

## 鶏肉から分離されたサルモネラの血清型および薬剤耐性について

Serovars and drug-resistance of *Salmonella* strains isolated from commercial chicken meat

微生物部門

## Abstract

A total of 96 *Salmonella* strains isolated from commercial chicken meat during August 2012–October 2017, were examined for their serovars and drug-resistance.

96 strains were classified into 9 serovars. Among them, *S. Schwarzengrund* (63 strains, 65.6%) was the most prevalent, followed by *S. Manhattan* (13 strains, 13.5%), *S. Infantis* (9 strains, 9.4%), and other 6 serovars (11 strains).

The antimicrobial susceptibility test showed that 9 strains were resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. Among them, 7 strains were penicillinase-producers, 1 strain was plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase-producer, and 1 strain was extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-producer. In addition, ESBL genotype was blaTEM-52.

## Key Words

鶏肉 chicken meat, サルモネラ *Salmonella*, 血清型 serovar, 薬剤耐性 drug-resistance

## 1 はじめに

近年、世界中で薬剤耐性菌の拡がり懸念されている。食中毒の原因菌であるサルモネラにおいても、ヒトの日常の治療に用いられる第三世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示す基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL: Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase) 産生菌の市販鶏肉からの分離例も近年散見される<sup>1-3)</sup>。ESBL 産生菌遺伝子は、プラスミド上にコードされていることから、同一菌種だけでなく菌種を越えて伝播することにより、薬剤耐性菌が広がる可能性があるため、国では畜産分野を含め薬剤耐性対策を現在進めている<sup>4)</sup>。

今回の調査研究では、当部門で鶏肉から分離されたサルモネラ菌株の血清型及び薬剤耐性の調査と ESBL 産生菌の遺伝子性状について報告する。

## 2 目的

当部門で市販の鶏肉から分離されたサルモネラ菌株の血清型および薬剤耐性を調査するとともに、鶏肉の生食はカンピロバクター食中毒のみならず、薬剤耐性菌を取り込むリスクもあることについて注意喚起を行うための一助とする。

## 3 材料と方法

## (1) 材料

2012年8月から2017年10月にかけて、当部門で市販の鶏肉から分離されたサルモネラ菌株、96株を被検材料とした。

## (2) 方法

## ア 血清型別試験

診断用免疫血清 (デンカ生研) を用い、常法に従い実施した。

## イ 薬剤感受性試験

VITEK2 グラム陰性桿菌感受性カード AST-n229 (シスメックス) を用いて、薬剤感受性スクリーニングを実施した。wild type 以外の判定が得られた株については、米国臨床検査標準化委員会 (CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute) に準拠してセンシ・ディスク (BD) を用いたディスク拡散法スクリーニングにより確認を行った。供試薬剤は、アンピシリン (ABPC)、アンピシリン/スルバ

クタム (ABPC/SBT), ピペラシリン (PIPC), ピペラシリン/タゾバクタム (PIPC/TAZ), セフトリアキソン (CTRX), セフトラジジム (CAZ) の 6 薬剤とした。

CTRX または CAZ に耐性を示す株については確認試験として, セフトラジジム (CAZ), セフトラジジム/クラブラン酸 (CAZ/CVA), セフトキサシム (CTX), セフトキサシム/クラブラン酸 (CTX/CVA) の 4 薬剤のディスク (栄研化学) を用いて, CVA 含有ディスクによる阻止円が単剤による阻止円よりも 5mm 以上拡張したものを ESBL 産生菌と判定した。

#### ウ ESBL 遺伝子型別試験

ESBL 産生菌と判定された菌株については, シカジーニアス ESBL 遺伝子型検出キット (関東化学) を用いて, PCR 法により TEM 型, SHV 型, CTX-M-1group, CTX-M-2group, CTX-M-8group, CTX-M-9group の ESBL 遺伝子検出を行った。さらに, シークエンス解析により塩基配列を決定し, DDBJ で相同性を比較し遺伝子型別を決定した。シークエンス解析には, BigDye Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用し, 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。

なお, 2013 年度から 2016 年度のうちの 50 株については, 国立感染症研究所により遺伝子解析が実施され, 薬剤耐性関連遺伝子の型別が判明している。

## 4 結果

### (1) 血清型別試験

表 1 に示すとおり 9 種類の血清型に分類された。*S. Schwarzengrund* が 63 株 (65.6%) と最も多く, 次いで *S. Manhattan* が 13 株 (13.5%), *S. Infantis* が 9 株 (9.4%), *S. Hadar* が 3 株 (3.1%), *S. Blockley*, *S. Istanbul*, *S. Yovokome* が 2 株 (2.1%), *S. Minnesota*, *S. Muenchen* が 1 株 (1.0%) ずつであった。

表 1 血清型別検出状況

| 血清型                      | 年度   |      |      |      |      |      | 合計 (%)   |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|----------|
|                          | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 |          |
| <i>S. Blockley</i>       |      |      |      |      | 1    | 1    | 2(2.1)   |
| <i>S. Hadar</i>          |      | 1    |      | 1    | 1    |      | 3(3.1)   |
| <i>S. Infantis</i>       | 3    |      |      | 2    | 1    | 3    | 9(9.4)   |
| <i>S. Istanbul</i>       |      |      |      | 2    |      |      | 2(2.1)   |
| <i>S. Manhattan</i>      |      |      | 6    | 3    | 1    | 3    | 13(13.5) |
| <i>S. Minnesota</i>      |      |      | 1    |      |      |      | 1(1.0)   |
| <i>S. Muenchen</i>       |      |      |      |      | 1    |      | 1(1.0)   |
| <i>S. Schwarzengrund</i> | 2    | 2    | 7    | 14   | 20   | 18   | 63(65.6) |
| <i>S. Yovokome</i>       |      |      |      | 2    |      |      | 2(2.1)   |
| 合計                       | 5    | 3    | 14   | 24   | 25   | 25   | 96(100)  |

### (2) 薬剤感受性試験

VITEK2 による薬剤感受性スクリーニングの結果 (表 2), 96 株中 2 株が後天性セファロスポリナーゼまたは ESBL, 7 株が獲得性ペニシリナーゼ, 残り 87 株は wild type と判定された。βラクタム系以外の薬剤では, ミノサイクリン (MINO) に耐性を示したものが 30 株, 部分耐性を示したものが 52 株, ゲンタマイシン (GM) に耐性を示したものが 1 株あった。

wild type 以外の 9 株についてはディスク拡散法スクリーニングにより確認を行った (表 3)。検体番号 15-3, 15-4, 15-10, 15-11, 15-12, 15-16, 15-23 は, ペニシリン系薬剤を分解する ClassA βラクタマーゼ (ペニシリナーゼ) 産生菌と判明した。検体番号 14-5 および 17-26 については, CTRX, CAZ の結果から ESBL 産生菌が疑われたため, 確認試験を実施した。

確認試験の結果 (表 4), 検体番号 14-5 は βラクタマーゼ阻害剤の効果がみられないこと, また, 国立感染症研究所による薬剤耐性関連遺伝子の型別解析結果で blaCMY-2 と判明したため, プラスミド性 AmpC 型 βラクタマーゼ (セファロスポリナーゼ) 産生菌株と判明した。検体番号 17-26 は ESBL 産生菌と判明した。

表2 VITEK2 薬剤感受性スクリーニング結果

| 検体番号  | 血清型                     | 年度   | 判定                    |
|-------|-------------------------|------|-----------------------|
| 14-5  | <i>S. Minnesota</i>     | 2014 | 後天性セファロスポリナーゼまたは ESBL |
| 15-3  | <i>S. Schwazengrund</i> | 2015 | 獲得性ペニシリナーゼ            |
| 15-4  | <i>S. Schwazengrund</i> | 2015 | 獲得性ペニシリナーゼ            |
| 15-10 | <i>S. Schwazengrund</i> | 2015 | 獲得性ペニシリナーゼ            |
| 15-11 | <i>S. Manhattan</i>     | 2015 | 獲得性ペニシリナーゼ            |
| 15-12 | <i>S. Yovokome</i>      | 2015 | 獲得性ペニシリナーゼ            |
| 15-16 | <i>S. Schwazengrund</i> | 2015 | 獲得性ペニシリナーゼ            |
| 15-23 | <i>S. Schwazengrund</i> | 2015 | 獲得性ペニシリナーゼ            |
| 17-26 | <i>S. Manhattan</i>     | 2017 | 後天性セファロスポリナーゼまたは ESBL |

表3 ディスク拡散法スクリーニング結果

| 検体番号  | 血清型                     | 薬剤   |          |      |          |      |     |
|-------|-------------------------|------|----------|------|----------|------|-----|
|       |                         | ABPC | ABPC/SBT | PIPC | PIPC/TAZ | CTRX | CAZ |
| 14-5  | <i>S. Minnesota</i>     | R    | R        | S    | S        | R    | R   |
| 15-3  | <i>S. Schwazengrund</i> | R    | R        | R    | S        | S    | S   |
| 15-4  | <i>S. Schwazengrund</i> | R    | R        | R    | S        | S    | S   |
| 15-10 | <i>S. Schwazengrund</i> | R    | R        | R    | S        | S    | S   |
| 15-11 | <i>S. Manhattan</i>     | R    | R        | R    | S        | S    | S   |
| 15-12 | <i>S. Yovokome</i>      | R    | R        | R    | S        | S    | S   |
| 15-16 | <i>S. Schwazengrund</i> | R    | R        | R    | S        | S    | S   |
| 15-23 | <i>S. Schwazengrund</i> | R    | R        | R    | S        | S    | S   |
| 17-26 | <i>S. Manhattan</i>     | R    | R        | R    | S        | R    | R   |

S : 感受性 R : 耐性

表4 確認試験結果

| 検体番号  | 血清型                 | 薬剤 (阻止円径 : mm) |         |     |         |
|-------|---------------------|----------------|---------|-----|---------|
|       |                     | CAZ            | CAZ/CVA | CTX | CTX/CVA |
| 14-5  | <i>S. Minnesota</i> | 11             | 12      | 16  | 17      |
| 17-26 | <i>S. Manhattan</i> | 16             | 30      | 18  | 34      |

(3) ESBL 遺伝子型別試験

検体番号 17-26 の遺伝子型別は TEM 型であった。  
シーケンス解析により塩基配列を調査した結果、  
TEM-52 型遺伝子と判明した。国立感染症研究所実

施によるその他の検体の解析結果と合わせて、血清型と薬剤耐性関連遺伝子についてまとめたものを表 5 に示す。

表5 血清型と薬剤耐性関連遺伝子

| 分類  | 薬剤耐性関連遺伝子 | 血清型                      | 菌株数 |
|---|-----------|--------------------------|-----|
| ClassA $\beta$ ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）産生菌           | blaTEM-1B | <i>S. Schwarzengrund</i> | 5   |
|   |           | <i>S. Manhattan</i>      | 1   |
|   |           | <i>S. Yovokome</i>       | 1   |
| プラスミド性 AmpC 型 $\beta$ ラクタマーゼ（セファロスポリナーゼ）産生菌 | blaCMY-2  | <i>S. Minnesota</i>      | 1   |
| 基質特異性拡張型 $\beta$ ラクタマーゼ（ESBL）産生菌            | blaTEM-52 | <i>S. Manhattan</i>      | 1   |

