

第 3 章 調査研究・報告

第 2 節 報 告

小麦粉中の残留農薬検査方法の検討

荒堀康史・島友紀・桐山秀樹

Examination of Methods for Analyzing Pesticide Residues in Flour

Yasushi ARAHORI・Tomoki SHIMA and Hideki KIRIYAMA

緒 言

奈良県は全国的にも有名な三輪そうめんの産地であり、小麦粉消費量も全国的に上位で、少量ながら高品質の小麦栽培も行われている。小麦栽培には病害虫被害の未然防止、収量・品質確保のために農薬が使用される。農薬は適正使用されていれば健康危害のおそれはないが、誤った使用や意図的な混入などがあれば健康被害が大きく懸念される。特に、小麦は主食として多量に喫食されるので、残留農薬の影響は無視できない。

食に関する健康危機事象発生時は、原因食材を迅速に特定し対応することが被害拡大防止に有効である。小麦粉等粉末穀類やそれに類似した試料の分析については報告例があるが¹⁻⁵⁾、当センターでは、野菜や果実の残留農薬検査を日常的に行っており、技術や経験の蓄積はあるが、乾燥した穀類については少なくとも最近 10 年間は検査事例がなく、知見に乏しい状況にある。そこで本研究では、小麦粉中の残留農薬について、迅速かつ一斉に分析する方法を検討し、当センターにおける健康危機管理体制の拡充を図る事を目的とする。

方 法

1. 試料

小麦粉試料として薄力小麦粉 3 種類及び強力小麦粉 1 種類を用いた。参考試料としては上新粉、もち粉、そば粉、きな粉、はったい粉、片栗粉、コーンスターチの各 1 種類を用いた。

2. 試薬・標準品・固相カートリッジ

抽出及び精製用の試薬として、アセトニトリル、トルエン、アセトン、ヘキサンは、富士フイルム和光純薬株式会社製の残留農薬・PCB 試験用濃縮 300 を用いた。塩化ナトリウム（試薬特級）、くえん酸三ナトリウム二水和物（試薬特級）、無水硫酸マグネシウム（和光特級）、いずれも富士フイルム和光純薬株式会社製を用いた。くえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物（鹿 1 級）は、関東化学株式会社製を用いた。

農薬標準品として、富士フイルム和光純薬株式会社

製の農薬混合標準液 PL-7-2（29 成分）、PL-14-2（30 成分）、PL-15-1（28 成分）、PL-17-2（29 成分）を用いた。

LC-MS/MS の移動相には、1 mol/L 酢酸アンモニウム（HPLC 用）及び超純水（LC/MS 用）は富士フイルム和光純薬株式会社製、メタノール Plus（LC/MS 用）は関東化学株式会社製を用いた。

クリーンアップ用固相カートリッジとして、アジレント・テクノロジー株式会社製 Bond Elut C18（1 g）、Merck KGaA 製 Supelclean™ ENVI-Carb™ II/PSA SPE（500 mg/500 mg）及び Supelclean™ ENVI-Carb/NH₂（500 mg/500 mg）を用いた。

3. 測定装置

LC-MS/MS の UHPLC 部は株式会社島津製作所製 Nexera XS システム、質量分析計は株式会社エービー・サイエックス製 QTRAP4500 を用いた。UHPLC 測定条件を表 1 に、質量分析計測定条件を表 2 に示す。

検討事項

1. クリーンアップ条件

1) 農薬標準品での Bond Elut C18 の添加回収試験

表 1 UHPLC 測定条件

カラム	YMC Triart C18 100×2.1 mm 1.9 μm
カラム温度	40℃
注入量	1 μL
流速	0.2 mL/min
移動相	A:5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B:5 mM 酢酸アンモニウム メタノール溶液
グラジエント (移動相 A の比率)	95%→95%(0.1min)→50% (1.0min)→42%(5.0min)→ 25%(10.0min)→10%(13.0min)→ 2%(14.0min)→2%(18.0min)→ 95%(18.1min)→95%(25.0min)

表 2 質量分析計測定条件

Ion Spray Voltage	5500 V(Positive);-4500 V(Negative)		
Curtain Gas	4 psi	Ion Source Gas1	50 psi
Collision Gas	9 psi	Ion Source Gas2	60 psi
Gas2 Temperature	350 °C		

