

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4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手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を検討し、検討対象とした55化合物のうち、血液からは45化合物、尿からは39化合物が定量可能な分析法を開発した。また、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シアン及びシアノ配糖体の簡易な分析法を開発した。さらに食品からのシアン化ナトリウム暴露時のために、血液中のシアン化物イオン及びその代謝産物であるチオシアン酸イオンの迅速同時分析法を開発した。また、食品への毒物・異物混入事例を調査し、混入した毒物・異物と分析法について整理した。

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手法の開発、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による人体試料中の有機リン系農薬(47種類)及びカーバメート系農薬(17種類)の分析法を開発した他、LC-MS/MSによる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

R4年度は、前年度に検討したLC-MS/MSによる人体試料中の高極性農薬の分析法の検討、及びHPLCによる遊離シアン等分析法の予備検討の結果に基づき、それぞれの分析法を開発し

た。

(1) 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]）。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。

(2) 対象化合物

高極性農薬として、アセフェートやメタミドホス等、前年度に対象とした 7 種を含む 55 種化合物を対象とした（表 2）。標準溶液は、STQ 法用 農薬混合標準溶液（極性 53 種類混合）（林純薬工業製）、グリホサート及びグルホシネートの標準溶液を、適宜混合、希釈して調製した。

(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 分間遠心分離した後、上澄液の一部を採り 0.1 vol% ギ酸水溶液で 10 倍希釈し、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。定量イオンは表 2 に示した。

(4) 加工館中シアン化物の簡易分析

・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館の製造工程フロー（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。

なお、シアン含有豆（白いんげん豆）を原料とする生餡等検体は、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いたものを用いた。

・前処理法

コンウェイ皿を用いた拡散法として、外室に餡子抽出液と酸等の試薬、内室にアルカリを加え、38°Cでインキュベーションし、内室に捕集したシアン化水素をHPLCで測定する方法を開発した。

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。

①遊離シアンの分析

抽出液 1 mL をコンウェイ皿の外室に移し、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 時間静置した（図 2）。内室溶液 10 μL を以下の条件の HPLC に注入した。

②シアノ配糖体の分析

抽出液 100 μL をコンウェイ皿の外室に移し、内室には水酸化ナトリウム水溶液を 1 mL 添加した。外室に酵素液（リナマラーゼ含有）1 mL を添加し 38°Cで 4 時間反応させた後、更に 1 M 硫酸を 1 mL 加えて 38°Cで 2 時間静置した（図 2）。内室溶液 10 μL を以下の条件の 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 i.d. x 250 mm (Imtakt 社)

温度：40 °C

移動相：12.5 mM 過塩素酸ナトリウム含有 0.1M 酢酸緩衝液及びメタノール混液

流速：0.5 mL/min

反応液 1：0.1% クロラミン T 水溶液
(流速 0.1 mL/min)

反応液 2：ピリジン-バルビツール酸混液
(流速 0.1 mL/min)

検出：蛍光検出器 (583 nm、Em 607 nm)

注入量：10 μL

(5) 人体試料中シアン化物の簡易分析

・分析試料

人体試料として、ヒト全血 A 型（コスモ・バイオ）を検体とした。

・前処理法

血液 50 μL に EDTA 緩衝液 (pH 8.0) 50 μL を添加し、10 分間静置した。次いでメタノール 400 μL を添加し、冷所で 10 分間保存した後、8,000 ×g、室温で 10 分間遠心分離した。上澄液を WCX 固相抽出カラムに注入し、溶出液 10 μL を以下の条件の 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 i.d. x 250 mm (Imtakt 社)

温度：40 °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混液
流速：0.5 mL/min

反応液 1：0.1% クロラミン T 水溶液
(流速 0.1 mL/min)

反応液 2：ピリジン-バルビツール酸混液
(流速 0.1 mL/min)

検出：蛍光検出器 (583 nm、Em 607 nm)

注入量：10 μL

(6) 食品への毒物・異物混入事例及び分析法の調査

異物に関する書籍、論文、公的機関のホームページ、ニュースサイト等から情報を収集した。調査目的の性質上、食品に対する意図的な異物

混入事例を調査の主な対象としたが、混入される異物の種類の比較対照として非意図的な異物混入事例についても調査した。

C. 研究結果

(1) 高極性農薬の分析

予備検討において、以前に開発した有機リン系農薬及びカーバメート農薬等の分析法と同様、人体試料に2倍量のメタノールを加え抽出する方法を検討したが、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。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があると考え、人体試料に2倍量のメタノールを加え抽出した後、さらに0.1 vol%ギ酸水溶液で10倍希釈したところ、安定した面積値を得ることができた。

水試料、血液試料、尿試料に各農薬50 ng/mLとなるように混合標準溶液を添加し、添加回収試験を行った。回収率50%、100%、及び150%相当濃度の検量線用標準溶液を作成し、絶対検量線法により回収率を算出した。各試料につきn=5で試験を実施し、得られた回収率の平均値を真度(%)とし、並行精度(RSD%)を求めた。また、回収率100%相当濃度のマトリックス添加標準溶液も調製し、溶媒標準溶液中のピーク面積値との比を算出し、この値で真度を除して補正真度を算出した(表3)。食品中に残留する農薬等に関する妥当性評価ガイドラインを参考に、目標値を「真度70~120%、並行精度10RSD%未満」とすると、水試料は47種類、血液試料は45種類、尿試料は39種類の農薬が目標を満たした。

(2) 加工餡中シアン化物の簡易分析

開発した方法について、妥当性評価試験を実施した。実施者3名がそれぞれ、同一の添加試料を1日に2併行、2日間試験で実施し、真度試料数=12)、併行精度(自由度=6x1=6)及び室内精度(自由度6-1=5)の評価を行った。

遊離シアンの回収率は真度73.9%、並行精度3.33%並びに室内精度3.33%、シアノ配糖体の回収率は真度82.2%、並行精度1.95%、室内精度3.42%であり、どちらも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(図3)。

(3) 人体試料中シアン化物の簡易分析

人体にはシアンイオン代謝経路が存在し、シアン化物イオンは酵素 rhodanese によってチオシアン酸イオンに代謝され尿中排泄される(図4)。そこで、シアン化物イオン及びチオシアン酸イオンを同時に検出できるように、人体試料(血液)にEDTA緩衝液及びメタノールを加え、WCX固相抽出カラムで精製する方法を検討したところ、クロマトグラムにおいて、血液にシアンを添加したサンプルからシアン化物イオン及びチオシアン酸イオンを検出でき、ピークの形状及び分離は良好であった(図5)。続いて添加回収試験を実施したところ、シアン化物イオンの回収率は真度99.9%、並行精度5.70%、チオシアン酸イオンは真度89.1%、並行精度3.84%であり、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(図6)。

