

平成30年度

広島市衛生研究所 業績発表会

発表要旨集

日時:平成 31 年 3 月 15 日(金) 13 時 45 分～16 時 00 分

場所:衛生研究所 1階 大会議室

広島市衛生研究所

平成30年度 広島市衛生研究所業績発表会

1 日 時

平成31年3月15日（金） 13時45分～16時00分

2 場 所

広島市衛生研究所 1階 大会議室 （広島市西区商工センター四丁目1番2号）

3 内 容

(1) 開会挨拶（上田所長）

(2) 業績発表（発表・質疑時間合わせて1題につき15分程度）

ア 生活科学部（座長：吉貞専門員） 13時50分～

① 繊維製品中のアゾ染料由来の特定芳香族アミン類の高速液体クロマトグラフを用いた確認試験に関する検討	長谷川 富子
② 市内生産野菜の残留農薬実態調査	小串 恭子

イ 生物科学部（座長：山本専門員） 14時20分～

① <u>2018年に食中毒等で分離されたサルモネラ4:i:-菌株の解析</u>	京塚 明美
② <u>カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の検査と検出遺伝子について（2018年）</u>	青田 達明
③ <u>広島市におけるアデノウイルス検出状況</u>	福永 愛

（休憩：10分間）

ウ 環境科学部（座長：中村専門員） 15時15分～

① <u>ICP-MSによる要監視項目（金属類）の測定について</u>	竹井 秀夫
② <u>直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩（LAS）の調査結果について（平成30年度）</u>	田坂 葉子
③ <u>環境ホルモンの固相抽出法の検討</u>	加藤 寛子

(3) 閉会

市内生産野菜の残留農薬実態調査

生活科学部 小串恭子

はじめに

農作物における残留農薬の問題は消費者の関心が高いことから、本市においては農作物の安全確保のため、継続して生鮮農作物等の残留農薬検査を実施している。

今回、市内生産野菜（トマト、キュウリ、なす、小松菜、水菜）について、平成 28 年度から平成 30 年度の 3 カ年の農薬使用状況及び農作物中の農薬残留量の調査結果をまとめたので報告する。

調査概要

残留農薬試験は、広島市保健所が J A 広島市より収去した検体について行い、使用した農薬については生産者に記入してもらったものを参照している。

検体量は可食部 1 キログラム以上、検体数は下記のとおりである。

	トマト	キュウリ	なす	小松菜	水菜
平成 28 年度	4	4	4	4	4
平成 29 年度	4	4	4	4	4
平成 30 年度	4	4	4	8	—

試料の調製と分析

フードプロセッサーで細切均一化した試料 10 g をアセトニトリル 20m l により抽出したのち、ミニカラム（ENVI-Carb II/PSA）で精製し、GC/MS/MS 及び LC/MS/MS で分析する。

結果

平成 22 年の厚生労働省通知により、妥当性評価が完了していない試験方法による結果を正式な結果とすることは問題が生じる可能性があるため、当所でも試験を行う作物ごとに試験法の妥当性評価を行っている。

今回の調査対象作物の妥当性が確認された検査項目数は下表のとおりである。

	トマト	キュウリ	なす	小松菜	水菜
検査項目数	163	130	124	137	123

試験を行った結果、5 品目 60 検体より延べ 21 項目の農薬が検出された。検出項目はすべて基準値以内であった。

	検出農薬
トマト	アゾキシストロビン、トリフルミゾール
キュウリ	アセタミプリド
なす	アセタミプリド、アゾキシストロビン
小松菜	アセタミプリド、シアゾファミド、フルフェノクスロン、イミダクロプリド、チアメトキサム
水菜	アゾキシストロビン、シアゾファミド、フルフェノクスロン

今後も市内産野菜の農薬残留実態を調査し、関係機関へ情報提供をすることにより、市民の食生活の安全性確保を図っていくことが重要と考えられる。また、新たな農作物についての妥当性評価を行う予定である。

2018年に食中毒等で分離されたサルモネラ 4:i:-菌株の解析

生物科学部 京塚 明美

1 はじめに

H抗原の2相を発現しないサルモネラ 4:i:-(4:i:-)は、近年家畜からの分離報告数の増加が問題となっていることに加え、病原微生物検出情報(IASR)での人由来のサルモネラ血清型別報告数順位でも上位に位置する血清型であり、食中毒の原因としても重要な血清型であると考えられる。2018年6月に広島市内飲食店で発生した食中毒事例から原因物質として4:i:-が分離された。また、この食中毒事例と前後して市内の散発下痢症患者2名から4:i:-が分離された。これらの分離株について薬剤感受性試験、PFGEによる疫学的解析を行うとともに、4:i:-は、*Salmonella Typhimurium*(ST)由来のH抗原単相変異株(非定型ST)と考えられていることから、非定型STであるかの確認遺伝子検査を併せて実施した。

2 対象及び方法

(1) 対象

食中毒事例検査検体及びその前後に市内散発下痢症患者から分離された4:i:-株10株を供試した。その内訳は5月に分離された散発下痢症患者由来1株(菌株No.1)、食中毒事例検査検体から分離された患者由来3株(菌株No.2~4)・従事者由来4株(菌株No.5~8)・食品由来1株(菌株No.9)及び食中毒事例と同時期に分離された散発下痢症患者由来1株(菌株No.10)である。

(2) 方法

ア 薬剤感受性試験

1濃度ディスク法によりアンピシリン(ABPC)、セフトキシム(CTX)、ゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、イミペネム(IPM)、ノルフロキサシン(NFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、ナリジクス酸(NA)、ST合剤(SXT)、メロペネム(MEPM)、セフトジジム(CAZ)、ホスホマイシン(FOM)、クロラムフェニコール(CP)、セフォキシチン(CFX)、アミカシン(AMK)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、コリスチン(CL)の18薬剤について実施した。

イ PFGE法

制限酵素 *Xba*I 及び *Bln*I を用いて、国立感染症研究所で示された方法に準拠し実施した。PFGE 泳動像は、BioNumerics Ver.7.5(Applied Maths)で解析し系統樹を作成した。

ウ 非定型 ST 確認遺伝子検査

農水省通知 29 消安第 6791 号(平成 30 年 3 月 29 日)添付の「サルモネラ(4:i:-)の同定法マニュアル」の方法に従い、①ST 同定用マルチプレックス PCR(ST 由来の推定)、②変異同定用 PCR(A 型または B 型変異の特定)、③ *fljA* 増幅用 PCR・*hin* 増幅用 PCR・増幅産物の塩基配列の解析(C 型変異の特定)を行った。

