

[原 著]

兵庫県下の水道原水および水道水中 102 農薬の実態調査
結果に基づく総農薬方式による水質評価川元 謙彦^{1*} 山崎 富夫¹ 野村 素行² 中野 武¹Studies on Evaluation of Water Quality by Using Detection Index Value
Based on Survey of 102 Pesticides in Raw and Tap Water in Hyogo PrefectureTatsuhiko KAWAMOTO^{1*}, Tomio YAMASAKI¹, Motoyuki NOMURA² and Takeshi NAKANO¹¹Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and
Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan²Public Health and Sanitation Division, Public Health Bureau, Health Welfare and
Environmental Service Department, Hyogo Prefectural Government, Kobe 650-8567, Japan

The evaluation method by using detection index value was newly introduced. The method involves taking each individual value of the pesticides detected in the water and dividing it by the target value. The sum of the values is defined as the detection index value, which is observed not to be over 1. Accordingly, the concentration of 102 pesticides in raw and tap water collected from 15 points (in June in 2004) and 3 points (from June to Nov. in 2004) in Hyogo Prefecture was measured and evaluated the water quality by the detection index value. Since the detection index value at the sampling points was low in that it was 0 - 0.10 for the raw water and 0 - 0.015 for the tap water, the safety of the drinking water was assured. In the 15 sampling points, from the raw water, 14 kinds of herbicide including Bentazone, 6 kinds of fungicide including Carboxenol, and 5 kinds of insecticide including Fipronil were detected. Fourteen kinds of pesticides detected in tap water were recognized among them from raw water. These pesticides have often been used for paddy rice farming. In the 3 sampling points, from the raw water, Bromobutide, Malinax, and Chloranil were detected at high frequency. Pesticides that became factors to indicate a comparatively high detection index value were Fenitrothion, Benzoph, Carbaryl and Fipronil possessing strong toxicity. In order to protect drinking water from 102 pesticides pollution, it is important to continue monitoring pesticides, to evaluate the water quality by the detection index value, and to survey their behaviors in water treatment processes.

1 はじめに

水道法水質基準の改正(2004年3月1日施行)¹⁾に伴い、水質基準項目を確定するため水質基準目標設定項目27項目が定められた²⁾。このうち、農薬は国民

の関心が高く、優先して測定することが望ましい項目として取り上げられ、101種類の農薬について目標値が設定された。その後、水質基準の再次改正(2008年4月1日施行)により、殺虫剤イプロロニルが追加設定³⁾され、102種類の農薬が規制対象となった。これらの種類の評価方法として、それぞれの農薬の検出値を目標値で除した値の総和である総農薬濃度が1を超えないこととする「総農薬方式」が導入された。この方式は農薬の水中濃度を個別の基準値または目標値と比較して評価する従前の方法と異なり、

¹水質環境部 兵庫県健康福祉部生活衛生課

²別添録表先:〒652-0012 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所センター

水質環境部 川元 謙彦

水中に含まれる農薬の人への影響を総合的に評価しうる新しい方法として、現在は水道分野のみを導入されている。河川等における農薬の検出報告例等は数多く見られるが¹⁾、102 農薬すべてについて実態調査を行い、総農薬方式により評価を行った報告は未だ見当たらない。今回、水道原水および水道水中 102 農薬の濃度の測定を行い、水質別による検出特性を把握するとともに、「総農薬方式」による評価を試みたので報告する。

II 材料と方法

1. 水試料

兵庫県水道水質管理計画²⁾に基づく監視15地点の水道原水および水道水を対象とした。15地点の水質の種類は、湖沼水1地点 (A地点)、河川水5地点 (B～F地点)、伏流水4地点 (G地点)、浅井戸6地点 (H～M地点)、深井戸2地点 (N, O地点) とした (Fig. 1)。監視15地点の採水は2004年6月22日に実施した。また、農薬が検出されやすい湖沼水 (A地点) および河川水 (C地点) と、河川水の影響を受けている伏流水 (G地点) については、2004年7月～11月の期間、各月1回 (7月27日、8月27日、9月29日、10月19日、11月26日) の採水を行った。試料水の前処理は、採水後速やかにを行い、直ちに分析に供した。さらに、水質基準の運次改定に備え、新規の規制農薬等 (フィボニル) に迅速対応するために、抽出液の一部は農薬分析を行うまで -40℃ で凍結保存した。



Fig. 1 Sampling points in Hyogo Prefecture.

2. 測定対象農薬

測定対象とした102農薬の種類を、Table 1に示す。

3. 分析方法

1) 試薬および装置

農薬標準品はHiedel-de-Baer社製、和光純薬工業社製および林純薬工業社製を用いた。ジクロロメタン、アセトニトリル、アセトン、n-ヘキサン、メタノールは残留農薬分析用をアセトニトリルはナウラム測定用を用いた。その他の試薬はいずれも和光純薬製特級を用いた。GC/MS分析の内部標準物質としてのフルオランテン-*d*₄ (純度98%以上) は、ケンブリッジアイソトープ社製 (Andover, USA) を用いた。塩化ナトリウムおよび硫酸ナトリウムは和光純薬製残留農薬分析用で、500℃で2時間加熱したものを用いた。水は水道水をAuto Still (Yamato KOG220) で蒸留した後、Milli-Q SP 700 (Millipore社製) で精製したものを用いた。

GC/MS装置はガスクロ注入口温度制御機能 (TPI: Temperature programmable inlet) を有するイオントラップ型GC/MS (Thermo Quest社製GCQ) を用いた。また、LC/MS装置はLC部がAgilent社製のHP1100、MS部がThermo Quest社製のFinnigan AGAで構成されたものを用いた。

2) 分析方法および定量下限値

分析法は厚生労働省により示された通知法³⁾ に従って実施した。脂溶性農薬のシマジン、チオベンカルブ等はメチレンジニルベンゼン共重合体のポリマー系固相カラム (PS-2, Waters社製) と活性炭カラム (MC-2, Waters社製) を用い、水溶性農薬のチクラム等はポリマー系固相カラム (HRB, Waters社製) を用いて抽出を行い、前者はジクロロメタン、後者はアセトニトリルで農薬の抽出を行い、分析を実施した。この他、水試料の前処理および機器分析の際に分解しやすいトリクロロホン⁴⁾、ベンフラカルブ⁵⁾、充分な感度が得られないビベロホス⁶⁾ は大容量注入-GC/MS法、イミノクタジン酢酸塩⁷⁾、ポリカーバメート⁸⁾、グラボン⁹⁾、ホセナル¹⁰⁾ については著者らが開発および改良した方法を用いて実施した。また、CNP-アミノ体¹¹⁾ はアルカリ性(pH10) 下で、ジクロロメタンによる溶液抽出後にGC/MS法で分析を実施した。また、ジグワットは鈴木ら¹²⁾ の方法を改良して実施した。102農薬の分析方法の概略及び定量下限値をTable 1に示した。

Table 1 Limits of quantitation(LOQ) and analytical methods of 102 pesticides

No.	Pesticides	Target value ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	Analytical method
1	Thiram	20	0.2	A
2	Simazine	3	0.004	B
3	Thiofenacarb	20	0.002	B
4	1,3-dichloropropene	5	0.02	C
5	Isocarbion	8	0.01	B
6	Diazinon	5	0.02	B
7	Fenitrothion	3	0.01	B
8	Inprathiocarb	40	0.003	B
9	Chlorothalonil	50	0.01	B
10	Propiconazole	50	0.005	B
11	Dakoron	8	0.05	B
12	Fenbuticarb	30	0.01	B
13	Chlorzinifosin	0.1	0.01	B
14	CNP-amine	-	0.05	B
15	Spinetorin	8	0.003	B
16	EPN	6	0.05	B
17	Bentazone	200	0.05	A
18	Carbofuran	5	0.01	A
19	2,4-D	30	0.05	A
20	Triallate	6	0.06	A
21	Acetate	80	0.2	A
22	Isopropyl	1	0.01	B
23	Chlorpyrifos	30	0.05	B
24	Trichlorfon	30	0.05	B
25	Pyridaphenthion	2	0.02	B
26	Imidacloprid	300	0.02	B
27	Ethionazole	4	0.01	B
28	Osine-copper	40	0.4	A
29	Captan	300	0.1	B
30	Chloranil	50	0.02	B
31	Tebuconazole-methyl	200	0.01	B
32	Fluazifent	200	0.004	B
33	Penoxyceton	40	0.1	B
34	Metalaxyl	50	0.05	B
35	Mepiquat	100	0.01	B
36	Azinphos	200	0.5	A
37	Dehiager	8	0.01	B
38	Terbucarb	20	0.01	B
39	Napropamide	30	0.01	B
40	Pyridinacarb	20	0.02	B
41	Dazometil	30	0.05	B
42	Benzothiazole	100	0.01	A
43	Benzofuran	80	0.01	B
44	Pendimethalin	100	0.01	B
45	Mecoprop	5	0.05	A
46	Methylthioan	30	0.05	B
47	Alachlor	10	0.02	B
48	Carbaryl	50	0.2	A
49	Ethionazole	6	0.05	B
50	Proxapachlor	40	0.002	B
51	Fthalide	100	0.003	B
52	Mefenoxam	9	0.002	B
53	Permethrin	40	0.003	B
54	Isoprocarb	10	0.05	B
55	Thiophanate-methyl	300	2	A
56	Thiophanate	200	0.02	B
57	Methidathion	4	0.01	B
58	Carpropamid	40	0.1	A
59	Isauctamide	40	0.003	B
60	Molinate	5	0.003	B
61	Procydimazole	90	0.1	B
62	Azinphos	3	0.02	B
63	Azinphos	10	0.05	B
64	Dalapon	80	0.8	D
65	Dichlorobutyl	10	0.01	B
66	Dimethoate	50	0.01	B
67	Diquat	5	0.05	E
68	Diazinon	20	0.1	A
69	Endosulfan	10	0.05	B
70	Etofenprox	80	0.05	B
71	Fenbuticarb	3	0.003	B
72	Glyphosate	2000	20	F
73	Malathion	50	0.05	B
74	Methamid	30	0.3	A
75	Bisoxazol	20	0.2	A
76	Bentazone	40	0.2	A
77	Sometrin	30	0.003	B
78	Disopropylate	3	0.02	B
79	Phosalone	4	0.04	B
80	Imidacloprid	20	0.01	B
81	Ethionazole	4	0.04	B
82	Probenazole	30	0.3	A
83	Eprocarb	10	0.1	B
84	Diazinon	800	0.02	A
85	Bifenthrin	200	0.1	B
86	Benzofuran-methyl	400	0.1	A
87	Triethylazole	80	0.8	A
88	Piperophos	0.9	0.009	B
89	Dimethoate	20	0.01	B
90	Azinphos	500	0.2	A
91	Imidacloprid	6	0.06	E
92	Fenbuticarb	2000	20	D
93	Polycarbamate	30	0.3	G
94	Halosulfuron-methyl	300	0.2	A
95	Flazasulfuron	30	0.1	A
96	Thiodicarb	80	0.2	A
97	Propiconazole	50	0.05	B
98	Sulfon	300	1	A
99	Perprocyfen	200	0.01	B
100	Trifluralin	60	0.01	B
101	Carbendazim	8	0.005	B
102	Fipronil	0.5	0.003	A, B

A: Solid phase extraction - LC/MS

B: Solid phase/No.14 liquid-liquid extraction - GC/MS

C: Pump and trap - GC/MS

D: Large volume injection - LC/MS/MS, No.64/No.92, liquid-liquid extraction-derivatization-GC/MS/MS

E: Solid phase extraction - HPLC-LC/MS

F: HPLC-Fluorescence detection

G: Alkali decomposition-derivatization liquid-liquid extraction - GC/MS

3) 総農薬方式

次の数式によって求めた検出指標値を用いて、水質評価を行った。

$$DI = \sum_{i=1}^n \frac{DF_i}{GFI}$$

ここでDIは検出指標値、DF_iは農薬iの検出値、GFIは農薬 i の目標値である (Table 1)。

4) 兵庫県下の農薬の使用状況

各調査地点の農薬の使用状況は、各地域の農業協同組合 (JA) からの農薬供給量、防除ごよみ、および

化学物質排出移動量届出制度 (PRTR) 法による集計結果から把握した。

III 結果および考察

1. 監視 15 地点における実施調査

1) 農薬の検出状況

2004 年 6 月に調査を行った監視 15 地点の原水からは、分析対象とした 102 農薬のうち、25 種類の農薬が検出された。25 農薬の検出地点別の原水および水道水中濃度を Table 2 に示した。原水中から検出された農薬を用途別に分類すると、除草剤 14 種類、

Table 2 Concentration of pesticides detected in raw and tap water collected at 15 points in Hyogo Prefecture in June, 2004

Sampling point	Use	A Lake	B Riv	C Riv	D Riv	E Riv	F Riv	G Riv	H Shallow well	I S.W.	J S.W.	K S.W.	L S.W.	M S.W.	N D.W.	O D.W.
Herbicide	H R.W.	0.35	0.79	0.77	0.18	0.08	0.77	0.30								0.24
(17)	T.W.							0.64								
Dymon	H R.W.	0.03	0.35	0.09	0.02	0.13			0.05							0.08
(8)	T.W.															
Sanctryn	H R.W.	0.005	0.021	0.137	0.006	0.021										
(7)	T.W.			0.004												
Diquat	H R.W.								0.2	0.3	0.3	0.2				
(67)	T.W.															
Pretlacher	H R.W.	0.041	0.036									0.023				
(5)	T.W.	0.010	0.004													
Homobutal	H R.W.	0.084	0.297						0.058							
(59)	T.W.	0.048	0.008						0.057							
Melate	H R.W.			0.011		0.012										0.017
(60)	T.W.			0.004												
Sarazan	H R.W.			0.021												
(7)	T.W.															
Thiobencarb	H R.W.			0.003												
(5)	T.W.			0.032												
Propyzamide	H R.W.			0.051												
(10)	T.W.			0.044												
Melnacon	H R.W.			0.107												
(52)	T.W.															
Piprothifos	H R.W.			0.017												
(8)	T.W.															
Dimethametryn	H R.W.			0.021												
(69)	T.W.															
Carbofenthoate	H R.W.			0.091												
(10)	T.W.			0.008												
Carpropamid	F R.W.								0.3					0.3		
(58)	T.W.															
Isoprotolane	F R.W.			0.028												
(8)	T.W.			0.005												
Iprobofen	F R.W.			0.026												
(15)	T.W.			0.005												
Flutalend	F R.W.					0.011										
(52)	T.W.															
Pyroquilon	F R.W.			0.036												
(8)	T.W.			0.034												
Fifalude	F R.W.						0.010									
(51)	T.W.															
Carbaryl	I R.W.							0.8	1.1					0.9		
(48)	T.W.															
Fenbion	I R.W.			0.015	0.011	0.019										
(71)	T.W.			0.008	0.008	0.013										
Carbofuran*	I R.W.			0.05												
(16)	T.W.			0.01												
Dimethoate	I R.W.			0.03												
(6)	T.W.			0.01												
Fipronil	I R.W.			0.005	0.008	0.006	0.005	0.004	0.006	0.005	0.004					
(10)	T.W.															
Total concentration	R.W.	0.170	1.650	1.218	0.019	0.343	0.224	1.591	1.664	0.678	0.304	1.100	0.300	0.080	0.237	
	T.W.	0.072	0.074	0.868	0.013	0.180		0.440	0.057							

* Decomposition product of carbofuran. Unit: µg/L.

H Herbicide, F Fungicide, I Insecticide, S.W.: Shallow well, D.W.: Deep Well, R.W.: Raw Water, T.W.: Tap Water, Riv.: River

() No. shown in Table 1

殺菌剤6種類、殺虫剤5種類であり、除草剤が最も多く検出された。農業別で、最も検出地点が多かったのは、フィプロニル(8地点)、ペンタゾンおよびダイムロン(7地点)、次いでシメトリン(5地点)、ジクワット(4地点)、プロモプチド、モリネート、プレチラクロール、カルバリル、フェンチオン(各3地点)、カルプロバミド(2地点)であり、シマジン他14農薬が各1地点から検出された。水道水においてはペンタゾン、プロモプチド、フェンチオンが各3地点から、プレチラクロールが2地点から検出され、シメトリン他10農薬が各1地点から、低濃度レベルで検出された。原水から検出されたほとんどの農薬は、兵庫県下で水稲農薬として使われている農薬¹²⁻¹⁴⁾であった。今回の調査時期は6月下旬であり、稲作において除草剤を中心に農薬散布がよく行われる時期¹²⁻¹⁴⁾で、本結果はこのこととよく一致していた。

また、水源別にみると深井戸1地点を除く14地点から1種類以上の農薬が検出された。湖沼水からは6種類、河川水からは1~14種類、伏流水からは3種類、浅井戸からは1~5種類、深井戸からは2種類の農薬が検出された。農薬の種類が14種類(B地点)及び10種類(C地点)と比較的多く検出された地点は水田に隣接して流れる河川であり、水田で散布された農薬が河川に流出したものと考えられた。検出率が高いダイムロンは水溶性が $1.7 \mu\text{g/L}$ と低く、土壌への吸着性が大きいにもかかわらず、流出

が認められる理由としては、水田からの流出形態が主に表面流出によるためであると報告されている¹⁵⁾。今回の結果でも、湖沼水、河川水などの表流水から主に検出されていた。一方、水溶性が $2,000 \mu\text{g/L}$ 、 $500 \mu\text{g/L}$ ¹²⁾と比較的高いフィプロニル、ペンタゾンは河川水からも比較的高い濃度で検出されたが、浅井戸等の地下水からも検出された。これらの農薬は、比較的水溶性が高く地下への浸透性が高いものと推察される。著者らの過去の調査結果では、深井戸から全く検出されなかったが¹²⁾、今回、102農薬に種類を増やし、従来よりも低濃度まで測定した結果、深井戸からも僅かにN地点でペンタゾンとモリネート(水溶性 $880 \mu\text{g/L}$ ¹²⁾)が検出された。

これらの調査結果から、監視強化の水源として地下水、特に浅井戸はモニタリングを要する水源であることが明らかとなった。

2) 農薬総濃度と「総農薬方式」による水質評価

Fig. 2に各地点ごとの検出農薬の総濃度と総農薬方式による検出指標値を示した。原水における検出農薬の総濃度について、著者らの今までの調査結果¹²⁾では河川等の表流水が浅井戸等の地下水に比べて高値を示したが、今回の102農薬の測定結果では、地点によって異なるものの、一部の地下水から表流水に匹敵する濃度が検出された。また、検出指標値で比較検討を行った結果、検出された総濃度が低い浅井戸1, Jが総濃度が高い浅井戸Hと同レベルとなり、

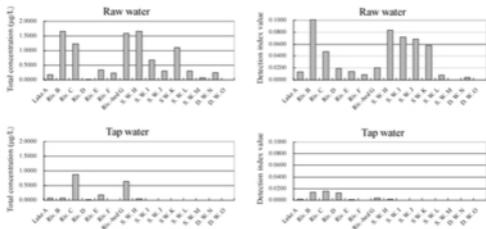


Fig. 2 Comparison of total concentration and detection index value of pesticides
Riv: River, S.W.: Shallow well, D.W.: Deep well
A~O: Sampling points shown in Fig. 1.

これらの地点の調査結果から総農薬方式による検出指標値で水質を評価する意義が明確に示された。

兵庫県における水源の種類として、地下水の数が河川水や湖沼水である表流水の約5倍²⁰⁾となっている。本研究結果も踏まえて、本県では浅井戸も監視強化が必要な水源のひとつとして方針²¹⁾を出している。また、日本の水道水源に占める地下水の割合は、上水道事業等(年間取水量167億^{m³})においては25%²²⁾、簡易水道(年間取水量3億^{m³})においては52%である。そのため、地下水の農薬監視は全国的にも重要であることが考えられる。

なお、今回の調査対象地点における総農薬方式による検出指標値は、原水で最高値0.10、浄水で最高値0.015を示した。これらの値は規制値1と比べて非常に低い値にあったが、原水に農薬が多く検出された地点、毒性の高い農薬が検出された地点の詳細な監視調査は今後も重要であることが考えられた。

3) 浄水処理による農薬濃度の変化

農薬が検出された14地点の原水とその水道水について農薬濃度を比較検討した。水道水において全く検出されなかった農薬は、フィプロニル、ピペロホス、ダイムロン、ジクワット、シマジン、メフェナセト、ジメタメトリン、カルプロバミド、フルトラニル、フサライド、カルバリルの11農薬、0~50%残存していた農薬はシメトリン、モリネート、カフェンストロール、イゾプロチオラン、イプロベンホス、ピロキロン、カルボフラン、ジメトエートの8農薬、地点により幅があるが50%以上残存していた農薬はプロピザミド(86%)、フェンチオン(55~78%)、プロモプチド(3~100%)、チオベンカルブ(51%)、プレチラクトール(0~95%)、ペンタゾン(0~98%)であった。水中農薬の塩素処理による分解性については、135農薬の半減期を調査した奥村²³⁾、大戸らの報告^{24,25)}があり、上記の11農薬のうちピペロホスは塩素水中での半減期が1.8時間と報告²³⁾されており、今回100%除去されていた主要因は塩素による分解であると考えられた。また、ピペロホス以外の10農薬の塩素処理室内実験(有効塩素濃度1.0mg/L、24時間)で、完全に分解できないメフェナセト等の多くの農薬種(未発表データ)が認められたことから、浄水処理による農薬除去に凝集沈殿や活性炭処理の寄与が比較的高いものと考えられた。プロピザミドは塩素分解し難いと報告^{24,25)}があり、今回の結果とよく一致していた。チオベンカルブは奥村の報告²³⁾では半減期

が86.6時間と比較的長いものに対して、30分間で消失といった異なる報告^{26,27)}もあるが、今回の結果からは比較的塩素による分解が遅いものと考えられた。一方、プロモプチドは水道水中からの検出が報告されている農薬²⁸⁾であり、我々の実験(未発表データ)でも塩素処理による分解が比較的困難な農薬種であった。今回、原水で検出された農薬の浄水処理過程における詳細な挙動について、未だ十分に検討・報告されていない農薬が比較的多く存在しているため、塩素による分解だけでなく、オゾンによる酸化分解、凝集沈殿や活性炭吸着などを含めた全過程における挙動(除去性)について、今後更に詳細な研究が必要であることが考えられた。

2. 監視3地点における経月的変動調査

1) 農薬の検出状況

兵庫県における代表的な調査地点、湖沼水(A地点)、河川水(C地点)および伏流水(G地点)の3地点における6月~11月の原水および水道水中農薬濃度をTable 3に示した。A地点の原水からは延べ9農薬が検出された。最も高濃度で検出されたのはプロモプチド(0.008~0.084 $\mu\text{g/L}$)で、6月に最も高く、徐々に減少しながら11月までの間、毎月検出された。次いで、フィプロニルが3回、ペンタゾンが2回検出された。C地点の原水からは延べ11農薬が検出された。最も高濃度で検出されたのはモリネート(0.004~0.011 $\mu\text{g/L}$)で、6月に最も高く、徐々に減少しながら9月までの間、毎月検出された。次いで、フィプロニル及びペンタゾンが3回、シメトリン、ダイムロン、フェンチオンが各2回検出された。G地点の原水からは延べ5農薬が検出された。最も高濃度で検出されたのはクロロネブ(0.009~0.015 $\mu\text{g/L}$)で、7月~9月に毎月検出された。次いで、ペンタゾンが2回検出された。

農薬の使用状況からみると、検出された農薬はすべてこれらの地域で使用されていた。プロモプチドはA地点の地域において水田除草剤として6月の田植え時期に使用されていた。モリネートはC地点の地域の中期水稲除草剤として6月に使用されていた。この地域におけるモリネートの使用密度は6.6 $\text{kg}/\text{km}^2\cdot\text{年}$ と県下96市区町の中で2番目に高い値であった^{29,30)}。G地点で検出されたクロロネブはゴルフ場のペントグラス葉腐病に梅雨終期~9月の期間に散布^{31,32)}されており、検出された時期とよく一致していた。

Table 3 Concentration of pesticides detected in raw and tap water collected at three points in Hyogo Prefecture from June to November, 2004

Pesticides	Use	22-Jun		27-Jul		27-Aug		29-Sep		19-Oct		26-Nov	
		R.W.	T.W.	R.W.	T.W.	R.W.	T.W.	R.W.	T.W.	R.W.	T.W.	R.W.	T.W.
Bromobenzide(59)	H	0.084	0.048	0.057	0.038	0.038	0.018	0.046	0.033	0.010		0.008	
Benazone(17)	H					0.05		0.07					
Bromoxyl(75)	F										0.4		
Point A													
Dimethoate(66)	I	0.03	0.01										
Dymron(84)	H	0.03											
Fenitrothion(71)	I					0.019	0.010						
Perflachlor(53)	H	0.011	0.010										
Simetryn(77)	H	0.005											
Fipronil(102)	I	0.005		0.006		0.004							
Molinate(60)	H	0.011	0.004	0.008	0.005	0.004		0.004					
Benazone(17)	H	0.79	0.77	0.37	0.31			0.05					
Simetryn(77)	H	0.157	0.004	0.008	0.004								
Dymron(84)	H	0.09		0.02									
Point C													
Fenitrothion(71)	I	0.011	0.008							0.033	0.021		
Pyrophenol(59)	F	0.076	0.034										
Propyzamide(10)	H	0.051	0.044										
Iprobenfos(15)	F	0.026	0.005										
Simazine(2)	H	0.021											
Pencyuron(33)	F			0.014	0.010								
Fipronil(102)	I	0.006		0.007		0.004							
Chlorobenz(30)	F			0.012	0.007	0.009	0.009	0.015	0.009				
Point G													
Fenitrothion(71)	I					0.013	0.009						
Simetryn(77)	H	0.021											
Benazone(17)	H	0.77	0.64			0.09							
Carbaryl(48)	I	0.8											

H: Herbicide, F: Fungicide, I: Insecticide, R.W.: Raw water, T.W.: Tap water
 (): No. shown in Table 1
 Unit: $\mu\text{g/L}$

2) 農業総濃度と総農業方式による水質評価

Fig. 3およびFig. 4に3地点の6~11月の検出農薬の総濃度と総農業方式による検出指標値を示した。検出された各農薬の目標値が異なるため、総濃度の月変化と検出指標値の月変化のパターンは異なっていた。原水において、比較的高い検出指標値を示す要因となった農薬は、A地点の8月、C地点の6月および10月、G地点の8月においてはフェンチオンであり、A地点の10月においてはペノミルであり、G地点の6月においてはカルバリルであった。また、A地点とC地点の6月~8月の期間においてフィプロニルが検出されていたが、この追加設定された農薬の寄与も大きいことが明らかとなった。102農薬の目標値はその毒性により0.1 $\mu\text{g/L}$ ~2,000 $\mu\text{g/L}$ に設定されているが (Table 1)、フェンチオンの目標値は1 $\mu\text{g/L}$ 、ペノミルは20 $\mu\text{g/L}$ 、カルバリルは50 $\mu\text{g/L}$ 、フィプロニルは0.5 $\mu\text{g/L}$ であり、これらの農薬は毒性が強い部類に入っている。従って、毒性が強い農薬を含む原水の場合、総濃度として低い値であっても、検出指標値は高値を示すこととなり注意を要する。従来、個々の農薬ごとに水中濃度

を規制値と比較する方法、総濃度を比較する方法で水中農薬の汚濁評価が行われてきたが、今回の水質基準改正に伴う総農業方式による検出指標値の導入により、総合的な毒性評価が可能となった。

また、原水に検出されたペノミル、カルバリルおよびフィプロニルは浄水処理で除去され、水道水に検出されなかったため、A地点の10月およびG地点の6月における検出指標値は著しく低下した。さらに、一過性に検出されたフェンチオンは、原水中濃度の53~73%の範囲 (Table 3, n=4) で水道水に検出され、この場合の浄水処理による除去率は高値を示さなかったことから、検出指標値の大きな減少は認められなかった。フェンチオンに関する著者らの最近の研究結果では、高度浄水処理 (オゾン+粒状活性炭処理) で完全に除去できる結果を得ることができた (未発表データ)。

水道水の安全性を確保するためには、総農業方式による検出指標値の詳細な年内変動、経年変化を蓄積すること、浄水処理過程における分解・除去機構についても更に研究を行うことが必要であることと考えられた。

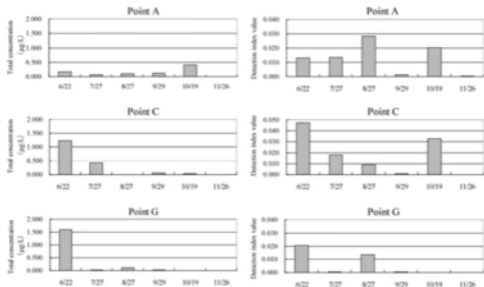


Fig.3 Comparison of total concentration and detection index value of pesticides in raw water from three sampling points

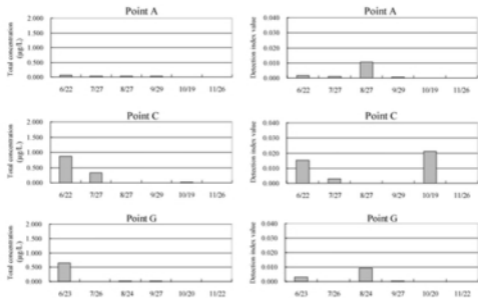


Fig.4 Comparison of total concentration and detection index value of pesticides in tap water from three sampling points

IV 要 旨

新規規制農薬を含む 102 農薬について、兵庫県下の農薬の検出実態を水源別等で比較検討し、総農薬方式による水質の評価を行った結果、以下の知見が得られた。

1. 兵庫県水道水質管理計画に基づく監視15地点の102農薬を測定した結果、水道原水から25農薬、水道水から14農薬が検出された。原水で最も多く検出されたのは除草剤で、農薬散布が行われる時期をよく反映していた。
2. 水源別では河川から最も多くの農薬が検出され、また浅井戸（地下水）においても比較的多くの農薬が検出されたことから、浅井戸は河川と同様に監視強化が必要な水源であることが明らかとなった。
3. 総農薬方式（検出指標値）による水質評価の結果、検出された農薬の総濃度が低い地点と高い地点で、検出指標値が同じ結果となる場合が認められた。検出指標値を高める要因は、これらの地点では毒性の強いフェンチオン等が検出されたことに起因することが考えられた。
4. 経月的変動調査（監視3地点）の結果でも、毒性の強いフェンチオン、ペノミル、カルバリルおよびフィプロニルが検出された地点、時期に検出指標値は高いことが認められ、これらの農薬が特に監視強化の必要な農薬種であることが明らかとなった。
5. 農薬に対する水質評価の方法として、従来は個々の農薬ごとに水中濃度を規制値と比較する方法や総濃度を比較する方法で水中農薬の汚濁評価が行われてきたが、今回の総農薬方式による検出指標値の導入（総合的な毒性評価）により、毒性が強い農薬を含む原水の場合には総濃度として低値であっても検出指標値は高値を示すため特に注意を要すること、監視強化すべき水源および農薬種が判明し、本水質評価法の意義が認められた。
6. 浄水処理過程において100%除去されていた農薬は、フィプロニル、ピペロホスなど11農薬、50%～100%除去されていた農薬はシメトリンなど8農薬、50%未満の農薬はプロピザミド等6農薬であった。これらの結果から、除去率の高い農薬種と低い農薬種が判明したが、特に除去率の低い農薬種については着目して、除去対策（方法）の検討を行う必要性が考えられた。

水道水の安全性確保のため、今後も詳細な監視調査、検出指標値による水質評価や除去機構の解明等に関する研究を実施することが必要と考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、試料水の採取にご協力をいただきました兵庫県健康福祉部生活衛生課ならびに各市町水道事業所の皆様へ深く感謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省：「水質基準に関する省令」、2003年5月30日、厚生労働省令第101号
- 2) 厚生労働省健康局長通知：「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について」2003年10月10日、健発第1010004号
- 3) 厚生労働省健康局長通知：「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正について」2007年11月15日、健発第1115003号
- 4) Suzuki, M., Yamato, Y. and Akiyama, T. : Fate of herbicide CNP in river and agricultural drainages. *Water Res.*, **12**, 771-781(1978)
- 5) 土屋悦輝, 中室克彦, 酒井康行: 水のリスクマネジメント実務指針, P51 - 57, サイエンスフォーラム, 東京 (1998)
- 6) 近藤秀治, 福山龍次, 劉愛民: 石狩川水系における農薬の多成分同時分析とその季節変動. *環境化学*, **11** (2), 253-266(2001)
- 7) 高橋保雄, 小野寺祐夫, 森田昌敏, 寺尾良保: 水道原水及び水道水中の農薬とその濃度. *環境化学*, **13** (1), 89-101(2003)
- 8) 厚生労働省健康局水道課長通知：「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について」2003年10月10日、健水発第1010001号(最終改正 2005年11月1日)
- 9) 兵庫県健康生活部健康局生活衛生課：「水質監視に関する計画」2004年4月1日、「兵庫県水道水質管理計画」2005年9月第2次策定
- 10) 川元達彦, 寺西清: GC/MSにおける注入口温度の制御可能なTPIオンカラム注入法を適用した水中農薬分析について. *兵庫県立衛生研究所年報*, **33**, 124-132(1998)
- 11) T. Kawamoto and N. Makihata : Development

- of a simultaneous analysis method for carbofuran and its three derivative pesticides in water by GC/MS with temperature programmable inlet on-column injection. *Anal. Sci.*, **19**, 1605-1610 (2003)
- 12) 川元達彦, 矢野美穂, 巻幡希子: 水道法水質基準改正で規制された農薬の注入口温度制御型-GC/MS法による分析, 日本分析化学会第53年会講演要旨集, P323 (2004)
- 13) T. Kawamoto, M. Yano and N. Makihata: Analytical method for determining iminocetadine triacetate by LC/ESI/MS using hydrophilic interaction chromatography. *Anal. Sci.*, **22**, 489-490 (2006)
- 14) T. Kawamoto, M. Yano and N. Makihata: Development of a high-sensitivity quantitative analytical method for determining polycarbamate by gas chromatography-mass spectrometry incorporating temperature-programmable inlet on-column injection. *J. Chromatogr. A.*, **1074**, 155-161 (2006)
- 15) 川元達彦, 山崎富夫, 中野武: 総農薬方式による水中102農薬の微量分析, 第11回日本水環境学会講演要旨集, P166-167 (2008)
- 16) 鈴木俊也, 宇佐美美穂子, 岡本寛, 永山敏廣: 東京都多摩地域における飲用の井戸水中農薬の実態調査, 水環境学会誌, **29**(10), 659-662 (2006)
- 17) 上杉康彦, 上野雅子, 櫻岡政二: 最新農業データブック第3版, P36-397, ソフトサイエンス社, 東京 (1997)
- 18) 日本植物防疫協会編: 農業要覧-2002-, P214-377, 東京 (2002)
- 19) 兵庫県農林水産部普及教育課編: 平成14年度農作物病害虫・雑草防除指導指針, P297 (2002)
- 20) 永源修, 海老瀬潤一, 浮田正夫, 井上隆信: 除草剤ダイムロンの水田からの流出特性, 水環境学会誌, **24**, 325-330 (2001)
- 21) 川元達彦, 巻幡希子, 辻英高, 寺西清: 兵庫県下の水源地からみた水道原水中の農薬の濃度及び検出頻度の経年的変動. *J. Health Science*, **45**, 401-411 (1999)
- 22) 兵庫県県民生活部生活衛生課: 平成12年度水道施設現況調査, (2002)
- 23) 厚生労働省健康局水道課: 平成13年度水道統計, 施設・業務編, 第84-1号, P41 (2003)
- 24) 奥村為男: 水中農薬の塩素およびオゾンによる分解について, 水環境学会誌, **15**, 62-69 (1992)
- 25) 大戸幹也, 山本敦, 松永明信, 高柳信孝, 鎌名智子, 斉藤行雄, 水上英一: 塩素処理水中のゴルフ場使用農薬の分解, 環境化学, **3**, 59-64 (1993)
- 26) 日本水道協会編: 上水試験方法解説編, P572-573, 東京 (2001)

〔原 著〕

栗鹿山山林域（兵庫県丹波市）からの窒素およびリンの流出

梅本 諭^{1*} 駒井 幸雄² 竹田 洋子³ 平木 隆年⁴ 藍川 昌秀⁴

Nutrient Runoff from Forested Watershed at Mt. Awaga in Hyogo Prefecture

Satoshi UMEMOTO^{1*}, Yukio KOMAI², Yoko TAKEDA³,
Takatoshi HIRAKI⁴ and Masahide AIKAWA⁴¹Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihira-cho, Suma-ku, Kobe 654-0037, Japan,²Faculty of Engineering, Osaka Institute Technology, 5-16-1, Omiya, Asahi-ku, Osaka 535-8585, Japan, ³Takarazuka Health and Welfare Office, 2-4-15, Asahi-cho, Takarazuka 665-8567, Japan, and ⁴Atmospheric Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihira-cho, Suma-ku, Kobe 654-0037, Japan

Nutrients and other pollutant runoffs from the stream in a forested area in the central eastern part of Hyogo Prefecture were investigated to estimate the specific pollutant loads for three years from 1999 to 2002. Small watershed located the east slope at Mt. Awaga which had no influence of artificial pollution was selected.

The mean stream flow volume was higher than that in Ikuno dam watershed located at a distance of 10 km of southwest selected in our previous report. The difference of slopes in the both areas causes the difference of stream flow volume. The water quality of the streams in the both area was usually stable in a low concentration, but it increased when the stream flow volume increased after the rain events. Significant differences were recognized between T-N and T-P loads in the both area. In particular, the difference of T-P loads among them was too big, and it was caused by the difference of the surface geology of each watershed. It was found from the balance between input loads by atmospheric deposition and output loads by stream flow from forest area that the forest area at Mt. Awaga watershed played a role as a purifier of T-N and TOC and as a discharger of T-P.

