

6 研究発表抄録

ユニークイオンに着目した下水処理水中マクロライド系抗菌薬及びその類縁体の検索とゼオライトによる除去

Search for macrolide antibacterial agents and their analogues in sewage treatment water focusing on unique ions and their removal by zeolite

○伊藤朋子¹, 菊池一馬², 岩渕勝己², 石川奈緒³, 伊藤歩³

(¹ 岩手県環境研セ, ² 岩手県環境生活部, ³ 岩手大理工)

○ITO Tomoko (Res. Inst. Env. Sci. Pub. Health Iwate Pref.), KIKUCHI Kazuma, IWABUCHI Katsumi (Department of Environ. and Residential Life, Iwate Pref. Gov.), ISHIKAWA Nao, ITO Ayumi (Iwate University)

¹e-mail : tm-itou@pref.iwate.jp

【はじめに】

マクロライド系抗菌薬（以後、マクロライドという。）は比較的処方量が多く、河川水においても数種の未変化体や活性代謝物が検出されている¹⁾。マクロライドの基本構造は大員環ラクトンにデオキシ糖が結合したもので、MS/MS スペクトルには糖由来の特徴的なピーク（ユニークイオン）が観察される。本検討では、このユニークイオンに着目し、下水処理水中のマクロライド及びその類縁体の検索を行うとともに、抗菌薬の環境負荷低減を目的として、ゼオライトによる除去試験を行った。

【方法】

(1) 供試試料

県内に所在する A 浄化センターの下水処理水（消毒前のもの）を採取し、試料とした。

(2) LC-QTOFMS による分析

前処理を含む測定条件は、門上らの AIQS-LC の方法²⁾に準拠し、水質試料をタンデム固相（Waters HLB・AC-2）で抽出後、LC-QTOFMS(SCIEX X500R SWATH ESI-Positive)で測定した。取得データ中のマクロライド及びその類縁体は、AIQS-LC、SCIEX OS 及び MS-DIAL により検索した。

(3) ゼオライトによる除去試験

(1)の水質試料 100 mL あたり 1 g のモルデナイト型ゼオライトを添加し、一時間振とう接触後のろ液を(2)の方法で測定し、マクロライド及びその類縁体の除去率を確認した。

【結果と考察】

(1) 下水処理水中のマクロライド及びその類縁体の検索

AIQS-LC によるマクロライドのターゲットスクリーニング結果と、岩手県における処方量（厚生労働省 第 5 回 NDB オープンデータより算出）を表 1 に示す。AIQS-LC には Clarithromycin(CAM), Azithromycin(AZM), Roxithromycin(RXM) 及び Erythromycin(EM)が登録されており、処方量の多い CAM が最も高濃度に検出された。

表 1 下水処理水中のマクロライド

| Compound | 下水処理水 (ng/L) | 岩手県処方量 (kg/year) |
|----------|-----------------|---------------------|
| CAM | 420 | 385 |
| AZM | 180 | 78 |
| RXM | 42 | 36 |
| EM | 38 | 112 |

マクロライドは、経口投与後の代謝経路でジメチルアミノ糖の脱メチル化、クラジノースの脱離、また、CAM ではラクトン環 14 位の水酸化が起こることなどが知られている（図 1）³⁾。マクロライド未変化体の MS/MS スペクトルには、Precursor ion からクラジノースが Neutral loss として脱離したイオン、ジメチルアミノ糖及びジメチルアミノ糖から C₂H₂O が脱離したイオンが特徴的に観察される（図 2）。代謝物や類縁体においても、同様のフラグメンテーションが起こることが予想され、これらのユニークイオンをマーカーとして、mass tolerance 0.02 Da でマクロライド及びその類縁体と思われるピークを検索した。結果を図 3 に示す。

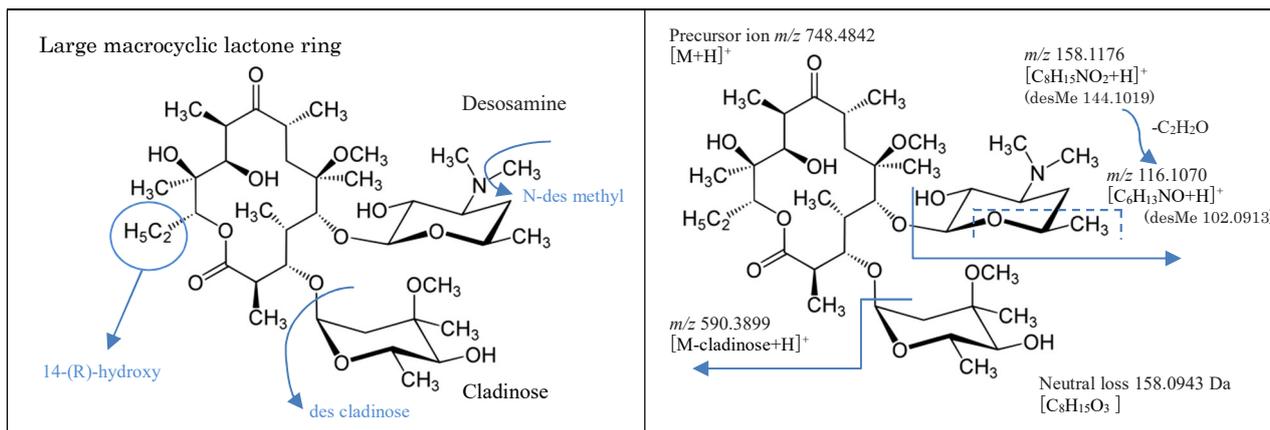


図1 Clarithromycin の代謝経路

図2 Clarithromycin のフラグメント

MS-DIAL によるピークピッキング結果をユニークイオンでフィルタリングしたところ、各々数個のピークスポットが抽出された。AIQS-LC の結果と合わせ、4, 7, 8 は AZM,CAM,RXM であると同定した。その他については、CAM の MS/MS スペクトルと 40%以上の類似度を持つものについて、ライブラリー一致率やユニークイオンの種類などから考察し、5つのマクロライド類縁体を推定した(表2)。

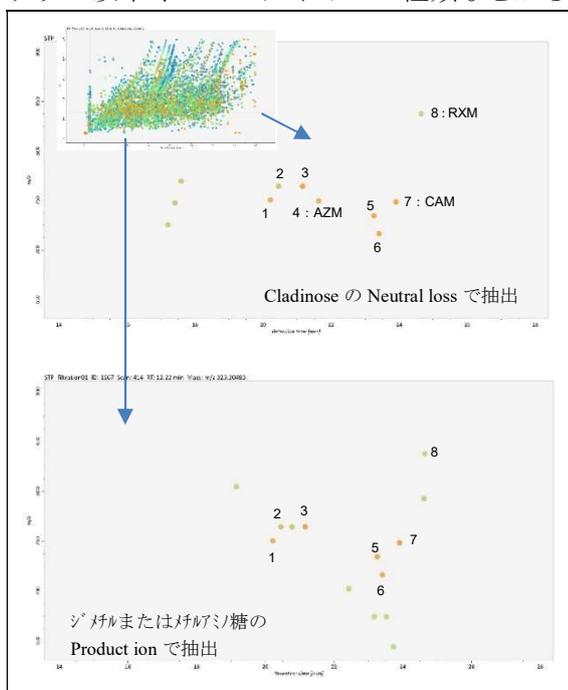


図3 ユニークイオンによるピークの抽出
(縦軸: m/z 、横軸: RT(min))

表2 抽出ピークの精密質量と推定物質名

| No. | Precursor ion (accurate mass) | 推定組成式 | Product ion (accurate mass) |
|----------|-------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 7 | 748.4851 (1.3 ppm)* | C38H70NO13+ | 590.3907(1.4ppm) |
| | RT 23.90 min | | 158.1167(-5.4ppm) |
| | | Clarithromycin | 116.1074(3.5ppm) |
| 1 | 750.4669 (4.6 ppm) | C37H68NO14+ | 592.3695(0.6ppm) |
| | RT 20.20 min | | 144.1020(0.7ppm) |
| | | N-Desmethyl 14-Hydroxyclearithromycin | 102.0910(-3.3ppm) |
| 3 (2) | 764.4797(0.8 ppm) | C38H70NO14+ | 606.3855(1.2ppm) |
| | RT 21.16 (20.45) min | | 158.1170(-3.5ppm) |
| | | 14(or16)-Hydroxyclearithromycin | 116.1070(0.1ppm) |
| 5 | 734.4657(-3.8ppm) | C37H68NO13+ | 576.3755(2.2ppm) |
| | RT 23.24 min | | 144.1007(-8.3ppm) |
| | | N-Desmethyl Clarithromycin | 102.0910(-3.3ppm) |
| - | 734.4681(-0.5ppm) | C37H68NO13+ | 589.3483 (-0.5ppm) |
| | RT 21.98 min | | 158.1177 (0.9ppm) |
| | | Erythromycin** | 116.1078 (6.9ppm) |
| 6 | 716.4615(5.0ppm) | C38H70NO14+ | 558.3629(-1.3ppm) |
| | RT 23.39 min | | 540.3602 (13ppm) |
| | | Erythromycin A enol ether*** | 522.3446(3.9ppm) 158.1177(0.9ppm) |

*カッコ内は推定組成式に対する検出イオンの mass error

**AIQS-LC ターゲットスクリーニング結果

*** m/z 540,522 は m/z 558 から H_2O が 1 または 2 個脱離

(2) ゼオライトによる除去試験

ゼオライト処理後の下水処理水のピークスポット 1~8 及び EM の面積値を処理前のものと比較したところ、処理後の水質ではピークがほぼ消失していた。ゼオライトはアルミノシリケートが網目状に連なった構造を持ち、Al 近傍がマイナスチャージを帯びる。マクロライド及びその類縁体は、アミノ糖の窒素がプロトン化されやすく、電気的に吸着しているものと推察された。

【謝辞】 本研究の一部は公益財団法人日立財団 倉田奨励金 (1442) で実施したものです。

【参考文献】

- 1) 西野ら:環境研究総合推進費終了研究成果報告書,5-1954,令和4年5月
- 2) Kadokami, K., Ueno, D.: Anal. Chem. 2019, 91(12), 7749-7755.
- 3) Suzuki, A. et al.: Drug Metab Pharmacokin. 2003, 18(2), 104-113.

