

# 鉛川の高濃度フッ素について (I)

## Accessment of High Concentrations of Fluorine in the Namari River System (I)

清野 茂 阿部 時男\*<sup>1</sup> 藤巻 宏和\*<sup>2</sup>

Shigeru SEINO, Tokio ABE, Hirokazu FUJIMAKI

北上川水系二迫川支流鉛川の河川中フッ素濃度は、その最下流で $0.93\sim 3.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ と環境基準値 $0.8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ を超えていた。鉛川上流や沢水は $0.08\text{未満}\sim 0.65\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ と低濃度で、また降雨には含まれていない。一方細倉鉱山の坑廃水・製錬廃水等を処理した排水や捨石堆積場排水には $2.5\sim 6.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ と高濃度フッ素が含まれ、これらが鉛川河川中の高濃度フッ素の原因であることが分かった。鉛川の河床湧水はフッ素 $1\sim 2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下でカルシウム、ナトリウムや硫酸イオンの成分が少なく、一方高濃度の鉛、カドミウム、亜鉛を含有することが確認された。蛍石の溶解実験により、12時間溶解後のフッ素が硫酸溶液では純水や水酸化ナトリウム溶液よりも約2倍溶出したことから、硫酸酸性水が蛍石を溶解することが明らかとなった。石灰ソーダによる除去実験では、排水等のフッ素濃度 $3\sim 4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ を約40%から約70%除去することができた。

キーワード：フッ素濃度；蛍石；溶解；鉛川；細倉鉱山

**Keywords** : concentration of fluorine ; fluorite ; leaching ; the namari river system ; hosokura mine

### 1 はじめに

環境省は公共用水域及び地下水の健康項目の環境基準値としてフッ素を $0.8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ に設定した<sup>1)2)</sup>。

宮城県内河川のうち、鉛川についてはフッ素含有量調査がこれまで行われていなかった。鉛川は休廃止鉱山・細倉鉱山地帯を源としている。細倉鉱山は9世紀に発見、1987年の閉山まで鉛、亜鉛等の有用金属の採掘に伴って、多量の蛍石が掘り出されていた。鉱山周辺には露頭が多数あり、水-蛍石反応により高濃度フッ素含有水が存在する可能性がある。

そこで、鉛川の河川水や河床湧水、坑廃水等のフッ素含有量調査、溶解実験及び除去実験を行った。

### 2 方 法

#### 2.1 調査時期及び調査地点

##### 2.1.1 調査時期

調査は2002年6月24・25日、8月27・28日、10月22日、12月17日の4回実施した。8月には河床湧水調査も実施し、河床湧水の水温が河川水温以下であることを確認後、ガラス製500mL注射筒又は1Lポリ瓶で直接採水した。

##### 2.1.2 調査地点

調査地点を図1、湧水調査地点を図2に示した。

鉛川上流から最下流では河川水6地点、沢水5地点(う

\* 1 現 (財)宮城県下水道公社

\* 2 東北大学大学院理学研究科

ち3地点(図1中N9、N10、N15)は上流に鉱滓及び澱物堆積場がある)計11地点及び細倉鉱業(株)の排水、二迫川では2地点(鉛川合流地点の上流(3)及び下流(4))

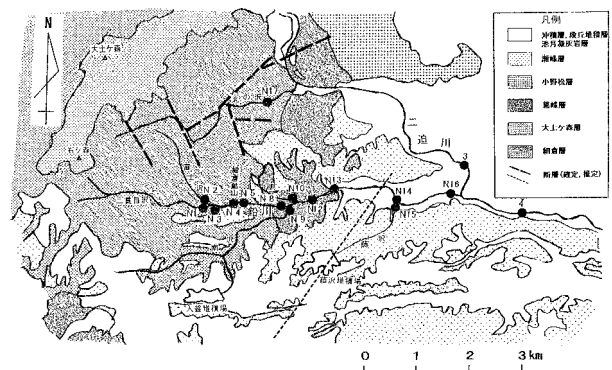


図1 鉛川流域の地質図及び調査地点図 (北村等 (1991) 一部改変)

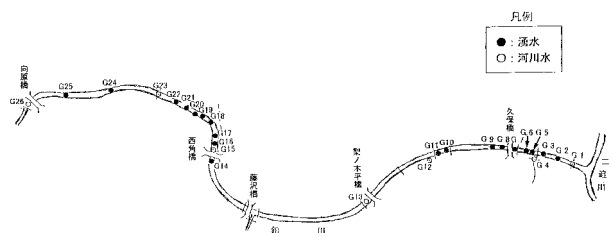


図2 湧水の調査地点図

と支流1地点(N17)の合計15地点とした(図1)。湧水調査は鉛川中流域から最下流域の約2.5kmの区間の26地点で、このうち湧水調査地点は19地点である(図2)。

## 2.2 測定方法

### 2.2.1 フッ素及び他の成分

フッ素はワットマンGF/Cろ紙(孔径1.2 $\mu$ m)によるろ過後イオンクロマトグラフ法で測定した。現地では気温、水温、流量を測定した。室内ではpH、EC、ORP、ろ過試料はカチオン(Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>)とアニオン(SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、Cl<sup>-</sup>)をイオンクロマトグラフ法で、SiO<sub>2</sub>はモリブデン青吸光度法、Al<sup>3+</sup>はCTMAC吸光度法により測定した。硝酸・硫酸分解試料はPb、Zn、Cdをフレーム原子吸光法、電気加熱原子吸光法で測定した。HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>は0.01mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>硫酸で中和滴定<sup>3)</sup>後計算して求めた。

### 2.2.2 溶解実験

試料は細倉鉱山感天杭産出の螢石で、メノウ鉢で細粉し、不純物を除去後にXRD法により螢石であることを確認し、この細粉螢石10gを試料とした。溶媒は0.001mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>硫酸溶液(pH2.2)、0.001mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>水酸化ナトリウム溶液(pH11.3)、超純水(pH6.7)の3種類で、それぞれ500mLを栓付ポリエチレン製500mL瓶にいった。溶解条件は室温常圧で、2000回/分振とう、振とう時間は12時間。検液は0~1時間では0.5時間毎、1~6時間では1時間毎、6~12時間では2時間毎に採水した。採水後静置し、上澄液をろ過(ワットマンGF/Cろ紙孔径1.2 $\mu$ m)して、分析用とした。

### 2.2.3 除去実験

除去剤は和光純薬工業製ソーダ石灰1号(粒径3.5mm以下)で、内径20mm長さ90mmのポリエチレン製注射筒に10g充填したものをカラムとして、単独を1段カラム、5連縦列連結したものを5段カラム、5段カラムに試料を2回通水した場合を10段カラムとした。試料水は標準溶液(フッ化ナトリウム20.0mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)、細倉鉱業(株)の廃水・排水を使用した。カラム通水後静置し上澄液をろ過(ワットマンGF/Cろ紙孔径1.2 $\mu$ m)したものを分析試料とした。

## 3 結果及び考察

### 3.1 鉛川流域の地質

鉛川は北上川水系二迫川支流で、石ヶ森(標高406.9m)に源を発し細倉鉱山地帯を東方に流下する延長約8.8km、流域面積16.5km<sup>2</sup>の小河川である。鉛川流域の概略的な地質図<sup>4)</sup>を図1に示した。鉛川源流域は細倉層下部(主として変朽安山岩溶岩)で、細倉鉱山付近(104m)は細倉層上部(主として緑色凝灰岩)からなり、五輪原橋付近(約50m)では葛峰層(安山岩溶岩)からなる、さらに下流域は瀬峰層(主として凝灰質シルト岩)からなるが、瀬峰層は第四紀の堆積物や火山灰層で覆われている<sup>4)</sup>。現地調査では、鉛川上流(荒町橋付近)から五輪原橋下流までの河床や河岸には安山岩溶岩の亀裂性岩盤

が露出し、向原橋付近から鉛川最下流までは中~巨礫の河床堆積物や脈石が数多く存在し、河床の砂地部からは湧水が認められた。

### 3.2 高濃度フッ素の検出の発端

2001年12月11日に、二迫川上流から旧北上川下流までの約55kmの範囲でフッ素濃度分布調査を行った(図3)。

フッ素濃度は二迫川上流や旧北上川では0.08mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>未満、迫川では0.20~0.23mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>、一方二迫川支流鉛川では3.7~5.9mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>と環境基準を4~7倍も超過していた。排水口上流の2地点は0.2~0.3mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>だが、排水口直下の鉛川河川中では6.6mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>と高濃度であった。さらに鉛川最下流の久保橋までは3~4mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>とほぼ一定の濃度であった。このことから、排水が高濃度フッ素を含有し、排水流入後の鉛川河川中のフッ素濃度が環境基準値を超過することが分かった。

### 3.3 鉛川流域のフッ素濃度

#### 3.3.1 河川中のフッ素濃度の変化

鉛川流域及び鉛川合流後の二迫川下流1.5km地点の豊後橋までのフッ素濃度変化を図4に示した。

フッ素濃度は細倉鉱業(株)排水(排水と略す)及び藤沢の沢水(藤沢と略す)で高く、これらが流入後の河川中のフッ素濃度は高く、最下流まで環境基準値を越える。鉛川河川中の高濃度フッ素の原因は排水及び藤沢であることが分かる。一方、藤沢を除く他の沢水のフッ素は低濃度である。二迫川との合流後ではフッ素濃度は著しく

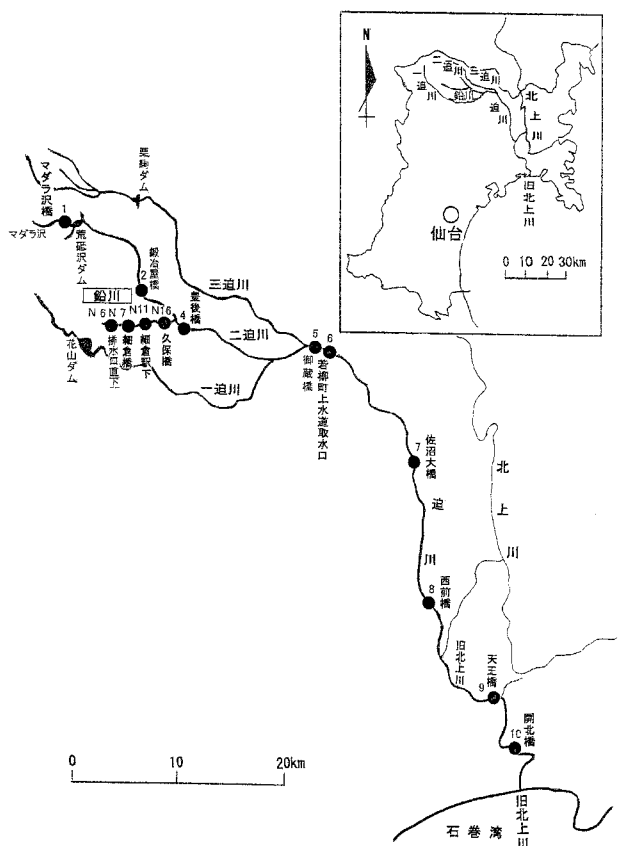


図3 旧北上川水系迫川流域図及びフッ素調査地点図

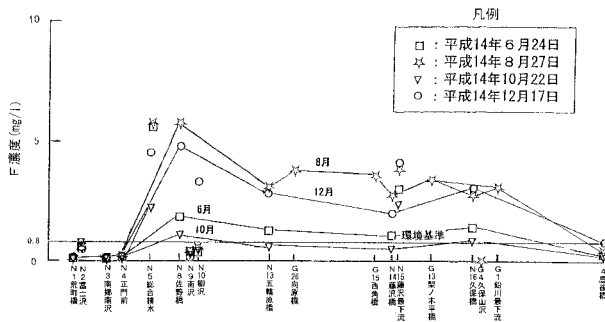


図4 鉛川流域におけるフッ素濃度変化

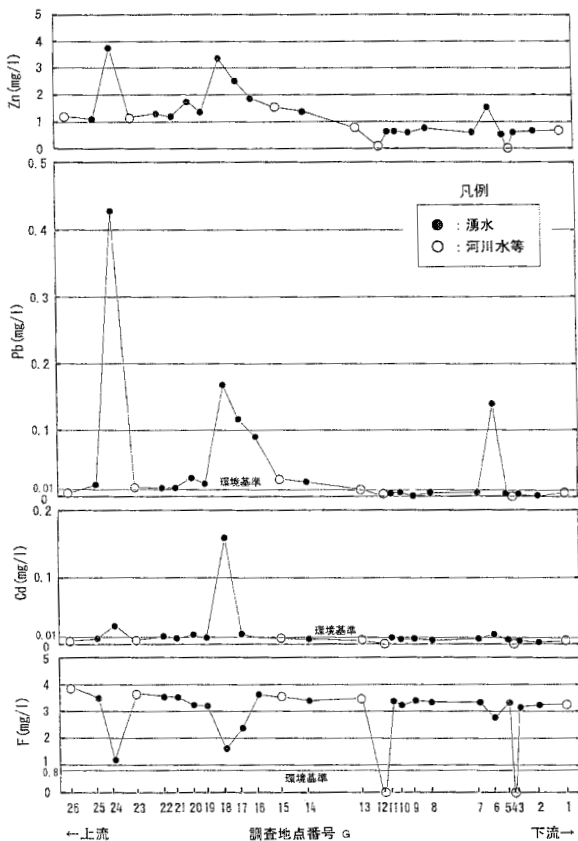


図5 湧水中のフッ素、鉛、カドミウム、亜鉛濃度

低下する。排水は坑内水や製錬所等からの廃水の処理水で、藤沢の上流には中和澱物堆積場としての藤沢堆積場がある。排水と藤沢のフッ素濃度は6月、8月、10月、12月いずれも高く、8月・12月>6月・10月であった。これは6月、10月の調査日一週間前の積算降水量がそれぞれ81mm<sup>5)</sup>、66mm<sup>6)</sup>で、降雨により河川中のフッ素が希釈されたと考えられる。

### 3.3.2 河床湧水のフッ素濃度

鉛川流域のフッ素濃度は、8月では向原橋(図4中G26)から最下流(図4中G1)まで3~4mg・L<sup>-1</sup>とほとんど変化していない(図4)。フッ素濃度の高い藤沢の流入地点は西角橋より下流にあり、西角橋より上流ではフッ素が高濃度である。周辺にはフッ素排出源はなく、河床に高濃度フッ素含有の湧水が存在すると考えられた。そ

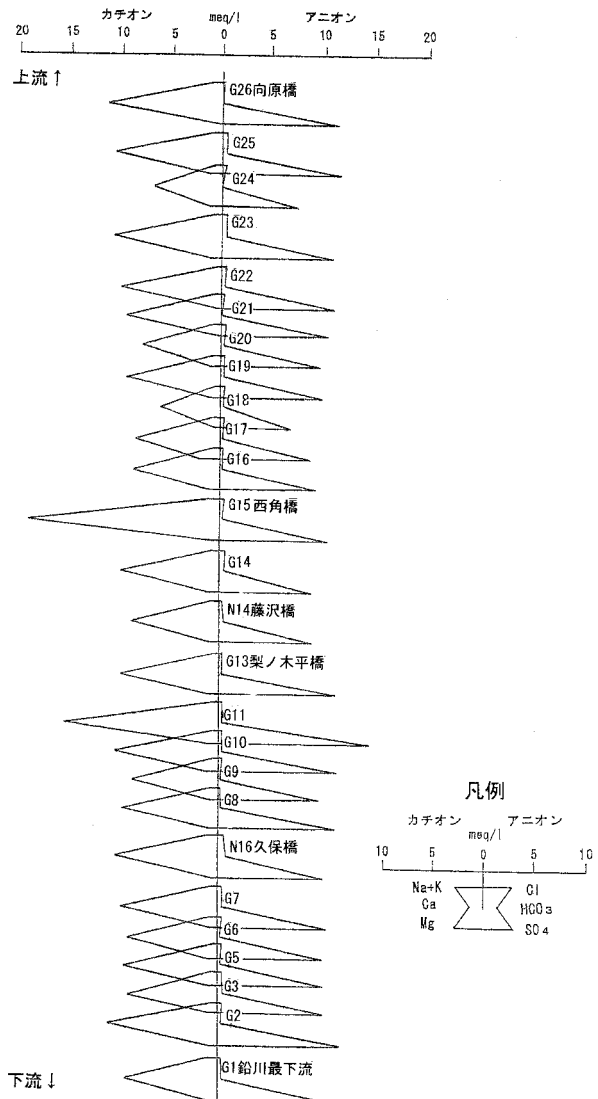


図6 湧水のパターンダイアグラム (2002. 8. 27)

