

B 調 查 研 究

I 論 文

わが国で発生したSRSVによると推定される事例の症状 及び潜伏時間の解析の試み

Analysis of Clinical Symptoms and Incubation Period of Food Poisoning Patients Caused by SRSV

阿部 和男

Kazuo ABE

キーワード：SRSV、小型球形ウイルス、食中毒、症状、潜伏時間

Key Words : SRSV, Small Round Structured Virus, Food Poisoning, Clinical Symptoms, Incubation Period

1982～1993年にわが国で発生したSRSV（小型球形ウイルス）が病因物質と推定された事例を収集・整理・解析して、事例別の症状（下痢・嘔吐・発熱）及び潜伏時間を一覧表に示した。

その結果から次のことが分かった。下痢患者の発生率の高い事例もみられるが、激しい下痢を呈する患者の割合の高い事例は多くない。また、嘔吐患者の発生率の比較的高い事例がみられるが、激しい嘔吐を呈する者の割合の高い事例は多いとはいえない。発熱患者の発生率は事例によって大きな差がみられる。36～<42時間の潜伏時間に患者多発のピークが現れる事例が多い。

1. はじめに

食中毒発生の情報を受けた場合、保健所では患者の確認、潜伏時間、症状及び喫食状況等の聞き取り調査を行う。またこれと併行して病因物質の検索及び汚染源・汚染経路の究明のため、あらゆる病因物質を想定した検体採取を行っている。

筆者らは、これらの調査での活用を目的として過去の食中毒発生疫学データ（原因菌種・患者の症状・潜伏時間等）を収集、整理及び解析し、食中毒患者の症状および潜伏時間による原因菌種の推定表を作成し報告¹⁾した。

一方、SRSV（小型球形ウイルス）は小児から成人までの広い年齢層で、特に冬期のウイルス性胃腸炎の主要な病原体であることが判明している。そこで今回、SRSVによると推定される食中毒事例を収集・解析し同様な推定表を作成したので報告する。

2. 材料及び方法

2.1 事件データの収集

推定表の作成には、①宮城県内で発生した食中毒事件調査報告書、②東京都の食中毒概要、③全国食中毒事件録、④全国の都道府県から提供を受けた食中毒事件調査報告書の中で、症状（下痢・嘔吐・発熱）と潜伏時間が調査されている事例でSRSVによると推定された34～42事例（下痢及び発熱調査41件、嘔吐調査42件、潜伏時間調査34件）を対象とした。なお本報告では、患者糞便か

ら食中毒原因菌が検出できないが、SRSVが検出された事例、及びSRSV検査を行っていないが非細菌性で嘔気が発症者の80%前後と高く、患者多発の潜伏時間のピークが27～48時間と遅く、かつ“かき”が原因食品とされた事例を解析に用いた。

2.2 各症状（下痢、嘔吐、発熱）の発生率別の事件構成割合と数値・記号化

下痢・嘔吐・発熱を示した患者の割合、及びこれらの症状の程度（強度）による発生率を解析に供した。

2.2.1 下痢発生の事件構成割合

SRSVによる食中毒事件において、下痢を呈した患者数の割合を下痢発生率として求め、これにしたがって事件を10%ごとに区分した。

次に、下痢発生率に基づいて区分された事件の構成割合を、事件が全く見られない0%を(N)、2%未満(n)、2～5%未満(0)、10±5%(1)、20±5%(2)、以下同様に・・・80±5%(8)、90±5%(9)として数値・記号化した(表1)。なお、事件構成割合の数値・記号化においては、一部補正を行った(補正方法については、項目2.4で示す)。

また、下痢患者の中で5回以上の下痢を示した者の割合を「5回以上の下痢発生率」として下痢強度の指標とし、下痢発生率の場合と同様に事件を区分し、各事件構成割合を算出して、それらを数値・記号化した(表1)。

2.2.2 嘔吐発生と事件構成割合

下痢発生の場合と同様に、嘔吐発生率及び「5回以上の嘔吐発生率」に基づいて区分された各事件の構成割合を求めて、それらを数値・記号化した(表2)。

2.2.3 発熱発生と事件構成割合

発熱(37.0℃以上を呈した者)を示した患者の割合を発熱発生率として求め、発熱発生率に基づいて区分され

た事件の構成割合を算出して、それらを数値・記号化した。また、発熱を呈した患者の中で38.0℃及び39.0℃以上の発熱を示した割合をそれぞれ「38℃以上および39℃以上の発熱発生率」として求め、これに基づいて区分された各事件の構成割合を算出して、それらを数値・記号化した(表3)。

表1 下痢発生率に基づく事件構成割合と数値・記号化

下痢発生率 (%)	下痢発生			5回以上下痢発生		
	事件数	事件構成割合 (%)	数値・記号化	事件数	事件構成割合 (%)	数値・記号化
100	2	4.9	0	0	0.0	N
90~<100	3	7.3	1	0	0.0	N
80~<90	9	22.0	2	0	0.0	N
70~<80	7	17.1	2	1	2.9	0
60~<70	10	24.0	2	1	2.9	0
50~<60	4	10.0	1	2	5.9	1
40~<50	2	4.9	0	3	8.8	1
30~<40	2	4.9	0	10	29.4	3
20~<30	2	4.9	0	9	26.4	3
10~<20	0	0.0	N	5	14.7	1
0~<10	0	0.0	N	2	5.9	1
0	0	0.0	N	1	2.9	0
合計	41	100.0		34	100.0	

*1 補正1: 下痢発生率80~<90%で事件構成割合は22.0%、発生率70~<80%で事件構成割合17.1%であることから、項目2.4.1の補正方法によりこれらを平均して表した。

表2 嘔吐発生率に基づく事件構成割合と数値・記号化

嘔吐発生率 (%)	嘔吐発生			5回以上嘔吐発生		
	事件数	事件構成割合 (%)	数値・記号化	事件数	事件構成割合 (%)	数値・記号化
100	0	0.0	N	1	2.9	0
90~<100	0	0.0	N	0	0.0 → n*2	n
80~<90	3	7.1	0	0	0.0 → n*2	n
70~<80	1	2.4	0	0	0.0 → n*2	n
60~<70	4	9.5	1	0	0.0 → n*2	n
50~<60	9	21.4	2	3	8.8	1
40~<50	9	21.4	2	1	2.9	1
30~<40	10	23.8	2	6	17.6	2
20~<30	5	11.9	1	8	23.5	2
10~<20	1	2.4	0	6	17.6	2
0~<10	0	0.0	N	1	2.9	0
0	0	0.0	N	8	23.5	2
合計	42	100.0		34	100.0	

*1 補正1: 項目2.4.1の補正方法により平均して各々4.7%、5.9%とした。

*2 補正2: 嘔吐発生率100%で事件発生が認められ、発生率60~90%の各区分で事件構成割合が0%の場合、項目2.4.1の補正方法により記号nとして表した。

表3 発熱発生率に基づく事件構成割合の数値・記号化

発熱発生率 (%)	発熱発生			38℃以上の発熱発生		
	事件数	事件構成割合 (%)	数値・記号化	事件数	事件構成割合 (%)	数値・記号化
100	0	0.0	N	1	3.2	0
90~<100	0	0.0	N	0	0.0 → n*2	n
80~<90	2	4.9	0	2	6.5	1
70~<80	3	7.3	1	3	9.7	1
60~<70	4	9.8	1	4	12.9	1
50~<60	4	9.8	1	7	22.6	2
40~<50	7	17.1	2	4	12.9	1
30~<40	9	22.0	2	3	9.7	1
20~<30	5	12.2	1	5	16.1	1
10~<20	5	12.2	1	0	0.0 → n*2	n
0~<10	2	4.9	0	0	0.0 → n*2	n
0	0	0.0	N	2	23.5	1
合計	41	100.0		34	100.0	

*1 補正1: 項目2.4.1の補正方法により平均して12.9%とした。

*2 補正2: 発熱発生率0%で事件発生が認められ、発生率0~<20%の各区分で事件構成割合が0%の場合、項目2.4.1の補正方法により記号nとして表した。

2.3 潜伏時間別の事件構成割合と数値・記号化

各事件において、潜伏時間（3時間ごと）別に患者数を区分して、それに基づく患者発生率を求め、患者発生率の最も多い潜伏時間を多発潜伏時間とした。

なおこの際には、患者発生率が他の区分した潜伏時間の発生率に比べ、5%以上高い場合にのみ多発潜伏時間とした。また5%以下の場合、両方の区分の潜伏時間の中間を多発潜伏時間として表した。次に、多発潜伏時間に基づいて事件を区分し、さらにそれらの事件構成割合を求め、数値・記号化した（表4）。

表4 多発潜伏時間に基づく事件構成割合と数値・記号化

多発潜伏時間	事件数	事件構成割合(%)	数値・記号化
18~<21	0	0.0	N
21~<24	0	0.0	N
24~<27	0	0.0	N
27~<30	1	2.9	0
30~<33	3	8.8	1
33~<36	4	11.8	1
36~<39	10	32.2	3
39~<42	7	20.5	2
42~<45	3	8.8	1
45~<48	6	17.6	1
48~<51	0	0.0	N
51~<54	0	0.0	N
合計	34	100.0	

*1 補正3：項目2.4.2の補正方法により平均して13.2%とした。

表5 SRSVによると推定される食中毒事件の各症状に基づく事件構成割合の数値・記号化

各症状の発生率(%)	下痢・嘔吐・発熱発生率に基づく事件構成割合			下痢・嘔吐・発熱の症状の強度に基づく事件構成割合			
	下痢	嘔吐	発熱	5回以上の下痢発生率	5回以上の嘔吐発生率	38℃以上の発熱発生率	39℃以上の発熱発生率
100	0	N	N	N	0	0	N
90~<100	1	N	N	N	n	n	N
80~<90	2	0	0	N	n	1	N
70~<80	2	0	1	0	n	1	N
60~<70	2	1	1	0	n	1	N
50~<60	1	2	1	1	1	2	N
40~<50	0	2	2	1	1	1	N
30~<40	0	2	2	3	2	1	N
20~<30	0	1	1	3	2	1	2
10~<20	N	0	1	1	2	n	2
0~<10	N	N	0	1	0	n	2
0	N	N	N	0	2	1	5

2.4 事件構成割合の補正と数値・記号化

2.4.1 各症状別による事件構成割合における数値・記号化

下痢、嘔吐及び発熱を示した患者数の割合、及びこれらの各症状の程度（強度）による症状発生率については、発生率100%及び0%以外、各発生率における事件数（事件構成割合）は一般にほぼ正規分布を示しており、この分布を示さない場合、事件構成割合を平均して表した（表1~3の補正1）。発生率0%または100%に事件がみられ、0%以上または100%以下の各区分で事件構成割合が0%の場合、それぞれ補正し、記号nとして表した（表2、3の補正2）。

2.4.2 多発潜伏時間による事件構成割合の補正と数値・記号化

多発潜伏時間による事件も一般にほぼ正規分布を示し、この分布を示さない場合、事件構成割合を平均して数値・記号化した（表4の補正3）。

3. 結果及び考察

多発潜伏時間に基づく事件構成割合の数値・記号化は表4に示したが、各症状別における発生率に対応した事件構成割合を数値・記号化したものを一括して表5に示す。

① 患者の下痢発生率が60~<70%、70~<80%、80~<90%の各区分で、SRSVと推定された事件の20%前後（数値2）が発生しており、60~<90%の各区分の数値の合計が6、すなわち事件の60%前後はこの区分

で発生している（表5）。

- ② 下痢患者の中で5回以上の下痢を呈する者の割合が20~<40%の事件は、SRSVと推定された事件の60%前後（数値合計6）で、激しい下痢を呈する者の割合が高い事件は多くない（表5）。
- ③ 患者の嘔吐発生率30~<60%の事件が、SRSVによると推定された事件の60%前後（数値合計6）を占めているが、嘔吐患者の中で5回以上を呈する者が40%未満の事例が多く、激しい嘔吐を呈する者の割合が高い事件は多くない（表5）。
- ④ 発熱は、10~<80%の各発生率区分に各事件が分散傾向がみられ、事件によるバラツキが大きい。また発熱がみられる場合でも39℃以上の高熱を呈する患者が発熱患者の30%以上を占める事件は1件もなく、発熱の強度は低い（表5）。
- ⑤ 36~<39時間に患者多発潜伏時間がみられる事件はSRSVが推定された事件の30%前後と最も多く、それに次いで39~<42時間の事件が多い（表4）。

SRSVによる急性胃腸炎と推定される事例では一般的に嘔気や嘔吐の発生率が高いといわれているが、本調査では嘔吐発生率が20~<70%の事件が大半であり、嘔吐発生率の高い事件は黄色ブドウ球菌やセレウス菌ほど多くない^{1),2),3)}。5回以上の嘔吐発生率も低く、黄色ブドウ球菌のように激しい嘔吐を示す事件は少ない。また潜伏時間が遅い点で毒素原性大腸菌による食中毒に類似していることがわかった。食中毒発生時にはこれらに十分注意をして発生状況、喫食調査、

原因食品調査、検体採取及び検査などを実施し原因を究明する必要があると考える。なお、今回の調査ではSRSVが原因物質と推定される事例について収集し解析したが、今後はSRSVが原因物質であることが確定された事例について解析する必要があると考える。

参 考 文 献

- 1) 阿部和男、品川邦汎：日食微誌、12(3)、187-192(1995)
- 2) 二階堂日出伸：食中毒菌の早見表についての一考察。p 12-15、平成2年度全国食品衛生監視員研修会発表抄録(1990)。
- 3) 東京都衛生局環境衛生部食品衛生課：患者の症状より原因菌を推定する。p 171-183、昭和63年東京都の食中毒の概要

NO₂メッシュ濃度推定法の検討

A Study on a Presuming Method about NO₂ Concentration in Mesh

高橋 正人 小室 健一 山本 仁

Masato TAKAHASHI, Ken-ichi KOMURO, Hitoshi YAMAMOTO

キーワード：NO₂、メッシュ濃度、推定法

Key Words : NO₂, Concentration in Mesh, Presuming Method

従来本県ではNO₂及びSO₂濃度に関して、測定局のデータをスプライン関数で加工し、県内全域における濃度の推定を行ってきたが、NO₂の推定に関してはやや精度が粗く、実際の適用に難があった。この欠点を克服するため、NO_x排出量を使用した新しい推定法を考案した。

1. はじめに

1.1 NO₂、SO₂メッシュ濃度の推定

NO₂及びSO₂濃度は大気汚染の指標として最も基本的なものであり、本県では大気汚染常時監視システムで測定された年平均値を基に、県内全域における濃度を標準地域メッシュ第三次地域区画（以下1kmメッシュ）を単位として推定計算している。結果は図示することにより、県内各地における大気汚染の状況を概観的に把握するため用いられるほか、個別メッシュにおける濃度は環境アセスメント実施時のバックグラウンド値として使用される。この推定計算にはスプライン法（スプライン関数を使用した近似）が使用されている。平成6年度及び9年度のNO₂推定結果を図1に示す。

1.2 スプライン法の問題点

現在、防止対策の進んだSO₂濃度に関しては、概ね2～4ppb程度の低いレベルで推移しており、スプライン法による推定値が実際の値と大きく異なることはなく、

さらに厳密な推定法を使用する必要性は小さい。しかし、NO₂については最低3ppb、最高18ppb（平成9年度年平均値）と差があり、また、測定局の分布が図2に示すとおり、仙台市及びその周辺に多く、他の地域ではややまばらに分布していることなどが影響し、以下の問題が発生する。

- ① 測定局から比較的距離（20km程度）がある場合、近似ができずにバックグラウンド値となりやすい。（測定局設置以前の築館、迫など）
- ② 測定局が都市域にある場合、それにつられて郊外域が実際より高めの値となる。（仙台市近郊など）
- ③ 逆に測定局が郊外域にある場合、付近の都市域が実際より低めの値となる。（涌谷町など）

関数を用いた推定計算は簡便であるものの、地域によっては実際の数値とかなり異なっていることも考えられ、より精度のよい推定手法の開発が望まれていた。

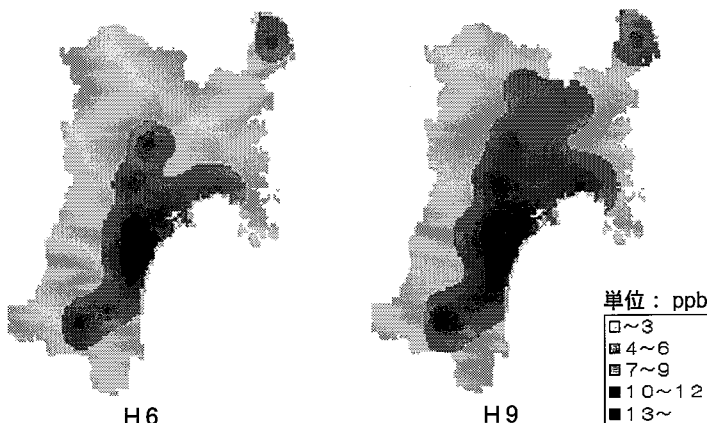


図1 スプライン法によるNO₂濃度推定結果

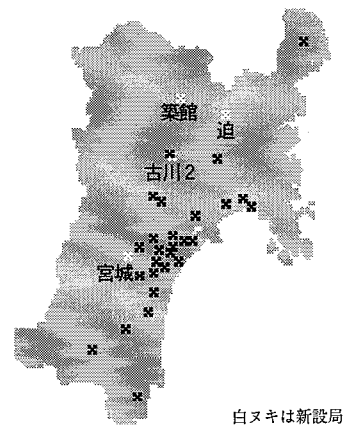


図2 測定局位置図

2. 方 法

2.1 NOx排出量を用いた推定方法

NOxは燃焼を伴うあらゆる人為活動において発生するが、工場事業場及び自動車の排出割合が大部分を占めており、特に地表付近での大気中濃度を考える場合、自動車からの影響を重視する必要がある。自動車交通量データを使用していないことはスプライン法の大きな欠点であり、本研究では1kmメッシュ毎のNOx排出量からNO₂濃度の推定を行う手法を試みた。従来、自動車交通量データは工場・事業場データに比較しシステム化が遅れており、実態把握のネックとなっていたが、近年、交通量及び道路座標のファイルが入手可能になり、メッシュレベルでのNOx排出量が推計できるようになっている。

2.2 NOx排出の把握

まず、平成6年度を対象に1kmメッシュ毎のNOx排出量(全てNO₂として重量換算)を算出した。通常、排出量の推計に当たっては工場・事業場、自動車、一般家庭、船舶、航空機からの排出が対象とされるが、船舶・航空は比較的排出量が少ないことや正確なモデリングが困難なため除外した。各部門毎の使用データは以下の通りで

ある。

工場・事業場：平成4年度大気汚染物質排出量総合調査(H6石油消費構造等調査により補正)

自動車：平成6年度道路交通センサス調査

家庭：平成2年度国勢調査メッシュデータ(H6住民基本台帳により補正)

3. 結果と考察

3.1 メッシュにおけるNox排出量

部門毎及び合計について、宮城県域の7,821メッシュにおけるNOx排出量を図3に示す。また、県内の合計を表1に示す。家庭は人口集中する地域を中心に、いわば薄く広く排出している様子がみられる。自動車については、県内をほぼ限なく張りめぐらされた幹線道から相当程度の排出があることが理解できる。工場・事業場から

表1 NOx排出量推計結果(平成6年度)

部 門	工場・事業場	家 庭	自動車	合 計
NOx排出量(t/年)	14,464	1,409	9,259	25,133
排 出 割 合	57.6%	5.6%	36.8%	100.0%

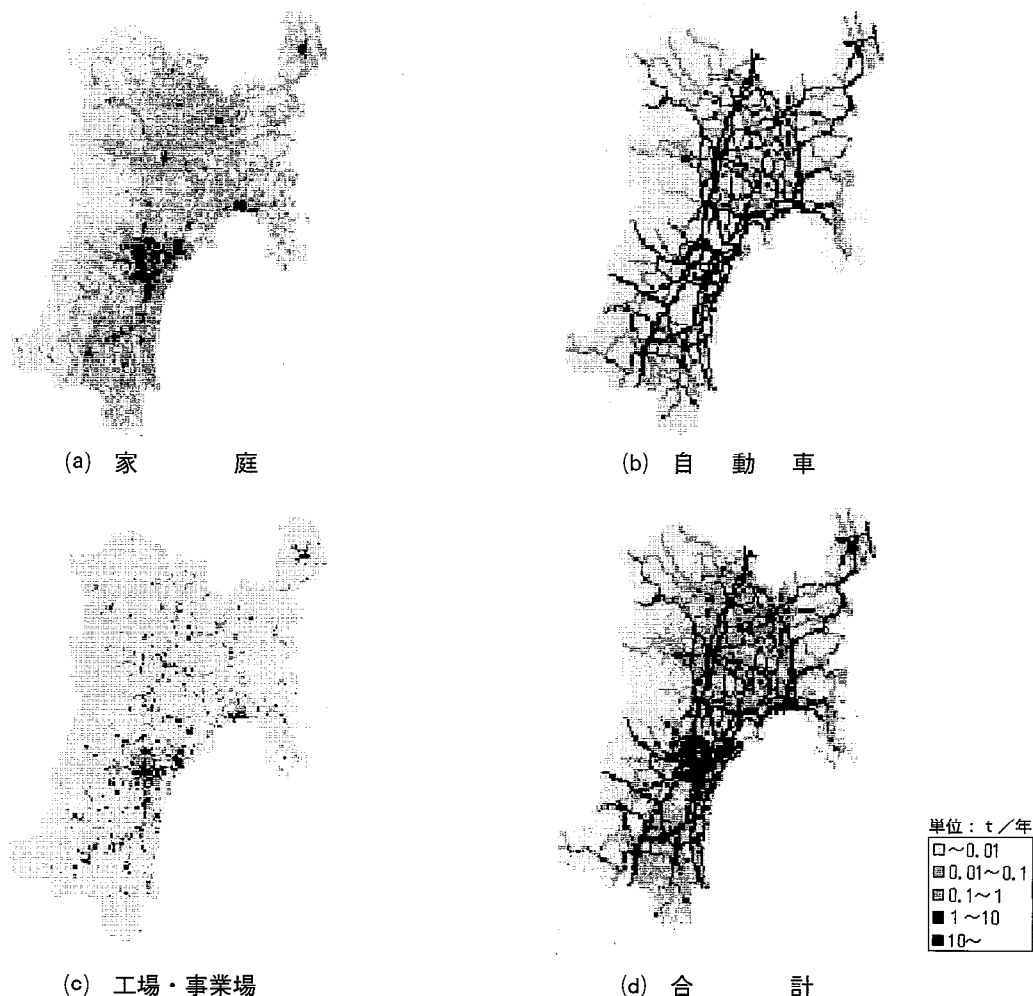


図3 NOxメッシュ排出量

の排出はこれらと比較すると、排出総量が多いにも関わらず局地的なように見えるが、実際に内訳を調べたところ、工場・事業場が立地している717メッシュのうち、100 t/年を超える13メッシュの排出割合が工場・事業場排出分の87.5%を占めている。また、そのうちの4メッシュは1,000 t/年を超え、同68.8%を占めるといった極めて特異的な状況にあることがわかった。

3.2 排出量と実測値との相関

排出量と実際の測定値との関係を見るため、平成6年度における一般局27局の実測値を縦軸に、排出量を横軸に取り、相関を表したものを図4である。単に排出量を合計しただけでは $r=0.588$ とさほど相関は大きくない。ここで排出高さが異なる工場・事業場と家庭・車について別々に相関を調べた。工場・事業場については排出量そのものが意味を持つことは考えられないため、

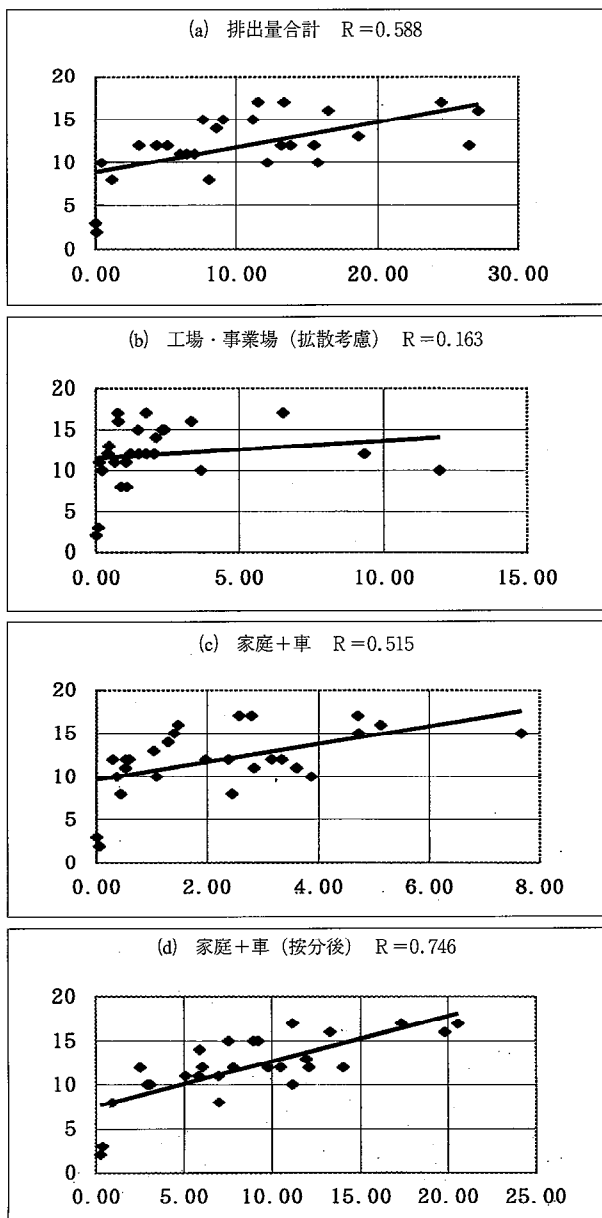


図4 メッシュ排出量と実測値の相関

排出量をサットン式による着地濃度を用いて周辺メッシュに比例配分したが、 $r=0.163$ と相関はほとんどないことがわかった。家庭・車に関しては、メッシュ排出量そのものでは $r=0.515$ とさほどよい相関がみられなかったが、隣接メッシュに対し、排出量を1:1で按分(隣接メッシュ数は8であるため、1メッシュ当たり1/8)して振り分けたところ、 $r=0.746$ と実用可能なレベルに向上した。しかし、この段階ではスプライン法の問題点①③のケースに必要な2~8 ppb付近の推定が全くできないという問題が残った。

3.3 拡散を考慮した排出量の修正と対数化

スプライン推定図(図1)と排出量分布図(図3)は細部において異なるものの、仙台市を中心に排出が行われている状況は似通っている。ただし、階級分けが前者は3 ppb毎であるのに対し、後者はオーダー毎であることから、前節で比較的良好な相関を示した家庭・車の排出量に関して、その対数と測定局データとの相関を調べた。図5に示す通り対数化を行うと $r=0.644$ 、さらに隣接メッシュへの按分を行った場合は $r=0.856$ とかなり良好な相関が得られた。

単純な按分でも良好な結果が得られたが、さらに精密化を図るため、家庭・車の排出量を拡散式による濃度予測値で指数化し、その対数を取った値と実測値との相関をみた。家庭と車を比較した場合、自動車の排出量が支配的なので、拡散式としてはJEAモデル¹⁾を使用した。パラメータの設定に関わらず、ほとんどのケースで $r=0.86$ 以上となることがわかった。

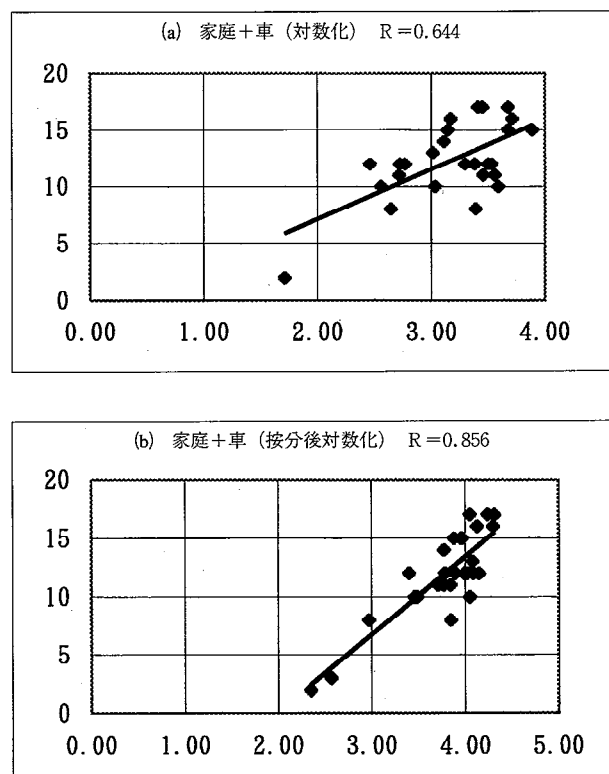


図5 対数化した排出量と実測値の相関

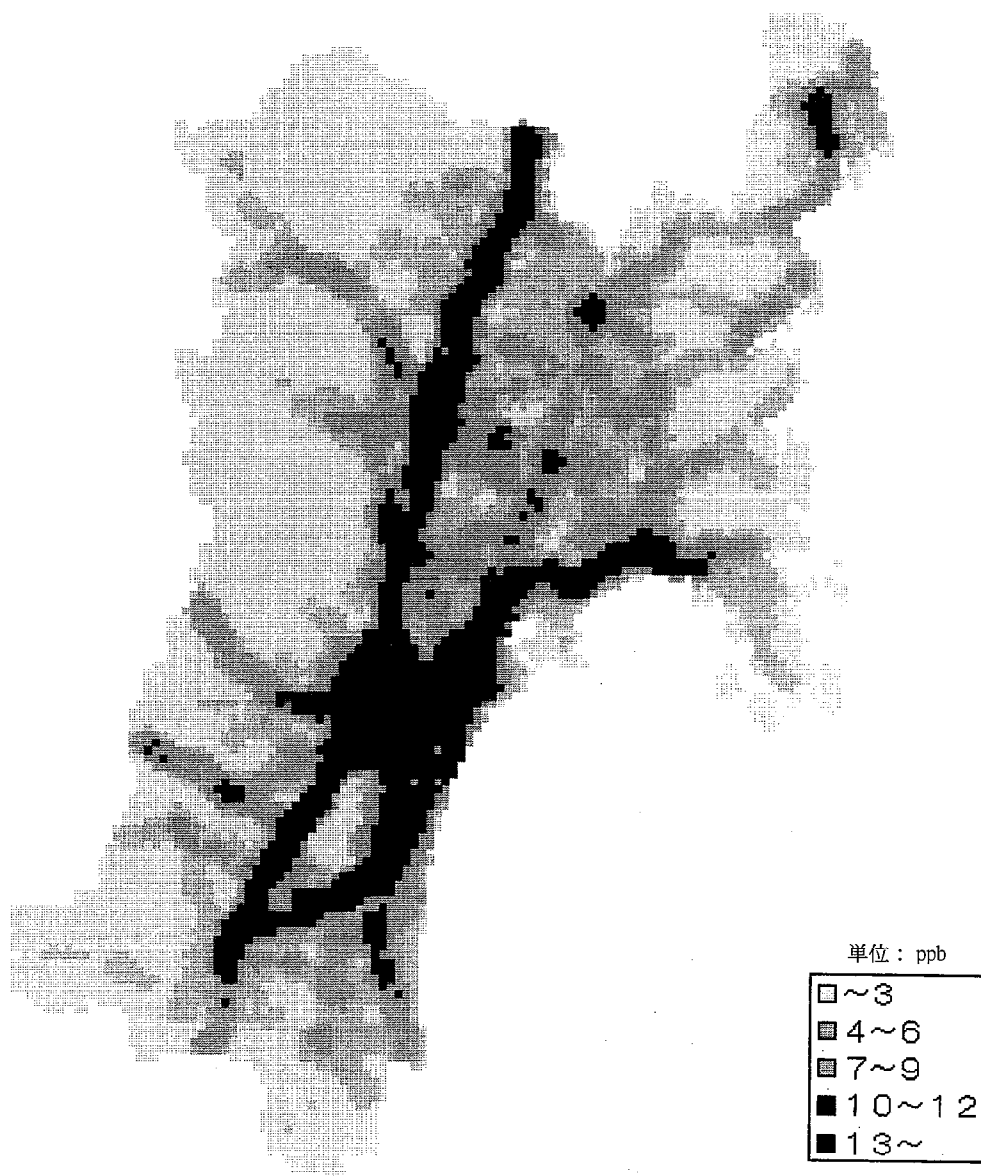


図6 NO₂ 濃度推定結果

3.4 対数推定式

無風かつ大気安定度Bとして拡散計算を行った場合、相関係数は0.887となった。その回帰式は

$$Y = 5.90 \text{Log} X - 0.236$$

Y: NO₂濃度推定値

X: (家庭+車排出量)を拡散濃度の相対値で指数化したもの

で示される。

さらに工場・事業場排出分を加味するため、重回帰式を算出したが、本県の特異的な排出状況とも相まって、家庭・車の排出量でほとんど説明がされていた。

3.5 対数推定式を使用した濃度推定

対数推定式を使用して全県の濃度推定を行った結果を図6に示す。また、平成6年度以降の新設局(築館、迫、宮城、古川2)の推定値と直近年の実測値との比較を表2に示す。宮城局・古川2局に関しては良好な近似を示

表2 新設局における推定値と実測値の比較

測定局	H7	H8	H9	推定値	誤差	従来推定値
宮城	-	10	11	11.0	1.0	7
古川2	-	-	13	10.8	-2.2	11
築館	-	6	6	10.8	4.8	2
迫	6	6	8	11.3	5.3	2

した。幹線道路付近に位置する築館局・迫局は実測値をやや上回るものの、スプライン法においてバックグラウンド値とされていたのとは逆の結果となった。

今後、さらに排出量データ把握の精度向上や推定モデルに検討を加えて、実用度を高めていきたい。

参考文献

- 1) 宮城県環境生活部：宮城県環境影響評価技術マニュアル(平成6年7月)

A型インフルエンザ迅速診断法の検討

Evaluation of Rapid Enzyme Immunoassay for Detection of Influenza A Virus

後藤 郁男 沖村 容子 秋山 和夫
白石 廣行 堺 春美*

Ikuo GOTO, Youko OKIMURA, Kazuo AKIYAMA
Hiroyuki SHIRAISHI, Harumi KUNO-SAKAI

キーワード：インフルエンザA、迅速診断、ダイレクトイジェンFluA

Key Words : InfluenzaA, Rapid Diagnosis, Directigen FluA

ダイレクトイジェンFluA（抗原検出キット）の検出限界と検体の保存時間がインフルエンザウイルスの検出に及ぼす影響について、細胞培養法と比較して検討した。その結果、抗原検出キットの検出限界は 1.9×10^3 pfu/assayのウイルス量であった。また、細胞培養法では4℃で24時間保存した検体の感染力価が著しく低下したのに対して、抗原検出キットは4℃で72時間保存した検体からも抗原検出が可能であった。

1. はじめに

インフルエンザの流行は短期間に爆発的に拡大するため、病原ウイルスの検出には迅速性と信頼性が要求される。最近、インフルエンザウイルスの検出法として迅速診断法に加え、感度も優れているPCR法が報告されている。¹⁻⁴⁾しかし、設備等の問題により実施可能な施設は限られている。この様な状況の中、本邦において1999年1月に体外診断用医薬品として、A型インフルエンザ迅速診断キット ダイレクトイジェンFluA（日本ベクトンディッキンソン(株)、以下抗原検出キット）が認可された。この抗原検出キットはA型インフルエンザウイルスを特異的に検出し⁵⁾、操作が簡便でかつ15分程度で判定が可能のため、特に開業医等の医療現場において有望視され^{5,6)}、1998/99シーズンのインフルエンザ流行時にはその有用性が確認されたと言われている。しかし、検体の採取法や処理法によっては感度が低下することが報告されており⁵⁾、検査に際してはできるだけ新鮮な検体を使用し、検体の遠心処理を避けるなど、その取り扱いには幾つかの注意点がある。

一般に地方衛生研究所においては、感染症動向調査のためにインフルエンザウイルスの検出を主に組織培養法により実施している。インフルエンザの検査材料は、協力医療機関によって採取された後、連絡を受けた所轄保健所によって搬入されるケースが多く、採取の日時や交通事情により搬入が遅れ、時にはウイルス検出感度の低下を招く場合もみられる。そこで今回、将来本キットが感染症動向調査等においても迅速診断法として応用され

* 東海大学医学部小児科

ることを予想し、検体採取から検査開始までの検体の保存時間がインフルエンザウイルス検出に及ぼす影響について、抗原検出キットと組織培養を用いて検討を行ったので報告する。

2. 材料と方法

2.1 ウイルス株とウイルス液の調製

試験ウイルス株は当保健環境センターにおいて1998/99シーズンに分離されたA/宮城/25/99(H3N2)株 (A/Sydney/05/97類似株)を使用した。また、ウイルス液は同じく当センターで咽頭拭い液の運搬に使用している保存培地 (0.5%ゼラチン、0.2% BSA 添加MEM培地) で希釈・調製した。

2.2 ウイルス定量法

使用したウイルス原液中のウイルス定量は、常法に従いMDCK細胞によるプラーク法で行った。

2.3 抗原検出キットの検出限界測定

ウイルス原液の $10^{-1} \sim 10^{-5}$ までの希釈系列を調整し、抗原検出キットの検出限界を算出した。

2.4 TCID₅₀の測定

96穴マイクロプレートでMDCK細胞プレートを作成し、1ウェルあたり25 μ lのウイルス液を接種してCPEの出現を観察した。接種5日後にTCID₅₀/25 μ lを算出した。

2.5 経時的ウイルス検出と感染力価の測定

抗原検出キットの検出限界測定結果から、新たに検出限界濃度のウイルス液、およびその 10^{-1} と 10^{-2} 液を調製した。そして検体搬送時の保存状態を想定して、各ウイルス希釈液を4℃で保存し、経時的にウイルス検出を行っ

た。すなわち保存開始時(0時)、6時間保存後、18時間後、24時間後、48時間後そして72時間後に各希釈ウイルス液を分取し、抗原検出キットによる検出と、MDCK細胞によるTCID₅₀を測定した。なお、抗原検出キットに供したウイルス液は組織培養と条件を統一するため、ウイルス液25μlに滅菌生理食塩水100μlを加えて使用した。また、抗原検出キットは1検査につき2個使用し、紫色の三角形マークが明瞭に確認できた場合を陽性とし、三角形マークが不明瞭な場合を便宜的に偽陽性とした。

3. 結果

3.1 抗原検出キットの検出限界およびウイルス定量

希釈調製したウイルス液を抗原検出キットで判定したところ、10⁻¹および10⁻²液では陽性を示す紫色の三角形マークが明瞭に確認できたが、10⁻³以下では確認できなかった。この結果から、抗原検出キットによる検出限界はウイルス原液の100倍希釈液とした。

またプラーク定量の結果、使用したウイルス原液は7.5×10⁶pfu/mlのウイルス量であった。従って、10⁻²希釈液には7.5×10⁴pfu/mlのウイルス粒子が含まれることになり、抗原検出キットの検出限界は1.9×10³pfu/assayと算出された。そこで、7.5×10⁶pfu/mlのウイルス量を含む原液から新たに10⁻²~10⁻⁴希釈ウイルス液を調製して、経時的な検出試験に供した。

3.2 経時的感染力価の測定とウイルス検出

10⁻²~10⁻⁴希釈ウイルス液の経時的な感染力価を図1に示した。感染力価はウイルス量と保存時間に依存して推移し、18~24時間保存後では著しく低下したが、24~72時間保存後では大きな低下はみられなかった。

一方、抗原検出キットによる判定は表1に示したとおり、検出限界濃度である10⁻²液では、4℃保存において72時間保存まで安定して抗原が検出された。また、10⁻³液では6時間保存後と18時間保存後においてキットの1

個で偽陽性であった(表中では便宜的に(±)とした)が、保存開始時、および24時間保存以後は全て陰性であり、10⁻⁴液では全く検出されなかった。

表1 抗原検出キットの判定に対する検体保存時間の影響

ウイルス液	検査番号	保存時間 (h)					
		0	6	18	24	48	72
10 ⁻² ウイルス液	1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
10 ⁻³ ウイルス液	1	(-)	(±)	(±)	(-)	(-)	(-)
	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10 ⁻⁴ ウイルス液	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(+); 陽性、(-); 陰性、(±); 偽陽性

4. 考察

今回インフルエンザ検査用咽頭拭い液の保存時間がインフルエンザウイルス検出の感度に及ぼす影響について検討した。抗原検出キットの精度として重要な検出限界は、ウイルス量として1.9×10³pfu/assayであった。このウイルス量は抗原検出キットの性能試験で使用された弱陽性コントロールと同等で、また清水らの報告⁵⁾とほぼ一致した。中村と西沢⁷⁾によれば、インフルエンザ患者の咽頭拭い液中には5.0×10⁶pfu/ml~1.5×10⁴pfu/mlのウイルス粒子が含まれるとされ、抗原検出キット1検体(125μl)換算で、6.3pfu/assay~1.9×10³pfu/assayのウイルス量となる。我々が求めた検出限界が患者咽頭拭い液中の最も多いウイルス量に相当することを考慮すると、抗原検出キットでインフルエンザの確実な診断を行うためには、患者の急性期に十分なウイルスを含む咽頭拭い液を採取することが最も重要である。

しかし、抗原検出キットは検出限界のウイルス量が検体に存在すれば、72時間保存でもウイルスを検出可能であった。これは抗原検出キットが、細胞に対する感染力価を指標としているものではなく、A型インフルエンザウイルスの核タンパク抗原(NP抗原)に対するモノクローナル抗体を用いたNP抗原検出用酵素免疫検査キットであるため、検体に十分量のウイルス数があれば、ウイルスの感染力価が低下してもウイルス粒子内部のNP抗原を検出可能であるからと考えられる。また図1において、10⁻²ウイルス液の72時間保存後におけるTCID₅₀が10⁻³ウイルス液の保存開始時のTCID₅₀以下の数値であったのに対し、抗原検出キットで陽性と判定されたことは、本キットがNP抗原を検出することを裏付けている。

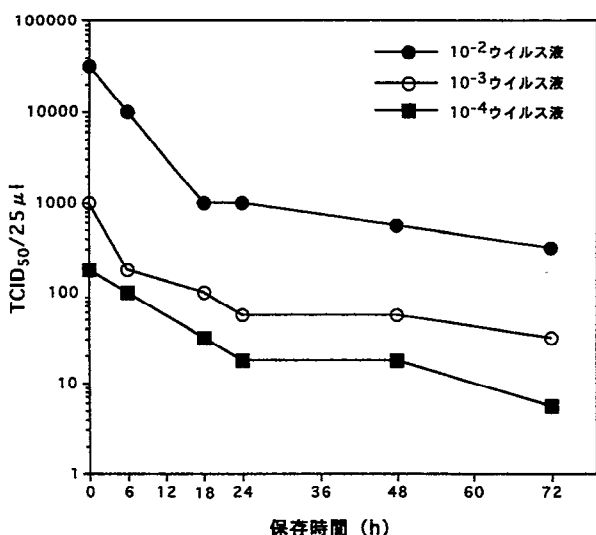


図1 ウイルス感染力価に対する検体保存時間の影響

本来、抗原検出キットは医療現場での迅速診断を目的としているが、何らかの理由で検査が翌日になるなど検体の保存が必要になった場合でも抗原検出キットは有効であることが示された。すなわち、細胞培養法では検体保存24時間後でウイルスの感染力価が1/20以下に減少したのに対し、抗原検出キットは24時間保存以降においてもインフルエンザウイルスの検出が可能であった。この様に抗原検出キットは医療・検査の現場における迅速診断法として従来から使用されている細胞培養法と併用して十分利用しうることが明らかとなった。

今回の検討は、フリーのインフルエンザウイルスを用いたモデル実験系で行ったが、一般の咽頭拭い液中には種々の細菌や細胞成分等の混入が予測されるので、その影響について今後検討が必要である。

5. まとめ

- 1) 抗原検出キットでインフルエンザの確実な診断を行うためには、患者の急性期に十分なウイルスを含む咽頭拭い液を採取することが重要である。
- 2) 抗原検出キットは医療・検査の現場における迅速診断法として従来から使用されている細胞培養法と併用して十分利用しうる。

参考文献

- 1) Yamada A, et al. : Microbiol Immunol, 35(3), 259~265(1991)
- 2) Zhang WD, Evans DH : J Virol Methods, 33(1-2), 165~189(1991)
- 3) 石崎 徹他 : 臨床とウイルス, 22(3), 169~172(1994)
- 4) 清水英明他 : 感染症誌, 71(6), 522~526, (1997)
- 5) 清水英明他 : 感染症誌, 72(8), 827~833, (1998)
- 6) 三田村敬子他 : 感染症誌, 72(9), 883~889, (1998)
- 7) 中村和幸、西沢修一 : 感染症誌, 60(12), 1284~1293, (1986)

宮城県における日本脳炎中和抗体保有状況－ワクチンの効果－

Distribution of Neutralization Antibodies against Japanese Encephalitis Virus in Miyagi Prefecture – Efficacy of JEV vaccine –

沖村 容子 野池 道子 後藤 郁男
秋山 和夫 白石 廣行

Youko OKIMURA, Michiko NOIKE, Ikuo GOTO
Kazuo AKIYAMA, Hiroyuki SHIRAISHI

キーワード：日本脳炎ウイルス、中和試験、ワクチン

Key word : Japanese Encephalitis Virus, Neutralization Test (NT), Vaccine

1995～97年度の日本脳炎流行予測調査（ヒト感受性調査）よりワクチン接種と中和抗体保有状況について調査した。その結果、ワクチン接種率は年々低下する傾向が認められた。一方、ワクチンを接種した14才以下では80～100%の中和抗体保有率であり、しかも抗体価は高いレベルを維持していた。さらに、北京-1株ワクチンにより基礎免疫を獲得したグループは、抗体獲得率ならびに抗体の持続性が高くワクチンの効果が明確であった。

1. はじめに

近年、わが国での日本脳炎患者数は環境や生活様式の変化により激減しており、宮城県においても1967年に発生した10名の患者を最後に報告されていない¹⁾。しかし、県内で飼育された6ヶ月令のブタの感染源（抗体）調査によれば、自然界において日本脳炎ウイルスは毎年大小の差はあるものの活動が確認されており、1994年にはブタの抗体保有率が50%を越え日本脳炎汚染地区に指定された²⁾。この調査結果を踏まえて、1995年度より日本脳炎ワクチンが定期接種に取り入れられているが、患者の発生が認められないため一般の関心はあまり高くない。そこで、1995年度から1997年度の宮城県におけるヒトのワクチン接種と中和抗体保有状況を調査し、併せてワクチンの効果について検討した。

2. 材料および方法

県内に5年以上在住し、母子手帳等によりワクチン接種歴が明らかな20才未満の健康人血清192件を対象とした。各年度の対象者数は表1のとおりで、年齢群は流行予測調査に従って分類した。

表1 中和抗体保有状況

年齢群	1995年度	1996年度	1997年度
0～4		4/8 (50.0%)	6/9 (66.7%)
5～9	4/4 (100.0%)	19/26 (73.1%)	24/32 (75.0%)
10～14	21/27 (77.8%)	13/14 (92.9%)	9/14 (64.3%)
15～19	18/28 (64.3%)	9/17 (52.9%)	8/13 (61.5%)
計	43/59 (72.9%)	45/65 (69.2%)	47/68 (69.1%)

血清中の中和抗体は流行予測調査術式に従い、ブラック減少による中和抗体測定法で行った。即ち、80倍ないしは640倍に希釈した血清に、160PFU/mlに調整した日本脳炎ウイルスを等量加え、37℃、90分中和した。中和後、Vero細胞に接種し、37℃、90分吸着させ、重層培地を加えて5日間培養した。その後、ホルマリン処理、メチレンブルー染色を行い、出現したブラック数を計測した。ウイルス対照との比較により減少率を求め、ブラックを50%に減少させる血清希釈度を理論的に算出し中和抗体価とした。抗体価は採血年度に測定した値で、12倍以上を陽性とした。なお、日本脳炎ウイルスは乳のみマウスの脳内に接種後、感染脳組織を乳剤とし使用した。

3. 結果および考察

3.1 ワクチン接種率

日本脳炎ワクチンにおける基礎免疫は3～5才を対象に初年度は2回、翌年1回の計3回接種を行っている。追加接種は9～12才と14～19才で2回行い抗体を持続させている。今回は、5回のうち1回でも接種した場合を接種歴有りとしワクチン接種率を求めた。表2のとおり、1995年度84.7%、1996年度80.0%、1997年度76.4%と年々ワクチン接種率が低下する傾向が認められた。このうち3回の基礎免疫を受けた対象者は95年度67.8%、96年度56.9%、97年度36.8%と、前群と比較して低下傾向が著明であった。

3.2 年齢群別の中和抗体保有状況

年齢群別の中和抗体保有状況を表1に示した。1995年

度は5～9才群で100%、10～14才群で77.8%の抗体保有率であったが15～19才群では64.3%と若干低下していた。96年度は0～4才群で50.0%であり、5～9才群では73.1%、10～14才群では92.9%となったが15～19才群で52.9%に低下していた。97年度は5～9才群で75.0%であったが、その他の年齢群ではすべて60%代であった。

次に、表2に示した1回以上のワクチン接種者について、各年度の年齢群別中和抗体保有率を図1に示した。1995年度は5～9才群で100%、10～14才群で83.3%の保有率であったが、15～19才群では68.2%に低下していた。

96年度は0～4才群では80.0%の保有率であったが、5～9才群は95.0%、10～14才群は100%の高い保有率であった。15～19才群は95年度と同じく50.0%に低下していた。

97年度は、14才以下では100%の保有率であり、15～19才群でも87.5%の保有率であった。

3.3 抗体陽性者の中和抗体価分布

年齢群別に抗体陽性者の中和抗体価分布を12～39倍、40～159倍、160～639倍、640以上の4段階に区分し、その割合を解析した(図2)。

1995年度は5～9才群で100%、10～14才群で35.0%が640倍以上の非常に高い抗体価を維持していた。

一方、ワクチン接種経過年数が長い15～19才群では75.0%が12～39倍の低いレベルに分布していた。96年度は0～4才群、5～9才群、10～14才群で、各々50.0%、79.0%、38.5%が640倍以上の高いレベルであったが、15～19才群では71.4%が12～39倍の低い抗体価に分布していた。97年度も、95、96年度と同じ傾向を示していた。

3.4 抗体陽性者の平均中和抗体価

年齢群別の平均中和抗体価を図3に示した。平均中和抗体価が0～4才群で1996年度は938倍、97年度は1871倍であり、また、5～9才群で95年度は2528倍、96年度は1917倍、97年度は1162倍の高い抗体価であった。これに対して、15～19才群は各年度とも30倍程度であった。

表2 年度別のワクチン接種率

年 度	1995	1996	1997
1回以上のワクチン 接 種 者 (率)	50/59 (84.7%)	52/65 (80.0%)	44/68 (64.7%)
基礎免疫を完了した 接 種 者 (率)	40/59 (67.8%)	37/65 (56.9%)	25/68 (36.8%)

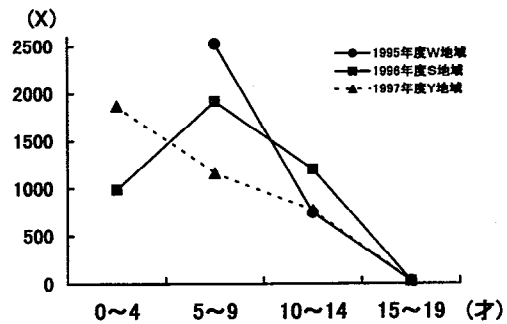


図3 年齢群別の平均中和抗体価

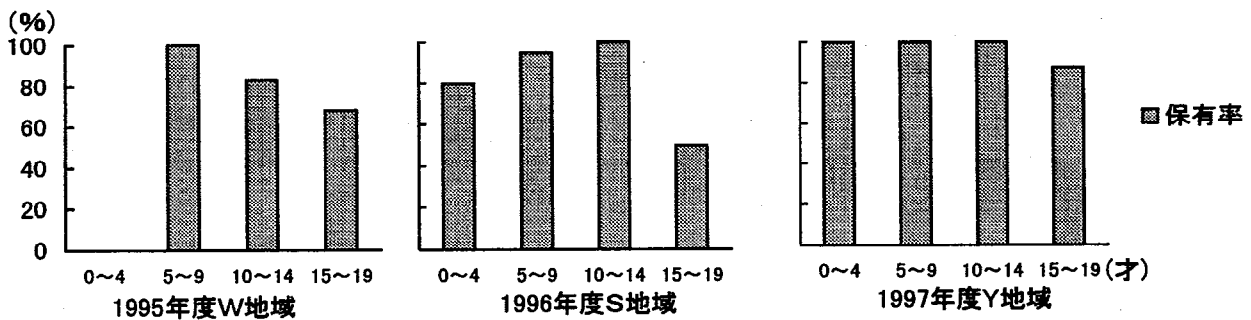


図1 年齢群別の中和抗体保有率

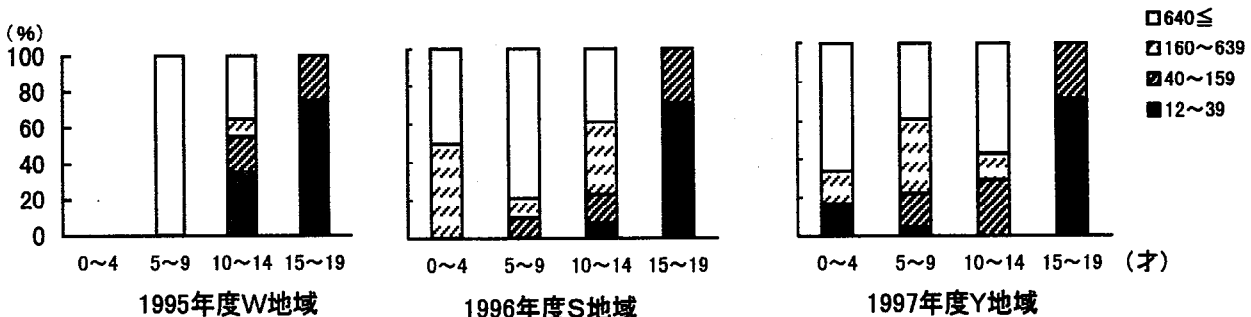


図2 年齢群別の中和抗体価分布

3.5 接種回数別の平均中和抗体価

1954年のワクチン接種開始より中山-予研株がワクチン製造株として使用されていたが、1989年以降、より広い抗原域をもつ北京-1株に変更されている。そこで1995~97年度の調査対象より北京-1株ワクチンのみを接種した46例について、基礎免疫の接種回数別に平均中和抗体価をもとめ図4に示した。

0~4才群、5~9才群において2回接種では平均中和抗体価206、631倍であったが、3回接種では2359、2105倍の非常に高い抗体価を保有していた。また、10~14才群では、2回接種で320倍、3回接種で1535倍であった。

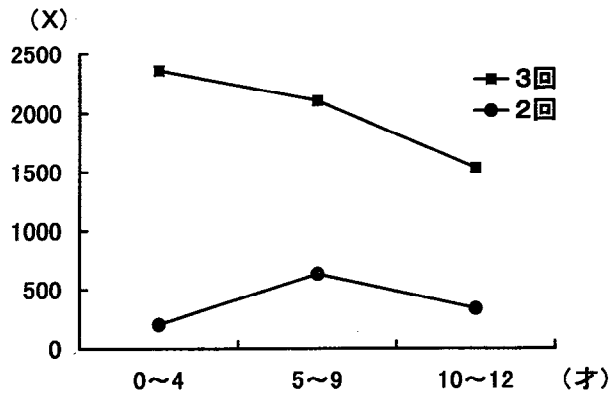


図4 接種回数別の平均中和抗体価

4. 考 察

ワクチン接種者の抗体保有率は、各年度ともに14才以下では80.0~100%で、ワクチンによる抗体獲得が十分であることが明らかとなった。しかも、中和抗体価も0~4才群では50~70%が、5~9才群では40~100%が、10~14才群では35~60%が640倍以上の高いレベルに分布していた。

ただし、0~4才群では保有率と640倍以上の高い抗体価を保有している割合が、5~9才群に比較して低い年度が認められた。これは、基礎免疫を獲得するのに必要な3回の接種回数を満たしていない例があったためと推測された。

一方、15~19才群の中和抗体保有率は各年度ともに他の年齢群より低下し、また抗体価も70~78%が12~39倍の低いレベルに分布していた。これは接種歴をみると追加接種を受けた例が無いことより、基礎免疫として一度獲得した抗体価が、年数の経過と共に検出限界以下に低下した可能性が考えられる。

また、北京-1株ワクチンを接種した14才以下の年齢群では、平均抗体価が10~14才群で700~1000倍であり、さらに0~4、5~9才群では1000倍以上の非常に高い値を保有し、抗体産生能が優れているとする秋山等の報告が再確認された³⁾。これに対して、15~19才群では各年度共に30倍程度の低い値であり、年数の経過による抗体価の減少が認められた。この成績は、この対象群の基

礎免疫が中山-予研株ワクチンであったことや、2回の追加接種を受けていないことが影響していると考えられる。

次に、基礎免疫として北京-1株ワクチンを3回接種した場合は、0~4、5~9才群では2000倍以上の非常に高い平均抗体価を保有しており、また、10~14才群では追加接種を受けていないにもかかわらず1535倍の平均抗体価を維持していた。以上の成績から、北京-1株ワクチンは抗体産生能が優れており、確実に3回接種の基礎免疫を完了していれば持続性も高くワクチンの効果は十分であることが明確となった。

近年、日本脳炎届出患者数は1ケタ代であり発生も九州、四国地方に集中しているが、1994年には群馬県と新潟県でも各1名の患者が発生している³⁾。宮城県でも患者の発生こそ無いが、1995年に日本脳炎汚染地区に指定されたことがあり、日本脳炎ウイルスの活動が毎年確認されている。今後、流行の恐れが皆無とはいえずワクチンの接種が推奨される。

5. ま と め

- 1) ワクチン接種率は年々低下し、ワクチン接種への関心が薄れていると推測された。
- 2) ワクチン接種者で14才以下の年齢群では中和抗体保有率が80~100%であり、また中和抗体価分布、平均抗体価ともに高いレベルを維持していることからワクチンによる抗体獲得は十分であることが明らかとなった。
- 3) 北京-1株ワクチンの抗体産生能がきわめて高いことが再確認され、また、完全な基礎免疫を得たグループは、抗体獲得率ならびに抗体の持続性も高くワクチンの効果が明確であった。

参 考 文 献

- 1) 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課・国立感染症研究所感染症情報センター：平成8年度伝染病流行予測調査報告、50~80(1998)
- 2) 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課・国立予防衛生研究所感染症疫学部：平成6年度伝染病流行予測調査報告、53~80(1996)
- 3) 秋山和夫他、臨床とウイルス、23-3、204~209(1996)

健康人におけるNorwalk-like Virusの侵淫状況

Epidemiological Survey of Norwalk-like Virus in Healthy Subjects.

