

3 調査研究

3・1 報 文

1) トリプレックス・リアルタイム PCR 法による 糞便からの食中毒菌迅速スクリーニング法の開発

古川 真斗 徳岡 英亮 原田 誠也

要 旨

LightCycler 2.0/480 II を用い、主要な食中毒菌 3 菌種（カンピロバクター ジェジュニ、サルモネラ属菌、腸炎ビブリオ）の標的遺伝子を 1 チューブで一斉に検出できるトリプレックス・リアルタイム PCR 法（TaqMan プローブ法）を開発した。

本法を食中毒検査に導入することで、原因菌検索の手間、時間及びコストを大幅に削減することができ、かつ原因菌の推定情報を速やかに各関係機関へ提供することで、感染拡大の防止、及び行政対応の迅速化に大きく寄与できると考えられた。

キーワード：トリプレックス・リアルタイム PCR, 食中毒菌, LightCycler

はじめに

細菌性食中毒の検査は培養法が基本であり、患者便、検食、施設の拭き取り等から直接分離培養及び増菌培養等を行い、原因菌を分離・同定する。しかし培養法では、直接分離培養でも原因菌の推定に 1~2 日間、さらに生化学的性状検査による同定に 1~2 日間を要する。そのため、分離培養後、分離培地上のコロニーから直接 PCR 法で原因菌の特異遺伝子を検出・同定し、同定時間を数時間に短縮する方法が多用されているが、分離培養の時間は必要であり、顕著な時間短縮とはなっていない。

近年、従来の PCR 装置より迅速・正確・高感度に標的遺伝子を検出できるリアルタイム PCR 装置が急速に

普及した。この装置を用いたリアルタイム PCR 法には、二重鎖 DNA に結合する SYBR Green I などの蛍光物質を用いるインターカレート法と TaqMan プローブなどの蛍光標識プローブを用いる蛍光プローブ法があり、福島ら¹⁾や飯田ら²⁾は、患者便等から直接 DNA を抽出し、インターカレート法を用いたデュプレックス（1 チューブ 2 菌種）・リアルタイム PCR 法を報告した。しかし、インターカレート法は非特異的な増幅産物やプライマーダイマー等にも反応するため、リアルタイム PCR 法の反応終了後に融解曲線（Tm）分析を行い、特異性を確認する必要がある。一方、蛍光プローブ法は蛍光プローブが標的 DNA に対し特異的に設計してあるため、インターカレート法より特異性の面で優れ

ている。

そこで本研究では、蛍光プローブ法 (TaqMan プローブ法) による食中毒菌の迅速スクリーニング法を開発し、原因菌の検索作業を効率化することを目的とした。

手始めに、主要な感染型食中毒菌であるカンピロバクター ジェジュニ、サルモネラ属菌及び腸炎ビブリオをターゲットとしたトリプレックス (1 チューブ 3 菌種)・リアルタイム PCR 法を開発した。

材料と方法

1 試薬

リアルタイム PCR の反応試薬には、Premix Ex Taq (TaKaRa) を使用し、各種プライマーは TaKaRa の DNA 合成を利用して作製した。また、各種今回使用した TaqMan プローブ (FAM [検出波長: 530nm], Pulsar 650 [検出波長: 705nm], Cal Fluor Red 610 [検出波長: 610nm], クエンチャーは全て BHQ) は、バイオサーチテクノロジーズジャパンに合成を依頼した。

2 使用機器

本研究は当初、LightCycler 2.0 (Roche) の使用を前提として開始したが、新たに LightCycler 480 II (Roche) が整備されたため、こちらの機種でも同様の検討を行った。

3 使用菌種

実験には当所で分離した保存菌株を使用した。カンピロバクター ジェジュニは、プレストン培地で 48 時間好気培養した。菌数は 1.02×10^8 cfu/ml であった。サルモネラは、Trypticase Soy Agar (以下「TSA」という。) で一夜培養後、Tryptic Soy Broth (以下「TSB」という。) に接種して 24 時間培養した。菌数は 1.03×10^9 cfu/ml であった。腸炎ビブリオは 2%NaCl 加 TSA で一夜培養後、2%NaCl 加 TSB に接種して 24 時間培養した。菌数は 5.5×10^7 cfu/ml であった。

DNA の抽出は、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を

用いて、添付の説明書どおりに実施した。

4 リアルタイム PCR 法に最適なプライマーと蛍光プローブの選択及び反応条件の検討

今回、カンピロバクター ジェジュニ、サルモネラ属菌及び腸炎ビブリオについて、Josefsen ら³⁾、Luke ら⁴⁾及び Linda ら⁵⁾の文献を参照して標的遺伝子、プライマー及びプローブを決定した。採用したプライマー及びプローブの塩基配列は表 1 に示した。

使用する蛍光色素は、LightCycler 2.0 の説明書を参照し、検出チャンネルの離れた FAM 及び Pulsar 650 を選択した。また、クエンチャーはクエンチング性能のよい Black Hole Quenchre (BHQ) を採用した。

まず、モノプレックス (1 チューブ 1 菌種)・リアルタイム PCR 法は、前記文献³⁻⁵⁾記載の反応液組成及び条件を参照し、表 2 及び 3 のとおりに実施した。

次に、デュプレックス・リアルタイム PCR 法を検討した。最適な蛍光色素の組み合わせを選定するために、6 通りの組み合わせを検討した。反応液組成は表 4、反応条件は表 3 に示した腸炎ビブリオの反応条件とした。

さらに、トリプレックス・リアルタイム PCR 法を行うため、新たな蛍光色素・クエンチャーを 1 セット (Cal Fluor Red 610-BHQ) 追加した。反応液組成及び条件は表 5 に示した。また、異なる蛍光検出チャンネル間で蛍光が重なって検出されるクロストークを最小化し、1 つの蛍光検出チャンネルで 1 つの蛍光色素しか検出できないようにするため、LightCycler 2.0 の機能の一つである Color Compensation Analysis (以下「CCA」という。) を実施した。

表 1 各種プライマー及びプローブの塩基配列

プライマー名	菌種	標的因子	塩基配列	参考文献
Cj-F	カンピロバクター ジェジュニ	16SrRNA	5' CTG CTT AAC ACA AGT TGA GTA GG 3'	1
Cj-R			5' TTC CTT AGG TAC CGT CAG AA 3'	
Cj-Probe			5' TGT CAT CCT CCA CGC GGC GTT GCT GC 3'	
Sal-F	サルモネラ属菌	<i>invA</i>	5' GCG TTC TGA ACC TTT GGT AAT AA 3'	2
Sal-R			5' CGT TCG GGC AAT TCG TTA 3'	
Sal-Probe			5' TGG CGG TGG GTT TTG TTG TCT TCT 3'	
Vp-F	腸炎ビブリオ	<i>tdh</i>	5' GTA RAG GTC TCT GAC TTT TGG AC 3'	3
Vp-R			5' CTA CAG AAT YAT AGG AAT GTT GAA G 3'	
Vp-Probe			5' ATT TTA CGA ACA CAG CAG AAT GA 3'	

表 2 1 反応 1 菌種のリアルタイム PCR 反応液組成

カンピロバクター ジェジュニ		サルモネラ属菌		腸炎ビブリオ	
試薬名	容量 (μl)	試薬名	容量 (μl)	試薬名	容量 (μl)
Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10
Cj-F (10μM)	0.5	Sal-F (10μM)	1	tdh-F (20μM)	0.4
Cj-R (10μM)	0.5	Sal-R (10μM)	1	tdh-R (20μM)	0.4
Cj-FAM (10μM)	0.5	Sal-FAM (10μM)	0.4	tdh-FAM (20μM)	0.2
DW	6.5	DW	5.6	DW	4
sub-total	18	sub-total	18	sub-total	15
DNA	2	DNA	2	DNA	5
total	20	total	20	total	20

カンピロバクター ジェジュニ		サルモネラ属菌		腸炎ビブリオ	
試薬名	容量 (μl)	試薬名	容量 (μl)	試薬名	容量 (μl)
Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10
Cj-F (10μM)	0.5	Sal-F (10μM)	1	tdh-F (20μM)	0.4
Cj-R (10μM)	0.5	Sal-R (10μM)	1	tdh-R (20μM)	0.4
Cj-Pulsar650 (10μM)	1	Sal-Pulsar650 (10μM)	0.4	tdh-Pulsar650 (20μM)	0.4
DW	6	DW	5.6	DW	3.8
sub-total	18	sub-total	18	sub-total	15
DNA	2	DNA	2	DNA	5
total	20	total	20	total	20

表 3 1 反応 1 菌種のリアルタイム PCR 反応条件

カンピロバクタージェジュニ	サルモネラ属菌	腸炎ビブリオ
pre-incubate 95°C 30s	pre-incubate 94°C 60s	pre-incubate 95°C 30s
PCR 95°C 15s (40cycle) 58°C 60s	PCR 94°C 0s (40cycle) 60°C 20s	PCR 94°C 20s 58°C 20s (50cycle) 72°C 30s
cooling 40°C 30s	cooling 40°C 30s	cooling 40°C 30s

表 4 1 反応 2 菌種同時スクリーニングの反応液組成

Cj (FAM)-Sal (Pulsar650)		Sal (FAM)-Cj (Pulsar650)		Vp (FAM)-Cj (Pulsar650)	
試薬名	容量 (μl)	試薬名	容量 (μl)	試薬名	容量 (μl)
Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10
Cj-F (10μM)	0.5	Sal-F (10μM)	1	tdh-F (20μM)	0.4
Cj-R (10μM)	0.5	Sal-R (10μM)	1	tdh-R (20μM)	0.4
Cj-FAM (10μM)	0.5	Sal-FAM (10μM)	0.4	tdh-FAM (20μM)	0.2
Sal-F (10μM)	1	Cj-F (10μM)	0.5	Cj-F (10μM)	0.5
Sal-R (10μM)	1	Cj-R (10μM)	0.5	Cj-R (10μM)	0.5
Sal-Pulsar650 (10μM)	0.4	Cj-Pulsar650 (10μM)	1	Cj-Pulsar650 (10μM)	1
DW	4.1	DW	3.6	DW	5
sub-total	18	sub-total	18	sub-total	18
DNA	2	DNA	2	DNA	2
total	20	total	20	total	20

Cj (FAM)-Vp (Pulsar650)		Sal (FAM)-Vp (Pulsar650)		Vp (FAM)-Sal (Pulsar650)	
試薬名	容量 (μl)	試薬名	容量 (μl)	試薬名	容量 (μl)
Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10	Premix Ex Taq	10
Cj-F (10μM)	0.5	Sal-F (10μM)	1	tdh-F (20μM)	0.4
Cj-R (10μM)	0.5	Sal-R (10μM)	1	tdh-R (20μM)	0.4
Cj-FAM (10μM)	0.5	Sal-FAM (10μM)	0.4	tdh-FAM (20μM)	0.2
tdh-F (20μM)	0.4	tdh-F (20μM)	0.4	Sal-F (10μM)	1
tdh-R (20μM)	0.4	tdh-R (20μM)	0.4	Sal-R (10μM)	1
tdh-Pulsar650 (20μM)	0.4	tdh-Pulsar650 (20μM)	0.4	Sal-Pulsar650 (10μM)	0.4
DW	5.3	DW	4.4	DW	4.6
sub-total	18	sub-total	18	sub-total	18
DNA	2	DNA	2	DNA	2
total	20	total	20	total	20

表 5 1 反応 3 菌種同時スクリーニングの反応液組成及び反応条件

試薬名	容量(μl)
Premix Ex Taq	10
Cj-F(10μM)	0.4
Cj-R(10μM)	0.4
Cj-Red610(10μM)	0.8
Sal-F(10μM)	0.4
Sal-R(10μM)	0.4
Sal-Pulsar650(10μM)	0.8
tdh-F(20μM)	0.2
tdh-R(20μM)	0.2
tdh-FAM(20μM)	0.4
DW	4
	18
DNA	2
total	20

反応条件	
pre-incubate	95°C 30s
PCR	95°C 5s (40cycle) 60°C 30s
cooling	40°C 30s

5 検出限界の測定

3で抽出したDNA溶液をQIAamp DNA Mini Kit付属のAE bufferで10倍段階希釈したものを検体としてリアルタイムPCR法を実施し、検出限界を測定した。

6 実際の食中毒事例への適用例

本年5月に飲食店で発生した食中毒事例で本法を適用した。すなわち、食中毒患者便8検体及び従業員便2検体について、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)を用いて、添付の説明書どおりDNAを抽出し、本法に供した。

結果

1 リアルタイムPCR法に最適なプライマー、蛍光色素の選択及び反応条件の検討

まず、LightCycler 2.0を用い、モノプレックスで標的遺伝子の増幅及び2種類の蛍光色素標識プローブで検出可能か確認したところ、3菌種とも検出可能であった。次に、デュプレックス・リアルタイムPCR法を行うために、蛍光色素の組み合わせを選定した。結果は図1のとおり、いずれも同一反応条件で遺伝子の増幅が確認され、どの蛍光色素の組み合わせでも検出が可能であることが分かった。さらに、蛍光検出チャンネルをそれぞれの蛍光色素の検出波長に切り替えると、目的とする蛍光のみが検出された。このことから、

LightCycler 2.0を使用したデュプレックス・リアルタイムPCR法が可能となった。

続いて、トリプレックス・リアルタイムPCR法を行うため、蛍光色素にCal Fluor Red610-BHQを追加した。結果は、図2のとおりで、3菌種の遺伝子増幅は確認されたものの、蛍光検出チャンネルをPulsar 650 (705nm)に合わせると、FAM及びPulsar 650の蛍光波長が同時に検出されることが判明した。これを解決するためCCAを実施したところ、図3のとおり、蛍光強度が補正され、1蛍光検出チャンネルあたり1蛍光色素の検出が可能となった。以上の結果から、今回設定した反応条件及びCCAを用いることで、LightCycler 2.0によるトリプレックス・リアルタイムPCR法が確立した。

また、LightCycler 480 IIでも検討したところ、この機種でも同様にCCAを設定することでトリプレックス・リアルタイムPCR法が可能であった。

2 検出限界の測定

検出限界の測定結果を図4に示した。各菌種とも、LightCycler 2.0での定量下限値は 10^3 cfu/mlであり、LightCycler 480 IIでも同様であった。

3 実際の食中毒事例での適用例

本法を実際の食中毒事例に適用したところ、患者便8検体からカンピロバクター ジェジュニの標的遺伝子が検出され、そのうち7検体から実際に菌が分離された。

本食中毒事例では、2日に亘り患者便が搬入され、分離培養による原因菌の推定に2日、生化学的性状検査による同定に2日を要したが、本法では初回の搬入から約3時間で原因菌の推定情報を提供することができた。

