

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)
「新型コロナウイルス感染症対策に取り組む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3年度)

血液・尿等人体試料中毒物及び食品中の毒物・異物の検査手法の開発と標準化

研究分担者 田口貴章(国立医薬品食品衛生研究所)

協力研究者 穂山 浩(星薬科大学薬学部)

研究要旨

食品テロ等、意図的毒物混入事件時に健康被害が発生した場合、原因物質究明のため、保健所等自治体において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、血液・尿等人体試料中の毒物の検査方法の開発及び標準化が必要である。本年度は、LC-MS/MSによる人体試料中の高極性農薬の分析法の開発に取り組んだが、前処理方法とLC条件の改良が必要と判明した。また、ICP-MSによる飲料水中カドミウム分析法が人体試料に適用できることを確認した。加えて、蛍光検出ポストカラムHPLC法とコンウェイ皿を用いた前処理法を用いて生餡中の遊離のシアン化物イオンの分析法を確立した。シアノ配糖体由来のシアン化物イオン分析と遊離のシアン化物イオンの合計値を測定することにより、水蒸気蒸留を用いない方法で生餡中のシアン化合物を分析することが可能となった。

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血液・尿等人体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の開発、並びに標準化はまだ十分ではない。

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あると想定されるが、農薬、重金属等、使用された毒物によって適切な分析法を開発することが必要である。我々はこれまでに、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、並びにシアン配糖体の分析法、及

び誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)を用いたヒ素等重金属の分析法について検討してきた。本分担研究課題においては、入手が容易な高極性農薬、顔料に含まれるカドミウム等重金属及びシアン化合物について簡易分析法の開発と標準化を目的とした。

又、新型コロナウイルス感染症の流行により販路が多様化した中で、宅配業者に悪意がある場合、宅配中の意図的な毒物・異物混入は比較的容易であると想定されることから、調理済み食品中の毒物・異物の既存の分析法の調査・体系化と、より簡易な分析法の新規開発と標準化を併せて進める。

B. 研究方法

R3年度は、LC-MS/MSによる人体試料中の高

極性農薬の分析法の検討、ICP-MSによる人体試料中のカドミウムの分析法の検討、及びHPLCによる遊離シアン分析法の予備検討を実施した。

(1) 対象化合物

高極性農薬として、グリホサート、グルホシネート、メタミドホス、アセフェート、ジメトエート、メソミル、オキサミルの7種を対象とした。カドミウムは、ICP-MS用標準品(富士フイルム和光純薬工業製)を用い、陽性対照としてヒ素(As、三酸化二ヒ素として)も合わせて分析した。遊離シアンの分析法検討には、シアン含有豆(白いんげん豆)を原料とする生餡等検体を、国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 朝倉宏部長より供与いただき用いた。

(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(個別別、品番12081445、450 mL [1バッグ])。適切な手続きを得て匿名化された試料で、過去に国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理審査委員会の了承取得済み。)を購入した。購入後、約50 mLずつバイアルに分注し4 °Cで保管したものを、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。

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) 高極性農薬の分析

・前処理法

水、血液試料又は尿試料は、使用直前に40 °Cの水浴で10分間加温してから用いた。水、血液試料又は尿試料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 °C)で10分間静置した。12,000 ×g, 4 °Cで10分間遠心分離し、上清の一部をコスモスピンフィルター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

農薬無添加の水、血液試料又は尿試料を前処理して得た試料溶液をブランク試料とし、ブランク試料に農薬各16.7 ng/mLとなるよう添加したものをマトリックス添加標準溶液とした。

水、血液試料又は尿試料に農薬各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溶液とした。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: Scherzo SM-C18 MF (3 µm),
2.1 x 100 mm (Imtakt社)

温度: 40 °C

移動相: A) 0.1 vol% ギ酸水溶液

B) 0.1 vol% ギ酸メタノール溶液

グラジエント: 0 min: 10%B, 9 min: 100%B,
12 min: 100%B, 13 min: 10%B,
18 min: 10%B

流速: 0.3 mL/min

注入量: 3.0 µL

MS/MS条件

装置: Xevo TQ-S micro (Waters)

イオン化: ESI (+)

