

平成 23 年度

広島市衛生研究所 業績発表会

発表要旨集

日時:平成 24 年 3 月 8 日 午前 9 時 20 分～午後 2 時 50 分

場所:衛生研究所 1階 小会議室

広島市衛生研究所

<input type="checkbox"/>	開 会:9:20			
<input type="checkbox"/>	開会挨拶:笠間所長			9:20
<input type="checkbox"/>	業績発表(発表・質疑時間 合わせて 15 分)			
	演 題	発表者		開始時刻
	座長:伊藤専門員			
1	クドア属の検査について	(佐藤 真帆)	P1	9:30
2	広島市で発生したボツリヌス症について	(京塚 明美)	P3	9:45
3	2011 年に広島市で発生した EHEC O157:H7 の分子疫学的解析	(田内 敦子)	P5	10:00
4	LAMP 法を用いた浴槽水レジオネラ属菌の迅速検査法の検討	(築地 裕美)	P7	10:15
	－休憩 10 分－			
5	2011 年の広島市における腸重積症からのウイルス検出	(田中 寛子)	P8	10:40
6	2011 年の広島市におけるライノウイルスの検出状況	(藤井 慶樹)	P10	10:55
7	2011 年パレコウイルス 3 型流行について	(山本 美和子)	P12	11:10
8	カキ中のヒト糞便由来 F 特異 RNA 大腸菌ファージの検出法の検討	(阿部 勝彦)	P13	11:25
	－昼休憩－			
	座長:國弘専門員			
9	広島市における放射性物質の測定について	(橋本 和久)	P14	13:00
10	ICP-MS法による飲料水の金属類一斉分析法導入の検討	(金行 良隆)	P16	13:15
11	ICP-MSを使用した大気粉じん中の金属元素分析法の検討	(市川 恵子)	P17	13:30
12	加工食品中の残留農薬分析	(佐々木 珠生)	※1	13:45
13	LC/MS/MS によるゴルフ場農薬 44 成分同時分析の検討	(森本 章嗣)	P18	14:00
14	異性体指標法によるダイオキシン類汚染源寄与の推算	(村野 勢津子)	P20	14:15
	※1 資料なし			
<input type="checkbox"/>	閉会(講評):笠間所長			14:30

クドア属の検査について

生物科学部 ○佐藤真帆 坂本綾 国井悦子 築地裕美 田内敦子 井澤麻由
京塚明美 伊藤文明 橋本和久

【はじめに】

近年、全国的に、食後数時間程度で一過性の嘔吐や下痢を呈すが、軽症で終わる原因不明の有症事例が多発している。これらの有症事例の中では特にヒラメの刺身の喫食が多く見られた。原因と考えられるヒラメからは、クドア属の寄生虫 (*Kudoa septempunctata*) が確認され、動物試験においても病原性を有していた。これらの結果から粘液胞子虫の一種である *Kudoa septempunctata* の関与があることが強く示唆された。これを受け、厚労省から昨年7月に「*Kudoa septempunctata* の検査法 (暫定版)」が通知された。

このような中、昨年9月広島市でヒラメが疑われた食中毒事件が発生し検査を実施したのでその概要を報告する。また、クドア属の検査法周知のため関係機関に対しクドア検査の研修を行ったので併せて報告する。

【材料と方法】

1. 使用検体

陽性検体：国立感染研より提供を受けたヒラメ

検体：ヒラメの検食および同じ水槽で飼育されていたヒラメ

2. 検査方法

(1) 顕微鏡法

ヒラメに PBS を加えてメッシュで濾過後、遠心分離し、その沈査に PBS を 500 μ l 正確に加える。この懸濁液 10 μ l とトリパンブルー-10 μ l を混合した後、血球計算版に添加し、光学顕微鏡 ($\times 200$) でクドア胞子の数を測定、ヒラメ 1g 当たりのクドア胞子数を算出した。

(2) リアルタイム PCR 法

DNA の抽出はキアゲン社 QIAmp DNA Mini Kit を使用した。プライマーおよびプローブの配列は以下の通りである。反応調整液は (表 1) の通り作成し実施した。

プライマー Kudoa-F : CATGGGATTAGCCCCGTTTA

Kudoa-R : ACTCTCCCCAAAGCCGAAA

プローブ Kudoa-P : FAM - TCCAGGTTGGGCCCTCAGTGAAAA - TAMRA

表 1 リアルタイム PCR 反応調整試薬

	試薬	
1	TaqMan 2 \times Universal Master Mix	10 μ l
2	プライマー・プローブミックス	2 μ l
3	検体からの DNA 溶液 or 陽性コントロール or 精製水	4 μ l
4	精製水	4 μ l
反応条件	95 $^{\circ}$ C 10分 1サイクル \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 15秒、60 $^{\circ}$ C 60秒 45サイクル	

【検査結果】

検査法 検体名	顕微鏡法 (クドア孢子数/1g)	リアルタイム PCR 法 (rDNA コピー数/1g)
検体1	定量限界以下	陰性(9.0×10^6)
検体2	陰性	陰性
陽性検体	7.8×10^6	2.8×10^9
判定基準	10^5 以上陽性	10^7 以上陽性

【研修実施内容】

- (1) クドア属 (*Kudoa septempunctata*) の総論
- (2) 検査法の実習 (顕微鏡検査)
- (3) 実習後の検討会

【まとめ】

顕微鏡検査において、検食のヒラメについては *Kudoa septempunctata* は確認されたが定量限界以下、同一水槽にいたヒラメについては孢子が確認されず陰性であった。リアルタイム PCR において、検食のヒラメについては 9.0×10^6 コピー数/g と判定基準の 10^7 未満で陰性判定、同一水槽にいたヒラメについては検出されなかった。今回、顕微鏡検査で全視野に数個と定量限界以下だった検体 1 についてはリアルタイム PCR で陰性(9.0×10^6 コピー数/g)と判定されたが、判定基準値(10^7 コピー数/g)に近い値であった。顕微鏡検査でクドア孢子が確認されなかった検体 2 はリアルタイム PCR においても検出されなかった。

Kudoa septempunctata の検査法として、リアルタイム PCR 法は、他のクドア属も検出する可能性があり、スクリーニング的な位置づけと考えられる。一方、顕微鏡検査は、*Kudoa septempunctata* 特異の 6～7 極嚢を確認できることから、*Kudoa septempunctata* 特異的な検査と考えられる。

一般的にクドアは体内で増加せず、発症時間も短いため、患者の排出物検査を行う際にはすでに患者の体内から排出されてしまっており、患者排出物からのクドア検出は難しい。そのため、クドアによる食中毒解明のためには食品の保存が重要であると考えられる。

研修会では、陽性検体を用いて顕微鏡検査を行った。実習時間は 1 時間程度であったが、研修参加者全員が *Kudoa septempunctata* の孢子を確認することができた。今回の研修会は、参加者から現場で指導する上で有用であるなど好評を得た。また、当所も検査手技や検査の重要性を再確認でき、実のある研修会となった。今後もこのような研修会を検討していきたい。

Kudoa septempunctata は近年発見された新種であるため、解明されていない部分も多く、今後も検査法を検討していく必要があると思われる。

広島市で発生したボツリヌス症について

広島市衛生研究所生物科学部

○京塚 明美 築地 裕美 田内 敦子 佐藤 真帆 国井 悦子 坂本 綾
伊藤 文明 橋本 和久 笠間 良雄

広島大学病院小児科

小林 良行 藤井 裕士 石川 暢恒 川口 浩史 中村 和洋 小林 正夫
広島大学病院脳神経内科

藤井 裕樹 上野 弘貴 中村 毅 山脇 健盛 松本 昌泰

【背景および目的】

ボツリヌス症とは、ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)等の産生するボツリヌス毒素により発症する神経・筋の麻痺性疾患である。本症は、ボツリヌス毒素あるいはそれらの毒素を産生する菌の芽胞が混入した食品の摂取等により発症する。現在、本症は感染症法に基づく四類感染症として届出が義務付けられている。

今回、本市において12年ぶりに同時期に発生したボツリヌス症2事例について報告する。

【事例1】

6か月男児(2011年11月10日届出)

1. 現病歴

発症約2週間前より便秘傾向で、発症約1週間前より数日間にわたり感冒症状があった。その後、哺乳低下や座位保持が不可能となったため、病院を受診し、四肢の動きは活発であったが、体幹部優位の筋緊張低下を認めた(第1病日、10月9日)。第3病日になっても症状が改善しないため、総合病院へ転院となった。