3 結果

(1) 薬剤感受性試験

散発患者株 No.1 は全ての薬剤に感受性であった。食中毒事例全株(No.2~9)及び散発患者株 No.10 は ABPC、SM、TC の 3 薬剤に耐性を示した。

(2) PFGE 法

解析結果を図 1 と図 2 に示した。*Xba*I 処理では、食中毒事例株(No.2~9)間では類似度 100%ですべて一致した。食中毒事例株に対し、散発患者株の No.10 は 94.7%と高い類似度を示したが、これらと散発患者株 No.1 では 68.8%と低い類似度であった。*Bln*I 処理では、食中毒事例株(No.2~9)と散発患者株 No.10 は類似度 100%で一致した。食中毒事例株と散発患者株 No.1 では、29.9%と低い類似度であった。

(3) 非定型 ST 確認遺伝子検査

①ST 同定用マルチプレックス PCR では、*invA*(サルモネラ属菌特異的遺伝子)及び TSR1~3 遺伝子(ST 特異的遺伝子)が全ての菌株から検出された。②変異同定用 PCR では、全ての菌株で目的サイ

ズ(452bp)の増幅が認められた。③*fljA*増幅用PCRでは、全ての菌株で目的サイズ(1049bp)の増幅が認められた。*hin*増幅用PCRでは、散発患者株No.1で目的サイズ(1213bp)の増幅がみられたが、その他の菌株(No.2~10)では異なるサイズ(700bp付近)での増幅がみられた。増幅産物の塩基配列の解析結果、散発患者株No.1では*fljA*の46番目のアラニンからトレオニン(A46T)及び*hin*の140番目のアルギニンからロイシン(R140L)へのアミノ酸の置換がみられた。

4 考察

食中毒事例株(菌株No.2~9)は、薬剤感受性及びPFGE解析結果が一致したことから、全て同一由来と推定された。

5月に分離された散発患者株No.1は、食中毒事例株とは薬剤感受性、PFGE解析結果及び*hin*増幅用PCRでの増幅サイズが異なることから食中毒事例株とは関連性が低い株と考えられた。

食中毒事例と同時期に分離された散発患者株No.10は、食中毒事例株と、薬剤感受性が一致し、PFGE解析で高い類似度を示したこと及び同様に*hin*増幅用PCRで目的サイズでの増幅が同様に見られなかったことから、食中毒事例株と関連性の高い株である可能性が示唆された。しかしながら、喫食調査の結果、この患者は本食中毒事例原因施設を利用しておらず、また市域でのサルモネラ属菌株のモニタリングデータの蓄積もないため、その関連性については不明である。

全ての株は、サルモネラ属及びST特異的遺伝子を保有していたことから、ST由来のH抗原単相株であることが推定された。また、変異パターンについては、変異同定用PCRで452bpでの増幅が見られたことから、A型またはB型変異株とは特定できなかった。散発患者株No.1では、*fljA*のA46T及び*hin*のR140Lというアミノ酸置換を伴う点変異により2相が発現しないC型変異株であることが確認できた。他の菌株(No.2~10)については、*hin*増幅用PCRで目的サイズの増幅が得られなかったことから、*hin*を含む領域に欠損が生じていることが推定された。

近年家畜から、STと同等の病原性を示すと考えられる4:i:-株の分離が増加していることが問題視されていることから、今後、人における食中毒起因菌としての4:i:-株の動向に注視していきたい。

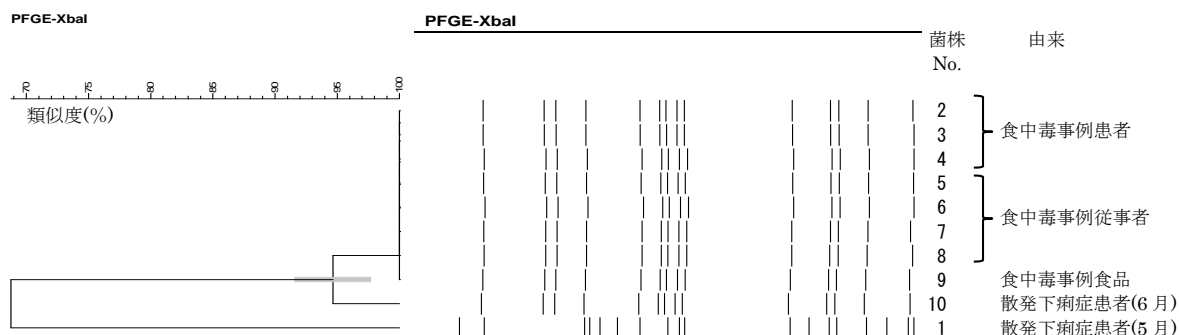


図1 *Xba*I処理PFGE解析結果

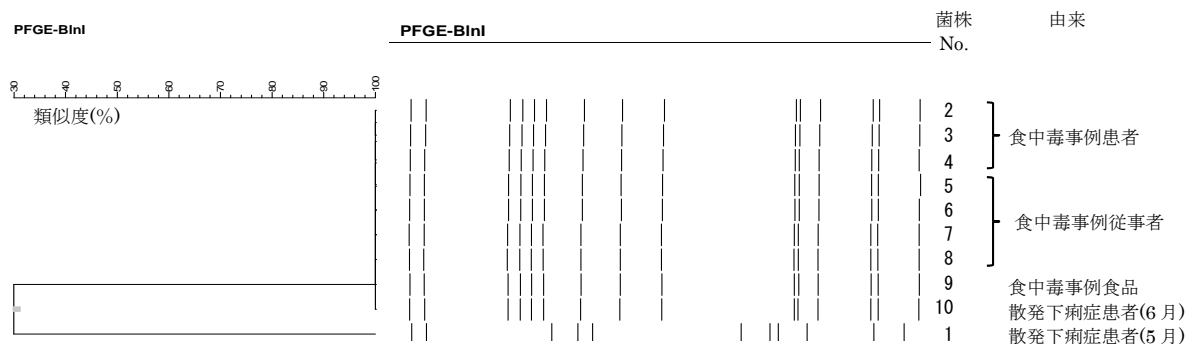


図2 *Bln*I処理PFGE解析結果

1 はじめに

カルバペネム系抗菌薬は、細菌感染症治療に用いられる各種抗菌薬の中で「最後の頼みの綱」として極めて重要な位置づけをされている。しかし、2000年代に入るとカルバペネムに対し耐性を獲得したカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)が問題となり始め、国際的に大きな関心事となっている¹⁾。地域における薬剤耐性菌のまん延などの流行状況を把握するために、平成29年3月厚生労働省から通知(健感発0328第4号)が発出された。CRE感染症の届出があった場合は、病原体の収集及び耐性遺伝子等の詳細な解析を行い、検査結果を厚生労働省へ報告することとなった。今回、2018年1月から12月の間に届け出があった16件のうち、15菌株について検査を実施したのでその結果を報告する。