(4) 食品への毒物・異物混入事例及び分析法の調査

a. 書籍の調査

「食品の異物混入防止対策：あなたの会社の危機管理は？」(日本食品衛生協会、2000年11月出版)を参考に、記載されている異物混入事例を抽出、整理した(表4)。すべて製造過程での非意図的な異物混入事例であり、製造時の対策不足によるハエの混入や、製造工場内設備の修繕によって出た電線カバーの混入などであった。

b. Google Scholar での調査

Google Scholarで「異物」「混入」「事例」の3語をキーワードとして検索すると約2,920件がヒットした。そのうち総説論文は22報、タイトル又は本文中に食品への異物混入についての記載が

あるものは6報であり、意図的な異物混入事例について記載されているのは1報のみであった。また、検索結果の約2,920件を公表年で分類すると表5及び図7の通りとなり、2008年以降は100件を超えていた。

内容は、保健所や衛生研究所に寄せられた消費者からの苦情に対応して試料を検査した論文、過去に起きた毒物・異物混入事件について考察した論文、もしくは食中毒が発生した際の症例報告等、非意図的な混入と意図的な混入の両方が混在していた。非意図的な混入事例は、虫、繊維、毛髪等の混入が圧倒的多数で、意図しない混入を防ぐための対策や、混入した場合の分析方法についての内容が多かった。その他、飲食店で料理に添えられていた装飾用のアジサイの葉を喫食した1名が嘔吐・顔面紅潮などの症状を呈した中毒事例があった。

一方、意図的な混入事例について言及している論文は数が少なかったが、1998年に発生した「和歌山ひ素カレー事件」について考察している論文が数報あった。また、この事件のすぐ後に発生した、会社のポットの湯にアジ化ナトリウムが混入され集団中毒を起こした事例、スーパーマーケットに陳列されたウーロン茶にシアンが混入されて購入者が死亡した事例など、連鎖的に起こった毒物混入についてもともに記載している論文があった。

続いて、入手しやすく、摂取した場合に重篤な健康被害を起こすと考えられる農薬について、「農薬」「混入」「事例」の3語をキーワードとして再検索したところ、約6,590件がヒットした。多くは農薬の分析手法や中毒診断・治療方法についての論文で、混入事例に関する論文は少なかったが、2007年～2008年に発生した中国産冷凍ギョウザへのメタミドホスの意図的な混入や、2013年に発生したアクリフーズ群馬工場での冷凍食品へのマラチオンの意図的な混入といった事件について考察している論文が複数あった。

また、「農薬」「混入」「症例」の3語をキーワードとして検索したところ、パラコート剤によ

る中毒事例が多数ヒットした。そのほとんどは自殺企図での飲用事例であったが、1985年に国内各地で飲料にパラコート剤が混入され、「パラコート連続殺人事件」として多くの死者がでた。そこで「パラコート」「混入」の2語で再検索したところ、当該事件の1症例と思われる報告があった。さらに、農薬と同様、入手が容易な洗剤（界面活性剤）の混入事例についても調査した。「食品」「界面活性剤」「混入」の3語をキーワードとして検索したところ、食品への界面活性剤の混入を想定した分析方法についての論文や界面活性剤の性質等の論文が多く見られた。実際の混入事例として、清涼飲料水への界面活性剤の混入事例を2例発見した。

c. Microsoft Bing での調査

検索エンジンを Microsoft Bing に変更し、「異物混入事例」をキーワードに検索すると約185,000件がヒットした。このうち、三重県の公式ホームページで異物混入事例が複数、詳しく紹介されていた。それらは意図的な混入ではなく、原料由来もしくは製造過程での非意図的な混入であり、ゆでうどんに、同一の製造機で製造していた蕎麦の麺が付着してこげ茶色の異物が混入した事例、調理パンに、製造工程で使用したザルが破損し、針金状の金属異物が混入した事例などが紹介されていた。

また、上記の検索結果に給食への異物混入事例に言及するものが多かったため、「給食」「異物」「混入」の3語をキーワードとして再検索し、ニュース記事から一部の事例を集めた。給食への異物混入事例は非常に多く、ほとんどが製造過程や輸送過程での非意図的な混入であったが、漂白剤や下剤を意図的に混入させた事例もあった。

d. 小括

上記 a, b, c の調査結果を、異物の分類と異物の種類を、非意図的な混入事例と意図的な混入事例にわけて整理した（表6, 7）。

e. 分析法

Google scholar で「食品」「異物」「分析」の3語をキーワードとして日本語のページを検索すると、約 3,510 件がヒットした。意図的・非意図的な混入の区別に関わらず、異物混入時の分析法として、タンパク質測定、デンプン質測定、木化組織判定、植物繊維判定、骨組織判定、カタラーゼ活性反応試験、微生物検査、遺伝子解析等が挙げられた。また、用いられる分析装置はフーリエ変換赤外分光光度計、蛍光 X 線分析装置、ガスクロマトグラフ（および質量分析計（GC または GC-MS））、高速液体クロマトグラフ（および質量分析計（LC または LC-MS））、アミノ酸分析装置、分光光度計、原子吸光光度計、ICP 発光分析装置等であった。

意図的な異物混入によって重大な健康被害が発生した場合、農薬及び界面活性剤が使われた事例が多かった。そこで、Google scholar で「食品」「農薬」「混入」の3語をキーワードとして検索した。そのうち、特に加工食品や市販飲料を対象試料として分析している論文を数点抽出し整理した（表 8）。分析装置は GC-MS や LC-MS が頻用されていた。飲料を対象とした分析法は、試料を希釈してフィルター濾過したものを測定に供するものなど、比較的前処理が簡便であった。一方、加工食品は脂質など夾雑物が多いため、飲料に比べて前処理が煩雑であった。

なお、厚生労働省 医薬食品局 食品安全部基準審査課から、平成 25 年 3 月 26 日付けで「加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について」という事務連絡が発出されている。この中で、インスタントラーメン（油揚げめん（具、スープは除く））、白菜キムチ、コンビーフ、ウナギ蒲焼き（たれを含む）、乾燥エビ、冷凍餃子、レトルトカレー、赤ワイン、バター及びチーズの 10 食品を用いて、コリンエステラーゼ活性阻害作用のある農薬等（有機リン系農薬、カルバメート系農薬）172 種類の LC-MS/MS による分析法が検討されている。

