

3 調査研究

3・1 報 文

1) *Escherichia albertii* 及び腸管出血性大腸菌 (O183 : H18) が検出された食中毒事例について

古川真斗 徳岡英亮*¹ 浴永圭吾*² 徳永晴樹*³
東 竜生*² 大岡唯祐*⁴ 林 哲也*⁴ 原田誠也

要旨

平成 23 年 5 月に天草市内で発生した下痢、腹痛を主症状とする食中毒事例では、摂食者便の 65.9%から *eae* 遺伝子陽性の非典型的大腸菌が、22.7%から VT2/*astA* 遺伝子陽性的大腸菌が検出された。このため、前者の大腸菌を腸管病原性大腸菌と判定し、本食中毒事例の主因とした。しかしその後、この菌を詳細に検討したところ、*Escherichia* 属の新菌種 *Escherichia albertii* であることが判明した。本菌種による散発性下痢症の報告はあるものの、集団食中毒事例の報告は非常に少なく、本事例は世界でも珍しい集団食中毒事例である。さらに、後者の大腸菌は、*Shigella boydii* type10 と同一の O 抗原もつ腸管出血性大腸菌 (EHEC O183 : H18) であることが確認された。

キーワード：食中毒, *eae* 遺伝子, *Escherichia albertii*, EHEC O183 : H18

はじめに

2011 年 5 月に天草市内の飲食店で発生した食中毒事例では、有症者便等から高率に *eae* 遺伝子陽性の非典型的な性状を示す大腸菌様細菌と低率ながら VT2/*astA* 遺伝子陽性の腸管出血性大腸菌 (以下「EHEC」という。) が分離された。前者の大腸菌様細菌は生化学的反応性に乏しかったものの、簡易同定キットで大腸菌と同定されたことから、この菌を非典型的な腸管病原性大腸菌 (以下「EPEC」という。) と判断し、臨床症状や疫学調査の結果を踏まえ、本事例は非典型的 EPEC を主因とした食中毒事例であると判断した。しかしその後、本菌の遺伝学的性状を詳細に研究したところ、*Escherichia albertii* (以下「*E.albertii*」

という。) であることが判明した。

E.albertii は下痢症状を呈するバングラディッシュの小児から分離され、Albert ら¹⁾によって 1991 年に初めて報告された細菌で、当初は *Hafia alveit* とされていた。しかしその後、遺伝学的な解析で *Escherichia* 属の新菌種であることが明らかとなり、2003 年に Huys ら²⁾によって正式に発表された。本菌は非運動性で、生化学的反応性に乏しく、病原因子の 1 つである *eae* 遺伝子保有などの特徴を有している。本菌種による散発下痢症事例の報告はあるものの、集団事例の報告は非常に少ない。

さらに、後者の EHEC は、*Shigella boydii* type10 と同一の O 抗原を持ち、最近、わが国でも検出数が増加し、

*1 現熊本県健康福祉部健康局薬務衛生課

*2 天草広域本部天草地域振興局保健福祉環境部

*3 熊本県環境生活部環境局廃棄物対策課

*4 宮崎大学

注目されている EHEC (O183 : H18)³⁾ であることが確認された。

材料と方法

(1) 事例の概要

2011 年 5 月 31 日に、A 高校運動部の保護者から管轄保健所へ、運動部の生徒、保護者及び高校の職員数人が、5 月 30 日から下痢・腹痛等の体調不良を訴えている旨の連絡があった。保健所による調査の結果、5 月 29 日に天草市内の飲食店で A 高校運動部の歓迎会が開催され、出席者の半数が同様の症状を呈していること、及び当日法事で同施設を利用したもう一つのグループにも有症者がいることが判明した。摂食者は高校運動部の歓迎会のグループ（以下「G1」）86 名と法事グループ（以下「G2」）8 名の 94 名で、このうち有症者は 48 名（51%、G1 : 43 名、G2 : 5 名）であった。主要症状は水溶性下痢(83%)、腹痛(69%)、発熱(44%、平均 37.2℃) 及び嘔気(29%) であった。平均潜伏時間は 19 時間で、16~18 時間をピークとする一峰性の発症曲線を示したことから、単一曝露による食中毒と推定された。

(2) 検査材料

保健所から搬入された摂食者便 44 検体 (G1 : 37 検体、G2 : 7 検体)、従業員便 10 検体、拭き取り 5 検体、及び井戸水 1 検体の合計 60 検体を検査材料とした。

(3) 検査方法

検査は以下の 3 項目について実施した。

1) 下痢症ウイルス検査

摂食者便 44 検体のうち、最初に搬入された有症者便 5 検体及び拭き取り 5 検体について、既報⁴⁾ に従い、ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、アデノウイルス、A 群及び C 群ロタウイルスを対象とした PCR 検査を実施した。

拭き取り 5 検体については、PBS (-) 10ml 中に振り出したものを 10,000rpm、20 分間冷却遠心後、上清を 30% ショ糖溶液 1ml を入れた超遠心用遠心管に重層し、40,000rpm、120 分間遠心した。沈渣を 200 μ l の蒸留水に再浮遊し、厚生労働省通知⁵⁾ に準じて cDNA を作製した。

2) 細菌検査

① Multiplex-realtime PCR 法によるサルモネラ、腸炎ビブリオ及びカンピロバクターのスクリーニング

ウイルス検査同様、最初に搬入された有症者便 5 検体について、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いて便から直接 DNA を抽出後、既報⁶⁾ に従いサ

ルモネラ、腸炎ビブリオ及びカンピロバクターのスクリーニングを実施した。

② 培養法による食中毒菌の検索

常法により食中毒菌の検索を行った。すなわち、摂食者便 44 検体及び従業員便 10 検体を、DHL 寒天培地、マッコンキー寒天培地、クロモアガービブリオ、mCCDA 培地、卵黄加 CW 寒天培地、卵黄加マンニト食塩培地、及び卵黄加 NGKG 培地に画線塗抹し、mCCDA 培地は 2 日間微好気培養、卵黄加 CW 寒天培地は一夜嫌気培養、及びその他の培地については一夜好気培養を実施した。

拭き取り 5 検体は、緩衝ペプトン水 (BPW)、アルカリペプトン水 (APW)、プレストン培地、及びチオグリコレート培地 (TGC) で 24 時間増菌培養後、BPW から DHL 寒天培地、マッコンキー寒天培地、卵黄加マンニト食塩培地、卵黄加 NGKG 培地へ、APW からクロモアガービブリオへ、プレストン培地から mCCDA 培地へ、TGC から卵黄加 CW 寒天培地へ画線塗抹し、便の直接培養と同一の条件で培養した。

井戸水 1 検体も拭き取り検体と同様に培養した。

下痢原性大腸菌の有無は、伊藤の方法など⁷⁾ に準じ、下痢原性大腸菌の各種病原遺伝子 (VT1/2, LT, ST, *invE*, *eae*, *bfpA*, *aggR*, 及び *astA*) をターゲットとした分離培地のスィープ PCR 法⁸⁾ で判定した。その後、スィープ PCR 法で何らかの病原遺伝子が検出された分離培地から個々の大腸菌様コロニーを釣菌し再度 PCR を行い、病原遺伝子保有株を分離した。

③ 生化学的性状及びベロ毒素 (VT) 確認検査

API20E (日本ビオメリュー) 及び自家製培地により生化学的性状検査を実施した。また、ベロ毒素の確認には、デュオパス・ベロトキシン (極東製薬工業株式会社) を使用した。

④ 血清型別

病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用い、添付文書に従い O 群抗原及び H 抗原の血清型別を行った。

⑤ 薬剤感受性試験

シプロフロキサシン (CIP)、セフトキシム (CTX)、クロラムフェニコール (CP)、ナリジクス酸 (NA)、テトラサイクリン (TC)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、アンピシリン (ABPC) の 8 剤を使用し、KB ディスク法により実施した。

⑥ パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 分析

常法により調製した染色体 DNA を制限酵素 *Xba*I で切断後、CEHF DRIII (Bio-Rad 社) で 12.0℃、6.0V/cm、2.2~54.2 秒、18 時間の条件で電気泳動を行った。

3) *E. albertii* 同定のための追加試験

宮崎大学医学部感染症学講座に依頼し, Ooka らの方法⁹⁾で, 以下の4項目について追加試験を実施した。

① Multi-locus sequence analysis (MLSA)

ハウスキーピング遺伝子 *adk*, *gyrB*, *mdh*, *fumC*, *recA*, *purA*, *icd* の7種をPCR増幅し, ダイレクトシークエンスで塩基配列を決定した。その後, その内部配列を連結(計3423bp)し, 大腸菌及び近縁菌の同部

表1 細菌検査結果(分離株数)

	G1(37検体)	G2(7検体)	従業員(10検体)
<i>E. albertii</i>	19	3	2
<i>E. albertii</i> + EHEC(O183:H18)	6	1	0
EHEC(O183:H18)	3	0	0
不検出	9	3	8

表2 摂食者及び従業員の臨床症状(人数)

	<i>E. albertii</i> (24名)	<i>E. albertii</i> + EHEC(O183:H18) (7名)	EHEC(O183:H18) (3名)
水溶性下痢	17	1	7
腹痛	16	2	6
嘔吐	0	0	0
嘔気	5	0	5
発熱	8	2	4
症状不明	2	0	0
無症状	3	0	0

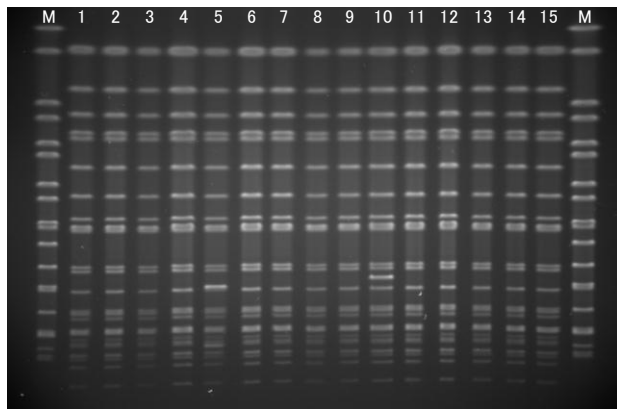


図1 *eae* 陽性菌株の PFGE 解析結果

レーン 1~9 : G1 摂食者株, レーン 10~13 : G2 摂食者株, レーン 14~15 : 従業員株, M : マーカー

位の配列を含め, Neighbor-Joining (N-J) 法により解析した。

② *eae* 遺伝子サブタイピング

2組の primer pair (*cesT-F9/eae-R3* 及び *eae-F1/escD-R1*) で *eae* 遺伝子前後を増幅後, ダイレクトシークエンスで得られた塩基配列により判定した。

③ *cdtB* 遺伝子サブタイピング

2組の primer pair (*CDT-s1/CDT-as1* 及び *CDT-s2/CDT-as2*) で *cdtB* 遺伝子内部を増幅後, ダイレクトシークエンスによる塩基配列解析で, II, III, V型, 又は I, IV型のいずれであるか判定した。

④ locus of enterocyte effacement (LEE) 挿入部位スクリーニング

PCR法を用い, LEEがゲノム上の tRNA 遺伝子(*pheV*, *selC*, *pheU*) のいずれの位置に挿入されているか判定した。

結果

1) 下痢症ウイルス検査

ウイルス検査では, いずれの下痢症ウイルスも不検出であった。

2) 細菌検査

① Multiplex-realtime PCR 法によるサルモネラ, 腸炎ビブリオ及びカンピロバクターのスクリーニング

Multiplex-realtime PCR 法にて迅速スクリーニングを行ったが, 3菌種ともに不検出であった。

② 培養法による食中毒菌の検索

培養法による細菌検査の結果を表1に示した。菌が分離された摂食者及び従業員の臨床症状を表2に示した。摂食者便及び従業員便の検査では, DHL寒天培地及びマッコンキー寒天培地以外に, 食中毒菌様細菌の発育はみられなかった。そこで, ターゲットを下痢原性大腸菌に絞り, DHL寒天培地のコロニー密集部からスィープPCRを実施したところ, *eae*, *astA* 及び VT2 遺伝子がそれぞれ複数の培地から検出された。次に, これらの病原遺伝子が検出された DHL寒天培地から病原遺伝子保有菌の分離を試みたところ, 摂食者便44検体中29検体(65.9%, G1:25検体, G2:4検体), 及び従業員便10検体中2検体(20.0%)から *eae* 遺伝子を保有する乳糖・白糖非発酵性の大腸菌様細菌(*eae* 遺伝子陽性菌)が分離された。

さらに, VT2/*astA* 遺伝子陽性菌も摂食者便44検体中10検体(22.7%)から分離され, このうちの7検体からは両方の菌が分離された。

なお, 拭き取りは食中毒菌様の発育がみられず, スィープPCR法も陰性であった。井戸水は DHL寒天のスィープPCR法で *eae* 遺伝子が陽性となったため, *eae* 遺伝子陽性菌の分離を試みたが, 分離することはできなかった。

③ 生化学的性状及び VT 確認検査

分離された *eae* 遺伝子陽性菌, VT2/*astA* 遺伝子陽性

菌及び *E.albertii* の生化学的性状を表 3 に示した。*eae* 遺伝子陽性菌は API20E では大腸菌と同定されたものの、非運動性、乳糖、白糖、キシロース非発酵性、及び β -Glucuronidase 陰性など、大腸菌にしては非典型的な生化学的性状を示した。一方、VT2/*astA* 遺伝子陽性菌は典型的な大腸菌の生化学的性状であり、デュオパス・ベロトキシンで VT2 陽性となったことから、EHEC であることが確定した。

表 3 分離株の生化学性状

	<i>eae</i> 陽性株	EHEC(O183:H18)	<i>E.albertii</i> ⁹⁾
Indole	+	+	-
H ₂ S	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-
Methyl red	+	+	NT
Citrate, Simmons	-	-	-
MUG	-	+	-
Motility	-	+	-
Glucose	+	+	+
Lactose	-	+	-
Sucrose	-	±	-
Mannitol	+	+	+
Dulcitol	-	+	-
Salicin	-	-	-
Adnitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	+	-
Arabinose	+	+	NT
Raffinose	-	+	NT
Rhamnose	-	+	-
Maltose	+	+	+
Xylose	-	+	-
Trehalose	+	+	+
Cellobiose	-	-	-
Melibiose	-	+	NT
Sorbose	+	+	NT
Gelatin	-	-	NT
ONPG test	+	+	+
Urea	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	-	+
Arginine dihydrolase	-	-	-
Phenylalanine deaminase	-	-	NT
Utilization of acetate	+	+	+

NT: Not test (参考文献に記載なし)

④血清型別

eae 遺伝子陽性菌は使用した市販の血清に凝集せず、かつ非運動性であったため、OUT:HNM とした。一方、VT2/*astA* 遺伝子陽性菌は OUT:H18 と判定された。また、EHEC が確定したため国立感染症研究所に送付したところ、O183:H18 であることが判明した。

⑤薬剤感受性試験

eae 遺伝子陽性菌は TC にのみ耐性を示した。一方、VT2/*astA* 遺伝子陽性菌は使用したすべての薬剤に感受性であった。

⑥PFGE 分析

eae 遺伝子陽性菌の PFGE による泳動像の一部を図 1 に示した。ほぼ全株が同一の泳動パターンであった。EHEC の PFGE を実施したところ、ほぼ全株が同一の泳動パターンであった。これらの結果より、感染源が同一である可能性が示唆された。

3) *E.albertii* 同定のための追加試験

eae 遺伝子陽性菌の追加試験の結果を以下に示す。

①MLSA

MLSA による N-J 系統樹解析では、*E.albertii* のクラスターに分類された。

②*eae* 遺伝子サブタイピング

eae 遺伝子陽性菌のインチミンのサブタイプは、大腸菌では稀な σ (シグマ) 型と同定された。

③*cdtB* 遺伝子サブタイピング

cdtB 遺伝子のタイプは、ほぼすべての *E.albertii* が示す II, III, V 型であった。

④LEE の挿入部位スクリーニング

LEE の挿入部位は、ほぼすべての *E.albertii* が示す tRNA-*pheU* の位置であった。

これらの追加試験の結果から、今回の食中毒事例の主因と推定された *eae* 遺伝子陽性菌は、*E.albertii* と同定された。

考察

本食中毒事例では、有症者及び従業員便 31 検体から *E.albertii* が、有症者便 10 検体から EHEC(O183:H18) が分離され、このうち 7 検体は両菌とも分離された。このため、*E.albertii* と EHEC(O183:H18) による混合感染による事例ではあるが、主因は高率に検出された *E.albertii* と推定された。残念ながら検食が保存されていなかったため、原因食品を特定することはできなかった。しかし、井戸水については、*E.albertii* は分離できなかったものの、*eae* 遺伝子が検出されたことから、井戸水中の *E.albertii* が食品を汚染し、増殖して引き起こした事例であろうと推定された。事実、保健所の調査によると、厨房内には市の上水道と井戸水が引かれており、半分以上で井戸水が使用されていたが、井戸水への塩素剤等の注入や受水槽の掃除は数年間行われておらず、壁面に藻類が発生した状態であった。通常、食中毒菌は、腸管出血性大腸菌やカンピロバクターなど、一部の細菌を除き、ヒトに感染し、発症する菌数

は 100 万個程度が必要とされている。しかし、緒方ら¹⁰⁾は、2005 年に大分県のキャンプ場で発生した有症者数 176 名に及ぶ、湧き水を感染源とした水系感染による *E.albertii* の集団食中毒事例を報告しており、これより少ない菌数で発症したと考えられる。今回の事例でも食品中で増殖したとは限らないことから、*E.albertii* は少ない菌数で感染が成立する可能性も考えられた。

本食中毒事例において、我々は当初、*E.albertii* を非典型的な性状の EPEC と同定し、報告¹¹⁾した。また、このことは前述のキャンプ場での事例でも同様¹²⁾であった。*E.albertii* は生化学性状も乏しいものの、*Escherichia* 属の菌種であることから大腸菌と類似したところがあり、本事例でも API20E を用いた簡易検査で大腸菌と同定された。また、*eae* 遺伝子陽性であることから、EPEC と誤同定されやすい。*E.albertii* の同定法として村上ら¹³⁾は、現在のところキシロース発酵陰性を指標として、Hyma らが確立した *E.albertii* 検出用 PCR で判定する方法¹⁴⁾が最も実用性があると述べている。*E.albertii* は散発性下痢症の報告はあるものの、集団食中毒事例の報告は非常に稀である。しかし、本事例のように非典型的な性状の EPEC 食中毒と判断された事例も少なからず存在する可能性があり、検査法の普及とともに、事件数の増加が予想される。また、*E.albertii* に関して、現在保菌動物や発症菌量などは不明であり、生態学的な研究も少ないことから、今後さらなる研究の進展が望まれる。

一方、本食中毒事例で同時に検出された EHEC (O183:H18) は、*Shigella boydii* type10 と同一の O 抗原を持つことで注目されている血清型で、九州地域をはじめ、国内でも報告数が増加傾向にあり、今後とも注意が必要である。

まとめ

2011 年 5 月に天草市で発生した食中毒事例では、摂食者の 65.9% から *eae* 遺伝子陽性の大腸菌様細菌が検出され、22.7% から VT2/*astA* 遺伝子陽性の EHEC が検出された。前者は大腸菌にしては非典型的な生化学的性状であったが、簡易同定キットで大腸菌と判定されたため、当初、本事例は EPEC を主因とする食中毒と判定した。しかしその後、本菌は *Escherichia* 属の新菌種 *E.albertii* であることが判明した。本菌種は比較的新しい菌種であり、一般に食中毒発生時の検査対象とはなっていない。しかし今後、乳糖・白糖非発酵性、非運動性、 β -Glucuronidase 陰性を示し、*eae* 遺伝子陽性

の非典型的な大腸菌様細菌が検出された場合、本菌種の可能性を検討すべきである。また、同時に検出された EHEC (O183:H18) は、最近わが国での報告数が増加していることから、今後も注意する必要がある。

文献

- 1) Albert, M. J., K. Alam, M. Islam, J. Montanaro, A. S. M. H.Rahman, K. Haider, M. A. Hossain, A.K.M.G. Kibriya, and S.Tzipori. : *Infect. Immun*, **59**, 1507-1513, (1991).
- 2) Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swings J. : *Int J Syst Evol Microbiol.*, **53**, 807-10, (2003).
- 3) Iguchi, A., Iyoda, S., Seto, K., and Ohnishi, M., on behalf of the EHEC Study Group : *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 3678-3680, (2011).
- 4) Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, et al. : *J. Med. Virol.*, **81**, 1117-1127, (2009).
- 5) 平成15年11月5付, 食監発第1105001号, 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知
- 6) 古川真斗, 徳岡英亮, 原田誠也 : 熊本県保環研報, **41**, 20-26 (2011).
- 7) 伊藤健一郎 : 国立保健医療科学院, 平成20年度新興再興感染症技術研修「遺伝子検査法」実習テキスト, (2008).
- 8) 緒方喜久代, 成松浩志, 小川正雄 : 感染症誌, **87**, 294 (2013).
- 9) Ooka T, Seto K, Kawano K, Kobayashi H, Etoh Y, Ichihara S, Kaneko A, Isobe J, Yamaguchi K, Horikawa K, Gomes TA, Linden A, Bardiau M, Mainil JG, Beutin L, Ogura Y, Hayashi T : *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 488-492 (2012).
- 10) 緒方喜久代, 成松浩志, 小川正雄 : 感染症誌, **87**, 249 (2013).
- 11) 徳岡英亮, 古川真斗, 永村哲也, 原田誠也, 浴永圭吾, 徳永晴樹, 東 竜生 : 病原微生物検出情報, **33**, 8-9 (2011).
- 12) 馬場 愛, 江渕寿美, 瓜生佳世, 樋脇弘, 緒方喜久代, 鷺見悦子, 長谷川昭生, 内山静夫 : 病原微生物検出情報, **26**, 275-276 (2005).
- 13) 村上光一, 江藤良樹, 小迫芳正, 河村好章, 伊藤健一郎 : 病原微生物検出情報, **33**, 134-136 (2012)
- 14) Hyma KE, Lacher DW, Nelson AM, Bumbaugh AC, Janda JM, Strockbine NA, Young VB, Whittam TS : *J. Bacteriol.* **187**, 619-628 (2005).