2 材料と方法

CRE感染症届出基準に合致した菌株のうち、収集が可能であった15株の検査を実施した。カルバペネマーゼ阻害剤を用いたカルバペネマーゼ産生性確認試験及びPCR法によるカルバペネム耐性遺伝子検出試験を実施した。この2法の結果を基に、必要に応じてカルバペネマーゼ産生性確認試験であるmodified Carbapenem Inactivation Method (mCIM法)を実施した。

3 結果

検査を実施したCREは、7菌種15株であった。阻害剤試験の結果、メルカプト酢酸ナトリウムによる阻害効果が認められたものが4株、ボロン酸による阻害効果が認められたものが3株であった。PCR法による耐性遺伝子検出試験の結果、カルバペネマーゼ遺伝子 bla_{IMP-6} が4株、 bla_{GES-24} が1株から検出された。その他の株から、カルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった。mCIM法の結果、カルバペネマーゼ遺伝子を検出しなかった株のうち1株が陽性、2株が判定保留となった。

4 考察

カルバペネマーゼ遺伝子を検出した5株のうち4株は、IMP-1型に分類される bla_{IMP-6} であった。 bla_{IMP-6} 保有株は限られた地域からのみ検出される傾向が報告されている²⁾。本市域においても bla_{IMP-6} 保有株のまん延が示唆された。また、1株から検出された bla_{GES-24} は全国的にも報告数が少ない型である。本事例を含め中国・四国地方からの報告^{3,4)}があることから、中国・四国地方に浸淫している可能性が示唆された。2018年のCRE感染症届出件数は16件であり、2017年の8件から倍増した。昨年同様 bla_{IMP-6} 保有株が複数検出されたことや、全国でも報告が稀である bla_{GES-24} 保有株が検出されたことから、引き続き耐性遺伝子の検出動向に注視し、関係機関と協力して耐性遺伝子の拡散防止や院内感染事例の早期探知に努めなければならない。

5 参考文献

- 1) 荒川宜親：腸内細菌科菌種におけるカルバペネム耐性メカニズムとその特長および動向，病原微生物検出情報，35(12)，283～284(2014)
- 2) 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター 他：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: CRE) 病原体サーベイランス，2017年，病原微生物検出情報，39(9)，162～163(2018)
- 3) 福田千恵美 他：香川県内のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の薬剤耐性遺伝子の検出状況，香川県環境保健研究センター所報，15，47～52(2016)
- 4) 仙波敬子 他：愛媛県の医療機関で分離された薬剤耐性菌株の遺伝子解析，平成28年度愛媛衛環研年報，19，1～7(2016)

広島市におけるアデノウイルス検出状況

生物科学部 福永 愛

1 はじめに

アデノウイルス(HAdV)はAからGまでの7種、60種類以上の型に分類され、種や型によって引き起こされる疾患(呼吸器疾患、感染性胃腸炎、角結膜炎など)の種類、重篤度が異なることが知られている。そこで、2016年～2018年の本市におけるHAdVの検出状況や概要をまとめたので報告する。

2 方法

2016年1月1日～2018年12月31日までに感染症発生動向調査事業で病原体定点医療機関から送付された患者1533人の咽頭拭い液、糞便、結膜拭い液等2196検体を調査対象とした。

検体を培養細胞に接種し、分離されたHAdVは中和法で型を同定した。HAdVが分離できなかった検体については検体からウイルスDNAを抽出し、遺伝子検査により型を決定した。また、患者の臨床症状や発生状況について検証した。

3 結果

2016年は817検体中51検体、2017年は804検体中60検体、2018年は575検体中66検体からHAdVが検出された。過去3年間に共通して、主に呼吸器疾患(咽頭結膜熱を含む)を引き起こすHAdV2型(HAdV-2)の検出が多かった。

(1) 月別・疾患別検出数(図1)

年間を通じて消化器疾患(感染性胃腸炎を含む)からHAdVが検出され、特に5月～7月が多かった。また、眼疾患(流行性角結膜炎を含む)からの検出は8月がピークであった。

(2) 年齢別・疾患別検出数(図2)

呼吸器疾患及び消化器疾患では0歳～6歳の幼児からの検出が100%であったのに対し、眼疾患では主に20代～50代以上の幅広い年齢層から検出された。

(3) 各疾患における型別検出状況(図3～図5)

呼吸器疾患ではHAdV-2が9株、次いでHAdV-3が5株検出された。また、流行性角結膜炎を引き起こすHAdV-64(19a)が検出された症例もあった。

消化器疾患ではHAdV-2が20株、次いでHAdV-5が15株検出された。感染性胃腸炎を引き起こすA種のHAdV-31は7株、F種のHAdV-41は6株検出され、全体の18.3%だった。

眼疾患ではHAdV-54が16株、次いでHAdV-3が11株検出された。その他の型も含め、検出されたHAdVの78.6%が眼疾患に関与するD種からの検出であった。また、眼疾患からは組換え型の新型HAdVである53、54、56、64、85型の検出が目立った。

4 考察

最も検出数の多かった HAdV-2 は、主に咽頭炎や扁桃炎などの呼吸器疾患を起こすとされているが、呼吸器疾患だけでなく感染性胃腸炎やヘルパンギーナなどの診断名の患者からも検出された。

月別・疾患別検出状況より、呼吸器疾患から 6 月と 7 月に多く検出された要因として HAdV が夏風邪のウイルスであるためと考えられる。

年齢別・疾患別検出数より、消化器疾患においては、0 歳～4 歳までの乳幼児からの検出数が 69 と多く、腸重積症からの検出が多かった。腸重積症から HAdV が多数検出されるという報告¹⁾はあるが、健康者からの検出に関するデータは不十分であり、因果関係については不明な点も多い。