Acquisition: MRMモード

Capillary voltage: 0.25 kV

Source temperature: 150 °C

Desolvation temperature: 500 °C

Cone gas flow: 50 L/hr

Desolvation gas flow: 1,000 L/hr

Cone voltage (CV) and Collision energy (CE): マニュアル操作で最適化した。定量イオン及び定性イオンの m/z と共に表2に示した。

(4) カドミウムの分析

・前処理法

水、血液試料又は尿試料は、使用直前に 40 °C の水浴で 10 分間加温してから用いた。水、血液試料又は人工尿 200 µL 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 製分解容器にいれ、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

カドミウム (Cd) 及び陽性対照としてヒ素 (As) を対象とした。金属無添加の水、血液試料、又は尿試料を前処理して得た試料溶液をブランク試料とした。ブランク試料の調製途中でカドミウム及びヒ素混合標準溶液を添加し、試料溶液中濃度各 0.4 ng/mL となるよう調製したものをマトリックス添加標準溶液とした。

水、血液試料、又は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溶液とした (水は空試験)。各試料溶液中の金属濃度は、内部標準法により求めた。内部標準物質はカドミウムにはインジウム (In)、ヒ素にはイットリウム (Y) を用いた。

・ICP-MS 条件

装置 : iCAP RQ (Thermo Fish-er Scientific 社)

測定モード : KED (Kinetic Energy Discrimination) モード

コリジョンガス : He

測定質量数 : 75 (As), 89 (Y), 111 (Cd), 115 (In)

積分条件 : 積分時間 (s) : 0.1、チャンネル : 1、

スペース (u) : 0.1、掃引数 : 10

(5) 遊離シアン分析法

・分析試料

予備検討として、シアン含有豆 (白いんげん豆) を用いて分析法を検討した。白いんげん豆を原料とする生餡の製造工程フロー (図 1) の①から⑤までの各段階で採材したものを検体とした。

・分析条件

検体 1 g に 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を 7 mL 添加し、攪拌、混和した後、遠心分離して上澄み液を得た。沈殿物に 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を 3 mL 添加し、攪拌、混和した後、遠心分離して上澄み液を得た。先の上澄み液と合わせて 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液で 10 mL に定容し、抽出液とした。抽出液 1 mL をコンウェイ皿 (図 2) の外室に移し、内室には水酸化ナトリウム水溶液を 1 mL 添加した。外室に 1 M 硫酸を 1 mL 加えて 38°C で 16 h 静置した。内室溶液 10 µL を以下の HPLC に注入した。

・HPLC 条件 (ポストカラム法)

カラム : Scherzo SS-C18 (3 µm),
4.6 x 250 mm (Imtakt 社)

温度 : 25 °C

移動相 : 12.5 mM 過塩素酸ナトリウム含有
0.1M 酢酸緩衝液とメタノール (9:1) 混液

反応液 1 : クロラミン T 水溶液
(流速 0.1 mL/min)

反応液 2 : ピリジン-バルビツール酸溶液
(流速 0.1 mL/min)

流速 : 0.5 mL/min

注入量 : 10 µL

検出 : 蛍光検出器 (583 nm, Em 607 nm)

C. 研究結果

(1) 高極性農薬の分析

高極性農薬 7 種類の混合溶媒標準液を用いて作成した検量線 (各農薬の濃度 : 5, 10, 25, 50 ng/mL) は、いずれも良好な直線性を示した (図 3)。空試験として、農薬各 50 ng/mL となるよう添加した水試料からの添加回収試験を 2 回実

施し、平均回収率を算出したところ以下の通り概ね良好な値 (70~120%) となった：メタミドホス 103.8%、メソミル 103.2%、グリホサート 101.9%、グルホシネート 104.6%、アセフェート 97.3%、ジメトエート 113.9%、メソミル 90.1%。なお、ブランク試料にはいずれの農薬も検出されなかった。

しかしながら、検量線用標準溶液、人体試料から調製したブランク試料、マトリックス添加標準溶液、及び添加回収試験を3回ずつ繰り返し注入して分析したところ、いずれの試料においても得られるピークの面積のばらつきが大きく、検量線の直線性が悪く濃度算出に使用できなかった(図4)。人体試料から調製した溶液については、参考までに各農薬のピーク的面積値で比較したところ(図5)、ジメトエートと尿試料中のメソミルを除き、血液または人工尿のマトリックス効果によりピーク強度が低下する傾向が示唆された。