考察

本研究は、リアルタイムPCR装置LightCycler 2.0によるトリプレックス・リアルタイムPCR法を開発するために開始した。LightCycler 2.0は96ウェルのプレートではなく、独立したガラスキャピラリーでPCR反応を行う装置であるため、少数の検体でも使い勝手が良く、非常に重宝している。この装置は6つの蛍光検出チャンネルを装備しているが、励起光源がLEDであるため、励起波長(470nm)は単一である。このため、TaqManプローブ法で検出する場合、この波長で効果的に励起できる蛍光色素を選択する必要があり、蛍光色素の種類が制限される。今回、デュプレックス・リアルタイムPCR法を開発するため、蛍光色素としてFAM

及び Pulsar 650 を先に選択した。検討を重ねてデュプレックス・リアルタイム PCR 法を開発することができたため、Cal Fluor Red 610 を追加し、トリプレックス・リアルタイム PCR 法を検討した。しかし、Pulsar 650 の検出チャンネルに合わせると、FAM と Pulsar 650 の蛍光が重なって検出されるクロストークの問題が発生した。この問題は、上述のとおり、CCA で解決することができた。

また本法は、トリプレックス・リアルタイム PCR 法であるため、使用する試薬は通常の 1/3 で済ませることができ、かつ蛍光プローブ法を採用しているため、インターカレート法より特異性も高い。

検出限界の測定を実施したところ、各菌種の定量下

限値は 10^3 cfu/ml であった。一般に、食中毒患者の急性期の糞便には 10^6 cfu/g 以上の原因菌が排菌されることから⁶⁾、急性期患者の糞便が入手できれば、今回開発した方法で原因菌を検出することが十分可能である。

今回開発したトリプレックス・リアルタイム PCR 法を実際に発生した食中毒事例で試したところ、患者便 8 検体からカンピロバクター ジェジュニの標的遺伝子が検出された。培養検査により、そのうち 7 検体から菌が分離されたが、1 検体は分離することができなかった。この 1 検体は、本法でのピークの立ち上がりが極めて遅かったため、非特異的なものであったのか、または菌量ごく微量であった可能性等が考えられたことから、今後も十分な検討が必要である。

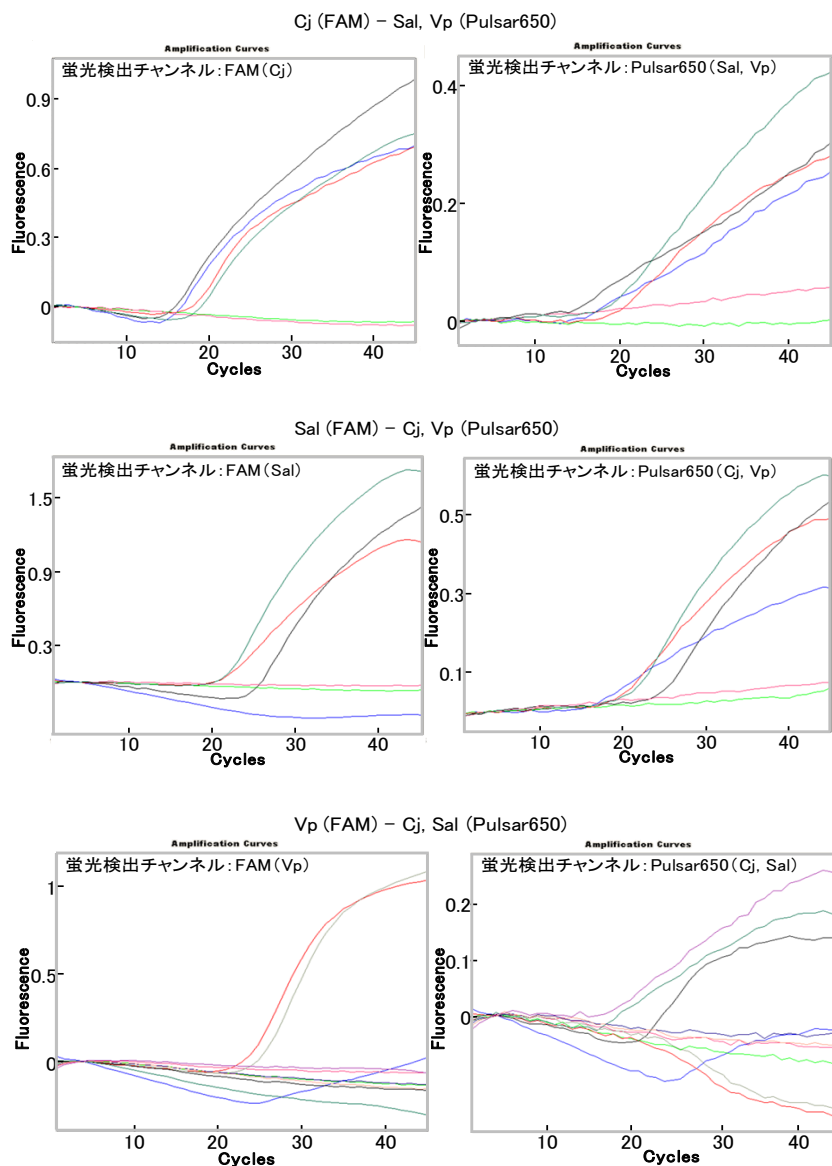


図 1 リアルタイム PCR 結果 (デュプレックス・スクリーニング)

Cj : カンピロバクター ジェジュニ Sal : サルモネラ属菌 Vp : 腸炎ビブリオ

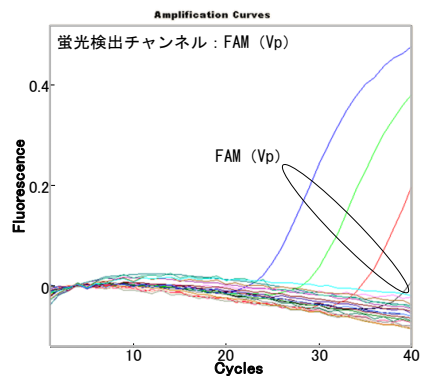
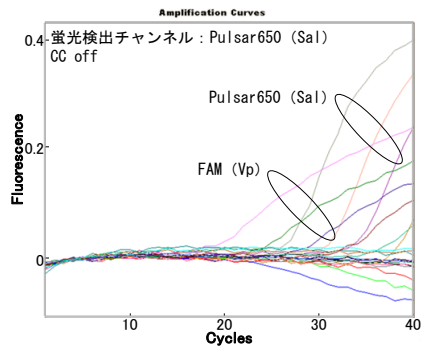
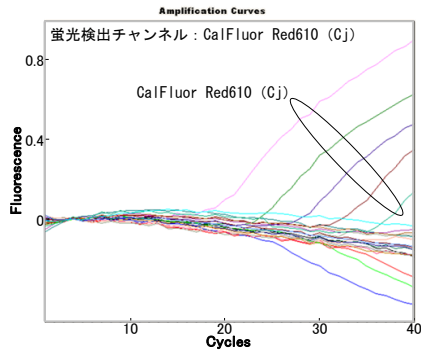


図2 リアルタイム PCR 結果 (Cj - Sal - VP)

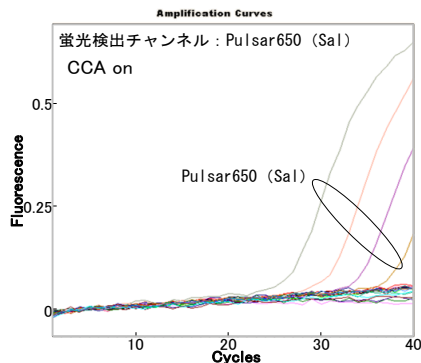


図3 リアルタイム PCR 結果 (CCA 補正後)

食中毒菌の培養検査は、直接分離培養でも菌の推定に1～2日間を要するが、本法ではわずか3時間程度で迅速に原因菌の推定情報を得ることができるため、その後の検査の方向性を決めやすく、検査の効率化に繋がる。

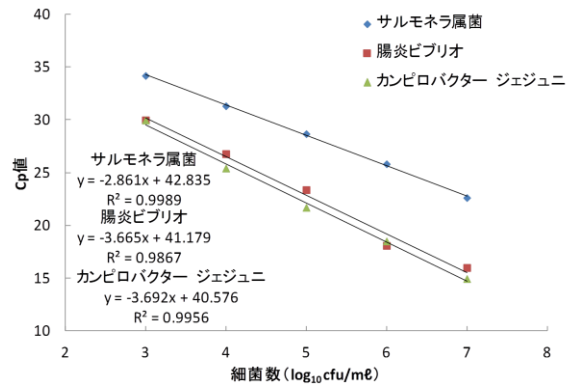


図4 定量下限値の測定

また、検体搬入後短時間で、現場へ原因菌の推定情報を提供できるため、極めて有用な方法であると考えられる。

まとめ

主要な食中毒起因菌3菌種(カンピロバクター ジェジュニ, サルモネラ属菌, 腸炎ビブリオ)を標的とした特異的プライマー及びTaqManプローブを用いたトリプレックス・リアルタイムPCR法の開発により、検体搬入後、約3時間で結果が判明する迅速スクリーニングが可能となった。本法はトリプレックス・リアルタイムPCR法であるため、使用する試薬も1/3で済ませることができ、かつ蛍光プローブを採用しているため、特異性も高い。検出下限値は各菌種とも 10^3 cfu/mlであったが、一般に食中毒患者の急性期糞便には 10^6 cfu/g以上の原因菌が排出されることから、本法は十分使用可能である。

本法を実際の食中毒事例に適用したところ、約3時間で結果が得られ、陽性となった検体から高率に目的の原因菌が分離された。また、このことから、その後の原因菌検索の手間が大幅に減少した。

今回構築したマルチプレックス・リアルタイムPCR法は、迅速性、特異性に優れた方法であり、食中毒検査時に本法を導入することで、余分な検査を省き、コストを大幅に削減することができる。さらに、今回の蛍光色素の組合せは他の菌種への応用が可能であり、現在、検査対象菌種の拡大を検討している。

参考文献

- 1) 福島博, 角森ヨシエ: 感染症学雑誌, 79, 644-655, (2005).
- 2) 飯田奈都子, 高橋奈緒美, 廣井みどり, 八木美弥, 西尾智裕, 神田 隆: 静岡県環境衛生科学研究所, 53, 19-24 (2010).
- 3) Josefsen MH, Jacobsen NR, Hoorfar J: *Appl. Environ.*

Microbiol., 3588-3592 (2004).

- 4) Luke TD, William JB, James CM, Margaret SN, Lynn AC, William BH, Linda G, W. S. Riggins, Sandra M, Ann S, Kenton LL : *J. Clin. Microbiol.*, **40**,3050-3052 (2002).
- 5) Linda NW, Asim KB : *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2031-2042 (2006).
- 6) Fukushima H, Katsube K, Tsunomori Y, Kishi R, Atsuta J, Akiba Y : *Int. J. Microbiol.*, Published online June 24 (2009).

2) 熊本県における日本紅斑熱の疫学調査

大迫英夫 古川真斗 徳岡英亮 松尾 繁¹⁾ 八尋俊輔²⁾ 松本一俊³⁾
本田俊郎⁴⁾ 山本正悟⁵⁾ 安藤秀二⁶⁾ 猪熊 壽⁷⁾ 和田正文⁸⁾ 原田誠也

要 旨

マダニ媒介性の *Rickettsia Japonica* (Rj) 感染症である日本紅斑熱 (JSF) が、2007 年から上天草地域を中心に増加した。本研究所は共同研究機関と連携し、2007 年から 2011 年まで、患者データの収集、患者多発地域の野外捕獲マダニ、野鼠類、イノシシ、イノシシ付着マダニ及びイヌ付着マダニの調査を行った。

その結果、患者多発時期は 8 月～10 月であり、農作業時に感染した事例が多かった。また、多発地域のヤマアラシチマダニとアカネズミから Rj が分離された。一方イノシシは、血中からリケッチア属特異的 *gltA* 遺伝子は検出されず、Rj に対する抗体が認められたこと及び付着マダニから Rj 遺伝子が検出されたことから、Rj 保有マダニの運搬動物となっている可能性が考えられた。

また、発生地域の野外捕獲マダニ及びイノシシ付着マダニのみならず、県内各地のイヌ付着マダニからも、Rj に近縁の *gltA* 遺伝子が検出されたことから、発生地域以外でも野外での活動には十分注意する必要があると考えられた。

キーワード：日本紅斑熱，イノシシ，ヤマアラシチマダニ，*gltA* 遺伝子

はじめに

日本紅斑熱 (JSF) は、1984 年に徳島県阿南市の開業医である馬原によって初めて報告された比較的新しいマダニ媒介性のリケッチア感染症で、病原体は 1992 年に徳島大学の内田らにより *Rickettsia Japonica* (Rj) と命名された。

本感染症は、1999 年 4 月には感染症法の第四類感染症に指定され、全数把握疾患となった。高熱、発疹、全身倦怠等の臨床症状を呈し、重症例や死亡例の報告もある。症状が *Orientia Tsutsugamushi* 感染症であるツツガムシ病と似ているため、臨床症状からの診断は困難と言われている。本感染症の患者は、従来、南九州や四国等をはじめとする主に西日本の温暖な太平洋沿いを中心に少数確認されていたが、2007 年から増加し、発生地域も北陸や東北地方にまで拡大した。さらに最近では、Rj 以外に、*R. helvetica* や *R. heilongjiangensis* による紅斑熱も報告されている。

熊本県では、2002 年に初めて 1 例確認されたが、そ

の後数年間、患者発生は見られなかった。ところが、2007 年から上天草市を中心に患者が増加した¹⁾。

そこで我々は、2007 年から患者及び患者多発地域である上天草市のマダニ類と野鼠類の調査を開始した。また、患者多発地域では近年イノシシの増加が著しく、JSF 増加との関連が取り沙汰されていることから、イノシシの役割解明に取り組んだ。さらに、県内のマダニのリケッチア保有状況を明らかにし、患者発生防止のための有益な情報を県民に提供することを目的として、県動物管理センターに搬入されたイヌ (飼育放棄犬や捕獲犬等) に付着したマダニの調査を行った。

なお、2007 年まで確認された 16 症例の患者情報は既に資料として掲載¹⁾したが、今回はそれも含めて 2011 年までの調査結果を報告する。

材料と方法

1) 患者検体：2002 年～2012 年 3 月末までにリケッチア感染症の疑いで検査依頼のあった患者血清 135 名分

¹⁾ 芦北地域振興局保健福祉環境部，²⁾ 熊本県薬務衛生課，³⁾ 菊池振興局保健福祉環境部，⁴⁾ 鹿児島県立大島病院，⁵⁾ 宮崎大学，⁶⁾ 国立感染症研究所，⁷⁾ 帯広畜産大学，⁸⁾ 上天草総合病院

について、リケッチア感染症診断マニュアル²⁾に準じ、Rj(YH株)とツツガムシ(Karp株, Kat株, Gilliam株, Kawasaki株及びKuroki株)を抗原とした間接蛍光抗体法(IFA)でIgM抗体価及びIgG抗体価を測定し、原則として、ペア血清で4倍以上の抗体価上昇が認められたものを陽性と判定した。その他、刺し口の痂皮28名及び血液33名分について、QIAamp BloodDNA mini Kid(QIGENA)でDNAを抽出し、古屋らのPCR法³⁾及び花岡らのリアルタイムPCR法⁴⁾でRj特異的遺伝子の検出を行った。また、患者データは患者調査票を集計した。