化学物質分析法開発に関する基礎的研究 (8)

Fundamental studies on the development of chemical analysis (8)

○深渡 柚¹, ○長谷川瞳², ○平生進吾², 小野純子³, 吉野共広⁴, 飛石和夫⁵

(1 岩手県環境研セ, 2 名古屋市環科セ, 3 大阪府環農水研, 4 神戸市健科研, 5 福岡県保環研)

FUKAWATARI Yu (Res. Inst. Env. Sci. Pub. Health Iwate Pref.), HASEGAWA Hitomi, HIRAO Shingo (Nagoya City Env. Sci. Res. Inst.)

e-mail: yu-fukawatari@pref.iwate.jp, hitomi@ncies.net, hirao@ncies.net

【はじめに】

確立した測定法が無い環境中化学物質について、LC/MS 及び GC/MS 等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における検討等で得られた主な知見を取りまとめたものである。

【方法】

水質試料中の(1)ミコナゾール及びフルコナゾール、(2)N-フェニルマレイミド、(3)ジアクリル酸ヘキサメチレンの分析法を検討した。

【結果と考察】

(1)水質試料中のミコナゾール及びフルコナゾールの分析 (岩手県環境保健研究センター)

[概要]抗真菌薬であるミコナゾール及びフルコナゾールの水質試料中における同時分析法を検討した。

[方法]水質試料にメタノールを添加し、HCl で pH3 に調整した後、サロゲート内標準物質を添加する。調整した水質試料を固相カートリッジ (Waters 製 Oasis HLB Plus 225 mg) に通水後、ブランク水で洗浄する。HLB の後段にイオン交換固相 (Waters 製 oasis MCX Plus 225 mg) を取り付け、ギ酸メタノール溶液を通液し、対象物質を HLB から MCX に吸着させる。HLB を取り除き、対象物質を MCX からアンモニアメタノール溶液で溶出したものを試験液とし、LC-MS/MS(ESI-Positive)で定量する。

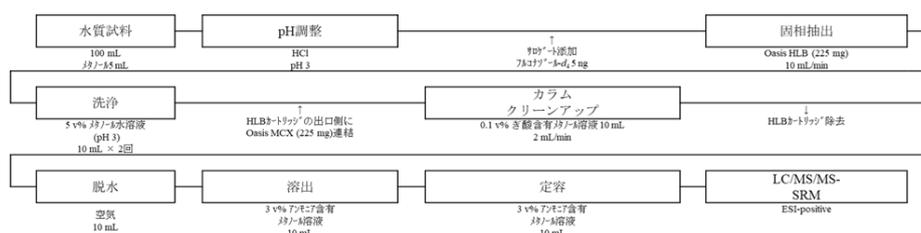


Fig. 1 分析法のフローチャート

[結果]本法の MDL 及び MQL はそれぞれ、ミコナゾールが 0.00046 $\mu\text{g/L}$ 及び 0.0012 $\mu\text{g/L}$ 、フルコナゾールが 0.00090 $\mu\text{g/L}$ 及び 0.0023 $\mu\text{g/L}$ であった。河川水を用いた添加回収試験 (添加量: ミコナゾール硝酸塩 0.15 ng、フルコナゾール 0.30 ng, n=7) の回収率は、ミコナゾールが 100% (変動係数 7.5%)、フルコナゾールが 103% (サロゲート回収率 93%、変動係数 7.5%) であった。海水を用いた添加回収試験 (添加量: ミコナゾール硝酸塩 1.0 ng、フルコナゾール 2.0 ng, n=5) の回収率は、ミコナゾールが 105% (変動係数 5.7%)、フルコナゾールが 115% (サロゲート回収率 97%、変動係数 1.2%) であった。本法を用いて岩手県内の環境試料を測定した結果、一部の河川水からミコナゾールが MDL 以上の濃度で検出された。特に下水処理場の放流水が流入した後の河川水からは、0.014 $\mu\text{g/L}$ のミコナゾール及び 0.017 $\mu\text{g/L}$ のフルコナゾールが検出された。

(2)水質試料中のN-フェニルマレイミドの分析 (名古屋市環境科学調査センター)

[概要] N-フェニルマレイミドは、耐熱性樹脂原料、ゴム加硫性改質剤、殺菌剤、医薬、農薬及び染料の中間体としての用途がある物質で、化管法の第1種指定化学物質に指定されている。本研究では、環境水中に存在するN-フェニルマレイミドをLC/MSで定量する方法を検討した。

[方法] 水質試料100 mLをフラスコに取り、6 mol/L塩酸100 µLを加えて混和した後、固相カートリッジで抽出する。精製水で洗浄後、窒素ガスにて乾燥し、メタノール5 mLで溶出する。精製水を添加して10 mLに定容したものを試験液とし、LC/MSで測定する。

[結果] 本法によるIDLは1.16 pg (試料換算濃度は0.058 µg/L)であり、2~1000 ng/mLの範囲で検量線の直線性が確認された。また、本法のMDLは0.13 µg/L、MQLは0.35 µg/Lであった。N-フェニルマレイミドを海水に100 ng添加した時の回収率は97% (CV値3.6%)であった。本法により、名古屋市の河川水及び海水を測定したところ、いずれの地点も不検出であった。以上の結果から、本法は水質試料中に含まれる0.1 µg/L程度のN-フェニルマレイミドを検出できるものと判断される。また、本物質は非常に加水分解が進みやすく、試料採取後は速やかに塩酸を添加し、保存の際は-30℃の冷凍庫内で十分に保冷をする等、注意が必要である。

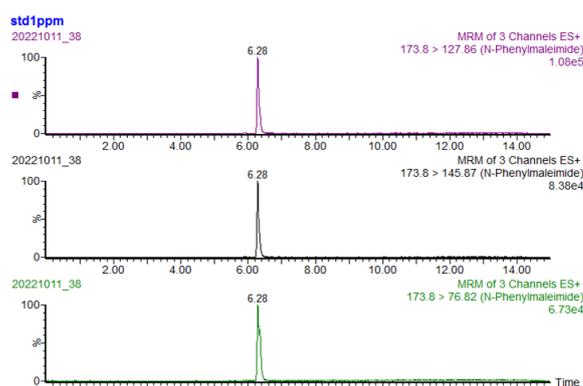


Fig. 2 1 µg/mL標準溶液のクロマトグラム

(3)水質試料中のジアクリル酸ヘキサメチレンの分析 (名古屋市環境科学調査センター)

[概要] ジアクリル酸ヘキサメチレンは、アクリル樹脂のモノマーや高分子改質剤として使用されている。化審法届出公表値では、2012年から2019年まで「1,000トン未満」の製造・輸入量であると示されている。この物質が環境中に排出された場合、23%程度が水質に、0.1%程度が底質に、76%程度が土壌に存在すると分配予測されている。但し、それぞれの環境中における存在量は、現在不明である。このように、この物質が底質や土壌へ吸着し、継続的に水質へと移行することで環境中に残留する可能性がある。そこで、水質中のジアクリル酸ヘキサメチレンをLC/MS/MSで定量する方法を検討した。

[方法] 水質試料1~100 mLを分取し、超純水で希釈して200 mLに定容する。さらに、ヒドロキノン-アセトニトリル溶液(100 mg/L)を添加した。このヒドロキノンは、重合禁止剤として使用されているものである。試料水を、Oasis HLB Plusで固相抽出してからヒドロキノン-アセトニトリル溶液(0.5 mg/L)で溶出した。得られた試験液をヒドロキノン-アセトニトリル溶液(0.5 mg/L)を用いて10 mLに定容し、LC/MS/MSで定量を行った。

[結果] 水質試料が100 mLの場合、添加回収率が50%程度となった。さらに、水質試料が10 mLの場合、回収率は70%程度となった。一方、水質試料が1 mLの場合では、良好な結果が得られた。これは、試料水中のマトリックス成分によるイオン化抑制(イオンサプレッション)の可能性が示唆された。そこで、確認試験を実施した結果、イオン化抑制が確認された。また、3日間程度の試料の保存性試験を実施した結果、重合禁止剤としてヒドロキノンを添加することである程度重合を抑制して損失を抑えることができることも分かった。

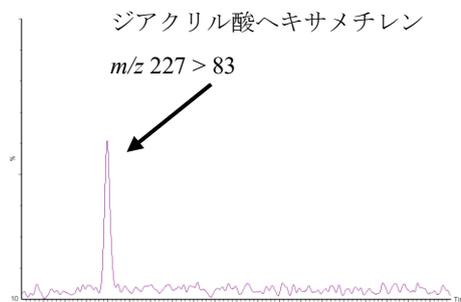


Fig.3 0.05 ng/mL標準液のクロマトグラム

残留農薬検査における前処理方法の検討

岩手県環境保健研究センター 衛生科学部 ○川村あさひ 後藤吉乃

1 はじめに

当センターの食品中の残留農薬検査における前処理方法は、厚生労働省が定める通知試験法¹⁾により実施していたが、株式会社アイスティサイエンスが開発したSTQ法(Solid Phase Extraction Technique with QuEChERS method)への移行を検討することとした。

STQ法は、簡便で迅速性等に優れた手法であるため、この試験法を採用することにより、有機溶媒使用量の削減や分析時間の短縮による業務の効率化を図ることができる。

STQ法を採用するためには、「妥当性評価ガイドライン²⁾」に基づき、適正な結果を出せる試験法であるのか、妥当性を評価する必要がある。当センターの残留農薬検査は、GC-MS/MS及びLC-MS/MSで測定をしていることから、STQ法の妥当性を評価するには、GC-MS/MSで測定するSTQ GC-B法及びLC-MS/MSで測定するSTQ LC法の両方を評価する必要がある。今般、STQ GC-B法の妥当性評価が完了したので、その概要を報告する。

2 方法

(1) 妥当性評価及び添加回収試験の方法

試験対象の農薬は、現在収去で検査している60項目の他に、96項目を追加し、合計156項目とした。

代表的な食品として10品目を選定し、妥当性評価を実施し、それ以外の品目(これまでに検査対象としてこなかった品目を含む。)については、添加回収試験を行った(表1)。

品目毎に、試験対象である農薬を含まない試料(ブランク試料)に試験対象の農薬を添加した試料(添加試料)を調製し、STQ GC-B法に従い試験を行った。

妥当性評価は1日1回(2併行)、5日間の試験を、添加回収試験は1日1回(5併行)の試験を実施し、その結果から、選択性、真度(回収率)、精度及び定量限界の性能パラメータを求め、それぞれの目標値に適合しているかを確認した。

表1 試験別の対象品目

| | 対象品目数 | 対象品目 |
|--------|--------------|---|
| 妥当性評価 | 代表食品 10品目 | ほうれんそう、きゃべつ、えだまめ、きゅうり、じゃがいも、トマト、なす、ピーマン、りんご、オレンジ |
| 添加回収試験 | 収去対象 12品目 | レタス、アスパラガス、はくさい、しゅんぎく、さやいんげん、さやえんどう、こまつな、ぶどう、なし、バナナ、グレープフルーツ、パイナップル |
| | 収去対象外 5品目 | だいこん、にんじん、とうもろこし、かぼちゃ、かき |