(2) カドミウムの分析

ヒ素、カドミウム共に良好な検量線が得られた(図6)。マトリックス添加標準溶液、及び添加回収試験溶液の濃度からブランク試料の濃度を減算し、マトリックス効果及び回収率を算出した(表3)。添加回収試験を3回実施し(n=3)、陽性対照としたAsの回収率平均及びマトリックス効果を算出したところ、いずれの試料においても前年度に実施したものと概ね同等の結果が得られた。カドミウムの平均回収率は、水試料 113.0%、血液試料 100.5%、尿試料 108.5%であり、並行精度と合わせて良好な値が得られた。

(3) 遊離シアン分析

遊離シアン化物イオンの捕集時間の検討

生餡中の遊離シアン化物イオンの分析をコンウェイ皿で捕集を分析する上で、予備実験では回収率が低い結果であった。捕集時間を検討

した結果、実際の実験の操作性を考慮して、16時間が適していると判断した。図7には2時間と16時間の結果を示している。16時間では77%の回収率が得られていることから捕集時間は16時間と設定した。

分析法の妥当性評価

添加回収試験に併せて、生餡製品試料よりシアン化物イオンが検出されるか確認を行った。生餡製品試料ではシアン化イオンは不検出であった。また、添加試料を用いた繰り返し分析から得られた測定値を解析し、真度、併行精度及び室内精度を算出した。生餡において、10 ppm 添加濃度で平均回収率 86.6%、併行精度 3.33%、室内精度 3.33%であり、良好な真度(70~120%)、併行精度(< 10 RSD%)及び室内精度(< 15 RSD%)が得られ、残留農薬等の妥当性評価ガイドラインの目標値を達成した。従って、本分析法は比較的温和な条件でのシアン化物イオンの分析が可能であり、すでに開発したシアン配糖体(リナマリ)由来シアン化物イオンの分析と本法により遊離のシアン化物イオンの測定値を合計することにより生餡中のシアン化合物を水蒸気蒸留することなく分析が可能であることが示唆された。

試料検体の分析結果

妥当性が確認された本分析法を用いて、原料豆及び生餡製造過程における中間製品試料検体の分析を行った。なお、食品衛生法上の基準がシアン化合物に対し設定され、HCN濃度で規定されていることから、シアン化物イオン濃度をHCNに換算した結果を報告する。

その各工程によるシアノ配糖体由来のシアン化物イオン及び遊離のシアン化物イオンの消長を図8に示す。最初の段階ではシアノ配糖体が含まれているが、製造工程途中で減少し、最終生餡中にはほぼ検出されないことが示唆された。

D. 考察

(1) 高極性農薬の分析

検量線用標準溶液及び水試料からの添加回収試験溶液の分析だけなら良好な結果であったが、血液試料及び尿試料からの各種試験溶液も共に分析したところ、いずれの農薬においても繰り返し注入で安定した面積値を得ることが出来なかった。本検討で用いたカラムは ODS とイオン交換樹脂のハイブリッド型のものである。血液試料及び尿試料には多くのイオンが含まれているため、2 倍量のメタノールを添加しただけではイオンの効果を除去できていない可能性、及び LC 分析で、注入 1 回あたりの平衡化時間が不足しており、カラム内に残存するイオンがピーク強度減弱に影響を与えている可能性等が考えられる。今後は前処理に用いる溶媒の種類・量の検討、LC 分析の平衡化時間の最適化等の検討が必要である。

(2) カドミウムの分析

本研究の方法は、飲料水中の微量金属を検出するものであり、人体試料への適用が可能か否か検討した。陽性対照としたヒ素は、平均回収率、並行精度共に、前年度と概ね同程度の結果となったが、水試料および尿試料の差(日間差)が大きく、実験操作に注意が必要であると示唆された。カドミウムについて、平均回収率をマトリックス効果で除して補正真度を算出すると、水試料 100.8%、血液試料 86.4%、尿試料 91.2%となり、補正真度も良好であった。ヒ素、カドミウム共に、本研究の方法ではマトリックス効果が 1.11 から 1.19 であり、試料中濃度が少し高めに検出される傾向が示唆されたが、本研究の目的は毒物混入事件時の原因物質究明であることから、本試験法は半定量的試験法として十分利用できることが示唆された。