2) 2012年6月、熊本県で発生した原因不明ボツリヌス症について

古川真斗 徳岡英亮*¹ 高本芳寿*² 椎葉加奈*³
濱本愛*³ 木下まり*⁴ 天野朋子*⁴ 原田誠也

要旨

2012年6月、本県でボツリヌス症疑いの患者が発生した。本研究所で患者血清からのボツリヌス毒素検出及び糞便からのボツリヌス菌分離を実施したところ、患者便からA型及びB型毒素遺伝子を保有したボツリヌス菌が分離され、マウスを用いたボツリヌス毒素中和試験によりA型毒素の産生が確認された。このことから、本症例の原因菌はサイレントのB型毒素遺伝子を保有したA型ボツリヌス菌であることが明らかとなったが、感染源は不明であった。

患者には抗毒素血清が投与され、一時回復の兆しが見られたものの、発症から約1ヵ月後に容態が急変し、心肺停止により死亡した。

キーワード：ボツリヌス症，ボツリヌス毒素中和試験，A型ボツリヌス菌

はじめに

ボツリヌス症は、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、又は *Clostridium butyricum*、*Clostridium baratii* などが産生するボツリヌス毒素により発症する神経、筋の麻痺性疾患で、感染経路により食餌性ボツリヌス症、乳児ボツリヌス症、創傷ボツリヌス症、及び成人腸管定着ボツリヌス症の4つに分類される。食餌性ボツリヌス症は、ボツリヌス毒素に汚染された食品を摂取することによって発症するボツリヌス菌食中毒で、初期症状として視力の低下や眼瞼下垂などの視覚障害を訴え、吐き気や全身の筋弛緩などの症状を呈する。重症の場合は、呼吸器筋の麻痺による呼吸不全で死亡することもあり、致死率は他の食中毒に比べてかなり高く、10～20%に達する。国内のボツリヌス菌食中毒は1951年から2011年までに118事例報告されており、うち104事例は「いずし」を原因としたE型ボツリヌス菌である。残りの11事例はA型、3事例はB型ボツリヌス菌によるものである。表1に過去5年分のA型ボツリヌス菌食中毒事例についてまとめたが、原因食品が断定される事例は極めて稀である。

本症の主要原因菌であるボツリヌス菌は、グラム陽性の嫌気性有芽胞桿菌で、土壌中に芽胞の形で広く生息している。本菌は非常に強力なボツリヌス毒素を産生し、毒素の抗原性の違いによりA型～G型に分類される。ヒトに対してA、B、E型が主に中毒を起こすと言われているが、稀にF型による中毒も認められる¹⁻³⁾。

2012年6月、本県でボツリヌス症疑いの患者が発生し、管轄保健所経由で患者の血清及び便が搬入された。本所で検査を実施したところ、便からサイレントのB

表1 過去5年のA型ボツリヌス菌による食餌性ボツリヌス症発生件数

発生年	発生地	患者数	原因食品
2008	栃木県	1	不明
2009年は事例なし			
2010	船橋市	1	不明
2011	広島市	1	不明
2012	鳥取県	2	パック詰めあずきばっとう
2012	熊本県	1	不明

*1 現熊本県健康福祉部健康局薬務衛生課

*2 県央広域本部宇城地域振興局保健福祉環境部

*3 県南広域本部八代地域振興局保健福祉環境部

*4 健康保険熊本総合病院

型毒素遺伝子を保有する A 型ボツリヌス菌が検出された。国内におけるボツリヌス症の発症件数は少なく、貴重な症例であり、毒素確認試験や生化学的性状の確認等の詳細な細菌学的検討を実施したので報告する。

材料と方法

(1) 症例

患者は 76 歳の男性で、既往歴は特段なく健康であった。ところが、2012 年 6 月 14 日、太極拳練習中に胸のつかえを初期症状として腹痛、嘔気・嘔吐を呈し、近隣の医療機関を受診して、点滴などの治療を受けた。翌 15 日、腹部の症状は改善したものの、両上肢の麻痺や複視、嚥下障害や言語障害が出現した。さらに翌 16 日も神経症状が続いたため、再度近隣の医療機関を受診した。そこで、総合病院を受診を勧められて受診し、すぐに入院となった。総合病院では、複視、構音障害、嚥下障害、左上肢の失調症状、右上肢の軽度麻痺、及び拮抗障害等が確認されたことから左脳幹部の梗塞が疑われ、入院加療が開始された。その後、嚥下障害や構音障害が徐々に増悪し、18 日には眼瞼下垂も出現した。これらの臨床症状及び 20 日に実施された MRI 検査や髄液検査等の所見から脳梗塞、重症筋無力症及びギランバレー症候群は否定的となった。そのような中、ボツリヌス症の可能性が考えられたため、21 日に本所へ細菌学的検査が依頼された。同日、患者に対し、ボツリヌス抗毒素血清が投与されたが、一時呼吸停止となり人工呼吸器が装着された。また翌 22 日に 2 回目のボツリヌス抗毒素血清が投与され、自発呼吸や動きがみられるなど一時回復傾向にあったが、発症して約 1 ヶ月後に容態が急変し、心肺停止により死亡した。

(2) 検査材料

2012 年 6 月 20 日に採取され、21 日に本所へ搬入された患者検体（血清、便）及び後日搬入された患者の家族の検体（便）を検査材料とした。

(3) 検査方法

まず、血清からのボツリヌス毒素検出と、便からのボツリヌス菌の分離を行った。

1) 患者血清中のボツリヌス毒素検出（マウス試験）

患者血清中のボツリヌス毒素検出するため、患者血清 0.5ml をマウス（ddY, 4 週齢, 雄）の腹腔内に投与し、マウスの症状を 1 週間観察した。

2) 便からのボツリヌス菌分離

便はゼラチン希釈液で 10 倍乳剤とした。その後、60℃・15 分、80℃・30 分で加熱処理したもの、及び未処理のものをそれぞれ卵黄加変法 GAM 寒天培地（日

水製薬）、卵黄加 CW 寒天培地（日水製薬）に画線塗抹し、嫌気培養を行った。また、0.3% グルコースと 0.2% スターチを加えた強化クックドミート培地（Oxoid）に接種し、30℃で 1 週間嫌気培養を行った。

その後、便検体中のボツリヌス菌の有無は以下のようにして確認した。まず、便検体を未処理及び加熱処理後、直接画線塗抹し、一夜嫌気培養した分離培地上のコロニー密集部からスweep PCR 法⁴⁾によりボツリヌス毒素遺伝子（A 型、B 型、C 型、D 型、E 型、F 型）の検査を行った。いずれかの毒素遺伝子が検出された場合、リパーゼ反応陽性のボツリヌス菌様集落を釣菌し、単独コロニーについて、再度 PCR 法により毒素遺伝子の確認を行った。毒素遺伝子が確認されたコロニーを純培養後、タンパク分解性試験、ゼラチン液化試験、及び糖加 GAM 半流動寒天培地を用いた糖分解試験（グルコース、フルクトース、マンノース、マルトース、白糖、トレハロース）等の生化学的性状試験を実施した。なお、糖分解試験の判定には BTB-MR 試薬を使用した。

3) 分離株のボツリヌス毒素産生試験及び中和試験

毒素遺伝子陽性の分離株を強化クックドミート培地で 30℃で 1 週間嫌気培養した。その培養液の遠心上清について、無処理、100℃・10 分処理、A 型及び B 型抗毒素による中和処理を行った。なお中和処理は、遠心上清と等量の各抗毒素血清を加え、37℃で 30 分間反応させた⁵⁾。マウス試験は (3) の 1) と同様に実施した。なお、患者便 1g 中の菌数は、菌分離に用いた 10 倍乳剤を、さらにゼラチン希釈液で段階希釈し、100 倍希釈及び 1000 倍希釈を行った。各希釈段階の液を卵黄加 GAM 寒天培地 2 枚に 100µl ずつ接種し、コンラージ棒で塗抹した。30℃で 48 時間嫌気培養後、各平板の菌数を測定し、その平均値を便 1g 中の菌数とした。

結果

(1) 血清中のボツリヌス毒素確認検査

患者血清を接種したマウスは、ボツリヌス毒素特有の症状（腹部の陥没など）を示さず、1 週間後も生存していた。このことから、ボツリヌス毒素は不検出であった。

(2) 便からのボツリヌス菌分離

患者便及び家族便を直接接種した分離平板からスweep PCR 法でボツリヌス毒素遺伝子の検出を試みたところ、患者便の平板のみから A 型及び B 型のボツリヌス毒素遺伝子が検出された（図 1）。そこで、分離培地上でリパーゼ反応陽性を示すボツリヌス菌様集落を

表2 ボツリヌス菌（分離株，Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ群菌）及び類縁菌の生化学的性状

	分離株	群				<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i>
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	<i>butyricum</i>	<i>baratii</i>
毒素型	A(B:サイレント)	A, B, F	B, E, F	C, D	G	E	F
タンパク分解性	+	+	-	-	+	-	-
ゼラチン液化	+	+	+	+	+	-	-
リパーゼ産生	+	+	+	±	-	-	-
糖分解							
グルコース	+	+	+	+	-	+	+
フルクトース	+	±	+	±	-	+	+
マンノース	-	-	-	-	-	+	+
マルトース	+	±	+	±	-	+	+
白糖	-	-	-	+	-	+	+
トレハロース	-	-	+	-	-	+	-

釣菌し，再度 PCR 検査を行ったところ，A 型及び B 型の毒素遺伝子を保有した株を得ることができた。この株の生化学的性状試験を実施したところ，結果は表 2 のとおりとなった。このことから，本事例の分離株はタンパク分解性のⅠ群菌に分類されることが分かった。なお，家族の便からは，ボツリヌス毒素及びボツリヌス菌ともに検出されなかった。

(3) 分離株のボツリヌス毒素産生試験及び中和試験
強化クックドミート培地で 30℃，1 週間嫌気培養した分離株の培養液を用いてマウスによる毒素産生試験及び中和試験を行ったところ，無処理及び B 型抗毒素処理検体投与マウスはボツリヌス毒素特有の症状を呈して死亡した（図 2）。一方，100℃・10 分処理及び A 型抗毒素処理検体を投与したマウスは生存した。

(4) 便中のボツリヌス菌の菌数測定
患者便中のボツリヌス菌数測定を行ったところ，菌数の平均値は 2.0×10^5 cfu/g であった（図 3）。



図2 毒素産生試験に使用したマウス（無処理群）
ボツリヌス症状に特徴的な腹部の陥没が観察される。

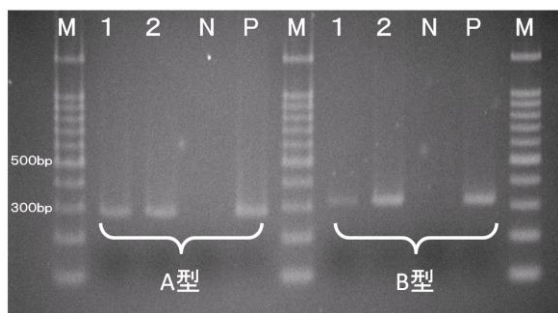


図1 PCR 法による毒素遺伝子検出結果

M: 100bp ladder maker, 1 及び 2: 分離平板上のリパーゼ反応陽性コロニー, N: negative control, P: positive control



図3 ボツリヌス菌測定時の変法 GAM 寒天培地
リパーゼ反応陽性コロニーを推定ボツリヌス菌として便 1g 中の菌数を算定した。

考 察

本県では、1986年に土産用の真空包装の辛子レンコンによるA型ボツリヌス菌食中毒が発生した。この事例では辛子レンコンを食した県外の患者11名の死亡が報告されているが、本県に患者発生はなく、今回のボツリヌス症例は本県初の事例であった。

保健所の疫学調査によると、本事例の患者は日頃から家族と同じ食事を摂っていたが、たまたま患者だけが発症日の2日前に市販のパック詰めカレーを食べたということであった。残念ながら、患者宅に残品が残っておらず、検査はできなかったものの、同時期にボツリヌス症の発生報告がないため、このカレーが原因とは考えにくい。また、A型ボツリヌス菌は、土壌などの環境中から分離されることが知られており⁶⁾、ハウスダストや土壌等からの感染も考えられたが、こちらも調査ができず、原因究明までには至らなかった。なお、家族に症状はなく、便検査でもボツリヌス毒素及び菌ともに検出されなかった。

通常、ボツリヌス菌の分離培養は、30°Cで2~3日嫌気培養を行うことになっている。しかし、今回の事例では、小さいコロニーではあったが、一夜培養で2個だけリパーゼ反応陽性のボツリヌス様コロニーが確認され、PCR法で迅速にA型及びB型毒素遺伝子が検出することができた。このことから、臨床症状からボツリヌス症が疑われる場合、直接分離培養1日目から、発育状況の確認が必要だと思われる。また本事例は、食餌性ボツリヌス症の可能性が高いと思われたが、通常食餌性ボツリヌス症では、患者便から直接培養で菌が分離されることは稀であり、症状の経過が長かったことから、成人腸管定着ボツリヌス症であった可能性も否定できない。

なお、今回の事例はサイレントのB型毒素遺伝子を保有するA型ボツリヌス菌による事例であったが、同年3月に鳥取県で発生した岩手名産の「あずきばっとう」による事例⁷⁾でも、同じタイプのA型ボツリヌス菌が検出されている。事例の発生時期が近いことから分離株の異同が気にかかるところである。

まとめ

2012年6月、本県でボツリヌス症疑いの患者が発生した。患者便を直接塗抹した分離培地からA型及びB型遺伝子を保有したボツリヌス菌が検出され、マウスによる中和試験でサイレントのB型毒素遺伝子を保有するA型ボツリヌス菌であることが判明した。本症例は本県初のボツリヌス症例であった。

文 献

- 1) Sakaguchi G: *Pharmacol. Ther.*, **19**, 165-194 (1982).
- 2) 阪口玄二: 食中毒, 358-408 (1981).
- 3) 武士甲一: 新訂食水系感染症と細菌性食中毒, 492-513 (2000).
- 4) Takeshi K, Fujinaga Y, Inoue K, Nakajima H, Oguma K, Ueno T, Sunagawa H, Ohyama T: *Microbiol. Immunol.*, **40**, 5-11 (1996).
- 5) 坂井千三, 伊藤武: 臨床と細菌, **4**, 15-20 (1977).
- 6) 仲西寿男, 丸山務: 食品由来感染症と食品微生物, 456-467 (2009).
- 7) 上田 豊, 花原悠太郎, 坂本智宏, 村松 毅, 北村勝, 百瀬愛佳, 朝倉 宏, 岡田由美子, 五十君静信, 岩城正昭, 加藤はる, 柴山恵吾: 病原微生物検出情報, **33**, 218-219 (2012).

3) 熊本県におけるエンテロウイルス (EV) の検出状況と 無菌性髄膜炎由来 EV の系統樹解析

清田 直子 西村 浩一* 吉岡 健太 原田 誠也

要 旨

手足口病や無菌性髄膜炎の原因となるエンテロウイルス (EV) の分離と遺伝子検出及び系統樹解析を行った。2011 年は全国規模で手足口病の大流行が起こり、患者からは Enterovirus 71 型や Coxsackievirus A(CA) 6 型, CA16 型が検出された。無菌性髄膜炎患者からは主に Coxsackievirus B(CB) 1 型と CB5 型が検出され、それらの系統樹解析を行ったところ、検出された株の相同性は高く、調査期間内において遺伝的に近い株が流行していたと考えられた。

キーワード：エンテロウイルス，手足口病，無菌性髄膜炎，系統樹解析

はじめに

エンテロウイルス (EV) 感染症は、主に夏季に小児の間で流行する感染症である。EV が引き起こす疾患は、手足口病、ヘルパンギーナ、感冒、無菌性髄膜炎、感染性胃腸炎等と多岐にわたり、2011 年には全国的な手足口病の大流行が起こった¹⁾。流行する EV の血清型は年によって異なり、地域によっても差が見られる。一般的に EV による無菌性髄膜炎の予後は良好とされるが、重症化する例もあり、特にエンテロウイルス 71 型 (EV71) による手足口病流行時は中枢神経合併症の頻度が高くなるという報告がある²⁾。このことから、流行している血清型の調査を行うことは重要である。

そこで今回、2011 年 4 月から 2013 年 3 月までの当所における EV 検出状況及び無菌性髄膜炎由来 EV の系統樹解析結果について報告する。

実験方法

2011 年 4 月から 2013 年 3 月に、本県の病原体定点医療機関を受診した手足口病、ヘルパンギーナ、発疹症、無菌性髄膜炎及び脳炎・脳症疑いの患者 451 名 (手足口病：168 名、ヘルパンギーナ：101 名、発疹症：106 名、無菌性髄膜炎：50 名、脳炎・脳症：26 名) から採

取された 518 検体 (咽頭ぬぐい液：419 検体、髄液：71 検体、便：19 検体、その他：9 検体) を試験に供した (表 1)。EV の遺伝子検査は、VP4/VP2 領域を標的とした semi-nested PCR 法³⁾により行った。エンテロウイルス陽性と判定された場合、VP1 領域を標的とした nested PCR 法⁴⁾及びダイレクトシーケンスで塩基配列を決定し、BLAST による相同性検索で型別同定を行った。また、無菌性髄膜炎及び脳炎・脳症由来 EV の一部については、得られた VP1 領域の塩基配列 (約 270bp) を用いて、近隣結合法による系統樹解析を行った。

表 1 診断名別患者検体数

検体種別 診断名	咽頭 ぬぐい液	髄液	便	その他	総計
手足口病	167	1	1	2	171
ヘルパンギーナ	96		5		101
発疹症	105	3		2	110
無菌性髄膜炎	32	44	8		84
脳炎・脳症	19	23	5	5	52
総計	419	71	19	9	518

* 現熊本県健康福祉部薬務衛生課

ウイルス分離は、4細胞（2011年：RD-18S, VeroE6, MRC-5, A549, 2012年：RD-A, VeroE6, MRC-5, HEp-2）を使用し、3代目まで継代及び観察を行った。分離できた株は、中和試験を行った。

結果

1. 疾患別患者報告数の推移とEV検出状況

(1) 手足口病

2011年は、全国的に手足口病の大流行が起こった年であった。本県においても同様に、2011年第21週（5/23～29）頃から増加傾向が見られ、第24週（6/13～19）に定点当たりの患者報告数が7.04で警報基準値（5.00以上）を超えた。第27週（7/4～10）にピークを迎えた後は減少し続け、第36週（9/5～11）には警報基準値を下回った。一方、2012年度は手足口病の流行はほとんど起こらなかった。