(2) 試験方法

STQ法の検査フローを図1に示す。

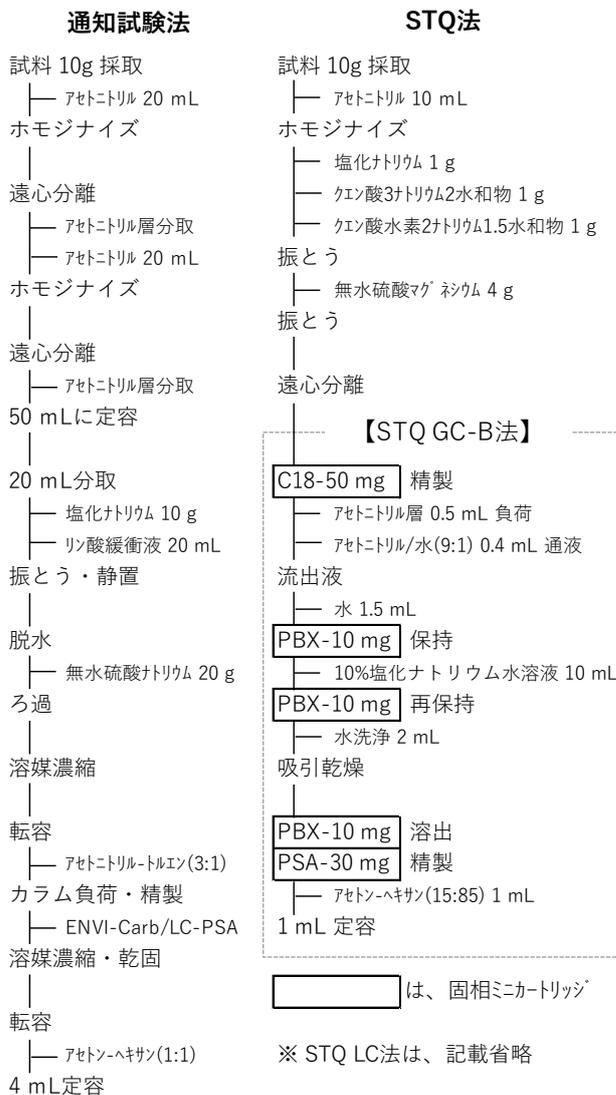


図1 試験法別の検査フロー

(3) GC-MS/MS 測定条件

GC-MS/MS の測定条件を表 2 に示す。

表 2 GC-MS/MS 測定条件

| | |
|--------------|---|
| 機 器 | GC : Agilent社製 7890B MS/MS : Agilent社製 7000D |
| キャリアガス | ヘリウム |
| 注入口温度 | 270℃ |
| オープン温度 | 80℃ (1 min) - 20℃/min - 140℃ - 4℃/min - 200℃ - 8℃/min - 300℃ - 20℃/min - 310℃ (5.5 min) → 310℃ (ポストラン5 min) |
| トランスファーライン温度 | 290℃ |
| カラム | Agilent社製 VF-5MS (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm) |
| 注入モード | スプリットレス |
| 試料注入量 | 2 μL |
| イオン化方式 | EI (70 eV) |
| イオン源温度 | 320℃ |
| 測定モード | MRM |

3 結果

(1) 妥当性評価

妥当性評価の結果を図 2 に示す。

代表的な食品として選定した 10 品目の妥当性が確認された農薬は 94/156 項目で、その内訳は、収去項目 40/60 項目、収去項目以外 54/96 項目となった。

オレンジは他の品目と比べて不適合となる項目が多くなった。

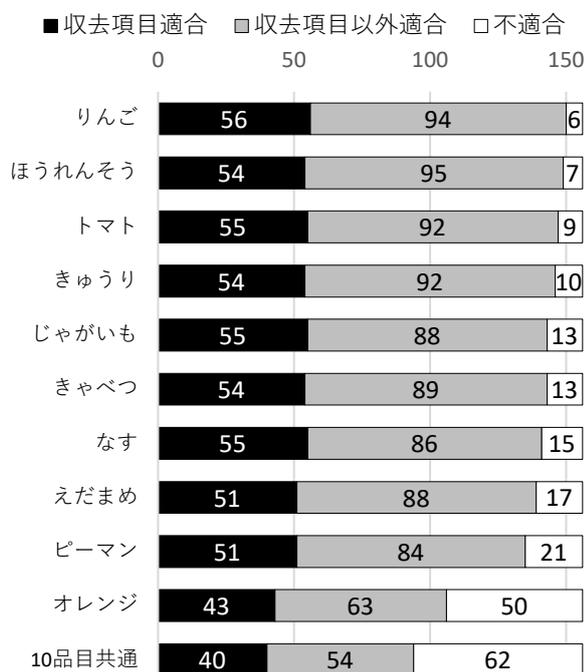


図 2 妥当性評価結果

(2) 添加回収試験

添加回収試験を行った 17 品目について、3(1)で妥当性が確認された農薬 94 項目のうち、不適合となった項目数を表 3 に示す。

グレープフルーツ以外の 16 品目（収去対象外の 5 品目を含む。）については、不適合となる項目が少なく良好な結果が得られた。

グレープフルーツは、妥当性評価を行ったオレンジ同様、不適合となる項目が多くなった。

表 3 添加回収試験結果

| 品目 | 不適合項目数 |
|---|--------|
| レタス、はくさい、しゅんぎく、こまつな、パイナップル、だいこん、にんじん、とうもろこし、かぼちゃ、かき | 0 |
| アスパラガス、さやいんげん、さやえんどう、ぶどう、なし、バナナ | 1 |
| グレープフルーツ | 6 |

4 まとめ

本研究の結果、STQ 法でも、多くの農薬成分の定量が可能であることが示された。

オレンジとグレープフルーツは他の品目と比べて不適合となる項目が多かったが、これは柑橘類に含まれるフラボノイド類などの夾雑成分の影響と推定される。STQ 法の特徴として、このような成分を取り除くための固相ミニカートリッジを追加して試験を行うこともできるため、今後その実施も検討していきたい。

本県では、令和 5 年度から食品中の残留農薬検査に STQ 法を採用し、残る STQ LC 法の妥当性評価を併行して進めながら対応している。

また、ヘリウムの不安定供給及び価格高騰の問題により、GC-MS/MS 分析のキャリアガスをヘリウムから変更せざるを得なくなったため、本県では代替ガスとして水素を採用することとした。これにより、STQ GC-B 法の妥当性評価をやりなおす必要があり、これについても対応しているところである。

今後、妥当性評価を完了した後は、さらに検査対象品目の拡充を進め、本県の食の安全を支えるために必要な試験検査体制の充実強化を図っていくこととする。

(参考文献)

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全全部長通知「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号)

岩手県におけるニホンジカの生息密度指標の傾向と地域間差

Trend and differ between regions of sika deer density index in Iwate Prefecture,2019-2022

○鞍懸重和¹・千崎則正¹・山内貴義²¹岩手県環境保健研究センター・²岩手大学農学部

岩手県では、2020年度以降にニホンジカ(*Cervus nippon*)を2万頭以上を捕獲している。そのためシカの個体群動態に影響している可能性があるが、生息密度指標の傾向について検証されていない。そこで、生息密度指標である糞塊密度が、捕獲圧を高めた前年の2019年以降において減少傾向が見られるか調査した。また、管理ユニットである奥羽山脈地域(OU)と北上山地北部地域(KN)、また北上山地南部地域を五葉山周辺(G)とそれを除いた五葉山南部地域(KS)に分割した4地域における、糞塊密度の地域間差を明らかにすることを目的とした。解析は、2019年から2022年の糞塊密度を目的変数、管理ユニット及び2019年を基点とした経過年数を説明変数、誤差分布をポワソン分布、調査地点をランダム変数とした一般化線形混合モデルにより行った。その結果、経過年で有意に負の効果が認められた。また地域ごとの糞塊密度はG、KS、KN、OUの順に有意に高かった。これらのことから2019年以降岩手県ではニホンジカの減少傾向が見られること、また分布に地域差が認められることが示唆された。減少傾向は2020年以降の捕獲数の上昇、OUの糞塊密度の低さは多雪地域であること、またG、KS、KN順での糞塊密度の高さは、分布拡大の変遷を表すものと推察された。今後は捕獲数を維持しつつ、生息密度が高い地域を重点的に捕獲することが望まれる。

(599文字)

2023 年日本鳥学会 発表要旨

北上高地におけるイヌワシの巣の特徴と繁殖成績

前田 琢 (岩手県環境保健研究センター)

岩手県北上高地では、これまでに計 34 つがいのイヌワシの生息が確認され、107 個の巣の存在が明らかになっている。このうち 67 個は岩棚に、40 個は樹上に造られている。また、標高が明らかな 92 巣についてみると、179～844m の範囲に分布し、平均値は 532m であった。こうした巣の形態や標高の違いによって、抱卵期以降の繁殖成績（産卵が確認された事例における雛の巣立ち成否）がどの程度予測可能か検討した。2002～2022 年に確認された 242 件の産卵（抱卵開始）事例のうち、雛が巣立ちに至ったのは 73 件だった。これらの記録を応答変数、巣の形態と標高を説明変数、つがい差をランダム効果として、一般化線形混合モデルによるロジスティック回帰を行なった結果、標高のみを用いたモデルが最も予測が良く、巣の形態を含めると予測が悪くなった。標高の低い巣ほど繁殖に有利である一方、岩棚か樹上かの違いは繁殖成績に影響していない傾向が示された。しかし、前期（2002～11 年）と後期（2012～22 年）に事例を分けると、後期には標高による有意な予測はできなかった。

演 題： ゆでたまごの製造に指定外添加物 (DDAC) を使用した事例の対応について

所属 氏名：岩手県環境保健研究センター 後藤 吉乃

(発表要旨)

四級アンモニウムの陽イオン性界面活性剤であるジデシルジメチルアンモニウムクロリド (以下、「DDAC」という。) は、動物用医薬品として鶏体や鶏舎、機械器具などの消毒等のほか、食品製造加工施設内の殺菌消毒等に広く使用される殺菌消毒剤である。

当該成分は、食品添加物としての指定はなく、食品の製造加工工程での使用が認められていない。しかし、平成25年度に県内で、惣菜製造業者が味付けゆでたまご表面へのかびの発生を防ぐことを目的に、茹で汁にDDACを添加しゆでたまごを製造するという指定外添加物使用違反の事例が発生した。当時、保健所からの検査依頼があったが、当所ではDDAC分析法を確立していなかったため、試験実施を断念した経緯がある。