2)野鼠類:シャーメントラップ又は網籠で捕獲した野鼠類81匹について、種を同定し、心臓からの採血後、腹部を切開して、肝臓、脾臓及び腎臓を採取した。臓器乳剤作成後、上記抽出キットでDNAを抽出し、古屋らのPCR法³⁾でRj特異的遺伝子検出を行った。

3)イノシシ:上天草地域で捕獲されたイノシシの血液49検体について、IshikuraらのPCR法⁵⁾によるリケッチア属に特異的な*gltA*遺伝子の検出及びIFAによる血清抗体価の測定を行った。また、イノシシの捕獲頭数は、上天草市農林水産課から聴取した。

4)マダニ:上天草地域で旗振り法により捕獲した野外捕獲マダニ1282匹、上記イノシシに付着していたイノシシ付着マダニ388匹及び県動物管理センターに搬入されたイヌ(飼育放棄犬や捕獲犬等)に付着したマダニ114匹について、種の同定後、マダニ乳剤からアルカリ抽出法でDNAを抽出し、PCR法で*gltA*遺伝子及びRj特異的遺伝子を検査した。ただし、イヌ付着マダニについては、県動物管理センターで保健所毎及びマダニの種類毎に数匹ずつプール(46プール)して検体とした。なお、PCR法によりRj特異的遺伝子が検出された場合には、単層培養したL929細胞に接種し、リケッチア分離を試みた。また、上記検体から検出されたPCR産物の一部及び培養後分離されたリケッチアのPCR産物を精製後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。野外捕獲及び犬付着マダニから検出した*gltA*遺伝子の一部は、決定した塩基配列をClustal Wで解析した後、MEGA5により系統樹を作成した。

結 果

1)患者検体:2002年~2012年3月末までに、IFAによりJSF74例、ツツガムシ病15例の陽性が確認された。血清以外の臨床検体では、刺し口の痂皮6検体及び血液2検体がPCR法でRj特異的遺伝子陽性となり、このうち血液2検体からRjが分離された。紅斑熱患者

の年別患者数は、2002年1例、2006年2例、2007年13例、2008年14例、2009年16例、2010年9例、及び2011年19例の合計74例で、全国的な傾向で2007年以降増加している(図1)。患者発生月は3月~11月で、特に8月14例、9月15例、10月24例と8月~10月の3ヶ月に53例(約71%)が発生した(図2)。推定感染地域(図3)は、上天草地域49例、天草地域12例、八代地域6例、球磨地域1例、熊本市1例、及び不明・県外5例であった。患者が最も多かった上天草市の地域別内訳は、龍ヶ岳町29例、松島町11例、姫戸町9例であった。患者の年齢は、70代が最も多く45%を占め、次が60代17%であった(図4)。推定感染場所は、野山63%、平地33%(図5)で、農作業時の感染が67%と最も多く、次いで森林作業が9%であった(図6)。なお、IFAでツツガムシ病と診断された症例は、2003年1例、2004年3例、2005年4例、2006年1例、2010年3例、2011年3例で、患者発生月は、10月4例、11月7例、12月2例、1月1例、4月に1例であった。

2)野鼠類:捕獲された野鼠類81匹の内訳は、アカネズミが79匹、ヒメネズミが1匹及びヒミズが1匹であった。そのうちアカネズミ1匹の肝臓及び脾臓からPCR法によりRj特異的遺伝子が検出された。PCR産物のダイレクトシーケンスで得られた塩基配列はRjと100%一致した。

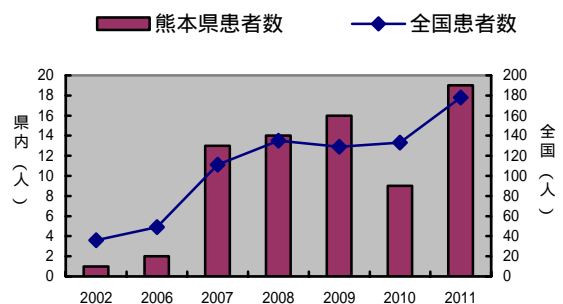


図1 紅斑熱患者数(県内、全国)推移

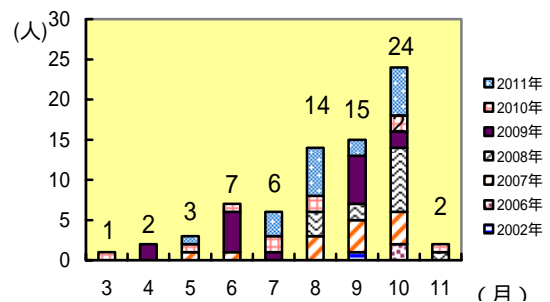


図2 紅斑熱患者数月別累積発生数

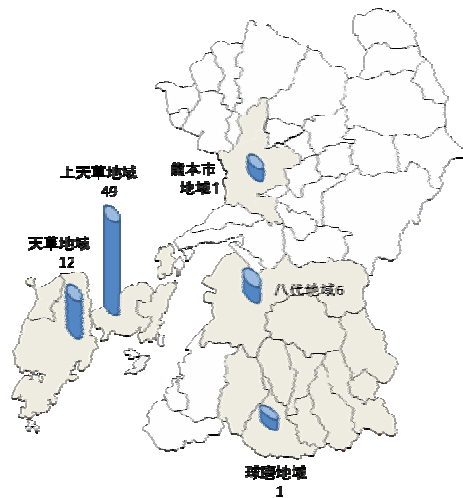


図3 県内の推定感染地域患者数

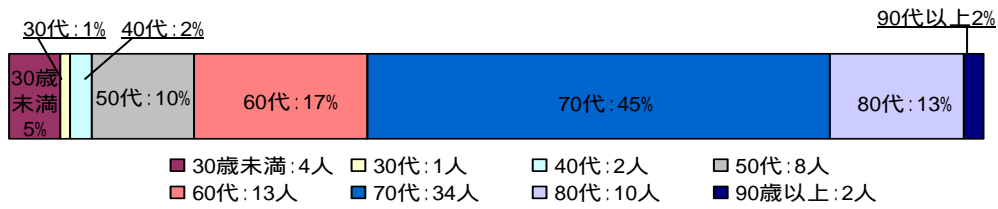


図4 年齢別患者割合



図5 推定感染場所の地形

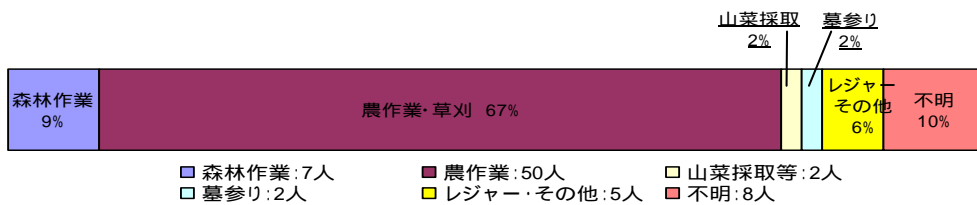


図6 感染時の状況

3) イノシシ: 血液から *gltA* 遺伝子は検出されなかったが、全頭から紅斑熱群リケッチアに対する抗体が検出された。抗体価は 40~640 倍の範囲で、160 倍が最も多く 22 頭であった。(図 7)。上天草地域のイノシシ捕獲頭数は、2002 年: 2 頭, 2006 年: 37 頭, 2007 年: 149 頭, 2008 年: 328 頭, 2009 年: 268 頭, 2010 年: 894 頭, 2011 年: 692 頭で、患者が増加した 2007 年以降増加傾向にあった(図 8)。

4) マダニ: 野外捕獲マダニは、タカサゴキララマダニ (At): 13 匹, キチマダニ (Hfl): 6 匹, タカサゴチマダニ (Hfo): 808 匹, ヤマアラシチマダニ (Hh): 196 匹, フトゲチマダニ (Hl): 71 匹, オオトゲチマダニ (Hm): 80 匹, アカコッコマダニ (It): 108 匹の合計 3 属 7 種 1282 匹が採取され、そのうち、Hfo と Hh が多数を占めた(図 9)。PCR 検査では、Hfo: 27 匹, Hh: 20 匹, Hl: 3 匹, It: 8 匹, 及び Hm: 2 匹の 2 属 5 種のマダニ 60 匹が *gltA* 遺伝子陽性であった。Hh: 4 匹は Rj 特異的遺伝子も陽性で、若虫と成虫雌の各 1 匹から Rj が分離された(表 1)。イノシシ付着マダニは、2 属 4 種 388 匹 (At: 52 匹, Hfl: 9 匹, Hfo: 153 匹, Hh: 148 匹, その他のチマダニ: 26 匹) であった(図 10)。そのうちの 93 匹 (At: 18 匹, Hfl: 2 匹, Hfo: 16 匹, Hh: 51 匹, 及びその他のチマダニ: 6 匹) から *gltA* 遺伝子が検出され、ダイレクトシーケンスにより 3 種 11 匹 (At 1: 匹, Hfo: 2 匹, Hh: 8 匹) が Rj と同定された(表 2)。イヌ付着マダニは 2 属 3 種 114 匹 (Hfl: 46 匹, Hm: 23 匹, Hh: 5 匹, その他チマダニ属: 7 匹, マダニ属: 4 匹, 属種同定不可: 29 匹)(図 11) が採取され、そのうちの 17 プール (Hfl: 6 プール, Hm: 3 プール, Hh: 4 プール, その他チマダニ: 1 プール, 属種同定不可: 3 プール) から *gltA* 遺伝子が検出された(表 3)。保健所別では、有明: 5 プール, 山鹿・菊池: 4 プール, 宇城: 1 プール, 人吉・八代: 1 プール, 天草: 5 プール, 不明: 1 プールであった。

なお、Rj 特異的遺伝子は検出されなかった。マダニから検出された *gltA* 遺伝子 23 検体 (野外捕獲マダニ: 19 匹, イヌ付着マダニ: 4 プール) を選択し、ダイレクトシーケンス解析を行ったところ、21 検体 (野外捕獲マダニ: 18 検体, イヌ付着マダニ: 3 検体) が Rj と近縁であった(図 12)。

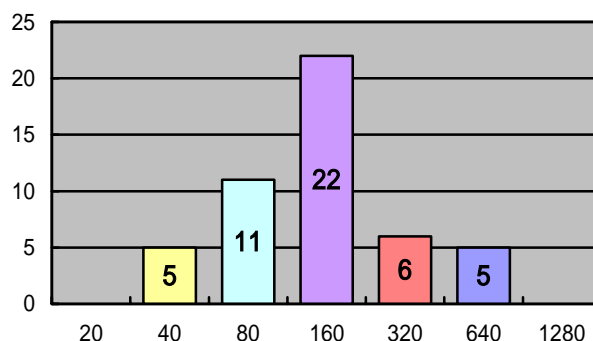


図 7 イノシシの Rj に対する抗体保有状況

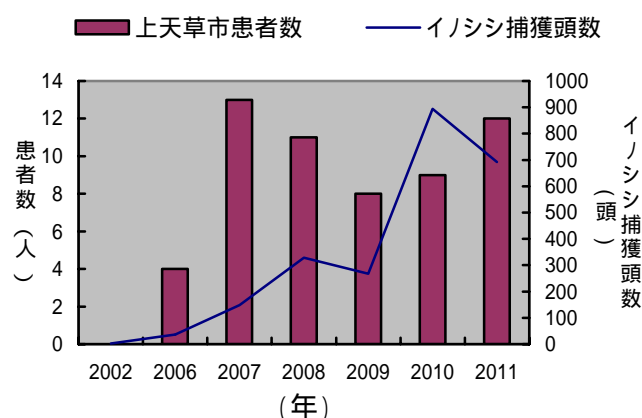


図 8 上天草市イノシシ捕獲頭数と上天草市 JSF 患者数推移

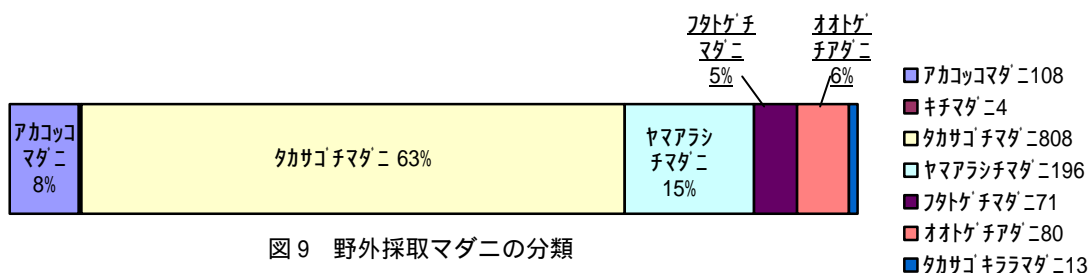


図 9 野外採取マダニの分類

表1 野外採取マダニ類別の遺伝子検出状況

	タカサゴ チマダニ	ヤマアラシ チマダニ	フタトゲ チマダニ	アカコッコ マダニ	オオトゲ チマダニ	合計
<i>gltA</i> 遺伝子 検出数	27	20	3	8	2	60
<i>Rj</i> 遺伝子検出数		4				4
<i>Rj</i> 分離数		2				2

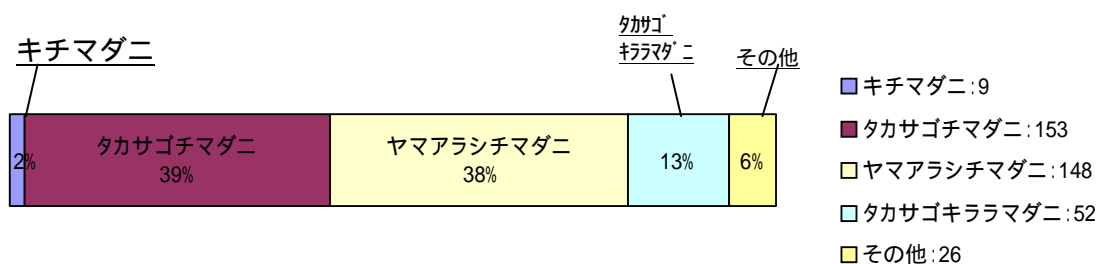


図10 イノシシ附着マダニの分類

表2 イノシシ附着マダニの種類別遺伝子検出状況

	タカサゴキ ララマダニ	キチマ ダニ	タカサゴ チマダニ	ヤマアラシ チマダニ	その他 チマダニ属	合計
<i>gltA</i> 遺伝子 検出数	18	2	16	51	6	93
<i>Rj</i> 遺伝子検出数	1	0	2	8	0	11

