

第3 調查研究業績

講演発表表

日本におけるギンブナ中の POPs (有機塩素系農薬) 蓄積量調査

○岩村幸美¹、陣矢大助¹、門上希和夫¹、福本真紀²、布川徹²、肥塚隆男²
 (¹北九州市立大学大学院アクア研究センター、²北九州市環境科学研究所)
 第 16 回環境化学討論会 (北九州市)

平成 19 年 6 月

【はじめに】

環境中の残留性有機汚染物質 (POPs) については、環境省の POPs モニタリングなど多くの調査が行われており、低レベルでの濃度実態が明らかになってきている。梶原らは、平成 15 年から平成 17 年にかけて、日本国内の河川や湖沼におけるギンブナ中のダイオキシン類調査を行い、その蓄積量を明らかにした[1]。本報告では、梶原らがダイオキシン類調査に用いた試料を対象に、POPs 条約における対象物質のうち、ダイオキシン類、PCB 類及びトキサフェンを除く物質群に HCH を加えた 11 物質群を対象に、ギンブナ及び底質中の蓄積量を調査した結果を報告する。

【調査方法】

(1) 調査地点及び採取試料

調査地点は、図 1 に示す 14 地点である。試料の採取は平成 15 年～平成 17 年の秋期に行い、対象媒体はギンブナ(琵琶湖のみニゴロブナ)及び底質とした。魚試料は各地点 30 個体以上を採取し、筋肉部を等量混合して分析に供した。また、産卵期の性差及び卵への移行を調査するため、北九州市の紫川で平成 15 年 4 月にオス 10 個体と産卵前のメス 20 個体を採取し、それぞれの筋肉部を等量混合したもの及び卵塊の分析を行った。

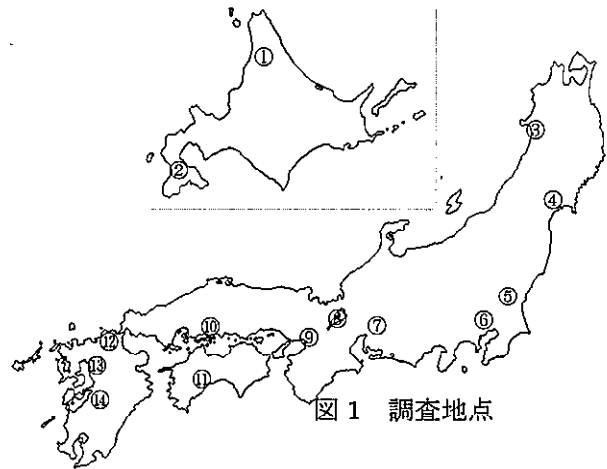


図 1 調査地点

(2) 分析方法

分析は、環境省の「POPs モニタリング調査マニュアル」に準拠して行った。試料にサロゲート物質 (¹³C ラベル化物) を添加し、アセトンを加えて振とう・遠心分離後上澄みを回収し、残渣をジクロロメタンで 6 時間以上ソックスレー抽出した。抽出液を合わせ、5%食塩水を加えて有機層を回収し、脱水・ヘキササン転溶後、底質試料は脱硫黄処理を行った。さらにフロリジルカラムクロマトグラフィーを経て、高分解能 GC/MS(分解能 10,000≧)で測定した。

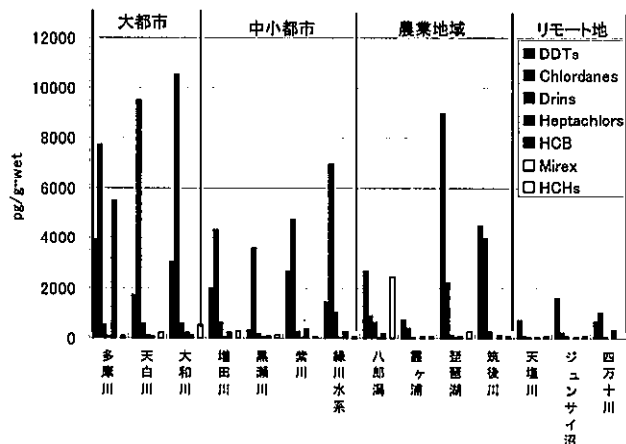
【結果及び考察】

(1) ギンブナ中の POPs 濃度

ギンブナ筋肉中から *trans*-ヘプタクロルエポキシドを除くすべての対象物質が検出された。物質群毎の検出濃度を図 2 に示す。大都市及び中小都市及びリモート地の四万十川ではクロルデン類の濃度が最も高く、その他の地点では DDT 類濃度が高い傾向が見られた。多摩川においては、ヘキサクロロベンゼン (HCB) が高い値を示した。

また、すべての検体から検出されたクロルデン類の濃度構成比を図 3 に示

図 2 ギンブナ筋肉中の POPs 濃度



Nationwide study of organochlorine pesticides in *Carassius auratus langsdorfii* (crucian carp) in Japan
 Tomomi IWAMURA¹, Daisuke JINYA¹, Kiwao KADOKAMI¹, Maki FUKUMOTO², Toru NUNOKAWA², Takao KOEZUKA²
¹Graduate School of Environmental Engineering, The University of Kitakyushu, ²Kitakyushu City Institute of Environmental Sciences, Shin-ike 1-2-1, Tobata, Kitakyushu, Fukuoka 804-0082, TEL 093-882-0333, FAX 093-871-2535, Email: t-iwamura@env.kitakyu-u.ac.jp

す。いずれの地点も *cis*クロルデンと *trans*ノナクロルが高い割合を占めていた。地域による差異については、リモート地においてオキシクロルデンの占める割合が若干高い他は、特に大きな差は見られなかった。

(2) POPs 濃度の性差及び卵への移行

産卵期に採取したギンブナのオス、メス及び卵の POPs 濃度を表 1 に示す。ほぼすべての対象物質において、オスの方がメスよりも筋肉中濃度が高かった。これは、ダイオキシン類の調査結果と同様に、産卵期において POPs が母体から卵へ移行したためと考えられる。卵への移行量は、筋肉中の濃度がギンブナの体全体の濃度であると仮定すると、産卵期における母体から卵への移行率は、19.2%~34.1%であった。

(3) ギンブナへの生物濃縮

ギンブナの生育環境からの生物濃縮を、底質-生物蓄積係数(Biota to Sediment Accumulation Factor, BSAF)を用いて評価した。BSAFは次式より求めた。

$$\text{BSAF} = (\text{ギンブナ脂質重量当たりの POPs 濃度}) / (\text{底質有機物重量当たりの POPs 濃度})$$

ギンブナ、底質ともにすべての検体から検出されたクロルデン類の BSAF を図 4 に示す。地点により、BSAF の値に差が見られた。また、一部の地点でオキシクロルデンの BSAF が高いが、オキシクロルデンはクロルデンの代謝物であり、生育環境からの濃縮よりも生物の体内での代謝による要因が大きいと考えられる。

【謝辞】

本調査は、環境省の「内分泌かく乱物質に関する日韓共同研究」の一環として、国立環境研究所及び釜山大学と共同で行った。調査地点の選定に関して、大学及び関係自治体からご助言をいただいた。記して深謝いたします。

【参考文献】

[1] Y. Kajiwara, N. Kashiwagi, and K. Kadokami: *Chemosphere*, now submitted.

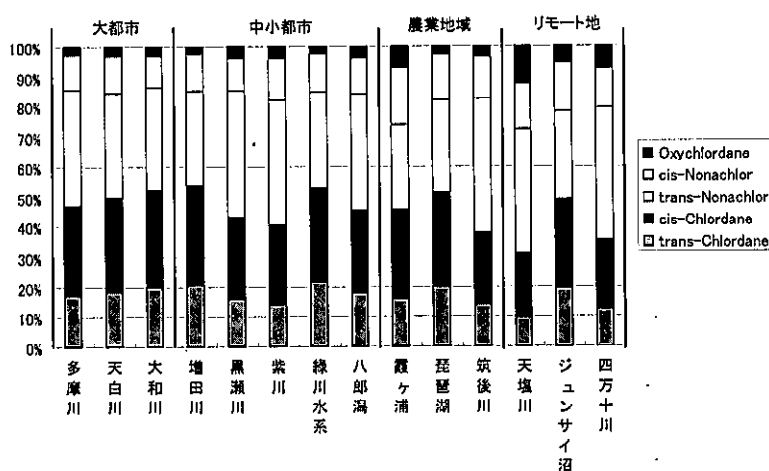


図 3 ギンブナ筋肉中のクロルデン類濃度構成比

表 1 ギンブナ筋肉及び卵中の POPs 濃度 (pg/g-wet)

Compound	オス	メス	卵	卵への移行率(%)
DDTs	6,797	3,213	8,322	19.6~24.4
Chlordanes	7,840	6,170	14,240	19.2~21.8
Drins	534	255	1,045	28.1~34.1
Heptachlors	90	48	154	23.8~26.6
HCB	220	150	500	27.1
Mirex	7	4	11	23.5
HCHs	446	236	612	19.5~29.3
平均重量(g)	213	244	27.2	—
脂質重量(%)	1.44	1.13	4.87	—

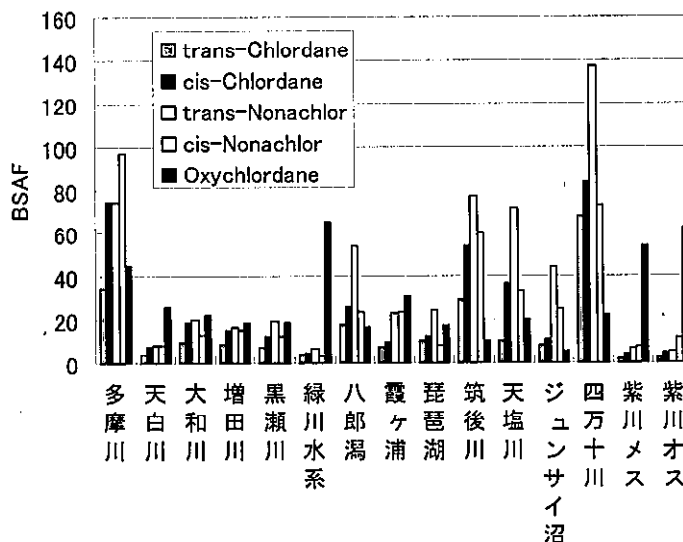


図 4 クロルデン類の BSAF

LC/MSによる化学物質分析法の基礎的研究

○花田喜文、○梶原葉子、○一田亜希子(北九州市環科研)、○飛石和大、
○塚谷裕子(福岡県保環研)、佐々木和明、鎌田憲光(岩手県保環研セ)、
吉澤正、清水明(千葉県環研セ)、長谷川敦子(神奈川県環科セ)、中澤
剛、茨木剛、田辺顕子(新潟県保環研)、鈴木茂(中部大学)、中根知康
(愛知県環調セ)、渡辺正敏、長谷川瞳(名古屋市環科研)、上堀美知子、
今村清(大阪府環農総研)、古武家善成、吉田光方子(兵庫県健環研セ)、
高良浩司(和歌山県環衛研セ)、森脇洋(信州大学)、八木正博、長谷川
明彦(神戸市環保研)、浦山豊弘、吉岡敏行、剣持堅志(岡山県環保セ)、
大野ちづ子(徳島県保環セ)、嘉村久美子、古谷典子(山口県環保研セ)

第16回環境化学討論会(北九州市)

平成19年6月

【はじめに】 GC/MSでは測定困難な環境中化学物質について、LC/MSの適用可能性を検討した。本報は、環境省委託化学物質分析法開発調査における検討で得られた主な知見について取りまとめたものである。

【実験】 水質試料中の i)チウラム、ii) *m*-アミノフェノール、iii) ヘキサコナゾールについて LC/MSによる分析法を検討した。

【結果と考察】 チウラム(北九州市環科研)：農薬のチウラム(殺菌剤、年間使用量:395 t、環境基準値:6 µg/L)について高感度分析法を検討した。分析は、水試料1Lにサロゲートとしてチウラム- d_{12} を添加し、昭和電工製 Autoprep PS@Liq HQを用いて固相抽出した後、0.2 mLまで濃縮後 LC/MSで分析する方法を用いた。シングル型-質量分析計では、水質試料中の夾雑物による妨害を受け分析困難であったが、タンデム型-質量分析計を用いることにより、図 i-1 に示すように妨害ピークのない良好なクロマトグラムを得ることができた。また、精製水に 0.010 µg/L となるようにチウラムを添加した後、本分析法を用いて繰り返し測定を行った。繰り返し測定の平均値及び標準偏差は、各々 0.0106 µg/L (n=5) 及び 0.00571 µg/L (相対標準偏差:5.4%) と良好な結果を示した。標準偏差から求めた分析法検出限界(MDL)は、0.0024 µg/L に達し、従来の HPLC-UV 法の 0.6 µg/L に比べ 200 倍以上高感度化することができた。LC/MSによるチウラムのピーク検出は、シングル型 LC/MS では、5 ng/mL (試料換算:0.001 µg/L)、タンデム型では図 i-2 のように 0.05 ng/mL (試料換算:0.00001 µg/L) までピークを観察することが可能であった。しかしながら、タンデム型の検出濃度レベルでは、検量線の落ち込みがみられ、極低濃度域の定量に課題が示された(図 i-3)。

Fundamental studies on chemical analysis by liquid chromatography/mass spectrometry (33)