I はじめに

河川水環境を保全するうえで、流域全体の水管理を行う必要がある。そのために流域に存在する種々な汚濁源からの汚濁物質の排出状況を的確に把

握することは重要なことである。これまで山林や農耕地等の面源（非点源ともいう）からの排出状況については、降雨などの自然的条件や植林・伐採あるいは農作業といった人為的条件によって大きく左右されるため十分に把握されていないのが現状である。特に山林域については調査頻度についてみても、週1回のもの¹から数週間に1回のもの²など、それぞれの研究方針に基づいて実施・評価されており、統一的方法が確立されていない。また、立地条件等が悪く試料採取におおきの労力がかかること、精度を高めるには長期にわたる高頻度の調査が必要であ

¹水質環境部 ²大阪工業大学工学部³宝塚健康福祉事務所 ⁴大気環境部

*別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究所センター

水質環境部 梅本 諭

ること等条件の厳しさにより、実施された例は少ない¹⁰⁾。そのため、汚濁物質の排出負荷原単位についても統一されたものが無いのが現状である。筆者らは山林域からの排出負荷原単位を精度高く求めるため、人為的汚染の少ない山林域として兵庫県中央部に位置する市川流域上流の生野ダム遊山湖に流入する山林域小河川を対象に選定し、小集水域法により高精度で長期にわたる調査を実施し、窒素やリン等の流出負荷量を求めてきている²⁻¹⁰⁾。

本研究では、兵庫県の中央東部に位置する栗鹿山東斜面の山林集水域を対象にして調査を行い、人為的汚染の影響をほとんど受けていない山林域の一例として、窒素およびリン等栄養塩類の流出負荷量を求めた。また、近接する生野ダム遊山湖へ流入する山林域小河川での汚濁物質流出量に関する研究で得られた結果との比較も行った。

II 材料と方法

1. 調査地点および調査時期

兵庫県にある一級河川である加古川の最上流部にある支川、稲土川の最上流部にある栗鹿山山林集水域（丹波市青垣町）を対象に調査を行った。当該集水域は栗鹿山の東斜面の標高280～962 mに位置し、集水域面積は4.1 km²で、植生はスギ・ヒノキの人工林（両者の比率はほぼ1:1）が主として分布し、アマツブサイゴクミツバツブツジ群集やミズナラケリ群落がところどころ散在している¹⁰⁾山林域である。集水域内には居住者も農地もまったく無く、人的汚染源はほとんど認められない。表層地質は安山岩溶岩および火砕岩類が分布¹¹⁾し、土壌は褐色森林土壌のみが分布¹²⁾している。調査地点の概略をFig. 1に示す。

調査時期は1999年5月～2002年4月の3か年間で、原則として週1回の頻度で集水域の末端で河床に岩盤が露出しているところに測定点を定め、河川水を採取し分析に供した。

2. 分析項目および分析方法

分析項目および用いた分析方法をTable 1に示した。なお、調査地点における河川流量は、月1回実測（河川の流路断面積と流速を実施し流量計算式¹³⁾から算出）を行うとともに、他の日は河川内に水位測定点を定め、水位を測定した。月1回測定の実測流量（m³/sec）とそのときの実測水位（m）とから関係式を求め、水位測定点における水位H（m）から河川

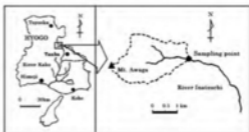


Fig.1 Schema of sampling point of forested watershed at Mt. Awaga catchment

○ District of forested watershed

Table 1 Measuring items and their methods

Item	Method
pH	Glass electrode method (Orion M 13 pH meter)
EC	Electrode method (TOA conductivity meter CM-608)
SS	Glass fiber filter paper method (Whatman GFC)
NO ₃ -N	Calculation from the value of NO ₃ ⁻ , measured by ion chromatography (Dionex DX-300)
NO ₂ -N	Calculation from the value of NO ₃ ⁻ , measured by ion chromatography (Dionex DX-300)
NH ₄ ⁺ -N	Indophenol blue absorptionmetry GBC KD102 ¹⁴⁾ 42.2 after filtration by Whatman GFC
T-N	T-N analyzer (Yamagoto TN-301P) method
PO ₄ -P	Molybdenum blue absorptionmetry GBC KD102 46.1.1) after filtration by Whatman GFC
D-P	The same method for T-P after filtration by glass fiber filter paper (Whatman GFC)
T-P	Potassium persulfate decomposition method GBC KD102 46.3.1)
TOC	TOC analyzer (Shimadzu TOC-5000A) method

EC : Electric Conductivity
SS : Suspended Solids

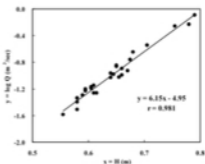


Fig.2 Relationship between water levels and flow rates at the sampling point

流量 Q (m^3/sec)を算出した。実測流量と水位の分布状況をFig. 2に示した。これらの分布から、最小二乗法で線形回帰して得られた H - Q 関係式を求め以下に示した。

$$\log Q = 6.15 \times H - 4.95$$

(サンプル数 $n=27$, 相関係数 $r=0.981$)

日降水量は調査集水域の北西約7 kmにあるアメダス観測点(和田山)での値を用いた。また、調査地点の上流約200 mの地点に簡易型雨水採取装置¹⁷⁾を設置して、2000年5月~2002年4月の2年間、原則として1週間ごとにバケツ降水を採取し、1か月ごとのコンポジット試料とした後、分析し、集水域への大気降下物による負荷量を求めた。

III 結果および考察

1. 降水量および河川流量

日降水量および河川流量をFig. 3に示した。年間降水量は1999年5月1日~2000年4月30日、2000年5月1日~2001年4月30日および2001年5月1日~2002年4月30日のそれぞれの1年間で1,856 mm, 1,233 mmおよび1,624 mmで、平均値は1,568 mmとなり当該地域における年間平均降水量と大きな違いはなかったが、調査年により20%前後変動していた。

河川流量は、0.02~3.26 m^3/sec の範囲で変動しており、平均値は0.29 m^3/sec であった。平均値から見た単位面積当たりの比流量は47.1 $m^3/ha/日$ となり、同時期に測定した生野地域における比流量(22.4~31.7 $m^3/ha/日$)に比べて高かった。その一因としては、河集水域が分布する山林域の傾斜が、生野ダム集水域では168~172/1000であるのに対して、栗産山集水域では227/1000と約1.3~2.1倍と急傾斜になっており、降水が流出しやすくなっていることが考えられた。

2. 水質の変動状況

各水質の最大値、最小値および平均値をTable 2に、T-NとT-P濃度の変動状況をFig. 4に示した。

pHは7.20~7.83の少しアルカリ側に偏っているがほとんど変動がなく、平均値は7.48であった。変動幅が少なく明瞭ではないが河川流量が多くなったときに低下する傾向が認められた。生野集水域における場合と同様に多量の降水により表層土壌との接触も少なくなり、土壌の緩衝作用の効果が無くなり、降水自体の低pHの影響が現れ、低下したものと考えられた。

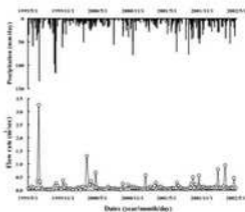


Fig. 3 Daily variation of precipitations and weekly variation of flow rates
Precipitation: Data at Wadayama from AMeDAS, Japan Meteorological Agency

Table 2 The maximum, minimum and average concentration of each item in the river water at sampling point
($n = 160$ for each item)

	pH	EC($\mu mhos/cm$)	DO(mg/L)	NO ₃ -N(mg/L)	NH ₄ -N(mg/L)
Max	7.83	0.7	30	1.00	0.012
Min	7.2	0.4	0.4	0.02	<0.001
Avg	7.48	0.8	0.4	0.40	0.007

	T(mg/L)	PO ₄ -P(mg/L)	B-P(mg/L)	T-P(mg/L)	TN(mg/L)
Max	1.04	0.019	0.019	0.060	2.5
Min	0.12	0.007	0.007	0.007	0.2
Avg	0.45	0.012	0.012	0.014	1.0

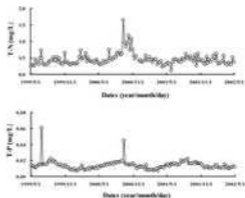


Fig. 4 Weekly variations of TN and TP concentrations in river water

ECも4.4~6.7 mS/mの狭い範囲で変動しており、平均値は5.8 mS/mであった。河川流量が多くなれば低下していた。

SS濃度は0.1~30 mg/Lの範囲で変動しており、平均では0.4 mg/Lであった。降雨により河川流量が増加したときのみ高くなり、これ以外の時にはほとんどが0.1 mg/Lと低濃度で、かつ安定していた。

無機態窒素のうちNO₃-Nはすべての試料で不検出、NH₄-Nは0.001~0.032 mg/L、平均で0.007 mg/Lと低濃度であった。一方NO₂-Nは0.18~1.00 mg/L、平均値で0.40 mg/Lと高くT-Nの70%以上を占めていた。T-Nは0.12~1.64 mg/Lの範囲で変動し、平均値は0.45 mg/Lで、それらに占める割合が高いNO₂-Nに強く影響されて、その変動とはほぼ同様なパターンを示した。T-NおよびNO₂-Nは河川流量が多くなれば高くなる傾向が認められた。

T-Pは0.007~0.061 mg/Lの範囲で変動しているが、ほとんどが0.01~0.02 mg/Lの値で、河川流量が調査前日の降水の影響を受けて多いときに高濃度になった以外は比較的安定した水質を示していた。平均値は0.014 mg/Lであった。T-Pに占めるD-Pの割合は、平均値でみると50~70%であるが、河川流量が多くSS濃度が高い降雨時後の値を除く平時ではそのほとんどがD-Pであり、また、D-PのほとんどがPO₄-Pであった。

TOCは0.2~2.5 mg/Lの範囲で変動し平均値は1.0 mg/Lと低濃度であった。

いずれの水質項目も、平時のように河川流量が比較的少ないときには低濃度で安定しているが、多量の降雨のあった後の河川流量が増加したときに高くなっていた。

同時期に調査した生野ダム銀山湖周辺の山林集水域における結果と比べて、T-NとT-Pの2項目に統計的に有意の差が認められた。特にT-Pについては本調査結果の方が数倍高い値を示した。水質に大きく影響すると考えられる因子として、集水域の地質が考えられる。そこで、両調査地点における河川底質と集水域内に主に分布する岩石を採取し、酸分解抽出処理^{15,16)}後、Table 1に示すT-Pの分析法で測定比較した。なお、岩石試料は風化された表面をカッピングして取り除き、新鮮な状態とした後上記と同様に測定した。別途それらの主要成分をエネルギー分散型蛍光X線分析装置(日本電子製エレメントアナライザーJSX-3220)を用いて測定し、底質と集水域の地質との関係について検討した結果、両者に明らかな関係が認められ、底質を用いることによ

り集水域表層地質が代替できることが分かった。なお、測定方法は足立ら¹⁷⁾の測定条件に準じて行った。また、底質中のT-P濃度と河川水中のT-P濃度の間に相関係数0.97の強い正の相関関係が得られ、河川水中のリン濃度は集水域の表層地質に影響を受けていることが明らかになった。

3. 汚濁物質流出負荷量の算定

河川流量および水質分析結果から、区間代表法¹⁸⁾により1999年5月1日~2000年4月30日、2000年5月1日~2001年4月30日および2001年5月1日~2002年4月30日のそれぞれの1年間のT-N、T-PおよびTOCの単位面積当たりの年間流出量(比流出負荷量)、流出水量を算出した。その結果をTable 3に示した。

降水量と流出水量から求めた降水の流出率は57.6~78.1%と計算され、一般的にいわれている流出率と比べて大きな違いはなかった。本調査のように降雨時の影響を考えずに週1回の定期的調査データから区間代表法で計算される比流出負荷量には、流量が多かつ濃度が高い降雨の影響を含む日のデータが欠けている可能性があり過少評価されると推察されたが、降雨時を加味して調査した生野集水域における結果と同程度であり、得られた数字は妥当なものであると考えられた。

一方、大気降下物による負荷量は2年間の調査ではあるが、T-N、T-PおよびTOCそれぞれについて751 kg/km²/年、12.3 kg/km²/年および1,840 kg/km²/年と算出された。これらの値とTable 3の平均値から考えて、生野集水域ではT-N、T-PおよびTOCいずれも浄化型であった^{18,19)}が、本調査対象である栗山山山林集水域は、T-P負荷については付加型であり、T-NおよびTOC負荷については、既に報告した硫黄成分²⁰⁾と同様に、浄化型であることが分かった。

Table 3 Specific runoff loads of T-N, T-P and TOC, and runoff flow volumes

Period	Runoff water volume mm/year	Specific runoff loads (kg/km ² /year)			Precipitation mm/year
		T-N	T-P	TOC	
1999.5.1~ 2000.4.30	1,450	764	38.1	1,850	1,856
2000.5.1~ 2001.4.30	704	424	10.2	779	1,223
2001.5.1~ 2002.4.30	1,155	355	16.7	1,220	1,624
Ave.	1,103	583	21.7	1,280	1,568

Precipitation: Data at Wadayama from AMeDAS, Japan Meteorological Agency

IV 要 旨

人為的汚染の影響をほとんど受けていない山林域の例として、兵庫県の中央東部に位置する栗鹿山東斜面の山林集水域を対象にして調査を行い、窒素およびリン等栄養塩類の流出負荷量を求めた。また、近接する生野ダム湖調流入の山林域での調査結果と比較した。

得られた知見は以下のようである。

1. 河川流量は、 $0.02 \sim 3.26 \text{ m}^3/\text{sec}$ の範囲で変動しており、平均値は $0.20 \text{ m}^3/\text{sec}$ であった。平均値から見た単位面積当たりの比流量は生野地域に比べて高かった。両集水域が分布する山林域の傾斜の違いが一因と考えられた。
2. いずれの水質項目も、河川流量が少ないときには低濃度で安定しているが、多量の降雨のあった後の河川流量が増加したときに高くなっていた。
3. 生野ダム湖調流入の山林集水域における結果と比べて、T-NとT-Pの2項目に統計的に有意な差が認められた。特にT-Pについては差が大きかった。この原因は集水域の表層地質に影響を受けていることが分かった。
4. 降雨時の影響を考えずに週1回の定期的調査データから区間代表法で計算される比流出負荷量は、降雨時を加味して調査した生野集水域における結果と同程度であり、過少評価は認められなかった。
5. 大気降下物による負荷量と本調査で得られた山林集水域からの流出負荷量から、本栗鹿山山林集水域はT-NおよびTOC負荷については浄化型、T-P負荷については排出型であることが分かった。

謝 辞

本研究を実施するに際し、調査方法やデータの取り扱い等について滋賀県立大学國松孝男教授、豊橋技術科学大学井上陽信教授に種々ご助言を頂いた。ここに記して感謝の意を表します。

本研究の一部は、ひょうご科学技術協会および河川環境管理財団の助成金を受けて実施した。

文 献

- 1) 國松孝男, 須戸幹: 林地からの汚濁負荷とその評価, 日本水環境学会誌, **20**, 810-815(1997)
- 2) 生田和義, 藤山英保, 長井武雄: 山林小流域からの窒素流出に影響をおよぼす渓流流量と土壌温度,

日本土壌肥科学雑誌, **66**, 348-355(1995)

- 3) 國松孝男, 須戸幹: 森林渓流の水質と汚濁負荷流出の特徴, 琵琶湖研究所報, No.14, 6-15(1997)
- 4) 福島武彦, 松重一夫: 山林河川における流出特性と水質の関係について, 日本水環境学会誌, **18**, 909-916(1995)
- 5) 梅本諭, 駒井幸雄: 山林小河川における栄養塩類の濃度変動と流出特性, 国立環境研究所研究報告, No.144, 101-113(1999)
- 6) Komai, Y., Umemoto, S. and Inoue, T.: Estimation for amount of annual runoff of major ionic species by regression model in forested watershed, Proc. of 1st World Cong. of Internal. Water Assoc., CD-ROM NP149(2000).
- 7) Umemoto, S., Komai, Y. and Inoue, T.: Runoff characteristics of nutrients in the forest streams in Hyogo Prefecture, Japan, *Water Sci. and Technol.*, **44**(7), 151-156(2001).
- 8) Komai, Y., Umemoto, S. and Inoue, T.: Runoff Characteristics of major ionic species during rain events in forested watershed, *Water Sci. and Technol.*, **44**(7), 105-112(2001).
- 9) 環境庁: 第3回自然環境保全基礎調査(植生調査), 昭和59年度調査, 現地植生図兵庫県 16, 環境庁, 東京 (1984).
- 10) 兵庫県: 兵庫県地質鉱産図, 同解説書, 兵庫県, 神戸 (1973).
- 11) 経済企画庁総合開発局: 土地分類図(表層地質図, 土壌図)兵庫県, 経済企画庁, 東京 (1974)
- 12) JIS K0102(工場排水試験方法), 日本規格協会, 東京 (2008).
- 13) JIS K0094(工業用水・工場排水の試料採取方法), 日本規格協会, 東京 (2004).
- 14) 小林樹穂, 中川吉弘: 1ヶ月間採取法による雨水中水銀のモニタリング, 兵庫県立公害研究所研究報告, No.23, 21-26(1991).
- 15) 環境庁: 底質調査方法(昭和63年9月8日環境水管第127号 環境庁水質保全局長通知)(1988).
- 16) 駒井幸雄: 神戸大学博士論文 加古川流域と播磨灘におけるリンの形態と移動に関する研究, 21-39(1994).
- 17) 足立光司, 田結庄良昭: 神戸市東部における表層土壌の重金類汚染, 神戸大学発達科学部研究紀要, **8**(1), 89-102(2000).
- 18) 駒井幸雄: 森林集水域におけるリンの収支と流出特性, 日本水環境学会誌, **27**(9), 591-594(2004)

- 19) 梅本諭, 駒井幸雄, 竹田洋子, 井上隆信, 今井
章雄: 山林集水域からの汚濁物質の流出について,
第 33 回環境保全・公害防止研究発表会講演要旨集,
64 (2006).
- 20) Aikawa, M., Hiraki, T., Komai, Y., Umemoto, S.
and Tokuchi, N. : *J. Jpn. Soc. Atmos. Environ.*,
43(1), 23-30 (2008)

[Original Paper]

Annual variation of air temperature distributions observed in Augusts 2005 and 2006 in urban area of Japan

Masahide AIKAWA* and Takatoshi HIRAKI

*Atmospheric Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and
Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, 654-0037, Japan*

The air temperature distributions in August (summer season) were measured for two years (2005 and 2006) in an approximately 10 x 15-km urban area in Hyogo Prefecture, Japan, in order to evaluate the annual variation of the spatial air temperature distribution. The ultimate aim of the study is to propose effective measures against the heat island phenomenon in the future. The air temperature was measured by using naturally ventilated thermometer shelters installed in elementary schools and junior high schools. Some similar characteristics were observed in the distributions of the monthly mean air temperature, monthly mean of the daily-highest air temperatures, and monthly mean of the daily-lowest air temperatures in 2005 and 2006. On the other hand, some annual variations were also observed in each air temperature distribution. The characteristic air temperature distributions described in the previous paper (Aikawa et al., 2007) were observed more clearly in 2006. The higher monthly mean air temperature appeared 5 to 10 km inland from the coast, and the severe thermal condition represented by the daily-highest air temperature was found in inland areas. The air temperature distributions showed an annual variation, suggesting that continuous monitoring is necessary in order to propose effective measures in the future.

I INTRODUCTION

With the objective of limiting thermal pollution in urban areas, scientists around the world have studied the urban heat island phenomenon¹⁻⁷⁾. Because the urban heat island phenomenon is not a global but a local environmental pollution issue, it is necessary for local governments to take measures against individual phenomena. Mikami et al.⁸⁻¹⁰⁾ have thoroughly studied urban heat islands in the Tokyo metropolitan area, and the Tokyo metropolitan government has established measures against the urban heat island phenomenon in that area. The Hyogo prefectural government instituted measures against heat

islands in August 2005. It is necessary to measure the air temperature to verify the effect of the action plan and to propose effective measures in the future. Aikawa et al.¹⁰⁾ studied the accumulated air temperature data in a 15 x 15-km area in an urban area of Hyogo Prefecture, Japan, and characterized the growing heat island phenomenon in the area. In addition, Aikawa et al.¹¹⁾ clarified the characteristic air temperature distributions by season in the relevant area, by using a data set obtained from the monitoring network newly constructed by the Hyogo prefectural government. In order to verify the effect of the action plan precisely and to propose effective measures in an appropriate manner in the future, we have to continuously collect detailed data sets on the air temperature, and properly analyze the accumulated data sets. The data sets obtained in 2005 were studied previously in detail by Aikawa et al.¹¹⁾. The newly

大気環境部

* 別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究所センター

大気環境部 藍川 昌秀

accumulated data sets in the summer season (August, 2006) were analyzed, and the findings will be reported and discussed in this paper.

II MATERIALS AND METHODS

1 Air temperature measurement

The air temperature was measured at elementary schools and junior high schools located within a 10 x 15-km area of Hyogo Prefecture, Japan. The area is located between Osaka City (population 2,634,000/ 222 km²) and Kobe City (population 1,520,000/ 551 km²). The southern part of the area is urban, characterized by intensive industrial development and a dense population. In the northern part of the area, which includes the satellite cities of Osaka and Kobe, urbanization has been progressing rapidly¹³. The land use in the area was analyzed in detail in the previous paper¹³. The locations of the sites are shown in Fig. 1. The air temperature was measured by a thermometer calibrated with a thermostat and installed in a naturally ventilated thermometer shelter positioned about 1.5 m above the ground. The air temperature data were stored in a data logger. The air temperature was measured at the survey site every 15 minutes, and data measured on the hour was used for the evaluation. The air temperatures obtained in August (summer season) of 2005 and 2006 were studied.



Fig.1 Location map of the survey site.

2 Number of survey sites

The air temperature was measured at 18 survey sites. However the data at one survey site was missing in 2005, resulting in that 17 monthly data sets for August 2005 and 18 for August 2006 are available. To compare the monthly air temperature distributions in 2005 and 2006, the data sets obtained at 17 survey sites, excluding the above one survey site, were used.

3 Altitude correction

The air temperatures were corrected by the altitude of the sites and a temperature-lapse rate of 0.6 °C/100 m, when the air temperatures of the sites were compared.

4 Survey site characteristics

The survey site characteristics were previously studied¹³. A concise summary is as follows: (1) the most urbanized area along the coast; (2) the suburban area, mainly in the southern part of the study area; and (3) the residential development area in satellite cities, located mainly in the northern part of the study area.

5 Geographic information system

A geographic information system (ArcView) was used for the spatial analysis of the air temperature. An inverse distance-weighted method was employed to draw the distribution of the air temperature.

III RESULTS AND DISCUSSION

1 Comparison of monthly mean air temperature

The monthly mean air temperature, not being corrected by the altitude, is summarized in Table 1. The monthly mean air temperature in 2006 was higher than that in 2005 by 0.7 °C. The median values of the air temperature among the survey sites in 2005 and 2006 were 28.9 and 29.5 °C, respectively, showing that the air temperature in 2006 was higher than that in 2005.

Table 1 Monthly mean air temperatures in August 2005 and 2006

	Unit: °C	
	2005	2006
Monthly mean air temperature	28.8	29.5

Note: The air temperatures are not corrected by the altitude.

2 Distribution of deviation in monthly air temperatures

The distribution of the deviation in the monthly mean air temperatures, monthly mean of the daily-highest air temperatures, and monthly mean of the daily-lowest air temperatures in Augusts 2005 and 2006 are shown in Figs. 2(a) and (b), respectively, wherein the deviation is defined as $T_p - T_g$ (i = site, p = monthly mean air temperature, monthly mean of the daily-highest air temperatures, monthly mean of the daily-lowest air temperatures).

T_p : Air temperature at site i and for p

T_g : Average of T_p for each p

Aikawa et al.¹³⁾ demonstrated that the corresponding area in a region 5-10 km inland had a higher monthly mean air temperature distribution in August 2005. A similar distribution for the monthly mean air temperature was observed in 2006 (Fig. 2(b)-1) although the area with the higher monthly mean air temperature shifted a few kilometers northward. In addition, the southwestern area showed higher air temperatures in 2006 (Fig. 2(b)-1) although the area with higher air temperature in 2006 was somewhat different from that in 2005 (Fig. 2(a)-1).

Aikawa et al.¹³⁾ showed that the higher monthly maximum air temperature was also in the region 5-10 km inland in 2005. As for the distribution of the deviation in the monthly mean of the daily-highest air temperatures, different characteristics were observed in 2006, comparing 2006 (Fig. 2(b)-2) with 2005 (Fig. 2(a)-2). The distribution of the deviation in the monthly mean of the daily-highest air temperatures in 2005 appeared in the region 5-10 km inland like a hot spot (Fig. 2(a)-2), while a higher monthly mean of the daily-highest air temperatures was found inland in the distribution for 2006 (Fig. 2(b)-2).

As for the distribution of the deviation in the monthly mean of the daily-lowest air temperatures, quite similar distributions were observed in 2005 (Fig. 2(a)-3) and 2006 (Fig. 2(b)-3), i.e., the monthly mean of the daily-lowest air temperatures in the southwestern area showed a higher air temperature. This characteristic was similar to the results of Aikawa et al.¹³⁾

3 Classification of distribution by wind speed

3.1 Categorization by wind speed

The wind is one of the most important parameters to determine air temperature. The wind speed and direction were measured at 27 air pollution monitoring stations (16 ambient air pollution monitoring stations (APMSs) and 11 national roadside air pollution monitoring stations (RAPMSs)) in the study area. Aikawa et al.¹⁴⁾ selected 5 APMSs to obtain a representative wind field by studying the characteristics of the wind speed and direction at 27 stations.

The 31 days in August were classified by wind speed at the selected 5 APMSs in order to study the wind speed-dependence of the air temperature distribution. The frequency distributions of the mean of daily-mean wind speeds at the 5 APMSs in August 2005 and 2006 are summarized in Table 2. The days on which the mean of daily-mean wind speeds at the 5 APMSs was less than 2.0 m/s were categorized as a weak wind-speed day, and more than 3.0 m/s were a strong wind-speed day.

Table 2 Frequency distributions of the mean of daily-mean wind speeds at 5 APMSs in August 2005 and 2006

	Unit: m·sec ⁻¹	
	2005	2006
0 ≦ <0.5	0	0
0.5 ≦ <1.0	0	0
1.0 ≦ <1.5	3	0
1.5 ≦ <2.0	7	10
2.0 ≦ <2.5	12	15
2.5 ≦ <3.0	6	1
3.0 ≦ <3.5	3	2
3.5 ≦ <4.0	0	2
4.0 ≦	0	1

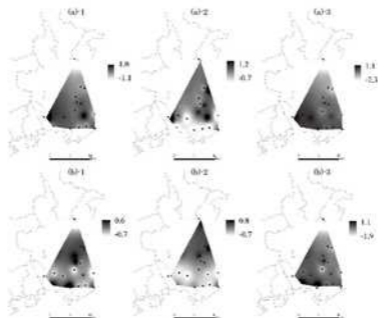


Fig.2 (a)-1: Distribution of the deviation in the monthly mean air temperatures in August 2005
 (a)-2: Distribution of the deviation in the monthly mean of the daily-highest air temperatures in August 2005
 (a)-3: Distribution of the deviation in the monthly mean of the daily-lowest air temperatures in August 2005
 (b)-1: Distribution of the deviation in the monthly mean air temperatures in August 2006
 (b)-2: Distribution of the deviation in the monthly mean of the daily-highest air temperatures in August 2006
 (b)-3: Distribution of the deviation in the monthly mean of the daily-lowest air temperatures in August 2006

3.2 Distribution of deviation in monthly air temperatures on weak wind-speed days and strong wind-speed days

The distribution of the deviation in the monthly mean air temperatures, monthly mean of the daily-highest air temperatures, and monthly mean of the daily-lowest air temperatures on weak wind-speed days in August of 2005 and 2006 are shown in Figs. 3(a) and (b), respectively. In addition, the distribution of the deviation in the monthly mean air temperatures, monthly mean of the daily-highest air temperatures, and monthly mean of the daily-lowest air temperatures on strong wind-speed days in August of 2005 and 2006 are shown in Figs. 4(a) and (b), respectively.

The distribution patterns on both weak wind-speed days (Figs. 3(a) and (b)) and strong wind-speed days (Figs. 4(a) and (b)) were generally similar to those of the monthly distributions (Figs. 2(a) and (b)), while the

contrast between distributions on weak wind-speed days was more pronounced.

IV CONCLUSIONS

The distributions of the monthly mean air temperature, the monthly mean of the daily-highest air temperatures, and the monthly mean of the daily-lowest air temperatures were studied for data sets obtained in Augusts 2005 and 2006. Some annual variations were observed in the distributions while the outline of the distributions in each year was common and similar each other, showing that continuous monitoring is necessary in order to verify the effect of action plans against heat islands and propose effective measures in the future. Furthermore, the dependence of the distributions of the monthly mean air temperature, the monthly mean of the daily-highest air

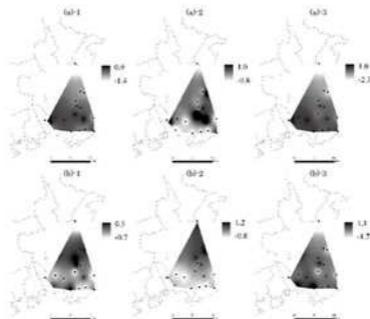


Fig. 3 Distribution of the deviation in the monthly mean air temperatures (1), monthly mean of the daily-highest air temperatures (2), and monthly mean of the daily-lowest air temperatures (3) at weak wind-speed day in August 2005 (a) and 2006 (b).

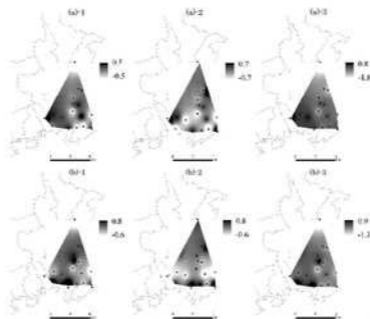


Fig. 4 Distribution of the deviation in the monthly mean air temperatures (1), monthly mean of the daily-highest air temperatures (2), and monthly mean of the daily-lowest air temperatures (3) at strong wind-speed day in August 2005 (a) and 2006 (b).

temperatures, and the monthly mean of the daily-lowest air temperatures on the wind speed was studied. The characteristics observed in the monthly distributions appeared on the weak wind-speed days more clearly.

V ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Professor Dr. Masakazu Moriyama of Kobe University for his support with the calibration of the thermometer.

REFERENCES

- 1) Oke, T.R.: City size and the urban heat island. *Atmospheric Environment* 7, 769-779(1973).
- 2) Oke, T.R. and Maxwell, G.B.: Urban heat island dynamics in Montreal and Vancouver. *Atmospheric Environment* 9, 191-200(1975).
- 3) Gotoh, T.: Relation between heat islands and NO₂ pollution in some Japanese cities. *Atmospheric Environment* 27B, 121-128(1993).
- 4) Saitoh, T.S., Shimada, T. and Hoshi, H.: Modeling and simulation of the Tokyo urban heat island. *Atmospheric Environment* 30, 3431-3442(1996).
- 5) Yamashita, S.: Detailed structure of heat island phenomena from moving observations from electric tram-cars in metropolitan Tokyo. *Atmospheric Environment* 30, 429-435(1996).
- 6) Oke, T.R., Spronken-Smith, R.A., Jauregui, E. and Grimmond, C.S.B.: The energy balance of central Mexico City during the dry season. *Atmospheric Environment* 33, 3919-3930(1999).
- 7) Aikawa, M., Hiraki, T., Eiho, J. and Miyazaki, H.: Characteristic air temperature distributions observed in summer and winter in urban area in Japan. *Environmental Monitoring and Assessment* 131, 255-265 (2007). DOI 10.1007/s10661-006-9473-5
- 8) Mikami, T., Taguchi, A., Ito, M., Udagawa, M., Soufuku, M. and Asakuno, K.: Spatial distribution of summer temperatures in Shinjuku district. *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection* 1992, 32-38(1992). (In Japanese with English abstract)
- 9) Mikami, T., Udagawa, M., Ito, M., Soufuku, M., Asakuno, K. and Hamada, T.: The environment of large vegetated parks in central Tokyo: Part I. *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection* 1993, 19-24(1993). (In Japanese with English abstract)
- 10) Mikami, T., Udagawa, M. and Ito, M.: Long term variations of the diurnal temperatures ranges in Tokyo. *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection* 1995, 35-41(1995). (In Japanese with English summary)
- 11) Mikami, T., Wakabayashi, M., Udagawa, M. and Ito, M.: Urban heat island phenomena in Tokyo. Part 1. Reproducibility simulation of present conditions by numerical model. *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection* 1997, 38-48 (1997). (In Japanese with English summary)
- 12) Mikami, T., Wakabayashi, M., Udagawa, M. and Ito, M.: Urban heat island phenomena in Tokyo. Part 2. Measures for reducing heat island intensity and their effects. *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection* 1997, 49-56 (1997). (In Japanese with English summary)
- 13) Mikami, T.: Actual condition of urban heat island in Japan. *Environmental Information Science* 32, 32-36(2003). (In Japanese)
- 14) Aikawa, M., Hiraki, T., Sumitomo, S. and Eiho, J.: Distribution and Variation of the Air Temperature from 1990 through 2003 in Urban Areas of Hyogo Prefecture from the aspect of Heat Island Phenomenon. *Bulletin of the Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences* 2, 1-9(2006).
- 15) Aikawa, M., Hiraki, T., Eiho, J. and Miyazaki, H.: Air temperature variation with time and thermally evaluated atmospheric conditions correlated with land use change in urban areas of Japan. *International Journal of Climatology* 28, 789-795(2008).

- 16) Aikawa, M., Hiraki, T. and Eiho, J.: Grouping and representativeness of monitoring stations based on wind speed and wind direction data in urban areas of Japan. *Environmental Monitoring and Assessment* 136, 411-418 (2008).

【原著】

ヒートアイランド現象観測に係る 2005 年 8 月と
2006 年 8 月の気温分布の年偏差

藍川 昌秀* 平木 隆年

要 約

ヒートアイランド現象への効果的な対策を提言することを将来目的として本研究を実施した。兵庫県の都市域において 2005 年度及び 2006 年度の 2 年間気温分布を観測した。気温は小中学校に設置されている百葉箱を利用して行った。2005 年 8 月と 2006 年 8 月の気温分布を比較すると、共通する分布の特徴が観測された。すでに学術論文で公表している 2005 年 8 月に観測された月平均気温の分布の特徴（気温の高い地域が海岸から 5~10 km の地域で観測される）が 2006 年 8 月にはより顕著に観測された。また、月最高気温により代表される厳しい熱環境が内陸の地点ほど観測されやすい傾向も 2006 年 8 月にはより顕著に観測された。この 2 年の調査結果から、夏期の気温分布には共通する特徴が観測される一方、年偏差も観測されることから、将来、効果的な対策を検討するためには引き続き調査を行い、年偏差等も含めた正確な現況把握が必要であると考えられる。

兵庫県における生活習慣病関連死亡の地域特性

小笠原 芳知* 沖 典男 前田 幹雄

Regional characteristics of deaths from life-style related diseases in Hyogo Prefecture

Yoshitomo OGASAWARA*, Norio OKI and Mikio MAEDA

*Project Planning and Information Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health
and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

Mortality data of life-style related diseases in Hyogo Prefecture were analyzed about characteristics of the region. Standardized mortality ratio (SMR) of diabetes mellitus and the acute myocardial infarction revealed high tendency in male and female, while that of cerebrovascular diseases, subarachnoid haemorrhage, intracerebral haemorrhage and cerebral infarction revealed low tendency. For males, SMR of diabetes mellitus correlated with cerebrovascular diseases. For females, it correlated with renal failure.

I はじめに

2007年の日本人の平均寿命は、男性で79.19歳（世界第2位）、女性で85.99歳（世界第1位）と、日本は世界有数の長寿国である¹⁾。しかし、人口の急速な高齢化とともに、生活習慣病や要介護者の増加など、さまざまな社会問題もあるのが現状である。このため、国は、メタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）等の該当者・予備群への保健指導徹底を目的に、標準的な健診・保健指導プログラムを2007年4月に策定、2008年4月から医療保険者（国保・被用者保険）において、40歳以上の被保険者・被扶養者を対象とする内臓脂肪型肥満に着目した健診及び保健指導の事業実施を義務づけた。

兵庫県においても、兵庫県保健医療計画（1987年策定）及び兵庫県健康増進計画（2001年策定）を2008年4月に見直し、生活習慣病対策について具体的かつ積極的に取り組みを進めているところである。

ここでは、兵庫県における死因別死亡データの解析結果から、生活習慣病関連死亡の地域特性について報告する。

II 材料と方法

解析用資料として、2001～2005年の人口動態統計死亡データと国勢調査市町別・性・年齢階級別人口データを用いた。対象市町および圏域は、2007年4月1日現在の41市町、10圏域とした。

兵庫県における死因別死亡の地域特性の検討では、最初に、県全体として、死因割合や年代別死亡者数、死因別標準化死亡比（SMR）²⁾の特徴を観察した。次に、圏域別として、市町別・性・死因別SMRの分布を箱ひげ図で確認、標準化死亡比の経験的ベイズ推定値（EBSMR）³⁾を算出して疾病地区を作製し、地域特性を圏域単位で検討した。なお、地域特性の検討では、SMRの検定結果やTangoの方法⁴⁾による地域集積性の検討結果も参考にした。また、標準化死亡比の算出にあたり、国勢調査年以外の年の年齢階級別人口や市町別人口は、全国、県とも国勢調査人口を内挿して求めた。SMR及びEBSMRの算出には Empirical Bayes estimator for Poisson

企画情報部

*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所センター

企画情報部 小笠原 芳知

Gamma model (ver.2.0)¹⁾ を、地域集積性の検討には FlexScan(ver.2.0)²⁾ を使用した。

最後に、死因別 SMR の地域相関分析を行い、死因間の関連性について検討した。分析には SPSS for Windows Ver12.0J を使用した。

III 結果および考察

1. 県全体の特性

最初に、県全体として死因別の特徴を観察した。Fig.1 に県全体の死因別死亡割合を示す。一番高い死因は悪性新生物であるが、生活習慣病関連のうち糖尿病、高血圧性疾患、心疾患、脳血管疾患で全死亡数の 29% を占めていた。

Fig.2 に県全体の死因別死亡者数の推移を示す。糖尿病と心疾患の死亡者数は 2001~2005 年で増加していた。しかし Fig.3 に示す年齢階級別死亡者数から、糖尿病、心疾患とも高齢者ほど死亡率が高いこと、年齢階級別死亡率の変化はあまり大きくないことが分かる。これらのことから、県全体の死亡者数の増加は人口の高齢化による寄与が大きいと考えられる。

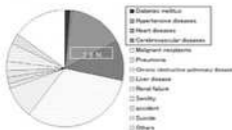


Fig. 1. Proportion of deaths from main causes, Hyogo Pref. (2001-2005)

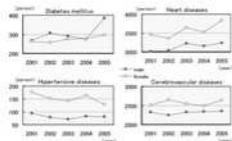


Fig. 2. Time trends of death number, Hyogo Pref. (2001-2005)

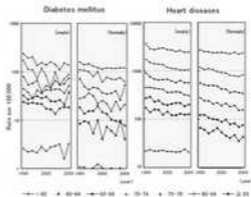


Fig. 3. Time trends of age-specific mortality rate of diabetes mellitus and heart diseases, Hyogo Pref. (1995-2005)

次に Table 1 に県全体の性・死因別 SMR を示す。男女とも全国平均に比して有意に高い死因は、全死因、糖尿病、急性心筋梗塞であった。その他の死因では、男性の心筋症、女性の心疾患、心不全が全国平均より高かった。また、脳血管疾患、くも膜下出血、脳内出血、脳梗塞については、男女とも全国平均より有意に低かった。なお、2001~2005 年の県全体の死因別累積死亡数は、悪性新生物、心疾患、脳血管疾患の順に高いなど、男女とも全国とはほぼ同様の傾向であった。

Table 1. Standardized mortality ratio (SMR) by causes of death, Hyogo Pref. (2001-2005)

Causes of death	SMR	
	male	female
all deaths	101.1 *	102.0 *
Diabetes mellitus	106.6 *	105.9 *
Hypertensive diseases	92.9	98.7
Heart diseases	95.7 →	103.3 *
Acute myocardial infarction	108.3 *	111.0 *
Cardiomyopathy	110.4 *	111.0
Heart failure	100.5	113.8 *
Cerebrovascular diseases	87.5 →	88.1 →
Subarachnoid haemorrhage	70.4 →	77.6 →
Intracerebral haemorrhage	85.7 →	89.5 →
Cerebral infarction	91.3 →	89.5 →

*: $p < 0.05$

2. 市町別・性・死因別SMRの分布

県全体のSMRは、人口の多い都市部の傾向に偏りがちになるため、県下各市町の傾向を反映しているとは限らない。県下各市町の傾向を確認するため、市町別・性・死因別SMRの箱ひげ図を作成し、SMRの分布を調べた (Fig.4)。

市町別SMRの平均値は、男女とも急性心筋梗塞、心不全で100を超えている。

心疾患や男性の糖尿病では、全県のSMRは高めであるが市町別SMRの平均値や中央値は100未満となっている。これらの死因では、人口の多い都市部で高いことが考えられる。また、男性の脳梗塞は、全県のSMRは低めであるが市町別SMRの平均値や中央値は100に近い値となっている。このような死因については、人口の少ない都市部で高いことが考えられる。

市町別SMRの最大値では、男女の糖尿病、高血圧性疾患、急性心筋梗塞、心疾患、心不全で高い値を示す市町がみられた。ただし、女性の心疾患は、SMRの特に高い地域が人口の小規模市町のみであり、全国平均との有意差は認められなかった。

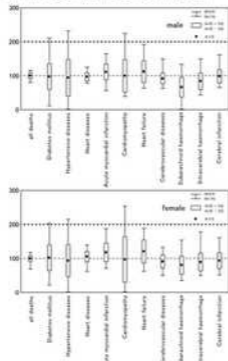


Fig.4 Box-and-whisker plot in SMR by cities, Hyogo Pref. (2001-2005)

3. 圏域別・市町別の地域特性

3.1 性・死因別EBSMR疾病地域の観察結果

以上の結果をふまえて、生活習慣病関連死亡の疾病地図を作成した。疾病地図は市町別指標を用いて作成したが、地域特性は基本的に2次保健医療圏域 (Fig.5) 単位で観察した。なお、観察された疾病がある地域に集積しているかどうかについては、SMRの検定結果や、Tangoの方法による地域集積性の検定結果も参考にした。地域の観察結果は、以下のとおりである。

- 1) Fig.5.1に全死因死亡のEBSMR疾病地図を示す。全死因のEBSMRの水準は、男女とも西播磨および阪神南にやや高い地域がみられる。
- 2) 糖尿病は、中播磨、西播磨、東播磨、淡路が高く、神戸、阪神南にも高い地域がある (Fig.5.2)。
- 3) 高血圧性疾患は、男女とも東播磨に高い地域がある。女性は但馬、北播磨にも高い地域がある。神戸は男女ともやや高いが統計的に有意といえるレベルではなかった (Fig.5.3)。
- 4) 心疾患は、男女とも阪神南、中播磨にやや高い地域がある。男性は西播磨、女性は東播磨、北播磨などにもやや高い地域がある (Fig.5.4)。
- 5) 急性心筋梗塞は、西播磨、中播磨、東播磨、阪神南で高い地域があるほか、全国と比べてやや高い地域が多い (Fig.5.5)。
- 6) 心筋症は、神戸、阪神南で高い地域があるほか、全国と比べてやや高い地域が比較的多い (Fig.5.6)。
- 7) 心不全は、丹波、中播磨、西播磨、北播磨、東播磨で高い地域が多い (Fig.5.7)。
- 8) 脳血管疾患は、西播磨、但馬、丹波にやや高い地域が散在している。神戸、阪神北、阪神南 (一部を除く)、北播磨、東播磨は低い傾向がみられる (Fig.5.8)。
- 9) くも膜下出血は、全国と比べて比較的低い。 (Fig.5.9)。
- 10) 脳内出血は、男女とも中播磨、西播磨、但馬で高い地域がある。神戸、阪神北、阪神南 (一部を除く) は低い傾向がみられる (Fig.5.10)。
- 11) 脳梗塞は、男女とも丹波で高く、男性の西播磨などやや高い地域が散在している。神戸、阪神北、阪神南は低い傾向がみられる (Fig.5.11)。



Fig. 5 Secondary area of medical services, Hyogo Pref.



