

蚊・小バエに対する無調製・無標準定量法の開発

世良耕一郎¹、鈴木弘行²、沢辺京子³、駒形 修³、
後藤祥子⁴、高橋千衣子⁴、齋藤義弘⁴

¹岩手医科大学医歯薬総合研究所高エネルギー医学研究部門（サイクロトンセンター）
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

²千葉大学大学院薬学研究院
260-8675 千葉市中央区亥鼻 1-8-1

³国立感染症研究所昆虫医科学部
162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

⁴日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

1 はじめに

近年、蚊が媒介する感染症の流行が世界的問題となっている。それらは、コガタアカイエカが媒介する日本脳炎、ハマダラカが媒介するマラリア、そしてネッタイシマカが媒介するデング熱、黄熱病、西ナイル熱などである。これらは従来特定の地域に限定されていたが、航空ルートの普及、地球温暖化などの影響を受け、一挙に世界的に流行する兆しを見せている。日本脳炎に関しては、日本固有のウィルス株に加え、アジア各地の固有株が日本に侵入しており、それを運ぶのが長距離移動型昆虫や渡り鳥であると言われている。注目すべきはネッタイシマカであり、本来日本には生息していないこの種の侵入例が近年多数報告され、2013年には国内でボウフラから羽化したことも確認されている¹⁾。さらに懸念されることは、関東以西に広く生息し我国で最もポピュラーな蚊の一つでもあるヒトスジシマカがネッタイシマカとほぼ同じ遺伝子を持ち、ウィルスが存在すればデング熱や黄熱病ウィルスの conveyer になることである。事実、アメリカの CDC(Centers for Disease Control and Prevention) は、日本をデング熱の危険地帯に指定している。2013年には日本から帰国したドイツ人がデング熱と診断された例もあり²⁾ 危機は目前に迫っていたが、それは図らずも 2014年8月、国内初の感染者確認という形で証明された。

しかし日本に侵入した外来種の生態は全く分かっていない。どこで産卵・羽化し、成虫になった後どの程度の距離を移動するのか等の情報は適切な駆除を行うために不可欠なものである。だが外来種が捕獲される例は少なく、通常は一匹単位である。また在来種の生態も未知の部分が多い。蚊の重量はほぼ 1 mg 程度であり、通常の分析法では定量値を得ることが難しい。

小型バエの異常繁殖も、近年社会的問題となっている。2013年にはクロバネキノコバエが各地で異常繁殖し、学校給食のパンにも混入するなどの社会問題となった。直接感染症の伝搬には寄与しないが衛生上の問題があり、どこで幼虫が繁殖するかなどの生態を調べる必要がある。

これら小型昆虫体内の元素濃度はその成育環境を繁栄するものと推測され、元素分析はそれらの生態解明に貴重な情報を与えるものと期待される。しかしこれら微小昆虫の分析法は確立されていない。さらにこれら微小昆虫の部位別分析も貴重な情報をもたらすものと思われる。脚・翅中の元素濃度は環境に強く影響されると推定され、さらに胴は消化管を含むため食物の違いを反映することが期待される。さらに頭。胸などの主用部には、種の特徴が反映されるであろう。しかし全体で1 mgほどの蚊の各部の重量はさらに小さく、翅などは一枚で数 μg 程度であり、従来の方法では、定性分析は可能でも定量分析は不可能であった。

本研究においては、まず無調製の蚊に対する無標準定量法の開発を行う。また蚊の各部(頭+胸、腹、脚、翅)についても適用可能か否かの検討を行う。さらにそれを、小型ハエにも応用し、本法の他の微小昆虫に対する有効性を確認する。また、本法が他の生物試料に適用可能か否かを検討するため、乾燥重量で数10 μg ほどの一粒のタラコ試料への応用を試みる。さらに得られた結果により、感染症を媒介する蚊の生態解明に本法が有効であるか否かの検討を行う。

2 実験

2.1 試料採取と Target 作成

100匹以上のヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) が、千葉大学薬草園において「ヒト囷法」により採取され、オスメス、吸血の有無により分類された。ヒトスジシマカに関しては、全て天然のものが採取された。一方、自然における生息数の極めて少ないコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) に関しては、国立感染症研究所の研究室において室内飼育されているものを使用した。クロバネキノコバエ (*Bradysia praecox*) は、盛岡市内の一般家庭において70匹ほどが採取された。タラコは通常のマーケットで購入したものを使用した。

無調製試料は、これらの試料を4 μm prolene film 上に載せ、1% collodion 溶液で固定し、ターゲットとした。部位別試料に対しては、乾燥後部位を分け使用したが、頭部と胸部の分離は試料の破壊を伴うため難しく、頭・胸部として一緒に測定された。

一方、内部標準法適用試料に対しては、5~30 mg ほどの試料が集められ(脚・翅に関しては数10匹)通常の硝酸灰化・内部標準法^{3,4)}の調製過程に基づき調製が行われた。内部標準として、試料の重量に応じて1000~5000 ppm の In が添加され、10 μg ほどを4 μm prolene film 上に滴下し、乾燥させた後測定が行われた。

2.2 照射・測定条件

NMCCの小型サイクロトロンから引き出された2.90 MeVの陽子ビームは真空散乱槽に導かれる。5 mm ϕ のグラファイト製コリメータを通過し整形されたビームは薄いターゲットを衝撃する。通り抜けたビームはファラデーカップにより集められ、電流値が測定される。ビーム電流は試料の両に応じ15~100 nA、照射時間は1試料あたり10分ほどであった。発生したX線は2検出器同時測定システム^{5,6)}により測定され、重元素要検出器の吸収体として300 μm Mylar フィルムが用いられた。

3 微小の蚊ハエに対する無標準法

Fig. 1に2種の蚊、コバエに対するスペクトルを示す。300 μm Mylar が吸収体として用いられ、検出器1で測定された。互いに4.3~5.7 keVの領域のX線収量で規格化されている。また、4 μm prolene film からの連続X線は、クーロン数で規格化され差し引かれている。図から明らかなように、この領域の連続X線の形状は全試料に対してほぼ同一であり、主用元素の組成がほぼ同一であることを示している。この事実から、この領域の連続X線収量に対する指標元素(カリウム)のピーク収量の比をパラメ