Yoshifumi HANADA, Yoko KAJIWARA, Akiko ICHIDA(Kitakyushu City Inst. Env. Sci., 1-2-1 Shin-ike, Tobata, Kitakyushu, 804-0082, TEL: 093-882-0333, Fax: 093-871-2535), Kazuhiro TOBIISHI, Hiroko TSUKATANI (Fukuoka Inst. Health Env. Sci.), Kazuaki SASAKI, Norimitsu KAMADA (Res. Inst. Env. Sci. Pub. Health Iwate Pref.), Tadashi YOSHIZAWA, Akira SHIMIZU (Chiba Pref. Env. Res. Center), Atsuko HASEGAWA (Kanagawa Env. Res. Center), Tsuyoshi NAKAZAWA, Tsuyoshi IBARAKI, Akiko TANABE (Niigata Pref. Inst. Pub. Health Env. Sci.), Shigeru SUZUKI (Chubu Univ.), Tomoyasu NAKANE(Aichi Env. Res. Center), Masatoshi WATANABE, Hitomi HASEGAWA (Nagoya City Env. Sci. Res. Inst.), Michiko UEBORI, Kiyoshi IMAMURA (Res. Inst. Env. Agri. Fish., Osaka Pref. Gov.), Yoshinari KOBUE, Mihoko YOSHIDA (Hyogo Pref. Inst. Pub. Health Env. Sci.), Koji TAKARA (Wakayama Pref. Center Env. Pub. Health), Hiroshi MORIWAKI (Shinshu Univ.), Masahiro YAGI, Akihiko HASEGAWA (Kobe Inst. Health), Toyohiro URAYAMA, Toshiyuki YOSHIOKA, Katashi KENMOTSU (Okayama Pref. Inst. Env. Sci. Pub. Health), Chizuko OHNO (Tokushima Pref. Inst. Pub. Health Env. Sci.), Kumiko KAMURA, Noriko FURUYA (Yamaguchi Pref. Res. Inst. Pub. Health)

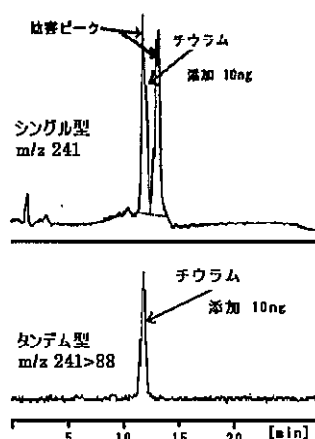


図 i-1 タンデム型の効果

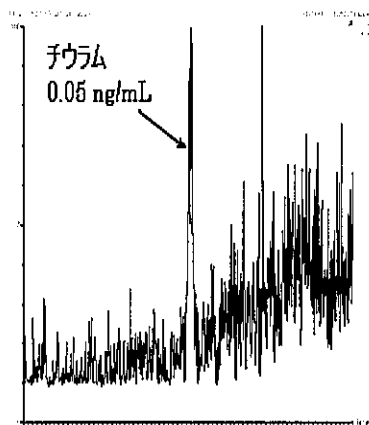


図 i-2 チウラム検出可能濃度

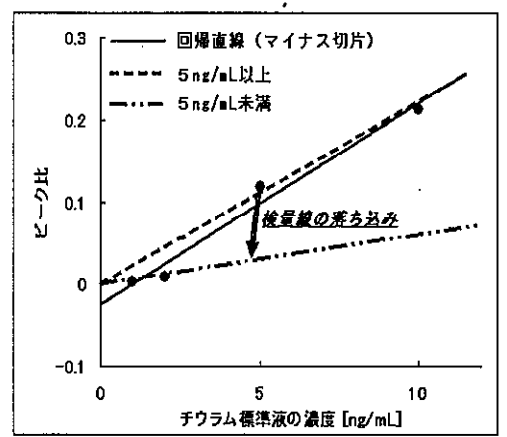


図 i-3 検量線の落ち込み

m-アミノフェノール（福岡県保環研）：染料や医薬品中間体として使用される *m*-アミノフェノールの分析法を検討した。水質試料 100 mL を Waters 製 Oasis HLB Plus に通水した後、被検成分をメタノールで溶出し、シングル型 LC/MS で分析した。LC/MS によるアミノフェノール類の SIM クロマトグラムを図 ii-1 に示す。本分析法を用いることにより、存在するアミノフェノールの異性体 3 種を全て分離することが可能であった。また、MDL は 0.007 $\mu\text{g/L}$ であり、実試料（海水）からの回収率及び相対標準偏差は 73% 及び 4.5% であった。さらに、環境試料中に存在する夾雑物の影響を低減するため、①固相吸着前に Sep-Pak tC18 カートリッジで試料水を洗浄、②吸着後のカートリッジを 2% メタノール溶液で洗浄、の 2 つのクリーンアップ法について検討した。その結果、どちらの方法も 80% 以上の回収率を示し、夾雑物の多い環境試料についても適用可能であることが示された。

ヘキサコナゾール（福岡県保環研）：農薬のヘキサコナゾール（年間出荷量：約 3.4 t）の分析法を検討した。シングル型質量分析では、クロマトグラムのバックグラウンドが高いため、タンデム型質量分析計を使用した。タンデム型質量分析計による低濃度のクロマトグラムを図 iii-1 に示す。分析法は、水質試料 200 mL を Waters 製 Sep-Pak Plus tC18 に通水した後、被検成分をメタノールで溶出し、タンデム型 LC/MS で分析する方法を選択した。ただし、LC/MS 測定用の試料液の溶液組成を LC/MS 移動相に合わせるため、6 mL のメタノールで溶出した後、精製水 2 mL を加え混合したものを試料液とした。本分析法の MDL は、0.057 $\mu\text{g/L}$ であった。また、海水を用いた添加回収試験では、回収率 90.4%、相対標準偏差 7.3% と良好な結果を示した。

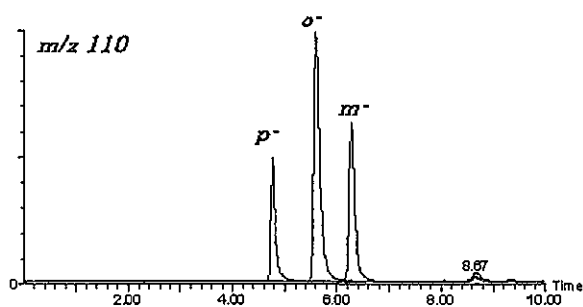


図 ii-1 アミノフェノール異性体の分離

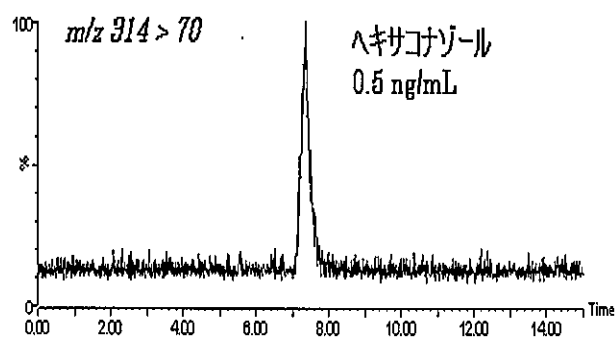


図 iii-1 タンデム型によるヘキサコナゾールの検出濃度

全国河川水の *in vitro* バイオアッセイによる曝露モニタリングに関するパイロット研究

その 1 : 酵母アッセイを用いた河川水の受容体結合活性

○白石不二雄¹、中島大介¹、鎌田 亮¹、武内伸治²、永洞真一郎³、高橋 悟⁴、大金仁一⁵、大谷仁己⁶、堀内孝信⁷、渡邊雅之⁸、山根一城¹⁰、原口公子¹¹、陣矢大助¹²、門上希和夫¹²、後藤純雄¹³、鎌迫典久¹、白石寛明¹、鈴木規之¹
(¹国環研、²北海道衛研、³北海道環科研、⁴岩手県環保研セ、⁵宮城県保環セ、⁶群馬県衛環研、⁷長野県環保研、⁸静岡県環衛研、⁹京都府保環研、¹⁰鳥取県衛環研、¹¹北九州市環科研、¹²北九州市大院、¹³麻布大)

第 16 回環境化学討論会 (北九州市)

平成 19 年 6 月

【はじめに】 河川水的环境汚染物質のモニタリングは、これまで人体への影響が懸念される特定の化学物質について機器分析を用いる手法により行われるのが通常であった。近年、生態系保全の観点から、生態系に及ぼす影響も含めて把握する必要性が指摘されている。しかしながら、我が国では、河川水の生態毒性を示すと懸念される化学物質は、法規制等の効果により低濃度汚染となりつつあり、個別の化学物質が生態系に及ぼす影響を機器分析などで定量的に評価することは困難になりつつあり、未知の生物活性 (毒性) 物質を含めた多くの汚染化学物質による複合的影響はバイオアッセイという手法により包括的に調べ、評価することが求められる。我々は河川水の生態影響に関与すると思われる汚染化学物質のモニタリングを、比較的迅速かつ簡便に行える複数の *in vitro* バイオアッセイ手法を用いて行うことにより、河川における生態系への予見的な影響を評価する研究に着手した。今回、パイロット研究として複数の都道府県から搬送された河川水について、エストロゲン活性など酵母アッセイによる受容体結合活性のモニタリングを試みたので報告する。

【方 法】 今回、試験に供した河川水試料は、共同研究を行っている地方環境研究所の担当者が任意に選択した河川からポリタンク (5L 用) に 2006 年 10 月あるいは 11 月に採水し、冷蔵宅配便で国環研に搬送された 9 都道府県 (A~I) の 20 検体である。搬送された河川水は、一般調査項目 (TOC、T-N、T-P など) の測定用に一部を分取後、1L ずつガラス瓶に分け、昨年の本学会 (第 15 回環境化学討論会、仙台市) で提案した試料調製法に準じてアッセイ用試料を作成した。すなわち、酢酸 : 水 : メタノール (1:9:90) 溶液を 10mL 添加後、グラスフィルター (GF/C) で濾過して SS を除去したものを C18 固相ディスク (3M 製) で有機物をトラップしてホットプレート (35°C) 上で乾燥後、メタノール溶出 (C18-MeOH) した。C18-MeOH 試料は窒素ガスで乾固してヘキサン:ジクロロメタン (Hx:DCM=3:1) の少量を加え、超音波処理により溶解後、フロリジルカラム (FL; BONDELUT, 500mg/3mL) に重層して Hx:DCM で洗浄 (FL-W 画分) し、次いで 10%アセトン/DCM で溶出 (FL-10%画分) し、最後にメタノールで溶出 (FL-RM 画分) して、3つの分画試料を作成した。分画試料はそれぞれ窒素ガスで乾固後、100 μ L の DMSO で溶解してバイオアッセイに供した。

今回、河川水の受容体結合活性を調べた酵母アッセイ法は、ヒト・エストロゲン受容体 α (hER)、メダカ・エストロゲン受容体 α (medER)、ヒト・レチノイン酸受容体 γ (RAR) が組み込まれた酵母ツーハイブリッドアッセイ法、及びヒト・アрилハイドロカーボン受容体 (AhR) が組み込まれた酵母アッセイ法[1] の 4 種類を用いた。

Pilot study on exposure monitoring of river waters with an *in vitro* bioassay system.

Part I: Receptor binding activities of river water samples by several yeast assay

Fujio SHIRAIISHI*, Daisuke NAKAJIMA, Ryo KAMATA, Shinji TAKEUCHI, shinichiro NAGAHORA, Satoru TAKAHASHI, Jinichi OGANE, Yoshimi OHTANI, Takanobu HORIUCHI, Masayuki WATANABE, Kazuki YAMANE, Kimiko HARAGUCHI, Daisuke JINYA, Kiwao KADOKAMI, Sumio GOTO, Norihisa TATARAZAKO, Hiroaki SHIRAIISHI, and Noriyuki SUZUKI

*National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan, TEL: +81-29-850-2454, FAX: +81-29-850-2870, E-mail: fujios@nies.go.jp

【結果と考察】 図-1に、TOCが50mg/L以上と極めて高い工場排水直下のA県の河川水2検体を除いた、8都道府県の河川水18検体の測定項目の平均値（凡例）と県別（B～I）ごとの各河川水の全体平均値（100%）に対する割合（%）を棒グラフで示した。

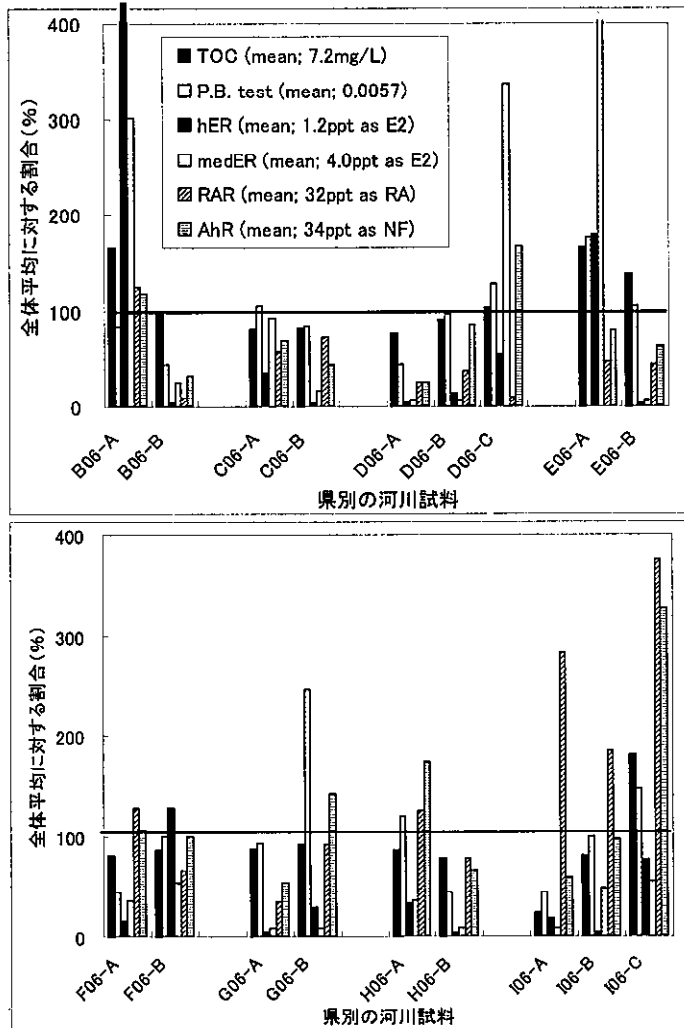


図-1. 河川水18検体の各種バイオアッセイの測定値の平均と各河川の全体平均値に対する割合(%)