令和4年度、保健所から平成25年度と同様の違反事例疑いによる試験実施の要請があったことから、ゆでたまごに含まれるDDACの検査法を検討し、妥当性評価試験を行ったので、その概要を報告する。

NGS（次世代シーケンサー）を用いた食中毒原因キノコの特定向けて

○宮手 公輔

(岩手県環境保健研究センター)

〔目的〕

当センターでは、植物性自然毒を起因とする食中毒の原因究明体制の構築を目指して検討を進めており、これまでに LC-MS/MS による植物毒・キノコ毒 29 成分の一斉分析法や PCR 法によるキノコ種特定法について検討してきた。

PCR 法では、未調理の生鮮キノコであればユニバーサルプライマーを用いて増幅した DNA をサンガーシーケンス法で配列特定できるが、複数のキノコが混在した調理品等のキノコ混合物では、キノコ種を特定する際にキノコ種毎に特有のプライマーを準備する必要があり、これを整備することは現実的ではない。

今般、キノコ混合物に含まれるキノコの判別手法として、NGS（次世代シーケンサー）を用いた分析手法を試みたのでその概要を報告する。

〔方法〕

1. 試料調製

小売店で購入したエノキ、エリンギ、シイタケ、ヒラタケ、ブナシメジ及びマイタケの6種のキノコを用い、以下により試料を準備した。

- ①各キノコを細切し約 100 mg を別々に分取しバイオマッシャー II (Nippo 社製) を用いて摩砕した。(各キノコ試料)
- ②1.5 mL のエッペンチューブに細切した6種のキノコを約 20 mg ずつ分取しバイオマッシャー II を用いて摩砕した。(混合試料)
- ③自家製のシイタケ入り味噌汁の汁を 1.5 mL のエッペンチューブに 100 μ L 分取した。(味噌汁試料)

2. DNA の抽出・精製

各試料は、Qiagen 社製 DNeasy Plant Mini Kit

を用いてプロトコールに従い DNA の抽出精製を行った。

3. PCR 増幅

PCR マスターミックスに Invitrogen Platinum II Hot-Start PCR Master Mix(2X) (サーモフィッシャー社製) を用い、Fig. 1 により増幅反応液を調製し増幅反応を行った。プライマーはユニバーサルプライマーとして報告されているものとして F-Primer (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3')、R-Primer (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') を用い、5.8S 領域を含む ITS 領域を増幅した。

4. NGS によるデータ採取

NGS 分析は、機器に Nanopore 社製 MinION Mk1C、シーケンシングキットに SQK-LSK109 を用いて行った。3 で得られた各試料について End Prep 処理のちバーコーディング処理を行い、全試料を混合した。混合液を Adapter 結合処理したのち MinION Mk1C のフローセルにアプライし、run 時間を 4 時間として分析した。

5. データ解析

データ解析は、プログラミング言語 Python を用いて行った。4 の分析において得られたデータのうち、ベースコーリング後の fastq.gz ファイルを構築したプログラムに読み込み、得られたシーケンスデータの数 (Count 数)、塩基長の最大値、最小値及び平均値を確認した。各試料のシーケンスデータは Count 数が 1000 以上のものはランダムに 1000 個抽出し、PairwiseAlignment ツールを用いて類似度をもとにクラスタリング (分類) を行った。得られたクラスタのうち構成する Count 数が 5 個以上の各クラスタから得た代表配列について BLAST 検索を行った。

[結果]

NGS 分析で得られたシーケンスデータの個数、最大塩基長、最小塩基長、平均塩基長、得られたクラスターの個数及びBLAST 検索結果として相同性や Taxonomy から判定された種を Table 1 に、シーケンスで得られた塩基長分布の例として②の混合キノコ試料の分布を Fig. 2 に示す。

味噌汁を除く試料では 5964~19431 個のシーケンスデータが得られ、ユニバーサルプライマーで増幅したと推測できる 600~1000 bp の塩基長のデータが多く得られていることを確認した。①の各キノコ試料ではそれぞれ 5~6 のクラスターが得られ、いずれも BLAST 検索により試料としたキノコであると判定できた。また、②の混合キノコ試料においてもキノコ 6 種を結果として得ることができた。③味噌汁試料ではシイタケの他、カワラタケやトルラ酵母のクラスターが得られた。

[考察]

今回、市販のキノコ 6 種を混合した試料から DNA を抽出・精製しユニバーサルプライマーを用いて増幅した反応液の NGS 分析により、含まれるキノコを特定できる可能性が示された。また味噌汁試料からシイタケの他に得られたトルラ酵母データは出汁調味料の原材料の酵母エキス由来のものと考えられたが、カワラタケは不明であった。

本検討での最大の難点として挙げられたのが NGS から得られるデータの解析手法であった。NGS メーカーが提供している解析ツールではキノコがデータベースに搭載されていなかったため

Python を用いて解析を行ったが、Python では遺伝子解析用のライブラリや手法が数多くあり、どの手法を選択するかについて試行錯誤を重ねた。今般、当センターで採用した手法以外にも適切な解析手法がある可能性があり、今後も検討を要すると考えている。

[まとめ]

キノコ混合物試料から DNA を抽出・精製し、ユニバーサルプライマーを用いて増幅したのち NGS 分析することにより、含まれる複数のキノコ種を特定できることが示唆された。今後、毒キノコや調理食品を用いて検証を行い、食中毒発生時のスクリーニング手法として適用できるか検討する。

| | |
|--|---------|
| ○ 増幅反応液 | |
| Platinum II Hot-Start PCR Master Mix(2X) | 12.5 μL |
| 100 μM F-Primer | 0.25 μL |
| 100 μM R-Primer | 0.25 μL |
| Template DNA | 2.0 μL |
| DW | 10.0 μL |
| | 計 25 μL |
| ○ 増幅温度 | |
| 94°C, 2min | |
| → [94°C, 15sec → 60°C, 15sec → 68°C, 30sec] × 30cycles | |
| → 4°C, ∞ | |

Fig. 1 PCR 増幅条件

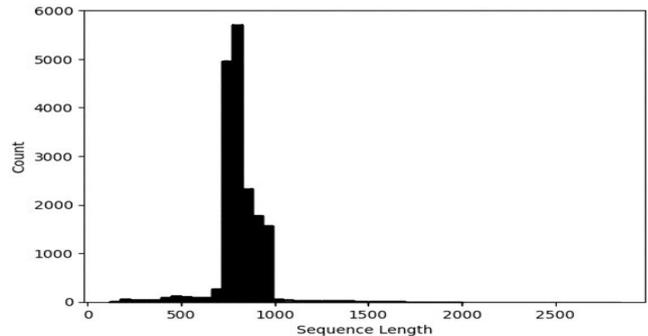


Fig. 2 混合キノコ試料の塩基長分布

Table 1. 混合キノコ試料の塩基長分布

| sample | シーケンスデータの概要 | | | | 得られた | | BLAST検索結果 ¹⁾ |
|---------|----------------|------------|------------|----------------|--------|--|-------------------------|
| | Sequence count | Max Length | Min Length | Average Length | クラスター数 | | |
| エノキ | 15375 | 3278 | 180 | 903.3 | 5 | Flammulina velutipes(Flammulina filiformis) [5] | |
| エリンギ | 11094 | 2651 | 145 | 804.9 | 6 | Pleurotus eryngii [6] | |
| ① シイタケ | 8115 | 3055 | 150 | 914.5 | 5 | Lentinula edodes [5] | |
| ナメコ | 15405 | 2778 | 140 | 809.6 | 6 | Pholiota nameko(Pholiota microspora) [6] | |
| ブナシメジ | 19431 | 2774 | 139 | 791.8 | 6 | Hypsizygus marmoreus [6] | |
| マイタケ | 5964 | 3140 | 131 | 784.4 | 6 | Grifola frondosa [6] | |
| ② 混合キノコ | 17692 | 2845 | 119 | 810.7 | 20 | Flammulina velutipes(Flammulina filiformis) [5], Pleurotus eryngii [4], Lentinula edodes [1], Pholiota nameko(Pholiota microspora) [1], Hypsizygus marmoreus [3], Grifola frondosa [6] | |
| ③ 味噌汁 | 417 | 1512 | 204 | 754.1 | 8 | Lentinula edodes [4], Trametes versicolor [2], Cyberlindnera jadinii [2] | |

1) 【 】内は、分類されたクラスターの数

地下水中の鉛起源推定手法の確立について

岩手県環境保健研究センター 長澤敦・伊藤朋子

1. はじめに

岩手県の地下水概況調査において、鉛はヒ素と並んで検出頻度が高い元素であり、報告下限値(0.002 mg/L)を超えて検出した地点について、毎年数件の汚染井戸周辺地区調査を実施している。

汚染井戸周辺地区調査は、汚染の範囲や汚染原因の推定を目的としているが、周辺井戸の調査だけでは鉛の発生源を究明するのは難しい。このため、汚染原因不明のまま、継続監視調査を長期間実施している地点が複数存在している。

地下水は、通常、井戸所有者宅で地下水層から給水装置を介して採水している。地下水中の鉛の発生源はいくつか想定されるが、過去の調査において、給水経路内での汚染が疑われる事例があった。

このことから、本研究では、主に給水経路内での鉛の溶出影響に着目して、地下水中の鉛の起源推定方法を検討したので、これを報告する。

2. 調査方法

2.1 試料

【地下水】**初流試料**: 地下水調査地点において、蛇口の開栓直後に採取した配管滞留水を含む試料。**通常試料**: 上記地点で配管滞留水を十分通水した後、採取した試料。**通水量毎の地下水試料**: 蛇口の開栓直後から一定の通水量毎に250 mLずつ採取した試料。

【坑廃水】県内に所在するA休廃止鉱山の坑道から湧出する処理前の廃水(自然由来鉛を含む)。

【給水用具浸漬液】ホームセンター等で市販されている黄銅または青銅製の給水用具(継手、バルブ等)を精製水に一晩浸漬して作成した試料。

2.2 測定方法

【鉛及び共存元素濃度の測定】

鉛及び共存元素の濃度測定はICP-MS(Agilent 7700)で行い、試薬は硝酸 1.38 電子工業用、塩酸Ultrapure(関東化学)、元素類の測定用標準液はXSTC-469(SPEX)、すず標準液1000及び陽イオン混合標準液Ⅲ(関東化学)を使用した。前処理を含む測定の詳細はJIS K 0102の各項に準じた。

【鉛同位体比の測定】

鉛同位体比の測定は、座間味ら¹⁾の方法に準じ、上記ICP-MSで積算時間を²⁰⁶Pb、²⁰⁷Pbは10秒、²⁰⁸Pbは1秒、スイープ回数1000回、繰り返して10回で測定した。

