

流入下水中における薬剤耐性菌の実態調査

○矢内 英之 (微生物グループ)

【はじめに】

感染症法に基づく7種類の薬剤耐性菌感染症のうち、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE) 感染症、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 感染症による届出数は、全国的に増加傾向である。

CREのうち、カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (CPE) が保有するカルバペネマーゼは、ほとんどのβ-ラクタム剤を分解することが多く、その遺伝子の多くがプラスミド上に存在することから多菌種に広がりやすく、特に注意を要するとされている。

また、*vanA* 遺伝子等を有するVREは高度耐性を示す株が多く、その耐性遺伝子がプラスミド上に存在することもあるため、CPEと同様である。

これらの感染症の届出に関しては届出基準を満たす者に限られ、無症状病原体保有者等は届出対象外となっており、市中の感染状況を把握することは困難である。

CPEやVREの起因菌は腸内に生息しているものが多く、流入下水などの環境に流出していると考えられる。そこで、市中の感染状況を類推するための流入下水中のCPE及びVREの実態調査を目的として初年度は分離方法の検討を行った。

【材料と方法】

1. 材料

2023年10月、12月、2024年1月に採水した流入下水を使用した。

2. 方法

1-1) 腸内細菌目細菌 (推定) のスクリーニング

流入下水を、選択剤を加えた2倍濃度のBGLB培地、mEC培地及びEC培地に等量加え増菌培養を行い、増菌培養液をmSuper CARBA、選択剤を加えたX-MG寒天培地及びDHL寒天培地に接種した。発育したコロニーのうち、グラム陰性桿菌、オキシダーゼ試験陰

性、ブドウ糖発酵の性状を満たす菌を腸内細菌目細菌 (推定) とした。

1-2) CPEのスクリーニング

腸内細菌目細菌 (推定) としたコロニーについては、国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル薬剤耐性菌」に準じて、β-ラクタマーゼ産生性試験、カルバペネマーゼ産生確認試験を実施すると共に、マルチプレックスPCR法による耐性遺伝子の検索を実施した。

1-3) 培地等の選定

腸内細菌目細菌 (推定) の検出状況や保有するカルバペネマーゼ遺伝子の種類を元に、培地等を選定した。

1-4) 培地等の検証

流入下水を用いた検討で選定した培地等について、当所で保有している6株を用いて有用性の検証を行った。

2-1) 腸球菌のスクリーニング

流入下水を適宜希釈し、CHROMagar VRE及びバンコマイシンを8µg/ml添加したmEI agarに接種し、それぞれ特徴的なコロニーを釣菌した。

なお、mEI agarについてはメンブレンフィルター法による腸球菌の分離も試みた。

2-2) 腸球菌の同定及び耐性遺伝子

分離された腸球菌についての菌種同定及び耐性遺伝子の検出はPCR法を用いて行った。

【結果】

1. CPE検出のための培地等の選定結果

CPEを分離するため、流入下水を用いて選択剤を加えた分離培地と増菌培地の組み合わせとして36通りの方法で行ったところ、様々な組合せからGES型やKPC型のカルバペネマーゼ遺伝子を保有するCPE (推定) を分離することができた。このため、こ

これらのカルバペネマーゼ遺伝子を保有する CPE (推定) を分離できた組合せを, CPE を検出するための培地として選定した. (増菌培地として BGLB 培地または EC 培地, 分離培地として DHL 寒天培地).

【考察】

当所に搬入される検体は菌株であり, 流入下水等の環境検体から CPE を分離するためのノウハウは持ち合わせてはいない. そこで, 腸内細菌目細菌(推定) を効率的に検出できる分離培地を第一条件として選定したところ, DHL 寒天培地 (メロペネム: 1 μ g/ml, ZnSO₄: 70 μ g/ml) が良好であった. 増菌培地に関しては, GES 型及び KPC 型のカルバペネマーゼ遺伝子を保有する CPE (推定) を単離できた BGLB 培地及び EC 培地を増菌培地として選定した.

選択剤に関しては, 選択剤を添加せずに増菌した培地からは GES 型のカルバペネマーゼ遺伝子を保有する株のみが単離され, KPC 型のカルバペネマーゼ遺伝子を保有する株は得られなかった. このことから, 増菌培地に関しては選択剤を添加しない培地と選択剤を添加した培地を併用することとし, 選択剤としてはメロペネムを添加したものを選定した.

しかしながら, 当所で保有する菌株と同様の菌が流入下水を用いた検討において選定した培地等で検出できるかの保証はないため, 当所で保有している 6 株を選定し, 培地等の検証を行った.