	定 量 イオン				確 認 イオン					定 量 イオン				確 認 イオン			
	イオン化 モード	Precursor	Fragment	Retention	イオン化 モード	Precursor	Fragment	Retention		イオン化 モード	Precursor	Fragment	Retention	イオン化 モード	Precursor	Fragment	Retention
		[m/z]	[m/z]	[m/z]		Time [min]	[m/z]	[m/z]			[m/z]	Time [min]	[m/z]		[m/z]	[m/z]	Time [min]
3-Hydroxycarbofuran	ESI+	238	163	238	181	4.33			Flufenacet	ESI+	364	152	364	194	12.19		
Abamectin B1a	ESI+	890	305	890	567	16.08			Flufenoxuron	ESI+	489	158	489	141	15.48		
Acibenzolar-S-methyl	ESI+	211	136	211	140	11.40			Fluridone	ESI+	330	310	330	259	10.44		
Aldicarb	ESI+	208	116	208	89	5.66			Furametpyr	ESI+	334	157	334	290	8.70		
Aldoxycarb	ESI+	240	148	240	86	3.27			Furathiocarb	ESI+	383	195	383	252	14.78		
Ametryn	ESI+	228	186	228	96	10.96			Hexaflumuron	ESI+	461	158	461	141	14.47		
Amitraz	ESI+	294	163	294	122	16.12			Hexythiazox	ESI+	353	228	353	168	15.36		
Anilofos	ESI+	368	125	368	199	13.25			Imazalil	ESI+	297	159	297	109	13.18		
Azamethiphos	ESI+	325	183	325	139	6.42			Imidacloprid	ESI+	256	175	256	209	3.94		
Azinphos-methyl	ESI+	318	132	318	160	10.29			Indanofan	ESI+	341	175	341	187	12.58		
Azoxystrobin	ESI+	404	372	404	344	10.65			Indoxacarb	ESI+	528	203	528	56	14.16		
Barban	ESI+	258	178	258	143	11.73			Iprovalicarb	ESI+	321	119	321	203	12.05		
Benalaxyl	ESI+	326	148	326	294	13.38			Isoxaflutole	ESI+	377	251	360	144	9.24		
Bendiocarb	ESI+	224	109	224	167	6.97			Linuron	ESI+	249	160	249	182	10.83		
Benfuracarb	ESI+	411	195	411	252	14.64			Lufenuron	ESI+	511	158	511	141	15.19		
Benzofenap	ESI+	431	105	431	119	14.62			Mefenpyr-diethyl	ESI+	373	327	373	160	13.60		
Boscalid	ESI+	343	307	343	140	11.02			Mepanpyrim	ESI+	224	106	224	77	12.51		
Bromacil	ESI+	261	205	261	188	7.04			Methabenzthiazuron	ESI+	222	165	222	150	9.03		
Butafenacil	ESI+	492	180	492	331	12.02			Methiocarb	ESI+	226	121	226	169	10.88		
Carbaryl	ESI+	202	145	202	127	7.76			Methomyl	ESI+	163	88	163	106	3.58		
Carbetamide	ESI+	237	118	237	192	6.21			Methoxyfenozide	ESI+	369	149	369	313	11.63		
Carbofuran	ESI+	222	165	222	123	6.98			Monolinuron	ESI+	215	126	215	99	8.27		
Carbosulfan	ESI+	381	118	381	160	16.50			Naprosanilide	ESI+	292	171	292	120	12.91		
Carfentrazone-ethyl	ESI+	412	346	412	366	13.11			Novaluron	ESI+	493	158	510	158	14.47		
Carpropamid	ESI+	336	139	336	103	13.42			Oxabetrinil	ESI+	233	147	233	87	10.75		
Chlorbufam	ESI+	224	172	224	154	10.93			Oxamyl	ESI+	237	72	237	90	3.31		
Chlorflazuron	ESI+	540	383	540	158	15.85			Oxaziclonemefone	ESI+	376	190	376	161	14.68		
Chloridazon	ESI+	222	92	222	104	4.69			Oxycarboxin	ESI+	268	175	268	147	4.81		
Chloroxuron	ESI+	291	72	291	218	11.86			Pencycuron	ESI+	329	125	329	89	13.99		
Chromafenozide	ESI+	395	175	395	147	12.19			Pentoxazone	ESI+	354	286	354	186	14.80		
Clodinafop-propargyl	ESI+	350	266	350	91	13.16			Phoxim	ESI+	299	129	299	77	13.92		
Clofentezine	ESI+	303	102	303	138	14.26			Pyrimicarb	ESI+	239	72	239	182	8.58		
Cloquintocet-mexyl	ESI+	336	192	336	238	15.04			Prometryn	ESI+	242	158	242	200	12.39		
Clothianidin	ESI+	250	169	250	132	4.11			Propaquizafop	ESI+	444	100	444	163	14.95		
Cumyluron	ESI+	303	185	303	125	11.78			Pymetrozine	ESI+	218	105	218	78	3.42		
Cyazofamid	ESI+	325	108	325	261	12.51			Pyraclostrobin	ESI+	388	194	388	163	13.82		
Cycloate	ESI+	216	154	216	154	14.21			Pyrazolynate	ESI+	439	173	439	155	13.98		
Cycloprothrin	ESI+	499	181	499	229	15.71			Pyrazophos	ESI+	374	222	374	194	14.05		
Cyflufenamid	ESI+	413	295	413	241	13.80			Pyrifthalid	ESI+	319	139	319	179	10.46		
Cymoxanil	ESI+	199	128	199	111	4.89			Pyrimethanil	ESI+	200	107	200	168	11.11		
Cyprodinil	ESI+	226	93	226	108	13.60			Quizalofop-ethyl	ESI+	373	299	373	271	14.75		
Daimuron	ESI+	269	151	269	91	11.60			Silafluofen	ESI+	426	287	426	168	18.18		
Diflubenzuron	ESI+	311	158	311	141	12.79			Simeconazole	ESI+	294	70	294	135	11.98		
Dimethirimol	ESI+	210	140	210	71	8.43			Spinosyn A	ESI+	732	142	732	98	16.63		
(E)-Dimethomorph	ESI+	388	301	388	165	10.72			Spinosyn D	ESI+	746	142	746	98	17.06		
(Z)-Dimethomorph	ESI+	388	301	388	165	11.27			Tebufenozide	ESI+	353	297	353	133	12.80		
Diuron	ESI+	233	72	233	160	9.47			Tebuthiuron	ESI+	229	172	229	116	7.22		
Epoxiconazole	ESI+	330	121	330	101	12.39			Teflubenzuron	ESI+	381	141	381	158	15.11		
Etoxazole	ESI+	360	141	360	304	15.61			Tetrachlorvinphos	ESI+	367	127	369	127	12.90		
Fenamidone	ESI+	312	92	312	65	10.89			Thiabendazole	ESI+	202	131	202	175	6.45		
Fenoxaprop-ethyl	ESI+	362	288	362	121	14.68			Thiacloprid	ESI+	253	126	253	99	4.83		
Fenoxycarb	ESI+	302	88	302	116	12.93			Thiamethoxam	ESI+	292	211	292	181	3.53		
Fenpropiimorph	ESI+	304	147	304	117	16.81			Thiodicarb	ESI+	355	88	355	108	8.27		
(E)-Fenpyroximate	ESI+	422	366	422	107	15.21			Trifloxystrobin	ESI+	409	186	409	206	14.34		
(Z)-Fenpyroximate	ESI+	422	366	422	107	15.90			Triflumizole	ESI+	346	278	346	73	14.35		
(E)-Ferimzone	ESI+	255	124	255	132	11.06			Triflumizole metabolite	ESI+	295	278	295	215	12.06		
(Z)-Ferimzone	ESI+	255	124	255	132	11.23			Triflumuron	ESI+	359	156	359	139	13.74		
Flamprop-methyl	ESI+	336	105	336	77	11.63			Triticonazole	ESI+	318	70	318	125	12.03		
Fluazuron	ESI+	506	141	506	158	15.30			Orzalin	ESI-	345	281	345	78	12.20		

