどちらでも抽出可能であった（表 1）。絶対検量線法による回収率は 57.1～82.3%と低めであったが、マトリックス効果も 0.55～0.71 であり、リナマリンより影響は小さいものの、血液試料または尿試料中成分のマトリックス効果によるリナマリンの分解、又はイオン化抑制が起こっていると推測される。並行精度、補正真度は良好であり、人体試料中 500 ng/mL 程度であれば、メタノールまたはアセトン抽出によりアミグダリ

ンを検出可能と判断した。

以上、シアン配糖体であるリナマリン及びアミグダリンを、血液・尿等人体試料から検出する方法を検討し、人体試料中 500 ng/mL であれば検出可能な方法を確立したが、リナマリンはアセトンで検出不可であることが判明したため、両成分を同時に分析する必要がある場合はメタノール使用が望ましいと判明した。

(2) カーバメート系農薬の分析

メタノール抽出、アセトン抽出共に、血液試料中チオジカルブは不検出で、メソミル回収率は 164.1%又は 200.0%であった。チオジカルブは、硫黄原子を介してメソミルが二量化した化合物であり（図 1）、チオジカルブは血中でメソミルに分解されることが強く示唆された。食品中の残留農薬試験法の公定法である個別試験法「チオジカルブ及びメソミル試験法（農産物）」においても、「チオジカルブ及びメソミルをメソミルオキシムに変換した後、（中略）メソミルに換算した値を分析値とする。」とあることから、チオジカルブを 2 分子のメソミルとして濃度換算し、メソミルの分析値との合算として算出した（表 4、5、最下段）。この結果、回収率は 85.7～104.4%となり良好な値となったが、血液試料、尿試料共に、メタノールはアセトンより回収率が低かった。また、血液試料からメソミルが検出された場合は、チオジカルブも原因物質として疑う必要があることも判明した。尚、尿試料中チオジカルブは検出されてはいるが、経口摂取された場合、血中ですべてメソミルに変換され、尿試料からは回収されないと考えられる。

チオジカルブをメソミルに換算して合算すると、メタノール抽出の回収率は血液 13.4～103.7%、

人工尿 39.0~106.2%、アセトン抽出では血液 92.1~133.9%、人工尿 36.4~112.1%となる。アセトンの回収率がメタノールより高いのは、アセトンによるイオン化促進効果によると考えられる。これは、水試料のマトリックス効果が高いことから支持される。

本検討での LC 条件で保持時間が 10 分未満の農薬の回収率は良好であるが、10 分以上のアラニカルブ、ベンフラカルブ、フラチオカルブ、カルボスルファンの回収率が低かった。水試料からの抽出でも回収率が低いことから、マイクロチューブや限外ろ過膜への吸着の可能性が考えられるが、人体試料からの抽出は水試料からの抽出より回収率が高くなった。特に、血液試料からアセトンで抽出すると回収率が飛躍的に高まったことから、緊急時の分析では、メタノールよりアセトンの使用が望ましいと考えられる。

(3) 人工尿中ヒ素又は 6 価クロムの固相抽出と水質検査用簡易キットによる分析

ヒ素は、尿試料からの回収率が水試料からの回収率より高かったが、これは、ヒ素検出用パックテストの原理上、リン酸イオンも呈色してしまうことに依る。補正回収率は 97.9%であり数値としては良好ではあるが、添加濃度が 10 ppm と高い。パックテストではこの濃度が限度であるため、より低濃度でも検出できる方法の確立が望ましい。6 価クロムは本検討方法で検出できたものの、回収率が 25.3%、マトリックス効果で補正しても 32.0%と低く、改善が必要であった。

(4) 血液中ヒ素の分析法検討

本検討方法にて、水試料、血液試料からヒ素を検出できたものの、回収率は 77.5%、19.3%と低かつ

た。また並行精度が両試料とも 20%前後であり、分析値のばらつきが非常に大きかった。これには、ロータリーエバポレーターでの濃縮操作が一因として考えられる。非常事態時の操作ということ を考慮し、ロータリーエバポレーターを使用しない方法を確立し、回収率及び並行精度を向上させる必要があると判断した。