野池 道子 有田 富和 後藤 郁男
 沖村 容子 秋山 和夫 白石 廣行
 名取 克郎* 武田 直和*

Michiko NOIKE, Tomikazu Arita, Ikuo Goto
 Yoko OKIMURA, Kazuo AKIYAMA, Hiroyuki SHIRAISHI
 Kathuro NATORI, Naokazu TAKEDA

キーワード：Norwalk-like Virus、RT-PCR、血清型、バキュロウイルス

Key Word：Norwalk-like Virus, RT-PCR, Serotype, Baculovirus

宮城県におけるNorwalk-like Virus (NLV) の侵淫状況を調査するために、270名の健康人血清から、バキュロウイルスを用いて作成したNLV中空粒子の7血清型を抗原として、NLVに対する抗体を測定した。その結果、抗体保有者は低年齢層より存在し、加齢に伴って増加する傾向が認められた。また、健康人339名の糞便からRT-PCR法を用いてNLV遺伝子の検出を行ったところ、NLV遺伝子を確認した。この結果より、NLVは広い年齢層に侵淫していることが明らかとなった。

1. はじめに

小型球形ウイルス (Norwalk-like viruses: NLVs) は、非細菌性食中毒や秋から冬にかけて流行するウイルス性胃腸炎の原因ウイルスであることが知られており、主な症状は腹痛・嘔吐・吐気および下痢である¹⁾。NLVsはヒト腸管内で増殖し糞便から体外へ排泄されるが、感染しても無症状のまま経過する例も報告されている²⁾。

NLVsの検査法は培養系が確立されていないことから、電子顕微鏡によるウイルス粒子の確認やPCR法による遺伝子検出が主流である。しかし、最近遺伝子組み換え技術による構造蛋白発現系の研究が進み、種々の血清型に対する抗体測定が可能となり、血清疫学調査に応用できるようになった^{3),4)}。

今回、我々は健康人の糞便中からNLVs遺伝子の検出およびELISA法による血清中のNLVsに対する抗体の測定を行い、県内におけるNLVsの侵淫状況を調査したので報告する。

2. 材料と方法

2.1 健康人糞便からのNLVs遺伝子検出

調査は保育所や幼稚園で集団生活をしている健康な0～6才児を対象とし、検体は表1に示すように1996年の11月にA地域、1997年2～3月にB地域、1997年11月にC地域とD地域、1998年11月にE地域、1999年1月にF

地域、計6地域、349件の糞便を採取した。

なお、糞便は検査まで-80℃に保存した。

糞便からのRNA抽出はグアニジン・チオシアネート (GTC) とガラスパウダーを用いる方法で行い⁵⁾、逆転写酵素で処理後Nested PCR法を実施した。プライマーはP36/356)をmodifyしたP36/35' →林等が構築したNV82、SM82/NV81 (NV系) とMR3/47) →Yuri22F/R8) (Yuri系) の2系統を用いた。それぞれ目的とする330bp、373bpの部位にバンドが検出された検体については、サザンハイブリダイゼーション法 (図1) で確認試験を行った。プローブは食品衛生法施行規則⁶⁾の中で推奨された6種類を使用した。また、確認試験で陽性を示した検体の一部については、PCR産物を電気泳動とスピンカラムで精製し、直接塩基配列の決定を行い遺伝子型の分類を行った。

2.2 健康人の抗体測定

検査対象は1995年9月～10月に採取したG地域 (4～58歳) 135件、1997年1月に採取したH地域 (4～70歳) 135件、計270件を用いた。抗体測定は、バキュロウイルスにNLVsの構造蛋白領域を組み込み、発現させた系を用いて作成したNLVs中空粒子を抗原としてELISA法で行った¹⁰⁾。即ち、図2に従い固相化抗原に200倍希釈血清を加えて反応した後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体を結合させ、その後基質を加え、492nmで吸光度を測定した。吸光度が陰性対照の2倍以上を示した検体を

* 国立感染症研究所ウイルス第2部

抗体保有者とした。使用した抗原は、Genogroup-1 (G-1型)として、Chiba virus (CV)、Southampton virus (r258)、Norwalk virus (r124) の3血清型、Genogroup-2 (G-2型)として、Lordsdale virus (r104)、47/97 virus (r47)、7k/94 virus (r7)、Hawaii virus (r76) の4血清型、計7血清型である。

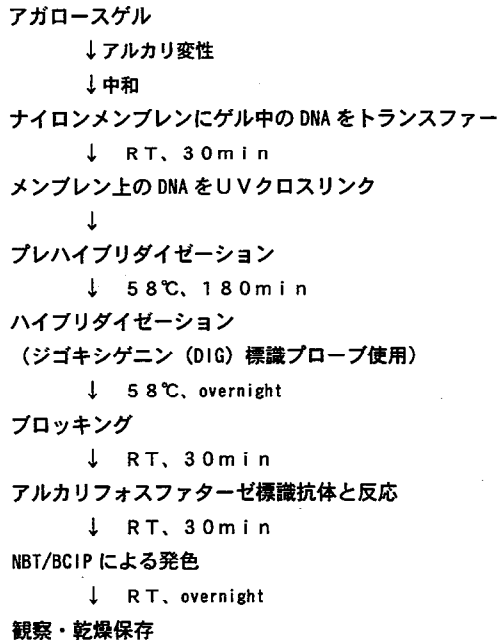


図1 サザンハイブリダイゼーション

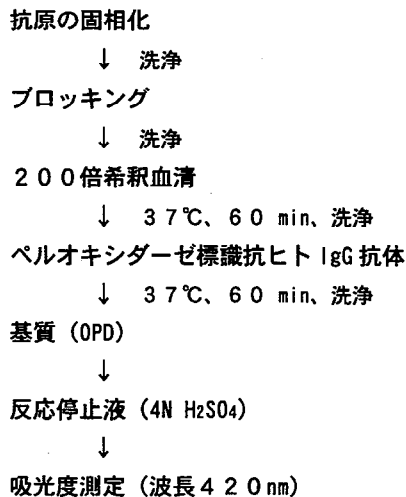


図2 酵素抗体法(ELISA法)

3. 結果と考察

3.1 糞便からのNLVs遺伝子の検出と遺伝子型の解析

A地域からは12/56件(21.4%)と最も高率に検出され、ついでB地域から6/62件(9.7%)、F地域から2/66件(3.0%)検出された。これに対してC地域0/58件、D地域0/47件、E地域0/60件と全く検出されず、検出率は調査年度や地域により大きく異なっていた。

近年の我が国における全国的なNLVsの流行は、1995年秋から96年にかけて乳幼児を中心に発生した¹¹⁾。しかもこの期間には全国的にNLVsの検出数が過去数年間で最も多かったと報告されている³⁾。また、仙台周辺でも患者の発生やNLVsの遺伝子が確認された¹²⁾。この全国的な流行時期とは少し外れていたが、NLVsの遺伝子がA地域で5人に1人、B地域では10人に1人と高率に検出された。これらの集団の中でNLVsの流行があったと推測されるものの、検体は健康な状態の時に採取されており不顕性感染であった可能性が大きいと考えられる。NLVs感染では、その遺伝子がPCR法によって通常約1週間程度まで陽性になることも知られており^{13),14)}、今回の成績からは不顕性感染を確定するまでには至らなかった。また、F地域においても散発的な流行または不顕性感染の可能性が示唆された。

次に、使用したプライマー別の検出状態を表1に示した。A地域では12件中9件がNV系で検出されたのに対して、B地域では6件中4件がYuri系で検出された。そこで、NV系で検出されたA地域の7株とB地域の1株、Yuri系で検出されたA地域の3株とB地域の4株についてシークエンスを行った。

その結果、解析可能であった13株(NV系7株、Yuri系6株)は、Yuri系で検出された1株がG-1型で12株はG-2型に分類された(表2)。A地域ではG-1型1株とG-2型8株であり、そのうち6株は塩基配列が完全に一致していた。しかし図3に示したようにAb株とAc株間では87%、Ab株とAd~Ai株間では73%、Ac株とAd~Ai株間では67%の一致率であり同一地域内で3種類の株による感染があったと推定された。

一方B地域ではG-2型4株であり、またA地域で検出されたG-2型の3種類と塩基配列が一致しており、1997年2月時点でもA地域で検出された株による感染が継続していたことが判明した。(図3)

表1 健康人糞便からのNLVs遺伝子検出状況

プライマー	地域	A	B	C	D	E	F	計
		例数	56	62	58	47	60	66
NV系	+*	9	2	0	0	0	0	11
	-	47	60	58	47	60	66	338
Yuri系	例数	56	62	58	47	60	66	349
	+	3	4	0	0	0	0	9
	-	53	58	58	47	60	66	340

*: サザンハイブリダイゼーション陽性(+), 陰性(-)

表2 シークエンス結果

地域	例数	遺伝子型		
		G I	G II	解析不能
A	10	1	8	1
B	5	0	4	1

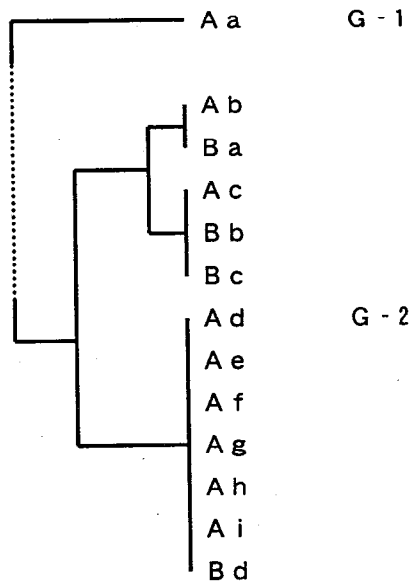


図3 13株の系統樹

3.2 抗体保有状況

3.2.1 年齢群別・抗原別抗体保有状況

0～4才群の抗体保有状況を見ると、G地域の保有率はr124とr104に66.7%と高く、r47に27.3%と低かった。一方、同群のH地域ではr124とr7に対して100%と非常に高く、また、r258で12.5%と低く血清型によって保有率に差は認められるものの、7血清型全てに対して抗体を保有していた。次に、5～9才群では、G地域のr47で47.1%、H地域のr124で40.0%、CVで43.3%であったが、その他の4血清型に対しては、両地域共に50%以上の抗体を保有していた。さらに、他の年齢群では各血清型に対して加齢と共に保有率は上昇する傾向にあり、30～49才群では7血清型に対して70%以上の保有率となった。また、7血清型の全てに対して抗体を保有していなかった者は270件中、G地域で6名、H地域で2名のみであった。これらの結果は、名取らによる、2才頃より感染を

受け成人では高い抗体保有率になるという報告^{9),10)}と同様であった。

即ち、宮城県においても低年齢層より抗体保有者が存在することや、7血清型に対する抗体陰性者が約3%のみであったことより、NLVsは巾広く侵淫していることが明らかとなった。なお、低年齢層では血清型による保有率に差があるにもかかわらず、加齢と共に血清型による差がなくなるのは、年齢の経過に従って異なった血清型に何度も感染し抗体を獲得するのか、あるいは2～3種の血清型による感染が共通抗原として7血清型に対して抗体を保有するようになるのかが不明であり、今後さらに検討する必要がある。

3.2.2 G-1、G-2型別抗体保有状況

G-1型である3血清型の1つ以上、また、G-2型である4血清型の1つ以上に陽性を示した対象者をそれぞれの抗体保有者とし抗体保有率を算出した。

G地域においては両型に対して0～4才群から70%以上がNLVsに感染し抗体を保有し、加齢と共に抗体保有率も上昇する傾向が認められた。一方、H地域においてはG-1型に対する抗体はG-2型に比較し、加齢と共に極端な上昇は認められず最高でも80%であった。これに対してG-2型は、5～9才群の90%、50才以上の95%である以外は100%抗体を保有していた。特に、0～4才群ですでに100%の保有率であったことは、この対象地域での検体採取が1995年の全国的な流行が認められた翌年であるので地域によっては流行が続いており、この影響を受けている可能性が高いと考えられる(図4, 5)。

我が国で検出されるNLVsの遺伝子型は、1:9の頻度でG-2型が多いとされている¹¹⁾。今回の我々の調査においても、健康人から検出した遺伝子型はG-2型が多数を占め、さらに7種の血清型に対する抗体保有状況においてもG-2型が高い保有率を示し、宮城県内におけるNLVs流行も限られた地域であるもののG-2型優勢であることが明らかとなった。

表3 抗原別抗体保有状況

年齢群	抗原 例数	G地域 (1995年9月採血)							抗原 例数	H地域 (1997年1月採血)						
		G-1型				G-2型				G-1型				G-2型		
		CV	r258	r124	r104	r47	r7	r76		CV	r258	r124	r104	r47	r7	r76
0～4	33	12 ¹⁾ (36.4)	(36.4)	(66.7)	(66.7)	(27.3)	(36.4)	(36.4)	8	(37.5)	(12.5)	(25.0)	(100.0)	(62.5)	(100.0)	(50.0)
5～9	17	10 (58.8)	(52.9)	(76.5)	(70.6)	(47.1)	(58.8)	(58.8)	30	(43.3)	(60.0)	(40.0)	(73.3)	(66.7)	(90.0)	(56.7)
10～14	20	14 (70.0)	(70.0)	(70.0)	(95.0)	(75.0)	(85.0)	(85.0)	19	(42.1)	(52.6)	(47.4)	(89.5)	(73.7)	(100.0)	(68.4)
15～19	17	17 (100.0)	(58.8)	(70.6)	(97.1)	(52.9)	(64.7)	(58.8)	19	(63.2)	(42.1)	(57.9)	(73.9)	(89.5)	(100.0)	(52.6)
20～29	16	12 (75.0)	(75.0)	(81.3)	(93.8)	(87.5)	(87.5)	(87.5)	19	(57.9)	(63.2)	(57.9)	(89.5)	(84.2)	(94.7)	(57.9)
30～49	28	24 (85.7)	(85.7)	(82.1)	(92.9)	(82.1)	(92.9)	(92.9)	20	(70.0)	(75.0)	(65.0)	(80.0)	(90.0)	(100.0)	(70.0)
50～	4	4 (100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(25.0)	(75.0)	(75.0)	20	(80.0)	(80.0)	(75.0)	(70.0)	(85.0)	(95.0)	(80.0)

1) 保有者数、() 保有率

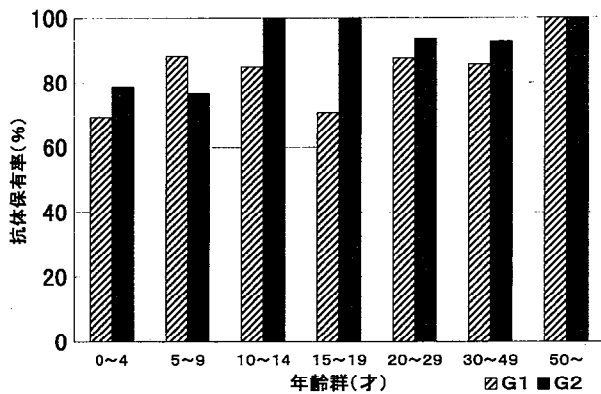


図4 G1・G2別抗体保有率 (G地域)

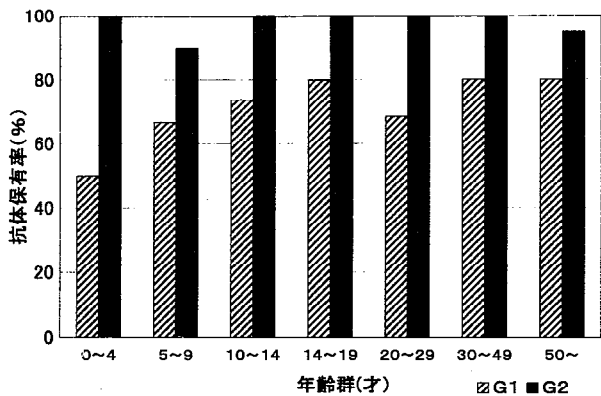


図5 G1・G2別抗体保有率 (H地域)

また、G-2型に加えて、G-1型の血清型に対する抗体保有者も多数認められたことから、同型のNLVsも流行していることが示唆された。

現在、NLVsの構造蛋白の塩基配列の解析からG-1型、G-2型には少なくとも11種類の血清型があるといわれている¹⁾。今後、さらに他の血清型の抗原が発現され抗体測定が可能になれば、より詳細な血清疫学調査を行うために有効となるであろう。

4. まとめ

- ① 3地域の健康人の糞便よりNLVs遺伝子が検出されたことにより、健康者のNLVs不顕性感染の可能性が示唆された。
- ② 低年齢層より抗体保有者が存在することが確認され、成人になるに従って増加する傾向が認められ、NLVsは広い年齢層に侵淫していることが明らかとなった。
- ③ 糞便中のNLVs遺伝子検出、および血清中の抗体調査を平行して継続することは、NLVsの感染経路、汚染経路解明の上で有効であると考えられた。

参考文献

1) 安藤 民衛:モダンメディア、36、8、16-41(1990)
 2) David Y. Graham etc.:JID.、170、7、34-43(1995)

3) 病原微生物検出情報:19、11、1-5(1998)
 4) 武田 直和他:モダンメディア、45、6、1-11(1999)
 5) 植木 洋他:宮城県保健環境センター年報、13、47-51(1995)
 6) C.L.Moe etc.:J.CLIN Microbiol.、32、3、642-648(1994)
 7) Judy.F.Lew etc.:J.Virol.、68、5、3391-3396(1994)
 8) Hiroyuki Saito etc.:Microbiol.Immunol.、42、6、439-446(1998)
 9) 厚生省:食品衛生法施行規則の一部を改正する省令(平成9年5月30日、厚生省令第49条)
 10) 名取 克郎他:第46回日本ウイルス学会総会講演要旨(1998)
 11) 牛島 廣治他:LABEAM.、19、10、1-5(1997)
 12) 病原微生物検出情報:17、12(1996)
 13) Jiang etc.:J.CLIN Microbiol.、30、10、2529-2534(1992)
 14) 大石 功:臨床とウイルス、27、3、114-126(1997)

散発下痢症患者から分離されたEHEC O157の性状

Characterization of EHEC O157 isolated from Diarrhea

伊藤 友美 有田 富和 齋藤 紀行
御代田 恭子* 秋山 和夫 白石 廣行

Yumi ITO, Tomikazu ARITA, Noriyuki SAITO
Yasuko MIYOTA, Kazuo AKIYAMA, Hiroyuki SHIRAIISHI

キーワード：EHEC O157、ベロ毒素、*vtx*遺伝子、*eaeA*遺伝子

KeyWord：EHEC O157, Vero toxin, *vtx* gene, *eaeA* genes

宮城県内の散発事例から分離された特異的なベロ毒素産生性を示すEHEC O157の諸性状について他事例分離O157と比較検討した。

1. はじめに

腸管出血性大腸菌 (VTEC) 感染症は、1996年に国内で大規模な集団感染が発生して以来、宮城県内においても散発例を中心に増加傾向にある。我々はVTECの感染様式の解明と感染拡大の防止を目的として、VTECの病原性とベロ毒素の産生性との関係について検討してきた¹⁾。

VTECの鑑別は、分離菌の生化学的性状試験による菌種の決定と血清型別試験およびベロ毒素 (VT) の検出といった一連の確認試験で行われ、VTの検出は特に重要な確認試験である。ベロ毒素にはVT 1およびVT 2があり、さらにそれぞれに幾つかのバリエーションが報告されている²⁾。それらの確認は逆受け身ラテックス凝集法 (RPLA) による毒素蛋白VT 1、2の検出方法とPCR法によるベロ毒素遺伝子 $vtx 1$ 、 2 の検出が一般的な検査法として用いられている³⁾。ベロ毒素蛋白の検出はモノクローナル抗体によるイムノクロマト法 (EIA)⁴⁾あるいはポリクローナル抗体によるRPLA法が用いられている。一方、遺伝子の検査はベロ毒素の遺伝子上でホモロジーの高い部位を検出する、小林⁵⁾あるいはPollard⁶⁾が開発したプライマーがPCR法に用いられる。

平成10年度において、VTEC O157集団感染 (家族内) 2事例から分離された菌株が、Pollardのプライマーを用いたPCR法でVT 1およびVT 2遺伝子が明確に検出されるにも関わらず、RPLAキット (デンカ生研) でVT 1は検出されるがVT 2が不明瞭あるいは陰性を示した。これらのことは日常検査をする中で、菌の同定におけるPCR法の使用に大きな問題を提起している。そこで、このPCRとRPLAの結果の不一致がなによりかを明らかに

する目的でPCR法による遺伝子の解析調査を行ったので、他の性状試験の結果と併せて報告する。

2. 方法と材料

2.1 検査材料

平成10年度のVTEC感染症事例50件から分離したVTEC O157 (25株)、VTEC O26 (23株)、VTEC O111 (2株) を検査材料とした。

2.2 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験はアンピシリン、ピペラシン、セファゾリン、セフトリアム、セフトチキシム、セフメタゾール、セフトジウム、セフクロロム、ラタモキシム、アズトレオナム、ゲンタミシン、アミカシン、ミノサイクリン、イミペネム、オフロキサシン、ホスホマイシンの16種類について微量液体希釈法 (ドライプレート：栄研化学) で行いMICを求め、結果をNCCLSの基準に準じて耐性(R)、中間(I)および感受性(S)とした。

2.3 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法

VTECをHIブイオンで1晩培養後、加温溶解した1%アガロースゲルを混合し、 $1 \times 5 \times 8$ mmの大きさに固化 (プラグ) した。プラグをリゾチーム処理した後、制限酵素Xba IでDNA切断処理を行い、更にアガロースゲルに埋め込みパルスフィールド法で電気泳動を行った。電気泳動はBIO-RADの装置を使用し、電圧6 V/cm、角度120度、ステップ1 (4-8 sec : 12hr.)、ステップ2 (8-50sec : 10hr.) の条件で行った。泳動後はPCR法と同様にしてDNAのバンドを観察した。

2.4 ベロ毒素 (VT) 産生と検出法

VTの定性は分離したVTECをそれぞれ毒素産生用培地のCAYE培地2 ml中に菌を接種し、37°Cで18-20時間

* 現 仙南食肉衛生検査所

振とう培養した。培養液を遠心後、培養上清のVT1および2をRPLA法（デンカ生研）で検出した。VTの定量と生菌数測定はVTECをCAYE培地で 2×10^5 cfu/mlに調整して37℃で振とう培養後、経時的に菌液を採りVTはRPLAで凝集価を求め、生菌数は希釈法によってコロニーを寒天平板上に形成させ菌数を算出した。

2.5 PCR法による病原遺伝子検出

病原遺伝子保有の検索は、95℃6分加熱処理したVTECをテンプレートとし*vtx 1*、*2*、*vtx 2 vh*、*vtx 2 vp*、*eaeA*および*EAST*遺伝子検出用のプライマーを用いてそれぞれに適した条件下でPCRを行い、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、UV照射下でポロライド撮影しDNAバンドを観察した。表1に各プライマーの名称と塩基配列、増幅DNAサイズ、および報告者名を示した。

表1 遺伝子検出用プライマー

遺伝子名	プライマー名・塩基配列 (5'→3')	DNAサイズ	報告者
<i>vtx1</i>	VT1a GAAGAGTCCCGTGGGATTACG	130bp	Pollard ^a
	VT1b AGCGATGCAGCTATTAATAAA		
<i>vtx2</i>	VT2a TTAACCACACCCACGGCAGT	346bp	Pollard ^a
	VT2b GCTCTGGATGCATCTCTGGT		
<i>vtx2vp</i>	VT2vpu AAGCCTTACGGTTCAGGCAA	686bp	山崎 ^b
	VT2vpd CAGTTAAACTTCACCTGGGC		
<i>vtx2vh</i>	VT2v1 CATTACACAGTAAAAAGTGGCC	385bp	Tyler ^c
	VT2v2 GGGTGCCTCCCGGTGAGTTC		
<i>eae</i>	EA1 AAACAGGTGAAACTGTTGCC	454bp	八柳 ^d
	EA2 CTCTGCAGATTAACCTTCTGC		
<i>EAST</i>	1S GCCATCAACACAGTATATCC	106bp	八柳 ^d
	1AS GAGTGACGGCTTTGTAGTCC		

3. 結果及び考察

3.1 散発患者から分離されたVTECの菌種と血清型

県内（仙台市は除く）で発生したVTEC感染症の件数と分離したVTECを血清型別に分類して表2に示した。平成8、9年度のVTEC感染症発生は散発事例がほとんどで年間件数も20件以下であり、分離されたO157のH血清型別は全てがH7、O26はH11であった。

表2 平成8～10年度に分離されたVTECの血清型別分類

血清型	O157		O26		O114	O111	合計
	H7	HNM	H11	HNM	HNM	HNM	
平成8年度	8	0	6	0	2	0	16
平成9年度	8	0	11	0	0	1	20
平成10年度	20	5	22	1	0	2	50

平成10年度のVTEC感染症事例は50件（集団発生8）で、分離されたVTECの血清型はO157:H7が20菌株、O157:HNMが5菌株、O26:H11が22菌株、O26:HNMが1菌株、O111:HNMが2菌株と、発生件数、集団発生事例の増加と分離菌のH血清型に変化があった。分離されたO157（25菌株）のRPLA法によるVT産生とPCR法による*vtx*遺伝子の有無の結果を表3に示した。

表3 平成10年度分離VTEC O157のベロ毒素産出性

番号	菌株番号	事例	血清型	ベロ毒素			
				VT1		VT2	
				PCR	RPLA	PCR	RPLA
1	EC470	A	O157:H7	+	+	+	+
2	EC476	B	O157:H7	-	-	+	+
3	EC477	B	O157:H7	-	-	+	+
4	EC478	B	O157:H7	-	-	+	+
5	EC487	C	O157:H7	+	+	+	+
6	EC489	D	O157:H7	-	-	+	+
7	EC492	D	O157:H7	-	-	+	+
8	EC493	D	O157:H7	-	-	+	+
9	EC530	E	O157:H7	+	+	+	+
10	EC534	F	O157:H7	+	+	+	+
11	EC535	F	O157:H7	+	+	+	+
12	EC536	G	O157:H7	+	+	+	+
13	EC545	H	O157:HNM	+	+	+	±*
14	EC546	H	O157:HNM	+	+	+	±
15	EC547	H	O157:HNM	+	+	+	±
16	EC556	H	O157:HNM	+	+	+	±
17	EC557	H	O157:HNM	+	+	+	±
18	EC548	I	O157:H7	+	+	+	+
19	EC549	J	O157:H7	+	+	+	-
20	EC550	J	O157:H7	+	+	+	-
21	EC551	J	O157:H7	+	+	+	-
22	EC552	K	O157:H7	+	+	+	+
23	EC553	K	O157:H7	+	+	+	+
24	EC554	K	O157:H7	+	+	+	+
25	EC555	K	O157:H7	+	+	+	+

*：不明瞭な凝集を±とした

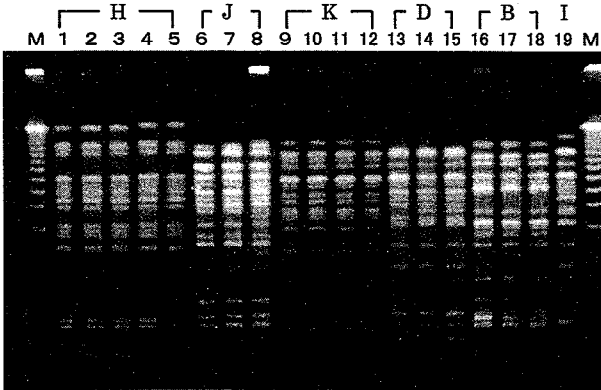
3.2 VTECの薬剤感受性試験

分離菌株について16種の薬剤に対する感受性試験を行った。結果の詳細は省略するが、分離O157の5菌株がアンピシリンに、3菌株がミノサイクリンに3菌株に耐性を示し、O26ではアンピシリンに2菌株、ホスホマイシンに1菌株が、O111ではアンピシリンに1菌株、ホスホマイシンに2菌株が耐性を示した。分離菌株の中に多剤耐性を示すものは検出されなかったことから、現時点では多剤耐性VTECの浸淫は本県においては起きていないと推察される。

3.3 VTECのPFGEによる解析

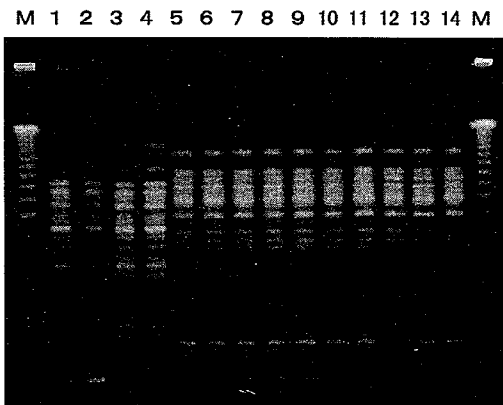
集団感染事例から分離したVTECのPFGE DNAパターンを図1、2に示した。図1は表3のグループH、J、K、D、B、Iから分離したVTEC O157のPFGEパターンである。パターンはグループ別では異なるが、グループ間では相似しており、グループ内では同一菌株による感染であることが明確に示唆された。図2にはO26の集団感染事例から分離したVTECのPFGEパターンを示した。No.1-13は保育園児感染事例からのVTEC、3

は同一感染事例の園児から分離されたVT1非産生O26、1および2はそれぞれ異なる感染事例から分離されたO26である。13は1-3の散発事例と異なり菌株間で相似のパターンを示し、同一菌による感染であることを示していた。このように、PFGEによるDNA解析は集団感染事例において同一菌による感染かどうかを特定する場合に有用であるとともに感染経路の調査も大いに役立つことが明らかになった。



M: マーカー

図1 VTEC O157のPFGEパターン



M: マーカー

図2 VTEC O26のPFGEパターン

3.4 菌の増殖とVT産生性

平成10年に発生した2つの集団感染事例(表3:グループHとJ)より分離したVTEC O157の8菌株は、PCR法で*vtx 1*、*vtx 2* 遺伝子が検出されたにもかかわらず、RPLA法でVT1は検出されるがVT2産生は明瞭でなかった。そこで、グループHおよびJのそれぞれ1菌株(EC545およびEC550)を対照として他の事例(グループK)から分離した菌株(EC552)について菌増殖とVT1、2産生性(凝集価)を培養48時間後まで経時的に調べ、結果を図3の(1)~(3)に示した。EC552のVT1、2産生は菌数の増殖とともに増殖しているが(図3-(1))、EC545ではVT1の産生がEC552と比べて低く、更に

VT2は培養後8-48時間でも凝集価が1と低い値を示した(図3-(2))。また、EC550においてはVT1の産生性は低く、VT2は48時間培養しても検出されなかった(図3-(3))。

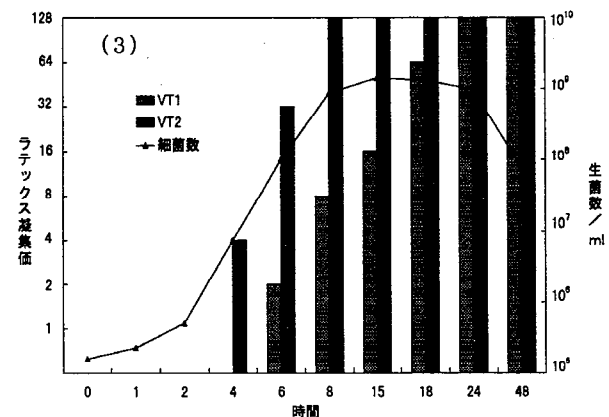
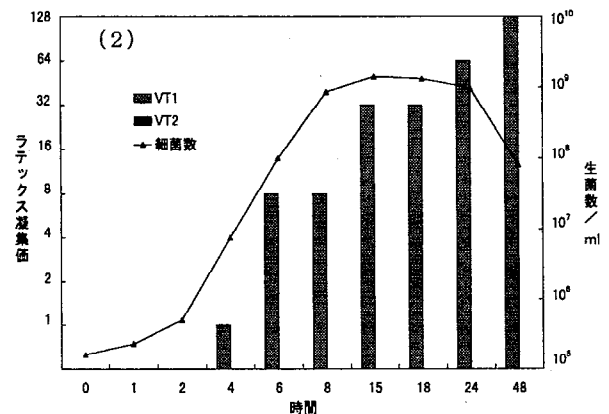
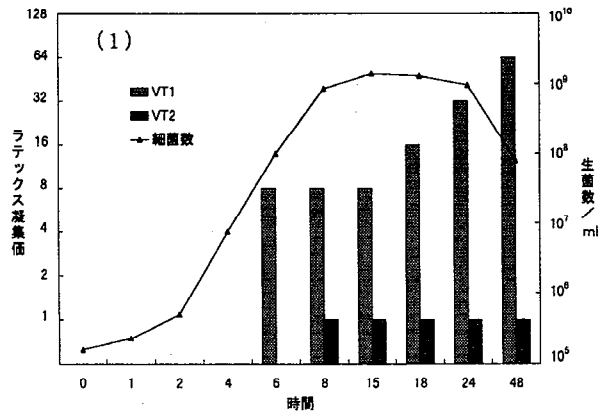


図3 細菌数と凝集価の経時適変化

- (1) EC552 (K)
- (2) EC545 (H)
- (3) EC550 (J)

以上のことから、表3に示したようにRPLA法によるVT2の検出で菌株EC545が±に、菌株EC550が陰性に判定されたと推察される。

3.5 各種遺伝子保有状況

VTEC O157について表1に示したそれぞれのプライマーを用いPCR法で*eaeA*、*EAST*、*vtx2vp*、*vtx2vh*遺伝子の保有状況を調べ、その結果を表4に示した。*eaeA*遺伝子はヒトの下痢症に関する遺伝子の一つとして、また*EAST*遺伝子はEPECあるいはVTECのヒトへ下痢を起こすエンテロトキシンの遺伝子であるとの報告がある^{10,11)}。しかし、保有菌とヒトへの病原性との関連性については明確でない。*eaeA*遺伝子は分離菌の全てで検出されたが、*EAST*遺伝子はVT1非産生菌株では検出されなかった。

一方、VT2バリエントが保有する遺伝子として*vtx2vp*、*vtx2vh*遺伝子が知られている。分離菌株については、*vtx2vp*遺伝子はいずれからも検出されなかったが、*vtx2vh*遺伝子が3グループ(D、H、J)の11菌株から検出された。グループDの菌株は*EAST*遺伝子欠損株であり、H、Jは*vtx2*遺伝子を保有するがデンカ生研のRPLAキットで明瞭なVT2が観察されなかった菌株であった。このことから、EC545とEC550が*vtx2vh*遺伝子を保有するVT2バリエントのため、市販のベロ毒素検出キットでVT2が検出されなかったものと推察された。

このようなバリエント菌株による感染事例が増加した場合、現在の市販のベロ毒素用キットでは正確な結果が期待できない。菌の多様化に伴い、今後VTECのバリエントを容易にかつ正確に検出する方法の開発が望まれる。

今後、今回分離した菌株について更に詳細な各種遺伝子の保有状況を調べVTECにおける各遺伝子と病原性との関係、あるいは各遺伝子の分子疫学への利用を検討したい。

表4 平成10年度分離VTEC O157の保有遺伝子

群	血清型	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>vtxvp</i>	<i>vtxvh</i>	<i>eaeA</i>	<i>EAST</i>
A	O157:H7	+	+	-	-	+	+
B	O157:H7	-	+	-	-	+	-
C	O157:H7	+	+	-	-	+	+
D	O157:H7	-	+	-	+	+	-
E	O157:H7	+	+	-	-	+	+
F	O157:H7	+	+	-	-	+	+
G	O157:H7	+	+	-	-	+	+
H	O157:HNM	+	+	-	+	+	+
I	O157:H7	+	+	-	-	+	+
J	O157:H7	+	+	-	+	+	+
K	O157:H7	+	+	-	-	+	+

4. まとめ

平成10年度に宮城県内の散発・集団事例から分離されたVTECについて血清型別、毒素産生性、薬剤感受性、病原遺伝子保有状況さらにPFGE解析を行い、次のことが明らかになった。

- (1) 県内のVTEC感染事例は増加傾向にあり、分離されるVTECの血清型も多様化してきた。
- (2) 分離されたVTECにアンピシリン、テトラサイクリン耐性を示すものがあつたが多剤耐性を示す菌株は検出されなかった。
- (3) PFGEによるDNA解析は集団感染事例等での原因菌株の同一性を調査する場合に有用であることが確認された。
- (4) *vtx1*、*2*遺伝子を保有してもRPLAでVT2が検出されないVTECが2集団感染事例から分離され、両者とも*vtx2vh*遺伝子を保有していた。

参考文献

- 1) 中村知子ほか：腸管出血性大腸菌(VTEC)のベロ毒素産生性、宮城県保健環境センター年報、16、42-44、(1998)
- 2) 大村真理ほか：腸管出血性大腸菌のPCR法による同定、臨床微生物、23、813-819、(1996)
- 3) 甲斐明美ほか：ラテックス凝集反応による大腸菌Verocytotoxin 1及び2の検出と応用、日細誌、44、434、(1989)
- 4) 志賀毒素(STX)を検出するイムノクロマト(EIA)法について：第19回日本食品微生物学会講演要旨集、(1998)
- 5) 小林一寛ほか：遺伝子増幅法(PCR)による志賀赤痢菌様毒素遺伝子の検出とその型別法、日細誌、45、649-652、(1990)
- 6) Pollard DR. et al. : Rapid and sepcific detection of verotoxin genes in Escherichia coli by the polymerase chain reaction、J. Clin. Microbiol.、28、540-545、(1990)
- 7) Yamazaki S. et al. : Typing of Verotoxions DNA colo-ny hybridization with poly- and oligonucleotid probes, a beadenzayme-linked immunosorbent assay, and poly-merase chain reaction.、Microbiol. Immunol.、40、345-352、(1996)
- 8) Tyler S.D. et al. : Identification of Verotoxin Type 2 Variant B Subunit Genes in Escheichia coli by the Poly-merase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis、J. Clinical Microbiology、29、1339-1343、(1991)
- 9) 八柳潤ほか：腸管集合性大腸菌耐熱性エンテロトキシン-1(EAST-1)遺伝子を保有する、食中毒様事例由来病原血清型大腸菌、感染症学雑誌、70、73-79、(1996)

- 10) Stephan R. et al. : Virulence Factors and Phenotypical Traits of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Asymptomatic Human Carriers, 37, 1570-1572, (1999)
- 11) Yamamoto T. et al. : Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea, 35, 223-227, (1997)

宮城県内における動物由来腸球菌の薬剤耐性保有状況調査 —特にバンコマイシン耐性腸球菌保有状況—

Survey of Drug Resistant Enterococci (VRE) in Animal Faecals

齋藤 紀行 伊藤 友美 御代田 恭子*
白石 廣行

Noriyuki SAITO, Yumi ITO, Yasuko MIYOTA
Hiroyuki SHIRAIISHI

キーワード：薬剤耐性、腸球菌、VRE、Van遺伝子

KeyWord: Drug Resistance, Enterococci, VRE, Van genes

バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) が鶏糞から検出されることから、宮城県内の鶏を中心とした動物の糞便由来腸球菌について薬剤感受性試験を実施し、薬剤耐性の保有状況について調査した。

1. はじめに

腸球菌は、ヒト・動物の腸管および環境に広く生息している。温度あるいはpHの変動に強い抵抗性を示すとともに、消毒薬や多くの薬剤に対して自然耐性を示す。臨床において、腸球菌は尿路感染症の起因为菌とされてきたが、重篤となることが少ないことから重要視されてこなかった¹⁾。しかし、近年、腹腔内感染や難治性の市中肺炎の起因为菌となった症例が報告され^{2,3)}、尿路感染症以外の原因菌になりうるようになってきている。

腸球菌は耐性獲得が容易で、多くの薬剤に耐性を示すことから腸球菌感染症の有効な治療薬にはバンコマイシンが用いられてきた。しかし、1986年にバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) が検出され⁴⁾、その後欧米の病院で多剤耐性VREによる感染症が相次いで発生し、特に米国ではVREによる重篤な敗血症の急増が深刻な社会問題になっている^{5,6)}。例えば、院内感染者で血液、膿などの臨床材料からVREが検出された場合と、糞便からのみ検出された場合では前者における死亡率は高く⁷⁾、更にVRE敗血症による死亡率は急性白血病、慢性骨髄腫患者で70%以上ときわめて高い⁸⁾、との報告がある。

VREの出現・拡大の理由の一つに、医療現場でのバンコマイシンの多量および長期使用が選択的にVREを増加させ、不完全な医療器具器材の消毒および手洗いによって医療環境に広がったと考えられている⁹⁾。一方、家畜の感染予防・成長促進の目的で飼料に添加された抗生剤の1つにバンコマイシン類似構造のアポパルシンを使用した養鶏の糞便中よりVREが検出されたことから、これらの環境下で耐性を獲得した腸球菌が何らかな経路

* 現 仙南食肉衛生検査所

で臨床にまで広がったとの考え方もある。

我が国でも、医療環境および家畜飼育の実状は欧米と同様であり、医療現場で多くの抗生剤が多量に使用されている。特にバンコマイシンはMRSAおよびデフィシル菌の治療薬として使用頻度が増加している。我が国でのVRE感染症は、1997年から1998年に8名が発症し1名の死亡例が報告され、その後も各地で発症者がでていいる。また、家畜の飼料には約20種類の抗生剤の添加が認可されていることから、臨床のみならず、鶏をはじめとする家畜と環境からVREなどの薬剤耐性菌の出現・拡大が大いに危惧される。

このような現状から、環境中および臨床の細菌検査部門における腸球菌の薬剤耐性調査、特にVREの検出監視は重要であると考え、我々は、VREの検索を念頭に置き、宮城県内のブロイラー鶏、採卵鶏、食肉用牛・豚、ペットの犬・猫の糞便中の腸球菌の保有状況を調査し、更に分離採取した腸球菌について薬剤感受性試験を実施した。バンコマイシン耐性菌についてはPCR法で保有する耐性遺伝子を調べた。

2. 方法と材料

2.1 動物糞便からの腸球菌の分離法

検査材料は、1997年から8年に県内で採取したブロイラー養鶏場1施設 (A) 内の鶏糞31検体、採卵養鶏場3施設 (B, C, D) 内の鶏糞92検体およびその他1施設 (E) 内の鶏糞9検体、食肉用豚糞20検体、食肉用牛糞14検体、ペット犬糞10検体、ペット猫糞9検体検体の合計185検体を検査対象としてシードスワブで採取した。それぞれの検体をSFブイヨンに接種し42℃で24-48時

間培養後、培地が黄変したものについて、E F培地で腸球菌の分離を行った。E F培地に発育し、グラム陽性球菌でカタラーゼ陰性・耐塩性を示すものを腸球菌 (*Enterococcus*) とした。

2.2 分離腸球菌の属種の同定

分離した *Enterococcus* はアピ20ストレブ (バイオメロウ社製) を用いて生化学性状試験および小栗の鑑別法¹⁰⁾ を参考にした運動性試験などの諸性状試験から菌種を決定した。

2.3 薬剤感受性試験

薬剤に対する感受性試験はNCCLS微量液体希釈法によるMIC測定法¹¹⁾ で行った。すなわち、分離したそれぞれの *Enterococcus* をBHIブイオンで一晩培養後、生理食塩水でマクファーランド1に調整し、更にミュラーヒントンブイオンで500倍に希釈した菌液を下記の薬剤がそれぞれの濃度に添加調整されたドライプレートDP16(栄研化学社製) に接種し37℃ で24時間培養して菌の発育の有無からMICを測定した。

薬剤はPCG (0.25-32μg/ml)、ABPC (0.25-32μg/ml)、AMP/CVA (0.25/0.13-32/16μg/ml)、IPM (0.25-32μg/ml)、MINO (0.25-32μg/ml)、EM (0.25μg/ml)、CLDM (0.25-32μg/ml)、GM (0.25-32μg/ml)、VCM (0.25-32μg/ml)、ST (1.25-160μg/ml)、OFLX (0.25-32μg/ml) およびTFLX (0.25-16μg/ml) を使用。MICの結果からNCCLSの基準に沿って耐性(R)、中間(I)および感受性(S)に分類した(表1)。菌株ごとに保有するRの数を耐性数とし、耐性数に2を乗じ更にIを1として加算した数を耐性度として耐性の程度を数字で表した。

表1 薬剤感受性カテゴリー

抗 生 剤	感受性(S)	中間(I)	耐性(R)
ペニシリン (PCG)	≦ 8		≧ 16
アンピシリン (ABPC)	≦ 8		≧ 16
アモキシシリン (ABPC)	≦ 12	24	≧ 48
イミペネム (IPM)	≦ 4	8	≧ 16
ミノサイクリン (MINO)	≦ 0.5	8	≧ 16
エリスロマイシン (EM)	≦ 0.5	1-4	≧ 8
クリンダマイシン (CLDM)	≦ 4	1-2	≧ 4
ゲンタミシン (GM)	≦ 4	8	≧ 16
バンコマイシン (VCM)	≦ 4	8-16	≧ 32
ST合剤 (ST)	≦ 40		≧ 80
オフロキサシン (OFLX)	≦ 2	4	≧ 8
トスフトキサシン (TFLX)	≦ 0.5	1	≧ 2