ここで、向原橋から鉛川最下流までの湧水調査を実施した。その結果を図5に示した。

ほとんどの湧水中のフッ素濃度は鉛川河川水と同程度だが、一部の湧水は約1mg・L<sup>-1</sup>のものが認められた。一方この湧水には極めて高濃度の鉛、カドミウム、亜鉛が含有する(図5)。その湧水のパターンダイアグラムからカルシウム、ナトリウムや硫酸イオンの溶存成分が少ない(図6)。

向原橋から西角橋までの区間の河床には脈石混じりの中~巨礫が堆積する。その脈石中には黄鉄鉱(FeS<sub>2</sub>)が存在している。黄鉄鉱は各種硫化鉱物中でも溶解度が高く、水と最も反応しやすく、2価鉄、3価鉄、硫酸が生成する<sup>7)</sup>。黄鉄鉱が溶解した後の3価鉄と硫酸の存在により、閃亜鉛鉱(硫化カドミウムを含む)、方鉛鉱等の硫化鉱物は溶解すると考えられる。

丸茂<sup>8)</sup>は西角橋付近(図2中G14地点)の河床堆積物にはナトリウム、マグネシウム、カリウム、カルシウムの濃度が低く、一方鉛や亜鉛が異常に高いことで特徴づ

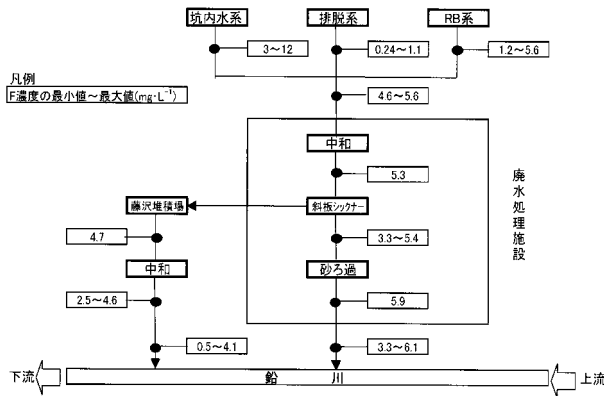


図7 細倉鋳業廃水系統図及びフッ素濃度

けている。河床堆積物中を通過する河床間隙水<sup>9)</sup>の流れが点在すると考えると、河床堆積物中に鉛、亜鉛を多く含有する脈石と浅い地下水の相互反応により、これらを高濃度に含有する水質が形成され、特に蛍石が存在すればフッ素が多い原因となる可能性は否定できない。

### 3.3.3 坑内水等の廃水中のフッ素濃度

細倉鋳業株廃水は鉛蓄電池から鉛等を回収するリサイクル・バッテリー系廃水系統 (RB系と略す)、溶解炉排煙中の硫黄を回収する排煙脱硫廃水系統 (排脱系と略す)、製錬廃水・細倉鋳山坑廃水・堆積場廃水等を主とした系統 (坑内水系と略す) に分類できる。これらの廃水系統毎に測定したフッ素濃度を図7に示した。

細倉鋳業株の廃水系統のうちフッ素濃度はRB系及び排脱系で0.24~5.6mg・L<sup>-1</sup>、坑内水系3~12mg・L<sup>-1</sup>であり、特に坑内水系で高い。これらの高濃度フッ素含有廃水は、現廃水処理施設で消石灰中和処理法や金属凝集剤による除去及び砂ろ過処理では除去されず、鉛川へ流出している。また藤沢堆積場からも2.5~4.6mg・L<sup>-1</sup>と高濃度フッ素含有の排水が鉛川へ排出している。

### 3.4 溶解実験

蛍石の溶解実験の結果を図8に示した。

溶解30分後のフッ素濃度は0.001mol・L<sup>-1</sup>硫酸溶液で15.3mg・L<sup>-1</sup>、超純水で7.19mg・L<sup>-1</sup>、0.001mol・L<sup>-1</sup>水酸化ナトリウム溶液で5.97mg・L<sup>-1</sup>であり、溶解12時間後は硫酸溶液中で19.9mg・L<sup>-1</sup>、超純水中で9.49mg・L<sup>-1</sup>、水酸化ナトリウム溶液中で8.44mg・L<sup>-1</sup>であった。

pH2.2の硫酸溶液が超純水、水酸化ナトリウム溶液よりもそれぞれ2.1倍、2.4倍のフッ素を溶出することが分かった。なお、溶解30分後以降のフッ素濃度は穏やかに増加していた。この現象は実験経過とともに大気中の二酸化炭素が液中に溶解し、炭酸イオンとなり、残存するフッ化カルシウムを溶解したためにフッ素濃度が上昇したと考えられる。

### 3.5 鉛川河川中の高濃度フッ素の原因

河川水中フッ素の世界的なバックグランド値は平均0.1~0.2mg・L<sup>-1</sup>程度<sup>10)</sup>、人為的汚染のない主要な河川は0.01~0.02mg・L<sup>-1</sup><sup>11)</sup>、わが国の河川の0.2mg・L<sup>-1</sup>前後<sup>12)</sup>

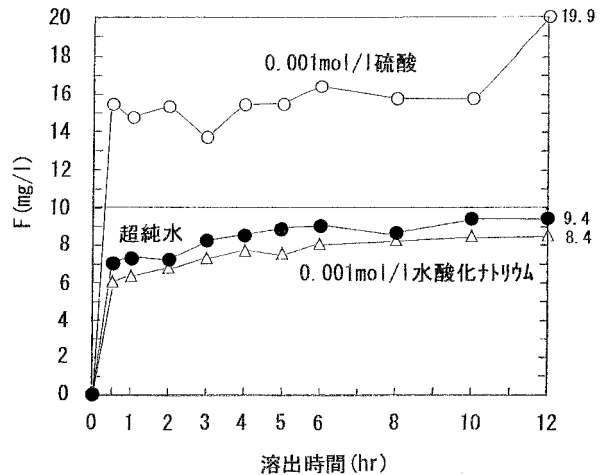


図8 蛍石の溶解実験結果

と比較すると、鉛川流域の河川中のフッ素濃度3mg・L<sup>-1</sup>は明らかに高い。河川水中のフッ素の起源は海塩粒子<sup>13)</sup>、大気降水物<sup>14)</sup>と考えられ、わが国の河川中のフッ素の濃度は0.009~0.74mg・L<sup>-1</sup>と報告されている<sup>15)16)</sup>。河川中のフッ素起源は①降水 (降水物を含む)、②温泉水、③人間活動 (工業活動を含む)、④岩石と考えられている<sup>17)</sup>。鉛川流域には②の温泉水は存在しない。①は、筆者等の測定より宮城県内20市町村の雨水中には0.01未満~0.07mg・L<sup>-1</sup>のフッ素が含有するだけであり、鉛川流域の鶯沢町の雨水中フッ素濃度は0.01mg・L<sup>-1</sup>未満であった。鶯沢町は太平洋沿岸から約56kmの距離にあり海塩粒子の影響は考えにくく、流域にはフッ素を大気中へ排出する工業活動もない。③の工業活動を含む人間活動は、細倉鋳業株の廃水系統のうちで坑内水系が高濃度のフッ素を含有することが判明している。④岩石は、蛍石の溶解実験の結果からpH2.2の硫酸溶液が超純水、水酸化ナトリウム溶液よりもそれぞれ約2倍のフッ素を溶出することが分かった。戸苅<sup>18)</sup>は細倉鋳山の鋳石中に存在する黄鉄鉱を報告している。坑内水系廃水はpH2~4で、硫酸イオン約1000~2000mg・L<sup>-1</sup>の硫酸酸性水である。黄鉄鉱 (FeS<sub>2</sub>) が、天水や地下水等と反応し、2価鉄と硫酸が生成する<sup>7)</sup>。この硫酸酸性水が蛍石を溶解し、フッ素が高濃度の坑廃水を形成すると考えられる。現廃水処理施設ではフッ素が除去されず、中和澱物中にも高濃度のフッ素が含有し、これらの排水が鉛川へ流出している。鉛川の高濃度フッ素の起源は蛍石であり、そして鉛川河川中の高濃度フッ素の発生メカニズムは蛍石と黄鉄鉱由来の硫酸酸性水の反応によりフッ素が溶解することにあると考えられる。

### 3.6 除去実験

フッ素の除去実験結果を図9、図10に示した。

フッ素標準溶液と石灰ソーダを30分間混合振とうした溶液の残留フッ素濃度は10.0mg・L<sup>-1</sup>で、除去率は50%、数時間静置後も白濁を呈した。フッ素標準溶液を5段カラム、10段カラムに通過させた溶液では残留フッ素濃度



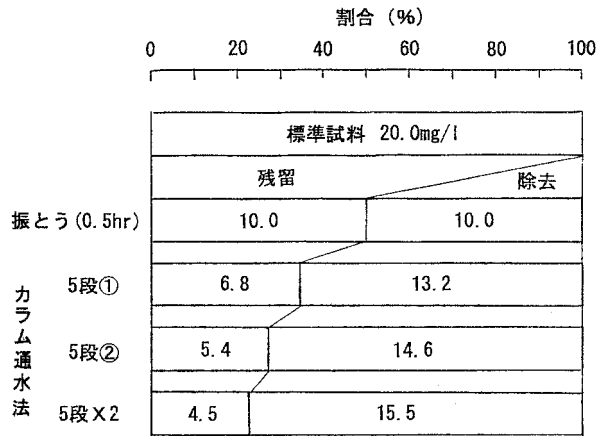


図9 除去実験結果(1)

は5.4~6.8mg・L<sup>-1</sup>, 4.5mg・L<sup>-1</sup>で, 除去率は73.0~66.0%, 77.5%であり, いずれも溶液は混濁を呈せず, 清澄水であった。よって, 実試料中のフッ素除去実験は10段カラムにより通過させる方法で行った結果, フッ素濃度3.33~4.49mg・L<sup>-1</sup>が残留フッ素濃度1.65~1.97mg・L<sup>-1</sup>となり, その除去率は40.8%~63.0%であった。

フッ化物含有工場廃水等の処理方法は石灰添加法が一般的で<sup>19)20)</sup>, フッ素量を10~20mg・L<sup>-1</sup>まで処理可能だが, それ以下に減少させるには高度処理が必要である。わが国の高度処理法は活性アルミナ吸着法<sup>21)22)</sup>, 消石灰-アパタイト法<sup>23)</sup>, フッ化カルシウム晶析法と共沈法の併用方法<sup>24)</sup>等があるが, 大量の汚泥が発生する<sup>25)</sup>。また, 水質汚濁防止法ではフッ素の排水基準が15mg・L<sup>-1</sup>から8mg・L<sup>-1</sup>となり, 2001年7月1日施行されている。フッ化カルシウムの溶解度はフッ素8mg・L<sup>-1</sup>に相当するので, 従来の石灰添加法ではその濃度以下に処理できない。

Scottら<sup>26)</sup>は, 石灰ソーダによるフッ素除去の場合, 残留フッ素濃度は(原水中フッ素濃度) - {0.07 × (原水中フッ素濃度) × √(除去されたマグネシウム濃度)} の近似式に従うと報告した。実試料にはフッ素が3.3~4.4mg・L<sup>-1</sup>, マグネシウムは49.0~79.9mg・L<sup>-1</sup>含有する。石灰ソーダカラム通水による除去試験では残留フッ素濃度は1.45~1.97mg・L<sup>-1</sup>, 残留マグネシウム濃度は0.01mg・L<sup>-1</sup>未満であった。マグネシウムの全量が水酸化マグネシウム沈殿物となり, この際水酸化マグネシウムにフッ素が吸着して沈殿除去されたと考えられる。今回の実験結果をScottの近似式に適用すると, 残留フッ素量は1.7~2.2mg・L<sup>-1</sup>で, ほぼ一致していた。

#### 4 ま と め

- (1) 鉛川のフッ素濃度は環境基準値を超えていた。坑内水や製錬廃水等を処理した排水や捨石堆積場の排水中のフッ素は高濃度に含有されることから, これらが鉛川河川中の高濃度フッ素の原因である。
- (2) 河床湧水の一部にはフッ素が低濃度でカルシウム, ナトリウムや硫酸イオン成分が少ないが, 高濃度の鉛,

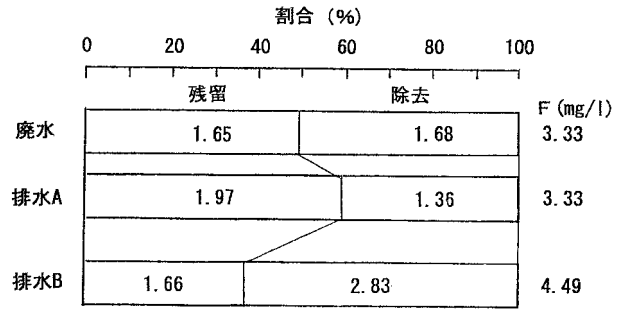


図10 除去実験結果(2)

カドミウム, 亜鉛を含有する水質組成であった。

- (3) 蛍石の溶解実験により, 12時間溶解後のフッ素が硫酸溶液では純水や水酸化ナトリウム溶液よりも約2倍溶出したことから, 硫酸酸性水が蛍石を溶解する。
- (4) 石灰ソーダ処理による10段カラム除去実験を行った結果, 細倉鉱業からの排水中のフッ素濃度3~4mg・L<sup>-1</sup>を約40%から約70%除去できた。

#### 謝 辞

本研究を進めるに当たり, 調査に協力していただいた鶯沢町町民生活課職員各位, 細倉鉱業株の関係各位並びに東北大学理学部地学科岩石学・固体地球科学教室の各位に有益な助言・指導をいただいた。以上の方々には心よりお礼申し上げます。

#### 引用文献

- 1) 環境庁告示: 水質汚濁に係る環境基準の一部の改正について. 平成11年2月22日, 第14号
- 2) 環境庁告示: 地下水の水質汚濁に係る環境基準について. 平成11年2月22日, 第16号
- 3) 厚生省生活衛生局・水道環境部監修: 上水試験方法 1993版. 94, (1993), (日本水道協会).
- 4) 北村 信, 中川久夫: 表層地質. 土地分類基本調査「岩ヶ崎」5万分の1. 宮城県企画部土地対策課, 22 (1991).
- 5) 気象庁: 気象庁月報. 2002年6月号, コンパクトディスク00S-107, (2002).
- 6) 気象庁: 気象庁月報. 2002年10月号, コンパクトディスク00S-112, (2002).
- 7) P. C. Singer, W. Stumm: Science, 167, 1121 (1970).
- 8) 丸茂克美: 平成14年度土壤汚染状況調査・分析法調査事業調査報告書. 39, 産業技術総合研究所. (2003).
- 9) J. A. Standford, J. V. Ward: Nature, 335 (1988).
- 10) D. A. Livingstone: U. S. Geol. Surv. Prof. Paper., 440-G, p64. (1963).
- 11) R. Capenter: Geochim. Cosmochim. Acta., 33, 1153 (1969).
- 12) 山縣登: 微量元素. 193, (1977), (産業図書).
- 13) C. Neal: Sci. Total Environ., 80, 213 (1989).

- 14) 宝来俊一：公害と対策, 27, 241 (1991).
- 15) 後藤達夫：水, 37, 75 (1995).
- 16) 高 春心, 小倉紀雄：地球科学, 29, 67 (1995)
- 17) 菅原 健, 半谷高久：地球科学入門. 161, (1964),  
(丸善).
- 18) 戸苅賢二：鉱物学雑誌, 1, 391 (1954).
- 19) W. Zabban, H. W. Jewet : Proc 22nd Purdue Industrial  
Waste Conf. , 706 (1967).
- 20) T. N. Petrova, U. G. Bakhurov : Wat. Pollut. Abstr. ,  
609, 43 (1970).
- 21) 浅田日出夫：水道協会雑誌, 328, 70 (1962).
- 22) 川井利長, 山本達也：水質汚濁研究, 11, 299 (1988).
- 23) 森 正枝, 渡辺修一, 若山晴夫, 安藤淳平：石膏と  
石灰, 140, 14 (1976).
- 24) 真島敏行, 高月 紘：石膏と石灰, 221, 28 (1989).
- 25) 山田悦：用水と廃水, 41, 45 (1999).
- 26) R. D. Scott, A. E. Kimberly, A. L. Van Horn, L. F. Ey,  
F. H. Waring : J. AWWA, 29, 9 (1937).