眼疾患は全国的に 0 歳～4 歳と 30 代を中心とする患者分布が見られるが、本市では 30 代が最も患者数が多い結果となり全国の傾向とは少し異なった。

呼吸器疾患から検出された HAdV は 64 型を除いて全てが呼吸器疾患を引き起こす種であった。HAdV-64 は肺炎と診断された患者の糞便と咽頭拭い液から検出され、臨床症状は発熱、肺炎、角結膜炎であった。同一の型であっても肺炎と角結膜炎を引き起こすなど、症状は多彩である。

消化器疾患から検出された HAdV のうち、77.5%が呼吸器疾患を引き起こす B 種の 3 型、C 種の 1 型、2 型及び 5 型であり、胃腸炎を起こす A 種、F 種は少なかった。消化器疾患の内訳では腸重積症が多く、腸重積症からは HAdV の 2 型、3 型がよく検出されるためこのような結果になったと推察される。

眼疾患から検出された HAdV は 78.6%が眼疾患を引き起こす D 種であった。また、2018 年には HAdV-85 が本市において初めて検出された。1 月～4 月に相次いで検出され、今までとは異なった傾向であった。今後の動向には注意が必要である。

HAdV は飛沫や接触で感染する感染力の強いウイルスである。また、型によっては非常に重篤な症状を起こすことがあるためサーベイランス体制を維持し、発生動向を常に監視していくことが重要である。

5 参考文献

- (1) Okimoto S et al.: Association of viral isolates from stool samples with intussusception in children, *International Journal of Infectious Diseases*, 15, e641-e645(2011)