8倍を示した。AhRは、薬物受容体の一種であり、ダイオキシンがリガンドであることからダイオキシン受容体とも呼ばれ、PCBなど様々な物質が結合することが明らかになってきている[3]。今回、もっとも強い結合活性が見られたのは、I県のC河川水の111ppt(β-Naphthoflavone; NF換算)で平均値の3.3倍を示した。なお、当河川水を採取した上流部にはし尿処理場の排水口が存在し、TOCやRAR結合活性ももっとも高く、AhR結合活性を含めたこれらの高い値に排水が影響を及ぼしているものと思われる。

今回、全国数カ所の河川水を複数の*in vitro*バイオアッセイによりモニタリングすることを試みたが、*in vitro*バイオアッセイを用いる包括的生物活性を調べることで、河川ごとの生態系への予見的な影響を評価・監視できる可能性が本パイロット研究により示唆された。

【文献】 [1] C.A. Miller, III, J. Biol. Chem., 272, 32824-32829 (1997)

[2] 中島大介ら、第16回環境化学討論会講演要旨集(演題番号:P175) 2007

[3] 武内伸治ら、第16回環境化学討論会講演要旨集(演題番号:P16) 2007

TOC(総有機炭素)は環境水の有機物質汚染実態を示す指標として調査した。TOCのレベルは1.7~13mg/Lを示し、平均値は7.2mg/Lと一般河川水としては比較的高い濃度レベルと思われる。また、いわゆる一般毒性の指標である発光細菌毒性試験(P.B. test)を濃縮試料について行い、50%抑制濃度(IC50)を示す濃縮率(C.R.)の逆数を毒性強度として算出した。もっとも強い毒性を示した検体は、G県のB河川水で平均値の2.5倍を示した。当河川水はTOCや受容体結合活性は平均値に近い値であったが、遺伝毒性の指標であるumu試験において強い活性を示すことが明らかになった[2]。エストロゲン活性は、hER酵母アッセイにおいては、もっとも強い活性が見られたのは、B県のA河川水の14ppt(E2換算)であり、強活性は上流の下水処理場排水に由来するものと思われる。一方、medER酵母アッセイにおいては、E県のA河川水の30ppt(E2換算)であったが、当河川の上流に豆腐の加工場が存在することが影響している可能性が示唆された。RARは、ビタミンAの酸化代謝産物であるall-transレチノイン酸(RA)がリガンドの核内受容体である。RARはリガンドの過剰曝露により種々の奇形を誘発することが知られている。もっとも強い結合活性が見られたのは、I県のC河川水の120ppt(RA換算)で平均値の3.

全国河川水の *in vitro* バイオアッセイによる曝露モニタリングに関するパイロット研究

その2 : *umu* 試験による河川水の変異原性測定

- 中島大介¹、白石不二雄¹、鎌田 亮¹、影山志保¹、永洞真一郎²、高橋 悟³、大金仁一⁴、大谷仁己⁵、堀内孝信⁶、渡邊雅之⁷、濱根貴志⁸、山根一城⁹、原口公子¹⁰、陣矢大助¹¹、門上希和夫¹¹、後藤純雄¹²、鐘迫典久¹、白石寛明¹、鈴木規之¹ (1 国環研、² 北海道環科研、³ 岩手県環保研セ、⁴ 宮城県保環セ、⁵ 群馬県衛環研、⁶ 長野県環保研、⁷ 静岡県環衛研、⁸ 京都府保環研、⁹ 鳥取県衛環研、¹⁰ 北九州市環科研、¹¹ 北九州市大院、¹² 麻布大)

第 16 回環境化学討論会 (北九州市)

平成 19 年 6 月

【はじめに】河川水の遺伝毒性モニタリングは、後藤ら[1]や遠藤ら[2]による全国 100 河川以上についての詳細な報告がある。このモニタリングでは、試料採取にブルーレーヨンが用いられ、24 時間のパッシブサンプリングが行われている。しかしこの方法では単位河川水体积あたりの活性を算出することができないことや、多環芳香族類を選択的に捕集し、他の活性物質を捕集しにくいことなどが課題となってきた。そこで本研究では、河川水試料の濃縮に C18 系のディスクを使用し、有機化合物を広範囲に捕集することとした。またアッセイ法については、エームス法よりも高感度化が期待される発光 *umu* 試験の河川水試料への適用を検討した。

【方法】試料水の前処理：試料は全国 9 都道府県で採取した水試料を用いた。各試料の基礎的なデータを表 1 に示した。前処理は白石らの方法[3]に従って処理した。即ち、試料 1ℓに酢酸-水-メタノール (1:9:90, v/v) 10ml を添加し、ガラス繊維濾紙で吸引濾過して SS 分を除去した。得られた濾液を予めメタノールでコンディショニングした C18FF ディスク (3M 製) に通し、メタノールで溶出した。これを窒素ガスで乾固させて一次固相抽出試料とした。これにヘキサニージクロロメタン (Hex:DCM=3:1, v/v) を加えて溶解した試料をフロリジル (FL) カートリッジ (BOND ELUTE, 500 mg/3 ml) に重層し、Hex:DCM=3:1 で洗浄した液を W 画分とし、続けてアセトンを 10% 添加したジクロロメタンで溶出し、FL 画分を得た。更にメタノールで溶出した画分を RM 画分とした。発光 *umu* 試験：発光 *umu* 試験は中島らの既報[4]に従い、*S.typhimurium* TL210 株を用いて行った。即ち、TGA 培地 (全量の 1/6 体積に S9mix または 0.1M リン酸緩衝液 pH 7.4 を含む) を用いて前培養した TL210 株を希釈し、OD=0.1 に調整した。黒色 96 穴プレートの 1 ウェルにつき、DMSO に転溶した試料 4 μ ℓと調製した菌液 200 μ ℓを入れてよく攪拌し、30℃で静置培養した。

表 1 測定に供した試料水の基礎データ

River ID	TOC	T-N	
		(mg/l)	
A06-A	90	2.3	0.287
A06-B	56	36	0.666
B06-A	12	5.43	0.321
B06-B	7.1	1.48	0.027
C06-A	5.8	1.73	0.089
C06-B	5.9	1.65	0.062
D06-A	5.5	0.93	0.021
D06-B	6.5	4.9	0.211
D06-C	7.5	5.12	0.813
E06-A	12	13	0.839
E06-B	10	2.63	0.415
F06-A	5.8	11.7	0.451
F06-B	6.2	3.62	0.336
G06-A	6.3	0.7	0.042
G06-B	6.6	3.9	0.312
H06-A	6.2	1.6	0.37
H06-B	5.6	4.1	0.085
I06-B	5.8	1	0.13
I06-C	13	22	1.2

Pilot Study on Exposure Monitoring of River Waters with an *in vitro* Bio-assay System. Part II: Genotoxic Activity of River Waters by *umu* Test

Daisuke NAKAJIMA*, Fujio SHIRAISHI, Ryo KAMATA, Shiho KAGEYAMA, Shinichiro NAGAHORA, Satoru TAKAHASHI, Jinichi OGANE, Yoshimi OHTANI, Takanobu HORIUCHI, Masayuki WATANABE, Takashi HAMANE, Kazuki YAMANE, Kimiko HARAGUCHI, Daisuke JINYA, Kiwao KADOKAMI, Sumio GOTO, Norihisa TATARAZAKO, Hiroaki SHIRAISHI, and Noriyuki SUZUKI

*National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, TEL 0298-50-2984, FAX 0298-50-2849, E-mail: dnakaji@nies.go.jp

反応開始後 120 分から 20 分間隔で 300 分まで発光量を測定した。発光及び OD はそれぞれルミネッセンスリーダー JNR AB2100 (ATTO) 及びマイクロプレートリーダー (BIO-RAD) を用いて測定した。発光量は 1 ウェルあたり 1 秒の積算値を測定した。評価に用いる発光量は、それぞれ溶媒対照が最大の発光量を与えた時点 (通常 180 ~ 220 分) における値を用いた。

【結果と考察】まず、埼玉県綾瀬川の試料を用意し、エームスマイクロサスペンション法 (TA98 株及び TA100 株を使用) に供した。河川試料 3ℓ を濃縮し、プレートあたり 150ml を最高濃度にして試験したが、W, FL 及び RM のいずれの画分においても用量に応じた復帰コロニー数の上昇は認められなかった。同一の試料を発光 *umu* 試験に供したところ、-S9mix 系では試料量に応じた発光量の増加は認められなかったが、FL 画分の +S9mix 系においては用量依存的な発光量の増大が認められた。RM 画分の +S9mix 系においても若干発光量の増大が確認された。このように、エームスマイクロサスペンション法で検出されなかった遺伝毒性が、発光 *umu* 試験法を適用することで検出可能になるものと思われた。なおこの時、1ℓ の河川水を 100 μ ℓ に濃縮したものを最高試料濃度とし、1 ウェルあたりの試料量は河川水 40ml に相当した。

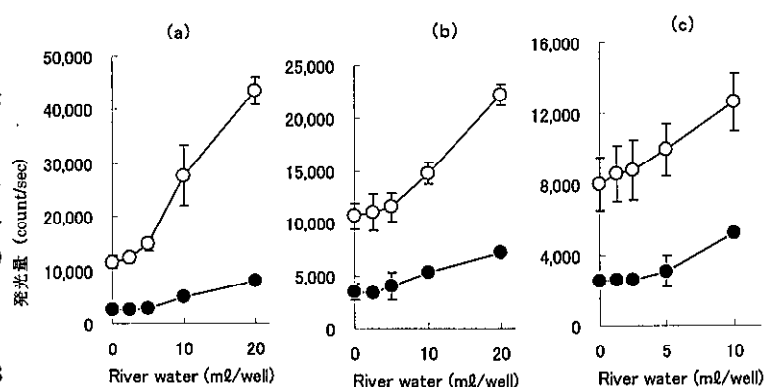


図 1 河川水 FL 画分の発光 *umu* 試験結果例 (a) B06-B, (b) D06-B, (c) G06-B

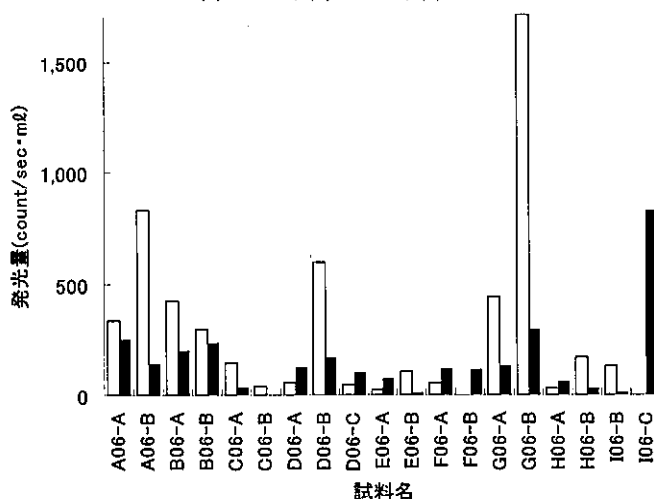


図 2 各 FL 画分の発光 *umu* 試験による遺伝毒性比活性 □代謝活性化なし ■代謝活性化あり

図 1 に全国から採取した河川水を同様に処理して得られた各 FL 画分を発光 *umu* 試験に供した結果のうち、典型的な用量反応曲線の例を示した。この図に示した試料では、いずれも -S9mix 系及び +S9mix 系の両方において試料量に応じた用量依存性が認められた。この時の試料量に対する発光量を、遺伝毒性の比活性 (count/mℓ・試料) とし、その強弱を比較した。算出された比活性をまとめて図に示したものが図 2 である。測定した 18 検体の比活性は、-S9mix 系で検出限界以下のもの (2 試料) から 1709 count/mℓ となった。一方 +S9mix 系では検出限界以下 (1 試料) から 825 count/mℓ となり、ほとんどの試料から比活性を算出することが可能となったとともに、試料により比活性は大きく異なることも明らかとなった。また、同一試料における -S9mix 系と +S9mix 系の比活性の比も試料によって大きく異なり、各河川水に含まれる化学物質組成が異なることを示した。

以上のように、河川水試料の遺伝毒性評価手法として、発光 *umu* 試験を適用したところ、1ℓ の試料から殆どの試料で比活性を算出することができ、そのダイナミックレンジも広いことが確認された。本法は 96 ウェルプレートを使用することから他検体試料に適応でき、また厳密な無菌操作も必要ないことから、環境水のモニタリングに適した方法であると考えられる。今後、規格化や自動化など、環境リスク評価ツールとして利用しやすい改良を進める予定である。

【参考文献】 [1] 後藤純雄ら、環境変異原研究 22, 45-54 (2000) [2] 遠藤 治ら、環境変異原研究 26, 9-22. (2004) [3] 白石不二雄ら、第 16 回環境化学討論会講演要旨集 演題番号 P174 (2006) [4] Nakajima *et al.*, *J. Environ. Chem.*, 15: 569-574 (2005)

ACCUMULATED AMOUNTS OF PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS IN *CARASSIUS GIBELIO LANGSDORFII* (CRUCIAN CARP) IN JAPAN

Iwamura T¹, Jinya D¹, Kadokami K¹, Fukumoto M², Nunokawa T², Koezuka T²

¹Graduate School of Environmental Engineering, The University of Kitakyushu, ²Kitakyushu City
27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Tokyo)

September 2007

Abstract

Our investigations were carried out into the accumulated amounts of 10 groups of Organochlorine Pesticides covered by the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) together with HCHs in freshwater fish and bottom sediments in Japan. Samples of the fish (Crucian carp, *Carassius gibelio langsdorfii*) and bottom sediment were taken from 14 river and lake locations in Japan during autumn periods between 2003 and 2005. Furthermore, differences between the sexes in the reproductive stage for *Carassius gibelio langsdorfii* as well as transfer to the eggs were investigated using samples from Murasaki River in Kitakyushu City. Almost all target compounds were found in both fish and the bottom sediment samples. During the spawning season, concentrations in muscle tissue were found to be higher in male fish than in female fish, and this was thought to be due to transfer from the parent body to the eggs. The transfer ratio from the female body to the eggs was calculated to be 19.2%–34.1% assuming the concentration in muscle tissue was equal to the average body concentration. Furthermore, a comparison of bioaccumulation from the growth environments for *Carassius gibelio langsdorfii* at each location was carried out using the Biota-Sediment Accumulation Factor (BSAF).

