

平成 24 年度

広島市衛生研究所 業績発表会

発表要旨集

日時:平成 25 年 3 月 8 日 午前 9 時 00 分～11 時 55 分

場所:衛生研究所 1階 大会議室

広島市衛生研究所

平成 24 年度広島市衛生研究所業績発表会

日時：平成 25 年 3 月 8 日（金）午前 9 時～11 時 55 分

場所：衛生研究所 1 階 大会議室

平成 24 年度 広島市衛生研究所業績発表会プログラム

司会：森本 章嗣

開 会：9：00

開会挨拶：岩崎幸治所長

業績発表（発表・質疑時間 合わせて 15 分）

	演 題	発表者	頁	開始時刻
座長：児玉実専門員				
1	カンピロバクターのGBS関連遺伝子の検討	鈴木 康仁	P1	9:10
2	便からのクドア抽出方法の検討	佐藤 真帆	P2	9:25
3	広島市で分離された腸管出血性大腸菌O157の分子疫学解析	田内 敦子	P4	9:40
－休憩 10 分－				
座長：京塚明美専門員				
4	Campylobacterの迅速検査法の検討	築地 裕美	P6	10:05
5	広島市におけるRSVの検出状況と遺伝子解析	田中 寛子	P8	10:20
6	CODEHOP PCR法によるエンテロウイルス検査について	藤井 慶樹	P10	10:35
－休憩 10 分－				
座長：片岡真喜夫専門員				
7	放射線照射検知の外部精度管理試験参加結果について	佐々木 珠生	※	11:00
8	ゴルフ場農薬のLC/MS/MSによる同時分析法の検討－その2－	小串 恭子	P12	11:15
9	環境中ダイオキシン類濃度の季節変動について －水質試料を中心に－	村野 勢津子	P14	11:30

※ 資料なし

閉会（講評）：岩崎幸治所長

カンピロバクター分離株のGBS関連遺伝子の検討

生物科学部 鈴木 康仁

【背景と目的】

ギランバレー症候群（以下 GBS）は、筋肉を動かす運動神経の障害により、急に四肢に力が入らなくなる難治性疾患である。呼吸器や消化器感染症状の後、1～2週間して症状が現れることが多く人口10万人当たり1～2人が発症している。先行する感染の約30%が *Campylobacter jejuni*（以下 *C.jejuni*）によるものであることが知られている。GBSは、先行感染の病原体と運動神経を形成する構成成分の構造が類似しているため、両者に共通の抗体が生成され、自己を攻撃してしまうために発症すると考えられている。*C.jejuni*は菌体外膜に、神経の細胞膜を構成する糖脂質である GM1 ガングリオシド、GD1a ガングリオシドと類似した構造を有するリポオリゴ糖（以下 LOS）を保有することが明らかとなっている。

*C.jejuni*は発熱、下痢、腹痛などを呈する食中毒の起因菌である。広島市でも毎年食中毒事件数の筆頭であり、発生防止のための啓発・指導が行われている。本菌の場合、上記のとおり GBS などの後発疾患も視野に入れた検討と対策の構築が望まれる。*C.jejuni*の神経細胞様 LOS は、本菌の有するシアル酸転移酵素 Cst - II や N-アセチルガラクトサミン転移酵素 CgtA、ガラクトース転移酵素 CgtB などにより異なるものが生合成される。そこで GBS と各種の由来株の関連性を検討するための基礎として、当所保有の分離菌株における GBS 関連遺伝子の保有状況について検討する。

【材料および方法】

1 菌株

2012年に市内医療機関から分与された散发事例患者由来菌株93株、当所で分離した下痢症患者由来菌株12株、計105株

2 GBS 関連遺伝子検出法

M.Koga、Irving Nachamkin らの報告した *cst-II*、*cgtA*、*cgtB* 各遺伝子領域を検出するプライマーを用いて PCR 法により行った。

【結果と考察】

*cst-II*を持つものは105株中24株(23%)に認められた。そのうち *cgtA*、*cgtB*を持つものは15株(14%)認められた。

今回の結果は以前当所で行われたものと割合が異なるものであった。今後さらに検討を進めて GBS 関連遺伝子の保有状況を調査していきたい。

便からのクドア抽出方法の検討

生物科学部 佐藤真帆

【はじめに】

ヒラメの生食を共通食とする有症事例については、ヒラメ筋肉内寄生性の粘液胞子虫であるナホシクドア（学名：*Kudoa septempunctata* 以下、クドア）が関与することが明らかとなり、これらの事例は食中毒として扱うことが通知された。クドアを原因とする食中毒と断定するには、喫食残品から検出する必要があるが、残品の入手は難しいのが現状である。したがって、患者の便や吐物からの検出が重要となる。現在、ヒラメからのクドア検査法は、暫定法として通知されているが、便や吐物からのクドア検査については特定の方法が定まっていない。そこで今回、便からのクドア検出が可能であるかを検討するため、クドア胞子を浮遊させた試料液を便に添加し、4種類のDNA抽出キットを用いて便中のクドアDNAを抽出、2種類の試薬を用いてリアルタイムPCRを実施し、比較したので報告する。

【材料及び方法】

1. 使用検体

便：クドア胞子が存在しないことを確認した患者便2検体（I1、I2）

2. 試験方法

(1)DNA抽出方法

10⁷個/gのクドア胞子を添加した糞便を用いて、4つの市販キットでDNA抽出を行った（表1）。

表1 使用したキット名およびメーカー

	キット名	略式	メーカー
1	QIAmp DNA Mini Kit	Mini Kit	QIAGEN
2	QIAmp DNA Stool Mini Kit	Stool	QIAGEN
3	Extract Master Fecal DNA Extraction Kit	Extract Master	epicentre
4	UltraClean [®] Fecal DNA Isolation Kit	UltraClean	MO BIO

(2)リアルタイムPCR法

各キットで抽出したDNAをテンプレートとし、Premix Ex Taq(TaKaRa)、TaqMan Universal Master Mix II(ABI)の2種類の試薬を用いて、リアルタイムPCRを行った。

【結果及び考察】

クドアを添加した便からの抽出を各検体(I1,I2)について2回行い、4種類の抽出キットおよび2種類の試薬を用いた際のcycle threshold(Ct)値を表2に示した。