EVは手足口病患者168名中134名から検出された。型の内訳は、EV71が25名、Coxsackievirus A6型（CA6）が39名、Coxsackievirus A10型（CA10）が1名、Coxsackievirus A14型（CA14）が1名、Coxsackievirus A16型（CA16）が59名、Echovirus 7型（Echo7）が2名、Enterovirus 型不明（EV NT）が7名であった（表2）。時期によって流行型に違いが見られ、2011年4月はEV71、6月はCA6、7月はCA6とCA16、8～10月はCA16が主な流行型であった。2012年度は、CA6、CA14、CA16が散発的に検出されたのみであった（図1-A）。

(2) ヘルパンギーナ

ヘルパンギーナは、2011年は第22週（5/30～6/5）頃から増加傾向となり、第28週（7/11～17）にピークを迎えた後は減少した。2012年も2011年と同様の傾向が見られ、第22週（5/28～6/3）頃から増加傾向となり、第27週（7/2～8）にピークを迎えた後に減少するという経過であった。

EVはヘルパンギーナ患者101名中50名から検出された。型の内訳は、EV71が1名、Coxsackievirus A2型（CA2）が4名、Coxsackievirus A4型（CA4）が8名、Coxsackievirus A5型（CA5）が4名、CA6が10名、CA10が4名、CA16が3名、Coxsackievirus B1型（CB1）が2名、Coxsackievirus B3型（CB3）が1名、Echo7が2名、Echovirus 9型（Echo9）が1名、Poliovirus 2型（Polio2）が1名、EV NTが9名であった（表2）。2011年はCA6が、2012年はCA4が、他と比較して多く検出されたが、CAを中心とした多様な型が検出された（図1-B）。

(3) 発疹症

発疹症は定点把握疾患としての患者報告がなされていないため、EV検出状況のみ以下に記載する。

EVは発疹症患者106名中31名から検出された。型の内訳は、CA6が4名、Coxsackievirus A9型（CA9）が1名、Echo9が13名、Echovirus 18型（Echo18）が8名、Poliovirus 1型（Polio1）が1名、EV NTが4名であった（表2）。2011年と2012年の6、7月はEcho9が、2012年の10月はEcho18が多く検出された。（図1-C）。

(4) 無菌性髄膜炎

無菌性髄膜炎は、近年では流行は見られず、本県においても同様に低い水準で推移している。2011年、2012年も例年と同じように大きな流行は見られなかった。

EVは無菌性髄膜炎、脳炎・脳症患者76名中32名から検出された。型の内訳は、CB1が9名、Coxsackievirus B4型（CB4）が1名、Coxsackievirus B5型（CB5）が12名、Echovirus 6型（Echo6）が3名、Echo7が4名、Echo18が1名、EV NTが2名であった。（表2、図1-D）。

表2 診断名別EV検出状況

診断名 (検査 患者数)	手足口病 (168)	ヘルパン ギーナ (101)	発疹症 (106)	無菌性髄膜炎 脳炎・脳症 (76)
EV71	25	1		
CA2		4		
CA4		8		
CA5		4		
CA6	39	10	4	
CA9			1	
CA10	1	4		
CA14	1			
CA16	59	3		
CB1		2		9
CB3		1		
CB4				1
CB5				12
Echo6				3
Echo7	2	2		4
Echo9		1	13	
Echo18			8	1
Polio1			1	
Polio2		1		
EV NT	7	9	4	2
計	134	50	31	32

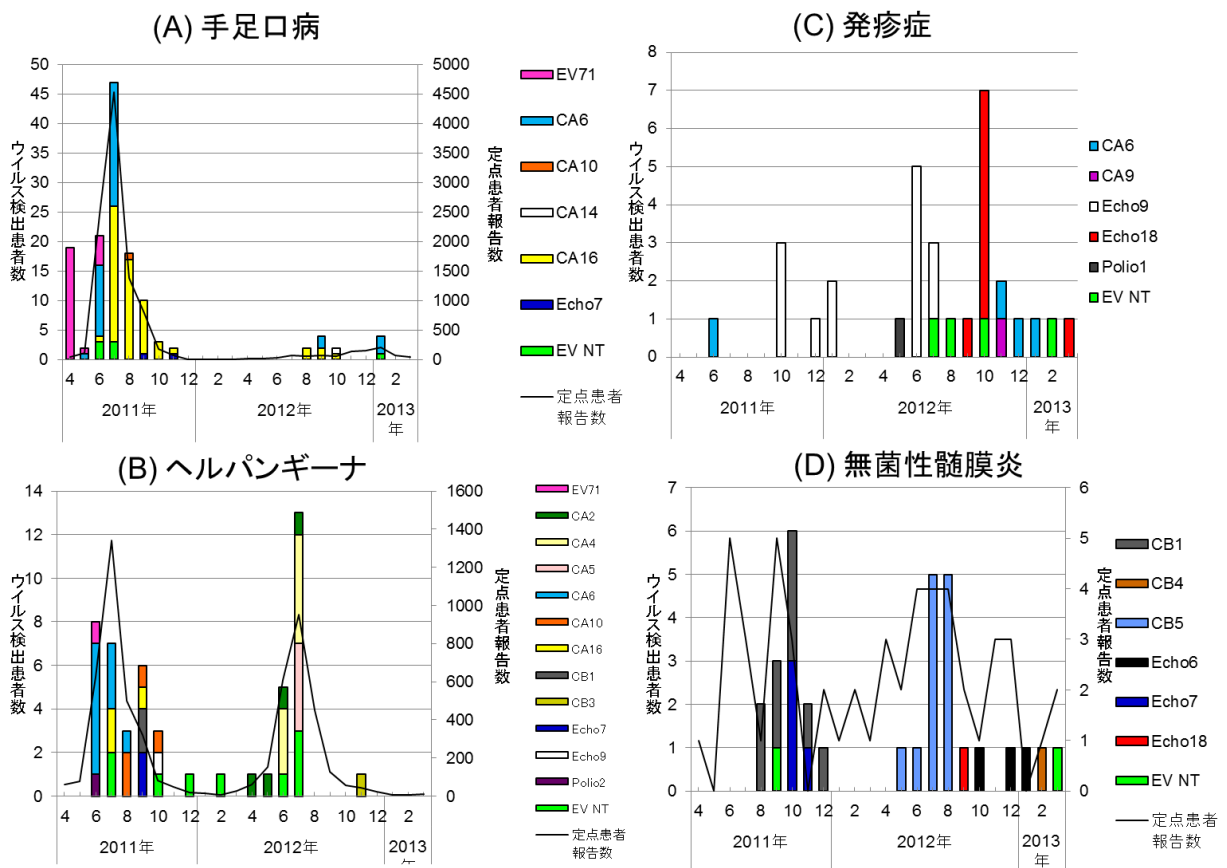


図1 診断名別ウイルス検出状況および定点患者報告数

2. 細胞培養によるEV分離

2年間で数多くのEVが分離され、RD-AとVeroE6はCA, CB, Echo, Polio, RD-18SはCAとEcho, MRC-5はCAとEchoとPolio, A549はCBとEchoに感受性を示した。特に、RD-AはCA2やCA6にも感受性を示した(表3)。

3. 無菌性髄膜炎由来EVの系統樹解析

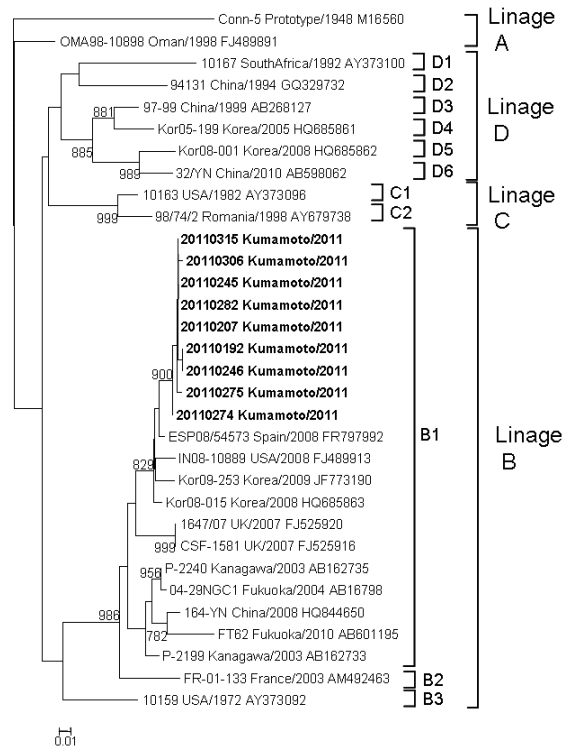
無菌性髄膜炎、脳炎・脳症の患者から主に検出されたCB1とCB5の検出株について、VP1領域の系統樹解析を行った(図2)。CB1はA~Dに、CB5はA~Eのグループに分かれることが知られている^{5,6)}。今回得られたCB1株の相同性は99%以上と高く、いずれもLinage Bの中のsublinage B1に属していた。また、スペインで2008年に検出された株と最も高い相同性を示した。CB5については、今回得られた株の相同性は95%以上と高く、全てLinage Eに分類された。得られたCB5株は、さらに2つのサブグループ(Kumamoto2012-1, -2)に分けられた。CB5が検出された患者の中には髄膜炎症状だけでなく、脳炎症状を呈する患者もいた。

表3 細胞別EV分離株数*

EV 型名	RD-A	RD-18S	VeroE6	MRC-5	HEp-2	A549
EV71		5				
CA2	3					
CA6	6					
CA9					1	
CA10		4				
CA14	1		1	1		
CA16	5	2	7	3		
CB1			4		1	4
CB3	1		1			
CB4	1		1			
CB5	3		3		10	
Echo6	3			1		
Echo7		7	3			2
Echo9	3	2	9	5		3
Echo18	1			5		
Polio1	1		1	1	1	

* RD-Aは2012年, RD-18Sは2011年, HEp-2は2012年, A549は2011年のみ使用。

(A) CB1



(B) CB5

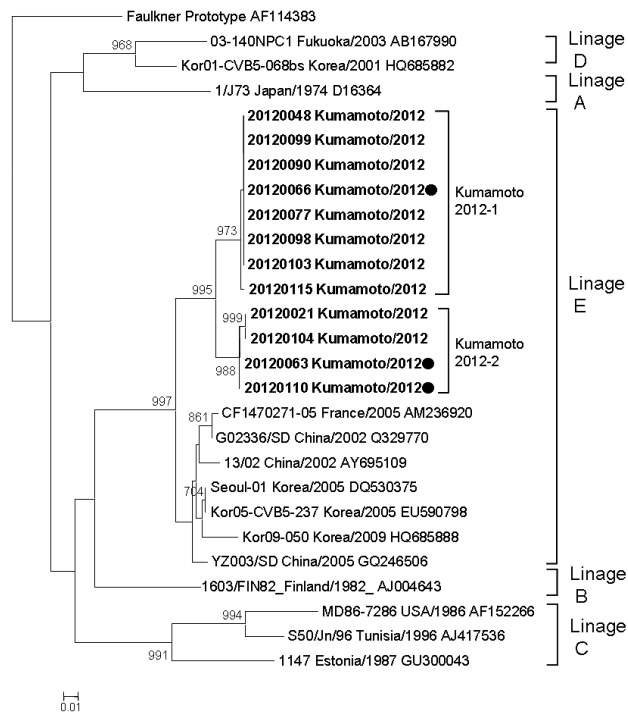


図2 無菌性髄膜炎由来 EV の VP1 領域分子系統樹

(今回の検出株を太字で示し、脳炎患者由来の検出株を●で示した。ブートストラップ値は、70%以上のみを示した。)

考察とまとめ

2011 は全国的に手足口病の大流行が起こったことから、本県でも多数の EV が分離・検出された。EV71 による流行の後に、CA6 と CA16 の流行が続いて起こり、これは全国の手足口病由来 EV の血清型とも同様の流れであった。2012 年は手足口病の大きな流行は見られなかったが、2011 年に起こった大流行の際に、抗体を獲得した小児が数多くいたためと考えられた。

手足口病患者からは、主に CA もしくは EV71 が分離・検出されることが多いが、2011 年の CA6 流行時には RD-A ではなく RD-18S を使用しており、CA6 が分離できていない。分離率の向上を目的に 2012 年は RD-A を使用したことで、CA6 の分離ができたことから、RD-A は CA6 の分離に非常に有用であると考えられた。

ヘルパンギーナ及び発疹症は大きな流行ではなかったが、CA を中心とした多種類の EV が検出され、発疹症では Echo9, 18 型を中心とした流行が確認された。

無菌性髄膜炎は、2002 年に Echovirus 13 型による流行⁷⁾が起きて以来、近年は落ち着いた動向を見せている。EV の検出状況を見ると、2011 年は CB1 が、2012 年は CB5 が主な流行の型であったことが明らかとなった。CB1, CB5 ともに検出株の相同性は高く、調査期間内の本県では遺伝的に近い株が流行していたと考えられた。検出された CB5 はサブグループ間の相同性は高いものの、2つの系統の CB5 が同時に流行していたことが推定された。また、EV による脳炎は比較的少ないが、今回検出された CB5 の中には脳炎症状を呈した患者もおり、EV による脳炎の発生にも注意が必

要と考えられた。

EV は血清型が数多く存在し、年や時期によって流行の型が入れ替わり、規模も大きく変化する。今後とも EV サーベイランスを継続し、データを蓄積するとともに、流行を早期に探知することが重要であると思われる。

謝 辞

感染症発生動向調査に御協力いただいた病原体定点医療機関、関係機関の皆様方に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症情報センター：病原微生物検出情報, **33**, 55-56 (2012).
- 2) 国立感染症情報センター：病原微生物検出情報, **30**, 9-10 (2009).
- 3) H. Ishiko, Y. Shimada, M. Yonaha, O. Hashimoto, A. Hayashi, K. Sakae, N. Takeda: *J. Infect. Dis.* **185**, 744-754 (2002).
- 4) W.A. Nix, M.S. Oberste, M.A. Pallansch: *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2698-2704 (2006).
- 5) T. Zhang, J. Du, Y. Xue, H. Su, F. Yang, Q. Jin.: *PLoS One.* **8**, e67157 (2013).
- 6) K. Baek, S. Yeo, B. Lee, K. Park, J. Song, J. Yu, I. Rheem, J. Kim, S. Hwang, Y. Choi, D. Cheon, J. Park: *Virology*, **8**, 297 (2011).
- 7) 国立感染症情報センター：病原微生物検出情報, **30**, 1-3 (2009).

4) 超臨界流体抽出を用いる玄米及び土壌中イソチアニル分析法の開発

吉田 達雄 山本 理世 飛野 敏明 村川 弘

要 旨

超臨界流体抽出を用いることにより、公定法が示されていない新規登録農薬イソチアニルを簡易迅速に分析する方法を開発した。農薬を強く吸着する土壌分析については、モディファイアとして、メタノールを用いることにより、十分な抽出効果が得られた。添加回収試験を行った結果、0.01 mg kg⁻¹添加濃度において玄米:97.0%, 土壌:95.2%, 0.05 mg kg⁻¹添加濃度において玄米:99.3%, 土壌:95.1%となり良好な値が得られた。本分析法は、農薬の簡易迅速分析法として、農作物の安全安心確保に寄与するものと期待される。

キーワード：イソチアニル，超臨界流体抽出，GC/MS，玄米，土壌

はじめに

イソチアニル (3,4-dichloro-2'-cyano-1,2-thiazole-5-carboxanilide) は、2010年に新規に国内登録され、水稻に対して使用登録された農薬である。農薬の種類については、病原菌への直接的な抗菌作用を示さず、宿主植物に全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance, SAR) を与えることで病害の発生を防除する「植物病害抵抗性誘導剤」に分類され、水稻の主要病害であるいもち病、白葉枯病及び広範囲の主要害虫に効果を示す。また、低薬量処理で長期間防除効果を持続し、非標的生物に対する影響も少ないことから、環境負荷の少ない薬剤として期待されている農薬である。現在、日本以外においては韓国に使用登録があり、今後、稲作の盛んな国、地域へ使用登録が拡大していくものと考えられる。

農薬を適正に使用するためには、農薬を散布対象とする農作物や土壌への農薬残留量を測定する必要がある。そのため分析法が求められる。しかし、イソチアニルについては、まだ国内で登録されてから期間が短いため、現在、厚生労働省通知試験法が示されていない。また、分析法に関する報告もほとんど見あたらないため、農作物及び土壌中のイソチアニル残留量を分析する目安となる方法がない。近年、様々な農薬を

迅速に分析する方法の一つとして、超臨界流体抽出法 (Supercritical Fluid Extraction, 以下 SFE という。) が注目されている。SFE は、高い浸透性と有機溶媒に近い溶解性を有する超臨界状態の流体を使用して、抽出を行う方法で、作物中の農薬分析^{1,2)}や土壌中のダイオキシン類分析³⁾に適用した研究報告がある。また筆者らの研究室においても、SFE を用いた作物中の農薬⁴⁾及び土壌中の残留性有機塩素系農薬⁵⁾分析法の開発を行ってきた。この分析法では、多様な種類の農作物や農薬吸着の強い土壌中の農薬を良好に抽出することができる。

農作物中の残留農薬を分析することは、残留農薬の過剰摂取による健康被害を未然に防ぐことを可能とし、食の安全安心に大きく寄与する。さらに、土壌中の残留農薬を分析することは、農薬の土壌中環境動態を把握することを可能とし、環境動態研究分野への寄与も考えられる。そこで、今回、分析法が確立していないイソチアニルについて、SFE を用いて、玄米及び土壌中のイソチアニル残留量を分析する方法の開発を行った。

実験方法

1 試料の調製

イソチアニル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) はアセトンを用いて溶解し、標準原液 1000 mg l^{-1} を調製した。これらを適宜、アセトンで希釈して標準溶液とした。

玄米及び土壌試料については、イソチアニルが過去に使用されていないことを確認した試料を用いた。玄米試料は、フードミルで粉碎後、 $425 \mu\text{m}$ の標準ふるいに通した。土壌試料の Texture は Loam, Carbon は 7.4%, Soil pH は 6.2 のものを用いた。土壌試料は、金属製のヘラで砕き、時々攪拌しながら 5 日間静置して風乾した。これをふるいにかけて 2 mm 以下に調製した。これらに低濃度として 0.01 mg kg^{-1} 、高濃度として 0.05 mg kg^{-1} となるようにイソチアニル標準品溶液をそれぞれ添加し、試験用試料とした。

2 SFE

SFE 装置は SFX1220 (Teledyne ISCO, Lincoln, NE) を用い、 10 mL 容抽出容器を使用した。抽出溶媒は二酸化炭素とし、オーブン温度は 40°C 、圧力は 2000 psi に設定した。また、リストラクター温度は 60°C 、スタティック及びダイナミック抽出時間はそれぞれ 15 min 、ダイナミック流量は 2 mL min^{-1} とした。分析操作

について Fig. 1 に示した。試料 2 g に、あらかじめフードカッターを用いて細粉した吸湿剤 (CHEM TUBE-HYDROMATRIX, Agilent, Santa Clara, CA) 2.7 g を加え混和した後、抽出容器に充填した。さらに、土壌については、試料容器にモディファイアとしてメタノールを 0.5 mL 加え、上記の条件で超臨界流体抽出を行った。抽出物をアセトン 20 mL で捕集した後、エバポレーターで濃縮し、窒素気流下で乾固した。これを玄米については、アセトニトリル飽和ヘキサン 5 mL に溶解して抽出液とし、さらに 3 に示した精製操作を行った。一方、土壌については、乾固したものをアセトン 1 mL に溶解し、これを測定用試験溶液とした。

3 玄米試料精製操作

2 で得られた玄米抽出液にヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加え、 2 min 振とうした。アセトニトリル層を採取し、ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加え、振とうした後、アセトニトリル層を採取した。この操作を再度繰り返し、アセトニトリル層 30 mL を併せて、エバポレーターで減圧濃縮後、窒素気流下で乾固した。これにアセトン/ヘキサン (3:1) 混液 2 mL を加えて溶解し、抽出液とした。得られた抽出液をアセトン/ヘキサン (3:1) 混液 15 mL でコンディショニングを行った SAX/PSA ミニカラム

[Brown rice]

Homogenized sample 2 g

- mix with pulverized moisture absorbent 2.7 g
- set in SFE cartridge

SFE

- 2000 psi , 40°C , static time 15 min , dynamic time 15 min
- trap acetone 20 mL
- concentrate
- dry up with N_2 stream

Residue

- *n*-hexane (saturated with acetonitrile) 5 mL
 - acetonitrile (saturated with *n*-hexane) 10 mL
 - shake 2 min
- } $\times 3$

Acetonitrile layer

- concentrate
- dry up with N_2 stream

Residue

- acetone-hexane (3:1,v/v) 2 mL

Minicolumn (SAX/PSA) cleanup

- prewash with acetone-hexane (3:1,v/v) 15 mL
- elute with acetone-hexane (3:1,v/v) 18 mL

Elute

- concentration
- dry up with N_2 stream
- acetone 1 mL

GC-MS

[Soil]

Sieved sample 2 g

- mix with pulverized moisture absorbent 2.7 g
- set in SFE cartridge
- methanol 0.5 mL

SFE

- 2000 psi , 40°C , static time 15 min , dynamic time 15 min
- trap acetone 20 mL
- concentrate
- dry up with N_2 stream

Residue

- acetone 1 mL

GC-MS

Fig. 1 Treatments of brown rice and soil samples for GC/MS analysis.