次に、被害者の尿や血液といった生体試料から原因物質を検出する場合も想定されるため、「生体試料」「農薬」の2語をキーワードとして検索した。また、睡眠薬の分析方法として毛髪が使用されると記載されている論文が散見されたため、「毛髪」「睡眠薬」の2語をキーワードとして再検索した。そのうち、ヒト生体試料を対象試料として分析している論文を数点抽出し整理した（表 9）。

D. 考察

(1) 高極性農薬の分析

人体試料中の高極性農薬分析法を開発した。検討した化合物 55 種類のうち、水試料は 47 種類、血液試料は 45 種類、尿試料は 39 種類が妥当性評価ガイドラインの目標を達成した。これらは、人体試料中濃度が 50 ng/mL 程度であれば、定量可能であり、事件発生時、摂取した農薬の量も推定可能である。また、本検討で目標を達成できなかった化合物でも、ピークの検出は可能であり、暴露した農薬の同定は可能と期待される。ただし、血液試料中の TCMTB、尿試料中の dichloran は、本検討において検出できなかったので注意が必要である。

(2) 加工餡中シアン化物の簡易分析

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簡易な方法で生餡中のシアン化合物を分析が可能となった。

(3) 人体試料中シアン化物の簡易分析

血液中のシアン化物イオンとチオシアン酸イオンの迅速同時分析を可能にした。本法を用いることで、シアン化ナトリウム暴露の際の血液中シアン化物イオンだけでなく、生体内代謝産物であるチオシアン酸イオンも迅速に分析可能と期待

される。

(4) 食品への毒物・異物混入事例及び分析法の調査

Google scholarに限っても、「異物」「混入」「事例」に関連する論文等は2009年以降100件を超えており、異物混入に関連する研究が増加していることが示唆された。意図的な混入事例についての報告等は少なかった。企業等による針等の目視で確認できる異物の対応、また、医療現場や警察等による薬品・薬剤等の混入への対応については、必ずしも論文等で公表されていないと推測される。

表7に示した通り、意図的に混入される異物には薬品・薬剤等に分類される異物、中でも農薬や界面活性剤の混入事例が多かった。いずれも小売店等で容易に入手が可能であり、毒性も高いことから悪用されていると思われる。一方で、アジ化ナトリウムやヒ素といった毒物は、表7に示した事例以降、毒劇物取締法の改正により容易に入手することができなくなっており、事例数が少ないものと推定される。

東京都福祉保健局が公表している東京都、特別区、八王子市及び町田市に寄せられた、過去25年間の食品等による苦情件数(図8)から、「雪印乳業食中毒事件」が発生した平成12年度(2000年度)に苦情件数が前年度の倍近くに増加したこと、その後は約4000件で推移し、「中国産冷凍ギョウザへ農薬混入事件」が発生した平成19年度(2007年度)に再び増加したこと、以降、苦情件数は2000年以前よりも高い水準を保っており、国民の食品の安全に対する関心が高まっていることが伺える。一方、平成10年度(1998年度)には「和歌山ヒ素カレー事件」が発生し、当時ニュースでも大きく取り上げられ多くの国民が認知したと推測されるものの、苦情件数の増加は見られない。この背景には、「和歌山ヒ素カレー事件」は一部地域で調理・提供された食品が原因であったのに対し、以降の事件は国内でよく知られている食品企業から全国に流通する食品が原因

であったことが理由と考えられる。密封されたパッケージに包装され、全国に流通している食品は安全であることが大前提であったが、上述の事件によって、その安全性に対する消費者の不信感が高まったために食品への見方が厳しくなったものと推測される。意図的、非意図的に関わらず異物混入事件は企業の信頼を大きく失墜させる。これら事件が、食品防御に対する意識を高めたのは間違いない。

しかしながら、近年増加しているフードデリバリーサービスの分野では、食品を製造している企業(事業者)側による異物混入対策が万全であっても、配達中や配達後(いわゆる置き配等)の混入に対しては未だ対策が不十分である。特に、明確な意思を持って異物(毒物等)を混入させる場合には、防ぐことが非常に難しい。現在までのところ、フードデリバリーサービスを利用して得た食品による国内での重大な健康被害等のニュース等は確認できないが、今後、標的とされる可能性は高いと思われる。そうした事件が発生した場合に、混入経路や混入した異物の種類、毒物であった場合にはその詳細な情報等の解明が迅速に求められる。

表6,7に示した通り、冷凍ギョウザへの農薬混入事件の影響から、加工食品や飲料に農薬・界面活性剤等が混入した場合を想定した論文が多く公表されており、また、健康障害が生じた場合を想定し、生体試料を分析対象とする論文も数報確認できたが、使用される毒物は予想ができず、今後発生し得る全ての事例に対応するのは困難である。これからさらにフードデリバリーサービスが普及するにつれ、異物混入のリスクは益々高まる。まずそうした事例が発生しないための対策するのは勿論であるが、発生してしまった場合に迅速な対応ができるよう、今回収集した情報を活用し、関連機関と連携してさらなる議論が為されることを期待する。

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。

生餡中の遊離シアン及びシアノ配糖体については、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る簡易な分析法を開発した。人体試料（血液）については、シアン化ナトリウム暴露の際の血液中シアン化物イオンだけでなく、生体内代謝産物であるチオシアン酸イオンも迅速に分析可能になった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 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, 29(2), 77-84, 2022

2. 学会発表

石橋愛理、甲斐剛志、菊地彩香、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、朝倉宏、穂山浩. 加糖餡中のシアン化合物の分析法の開発. 日本食品化学学会第 28 回総会・学術大会. 2022 年 5 月. 東京

菊地彩香、石橋愛理、甲斐剛志、伊藤理恵、田口貴章、堤智昭、朝倉宏、穂山浩. HACCP における製造工程を通じた加糖餡中シアン化合物の動態. 日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム. 2022 年 8 月. 東京

田口貴章、山下涼香、穂山浩、堤智昭. 食品テロ対策のための LC-MS/MS による血液・尿等人体試料中の高極性農薬の分析法検討. 日本食品衛生学会第 118 回学術講演会. 2022 年 11 月. 長崎