同位体比の補正は、鉛同位体標準液 NMIJ CRM 3681-a(産業技術総合研究所)を用いて比較標準化法で行い、野々瀬ら²⁾の方法を参考に、試料3検体を測定するごとに標準試料を

測定し、補正係数の校正を行った。また、測定時の質量差別効果を一定とするため、標準試料と各種試料の鉛濃度は $1.0 \pm 0.1 \mu\text{g/L}$ (1%硝酸溶液)に調製した。

3. 結果と考察

3.1 初流試料と通常試料の鉛濃度比較

地下水が給水経路で鉛の溶出影響を受けなければ、初流試料と通常試料の鉛濃度は等しくなるはずである。しかし、初流試料の鉛濃度の方が有意に高値となり($p < 0.05$, $n=64$)、多くの地点で給水用具の溶出影響を受けていることが示唆された。

3.2 地下水通水量に伴う元素濃度の変化

給水経路内の溶出影響が、地下水の通水量とともにどのように変化するか確認を行った。例を図1に示す。

給水用具に関連する鉛、銅、亜鉛等の元素が0~10 L通水時まで濃度が高く、20~40 L程度通水後に一定となった。一方、給水用具に関連のないヒ素やほう素では、通水直後からほぼ一定の濃度で推移した。

100 L通水時に検出される鉛が、給水用具の溶出影響のみなのか、地質など他の発生源も関与しているのかについては、濃度変化だけでは判断できない。このため、別の指標による検討が必要であると考えた。

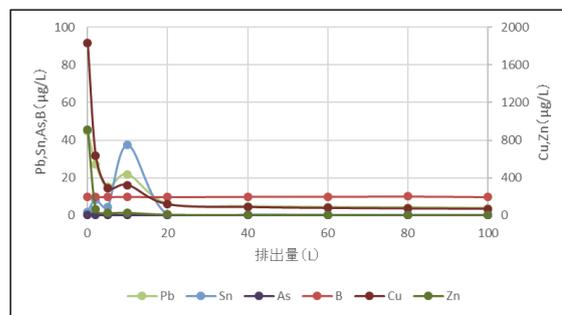


図1 通水に伴う地下水中の元素濃度変化

3.3 鉛同位体比による発生源推定

100 L通水時点で検出される鉛が、地下水そのものに含まれるのか、給水用具の溶出影響が続いているのかを判別するため、鉛同位体比を用いて、より詳細な発生源推定ができないか、検討を行うこととした。

発生源による鉛同位体比の違いを調べるため、地下水や給水用具の浸漬液、休廃止鉱山の坑廃水など、各種試料の鉛同位体比を測定した。結果を図2に示す。

今回の検討では、給水経路での溶出影響を強く受けている初流地下水と、鉛を検出した地点の100 L通水時点の鉛同位体比は、ほぼ同じ比率で比較的狭い範囲に集中し、国内非

汚染土壌や国内鉱床鉛、県内の休廃止鉱山坑廃水など、日本固有の鉛同位体比を持つ試料とは明らかに異なる分布を示した。

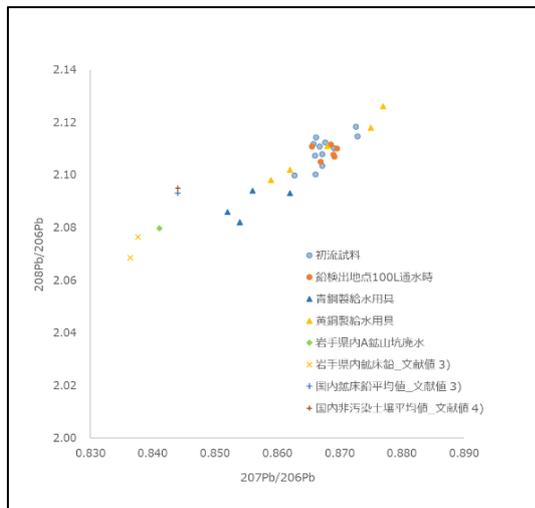


図2 各種試料の鉛同位体比

海外の鉱床鉛は国内の鉛と異なる同位体比を持ち、海外産鉱石が使用される工業製品では、日本固有の鉛同位体比と異なる比率を示す。このため、100 L通水時においても、鉛の検出には給水用具の溶出影響が大きいことが示唆された。

3.4 鉛起源推定フロー構築

3.1から3.3の結果に加え、共存元素濃度による給水用具溶出影響の評価や、複数の鉛の発生源があった場合の寄与率算定等について検討を行い、その結果から、地下水中の鉛起源推定フローを図3のとおりまとめた。今回、給水用具の溶出影響と自然由来鉛の推定が可能になったことで、井戸所有者への地下水使用方法の指導等、適切な行政措置に繋げることができると考えている。

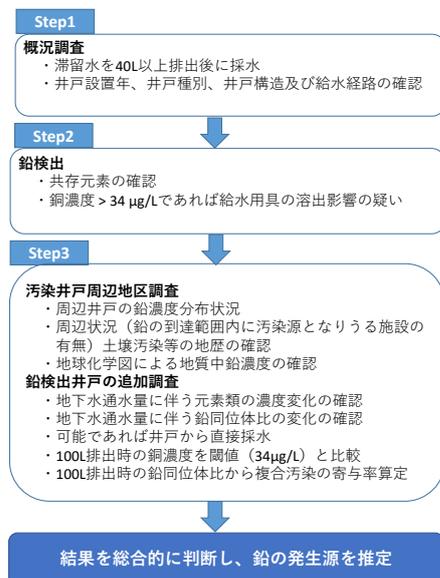


図3 地下水中の鉛起源推定フロー

4. まとめ

地下水概況調査で鉛が検出された際に、通水に伴う給水用具由来の元素濃度変化や、同位体比等を用いて、鉛の起源推定を行った。調査の結果、すべての地点が給水用具由来で鉛を検出したものと推察された。また、検討結果をもとに、地下水中の鉛起源推定フローを構築し、給水経路の溶出影響と自然・地質由来の鉛について、発生源や寄与率の推定が可能となった。

岩手県では、鉛の発生源が給水経路由来と判断された場合は継続監視調査の対象から除外できるよう、地下水質常時監視実施細目を今年度改正したところであるが、給水用具由来の判断基準は定めていない。今後は、井戸所有者の同意の取れた県内全ての鉛の継続監視調査地点を対象に本推定フローによる鉛起源の調査を実施し、本フローを判断基準として適用可能か検証し、給水用具由来の判断基準の策定につなげていく。(本稿には掲載していないが、推定フローの検証に係る調査データについて発表予定である。)

5. 引用文献

- 1) 座間味佳孝：ICP-MSによる地下水中の鉛同位体比分析法の検討，沖縄県衛生環境研究所報，52，62-67，2018
- 2) 野々瀬奈穂子，日置明治，倉橋正保，久保田正明：同位体希釈/誘導結合プラズマ質量分析法による金属イオン濃度測定の国際比較．分析化学，47，4，239-247，1998
- 3) 佐々木昭，佐藤和郎，G.L. カミング：日本列島の鉱床鉛同位体比，鉱山地質，32，(6)，457-474，1982
- 4) 丸茂克美，江橋俊臣，氏家亨：日本各地の土壌中の重金属含有量と鉛同位体組成，資源地質，53(2)，125-146，2003

自然毒による食中毒の検査体制について

○宮手 公輔

(岩手県環境保健研究センター)

【目的】

国内では、例年、自然毒に起因する食中毒が多く発生しており、2018年から2022年までの5年間だけでも全国で321件(患者757名、うち死者14名)、本県では12件(患者31名)が報告されている。

細菌やウイルス等を含む全食中毒事案のうち、植物性又は動物性自然毒によるものは、事件数が全体の約7%、患者数は約1%と少ない。一方、死者数の約80%は自然毒によるものであり、他の食中毒と比較してその致死率の高さが特徴として挙げられる。そのため、事案発生時には早期に原因物質を特定し、適切な治療へと繋げることが重要となる。

しかし、自然毒の分析には公定法がなく、各地方衛生研究所等は独自に試験法を検討し、原因究明を行っている状況である。当センターでも、令和3年度から、自然毒による食中毒の早期原因究明に向けた体制の構築を目指し、検討を進めてきた。

今般、これまでの検討結果を取りまとめ、当センターにおける健康危機管理事案を想定したマニュアル(案)を作成したので、その概要を報告する。

【方法・結果】

1. LC-MS/MSを用いた毒成分分析方法の検討

毒成分の分析はLC-MS/MSを用いることとし、試験条件は毒成分の性質から植物性自然毒(キノコ毒を含む)と動物性自然毒に分けて設定した。また、植物性自然毒については既報²⁾により、動物性自然毒については鈴木らの方法³⁾により添加回収試験等を実施した。

その結果、Table 1に示す成分について標準品等を整備するとともに、これらの成分については分析が可能であることを確認した。

2. PCR法によるキノコ種の特定制法の検討

毒キノコのなかには、それ自体が毒を持つことは知られているが、毒成分の特定ができていないため、LC-MS/MSによる原因究明が困難なものがある。このことから、LC-MS/MSによる成分分析と並行してDNA解析による種の特定制法を行うこととし、その方法を検討した。

まず、キノコ6種を試料としDNAを抽出・精製を行い、次に、キノコDNAのITS領域を増幅するユニバーサルプライマーを用い、PCRで一定領域を増幅させ、その後、サンガーシーケンス法又はNGS(次世代シーケンス)法により、塩基配列の解析を行った。

その結果、サンガーシーケンス法及びNGS法のいずれにおいても、試料としたキノコ6種を検出することが可能であった。

3. 理化学検査における生体試料取扱規程の整備

自然毒による食中毒が発生した場合、主な検体は調理品や食材であるが、稀に患者の尿、血液、吐しゃ物等の生体試料が搬入されることがある。

生体試料は、微生物部門の試験検査では感染性試料として取り扱うため、安全キャビネット等の設備を用いて検査を行っている。これに対し、理化学検査部門では、感染性試料の取扱いについての基準等が無く、課題となっていたところである。

そこで今後、作業者の安全と設備の汚染防止を図ることを目的に、理化学検査部門における生体試料等の取扱い要領等を策定した。

4. 試験検査等対応マニュアル案の作成

自然毒による食中毒は、発生頻度が細菌やウイルス等に比べて少ないうえに、本県では発生しない年度もある。そのため、人事異動により、事案発生時に対応すべき担当者が自然毒分析の未経験者である状況も考えられ、技術継承が課題となっている。

このことから、これまで行ってきた各分析法の検討結果を踏まえ、試験検査等対応マニュアル案を作成した。これには、食中毒が発生した際の検査方法のほか、検体受入や連絡調整の手順に加え、実際に行った添加回収試験の結果等も明記した。