2.4 バンコマイシン耐性遺伝子van A、van Bおよびvan Cの確認

van A遺伝子はDetkaのプライマー¹²⁾ で、van B遺伝子は山根のプライマー¹³⁾、van C遺伝子はPatelのプライマー¹⁴⁾ でPCR法を行い、特定のDNA塩基配列を増幅し、アガロース・ゲル電気泳動法により特異遺伝子を検出した。使用したプライマーの塩基配列等を表2に示した。更に、van C1、C2/3を決定するためにPCR-RFLP法を用いPCR産物をDNA制限酵素で切断し、切断

DNAバンドを確認して決定した。すなわち、van C1およびC2/3のそれぞれのPCR産物18μlに×10反応用緩衝液2μl、制限酵素Msp I (10u/ml) 0.4μlを加え37℃で20時間反応させた後、アガロース・ゲル電気泳動法で特異的に切断されたバンドを検出した。van C1は467bpのPCR産物が制限酵素により230/237に切断され、van C2/3は429bpが338/91に切断される。

表2 遺伝子検出用プライマー

遺伝子名	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	DNAサイズ	報告者
vanA	A1	GGGAAAAACGACAATTGC	732	Detka
	A2	GTACAATGCGCGGTTA		
vanB	1	CATCGCCGTCCCCGAATTTCAAA	297	山根
	2	GATGCGGAAGATACCGTGGCT		
vanC1	vanC123-FOR	GATGGCWGTATCCAAGGA	467	Patel
	vanC1-REV	GTGATCGTGGCGCTG		
vanC2	vanC123-FOR	GATGGCWGTATCCAAGGA	429	Patel
	vanC1-REV	ATCGAAAAAGCCGTCTAC		

2.5 遺伝子検査の標準菌株

van A陽性菌株に*E. faecium* ATCC 51299、van B陽性菌株に*E. faecalis* ATCC 51599、van C1陽性菌株に*E. gallinarum* ATCC 49573、van C2陽性菌株に*E. casseliflavus* ATCC 25788をそれぞれ使用した。

3. 結 果

3.1 分離腸球菌

動物糞185検体から分離された腸球菌は合計197菌株で、その内訳を表3に示した。鶏はブロイラー用と採卵用とを分けた。

表3 腸球菌分離材料と分離菌株数

検 査 体	検体数	分離菌株数	検 査 体	検体数	分離菌株数
鶏糞	ブロイラー用	31	牛糞	14	7
	採卵用	92	犬糞	10	10
その他	9	11	猫糞	9	9
豚糞	20	15	合 計	185	197

3.2 分離腸球菌の薬剤感受性

分離菌株について12薬剤に対する薬剤感受性試験を行い、結果を図1に示した。分離菌株の94.5%がペニシリ

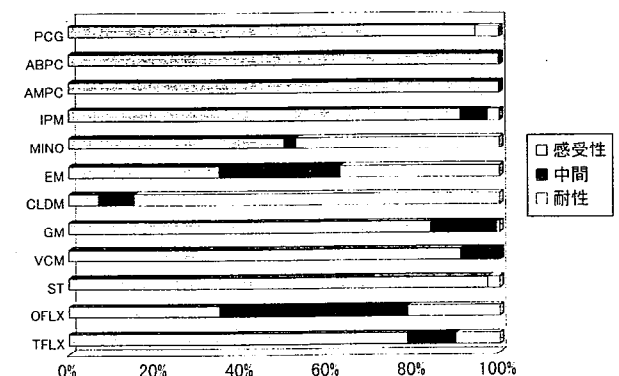


図1 動物由来腸球菌の薬剤感受性%

ンに感受性、100%がアンピシリンに感受性で、84.9%がクリンダマイシンに耐性であった。また、ミノサイクリンに47.3%、エリスロマイシンに37.0%耐性であった。一方、バンコマイシンに耐性を示すものは検出されなかったが、中間の耐性(I)を示す分離菌株が16株(8.6%)検出された。

3.3 薬剤耐性腸球菌の保有状況

分離菌株の薬剤耐性保有状況を、由来の動物別に分類し、結果を図2と3に示した。鶏は腸球菌の分離由来別にプロイラー用と採卵用を分けて図2に示したが、4剤以上の多耐性を示した菌株はプロイラー用で15菌株(30%)、採卵用で2菌株(2.1%)とプロイラー用由来菌株が明らかに高い保有率を示した。一方、他の動物種での耐性保有は豚由来の腸球菌が他の動物由来に比べ高い耐性保有率(4剤耐性:53.3%)を示した。

6および5薬剤に耐性を示した高度耐性菌13菌株の菌種と薬剤感受性試験の結果および耐性度を表4に示した。高度耐性を示した腸球菌は*E. faecium* 5株、*E. faecalis* 4菌株、*E. casseliflavus* 3株、*E. hirae* 1株であった。

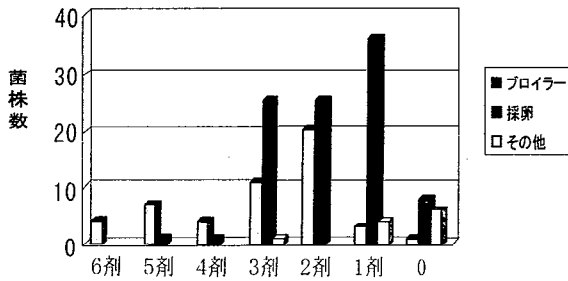


図2 鶏糞由来腸球菌の耐性保有状況

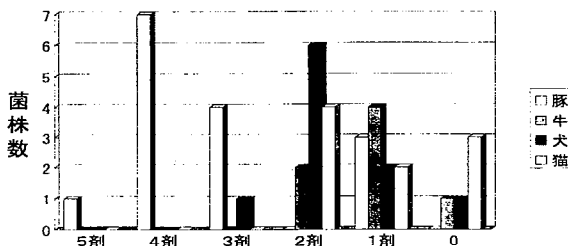


図3 腸球菌の動物別薬剤耐性保有状況

表4 動物分離多剤耐性腸球菌の薬剤感受性

菌種	菌株名	由来	P	C	A	B	I	M	E	C	V	S	O	T	耐性度(a)	耐性度(b)	
1 <i>E. faecium</i>	2-1	鶏	R	S	S	R	S	R	R	R	I	S	S	R	R	6	13
2 <i>E. faecium</i>	2-12	鶏	R	S	S	I	R	R	R	R	I	S	S	R	R	6	14
3 <i>E. faecium</i>	2-61	鶏	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	6	12
4 <i>E. casseliflavus</i>	2-16	鶏	R	S	S	I	S	R	R	R	R	S	S	R	R	6	13
5 <i>E. casseliflavus</i>	2-17	鶏	S	S	S	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R	5	12
6 <i>E. casseliflavus</i>	2-19	鶏	R	S	S	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R	5	12
7 <i>E. faecalis</i>	2-24	鶏	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	I	5	11
8 <i>E. faecalis</i>	2-35	鶏	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	I	5	11
9 <i>E. faecalis</i>	2-40	鶏	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	I	5	11
10 <i>E. faecalis</i>	2-41	鶏	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	5	10
11 <i>E. faecium</i>	2-54	鶏	R	S	S	I	S	R	R	R	I	S	S	R	R	5	12
12 <i>E. faecium</i>	5-72	鶏	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	5	10
13 <i>E. hirae</i>	p-6	豚	R	S	S	I	R	R	R	R	S	S	S	R	I	5	12

(a): Rの合計 (b): Rを2、Iを1とした合計

3.4 バンコマイシン耐性遺伝子

分離腸球菌の薬剤感受性試験の結果(図1)、バンコマイシンにMICが8-6 mcg/mlの中間(I)を示す腸球菌が16株分離された。菌種は*E. faecalis*、*E. casseliflavus*それぞれ5株、*E. faecium* 3株であった。これらについてVREの耐性遺伝子、*vanA*、*B*および*C*の検出をそれぞれのプライマーを用いてPCR法で行った、その結果、*vanA*および*B*は検出されなかったが16菌株すべては*vanC*遺伝子を保有していた。その結果の一部を*vanA*、*vanB*、*vanC*の陽性対象菌株と共に図4に示した。*vanC*

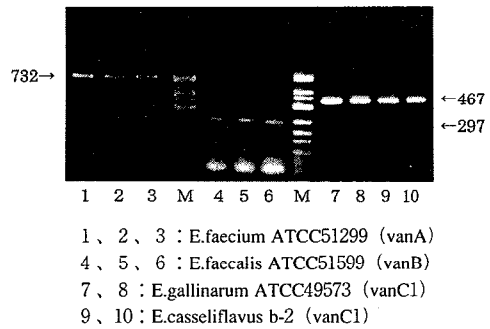
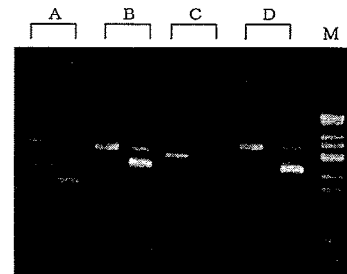


図4 VRE耐性遺伝子のPCRパターン



A: *E. gallinarum* ATCC49573 (*vanC1*)
 B: *E. casseliflavus* ATCC25788 (*vanC2*)
 C: *E. casseliflavus* 3-6 (*vanC1*)
 D: *E. faecalis* 5-4 (*vanC2*)

それぞれの左レーンは酵素処理前、右のレーンは酵素処理後

図5 *vanC*のPCR-RFLPパターン

遺伝子を保有していた16菌株についてPatelのコモンプライマーを用いてPCRを行なった後、PCR-RFLPにより*vanC1*、*C2/3*を決定した。図5にPCR-RFLPの結果を、また表5に16菌株の菌種と決定された*vanC*遺伝子を示した。

考 察

我が国では、多種多量の抗生剤が添加された飼料が家畜飼料として用いることが多い。細菌は薬剤に曝されると薬剤に抵抗力のないものは死滅するが、容易に抵抗性(耐性)を獲得することが知られている。耐性を獲得した細菌は耐性情報として遺伝子に組み込まれ、細菌から細菌へ伝達し拡散する。特に、腸球菌は自然界に広く分布するので、他の細菌への耐性伝達の間接細菌となる可

能性は高いことから腸球菌の耐性保有状況調査は重要である。

臨床で分離される腸球菌はペニシリン系に感受性、アミノグリコシド系に耐性であることが多い¹⁵⁾。今回、アンピシリンには感受性であるがペニシリンに耐性を示す菌株がプロイラー鶏由来腸球菌から分離した(表1)。一方、分離腸球菌がマクロライド、テトラサイクリン系の抗生剤に耐性を示す菌株が多く検出されたのは飼料中に両抗生剤が多く含まれることによると考えられる。また、耐性保有率が高い菌種として、*E. faecium*、*E. faecalis*が知られているが、本調査においても表4に示したように鶏糞由来分離菌では同様の結果であった。また、プロイラー用鶏糞由来腸球菌が採卵用由来よりも多剤耐性を示す菌株が多い(表5)理由として、プロイラー用飼料中の抗生剤の量・種類が採卵用よりも多いことによると推察された。一方、調査した動物種の中で豚から分離した腸球菌が高い耐性保有を示したことも、多種の抗生剤を添加した飼料の使用が影響していると考えられた。

今回の調査ではバンコマイシンに高度耐性を示す菌株は検出されなかったが、MICが8-16 μ g/mlの中間型が鶏から13菌株、牛から3菌株分離された。VREの耐性遺伝子として*vanA*、*B*、*C*があり、*vanA*はプラスミド、*vanB*はプラスミド・クロモゾーム、*vanC*はクロモゾーム由来である。特にAおよびBは高度耐性を誘導する遺伝子として重要な遺伝子であることが知られている¹⁶⁾。前述の13菌株はPCR法による*Van*遺伝子検査の結果、いずれも*VanC*遺伝子を保有する菌株であることが確認された。

表5 VanC遺伝子保有腸球菌の菌種

	菌種	菌株名	由来	保有遺伝子
1	<i>E. faecalis</i>	3-15	鶏	VanC2
2	<i>E. faecalis</i>	3-16	鶏	VanC2
3	<i>E. faecalis</i>	5-2	鶏	VanC1
4	<i>E. faecalis</i>	5-4	鶏	VanC2
5	<i>E. faecalis</i>	5-12	鶏	VanC2
6	<i>E. faecium</i>	3-2	鶏	VanC2
7	<i>E. faecium</i>	5-52	鶏	VanC1
8	<i>E. faecium</i>	2-32	鶏	VanC2
9	<i>E. faecium</i>	3-7	鶏	VanC1
10	<i>E. casseliflavus</i>	3-6	鶏	VanC1
11	<i>E. casseliflavus</i>	3-14	鶏	VanC1
12	<i>E. casseliflavus</i>	4-66	鶏	VanC1
13	<i>E. casseliflavus</i>	4-67	鶏	VanC2
14	<i>E. casseliflavus</i>	b-2	牛	VanC1
15	<i>E. casseliflavus</i>	b-4	牛	VanC2
16	<i>E. hirae</i>	b-6	牛	VanC2

今回の調査で多剤耐性を示すものおよびVanCを保有する菌株が確認されたことは、動物や環境中における定期的な細菌の薬剤耐性調査の重要性が再認識された。

参考文献

- 1) 大井好忠ほか: 尿路性器感染症における腸球菌の意義、臨床と微生物、23、325-332、(1996)
- 2) 松本慶蔵: 私たちの感染症と化学療法(19)市中肺炎(2)-腸球菌性肺炎と腸球菌(VREも含めて)-化学療法の領域、13、1373-1380(1997)
- 3) 小林芳夫: 感染性心内膜炎・敗血症、臨床と微生物、23、301-305、(1996)
- 4) Leclercq, R., et al: Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium* The New England Journal of Medicine、319、157-161、(1988)
- 5) French, G.: Vancomycin resistance in south London, Lancet、338、283、(1992)
- 6) Friedan, T.: Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City, Lancet、342、76-79、(1993)
- 7) Wells, CL., et al: Stool carriage, clinical isolation, and mortality during an outbreak of vancomycin-resistant *Enterococci* in hospitalized medical and/or surgical patients, Clinical Infectious Diseases、21、45-50、(1995)
- 8) Edmond, MB., et al: Vancomycin-resistant *Enterococci* alert Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: Risk factors for infection. Clinical Infectious Diseases、20、1126-1133、(1995)
- 9) Murray, BE., et al: What can we do about vancomycin-resistant *Enterococci*? Clinical Infectious Diseases 20、1134-1136、(1995)
- 10) 小栗豊子: 分類・臨床検査における検査法の実際と微生物臨床と微生物、23、275-281、(1996)
- 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 6th informational supplement M-100-S6. NCCLS. (1997)
- 12) Deutka-Malen S et al.: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR, J. Clin. Microbiol.、33、24-27、(1995)
- 13) 山根誠久他: バンコマイシン耐性腸球菌検出のための各種薬剤感受性試験の検討、臨床病理、45、381-390、(1997)
- 14) Patel R., et al: Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in *Enterococci*, J. Clinical Microbiology、35、703-707、(1997)
- 15) 池康嘉: 腸球菌の院内感染と高度薬剤耐性、臨床と微生物、23、295-300、(1996)
- 16) 平写洋一: 話題の感染症(3)-VRE-、医学検査、46、1670-1675、(1997)

結核菌の遺伝子検査とRFLP解析

Molecular Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*

有田 富和 斎藤 紀行 秋山 和夫
白石 廣行

Tomikazu ARITA, Noriyuki SAITO, Kazuo AKIYAMA
Hiroyuki SHIRAISHI

キーワード：結核、遺伝子解析、RFLP、系統樹

Key Words : Tuberculosis, Molecular Diagnosis, RFLP, Phylogenetic Tree

仙台市を除く宮城県下の各保健所から搬入された35件の検体（菌株、喀痰、胸水、気管支洗浄液）について、PCR法による菌種同定、培養検査、薬剤感受性試験、RFLP解析を行った。

1. はじめに

結核は結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* の感染によって引き起こされる感染症である。感染は主に咳などによって結核菌を含む飛沫が飛散し、それを吸い込む空気感染（飛沫核感染）によって生じる。平成9年の全結核新登録患者数は、4万2,715人（前年比243人増）で、昭和34年以来38年ぶりに、罹患率は人口10万対33.9（前年比0.2増）で、昭和29年以来43年ぶりにいずれも前年を上回った。結核の感染源となりうる塗抹陽性の新登録患者数は、1万5967人（前年比932人増）と増加の傾向がより明確である。増加の主な要因は結核が国民病であった時代に感染した人々の高齢化に伴う発症と、結核菌に対する免疫のない未感染若年層の増加と考えられている。また最近では老人介護施設、病院、学校などで院内感染・集団感染が多発する傾向にあり、その対策が急がれている¹⁾。

このような状況の下、宮城県においては先の仙台市における集団感染発生の経緯から迅速診断を目的とした新規事業を開始したのでその現状について報告する。

2. 材料と方法

2.1 材料

仙台市を除く県内各保健所から搬入された、結核と診断された患者検体（喀痰・菌株・胸水）を材料とした。生きた結核菌を含む可能性のある試料は全て高度安全実験室内のクラスII安全キャビネット中で扱い、作業時には防護ガウン、防護キャップ、ゴム手袋、結核用N95マスクを着用した。

2.2 検体の前処理

検体を50mlチューブに取り、2倍量のN-アセチル-L-

システイン・水酸化ナトリウム (NALC-NaOH) 溶液を加えて10秒間激しく攪拌した。室温で20分間静置後、検体の15倍量のPBSで中和してエアロゾル飛散防止型の遠心チューブに移し、4℃に冷却したバイオセーフティーローターで室温20分間、3,000rpm. で遠心した。沈渣を少量のPBSに懸濁して前処理菌懸濁液とし、各種の検査に用いた。固形培地に発育した菌株は1・2コロニーをPBSに懸濁し試料とした。

2.3 遺伝子増幅 (PCR) 法による迅速抗酸菌検出

前処理菌懸濁液をアンプリコア検体前処理キット（以下、アンプリコア関連製品は全てロッシュ・ダイアグノスティクス製品）により洗浄、溶菌、中和してDNAを抽出後、アンプリコア増幅試薬を用いて16S rDNAの一部を標的としたPCRを行った。次にPCR産物を変性し、アンプリコア検出キットによるマイクロプレート・ハイブリダイゼーション法で結核菌群 (*M. tuberculosis* complex)、*M. avium* complex (MAC) に含まれるアビウム菌 (*M. avium*)、イントラセラー菌 (*M. intracellulare*) の遺伝子を検出した。すべての操作は各キットの使用法に従った。

2.4 培養検査

前処理菌懸濁液100・200 μ lを固形培地（1%小川培地、2%小川培地、ビット培地：極東製薬）と液体培地（BBL MGIT培地：ベクトン・ディッキンソン）に植え36℃で培養した。固形培地ではコロニーが出現するまで、液体培地では酸素消費が確認できるまで最長3ヶ月間にわたり観察した。

液体培地で増殖が確認された場合は培養液中の沈渣をフェノール、ウシ血清と混合してスライドグラスに塗沫・火炎固定後、抗酸菌迅速染色試薬 (BBL TB Quick

Stain:Becton Dickinson) で染色して抗酸菌の有無を確認した。ただし培養後1・3日以内に増殖が確認された場合は雑菌汚染を疑い、再度NALC-NaOH処理を行って培養した。

2.5 薬剤感受性試験

液体培地 (MGIT感受性システム:Becton Dickinson) による単一濃度法は添付説明書に従った。また、一部の喀痰と菌株についてはRNA合成酵素遺伝子の一部をPCR法で増幅し、DNAシーケンサー (Abi310:パーキンエルマー) を用いて直接法 (ダイレクトシーケンス法) で薬剤耐性突然変異が集中するホットスポット領域の遺伝子配列を決定した。

耐性変異の有無はインターネット経由で遺伝子データベース (Genbank:アメリカ国立医学図書館、バイオテクノロジー情報センター) を検索して確認した。

2.6 菌株精査

全DNAを用いたマイクロプレートハイブリダイゼーション法 (DDHマイコバクテリア:極東製薬) を用いて結核菌を含む主要な病原性抗酸菌18種類の特定を行った。

2.7 RFLP分析

結核菌コロニーからの全DNAの抽出には植物組織用DNA抽出試薬 (ISOPLANT:日本ジーン) を用いた。Solution Iに固形培地または液体培地から回収した菌塊を加えてディスポベッセルでホモジナイズし、37℃で3時間・一晚静置した。その後Solution IIを加えて混合し、52℃で40分間加熱処理後、スピンドウンしてSolution IIIを加えて15分間水上に置き、13,000rpmで遠心した。上清に2倍量のエタノールを加えて10,000rpmで10分間遠心しDNAを沈殿した。沈殿を70%エタノールで洗浄し、風乾後TEバッファーに溶解して定量した。そしてDNA700ng・2μgを含む溶液を制限酵素 Pvu II で一晚処理することにより完全に消化した。次に0.8%高強度アガロースゲルで分離し、ナイロンメンブレン (Hybond-N+:アマシャム・ファルマシア) に転写、UVクロスリンカー (GS GENE LINKER: BIO-RAD) で紫外線固定した。メンブレン上の遺伝子検出には非RI方式の検出キット (スマイライト:住友金属) を用い、プローブには結核菌群特異的挿入配列IS6110を利用した。X線フィルム上に現れたバンドパターンはCCDカメラで取り込み画像処理ソフトで泳動度を補正後、遺伝子解析ソフトを用いてバンドサイズの計測、パターン化、データベースへの蓄積、系統樹の構築を行った。全ての操作は基本的に助結核予防会結核研究所の方法に従って行った²⁾。

3. 結果及び考察

3.1 PCR法による結核菌の迅速同定とDDHによる菌株精査

平成10年10月から11年3月末までに菌株10件、喀痰24件、胸水1件の計35件の依頼があった (表1)。初めにアンプリコアで結核菌群、アビウム菌およびイントラセ

ラー菌のDNA検出を行った。アンプリコアによる検査結果の一例を図1に示した。

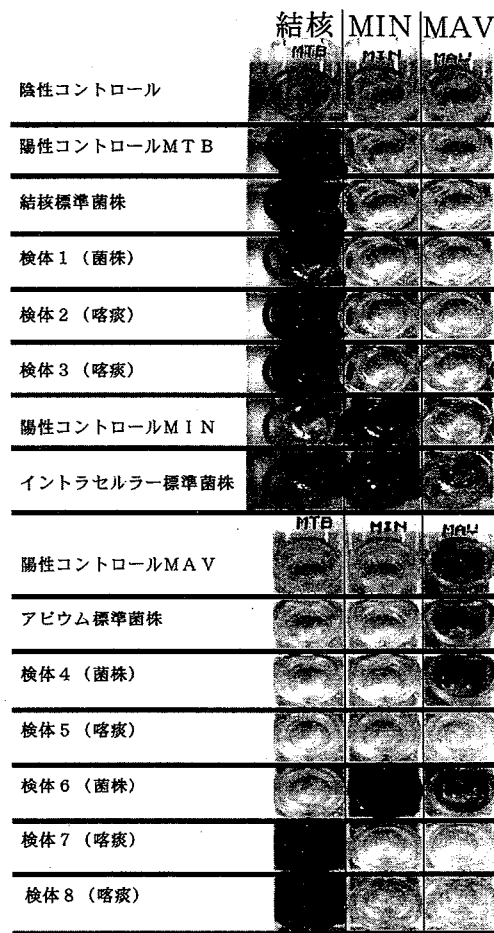


図1 アンプリコアの結果 (一部)

表1 遺伝子解析検査の結果

	件数	アンプリコア			DDH
		結核菌群	アビウム菌	イントラセラー菌	結核菌群
喀痰	24	15/24	1/24	1/24	0/0
菌株	10	7/10	2/10	0/10	3/3
胸水	1	0/1	0/1	0/1	0/0
計	35	22/35	3/35	1/35	3/3

(延べ件数)

その結果、結核菌群陽性が22件、アビウム陽性が3件、イントラセラー陽性が1件、全て陰性が10件であった (アビウムとイントラセラーの重感染1件、アンプリコア陰性でDDHによる菌株精査で結核菌群と同定された1件を含む)。今回の我々の成績から、アンプリコアが結核菌群の同定だけでなく、アビウム菌、イントラセラー菌という主要な2種の非結核性抗酸菌の同定にも極めて有効であることが明らかになった。アンプリコアなどの遺伝子増幅法を利用した結核菌検出キットは従来

1ヶ月程度必要だった結核菌の同定を短時間で可能にした優れた方法であり、今後利用が拡大するものと思われる。しかし、①検体の前処理にNALC-NaOH法を用いるため、安全キャビネットとバイオセーフティーローターを備えた検査設備が必要である ②検査手順が極めて煩雑である ③非常に感度が高いため微量の試料混入で偽陽性となる ④検体中に含まれる血液、培地成分など微量の阻害物質の影響で偽陽性となる ⑤試薬の使用期限が短く高価であるなど問題点も多い。そのため、固形培地による培養などの従来の検査法と併用して活用すべきであるとされている。

次に、医療機関が喀痰からアンプリコアによる検査を実施し、結核菌群陰性と判定された3件の菌株についてDDHマイコバクテリアで精査を行った結果、3件とも結核菌群陽性と判定した。このうち2件は菌株からDNAを抽出して再度アンプリコアで検査したところ、結核菌群陽性と判定された。残る一件はアンプリコアによる検査と、RNA合成酵素遺伝子を標的としたPCRでも結核菌群陰性であった。このように菌株、喀痰中の、おそらく微量阻害物質の影響でアンプリコア陰性となった事例があったことから、検体前処理方法などの改良が必要であることが明らかになった。

3.2 培養検査

固形培地（1%小川培地、2%小川培地、ピット培地）および液体培地（BBL MGIT、Becton Dickinson）による培養を行った。その結果アンプリコアで結核菌群陽性と判定された喀痰15件のうち、14件が培養陽性となった。培養陽性となるまでの期間は液体培地が最短で5日、小川培地が12日と液体培地の方が検出までの期間が短く有効であったが、液体培地では雑菌汚染がやや多く認められた。また液体培地で増殖した菌はDDHなどの遺伝子検査で正しい結果が出ないことが報告されており、今後とも固形培地による培養を併用することが必要である。

3.3 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は液体培地によるMGIT感受性システムで、主要な抗結核薬であるリファンピシン、イソニアジド、ストレプトマイシン、エタンブトールについて検査を行った。その結果、液体培地で増菌が確認された検体11件は全て4剤に対して感受性が認められた。MGIT感受性システムは液体培地を用いるために従来法と比較し迅速に結果が得られるが、国内ではまだ利用している機関が少ない「単一濃度法」による発育阻害試験であるため、従来法と一部異なる成績であった。そこで現在液体培地を用いた方法でなおかつ発育阻止濃度を算定可能な方法の導入を検討している。

さらに遺伝子配列の解析からRIF耐性菌の検出を試み、菌株からの検出には成功したが、喀痰からの直接検査では安定した結果が得られなかったため現在方法の改良を行っている。ピリジナミド（PZA）耐性の遺伝子配列からの検出についても検討中である。

3.4 RFLP法による類縁分析

RFLP（制限酵素断片長多型、DNA指紋）法はDNA内に存在する制限酵素認識配列と挿入配列の位置および個数によって菌株を識別する方法で、結核菌の分析に世界中で広く用いられている³⁾。この方法により集団感染が疑われる事例について同一菌による感染事例かどうかを最終的に確定することができる（集団感染はRFLP解析によって初めて判明する）。今回、結核菌と同定され、かつ必要な菌量が確保できた検体19件について、全DNAを抽出してRFLP法により菌株の亜系分析を行い、菌株間の関連を解析した。その結果、18件について分析可能なパターンが得られた。結果の一部を図に示した（図2、図3）。

27と32のパターンが一致している

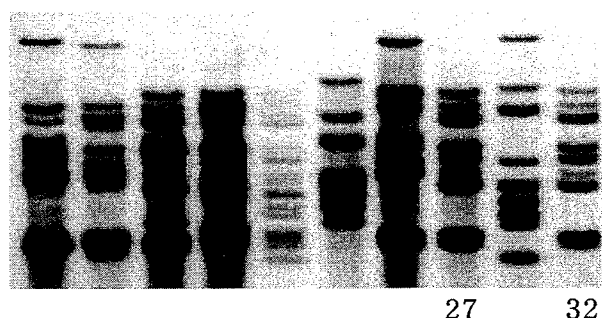


図2 実際のRFLPパターン

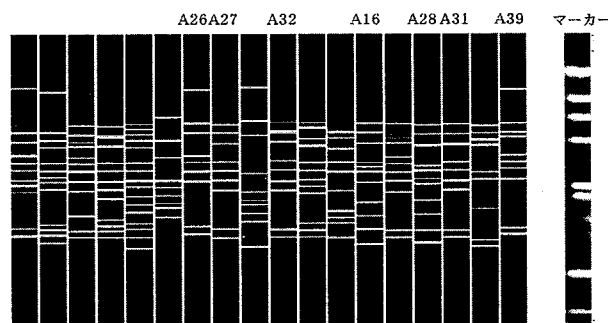


図3 RFLPパターン（模式図）

このパターンを解析した結果、患者間で完全に一致する菌株が2例発見され（A27とA32、A16とA28）、この2例がそれぞれ同じ菌による感染であることが明らかになった。また一部異なるが非常に類似したパターンも2例認められた（A27/A32とA31、A26とA39）。検査した全検体の類縁関係を系統樹で示した（図4）。

A27とA32は患者間に接触があったことが事前に判明していたが³⁾、A16とA28は今回のRFLP解析で初めて同一菌株による感染であることが明らかとなった事例である。結核集団感染は、「同一の感染源が2家族以上にまたがり、20人以上に結核を感染させた場合を言う。ただし、発病者1人は6人が感染したものとして患者数を計

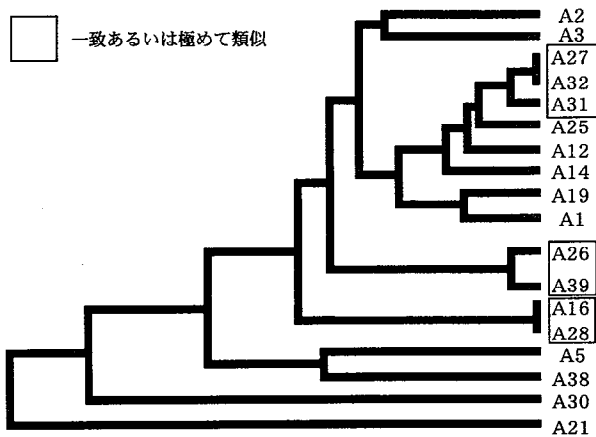


図4 結核菌株の類縁関係を示す系統樹

算する」と規定されているが⁵⁾、今回の検査ではこの定義に合致する集団感染例は見出されなかった。今回この検査方法を導入したことにより集団感染や院内感染事例が発生した場合に、同一菌による感染か、異なる菌による感染が偶然同時多発的に発生したのかを迅速かつ明確に区別できるようになった。今後さらにパターンデータを蓄積して行くことで、新たに発生した結核と過去の事例との関係を知ることが可能になり、感染ルートの特定と感染拡大防止対策に大いに役立つものと考えている。

4. まとめ

1. PCR法など遺伝子解析技術を用いた検査方法を導入することで培養を待たずに菌種が特定できるようになった。
2. 液体培地、遺伝子配列を利用した薬剤感受性試験法の有効性、と改良すべき点が明らかになった。
3. RFLP解析の導入によって結核菌の亜系分析が可能になり、集団感染、院内感染の解析に有力であることが判明した。同一菌株による感染事例を新たに1例発見した。

5. 謝 辞

検体を提供していただいた関係医療機関の先生方、各保健所職員、RFLPに関する技術指導とプローブを分与していただきました(財)結核予防会結核研究所の阿部千代治先生、高橋光良先生、遺伝子解析に関するアドバイスをいただきました名古屋大学理学部生命理学教室の村上安則博士、東北大学理学部生物学教室の湯浅創博士、近畿大学医学部免疫学教室の阿部弘之博士、東北大学医学部免疫学教室の菅村和夫教授に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 石川信克：統計から見た日本の結核 (1999)
<http://www.jata.or.jp/rit/rj/JGEN.HTM>
- 2) 高橋光良ほか：ISタイピング法：IS6110をプローブとしたRFLP分析による結核菌の亜分類。日細誌．49 (5・6)：853-857. (1994)
- 3) 高橋 光良：結核菌挿入断片IS6110をプローブとした結核の分子疫学、資料と展望、17：43・53. (1996)
- 4) 吉田菊喜ほか：接触者検診で発見された結核患者4例について (投稿中)
- 5) 厚生省保健医療局結核・感染症対策室：結核定期外健康診断ガイドラインとその解説
結核予防会 (1993)

農産物中残留農薬の多成分一斉分析法の検討

A Study on Simultaneous Determination of Pesticide Residue in Agricultural Products

菊地 秀夫 佐藤 勤*¹ 山口 剛史*²
伊藤 孝一*³

Hideo KIKUCHI, Tsutomu SATOU, Tsuyoshi YAMAGUCHI
Kouichi ITOU

キーワード: 残留農薬、一斉分析法、カラムクロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー

Key Words : Pesticide Residue, Simultaneous Determination,
Column Chromatography, Gas Chromatography

当部で行っているガスクロマトグラフを用いた残留農薬の分析法について、新たに食品衛生法で追加された農薬に対応することも考慮に入れ、より簡便で効率的な分析手法の検討を行った。アセトニトリルによる抽出後、これまでのゲル浸透クロマトグラフィーをイオン交換系の二層カラムに置き換えることにより、およそ80種の農薬の分析が可能となった。

1. はじめに

食品中の残留農薬は、農作物ごとに基準値が食品衛生法で定められている。平成4年まで基準設定農薬数は26であったものが、年々追加され、平成10年10月12日の告示の段階で179種の農薬に基準が設定されている。今後もその数は増え続け、西暦2000年までにその数は約200になるものと見込まれている。食品衛生法上に定められている農薬の分析法は統合化されつつあるとはいえ、多くの農薬を分析するには多くの時間と労力を要し、個別に分析するのは不可能といつてよい。

これまで当部において、本研究を含め、ガスクロマトグラフ(以下「GC」という。)を用いて測定できる農薬を対象とした一斉分析法^{1,2)}、及び高速液体クロマトグラフ(以下「LC」という。)によるN-メチルカーバメート系農薬の一斉分析法³⁾を開発してきた。これらの分析法は、同一分析法で同時に多成分の農薬を対象にできるという分析効率性のすぐれたものである。とくに、GCを用いる分析法では、ミニカラムを用いた精製を取り入れることにより分析操作の効率性を向上させ、有機溶媒の使用量を減少させるなどの長所を持っている。

今年度は、本研究課題のまとめとして、以下の点について検討を加え、前回までに開発した残留農薬の一斉分析法²⁾に変更を加えた。標準農薬による添加回収率が良くなかった一部の試料について回収率をあげること、水

分・糖分の多い試料からの抽出操作を向上させること、装置の制約上並行処理が難しく分析に長時間を要するゲル浸透クロマトグラフィー(以下「GPC」という。)にかわる精製法を採用すること、また、平成10年10月に告示された農薬にも対応することなどである。なお、GC測定にいたるまでの分析法も、当部で現在検討しているポストカラムを用いたLCによるN-メチルカーバメート系農薬分析法と分析操作の整合性をはかることも考慮に入れた。

2. 試薬及び装置

2.1 試薬

試薬・有機溶媒、残留農薬試験用または同等品
精製用ミニカラム

Sep-Pak Plus Florisil (910mg、Waters製)

Bond Elut SAX/PSA (6 ml/lg、Varian製)

農薬標準

農薬はいずれも標準品として入手できるものを用いた。

これまで検討してきた農薬と、今年度追加して検討した農薬を表1に示す。今年度追加した農薬は、告示で新たに追加された農薬と公定法ではLC法であるがGC法でも測定可能なものである。

2.2 装置

ミキサー: 松下電器製、MX-V100、MX-740G

振とう器: ヤヨイ製、8-1-W、8-20-W他

遠心分離器: KUBOTA製、KN-45他

*1 現 仙南保健所 *2 現 登米保健所

*3 現 (財)環境事業公社

ロータリーエバポレーター：東京理化機械製
遠心式濃縮器：Yamato製、RD-41
ガスクロマトグラフ（GC）：

Hewlett Packard社製 5890 Series II
Hewlett Packard社製 6890

2.3 農薬標準液

今年度新たに検討を加えた農薬については、農薬標準品をアセトンまたはn-ヘキサンに溶解し、窒素系列（以下「N系列」という。）、リン系列（以下「P系列」という。）及び塩素系列（以下「Cl系列」という。）の各農薬はそれぞれ100ppm溶液を、ピレスロイド系列（以下「Py系」という。）の各農薬はそれぞれ200ppm溶液を調製し標準原液とした。これら標準原液とこれまでに調製した標準原液をもとに、各系列ごとに、それぞれの農薬について食品衛生法で規定されている検出限界値の200倍濃度となるように混合標準液をアセトン溶液にかえ調製した。さらにこの標準液を以下のようにアセトンに希釈してガスクロマトグラフ測定及び添加回収用の標準液とした。

ガスクロマトグラフ測定用：
高濃度（Max.） 検出限界値×50
低濃度（Min.） 検出限界値×5
添加回収測定用：
検出限界値×200（添加量 1ml）

3. 実 験

3.1 カラム及びGCの測定条件

標準農薬を用い、各農薬のピークが分離され、かつ、Min. 濃度が定量可能でありMax. 濃度との2点検量線法で試料の農薬濃度を計算できるカラムとGCの条件を求めた。また、これまでGC/ECDを測定器とするCl系とPy系農薬の測定は個別になっていたが、同時測定が可能である条件についてもあわせて検討した。

3.2 農薬の一斉分析法

前回到報告した分析法²⁾を基本としたが、今年度は以

下の点について変更、検討を加えた。酢酸エチル抽出である前回の分析法で実試料を分析した際、ブロッコリーといちごで添加回収率が悪かったため、広く用いられており当理化学部でも以前に採用していたアセトニトリル抽出¹⁾に変更可能かどうか検討した。また、精製過程で採用しているGPCでは多試料の同時並行処理が難しいため、現在当部で行っているLCによるN-メチルカーバメート系農薬分析で用いているイオン交換系の二層カラムによる精製に変更できるかどうか検討した。

変更した分析法で農薬の一斉分析が可能かどうか、標準農薬を用いて各分析操作ごとの回収試験を行い、実際の農産物試料を用い添加回収試験を行った。

4. 結果及び考察

4.1 カラム及びGCの測定条件

表2に各系列ごとのカラムとGCの測定条件を示す。GCの検出器には、N系列農薬にNPDを、P系列農薬にFPDを、Cl系列とPy系列農薬にECDを用いた。対象農薬数を考慮すれば、完全とはいえないものの、これらの条件で各系列のピーク分離性はほぼ満足できるものであった。N系列の測定には、HP5890 IIと比較して検出器（NPD）の安定性と再現性に勝るHP6890を採用した。P系列の農薬については、カラムをUltra-2からDB-1701¹⁾に変えることにより、ピークの分離性が増した。Cl系列とPy系列農薬については、一回当たりの測定時間は長くなったが、この条件で同時測定が可能となった。しかし、これらの条件では、アセタミプリド（N系列農薬）、メタミドホス（P系列農薬）及びジコホール（Cl系列農薬）はピークが広がり定量性は確保できなかったため、今後の検討農薬から除外した。

これらの条件における各農薬の保持時間と相対保持時間の値を表3から表5に示す。相対保持時間は次の計算式で求めた。

$$\text{相対保持時間} = (\text{農薬の保持時間} - \text{不感時間}) / (\text{基準農薬の保持時間} - \text{不感時間})$$

表1 分析検討農薬

農薬(系列名)	これまでに検討してきた農薬	追加検討農薬
有機リン系	EPN、アセフェート、エトプロホス、エトリムホス、カズサホス、キナルホス、クロルピリホス、クロルフェンピホス、ジクロロホス、ジメトエート、ダイアジノン、チオメトン、トルクロホスメチル、パラチオン、パラチオンメチル、ピラクロホス、ピリミホスメチル、フェニトロチオン、フェントエート、ブタミホス、プロチオホス、ホスチアゼート、マラチオン、メタミドホス	イソフェンホス
有機窒素系	アミトラズ、キノメチオネート、クロルプロファミン、ジエトフェンカルブ、ジフェノコナゾール、チオベンカルブ、テブフェンピラド、トリアジメノール、バクプロトラゾール、ピテルタノール、ピリダベン、フルシラゾール、フルトラニル、ペンディメタリン、ミクロブタニル、メトリブジン、メブロニル、レナシル	EPTC、アセタミプリド、アラクロール、カルバリル、シプロコナゾール、テブコナゾール、ピリプロキシフェン、フェナリモル、フルジオキソニル、メトラクロール
有機塩素系	BHC (α, β, γ, δ)、pp'-DDD、pp'-DDE、op'-DDT、pp'-DDT、アルドリリン、エンドリン、キャプタン、ジクロルフルアニド、デイルドリン、ピリフェノックス (Z体、E体)	カプタホール、クロルフェナピル、クロルベンジレート、ジコホール、トリフルラリン
ピレスロイド系	シハロトリン、シフルトリン、シベルメトリン、テフルトリン、デルタメトリン、トラロメトリン、ビレトリン、フェンバレレート、フルシトリネート、フルバリネート、ベルメトリン	アクリナトリン、クロルフルアズロン、ピフェントリン

不感時間は表2の値を使用した。Cl系列とPy系列農薬の相対保持時間は、定圧モードであるが、オープン初期温度時の流速を用い算出し参考値として記載した。

一部の農薬で他の農薬とピークが重なるもの、低濃度でピークが他の農薬のピークに吸収されるものがあるが、マススペクトロメータを用いたGC(以下「GC/MS」という。)で当該農薬の確認を行うことにより、これらの条件で農薬の一斉分析法は可能になるものと考えられる。

4.2 農薬の一斉分析

4.2.1 抽出時及び塩析剤の違いによる添加回収

標準農薬を用い、アセトニトリルから酢酸エチルに転溶する時の塩析材として、2%硫酸ナトリウム水と飽和食塩水を用いたときの添加回収を調べた。一般に飽和食

塩水を用いると回収率が高かったため、塩析材として飽和食塩水を採用することにした。

4.2.2 SAX/PSAにおける溶出

N系農薬標準を用い、アセトン/n-ヘキサン溶液での溶出状況を調べた。

アセトン濃度を15%、20%、30%及び50%に変え10mlで溶出した時、大部分が20%までの濃度で溶出したが、30%濃度ではほぼ全量が溶出した。次に30%アセトン濃度で溶出に必要な量を調べたところ、10mlではほぼ全量が溶出した。しかし、この溶出条件でキノメチオネートは少量しか溶出されなかった。

30%アセトン/n-ヘキサン溶液10mlで溶出することとし、他の系列農薬にも同じ条件で溶出することとした。

表2 ガスクロマトグラフの測定条件

	有機窒素系農薬	有機リン系農薬	有機塩素、ピレスロイド系農薬
カラム	Ultra-1 (HP19091A-102) 0.2mm φ × 25m, 0.33 μ m	DB-1701 0.32mm φ × 30m, 0.25 μ m	DB-5 0.25mm φ × 30m, 0.25 μ m
昇温条件	60℃ (1 min) - 30℃ / min - 160℃ - 4℃ / min - 280℃ (5 min)	80℃ (2 min) - (20℃ / min) - 180℃ - 4℃ / min - 230℃ - 20℃ / min - 270℃ (10min)	80℃ (2min) - (30℃ / min) - 200℃ (2min) - (2℃ / min) - 230℃ - (5℃ / min) - 270℃ (15min)
GC装置	HP 6890	HP 5890 II	HP 5890 II
検出器	NPD	FPD	ECD
注入口温度	250℃	250℃	200℃
検出器温度	290℃	280℃	300℃
モード	定流量	定流量	定圧力
圧力	15psi (60℃)	9psi (80℃)	15psi
キャリア流速	0.62ml/min. (24cm/s)	1.59ml/min. (29.5cm/s)	1.15ml/min. (19.4cm/s) at 80℃
不感時間	1.74min.	1.70min.	1.70min.
min.濃度 (5 * DL)	INITIAL AREA REJECT 0.5 INITIAL THRESHOLD -0.5 INITIAL PEAK WIDTH 0.05	ATT=THRSH=3 AR REJ =1,000 PK WD =0.04	ATT=THRSH=4 AR REJ =5,000 PK WD =0.04
積分条件	INITIAL SHOULDERS ON 注入量 2 μ l (スプリットレス)	注入量 2 μ l (スプリットレス)	注入量 2 μ l (スプリットレス)

(注) 不感時間(min.) = カラム長(cm) / カラム流速(線速度: cm/s) / 60(s/min.)