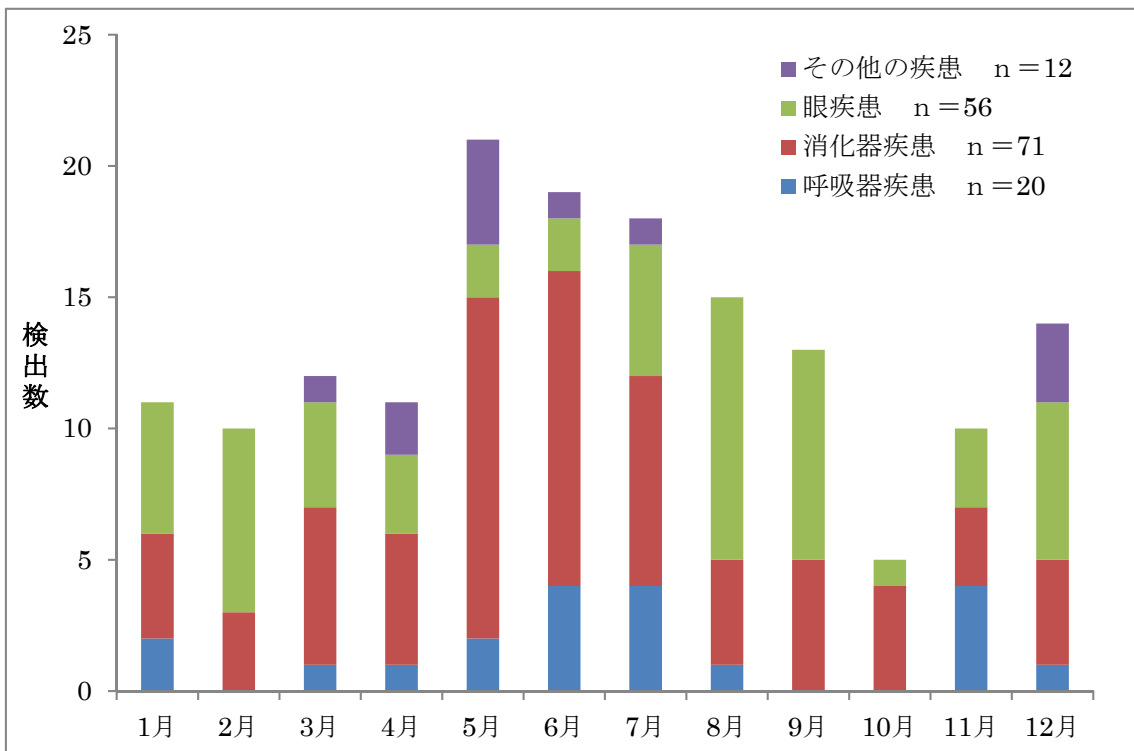


図1 月別・疾患別検出数

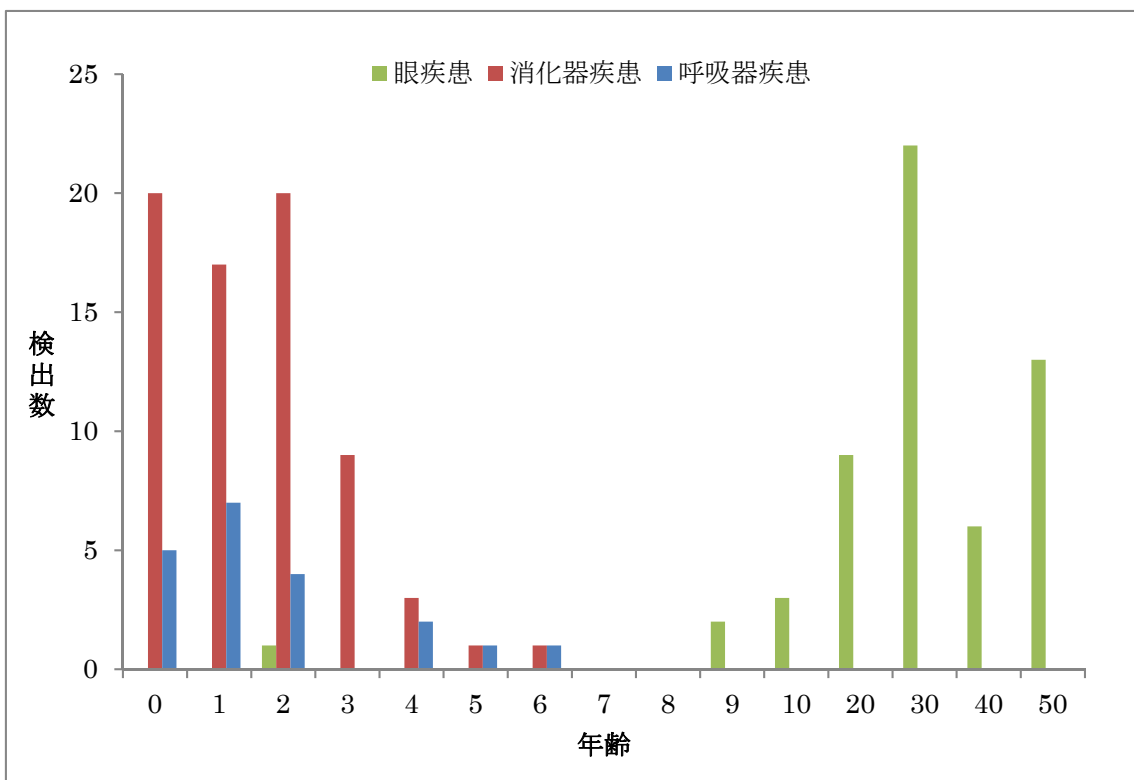


図2 年齢別・疾患別検出数

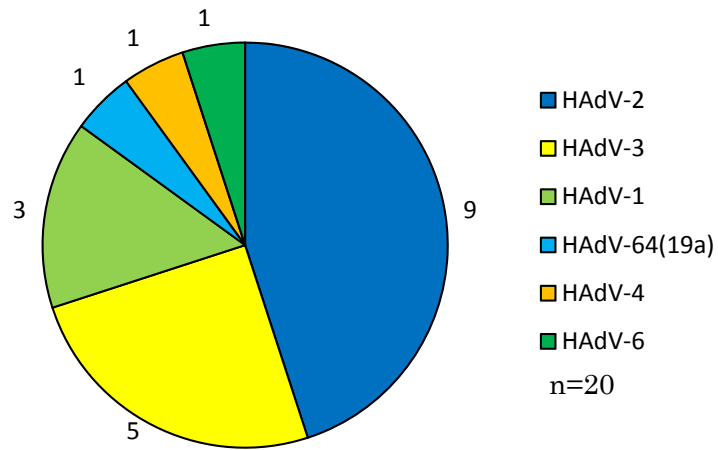


図3 呼吸器疾患からの型別検出状況

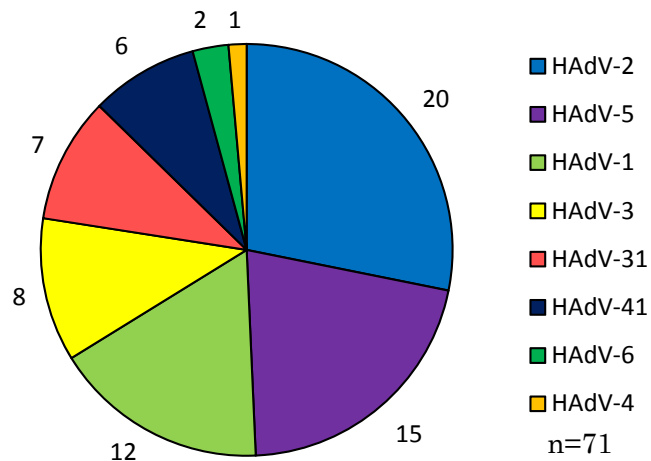


図4 消化器疾患からの型別検出状況

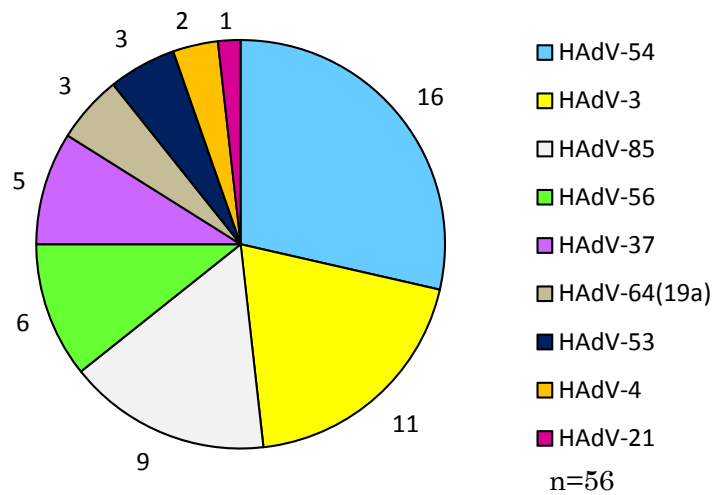


図5 眼疾患からの型別検出状況

ICP-MSによる要監視項目（金属類）の測定について

環境科学部 竹井 秀夫

1 はじめに

公共用水域の水質の測定は、環境基準（健康項目及び生活環境項目）のほか、要監視項目や要調査項目が設定されており、要監視項目には「人の健康の保護に関連する物質（健康項目）」と「水生生物の保全に関連する物質」がある。このうち、健康項目については平成5年3月に「人の健康の保護に関連する物質ではあるが、公共用水域等における検出状況等からみて、直ちに環境基準とはせず、引き続き知見の集積に努めるべきもの」として、設定された。その後、3度の改正（平成21年11月最終改正）を経て、現在は公共用水域について26項目が設定されている（表1）。

本発表では、誘導結合プラズマ-質量分析装置（以下、「ICP-MS」という。）を用いた測定方法が示されている金属元素5種類（ニッケル(Ni)、モリブデン(Mo)、アンチモン(Sb)、全マンガン(Mn)、ウラン(U))（表1内の太字）について、公定法^{1),2)}を参考に、一斉での前処理及び分析の実施を検討したので報告する。

2 方法

(1) 試薬

ア 硝酸

関東化学（株）社製 Ultrapur-100

イ 測定対象金属標準溶液

ジーエルサイエンス（株）社製 水質分析用 無機混合標準液 DWS-1 (Ni 1 mg/L, Mo 7 mg/L, Sb 0.2 mg/L, Mn 5 mg/L, U 0.2 mg/L, ほかに全15元素)を希釈し、検量線用標準液及び添加用標準液を調製した。