## 5 まとめ及び考察

家畜における薬剤耐性菌の出現は、家畜への抗菌薬の過剰使用が一因と言われており、鶏肉からの薬剤耐性菌の検出報告が散見される。また、近年、医療現場で広く使用されている第三代セファロスポリン系薬剤に耐性を示す ESBL 産生菌がヒト及び食肉から分離されているとの報告が増加しており、公衆衛生上問題となっている<sup>5)</sup>。

今回の調査研究では、市販の鶏肉から分離されたサルモネラ 96 株の血清型及び薬剤耐性状況と ESBL を含む薬剤耐性関連遺伝子の検出状況について調査した。

今回の調査に用いたサルモネラの最も多い血清型は *S. Schwarzengrund* で、6 割以上を占めていた。VITEK2 による薬剤感受性スクリーニングでは、テトラサイクリン系薬剤の MINO の耐性株が約 3 割、部分耐性の株が約 5 割検出され、MINO への耐性化傾向が強いと思われ、同薬剤の家畜への使用率が高いことが推察された。また、ESBL 産生菌の治療に使用されるカルバペネム系薬剤やサルモネラ症の第一選択薬であるフルオロキノロン系薬剤に対し耐性を示す株は検出されなかった。今回、 $\beta$  ラクタム系薬剤の耐性株は 9 株検出され、主にペニシリン系薬剤に耐性を示す ClassA  $\beta$  ラクタマーゼ産生菌が 7 株、主にセファロスポリン系薬剤に耐性を示すプラスミド性 AmpC 型  $\beta$  ラクタマーゼ産生菌が 1 株、ESBL 産生菌が 1 株であった。耐性株の血清型は *S. Schwarzengrund* (5 株)、*S. Manhattan* (2 株)、*S. Minnesota* (1 株)、*S. Yovokome* (1 株) の 4 種類であった。

検出された ESBL 産生菌は 2017 年度の分離株で、血清型は *S. Manhattan* であった。ESBL 産生菌の遺伝子型は日本国内では CTX-M 型が主流で、TEM 型の分離報告は少ないと言われていたが、検出された株は TEM-52 であり、南日本のプロイラーから分離されたサルモネラで検出例がある<sup>6)</sup>。また、プラスミド性 AmpC 型  $\beta$  ラクタマーゼ産生菌は 2014 年

度の分離株で、血清型は *S. Minnesota* であった。検出された CMY-2 は国内のプロイラーなどから分離されたサルモネラで多くの検出例がある<sup>6, 7)</sup>。プラスミド性 AmpC 型  $\beta$  ラクタマーゼは ESBL 同様に第三代セファロスポリン系薬剤に耐性を示すこと、そして、プラスミドを介して薬剤耐性遺伝子が他菌種にも伝播する可能性があるため、汚染の拡大が懸念されている。

薬剤耐性菌は、ヒトだけでなく畜水産物等の食品からも検出されている。今回鶏肉から検出されたような食品由来の薬剤耐性菌が食事を介してヒトに取り込まれ、抗菌薬の効果が減弱する等といったヒトの健康への影響は、現在明確に解明されている訳ではない。しかしながら、薬剤耐性サルモネラ菌も通常のサルモネラ菌と同様に、十分な加熱で死滅させることができる。鶏肉の生食は、細菌性食中毒の中で発生件数の最も多いカンピロバクター食中毒のリスクがあるだけでなく、薬剤耐性菌を取り込むリスクもあるということを知っておく必要があり、鶏肉の生食は行わず十分に加熱して食べるということの注意喚起が必要であると思われる。

## 6 文献

- 1) 石井良和：家畜および食肉から分離される ESBL 産生菌 THE CHEMICAL TIMES 2010 No.2 (通巻 216 号)
- 2) 加藤玲, 松下秀, 下島優香子 他：国内産鶏肉から検出されたサルモネラ属菌の血清型と薬剤耐性 (1992～2012 年) 感染症学雑誌 第 89 巻 第 1 号
- 3) 松本裕子, 泉谷秀昌, 山田三紀子 他：横浜市内の小売店より取去した国産鶏肉から分離された *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar *Infantis* における薬剤感受性の状況および基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌の検出状況について 日本食品微生物

学会雑誌 Jpn. J. Food Microbiol., 27(1), 27-33, 2010

4) 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020

5) 石原ともえ, 古川一郎, 黒木俊郎 他: 市販鶏肉および市中病院外来患者における ESBL 産生菌の検出状況  
日本食品微生物学会雑誌 Jpn. J. Food Microbiol., 28(2), 123-127, 2011

6) 中馬 猛久: 抗菌剤耐性サルモネラの感染様式と耐性因子伝達機構の解明 科学研究費助成事業 研究成果報告書

7) 食品安全委員会 肥料・飼料等/微生物・ウイルス合同専門調査会 (薬剤耐性菌に関するワーキンググループ): 牛及び豚に使用するセフトフル製剤に係る薬剤耐性菌に関する食品健康評価

## 7 謝辞

今回、遺伝子解析にご協力いただきました国立感染症研究所感染症疫学センター 村上光一先生, 病原体ゲノム解析研究センター 黒田誠先生に深謝いたします。

## 家庭用品（繊維製品）中のアゾ化合物由来特定芳香族アミン類の試験法に関する検討

Examination on testing method of azo compounds origin the certain aromatic amines in textiles

藪下 小雪\*, 瀬村 好絵\*\*, 富田 陽子\*, 伴埜 行則\*\*\*

Koyuki YABUSHITA, Yoshie SEMURA, Yoko TOMITA, Yukinori BANNO

## Abstract

Regulation on azo compounds (24 kinds of carcinogenic aromatic amines which are easily released) began on April 1, 2016 in "Law concerning the regulation of household articles containing harmful substances".

Therefore, in the GC / MS measurement adopted by the official analysis method, two different capillary columns were examined. Partial components of PAA became unseparated peaks, but since the m / z of the monitor ion was different, it was possible to separate and quantify. However, the isomers (ortho-form and para form) of dimethylaniline could not be separated and quantitated because the m / z of the monitor ion was also in common.

Also, as a result of investigating the measurement conditions of HPLC adopted for the confirmation test of the official method, it was possible to separate all PAAs.

## Key Words

azo compound/アゾ化合物, primary aromatic amines(PAAs)/特定芳香族アミン類, GC/MS, HPLC/PDA

## 1 はじめに

アゾ染料は、世界で広く用いられている染料であるが、一部のアゾ染料はアゾ基の開裂により、発がん性を有する特定芳香族アミン（以下「特定 PAAs」という。）を生成することが知られている。

そのため、平成 27 年 4 月に有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（以下「家庭用品規制法」という。）第 2 条第 2 項の物質を定める政令の一部改正<sup>1)</sup>により、有害物質として新たにアゾ化合物（化学的変化により容易に特定 PAAs を生成するもの。）（24 物質、表 6 参照）が指定され、平成 28 年 4 月 1 日から規制が始まった。

試験法については、家庭用品規制法施行規則の一部を改正する省令（平成 27 年厚生労働省令第 124 号）<sup>2)</sup>により示された。本試験法では、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）による定量分析を行い、特定 PAAs が基準値（30  $\mu\text{g/g}$ ）を超えて検出された場合には、確認試験として

GC/MS による測定で得られたマススペクトルの確認と高速液体クロマトグラフ（HPLC）による定性分析を行う。

今回、本試験法に従い繊維製品中の特定 PAAs 試験法に関する検討を行ったので、その結果を報告する。

## 2 実験方法

## (1) 試料

平成 28 年度に家庭用品試買検査の検体として試買した 2 製品を試料とした。

試料 A：乳幼児用中衣（綿 100%，赤色単色）

試料 B：寝衣（ポリエステル 65%，綿 35%，青色単色）

## (2) 測定対象物質

家庭用品規制法で規制されているアゾ化合物由来の特定 PAAs24 物質及びパラ-フェニルアゾアニリンの還元分解により生成するアニリン並びに 1,4-フェニレンジアミンの計 26 物質とした（表 3）。

\* 生活衛生部門 \*\*\* 管理課

\*\* 医療衛生センター

## (3) 試薬等

## ア 標準品

特定 PAAs 混合標準原液：SPEX 社製 特定 PAAs 混合標準原液（26 種類）（各 1,000mg/L メタノール溶液）

その他個別標準品：AccuStandard 社製の特定 PAAs 類分析用標準液セットのうち必要なもの（各 100mg/L アセトニトリル溶液）

## イ 内部標準物質

アントラセン-d10 標準品：関東化学（株）製

ナフタレン-d8 標準品：和光純薬工業（株）製

## ウ その他の試薬等

ケイソウ土カラム：Agilent 社製 Chem Elut20ml

その他の試薬：特級又は残留農薬試験用

## (4) 測定機器等

GC/MS：(MS:サーモフィッシャーサイエンティフィック社製 PolarisQ GC:同社製 TraceGC Ultra)

HPLC/PDA：(株)島津製作所製 LC10

減圧濃縮装置：ジーエルサイエンス社製ソルキャッチ・ミニ SC907, 東京理化社製 EYELA N-1300

## (5) GC/MS による分析

## ア 標準溶液の調製

アントラセン-d10 標準品, ナフタレン-d8 標準品をそれぞれメタノール, アセトンに溶解し, 1,000  $\mu$ g/ml とした。これらにメチル-tert-ブチルエーテル（以下「MTBE」という。）を加えて希釈し, 各 200  $\mu$ g/ml とした。これらを等量混合したのち MTBE で希釈し各 10  $\mu$ g/ml としたものを内部標準溶液とした。

特定 PAAs 混合標準原液に MTBE を加えて各 2  $\mu$ g/ml としたものを適宜希釈し, その 1ml を正確に採り, 内部標準溶液 100  $\mu$ l を正確に加えたものを標準溶液とした。

## イ 検量線の作成

0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0  $\mu$ g/ml に調整した標準溶液に内部標準溶液を加えたものを測定, 得られた測定対象物質と内部標準物質のピーク面積比から検量線を作成し, その決定係数を確認した。

## ウ 試料溶液の調製

パラ-フェニルアゾアニリン以外の特定 PAAs の分析は, 試料を細切りにしたのち 1.0 g を採取し, 分散染料が使用

されていない試料 A についてはクロロベンゼン抽出を行わずに施行規則に示される試験法（以下「試験法」という。）に従い前処理を行い, MTBE で正確に 20ml に定容し試験溶液とした。分散染料が使用されている可能性のある試料 B については, 試験法の記載では「還流冷却器内に, 沸騰した抽出液に直接触れないよう, かつ, 冷却凝縮した抽出液が十分に試料に浸潤するように, 試料を宙ぶりに設置する」とあるが, 実際に試みると技術的に困難であった。そこで, 抽出容器（100ml ナフラスコ）内に設置可能なサイズの足付きのクロロベンゼン抽出専用かご（図 1）を作成し, クロロベンゼン抽出を行った。その後は試料 A と同様の前処理を行った。それぞれの試験溶液 1ml を正確に採り, 内部標準溶液 100  $\mu$ l を正確に加えたものを GC/MS 分析に供した。



図 1 クロロベンゼン抽出専用かご

パラ-フェニルアゾアニリンの分析は, 試験法に従い, 試料 B のみクロロベンゼン抽出を行ったのち, 試料 A 及び B について別途前処理を行った。試験溶液 250  $\mu$ l を正確に採り, MTBE750  $\mu$ l 及び内部標準溶液 100  $\mu$ l を正確に加えたものを GC/MS 分析に供した。