分離培地に関してはメロペネム 0.5 μ g/ml の濃度で 3 株 (全て *E. coli*), 0.25 μ g/ml の濃度で 2 株 (全て *E. coli*) の発育抑制が確認された. このため分離培地として MacConkey 寒天培地を選定し, 同様の検証を行ったところ, 0.25 μ g/ml の濃度では影響がないことが確認された. したがって, 分離培地としてはメロペネムを 0.25 μ g/ml の濃度で添加した MacConkey 寒天培地を併用することとした.

増菌培地に関しては BGLB 培地で発育抑制が確認されたため, 選択剤を加えた培地として EC 培地を選定した. 選択剤を加えない増菌培地としては, BGLB 培地及び EC 培地を候補として選定していたが, 発育

支持能がより高かった EC 培地を選定した.

下水などの環境から薬剤耐性菌を検出する方法は様々であり, 使用されている選択剤や濃度, 培地も多様である. 今回, 実際の流入下水を用いて検討し, 選定した培地等では当所で保有する菌株と同様の菌が実際の流入下水に入っていた場合, 検出できなかったと思われる. したがって, 流入下水などの環境検体から目的とする菌を単離するには培地や選択剤等の条件をあらかじめ把握したうえで選定することが重要と思われた.

VRE に関しては CHROM agar VRE ではコロニーの単離すら困難であったため, バンコマイシンを 8 μ g/ml の濃度に添加した mEI agar を用いて単離を試みたが, 直接塗抹では発育がよくなく, メンブレンフィルター法により改善がみられた. 結果として *E. gallinarum* (*vanC1*), *E. casseliflavus*/*E. flavescens* (*vanC2/3*) を流入下水から効率よく分離できるようになったため, 今後は経時的に採取したサンプルを用い本試験を実施していく予定である.

和歌山県における大気環境中の多環芳香族炭化水素について

○向井 星瑠（大気環境グループ）

【はじめに】

多環芳香族炭化水素（以下 PAHs）は2環以上の芳香族の縮合体の総称であり、そのうちのいくつかは発がん性の疑いがあることが知られている。PAHs は物質の不完全燃焼や化石燃料等の燃焼によって発生するため、焚き火や自動車等の排気ガスから排出されている。環境中の PAHs はほとんどが混合物として存在しており、このうち環境省が作成した有害大気汚染物質測定方法マニュアル（以下マニュアル）では、PAHs のうちベンゾ [a] ピレン（以下 BaP）を含む複数物質を高速液体クロマトグラフ（HPLC）で分離後、蛍光検出法による分析方法が記載されている。加えて、マニュアルには複数の PAHs を効率よく測定するための励起波長、蛍光波長などの測定条件についても記載されている。

現在、当県では有害大気汚染物質モニタリング調査として毎月、県内3地点（岩出市、海南市、有田市）で優先取組物質である BaP を測定しているがその他の PAHs は対象としていない。そこで本調査研究では複数の PAHs を対象とし、当県における一般環境中の状況を把握することを目的として、今年度は分析条件の検討を行ったので報告する。

【方法】

(1) 試薬

AccuStandard Inc 製 PAH 混合標準液 (16 種混合) (0.2 mg/mL)

1. アセナフテン、
2. アセナフチレン、
3. アントラセン、
4. ベンゾ [a] アントラセン、
5. ベンゾ [a] ピレン、
6. ベンゾ [b] フルオランテン、
7. ベンゾ [g, h, i] ペリレン、
8. ベンゾ [k] フルオランテン、
9. クリセン、
10. ジベンズ [a, h] アントラセン、
11. フルオランテン、
12. フルオレン、
13. インデノ [1, 2, 3-c, d] ピレン、
14. ナフタレン、
15. フェナントレン、
16. ピレン

及び、AccuStandard Inc 製 ベンゾ [e] ピレン標準品 (50 μ g/mL)

(2) 装置

装置はアジレントテクノロジー株式会社製 HPLC1100 シリーズを使用し検出器として同シリーズの蛍光検出器 (FLD) とダイオードアレイ検出器 (DAD) を用いた。

【結果及び考察】

(1) 測定波長の検討

FLD 及び DAD の最適条件を検討した。

なお、FLD の励起波長及び蛍光波長の最適化については、マニュアルにある励起波長より、蛍光スペクトルを採取し、各物質の極大波長を確認した。この蛍光波長より、各物質の励起スペクトルを採取し、極大波長を確認後、各物質の極大となる励起・蛍光波長にて確認し表 1 に示すものを測定波長とした。