表3 窒素系農薬の保持時間と相対保持時間

農薬名	保持時間 min.	相対保持 時間	DL濃度 μ g/ml	備考
EPTC	7.57	0.25	0.01	
クロロプロファミ	11.69	0.43	0.001	
メトリブジン	15.63	0.60	0.01	
カルバリル(NAC)	16.24	0.63	0.01	
アラクロール	16.70	0.65	0.005	
チオベンカルブ	17.83	0.70	0.05	
ジエトフェンカルブ	18.01	0.70	0.01	
メトラクロール	18.27	0.72	0.005	
ベンディメタリン	19.65	0.78	0.01	
トリアジメノール	20.25	0.80	0.01	
キノメチオネート	20.54	0.81	0.01	
バクロプロトゾール	20.99	0.83	0.005	
フルジオキソニル	21.47	0.85	0.005	フルトラニルに吸収
フルトラニル	21.71	0.86	0.025	
ミクロプタニル	22.17	0.88	0.02	
フルシラゾール	22.59	0.90	0.01	
シプロコナゾール	23.06	0.92	0.005	
メプロニル	24.45	0.98	0.01	
レナシル	24.83	1.00	0.05	
テブコナゾール	26.17	1.06	0.005	
テブフェンピラド	28.51	1.16	0.01	
ピリプロキシフェン	29.53	1.20	0.01	
アミトラズ	30.24	1.23	0.01	フェナリモルと重なる
フェナリモル	30.37	1.24	0.02	
ビテルタノール	31.81	1.30	0.01	
ビテルタノール	32.06	1.31	0.01	
ピリダベン	32.23	1.32	0.01	
ジフェノコナゾール	37.34	1.54	0.01	
ジフェノコナゾール	37.57	1.55	0.01	

(注) DL濃度は食品衛生法の値を参考とした

表4 リン系農薬の保持時間と相対保持時間

農薬名	保持時間 min.	相対保持 時間	DL濃度 μ g/ml	備考
ジクロロボス(DDVP)	7.30	0.39	0.01	
エトプロホス	10.76	0.63	0.005	
カズサホス	11.14	0.66	0.01	
チオメトン	12.01	0.72	0.01	
ダイアジノン	12.51	0.76	0.01	
エトリムホス	13.14	0.80	0.01	
ジメトエート	14.40	0.89	0.02	
トルクロホスメチル	14.87	0.92	0.02	
ピリミホスメチル	15.23	0.95	0.01	
クロルピリホス	15.83	0.99	0.01	
パラチオンメチル	15.97	1.00	0.01	
フェンチオン	16.44	1.03	0.01	
マラチオン	16.57	1.04	0.01	
フェントロチオン(MEP)	16.72	1.05	0.01	
パラチオン	17.41	1.10	0.01	
クロルフェンビンホスA	17.59	1.11	0.02	
キナルホス	18.03	1.14	0.01	イソフェンホスと一致
イソフェンホス	18.03	1.14	0.002	
クロルフェンビンホスB	18.21	1.16	0.02	フェントエートと重なる
フェントエート(PAP)	18.27	1.16	0.01	
ホスチアゼート	18.76	1.20	0.02	
ホスチアゼート	18.90	1.21	0.02	プロチオホスと一致
プロチオホス	18.90	1.21	0.01	
ブタミホス	20.20	1.30	0.01	
フェンスルホチオン	22.19	1.44	0.02	
EPN	23.72	1.54	0.02	
ビラクロホス	25.97	1.70	0.05	

(注) DL濃度は食品衛生法の値を参考とした

4.2.3 一斉分析フロー及び分析操作各段階における添加回収

前述したアセトニトリル抽出及びSAX/PSAカラムの精製の検討結果から決定した一斉分析法を図1に示す。本分析法をもとに、アセトニトリル抽出・酢酸エチル転溶、SAX/PSAカラム精製及びフロリジルカラム精製段階における標準農薬を用いた回収試験を実施した。結果を表6から表8に示す。

抽出・転溶の段階で回収率が低かった農薬は、確認できなかったものも含め、N系列でEPTC、アミトラス、ジエトフェンカルブ、P系列ではイソフェンホス、ジメトエート、チオメトン、ピリミホスメチル、フェンチオンであった。CIとPy系列農薬では良好な回収率が得られた。

SAX/PSAカラム精製(N, CI及びPy系列農薬が対象)の段階で回収率が低かった農薬は、確認できなかったものも含め、N系列のみでアセタミプリド、キノメチ

オネート及びジエトフェンカルブであった。CIとPy系列農薬では良好な回収率が得られた。

フロリジルカラム精製(CI及びPy系列農薬が対象)の段階では、カプタホールを除いて全ての農薬で良好な回収率が得られた。

全体として、回収率を確認できなかったものや回収率が70%を下回るものがあるが、大部分の農薬で回収率は良好であった。回収試験数は1もしくは3と少なく回収率の値に含まれる変動は大きいと考えるべきであるが、この分析法が農薬分析に有効なものであるといえる。

4.2.4 農産物での添加回収

次に、本分析法が実際の農産物に適用できるかどうか、実試料に混合農薬標準溶液を添加して回収試験を行った。白菜、ブロッコリー、日本梨、馬鈴薯、大根、いちご、トマト、きゅうりの各農作物に対し、食品衛生法に定める採取部位を取り、ミキサーにて粉碎した試料を用い、農作物20.0gあたり各系列の混合標準農薬1.0mlを添加して図1の分析法に従って求めた。結果を表6から表8に示す。回収率値には妨害があった場合その成分も含まれている。

表5 塩素及びピレスロイド系列農薬の保持時間と相対保持時間

農薬名	系列	保持時間 min.	(参)相対 保持時間	DL濃度 μg/ml	備考
トリフルラリン	CI	8.57	0.45	0.01	
α-BHC	CI	9.10	0.48	0.005	
β-BHC	CI	9.67	0.52	0.005	
γ-BHC	CI	9.79	0.53	0.005	
テフルトリン	Py	10.13	0.30	0.01	
δ-BHC	CI	10.35	0.56	0.005	
ジクロフルアニド	CI	12.49	0.70	0.001	
アルドリン	CI	12.97	0.73	0.005	
ピリフェノックスZ	CI	14.36	0.82	0.01	
キャプタン	CI	14.61	0.84	0.025	
ピリフェノックスE	CI	15.54	0.90	0.01	
pp'-DDE	CI	17.07	1.00	0.005	ディルドリンと重なる
ディルドリン	CI	17.19	1.01	0.005	
エンドリン	CI	18.31	1.08	0.005	
クロルフェナピル	CI	18.45	1.09	0.01	
クロルベンジレート	CI	18.80	1.11	0.02	
pp'-DDD	CI	19.34	1.15	0.005	
pp'-DDT	CI	19.50	1.16	0.005	
ピレトリン-1	Py	19.95	0.64	0.2	
ピレトリン-1	Py	20.61	0.67	0.2	
pp'-DDT	CI	21.55	1.29	0.005	
カプタホール	CI	22.77	1.37	0.01	
ピフェントリン	Py	25.11	0.82	0.01	
シハロトリン	Py	27.65	0.91	0.02	
シハロトリン	Py	28.22	0.93	0.02	
アクリナトリン	Py	28.90	0.96	0.01	
ピレトリン-2	Py	29.01	0.96	0.2	アクリナトリンと重なる
ベルメトリン	Py	30.12	1.00	0.02	
ベルメトリン	Py	30.48	1.01	0.02	
シフルトリン	Py	31.77	1.06	0.05	
シフルトリン	Py	32.04	1.07	0.05	
シフルトリン	Py	32.25	1.07	0.05	
シフルトリン	Py	32.38	1.08	0.05	
シベルメトリン	Py	32.63	1.09	0.01	
シベルメトリン	Py	32.95	1.10	0.01	
シベルメトリン	Py	33.16	1.11	0.01	
シベルメトリン	Py	33.30	1.11	0.01	
フルシトリネート	Py	33.30	1.11	0.005	フルシトリネートと一致
フルシトリネート	Py	33.95	1.13	0.005	
フェンバレーレート	Py	35.63	1.19	0.005	
フェンバレーレート	Py	36.49	1.22	0.005	フルバリネートと一致
フルバリネート	Py	36.49	1.22	0.01	
フルバリネート	Py	36.77	1.23	0.01	
デルタメトリン	Py	38.68	1.30	0.01	トラロメトリンの分解物

(注) DL濃度は食品衛生法の値を参考とした

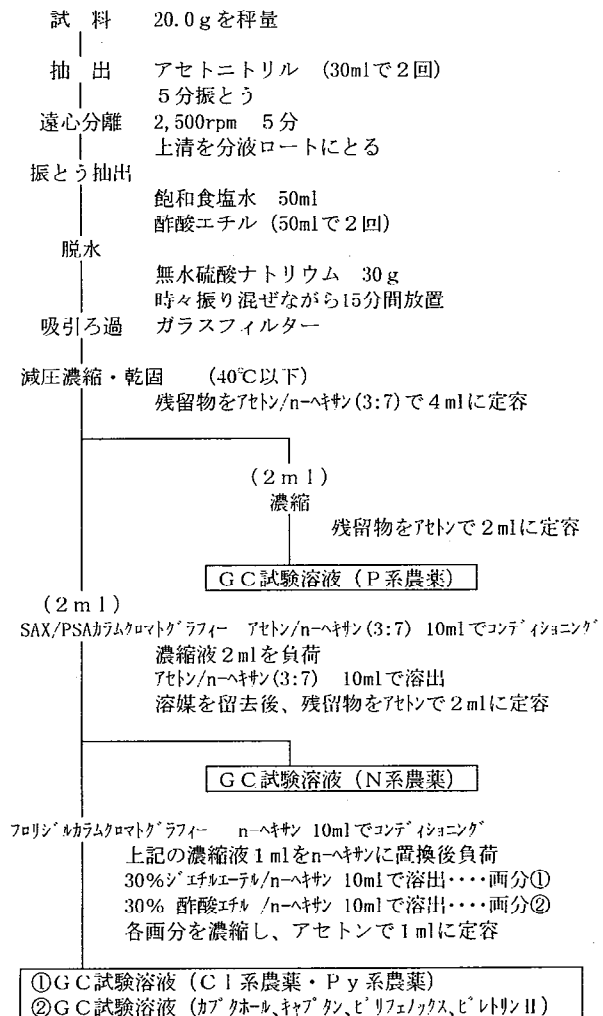


図1 農薬一斉分析のフロー

1 試料あたりの分析数は1と少なくこの結果のみで判断するのは難しいが、全般的に満足すべき回収率が得られた。本分析法は一斉分析としての目的を果たすものと判断される。農産物の種類ごとに差はあるが、回収率が低いかまたは異常に高い農薬として、確認できなかったものを除いて、N系列農薬ではアミトラズ、キノメチオネート、ジエトフェンカルブ、フルジオキシニルが、P系列農薬ではフェントエートが、CI系列農薬ではカプタホールがあげられる。農産物に起因する妨害ピークはN系列農薬に比較的多くあらわれ、白菜、ブロッリー、大根、特に大根で多かった。(3)で得られた分析操作各段階における添加回収結果とあわせると、アミトラズ、キノメチオネート、ジエトフェンカルブ、フルジオキシニル(以上N系列)、フェントエート(P系列)カプタホール(CI系列)の農薬は本分析法への適用は難しいものと考えられる。

5. まとめ

今回開発したGCによる一斉分析法は、農産物の種類によっては回収率が低くなるものもあるが、分析検討対象とした90農薬のうちおよそ80種が分析可能であった。前回の分析法と比較して、GPCによる精製をイオン交換系の二層カラムに変えた点で分析操作の効率性で省力化を図ることが可能となり、測定するまでの分析操作につい

てもLCによるN-メチルカーバメート系農薬分析法と整合性を図ることが可能となる利点をもつものである。一斉分析法として、同時に多成分の農薬を分析するという目的を十分満足するものと考えられる。しかし、N系列農薬では一部の農産物の妨害成分に対する精製が十分とはいえないので、異なる精製方法などについて、さらに検討する必要があるものと考えている。

食品残留農薬の一斉分析法の検討という研究課題について、GCを用いた分析法を開発し、実際の農産物に十分適用可能であることが確認できた。しかし、対象農薬の増加とともに、妨害成分の精製を含め分析法改良の必要性も従来にもまして増えてきている。

今後とも、精製条件の検討のみならず、更新予定であるGC/MSを積極的に使用する分析法を採用することにより、一回の分析で対象になる農薬数を増加させ、簡略化を含めた精製過程などの分析上の効率化について引き続き検討を続けていく必要がある。

(引用文献)

- 1) 新目眞弓ほか：保健環境センター年報 14、55(1996)
- 2) 山口剛史ほか：保健環境センター年報 16、53(1998)
- 3) 加藤玲子ほか：保健環境センター年報 15、53(1997)
- 4) 尾花裕孝ほか：食品衛生学会誌 39(3)、172(1998)

表6 窒素系列農薬の回収率

農薬名	分析操作ごとの回収率：%			農産物に標準を添加したときの回収率：%							
	抽出・転溶 塩析・NaCl	SAX/PSA 精製	フロリジル 精製	白 菜	ブロッコ リ	日 本 梨	馬 鈴 薯	大 根	いちご	ト マ ト	きゅうり
EPTC	39	65		74	70	72	50	89	67	73	92
アセタミプリド	91	19		85	124	64	71	231		77	147
アミトラズ	47	125		23	14	0	30	50	7	0	48
アラクロール	84	142		109	103	94	89	0	106	106	121
カルバリル	100	158		136	142	106	100	839	95	111	162
キノメチオネート	82	33		11	0	0	0	4	0	4	5
クロロプロファム	87	141		156	110	111	99	172	110	111	127
ジエトフェンカルブ						199	189	0	168	154	173
ジフェノコナゾール	101	143		137	135	118	106	156	59	110	152
シプロコナゾール	97	144		129	128	109	84	363	81	114	154
チオベンカルブ	80	138		116	102	96	87	126	103	105	121
テブコナゾール	92	137		133	127	120	98	173	76	111	149
テブフェンピラド	84	124		122	107	96	86	128	94	113	143
トリアジメノール	93	156		126	123	107	93	155	88	113	138
バクロプロトラゾール	92	142		125	117	107	91	140	85	113	139
ビテルタノール	106	149		141	149	102	91	159	76	115	156
ピリダベン	78	116		158	150	103	95	132	85	111	138
ビリプロキシフェン	83	127		117	119	95	88	143	85	109	140
フェナリモル	86	131		128	121	100	92	147	62	105	141
フルジオキシニル	83	151				0	0	53			22
フルシラゾール	85	130		118	114	100	89	131	74	103	131
フルトラニル	82	131		118	110	99	85	128	102	117	145
ペンディメタリン	84	133		113	90	93	80	121	99	106	116
ミクロブタニル	88	139		130	119	105	91	150	84	120	152
ミトラクロール	86	129		137	178	95	88	110	145	120	130
メトリブジン	84	132		156	123	78	106	96	79	73	97
メブロニル	75	125		122	118	104	93	137	96	111	132
レナシル	74	135		136	138	117	95	177	80	115	143

(注) 空欄：未確認または確認できず。

表7 リン系農薬の回収率

農薬名	分析操作ごとの回収率：%			農産物に標準を添加したときの回収率：%							
	抽出・転溶 塩析・NaCl	SAX/PSA 精製	フロリジル 精製	白 菜	ブロッコ リ	日本梨	馬鈴薯	大 根	いちご	トマト	きゅうり
イソフェンホス				95	78	95	102	78	105	96	124
エトプロホス	99			90	71	115	120	86	131	114	122
エトリムホス	102			93	80	108	110	80	104	100	110
カズサホス	103			28	54	104	107	161	104	94	112
キナルホス	64			95	78	95	102	78	105	96	124
クロルピリホス	102			83	58	104	110	82	111	97	118
クロルフェンビンホス	124			162	94	107	52	77	108	98	122
ジクロロボス	73			73	46	102	104	74	79	94	104
ジメトエート	28			91	72	156	171	40	189	219	289
ダイアジノン	98			83	125	100	106	83	84	89	110
チオメトン	0			72	24	0	56	114	24	0	63
トルクロホスメチル	99			92	80	110	113	80	114	102	120
パラチオン	115			80	55	103	101	79	118	107	126
パラチオンメチル	97			100	90	125	123	58	141	129	161
ピラクロホス	78			93	58	136	121	24	140	142	187
ピリミホスメチル	0			86	73	95	103		77	90	108
フェニトロチオン	102			101	73	133	116	58	131	121	142
フェンスルホチオン	105			103	73	112	131	67	128	129	207
フェンチオン	51			91	61	64	94	77	94	56	105
フェントエート	146			158	92	0	235	152	0	0	0
ブタミホス	77			75	62	86	105	88	104	89	116
プロチオホス	97			32	37	140	144	91	122	117	160
ホスチアゼート	91			32	18	139	137	79	116	119	299
マラチオン	99			101	68	109	114	64	114	102	114
メタミドホス	85			68	65	454	452	0	232	609	930

(注) 空欄：未確認または確認できず

表8 塩素系列及びピレスロイド系列農薬の回収率

農薬名	系 列	分析操作ごとの回収率：%			農産物に標準を添加したときの回収率：%							
		抽出・転溶 塩析・NaCl	SAX/PSA 精製	フロリジル 精製	白 菜	ブロッコ リ	日本梨	馬鈴薯	大 根	いちご	トマト	きゅうり
op'-DDT	Cl	102	109	75	128	78	107	84	53	95	111	105
pp'-DDD	Cl	110	121	90	79	101	108	105	111	90	102	107
pp'-DDE	Cl	108	99	90	75	93	98	98	105	92	101	102
pp'-DDT	Cl	120	108	64	171	87	82	73	25	85	110	109
α-BHC	Cl	89	77	78	73	80	80	65	68	72	84	80
β-BHC	Cl	108	83	73	75	80	85	83	88	79	85	85
γ-BHC	Cl	94	80	78	76	91	88	76	68	82	87	76
δ-BHC	Cl	106	86	88	84	95	97	93	96	91	100	87
アルドリン	Cl	91	85	85	78	87	105	94	95	87	97	95
エンドリン	Cl	111	112	88	97	107	112	107	104	98	110	109
カブタホール	Cl	119	107	15		0	0	0	0	0	18	0
キャプタン	Cl	122	124	69	165	45	20	0	0	61	114	76
クロルフェナピル	Cl	112	132	88	93	106	205	111	114	101	116	113
クロルベンジレート	Cl	101	96	86	83	88	110	104	108	113	109	102
ジクロルアニド	Cl	74	130	88	34	64	47	16	16	61	87	44
ジコホール	Cl	97	91	115	261	111	133	128	126	116	131	130
ディルドリン	Cl	110	115	91	81	99	108	107	107	100	110	105
トリフルラリン	Cl	109	106	89	106	129	112	107	112	102	118	117
ピリフェノックスE	Cl	108	125	88	69	77	80	85	107	29	84	94
ピリフェノックスZ	Cl	113	120	79	78	83	87	91	112	28	88	100
アクリナトリン	Py	112	134	109	95	121	128	97	116	92	121	116
シハロトリン	Py	115	131	85	90	105	112	96	102	94	107	107
シフルトリン	Py	104	122	86	79	99	109	89	106	85	108	103
シベルメトリン	Py	113	121	88	73	95	105	83	105	85	106	90
テフルトリン	Py	110	96	95	86	98	111	103	108	93	113	116
デルタメトリン	Py	113	124	93	65	88	107	15	109	80	104	98
ピフェントリン	Py	125	109	91	88	103	115	94	113	90	109	109
ビレトリン	Py	74	140	90	67	110	106	102	100	88	107	102
フェンバレレート	Py	114	123	86	70	120	114	78	103	79	104	98
フルシトリネート	Py	115	124	91	72	94	109	82	110	86	108	89
フルバリネート	Py	114	121	87	71	103	102	72	103	78	105	96
ベルメトリン	Py	114	110	94	95	108	113	94	120	93	112	113

(注) 空欄：未確認または確認できず
 デルタメトリンにはトラロメトリンを含む

Nメチルカーバメイト系農薬の同時分析における簡便な精製法の検討

A Study of Simplified and Useful Cleanup Method for Simultaneous Determination of N-Methylcarbamates and Metabolites

氏家 愛子 高橋 紀世子 細矢 義隆
伊藤 孝一*

Aiko UJIIE, Kiseko TAKAHASHI, Yoshitaka HOSOYA,
Kouichi ITOU

キーワード：HPLC、N-メチルカーバメイト系農薬、同時分析、SAX/PSA二層カラム

Key words : HPLC, N-Methylcarbamates, Simultaneous Determination
SAX/PSA Cartridge

Nメチルカーバメイト系農薬の同時分析について、アセトニトリル抽出-ジクロロメタン抽出-GPC-ポストカラム蛍光誘導体化による分析法の前処理工程を簡便化するため、アセトニトリル抽出-塩析-ミニカラム精製-ポストカラム蛍光誘導体化を検討した。均質化した試料からの抽出液の溶媒を留去した後、アセトン/ヘキサン (30/70) でMega Bond Elut SAX/PSA二層カラムに負荷し、アセトン/ヘキサン (70/30) で溶出する方法により分析時間の短縮が可能となった。標準添加回収率はほぼ70%~120%であったが、エチオフェンカルブは大根を除く7種の野菜、果物で回収率が低く、エチオフェンカルブスルホンの回収率が100%以上になっていることから、分析の過程で酸化されたものと考えられた。この方法の定量下限値は0.005 μ g/gであった。

1. はじめに

現在、野菜等に使用されている農薬の残留基準の設定は約180物質にのぼっており、残留農薬分析をルーチン業務として行うためには、多成分の一斉分析法は不可欠のものであり、更に、時間的、労力的にもより簡便・迅速に精度良く分析できることが望ましい。

そこで、著者らは告示法でポストカラム反応蛍光HPLC分析の対象としているNメチルカーバメイト系農薬(以下NMCと略す)の一斉分析法について、加藤ら¹⁾が報告した方法に検討を加え、環境保全の面からジクロロメタンを使用せず、GPC精製にかかる時間を短縮するため、抽出及び精製法について検討を行った。最近、小川ら²⁾のアルジカルブ等5物質を含む95種の農薬のGC/MS-SIMによる一斉分析、津村ら³⁾の21種のNMCと12種の代謝物についての一斉分析法等が報告されているが、GC法及びHPLC法での前処理を同じにすることによってかなりの労力と時間を省くことができると考えられる。著者らは、外海ら⁴⁾が23種のGCで測定困難な農薬やHPLCでしか分析できない農薬を対象として報告した一斉分析法の前処理について、NMCの同時分析に適用できないか検討を加え、良好な結果を得たので報告する。

* 現 (財)環境事業公社

2. 方 法

2.1 分析対象農薬および食品

分析対象食品としては、平成10年度の検査対象食品であるきゅうり、とまと、梨、ブロッコリー、大根、白菜、馬鈴薯、いちごの8品目とした。対象農薬はアルジカルブ、アルジカルブスルホン、アルジカルブスルホキシド、ベンダイオカルブ、カルバリル、エチオフェンカルブ、エチオフェンカルブスルホン、エチオフェンカルブスルホキシド、フェノブカルブ、メチオカルブ、メチオカルブスルホン、メチオカルブスルホキシド、オキサミル、ピリミカルブの14物質とした。

2.2 試 薬

2.2.1 抽出及びHPLC用試薬

アセトニトリル：残留農薬分析用、関東化学(株)、メタノール、蒸留水：HPLC用、関東化学(株)、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム：特級、和光純薬工業(株)、それぞれ0.03Mの溶液を1:1で混合しpH6.7の緩衝液を作る。

無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム：残留農薬分析用、関東化学(株)

o-フタルアルデヒド：生化学用、和光純薬工業(株)

β -メルカプトプロピオン酸：試験研究用、和光純薬工業(株)

ホウ酸、水酸化ナトリウム：特級、和光純薬工業(株)
 精製用カートリッジカラム：Mega Bond Elut SAX/PSA、Bond Elut SAX、Bond Elut PSA：Varian

2.2.2 農薬標準試薬

アルジカルブ、アルジカルブスルホン、アルジカルブスルホキシド、エチオフェンカルブスルホン、エチオフェンカルブスルホキシド、フェノブカルブ、メチオカルブ：残留農薬分析用、林純薬(株)
 ベンダイオカルブ、カルバリル、エチオフェンカルブ、メチオカルブスルホン、メチオカルブスルホキシド、オキサミル、ピリミカルブ：残留農薬分析用、和光純薬工業(株)

各農薬標準品について、100 μ g/mlの標準原液（アセトニトリル溶液）を作成、冷蔵庫保存をし、検量線は10 μ g/mlの中間原液から0.1 μ g/ml、0.2 μ g/ml、1.0 μ g/mlのメタノール溶液を用時調整した。標準添加回収用標準溶液もメタノール溶液を使用した。

2.3 装置

HPLC：島津 LC-10 カーバメイト分析システム
 検出器：蛍光検出器
 オートインジェクター：SIL-10A
 カラム恒温槽：CTO-10A
 カラム：ODS-III (4.6mmi.d.×250mm)、ジーエルサイエンス(株)

2.4 分析条件

カラム温度：50℃
 測定波長：励起波長；340nm、蛍光波長；445nm
 流速：0.8ml/min
 移動相：A；蒸留水
 B；メタノール

タイムプログラム；	A	B
init.	82%	18%
10min	82%	18%
40min	30%	70%
41min	Ex	312nm
	Em	382nm
43min	Ex	340nm
	Em	455nm
45min	10%	90%
50min	10%	90%
50.01min	82%	18%
60min	STOP	

3. 分析方法

3.1 試料液調整法及び標準添加回収試験

ミキサーで細切均質化した野菜及び果実の試験品を20g採り、標準添加試験用には混合標準溶液（1.0 μ g/ml）400 μ lを添加した。これに、リン酸緩衝液を10ml、アセトニトリル50mlを入れて5分間振とう後、2,500rpmで5分間遠心分離をして上清を分液漏斗に分取し、

食塩7gで塩析を行ったのちアセトニトリル層を三角フラスコに移し採る。試料残さをアセトニトリル50mlにより再抽出し、遠心分離後、一回目の抽出液を塩析した分液漏斗に移し採り塩析をしたのち、アセトニトリル層を一回目の抽出液と合わせ無水硫酸ナトリウム15gを加えて脱水をした。これを乾固直前まで濃縮し、窒素気流下で乾固し、アセトン/ヘキサン（30/70）10mlで溶解し、あらかじめアセトン/ヘキサン（30/70）10mlで活性化したMega Bond Elut SAX/PSAに負荷した。負荷流出液を採り、アセトン/ヘキサン（70/30）10mlで溶出した溶出液と合わせ、乾固直前まで濃縮したのち窒素気流下で乾固し、メタノール 2mlに溶解して試料液とした。

3.2 Mega Bond Elut SAX/PSAでの精製の検討

色素や脂肪の除去に有効である Mega Bond Elut SAX/PSA二層カラムに、NMC混合標準200ngを負荷し、負荷溶媒の極性及び溶出溶媒の極性を変えた時にどのような溶出特性があるか検討を行った。また、大根等の抽出液にNMC標準混合溶液を試料液濃度として0.2 μ g/mlとなるように添加し、同様に検討を行った結果を図1、2に示す。二層カラムの標準物質の回収率は、負荷溶媒の極性の違いによりそれぞれの画分に溶出する割合が変化し、負荷溶媒の極性がアセトン/ヘキサン（10/90）と低い場合、溶出溶媒の極性を高くしてもアルジカルブ代謝物やエチオフェンカルブの溶出割合が低かった。

しかし、大根等抽出液のマトリックスが入った場合、図2に示すように負荷溶媒の極性がアセトン/ヘキサン（10/90）でもアセトン/ヘキサン（70/30）の画分で、メチオカルブスルホンが60%で低い外はほぼ100%溶出

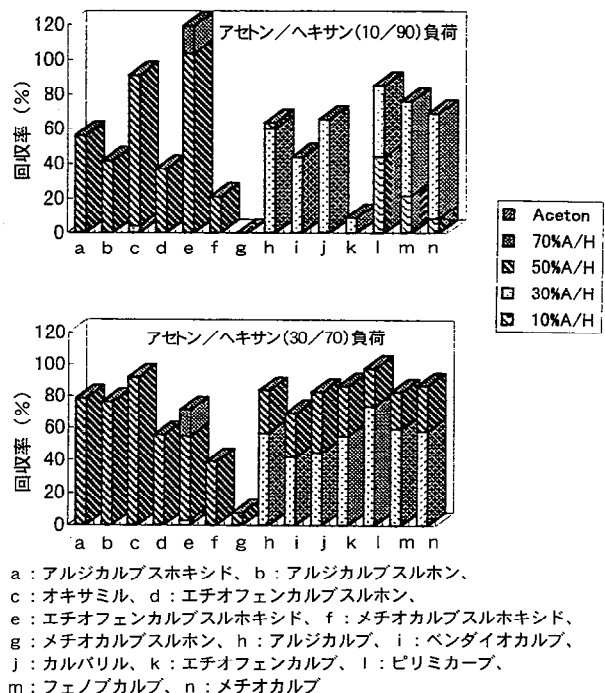


図1 SAX/PSAの標準添加回収率

した。これらの結果から、二層カラムの精製条件は、アセトニトリル抽出液を濃縮乾固後、アセトン/ヘキサン(30/70)に溶解・負荷し、アセトン/ヘキサン(70/30)で溶出することとした。

上記精製条件により、8種の野菜、果実に試料換算で0.02μg/gになるよう混合標準溶液を添加し回収試験を行った。アセトニトリル-塩析による抽出操作のみの回収率及び抽出-二層カラム精製をした回収率を並べて

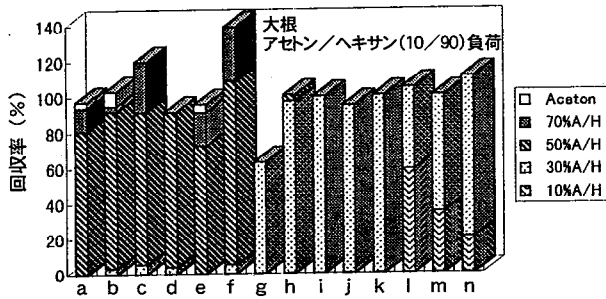


図2 SAX/PSAの標準添加回収率(大根)

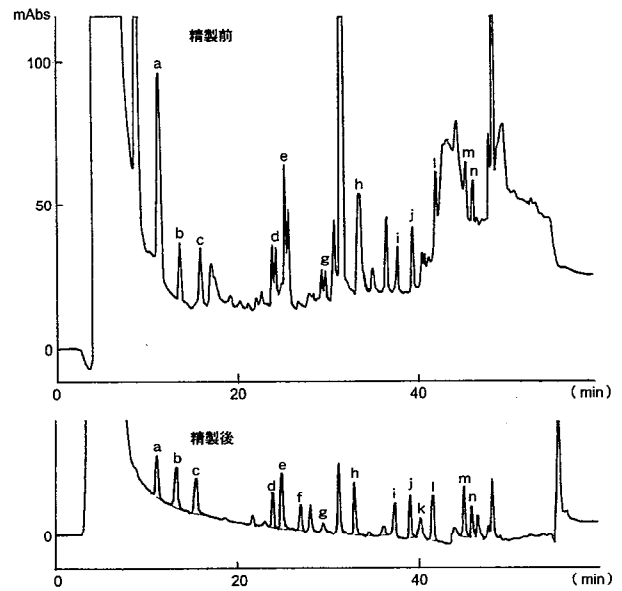


図3 SAX/PSAによる精製前後の標準添加クロマトグラム(白菜)

表1 野菜、果実への標準添加回収率

(0.02μg/g)

農薬名	白菜		大根		ブロッコリー		馬鈴薯	
	recovery±SD (%)		recovery±SD (%)		recovery±SD (%)		recovery±SD (%)	
	抽出	精製	抽出	精製	抽出	精製	抽出	精製
Aldicarb sulfoxide		74.9±0.6	98.8±14	73.5±7.0		94.4±5.0		85.8±10
Aldicarb sulfone	101±2.4	77.8±0.5		78.0±8.5	72.7±2.4	78.1±4.2	86.1±9.9	80.7±2.4
Oxamyl	113±6.8	80.5±6.9	117±11	133±10	682±3.5	495±7.3	102±7.5	80.9±3.0
Ethiofencarb sulfone	108±13	79.8±0.0	92.3±5.3	78.7±7.1	75.3±3.0	74.3±3.1	106±8.0	81.8±3.2
Ethiofencarb sulfoxide	92.1±3.9	128±3.2	91.0±2.5	78.2±6.9		140±1.8	119±14	148±13
Methiocarb sulfoxide	101±2.4	76.6±6.6		91.9±8.5		95.1±4.7		82.4±3.7
Methiocarb sulfone	155±11	109±9.5		87.0±4.1		118±7.3		78.5±5.6
Aldicarb		79.9±5.4	114±9.7	86.3±5.5		74.7±5.2	101±5.7	73.8±1.4
Bendiocarb	80.2±6.9	83.6±8.4	84.8±18	79.6±9.5	23.2±170	68.5±1.9	107±7.0	87.5±3.1
Carbaryl	113±3.9	79.6±0.0	91.8±13	80.5±4.5	76.3±3.7	103±4.0	104±7.8	86.3±2.6
Ethiofencarb	51.7±5.3	47.9±14	85.0±18	89.1±9.9	34.2±44	18.4±30	78.0±9.6	20.1±97
Pirimicarb	97.3±3.4	72.3±4.0	87.2±3.7	77.1±6.8	137±4.9	67.3±4.9	89.6±22	81.1±3.7
Fenobucarb	109±37	104±30	81.3±4.8	77.7±7.8	91.2±3.6	94.9±4.9	99.6±4.1	83.7±2.7
Methiocarb	102±17	104±3.8	88.7±6.3	92.0±8.0	85.2±5.4	103±5.8	102±3.6	88.4±1.7
農薬名	とまと		梨		きゅうり		いちご	
	recovery±SD (%)		recovery±SD (%)		recovery±SD (%)		recovery±SD (%)	
	抽出	精製	抽出	精製	抽出	精製	抽出	精製
Aldicarb sulfoxide	386±7.1	88.0±5.4	98.3±5.8	75.4±7.0	404±2.8	96.3±11		99.1±9.0
Aldicarb sulfone	86.0±4.2	103±4.4	104±6.5	79.6±7.1	98.8±1.4	82.6±5.7	116±13	102±6.6
Oxamyl	98.6±2.0	103±4.2	92.5±5.3	79.9±8.0	101±3.2	79.1±4.9	92.8±5.2	101±7.0
Ethiofencarb sulfone	83.1±7.9	103±3.2	107±5.4	80.8±6.0	89.1±2.2	82.8±7.4	96.0±4.2	98.2±6.4
Ethiofencarb sulfoxide	123±2.8	139±2.6	119±8.2	97.0±5.4	141±4.0	152±6.3	136±11	132±19
Methiocarb sulfoxide	104±7.2	116±5.9		70.5±10		83.7±3.4	94.7±4.6	96.9±6.6
Methiocarb sulfone	123±7.5	82.9±22		34.8±35	240±14	81.6±15	200±16	70.8±20
Aldicarb	97.9±5.6	102±3.6	100±2.1	75.0±8.4	88.7±2.6	61.1±11	89.9±2.5	89.8±4.8
Bendiocarb	103±4.7	113±4.4	107±3.2	80.7±10	92.3±1.0	79.3±4.1	99.1±4.5	100±5.4
Carbaryl	105±3.8	109±3.4	107±12	114*	95.4±0.5	81.6±5.0	122±12	102±6.4
Ethiofencarb	76.7±4.2	72.6±5.2	95.5±5.2	55.6±13	21.8±26	12.5±39	66.7±11	66.4±23
Pirimicarb	93.9±13	103±3.8	103±5.2	76.1±9.0	95.4±3.4	68.8±4.1	44.4±25	100±7.0
Fenobucarb	88.2±12	105±4.0	102±3.6	78.7±8.4	94.3±0.7	80.0±6.0	82.9±8.8	96.8±5.9
Methiocarb	86.0±19	112±3.9	102±5.2	82.2±7.9	92.3±5.1	81.7±4.5	97.0±47	101±6.0

注：1；*) 添加回収試験に用いた梨にCarbarylが検出されたため、値を差し引いた回収率。

2；空欄は妨害物質のため定量不能。

3；n=3、ただし、とまと及びいちごのみn=5

表1に示す。また、標準物質のクロマトグラム及び白菜の精製前後のクロマトグラムを図3に示す。

表1の空欄は、妨害物質が目的物質と重なっているため定量できなかったものであるが、二層カラム精製により妨害物質が除去され定量可能となった。しかし、オキサミルは、ブロッコリーからの回収率が精製後も495%と高く、妨害物質の除去が不十分であった。このオキサミルのピークと重なっている妨害物質は、ポストカラム反応液を流さないで分析すると蛍光を持たないことから、オキサミルと同じクロマト上の挙動を示した。このため、ブロッコリーの残留オキサミルの定量はできなかった。また、エチオフェンカルブは、回収試験過程で酸化されてブロッコリー、白菜、馬鈴薯、梨、きゅうりでの回収率が低かったが、その他の農薬は厚生省生活衛生局長通知（H9.4.8衛化第43号）の「残留農薬迅速分析法の利用について」に示す、おおむね回収率70%~120%、RSD20%以下を満足する結果が得られた。エチオフェンカルブについても、エチオフェンカルブスルホン、エチオフェンカルブスルホキシドの総和で満足のいく結果が得られたため、酸化物との総和で評価する必要があると考えられた。

また、この抽出-精製法は別途菊地ら⁵⁾が本年報で報告しているGC法での一斉分析法と共通であり、二層カラム精製後の試験液を分取・使用することにより、前処理を一本化することが可能となった。

4. まとめ

現在、残留基準の設定されている農薬のうち、告示法がポストカラム反応蛍光HPLCであるNMCについて、簡便・迅速な同時分析法を検討した結果は下記のとおりであった。

- 1) アルジカルブ等8種のNMC及びそれらの6種の代謝物について、アセトニトリル抽出-塩析-Mega Bond Elut SAX/PSA二層カラム精製をすることにより、環境保全の面からジクロロメタンを使用せずに簡便・迅速に同時分析をすることができた。
- 2) オキサミルは、ブロッコリーについては妨害物質除去が不十分であり定量できなかった。
- 3) エチオフェンカルブは、標準添加回収試験過程で酸化されてしまい、特にブロッコリー、きゅうり、馬鈴薯で著しかった。このため、エチオフェンカルブは、エチオフェンカルブスルホン、エチオフェンカルブスルホキシドの総和で評価する必要があると考えられた。
- 4) この抽出・精製を採用することにより、前処理法をGC法と一本化することが可能となった。

参 考 文 献

- 1) 加藤玲子他、保健環境センター年報、15、53-55 (1997)
- 2) 小川正彦他、食品衛生学会誌、38、48-61 (1997)
- 3) 津村ゆかり他、食品衛生学会誌、39、357-367 (1998)
- 4) 外海泰秀他、食品衛生学会誌、39、13-25 (1998)
- 5) 菊地秀夫他、保健環境センター年報、17、64-69 (1999)

フォトダイオードアレイ検出器付きHPLCによる食肉中の 残留動物用医薬品の同時分析法の検討

A Study of Simultaneous Determination of Residual Veterinary Drugs in Meats by HPLC with Photo Diode Array Detector

氏家 愛子 高橋 紀世子 細矢 義隆
伊藤 孝一*

Aiko UJIIE, Kiseko TAKAHASHI, Yositaka HOSOYA
Kouichi ITOU

キーワード：HPLC、残留動物用医薬品、同時分析、SAX/PSA二層カラム

Key words : HPLC, Residual Veterinary Drugs, Simultaneous Determination
SAX/PSA Cartridge

平成7年及び平成9年に残留基準が設定された11品目の動物用医薬品の同時分析を検討したところ、代謝物を含む7品目8種類の同時分析が可能であった。均質化した試料を酢酸エチル/アセトニトリル(20/80)で抽出し、Mega Bond Elut SAX/PSA二層カラム精製を行うことにより、逆相系のミニカラム精製では不十分であった妨害成分の除去が可能であった。標準添加回収率は、豚肉(筋肉)では74.4%~117%(C.V.0.8%~5.3%)、牛肉(筋肉)では82.0%~100%(C.V.1.0%~10%)、定量下限値は、肉換算で $0.002\mu\text{g/g}$ ~ $0.005\mu\text{g/g}$ であった。

1. はじめに

食肉、食鳥卵及び魚介類中の抗生物質及び合成抗菌性物質については、食品衛生法によりこれら食品中に含有してはならないとされていたが、人の健康に影響のないレベルとして平成7年12月26日付け厚生省令第62号および厚生省告示第218号により、新たに6種の動物用医薬品(オキシテトラサイクリン、イベルメクチン、クロサンテル、フルベンダゾール、セラノールおよびトレンボロン)の食品中の残留基準値及び試験法が設定された。

また、平成9年3月28日付け厚生省令第33号および厚生省告示第72号により、新たに5種の動物用医薬品(イソメタミジウム、キノキサリン-2-カルボン酸、スルファジミジン、チアベンダゾール、5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン)の残留基準値および試験法が追加設定された。

これらの動物用医薬品は、畜産動物や養殖魚等に寄生虫駆除剤、ホルモン剤、合成抗菌剤、抗生物質として使用されており、県でも平成10年度から合成抗菌剤のモニタリングと並行して畜産物中の残留濃度の調査を開始している。しかし、11品目の動物用医薬品の個別試験法による分析は、時間及び労力がかかりすぎるため、複数の動物用医薬品を簡便かつ迅速に分析できる方法が要求されている。

* 現(財)環境事業公社

性質の異なる動物用医薬品の同時分析についてはこれまでも報告^{1)~3)}がなされているが、著者らは、平成5年4月1日衛乳第79号で示された畜水産食品中の残留合成抗菌剤の一斉分析法(改定法)をもとに、妨害成分の精製方法を中心とした検討を行った。

2. 方 法

2.1 分析対象食品及び動物用医薬品

分析対象食品は、残留基準値が設定されている畜水産食品のうち、平成10年度の検査対象食品である豚肉(筋肉)、牛肉(筋肉)、鶏肉(筋肉)とした。鶏卵については、妨害成分がほとんどなかったため、精製の対象から除外した。

また、動物用医薬品は、キノキサリン-2-カルボン酸(QCA)、スルファジミジン(SDD)、チアベンダゾール(TBZ)、5-ヒドロキシ-チアベンダゾール(TBZm)、5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン(ABZm)、クロサンテル(CST)、フルベンダゾール(FBZ)、セラノール(ZER)、 α -トレンボロン(α -TB)、 β -トレンボロン(β -TB)の9品目10種とした。

2.2 装 置

HPLC：島津 LC-10

検出器：フォトダイオードアレイ(PDA)検出器、SPD-M10A V

オートインジェクター：S I L-10A
 カラム恒温槽：C T O-10A
 カラム：TSK-GEL ODS 80TS (4.6mmi. d. ×150mm)、
 東ソー(株)

2.3 分析条件

カラム温度：40℃
 流速：0.7ml/min
 移動相：

A ; 0.025M- K H₂ P O₄ (p H 3.0)
 B ; アセトニトリル / 0.025M- K H₂ P O₄ (p H 3.0) : 80 / 20

グラジュエント条件；	A	B
0min	95%	5%
19min	70%	30%
32min	30%	70%
36min	0%	100%
50min	0%	100%
50.01min	95%	5%
60min	S T O P	

測定波長：225nm (A B Z m, Z E R, C S T), 241nm (Q C A, F B Z), 265nm (S D D), 305nm (T B Z, T B Z m), 350nm (α-TB, β-TB)

2.4 試薬

アセトニトリル、アセトン、n-ヘキサン、メタノール：
 残留農薬分析用、関東化学(株)
 酢酸エチル：残留農薬分析用、和光純薬工業(株)
 アセトニトリル：高速液体クロマトグラフィー (HPLC)
 用、片山化学工業(株)
 蒸留水：HPLC用、関東化学(株)
 リン酸二水素カリウム：特級、和光純薬工業(株)
 硫酸ナトリウム (無水)：残留農薬用、関東化学(株)
 Sep pak plus PS-2、フロリジル、アルミナN、C18
 : Waters
 Mega Bond Elut SAX / PSA、Bond Elut SAX、
 PSA : Varian
 「標準試薬」
 A B Z m, Q C A, T B Z m, F B Z, Z E R, α-TB、
 β-TB : 林純薬工業(株)
 T B Z : 和光純薬工業(株)

SDD : SIGMA chemical company
 CST : 関東化学(株)

各動物用医薬品について、100μg/ml (メタノール溶
 液) の標準原液を作成、冷凍保存をし、検量線は0.05μ
 g/ml、0.1μg/ml、0.25μg/ml、1.0μg/mlのア
 セトニトリル / 0.025M- K H₂ P O₄ (p H 3.0) : 25 / 75溶液
 を用時調整した。また、標準添加回収用標準溶液はアセ
 トニトリル溶液を使用した。

3. 結果

3.1 モニタリングー斉分析法に準拠した標準添加回
 収試験

モニタリングー斉分析法に準拠した試料調整法により
 実施したSep pak plus PS-2の標準物質負荷回収試験結
 果及び豚肉、牛肉の標準添加回収試験結果を表1に示す。
 豚肉では、QCAが29.6%、SDDが48.1%と低い回収率
 であったが、他の7品目の医薬品については80%以上の
 回収率が得られた。しかし、A B Z mはPDA検出器による
 ピークスペクトルをみると肉抽出物の妨害成分が十分に
 除去されておらず、131%と高い値となった。特に、ホ
 モジナイズをして肉組織を十分に破壊した状態で数日冷
 蔵保存した肉について、同様の回収試験を行ったところ、
 その傾向は顕著であり225nmでの測定は不可能であった。

牛肉では豚肉と若干異なり、T B Z mが60.4%、F B Zが
 54.6%、α-TBが71.8%、β-TBが63.1%と豚肉に比べ
 て回収率が低く、SDDは3.1%とほとんど回収されな
 かった。また、A B Z m及びZ E Rはマトリックスの影響を
 受けて妨害ピークが重なっており、特にA B Z mは、ピー
 クスペクトルから判断してもA B Z mのみのピークを分
 離することができず、定量が不可能であった。

また、Sep pak plus C18精製による牛肉への添加回収
 試験を同様に行ったが、T B Z、SDD、α-TB、β-TB
 が76%~86%、T B Z mが63.5%、QCAが28.5%、F B Z
 が63.3%、ZRNが52.0%と低い回収率であった。A B Z m
 はSep pak plus PS-2精製と同様、マトリックスの影響
 を受けて妨害ピークが重なっており、ピークスペクトル
 から判断してもA B Z mのみのピークを分離することが
 できず、定量が不可能であった。

表1 モニタリングー斉分析法(準拠)による標準添加回収率

(肉換算0.1μg/g)

医薬品名	sep pak PS-2			sep pak C18
	標準のみ(n=5)	豚肉(n=5)	牛肉(n=5)	牛肉(n=3)
T B Z m	96.2 ± 1.9	90.3 ± 2.9	60.4 ± 7.3	63.5 ± 1.1
A B Z m	96.6 ± 2.6	131 ± 1.2	**	**
Q C A	93.7 ± 2.4	29.6 ± 3.1	31.6 ± 6.5	28.5 ± 5.8
T B Z	94.9 ± 2.7	101 ± 5.4	90.0 ± 2.4	83.4 ± 2.5
S D D	81.7 ± 6.0	48.1 ± 9.0	3.1 ± 3.9	87.3 ± 8.9
F B Z	94.6 ± 1.4	97.0 ± 2.1	54.6 ± 13.0	63.1 ± 2.4
β-TB	84.7 ± 3.6	80.1 ± 2.8	63.1 ± 6.2	76.3 ± 1.8
α-TB	85.3 ± 3.5	85.5 ± 2.5	71.8 ± 5.6	78.4 ± 1.9
Z E R	91.4 ± 1.9	107 ± 3.9	121 ± 44.5	52.0 ± 0.8
C S T	0.6 ± 1.2	7.6 ± 0.3		

注) **印：妨害成分と分離できず定量不能

表2 Sep pakフロリジル、アルミナNの標準添加回収率

(1.0μg/ml)

医薬品名	ミニカラム	フロリジル				アルミナN
	負荷液	酢酸エチル/ヘキサン (10/90)				
		溶出液	a	b	c	d
T B Z m		60.3	52.0	68.4	59.3	9.0
A B Z m		29.7	22.9	33.0	3.4	20.2
T B Z		98.2	101	100	89.5	84.1
S D D		96.2	75.5	102	48.2	78.0
F B Z		97.6	95.7	101	83.6	84.0
β-TB		101	94.9	97.0	94.1	73.3
α-TB		103	96.0	98.5	95.5	74.5
Z E R		67.1	82.4	90.7	7.4	26.2

溶出液 a : 酢酸エチル/メタノール (30/70) 10ml
 b : 酢酸エチル/メタノール (20/80) 10ml
 c : 酢酸エチル/メタノール / 0.025M-H K₂ P O₄ (30/50/20) 10ml
 d : ジエチルエーテル/メタノール (30/70) 10ml

以上のことから、動物用医薬品の抽出溶媒にアセトニトリルを使用した場合、妨害成分の精製は、逆相系では困難であると考えられた。また、QCA及びCSTは物性が違うため今回の同時分析法での回収率が悪く、対象品目から除外した。

3.2 Sep pak plus フロリジルおよびアルミナN精製による標準添加回収試験

モニタリング一斉分析法に準拠した方法で標準添加回収率が全体的に低かった牛肉や、標準添加回収試験で使ったホモジナイズ後の冷蔵・冷凍保存した試料の妨害成分として、タンパク質の変質等を考え、前段の結果を受けて、この妨害成分の除去に順相系での精製を検討した。

Sep pak plus フロリジルによる標準物質の回収率を、負荷液に極性を低くした酢酸エチル/n-ヘキサン(10/90)を使用し、溶出溶媒の極性を少しずつ高くしたもので検討したところ、TBZ等6品目の医薬品の回収率が酢酸エチル/メタノールの溶出で高い値を示したが、TBZmが52%~68%、ABZmが23%~33%と低く、フロリジル精製は8品目の動物用医薬品の同時分析には不相当であると考えられた。

また、フロリジル精製と同様に、Sep pak plus アルミナNによる標準物質の回収試験を、負荷液に酢酸エチル/n-ヘキサン(10/90)を使用し、溶出溶媒に酢酸エチル/メタノール(20/80)を使用して行ったが、良好な結果が得られなかった(表2)。

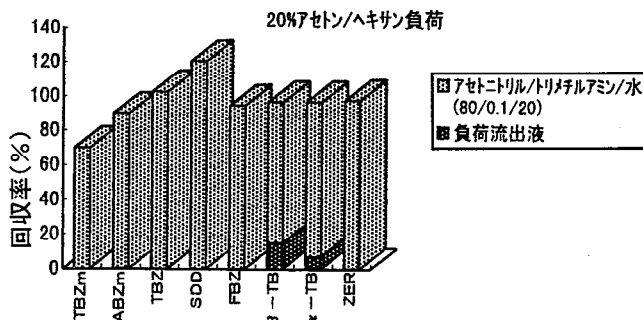


図1 SAX/PSAの標準添加回収率

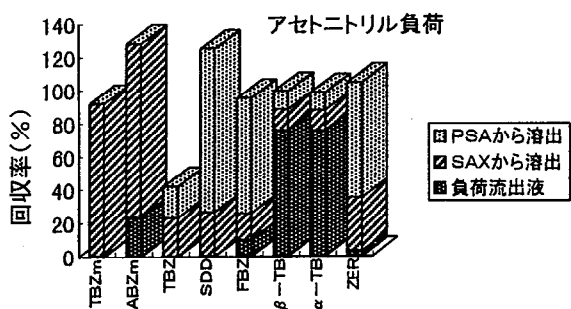


図2 動物用医薬品のSAX及びPSAの保持状況

3.3 Mega Bond Elut SAX/PSA二層カラムによる標準添加回収試験

次に色素や脂肪の除去に有効であるMega Bond Elut SAX/PSAでの精製を検討した。

モニタリング一斉分析法に準拠したアセトニトリルによる抽出のみ(精製なし)の回収率はSDD、ZERで低かったことから、これを改善するため酢酸エチルを使用したところ、回収率の向上が認められた。そこで、SAX/PSA精製での検討では、抽出溶媒としてアセトニトリル/酢酸エチル(80/20)を使用した。また、鶏卵については、クロマト上の妨害が少なかったためカラム精製の対象から除外した。

SAX/PSA二層カラムに、標準溶液(1.0μg/ml)1mlを窒素パージしてアセトン/n-ヘキサン(20/80)5mlに溶解したものを負荷し、アセトニトリル/トリメチルアミン/水(80/0.1/20)10mlで溶出した結果を図1に示す。

また、動物用医薬品のSAX及びPSAでの保持状況を明らかにするため、Bond Elut SAX、Bond Elut PSAを縦列に接続し、標準溶液(1.0μg/ml)1mlを窒素パージしてアセトニトリル5mlに溶解負荷した。SAXからの溶出には0.001N塩酸-メタノールを10ml、PSAからの溶出にはアセトニトリル/トリメチルアミン/水(80/0.1/20)を10ml使用した。図2に示すようにホルモン剤のα-TB、β-TBは負荷液に極性がアセトニトリルのように高いものを使用すると、約80%が両カラムに吸着せず流出してしまい、TBZm、ABZmは主にSAXに、SDD、FBZ、ZERは主にPSAに保持する性質を持つことがわかった。また、α-TB、β-TBが負荷流出液に流出しない溶媒の極性はアセトン/n-ヘキサン混液でアセトンの割合が15%以下であった。

標準溶液の溶出試験から、二層カラムの溶出溶媒としてアセトニトリル/トリメチルアミン/水(80/0.1/20)が有効であったが、トリメチルアミンが悪臭を放つためこれを使用せずに畜肉からの回収率を高くできないか、カラム負荷溶媒、溶出溶媒を変え回収率の検討を行った。

3.3.1 試料溶液の調整

均質化した肉を20g採取し、1.0μg/mlの標準混合溶液(アセトニトリル溶液)1mlを添加した。これに、酢酸エチル/アセトニトリル(20/80)50ml、無水硫酸ナトリウム30gを加えてバイオトロンで1分間抽出、3,000rpmで10分間遠心分離後、アセトニトリル層を採り、残さに酢酸エチル/アセトニトリル(20/80)50mlを加えてバイオトロンで再度30秒間抽出した。遠心分離後、アセトニトリル層を採って1回目と合わせ、ロータリーエバポレーターにより40℃以下で溶媒を留去した後、窒素気流下で乾固し、負荷検討溶媒10mlで溶解してMega Bond Elut SAX/PSA二層カラムに負荷した。二層カラムは、あらかじめ負荷溶媒と同じ溶媒10mlで活性化をしておいた。試料の入っていたナシ型フラスコに

溶出検討溶媒10mlを入れ、フラスコ内を洗浄した後、この溶媒で二層カラムから溶出した。アセトン/n-ヘキサン (15/85) 以外の極性の高い負荷液の場合は、負荷流出液も併せて採取した。溶出液の溶媒を留去し、窒素気流下で乾固した後、アセトニトリル/0.025M-リン酸二水素カリウム溶液 (25/75) 1 mlを加えて溶解した。これを、ポアサイズ0.45 μ mのDismic-13HP PTFEでろ過し、HPLCの試料溶液とした。

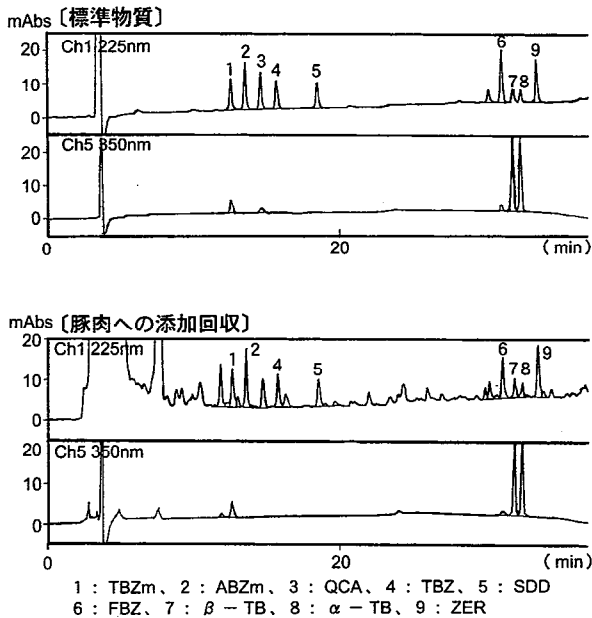


図3 動物用医薬品のHPLCクロマトグラム

表3-2 Mega Bond Elut SAX/PSA精製による豚肉の標準添加回収率

- ホモジナイズ後冷蔵冷凍保存した豚肉 -

(豚肉換算0.1 μ g/g)

負荷液 溶出液 医薬品名	アセトン/ヘキサン(15/85)		アセトニトリル
	a + f	e + f	f
T B Z m	88.8 \pm 3.7	91.3	93.7
A B Z m	99.1 \pm 3.2	116	107
T B Z	85.7 \pm 0.3	90.7	91.3
S D D	59.1 \pm 5.9	85.4	105
F B Z	52.7 \pm 2.8	51.6	72.4
β -T B	82.7 \pm 2.1	73.7	84.5
α -T B	83.3 \pm 2.1	74.7	85.7
Z E R	73.3 \pm 12	66.9	75.5
n	3	1	1

溶出溶媒 a: アセトン/ヘキサン (50/50)、
e: アセトン/アセトニトリル (10/90)、
f: アセトニトリル/水 (90/10)、g: メタノール

3.3.2 検討結果

豚肉での結果を表3に標準物質及び添加回収クロマトグラムを図3に示す。豚肉の場合、変質が進んでいない筋肉中からの回収率は、アセトン/n-ヘキサン (15/85) で負荷し、アセトン/アセトニトリル (10/90)10mlで溶出した後、更にアセトニトリル/水 (90/10)10mlで溶出する条件で動物用医薬品8品目の回収率が74.4%~117% (c.v.0.8%~5.0%) と良好であった。また、ホモジナイズ後の冷蔵保存や解凍による変質の進んだ筋肉では、カラム負荷溶媒に極性の高いアセトニトリル、溶出溶媒にアセトニトリル/水 (90/10)10mlを使用する方法が良好であった。

表3-1 Mega Bond Elut SAX/PSA精製による豚肉の標準添加回収率

(豚肉換算0.1 μ g/g)