上記の試験を実施するにあたり, 各操作間は中断せず連続して操作するよう留意した。また, 減圧濃縮工程においてエバポレーターの減圧条件は, (独)大阪健康安全基盤研究所の小泉氏らの検討結果<sup>3)</sup>によると, 水浴を 40°C, 310~360mbar で濃縮した場合, 良好な回収率が得られているため, 同様の条件とした。試験法の概略を図 2 に示す。

| 測定対象物質   |  |
|--|--|
| パラフェニルアゾアニリン以外   | パラフェニルアゾアニリン   |
| 試料1.0g<br>+クロロベンゼン25ml<br>クロロベンゼン抽出(分散染料使用時のみ)<br>+メタノール2ml<br>+クエン酸緩衝液15ml<br>加温(70℃)<br>+亜ジチオン酸ナトリウム水溶液3ml<br>還元<br>加温(70℃)<br>冷却<br>+10%水酸化ナトリウム水溶液0.2ml<br>珪藻土カラムで精製<br>+MTBE10ml<br>+MTBE10ml<br>+MTBE60ml<br>溶出<br>濃縮(エバポレータ)<br>定容<br>GC/MS分析 又は HPLC/PDA分析 | 試料1.0g<br>+クロロベンゼン25ml<br>クロロベンゼン抽出(分散染料使用時のみ)<br>+メタノール1ml(3回繰り返す)<br>+2%水酸化ナトリウム水溶液9ml<br>+亜ジチオン酸ナトリウム水溶液1ml<br>加温(40℃)<br>冷却<br>分離及び濃縮<br>+MTBE5ml<br>+塩化ナトリウム7g<br>水平振とう(45分)<br>遠心分離<br>GC/MS分析 又は HPLC/PDA分析 |

図 2 試験法概略

エ GC/MS 測定条件

GC/MS 測定条件は、試験法に基づき、以下の表 1 の通り中極性のカラム(カラム条件①)と微極性のカラム(カラム条件②)の2種類のカラムについて検討した。

表 1 GC/MS 測定条件

|            |  |
|------------|--|
| カラム条件①     | Agilent社製DB-35MS<br>35%フェニルメチルボキシシロキサン<br>内径0.250mm×長さ30m×膜厚0.25μm       |
| カラム条件②     | 関東化学社製 ENV-5MS<br>5%フェニルボキシシロキサン<br>内径0.250mm×長さ30m×膜厚0.25μm             |
| 注入口温度      | PTV: 50℃(0.1min) - (14.5℃/sec) - 250℃(5min)                              |
| 注入量        | 1μL  |
| 注入方法       | スプリットレス  |
| 昇温条件       | 55℃(5min) - 15℃/min - 230℃ - 5℃/min - 290℃ - 20℃/min - 310℃ - 310℃(5min) |
| キャリアガス     | 高純度ヘリウム  |
| 流速         | 1.0ml/min  |
| インターフェース温度 | 300℃   |
| イオン源温度     | 230℃   |
| イオン化法      | EI   |

オ 添加回収試験

標準溶液を添加した試料を 2(5)ウ試料溶液の調製と同様の前処理を行った。

ただし、前処理の還元工程により No. 21 2-メチル-4-(2-トリルアゾ)アニリンは No. 3 オルト-トルイジンに、No. 22 2-メチル-5-ニトロアニリンは No. 9 2,4-ジアミノトルエンに、No. 19 パラフェニルアゾアニリンは、No. 25 アニリン又は No. 26 1,4-フェニレンジアミンに分解されるため、この7物質は添加回収試験の測定対象物質から除いた。

(6) HPLC/PDA による分析

ア 標準溶液の調製

特定 PAA 混合標準原液に MTBE を加えて各 30 μg/ml としたものを正確に 0.5ml 採り、窒素ガス気流下で MTBE を除去後メタノールで 0.5ml に定容し、30 μg/ml としたものを標準溶液とした。

イ 試料溶液の調製

パラフェニルアゾアニリン以外の特定 PAA の分析は、2(5)ウで作成した試験溶液 10ml を採り、窒素ガス気流下で MTBE を除去後メタノールで 0.5ml に定容し、HPLC/PDA 分析に供した。

パラフェニルアゾアニリンの分析は、2(5)ウで作成した試験溶液 1ml を採り、窒素ガス気流下で MTBE を除去後メタノールで 0.5ml に定容し、HPLC/PDA 分析に供した。

ウ HPLC/PDA 測定条件

試験法に基づき、表 2 のとおりとした。

表 2 HPLC-PDA 測定条件

|           |   |
|-----------|---|
| カラム       | Agilent Technologies社製<br>Zorbax Eclipse XDB-C18<br>内径4.6mm×長さ150mm×粒子径3.5μm      |
| カラム温度     | 32℃   |
| グラデーション条件 | 10%B(0min) - (22.5min) - 55%B(0min) - (5min) - 95%B(1min) - (0.5min) - 10%B(6min) |
| 流速        | 0.6ml/min (27.5min) - (1min) - 2ml/min (0min) - (2.5min) - 0.6ml/min (4min)       |
| 注入量       | 5μl   |
| 測定波長      | 240, 280, 305, 380nm  |

3 結果及び考察

(1) GC/MS による分析の結果

ア MS 条件の検討

電子イオン化 (EI) 法により各測定対象物質を SCAN モード (m/z60~300) で測定し、得られたマススペクトルを基に試験法を参考に定量イオン及び確認イオンを決定した(表 5)。

イ カラムの検討

各測定対象物質及び内部標準物質の保持時間及び MS 条件を表 5、クロマトグラムを図 3 に示す。

各測定対象物質について作成した検量線の決定係数は、カラム①で内部標準物質をアントラセン-d10 としたとき、測定対象物質 26 物質中 0.99 以上が 21 物質、0.999 以上が 3 物質であった。カラム②もほぼ同様の結果であった。一部の特定 PAA の決定係数が 0.99 未満であったため、い

くつかの測定条件を変更し更に検討を行った。その結果、注入量を1μlから2μlに変更し、併せて注入方法をスプリットレスからスプリット（スプリット比 10:1）に変更したところ、表 3 に示すとおりカラム①で測定対象物質 26 物質中 0.99 以上が 12 物質、0.999 以上が 14 物質と大幅に直線性が向上した。

表 3 注入方法の変更による決定係数の向上

| No.                  | Compound name                             | 注入方法    |    |              |    |
|----------------------|---|---------|----|--------------|----|
|                      |   | スプリットレス |    | スプリット (10:1) |    |
|                      |   | 決定係数    | 判定 | 決定係数         | 判定 |
| 1                    | 4-Aminobiphenyl                           | 0.9982  | 良  | 0.9993       | 優  |
| 2                    | o-Anisidine                               | 0.9964  | 良  | 0.9995       | 優  |
| 3                    | o-Toluidine                               | 0.9964  | 良  | 0.9994       | 優  |
| 4                    | 4-Chloro-2-methyl-aniline                 | 0.9983  | 良  | 0.9995       | 優  |
| 5                    | 2,4-Diaminoanisole                        | 0.9926  | 良  | 0.9965       | 良  |
| 6                    | 4,4'-Diaminodiphenylether                 | 0.9957  | 良  | 0.9986       | 良  |
| 7                    | 4,4'-Diaminodiphenylsulfide               | 0.9942  | 良  | 0.9985       | 良  |
| 8                    | 4,4'-Diamino-3,3'-dimethyldiphenylmethane | 0.9992  | 優  | 0.9991       | 優  |
| 9                    | 2,4-Diaminotoluen                         | 0.9933  | 良  | 0.9975       | 良  |
| 10                   | 3,3'-Dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane | 0.9996  | 優  | 0.9969       | 良  |
| 11                   | 3,3'-Dichlorobenzidine                    | 0.9781  | 可  | 0.9985       | 良  |
| 12                   | 2,4-Dimethylaniline                       | 0.9965  | 良  | 0.9996       | 優  |
| 13                   | 2,6-Dimethylaniline                       | 0.9971  | 良  | 0.9990       | 優  |
| 14                   | 3,3'-Dimethylbenzidine                    | 0.9974  | 良  | 0.9955       | 良  |
| 15                   | 3,3'-Dimethoxybenzidine                   | 0.9929  | 良  | 0.9930       | 良  |
| 16                   | 2,4,5-Trimethylaniline                    | 0.9987  | 良  | 0.9993       | 優  |
| 17                   | 2-Naphthylamine                           | 0.9995  | 優  | 0.9995       | 優  |
| 18                   | p-Chloroaniline                           | 0.9936  | 良  | 0.9990       | 優  |
| 19                   | p-(Phenylazo)aniline                      | 0.9959  | 良  | 0.9971       | 良  |
| 20                   | Benzidine                                 | 0.9896  | 可  | 0.9942       | 良  |
| 21                   | 2-Methyl-4-(2-triazo)aniline              | 0.9923  | 良  | 0.9920       | 良  |
| 22                   | 2-Methyl-5-nitroaniline                   | 0.9949  | 良  | 0.9994       | 優  |
| 23                   | 4,4'-Methylenedianiline                   | 0.9906  | 良  | 0.9949       | 良  |
| 24                   | 2-Methoxy-5-methylaniline                 | 0.9988  | 良  | 0.9992       | 優  |
| 25                   | Aniline                                   | 0.9952  | 良  | 0.9994       | 優  |
| 26                   | 1,4-Phenylenediamine                      | 0.9933  | 良  | 0.9995       | 優  |
| I.S.1 Anthracene_d10 |   |         |    |              |    |
|                      | ~0.9"以上                                   | 可       | 2  |              | 0  |
|                      | ~0.99"以上                                  | 良       | 21 |              | 12 |
|                      | ~0.999"以上                                 | 優       | 3  |              | 14 |

このため、本検討以降は注入量を2μl、注入方法をスプリット（スプリット比 10:1）とすることとした。

また、各測定対象物質のピークの分離については、図 3 のとおりであった。

ピークが重なる物質のモニターイオンについて重複する m/z の相対強度一覧を表 4 に示す。カラム①測定時には No. 4 4-クロロ-2-メチルアニリン及び No. 26 1,4-フェニレンジアミン、No. 10 3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン及び No. 11 3,3'-ジクロロベンジジンのピークが分離できなかった。これらの物質については、表 4 のとおりモニターイオンの相対強度が異なるため、個々に定量は可能と考えられる。カラム②測定時には No. 12 2,4-ジメチルアニリン及び No. 13 2,6-ジメチル

アニリン、No. 20 ベンジジン及び No. 23 4,4'-メチレンジアニン、No. 10 3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン、No. 11 3,3'-ジクロロベンジジン並びに No. 15 3,3'-ジメトキシベンジジンのピークが分離できなかった。これらの物質のうち、No. 12 及び No. 13 については表 4 のとおりモニターイオンの相対強度に相似があるため、個々に定量することは不可能と考えられる。しかし、No. 10 及び No. 11、No. 15、No. 20 及び No. 23 については表 4 のとおりモニターイオンの相対強度が異なるため、個々に定量は可能と考えられる。カラムによって一部分離できないピークが異なるため、試料によってカラムを使い分けて使用することも有用であると考えられる。