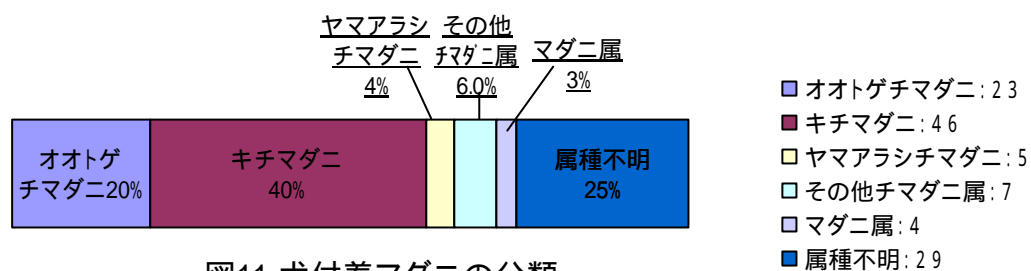


図11 犬附着マダニの分類

表3 イヌ附着マダニの種類別遺伝子検出状況

	マダニ属 種不明	キチマダニ	オオトゲ チマダニ	ヤマアラシ チマダニ	属種不明	合計
<i>gltA</i> 遺伝子検出 検体数	1	6	3	4	3	17

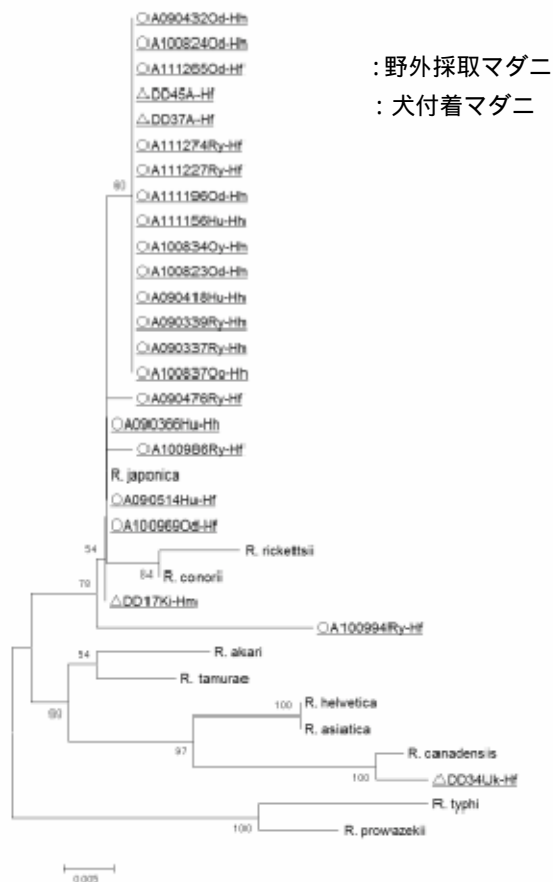


図 12 マダニ（野外捕獲，犬付着）から検出した *gltA* 遺伝子の系統樹

考 察

本県の JSF 患者発生は，上天草市が最も多く発生数の 66% (49/74) を占め，次が天草地域 16% (12/74)，八代地域 8% (6/74) の順であった。発生期間は 3 月～11 月で，特に 8 月～10 月の 3 か月に発生数の 71% (53/74) が集中していた。また，感染時の状況は農作業時が 67% で最も多かった。農繁期である晩夏～秋は農作業の機会が多いため，Rj 保有マダニに吸血される危険性が高くなると考えられた。患者多発地域では，農作業などで野山に入る場合，忌避剤の使用や，肌の露出を減らし，ダニが付着し難い素材の服の着用などの防ダニ対策を徹底することが重要と考えられる。

ヒト，イノシシ付着マダニ (At, Hfo, Hh) 及びアカネズミから Rj 特異的遺伝子が検出され，ヒト及び Hh から実際に Rj が分離されていることから，天草地域で増加している JSF の感染経路の一つとして，アカネズミをリザーバー，Hh, Hfo などを主な媒介マダニとしてヒトに感染する経路が推定された。

上天草地域のイノシシは，JSF 患者増加と共に増加

し，2007 年以降捕獲頭数も 3 桁となった。このことから JSF は，地元ではイノシシ病とも呼ばれていた。そこで今回，地元で捕獲されたイノシシ 49 頭について，血液検査を行ったところ，*gltA* 遺伝子は検出されず，全頭が Rj に対する抗体を保有していた。一方でイノシシ捕獲頭数が 894 頭と急増した 2010 年の JSF 患者発生数は 9 名で，2009 年の 16 名よりも少なかったこと，また，上天草市イノシシ被害実態調査報告書⁶⁾ による 2002 年～2008 年のイノシシ捕獲頭数は，上天草地域の 516 頭，隣接する天草地域の約 1 万頭に対し，JSF 患者数は，前者が 49 例，後者が 12 例であったことなどから，上天草地域の JSF 患者増加とイノシシ頭数増加との関連性は認められなかったが，関連性の解明は今後の検討課題である。Inokuma ら⁷⁾ は，洞爺湖の中ノ島の野生エゾシカで同様の調査を行い，シカの血液 112 検体中 8 検体から *R. helvetica* の遺伝子を検出した。また，同じくエゾシカの調査を行った Jilintai ら⁸⁾ は，22 検体中 15 検体に *R. helvetica* の抗体を認め，14 検体から *R. asiatica* の遺伝子を検出した。このことから，シカは紅斑熱群リケッチアのリザーバーである可能性がある」と報告している。本県で実施した今回の調査ではイノシシから *gltA* 遺伝子は検出されていないことから，イノシシが Rj のリザーバーとなっている可能性は低いと考えられるが，さらなる調査が必要である。

一方，イノシシ付着マダニから *gltA* 遺伝子及び Rj 特異的遺伝子が検出されており，イノシシに付着していた Rj 保有マダニが畑の周囲や人里で脱落して繁殖し，ヒトを吸血する頻度が高くなっている可能性，つまり，イノシシは Rj 保有マダニの運搬動物となっている可能性は高いと推測された。

上天草市の患者増加の要因は未だ不明であるが，地元の基幹病院の臨床医が非常に熱心で，地域住民を対象とした講演会や他の医療機関への情報提供を積極的に行っていること，及び患者増加がマスコミ報道されたことなどで地域住民の関心が高まっていること等により罹患者の発見率が上がった可能性があることも患者増加の一因と考えられた。

さらに今回の調査では，県内におけるマダニのリケッチア保有状況を把握するため，県内各地から県動物管理センターに搬入されたイヌに付着したマダニの調査も実施したところ，Rj の主要な媒介種として知られている Hh が採取された。また，Rj と近縁な遺伝子を持つマダニが検出された。森中ら⁹⁾ は，広島県のイヌ 200 頭中 37 頭 (18.5%) が紅斑熱群リケッチア抗体陽性であったと報告している。また，JSF 患者が飼育していたイヌからリケッチア抗原が検出されたという報告¹⁰⁾ も

ある。Inokumaら¹¹⁾によるとイヌがRjのリザーバーとなる可能性は低いようであるが、イヌ付着マダニを介した感染も考えられるため、特に猟犬など野山に入る機会の多いイヌは防ダニ対策が必要であろう。

JSF は、近年全国的に患者発生数が増加し、発生地域も拡大傾向にある。本県でも最近、新たな地域で患者が確認されるなど、全国と同様の傾向が見られている。JSF の治療にはテトラサクリン系抗菌剤が有効であるが、治療が遅くなれば、重症化し、死亡例もあるため、早期発見・早期治療が肝要である。現在当所は、患者多発地域の管轄保健所及び基幹病院と連携して対応し、速やかな検査診断結果の提供に努めている。今後も調査を継続し、地域住民への注意喚起及び医療関係者への情報提供を続けたい。

謝 辞

イヌ付着マダニの採取のご協力頂きました熊本県動物管理センターの職員の皆様及び各保健所の狂犬病予防技術員の皆様方に深謝します。

参考文献

- 1) 松尾繁, 八尋俊輔, 原田誠也, 中島龍一: 熊本県保健環境科学研究所報, 37, 88-89 (2007) .
- 2) 国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会: 2000年度リケッチア感染症診断マニュアル
- 3) Furuya Y. , Takahashi K. , Yoshida Y. , Ikuo K. : *J.Clin.Microbiol.* 33, 487-489 (1995) .
- 4) Hanaoka N, Matsutani M, Kawabata H, Yamamoto S., Fujita H., Sakata A., Azuma Y., Ogawa M., Takano A., Watanabe H., Kishimoto T., Shirai M., Kurane I., and Ando S. : *Emerging infectious Disease.*15, 1994-1997 (2009) .
- 5) Ishikura M, Ando S, Shinagawa Y, Matsuura K, Hasegawa S, Nakayama T, Fujita H, Watanabe M : *Microbiol Immunol.*47, 823-832 (2003) .
- 6) 上天草市イノシシ被害実態調査報告
- 7) Inokuma H, Seino N, Suzuki M, Kaji K, Takahashi H, Igota H, Inoue S. : *J Wildl Dis.* 44 ,164-167(2008) .
- 8) Jilintai, Seino N, Matsumoto K, Hayakawa D, Suzuki M, Hata H, Kondo S, Yokoyama N, Inokuma H : *Jpn. J Infect Dis.* , 61 , 315-317 (2008)
- 9) 森中重雄, 勝部由紀子, 松田政明: 広島県獣医師会雑誌 : 25 (2010)
- 10) 馬原文彦: モダンメディア 54, 4 - 13 (2007) .
- 11) Inokuma H ,Matsuda H ,Sakamoto L ,Tagawa M, and Matsumoto K : *Clinic . and Vaccine Immun.* , 18 ,

161-166 (2011) .

3) 多孔性ケイソウ土カラム-GC/MSによる飲料中農薬迅速分析法の検討

吉田 達雄 村川 弘

要 旨

農薬混入事件事故の危機管理のため、飲料（日本茶、スポーツドリンク及びアルコール飲料）中農薬の迅速分析法の開発を行った。多孔性ケイソウ土カラム-GC/MSにより分析を行い、精製操作として日本茶はGCミニカラム、スポーツドリンクはSAX/PSAミニカラム、アルコール飲料はGC/SAX/PSAミニカラムを適用した。農薬369成分について各飲料への添加回収試験を行った結果、317～348成分について良好な回収率（70～120%、RSD<15%）が得られた。本法は、農薬混入事件事故における迅速な原因究明に対して非常に有効な手法であることが明らかとなった。

キーワード：多孔性ケイソウ土カラム、GC/MS、農薬、飲料

はじめに

農薬は身近に入手できる化学物質であり、これが飲料などに混入する事件や事故が全国各地で発生し、これらを摂取したことによる健康被害が報告されている^{1)~3)}。これらの事件事故の原因究明と被害の拡大防止、さらに再発を防止するためには、混入した農薬成分の迅速な特定が重要であり、そのためには、多成分を迅速に分析する方法の確立が求められる。

当研究室では、公共用水や飲料水中へ混入した農薬を迅速に分析する方法を開発した⁴⁾⁵⁾。これは、水分を含む試料中の農薬を多孔性ケイソウ土カラムに水とともに保持させ、それをヘキサンや酢酸エチルなどで溶出させることにより、GC/MSで測定可能な有機溶媒中に移行させる方法である。

一方、飲料へ農薬が混入する事件や事故は、公共用水や飲料水に限らず、多様な種類の飲料に及んでいる。そこで、これまで得られた知見を基に、多様な種類の飲料に対する本分析法の適用拡大を目的として、日本茶、スポーツドリンク及びアルコール飲料中に含まれる多成分の農薬を簡易迅速に分析する方法の開発を行った。分析法は、多孔性ケイソウ土カラムに試料を保

持させ、これを溶出しGC/MSを用いて測定する方法とした。また、飲料中には多量の夾雑成分が含有しており、これらは、機器分析に大きな障害となる。そこで、試料中夾雑成分を除去するため、各試料に適したミニカラム精製操作を追加した。検討方法は、標準品添加回収試験により行った。一方、アルコール飲料については、そのエタノール濃度増加に伴い農薬成分回収率が減少するという報告がある⁶⁾。そのため、アルコール飲料分析については、試料中エタノール濃度が農薬成分回収率に及ぼす影響を調べる必要がある。そこで、今回検討を行った分析法においても、エタノール濃度の異なる試料を複数調製し、これらを用いて分析を行い、試料中エタノール濃度が農薬成分回収率に与える影響について併せて調べた。

実験方法

1 試料の調製

農薬標準品は林純薬工業製、関東化学製、和光純薬工業製、Dr. Ehrenstorfer GmbH製、LKT labs Inc製を用いた。エタノール濃度による農薬成分回収率検討試料については、蒸留水にエタノールを加え、5、20及び

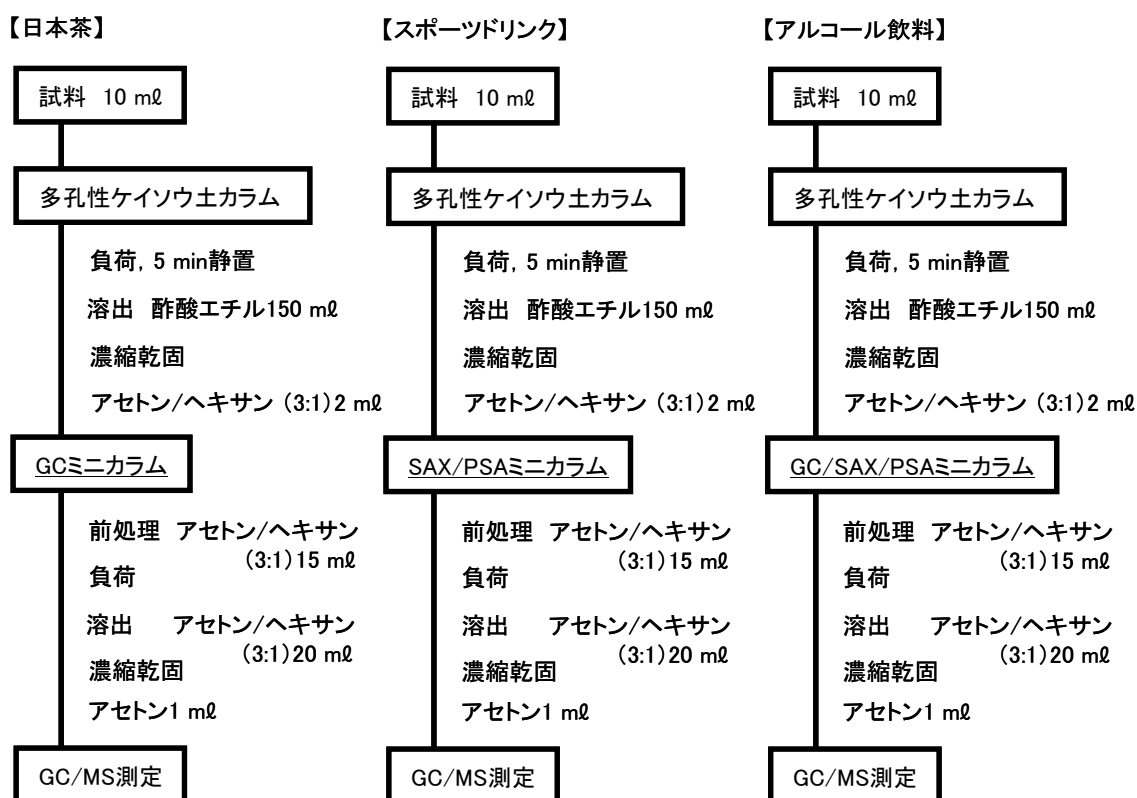


図1 日本茶, スポーツドリンク及びアルコール飲料中農薬の分析方法

40%のエタノール含有試料を作成した。これに系統の異なる5種の農薬〔クロルフェナピル(有機塩素系), シベルメトリン1(合成ピレスロイド系), ダイアジノン(有機リン系), フェノブカルブ(カーバメイト系), トリフルラリン(ジニトロアニリン系)]を試料中でそれぞれ $10\ \mu\text{g}\ \text{l}^{-1}$ の濃度となるように添加し, 試料調製を行った。添加回収試験用試料は, GC/MS分析対象農薬369成分の農薬標準混合溶液をこれらの成分が不検出であることを確認した日本茶(ペットボトル), スポーツドリンク及び焼酎(エタノール濃度:25%)に, 試料中でそれぞれ $10\ \mu\text{g}\ \text{l}^{-1}$ の濃度となるように添加し, 試料調製を行った。