Introduction

Persistent organic pollutants (POPs) are toxic, persistent, bioaccumulative, and mobile over long distances. As such, they are substances that can accumulate in ecosystems located far from their emission sources. Following the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants coming into effect on May 17, 2004, efforts directed at these substances have come to be carried out on a global basis. Substances prescribed in the Stockholm Convention include polychlorinated biphenyls, DDTs, and Chlordanes, which are already regulated in some countries and which to date have been widely monitored.¹⁻⁴ Kajiwara et al. elucidated the amounts of dioxins, one of the POPs, accumulated in *Carassius gibelio langsdorfii* sampled from rivers and lakes in Japan.⁵ Using the same samples that Kajiwara et al. used in their report investigating dioxins, here we report the results of accumulation amount investigations for *Carassius gibelio langsdorfii* and bottom sediments for 11 substance groups comprising all substance groups prescribed in the Stockholm Convention (excluding dioxins, PCBs, and toxaphene) together with HCHs.

Materials and Methods

Sample collection

A total of 14 sites were selected for investigation (Figure 1; Table 1) and included sites in large cities, small- and medium-size cities, agricultural areas, and other areas. Sampling of bottom sediments and the target species *Carassius gibelio langsdorfii* (*Carassius auratus grandoculis* in the case of Lake Biwa) was undertaken during autumn periods in 2003–2005. At least 30 fish samples measuring 20–25 cm in length were taken from each sampling location, and mixtures of equal quantities of muscle tissue from each fish were analyzed. In addition, 10 male samples and 20 prespawning female samples were taken from the Murasaki River in Kitakyushu City in April 2003 for the purpose of investigating differences between the sexes during the spawning period and transfer to the eggs. Mixtures of equal quantities of muscle tissue from each sample and egg masses were analyzed.

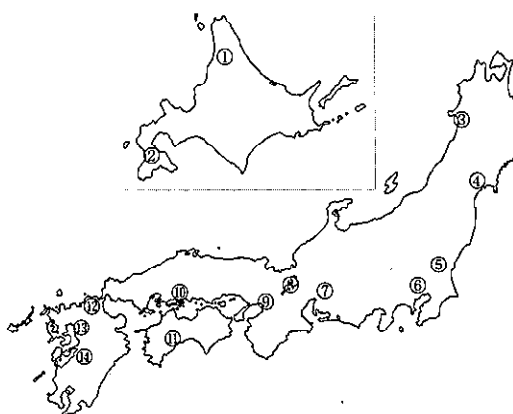


Fig.1 The locations of the 14 sampling sites in Japan

Collecting site	Sampling area	No.	Area category	Collecting date
Tama river	Tokyo	⑥	Large city	Oct. 4, 2003
Tenpaku river	Aichi	⑦		Nov. 8 - 9, 2004
Yamato river	Osaka	⑨		Oct. 14 - 18, 2003
Masuda river	Miyagi	④	Small- and medium-size city	Nov. 8, 2004
Kurose river	Hiroshima	⑩		Oct. 20, 2005
Murasaki river	Kitakyushu, Fukuoka	⑫		April. 23 - 28, 2003
Midori river	Kumamoto	⑭		Oct. 21, 2003
Hachiro-gata lake	Akita	③		Nov. 1 - 16, 2004
Kasumigaura lake	Ibaraki	⑤	Agriclt ural area	Oct. 11 - 29, 2003
Lake Biwa	Shiga	⑧		Oct. 4 - 22, 2005
Chikugo river	Asakura(Haki), Fukuoka	⑬		Oct. 21 - 22, 2003
Teshio river	Horonobe, Hokkido	①		Oct. 2 - 16, 2003
Junsai-numa pond	Nanae, Hokkaido	②	Other area	Oct. 31 - Nov. 2, 2004
Shimanto river	Kochi	⑪		Oct. 13 - 21, 2003
				Oct. 23 - Dec. 8, 2003

Analysis of POPs

Analysis was carried out in accordance with the Ministry of Environment's POPs Monitoring Manual. Surrogate substances (^{13}C labeled compounds) were added to a 20-g sample, acetone was added, and after shaking and centrifugation, the supernatant liquid was collected and the residue Soxhlet-extracted for more than 6 hours using 300ml of dichloromethane. Sodium chloride solution (5%) was added to the resulting extract and the organic layer was collected. After dehydrating and changing the solvent to hexane, the extracts were cleaned up with Florisil column, and then bottom sediment samples were also desulfurized. Measurements were taken using high resolution GC/MS ($\geq 10,000$).

Results and Discussion

Amounts of POPs accumulated in *Carassius gibelio langsdorfii* and bottom sediments

All target substances except *trans*-heptachlor epoxide were detected in the muscle tissue of *Carassius gibelio langsdorfii*. The detected concentrations of each substance group are shown in Figures 2 and 3. Concentrations of chlordanes were the highest in large cities, small- and medium-size cities, and the Shimanto River. Concentrations of DDTs tended to be high at other locations. Hexachlorobenzene (HCB) levels in fish in the Tama River were higher than at other locations. In addition, residual mirex, which has never been manufactured and used in Japan, was detected in all fish samples, indicating that it is residual over a wide area in freshwater areas in Japan.

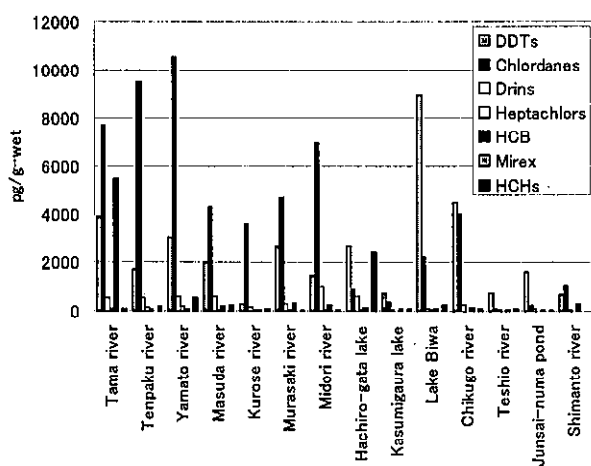


Fig.2 Concentrations of POPs in muscle

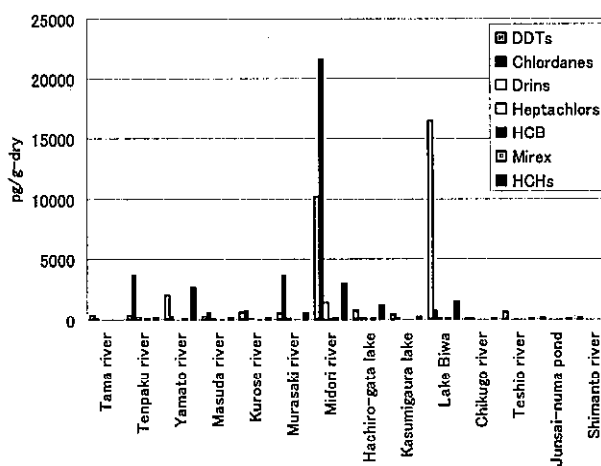


Fig.3 Concentrations of POPs in bottom

With regard to concentrations of chlordanes, the proportions of *cis*-chlordanes and *trans*-nonachlor were high in all fish and bottom sediment samples from all locations (Figures 4 and 5). The compositions of the DDTs in the fish samples were very different from those in the bottom sediments (Figures 6 and 7), and differences in accumulation conditions were observed.

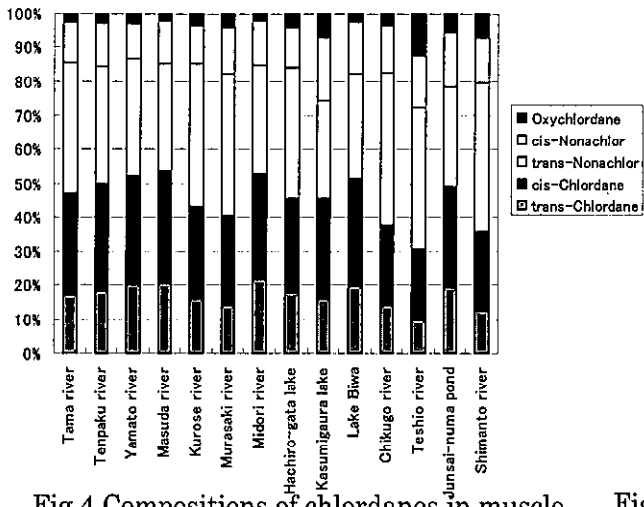


Fig.4 Compositions of chlordanes in muscle

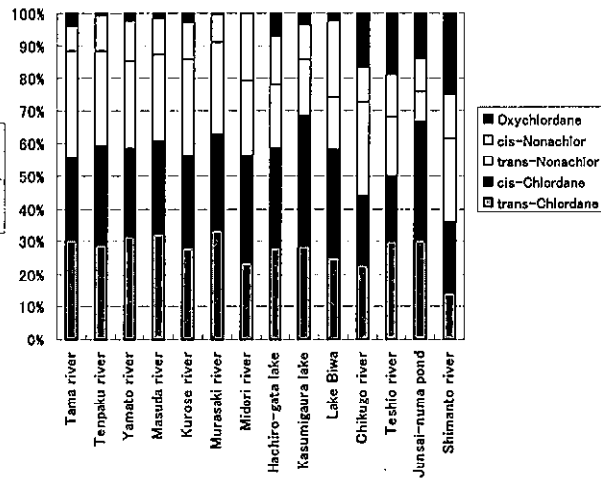


Fig.5 Compositions of chlordanes in bottom sediments

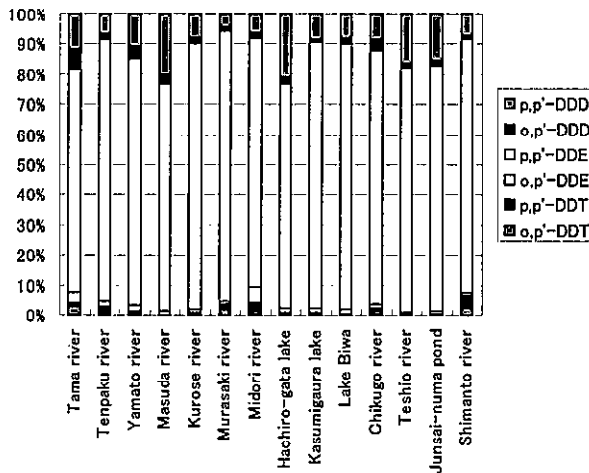


Fig.6 Compositions of DDTs in muscle tissue

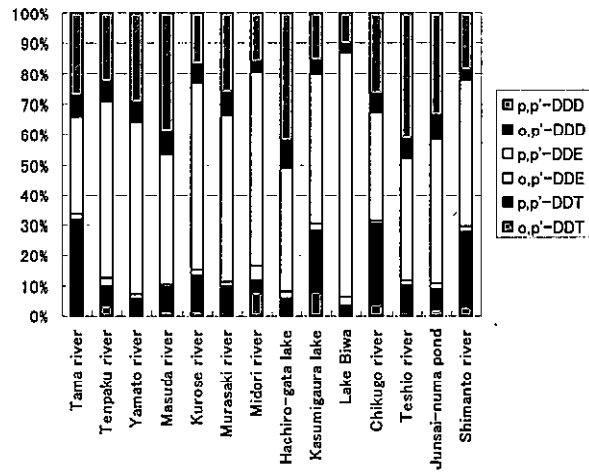


Fig.7 Compositions of DDTs in bottom

Differences between sexes for concentrations of POPs, and transfer to eggs

The concentrations of POPs for male and female *Carassius gibelio langsdorfii* and eggs during the spawning season are shown in Table 2. For almost all target substances, muscle tissue concentrations were higher for the male fish than for the female fish. This tendency was also seen in the dioxins study⁵ and is thought to be due to the fact that POPs are transferred from the female's body to the eggs. Assuming the concentration in muscle tissue is equal to the average body concentration, the transfer ratio from the female body to the eggs during the spawning season was calculated to be 19.2%–34.1%.

Table2 Concentration of POPs in muscle and eggs (spawning season)
(pg/g·wet)

Compound	male	female	eggs	Transfer to eggs (%)
DDTs	6,797	3,213	8,322	19.6~24.4
Chlordanes	7,840	6,170	14,240	19.2~21.8
Drins	534	255	1,045	28.1~34.1
Heptachlors	90	48	154	23.8~26.6
HCB	220	150	500	27.1
Mirex	7	4	11	23.5
HCHs	446	236	612	19.5~29.3
Average weight (g)	213	244	27.2	—
Lipid (%)	1.44	1.13	4.87	—

Bioaccumulation in *Carassius gibelio langsdorfii*

Using the results of fish and bottom sediment measurements, the bioaccumulation (Biota-Sediment Accumulation Factor [BSAF]) was calculated using the following equation.

$$\text{BSAF} = \frac{\text{Concentration per unit of fat in fish}}{\text{Concentration per unit of organic matter in bottom sediment}}$$

The BSAF values for chlordanes, which were detected in all fish and bottom sediment samples, are shown in Figure 8. Differences were observed in BSAF values depending on the location. High BSAF values were observed for oxychlordane in some locations. Oxychlordane is a metabolite of chlordane and it is thought that metabolism in the bodies of organisms is larger factor than accumulation from bottom sediments. In addition, BSAF values for HCB, which was also detected in all samples, are shown in Figure 9. The BSAF value is high for the Tama River, in which the HCB concentration in fish was also high.