2. 既往歴

出生時、新生児一過性多呼吸のため数日間NICUに入院していた。

3. 喫食状況

主な食事は母乳および離乳食であった。離乳食は市販品の利用はなく、すりつぶした野菜を昆布だし等で加熱したものであった。

【事例2】

72歳男性(2011年11月17日届出)

1. 現病歴

第1病日(10月24日)朝に複視を認めた。さらにふらつき・下痢等があったため、近医を受診したが、MRI上、異常はなく経過観察となった。帰宅後、両側眼瞼下垂・ふらつき増悪等が出現したため、他病院へ救急搬送され、そのまま緊急入院となった。入院時、右優位の両側眼瞼下垂、上肢の軽度協調運動障害等を認めた。その後、呼吸状態が悪化し、総合病院へ搬送された。

2. 既往歴

高血圧および脂質異常症。

3. 喫食状況

主な食事は魚料理中心であった。また、発症約1週間前に他の家族2名とともに真空パックの豚足を喫食していた。

【検査結果】

検査結果を表1に、分離菌の遺伝子検査結果を表2に示す。

表 1 検査結果

	事例 1		事例 2		
	患者便 (直接)	患者便 (増菌)	患者 血清	患者便 (直接)	患者便 (増菌)
毒素試験	－	＋	－	－	＋
中和試験	NT [†]	A 型	NT	NT	A 型
菌分離検査	－	＋	NT	－	＋
遺伝子検査	－	A 型および B 型	NT	－	A 型

†：検査せず

【まとめ】

1. 感染源および経路

今回発生した 2 事例とも喫食した食品との因果関係が不明であり、感染源および感染経路の特定はできなかった。

2. 事例の関連性

2 事例はともに A 型毒素を生産していたが、今回実施した遺伝子検査等の結果、関連性は認められなかった。

3. 患者の状況

事例 1 は、入院後徐々に四肢脱力・便秘・嚥下障害等症状が改善した。さらに第 40 病日頃より少量の経口哺乳が可能となり、状態が安定したため第 51 病日に自宅近くの病院へ転院した。

事例 2 は、入院当初集中治療室にて治療が行われていたが、第 25 病日に先進治療病棟へと移動した。しかしながら、呼吸筋および四肢の筋力低下等症状の改善が遅く現在（2012 年 1 月末現在）も入院中である。なお、第 46 病日の便の増菌液から A 型毒素遺伝子が検出されている。

【問題点】

- ボツリヌス菌およびボツリヌス毒素は、感染症法に基づく二種病原体に指定されているため、所持等において厚生労働省に許可が必要となり、その取り扱いが非常に難しい。
- 培養には最低 7 日間かかり、またマウス毒性試験では 4 日間の観察が必要であり、ボツリヌス菌等の検出には最低でも 10 日以上かかる。
- ボツリヌス症はまれな事例であり、常に検査できる試薬器材や技術力を維持しておくことが極めて重要である。

【謝辞】

今回の発表にあたり、ご協力いただきました保健医療課、保健センターおよび食品保健課等関係者の方に深謝します。

2011年に広島市で発生した EHEC O157:H7 の分子疫学的解析

生物科学部 ○田内 敦子 築地 裕美 井澤 麻由 佐藤 真帆 国井 悦子
坂本 綾 京塚 明美 伊藤 文明 橋本 和久

【目的】

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、腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157:H7 菌株を遺伝子レベルで型別、比較し、感染事例間での疫学的関連性を検討した。

【材料および方法】

2011年3月から11月までに広島市で分離された EHEC O157:H7 19 株を、PFGE、IS-printing、MLVA の 3 法で解析した。

【結果および考察】

MLVA 繰り返し回数 (RN)、IS コード及び国立感染症研究所 (感染研) で PFGE 解析し、型別された結果 (PFGE TN) を表 1 に、PFGE クラスタとバンドパターンを図 1 に示した。

同一感染源であると推察される家族内事例 12 及び 13 では、それぞれ 3 法ともほぼ結果が一致していたことから、3 法で結果がほぼ一致していれば感染源が同じである可能性はかなり高いことが示唆された。

一方で、PFGE のクラスタ解析で比較的高い類似度に分類された菌株でも、MLVA RN や IS コードは違った結果になった。これらのことから 3 法での結果が全て、ほぼ一致していなければ同一感染源であるとは言えず、集団事例や散発事例間の関連性を調べる上での分子疫学解析は、それぞれの方法の迅速性、簡便性等特性を考え使い分けを行うことが必

要であると考えられる。具体的には、MLVA や IS-printing は最短で 1 日で解析結果が得られるので、関連性を早く知りたければこれらの方法を実施する。結果が違っていれば同一感染源である可能性を否定でき、一致していれば同一感染源である可能性が高いため、疫学調査担当に結果を速報すると同時に PFGE を行い、平行して性状試験や薬剤感受性試験などで総合的に判断するという形である。特に散発事例間で関連性が高いことが早く分かれば、聞き取り等のより詳細な疫学調査が迅速に行えるため、感染源の追及には有用性が高い。

事例間の疫学的関連性については、散発事例 2~5 で 3 法の結果がほぼ一致していたため、同一感染源であることが疑われた。これらの事例は発生時期が比較的近かったものの、患者の年齢、職業、生活区域は異なっていた。唯一の共通事項は肉の喫食であり、事例 5 ではバーベキューだったが、その他ではレバ刺し等の生食が確認されていた。しかし一部患者の調査協力が得られなかったため、肉の流通ルート等さらなる遡り調査はできず、感染源の特定には至らなかった。MLVA、IS-printing の結果が出た時点で疫学調査担当に同一感染源の可能性を示していれば、さらに踏み込んだ調査により感染源を追えたかもしれない。迅速な結果のフィードバックとそれを生かして追加調査を行う等の体制の構築が、今後の課題である。

表1 MLVA RN、IS コード及び PFGE TN

菌株 番号	事例	VT 型	MLVA RN										IS コード	PFGE TN
			K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37	K10			
1	11001	1	VT2	4	6	7	-	7	9	11	8	-	012057 214442	g28
2	11003	2	VT2	4	16	7	10	5	7	-	9	25	345057 311652	c374
3	11005	3	VT2	4	16	7	10	5	7	-	9	25	345057 311652	c374
4	11007	4	VT2	4	16	7	10	5	7	-	9	25	345057 311652	c374
5	11011	5	VT2	4	16	7	10	5	7	-	9	26	345057 311652	c374
6	11012	6	VT1VT2	5	10	10	11	8	6	7	7	40	106577 201657	g52
7	11013	7	VT1VT2	5	10	10	11	6	6	6	6	33	307575 211757	e570
8	11016	8	VT1VT2	3	11	9	13	7	7	11	8	30	717575 611657	-
9	11018	9	VT1VT2	5	13	11	15	7	6	11	11	25	717577 611657	c272
10	11020	10	VT1VT2	6	14	9	15	7	4	12	6	25	613575 610446	g233
11	11021	11	VT1VT2	9	13	11	9	7	6	3	6	32	715577 611257	g235
12	11022		VT1VT2	4	12	10	9	6	6	10	7	19	317557 611657	g236
13	11023	12	VT1VT2	4	12	10	9	6	6	10	7	19	317557 611657	g236
14	11024		VT1VT2	4	12	10	9	6	6	10	7	19	317557 611657	g236
15	11027		VT1VT2	4	12	10	8	6	6	10	7	21	717557 611657	g450
16	11026	13	VT1VT2	4	12	10	8	6	6	10	7	21	717557 611657	g449*
17	11025		VT1VT2	4	12	10	8	6	6	10	7	21	717557 611657	g450
18	11034	14	VT2	5	5	7	-	5	9	8	5	-	012057 214443	f740
19	11037	15	VT1VT2	5	12	10	5	7	6	9	6	27	713557 610457	g167