表 4 ピークが重なる物質のモニターイオンについて重複する m/z の相対強度一覧

| ピークNo. | 4     | 26    | 12    | 13    | 10    | 11    | 15    | 20    | 23    |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ①RT    | 13.07 | 13.04 | 11.44 | 11.49 | 26.13 | 26.14 | 26.32 | 21.79 | 21.68 |
| ②RT    | 12.26 | 11.87 | 10.80 | 10.80 | 22.96 | 22.94 | 22.92 | 19.23 | 19.25 |
| m/z    | 106   | 84.1  | 1.1   | 54.4  | 56.5  |       |       |       | 30.3  |
|        | 108   |       | 100   |       |       | 3.3   |       |       |       |
|        | 120   |       |       | 71    | 53.1  |       |       |       |       |
|        | 121   |       |       | 100   | 100   |       |       |       |       |
|        | 141   | 100   |       |       |       | 4.7   |       | 1     |       |
|        | 184   |       |       |       |       |       |       | 1     | 99.9  |
|        | 185   |       |       |       |       |       |       |       | 13.7  |
|        | 195   |       |       |       |       | 29.2  |       |       | 4.5   |
|        | 197   |       |       |       |       | 1.5   |       |       | 59    |
|        | 198   |       |       |       |       |       |       | 1.2   | 100   |
|        | 201   |       |       |       |       | 1.2   |       | 22    |       |
|        | 231   |       |       |       |       | 100   |       |       |       |
|        | 244   |       |       |       |       |       |       | 100   |       |
|        | 252   |       |       |       |       | 1.8   | 100   |       |       |
|        | 254   |       |       |       |       |       | 63.9  |       |       |
|        | 266   |       |       |       |       | 46.4  |       |       |       |

①RT : DB-35MS 0.25mm×30m×0.25 μm

②RT : ENV-5MS 0.25mm×30m×0.25 μm

\* : 各物質の m/z データは国立研究開発法人産業技術総合研究所

およびNISTライブラリーを引用した。

\* : 各ピークNoの物質名は表3参照

ウ 添加回収試験

2(5)オにより添加回収試験を実施した結果、試料 A に添加した測定対象物質はJIS L1940-1<sup>4)</sup>にある標準溶液のみを添加した場合（試料を添加しない場合）の回収率の最低要求基準をほぼ満たすことができた。しかし、試料 B に添加した測定対象物質は、回収率が低く、この基準を満たすことはできなかった。試料 A と試料 B の添加回収試験は同

時並行で行っており、試料の素材により回収率が異なる結果となった。ただし、試行回数が少ないため、今後さらに試行を重ねることが必要である。

加えて、回収率が低い物質について原因を追究するとともに、今回、試験操作中の還元分解により別の特定 PAA に変化するため測定対象外とした物質についても、個別に添加回収試験を実施することが望ましいと考える。

(2) HPLC/PDA による分析の結果

2(6)ウで示した方法により、各測定対象物質を測定し、試験法及び河上らの報告<sup>5)</sup>を参考に各測定対象物質のピー

クを確定した。ただし、確定し難い特定 PAA については単品の標準液により確定した。各測定対象物質の保持時間及び検出波長を表 6 に示す。混合標準液及び試料 A, B を測定した際のクロマトグラムを図 4 に示す。試料を測定した結果、試料 A, B ともにクロマトグラムに妨害ピークが見られたが、特に試料 B については全測定時間帯に妨害ピークが存在した。そのため、妨害ピークが測定対象物質と同じ保持時間であった場合、溶媒の変更やカラムの変更が必要になる場合が想定される。

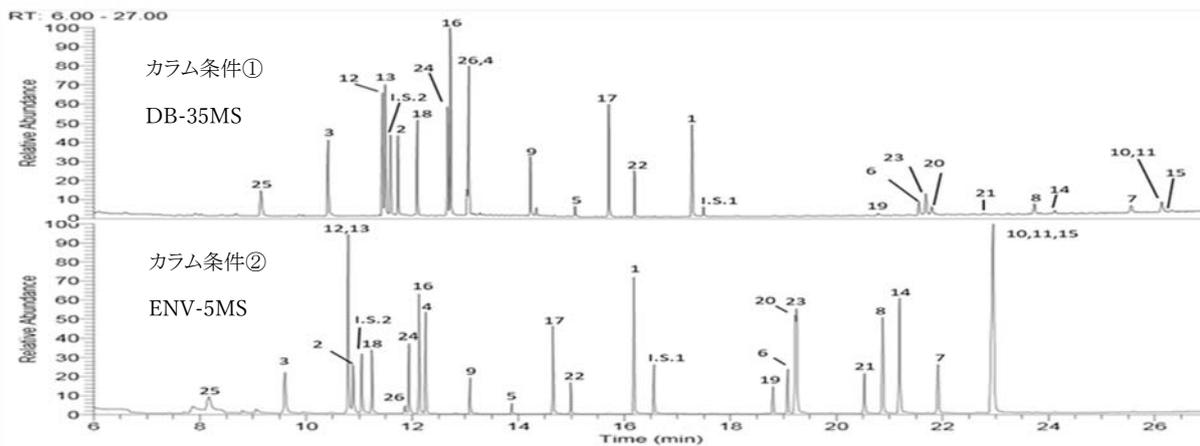


図 3 GC/MS トータルイオンクロマトグラム (内部標準物質添加 2.0 μg/ml 混合標準溶液 (26 種))

表 5 GC/MS 分析パラメータ

| No.     | Compound name                             | CAS No.  | R. T. (min) カラム① | R. T. (min) カラム② | Monitor Ion (m/z) |
|---------|---|----------|------------------|------------------|-------------------|
| 1       | 4-Aminobiphenyl                           | 92-67-1  | 17.28            | 16.18            | 168 169           |
| 2       | o-Anisidine                               | 90-04-0  | 11.73            | 10.89            | 80 108 123        |
| 3       | o-Toluidine                               | 95-53-4  | 10.41            | 9.62             | 106 107           |
| 4       | 4-Chloro-2methyl-aniline                  | 95-69-2  | 13.07            | 12.26            | 106 141           |
| 5       | 2,4-Diaminoanisole                        | 615-05-4 | 15.07            | 13.86            | 95 123 138        |
| 6       | 4,4'-Diaminodiphenylether                 | 101-80-4 | 21.56            | 19.08            | 108 171 200       |
| 7       | 4,4'-Diaminodiphenylsulfide               | 139-65-1 | 25.55            | 21.91            | 184 216           |
| 8       | 4,4'-Diamino-3,3'-dimethyldiphenylmethane | 838-88-0 | 23.73            | 20.87            | 120 211 226       |
| 9       | 2,4-Diaminotoluen                         | 95-80-7  | 14.23            | 13.09            | 121 122           |
| 10      | 3,3'-Dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane | 101-14-4 | 26.13            | 22.96            | 195 231 266       |
| 11      | 3,3'-Dichlorobenzidine                    | 91-94-1  | 26.14            | 22.94            | 252 254           |
| 12      | 2,4-Dimethylaniline                       | 95-68-1  | 11.44            | 10.80            | 106 120 121       |
| 13      | 2,6-Dimethylaniline                       | 87-62-7  | 11.49            | 10.80            | 106 120 121       |
| 14      | 3,3'-Dimethylbenzidine                    | 119-93-7 | 24.12            | 21.19            | 106 212 213       |
| 15      | 3,3'-Dimethoxybenzidine                   | 119-90-4 | 26.32            | 22.92            | 201 244           |
| 16      | 2,4,5-Trimethylaniline                    | 137-17-7 | 12.72            | 12.14            | 120 134 135       |
| 17      | 2-Naphthylamine                           | 91-59-8  | 15.71            | 14.65            | 115 143           |
| 18      | p-Chloroaniline                           | 106-47-8 | 12.10            | 11.25            | 65 127 129        |
| 19      | p-(Phenylazo)aniline                      | 60-09-3  | 20.78            | 18.80            | 92 120 197        |
| 20      | Benzidine                                 | 92-87-5  | 21.79            | 19.23            | 184 185           |
| 21      | 2-Methyl-4-(2-triazo)aniline              | 97-56-3  | 22.76            | 20.52            | 106 134 225       |
| 22      | 2-Methyl-5-nitroaniline                   | 99-55-8  | 16.19            | 14.99            | 77 79 152         |
| 23      | 4,4'-Methylenedianiline                   | 101-77-9 | 21.68            | 19.25            | 106 197 198       |
| 24      | 2-Methoxy-5-methylaniline                 | 120-71-8 | 12.67            | 11.94            | 94 122 137        |
| 25      | Aniline                                   | 62-53-3  | 9.15             | 8.19             | 66 93             |
| 26      | 1,4-Phenylenediamine                      | 106-50-3 | 13.04            | 11.87            | 108               |
| I. S. 1 | Anthracene_d10                            |          | 17.49            | 16.55            | 188               |
| I. S. 2 | Naphthalene_d8                            |          | 11.59            | 11.04            | 136               |

表 6 HPLC/PDA 分析パラメータ

| No. | Compound name                             | CAS No.  | R. T. (min) | Wavelength (nm) |
|-----|---|----------|-------------|-----------------|
| 1   | 4-Aminobiphenyl                           | 92-67-1  | 27.3        | 280             |
| 2   | o-Anisidine                               | 90-04-0  | 13.5        | 240             |
| 3   | o-Toluidine                               | 95-53-4  | 14.7        | 240             |
| 4   | 4-Chloro-2methyl-aniline                  | 95-69-2  | 23.7        | 240             |
| 5   | 2,4-Diaminoanisole                        | 615-05-4 | 4.20        | 240             |
| 6   | 4,4'-Diaminodiphenylether                 | 101-80-4 | 12.3        | 240             |
| 7   | 4,4'-Diaminodiphenylsulfide               | 139-65-1 | 20.3        | 240             |
| 8   | 4,4' Diamino-3,3' dimethyldiphenylmethane | 838-88-0 | 24.9        | 240             |
| 9   | 2,4-Diaminotoluene                        | 95-80-7  | 5.10        | 240             |
| 10  | 3,3'-Dichloro-4,4' diaminodiphenylmethane | 101-14-4 | 28.2        | 240             |
| 11  | 3,3'-Dichlorobenzidine                    | 91-94-1  | 27.9        | 280             |
| 12  | 2,4-Dimethylaniline                       | 95-68-1  | 20.5        | 240             |
| 13  | 2,6-Dimethylaniline                       | 87-62-7  | 20.8        | 240             |
| 14  | 3,3'-Dimethylbenzidine                    | 119-93-7 | 19.6        | 280             |
| 15  | 3,3'-Dimethoxybenzidine                   | 119-90-4 | 19.2        | 280             |
| 16  | 2,4,5-Trimethylaniline                    | 137-17-7 | 25.2        | 240             |
| 17  | 2-Naphthylamine                           | 91-59-8  | 22.2        | 240             |
| 18  | p-Chloroaniline                           | 106-47-8 | 18.2        | 240             |
| 19  | p-(Phenylazo)aniline                      | 60-09-3  | 28.2        | 380             |
| 20  | Benzidine                                 | 92-87-5  | 11.7        | 280             |
| 21  | 2-Methyl-4-(2-triazo)aniline              | 97-56-3  | 28.9        | 240             |
| 22  | 2-Methyl-5-nitroaniline                   | 99-55-8  | 18.6        | 240             |
| 23  | 4,4'-Methylenedianiline                   | 101-77-9 | 17.5        | 240             |
| 24  | 2-Methoxy-5-methylaniline                 | 120-71-8 | 19.8        | 240             |