(3) 遊離シアン分析法

シアノ配糖体由来のシアン化物イオン分析

と遊離のシアン化物イオン分析を 2 回分析する必要はあるが、生餡中シアノ配糖体由来のシアン化物イオン分析と遊離のシアン化物イオンの合計値を測定することにより、水蒸気蒸留を用いない方法で生餡中のシアン化合物を分析することが可能となった。

E. 結論

人体試料中の高極性農薬の分析法は、前処理に用いる溶媒の種類・量の検討、及び LC 条件における平衡化時間の検討が必要であると判明した。

カドミウム分析は、飲料水中の微量金属検出法が適用できることが確認できた。

蛍光検出ポストカラム HPLC 法とコンウェイ皿を用いた前処理法を用いて生餡中の遊離のシアン化物イオンの分析法を確立した。シアノ配糖体由来のシアン化物イオン分析と遊離のシアン化物イオンの合計値を測定することにより、水蒸気蒸留を用いない方法で生餡中のシアン化合物を分析することが可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. 日本食品化学学会誌, Vol29(2). 2022 年 4 月 6 日 in press

2. 学会発表

穂山浩. 残留農薬等の基準値設定の動向、これにかかわる作残試験及び試験法の今後. 残留農薬分析国際交流会 2021 ウェブセミナー. 2021 年 5 月 24 日. Web 開催

田口貴章、難波樹音、穂山浩. 食品テロ対策のための血液・尿等人体試料中のヒ素等重金属の分析法検討. 日本食品衛生学会 第 117 回食品衛生学会学術講演会. 2021 年 10 月 26 日. Web 開催

穂山浩. 残留農薬等のレギュラトリーサイエンス. 日本食品衛生学会ブロックイベント 食品に関するリスクコミュニケーション公開セミナー、2021 年 12 月 10 日. 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

表 2. 定量及び定性イオン条件

農薬	定量イオン				定性イオン			
	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CV	CE	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CV	CE
グリホサート	170.1	88.1	10	10	170.1	60.1	15	15
グルホシネート	182.2	136.2	10	10	182.2	56.1	20	20
メタミドホス	141.9	93.9	30	12	141.9	124.8	30	14
アセフェート	183.9	142.8	20	10	183.9	94.6	20	25
ジメトエート	230.0	198.8	20	10	230.0	124.8	20	22
メソミル	162.9	105.9	15	10	162.9	88.0	15	10
オキサミル	237.0	72.0	15	10	237.0	90.0	15	10

注) CV: Cone Voltage, CE: Collision Energy.

表 3. ヒ素及びカドミウムの添加回収試験結果

試験実施年度	対象金属	水試料				血液試料				尿試料			
		回収率真度 (%)	並行精度 (RSD%)	マトリックス効果	補正真度 (%)	回収率真度 (%)	並行精度 (RSD%)	マトリックス効果	補正真度 (%)	回収率真度 (%)	並行精度 (RSD%)	マトリックス効果	補正真度 (%)
R02	As	99.7	3.5	1.14	87.5	102.7	3.1	1.20	85.6	102.2	2.9	1.21	84.5
R03	As	104.8	9.7	1.13	92.4	104.4	6.4	1.18	88.4	113.3	2.9	1.11	101.9
	Cd	113.0	4.4	1.12	100.8	100.5	7.7	1.16	86.4	108.5	2.9	1.19	91.2

シアン含有豆を用いた生餡の製造工程フローにおける採材

- ①原料豆（白いんげん豆⇒3検体）
- ②浸漬後の豆（60°Cまたは常温水で4h浸漬後⇒計6検体）
- ③渋切の回数（0回、1回⇒計6検体）
- ④保温後の翌日の温度（3検体）
- ⑤包装後製品（生餡製品⇒3検体）