(5) 重金属の ICP-MS による分析

ICP-MS を用いることで、ヒ素、鉛、6 価クロムを 100 ng/mL の濃度で添加した水試料、血液試料、尿試料から、回収率 93.6~102.7%、並行精度 2.7~10.2%で対象金属を検出できた (表 8)。また、回収率をマトリックス効果で除した補正回収率は表 9 に示した。金属 3 種、試料 3 種合わせて 84.1~90.0%の回収率であり、人体試料中 100 ng/mL のヒ素、鉛、6 価クロムは十分に検出可能であると判断された。

本検討方法において、試料調製にかかる時間は 1 試料あたり約 10 分、マイクロ波分解に 36 分、分解後放冷に 1 時間、ICP-MS の分析時間は 1 試料当たり 15 分であり、合計すると約 2 時間となる。テロ等の緊急事態における原因物質究明という目的からすると、放冷時間を短縮するなど、より短時間で分析結果を得られるよう、改善する必要がある。

ブランク試料の分析において、ヒ素は 0.3~0.9 ng/mL、6 価クロムは 1.9~5.6 ng/mL 検出されたのに対し、鉛の水試料、尿試料中濃度は 3.3、6.9 ng/mL であったが血液試料中濃度は 54.6 ng/mL と他の試料より高濃度で検出された。臨床的知見として、血中鉛濃度が 10 µg/dL (= 100 ng/mL)程度から、ヘム合成に関わる δ-アミノレブリン酸脱水酵素 (ALAD) 活性の阻害が生じ、50~80 µg/dL 以

上になると倦怠感、胃腸障害、抹消神経障害が出るとされている（出典：「臨床検査項目辞典」医歯薬出版株式会社）。テロ事件等の被害者の普段の生活状況によって、血中鉛濃度は高めに出る可能性があること、及び個人差が大きい可能性に留意すべきと考えられる。

E. 結論

令和2年度は、LC-MS/MSによる血液・尿等人体試料中のシアン配糖体、及びカーバメート系農薬の分析法と、ICP-MSによる人体試料中のヒ素、鉛、6価クロムの検出法を検討した。シアン配糖体とカーバメート系農薬は、令和元年度に検討した有機リン系農薬と同様の前処理法とし、人体試料中500 ng/mLのシアン配糖体2種と、50 ng/mLのカーバメート系農薬16種を検出できる方法を確立した。ヒ素、鉛、6価クロムはICP-MSを使用することで人体試料中100 ng/mLの濃度を検出できることを確認した。

有機リン系農薬、カーバメート系農薬、シアン配糖体の前処理方法は同じとしたが、シアン配糖体2種のうち、リナマリンはアセトンで抽出できずメタノールを用いることが望ましいと判明したのに対し、カーバメート系農薬は、メタノールよりアセトンで抽出する方が高感度に検出可能ということが明らかとなった。テロ等事件発生時に、短時間で原因物質を特定できるよう、個々に開発した分析法は可能な限り統合することが望ましいと考えられる。有機リン系農薬、カーバメート系農薬、シアン配糖体については、他の溶媒での抽出効率の検討も今後の課題となる。

重金属については、水質検査用簡易キットを用いる分析方法の開発は困難であった。一方、ICP-MSの仕様により簡便で高感度な分析方法を確立

できたが、前処理に2時間かかることから、前処理に要する時間の短縮が今後の課題である。

尚、本研究課題においてシアン配糖体を検討したが、シアン化合物で毒物として用いられる可能性が最も高いのはシアン化ナトリウム及びシアン化カリウムである。これらについても、今後検討することが課題と考える。

本研究で確立したLC-MS/MSによる血液・尿等人体試料中の有機リン系農薬の一斉分析法の論文の最終原稿を国立医薬品食品衛生研究所のホームページの下記URLから公開している。

(<http://www.nihs.go.jp/food/group3/JintaiShiryouKensaJouhou/JintaiShiryouKensa-Jouhou.html>) から公開した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 田口貴章、山下涼香、成島純平、岸美紀、赤星千絵、岡部信彦、穂山浩. 食品テロ対策のためのLC-MS/MSによる血液・尿等人体試料中の有機リン系農薬の一斉分析法の検討. 日本食品化学学会誌. Vol. 27(1), 33-39, 2020

2. 学会発表

1. 田口貴章、難波樹音、山下涼香、岸美紀、赤星千絵、岡部信彦、穂山浩. 食品テロ対策のためのLC-MS/MSによる血液・尿等人体試料中のカーバメート系農薬の一斉分析法の検討. 日本食品衛生学会. 第116回食品衛生学会学術講演会. 2020年11月. 長崎 (Web開催)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