2 GC/MS測定

2.1 試料中エタノール濃度検討試験溶液調製

1によりエタノール濃度5~40%に調製した試料10mlを多孔性ケイソウ土カラム(InertSep K-solute, 20ml, GL Sciences製)に負荷し, 5分間静置した後, 酢酸エチル150mlで溶出した。これを濃縮乾固し, アセトン1mlで定容して, 試験溶液とした。

2.2 添加回収試験溶液調製

図1に従って, それぞれの試料について試験溶液調

製を行った。精製カラムについては, 日本茶は色素除去を目的としてGCミニカラム〔GL-Pak CARBOGRAPH(500mg, GL Sciences製)], スポーツドリンクは極性夾雑物除去を目的としてSAX/PSAミニカラム〔InertSep SAX/PSA(500mg/500mg, GL Sciences製)], アルコール飲料は色素及び極性夾雑物除去を目的としてGC/SAX/PSAミニカラム〔InertSep GC/SAX/PSA(500mg/500mg/500mg, GL Sciences製)]を用いた。

2.2 測定条件

GCは, Agilent社製Agilent7890, MSは, Agilent社製Agilent5975, カラムはAgilent社製HP-5MS(長さ30m, 内径0.25mm, 膜厚0.25 μm)を使用した。注入口温度は250 $^{\circ}\text{C}$ に設定し, 注入方法はパルスドスプリットレス法により行った。オープン温度は80 $^{\circ}\text{C}$ で2分間保持し, 毎分30 $^{\circ}\text{C}$ で180 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温した後, 10分間保持した。さらに毎分2 $^{\circ}\text{C}$ で200 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温し, それから毎分3 $^{\circ}\text{C}$ で280 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温を行い10分間保持した。イオン化法は電子衝撃イオン化(EI)法で, イオン源温度は230 $^{\circ}\text{C}$, MS四重極温度は150 $^{\circ}\text{C}$ とした。定量は選択イオンモード(selected ion monitoring, SIM)を用いた。なお, 検量線は, 無添加試料抽出液を使用してマトリックス一致標準溶液を用いて作成した。

表 1 試料中エタノール濃度の違いによる農薬成分添加回収率 ($n = 3$)

農薬成分名	系統	エタノール (5%)		エタノール (20%)		エタノール (40%)	
		回収率,	RSD,	回収率,	RSD,	回収率,	RSD,
		%	%	%	%	%	%
クロルフェナピル	有機塩素系	103	4.4	104	0.2	103	3.2
シベルメトリン1	合成ピレスロイド系	90	3.8	96	0.3	96	3.5
ダイアジノン	有機リン系	92	0.8	95	4.1	92	3.1
フェノブカルブ	カーバメイト系	83	4.2	92	0.0	89	1.4
トリフルラリン	ジニトロアニリン系	78	4.6	88	1.7	82	2.6

結果及び考察

1 試料中エタノール濃度が回収率に与える影響

エタノール濃度が異なる試料に対する農薬成分添加回収試験結果について、農薬系統別回収率を表 1 に示した。系統の異なるクロルフェナピル（有機塩素系）、シベルメトリン 1（合成ピレスロイド系）、ダイアジノン（有機リン系）、フェノブカルブ（カーバメイト系）及びトリフルラリン（ジニトロアニリン系）のどの系統についても試料中エタノール濃度の違いによる回収率の大きな変化は見られなかった。今回、検討したケイソウ土カラムによる分析法においては、農薬成分回収率に与える試料中エタノール濃度の影響は小さく、この分析法は、エタノール濃度の異なる多くのアルコール飲料に適用可能であると考えられる。

2 添加回収試験

日本茶、スポーツドリンク及びアルコール飲料に対する添加回収試験結果を表 2 に示した。農薬成分の添加回収試験において回収率の許容範囲の目安とされる 70~120%、相対標準偏差 15%未満を満たしたものは、農薬成分 369 成分について日本茶：334 成分、スポーツドリンク：348 成分、アルコール飲料：317 成分であった。農薬の系統別についても、有機塩素系、合成ピレスロイド系、有機リン系、カーバメイト系など幅広い系統の農薬成分について良好な回収率を示した。試料の種類については、スポーツドリンクに比べ日本茶及びアルコール飲料は、回収率が良好な農薬成分が少なかった。これらは、クロマトグラムのピーク低減や消失などの現象が原因で、日本茶中カフェインやアルコール飲料中の夾雑成分によるイオン化阻害などのマトリックス効果によって引き起こされたものと考えられる。

3 検出限界及び定量限界

本分析法で用いた検量線の最小濃度は、GC/MS 測定で $10\mu\text{g l}^{-1}$ である。試験溶液は 10 倍濃縮を行うため、これらは、試料中濃度でそれぞれ $1\mu\text{g l}^{-1}$ となる。今回、クロマトグラムにおいて S/N 比 >3 であるものを検出限界とし、検量線最小濃度においてすべての農薬成分について S/N 比 >3 を満たしたため、このときの試料中濃度 $1\mu\text{g l}^{-1}$ を定量限界とした。この濃度は、食品衛生法に定められた食品中残留農薬の一律基準 $10\mu\text{g kg}^{-1}$ の 10 分の 1 である。一律基準は、人の健康を損なうおそれのない量として設定された値であり、これは健康被害を発生する量より十分低い値である。よって定量限界である $1\mu\text{g l}^{-1}$ は、飲料中の農薬混入事件等の危機管理における農薬成分の特定を目的とした本分析法の定量限界として、十分な濃度であると考えられる。

まとめ

農薬混入事件事故の危機管理のため、日本茶、スポーツドリンク及びアルコール飲料中農薬の迅速分析法の開発を行った。多孔性ケイソウ土カラムを用いる GC/MS 測定にミニカラム精製を加え、農薬 369 成分について検討を行った。その結果、日本茶：334 成分、スポーツドリンク：348 成分、アルコール飲料：317 成分について良好な回収率（70~120%、RSD<15%）が得られた。定量限界は $1\mu\text{g l}^{-1}$ であった。

また、この分析による操作時間は約 2 時間と短く、午前中に試料を搬入できれば、当日の夕方に分析結果を導き出すことも可能である。全国各地で、農薬が飲料などに混入する事件や事故が発生し、これらを摂取することによる健康被害が報告されている。今回、この分析法の確立によって、飲料中の農薬成分を迅速に

分析することが可能となり，農薬混入事件事故の原因究明に大きな役割を果たすと考えられ，再発防止への取り組みに役立つものと期待される。

文 献

- 1) 鈴木雄亮，金子毅：分析化学，**58**，1029-1034(2009).
- 2) 佐藤満，山下敦士，菊地道大，伊藤達朗，本多正夫：法科学技術，**14**，35-43(2009).
- 3) http://www.city.sendai.jp/shoku/1188659_2482.html
- 4) 吉田達雄，飛野敏明：第33回農薬残留分析研究会講演要旨集，p.90-96(2010).
- 5) 吉田達雄，飛野敏明：分析化学，**59**，855-862(2010).
- 6) 福井直樹，高取聡，北川陽子，起橋雅浩，中辻直人，小阪田正和，柿本幸子，尾花裕孝：全国衛生化学技術協議会年会講演集，p.48-49(2010).

表2 添加回収試験結果(n=3)-1

	日本茶		スポーツドリンクアルコール飲料			
	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
2,3,5-Trimethacarb	102	2.6	87	2.0	112	5.0
2,4-Dichloroaniline	102	3.4	72	0.3	85	1.8
2,6-Dichlorobenzamide	85	5.1	98	4.7	105	1.1
2-Phenylphenol	95	1.2	91	2.0	113	13.6
3,4,5-Trimethacarb	98	0.6	77	4.5	107	4.5
Acephate	<10	-	<10	-	<10	-
Acetamidrid	92	8.0	101	2.9	97	2.7
Acetochlor	102	1.7	92	3.4	106	9.1
Acrinathrin 1	96	4.2	87	2.4	91	6.7
Acrinathrin 2	72	1.3	73	3.9	80	12.8
Alachlor	98	0.9	94	5.5	108	2.7
Aldrin	73	1.4	80	1.0	99	0.7
Allethrin 1	92	0.8	92	3.8	102	0.8
Allethrin 2	92	0.7	92	2.9	99	3.9
Ametryn	98	2.2	94	2.1	112	9.1
Aminocarb	100	3.6	80	0.9	103	2.4
Amitraz	81	3.7	83	2.2	<10	-
Anilofos	95	1.6	90	4.0	79	18.7
Atrazine	92	1.0	93	3.4	103	7.0
Azaconazole	104	3.2	95	1.9	100	4.6
Azinphos-ethyl	103	0.4	94	5.5	88	7.5
Azinphos-methyl	91	10.5	91	3.5	89	10.6
Azoxystrobin	91	3.2	95	0.7	93	1.6
Benalaxyl	103	2.6	95	1.1	101	4.3
Bendiocarb	79	2.8	71	1.3	98	3.2
Benfluralin	73	1.0	84	2.1	98	11.4
Benfuracarb	<10	-	35	4.6	63	19.6
Benfuresate	97	4.8	98	2.6	105	3.2
Benoxacor	106	2.9	98	1.9	103	5.7
Bifenazate	85	12.9	82	3.0	67	9.6
Bifenox	88	0.4	83	2.8	72	1.8
Bifenthrin	72	2.2	86	2.3	101	9.0
Biphenyl	89	3.2	61	3.2	78	3.4
Bitertanol 1	107	3.2	100	2.5	106	3.4
Bitertanol 2	103	3.3	97	2.4	98	5.6
Boscalid	89	2.5	98	1.8	49	6.1
Bromacil	97	2.6	97	3.4	102	3.5
Bromobutide	99	0.6	96	2.6	103	7.7
Bromobutide-des-bromo	99	2.4	93	1.1	101	5.5
Bromophos	92	2.6	85	2.5	103	5.4
Bromophos-ethyl	81	0.5	90	3.9	101	6.0
Bromopropylate	89	1.6	84	3.1	101	4.2
Bupirimate	92	0.7	97	2.3	96	3.6
Buprofezin	97	0.8	92	3.3	99	5.5
Butachlor	92	0.9	92	3.0	104	3.7
Butamifos	90	2.2	90	3.0	91	15.8
Butylate	87	3.1	64	3.4	83	10.0
Cadusafos	97	4.3	87	2.7	104	5.7
Cafenstrole	74	26.4	89	11.3	97	5.5
Captafol	<10	-	<10	-	<10	-
Captan	83	5.5	85	7.4	<10	-
Carbaryl 1	113	2.6	95	2.3	109	10.7
Carbaryl 2	85	4.9	71	4.6	100	5.4
Carbetamide	96	2.6	93	1.2	96	8.4
Carbofuran	78	4.3	98	7.5	98	1.7
Carbosulfan	<10	-	<10	-	<10	-
Carboxin	26	6.3	75	1.8	60	4.7
Carfentrazone-ethyl	96	1.5	86	2.9	96	3.8
Carpropamid	98	1.6	88	3.1	91	1.8
Chinomethionat	<10	-	40	4.4	<10	-
Chlorfenapyr	83	2.2	81	1.2	104	1.6
Chloridazon	85	5.4	97	2.3	97	2.2
Chlormetoxinyl	87	2.4	83	2.1	103	5.9
Chlornitrofen	84	2.5	87	0.9	85	7.7
Chlorobenzilate	94	1.4	89	3.1	104	1.5
Chloroneb	93	3.1	86	1.8	107	1.6
Chlorothalonil	90	3.8	93	4.7	103	6.6
Chlorpropham	100	3.5	95	4.3	110	6.5
Chlorpyrifos	84	1.4	91	5.9	101	3.2
Chlorpyrifos-methyl	94	3.2	90	0.2	102	2.9
Chlorthal-dimethyl	91	2.6	92	2.9	105	4.2