負荷液 溶出液 医薬品名	アセトン/ヘキサン (15/85)						アセトニトリル	アセトン/アセトニトリル (30/70)	アセトン
	a + f	b + f	c + f	d + f	e + f	g	e + f	f	f
T B Z m	74.0	89.2	88.3	89.7 \pm 0.7	106 \pm 5.3	107	88.1 \pm 6.4	95.1 \pm 8.2	92.4
A B Z m	89.4	96.9	92.6	104 \pm 1.5	117 \pm 1.7	117	102 \pm 8.4	99.2 \pm 9.6	98.8
T B Z	84.5	96.1	89.9	88.7 \pm 6.7	90.9 \pm 1.5	88.8	84.0 \pm 6.2	100 \pm 6.7	91.5
S D D	90.7	93.0	87.5	67.0 \pm 5.0	74.4 \pm 0.8	59.3	94.1 \pm 3.0	101 \pm 9.1	99.8
F B Z	79.9	49.1	56.5	80.2 \pm 3.2	90.0 \pm 1.7	87.0	57.1 \pm 7.3	44.0 \pm 3.1	36.1
β -T B	85.1	81.2	83.2	79.8 \pm 0.4	88.4 \pm 1.3	86.6	78.5 \pm 3.1	81.5 \pm 5.0	71.3
α -T B	84.9	82.8	84.8	80.6 \pm 0.3	87.9 \pm 0.9	87.6	81.6 \pm 2.1	84.6 \pm 5.3	73.7
Z E R	91.8	77.4	75.2	78.0 \pm 0.5	88.6 \pm 3.1	81.1	77.1 \pm 5.2	70.6 \pm 3.9	66.3
n	1	2	1	3	3	1	5	3	1

溶出溶媒 a: アセトン/ヘキサン (50/50)、b: アセトン/ヘキサン (90/10)
c: アセトン/アセトニトリル (90/10)、d: アセトン/アセトニトリル (60/40)
e: アセトン/アセトニトリル (10/90)、f: アセトニトリル/水 (90/10)、g: メタノール

同様に、牛肉について検討した結果を表4に示す。牛肉の場合、カラム負荷溶媒に豚肉の条件より極性の高いアセトン/アセトニトリル(30/70)を使用し(カラムからの流出液も受ける)、溶出溶媒にアセトニトリル/水(90/10)10mlを使用する条件で、動物用医薬品8品目の回収率が82.0%~100%(c.v.1.0%~10%)と良好であった。

鶏肉について検討した結果を表5に示す。鶏肉の場合、カラム負荷溶媒に豚肉の条件と同様アセトン/n-ヘキサン(15/85)で負荷し、溶出溶媒にアセトン/n-ヘキサン(50/50)10mlまたはアセトン/アセトニトリル(60/40)10mlとアセトニトリル/水(90/10)10mlを使用する条件で、動物用医薬品8物質の回収率が78.4%~98.6%と良好であった。

良好な回収率を得るため、負荷溶媒および溶出溶媒を肉質によって変える必要があったが、これは、いずれもPSAに保持されるFBZ、SDD、ZERの回収率が変動するためであり、肉質の違いによるマトリックスがPSAと保持成分との関係に影響を及ぼしているためと考えられた。

8種の動物用医薬品のこの分析方法での定量下限値は、肉換算で0.005 $\mu\text{g/g}$ であったが、 α -TB、 β -TB、ZERについてはHPLCの移動相のグラジュエント条件を、リテンションタイムを10分頃にする条件に変えて再分析をすることにより肉換算で0.002 $\mu\text{g/g}$ まで下げることができた。

表4 Mega Bond Elut SAX/PSA精製による牛肉の標準添加回収率
(牛肉換算0.1 $\mu\text{g/g}$)

負荷液 溶出液 医薬品名	アセトン/ヘキサン (15/85)		アセトン/アセトニトリル (30/70)	アセトニトリル
	a+c	b+d	c+e*	d
TBZm	66.4±6.2	61.9	84.5	82.0±1.9
ABZm	-	86.2	139	96.1±1.0
TBZ	81.1±7.0	83.7	98.6	85.9±3.6
SDD	41.4±6.5	72.7	59.8	92.7±2.7
FBZ	69.9±6.5	94.8	120	91.7±1.0
β -TB	62.0±3.3	91.0	86.8	83.8±3.5
α -TB	66.0±2.9	91.6	87.9	84.5±2.8
ZER	85.6±10	95.5	92.7	100±4.4
n	3	1	2	3

溶出溶媒 a:アセトン/アセトニトリル(60/40)、b:アセトン/アセトニトリル(30/70)
c:アセトン/アセトニトリル(10/90)、d:アセトニトリル/水(90/10)
e:メタノール

注) *印:ホモジナイズ後冷蔵保存した牛肉を使用

表5 Mega Bond Elut SAX/PSA精製による鶏肉の標準添加回収率
(鶏肉換算0.1 $\mu\text{g/g}$)

負荷液 溶出液 医薬品名	アセトン/ヘキサン (15/85)		アセトン/アセトニトリル (30/70)	アセトン
	a+c	a+c*	b+c	c
TBZm	81.6	73.8±11	86.4	90.7±1.9
ABZm	98.6	86.3±6.5	97.7	90.1±2.1
TBZ	82.3	82.4±3.2	90.4	91.6±1.8
SDD	83.7	79.7±11	89.1	105±4.2
FBZ	80.4	62.4±5.7	78.4	56.3±0.6
β -TB	86.6	80.6±4.2	83.7	75.4±2.9
α -TB	86.7	80.2±4.3	83.3	78.1±2.8
ZER	85.7	70.3±4.2	86.9	70.3±1.3
n	1	3	2	3

溶出溶媒 a:アセトン/ヘキサン(50/50)、b:アセトン/アセトニトリル(60/40)
c:アセトニトリル/水(90/10)

注) *印:ホモジナイズ後冷蔵保存した鶏肉を使用

4. まとめ

残留基準値が設定されている11品目の動物用医薬品のうち、7品目8種(TBZ、TBZm、ABZm、SDD、FBZ、 α -TB、 β -TB、ZER)について、アセトニトリル/酢

酸エチル(80/20)抽出、SAX/PSA二層カラム精製により、同時分析が可能であった。豚肉、牛肉、鶏肉のクロマト上の妨害成分を除去するため、精製条件を検討した結果は下記のとおりであった。

- (1) 畜水産食品中の残留合成抗菌剤の一斉分析法(平成5年4月1日衛乳第79号)に準拠したODSカラム精製では妨害成分の除去が十分ではなく、回収率も豚肉でSDDが、牛肉でTBZm、SDD、FBZ、TBが70%以下の低い値であった。特に、タンパク質の変性が進んだ肉では精製が不十分であり、TBZm、ABZmのリテンションタイム付近に妨害ピークが大きく認められた。
- (2) Mega Bond Elut SAX/PSA二層カラムにより、妨害ピークの除去精製について満足のいく結果が得られ、タンパク質の変性が進んだ肉でも良好な結果が得られた。特に、ODS精製で不十分であったTBZm、ABZmの妨害ピークの除去に満足のいく結果が得られた。
- (3) 精製条件は豚肉、牛肉、鶏肉の抽出物の性状がそれぞれ異なっているため、最適なカラム負荷溶媒、溶出溶媒の条件が若干異なっていた。

豚肉や鶏肉は、カラム負荷溶媒に比較的極性の低いアセトン/n-ヘキサン(15/85)が適しており、牛肉の場合は、前者に比較し極性の高いアセトン/アセトニトリル(30/70)が最適であった。溶出溶媒には極性の高いアセトニトリル/水(90/10)を使用し、豚肉及び鶏肉の場合はその前段に極性を低くした溶媒による溶出をはさむ方法が最適であった。

良好な回収率を得るため、負荷溶媒および溶出溶媒を肉質によって変える必要があったが、これは、いずれもPSAに保持されるFBZ、SDD、ZERの回収率が変動するためであり、肉質の違いによるマトリックスがPSAと保持成分との関係に影響を及ぼしているためと考えられた。PSAからの溶出溶媒としては、アセトニトリル/トリメチルアミン/水(80/0.1/20)が有効であったが、トリメチルアミンの悪臭のため室内での使用はできるだけ避けられたため今回の検討では使用しなかった。しかし、肉質の違いによる精製条件の一本化のためには今後の検討を要すると思われる。

参考文献

- 1) 石井里枝他、食品衛生学会誌、35、173-179(1994)
- 2) 堀井昭三他、食品衛生学会誌、35、352-356(1994)
- 3) 石井里枝他、食品衛生学会誌、39、42-45(1998)
- 4) 吉田栄充他、第34回全国衛生化学技術協議会年會講演集、p50-51
- 5) 貫山道子他、第34回全国衛生化学技術協議会年會講演集、p54-55
- 6) 村上恵美子他、日本食品衛生学会第74回学術講演会講演要旨集、p44
- 7) 堀江正一他、食品衛生学会誌、39、383-389(1998)
- 8) 腹巻ゆかり他、食品衛生学会誌、35、262-270(1994)

CNP代替除草剤一斉分析法簡便化の検討とシジミ中の残留実態調査

A Study on Analytical Method of CNP Alternative Herbicides
and Survey in Shellfish山口 剛史*¹ 新目 眞弓 佐藤 勤*²
細矢 義隆 伊藤 孝一*³Tsuyoshi YAMAGUCHI, Mayumi ARATAME, Tsutomu SATOU
Yoshitaka HOSOYA, Kouichi ITOU

キーワード：クロルニトロフェン(CNP)、除草剤、SAX/PSAカラム、グラファイトカーボンカラム

Key Words : Chlornitrofen(CNP), Herbicides, SAX/PSA Cartridge Column
Graphite Carbon Cartridge Column

CNPおよび12種の除草剤の一斉分析法について検討した。その結果、取り扱いの簡便な二段階の精製法によりクロマトグラム、回収率とも良好な結果が得られた。また、この分析法により汚染実態を調査したところ、チオベンカルブをはじめ多くの除草剤の残留が明らかとなった。

1. はじめに

クロルニトロフェン(CNP)は、イネや魚に対する毒性が低く、廉価なこともあって長年水田用の初中期除草剤として汎用されてきた。しかし、CNPの使用量と胆のうガンの患者数とに相関があるのではないかの報告を受け¹⁾、平成6年に農水省およびメーカー側は使用および販売の自粛を決定した。これにより、CNPに代わる除草剤の使用量の増加、およびCNP以外の除草剤の魚介類への汚染が考えられる。これまで当理化学部において、魚介類におけるCNPなどジフェニルエーテル系除草剤の残留調査を行っていたが²⁾、平成8年度より宮城県で使用量の多い10種の除草剤を加え調査を行っている。しかし、昨年度報告した方法³⁾では精製過程が多段階に及ぶうえ、一部の除草剤で回収率が低い傾向が見られた。そこで筆者らは精製法を中心にこの分析法に改良を加え、知見を得たので報告する。

2. 方 法

2.1 試 料

県北部A川および県南部B川産のシジミを、4月29日から6月29日までの期間に約1週間ごと、合計各10検体の買い上げを行った。

2.2 試 薬

CNP、ニトロフェン(NIP)、クロメトキシニル(X-52)、ピフェノックス、チオベンカルブ、エスブ

*1 現 登米保健所 *2 現 仙南保健所

*3 現 財環境事業公社

ロカルブ、モリネート、ピリプチカルブ、ブタクロール、プレチラクロール、メフェナセット、ジメタメトリン、オキサジアゾン：残留農薬試験用

アセトン、ヘキサン、エタノール：

残留農薬試験用、関東化学製または和光純薬製

アセトニトリル、無水硫酸ナトリウム：

残留農薬試験用、関東化学製

塩化ナトリウム：特級、関東化学製

Bond Elut 1. SAX/PSA (500mg/500mg)：

Varian社製

Sep-Pak Plus フロリジルカートリッジ (910mg)：

Waters社製

グラファイトカーボンカートリッジ

CARBOGRAPH (300mg)：ジーエルサイエンス社製

2.3 装 置

ガスクロマトグラフ：Hewlett Packard 社製

6890 (NPD•ECD付き)

5890 series II (NPD•ECD付き)

ケミステーション：Hewlett Packard 社製

(6890に付属)

インテグレーター：Hewlett Packard 社製 3396

(5890 series IIに付属)

2.4 試験液調製法

図1のフローに沿って行った。

2.5 添加回収試験

各除草剤1 μ gを、SAX/PSA二層カラムとフロリジルカラムの2段カラムからの回収試験は20%アセトン・

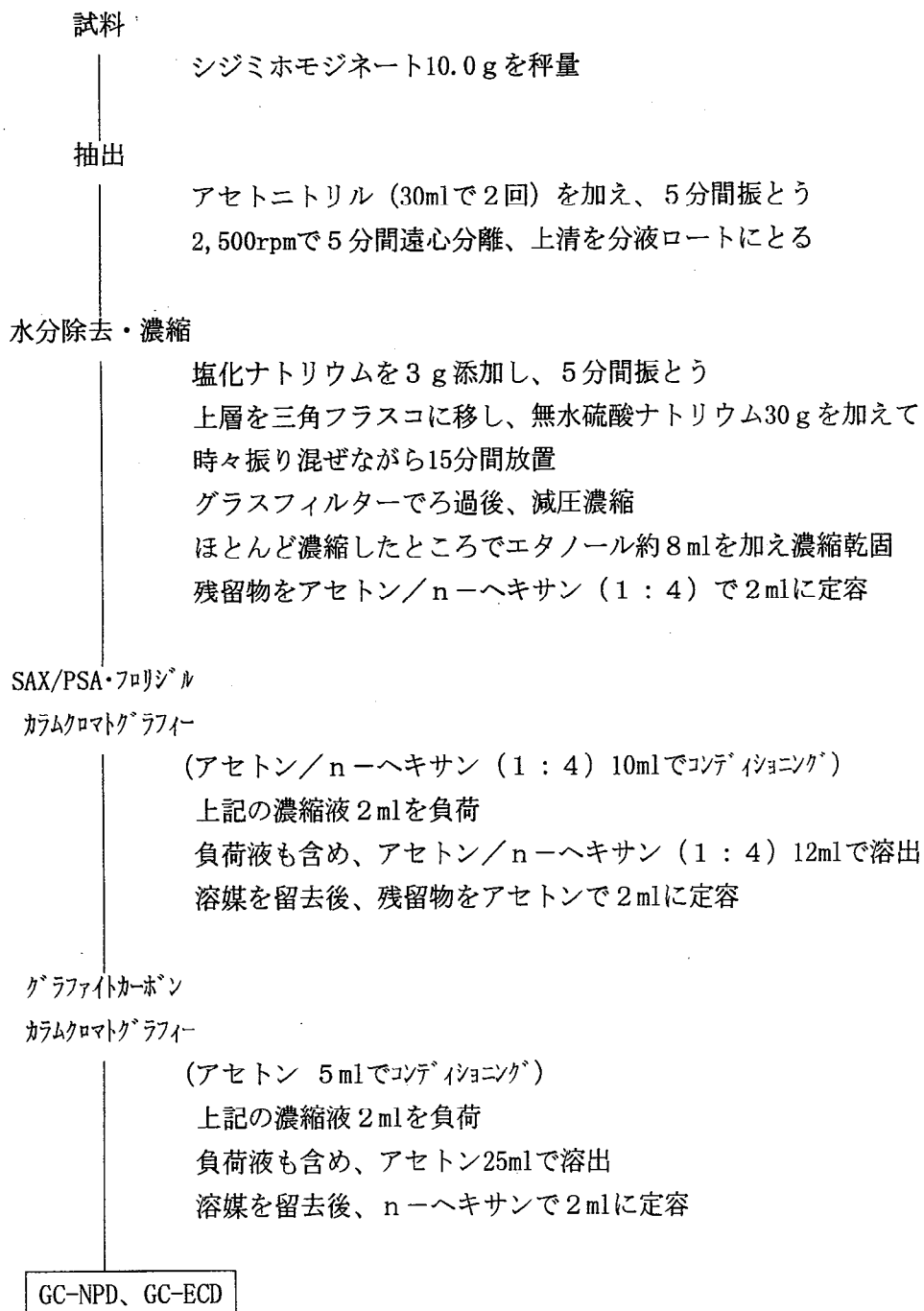


図1 試験液調整法

n-ヘキサン溶液で、その他の回収試験はアセトン溶液で添加した。

3. 分析法簡便化の検討結果および考察

3.1 ガスクロマトグラフ分析条件の検討

昨年度の方法³⁾では、クロマトグラム上で13種ともピークが分かれていたが、1検体の分析に1時間近くの時間を要した。この点はカラム膜厚がうすいカラムに切り替えることで分析時間が短縮された(表1、図2)が、ピリプチカルブとX-52のピークが分離できなかった。そ

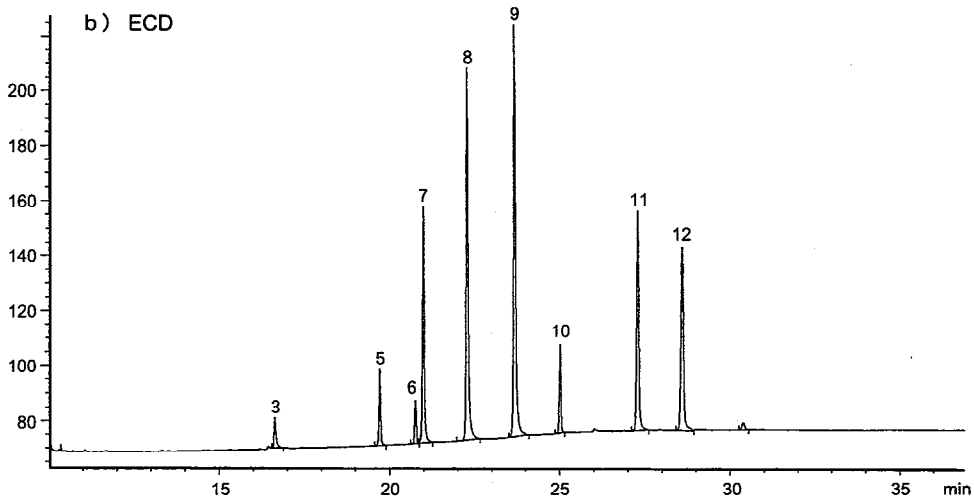
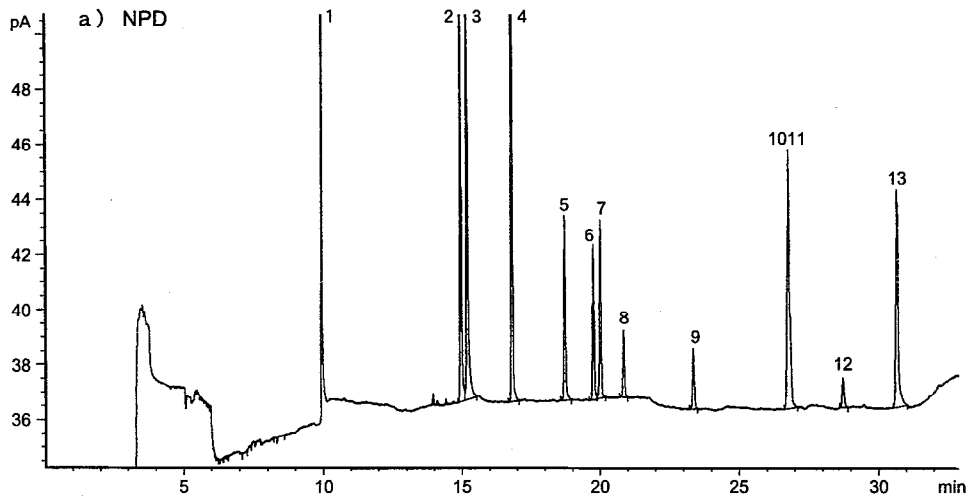
こで、NPDに装着できないDB-1701カラムを用いた分離条件をECDで検討した。その結果、ECDで検出可能な9種除草剤はすべて分離し、ピリプチカルブとX-52はそれぞれこの条件で同定が可能となった(表1、図3)。

3.2 抽出条件の検討

従来の3除草剤の分析法²⁾では、アセトニトリルにより抽出し、2%硫酸ナトリウム液とn-ヘキサンを加えた液液分配により水分を除去、濃縮後精製を行っていた。この方法が他の除草剤でも適用できないか検討したところ、ジメタメトリンとメフェナセットの回収率が低く、

表1 CG分析条件

検出器	使用カラム	注入口温度	検出器温度	その他諸条件
NPD	DB-5 (30m×0.25mm, 0.25 μ m)	220 $^{\circ}$ C	280 $^{\circ}$ C	カラム温度： 60 $^{\circ}$ C (2min) \rightarrow 20 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 200 $^{\circ}$ C (2min) \rightarrow 2 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 240 $^{\circ}$ C \rightarrow 30 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 270 $^{\circ}$ C (1min) キャリアガス：ヘリウム カラムヘッド圧：15psi (60 $^{\circ}$ C) コンスタントフローモード 試料注入法：スプリットレス 試料注入量：2 μ l
ECD	DB-1701 (30m×0.25mm, 0.25 μ m)	220 $^{\circ}$ C	290 $^{\circ}$ C	カラム温度： 60 $^{\circ}$ C (2min) \rightarrow 20 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 200 $^{\circ}$ C (1min) \rightarrow 4 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 260 $^{\circ}$ C (8min) キャリアガス：ヘリウム カラムヘッド圧：15psi (60 $^{\circ}$ C) コンスタントフローモード 試料注入法：スプリットレス 試料注入量：2 μ l



1. モリネート、2. エスプロカルブ、3. チオベンカルブ、4. ジメタメトリン、5. ブタクロル、6. プレチラクロール
 7. オキサジアゾン、8. ニトロフェン (NIP)、9. クロルニトロフェン (CNP)、10. ビリプチカルブ、11. クロメトキシニル (X-52)
 12. ビフェノックス、13. メフェナセツ

図2 13種除草剤標準液のガスクロマトグラム

13種一斉の分析法には適さないことが分かった。液液分配時の抽出用有機溶媒をジクロロメタン⁴⁾に変更することで回収率が向上すると考えられたが、ジクロロメタンは環境汚染に対する影響が問題となっているため、液液分配抽出に代わり塩化ナトリウムを加え塩析する方法⁵⁾⁶⁾を検討した。

アセトニトリル抽出液に塩化ナトリウム3gを添加する塩析法により回収率を求めたところ、ジメタメトリンとメフェナセットの回収率も改善され(表2)、一斉分析に適用可能であることがわかった。

3.3 精製法の検討

シジミ抽出液の精製法として、硝酸銀フロリジル法²⁾やゲル浸透クロマトグラフィー法⁷⁾などが幅広く用いられている。この両法について条件等を検討したが、前者は一部の除草剤で回収が見られなかった。また後者では各除草剤とも回収率が高く精製効率も良好であったが、複数の検体を同時に精製することができないため多検体

分析時には精製に長時間を要することになる。

一方、青果物中の残留農薬分析にSAX/PSA二層カラムとフロリジルカラムを組み合わせる精製している報告⁶⁾があり、この方法がシジミ抽出液に適用可能か検討した。15%および20%アセトン・n-ヘキサンで10mlまでは2mlごとに、20mlまでは5mlごとに溶出状況を追跡したところ、いずれの溶媒でも他の除草剤に比してメフェナセットの溶出が最も遅く、15%ではメフェナセットが10~15mlの画分にほとんど存在するのに対し、20%では10mlまででほとんど回収された(図4)。そこで溶出条件を、負荷液も含め20%アセトン・n-ヘキサン12mlと設定した。この条件下では13除草剤とも良好に溶出、回収され(表3)、シジミ由来成分もほとんど除去できた。しかし、若干の色素成分が残っていたため、さらにグラファイトカーボンカラムによる精製⁸⁾を試みた。その結果、アセトン25mlで13種とも回収され(表4)色素はほぼ除去された。

表2 NaCl添加法での回収

除草剤名	回収率(%)	除草剤名	回収率(%)
モリネート	99	N I P	84
エスプロカルブ	78	C N P	87
チオベンカルブ	81	ピリブチカルブ	84
ジメタメトリン	90	X-52	84
ブタクロール	91	ビフェノックス	84
プレチラクロール	87	メフェナセット	93
オキサジアゾン	88		

表3 SAX/PSA・フロリジル2段カラムからの回収 (20%アセトン・n-ヘキサン12ml)

除草剤名	回収率(%)	除草剤名	回収率(%)
モリネート	65	N I P	78
エスプロカルブ	92	C N P	66
チオベンカルブ	89	ピリブチカルブ	98
ジメタメトリン	83	X-52	98
ブタクロール	88	ビフェノックス	75
プレチラクロール	78	メフェナセット	86
オキサジアゾン	84		

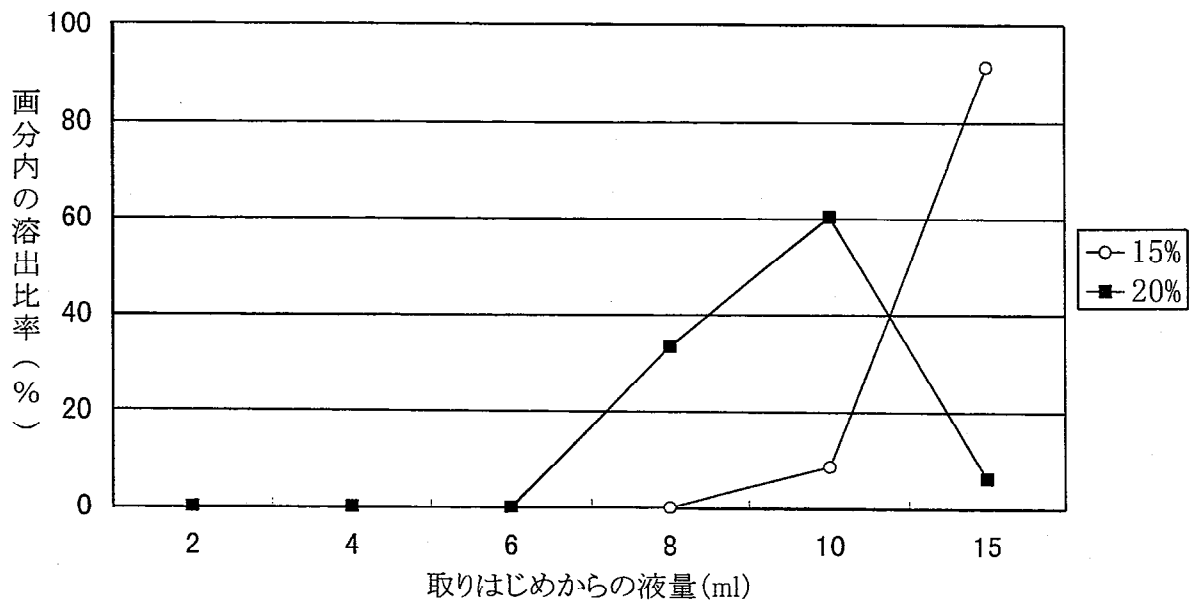


図3 メフェナセットのSAX/PSA・フロリジル2段カラムからの溶出状況

表4 グラファイトカーボンカラムからの回収
(アセトン25ml)

除草剤名	回収率(%)
モリネート	83
エスプロカルブ	113
チオベンカルブ	113
ジメタメトリン	100
ブタクロル	99
プレチラクロール	110
オキサジアゾン	114
N I P	115
C N P	121
ピリプチカルブ	115
X-52	115
ビフェノックス	116
メフェナセット	110

表5 各除草剤の添加回収率

除草剤名	回収率(%)
モリネート	78
エスプロカルブ	90
チオベンカルブ	86
ジメタメトリン	90
ブタクロル	87
プレチラクロール	96
オキサジアゾン	96
N I P	93
C N P	92
ピリプチカルブ	90
X-52	90
ビフェノックス	104
メフェナセット	107

3.4 シジミからの添加回収試験

3.3の結果をもとに図1のフローに沿って添加回収試験を行ったところ、各除草剤とも良好な回収率が得られた(表5)。また、各除草剤とも0.01ppm(試験液0.05ppm)の検出が可能であった。

4. 県内シジミ中の除草剤残留実態調査結果および考察

この分析法により、県内2河川で採取したシジミ計20検体について13除草剤の残留実態調査を行った。その結果13種中8種の除草剤が検出された(表6)。チオベンカルブの残留が両河川のしじみに共に高くみられたこと、販売自粛となったCNPも検出されたことが特徴的な傾向であった(図4、図5)。チオベンカルブの残留が高い原因として、CNPに代わってチオベンカルブ剤が幅広く用いられてきたことが考えられる。

ほかに、ピリプチカルブやプレチラクロールなどの初期除草剤は5月中旬ころ、モリネートなどの中期除草剤は6月上旬から中旬頃に残留濃度がピークに達する傾向が見られた(図6、図7)。チオベンカルブやメフェナセットなどは初・中期ともに用いられているため、ピークが2度見られた。除草剤が散布されたと思われる時期からおおよそ2週間後に、これらのピークが現れる点も特徴的な点である。

5. まとめ

13除草剤の一斉分析法を検討した結果、13種すべての除草剤で良好な回収率が得られ、またチオベンカルブなどの残留実態も明らかとなった。

今後本調査をさらに進め経年的な傾向をつかむとともに、GC-MSの利用により試料調製および分析のさらなる効率化を検討する予定である。

6. 謝 辞

本調査において、検体として供するシジミの採取にご協力くださいました皆様に、厚く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) 山本正治：医学のあゆみ、166(13)、839(1993)
- 2) 石川潔ほか：食衛誌、22(1)、56(1981)
- 3) 細矢義隆ほか：宮城県保健環境センター年報、16、114(1998)
- 4) 新日眞弓ほか：宮城県保健環境センター年報、14、55(1996)
- 5) 秋山由美ほか：食衛誌、37(6)、351(1996)
- 6) 外海泰秀ほか：食衛誌、39(1)、13(1998)
- 7) 小林智ほか：北海道衛生研究所報、45、71(1995)
- 8) 佐々野僚一ほか：日本食品衛生学会第76回学術講演会要旨集、46(1998)

表6 除草剤残留状況

(県北部A川)

(単位: ppm)

採取日	4/29	5/5	5/12	5/17	5/24	5/31	6/7	6/16	6/21	6/28
モリネートA河	0.01	0.01	0.03	0.10	0.11	0.33	0.48	0.10	0.06	0.10
エスプロカルブA河	nd	nd	0.12	0.40	0.42	0.26	0.11	0.02	0.03	0.04
チオベンカルブA河	0.07	0.09	0.37	2.36	4.21	5.24	3.79	1.40	1.03	1.31
ジメタメトリン	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ブタクロル	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
プレチラクロールA河	nd	0.13	0.12	0.07	0.02	nd	nd	nd	nd	nd
オキサジアゾン	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NIP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CNPA河	nd	0.10	0.24	0.21	0.13	0.15	0.13	0.04	0.03	0.05
ピリブチカルブA河	nd	0.08	0.30	0.74	0.42	0.27	0.15	0.03	0.02	0.03
X-52	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ピフェノックス	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
メフェナセットA河	nd	nd	0.06	0.16	0.22	0.18	0.10	0.03	0.02	0.03

(県南部B川)

採取日	4/29	5/5	5/12	5/18	5/24	5/31	6/7	6/16	6/21	6/28
モリネートB河	nd	nd	0.01	0.04	0.06	0.28	0.42	0.11	0.12	0.08
エスプロカルブB河	nd	0.01	0.03	0.21	0.14	0.21	0.04	0.05	0.10	0.03
チオベンカルブB河	0.02	0.09	0.44	2.33	2.63	2.12	1.98	3.12	0.99	1.06
ジメタメトリン	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ブタクロル	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
プレチラクロールB河	nd	0.05	0.04	0.07	0.04	0.05	0.08	0.05	0.04	nd
オキサジアゾン	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NIP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CNPA河	nd	0.02	0.03	0.05	0.05	0.06	0.09	nd	nd	nd
ピリブチカルブB河	nd	0.05	0.27	0.71	0.48	0.31	0.32	0.03	0.35	0.01
X-52	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ピフェノックスB河	nd	0.11	0.05	0.09	0.02	0.02	nd	nd	nd	nd
メフェナセットB河	nd	nd	0.02	0.07	0.07	0.11	0.07	0.04	0.07	0.02

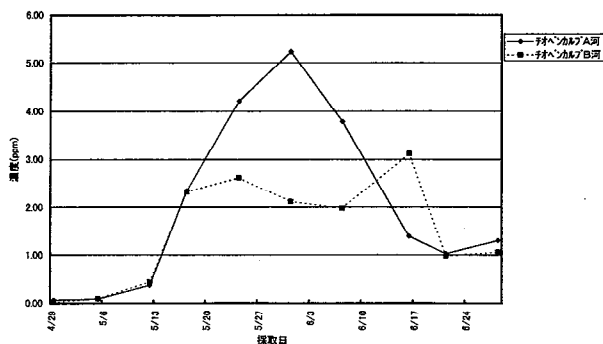


図4 チオベンカルブ濃度

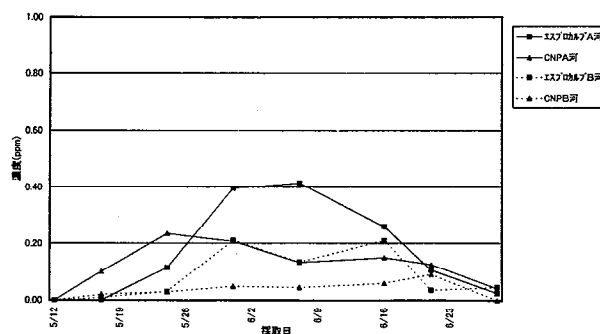


図5 エスプロカルブ・CNP

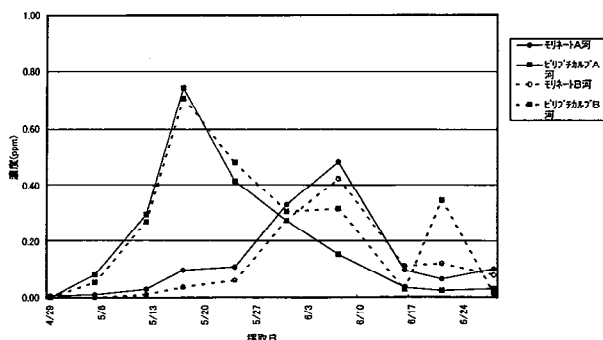


図6 ピリブチカルブ・モリネート濃度

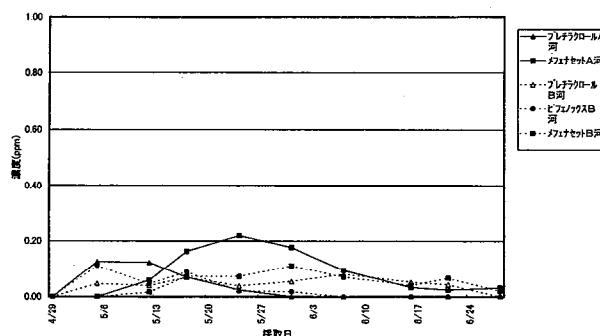


図7 プレチラクロール・メフェナセット・ピフェノックス

室内環境の揮発性有機化合物の調査手法の検討 (第1報)

Determination Method of Volatile Organic Compounds in Dwelling Environment

阿部 時男 葛岡 勝悦 加藤 謙一
浦山 清 佐々木 ひとえ 助野 典義

Tokio ABE, Shoetu KUZUOKA, Ken-ichi KATOU
Kiyosi URAYAMA, Hitoie SASAKI, Noriyosi SUKENO

キーワード：揮発性有機化合物、室内環境

Key Words : Volatile Organic Compounds, Dwelling Environment

シックビル症候群等で問題とされている室内空気中の揮発性有機化合物（以下VOCという）定量のための諸条件を検討した。その結果48物質が検出され、その内18物質の化合物名が判明した。夏と冬を比較すると、冬の方が多くのVOCが検出された。とくに石油ストーブによる燃焼VOCが多く検出された。

1. はじめに

化学工業の発展とともに、多種多様な化学物質が使用され、これらの健康に対する影響について国際的に注目されている。特にシックビル症候群あるいは新築病と言った建物に関連した健康被害が国内において急増している。このため室内空気中に存在する揮発性有機化合物（以下VOCと言う）の実態や、人体に対する個人の曝露調査を行い、空気汚染の防止対策に資する。

2. 調査目的

本年度は室内環境汚染VOCの測定方法の確立を図ることを目的とした。このため室内空気を採取した試料をGC/MSにより、含まれている化合物を検索同定した。これにより次年度以降に実施する定量のための諸条件を検討した。

3. 測定方法

①. 試料採取方法

乾電池付小型ポンプに、吸着剤として活性炭を詰めた捕集管を取り付け、毎分100mlで24時間吸引する。

②. 試料の前処理

試料を採取した吸着剤を抽出瓶に入れ、これに二硫化炭素1mlを入れ時々振り混ぜながら2時間放置し、分析用試料溶液とする。

③. 分析操作

分析用試料1 μ lをGC/MSに注入しスキャン測定することにより、得られたマススペクトルより、化合物の種類を決定した。

④. GC/MS条件

カラムDB-1内径0.25mm長さ60m膜厚1 μ m

4. 結果

夏と冬に測定した4室内のGC/MSのスキャン測定結果を表1に示す。これによると全体で48物質が検出され、この内18物質の化合物名がマススペクトル検索の結果判明した。又比較的ピークが大きいにもかかわらず、9物質の化合物名が判明できなかった。その他、大部分が検出下限付近の小さいピークの21物質についても化合物名が判明しなかった。しかしこれらの結果より、VOCの定量条件作成のための多くの資料が得られた。

今回の結果より夏と冬を比較すると、冬場の方が多くのVOCが検出された。特に石油ストーブを使用しているC宅においてはトリデカン等の高沸点脂肪族炭化水素が多く認められた。B宅では α -ピネン、D宅ではp-ジクロロベンゼンの非常に大きなピークが検出された。この様にスキャンによる半定量結果により、各室内におけるそれぞれの特徴が認められた。なお図1にGC/MSスキャンによるトータルイオンクロマト及び判明した物質名を示す。

5. 考察

室内空気の試料を、GC/MSによるスキャン分析したところ、検出されたピークの半分程度の化合物名が特定できた。これらを基に、SIM測定によるVOCの高感度定量分析を行うことが可能となった。今回のスキャン測定は比較的感度が低いにもかかわらず、48物質ものV

OCが検出された。このことにより室内環境は、多くの化学物質に汚染されていることが示唆された。今後は新築、中古住宅等、種々の室内環境の測定を行いデータの積み重ねを行い、汚染防除対策の一助としたい。

表1 室内環境空気中のGC/MSによるスキャン測定

No	RT	平成10年8月		平成11年1月		マススペクトルにより 確認された化合物	No	RT	平成10年8月		平成11年1月		マススペクトルにより 確認された化合物
		A宅	B宅	C宅	D宅				A宅	B宅	C宅	D宅	
1	12.64		△?				27	21.69			△?		
2	14.63			△	○	ヘプタン	28	21.83			○?		
3	16.05	◎	◎	○	○	トルエン	29	22.28			●	○	ウンデカン
4	16.56	○				酢酸ブチル	30	22.6			△?		
5	16.73			◎	○	オクタン	31	23.2			△?		
6	17.36			△?			32	23.33			△?		
7	17.72			△?			33	23.45			○?		
8	17.83			△?			34	23.86			●	○	ドデカン
9	18.05	○	○	◎	○?	エチルベンゼン	35	24.12			○?		
10	18.21	○	○	◎	○	m、p-キシレン	36	24.27			△?		
11	18.58	○	○			スチレン	37	24.68			△?		
12	18.72	△	○	●	◎	ノナン	38	24.77			△?		
13	19.25			○?			39	24.84			△?		
14	19.44			○?	△?		40	24.95			△?		
15	19.65			◎?	△?		41	25.01			△?		
16	19.78		●			αピネン	42	25.34			●	○	トリデカン
17	19.94			◎?	△?		43	25.66			△?		
18	20.09			○	△?	1、3、5トリメチルベンゼン	44	26.06			△?		
19	20.37			△?			45	26.48			△?		
20	20.57	△	△	●	◎	デカン	46	26.72			◎	△	テトラデカン
21	21.03			○	●	p-ジクロロベンゼン	47	26.9			△?		
22	21.14			△?			48	28.08			○		ペンタデカン
23	21.23			△?									
24	21.35		△	○	△	リモネン							
25	21.47			○?									
26	21.58			△?									

△ SN3前後のピーク
○ 明らかにピークとして認められる
◎ 大きなピーク
● 非常に大きなピーク
? マススペクトルから化合物を確認出来ず

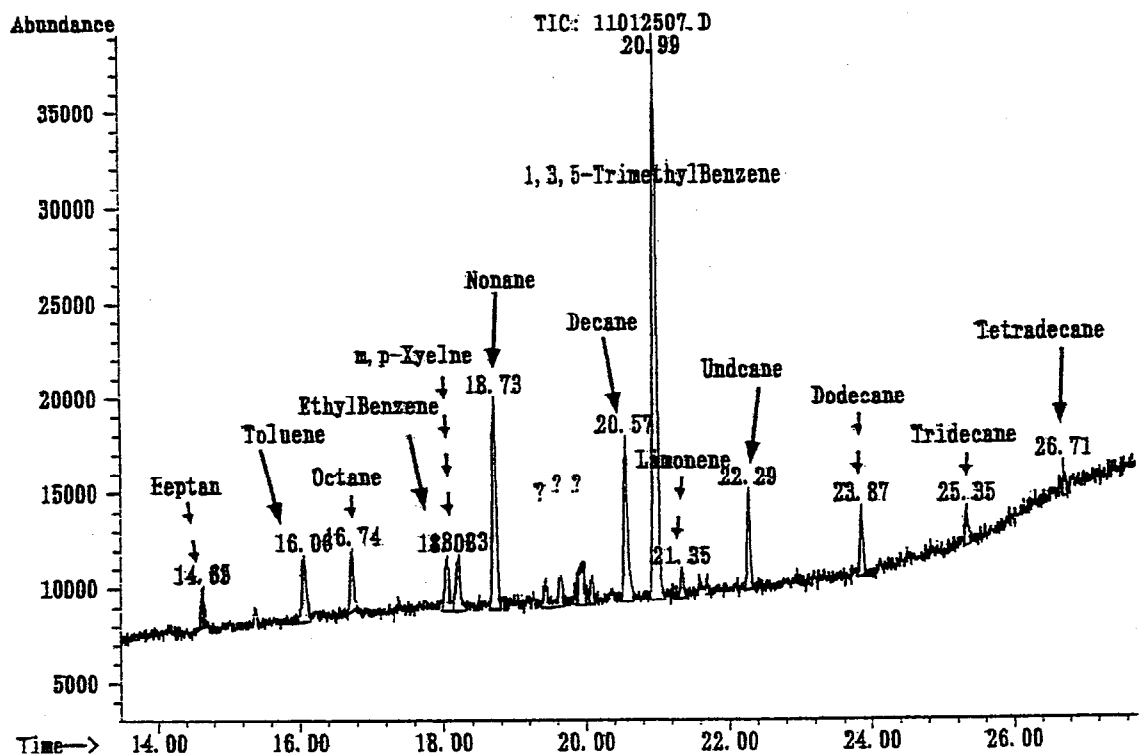


図1 トータルイオンクロマト

未汚染地下水の県内分布について

Distribution of Non-Polluted Groundwater in Miyagi Prefecture

阿部 時男 清野 茂 高橋 正人
 嵯峨 京時 八木 純 渡辺 丈夫

Tokio ABE, Sigeru SEINO, Masato TAKAHASHI
 Kyouji SAGA, Atsushi YAGI, Takeo WATANABE

キーワード：地下水、飲用井戸、宮城県

Key Words : Groundwater, Wells, Miyagi Prefecture

宮城県は平成3年より5カ年にわたり、県内66市町村の飲用井戸8,123件の検査を行った。このうち人為的な汚染のない未汚染井戸について解析を試みた結果、地域的な分布がみられ、地質との関連性もみられた。

1. はじめに

最近ではミネラルウォーターの普及などからみられるようにおいしい水に対する関心が高まっている。幸い県内には数多くの地下水が湧き出ており、人々に飲用として利用され親しまれてきた。しかし、最近の経済の発展に伴い、年々汚染される傾向にある。そこで県内の8,000件以上の地下水の中から、より自然に近い、人為的な汚染のない地下水（以下清水という）について解析を試みたところ、県内3ブロックに集中して清水が分布しており、これらは地質との関連性もみられた。

2. 清水水質の設定

より自然に近い未汚染の水質については、特に定義されたものがない。そこで県内の地下水の測定結果及び山間部上流域の沢水等の水質より、表1に示す値を清水水質として設定した。

表1で比較するとおり、設定項目のほとんどが水道水質基準よりはるかに厳しい10分の1程度の値となっている。なお、塩素イオン、硬度については地質由来の影響が大きいため、特に値を設定しなかった。

3. 結果

3.1 清水の県内分布

全県8,123件中1.4%の117件が清水であった。この県内分布を図1に示す。これより、気仙沼市等の沿岸部、大和町等の仙北部、角田市付近の三ブロックに区分された。件数では気仙沼、志津川、本吉町の28件、大和町の28件、角田市の31件で、これら5市町村で全体の62%を占めた。

3.2 清水の水質分布

県内3ブロックの水質分布を図2～6に示す。pHは全体として6～8を中心とした分布がみられ、海岸地域はアルカリ側へ高い傾向がみられた。硝酸・亜硝酸については0.3mg/l付近を中心とした分布がみられるものの、海岸地域では0.9mg/l付近の高い値がみられた。塩素イオンは5～10mg/l付近を中心とした分布がみられた。

KMnO₄消費量は全体として1.0mg/lを中心とした正規分布が得られたが、海岸地域では0.2mg/l以下の値が多くみられた。硬度はほぼ50mg/l以下の値を示したものの、仙南地域では若干高い値もみられた。

3.3 地質との関連性

宮城県の地質と地形を概観すると¹⁾、北上山地が北から南に向かって没し、阿武隈山地が南から北へ向かって没している。両山地ともに、古生代から中生代初期にかけての古い山地であり、その間に仙台湾と仙台平野を差し挟んでいる。本県の西部は宮城・山形両県の県境を縦走する奥羽山脈が連なり、第四紀火山を配列する新しい山地である。ところで、清水の分布は県北沿岸地域と仙南地域（特に角田市を中心として）に両極化している。この特性は前述した地質・地形と一致している。また、清水の分布すなわち両極化に共通する地層は、まず古い

表1 清水水質

項	目	清水水質	水道水質基準
一般細菌数	(MPN)	10以下	100以下
大腸菌群数	(個)	検出されないこと	検出されないこと
NO ₃ -N、NO ₂ -N	(mg/l)	1以下	10以下
Cl	(mg/l)	—	200以下
硬度	(mg/l)	—	300以下
KMnO ₄ 消費量	(mg/l)	1.5以下	10以下
pH	(—)	6.0～8.0	5.8～8.6
色	(度)	2以下	5以下
濁度	(度)	1以下	2以下
Fe	(mg/l)	0.05以下	0.3以下
Mn	(mg/l)	0.01以下	0.1以下

地層（古生代～中生代）であること、次に、この古い地層に花崗閃緑岩が貫入していることである。したがって地下水の湧出機構としては、岩石の割れ目や節理の裂け目、いわゆる「裂か泉」タイプで、地下水が地表へ湧出する過程で地層が濾過器の役割をなしているものと考えられる。また、古い地層のためイオン成分はほとんど溶脱していることから、両地域におけるpH6.5～7.3の中性、花崗閃緑岩では $Ca^{2+} > Mg^{2+}$ なので、総硬度のほとんどはCaと推定される。

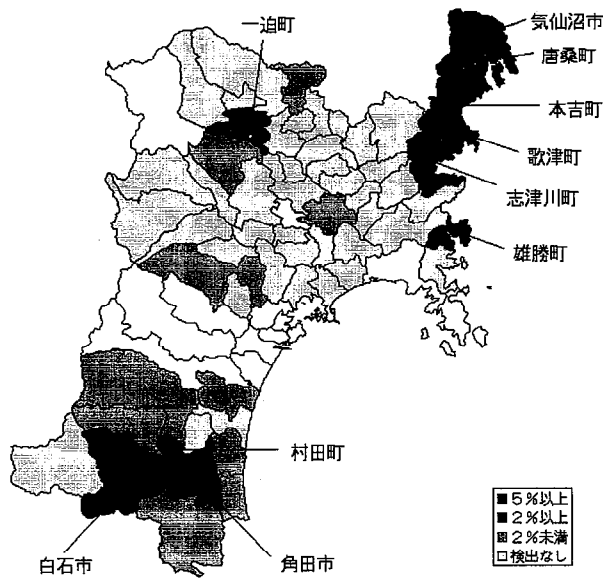
以上のように、清水の両極化は地質と関連しているといえる。

4. 考 察

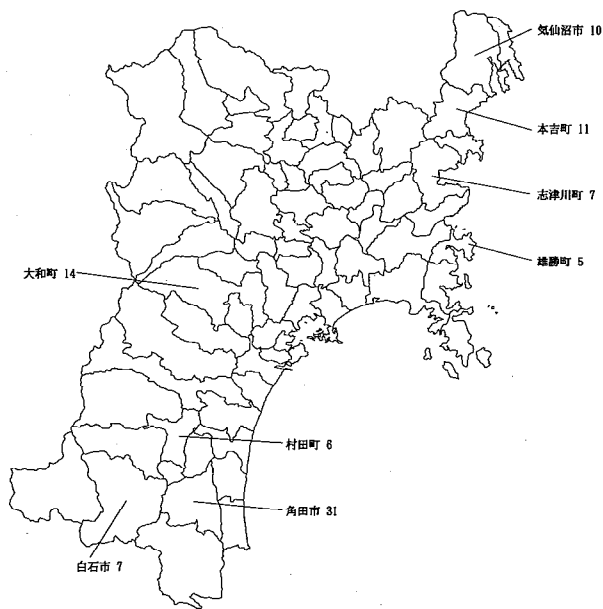
県内では数多くの地下水が飲用に供され、人々の豊かな生活を支えている。この中で数は少ないものの、117件の限りなく自然に近い未汚染の地下水が見出された。これからはこれらの清水を宮城県の貴重な財産として守り育てていく必要があると考えられる。

参 考 文 献

- 1) 加藤多喜雄、加藤陸奥雄監修：宮城の自然、1、13 宝文堂（1978）



(a) 清水検出率の分布



(b) 清水検出本数が5以上の市町村

図1 市町村別清水検出状況

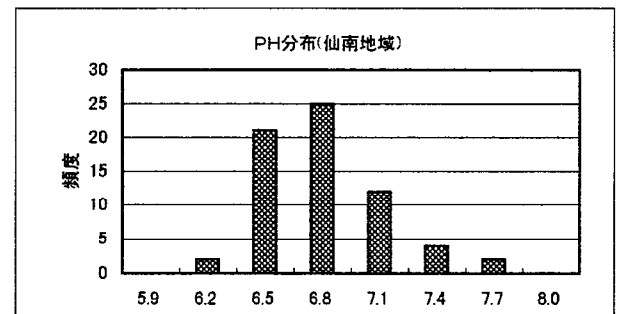
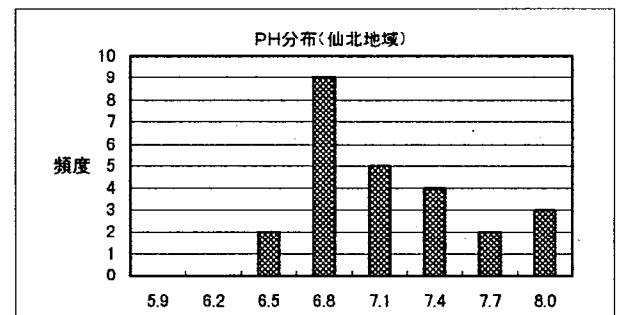
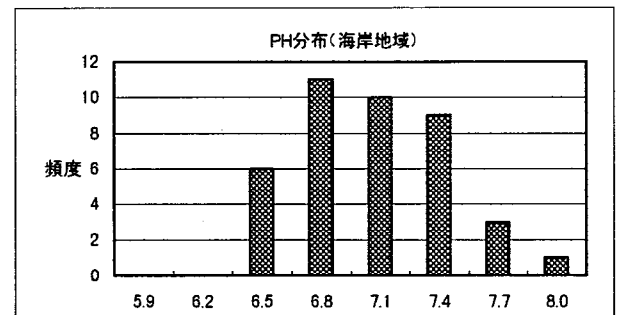
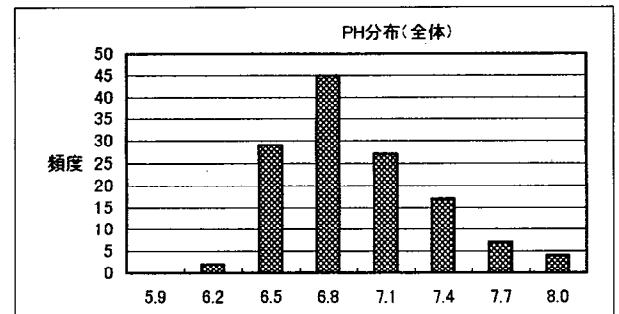