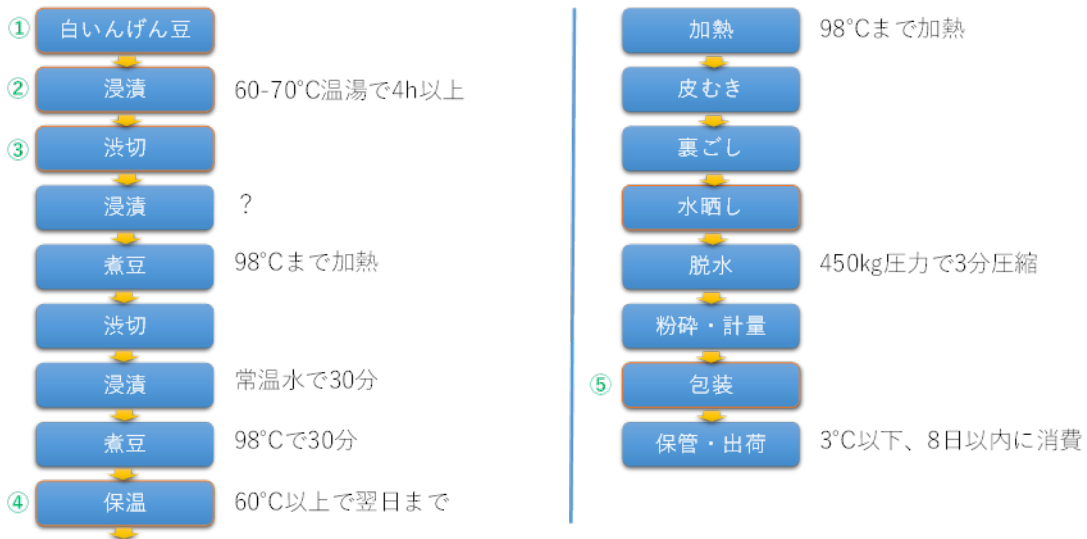


図 1. 生餡の製造工程フローと採材

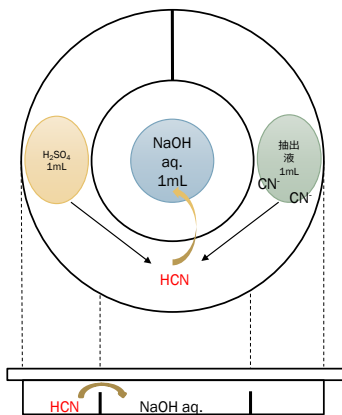


図 2. コンウェイ皿の概略図

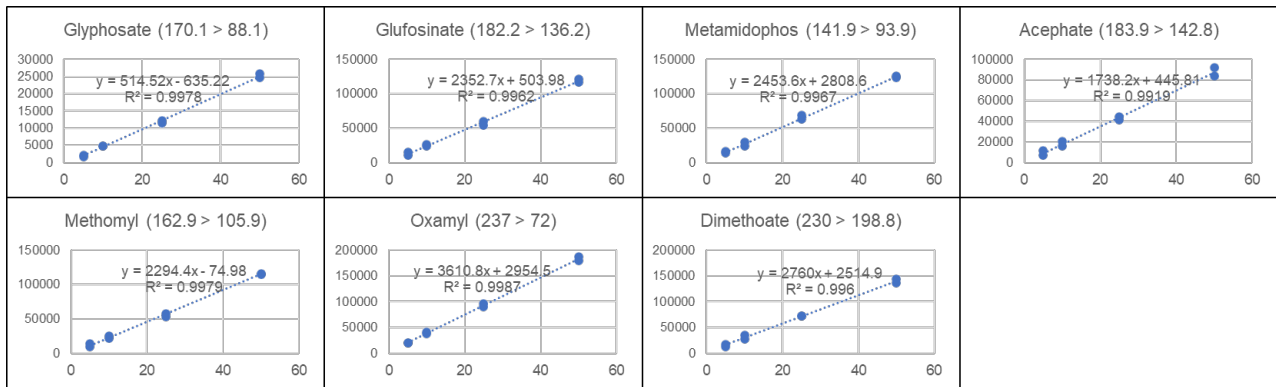


図 3. 農薬標準溶液の検量線. 各濃度の試料につき 3 回ずつ繰り返し注入した.