当センターでは食品中残留農薬検査の前処理は QuEChERS 法をベースとした独自法を用いており、2 種類の固相カートリッジを用いて抽出液をクリーンアップしているが、この段階で幾つかの農薬回収率が低下する可能性がある。このため、抽出液の脱脂等低極性物質を除去する Bond Elut C18 を通した時の農薬回収率の確認を行った。本固相カートリッジをアセトニトリル 10 mL でコンディショニングを行い、アセトニトリル 4 mL に農薬混合標準液 PL-7-2, PL-14-2, PL-15-1, PL-17-2 を等量ずつ混合して作成した分析対象物質 118 種類各 2 mg/L のアセトニトリル溶液 40 μ L を添加した添加回収試験液を通液し、アセトニトリル 26 mL で溶出を行った。通過した液をロータリーエバポレーターを用いて 40℃の水浴で加温しながら乾

固直前まで濃縮し、窒素ガス吹きつけにより残溶媒を除去、メタノールで 2 mL にメスアップした。この液をメタノールで 4 倍希釈してメンブランフィルターでろ過後、LC-MS/MS で測定を行った。

2) ENVI-Carb™ II /PSA SPE と ENVI-Carb/NH2 の溶出
溶媒

グラファイトカーボン/陰イオン交換固相カートリッジについては、ENVI-Carb™ II/PSASPE と ENVI-Carb/NH₂ がクリーンアップによく用いられている。この時の溶出溶媒として、アセトニトリル・トルエンの混液を用いるが、溶出溶媒の混合割合をアセトニトリル：トルエンを 8：0 から 4：4 まで 5 段階に条件を変えて添加回収試験を行った。両固相カートリッジのコンディショニングは通液する組成の液 10 mL を用

い、添加する農薬混合標準液は Bond Elut C18 の時と同様に作成した分析対象物質 118 種類各 2 mg/L のアセトニトリル溶液 40 μ L を、通液する溶出溶媒 4 mL に添加して各固相カートリッジに負荷した。固相カートリッジは各組成のアセトニトリル・トルエン混合溶媒 26 mL を用いて溶出した。溶出液は Bond Elut C18 の時と同様に濃縮操作とメタノールへの転溶・希釈・濾過を行い、LC-MS/MS で測定を行った。

2. 抽出条件の検討

試料からの抽出にはアセトニトリルを用いているが、通知⁶⁾の食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法によると、穀類、豆類及び種実類の抽出には、試料に水を加え、15 分間又は 30 分間放置してからアセトニトリルを加えてホモジナイズを行うとある。この時の水分添加について、最適な条件を検討した。当センターで行っている独自法では、水 10 mL を添加して 15 分静置後、アセトニトリル 10 mL を加えて抽出操作を行っている。今回、この方法に加えてアセトニトリルを 10 mL、15 mL、20 mL の 3 段階に変化させて添加し、その直後に水の添加量を 0 mL～10 mL まで 6 段階に変化させて添加し抽出操作を行い、水とアセトニトリルの最適な添加量を検討した。試料は小麦粉 5 g に固相カートリッジによるクリーンアップ条件と同じ分析対象物質 118 種類各 2 mg/L のアセトニトリル溶液 100 μ L を添加し、30 分静置したものを実験に用いた。アセトニトリル添加量の差があるため、Bond Elut C18 に負荷する抽出液は、添加したアセトニトリルの 40% とした。

3. 妥当性評価及び市販試料の調査

薄力小麦粉を用い、検討した条件下で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⁷⁾

に基づき、分析対象物質の添加濃度は低濃度 0.01 mg/kg、高濃度 0.05 mg/kg の 2 濃度、実施者 1 名が 2 併行 5 日間実施の条件で妥当性評価を行った。また、市販試料の調査として、小麦粉試料を薄力粉 3 種、強力粉 1 種の農薬含有量調査を行った。また、小麦粉に類似する穀物粉末の試料として、上新粉、もち粉、そば粉、きな粉、はったい粉についても市販品各 1 種ずつ農薬含有量調査を行った。更に、穀類を直接粉末にしたものではないが、穀類の澱粉を精製して製造した片栗粉とコーンスターチ各 1 種についても行った。

結 果

1. クリーンアップ条件

1) 農薬標準品での Bond Elut C18 の添加回収試験

Bond Elut C18 固相カートリッジの添加回収試験の結果、所定の条件で回収率 70～120% を満たさなかった農薬は、Benfuracarb, Carbosulfan, Dimethirimol, Fenpropimorph, (*E*)-Ferimzone, (*Z*)-Ferimzone, Imazalil, Pymetrozine, Spinosyn A, Spinosyn D, Thiabendazole, Thiodicarb, Triflumizole metabolite, Triticonazole の 14 種であった。

2) ENVI-Carb™ II/PSA SPE と ENVI-Carb/ NH₂ の溶出溶媒

グラファイトカーボン/陰イオン交換固相カートリッジからの溶出溶媒の組成と所定の回収率を満たした分析対象物質の数を表 3 及び表 4 に示す。両固相カートリッジとも、アセトニトリル：トルエンが 8：0 ではカートリッジに補足されて回収出来ない農薬が多かったが、トルエンを混合するとカートリッジから溶出する農薬が増え、アセトニトリル：トルエンが 6：2 から 4：4 までの間は回収出来る農薬数はほぼ同じで

表 3 ENVI-Carb™ II/PSA での溶出溶媒の組成（アセトニトリル：トルエン）と
所定の回収率を満たした分析対象物質数

アセトニトリル：トルエン	8：0	7：1	6：2	5：3	4：4
ENVI-Carb™ II/PSAのみ 回収率 70～120%	61	98	109	108	111
Bond Elut C18+ENVI-Carb™ II/PSA 回収率 70～120%	42	70	87	86	88
Bond Elut C18+ENVI-Carb™ II/PSA 回収率 80～120%	7	6	47	19	42