図2 pHの頻度分布

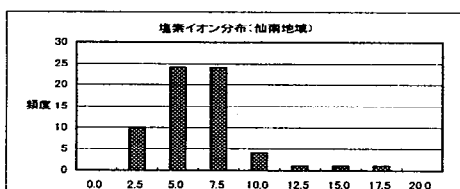
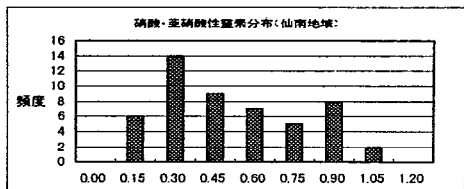
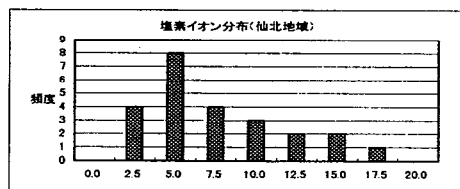
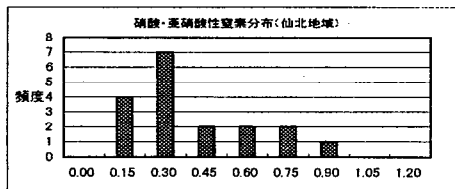
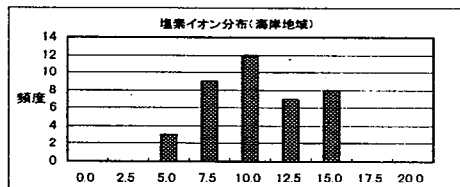
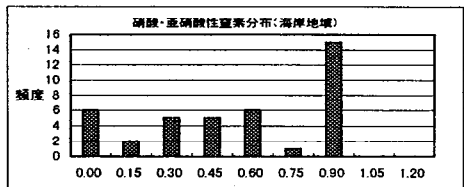
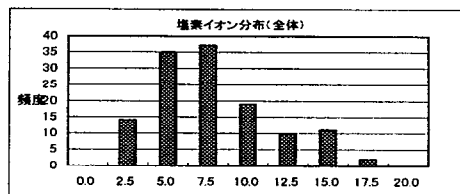
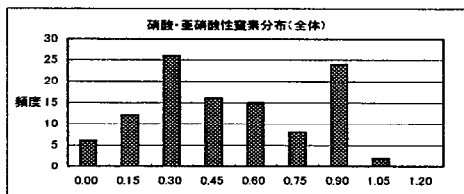


図3 硝酸・亜硝酸性窒素の頻度分布

図4 塩素イオンの頻度分布

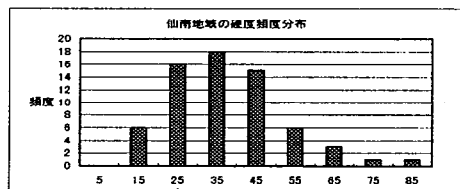
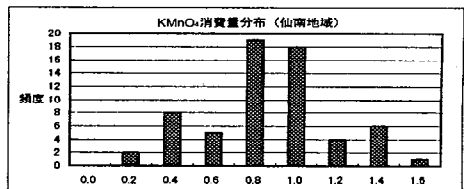
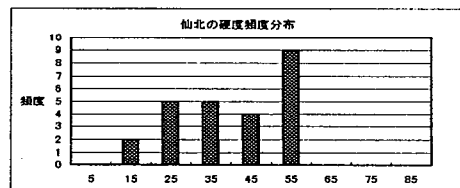
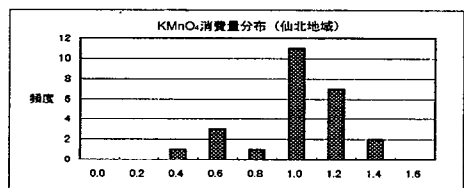
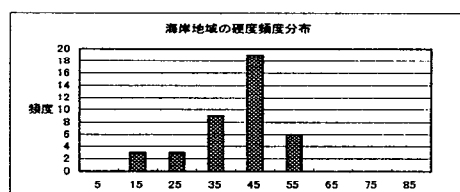
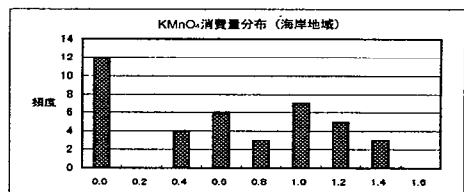
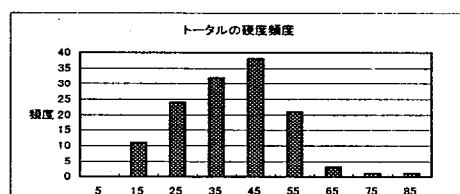
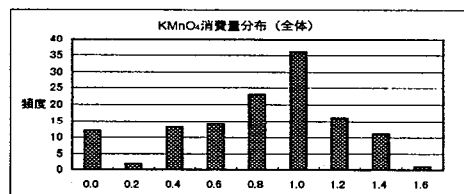


図5 過マンガン酸カリウム消費量の頻度分布

図6 硬度の頻度分布

酸性雨の水平分布構造に関する考察

A Study on the Horizontal Distribution of Acid Rain

仁平 明 榎野 光永* 中村 栄一
佐久間 隆 木戸 一博 沢田 和夫

Akira NIDAIIRA, Mitsunaga KAYANO, Eiichi NAKAMURA
Takashi SAKUMA, Kazuhiro KIDO, Kazuo SAWADA

キーワード：酸性雨、水平分布、降水量

Key words : Acid Rain, Horizontal Distribution, Amount of Precipitation

全県一斉酸性雨調査結果によれば、中和の影響が小さく海塩成分が少量である降水の場合は、水平分布上においても、時系列変化の場合と同様の降水量増加に伴う降水中イオン成分濃度の減少傾向、即ち、降水量が多い地域では nssSO_4^{2-} 、 NO_3^- 等の濃度が低下する傾向がみられ、その地域的な減衰係数は初期濃度が高いほど小さい傾向があった。また、簡単なモデルにより実測pHを降水量変化によって説明される分とそれ以外に分離したところ、pH水平分布はイオン成分濃度の降水量に応じた地域変化だけで決まる分布を基本として、これに地域的な中和の影響が重なる構造をしていた。

1. はじめに

酸性雨調査においては、1降水または一定期間の降水全量を採取し、イオン成分濃度を分析する方法が広く行われている。このようにして採取した降水試料中のイオン成分は、大気汚染物質のうち雨水に取り込まれ、雨水として地表に落下した分であり、大気中の汚染状態を直接測定しているわけではない。降水現象を介して輸送されるため、汚染物質濃度は降水機構に支配される。降水機構には、降水量の量、強度等の降水特性や、汚染物質の物理化学的な物質特性等が関係すると思われるが、時系列的性質として、降水中イオン成分濃度は降水継続に伴って減少する傾向のあることが知られている¹⁻⁴⁾。この性質により、1降水平均濃度もまた降水量に関係し¹⁾、一定期間の降水全量についても降水量の依存性が認められている^{5,6)}。さらに、時系列変化の場合と同様の降水量による減少傾向は、同一降水の水平分布においても確認されることを前報⁷⁾で報告した。これらの事実は、測定結果を時間空間的に配列しても、降水中濃度が降水量の関数になっている以上、降水量を管理しなければ、結果全体を記述しているだけであって、現象論的な意味は一切持っていないことを物語っている。

本報告では、宮城県がこれまで実施した全県一斉酸性雨調査結果⁸⁾について、降水継続に伴うイオン成分濃度の地域的な減少傾向の発現事例を解析し、その上で、降水量とイオン成分濃度の関係から簡単なモデルを構成し、

* 現 生活衛生課

実測pHを降水量変化によって説明される分とそれ以外に分離して、酸性雨の水平分布構造について考察する。

2. 方 法

2.1 濃度変化式

降水量Rに伴うイオン成分濃度Cの変化には、前報⁷⁾と同様に

$$C = C_0 R^{-a} \quad (1)$$

を適用した。C₀、aはRによらない係数。降水量Rのときの平均濃度C_mは(1)式をRで積分することにより

$$C_m = D_0 R^{-a} \quad (2)$$

ここで、 $D_0 = C_0 / (1 - a)$

である。C₀、D₀はそれぞれ(1)式、(2)式における初期濃度であり、aを減衰係数と呼ぶことにする。

2.2 pH成因モデル

一般に、pHに海塩成分は関与せず⁹⁾、H⁺は

$$[\text{H}^+] = [\text{nssSO}_4^{2-}] + [\text{NO}_3^-] - [\text{NH}_4^+] - [\text{nssCa}^{2+}] \quad (3)$$

により決定されるとした扱いがなされている¹⁰⁾。ここで、(3)式右辺の各項が、(2)式によって降水量の関数として表現されれば、H⁺も降水量の関数になる。このようにして求めた水素イオンをH₀⁺、水素イオン指数をpH₀と呼ぶ。また、降水量に依らない分として、実測値からpH₀、H₀⁺を除去したものをそれぞれΔpH、ΔH⁺と表す。

$$\Delta \text{pH} = \text{pH} - \text{pH}_0$$

$$\Delta \text{H}^+ = [\text{H}^+] - [\text{H}_0^+]$$

2.3 酸性雨指標

pH、ECのみを測定している場合については、汚染度及び中和度の指標として、前報⁷⁾で提案した汚染導電率EC_p及び水素イオン比率rHを用いた。EC_pはH⁺以外のイオン成分総量に概ね比例し、rHは近似的に陽イオン中に占めるH⁺の割合を表す。

2.4 データ

解析には本県で行っている全県一斉酸性雨調査結果⁸⁾を用いた。これは、酸性雨の地域特性の把握を目的として、県（仙台市内2地点）と県内市町村（各1地点）が合同で同一の降水を採取し、それぞれの管轄保健所でpH、ECを測定するとともに、仙台市内及び各保健所・支所管内の代表1地点については保健環境センターでイオン成分濃度を分析する総合調査であり、平成4年度からこれまで毎年2回づつ計14回実施している。その結果を解析の対象とした。ただし、平成4年度はpHのみの測定、平成7年度第1回目は降水途中からの採取であったため、これらは除いた。なお、本調査の降水量は全て採取試料量から換算したものである。

3. 結果

3.1 酸性雨指標の典型的な時系列変化

0.5mm降水ごとの酸性雨自動測定結果¹¹⁾によれば、EC_p、rH及びH⁺が示す降水量変化は、降水が続いた場合は複雑であるが、降水初期には特徴的な変化をする。その典型をpH-EC図⁷⁾及び時系列図として図1に示した。図1(a)は降水期間中rHはほぼ一定で、EC_pの減少とともにpHは高化する場合、(b)は降水継続によって中和作用が衰退しrHは大きくなるため、EC_pが減少してもpHは低下する場合、(c)はEC_pが減少してもpHはほぼ不変で、海塩成分の影響が大と考えられる場合である。いずれの場合も両対数軸上でEC_pは降水量とともに直線的に減少しており、(1)式の適用は妥当である。また、これらの降水変化の様子は、図1のpH-EC図上でも極めて明確に特徴付けられている。

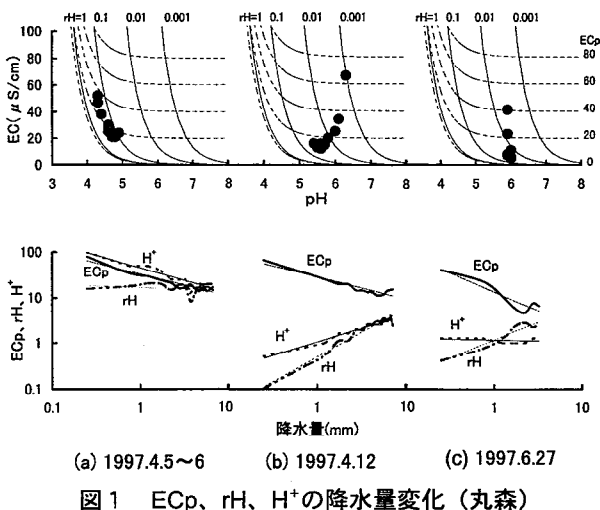


表1 全県一斉酸性雨調査結果の概要

番号	調査年月日	雨域	最大降水量 (mm)	pH		Na ⁺ / Cation	中和作用	C-R 相関
				最大	最小			
1	1993.7.12	○	72	5.0	4.1	0.07	○	○
2	1994.2.21~22	○	47	6.6	4.7	0.42	×	×
3	1994.9.27~28	○	29	6.2	4.1	0.20	清浄	×
4	1995.3.3~5	○	46	7.3	3.8	0.32	×	△
5	1996.3.1	△	11	5.4	3.9	0.34	○	×
6	1996.6.10~11	○	54	5.0	4.2	0.10	○	○
7	1996.9.9~10	○	31	6.0	4.0	0.18	○	○
8	1997.6.18~19	△	7	6.0	3.8	0.15	○	○
9	1997.9.16	△	25	6.3	4.2	0.63	×	△
10	1998.6.9~11	○	46	6.6	4.5	0.49	×	○
11	1998.9.29~10.1	○	155	6.5	4.7	0.33	清浄	×

(注) 雨域は○：県全域、△：一部地域、Na⁺/Cationはイオン成分測定地点の平均比、中和作用はpH-EC図による判定で○：小、×：大、C-R相関は地点間におけるイオン成分と降水量の関係が○：有、×：無

3.2 全県一斉酸性雨調査結果の概要

解析した11例の全県一斉酸性雨調査結果の概要は表1のとおり。イオン成分測定地点におけるnssSO₄²⁻、NO₃⁻、NH₄⁺、nssCa²⁺と降水量の関係については、表1のC-R相関欄に印したように、調査番号1、6~8及び10の5例は、降水量が多い地点ほどイオン成分濃度は減少する傾向がみられた。また、調査番号4、9は一部の測定地点を除いてイオン成分濃度は降水量に関係していた。残り4例は測定地点間で両者に関係はみられなかったが、このうち2例（調査番号3、11）は汚染度が小さく清浄であったもの、1例（調査番号5）は、たまたまイオン成分を測定した地点が汚染度の小さい所だけに集中していたものである。もう1例（調査番号2）は、地点間で降水量の差はなかったがイオン成分濃度は異なっていたもので、他と比べると特異的な降水であった。表1によれば、イオン成分濃度と降水量に関係があった5例のうち4例（調査番号1及び6~8）は、他の降水に比べ中和の影響が小さく、また陽イオン中のNa⁺比は20%未満で、海塩成分の含有が少ない特徴があった。

3.3 降水量とイオン成分濃度との関係

中和の影響が小さく海塩成分が少量であった調査番号1、6~8の4例について、nssSO₄²⁻、NO₃⁻、NH₄⁺及びnssCa²⁺濃度と降水量の関係を図2に示した。図2では、nssCa²⁺以外の成分に関しては、4降水とも降水量の増加に対して濃度が両対数軸上で直線的に減少する関係がよく現れている。nssCa²⁺の場合は、調査番号7（●印）以外では同様の傾向がみられたが、調査番号1及び8（○印及び△印）と調査番号6（×印）とでは減衰の仕方が異なり、調査番号6はnssCa²⁺が低濃度で降水量による減衰の程度が小さい。調査番号7は、降水量7~8mmを境に、降水量がこれより少ない場合の減衰は調査番号1及び8と同程度で大きく、多い場合は調査番号6と同程度に小さくなっている。

次に、図2に(2)式を適用したときのD₀及びaを表2に整理した。なお、表2には、中和の影響は大きいのが、濃度と降水量に関係がみられた例（調査番号9及び10、ただし調査番号9については全体の関係からズレている地

点を除いて計算)についても併せて示した。これによれば、水平分布上の減衰係数 a は、同一降水のイオン成分間で比較すると、 nssSO_4^{2-} より NO_3^- の方が大きく、また nssCa^{2+} の場合は、前述のとおり降水量との関係が一般でなく複雑であるが、降水量が少ないところでの減衰係数は他のイオン成分より大きい傾向がある。このようなイオン成分間における減衰係数の大小差は、時系列変化について報告¹⁻³⁾ されているものと傾向が一致している。

3.4 pH成因モデルによる pH_0 、 ΔpH の評価

図2のように、前項で解析した4降水は1降水平均の nssSO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 NH_4^+ 及び nssCa^{2+} 濃度が降水量と関係しており、(2)式は成立していた。また、図3の非海塩成分間のイオンバランスは概ね良好であり、(3)式は成立しているとみなせる。

そこで、表2の D_0 、 a の値を用い、全県一斉酸性雨調査全地点について、その降水量からpH成因モデルによる pH_0 及び ΔpH を求めた。図4は各降水ごとに pH_0 を pH と比較したものである。表2で各成分の減衰係数が大きかった平成9年度1回目の pH_0 は3.5~5.0に分布しているが、これ以外は4.0~5.0であり、 pH_0 の変動範囲は小さい。実際の pH は pH_0 との対応はみられず、降水量から期待される pH_0 よりも高い場合が多い。これに対し、図5に示した ΔpH と pH の関係は、両者により対応がみられる。図4と見比べると、 pH_0 は pH を説明しておらず、 pH は ΔpH に関係していることがわかる。図6には ΔH^+ の地域分布を示した。降水時の状況によって形状は変わるが、 ΔH^+ の分布には地域性がある。

4. 考察

4.1 ΔpH の特性

図7は各測定地点の ΔpH と $r\text{H}$ を比較したものである。4降水とも両者の関係はよい。 $r\text{H}$ は陽イオン中の H^+ の割合を pH 、 EC から推計するもので中和度の指標となる。

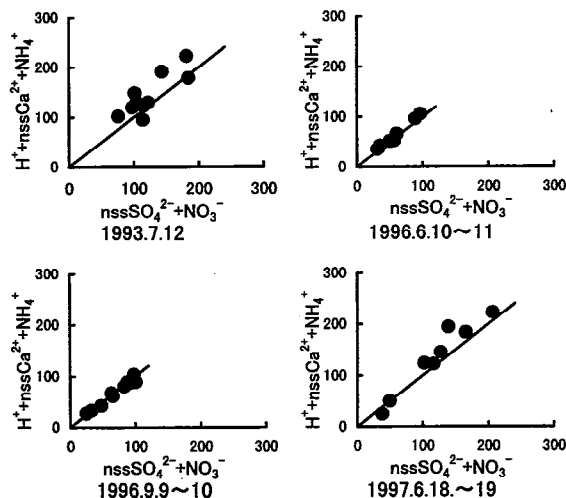


図3 非海塩成分イオンバランス ($\mu\text{eq/l}$)

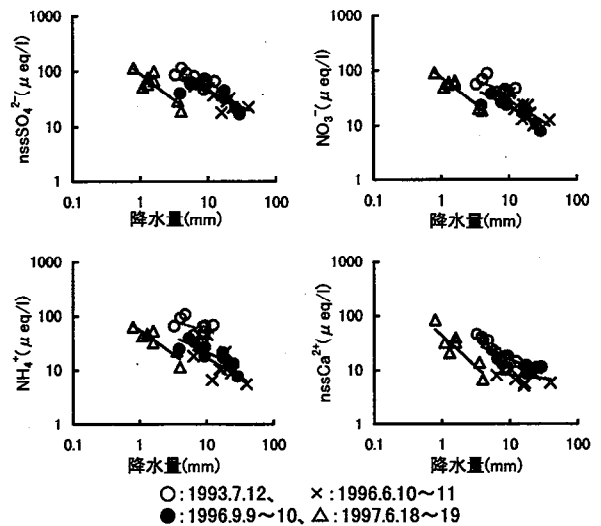


図2 地点間のイオン成分濃度と降水量の関係

表2 水平分布上の減衰係数 a と初期濃度 D_0

調査年月日	nss-SO_4^{2-}		NO_3^-		NH_4^+		nss-Ca^{2+}	
	D_0	a	D_0	a	D_0	a	D_0	a
1993.7.12	176	0.45	123	0.51	122	0.35	151	1.02
1996.6.10~11	148	0.54	162	0.76	90	0.72	11	0.13
1996.9.9~10	152	0.53	98	0.65	84	0.58	55	0.54
1997.6.18~19	93	0.96	77	0.97	57	0.91	45	1.18
1997.9.16	26	0.38	35	0.61	52	1.14	49	1.31
1998.6.9~11	43	0.29	31	0.41	212	0.87	121	1.27

図7の関係は、中和が進んで $r\text{H}$ が小さいほど ΔpH は正に大きく、実際の pH は pH_0 よりも高くなることを示している。 $r\text{H}$ が ΔpH の変化をほぼ説明していることから、 ΔpH には中和の影響による pH 高化が現れている。

降水中の pH が、地上付近の汚染、特に Ca^{2+} の影響によって高化することに関しては、その現象を工藤ら¹²⁾、加藤ら¹³⁾ が報告しており、加藤ら¹⁴⁾、川上¹⁵⁾ は地上付近の粒子状物質が pH を高化させる要因になっていること

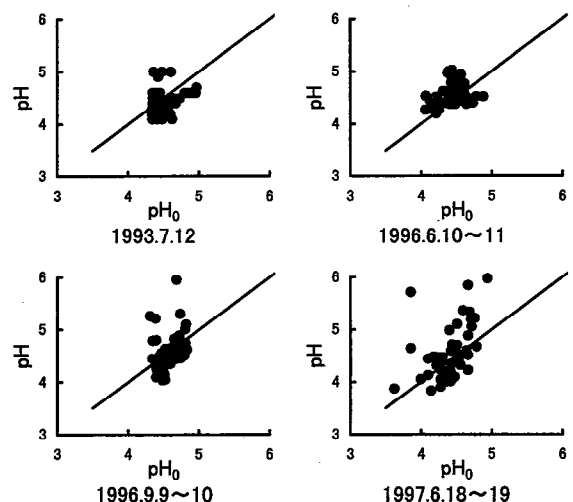


図4 pH_0 と pH の比較

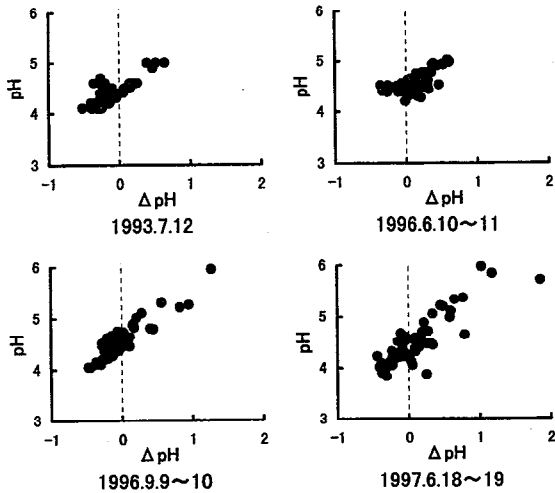


図5 ΔpHとpHの比較

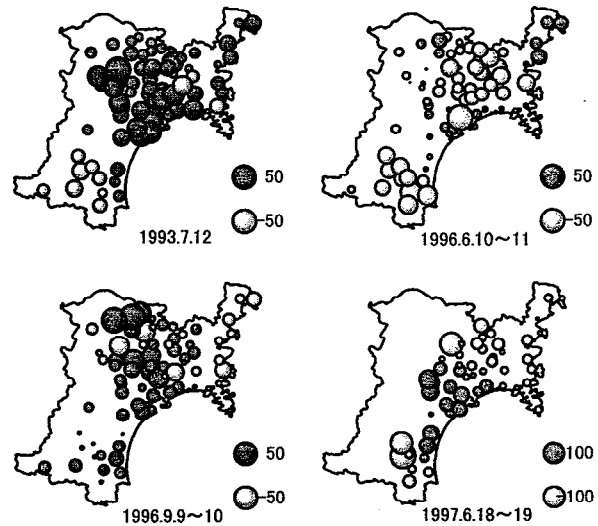


図6 ΔH⁺分布 (μeq/l)

を示している。また、鶴田ら¹⁰⁾は雲底部と地上の雨水を実際に採取し、雨滴が地上に落下するまでの間に中和成分を取り込んでpHを高めることを実証している。したがって、ΔpHに現れるpH変動は、これらで報告されるような地表付近のwashoutによる中和効果を反映していると考えられる。

なお、図7でΔpHが負の部分については、降水量から想定されるpH₀よりも実際のpHは更に低下し、図6の分布図では、県内で大気汚染物質の排出負荷が大きい仙台平野部でΔH⁺が正になりやすいことから、一つには局所的な酸性化の影響が考えられる。ただし、本報告では(2)式に適用した初期濃度D₀と減衰係数aを、降水量とイオン成分濃度との関係から最小自乗法で求めており、物理化学的な手続きはとっていない。図7のΔpH=0は、中心からの偏差を最小とする統計処理上の意味しかないので、ΔpHに関する酸性化の主張にはもっと厳密な議論が必要であろう。

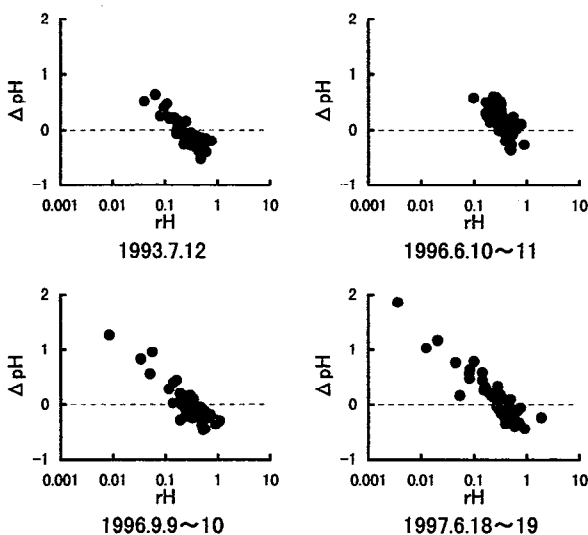


図7 ΔpHとrHの比較

4.2 pHの水平分布構造

pH₀はイオン成分濃度の降水量に応じた地域変化だけで決まるpHである。ΔpHは中和によって高化するpH変動と解釈でき地域性を形づくっていた。このことから、第一義的には、pH水平分布は降水量に対応して形成される分布を基本として、これに地域的な中和の影響が重なる構造をしているのがわかる。

更に推測を進めれば、仮説として、pH₀は主にrainoutに関連し、ΔpHは主にwashoutに関連することが考えられた。即ち、(2)式のパラメータとして求めたD₀、aには、対象地域全体の降水量変化に対するイオン成分濃度変化分のすべてが反応し、rainoutとwashoutを区別していないが、①現象スケール的には、pH₀は県域全体の変動を統一的に記述し、ΔpHには地域性がみられること、②前項で検討したように、washoutの影響は主にΔpHに現れると考えられたため、pHからΔpHを除いたpH₀にはrainoutを反映したものが残ると思われること、③更には、鶴田ら¹⁰⁾が報告したように、雨水の酸性化が主に雲の中で行われ、また、雲底部における雲水中のイオン成分濃度が、降水開始前後に高く、降水期間中は低くなり、降水終了後に再び高くなる変化をしていたことの類推として、雲の中の雨水濃度も雲水と同様の変化をするのであれば、pH₀の基礎となるイオン成分濃度の降水量依存性はrainoutに帰着できるであろうと思われるからである。

ところで、pH₀はpHを説明しておらず、pHはΔpHに関係していた。つまり、降水中pHは、主に地上付近での中和作用が強く影響するため、pH₀を支配する大気汚染の降水酸性化能力に関しては、直接的な意味をほとんど持っていないことになる。図4においては、pH₀はすべて5.0以下であり、最小値は3.5程度のものがあつた。この4例だけを見ても、現在の汚染状態は、少なくともpH3.5程度の酸性化能力を保有していると理解される。

4.3 D_0 と a

表2で求めた各降水の初期濃度 D_0 と減衰係数 a の関係を図8に示した。各成分の a は D_0 と関係しているようである。その関係は中和の影響が小さい場合(●印)と大きい場合(○印)で様相が異なる。中和の影響が小さいときは nssSO_4^{2-} 、 NO_3^- 及び NH_4^+ の a は、 D_0 が大きいほど小さい傾向、即ち初期濃度が高ければ容易に除去されない傾向がみられる。これに対して、中和の影響が大きいときは、図8の例では酸性化成分の D_0 は小さく支配的でないが、 NH_4^+ は a が大きい。 nssCa^{2+} の場合は、前述した降水量が多いときに a が小さかった例(×印)を除けば、○印と●印はあまり区別されず、中和の影響が大きいときの NH_4^+ と同じような状況にみえる。

例数が少ないので多くは語れないが、 a の値はイオン成分間差のような物性に基づくもののほか、 D_0 にも関係し、その関係はrainoutとwashoutでも異なることが示唆された。

5. まとめ

- (1) 全県一斉酸性雨調査結果により地域的な降水特性を検討したところ、中和の影響が小さく海塩成分が少量である降水の場合は、水平分布上でも降水量の増加に伴って nssSO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 NH_4^+ 及び nssCa^{2+} 濃度が指数的に減少する傾向がみられた。
- (2) イオン成分濃度の減衰係数 a は、中和の影響が小さいときの nssSO_4^{2-} 、 NO_3^- 及び NH_4^+ については、初期濃度 D_0 が大きいほど小さい傾向がみられ、物性に基づくもののほか、 D_0 にも関係することが示唆された。
- (3) 中和の影響が小さく海塩成分が少量である降水のpH水平分布は、イオン成分濃度の降水量に応じた地域変化だけで決まるpH₀分布を基本として、これに地上付近のwashoutによる中和の影響が重なる構造をしており、仮説として、前者は主にrainoutに関連することが考えられた。
- (4) pHは、地上付近での中和作用が強く影響するため、pH₀を支配する大気汚染の降水酸性化能力に関しては、直接的な意味をほとんど持っていないことがわかった。

参考文献

- 1) 村田雄二、古谷登志、辻潔、吉川邦夫：第38回大気環境学会年会講演要旨集、275(1997)
- 2) 松本光弘、坂野龍光：大気汚染学会誌、20、1、12~22 (1985)
- 3) 渡辺善徳、草野一、鶴田治雄：横浜市公害研究所報、9、51~57 (1984)

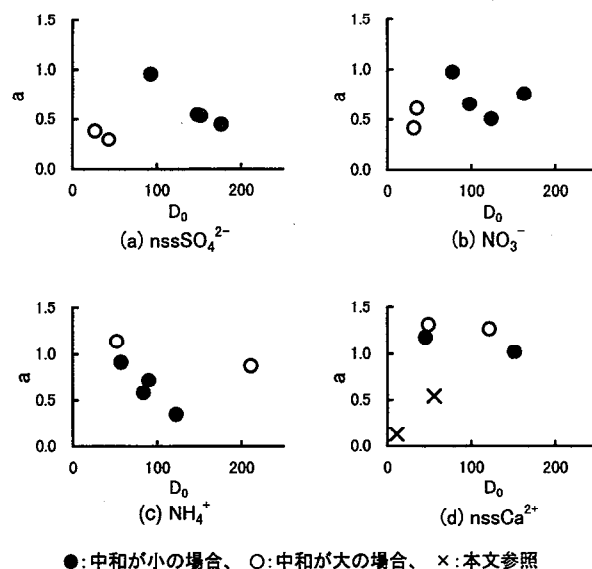


図8 初期濃度 D_0 と減衰係数 a の関係

- 4) 箕浦宏明、小木曾毅：第33回大気汚染学会講演要旨集、531 (1992)
- 5) 全国公害研協議会第2次酸性雨全国調査報告書(平成9年度)：全国公害研会誌、23、4、2~46(1998)
- 6) 福崎紀夫、大泉毅：第33回大気汚染学会講演要旨集、522 (1992)
- 7) 仁平明、榎野光永、中村栄一、佐久間隆、木戸一博、須藤幸蔵：宮城県保健環境センター年報、16、68~75 (1998)
- 8) 宮城県環境生活部：宮城県公害資料〔大気編〕、平成5年度~平成9年度分
- 9) 加藤善徳、矢本てるみ、草野一：横浜市環境科学研究所酸性雨に関する調査研究報告書、63~66(1993)
- 10) 酸性雨対策検討会大気分科会：酸性雨対策調査報告書 (1990)
- 11) 百川和子、加賀谷秀樹、宮崎栄一郎：宮城県保健環境センター年報、10、73~81 (1992) など
- 12) 工藤隆治、工藤精一、関野正義：第36回大気環境学会年会講演要旨集、274 (1995)
- 13) 加藤善徳、矢本てるみ、草野一：横浜市環境科学研究所酸性雨に関する調査研究報告書、51~62(1993)
- 14) 加藤善徳、草野一、鶴田治雄：横浜市環境科学研究所酸性雨に関する調査研究報告書、101~107(1993)
- 15) 川上智規：第39回大気環境学会年会講演要旨集、315 (1998)
- 16) 鶴田治雄、草野一、渡辺善徳、人田正雄、平野耕一郎：横浜市公害研究所報、14、27~35 (1990)

騒音と大気汚染物質との関係に関する調査研究(1)

Research regarding the relation between noise and air pollutant(1)

野村 保 榎野 光永*¹ 中村 栄一
 仁平 明 星川 大介*² 百川 滉
 沢田 和夫

Tamotsu NOMURA, Mitsunaga KAYANO, Eiichi NAKAMURA
 Akira NIDAIRA, Daisuke HOSHIKAWA, Hiroshi MOMOKAWA
 Kazou SAWADA

キーワード： L_{Aeq} 、大気環境測定車、 NO_x 、プルーム・パフモデル

Key word： L_{Aeq} ， Atmosphere environment measurement car， NO_x ， Plume・puff-model

交通公害を多角的に把握するため、大気環境測定車による道路近傍における大気汚染測定に併せて騒音測定を実施し、交通量と NO_x 及び騒音の関係について解析した。この結果、交通量と L_{Aeq} とのシュミレーションをもとに、 L_{Aeq} 実測値から交通量を推計することは手ごろで有効な手法であること、また、この推計交通量を活用してプルーム・パフモデルにより計算した NO_x 濃度はフィールドにおける NO_x の現況を良く再現していることが確認できた。交通量、騒音、大気汚染物質の関係を解析することは、交通公害の解決策を考えていく上でも重要なことであり、調査研究の第1報を報告する。

1. はじめに

道路近傍における大気汚染物質濃度は発生源である交通量に比例するものであるが、風向風速や大気安定度が変化するフィールドでの関係についてはまだ分からないところが多い。この解析には交通量の測定は不可欠であるものの、交通量1時間値を長期にわたり連続的に測定するには人的要件を含め困難を伴うものである。

大気汚染とならぶ交通公害の一つである騒音は、風や大気安定度に対して大気汚染物質のように鋭敏ではなく交通量と密接に関係していると考えられる。このことから、交通量の代替手段として騒音レベルを使用することを検討するとともに、騒音レベルから推定した交通量を用いて大気汚染物質の変化をシュミレートしたところ、比較的現況を再現する結果が得られた。

騒音と大気汚染物質を同時に解析することは、自動車公害の解決策を考えていく上でも重要なことであり、その結果を報告する。

2. 調査方法等

2.1 調査期間

平成10年5月8日～5月22日

2.2 調査地点

宮城県仙台東土木事務所（多賀城市・国道45号線沿道）

(図1)

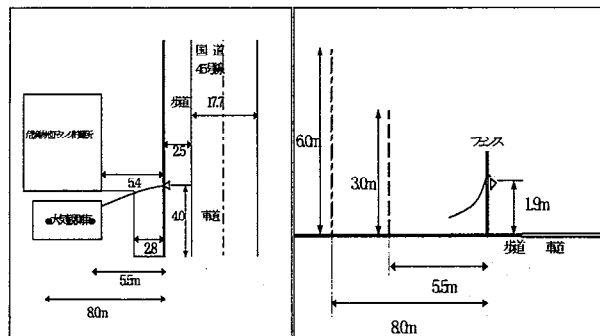


図1 調査地点

図2 サンプル位置

2.3 調査方法

・大気汚染物質測定

測定車による大気汚染物質（サンプリング高3.0m）及び気象項目の測定、サンプリング高さを6.0m及び1.9mに設定した NO_x 濃度（図2）

・騒音測定

測定項目： L_{50} 、 L_{Aeq}

サンプリング個数 1,000個

サンプリング間隔 2.5秒

タイムインターバル 1時間

・交通量調査

平成10年5月13日～5月14日

正時から10分間の交通量

*1 現 生活衛生課 *2 現 仙南保健所

2.4 L_{Aeq}と交通量

交通量Nは、日本音響学会道路交通騒音調査研究委員会の「道路交通騒音の予測モデル“ASJ Model 1998”」 $L_{Aeq} = LAE + 10 \cdot \log N - 35.6$ に実測値 L_{Aeq} を代入して求める。なお、大型小型車の比は、上記交通量調査結果の比を用いる。この式において

$LAE = 10 \cdot \log_{10}(1 / T_0) \cdot \sum 10^{(LPAi / 10 \cdot \Delta ti)}$ である。

2.5 拡散式

拡散式は環境影響評価法及び環境影響評価条例で標準手法として定められているプルーム・パフモデルを使用することとし、計算は、「建設省所管道路事業環境影響評価技術指針」及び「道路環境整備マニュアル」に基づく市販のソフトを使用する。

なお、このモデルは、次の式になっている。

(プルームモデル)

拡散物質の濃度C=

$$(Q / 2\pi \cdot \sigma_y \cdot \sigma_z \cdot U) \cdot \exp(-y^2 / 2\sigma_y^2) \cdot \exp(-(z-H)^2 / 2\sigma_z^2) + \exp(-(z+H)^2 / 2\sigma_z^2)$$

ここで、 $\sigma_z = 1.5 + 0.3 \cdot L^{0.83}$ $\sigma_y = w / 2 + 0.46 \cdot L^{0.81}$

Lは距離、wは道路幅員

(パフモデル)

拡散物質の濃度C=

$$(Q / (2\pi)^{3/2} \cdot \gamma) \cdot \{1 / (CR^2 + \alpha^2 / \gamma^2 \cdot (z-H)^2) + 1 / (CR^2 + \alpha^2 / \gamma^2 \cdot (z+H)^2)\}$$

ここで、 $R^2 = x^2 + y^2$ 、 α 、 γ は定数

3. 結果及び考察

3.1 フィールドでのNOxの変化。

- NOxの濃度を高さを変えて3点(高さ1.9、3.0、6.0m)で測定したが、低い位置の道路に近い歩道脇のフェンスで測定したものが一番高い濃度を示した。期間中の1時間値平均は、測定位置の高い順に、NOx(U) 35ppb、NOx(C) 43ppb、NOx(L) 111ppbであった。
- 低い位置のデータと比較し、6mの位置が32%、3mの位置が39%であり、6mの「高さ」と約10mの道路からの距離での減衰がかなり大きい。
- 3地点での最低値、最高値はそれぞれ、NOx(U) 0~133ppb、NOx(C) 1~137ppb、NOx(L) 9~314ppbであった。
- NOx(C)は塩釜自排局と、NOx(L)は名取自排局と同程度の濃度である。
- 濃度を決定する大きな要因であると考えられる風向・風速との関係では、2m/s以下の風速の場合は、風向と濃度の明確な関係は見られない。また、2m/s以下、2m/s以上3m/s以下、3m/s以上の階級で風速と濃度の関係では、濃度は風速に反比例している。
- 降雨との関係では、大量の降雨のときは測定値は低い

ものの、少量の降雨では、反対に濃度を高めている。

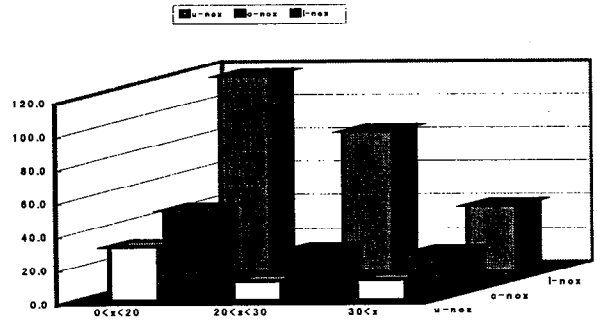


図3 風速階級別NOx濃度

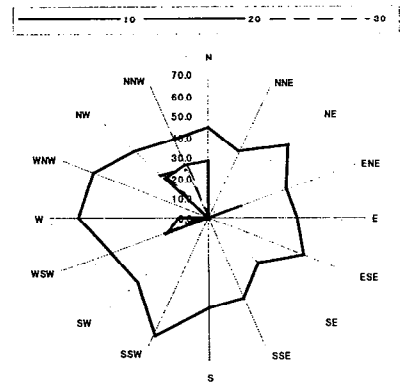


図4 風向風速別NOx濃度

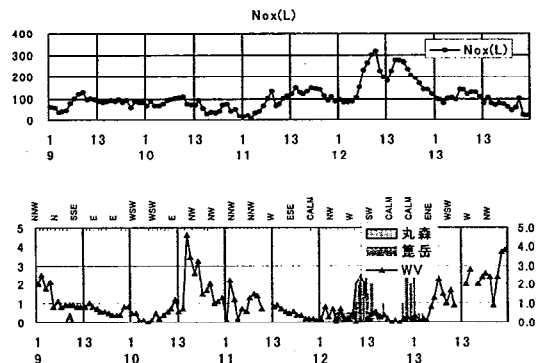


図5 雨とNOx濃度との1例

3.2 騒音調査結果

- 期間中の騒音の1時間平均値は、時間区分毎にL₅₀が朝71.4dB、昼間73.3dB、夕72.8dB、夜間64.4dB、L_{Aeq}が朝74.9dB、昼間75.1dB、夕75.1dB、夜間71.6dBであった。交通量調査は、時間帯別に正時から10分間の通行量は、朝(6~7時)259台、昼間(12~16.8~11時)341台、夕(19~21時)319台、夜間(22~23時)188台であった。大型車の混入率は、3.8~16.5%で朝及び昼間が多かった。
- 3箇所のNOxデータ及び騒音との相関係数は、L₅₀が0.27~0.45、L_{Aeq}が0.36~0.55であり、どちらもNOx(L)との相関係数が高かった。これらについて13日間(5

／9～5／21)の相関を確認したところ、0.8以上の相関を示したのはL₅₀で1日(8%)、L_{Aeq}で2日(15%)、0.6～0.8の相関を示したのはL₅₀及びL_{Aeq}で3日(23%)であった。0.8以上の相関を示した2日間は、平均風速が0.3m/s以下で日射量が少なく、通交車両が多い時間帯において大気が安定し、拡散しにくい状態であった。

3.3 L_{Aeq}の変化、L₅₀の変化と交通量との関係

- ・L₅₀の実測値と計算値及びL_{Aeq}の実測値と計算値のそれぞれの相関係数を求めると、L₅₀の場合がR=0.903、L_{Aeq}がR=0.821でありL₅₀のほうが高かった。(図6、8)しかし、それぞれの理論式を当てはめてみると、L_{Aeq}のほうが実測値と理論式とがよく合っていることが分かる。(図7、9) L_{Aeq}の場合は、5/14の7時のデータが相関を落としており、L₅₀では5/13の23時の低いデータが相関を高めていると推測される。
- ・このことから、騒音から交通量を算出するにはL_{Aeq}の理論式を用いることとした。交通量は2.4の式から計算し、大型車、小型車の混入率は、実測時における比率を用いた。

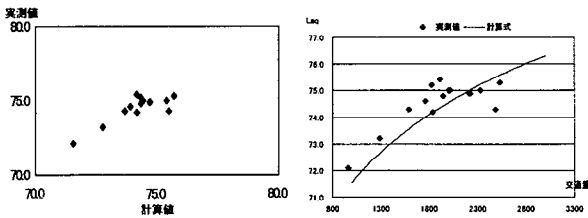


図6 L_{Aeq}計算値と実測値 図7 L_{Aeq}理論値と実測値

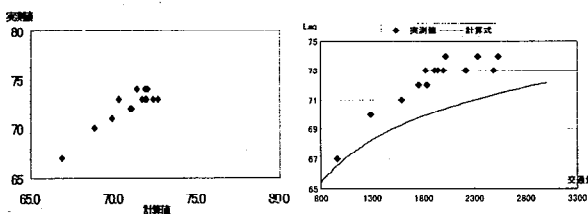


図8 L₅₀計算値と実測値 図9 L₅₀理論値と実測値

3.4 NOxの拡散と現況との比較

- ・道路交通量調査による交通量のデータと名取局の風向風速のデータを用いて拡散計算を実施し名取自排局及び名取局のNO_x実測値との比較を行った。日平均値では比較的一致(R=0.986、n=8)しているが、時間値では、現況とのずれが見られる(R=0.721、n=192)。(図10、11)
- ・このような限界のもとで、L_{Aeq}から計算した交通量を使用しての拡散計算結果と現況との比較を試みた。

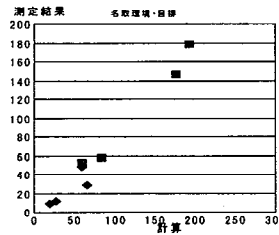


図10 日平均値

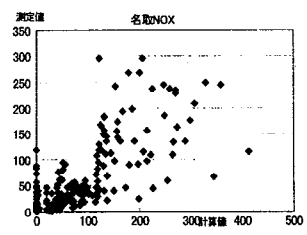


図11 時間値

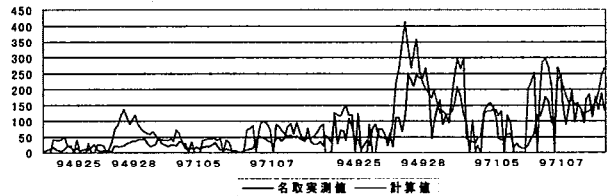


図12 名取局及び名取自排局の計算値と実測値

3.5 L_{Aeq}から計算した交通量を使用しての拡散計算結果と現況

- ・L_{Aeq}からの計算交通量を使用した拡散計算値と実測値との比較では、上記3.4の結果同様、日平均値では比較的高い相関(R=0.911、n=39)を示している。
- ・時間値での相関はR=0.569(n=914)と低くなるが、NO_x(L)、NO_x(C)、NO_x(U)のいずれにおいても実測値の変化を良く捉えている。
- ・計算値と実測値を時系列のグラフで展開してみると(図15、16、17) NO_x(L)は計算値が実測値よりも低く、特に夜間が著しい。これは、使用した拡散式で考えているほど夜間には拡散が起こっていないと考えられる。なお、風が吹いている夜間では良い一致を見せている。
- ・NO_x(C)、NO_x(U)では計算値が実測値を上回っている。差が著しいのは日中であり、実測値の低い濃度のときに差が大きい。反対に、日中の濃度が高いときと夜間には比較的一致している。
- ・NO_x(C)、NO_x(U)で差が特に著しいのは9、11、14、17日である。これらの日は、近くの環境局多賀城II局と移動車の風向風速が異なる日であり、多賀城II局の風向風速を使用して再計算すると、実測値に近くなる。多賀城II局と移動車の風向風速を比較すると、移動車では南成分の風が非常に少なく、風速が弱くなっている。これらのことから、移動車では、南側に位置した土木事務所の建物の影響が現れているものと推察され、計算値と実測値の乖離を引き起こしている原因と考えられる。
- ・これらのことを考察すると、L_{Aeq}から交通量を求める手法も有効な手法である。また、プルーム・パフモデルは、道路近傍のNO_x濃度変化を比較的良好に捉えており、特に風向風速を平均的な形で捉える長期平均濃度を表現するには適しているといえる。

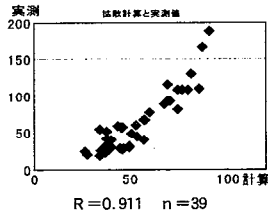


図13 日平均値相関図

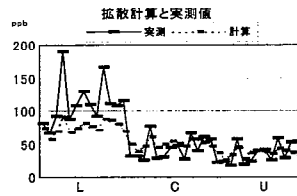


図14 計算値と実測値

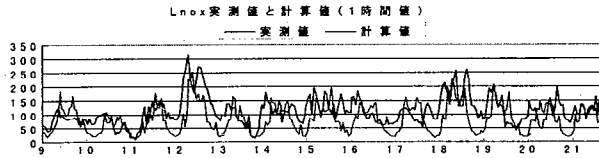


図15 NOx(L) 計算値と実測値(時間値)

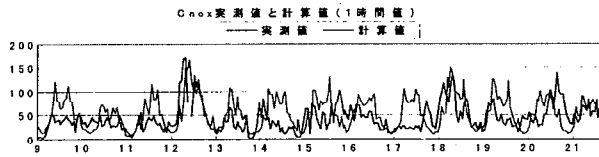


図16 NOx(C) 計算値と実測値(時間値)

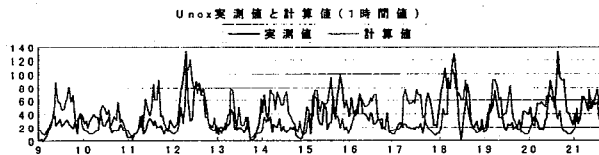


図17 NOx(U) 計算値と実測値(時間値)

4. まとめ

- ・長期間にわたる交通量を実測するには経費が高むが、理論の確立している L_{Aeq} と交通量の関係式から、交通量を推測するには、最も一般的な手法と考える。
- ・拡散式により発生源とフィールドを関係づけることができる。このことは、NOxのフィールドにおける状況を説明する手段として、また、発生源対策を検討する手段として有効である。
- ・今後、 L_{Aeq} と交通量との関係をさらに詳細に検討していくとともに、種々考えられている拡散式を検討し解析することも必要である。

国立環境研究所との内分泌攪乱化学物質の影響に関する共同研究 — 宮城県におけるイボニシのインポセックスを中心に —

Joint research on effects of endocrine disrupting chemicals
with National Institute for Environmental Studies
— Mainly studies on imposex in the rock shell, *Thais clavigera*
in Miyagi prefecture —

佐久間 隆 鈴木 滋 木戸 一博
小野 研一 沢田 和夫

Takashi SAKUMA, Shigeru SUZUKI, Kazuhiro KIDO,
Ken-ichi ONO, Kazuo SAWADA

キーワード：インポセックス、イボニシ、有機スズ

Key words : imposex, *Thais clavigera*, Organotins

宮城県内沿岸域4地点について、海産巻貝類の一種イボニシのインポセックス調査を実施した。その結果、インポセックスの出現率は100%であり、いずれの地点においても輸卵管末端開口部が閉塞している産卵不能個体が観察された。また、同じ湾内におけるインポセックス症状と海水のトリブチルスズ濃度との関連が推察でき、イボニシのインポセックスがトリブチルスズの生物指標として有用であることが確認できた。

1. はじめに

近年外因性内分泌攪乱化学物質による人への健康影響や野生生物への生態影響等が指摘され、全地球的規模で新たな環境問題を引き起こすことが懸念されている。これらの化学物質による生態影響の事例のうち、原因と化学物質との因果関係が証明された実例として巻貝類のインポセックス（メスの巻貝類にオスの生殖器官が形成されて発達する現象及びその個体）があり、この現象は船底防汚塗料や漁網防汚剤として使用されたきた一部の有機スズ化合物により引き起こされることが知られている¹⁾。

宮城県ではこれまで平成7年度～9年度保健環境センタープロジェクト調査研究等により有機スズ化合物の環境中濃度測定を実施してきたが、生態影響に関する調査も必要であるという認識に基づき、平成10年度同プロジェクト調査研究及び平成10年度国立環境研究所との共同研究の一環として、国立環境研究所において約一ヶ月間海産巻貝類のインポセックス調査手法習得等の技術研修を受けるとともに、宮城県内で採集した海産巻貝類のインポセックス実態調査を行ったので報告する。