ータとし、無標準法が適用可能であることが示唆される。

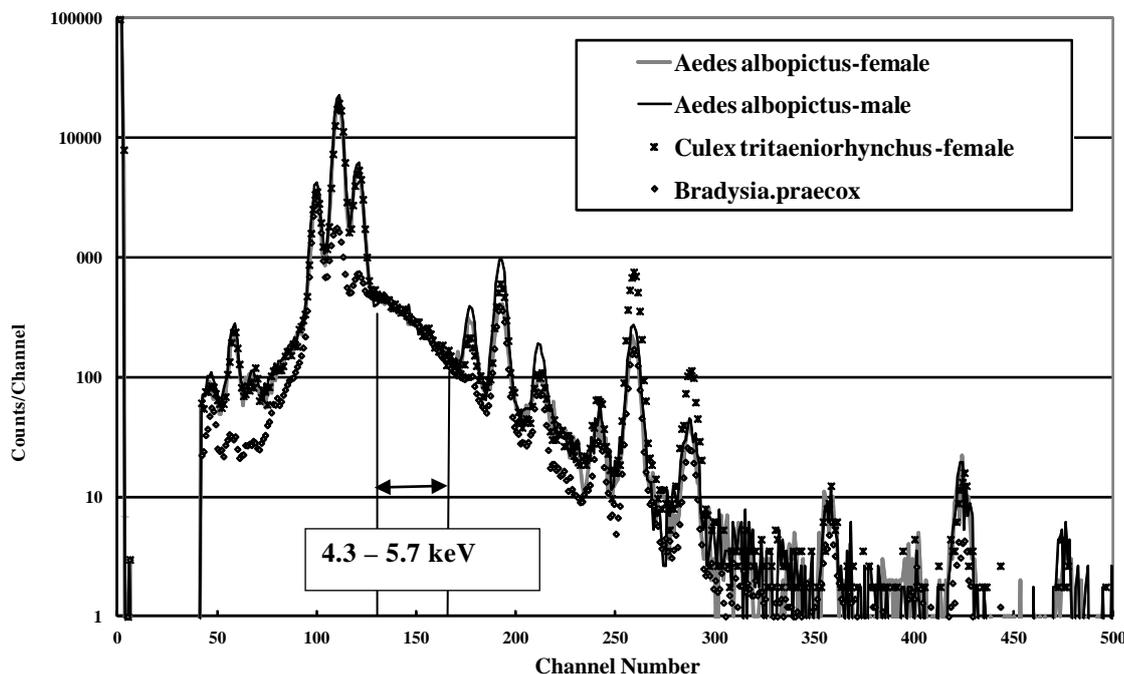


Fig 1. X-ray spectra of four species of small insects: *Aedes albopictus* female and male, *Culex tritaeniorhynchus* and small fly (*Bradysia.praecox*).

蚊・小型バエに対する無標準法の手順は、基本的に血清^{7,8)}、そして他の生物試料⁹⁻¹⁹⁾に対するものと同様であり、Fig. 2に示されている。このスペクトルは、ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) を丸ごと 2.9 MeV 陽子ビームで照射し、検出器 1 に 300 μm Mylar を吸収体として装着し得られたものである。図中に連続 X 線収量を積分するエネルギー領域が示されている。この 4.5-5.7 keV の領域の全収量から、電流値で規格化したバックグランドからの連続 X 線成分を差し引き、さらにその領域内のピーク収量を差し引いた値を試料からの正味の連続 X 線収量 = Y_{CX} とし、それに対する指標元素 s のピーク収量の比、 $R_s = Y_s/Y_{\text{CX}}$ が求められる。指標元素 s の濃度を求めるための変換係数 K_s は、以下の手順で求める。同等の試料 (20 mg 以上) を硝酸灰化法で処理し内部標準を加え、内部標準法を用いてまず指標元素濃度 C_s を求める。次に残りの試料をいくつか用い、無調製で試料を照射することにより R_s を求め、 $K_s = C_s/R_s$ から K_s が決定される。一旦変換係数 K_s が求められれば、個々の無調製の試料に対し R_s を求め、 $C_s = K_s \times R_s$ より指標元素濃度を求めることができる。今回は指標元素として軟組織^{16,17)} 体液^{18,19)} と同様 K が指定された。更に詳細な記述は、参考文献 7、8、及び 9-19 を参照されたい。

蚊に対する変換係数の決定は以下の手順で行われた。二種の蚊のメス数十匹の中からヒトスジシマカのメス 6 匹とコガタアカイエカのメス 4 匹を選び無調製で照射しそれぞれ R_s を求めた。残りの 30 匹ほどを合わせて硝酸灰化し、内部標準法で求めた K 濃度 (6850 ± 350 ppm) と R_s を比較することにより変換係数が求められた。Fig. 3 にその比較を示す。同じ条件下で採取された試料とはいえ、無調製で照射された試料は硝酸灰化を施した試料とは同一ではないため、平均値での比較が行われた。図から見られるように、生物にとり常に必須元素である K の値にも、かなりの個体差が存在することが分かる。しかし 10 匹中 7 匹までが、実験誤差の範囲内で内部標準法により求めた値と一致している。実験誤差としては、統計精度に依存する最小二乗 fitting の誤差の他に、検出効率や吸収体の透過率などの系統誤差も加わり、10%に近い値となる。

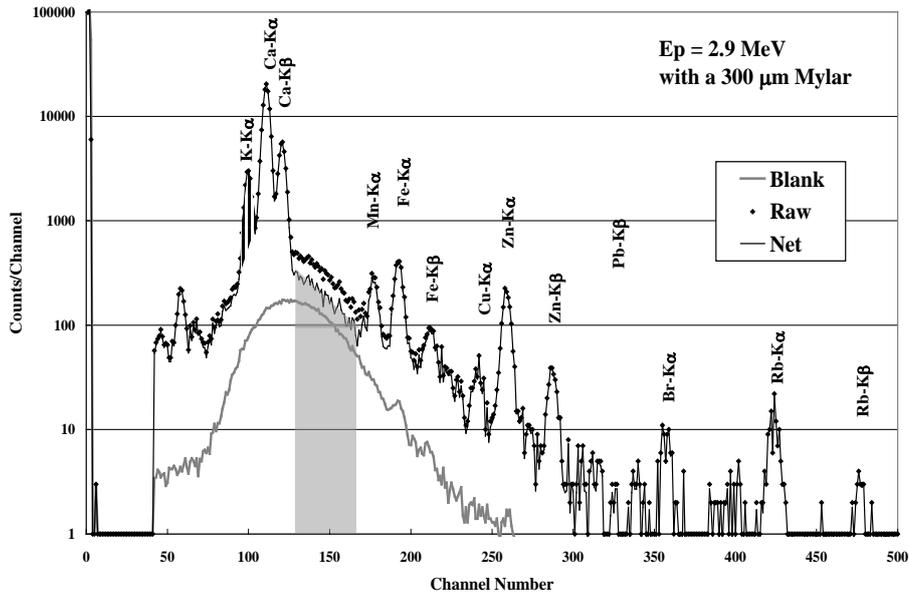


Fig. 2 Procedure for the standard-free method for small insect samples. All peak functions are subtracted from the spectrum in the region between 4.3-5.7 keV indicated by the shaded portion and the total yield of continuous X-rays Y_{cx} is obtained.

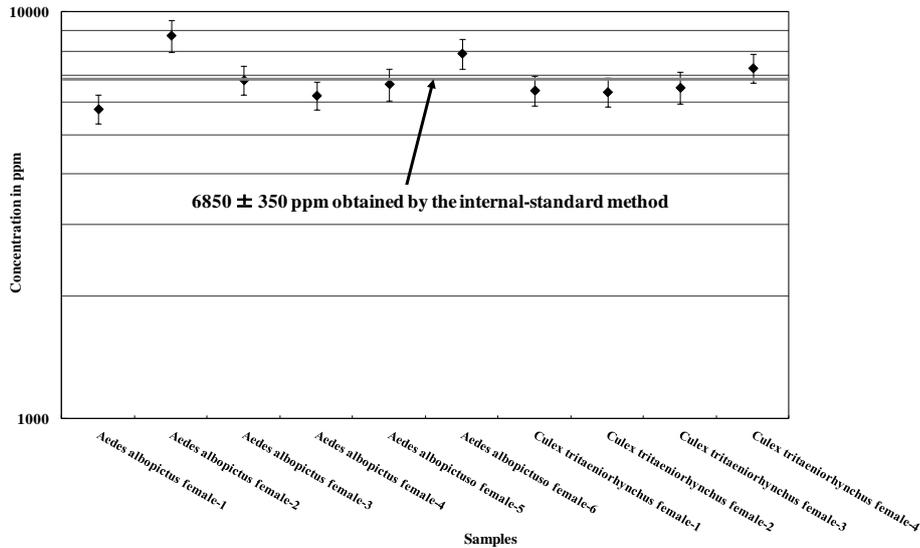


Fig. 3 Comparisons of the potassium concentrations for ten untreated mosquitoes obtained by the standard-free method and that obtained by the internal-standard method.