Fig. 5.1 All deaths



Fig. 5.2 Diabetes mellitus



Fig. 5.3 Hypertensive diseases



Fig. 5.4 Heart diseases



Fig. 5.5 Acute myocardial infarction



Fig. 5.6 Cardiomyopathy



Fig. 5.7 Heart failure



Fig. 5.8 Cerebrovascular diseases



Fig. 5.9 Subarachnoid hemorrhage



Fig. 5.10 Intracerebral hemorrhage



Fig. 5.11 Cerebral infarction

3.2 圏域別・性別 SMR レーダーチャートの観察結果
次に、圏域別・性別に SMR のレーダーチャート
を作製した (Fig.6)。全国と全県と比較して圏域ごと
に観察したところ、淡路地域の男性で糖尿病が高い、

西播磨、東播磨、阪神南、中播磨で急性心筋梗塞が
高い、神戸、丹波地域で心筋症が高いなどの傾向が
みられた。また、阪神北地域は全体的に低い傾向が
みられた。

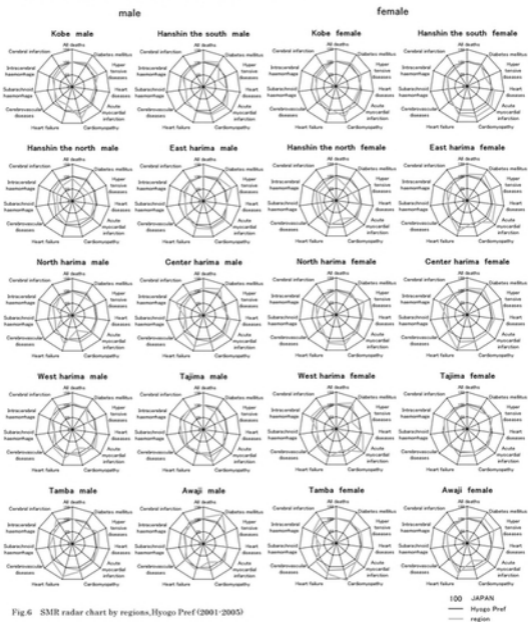


Fig.6 SMR radar chart by regions,Hyogo Pref (2001-2005)

Table 2 Regional correlation analysis result of SMR by causes of death, Hyogo Pref. (2001-2005)

Causes of death		Correlated
all deaths	male	Cerebrovascular diseases, Intracerebral haemorrhage, Heart diseases
	female	Heart diseases, Cerebrovascular diseases
Diabetes mellitus	male	Cerebrovascular diseases, Cerebral infarction
	female	(Renal failure)
Hypertensive diseases	male	—
	female	—
Heart diseases	male	Acute myocardial infarction, Heart failure
	female	Heart failure
Acute myocardial infarction	male	Heart diseases
	female	Cerebrovascular diseases, Cerebral infarction, Intracerebral haemorrhage
Cardiomyopathy	male	—
	female	—
Heart failure	male	Heart diseases
	female	Heart diseases
Cerebrovascular diseases	male	Cerebral infarction, Intracerebral haemorrhage, Diabetes mellitus
	female	Cerebral infarction, Intracerebral haemorrhage, Acute myocardial infarction
Subarachnoid haemorrhage	male	Intracerebral haemorrhage
	female	—
Intracerebral haemorrhage	male	Cerebrovascular diseases, Subarachnoid haemorrhage
	female	Cerebrovascular diseases, Cerebral infarction, Intracerebral haemorrhage, Acute myocardial infarction
Cerebral infarction	male	Cerebrovascular diseases, Diabetes mellitus
	female	Cerebrovascular diseases, Intracerebral haemorrhage, Acute myocardial infarction

4. 死因別 SMR の相関分析の結果

最後に、死因別 SMR の地域相関分析を行い、死因間の関連性を検討した (Table 2) 表では、相関係数の検定で有意 (両側検定, 5%水準) となった死因のうち、他の変数の影響を除いた偏相関分析でも有意となった死因のみを示した。

Table 2 から、全死因には脳血管疾患、心疾患が有意に相関した。これは単に、相関した死因が全死因の主な構成要素であったためと考えられる。心疾患に相関する心不全や、脳血管疾患に相関する脳梗塞や脳内出血なども同じ理由が考えられる。

糖尿病については、男性において、危険因子と疾患の関係にある脳血管疾患、脳梗塞との間に有意な相関関係がみられた。また、女性においては、危険因子と疾患の関係にある腎不全との間に有意な相関関係がみられた。その他、男性における糖尿病と腎不全との間などは、相関の傾向はあるものの統計的に有意といえるものではなかった。また、危険因子と疾患の関係にある心疾患とは、1996~2000 年のデータでは統計的に有意な相関がみられた²⁾が 2001~2005 年ではみられなかった。

本報では生活習慣病関連死亡データを検討したが、効果的な健康づくり施策を検討するためには、生活習慣との関連性の解析や、出生コホート解析などが必要と考えられる。また、死亡データだけではなく、老人保健事業報告などから確認できる罹患患者数や罹患率など現在の県民の罹患状況の地域特性について、的確に把握し、地域の実態に即した施策に繋げていく必要があると考えられる。

IV 要 旨

兵庫県における 2001~2005 年の生活習慣病関連死亡データから、市町別・性別・死因別 SMR を求め、関連死亡の地域特性を検討した。その結果、兵庫県では、男女とも糖尿病、急性心筋梗塞が全国平均に比して有意に高く、男性の心筋症、女性の心疾患、心不全も全国平均より高かった。脳血管疾患、くも膜下出血、脳内出血、脳梗塞については、男女とも全国平均より有意に低かった。糖尿病については、男性では脳血管疾患や脳梗塞との間に有意な相関関係がみられ、女性では腎不全との間に有意な相関関係がみられた。

文 献

- 厚生労働省大臣官房統計情報部：日本人の平均寿命、平成 19 年簡易生命表(2008)
- 福富和夫、橋本修二：保健統計・疫学、第 2 版、p. 41-47、南山堂、東京(2000)
- 丹後俊郎：疾病地区と疾病集積性一疾病指標の正しい解釈をめざして、公衆衛生研究、48、84-93 (1999)
- 丹後俊郎、横山徹爾、高橋邦彦：空間疫学への招待、朝倉書店、東京(2007)
- 国立保健医療科学院：技術評価部プログラム http://www.niph.go.jp/sohiki/giutsu/download/index_j.html
- 沖島勇、山本弘：兵庫県立健康環境科学研究所センター年報、1、156-160(2002)

兵庫県内の患者から分離された結核菌の分子疫学解析における VNTR法の検討

辻 英高* 西海 弘城 谷岡 絵理 近平 雅嗣

Evaluation of VNTR Method for the Molecular Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from the Patients in Hyogo Prefecture

Hidetaka TSUJII*, Hiroki NISHIUMI, Eri TANIOKA, and Masatsugu CHIKAHIRA

Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

An RFLP analysis was performed on 26 strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in Hyogo prefecture between April 2006 and March 2007. Simultaneously, the VNTR method was evaluated for a molecular epidemiological analysis. The discrimination index (DI) for the VNTR44 region was in a range of 0 to 0.962, with wide variations among the regions. For typing by combining the VNTR regions, DI was compared against the RFLP method: the analytical capacity, by combining the MIRU 12 region, was inferior to that of the RFLP method. On the other hand, typing by Supply 24, which is internationally practiced, and that by JATA 12, the practice of which is being evaluated in Japan, were associated with an analytical capacity comparable to that of the RFLP method. These typing methods can probably be used for molecular epidemiological analysis of isolates in the prefecture. In the cluster analysis for RFLP and VNTR, those isolates forming groups that were similar in RFLP were associated with different copy numbers in any of the 17 loci of VNTR. Two strains within similar groups that were identical in RFLP could be identified by 7 of these loci. By comparing the databases that were constructed based on Supply 24, the genotypes of the isolates were classified into: Beijing genotype, EAI genotype and the H37Rv-resembling strains. Through cluster analysis of RFLP and VNTR, the isolated strains were divided into 2 groups. Compared with RFLP, the tree diagram that was prepared based on VNTR showed a tendency for the groups of strains with identical genotypes to form cluster groups.

1 はじめに

結核の分子疫学解析法は、接触者検診や集団感染における結核患者間の疫学的な関連性の証明や、結核再発事例における患者の外実性再感染と内因性再燃などの判別に用いられている。結核菌の遺伝子解析法として挿入因子IS6110を指標としたRFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism)法は、国内外で広く用いられ、結核菌の遺伝子解析における標準法となっている^{1,2)}。近年、結核菌の繰り返し配列を指標とした反復配列多型分析 (Variable Numbers of Tandem Repeats: VNTR)により菌株間の遺伝子の比較が可能であることが明らかになってきた。VNTRは結核菌遺伝子を、その反復配列領域の外側に設定したプライマーを用いて増幅させ、反復配列数を求める方法である。その操作はPCRに基づくため、多量の結核菌DNAを必要とせず、菌株の分析や解析が迅速で、また、分析結果は数値化されるため菌株間の比較が容易であるなど、RFLPに比較して

感染症部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区瓦町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所センター
感染症部 辻 英高

種々の利点を持つ、結核菌型別法としてのVNTR タイピングは、複数の反復配列領域を組み合わせて菌株の解析を行うもので、結核菌における反復配列領域が発見^{6, 7}されてから、ETR(Exact Tandem Repeats) 6領域⁸について検討されたが、その解析能は、RFLP法に劣ることが報告された⁹。その後、MILE (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) 領域¹⁰やQEB(Queen's University Belfast)領域¹¹、さらに、その他の反復配列を有する領域¹²⁻¹⁵が新たに見いだされ、それらの領域の組み合わせによって、菌株の解析能が向上し、VNTRによる型別法はRFLPと変わらない解析能を有することが報告¹⁶されている。我々は接触者検診等で分離された菌株について、RFLP法による菌株の異同を調べ、結核患者間の疫学的な関連性の証明を行っているが、本報告では、VNTR法を結核の分子疫学解析法として適用するために、兵庫県内で2006年4月から2007年3月に分離された26菌株を用いて、MIRU等の44領域についてVNTR分析を行い、結核菌の型別法として、その有用性を検討したので、その結果について報告する。

II 材料と方法

1. 供試菌株

使用した菌株は2006年4月から2007年3月に分離され、患者の同意が得られて研究センターに搬入された26菌株である。

2. RFLP分析

既報¹⁷に基づいて行った。また、各菌株間のRFLPパターンはFingerprinting II (バイオラッド)を用いて解析した。類似度の算出はDiceの方法を用い、UPGMAで系統樹を作成した。

3. VNTR分析

供試菌株について、MIRU 12領域¹⁸、ETR 4領域⁸、QEB 12領域¹⁰、Mtub (Le Flèche et al., 2002) 10領域¹⁹、および、その他の6領域²⁰の計44領域 (Table 1)を用いて、菌株から抽出したDNAをテンプレートとしてPCRを行い、各領域の反復配列数を求めた。VNTR各領域の結核菌標準菌株H37Rvにおける増幅サイズはin silico simulation of molecular biology experiments (<http://insilico.cmu.edu/>)により求め、反復配列の長さ(Tandem repeat length)は、増幅サイズを基に、Tandem Repeats Finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>)により求めた。反復配列数(Copy number: コピー数)は、文献に記載された数値^{6, 8, 9, 10}を参照として、整数表記

とした。

4. VNTR各領域のコピー数の分布および識別値(Discriminate Index: DI)

供試した26菌株のうち、患者間の関連性が明らかでない4事例から分離された、各事例の同一株である5菌株を除いた21菌株について、VNTR 44領域のコピー数の分布および識別値(DI)¹⁸を求めた。

5. 菌株クラスター解析

供試26菌株は、VNTR法によって得られた各領域の反復配列数に基づいて、WEB上で公開されている統計ソフト(<http://sok12.si.gunma-u.ac.jp/>)を用いて、Ward法(正規化)によりクラスター解析を行い、樹形図を作成した。

6. 菌株の遺伝子型

MIRU-VNTR plus (<http://www.miru-vntrplus.org/>)において構築されているデータベースに基づき、供試菌株について、VNTR 24領域のコピー数を、データベースと比較検索し、菌株をBeijing genotype, H37Rv 類似菌株、およびEAI (East-African Indian) genotypeとして型別した。また、Beijing genotypeに分類された株は、既報等^{18, 19}に基づき、さらにancient sublineage とmodern sublineageに亜型別した。

7. VNTRの型別法

VNTRの型別法としてVNTR領域のうち、MIRU 12領域を組み合わせたMIRU 12¹⁸、Supplyらによって報告されている24領域 (Supply 24)¹⁸、および結核研究所で検討されている12領域¹⁷ (JATA 12)について、DIを用いて解析能を比較した。

III 結果

1. RFLP 分析結果ならびにクラスター解析結果

分離菌株のRFLPパターンについて、クラスター解析により、菌株間の相同性を比較した結果、26菌株は、20型に分類された (Fig. 1)。RFLPパターンが一致する類似度 100%のクラスターは、5種類 11株 (Cluster no. 4, 5, 6, 16, 20)であった。このなかで4種類 9株は、それぞれ、健康福祉事務所の疫学調査で、患者間の接触が明らかでない事例から分離された株であった。他の1種類 2株 (Cluster no. 5)については、患者間の疫学的な関連性は明らかではなかった。また、全体の菌株はI群、II群の2グループに大別された。さらにI群のグループはIa、およびIbに細分化された。グループIaは類似したRFLPパターンの菌株から構成され、これらは、既報¹⁷

Table 1 Tandem repeat locus and repeat unit size in *M. tuberculosis* H37Rv of the VNTR loci

Tandem repeat locus		Designation by researchers	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv			Reference
No.	Name		Amplification size	Tandem repeat length	Copy number	
1	0154	MILU 2	508 bp	53 bp×2 + 19 bp	2	8
2	0424	Mtub04	269 bp	51 bp×2 + 30 bp	2	12
3	0569	VNTR0569	632 bp	56 bp×2 + 46 bp	2	11
4	0577	ETR C	276 bp	58 bp×3 + 37 bp	4	6
5	0580	MILU 4, ETR D MILU 4	353 bp, 310 bp 330 bp	77 bp×3 + 12 bp 77 bp×2 + 41 bp	3.1 2	8, 6
6	0595	VNTR 0595	437 bp	58 bp×1 + 56 bp	2	11
7	0802	MILU 40	408 bp	54 bp	1	8
8	0960	MILU 10	643 bp	53 bp×3	3	8
9	1281	QUB 1281	124 bp	60 bp×2 + 3 bp	2	10
10	1443	Mtub 16	291 bp	53 bp×2 + 19 bp	1	12
11	1451	QUB 1451	305 bp	57 bp×3 + 46 bp	3	10
12	1612	QUB 23	141 bp	21 bp×4 + 20 bp	5	9
13	1644	MILU 16	671 bp	53 bp×2 + 13 bp	2	8
14	1895	QUB 1895	319 bp	57 bp×4 + 11 bp	4	10
15	1955	Mtub 21	206 bp	57 bp	1	12
16	1982	QUB 18	504 bp	78 bp×5 + 49 bp	5	9
17	2059	MILU 20	591 bp	77 bp×2 + 17 bp	2	8
18	2074	Mtub 24	805 bp	56 bp×3 + 30 bp	3	12
19	2163a	QUB 11a	305 bp	69 bp×2 + 8 bp	2	9
20	2163b	QUB 11b	412 bp	69 bp×5 + 10 bp	5	9
21	2165	ETR A	420 bp	75 bp×3 + 32 bp	3	6
22	2347	Mtub 29	350 bp	57 bp×3 + 48 bp	4	12
23	2372	VNTR 2372	298 bp	57 bp×2 + 10 bp	2	11
24	2401	Mtub 30	319 bp	58 bp×1 + 53 bp	2	12
25	2461	ETR B	292 bp	57 bp×3 + 13 bp	3	6
26	2531	MILU 23	873 bp	53 bp×6	6	8
27	2687	MIRU 24	447 bp	53 bp	1	8
28	2990	Mtub 31	257 bp	55 bp×2 + 4 bp	2	12
29	2996	MIRU 26	614 bp	51 bp×3 + 12 bp	3	8
30	3006	MIRU 27, QUB 5	657 bp 219 bp	53 bp×3 + 24 bp	3	8 9
31	3155	QUB 15	252 bp	54 bp×3 + 45 bp	3	9
32	3171	Mtub 34	279 bp	54 bp×2 + 51 bp	3	12
33	3192	MIRU 31, ETR E	651 bp	53 bp×2 + 49 bp	3	8, 6
34	3232	QUB 3232	591 bp	56 bp×3 + 48 bp	3	10
35	3239	ETR F	476 bp	79 bp×2 + 66 bp	3	6
36	3336	QUB 3336	407 bp	59 bp×5 + 5 bp	5	10
37	3663	Mtub 38	373 bp	63 bp×2 + 44 bp	3(2.7)	12
38	3690	Mtub 39	341 bp	58 bp×2 + 32 bp	2(2.6)	12
39	3820	VNTR 3820	444 bp	57 bp×3 + 9 bp	3	11
40	4052	QUB 26	708 bp	111 bp×5 + 24 bp	5	9
41	4120	VNTR 4120	447 bp	57 bp×2 + 23 bp	2	11
42	4155	VNTR4155	758 bp	57 bp×2 + 9 bp	2	11
43	4156	QUB 4156	415 bp	59 bp×2 + 51 bp	2	10
44	4348	MIRU 39	646 bp	53 bp×2	2	8

MIRU, ETR, QUB and VNTR are direct repeats, mycobacterial interspersed repetitive units, exact tandem repeats, Queen's University Belfast and variable-number tandem repeats, respectively. The sizes of H37Rv's amplified products were confirmed by *In silico* simulation of molecular biology experiments and tandem repeat length were also confirmed with the sequence of virtual amplified products by tandem repeats finder. Copy numbers of H37Rv in the VNTR loci were quoted numerical value listed in references except for VNTR3663 and VNTR3690. The copy number of H37Rv at these two VNTR loci were converted into the integer. The name of the locus denotes the position of the locus in the genome of the H37Rv strain in kilobases.

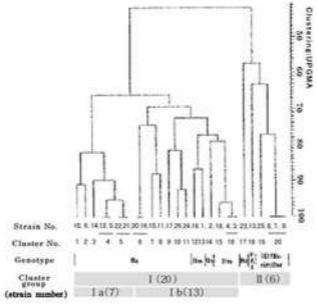


Fig.1 Dendrogram of IS6110-RFLP of 26 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* based on Dice coefficients and UPGMA clustering: Two large cluster groups (I, II) and sub cluster group I (Ia, Ib) were shown in under the figure. Genotypes of the strains described as Hn, Ba and Ea/EI means each Beijing genotype modern sublineage, Beijing genotype ancestral sublineage and East African Indian genotype.

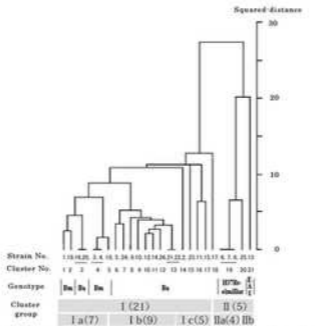


Fig.2 Dendrogram of VNTR analysis of 26 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* based on ward method: Two large cluster groups (I, II) were shown in under the figure. Genotypes of the strains were same as described in Fig.1.

で示したグループ A に相当する菌株群であった。各菌株の遺伝子型とクラスターグループとの関係は、Beijing genotype に該当する 21 菌株は、I 群に 20 株 (I a : 7 株, I b : 13 株)、および II 群に 1 株が属し、また、H37Rv 類似株の 4 菌株、および EAI genotype の 1 菌株は、II 群に属した (Table 2)。さらに細分化されたクラスターグループにおいて、Beijing genotype 株のうち、modern sublineage 株が類似したグループを構成する傾向にあったが、菌株の遺伝子型とクラスターグループとの関連性は明確ではなかった。

2. VNTR 分析結果ならびにクラスター解析結果

分離菌株の VNTR 分析結果に基づいてクラスター解析を行い、菌株間の相同性を比較した結果、26 菌株は、21 型に分類された (Fig. 2)。VNTR の結果が一致するクラスターは、4 種類 9 株 (Cluster no. 3, 4, 13, 19) であり、これらはいずれも健康福祉事務所の疫学調査で、患者間の接触が明らかな事例から分離された株であった。また、全体の菌株は I 群、II 群の 2 グループに大別された。さらに I 群のグループは I a, I b, I c に、および II 群のグループは II a, II b に細分化された。I 群のグループ I b には RFLP パターンの類似した 9 菌株 (Fig. 1: RFLP グループ I a) がすべて含まれていた。各菌株の遺伝子型とクラスターグループとの関係は、Beijing genotype に該当する 21 菌株は、すべて I 群に属し、また H37Rv 類似株の 4 菌株、および EAI genotype の 1 菌株は、II 群の、それぞれ II a および II b に分類された (Table 2)。さらに細分化されたクラスターグループにおいて、Beijing genotype 株のうち、modern sublineage 株は、類似したグループを構成しており、RFLP に比べると、遺伝子型が類似した菌株が、クラスターグループを構成する傾向が認められた。

3. VNTR のコピー数の分布および DI

VNTR44 領域のコピー数の分布は領域によって差がみられ、領域の DI は 0 から 0.962 の範囲であった。

菌株間のコピー数の分布に差がみられない領域は、それぞれ、VNTR 0154, 0577, 1281, 1612, 2059, 3171 の 6 領域であった。菌株間のコピー数の分布幅が広い DI が 0.8 以上は、VNTR 4120, 3232, 2163a, 3820 の 4 領域であった。また、増幅サイズの上限が 1000bp を超える領域は、VNTR 2163a, 3232, 4120, 4052, 3820, 4155 の 6 領域にみられ、そのなかで、DI が 0.8 以上の 4 領域もこの中に含まれていた (Table 3)。

4. VNTR 型別法

VNTR 型別法の MIRU 12 (Typing method A), Supply 24 (Typing method B), および JATA 12 (Typing method C) について、各型別法の領域の組み合わせを Table 3 に、また DI で示した解析能の比較結果を Table 4 に示した。型別法の比較の結果、21 菌株は、MIRU 12 により、14 型に、また SUPPLY24, および JATA12 により 21 型に分類され、各型別法の DI は、それぞれ 0.924, 1.000, 1.000 であった。また、RFLP により 21 菌株は 20 型に分類され、その DI は 0.995 であった。Supply 24, および JATA 12 を用いた菌株の型別は、MIRU 12 や RFLP による型別に比べて、高い解析能を示した。

5. RFLP 類似菌株の VNTR 領域の差異

RFLP のクラスターで類似菌株として認識された 7 菌株 (Fig. 1: RFLP クラスターグループ I a)、および VNTR のクラスター解析において、これら 7 菌株の類似株とされた 1 菌株 (Fig. 2: VNTR クラスターグループ I b : strain no. 26) の計 8 菌株は、VNTR 44 領域のうち、17 領域において、いずれかの菌株に異なるコピー数がみられた (Fig. 3)。また、RFLP が同一の菌株 (Strain no. 5, 12)、および VNTR が類似した菌株 (Strain no. 12, 14, 26) 間で、これらの 17 領域のうち、それぞれ 7 領域、および 10 領域において、コピー数の相違がみられたが、これらの領域のうち、VNTR 2163a など 5 領域は Supply 24, および JATA 12 による型別法に含まれなかった (Table 3 : Typing method B)。

Table 2 Genotype of isolates and relevance to the cluster groups of RFLP and VNTR

Number of Strains	Genotype	RFLP Cluster	VNTR Cluster
		Group (No. of strain)	Group (No. of strain)
21	Beijing	I (15) [I a(7), I b(13)], II (1)	I (21)
16	Ancestral sublineage	I (15) [I a(7), I b(8)], II (1)	I (16)
5	Modern sublineage	I (5) [I b(5)]	I (5)
4	H37Rv similar	II (4)	II (4) [II a(4)]
1	EAI	II (1)	II (1) [II b(1)]

Genotypes were determined using 24 locus VNTR typing method, and Beijing genotype strains were also divided into two sublineage by the PCR based typing method. Cluster groups of RFLP and VNTR were same as shown in Fig. 1 and Fig. 2.

Table 3 Allelic profiles of each VNTR locus in 21 strains

VNTR locus		Copy number of tandem repeats											Range of amplification size (bp)	D I	Combination of VNTR locus			
No.	Name	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	≥10			Typing method			
													A	B	C	D		
1	0154			21									508	0	×	×		
2	0424		3	4	1	13							218~371	0.586	×	×	×	×
3	0569		1	20									576~632	0.095				
4	0577					21							276	0			×	
5	0580		1	19				1					253~330	0.186	×	×		
6	0595			19	1				1				437~727	0.186				
7	0802		3	1	16	1							408~570	0.414	×	×		
8	0960		7		13	1							537~696	0.529	×	×	×	
9	1281				21								184	0				
10	1443		2	19									291~344	0.181				
11	1451		18		3								191~305	0.257				
12	1612							21					162	0				
13	1644				20	1							724~777	0.095	×	×		
14	1895			5	1	14	1						205~376	0.519				
15	1955		2	1	15	2			1				206~548	0.490		×	×	×
16	1982					1	2	1	1	2	2	12	426~894	0.671				
17	2059			21									591	0		×	×	
18	2074		7	13	1								693~805	0.529			×	
19	2163a			2			1	2	2	7	4	3	305~3617	0.857				×
20	2163b			1	2		4	7	7				205~550	0.767	×	×	×	
21	2165				2	19							420~495	0.181	×			
22	2347				1	20							293~350	0.095	×			
23	2372		1	1	12	6		1					241~526	0.614		×	×	
24	2401			5		16							319~435	0.381	×			
25	2461			20				1					235~463	0.095	×			
26	2531			2			15	4					604~869	0.467				×
27	2687		20	1									447~500	0.095	×	×		
28	2990			2	19								257~312	0.181				
29	2996			1		1	2	1	15	1			563~869	0.495	×	×		
30	3006			1	19	1							604~710	0.186	×	×	×	
31	3155		1		19	1							144~306	0.186	×	×	×	
32	3171				21								279	0			×	
33	3192				3	1	15	2					651~810	0.481	×	×	×	
34	3232	1			2			1				17	423~1655	0.914				×
35	3239			1	20								397~476	0.095				
36	3336								16	2	1	2	525~761	0.419				×
37	3663		17	2	2								247~373	0.343				
38	3690		1	16	1	2			1				341~689	0.424	×			
39	3820					1			1	1	18		558~1242	0.848				×
40	4052			1			2	3	12	1	2		375~1263	0.662	×	×	×	
41	4120		1		1	1	1	2	1	1	1	12	390~1416	0.962				×
42	4155			20					1				758~1043	0.095				
43	4156		1	4	4	12							356~533	0.629		×	×	
44	4348		2	2	17								593~699	0.343	×	×		

Name of VNTR locus was same as shown in Table 1. The number of strains that had more than 10 copies in the locus was represented all together in the same column.

Discriminate index (DI) represents the allelic diversity of each locus described in Methods.

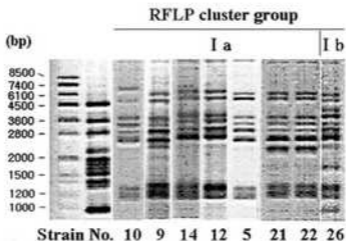
Combination of different VNTR locus of typing methods A~C was described in the literature (3,16,17)

listed in Table 1. Typing method D was obtained from the result as shown in Fig. 3.

Table 4. Comparison of the discriminatory power of various genetic markers to type *M. tuberculosis* 21 strains

Typing methods	Total no. of type patterns	D I
A. MIRU 12	14	0.924
B. Supply 24	21	1.000
C. Jata 12	21	1.000
D. 10 loci	21	1.000
IS 6110 RFLP	20	0.995

Combination of VNTR locus on the typing methods was designated in Table 3.



Strain No.	Copy number of VNTR loci													RFLP Cluster group	VNTR Cluster group				
	VNTR locus NO.																		
	2	6	7	14	15	16	18	19	20	23	26	29	34			39	40	41	43
10	4	1	3	4	4	4	1	9	4	4	5	7	15	15	8	11	4	I a	I b
9	2	2	3	5	4	10	2	9	7	4	5	7	19	14	8	11	4	I a	I b
14	4	1	3	4	4	10	1	6	7	6	5	7	6	14	8	15	4	I a	I b
12	2	1	3	4	4	10	1	9	7	4	6	7	12	15	7	13	4	I a	I b
5	4	1	3	4	4	10	1	7	6	4	5	7	15	14	8	13	4	I a	I b
21,22	4	1	4	4	4	10	1	9	7	4	5	6	15	14	8	7	3	I a	I b
26	4	1	3	4	3	10	1	7	6	3	5	7	11	14	8	4	4	I b	I b
5,12	×							×	×		×		×	×	×			RFLP identical strains	
12, 14, 26	×				×			×	×	×	×		×	×	×	×		VNTR-similar strains	
Typing method D	×				×			×	×	×	×		×	×	×	×		Combined	

Fig. 3. Comparative analysis between RFLP and VNTR in the strains showing similar or identical patterns obtained by RFLP analysis. Cluster groups of RFLP and VNTR were same as shown in Fig. 1 and Fig. 2, respectively. Typing method D was combination of 10 VNTR loci from the results of VNTR analysis of RFLP-identical and VNTR-similar strains associated with different copy numbers in any of the VNTR loci examined.

IV 考察

結核菌の多型反復配列領域を標的とした VNTR 法は、領域の組み合わせにより RFLP 法と変わらない解析能を持つ¹⁰⁾ことが示されている。さらに VNTR 法は分析時間が短いことや、分析結果が数値化されるため、菌株間の比較が容易であり、数値化された菌株のデータは、クラスター解析を組み合わせることで、同一の菌株を容易に把握できる。VNTR 法のこれらの利点は、結核の集団発生や接触者調査における分子疫学解析上、有用な方法であると考えられる。また、VNTR のクラスター解析では、類似した遺伝子型の菌株がグループ化する傾向にあった。各菌株について、VNTR 24 領域のコピー数のデータを MIRU-VNTR plus において構築されているデータベースと比較検索した結果、分離菌株 26 株は、21 株が日本及びアジアを中心に分布する¹⁰⁾ Beijing genotype に、4 株が結核菌 H37Rv 類似株に、および 1 株がアジアを中心に分布する¹⁰⁾ EAI genotype に該当した。一方、RFLP のクラスターは、類似した遺伝子型の菌株がグループ化する傾向がみられるもの、遺伝子型との関連性は明確ではなかった。また、VNTR の解析において、領域を増やせば解析精度は向上するが、多数の領域や、コピー数が多い領域を PCR によって比較するのは容易ではなく、分析精度上の問題も生じる。このため、適切な領域の選択が重要となる。VNTR 領域を組み合わせた結核菌の型別法について、Supply 14¹⁰⁾ は VNTR 3232 などの高変異領域を含む 5 領域は、コピー数の変動幅が大きく解析が困難であるなど、精度管理上の理由からこれらの領域を除外し、日常分析用として 15 領域を、高解像度用として 24 領域を組み合わせた VNTR を型別の標準法とすることを提案した。今後、これらの型別法は国際的に広く使用されていくと思われる。また、国内の菌株については結核研究所が 12 領域を中心とした型別法¹⁰⁾ (JATA12) を検討している。菌株の解析法として Supply 24 や JATA 12 による型別法が、充分な解析力を有していることから、これらの型別法は、患者間の疫学的な関連性が明確な集団感染や接触者検診から分離される菌株については、解析法としての適用が可能であると思われる。しかしながら、県内には疫学的な関連性が明らかでない RFLP が類似する菌株が分布しており¹⁰⁾、このような菌株の解析には、国内外の型別法に含まれない、特異的な領域を補足的に選択して VNTR を実施していく必要性も考えられる。また、薬剤耐性株の迅速把握に

対する VNTR の有用性の検討など、県内で分離される菌株の VNTR 分析に関して、さらなる評価が必要である。

V 要旨

県内の患者から 2006 年 4 月から 2007 年 3 月に分離された結核菌 26 菌株を用いて、RFLP 分析を行うとともに、VNTR 法について、分子疫学解析法としての検討を行った。検討した VNTR 44 領域の識別値 (DI) は 0 から 0.962 の範囲であり、領域によって大きな違いがみられた。VNTR 領域の組み合わせによる型別法について、DI を RFLP 法と比較した結果、MIRU12 領域の組み合わせによる型別法は、RFLP 法に比べて、解析能が低かったが、国際的に行われている Supply 24 による型別法や、国内で実施が検討されている JATA 12 による型別法は、RFLP 法と変わらない解析能を有しており、これらの型別法は、県内の分離株の分子疫学的解析法として、適用が可能であると考えられた。RFLP および VNTR のクラスター解析において、RFLP が類似したグループを構成した菌株は、VNTR の 17 領域のいずれかにコピー数の違いがみられた。また、RFLP が同一とされた類似グループ内の 2 菌株は、これらの領域のうち、7 領域によって、区別が可能であった。Supply 24 を基に構築された、データベースとの比較から、分離株の遺伝子型は Beijing genotype、EAI genotype、および H37Rv 類似株の 3 種類に分類された。また、RFLP や VNTR のクラスター解析によって、分離株は、2 グループに大別されたが、VNTR に基づいて作成された樹形図は、RFLP と比べて、同じ遺伝子型の菌株群がクラスターグループ化する傾向がみられた。

謝辞

本稿を終るにあたり、調査にご協力いただいた兵庫県健康福祉部健康局疾病対策課、洲本健康福祉事務所、及び健康福祉事務所の関係者の皆様方、ならびに菌株を提供いただいた医療機関の関係者の皆様方に深謝いたします。

文献

- 1) van Soolingen, D., Hermans, P. W., de Haas, P. E., Soll, D. R. and van Embden, J. D.: Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex

- strains : evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2578-2586 (1991)
- 2) van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R. and Shinnick, T. M. : Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 406-409 (1993)
- 3) Takahashi, M., Kazumi, Y., Fukusawa, Y., Hirano, K., Mori, T., Dale, J. W. and Abe, C. : Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiol. Immunol.*, **37**, 289-294 (1993)
- 4) Hermans, P. W., van Soolingen, D. and van Embden, J. D. : Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *J. Bacteriol.*, **174**, 4157-4165 (1992)
- 5) Goyal, M., Young, D., Zhang, Y., Jenkins, P. A. and Shaw, R. J. : PCR amplification of variable sequence upstream of katG gene to subdivide strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 3070-3071 (1994)
- 6) Frothingham, R. and Meeker-O'Connell, W. A. : Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.*, **144**, 1189-1196 (1998)
- 7) Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W. H., Hermans, P. W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B. B., Riley, L. W., Yakus, M. A., Musser, J. M. and van Embden, J. D. : Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains : interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 2607-2618 (1999)
- 8) Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B. and Loch, C. : Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.*, **36**, 762-771 (2000)
- 9) Skuce, R. A., McCorry, T. P., McCarroll, J. F., Roring, S. M., Scott, A. N., Brittain, D., Hughes, S. L., Hewinson, R. G. and Neill, S. D. : Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*, **148**, 519-528 (2002)
- 10) Roring, S., Scott, A., Brittain, D., Walker, I., Hewinson, G., Neill, S. and Skuce, R. : Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis* : comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2126-2133 (2002)
- 11) Smittipat, N., Billamas, P., Palittapongarnpim, M., Thong-On, A., Temu, M. M., Thanakijcharoen, P., Karnkawinpong, O. and Palittapongarnpim, P. : Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5034-5043 (2005)
- 12) Le Flèche, P., Fabre, M., Denoel, F., Koeck, J. L. and Vergnaud, G. : High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol.*, **2**, 37-48 (2002)
- 13) 辻 英高, 西海弘城, 神部智宏, 山岡政興 : 兵庫県内の患者から分離された結核菌の RFLP 分析に基づいた分子疫学. 兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要, **4**, 1-7 (2007)
- 14) Hunter, P. R. and Gaston, M. A. : Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems : an Application of Simpson's Index of Diversity. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 2465-2466 (1988)
- 15) Mokrousov, I., Jiao, W. W., Valcheva, V., Vyazovaya, A., Otten, T., Ly, H. M., Lan, N. N., Limeschenko, E., Markova, N., Vyshevskiy, B., Shen, A. D and Narvskaya,

- O. : Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 2851-2856 (2006)
- 16) Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsch-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez M. C., Fauville, M., Niemann, S., Skuce, R., Kremer, K., Locht, C. and van Soolingen, D. : Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 4498-4510 (2006)
- 17) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗 聡, 菅原 勇, 加藤誠也: 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型 (VNTR) 分析システム・JATA(12)・VNTR 分析法の実践. *結核*, **83**, 673-678 (2008)
- 18) Bifani, P. J., Mathema, B., Kurepina, N. E. and Kreiswirth, B. N. : Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.*, **10**, 45-52 (2002)
- 19) Glynn, J. R., Whiteley, J., Bifani, P. J., Kremer, K. and van Soolingen, D. : Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis* : a systematic review. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 843-849 (2002)
- 20) Brudey, K., Driscoll, J. R., Rigouts, L., Prodinger, W. M., Gori, A., Al-Hajjaj, S. A., Allix, C., Aristimuño, L., Arora, J., Baumanis, V., Binder, L., Cafrune, P., Cataldi, A., Cheong, S., Die, R., Ellermeier, C., Evans, J. T., Fauville-Dufaux, M., Ferdinand, S., Garcia de Viedma, D., Garzelli, C., Lidia Gazzola, D., Gomes, H. M. et al. and Christophe Sola : *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity : mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.*, **6**, 23-40 (2006)

兵庫県における 2007/08 シーズンのインフルエンザウイルス 分離株の性状解析

押部 智宏^{1*} 山岡 政興^{1**} 稲元 哲朗¹ 岡藤 輝夫² 芥川 宏³ 近平 雅嗣¹

Antigenic and Genetic Characters of the Epidemic Influenza Viruses in 2007/08 Season of Hyogo Prefecture, Japan.

Tomohiro OSHIBE^{1*}, Masaaki YAMAOKA^{1**}, Tetsuro INAMOTO¹, Teruo OKAFUJI²,
Hiroshi AKUTAGAWA³ and Masatsugu CHIKAHIRA¹

¹Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and
Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

²Okafuji Pediatric Clinic ³Hyogo Prefectural Tsukaguchi Hospital

In the season of 2007/2008, fifty one (78%) of 65 isolates of influenza in Hyogo prefecture were type AH1. However, the dominant type AH1 were replaced by type AH3 after April, 2008. Not a few number of type B were also isolated sporadically through the epidemic season.