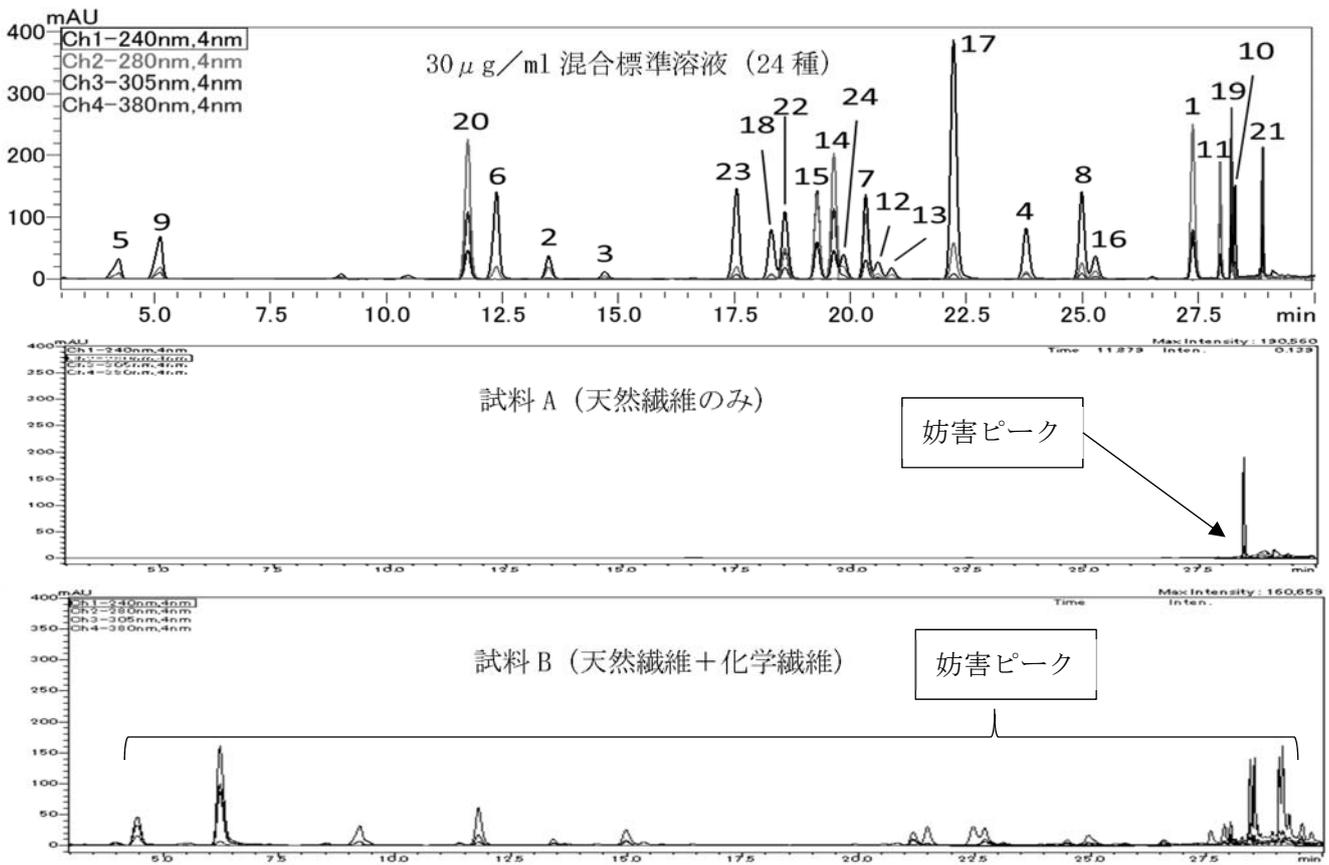


図 4 HPLC/PDA クロマトグラム

#### 4 まとめ

「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」により規制されている有害物質アゾ化合物について、同法施行規則により示された試験法の検討を行った。GC/MSによる定量分析法については2種類のカラムを用いて分析条件を検討したところ、使用するカラムによって混合標準物質の一部のピークの溶出順や分離が異なることが分かった。また、HPLC/PDAによる定性分析では、対象成分が概ね分離した良好なクロマトグラムが得られた。

#### 参考文献

- 1) 平成27年4月8日付け厚生労働省医薬食品局長通知 薬食発0408第1号:有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律第2条第2項の物質を定める政令の一部を改正する政令の制定について
- 2) 平成27年7月9日付け厚生労働省医薬食品局長通知 薬食発0709第1号:有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則の一部を改正する省令の制定について
- 3) 小泉義彦 他:アゾ染料に由来する2種の特定芳香族アミンの分析における回収率の検討, 大阪健康安全基盤研究所研究年報, Ann. Rep. Osaka. Inst. Pub. Health, 1, 85-92 (2017)
- 4) JIS L1940-1:繊維製品—アゾ色素由来の特定芳香族アミンの定量方法—第一部:繊維の抽出及び非抽出による特定アゾ色素の使用の検出
- 5) 河上強志, 伊佐間和郎, 五十嵐良明, 繊維および革製品中のアゾ染料由来の特定芳香族アミン類の高速液体クロマトグラフィーを用いた確認試験に関する検討, Bull. Natl Inst. Health Sci., 132, 57-66 (2014)

## ダイズ加工食品の遺伝子組換えダイズ混入状況について

### Detection Rate of Genetically Modified Soybean in Soybean Processed Food

西中 麻里子\*, 瀬村 好絵\*\*, 富田 陽子\*

Mariko NISHINAKA, Yoshie SEMURA, Yoko TOMITA

安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査及び判定方法は消費者庁の通知において定められているが、平成28年11月の通知改正に伴い、ダイズ加工食品の検査方法は定量検査から定性検査に改正された。京都市内で製造又は販売されていたダイズ加工食品の遺伝子組換えダイズ混入状況において、定量検査及び定性検査によるそれぞれの測定結果を比較したところ、定量検査では遺伝子組換えダイズの混入率が、改正前の許容範囲である5%を超えたものはなかったが、定性検査では遺伝子組換えダイズが陽性となったものがあった。また、食品表示について確認したところ、原料ダイズの産地表示が国産のみ使用となっている検体において、定量検査の結果では遺伝子組換えダイズの混入が認められなかったものの、定性検査の結果、遺伝子組換えダイズが陽性となった検体があった。

#### キーワード

genetically modified soybean/遺伝子組換えダイズ, soybean processed food/ダイズ加工食品, quantitative polymerase chain reaction/定量PCR, qualitative polymerase chain reaction/定性PCR

#### 1 目的

京都市では伝統食として豆腐やゆばなどをはじめとしたダイズ加工食品が市民や観光客に広く親しまれている。しかし、日本では原料であるダイズ穀粒の自給率は低く、その過半数を輸入に頼っている。海外では広く遺伝子組換えダイズ（以下「GMダイズ」という）が栽培されているため、流通及び製造過程でGMダイズの意図せざる混入が起こる可能性がある。

安全性審査済みの遺伝子組換え食品は、その検査方法が平成27年3月30日付け消食表第139号消費者庁次長通知（以下「旧通知法」という）により定められていたが、平成28年11月17日付け消食表第706号消費者庁次長通知（以下「新通知法」という）により検査方法及び判定方法の改正がなされた。<sup>1)</sup>ダイズ加工食品は、旧通知法では定量試験においてGMダイズの混入率が5%以下であれば許容範囲内であるとされていたが、新通知法では検査方法が定性試験に改正されたことから、混入率ではなく混入の有

無による判定が求められることとなった。そこで、京都市内で製造又は販売されているダイズ加工食品について、旧通知法及び新通知法を用いてGMダイズの混入状況を調べた。また、その結果を用いて、遺伝子組換え表示（表1）<sup>2)</sup>及び原料ダイズの産地表示について確認したので報告する。

表1 遺伝子組換え食品の表示

| 食品の種類  | 表示の義務               |
|--|---------------------|
|  | 表示例                 |
| 分別生産流通管理が行われた遺伝子組換え農産物を原材料とする食品                          | 表示義務あり              |
|  | 大豆（遺伝子組換え）          |
| 遺伝子組換え農産物と非遺伝子組換え農産物が不分別の農産物を原材料とする食品                    | 表示義務あり              |
|  | 大豆（遺伝子組換え不分別）       |
| 分別生産流通管理が行われた非遺伝子組換え農産物を原材料とする食品                         | 表示義務なし<br>（任意表示が可能） |
|  | 大豆（遺伝子組換えでない）       |
| 加工後に組み換えられたDNA及びこれによって生じたたん白質が残存しない（とされる）加工食品（大豆油、しょうゆ等） | 表示義務なし              |
|  | ————                |

\*生活衛生部門

\*\*医療衛生センター

## 2 方法

### (1) 試料

京都市内で平成26年4月から平成29年7月までに製造又は販売されていた、豆腐28検体、油揚げ7検体、豆乳4検体、ゆば2検体、きな粉2検体及びおから1検体の計44検体を試料とした。

### (2) 試料の調整

豆腐及び油揚げ、ゆば、おからは適量の水を加え、粉碎機（グラインドミックス GM200（ヴァーダー・サイエンティフィック株式会社）又はダンシングアジテーターII（有限会社カワジリマシナリー））を用いて粉碎し、きな粉及び豆乳はそのまま DNA 抽出に供した。

### (3) DNA の抽出及び精製

試料からの DNA 抽出は Genomic-Tip 20/G (QIAGEN) を使用し、旧通知法又は新通知法に従って DNA の抽出及び精製を行った。（図1）

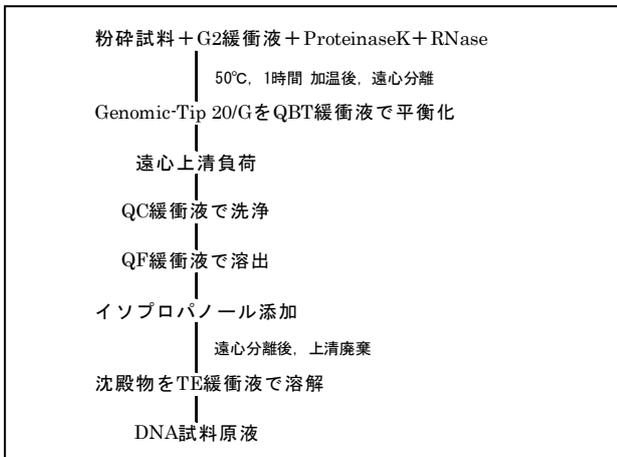


図1 DNA抽出法の概略（旧通知法及び新通知法）

### (4) 抽出 DNA の評価

(3) DNA の抽出及び精製で抽出した DNA 試料原液を TE 緩衝液で適宜希釈し、分光光度計（SHIMADZU UV-1600 株式会社 島津製作所）を用いて、吸光度を測定し、DNA 試料の濃度の算出及び純度の確認を行った。

### (5) 定量 PCR 及び定性 PCR

抽出した DNA 溶液をリアルタイム PCR 装置（ABI PRISM<sup>TM</sup> 7900HT (Thermo Fisher Scientific)）を用い、旧通知法又は新通知法に従って、それぞれ定量試験又は定性試験を行った。

### (6) 表示の確認

試料としたダイズ加工食品の遺伝子組換え表示について確認した。同時に、原料ダイズの遺伝子組換えに関して表示されている食品の GM ダイズ混入実態と原料ダイズの産地表示についても比較を行った。

## 3 結果

今回の検討で用いたダイズ加工食品の表示は表3のとおりである。今回の検討で使用した全ての試料において食品表示法に基づく遺伝子組換え混入又は不分別の表示はなく、遺伝子組換えでない旨の任意表示が44検体中38検体あった。次に、定量試験（旧通知法）及び定性試験（新通知法）の検査結果を表3に示す。定量試験においては、旧通知法に従って、JAS 分析試験ハンドブック<sup>3)</sup>を参考に混入率の定量下限値を0.1%としたところ、豆腐1検体においてRRSの混入率が0.4%となった他はRRS、LLS及びRRS2のすべての項目で混入率0.1%未満となり、今回検討に供した試料44検体で混入率5%を超えるものはなかった。一方、定性試験においては、P35S及びRRS2ともに44検体中32検体が陽性となった。原料ダイズが国産の表記であった豆腐3検体が遺伝子組換えダイズ陽性となり、その内訳は、2検体がP35S及びRRS2陽性、1検体がRRS2陽性となる結果が得られた。国産ダイズ使用表記のないダイズ加工食品でP35S及びRRS2ともに陰性となったのは、きな粉1検体のみであった。