アセナフチレンのみ蛍光特性が確認できず FLD で測定することは不可能であったため DAD を用いて測定することとした。

(2) 分離の検討

17 種混合標準品を従来のモニタリング調査の際に BaP を測定していた Ascentis®製 Express C18 カラムを使用し分離を検討した。

結果、ピーク形状にテーリングが認められ、8 ピークしか確認することができなかったためさらなる検討が必要となった。

(3) カラムの変更

(2)の結果よりカラムをアジレントテクノロジー株式会社製 ZORBAX Eclipse PAH に変更したことに伴い分析条件をカラムに適した条件に設定した。

結果、FLD で 16 ピーク、DAD で 1 ピークを確認することができた。これと単品標準品の結果の保持時間と蛍光スペクトルの比較から各ピークを同定した。

しかし、この測定条件では 1 検体につき 4 条件での測定を必要とするため測定時間 120 分 (30 分×4 条件) と従来の BaP 測定の約 4 倍の時間を要することとなった。

(4) 測定時間の短縮

(3)において対象成分の分離が可能となったが測定時間が約4倍となるため、これを短縮することを目的としFLDの測定条件を検討した。

しかし、使用したFLDの特性上、複数の励起波長による同時測定が行えないため、励起波長が異なり保持時間が近い物質を1条件で測定できない。本調査研究の対象であるBePとBbFA、BghiPとInPがこれに該当するため、BePとInPは表2に示すとおり別条件で測定することにした。

この条件で測定した結果、図1のクロマトグラムを得た。これにより、2条件に分けて分析を行うことで検出が可能になり、測定時間を半分の60分に短縮することができた。

【まとめ】

本研究において、環境省が作成したマニュアルを参考にHPLCを用いた蛍光検出法を使用しPAHsの分析条件の検討を行った。各物質の最適な励起・蛍光波長を検討し測定波長を決定した。

この波長を用いてBaPの測定に使用していたC18カラムで測定したところ分離が不十分であったため、分離の改善のためにPAHsの測定に適したカラムを使用したところ各成分の分離が可能となった。しかし、1検体につき120分(30分×4条件)の分析時間を要することになった。

これを短縮するためFLDの測定条件を検討した結果、PAHs17種を60分(30分×2条件)で分析することが可能となった。

次年度は県内3地点のサンプリングを行い和歌山県内のPAHsの現状を把握していく。

表1. 対象物質の測定波長と略号

No	員環数	物質名	略号	本研究測定波長	
				励起波長 単位:nm	蛍光波長 単位:nm
1	2	ナフタレン	N	220	330
2	3	アセナフテン	Ant	220	330
3	3	アセナフチレン	Anl	DAD: 322.4nm	
4	3	フルオレン	Fl	220	330
5	3	フェナントレン	Ph	250	363
6	3	アントラセン	A	250	405
7	4	ベンズ[a]アントラセン	BaA	270	400
8	4	クリセン	Chr	270	400
9	4	フルオランテン	FA	250	460
10	4	ピレン	Py	250	405
11	5	ベンゾ[a]ピレン	BaP	270	415
12	5	ベンゾ[b]フルオランテン	BbFA	250	460
13	5	ベンゾ[k]フルオランテン	BkFA	250	460
14	5	ジベンズ[a,h]アントラセン	DBAhA	270	415
15	5	ベンゾ[e]ピレン	BeP	295	400
16	6	ベンゾ[g,h,i]ピリレン	BghiP	270	415
17	6	インデノ[1,2,3-c,d]ピレン	InP	250	490

表2. Eclipse PAHを用いた分析条件

移動相		A : B = 水 : MeCN			
分析カラム	Agilent Eclipse PAH 4.6 × 150mm 5 μm				
流速	1.5ml/min				
グラジエント	0 - 2min	A : B = 50 : 50			
	2 - 22min	= 50 : 50 → 0 : 100			
	22 - 28min	= 0 : 100			
DAD測定波長	322.4 nm				
FLD測定波長					
・ 1条件目: 14物質対象					
分析時間 (min)	励起 (nm)	蛍光 (nm)	対象物質	保持時間 (min)	
0.0~7.8	220	330	N	4.8	
			Ant	7.1	
			Fl	7.3	
			Ph	8.2	
7.8~8.6	250	363	Ph	8.2	
8.6~9.7			405	A	9.1
9.7~10.5			460	FA	10.1
10.5~12.0			405	Py	10.8
12.0~14.5	270	400	BaA	13.3	
Chr			13.8		
14.5~17.2	250	460	BbFA	15.8	
			BkFA	16.6	
			BaP	17.6	
17.2~28.0	270	415	DBAhA	18.9	
			BghiP	19.7	
			InP	20.1	
・ 2条件目: 2物質対象					
分析時間 (min)	励起 (nm)	蛍光 (nm)	対象物質	保持時間 (min)	
0.0~16.5	295	400	BeP	15.4	
16.5~28.0	250	490	InP	20.1	