Forty three (84 %) of 51 type AH1 isolates showed reduced HI titers with antisera of A/Solomon Islands/3/2006, adapted to the component of 2007/08 influenza vaccine. HA gene phylogenetic analysis found two definitely different type viruses, both of which were different from A/Solomon Islands/3/2006 strain.

All of nine type AH3 isolates were antigenetically similar to A/Hiroshima/52/2005, adapted to the component of 2007/08 influenza vaccine. However, genetically all isolated strains differ from the A/Hiroshima/52/2005 strain.

I はじめに

インフルエンザは毎年冬季に幼児や児童を中心に流行する急性の呼吸器感染症であり、通常は約1週間で軽快する。しかし高齢者や気管支喘息などの基礎疾患を持つ場合は、肺炎等を併発して死に至ることがある。この原因であるオルソミクソウイルス科のインフルエンザウイルスは、その内部蛋白の抗原性からA、B、Cの3つの型に分類され、A型はさらにウイルス表面にある血球凝集素 (HA) 蛋白の抗原性の

違いにより H1 から H16 まで 16 亜型に分類される。このうちヒトで流行するのは、AH1 型 (A ソ連型)、AH3 型 (A 香港型) 及び B 型であり、AH3 型はほぼ毎年流行を繰り返している。

今回、我々は 2007/08 シーズンに兵庫県内で流行したインフルエンザウイルスの性状を把握することを目的として、県内の患者からインフルエンザウイルスを分離して、同定、抗原解析及び遺伝子解析を行い、過去の県内の流行株と比較検討したので報告する。

II 材料と方法

1. インフルエンザウイルスの分離材料
2007年11月～2008年6月に姫路市及び尼崎市の小児科医療機関の2定点において採取された咽頭ぬぐ

¹感染症部 ²岡藤小児科医院 ³兵庫県立塚口病院
*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所
感染症部 押部 智宏
** 現 神戸大学医学部

い流118株体、及び4つの学校施設等のインフルエンザを疑う集団発生事例で採取された明確なぐい流11株体、合計129株体を分離材料として供試した。

2. インフルエンザウイルス株

2007/08シーズンに分離されたウイルス株との比較に基いて分離された。2001/02、2002/03、2005/06、2006/07シーズンのA/H1型ウイルス24株、2001/02から2006/07シーズンのA/H3型ウイルス株37株を供試した。

3. インフルエンザウイルスの分離

採取した咽頭ぬぐい液をMDCK細胞に接種し、トリプシン存在下で5%CO₂の条件で33℃、7日間培養し、2代百菌代した。細胞変性効果のみられた培養上清は、0.75%モルモット赤血球を用いて赤血球凝集 (HA) 試験を行った²⁾。

4. インフルエンザウイルス株の同定及び抗原解析

A/H1、A/H3型及びB型系統同定の同定及び抗原解析は、国立感染症研究所より分与された以下の感染フレット抗血清であるA/Solomon Islands/3/2006 (A/H1型)、A/Bangkok/52/2005 (A/H3型)。

B/Shanghai/361/2002 (B型)、山形系統、

B/Malaysia/2506/2004 (B型)、Victoria系統により赤血球凝集抑制 (HI) 試験を行った³⁾。

5. インフルエンザウイルス株の遺伝子解析

RT-PCR法により増幅した産物についてダイレクトシーケンス法によりHA1遺伝子の一部の領域 (A/H1型は617塩基 (354番目～976番目)、A/H3型は618塩基 (370番目～987番目)) の塩基配列を決定してCLUSTALソフトウェアにより系統解析を行った。

III 結果および考察

1. ウイルス分離状況

2007/08 シーズンの月別インフルエンザウイルスの分離数を Table 1 に、また Fig. 1 に当研究センターでのインフルエンザウイルス分離数と定点医療機関当たりのインフルエンザ患者報告数を並列に示した。

2007/08 シーズンは、129 検体中 65 株のウイルスが分離され、分離率は 50%であった。このうち A 型では A/H1 型が 51 株 (78%)、A/H3 型が 9 株 (14%)、B 型では山形系統が 4 株 (6%)、Victoria 系統が 1 株 (2%) であった。全国の分離状況をみると A/H1 型が 3,614 株 (86%)、A/H3 型が 319 株 (8%)、B 型が 239 株 (6%) で⁴⁾、県内と同様に A/H1 型、A/H3 型及び B 型が混合流行し、その主体は A/H1 型であった。

Table 1 Monthly isolation of influenza viruses in Hyogo prefecture during 2007/08 season.

Sampling period		Sample	Isolate			Rate of isolation (%)		
Year	Month		A/H1	A/H3	B			
2007	11	21	12	0	0	12	57	
	12	21	9	0	0	9	43	
2008	1	14	9	0	1	10	71	
	2	29	14	1	0	15	52	
	3	17	7	1	3	11	63	
	4	14	0	7	0	7	50	
	5	8	0	0	1	1	13	
	6	7	0	0	0	0	0	
	Total		129	51	9	9	65	50

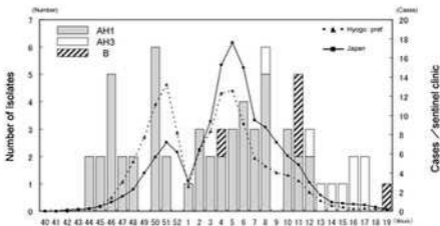


Fig. 1 Weekly cases of influenza and isolation of influenza viruses in Hyogo prefecture during 2007/08 season.

AH1型は2004/05シーズンから4シーズン連続して流行したが、2006/07シーズンの後半になるとそれまで少なかった分離数が増加し、2007/08シーズンになると、その当初では流行初期からこれが主体を占めていた。

2007年11月7日に2007/08シーズン初のインフルエンザウイルス(AH1型)が分離され、これは加古川健康福祉事務所管内で集団感染した幼稚園の4歳児からであった。AH1型は2007年44週～2008年12週の間、継続して分離されたことから、定点からの患者報告数の2007年51週(13.23人)、2008年5週(12.6人)の2つのピークを形成して流行したウイルスの主体はAH1型であると考えられた。しかし、その後分離数は減少し、13週以降は分離されなくなった。これに代わって、AH3型が2008年8週に姫路市で家族内感染し定点医療機関に受診した4歳児から初めて分離され、12週から17週に8株分離されている。B型は2008年第4週に尾崎市の定点医療機関に受診した5歳児から初めて分離され、Victoria系統であった。

2. 分離株の抗原解析

2007/08シーズンに兵庫県内で分離されたインフルエンザウイルス株の抗原解析の結果をTable 2に示した。

2007/08シーズンのワクチン株であるA/Solomon Islands/3/2006(AH1型)の抗血清によるHI試験では、県内で分離された51株は、抗血清と同じ抗原を用いたHI価(ホモHI価)との差が2倍以内であった株が2株、4倍は6株であったが、8倍以上と大きく抗原性の異なる変異株が43株で84%と大半を占めた。また、データを示していないが、シーズン後半になるとさらに差が広がって抗原変異の程度が顕著になる傾向がみられた。これらの結果から、今シーズンの県内におけるAH1型流行株の多くが抗原変異株であったと考えられ、このことが流行の主体となった要因の一つと推察された。

2007/08シーズンのワクチン株であるA/Hiroshima/52/2005(AH3型)の抗血清によるHI試験では、県内分離株の9株は、ホモHI価との差が2倍以内であった株が8株で最も多く、4倍が1株で8倍以上はなかった。これらの結果から県内のAH3型の流行株の多くはA/Hiroshima/52/2005類似株と考えられた。

B型の山形系統の分離株4株は、ワクチン株であるB/Shanghai/361/2002の抗血清によるHI試験で2倍以内であったのが1株、4倍が1株で、8倍以上が

Table 2 Hemagglutination inhibition tests of isolates to the reference antisera

Type	Multiple number of HI-titers against the reference antisera ^a			Total
	2-fold	4-fold	≥8-fold	
AH1	2	6	43	51
AH3	8	1	0	9
B (Yamagata lineage)	1	1	2	4
B (Victoria lineage)	0	0	1	1

^a The reference antisera is anti-A/Solomon Islands/3/2006 ferret serum (AH1), anti-A/Hiroshima/52/2005 ferret serum (AH3), anti-B/Shanghai/361/2002 ferret serum (B/Yamagata lineage), anti-B/Malaysia/2506/2004 ferret serum (B/Victoria lineage).

2株であった。また、Victoria系統の分離株1株は、ワクチン株であるB/Malaysia/2506/2004の抗血清によるHI試験で8倍であった。

3. AH1型分離株の遺伝子解析

AH1型分離株のHA遺伝子について系統樹解析した結果をFig. 2に示した。

AH1型の分離株は2001/02～2006/07シーズンのワクチン株であるA/New Caledonia/20/1999に対してY252Fのアミノ酸置換を持つ群(Group 1)とR145K, R208K及びT266Nの置換を持つ群(Group 2)に分類された。Group 1には2004/05シーズンの株と2005/06シーズンの大半の分離株(8株/10株)が属しており、Group 2にはA/Solomon Islands/3/2006、2008/09シーズンのワクチン株であるA/Brisbane/59/2007、2005/06の一部の株(2株/10株)及び2006/07、2007/08シーズンの全ての分離株が属していた。Group 2はさらにR188K及びE273Kの置換を持つ亜群(Group 2.1)、R188L, A189T及びT193Kの置換を持つ亜群(Group 2.2)及びこれら亜群の置換を持たない亜群(Group 2.3)に分類された。

Group 2.1は、A/Brisbane/59/2007や2006/07シーズンの株の一部(8/10株)及び2007/08シーズンの株の一部(10/22株)が属していた。さらにGroup 2.1に属する2006/07シーズンの4株がE169Kの置換を伴っていた。また、A/Brisbane/59/2007及び2007/08シーズンの全ての株はK145Rの置換を持っていた。

Group 2.2は、2005/07シーズンの株の一部(2/10株)及び2007/08シーズンの株の半数以上(12/22株)が属していた。さらにGroup 2.2に属する2007/08シーズンの全ての分離株はN244Sの置換を持ち、このうち3株はD186Nの置換もあった。

Group 2.3は、2005/06シーズンの一部(2/10株)とA/Solomon Islands/3/2006が属していた。

これらの系統樹解析の結果から、2007/08シーズンの分離株の大半はA/Solomon Islands/3/2006と12

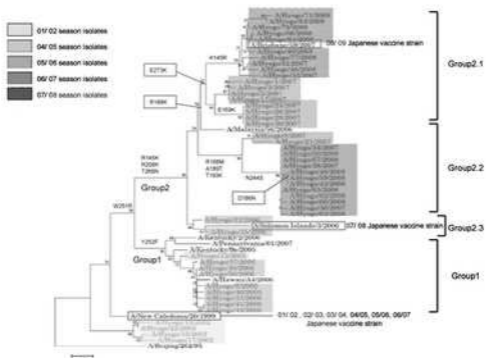


Fig.2 Phylogenetic analysis of influenza A/H1 HA genes in Hyogo prefecture.

異なる群に属していたが、その一部は Group 2.1 に属しており、遺伝学的にも A/Brisbane/59/2007 と近縁であることが明らかとなった。

これらの解析に加えて、A/New Caledonia/20/1999 の抗原変異株に多くみられる HA 蛋白の抗原領域 B の K140E の置換¹⁾は、2001/02～2006/07 シーズンの分離株にはみられなかったが、2007/08 シーズンにこれが大半の株 (21/22 株) で認められ、残りの 1 株 (A/Hyogo/63/2009) は K140G の置換であった。この株は A/Solomon Islands/3/2006 (ホモBI 価 1:640) に対して HI 価が 1:10 であり、他の 21 株と比較して抗原性がさらに変異していたことから、この抗原性の変異に K140G の置換が関与していることが考えられた。

4. A/B3 型分離株の遺伝子解析

A/B3 型分離株の HA 遺伝子について系統樹解析した結果を Fig. 3 に示した。

2001/02 シーズンの A/B3 型の分離株は、2001/02～2003/04 シーズンのワタナン株である A/Panama/2007/1999 に対して R222K, I202V の置換を持つ群と

S199P, K173E の置換を持つ群に分類できた。

2002/03 シーズンの分離株は A/Panama/2007/1999 に対して H155T, A131T 置換が認められ、さらにこれには Q156R 置換を持つ 4 株と持たない 1 株 (A/Hyogo/151/2002) があつた。

2003/04 シーズンは、A/Panama/2007/1999 に対して H155T, A131T 及び Q156R の置換を持つ前シーズンと同じ群に 1 株 (A/Hyogo/27/2004) が属し、その他の 5 株は 2004/05 シーズンのワタナン株である A/Wyoming/3/2003 に対して S189K, Y109F 及び S227P の置換を有していた。

2004/05 シーズンの分離株は、2005/06 シーズンのワタナン株の A/New York/55/2004 と同じ群に属し、基準株の A/Wellington/1/2004 に対して Y226I, K145N の置換及び R173K, R201K の置換を持つ群に属していた。

2005/06 シーズンの分離株は、A/New York/55/2004 に対して S193P, D225N の置換を持ち、K310R, A198T の置換をもつ群 (2/4 株) と持たない群 (2/4 株) に分類された。

2006/07 シーズンの分離株は K140I の置換を持つ

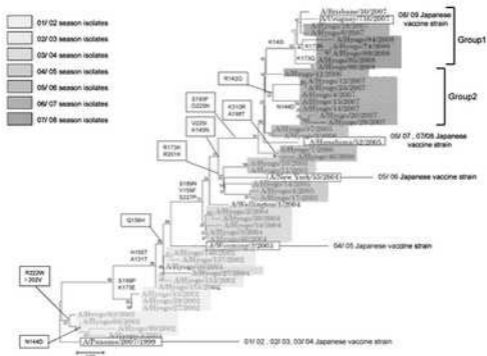


Fig.3 Phylogenetic analysis of influenza A/H3 HA genes in Hyogo prefecture.

群 (2/10 株) (Group 1) と R1425 の置換を持つ群 (7/10 株) (Group 2) 及び両方の置換を持たない 1 株 (A/Hyogo/42/2006) の 3 つに分類された。Group 2 はさらに N1440 の置換を持つ群 (5/7 株) と持たない群 (2/7 株) に分類でき、この N1440 置換を持つ 5 株のうち A/Hyogo/20/2007 の 1 株は S216S の置換が認められた。

2007/08 シーズンの分離株 5 株は全て Group 1 に属し、K173N の置換を持つ群 (2/5 株) 及び K173Q を持つ群 (2/5 株) と両方の置換を持たない 1 株の 3 つに分類され、A/Hiroshima/32/2005 はこれとは異なる群に属していた。2008/09 シーズンのワクタン株である A/Trugsey/716/2007 は 2007/08 シーズンの分離株と同じ Group 1 に属しており系統樹上から近縁であることが示された。

IV まとめ

2007/2008 シーズンの兵庫県におけるインフルエンザは分離した 65 株のうち 78% (51 株) を AH1 型が

占め、流行の主体であると考えられた。しかし、4 月になると AH1 型に代わって AH3 型が流行した。また、B 型も少数ながら流行期を通して分離された。

AH1 型流行株は分離した 51 株の 94% がワクタン株に対するフェレット感染試験に対して 8 倍以上の抗原変異を示した。また、HA 遺伝子の系統解析では異なる 2 群のウイルスの存在が確認され、いずれもワクタン株である A/Solomon Islands/3/2006 とは異なっていた。

AH3 型流行株は分離した 9 株すべてがワクタン株である A/Hiroshima/32/2005 の類似株であったが、遺伝子レベルではすべての分離株はワクタン株とは異なる群に属していた。

文献

- 1) 世路結昭昭, 杉浦昭, 植田昌宏: オルツミタソウウイルス, ウイルス実験学各論, 改訂二版, 国立予防衛生研究所学友会編, p. 287 ~ 330 (1982)。(東大)
- 2) 世路結昭昭: インフルエンザウイルス, 微生物検

査必携, ウイルス・クラミジア・リケッチア検査, 第II分冊, 各論1, 厚生省監修, 第3版, 2-24, 日本公衆衛生協会, (2004), (東京)

- 3) IDWR 感染症発生動向調査週報, 国立感染症研究所, 10, 第17号, 14-15(2008)
- 4) IASR 病原微生物検出情報(月報), 27, 第11号, 11-12, (2007)

苦情ミネラルウォーターから検出された真菌の塩基配列解析による同定

谷岡 絵理^{1*} 辻 英高¹ 西海 弘城¹ 高井 伝仕¹ 藤田 昌民² 近平 雅嗣¹

Identification of Fungi Isolated from Complained Mineral Water Using Sequencing Analysis

Eri TANIOKA^{1*}, Hidetaka TSUJI¹, Hiroki NISHIUMI¹, Denshi TAKAI¹,
Masatami FUJITA² and Masatsugu CHIKAHIRA¹

¹Infectious Disease Research Division, and ²Life Science Division,
Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences,
2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

The complaint that the mineral water was contaminated with a mold-like float was reported to the public health center. The public health center collected some packs of the mineral water from the manufacturer and asked our institute for a quality conformance examination of them. As a result, the coliform bacteria was not detected in all samples and the standard plate count was $2.5 \times 10^3 - 1.5 \times 10^6$ /mL. Additionally two kinds of fungi were detected by morphological observation. One of them was identified as *Cladospirium* sp. morphologically, however the other could not be. We performed sequence analysis about ITS region of rDNA gene to clarify the unidentified fungi, it was identified as *Exophiala salmonis* because of high concordance rate (99%) with sequence data of *E. salmonis* disclosed in the internet database. Therefore, it is useful to use sequence analysis in combination with morphological observation in identification of fungi isolated from foods.

I はじめに

加工技術や流通手段の進歩により食品が多様化するなか、食品の偽装問題や食品による健康被害事例が増えている。また、2008年には中国産冷凍餃子が原因と疑われる健康被害事件が県内で発生したことが契機となって、消費者の食品に対する「安全安心」への関心がより高まっている。このような状況の中で、2008年6月に住民から京都市の保健所に、「購入したミネラルウォーターにカビ様の異物が浮いている」との苦情があった。食品衛生法第11条第2項違反疑いとして、通知を受けた県内の製造業者を管轄す

る健康福祉事務所は立ち入り調査し、苦情品と同一の商品19ロット28サンプルを収去し、その収去品4検体について研究センターに検査依頼があった。

ミネラルウォーターは食品衛生法における、清涼飲料水成分規格の適用を受け、混濁、沈殿物、大腸菌群などが規定されている。さらに、清涼飲料水は製造基準として、原水の一般細菌数が100個/mL以下であることが定められている。このことから、研究センターでは依頼品について、大腸菌群試験、一般細菌数測定試験及び真菌の同定試験を行った。

真菌の同定は通常、肉眼や顕微鏡による形態的特徴などの表現性状を指標に行われるが、培養に時間を要するうえに、鑑別のための専門的な知識や熟練した技術が必要とされ、非定型な菌株ではその判定に困難を伴う。

近年、微生物の同定にも、迅速で客観的な判定が可能ならぬに再現性に優れた分子生物学的手法が取

¹ 感染症部 ² 健康科学部

* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所センター
感染症部 谷岡 絵理

り入れられるようになっており、その中でも、すべての生物が共有するリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子の塩基配列を比較する相同性解析がよく用いられている。今回、真菌検査において、形態観察と共に、rRNA 遺伝子の中で遺伝情報の保存性が低く種の同定に適しているとされる ITS 領域の解析による同定を試みたので、当該事例の検査結果とあわせて報告する。

II 材料と方法

1. 試料

搬入されたミネラルウォーターは合成樹脂製の容器 (1L入り) に充填されており、4検体すべてに浮遊性の異物が認められた。

2. 鏡検

異物を無菌的に採取し、光学顕微鏡で直接鏡検した。

3. 大腸菌群

試料原液の10mL、1mL及び10倍希釈液1mLをそれぞれ、LB発酵管に接種し、35℃で48時間培養して培地の黄変とガス産生の有無を観察した。

4. 一般細菌数

試料原液を滅菌リン酸緩衝液で $10 \sim 10^6$ 倍に段階希釈して、各々1mLずつを2枚のシャーレに分注。これに滅菌標準寒天培地15~20mLを加えて混合した後、35℃で24時間培養し、集落計数した。

5. 真菌の同定

5.1 培養

試料900mLをメンブランフィルター(孔径0.45 μ m, millipore)でろ過し、フィルター上の異物を2mLの滅菌蒸留水に懸濁して450倍濃縮液を作成した。濃縮液0.1mLをクロラムフェニコール加PDA培地に塗布し、25℃10日間培養した。さらに、この濃縮液1mLをクロラムフェニコール加サブローブロスに添加して、25℃10日間培養後、PDA培地に画線して25℃10日間培養した。

5.2 真菌の形態学的試験

PDA培地上のコロニーを釣菌して再度PDA培地で10~15日間純培養し、コロニーの形態観察を行った。同時に、スライドカルチャーを行い顕微鏡で微細構造を観察し、それらの形態をかび検査マニュアルカラー図譜²⁾と比較した。

5.3 DNA塩基配列の決定と解析

5.3.1 DNAの抽出

PDA培地上の純培養真菌から、Hengらの方法³⁾でDNA

抽出を行った。

5.3.2 PCR条件及び増幅産物の精製

ITS1領域増幅用PCRプライマーはITS1F(5'-GTACACAGGT(T/C)TCGGT-3')及びITS1R(5'-CGTCTTCATCGATG-3')⁴⁾を用いた。反応液は0.5 μ M プライマー、200 μ M dNTP Mixture、0.5U TaKaRa Ex-Taqに抽出DNA 1 μ Lを加えて反応液を25 μ Lとした。DNA増幅は、95℃/5分、94℃/30秒-55℃/30秒-72℃/60秒(35サイクル)、72℃/10分で行った。エチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動により標的DNAの増幅を確認した後、その反応液をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社)により精製した。

5.3.3 DNA塩基配列の決定

精製DNAはBig-Dye terminator Cycle sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いて、93℃/10分、96℃/10秒-48℃/20秒-60℃/3分(25サイクル)でダイレクトシークエンス反応を行った。反応産物のスピнкаラムゲルろ過精製を行い、95℃5分間加熱後氷冷して、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerで塩基配列を決定した。

5.3.4 DNA塩基配列の解析

決定した塩基配列について、BLAST (basic local alignment search tool)による相同性解析により菌種を決定した。

III 結果および考察

1. 大腸菌群及び一般細菌数

汚染の指標となる大腸菌群は陰性で、清涼飲料水の規格基準に適合していた。

一般細菌数は $2.5 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^6$ 個/mLであった。一般細菌数は清涼飲料水の規格基準には定められていないものの、その製造基準で、原水的一般細菌数は100個/mL以下と規定されている。今回の結果は、この数値を大幅に上回っており、製造時の原水が基準を満たしていなかった可能性や、基準に適合した原水が用いられていた場合には、製造・輸送・貯蔵過程において適切に取り扱われなかったために一般細菌が増殖したことが示唆された。

2. 真菌の同定

試料中の異物を直接鏡検したところ、菌糸塊が認められ(Fig.1)、その形態から2種類の菌種の混在が疑われたものの、同定の指標となる特徴的な形態は確認できなかった。培養試験では、すべての検体

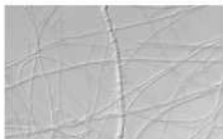
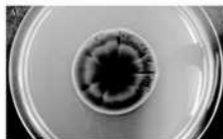


Fig.1 Micrograph ($\times 400$) of mold-like floats in the complained mineral water



B)

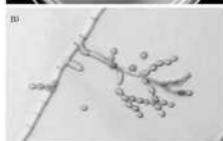


Fig.2 *Cladosporium* sp.

A) Cultured colony in PDA (25°C, 15 days)

B) Micrograph ($\times 400$)

で性状の異なる2種類のコロニーが観察された。これらのコロニーについて、プレートを用いた純培養及びスライドカルチャーによる形態観察を行った。このうち一つはコロニーの性状及び分生子などの形態的特徴から *Cladosporium* 属菌と考えられた (Fig.2)。もう一方は、形態からの菌種の同定が困難であったため、この菌の rDNA 遺伝子の ITS1 領域の塩基配列を決定し同源性解析を行った。解析した 263bp は、*Exophiala salmonis* (GenBank accession number: AY213632) の当該領域と 99% 一致した。これに基づいて、当該菌の形態的な特徴について再度確認したところ、PDA 培地上のコロニー形態及び分生子の形状が *Exophiala salmonis* の特徴と一致した



Fig.3 *Exophiala salmonis*

A) Cultured colony in PDA (25°C, 15 days)

B) Micrograph ($\times 400$)

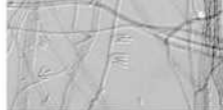


Fig.3 *Exophiala salmonis*

A) Cultured colony in PDA (25°C, 15 days)

B) Micrograph ($\times 400$)

(Fig.3)。

また、形態的特徴から *Cladosporium* 属と考えられた菌についても、同様に解析したところ、解析した 236bp は *Cladosporium* sp. (GenBank accession number: EU139655) の当該領域と 100% 一致した。

以上のことから、ミネラルウォーター中の異物は *Exophiala salmonis* 及び *Cladosporium* 属による菌糸塊と考えられた。

食品由来真菌の同定に分子生物学的手法を用いた報告は少ない。その中で、千葉¹⁶⁾ は表現性状試験のみでは真菌の同定に苦慮するような場合において、塩基配列決定による同源性解析が有効であったと報告している。真菌の rDNA 遺伝子は 18S (small subunit rDNA), 5.8S, 28S (large subunit rDNA) の3種のサブユニットと、それらの間に存在する ITS (internal transcribed spacer), ETS (external transcribed spacer), IGS (intergenic spacer) のスペイサー領域で構成されている¹⁷⁾。rDNA 遺伝子の中でも、18S や 28S といったサブユニット領域は属の同定に適しているとされている。これに対して ITS 領域は比較的多くの変異が蓄積された領域であるため、近縁の菌種を区別するのに有用であるとされている¹⁸⁾。このことから、今回我々は分離された真菌について、日本薬局方記載の方法によって ITS1

領域を解析したが、*Cladosporium*属であることは判明したものの、その種の特定には至らなかった。これについては、種によって区別に適した解析領域が異なる旨を指摘する報告¹⁾もあることから、効率よく正確に同定するための必要最小限の複数の領域を選定することが必要と思われた。

真菌は形態的分類に基づいて、国際植物命名規約で命名されている。一方、遺伝子での分類体系は確立されておらず、また菌種によって遺伝子登録データ数に大きな偏りがあるなど、真菌における塩基配列解析には課題が残されている。しかし、これらのことを留意しつつ、従来法である形態に基づく同定結果に、塩基配列解析の結果を加味することで、迅速で正確を射た同定が可能になるとと思われる。

3. 清涼飲料水における真菌の混入

清涼飲料水では *Penicillium*, *Cladosporium* および *Aureobasidium* などの汚染が多いと報告されている⁹⁾。今回、我々が同定した *Cladosporium* 属や *Exophiala* 属は、様々な飲料水から検出されている¹⁰⁾。*Cladosporium* 属は空中浮遊菌の30~40%を占めるとされ、*Exophiala* 属は使用水や環境中に存在する菌であることから¹⁰⁾、今回の苦情製品は製造過程におけるパイプラインや充填時の汚染、あるいは充填容器の不適切な管理などが原因と考えられた。

Cladosporium 属菌、*Exophiala* 属菌は生活環境中に常在しており、摂取しても人体への影響は少ないと考えられる。しかし、真菌による健康被害については不明な点も多く、これらによる食品汚染は軽視すべきではない。カビによる製品汚染を防止するには、諸角ら¹¹⁾が指摘しているように、原材料から製品に至るまでの様々な工程でカビ汚染に対するリスク評価を行い、これに基づいて適切な管理基準を設定し定期点検を行うなど、製造環境の衛生管理が求められる。

IV まとめ

2008年6月、購入したミネラルウォーターにカビ様の異物が浮いているとの苦情があり、兵庫県内の健康福祉事務所が当該製造所に立ち入り調査をした。健康福祉事務所が収去した製品について、当センターで検査した結果、大腸菌群はいずれも陰性、一般細菌数は $2.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 個/mL であった。真菌では、*Cladosporium* 属菌及び *Exophiala salmonis* が検出された。*Exophiala salmonis* については、形態観察のみでは同定できなかったが、rDNA 遺伝子の

ITS1 領域の塩基配列解析によって、菌種を決定できた。このことから、食品由来の真菌同定に塩基配列解析法を併用することは、迅速性や正確性において有用であると考えられた。

謝辞

本稿を終えるにあたり、ご協力いただきました県生活衛生課、和田山健康福祉事務所の関係者方々に感謝いたします。

文献

- 1) 高島浩介監修:かび検査マニュアルカラー図譜, p.242-429, 株式会社テクノシステム, 東京(2002)
- 2) Zhu, H., Qu, F., Zhu, L. H.: Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.*, 21(22), 5279-5280(1993)
- 3) 厚生労働省: 第十五改正日本薬局方, p.1580-1581, 厚生労働省(2006)
- 4) 千葉隆司, 和宇慶朝昭, 諸角聖, 矢野一好, 甲斐明美, 山田澄夫: DNA 塩基配列解析法を利用した苦情食品由来真菌の同定に関する検討. 東京健康研七号報, 57, 159-163(2006)
- 5) 久保田裕子: カビ検査を考える. 日食雑誌, 25(2), 66-69(2008)
- 6) Sugita, T., Nishikawa, A.: Molecular taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis. *Jpn. J. Med. Mycol. (in Japanese)*, 45, 55-58(2004)
- 7) 千葉隆司, 和宇慶朝昭, 貞井健志, 矢野一好, 諸角聖: 食品由来酵母の同定における DNA 塩基配列解析法と表現性状試験との比較. 食衛誌, 48(1), 1-7(2007)
- 8) 北爪晴恵, 桐ヶ谷忠司, 石黒裕紀子, 鈴木正樹, 松本裕子, 山田三紀子, 武藤哲典: 真菌を原因とする苦情食品事例. 横浜衛研年報, 45, 69-73(2006)
- 9) 諸角聖: 市販食品のカビ汚染とその防止対策. 日食雑誌, 25(2), 56-63(2008)
- 10) 諸角聖, 藤川浩, 和宇慶朝昭, 千葉隆司: 食品のカビ汚染と防止対策. 東京健康研七号報, 55, 13-22(2004)
- 11) 宇田川俊一: 食品のカビ汚染と危害. p.53-41, 155-159, 幸書房, 東京(2004)

兵庫県における麻痺性・下痢性貝毒の検出状況（2005年～2007年） および貝毒成分の分析

吉岡 直樹^{1*} 押部 智宏² 武田 信幸¹ 近平 雅嗣²
波邊 龍一³ 大島 泰克³

Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) and Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) in Hyogo Prefecture between 2005 and 2007

Naoki YOSHIOKA^{1*}, Tomohiro OSHIBE², Nobuyuki TAKEDA¹, Masatsugu CHIKAHIRA²,
Ryuichi WATANABE³ and Yasukatsu OSHIMA³

¹ Life Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan, ² Infectious Disease Research Division and ³ Tohoku University, Graduate School of Life Sciences

The results of PSP and DSP monitoring were presented for the oyster and short-necked clam samples collected in Hyogo prefecture between 2005 and 2007. Toxicity was determined by the official mouse bioassay method. In 2005, no samples exceeded the regulatory limit (4 MU/g) of PSP. In 2006 and 2007, highly toxic samples of PSP were found. In contrast, there were no samples exceeded the detection limit (0.05 MU/g) of DSP in the period 2005-2007. PSP toxins (Saxitoxins, Gonyautoxins, and C toxins) were determined by HPLC for the positive samples in 2007. The major components were C1, C2, GTX1, and GTX4.

I はじめに

兵庫県では、1980年から貝毒監視のためのモニタリング調査を実施しており、現在は生産量の多いアサリ、マガキを主な対象として、それぞれの出荷時期にモニタリングを実施している。県内産の貝による中毒事例はないものの、最近では、ほぼ毎年のように麻痺性貝毒による毒化は起きており、注意喚起が必要である。本県の麻痺性貝毒の主な原因種は、渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* であり、下痢性貝毒

では、渦鞭毛藻 *Dinophysis fortii* や *Baculinata* である。それらのプランクトンを計数することで毒化予知の一助としている。

また、本県の沿岸部は、淡路島を挟んで大阪湾側、播磨灘側と紀伊水道側に分かれており、それらが明石海峡、友ヶ島水道、鳴門海峡でつながっている特殊な地形をしている。特に、大阪湾側は明石海峡と友ヶ島水道が海水の流出入口であり、閉鎖性が高い。

当研究センターでは、兵庫県水産課の依頼により、県内で採取されたアサリ・マガキ等の貝類について、麻痺性および下痢性貝毒試験を行っている。今回、2005年～2007年に実施された、公定法による貝毒試験の結果を報告する。また、2007年には検査開始以来、アサリにおいて最高濃度 92.2 MU/g の麻痺性貝毒を検出したことから、同年のサンプルについて、ポストカラム蛍光検出高速液体クロマトグラフィー

¹健康科学部 *感染症部

²東北大学大学院生命科学研究所

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所
健康科学部 吉岡 直樹

(HPLC)により、麻痺性貝毒の有毒成分であるサキシトキシン(STX)群、ゴニオトキシン(GTX)群、およびCトキシン群の各型標体の定量分析を行ったので、その結果も併せて報告する。

II 方法

1. 試料

2005年1月～2007年12月に採取された、アサリ75標体、マガキ54標体(合計129標体)を用いた。採取地点は、赤穂市、相生市、たつの市、姫路市、神戸市、芦屋市、南あわじ市、および西本市の各海岸である。これらの採取地点をFig.1に示した。

2. 麻痺性貝毒試験

麻痺性貝毒試験は、麻痺性貝毒検査法¹⁾に従って実施した。ホモジナイズした試料100 gに0.15塩酸100 mLを加え、pHを4.0以下に調整後、さらにホモジナイズし、5分間加熱煮沸させたのち、室温になるまで放冷した。これをpH2.0～4.0に再調整し、水を加えて200 mLに定容した。復検後、ろ紙でろ過したものをマウス毒性試験に使用した。

3. 下痢性貝毒試験

下痢性貝毒試験は、下痢性貝毒検査法¹⁾に従って実施した。ホモジナイズした試料200 gにアセトン600 mLを加え、さらにホモジナイズし、減圧ろ過した。抽出残渣にアセトン400 mL加えて同様に抽出を行い、さらにこの操作を繰り返して、合計3回の抽出を行った。合わせた抽出液をロータリーエバポレーターで約1/8程度になるまで減圧濃縮し、濃縮物を分液漏斗に移しジエチルエーテル150 mLを加え、軽く振とうし、水層を除いた。エーテル層を約半量の水で洗浄し、さらにこの操作を繰り返した。最後に、エーテル層をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、1% Tween60生理食塩水に懸濁させ、全体を10 mLに定容した。これをマウス毒性試験に使用した。

4. HPLCによる麻痺性貝毒分析

4.1 試薬

イオンペア試薬であるリン酸テトラゾナルアンモニウム、ヘプタンスルホン酸ナトリウムはHPLC用を用い、その他は試薬特級を用いた。毒の定量には、東北大学において調製された麻痺性貝毒の標準毒溶液を用いた。



Fig.1 Locations of sampling sites.