Fig. 3 の変換係数の決定は、両法に対し同一の試料が用いられたわけではなく、平均値の比較において行われた。そのためこの変換係数の精度は、複数回にわたり確認された。Fig. 4 にはヒトスジシマカ オスの対し Fig. 3 と同様の比較を行った結果を示す。硝酸灰化に使われた個体数は 20 匹ほど、無調製試料として 3 匹のオスが用いられた。Fig. 3 の 10 匹のメスに対して求められた変換係数を用い得られた K の値は、いずれも実験誤差の範囲内で内部標準法により得られた値と一致している。Fig. 5 には、二種の蚊のメス 4 匹に対し同様の比較を行った結果を示す。ここでは Fig. 3 とは別の数十匹の蚊が

用いられている。この場合も両法で得られた K 濃度はよく一致している。このように二種の蚊における多数試料のオスメスの結果が一致したことから、本法の多くの蚊試料に対する有効性が示された。

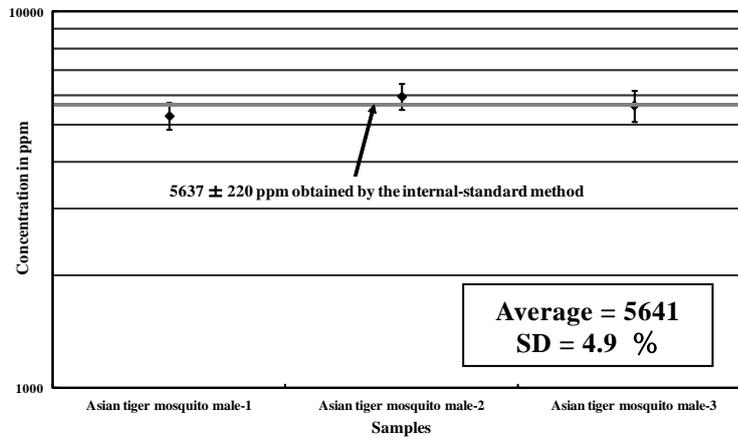


Fig. 4 Same comparisons as in Fig. 3 but for three male *Aedes albopictus*.

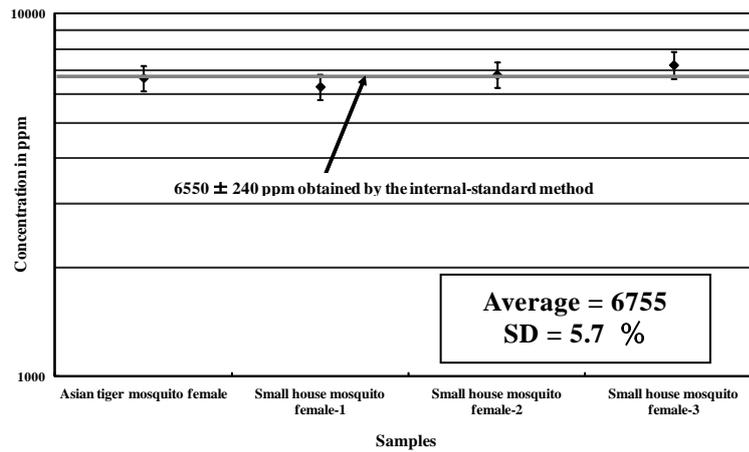


Fig. 5 Same comparisons as in Fig. 3 but for two species of four female mosquitoes.

次に、本法は蚊の各部位の定量分析に応用された。Fig. 6にはコガタアカイエカ一匹から採取された各部位のスペクトルを比較して示す。図から明確に確認できるように、4.5–5.7 keVの領域における連続 X 線の形状はほぼ完全に一致しており、このことから全身に対し確立された無標準法が、各部に対しても応用可能であることが分かる。脚部には Ca が多く含まれ、腹部には Zn や Mn が多いなど各部位における元素濃度は特徴的であるが、連続 X 線の形状に影響を及ぼすほどの元素組成変化ではないことが確認できた。

Fig. 7には、Fig. 3–5と同様の本法と内部標準法による K の値の比較を頭胸部に対して示す。乾燥した蚊においては、頭部と胸部を破損させることなく分離することは難しく、一部位として測定を行った。この場合も、硝酸灰化法には 30 匹ほどのヒトシジマカの部位が用いられた。全身に対し決定さ

れた変換係数を用いて得た無標準法の結果が、内部標準法による結果と良く一致し、このことから本法は頭胸部に対しても有効であることが確認できた。

Fig. 8には、Fig. 7と同様の比較を腹部に対して示す。同様に両法による結果はよく一致しており、本法が腹部に対しても有効であることが分かる。Fig. 9には同じく脚部に対する比較を示す。他の部位と比べCa濃度は極端に高いが、ビーム電流を落としてpileupを避ければ、連続X線の形状が他の部位と異なることはない。その事実はFig. 6で確認することができる。得られた結果は、内部標準法による結果と良く一致しており、脚部に対する本法の有効性も確認することができた。なお、硝酸灰化法へ供された試料はヒトスジシマカ 30 匹分、計 180 本ほどの脚であり、一方無標準法には、一匹から採取された 6 本の脚がまとめて 1 ターゲットとして供された。

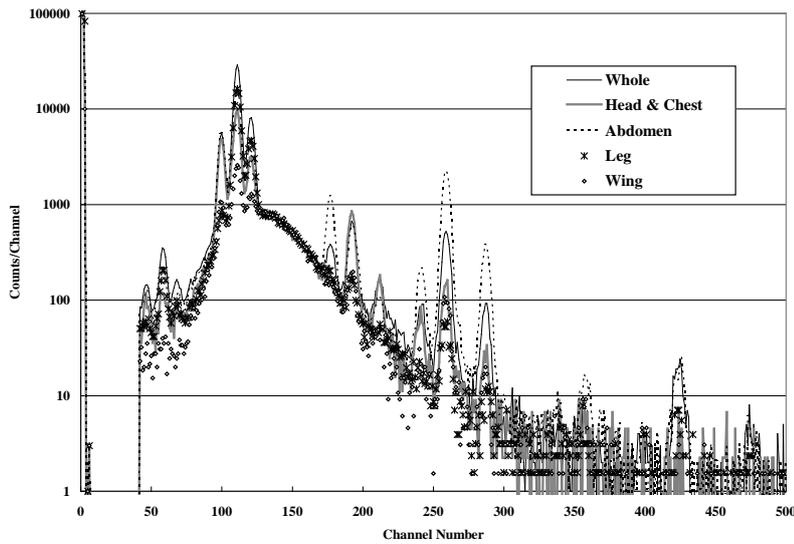


Fig. 6 X-ray spectra of five parts collected from a single *Aedes albopictus*.