# 伊豆沼の水生植物と内沼のカラス貝分布調査（水質浄化に関連して）

## An Investigation of the Distribution of Aquatic Plants in Izunuma and *Cristaria Plicata* in Uchinuma — in Connection with Water Quality Purification

渡部 正弘 栗野 健 小山 孝昭  
佐々木 久雄 大庭 和彦

Masahiro WATANABE, Takeshi AWANO, Takaaki KOYAMA,  
Hisao SASAKI, Kazuhiko OHBA

伊豆沼・内沼における水質浄化能の検討として従来からの「巻上除去法」試験に加えて、貝を用いた生物学的手法による濁質除去効果を調べる「カラス貝生息調査」と、植物による水質への影響を調べる「水生植物分布調査」及び「水生植物分解試験」を実施した。

「カラス貝生息調査」では、内沼でのカラス貝生息数は昨年度の伊豆沼とほぼ同様であり、また、今回の調査でも大きな貝のみで若いカラス貝は見られず、今後、カラス貝の減少が危惧され、水質浄化の点からも何らかの対策が必要と考えられる。

「水生植物分布調査」では昨年の台風のため伊豆沼にハスは少なく、代わりにヒシ・ガガブタが優占していた。「水生植物分解試験」では、窒素の分解はアンモニアから亜硝酸を経て硝酸に変化した。この実験結果は、公共用水域のデータにおいて秋から春までの時期に窒素がアンモニアから硝酸に変化する現象によく符合している。

キーワード：伊豆沼・内沼、底質除去、カラス貝、水生植物、水質浄化

**Keywords** : Izunuma&Uchinuma, sediment removal, *Cristaria Plicata*, aquatic plant, water quality purification

### 1 はじめに

伊豆沼・内沼は、宮城県に残されている貴重な湿地で、1985年にラムサール条約の指定湖沼となっている。県は水鳥の生息環境を保全する観点から、水質改善・浅底化防止を重要課題<sup>1)</sup>として、いくつかの対策を実施してきている。当センターでも平成11年度からは物理的方法として巻上時の底質を除去する「巻上除去法」試験を行ってきたが、これに加えて、平成14年度から生物による水質浄化能を調査検討することとした。生物的方法では貝による濁質除去効果の「カラス貝生息調査」及び植物による水質への影響を調べる「水生植物分布調査」及び「水生植物分解試験」を実施した。

#### 1.1 巻上除去法試験

一般的に湖沼は河川と異なり流れがほとんどなく泥が堆積しやすい。河川から流入した泥や内部生産物の堆積等により水深が次第に浅くなり、ついには陸地化してしまう運命にある。伊豆沼・内沼の湖面積は合わせて約3.9 km<sup>2</sup>と宮城県内で最大の自然湖沼であるが、最大水深が約1.4mと浅く、地形的に流出河川荒川の勾配が非常に緩やかで沼水が流出しにくい構造となっているため、泥が堆

積しやすく浅底化及び富栄養化が問題となっていた。そこで、利水の必要のない冬季に、一迫川からの導水により沼の水位を上げ、満水にして待ち、強い北西風が吹き沼の底質が強く巻き上がった時点で堰を下げれば、沼水の流下と共に一気に底質を除去でき、生物への底生環境を損なわずに浅底化防止と水質改善が図られると柴崎<sup>2)</sup>が提案していた。この「巻上（まきあがり）除去法」の試験<sup>3)~4)</sup>を平成12年から、年に一回程度の頻度で実施し、風と除去量との関係データを積み重ねている。今年度は底質除去試験を平成16年1月に2回実施した。

#### 1.2 カラス貝生息調査

貝は水のごり除去や水質浄化能を有することが知られている。そこで、沼における濁り除去・水質浄化能を把握する目的で、平成14年度にイシガイ科でも大型二枚貝であるカラス貝 (*Cristaria plicata*) の伊豆沼での生息数の調査<sup>5)</sup>を行なって、種類、大きさ、生死の別を調べた。今年度は内沼において、同様に貝を引き上げ、数・大きさを調査した。これにより、伊豆沼・内沼全体の貝総量と浄化能が推算できた。

これまで、魚貝類の調査は部分的には行なわれたこと

はあるが、貝に絞る伊豆沼・内沼全域で本格的に実施したのは、今回の一連の調査が初めてである。

なお、カラス貝は絶滅危惧種のゼニタナゴの貴重な産卵母貝にもなっており、伊豆沼の生態系にとっても重要な位置を占めている。

### 1.3 水生植物分布調査及び室内分解試験

沼の水生植物は水中プランクトンと栄養塩で競合している。水生植物の春から夏の栄養塩類の取り込みを把握するためには総量を把握する必要があるが、手始めとして分布を調べる伊豆沼の「水生植物分布調査」と、秋から冬の水生植物の分解による水質への影響を室内実験する「水生植物分解試験」を実施した。

## 2 調査・試験方法

### 2.1 巻上除去法試験

1 回目：平成16年 1 月15日14時から16日12時まで

2 回目：平成16年 1 月22日15時から23日16時まで

第1回目は約22時間、第2回目は約25時間、荒川下流の飯土井水門の堰を倒して試験を実施した。排出水量は、迫土木事務所が設置している伊豆沼出口直下の荒川沼口橋の水位の変化により把握した。採水は、真冬で凍結するため自動採水器は使えず、同沼口橋においてポリバケツで行ない、SS、COD、N・Pを測定した。

沼底質の除去量は、沼の水位の減少量に沼の面積を乗じて求めた総排出水量と沼口橋でのSS平均濃度の積により算出した。

### 2.2 カラス貝生息調査

平成15年11月5日、内沼8地点で、縦横1mの枠内を10mm目の鋤簾（じょれん）で、貝をもれなくすくい上げ、貝の種類、数、大きさ、重さ（殻付）を調査した。数の少ないところでは付近の数か所の平均値とした。

### 2.3 水生植物分布調査及び分解試験

分布調査は、平成15年9月9日、伊豆沼に船を浮かべ、目測にて植物の種類と分布を調査した。

分解試験は、分布調査時に採取した代表的な水生植物の、ヒシ、ガガブタ、アサザ、ハスを採取し、同時に採水した伊豆沼中央の水を綿栓ろ過した水で、分解試験を行った。試験は、直射日光の射し込まない実験室内で、5個の20ℓポリバケツに綿栓ろ過した伊豆沼の水約15ℓと植物約100gをそれぞれ入れ、毎夕一度バケツを揺すって攪拌し酸素を供給し、室温にて約22週間分解試験した。週1回午前9時頃約100ml採水ろ過し、D-COD、D-TOC、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、D-TN、PO<sub>3</sub>-P、D-TPを測定した。

## 3 結果と考察

### 3.1 巻上除去法試験

今冬は、風の吹く日が多かった。第1回目試験は平成16年1月15日から16日にかけて実施した。1月8日から11日にかけて強風が吹き、12、13日はやや弱まり、14日からまた強くなったが、準備が整わず15日の14時から開始し、16日の12時に試験を終了した。風向は北西から西北西であった。SSの変化は図1のとおりであった。また、試験実施による伊豆沼・内沼の水位低下は約5cmで、沼からの排水量は約20万t、底質の排出量は約24tと推定された。なお、導水の量は、1月20日に導水出口で流量測定し0.13t/sと少ないため、ほとんど無視できるものとした。平成15年12月27日まで水位を下げていたことで、試験直前まで沼の水位があまり上昇していなかったため、総排水量はやや少ないものとなったが、1月8日から強風が続き、巻き上りが継続していたためSSの排出は多かったと推測される。

第2回目試験は平成16年1月22日から23日にかけて実施した。前日の21日までは風が弱かったが、22日から23日にかけて強風が吹いた。風向は概ね西から西北西であった。この間のSSの変化は図2のとおりであった。また、試験実施による伊豆沼・内沼の水位低下は約4cmであり、沼からの排水量は約16万t、底質の排出量は約37t

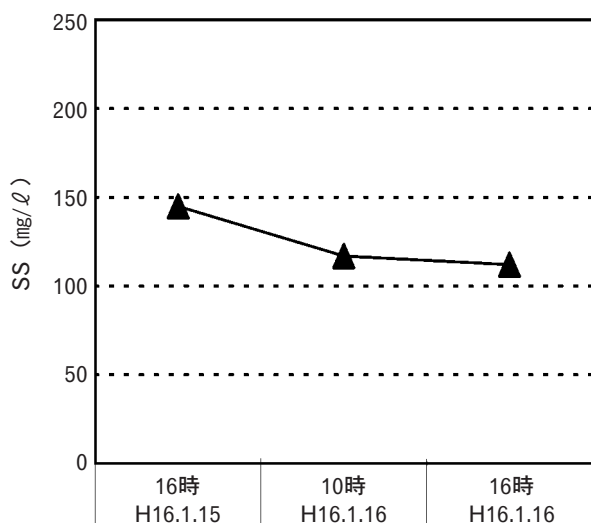


図1 SSの変化（第1回目）

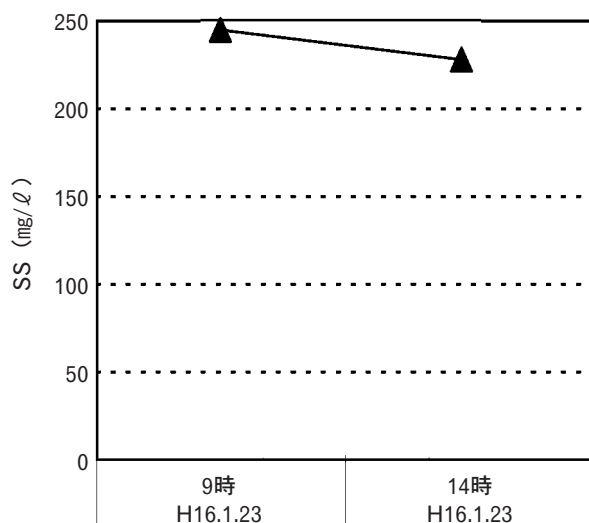


図2 SSの変化（第2回目）



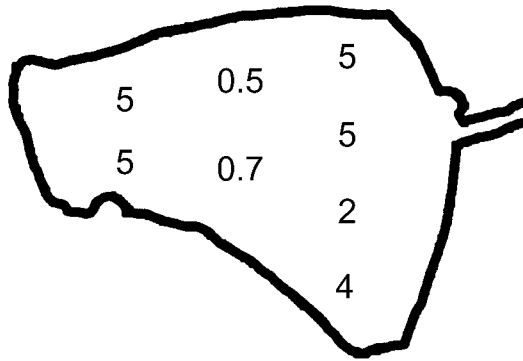


図3 内沼カラス貝の生息数 (個/m<sup>2</sup>)

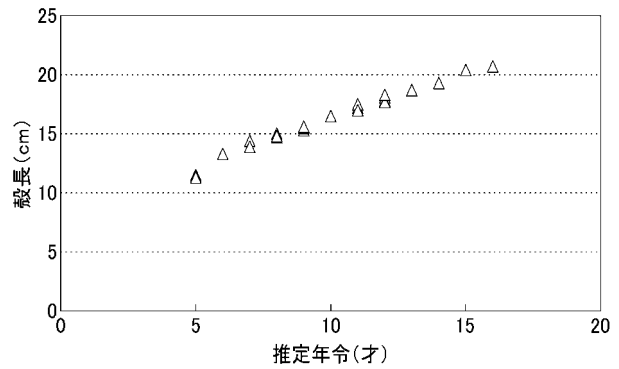


図4 内沼のカラス貝の推定年令

と推定された。ただし、SSの測定は1月23日の9時と14時の2回の平均値であり、22日の夕と夜のデータが取れなかったため、やや荒い数字となっている。排出水量は、やや少ないものとなったが、底質の排出は多かった。

今年度の試験で底質排出量がこれまでより比較的多かった。原因ははっきりしないが、昨年度までと異なっている点は、沼の水位がかなり下がっていたことと、昨年夏に沼出口付近に堆積していた砂が除去され流れがスムーズになったことである。

巻上試験は風や利水の関係で、年に1、2回しか実施できないため、今後は風の向きや吹き方、水位の状況等種々の条件下で実施し、適切な実施方法の確立とその効果の検討を行なっていく必要があると考えられる。

3.2 カラス貝生息調査

内沼8地点での貝の生息数の調査結果は図3のとおりであった。内沼でも、カラス貝の小さな貝は見られなかった。平成6年に伊豆沼沿岸部におけるカラス貝の殻長と年令の関係を調査した進東<sup>6)</sup>のデータを用い、今回調査したカラス貝の年令を推定し図4に示す。カラス貝は大きな貝のみで若い貝はみられず、今後伊豆沼同様カラス貝の減少が危惧される。カラス貝は成長の過程で幼生が底生魚に付着する時期がある。内水面水産試験場の高橋ら<sup>7)</sup>の調査によると近年のブラックバスによる魚介類の食害により他の魚が激減しているとの報告もあり、底生魚の減少が大きく影響しているためと推測される。

今回の内沼におけるカラス貝生息数は単純平均すると約3.4個/m<sup>2</sup>で、1個当たり平均重さは約0.34kgであった。

昨年の伊豆沼と今年の内沼での結果から、伊豆沼・内沼全体では、カラス貝生息数は平均すると約2.7個/m<sup>2</sup>で、1個当たり平均重さは約0.32kgとなり、貝が昼夜を問わず沼水を交換できると仮定すると、室内実験での千葉ら<sup>8)</sup>のデータ (15ml/g・h) から、カラス貝2.7個で1m<sup>3</sup>の水を約3日間ろ過できる能力があると推算される。カラス貝は、濁質のうちプランクトン類を餌として食べ、無機質を擬糞として固定化するといわれており、伊豆沼・内沼のSS低下に大きく寄与していると推測される。

これまで、貝による水質浄化能の研究は、砂質底質に棲むシジミで主になされているだけで、泥状底質の多い

淡水湖沼において、泥状底質を好むカラス貝の利用を検討する価値は大きいと考えられる。

また、カラス貝の減少が懸念されることから、水質浄化の観点からもカラス貝の減少を食い止めるための何らかの対策が必要と思われる。

3.3 水生植物分布調査及び室内分解試験

平成15年9月9日の水生植物分布調査結果を図5に示す。平成10年8月の増水により、それまで沼の大部分を占めていたハスが枯れ、平成13年ごろより少しずつ復活し、平成14年には伊豆沼面積の1、2割程度までになったが7月の台風による大雨によって枯れてまた減ってしまった。図に示すとおり、平成15年度は沼の大部分が、ヒシ・ガガブタによって占められている。昭和55年に増水でハスが壊滅状態になった後もやはりヒシ・ガガブタが優占していた時期があった。

ヒシ、ガガブタ、アサザ、ハス、ブランク水の5種類を22週にわたり室内分解試験した。分解に用いた植物試料の詳細は表1のとおりで、またその分解試験結果について、ガガブタの水質変化の例を図6に示す。D-CODは1、2週で急上昇した。試験初期のD-COD急上昇期のみDO供給が十分でなかったため、一時的に嫌気性分解条件となったと考えられるが、植物体の分解過程の事例としては参考となり得ると思われる。また、窒素はNH<sub>4</sub>-NからNO<sub>2</sub>-Nを経てNO<sub>3</sub>-Nに変化することが確認された。他の3種の植物についても同様の変化であった。なお、ブランク水ではほとんど変化はなかった。また、この実験結果は公共用水域の伊豆沼のデータにおいて、秋に水生植物が枯れ春までの時期に窒素がNH<sub>4</sub>-NからNO<sub>3</sub>-Nに変化する現象によく符合している。

表1 水生植物分解試験の試料

	ヒシ	ガガブタ	アサザ	ハス
綿栓ろ過水 (ℓ)	15.80	15.62	15.76	15.87
植物量 (g)	100	96	97	97
植物の水分 (%)	88	91	87	76
強熱減量 (%)	87	90	89	89