ウ 内部標準物質

富士フィルム和光純薬（株）社製 ICP-MS分析用 多元素混合標準液 W-XI (Be, Co, Ga, Y, In, Tl 各 100 mg/L)及び AccuStandard Inc. 製 ICP-MS用標準液 (Te 100 mg/L)を混合、希釈して、7元素（各 5 µg/L）として、内部標準液とした。

(2) 測定装置

サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）製

ICP-MS X-Series II

本装置は、試料と内部標準溶液を別々に導入し、混合できるよ

うになっている。各測定元素に対する内部標準元素を表2に示す。-H₂とは、環境イオンの妨害

表1 要監視項目及び指針値

(公共用水域)	単位：mg/L
項目	指針値
クロロホルム	0.06 以下
トランス-1,2-ジクロロエチレン	0.04 以下
1,2-ジクロロプロパン	0.06 以下
p-ジクロロベンゼン	0.2 以下
イソキサチオン	0.008 以下
ダイアジノン	0.005 以下
フェニトロチオン (MEP)	0.003 以下
イプロチオラン	0.04 以下
キシン銅 (有機銅)	0.04 以下
クロロタロニル (TPN)	0.05 以下
プロピザミド	0.008 以下
EPN	0.006 以下
ジクロロホス (DDVP)	0.008 以下
フェノカルブ (BPMC)	0.03 以下
イプロベンホス (IBP)	0.008 以下
クロロニトロフェン (CNP)	—
トルエン	0.6 以下
キシレン	0.4 以下
フタル酸ジエチルヘキシル	0.06 以下
ニッケル	—
モリブデン	0.07 以下
アンチモン	0.02 以下
塩化ビニルモノマー	0.002 以下
エビクロロヒドリン	0.0004 以下
全マンガン	0.2 以下
ウラン	0.002 以下

表2 内部標準元素

内標元素	
⁶⁰ Ni	¹¹⁵ In
⁶⁰ Ni-H ₂	¹¹⁵ In-H ₂
⁹⁵ Mo	¹¹⁵ In
⁵⁵ Mn	¹¹⁵ In
⁵⁵ Mn-H ₂	¹¹⁵ In-H ₂
¹²¹ Sb	⁸⁹ Y
²³⁸ U	²⁰⁵ Tl

を低減するため、コリジョンセル（CCT）モードで測定することを表す。

(3) 装置の検出下限値（IDL）の測定

「要調査項目等調査マニュアル」³⁾ II. 分析精度管理に基づき、広島県の水質測定計画⁴⁾に定める定量下限値付近の濃度について、7回測定を行った。

(4) 分析方法の検出下限値（MDL）及び定量下限値（MQL）の測定

「要調査項目等調査マニュアル」³⁾ II. 分析精度管理に基づき、泉橋（環境基準点。平成 30 年 11 月 14 日採水）の河川水 50 ml、7 検体をテフロンビーカーに入れ、(3) の倍程度の濃度になるように混合標準液を添加し、硝酸 1 ml を加え、テフロン製時計皿でふたをして、ホットプレート（約 200℃）で約 1 時間程度、加熱・分解を行って、放冷した。

放冷後、オールプラスチックシリンジ及びフィルターユニット（孔径 0.20 μm）を用いて、ろ過し、ポリプロピレンチューブで 50 ml に定容し、測定を行った。

3 結果

各測定元素について、IDL, MDL, MQL を表 3 に示す。IDL については、すべての元素において、目標定量下限値の 1/10 以下となり、良好な結果であった。また、MQL についても、すべて目標定量下限値を下回る結果となり、この 5 元素について、一斉分析が可能であることを示せた。

表 3 IDL, MDL, MQL の算出

項目	測定モード	IDL	MDL	MQL	単位：mg/L
					目標定量下限値
ニッケル(Ni)	STD	0.000029	0.000125	0.000321	0.001
	CCT	0.000031	0.000150	0.000387	0.001
モリブデン(Mo)	STD	0.000153	0.000545	0.001403	0.007
マンガン(Mn)	STD	0.000111	0.000950	0.002445	0.005
	CCT	0.000128	0.001189	0.003059	0.005
アンチモン(Sb)	STD	0.000003	0.000019	0.000050	0.001
ウラン(U)	STD	0.000004	0.000037	0.000095	0.0002

なお、同時に測定した泉橋の値と、参考に平成 29 年度の同地点の結果（委託により実施）を表 4 に示す。おおむね、前年度と同様の結果が得られた。また、いずれも指針値（ニッケルは未設定）を下回っていた。

表 4 泉橋の測定結果

	単位：mg/L	
	H30	H29(参考)
ニッケル(Ni)	<0.001	<0.001
モリブデン(Mo)	<0.007	<0.007
マンガン(Mn)	0.012	0.017
アンチモン(Sb)	<0.001	<0.001
ウラン(U)	0.0008	0.0006

文献

- 1) 水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準の測定方法及び要監視項目の測定方法について（平成 5 年 4 月 28 日 環水規 121 号）
- 2) 水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準等の施行等について（通知）（平成 16 年 3 月 31 日 環水企発 040331003 号・環水土発 040331005 号）
- 3) 要調査項目等調査マニュアル（水質、底質、水生生物）平成 20 年 3 月 環境省水・大気環境局 水環境課
- 4) 平成 30 年度公共用水域等の水質測定計画 平成 30 年 3 月 広島県

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩（LAS）の調査結果について（平成 30 年度）

環境科学部 田坂葉子

1 はじめに

広島市では河川水に混入する生活雑排水の影響を把握するため、中小河川における洗剤残存調査として LC を用いて、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩（以下 LAS）の測定を行ってきた。

平成 25 年 3 月に、水生生物の保全に係る環境基準値の項目として LAS が追加され、分析法として LC-MS/MS による分析法が示された。

当所では、平成 28 年度から、この分析法について検討し、平成 29 年度は河川水の測定を行った。平成 30 年度は、広島市内の河川水及び海水の調査を行ったので、その結果について報告する。

2 方法

(1) 調査日及び調査地点

海水は平成 30 年 10 月、河川水は 12 月に環境基準点で調査を行った。河川下流域の基準点は、海水の影響が少ない干潮時に採水を行った。調査地点は図 1 に示す。

(2) 分析方法

昭和 46 年環境庁告示第 59 号付表 12 に準じて、固相抽出-LC/MS/MS 法で分析を行った。分析対象物質の LAS は、アルキル基が直鎖型で、炭素数が 10~14 の混合物である。