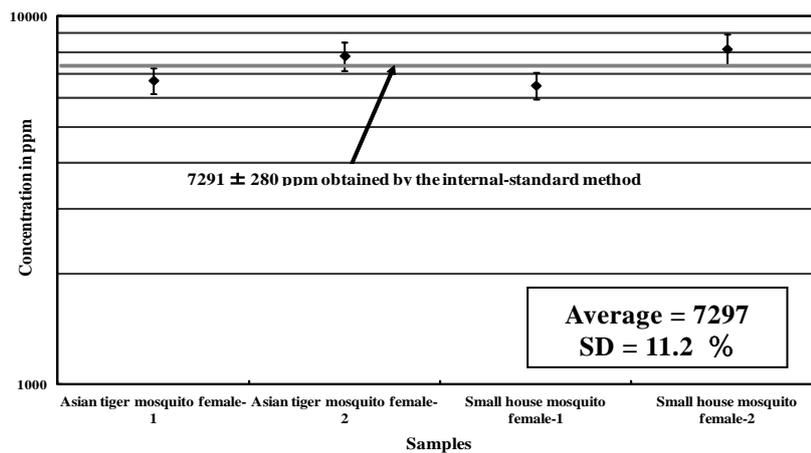


Fig. 7 Same comparisons as in Fig. 3 but for the head and the chest of the four *Aedes albopictus*, where the each sample was collected from a single mosquito. The average value of potassium concentration was obtained by the internal-standard method using samples collected from nearly 30 mosquitoes.

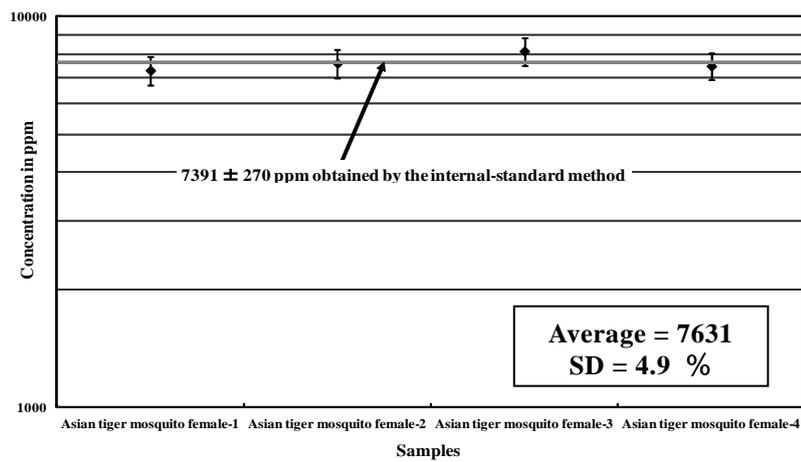


Fig. 8 Same comparisons as in Fig. 3 but for the abdomen collected from four *Aedes albopictus*.

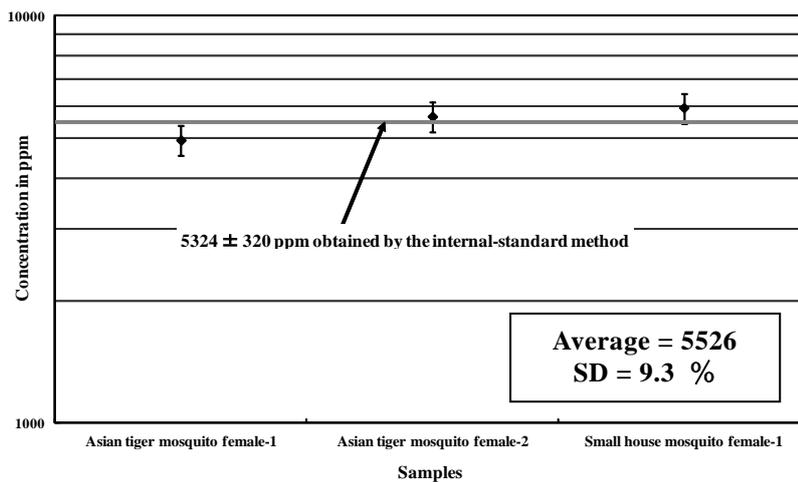


Fig. 9 Same comparisons as in Fig. 3 but for the leg collected from three mosquitoes.

一方、翅中の K、Ca 濃度は他の部位と比して極めて低く、また小さな翅は 2.5 μg ほどの重量であり極めて微量である。そのため特にバッキングからの連続 X 線の差引に際しては大きな誤差が伴うことが予想される。しかし Fig. 10 に見られるように平均値同士の比較では概ね一致しており、微小な翅に対する本法の有効性も確認されたと言える。この場合、硝酸灰化法に供された試料はヒトスジマカの翅 80 枚ほどであり、本無標準法には、2、3 匹から採取された翅 6 枚ほどが 1 ターゲットとして供された。

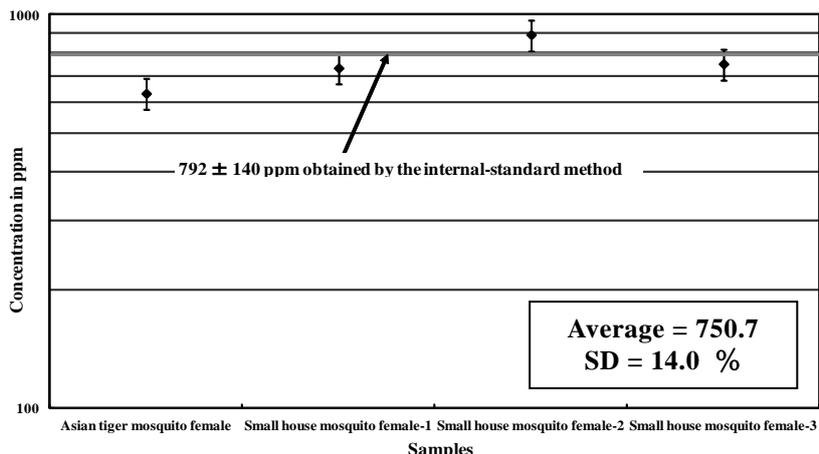


Fig. 10 Same comparisons as in Fig. 3 but for the wing collected from four mosquitoes.