## 4 考察

定量試験の結果では全ての試料でGMダイズ混入率は5%以下であったが、定性試験の結果では国産ダイズ使用表記のないダイズ加工食品31検体中、P35Sは30検体、RRS2は29検体がGMダイズ陽性となった。原料ダイズに

国産との表記がなく、定性試験で陰性となったきな粉は JAS 規格認証の有機加工食品の表示がされていた。有機加工食品は原材料に遺伝子組換え技術を使用しないことが定められているため<sup>4)</sup>、定性試験においても陰性となったと考えられる。一方で国産ダイズ使用表記のある豆腐が遺伝子組換えダイズ陽性となったが、日本国内では一般に GM ダイズの栽培は行われていないため、原料ダイズの流通過程又は製造工程のいずれかで GM ダイズの混入が起きた可能性が考えられる。

京都市では平成 17 年度から平成 28 年度まで、ダイズ加工食品を収去し、遺伝子組換え検査を毎年行ってきた。旧通知法ではダイズ加工食品中の GM ダイズ混入率が 5%を超えた場合には分別生産流通管理がされていなかったか、もしくは適切に行われなかった可能性があることを示すとしていたが、この期間で許容範囲を超える検体はなかった。

今回の検討結果から、ダイズ加工食品中の GM ダイズにおいて、旧通知法の定量検査で混入率 5%を超えると判定されていた検体の数と比べて、新通知法の定性検査で GM ダイズ陽性と判定される検体の数が増えると予想される。「遺伝子組換えでない」との表示があるダイズ加工品の定性検査の結果が GM ダイズ陽性であったとしても、ダイズ穀粒については新通知法においても GM ダイズ混入率が 5%以下であれば許容範囲内であるため、表示が適切であるかを判断するためには、原料ダイズの分別生産流通管理が適切に行われていたかの確認が必要であると思われる。また、使用している原料ダイズに国産表示のあった検体が定性検査の結果、GM ダイズ陽性となったことから、ダイズ加工食品の遺伝子組換え検査と共に、製造現場における原料ダイズの適切な使用管理について監視指導を行うことが重要であると考えられる。食の安心安全を守るため、検査体制と現場における監視体制の連携を強化し、さまざまな事例に対して柔軟に対応できるよう、検査体制をさらに充実させていきたい。

本報告は、平成 29 年 11 月 21 日～22 日に奈良県で開催された第 54 回全国衛生化学技術協議会年會にて示説発表

したものを加筆修正したものである。

## 5 参考文献

- 1) 「食品表示基準について」の一部改正について（平成 28 年 11 月 17 日付 消食表第 706 号消費者次長通知）
- 2) 食品表示に関する共通 Q&A（第 3 集：遺伝子組換え食品に関する表示について）（消費者庁ホームページ）
- 3) JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 第 3 版（平成 24 年 9 月 24 日 独立行政法人 農林水産消費安全センター）
- 4) 有機農産物及び有機加工食品の JAS 規格の Q&A（平成 28 年 7 月 農林水産省食料産業局食品製造課）

表2 ダイズ加工食品の遺伝子組換え表示及び原料ダイズの産地表示について

| 品目  | 原料ダイズに関する表示 |    | 遺伝子組換えに関する表示なし |    | 遺伝子組換えでない旨の任意表示 |    |
|-----|-------------|----|----------------|----|-----------------|----|
|     | 海外産又は産地不明   | 国産 | 海外産又は産地不明      | 国産 | 海外産又は産地不明       | 国産 |
| 豆腐  | 0           | 0  | 5              | 0  | 13              | 10 |
| 油揚げ | 0           | 0  | 0              | 0  | 7               | 0  |
| 豆乳  | 0           | 0  | 1              | 0  | 3               | 0  |
| ゆば  | 0           | 0  | 0              | 0  | 0               | 2  |
| きな粉 | 0           | 0  | 0              | 0  | 1               | 1  |
| おから | 0           | 0  | 0              | 0  | 1               | 0  |
| 合計  | 0           | 0  | 6              | 0  | 25              | 13 |

表3 ダイズ加工食品の遺伝子組換えダイズ混入状況

| 品目  | 国産ダイズ<br>使用表記 | 定量試験（旧通知法） |      |        |      | 定性試験（新通知法） |    |      |    |
|-----|---------------|------------|------|--------|------|------------|----|------|----|
|     |               | RRS及びLLS   |      | RRS2   |      | P35S       |    | RRS2 |    |
|     |               | 5%を超える     | 5%以下 | 5%を超える | 5%以下 | 陽性         | 陰性 | 陽性   | 陰性 |
| 豆腐  | あり            | 0          | 10   | 0      | 10   | 2          | 8  | 3    | 7  |
|     | なし            | 0          | 18*  | 0      | 18   | 18         | 0  | 18   | 0  |
| 油揚げ | あり            | 0          | 0    | 0      | 0    | 0          | 0  | 0    | 0  |
|     | なし            | 0          | 7    | 0      | 7    | 7          | 0  | 7    | 0  |
| 豆乳  | あり            | 0          | 0    | 0      | 0    | 0          | 0  | 0    | 0  |
|     | なし            | 0          | 4    | 0      | 4    | 4          | 0  | 3    | 1  |
| ゆば  | あり            | 0          | 2    | 0      | 2    | 0          | 2  | 0    | 2  |
|     | なし            | 0          | 0    | 0      | 0    | 0          | 0  | 0    | 0  |
| きな粉 | あり            | 0          | 1    | 0      | 1    | 0          | 1  | 0    | 1  |
|     | なし            | 0          | 1    | 0      | 1    | 0          | 1  | 0    | 1  |
| おから | あり            | 0          | 0    | 0      | 0    | 0          | 0  | 0    | 0  |
|     | なし            | 0          | 1    | 0      | 1    | 1          | 0  | 1    | 0  |
| 合計  | —             | 0          | 44   | 0      | 44   | 32         | 12 | 32   | 12 |

\*：18検体中、1検体が検出下限値の0.1%以上検出

## イオンクロマトグラフ-ポストカラム法による大気粉じん中の六価クロム化合物の測定条件の検討

Analytical method for hexavalent chromium compound in atmospheric dust by ion chromatography with post column derivatization.

伴 創一郎

Soichiro BAN

## Abstract

We examined the method for the determination of hexavalent chromium compound in atmospheric dust by ion chromatography with post-column derivatization, which was released by Ministry of the Environment of Japan in March 2017.

No.5C 47mm diameter cellulose filter was washed with (1+9) HNO<sub>3</sub>+(2+98)HF, then it was washed with ultra pure water. The filter was subsequently treated with 1.2M NaHCO<sub>3</sub> solution.

Air samples were collected on the alkaline treated No.5C 47mm filter using a calibrated sampling pump at the rate of 5L/min for 24hr. The filter was treated with 5mL pure water and ultrasonification was carried out to extract the hexavalent chromium. Extracted sample was filtered through 0.45 μm membrane filter. Hexavalent chromium of extracted sample was analyzed by ion chromatography coupled with postcolumn diphenylcarbazide derivatization.

This method was based on anion exchange chromatography on a Shim-Pack IC-SA2 and detection after post column reaction with diphenylcarbazide, which yields a compound with visible absorbance at 540nm.

The recovery of hexavalent chromium through the analytical procedure tested in this study was 36.08%(10ng fortified sample), 15.08%(50ng fortified sample) respectively.

The concentrations of hexavalent chromium ranged between 0.15 and 0.44 ng/m<sup>3</sup> in atmospheric dust collected in Kyoto, Japan, from November, 2017 to October, 2018(n=10).

## Key words

Hexavalent Chromium/六価クロム, Atmospheric dust /大気粉じん,  
Ion Chromatography /イオンクロマトグラフィ, Post column derivatization /ポストカラム誘導体化

## 1 はじめに

大気環境の状況等に鑑み健康リスクが高いと考えられる有害大気汚染物質として 23 の「優先取組物質」がリスト化されている。大気汚染防止法に基づき、地方公共団体（都道府県及び大気汚染防止法の政令市）において優先取組物質のモニタリングが実施されている。

23 の優先取組物質のうち、「六価クロム化合物」及び「クロム及び三価クロム化合物」についてはクロムの形態別分析方法が確立されていないことから「クロム及びその化合物」として 3 価と 6 価を合計した総クロムとして測定されてきた。

六価クロムは人体に有害であり、細胞内のたんぱく質や DNA に結合し代謝異常やがん、皮膚の炎症、喘息、肝臓の損傷を引き起こすと言われている。このため、毒性のない三価クロムと分けて、六価クロムを形態別に定量できる分析法の確立が求められている。

「六価クロム化合物」の分析法として平成 29 年 3 月に環境省

水・大気環境局大気環境課より「大気粉じん中の六価クロム化合物測定方法」<sup>1)</sup>が発表され、平成 30 年 3 月に有害汚染物質測定方法マニュアルに正式に掲載された。

本測定方法では、「アルカリ含浸フィルタ捕集-イオンクロマトグラフ-ポストカラム吸光光度法」が採用されている。六価クロム化合物をアルカリ性に処理したフィルターを用いて捕集し、これを超純水により抽出してイオンクロマトグラフに導入し、クロム酸イオンをカラムで分離した後ジフェニルカルボノヒドラジドと反応させ、吸光光度検出器で測定する方法である。(図 1)

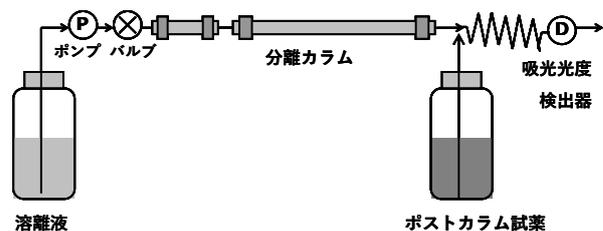


図1 イオンクロマトポストカラム法の配管

ジフェニルカルボノヒドラジドは三価クロムと反応せず、六価クロムのみと反応して錯体を形成し、540 nm 付近にピークを持つ吸収曲線を示すため、540nm 付近のピークを紫外可視分光光度計で測定すれば、六価クロムを選択的に定量することができる。

京都市では、平成 27 年度以前は京都市役所で、平成 28～29 年度は北区役所で、平成 30 年度からは左京区役所で、優先取り組み物質として「クロム及びその化合物」を毎月、サンプリングを行い、総クロムとして測定している。

「六価クロム化合物」が優先取組物質に指定されていることから、平成 29 年度の液体クロマトグラフ機器の更新に際し、反応液送液用のイナート送液ユニット、反応コイル等、イオンクロマトグラフ-ポストカラム六価クロム分析法に対応した機器を導入した。今回、導入した機器を用いて、六価クロム化合物の分析条件の検討を行い、測定精度や検出感度の確認、実大気サンプルの測定を行ったので報告する。

2 方法

(1) 標準品および試薬

- ア 標準物質：二クロム酸カリウム(容量分析用 関東化学)
- イ 1,5-ジフェニルカルボノヒドラジド (有害金属測定用 ナカライ)
- ウ 硝酸、ふっ化水素酸、硫酸 (有害金属測定用 ナカライ)