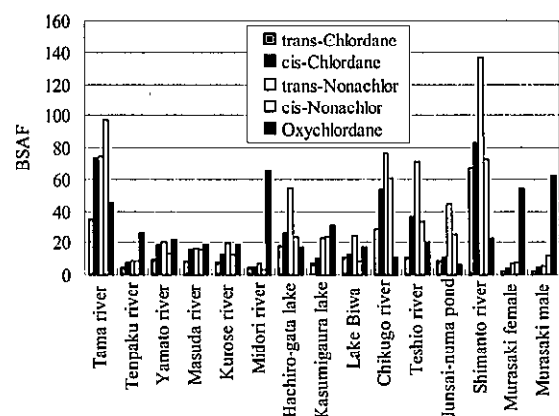


Fig.8 BSAF of chlordanes

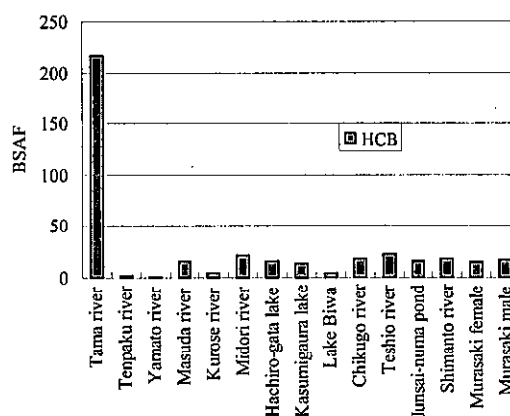


Fig.9 BSAF of HCB

Acknowledgements

This research was carried out as part of the Japanese Ministry of Environment's "Korea-Japan Co-operative Joint Research on Endocrine Disrupting Chemicals." We received advice from universities and local government regarding selection of study sites. We take the opportunity here to extend our sincere thanks.

References

1. Tsuda T. *Journal of Environmental Chemistry* 2000;10:263
2. Tsuda T. *Journal of Environmental Chemistry* 2002;12:1
3. Sapozhnikova Y, Bawardi O, Schlenk D. *Chemosphere* 2004; 55:797
4. Yang Y, Liu M, Xu S, Hou L, Ou D, Liu H, Cheng S, Hofmann T. *Chemosphere* 2006; 62:381
5. Kajiwara Y, Kashiwagi, Kadokami K. *Chemosphere* 2007; submitted.

LC/MS を用いたチウラムの高感度分析法の検討

花田 喜文、梶原 葉子、一田 亜希子

第 10 回水環境学会シンポジウム (熊本市)

平成 19 年 9 月

【はじめに】

テトラメチルチウラムジスルフィド (チウラム) は、シマジンやチオベンカルブとともに水質の環境基準項目に指定されている代表的な環境汚染農薬である。そのため、河川や海域などの公共用水域では頻りにモニタリングが行われ、国内での年間測定頻度は、3,563 件 (2000 年) に達している¹⁾。

しかしながら、チウラムの環境基準は「人の健康の保護」を目的に設定されているため、基準濃度は 6 $\mu\text{g/L}$ と比較的高い。しかも、計測には HPLC-UV が用いられていることから、モニタリングの検出下限値は、0.4 - 3 $\mu\text{g/L}$ と、現状では ppb 濃度レベルの実態把握しかできず、殆どのモニタリング結果は不検出を羅列するに留まっている。

一方、環境省のリスク評価では、チウラムの生態への予測無影響濃度を 0.003 $\mu\text{g/L}$ と評価しており、「検出下限値を見直した上で、環境中濃度の測定を優先的に行う必要がある」物質に分類している²⁾。

演者らは、チウラムの環境モニタリングを人の健康保護のみではなく、生態系への影響についても把握できるようにする目的で、液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) を用いたチウラムの高感度分析法について検討した。ここでは、検討を行う中で、低濃度領域で生じるいくつかの問題点に関する知見を得たので報告する。

【実験】

装置: 分析に使用した液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC/MS) は、シングル型 LC-MS として Alliance 2690 型 HPLC 装置付き ZMD 4000 型質量分析計 (Waters) を、タンデム型 LC-MS として Aquity Ultra performance LC 型 HPLC 装置付き Qutro Premier XE 型質量分析計 (Waters) を用いた。タンデム型による LC/MS 測定条件を Table 1 に示す。なお、シングル型による測定は、タンデム型とほぼ同じ測定条件を用いた。

分析操作: 水質試料 1L にサロゲートとしてチウラム-d₁₂ を添加し、1M塩酸で pH を 3.5 に調整した後、コンディショニング済みの固相カートリッジ Autoprep PS@Liq HQ (昭和電工) に 10~20 mL/min の流速で通水した。通水後、カートリッジを精製水 5 mL で洗浄し、遠心分離で水分を除去した後、アセトニトリル 5 mL で被検成分を溶出した。溶出液を窒素ガスで 0.1 mL に濃縮し、アセトニトリル-水 (1:1) で全量を 0.2 mL とした後、LC/MS で分析した。

Table 1 Operating conditions for LC/MS

LC conditions	
Column	Shodex ODP2 HP-2B (50 mm, 2.0 mm)
Mobile phase	A: Acetonitrile B: 0.1% Formic acid 5% A(1min) → (liner gradient, 10min) → 70% A(9min) → (liner gradient, 5min) → 100% A (5min) → (liner gradient, 5 min) → 5% A(10min)
Flow rate	0.2 ml/min
Injection vol.	10 μl
MS conditions	
Ionization mode	Positive ion-ESI
Desolvation gas	Nitrogen, 1000 L/h
Desolvation temp.	450 $^{\circ}\text{C}$
Capillary voltage	5.0 kV
Cone voltage	10 V
Collision energy	10 eV
Ion source temp.	120 $^{\circ}\text{C}$
Monitor ion	m/z 241 > 88, 241>120 for thiuram m/z 253 > 94 for surrogate (thiuram-d ₁₂)

【結果及び考察】

イオン化法の検討: 10 mg/L のチウラム標準溶液を質量分析計にシリンジポンプで直接導入し、大気圧化学イオン化法 (APCI) 及びエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用いて各々正イオン (pos-) 及び負イオン (nega-) の被検成分を測定した。その結果、pos-ESI による測定で、チウラムの擬分子イオン (m/z 241) がベースピークとなったため、測定には pos-ESI を用いた。

カラムの検討: 一般に pos-ESI での測定は、nega-ESI や nega-APCI での測定に比べてバックグラウンドが高く、分析に支障を生じるきらいがある。分析カラムからのバックグラウンドの影響を評価するため、市販されている 3 種類の分析カラムについて、pos-ESI での m/z 241 イオンのバックグラウンドを測定した。その結果、Shodex ODP2 HP-2B カラムからのバックグラウンドが最も低かったため、測定にはこのカラムを選択した。

タンデム型 LC/MS の効果: 精製水にチウラム 10ng を添加し、所定の分析操作に従ってシングル型及びタンデム型 LC/MS を用いて測定を行った。その結果、シングル型では、水質試料中に存在する妨害物質の影響を受け、分析困難であったが、タンデム型を用いることにより、Fig. 1 に示すような妨害ピークのない良好なクロマトグラムを得ることができた。そのため、測定にはタンデム型 LC/MS を用いることとした。

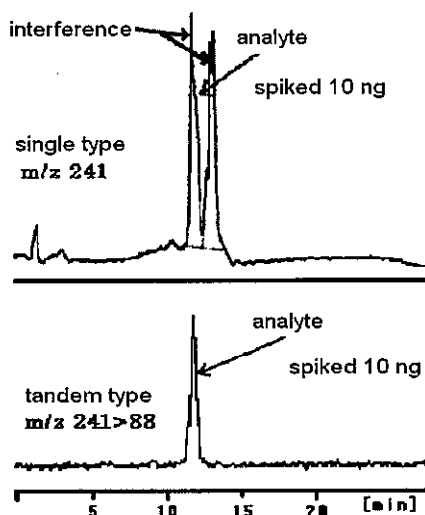


Fig. 1 Effect of tandem-type LC/MS クのない良好なクロマトグラムを得ることができた。そのため、測定にはタンデム型 LC/MS を用いることとした。

検量線及び低濃度域での感度変動: LC/MS の測定条件をチウラムに合わせて最適化した。最適化条件を Table 1 に示す。最適化により、 $0.05 \mu\text{g/L}$ の極微量濃度域までチウラムをピークとして検出することができた。 $0.05 \mu\text{g/L}$ のチウラム標準溶液 (試料換算濃度: $0.00001 \mu\text{g/L}$) のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

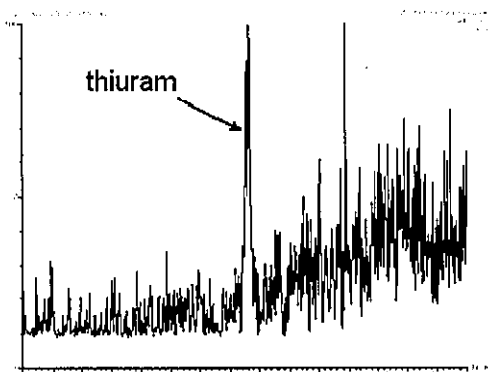


Fig. 2 MRM chromatogram of the ultra trace level of thiuram ($0.05 \mu\text{g/L}$)

しかしながら、この濃度域では、Fig. 3 に示すように感度変動による検量線の落ち込みが確認された。US-EPA は、化学物質分析の理論の中で、検出下限値を推定する方法の一つに検量線の落ち込みなど低濃度域での感度が明瞭に変化する濃度を挙げている²⁾。LC/MS では、装置を最適化することにより、 $0.05 \mu\text{g/L}$ までピークを検出できるものの、定量分析法としては、 $5 \mu\text{g/L}$ (試料換算濃度: $0.001 \mu\text{g/L}$) 付近が分析装置の限界と考えられる。なお、 $5 \mu\text{g/L}$ の標準溶液の繰返し測定から算出した装置検出限界は、 $0.5 \mu\text{g/L}$ (試料換算濃度: $0.0001 \mu\text{g/L}$) であった。

分析法検出下限値: 精製水に $0.010 \mu\text{g/L}$ となるようにチウラムを添加した後、本分析法を用いて繰返し測定を行った。繰返し測定の平均値及び標準偏差は、各々 $0.0106 \mu\text{g/L}$ ($n=5$) 及び $0.00571 \mu\text{g/L}$ (相対標準偏差: 5.4%) と良好な結果を示した。標準偏差から求めた分析法検出下限値は、 $0.0024 \mu\text{g/L}$ に達し、従来の HPLC-UV 法の $0.4 - 3 \mu\text{g/L}$ に比べ 160 - 1200 倍に高感度化することができた。

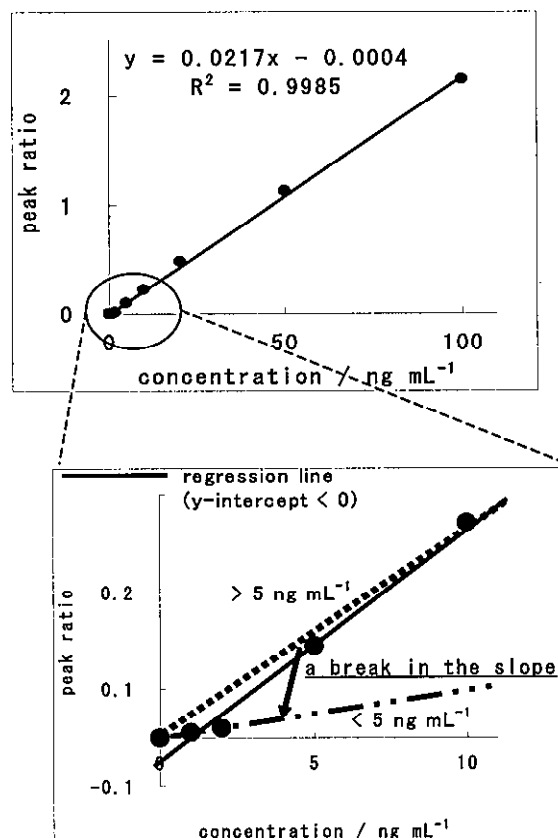


Fig. 3 calibration curve and change in sensitivity at low analyte concentration (i.e. a break in the slope)

【まとめ】

LC/MS によるチウラムの高感度分析法を検討した結果、従来法に比べ 160-1200 倍高感度化することができた。今後は、河川水など実試料への適用を検討する予定である。

謝辞 本研究の一部は、環境省環境安全課からの化学物質環境実態調査委託業務を受けて実施したものである。研究の遂行にあたり、LC/MS 測定に関する有益なご助言を頂いた日本ウォーターズ㈱の米久保淳氏、カラム及び吸着剤の開発にご尽力頂いた昭和電工㈱の篠田昌子女士に深謝いたします。

引用文献)

- 1) 環境省環境リスク評価室. '化学物質の環境リスク評価', 第2巻: [37]チウラム, 2003, pp. 431-436.
- 2) John A. Glaser, et al.: Trace analyses for waste waters, *Environmental Science & Technology* 15(12), 1426-1435 (1981)

絶滅危惧種「ガシャモク」の生育池調査

佐藤尚之、森下正人、原口公子
第42回水環境学会年会（名古屋）
平成20年3月

1 はじめに

ガシャモクはヒルムシロ科の多年生沈水植物で、国内では北九州市内の農業用ため池一ヶ所のみで自然状態で生育している。¹⁾しかし、近年、生育量、生育面積の減少が著しい。その原因調査として、ため池の水質及び底質の測定を行った。

2 調査内容

試料採取場所を図1に示す。このため池は、標高100mの石灰岩台地にあり、「流入」は、台地を伏流する地下水がため池に唯一流れ込む場所である。「湖心」は、ため池のほぼ中心で最深部である。「中島」は、過去にガシャモクが繁茂していた場所である。「ねむの木」は、現在ガシャモクが生育している地点で、湖心に近いため底質のみ測定した。「流出」はオーバーフロー地点である。平成16年からCOD、T-N及びT-Pの測定を開始し、平成18年9月より水温、pH、DO、COD、クロロフィルa及びプランクトンの測定を追加した。底質は平成19年2月、5月及び9月に含水率、強熱減量及び粒度分布を測定した。