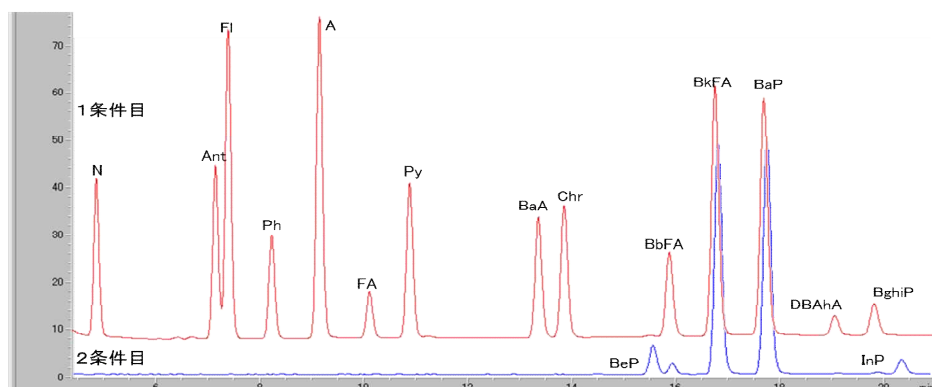


図1. PAHs17種のクロマトグラム(2条件重書きのもの)

大気中 VOC のリスク評価について

○ 桶谷 嘉一（大気環境グループ）

【はじめに】

我々の身の回りには多くの化学物質が使用され大気中へ排出されており、排出される化学物質には生物および環境へ悪影響を及ぼす有害物質が含まれる。当県においては、環境省が指定する優先取組物質をモニタリングし、大気環境の現状を把握している。一方、優先取組物質に登録されていない物質については、PRTRにより排出量を把握できるが、大気中の実濃度は確認できていない。本研究では、揮発性有機化合物（以下、「VOC」とする）の大気中濃度を測定し、ヒトへのリスク評価を行うことを目的として調査解析を行った。

【調査方法】

1 調査地点

有害大気汚染物質のモニタリング実施地点（岩出市那賀消防組合中消防署，海南市日方小学校，有田市初島公民館）の3地点とした。

2 調査期間

令和5年4月から令和6年2月に毎月1回実施し、測定結果を解析に使用した。

3 測定方法

大気中 VOC 測定は「有害大気汚染物質測定方法マニュアル」により行った。毎月の採取には6 L キャニスターを使用し、3 mL/min 程度の流量で24時間採取した。測定はガス自動濃縮装置を結合したガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を使用した。

4 使用試薬

HAPs-J44, n-ヘキサン，メタクリル酸メチルを用い混合標準ガスを調製し、内部標準物質にトルエン-d8 を使用した。

【結果と考察】

1 GC/MS 設定について

通常の優先取組物質の測定は対象物質が少ないため検出する質量数を限定する SIM で行っている。一方、本調査研究では多くの物質を測定するために、設定した範囲の質量数を全て検出する SCAN で測定することを試みた。標準物質の測定で得られたクロマトグラムの解析から、今回使用した46物質全てを検出することができた (*m*-, *p*-キシレンは合算値)。また、SIM と SCAN の感度比較のため、以前からモニタリングしている優先取組物質 11 物質について定量下限値を算出したところ、SCAN ではわずかに感度が低下したが、同程度で定量できることが確認できた。このことから、SCAN で測定することが可能であると判断した。

2 リスク評価について

リスク評価の方法については、環境省が実施した「化学物質の環境リスク初期評価」(https://www.env.go.jp/chemi/risk/chemi_list/index.htm) に準じて行った。各物質のリスクについては、2通りの方法により評価した。

1) 環境基準値，指針値が設定されている物質

各物質に対して設定された値と実測値を比較したところ、すべての物質で設定値を下回る結果であったため、リスクは低いと考えた (表1)。

2) 環境基準値，指針値が設定されていない物質

環境基準値，指針値が設定されていない物質は暴露マージン (Margin of Exposure, 以下「MOE」とする) を算出しリスク評価した。MOE は、有害性の閾値である無毒性量を実測値で除して算出した。無毒性量は、環境省が環境リスク初期評価を行った際に設定した値を用いた。通常リスク評価は年間平均値により行うものであるが、初年度であるため、状況把握のために月ごとの MOE を算出し評価した。

河川プラスチックごみの排出実態把握と排出抑制対策に資する研究

○大内 康裕, 弓庭 一輝 (水質環境グループ)