表2 キットおよび試薬別のリアルタイムCt値

	Premix Ex Taq (TaKaRa)					TaqMan Universal Master Mix II (ABI)				
	1回目		2回目		平均	1回目		2回目		平均
	I1	I2	I1	I2		I1	I2	I1	I2	
MiniKit	21.7	21.9	21.0	20.0	21.2	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
stool	27.5	26.9	25.2	24.2	26.0	38.7	35.6	44.9	31.4	37.6
ExtractMaster	24.7	23.7	27.2	24.2	25.0	35.1	25.6	33.0	44.5	34.6
UltraClean	25.8	23.7	28.4	27.3	26.3	34.6	29.9	29.9	32.3	31.7

(1)キット間の違いについて

MiniKitによる抽出ではTaKaRaの試薬を用いると、Ct値の平均が21.1と、4種類のキットの中では最も小さかったが、ABIの試薬を用いると検出されなかった。これについては、クドア陽性のヒラメを検体として同キットにより抽出し、ABIの試薬を用いてリアルタイムPCRを行うと検出されることから、便中の何らかの阻害物質がMiniKitの抽出工程では排除されず、ABIの試薬の働きを阻害していることが考えられた。他の3つのキットについては、どの試薬を用いても検出することができ、同一試薬を用いた場合での抽出キット間によるCt値の大きな差はみられなかった。

4種類のキットの中では、MiniKitがCt値は最も小さい結果であったが、MiniKitは本来、組織や血漿等からの抽出用キットである。したがって、患者便によっては消化しきれなかった食物の繊維等の固形物が含まれている場合があり、便を完全に液状化するまでに時間を要してしまうという欠点がある。Extract Masterについては抽出可能な糞便は50 mg以下となっており、発症から数日が経過している場合や便中にクドアが少量しか含まれない場合、検出が難しいと考えられる。また、UltraCleanについてはビーズを用いた抽出キットであり、本来、そのビーズを攪拌するには専用の攪拌機が必要であるが、今回は10分間激しくボルテックスを行うことで代用した。しかし、この方法では残渣を十分に取り除くことができず、カラムが何度も詰まってしまった。Stoolについては操作が比較的容易であり、抽出可能な糞便も数mgから数gまでと幅広く対応できるため、最も有用な方法であると考えられた。

(2)PCR反応試薬間の違い

試薬間で比較すると、TaKaRaに比べて、ABIの試薬を用いた場合のCt値が5~10程大きい結果となった。また、ABIの試薬を用いた場合、検体や実験日の違いによるCt値のばらつきがみられた。したがってTaKaRaの試薬を用いた方が安定してクドアを検出できると考えられた。また、Ct値が小さいということは、増幅効率が良いといえることから、反応時間を短く設定することで、リアルタイムPCRにおけるクドアの検出時間を短縮できるということも今後の展望として考えられる。

以上のことより当所で糞便からクドアの検出を行う場合、QIAmp DNA Stool Mini Kitを用いて抽出を行い、Premix Ex Taq(Takara)を用いてリアルタイムPCRを行う方法が適当であると考えられた。

今回、糞便中のクドア胞子は 10^7 個/gと高濃度であった。今後は希釈したクドア試料液を便に添加し、定量限界を求めることが課題である。また、今年度は広島市においてクドアを原因とする食中毒の発生がなかったため、実際の検体を用いて検査することができなかった。今後は実例も含め、検体数を重ねていくことにより、さらに抽出方法を検討していく予定である。

【目的】

腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 を分子疫学的解析法であるパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)、IS-printing system[®] 法 (IS-printing)、Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) の 3 法を用いて解析し、3 法間の型別能についての比較を行った。

【材料】

2006 年から 2012 年までに広島市で分離された EHEC O157 139 株を用いた。

【結果および考察】

1. IS コードを軸にした比較

2006～2012 年の分離株の中で、家族内感染や共通食があるなどの同一事例内の株同士では、IS コードが一致していれば他の 2 法でも結果がほぼ一致していたが、図 1 に例を示すように、事例間で比べると、IS コードが一致していても PFGE バンドパターンが違い、さらに MLVA RN も異なっていたケースが 5 例あった。散発事例間の関連性を IS コードのみで見る場合、疫学的背景はさらに重要になることが示唆された。

2. MLVA RN を軸にした比較

図 2 に示すように、MLVA RN が 9 領域で全て一致していた場合、家族又は集団事例内でも散発事例間でも、PFGE バンドパターンの類似度は 95%以上と高く、さらに IS コードは 2 例(10033 と 10034、10050、10051 と 10054) を除き全て一致していたことから、MLVA は散発事例間の関連性を見る上で、有用性が高いことが示唆された。しかし、9ヶ所の VNTR 領域の内、1ヶ所のみが 1 違っている例も存在することから、どの程度の違いまでが同一株と判断できる許容範囲であるか明確にしていくことが今後の課題である。

3. PFGE バンドパターンを軸にした比較

PFGE バンドパターンの類似度が高いものでも、IS コード及び MLVA RN が異なっているケースが多数存在したことから、3 種の異なる分子疫学的解析法を用いることは、事例間の関連性を判断する上で有意義である。

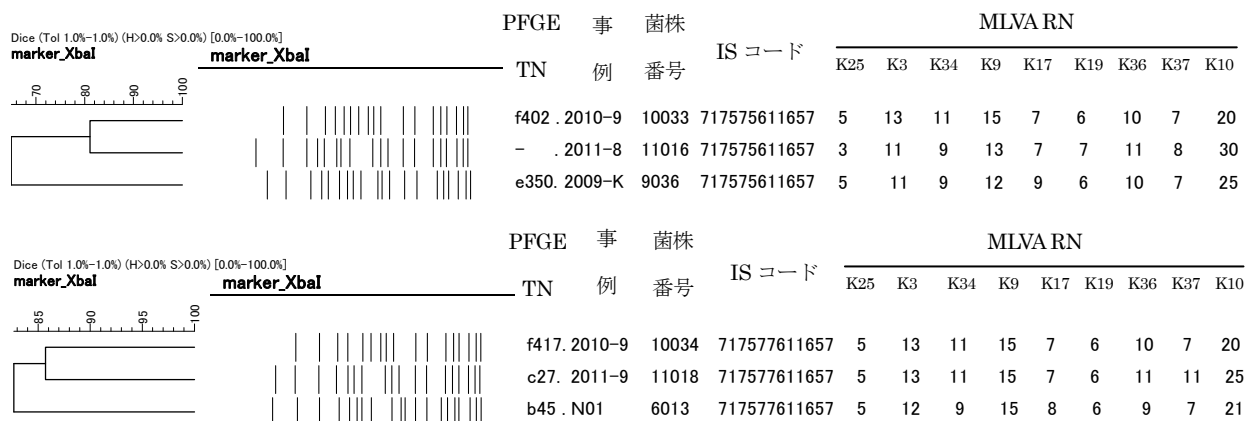


図 1 同一 IS コード菌株の PFGE クラスタ及び MLVA repeat number (RN)