(500 mg / 500 mg / 20 ml, InertSep SAX/PSA, GL Sciences, Tokyo, Japan) に負荷した。このカラムに同混液を 18 ml 加えて溶出し、エバポレーターで減圧濃縮後、窒素気流下で乾固した。これにアセトン 1 ml を正確に加えて溶解し、測定用試験溶液とした。なお、検量線は、それぞれ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。

4 GC/MS 測定

試験溶液はガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS, Agilent7890/5975C, Agilent) を用いて定量した。カラムは Agilent 社製 HP-5MS (長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm) を用いた。注入口温度は 250°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°C で 2 min 保持し、毎分 30°C で 180°C まで昇温した後、10 min 保持した。さらに毎分 2°C で 200°C まで昇温し、それから毎分 3°C で 280°C まで昇温を行い 10 min 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°C, MS 四重極温度は 150°C とした。定量は選択イオンモード (selected ion monitoring, SIM) を用いた。定量 m/z は 297, 定性 m/z は 180 とした。

結果及び考察

1 測定条件

玄米及び土壌中イソチアニルの検量線については、マトリックス一致標準溶液を用いることにより 2~600 $\mu\text{g l}^{-1}$ (試料中濃度 1~300 $\mu\text{g kg}^{-1}$) の範囲で良好な直線性 ($R^2 > 0.999$) が得られた。

Brown Rice : Peak abundance

$$= 959 \text{ isotianil } (\mu\text{g L}^{-1}) - 4571, R^2 = 0.999 \quad (1)$$

Soil : Peak abundance

$$= 1126 \text{ isotianil } (\mu\text{g L}^{-1}) - 5885, R^2 = 0.999 \quad (2)$$

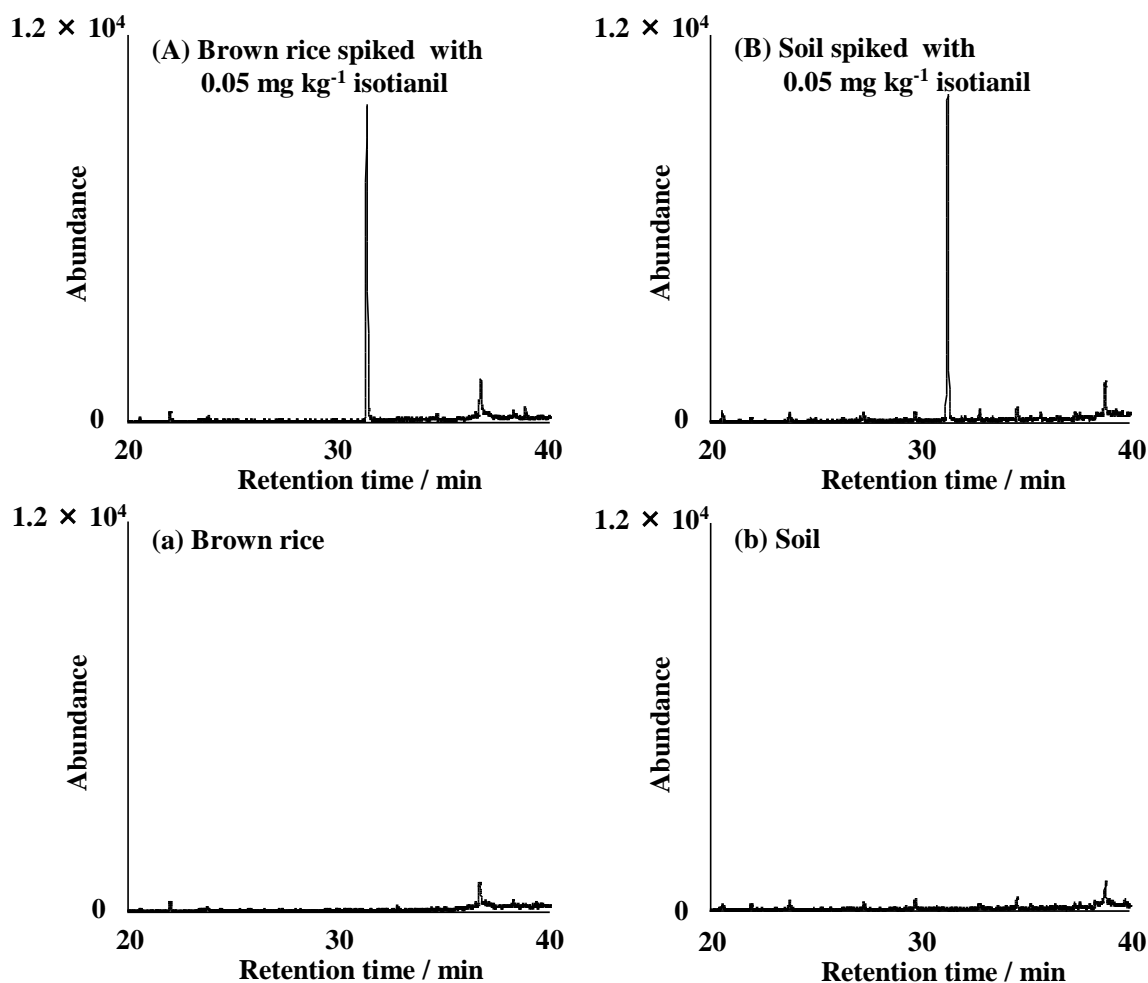


Fig. 2 Chromatograms (SIM, m/z 297) obtained for extracts from brown rice with (A) and without (a) spiking of 0.05 mg kg^{-1} of isotianil, and from soil with (B) and without (b) 0.05 mg kg^{-1} of isotianil.

本条件の測定により得られたクロマトグラム例を Fig. 2 に示した。玄米においても、多量に含有される脂質の除去が十分に行われ、良好なクロマトグラムが得られた。Signal to noise ratio (S/N)から求めた検出限界 (LOD, $S/N=3$) は、玄米で $0.39 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、土壌では $0.91 \mu\text{g kg}^{-1}$ となり、定量限界 (LOQ, $S/N=10$) は、玄米で $1.30 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、土壌では $3.03 \mu\text{g kg}^{-1}$ となった。この定量限界では、食品衛生法残留農薬基準におけるイソチアニルの玄米に対する残留基準 ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$) の 100 分の 1 程度の濃度が測定可能である。よって、この定量限界は玄米及び土壌中イソチアニルの測定に十分な濃度であると考えられる。

2 抽出圧力検討

超臨界流体 (Supercritical Fluid) は、気体や液体を加熱加圧し、気液の界面を消滅させることにより作成される。この流体を用いて、試料中の目的物を抽出する方法が SFE である。SFE では、一定温度で圧力を高くすると流体の密度が増加し、溶解度が大きくなる。そのため、抽出圧力の変化は、抽出効率へ影響を及ぼすが、抽出圧力の過剰な増加は、SFE 抽出効率を低下させる報告⁶⁾もある。そこで、最初に玄米及び土壌中のイソチアニルに対して、最も良好な抽出効率が得られる抽出圧力について、検討を行った。超臨界二酸化炭素の臨界圧力は 1070 psi である。そこで、超臨界状態を形成させるため、設定する抽出圧力は 1070 psi 以上とし、検討圧力は、1500、2000、2500 及び 3000 psi とした。

それぞれの抽出圧力において抽出を行った標準品添加回収結果を Fig. 3 (玄米試料、土壌試料) に示した。玄米及び土壌試料のどちらについても、回収結果は同様の傾向を示した。1500 psi での抽出では、回収率が低く、2000 psi に圧力を上げると回収結果が最も大きくなり、さらに 2500 psi、3000 psi へと抽出圧力を上げていくにつれて、なだらかな回収率減少が見られた。抽出圧力の増加は、抽出効率を増加させるが、過剰の増加は超臨界流体の拡散係数 (diffusion coefficient) の低下を引き起こし、抽出効率が低下する⁶⁾。今回、イソチアニルに対する超臨界流体抽出については、2000 psi の抽出条件下において、最も良好な抽出効率が得られることが示された。玄米試料においては、2000 psi の抽出圧力において、回収率が 98.0% と良好な値が得られたため、この圧力を玄米試料分析の抽出圧力とした。一方、土壌試料においては、回収率が最も良好であった 2000 psi の抽出圧力においても、回収率は

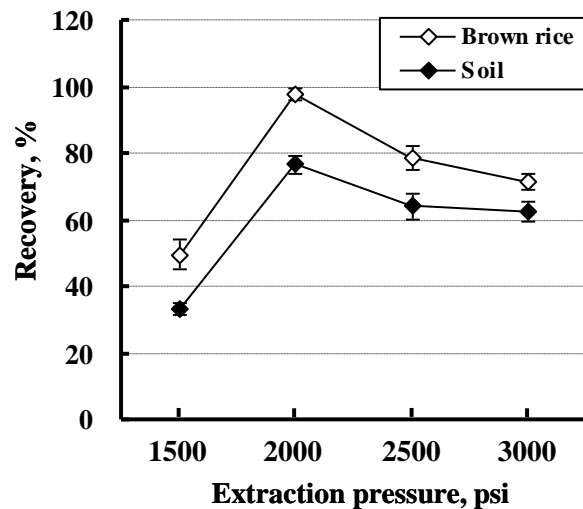


Fig. 3 Effect of SFE pressure for brown rice and soil samples spiked with isotianil.

76.7% であり、十分な回収率は得られなかった。これは、土壌中に含まれる有機炭素成分にイソチアニルが強く吸着しているため、玄米試料と異なり、二酸化炭素のみの超臨界流体抽出では、十分な抽出効果が得られなかったためと考えられる。そこで、超臨界流体の抽出効率を上げることを目的として、モディファイア添加の検討を行った。

3 土壌抽出におけるモディファイアの検討

土壌分析においては、農薬成分に対して十分に抽出効率が得られない場合があることが報告されおり⁵⁾、これは、土壌中に含まれる有機炭素成分に農薬成分が強く吸着するためと考えられている。SFE において、抽出効率を上げる方法として、有機溶媒をモディファイアとして試料に添加する方法がある⁷⁻⁹⁾。無極性である二酸化炭素に極性を有するモディファイアを添加することにより、超臨界流体状態の二酸化炭素が、極性を有することになり、抽出効率が上がることが知られている。今回、土壌試料抽出では、回収率が最も良好であった抽出圧力 2000 psi においても、十分な回収率が得られなかったため、抽出効率を上げることを目的として、モディファイア添加の検討を行った。検討を行ったモディファイアの種類としては、超臨界流体の極性を変化させ、SFE の抽出効率を上げる極性溶媒として酢酸エチル、アセトン及びメタノールを選択した。モディファイアの添加方法については直接試料へ添加する方法とし、土壌試料を抽出容器へ充填した後、モディファイアを抽出容器中へ直接添加した。モディ

Table 1 Effect of modifiers on extractions from the isotianil spiked soil

	Log Pow ^a	isotianil concentration/ mg kg ⁻¹	Recovery Average and RSD/% (n = 3)	
Without	—	0.05	76.7	3.5
Ethyl acetate	0.73	0.05	66.7	5.1
Acetone	-0.24	0.05	89.1	6.0
Methanol	-0.82	0.05	98.1	3.9

a. Octanol – water partition coefficient

Table 2 Recoveries of isotianil from brown rice and soil

Compound	Sample	Concentration/ mg kg ⁻¹	Recovery		LOD / $\mu\text{g kg}^{-1}$ (S/N=3)	LOQ / $\mu\text{g kg}^{-1}$ (S/N=10)
			Average and RSD/ % (n = 6)			
isotianil	Brown rice	0.01	97.0	2.8	0.39	1.30
		0.05	99.3	2.8		
	Soil	0.01	95.2	1.8	0.91	3.03
		0.05	95.1	2.6		

ファイア効果は、有機溶媒含有が 5%の時に良好になるという報告⁷⁾があるため、有機溶媒の添加量については、容器 (10 ml 容量) に対して 0.5 ml とした。モディファイアの種類による回収率の変化について、Table 1 に示した。モディファイアとして添加した溶媒の極性に比例して、土壌中のイソチアニル抽出効率の上昇が見られた (酢酸エチル: logPow 0.73, アセトン: logPow -0.24, メタノール: logPow -0.82)。Koineck らは、土壌中農薬成分 5 種に対して、異なる有機溶媒のモディファイア効果を比較した結果、メタノールが最も良好な抽出効率を示したことを報告⁷⁾しており、今回、イソチアニルについても同様の結果が得られた。無添加と比較して、酢酸エチルは添加による抽出効率上昇効果がなく、アセトンは 10% 程度、メタノールは 20% 程度の上昇効果が見られた。その結果、メタノールの添加は、抽出効率が 98.1% となり 100% に近い値となった。そこで、土壌中イソチアニル分析においては、最も良好な抽出効率を示したメタノールをモディファイアとして用いることとした。

4 玄米及び土壌添加回収試験結果

MS 分析においては、測定試料中に多量のマトリックスを含むと、イオン化の過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^{10~12)}。SFE による GC/MS 測定においても、玄米及び土壌試料について、約 10% のイオンエンハンスメントが見られた。そこで、試料の定量については、玄米、土壌そ

れぞれの無添加試料から調製したマトリックスマッチ標準溶液を用いて行った。玄米及び土壌について行った標準品添加回収試験結果を Table 2 に示した。添加濃度は低濃度として 0.01 mg kg⁻¹ 及び高濃度として 0.05 mg kg⁻¹ の 2 濃度により、試行回数 6 回で実施した。0.01 mg kg⁻¹ 添加における回収率は玄米: 97.0% (相対標準偏差 2.8%)、土壌: 95.2% (相対標準偏差 1.8%) となった。0.05 mg kg⁻¹ 添加における回収率は玄米: 99.3% (相対標準偏差 2.8%)、土壌: 95.1% (相対標準偏差 2.6%) となった。低濃度 (0.01 mg kg⁻¹) から高濃度 (0.05 mg kg⁻¹) まで添加濃度の違いによる回収率の変動はなく、すべての試料について良好な回収率が得られた。6 日間の Inter-day RSD は、玄米で 5.4%、土壌で 5.6% となり、玄米及び土壌の分析において、日間変動は小さいものであった。

5 土壌中の水分含有量が SFE 抽出効率に与える影響

また、土壌中の農薬などの有機化合物分析では、土壌中の水分の影響により、SFE 抽出効率に変化し、土壌中からの回収率が変化してしまう事例が報告されている¹³⁾。土壌中の水がモディファイアとして働くと同時に、超臨界流体の抽出効果を不活化化する働きも示すため¹³⁾、過剰な水分含有は抽出効率の低下を引き起こす。そこで、今回開発した分析法についても、対象とする土壌の水分含有量が異なる時に、十分な抽出効率を得られるかを調べた。風乾土壌に蒸留水を添加し、水分含有量の異なる土壌を作成した。この土壌に対して添加回収試験を行い、回収率を求めた結果を Fig. 4

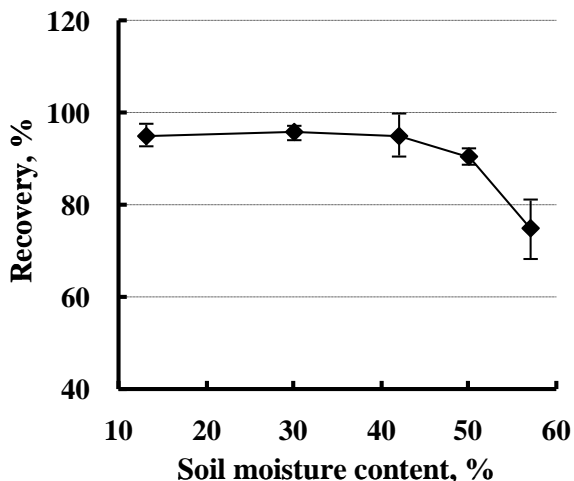


Fig. 4 Effect of soil moisture on SFE for isotianil-spiked soil

に示した。水分含有量 13%の土壌は、風乾した状態の土壌である。水分含有量 13~50%の状態では、土壌中に残留したイソチアニルに対して、回収率が 90%以上となり、十分な抽出効率が得られている。一方、50%を越えた水分含有量においては、抽出効率の低下が見られたが、この土壌の飽和水分含有量は 50%程度であり、自然環境中に存在する土壌では、50%を越えることはないと考えられる。本分析法では、試料を超臨界流体抽出容器中に充填する際に吸湿剤を合わせて充填するので、抽出容器中の水分割合が低下し、試料中に含まれる水分が抽出効率に与える影響を低下させていると考えられる。以上のことから、本分析法は、土壌が自然環境中で水分を含有するどのような状態においても、適用可能であると考えられる。

まとめ

新規に国内登録された農薬イソチアニルについて、SFE を用いた土壌及び玄米中当該農薬の分析法を確立した。玄米については、二酸化炭素のみの SFE により十分な抽出が得られたが、土壌分析では十分な抽出効率が得られなかった。そこで、モディファイア添加の検討を行った結果、試料 2 g に対して直接メタノール 0.5 ml を添加することにより、十分な抽出効果が得られた。確立した分析法により添加回収試験を行った結果、良好な値が得られた。さらに、この分析法は土壌中の水分含有量には影響されず、風乾状態から水飽和状態の範囲の土壌においても十分な回収率が得られた。今回、検討に用いた土壌は、有機炭素含有量が 7.4%と高く、農薬成分を強く吸着する土壌である。この土

壤において、SFE により良好な抽出結果が得られたことから、他の土壌種においても、本分析法は十分に適用可能であると考えられる。また、SFE は抽出時間が 30 min であり迅速分析が可能であり、また、抽出に二酸化炭素を用いるため、有機溶媒の使用が少なく、環境への負荷も少ない。さらに、有機溶媒を用いた振とう抽出やソックスレー抽出などと比較して、操作も簡便である。今後、イソチアニル同様、公定法が通知される前に、農業現場で使用される農薬や、土壌吸着の大きな農薬が新規開発されることが想定される。今回、開発した分析法は、これら新規農薬に対しても、抽出条件を最適化することにより簡易迅速分析法として適用される可能性を有しており、農作物の安全安心確保や新規農薬開発に対して大きく寄与するものと期待される。

文献

- 1) M. Saka, K. Iijima, Y. Odanaka, Y. Kato : *J.Pestic.Sci.*, **23**, 414-418(1998).
- 2) 根本了 : 農薬学会誌, **32**, 328-333(2007).
- 3) 宮脇崇, 川嶋文人, 本田克久 : 分析化学, **52**, 989-995(2003).
- 4) 村川弘, 吉田達雄, 吉元秀和, 飛野敏明 : 熊本県保健環境科学研究所報, **37**, 29-35(2007).
- 5) 吉田達雄, 村川弘, 福島孝平, 吉元秀和, 飛野敏明 : 分析化学, **58**, 931-935(2009).
- 6) V. Librando, O. Hutzinger, G. Tringali, M. Aresta : *Chemosphere*, **54**, 1189-1197(2004).
- 7) A. Koinecke, R. Kreuzig, M. Bahadir : *J. Chromatog. A*, **786**, 155-161(1997).
- 8) M.L. Jeong, D.J. Chesney : *J. Supercrit. Fluids*, **16**, 33-42(1999).
- 9) J.R. Forero-Mendieta, H.I. Castro-Vargas, F. Parada-Alfonso, J.A. Guerrero-Dallors : *J. Supercrit. Fluids*, **68**, 64-70(2012).
- 10) 小林裕子 : 分析化学, **58**, 985-997(2009).
- 11) T. Yoshida, H. Hamada, H. Murakawa, H. Yoshimoto, T. Tobino, K. Toda : *Anal. Sci.*, **28**, 179-182(2012).
- 12) T. Yoshida, H. Murakawa, K. Toda : *J.Pestic.Sci.*, **38**, 27-32(2013).
- 13) L. Spack, C. Alvarez, J.M.F. Martins, J. Tarradellas : *J. Contam. Hydrol.*, **33**, 171-185(1998).