(3) 試薬

LAS 標準溶液、内部標準物質（p-n オクチルベンゼンスルホン酸ナトリウム）、ギ酸、ギ酸アンモニウムは和光純薬工業製、アセトニトリル、メタノールは関東化学製を用いた。

(4) 装置及び分析条件

①HPLC

装置：島津製作所 NexeraX2 LC-30AD

カラム：Shim-Pack XR-ODS II ID 2.0mm×L 150mm, 2.2µm

流速：0.2mL/min

注入量：5µL

カラム温度：40℃

移動相 A ギ酸 (0.1v/v%)・ギ酸アンモニウム水溶液 (50mmol/L) : B アセトニトリル=35 : 65

②MS/MS

装置：島津製作所 LCMS8050

イオン化モード：ESI-

インターフェイス温度：150℃

ネブライザーガス流量：3.0L/min

DL 温度：250℃

ヒートブロック温度：400℃

(5) 測定値算出方法

	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE (eV)
C8-LAS	269	183	35
C10-LAS	297	183/119	32/50
C11-LAS	311	183/119	34/52
C12-LAS	325	183/119	36/52
C13-LAS	339	183/119	37/55
C14-LAS	353	183/119	40/55

総 LAS 濃度の定量下限値は、「公共用水域等の水質測定計画 広島県」により、0.0006mg/L とした。C10-C14LAS 濃度の定量下限値は均等に 0.00012mg/L とし、測定値が定量下限値未満の場合は、その定量下限値未満に代えて、定量下限値 (0.00012mg/L) の数値を測定値とした。全ての LAS が定量下限値未満の場合に総 LAS 濃度は定量下限値未満とした。有効数字は 2 桁で、3 桁目を切り捨て、定量下限値の桁を下回る桁については切り捨てた。

3 結果

海域5地点は全て定量下限値（0.0006mg/L）未満、河川水9地点は0.0006～0.019mg/Lであった。広島市内の河川及び海域は、水生生物保全水質環境基準（LAS）の類型指定をされていないが、基準値0.02～0.05mg/Lを超える濃度は検出されなかった。（表2）

4 まとめ

LASの測定に、LC-MS/MS法を導入し、0.0006mg/Lまで定量が可能となった。洗剤残存調査としては低濃度であるが、水生生物保全水質環境基準値（LAS）を参考に、海水等、低濃度地点の測定も行いたい。

表1 前処理方法

項目	内容
固相	Waters Sep-Pack Plus PS-2
コンデーション	メタノール20ml+超純水10ml
試料量	500ml
通水装置	GL Science アクローガー-III
通水速度	20ml/分
洗浄	超純水20ml
溶出量	メタノール6ml
溶出装置	Waters Sep-Pack Elution Pump
定容量	1ml

表2 調査結果

調査地点	水系名	調査地点名	LAS (mg/L)
1	八幡川	泉橋	0.0019
2	太田川	宇津橋	0.0029
3	根谷川	根の谷橋	0.0006
4	三篠川	深川橋	0.0006
5	太田川	戸坂取水口	0.0006
6	古川	東原	0.0020
7	瀬野川	日浦橋	0.0019
8	猿猴川	仁保橋	0.0006
9	府中大川	新大州橋	0.019
A	海田湾	海田湾中央	<0.0006
B	広島湾	金輪島南	<0.0006
C	広島市地 先海域	江波沖	<0.0006
D	広島湾	17番地点	<0.0006
E	五日市・ 廿日市	26番地点	<0.0006

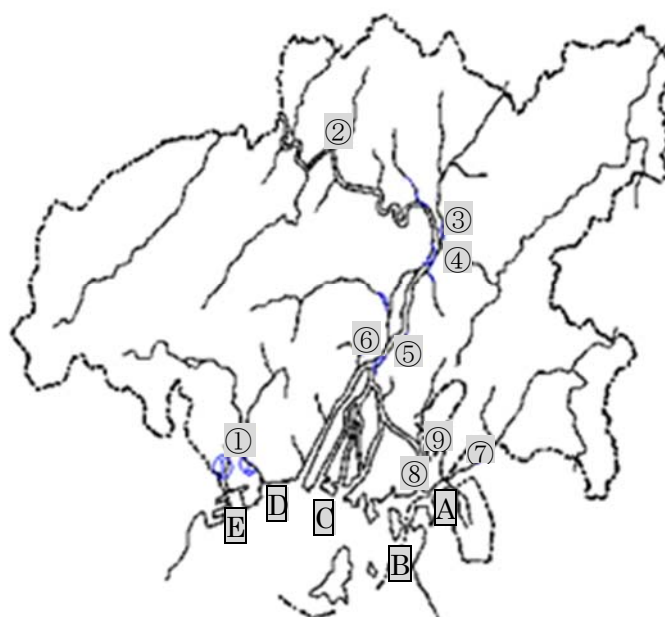


図1 調査地点

環境ホルモンの固相抽出法の検討

環境科学部 加藤 寛子

1. はじめに

内分泌かく乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)とは、環境中に存在し、生物に対してホルモンのような影響を与える物質である。例えば、下水処理排水による川魚の性の変化などが知られている。

当所では、国が実施した試験によって内分泌かく乱作用があることが推察された、ノニルフェノール(NP)、オクチルフェノール(OP)及びビスフェノール A (BPA) について調査している。これらの物質は、主に界面活性剤や樹脂の合成原料などとして使用されている。

現在、NP は、環境庁告示第 59 号付表 11 で測定方法(公定法)が規定されており、OP との同時測定が可能とされている¹⁾。

公定法では、固相抽出法が採用されており、当所が従来用いていた液液抽出法に比べて、ジクロロメタンの使用量が少なく、誘導体化も不要となっている。問題点としては、固相カートリッジからの溶出の際、溶媒の転溶操作が必要であること、脱水やクリーンアップの操作が煩雑であることが挙げられ、全国の地研でも様々な測定方法の検討が報告されている。^{2), 3), 4)}

今回、これらの報告を参考に、NP・OP 同時分析を実施したので報告する。

2. 方法

(1) 器具及び装置

- ・カートリッジ型固相カラム：Waters 製 Oasis HLB plus LP Extraction Cartridge
- ・ドライカートリッジカラム：Waters 製