【はじめに】

近年、プラスチックによる海洋汚染は喫緊の環境問題として注目されている。なかでもマイクロプラスチック (MP) と呼ばれる 5 mm 以下の微小なプラスチック片は、海洋環境への影響や環境中での動態、化学物質の吸着などに関して、海域を中心に研究が多く行われてきた。一方で、河川についての研究事例は海域に比べると少ないが、陸域から海域への MP の主要な流入経路と考えられることから、近年、調査・研究が進められており、環境省は河川水中の MP の分布実態を把握するための調査方法を定めた『河川マイクロプラスチック調査ガイドライン (環境省ガイドライン)』¹⁾ を 2021 年 6 月に公表 (最新版は令和 3 年 6 月) するなど、河川を通じた排出実態や海洋流出量の把握およびその削減に向けた取り組みが始まっている。国立環境研究所 (国環研) においても、海洋プラスチックごみ削減に貢献することを最終目的とした地方環境研究所 (地環研) との II 型共同研究『河川プラスチックごみの排出実態把握と排出抑制対策に資する研究 (2021~2023 年度)』²⁾ を開始し、国環研と地環研で共同して河川 MP 調査方法の共通化や効率化を図り、全国の河川における実態調査を通して、河川 MP の海洋流出実態把握や削減効果の検証、モニタリング体制のあり方を検討してきた。

当センターにおいても、①当県で MP 調査を実施する為の技術取得、②県内河川での MP 実態把握、③これらを通じた環境行政へのフィードバックや啓発活動への展開を目的に、2021 年度より II 型共同研究 (II 型) に参加し、MP サンプルング技術の取得や紀の川での実態調査の実施、河川 MP データベースの構築を主導するなど、II 型の推進に尽力した。

本発表では、当センターが II 型に参加した 3 年間の取組と成果について報告する。

【紀の川での MP 調査】

(1) 調査内容および MP の採取方法

MP 調査は、紀の川の上流 (橋本橋)、中流 (麻生津大橋および川辺橋) および下流 (河口大橋) の計 4 地

点にて、環境省ガイドラインに基づき実施した。

MP 試料の採取は、目開き 0.3 mm、口径 30 cm、側長 75 cm のプランクトンネット ((株) 離合社製) を用い、開口部全体が浸水するよう河川内に沈め (図 1)、河川水を 10 m³ 程度プランクトンネットへろ水 (通水) することにより採取した。

(2) 試料の前処理

採取した試料は、植物片等の有機物を除去する為の過酸化水素溶液による酸分解処理、土粒子等の無機物を除去する為のヨウ化ナトリウム溶液による比重分離を実施し、乾燥させた後、プラスチック様の粒子 (MP 候補粒子) をピンセットで取り出して測定試料とした。

(3) MP 候補粒子の分取と同定

実体顕微鏡にて MP 候補粒子のフェレ径、形状、色を記録した後、和歌山県工業技術センター所有のフーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR, 株島津製作所) を用い、ATR 法 (全反射法) にて材質を同定した。

(4) 調査結果

紀の川での MP 調査結果を表 1 に、材質、形状及び色それぞれの割合を図 2~4 に示す。併せて、II 型にて構築した河川 MP データベースの値 (以下「データベース」と比較した。MP の個数密度は、上流 3 地点では 0.44~0.85 個/m³ 程度となり、データベース中央値 (0.89 個/m³) と比較すると低い結果となった。河口大橋については 2.3 個/m³ と高いものの、流れが遅くろ水量が適切に確保できなかった事が影響したものと考えられる。材質は、上流 3 地点で PP 及び PE が、河口大橋では加えて PET が検出された。また、形状はほとんどの地点で破片と繊維が大半を占めており、河口大橋では全て繊維であった。ビーズや発泡は全ての地点で検出されなかった。色については、平均値同様種々の色が検出されたが、河口大橋では白のみであった。河口大橋と上流 3 地点での傾向が異なっており、流速の影響を受けているものと考えられる。今回の調査結果より紀の川では、データベースと比較しても、MP の個数密度も小さく、他府県で見られるような人工芝や被服肥料殻などの特異的な問題も確認されなかった。

【ポンプ法の実施検討】

河口付近などの低流速地点では、自然通水によるろ水量の確保が難しく、適切なサンプリングが実施できない。そこで、ポンプを使用し強制的にネットへ通水するポンプ法について、国環研よりポンプを貸借して検討し、問題なく実施できることを確認した。これにより、河川の低流速地点に加え、今後海洋を見据えた海岸付近等の調査にも応用できるようになった。

【河川MPデータベースの構築】

II型参加における取組の一つとして、II型参加機関が取得したMPデータを共有化するための『河川MPデータベース』の作成を当センター主導で行った。個数密度、材質組成、形状、色や劣化等の情報を整理・類型化した共有フォーマットを作成しクラウド上で運用する案を提案・実行したことで、II型参加機関が共有データを閲覧・引用のうえ取得データの比較・解析が可能となった。次年度より、II型では本データベースを基に、排出実態把握と抑制対策へと繋げていく事になる。