(2) 試料採取装置

- ア フィルタホルダ：ニールフィルターホルダー(東京ダイレック)
- イ アルカリ含浸フィルタ  
直径 47mm の 5 種 C ろ紙 (ADVANTEC) を使用し、(4)アで述べる方法で作成した。
- ウ 流量測定部：シナガワ 乾式ガスメータ DC-1  
(2018 年 2 月測定まで使用)
- エ ポンプ：島津製作所 VPC-1(2018 年 2 月測定まで使用)  
：柴田科学 MPΣ500NII(2018 年 3 月以降使用)  
：柴田科学 LV40-BW(2018 年 7 月以降使用)

(3) 装置及び測定条件

- ア 装置：(図 2)  
溶離液送液ポンプ 島津 LC-20AD  
反応液送液ポンプ 島津 LC-20Ai  
カラムオーブン 島津 CTO-20AC  
オートサンプラー 島津 SIL-20AC  
PDA 検出器 島津 SPD-M20A 検出波長 540nm
- イ 分離カラム：Shim-Pack IC-SA2 内径 4mm 長さ 25cm  
保護カラム：Shim-Pack IC-SA2(G)内径 4mm 長さ 1cm
- ウ 溶離液：10mmol/L 炭酸ナトリウム-100mmol/L 炭酸水素ナトリウム
- エ 反応液：2mmol/L ジフェニルカルボノヒドラジド-10%メタノール-0.5mol/L 硫酸

- オ カラム温度：40℃
- カ 流量：溶離液 1.0 mL/min 反応液 0.2mL/min
- キ 反応部 (PEEK)：内径 0.5mm、長さ 10m (PEEK)
- ク 反応温度 40℃
- ケ 注入量：250μL

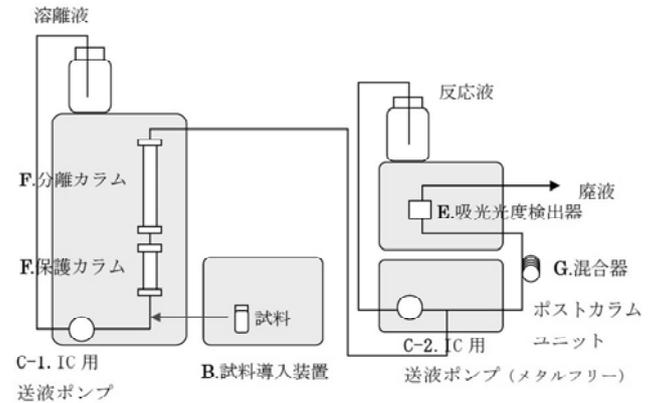


図2 イオンクロマトポストカラム六価クロム分析システム

(4) 試料採取及び試験液の調製

- ア アルカリ含浸フィルタの作成  
5 種 C フィルタを(1+9)硝酸+(2+98)ふっ化水素酸に浸し、フィルタ中のクロムを溶出させた後、水で洗浄しフィルタ中の酸を取り除いた。0.12mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液に浸した後、デシケータ内で乾燥させ、密封して冷凍庫で保管して使用した。
- イ 試料の捕集  
試料採取用のアルカリ含浸フィルタを装着したフィルタホルダを図 3 のように各部と接続し、大気を 5L/min で 24 時間採取した。

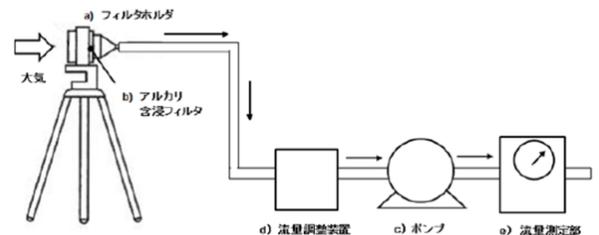


図3 六価クロムの試料採取装置

ウ 試験液の調製

大気粉じんを捕集したアルカリ含浸フィルタを抽出用容器(15mLPP 製チューブ)に入れ、超純水 5 mL を加え、超音波発生装置内で 30 分間超音波をかけて六価クロムを抽出した。この抽出液を PP 製注射筒に取り、0.45 μm ディスクフィルタ(IC アクロディスク PALL 社 4485T)を取り付けてろ過した後、オートサンプラー用バイアルに移し、試験液とした。

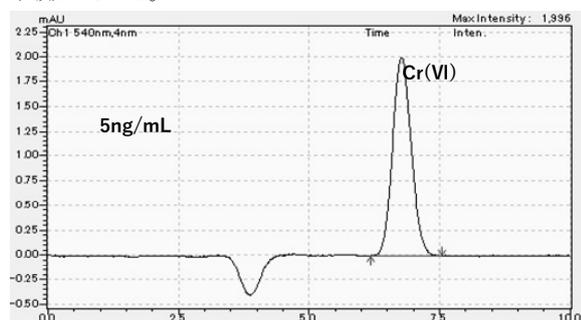
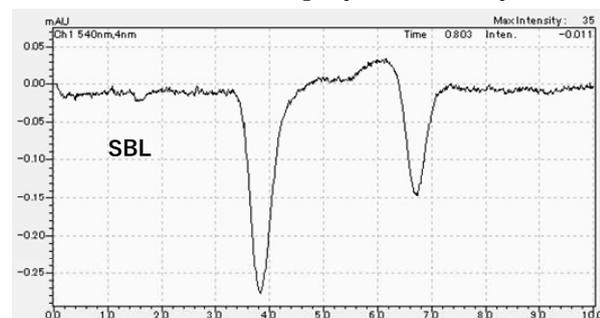
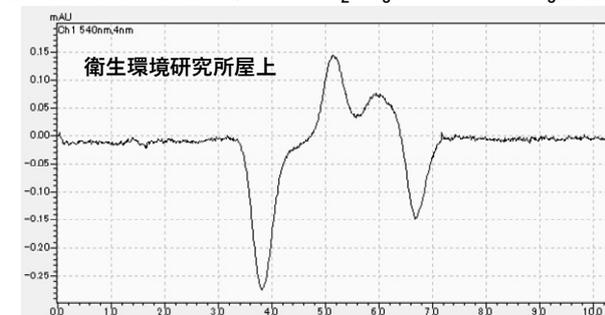
## 3 結果及び考察

## (1) 溶離液条件の検討

イオンクロマトグラフの溶離液には、硫酸アンモニウム/アンモニア水溶離液、水酸化ナトリウム溶離液、炭酸ナトリウム/炭酸水素ナトリウム溶離液などの種類があるが、今回は、試薬の取り扱いが簡便である炭酸ナトリウム/炭酸水素ナトリウム溶離液を用いて、分析条件の検討を行った。

はじめに、めっき液、飲料水中の六価クロムの分析条件<sup>2)</sup>を参考に 10mmol/L 炭酸ナトリウム・10mmol/L 炭酸水素ナトリウムの移動相条件で検討を行った。

標準溶液の保持時間は、6.8 分であった。ピーク形状は良好(図 4)であったが、アルカリ含浸フィルタを前処理した操作ブランク試料(図 5)や実大気サンプルの分析(図 6)では、試料の pH の影響をうけやすくマイナスピークが出現し、定量が困難であった。

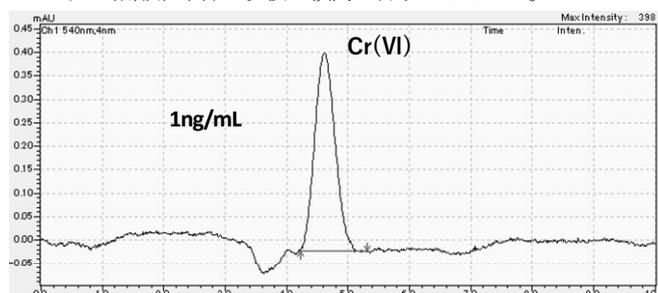
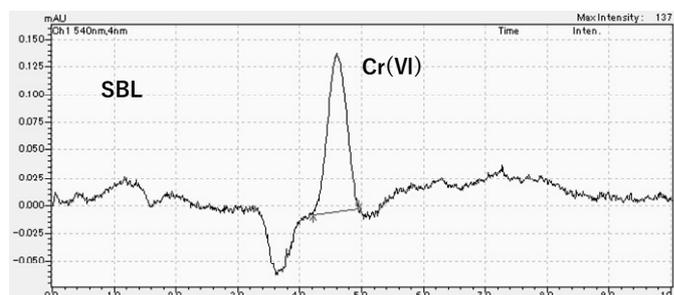
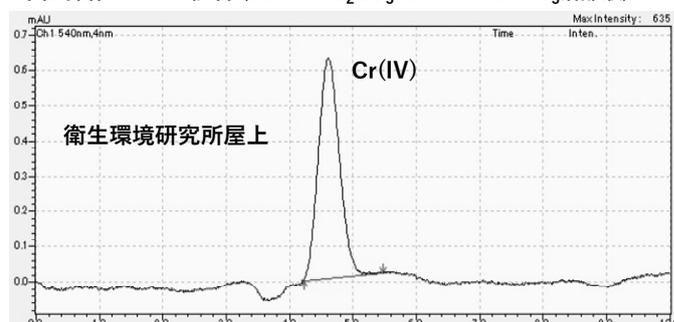
図4 Cr(VI)5ng/mL (10mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>・10mM NaHCO<sub>3</sub>溶離液)図5 操作ブランク試料 (10mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>・10mM NaHCO<sub>3</sub>溶離液)図6 実大気サンプル(10mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>・10mM NaHCO<sub>3</sub>溶離液)

次に、溶離液中の炭酸水素ナトリウムの濃度をアルカリ含浸フィルタの作成時に近づけて、10mmol/L 炭酸ナトリウム・100mmol/L 炭酸水素ナトリウムの移動相条件で測定を行っ

た。標準の保持時間は、4.6分となった。(図 7)

炭酸水素ナトリウムの濃度を 100mmol/L に上げることで操作ブランク試料(図 8)と実大気サンプル(図 9)のピーク形状が改善され、実大気サンプルの定量分析が可能となった。

そのため、10mmol/L 炭酸ナトリウム・100mmol/L 炭酸水素ナトリウムの溶離液条件で以後の検討を行うこととした。

図7 Cr(VI)1ng/mL (10mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>・100mM NaHCO<sub>3</sub>溶離液)図8 操作ブランク試料 (10mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>・100mM NaHCO<sub>3</sub>溶離液)図9 実大気サンプル(10mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>・100mM NaHCO<sub>3</sub>溶離液)

## (2) 検量線の直線性の検討

容量分析用標準試薬二クロム酸カリウム 0.283g を秤量して、超純水に溶解して、100mL に定容とし、標準原液 (1mg-Cr(VI)/mL)とした。標準原液を超純水で希釈し、0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10ng/mL の溶液を調製した。これをイオンクロマトグラフーポストカラム法により測定し、六価クロム濃度に対する検出器の応答を調べた。その結果を図 10 に示す。