表 4 ENVI-Carb/NH₂ での溶出溶媒の組成（アセトニトリル：トルエン）と
所定の回収率を満たした分析対象物質数

アセトニトリル：トルエン	8：0	7：1	6：2	5：3	4：4
ENVI-Carb/NH ₂ のみ 回収率 70～120%	58	103	112	113	114
Bond Elut C18+ENVI-Carb/NH ₂ 回収率 70～120%	47	86	89	91	91
Bond Elut C18+ENVI-Carb/NH ₂ 回収率 80～120%	3	48	20	33	17

表5 アセトニトリル及び水の添加量と回収率 70～120%を満たした分析対象物質数

水添加量[mL]	0	2	4	6	8	10	10※
アセトニトリル添加量10 mL	-	-	106	107	101	105	103
アセトニトリル添加量15 mL	89	-	106	108	104	104	105
アセトニトリル添加量20 mL	85	109	108	109	105	107	105

10※は水10 mL添加後15分静置してアセトニトリルを添加

あった。ENVI-Carb™ II/PSA SPE と ENVI-Carb/NH₂ の農薬回収率の結果からは、固相カートリッジに通液するアセトニトリル：トルエンは6：2から4：4の任意の比率で良いと思われた。しかし、ロータリーエバポレーターでの濃縮は既定条件下ではアセトニトリル：トルエンは8：0から6：2までは6分前後で完了するが、これよりトルエン濃度が高い5：3と4：4では6分以降溶媒の除去が進行せず濃縮困難であった。このため、ルーチン分析で実用的な条件としてアセトニトリル：トルエン比6：2(3：1)の条件を採用した。

ENVI-Carb™ II/PSA SPE と ENVI-Carb/NH₂ の比較では、それぞれ単独では回収出来る分析対象物質数に大きな差は見られなかったが、Bond Elut C18 と組み合わせた場合について考察した。各農薬について、クリーンアップの第一段階である Bond Elut C18 使用時の回収率に第二段階である ENVI-Carb™ II/PSA SPE 又は ENVI-Carb/NH₂ 使用時の回収率を掛け合わせるにより一連のクリーンアップ操作の回収率を推測した。これは、例えば個々のカートリッジで仮に80%の回収率が得られたとしても、二段階組み合わせると実質の回収率は $0.8 \times 0.8 = 0.64$ となる事より推測した。さらに実試料では抽出効率等農薬回収率を低下させる要因が加わるため、二段階のクリーンアップ後実質回収率を80～120%と条件を厳しくして所定の回収率が得られる農薬数を比較したところ、ENVI-Carb™ II/PSA SPE は47種類、ENVI-Carb/NH₂ は20種類となり、実試料では ENVI-Carb™ II/PSA SPE の方が多くの農薬を分析出来る可能性が高いため、こちらのカートリッジを用いる事とした。

2. 抽出条件について

アセトニトリル及び水の添加量と所定の回収率を満たした分析対象物質数の結果を表5に示す。データがない箇所は、アセトニトリルと水の添加量の組み合わせによっては、抽出操作後に必要量のアセトニトリルを採取出来ずデータが得られなかったことを示している。

抽出に使用するアセトニトリル添加量を10 mL, 15 mL, 20 mL に変化させた結果、所定の回収率を満た

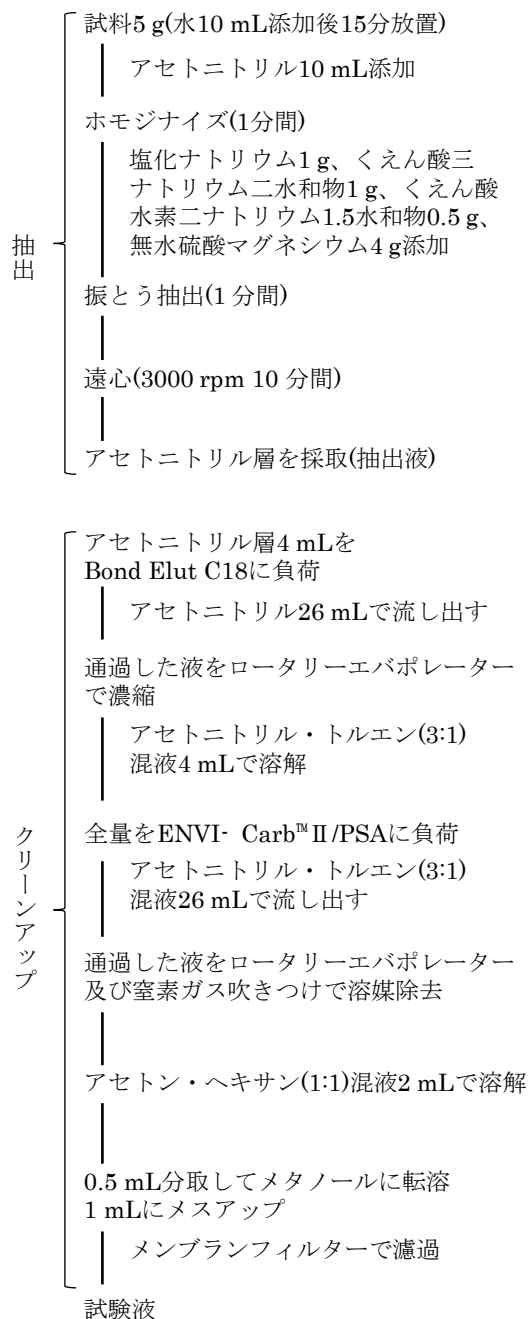


図 前処理フロー

す農薬数は変わらなかったため、試薬使用量が少ない10 mLとした。水添加量が0 mLの場合、回収率70～120%を満たす農薬数は85～89種であった。水を添加した場合は100種以上の農薬で回収率を満たすので、

水の添加は有効であると言える。また、水添加量については、データを得ることが出来た 4 mL~10 mL の範囲では、所定の回収率を得られた農薬数の変動は小さく、水の有無が農薬回収率に大きく関与した。