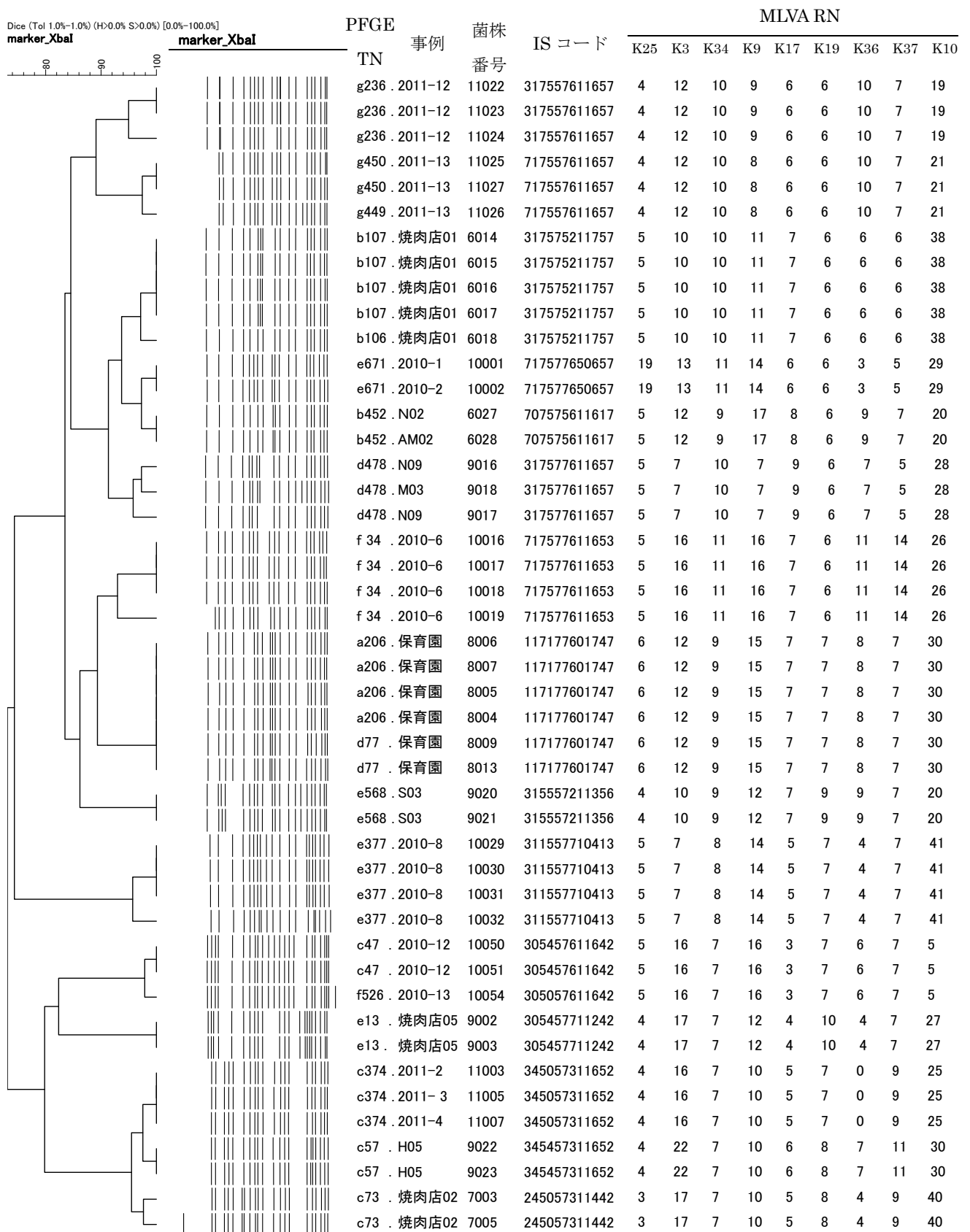


図2 同一 MLVA RN 菌株の PFGE クラスター及び IS コード

Campylobacter の迅速検査法の検討

生物科学部 築地裕美

【背景および目的】

Campylobacter による食中毒は事件数・患者数ともに非常に多い細菌性食中毒である。現在、検査は培養法にて行われており、同定までに 4～5 日程度かかる。そのため、食中毒発生時の原因究明にはより迅速な検査法が求められている。

今回は、食中毒事例等の検体を用い、LAMP 法およびイムノクロマト法の検討を行った。

【材料および方法】

1. LAMP 法による検討

(1) 検体

食中毒・有症苦情事例（検便、施設拭き取り等） 112 検体、収去品（鶏肉等） 10 検体、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ標準試験法 NIHSJ-02 の評価を目的とした共同試験の供試検体 94 検体の合計 216 検体を使用（このうち、*C.jejuni* 25 株、*C.coli* 3 株、*C.jejuni* / *coli* 不明 18 株を分離）した。

(2) 方法

各種増菌液にて培養後、「Loopamp カンピロバクター検出試薬キット（栄研化学）」を用いて LAMP 法を行った。

2. イムノクロマト法による検討

(1) 検体

食中毒・有症苦情事例（検便、施設拭き取り等） 35 検体、収去品（鶏肉等） 8 検体、共同試験供試検体 14 検体の合計 57 検体を使用（このうち、*C.jejuni* 12 株、*C.coli* 3 株、*C.jejuni* / *coli* 不明 2 株を分離）した。