4.2 前処理

麻痺性貝毒検査法に従って調製したマウス毒性試験用原液を4 mL取り、Sep-pak plus C18 (メタノール10 mL、水10 mLの順でコンディショニング後、水を切ったもの)を通して、最初に溶出する2 mL分を捨て、次に溶出する両分を固相ろ過カートリッジ (Millipore Ultrafree-0.5, MFL: 100Da) に取り、12000rpmで10分間遠心ろ過したものをHPLC試験原液とした。

4.3 HPLC条件²⁾

移動相ポンプ:日立L-2100

反応液および中和液ポンプ: Lab-quatec York-21 MP-311

カラム: Wighytail RP-8 GP (内径4.6mm×150mm)

反応コイル: デフロンチューブ (内径0.5mm×10m)

検出器: 日立L-7480蛍光検出器

Cトキシン群 (C1, C2) 用移動相: 2mM リン酸テトラゾナルアンモニウム(pH 6.3)

GTX群 (GTX1-5, 4-GTX2, 3) 用移動相: 2mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム-10mM リン酸アンモニウム(pH 7.2)

STX群 (STX, neoSTX, 4-STX) 用移動相: 2mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム-30mM リン酸アンモニウム(pH 7.0) / アセトニトリル (100 : 4.3)

反応液: 7mM 過ヨウ素酸-50mM リン酸緩衝液(pH 9.0)

中和液: 0.5M醋酸

移動相流速: 0.8 mL/min

反応液および中和液流速: 0.4 mL/min

注入量: 10 μ L

検出波長: 320 nm (励起), 390 nm (蛍光)

反応温度: 85°C

III 結果および考察

1. 公定法による検査結果

2005年～2007年の麻痺性貝毒の検査結果をTable 1に示し、Table 2に下座性貝毒の検査結果を示した。麻痺性貝毒について、2005年は規制値(4 MU/g)を超える貝毒は検出されなかったが、芦屋において4月中旬から5月上旬にかけて、検出限界(2.0 MU/g)

以上の貝毒がアサリから検出された。2006年には、芦屋・南あわじ・洲本の3ヶ所において毒化がみられ、芦屋においては4月上旬に規制値を超える5.8 MU/gの毒力を検出した。また洲本においては3月下旬から5週にわたり毒化が続き、ピーク時の4月6日採取のサンプルは73.2 MU/gの毒力であった。2007年は、大阪湾沿岸の神戸・芦屋・洲本の3ヶ所において毒化がみられ、芦屋においては5月上旬に規制

Table 1 Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxicities of oysters and short-necked clams in 2005, 2006, and 2007

2005															
Sampling site	Oyster			Short-necked clam								Oyster			
	Jan 17	Feb 14	Mar 7	Mar 24	Apr 11	Apr 18	Apr 25	May 2	May 9	May 16	May 23	Oct 24	Nov 14	Dec 11	
Aoi	ND	ND	ND	ND	--	ND	--	--	ND	--	--	ND	ND	ND	
Aoi	ND	ND	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	ND	ND	ND	
Tanabe	ND	ND	ND	ND	ND	--	--	--	ND	--	--	ND	ND	ND	
Honjo	--	--	--	ND	ND	ND	--	--	ND	--	--	--	--	--	
Kobe	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Afusa	--	--	--	--	--	2.4	2.7	2.2	ND	ND	--	--	--	--	
Mitsunaga	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Susaki	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
(MU/g)															
2006															
Sampling site	Oyster			Short-necked clam								Oyster			
	Jan 18	Feb 11	Mar 5	Mar 22	Apr 7	Apr 14	Apr 21	Apr 28	Apr 28	May 5	May 12	Jun 5	Oct 27	Nov 17	Dec 11
Aoi	ND	ND	ND	ND	--	ND	--	--	ND	--	ND	ND	ND	ND	ND
Aoi	ND	ND	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	ND	ND	ND
Tanabe	ND	ND	ND	ND	--	ND	--	--	ND	ND	--	ND	ND	ND	ND
Honjo	--	--	--	ND	ND	ND	--	--	ND	--	ND	--	ND	--	--
Kobe	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Afusa	--	--	--	--	--	8.8	2.2	1.4	17.0	ND	ND	--	Oct 13	ND	--
Mitsunaga	--	--	--	--	Mar 11	1.2	Apr 14	2.8	ND	ND	--	--	--	--	--
Susaki	--	--	--	--	17.6	Oct 13	45.6	1.4	17.1	49.2	5.7	2.1	ND	ND	--
(MU/g)															
2007															
Sampling site	Oyster			Short-necked clam								Oyster			
	Jan 11	Feb 1	Mar 7	Mar 26	Apr 9	Apr 23	May 7	May 7	May 14	May 21	May 28	Jun 4	Oct 27	Nov 12	Dec 11
Aoi	ND	ND	ND	ND	ND	--	--	ND	--	--	--	--	ND	ND	ND
Aoi	ND	ND	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	ND	ND	ND
Tanabe	ND	ND	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	ND	ND	ND
Honjo	--	--	--	ND	--	--	ND	--	--	--	--	--	ND	ND	ND
Kobe	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Afusa	--	--	--	ND	--	2.7	16.6	2.5	ND	ND	--	--	--	--	--
Mitsunaga	--	--	--	ND	--	--	ND	--	--	--	--	--	--	--	--
Susaki	--	--	--	ND	--	--	91.2	87.4	9.1	2.3	ND	ND	--	--	--
(MU/g)															

--: Not tested, ND: <2.0 MU/g, Bold: >4 MU/g (regulatory limit)

Table 2 Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxicities of oysters and short-necked clams in 2005, 2006, and 2007

2005														
Sampling site	Oyster			Short-necked clam								Oyster		
	Jan 17	Feb 14	Mar 7	Mar 24	Apr 11	Apr 18	May 2	May 2	May 9	May 16	May 23	Oct 24	Nov 14	Dec 11
Aoi	ND	ND	ND	ND	--	--	ND	ND	ND	--	--	ND	ND	ND
Aoi	ND	ND	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	ND	ND	ND
Tanabe	ND	ND	ND	ND	ND	--	ND	--	ND	ND	--	ND	ND	ND
Honjo	--	--	--	ND	ND	ND	ND	--	ND	--	--	--	--	--
Kobe	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Afusa	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
(MU/g)														
2006														
Sampling site	Oyster			Short-necked clam				Oyster						
	Jan 18	Feb 11	Mar 5	Mar 22	Apr 14	May 5	Jun 5	Oct 27	Nov 17	Dec 11				
Aoi	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND				
Aoi	ND	ND	ND	--	--	--	--	ND	ND	ND				
Tanabe	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND				
Honjo	--	--	--	ND	ND	ND	ND	--	--	--				
Kobe	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--				
Afusa	--	--	--	--	--	May 4	ND	Jun 1	ND	--				
(MU/g)														
2007														
Sampling site	Oyster			Short-necked clam				Oyster						
	Jan 11	Feb 1	Mar 7	Mar 26	Apr 9	Apr 23	Jun 4	Oct 27	Nov 12	Dec 11				
Aoi	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND				
Aoi	ND	ND	ND	--	--	--	--	ND	ND	ND				
Tanabe	ND	ND	ND	--	--	--	--	ND	ND	ND				
Honjo	--	--	--	ND	--	ND	--	--	--	--				
Kobe	--	--	--	--	--	ND	--	--	--	--				
Afusa	--	--	--	ND	--	--	--	--	--	--				
(MU/g)														

--: Not tested, ND: <0.05 MU/g

値を超える 15.4 ㎍/g の貝毒を検出した。瀬本での 5 月 1 日採取のサンプルからは、兵庫県内において検査開始以来最高の 92.2 ㎍/g という高濃度の麻痺性貝毒が検出された。また、この年には大阪府の調査¹⁾によっても、府内沿岸で採取した貝類から高濃度の麻痺性貝毒が検出されており、大阪府貝塚市の二色の浜で 4 月 30 日に採取されたアサリからは、その年の最高値である 140 ㎍/g の毒力を検出していることから、2007 年は大阪湾沿岸において広範囲にわたって麻痺性貝毒による毒化が広がっていたことが分かった。この年の調査点における毒化期間は、5 週程度であった。

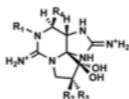
兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センターが実施した芦屋および瀬本における計数 (Table 3) では、5 月 14 日の調査時点でプランクトンは消失し、アサリの毒も規制値付近まで激減した。大阪府における同日の調査¹⁾でも、アサリの毒は規制値付近まで低下しており、大阪湾沿岸の毒化はほぼ同時期に収束したことも分かった。2006 年の毒化の推移もほぼ同じであった。

なお、播磨灘に面した調査点ではアサリの毒化は検出されなかった。

一方、下府内貝毒については、2005 年～2007 年は、検出限界 (0.05 ㎍/g) を超える貝毒は検出されなかった。

2. HPLC による麻痺性貝毒分析の結果

2007 年に、麻痺性貝毒試験において陽性であったアサリ 8 サンプル (神戸 1、芦屋 3、瀬本 4) について、ポストカラム蛍光検出 HPLC による分析を行った。Fig. 2 に C トキシン群、GTX 群、STX 群の各異種体の構造式を示し、各定量結果と、これらの濃度にマウス腹腔内投与による比毒性 (1 μmol あたりの ME) を乗じて求めた毒力を Table 4 に示した。



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
C1	H	H	OSO ₂	CH ₂ OCONHSO ₂
C2	H	OSO ₂	H	CH ₂ OCONHSO ₂
GTX1	OH	H	OSO ₂	CH ₂ OCONH ₂
GTX2	H	H	OSO ₂	CH ₂ OCONH ₂
GTX3	H	OSO ₂	H	CH ₂ OCONH ₂
GTX4	OH	OSO ₂	H	CH ₂ OCONH ₂
GTX5	H	H	H	CH ₂ OCONHSO ₂
dcGTX2	H	H	OSO ₂	CH ₂ OH
dcGTX3	H	OSO ₂	H	CH ₂ OH
neoSTX	OH	H	H	CH ₂ OCONH ₂
dcSTX	H	H	H	CH ₂ OH
STX	H	H	H	CH ₂ OCONH ₂

Fig. 2 Chemical structures of PSP.

Table 3 Cell density of *Alexandrium tamarense* in 2007

Sampling site	<i>Alexandrium tamarense</i>						
	Mar 26	Apr 9	Apr 23	May 1	May 7	May 14	May 21
Kobe	0	0	—	—	60	0	0
Ashiya	0	100	0	180	40	0	0
Matsunawaji	0	60	100	—	520	—	—
Sumoto	0	40	1700	520	80	0	0

—: Not tested (cells/L)

Table 4 Concentrations of Paralytic shellfish toxins in short-necked clams in 2007

Sampling Site	Date	Concentration in shellfish (μg/g)											Toxins (ME/g) by HPLC (1 by Mouse bioassay 1)	
		C toxins		Gonyautoxins (GTX)						Saxitoxins (STX)				
		C1	C2	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	dcGTX2	dcGTX3	neoSTX	dcSTX	STX	
Kobe	May 7, 2007	0.61	0.10	1.13	0.22	0.09	ND	ND	0.08	0.02	0.10	ND	0.07	3.7 (2.2)
Ashiya	Apr 25, 2007	1.86	1.65	1.67	0.38	0.22	0.91	ND	0.09	0.08	0.16	ND	0.04	7.5 (2.7)
Ashiya	May 1, 2007	6.88	4.65	5.57	0.91	0.69	3.41	ND	0.39	0.35	0.71	ND	0.17	26.3 (15.4)
Ashiya	May 7, 2007	1.21	0.27	3.31	0.49	0.20	ND	ND	0.35	0.04	0.18	ND	0.12	5.0 (2.5)
Sumoto	May 1, 2007	8.15	12.96	18.29	3.22	2.86	24.36	ND	0.11	0.35	1.04	ND	0.26	102.3 (62.2)
Sumoto	May 7, 2007	7.11	3.99	17.18	2.36	1.81	13.32	ND	0.24	0.28	1.04	0.06	0.47	77.0 (37.2)
Sumoto	May 14, 2007	1.12	0.17	2.79	1.11	0.46	0.52	ND	0.21	0.08	0.34	ND	0.32	11.7 (7.1)
Sumoto	May 21, 2007	0.40	0.08	0.48	0.39	0.16	ND	ND	0.11	0.04	0.23	ND	0.08	3.8 (2.3)
Specific toxicity (ME/μmol)		15	239	2468	892	1584	1803	100	1617	1872	2295	1274	2480	

ND=0.01 μg/g

これらのサンプルからはCトキシン群、GTX1~4が主に検出され、STX群は低濃度であった。それらを毒力に換算したところ、GTX1~4のみで総毒力の8割を占めており、マウス毒性試験で検出した毒力の主要成分であると考えられた。従って、本マウス毒性試験が適正に行われていたことが裏付けられた。また、HPLCによる定量値から換算した毒力と、公定法によるマウス毒性試験から得られた毒力を比較すると、高毒力のサンプルでは値は近似していたが、低毒力のサンプルでは、マウス毒性試験の方が低い値を示した。これは、毒力が低い場合、マウス試験においては抽出液をそのまま、あるいは低倍率希釈で投与することから、食塩等の不純物が毒性の発現を遅らせるためであると言われている²。

Fig.3には、個体ごとの成分組成をwt%で表した結果を示した。すべてのサンプルにおいて、C1、C2、GTX1の3種類の合計で全体の半分以上の割合を占めた。

また、芦屋のサンプルは、神戸、洲本のサンプルよりC1、C2の割合が高かった。

洲本において、毒化した5月1日から5月21日採取サンプルの麻痺性貝毒の成分組成を見ると、C2およびGTX4の割合が徐々に減っていき、C1、GTX1およびGTX2が増加している。芦屋においても、ほぼ同様の傾向が見られた。この理由として以下ことが考えられる。GTX群については11位硫酸エステル基の立体配置によって安定性が異なり、 β 配位より α 配位であ

る α エピマー (C1、GTX1およびGTX2等)の方が安定である²。また、C1-C2、GTX1-GTX4、GTX2-GTX3は互いに立体異性体として存在している。毒化の初期には、高解毛藻自体が生合成している11位エピマー(C2、GTX3およびGTX4)の割合が多く、時間の経過につれて、それらが2枚貝体内で、安定な α エピマー (C1、GTX1およびGTX2等)に異性化することによるものと考えられる。また、少量であったGTX2とneoSTXが徐々に増加していった。これは、主要成分であるC1、C2の13位側鎖における硫酸もしくはGTX1、GTX4のN1位水酸基の還元、11位硫酸基の還元脱離が、貝体内の化学物質あるいは酵素によって進行したものと考えられた。

IV まとめ

2005年~2007年の兵庫県における貝毒試験の結果について報告した。麻痺性貝毒について、2005年は規制値を超える貝毒は検出されなかったが、2006年および2007年は、大阪湾に面した調査点のアサリにおいて高い毒化が見られた。毒化は年度によって異なるものの、3月下旬から5月中旬にかけてであり、毒化期間は3~5週であった。また、大阪湾沿岸(大阪、兵庫の両府県)に生息するアサリは、ほぼ同時間に毒化のピークを迎え、収束したが、大阪湾沿岸と播磨灘沿岸における毒化は同期しなかった。一方、下瀬性貝毒については、検出限界を超える貝

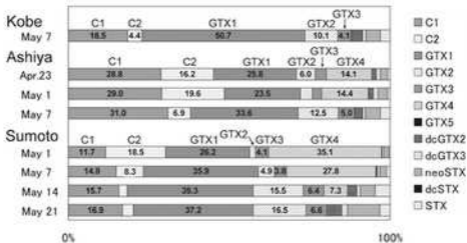


Fig.3. Toxin profiles of short-necked clams collected in 2007.

毒は検出されなかった。

また、2007年に麻痺性貝毒が検出されたサンプルについて、ポストカラム蛍光検出 HPLCにより各型録体ごとに定量分析を行い、毒組成を明らかにした。

2008年においても、前年に続き麻痺性貝毒による高い毒化がみられていることから、今後ともモニタリングによる監視が重要であると考えられる。

謝 辞

本報告は、兵庫県の貝毒被害防止対策事業、貝毒・有害物質被害防止対策事業の一環として行われたものである。試料を採取して頂きました兵庫県農政環境部水産課、各農林水産振興事務所、兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センターの担当者の方々、ならびにプランクトン調査データを提供して頂いた同水産技術センター西川哲也主任研究員に感謝致します。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知：貝毒の検査法等について、1980年7月1日、環乳第30号
- 2) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知：下痢性貝毒の検査について、1981年5月19日、環乳第37号
- 3) Oshima, Y.: Postcolumn Derivatization Liquid Chromatographic Method for Paralytic Shellfish Toxins, *J. AOAC Int.*, **78**, 528-532(1995)
- 4) 濱野米一ら：平成19年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部自然毒部会発表発表会抄録集, p.25-28(2008)。大阪
- 5) 大島泰克, 濱野米一：麻痺性貝毒のモニタリング, 今井一郎, 福代康夫, 広石伸五編, 貝毒研究の最先端—現状と展望, p.19-29, 恒星社厚生閣, 東京(2007)
- 6) Murakami, R., Yamamoto, K. and Noguchi T.: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **40**, 46-54(1999)

チョウセンアサガオの中毒事例におけるLC/MSを用いた アトロピンおよびスコポラミンの分析

吉岡 直樹* 秋山 由美 松岡 智郁 祭原 ゆかり 三橋 隆夫

Determination of Atropine and Scopolamine by LC/MS in *Datura* Poisoning

Naoki YOSHIOKA*, Yumi AKIYAMA, Tomofumi MATSUOKA,
Yukari SAIBARA and Takao MITSUHASHI

*Life Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental
Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

Two patients took "burdock roots" grown in their garden. After eating, they were admitted to hospital with a complaint of vertigo. The symptoms were mydriasis, tachycardia, and visual hallucinations. Then, we analyzed "burdock roots" they took. The root was extracted with diethyl ether and ammonia solution, and the extract was analyzed by LC/MS. The concentrations of atropine and scopolamine were 425 µg/g and 4.57 µg/g, respectively. The compounds were further confirmed within 1 ppm error by measuring accurate mass using LC/TOF-MS. The result showed that the patients mistook *Datura* roots for burdock roots.

I はじめに

2009年1月に兵庫県丹波市内において、チョウセンアサガオの誤食が原因と思われる食中毒が発生した。当該患者(2名)が、自宅畑で「ゴボウ」として採取した植物の根を調理、喫食したところ、めまい、瞳孔散大、幻視等の症状を呈したため、医療機関を受診した。その後、患者からの聞き取り調査により、収穫したゴボウ畑周辺の花壇に以前「チョウセンアサガオ」を植えていたことが判明し、症状と併せて、チョウセンアサガオによる食中毒と推定された。

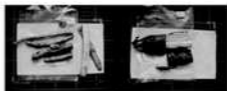
そこで、研究センターでチョウセンアサガオの確認試験を行った。装置として、液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)および液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析計(LC/TOF-MS)を用いて分析条件を検討し、含有成分であるアトロピンおよびスコポラ

ミンを測定した。その結果、両成分の含有が確認されたので報告する。

II 方法

1. 試料

患者らが喫食した「ゴボウ」根の残骸が無かったため、同品と同じ場所から採取した根菜(検体1)を試料とした。また、自宅畑で栽培しているゴボウ(検体2)を対照品とした(Fig.1)。



Sample No.1 Sample No.2
(Glehenze, Burdock root)

Fig.1 Root samples which the patients took by mistake.

健康科学誌

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所センター
健康科学誌 吉岡 直樹

2. 試薬および試液

硫酸アトロピン水和物 ($C_{17}H_{27}NO_3$) \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O は和光純薬工業株式会社を用い、臭化水素酸スコポラミン $C_{17}H_{27}NO_3$ \cdot $10H_2O$ (換算値 $n=1.3$) は和光純薬工業株式会社製生薬試験用を用いた。ジエチルエーテルは残留農薬・PCB試験用、メタノールは高速液体クロマトグラフ用を用いた、その他の試薬は特級を用いた。

3. HPLCによる定量分析

3.1 LC/MSによる測定条件

装置: Agilent 1100 Series LC + MSD (SL)

カラム: Inertsil ODS-3 (150 mm \times 3.0 mm, 5 μ m)

移動相: メタノール-10mM酢酸アンモニウム (25:75)

流量: 0.4 mL/min, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C,

注入量: 5 μ L

イオン化法およびキャピラリー電圧: ESI(Positive, 2500 V)

ネプライザ圧力: 50 psi, 乾燥ガス: 10 L/min (350 $^{\circ}$ C)

フラグメンター電圧: 100 V, 200 V

スキャン範囲: m/z 50-400

3.2 LC/TOF-MSによる測定条件

装置: Agilent 1200 Series LC + 6210 TOF-MSD

カラム: Inertsil ODS-3 (150 mm \times 3.0 mm, 5 μ m)

移動相: メタノール-10mM酢酸アンモニウム (25:75)

流量: 0.4 mL/min, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C,

注入量: 5 μ L

イオン化法およびキャピラリー電圧: ESI(Positive, 4000 V)

ネプライザ圧力: 50 psi, 乾燥ガス: 10 L/min (350 $^{\circ}$ C)

フラグメンター電圧: 100 V

スキャン範囲: m/z 50-950

リファレンスマス: 121, 0509および922, 0098

4. 試験溶液の調製

第十五改正日本薬局方 ロートコン定量法¹⁾を参考にした。ブレンダーで細切した試料2 gを50 mL共栓遠沈管に入れ、10%アンモニア水15 mLおよびジエチルエーテル25 mLを加えた。15分間激しく振とうした後、遠心分離し、ジエチルエーテル層を分取した。残留物にジエチルエーテル25 mLを加え、上記と同様に更に2回抽出し、全抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターでジエチルエーテルを留去した。残留物をメタノールに溶解し、全量を2 mLとしたものを、HPLC用試験溶液とした。

III 結果および考察

1. LC/MSによる分析

1.1 分析条件の検討

チョウセンサガオには有毒なアルカロイド成分としてアトロピンおよびスコポラミンが含まれている。それらの構造式をFig.2に示した。両化合物のHPLC分析においては、分離カラムとしてODS²⁾³⁾やPhenyl¹⁰⁾, HILIC¹²⁾等を用いた分析例が報告されている。本報では分離カラムとして一般的なODSを用いた。なお、ODSの場合、カラムへの保持を高めるためにイオンペア試薬を使用している例^{3,4,13)}もあるが、本報の移動相条件ではイオンペア試薬を用いても分析に支障がなかった。

また、検出器としては、UV^{3,4,14)}、蛍光(誘導体化)⁶⁾、MS^{15,16)}、MS/MS^{17,18)}を使用した例が報告されている。UVは、妨害物質の影響を受けやすいこと、また蛍光は煩雑な誘導体化が必要なことから、今回は妨害が少なく高感度なMS検出器を用いることにした。

MS検出器のイオン化については、アトロピンおよびスコポラミンは正イオンモードでイオン化可能であった。フラグメンター電圧100 Vでは、それぞれプロトン付加分子イオン(m/z 290.1および304.1)が検出され、電圧200 Vではトロパン骨格部分と推定されるフラグメントイオン(m/z 124.1および138.1)も検出された。

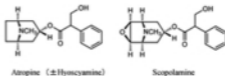


Fig.2 Chemical structures of atropine and scopolamine.

1.2 分析結果

Fig.3に、アトロピン標準溶液と検体1からの抽出イオンクロマトグラム(EIC)およびマススペクトルを示した。またFig.4には、スコポラミン標準溶液と検体1からのEICおよびマススペクトルを示した。

検体1から検出されたピークは、保持時間およびマススペクトルが両標準物質のものと一致した。フラグメンター電圧100 Vで検出されたプロトン付加分子イオンのピーク面積により定量した結果、検体1からアトロピン 425 μ g/g、スコポラミン4.57 μ g/g (共に2試行の平均値)が検出された。一方、対

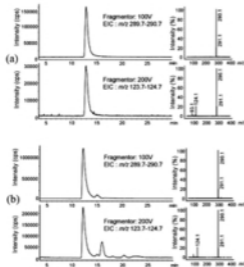


Fig.3 Extracted ion chromatograms and mass spectra of atropine standard (2 µg/mL) (a) and sample extract (b) by LC/MS.

照品である検体 2 からは、両化合物は検出されなかった。この際のアトロピンおよびスコポラミンの検出下限は、いずれも 0.2 µg/g 未満であった。

1.3 添加回収試験

対照品のごぼうにアトロピンおよびスコポラミンを 5 µg/g 相当添加し、添加回収試験を行った (3 試行)。その結果、回収率はアトロピン、スコポラミンそれぞれ、99.3±4.6 %、84.6±2.8 % と良好な値であった。

2. LC/TOF-MS による分析

2.1 分析条件の検討

LC/TOF-MS では、検出されたピークの精密質量測定が可能である。本分析で使用した装置では、リフアレンスマスを常時導入することにより 3 ppm 以内の質量誤差が確保されている。したがって EIC の抽出質量範囲を 0.02 u 幅程度に狭く設定することで、ピークの選択性を上げ、目的成分を妨害成分から離すことが可能である。

そこで検体 1 について LC/TOF-MS を用いて再分析を行った。HPLC カラムおよび移動相は、LC/MS と同じ条件を用いた。

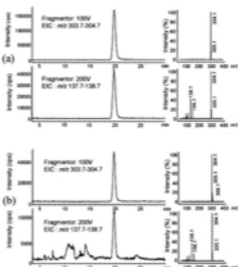


Fig.4 Extracted ion chromatograms and mass spectra of scopolamine standard (2 µg/mL) (a) and sample extract (b) by LC/MS.

2.2 分析結果

Fig.5、Fig.6 に、それぞれ LC/TOF-MS におけるアトロピン・スコポラミン標準溶液と検体 1 からの EIC およびマススペクトルを示した。

アトロピンのプロトン付加分子イオン ($C_{17}H_{21}NO_3$) の精密質量の理論値は 290.1756、スコポラミンのプロトン付加分子イオン ($C_{17}H_{21}NO_3$) の理論値は、304.1548 であり、EIC の質量範囲を、アトロピンで 290.1650～290.1850、スコポラミンで 304.1450～304.1650 に設定してイオンを選択した。

Fig.5、Fig.6 のマススペクトルより、検体 1 で検出されたピークの精密質量の実測値は 290.1759 および 304.1546 であった。この値とアトロピンおよびスコポラミンの精密質量理論値との質量誤差はそれぞれ、0.97 ppm、-0.93 ppm であり、アトロピン、スコポラミンの存在が高い信頼性で確認できた。また、EIC ピーク面積により定量計算した結果、アトロピン 469 µg/g、スコポラミン 5.68 µg/g となり、LC/MS での定量値とはば一致した。これより、アトロピンおよびスコポラミンの含有が再確認できた。

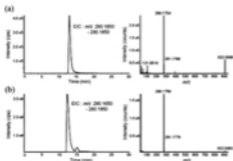


Fig.5 Extracted ion chromatograms and mass spectra of atropine standard (2 µg/mL) (a) and sample extract (b) by LC/TOF-MS.

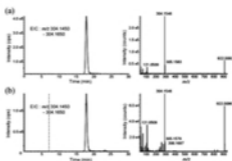


Fig.6 Extracted ion chromatograms and mass spectra of scopolamine standard (2 µg/mL) (a) and sample extract (b) by LC/TOF-MS.

IV まとめ

チョウセンアサガオは根茎がゴボウと類似し、誤食による食中毒事例がしばしば発生している^{1,2,3,4,5,10-12}。兵庫県内でも、1994年¹⁰、1996年(神戸市)¹¹、2003年¹²にそれぞれモロヘイヤやゴボウ等と誤食したことによる食中毒事例が報告されている。

今回、チョウセンアサガオと推定される植物の根茎中のアトロピンおよびスコポラミンを、LC/MSを用いて分析し、アトロピン 425 µg/g、スコポラミン 4.57 µg/gを検出した。さらにLC/TOF-MSを用いて両化合物の存在を再確認した。

アトロピンのヒト経口中毒量は5~10 mg (硫酸アトロピンとして)と報告されており¹³、本事例の「ゴボウ」の場合、約10 g摂取すると中毒量に達すると推定された。またスコポラミンの経口中毒量は3~5 mgであり¹⁴、約650 g摂取すると中毒量に達することになる。

今回の事例では、喫食残品は入手できなかったが、以上の結果から、チョウセンアサガオの誤食であることを確認できた。

謝辞

試料採取、情報収集して頂きました柏原健康福祉事務所および県生活衛生課の関係の方々へ感謝致します。

文献

- 1) 第十五改正日本薬局方 p.1278-1279, 厚生労働省(2006)
- 2) 宮武ノリエ, 重岡裕身, 寺島 潔, 長嶋真知子, 上原真一, 秋山和幸: 高速液体クロマトグラフィーによる胃腸薬中のヒソスチアミンの定量. 東京衛研年報, **41**, 47-50(1990)
- 3) 岡山明子, 青木喜也, 田原俊一郎, 氏家英司, 田中 健, 佐々木美智子: 雑煮に混入したトロパノアルカロイドの検出. 奈良県衛生研究所年報, **29**, 45-47(1995)
- 4) 高橋美佐子ら: 第 33 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, p.148-149(1996), 京都
- 5) 小阪妙子, 山本雄三, 小野和則, 武田 攻: チョウセンアサガオによる食中毒事例. 宮崎県衛生環境研究所年報, **10**, 115-119(1998)
- 6) 伊藤 健, 笠原義正, 齋藤一夫, 本間弘樹: チョウセンアサガオによる食中毒. 山形衛生所報, **33**, 18-22(2000)
- 7) 多田裕之, 白木康一, 吉田 勲, 中屋謙一, 飯沼宗和: 固相抽出によるハシリドコロ及びヒト血清中のアトロピン, スコポラミンの分析法. 岐阜県保健環境研究所報, **9**, 29-34(2001)
- 8) 北野隆一, 茶谷祐行, 小川隆男, 竹前道夫: 炊き込みご飯中に混入したトロパノアルカロイド類の検出. 京都府保健研年報, **47**, 52-55(2002)
- 9) 福田達男, 高橋美佐子, 荒金真佐子, 吉澤政夫, 鈴木幸子, 森本陽治, 安田一郎: 植物系ドラッグ

- フラシードの鑑定に関する研究, 東京健安研セ年報, **55**, 61-66(2004)
- 10) Steenkamp, P.A., Harding, N.M., van Heerden F.R. and van Wyk B.E. : Fatal *Datura* poisoning: identification of atropine and scopolamine by high performance liquid chromatography / photodiode array/mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.*, **145**, 31-39 (2004)
- 11) 横田洋一, 高橋 敏, 寺崎さち子, 田中彰雄, 村上守一: チョウセンアサガオ属のアルカロイドの分析について, 富山県薬事研究所年報, **34**, 29-34 (2007)
- 12) 山辺真一, 肥塚加奈江, 田邊英子, 北村雅美, 今中雅章: LC/MS/MS による食品中のアトロピン, スコポラミンの迅速定量, 岡山県環境保健センター年報, **31**, 127-132(2007)
- 13) 小西友彦ら: 第 94 回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集, p. 52(2007), 静岡
- 14) 松田貴美子, 森永睦子, 岡本 操, 宮崎修平, 石丸 剛, 鈴木幸一郎, 通山 薫: 中毒分析が有用であったチョウセンアサガオ中毒の1症例について, 臨床病理, **54**, 1003-1007(2006)
- 15) 仲村佳彦, 荒武憲司, 藤田あゆみ, 金村剛宗, 西田武司, 田中 仁, 友尻茂樹: 定量分析が可能であったチョウセンアサガオ中毒の2例, 中毒研究, **21**, 177-181(2008)
- 16) 兵庫県保健環境部生活衛生課: 兵庫県食中毒事件録 平成 6 年 (1996)
- 17) 兵庫県健康福祉部生活衛生課: 兵庫県食中毒事件録 平成 8・9 年 (1999)
- 18) 兵庫県健康生活部生活衛生課: 兵庫県食中毒事件録 平成 15 年 (2004)
- 19) 吉村正一郎, 早田道治, 山崎 太, 森 博美: 急性中毒情報ファイル, p. 484, 廣川書店, 東京 (1996)
- 20) 日本中毒情報センター: 急性中毒処置の手引, p. 564-565, 薬業時報社, 東京 (1999)

[ノート]

活性炭カートリッジを用いた食品中 *tert*-ブチルヒドロキノン (TBHQ) の HPLC 簡易分析法

祭原 ゆかり* 三橋 隆夫

Simple Determination of *Tert*-Butylhydroquinone (TBHQ) in Foods by Using an Activated Carbon Cartridge with HPLC

Yukari SAIHARA* and Takao MITSUHASHI

Health Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

A simple and rapid HPLC method for determining *tert*-Butylhydroquinone (TBHQ) in foods was developed with an activated carbon cartridge. TBHQ in food samples was extracted with acetonitrile, the extract was applied to an activated carbon cartridge (AC-2). The cartridge was washed, adsorbed TBHQ was eluted with 25mL of acetone:10% ascorbic acid solution (9:1), and the eluting solution was injected into the HPLC with fluorescence detection. Recoveries of spiked TBHQ in food samples (vegetable oil, margarine, instant noodles, bouillon cubes and wafers) at the level of 20µg/g ranged from 88.6 to 96.7%. The determination limit was 1µg/g in the sample.

I はじめに

tert-ブチルヒドロキノン (TBHQ) は米国や中国などでは酸化防止剤として用いられているが、わが国では使用が許可されておらず、輸入食品から検出される違反事例が見受けられる^{1,2)}。TBHQは空気酸化を受けやすいため、分析操作は簡単で迅速であることが望ましい。従来のTBHQの分析は、食品中の食品添加物分析法³⁾に基づいて行われていたが、平成17年3月に厚生労働省より改良法⁴⁾が通知された。この改良法は、TBHQをアセトニトリルで抽出し、*n*-ヘキサンを用いて油脂分を除去するもので、従来の分析法に比べてクリーンアップが十分に行われるようになった。しかし、溶媒の濃縮過程が含まれ、この段階でのTBHQの空気酸化による分解が危惧される。

活性炭やグラファイトカーボンなどの炭素系物質

は吸着力が強いので、固相抽出の充填剤としての有用性が認められつつある。固相抽出の適用は、抽出溶媒の減量化やクリーンアップ操作の迅速化などを可能とすることから、環境分野では活性炭カートリッジを用いた環境水中のアミトロール⁵⁾や1,4-ジオキサン⁶⁾の分析などに利用されている。一方、食品分野では残留農薬のアセフェート分析⁷⁾に用いられているが、この分野での報告例は少ない。今回、活性炭カートリッジを利用した食品中のTBHQの簡易・迅速分析を試みたところ、良好な結果が得られたので報告する。

II 材料と方法

1. 試料

市販の植物油、マーガリン、インスタント麺、固形ブイヨンおよびウエハースを用いた。

2. 試薬等

試薬：*tert*-ブチルヒドロキノン (TBHQ) 標準品は和光純薬工業製の特級品を用いた。アセトンおよび

健康科学部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所センター

健康科学部 祭原 ゆかり

アセトニトリルは和光純薬工業精製の高濃液体クロマトグラフ用試薬を、L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル(AP)は和光純薬工業精製の一般試薬を、その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

標準溶液：標準品50.0mgを精秤し、通知法⁶⁾に従って0.01%w/v AP アセトニトリル溶液に溶かして全量を50mLとし、標準原液とした(1mg/mL)。この液をアセトニトリルで適宜希釈して、標準溶液を調製した。なお、検量線用の標準溶液は、アスコルビン酸を1%の濃度になるように添加した。

炭素系カートリッジ：活性炭系カートリッジであるウォーターズ製Sep-Pak Plus AC-2(充填量400mg)、グラファイトカーボン系のスベルコ製ENVI-carb(充填量250mg)、カーボンモレキュラーシーブ系のスベルコ製 Carboxen-1016(充填量 220mg)および Carboxen-1000(充填量200mg)を用いた。各カートリッジは使用前に、アセトニトリル4mLおよび精製水5mLで調整した。

精製水：Milli-Q純水製造装置(ミリポア社製)により調製したものをを用いた。

3. 装置および測定条件

装置：島津製作所製LC-10Aシリーズ (RF-10A型 蛍光検出器付)

カラム：Myghtyasil RP-18 GP (関東化学製、4.6mm i.d.×150mm, 5 μ m)、移動相：5%酢酸・メタノール・アセトニトリル混液(6:2:2)、カラム温度：30℃、流速：1.0mL/分、励起波長：293nm、蛍光波長：332nm

4. 試料溶液の調製

試料5.0gにアセトニトリル50mLを加えて5分間振とうし、アセトニトリル層をろ紙(5A)でろ過した。ろ液を冷凍庫(-30℃)で30分間放置した後、再びろ紙(5A)でろ過した。このろ液10mLを共栓付試験管に取り、精製水10mLを加えて混和した後、活性炭カートリッジを通してTBHQを吸着させた。次に50%アセトン水溶液10mLおよび精製水10mLで洗浄し、アセトン・10%アスコルビン酸水溶液の混液(9:1)25mLで溶出したものをHPLC試験溶液とした。

5. 定量

標準溶液および試験溶液各10 μ LをHPLCに注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法により定量した。

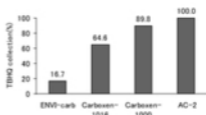


Fig.1 Collection efficiency of TBHQ with 4 kinds of solid-phase columns
20 μ g TBHQ in 10mL acetonitrile was loaded.

III 結果および考察

1. 固相抽出カートリッジによるTBHQの保持

炭素系の4種固相抽出カートリッジを用いて、アセトニトリル抽出液中のTBHQの分離を検討した。まず、各カートリッジに標準溶液10mL(TBHQを20 μ g含む)を通し、TBHQの保持力を調べた。各カートリッジにおけるTBHQの保持率をFig.1に示した。グラファイトカーボン系のENVI-carbの保持率が最も低く20%以下であった。カーボンモレキュラーシーブ系のCarboxen-1016とCarboxen-1000が90%以下であったのに対し、活性炭系のAC-2の保持率は100%であった。これより、本法では固相抽出カートリッジとしてTBHQの保持力の大きいAC-2を用いた。なお、本法ではTBHQの保持を強固とするために、アセトニトリル抽出液に等量の精製水を加えたものをカラムに負荷した。

2. TBHQの溶出溶媒

次にAC-2からのTBHQの溶出条件を検討した。標準溶液10mL(TBHQを20 μ g含む)をAC-2カートリッジに負荷し、水、メタノール、アセトニトリルおよびアセトンの4種溶媒を各40mL流したところ、いずれもTBHQはほとんど溶出しなかった。ところが、理由は不明であるが、アスコルビン酸を溶出溶媒に添加すると、TBHQの溶出性が向上した。同濃度のアスコルビン酸の添加では、TBHQの溶出率はアセトン>アセトニトリル>メタノールの順であった。これより、溶出液として、アセトン・アスコルビン酸水溶液の混液を用いることとした。なお、アスコルビン酸の添加効果は、その還元作用が原因と推定されたため、アスコルビン酸(10%、pH2.2)の代わりに、アスコルビン酸ナトリウム(10%、pH7.5)、水酸化ホウ素ナトリウム(1%)およびチオ硫酸ナトリウム(1%)な

どの還元剤の添加を検討した。結果は、アスコルビン酸ナトリウムではアスコルビン酸よりやや弱い溶出性の向上が見られたが、他の2種ではほとんど効果は認められず、アスコルビン酸の添加が最適であった。

次に、アスコルビン酸の添加条件（濃度および混合比）を検討した。3種濃度のアスコルビン酸水溶液（5%、10%、および20%）を調製し、アセトンと3種の水溶液を19:1、9:1、および4:1の割合で混合したアセトン・アスコルビン酸水溶液を調製した。これらの溶液（各40mL）を用いて、TBHQの溶出を調べたところ、アセトンと20%アスコルビン酸水溶液を19:1で混合した場合、およびアセトンと10%アスコルビン酸水溶液を9:1で混合した場合の溶出率が97~98%の高い溶出率であった（Fig.2）。本法では、溶出したアセトン・アスコルビン酸水溶液をそのままHPLCのODSカラムに注入することから、カラムの劣化などを防ぐためにアセトン濃度が低い方が望ましい。これより、本法の溶出溶媒として、アセトンと10%アスコルビン酸水溶液を9:1で混合したものを用いることとした。

3. 溶出液量

上記の溶出溶媒を用いて、AC-2カートリッジからのTBHQの溶出パターンを調べた（Fig.3）。溶出液を5mLごとのフラクションに分けて溶出率を求めたところ、溶出液量10mLでTBHQの90%以上が溶出され、溶出液量25mLでは99.8%に達した。これより、本法の溶出液量を25mLとした。

4. 検量線

本法に従って検量線を作成したところ、TBHQの濃度範囲が0.5~4.0 µg/mLにおいて良好な直線性を示し、相関係数は1.000であった（Fig.4）。

5. 添加回収実験

実試料を用いて本法での添加回収実験を行った。TBHQを含有していないことを確認した5種試料（植物油、マーガリン、インスタント麺、固形ブイヨンおよびウエハース）各々5gに、試料濃度として20 µg/gとなるように標準溶液を添加し、回収率を求めた。いずれの試料においても試験溶液のクロマトグラム上には妨害となるピークは認められなかった（Fig.5）。回収率は固形ブイヨンがやや低く88.6%であったが、それ以外の試料は全て90%以上の高値であった（Table1）。なお、本法の定量下限値は1 µg/g

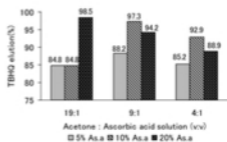


Fig. 2 Effects of ascorbic acid solution (As.a) concentrations and volumes on TBHQ eluting from AC-2 cartridge

20 µg TBHQ was loaded and eluted with 40mL acetone-ascorbic acid solution.

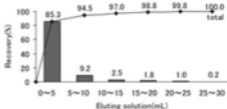


Fig. 3 Recoveries of TBHQ in each fraction from AC-2 cartridge. Each fraction volume was 5 mL.

20 µg TBHQ was loaded and eluted with acetone-10% ascorbic acid solution (9:1).

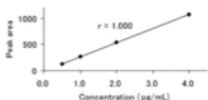


Fig. 4 Calibration curve of TBHQ

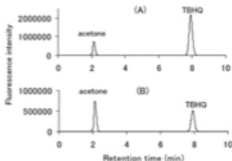


Fig. 5 HPLC chromatograms in recovery tests

(A) 2 µg/g TBHQ standard solution

(B) Instant noodles spiked with 20 µg/g TBHQ

Table 1 Recoveries of TBHQ in various food samples

samples*	recovery (%) **	
	proposed method	notified method
vegetable oil	93.7±1.1	100.7±0.1
margarine	91.3±0.9	105.9±0.6
instant noodles	96.7±0.6	85.2±1.8
bouillon cubes	88.6±3.7	89.1±1.3
wafers	95.1±1.5	89.0±0.6

* spiked with 20 µg/g TBHQ

** n=3, average±S.D.

であった。

6. 従来法との比較

上記のTBHQ添加回収実験の試料を、厚生労働省の通知法⁶⁾を用いて分析し、両法の測定値を比較した(Table 1)。植物油およびマーガリンでは、本法に比べて通知法での回収率が高値であった。一方、インスタント麺およびウエハースは本法が高く、固形ブイヨンでは両法で同程度であった。

IV まとめ

- 炭素系の4種の固相抽出カートリッジについてTBHQ分析への適用性を検討したところ、活性炭系のAC-2の保持力が最も強く、アセトニトリル溶液として通した場合、TBHQをほぼ完全に保持できた。
- TBHQの溶出は、溶出溶媒にアスコルビン酸を添加することで向上した。溶出溶媒として、アセトン・10%アスコルビン酸水溶液の混液(9:1)25mLを流すことで、TBHQはほぼ100%溶出した。
- 試料として植物油、マーガリン、インスタント麺、固形ブイヨンおよびウエハースを用いた添加回収実験では、85%以上の高い回収率が得られた。

従来法である通知法と比較した結果、ほぼ同程度の測定値であった。なお、本法の定量下限値は通知法と同じく1 µg/gであるが、カートリッジへの負荷量を増やすことなどにより、さらに定量下限値を下げる事が可能と考えられる。

- 本法は活性炭カートリッジを用いた簡易な試験法であり、試験溶液調製の所要時間は従来法に比べて1/2程度であった。本法は、迅速性の求められる食品中のTBHQの分析に有効に適用できると考えられる。

文献

- 畑中久勝, 秋山由美: 輸入食品より検出された法定外酸化防止剤(TBHQ), 兵庫県立衛生研究所年報, **32**, 184-187(1997)
- 福岡市保健環境研究所: メッセージ, 113(2002)
- 厚生省生活衛生局食品化学課長: 食品中の食品添加物分析法について, 衛化第15号, 平成12年3月30日
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: tert-ブチルヒドロキノン(TBHQ)にかかる試験法について, 食安監発第0303001号, 平成17年3月3日
- 上堀美知子: LC/MS/MSによる環境水中のアミトロールの分析, 全国環境研会誌, **28**(4), 222-228(2003)
- 西岡信浩, 三好益美, 久保正弘: 固相抽出による1,4-ジオキサンの分析法について, 香川県環境研究センター所報, **23**, 51-53(1998)
- 山下幸宏: ゴルフ場農薬の分析—親水性農薬およびHPLC対象農薬の同時固相抽出—, 和歌山市衛生研究所報, **12**, 62-67(2000)

【ノート】

イムノアフィニティーカラムを応用したアフラトキシンの
迅速スクリーニング

武田 信幸* 後藤 操

A Rapid Screening for Aflatoxins using Immunoaffinity Column

Nobuyuki TAKEDA* and Misao GOTOU

*Health Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health
and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

A rapid and selective procedure was developed for screening aflatoxins in foods with an immunoaffinity column (IAC) cleanup liquid chromatography using post-column bromination. The sample was extracted with acetonitrile-water (9:1) for nuts, cereal, peppers, and methanol-water (8:2) for peanut butter and dried figs. The sample extract was diluted with 2% Tween-phosphate buffer saline, and applied to IAC. Aflatoxins were eluted with two consecutive 0.2 mL aliquots of acetonitrile. Water (0.2 mL) was added to the second aliquot and the mixture (100 μ L) was injected onto HPLC. The mean recoveries were >70% with RSDs <11%. Limits of quantitation were estimated to be 0.5 ppb. Using the developed method, 5 samples (peanut 2, peanut butter 2, black pepper 1) were found to contain aflatoxin B1 and/or G1 ranging from 0.5 - 1.6 ppb in 60 commercial samples.