2. 材料および方法

平成10年6月10日～11日、牡鹿町2地点及び志津川町2地点の計4地点において海産巻貝類の一種であるイボ

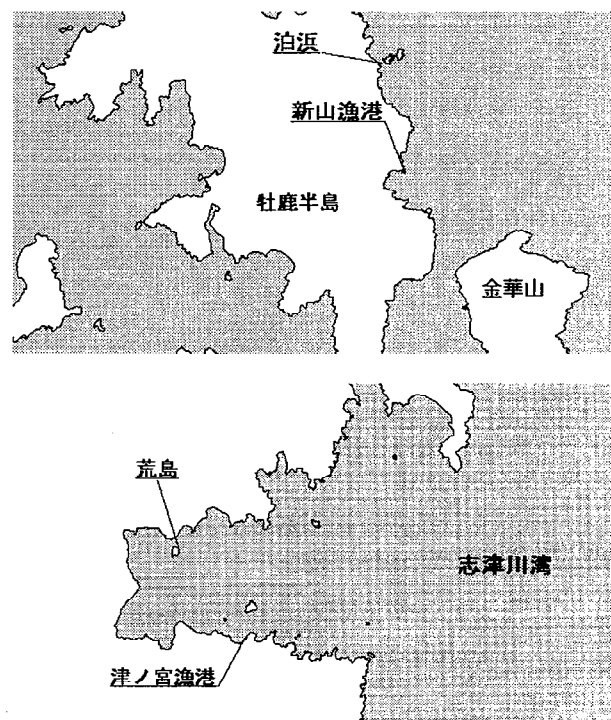


図1 採集地点

ニシを採集し材料とした（図1）。イボニシは殻高、殻径、体重を計測し軟体部を殻から取り出した後、雌性生

殖器官（輸卵管）及び外部生殖器官（ペニス及び輸精管）を観察し、雌雄の識別及びインポセックスの判定を行った。インポセックスの判定は雌性生殖器官を有しながら雄性生殖器官が存在する個体をインポセックスとした。また、ペニス長の計測とRPL Index (%)の算出及び輸卵管末端開口部の閉塞状況等の確認を行った。

国立環境研究所の堀口らはインポセックスの症状をイボニシの殻高、ペニス長、輸卵管末端開口部の閉塞状況及び変質卵囊塊の有無から、Ⅰ（ペニスの長さが殻高の4分の1未満である個体）、Ⅱ（ペニスの長さが殻高の4分の1以上である個体）、Ⅲ（ⅠまたはⅡのうち輸卵管末端開口部が閉塞している個体）、Ⅳ（Ⅰ、Ⅱ及びⅢにかかわらず変質卵囊塊を有している個体）の4つのgradeに分け評価し、ⅠからⅣにすすむほど症状が重いとしているが、この評価法に従ってインポセックスと判定した個体の症状について評価を行った。

3. 結果および考察

各調査地点におけるインポセックスの出現率を表1に示した。堀口ら²⁾の全国実態調査ではインポセックスの出現率はほぼ100%であり、正常な雌を見出すことは困難であったとしているが、同じように今回採集したイボニシのインポセックスの出現率は100%であり、いずれの調査地点においても正常な雌を見出すことはできなかった。

インポセックスの奇形の度合いを比較するため各調査地点のRPL Index(= $\frac{\text{雌の平均ペニス長}}{\text{雄の平均ペニス長}}$) $\times 100$)値を表2に示した。志津川湾荒島が

51.8と最も高く、次いで同湾津ノ宮漁港が32.1、牡鹿町新山漁港30.4、同泊浜が12.0であった。志津川湾内においては、湾岸奥に位置する荒島のRPL Index値が湾岸中央に位置する津ノ宮漁港より高く、荒島ではイボニシの生息密度が低く年齢の若い小型個体はほとんど採集されなかった。また、インポセックスの症状はトリブチルスズ汚染の程度と正相関することが知られているが¹⁾、当センター水質部が平成9年2月に同湾内で実施した水質調査³⁾では湾奥部ほどトリブチルスズ濃度が高い結果となっており、今回のわれわれの調査からもRPL Index値とトリブチルスズ濃度との関連が推察できた。

インポセックスの症状を4つのgradeで評価した結果を表3に示した。いずれの調査地点においても、gradeⅢの輸卵管末端開口部が閉塞している産卵不能個体が観察され、津ノ宮漁港ではインポセックス47個体中36個体(76.6%)が開口部閉塞であり、その中で変質した卵囊塊を有するgradeⅣが5個体見られた。泊浜はgradeⅠが77.3%と各調査地点の中では症状が軽く、RPL Index値(12.0)からも周辺海域の有機スズ化合物汚染の度合いが最も低いと考えられるが、変質卵囊塊を有するgradeⅣも1個体見られ海域の汚染度合いにかかわらず症状が重い個体が発見することがわかった。

イボニシの殻高サイズ別にRPL Index (%)とgradeⅢ・Ⅳの割合を表4に示した。比較的採集数が多い津ノ宮漁港では、殻高サイズ27.5mm~30.0mmのRPL Index値(45.9)が高かった。また、新山漁港及び泊浜では殻高サイズが大きくなるとともにgradeⅢ・Ⅳの割合が高くなる傾向が見られた。

表1 各調査地点における imposex の出現率

採集地点	調査総数	♂数	♀数	imposex数	出現率(%)
志津川湾津ノ宮漁港	83	36	47	47	100
志津川湾荒島	6	4	2	2	100
牡鹿町新山漁港	21	8	13	13	100
牡鹿町泊浜	41	19	22	22	100

表2 各調査地点における RPL Index (%)

採集地点	♀平均ペニス長(mm)	♂平均ペニス長(mm)	RPL Index (%)
志津川湾津ノ宮漁港	6.7	20.8	32.1
志津川湾荒島	9.0	17.4	51.8
牡鹿町新山漁港	6.2	20.5	30.4
牡鹿町泊浜	2.4	19.8	12.0

表3 各調査地点における imposex grade Ⅰ~Ⅳの構成

採集地点	imposex数	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	判定不能(%)
志津川湾津ノ宮漁港	47	8(17.0)	2(4.3)	31(66.0)	5(10.6)	1(2.1)
志津川湾荒島	2	—	1(50.0)	1(50.0)	—	—
牡鹿町新山漁港	13	5(38.5)	—	8(61.5)	—	—
牡鹿町泊浜	22	17(77.3)	—	4(18.2)	1(4.5)	—

表4 各調査地点の殻高サイズ別 RPL Index (%) とgrade III & IV (%)

志津川湾津ノ宮漁港 (♂: n=36, ♀: n=47)

殻高 (mm)	20.0 ~22.5	22.5 ~25.0	25.0 ~27.5	27.5 ~30.0	30.0 ~32.5	32.5 ~35.0	35.0 ~37.5	37.5 ~38.0	全体
♂ ペニス長 (mm)	19.0	17.4	20.4	20.7	20.7	23.6	22.3	—	20.8
♀ ペニス長 (mm)	5.0	5.9	5.5	9.5	6.7	6.9	7.4	10.0	6.7
RPL Index (%)	26.3	33.7	27.0	45.9	32.3	29.2	33.2	—	32.1
grade III & IV (%)	100.0	75.0	50.0	100.0	67.0	100.0	73.0	100.0	77.0

志津川湾荒島 (♂: n=4, ♀: n=2)

殻高 (mm)	20.0 ~22.5	22.5 ~25.0	25.0 ~27.5	27.5 ~30.0	30.0 ~32.5	32.5 ~35.0	35.0 ~37.5	37.5 ~38.0	全体
♂ ペニス長 (mm)	—	—	19.0	14.8	21.0	—	—	—	17.4
♀ ペニス長 (mm)	—	—	8.0	—	—	10.0	—	—	9.0
RPL Index (%)	—	—	42.1	—	—	—	—	—	51.8
grade III & IV (%)	—	—	0.0	—	—	100.0	—	—	50.0

牡鹿町新山漁港 (♂: n=8, ♀: n=13)

殻高 (mm)	20.0 ~22.5	22.5 ~25.0	25.0 ~27.5	27.5 ~30.0	30.0 ~32.5	32.5 ~35.0	35.0 ~37.5	37.5 ~38.0	全体
♂ ペニス長 (mm)	16.5	—	18.7	22.0	—	—	25.0	—	20.5
♀ ペニス長 (mm)	3.5	5.5	—	7.2	6.3	—	11.0	—	6.2
RPL Index (%)	21.2	—	—	32.6	—	—	44.0	—	30.4
grade III & IV (%)	0.0	33.3	—	100.0	50.0	—	100.0	—	62.0

牡鹿町泊浜 (♂: n=19, ♀: n=22)

殻高 (mm)	20.0 ~22.5	22.5 ~25.0	25.0 ~27.5	27.5 ~30.0	30.0 ~32.5	32.5 ~35.0	35.0 ~37.5	37.5 ~38.0	全体
♂ ペニス長 (mm)	15.0	17.4	21.0	21.8	25.7	—	—	21.0	19.8
♀ ペニス長 (mm)	1.5	1.7	2.0	1.8	2.3	3.0	3.0	—	2.4
RPL Index (%)	10.0	9.6	9.5	8.3	9.1	—	—	—	12.0
grade III & IV (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	17.0	33.0	100.0	—	23.0

4. まとめ

今回の調査では、イボニシのインボセックスがすべての地点で観察され、その出現率は100%であった。インボセックス実態調査と平成7年度~9年度保健環境センタープロジェクト研究の水質調査結果との関連を解析したところ、志津川湾内でのトリブチルスズ濃度とインボセックス症状との関連を確認することができた。イボニシのインボセックスがトリブチルスズ汚染の生物指標となることを生かし、今後も宮城県沿岸域のモニタリング調査を行うことにより、有機スズ化合物汚染の動向を把握できると考える。

5. 謝辞

共同研究者として御指導いただいた国立環境研究所堀口敏宏主任研究員に深く感謝いたします。また海産巻貝

類の生態等についてご助言をいただいた宮城県気仙沼水産試験場白石一成研究員に感謝いたします。

参考文献

- 堀口敏宏：“第5章巻貝のメスがオスに性転換”『よくわかる環境ホルモン学』、環境新聞社、p 99-125、1998
- 堀口敏宏ら：第6回環境化学討論会予稿集、p 29-30、1997
- 渡部正弘他：宮城県保健環境センター年報、15、145、(1997)

地下水中等の揮発性有機化合物多成分一斉分析法の検討

Studies on Simultaneous Determination Method of Volatile Organic Compounds in Groundwater et al

中村 朋之 阿部 公恵 吾妻 正道
渡部 正弘 八木 純

Tomoyuki NAKAMURA, Kimie ABE, Masamichi AZUMA
Masahiro WATANABE, Atsushi YAGI

キーワード：揮発性有機化合物、多成分一斉分析法、地下水、ヘッドスペース-GC/MS

Key Words : Volatile organic compounds, Simultaneous determination method
Groundwater, Headspace-GC/MS

ジクロロメタン、トリクロロエチレン等に代表される揮発性有機化合物 (VOC) は、水道水質基準の改正、及び水質環境基準等の改正により現在23種が規制対象とされている。しかしながらこれら規制物質以外にも多数の未規制物質が水環境中に含有されていると推測される。そこでVOCの54化合物を対象として分析条件を検討し、併せて地下水等の環境水についてスクリーニングを行ったので報告する。

1. はじめに

VOCは地下水汚染に代表されるように水環境を汚染し、化合物の持つ毒性から、健康影響が懸念されている。平成9年3月に地下水に係る環境基準が設定され、VOCは要監視項目と併せ17化合物について基準値及び指針値が設定された。しかしながら、これら17物質以外にも、多数の未規制物質が水環境中には含有されていると推測される。

水中のVOC分析法の公定法としては、パージ&トラップGC/MS法、ヘッドスペースGC/MS法(以下HS-GC/MSと略す)等が採用されている。このうち、HS-GC/MS法は分析操作も比較的簡易で、分析中のコンタミネーションも受けにくいといった利点があり、当センターにおいても、環境水測定用として平成5年度に導入している。そこで今回従来の条件等を見直し、分析条件等の検討を行い、54化合物を対象として宮城県内の地下水等におけるスクリーニングを実施した。

今回、これら検討した分析条件の検討結果並びにスクリーニングを実施した分析結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬

標準品：東京化成製VOC混合標準原液

(54物質、各1mg/ml、メタノール溶液)

メタノール：和光純薬製 トリハロメタン測定用

塩化ナトリウム：関東化学製試薬特級を300℃で3時間

以上加熱し、放冷後使用

ブランク水：エビアン水

2.2 器具

バイアル：Hewlett-Packard製20ml容をメタノールで洗浄後、120℃で1時間以上加熱して使用

セプトム：Hewlett-Packard製を120℃で1時間以上加熱して使用

カラム：Supelco製 VOCOL

(φ0.32mm×60m 膜厚 3.0μm)

2.3 装置

HS：Hewlett-Packard製 HP-7694

GC：Hewlett-Packard製 HP-5890 Series II

MS：Hewlett-Packard製 HP-5972A

2.4 分析方法

方法を図1に示す。

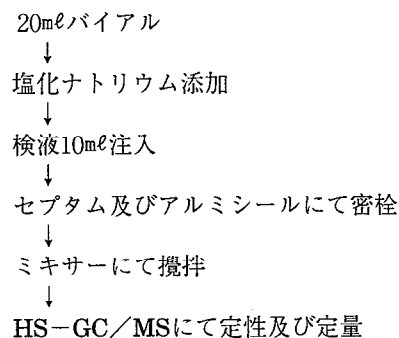


図1 分析フロー

標準物質については、検液10ml注入後、マイクロシリンジにて適宜希釈した混合標準メタノール溶液 (0.2、1.0、10ng/μl等) 10μlを添加した。

2.5 分析条件

田辺等の条件^{1),2)}を参考に表1に示した条件で分析を行った。主な相違点は従来の方法をベースに昇温条件を変え分離を良くし、HS部の条件を変え安定的に試料をGC部へ導入できるようにした点である。

表1 HS-GC/MS条件

HS条件	
バイアル加熱温度	60℃
バイアル平衡時間	30分
注入圧	10psi
ループ温度	150℃
トランスファーライン温度	200℃
ループフィル時間	0.01分
ループ平衡化時間	0.05分
注入時間	1.0分
サンプルループ	1 ml
GC/MS条件	
カラム	VOCOL (0.32mm×60m、3.0μm)
キャリアーガス	He
注入口圧力	40psi(1分)→-99psi/分→ 10psi(0分)→コンスタントフロー
注入口温度	200℃
オープン温度	40℃(4分)→4℃/分→ 200℃(6分)
インターフェース温度	200℃
イオン化電圧	70V
測定モード	SIM、SCAN

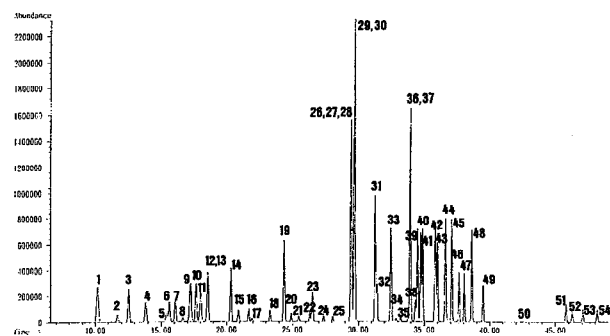
3. 結果及び考察

前項2で示した実験方法によりHS-GC/MSにて54化合物のVOCを測定し、以下の項目について検討を行った。

3.1 分析条件及び装置条件等の検討

3.1.1 分離及び測定

図2に、VOC54化合物のトータルイオンクロマトグラムを示した。



(図中の番号は表2に対応)

図2 VOC54化合物のトータルイオンクロマトグラム

表2 対象化合物の測定質量数

ピーク No	化合物名	T.I(m/z)	Q.I(m/z)
1	1,1-Dichloroethene	60.95	95.90
2	Dichloromethane	83.95	85.95
3	trans-1,2-Dichloroethene	60.95	95.90
4	1,1-Dichloroethane	62.95	64.95
5	2,2-Dichloropropane	77.00	79.00
6	cis-1,2-Dichloroethene	60.95	95.90
7	Chloroform	82.95	84.95
8	Bromochloromethane	129.80	127.80
9	1,1,1-Trichloroethane	97.00	98.90
10	1,1-Dichloropropene	75.00	109.95
11	Carbon tetrachloride	116.85	118.85
12	1,2-Dichloroethane	61.95	63.95
13	Benzene	78.00	77.00
14	Trichloroethylene	129.90	131.80
15	1,2-Dichloropropane	62.95	61.95
16	Bromodichloromethane	82.95	84.95
17	Dibromomethane	92.85	94.85
18	cis-1,3-Dichloropropene	75.00	109.95
19	Toluene	91.05	92.05
20	trans-1,3-Dichloropropene	75.00	109.95
21	1,1,2-Trichloroethane	96.90	82.95
22	1,3-Dichloropropane	76.00	78.00
23	Tetrachloroethylene	165.85	163.85
24	Dibromochloromethane	128.80	126.90
25	1,2-Dibromoethane	106.90	108.95
26	Chlorobenzene	111.95	113.95
27	Ethylbenzene	91.05	106.00
28	1,1,1,2-Tetrachloroethane	130.90	132.80
29、30	m-&p-Xylene	91.05	106.00
31	o-Xylene	91.05	106.00
32	styrene	104.00	78.00
33	Isopropylbenzene	105.00	120.05
34	Bromoform	172.75	170.85
35	1,1,2,2-Tetrachloroethane	82.95	84.95
36	1,2,3-Trichloropropane	109.95	111.95
37	n-Propylbenzene	91.05	120.05
38	Bromobenzene	155.90	77.00
39	1,3,5-Trimethylbenzene	105.00	120.05
40	2-Chlorotoluene	91.05	126.00
41	4-Chlorotoluene	91.05	126.00
42	tert-Butylbenzene	134.00	119.05
43	1,2,4-Trimethylbenzene	105.00	120.05
44	sec-Butylbenzene	105.00	134.00
45	p-Isopropyltoluene	119.05	134.00
46	1,3-Dichlorobenzene	145.95	147.90
47	1,4-Dichlorobenzene	145.95	147.90
48	n-Butylbenzene	91.05	134.00
49	1,2-Dichlorobenzene	145.85	147.90
50	1,2-Dibromo-3-chloropropane	75.00	156.80
51	1,2,4-Trichlorobenzene	179.90	181.90
52	Hexachlorobutadiene	224.75	259.70
53	Naphthalene	128.00	102.00
54	1,2,3-Trichlorobenzene	179.90	181.90

このうち、

- (1) ベンゼンと1,2-ジクロロエタン
- (2) クロロベンゼンとエチルベンゼンと1,1,1,2-テトラクロロエタン
- (3) *m*-及び*p*-キシレン
- (4) 1,2,3-トリクロロプロパンと*n*-プロピルベンゼン

との分離は困難であった。特に、*m*-及び*p*-キシレンについては極めて類似したマススペクトルを持つために各々の定量は難しく、*o*-キシレンと合算した形で、キシレンとして定量することとした。これら以外の化合物については、表2に示したモニターイオンを使用したSIM測定を行うことで各化合物の分離および定量が可能であった。

表3にSIM測定ของกลุ่มを示す。

表3 分析対象化合物のグループ化

グループ名	対象化合物 No.
A	1, 2, 3, 4
B	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12
C	14, 15, 16, 17
D	18, 19, 20, 21, 22, 23
E	24, 25
F	26, 27, 28, 29, 30, 31, 32
G	33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41
H	42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49
I	50
J	51, 52, 53, 54

3.1.2 塩析効果

塩化ナトリウムの添加による増感効果について検討した。添加量は0, 1, 2, 2.3, 3gとした。このうち2.3gは以前の23化合物分析時に検水15mlに対して3.5g添加していたときの比から値を算出したものである。

図3に代表的な化合物についての結果を示した。縦軸に塩化ナトリウム無添加時を1としたレスポンス比をとっている。全化合物で塩析による効果が認められたが、一部の化合物で、2.3gから3gにかけて感度が低下する化合物があったことから、測定では塩化ナトリウムを2.3g添加することにした。

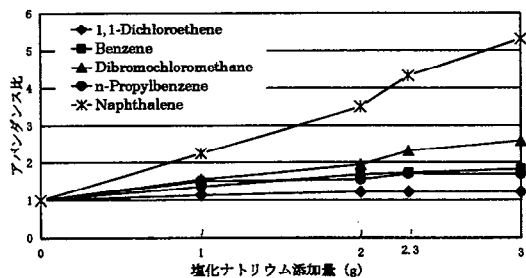


図3 塩析効果

3.1.2 直線性

0.2 $\mu\text{g}/\ell$ から100 $\mu\text{g}/\ell$ までの濃度範囲について直線性を調べたが、100 $\mu\text{g}/\ell$ まで相関係数が1.000の

直線性が認められた。この結果は図4に代表的な化合物について示した。

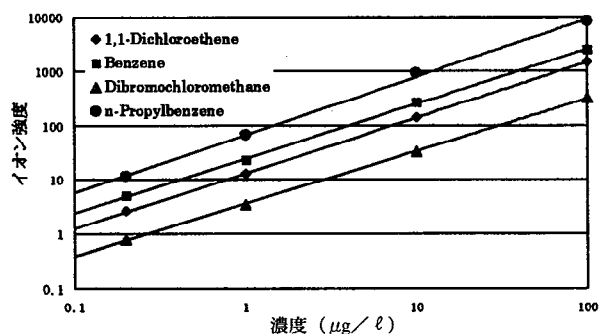


図4 ダイナミックレンジ

3.1.3 検出及び定量下限値の算出

検出下限値については検体濃度0.2ppbのバイアルを5回測定し、検出下限値を3 σ として算出した。結果は0.01~0.04ppbであり、微量濃度レベルまで測定可能であった。また、定量下限値については同様な操作を行い、10 σ として算出した。結果は0.03~0.12ppbであり、最低限必要とされる0.2ppbの濃度レベルまで定量可能であった。以上から実試料における測定化合物のバックグラウンド等を考慮に入れ、定量限界値を各化合物0.2ppbとした。

3.1.4 添加回収試験

地下水及び河川水に標準物質10ngを添加し、n=3で実施した。回収率は殆どの化合物で約100%と良好な結果を示した。

またC.V値は2,2-ジクロロプロパン及び1,2-ジブromo-3-クロロプロパンで10%を超えたが、それ以外の物質では、10%未満であり、安定した値を示した。

3.2 地下水及び河川水におけるスクリーニングの実施

スクリーニングの結果については、今回検討した定量限界値0.2ppbを超えて検出されたものを検出地点としてカウントした。

3.2.1 地下水のスクリーニング結果

県内の井戸65地点について平成10年6月から7月まで分析を実施した結果、基準項目にない化合物で表4に示す物質が検出された。

この結果、1,1-ジクロロエタンは、トリクロロエチレン、1,1,1-トリクロロエタンの汚染地域で高い割合で検出される傾向にあった。これは、土壌中の微生物により、それぞれが脱塩素化、還元されていることを示唆しており^{3),4),5)}、これを裏付けるものとして同じ2塩素化合物の1,2-ジクロロエタンが検出されていないことが挙げられる。また1,1,1,2-テトラクロロエタンは、テトラクロロエチレン汚染地域で検出されることが多かった。このことから、これら有機塩素化合物による汚染地域を考えた場合、こうした未規制物質のモニタリングも重要であることが示唆された。

3.2.2 河川水のスクリーニング結果

県内48地点について平成10年11月から平成11年3月までそれぞれの地点について2回分析を実施した結果、基準項目にない化合物で表5及び表6に示す物質が検出された。

この結果、都市河川の下流域で、アルキルベンゼン類が多く検出される傾向にあった。また、全体的に、アルキルベンゼン類は総検出物質に占める割合が高い傾向にあった。また、1回目の調査よりも2回目の調査で検出率は低かった。

全体的に河川の類型が悪くなる程こうした物質が多く検出されることが多く、汚染指針のひとつとして、捉えることもできるものと推測される。

表4 地下水調査結果

(平成10年6月～7月)

物質名	検出地点	総地点	検出率 (%)
trans-1,2-Dichloroethene	1	65	1.5
1,1-Dichloroethane	10	65	15.4
Chloroform	6	65	9.2
Bromodichloromethane	1	65	1.5
Dibromomethane	1	65	1.5
Dibromochloromethane	1	65	1.5
Chlorobenzene	1	65	1.5
Ethylbenzene	2	65	3.1
1,1,1,2-Tetrachloroethane	6	65	9.2
Xylene	2	65	3.1
Bromoform	1	65	1.5
1,3,5-Trimethylbenzene	1	65	1.5
1,4-Dichlorobenzene	1	65	1.5

注) 検出地点：今回検討した定量限界値を超えて検出された地点

表5 第1回河川水調査結果

(平成10年11月～12月)

物質名	検出地点	総地点	検出率 (%)
Chloroform	4	48	8.3
1,2-Dichloropropane	1	48	2.1
Toluene	4	48	8.3
Chlorobenzene	1	48	2.1
Ethylbenzene	1	48	2.1
Xylene	3	48	6.3
n-Propylbenzene	2	48	4.2
1,3,5-Trimethylbenzene	2	48	4.2
1,2,4-Trimethylbenzene	3	48	6.3

注) 検出地点：今回検討した定量限界値を超えて検出された地点

表6 第2回河川水調査結果

(平成10年12月～平成11年3月)

物質名	検出地点	総地点	検出率 (%)
Chloroform	5	48	10.4
Toluene	5	48	10.4
Ethylbenzene	1	48	2.1
Xylene	2	48	4.2
n-Propylbenzene	1	48	2.1
1,3,5-Trimethylbenzene	1	48	2.1
1,2,4-Trimethylbenzene	3	48	6.3

注) 検出地点：今回検討した定量限界値を超えて検出された地点

4. まとめ

今回、HS-GC/MSを用いて54種類のVOC分析方法を検討した。化合物によって感度に差がみられたが、再現性及び定量性は良好であった。このことから、検討した方法をもとに、環境水へのスクリーニングを実施した。

スクリーニングは地下水及び河川水について行った。地下水では有機塩素化合物汚染地域で、汚染源と推定されるVOCの分解生成物と推測される未規制化合物が数多く検出される傾向にあった。また河川水では主として都市河川で基準値の定めのない未規制物質が多く検出される傾向にあった。

今後の検討課題としては、内部標準物質の検討、分析時間の短縮、スクリーニングエリアの拡大が挙げられる。また、共存物質の影響等も考慮に入れる必要がある。

参考文献

- 1) 田辺顕子他：第22回北海道・東北ブロック公害研究連絡会議要旨集、12 (1996)
- 2) 田辺顕子他：環境化学、7、69-79 (1997)
- 3) 矢口久美子他：水質汚濁研究、14、479-486 (1991)
- 4) 森山登他：衛生化学、34、366-370 (1988)
- 5) 矢木修身他：微生物、5、13-22 (1989)
- 6) 石塚伸一他：青森県環境保健センター研究報告、6、71 (1995)
- 7) 和田修二他：愛媛県環境保全センター所報、18、11 (1998)
- 8) 加藤寛久他：水道協会雑誌、62、41 (1993)
- 9) 渡部欣愛他：環境分析技術手法、p232、しらかば出版 (1995)

火口湖「瀉沼」で観測された湖内鉛直分布特性に関する検討

Water Quality of Vertical Distribution observed Lake Katanuma

清野 茂 八木 純

Sigeru SEINO, Atsushi YAGI

キーワード：湖沼水、鉛直分布、瀉沼、酸性湖

Key words : Lake Water, Vertical Distribution, Lake Katanuma, Acid Lake

瀉沼湖水の水温・水質の鉛直分布調査を1994年から1998年までの5年間実施した。その中で1996年6月12日に観測された特異的な水質の鉛直分布について検討した結果、従来湖底から湧出している火山性熱水に地下水が混入して噴出した可能性が示唆された。

1. はじめに

鳴子火山の火口湖「瀉沼」の水質調査は1993年から1996年までの5年間は環境庁委託調査として、1997年は当センター調査研究として実施しており、湖心部の水質鉛直分布調査結果については既に報告した¹⁾。そのうち、1996年6月12日に観測された鉛直分布は特異的な変動を示していた。そこで、本報では、この水質変動について検討を行った。

2. 調査資料

検討に用いた資料は前報¹⁾のうち、1995年から1997年までの6月、8月、11月の年3回、計12回分である。

3. 結果及び考察

3.1 火口湖「瀉沼」の概要

瀉沼は蔵王「お釜」と同様に本県における代表的な無機酸性湖であり、県北部・鳴子町に位置する鳴子火山の火口湖で、流出口はない。北緯38°44'、東経140°43'に位置し、湖面標高308mである。湖盆形態は佐藤(1989)²⁾により精測されており、湖面形状は東西462m、南北326m、周囲1,380mではほぼ円形をなす表面積0.13km²、最大深度21.3m、湖水容積は7.48×10⁵m³である。これまでの調査結果³⁾から、湖水のpHは2.2、溶存主成分はSO₄²⁻で約300~600mg/ℓを含有する硫酸湖であることが分っている。

3.2 1996年6月12日に観測された水温・水質の鉛直分布

瀉沼の湖心部における水温及び主な水質の鉛直分布調査結果を図1~3に示す。

1996年6月12日に観測された湖心部における水温・水質の鉛直分布(図2)を概観する。

水温鉛直分布は成層をなし(図4)、DOは6m以深で

無酸素状態の還元状況下であり、BOD及びChl-aもほとんど検出されていない。pHが上下層間で2.2を示すように、ほとんどの成分では上下層でその濃度に差は認められない。しかし、Cl⁻、COD、SO₄²⁻そしてSiO₂の4成分は深度による濃度差が認められるなど特異的である。Clは5m以深0.7mg/ℓ、CODは5m以深13~18mg/ℓさらに底層部では30mg/ℓと高く、SO₄²⁻は全層350mg/ℓ(通常約500mg/ℓ)の値を示している。SiO₂は底層部で68~72mg/ℓと高濃度になっていた。

そこで、4成分の特異的な現象について、次のように考えることができる。

瀉沼は夏季停滞期にあり、水温躍層が深度4~5mで認められ、6m以深では無酸素状態の還元状況にある。岩崎ら⁴⁾は火成岩の高温加熱や硫酸水溶液の反応実験から、生成した水にはHClやSO₄²⁻等が吸収されてガス中にはHClがほとんどなく硫酸酸性を示していたことを報告している。また、火山地帯の噴気型酸性熱水中にはCl⁻が低濃度⁵⁾であり、噴気ガス中には塩素化合物が少ない⁶⁾等の報告がみられる。このことから、噴出した熱水は火山性であった可能性が高い。従来湖底部からの熱水の湧出形態は穏やかな浸出に近いものであるが、この日に観測された湧出は激しい噴出状態であったと考えられる。火山性熱水が無酸素状態の深層部底部に噴出し、湖底付近では沈澱堆積物(主成分は粘土鉱物で、硫黄や珪藻の殻を含む⁷⁾)が巻上がり、CODが5m以深13~18mg/ℓ、底層部30mg/ℓと高濃度になった。また、SiO₂は68~72mg/ℓと高濃度で沈澱堆積物中に含まれる珪藻(*Pinnularia* sp.)の殻(主成分SiO₂)が巻上がっていたものと考えられる。一方、CODについてはその測定方法が100℃過カンガン酸カリウム消費量の測定(JIS K 0102)によるために、H₂SやFe²⁺等の無機還元物質の影

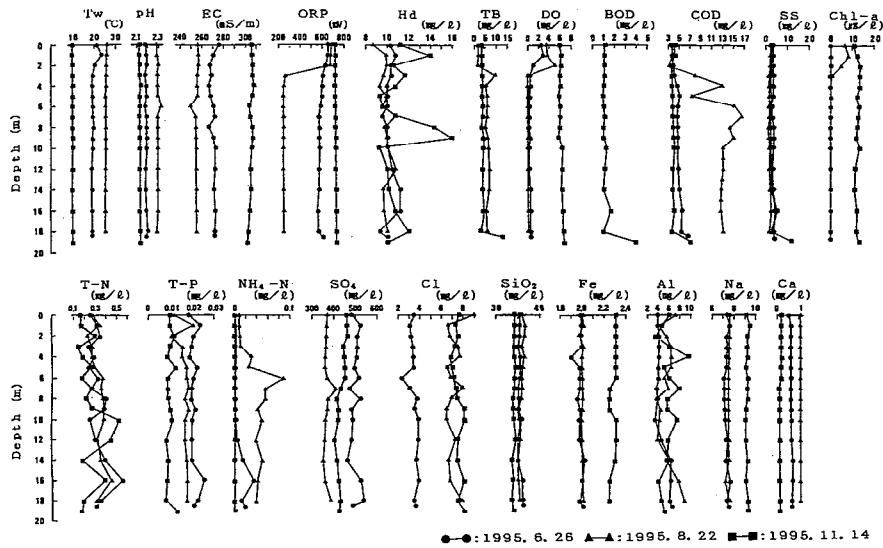


図1 潟沼の水温及び主な水質成分の鉛直分布 (1995)

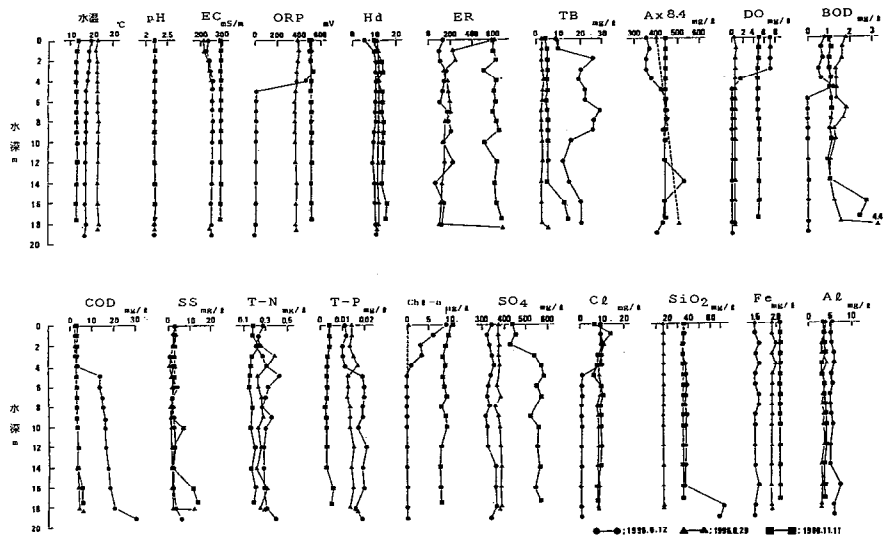


図2 潟沼の水温及び主な水質成分の鉛直分布 (1996)

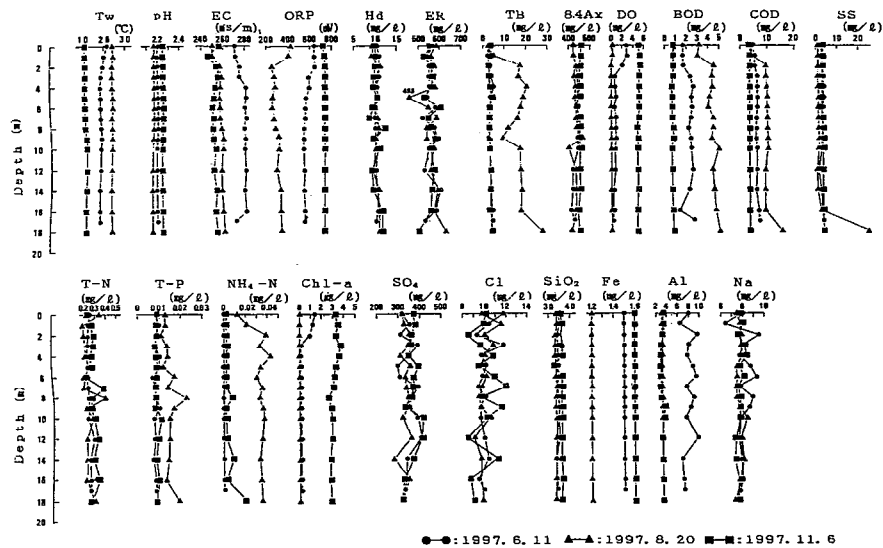


図3 潟沼の水温及び主な水質成分の鉛直分布 (1997)

響により高濃度となった可能性が高く、 H_2S は未測定ではあるものの無酸素状況すなわち還元状態下では湖水の主要成分 SO_4^{2-} が H_2S に、 $Fe(OH)_3$ の Fe が還元されて FeS にそれぞれ生成され、この2成分が同法による高CODの要因となっていたことが推定される。溶存態 Fe が $1.5mg/l$ 通常約 $2mg/l$ 、 SO_4^{2-} が $350mg/l$ (通常約 $500mg/l$)となっていたことから理解される。

以上のことから、夏季停滞期で6m以深の無酸素状態となっている深水部へ従来とは異なる Cl^- が低濃度の火山性熱水が噴出したために、湖底部付近で沈澱堆積物が巻上がり、その沈澱堆積物中に含まれる H_2S や Fe^{2+} 等の無機還元物質や珪藻の殻(主成分 SiO_2)を測定したことによりCODと SiO_2 がそれぞれ高濃度になっていた可能性が高いと考えられる。

3.3 1996年8月11日に発生した宮城県北部地震について

1996年8月11日午前3時12分宮城県北部地震(M)5.9震度5が発生し、潟沼南西岸の鳴子クレ射撃場内で落石があるなど⁹⁾の地震活動が潟沼周辺でもあったものと推定される(潟沼周辺では地震計は設置されていない)。今回の地震は火山性の地震ではなく、垂直と水平に岩盤がずれる「逆断層型」と「横ずれ型」という2つの異なる型の内陸型地震であった⁹⁾。

3.4 宮城県北部地震発生翌年の水温・水質の鉛直分布

宮城県北部地震発生翌年1997年には6月11日、8月20日、11月6日の3回の鉛直分布調査を実施している。3回の調査ともに、 SO_4^{2-} と Cl^- の2成分が深度とは無関係に小さく変動するという特性を示しており、他の成分として蒸発残留物(ER)にもその傾向がみられたもののその変動幅は小さい(図3)。 SO_4^{2-} と Cl^- の2成分は1996年6月12日を除くと、これまでの調査結果からは上下層間に濃度差が認められない濃度分布を示している傾向にある。従って、その変動は3.1に述べたような潟沼内における水質形成ではなく、潟沼外すなわち湖底下から供給された地下水と考えられる。この地下水は、従来から湧出している火山性熱水へ浸入して湧出した可能性が考えられる。そこで、1995年から1998年における水温成層下の深水層(気温や風等の影響を受けずに一定水温となっている)での水温とその変化について検討した(図4、表1)。まず、水温をみると8月が高く、次いで6月そして11月の順で低くなっている。地震発生年(1996年)は地震発生以前(1994、1995年)や地震発生翌年(1997年)と比べると、6月・8月が低く、11月は高くなっている。次に、6月～8月の2か月間、8月～11月の3か月間の上昇幅、6月～11月の5か月間の下降幅について水温変化をみた。その結果、上昇幅及び下降幅ともに、地震発生年<地震発生翌年<地震発生前年となっている。一般に恒温層(地温の年変化が消失する層で、深度は8m～15m)以浅の地下水水温は夏に最高水温、冬に最低水温が出現する年変化になる¹⁰⁾。同様の年変化傾向を深水層では示しているものの、地震発生年

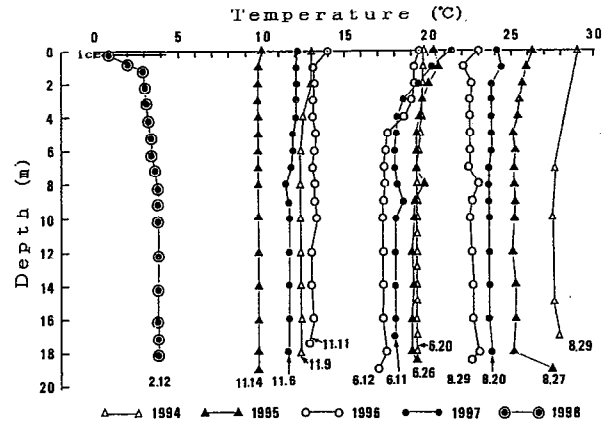


図4 潟沼の水温の鉛直分布(1994~1998)

表1 潟沼の深水層における水温及び水温の変化幅

項目	水 温			水温の変化幅		
	6月	8月	11月	6月→8月	8月→11月	6月→11月
1994	19.3	27.5	12.4	8.2	-15.1	-6.9
1995	19.2	25.1	10.4	5.9	-14.7	-8.8
1996	17.4	22.7	13.0	5.3	-9.7	-4.4
1997	18.0	23.6	11.6	5.6	-12.0	-6.4

(1996年)の水温は地震発生以前及び翌年に比べ6・8月に小さく11月に大きく、水温上昇幅及び下降幅が小さいことから、地下水が火山性熱水中に混入したことが推定される。さらに、従来湖底から地下水が湧出していた熱水の水温が地震発生年に最も低下し、翌年においても継続し地震発生前の状態に戻っていないことから、地震発生年以降においても依然として地下水が火山性熱水と混合して湖底から湧出している可能性が高いことが示唆される。

3.5 潟沼周辺の地質構造

前述した地下水について水文地質構造を検討し、潟沼の水循環を考察する。

潟沼は鳴子火山の火口湖であることを前述したが、その地質構造は基盤岩が先第三紀花崗閃緑岩でその上に火山岩や火山砕屑岩からなる緑色凝灰岩が不整合にあり、さらに両輝石石英安山岩類の火山噴出物が覆っている¹¹⁾、地質内部はN7°E~N80°Eに亀裂や小断層が発達していると考えられている¹²⁾。このことから、潟沼湖底下の地質内部は間隙性に富み、透水性や保水性に優れた凝灰岩の滞水層が形成されていることが推察される(図5、6)。次に、潟沼周辺の水収支を試算する。潟沼には流出口がないことから、降水が全量地面に浸透して地下水となるとみなし、年平均降水量約2,200mm¹³⁾、蒸発散量400mm¹¹⁾と仮定すると、総地下水量は約9.36m³/年となる。潟沼の集水面積が約5.2×10⁵m²であることから、地下水の流出比流量は0.057m³/s/km²と試算され、1km²当りの日量

参考文献

- 1) 清野茂他：宮城県保健環境センター年報、16、124-126 (1998)
- 2) 佐藤五郎：鳴子火山・潟沼における水温・水質の形成機構、18、10、93-100、水環境学会誌 (1995)
- 3) 清野茂他：宮城県保健環境センター年報、13、118-123 (1995)
- 4) 岩崎岩次：火山化学、215pp、講談社 (1970)
- 5) 後藤達夫：日本の火山性酸性温泉の化学的特徴(1)、vol.38-13、65-77、水 (1996)、日本の火山性酸温泉の化学的特徴(2)、vol.38-15、29-35、水 (1996)
- 6) 湯原浩三・瀬野錦蔵：温泉学、159、地人書館、67-71 (1969)
- 7) 西条八東：湖は生きている、127-128、蒼樹書房 (1998)
- 8) 宮城県総務部消防防災課：平成8年8月11日発生地震被害状況について (平成8年8月15日現在)
- 9) 地震調査研究推進本部地震調査委員会：秋田・宮城県境を震源とする地震活動について 平成8年8月15日
- 10) 山本荘毅：陸水、5、25-30、共立出版 (1973)
- 11) 村山磐：火山の活動と地形、6、170-173、大明堂 (1987)
- 12) 鳴子町：鳴子町役場温泉事業集中管理計画調査報告書、東京技営(株)、昭和44年2月28日
- 13) 建設省東北地方建設局鳴子ダム管理所：鳴子ダム観測データ資料集 (昭和62年~平成3年)
- 14) 国土庁水資源局：水資源供給限界調査報告書 (水資源賦存量調査)、昭和51年3月

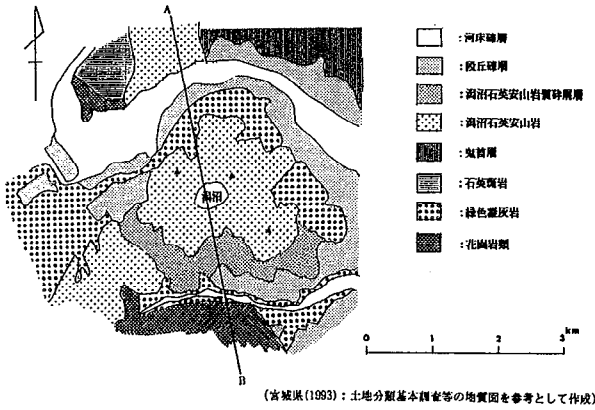


図5 鳴子火山周辺の地質図

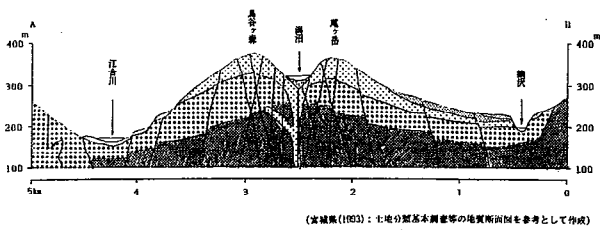


図6 鳴子火山周辺の地質断面図

約4,900㎡と豊富な地下水がかん養されているものと考えられる。

以上のような水文地質構造の潟沼においては、1998年8月11日に発生した宮城県北部地震のような内陸型地震による地質構造の変化が想定される。潟沼の場合には、亀裂や小断層が発達している地質内部で地下水脈等が変化し、その地下水の一部が湖底へ湧出する熱水の通路に浸入した可能性が考えられる。

4. まとめ

潟沼湖心部において1996年6月12日に観測された特質的な水質分布特性は火山性の活動によるものではなく、宮城県北部地震(1996年8月11日発生)活動により湖底から従来湧出していた火山性熱水に地下水が混入して噴出した可能性が高く、地震発生以降もその状態で引き続き湧出していることが示唆された。

5. 謝辞

本論文をまとめるにあたり、貴重な資料を心よく提供をしていただいた鳴子町温泉事業所高橋孝男氏、また御御助言をいただいた郷土史家高橋忠治氏、山形中央高校教諭佐藤五郎先生に感謝申し上げます。

宮城県の湖沼(2) - 桑沼三湖 -

Lakes in Miyagi Prefecture(2) - 3 Linked Lakes in Kuwanuma Range -

清野 茂 中村 朋之 三沢 松子
八木 純

Shigeru SEINO, Tomoyuki NAKAMURA, Matsuko MISAWA
Atsushi YAGI

キーワード：湖沼水、主要溶存成分、垂直分布、堰止湖

Key words : Lake-Water, Major Chemical Constituents, Vertical Distribution
Dammed Lake

奥羽山脈・船形連峰東面の北泉ヶ岳北東崖に位置する崩壊堰止湖-桑沼三湖はいずれも流域が狭く、また流出水がないことから、地下部で地下水で結ばれ上部の湖沼の影響を受けながらリンクする湖沼と考えられている。

今回、桑沼三湖について流入水も含めて水質調査を実施した結果、湖水の主要溶存成分の組成と地形的分布から、桑沼三湖が同一の地下水で繋がっているとの説が実証された。

1. はじめに

環境庁は平成10年度から12年度までの3年間国内17湖沼を対象として「酸性雨モニタリング調査」を開始している。本県の桑沼はその調査対象湖沼のひとつとなっており、平成9年度の予備調査を経て、平成10年度から本調査が実施されている。

今回、本調査に加えてスズ沼(鈴沼)、ハナス沼を加えた桑沼三湖についての水質調査を実施した。その結果、3つの湖沼が地下水によって繋がっていることが実証されたので報告する。

2. 方 法

2.1 調査年月日

現地調査及び採水は平成10年6月4日(春季)、8月5日(夏季)、10月15日(秋季)の3回実施した。

2.2 調査対象及び調査地点

桑沼三湖と呼ばれている桑沼・スズ沼・ハナス沼の3湖沼の他に、スズ沼に流入する沢及び周辺の湧水も調査対象として選定した。調査対象の湖沼等の位置図を図1、調査地点図を図2に示す。

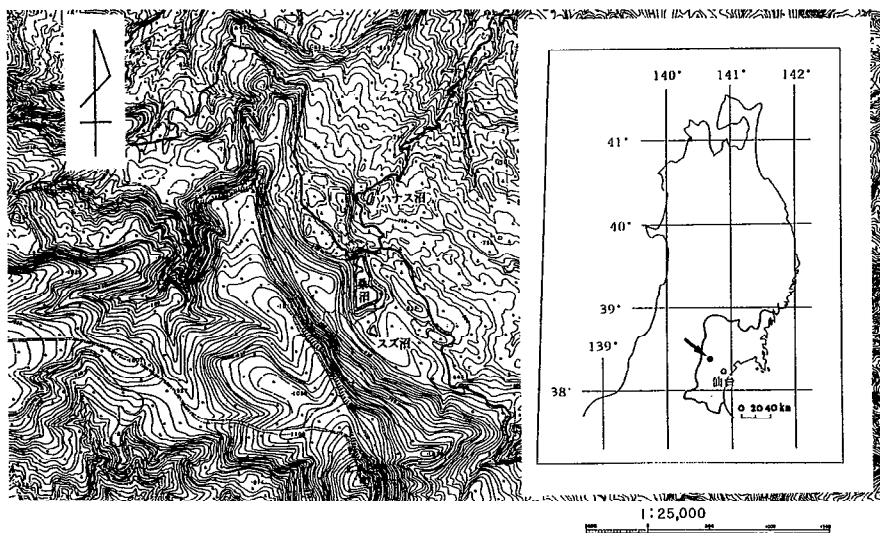


図1 桑沼三湖の位置図

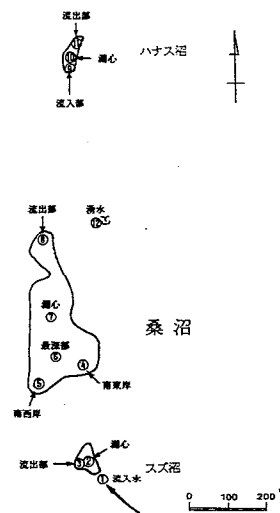


図2 調査地点図

表1 水質調査結果 (1998. 6. 4)

Table 1: Water quality survey results (1998. 6. 4). Columns include location name, inflow, and various water quality parameters (pH, EC, ORP, etc.) across different sampling points (湖心部, 流出部, 南東岸, etc.).

表2 水質調査結果 (1998. 8. 5)

Table 2: Water quality survey results (1998. 8. 5). Columns include location name, inflow, and various water quality parameters (pH, EC, ORP, etc.) across different sampling points (湖心部, 流出部, 南東岸, etc.).

表3 水質調査結果 (1998.10.15)

Table 3: Water quality survey results (1998.10.15). Columns include location name, inflow, and various water quality parameters (pH, EC, ORP, etc.) across different sampling points (湖心部, 流出部, 南東岸, etc.).