H. 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. 定量イオン条件

No.	農薬	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	No.	農薬	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
1	Carbofuran-3-hydroxy	238.0	181.0	29	Isoprocarb	194.1	95.1
2	Acephate	183.9	142.8	30	IsoxathionOxon	298.2	242.2
3	Acetamiprid	223.0	126.0	31	Lenacil	235.2	153.1
4	Atrazine	216.1	174.1	32	Metamidophos	141.9	93.9
5	Bitertanol	338.1	70.1	33	Methomyl	162.9	105.9
6	Bromacil	261.0	204.9	34	Mevinphos_Cys	225.1	127.1
7	Carboxin	236.0	143.0	35	Mevinphos_Trans	225.1	127.1
8	Cyanazine	241.0	214.0	36	Monocrotophos	224.1	193.1
9	Cyproconazole	292.1	70.1	37	Myclobutanil	289.1	70.2
10	Dichlorvos	221.0	109.0	38	Norflurazon	304.1	284.1
11	Demeton-S-methyl	231.1	89.1	39	Omethoate	214.0	124.8
12	Dichloran	205.1	175.0	40	Oxadixyl	279.1	219.0
13	Dicrotophos	238.0	112.0	41	Oxamyl	237.0	72.0
14	Difenoconazole	406.1	250.9	42	Phosphamidon	300.1	174.1
15	Dimethoate	230.0	198.8	43	Propoxur	210.1	110.9
16	Fenamiphos	304.1	217.1	44	Pyroquilon	174.0	132.0
17	Fenbuconazole	337.0	70.1	45	Quinoclamine	208.0	89.0
18	Fensulfothion	309.0	157.1	46	Simazine	202.0	124.0
19	Flusilazole	316.0	247.0	47	Simetryn	214.0	124.0
20	Flutriafol	302.1	70.1	48	Spiroxamine	298.4	144.2
21	Fosthiazate	284.0	104.0	49	TCMTB	239.1	180.1
22	Glufosinate	182.2	136.2	50	Tetraconazole	372.0	70.1
23	Glyphosate	170.1	88.1	51	Thifluzamide	524.9	125.1
24	Hexaconazole	314.1	70.1	52	Tolfenpyrade	384.2	197.2
25	Hexazinone	253.1	171.1	53	Triadimenol	296.1	70.0
26	Imazamethabenzmethyl	289.2	86.2	54	Tricyclazole	190.0	136.0
27	Imibenconazole	411.0	125.0	55	XMC	180.3	123.2
28	Iprodione	330.0	245.0				

表 3. 人体試料中高極性農薬の回収率補正真度

No.	農薬	水試料		血液試料		人工尿試料	
		補正真度 (%)	並行精度 (RSD%)	補正真度 (%)	並行精度 (RSD%)	補正真度 (%)	並行精度 (RSD%)
1	Carbofuran-3-hydroxy	94.5	3.8	97.6	2.8	86.8	5.8
2	Acephate	94.3	3.2	73.7	5.2	76.0	9.1
3	Acetamiprid	92.3	2.8	123.0	2.1	89.7	4.9
4	Atrazine	90.0	3.3	117.6	2.5	113.6	3.6
5	Bitertanol	51.2	12.0	107.3	9.4	51.0	26.1
6	Bromacil	95.0	3.6	82.8	4.6	88.7	9.0
7	Carboxin	89.0	2.9	91.5	4.7	128.1	5.9
8	Cyanazine	92.8	6.0	104.2	2.4	95.3	6.1
9	Cyproconazole	85.8	3.3	105.0	1.3	108.7	3.3
10	Dichlorvos	91.6	2.2	73.7	3.8	92.2	5.3
11	Demeton-S-methyl	85.9	4.1	109.4	3.0	100.2	5.9
12	Dichloran	78.2	102.3	62.5	0.0	-	-
13	Dicrotophos	93.2	2.0	111.7	1.5	100.5	4.6
14	Difenoconazole	55.2	15.0	99.3	16.9	82.3	15.0
15	Dimethoate	92.2	3.4	110.4	4.3	94.9	5.2
16	Fenamiphos	78.2	3.0	109.4	1.8	116.6	3.4
17	Fenbuconazole	68.0	6.3	66.9	4.8	53.2	5.5
18	Fensulfothion	89.4	1.8	107.7	2.9	97.4	4.3
19	Flusilazole	77.6	3.5	103.7	4.4	89.3	5.1
20	Flutriafol	88.6	2.5	100.4	2.0	104.7	2.6
21	Fosthiazate	91.4	1.7	105.8	2.1	174.5	5.6
22	Glufosinate	59.8	3.0	41.6	28.9	29.6	12.6
23	Glyphosate	80.0	13.3	84.5	7.4	118.8	10.5
24	Hexaconazole	77.5	4.4	120.0	8.0	95.1	8.3
25	Hexazinone	94.2	4.0	109.2	2.0	99.5	6.0
26	Imazamethabenz methyl	91.1	2.3	112.0	2.3	100.3	4.7
27	Imibenconazole	21.8	8.7	286.1	2.4	122.0	7.8
28	Iprodione	84.9	16.8	62.4	19.4	65.0	17.1
29	Isoprocarb	90.7	2.7	101.9	1.7	119.9	4.8
30	IsoxathionOxon	82.1	4.7	3.2	5.1	138.5	5.3
31	Lenacil	93.9	1.8	99.8	2.1	128.5	3.0
32	Metamidophos	93.3	1.3	80.1	2.7	56.7	11.7
33	Methomyl	91.4	3.4	141.1	3.7	148.8	4.6
34	Mevinphos_Cis	90.8	3.3	112.2	2.0	99.2	5.2
35	Mevinphos_Trans	94.5	4.2	102.5	2.1	92.0	3.6
36	Monocrotophos	93.9	2.9	113.8	2.0	104.7	5.4
37	Myclobutanil	82.7	2.6	72.6	1.5	59.0	2.3
38	Norflurazon	90.5	6.4	97.3	3.2	128.1	4.7
39	Omethoate	91.1	0.7	102.1	7.7	80.3	5.9
40	Oxadixyl	90.3	3.7	105.7	4.1	103.4	4.9