5) HILIC-MS/MS による飲料中グリホサート, グルホシネート及び代謝物

分析法の開発

吉田 達雄 村川 弘

要 旨

除草剤グリホサート及びグルホシネートは、国内流通量が多く、入手が容易なため、飲料への混入などによる事故や事件が多い農薬である。これらの事件・事故対策のため、原因物質を迅速に定性・定量する必要があるが、グリホサート、グルホシネート及びそれらの代謝物である AMPA, MPPA は非常に極性が高いため、分析法は煩雑な操作を必要とする。そこで、今回、高極性化合物を分析可能な HILIC-MS/MS を用いることにより、これらの成分を簡易迅速に分析する方法を開発した。

キーワード：グリホサート, グルホシネート, AMPA, MPPA, HILIC-MS/MS

はじめに

含リンアミノ酸系除草剤グリホサート及びグルホシネートは、非選択性除草剤として、世界中で広く使用されている。一年生雑草から多年生雑草に対して高い防除効果を示すことから、国内においても1980年代から急速に普及してきた。流通量が多く、入手が比較的容易なため、誤飲や服用による事故や事件が多発することとなった。これらの事件・事故発生時における被害拡大防止のためには、原因を迅速に把握する必要があり、原因物質を迅速に定性・定量することのできる方法が求められる。

グリホサート及びグルホシネートは植物体内や環境中において、それぞれ代謝物aminomethylphosphonic acid (AMPA)及び3-methylphosphinicopropionic acid(MPPA)を生成する。グリホサート及びグルホシネートは代謝物も含め、極めて高極性であるため、誘導体化法を用いずにGC/MSで検出することが困難であり、HPLCにおいても良好なピーク分離や検出感度が得られにくい。そのため、これらの分析手法は、誘導体化した後にGC^{1),2)}やLC^{3),4)}で測定する方法や、LCで分離した後に誘導体化するポストカラム法⁵⁻⁷⁾が報告されている。これらの分析法は煩雑な前処理を必要とし、分析操作に時間を要することから迅速に分析結果を導くことが困難である。

また、高極性化合物を分離する方法として、親水性相相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を用いる方法がある⁸⁻¹⁴⁾。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相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、分析できないものがあつたが、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グリホサート類を保持し、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、飲料中に含有するグリホサート、グルホシネート及びそれらの代謝物を簡易迅速に分析する方法の開発を目的として、HILIC を用い、さらに化合物の選択性が高いLC/MS/MSを併用する分析方法を検討した。試験方法は、飲料水を試料として標準品の添加回収試験により行った。更に、実際にグリホサート及びグルホシネートを成分とする農薬製剤を飲料中に含有させた試料を作成し、これらを HILIC-MS/MS を用いて、定量を行うことにより、実試料への適用性の確認を行った。

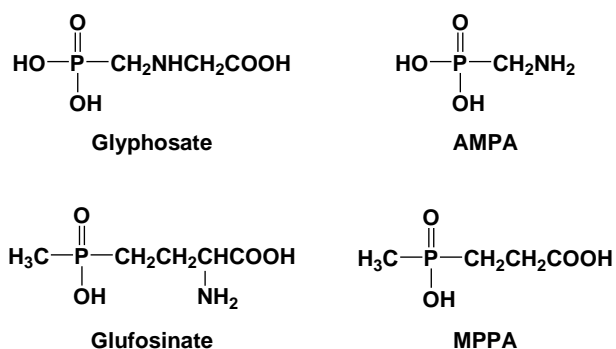


Fig. 1 Chemical structure of glyphosate, glufosinate, AMPA and MPPA

実験方法

1 標準液の調製

グリホサート (glyphosate, Sigma-Aldrich, St Louis, MO), グルホシネート (glufosinate ammonium, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), AMPA (aminomethylphosphonic acid, Wako Pure Chemical Industries) 及び MPPA (3-methylphosphinicopropionic acid, Sigma-Aldrich) は蒸留水を用いて溶解し、それぞれ標準原液 1000 mg l⁻¹ を調製した。さらに適宜、蒸留水により希釈して標準溶液とした。

2 試料の調製

飲料 5 種類 (お茶, 牛乳, オレンジジュース, コーヒー, ミネラルウォーター) に低濃度として 20 mg l⁻¹, 高濃度として 100 mg l⁻¹ となるようにグリホサート, グルホシネート, AMPA 及び MPPA 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, グリホサート及びグルホシネートを成分とする農薬製剤であるグリホサートカリウム塩液剤 (ラウンドアップマックスロード, glyphosate-potassium 48.0%, NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., Tokyo, Japan) 及びグルホシネート液剤 (バスタ液剤, glufosinate 18.5%, Bayer CropScience AG, Monheim, Germany) をお茶試料に添加し, 実際に農薬を混入させ, 農薬製剤 1% 含有する実試料 (グリホサートカリウム 0.48% 及びグルホシネート 0.185%) を作成した。これを実試料への分析法適用性試験用試料とした。

3 HILIC-MS/MS 測定用試験溶液調製

LC/MS/MS 測定用試験溶液の調製方法を Fig. 2 に示した。2 で調製した試料 1 ml を蒸留水により, 添加回

Sample 1 mL

- make up to 1,000 – 10,000 times of the volume with distilled water
- filtrate by 0.45 μ m filter
- put into polypropylene plastic vial

LC/MS/MS

Fig. 2 Treatments of drink samples for HILIC-MS/MS analysis.

収試験用試料は 1,000 倍, 実試料への適用性試験用試料は 10,000 倍希釈した。これを水系フィルター (GL クロマトディスク 25A, 0.45 μm, GL Sciences, Tokyo, Japan) を用いてろ過し, ポリプロピレン製バイアル (polypropylene plastic, screw-top vial, 300 μl, waters, MA) に充填したものを HILIC-MS/MS 測定用試験溶液とした。

4 HILIC-MS/MS 測定条件

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, スルホベタイン型の両性イオン型官能基を共有結合した Merck 社 (Darmstadt, Germany) 製 ZIC-pHILIC (長さ 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒子径 5 μm) を用いた。試料注入量は 10 μl, カラム温度は 40°C とし, 移動相は 0.2% ギ酸-アセトニトリル (80:20), 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) で行い, selected reaction monitoring (SRM) 測定により定量した。キャピラリー電圧は 3 / -2.5 kV, ソース温度は 120 °C, デゾルベーション温度は 350 °C, デゾルベーションガス (N₂) 流量は 1,000 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, 無添加飲料試料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。

Table 1 Chromatographic and MRM method parameters for glyphosate, glufosinate, AMPA and MPPA

Compound	$t_R^{a)}$, min	Ion type	Quantification transition	Cone, V	CE ^{b)} , eV	Confirmatory transition	Cone, V	CE ^{b)} , eV
glyphosate	2.5	[M-H] ⁻	167.86→149.74	25	10	167.86→62.07	25	25
glufosinate	4.1	[M+H] ⁺	181.87→135.73	25	10	181.87→55.69	25	25
AMPA	2.9	[M+H] ⁺	111.77→30.14	15	15	111.77→64.59	20	30
MPPA	2.7	[M+H] ⁺	152.96→78.83	15	20	152.96→134.29	15	10

^{a)}Retention time, ^{b)}collision energy

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¹⁵⁾。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、Table 1 に示す条件が最適となった。

飲料中グリホサート、グルホシネート、AMPA 及び MPPA の検量線については、マトリックス一致標準溶液を用いることにより 0.01~1 mg l⁻¹ (試料中濃度 10~1000 mg l⁻¹) の範囲で良好な直線性 ($R^2>0.999$) が得られた。本条件での測定により得られたクロマトグラム例を Fig. 3 に示した。カフェインを多量に含有するお茶及びコーヒー、脂質を多量に含有する牛乳、酸性試料であるオレンジジュースにおいても、良好なクロマトグラムが得られた。Signal to noise ratio (S/N) から求めた検出限界 (LOD, S/N=3) 及び定量限界 (LOQ, S/N=10) を Table 2 に示した。検出限界は、グリホサート: 0.24~0.42 mg l⁻¹, グルホシネート: 0.06~0.08 mg l⁻¹, AMPA: 0.62~0.94 mg l⁻¹, MPPA: 0.09~0.14 mg l⁻¹ となった。定量限界は、グリホサート: 0.81~1.39 mg l⁻¹, グルホシネート: 0.20~0.27 mg l⁻¹, AMPA: 2.06~3.14 mg l⁻¹, MPPA: 0.32~0.47 mg l⁻¹ となった。農薬として市場に流通しているグリホサート及びグルホシネート製剤は、製剤中に成分として数 10% が含有されている。これが事故等により、わずか数滴 (0.5 ml 程度) ほど飲料 (500 ml) に混入した場合、飲料中に含まれる農薬成分の濃度は、数 100 mg l⁻¹ 程度になる。また、

グリホサート及びグルホシネートの半数致死量 (LD₅₀) は、マウスに対して、それぞれ 11,300 及び 416 mg l⁻¹ とされている¹⁶⁾。本分析法では、さらにこれらの濃度の 100 分の 1 が十分に測定可能であるため、多量に農薬が混入した事件事故だけではなく、微量に混入された事件事件に対しても、原因究明を行うことが可能である。また、グリホサート及びグルホシネートのどちらの農薬成分についても、代謝物をも測定可能であるので、より正確な原因究明が行えるものと考えられる。

2 添加回収試験結果

MS 分析においては、測定試料中に多量のマトリックスを含むと、イオン化の過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^{13),14),17)}。HILIC-MS/MS においても、グルホシネートは約 10% のイオンエンハンスメント、グリホサート及び AMPA は約 5% のイオンサプレッションが見られた。そこで、試料の定量については、それぞれの無添加試料から調製したマトリックスマッチ標準溶液を用いて行った。標準品添加回収試験結果を Table 2 に示した。添加濃度は低濃度として 20 及び高濃度として 100 mg l⁻¹ の 2 濃度により、試行回数 6 回で実施した。20 mg l⁻¹ 添加における回収率はグリホサート: 96.9~106.7% (相対標準偏差 2.4~6.0%), グルホシネート: 95.1~103.7% (相対標準偏差 3.8~9.1%), AMPA: 92.6~105.6% (相対標準偏差 2.9~4.9%), MPPA: 97.3~102.6% (相対標準偏差 2.0~8.0%) となった。100 mg l⁻¹ 添加における回収率はグリホサート: 98.0~101.9% (相対標準偏差 1.5~3.8%), グルホシネート: 96.1~103.6% (相対標準偏差 1.8~8.9%), AMPA: 92.8~100.8% (相対標準偏差 2.0~5.0%), MPPA: 94.5~107.2% (相対標準偏差 1.3~3.1%) となった。すべての農薬成分において、低濃度 (20 mg l⁻¹) から高濃度 (100 mg l⁻¹) まで添加濃度の違いによる回収率の変動はなく、すべての試料について良好な回収率が得られた。お茶試料を用

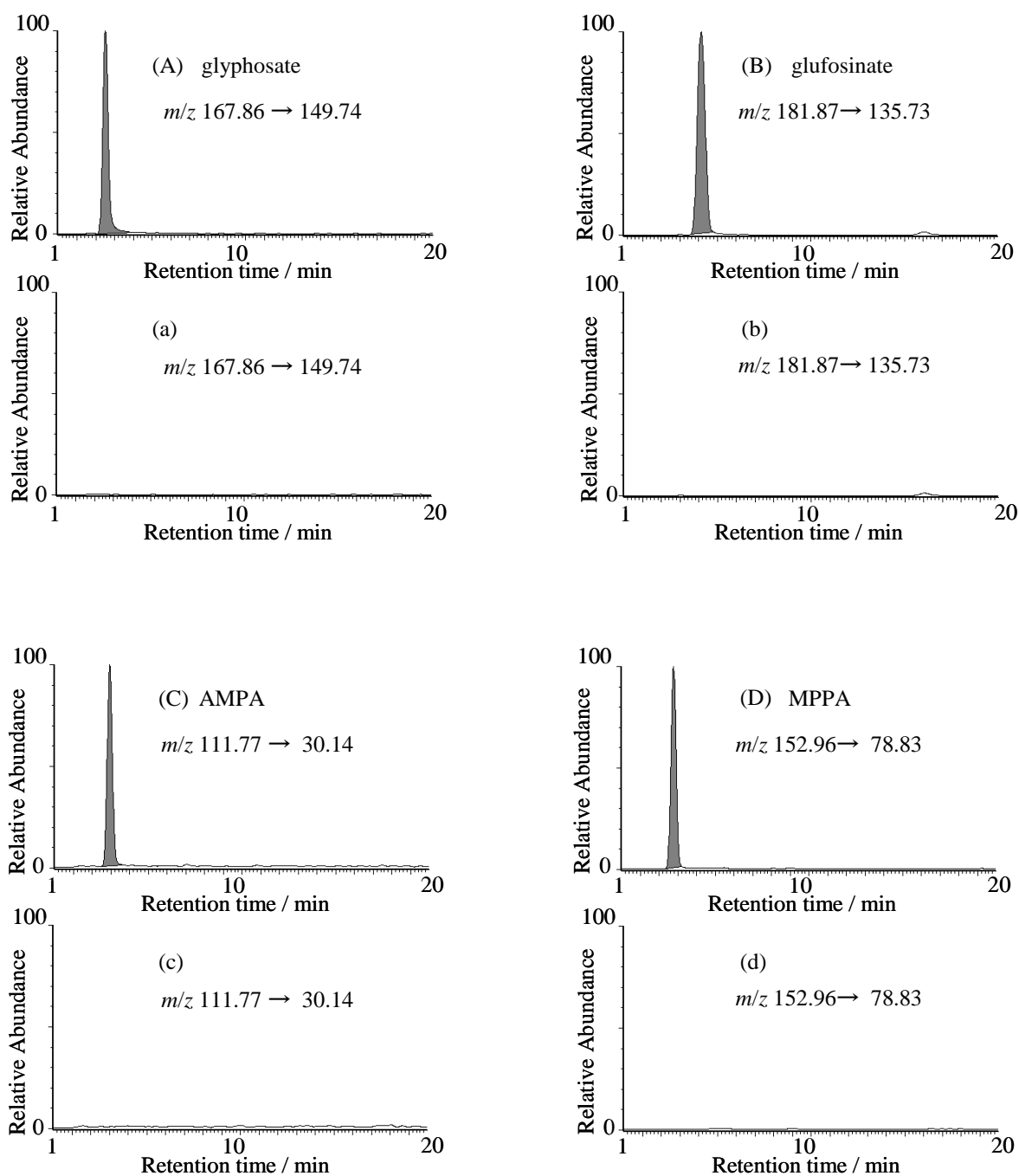


Fig. 3 Chromatograms obtained for extracts from green tea spiked with 100 mg L⁻¹ glyphosate(A), glufosinate(B), AMPA(C), and MPPA(D) and green tea extracts(a), (b), (c), and (d).

いて確認した 6 日間の日間変動(100 mg l⁻¹, n = 1)は、グリホサート: 3.5%, グルホシネート: 7.7%, AMPA: 5.0%, MPPA: 3.4%となり、日間変動は小さいものであった。

3 HILIC-MS/MS の実試料への適用性試験

グリホサート及びグルホシネートを成分とする農薬製剤をお茶試料へ混入させ、この混入試料を測定する

ことで、実際に農薬が飲料へ混入した事件・事故発生時における HILIC-MS/MS の実試料への適用性の確認を行った。この実試料への適用試験結果を Table 3 に示した。農薬製剤を 1%含有した実試料(グリホサートカリウム 0.48%及びグルホシネート 0.185%)に対して回収率は、グリホサート:101%, グルホシネート:96%となり、良好な結果が得られた。農薬製剤は、農薬標

Table 2 Performance of the analytical method for glyphosate, glufosinate, AMPA, and MPPA in drinks

Compound	Sample	Concentration/ mg L ⁻¹	Recovery		LOD / mg L ⁻¹ (S/N=3)	LOQ / mg L ⁻¹ (S/N=10)			
			Average and RSD/ % (n = 6)						
glyphosate	Green tea	20	102.3	3.9	0.42	1.39			
		100	101.9	2.9					
	Milk	20	99.0	6.0					
		100	98.0	3.8					
	Orange juice	20	106.7	5.9					
		100	99.4	2.1					
	Coffee	20	96.9	2.4					
		100	98.2	1.7					
	Mineral water	20	97.5	3.4					
		100	99.4	1.5					
	glufosinate	Green tea	20	103.7			4.3	0.06	0.20
			100	99.1			7.2		
Milk		20	95.1	8.1					
		100	96.1	6.1					
Orange juice		20	97.5	9.1					
		100	103.6	8.9					
Coffee		20	98.7	6.4					
		100	97.4	1.8					
Mineral water		20	101.0	3.8					
		100	99.8	2.6					
AMPA		Green tea	20	101.1	3.4	0.62	2.06		
			100	100.8	5.0				
	Milk	20	92.6	2.9					
		100	99.8	3.1					
	Orange juice	20	105.6	4.9					
		100	92.8	4.5					
	Coffee	20	94.4	4.4					
		100	96.5	2.8					
	Mineral water	20	97.7	3.4					
		100	98.3	2.0					
	MPPA	Green tea	20	102.6	3.1			0.13	0.44
			100	94.5	2.7				
Milk		20	101.9	8.0					
		100	107.2	3.1					
Orange juice		20	97.3	4.2					
		100	96.4	2.1					
Coffee		20	102.1	2.0					
		100	99.4	1.3					
Mineral water		20	101.1	3.5					
		100	96.2	1.5					

Table 3 Recoveries from tea samples which contaminated with an actual pesticide

Pesticide		Tea sample	Measurement		
Trade name	Active ingredient	Concentration ^a / mg L ⁻¹	Substance	Concentration / mg L ⁻¹ (n = 6)	Recovery / %
Roundup Maxload	glyphosate	3900	glyphosate	3940 ± 104	101
			AMPA	—	—
Basta	glufosinate	1850	glufosinate	1770 ± 95	96
			MPPA	—	—

^a The concentration of a sample which contains 1% an actual pesticide.

準品と異なり、農薬成分だけではなく、他に、界面活性剤や色素等を含有していることから、これらが分析結果へ影響を与えることが危惧される。しかし、今回、農薬製剤を含有した実試料への適用性試験についても、良好な結果が得られたことから、HILIC-MS/MSは、界面活性剤等の影響を大きく受けることが無く、実際に飲料へ農薬が混入した事件・事故発生時の原因究明に十分に適用可能であると考えられる。

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、飲料中のグリホサート、グルホシネート及び、それらの代謝物 AMPA、MPPA を迅速に分析する方法を開発した。添加回収試験を行った結果、すべての試料について良好な値が得られた。さらに、実際にグリホサート及びグルホシネートを有効成分とする農薬製剤を含有する実試料に対しても、良好な添加回収率が得られた。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、試料調製時間が、約 30 分と非常に短いため、より迅速に結果を得ることができる。そのため、農薬が混入した事件・事故の原因究明等に有用である。さらに、有機溶媒や試薬の使用量が少ないため、分析を行うことによる環境負荷に配慮できる利点もある。本法は、農薬混入等の事件・事故の健康危機管理時における飲料中のグリホサート、グルホシネート、AMPA 及び MPPA 残留量測定に対して非常に有効な手法であると考えられる。

文 献

1) H. Kataoka, K. Horii, M. Makita : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 195-198(1991).

- 2) H. Kataoka, S. Ryu, N. Sakiyama, M. Makita : *J. Chromatogr. A*, **726**, 253-258(1996).
- 3) 田中 健, 北田善三, 芋生眞子, 玉瀬喜久雄, 兎本文昭, 岡山明子, 佐々木美智子 : 奈良県衛生研究所報, **24**, 56-60(1989).
- 4) C. J. Miles, L. R. Wallace, H. A. Moyer : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 458-461(1986).
- 5) H. A. Moyer, C. J. Miles, S. J. Scherer : *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 69-72(1983).
- 6) T. E. Archer, J. D. Stokes : *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 586-588(1984).
- 7) M. J. Lovdahl, D. J. Pietrzyk : *J. Chromatogr.*, **602**, 197-204(1992).
- 8) A. J. Alpert : *J. Chromatogr.*, **499**, 177-196(1990).
- 9) 岩崎雄介, 井之上浩一, 伊藤里恵, 吉村吉博, 齊藤貢一, 中澤裕之 : 分析化学, **54**, 135-142(2005).
- 10) 池上亨, 田窪宏貴, 田中信男 : *Chromatography*, **29**, 1-6(2008).
- 11) C. Lamouroux, G. Foglia, G. Le Rouzo : *J. Chromatogr. A*, **1218**, 3022-3028(2011).
- 12) P. Jandera : *Anal. Chim. Acta*, **692**, 1-25(2011).
- 13) T. Yoshida, H. Hamada, H. Murakawa, H. Yoshimoto, T. Tobino, K. Toda : *Anal. Sci.*, **28**, 179-182(2012).
- 14) T. Yoshida, H. Murakawa, K. Toda : *J. Pestic. Sci.*, **38**, 27-32(2013).
- 15) MERCK KGaA : “A Practical Guide to HILIC”, p. 4(2008).
- 16) 金澤 純 : 農薬の環境特性と毒性データ集, 183-184, 1996, 合同出版, 東京
- 17) 小林裕子 : 分析化学, **58**, 985-997(2009).