I はじめに

熱帯から亜熱帯地域に生息するカビが産生するアフラトキシンは、ヒトへの経口発がん性が実証されている唯一の物質であるとされている¹⁾。カビが付着した食品はアフラトキシンが含有されている可能性があるため、輸入食品にかかわる食品衛生上の大きな問題のひとつである。兵庫県では、食品の安全性を確保する目的で1981年から市販輸入食品のアフラトキシン試験を実施し、食品衛生法違反食品の排除を行うとともに、県内に流通している食品の汚染実態と特性を明らかにしてきた²⁾。

行政検査においては、多数の検体を正確に試験して迅速に報告し、違反事例などへの対応に科学的根

拠を示す必要がある。また最近では、「食の安全と安心」を脅かす事例が頻発しているため、危機管理の面からも食品を緊急に試験しなければならない事態に遭遇する可能性がある。このような検査を円滑に行うには、それに適した試験法を構築しておく必要がある。そのアプローチの方法には、初めから全検体に精緻な定量法を適用する、あるいは定性試験後に陽性試料を定量する、などが考えられる。輸入食品中アフラトキシン試験については、その検出率は香辛料などで約5%と低いことから³⁾、検査の迅速化には後者の方法を採用のがより合理的であると考えられる。著者らは、このような目的意識を持って試験法を逐次改善し³⁾、検査実施標準作業書(SOP-6311)⁴⁾としてまとめた。この方法は、逆相および陰・陽イオン交換能を有する多機能カラムと、アフラトキシン特異的モノクローナル抗体固定化カラム(イムノアフィニティーカラム:IAC)⁵⁾を組み合わせているため、夾雑物や妨害物の影響を完全に排除できる。そのため、加工品を含めた全除去検体について、ア

健康科学部

*別刷請求先:〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所センター

健康科学部 武田 信幸

フラトキシシン B1 の陽性判定(基準値 10ppb)において困難をきたすことがない。しかし、定量に要する費用と効率の点でやや劣り、試験結果の報告までにやや時間を要するという欠点があった。

今回、これらの問題を解決する目的で、IAC 法のみでの試験法構築を目指し、試料負荷や洗浄・溶出などに関する諸条件を再検討した。その結果、迅速・簡便で特異性が高く、経済的な検査法を確立したので報告する。

II 材料と方法

1. 試料および試薬

試料は、平成20年度に兵庫県内で収去されたピーナツなど輸入食品60検体を用いた。その内訳は、穀類・豆類・種実類計32検体(ピーナツ、ピスタチオ、アーモンド、カシューナッツ、ポップコーン、クルミ)、香辛料17検体(ナツメグ、ブラックペパー、ホワイトペパー、コショウ、唐辛子、クローブ末)および加工品11検体(ピーナツバター、乾燥イチジク)である。

標準原液は、アフラトキシシン4種を含むSigma社製混合メタノール溶液Aflatoxin Kit-M (B1/G1: 1 μg/mL, B2/G2: 0.3 μg/mL)を用いた。

ポストカラム蛍光化試薬は、臭化水素酸ピリジニウムペルブロミド(OPPB, 東京化成) 0.2gを精製水100mLに加えて十分攪拌して飽和水溶液とし、用時調製した⁶⁾。

25Tween20-PBS (T-PBS) は、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(ICI社製, Tween20)と生理的リン酸緩衝液(pH7.4, PBS)を2:98 (v/v)で混合して調製した⁷⁾。

イムノアフィニティーカラム(IAC)はVianco社製Afla-Test Pを用いた。カラム内のゲルに亀裂や泡が混入していると、試料や溶出液の流れが不均一となり、回収率や測定値変動の原因となるので使用前にこれらを除去しておく。カラム上部の充填溶液を除去した後、アダプターを連結した注射器に精製水を充填し、カラム下部から精製水をゆっくり押し出す。次いでアセトニトリルで同様の操作を行って泡などを取り除き、さらに精製水で置換する。カラム上部をT-PBSで満たして(約1mL)溶出させ、試料注入のコンディショニングを行う。試料注入および洗浄操作はすべて自然落下で行う。使用後は、アセトニトリル、精製水およびPBS各1mLで順次洗浄し、PBSを充填して冷蔵庫で保存する。長期間保存する場合は防

腐剤として0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSを使用する。

2. 装置および測定条件

高速液体クロマトグラフ(HPLC)は島津製作所製LC-10Aを用いた。検出は蛍光検出器(RF-10A)を用い、励起波長365nm/蛍光波長460nmで測定した。分析はカラムにInertsil ODS-3 (15cm x 4.6mm, 5 μm, GL Sciences)、移動相にアセトニトリル・メタノール・水(1:4:5)を用い、カラム温度40℃、流速0.8mL/minで行った。ポストカラム蛍光化試薬はLC用ポンプ(LC-10AD)を用いて0.01mL/minで送液し、T型ジョイントで分離カラムからの溶出液と混合し、テフロンコイル(内径0.25mm, 外径1/16 inch, 長さ40cm)内で反応させた。試験溶液は100 μLをHPLC装置に注入した。

3. 試験溶液の調製

ピスタチオ、落花生またはピーナツでは、殻または薄皮を除去して可食部のみを検体とした。ピスタチオは1kg⁸⁾を、その他の食品は約100gをフードプロセッサーで粉砕均一化して試料とした。ピーナツバターおよび粉末化されている香辛料は均一化されているものとして、搬入されたままの検体を試料として用いた。

定性(スクリーニング)

①香辛料類

試料2gをスクリーキャップ付プラスチック遠心管(50mL)に採り、アセトニトリル・水(9:1) 20mLを加えて30分間振とう後、遠心分離(2,500rpm, 5分間)して清澄な抽出液を得た。抽出液1mL(試料0.1g相当)とT-PBS 2mLを混合してIACカラムに負荷する。全ての試料液を溶出させた後リザーバーを外し、カラム内を順次T-PBS および精製水で満たして溶出し、洗浄する。その後アセトニトリル 0.2mLで2回溶出し、2回目の溶出液のみをLC用バイアルに採取し、精製水0.2mLを加えて混合し試験溶液とする。

②加工品(ピーナツバターおよび乾燥果実類)

ピーナツバターの加工品はアセトニトリル中では十分に分散しないため、メタノールを用いた。試料5gをメタノール・水(8:2) 20mLで抽出し、抽出液0.4mL(試料0.1g相当)とT-PBS2mLを混合し、香辛料類と同様に操作して試験溶液を得る。

③穀類、豆類および種実類

試料10gをアセトニトリル・水(9:1) 20mLで抽出し、

抽出液 0.2ml (試料 0.1g 相当) と T-PBS 1ml を香辛料類と同様に操作して試験溶液を得る。

定量

試料 0.2g に相当する抽出液 (香辛料 2ml, 加工品 0.8ml, 種実類 0.4ml) を 10ml 共栓試験管にとり、エボロレーターを用いて溶解を除去する。残留物に T-PBS (香辛料 2ml, 加工品および種実類 1ml) を加えて再溶解し、IAC カラムに注入する。全ての試料液を抽出させた後、カラム内を順次 T-PBS および精製水で満たして溶出し、洗浄する。その後アセトニトリル 0.5ml で 2 回溶出し、エボロレーターを用いて溶解を除去する。残留物にメタノール 0.1ml と精製水 0.2ml を加えて溶解し試験溶液とする。

III 結果および考察

通知法¹⁾では、IAC カラムに負荷する試料は 10 μ l、洗浄は PBS および精製水各 10 μ l である。1 試料につき 30ml をカラムに通過しなければならず、アフラトキシン溶出前にはカラム内の残留水分を除去し、さらにプレカラム蛍光誘導体化のためにアセトニトリル抽出液を乾固しなければならない。これらの作業には人員が固定して必要であり、しかも複数試料の同時並行処理ができない。実際の検査では多数試料を取り扱うため、多大の手間と時間を要する。

そこで、この問題点を解決して効率的な検査が行えるよう種々の条件を再検討した。はじめに、HPLC 条件を設定した。アフラトキシンには 4 種の異性体があり、そのうち G2 と B2 は蛍光性を有しているが、G1 および B1 は蛍光強度が弱い。そのため、LC 測定のためにプレカラムまたはポストカラム法による蛍光誘導体化が必要である。本法では、アフラトキシンを LC で分離後、臭素試薬 (PBBP) と混合して蛍光化するポストカラム法を採用した²⁾。分析システムに追加の送液ポンプが必要となるものの、分離前の試験溶液濃縮操作と個別誘導体化が不要となった。移動相流速 0.8ml/min および試薬送液 0.01ml/min の条件下、分析は 10 分以内で終了し、必要な検出感度は確保可能であることがわかった (Fig.1)。

つぎに、IAC カラムに関する諸条件を再検討した。通知法¹⁾は溶出にアセトニトリル 3 μ l が必要としているが³⁾、溶出液を 0.2ml ごとに採取してアフラトキシン溶出パターンを解析したところ、実際には 0.2-0.4ml の範囲内に負荷量の約 99% が溶出してき

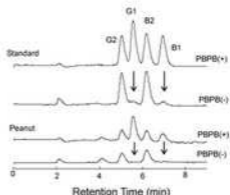


Fig.1 Chromatograms of standard aflatoxins and the extract of peanut sample with and without the post-column reagent (PBBP).

Arrows indicate the disappearance of B1 and G1 by stopping the reagent flow.

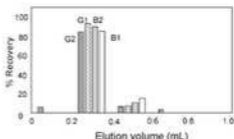


Fig.2 Elution profile of aflatoxins from IAC column (Afla-Test P) with acetonitrile.

ていることがわかった (Fig.2)。この両分だけを試験溶液とすれば濃縮は不要であり、操作の簡便化と短時間化が図られる。しかし、この両分を直接 HPLC に注入すると正常なピーク形状が得られなかった。そこで、同量の精製水を加えて試験溶液の極性を高めたところ、LC カラムによく保持されるようになり、各アフラトキシンのピーク形状は改善され (Fig.1)、さらに大量の試験溶液 (100 μ l) を LC に注入可能となった。

そこで上記で得られた諸条件が、実際の試料溶液に適用可能な、また通知法で示された負荷・洗浄などに要する流量が適正か否かなどを検討した。試料溶液は、ナツメグ抽出液 (アセトニトリル 90%) にアフラトキシン B1 が 10 μ g/ml となるように添加して調製した。通知法では抽出液の 10 倍希釈液 (アセトニ

トリル 9%) 10mL を負荷しているが⁷⁾、本法では負荷量を少なくする目的で抽出液 1mL を T-PBS 5mL で希釈することとした(アセトニトリル 15%)。その結果、G2 の回収率が約 50% と低いものの B1、B2 および G1 では約 80% 以上という良好な回収率が得られ、本法が実試料に適用可能であることが示唆された。G2 の低回収率は負荷液中のアセトニトリル濃度(15%)が高いためと思われる⁸⁾。通知法で示されているカラム内残留水分の除去については、その操作の有無で回収率は影響されなかったので省略することとした。さらに、洗浄溶液(精製水および T-PBS)の量を種々変更してもクロマトグラム上のアフラトキシン溶出部位での妨害ピークは認められず、1mL 程度の洗浄で十分であった(Fig. 1)。これらの条件を採用することで手間と時間の大幅な削減が可能となり、作業効率が極めて向上した。ナツメグ抽出液にアフラトキシン B1 および G1 では 1~10 ppb、B2 および G2 では 0.3~3 ppb となるよう添加して用量-反応関係を調べたところ良好な直線関係 ($r^2 = 0.97 - 0.99$) が得られ、本法がスクリーニング法として使用可能であることが示された。このときの検出限界値はいずれも 0.5ppb であった。

IAC カラムは通常の固相抽出カラムと比べて高価であるため、通知法においてはアフラトキシンの判定が困難な場合においてのみ使用することとされている⁷⁾。しかし、再使用すればコストは低減される。そこで、極めて高い効果が期待される精製手段を低コストで全検体に適用できるような、カラム再使用の可能性を検討した。試料としてアフラトキシンを添加したナツメグ(香辛料類)、ピーナツバター(加工品)およびピスタチオ(種実類)を用い、同一カラムを 5 回連続再使用し、各回でのアフラトキシン結合能を測定した。その結果、Fig. 3 A-C に示したようにナツメグ (15%アセトニトリル溶液、6mL 負荷) では、カラムの再使用回数を増すごとにアフラトキ

シン G 群への結合能がほぼ直線的に減少することがわかった。しかし、その傾向はピーナツ (15%メタノール溶液、2.4mL) およびピスタチオ (15%アセトニトリル溶液、1.2mL) では見られなかった。一方、B 群への結合能はいずれの試料においても再使用による減少傾向は認められなかった。アフラトキシン規制は B1 のみで行われ(基準値 10ppb)、また自然汚染においては G 群が検出される頻度は B 群より低く、また G 群のみの検出事例は報告されていないことを考え合わせれば⁹⁾、B1 を指標としたスクリーニング目的でカラムを再使用することは実用上問題ないと考えられた。ただし、従来からの定量下限値 0.5ppb⁴⁾を採用するには、再使用カラムで 0.5ppb の B1 を含む試料はすべて見落すことなく検出できなければならない。そこで、過去に比較的高程度でアフラトキシンが検出されたものや夾雑物が多いと判明している代表的試料(ピスタチオ、ピーナツ、ナツメグ、ブラックペパー、唐辛子、ピーナツバター)を用いて試験したところ、全ての試料でこの濃度の B1 をクロマトグラム上で視認できることがわかった。以上のことから、本法をスクリーニング法として使用することとした。

他方、抽出液の有機溶媒を除去した後 T-PBS で再可溶性化して IAC カラムに負荷すると、B 群 G 群ともに再使用に伴う結合量低下は認められず、G2 の回収率も大きく改善されることも判明した(Fig. 3D)。この方法を用い、3 種類の食品(ナツメグ、ピーナツバター、ピスタチオ)にアフラトキシンを B1 として 2ppb および 5ppb 添加して再現性と精度を求めたところ、各添加濃度とも平均回収率は 70% 以上、RSD は 11 以下と良好な値を示し、本法が定量法として優れていることが示された(Table 1)。B1 の定量限界値は 0.5ppb とした。以上のことから、希釈法で迅速スクリーニングを行い、何らかのピークを見出した試料は溶媒除去法で定量を行う、という分析プロトコ

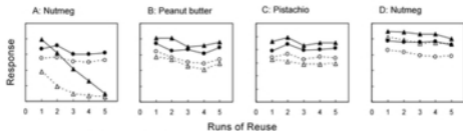


Fig. 3 Effect of reuse on IAC column performance

A - C: Extract diluted with T-PBS was applied. D: Extract was evaporated before application. Closed circle: B1, open circle: B2, closed triangle: G1, open triangle: G2.

Table 1 Recoveries of Aflatoxin B1, B2, G1 and G2 (n=5)

	Nutmeg		Peanut Butter		Pistachio	
	Average (%)	RSD (%)	Average (%)	RSD (%)	Average (%)	RSD (%)
2 ppb						
B1	77.6	1.7	73.6	3.7	81.4	10.3
B2	71.5	2.7	75.0	4.0	79.1	11.1
G1	78.6	5.7	81.1	2.7	86.6	6.7
G2	70.6	8.3	75.8	2.4	76.3	5.4
5 ppb						
B1	85.6	3.4	74.0	6.7	95.0	4.7
B2	78.4	2.6	76.0	4.1	95.5	3.2
G1	92.1	3.1	75.0	10.7	91.7	11.1
G2	70.7	6.3	78.8	7.3	99.1	9.8

ールが可能となった。

本法はポストカラム法でB1およびG1を蛍光化して測定を行っているため、試薬送液を停止すれば、それらの蛍光ピークは大きく減少する。この蛍光強度変化はオンラインでの確認法として応用可能である(Fig. 1)。最終的には質量分析装置で行うべきであるが、この方法を用いれば簡易にB1およびG1の確認が行われ、誤認(false positive)を防ぐことができる。

本法を用いて市販輸入食品 60 検体を試験した。スクリーニング段階で7検体からアフラトキシンを検出し、定量試験で汚染食品5検体を見出した(①ピーナツ: G1 1.6ppb, B1 0.5ppb, ②ピーナツ: G1 0.5ppb, B1 0.6ppb, ③ピーナツバター: B1 1.2ppb, ④ピーナツバター: B1 0.6ppb, ⑤ブラックペパー: B1 0.6ppb)。これらの食品では、試薬送液停止による簡易確認法を用いてB1およびG1の確認を行った(Fig. 1)。ピーナツバターが示す比較的高頻度かつ低濃度の汚染や香辛料の汚染は通例的に見られることであるが¹⁾、全粒ピーナツ商品からのアフラトキシン検出は極めて稀であり、しかも1例はG1濃度がB1よりも高い値を示した。従来から、アフラトキシン類のなかではB1が検出頻度および濃度ともに最も高いとされてきた。本例が特例的なものなのか、アフラトキシンを産生するカビに変化が生じているのか、カビ発生と関連する天候の影響なのか、などは不明である。今後とも調査を継続して、汚染の程度だけでなくその質の変化も注意深く観察していく必要があると考える。

IV 要 旨

特異的アフィニティーカラムと臭素によるポスト

カラム蛍光化HPLCを組み合わせた輸入食品のアフラトキシン検査法を確立した。食品の希釈抽出液をカラムに負荷してスクリーニングし、陽性試料は抽出液の溶媒を除去した後カラム処理して定量するという2段階法を採用することで検査全体の迅速化を可能とした。また、高価なカラムの再使用が可能であることを実証して経済的な方法とした。本法の定量下限値は0.5ppbで、添加濃度2ppbおよび5ppbでの平均回収率は80.8%、平均RSDは5.7であった。60検体の市販食品を分析し、ピーナツ・ピーナツバター・ブラックペパーなど5検体から0.5~1.6mg/gのアフラトキシンを検出した。

謝 辞

本調査を行うに当たり、試料の収集にご尽力いただいた兵庫県健康福祉部生活衛生課および県下各健康福祉事務所の関係各位に感謝いたします。

文 献

- 1) 栗飯原景昭 他: 食品の安全性評価, pp30-35 (1983), (学会出版センター, 東京)
- 2) 武田信幸: 輸入食品中のアフラトキシン検査 10年間のまとめ, 兵庫衛研報, 31, 164-167(1996)
- 3) 武田信幸, 西海弘城: 輸入食品中のアフラトキシン検査(平成8~11年度)および厚生省告示分析法の問題点について, 兵庫衛研報, 34, 206-209(1999)
- 4) 兵庫県立健康環境科学研究所センター 検査実施標準作業書(SOP 6311) 豆類等のアフラトキシン試験 平成17年8月31日
- 5) 中島正博: 食品分析におけるイムノアフィニティーカラムの応用 食衛誌, 42, J-1 - J7(2001)
- 6) Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study : *J. AOAC Int.*, 83, 320-340(2000)
- 7) 医薬食品局食品安全部監視安全課長: カビ毒(アフラトキシン)を含有する食品の取り扱いについて, 食安監発第 0728004号, 平成20年7月28日
- 8) 医薬食品局食品安全部監視安全課長: アフラトキシン検査におけるサンプリングについて, 食安監発第177号, 平成13年8月16日

底質中におけるフェンバレートの分析法

吉田 光方* 中野 武

Analysis of the Fenvalerate in Sediment Samples

Mihoko YOSHIDA* and Takeshi NAKANO

Environmental Safety Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27 Yukihira-cho, Suma-ku, Kobe, Hyogo 654-0037, Japan

Analytical method for Fenvalerate in the sediment using solvent extraction was developed. The sediment samples were analyzed after adding mass labelled isomer as surrogate, and determined using isotope dilution method. MDL of Fenvalerate in the sediment was 0.80 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ for Fv-1 (0.65 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ for Fv-2). MQL of Fenvalerate in the sediment was 0.31 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ for Fv-1 (0.25 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ for Fv-2). The recovery of Fenvalerate in sediment sample was 95% for Fv-1 (89% for Fv-2). The influence of interference was not observed in SIM chromatogram of Fenvalerate in environmental sediment sample, Fenvalerate in water sample was not detected. Using this analytical method the quantification of Fenvalerate in the sediment sample containing at the ppb level was enabled.

I はじめに

近年、農産物においては残留農薬が、環境中においては水中における農薬の分析が主だったものであり、GS/MSやLC/MSを用いて、数種の農薬を一齐に検出できる同時分析法が確立され、精度の向上がみられる。そのなかで、Fig.1に示す殺虫剤のフェンバレートは、魚毒性がC類、毒物及び劇物取締法で劇物に指定されており、また、人や生態系に有害であり、

かつ環境中に広く継続的に存在すると認められることから、平成11年度に「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律」(PRTR法)の第1種指定化学物質に指定され、排出量などを国へ報告する義務のある化学物質である。フェンバレートの水質中における分析法はいくつか報告¹⁾²⁾があり、ng/Lレベルの低濃度での分析法が確立している。

一方、フェンバレートは、水溶解度0.31mg/L³⁾、土壌吸着定数5270⁴⁾と水に溶けにくく、土壌に吸着されやすい性質であるため、土壌中での残存が懸念される化学物質でもある。そこで、本研究ではフェンバレートの環境底質中での存在状況を把握することを目的として、底質におけるフェンバレートの分析法を確立し、底質試料の分析を行ったので、その結果を報告する。

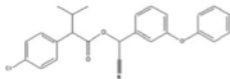


Fig.1 Fenvalerate structural formula

安全科学部

*別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究所センター

安全科学部 吉田 光方

II 方法

1. 試料及び試薬

分析法の検討に使用した底質は、姫路沖で2004年

から2006年の秋季に採取した後、湿泥の状態でも冷蔵保存していたものを試料として用いた。

採取方法については、環境省編集「化学物質環境実態調査実施の手引き」⁶⁾における「試料の採取方法」及び「試料採取にあたっての留意事項」に従った。

フェンバレート標準品は、和光純薬工業(株)製残留農薬試験用を用いた。サロゲート物質及び内標準として使用したエスフェンバレート-d₁₂は、林純薬工業(株)製を、ベンゾ(e)ピレン-d₁₂はCambridge Isotope Laboratories, Inc.製を用いた。

アセトン、ヘキサン、ジエチルエーテルなどの有機溶剤は、残留農薬試験・PCB分析用(5000倍濃縮)の高純度のものを、その他L(+)-アスコルビン酸及び塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウムなどの試薬は、試薬特級もしくは残留農薬試験・PCB分析用を用い、いずれも被験物質の測定を妨害しないことを確認した。また、分析試料のクリーンアップには、スベルコ製LC-Florisil(1g/6mL, SUPELCO SPE tube Cat No. 57057)を使用した。

2. 分析手法及び前処理法

2.1 底質試料の前処理法

湿泥試料20g(含水率50%として乾重量換算10g相当)を遠沈管に分取し、2%アスコルビン酸水溶液1mL及びサロゲートとしてエスフェンバレート-d₁₂を10ng加えた後、アセトン50mLを加え、超音波振とうを各10分行い溶媒抽出を行う。3000rpmで遠心分離後、アセトンを分取し、再度アセトン50mLを加え同様の操作を行う。分取したアセトンは、25g NaClを溶かした精製水500mL(5%NaCl溶液)に加え混合する。

上記を分液ロートにとり、ヘキサン100mLを加え10分振とう、転溶した。得られたヘキサン層をビーカーに分取し、新たにヘキサン100mLを加え、同様の操作を繰り返す。

ヘキサンをあわせて、無水硫酸ナトリウムで脱水後、ターボバップで約1mLに濃縮する。

2.2 試料溶液の調製

得られた濃縮液をフロリジルカラムに負荷し、ヘキサン10mL、3%ジエチルエーテル/ヘキサン10mLの順で洗浄後、10%ジエチルエーテル/ヘキサン10mLで溶出する。この溶出液をターボバップで約1mLに濃縮する。この操作に使用するフロリジルカラムは、予めヘキサン10mLでコンディショニングを行っておく。

得られた濃縮液に内標準物質として、ベンゾ(e)ピレン-d₁₂を10ng添加し、GC/MS-SIMで分析を行う。

2.3 標準溶液の調製及び検量線の作成

標準物質及びサロゲート物質、内標準は、各物質10ngを正確に秤取りアセトンで10mLとし、1000µg/mLの標準原液を作成した。この標準原液は、冷蔵保存し、使用時に適宜ヘキサンで希釈して用いた。

検量線は、標準物質10~100ng/mLの濃度範囲で作成し、各濃度の標準物質に、サロゲート物質のエスフェンバレート-d₁₂及び、内標準のベンゾ(e)ピレン-d₁₂がそれぞれ10ng/mLとなるよう添加して低濃度標準溶液を調製した。分析用の底質試料においては前処理操作段階でサロゲート物質を10ng添加し、試料溶液調製時に内標準を10ng/mLとなるよう添加した。

2.4 GC/MS 分析

GCは、6890N(Agilent Technologies社)、MSはJMS-Q1000GC K9(JEOL社)の装置を使用した。カラムはSUPELCO社の5%ジフェニル:SLB-5ms(長さ30m、内径0.25mm、厚さ0.25µm)を用いた。その他測定条件は、Table 1及び詳細は既報⁵⁾に記した。

Table 1 Operational conditions of GC/MS-SIM

Gas chromatograph	: 6890N (Agilent Technologies)
Mass spectrometer	: JMS-Q1000GC K9 (JEOL)
Column	: SLB-5m: 30m×0.25mm×0.25µm(SUPELCO)
Temp. program	: 50°C (1 min)→25°C/min→150°C (0min)→5°C/min→250°C (0min)→25°C/min→300°C (1 min)
Injection temp.	: 250°C
Interface temp.	: 250°C
Carrier gas	: Helium (Flow Rate: 1 mL/min)
Injection mode	: Splitless (purge on time: 1.5 min)
Injection volume	: 2µL
Ion source temp.	: 230°C
Ionization voltage	: 70 eV
Ionization current	: EI 200pA
Selected Ion Monitor	: Fenvalerate 167
	: Esfenvalerate-d ₁₂ 174
	: Benzo(a)pyrene-d ₁₂ 264

III 結果および考察

1. 標準物質のSIMクロマトグラム

Fig.2に各物質のマススペクトルを、Fig.3にSIM

クロマトグラムを示す。この標準物質は、検量線作成用に3物質を調製したフェンバレート30mg/mL、エスフェンバレート-d₂及びベンゾ(e)ピレン-d₁₂10g/mLのヘキサン溶液を用いた。

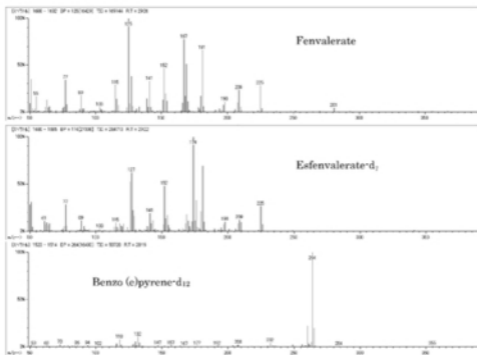


Fig.2 Mass spectra of Fenvalerate , Esfenvalerate- d₂ and Benzo (e)pyrene- d₁₂

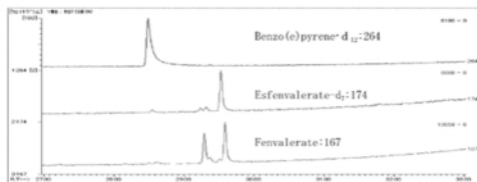


Fig.3 SIM chromatogram of standard

各物質とも28分から30分程度の保持時間でピークが分離され、本法で示した測定条件での分析が可能であることが確認された。

本法の測定条件や既報¹²⁾において、フェンバレートのピークは2本に分離されたが、フェンバレレートは4種の光学異性体の混合物であることが知られており、エスフェンバレートを有効成分とする、各光学異性体のピークをGC/MSで分離するのは困難であり、本報告において、保持時間の早いピークをフェンバレート異性体1、後のピークをフェンバレート異性体2（以下Fv-1, Fv-2と示す）とした。

2. 定量方法及び検出下限値、定量下限値

本報告では、光学異性体の合計をフェンバレート定量値とする手法を用いるが、検出下限値及び定量下限値は、Fv-1、Fv-2それぞれを面積比で按分してそれぞれの値を求めた。

検量線は、Fv-1、Fv-2とサロゲートのエスフェンバレレート-d₂の面積比から作成し、その一例をFig.4に示す。フェンバレートの濃度は、面積比率からFv-1:Fv-2の面積割合を42%:58%と按分した。

定量は、試料液2 μ LをGC/MSに注入し、Fv-1、Fv-2それぞれのピーク面積をサロゲートのエスフェンバレレート-d₂との面積比から下式により濃度を算出した。また、サロゲートの回収率は、内部標準ベンゾ(e)ピレン-d₁₂のピーク面積を用いて求める。

底質試料中の濃度 (ng/kg)

$$= \text{検出量 (pg)} \times \frac{\text{固相抽出後の最終液量 (mL)}}{\text{GCMS 注入量 (}\mu\text{L)} \times \text{分析試料量 (kg)}}$$

その結果、検出下限値は Fv-1 : 0.31 μ g/kg-dry, Fv-2 : 0.25 μ g/kg-dry, 定量下限値 Fv-1 : 0.80 μ g/kg-dry, Fv-2 : 0.65 μ g/kg-dry の値が得られた。

3. 添加回収試験

底質試料に標準物質 0.15 μ g/kg-dry を添加したサンプルを本法により調整後、分析を行い回収率及び変動係数を求めた¹³⁾。その結果、Fv-1及びFv-2の回収率は、それぞれ95%、89%であり、変動係数は6.7%、4.2%と良好な値が得られた。

4. 環境試料の濃度レベル

海域底質の測定結果をFig.5に示す。

本SIMクロマトグラムの試験溶液は、測定時に内部標準ベンゾ(e)ピレン-d₁₂を添加した以外、添加した物質はなく、分析対象物質のFv-1、Fv-2及びサロゲートのエスフェンバレレート-d₂は、いずれも保持時間にピークは検出されなかった。

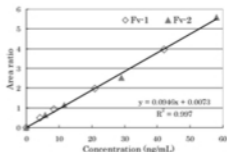


Fig.4 Standard curve of Fenvalerate

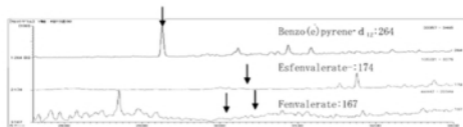


Fig.5 SIM chromatogram of sediment

IV 要 旨

本報において、溶媒抽出法を用いた底質に存在する農業フェンバレーートの微量分析を行うための検討を進め、以下の結果を得た。

- ①フェンバレーートは、カラム温度 50℃～300℃の昇温条件で 28 分から 30 分程度の保持時間でピークが良好に分離され、本法で示した測定条件での分析が可能であることが確認された。
 - ②底質試料の分析はサロゲートを添加し、標準物質との面積比から対象物質の濃度を算出した。その結果、検出下限値は、Fv-1: 0.31 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ 、Fv-2: 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ 、定量下限値は、Fv-1: 0.80 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ 、Fv-2: 0.65 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ の値が得られ環境試料へ適用可能な低濃度レベルが得られた。
 - ③対象物質及びサロゲート物質の汚染がないことを確認した底質試料を用いた添加回収試験（試料濃度 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ ）では、Fv-1 の回収率 96%、変動係数 6.7%、Fv-2 の回収率 89%、変動係数 4.2% であった。
 - ④底質環境試料を分析した SIM クロマトグラムには夾雑物の影響は見られず、ppb レベルで存在するフェンバレーートの定量が可能であることが確認できた。
- 以上の結果から底質試料のフェンバレーート分析法を確立した。本報告での結果、及び吉岡らの水質試料の報告¹⁾²⁾での環境試料からは、いずれもフェンバレーートの存在は確認されなかった。

今後、フェンバレーートの汚染が危惧される地域での水質経由、底質への環境中での汚染の拡大など、検討の余地があると考えられる。

本研究は、環境省の「平成 18, 19 年度化学物質分析法開発調査」の委託事業の一環として行われた結果をまとめたものである。

文 献

- 1) 吉岡敏行、剣持聖志：フェンバレーート及びエスフェンバレーートの水質分析法の検討、第 42 回日本水環境学会年会講演集、622、(2008)
- 2) 環境省環境安全課：平成 18 年度 化学物質分析法開発調査報告書 平成 18 年 12 月（フェンバレーート、エスフェンバレーート水質試料；岡山県環境保健センター）、622、(2006)
- 3) 榎原昭三・山本広基著：土壌中における農業の挙動 農業の吸着と移動、土と農業（社）、日本植物防疫協会発行、pp87(1998)
- 4) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：化学物質環境実態調査実施の手引き（平成 17 年度版）平成 18 年 3 月 (2006)
- 5) 環境省環境安全課：平成 19 年度 化学物質分析法開発調査報告書 平成 20 年 12 月（フェンバレーート底質試料；兵庫健康環境科学研究センター）、p300～310、(2008)

[ノート]

兵庫県に飛来した黄砂による POPs の大気中濃度への影響

鈴木 元治* 松村 千里 中野 武

Influence on the Air Concentrations of POPs
by Asian Dust transported to Hyogo

Motoharu SUZUKI*, Chisato MATSUMURA and Takeshi NAKANO

*Environmental Safety Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and
Environmental Sciences, 3-1-27 Yukihira-cho, Suma-ku, Kobe 654-0037, Japan*

The air concentrations of POPs were investigated to reveal the transportation of POPs with Asian Dust between May 8th and June 7th in 2007 in Hyogo. The breakthrough of POPs could be prevented by sampling with activated carbon filter and polyurethane form. The air concentrations of Chlordanes, Drins, DDTs, PCBs, HCB and HCHs were increased when Asian dust was transported. The air concentrations of those POPs except for PCBs and Endrin were positively correlated with SPM concentration. It was thought that those POPs were transported from China and the Korean Peninsula according to backward trajectory analyses.

I はじめに

黄砂とは、中国大陸内陸部のタクラマカン砂漠や黄土地域及びモンゴルのゴビ砂漠の土壌などが、偏西風によって運ばれながら沈降する現象である。日本では、3月から4月に西日本や日本海側で黄砂が多く観測されるが、森林伐採や地球温暖化などの人為的な要因が加わり、頻度が増加傾向にあるといわれている¹⁾。黄砂による被害には、視程や光をさえぎることによる植物や交通機関への物理的な影響があり、そのほかにも呼吸器疾患などの健康への影響が指摘されている²⁾。さらに近年では、近隣アジア諸国の発展に伴い、それらの地域の環境汚染物質が黄砂に付着して飛来することが懸念されている。平成14年度から環境省によって行なわれている黄砂実態調査によると、硫酸イオンの黄砂による飛来が示唆されている³⁾。

本研究の対象である残留性有機汚染物質 (POPs) は、日本では20年以上前に使用が禁止されている。一方、中国ではクロルデンなどが現在も使用されており、DDTやヘキサクロロシクロヘキサン (HCH) のこれまでの生産量は日本よりもはるかに多く、全世界の20~30%を占める。これらのPOPsは、海流や気流によって地球上を長距離移動することが知られている。このようなことから、黄砂実態解明調査ではPOPsについても調査されているが、黄砂の影響はいまだ明らかになっていない。その原因として、調査対象がろ紙によって捕集されたダスト成分のみであることや、調査期間が黄砂飛来時のみに限定していることが考えられる。POPsは捕集中にろ紙上でダストからの脱着やガス化が生じる可能性がある。また、POPsの大気中濃度は、気温などの様々な要因によって変化するため、黄砂飛来の前後の状態と比較することが必要と考えられる。

そこで、本研究では黄砂飛来が兵庫県のPOPの大気中濃度に与える影響を把握することを目的とし、大気中のPOPの粒子成分とガス成分の両方を調査対象として、黄砂が飛来する時期の1ヶ月間、1日ごとにサンプリングした。

安全科学部

*別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究所センター

安全科学部 鈴木 元治

II 方法

1. 対象物質

本研究では、黄砂実態解明調査で調査されている HCHs、DDTs、Endrin に加えて、Table 1 に示す POPs やカロルゼン同族体及びその代謝物などの POPs と関連する物質も調査対象とし、これらの関連物質を含めて POPs と呼ぶこととした。

2. 試薬及び標準液

ジクロロメタン (DCM)、トルエン及びヘキサンはダイオキシン用、塩化ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用をそれぞれ和光純薬より購入した。精製水は、純水装置 Elx の純水 (>300°Cm) (Mitsubishi 社) をヘキサン液とうにより精製したものをを用いた。POPs の標準液には、CIL 社の標準液を混合したものをを用いた。サンプリングスバイクには、 3°C でラベル化されたものをを用い、PCBs では WELINGTON 社の MMP-MF、MMP-CG 及び TPCB-Cl-B100 を用いた。サンプリングスバイクには、MMP-70 と MMP-101 を用いた。

3. 試料の採取

試料の採取期間は、当センター屋上 (神戸市東灘区) にて平成 19 年 5 月 8 日～6 月 7 日の 30 日間とした。大気試料のサンプリングは、Fig. 1 に示したように、ハイボリュームエアサンプラー (Hi-Vol, SIBATA 社) に捕集材として石英繊維ろ紙 (QH-100, ADVANTEC 社)、活性炭ろ紙 (AC フィルター、昭和電工社) 及びポリウレタンフォーム (PUF, SIBATA 社) を図に示した順に装着し、流速 700L/min で 24 時間ごとに行った。なお、サンプリングスバイクは石英繊維ろ紙に追加した。

気温及び湿度は、Thermo Recorder TR-72E 「おんどり」 (T&D 社) により一時間おきに測定した。

4. 試料の前処理

5 月 8 日～16 日の試料は、石英繊維ろ紙、活性炭ろ紙および PUF を個別に分析し、17 日以降は合わせて分析した。抽出には、高速溶媒抽出装置 (ASE300, DIONEX 社) を用いた。石英繊維ろ紙及び活性炭ろ紙はジクロロメタン 60mL、PUF はトルエン 60mL により抽出した。抽出液はすべてヘキサンに転溶し、17 日以降の混合抽出液は精製水を加え、超音波により水洗した。試料の 3/10 の量を 1C シンカカラム (充填量 500mg, SUPPLCO 社) によりクレンジアップした。

試料の残りは、他の物質の分析用に保管した。その後、濃縮してシリレンジスバイクを追加し、100 μL に定容したものを POPs の分析試料とした。

5. GC/MS の分析条件

POPs の分析には、HT8-PCB キャピラリーカラムを装着した HRGC/MS (HP6890/JMS-8000) を用いた。HT8-PCB による PCBs 及び POPs の分析条件は、当センターの松村らの方法¹⁰⁾ に従った。

6. バックトラジェクトリ解析

バックトラジェクトリ解析 (後方流跡解析) には、国立環境研究所地球環境研究センター (NIES-GER) で開発された METEX (Metecrological Data Explorer) を用いた。解析の基点は、調査地点 (経度 135 度、緯度 34.6 度) の高度 1000m と設定し、調査したすべての日について 5 日前までの大気経路を 6 時間ごと に解析させた。

Table 1 Target POPs and POPs-related substances.