(2) 方法

各種増菌液にて培養後、「NH イムノクロマトカンピロバクター（以下 NH イムノクロマト、日本ハム）、シカイムノクロマトカンピロバクター II（以下シカイムノクロマト、関東化学）およびシングルパス・カンピロバクター（以下シングルパス、メルク）」を用いて、イムノクロマト法を行った。

【結果】

1. 各検査法の検出率

LAMP 法は非特異反応または死菌由来 DNA による反応と思われた 2 検体を除き、21.0% (45 検体/214 検体) で、培養法 (21.3%, 46 検体/216 検体) とほぼ同等であった。一方、イムノクロマト法は、NH イムノクロマトおよびシカイムノクロマトは 14.0% (8 検体/57 検体)、シングルパスは 15.8% (9 検体/57 検体) で、LAMP 法に比較して低い検出率であった。

2. LAMP 法による検討

結果を表 1 に示す。培養法の結果と一致したのは、98.6% (213 検体/216 検体) であった。また、陽性的中率⁽¹⁾および陰性的中率⁽²⁾は、それぞれ 95.7%, 99.4% と非常に高かった。

3. イムノクロマト法による検討

結果を表2に示す。培養法の結果と一致したのは、NHイムノクロマトおよびシカイムノクロマトでは84.2%（48検体/57検体）、シングルパスでは86.0%（49検体/57検体）であった。

また陽性的中率は3法とも100%、陰性的中率はNHイムノクロマトおよびシカイムノクロマトで81.6%、シングルパスで83.3%であった。

【まとめ】

今回の検討による検出率は、培養法、LAMP法、シングルパス、NHイムノクロマトおよびシカイムノクロマトの順に高かった。

LAMP法およびイムノクロマト法を用いることで、検査開始から2日目には

*Campylobacter*の存在を推定することができた。また、LAMP法の陽性的中率および陰性的中率はともに95%以上を示しており、その有用性が示唆された。その一方、イムノクロマト法の陽性的中率は100%であったのに対し、陰性的中率は約80%と偽陰性に注意しなければならない。

今後は、LAMP法については反応阻害物質等の影響評価やEMA処理による生菌由来DNAの選択的検出、イムノクロマト法については検出感度の向上を目的とした増菌培養液の前処理法の検討が必要である。さらに、増菌液や菌種による検出率の評価や他の迅速検査法であるリアルタイムPCR法の検討も行っていきたい。

【謝辞】

今回の発表にあたり、ご協力いただきました食品保健課および食品指導課等関係者の方に深謝します。

表1 培養法とLAMP法との比較

		LAMP法		計
		+	-	
培養法	+	45	1	46
	-	2	168	170
計		47	169	216

+:陽性, -:陰性

表2 培養法とイムノクロマト法との比較

		イムノクロマト法		計
		+	-	
培養法	+	8 (9)	9 (8)	17 (17)
	-	0 (0)	40 (40)	40 (40)
計		8 (9)	49 (48)	57 (57)

()内:シングルパスの結果, +:陽性, -:陰性

(1) 陽性的中率 (培養法における陽性検体数) / (LAMP法またはイムノクロマト法における陽性検体数) ×100

(2) 陰性的中率 (培養法における陰性検体数) / (LAMP法またはイムノクロマト法における陰性検体数) ×100

1 背景及び目的

RS ウイルス感染症は RS ウイルス (RSV) を病原体とする呼吸器感染症であり、感染症発生動向調査事業において 5 類感染症の小児科定点把握疾患に指定されている。例年冬季に流行のピークが見られるが、2012 年は 8 月末頃から全国で定点医療機関からの報告数が急増した。

RSV の G 蛋白は中和抗体の誘導に関連する表面抗原であり、サブグループ A・B に大きく分けられる。またそれぞれに多くの遺伝子型が報告されている。今回、広島市で検出された RSV について疫学的特徴を明らかにするために遺伝子解析を行ったので報告する。

2 方法

2008 年 11 月から 2012 年 10 月までの間に感染症発生動向調査事業において採取された呼吸器疾患患者検体 1963 検体を対象として、RSV の各サブグループについて特異的な Real Time-PCR を実施し RSV を検出した。また検出された RSV について G 遺伝子を標的とした PCR を実施した。得られた増幅産物を用いてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、サブグループ A は 270bp、サブグループ B は 330bp について系統樹解析を行った。

3 結果

調査の結果、Real Time-PCR により RSV が 167 検体から検出された。そのうちサブグループ A は 109 検体(63.5%)、サブグループ B は 58 検体(36.5%)であった。またサブグループ A・B 両方が検出された検体が 2 検体あった。

RSV が検出された患者の年齢は、各サブグループともに 2 歳以下が全体の 8 割以上を占めた。また患者の症状としては、発熱、下気道炎が 7 割以上を占め、少数ではあるが、意識障害や脳炎・脳症などの重篤な症状もみられた。今回の調査では各サブグループに症状などの目立った差は見られなかった。

検出された RSV のうちシーケンスを実施した 56 検体について系統樹解析を行った結果、サブグループ B は 19 検体すべてが遺伝子型 BA に分類された。(図 1) サブグループ A については 34 検体が遺伝子型 NA1、2 検体が遺伝子型 NA2 に分類され、2012 年に採取された 1 検体は遺伝子型 ON に分類された。(図 2)

4 考察

今回の調査により、2008 年以降広島市において流行していた RSV は、系統樹解析の結果サブグループ A の遺伝子型 NA1 とサブグループ B の遺伝子型 BA がほとんどを占めていたことがわかった。これらは系統樹では同じクラスターに属していることから年を隔てても大きな遺伝的差はなく 2008 年から 2012 年までの間同系統の RSV が流行を続けていることが示唆された。

2012 年に当所で RSV が検出されたのは 6 検体で、そのうち 5 検体はサブグループ A の遺伝子型 NA1 に分類された。また広島市では初めて遺伝子型 ON も検出されたが、1 検体のみであったため、2012 年の大きな流行の原因であったかは不明である。2011 年 10 月に迅速診断キットが保険適応され普及してきたこともあり、医療機関で診断される例が増えたことも 2012 年の報告増加の一因であると考えられる。