*:one band diffr. from g450

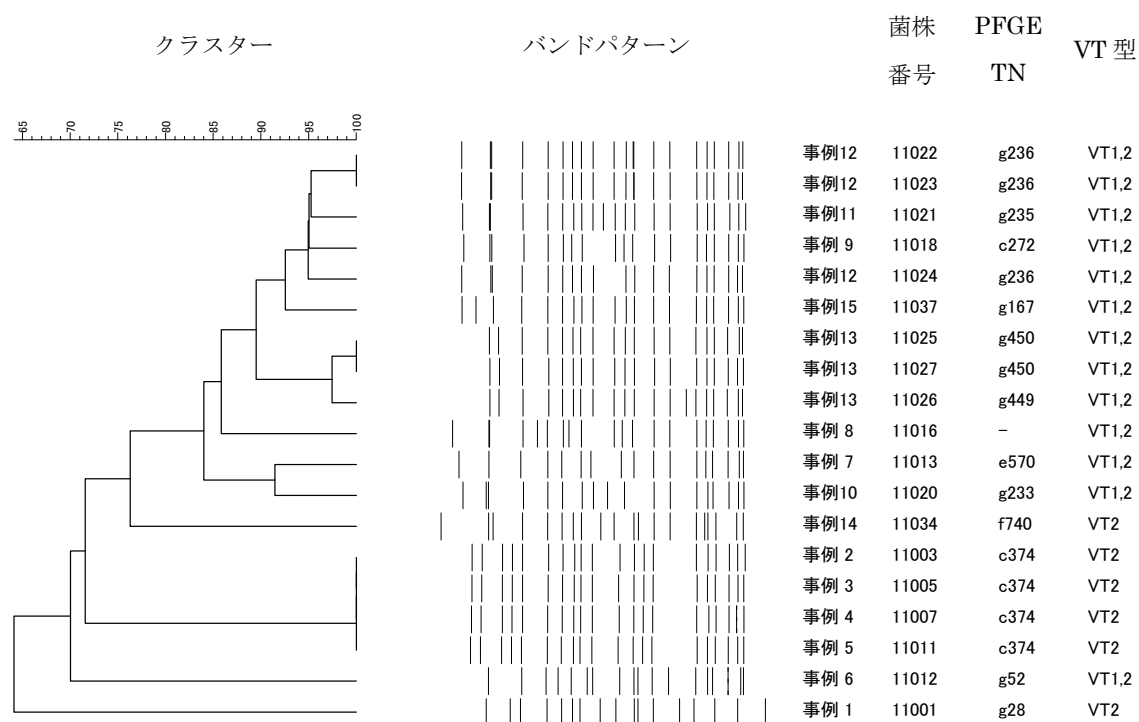


図1 PFGE クラスタとバンドパターン

LAMP 法を用いた浴槽水レジオネラ属菌の迅速検査法の検討

生物科学部

○築地裕美 田内敦子 佐藤真帆 国井悦子
坂本綾 京塚明美 伊藤文明 橋本和久

【背景および目的】

レジオネラ属菌はレジオネラ症の原因菌であり、河川・土壌・温泉水等自然界に広く分布している。現在、レジオネラ属菌の検査は培養法により行われているが、結果判明までに7～10日間程度を要し、集団発生等緊急時への速やかな対応が困難である。このため、より迅速かつ正確な検査法が求められ、近年、遺伝子検査による迅速検出法の検討が行われている。

今回は、浴槽水を用いて迅速検出法の1つであるLAMP法の検討を行った。

【まとめ】

今回の検討から、LAMP法は従来の培養法に比べて、検査開始から2日以内には結果を得ることができ、レジオネラ属菌の迅速な検出法であることが示唆された。しかしながらLAMP法は、生菌だけでなく死菌由来のDNAを検出してしまうことや反応を阻害する物質の存在も知られており、現時点では培養法の補助的検査法としての利用が妥当であると考えられる。

【今後の課題】

LAMP法のさらなる有用性を評価するために、*Legionella pneumophilla* 以外の他菌種による感度試験や多様な浴槽水への応用を検討するとともに、反応阻害物質によるLAMP法への影響等を評価する必要がある。

また、LAMP法以外の迅速検出法であるリアルタイムPCR法や生菌由来のDNAを選択的に検出できるEMA-PCR法の検討が必要である。

【謝辞】

今回の発表にあたり、ご協力いただきました環境衛生課等関係者の方に深謝します。

2011年の広島市における腸重積症からのウイルス検出

広島市衛生研究所 生物科学部 ○田中 寛子 藤井 慶樹 山本 美和子
阿部 勝彦 橋本 和久

【背景及び目的】

2011年の広島市での、感染症発生動向調査における消化器系疾患の内訳は、感染性胃腸炎約47%、腸重積約46%、その他の消化器系疾患約7%であり、腸重積症と感染性胃腸炎が消化器系疾患のほとんどを占めている。典型的な腸重積症は回腸が大腸に入り込むために生じ、時には小腸にポリープがある・膵臓組織が小腸に迷い込んでいる・メッケル憩室が残っているなどの場合にはこれらの部分から腸重積が起こることもある¹⁾。小児の腸重積症の根本的原因は未知であるが、ウイルス感染との関係が指摘されている²⁾。当所では細胞培養、RT-PCRなどの方法により糞便検体からのウイルス検出をおこなっており、今回2011年の腸重積症からのウイルス検出結果について報告する。

【材料及び方法】

2011年の感染症発生動向調査で腸重積症患者から採取された糞便検体(41検体)を検査対象とした。糞便検体の10%乳剤を作製し、10,000rpm・30分遠心後4種類の細胞(HE、HEp-2、RD-18S、Vero)に接種し、二代継代をおこなった。細胞変性効果(CPE)を現したものを回収後、中和抗体法により血清型を同定した。中和抗体法で型別できなかったウイルスについては回収した上清からPCRをおこない、増幅産物の塩基配列についてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、既存のウイルス参照株と相同性を比較・型別した。

また検体から直接ウイルス核酸抽出用キットを用いてウイルスゲノム抽出後、逆転写反応をおこない、PCRにてNorovirus、Sapovirus、Astrovirus、Adenovirusなどの遺伝子検出をおこなった。RotavirusについてはIC法・PCRにより同定した。すべての検査が陰性であった場合は、電子顕微鏡にてウイルス粒子の検索をおこなった。

【結果及び考察】

細胞培養およびPCRなどの結果、41検体中32検体から36株のウイルスが検出された。内訳はAdenovirus1型および同31型各5株、Adenovirus2型、同5型およびParechovirus1型各4株、Poliovirus2型3株、A群Rotavirus、Poliovirus1型、同3型およびSapovirus各2株、Adenovirus11型、同41型、およびNorovirus G2群各1株であった。またこのうちPoliovirus1型と同2型の混合感染が2検体、Adenovirus31型とParechovirus1型の混合感染が1検体、Adenovirus2型とSapovirusの混合感染が1検体あった。

患者(計41人)の年齢は0歳~6歳で、その内訳は多いものから順に0歳18人、2歳12人、1歳8人、4歳、5歳および6歳が各1人であった。92.6%は2歳以下であった。また性別は、女性21人、男性20人であった。

主な臨床症状としては、吐気・嘔吐（22/41人）、腹痛（18/41人）、下痢（10/41人）、発熱（9/41人）、血便（7/41人）、上気道炎（2/41人）などであった。

この度の調査では腸重積症から多様なウイルスが検出されたが、最も多かったものは Adenovirus（20/36株、55.5%）であった。このうち C種（1型・2型・5型）が最も多く 65%（13/20株）を占めた。主に呼吸器感染症の起因となる B種（11型）および C種が Adenovirus 全体の 70%（14/20株）を占めたのに対し、主に胃腸炎の起因となる A種（31型）および F種（41型）は 30%（6/20株）であった。また、Poliovirus、Parechovirus などのウイルスも多く検出された。これらはそれぞれワクチン接種時期や流行のあった時期に検出されている。ウイルスが検出されなかった検体も 9 検体あり、これらは今回検査していないウイルスやポリープなどが原因である可能性が考えられる。Adenovirus は無症候でも数週間から数か月排出されるため、直接の原因でないことも考えられるが、感染症流行予測調査事業の報告では健常児糞便からの Adenovirus 分離率（1998年～2007年）は 2.1% であり³⁾、今回の調査の結果は有意に高い値であると思われる。また Poliovirus も 2～6 週間腸管で増殖・排泄が続くとされており⁴⁾、長期に潜伏・排泄されるウイルスが腸重積症患者便から多く検出される傾向にあった。

腸重積症は主に 2 歳までの小児に多く、性別についても男児の方が多いとされている¹⁾。この度の調査でも多くが 2 歳以下の小児であったが、4 歳から 6 歳の患者も 3 人いた。この 3 人中 2 人（4 歳、5 歳）からはそれぞれ Adenovirus 1 型、同 2 型が検出されており、症状についても他の 2 歳以下の患者と大きな違いは見られなかった。また、この度の調査にはほとんど性差はみられなかった。