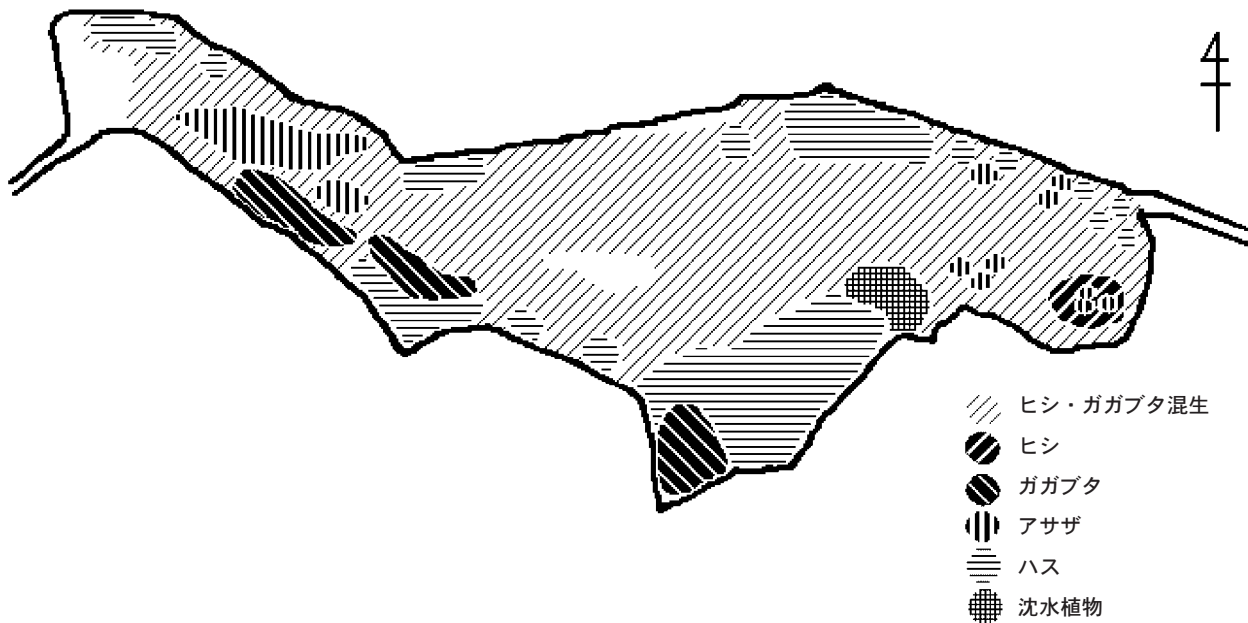


図5 伊豆沼水生植物分布 (H15. 9. 9調査)

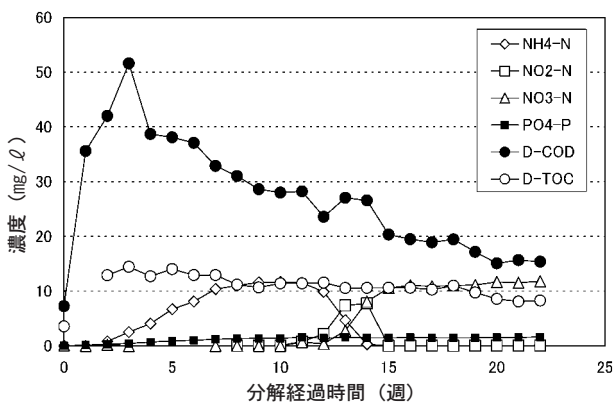


図6 水生植物分解試験 (ガガブタ)

#### 4 ま と め

「巻上除去法試験」は平成16年1月に2回実施し、底質排出量が比較的多く、底質改善にかなり効果があるものと考えられる。

「カラス貝生息調査」は平成15年11月に実施し、内沼でのカラス貝生息数は約3.4個/m<sup>2</sup>で、1個当たり平均重さは約0.34kgであった。また、今回の調査でも大きな貝のみで若いカラス貝はみられず、今後、伊豆沼・内沼でカラス貝の減少が危惧され、水質浄化の点からも何らかの対策が必要と考えられる。

「水生植物分布調査」は平成15年9月に実施し、伊豆沼では昨年の台風のためハスは少なく、代わりにヒシ・ガガブタが優占していた。「水生植物分解試験」では、ヒシ、ガガブタ、アサザ、ハスを約22週にわたり室内分解試験を実施したところ、窒素の分解はアンモニアから亜硝酸を経て硝酸に変化した。この実験結果は、公共用水域のデータで、秋から春までの時期に窒素がアンモニアから硝酸に変化する現象によく符合している。

#### 5 謝 辞

巻上除去法試験では、伊豆沼・内沼環境財団には採水協力いただき、三町排水組合(事務局：迫町)には堰操作で協力をいただき、迫土木事務所には水位データを提供いただいた。また、カラス貝の調査では、東北大学工学部西村研究室に貝の生息調査時の協力と室内実験データの提供をいただき、伊豆沼・内沼環境財団の進東研究員には貝の生息調査時の協力と貝の年齢に関するデータを提供いただいた。ご協力いただいた関係者に深謝いたします。

#### 参 考 文 献

- 1) 宮城県, “伊豆沼・内沼環境保全対策基本計画書”, (1992).
- 2) 柴崎徹: “日本の水環境”, 第2巻東北編, 日本水環境学会編, p40 (2000), (技報堂).
- 3) 渡部正弘, 小葉松英行, 栗野健, 柴崎徹: “日本水環境学会誌”, 26, 387 (2003).
- 4) 渡部正弘, 栗野健, 小山孝昭, 阿部時男: “宮城県保健環境センター年報”, 21, 147 (2003).
- 5) 渡部正弘, 栗野健, 小山孝昭, 阿部時男: “宮城県保健環境センター年報”, 21, 143 (2003).
- 6) 進東健太郎: 伊豆沼におけるカラス貝の殻長組成 (私信).
- 7) 高橋清孝, 小野寺毅, 熊谷明: “宮城県水産研究報告”, 1, 111 (2001).
- 8) 千葉信夫, 野村宗弘, 西村修: “日本水処理生物学会第39回大会要旨集”, p94 (2002).

# 伊豆沼湖水中の溶存有機物の動態

## Dynamics of Dissolved Organic Matter in Izunuma

阿部 公恵 三沢 松子\* 清野 茂  
牧 滋 大庭 和彦

Kimie ABE, Matsuko MISAWA, Shigeru SEINO  
Shigeru MAKI, Kazuhiko OHBA

伊豆沼湖水及び流入河川水を対象として溶存有機炭素（以下「DOC」と略す。）をフミン物質（疎水性酸）、疎水性中性物質、親水性酸、親水性塩基、親水性中性物質の5つに分画し、DOC分画分布及び紫外外部吸光度特性により、溶存態有機物の特性及びその起源を評価した。その結果、DOC分画分布からは、難分解性である有機酸の存在割合が約60%から80%を占めていることが明らかになった。さらに、紫外外部吸光度特性からは、大部分が水域由来の内部生産DOCであることが推定された。

キーワード：溶存有機炭素；分画；フミン物質；難分解性有機物

**Keywords** : dissolved organic carbon ; fractionation ; aquatic humic substances ; recalcitrant organic matter

### 1 はじめに

宮城県の湖沼におけるCODの環境基準の平成14年度達成率は8%である。この汚濁の原因となる有機物の多くは溶存態で不均質な混合物であると考えられている。この汚濁に対する有効な改善施策を検討する上で、溶存態有機物の動態や起源を明らかにすることが重要であるが、これまで各成分の存在比や特性を評価した報告は少ない。

そこで、本研究では今井らの方法<sup>1)</sup>により、伊豆沼湖水及び伊豆沼に流入する河川水等を対象としてDOCをフミン物質（疎水性酸）、疎水性中性物質、親水性酸、親水性塩基、親水性中性物質の5つに分画し、DOC分画分布及び紫外外部吸光度特性により、溶存態有機物の特性及びその起源を評価した。

### 2 方 法

#### 2.1 樹脂の精製方法

分画に使用する樹脂は、非イオン性マクロ網状アクリル樹脂Supelite™DAX-8 (Supelco 40-60mesh, 平均表面積160m<sup>2</sup>/g, ポア径225Å, AmberLite XAD 8 と同等品)、強酸性マクロポーラス陽イオン交換樹脂 (Bio-Rad AG-MP50, 100-200mesh, 水素イオン形) 及び強塩基性マクロポーラス陰イオン樹脂 (Bio-Rad AG-MP-1, 50-100mesh, 塩基イオン形) の3種類である。

DAX-8樹脂は、0.1MNaOH溶液に24時間浸漬した後

\* 現 廃棄物対策課

に上澄み液を捨てる操作を連続5回を行い、次に、円筒ろ紙 (ADVANTEC88Rシリカ織) に入れ、24時間ソックスレー抽出洗浄をメタノール、ジエチルエーテル、アセトニトリル、メタノールの順序で行い精製した。

陽イオン交換樹脂は、メタノールで24時間ソックスレー抽出洗浄を行い精製した。

陰イオン交換樹脂は、メタノールで24時間ソックスレー抽出洗浄を行い、その後、樹脂量の約10倍量の1MHClで逆再生を行い、溶出水のpHが中性となるまで超純水で洗浄した。さらに樹脂量の約20倍量の1MNaOHで再生した後、再び溶出水のpHが中性となるまで超純水で洗浄した。

#### 2.2 DOC分画方法

DOC分画は、今井ら<sup>1)2)</sup>の方法に準じた。樹脂吸着によるDOC分画法の概略を図1に示す。

DAX-8樹脂3mlをガラスカラムに充填し、超純水で洗浄後0.1MNaOH10ml及び0.1MHCl10mlを交互に各3回通水し、その後、超純水を通水しブランクを採取する (B1)。陽イオン交換樹脂6ml及び陰イオン交換樹脂12mlをガラスカラムに充填し、陽イオン交換樹脂及び陰イオン交換樹脂の順で連結し、コンディショニング終了直前に陽イオン交換樹脂から超純水を採取する (B2)。さらに、連結したカラムを通過した超純水のブランクを採取する (B3)。

試料は、450°Cで4時間熱処理したガラスびんに採取し、採取後450°Cで4時間熱処理したWhatmanGF/F (平均孔径

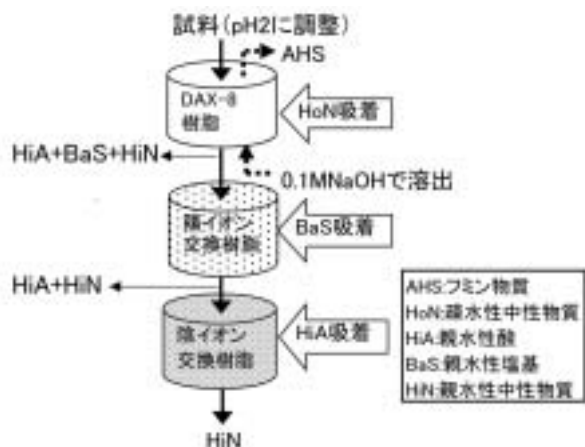


図1 樹脂吸着によるDOC分画法

0.7 μm)ろ紙でろ過した。

6 M HCl で pH 2 に調整した試料 200 ml (DOC 1) を DAX-8 樹脂カラムに流速 1 ml/分 で通水する。次に、6 ml の 0.1 M HCl でリンスし、9 ml の 0.1 M NaOH を逆方向から流速 0.5 ml/分 で通水し、溶出させ (DOC 2)、その溶出量を測定する。

DAX-8 樹脂カラムを通過した溶液 (DOC 3) を陽イオン交換樹脂-陰イオン交換樹脂の順で連結したカラムに流速 1 ml/分 で通水し、36 ml 通過後、陽イオン交換樹脂通過液 (DOC 4) 及び陰イオン交換樹脂通過液 (DOC 5) を採取する。

上記の操作で得られた溶液及びコンディショニングに使用した超純水に 2 M HCl を添加し pH 2 に調整後、高純度窒素ガスを通気し無機炭素を除去後、DOC (Shimadzu TOC500) を測定した。紫外外部吸光度は、光路長 1 cm の石英セルを用いて 260 nm における吸収 (日本分光 V-560) を測定し、UV/DOC 比 [(mAbs/cm)/(mg/l)] を計算した。

各画分の DOC 濃度は、以下のとおり算出した。但し、疎水性塩基性物質については、今井ら<sup>1)</sup>によれば多くの天然水及び排水サンプルでは、ほとんど存在しないとの報告があることから無視することとした。

- フミン物質 (AHS) = DOC 2 × 溶出量 / サンプル量
- 疎水性中性物質 (HoN) = DOC 1 - フミン物質 - (DOC 3 - B 1)
- 親水性塩基 (BaS) = (DOC 3 - B 1) - (DOC 4 - B 2)
- 親水性酸 (HiA) = (DOC 4 - B 2) - (DOC 5 - B 3)
- 親水性中性物質 (HiN) = DOC 5 - B 3

### 3 結果及び考察

#### 3.1 伊豆沼におけるDOC分画分布の季節変動

伊豆沼中央 (表層水) におけるDOC分画分布の季節変動を図2に示す。

いずれの季節においても難分解性といわれているフミン物質 (21%~33% : 0.72 mg/l~1.25 mg/l) 及び親水性酸 (29%~35% : 0.90 mg/l~1.19 mg/l) の存在比が大きかつ

た。次いで、親水性中性物質 (14%~29% : 0.57 mg/l~1.02 mg/l) の存在比が大きく、疎水性中性物質 (3%~20% : 0.14 mg/l~0.83 mg/l) 及び親水性塩基性物質 (5%~12% : 0.57 mg/l~1.02 mg/l) の存在比は小さかった。

#### 3.2 伊豆沼湖水, 流入水及び底質からの溶出水のDOC分画分布

伊豆沼湖水, 伊豆沼に流入する浄土川河川水, 栗原郡衛生センター排水 (し尿処理施設), 築館町都市下水路排水 (生活雑排水), 荒川河川水及び底質からの溶出水のDOC分画分布を図3に示す。

伊豆沼湖水では、親水性酸が35% (1.12 mg/l) と最も多く存在し、次いでフミン物質が24% (0.78 mg/l) 存在し、親水性酸とフミン物質を合わせた有機酸が約60%を占めた。また、流入水についても、親水性酸は浄土川で42% (1.44 mg/l), 栗原郡衛生センター排水で71% (4.03 mg/l), 都市下水路排水で39% (1.80 mg/l), 荒川で23% (0.51 mg/l), 底質からの溶出水で31% (1.08 mg/l) 存在していた。フミン物質は浄土川で32% (1.11 mg/l), 栗原郡衛生センター排水で13% (0.71 mg/l), 都市下水路排水で23% (1.05 mg/l), 荒川で22% (0.49 mg/l), 底質からの溶出水で40% (1.40 mg/l) 存在していた。親水性中性物質は9%~32% (0.36 mg/l~0.72 mg/l), 疎水性中性物質 0%~17% (0 mg/l~0.38 mg/l), 親水性塩基性物質 6%~20% (0.14 mg/l~0.93 mg/l) 存在しており、荒川を除く流入水及び底質からの溶出水についても、有機酸 (親水性酸とフミン物質) が約60%から80%の割合で優占した。

なお、伊豆沼湖水の有機酸の占める割合は、今井ら<sup>1)2)</sup> している霞ヶ浦や琵琶湖の70%とほぼ同様の結果が得られた。

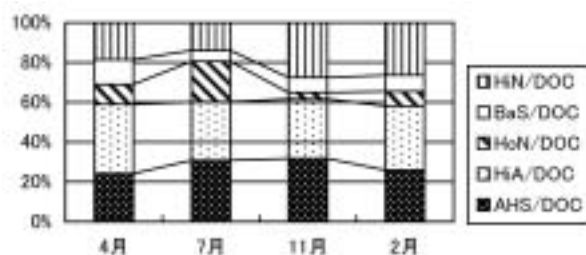


図2 伊豆沼中央におけるDOC分画分布の季節変動

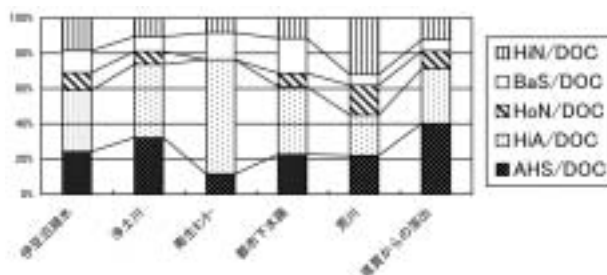


図3 伊豆沼湖水, 流入水及び底質からの溶出水のDOC分画分布



### 3.3 生分解試験後の伊豆沼湖水及び流入水のDOC分画分布

伊豆沼湖水及び伊豆沼に流入する浄土川河川水、栗原郡衛生センター排水、築館町都市下水路排水（生活雑排水）及び荒川河川水の生分解試験後（20℃、暗所保存、100日後）のDOC分画分布を図4に示す。