表 1. 人体試料中リナマリン及びアミグダリンの添加回収試験結果

抽出溶媒	化合物	水			血液			尿		
		回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果
メタノール	リナマリン	97.1	5.6	1.03	32.7	19.6	0.27	32.1	15.1	0.33
	アミグダリン	106.0	5.0	0.99	66.0	3.8	0.59	57.5	2.6	0.55
アセトン	リナマリン	0.0	-	0.00	0.0	-	0.00	0.0	-	0.00
	アミグダリン	111.3	5.2	1.06	82.3	2.4	0.71	57.1	2.9	0.56

表 2. 人体試料中リナマリン及びアミグダリンの補正回収率

抽出溶媒	化合物	補正回収率		
		水	血液	尿
メタノール	リナマリン	94.3	121.1	97.3
	アミグダリン	107.1	111.9	104.5
アセトン	リナマリン	-	-	-
	アミグダリン	105.0	115.9	102.0

表 3. カーバメート系農薬 17 種の定量イオンと保持時間等

	定量イオン (m/z)		保持 時間 (分)	移動相 強度 比較 ^a
	Precursor	Product		
オキサミル	237.0	72.0	3.7	2.1
メソミル	162.9	88.0	3.9	1.9
メトルカルブ (MTMC)	166.0	109.0	6.5	1.5
プロボキスル	210.1	110.9	6.9	1.8
ベンダイオカルブ	224.1	109.0	7.0	2.4
カルパリル	202.0	145.0	7.3	7.1
チオジカルブ	355.1	88.1	7.4	3.8
MPMC	180.2	132.2	7.4	2.5
エチオフェンカルブ	226.1	107.0	7.6	3.8
XMC	180.3	123.2	7.6	1.9
ピリミカーブ	239.1	72.0	7.8	1.3
イソプロカルブ (MIPC)	194.1	95.1	8.0	1.8
フェノブカルブ (BPMC)	208.0	94.9	8.8	1.4
アラニカルブ	400.1	238.1	10.2	1.3
ベンフラカルブ	411.1	195.0	11.3	0.65
フラチオカルブ	383.3	195.2	11.4	2.7
カルボスルファン	381.0	118.0	13.5	0.85

a: 5 mM ギ酸アンモニウム含有水-メタノール系で作成した検量線の傾きを、0.1% ギ酸含有水-アセトニトリル系で作成した検量線の傾きで除した値。

b: マトリックス標準溶液中のピーク面積値を溶媒混合標準溶液中のピーク面積値で除した値。

表 4. 人体試料中カーバメート系農薬のメタノール抽出による添加回収試験結果

	水			血液			尿		
	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果
オキサミル	100.2	6.6	0.94	95.5	10.7	0.94	96.3	7.0	0.92
メソミル	104.1	9.6	0.91	164.1	8.3	1.66	119.5	10.4	1.02
メトルカルブ (MTMC)	102.0	7.8	0.93	99.9	16.6	1.05	105.1	8.5	1.02
プロポキスル	101.8	6.8	0.95	102.6	13.9	1.05	106.2	8.8	1.05
ベンダイオカルブ	97.8	7.6	0.94	94.7	13.2	1.03	97.1	7.7	1.00
カルバリル	101.6	7.8	0.96	98.1	17.0	1.05	104.1	8.5	1.03
チオジカルブ	92.5	9.7	0.95	0.0	-	0.04	53.2	10.5	0.73
MPMC	99.7	5.5	0.96	98.9	11.7	1.05	103.5	7.8	1.05
エチオフェンカルブ	99.1	7.5	0.92	99.0	12.5	1.04	95.5	3.7	1.02
XMC	100.1	5.8	0.97	100.1	9.8	1.06	103.2	6.9	1.06
ピリミカーブ	98.4	7.0	0.92	103.7	16.9	1.01	102.7	9.3	1.02
イソプロカルブ (MIPC)	99.9	6.2	0.98	98.0	13.6	1.03	104.0	8.6	1.04
フェノブカルブ (BPMC)	103.8	4.5	0.93	96.0	15.2	1.02	105.9	12.0	1.02
アラニカルブ	60.9	32.1	0.93	96.9	15.6	1.07	82.2	25.5	1.03
ベンフラカルブ	37.1	28.3	0.96	95.7	6.2	1.05	60.5	36.1	1.11
フラチオカルブ	42.0	30.6	0.98	13.4	37.0	0.78	52.1	19.8	1.03
カルボスルファン	16.6	9.6	1.05	66.8	21.9	0.92	39.0	33.3	1.06
メソミル+チオジカルブ ^a	98.6	9.6	-	85.7	8.3	-	87.8	9.9	-