抽出操作自体の回収率を模した試験として、超純水に農薬混合標準液を添加した模擬試料を作成した。ここに図の前処理フローに従いアセトニトリル 10 mL を加えて 1 分間振とう後、塩類を添加して再度振とうして、アセトニトリル層を分取して測定した結果、Benfuracarb, Carbofuran, Carbosulfan については

回収率 70~120%の範囲外となり、測定不可能であった。

これらの結果より、前処理方法を図の前処理フローに示すとおり決定した。

3. 妥当性評価及び市販試料の調査

結果を表 6 に示す。ガイドラインの真度・併行精度・室内精度を満たした物質を○、満たさなかった物質を×で示す。小麦粉試料では 105 種類の分析対象物質が妥当性評価をクリアした。

市販試料の調査結果は検査に用いた検体全ての種

表 6 薄力小麦粉中の残留農薬検査方法の妥当性評価結果

分析対象物質名	結果	分析対象物質名	結果	分析対象物質名	結果
3-Hydroxycarbofuran	○	Cyprodinil	○	Monolinuron	○
Abamectin Bla	×	Daimuron	○	Naproanilide	○
Acibenzolar-S-methyl	○	Diflubenzuron	○	Novaluron	○
Aldicarb	○	Dimethirimol	○	Oryzalin	○
Aldoxycarb	○	(E)-Dimethomorph	○	Oxabetrinil	○
Ametryn	○	(Z)-Dimethomorph	○	Oxamyl	○
Amitraz	×	Diuron	○	Oxaziclomefone	○
Anilofos	○	Epoxiconazole	○	Oxycarboxin	×
Azamethiphos	×	Ettoxazole	○	Pencycuron	○
Azinphos-methyl	○	Fenamidone	○	Pentoxazone	○
Azoxystrobin	○	Fenoxaprop-ethyl	○	Phoxim	○
Barban	○	Fenoxycarb	○	Pirimicarb	○
Benalaxyl	○	Fenpropimorph	○	Prometryn	○
Bendiocarb	○	(E)-Fenpyroximate	○	Propaquizafop	○
Benfuracarb	×	(Z)-Fenpyroximate	○	Pymetrozine	×
Benzofenap	○	(E)-Ferimzone	○	Pyraclostrobin	○
Boscalid	○	(Z)-Ferimzone	×	Pyrazolynate	×
Bromacil	○	Flamprop-methyl	○	Pyrazophos	○
Butafenacil	○	Fluazuron	○	Pyrifthalid	○
Carbaryl	○	Flufenacet	○	Pyrimethanil	○
Carbetamide	○	Flufenoxuron	○	Quizalofop-ethyl	○
Carbofuran	×	Fluridone	○	Silafluofen	○
Carbosulfan	×	Furametpyr	○	Simeconazole	○
Carfentrazone-ethyl	×	Furathiocarb	○	Spinosyn A	○
Carpropamid	○	Hexaflumuron	○	Spinosyn D	○
Chlorbufam	○	Hexythiazox	○	Tebufenozide	○
Chlorfluazuron	○	Imazalil	○	Tebuthiuron	○
Chloridazon	○	Imidacloprid	○	Teflubenzuron	○
Chloroxuron	○	Indanofan	○	Tetrachlorvinphos	○
Chromafenozide	○	Indoxacarb	○	Thiabendazole	○
Clodinafop-propargyl	○	Iprovalicarb	○	Thiacloprid	○
Clofentezine	○	Isoxaflutole	×	Thiamethoxam	○
Cloquintocet-mexyl	○	Linuron	○	Thiodicarb	×
Clothianidin	○	Lufenuron	○	Trifloxystrobin	○
Cumyluron	○	Mefenpyr-diethyl	○	Triflumizole	○
Cyazofamid	○	Mepanipyrim	○	Triflumizole metabolite	○
Cycloate	○	Methabenzthiazuron	○	Triflumuron	○
Cycloprothrin	○	Methiocarb	○	Triticonazole	○
Cyflufenamid	○	Methomyl	○		
Cymoxanil	○	Methoxyfenozide	○		

類で、残留農薬濃度は 0.01 mg/kg 未満であった。

考 察

抽出操作時の水添加量については、水添加量が 10 mL 以下の場合、通知^⑥のように水を先に添加して一定時間経過後にアセトニトリルを加えず、アセトニトリルを加えた直後に水を添加する順に操作を行った。この理由は、水添加量が少ない場合、先に水を添加すると小麦粉試料が水を吸い込み、試料全体に均質に水が行き渡らないことと、水を含んだ試料が塊となり、次にアセトニトリルを入れても上手くホモジナイズ出来ず抽出操作が困難であったためである。水添加量が 10 mL の場合、水添加後 15 分間静置とアセトニトリルと水をほぼ同時に添加した 2 つの条件下であまり差が出なかったことと、水添加量を段階的に変えた実験で水 0 mL 以外の条件で添加回収出来た農薬数に大きい変化がないことから、水の有無自体が添加回収に影響すると言える。

市販の小麦粉及び乾燥粉末試料について、今回対象とした農薬については全て 0.01 mg/kg 未満であった。今後、今回検討を行っていないガスクロマトグラフ質量分析計で測定する農薬についても検討を行い、対象とできる農薬数を増加していきたいと考える。

謝 辞

本研究は、公益財団法人大同生命厚生事業団より地域保健福祉研究助成を受けて行っており、大同生命厚生事業団及び関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 小鍛治好恵, 富澤早苗, 上條恭子, 他:食衛誌, 64, 246-252 (2023)
- 2) 岡部亮, 柿本洋一郎, 青柳光敏:北海道立衛生研究所報, 69, 47-50 (2019)
- 3) 山口玲子:千葉市環境保健研究所年報, 22, 63-66 (2015)
- 4) 山口玲子:千葉市環境保健研究所年報, 28, 74-78 (2021)
- 5) 永山敏廣, 真木俊夫, 観公子, 他:食衛誌, 30, 438-443 (1989)
- 6) 医薬食品局食品安全部長通知「食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」, 食安発第 0124001 号(2005)
- 7) 医薬食品局食品安全部長通知「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について」, 食安発第 1115001 号 (平成 22 年 12 月 24 日一部改正) (2010)