腸重積症の治療では 8 割は造影剤などでの腸重積の整復が出来るが、2 割前後は手術により整復・切除する場合もあり、早期の受診・診断が望まれる。今回の調査では様々なウイルスが検出されており、2 歳以下の小児では呼吸器感染症や胃腸炎だけでなくポリオワクチン接種後などにも、症状が認められる場合は腸重積症を考慮する必要があると考えられる。また、年齢に関わらず可能性を考慮すべきと考える。

【文献】

- 1) 日本小児外科学会 http://www.jsps.gr.jp/05_disease/gi/intus.html
- 2) Satoshi Okimoto et al. : Int J Infect Dis., 15(9), 641-5(2011).
- 3) IASR 30: 176-178, 2009
- 4) 小出雄彦 ほか :最新予防接種の知識 ,118

2011年の広島市におけるライノウイルスの検出状況

広島市衛生研究所 生物科学部 ○藤井 慶樹 田中 寛子 山本 美和子
阿部 勝彦 橋本 和久

【はじめに】

ライノウイルスは普通感冒の最も一般的な原因ウイルスであり、その症状は鼻漏、鼻閉、くしゃみ程度の軽いものが多く、いわゆる鼻カゼと称される。その血清型は 100 種類以上（数百種類？）あるため、人は生涯にわたり、このウイルスに何度も感染する。近年、ライノウイルスは小児において風邪症状に加え、喘息の悪化や肺炎などで入院治療を必要とする症例との関連性が示唆され、注目されている。

ライノウイルス検査は培養細胞によるウイルス分離も可能であるが、至適増殖温度が気道の温度に近い 33-35°C であり、当所で採用している培養条件と異なるため、めったに分離されることがない。また、分離されても血清型が多岐にわたることに加え、市販の抗血清等の試薬もないため、中和法による血清学的同定は困難である。そのため、現在は専ら遺伝子学的検査により診断される。

ライノウイルスは VP1 もしくは VP4-2 遺伝子のシークエンス解析により、遺伝子群 A、B、C の 3 群に分類されることが報告されている^{1),2)}。中でも、近年になって報告された遺伝子群 C については、喘息の重症化に関与し、他の 2 群よりも病原性が強い可能性が示唆されている^{3),4)}。また、生物学的特性も他の 2 群と異なり、培養細胞を用いたウイルス分離が不可能であり、その検出は遺伝子学的検査に頼らざるを得ない。

2011 年の当所での培養細胞によるライノウイルス分離結果は 2 件のみであったが、実際にはもっと多くの症例にライノウイルスが関与していると推察し、遺伝子学的検査によるライノウイルスの検出状況と遺伝子群の分布状況を調べたので、その概要を報告する。

【材料及び方法】

2011年の1月から12月に感染症発生動向調査事業で搬入された154検体（咽頭拭い液103検体、鼻汁51検体）を検査材料とした。検体の選択基準は、呼吸器疾患の診断名で搬入されたもの、もしくはそれ以外の診断名で搬入され、気道炎等の呼吸器系症状が認められたもので、ルーチンでPCR検査を実施しているインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、RSウイルスが陰性であった検体を選んだ。

検体からQIAamp Viral RNA Mini Kitを用いてウイルスRNAを抽出後、RT反応により得られたcDNAをPCR検査に用いた。Ishikoraの方法⁵⁾に従い、VP4-2領域を増幅するEVP-4/OL68-1のプライマーを使用し、約550bpのライノウイルスに相当するPCR増幅産物が得られた場合には、さらにQIAquick Gel Extraction Kitを用いて、PCR産物を精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いたダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定し、近隣結合法による系統樹解析を行い、遺伝子群を同定した。

【結果】

1 ライノウイルスの検出率

154検体中42検体からライノウイルスが検出された。特に、百日咳18検体中9検体（50%）、喘息性気管支炎13検体中8検体（61.5%）から高率に検出され、激しい咳嗽疾患との関連性が示唆された。

2 月別及び年齢別検出状況

ライノウイルスは通年にわたり検出されたが、特に春（4-5月）と秋（9-11月）に多数検出される傾向にあった。また、年齢別では0歳児と1歳児で多数検出された。

3 ライノウイルスの症状

ライノウイルスが検出された42例中、発熱28例（66.6%）、上気道炎25例（59.5%）、気管支炎21例（50%）が高率に認められた。その他に、肺炎6例（14.2%）も認められた。下痢、肝障害などの呼吸器系以外の症状を有する症例も一部あった。

4 遺伝子群の分布状況

ライノウイルス特異バンドが検出された42株のうち、明瞭なバンドが得られた31株について、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定し、近隣結合法による系統樹解析を行い、遺伝子群を同定した。その結果は、A群21株、C群10株であり、B群は検出されなかった。A群、C群とも季節による流行状況に差

はなく、ライノウイルスが多く検出された春と秋に、各遺伝子群が混じって検出された。また、患者の症状については、A群、C群検出例ともほぼ同様であった。

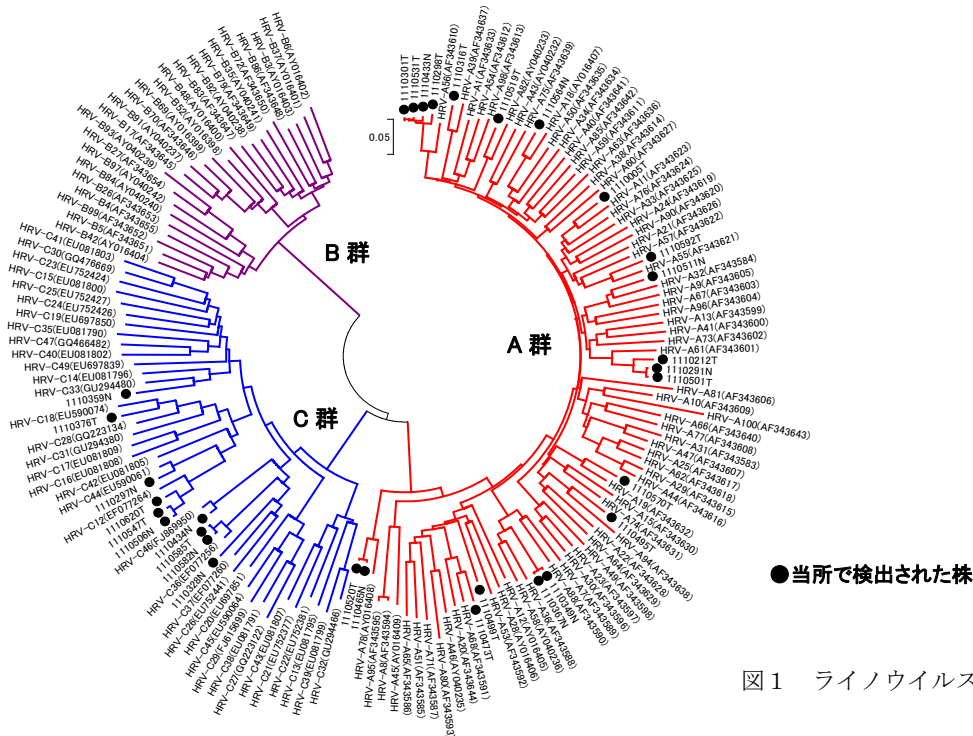


図1 ライノウイルス系統樹

【まとめ】

今回はライノウイルスに的を絞って2011年の一年間の検出状況を調査した。その結果、ルーチンでPCR検査を実施しているインフルエンザ、ヒトメタニューモ、RSウイルスが陰性であった154例中42例からライノウイルスが検出された。特に、喘息性気管支炎や百日咳の診断名で搬入された検体からのライノウイルス検出率が高く、激しい咳嗽疾患にライノウイルスが強く関与していることが示唆された。一方で、呼吸器系症状を引き起こすウイルスはその他にも多数あり、また、複数ウイルスの混合感染例も多く報告されており、どのウイルスがその疾患に関与するのかが論議されているが結論には至っていない。そのため、呼吸器系ウイルスによる感染症発生病動向を調査するためにはもっと多くのデータを積んでいくことが必要と思われる。

広島市においても他文献で報告されている傾向とほぼ同様で、遺伝子群の分布状況はA群が最も多く、次いでC群であった。A群、C群とも流行時期や患者の症状に差は認められなかった。当所では患者の臨床状態までは把握できないので、C群が他の2群よりも重症化に関与しているかどうかは不明である。

喘息等の基礎疾患をもつ小児では、ライノウイルスの感染がその病状を著しく悪化させるため、流行時期には手洗い、うがい、マスクの装着等、感染防止対策をとることが重要である。また、ライノウイルスの流行状況についても医療機関等に積極的に情報提供し、還元していきたい。

【文献】

- 1) 国立感染症研究所：ライノウイルス検査マニュアル
- 2) Carita Savolainen, *et al.* Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *Journal of General Virology* 2002; 83:333-340.
- 3) James E. Gern. The ABCs of Rhinoviruses, Wheezing, and Asthma. *JOURNAL OF VIROLOGY* 2010; 84:7418-7426.
- 4) Marika K. Iwane, *et al.* Human Rhinovirus Species Associated With Hospitalizations for Acute Respiratory Illness in Young US Children. *The Journal of Infectious Diseases* 2011; 204:1702-1710.
- 5) Hiroaki Ishiko, *et al.* Molecular Diagnosis of Human Enteroviruses by Phylogeny-Based Classification by Use of the VP4 Sequence. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 185:744-754.