本マニュアル案作成にあたっては、検査方法において、理化学試験担当者が通常行っていない方法も含まれることから、操作手順に画像を多く掲載した。また、本マニュアルをそのまま試験記録として活用できる形式とした。

[考察]

これまで、当センターでは、自然毒食中毒が発生してから試験法を確認していたため、対応が遅れが生じていた。併せて、技術継承が困難であったり、生体試料の取扱い・管理方法が不明確であったりと課題が複数散見された。

今般、理化学検査における生体試料の取扱いを規定するとともに、試験検査等対応マニュアル案を作成した。これらが、従前の課題解決に寄与すると考える。

[まとめ]

自然毒による食中毒の原因究明体制の構築に向け、当センターにおける健康危機管理発生時のマニュアル案を策定した。今後は、今年度中にマニュアルの試験運用を行う予定である。併せて内容の精査を行った後、正式な運用を開始することとする。

- 1) 厚生労働省ホームページ：食中毒統計資料
- 2) 宮手，岩手県環境保健研究センター年報第 21 号令和 3 年度
- 3) 第 58 回全国衛生化学技術協議会年会

Table 1. LC-MS/MS 分析対象成分

| 区分 | 成分 | 含有生物種等 | |
|-----|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| 植物性 | α-ソラニン α-チャコニン | ジャガイモ | |
| | アトロピン スコポラミン | チョウセンアサガオ、 エンジェルトランペット など | |
| | アコニチン メサコニチン ヒパコニチン ジェサコニチン | トリカブト | |
| | ニコチン | タバコ | |
| | アミグダリン | アンズ、アーモンド、 梅などの種子 | |
| | ククルビタシン B | ゴーヤ、ユウガオ、 ズッキーニ など | |
| | ジギトキシン ジゴキシン | ジギタリス | |
| | グラヤノトキシン I | レンゲツツジ | |
| | ジオスゲニン ジオスシン | カエデドコロ など | |
| | リコリン ガラントミン ガラントミノン | スイセン、 タマスダレ など | |
| | コルヒチン デメコルシン | イヌサフラン、 グロリオサ など | |
| | ジェルピン シクロパミン | バイケイソウ など | |
| | フェブリフジン | アジサイ、アマチャ | |
| | α-アマニチン β-アマニチン ファロイジン | シロタマゴテング、 テングタケ など | |
| | イルジン S | ツキヨタケ | |
| | ムスカリン | テングタケ など | |
| | 動物性 | テトラミン | ツブ貝 |
| | | C トキシン群 ゴニオトキシン群 | 麻痺性貝毒 (ホタテガイ等) |
| | | テトロドトキシン | フグ |

陽イオン性界面活性剤の分析法の検討

岩手県環境保健研究センター ○後藤吉乃、宮手公輔

【目的】

令和4年度、県内のそうざい製造業者が、指定外食品添加物である陽イオン性界面活性剤のジデシルジメチルアンモニウムクロリド（以下、「DDAC」という。）を味付き卵の製造に使用し、行政処分を受けた。当該事例は本県で2度目であり、今後も類似事例の発生が懸念される。

そこで、昨年度開発したゆで卵中のDDAC分析法を用いて、DDACと同様に広く消毒剤として使用されている陽イオン性界面活性剤の塩化ベンザルコニウムも分析できないかを検討した。

また、類似事例発生の際に、陽イオン性界面活性剤の故意の使用を判断する材料となるよう、通常市場に流通している鶏の生卵及び卵加工品のDDAC及び塩化ベンザルコニウムによる汚染実態を調査したので、併せて報告する。

【方法】

1. LC-MS/MSを用いた塩化ベンザルコニウムの分析

塩化ベンザルコニウムの構造式はFig.1のとおりであり、アルキル基がC₈からC₁₈の混合物として存在する。主成分はアルキル基がC₁₂、C₁₄及びC₁₆と言われているため¹⁾、分析対象成分をこれら3成分（それぞれBAC12、BAC14及びBAC16と呼ぶ。）とした。

ゆで卵中の塩化ベンザルコニウムの分析は、昨年度開発したDDAC分析法に則った。前処理方法をFig.2に、測定装置及び測定条件をTable.1に示す。

妥当性評価試験は、厚生労働省通知「妥当性評価ガイドライン」²⁾に従い試験を実施した。すなわち、1試験当たり非添加試料(n=1)、定量下限値相当添加試料(0.01 ppm, n=2)及び鶏卵(可食部)におけるDDACの残留基準値相当添加試料(0.05 ppm, n=2)の試験を行い、これを5回繰り返した。そこで得られた結果から、選択性、真度(回収率)、併行精度、室内精度により妥当性を評価した。

なお、試料は県内で購入した鶏卵を沸騰水浴中で10分間茹で、殻を剥いて粉碎均一化したものを用いた。試料5gを分取し、標準溶液を添加して30分間

放置したものを添加試料とした。検量線用標準溶液は、2%ギ酸含有メタノールを用いて0.5~20 ppb標準溶液の6点を調製した。

2. 市場流通する生卵及び卵加工品の汚染実態調査

令和5年7月、盛岡市内の複数のスーパーマーケットから、鶏の生卵を8種類、温泉卵や味付き卵等の卵加工品を8種類購入し、可食部及び殻におけるDDAC及び塩化ベンザルコニウムを測定した。

【結果及び考察】

1. LC-MS/MSを用いた塩化ベンザルコニウムの定量

非添加試料については、妨害ピークは認められなかった。また、添加試料のピークはS/N \geq 10であることを確認した。真度(回収率)、併行精度、室内精度の結果はTable.2に示すとおりで、いずれも妥当性評価ガイドラインの判定基準を満たした。

2. 市場流通する生卵及び卵加工品の汚染実態調査

生卵及び卵加工品の可食部では、測定対象成分はすべて0.01 ppm未満であった。

一方、殻では、Table.3及びTable.4に示すとおり、多くの製品では測定対象成分は0.01 ppm未満であったが、一部の製品では0.01~0.05 ppm検出されるものもあった。

なお、令和4年度の事例では、原料由来のもので殻から0.01~0.02 ppm程度だったのに対し、DDACを防カビ目的で添加した際、殻から1~10 ppmというオーダーでDDACが検出されている。

以上のことから、今後同様の事例が発生した際、生卵及び卵加工品から検出された陽イオン性界面活性剤が、原料由来なのか、故意に添加されたものなのか判断する材料として、本結果が参考となりうると思われる。

【まとめ】

昨年度開発したゆで卵中のDDAC分析法を用いて、塩化ベンザルコニウムの主成分も定量可能であることがわかった。

市場流通する生卵及び卵加工品におけるDDAC及び塩化ベンザルコニウムの汚染実態調査では、可食部で

はいずれの成分も 0.01 ppm 未満であることがわかった。殻では、多くが 0.01 ppm 未満であり、検出されたとしても 0.01~0.05 ppm 程度であることがわかった。

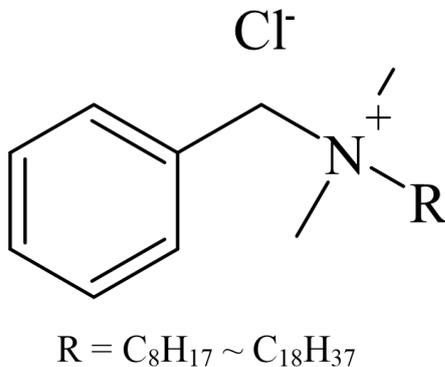


Fig. 1 塩化ベンザルコニウムの構造式

| | |
|-------------|---|
| 【抽出】 | |
| 試料 | 5 g (50 mL容PP製遠沈管) + 0.2%アンモニア含有メタノール 20 mL ホモジナイズ (11,000rpm, 1min) 0.2%アンモニア含有メタノールで25 mLにメスアップ 遠心分離 (3,000rpm, 5min) |
| 上清 | 【抽出液】 |
| 【精製】 | |
| 固相カラム | OASIS WCX (150 mg/6 cc) <コンディショニング> メタノール 3 mL 水 3 mL 0.2%アンモニア含有メタノール 3 mL |
| 抽出液 | 5 mL負荷 (流出液は廃棄) <洗浄 (流出液は廃棄)> 5%アンモニア水 4 mL (流出液は廃棄) メタノール 4 mL (流出液は廃棄) <溶出 (流出液を採取)> 2%ギ酸含有メタノール 4 mL (流出液を採取) 2%ギ酸含有メタノールで 5 mLに定容 |
| 試験溶液 | 【LC-MS/MS測定液】 |

Fig. 2 抽出及び精製方法

Table.1 LC-MS/MS測定条件

| | |
|------------------|--|
| 装置 | LC : Shimadzu LC-20AD MS : Sciex Triple Quad 5500 |
| カラム | Imtakt scherzo SM-C18 (2 mm×150 mm, 3 μm) |
| 移動相 | A液…20 mMギ酸アンモニウム水溶液 B液…20 mMギ酸アンモニウム含有80%アセトニトリル |
| グラジエント条件(B液%) | 0 min(5%) → 7 min(100%) → 15min(100%) → 16 min(5%) → 20 min(5%) |
| カラム温度 | 40℃ |
| 流速 | 0.4 mL/min |
| 注入量 | 5 μL |
| イオン化モード | ESI (+) |
| Spray voltage(V) | 4500 (V) |
| SRM条件 | DDAC …326.4 > 186.2 BAC12 …304.0 > 91.2 BAC14 …332.1 > 90.9 BAC16 …360.0 > 90.9 |

Table. 2 妥当性評価確認結果

| 成分名 | 試料中濃度 (ppm) | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | 室内精度 (RSD%) |
|-------|-------------|--------|-------------|-------------|
| BAC12 | 0.01 | 88.5 | 18.7 | 19.7 |
| | 0.05 | 92.5 | 5.1 | 8.4 |
| BAC14 | 0.01 | 87.6 | 13.9 | 16.6 |
| | 0.05 | 87.3 | 5.3 | 8.9 |
| BAC16 | 0.01 | 80.8 | 9.1 | 14.1 |
| | 0.05 | 79.1 | 5.4 | 11.0 |

Table. 3 陽イオン性界面活性剤の検出結果 (生卵の殻)

| 生卵 | DDAC | 塩化ベンザルコニウム | | |
|----|-------|------------|-------|-------|
| | | BAC12 | BAC14 | BAC16 |
| A | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| B | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| C | <0.01 | 0.05 | 0.02 | <0.01 |
| D | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| E | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| F | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| G | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| H | 0.03 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