6) 水産物中マラカイトグリーン³⁾の簡易迅速分析法の検討

濱田寛尚* 山本理世 村川 弘

要 旨

水産物中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンについて、抽出後の精製操作を省略したLC/MS/MSによる簡易迅速分析法を検討した。検討した分析条件による、活ウナギを用いた妥当性評価試験において、良好な結果が得られた。また、素焼きウナギ、ヤマメ、ニジマス、シマアジ、マダイ、クルマエビを用いた添加回収試験 (n=3) においても、良好な回収率が得られた。これにより、本分析法は、水産物中のマラカイトグリーン分析において非常に有効な簡易迅速分析法であることが明らかとなった。

キーワード：動物用医薬品、マラカイトグリーン、ロイコマラカイトグリーン、LC/MS/MS

はじめに

マラカイトグリーン (以下「MG」という。) は、食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示第 370 号) において、『食品において「不検出」とされる農薬等の成分である物質』とされている合成抗菌剤であり、当該告示で示されている試験法 (以下「告示法」という。) は、MG 及びその代謝物であるロイコマラカイトグリーン (以下「LMG」という。) を分析対象としている。また、通知^{1), 2)}において、ウナギを試験に供する場合にあっては、安定同位元素標識標準品 (以下「サロゲート」という。) を用いた内標準法又は標準添加法により回収率等の補正を行い、サロゲートの回収率 40% 以上を確認することとされている。

これまで、当所では告示法に準じた試験法又はアセトニトリル抽出-ヘキサン分配による方法により、水産物中マラカイトグリーン³⁾の検査を行ってきたが、サロゲートの回収率が 40% を下回る場合があるため、当該試験法の改善が必要となった。

前述の検査法では、脱脂操作にヘキサンを用いてい

るが、LMG は抽出過程でヘキサンに移行することが確認されている³⁾ため、千葉らの報告⁴⁾のように C18 ミニカラムによる脱脂を用いる事例のほか、小西らの報告⁵⁾では、告示法と同様の抽出を行い、冷凍処理により脂肪層を除去した後、少量固相の C18 及び SCX を用いる精製方法が用いられている。

今回、小西ら⁵⁾の抽出方法を参考に、ミニカラム及びサロゲートを使用せずに MG 及び LMG の分析が可能な簡易分析法を開発し、活うなぎ試料を用いた妥当性評価試験を行ったところ、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たす結果が得られた。また、うなぎ (素焼き) を含む 6 魚種を試料とし、当該分析法により添加回収試験 (n=3) を行ったところ、良好な回収率が得られたので報告する。

実験方法

1 試薬

1. 1 標準品

マラカイトグリーンしゅう酸塩 (林純薬工業(株))
ロイコマラカイトグリーン (林純薬工業(株))

1. 2 その他の試薬

* 現熊本県健康福祉部健康福祉政策課

メタノール（和光純薬工業(株) 残留農薬・PCB 試験用, HPLC 用), アセトニトリル（和光純薬工業(株) 残留農薬・PCB 試験用), くえん酸一水和物（和光純薬工業(株) 試薬特級), リン酸水素二ナトリウム（和光純薬工業(株) 試薬特級), アンモニア水（和光純薬工業(株) 医薬品試験用), 塩化ナトリウム（関東化学工業(株) 残留農薬試験用・PCB 試験用), 無水硫酸ナトリウム（和光純薬工業(株) 試薬特級), その他, HPLC 用, 特級を使用した。

1. 3 混合標準液

1.1の各標準品を秤量後, メタノールに溶解して標準原液を調製後, マラカイトグリーンしゅう酸塩及びピロイコマラカイトグリーンを混合し, 1 mg/lとなるようにアセトニトリルで調製し, MG・LMG 混合標準溶液とした。また, マラカイトグリーンしゅう酸塩-d₅及びピロイコマラカイトグリーン-d₆についても同様に調製し, 内部標準溶液とした。

1. 4 クエン酸・リン酸緩衝液 (pH3.0)

第1液: クエン酸 63.0 g を量り, 水を加えて溶かし, 1,000 mlとした。

第2液: リン酸二ナトリウム 215g を量り, 水を加えて溶かし, 1,000 mlとした。

第1液に第2液を加えて混和, pHを3.0に調整した。

2 試料

MG 及び LMG を含まないことを確認した活ウナギ, 素焼きウナギ, ヤマメ, ニジマス, シマアジ, マダイ及びクルマエビの可食部をフードプロセッサーで細切したものをマトリックス用試料とした。また, 当該試料 5.0 g に 2 ng/g となるように MG・LMG 混合標準溶液を添加し, 混和して 30 分間静置したものを添加回収試験用試料とした。

3 LC/MS/MS 測定条件

高速液体クロマトグラフ: Waters 社製 Waters2795

タンデム型質量分析装置: Waters 社製 Quattro Premier

分析カラム: Shiseido 社製 CAPCELL PAK C18 MG II (3.0 mm×100 mm, 3.0 μm)

LC/MS/MS の測定条件は表 1 及び表 2 に示した。

なお, 定量は, マトリックス一致検量線により行った。

結果及び考察

1 分析条件の検討

MG の分析法に関するこれまでの報告のうち, 小西らの方法⁵⁾は, 凍結処理による脱脂と少量固相カラムによる精製を併用し, その定量に絶対検量線を用いる方法

であり, サロゲートを使わずとも高回収率が得られる手法である。当所において, 活ウナギを試料とし, 当該方法による添加回収試験を行ったところ, 報告と同等の回収率が得られた(表 3)。

また, その際, ミニカラム精製前の抽出液を 5 倍希釈した後, マトリックス検量線を用いて定量を行ったところ, LMG の回収率が 120%を超えたものの良好な回収率が得られた(表 3)。

表 1 LC/MS/MS測定条件

LC 条件	
移動相	A=水 B=アセトニトリル C=500mM 酢酸アンモニウム
流量	0.20ml/min
カラム温度	40°C
注入量	10 μl
測定時間	40min
MS/MS 条件	
イオン化方法	ESI (+/-同時取込み)
キャピラリー電圧	3.0kV (-2.5kV)
ソース温度	120°C
デゾルベーション温度	350°C
コンガス流量	50l/hr
デゾルベーションガス流量	1,000l/hr
測定モード	MRM

表 2 LC グラジエント条件

時間 (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Flow (ml/min)
0	88	10	2	0.2
20	0	100	0	0.2
30	0	100	0	0.2
30.01	88	10	2	0.3
40	88	10	2	0.3

表 3 ミニカラム精製前後の定量値比較

	ミニカラム精製後 (絶対検量線)		ミニカラム精製前 (マトリックス検量線)	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
MG	98.7	3.9	100.8	3.5
LMG	82.8	7.3	128.2	6.4

これらの結果より, 小西らの方法を応用し, ミニカラムによる精製を省略することで, より簡便な MG 分析法が構築できると考え, 抽出条件等の検討を行った。

小西らの方法⁵⁾は, 試料 10g にクエン酸・リン酸緩衝液 (pH3.0) を 4 ml 及びアセトニトリルを 10 ml 添加した後にホモジナイズしている。そこで, ウナギ試料か

ら MG 及び LMG を効率よく抽出するため、試料の採取量を告示法と同じ 5.0 g とし、クエン酸・リン酸緩衝液 (pH3.0) 添加後及びアセトニトリル添加後にそれぞれホモジナイズし、抽出液の定容をアセトニトリルで行ったところ、活ウナギ試料での回収率は、MG 及び LMG ともに良好であった (表 4)。

上記の方法で、シマアジ及びマダイ試料を用いて添加回収試験を行ったところ、表 4 のとおりシマアジでは LMG が、マダイでは MG 及び LMG の両方の回収率が 70% を下回った。この理由として、抽出液の定容をアセトニトリルで行うことによる MG の還元及び LMG の分解等が考えられた。そこで、抽出液の定容溶媒をアセトニトリル：アンモニア水 (9:1) 混液で行ったところ、良好な回収率が得られたので、アセトニトリル：アンモニア水 (9:1) 混液にて定容を行うこととした。

これらの検討の結果、図 1 に示す分析法 (以下改良分析法いう。) を作成した。

なお、定量にはマトリックス一致検量線を用いることとした。

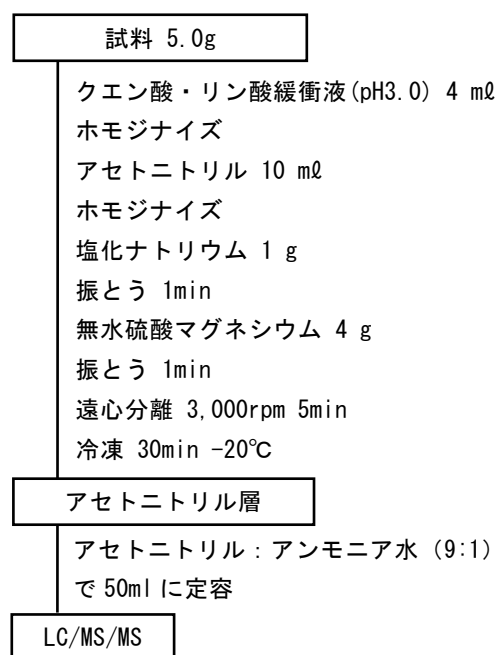


図 1 改良法分析フロー

表 4 定容溶媒の検討結果

(1) 活ウナギ試料

定容 溶媒	アセトニトリル		アセトニトリル： アンモニア水 (9:1) 混液	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
MG	99.8	0.6	82.3	4.1
LMG	99.3	4.3	82.0	6.4

(2) シマアジ試料

定容 溶媒	アセトニトリル		アセトニトリル： アンモニア水 (9:1) 混液	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
MG	90.2	8.1	91.2	13.7
LMG	60.8	15.3	82.7	2.4

(3) マダイ試料

定容 溶媒	アセトニトリル		アセトニトリル： アンモニア水 (9:1) 混液	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
MG	64.7	14.4	83.7	4.5
LMG	66.7	20.8	83.2	3.3

* 回収率(%)は n=3 の平均値

2 活ウナギを試料とした妥当性評価試験

改良分析法について、妥当性評価ガイドラインに基づく妥当性評価試験を行った。活ウナギ試料を用い、分析者 3 名、併行回数 2 回の試験を 2 日間実施した。

その結果、表 5 に示すとおり、真度、並行精度及び室内精度について、ガイドラインの目標値を満たす結果となり、本分析法の妥当性が確認された。

表 5 活ウナギ試料を用いた妥当性評価試験結果

	真度 (%)	併行精度 RSD (%)	室内精度 RSD (%)
MG	98.7	3.9	3.5
LMG	82.8	7.3	6.4

3 他魚種試料を用いた添加回収試験

活ウナギ、シマアジ及びマダイに加え、素焼きウナギ、ヤマメ、ニジマス及びブルマエビを試料として、改良試験法による添加回収試験 (n=3) を実施した。

その結果、表 6 に示すとおり、回収率 (真度) の平均値がガイドラインの目標値内となり、良好な結果が得られた。

表6 他魚種試料を用いた添加回収試験結果

試料	MG		LMG	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
素焼きウナギ	97.2	1.3	81.0	13.4
ヤマメ	98.7	3.9	82.8	7.3
ニジマス	106.2	3.3	83.8	8.0
クルマエビ	91.2	3.2	70.8	0.8

*回収率はn=3の平均値

まとめ

水産物中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンについて、小西らの方法を参考にし、抽出後の精製操作を省略、希釈及びマトリックス一致検量線による改良分析法を作成した。

本分析法について、活ウナギを用いた妥当性評価試験を実施したところ、良好な結果が得られた。

また、シマアジ、マダイ、素焼きウナギ、ヤマメ、ニジマス、及びクルマエビを用いた本分析法による添加回収試験（n=3）においても、良好な回収率が得られた。

以上により、本分析法は、水産物中のマラカイトグリーン分析において有効な簡易迅速分析法であると考えられた。

文献

- 1) 「食品中のマラカイトグリーンの試験法について」厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課：平成18年7月3日付け事務連絡.
- 2) 「食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について」厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：平成18年11月30日食安発第1130001号.
- 3) 大熊紀子，氏家愛子，千葉美子，吉田直人，濱名徹：宮城県保健環境センター年報，28，101-102（2010）.
- 4) 千葉美子，吉田直人，高橋祐介，濱名徹：宮城県保健環境センター年報，29，50-53（2011）.
- 5) 小西賢治，栢木春奈，佐々野僚一：日本食品衛生学会学術講演会要旨集.

7) 畜産物内臓中残留動物用医薬品の一斉分析法の検討

濱田寛尚* 山本理世 村川 弘

要 旨

畜産物内臓（肝臓）試料中の残留動物用医薬品一斉分析法の開発を目的として、当所で開発した畜水産物（筋肉等）中残留動物用医薬品一斉分析法をもとに、改良試験法を作成した。当該試験法について、妥当性評価ガイドラインに基づく枝分かれ実験による妥当性評価試験を行った。目標値を満たしたものは、動物用医薬品等 155 成分中、鶏肝臓試料では標準添加濃度 40 ng/g で 129 成分、10 ng/g で 123 成分、豚肝臓試料では 40 ng/g で 126 成分、10 ng/g で 121 成分であり、良好な結果が得られた。

キーワード：動物用医薬品，畜産物内臓，LC/MS/MS

はじめに

当所ではこれまで、畜水産物中の残留動物用医薬品一斉分析法を開発¹⁾、改良²⁾し(以下「従来法」という。)、熊本県食の安全・安心推進条例に基づく畜水産物の出荷前食品安全検査、及び食品衛生法に基づく収去検査に資してきた。

しかしながら従来法は、畜産物の筋肉及び水産物の可食部を対象とした分析法であり、内臓試料を用いた検討は行っていなかった。

そこで、従来法により、その分析対象動物用医薬品 155 成分について、鶏の筋肉及び肝臓試料を用いた添加回収試験 (n=3) を行い、回収率の平均値を比較した。その結果、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」³⁾ (以下「ガイドライン」という。) で要求される真度 70%~120%の範囲内にある成分数が、筋肉では 138 成分であったが、肝臓では 118 成分と筋肉より少なかった。

このことから、畜産物の内臓（肝臓）を分析対象とした場合、従来法の改良が必要であると考え、従来法の試料抽出時に、水溶性夾雑物を低減させる目的で無水硫酸ナトリウムを添加する改良試験法を作成した。

この改良試験法について、動物用医薬品等 155 成分を対象に、鶏肝臓及び豚肝臓試料を用いたガイドラインに基づく妥当性評価試験を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1 試薬

1. 1 標準品

添加回収試験及び妥当性評価試験に用いた各標準品(表 3 に示す動物用医薬品等)は、和光純薬工業(株)製、関東化学(株)製、林純薬工業(株)製、Dr.Ehrenstorfer 社製、Riedel-de Haen 社製、Sigma 社製を使用した。

1. 2 その他の試薬

メタノール(和光純薬工業(株)、残留農薬・PCB 試験用、HPLC 用)、アセトニトリル(和光純薬工業(株)、残留農薬・PCB 試験用)、無水硫酸ナトリウム(和光純薬工業(株)、残留農薬・PCB 試験用)、その他の試薬は HPLC 用または特級を使用した。

1. 3 混合標準液

表 3 の*を付した各成分の標準品を秤量し、メタノール、アセトン、アセトニトリル(一部ジメチルスルホキシド、水等を添加)に溶解後、混合したものに市販混合標準液(和光純薬工業(株)製 PL-1-3 及び PL-2-1)を加え、200 µg/l の混合標準液を調製した。

* 現熊本県健康福祉部健康福祉政策課

2 試料

2.1 試験用試料

分析対象の動物用医薬品等が含まれないことを確認した鶏肝臓及び豚肝臓を、フードプロセッサーで細切し、試験用試料とした。

2.2 添加回収試験用試料

2.1で作成した試料 5.0 g (改良法用) 及び 10.0 g (従来法用) を 100 mlpp 遠沈管にとり、40 ng/g となるように混合標準溶液を添加し、混和したものを添加回収試験用試料とした。

2.3 妥当性評価試験用試料

2.1で作成した試料 5.0 g を 100 mlpp 遠沈管にとり、10 ng/g 及び 40 ng/g となるように混合標準溶液を添加し、混和したものを妥当性評価試験用試料とした。

3 LC/MS/MS 測定条件

高速液体クロマトグラフ：Waters 社製 Waters2795

タンデム型質量分析装置：Waters 社製 Quattro Premier

分析カラム：Waters 社製 Symmetry Shield

(4.6 mm×50 mm, 3.5 µm)

LC/MS/MS の測定条件は、前報²⁾のとおり。

なお、定量はマトリックス一致検量線を用いた。

結果及び考察

1 従来法の改良

畜産物の内臓（肝臓）を分析対象とした場合、試料から抽出される水溶性夾雑物等の妨害が考えられるので、これらの夾雑物を除去するため、従来法では使用していない無水硫酸ナトリウムを試料抽出時に添加することとし、下記に示す内臓（肝臓）を分析対象とした試験方法（以下「改良法」という。）を作成した。

・改良法

試料 5.0 g に、アセトニトリル 30 ml、アセトニトリル飽和 n-ヘキサン 20 ml 及び無水硫酸ナトリウム 10 g を加え、ホモジナイズした後、10 分間激しく振とうし、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を別の 100mlpp 遠沈管に分取する。また、n-ヘキサン層を 50 mlpp 遠沈管に分取し、アセトニトリル 2 ml を加え、軽く混和した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を先のアセトニトリル層と併せる。さらに、残渣に、メタノール：水 (9 : 1) 混液 20 ml 及びメタノール：水 (9 : 1) 混液飽和ヘキサン 20 ml を加え、同様に 10 分間激しく振とう後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、メタノール：水 (9 : 1) 層を先のアセトニトリル層と併せる。併せたものを、ガ

ラスロートでろ過し、そのろ液を 200 ml ナス型フラスコに採り、n-プロパノール 10 ml を加え、40℃以下で濃縮、チッ素気流下で溶媒を除去する。残留物にアセトニトリル：メタノール：水 (3 : 2 : 5) 混液で 50 ml メスフラスコに洗いこみ、50 ml に定容したものを抽出液とする。この抽出液を 5 ml 採り、メタノール 0.5 ml を加え、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 LC/MS/MS 測定用試験液とする。(図 1)

なお、検量線は、マトリックス試料からの抽出液 5 ml に、各濃度の混合標準溶液 (0.1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 40 ng/ml, 200 ng/ml) 0.5 ml を加え、同様にろ過したものをマトリックス一致検量線用試験液とする。(検量線濃度として 0.01 ng/ml, 0.05 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 4 ng/ml, 20 ng/ml)

2 内臓試料（肝臓）を用いた改良法と従来法の比較

鶏肝臓及び豚肝臓を用い、添加回収試験（対象動物用医薬品等は表 3 に示す 155 成分、n=3）による改良法と従来法の比較を行った。

添加回収試験を実施するにあたって、分析対象とする試料が肝臓であるため、標準品添加後の静置時間によって動物用医薬品成分が分解する可能性が考えられた。そこで、経時的な成分の分解を確認するため、添加回収試験に用いる動物用医薬品等 155 成分を添加し、0, 0.5, 2, 6, 12, 24 時間経過後に抽出を行い、その回収率を確認したところ、147 成分は経時的な回収率の変化が認められなかったが、図 2 に掲げる 8 成分は、添加後 30 分で、図に示すとおり回収率が 60%以下となり、以降経時的に回収率が減少する傾向がみられた。このことから、肝臓試料の場合は、標準品を添加後に十分に混和したのち、直ちに抽出を開始することとした。

以上のことを踏まえ、添加回収試験を実施し、回収率平均値が妥当性評価ガイドラインにおける真度の目標値 70%~120%の範囲にある成分数を比較したところ、鶏肝臓では改良法 132 成分、従来法 118 成分、豚肝臓では改良法 131 成分、従来法 120 成分となり、両試料とも改良法の方が、従来法より真度が目標値に適合する成分数が増加した。

3 無水硫酸ナトリウムの添加量の検討

次に改良法における無水硫酸ナトリウムの添加量の検討を行った。

検討には鶏肝臓試料を用い、表 3 に示す動物用医薬品等 155 成分を対象とし、改良法の抽出時に使用する

無水硫酸ナトリウムの添加量をそれぞれ 0 g, 10 g, 20 g, 30 g として添加回収試験 (n=1) を実施し比較を行ったところ, 155 成分のうち, 表 1 に掲げる 14 成分は, 無水硫酸ナトリウムを添加しない場合 (0 g) に回収率が低下し, 10 g 以上の添加量ではその回収率に大きな差は出ないことが分かった。このことから, 無水硫酸ナトリウムの添加量を 10 g とした。

4 ガイドラインに基づく妥当性評価試験

改良法のガイドラインに基づく妥当性評価試験を, 表 3 に示す動物用医薬品等 155 成分について, 鶏肝臓及び豚肝臓試料を用い実施した。

試験は分析者 3 名, 併行回数 2 回で 2 日間の枝分かれ実験で行い, 真度, 併行精度, 室内精度を求めた結果, 表 2, 表 3 及び表 4 (表 3 と同成分) に示すとおり, 良好な結果が得られ, 鶏肝臓及び豚肝臓試料について, 本分析法の妥当性が確認された。

まとめ

当所で開発した畜産物の筋肉等を検査対象とした残留動物用医薬品一斉分析法 (従来法) をもとに, 畜産物内臓 (肝臓) 試料中の残留動物用医薬品一斉分析法

(改良法) を開発した。改良法を鶏及び豚の肝臓試料を用いた添加回収試験 (分析対象動物用医薬品等 155 成分) により従来法と比較した結果, 真度の目標値に適合する成分数の増加が認められた。

さらに, 改良法について, ガイドラインに基づく枝分かれ実験による妥当性評価試験を行ったところ, 目標値を満たしたものは, 動物用医薬品 155 成分中, 鶏肝臓試料では標準添加濃度 40 ng/g で 129 成分, 10 ng/g で 123 成分, 豚肝臓試料では 40 ng/g で 126 成分, 10 ng/g で 121 成分であり, 良好な結果が得られた。

これらのことから, 今回開発した分析法により, 鶏及び豚肝臓中動物用医薬品の迅速一斉分析が可能な成分数が増加し, 本県の食の安全安心に係る検査体制の強化に寄与できるものと考えられる。

文献

- 1) 和久田俊裕, 西名武士, 増永ミキ, 飛野敏明: 熊本県保健環境科学研究所報, 35, 39-44 (2005) .
- 2) 村川弘, 福島孝兵, 飛野敏明: 熊本県保健環境科学研究所報, 39, 21-25 (2009) .
- 3) 厚生労働省 : 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知, 食安発 1224 第 1 号, 平成 22 年 12 月 24 日 .