3 結果及び考察

平成18年9月～19年9月までの水質測定結果：「流入」の水温は年間を通して一定(14.0～15.2℃)であるが、その他の地点では季節変化(7.3～23.2℃)を示した(図2)。pH、電気伝導率は「流入」を除いた測定点でほぼ同一の推移を示し、地点間の差は殆ど見られなかった(pH:7.9～8.2,電気伝導率:217～317 μ S/cm)。COD、濁度、クロロフィルaは「流入」では検出されていない。その他の地点ではほぼ同様な変動を示した(COD:0.7～2.8mg/l,濁度:0.0～16.4度)(図3)。T-N及びT-Pは変動が大きく(T-N:ND～0.46mg/l T-P:ND～0.023mg/l)、地点間、季節別の傾向は見られなかった。プランクトンは、「流入」では観察されなかったが、その他の地点では秋期に珪藻のシネドラ及びアクナンテスが増殖した。

流入水の水質は良好で変化は見られないが、平成15年～19年までの「湖心」のCODの経年変化は増加傾向²⁾を、透明度は減少傾向を示し(図4)、「中島」のCODも「湖心」と同様に増加傾向を示しており、池全体の水質は徐々に悪化していると考えられる。

底質試験の結果、「湖心」及び「中島」では、含水率(56.9～70.5%)、強熱減量(9.9～21.6%)が高く、粒度分布はシルト・粘土(76.7～99.1%)の割合が高いが、他の3地点では、含水率(13.4～39.2%)、強熱減量(2.7～8.3%)が低く、粒度分布は礫、砂(71.2～99.7%)の割合が高い(図1 粒度分布：平成19年9月採泥)。

ガシャモクは、近年、底質の礫、砂の割合の高い「ねむの木」、「流出」付近で生育が確認されている。³⁾なお、「中島」、「湖心」の周辺では過去に大きなガシャモクの群落があったが、現在は消滅している。

本ため池は、近年、水の使用量が減少し、水抜きは昭和25

年を最後に行われていない。水の入れ替わりが殆どなく、シルト・粘土は湖岸が侵食されて流入、堆積したと考えられる。この堆積シルトが巻き上がりCODの上昇、透明度の低下を引き起こし、ガシャモクの生育を阻んだ要因の一つと推察される。平成18年から底質の改善を図るため、地元の協力を得て、秋～冬に水落しを行っている。

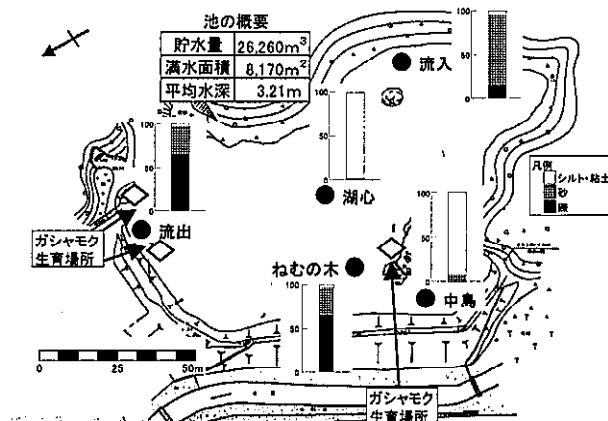


図1 調査地点、底質の粒度分布及びガシャモク生育場所

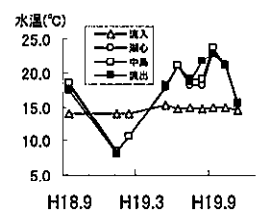


図2 水温の変化

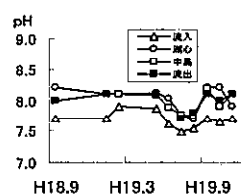


図3 pHの変化

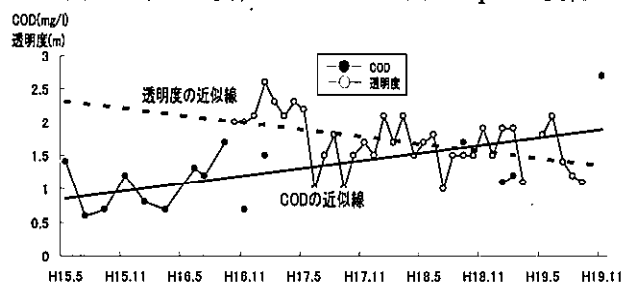


図4 湖心のCOD及び透明度の経年変化

参考文献

- 1) 大野睦子 (1998) 北九州市の植物(12)ガシャモク, わたしたちの自然史 27, 22.
- 2) 北九州市 平成15年度自然環境ふれあい推進事業調査業務委託報告.
- 3) 須田隆一 (2004) 絶滅危惧種ガシャモクの生育状況と生育環境, 第11回アクア研究センター研究発表会要旨集 pp35-38.

LC/MSによる農薬等分析法の基礎的研究 (1)

— *N,N'*-エチレンビスジチオカーバメート系農薬 (ジネブ, マンコゼブ, マンネブ) —

花田喜文

古賀実、白石寛明*、相馬光之***

*熊本県立大学、**国立環境研究所、***静岡県立大学

第33回九州衛生環境技術協議会 (鹿児島市)

平成19年10月

【はじめに】

エチレンビスジチオカーバメート系殺菌剤 (EBDCs) のジネブ、マンコゼブ及びマンネブは、野菜・果樹栽培において広範囲な病害防除効果があり、また安価で薬害が少ないことなどから、我国及び諸外国で広く使用されている。我国における年間の生産及び輸入量は、ジネブが416t、マンコゼブが6,555t、マンネブが1,046tであり、農薬の中でも使用量は多い方である。食品衛生法においては、これらの物質を‘ジチオカルバメート’としてチラムやジネブ等と共に暫定基準が定められている。その基準濃度は、食品の種類によって異なるが、農産物では、豆類の0.06 ppmやはくさいの0.2ppmのようにppm以下の低濃度に設定されているものが多い。また、ポジティブリスト制度ではさらに厳しい一律基準0.01ppmが定められているため、食品監視においては、それら低濃度の基準値に対応する検査を実施しなければならない。

食品検査に用いられるEBDCsの分析法としては、酸分解し生成する二硫化炭素やエチレンジアミンを定量する方法^{1,2)}、あるいは、ヨウ化メチルで誘導体化しHPLC-UVで定量する方法³⁾が、農産物を対象に開発されている。しかしながら、これらの方法を実試料に適用した場合、前者は、大根やはくさいなど一部の作物では試料由来の二硫化炭素あるいはエチレンジアミンとの分別の問題があり、後者は、検出器の選択性及び感度の面で低濃度の検査に支障を生じるきらいがある。

一方、液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) は、熱的に不安定な物質や難揮発性の物質などGCやGC/MSで分析できない農薬に対する高感度な検出法として期待されている。本研究では、前述したHPLC-UV法を参考に、ジネブ、マンコゼブ及びマンネブをイオン対試薬とヨウ化メチルでエチレンビスジチオカルバミン酸ジメチルエステル (EBD-dimethyl) に誘導体化し、LC/MSで検出するための基礎検討を行ったので報告する。

【実験】

試薬及び装置: ジネブ (86.3%)、マンコゼブ (74.5%) 及びマンネブ (70.5%) の標準品は関東化学製を、ヨウ化メチルは特級規格品を使用前に蒸留し精製したものを用いた。アルカリ性EDTA溶液は149gのEDTA・2Na (同仁化学研究所) を1Lの0.4M水酸化ナトリウム溶液に溶かして調製した。液体クロマトグラフ-質量分析装置は、Waters製のAlliance2690型高速液体クロマトグラフ付きZMD4000型質量分析装置を用いた。LC/MSの測定条件を表1に示す。

EBD-dimethyl 標準品の合成: EBD-dimethylの標準品は、Gustafsonら⁴⁾の報告に従い次の操作で合成した。1,2-ジアミノエタン3gを96%エタノール25mLに溶かし、0.05M二硫化炭素/エタノール溶液を攪拌しながら加えた。生成したペレット状の白色沈殿をガラス棒で細かく砕き、攪拌しながらヨウ化メチル7.1gを滴下した。沈殿が少なくなるまで攪拌後、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過した。ろ液に精製水150mLを加え、生成した白色沈殿を吸引ろ過により回収し、一昼夜室温で乾燥させた。これを、クロロホルムで二度再結晶し、白色の粉状結晶を得た。

表1 LC/MS 測定条件

カラム	Inertsil ODA-80A, 内径 1.5 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm
移動相	A: water, B: acetonitrile 100% A → (10分) → 100% B (10分保持)
流速	0.2 mL/分
注入量	2 μL
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (負イオン)
脱溶媒ガス	窒素(100°C), 400 L/hr
電圧	キャピラリー 3.0 kV, コーン 10 V
SIM イオン	m/z 239(定量用), 191(確認用)

分析操作: 試料50gにL-システイン0.5gとアルカリ性EDTA溶液100mLを加えてホモジナイズし、遠心分離後ろ過した。ろ液を2M塩酸でpH7に調整し、0.41M硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液5mLを加えた後、0.1Mヨウ化メチル含有クロロホルム-ヘキサン(3:1)50mL及び40mLで振とう抽出した。抽出液を合わせ、30分間室温で静置し誘導体化を促進させた後、溶媒と過剰のヨウ化メチルをロータリーエバポレーターで留去した。残さを5mLアセトニトリルに溶かし、

LC/MS分析に供した。なお、ここでは、測定条件の最適化、誘導体化率の確認などの基礎検討を目的としているため、実際の食品試料は用いず、試料と同量の蒸留水を用いて実験を行った。

【結果及び考察】

EBD-dimethyl 合成品の確認: 本分析法は、図1に示すようにEBDCsを水溶性ナトリウム塩として水相に移行させた後、イオン対試薬とヨウ化メチルでEBD-dimethylに誘導体化し、LC/MS分析を行う。そのため、定量用の標準溶液や誘導体化率確認の対照物質として、EBD-dimethylの標準品が必要である。前述の合成操作で得られた白色粉状結晶について、融点及び電子衝撃イオン化による質量スペクトルを測定し、文献値⁹⁾と比較した。その結果、融点及び質量スペクトルとも文献値と一致し、合成品がEBD-dimethylであることが確認された。以降の実験では、合成品をアセトニトリルに溶かしたものを定量用の標準溶液として使用した。

イオン化法の検討: 合成したEBD-dimethylを用いて、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)及び大気圧イオン化法、さらに、それぞれの正イオン及び負イオンの測定について検討した。その結果、ESIによる負イオン測定(ESI-nega)が最も高感度に被検成分を検出することができた。

物質毎の回収率: 本法は、ジネブ、マンコゼブ及びマンネブを分別せずにEBDCs総量として定量するため、各物質毎の反応率などに差がないことを確認しておく必要がある。そこで、物質毎に回収率の検討を行った。結果を表2に示す。3種の農薬の回収率に物質毎の顕著な差は見られなかった。

測定条件の最適化及び検出限界: ESI-nega測定におけるLC/MS測定条件について検討した。その結果、表1の条件でEBD-dimethylを最も高感度に検出することができた。また、被検成分濃度0.05~0.5 µg/mLで検量線を作成した結果、相関係数0.9997と良好な直線性を得られた。さらに、検量線の最低濃度0.05 µg/mLを7回繰り返し測定した結果から算出した装置検出限界(3σ)は0.03 µg/mLであった。この濃度を試料中のジネブ濃度に換算すると0.0034 ppmに達し、従来のHPLC-UV法の検出限界0.05 ppmに比べて一桁低い濃度まで検出可能となった。これは、ポジティブリストの一律基準(0.01 ppm)の食品検査にも十分対応できる濃度レベルであった。検量線の最低濃度のSIMクロマトグラムを図2に示す。

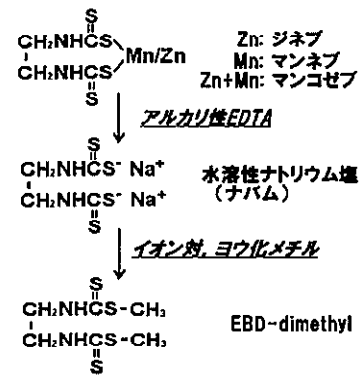


図1 分析における反応の概要

表2 物質毎の回収率

農薬名(純度 %)	添加濃度/ppm	検出濃度/ppm	回収率 %
ジネブ(86.3)	0.69	0.70	102
マンコゼブ(74.5)	0.60	0.50	83.3
マンネブ(70.5)	0.56	0.53	94.6

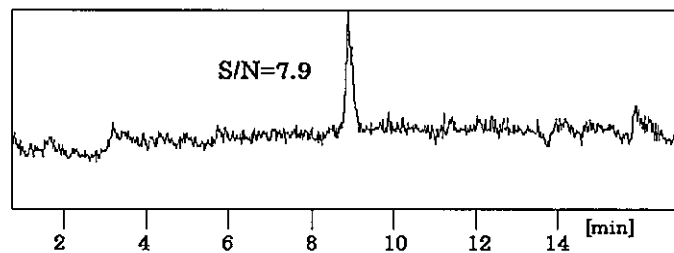


図2 検量線最低濃度(0.05 µg/mL)のクロマトグラム

引用文献

- 1) 日本食品衛生協会. “食品衛生検査指針 残留農薬編”, 厚生労働省監修, 2003, pp. 864-871.
- 2) Newsom, *J. Agric. Food Chem.*, 22, 886-889(1974).
- 3) “衛生試験法・注解”, 日本薬学会編集, 2005, pp. 456-459.
- 4) Gustafsson, K. H. and Fahlgren, C. H., *J. Agric. Food Chem.*, 31, 461-463(1983).
- 5) Marshall, W. D., *J. Agric. Food Chem.*, 26, 111-115(1978).