次に、本法の他の試料に対する有効性を確認するため、クロバネキノコバエの全身に対し同様な比較が行われた。一試料は数 100 μg 程度の重量と推定され、30 匹ほどのハエがまとめられ硝酸灰化法に供せられた。また、6 匹の小型ハエが一匹ずつ無調製ターゲットとして作成された。Fig.11 にその結果が示されているが、個体差は認められるものの平均値の比較は非常によく一致している。同様の比較は 1 カ月後に別の 30 試料に対しても行われ、良い一致を再現することができた。このことから、本法は他の小さな昆虫に対しても有効であることが確認された。

さらに本法の有効範囲を確認するため、微小な生物試料であるタラコにも同様の比較を試みた。虫とタラコでは構造も組成も全く異なるが、連続 X 線の形状は平均原子番号がほぼ同じであれば大きく変わることは無い。そのため本法が有効であることが期待された。タラコはマーケットで市販されているものを用い、洗浄は行わず、乾燥重量で 30 mg ほどがまとめて硝酸灰化法で処理された。一方、無調製試料としては一粒ずつ 1 ターゲットが作成された。照射・測定・解析の条件は小型昆虫の場合と同様である。Fig.12 にその結果を示すが、全 6 試料とも、本法で求めた K 濃度は非常に良く内部標準法で求めた値と一致している。予想通り、虫の場合と比べ生活環境の差異などもなく、全試料がほぼ一致している。このことから、平均的原子番号がおよそ一致する多くの生物試料に対し、本法が有効であることが確認できた。

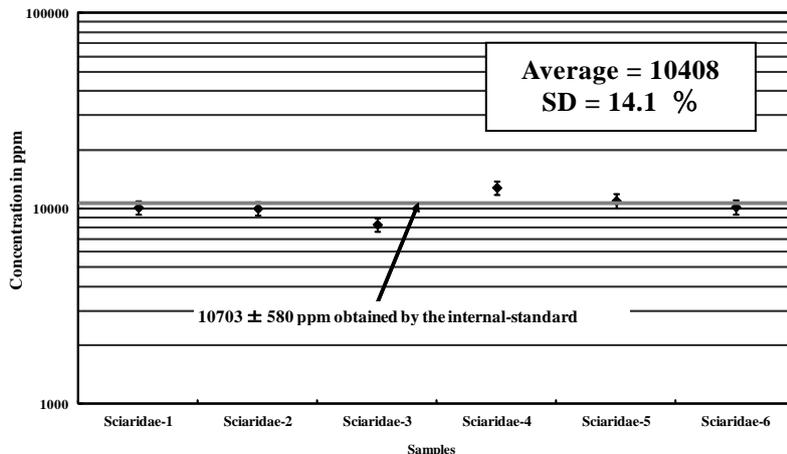


Fig. 11 Same comparisons as in Fig. 3 but for the whole body of *Bradysia.praecox*.

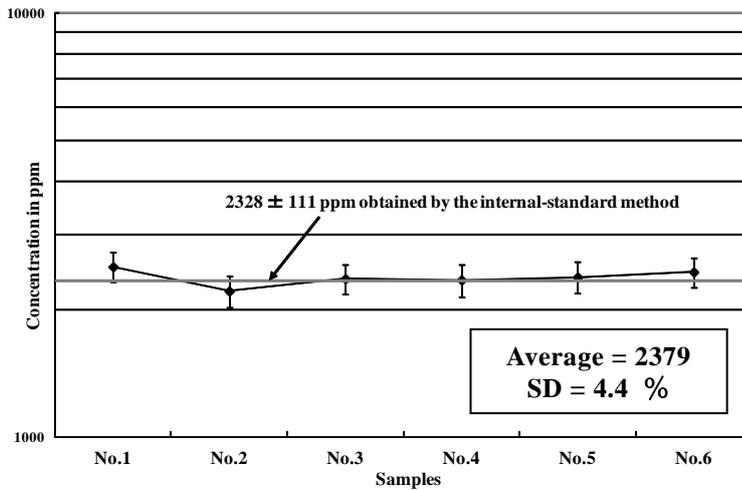


Fig 12. Same comparisons as in Fig. 3 but for eggs of Alaska pollock.

4 結果

Fig. 13 には、ヒトスジシマカの各部位別元素濃度を示す。いずれも無調製の試料を用い、本法により定量分析を行ったものである。図中に見られるように、脚部には Mg、P、Ca、Ni、Sr、Zr が他の部位よりも多く存在している。また先にスペクトル上で触れたように、腹部において Mn と Zn が突出する結果が得られた。さらに翅部においては多くの元素濃度が低く、特に P、S、K、Ca、Mn、Zn、Sr、Mo が低い濃度を示している。このように、各部が特徴的な元素組成を持つことが確認できた。同様の各部位の比較をコガタアカイエカに対し行った結果を Fig. 14 に示すが、ほぼ同様な特徴が再現されている。

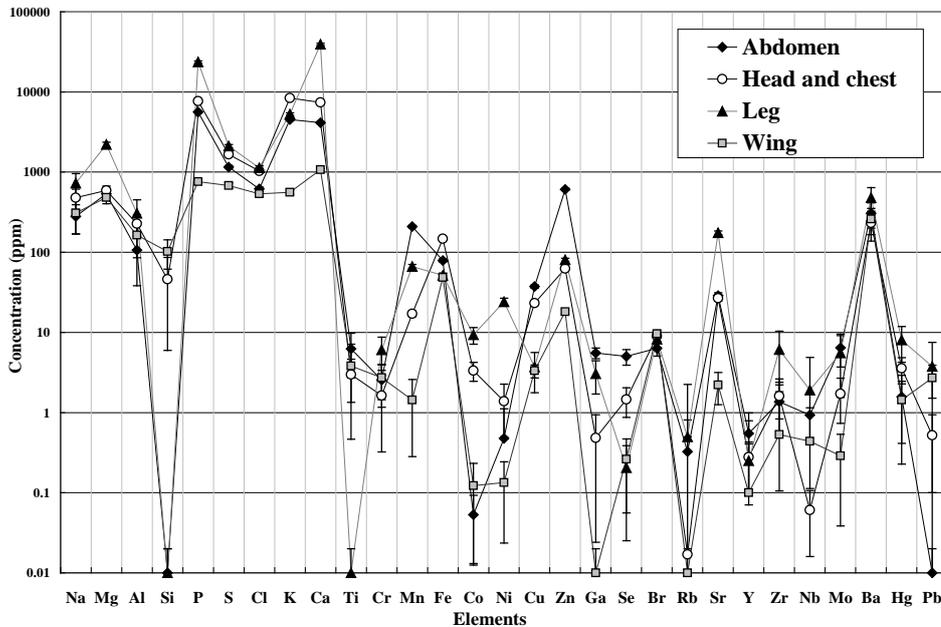


Fig 13. Elemental concentrations in *Aedes albopictus* for each part in the body.

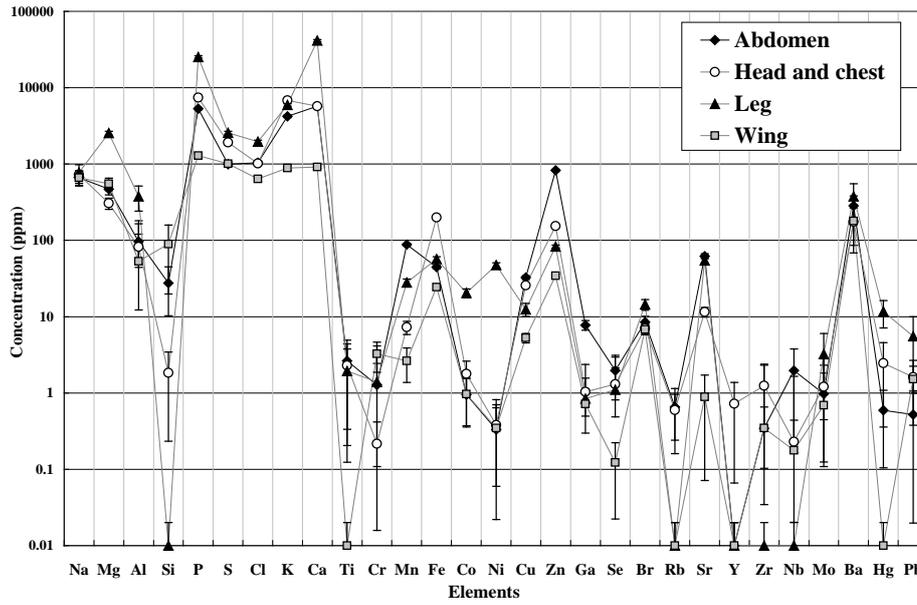


Fig 14 Elemental concentrations in *Culex tritaeniorhynchus* for each part in the body.