奈良県における薬剤耐性菌の検出状況（2024 年）

足立有彩・大西航平・井ノ上美紅・築山結衣・倉井悠貴・佐伯美由紀・田邊純子

Detection of the Antimicrobial-Resistant Bacteria in Nara Prefecture (2024)

Arisa ADACHI・Kohei ONISHI・Miku INOUE・Yui TSUKIYAMA・Yuki KURAI・Miyuki SAEKI
and Sumiko TANABE

緒 言

薬剤耐性菌とは、高濃度の抗菌薬存在下でも増殖が可能となった細菌であり、その感染症の拡大は世界的な問題となっている。

カルバペネム耐性腸内細菌目細菌（carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE）は、メロペネムなどのカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対して耐性を示す腸内細菌目細菌の総称である。カルバペネム系薬剤は、グラム陰性菌による重篤な感染症の治療において最も重要な抗菌薬である。

バンコマイシン耐性腸球菌（vancomycin-resistant Enterococci : VRE）は、バンコマイシンに対して耐性を示す腸球菌である。腸球菌は、セフェム系薬剤やカルバペネム系薬剤、アミノグリコシド系薬剤に自然耐性を持ち、バンコマイシンは腸球菌感染症の治療において極めて重要な抗菌薬である。

CRE 及び VRE は、それぞれの菌に対し重要な抗菌薬に耐性を持つため、これらによる感染症では治療が困難となることが多い。

CRE 感染症及び VRE 感染症は、感染症法の五類全数把握対象疾患に指定されており、2017 年 3 月の厚生労働省通知¹⁾において、感染症として届出があった患者から分離された菌株については、地方衛生研究所等で試験検査を実施することが明記されている。これに基づき、当該菌株は、保健所等の協力のもと当センターに搬入され、CRE 感染症についてはβ-ラクタマーゼ産生性及びβ-ラクタマーゼ遺伝子の検査、VRE 感染症についてはバンコマイシン耐性遺伝子の検査を実施している。

今回、2024 年 1 月から 2024 年 12 月に、奈良県で届出された CRE 感染症及び VRE 感染症の患者由来菌株について、検査を実施し、結果をまとめたので報告する。

方 法

1. 材料

2024 年 1 月から 2024 年 12 月までの間に、奈良県内の医療機関において CRE 感染症または VRE 感染症として届出された患者から分離され、当センターに搬入された CRE 39 株、VRE 11 株について検査を実施した。同一患者由来で複数株が搬入された場合は、同一菌種では 1 株のみ、異なる菌種ではそれぞれについて検査を実施した。患者情報は発生届に基づく。

2. CRE

1) β-ラクタマーゼ産生性確認試験

ディスク法により、β-ラクタマーゼ阻害剤（メルカプト酢酸ナトリウム、ボロン酸、クラブラン酸、スルバクタム及びクロキサシリン）を用い、各種β-ラクタマーゼ（メタロ-β-ラクタマーゼ（MBL）、KPC 型カルバペネマーゼ（KPC）、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）及び AmpC β-ラクタマーゼ（AmpC））産生性確認試験を実施した。検査法は、病原体検出マニュアル²⁾及び研修配付資料³⁾に準拠した。

2) β-ラクタマーゼ遺伝子型確認試験

PCR 法により、カルバペネマーゼ遺伝子（IMP 型、NDM 型、KPC 型、OXA-48 型）、ESBL 遺伝子（TEM 型、SHV 型、CTX-M 型）及び AmpC 遺伝子（MOX 型、CIT 型、DHA 型、ACC 型、EBC 型、FOX 型）の保有の有無を確認した。CTX-M 型を検出した菌株については、CTX-M-1 group（G）、CTX-M-2 group（G）、CTX-M-9 group（G）の型別を実施した²⁻⁵⁾。

3) カルバペネマーゼ遺伝子の型別

カルバペネマーゼ遺伝子を検出した場合、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し²⁾、得られた配列を参照配列（GenBank Accession No. リスト：<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#>）と比較し、亜型の特定制を行った。

3. VRE

1) バンコマイシン耐性型の推定

ディスク法により、バンコマイシン（VCM）及びテイコプラニン（TEIC）の阻止円径を測定した。Clinical and Laboratory Standards Institute に基づき、耐性

(R), 中間型 (I), 感性 (S) を判定した⁶⁾. 耐性型の推定は, 病原体検出マニュアルに準拠した²⁾.

2) バンコマイシン耐性遺伝子の検出

PCR 法により *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/3* の保有の有無を確認した^{2,7)}.

3) 菌種同定

PCR 法により *ddl* 遺伝子を確認し, *Enterococcus faecium* 及び *Enterococcus faecalis* を同定した^{2,3,7)}.

4) MLST 型別

E. faecium と同定された株について, Multilocus Sequence Typing (MLST) を実施した. *E. faecium* の 7 つのハウスキーピング遺伝子 (*adk*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *purK*, *pstS*) の塩基配列をダイレクトシーケンスにより判読し⁸⁾, 各遺伝子の Allele Number を決定した. 7 領域の Allele Number の組み合わせにより, 各株の sequence type (ST 型) を特定した. Allele Number 及び ST 型の決定には, pubMLST のデータベースを参照した (https://pubmlst.org/big5db?db=pubmlst_efaecium_seqdef).

結 果

1. CRE

1) 菌株の由来

供試した 39 株の由来は, 性別では, 男性 25 株, 女性 14 株であった. 年齢は, 70~79 歳が最も多く, 70 歳以上の高齢者が 7 割以上を占めた (図 1).

検出部位は, 尿が 13 株と多く, 次いで血液 10 株, 喀痰 9 株で, その他は腹水, 胆汁などであった (図 2).

菌種別では, *Escherichia coli* が 13 株で最も多く, 次いで *Klebsiella aerogenes* が 11 株, *Enterobacter cloacae* complex が 8 株, *Klebsiella pneumoniae* が 5 株などであった (図 3).