農薬等のポジティブリスト化に伴う検査の 精度管理に関する研究（第2報）

衛藤修一

○村田 弘、織田 馨、岩上正藏、田中之雄、住本建夫、高取 聡、北川陽子、柿本幸子、岡本 葉、（大阪府立公衆衛生
研究所）酒井 洋（新潟県保健環境科学研究所）、上野英二（愛知県衛生研究所）、田中敏嗣（神戸市環境保健研究所）、
宇野正清（奈良県保健環境研究センター）、宇治田正則（和歌山市衛生研究所）、佐々木珠生⁷（広島市衛生研究所）、

堤 泰造（徳島県保健環境センター）

第44回全国衛生化学技術協議会年会（津市）平成19年11月

A. 目的

ポジティブリスト制度下における検査精度の確認ならびに検査結果の信頼性確保のために昨年度¹⁾に引き続き、地方衛生研究所の9参加機関（新潟県、愛知県、神戸市、奈良県、和歌山市、広島市、徳島県、北九州市、大阪府）の協力を得て、食品中の残留農薬のGC/MS及びLC/MS/MSによる外部精度管理、内部精度管理を実施した。また、検査精度を維持・向上するための主な要因（標準品、分析法、分析装置）も検討して実施した結果を報告する。

B. 方法

1. 実施期間

精度管理用試料等の配布：内部精度管理試料（カボチャ、ニンジン、ホウレンソウ）及び市販の農薬混合液（140種類、関東化学製31・32）、GC/MSシステム評価用農薬標準試料（クライテリアサンプル、林純薬製）を平成18年8月28日に送付した。外部精度管理試料は平成18年10月10日に送付した。

結果報告書の提出：平成18年12月15日までに結果の提出を求めた。

2. 添加農薬

市販の農薬混合液から30種類を添加農薬指定リストとし、その中から4種類の農薬を添加した。

3. 精度管理用試料の調製

精度管理用試料は、業務用の冷凍マイクロペースト状食材（12-16kg、（株）新進）を用いた。外部精度管理用添加農薬は和光純薬製残留農薬試験用を使用し、表1に示した添加農薬の種類及び設定濃度になるように農薬混合アセトン溶液を調製して添加した。この農薬添加試料と農薬無添加の対照試料を冷凍後、参加機関に冷凍宅配便で送付した。送付した試料の均質性は、試料15個から無作為に5個の容器を選び、容器毎に2回採取して測定を行い、調製試料の均質性を確認した。調製試料の安定性は、調製後と-20℃、1ヶ月保存後に各食品につき無作為に5種類測定し、保存前後の添加濃度に変動のないことを確認した。

4. 検査方法

各機関の農薬検査標準作業書(SOP)に従って5回の分析を求めた。内部精度管理では、30項目の農薬についてカボチャ、ニン

ジン、ホウレンソウの3食品に0.1ppmになるように添加し、GC/MSによる測定により回収率を求めた。

GC/MSシステム状態が良好であること（一定レベルであること）の客観的かつ簡便な評価を目的としたクライテリアサンプルの中からクロルピリホスメチル、カプタホル、イソキサチオン、ペンタクロロフェノール、2,4-ジニトロアニリン、シマジン、フェニトロチオンの7項目の試料測定前と測定後のピーク形状（クロマトグラム）とピーク強度（定量値）の提出を求めた。

5. 評価方法

外部精度管理は、各機関から報告された定量値について、各々の検査項目毎に有意水準5%で異常値の棄却検定を行った後、基本統計量、ヒストグラム、正規確率プロット、 \bar{x} -R管理図、 \bar{z} -スコアを求めた。さらに精度を相対標準偏差(RSD)で評価した。内部精度管理は、平均回収率、相対標準偏差($RSD_p \cdot RSD_R$)、HorRat値により評価した。

C. 結果及び考察

添加農薬の均質性、安定性を統計的に確認したカボチャ、ニンジン、ホウレンソウに延べ12種類の外部精度管理調査を行った結果は、全機関が添加農薬の種類をすべて正しく検出した。GC/MSによる各農薬の全機関平均濃度は添加濃度の82%~105%、LC/MS/MSでは84%~110%と良好な結果が得られた。

\bar{x} -R管理図及び \bar{z} -スコアによる評価で、一部の項目で適正域に入っていない機関も認められたが、総合成績では前年度と比較してかなり良好な結果が得られた。すべての評価で「良好」が4機関あった。4機関の中で2機関は、2年連続「良好」な成績であった。GC/MSとLC/MS/MSによる測定値の比較では、LC/MS/MSの測定値がGC/MSの測定値と同程度あるいはそれ以上の精度の高い結果が得られた。相対標準偏差(20%以下が目安)で外部精度管理を評価すると、添加濃度の違いによる変動は概して認められず、カボチャ、ニンジンは全機関10%以下、ホウレンソウは全機関15%以下であった。Horwitzの各濃度と比較して良好な結果を示した。

標準品は、市販の農薬混合液(140成分)の同一ロットを使用した。このことが標準品による各機関の検査精度のばらつきによ

るファクターを少なくし、検査精度に大きく寄与したものと推察された。

分析法 (SOP) は、厚生労働省一斉分析法に準じた方法が5機関、独自法 (愛知県法、兵庫県法、SFE法、QuEChERS改良法) が各1機関で実施された。各機関のSOPで得られた添加回収率、HorRat値 (AOACのガイドラインでは、 $0.5 \leq \text{HorRat} \leq 2.0$ を許容範囲) による評価では、回収率が70%~120%、HorRat値が2を下回っていることから、各機関のSOPの精度が許容できる範囲であることを確認した。

検討した30農薬の添加回収率の結果は、厚生労働省による一斉分析法における添加回収のA評価 (平均回収率の中央値が70%~120%) と一致した。

濃度既知の内部精度評価と濃度未知の外部精度評価の関係は、どちらも概ね70%~120%の範囲内で示されており、内部精度評価で得られた結果と外部精度評価の結果は、ほぼ一致した。

GC/MS装置性能評価は、精度管理試料の注入後も注入口あるいは分離カラム部位における評価用農薬が、全機関とも概ね問題なく検出され、定量値・ピーク形状も良かったことから良好な状態

のGC/MSによる測定が行われていたと推察された。

D. まとめ

今回の精度管理 (外部精度管理及び内部精度管理) の結果は良好であり、「正確な (一定の) 標準品」を用いて、「適正な分析法」で実施して、「良好な状態の分析装置」で測定することによって信頼性のある結果が得られることが示唆された。

E. 謝辞

本研究は平成18年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安心・安全確保推進研究事業) により実施した。本研究にご協力いただきました各参加機関の諸氏に深謝いたします。

文献

- 1) 住本建夫ら：第43回全化協講演集, 89-90 (2006)

表1 外部精度管理調査結果 (GC/MS)

調製試料名	添加農薬名	設定添加量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	調製時 (平均値 \pm 標準偏差)	全参加機関 (平均値 \pm 標準偏差)	Xbar管理図 「良好」判定数	R管理図 「良好」判定数	z-スコア 「良好」判定数
カボチャ	アトラジン	50	46.49 \pm 2.97	47.50 \pm 5.20	9	9	8
	チオベンカルブ	50	46.08 \pm 2.85	52.36 \pm 5.61	9	9	9
	プロプロフェジン	300	274.61 \pm 13.86	257.40 \pm 3.97	9	9	9
	メタラキシル	100	92.01 \pm 5.19	94.28 \pm 10.92	9	9	8
ニンジン	エチオン	200	192.21 \pm 6.19	164.90 \pm 20.60	9	8	9
	プロピサミド	100	95.67 \pm 3.03	85.85 \pm 8.74	9	8	8
	マラチオン	200	193.96 \pm 4.93	165.60 \pm 20.00	9	9	9
	メタラキシル	100	93.69 \pm 1.41	91.07 \pm 11.15	9	9	9
ハウレンソウ	クロルピリホス	10	9.56 \pm 0.46	10.28 \pm 1.25	8	8	8
	テルブホス	10	9.45 \pm 0.58	10.45 \pm 1.76	7	9	9
	フルシトリネート	200	197.76 \pm 7.79	167.90 \pm 26.10	8	9	9
	メタラキシル	100	95.28 \pm 6.36	90.12 \pm 8.93	9	8	9

ポジティブリスト制度導入に伴う検査体制の充実 — LC/MSを用いた食品中残留農薬の分析法開発 —

花田喜文、小島勉、布川徹、苗床江理

平成19年度保健福祉研究発表会

(北九州市) 平成20年2月

【はじめに】

近年、中国輸入食品問題等により、食の安全・安心が強く求められ、その一つに残留農薬の問題がある。国は、食品中残留農薬の規制を強化するため、改正食品衛生法により平成18年からポジティブリスト制度を導入した。ポジティブリスト制度により、残留農薬については、生産過程での農薬使用の有無に係わらず、海産物など全ての食品が規制対象になると共に、新たに800種類以上の農薬成分について基準値が設定された。さらに、最近の科学技術の発展は新規農薬を次々と開発・実用化するため、食品監視の現場では、膨大な種類の農薬成分について、その残留状況を監視しなければならない。

一方、規制対象となる食品の種類と農薬成分の多様化に対し、食品検査に用いる分析法は、現在までのところ十分に整備されていない。そのため、残留農薬の分析法を開発し、検査体制の整備・充実を図ることは非常に重要である。

環境科学研究所では、新しい農薬分析装置として注目されている液体クロマトグラフー質量分析計(LC-MS)を導入し、食品中残留農薬の検査体制の整備・充実を図っている。

今回、野菜・果樹栽培において広範囲な病害防除効果があり、また安価で薬害が少ないことなどから、我国及び諸外国で広く使用されているマンネブ等のエチレンビスジチオカーバメート系殺菌剤(EBDCs)のLC/MS分析法を開発し、良好な結果を得たので報告する。

【既存分析法の問題点】

食品検査に用いられるEBDCsの分析法としては、EBDCsを酸分解し生成する二硫化炭素やエチレンジアミンを定量する方法^{1,2)}、あるいは、ヨウ化メチルで誘導体化しHPLC-UVで定量する方法³⁾が、農産物を対象に開発されている。しかしながら、これらの方法を実試料に適用した場合、前者は、大根やはくさいなど一部の作物では試料由来の二硫化炭素あるいはエチレンジアミンとの分別の問題があり、後者は、検出器の選択性及び感度の面で一律基準(0.01ppm)など低濃度の検査に支障を生じる嫌いがある。

【実験】

試薬及び装置：EBDCsの標準品(ジネブ、マンコゼブ及びマンネブ)は関東化学製を、ヨウ化メチルは特級試薬を使用前に蒸留し精製したものを用いた。LC-MSは、Waters製のAlliance2690型高速液体クロマトグラフ付きZMD4000型質量分析計を用いた。

EBDCs誘導体化物標準品の合成：EBDCsの誘導体化物(EBD-dimethyl)は、Gustafsonら⁴⁾の報告に従い次の操作で標準品を合成した。1,2-ジアミノエタン3gを96%エタノール25mLに溶かし、0.05M二硫化炭素/エタノール溶液を攪拌しながら加えた。生成したペレット状の白色沈殿をガラス棒で細かく砕き、攪拌しながらヨウ化メチル7.1gを滴下した。沈殿が少なくなるまで攪拌した後、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過した。ろ液に精製水150mLを加え、生成した白色沈殿を吸引ろ過により回収し、一昼夜室温で乾燥させた。これをクロロホルムで二度再結晶し、白色の粉状結晶を得た。

分析操作：試料50gにL-システイン0.5gとアルカリ性EDTA溶液100mLを加えてホモジナイズし、遠心分離後ろ過した。ろ液を2M塩酸でpH7に調整し、0.41M硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液5mLを加えた後、0.1Mヨウ化メチル含有クロロホルム-ヘキサン(3:1)50mL及び40mLで振とう抽出した。抽出液を合わせ、30分間室温で静置し誘導体化を促進させた後、溶媒と過剰のヨウ化メチルをロータリーエバポレーターで留去した。残さを5mLアセトニトリルに溶かし、LC/MS分析に供した。

【結果と考察】

合成した標準品の確認: 本分析法は、図1に示すようにEBDCsを水溶性ナトリウム塩として水相に移行させた後、イオン対試薬とヨウ化メチルでEBD-dimethylに誘導体化し、LC-MS分析する方法である。そのため、検査用標準品として、EBD-dimethylの標準品が必要である。前述の合成操作で得られた白色粉状結晶について、融点及び電子衝撃イオン化による質量スペクトルを測定し、文献値⁵⁾と比較した。その結果、融点及び質量スペクトとも文献値と一致し、合成品がEBD-dimethylであることが確認された。以降の実験では、合成品を溶媒に溶かしたものを検査用標準溶液とした。

LC-MSイオン化法の検討: 合成したEBD-dimethylを用いて、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)及び大気圧イオン化法、さらに、それぞれの正イオン及び負イオン測定について検討した。その結果、ESIによる負イオン測定が最も高感度に被検成分を検出することができた。

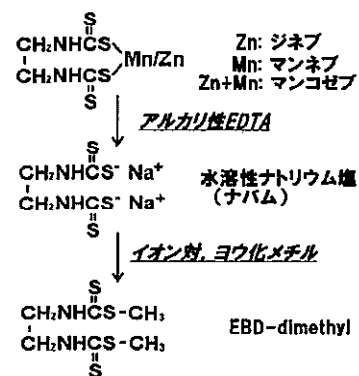


図1 分析における反応の概要

農薬成分毎の回収率: 本法は、ジネブ、マンコゼブ及びマンネブを分別せずにEBDCs総量として定量するため、検査前に各成分毎の収率に差がないことを確認しておく必要がある。そこで、成分毎に回収率の検討を行った。結果を表1に示す。本分析法による3種の農薬成分の収率に顕著な差は見られなかった。

表1 農薬成分毎の回収率

成分名 (純度, %)	添加濃度 / ppm	検出濃度 / ppm	回収率, %
ジネブ (86.3)	0.69	0.70	102
マンコゼブ (74.5)	0.60	0.50	83.3
マンネブ (70.5)	0.56	0.53	94.6

測定条件の最適化及び分析感度: LC-MSでは、測定条件によって被検成分の感度が大きく異なる。

そこで、合成したEBD-dimethylを用いてLC-MS測定条件の最適化を行った。その結果、分析感度を示す検出限界は、0.0034 ppmに達し、従来のHPLC-UV法の0.05 ppmに比べて十倍以上も高感度化することができた。また、この分析感度は、ポジティブリスト制度で定められた一律基準の0.01 ppmを評価する際にも十分対応できる濃度であった。