生分解試験後も試験前と同様に有機酸が約60%から80%の割合で優占した。特に、いずれの検体においてもフミン物質の存在割合が上昇したことから、他の画分に比べてフミン物質が難分解性であることが確認できた。

このことから、流入水の伊豆沼への寄与率は未解決であるものの、極めて難分解性の親水性酸やフミン物質を含む生活雑排水、し尿処理水及び河川水の流入や底質からの溶出により、これら有機酸による汚濁が進行していることが示唆された。

### 3.4 DOC起源の推定

紫外外部吸光度/溶存有機炭素比（UV/DOC比）を用い、DOC起源の推定を行った。

自然水中のDOCは、土壌由来の外來性DOCと水域由来の内部生産DOCに分類され、Zumstein and Buffleら<sup>3)</sup>は、外來性のDOCは芳香族性、内部生産DOCは脂肪族性であると報告している。したがって、外來性DOCのUV/DOC比は高く、内部生産DOCのUV/DOC比は低い。

腐植物質等を多く含む外來性DOCのUV/DOC比は23～58 [(mAbs/cm)/(mg/l)]、植物プランクトンから分泌された光合成産物、動物プランクトン、魚からの排泄物等が主体の内部生産DOCのUV/DOC比は12 [(mAbs/cm)/(mg/l)]と報告<sup>4)</sup>されている。

また、フミン物質について、Mcknightら<sup>5)</sup>は、外來性DOCが卓越する河川水フミン物質のUV/DOC比は40 [(mAbs/cm)/(mg/l)]、藻類由来DOCが卓越する湖水フミン物質のUV/DOC比は16～17 [(mAbs/cm)/(mg/l)]であると報告している。

伊豆沼湖水及び流入水のUV/DOC比を図5に示す。

伊豆沼湖水DOCのUV/DOC比は18.5 [(mAbs/cm)/(mg/l)]であった。このことから伊豆沼湖水DOCは大部分が水域由来の内部生産DOCであると思われるが、土壌由来の外來性DOCからの寄与も無視できないと推定される。

伊豆沼湖水DOCのうちそれぞれ約30%を占めるフミン物質及び親水性酸のUV/DOC比についてさらに解析を行った。

同様にフミン物質もUV/DOC比が24.4 [(mAbs/cm)/(mg/l)]で、内部生産DOCのUV/DOC比より高く、外來性DOCのUV/DOC比より低い。したがって、フミン物質も、内部生産DOCに外來性DOCが寄与しており、その程度は湖水全体のDOCに比較し、外來性DOCの寄与の程度が高いと推察される。

また、親水性酸については、UV/DOC比に関する報告はないが、同様の傾向であるとすれば、8.8 [(mAbs/cm)/

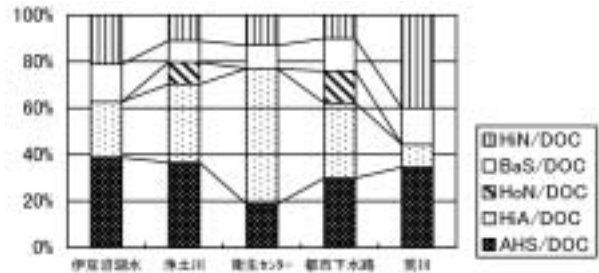


図4 生分解試験後のDOC分画分布

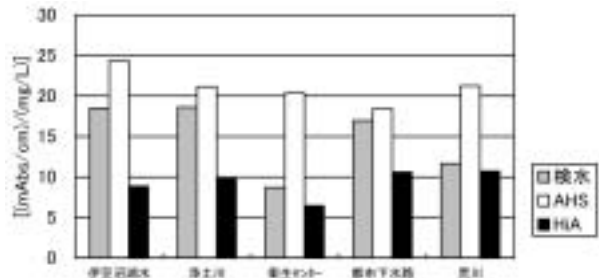


図5 伊豆沼湖水及び流入水のUV/DOC比

(mg/l)]と低いことから、大部分が内部生産由来と思われる。

また、流入水のUV/DOC比は8.7～18.6 [(mAbs/cm)/(mg/l)]、フミン物質は18.2～21.3 [(mAbs/cm)/(mg/l)]及び親水性酸は6.4～10.7 [(mAbs/cm)/(mg/l)]であることから、大部分が水域由来の内部生産DOCであることが推察された。

以上の結果から伊豆沼湖水の汚濁は、難分解性の有機酸によるものであり、その起源は、土壌由来の寄与は小さく大部分が水域由来の内部生産DOCの寄与が大きいことが推定された。

## 4 ま と め

伊豆沼湖水、流入水及び底質からの溶出水を3種類の樹脂を用い、フミン物質、疎水性中性物質、親水性酸、親水性塩基、親水性中性物質の5つに分画した結果、難分解性である有機酸の存在割合が約60%から80%を占めた。

また、生分解試験後も有機酸が約60%から80%の割合で優占した。

さらに、UV/DOC比を用い、DOCの起源を推定した結果、伊豆沼湖水及びフミン物質は、外來性DOCの寄与も無視できないが、大部分が水域由来の内部生産DOCであることが推定された。また、親水性酸は内部生産由来であることが推定された。さらに、流入水及びそのフミン物質、親水性酸についても土壌由来の寄与は小さく大部分が水域由来の内部生産DOCであることが推察された。

## 5 謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導、ご助言を賜りました

国立環境研究所の今井章雄室長に深く感謝いたします。

### 参 考 文 献

- 1) 今井章雄, 福島武彦, 松重一夫, 井上隆信, 石橋敏明: 陸水学会誌, **59**, 53 (1998).
- 2) 環境省国立環境研究所特別研究報告: “湖沼において増大する難分解性有機物の発生原因と影響評価に関する研究”, (2001).
- 3) Zumstein, J. and Buffle, J. : *Water Res*, **23**, 229 (1989)
- 4) 福島武彦, 今井章雄, 松重一夫, 井上隆信, 小澤秀明: 水環境学会誌, **20**, 397 (1997).
- 5) Mcknight, D.M., Andrews, E.D., Spaulding, S.A. and Aiken, G.R. : *Limnol.Oceanogr.*, **39**, 1972 (1994).

## 酵母Two-hybridアッセイ法による環境水中の 化学物質によるエストロゲン様活性の検索

### Investigations of the Estrogenic Activity in Environmental Waters using Yeast Two-Hybrid Assay System

三沢 松子\*<sup>1</sup> 名村 真由美\*<sup>2</sup> 千葉 美子  
阿部 公恵 大庭 和彦

Matsuko MISAWA, Mayumi NAMURA, Yoshiko CHIBA,  
Kimie ABE, Kazuhiko OHBA

酵母Two-Hybridアッセイ法を用いて、県内の河川水中エストロゲン・アゴニスト活性の検索を試みたところ、既往の報告と検出頻度、検出濃度とも同程度の結果が得られたが、一部の水域では魚類の雌化に影響があるとされるエストラジオール換算で10pptを上回る値が繰り返し認められ、一過性のものではないことが示唆された。また、同一試料でも、ヒトとメダカという生物種の異なる受容体遺伝子組込酵母を用いた試験で結果に差がみられたことから、生物種により受ける影響の違いがあるものと推察され、水圏を対象としてリスク評価をしようとする場合、そこで生活する生物への影響についての考慮が不可欠であると考えられた。バイオアッセイでは活性を示す構成物質の詳細な内訳をみることはできないものの、全体としての作用を反映しようという点から、環境試料の持つ複合的な作用の評価を行う場合において有用であるものと考えられた。

キーワード：酵母Two-Hybridアッセイ法；エストロゲン活性；環境水；ヒトエストロゲン受容体アルファ遺伝子；  
メダカエストロゲン受容体アルファ遺伝子

**Keywords** : yeast two-hybrid assay system ; estrogenic activity ; environmental waters ; hER  $\alpha$  ; mER  $\alpha$

## 1 はじめに

環境中の化学物質による包括的な生物の内分泌攪乱作用の検索に各種バイオアッセイ法が検討されている。今回、バイオアッセイ手法として水圏試料のエストロゲン様活性を対象とした場合に報告例の多い酵母Two-Hybridアッセイ法を導入すべく検討した。この手法には、測定原理として、吸光度を測定する「発色法」の他に「化学発光」を用いた方法があり、「化学発光法」は「発色法」に比べ試薬や装置のコストはやや高くなるものの、作業時間が短く、感度が高く、試料由来の濁りの影響を排除できる等のメリットがありスクリーニング手法としてより適しているとされている。

そこで、国立環境研究所との共同研究も併行して可能となったため、より迅速な方法として「化学発光法」による環境水の測定を通じ、スクリーニング手法としての環境水試料への適用とその有効性について検討を行ったので報告する。

なお、本調査研究は、平成13年度～15年度の所内プロ

\* 1 現 環境生活部廃棄物対策課

\* 2 現 県立がんセンター

ジェクト研究及び平成15年度地方公共団体研究機関と国立環境研究所との共同研究の一部として行ったものである。

## 2 方 法

### 2.1 供 試 菌 株

試験は、平成14年度に独立行政法人国立環境研究所から分与された、環境ホルモン検出のためのヒトのエストロゲン受容体 $\alpha$ 遺伝子（以下「hER $\alpha$ 」と略す。）を組み込んだ酵母を用いて行った。また、後述の生物種の違いに関する試験として、国立環境研究所所有のメダカのエストロゲン受容体 $\alpha$ 遺伝子（以下「mER $\alpha$ 」と略す。）を組み込んだ酵母を用いた。

### 2.2 酵母Two-Hybridアッセイ法の原理

酵母Two-hybrid法の測定原理は、ホルモンや化学物質がホルモン受容体に結合すると $\beta$ -ガラクトシダーゼ（ $\beta$ -gal）が発現するしくみを酵母に組み込み、 $\beta$ -galと外部から添加した基質との反応による発色もしくは発光の度合を測定することにより、ホルモンや化学物質の作用を評価するものである。

### 2.3 エストロゲン・アゴニスト作用の判定と評価

エストロゲン様活性のうち、今回対象としているアゴニスト作用とはホルモン様作用を誘発する作用である。その作用活性の有無の判定と評価は白石らの方法<sup>1)2)</sup>によった。すなわち、判定は、試料の各濃度ごとの化学発光強度の平均値 (T) を求め、ジメチルスルホキシド (以下「DMSO」と略す。) (ブランク) での化学発光強度の平均値 (B) に対する化学発光強度比 (T/B) を算出し、濃度に依存した化学発光強度比の増加がみられ、かつ最大化学発光強度比が4以上を示すものをアゴニスト作用陽性とした。また、その評価は、化学発光強度比が次の希釈濃度の2倍以上を示すような試験濃度領域で回帰直線式を求め、T/Bを10倍誘導する濃度を算出し10倍影響濃度 (EC<sub>x10</sub>) として指標とした。

### 2.4 化学物質標準品での測定

まず試験系の確認をするため、アルキルフェノール類を主とした化学物質標準品を被検試料として活性を測定した。今回使用した化学物質は表1のとおりであり、4-n-ノニルフェノールはDr.Ehrenstorfer GmbH製を、その他は関東化学製の標準品をDMSOに溶解し調製した。

### 2.5 水試料の前処理操作

河川水等水試料の前処理操作は、白石らの方法<sup>1)2)</sup>に準じた。試料に対しその1/100容の酢酸緩衝液：メタノール (1：9) 液を添加しガラスフィルター (GF/C) でろ過する。ここで試料に添加する酢酸緩衝液：メタノール (1：9) 液は、まず1M-酢酸溶液14.6mlと1M-水酸化ナトリウム溶液10mlを混合しDWで100mlとした酢酸緩衝液を調製し、その酢酸緩衝液とメタノールを1：9の割合で混合したものである。ろ液は、予めメタノール、ジクロロメタン各10mlで洗浄した後メタノール10mlと蒸留水20mlでコンディショニングした固相ディスク (3M製C18FF) に通水し、ディスクはDWで洗浄し、35~40℃のホットプレート上で1時間乾燥した後、ジクロロメタン8ml (4ml×2) で溶出し、溶出液はねじ口式ガラス試験管に-20℃で測定時まで保存した。測定直前に窒素ガスの吹きつけにより溶媒を除去した後DMSOに溶解し (原則として10,000倍濃縮とした。) 供試試料とした。

### 2.6 17β-エストラジオールの添加回収試験

前処理操作の確認を行うため、蒸留水及び環境水400mlに、それぞれアセトン転溶した17β-エストラジオール (以下「E2」と略す。) 200nMの溶液を40μl添加

した試料を調製し前処理操作及び測定を行った。この試料は、DMSOに転溶した段階で10,000倍濃縮となるため、添加分のE2の最終濃度は理論上200nMとなる。

### 2.7 環境試料の測定

#### 2.7.1 試験区分の設定

今回の検討において、実試料の測定では比較のため2つの視点で試験区分の設定を行った。

まず、異なる生物種のエストロゲン受容体遺伝子組込酵母を用いた場合における活性の差の有無という視点で、ヒト (hERα) とメダカ (mERα) による試験を行った。ここで、メダカは、生活の場が常に水中にある生物種として設定したものであり、当センターではmERα株を所有していないため、測定には独立行政法人国立環境研究所の白石不二雄氏の協力をいただいた。

次に、一般に、取り込まれた化学物質は生体内で薬物代謝酵素により代謝されるという過程を考慮し、代謝に伴う活性の変化の有無をみるため、前処理した試料を直接評価する試験 (-S9試験) 及び前処理した試料に予めラット肝ホモジネート上清を含む溶液 (S9 mix) を加えて処理し、代謝生成物の活性を評価する試験 (+S9試験) の区分を設定した。

#### 2.7.2 環境水の採取

測定対象を県内の河川水とし、下記のとおり計3回採水を行い、試験に供した。また、環境水の前処理操作に伴い試料中の夾雑物も一緒に濃縮されるため、試料自体の毒性影響について発光細菌を用いた試験 (マイクロトックス試験)<sup>1)2)</sup>を併せて行った。

- (1) 増田川流域 (平成15年4月採水) 13地点
- (2) 中小都市河川8水域 (平成15年6月採水) 10地点
- (3) (2)のうち鉛川中流域及び森越戸排水路の再調査 (平成15年9月採水) 9地点

## 3 結果及び考察

### 3.1 化学物質標準品のエストロゲン様活性と10倍影響濃度 (EC<sub>x10</sub>)

各化学物質標準品をhERαに曝露した時の用量反応曲線を図1に、10倍影響濃度を算定した結果を表2に、またE2の活性を100としたときの各物質の相対活性を図2に示した。

算定した10倍影響濃度は、既往の報告<sup>2)</sup>とほぼ同じであり、アッセイ系として同程度の感度であることが確認できた。

表1 単独曝露試験に使用した化学物質標準品

化学物質名	化学式	分子量	化学物質名	化学式	分子量
4-t-ブチルフェノール	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	150.22	4-オクチルフェノール (mix)	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	206.32
4-n-ペンチルフェノール	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	164.24	4-n-ノニルフェノール	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	220.36
4-n-ヘキシルフェノール	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	178.27	4-ノニルフェノール (mix)	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	220.36
4-n-ヘプチルフェノール	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	192.3	ビスフェノールA	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH)	228.29
4-n-オクチルフェノール	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	206.32	ビスフェノールF	CH <sub>2</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH) <sub>2</sub>	200.23