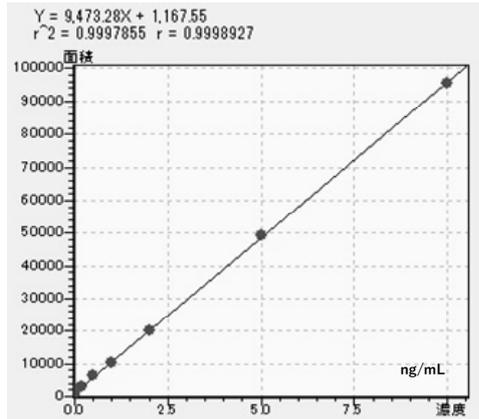


図10 0.1~10ng/mL Cr(VI)検量線

この結果より、六価クロム濃度0.1~10ng/mLの範囲で良好な直線性(相関係数=0.9998)が得られた。

(3) IDL(装置検出限界), IQL(装置定量限界)の算出

六価クロム濃度0.1ng/mLの標準溶液を用いて7回の繰り返し分析を行い、装置検出下限(IDL)及び装置定量下限(IQL)の確認を行った。結果を表1に示す。

表1 IDL及びIQLの算出

| Compounds                      | Cr(6+)  |
|--------------------------------|---------|
| 捕集量 (m <sup>3</sup> )          | 7.2     |
| 試験液量 (mL)                      | 5       |
| 注入濃度 (ng/mL)                   | 0.1     |
| 装置注入量 (μL)                     | 250     |
| 結果1 (ng/mL)                    | 0.088   |
| 結果2 (ng/mL)                    | 0.091   |
| 結果3 (ng/mL)                    | 0.094   |
| 結果4 (ng/mL)                    | 0.081   |
| 結果5 (ng/mL)                    | 0.092   |
| 結果6 (ng/mL)                    | 0.094   |
| 結果7 (ng/mL)                    | 0.086   |
| 平均値 (ng/mL)                    | 0.089   |
| 標準偏差                           | 0.00476 |
| IDL (ng/mL)                    | 0.0185  |
| IDL 試料換算値 (ng/m <sup>3</sup> ) | 0.0128  |
| IQL (ng/mL)                    | 0.0476  |
| IQL 試料換算値 (ng/m <sup>3</sup> ) | 0.0330  |

※ IDL =  $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$ , IQL =  $\sigma_{n-1} \times 10$

IDLは、試料溶液としては、0.0185ng/mL、大気濃度に換算すると0.0128ng/m<sup>3</sup>となった。

IQLは、試料溶液としては、0.0476ng/mL、大気濃度に換算すると0.0330ng/m<sup>3</sup>となった。

マニュアルに記載されている試験法の目標定量下限値0.08ng/m<sup>3</sup>※より低い値となったため、検討した分析装置は今回の試験法に対応可能な性能を有していたと考えられる。(※EPAの10万分の1リスクレベルに相当する濃度である0.8ng/m<sup>3</sup>の10分の1の値)

(4) MDL(分析法検出限界), MQL(分析法定量限界)の算出

操作ブランク試験として、試料用と同一のロットのアルカリ含浸フィルタについてサンプルと同様に前処理を行い操作ブランク用試験液を調製し、イオンクロマトグラフ-ポストカラム法により測定する試験を7回実施し、分析方法の検出限界(MDL), 分析方法の定量限界(MQL)の確認を行った。結果を表2に示す。

MDLは、大気濃度に換算して0.0293ng/m<sup>3</sup>となった。

MQLは、大気濃度に換算して0.0754ng/m<sup>3</sup>となった。マニュアルに記載の目標定量下限値0.08ng/m<sup>3</sup>をぎりぎり達成していた。

これは、操作ブランク用試験液からピークが出現するためであり、目標定量下限値を余裕をもって満たすためには、アルカリ含浸フィルタの作成方法を工夫して、操作ブランク用試験液から出現するピーク面積を小さくする必要があったと考えられた。

表2 MDL及びMQLの算出

| Compounds                    | Cr(6+) |
|------------------------------|--------|
| 試験液量 (mL)                    | 5      |
| 装置注入量 (μL)                   | 250    |
| 操作ブランク1 (ng/m <sup>3</sup> ) | 0.072  |
| 操作ブランク2 (ng/m <sup>3</sup> ) | 0.072  |
| 操作ブランク3 (ng/m <sup>3</sup> ) | 0.087  |
| 操作ブランク4 (ng/m <sup>3</sup> ) | 0.088  |
| 操作ブランク5 (ng/m <sup>3</sup> ) | 0.089  |
| 操作ブランク6 (ng/m <sup>3</sup> ) | 0.087  |
| 操作ブランク7 (ng/m <sup>3</sup> ) | 0.078  |
| 平均値 (ng/m <sup>3</sup> )     | 0.082  |
| 標準偏差                         | 0.0075 |
| MDL (ng/m <sup>3</sup> )     | 0.0293 |
| MQL (ng/m <sup>3</sup> )     | 0.0754 |

※ MDL =  $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$ , MQL =  $\sigma_{n-1} \times 10$

(5) 分析操作による六価クロム回収率の検討

六価クロムを含む標準試薬を用いて、捕集操作終了後の前処理の分析操作を行い、六価クロムがどの程度回収できるか調べた。

アルカリ含浸フィルタを抽出用PP製容器に入れ、K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>溶液を六価クロムとして10ngまたは50ng添加して前処理操作を行い、イオンクロマトグラフ-ポストカラム法で測定し、6価Cr添加量に対する回収率を計算した。結果を表3に示す。10ng添加試料で97.8%, 50ng添加試料で92.7%という結果となった。このことより、捕集操作終了後の前処理操作での抽出率は良好であり、前処理操作中に試料中の六価から三価への価数変化はほとんど起こらないことが示された。

表3 アルカリ含浸フィルターにおける添加回収率

| 試料名  | 6価Cr添加量 (ng) | 前処理操作時回収率 (%) | 1時間吸引後回収率 (%) | 24時間吸引後回収率 (%) |
|--|--------------|---------------|---------------|----------------|
| K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 溶液 | 10           | 97.8          | 89.6          | 36.08          |
|  | 50           | 92.7          | 80.3          | 15.08          |

(6) 実大気サンプル採取時における六価クロムの安定性の検討

実際に大気粉塵試料を採取する際には 24 時間連続して大気を吸引する必要がある。試料採取中に六価クロムの価数が変化するか調べるため、試料採取前のアルカリ含浸フィルタに  $K_2Cr_2O_7$  溶液を 6 価クロムとして 10ng または 50ng 添加して、大気捕集後、前処理操作を行い、イオンクロマトグラフ-ポストカラム法で測定し六価クロム添加量に対する回収率を計算した。結果を表 3 に示す。

試料採取開始後、1 時間でろ紙を回収し前処理を行い、イオンクロマトグラフ-ポストカラム法で測定した回収率は、10ng 添加試料で 89.6%、50ng 添加試料で 80.32% となった。試料採取開始後、24 時間でろ紙を回収し前処理を行い、イオンクロマトグラフ-ポストカラム法で測定した回収率は、10ng 添加試料で 36.08%、50ng 添加試料で 15.08% となった。

この結果、試料採取中に添加した二クロム酸カリウムが、ろ紙上に捕集された大気中の還元性物質により還元され、六価から三価へのクロムの価数変化が起き、六価クロムの回収率が減少したと推察される。

大気中の浮遊粉じんには還元性物質も含まれることが推察され、六価クロム捕集時には、周囲の浮遊粉じん濃度にも注意する必要があると考えられた。

今回の実験では液体の二クロム酸カリウム溶液を添加して添加回収試験を行ったが、実際の大気で捕集する試料は固体の粉じん試料であり、六価クロムの粉末試薬を直接フィルターに添加した場合には、クロムの形態変化がなく良好な結果であったという報告<sup>3)</sup>がある。

試料採取中の六価クロムの安定性については、実験条件を再検討し、さらなる検証が必要であると考えられた。

(7) 実大気サンプル中の六価クロム濃度の測定

平成 29 年 11 月～平成 30 年 10 月にかけて京都市衛生環境研究所屋上で 24 時間、大気サンプル採取を行い、今回検討した方法で前処理を行い、イオンクロマトグラフ-ポストカラム法で測定した。平成 29 年 11 月 29 日測定では、六価クロムの大気試料採取に加え、ハイボリュームサンプラーによる 24 時間大気採取を実施し、総クロムの分析も行った。結果を表 4 に示す。

10 回測定した六価クロムの濃度の平均値は、 $0.26[ng/m^3]$  であり、測定値は、 $0.15-0.44 [ng/m^3]$  の範囲内であった。神奈川県川崎市の 2006 年の観測値<sup>4)</sup>の報告例  $0.6[ng/m^3]$  と比較してやや低い値となった。平成 29 年 11 月 29 日測定での六価クロムの総クロムに対する濃度比は、7.1% となった。

表 4 大気粉じん中の六価クロム濃度測定結果

測定地点：京都市衛生環境研究所屋上

| 測定日         | 天候    | 6価Cr                 | T-Cr                 | 6価Cr/T-Cr |
|-------------|-------|----------------------|----------------------|-----------|
|             |       | [ng/m <sup>3</sup> ] | [ng/m <sup>3</sup> ] | [%]       |
| 2017年11月29日 | 曇後雨   | 0.44                 | 6.2                  | 7.1       |
| 2018年1月30日  | 晴     | 0.24                 | —                    | —         |
| 2018年2月14日  | 晴     | 0.45                 | —                    | —         |
| 2018年2月22日  | 薄曇一時晴 | 0.19                 | —                    | —         |
| 2018年3月29日  | 晴     | 0.23                 | —                    | —         |
| 2018年4月26日  | 薄曇一時晴 | 0.22                 | —                    | —         |
| 2018年7月19日  | 晴     | 0.31                 | —                    | —         |
| 2018年8月2日   | 晴後一時雨 | 0.22                 | —                    | —         |
| 2018年9月27日  | 曇時々雨  | 0.15                 | —                    | —         |
| 2018年10月25日 | 晴     | 0.20                 | —                    | —         |

4 まとめ

六価クロムの有害汚染物質モニタリング試験実施にむけ、イオンクロマトグラフ-ポストカラム法対応の液体クロマトグラフ分析装置を導入し、測定条件を検討した。

炭酸系の溶離液条件を検討した結果、10mmol/L 炭酸ナトリウム-100mmol/L 炭酸水素ナトリウムの溶離液条件で、実大気サンプルのピーク形状が良好となり分析が可能となった。

装置検出限界(IDL)は、大気濃度に換算して  $0.0128ng/m^3$ 、装置定量限界(IQL)は、大気濃度に換算して  $0.0330ng/m^3$  であった。分析方法の検出限界(MDL)は、大気濃度に換算して  $0.0293 ng/m^3$ 、分析方法の定量限界(MQL)は、大気濃度に換算して  $0.0754ng/m^3$  であり、マニュアルに記載の目標定量下限値  $0.08ng/m^3$  をぎりぎり達成していた。

京都市内で実大気サンプルの分析を行ったところ、六価クロムの測定値は  $0.15-0.44ng/m^3$  の範囲内であった。

正式な六価クロムの有害汚染物質モニタリング実施に向け、衛生環境研究所屋上での継続的観測、他の測定地点での測定の実施や試薬ブランクの値の低減方法、他の溶離液条件での分析条件、大気中の還元性物質の影響などの検討を進め、測定データを蓄積していく予定である。

5 文献

- 「大気粉じん中の六価クロム化合物測定方法」平成 29 年 3 月、環境省水・大気環境局大気環境課
- 島津アプリケーションニュース No.L334A 「ポストカラム誘導体化法による 6 価クロムの分析」平成 20 年 5 月
- 「優先取組物質の見直しに対応した大気中クロム分析法の開発」大気環境学会誌 第 48 巻 第 6 号(2013)
- 中西準子, 小野恭子: 詳細リスク評価書シリーズ六価クロム, 丸善(2008)