今回の調査で検出されたサブグループ B の遺伝子型 BA、サブグループ A の遺伝子型 ON はともに G

遺伝子上に重複配列をもっており抗原性に大きな変化が起きている。遺伝子型 BA は 2003 年にバングラデシュで報告された遺伝子型であるが、現在は世界中で流行している。また遺伝子型 ON についても 2011 年にカナダで報告された遺伝子型であるが、本邦でも 2012 年に千葉県で報告があり、今後も動向が注目される。

5 謝辞

広島市感染症発生動向調査事業に協力いただいている広島市内の定点医療機関各位に深謝します。

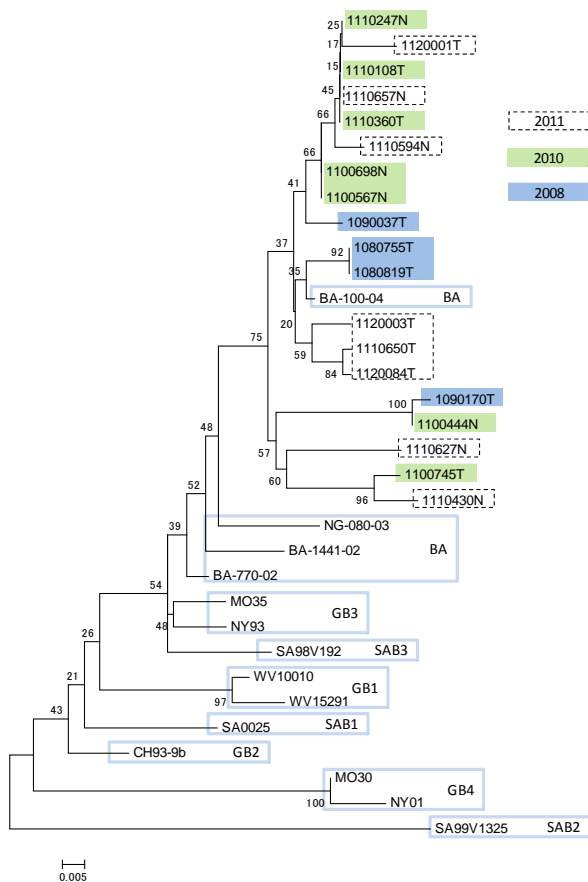


図 1 RSV サブグループ B 系統樹 330bp

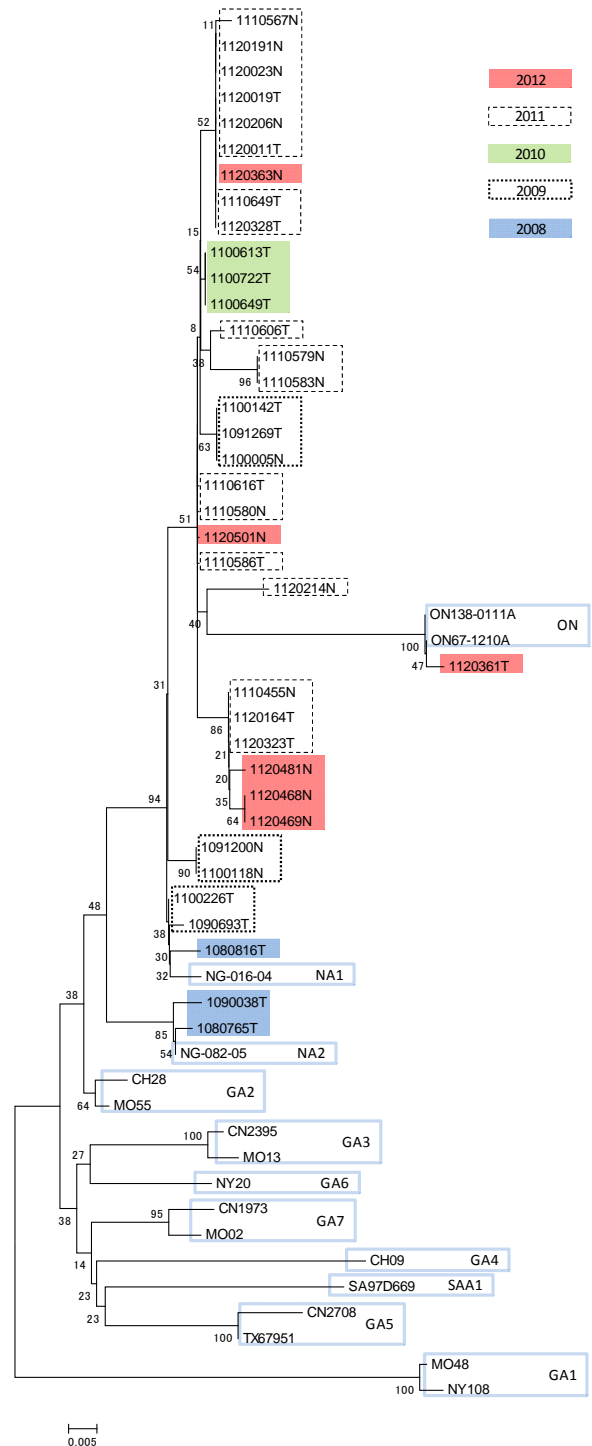


図 2 RSV サブグループ A 系統樹 270bp

CODEHOP PCR 法によるエンテロウイルス検査について

生物科学部 ○藤井 慶樹 田中 寛子 山本 美和子
京塚 明美 石村 勝之

【はじめに】

エンテロウイルス(EV)は小児感染症の主要な原因ウイルスであり、急性灰白髄炎(ポリオ)、無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナ、心筋炎、肝炎、上下気道炎など、多彩な臨床症状を引き起こす。同ウイルスには多数の血清型が存在し、毎年、様々な血清型のウイルスが流行する。

当所での EV 検査は、培養細胞を用いたウイルス分離と中和試験による血清型同定を主体に行っているが、培養細胞での分離が困難なウイルスの存在や様々な要因により中和試験がうまくいかず、血清型の同定に時間を費す場合が多々ある。そこで、中和試験だけでなく、遺伝子検査も併用して行っているが、これについても検出用プライマーの増幅効率の問題や VP1 領域以外の領域で型別を行うことによる遺伝子型と血清型の相違などの問題を抱えている。