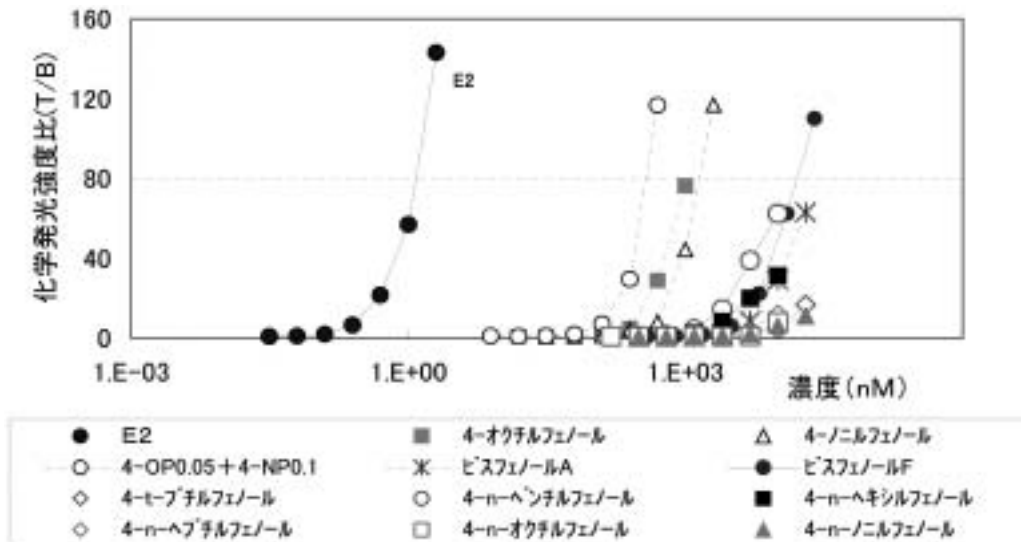


図1 各被検化学物質の用量反応曲線

表2 各物質の10倍影響濃度

化学物質	EC <sub>10</sub> (M)
① 4-t-ブチルフェノール	1.55×10 <sup>-5</sup>
② 4-n-ペンチルフェノール	1.90×10 <sup>-6</sup>
③ 4-n-ヘキシルフェノール	2.83×10 <sup>-6</sup>
④ 4-n-ヘプチルフェノール	8.11×10 <sup>-6</sup>
⑤ 4-n-オクチルフェノール	1.99×10 <sup>-7</sup>
⑥ 4-オクチルフェノール	3.02×10 <sup>-7</sup>
⑦ 4-n-ノニルフェノール	1.70×10 <sup>-5</sup>
⑧ 4-ノニルフェノール (mix)	5.24×10 <sup>-7</sup>
⑨ ビスフェノールA	4.98×10 <sup>-6</sup>
⑩ ビスフェノールF	3.96×10 <sup>-6</sup>

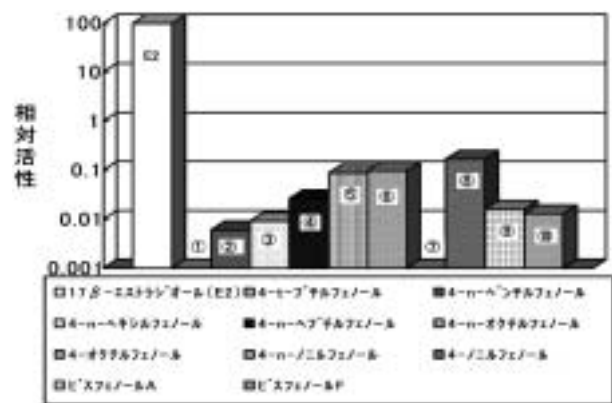


図2 アルキルフェノール類等標準品での活性比 (hERα)

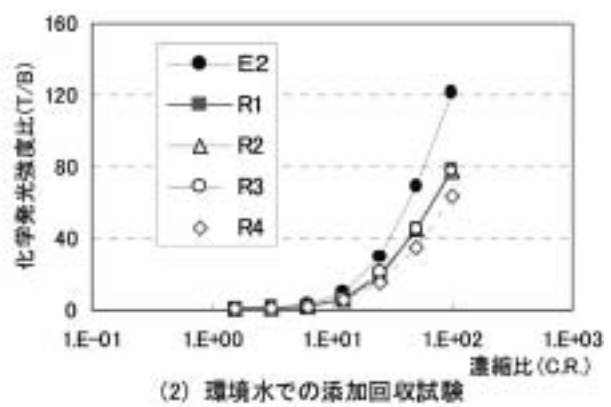
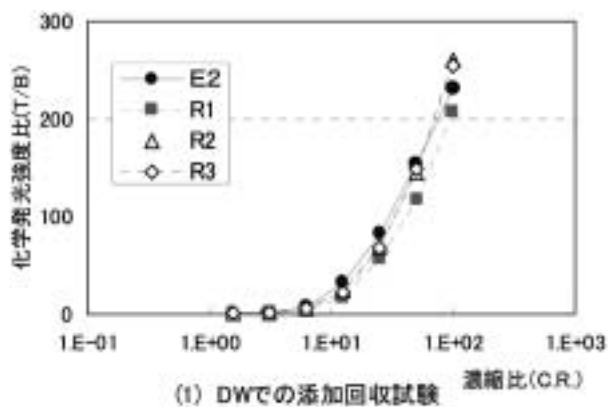


図3 E2の添加回収試験による用量反応曲線

また、hERα試験系における各化学物質のE2に対する相対活性は、1,000分の1～10,000分の1であった。すなわち、ヒトでは、これら化学物質は、単独の場合、E2の1,000～10,000倍の量でE2に匹敵する活性を発現するものと考えられる。

3.2 E2の添加回収試験

E2を添加した蒸留水及び環境水（増田川流域で採水

したものを使用した。）試料の試験結果を図3に示した。この試験操作に用いた蒸留水及び環境水自体には活性は認められず、添加原液と添加後前処理した試料の活性から計算した回収率は、蒸留水に添加した場合で80.6～90.7%（平均86.0%，n=3）、環境水に添加した場合は76.4～84.1%（平均79.3%，n=4）であり、概ね良好であると考えられた。

表3 増田川流域の測定結果

本 支 川		増 田 川 ( 本 川 )										館 腰 承 水 路		
No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
採 水 地 点		ダム流入前 (業師橋)	ダム下流 (朝町橋)	観音橋	吉合橋	増田川 上 橋	小山橋	増田飯 野坂橋	舟橋	柚の木橋	寺野橋	箱塚橋	小山一丁 目公園前	増田川 合流前
hER(-S9)	ppt as E2	N.A. <sup>注2)</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0.21	0.47	0.44	0.17
hER(+S9)	ppt as E2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
mER(-S9)	ppt as E2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1.3	1.1	N.A.	N.A.	2.5	N.A.	N.A.	N.A.
mER(+S9)	ppt as E2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
P.B.test <sup>注1)</sup>	IC <sub>50</sub> (C.R.)	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100

注1) 発光細菌による毒性試験

注2) N.A.: 活性を認めず

表4 中小都市河川の測定結果

水域・地点等		鉛川・ 佐野橋	鉛 川・ 五輪原橋	鉛川・ 久保橋	新町川	砂押川	新 堀 サ イ フ ォ ン 入 口	出来川	緒絶川	荒川都市 下 水 路	森越戸排水 路・出口
hER(-S9)	ppt as E2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0.86	1.9
hER(+S9)	ppt as E2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
mER(-S9)	ppt as E2	3.5	4.2	N.A.	N.A.	N.A.	2.4	N.A.	2.7	4.6	18
mER(+S9)	ppt as E2	N.A.	1.7	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
P.B.test	IC <sub>50</sub> (C.R.)	150	140	280	weak	weak	weak	weak	<100	140	150

### 3.3 環境試料のエストロゲン・アゴニスト活性

#### 3.3.1 増田川流域

名取市内の増田川流域は、その流域が比較的コンパクトであり、これまでの県の実態調査結果<sup>3)</sup>においてアルキルフェノール類等の検出頻度が高かったことから、上流から下流、代表的な流入支川を含む13地点で試料を採取し、測定した結果を表3に示した。

この流域での調査地点の活性の検出率は、hER $\alpha$ では-S9試験で4/13、+S9試験で0/13、mER $\alpha$ では-S9試験で3/13、+S9試験で0/13であった。また検出範囲はE2換算値で、hER $\alpha$ ではN.A.~0.47ppt、mER $\alpha$ ではN.A.~2.5pptであった。中流の市街地の部分や市街地を流下する流入支川で活性がみられ、下流で最大の活性値を示している。なお、発光細菌を用いた毒性試験では100倍濃縮までは毒性は認められなかった。

#### 3.3.2 中小都市河川8水域

以前実施した河川水中のフタル酸エステルの実態調査結果<sup>4)</sup>も参考に、下水道がそれほど普及していない中小都市河川等8水域(10地点)での試料を採取し測定した結果を表4に示した。

全調査地点の活性の検出率は、hER $\alpha$ では-S9試験で2/10、+S9試験で0/10、mER $\alpha$ では-S9試験で6/10、+S9試験で1/10であった。また検出範囲はE2換算値で、hER $\alpha$ ではN.A.~1.9ppt、mER $\alpha$ ではN.A.~18pptであった。前回の増田川流域より検出率、活性ともに高い値が認められ、特に森越戸排水路出口ではメダカで18pptを示し、魚類の雌化に影響があるとされる10pptを超える値であった。なお、発光細菌を用いた毒性試験では100倍濃

縮までは毒性は認められなかった。

#### 3.3.3 鉛川中流域及び森越戸排水路の再調査

6月の調査水域のうち、メダカのみで活性が認められた鉛川流域と、ヒト、メダカともに活性が認められた森越戸排水路において、再調査を行った。測定結果を表5に示した。

鉛川流域では、6月の調査で下流の久保橋において活性がみられなかったため、対象地点は佐野橋~藤沢橋までの中流域のみ調査を実施した。再調査では6月の調査と同様に、ヒトに比べメダカで高い活性がみられ、3地点の結果をみると、流下に伴い活性値は低下した。佐野橋付近或いはその上流域に活性をもたらす要因があるものと推察される。なお、発光細菌による毒性試験では、佐野橋で100倍以下の濃縮でやや毒性がみられ、50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)は83倍と算定された。

森越戸排水路では上流~出口までの5地点と最も大きな流入支川1地点の計6地点でサンプリングを行った。6月の調査時よりもさらに大きい値で活性が確認された。まず上流の地点AB間にメダカの活性に大きな上昇がみられ、地点B~Cでそれにつぐ上昇となっている。地点CE間には流入支川が多い。最も大きな支川の出口地点Dは、水の外観や性状、一般的な水質指標の値からかなり汚濁が進んでいると思われたが、全く活性がみられなかった。また地点EF間で活性は大きく上昇し、特にヒトで顕著であった。これら活性の推移には流入する支川の影響が大きいものと考えられる。特に地点E~Fでは水路に隣接する住宅や工場からの放流水が直接流入する状況にあることからその影響によるものと推察される。この6地点の

表5 2水域の再調査結果

採水地点		hER α (-S9)	mER α (-S9)	P.B.test (IC <sub>50</sub> )
		ppt as E 2	ppt as E 2	C.R.
鉛川	佐野橋	0.16	8.3	83
	五輪原橋	0.15	6.3	130
	藤沢橋	0.13	4.8	120
森越戸排水路	Aため池出口	0.59	14	weak
	B	5.5	103	68
	C	7.3	129	94
	D	-	-	9.8
	E	6.2	74	58
	F排水路出口	66	85	82

表6 各化学物質の比活性<sup>2)</sup>

	hER α	mER α
17β-エストラジオール	100	100
エストリオール	0.46	
エストロン	16	17
4-t-プチルフェノール	-	-
4-n-ペンチルフェノール	0.011	0.19
4-n-オクチルフェノール	0.0033	0.16
4-t-オクチルフェノール	0.21	0.44
4-n-ノニルフェノール	0.0025	0.085
4-ノニルフェノール	0.033	0.26
ビスフェノールA	0.0042	0.029

試料の発光細菌による毒性試験の結果では、地点Aでは殆ど毒性は認められなかったが、地点B以降ではいずれも100倍以下の濃縮率で毒性がみられた。IC<sub>50</sub>を算定したところ、地点Bから順に、68倍、94倍、10倍、58倍、82倍であり、地点Dではかなり強い毒性と考えられた。この毒性により地点Dで活性が認められなかった可能性が疑われたが、毒性影響のない濃縮段階で試験しても活性はみられなかったため、毒性によるものではないことが明らかとなった。

3.4 機器分析値からの換算値と酵母アッセイによる測定結果の比較

9月の鉛川3地点において、酵母アッセイによる実測活性値と表7に示すエストラジール関連物質及びアルキルフェノール類及びビスフェノールAの機器分析値(LC/MS)をもとに積み上げ換算した値の比較を行った。

機器分析からの換算は、①各物質の検出濃度 ②各化学物質を酵母アッセイで単独曝露した場合の比活性(比活性の値は白石ら<sup>2)</sup>による)の積の総和により算出した。その結果等を表6~7及び図4に示した。結果として、両者には大きな乖離が生じ、今回の機器分析対象物質だけでは実際の試料のエストロゲン様活性を説明づけるこ

表7 機器分析による検出状況と換算

No		1	2	3
水 域		鉛 川		
橋 の 名 前 等		佐野橋	五輪原橋	藤沢橋
17β-エストラジオール	μg/l	<0.01	<0.01	<0.01
エチニルエストラジオール	μg/l	<0.01	<0.01	<0.01
エストリオール	μg/l	<0.01	<0.01	<0.01
エストロン	μg/l	<0.005	<0.005	<0.005
4-t-プチルフェノール	μg/l	0.576	0.365	0.250
エストラジール換算	LC/MS→hER			
	ppt LC/MS→mER			
4-n-ベンチルフェノール	μg/l	<0.01	<0.01	<0.01
4-n-ヘキシルフェノール	μg/l	<0.01	<0.01	<0.01
4-n-ヘプチルフェノール	μg/l	<0.01	<0.01	<0.01
4-n-オクチルフェノール	μg/l	<0.01	<0.01	<0.01
4-t-オクチルフェノール	μg/l	<0.01	<0.01	<0.01
4-ノニルフェノール	μg/l	0.109	0.042	0.036
エストラジール換算	LC/MS→hER	0.044	0.017	0.015
	ppt LC/MS→mER	0.350	0.135	0.116
ビスフェノールA	μg/l	0.53	0.26	0.23
エストラジール換算	LC/MS→hER	0.027	0.013	0.012
	ppt LC/MS→mER	0.183	0.090	0.080
エストラジール換算合計	LC/MS→hER	0.071	0.030	0.026
	ppt LC/MS→mER	0.534	0.225	0.195

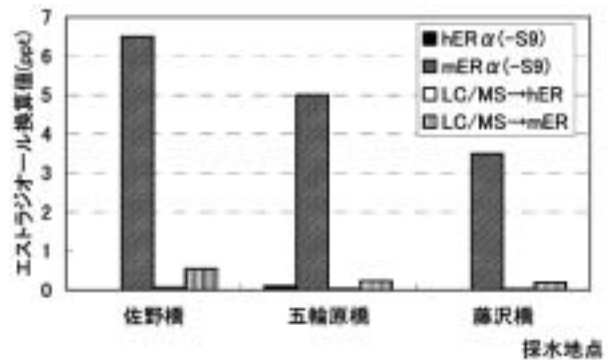


図4 鉛川中流域における活性比較

とはできなかった。

3.5 化学物質の組み合わせ試験による活性の変化

化学物質をそれぞれ単独で確実に活性がみられる濃度と量で添加量を設定し、単品ではなく複合で曝露した場合の活性を測定した結果を図5に示した。

E2にエストロン(E1)、オクチルフェノール(OP)、ビスフェノールA(BPA)を添加したところ、複合による実測値は単独曝露による実測値の和として想定した理論値とほぼ符合し、活性値は相加的な変化をみせたことになる。