Sep-Pak Dry Cartridge

- ・シリカゲルカートリッジカラム：GL サイエンス社製 InertSep Si
- ・固相抽出装置：GL サイエンス社製 AQUA Loader III
- ・固相溶出装置：Waters 製 Sep-Pak Elution Pump
- ・ガスクロマトグラフ水素炎イオン検出器(GC-FID)：島津製作所製 GC-2010 Plus
- ・ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)：日本電子社製 JMS-Q1050GC

(2) 分析条件

- ・キャピラリーカラム：DB-5MS 内径 0.25mm 長さ 30m 膜厚 0.25 μ m
- ・キャリアガス：ヘリウム 流量 1.2ml/min
- ・注入口 270°C、インターフェース 280°C、イオン源 250°C
- ・注入量：2 μ l、スプリットレス注入
- ・昇温プログラム：
50°C-20°C/min-90°C-5°C/min-120°C-20°C/min-280°C(3min)

(3) 分析方法

環境庁告示第 59 号付表 11 の NP の測定方法に準拠した。

カラムの昇温条件については野末²⁾、カートリッジの選定及び溶出溶媒については藤川ら³⁾、クリーンアップの方法等については市川ら⁴⁾の方法を参考にした。前処理方法について、アセトンで溶出後ジクロロメタンに転溶する方法から、ジクロロメタンで直接溶出する方法に変更した。また、脱水やクリーンアップ操作については、カートリッジを使用することとした。操作フローを図に示す。

水質試料 500ml	
	1N-HCl で pH3.5 とする 各サロゲート 10 μ g/mL 5 μ L 添加 添加回収用試料に NP、OP 混合標準液 10 μ L 添加
通水	HLB カートリッジ コンデ イションク (ジクロロメタン→アセトン→シリ Q 水各 10mL) 通水速度 10mL/min シリ Q 水で洗いこみ
脱水	アルゴンガス通気 30min
溶出・脱水	Dry カートリッジ コンデ イションク (ジクロロメタン 10mL) ジクロロメタン 7ml で溶出 アルゴンガスで少量に濃縮後ジクロロメタン 洗 いこみ 1 回 0.5mL に濃縮
クリーンアップ	Si カートリッジ コンデ イションク (ジクロロメタン 15mL) ジクロロメタン 洗いこみ×2 回 ジクロロメタン 5mL 少量に濃縮後ジクロロメタン 洗いこみ 1 回
濃縮	アルゴンガスで 0.5mL 以下に濃縮 内標 5 μ g/mL 10 μ L 添加 ジクロロメタンで 0.5mL にメスアップ
GC/MS 測定	

図 操作フロー

(4) 検出下限値及び定量下限値の算出

要調査項目等調査マニュアル(環境省)を参考に算出した。

河川水 500ml に NP、OP 混合標準液(OP : 20 μ g/L、NP : 100 μ g/L) を添加し、繰り返し分析を実施した。標準偏差から検出下限値(MDL) 及び定量下限値(MQL) を算出した。

3. 結果

MDL、MQL の算出結果を表に示す。OP 及び NP の MQL (NP については、各異性体の MQL の合計) は、広島県の平成 30 年度公共用水域等の水質測定計画に記載されている定量下限値(OP : 0.03 μ g/L、NP : 0.06 μ g/L) を下回った。

OP 及び NP のサロゲートの回収率は 59~79%で、目標とされる 50~120%以内であった。添加回収率は 70~117%であり、許容範囲の目安である 70~120%以内であった。

今回、固相抽出法に変更したことで、ジクロロメタン等の溶媒使用量を減らすことができた。また、脱水やクリーンアップ操作についてもカートリッジを使用することで、より簡易になり、時間も短縮された。

課題としては、内標のピークがカラムの汚れによってテーリングしやすいことが挙げられる。テーリングが見られた場合、カラムを切断または交換することになるが、保持時間を設定し直すのは非常に煩雑である。今後、内標の選定や、分析条件の検討が必要と考えられる。

4. 文献

- 1) 水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件の施行等について、環水大水発第 1303272 号、平成 25 年 3 月 27 日
- 2) 野末康宏：ノニルフェノールの分析方法、浜松市保健環境研究所年報、24、70-74 (2013)
- 3) 藤川和浩 他：ノニルフェノールの分析法の検討、福岡県保健環境研究所年報、41、97-100 (2014)
- 4) 市川智宏 他：環境水中ノニルフェノールの測定方法に関する検討、愛知県環境調査センター所報、43、9-16 (2015)

表 対象物質及び内標準物質の選択イオン及びMDL、MQLの算出結果

	異性体名	定量用 質量数	確認用 質量数	MDL ($\mu\text{g/L}$)	MQL ($\mu\text{g/L}$)
OP	4- <i>t</i> -オクチルフェノール	111	224	0.003	0.008
NP1	4-(2,4-ジメチルヘプタン-4-イル)フェノール	121	163	0.002	0.004
NP2	4-(2,4-ジメチルヘプタン-2-イル)フェノール	135	220	0.002	0.004
NP3	4-(3,6-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	135	107	0.004	0.009
NP4	4-(3,5-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149	191	0.003	0.006
NP5	4-(2,5-ジメチルヘプタン-2-イル)フェノール	135	163	0.001	0.003
NP6	4-(3,5-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149	191	0.0008	0.002
NP7	4-(3-エチル-2-メチルヘキサ-2-イル)フェノール	135	220	0.002	0.003
NP8	4-(3,4-ジメチルヘプタン-4-イル)フェノール	163	121	0.0007	0.002
NP9	4-(3,4-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149	107	0.003	0.007
NP10	4-(3,4-ジメチルヘプタン-4-イル)フェノール	163	121	0.0008	0.003
NP11	4-(2,3-ジメチルヘプタン-2-イル)フェノール	135	220	0.003	0.006
NP12	4-(3-メチルオクタ-3-イル)フェノール	191	163	0.002	0.004
NP13	4-(3,4-ジメチルヘプタン-3-イル)フェノール	149	107	0.002	0.004
NP 合計				0.0263	0.057
OP サロゲート	13C ラベル化 4- <i>t</i> -オクチルフェノール	141	113		
NP サロゲート	13C ラベル化 4-(3,6-ジメチル-3-ヘプチル)フェノール	155	113		
内標	4- <i>n</i> -ニルフェノール d 4	111	224		

※ NP4-NP6, NP8-NP10, NP9-NP13 : 立体異性体