【本庁との連携・啓発への展開】

R4年度より、循環型社会推進課とMPの取組みについて情報共有を開始し、『出張！県政おはなし講座』への話題提供やMPサンプルの提供など連携を図った。また、毎年和歌山市内で開催されている環境イベント『おもしろ環境祭り』に、採取したMPでキーホルダーを作成するコンテンツを出展し啓発へも展開した。

【まとめと今後の取組み】

II型に参加した3年間の取組みで、河川MP調査を実施する為の技術を取得した。紀の川での調査結果は、個数密度0.44~0.85個/m³程度と小さく、他府県で見られるような特異的な問題も確認されなかった。次年度以降も、II型参加を通して県内河川調査の継続と、データベースを活用した排出実態把握及び抑制対策へと繋げ、環境行政へのフィードバックを図りたい。

【参考文献】

- 1) 環境省：河川マイクロプラスチック調査ガイドライン，令和3年6月
- 2) 環境化学物質3学会合同大会，鈴木剛，ポスター発表（富山2022年）

【謝辞】

本調査を行うにあたり、採取器具をご提供いただき

ました国立環境研究所の皆様、多大なご助言をいただきましたII型共同研究参加機関の皆様、FT-IRを使用したMPの組成分析を実施させていただくとともに、有益なご助言をいただいた和歌山県工業技術センター結城副主査研究員に謝意を表します。



図1 MP調査の様子と採取したMP (右上)

表1 紀の川でのMP調査結果

調査日	地点名	採取位置	流速 (m/s)	ろ水量 (m ³)	最大フェレ径中央値 (μm)	プラスチック数 (個)	個数密度** (個/m ³)	
2021/12/21	恋野橋	上流	流心	0.87	13.7	2000	6	0.44
2021/12/21	麻生津大橋		流心	0.84	11.7	1000	4	0.34
2021/12/21	川辺橋		流心	0.29	9.4	1000	8	0.85
2021/12/22	河口大橋	下流	流心	0.057	1.3	2000	3	2.3 (参考値)

*河川MPデータベース：2020年2月~2023年12月データより参照 **データベース中央値:0.86、平均値:2.73

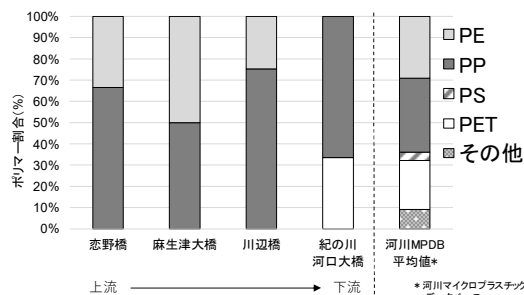


図2 材質（ポリマー）割合

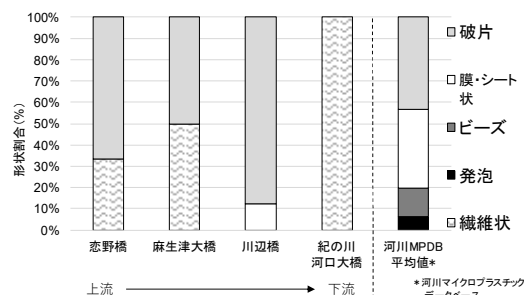


図3 形状割合

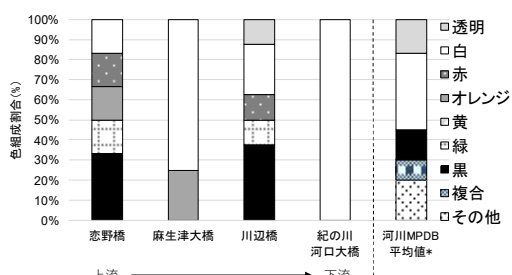


図4 色組成割合

LC-Q/TOF を用いた県内河川中に存在する化学物質に関するデータライブラリの作成及び活用

○弓庭 一輝（水質環境グループ）

【はじめに】

当センターでは、これまでに災害や事故等により河川の水質異常が発生した際の原因調査を行うため、LC-Q/TOF（液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析装置）を用いたノンターゲット分析による調査手法を開発し、実際に河川において魚のへい死事故が発生した際の原因究明に活用している。①

しかし、異常時に特異的な成分が存在してもそれが原因であると判断できなかつたり、事故発生後に現場にて平常時と予測される地点の水を採取するのはなかなか難しいことから、異常時に原因物質を特定するにはあらかじめ平常時における河川の水質状況を把握しておくことが有用であると考えられる。