表2 添加回収試験結果(n=3)-2

	日本茶		スポーツドリンクアルコール飲料			
	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
Cinmethylin	101	3.3	93	1.0	103	1.7
Clomazone	100	0.7	96	1.7	110	7.9
Cumyluron	102	1.7	102	1.8	76	4.6
Cyanazine	102	0.7	98	4.9	105	1.1
Cyanofenphos	91	0.7	89	1.1	100	5.0
Cyanophos	101	2.1	93	5.4	99	3.6
Cycloate	101	1.8	79	2.5	99	7.1
Cyfluthrin 1	91	6.5	89	7.1	91	4.3
Cyfluthrin 2	78	4.3	85	1.1	94	6.9
Cyfluthrin 3	82	1.5	86	2.0	99	6.0
Cyfluthrin 4	89	0.6	93	2.4	93	7.0
Cyhalofop-butyl	86	1.1	87	1.5	97	4.6
Cyhalothrin 1	67	5.9	85	2.8	93	6.3
Cyhalothrin 2	80	8.8	96	6.2	93	6.7
Cypermethrin 1	93	5.7	94	3.9	101	1.6
Cypermethrin 2	93	7.2	86	4.2	93	2.8
Cypermethrin 3	94	8.8	93	5.4	101	7.3
Cypermethrin 4	97	6.6	93	2.1	102	3.2
Cyproconazole	105	4.3	95	1.5	101	1.4
Cyprodinil	89	4.8	97	3.7	<10	-
Daimuron	<10	-	<10	-	102	4.8
Deltamethrin 1	89	3.0	91	1.9	83	4.7
Deltamethrin 2	78	2.1	87	5.1	78	5.2
Desmetryne	80	5.7	98	3.7	63	11.5
Diazinon	95	2.5	96	2.9	104	11.0
Dichlobenil	92	1.1	68	2.1	61	2.8
Dichlofenthion	85	2.0	86	0.7	105	9.5
Dichlofluanid	83	2.3	75	7.5	106	7.9
Dichloran	101	1.4	97	1.4	99	8.3
Dichlorvos	95	5.8	68	5.1	83	6.3
Diclocymet 1	98	1.5	91	2.1	93	2.0
Diclocymet 2	98	0.2	91	2.4	96	9.7
Diclofop-methyl	92	0.3	85	4.4	102	6.1
Dicofol	78	1.6	87	1.8	105	5.2
Dieldrin	89	1.1	88	2.9	100	5.8
Diethofencarb	101	1.9	96	1.9	104	10.0
Difenoconazole 1	91	4.8	95	1.2	99	3.7
Difenoconazole 2	104	3.1	97	2.5	91	1.3
Difenzoquat	<10	-	<10	-	<10	-
Diflubenzuron	74	1.3	93	4.6	<10	-
Diflufenican	14	2.9	91	2.2	<10	-
Dimepiperate	108	1.9	95	7.4	100	4.1
Dimethametryn	108	0.8	95	1.7	105	6.3
Dimethenamid	100	2.5	97	0.8	102	3.0
Dimethipin	99	1.0	100	3.0	<10	-
Dimethoate	97	3.0	96	3.6	75	5.6
Dimethomorph 1	90	4.9	93	6.2	98	3.2
Dimethomorph 2	93	3.0	91	8.0	98	4.0
Dimethylvinphos	98	2.7	96	0.8	107	0.6
Dioxacarb 1	95	9.2	95	4.1	105	14.8
Dioxacarb 2	78	3.2	73	0.4	94	5.4
Diphenamid	101	1.5	93	4.5	81	5.1
Diphenylamine	95	2.0	87	3.4	105	2.9
Disulfoton	26	7.6	77	0.8	63	5.2
Dithiopyr	82	1.9	88	2.3	103	4.2
Edifenphos	93	2.7	89	2.5	102	6.4
Endosulfan sulphate	92	6.9	91	3.1	94	14.4
Endrin	92	1.9	90	3.3	103	4.9
EPN	90	0.9	84	3.6	81	1.2
EPTC	93	2.1	64	2.0	52	3.4
Esprocarb	92	0.6	90	2.2	103	6.9
Ethiofencarb	<10	-	<10	-	<10	-
Ethion	85	3.2	87	1.2	99	7.2
Ethiprole	98	3.2	92	5.3	94	4.9
Ethofumesate	97	1.1	92	1.4	103	1.1
Ethoprophos	101	3.2	89	1.5	109	2.0
Ethychlozate	102	0.5	75	3.1	101	2.8
Etobenzanid	<10	-	97	4.3	<10	-
Etofenprox	73	1.0	87	1.4	95	1.3
Etoxazole	84	1.6	90	2.3	99	6.0
Etridiazole	86	3.6	75	2.0	84	7.1

表2 添加回収試験結果(n=3)-3

	日本茶		スポーツドリンクアルコール飲料			
	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
Etrimfos	100	2.2	91	4.6	102	4.0
Famoxadone	88	3.0	84	1.1	86	3.9
Fenamiphos	74	4.4	96	1.1	93	4.3
Fenarimol	107	1.6	92	1.0	100	3.5
Fenbuconazole	100	4.6	95	1.6	99	4.0
Fenchlorphos	90	0.5	85	3.0	105	8.7
Fenhexamid	<10	-	<10	-	<10	-
Fenitrothion	99	0.6	94	3.3	102	8.8
Fenobucarb	101	1.8	77	1.5	106	4.9
Fenothiocarb	99	1.1	97	2.7	95	15.8
Fenoxanil 1	101	1.9	90	4.6	101	1.4
Fenoxanil 2	98	0.9	89	1.5	100	1.6
Fenoxaprop-ethyl	82	2.8	93	3.2	<10	-
Fenpropathrin	76	1.5	82	2.5	100	7.2
Fenpropimorph	84	1.9	95	2.4	109	8.9
Fensulfothion	105	0.9	102	1.6	89	3.7
Fenthion	76	4.1	91	2.2	102	9.0
Fenvalerate 1	79	1.4	89	3.9	87	2.4
Fenvalerate 2	84	10.5	92	5.9	85	1.0
Ferimzone (E type)	81	2.2	86	5.5	101	3.5
Ferimzone (Z type)	101	2.5	98	1.3	86	2.9
Fipronil	97	3.0	83	3.4	99	5.2
Flamprop-methyl	100	2.4	91	3.7	98	6.1
Fluacrypyrim	89	2.7	89	1.2	93	8.9
Flucythrinate 1	69	1.5	71	3.6	89	2.6
Flucythrinate 2	69	0.9	75	2.8	80	3.4
Fludioxonil	99	2.0	98	3.5	104	2.1
Flumiclorac-Pentyl	78	2.1	90	1.7	86	4.7
Flumioxazin	89	4.7	99	1.9	72	6.0
Flusilazole	104	3.1	94	1.0	97	0.8
Flutolanil	98	1.5	90	2.8	102	6.1
Flutriafol	107	3.2	95	2.4	88	4.8
Fluvalinate 1	50	4.8	57	3.3	80	8.8
Fluvalinate 2	44	7.1	57	2.4	77	9.3
Folpet	87	4.3	75	3.6	89	4.4
Fonofos	94	1.7	89	3.2	105	7.4
Fosthiazate 1	95	1.2	95	2.6	89	7.1
Fosthiazate 2	92	2.2	101	3.3	92	7.7
Fthalide	100	2.8	94	1.4	53	9.9
Furametpyr	106	1.4	94	0.6	97	1.2
Furathiocarb	65	12.9	89	3.5	74	32.1
Halfenprox	63	0.6	89	2.1	70	0.5
Heptachlor	79	7.1	83	4.2	102	11.0
Heptachlor epoxide	89	0.9	94	3.5	107	6.8
Hexachlorobenzene	81	2.0	72	2.7	<10	-
Hexaconazole	107	1.2	94	1.0	98	6.9
Hexazinone	93	1.3	97	3.9	102	0.8
Hexythiazox	96	2.2	96	3.9	82	3.4
Hymexazol	96	8.6	84	1.3	<10	-
Imazalil	<10	-	101	1.2	68	5.4
Imazamethabenz methyl ester	103	5.2	90	2.6	100	4.5
Imibenconazole	90	7.2	90	6.0	<10	-
Imibenconazole-des-benzyl	101	3.5	97	2.2	100	1.9
Inabenfide	<10	-	107	2.0	<10	-
Indoxacarb	58	5.5	79	1.4	83	6.1
Iprobenphos	103	2.8	99	1.7	99	2.1
Iprodione	98	2.3	91	1.8	81	20.4
Iprodione metabolite	92	2.8	89	7.9	83	28.5
Isazophos	98	4.7	97	3.6	98	1.3
Isocarbophos	94	3.4	93	0.5	80	3.8
Isufenphos	94	0.8	91	2.1	102	3.7
Isufenphos oxon	92	5.2	95	2.4	86	7.0
Isoprocarb	99	2.6	81	1.8	69	27.0
Isopropalin	73	1.4	87	1.1	93	12.5
Isoprothiolane	104	0.7	93	3.0	101	5.2
Isoxathion	95	1.5	98	0.6	95	10.3
Isoxathion oxon	94	3.5	97	2.6	100	7.4
Kresoxim-methyl	99	2.4	92	4.0	105	3.1
Lenacil	103	0.5	100	3.0	101	6.7
Linuron	98	6.5	97	2.1	97	3.5
Malaonxon	<10	-	93	3.5	<10	-

表2 添加回収試験結果(n=3)-4

	日本茶		スポーツドリンクアルコール飲料			
	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
Malathion	99	2.4	95	3.1	102	1.7
Mefenacet	99	2.4	91	1.9	99	2.1
Mepanipyrim	31	5.8	93	2.9	<10	-
Mepronil	100	2.8	96	3.9	104	3.5
Metalaxyl	99	1.4	95	2.4	86	9.8
Metaldehyde	101	4.6	55	1.2	90	6.5
Methabenzthiazuron	73	2.5	99	4.4	110	9.6
Methacrifos	99	0.5	83	1.8	106	10.5
Methamidophos	49	3.5	77	2.2	<10	-
Methidathion	107	3.9	99	2.5	55	15.7
Methiocarb	89	3.7	70	6.1	<10	-
Methoprene	84	1.5	90	4.4	103	6.3
Methoprotryne	105	1.0	98	2.8	99	2.2
Methoxychlor	81	0.9	87	2.4	99	3.2
Methylidymron	111	4.9	100	4.0	101	7.7
Metolachlor	101	1.2	97	4.3	107	2.5
Metolcarb	95	1.7	79	2.9	<10	-
Metominostrobin (E type)	100	1.4	95	2.2	100	2.7
Metominostrobin (Z type)	103	2.5	94	3.3	101	2.0
Metribuzin	109	0.4	92	3.5	95	13.5
Mevinphos	100	3.6	87	2.1	112	11.1
Molinate	94	6.8	74	1.6	94	11.1
Monocrotophos	103	5.1	100	7.2	<10	-
MPMC	108	1.3	88	3.1	108	7.6
Myclobutanil	100	1.6	96	2.1	103	0.9
Naproanilide	64	3.4	96	4.4	<10	-
Napropamide	101	1.9	97	2.7	96	7.6
Nitralin	76	7.2	83	4.5	65	10.1
Nitrothal-isopropyl	92	1.2	95	3.5	80	6.9
Norflurazon	101	1.5	96	1.7	104	1.4
o,p'-DDT	79	2.6	89	1.4	96	3.1
Oxadiazon	89	0.7	86	3.2	103	2.9
Oxadixyl	105	5.9	96	2.4	104	3.6
Oxamyl	<10	-	<10	-	<10	-
Oxyfluorfen	77	2.3	83	2.0	87	12.8
p,p'-DDD	93	6.6	86	5.2	100	3.8
p,p'-DDE	74	1.8	89	5.6	105	1.3
p,p'-DDT	71	0.8	87	4.9	101	8.1
Paclobutrazol	108	1.2	95	2.5	97	2.1
Parathion	97	1.6	90	1.7	100	7.5
Parathion-methyl	98	2.9	92	2.2	93	7.2
Penconazole	107	2.4	95	2.7	70	7.9
Pencycuron	82	2.7	85	13.4	100	7.3
Pendimethalin	86	0.6	87	2.7	96	14.0
Permethrin 1	73	0.9	87	2.0	103	2.5
Permethrin 2	71	0.5	87	3.4	107	2.3
Phenothrin 1	79	4.7	89	2.4	101	6.6
Phenothrin 2	74	1.2	90	1.6	101	6.5
Phenthoate	97	3.3	93	3.0	103	8.6
Phorate	74	5.3	86	1.5	91	4.6
Phosalone	95	2.7	85	3.7	75	10.5
Phosmet	97	1.4	95	4.0	65	36.0
Phosphamidon	92	4.3	95	2.1	79	18.9
Piperonyl Butoxide	92	1.9	96	1.0	97	2.9
Piperophos	98	2.1	92	1.6	99	2.3
Pirimicarb	100	0.2	96	2.8	106	3.8
Pirimiphos-methyl	102	1.4	89	1.8	105	2.1
Pretilachlor	100	0.8	88	2.7	97	1.4
Probenazole 1	99	1.2	91	1.6	105	3.3
Probenazole 2	95	2.5	94	4.6	100	5.2
Prochloraz	78	1.9	98	1.3	80	2.2
Procymidone	99	2.8	92	5.5	108	5.4
Profenofos	88	0.8	88	2.3	92	10.3
Promecarb 1	<10	-	<10	-	<10	-
Promecarb 2	96	1.4	75	3.1	109	5.3
Prometon	103	2.8	97	3.8	107	6.6
Prometryn	105	0.9	94	3.1	107	7.3
Propachlor	98	1.0	91	1.9	110	10.1
Propamocarb	85	5.8	67	1.2	69	8.2
Propanil	102	2.2	90	1.1	91	9.0
Propaphos	72	4.5	94	0.9	89	9.3

表2 添加回収試験結果(n=3)-5

	日本茶		スポーツドリンクアルコール飲料			
	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
Propargite 1	78	2.9	92	2.5	80	6.2
Propargite 2	73	1.0	87	2.5	79	6.3
Propham	98	2.6	88	0.7	107	9.1
Propiconazole 1	103	2.4	94	2.1	99	2.9
Propiconazole 2	105	2.3	95	2.3	101	1.7
Propoxur	92	9.4	70	4.8	106	6.7
Propyzamide	96	1.3	99	4.0	105	5.8
Prothiofos	77	0.3	86	2.2	103	3.9
Pyraclofos	91	3.6	94	3.4	65	11.5
Pyraflufen-ethyl	89	1.4	88	3.1	101	5.2
Pyrazophos	104	1.1	91	2.3	48	2.2
Pyrazoxyfen	101	6.8	88	2.7	84	4.1
Pyributicarb	80	3.1	90	5.7	102	6.7
Pyridaben	80	0.8	87	1.5	101	3.6
Pyridafenthion	102	1.1	93	2.3	87	6.1
Pyrifenox 1	104	0.5	101	0.9	108	3.3
Pyrifenox 2	105	1.5	99	1.5	86	10.4
Pyrimethanil	95	1.4	97	3.7	40	13.4
Pyrimidifen	44	3.7	100	1.9	<10	-
Pyriminobac-methyl (E type)	102	3.7	99	2.8	100	4.9
Pyriminobac-methyl (Z type)	102	1.0	92	2.4	104	1.4
Pyriproxyfen	86	1.7	89	3.3	100	2.6
Pyroquilon	98	3.4	98	3.0	84	1.6
Quinalphos	98	0.9	93	0.7	103	4.8
Quinoclamine	94	3.0	96	1.8	<10	-
Quinoxifen	85	0.8	89	2.2	34	4.6
Quintozene	95	6.1	73	1.5	89	5.3
Resmethrin 1	76	4.9	89	1.8	102	5.3
Resmethrin 2	76	2.1	88	2.8	100	5.3
Sainepirin 1	95	4.0	92	4.3	106	8.0
Sainepirin 2	100	2.5	94	6.4	103	4.7
Salithion	94	3.0	91	0.6	110	5.0
Secbumeton	110	2.8	97	2.4	104	4.4
Silafluofen	64	1.8	87	4.0	91	2.9
Simazine	87	1.2	97	4.6	102	6.7
Simetryn	91	4.1	97	3.4	104	8.8
Sulprofos	64	3.9	86	2.2	98	8.1
swep	98	4.4	99	2.8	102	3.3
Tebuconazole	104	2.2	95	2.6	100	1.0
Tebufenpyrad	91	1.5	87	2.3	99	4.1
Tecloftalam	27	0.4	71	2.7	<10	-
Tecnazene	93	3.6	75	2.5	93	9.7
Tefluthrin	74	1.7	87	3.7	99	2.7
Terbacil	97	2.0	99	2.7	103	7.0
Terbucarb	97	1.7	90	3.7	105	7.7
Terbufos	76	4.9	87	0.9	96	3.4
Terbumeton	115	0.7	92	2.7	109	4.6
Terbutryn	101	0.9	99	6.6	109	10.2
Tetrachlorvinphos	85	0.7	90	6.8	87	11.5
Tetraconazole	109	3.7	92	1.2	80	4.8
Tetradifon	93	3.1	87	5.6	102	4.4
Tetramethrin 1	90	0.8	98	4.8	102	2.1
Tetramethrin 2	86	1.1	91	2.0	99	2.6
Thenylchlor	97	1.1	92	3.2	103	0.7
Thiabendazole	<10	-	98	2.1	<10	-
Thiamethoxam	97	2.3	97	2.9	106	2.8
Thifluzamide	93	1.6	92	1.5	97	9.7
Thiobencarb	99	0.4	92	2.2	106	1.1
Thiometon	35	7.1	79	2.4	78	2.5
Tolclofos-methyl	91	0.8	91	3.1	105	6.0
Tolfenpyrad	85	2.1	88	3.0	87	1.9
Tralkoxydim	102	1.9	86	3.8	105	0.3
Triadimefon	106	2.7	94	2.4	105	3.8
Triadimenol 1	102	2.4	93	9.0	99	4.9
Triadimenol 2	107	2.6	94	5.3	98	1.5
Tri-allate	87	2.6	85	1.8	99	9.7
Triazophos	105	0.6	95	2.1	99	5.5
Tribuphos	89	1.2	99	4.7	98	5.4
Tricyclazole	90	3.6	92	5.6	82	2.3
Trifloxystrobin	87	1.6	84	2.9	105	0.8
Triflumizole	97	6.6	97	1.0	92	11.7