単位 : ppm

Table. 4 陽イオン性界面活性剤の検出結果 (卵加工品の殻)

| 卵加工品 | DDAC | 塩化ベンザルコニウム | | | 備考 |
|------|-------|------------|-------|-------|----------|
| | | BAC12 | BAC14 | BAC16 | |
| A | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | 半熟卵 |
| B | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | 半熟卵 |
| C | <0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 半熟卵 |
| D | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | 半熟卵 |
| E | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | ゆで卵 |
| F | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | ゆで卵 |
| G | — | — | — | — | ゆで卵(殻無し) |
| H | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | ゆで卵 |

単位 : ppm

【参考文献】

- 1) 株式会社島津製作所 アプリケーションニュース
「消毒剤中ベンザルコニウムの高速分析」
https://www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/pim/pim_document_file/an_jp/applications/application_note/17752/an_01-00249-jp.pdf
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(平成 22 年 12 月 24 日食安発 1224 第 1 号)

岩手県における海浜性希少植物の消失リスクの推移と 生育域外保全に関する取り組み — 絶滅する前にできること —

○小山田智彰・鞍懸重和・千崎則正（岩手県環境保健研究センター）

1. はじめに

本県は 624 種の希少植物が絶滅危惧種として「いわてレッドデータブック (IRDB) ¹⁾」に記載されており、岩手県環境保健研究センターは、絶滅危惧種の保護及び監視に向け、現地確認や臨時的保護作業、関係機関が行う保護措置への技術指導の役割を担っている。

東日本大震災津波が発生した 2011 年に行った調査では、津波によって消失した「海浜性希少植物 (以下、希少植物)」は、砂浜・礫浜を自生地とするものが多く、消失した希少植物の生育基盤の改変の大きさと個体数の減少には正の相関がみられた ²⁾。

2022 年までに行った希少植物の残存調査及び消失リスク評価 ³⁾ では、全体の消失リスクが減少傾向である中、7 地点で希少植物の自生地点の消失が確認され、「エゾノコウボウムギ」、「エヅツルキンバイ」及び「オオアカバナ」について消失が予測された ⁴⁾。

これらのことから震災後においても依然として希少植物の自生地点の消失が継続しており、消失の危惧される自生地点が散見される状況にあるが、その消失要因については報告されていない。

そこで本発表では、2016 年から継続的に実施している IRDB に記載されている希少植物を対象とした希少植物の残存調査と消失リスク評価の結果を報告するとともに、この間に消失した消失地点の消失要因を報告する。

また、消失リスク評価により抽出された希少植物において、県内に残存する自生地が 1 ヶ所となり、自生地に 5 個体のみとなったオオアカバナに

ついては、生息域外保全の措置として自生地で採種・保存していた種子を用いて明所暗所による発芽試験及び育苗試験を実施後、「自生地播種」を行うとともに、試験地内で発芽させた苗の移植 (以下、「野生復帰 ⁵⁾」) を行った。

2. 方法

1) 消失リスク評価による希少植物の評価

2016 年及び 2019～2023 年の 5 月から 9 月に、IRDB 記載植物を対象とした希少植物について調査した (図 1)。調査は、希少植物の有無、個体数を記録した。消失した地点については周囲の状況から消失した要因を判断した後に記録し、要因を人為・自然に区分し集計した。さらに、これまで

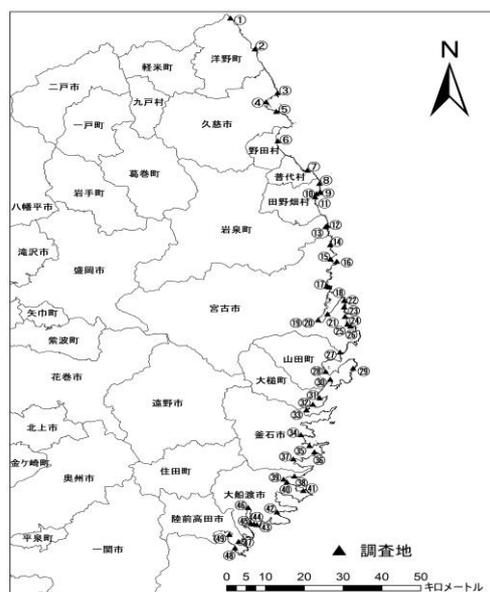


図 1 希少植物の調査地点 (2023 年 49 地点)

の調査から消失に関係する項目、つまり、「繁殖」・「立地」・「採集」・「個体数」・「自然災害の影響」・「生育基盤の変化」の6項目を5段階で評価した消失リスク評価を実施し、得点が高いほど消失リスクが高い種として評価した⁴⁾。尚、得られた消失リスク得点は、全調査地点及び2016年から同一の調査地を継続してモニタリングしている長期観測地点について、年ごとに合計得点の平均値を算出した⁴⁾。

2) オオアカバナの野生復帰試験

東日本大震災が発生した2011年の調査で、本県では過去に記録のなかったオオアカバナを確認したが、2023年の調査では「角の浜漁港」のオオアカバナが消失していた。また、県内唯一の自生地となった「久慈川河口」のオオアカバナも残存5本中開花1個体であることから、県内絶滅の回避の取り組みとして保存種子を用いた自生地播種を行い、あわせて同種子から発芽させた苗の移植を行った。

オオアカバナの種子については、消失リスク評価によって消失が予測されたことから、久慈川河口の自生地から2021年10月に採種し、また、角の浜漁港の自生地から2022年11月に採種している。種子は、研究室内で、環境省新宿御苑管理事務所が実施している種子保存の方法に沿って調整と乾燥処理を行い、種子保管庫に保存した⁶⁾。この種子を20粒ずつ用いて、明所と暗所の条件に分けて発芽試験に取り組み、発芽した苗を栽培試験地で育苗した。

自生地保全の措置として、2023年10月25日に角の浜の自生地において、保存種子200個をペーパーシートに付着させて播種した。久慈川河口においても保存種子200個を播種した。さらに、発芽試験で発芽・育苗していた苗を野生復帰として移植した。

3. 結果

1) 消失リスク評価による希少植物の評価

消失リスク評価では、6項目の合計得点が15点以上に達すると消失する可能性が高まる⁴⁾。

2023年の消失リスク評価は、全体及び長期観測地点の消失リスクの平均点が12.4及び11.8であった(図2)。

2023年の残存調査により新たに消失した自生地点は、織笠川のエゾツルキンバイ、角の浜のオオアカバナを含めた4地点であった(表1)。

全体の消失リスク評価を開始した2016年から2019年、2022年、2023年の調査で消失した希少植物と要因をまとめた結果、11地点において希少植物が消失し、そのうち54.5%が人為的な要因(開発行為)による消失であった(表1)。その具体的な事例として、「道路工事による土地改変」、「河川の河道掘削による水量変化」、「護岸工事による土地改変」、「資材設置による植物体への被圧」などが確認された。

表1 消失した希少植物と消失の要因

| 地名 | 種名 | 県内の残存自生地数 | 2016年 | 2019年 | 2020年 | 2021年 | 2022年 | 2023年 | 消失要因 | 区分 |
|----------|----------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|----|
| 角の浜 | オオアカバナ | 1 | 10 | 9 | 9 | 18 | 18 | 消失 | 虫による食害 | 自然 |
| 久慈川 | ハマボウフク | 8 | 18 | | 24 | 消失 | | | 復興道路に改変 | 人為 |
| 小本海岸南側 | ハマボウフク | 8 | 18 | 消失 | | | | | 自然消失 | 自然 |
| 太田浜 | エゾオグルマ | 0 | 20 | 21 | 消失 | | | | 台風19号による浸食 | 自然 |
| 重茂漁港 | エゾオオハコ | 9 | | | 12 | 16 | 消失 | | 復興道路に改変 | 人為 |
| 織笠川 | エゾツルキンバイ | 1 | 20 | 14 | 20 | 16 | 20 | 消失 | 河川改変による水量の変化 | 人為 |
| 大畑川 | カラヂシャ | 2 | 17 | 19 | 消失 | | | | 護岸工事 | 人為 |
| 甲子川 | カラヂシャ | 2 | 21 | 16 | 17 | | 15 | 消失 | 河川改変による水量の変化 | 人為 |
| 小壺崎 | ハマハタザオ | 10 | | | | 14 | 12 | 消失 | 自然消失 | 自然 |
| 盛川 | カラヂシャ | 2 | 20 | 17 | 消失 | | | | 自然消失 | 自然 |
| 浜漁港トイレの横 | ハマナシコ | 2 | 24 | 21 | 消失 | | | | 漁具の設置 | 人為 |

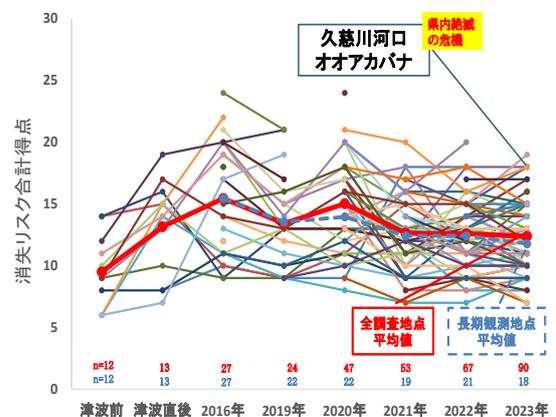


図2 2023年オオアカバナの消失リスク評価

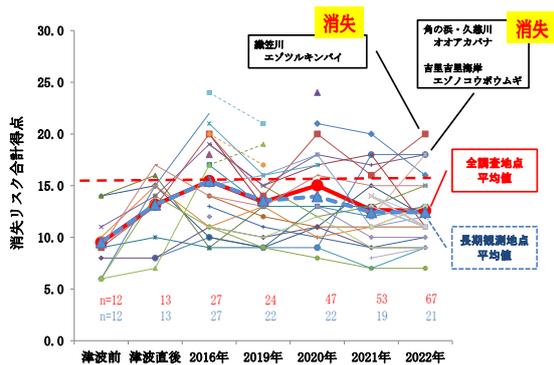


図3 2022年の消失リスク評価から消失が予測された希少植物

消失した希少植物（表1）のうち、織笠川のエゾツルキンバイと角の浜のオオアカバナは2022年の消失リスク得点から消失する可能性が高いと予想していた（図3）。特にオオアカバナについては、県内唯一の自生地となった久慈川河口の消失リスク評価の合計得点が18点と高いことから、県内絶滅に直面している（図2）。

2) オオアカバナの野生復帰試験

保存していた種子を利用して発芽試験に取り組んだ。自生地の照度測定と土壌含水率測定より、オオアカバナは明るく土壌水分の多い環境を好む傾向が見られた。また、種子の顕微鏡観察より種子表面に小さな突起（図4）が多く観察されたことから土壌表面に付着する性質を持った光発芽性種子⁷⁾であると推察した。これらの結果を参考に保存種子を用いて明所と暗所による発芽試験を行った結果、光を当てた条件においてのみ20%の発芽が認められ、4個体の苗を生産することができた。