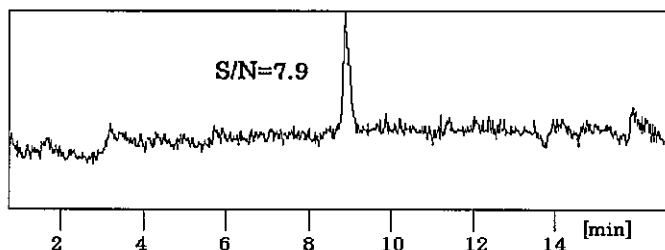


図2 実試料(大根)のクロマトグラム(0.0034 ppm)

精度管理: 近年、食品検査では精度管理が重要になっている。検査における精度管理の評価項目は、前述の分析感度に加え、直線性や真度・精度(再現性)等が国の通知したガイドラインに示されている。これに準じて開発した分析法の精度管理を

実施した結果、相関係数0.9997と良好な直線性を示し、真度・精度を評価する添加回収試験の結果もガイドラインの許容基準を満足していた。さらに、冒頭で述べた大根など実試料での選択性や感度の面においても、

図2に示すとおり、妨害物質の影響を受けない良好な被検成分のクロマトグラムを得ることができた。

【まとめ】

環境科学研究所の検査体制を整備・充実させる目的で、LC-MSを用いて食品中の残留農薬の分析法を開発した。その結果、従来法の10倍以上の高感度化に成功し、ポジティブリスト制度で定められた一律基準(0.01 ppm)にも対応できるようになった。また、開発した分析法の精度管理を実施した結果、国の示す許容基準を十分満足する結果であった。

なお、本報告は、地方衛研の集会である第33回九州衛生環境技術協議会で既に報告したものである。

- 引用文献: 1) 日本食品衛生協会. “食品衛生検査指針 残留農薬編”, 厚生労働省監修, 2003, pp. 864-871.
 2) Newsom, J. *Agric. Food Chem.*, 22, 886-889(1974).
 3) “衛生試験法・注解”, 日本薬学会編集, 2005, pp. 456-459.
 4) Gustafsson, K. H. and Fahlgren, C. H., *J. Agric. Food Chem.*, 31, 461-463(1983).
 5) Marshall, W. D., *J. Agric. Food Chem.*, 26, 11-115(1978).

迅速・正確な食中毒原因菌確定を目指した検査方法の改善 —カンピロバクター属菌の検査—

徳崎里美（現保健福祉局東部生活衛生課）、清水寧、下原悦子

第54回福岡県公衆衛生学会、(福岡市)平成19年5月

(平成18年度保健福祉研究発表会、平成19年2月でも発表)

1. はじめに

細菌検査室では、食中毒事件の際に保健所の依頼で原因菌の検査を行っている。迅速かつ正確な原因菌の検査は、飲食店などに対する行政処分や衛生指導に欠かせないだけでなく、食中毒の再発防止ひいては健康危機管理という観点からも重要である。我々はこのことを念頭において、日々検査方法の改善に努めている。ここでは、PCRを用いた遺伝子検査法を導入することによって、菌の確定までの日数を大幅に短縮することができたカンピロバクター属菌の検査について報告する。

2. 従来法の問題点

近年、カンピロバクターによる食中毒事例は全国的に増加しており、当市でも平成17年度に3件、平成18年度は12月末現在で2件の事例が発生している。カンピロバクターには17菌種あるが、このうち食中毒原因菌として指定されているのは *C. jejuni* (カンピロバクター・ジェジュニ) と *C. coli* (カンピロバクター・コリ) である。特に *C. jejuni* は鶏肉を広く汚染していることが知られており、鶏肉の生食や加熱不足によって食中毒を引き起こすことが多い。

図1に当市で実施している検査方法を示す。平成17年度まで実施していた方法では培養に3日、生化学的性状試験による菌種同定に更に3日以上を要し、検査開始後1週間経過後、やっと保健所に結果を報告するという状況であった。

検査方法にも問題があった。分離培養後、グラム染色等で培地上のコロニーがカンピロバクターと推定できれば、純粋培養後にまず馬尿酸加水分解試験を実施していた。本試験陽性の場合には *C. jejuni* と同定するが、菌の量や鮮度によって偽陰性となる場合があること、馬尿酸加水分解能が弱い *C. jejuni* 株があることが報告されており、再検査や他の詳細な同定検査が必要であった。このように、生化学的性状試験による同定には限界があるため、遺伝子検査法の導入が望まれた。

3. 検査方法の改善

菌種の同定に当たっては、食中毒菌に指定されており、実際に原因菌として報告される割合の多い *C. jejuni* と *C. coli* の遺伝子の特異的に検出する方法を用いることにした。カンピロバクターを種レベルで同定するためのPCRに用いるプライマーは様々なものが報告されているが、両菌種に対する特異性が保証され、かつ一度のPCRで *C. jejuni* と *C. coli* を識別できる方法を目指した。いくつかのプライマーを試用した結果、表1に示すプライマーを選択した。

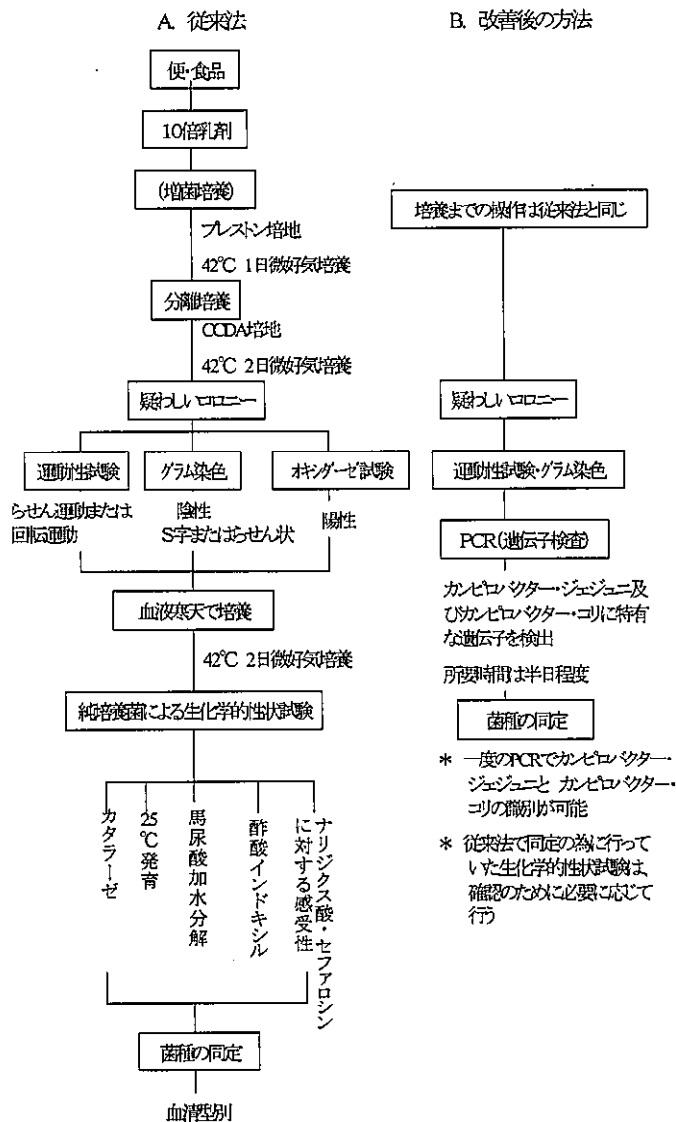


図1 カンピロバクターの検査方法

C. jejuni のプライマーは、馬尿酸加水分解酵素をコードする遺伝子を増幅・検出するように設計されている。

表1 プライマーの塩基配列と増幅サイズ

菌種	Primer		塩基配列	標的遺伝子	増幅サイズ (bp)
<i>C. jejuni</i>	HIP400F	Forward	GAAGAGGGTTTGGGTGGTG	馬尿酸加水分解酵素	735
	HIP1134R	Reverse	AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG		
<i>C. coli</i>	CC18F	Forward	GGTATGATTCTACAAAGCGAG	CCCH	500
	CC519R	Reverse	ATAAAAGACTATCGTCGCGTG		

(Linton et al. 1997)

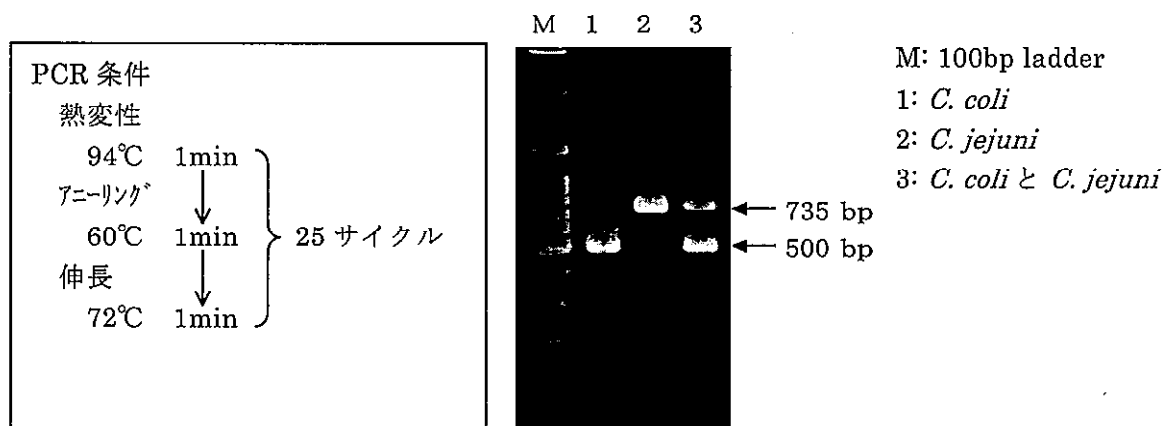


図2 PCR 条件及び結果

文献では、*C. jejuni* と *C. coli* の PCR 条件はアニーリング温度が 66°C と 60°C で異なっていたが、検討の結果、60°C に設定することにより、両菌種を一度の PCR で問題なく同時に検出・識別することができた。PCR の条件と電気泳動の結果を図 2 に示す。

なお、菌体からの DNA 抽出法は、NaOH 溶液によるアルカリ分解後に熱処理を行い、その後 Tris-HCl 緩衝液で中和するアルカリ抽出法を用いた。本法では通常の熱処理よりも菌体の破壊が良好で、感度の良い PCR を行うことができた。

4. 考察

従来の検査方法では、検体搬入後検査結果が出るまで 1 週間近くかかっていたが、検査方法の改善後は、平成 18 年 9 月及び 11 月の食中毒事件の際に 3 日で結果を出すことができた。また、従来 *C. jejuni* 同定の指標として用いていた馬尿酸加水分解試験は結果が不明瞭な場合があったが、PCR による同定に変更することで、確実な同定が可能となった。

更に、従来法では同定が困難であった *C. coli* についても、PCR で *C. jejuni* と同時に検出できるようになった。実際に平成 18 年の食中毒事件でも、同一の食中毒で大部分の患者の便から *C. jejuni* が検出されたが、数名から *C. coli* が検出された事例、一人の患者から *C. jejuni* と *C. coli* の両方が検出された事例があり、興味深い結果を得ることができた。全体として、今回の検査方法の改善は大きな成果をあげている。

なお、今回、同定の方法を従来の生化学的性状から PCR 法に変更したが、近年、カンピロバクターは他の菌と同様に生化学的性状や薬剤耐性の変化が報告されているため、同定後、分離された菌株については、必ず基本的な性状や薬剤耐性の確認試験を行っている。

迅速・正確な食中毒原因菌確定を目指して—カンピロバクター属菌の検査方法改善

徳崎里美（現保健福祉局東部生活衛生課）、清水寧、下原悦子
第 66 回日本公衆衛生学会総会、（松山市）平成 19 年 10 月

【目的】近年、カンピロバクターによる食中毒事例が全国的に増加している。当市で従来実施していた検査方法は、生化学的性状試験によって菌種を同定する方法であった。この方法によると、検査の所要日数が 1 週間近くかかっていた。また、生化学性状試験の 1 つである馬尿酸加水分解試験が陽性であれば *C.jejuni* と同定するが、*C.jejuni* でも菌の量や鮮度によって偽陰性になる場合があること、馬尿酸加水分解能が弱い *C.jejuni* 株があることが報告されており、陰性の場合は再検査や他の詳細な同定検査が必要であった。このように生化学的性状試験による同定には限界があるため、今回、菌種に特異的な遺伝子を検出する方法（PCR 法）を検討した。

【方法】菌種の同定に当たっては、対象を食中毒菌に指定され、実際に原因菌として報告されることの多い *C.jejuni* と *C.coli* の 2 菌種に絞り、一度の PCR でこれらを同時に検出できる方法を目指した。文献を参考にいくつかのプライマーを作成し、標準株・分離株を用いて実際に PCR を行った。PCR の結果から、最適なプライマーと PCR 条件を決定した。

【結果および考察】条件を満たすものとして、Linton ら（1997）のプライマーを選択した。増幅サイズは *C.jejuni* が 735bp、*C.coli* が 500bp である。PCR 条件は、熱変性 94℃1 分、アニーリング 60℃1 分、伸長 72℃1 分、25 サイクルに設定した。文献では、アニーリング温度は *C.jejuni* が 66℃、*C.coli* が 60℃と異なり、別々に PCR を行っていたが、今回 60℃に設定することにより、一度の PCR で 2 菌種を同時に検出することができた。現在は分離培地上のコロニーについて運動性・グラム染色等基本的性状を確認した後、直接 PCR による菌種同定を行っており、検査の所要時間は従来の 1 週間から 3 日～4 日へ、大幅に短縮された。また、生化学的性状試験では判定が難しい場合があったが、PCR 法に変更することにより正確な同定が可能となった。更に、生化学的性状試験では同定が困難であった *C.coli* についても *C.jejuni* と同時に検出できるようになった。今回の検査方法改善は、実際の食中毒検査で、大きな効果をあげている。