表 3. 人体試料中高極性農薬の回収率補正真度（つづき）

No.	農薬	水試料		血液試料		尿試料	
		補正真度 (%)	並行精度 (RSD%)	補正真度 (%)	並行精度 (RSD%)	補正真度 (%)	並行精度 (RSD%)
41	Oxamyl	93.8	2.1	99.8	2.0	80.9	5.0
42	Phosphamidon	93.3	4.1	109.8	2.1	100.4	6.0
43	Propoxur	90.9	2.8	101.2	1.9	100.7	4.2
44	Pyroquilon	91.1	2.3	98.8	3.1	95.9	6.2
45	Quinoclamine	100.2	8.2	76.2	7.2	90.5	9.2
46	Simazine	92.9	4.4	108.2	2.6	108.8	9.2
47	Simetryn	88.1	3.7	108.7	2.7	101.8	5.7
48	Spiroxamine	71.1	12.0	101.5	1.7	83.0	5.4
49	TCMTB	82.8	4.0	-	-	77.2	4.1
50	Tetraconazole	77.7	4.0	97.4	2.6	89.0	3.6
51	Thifluzamide	74.9	4.0	36.7	9.4	38.1	9.2
52	Tolfenpyrade	20.9	8.3	88.3	4.3	26.5	9.0
53	Triadimenol	87.3	2.6	100.2	2.9	94.8	2.2
54	Tricyclazole	89.9	3.8	104.7	2.7	100.7	6.9
55	XMC	93.7	2.4	99.0	1.7	128.8	4.1

注 1) - : Not detected.

注 2) 黄色または橙色は目標値を逸脱したもの。

表 4. 書籍中の非意図的な異物混入事例（一部抜粋）

分類	異物の種類
虫	クロキンバエ
鉱物性	金属片
動物性	ネズミの糞
原料由来	黒い異物
その他	電線カバー（ビニール）
その他	ゴム手袋の破片

表 5. 「異物」、「混入」及び「事例」の 3 語検索によるヒット数の経年変化

年	ヒット数 (件)	年	ヒット数 (件)	年	ヒット数 (件)
2000	58	2008	106	2016	129
2001	74	2009	109	2017	159
2002	67	2010	122	2018	128
2003	95	2011	158	2019	119
2004	84	2012	115	2020	101
2005	86	2013	105	2021	113
2006	92	2014	138	2022	61
2007	82	2015	129		

表 6. 非意図的な異物混入事例の異物の分類

分類	異物	食品	分類	異物	食品
虫	ハエ	トマトジュース	繊維	布の切れ端	スナック菓子
虫	ゴキブリ	豆腐	繊維	糸状異物	焼洋菓子
虫	詳細不明	洋菓子	繊維	糸状異物	ケーキ
虫	ハエ	惣菜	繊維	糸状異物	スナック菓子
鉱物性	金属片	サケ缶詰	繊維	糸状異物	惣菜
鉱物性	金属片	豆大福	繊維	糸状異物	牛乳（瓶入り）
鉱物性	針金状金属	和菓子	繊維	糸状異物	ココナッツクラッカー
鉱物性	針金状金属	和菓子	原料由来	黒い異物	ポテトチップス
鉱物性	針金状金属	調理パン	原料由来	こげ茶色異物	ゆでうどん
鉱物性	針金状金属	給食	原料由来	竹様異物	中華まんじゅう
鉱物性	石	豆菓子	原料由来	茶色異物	ウイスキー
鉱物性	釘	洋風きんとん	原料由来	黒色粒状異物	粉ミルク
動物性	ネズミの糞	輸入冷凍枝豆	その他	プラスチック片	氷菓
動物性	毛髪	惣菜	その他	紙片	お好み焼き
動物性	魚の骨	たこ焼き（冷凍）	その他	電線カバー（ビニール）	菓子パン
薬剤・薬品等	農薬	豆腐	その他	ゴム手袋の破片	惣菜
薬剤・薬品等	界面活性剤	揚げパン	その他	ポリエチレン製手袋	惣菜
薬剤・薬品等	界面活性剤	給食（牛乳）	その他	絆創膏	飲食店のスパゲティ
			その他	ビニール	中華まんじゅう

表 7. 意図的な毒物・異物混入事例

分類	異物	食品
鉱物性	針	カップ麺
鉱物性	針	レトルト食品・惣菜
動物性	排泄物	給食
薬剤・薬品等	アジ化ナトリウム	ポットの湯
薬剤・薬品等	亜ヒ酸	カレー
薬剤・薬品等	青酸	ウーロン茶
薬剤・薬品等	農薬	コーヒー
薬剤・薬品等	農薬	清涼飲料水
薬剤・薬品等	農薬	清涼飲料水
薬剤・薬品等	農薬	もち菓子
薬剤・薬品等	農薬	冷凍ギョウザ
薬剤・薬品等	農薬	冷凍食品
薬剤・薬品等	下剤	給食
薬剤・薬品等	界面活性剤	緑茶
薬剤・薬品等	界面活性剤	飲料製品
薬剤・薬品等	漂白剤	給食
その他	タバコ	漬物
その他	包装紙	給食

表 8. 食品中の混入異物（農薬・界面活性剤・その他）の分析法

測定機器	対象試料	分析対象物質	分析法概要	出典
GC-FPD GC-MS	加工食品 (インスタントラーメン、白菜キムチ、ワイン(赤)、コンビーフ、ウナギ蒲焼き、チーズ、バター、乾燥エビ、冷凍ギョウザ、レトルトカレー)	有機リン系農薬 カルバメート系農薬 ピレスロイド系農薬 有機窒素系農薬	酢酸エチルで抽出し、DSC-C18、ENVI-Carb 及び InertSep PSA ミニカラムまたは K-Solute、InertSep C18、InertSep GC 及び PSA ミニカラムで精製し、GC-MS 及び GC-FPD で測定する。	小林麻紀ら、 食衛誌(2011), 52 (4), 226-236.
GC-MS	加工食品 (冷凍えびドリア、冷凍餃子、冷凍あじ竜田揚げ、白菜キムチ、レトルトカレー) 未加工の鶏砂肝	有機リン系農薬	酢酸エチルで抽出し、抽出液を乾固後、n-ヘキサン飽和アセトニトリル及びアセトニトリル飽和n-ヘキサンを加え、分散固相 (PSA) を加えて振とうした後アセトニトリル層を分取し、GC-MS で測定する。	福光徹ら、 神奈川県衛生研究所研究報告 (2017), 47, 14- 19.
LC-QTOF-MS	ビール	農薬	ガス抜きしたビールを 0.20 µm PTFE フィルターで濾過し、LC-QTOF-MS で測定する。	鷺田和人ら、 日本醸造協会 (2019), 114(5), 287-293.
LC-MS	加工食品 (豚汁、カレー、 きんぴらごぼう)、 和風ドレッシング	界面活性剤 (LAS 標準品および 市販洗剤各種を標準 品として使用)	アセトニトリルまたはアセトニトリル及びヘキサンで抽出し、水に転溶後、Oasis PRiME HLB で精製し、LC-MS で測定する。	柿本葉ら、 大阪健康安全基 盤研究所研究年 報 (2020), 2020 (4), 37-42.
LC-MS/MS	加工食品 (白菜キムチ、オレンジ マーマレード、レーズン、 梅干し、ウスターソース)	農薬	試料に水を加えて浸潤させ、アセトニトリルで抽出し、塩析・脱水後、グラフアイトカーボン/PSA ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する。	福井直樹ら、 食衛誌(2013), 54 (6), 426-433.
LC-QTOF-MS	飲料	界面活性剤 (35% ラウリルジ メチルアミノ酢酸、 N,N-ジエタノール ラウリン酸アミド、 ラウリン酸、 ラウリル硫酸ナトリ ウム表運品および市 販洗剤)	分析試料を 0.02 µm PTFE フィルターで濾過し、LC-QTOF-MS で測定する。 シャンプーなどの混濁したものは水で希釈して遠心分離した上清を、上記同様フィルター濾過して LC-QTOF-MS で測定する。	宮本靖久ら、 食衛誌(2014), 55 (6), 261-268.
GC-MS GC-PFPD	冷凍餃子 米	農薬	酢酸エチルで抽出し、濃縮してアセトニトリルを加えた後、C18 及び Envi-Carb/NH2 ミニカラムで精製し、ヘキサンに転溶して GC-MS 及び GC-PEPD で測定する。	宮本伊織ら、 生活衛生(2010), 54 (1), 41-48.