次に、同一部位に対する種別の比較を行う。Fig. 15 には、腹部における元素組成の比較を二種の蚊に対して示す。図から、Na、Ca、Ti、Cr、Mn、Fe、Co、Y、Moなどが種による差異を示していることが確認できる。同様の比較を頭・胸部に対して行ったものを Fig. 16 に示す。Mg、Fe、Co、Y、Moなどが種による違いを示しているが、Fig.15 に示される腹部と比べ、種族間の差異は小さい。Fig. 17 には脚部に対する同様の比較を示す。Cl、Ti、Cr、Mn、Co、Ni、Cu、Sr、Zr、Nbなどが種により異なる値を示している。翅部に対する比較は Fig. 18 に示される。Na、P、S、Cl、K、Co、Cu、Zn、Gaについてはコガタアカイエカが高く、Fe、Ti、Hg は逆にヒトスジシマカの方が高いという結果となった。

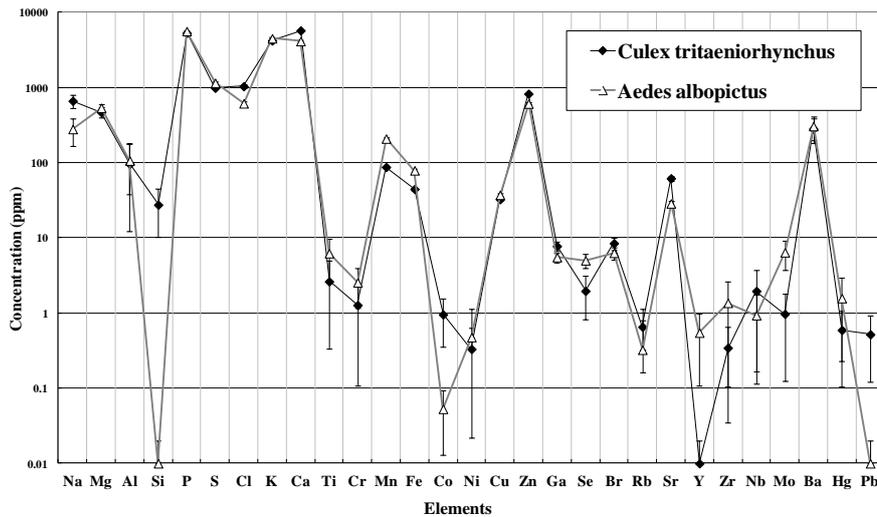


Fig 15. Comparisons of elemental concentrations in abdomen of *Culex tritaeniorhynchus* and *Aedes albopictus*.

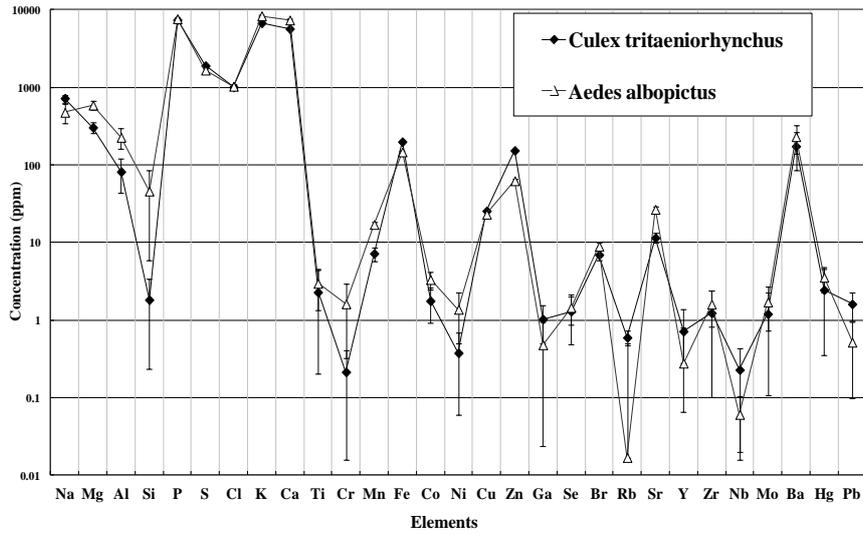


Fig 16. Same as Fig. 15 but for head and chest.

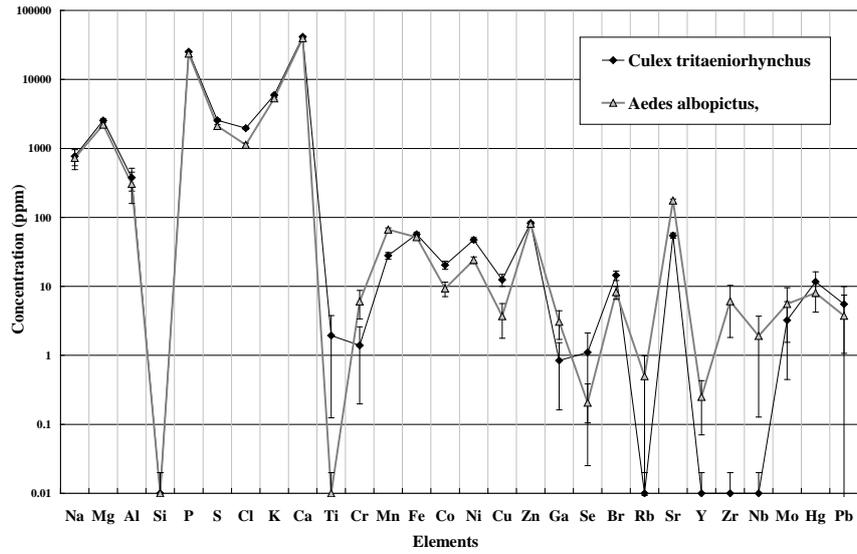


Fig 17. Same as Fig. 15 but for leg.

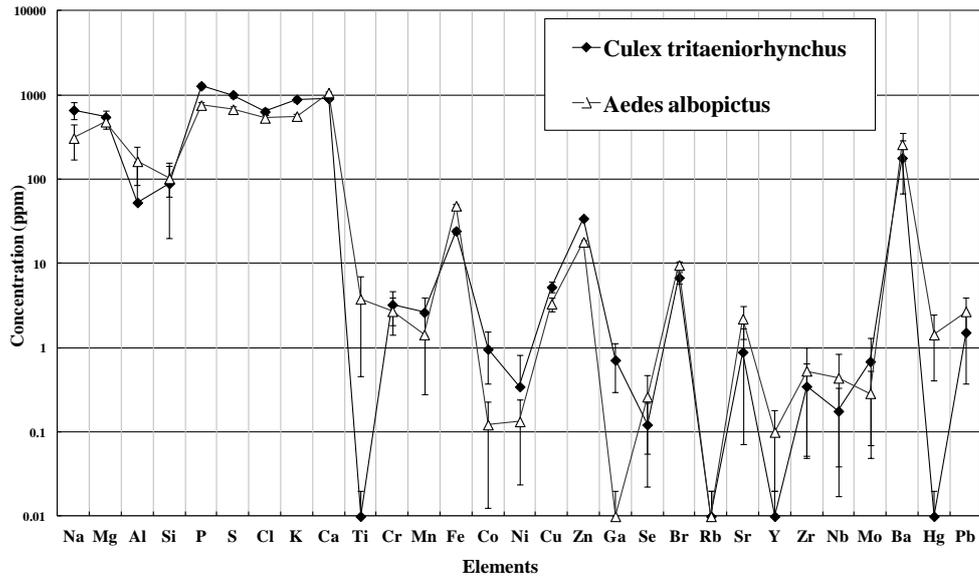


Fig 18. Same as Fig. 15 but for wing.