2011年パレコウイルス3型流行について

生物科学部 ○山本美和子 田中 寛子
藤井 慶樹 阿部 勝彦 橋本 和久

【はじめに】

パレコウイルス3型は、2006年および2008年夏期に、乳幼児を中心に全国的に流行した。広島市においては、2004年に初めて検出され、全国と同様2006年および2008年に流行を見せた。さらに2011年も全国的にパレコウイルス3型の流行が認められ、広島市においても夏期を中心に検出された。パレコウイルス3型は、他の型では報告のない流行を2~3年毎に起こしている。また、1型と比較して3カ月未満の乳児での感染が多いこと、および神経親和性が高いことが報告されている¹⁾。2011年に広島市において検出されたパレコウイルス3型についてまとめたので報告する。

【対象および方法】

2011年1月から12月に広島市結核・感染症発生動向調査事業定点医療機関を受診した患者659人から採取した956検体を、4種類の細胞(HE、HEp2、RD-18s、Vero)に接種し、36℃で培養した。Vero細胞においてパレコウイルス様の細胞変性効果(CPE)を現したものについて、RNA抽出キット(キアゲン製)によりRNAを抽出し、逆転写反応を行った。5' UTR-VP0領域を増幅するリアルタイムPCR法で、パレコウイルスと確認されたものは、VP1領域を増幅するPCRを行い、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、GenBankに登録されている既知のパレコウイルス1型から6型と相同性を比較し、遺伝子型別を決定した。

また、2006年及び2008年検出株と比較をするために、VP1領域における分子系統樹を作成した。

【結果および考察】

16人の患者からパレコウイルス3型が検出された。検出は6月、7月に多く、主に夏期に流行したことが伺えた。年齢別にみると、0歳児が多く、87%を占めた。さらに0歳児のうち生後2ヵ月までが全体の約63%を占め、極めて低年齢での検出が特徴的であった。臨床症状は、発熱(87.5%)、上気道炎(18.8%)、熱性痙攣(18.8%)、発疹(18.8%)、肝障害(12.5%)、脳症(6.2%)、嘔吐(6.2%)であった。

2006年および2008年流行株と2011年の株について、分子系統樹(塩基配列)を作成し比較したところ、各流行年ごとに一部の株を除き異なるクラスターのクレードを形成していることが分かった。パレコウイルス3型の流行は、2~3年おきにそれまでの流行株とは異なる株が、夏期に流行を起こし、極めて低年齢で感染が広がることが示唆された。

【参考文献】

1) Harvala H., *et al.*, J Infect Dis 199: 1753-1760, 2009

カキ中のヒト糞便由来 F 特異 RNA 大腸菌ファージの検出法の検討

広島市衛生研究所 生物科学部 阿部 勝彦、田中 寛子、藤井 慶樹、山本美和子
国立医薬品食品研究所 野田 衛

【目的】

ノロウイルス(NoV)など食中毒の原因となるウイルスは培養が不可能か困難なため、その検出はPCR法等の遺伝子検査に依存しているが、感染性ウイルスだけを検出している訳ではない。特に、カキ等の二枚貝や下水放流水、海水等の環境には紫外線や下水処理場の塩素等で不活化されたウイルスも含まれる可能性があり、汚染リスクや安全性を遺伝子検査によって正確に把握することはできない。

水環境中における糞便由来ウイルスの代替指標として、F 特異RNA大腸菌ファージ (Fファージ) がある。その中でⅡ群、Ⅲ群ファージはヒトの糞便に由来することが知られている。本研究は、感染性のあるヒト糞便由来病原ウイルスの汚染指標としてのFファージの有用性を検証することを目的として、カキ中のFファージをプラーク法で検出するとともに、リアルタイムPCR法でFファージおよびNoVの検出を行った。

【方法】

1. プラーク法

液体培地で F ファージ感受性菌株である *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49(WG49)を 37℃で 3～4 時間振とう培養を行った。カキ中腸腺 5 個を 50%乳剤とし、アミラーゼ処理後の遠心上清 1ml をシャーレに加え、WG49 入りの寒天培地を添加して混和後、静置凝固させ、37℃18～24 時間培養し、形成したプラークを計数した。

2. リアルタイム PCR 法

50%カキ中腸腺乳剤遠心上清について、F ファージ I 群～IV群、NoV G I、NoV G II それぞれのリアルタイム PCR 法を実施した。ヒト糞便は 10%乳剤の遠心上清を出発材料に、同様に処理した。

3. MS2 ファージ (I 群) のプラーク数およびリアルタイム PCR 法における CT 値との関連性

陽性コントロールとして用いている MS2 ファージ (I 群) を WG49 に感染させ 18～24 時間培養後に、10 倍階段希釈して上述のプラーク法及びリアルタイム PCR 法を実施し、プラーク数と CT 値との関連性を調べた。

【結果及び考察】

検出された検体のプラーク数は 50%カキ中腸腺乳剤遠心上清 1ml 当り最大で 46 個で、10 個以下であることが多く、多くの検体は陰性であった。この結果は当初想定していた汚染量や汚染率より低い傾向にあった。その原因を把握するために、陽性コントロールとして用いている MS2 ファージについてプラーク数とリアルタイム PCR 法の CT 値との関連性を調べた結果、100～1000 個/ml のプラーク数は約 38CT 値、10～100 個/ml は約 41CT 値に相当すると推定された。このことから、今回プラーク法で得られた F ファージの数はリアルタイム PCR 法から推定される数より少ない傾向にあった。この理由として、カキには不活化した F ファージが含まれておりリアルタイム PCR 法で陽性となるが、プラーク法では陰性となった可能性が考えられる。一方、カキ中にプラーク形成を阻害する要因が存在し、見掛け上低く定量されている可能性も否定できない。

また、プラーク法とリアルタイム PCR 法による F ファージの検出は必ずしも一致せず、NoV の検出と F ファージの検出も必ずしも一致しなかった。しかし、例数は少ないもののリアルタイム PCR 法による NoV の検出はプラーク法よりもリアルタイム PCR 法によるⅡ群あるいはⅢ群の F ファージの検出と関連性が高い結果であった。この結果も、カキには不活化された NoV が含まれる可能性を示唆する。

一方、カキにおける F ファージの保有量や保有率が低かったことから、ヒト糞便中の F ファージの検出を試みた結果、8 検体は全て陰性であった。健康人の F ファージの保有率は 2～6%とされており、この結果は必ずしも想定外の結果ではないが、今後例数を重ねて、検査法の妥当性の検証を含め、ヒトの糞便における F ファージの保有率や保有量を明らかにする必要がある。

今後、検査法についてさらなる検討を加えるとともに、データの蓄積等を行う必要があると考えられる。

広島市における放射性物質の測定について

生物科学部 橋本 和久

はじめに

広島市における放射能の測定は、1982年（昭和57年）衛生研究所が発足した時に始まった。当時の公害部特殊公害担当による環境放射能調査で、平常時における環境中の放射能レベルを把握することを目的としていた。1986年4月のチェルノブイリ原子力発電所事故時には放出された放射性物質による汚染の確認¹⁾を、また2006年10月の北朝鮮の地下核実験時に大気浮遊粉じんの放射能レベルの調査を実施した。2011年3月11日のM9.0の東日本大震災とそれに伴う大津波により発生した福島第一原子力発電所の事故は、放射性物質を環境中へ放出・流出し、人体、生活環境や食生活にその影響が出ている。