次に同じ試料であってもヒトとメダカとで活性に差がみられた点について検証するため、複数の化学物質を混

合した場合の両者の活性値を比較し図6に示した。

E2にエストラジオール関連物質(E1, エストリオール(E3), エチニルエストラジオール(EE2))を複数混合した場合は、ヒトとメダカでは大きな差はみられなかった。一方、E2にアルキルフェノール関連物質(ノニルフェノール(NP), OP, BPA)を複数混合した場合は、ヒトとメダカとで活性値に4倍以上の大きな差がみられた。このことから、メダカ酵母ではヒト酵母に比べアルキルフェノール類による影響を活性として大きく反映しうることが考えられる。ヒトとメダカの試験系に関して、白石らはヒト試験系に比べメダカ試験系のE2及びE2関連物質に対する感受性が低く、逆にアルキルフェノール類に対しては高い感受性を示すことから、ヒトとメダカの両試験系を併用することで水環境試料の主たるエストロゲン・アゴニスト活性が工業系化学物質によるのかあるいはE2関連物質によるのかを判別可能である<sup>5)</sup>としており、異なった生物種で試験することはモニタリングの上で有意義であるものと考えられた。

#### 4 ま と め

化学発光を利用した場合、曝露培養が短時間であり、実際の測定が1日で終了できるため、より迅速な方法であることを実際の操作を通して確認できた。

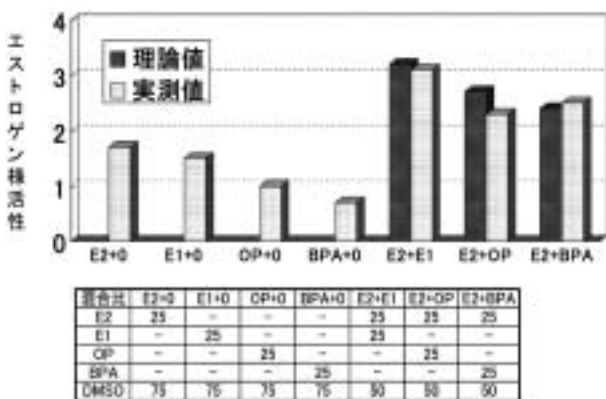


図5 複合曝露した場合の活性 (hERα)

1)ヒト用試験系 関連物質	hERα	mERα	m/h (%)	7)メダカ用試験系 関連物質	hERα	mERα	m/h
E2+0	1.0	(2.7)		E2+0	0.88	0.89	1.01
E2+E3	1.7	1.7	1.00	E2+NP	1.0	3.9	3.90
E2+E3+E1	3.4	2.9	0.85	E2+NP+OP	1.3	5.1	3.92
E2+E3+E1+EE2	4.2	5.3	1.26	E2+NP+OP+BPA	1.8	13	7.22

注) 表中のm/hは、mERαとhERαの活性比を示す。



図6 ヒトとメダカでの活性変化

また、±S9試験系で比較することにより、生体内の代謝による疑似的な活性変化が確認できることがわかった。一般に、天然の人畜由来のホルモン関連物質は、S9処理により活性が消失する<sup>3)</sup>といわれており、±S9試験結果によりおおまかな活性の由来を区別できるものと考えられる。

今回の増田川や中小都市河川の測定結果は、あまり汚濁が進んでいない河川や湖沼を測定対象とした既往の報告<sup>2)6)7)</sup>と検出頻度、検出濃度とも同等であり、河川水の結果としては妥当なものと考えられる。しかし、森越戸排水路では、魚類の雌化に影響があるとされるエストラジオール換算で10pptを上回った値が繰り返し認められたことから、この値は一過性のものではないことが示唆され、より詳細な調査が必要と考えられた。

さらに、同一試料でも、ヒトとメダカという生物種の異なる受容体遺伝子組込酵母を用いた試験結果に差がみられたことから、生物種によって受ける影響に違いがあることが推察され、水圏を対象としてリスク評価をしようとする場合、水圏で生活する生物への影響についての考慮が不可欠であると考えられた。

今回の検討の中では、限られた数種類の化学物質の分析値から環境試料が持つエストロゲン様活性を説明づけることができなかった。酵母Two-Hybrid法のようなバイオアッセイでは環境試料に含まれる物質の詳細な内訳をみることはできないものの、全体としての作用は反映するという点から、環境試料の持つ複合的な作用をモニタリングし評価を行う場合において有用であると考えられた。

今後は、まず現在の試料前処理操作の効率化とその手技の標準化を図り、水圏を対象とする上で化学物質の特性や生物の生活史も考慮し、単に「水」試料の「濃度」のみに終始せず、「量」や「底質」試料も含めた水圏全体のポテンシャルとしての評価を行うとともに、モニタリングで高い活性を示した場合の試料中活性寄与主要因の解明に備えた分析技術の充実を図る必要がある。特に、実試料中には、よく知られた活性寄与物質以外のものが含まれている可能性が大きく、それら未想定活性物質による影響や無活性濃度・無活性物質と活性物質との相互作用による複合曝露影響については今後検討を行うこととしたい。

#### 5 謝 辞

この調査研究の一部は、平成15年度地方公共団体研究機関と国立環境研究所との共同研究により実施したものである。今回の調査研究にあたり、供試菌株の分与やメダカ試験系の測定、発光細菌による毒性試験をはじめ、共同研究として種々のご指導ご協力をいただきました独立行政法人国立環境研究所の白石不二雄氏に心から深謝いたします。



### 参 考 文 献

- 1) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 西原力, 森田昌敏: 環境化学, 10, 57 (2000).
- 2) 国立環境研究所: 特別研究報告 “環境ホルモンの新たな計測手法の開発と環境動態に関する研究 (内分泌攪乱化学物質総合対策研究) 平成8~13年度”, (2002).
- 3) 宮城県環境生活部環境対策課, “報道発表資料 環境ホルモンの調査結果について”,  
<http://www.pref.miyagi.jp/kankyo-t/press.htm>,  
(2003. 3. 31).
- 4) 宮城県保健環境センター: 化学物質の環境汚染に関する調査研究-外因性内分泌攪乱化学物質へのアプローチ-平成10~12年度プロジェクト研究報告書,  
p.22 (2002).
- 5) 白石不二雄, 白石寛明, 西川智浩, 西川淳一, 丸尾直子, 森田昌敏: 第12回環境化学討論会要旨集, p.58 (2003).
- 6) 永洞真一郎, 阿賀裕英, 村田清康, 坂田康一: 第37回日本水環境学会年会講演集, p.443 (2003).
- 7) 高橋悟, 池田享司, 金一和, 白石不二雄: 第12回環境化学討論会要旨集, p.494 (2003).

## 宮城県内の市販魚介類及び海水・海泥からの ビブリオ・バルニフィカスの検出（第2報）

Isolation of *Vibrio vulnificus* from Sea-food, Sea-water,  
Sea-mad in Miyagi Prefecture (Second Report)

齋藤 紀行 名村 真由美<sup>\*1</sup> 渡邊 節  
川野 みち 田村 広子 佐々木 美江  
山口 友美<sup>\*2</sup> 島山 敬 御代田 恭子<sup>\*3</sup>  
秋山 和夫 鈴木 隆<sup>\*4</sup>

Noriyuki SAITO, Mayumi NAMURA, Setsu WATANABE,  
Michi KAWANO, Hiroko TAMURA, Mie SASAKI,  
Yumi YAMAGUCHI, Takashi HATAKEYAMA, Yasuko MIYOTA,  
Kazuo AKIYAMA, Takashi SUZUKI

ビブリオ・バルニフィカス（V<sub>v</sub>）は創傷あるいは経口から感染し重篤な感染症を引き起こす。平成13年度より宮城県内の沿岸部汽水域に定点を設定し海水・海泥におけるV<sub>v</sub>の生息状況と市販魚介類のV<sub>v</sub>汚染状況について調査した。その結果、V<sub>v</sub>は定点の汽水域に生息すること、また一部の市販貝類がV<sub>v</sub>で汚染していることが明らかになった。平成15年度は、定点でのV<sub>v</sub>の生息状況と県内産貝類のV<sub>v</sub>汚染状況についての継続調査と検出したV<sub>v</sub>菌株について詳細な生化学性状解析を行った。平成15年度は定点でのV<sub>v</sub>が検出された期間は13、14年度より1～2ヶ月短縮された。その理由として、定点の海水温度が平年より低かったためと考えられた。V<sub>v</sub>が検出された貝類はカキ20件中4件（20%）、あさり及びツブ貝各1件であった。本年度検出したV<sub>v</sub>30菌株のうち29菌株が典型的な生化学性状を示したが、1菌株がビブリオ選択分離培地（CV）で非典型的な白色のコロニーを形成した。

キーワード：ビブリオ・バルニフィカス；市販魚介類；海水；海泥

**Keywords** : *Vibrio vulnificus* ; sea-food ; sea-water ; sea-mad

### 1 はじめに

重篤な感染を引き起こすビブリオ・バルニフィカス（*Vibrio vulnificus* : V<sub>v</sub>）は沿岸部に生息し、海水から傷口あるいは新鮮魚介類を介してヒトへ感染する。患者の多くは熊本県、静岡県で発生している。特に、熊本県での患者発生が多く、平成13年から平成15年の3年間に13名発生し、うち6名が死亡するという重篤な感染症である。患者周辺の環境調査の結果、接触した可能性のある海水・海泥には高い菌数のV<sub>v</sub>が生息していることが確認されている<sup>1-3)</sup>。このことは、V<sub>v</sub>が生息する環境があれば、V<sub>v</sub>の感染症が発生する危険性があることを示している。

そこで、我々は本県でのV<sub>v</sub>発生の危険性の有無を把握する目的で、平成13年度から県内の沿岸部汽水域に定点

を設け、海水・海泥におけるV<sub>v</sub>の生息状況と市販魚介類のV<sub>v</sub>汚染状況を調査してきた。その結果、V<sub>v</sub>は定点の汽水域に生息していること、また市販の一部の貝類、特に県内産のアサリがV<sub>v</sub>で汚染していることが明らかになった<sup>4)</sup>。

検出された環境でのV<sub>v</sub>生息が一時的であるか、あるいは県内産生鮮貝類の汚染が地域的かを判定するには更なる継続調査が必要となる。そこで、平成15年度、定点でのV<sub>v</sub>生息調査と県内産生鮮貝類におけるV<sub>v</sub>汚染実態調査を実施した。

また、現在V<sub>v</sub>の検出用として優れた選択培地がなく、臨床あるいは環境材料からの菌検出が困難であることから効率的な選択分離培地の開発が求められ、国立感染症研究所でセルビオース・ビル・食塩（CB）培地を開発した。そこで、CB培地の有用性を環境材料について検討した。

\* 1 現 宮城県がんセンター

\* 2 現 宮城県拓桃医療療育センター

\* 3 現 宮城県動物愛護センター

\* 4 現 財団法人理容師美容師試験研修センター宮城県支部

## 2 方法と材料

### 2.1 調査期間

定点での海水・海泥及び県内産鮮魚介類についての調査は、平成15年5月から12月まで行った。

### 2.2 調査定点と検体入手

宮城県名取市閑上地区の増田川河口の汽水域を海水・海泥の検体採取定点とした。県内産鮮貝類は松島・塩釜地区の地場産品直売所から検査当日直接購入した。

### 2.3 使用培地

Vvおよび腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*: Vp) の増菌用、食品からの菌分離の1次増菌用、MPN値算定用および温度安定性試験用としてアルカリペプトン水 (日本製薬: APW)、2次増菌用としてCCPプロス (自家調整)、Vv分離培地としてTCBS (栄研化学)、mCPC (自家調整)、クロモアガービブリオ (関東化学: CV) およびCB (関東化学) 培地を使用した。

### 2.4 海水・海泥からのVv検出

#### 2.4.1 海水

海水100mlにAPWの粉末3gを加え原液とした。これを更に10倍、100倍および1000倍に希釈し、各希釈濃度の3本をMPN管として37℃で一晩培養後、各MPN管から1白金耳をTCBS、mCPCおよびCV培地に塗抹し培養した。TCBS培地で緑色、mCPC培地で黄色、CV培地で青色のコロニーを釣菌し、菌株の生化学的性状およびPCR法によりToxRS遺伝子を確認してVvと同定した。MPN値はVvが検出されたMPN管の本数を求め、海水1ml当たりの値を算出した。

#### 2.4.2 海泥

海泥20gをAPW180mlに加え10倍希釈液とした。これを更に100倍、1000倍、10000倍および100000倍に希釈し、海水の場合と同様にして海泥1gあたりのMPN値を求めた。

### 2.5 県内産魚介類からのVv検出

貝類からのVvの検出は下記に示したA及びBの2方法で実施した。貝類はむき身25gをストマッカー袋に秤量し、APW225mlを添加してストマッキングした。この液を10倍希釈液とし、更に10倍に希釈し、100倍希釈液を調整した。

(1)A法: ストマッキングした後、ストマッカー袋ごと37℃で18~20時間培養した。培養後、培養液表層の1mlをCCPプロス10mlに添加し37℃で6時間培養し、培養液からCB、mCPC及びCV培地に塗抹し37℃で一晩培養してVvの検出を行った。

(2)B法: 10倍、100倍、1000倍希釈濃度の各3本をMPN管とし37℃で一晩培養した後、各試験管からCB、mCPC及びCV培地を用いてVvの検出を行った。

### 2.6 分離菌株の性状試験と同定

CB培地で黄色、mCPC培地で黄色、CV培地で青色のそれぞれのコロニーを釣菌し、更にそれぞれの分離菌株についての生化学的性状試験、PCR法によるVvの特異遺伝

子の確認及び血清型別試験を実施してVvと同定した。

#### 2.6.1 生化学的性状試験

TSI、LIMでの性状、耐塩性、マロン酸利用、硝酸塩還元、ウレアーゼ、VP、オルニチン脱炭酸、アルギニン加水分解、ソルビトール分解、サッカロース利用、イノシトール利用、マンニトール利用、ラフィノース利用、ラムノース利用、サリシン利用、セルビオース利用について確認試験を行った。

#### 2.6.2 PCR法による遺伝子検査

Vv特異溶血毒素遺伝子 (Vvh)、ToxRS遺伝子 (ToxRS) をPCR法の定法で確認した。

#### 2.6.3 血清型別試験

国立感染症研究所より分与されたO抗原の抗血清 (1~7型) で決定した。

## 3 結果

### 3.1 海水・海泥におけるVv生息状況

調査定点における海水および海泥のVv検出状況と定点の海水温を図1に示した。海水からは7~9月までの3ヶ月間、海泥からは6~10月までの5ヶ月間Vvが検出されたが、6月および10月の海泥のMPN値は1g当たり1未満とごくわずかであった。海水温が20℃以上となった7~9月は海水、海泥ともにMPN値が高値を示した。

### 3.2 魚介類からのVvの検出状況

宮城県内産の貝类等57件についてVvの検出をA法およびB法で行い、その検出状況を表1に示した。VvはA法では2件、B法では4件からそれぞれ検出されたが、両方法で重複しては検出されなかった。

一方、分離培地別のVv検出状況は、CB培地が2件、mCPC培地が4件、CV培地が2件であった。重複して検出された検体は2件で、1件はCBとmCPC培地から、残りはmCPCとCV培地からVvが検出された。3種類の培地全てで検出された検体はなかった。

Vvの月別、食品別検出状況を表2に示した。月別では、7月は10件中4件 (検出率: 40%)、9月は10件中1件 (同: 10%)、11月は2件中1件 (同: 50%) の検出状況であった。Vv検出食品は、7月のカキ2件中2件、ア