LC-Q/TOF は、測定対象物質を限定しない網羅的な測定（ノンターゲット分析）が可能で、分解能が高く精密質量を測定できることから物質の組成が推定できるため、定性に優れた装置である（図1）。また、検出されたすべての物質についてデータを取得できることから、一度測定データを取得しておく、確認したい物質について後から遡って測定時に検出されていたかを確認できる（図2）。

そこで本調査では、県内河川ごとの平常時の水質データを蓄積し、河川中の化学物質の存在状況を把握することを目的とし、各河川においてLC-Q/TOFを用いたノンターゲット分析を行い、測定データおよび検出された化学物質について河川ごとにデータライブラリとして取りまとめる。当該データライブラリは、河川で異常が発生した際の原因究明や、優先的に調査が必要な地点や物質を選定するための判断材料とするなど、基礎データとして活用することを目指す。

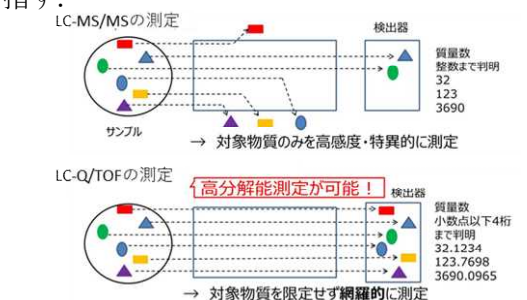


図1 測定原理のイメージ（汎用MS（LC-MS/MS）（上）およびLC-Q/TOF（下））

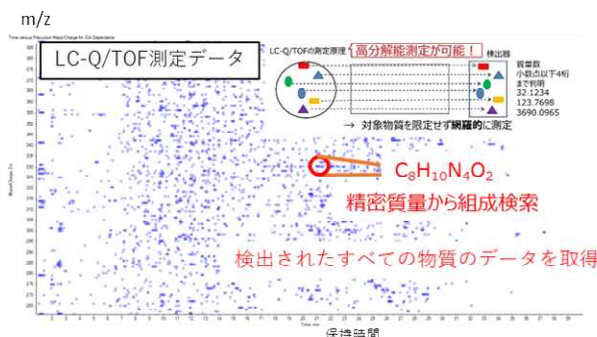


図2 LC-Q/TOFによるノンターゲット分析の測定データ例

【方法】

（1）採水地点・時期

採水地点は、県で常時監視している17河川の環境基準点24地点とした（図3）。採水は、令和5年4月、8月、10月、12月に実施し、平常時のデータを取得した。



図3 採水地点

（2）調査フロー

①前処理方法および測定方法 ①

試料の前処理は、図4の方法で実施した。

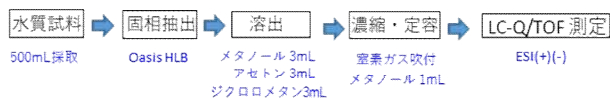


図4 前処理方法

測定は、LC-Q/TOF（AB Sciex 製 X500R）を使用し、LCはODS系カラムによるグラジエント分析を行い、ESI-PositiveまたはESI-negativeでイオン化することにより、ノンターゲット分析を行った。

②定性方法

測定結果を装置内蔵の定性データベースと照合し、精密質量で得られたMSスペクトルおよびMSMSスペクトルのフラグメントパターンの一貫性から該当する物質を定性分析した(図5)。



図5 定性データベース照合結果の例

③検出物質の整理

S/N比10以上のピークを解析対象とし、定性データベース一致度70以上の物質について、河川ごとに検出物質を整理した(表1)。なお、整理表に記載する内容は、物質名、種類(農薬・医薬品類・工業用物質など)とその用途、組成式、CAS登録番号、検出強度、ピーク面積とした。

表1 検出物質整理表(例:橋本川4月)