表2 添加回収試験結果(n=3)-6

	日本茶		スポーツドリンクアルコール飲料			
	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
Triflumizole metabolite	101	0.4	99	1.6	104	2.8
Trifluralin	74	3.7	89	2.4	93	11.2
Uniconazole P	104	3.6	92	4.0	99	2.7
Vamidothion	95	3.3	96	6.1	104	4.1
Vinclozolin	98	1.7	95	2.4	106	2.7
XMC	99	1.4	78	2.6	103	3.0
α -BHC	95	2.3	85	2.9	102	9.5
α -Chlorfenvinphos	100	0.9	97	2.7	112	5.0
α -Endosulfan	91	1.5	89	3.3	102	6.5
β -BHC	94	3.2	91	8.0	109	6.1
β -Chlorfenvinphos	98	1.7	91	3.2	112	4.4
β -Endosulfan	89	2.1	89	2.6	97	2.5
γ -BHC	98	3.5	89	4.0	93	8.5
δ -BHC	96	2.2	88	5.7	95	11.2

4) HILIC-MS/MS による農産物中ニテンピラム, CPMA 及び CPMF 分析法の検討

吉田 達雄 村川 弘

要 旨

ニテンピラムは国内使用量が多い農薬であり、残留農薬検査において重要な農薬成分であるが、ニテンピラム及びその代謝物である CPMA 及び CPMF は極性が非常に高く、分析法は煩雑な操作を必要とする。そこで、高極性化合物を分析可能な未修飾シリカ型 HILIC-MS/MS を用いることにより、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を簡易迅速に分析する方法を開発した。4 種類の農作物を用いて行った添加回収試験において、すべて良好な値が得られた。また、本分析法と厚生労働省通知試験法による分析値を比較した結果、同等の値を示し、本分析法は、有効な方法であることが明らかとなった。

キーワード : HILIC-MS/MS, ニテンピラム, CPMA, CPMF, 農作物

はじめに

農作物中の残留農薬においては、その代謝物にも強い活性を有するものがあり、代謝物も併せて分析を行う必要がある農薬成分が存在する。ニテンピラムは厚生労働省食品規格によりニテンピラムと2種の代謝物2-[N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチル]アミノ-2-メチルイミノ酢酸 (以下「CPMA」という。) 及び N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチル-N'-メチルホルムアミジン (以下「CPMF」という。) の含量で値を求めることとなっている¹⁾。厚生労働省通知試験法では、CPMA及びCPMFを、最終的にN-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチルホルムアミド (以下「CPF」という。) に変換して定量し、ニテンピラムに換算する分析法が示されている¹⁾。この分析法は、CPMAとCPMFを加水分解後、誘導体化して同一化合物として測定するため、各代謝物の残留量を把握できない欠点

あり、さらに手法が煩雑で、試薬や精製カラムなど使用する器材も多く、大変複雑な分析法である。

CPMAとCPMFを個別に分析できない原因として、CPMAがアセトンや酢酸エチル中において、容易に

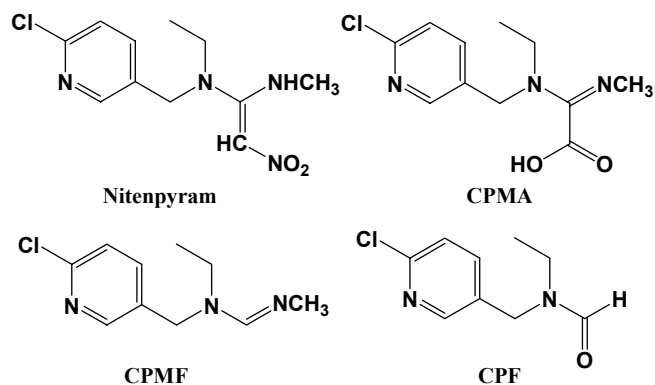


図1 Nitenpyram, CPMA, CPMF及びCPFの構造

CPMFに変換してしまうことが挙げられる²⁾。津村らによるとCPMA 10 µgを蒸留水20 ml及びアセトン150 mlで希釈してロータリーエバポレーターにて濃縮したところ、80.4%がCPMFに変化し、CPMAとして検出されたのは9.0%に過ぎず、CPMAとCPMFを分別定量するのは困難であるとしている³⁾。多くの分析法では、試料からの抽出に有機溶媒を用い、濃縮操作を伴うことから、CPMAの分析は困難である。さらに、CPMA分析を困難とする要因として、CPMAの極性が非常に高いため、農薬分析において一般的に用いられている逆相カラムを用いたLC測定では、良好なピーク形状が得られにくいことが挙げられる⁴⁾。従ってCPMAの分析には、有機溶媒含有率の低い抽出溶媒、濃縮操作を伴わない分析法及び高極性化合物を十分に保持するカラムが必要である。

一方、筆者らの研究室では、アセトニトリルと水の混合溶液を抽出溶媒として用いた抽出法により、様々な農薬成分や試料に対して、良好な抽出結果を得ている⁵⁾。この方法は、抽出溶媒に含水アセトニトリルを用いるため、有機溶媒の割合が低く、更に濃縮操作が不要である。また、高極性化合物を分離する方法として、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を用いる方法がある^{6)~11)}。これは、順相クロマトグラフィーの一種であり、水と有機溶媒の混合溶液と、それより高極性の固定相を用いる分離モードである。順相クロマトグラフィーには非水溶性の有機溶媒を移動層に用いることが多く、親水性の化合物の中にはこの溶媒系に溶解せず、分析できないものもあったが、HILICは移動相が水系であり、高極性の化合物も溶解、分離が可能である。このHILICの特性を用いることにより、高極性化合物であるCPMAを保持し、良好なピーク形状が得られることが考えられる。

そこで今回、これらの知見をもとに、高極性化合物の保持に効果を示す HILIC を用いて、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を簡易迅速に分析する方法の開発を行った。検討方法は、まず、CPMA の変換を抑えるため、抽出溶媒に水を加え、溶媒の含水量に対するニテンピラム、CPMA 及び CPMF の抽出効率に与える影響を調べた。次に、抽出効率が良好であった含水抽出溶媒を用い、農産物を試料として標準品添加回収試験を行った。さらに、HILIC-MS/MS を用いて、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を含有する試料の分析を行った。同時に同じ試料を厚生労働省通知試験法に示されている方法¹⁾により分析し、実試料への適用性確認を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1 試料の調製

ニテンピラム、CPMF 及び CPF (和光純薬工業製) についてはメタノール、CPMA (和光純薬工業製) については蒸留水を用いて溶解し、それぞれ標準原液 500 mg l⁻¹ を調製した。これらを適宜、メタノールにより希釈して標準溶液とした。

抽出溶媒中含水率の検討試験用試料は、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を含有する農作物 (アスパラガス) を用いた。添加回収試験用試料としては、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF が不検出であることを確認した農作物 4 種類 (ピーマン、みかん、たまねぎ、玄米) を用いた。玄米以外の農作物については、それぞれフードカッターを用いて均一化、ホモジナイザーを用いて細切化した。玄米については、フードミルにより細切化を行った。これらに低濃度として 0.005 mg kg⁻¹、高濃度として 0.5 mg kg⁻¹ となるようにニテンピラム、CPMA 及び CPMF 標準品溶液をそれぞれ添加し、添加回収試験用試料とした。また、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を含有する農作物 3 種類 (アスパラガス 2、メロン 1) を実試料への適用性試験用試料とした。

最初に有機溶媒の影響を受ける CPMA を効果的に抽出し、さらに他のニテンピラム及び CPMF についても良好な抽出効率を得ることのできる最適な抽出溶媒を選択するため、抽出溶媒中含水率の違いによる抽出効率の変化を調べた。CPMA はアセトンや酢酸エチル中で不安定であること²⁾から抽出溶媒はアセトニトリルを用いた。含水抽出溶媒として、アセトニトリル-水 (100 : 0, 65 : 35, 35 : 65, 10 : 90) の 4 種類を用いて抽出効率の比較を行った。1 で調製した試料 5g に上記 4 種類の抽出溶媒をそれぞれ 20 ml 加え、超音波抽出 5 min を行った。次いで遠心分離 (1882 xg, 5 min) を行い、上澄みをろ過後、残渣に抽出溶媒 20 ml を加え、超音波抽出 5min、遠心分離 5min を行い 50 ml に定容した。これを非水系フィルター (GL クロマトディスク 25N 0.45 µm, GL Sciences 製) を用いて、ろ過したものを試験溶液とした。

添加回収試験溶液及び実試料への適用試験溶液の調製方法を図 2 に示した。上記に示した分析方法に従って操作を行い、添加回収試験溶液及び実試料への適用試験溶液の調製における抽出溶媒は、抽出溶媒中含水率検討結果からアセトニトリル-水 (65 : 35) とした。

2 HILIC-MS/MS 測定

LC は、Waters 社製 Waters2795、MS/MS は Waters 社製 Quattro Premier を使用した。分離カラムは、未修飾

シリカ型カラムである Waters 社製 Atlantis HILIC (長さ 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒子径 3 μm) を用いた。試料注入量は 10 μl , カラム温度は 40 $^{\circ}\text{C}$ とし, 移動相は蒸留水-アセトニトリル-500 mM 酢酸アンモニウム (25:70:5), 流速は 0.5 ml min^{-1} とした。イオン化はエレクトロスプレー (ESI) によるポジティブモード (POS) で行い, multiple reaction monitoring (MRM) 測定により定量した。キャピラリー電圧は 3.45 kV, ソース温度は 120 $^{\circ}\text{C}$, デゾルベーション温度は 350 $^{\circ}\text{C}$, デゾルベーションガス流量は 1000 l h^{-1} , コーンガス流量は 100 l h^{-1} に設定した。なお, 検量線は, 無添加試料液を使用してマトリックス一致標準溶液を用いて作成した。

HILIC カラムの比較として, アミド型 (TSKgel Amide 80, 2.0 mm i.d. \times 150 mm L, 5 μm , 東ソー), スルホベタイン型カラム (ZIC-pHILIC, 4.6 mm i.d. \times 150 mm L, 5 μm , Merck KGaA), ジオール型 (Inertsil HILIC, 4.6 mm i.d. \times 150 mm L, 3 μm , GL Sciences), トリアゾール型 (COSMOSIL HILIC, 3.0 mm i.d. \times 150 mm L, 5 μm , ナカライ) を用いた。

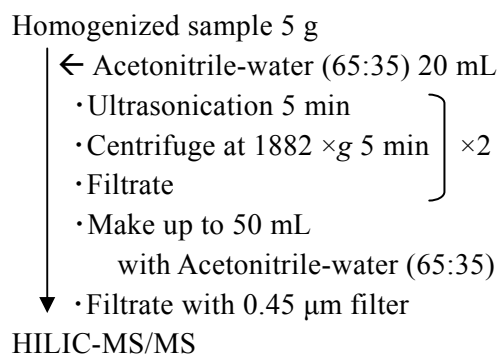


図 2 HILIC-MS/MS 分析法のフロー

3 HPLC-UV 測定

HILIC-MS/MS と比較する従来法は, ニテンピラムについては厚生労働省通知試験法に従い, HPLC-UV 法を用いた。試料をアセトン抽出, 多孔性ケイソウ土カラム及びシリカゲルカラムクロマトグラフィー精製後, HPLC-UV により測定を行った。

4 GC-FTD 測定

厚生労働省通知試験法による CPMA 及び CPMF 分析値の測定については, これらを CPF に誘導体化し, GC-FTD を用いて測定することになっている。そこで, HILIC-MS/MS と比較する従来法として, CPMA と CPMF は, CPF への誘導体化による GC-FTD 法を用いた。試料をアセトン抽出, トリエチルアミンによる誘導体化, 多孔性ケイソウ土カラム及びシリカゲルカラムクロマトグラフィー精製後, GC-FTD により測定を行った。

結果及び考察

1 測定条件

HILIC においては, 移動相の一部が固定相として機能し, 固定相中に水が豊富な液相が形成される⁹⁾。HILIC における目的成分の分離は, この親水性の環境と移動相との間での分配的な相互作用によって達成される。そのため, 分離が, 移動相から供給される水相に大きく依存してしまうため, カラムの平衡化が不十分であった場合, 保持時間の変動や再現性の低下等を引き起こす。このことから, 移動相については, 移動相組成が一定で, カラムを十分に平衡化させることができるイソクラテック条件を用いた。

また, LC-MS/MS 条件設定においては, 各標準溶液 1 mg l^{-1} をフローインジェクションにより直接 MS 部に導入し, イオン化条件を検討した結果, 表 1 に示す条件が最適となった。

表 1 Nitenpyram, CPMA 及び CPMF の MRM 測定条件

Compound	t_R , min	Quantification transition	Cone, V	CE, eV	Confirmatory transition	Cone, V	CE, eV	Ion ratio
Nitenpyram	4.6	270.66 \rightarrow 125.62	25	25	270.66 \rightarrow 188.78	25	25	13.6
CPMA	5.1	256.18 \rightarrow 126.12	25	25	256.18 \rightarrow 176.45	25	10	2.3
CPMF	9.4	212.30 \rightarrow 126.33	35	20	212.30 \rightarrow 90.47	35	35	4.6