本試験に用いた種子は、令和6年2月17日に環境省新宿御苑管理事務所に提出することにしており、同事務所の協力をいただきながら、種子保存を進めることにしている。

4. 考察

1) 消失リスク評価による希少植物の評価

本研究は、大震災の発生前から岩手県沿岸部で

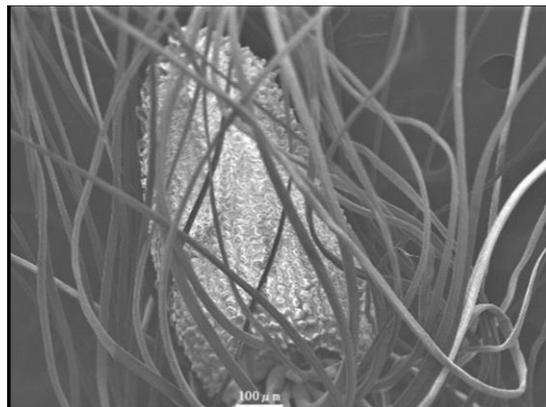


図4 オオアカバナの種子（角の浜漁港より採種）

確認していた希少植物の被害状況を把握するために始めたものである。その中で取り組んだ「消失リスク評価」は、調査地点において確認された希少植物の現状と減少要因の把握、さらに、消失する可能性が高まっている希少植物の把握にも役立てられることを確認した。

今年度の調査でも、全体の平均点が12.4と多くの自生地点で15点を下回り、安定した自生地点が多数確認された（図2）。一方で、15点を超える希少植物の自生地は複数地点存在しており、今後も消失リスク評価の結果に注視しながら対象となる希少植物の消失リスクの要因を把握し、保護対策を進めることが重要となる。

2) オオアカバナの野生復帰試験

自生地の環境調査、自生地からの採種、種子の調整と保存、明所条件下における発芽の確認により、オオアカバナの種子保存と苗生産が可能であることを立証できたことは、オオアカバナの生息域外保全の手法確立の一助となるものと思われる。一方で、発芽率が20%であることは安定した苗供給の点で課題になる。オオアカバナの生息域外保全を確実なものにするためにも、発芽法の再確認や発芽率の向上が望まれる。

今後は、自生地播種後の発芽確認や、移植した苗の生存と成長の確認を行って、絶滅回避の取り組み（「岩手方式」；図5）の有効性を検証しなければならない。

5. 最後に

本研究によって、東日本大震災の発生から12年が経過しても希少植物の消失が散見していることが明らかになった。特に自生地が少なく個体数の減少が顕著な希少植物については、リストアップを行いながら保護措置を検討する必要がある。そのためにも、生息域内保全として、対象となる植物の消失リスクの要因に応じた保全措置の検討を行うことや、生息域外保全としての自生地で採種された種子の保存と苗生産の技術開発を確保しておく必要があるだろう。

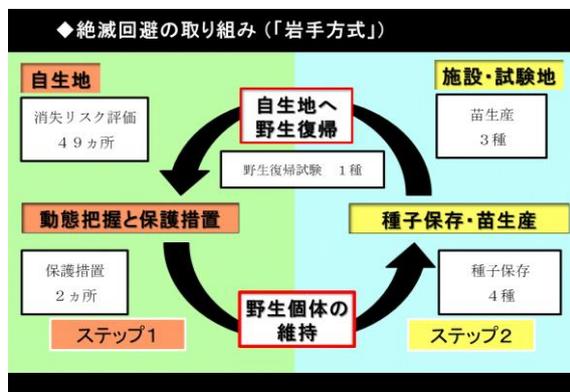


図5 絶滅回避の取り組み（「岩手方式」）

謝辞

2011年のオオアカバナ確認について、片山千賀志氏より協力をいただいた。希少植物の種子保存について、環境省新宿御苑管理事務所の温室第一科長・保護増殖専門官の関勝雄氏より協力をいただいた。ここに記して感謝を申し上げます。

引用文献

- 1) 岩手県環境生活部自然保護課（2014）いわてレッドデータブック。
- 2) 小山田智彰, 鞍懸重和, 新井隆介, 山内貴義, 片山千賀志（2012）東日本大震災の津波による岩手県における海浜性植物の消滅. 薬用植物研究 34（1）, 37-48.

- 3) 小山田智彰, 鞍懸重和, 千崎則正（2020）岩手県における東日本大震災津波の影響調査:海浜性希少植物の動態. 全国環境研会誌 45（4）, 33-38.
- 4) 小山田智彰, 鞍懸重和, 千崎則正（2023）東日本大震災後の岩手県における海浜性希少植物の消失リスクの推移. 第23回自然環境復元学会全国大会要旨, 23-24.
- 5) 環境省（2009）絶滅のおそれのある野生動植物種の生息域外保全に関する基本方針.
- 6) 環境省（2009）絶滅危惧植物種子の収集・保存等に関するマニュアル.
- 7) 松本正雄・大垣智昭・大川清（1998）園芸辞典. 165-167. 朝倉書店. 東京.

N-alkylpyridinium sulfonates RI による LC-QTOFMS 用自動同定・定量システムの RT 標準化

岩手県環境保健研究センター ○今野博貴*, 伊藤朋子

大阪市立環境科学研究センター 大方正倫, 市原真紀子

北九州市立大学 宮脇崇, 国立環境研究所 米山美幸, 中島大介

* hiroki-k@pref.iwate.jp

RT Standardization of an Automated Identification and Quantification System for LC-QTOFMS (AIQS-LC) using N-alkylpyridinium sulfonates RI, by Hiroki KONNO, Tomoko ITO (Iwate Prefectural Research Inst. Environ. Sci. and Pub. Health), Masanori OKATA, Makiko ICHIHARA (Osaka City Research Center of Environmental Science), Takashi MIYAWAKI (The University of Kitakyushu), Miyuki YONEYAMA, Daisuke NAKAJIMA (National Institute for Environmental Studies)

1. はじめに

近年開発された LC-QTOFMS 用自動同定・定量システム (AIQS-LC)¹⁾は, QTOFMS による精密質量分析とデータベースに登録された MS スペクトル及び保持時間 (RT)を参照して, 標準品を用いることなく多成分一斉分析を行うことが可能なシステムである。このシステムにおいて, MS スペクトルは精密質量測定により選択性が高いものの, RT は使用する装置の差異から生じる室間誤差を補正する機能が無く, 物質の誤同定や誤検出を生じさせる場合があった。本検討ではこの問題を解決するため, N-alkylpyridinium sulfonates (NAPS)を保持指標 (RI)として使い, AIQS-LC の RT を標準化する方法について検討を行った。

2. 実験方法

NAPS 標準品 (図 1) 及び AIQS-LC 用内部標準 Mix (IS) を分取・混合し, メタノールで定容した vial 1 と, NAPS, IS 及び農薬混合標準 (Pest) を分取・混合し, メタノールで定容した vial 2 を用意した。

調製した vial 1 及び 2 を, 国立環境研究所, 北九州市立大学, 大阪市立環境科学研究センター, 岩手県環境保健研究センターの 4 機関で門上らの方法¹⁾に準拠して測定し, それぞれの RT を取得した。なお, 測定に用いた LC は機関によって型番, ミキシングコイル容量等が異なる。

対象物質の RI は, 下記の式を用いて計算した²⁾。

$$RI = RI_0 + (RI_1 - RI_0) \frac{RT - RT_0}{RT_1 - RT_0} \quad (1)$$

RI, RT は対象物質の保持指標と保持時間。

RI₀, RT₀ は対象物質の直前に溶出する NAPS の RI 及び RT。

RI₁, RT₁ は対象物質の直後に溶出する NAPS の RI 及び RT。

3. 実験結果と考察

NAPS のクロマトグラムは, 各機関ともグラジエント範囲内にて, アルキル鎖長の増加に伴い一定の間隔で RT が大きくなる再現性の高いパターンを示した。また, vial 1 及び 2 を合計 9 回測定したが, 各測定で RT のばらつきはほとんど見られなかった。このことから, NAPS は各機関で

問題なく測定可能であることが分かった。

次に, AIQS-LC のデータベースを構築した装置を使用している北九大の測定結果を用いて, 大阪市, 国環研, 岩手県における Pest の RT 補正値を計算し, その補正値が実測値とどの程度の差があるか比較を行った。

まず, 式(1)を用いて, 北九大の実測 RT から Pest の RI を計算した。次に, 式(1)中の RI を北九大の計算値, RT₀, RT₁ に各機関で測定した NAPS の数値を代入し, Pest の RT 補正値を算出した。図 2 に Pest 実測 RT とデータベース登録 RT の差 (補正無し), 及び実測 RT と RT 補正値との差 (NAPS 補正有) を

示す。また, 表 1 にそれぞれの二乗平均平方根誤差 (RMSE) を示す。NAPS による補正を行わなかった場合, いずれの機関も平均してデータベース上の RT より 0.3 min 以上のずれが見られるが, RT 補正値は全ての機関で実測値との差の平均が 0.3 min 以下となり, 測定値のばらつき及び RMSE も小さくなった。このことから, NAPS を用いて, RT を標準化可能であることが示唆された。

【謝辞】

本研究は, 環境研究総合推進費 JPMEERF20235002 により実施しました。ここに記して, 感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) Kadokami and Ueno, 2019, Anal. Chem. 91 (12), 7749–7755
- 2) Rainer Stoffel et al., 2022, Anal. Bioanal. Chem. 414, 7387–7398

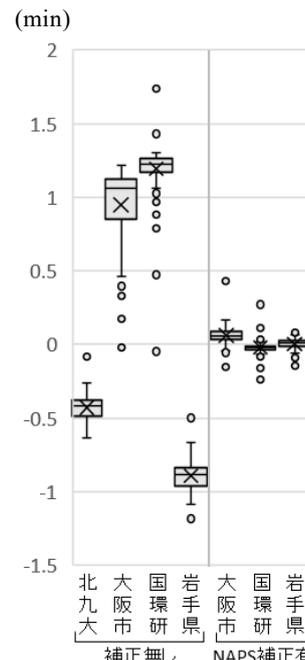


図 2 Pest (113 物質) の RT 残差の BoxPlot

表 1 各機関の RMSE

| | RMSE(min) | 補正無し | NAPS補正有 |
|-----|-----------|------|---------|
| 北九大 | 0.44 | - | - |
| 大阪市 | 0.98 | 0.09 | 0.09 |
| 国環研 | 1.20 | 0.05 | 0.05 |
| 岩手県 | 0.90 | 0.03 | 0.03 |