Fig. 19 にはクロバネキノコバエと二種の蚊の全身元素濃度を比較して示す。蚊と小型ハエでは明確な違いがあり、Na、Al、Si、As は小型ハエが蚊よりも高く、Ca、Mn、Br、Sr は蚊よりも低い値となっている。

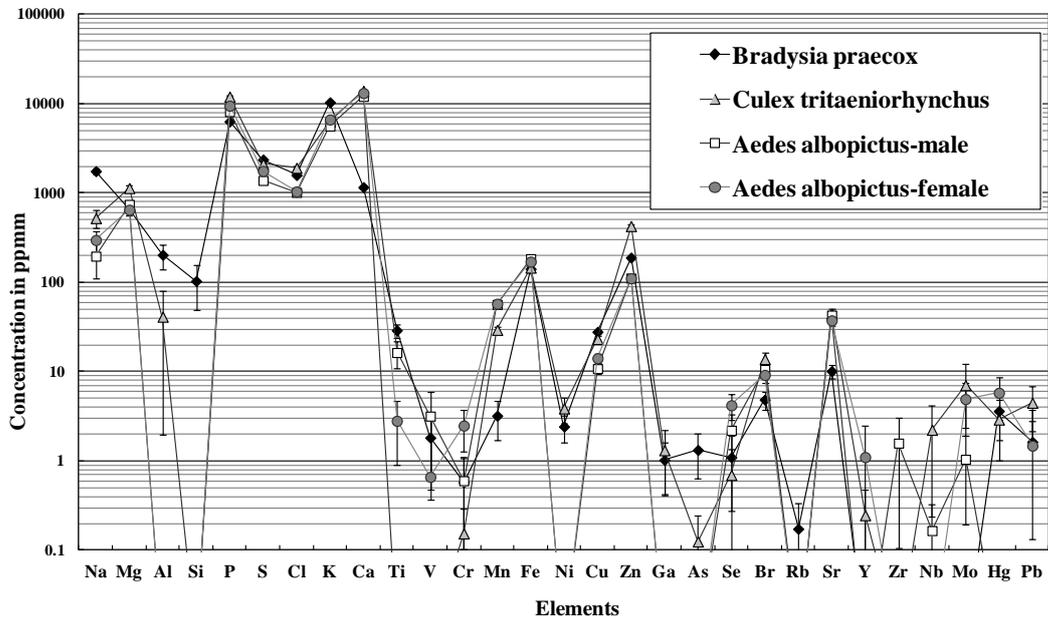


Fig 19. Comparisons of elemental concentrations of whole body between flies and mosquitoes.

Fig. 20 にはタラコ一粒ずつの結果を 6 粒のタラコに対し比較して示す。本法で得られた K 濃度は硝酸灰化法で得られた値とほぼ一致し、本法がタラコ試料にも有効であることが確認できる。さらに Cl、K、Ca 等の主元素濃度は互いにほぼ一致し、同一環境下にある試料には個体差が少ないことも確認できる。

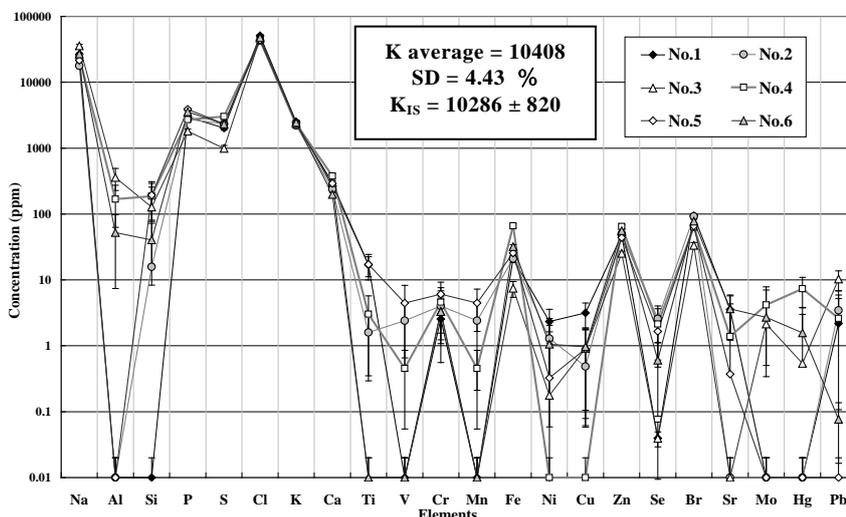


Fig 20. Elemental concentration in a single egg of Alaska pollock obtained by the present method.

5 議論

Figs 3-5 に示されるように、蚊・ハエに対し開発された本無調製・無標準法は、指標元素である K の濃度を正しく与えることが確認された。さらに本法は、全身に加え小型昆虫の各部位毎の定量分析にも応用可能であることが確認され、それは Figs 7-10 に示されている。特に脚部や翅部は主要部と比しその重量が極端に小さく、その上全く異なる元素組成を持つため、無標準法の適用が可能か否か心配されたが、Fig. 6 で確認されたように連続 X 線の形状に影響を与えるほどの違いではなく、これらの部位にも十分に適用可能であることが示された。特に 1 枚の翅の重量は 2.5 μg 程度であることが予測され、従来では定量分析が困難であったが、一匹分の翅を用い、十分な精度での定量分析が可能となった。さらに Figs 13-18 に示されるように、各部位ともほぼ 30 元素の元素濃度を求めることができ、これらの昆虫の生態調査や行動範囲などの特定に重要な情報をもたらすものと期待される。

これらの結果から、数 μg 程度の微小生物試料の定量分析が可能となったが、むしろ試料が大きいことにより生じる問題も生じると考えられる。蚊の重量は一匹 1 mg 以下程度であるが、ビームのエネルギーロスや試料内での X 線の吸収などの効果を考慮すると、本法は厚さ 30 μm 程度の試料にまで有効であるものと推測される。それ以上の大きな試料に対しては硝酸灰化-内部標準法の適用も可能と思われるが、乳鉢内で微粒子に粉碎し均一化したのち、その一部をバックリング膜上に固定し、本法を適用するなどの手段も有効であるものと期待される。

さらに本法は、Figs 1, 11, 19 で確認されたように蚊以外の微小な虫にも適用可能であることが示された。クロバネキノコバエなどは、近年各地で大量発生し社会的問題ともなっているが、幼虫がどこで繁殖し羽化するのかなど、生態が不明な点も多い。感染症の媒介の危険性がなくても衛生上の問題は存在する。本研究による開発は、これらの生態解明にも一助となることが期待される。また Fig. 20 に示されるように、一粒のタラコなど数 10 μg ほどの微小海洋生物試料にも有効であることが確認された。