平常時の生活環境中の放射能レベルを把握しておくことは、危機管理上重要であると考えられるため、広島市における放射性物質の測定について紹介する。

方 法

1 調査対象

昭和57年度から平成3年度²⁾

浮遊じん、雨水、降下物、海水、河川水、地下水、農作物、松葉、底質、土壌

平成4年度から平成18年度

降下じん、（浮遊じん）

2 試料の採取および測定方法

放射能測定用試料の採取、調製および測定は、科学技術庁編「全ベータ放射能測定法・昭和51年」、「ゲルマニウム半導体検出器等を用いる機器分析のための試料の前処理法・昭和57年」、「ゲルマニウム半導体検出器によるガンマ線スペクトロメトリー・平成4年」⁴⁾⁻⁶⁾によった。

3 測定装置

(1) 全ベータ放射能

富士電機製造製

低バックグラウンドβ線スペクトロメータ

ピコベータF-5

(2) ガンマ線核種分析

昭和57年度から平成4年度

オルテック製 GEM-10195

検出器 モデル 7050

平成5年度から現在

Canberra 製

検出器は、 Model GC 2518

結 果 と 考 察

1 ゲルマニウム半導体検出器を用いた放射性核種分析

図1に広島県における大気浮遊じん中のCs-137の放射能濃度の推移（広島県）³⁾を示す。1963年までにアメリカ、旧ソ連、イギリスとフランス大気圏内核実験を行わなくなったが、1964年以後1980年まで中国の核実験の影響で減少の傾向であったが、1986年4月に起こったチェルノブイリ原発事故の影響で大量の放射能が放出され一時的に急増した。その影響も約2年後には事故前のレベルに戻り、その後は減衰傾向である。2006年10月の北朝鮮の地下核実験に際しては、異常値は見られなかった。広島県によると、2011年4月から6月の3か月分の浮遊じん測定結果は、I-131検出されておらず、Cs-134が0.023mBq/m³、Cs-137が0.021mBq/m³であったが、7月から9月の3か月ではいずれの各種も検出されていない。人工放射性物質が検出されているが、極めて微量だった。

2 全ベータ放射能

β線の合計量を測定するため、放射性物質の種類を判別できないが、短時間の測定で結果がでるためスクリーニングとして使用する。6時間値は自然放射性核種（短寿命）の影響が多少残るため、測定値の変動が大きいため、その影響が少ない72時間値について検討すると評価しやすいといわれている。

ま と め

2011年3月12日に起きた原子力施設の事故のような緊急時の放射能調査において、放射線量モニタリングポストやサーベイメーターにより放射線量率（μSv/h）の増加を把握し、どのような放射性核種がどれくらいの放射能濃度（Bq/kg）で存在しているかを迅速に調査する必要がある。

25年前のチェルノブイリ原子力発電所の事故では、事故直後から放射能調査体制を強化して測定を実施し、地球規模の放射能汚染実態を明らかにすることができた。その後も引き続き環境放射能調査は、対象は限定されながらも継続されていた。しかしながら、研究所施設の耐震工事による測定業務の一時中断が、運悪く今回の事故の時期と重なってしまい、緊急時の迅速な対応調査ができなかったことは残念である。

1年を経過しても、放射性物質の人体や周辺環境に及ぼす影響は、依然として存在しており、今後とも継続して調査していくことが重要と考えられる。

文 献

- 1)広島市衛生研究所 ソ連チェルノブイリ原子力発電所事故に伴う環境放射能調査結果報告書 (昭和62年8月)
- 2)広島市衛生研究所 広島市の環境放射能調査報告書 (平成5年2月)
- 3)財団法人 日本分析センター 日本の環境放射能と放射線
- 4)文部科学省 全ベータ放射能測定法 (昭和51年)
- 5)文部科学省 ゲルマニウム半導体検出器等を用いる機器分析のための試料の前処理法 (昭和57年)
- 6)文部科学省ゲルマニウム半導体検出器によるガンマ線スペクトロメトリー (平成4年)

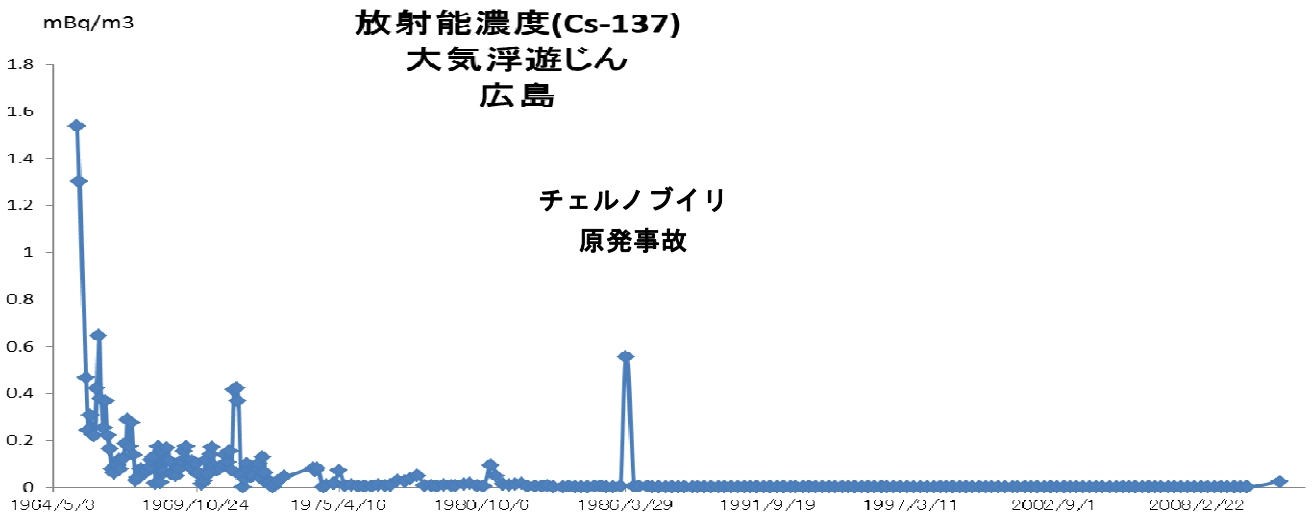


図 1

1. 背景

(1) 本検討実施前の状態

当所では、飲料水中の金属類の分析において、Cd、Se、Pb、As、Cr、Zn、Al、Fe、Cu、Mn の 10 元素はフレイムレス AA 法、B は ICP 発光法により測定を行っていた。AA 法においては、測定元素毎にランプを切り替える必要があるため、10 元素を一度に測定できず、通常、3~4 回に分けて AA 法を行っており、1 検体 1 元素の測定結果を得るまでの時間は 6 分程度であった。

(2) 目的と期待効果

公定法では、上記の計 11 元素について ICP-MS による一斉分析が可能である。このため、当所の ICP 発光分光分析装置を ICP-MS に更新したことに合わせて、この一斉分析法を導入することを目的とした。ICP-MS 法では測定元素が多くなっても、それに伴う測定時間はフレイムレス AA 法ほど多くならない(今回検討した条件では 1 検体全元素で 5 分弱)ため、一斉分析法の導入により測定時間の短縮並びに検査の省力化が期待できる。

2. 実施内容

上水試験方法に記載の方法に基づき、まず、水質基準値の 1/10 以下の濃度の試料のばらつきの変動係数を確認し、その後、当所の測定試料の実情に合わせて検量点を設定した。

3. 主要な測定条件

(1) 測定モードの設定

キャリアガスである Ar や試料中に多量に存在する可能性のある Cl の影響を避けるためのコリジョンセル(CCT)モードで Se、As、Cr、Fe の 4 元素の測定を行い、それ以外については標準(STD)モードにより測定を行うこととした。

(2) 内部標準元素及び検量点の設定

上水試験方法記載の方法に基づき、下表のように設定した。

4. 実施結果

(1) 低濃度領域でのばらつきの検討結果

全元素について、水質基準値の 1/10 の濃度より低い 0.1 $\mu\text{g/L}$ で 5 回ずつ測定した結果、変動係数が 10%を下回った。

(2) 検量点の検討

検討当初は、検量線の決定係数(R^2)について、Al 以外は 0.999 以上と良好だったものの、Al が 0.9883 であった。標準溶液の分取方法等を改善し、全元素で $R^2=0.999$ 以上を得られるようになった。今後は上水試験方法に示す定量下限値付近まで検量点を取る予定である。