2.3 分析項目及び分析方法

分析項目は一般項目としてpH、EC、ORP、Hd、ER、総酸度、総アルカリ度(ALK)の他に、DO、BOD、COD、DOC、SS、栄養塩としてT-N、T-P、NH₄-N、NO₃-N、NO₂-N、PO₄-P、無機塩(主要溶存成分)としてNa、K、Ca、Mg、Cl⁻、SO₄²⁻、SiO₂、微量重金属としてはFe、Mn、Al³⁺、そしてCh_l-aの27項目であり、現地では水温、透明度、流量等を測定した。

分析方法は概ねJIS K 0102及び上水試験方法、Ch_l-aは海洋調査指針(1970)に準拠した。

3. 結果

桑沼三湖及び流入沢、湧水の水質調査結果を表1~3に示す。

4. 考察

4.1 桑沼三湖の概要

桑沼三湖の諸元を表4、湖盆図を図3に示す。

桑沼三湖は宮城・山形両県の県境を縦走る奥羽山脈・船形連峰東面に当たる宮城県中央部の泉ヶ岳(1172.0m)、北泉ヶ岳(1253.1m)、大倉山(933.9m)を結ぶ北東側の火山性崩壊斜面に広がる窪地に位置し¹⁾、南方から北方へスズ沼(湖面標高790m、以下同じ)、桑沼(780m)

表4 桑沼三湖の諸元(1998. 8. 5)

沼名		ハナス沼	桑沼	スズ沼 (鈴沼)
項目	東 経	140° 41' 7"	140° 41' 5"	140° 41' 9"
	北 緯	38° 26' 36"	38° 26' 8"	38° 25' 49"
平均湖面標高 m		710	780	790
湖面面積 ha		0.27	42.0	0.33
湖岸線延長 m		220	1,100	210
最大深度 m		1.5	7	0.2
容 積 m ³		0.2	9.85	0.15
南 北 径 m		90	370	60
東 西 径 m		30	180	60

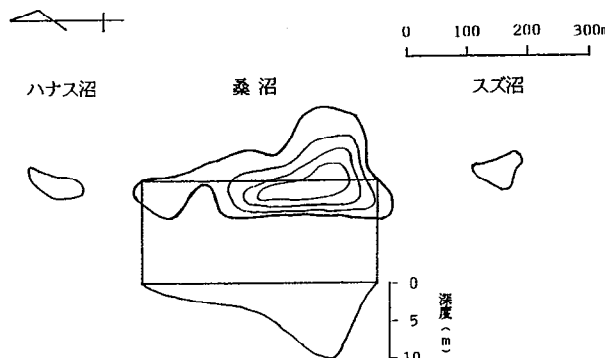


図3 桑沼三湖の湖盆図

そしてハナス沼(720m)の順に並ぶ崩壊碎屑岩や堆積物により堰止められた湖であり、いずれも流出沢はない。しかし、伏流水で結ばれているといわれている。さらに鳴瀬川水系花川上流種沢川の源流であると考えられている。

桑沼は船形連峰で最大の山中湖(湖表面積約4.2ha)であり、湖盆形態は南北に細長いひょうたん形をなし、湖岸線約1.1km、湖西岸は急斜地形となって湖底まで達していると推定され、深度は最深部において9.8mを測深している。スズ沼とハナス沼はともに湖表面積約0.3ha、湖岸線約0.2kmとはほぼ同じであるが、湖盆形態は異なっている。スズ沼は三湖中で唯一の流入沢(流量0.006m³/s)が南東岸からあり、その流入部には水質が清澄であることを示すバイカモや挺水植物が繁茂し、水深は浅く50cm以下で泥土が堆積する。湖盆は三角形をしている。一方、ハナス沼は湖心部の水深は1.5m以上あり、楕円形をしている。三湖周辺の地質・土壌・植生をみると¹⁾、船形火山の構成基盤緑色凝灰岩を覆うカンラン石を含む両輝石安山岩を岩質とする熔岩流堆積物で、周辺には崩壊碎屑岩塊が認められ、周辺土壌は褐色森林土(レキ質)であり、桑沼・スズ沼はブナ林内、ハナス沼はミズナラ林内に位置している。

4.2 降水量

山中湖の水質は地形、地質や土壌、植生の他に気象、特に降水による影響が大きいと考えられる。そこで、宮城県気象月報⁵⁾から調査日前10日間の降水量を調べた(表5)。

3回の調査ともに降水があり、特に秋季調査(10月15日)では7・8日の2日間降水量89mmの影響により、三湖いずれもが春季・夏季の調査時に比べて顕著な水位の上昇が認められ、ハナス沼においては約5m(目視観測)もの水位上昇があった。

4.3 表面水の水質

桑沼三湖及び沢、湧水の水質調査結果のうち、夏季

表5 降水量 (mm)

季 別	春(6月)		夏(8月)		秋(10月)	
	月日	降水量	月日	降水量	月日	降水量
10 日 前	5 25	×	7 26	13	10 5	0
9 日 前	26	×	27	2	6	0
8 日 前	27	0	28	3	7	63
7 日 前	28	0	29	0	8	26
6 日 前	29	14	30	4	9	1
5 日 前	30	1	31	1	10	1
4 日 前	31	0	8 1	0	11	0
3 日 前	6 1	0	2	15	12	0
2 日 前	2	2	3	1	13	0
1 日 前	3	22	4	0	14	2
調 査 当 日	4	0	5	0	15	15
調査当日前5日間計	25		17		3	
調査当日前10日間計	(39)		39		93	

観測地点: 泉ヶ岳(無線ロケット雨量計)

観測位置: 38° 24.5' (N)、140° 42.8' (E) 標高 1,172m

×: 未観測(休止)

(8月5日)についての調査結果をもとに述べる。

まず、pH値はスズ沼7.4、桑沼7.9、ハナス沼7.5の弱アルカリ性で、DOは三湖ともに9~12mg/lで過飽和状態。一方、BOD 1mg/l以下、Chl-aも5μg/l以下とプランクトン量は少なく、一次生産性が低い湖沼である。栄養塩ではT-Nが0.17~0.31mg/l、T-Pが0.01mg/l以下と少ないことから貧栄養湖といえる。桑沼については後述するように水温・水質の垂直分布でも明確になっているが、夏季成層期におけるDOが深度による差がほとんどなく上層・下層ともに酸素が多いという貧栄養湖の特徴を示していることから、スズ沼・ハナス沼も同様に推定される。

次に、溶存成分をみると、三湖ともに蒸発残留物 (T-Re) は60mg/l以下と少なく、特にCl⁻は2mg/l以下、一方SiO₂は15~26mg/lと多く、地質年代が新しい第四紀の火成岩地域、凝灰岩地帯の河川中には含有量が高いことと一致する。⁶⁾

さらに、主要溶存成分のパターンダイヤグラム (図4) からみた水質組成は次のように区分できる。

カチオン：
 $Ca^{2+} > Mg^{2+} > Na^{+} + K^{+}$ 桑沼、スズ沼、流入沢
 $Ca^{2+} > Na^{+} + K^{+} > Mg^{2+}$ ハナス沼、湧水

アニオン：
 $SO_4^{2-} > HCO_3^{-} > Cl^{-}$ 桑沼、スズ沼、流入沢
 $HCO_3^{-} > SO_4^{2-} > Cl^{-}$ ハナス沼
 $HCO_3^{-} > Cl^{-} > SO_4^{2-}$ 湧水

以上の水質組成は、三湖周辺の地質の主岩質であるカンラン石 ((Mg, Fe)₂SiO₄) を含む両輝石 (透輝石

(Ca, Mg) Si₂O₆と斜方輝石 (Mg, Fe) Si₂O₆を主成分) 安山岩を反映したものとなっていて、カチオンCa²⁺、アニオンSO₄²⁻が主成分のCaSO₄型である。流下するにしたがってSO₄²⁻は還元される一方で、HCO₃⁻が増加し、イオン交換によりNa⁺が増加するという水質の変化が起こっていると考えられる。

また、トリリニャーダイアグラム (図5) による水質区分から次のように区分できる。

菱形座標図から、
 領域Ⅲ アルカリ土類非炭酸塩CaSO₄型 流入沢
 領域Ⅰ アルカリ土類重炭酸塩Ca (HCO₃)₂型 ハナス沼、湧水
 領域Ⅴ 中間型 桑沼、スズ沼

となる。領域Ⅲアルカリ土類非炭酸塩CaSO₄型は火山岩地域の水質、領域Ⅰアルカリ土類重炭酸塩Ca (HCO₃)₂型は不圧地下水 (自由地下水) であり、領域Ⅴの水質は中間型といわれている。カチオン座標図をみると、湧水以外はひと固まりとなっており、ほぼ同一といえる。アニオン座標図をみると、ほぼ一直線上に並んでいることから同一の水質が変化しているものといえる。したがって、桑沼三湖の水質は流入沢にみられるCaSO₄型の水質成分がスズ沼、桑沼、ハナス沼の順に流入しているものと考えられることができる。なお、湧水は桑沼三湖の水質とは異なり、浅い地下水であることが推定できる。

4.4 桑沼の水温・水質の垂直分布

桑沼の湖心部と最深部の2か所において水温・水質の垂直分布調査を実施した。その結果、春季と秋季には湖水循環を観測した。ここでは、夏季における水温・水質

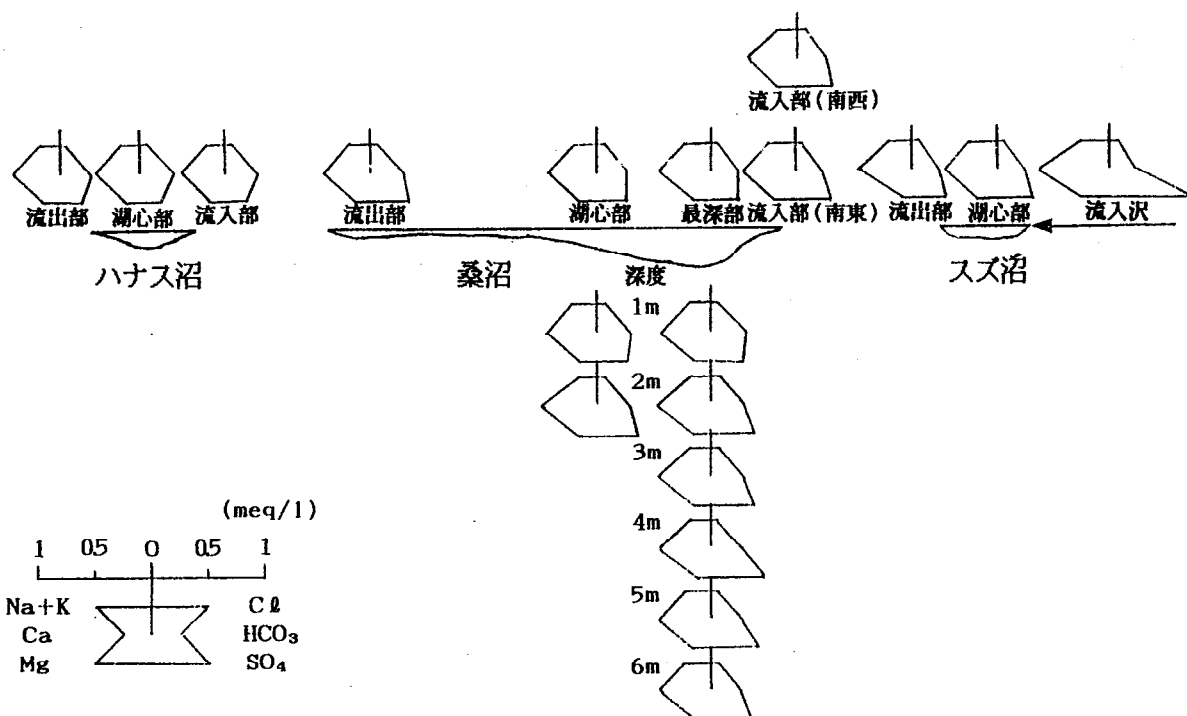


図4 桑沼三湖の表面水・深度別パターンダイヤグラム (1998. 8. 5)

を考察する。水温・水質の垂直分布図を図6に示す。

水温は夏季成層期の水温躍層を形成し、表水層0~1 m、変水層1~4 m、深水層4~7 mに区分できる。透明度は3.9m。DOは深水層まで十分に存在する貧栄養湖の特徴を示している。一方、DOは変水層に極大がみられ、pH値が9までに達している。しかし、BODは表水層~変水層において1mg/l以下、Chl-aも表水層~2 mでは2 μg/l以下と極めて少ないこと、その反面変水層において総アルカリ度、Ca、SO₄そしてSiO₂が増加している。これらの水質現象は植物性プランクトンの光合成によるCO₂が消費されてO₂が放出される生物学的な解釈では説明できない。これらは次のように考えることができる。すなわち、8月3日の日雨量10mmを超す降雨(15mm)(表5)により湖面水は稀釈されていて、一方湖盆壁からは降雨前の地下水が比較的浅い深度(変水層付近)へ大量に押し出されている。この地下水の水質は前項で述べたCaSO₄を主成分として、地中温度で温められ湖水水温よりも高い水温でしかもDOやHCO₃を十分に含みさらには地質中からの溶解成分としてSiO₂を含有するものである。この地下水が変水層付近への流入により、変水層付近ではDO、アルカリ度が上昇し、Ca、

SO₄そしてSiO₂の溶存成分が増加した。

以上に述べた解釈は、SiO₂が湖心部と最深部の間において約5mg/lの差となり、また深度別のパターンダイヤグラム(図4)をみると、表水層の水質組成が降雨のためにCa(HCO₃)₂型、変水層以深は湖水の主成分CaSO₄型となっていることでもいえる。

なお、桑沼の湖底堆積泥が明赤褐色を呈していることを観察した。これは底部にまで十分なO₂が存在していることを示していると考えられる。

4.5 桑沼三湖の水循環

桑沼三湖の水循環、すなわち地下水の流れを考察し、三湖が地下水で繋がっていることを検討する。

まず、本地域の水収支を試算してみる。年間降水量約1,800mm⁷⁾、蒸発散量を年間約400mm⁷⁾と仮定し、流出河川がないことを考慮すると、流出量の全量が地下水となっているとみなすことができる。その総地下水量は約1.96×10⁶ m³/年と推定される。桑沼の流域面積が約1.39 km²であることから、地下水の流出比流量は0.044 m³/s/km²と算出され、豊富な量であり、1 km²当たり日量約3,800 m³の地下水がかん養されているものと概算される。また、

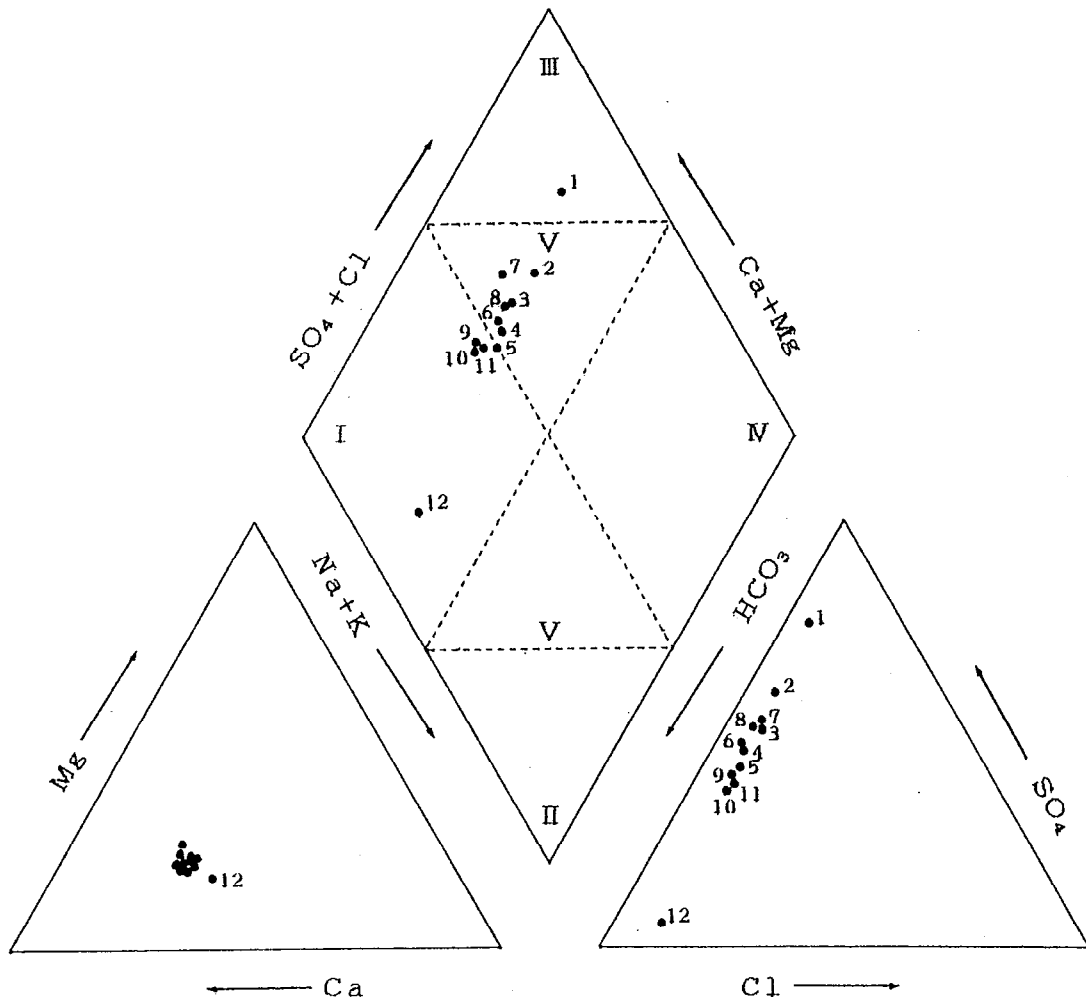


図5 桑沼三湖等の水質のトリリニャーダイヤグラム(1998.8.5)

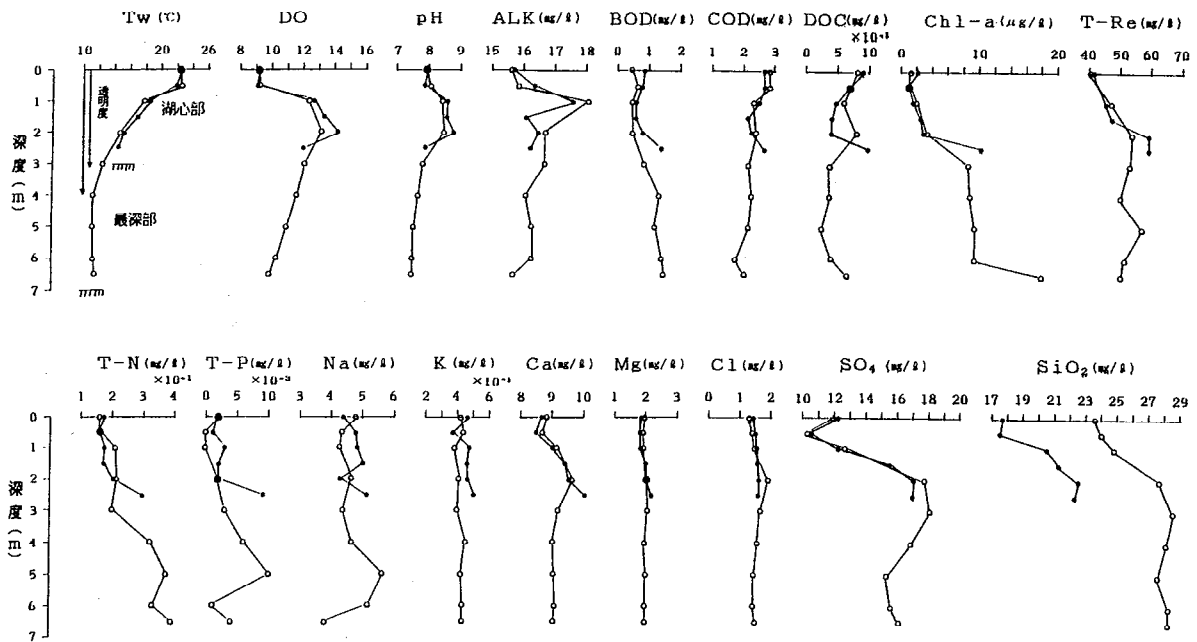


図6 桑沼の水温と主な水質の垂直分布図 (1998. 8. 5)

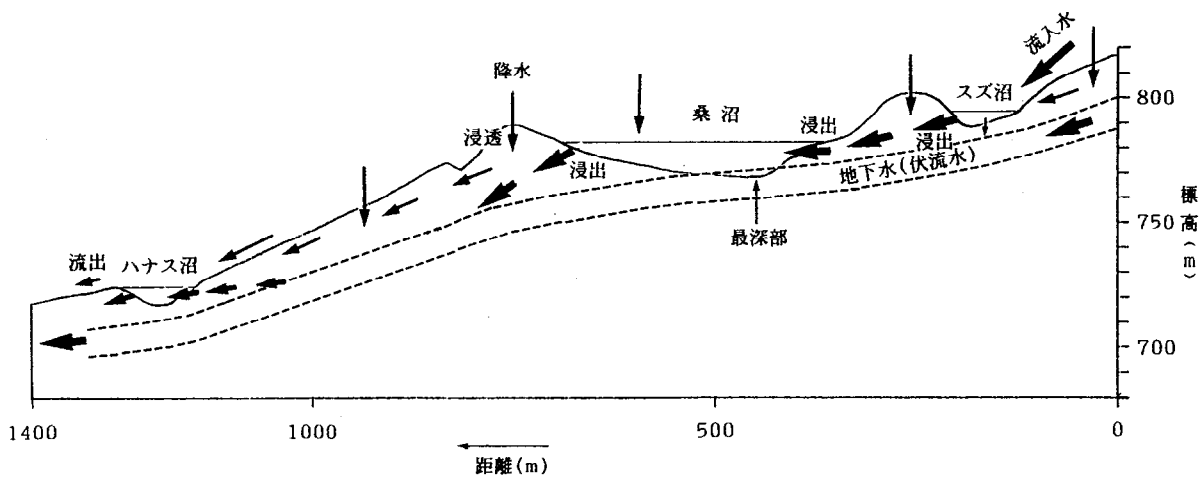


図7 桑沼三湖の水循環模式図(満水期)

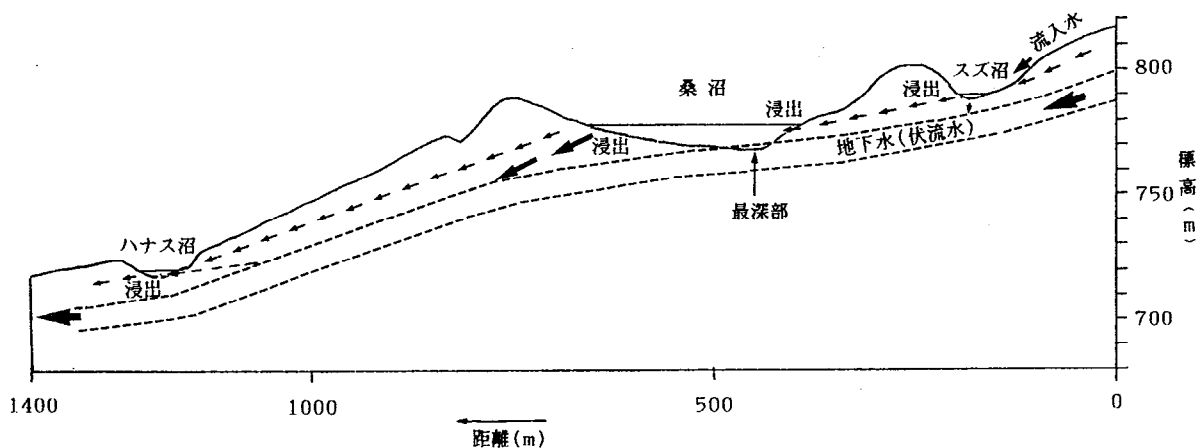


図8 桑沼三湖の水循環模式図(渇水期)

三湖のS-N方向配列位置の最大傾斜8/100であることから、地下水の流出速度は地下水としてはかなり速いことが推定できる。

次に、桑沼三湖の水質地質構造をみる。4.1で述べたように三湖周辺の地質は安山岩質熔岩流堆積物で、その上には崩壊碎屑岩及びレキ質の褐色森林土という地質構造から間隙性に富み、透水性と共に間隙に滞水する保水性に優れていると考えられる。したがって、地下の比較的浅い所に滞水層すなわち不圧滞水層（自由地下水層）が形成され、前述したように豊富な地下水すなわち不圧地下水（自由地下水）が存在する可能性がある。

さらに、桑沼三湖の地形的分布をみると、スズ沼と桑沼間の距離は約200m、湖面標高差は約10m、一方桑沼とハナス沼間の距離は約500m、湖面標高差は約60mで、三湖間の距離はスズ沼流入部からハナス沼流出部まで約1.2kmと短く、湖面標高差は約70mしかない。このことから、桑沼三湖の水循環すなわち地下部を流れる地下水は図7・8に示す模式図で表すことができる。

なお、桑沼とハナス沼の湖岸には標高1～5mの湧水面が観測されることから、融雪や大雨による水面上昇が容易に推定される。

以上のことから、桑沼三湖の水循環を総括すると、まず降水が地下に浸透し不圧滞水層中で地下水（伏流水）となり、その地下水はS-N方向へ傾斜する地形上に配列する三湖すなわちスズ沼、桑沼、ハナス沼へ順次に浸入・貯留・浸出している。このように、桑沼三湖は同一の地下水で繋がっているものといえる。

5. まとめ

桑沼三湖の水質調査から次のことが分かった。

- (1) 桑沼は貧栄養湖であり、スズ沼とハナス沼も同様である。
- (2) 桑沼三湖の表面水の水質は岩石・地質（カンラン石含有両輝石安山岩）を反映していて、その水質組成は桑沼とスズ沼が CaSO_4 型、ハナス沼が $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 型である。
- (3) トリリニヤーダイアグラムによる水質区分では、スズ沼流入沢が領域Ⅲアルカリ土類非炭酸塩区、ハナス沼が領域Ⅰアルカリ土類重炭酸塩区、桑沼とスズ沼が中間型である。
- (4) さらに、カチオン座標図からは三湖がひと固まりに、アニオン座標図からはほぼ一直線上に並ぶことから桑沼三湖の水質は同一と考えられる。
- (5) 桑沼の水温・垂直分布から、夏季は水温躍層を形成する成層期であり、表水層の水質組成は $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 型、変水層以深は CaSO_4 型となっていた。
- (6) S-N方向へ傾斜する地形上に配列している三湖には同一地下水が流れている。

6. 謝 辞

本調査を実施するにあたり御協力をいただいた県塩釜保健所黒川支所そして資料の提供及び御助言御指導をいただいた県伊豆沼・内沼環境保全財団柴崎徹室長に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 宮城県：県立自然公園船形連峰調査報告書（1976）
- 2) 柴崎徹：宮城の名山、1、49-50、河北新報（1992）
- 3) 宮城県：第2回自然環境保全基礎調査、湖沼調査報告書 67-71（1979）
- 4) 宮城県企画部土地対策課：土地分類基本調査 関山峠 5万分の1（平成4年度調査）、34、北海道地図（1994）
- 5) 仙台管区气象台：宮城県気象月報（平成10年5月、6月、8月、10月）（株）日本気象協会（1998）
- 6) 清野茂他：宮城県保健環境センター年報、16、99-103（1998）
- 7) 国土庁水資源局：水資源供給限界調査報告書（水資源賦存量調査）、昭和51年3月

荒砥沢ダム上流域の河川水質特性 - 栗駒火山周辺の水環境(第2報) -

Water Quality of Rivers in Aratozawa Dam - Water Environment of Around Kurikoma Volcanoes(2) -

清野 茂 中村 朋之 三沢 松子
吾妻 正道 水谷 登志喜 八木 純

Shigeru SEINO, Tomoyuki NAKAMURA, Matsuko MISAWA
Masamichi AZUMA, Toshiki Mizutani, Atsushi YAGI

キーワード：河川水、ダム湖水、垂直分布、環境特性、寄生火山

Key words : River-Water, Dam-Water, Vertical Distribution, Environmental Characteristics, Parasitic Volcano

栗駒火山の寄生火山「揚石山」を源とする二迫川の上流-荒砥沢ダム上流域の河川等の水質特性を調べた結果、河川水質は東北・日本の河川に比べるとNa、Caが低く、SiO₂が高く、栄養塩類ではI-N/T-N比が低いことなどから、流域の岩石・土壌の地質環境を反映していると共に植生の影響を受けていることが推定された。荒砥沢ダム湖は貧栄養湖で、湖水の主要溶存成分は表水層・変水層がNa-HCO₃型、深水層がCa-HCO₃・SO₄型であった。

1. はじめに

栗駒火山を源とする宮城県側の3水系のうち、一迫川と三迫川の水質特性については第1報として報告している¹⁾。今回は残る二迫川水系の上流-荒砥沢ダム上流域の水質調査を実施したので報告する。

現地調査及び採水は平成10年9月3日・4日の2日間実施した。

2.2 調査対象河川等及び調査地点

調査対象河川は二迫川水系の上流-荒砥沢ダム上流域の小河川(15)で、周辺の湧水1ヶ所。これらの河川が流入する荒砥沢ダムの湖内水(湖心部、流入部(北部、西部)、ダムサイト)及び漏水(3)を調査対象とした。さらに湖心部と2つの流入部においては水温、水質垂直

2. 方法

2.1 調査年月日

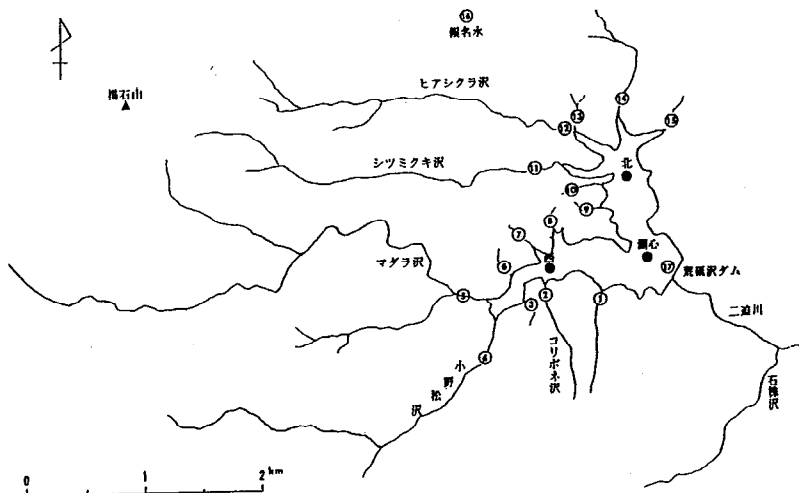
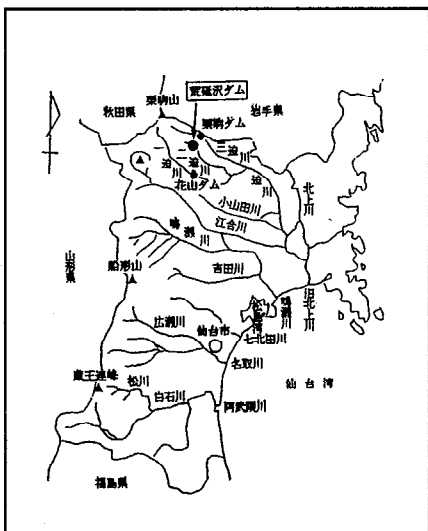


図1 調査対象の位置及び調査地点図

主要溶存成分の当量%を用いたトリリニヤードイヤグラムから水質組成をみると(図3)、領域Ⅳアルカリ非炭酸塩区(Na_2SO_4 型)が16地点中10地点と多く、流域に分布する岩石・土壌の地質を反映していることが考え

られ、他の地点は中間的組成区分(領域Ⅴ)を示している。また、カチオンとアニオンに分けて当量濃度%を図式したパターンダイヤグラムからは4つの水質グループに分けることができる。(図4)

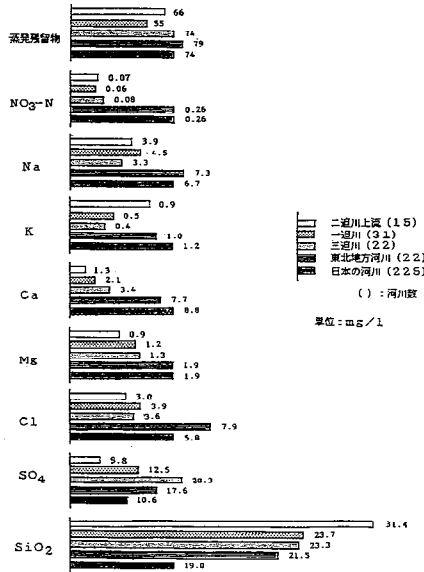


図2 二迫川上流河川及び一迫川・三迫川と東北・日本の河川水質成分の比較図

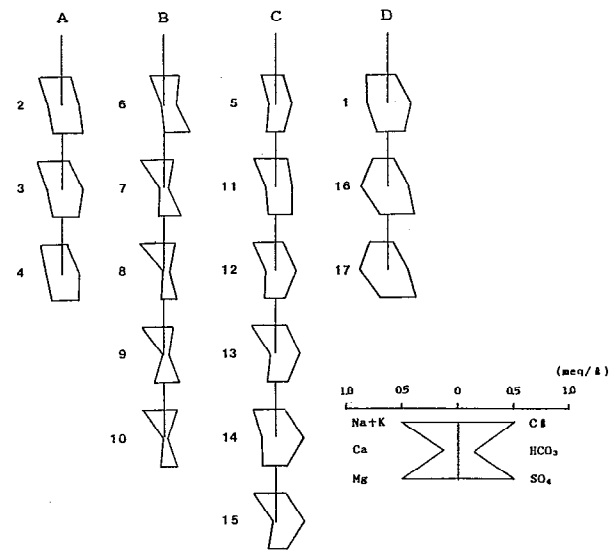


図4 パターンダイヤグラム

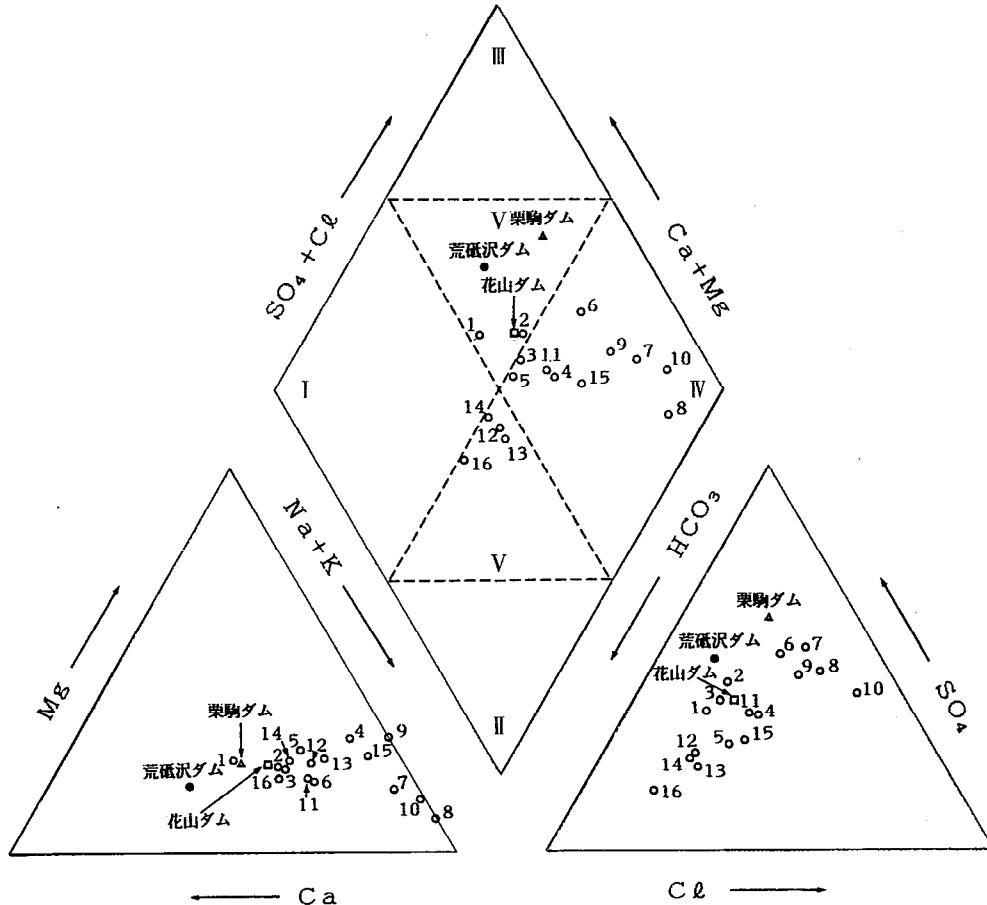


図3 トリリニヤードイヤグラム

4.1.3 水質形成因子

河川水質は風送塩、岩石・土壌の地質、温・鉱泉、人為活動等に支配される³⁾。本調査対象の流域には顕著な人為活動はみあたらないことや温・鉱泉の存在がないことから、二迫川上流の水質の形成因子に関する因子として風送塩、岩石・土壌の地質、植生から考察する。

4.1.3.1 風送塩

風送塩は海塩の飛沫、降雨や降雪により地表へ降下して河川・地下水に出現する。その風送塩の水質へ及ぼす影響は、水質成分を海水の組成と比較することによって、その寄与の大小が判断される³⁾。そこで、Na、K、Ca、Mg、SO₄²⁻について、Cl⁻との当量比を海水のそれと比較した。その結果を図5に示した。

Caの比は海水の比よりも1桁から3桁大きく、NaとSO₄²⁻は1桁程度大きい値を示し、これらは風送塩以外に由来するものと推定される。一方、MgとKは海水比と同程度から1桁程度大きい値で分布している地点が多い。

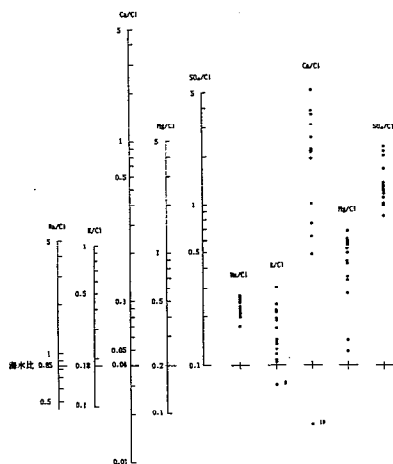


図5 無機塩のCl⁻に対する当量比図

4.1.3.2 岩石・土壌の地質

二迫川上流域の地質図を図6、地質断面図を図7に示す。

本地域周辺の地質⁴⁾は、小野松沢層と呼ばれる石英安山岩質の軽石凝灰岩を貫く複輝石安山岩、同質火山角レキ岩及び凝灰角レキ岩からなる火山噴出物で構成される。さらに荒砥沢ダムサイト付近の地質は⁵⁾、火山レキ凝灰岩及び頁岩の互層を主とする堆積岩と貫入安山岩と石英安山岩の火山岩で構成されていることが確認されていて、石英安山岩には石英、長石類の斑晶がみられたと報告されている⁵⁾。石英にはSiO₂、長石類にはCa、Naがそれぞれ含まれることから化学的組成としてCa、Na、SiO₂等が多いことが推定される。

パターンダイアグラムから4グループに区分され(図4)、Aグループは軽石凝灰岩、Bグループは石英安山岩質軽石凝灰岩、Cグループは複輝石安山岩、同質火山角レキ岩及び凝灰角レキ岩の分布と一致している。

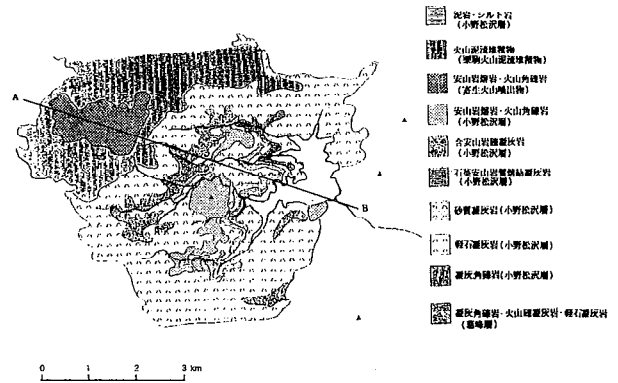


図6 荒砥沢ダム上流域の地質図

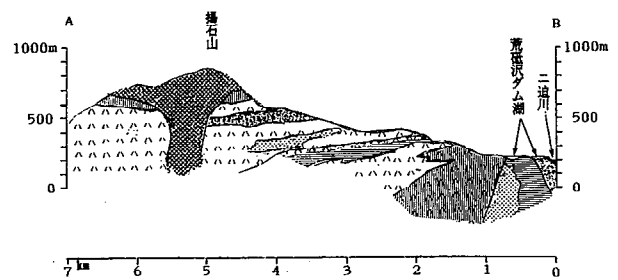


図7 荒砥沢ダム上流域の地質断面図

岩石の風化は炭酸あるいは硫酸を含んだ水により引き起こされるといわれている⁶⁾。本対象地域の河川水質をみると、アルカリ度がSO₄²⁻濃度に比べて高いことから、炭酸による岩石中の主として長石からNaやCaを溶出し、ケイ酸塩岩石からケイ酸も溶出しているものと考えられる。HCO₃⁻とCa+Mg、Na+K、SiO₂の関係(図8)に

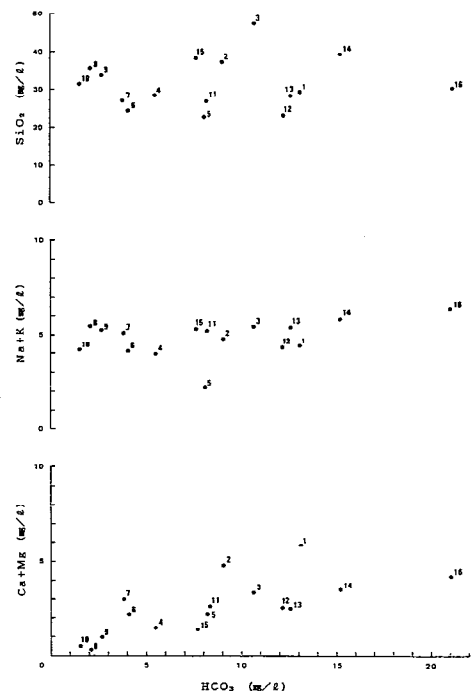


図8 HCO₃⁻とCa+Mg・Na+K・SiO₂の関係

は、相関関係が認められる。また、 HCO_3 (mg/ℓ) と $\text{HCO}_3/\text{SiO}_2$ (モル比) の関係 (図9) から、カオリナイトの粘土鉱物が生成されていることが示唆される⁷⁾。粘土鉱物の生成は地すべりの深刻な原因で、事実荒砥沢ダム堤体の左岸下流部には地すべり地帯が存在している⁵⁾。

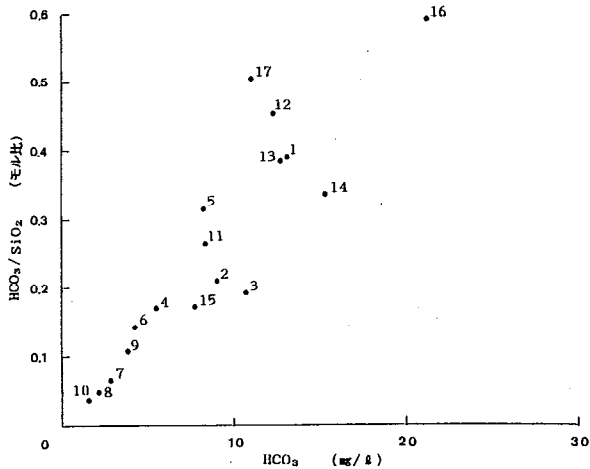


図9 HCO_3 (mg/ℓ) と $\text{HCO}_3/\text{SiO}_2$ (モル比) の関係

4.1.3.3 植 生

森林土壌分布と植生をみると⁸⁾⁹⁾、大部分が褐色森林土壌であり、二次林や植林が分布している。I-N/T-N、I-P/T-P (図10) をみると、栄養塩の無機化は余り進んでいないことが分かる。

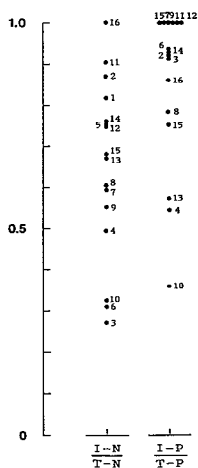


図10 I-N/T-N、I-P/T-Pの分布図

4.2 荒砥沢ダムの水質特性

4.2.1 荒砥沢ダムの概要

荒砥沢ダムは国営迫川上流事業として農業用水の安定供給を行うため、昭和51年度に着手、平成9年11月に運用開始し、同年12月国から県へ管理移管された多目的ダムである。ダム諸元⁵⁾を表2に示す。

4.2.2 表面水の水質

ダム湖心部及び2流入部 (北部・西部) の表面水のpH

表2 荒砥沢ダムの諸元

ダ ム			貯 水 池		
水 系 名	北上川		流域面積 km^2	20.4	
河 川 名	迫川支川二迫川		湛水面積 km^2	0.755	
型 式	中心運水ゾーン型 ロックアップフィル	貯水池の規模	総貯水要領 $\text{千}\text{m}^3$	13,850	
			有効貯水要領 $\text{千}\text{m}^3$	12,840	
工 期	実 調	昭和51年10月	最大水深 m	68	
	完 成	平成10年12月			
堤 体	堤 高 m	74.4	利 水	かんがい用水 $\text{千}\text{m}^3$	
	堤 頂 長 m	413.7			非洪水期: 利水 12,840
	堤 頂 巾 m	10.0			治水 670
	堤 体 積 $\text{千}\text{m}^3$	3,048			洪水期: 利水 9,340
	最低地整標高 m	205.0 (E.L.)			治水 3,500
	天端標高 m	279.4 (E.L.)			最大発電 kW
		基礎地盤地質	頁岩・凝灰岩		

は7.1~7.4、DOは9.0~9.4 mg/ℓ であり、水温躍層を形成する停滞期であっても、底層までDOが存在する貧栄養湖の特徴を示している。また、栄養塩をみてもT-Nは0.14~0.15 mg/ℓ 、T-Pは0.005~0.012 mg/ℓ で、Chl-aも2.6~4.5 $\mu\text{g}/\ell$ と少なく、貧栄養型となっている。CODは2.9~3.1 mg/ℓ である。

溶解性成分をみると、各種成分濃度は10 mg/ℓ 以下と少なく、蒸発残留物 (ER) も80 mg/ℓ 以下である。しかし、 SiO_2 は18 mg/ℓ であり、本流域の岩石、地質の環境を反映していると考えられる。

主な溶存成分の当量濃度から水質の組成をみると、カチオン: $\text{Na} > \text{Ca} > \text{Mg} > \text{K}$ 、アニオン: $\text{HCO}_3 > \text{SO}_4 > \text{Cl}$ であることから、溶存主成分は NaHCO_3 といえる。

4.2.3 水温・水質の垂直分布

ダム湖心部及び2流入部 (北部・西部) における水温、水質の垂直分布図を図11に示す。

水温躍層が水深8~10m付近で形成されていて、DOは深度と共に低下するが、特に湖心部では水深10m付近から上昇し16m付近でピークとなり、それ以深では低下するものの底層部は無酸素状態にはなっていない。

溶存主成分は表水層~変水層が Na-HCO_3 型、深水層が $\text{Ca-HCO}_3 \cdot \text{SO}_4$ 型と異なっている。この水質の差異は前者が前項で述べたように流域の岩石・地質を、一方後者は湖底及びダム堤体の岩石・地質をそれぞれ反映したものと考えることができる。なお、ダム漏水中にはCaが345~581 mg/ℓ 、 SO_4 が600~1,200 mg/ℓ それぞれ高濃度に含有されていた。

4.2.4 荒砥沢ダムサイトと花山・栗駒両ダムサイトの水質比較

栗駒火山を源とする宮城県側は3水系があり、二迫川水系の他に一迫川水系と三迫川水系がある。それぞれ花山ダム、栗駒ダムへ流入している。そこで、3ダムサイトにおける水質を比べてみる。

3ダムともに調和型の湖沼であり、荒砥沢ダムが貧栄養湖であることを既に述べたが、花山・栗駒両ダムは富栄養湖 (T-N>0.15、T-P>0.02) で、I-N/T-Nをみると、栗駒 (0.66) > 花山 (0.44) > 荒砥沢 (0.41) で栗駒ダム湖水中の無機態窒素が多い。これは集水域の植生

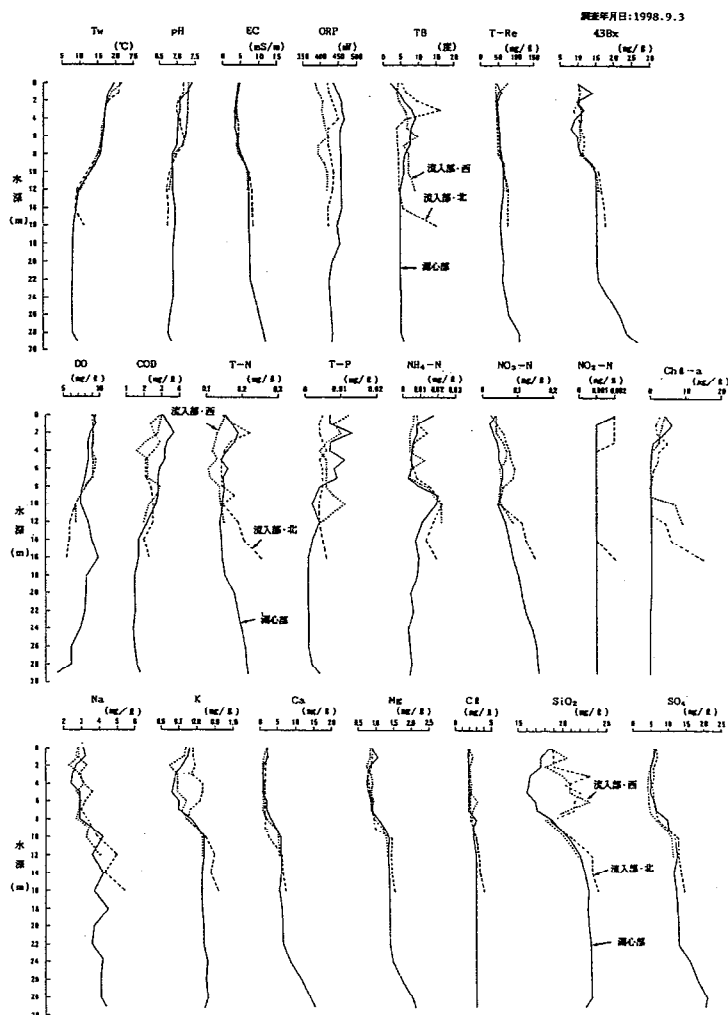


図11 荒砥沢ダムの水質・主要水質の垂直分布図

に違いによるものと考えられ、栗駒ダムではブナ林等の自然林、花山・荒砥沢両ダムは二次林や植林が多く分布しており⁹⁾¹⁰⁾、自然林による窒素の無機化作用が反映された水質を栗駒ダム湖水は示しているものといえる。

主な溶存成分の当量濃度%から溶存主成分をみると、荒砥沢ダムはCa-SO₄型、花山ダムはNa-HCO₃型、栗駒ダムはCa・Na-SO₄型といえる。荒砥沢ダムの溶存主成分が先に述べた型と異なっている。このことは荒砥沢ダムサイトにおいて、ダムサイト付近の停滞水中にロックフィルダム堤体を構成する岩石(石英安山岩質凝灰岩⁵⁾)からの溶出成分を大量に含有していることによるものと考えられることができる。

5. 謝 辞

本調査に御協力いただいた東北農政局迫川上流水利事業所、県栗原地方ダム総合事務所、県栗原保健所の関係各位に心から感謝いたします。

参 考 文 献

1) 清野茂他：宮城県保健環境センター年報、16、93-

98 (1998)
 2) 小林 純：農学研究、63 (1960)
 3) 半谷高久、菅原健：地球化学入門、丸善 (1964)
 4) 宮城県：土地分類基本調査 栗駒山・秋ノ宮5万分の1国土調査 (1992)
 5) 東北農政局迫川上流水利事業所：荒砥沢ダム技術誌 (1999)
 6) KITANO, Y. and S. NAKANO: Chemical composition of natural waters in the kinasa landslide area, Jpn. J. Limnol, 44, 132-138 (1983)
 7) Garrels, R. T.: Genesis of some ground waters from igneous rocks: in Researches in Geochemistry, Abelson, P. H. Ed., 405-420, John Wiley (1967)
 8) 経済企画庁総合開発局：土地分類図 (宮城県) 昭和47年
 9) 環境庁：第20回自然環境保全基礎調査 (植生調査) 現存植生図 宮城県 栗駒山 (1961)
 10) 宮城県：栗駒国定公園及び自然公園旭山学術調査報告書、昭和58年3月