今後、我々は本法を種々の分野の研究に応用したいと考えているが、特に 3.11 津波により崩壊した三陸海岸における海洋生態系の再生、食物連鎖の再構築などの調査研究に生かしたいと考えている。そのために、バックリング材質の再検討を行い、1 μg 以下の微小試料の定量分析法を確立する予定である。

以上の報告内容は、参考文献 20 に報告されている。

謝辞

共同利用の運営に携わる他の岩手医科大学サイクロトロンセンター、日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンターのスタッフの方々に謝意を表します。

参考文献

1. N. Sukehiro, N. Kida, M. Umezawa, T. Murakami, N. Arai, T. Jinnai, S. Inagaki, H. Tsuchiya, H. Maruyama¹, and Y. Tsuda, "First Report on Invasion of Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*, at Narita International Airport, Japan in August 2012", *Jpn. J. Infect. Dis.*, Vol. 66, 189-194 (2013)
2. J. Schmidt-Chanasit, P. Emmerich, D. Tappe, S. Günther, S. Schmidt, D. Wolff, K. Hentschel, D. Sagebiel, I. Schöneberg, K. Stark, and C. Frank. "Autochthonous dengue virus infection in Japan imported into Germany, September 2013.", *Euro Surveill.* 2014;19(3): pii=20681. (Available online)
3. S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, and K. Sera, "Present Status of NMCC and Sample Preparation Method of Bio-Samples.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. 3-4, 319-328 (1993)
4. ニツ川章二、畠山智、斎藤義弘、世良耕一郎、"PIXE試料調整法の検討"、NMCC共同利用研究成果報文集、第一巻、70-81 (1993)
5. K. Sera, T. Yanagisawa, H. Tsunoda, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, S. Suzuki, and H. Orihara, "Bio-PIXE at the Takizawa Facility. (Bio-PIXE with a Baby Cyclotron).", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. 2-3, 325-330 (1992)
6. 世良耕一郎、ニツ川章二、"PIXEの多目的利用のための測定法、解析法の開発"、NMCC共同利用研究成果報文集、第一巻、55-65 (1993)
7. K. Sera, S. Futatsugawa, K. Matsuda and Y. Miura, "Standard-free method of quantitative analysis for bio-samples", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.6, No.3, 4 (1996) 467-481
8. 世良耕一郎、ニツ川章二、畠山智、斎藤義弘、松田和弘、三浦吉範、斎藤勝美、"無標準定量法の開発 - PIXE の多目的利用のための測定・解析・定量法の開発 -"、NMCC 共同利用研究成果報文集、第四巻、194-222 (1996)
9. K. Sera, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh and K. Matsuda., "Quantitative Analysis of Bio-medical Samples of Very Small Quantities by the Standard-free Method.", *Journal of PIXE*, Vol. 7-3,4, 157-169 (1997)
10. 世良耕一郎、ニツ川章二、畠山智、斎藤義弘、松田和弘、三浦吉範、"無標準定量法の開発 - 第 2 報 -"、NMCC 共同利用研究成果報文集、第五巻、223-249 (1997)
11. K. Sera, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh and K. Matsuda., "Quantitative Analysis of Untreated Bio-samples.", *Nucl. Instr. Meth.*, B 150, 226-233 (1999)
12. 世良耕一郎、ニツ川章二、村尾智、"重元素による環境汚染・体内暴露モニタリングのための無調製毛髪定量分析法"、NMCC共同利用研究成果報文集 第八巻、216-225 (2001)
13. K. Sera, S. Futatsugawa and S. Muraio, "Quantitative Analysis of Untreated Hair Samples for Monitoring Human Exposure to Heavy Metals.", *Nucl. Instr. Meth.*, B189, 174-179 (2002)
14. K. Sera, Y. Miura and S. Futatsugawa, "Application of a Standard-free Method to Quantitative Analysis of Urine Samples.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.11-3,4, 149-158 (2001)
15. 世良耕一郎、ニツ川章二、三浦吉範、"重元素による環境汚染・体内暴露モニタリングのための無調製定量分析法 - 無調製尿試料のための定量分析法の開発 -"、NMCC 共同利用研究成果報文集 第九巻、185-194 (2002)

16. K. Sera, J. Itoh, S. Goto, Y. Saitoh, A. Fujimura, Y. Nosaka, Y. Noda, S. Nishizuka and G. Wakabayashi, “Quantitative Analysis of Very Small Quantity of Organs Taken from Patients and Experimental Animals; Standard-free Method for Organ Samples.”, *Int'l Journal of PIXE*, Vol.18 –3, 4, 111-122 (2008)
17. 世良耕一郎、寺崎一典、佐々木敏秋、後藤祥子、齋藤義弘、伊藤じゅん、二ツ川章二、藤村朗、野坂洋一郎、野田芳範、西塚哲、若林剛、“微小臓器試料に対する無標準定量分析法の開発”、NMCC共同利用研究成果報文集 第15巻, 178-190 (2009)
18. K. Sera, K. Terasaki, J. Itoh, Y. Saitoh, S. Futatsugawa and Y. Miura, “Standard-free Method for Body Fluid Samples such as Saliva, Sweat, Snivel and Tear.”, *Int'l Journal of PIXE*, Vol.15-1,2, 47-57 (2005)
19. 世良耕一郎、寺崎一典、伊藤じゅん、齋藤義弘、二ツ川章二、藤村朗、“無標準法の体液（汗、唾液、鼻汁、涙）及び歯科試料（歯、顎骨、歯石）への応用とフッ素を含む多元素同時分析 –有害元素人体暴露評価の観点から”、NMCC共同利用研究成果報文集 第十二巻, 123-139 (2005)
20. K. Sera, H. Suzuki, K. Sawabe, O. Komagata, S. Goto, C. Takahashi and Y. Saitoh, “Standard-Free Method for Quantitative Elemental Analysis of Mosquitoes and Small Flies”, *Int'l Journal of PIXE*, in press (2014)

Standard-free method for quantitative elemental analysis of mosquitoes and small flies

K. Sera¹, H. Suzuki², K. Sawabe³, O. Komagata³, S. Goto⁴, C. Takahashi⁴
and Y. Saitoh⁴

¹Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

²Graduate School of Pharmaceutical Sciences (Radioisotope Research Center),
Chiba University
1-33 Yayoichou, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

³Department of Medical Entomology, National Institute of Infectious Diseases
1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

⁴Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

A method of quantitative elemental analysis of mosquitoes which convey serious infectious diseases, such as Japanese encephalitis and Dengue fever, has been developed in order to clarify their mode of life and sphere of action. The method was developed on the basis of a standard-free method for biological samples. The method enables us to perform quantitative analysis of untreated mosquito. Moreover, the method was successfully applied to quantitative analysis of each part of mosquito's body such as head and chest, abdomen, leg and wing. It was found that there are clear differences among parts in the body of mosquito, and also among different species such as *Culex tritaeniorhynchus* and *Aedes albopictus*. The method was successfully applied to quantitative analysis of small fly belonging to Sciaridae (*Bradysia praecox*) whose size is smaller than that of mosquito. It was also confirmed that the method is applicable to other kind of bio-samples of small quantities such as a grain of egg of Alaska pollock whose dry weight is less than 100 µg.