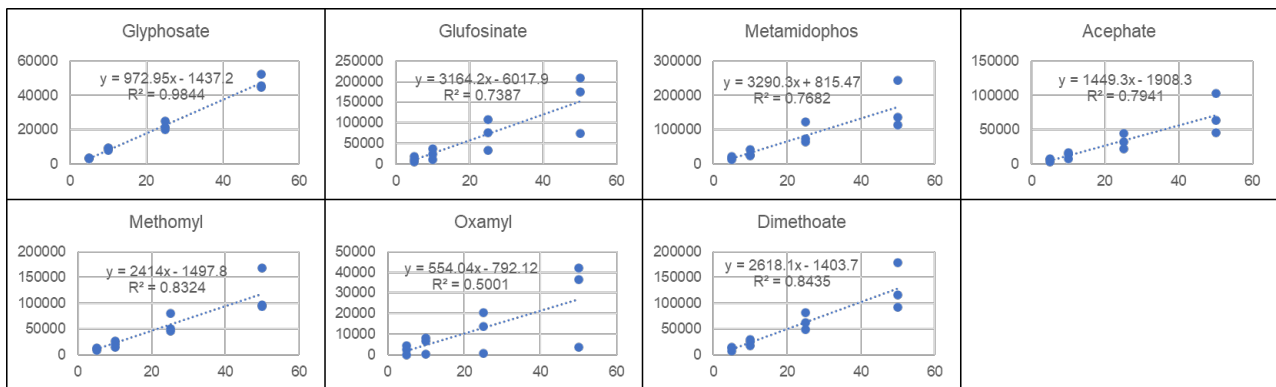


図 4. 人体試料分析の予試験における検量線. 各濃度の試料につき 3 回ずつ繰り返し注入した.

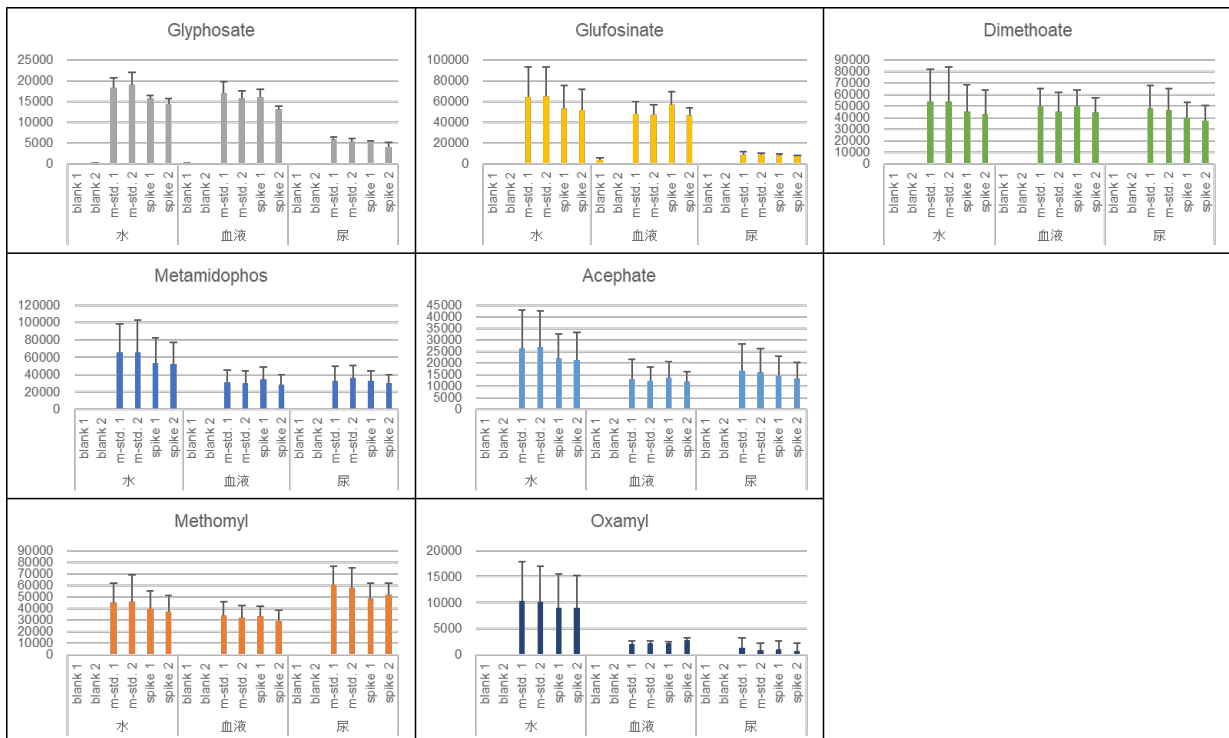


図 5. 各農薬の試料中の面積値比較.