表 8. 食品中の混入異物（農薬・界面活性剤・その他）の分析法（つづき）

測定機器	対象試料	分析対象物質	分析法概要	出典
LC-MS/MS	飲料 (茶類、ジュース類、炭酸飲料、コーヒー、栄養ドリンク、牛乳、アルコール飲料等 35 種類)	農薬	アセトニトリルで抽出し、塩析・脱水して遠心分離後、GCB/PSA ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する。	福井直樹ら、食衛誌 (2012), 53(4), 183-193.
LC-MS	飲料 (麦茶、烏龍茶、20%アップルジュース、コーラ、乳酸菌飲料、豆乳、牛乳)	界面活性剤 (LAS 標準品および市販洗剤各種を標準品として使用)	アセトニトリルで徐タンパク後、水に転溶して Oasis PRiME HLB で精製し、LC-MS で測定する。	柿本葉ら、大阪健康安全基盤研究所研究年報(2019), 2019(3), 48-56.
PESI-MS	飲料 (麦茶、コーラ、スポーツドリンク、ミルクティー)	界面活性剤 農薬製剤 睡眠薬錠剤	2-プロパノールを等量添加して希釈し、PESI-MS で測定する。	和田美暁ら、日本法科学技術学会誌 (2021), 26(1), 1-15.
GC-MS	加工食品 (冷凍ピザ)	農薬	【GC-MS 測定試料】 超臨界流体抽出後、抽出液を乾固し、ヘキサン及びアセトニトリルで液液分配する。アセトニトリル層をアセトン/ヘキサン混液に転溶後、GC/PSA で精製し、アセトンに転溶して GC-MS で測定する。 【LC-MS/MS 測定】 アセトニトリル/水混液を加えて超音波抽出し、抽出液に水及びメタノールを加えて 0.2 μm 非水系マイクロフィルターで濾過した後、LC-MS/MS で測定する。	山本理世ら、熊本県保健環境科学研究所報 (2013), 43, 30-40.

表 9. ヒト生体試料中の混入異物（農薬・界面活性剤・その他）の分析法

測定機器	対象試料	分析対象物質	分析法概要	出典
LC-MS	ヒト尿 ヒト血液	農薬 (パラコート、ジクワット)	【尿試料】 遠心分離後上清に水と OasisWCX 分散固相を加えて分散固相抽出する。 【血液試料】 スルホサリチル酸水溶液を加えて徐タンパクする。 【上記操作後の尿試料または血液試料】 酸化反応後、OasisHLB で精	鈴木雄亮ら、法科学技術 (2016), 21(1), 57-65

			製し、移動相に転溶して LC-MS で測定する。	
--	--	--	--------------------------	--

表 9. ヒト生体試料中の混入異物（農薬・界面活性剤・その他）の分析法（つづき）

測定機器	対象試料	分析対象物質	分析法概要	出典
MAL-DI-TOF-MS LC-MS	ヒト尿 ヒト血液	農薬 (バラコート、ジクワット)	【尿試料】 遠心分離後上清に水と OasisWCX の固相懸濁液を加えて抽出・洗浄し、MALDI-TOF-MS 及び LC-MS で測定する。 【血液試料】 アセトニトリルで徐タンパクし、OasisWCX 固相懸濁液を加えて抽出・洗浄した後、MALDI-TOF-MS 及び LC-MS で測定する。	鈴木雄亮ら，法科学技術(2019), 24(1), 49-61
LC-MS/MS	人工尿 ヒト血液	農薬 (有機リン系農薬)	試料に 2 倍量メタノールを加えて攪拌し、4℃で静置後、遠心分離後上清を限外ろ過して LC-MS/MS で測定する。	田口貴章ら，日本食品化学学会誌(2020), 27(1), 33-39
LC-MS/MS	人工尿 ヒト血液	農薬 (カーバメート系農薬)	試料に 2 倍量メタノールを加えて攪拌し、4℃で静置後、遠心分離後上清を限外ろ過して LC-MS/MS で測定する。	田口貴章ら，日本食品化学学会学会誌(2022), 29(2), 77-84
LC-MS	ヒト血清	農薬 (有機リン系農薬、カーバメート系農薬)	Oasis HLB 及び InertSep Active Carbon Jr.で精製し、メタノールに転溶して LC-MS で測定する。	宮澤孝仁ら，医学検査(2014), 63(4), 399-406
GC-MS/MS LC-MS/MS	毛髪	睡眠薬	リン酸塩緩衝液中で 1 夜放置し、ジエチルエーテル/ジクロルメタンで液液抽出して GC-MS/MS 及び LC-MS/MS で測定する。	中島憲一郎，分析化学(2008), 57(10), 783-799 (総説論文)