a: チオジカルブ濃度をメソミル濃度に換算し、メソミル濃度と合算して算出した回収率。

表 5. 人体試料中カーバメート系農薬のアセトン抽出による添加回収試験結果

	水			血液			尿		
	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果	回収率 真度 (%)	並行精度 RSD (%)	マトリックス 効果
オキサミル	109.4	8.2	1.17	116.7	5.4	1.15	103.1	7.1	1.05
メソミル	113.7	4.7	1.16	200.0	8.9	1.29	110.5	8.7	1.11
メトルカルブ (MTMC)	106.9	5.3	1.20	122.1	7.2	1.21	109.8	8.2	1.19
プロポキスル	108.8	6.1	1.21	123.7	6.8	1.22	109.8	6.6	1.20
ベンダイオカルブ	104.7	5.4	1.19	118.2	7.7	1.20	106.5	7.1	1.19
カルバリル	107.8	6.1	1.20	120.7	11.3	1.19	112.1	8.4	1.19
チオジカルブ	98.7	10.2	1.18	0.0	-	0.99	97.5	8.6	1.17
MPMC	105.5	5.6	1.22	122.9	5.1	1.21	108.5	6.9	1.20
エチオフェンカルブ	104.4	5.2	1.18	123.1	8.1	1.21	110.1	8.5	1.20
XMC	106.4	6.2	1.22	123.4	6.1	1.21	108.3	5.1	1.20
ピリミカーブ	102.4	5.2	1.17	125.2	8.6	1.18	107.0	11.7	1.18
イソプロカルブ (MIPC)	105.7	4.0	1.21	120.5	7.9	1.20	107.6	7.6	1.21
フェノブカルブ (BPMC)	110.1	7.2	1.17	120.9	5.4	1.25	107.9	9.8	1.26
アラニカルブ	70.2	26.9	1.21	122.4	17.0	1.14	88.2	15.2	1.16
ベンフラカルブ	38.3	35.4	1.24	133.9	14.2	1.13	64.1	49.8	1.16
フラチオカルブ	44.3	31.6	1.24	92.1	7.1	1.25	62.6	20.4	1.22
カルボスルファン	22.5	21.6	1.26	101.7	10.4	0.96	36.4	25.8	1.35
メソミル+チオジカルブ ^a	106.5	6.9	-	104.4	8.9	-	104.3	8.6	-

a: チオジカルブ濃度をメソミル濃度に換算し、メソミル濃度と合算して算出した回収率。



図 1. メソミル (左) とジチオカルブ (右) の構造.

左: メソミル ($C_5H_{10}N_2O_2S$)、分子量 162.21 g/mol、

右: ジチオカルブ ($C_{10}H_{18}N_4O_4S_3$) 分子量 354.47 g/mol.

表 6. 固相抽出とパックテストの組合せによるヒ素、クロムの添加回収試験結果

化合物	水			尿			
	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a	マトリックス 効果	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a	マトリックス 効果	補正回収率 (%)
ヒ素	100.8	17.3	-	123.3	5.0	1.26	97.9
6価クロム	42.7	5.4	-	25.3	9.1	0.79	32.0

表 7. 血液試料からのヒ素の添加回収試験結果

化合物	水		血液	
	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a
ヒ素	77.5	19.2	19.3	22.5

表 8. ICP-MS による人体試料中ヒ素、鉛、6 価クロムの添加回収試験結果

化合物	水			血液			尿		
	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a	マトリックス 効果	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a	マトリックス 効果	回収率 真度 (%) ^a	並行精度 RSD (%) ^a	マトリックス 効果
ヒ素	99.7	3.5	1.14	102.7	3.1	1.20	102.2	3.1	1.21
鉛	98.2	2.7	1.13	93.6	10.2	1.10	94.2	3.4	1.12
6価クロム	101.7	5.9	1.13	98.8	6.1	1.10	94.9	8.2	1.13

a: n = 4.

表 9. 人体試料中ヒ素、鉛、6 価クロムの補正回収率

化合物	補正回収率		
	水	血液	尿
ヒ素	87.5	85.6	84.5
鉛	86.9	85.1	84.1
6価クロム	90.0	89.8	84.0