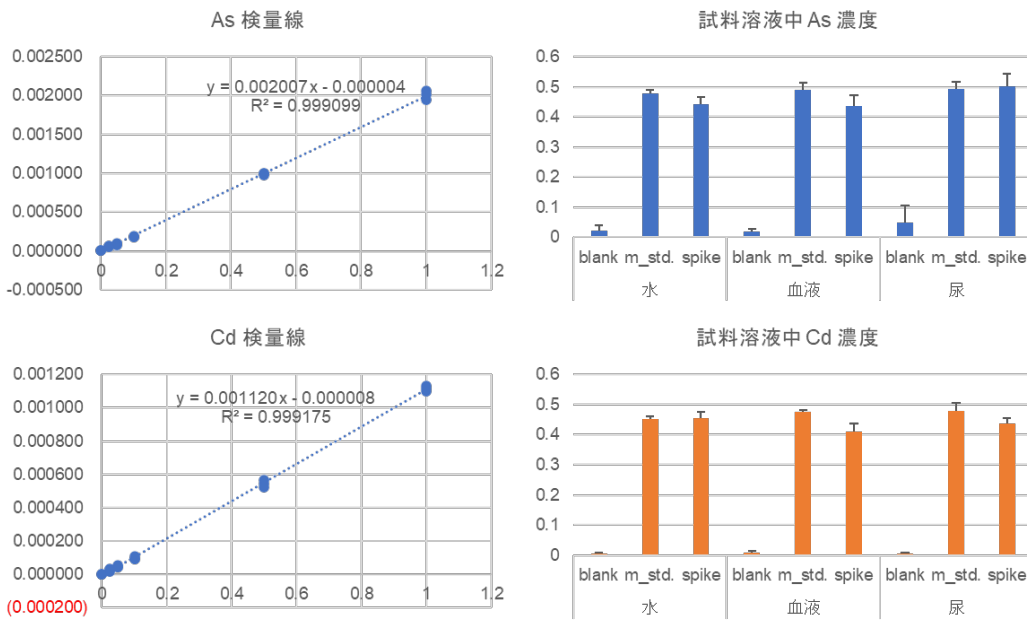


図 6. ヒ素及びカドミウムの検量線と試料溶液中濃度 (ng/mL) .

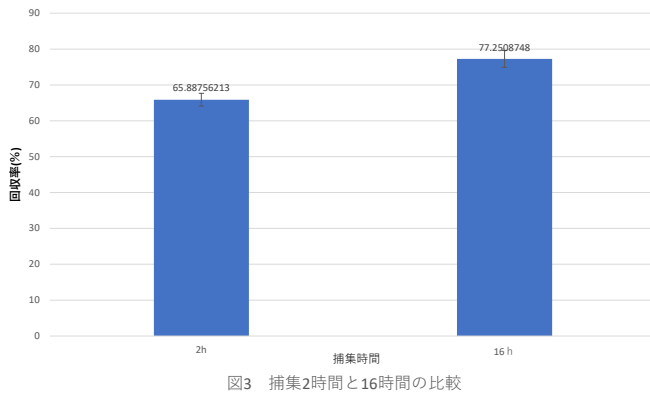


図 7 コンウェイ皿で捕集時間の検討

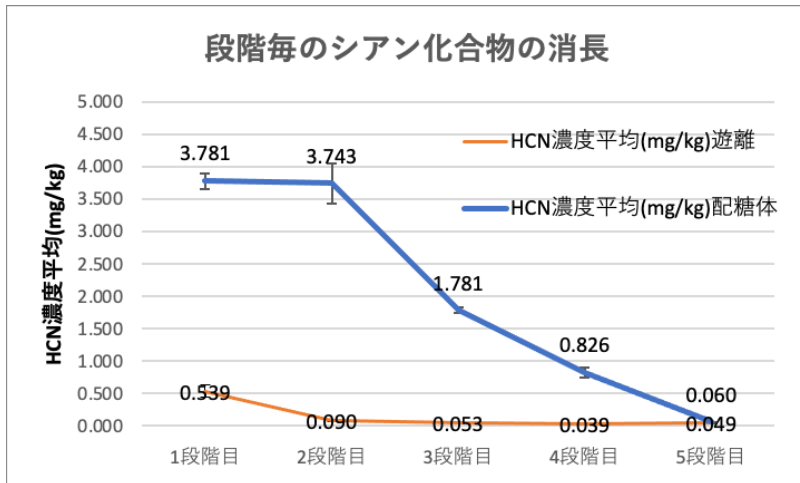


図 8 製造工程中のシアン化合物の消長