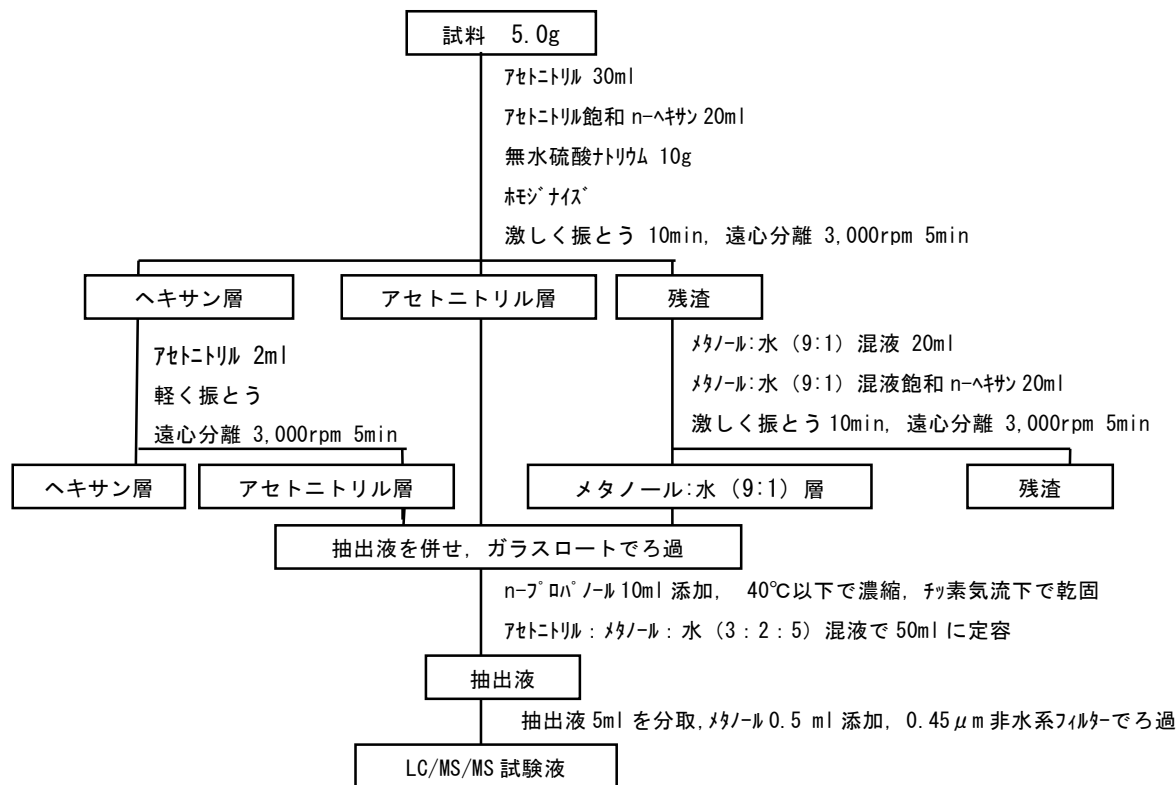


図 1 改良法フロー

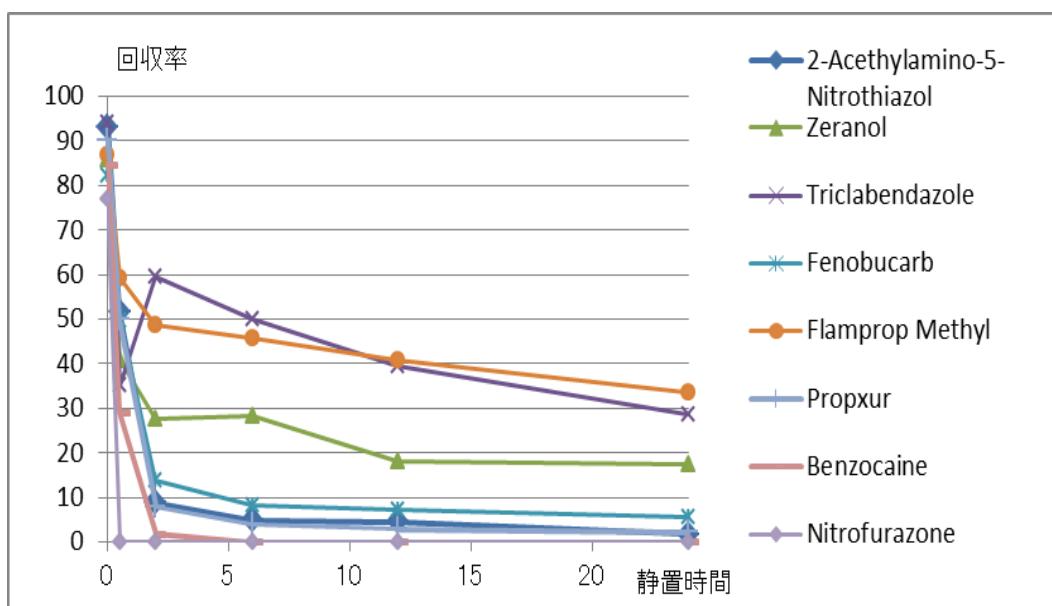


図2 鶏肝臓試料に標準添加後の経時的変化

表1 無水硫酸ナトリウム添加量の検討結果

動物用医薬品名	無水硫酸ナトリウム添加量			
	0g	10g	20g	30g
Albendazole	55.1	99.5	99.1	98.3
Oxacillin	53.7	88.8	97.3	83.6
Cloxacillin	41.5	85.3	82.9	78.7
Ketoprofen	66.3	94.4	95.4	90.7
Trenbolone	55.1	81.3	82.5	84.2
Sulfanitran	59.7	80.3	87.0	83.9
Tylosin	64.9	97.4	83.7	73.3
Phenoxymethylpenicillin	29.0	73.8	70.2	74.8
Flubendazol	43.4	105.5	107.5	105.9
Benzylpenicillin	52.1	85.3	89.7	85.7
Methylprednisolone	53.1	88.1	92.4	87.3
Meloxicam	59.4	109.0	103.2	103.3
Menbutone	40.6	96.2	90.1	88.2
Revamisole	53.9	73.0	73.9	77.7

※数値は回収率 (%) (試行回数 = 1)

表2 妥当性評価試験の結果

	40ppb で適合	10ppb で適合	両濃度 で適合
鶏肝臓	129	123	121
豚肝臓	126	121	116

※数値は真度及び精度が適合の成分数 (155成分中)

表3 妥当性評価試験結果 (試料：鶏肝臓)

No	Name	添加濃度：試料中 40 ng/g				添加濃度：試料中 10 ng/g				両濃度とも適合
		回収率 平均値 (%)	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	判定	回収率 平均値 (%)	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	判定	
1	2-Acethylamino-5-Nitrothiazol	98.9	3.0	3.6	○	93.9	4.4	4.4	○	◎
2	Albendazole*	100.6	3.1	4.2	○	99.1	2.4	4.0	○	◎
3	Albendazole Metabolite*	104.8	3.7	5.0	○	100.1	5.7	8.3	○	◎
4	Azaperone*	103.1	2.8	4.4	○	103.6	5.3	8.4	○	◎
5	Altrenogest*	83.0	7.7	7.7	○	80.7	7.3	7.6	○	◎
6	Amprolium*	125.6	4.6	23.0	○	131.9	6.1	12.8	○	◎
7	Isoprothiolane*	94.8	2.4	4.0	○	99.4	3.9	5.2	○	◎
8	Isometamidium*									
9	Ivermectin*	100.2	6.1	6.1	○	103.8	5.6	14.8	○	◎
10	Ethopabate	102.5	2.2	4.0	○	98.4	2.7	2.8	○	◎
11	Eprinomectin B1a*	95.6	1.7	2.2	○	100.0	7.5	7.5	○	◎
12	Epoxiconazol*	99.0	2.4	2.7	○	98.6	3.0	3.0	○	◎
13	Emamectin B1a	97.4	1.4	3.1	○	97.6	3.6	3.6	○	◎
14	8,9Z-Emamectin B1a*	95.1	2.5	3.9	○	96.9	2.6	2.6	○	◎
15	Erythromycin*	98.3	3.1	4.7	○	100.3	5.0	5.0	○	◎
16	Enrofloxacin*	112.3	3.7	3.7	○	130.2	10.6	20.2	○	◎
17	Ciprofloxacin*	95.5	2.9	5.7	○	140.1	7.6	23.5	○	◎
18	Oxacillin*	89.2	13.7	16.7	○	90.7	17.6	18.7	○	◎
19	Oxabetrinil*	95.6	3.9	3.9	○	96.8	5.8	5.8	○	◎
20	Oxytetracycline*	28.5	4.2	13.9	○	49.1	5.0	14.5	○	◎
21	Chlorotetracycline*	31.2	8.3	23.7	○	56.3	4.0	33.3	○	◎
22	Tetracycline*	46.2	6.1	16.2	○	63.4	10.6	10.6	○	◎
23	Oxibendazole*	103.0	3.6	5.6	○	99.0	6.4	8.6	○	◎
24	Oxolinic Acid*	101.7	2.5	2.5	○	101.5	4.1	5.6	○	◎
25	Ofloxacin*	119.0	6.1	19.7	○	171.3	6.0	10.8	○	◎
26	Olaquinox*	73.7	12.3	31.0	○	64.8	39.8	62.5	○	◎
27	Orbifloxacin*	117.3	4.9	12.2	○	119.2	3.0	12.2	○	◎
28	Ormetoprim*	96.7	3.4	6.5	○	92.7	7.5	7.5	○	◎
29	Oleandomycin*	105.0	5.3	5.4	○	98.0	4.1	5.2	○	◎
30	Carazolol*	106.5	4.7	5.2	○	101.8	4.3	6.5	○	◎
31	Carprofen*	95.0	2.8	4.6	○	93.0	9.1	9.1	○	◎
32	Xylazine	102.7	4.3	6.3	○	94.1	8.2	8.9	○	◎
33	Cloxacillin*	97.6	6.9	6.9	○	98.8	7.9	7.9	○	◎
34	Cloquintcet Mexyl*	8.7	36.0	53.4	○	10.2	34.9	52.0	○	◎
35	Closantel*	96.0	3.3	4.0	○	98.6	4.4	4.5	○	◎
36	Clostebol*	63.0	3.7	5.1	○	69.3	6.1	10.1	○	◎
37	Clopidol*	98.9	3.1	4.9	○	99.7	5.9	7.2	○	◎
38	Clorslon	101.4	4.4	4.4	○	109.6	9.7	10.3	○	◎
39	Chlorhexidine*									
40	Chlormadinone*	70.0	5.5	7.2	○	74.3	6.8	7.4	○	◎
41	Ketoprofen*	99.1	3.7	4.5	○	92.1	6.6	6.6	○	◎
42	Trenbolone	97.4	2.8	3.9	○	100.8	5.3	6.4	○	◎
43	Melengestrol Acetate	87.7	2.8	4.2	○	92.8	4.7	4.7	○	◎
44	Sarafloxacin*	117.7	5.5	6.5	○	123.5	3.4	40.4	○	◎
45	Diaveridine*	103.7	3.4	10.2	○	98.5	6.4	13.6	○	◎
46	Diclazuril*	93.7	3.8	4.6	○	99.7	8.3	10.7	○	◎
47	Dicyclanil*	98.0	8.4	10.1	○	113.5	13.2	21.2	○	◎
48	Dinitlmide*	104.0	7.1	11.5	○	93.0	11.8	16.3	○	◎
49	Difloxacin*	113.2	4.1	4.9	○	114.7	4.9	4.9	○	◎
50	Josamycin*	82.5	2.8	3.4	○	79.6	2.5	5.0	○	◎
51	Cyromazin*	102.8	4.5	10.4	○	81.8	5.8	23.0	○	◎
52	Spiramycin*	92.4	12.1	12.4	○	131.8	6.2	28.1	○	◎
53	Neospiramycin*	121.3	10.9	13.3	○					
54	Sulfaethoxypyridazine*	99.7	5.8	5.8	○	102.0	4.6	5.3	○	◎
55	Sulfaquinoxaline	101.4	3.1	3.1	○	96.8	6.6	6.8	○	◎
56	Sulfachlorpyridazine	106.7	3.5	6.0	○	91.2	7.4	10.4	○	◎
57	Sulfadiazine*	95.9	5.2	5.5	○	93.6	8.5	8.5	○	◎
58	Sulfadimidine	98.2	6.0	8.5	○	94.0	4.8	8.1	○	◎
59	Sulfadimethoxine	102.7	3.9	4.2	○	99.5	5.4	5.4	○	◎
60	Sulfacetamide	111.0	3.8	6.0	○	97.0	2.9	7.7	○	◎
61	Sulfathiazole	104.0	3.8	4.9	○	90.9	7.4	10.1	○	◎
62	Sulfadoxine	99.6	4.0	5.0	○	95.1	2.9	6.0	○	◎
63	Sulfatroxazole*	101.8	2.7	4.0	○	101.5	6.0	6.2	○	◎
64	Sulfanitran	97.5	3.8	5.4	○	88.4	7.0	7.0	○	◎
65	Sulfapyridine	108.5	4.8	4.8	○	105.1	8.2	8.3	○	◎
66	Sulfabromorethazine*	97.3	2.4	2.4	○	96.7	5.9	6.7	○	◎
67	Sulfabenzamide*	91.3	2.8	6.8	○	86.7	5.5	7.8	○	◎
68	Sulfamethoxazole	99.7	3.0	5.6	○	92.0	2.1	5.7	○	◎
69	Sulfamethoxypridazine	103.2	3.8	3.8	○	95.5	5.5	5.5	○	◎
70	Sulfamerazine	103.9	2.2	4.4	○	97.6	8.8	8.8	○	◎
71	Sulfamonomethoxine	101.7	6.9	6.9	○	86.9	10.7	10.7	○	◎
72	Sulfisozole*	98.7	5.3	6.8	○	96.3	7.7	7.7	○	◎

表3 妥当性評価試験結果 (試料：鶏肝臓)

No	Name	添加濃度：試料中 40 ng/g				添加濃度：試料中 10 ng/g				両濃度とも適合
		回収率 平均値 (%)	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	判定	回収率 平均値 (%)	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	判定	
73	Zeranol	87.0	3.4	4.5	○	84.3	17.2	17.2	○	◎
74	Tylosin*	83.3	7.3	7.3	○	76.2	7.8	12.2	○	◎
75	Danofloxacin	155.0	9.7	9.7		177.6	10.1	10.6		
76	Thiabendazole	101.2	2.4	2.7	○	97.9	4.4	4.4	○	◎
77	5-Hydroxythiabendazole*	106.6	4.3	8.1	○	97.5	8.2	8.2	○	◎
78	Tiamulin	100.2	3.6	3.6	○	99.8	3.2	3.2	○	◎
79	Thiamphenicol	106.1	9.3	9.3	○	102.1	9.4	13.4	○	◎
80	Tilmicosin	121.3	5.8	10.8		126.9	19.4	19.4		
81	Dexamethasone	100.1	2.8	7.0	○	102.7	6.0	7.8	○	◎
82	Decoquinat*	97.2	3.1	3.7	○	94.5	2.2	2.9	○	◎
83	Temephos	98.1	3.8	4.0	○	101.1	2.9	3.9	○	◎
84	Doramectin*	88.4	4.6	6.9	○	84.6	7.6	8.8	○	◎
85	Triclabendazole*	88.5	36.0	36.0		82.8	30.0	46.4		
86	Triclabendazole Sulphone*	93.6	8.6	9.9	○	101.8	15.1	15.1	○	◎
87	Trichlorhon*	83.7	5.5	27.5						
88	Tribromsalan*	93.8	10.4	10.4	○	88.6	7.2	17.9	○	◎
89	Tripelennamine*	98.5	3.4	3.4	○	94.1	3.2	4.2	○	◎
90	Trimethoprim	124.1	66.8	66.8		144.1	26.1	39.2		
91	Toltrazuril*	102.1	4.4	30.0		113.5	10.8	27.4	○	
92	Tolfenamicacid*	92.2	4.2	5.9	○	86.9	6.9	9.9	○	◎
93	Nicarbazin*	96.3	3.3	3.3	○	90.7	3.8	8.8	○	◎
94	Nafcillin*	93.3	2.9	2.9	○	96.9	4.1	4.1	○	◎
95	Nalidixic Acid*	98.0	3.7	3.7	○	91.2	2.5	4.6	○	◎
96	Nitarson*									
97	Nitroxynil*	85.3	4.1	5.3	○	91.4	7.9	13.0	○	◎
98	Novobiocin*	91.7	6.3	6.3	○	94.4	10.6	13.9	○	◎
99	Norfloracin*	110.0	4.6	8.2	○	203.7	6.9	19.0		
100	Halofuginone Lactate*	102.1	4.6	6.7	○	93.2	14.3	14.3	○	◎
101	Bithionol*	96.0	3.4	4.3	○	92.3	6.1	7.4	○	◎
102	Hydrocortisone	94.7	4.1	4.1	○	98.0	5.5	11.4	○	◎
103	Pyrantel*	105.9	5.1	5.8	○	104.7	6.8	6.8	○	◎
104	Pyrimethamine	104.4	6.5	7.8	○	96.4	3.9	6.6	○	◎
105	Famphur	104.1	5.2	5.2	○	109.3	5.7	7.2	○	◎
106	Fenitrothion*	99.4	5.0	10.0	○	100.1	15.3	15.3	○	◎
107	Phenoxymethylpenicillin*									
108	Fenobucarb	93.7	4.6	5.8	○	92.5	4.2	4.8	○	◎
109	Praziquantel*	100.9	2.9	2.9	○	99.9	4.1	4.4	○	◎
110	Flamprop Methyl*	95.4	3.8	4.3	○	94.6	4.5	4.5	○	◎
111	Prifinium*	104.8	3.8	7.2	○	104.4	7.4	8.5	○	◎
112	Flunixin*	100.1	2.8	2.8	○	101.7	5.2	5.2	○	◎
113	Flubendazol*	104.0	2.2	3.9	○	97.7	4.5	5.1	○	◎
114	Flumequine*	94.9	4.9	4.9	○	95.3	4.3	5.8	○	◎
115	Prednisolone	95.1	4.7	6.2	○	94.0	8.0	10.8	○	◎
116	Brotizolam*	100.9	4.4	4.4	○	102.7	4.9	5.9	○	◎
117	Propaquizafop*	3.2	53.5	53.5		4.5	24.2	44.8		
118	Propxur*	97.3	3.1	3.3	○	96.4	1.6	4.5	○	◎
119	Florfenicol	103.3	5.1	5.1	○	100.0	7.7	7.7	○	◎
120	Permethrin*	70.7	2.8	4.7	○	69.1	5.7	7.2		
121	Benzylpenicillin*	102.1	4.1	8.5	○	97.4	8.7	8.7	○	◎
122	Benzocaine*	90.3	4.5	5.3	○	92.8	4.9	9.1	○	◎
123	Boscalid*	97.9	2.1	3.6	○	95.6	3.6	3.6	○	◎
124	Mafoprozine*	107.9	3.5	5.7	○	103.0	5.7	7.5	○	◎
125	Marbofloxacin*	115.2	9.1	12.6	○	183.1	12.4	16.4		
126	Miloxacin*	90.5	4.1	13.1	○	87.5	6.3	8.7	○	◎
127	Methylprednisolone*	96.0	3.4	8.6	○	91.9	10.6	10.6	○	◎
128	Mefenpyr Diethyl*	19.8	52.5	52.5		15.9	56.3	59.2		
129	Mebendazol*	110.4	5.8	5.8	○	106.6	6.2	6.2	○	◎
130	Meloxicam*	102.9	5.4	5.4	○	102.1	2.7	7.2	○	◎
131	Menbutone*	104.2	6.7	6.7	○	92.7	7.4	11.4	○	◎
132	Moxidectin*	100.8	4.3	4.3	○	96.6	2.6	6.3	○	◎
133	Monensin	99.5	2.9	2.9	○	92.5	3.0	5.8	○	◎
134	Morantel*	94.3	5.6	6.3	○	88.6	7.7	9.8	○	◎
135	Lasalocid*	95.9	2.5	2.7	○	93.6	4.3	4.8	○	◎
136	Rifaximin*	107.3	2.4	8.4	○	106.0	2.4	6.6	○	◎
137	Lincomycin	107.5	5.7	13.7	○	92.3	19.5	28.0	○	◎
138	Revamisole*	98.8	3.1	5.8	○	98.3	3.9	5.4	○	◎
139	Robenidine*	95.1	3.2	3.8	○	99.7	9.8	9.8	○	◎
140	Warfarin*	99.8	1.8	2.5	○	96.4	2.8	2.8	○	◎
141	Glycyrrhizic Acid*	40.0	25.0	32.4						
142	Chloramphenicol*	99.8	4.5	5.2	○	100.0	6.3	7.4	○	◎
143	Chlorpromazine*	92.7	3.4	3.7	○	88.6	2.8	4.2	○	◎
144	Dimetridazole*	99.0	7.5	7.5	○	98.8	5.4	5.8	○	◎