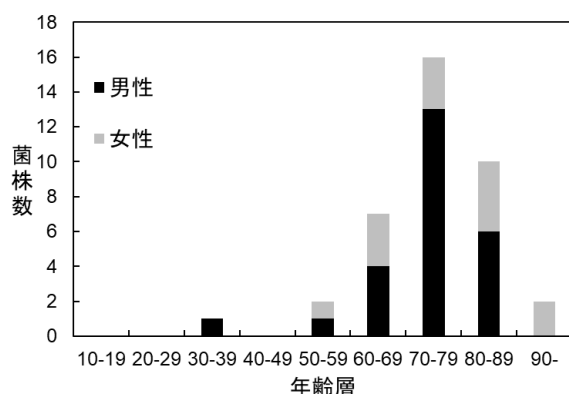


図 1 CRE の性別年齢分布

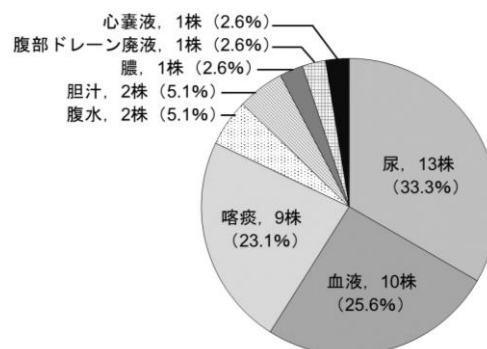


図 2 CRE の検出部位別内訳

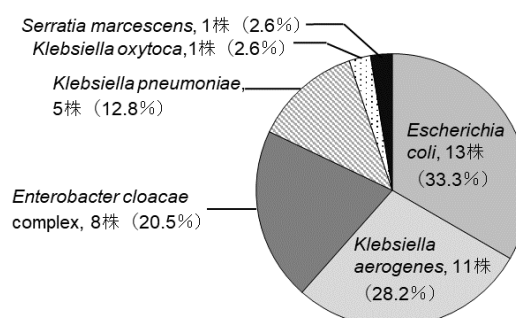


図 3 CRE の菌種別内訳

2) β -ラクタマーゼ産生性確認試験

MBL 産生性確認試験では 16 株, KPC 産生性確認試験では 2 株が陽性であった. ESBL 産生性確認試験では 7 株が陽性であり, そのうち 4 株は CTX-M 型, 3 株は判定保留となった. AmpC 産生性確認試験では, 15 株が陽性となった (表 1).

3) β -ラクタマーゼ遺伝子型確認試験

カルバペネマーゼ遺伝子は, IMP 型を 15 株, NDM 型を 1 株から検出した.

ESBL 遺伝子は, TEM 型を 5 株, SHV 型を 6 株, CTX-M-1G を 6 株, CTX-M-2G を 14 株, CTX-M-9G を 7 株から検出した. CTX-M 型を検出したが, CTX-M-1G, M-2G, M-9G のいずれにも該当しない菌株が 1 株あった. 複数の ESBL 遺伝子を保有する菌株が 13 株あった.

AmpC 遺伝子は, EBC 型を 5 株, ACC 型, DHA 型, CIT, 及び FOX 型をそれぞれ 1 株から検出した. 複数の AmpC 遺伝子を保有する菌株が 1 株あった.

いずれの薬剤耐性遺伝子も検出されなかった菌株が 12 株あった (表 1).

4) カルバペネマーゼ遺伝子の型別

IMP 型遺伝子を検出した 15 株のうち, 14 株が IMP-6, 1 株が IMP-1 であった. NDM 型遺伝子を検出した 1 株は, NDM-5 であった (表 1).

表1 CRE の検査結果

番号	菌種	βラクタマーゼ産生性確認試験※ ¹				βラクタマーゼ遺伝子型確認試験※ ²			
		カルバペネマーゼ		ESBL	AmpC	カルバペネマーゼ		ESBL	AmpC
		MBL	KPC						
1	<i>Escherichia coli</i>	+	—	CTX-M型	—	IMP型 (IMP-6)	TEM型, CTX-M-1G, CTX-M-2G	—	—
2		+	—	—	—	IMP型 (IMP-6)	CTX-M-2G, CTX-M-9G	—	—
3		—	—	判定保留	+	—	CTX-M-9G	—	DHA型
4		+	—	—	—	IMP型 (IMP-6)	CTX-M-2G	—	—
5		+	—	—	—	IMP型 (IMP-6)	TEM型, CTX-M-1G, CTX-M-2G	—	—
6		—	—	判定保留	—	—	CTX-M-9G	—	—
7		+	—	—	—	IMP型 (IMP-6)	CTX-M-2G, CTX-M-9G	—	—
8		+	—	—	—	IMP型 (IMP-6)	CTX-M-2G, CTX-M-9G	—	—
9		+	—	—	—	NDM型 (NDM-5)	—	—	CIT型, FOX型
10		+	—	—	—	IMP型 (IMP-6)	CTX-M-2G, CTX-M-9G	—	—
11		+	—	—	—	IMP型 (IMP-6)	CTX-M-2G	—	—
12		+	—	—	—	IMP型 (IMP-6)	CTX-M-1G, CTX-M-2G	—	—
13		+	—	—	—	IMP型 (IMP-6)	CTX-M-2G	—	—
14	<i>Klebsiella aerogenes</i>	—	—	—	+	—	—	—	—
15		—	—	—	+	—	—	—	—
16		—	—	—	—	—	—	—	—
17		—	—	—	+	—	—	—	—
18		—	—	—	+	—	—	—	—
19		—	+	—	—	—	—	—	—
20		—	—	CTX-M型	+	—	CTX-M-9G	—	—
21		—	—	—	+	—	—	—	—
22		—	—	—	+	—	—	—	—
23		—	—	—	—	—	TEM型, SHV型, CTX-M-1G	—	—
24		—	+	—	—	—	—	—	—
25	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	—	—	—	+	—	—	—	ACC型
26		—	—	—	+	—	—	—	EBC型
27		—	—	—	—	—	—	—	EBC型
28		—	—	—	+	—	—	—	EBC型
29		—	—	—	+	—	—	—	EBC型
30		—	—	—	+	—	—	—	EBC型
31		—	—	—	+	—	—	—	—
32		—	—	—	+	—	—	—	—
33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	—	—	—	IMP型 (IMP-6)	SHV型, CTX-M-2G	—	—
34		+	—	—	—	IMP型 (IMP-6)	SHV型, CTX-M-2G	—	—
35		+	—	CTX-M型	—	IMP型 (IMP-6)	TEM型, SHV型, CTX-M-1G, CTX-M-2G	—	—
36		+	—	—	—	IMP型 (IMP-6)	SHV型, CTX-M-2G	—	—
37		—	—	CTX-M型	—	—	TEM型, SHV型, CTX-M-1G	—	—
38	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	—	判定保留	—	IMP型 (IMP-1)	CTX-M型 (group不明)	—	—
39	<i>Serratia marcescens</i>	—	—	—	—	—	—	—	—