今回、これらの問題点を解決し、検査にかかる負担を軽減することを目的に、2006 年に Nix ら¹⁾によって発表されたすべての EV の VP1 領域を高感度に増幅し、血清型と最も関連の深い VP1 領域のシーケンス解析を行うことで、血清型と同一の遺伝子型を決定することが可能とされる CODEHOP PCR 法について検証したので、その概要を報告する。

【材料及び方法】

2008年から2012年に培養細胞で分離され、中和試験で血清型を同定した(中和試験ができなかった、うまくいかなかった等の理由でシーケンス解析によって同定したものも含む。)EV分離株25検体と培養細胞では分離されず、PCR検査でEVが検出された臨床検体1検体の計26検体を材料とした。

CODEHOP PCR法は4種類のEV特異プライマーを混合した逆転写反応、VP1領域を増幅する224/222、AN89/AN88プライマーによるnested PCRの3ステップからなる。まず、検体からウイルスRNAを抽出後、当所で採用しているオリゴdT、ランダムプライマーを用いた逆転写反応(A)とCODEHOP PCR法のEV特異プライマーを用いた逆転写反応(B)をそれぞれ行い、逆転写効率を比較した。続いて、(A)により得たcDNAについては従来行ってきたVP4-VP2領域及びVP2領域を増幅するPCRを、(B)により得たcDNAについてはVP1領域を増幅するCODEHOP PCR法を行い、PCR増幅効率の差を比較した。さらに、CODEHOP PCR法で得られたVP1領域の増幅産物についてシーケンス解析を行い、BLASTによる相同性検索で遺伝子型を決定し、血清型の明らかな標準株との相同性比較及び中和試験の結果との比較を行い、遺伝子型と血清型の相関性を調べた。

【結果】

1 逆転写効率の比較

逆転写後のcDNAをEV検出用のリアルタイムPCR法で検証した結果、オリゴdT、ランダムプライマーを用いた場合とEV特異プライマーを用いた場合とで、検出されるEVのCt値に大きなずれはなく、EV特異プライマーを用いても問題なく逆転写が行われていた。

2 PCR増幅効率の比較

VP4-VP2領域を増幅するプライマー及びVP2領域を増幅するプライマーを用いてPCRを行った場合は、EV分離株を用いても検出陰性であったり、検出されても非特異反応が多かったり、増幅のよくないものが認められたが、CODEHOP PCR法では検証に用いたEVのVP1領域が非特異反応もなく良好に増幅された。

3 遺伝子型と血清型の比較

VP1領域のシーケンス解析後、得られた塩基配列をBLASTで相同性検索し、遺伝子型を決定した上で、血清型の明らかな標準株との相同性を比較した結果、「塩基配列で75%以上、アミノ酸配列で88%以上であれば同一血清型としてよい。²⁾」の条件をクリアし、遺伝子型と血清型は一致した。さらに、その結果は中和試験で判定した血清型の結果とも一致した。

【まとめ】

従来採用してきたEVのVP4領域やVP2領域のPCRでは、しばしば増幅効率の悪い例に遭遇し、その結果、プライマーを変更して検査のやり直しをするなどの二度手間に陥る事態が発生する。今回検証したCODEHOP PCR法はEVのVP1領域を非特異反応なく、一回の検査で良好に増幅でき、かつ、VP1領域のシーケンス解析で決定した遺伝子型は血清型と完全に一致したため、中和試験ができない場合、うまくいかない場合などには血清型と同一の遺伝子型を決定する手段として有効に利用できる。

CODEHOP PCR法はEV特異プライマーを用いた逆転写を行うので、逆転写後のcDNAは他のウイルス検索に使用できないなどの欠点もあるが、今後は、対象範囲を分離株だけでなく臨床検体にも広げ、さらにその有用性を検討していきたい。

【文献】

- 1) W. Allan Nix, *et al.* Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotype from Original Clinical Specimens. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 2006; 44(8):2698-2704.
- 2) 国立感染症研究所:無菌性髄膜炎病原体検査マニュアル

ゴルフ場農薬の LC/MS/MS による同時分析法の検討—その 2—

環境科学部 小串 恭子

はじめに

ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の未然防止を図ることが緊急の課題となっている。このため、農薬の使用に当たっては、農薬取締法に基づき安全評価がなされた登録農薬の適正使用や使用量の削減等について指導が徹底される必要があるが、その際、これらの指導の実効を期す上で、ゴルフ場から排出される水に含まれる農薬の実態把握に努め、その結果に基づき、必要に応じて随時、ゴルフ場に対して適切な改善措置を求めることが肝要と考えられる。¹⁾

平成 22 年度に調査項目の変更が行われ、それに伴い液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(以下 LC/MS/MS)による 43 成分同時測定の方法が環境省により示された。

昨年、この標準法で検討を行った。その際、検出下限値のとれなかったイプロジオンとフラザスルフロンについて、測定条件の再検討を行い良好な結果が得られたので報告する。

対象物質

positiveモード：35成分

アセタミプリド、アゾキシストロビン、イソキサチオン、イソプロチオラン、イプロジオン、イミダクロプリド、エトキシスルフロン、オキサジクロメホン、カフェンストロール、クロチアニジン、シデュロン、ジフェノコナゾール、シプロコナゾール、シマジン、シメコナゾール、ダイアジノン、チアメトキサム、チフルザミド、テトラコナゾール、テブコナゾール、テブフェノジド、テルブカルブ、トリフルミゾール、トリフルミゾール代謝物、ピリブチカルブ、フェニトロチオン、ブタミホス、フルトラニル、プロピコナゾール、プロピザミド、ペンシクロン、ペンディメタリン、ボスカリド、メタラキシル、メプロニル

negativeモード：8成分

カフェンストロール脱カルバモイル体、シクロスルファムロン、ジチオピル、トリクロピル、ハロスルフロンメチル、フラザスルフロン、ベンスリド、メコプロップ

機器操作条件

カラム：Mightysil RP-18GP (HPLC用ODSカラム)

カラム槽温度：40℃

溶離液：5mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノールの混液(80:20)から(10:90)までの濃度勾配を13分間で行い、そのまま14分間維持