以上のように、標記一斉分析法を検討し、導入することにより、これまで数日かかっていた金属類の分析を 1 日程度でできるようになる等のメリットが得られるようになった。

表 各測定元素の内標元素、検量点並びに本検討の結果

	内標	検量点($\mu\text{g/L}$)	上記 4(1)の CV (%)	上記 4(2)の R^2
Cd	In	0.1, 0.5, 1, 2	3.7	1
Se	Co-H ₂	1, 2, 5, 10	4.3	1
Pb	Tl	0.5, 1, 2, 5	0.3	0.9998
As	Co-H ₂	0.5, 1, 2, 5	2.0	1
Cr	Co-H ₂	0.5, 1, 2, 5	0.8	1
B	Be	20, 50, 100, 200	0.6	0.9999
Zn	Ga	2, 5, 10, 20	1.1	0.9998
Al	Be	2, 5, 10, 20, 30, 40	0.9	0.9886→0.9999
Fe	Co-H ₂	10, 20, 50, 100, 200, 300	0.8	0.9999
Cu	Ga	2, 5, 10, 20	1.8	0.9993
Mn	Co	0.5, 1, 2, 5	0.8	1

ICP-MS を使用した大気粉じん中の金属元素分析法の検討

環境科学部 市川 恵子

はじめに

ベリリウム (Be) ,クロム (Cr) ,マンガン (Mn) ,ニッケル (Ni) ,ヒ素 (As) の金属元素は大気汚染防止法でモニタリングすることが定められている有害大気汚染物質である。

本所では昨年度まで Be, Cr, Mn, Ni は誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP-AES) により、As は水素化物発生原子吸光法により測定を行ってきた。本年度からの誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) の導入により、多元素同時分析が可能となると期待できる。

本研究では Be, Cr, Mn, Ni, As について測定法、分析精度の確認を行い、同時測定が可能であるかの検討を行った。

方法

(1) 前処理

試料の前処理はマイクロ波分解装置 (Milestone 社製 START D) を用いた圧力分解法により行った。使用する濾紙 50Φ を 2 枚切り取り、フッ化水素酸 3ml、硝酸 5ml、過酸化水素水 1ml を加えマイクロ波照射による分解を行った。分解後の溶液を濾過、加熱濃縮を行い、(2+98)硝酸で 10ml に定容した。Cr, Mn, Ni はさらに 20 倍希釈した溶液を測定に用いた。

(2) 測定方法

ICP-MS (Thermo Fisher 社製 X series 2) を用いて分析を行った。

結果

(1) 装置検出限界 (IDL) と定量下限値

本分析に使用した ICP-MS の IDL は検量線作成時の最低濃度を 7 回測定し算出した。定量下限値は濾紙ブランクの測定を 5 回行い算出した。結果を表 1 に示す。

(2) 添加回収

ブランク濾紙を分解する際検量線用の標準液を添加し行った。添加量は各元素の定量下限値付近とした。回収率はすべての元素で 87-110% と良好であった。

(3) 既存試料の測定

今回検討した分析方法により平成 22 年 6 月の試料の測定を行い、昨年度の報告値との比較を行った。その結果、Cr 以外の元素について測定値は報告値よりも大きかった。

昨年度の既存試料では試料量が少なく、1 試料につき最大 2 回しか測定できない。そのため、平成 23 年 4 月 25 日-26 日に井口小学校で採取した試料の測定を 6 回行い、再現性の確認を行った。その結果、Cr, Mn, Ni, As は相対標準偏差が 10% 未満であった。Be は相対標準偏差 11% と他の物質よりも高い値となった。

(4) 実験上の留意点

試験環境や使用器具からの汚染が原因であると考えられるブランク値の上昇があった。そこで、以下に留意し試験を行うとブランク値を安定して得ることができた。

- ・試験に使用する器具はすべて使用直前に硝酸による洗浄を行う。
- ・マイクロ波照射後の試験液の濾過に使用する濾紙は熱水および硝酸により洗浄を行う。

(5) 大気試料の測定

広島市内 4 地点 (井口小学校、安佐南区役所、比治山測定局、楠那中学校) において平成 23 年 4 月から平成 24 年 1 月まで毎月 1 回試料採取を行った。二重測定は井口小学校にて行った。

As は ICP-MS による測定値と水素化物発生原子吸光法による測定値とを比較したところ、ICP-MS による測定値の方が大きかった。この理由として共存する塩素、カルシウムなどの元素による干渉が示唆された。

まとめ

ICP-MS を用いた金属元素の測定方法の検討を行ったところ、モニタリング 5 物質の分析が可能であることを確認した。

As については前処理条件や ICP-MS 測定条件の検討を行い、共存元素の影響を確認する。

表 1 装置検出下限 (IDL) と定量下限値

	IDL ($\mu\text{g/l}$)	IDL 試料換算値 (ng/m^3)	定量下限値 (ng/m^3)
Be	0.004	0.0003	0.005
Cr	0.138	0.0096	1.2
Mn	0.268	0.0186	0.54
Ni	0.067	0.0046	1.47
As	0.050	0.0035	0.025

LC/MS/MSによるゴルフ場農薬 44 成分同時分析の検討

環境科学部 森本 章嗣

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料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⁾

なお、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トンデム型質量分析計(以下 LC/MS/MS)による 44 成分同時測定の方法が環境省により示された。今回、この標準法で LC/MS/MS による検討を行ったので報告する。

対象物質

アセタミプリド、アゾキシストロピン、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、カフェンストロール脱カルバモイル体、クミルロン、クロチアニジン、シクロスルファミロン、ジチオピル、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、テブフェンジド、テルブカルブ、トリクロピル、トリフルミゾール、トリフルミゾール代謝物、ハロスルフロンメチル、ピリブチカルブ、フェニトロチオン、ブタミホス、フラザスルフロン、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、ベンスリド、ペンディメタリン、ボスカリド、メコプロップ、メタラキシル、メプロニルの44成分。

検討項目

各成分の検出下限値(1ppb以下)及び定量下限値

試験方法

[検出下限値]

44成分混合標準溶液1ppbを7回測定して検出下限値を検討した。

[定量下限値]

河川水に200ppb混合標準溶液を添加し、最終濃度が1ppbと5ppbになるように調製した。各濃度毎にそれらを7つずつ、試料250mlを300ml三角フラスコに量り取り、1mol/L塩酸2.5mlを加えた。これを、あらかじめアセトン5ml、次いで水5mlを流し入れ洗浄した固相抽出カラム(Waters社製Oasis HLB PLUS)に毎分10mlの流速で20分間流し入れ、次いで水10mlを流し、流出液を捨てた後、アルゴンガスを通じ水分を除去した。アセトン30mlで展開し、溶出液を50mlのナス型フラスコに取り、アセトニトリル2mlを加え、ロータリーエバポレーターを用いて38℃で約1mlまで溶媒を留去し、アルゴンガス気流下で乾固した。この残留物にアセトン及びヘキサンの混液(1:1)2mlを加えて溶解した。その溶解液1mlを取り、アルゴンガス気流下で乾固し、この残留物に水

及びメタノールの混液(1:1)50mlを加えて溶解し、試験溶液として定量下限値を求めた。

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10分間維持

試験結果

[検出下限値]

44成分のうちイプロジオン及びフラザスルフロンを除いた42成分で1ppbの検出ができ、検出下限値を定めた。

[定量下限値]

検出下限値を算出した42成分について定量下限値を求めた。調製濃度1ppbと5ppbの試料のうち、基本的には定量下限値の算出は1ppbに調製された試料の値を用いたが、7つの試料のうち1つ以上添加回収率が70%を切った成分に関しては、定量下限値の算出の際5ppbに調製された試料の値を用いた。その結果、42成分のうち40成分で定量下限値を求めることができたが、トリフルミゾール、ペンディメタリンに関しては1ppb,5ppbともに添加回収率が70%を下回った試料がほとんどであり、定量下限値を定めることは出来なかった。

まとめ

今回の実験で、同時測定する44成分のうちイプロジオン、トリフルミゾール、フラザスルフロン、ペンディメタリン以外の40成分の定量下限値を定めた。それらの成分のうち、イプロジオン、ペンディメタリンはガスクロマトグラフ質量分析計によって、またフラザスルフロンは液体クロマトグラフによって既に測定を行っており、それらの機器を用いた測定を検討している。トリフルミゾールに関しては、光分解を起こしやすいため試験に用いるガラス器具を褐色のものにして再実験、再測定を行い、定量下限値を算出することが今後の課題である。