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

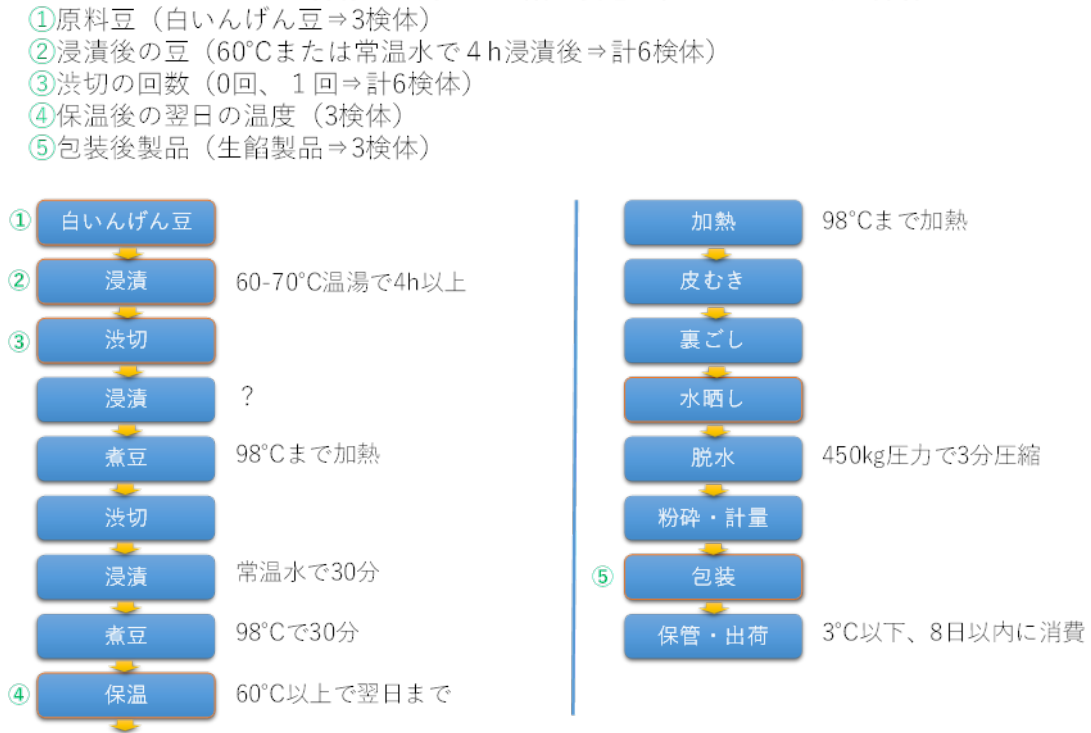


図 1. 生餡の製造工程フローと採材

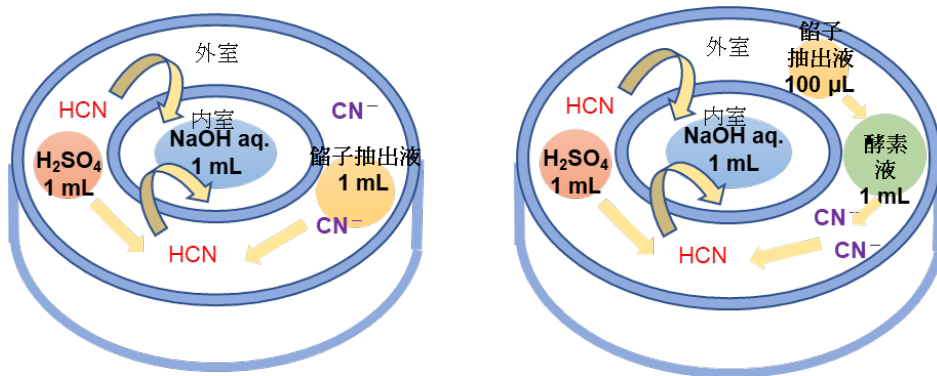


図 2. コンウェイ皿を用いた拡散法の概略図. 左) 遊離シアンの分析、右) シアノ配糖体の分析.

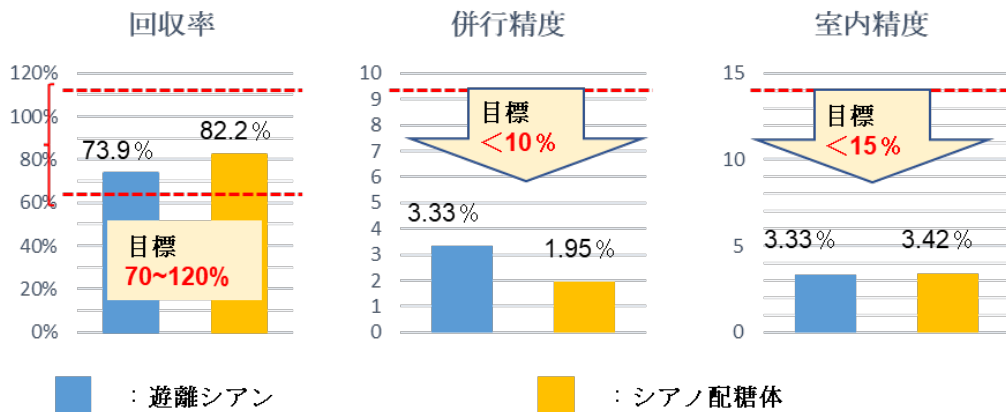


図 3. 生餡中のシアン化物イオンの分析法の妥当性評価試験結果.

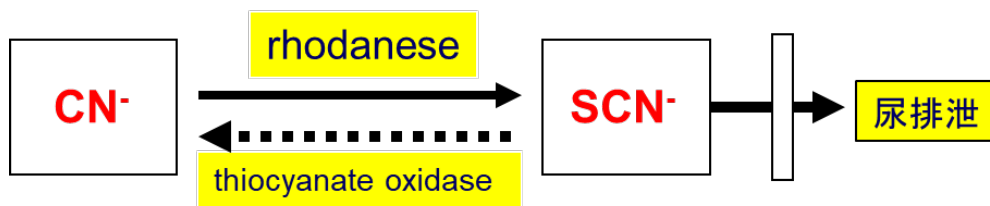


図 4. 生体内シアンイオン代謝経路.