	α -HCH	Chlordane
HCHs	γ -HCH	α -chlordane
	β -HCH	γ -chlordane
	δ -HCH	β -chlordane
		Oxy-chlordane
DDTs	o,p -DDT	Heptachlor
	p,p' -DDT	Epi-heptachlor-epoxide,B
DDDs	o,p -DDD	Endo-heptachlor-epoxide trans.
	p,p' -DDD	
DDEs	o,p -DDE	MC-4
	p,p' -DDE	trans-chlordane
Dieldrin		MC-5
Endrin		cis-chlordane
PCBs	C11~C10	Oxy-chlordane
HCB		MC-6
Mixes		Nonachlor
		trans-nonachlor
		cis-nonachlor

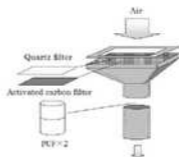


Fig. 1 Diagrammatic illustration of High Volume Air Sampler (Hi-Vol).

III 結果および考察

1. 大気状態及び黄砂飛来状況

5月8日～6月7日の調査期間中の気温、湿度及び降雨量を Fig.2 に示す。気温は、20℃前後で安定していた。5月25日の早朝から夕方にかけて降雨があり、5月24日(5月24日 15:40～25日 15:08)及び5月25日(5月25日 15:23～26日 10:10)に湿度が上昇した。

調査期間中に神戸で黄砂が観測された日は、気象庁によると5月26日と27日の計2日であった。気象庁では黄砂の観測は、主に目視によって行なわれている。本研究では、浮遊粒子状物質 (SPM) から黄砂の飛来状況を判断した。SPM は、大気中に浮遊する微小な粒子状の物質のことであり、黄砂粒子の飛来によって濃度が上昇する。そのため、黄砂飛来の判断によく用いられている¹¹⁾。SPM濃度が $100\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超えると風量がぼんやりとみだし、大規模な黄砂の飛来時には $400\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超える。

調査期間中の SPM 濃度の1日ごとの平均値、中央値、最大値及び最小値を Fig.3 に示す。これらの値は、近隣の一般大気常時監視地点(観測地点)の1時間値から計算したものである。期間中、SPM濃度が相対的に高かったのは、5月8日及び26日であり、それぞれ $60\mu\text{g}/\text{m}^3$ 及び $112\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。

黄砂の飛来状況は、大気拡散モデル (CFORS) から確認した。CFORS は、大気中の化学物質の輸送を計算するシステムであり¹²⁾、SPMなどの時間・空間的変動をインターネット上で閲覧することができる¹³⁾。CFORSにより、5月8日と5月26日のSPMは、黄砂の発生源周辺より飛来してきたことが確認できた。また、CFORSでは5月25日にも黄砂飛来が予測されていたが、神戸に雨が降ったため実際のSPM濃度は低かった。これらのことから、5月8日は目視では観測されない規模であったが黄砂が飛来したと判断し、5月8日と26日の計2日を黄砂の飛来日とした。

2. POPsの捕集状態

Hi-Vol では、POPsが大気中で粒子に付着した状態で存在した場合でも、石英繊維ろ紙に捕集された時に大流量の空気(700L/min)が通過することによって、ろ紙から剥離されたりガス化される可能性がある。そのため本研究では、石英繊維ろ紙の後段に活性炭ろ紙及びPEFを取り付けた。これらの捕集材ごとのPOP及びPCBsの同族体の捕集割合をそれぞれ Fig.4及びFig.5に示す。図の値は5月8日から16

日の平均値であり、ばらつきは小さかった。POPの捕集は、活性炭ろ紙が80%以上、PEFが10%程度であり、石英繊維ろ紙は10%以下であった。この結果は、活性炭ろ紙の代わりに活性炭素フェルトを用いた村山らの報告¹⁴⁾と一致する。PCBsの同族体では、塩素数によって違いが見られた。1塩素から7塩素までは、他のPOPと同様に石英繊維ろ紙に捕集される割合がほとんどなかった。一方、8塩素、9塩素及び10塩素では石英繊維ろ紙に捕集される割合が大きかったが、50%以上は活性炭ろ紙に捕集されていた。これらのことから、Hi-Volによって大気中のPOPを捕集する場合には、石英繊維ろ紙に加えて活性炭ろ紙及びPEFが必要であることが分かった。

ただし、本方法では大気中にガス状態で存在したPOPも合わせて捕集される。そのため、大気中で黄砂のようなダストにPOPがどの程度付着していたかを知るには、ろ紙上でPOPの濃度がどの程度起るかを確かめる必要がある。また、流量の小さいローボリュームエアサンプラーやパッシブエアサンプラーなどにより、ダストに付着していたPOPとガス状のPOPを分離して採取できるような方法を利用することも有効と考えられる。

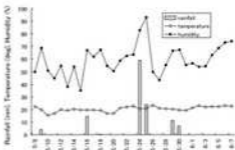


Fig.2 Daily variation of the air temperature, humidity and rainfall during the period.

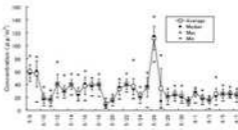


Fig.3 Daily variation of the SPM concentration at nearly monitoring station during the period.

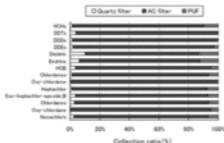


Fig.4 Collection ratio of POPs according to each sampling materials.

3. POPsの大気中濃度

調査期間中の POPs の大気中濃度を Fig.6 に示す。POPs の大気中濃度は、当センター屋上でこれまでに検出された範囲内であり、全国レベルと比較しても特に高いものではなかった。また、Endo-heptachlor-epoxide_B はすべての日で不検出 ($<0.16\mu\text{g}/\text{m}^3$) であった。しかしながら、POPs の大気中濃度が上昇する日がみられ、特に黄砂が飛来した 5 月 8 日は濃度上昇が顕著であった。5 月 8 日には、HCHs、PCBs、DDT 類 (DDTs、DDD、DDEs)、クロルデン類 (Chlordenes、Heptachlor、Chlordanes、Oxy-chlordane、Nonachlors、Exo-heptachlor-epoxide_B) 及びドリル類 (Dieldrin、Endrin) に大気中濃度の上昇がみられた。次に POPs の大気中濃度が高かったのは 5 月 25 日であり、特にクロルデン類とドリル類の濃度の上昇が顕著であった。5 月 25 日は雨が降ったため、SPM 濃度の上昇はみられなかったが、黄砂の飛来が予測されていた日である。黄砂が飛来し、SPM 濃度が最も高かった 5 月 26 日では、HCB の大気中濃度の上昇がみられ、クロルデン類及びドリル類の上昇もみられたが 5 月 8 日や 25 日ほど顕著ではなかった。また、クロルデン類は黄砂飛来のない 5 月 13 日及び 17 日にも 5 月 26 日と同程度の大気中濃度の上昇がみられた。Oxy-chlordane 及び Mirex は、それぞれ $2\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下及び $0.1\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下と他の POPs に比べて低濃度であり、期間中に大気中濃度の上昇はみられなかった。

大気中濃度の上昇がみられた POPs の大気中濃度と SPM 濃度の相関を Fig.7 に示す。 R^2 値は HCB の 0.38 が最も高く、その他は 0.072~0.31 であった。t 検定では、危険率 5% で PCBs 及び Endrin 以外の POPs と SPM に正の相関が認められた。しかしながら、相関にはばらつきがみられ、特に 5 月 8 日は、屋中の近辺直線から大きく外れている。このことは、POP がガス状で存在した割合が高かったか、あるいは

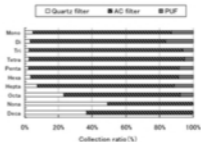


Fig.5 Collection ratio of PCB homolog according to each sampling materials.

POPs が黄砂粒子に付着する割合が日本の粒子よりも高いことが可能性として考えられる。また、SPM 濃度以外にも、POPs の大気中濃度を上昇させる要因があることが考えられる。

4. 大気経路と POPs の大気中濃度との関係

バックトラジェクトリ解析により推定した大気経路を Fig.8 に示す。図中の網掛けは、黄砂の発生源であるタクラマカン砂漠、ゴビ砂漠及び黄土高原を示す。(I) に示す大気経路は、POPs の大気中濃度が上昇した日のものであり、(II) はその他の日の大気経路である。

I-1 (5 月 8 日) 及び I-2 (5 月 26 日) は、黄砂が飛来した日の大気経路である。I-3 (5 月 17 日) は、黄砂の飛来はなかったがクロルデン類やドリル類の大気中濃度が上昇した日の大気経路であり、5 月 13 日の大気経路も同様のパターンであった。I-4 (5 月 25 日) は、雨が降ったが黄砂の飛来が予測されていた日であり、クロルデン類及びドリル類の大気中濃度が上昇した日である。I-1~4 の大気経路は、すべて中国大陸を横断し、黄砂発生源周辺を経て、黄海周辺及び朝鮮半島を通過していたことが分かる。一方、POPs の大気中濃度の上昇がなかった日の大気経路は、主に II の 4 つのパターンに分類することができた。II-1 (5 月 10 日) は、ロシア地域を通過する経路であり、同様のパターンが 5 月の前半に多くみられた。II-2 (5 月 16 日) は、黄海周辺を徘徊する経路であり、同様のパターンが 5 月 9 日及び 18 日にもみられた。II-3 (5 月 24 日) は、沖縄や台湾の近海など日本より南の地域を通過する経路であり、調査期間中この日だけにみられた。II-4 (6 月 3 日) は、日本の東側の太平洋を通過しており、黄砂発生源や黄海周辺地域の影響を全く受けない大気経路であった。II-4 と同様のパターンは 5 月 19 日~23 日

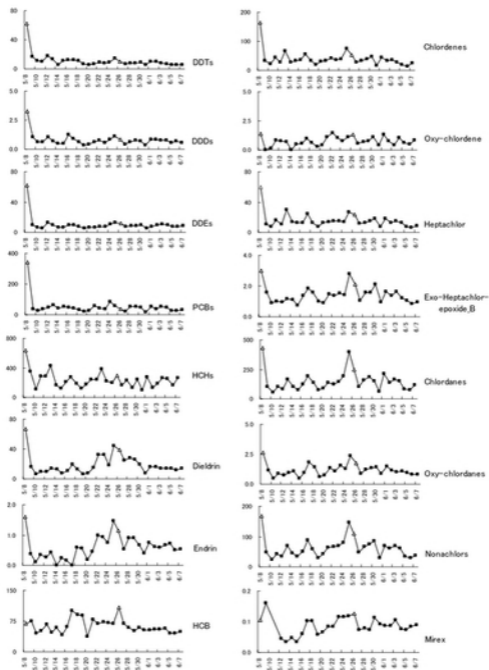


Fig.6 Daily variation of the air concentrations of POPs (pg/m³) during the period. Triangle points indicate the values when Asian dust was transported.

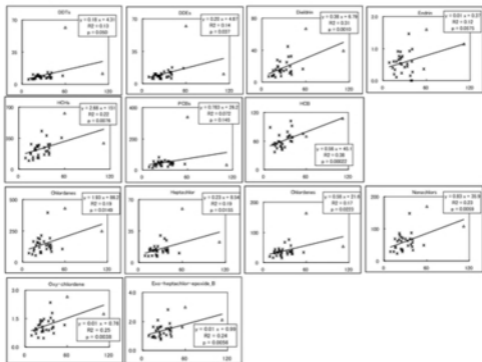


Fig. 7 Relationships between the SPM concentrations and the each POPs air concentrations. X-ray indicates SPM concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) and Y-ray indicates air concentration of POPs (pg/m^3). Triangle points indicate the values when Asian dust was transported.

及び5月27日～6月7日にもみられ、5月27日以降は黄砂飛来のシーズンが終わったことが確認された。

このように、POPの大気中濃度が上昇した日の大気経路（Ⅰ）は、その他の日の大気経路（Ⅱ）と明らかに異なることから、大気中濃度が上昇したPOPは、黄砂が飛来した経路から輸送された可能性が考えられる。

5. HCH 及び DDT の異性体パターン

調査期間中の HCH の α 体と γ 体の異性体比を Fig.9 に示す。日本で殺虫剤として使用された HCH は α 体の割合が高い。一方、中国では γ 体の割合が 99%以上である Lindane も多く使用されていた。中国の南部ではこの Lindane 由来の HCH 汚染が報告されている^{15,16}。同じように Lindane の使用が多いアメリカのガンベラストンでは、 α/γ 比がおよそ 0.6 と報告されている^{15,16}。ただし、 γ 体は α 体比べて

長距離を移動しないとされているため¹⁶、発生源から離れるにつれてその影響は小さくなると考えられる。調査期間中の α/γ 比は 2.5 付近で変動し、最も低かったのが5月24日の1.7である。5月24日は、バックトラジェクトリ解析から調査期間中に唯一、南西からの大気経路をとっていた日である (Fig. 8 のⅡ-3)。そのため、5月24日の γ 体の増加は、中国南部などの地域で使用された Lindane の影響を受けている可能性が考えられる。

調査期間中の DDT 及び DDE の o,p' 体と p,p' 体の異性体比を Fig.10 に示す。殺虫剤として過去に使用された DDT は約 85%が p,p' 体である。しかし、中国ではきょう雑物として o,p' 体が 85%程度含まれる Dicofol が殺虫剤として綿畑などで現在も使用されている¹⁷。そのため、中国南部^{15,16} や北京の河川¹⁸ では、Dicofol による o,p' 体の DDT 汚染が報告されている。調査中に DDTs 類の大気中濃度が上昇し

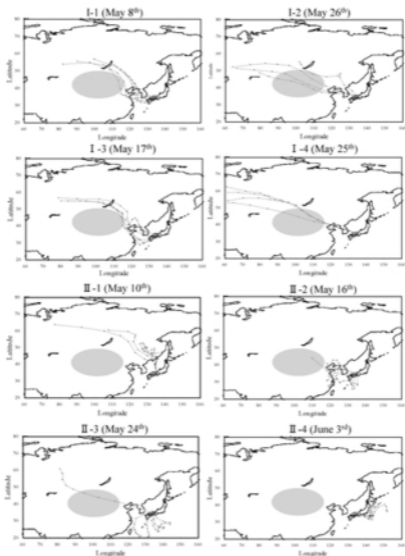


Fig.8 Backward trajectory analyses on the days when the air concentrations of POPs were high (I) and the days when the air concentrations of POPs were not high (II).

た5月8日の α, p', p, p' 比は1.23であり、 α, p' 体の割合は他の日の0.98~1.83と比べて高くなかった。また、DDEの代謝物であるDDEの α, p', p, p' 比も0.23であり、他の日の0.20~0.31と比べて高くなかった。

このように、HCH及びDDEの異性体パターンには

黄砂飛来による変化はみられなかった。しかしながら、5月24日にHCHの α/γ 比が低下したように、飛来源の汚染が異性体パターンに反映される可能性があることから、今後、黄海周辺の大気中のDDEやHCHの異性体パターンを確認し、それらと比較する必要がある。

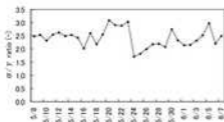


Fig. 9 Daily variation of the o/p isomer ratio of HCH during the period.

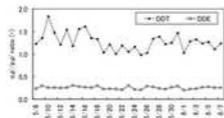


Fig. 10 Daily variation of the o,p' / p,p' isomer ratio of DDT and DDE during the period.

IV まとのめ

本研究は、黄砂飛来シーズンの大気中 POPs を 1 日ごとに集中調査することにより、黄砂飛来が兵庫県の大気中の POPs の大気中濃度に与える影響を調査した。その結果、得られた知見は以下のとおりである。

1. 石英繊維ろ紙の後段に活性炭ろ紙及び PUF を取り付けて大気中の POPs を捕集した結果、POPs のほとんどは活性炭ろ紙に捕集され、捕集時の経過を防ぐことができた。
2. 黄砂が飛来した日には、クロルデン類、ドリン類、DDT 類、PCBs、HCBs 及び BCBs の大気濃度が上昇し、PCBs 及び Endrin 以外の POPs の大気中濃度は、SPM 濃度と正の相関がみられた。
3. パックトラジェクトリ解析から、POPs の大気中濃度が上昇した日の大気は、すべて中国大陸を横断し、黄砂発生源周辺を経て、黄海周辺及び朝鮮半島を通過していた。

黄砂が飛来する日には、POPs の大気中濃度が上昇する傾向にあったが、POPs の輸送には大気経路が大きく関わっていることが考えられる。調査中に飛来した黄砂はやや小規模であったことから、黄砂によ

る POPs の輸送の有無を明確にするには、より規模の大きな黄砂飛来時のデータを蓄積し、大陸のデータなどを含めた詳細な解析を行なうことが必要である。

謝 辞

本研究にあたり、パックトラジェクトリ解析をご指導頂きました(独)国立環境研究所の高澤喜一研究員に感謝いたします。

文 献

- 1) 森 涼子, 竹野大志, 香月幸一郎, 白井吉彦: 長野県における大気環境の特徴—平成 14 年度大気汚染常時監視結果の解析と長期変動解析—, 長野県衛生公害研究所報, **48**, 1-17(2002)
- 2) 環境省: 黄砂問題検討会報告書 (2005)
- 3) 環境省: 黄砂実態解明調査中間報告書 (2007)
- 4) 松村千里, 鶴川正寛, 中野武, 江崎達哉, 大橋眞: キャピラリーカラム (HT5-PCB) による PCB 全 209 異性体の露出順位, 環境化学, **12**, 855-865 (2002)
- 5) 松村千里, 鶴川正寛, 北本寛明, 藤森一男, 中野武, 江崎達哉: HT5-PCB の POPs 分析への応用, 第 13 回環境化学討論会講演要旨集, 676-677 (2004)
- 6) 多田納 力: 島根県における大規模黄砂現象の発生状況と特徴, 環境技術, **36**, 251-257(2007)
- 7) 森 涼子: 長野県で観測された黄砂の実態, 環境技術, **36**, 258-263(2007)
- 8) Uno, I., Satake, S., Gregory, R. C., Youhua, T., Zifa W., Takemura, T., Sugimoto, N., Shimizu, A., Murayama, T., Thomas, A. C., Steven, C., Uematsu, M., Ohta, S., Patricia, K. Q. and Timothy, S. B.: Numerical study of Asian dust transport during the springtime of 2001 simulated with the Chemical Weather Forecasting System (CFORS) model, *J. Geophys. Res.*, 109(D19S24), doi:10.1029/2003JD004222 (2004)
- 9) <http://cfors.riam.kyushu-u.ac.jp/%7Ecfors/index.html>
- 10) 村山 等, 鈴木貴博, 冨家浩明, 旗本尚樹, 宮本泰子, 渋谷信雄: ハイボリウムエアサンプラーによる POPs 及び PAHs の捕集効率, 第 17 回環境化学討論会講演要旨集, 426-427(2008)

- 11) Yunyun, Y., Deliang, L. and Dehai M.: Levels, seasonal variations and sources of organochlorine pesticides in ambient air of Guangzhou, China. *Atmos. Env.*, **42**, 677-687 (2008)
- 12) Liua, M., Chenga, S., Oua, D., Yangb, Y., Liua, H., Houc, L., Gaoa, L. and Xua, S.: Organochlorine pesticides in surface sediments and suspended particulate matters from the Yangtze estuary, China. *Environ. Pollut.*, **156**, 168-173 (2008)
- 13) Park, J.S., Wade, T. L. and Sweet, S.: Atmospheric deposition of organochlorine contaminants to Galveston Bay, Texas. *Atmos. Env.*, **35**, 3315-3324 (2001)
- 14) Beyer, A., Mackay, D., Matthies, M., Wania, F. and Webster, E.: Assessing long-range transport potential of persistent organic pollutants. *Environ. Sci. Tec.*, **34**, 699-703 (2000)
- 15) Yanga, X., Wang, S., Biana, Y., Chena, F., Yua, G., Gua, C. and Jiang, a. X.: Dicofol application resulted in high DDTs residue in cotton fields from northern Jiangsu province, China. *Journal of Hazardous Materials*, **150**, 92-98 (2008)
- 16) Wan, Y., Hu, J., Liu, J., An, W., Tao, S. and Jia, Z.: Fate of DDT -related compounds in Bohai Bay and its adjacent Haihe Basin, North China. *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 439-445 (2005)

長期分解過程における大阪湾・播磨灘の有機物及び栄養塩の動態

仲川 直子* 金澤 良昭 梅本 諭

上村 育代 宮崎 一 藤森 一男

Changes of Organic Matters and Nutrients in Sea Water at Osaka Bay and the Sea of Harima during The Labo-scale Long-term Biodegradation

Naoko NAKAGAWA*, Yoshiaki KANAZAWA, Satoshi UMEMOTO,
Ikuyo KAMIMURA, Hajime MIYAZAKI and Kazuo FUJIMORI

Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe 654-0037, Japan

In recent years, Seto Inland Sea has the problem that the achievement rate of the environmental quality standard on the chemical oxygen demand (COD) has remained at the same level in spite of the reduction of COD loads. Sea water samples in Osaka Bay and the Sea of Harima were biodegraded by a 56-day incubation for studying on changes of organic matters and nutrients during the labo-scale long-term incubation.

These changes showed that the long-term non-biodegraded organic matters existed almost as dissolved organics and COD was not suitable as the index for evaluating the long-term non-biodegraded organic matters.

I はじめに

瀬戸内海は高度経済成長による産業活動の拡大に伴い干潟や藻場等が埋め立てられ、さらに、産業排水や生活排水により水質汚濁が進行し、大規模な赤潮が発生するようになった。このような状況の中、「瀬戸内海環境保全特別措置法」が施行され、化学的酸素要求量 (COD) の発生負荷量は大幅に減少し、瀬戸内海の水質は一定の改善がみられた。しかし、CODの環境基準達成率は満足できる状況になく、また赤潮、硝酸素水塊といった富栄養化に伴う環境保全上の問題が発生する状況にある¹⁾。

そこで、本研究は、海水中の生物分解性有機物とCODの関連性を追求する目的で、大阪湾及び播磨灘を

対象として、溶存酸素の補給を行う場合の振とう生分解実験と行わない場合の静置生分解実験の2種類の方法により長期生分解実験を行い、有機物及び栄養塩類の長期分解特性について解析した。

II 材料と方法

1. 調査地点及び試料採取

調査地点は、Fig. 1に示す大阪湾2地点 (O-1, O-2) と播磨灘3地点 (H-1, H-2, H-3) であり、各地点ともに、2007年7月に表層水20Lを採取し、直ちに実験室に持ち帰った。この表層水は、水温を20±2℃に保った状態で2時間曝気を行い、溶存酸素 (DO) を飽和させたものを試料とした。

2. 静置及び振とう生分解実験

1)で調製した試料を1Lねじ口ガラスビン8本、及び110mLフランビン15本に分取した。ただし、1Lねじ口ガラスビン8本のうち、4本については、空気層が入

水質環境部

*別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究所センター

水質環境部 仲川 直子

らないように満水にし、密閉した。残りの4本については、空気層を残し9分目になるように分取した後、シラコ栓でフタをし、通気性を維持した。

密閉したねじロガラスビン4本、及びフランビン15本については、環境省委託業務「広域総合水質調査」の実施要領に従い、20℃に温度設定したインキュベーター内に暗所で静置した。一方、通気性を維持したねじロガラスビン4本については、悪臭状態で室温20±2℃の実験室において、毎分60回転で振とうさせた。

各表層水ともに、静置または振とうを開始した時点をお日とし、7日目、14日目、28日目、56日目にねじロガラスビンを4本ずつ取り出し、CO₂、TOC（全有機炭素）、DOC（溶解有機炭素）、NH₄-N（アンモニア性窒素）、NO₃-N（亜硝酸性窒素）、NO₂-N（硝酸性窒素）、について、JIS K0102²及び海洋汚染調査指針作成調査³に従って分析を行うとともに、各日、フランビン3本を取り出してDOの分析を行った。

DOC、NH₄-N、NO₃-N、NO₂-Nの分析には、予め450℃、1時間加熱処理したガラス繊維フィルター（ワットマンGF/C、孔径1.2μm）によりろ過を行った試料を用いた。

III 結果および考察

1. 長期生分解過程におけるDO、CO₂、TOCの動態

各地点（O-1、O-2、H-1、H-2、H-3）の表層水を用いた静置生分解実験におけるDOの経日変化をFig. 2に、CO₂、TOCの経日変化をFig. 3に示すとともに、振とう生分解実験におけるCO₂、TOCの経日変化をFig. 4に示す。

Fig. 2より、大阪湾のO-1、O-2が最も酸素消費速度が速く、14日目にはDOがほぼ0mg/Lに達することが判明した。また、播磨灘の3地点では、沿岸域に位置するH-1が他の2地点に比べDOの減少が大きかった。

Fig. 3より、CO₂、TOCともに大阪湾のO-1、O-2が最も高く、静置生分解実験開始直後から急激な減少が認められたが、14日目以降はその減少がほぼ横ばいになることが認められた。

これらの結果より、有機物量の多い大阪湾の2地点では、14日目には有機物の分解のためにDOが消費されてしまい、悪臭状態に達するため、有機物の分解が滞まることが示唆された。

一方、DOが分解実験中0mg/Lに達しなかった播磨灘の3地点では、H-1のTOCについて減少がみられ

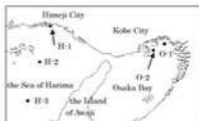


Fig.1 Location of sampling points

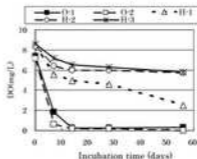


Fig.2 Temporal change in DO of several samples by static incubation
DO shows medium value obtained from three measurements.

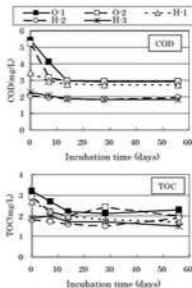


Fig.3 Temporal change in COD and TOC of several samples by static incubation

るものの、その他については、ほとんど減少が認められなかった。

Fig. 4より、好気状態が保たれた振とう生分解実験では、いずれの地点においても、静置生分解実験よりも有機物の分解は進むことが判明した。そのため、生分解されるのに長期間が必要な有機物について検討するには、酸素が供給され続けることが必要条件であることが考えられた。

一方、CODについては、静置生分解実験と同様に14日目以降の減少が認められず、14日目以降も徐々に減少したTOCとは異なる挙動を示した。

このようにCODとTOCの挙動に差が出たのは、TOCが全有機炭素を評価する指標であるため、有機物の種類により評価の差が生じないのに対して、CODは酸性高温過マンガン酸カリウム法による酸化力により有機物量を評価する指標であるため、有機化合物が酸化される度合いにより評価が大きく異なる¹⁾ことが原因することが考えられ、CODによる有機物の評価の問題点を補うため、TOCによる評価を併せて行うことが必要であることが分かった。

2. 長期生分解過程における $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の動態

各地点(0-1, 0-2, H-1, H-2, H-3)の表層水を用いた静置生分解実験と振とう生分解実験における $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の経日変化をFig. 5とFig. 6に示す。

Fig. 5より、静置生分解実験では、大阪湾の0-1, 0-2において、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の増加が認められたが、播磨灘のH-1, H-2, H-3では、ほとんど増加が認められなかった。この事実は、大阪湾の0-1, 0-2の試料では、14日目以降嫌気状態となったため、硝化が進まなかったことが原因であると考えられる。また、Fig. 3において大阪湾の有機物に顕著な減少が認められたことより、大阪湾では有機物の分解により $\text{NH}_4\text{-N}$ が生成したことも原因の1つであることが推察された。

さらに、 $\text{NO}_3\text{-N}$ を多く含む0-1において、14日目以降 $\text{NO}_2\text{-N}$ が急激に減少したのに対して $\text{NO}_2\text{-N}$ 及び $\text{NH}_4\text{-N}$ は28日目までいずれも増加することが認められた。しかし、28日目以降 $\text{NO}_2\text{-N}$ は急激に減少するのに対し、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の減少はわずかであることが認められた。この $\text{NO}_2\text{-N}$ の急激な減少は、嫌気状態となった14日目以降に $\text{NO}_2\text{-N}$ が $\text{NO}_3\text{-N}$ へと変化し、 $\text{NO}_3\text{-N}$ が増加したが、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が枯渇した28日目からは脱窒反応により $\text{NO}_2\text{-N}$ が窒素へと変化したためと考えられる。

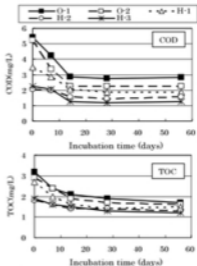


Fig.4 Temporal change in COD and TOC of several samples by shaking incubation

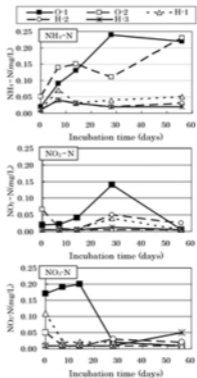


Fig.5 Temporal change in $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ and $\text{NO}_3\text{-N}$ of several samples by static incubation

次に Fig. 6 より、好気状態を維持した瓶とう生分解実験では、各地点間での濃度差があるものの、有機物やプランクトンの分解によると考えられる $\text{NH}_4\text{-N}$ の弱い増加が一見見られた、しかし、 $\text{NH}_4\text{-N}$ は 14~28 日目の間に減少し始め、これに代わり $\text{NO}_2\text{-N}$ と $\text{NO}_3\text{-N}$ が増加し始めた。また、28 日目を以降は $\text{NO}_2\text{-N}$ の硝化が進み、56 日目には $\text{NO}_2\text{-N}$ の大部分が $\text{NO}_3\text{-N}$ に変換することが認められた。これらの結果は、酸素存在下における生分解では、アンモニウムイオンが亜硝酸イオンを経て硝酸イオンまで硝化されるためであり、今回行った実験期間の 56 日間でこれら $\text{NH}_4\text{-N} \rightarrow \text{NO}_2\text{-N} \rightarrow \text{NO}_3\text{-N}$ への反応がほぼ完了することが判明した。

3. 長期生分解過程における TOC に占める DOC の割合の変化

各調査地点の瓶とう生分解実験による 0 日目と 56 日目の全有機炭素 (TOC) に対する懸濁態有機炭素 (DOC+DOC) 及び溶解態有機炭素 (DOC) の存在割合について、Fig. 7 に示す。

0 日目においては、TOC が高いほど、懸濁態の占める割合が高く、最も TOC の高い地点 O-1 では、4 分の 1 を懸濁態有機炭素が占めていた。しかし、56 日目は、いずれの試料においても TOC に対して約 9 割以上が溶解態有機炭素であることを示した。そのため、酸素が十分に供給される環境であれば、有機物量に関わらず懸濁態有機物は可溶化し、しかも生分解されずに残る有機物のほとんどが溶解態有機物であることが判明した。

また、海洋の溶解有機物を 100 とすると、懸濁態有機物は 10 であり、外洋中の溶解有機物の約 50% は安定で微生物によって分解されにくい有機物であるとの報告²⁾もあることから、海洋中の有機物の削減を目指すうえで、生分解されにくい溶解有機物の実態を把握することは必要不可欠であることが考えられた。

IV まとめ

本研究では、環境省委託業務「広域総合水質調査」の実施要領³⁾に示された静置における生分解実験と、好気状態を維持した瓶とうにおける生分解実験を行い、嫌気的あるいは好気的分解による有機物、栄養塩の分解過程の相違を比較するとともに、地点間の海水水質の相違を比較した。

その結果、以下の知見が得られた。

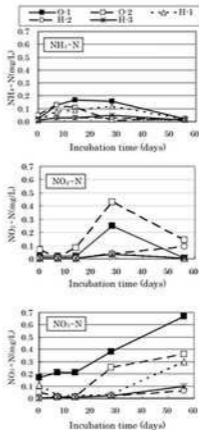


Fig. 6 Temporal change in $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ and $\text{NO}_3\text{-N}$ of several samples by shaking incubation

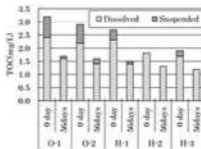


Fig. 7 DOC and TOC-DOC changes during 36 days shaking incubations

1. 長期生分解後の有機物を把握するには、酸素が供給される中で生分解させることが必要であるとともに、CODでは評価できない有機物が存在するため、TOCによる評価が必要であることが考えられた。
2. 大阪湾の海水は播磨灘の海水に比べ有機物量が多く、DOの消費速度が著しく速いこと、また、全有機物に占める懸濁態有機物の割合が高いことが示された。
3. 酸素存在下では、三態窒素は56日間の長期生分解過程において、アンモニア性窒素は亜硝酸性窒素を経て硝酸性窒素までほとんど硝化されることが認められた。
4. 酸素存在下で生分解されずに残留する有機物の大半が溶存態有機物であるため、有機物の削減を目指すうえで、生分解されにくい溶存有機物の実態把握が必要であることが示唆された。

謝 辞

本研究の一部は、大阪湾広域臨海環境整備センタ

ーによる「大阪湾圏域における廃棄物・海水環境保全に係る調査研究助成事業」による助成を受けました。

ここに記して謝意を表します。

文 献

- 1) 環境省水・大気環境局水環境課閉鎖性海域対策室：閉鎖性海域の環境保全の現状と課題。水環境学会誌，Vol.31 No.5，2-7(2008)
- 2) 環境省：「平成19年度広域総合調査委託業務実施要領（瀬戸内海）」，2007
- 3) 日本規格協会：工場排水試験方法 JIS K 0102，p42-44 p57 p94-96，日本規格協会発行，東京(1998)
- 4) 環境庁：「海洋汚染調査指針作成調査」，1994
- 5) 矢部積昭：CODおよび排出量の測定技術，用水と廃水，Vol.22 No.10，11-19(1980)
- 6) 青藤喜二，早野茂夫：フルボ酸のゲルコロマトグラフィ，生産研究，29巻3号(1977)

【ノート】

大阪湾海水中難分解性溶存有機物の特性について

仲川 直子* 金澤 良昭 梅本 諭 上村 育代

Characteristics of Non- or Less-Biodegradable Dissolved Organic Matter
in Sea Water at Osaka BayNaoko NAKAGAWA*, Yoshiaki KANAZAWA,
Satoshi UMEMOTO and Ikuyo KAMIMURA*Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and
Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihira-cho, Suma-ku, Kobe 654-0037, Japan*

The existence of the non- or less-biodegradable organic matter has been pointed out as a reason that COD value doesn't decrease in an enclosed coastal sea.

Non- or less-biodegradable portions of dissolved organic matter (DOM) in the surface water at Osaka Bay were examined by three-dimensional excitation-emission matrix spectroscopy and analysis of molecular weight by gel chromatography.

These results suggested that a part of non- or less-biodegradable DOM had the same fluorescent property as humic substances of the soil origin, and most of them had the molecular weight from 1355 to 1500.

I はじめに

瀬戸内海は、古くから自然の恵みを提供してきたが、産業排水や生活排水の負荷により水質汚濁が進行していった。そのため、瀬戸内海の水質改善を図るため、有機汚濁の指標の一つである化学的酸素要求量 (COD) の総量規制が始まり、CODの発生負荷量は大幅に減少していった。

しかし、瀬戸内海では、依然としてCODに係る環境基準未達成の海域は多く存在しており、近年はCODの改善が進まない状況にある。そして、このように閉鎖性海域のCODの改善が進まない原因として、生物分解されにくい難分解性溶存有機物の存在が指摘され始めている¹⁾²⁾が、その実態は未だ明らかでない。

そこで、本研究では、瀬戸内海の中でも水質汚濁が進行している大阪湾の海水中に含まれる難分解性溶存有機物の起源を特定することを目的に、蛍光特性、分子量分布特性、及びこれらの構造特性を解析した。

II 材料と方法

1. 調査地点

調査地点は、大阪湾奥部に位置する2地点であり、北緯34度41分30秒に位置し水深10mである地点を0-1、北緯34度39分18秒に位置し水深16mである地点を0-2とする。また、その位置関係については、Fig. 1に示す。

2. 難分解性溶存有機物試料の調製

地点0-1及び0-2において、2007年7月に表層水を20L採取し、直ちに実験室に持ち帰った。この表層水は、水温を20±2℃に保った状態で2時間曝気を行い、溶存酸素 (DO) を飽和させた。

水質環境部

*別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区平町3-1-27
兵庫県立健康環境科学研究センター
水質環境部 仲川 直子

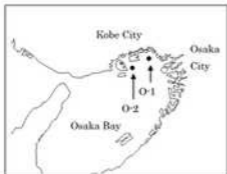


Fig. 2 Location of sampling points

この前処理を行った各表層水はねじりガラスビンに気泡が入らないように満水にして密閉し、20℃に温度設定したインキュベーター内に静置し、100日間生分解させた。この100日間生分解させた各表層水を、予め450℃、1時間加熱処理したガラス繊維フィルター（ワットマン GF/C、孔径1.2μm）により吸引ろ過し、ろ液を得た。

このろ液に含まれる有機物の全てを今井らの報告等^{21,22}に従い、難分解性溶存有機物と定義し、ろ液そのものを難分解性溶存有機物試料とした。ただし、地点O-1及び地点O-2より得られたろ液をそれぞれO-1及びO-2とした。

3. 土壌腐植物質抽出液の調製

兵庫県丹波市内の里山において針葉樹林（杉、栂、松）及び広葉樹林（くぬぎ、こなら）の腐植土壌を採取し、実験室に持ち帰った後、室内で風乾させた。風乾させた腐植土壌は手で軽くほみ細分化し、2mm目のふるいを通した。このふるいを通した腐植土壌60gを0.1M水酸化ナトリウム溶液600mlの入った比色ビンに分取し、毎分200回転で4時間振とうさせた。その後、メンブランフィルター（孔径0.45μm）でろ過し、0.1M水酸化ナトリウム溶液に抽出された土壌腐植物質を得た。ここで得られたろ液をそれぞれ蒸留水で100倍に希釈したものを土壌腐植物質抽出液として分析に用いた。ただし、針葉樹由来のものをH₁Aとし、広葉樹由来のものをH₁Bとした。

4. 3次元蛍光スペクトル分析

21において調製した難分解性溶存有機物試料、及び30において調製した土壌腐植物質抽出液について、3次元蛍光スペクトル分析を行った。

3次元蛍光スペクトル分析には、日立製分光蛍光光度計F-4500を用い、分析する試料を長さ1cmの無蛍光石英セルに入れ、励起波長220～500nm、蛍光波長200～600nmの間の蛍光強度を励起波長10nm、蛍光波長5nmのサンプリング間隔で測定した。

なお、腐植物質の定量方法²³に従い、試料の相対蛍光強度は、0.05M硫酸溶液の10μg/l硫酸キノール溶液における励起波長350nm、蛍光波長455nmでの蛍光強度を100%（Quinine Sulfate Unit）として見積もった。

5. 溶存有機炭素及び紫外線吸収度

21において調製した難分解性溶存有機物試料の溶存有機炭素濃度（DOC）を、島津製全有機炭素計TOC-5000Aを用いて、JIS K0102:22.21に定める燃焼酸化-赤外線法TOC自動計測法²⁴により測定した。

また同時に、芳香族化合物や不飽和二重結合を持つ化合物が250nm～290nmに大きな吸収を示すことから、5cmの石英セルを用いて、日立製分光光度計F-2001により、紫外線波長260nmにおける吸光度（UV260）も測定した。

なお、単位はセル長さ当たりのミリ吸光度とし、mAbs/cmで表現した。

6. Sephadex G-15を用いたゲルクロマトグラフィー

21において調製した難分解性溶存有機物試料を10mLナス型フラスコに50mL分散し、ロータリーエバポレーターを用いて、48±2℃の温度浴上で約9mLになるまで減圧濃縮を行った。減圧濃縮を行った試料は蒸留水を用いて16mLにメスアップした後、シリンジフィルター（ワットマンGPR/ PVDF、孔径0.45μm）でろ過を行い、ゲルクロマトグラフィー測定用試料とした。

なお、ゲルろ過は、亀井らの報告²⁵に準拠し、内径2.5cm、長さ100cmのカラムに高さ90cmになるようにSephadex G-15を充填し、試料5mLをカラムにのせた。溶離液は蒸留水を用い、溶出速度1.8mL/minで5mLごとに試験管90本に溶出液を分取した。

また、分取した溶出液についてそれぞれDOCとUV260を測定した。

III 結果および考察

1. 土壌腐植物質との比較における難分解性溶存有機物の蛍光特性

3次元蛍光スペクトル分析は、多様な有機物から

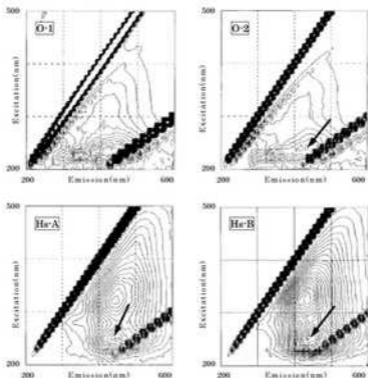


Fig.2 Characteristics of fluorescence spectra of sample O-1, O-2, Hs-A, and Hs-B

構成され様々な発色団を有する腐植物質のキャラクタリゼーションとして有効な測定手段である。そのため、Hs-A及びHs-Bの土壌腐植物質抽出液との比較により、O-1及びO-2の難分解性腐存有機物試料の3次元蛍光スペクトル分析を行い、これら試料の蛍光特性を把握した。

O-1, O-2, Hs-A及びHs-Bの3次元蛍光スペクトル分析から得られたスペクトルをFig.2に示すとともに、各スペクトルから得られたピーク位置とその相対蛍光強度をTable 1に示す。

Fig.2において、O-1, O-2の両試料とHs-A及びHs-Bの土壌腐植物質抽出液と比較検討した結果、これらの3次元スペクトルの形状が異なることが認められた。しかし、矢印で示すO-2のピークの一つが、Hs-A及びHs-Bの矢印で示すピークと近い位置に現れており、難分解性腐存有機物を構成する有機物の一部に、土壌腐植物質と同じ蛍光特性を示す有機物が含まれることが推察された。

Table 1 Fluorescence peak positions (Excitation/Emission wavelengths) and their relative fluorescence intensity of sample O-1, O-2, Hs-A and Hs-B

	position	position	position
	QSI	QSI	QSI
O-1	230/355	230/400	
	40.5 (Tryptophan-like)	44.3 (Humic-like)	
O-2	230/340	240/420	240/435
	34.3 (Tryptophan-like)	26.6 (Humic-like)	26.2 (Humic-like)
Hs-A	250/435	320/440	
	49.9	56.6	
Hs-B	250/435	330/435	
	79.5	77.1	

また、Table 1 より、3 次元蛍光スペクトルのピークの数が 0-2 より 0-1 の方が少ないことから、難分解性溶解有機物を構成する物質のうち、蛍光を発する有機物の種類は 0-2 より 0-1 の方が少ないことが考えられた。

なお、Table 1 中の括弧書きについては、福島県によりまとめられた 3 次元蛍光スペクトルのピーク位置の報告¹⁰⁾を参考に推測される由来物質を示したものであり、tryptophan-like 及び humic-like は、それぞれトリプトファン、及び腐植物質に現れるピーク位置と類似したピーク位置であることを示した。そのため、0-1、0-2 ともに、トリプトファン様 (タンパク質様) 及び腐植物質様の 2 のピークが認められたこととなり、海水中の溶解有機物がタンパク質様と腐植物質様の 2 つの蛍光を発するグループに大別されるという Mopper ら¹⁰⁾の報告と同様のことが、海水中の難分解性溶解有機物においても認められた。

これらの結果から、地点 0-1 及び 0-2 における海水中には tryptophan-like 及び humic-like 構造を有する難分解性溶解有機物を含むことが考えられた。

2. 溶解有機物濃度 (DOC) と紫外線吸光度 (UV260)

との比から見た難分解性溶解有機物の構造特性
難分解性溶解有機物試料 (0-1 及び 0-2) の DOC、UV260、及び DOC に対する UV260 の比を Table 2 に示す。

Table 2 より、DOC は 0-1 と 0-2 で大きな差はなかったが、DOC に対する UV260 の比は 0-2 より 0-1 の方が大きいことが分かった。このことより、難分解性溶解有機物を構成する有機物に含有する芳香族や不飽和二重結合等の官能基の数は、0-2 より 0-1 の方が多いことが考えられた。

また、DOC に対する UV260 の比が、外源性由来の有機物と内源性由来の有機物で大きく異なり、内源性由来の有機物の方が外源性由来の有機物に比

Table 2 Comparison of DOC, UV absorbance at 260nm, and ratio of UV absorbance at 260nm to DOC between sample O-1 and O-2.