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

異性体指標法によるダイオキシン類汚染源寄与の推算

環境科学部 村野勢津子

はじめに

ダイオキシン類は2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-パラジオキシン(2,3,7,8-TeCDD)の毒性に換算した濃度の合計で規制されている。換算するために定められた係数を毒性等価係数(TEF)といい、換算した濃度を毒性等量(TEQ)という。TEFは毒性を有するとみなされる29異性体について定められているので、TEQを算出するためには、最低でも29異性体を分離定量する必要がある。そのため、分画操作やGC-MSでの複数カラムの使用などで分析時間が長くなり、結果がでるまでに時間がかかるという問題がある。

野尻らは、ダイオキシン類の主要な4つの汚染源(燃焼、PCB製品、PCP製剤、CNP製剤)に由来するTEQを5つの指標異性体濃度から簡易に推算する方法(異性体指標法)を報告している。

今回、異性体指標法(ICM)の妥当性を評価するため、過去10年間の当所における分析結果に適用し比較解析したので、その結果を報告する。

また、主要4汚染源由来に由来する推算値から各汚染源寄与率を推算したので、その結果も合わせて報告する。

方法

1 対象試料

当所で分析を実施した試料のうち、底質98件(濃度範囲:0.17~22 pg-TEQ/g)、土壌83件(0.22~16 pg-TEQ/g)、大気10件(濃度範囲:0.064~0.43 pg-TEQ/m³)を対象とした。

2 ICMによるTEQの推算

各汚染源の指標異性体を表に示す。

TEQの推算は、2段階からなる。第1段階として各汚染源に由来する指標異性体の濃度を、5つ

表 各汚染源の指標となる異性体(指標異性体)

汚染源	異性体名
燃焼	2,3,4,7,8-PeCDF
PCB製品	#126及び#105(IUPAC番号)
PCP製剤	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD
CNP製剤	1,2,3,7,8-PeCDD

の指標異性体の実測値から、式1を用いて推算する。ここで、Cは異性体濃度で、上付文字は汚染源、下付文字は異性体名を示す。また、C_i^Sの取り得る濃度範囲は、ゼロ以上C_i以下である。従って式1で得られたC_i^Sが負になったときは、その値をゼロとし、C_iより大きくなったときは、その値をC_iとする。

第2段階として、式1で得られた5つの指標異性体の推算濃度から、式2を用いて対応する汚染源に由来するTEQを得る。ここでTEQの上付文字は由来する汚染源を示す。総TEQは4つの汚染源に由来するTEQの合計値とする。従来の方法で29異性体の実測濃度から換算したTEQと区別するため、従来の方法によるものは「総TEQ(実測)」とし、ICMによるものは「総TEQ(ICM)」とした。

結果

1 総TEQ(ICM)と総TEQ(実測)の比較

(1)底質試料

98件の試料について比較した結果、図1に示したとおり、よく一致していた(相関係数0.9964)。

(2)土壌試料

83件の試料について比較した結果、図2に示したとおり、よく一致していた(相関係数0.9988)。高濃度試料(2件)を除いた81件のみで比較した結果でも、よく一致していた(相関係数0.9936)。

(3)大気試料

大気試料10件について比較した結果、図3に示したとおり、よく一致していた(相関係数0.9963)。

2 各汚染源寄与率

式2により算出した各汚染源に由来する推算値から濃度ベースでの寄与率を推算した。その結果は、ケミカル・マス・バランス法による結果とは完全には一致しなかったが、傾向としては同様であると言える結果であった。

まとめ

ICM法で推算したTEQは、当所で測定している環境試料に対して概ね適用可能であることが示された。ICM法で指標となる5つの異性体のみを

分析する場合は、GC-MSで1種類のカラム(DB-5)法取り入れることも考えていきたい。
 を使って30分程度で分析可能であるので、ICM

$$\begin{pmatrix} C_{2,3,4,7,8\text{-PeCDF}}^{\text{燃焼}} \\ C_{\#126\text{-PeCB}}^{\text{PCB}} \\ C_{\#105\text{-PeCB}}^{\text{PCB}} \\ C_{1,2,3,4,6,7,8\text{-HpCDD}}^{\text{PCP}} \\ C_{1,2,3,7,8\text{-PeCDD}}^{\text{CNP}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1.03 & -0.00471 & -2.16 \times 10^{-6} & -6.41 \times 10^{-4} & -0.0679 \\ -0.825 & 1.00 & 1.73 \times 10^{-6} & 5.14 \times 10^{-4} & 0.0545 \\ -0.639 & 0.00292 & 1.00 & 3.98 \times 10^{-4} & 0.0422 \\ -3.62 & 0.0166 & 7.60 \times 10^{-6} & 1.00 & 0.239 \\ -0.330 & 0.00151 & 6.93 \times 10^{-7} & -0.00151 & 1.02 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_{2,3,4,7,8\text{-PeCDF}} \\ C_{\#126\text{-PeCB}} \\ C_{\#105\text{-PeCB}} \\ C_{1,2,3,4,6,7,8\text{-HpCDD}} \\ C_{1,2,3,7,8\text{-PeCDD}} \end{pmatrix}$$

式1

$$\begin{pmatrix} \text{TEQ}^{\text{燃焼}} \\ \text{TEQ}^{\text{PCB}} \\ \text{TEQ}^{\text{PCP}} \\ \text{TEQ}^{\text{CNP}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1/0.673 \times C_{2,3,4,7,8\text{-PeCDF}}^{\text{燃焼}} \\ 0.116 \times C_{\#126\text{-PeCB}}^{\text{PCB}} + 1.13 \times 10^{-4} \times C_{\#105\text{-PeCB}}^{\text{PCB}} \\ 1/29.2 \times C_{1,2,3,4,6,7,8\text{-HpCDD}}^{\text{PCP}} \\ 1/0.742 \times C_{1,2,3,7,8\text{-PeCDD}}^{\text{CNP}} \end{pmatrix}$$

式2

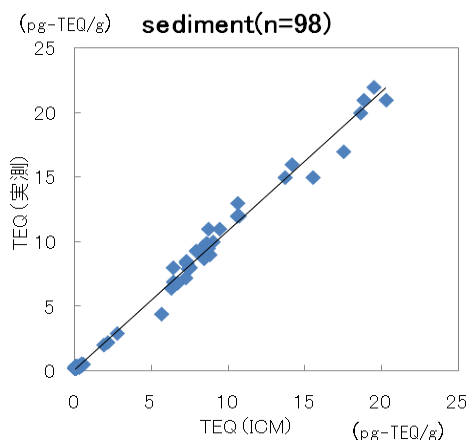


図1 総TEQ(ICM)と総TEQ(実測)の比較—底質—

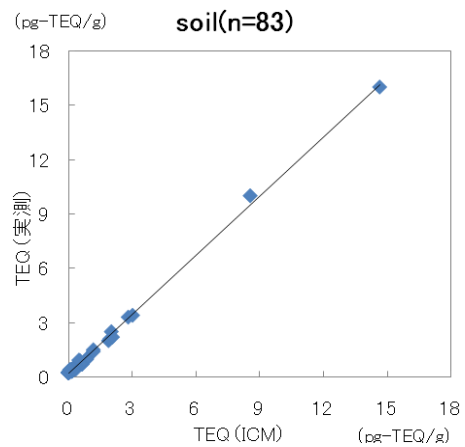


図2 総TEQ(ICM)と総TEQ(実測)の比較—土壌—

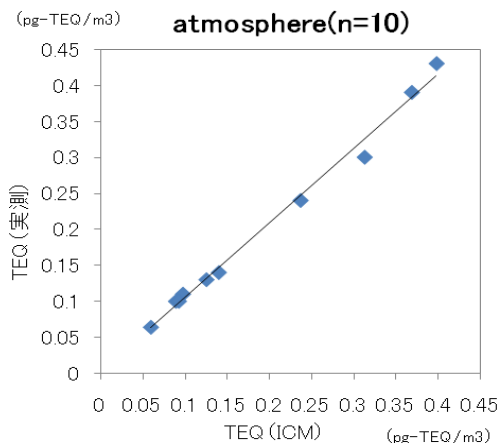


図3 総TEQ(ICM)と総TEQ(実測)の比較—大気—