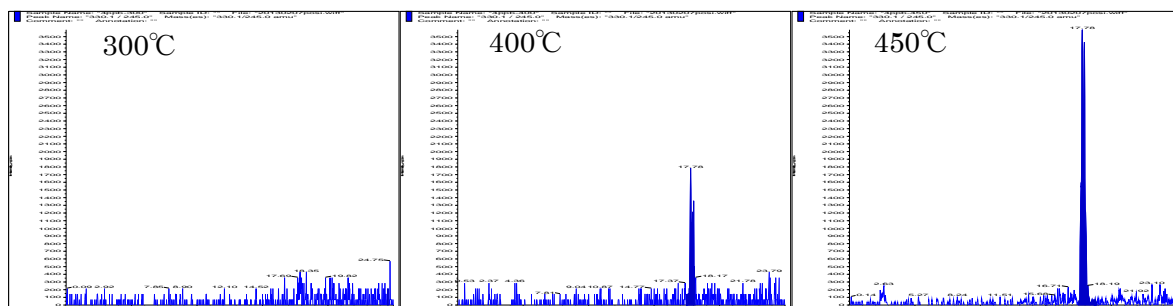
試験方法

positiveモード及びnegativeモードにおいてイオンソースの温度を変更し、43成分混合標準溶液を7回測定して検出下限値を検討した。

試験結果

[positiveモード]

イオンソースの温度を300℃、400℃及び450℃で再検討を行った。その結果、300℃では検出されなかったイプロジオンが、400℃及び450℃で検出された。



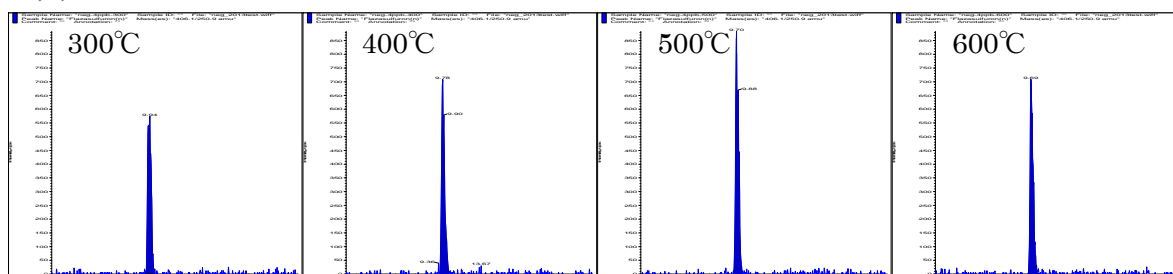
このとき、イプロジオン以外の34成分中、4成分で感度が大きく減少した。

450℃で混合標準液の7回繰り返し測定を行った結果、感度の大きく減少した4成分及びイプロジオンについても、ゴルフ場農薬暫定指針値の10分の1以下まで検出可能であることを確認した。

[negativeモード]

イオンソースの温度を300℃、400℃、500℃及び600℃で再検討を行い、良好な感度の得られた400℃において、7回繰り返し測定を行った。positiveモードからnegativeモードでの測定に変更したフラザスルフロンを含むすべての成分について、ゴルフ場農薬暫定指針値の10分の1以下まで検出可能であることを確認した。

フラザスルフロンの



まとめ

今回の実験で同時測定する43成分の全てについて、検出下限値を求めることができた。

昨年度の検討では、添加回収率が70%を下回っていたためトリフルミゾール、ペンディメタリンに関して定量下限値を定めることは出来なかった。2成分ともに疎水性の高い物質であるため、7月に実試料を用いての添加回収試験では、固相抽出カラムを十分に脱水した後に溶出を行ったところ良好な結果が得られた。

文献

1)環境庁水質保全局長通知：ゴルフ場農薬で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針 平成22年9月29日

はじめに

焼却炉等から環境中に放出されたダイオキシン類は、大気中で煤や粒子等に吸着して漂い、雨や雪に含まれて地面や河川などに落下し、河川や海に流され、河川や海の底の泥の中に蓄積される。

当所では、土壌、河川や海の水(水質)、底の泥(底質)のダイオキシン類を分析している。これまでに、汚染源を調査する目的で、底質、土壌の測定結果について解析を実施し、主な汚染源は既に使用禁止となっている除草剤と PCB 製品であることがわかってきた。

現在は、土壌と底質の間にある水質について解析を始めている。水質については、年 2 回夏季と冬季に調査を実施しているので、今回は水質中ダイオキシン類濃度の季節変動について解析した結果を報告する。

方 法

1 対象試料

当所で分析を実施した試料のうち、平成 16 年度から平成 23 年度までの海水試料 64 件(4 地点×8 年間×2 季、濃度範囲:0.015~0.11 pg-TEQ/g)、平成 17 年度から平成 23 年度までの河川水試料 124 件(9 地点×7 年間×2 季、ただし 1 地点については 6 年間、濃度範囲:0.018~0.62 pg-TEQ/g)について解析を実施した。調査地点を図 1 に示す。

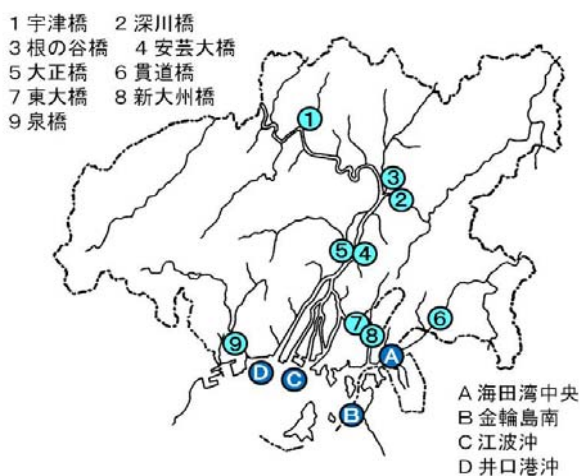


図 1 調査地点

2 対象項目

ポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン(PCDDs)、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)およびダイオキシン様ポリ塩化ビフェニル(DL-PCB)濃度を解析に用いた。

3 対象データ

PCDDs および PCDFs 総量について、地点ごとに季別に全年度を平均したものをダイオキシン類濃度(DXNs)とし、DL-PCB 総量について同様に平均したものを PCB 類濃度(PCBs)とした。