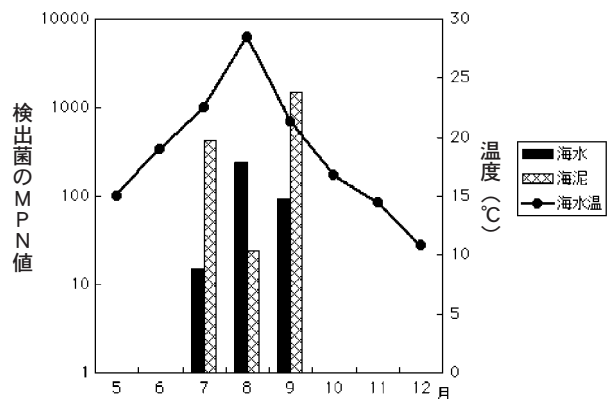


図1 海水および海泥におけるVvの月別変動と海水温度

表1 宮城県内産魚介類からのVv検出状況

検体	採材日	食品名	漁獲地	Vv	A法			B法			MPN
					CB	mCPC	CV	CB	mCPC	CV	
1	5月13日	カキ	松島湾		-	ND	ND	-	ND	ND	<0.3
2	5月13日	カキ	松島湾		-	ND	ND	-	ND	ND	<0.3
3	6月19日	カキ	松島外湾		-	-	-	-	+	-	<0.3
4	6月19日	カキ	松島内湾		-	-	-	-	-	-	<0.3
5	6月19日	アサリ	松島		-	+	-	-	+	-	<0.3
6	6月25日	アサリ	松島		-	-	-	+	+	-	<0.3
7	6月25日	アサリ	松島		-	+	-	+	+	-	<0.3
8	6月25日	ホタテ	女川		-	+	-	+	+	+	<0.3
9	6月25日	ツブ	塩釜		-	+	-	-	-	-	<0.3
10	6月25日	シャコ	松島		+	-	-	+	+	-	<0.3
11	6月25日	イワガキ	女川		-	+	-	-	+	-	<0.3
12	6月25日	クモダコ	松島		-	+	-	-	+	-	<0.3
13	7月15日	アサリ	松島		-	+	-	-	+	-	<0.3
14	7月15日	ホタテ	女川		-	+	-	-	-	-	<0.3
15	7月15日	アサリ	松島	検出	-	-	+	+	+	+	0.3
16	7月15日	シャコ	松島		-	-	-	+	+	-	<0.3
17	7月15日	ツブ	塩釜	検出	-	+	+	-	-	-	<0.3
18	7月15日	ウニ	松島		+	+	-	+	-	-	<0.3
19	7月15日	アサリ	塩釜		-	+	-	+	+	-	<0.3
20	7月15日	アサリ	松島		+	-	-	+	-	-	<0.3
21	7月15日	カキ	松島外湾	検出	-	-	-	+	+	+	0.3
22	7月15日	カキ	松島内湾	検出	-	+	-	+	+	-	0.92
23	8月20日	アサリ	松島		-	+	-	+	+	-	<0.3
24	8月20日	ホタテ	女川		-	+	-	-	+	-	<0.3
25	8月20日	ホッキ	塩釜		+	-	-	+	+	-	<0.3
26	8月20日	ツブ	塩釜		-	-	-	+	+	-	<0.3
27	8月20日	イワガキ	女川		-	-	-	+	+	-	<0.3
28	8月20日	ツブ	松島		-	-	-	-	-	-	<0.3
29	8月20日	シャコ	松島		+	-	-	+	+	-	<0.3
30	8月20日	カキ	松島外湾		-	-	-	+	+	+	<0.3
31	8月20日	カキ	松島内湾		-	-	-	+	+	-	<0.3
32	9月8日	カニ	関上		-	-	-	ND	ND	ND	<0.3
33	9月16日	アサリ	関上		-	-	-	+	-	-	<0.3
34	9月17日	アサリ	松島		-	-	-	+	+	-	<0.3
35	9月17日	ツブ	松島		-	-	-	-	-	-	<0.3
36	9月17日	ホタテ	女川		-	+	-	-	+	+	<0.3
37	9月17日	イワガキ	女川		-	-	+	-	+	+	<0.3
38	9月17日	アサリ	鳴瀬		-	+	-	+	+	-	<0.3
39	9月17日	ツブ	松島		-	-	-	-	+	-	<0.3
40	9月17日	カキ	松島外湾		-	+	-	+	+	-	<0.3
41	9月17日	カキ	松島内湾	検出	-	-	-	-	+	+	0.36
42	10月15日	アサリ	松島		-	-	-	ND	-	-	<0.3
43	10月15日	アサリ	塩釜		-	-	-	ND	-	-	<0.3
44	10月15日	ツブ	塩釜		-	-	-	ND	-	-	<0.3
45	10月15日	ホッキ	塩釜		-	-	-	ND	-	-	<0.3
46	10月15日	アサリ	松島		-	-	-	ND	-	-	<0.3
47	10月15日	ツブ	塩釜		-	-	-	ND	-	-	<0.3
48	10月15日	ホタテ	女川		-	-	-	ND	-	-	<0.3
49	10月15日	イワガキ	女川		-	-	-	ND	-	-	<0.3
50	10月17日	カキ	松島内湾		-	-	-	ND	-	-	<0.3
51	10月17日	カキ	松島外湾		-	-	-	ND	-	-	<0.3
52	11月9日	カキ	松島内湾	検出	-	+	-	ND	-	-	<0.3
53	11月9日	カキ	松島外湾		-	-	-	ND	-	-	<0.3
54	12月3日	カキ	松島内湾		-	-	-	ND	-	-	<0.3
55	12月3日	カキ	松島外湾		-	-	-	ND	-	-	<0.3

+ : CBで黄色、mCPCで黄色、CVで青のコロニーを検出

表2 県内産魚介類からのVv検出状況

	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	総計
カキ	0/2	0/2	2/2	0/2	1/2	0/2	1/2	0/2	4/16
イワガキ		0/1		0/1	0/1				0/4
アサリ		0/3	1/4	0/1	0/3	0/3			1/14
ツブ		0/1	1/1	0/2	0/2	0/2			1/8
ホタテ		0/1	0/1	0/1	0/1	0/1			0/5
その他		0/2	0/2	0/2	0/1	0/1			0/8
合計	0/2	0/10	4/10	0/9	1/10	0/10	1/2	0/2	6/55

検出件数/検査件数

表3 MPN管から選択分離培地別によるVv検出状況\*

	海水	海泥	計
CPC&CV	20	11	31 (55%)
CPC	8	11	19 (34%)
CV	4	2	6 (11%)
計	32	24	56

\* : 検出陽性本数

サリ4件中1件、ツブ貝1件中1件、9月のカキ（カキ2、イワガキ1）3件中1件、11月の養殖カキ2件中1件であった。

### 3.3 海水・海泥からの選択分離培地別のVv検出状況

海水・海泥をMPN管（APW使用）で一晩増菌培養した後、各管からmCPCおよびCV培地へ塗抹してVvの分離を行い、MPN管ごとに両培地でのVv検出状況と比較した。

調査期間中にVvが検出されたMPN管（Vv陽性管）のうちmCPC培地のみでVvを検出したものをCPC、CV培地のみで検出したものをCV、mCPCおよびCV培地両方で検出したものをCPC&CVと3つのグループに分類して表3に示した。Vv陽性MPN管56本のうち、CPC&CVが31本（54%）、CPCが19本（34%）、CVが6本（11%）であった。これを海水、海泥それぞれのMPN管陽性本数を希釈倍率ごとに分けグラフに示したのが図2である。海水（図2-A）、海泥（図2-B）ともに希釈倍率の低いMPN管（原液、×10）ではmCPC、CVの割合が高く、希釈倍率が上がる（×100、×1000、×10000）に従いCPC&CVの割合が高くなっていった。

また、海泥のVv陽性管においては10倍希釈の陽性管数（6本）が100倍希釈（9本）のそれより3本少なかった。これは、Vvが存在するはずの10倍希釈のMPN管からVvが適切に検出されないことを示していると考えられる。



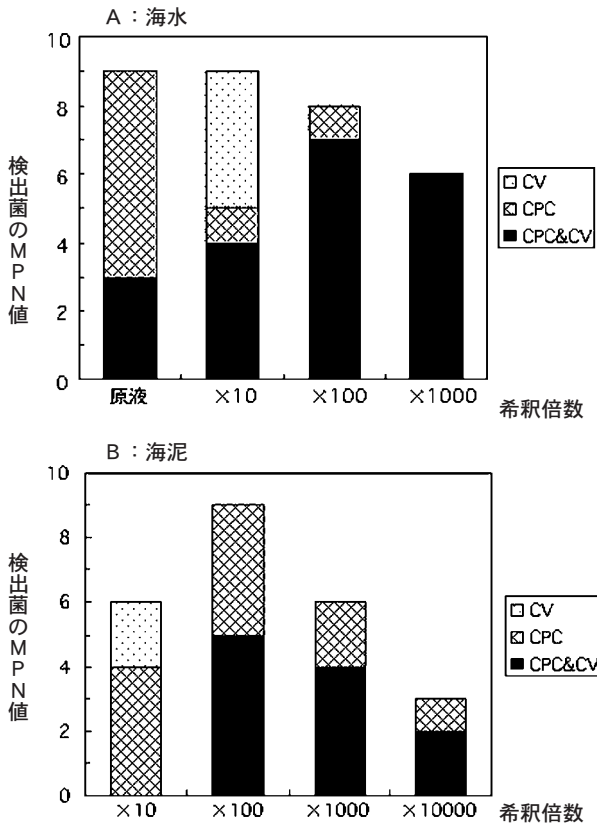


図2 海水・海泥におけるMPN管の希釈倍数別 Vv検出状況

### 3.4 分離Vv菌株の生化学的性状と血清型別

ツブ貝(エゾボラ属) 1件, カキ4件, アサリ1件, 海水3件および海泥5件の計14件からVvが80菌株検出された。それらの菌株について生化学的性状試験, 2種類のVv特異遺伝子検査および血清型別を行い, その結果を表4に示した。TCBS培地で緑色発育, 6%食塩加ペプトン水発育, 8%食塩加ペプトン水不発育の非典型的な生化学性状を示しToxRS遺伝子保有の菌株をVvとした。

8/4の海水, 9/8の海水および海泥から白糖分解の菌株(菌株番号8-3, 9-1), 9/8の海泥からはCV培地で白色を呈する菌株(同9-58)が検出され, ToxRSは陽性であったがVVhは陰性であった。他の生化学性状試験の項目ではオルニチン脱炭酸, クエン酸利用, マンニトール利用, サリシン利用で菌株による差が見られたものの, それ以外ではすべて同じ結果であった。

検出菌株の血清型別は, O1が5株, O4が9株, O5が1株, O6が4株, O7が1株, O1~O7以外のUTが10株であった。

## 4 考 察

Vvによる感染は九州地域あるいは東海地域で多く発生し, 東北では秋田および青森県で各1名の患者が報告されている。しかし, 平成13年度の調査で, 夏季に県内の沿岸部定点(名取市閑上地区)の海水・海泥および県

表4 Vv菌株の生化学的性状および血清型別

菌株番号	SI-1	S4-1	S2-1	S3-1	S5-2	S6-1	6-1	7-6	7-28	7-29	7-31	7-32	8-1	8-3	8-12	8-50	8-51	8-54	9-1	9-3	9-6	9-7	9-21	9-34	9-39	9-42	9-50	9-51	9-57	9-58
由来	ツブ	カキ	カキ	アサリ	カキ	カキ	海泥	海水	海泥	海泥	海泥	海水	海水	海水	海泥	海泥	海泥	海水	海水	海水	海水	海水	海水	海水	海水	海水	海水	海水	海水	海水
検体採取日	7/15	7/15	7/15	8/20	9/17	11/9	6/16	7/15	7/15	7/15	7/15	8/4	8/4	8/4	8/4	8/4	8/4	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8	9/8	
TCBSにおける発育	緑	緑	緑	緑	緑	緑	緑	緑	緑	緑	緑	緑	緑	黄	緑	緑	緑	緑	黄	緑	緑	緑	緑	黄	緑	緑	緑	緑	緑	
CVにおける発育	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	青	白
TSI	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	A/A	-/A	-/A	-/A	-/A	A/A	-/A	-/A	-/A	-/A	A/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A	-/A
LIM:																														
リシン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
インドール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
運動性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
食塩耐性:																														
0%NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6%NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8%NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10%NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
マロン酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
硝酸塩還元	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ウレアーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
オルニチン脱炭酸	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
アルギニン加水分解	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
糖分解																														
ソルビトール	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
サッカロース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
イノシトール	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
マンニトール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ラフィノース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
アドニット	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
アラビノース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ラムノース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
サリシン	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
セロビオース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR:																														
ToxRS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VVh	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
血清型	UT	O6	O4	O4	O7	UT	O1	O1	O6	O5	O1	UT	UT	UT	UT	UT	O4	O4	O4	O1	O4	O4	UT	O4	O1	O6	UT	O4	O6	UT

内産アサリからVvが検出され、宮城県内にもVvが生息していることが明らかとなり、Vv感染の危険性があることが示された。

そこで、Vvの魚介類の詳細な生息状況を調査する目的で、平成15年度は定点でのVv生息調査と県内産の貝類に限定してアサリ等のVv汚染状況調査を実施した。

平成15年度の夏季は冷夏のため海水温が20℃を越えたのは7～9月で13、14年と比較して1～2ヶ月短く、Vvの検出も海水で7～9月の3ヶ月間、海泥で6～10月の5ヶ月間と前年度より短縮された。しかし、検出されたVvのMPN値は海水で240、海泥で1500と13、14年と比較して高値であった。

Vvによる魚介類の汚染状況調査は県内産の貝類を主とし、55件について実施した。Vv検出は各検体をAPWで1次増菌後、CCPプロスで2次増菌し分離を行うA法と、APWのMPN管を用い各MPN管から分離を行うB法との2方法で実施し、両方法での検出率の比較検討も併せて行った。その結果、アサリ1件、ツブ貝1件及びカキ4件の合計6件（検出率：10.5%）からVvが検出された。アサリからのVv検出は16件中1件（検出率6%）と13年度の調査の結果（Vv検出20件中3件：検出率15%）より検出率が低かったが、夏季にとれる県内産アサリはVvで汚染している可能性があることを示している。また、カキが20件中4件（検出率：20%）と最も多く、しかも検出されたカキはいずれも養殖カキであった。

次にVv検出数をAあるいはB法で比較すると、A法2件、B法4件とB法がA法より高い検出数を示したが、検出総数が6件と少ないため両者の優劣については明確にできない。

また、今回Vv検出に適した培地としてCB培地を用いた。Vvの菌株をCB培地接種すると培地上で澄んだ黄色のコロニーを形成し、他の菌種と明瞭に区別できる。しかし、貝類からのVv検出にCB培地を用いた結果、B法でCB培地使用では2件菌が検出できたがA法でCB培地使用では全く検出されなかった。海水・海泥の検体でも同様の結果だったことから、CB培地はビブリオあるいは他の雑菌が多数存在する海産食品あるいは海浜の環境材料からのVv検出には適していないと思われた。現時点

では、食品あるいは環境からVvを確実に検出するためにはmCPC、CV培地各々を単独で使用するのではなく2種の培地を併用する必要があると思われた。

一方、海水・海泥からのMPN管法によるVv検出において、Vvの検出率は海水では10倍の希釈系列、海泥では100倍の系列が、原液などの高濃度の系列より高かった。更に、貝類からの検出においてもMPN管を用いたB法が高い検出率を示した。これらのことは、食品あるいは環境材料からVvを確実に検出するためには検体を10～100倍に希釈することが有効であることを示唆している。

今回検出した菌株のうち30菌株について諸生化学的性状等を調べた結果、生化学的性状では大差がなかったが、海泥由来の1菌株（菌株番号9-58）は生化学的性状で典型的なVvの性状を示し、TCBS培地でも緑色コロニーであったが、CV培地では白色のコロニーを形成した。Vv特異遺伝子はToxRSとVVhについて確認を行った結果、検出菌30株全てがToxRS陽性であったが、9-58株を含めた5菌株がVVh遺伝子非保有であった。このことから、Vvを適切に検出するためには、生化学性状試験と共に両遺伝子の確認が必要であると思われた。

平成13年度から15年度のVvの調査で、Vvは宮城県内の海水・海泥に生息すること、県内産の新鮮な貝類がVvに汚染していることが明確になり、Vv感染症が発生する可能性が皆無とは言い切れない。そこで、Vv感染症を防止するためにも生鮮魚介類及び海浜環境のVv生息状況を今後も継続して調査する必要がある。

## 参考文献

- 1) 宮坂次郎, 徳永晴樹, 甲木和子: 熊本県保健環境科学研究所報, 31, 31 (2001).
- 2) 宮坂次郎, 徳永晴樹, 荒平雄二, 甲木和子: 熊本県保健環境科学研究所報, 32, 37 (2002).
- 3) 宮坂次郎, 荒平雄二, 甲木和子: 平成15年度厚生科学研究補助金 新興・再興感染症研究事業報告書 (2003).
- 4) 齋藤紀行, 佐々木美江, 山口友美, 畠山敬, 渡邊節, 白石廣行: 宮城県保健環境センター年報, 20, 68 (2002).