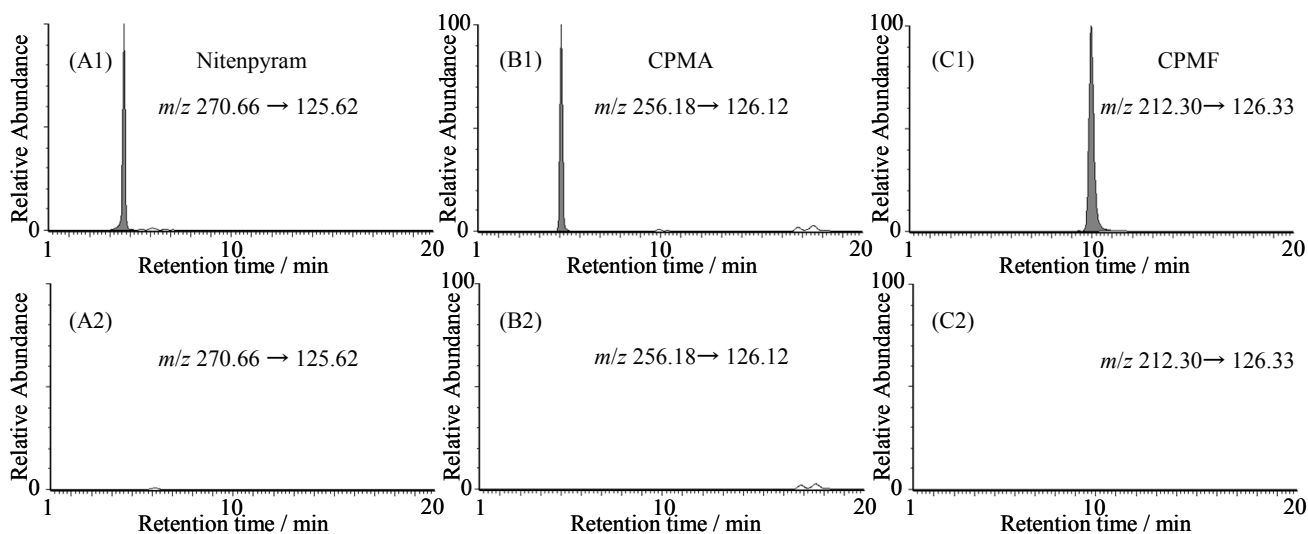


図3 ピーマン抽出溶液のMRMクロマトグラム

[Nitenpyram 0.5 mg kg⁻¹ 添加(A1), CPMA 0.5 mg kg⁻¹ 添加(B1), CPMF 0.5 mg kg⁻¹ 添加(C1), 無添加(A2, B2, C2)]

また、HILIC においては、未修飾シリカ型、アミド結合型、スルホベタイン型、ジオール型、トリアゾール型など、固定相が異なる様々な種類のものがあり、固定相の種類によって、化合物保持の特性が異なる。そこで今回、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF の保持が良好なカラムを選択するため、これらのカラムの比較を行った。その結果、アミド型、スルホベタイン型、ジオール型及びトリアゾール型においては、リテンションタイムが 5 min 未満となり、十分な保持を得ることができなかつた。一方、未修飾シリカ型においては、図 3 に示した通り、良好な保持(ニテンピラム:4.6 min, CPMA : 5.1 min, CPMF : 9.4 min) が得られた。クロマトグラムから得られた理論段数は、ニテンピラム : 5100, CPMA : 5200, CPMF : 5200 であった。そこで今回、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF における分離カラムとして未修飾シリカ型 HILIC カラムを用いた。

2 検出限界及び定量限界

ニテンピラム、CPMA 及び CPMF の検量線については、マトリックスメタノール標準溶液を用いることにより 0.2 ~ 200 µg l⁻¹ (試料中濃度 0.002~2 mg kg⁻¹) の範囲で良好な直線性 ($R^2 > 0.999$) が得られた。

本条件の測定により得られたクロマトグラム例を図 3 に示した。HILIC-MS/MS では、HILIC による分離に併せ、高感度かつ選択性の大きい LC-MS/MS を測定に用いるため、試料を希釈して測定することが可能であり、精製操作を行う必要がない。そのため、目的成分に妨害ピークはなく、ピーク形状が良好なクロマトグラムが得られた。検量線の最小濃度における S/N 比か

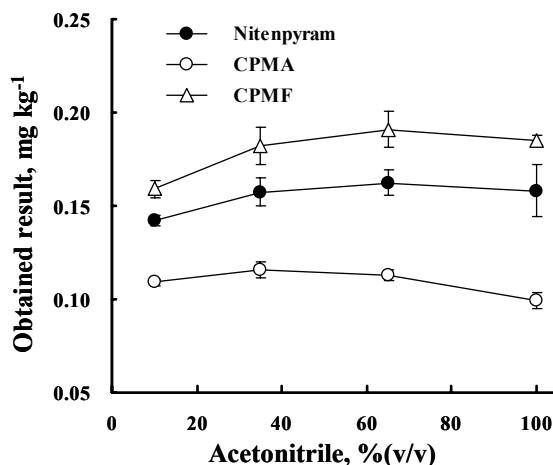


図4 Nitenpyram, CPMA 及び CPMF を含有するアスパラガスに対する含水溶媒中アセトニトリル濃度の違いによる抽出効率の変化

ら求めた検出限界は、試料中で、ニテンピラム : 0.24, CPMA : 0.14, CPMF : 0.17 µg l⁻¹ であった。また、定量限界は、試料中でニテンピラム : 0.80, CPMA : 0.47, CPMF : 0.56 µg l⁻¹ であった。この定量限界では、食品衛生法残留農薬基準における一律基準 (10 µg l⁻¹) の 10 分の 1 未満の濃度が測定可能である。よって、この定量限界はニテンピラム、CPMA 及び CPMF の測定に十分な濃度であると考えられる。

3 抽出溶媒検討結果

ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を含有するアスパ

表2 添加回収試験結果

Compound	Sample	Concentration /mg kg ⁻¹	Recovery [RSD], % (n = 6)
Nitenpyram	Sweet	0.005	98.7 [4.0]
	pepper	0.5	103.0 [1.9]
	Mandarin	0.005	93.0 [3.0]
	orange	0.5	103.3 [3.5]
	Onion	0.005	105.0 [3.1]
		0.5	103.8 [1.7]
	Brown	0.005	99.3 [2.4]
		rice	0.5
CPMA	Sweet	0.005	99.3 [4.7]
	pepper	0.5	102.0 [4.6]
	Mandarin	0.005	99.3 [3.3]
	orange	0.5	101.8 [3.3]
	Onion	0.005	98.3 [5.4]
		0.5	105.3 [3.6]
	Brown	0.005	93.0 [5.0]
		rice	0.5
CPMF	Sweet	0.005	99.0 [5.2]
	pepper	0.5	106.6 [2.5]
	Mandarin	0.005	106.3 [7.0]
	orange	0.5	98.6 [6.8]
	Onion	0.005	103.7 [3.1]
		0.5	105.0 [5.5]
	Brown	0.005	99.3 [4.9]
		rice	0.5

ラガスを含水率の異なるアセトニトリルで抽出し、抽出効率の変化を調べた結果を図4に示した。ニテンピラム及びCPMFについては、アセトニトリル含有量が増加するにつれて、抽出効率も増加し、アセトニトリル含有量が65%で、最も大きな抽出効率を示した。これは、有機溶媒含有量の多い溶媒は、農作物試料細胞中に十分に行き渡り、抽出効率が上がったためと考えられる。一方、アセトニトリル100%の時、CPMAの抽出効率が低下した。これは、CPMAが、高極性であることから、抽出溶媒は、水を含まない溶媒より極性の高い水を含む抽出溶媒を用いた場合に、CPMAの抽出効率が上がるためと考えられる。これらの結果より、ニテンピラム、CPMA及びCPMFすべてについて十分な抽出効率が得られたアセトニトリル-水(65:35)を抽出溶媒とした。

3 測定結果

LC-MS/MSなどの質量分析計は、測定試料中に多量のマトリックスを含むと、イオン化の課程でイオンサプレッションやイオンエンハンスメントなどマトリックス効果を引き起こし、定量値に影響を与えることがある²⁾。そこで、添加回収試験は、葉緑素含有量の多い試料(ピーマン)、酸性試料(みかん)、スルフィドを多く含む試料(たまねぎ)及び脂質を多く含む試料(玄米)など、それぞれ多様なマトリックスを含む試料を用いて実施した。添加回収試験は試行回数6回で実施した。すべての試料について添加濃度は0.005及び0.5 mg kg⁻¹で行い、いずれの試料においても、妨害ピークのない良好なクロマトグラムが得られた。添加回収率の結果を表2に示した。0.005 mg kg⁻¹添加における回収率はニテンピラム:93.0~105.0% (RSD:2.4~4.0%)、CPMA:93.0~99.3% (RSD:3.3~5.4%)、CPMF:99.0~106.3% (RSD:3.1~7.0%)となった。0.5 mg kg⁻¹添加における回収率はニテンピラム:103.0~103.8% (RSD:1.7~3.9%)、CPMA:95.4~105.3% (RSD:3.3~7.4%)、CPMF:98.6~106.6% (RSD:2.1~6.8%)となった。多様な試料や添加濃度の違いによる回収率の変動はなく、すべての農作物試料について良好な回収率が得られた。水分含有量の低い玄米などを有機溶媒で抽出する場合、十分な抽出効率を得るためには、試料中に水を加えて抽出を行う必要があることが報告されている^{12,13)}。これは、穀類などの乾燥した試料に水を追加することにより、組織が膨潤されて有機溶媒による抽出効率が上がるためと考えられている。しかし、今回、抽出に水を含有する溶媒を用いることにより、試料中に水を加えることなく、水分含有量の低い玄米試料においても、十分な回収率を得ることができた。このことにより、水を含有する溶媒による超音波抽出は、試料組織の膨潤と農薬成分の抽出を同時に行うことが可能と考えられた。また、この分析法におけるピーマンを分析試料とした6日間のInter-day RSDは、ニテンピラムで7.0%、CPMAで3.9%、CPMFで3.9%となった。

本法の実試料への適用性の確認を目的として、ニテンピラム、CPMA及びCPMFが含まれる試料の検索を行った。60試料について分析を行い、ニテンピラム、CPMA及びCPMFが含有する試料が3試料(アスパラガス2、メロン1)検索された。これらニテンピラム、CPMA及びCPMFを含有する試料を用いて、HILIC-MS/MSと厚生労働省通知試験法に示されているHPLC-UV及びGC-FTDにより分析を行った。ニテ

表3 HILIC-MS/MS と従来法の比較

Sample	Compound	Residue level /mg kg ⁻¹		
		HILIC-MS/MS	Conventional method ^b	Ratio,% ^c
Asparagus 1	Nitenpyram	0.162±0.0069	0.155±0.0125	104.5
	CPMA	0.113±0.0028	—	—
	CPMF	0.191±0.0096	—	—
	CPF	0.267 ^a	0.274±0.0051	97.4
Asparagus 2	Nitenpyram	0.100±0.0044	0.094±0.0028	106.4
	CPMA	0.045±0.0012	—	—
	CPMF	0.035±0.0010	—	—
	CPF	0.068 ^a	0.070±0.0065	97.1
Melon	Nitenpyram	0.031±0.0005	0.031±0.0009	100.0
	CPMA	0.009±0.0005	—	—
	CPMF	0.033±0.0018	—	—
	CPF	0.038 ^a	0.036±0.0021	105.6

a. CPMA and CPMF values are measured in terms of CPF value.

b. Nitenpyram was measured by HPLC-UV and CPF was by GC-FTD.

c. Ratios are HILIC-MS/MS data to conventional methods data.

ンピラムについては、HILIC-MS/MS 測定値と HPLC-UV 測定値との比較を行った。CPMA 及び CPMF 分析における GC-FTD では、CPMA と CPMF を CPF に変換して測定する。そのため、HILIC-MS/MS における CPMA 及び CPMF 分析についても、各定量値を CPF 量に換算した後、合計して測定値を算出し、GC-FTD 測定値との比較を行った。分析値の比較を表3に示した。ニテンピラムに対する HPLC-UV と HILIC-MS/MS で得られた値の比は 100.0~106.4%、CPF に対する GC-FTD と HILIC-MS/MS で得られた値の比は 97.1~105.6%となり、同等の値を示した。農薬含有量の多い (>0.05 mg kg⁻¹) アスパラガス試料から含有量の少ない (<0.05 mg kg⁻¹) メロン試料まで、広範囲な濃度において、HILIC-MS/MS 法は通常法と比べ、同等の値を得られることが明らかとなり、HILIC-MS/MS 法が実試料に対しても有効な分析法であることが示された。

まとめ

高極性化合物を分析可能な HILIC-MS/MS を用いることにより、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を一斉に定量可能な分析法を開発した。添加回収試験及び含有試料について分析を行った結果、すべての試料について良好な値が得られた。HILIC-MS/MS 法は、選択性が高い LC-MS/MS を用いて測定を行うため精製する必要がなく、非常に簡易な方法である。また、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を同時に分析できるため、

分析時間が、約 1 hr/6 検体と短い。これは、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を分けて測定する必要がある厚生労働省通知試験法 (HPLC-UV 法及び GC-FTD 法) にかかる約 7 hr/6 検体に比べて7分の1であり、より迅速に結果を得ることができる。さらに、有機溶媒や試薬の使用量が少ない利点もある。本法は、農作物中のニテンピラム、CPMA 及び CPMF 残留量測定に対して非常に有効な手法であることが明らかとなった。

文献

- 1) 厚生労働省：厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知,食安発第 0124001 号,平成 17 年 1 月.
- 2) 小林祐子：分析化学, **58**, 985-997(2009).
- 3) 津村ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 柿本芳久, 田中雄三, 柴田正：食衛誌, **39**, 127-134(1998).
- 4) 吉田達雄, 飛野敏明：熊本県保健環境科学研究所報, **39**, 32-35(2009).
- 5) 福島孝兵, 増永ミキ, 宮原喜子, 飛野敏明：熊本県保健環境科学研究所報, **37**, 36-39(2007).
- 6) A. J. Alpert : *J. Chromatogr.*, **499**, 177-196(1990).
- 7) 岩崎雄介, 井之上浩一, 伊藤里恵, 吉村吉博, 斉藤貢一, 中澤裕之：分析化学, **54**, 135-142(2005).
- 8) 池上亨, 田窪宏貴, 田中信男： *Chromatography*, **29**, 1-6(2008).
- 9) C. Lamouroux, G. Foglia, G. Le Rouzo : *J. Chromatogr.*, **4**, 1218, 3022-3028(2011).

- 10) P. Jandera : *Anal. Chim. Acta*, **692**, 1-25(2011).
- 11) T. Yoshida, H. Hamada, H. Murakawa, H. Yoshimoto, T. Tobino, K. Toda : *Anal. Sci.*, **28**, 179-182(2012).
- 12) 根本了 : 食衛誌, **51**, 349-359(2010).
- 13) 坂真智子, 飯島和昭, 狛由紀子, 藤田真弘, 小田中芳次, 加藤保博 : 農薬学会誌, **31**, 431-434 (2006).