結 果

地点ごとの夏季 DXNs、夏季 PCBs、冬期 DXNs、冬期 PCBs を図 2 に示す。全地点を比較したところ、3 つのグループに分けられた。グループごとの特徴を以下に述べる。

1 海域グループ

1 つ目のグループは海域 4 地点のグループ(SG)で、地点ごと季別の DXNs および PCBs を図 3 に示す。

PCBs は、4 地点すべてで冬季より夏季の方が高くなっていた。

DXNs については 2 つのパターンがあり、海田湾中央(A)及び金輪島南(B)については冬季の方が高く、江波沖(C)及び井口港沖(D)については夏季の方が高かった。海域の底質についても、PCB 製品からの汚染パターンが今回と同様に、東寄り 2 地点との西寄り 2 地点に 2 分された。

2 淡水河川域グループ

2 つ目のグループは淡水河川 7 地点(①~⑥および⑨)のグループ(RG1)で、地点ごと季別の DXNs および PCBs を図 4 に示す。

7 地点すべてで同様の傾向を示しており、PCBs に比べて DXNs が高かった。また、DXNs、PCBs いずれも夏季は冬季よりも高くなっていた。夏季に高濃度となるのは、降水量と関連していると推測できる。すなわち、降水により流域の土壌等が河川に流れ混むうえに、水量が増えて流速が上がり底質が巻き上がってしまうことによるのではないかと考えられる。

3 感潮河川グループ

3 つ目のグループは感潮河川グループ(RG2)で、

地点ごと季別のDXNsおよびPCBsを図5に示す。

2地点は異なる傾向を示した。東大橋(⑦)はSG1と同様の傾向であったが、PCBsの濃度がDXNsの濃度と同程度である点が異なっていた。新大州橋(⑧)では海域の東寄り2地点と同様にDXNsについて冬季の方が夏季よりも濃度が高くなっていた。しかし、PCBsについては他のどの地点とも異なり、冬季の方が高い濃度となっていた。

まとめ

海域及び河川域水質における夏季及び冬季のダイオキシン類測定データを解析した結果、3つの

グループに分けられることがわかった。1つは海域の4地点で、その特徴はさらに2つのグループにわけられた。

次の1つは河川域の7地点(上流域5地点、下流域2地点)で、その特徴はダイオキシン類に比べてPCB類の濃度が低いこと、冬季に比べると夏季濃度が高いことであった。最後の1つは河川域の2地点(下流域の感潮河川)で、その特徴は地点により異なる結果であった。

今回は、それぞれのグループの特徴を裏付ける原因について、解析することができなかったが、今後は、この原因を調査していきたい。

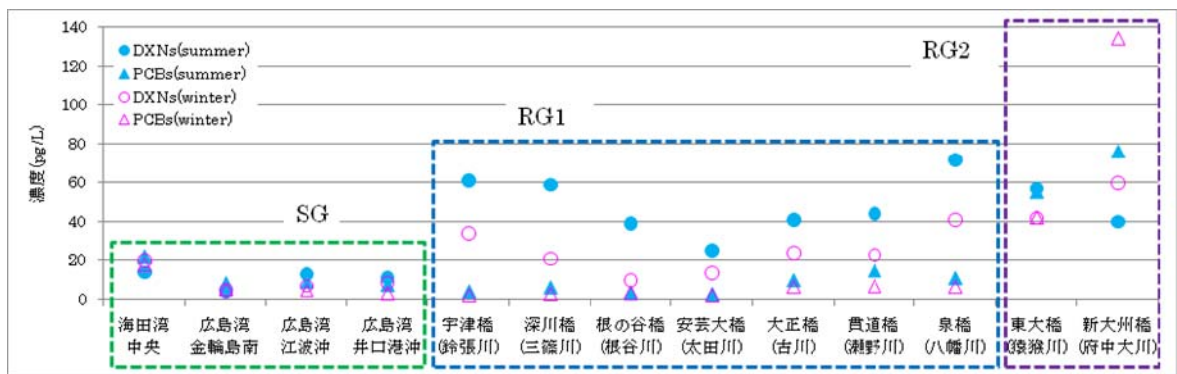


図2 各地点におけるダイオキシン類濃度の季節変動

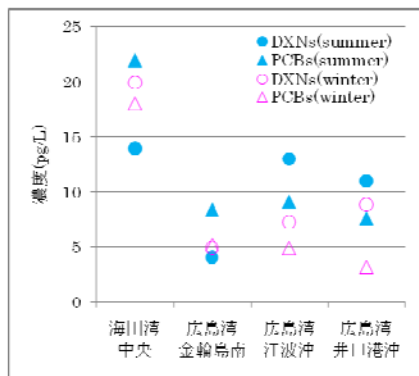


図3 SG

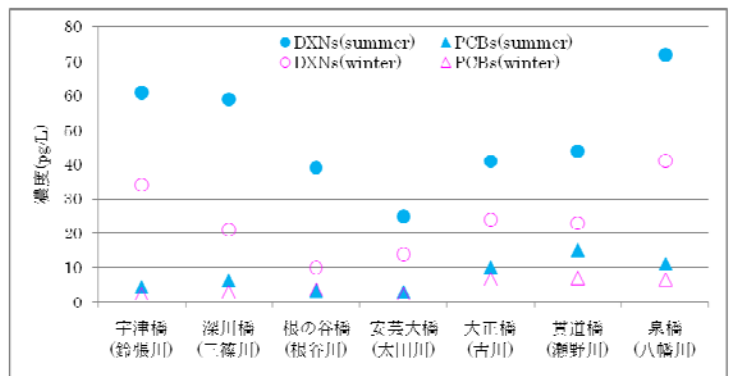


図4 RG1

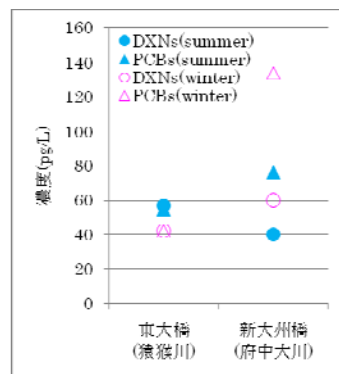


図5 RG2