①物質名	②組成	③分子式	④CAS番号	⑤種類	⑥用途	⑦ピーク強度	⑧ピーク面積
Flexfenadine	フェキソフェナジン	C20H25FN3O4	(901 28319)	医薬品	抗ヒスタミン薬	6.40E+05	7.22E+04
Caffeine	カフェイン	C8H10N4O2	(194 08096)	医薬品	カフェイン	1.56E+05	1.78E+04
Acacetrololol	アセカルプロロール	C31H35N2O3	(278 08097)	医薬品	降圧薬	1.88E+05	1.61E+04
Zofaradone	ゾララドン	C21H21ClN4O5	(412 93503)	医薬品	抗精神薬	2.27E+05	1.44E+04
Lidocaine	リドカイン	C14H22N2O	(294 17363)	医薬品	局所麻酔薬	1.02E+05	9.58E+03
Telmisartan	テルミサルタン	C24H29N5O4	(446 22776)	医薬品	降圧薬	5.33E+04	9.58E+03
Irbesartan	イルベサルタン	C33H33N5O4	(1514 23782)	医薬品	降圧薬	1.44E+05	7.32E+03
Clonidine	クロロニドリン	C11H12ClN2O	(295 26542)	医薬品	降圧薬	5.42E+04	7.30E+03
Irbesartan	イルベサルタン	C33H33N5O4	(149 32643)	医薬品	降圧薬	7.31E+04	7.25E+03
Sulfapyridine	スルファピリジン	C11H11N3O2S	(249 05796)	医薬品	抗菌薬	4.91E+04	6.71E+03
Specinomyacin	スペクチノマイシン	C14H24N2O7	(315 04329)	医薬品	抗生物質	6.82E+04	6.48E+03
Sulfadiazine	スルファジアジン	C10H10N4O2S	(341 14205)	医薬品	抗生物質	5.31E+04	4.66E+03
Sulfadiazine	スルファジアジン	C10H10N4O2S	(229 16647)	医薬品	抗生物質	3.32E+04	3.92E+03
N,N-Dimethylacetamide	N,N-ジメチルアセチルアミン	C4H9NO	(229 24007)	医薬品	界面活性剤	2.25E+04	2.76E+03
Carbamazepine	カルバマゼピン	C15H12N2O	(236 26588)	医薬品	抗てんかん薬	2.06E+04	2.58E+03
Sucralose	スクラロース	C12H19ClO5	(380 01453)	甘味料	甘味料	5.28E+04	4.78E+03
Diphenylpicrylhydrazyl	ジフェニルピクリルヒドrazil	C26H23N5O2	(535 11295)	化学物質	化学物質	2.91E+04	3.73E+03
Triphenylphosphate	トリフェニルホスフェート	C18H15O4P	(338 07140)	工業用物質	可塑剤、難燃剤	3.22E+06	3.00E+06
N,N-Dicyclohexylurea	N,N-ジシクロヘキシル尿素	C12H21N3O	(264 13267)	工業用物質	工業用物質	6.63E+04	3.98E+03
Acetobaldehyde	アセトアルデヒド	C2H4O	(33 10000)	有機溶剤	有機溶剤	2.42E+05	4.33E+04
Duron	ジロン	C8H10Cl2N2O	(682 01779)	農薬	除草剤	2.09E+05	2.08E+04

【データライブラリ作成】

データライブラリは、各河川ごとに、①水質デジタルデータ(LC-Q/TOF測定データ)、②定性データベース照合結果、③検出物質整理表の3点で構成することとした。

県内17河川24地点において年4回の採水および測定を実施し、平常時のデータを蓄積した。

【検出物質】

各河川ごとに検出強度が上位で検出された物質を確認したところ、複数河川の複数月においてCaffeine(カフェイン)、Fexofenadine(抗ヒスタミン薬)、Sucralose(甘味料)、Triphenyl phosphate(可塑剤)等が検出された(表2)。これらの物質は食品に含まれるものや通年で使用される医薬品などであり、

日常生活から排出される物質が平常時から検出されているものとする。

また、夏季と秋季には複数河川でDeet(虫よけ剤)が上位で検出されており、使用時期によるものが平常時において高頻度で検出されていた。

表2 平常時河川において高頻度で検出された物質

分類	物質名	用途
医薬品	Caffeine	カフェイン
	Fexofenadine	抗ヒスタミン薬
	Telmisartan	高血圧治療薬
	Irbesartan	高血圧治療薬
	Lidocaine	局所麻酔薬
農薬	Carbendazim	殺菌剤、防カビ剤
工業用物質	Triphenyl phosphate	可塑剤、難燃剤
甘味料	Sucralose	人口甘味料

【データライブラリの活用】

今年度河川においてBOD環境基準の大幅な超過があった際にデータライブラリの活用を試みた。基準超過していない月のデータと比較したところ、基準超過した月でStevioside(甘味料)が高強度で検出されていることが分かった。この甘味料成分は地域特産の農作物を加工する際に使用されるものと考えられた。なお、当該河川については今後も継続してデータを蓄積(平常時および異常時データの蓄積)していく必要がある。

【まとめ】

今年度は、県内17河川24地点についてLC-Q/TOFを用いたノンターゲット分析を行い、平常時のデータを取得し、平常時から検出されている化学物質を把握した。

また、河川で異常があった際、データライブラリに遡ることで特異的な成分が検出していることを探索できる可能性が示された。

【参考文献】

- 1) 山本道方 : LC-Q/TOFによる災害時等を想定した水質の緊急調査手法の開発, 和環衛研年報, No69, 69-73, 2023