※1: βラクタマーゼ阻害剤による阻害効果が認められたものを+, 認められなかったものを-とした。

なお, ESBLについては阻害パターンから推定される耐性型を記載した。

※2: 遺伝子が検出されたものはその遺伝子型を記載し, 検出されなかったものは-とした。

2. VRE

1) 菌株の由来

供試した 11 株の由来は, 性別では男性 5 株, 女性 6 株であった。年齢は, 60 代 1 株, 70 代 6 株, 80 代 3 株, 90 代 1 株であった。検出部位は血液が 4 株, 尿が 4 株, 胆汁, 膿及び便が各 1 株であった。

2) バンコマイシン耐性型の推定

11 株すべてが VCM 及び TEIC に対して耐性を示した。このことから, 耐性遺伝子は *vanA* を保有することが推定された (表 2)。

3) バンコマイシン耐性遺伝子の検出

11 株すべてが *vanA* 遺伝子を保有していた (表 2)。

4) 菌種同定

11 株すべてが *E. faecium* であった (表 2)。

5) MLST 型別

ST78 が 9 株, ST17 が 2 株であった (表 2)。

表2 VRE の検査結果

番号	耐性型の推定		耐性遺伝子	菌種	ST型
	VCM	TEIC			
1	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST78
2	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST17
3	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST17
4	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST78
5	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST78
6	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST78
7	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST78
8	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST78
9	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST78
10	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST78
11	R	R	<i>vanA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	ST78

考 察

CRE 39 株のうち, カルバペネマーゼ遺伝子を検出したのは 16 株 (41.1%) であった。菌種別に見ると, *E. coli* では 13 株のうち 11 株, *K. pneumoniae* は 5

株のうち4株がカルバペネマーゼ遺伝子を保有していた。奈良県では、例年この2菌種においてカルバペネマーゼ遺伝子の検出が多く、これまでの傾向と一致していた。また、カルバペネマーゼ遺伝子を保有する菌株は、他にもESBL遺伝子やAmpC遺伝子を合わせて保有していた。

カルバペネマーゼ遺伝子型は16株のうち15株がIMP型、1株がNDM型であった。IMP型は国内で最も多く検出されているのに対し、NDM型は海外で多く検出されている。奈良県におけるNDM型の検出は今回が初めてであり、県内への定着が懸念される。カルバペネマーゼ遺伝子の型別の結果、IMP-6が14株、IMP-1が1株、NDM-5が1株検出された。IMP型には地域特性があり、IMP-6は西日本で多く検出されている⁹⁾。当センターにおいても例年IMP-6の検出が多く¹⁰⁾、今回の結果はこれまでの傾向と同様であった。

一方、カルバペネマーゼ遺伝子を保有していない菌株は、23株(59.0%)のうち、ディスク法によるAmpC産生性確認試験で陽性となった株が15株存在し、菌種別に見ると*K. aerogenes*, *E. cloacae* complexに多く認められた。これらの菌種はAmpC遺伝子を染色体にコードするとされており¹¹⁾、本結果もそれを裏付けるものであった。また、AmpC産生性が陽性であったにもかかわらず、AmpC遺伝子が検出されなかった株については、今回対象とした6種類以外のAmpC遺伝子を保有している可能性が考えられた。

VREは近年、全国的に届出数が増加しており、奈良県でも毎年数例が報告されている。当センターに搬入された11株はすべて*vanA*遺伝子を保有する*E. faecium*であった。全国的にもVRE感染症として届出されている株のほとんどが*E. faecium*であり、奈良県においても同様の傾向を示した。さらに、MLST型別の結果、これら11株はST78及びST17に型別され、いずれも世界的な流行株とされるClonal Complex

17に分類された。

今後も薬剤耐性菌検査を継続し、得られた情報を関係機関に還元し、院内感染や市中における蔓延の防止等に貢献していきたい。

謝 辞

今回の調査を実施するにあたり、菌株を提供して頂きました医療機関、並びに保健所等関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 健康局結核感染症課長通知「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)感染症等に係る試験検査の実施について」、健感発 0328 第4号、(平成29年3月28日)
- 2) 国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌 Ver2.1」(2024年3月)
- 3) 国立感染症研究所細菌第二部第一室「薬剤耐性菌研修会資料 Ver.3」(2016年9月)
- 4) Xu, L, Ensor, V, Gossain, S, *et al.*: *J. Medical Microbiology*, **54**, 1183-1187 (2005)
- 5) Monstein, H, Ostholm-Balkhed, A, Nilsson, M, *et al.*: *APMIS*, **115**, 1400-1408 (2007)
- 6) CLSI M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, **34** (2024)
- 7) 国立感染症研究所「薬剤耐性菌解析機能強化技術研修会 資料」(2009)
- 8) H Billström: *Karolnska Institutet.*, 1-61 (2008)
- 9) 国立感染症研究所:病原微生物検出情報, **44**, 130-131 (2023)
- 10) 井上健太郎, 井ノ上美紅, 築山結衣, 他: 奈良県保健研究センター年報, **56**, 55-57 (2021)
- 11) 原田壮平: 日本臨床微生物学会雑誌, **31** (4), 1-10 (2021)