表3 妥当性評価試験結果（試料：鶏肝臓）

No	Name	添加濃度：試料中 40 ng/g				添加濃度：試料中 10 ng/g				両濃度とも適合
		回収率 平均値 (%)	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	判定	回収率 平均値 (%)	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	判定	
145	Nitrofurazone*									
146	Metoronidazole*	107.8	5.0	6.3	○	96.5	8.3	8.3	○	◎
147	Malachitegreen*	31.6	8.5	16.7		32.7	8.8	9.2		
148	Leucomalachitegreen*	80.5	3.8	4.3	○	79.7	3.8	4.6	○	◎
149	Oxfendazole Sulfone*	112.5	3.8	3.8	○	110.9	4.0	4.5	○	◎
150	Oxfendazole*	101.9	2.2	3.6	○	99.8	4.5	5.9	○	◎
151	Febantel*	100.0	2.8	2.8	○	96.0	2.3	2.7	○	◎
152	Fenbendazole*	97.8	4.3	4.3	○	95.6	3.7	4.0	○	◎
153	Canthaxanthin*	70.7	21.5	21.9						
154	Pirlimycin*	53.6	5.0	7.4		53.9	7.1	7.2		
155	Ractopamine*	99.1	6.5	14.0	○	108.3	7.8	10.6	○	◎
合計					129				123	121

表4 妥当性評価試験結果 (試料：豚肝臓)

No	Name	添加濃度：試料中 40 ng/g				添加濃度：試料中 10 ng/g				両濃度とも適合
		回収率 平均値 (%)	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	判定	回収率 平均値 (%)	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	判定	
1	2-Acethylamino-5-Nitrothiazol	102.3	1.3	9.8	○	97.4	2.3	9.2	○	◎
2	Albendazole*	100.3	1.3	2.0	○	97.8	2.7	3.3	○	◎
3	Albendazole Metabolite*	105.9	5.3	5.3	○	107.7	6.3	6.3	○	◎
4	Azaperone*	108.3	2.7	3.5	○	103.9	4.4	4.4	○	◎
5	Altrenogest*	68.9	18.6	18.6	○	73.9	14.5	16.0	○	◎
6	Amprolium*	117.0	2.3	17.2	○	161.7	6.4	15.7	○	◎
7	Isoprothiolane*	94.3	2.8	3.6	○	100.2	4.8	5.4	○	◎
8	Isometamidium*									
9	Ivermectin*	102.8	2.4	7.3	○	93.2	5.4	6.4	○	◎
10	Ethopabate	100.5	2.2	4.5	○	101.8	3.0	4.2	○	◎
11	Eprinomectin B1a*	93.8	5.7	5.7	○	96.8	5.3	5.3	○	◎
12	Epoxiconazol*	96.8	1.8	5.2	○	85.7	46.6	46.6	○	◎
13	Emamectin B1a	93.1	3.7	3.7	○	95.5	2.2	2.8	○	◎
14	8,9Z-Emamectin B1a *	93.7	5.2	7.7	○	97.6	2.3	3.3	○	◎
15	Erythromycin*	96.8	1.8	2.7	○	95.7	4.8	5.8	○	◎
16	Enrofloxacin*	134.9	5.6	16.8	○	157.1	4.7	16.8	○	◎
17	Ciprofloxacin*	137.7	8.9	28.9	○	173.3	8.2	11.1	○	◎
18	Oxacillin*	91.5	4.9	7.1	○					
19	Oxabetrinil*	91.1	2.6	8.2	○	95.0	1.4	5.9	○	◎
20	Oxytetracycline*	41.6	8.2	8.2	○	72.6	4.1	10.1	○	◎
21	Chlorotetracycline*	46.9	9.3	10.3	○	71.1	18.4	32.4	○	◎
22	Tetracycline*	58.9	7.7	10.4	○	93.2	2.9	7.0	○	◎
23	Oxibendazole*	101.9	3.1	4.0	○	94.8	4.7	4.8	○	◎
24	Oxolinic Acid*	102.6	3.6	3.6	○	104.9	3.9	4.2	○	◎
25	Ofloxacin*	157.1	4.6	10.8	○	191.3	8.7	11.8	○	◎
26	Olaquinox*	30.5	29.6	42.9	○	39.8	71.9	71.9	○	◎
27	Orbifloxacin*	103.0	2.0	3.2	○	98.6	3.7	8.0	○	◎
28	Ormetoprim*	94.4	5.7	8.9	○	92.1	5.7	5.7	○	◎
29	Oleandomycin*	102.2	4.5	4.6	○	105.6	3.4	3.6	○	◎
30	Carazolol*	101.6	4.4	4.4	○	101.6	4.6	8.0	○	◎
31	Carprofen*	85.6	2.7	4.8	○	81.9	2.7	3.0	○	◎
32	Xylazine	102.3	5.1	7.4	○	96.3	4.1	8.7	○	◎
33	Cloxacillin*	102.6	4.3	7.5	○	98.5	5.9	12.1	○	◎
34	Cloquintcet Mexyl*	3.1	22.7	25.9	○	3.3	29.5	29.5	○	◎
35	Closantel*	95.8	4.0	4.0	○	98.3	6.6	6.8	○	◎
36	Clostebol*	88.8	3.4	7.4	○	93.6	4.1	4.1	○	◎
37	Clopidol*	98.6	2.6	4.6	○	98.2	7.5	7.5	○	◎
38	Clorslon	95.1	4.7	4.7	○	105.1	7.0	7.0	○	◎
39	Chlorhexidine*									
40	Chlormadinone*	91.8	4.8	4.8	○	94.3	6.0	7.4	○	◎
41	Ketoprofen*	94.7	2.4	3.0	○	93.2	3.8	4.6	○	◎
42	Trenbolone	90.1	3.7	6.6	○	93.2	4.9	7.0	○	◎
43	Melengestrol Acetate	93.2	4.4	4.4	○	98.7	7.0	7.0	○	◎
44	Sarafloxacin*	104.7	5.4	5.4	○	131.8	4.0	4.0	○	◎
45	Diaveridine*	102.8	3.2	9.2	○	104.7	7.1	11.6	○	◎
46	Diclazuril*	95.7	3.4	5.4	○	94.5	4.6	6.9	○	◎
47	Dicyclanil*	98.4	2.9	11.9	○	115.1	3.2	3.3	○	◎
48	Dinitlmide*	90.9	5.8	14.0	○					
49	Difloxacin*	105.9	2.5	5.5	○	121.6	4.8	8.0	○	◎
50	Josamycin*	63.6	5.3	7.0	○	54.6	7.8	7.8	○	◎
51	Cyromazin*	95.0	6.1	6.1	○	88.7	5.2	15.5	○	◎
52	Spiramycin*	123.6	9.9	16.3	○	120.2	18.0	29.8	○	◎
53	Neospiramycin*	97.4	10.9	18.7	○					
54	Sulfaethoxyipyridazine*	97.5	5.0	5.7	○	101.4	3.9	4.6	○	◎
55	Sulfaquinoxaline	98.2	2.6	3.5	○	101.0	2.4	2.8	○	◎
56	Sulfachlorpyridazine	96.4	3.4	6.4	○	99.9	6.8	8.4	○	◎
57	Sulfadiazine*	98.7	4.1	4.9	○	97.6	7.3	7.3	○	◎
58	Sulfadimidine	97.3	3.4	3.4	○	102.4	6.2	6.2	○	◎
59	Sulfadimethoxine	98.5	5.2	5.2	○	101.3	4.4	7.0	○	◎
60	Sulfacetamide	97.1	3.6	3.7	○	94.0	6.2	6.8	○	◎
61	Sulfathiazole	93.9	4.5	6.3	○	105.8	2.2	6.7	○	◎
62	Sulfadoxine	98.6	1.7	3.4	○	98.8	2.2	3.0	○	◎
63	Sulfatroxazole*	96.0	3.2	3.2	○	98.3	4.1	4.2	○	◎
64	Sulfanitran	96.3	4.2	5.2	○	111.7	5.5	5.8	○	◎
65	Sulfapyridine	98.0	4.4	4.4	○	91.7	6.9	16.4	○	◎
66	Sulfabromothiazine*	112.8	8.5	32.3	○	98.8	5.9	5.9	○	◎
67	Sulfabenzamide*	93.0	3.4	4.8	○	94.9	4.6	4.6	○	◎
68	Sulfamethoxazole	101.6	2.0	4.1	○	97.8	5.6	6.3	○	◎
69	Sulfamethoxyipyridazine	97.3	4.8	7.1	○	98.3	5.2	10.3	○	◎
70	Sulfamerazine	97.0	2.1	2.9	○	94.8	8.5	8.5	○	◎
71	Sulfamonomethoxine	101.1	4.7	8.5	○	91.5	6.0	16.2	○	◎
72	Sulfisozole*	98.6	3.5	4.3	○	105.1	7.7	9.0	○	◎
73	Zeranol	85.4	5.7	5.7	○	98.3	4.2	7.5	○	◎
74	Tylosin*	94.2	2.7	3.3	○	85.3	4.0	17.0	○	◎

表4 妥当性評価試験結果（試料：豚肝臓）

No	Name	添加濃度：試料中 40 ng/g				添加濃度：試料中 10 ng/g				両濃度とも適合
		回収率 平均値 (%)	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	判定	回収率 平均値 (%)	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	判定	
75	Danofloxacin	171.1	5.4	22.8		226.2	7.2	8.4		
76	Thiabendazole	104.0	2.9	4.5	○	104.0	6.1	6.1	○	◎
77	5-Hydroxythiabendazole*	102.4	4.9	5.4	○	98.8	12.0	14.5	○	◎
78	Tiamulin	97.6	4.0	4.3	○	101.4	3.5	4.5	○	◎
79	Thiamphenicol	92.8	5.6	8.3	○	90.3	3.6	12.1	○	◎
80	Tilmicosin	130.1	10.3	14.0		130.0	7.1	14.5		
81	Dexamethasone	107.7	4.7	5.9	○	108.3	4.9	8.8	○	◎
82	Decoquinat*	95.1	1.8	2.2	○	96.5	2.4	2.4	○	◎
83	Temephos	95.3	3.1	4.5	○	95.0	4.0	4.4	○	◎
84	Doramectin*	110.1	4.6	5.4	○	103.6	8.0	8.0	○	◎
85	Triclabendazole*	94.4	23.3	35.2		87.3	16.0	27.8	○	
86	Triclabendazole Sulphone*	83.5	6.2	11.8	○	91.9	11.1	14.4	○	◎
87	Trichlorhon*	65.2	50.2	50.2						
88	Tribromsalan*	82.2	4.8	6.2	○	84.7	8.0	8.3	○	◎
89	Tripelennamine*	99.3	2.4	3.5	○	99.6	5.5	9.4	○	◎
90	Trimethoprim	102.0	2.5	12.2	○	96.4	2.3	18.5	○	◎
91	Toltrazuril*	95.6	2.9	10.2	○	99.8	9.4	10.5	○	◎
92	Tolfenamicacid*	89.3	3.4	4.3	○	94.7	5.9	8.3	○	◎
93	Nicarbazin*	97.3	2.2	3.3	○	97.4	3.1	5.7	○	◎
94	Nafcillin*	91.1	2.0	2.1	○	99.0	1.8	7.2	○	◎
95	Nalidixic Acid*	97.2	3.5	6.8	○	100.6	4.4	5.7	○	◎
96	Nitarson*									
97	Nitroxynil*									
98	Novobiocin*	92.0	5.0	5.0	○	86.8	7.0	7.0	○	◎
99	Norfloxacin*	116.3	4.4	10.7	○	173.1	10.0	11.3		
100	Halofuginone Lactate*									
101	Bithionol*	91.2	4.7	5.1	○	89.2	6.2	10.4	○	◎
102	Hydrocortisone	95.0	6.5	6.5	○	108.8	5.7	5.7	○	◎
103	Pyrantel*	82.7	4.8	13.0	○	88.8	5.9	11.7	○	◎
104	Pyrimethamine	99.6	2.9	3.6	○	91.8	5.3	7.3	○	◎
105	Famphur	94.4	3.1	3.1	○	97.3	7.0	7.0	○	◎
106	Fenitrothion*	85.7	9.2	12.6	○	81.5	28.2	38.5		
107	Phenoxymethylpenicillin*	95.9	4.9	8.4	○	94.9	5.7	8.3	○	◎
108	Fenobucarb	80.0	4.3	9.3	○	82.1	4.8	12.4	○	◎
109	Praziquantel*	101.1	2.9	5.8	○	103.7	2.7	5.7	○	◎
110	Flamprop Methyl*	102.4	2.0	8.2	○	101.6	4.8	9.4	○	◎
111	Prifinium*	95.5	2.5	3.6	○	95.3	5.3	7.9	○	◎
112	Flunixin*	98.8	2.7	4.6	○	94.2	3.7	5.2	○	◎
113	Flubendazol*	102.1	5.3	7.8	○	98.0	4.3	12.4	○	◎
114	Flumequine*	96.5	3.3	6.1	○	97.6	3.5	3.5	○	◎
115	Prednisolone	92.1	5.2	7.3	○	92.8	4.7	6.1	○	◎
116	Brotizolam*	102.2	2.7	3.3	○	107.0	5.3	5.3	○	◎
117	Propaquizafop*	5.8	27.8	35.7		6.6	27.8	37.0		
118	Propxur*	77.1	2.3	14.1	○	76.2	5.5	17.4	○	◎
119	Florfenicol	100.4	4.0	4.0	○	99.4	6.4	6.4	○	◎
120	Permethrin*	53.5	8.3	12.2		54.2	10.2	15.2		
121	Benzylpenicillin*	90.9	4.1	4.8	○	93.4	4.4	7.9	○	◎
122	Benzocaine*	79.1	5.3	10.1	○	74.5	5.3	7.7	○	◎
123	Boscalid*	97.6	2.9	2.9	○	100.4	3.9	5.0	○	◎
124	Mafoprozine*	102.3	3.3	5.5	○	100.8	6.8	6.8	○	◎
125	Marbofloxacin*	118.4	8.1	10.2	○	199.4	20.6	20.6		
126	Miloxacin*	79.0	1.7	2.3	○	78.2	2.3	3.1	○	◎
127	Methylprednisolone*	102.5	2.6	3.8	○	97.3	4.9	6.8	○	◎
128	Mefenpyr Diethyl*									
129	Mebendazol*	99.3	3.5	5.3	○	101.9	4.4	4.4	○	◎
130	Meloxicam*	93.6	2.6	6.4	○	94.4	3.7	7.0	○	◎
131	Menbutone*	95.3	1.8	5.1	○	99.5	5.3	14.0	○	◎
132	Moxidectin*	105.4	2.6	6.5	○	106.7	10.6	10.6	○	◎
133	Monensin	98.4	2.3	3.7	○	97.3	4.5	4.7	○	◎
134	Morantel*	95.5	3.8	4.2	○	96.4	4.0	4.9	○	◎
135	Lasalocid*	90.6	3.2	3.2	○	94.8	4.3	4.3	○	◎
136	Rifaximin*	91.5	3.5	5.4	○	97.0	3.4	4.0	○	◎
137	Lincomycin	99.4	3.5	18.3	○	101.3	5.8	11.3	○	◎
138	Revamisole*	87.9	5.3	7.4	○	93.0	4.0	5.6	○	◎
139	Robenidine*	82.2	4.7	14.4	○	98.8	2.9	3.3	○	◎
140	Warfarin*	95.5	1.8	2.5	○	98.8	2.1	2.3	○	◎
141	Glycyrrhizic Acid*									
142	Chloramphenicol*	98.4	4.8	4.8	○	98.4	6.9	7.6	○	◎
143	Chlorpromazine*	89.3	3.4	5.0	○	91.1	5.4	7.3	○	◎
144	Dimetrildazole*	86.0	2.1	7.9	○	80.6	3.5	6.1	○	◎
145	Nitrofurazone*									
146	Metoronidazole*	94.8	2.2	5.0	○	83.0	2.6	12.9	○	◎
147	Malachitegreen*	33.8	6.6	6.6		36.5	6.2	6.2		
148	Leucomalachitegreen*	80.8	6.1	8.5	○	80.6	3.5	5.4	○	◎

表 4 妥当性評価試験結果（試料：豚肝臓）

No	Name	添加濃度：試料中 40 ng/g				添加濃度：試料中 10 ng/g				両濃度とも適合
		回収率 平均値 (%)	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	判定	回収率 平均値 (%)	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	判定	
149	Oxfendazole Sulfone*	86.4	3.6	18.8	○	92.4	3.2	12.4	○	◎
150	Oxfendazole*	101.0	2.2	4.6	○	98.7	3.8	3.8	○	◎
151	Febantel*	97.2	2.1	2.5	○	98.7	3.6	3.7	○	◎
152	Fenbendazole*	99.9	4.0	4.6	○	99.3	2.8	3.2	○	◎
153	Canthaxanthin*									
154	Pirlimycin*	49.8	8.1	8.1		45.8	8.9	16.7		
155	Ractopamine*	96.0	4.7	4.7	○	95.9	2.6	12.4	○	◎
合 計					126				121	116