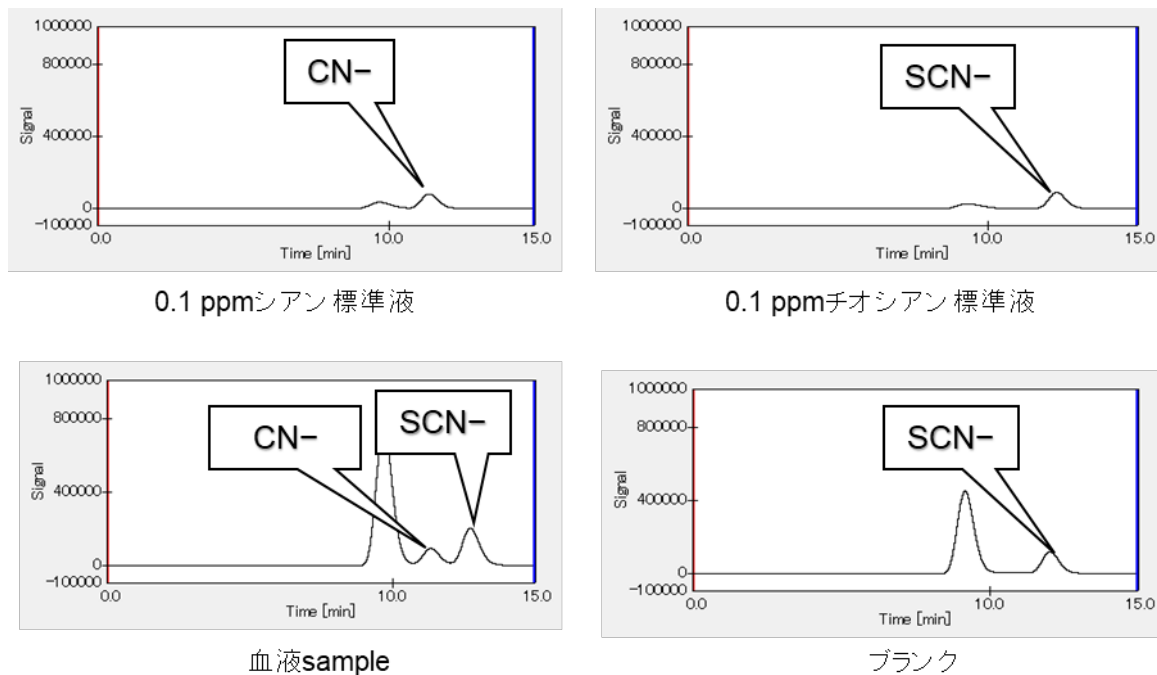


図 5. シアン化物イオン及びチオシアン酸イオンのクロマトグラム例.

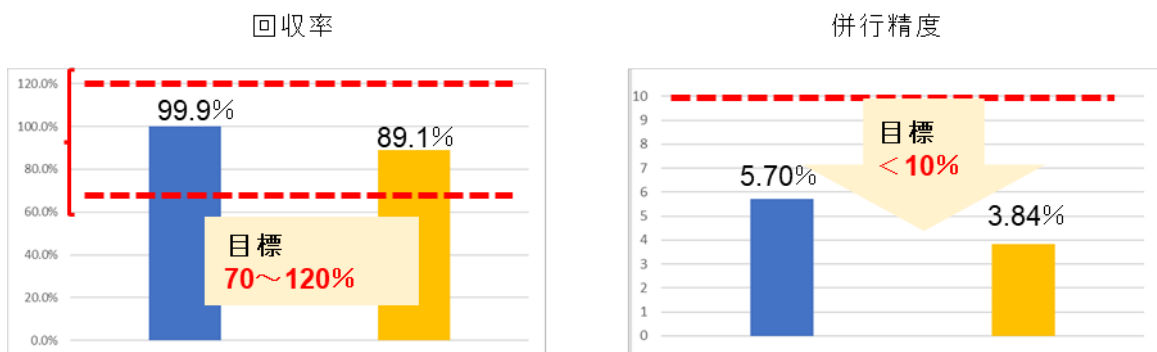


図 6. 血液中シアン化物イオン及びチオシアン酸イオンの分析法の添加回収試験結果.

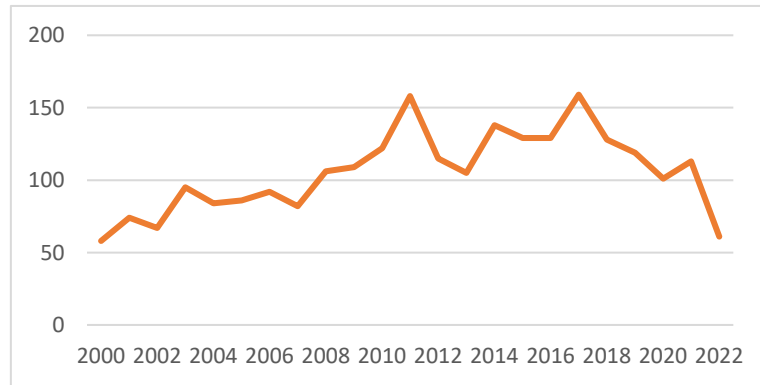


図7. 「異物」、「混入」及び「事例」の3語検索によるヒット数の経年変化

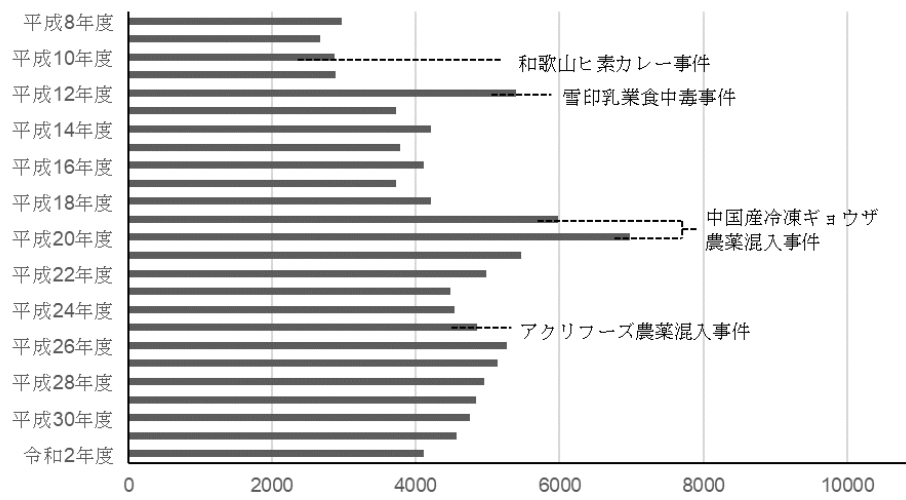


図8. 東京都の食品衛生関係苦情件数