	O-1	O-2
DOC (mg/L)	1.63	1.74
UV260 (mABS/cm)	41.2	34.0
UV260/DOC (mABS/cm/(mg/L))	25.3	19.6

べ DOC に対する UV260 の比が低いという報告¹¹⁾があることから、より流の奥側に位置する 0-1 の方が 0-2 より外源性由来の有機物の割合が高いことが推測された。

3. Sephadex G-15 を用いたゲルクロマトグラフィーによる難分解性溶解有機物の分子量分布特性及び構造特性

有機物の分子量分布は、溶解有機物の特徴を理解する上で重要な項目の一つとして、河川と湖沼を中心に多くの報告^{12)~14)}があり、水環境中の高分子割合を占めると考えられるフルボ酸は、分子量が 500~2,000 の範囲にあると言われている¹⁵⁾。そのため、分子量 1,500 以下を十分に分離し得る Sephadex G-15 を用いてゲルクロマトグラムを求めた。

難分解性溶解有機物試料 (0-1 及び 0-2) のゲルクロマトグラムを Fig. 3 に示すとともに、Table 3 に各ピーク位置についての DOC、UV260、及び DOC に対する UV260 の比を示す。

Fig. 3 に示す V_0 (void volume) は、分画可能範囲外の物質の溶出位置であり、相体として用いた Sephadex G-15 の分画可能分子量が 1,500 以下であることから、 V_0 を分子量 1,500 以上の位置とみなせる。また、1,355 の位置は、分子量のマーカーとして Vitamin B12 (分子量 1,355) の溶出位置を示している。

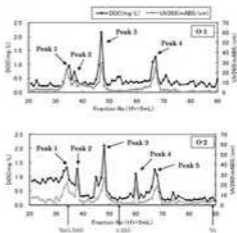


Fig. 3 Gel chromatograms of sample O-1 and O-2 with Sephadex G-15
 V_0 and V_t show void volume and total bed volume (441.6mL), respectively.

Table 3 DOC, UV absorbance at 260nm, and ratio of UV absorbance at 260nm to DOC of each peak

	O-1				O-2				
	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5
DOC (mg/L)	0.94	0.73	2.15	1.26	1.31	1.27	2.10	1.10	1.05
UV260 (mABS/cm)	14.2	12.0	29.2	24.8	21.8	23.0	26.4	18.0	18.6
UV260/DOC (mABS/cm/(mg/L))	15.0	16.4	13.6	19.7	16.6	18.1	12.6	16.4	33.6

Fig. 3より、O-1及びO-2ともに Y_0 の位置に1つのピーク (peak1) が現れ、分子量1,500以上の高分子化合物の存在が示された。しかし、 Y_0 から Y_t までの間にいくつかのピークが見られるとともに、分子量1,355~1,500の間にDOCの最大値を示すピーク (peak3) が認められたため、難分解性溶解有機物を構成する有機物のかなりの部分は分子量1,500以下のものであることが分かった。

また、O-1は主なピークの数4つであったのに対し、O-2は5つであり、O-1に比べO-2の方が構成する難分解性溶解有機物の種類が多いことが示唆された。そのため、3次元蛍光スペクトル分析から得られた蛍光を発する有機物の種類がO-1よりO-2の方が多くという結果と同様の傾向が認められ、同じ沿岸域でも地点が変われば、異なる難分解性溶解有機物が存在することを示すことが認められた。

次に、Table 3より、O-1及びO-2ともにDOCが最大値を示すピーク (peak3) において、DOCに対するUV260の比が最も低い値になることが認められた。そのため、大阪湾海水中難分解性溶解有機物に含まれる有機物のうち、比較的多く含まれるものは、芳香族や不飽和二重結合等の官能基の数が比較的小さい有機化合物であることが示唆された。

IV 要 旨

本研究では、大阪湾の湾奥部に位置する2地点から採水した表層水を対象として、難分解性溶解有機物の蛍光特性、分子量分布特性、及び構造特性について解析した。その結果、構成する有機物の種類や由来について地点間の差異を確認するとともに、難分解性溶解有機物の一部に土壌腐植物質由来の有機物が含まれること、難分解性溶解有機物を構成する有機物の大半は分子量1,500以下であること、また、

構成する有機物のうち、最も多く含まれる有機物の分子量は、1,355~1,500の間であり、その構造は、芳香族や不飽和二重結合等の官能基の数が比較的小さいものであることが示唆された。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、大阪湾広域臨海環境整備センターによる「大阪湾圏域における廃棄物・海域水環境保全に係る調査研究助成事業」の助成を受けました。

ここに記して謝意を表します。

文 献

- 1) 今井章雄: 湖沼トレンドモニタリングでみる難分解性有機物の特性と動態。地球環境研究センターニュース, Vol.14 No.7, 11-14(2003)
- 2) 今井章雄: 難分解性溶解有機物。環境値, No.13, 4-5。独立行政法人国立環境研究所発行。茨城県(2004)
- 3) 小田壽史, 今村修, 山崎文雄, 山形卓, 植木肇: 緑川の難分解性有機物負荷量。熊本県保健環境科学研究所報, 31号, 61-65(2001)
- 4) 長尾誠也: 腐植物質 (フミン物質)。日本分析化学会北海道支部編, 水の分析, 376-378, 養化学同人, 京都 (2005)
- 5) 日本規格協会: 工場排水試験方法 JIS K 0102, 57, 日本規格協会発行, 東京 (1998)
- 6) 矢部慎昭: COD 及び排出量の測定技術。用水と廃水, Vol.22 No.10, 11-19(1980)
- 7) 亀井翼, 丹保蓮仁: 水質のマトリックス的評価のためのゲルクロマトグラフィー。水道協会雑誌, 第519号, 24-41(1977)

- 8) 丹保恵仁, 亀井翼:マトリックスによる都市水代謝の水質評価. 水道協会雑誌, 第 502 号, 2-24 (1976)
- 9) 福島武彦, 中島俊之, 今井草雄, 松重一夫, 尾崎則篤: EEMS による水中溶存有機物の特性解析. 水環境学会誌, Vol.24 No.10, 686-692(2001)
- 10) Mopper, K. and Schultz,C.A.: Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components. *Marine Chemistry*, **41**, 229-238(1993)
- 11) 福島武彦, 今井草雄, 松重一夫, 井上隆信, 小澤秀明: 湖水溶存有機物の紫外線吸光度: DOC 比の特性とそれの水質管理への利用. 水環境学会, Vol.20 No.6 号, 397-403(1997)
- 12) 大竹嘉尚, 根岸正美: 霞ヶ湖における溶存有機物に関する研究. 茨城県公害技術研究所報, **14**, 1-8(2005)
- 13) 斉藤喜二, 早野茂夫: フルボ酸のゲルクロマトグラフィー. 生産研究, 29 巻 3 号, 75-78(1977)
- 14) 長尾誠也: 水中腐植物質の溶存形態解析. 水環境学会誌, Vol.27 No.2, 18-21(2004)
- 15) 松原英隆, 浦野純平: フミン質の酸化処理によるトリハロメタン生成能と分子量分布の変化. 水環境学会誌, Vol.21 No.5, 281-287(1998)
- 16) 今井草雄: 水環境における腐植物質の役割と分析法の進歩. 水環境学会誌, Vol.27 No.2, 2-7 (2004)

【ノート】

兵庫県における光化学オキシダント濃度の地域特性について

坂本 美徳* 吉村 陽 池澤 正

Regional Characteristics of Photochemical Oxidants in Hyogo Prefecture

Minori SAKAMOTO*, Akira YOSHIMURA and Tadashi IKESAWA

Atmospheric Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27 Yukihira-cho, Suma-ku, Kobe, Hyogo 654-0037, Japan

In order to clarify the regional characteristics in Hyogo prefecture, we analyzed the concentrations of photochemical oxidants (Ox) measured at 3 monitoring stations, Kakogawa, Nishiwaki and Tamba station in the Kakogawa River Basin, over the period 1990-2006. The results in this study suggest that the following regional characteristics: there was a tendency of long-term increase in the Ox concentrations in the Seto Inland Sea coastal area and, in particular, in the inland region around coastal area, and thus photochemical air pollution is increasing in the inland region around the coastal area.

I はじめに

近年、我が国の光化学オキシダント（以下、Ox）の濃度は増加傾向にあり、光化学大気汚染は大都市に限らず都市周辺部への広域化が指摘されている¹⁾。Oxが高濃度になり、健康被害発生の恐れがあると認められる場合には、「光化学スモッグ予報・注意報」等が発令される。兵庫県では、瀬戸内海沿岸の都市部においてOxが高濃度になることが知られているが、内陸に位置する西脇市と柏原町（現丹波市）においても、Ox濃度が注意報レベルの0.12ppm以上になることがあるために、2003年度より発令対象地域に追加されている。しかしながら、高濃度出現の原因については明らかになっていない。そこで、本研究では県下のOx濃度の地域特性を明らかにするために、瀬戸内海沿岸部および内陸部に位置する一般環境大気測定局（以下、測定局）の1990～2006年度の大気常時監視時間値データ（以下、時間値データ）を用い

て解析した結果、いくつかの知見を得たので報告する。

II 材料と方法

1. 解析に使用したデータ
1990～2006年度のOx濃度の時間値データを用いた。
2. 選定した測定局の概要
測定局は、瀬戸内海に流入する加古川流域に着目し、沿岸部の加古川市市役所局（以下、加古川局）、内陸部の西脇市市役所局（以下、西脇局）及び丹波市柏原局（以下、丹波局）の3局を選定した。加古川局は、播磨平野の東部を流れる加古川の下流に位置し、南部の播磨臨海工業地帯に隣接する市街地の中にある。西脇局は、中国山地の東南端が播磨平野に接する地点に位置し、周囲を山地や丘陵に囲まれ、加古川が南流し、市内には繊維工場などが多いが近傍に大きな発生源はなく、播磨臨海工業地帯から約30km離れた位置にある。丹波局は、加古川の源流に位置し、周囲を山に囲まれ、大きな発生源はなく、播磨臨海工業地帯から約50km離れた位置にある。測定局の位置をFig.1に示す。なお、Oxの測定方法は、加古川局、西脇局及び丹波局で、それぞれ2000年2

大気環境部

*別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究所センター

大気環境部 坂本 美徳

月、1998年8月及び2000年3月に吸光光度法から紫外線吸収法に変更している。

3. データ解析

解析は、国立環境研究所と地方環境研究所との共同研究報告書¹⁾に記載の方法に準じて行った。年度平均値は全時間値データの単純算術平均により算出した。年度最高値は全時間値データの最高濃度を採用した。濃度ランク別時間数は全時間値データを濃度ランク①0～29ppb、②30～59ppb、③60～89ppb、④90ppb以上に分け、時間数を積算した。解析年度の前半と後半を比較するため、解析年度の前半として1990～1994年度及び後半として2002～2006年度について、月別の平均値を全時間値データの単純算術平均により算出し、時間別の平均値を全時間値データの単純算術平均により算出した。ただし、吸光光度法による測定で向流吸収管の洗浄のために欠測となっている24時における時間別の平均値は算出しなかった。

III 結果および考察

1. 経年変化

1.1 年度平均値の経年変化

Fig.2に年度平均値の経年変化を示す。年度により差があるものの、平均濃度は丹波局>西脇局>加古川局で、内陸部ほど平均濃度が高い傾向が認められた。年度平均値の変化率を年度と年度平均値との直線回帰式の傾きから求めたところ、加古川局、西脇局及び丹波局で、それぞれ0.32ppb/年(95%信頼区間以下、信頼区間)0.13～0.50ppb/年、年率1.4%)、0.41ppb/年(信頼区間0.15～0.66ppb/年、年率1.8%)及び0.04ppb/年(信頼区間-0.15～0.23ppb/年、年率0.1%)であり、内陸部に位置する西脇局の増加が最も大きく、さらに内陸部に位置する丹波局の増加は少なかつた。大原²⁾は1995～2004年度の大気常時監視データを解析し、平均値の全国的な増加傾向を指摘し、その増加率は20年間約5ppbとしている。本研究とは対象期間が異なるものの同様の結果が得られ、加古川局、西脇局は全国平均より増加率が大きく、丹波局では増加率が小さかつた。

1.2 年度最高値の経年変化

Fig.3に年度最高値の経年変化を示す。年度ごとの変動は大きく、3局共に注意報レベルの0.12ppmに達する年度がある。2000年度以降は加古川局及び西脇局では毎年0.12ppmに達しているのに対し、丹

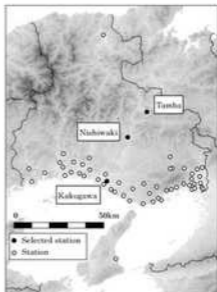


Fig.1 Location of monitoring station in Hyogo prefecture.

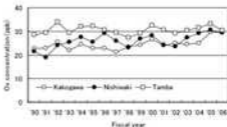


Fig.2 Annual variation of mean O₃ concentrations at 3 stations

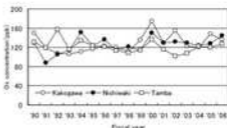


Fig.3 Annual variation of maximum hourly value of O₃ at 3 stations.

波局では0.12ppmに達しない年度もある。年度最高値の変化率を年度と年度最高値との直線回帰式の傾きから求めたところ、加古川局、西脇局及び丹波局で、それぞれ1.4ppb/年(信頼区間-0.5~3.3ppb/年、年率1.2%)、1.4ppb/年(信頼区間-0.2~2.9ppb/年、年率1.2%)及び-1.0ppb/年(信頼区間-2.3~0.3ppb/年、年率-0.7%)であり、瀬戸内海沿岸部及びその周辺の内陸部で増加傾向を示すもの。さらに内陸部では逆に減少していることが考えられる。

1.3 濃度ランク別時間数の経年変化

経年的な増加傾向の原因を探るため、濃度ランク別時間数を積算した。Fig.4に濃度ランク別時間数の経年変化を示す。

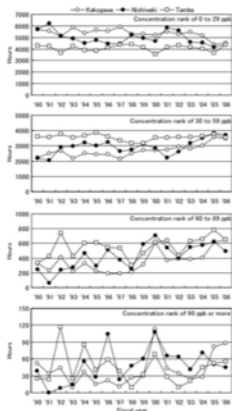


Fig.4 Annual variation of the number of hours that was classified into four concentration ranks.

1.3.1 濃度ランク 0~29ppb

濃度ランク 0~29ppbの時間数の年度変化率を年度と濃度ランク別時間数との直線回帰式の傾きから求めたところ、加古川局、西脇局及び丹波局で、それぞれ-53時間/年(信頼区間-87~19時間/年、年率-0.9%)、-54時間/年(信頼区間-111~3時間/年、年率-1.0%)及び-1時間/年(信頼区間-31~29時間/年、年率0.0%)であり、加古川局、西脇局では減少傾向が認められた。

1.3.2 濃度ランク 30~59ppb

濃度ランク 30~59ppbの時間数の年度変化率を年度と濃度ランク別時間数との直線回帰式の傾きから求めたところ、加古川局、西脇局及び丹波局で、それぞれ65時間/年(信頼区間40~90時間/年、年率3.0%)、59時間/年(信頼区間15~103時間/年、年率2.4%)及び-4時間/年(信頼区間-24~17時間/年、年率-0.1%)であり、加古川局、西脇局では増加傾向が認められた。

1.3.3 濃度ランク 60~89ppb

濃度ランク 60~89ppbの時間数の年度変化率を年度と濃度ランク別時間数との直線回帰式の傾きから求めたところ、加古川局、西脇局及び丹波局で、それぞれ19時間/年(信頼区間6~31時間/年、年率9.0%)、25時間/年(信頼区間13~38時間/年、年率11.3%)及び12時間/年(信頼区間-1~26時間/年、年率2.7%)であり、加古川局、西脇局及び丹波局で増加傾向が認められ、中でも西脇局の増加率が大きかった。

1.3.4 濃度ランク 90ppb以上

濃度ランク 90ppb以上の時間数の年度変化率を年度と濃度ランク別時間数との直線回帰式の傾きから求めたところ、加古川局、西脇局及び丹波局で、それぞれ2時間/年(信頼区間-1~5時間/年、年率9.1%)、3時間/年(信頼区間0~6時間/年、年率10.0%)及び-1時間/年(信頼区間-4~2時間/年、年率-1.6%)であり、加古川局及び西脇局で増加傾向が認められ、中でも西脇局の増加率が大きかった。丹波局では減少傾向が認められた。

1.3.5 出現する濃度範囲の特徴

加古川局及び西脇局の経年的な濃度増加には、0~29ppbの低濃度ランクの時間数の減少及び30ppb以上の中・高濃度ランクの時間数の増加が寄与していると考えられ、この傾向は西脇局が顕著であることから西脇局の経年的な濃度増加が特に大きくなったものと考えられる。また、西脇局における90ppb以上の高濃度ランクの時間数は、年度により差があ

るものの、他の2局に比べ解析期間で平均的に大きく、増加率も大きいことから、瀬戸内海沿岸部周辺の内陸部において光化学大気汚染が拡大している可能性が示唆された。一方、丹波局は経年的な濃度の増加傾向はあまりみられないものの、環境基準値である0.06ppm以上の時間数は増加していた。

2. 解析年度の前半と後半の比較

2.1 月変化の比較

Fig.5に解析年度の前半と後半の月変化を示す。3局とも類似した季節変化パターンで、4~5月に最大となり、11~12月に最低となり、9~10月にも小さなピークがみられる。1990年前半と2000年前半を比較すると、濃度増加は加古川局では7月を除いた月で認められ、西脇局では一年を通して認められた。特にOx濃度が高濃度になりやすい時期(4~10月)とも一致する4~6月、8~10月に大きく増加する傾向があった。この傾向は西脇局が顕著であることから西脇局の経年的な濃度増加が特に大きくなったものと考えられる。一方、丹波局では一年を通して濃度増加はあまり認められなかった。

2.2 時間変化の比較

Fig.6に解析年度の前半と後半の時間変化を示す。3局とも6時を最小に、14~15時に最大となる。1990年前半と2000年前半を比較すると、3局とも最大を示す時間が14時から15時へと遅くなっている。大阪平野のOxの日最高濃度出現時刻が経年的に遅くなる傾向が指摘されている¹⁶⁾が、本研究においても、加古川流域で同様の結果が得られた。濃度増加は加古川局及び西脇局で一日を通して認められた。特に夕方から夜間にかけての濃度増加が大きかった。この傾向は西脇局が顕著であることから西脇局の経年的な濃度増加が特に大きくなったものと考えられる。一方、丹波局では濃度増加は一日を通してあまり認められなかった。

IV 結論

兵庫県内のOx濃度の地域特性を明らかにするために、加古川流域の加古川局、西脇局及び丹波局の3局における1990~2006年度の時間値データを用いて解析したところ、以下のことが判明した。

- ①年平均値は経年的な増加傾向を示し、内陸部に位置する西脇局の増加が最も大きく、さらに内陸に位置する丹波局は増加が少なかった。
- ②年最高値は加古川局、西脇局では増加傾向、丹波

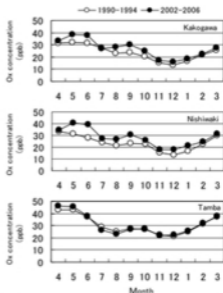


Fig.5 Monthly variation of mean Ox concentrations of the first half and the latter half of the study period.

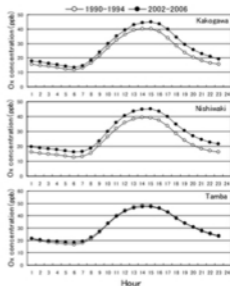


Fig.6 Diurnal variation of mean Ox concentrations of the first half and the latter half of the study period.

局では減少傾向が認められた。

③濃度増加には、0～29ppbの低濃度ランクの時間数の減少及び30ppb以上の濃度ランクの時間数の増加が拮抗していると考えられ、この傾向は西脇局が顕著であった。

④月変化を1990年前半と2000年前半と比較すると濃度増加は加古川局及び西脇局で認められ、特に4～6月、8～10月に大きくなる傾向があり、この傾向は西脇局で顕著であった。

⑤時間変化を1990年前半と2000年前半を比較すると、3局共に最大を示す時間が14時から15時へと遅くなっていた。濃度増加は加古川局及び西脇局で認められ、特に夕方から夜間にかけての濃度増加が大きくなる傾向があり、この傾向は西脇局が顕著であった。

これらの結果から、瀬戸内海沿岸部及びその周辺の内陸部のO₃濃度は経年的に増加傾向にあること、特に瀬戸内海沿岸部周辺の内陸部の増加傾向が著しいこと及び瀬戸内海沿岸部周辺の内陸部において光化学大気汚染が拡大している可能性が示唆された。また、顕著な増加傾向を示さない内陸部でも環境基

準値である0.06ppm以上の時間数は増加している可能性が示唆された。

文 献

- 1) 環境省:平成18年度大気汚染状況について、報道発表資料(2007)
- 2) 若松伸司編:西日本及び日本海側を中心とした地域における光化学オキシダント濃度等の経年変動に関する研究,国立環境研究所研究報告第184号(R-184-2004)5-6(2004)
- 3) 大原利眞編:日本における光化学オキシダント等の挙動解明に関する研究,国立環境研究所研究報告第195号(R-195-2007)11-56(2007)
- 4) 大原利眞:光化学オキシダントと浮遊粒子状物質の全国的・地域的特性,第48回大気環境学会年会講演要旨集,116-119(2007)
- 5) 山本勝彦:「海陸風との関係」の解析,大原利眞編,日本における光化学オキシダント等の挙動解明に関する研究,国立環境研究所研究報告第195号(R-195-2007),103-114(2007)

兵庫県における食品検査信頼性確保部門の10年間について

山口 幹子* 沖 典男 小笠原 芳知 利根川 美智恵 前田 幹雄

Report of Hyogo Prefectural Quality Assurance Unit in Food Inspection

Mikiko YAMAGUCHI*, Norio OKI, Yoshitomo OGASAWARA,
Michie TONEGAWA and Mikio MAEDA

*Project Planning and Information Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences,*

2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

Ten years have passed since GLP was introduced into the Hyogo prefectural food inspection facilities in 1998. We analyzed the records of the ten years of internal audit and precision management for improving the GLP. Then, following problems have been found. Firstly, it is necessary to analyze factors associated with impropriety judged in internal audit. Secondly, it is also necessary to recheck the methods of examination and result assessment of the internal quality control.

1 はじめに

食品の安全性のために、より正確、精密な検査の必要性が要求されるようになった。また、食品流通の国際化に伴い、国際的な基準に基づいた試験検査の信頼性の確保が強く求められるようになった。

このような背景から、食品衛生法施行令の一部が改正され、都道府県等が設置する食品衛生検査施設に対して検査等の業務管理(以下GLP)が義務付けられた¹⁾。

兵庫県では、1997年4月から順次、県が設置する食品衛生検査施設にGLPを導入した²⁾。

検査部門から独立した立場で、県立健康環境科学センター企画情報部に信頼性確保部門を置き、兵庫県食品衛生検査施設に対し内部点検の実施、精度管理の結果の確認等を行い、検査が適正に実施され、信頼に足るものであることを検証する業務を行

ってきた³⁾。

今回、信頼性確保部門のさらなる向上に資することを目的として、1998年度から2007年度の10年間に信頼性確保部門が実施した内部点検の状況並びに検査部門が実施した内部精度管理及び外部精度管理の結果等を通じて信頼性確保部門の解析評価を行った。

II 材料と方法

1997年度は、GLP対象施設が県立衛生研究所だけであった。1998年度からは、保健所検査室、食肉衛生検査施設もGLP対象となり、兵庫県全体のGLP体制が整った。ここでは、1998年度から2007年度の延べ135施設を対象とした。

信頼性確保部門責任者が各検査部門責任者に通知した「内部点検実施結果報告書」、「内部点検に伴う問題点の指摘事項勧告書・改善等の措置に関する確認書」及び「外部精度管理調査に伴う問題点の指摘事項勧告書・改善等の措置に関する確認書」、各検査部門責任者から信頼性確保部門責任者に提出された「内部精度管理結果報告書の写し」、財団法人食品薬

企画情報部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区瓦田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所センター
企画情報部 山口 幹子

品安全センター発行の「食品衛生外部精度管理調査結果報告書」, 研修会資料を用いて解析評価を行った。

III 結果および考察

1. 内部点検の実施状況

1.1 信頼性確保部門職員数

内部点検を実施した信頼性確保部門の職員数は, 1998年度から2004年度は信頼性確保部門責任者1名と指定職員5名, 2005年度からは信頼性確保部門責任者1名と指定職員4名であった。10年間で延べ57名, 実人員18名で内部点検を行った。

1.2 内部点検実施件数

内部点検の実施件数は, 年間81~129件で概ね経年的に増加していた。

1.3 内部点検における重要点検項目

2000年度からは, GLPの充実強化のため, 年度ごとに標準作業書の充実, 内部精度管理の充実, 検査記録の徹底等, 重要点検項目を設定して内部点検を行った。その結果, 標準作業書の整備も進み, 内部精度管理も実施されるようになったほか, 検査に関する記録の徹底, 検査結果の算出根拠の明確化等が充実した。

1.4 内部点検実施結果に基づく改善措置要請事項

内部点検の結果, 重大なものについては改善措置並びに報告を求めた。

- ① 2000年度は, 微生物検査室と事務室の区分がなかった1施設に対して改善を求めた結果, 年度内には独立した微生物検査室が整備された。
- ② 2003年度は, 記載内容に誤りがあった試験成績書を発行した1施設に対して改善を求めた結果, 原因の究明と再発防止策が講じられた。
- ③ 2007年度には, 標準作業書に明記している保存期間を超えた標準原液を使用した1施設に対して改善を求めた結果, 再発防止策が講じられた。

1.5 内部点検実施結果に基づく不適事項

1.5.1 不適件数

Fig.1に, 内部点検実施件数と不適件数の推移を示す。

2005, 2006年度に不適件数が増えているのは, それまで点検していなかった毒劇物の管理等の点検を強化したこと, 「食品生検査施設における検査等の業

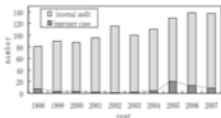


Fig.1 Time-trends of the number of internal audit and improper case

務管理要領」(以下「業務管理要領」)に基づき作成したチェックリストにおいて, 不適の場合は区分責任者と合意の上, 不適の報告を口頭ではなく全て文書で行ったためであった。

過去10年間の内部点検において, 適・不適の判定はチェックリストに基づき行ってきている。しかし, 検査施設への点検結果の周知方法や検査部門に求める基準に一貫性に欠ける部分があったことから, 各施設の評価について, 不適件数からだけでは判断が困難であった。

なお, GLP検査を初めて担当する者が不適を出しやすいといった傾向は見られなかった。

1.5.2 検査施設の不適事項

1998年度は標準作業書が未整備, 管理担当者が未決定等, GLP体制が整っていないがための不適事項が見られた。近年は記録もれ等の不適事項が見られる。内部点検において, 毎年不適事項はいくつか見られるが, 点検後, 改善が認められた。また, その検査結果を撤回しななければならないような不適切な検査の実施は認められなかった。ただ, 第3者に対して検査結果の信頼性を証明するためには, 「業務管理要領」に基づいた適切な検査の実施が求められている。そこで, 信頼性確保部門は不適事項について改善を促してきた。

また, 2007年度後半からは, 検査施設に対して日常の自主管理のために, 自己点検の推奨を行い, 検査施設自ら不適事項に意識が向くようにすすめてきた。

1.5.3 試験品採取(取去)施設の不適事項

1999年度は, 試験品搬入時に食品衛生監視員の立会いがない等の不適事項が4件見られた。しかし, 次年度以降改善が認められた。近年, ロットを混同した試験品の搬入の不適事項が見られる。

試験品採取施設は, 試験品採取・搬送と検査結果

に重要な影響を与える業務を行うため、トレースバックを念頭においた適正な取去が求められる。

2. 内部精度管理結果報告書の評価確認状況

2.1 内部精度管理評価確認件数

Fig.2 に、内部精度管理確認件数の年度推移を示す。

- 1998 年度から 2007 年度に延べ 5736 件の内部精度管理結果報告書の評価確認を行った。報告件数が 10 年間で 5 倍増えたことに伴い確認件数も増加した。
- 内部精度管理の必要性を指導した結果、2001 年度からはすべての施設から内部精度管理結果報告書の写しが提出されるようになった。
- 各施設間の件数の差は、取回数、検査項目、検査項目数等の違いによるものであった。

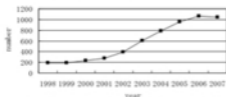


Fig.2 Time-trends of the number of internal quality control

2.2 評価

- 内部精度管理結果報告書を確認したところ、評価はすべて適であった^{4,5)}。
- 内部精度管理結果の評価が適であっても、外部精度管理調査で評価基準外となるものがあつた。これは、内部精度管理に認証標準物質となる食品を使用するのが困難なこと、検査担当者で試料を調製し添加量を知っていること、外部精度管理調査が他施設との測定値の比較により評価が行われること等が原因と思われる。
- 内部精度管理の評価(回収率と変動係数)について、経験年数2年以下と3年以上で比較を行ったが、有意な差は認められなかった。これは、取去品・検査項目・施設等により添加回収試験に使用する食品、添加量が同一ではないこと、また試料は自家調製であること等により、厳密な比較が困難であったことも一因と思われる。

3. 外部精度管理調査参加状況

3.1 外部精度管理参加件数

参加件数は毎年延べ30件前後、各施設1~5件で

あつた。

3.2 評価

評価は、外部精度管理実施機関が作成した個別報告書の評価結果により行った。すなわち、定量検査では、X-R 管理図を代用する比較法及び Z スコア法で管理線内にあつたもの、そして、定性検査では、正しく同定されたものを「良好」とし、それ以外の結果を「基準外」とした。

調査に参加した結果、概ね良好な評価であつたが保存料、重金属検査等で一部評価基準外となつた。

評価基準外となつた原因は、R(ばらつき)が管理線を超えたことによるものが半数を占めていた。次に X、Z スコアが管理線を超えたのが見られた。

また、評価基準外となつた施設について、特定の施設に偏った傾向は見られなかった。

3.3 改善措置要請事項

検査の信頼性に重大な影響を与えるため、基準外の施設に速やかに改善を求めた。その結果、次年度同じ検査項目で評価基準を超えた施設はなかった。

このように、全国レベルの技能試験である外部精度管理調査の結果が、検査施設の検査精度・検査手法等の問題解決のために有効に活用された。

3.4 評価に関連する要因分析

Table 1 に、検査担当者の経験年数と調査年度が評価結果に関連する要因と考へてロジスティック回帰分析を適用した結果を示す。

ここでは、相対危険の程度を評価するためにオッズ比(OR)を用いた。オッズは、ある事象が起こる確率と起こらない確率の比で、オッズ比は2群のオッズの比を表している。オッズ比の95%信頼区間(95% CI)は、信頼度95%で真のオッズ比を含む区間である。すなわち、経験年数3年以上に対し経験年数2年以下が評価基準外になるオッズ比は2.35(95% CI:1.06-5.17)で、経験年数2年以下の者が評価基準外になるリスクが高いことを表している。同様に2004年から2007年に対し、2001年から2003年、1998年から2000年のオッズ比は、5.58(95%CI:1.72-18.04)、5.80(95%CI:1.83-18.40)であつた。

この結果から、検査担当者の経験年数が評価結果に関連すること、2004年度から2007年度の評価結果がそれ以前より改善していること等が明らかとなつた。

Table 1 Adjusted odds ratio (OR) with 95% confidence interval (95%CI)

	OR	95%CI
Number of years as inspector		
≥ 3 years	1.00	—
≤ 2 years	2.35	1.06, 5.17
Year		
2004—2007	1.00	—
2001—2003	5.58	1.72, 18.04
1998—2000	5.80	1.83, 18.40

この結果は、検査担当者への技術研修や、外部精度管理調査への継続的参加が精度管理上で重要であることを示唆している。

4. 研修等の状況

2000年度から開催されている兵庫県食品衛生検査施設業務管理連絡協議会において、検査部門責任者並びに検査区分責任者に対して内部点検の結果等の報告を延べ7回行った結果、GLPの周知徹底・強化が図られた。また、1998年度から2007年度に検査室長・検査担当者に対して延べ19回、食品衛生監視員に対して延べ3回研修を行った結果、担当者にGLPの重要性の認識と意識付けが図られた。

一方、食品衛生検査施設信頼性確保部門責任者等研修会に毎年出席し、食品検査の信頼性確保についての理解を深め、内部点検に活かしてきた。

IV 結論

兵庫県食品衛生検査施設に対して、信頼性確保部門業務を行い10年が経過した。

今回、信頼性確保部門のさらなる向上に資することを目的として、1998年度から2007年度の10年間に信頼性確保部門が実施した内部点検の状況、内部精度管理及び外部精度管理の結果について解析を行ったところ、以下のことが明らかとなった。

1. 内部点検について

年度ごとに重要点検項目を定め、内部点検を行った結果、標準作業書の整備、内部精度管理の実施、検査記録の徹底、検査結果算出根拠の明確化等が年々充実した。

内部点検の実施は、速やかで有効な改善に繋がってきた。しかし、信頼性確保部門の点検に一貫性に欠ける部分があったこと等により、不適合数からだけでは、各施設の評価は困難であった。より信頼性

のある食品衛生検査施設となるために、関係職員の経験年数、担当人数、検査項目数、業務配分等も検証し不適となる要因を解析する必要がある。

さらに、信頼性確保部門の業務を客観的に自己評価し、検査精度の維持向上に繋がるような効率的、効果的な内部点検を行うこと、ヒヤリハット事例を共有しリスク管理を行うこと、検査施設自らが不適事項に気づき、改善に取り組めるよう自己点検を推奨し、組織全体の底上げに繋げていくことが必要と思われる。

2. 内部精度管理について

各施設の検査法・検査機器・検査精度が適正に保たれていることが、内部精度管理の技能評価により明らかとなった。しかし、内部精度管理で評価が適であっても、外部精度管理では評価基準外となるものも見られたため、今後は内部精度管理の評価方法、認証標準物質の代替となるような食品を用いた内部精度管理の実施、添加量が未知の食品を用いた内部精度管理の実施等を検討する必要がある。

3. 外部精度管理について

全国レベルの技能試験である外部精度管理調査の客観的評価が、検査施設の検査精度・検査手法等の問題解決のために有効に活用された。

また、解析結果より、検査担当者の経験年数が評価結果に関連すること、2004年度から2007年度の評価結果がそれ以前より改善していること等が明らかとなった。このことから、検査担当者の技術研修や外部精度管理調査への継続的参加が精度管理上重要であることが示唆された。

4. 研修について

研修の実施により、関係職員に対するGLPの取り組みへの理解と意識の向上が図られた。

今後、関係職員の異動等に対応するため、研修体系の構築並びに計画的な研修参加がGLPに不可欠である。

文献

- 厚生省生活衛生局長通知：食品衛生法施行令等の一部を改正する政令の一部の施行及び食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行について、平成9年1月16日、衛食第7号(1997)
- 厚生労働省医薬食品局安全監視安全課長通知：食品衛生検査施設における検査等の業務管理について、平成9年1月16日、衛食第8号(1997)
- 兵庫県健康福祉部長通知：兵庫県の食品衛生検査

施設における検査等の業務管理要綱及び兵庫県食品衛生検査施設業務管理連絡協議会運営要綱の制定について、平成 10 年 4 月 1 日、生第 146 号 (1998)

- 4) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知：食品衛生検査施設等の業務の管理の実施について一精度管理の一般ガイドライン、平成 9 年 4 月 1 日、衛食第 117 号 (1997)
- 5) 兵庫県立衛生研究所環境保健部長通知：兵庫県内部精度管理実施マニュアルの制定について、平成 12 年 8 月 28 日、GLP 第 45 号 (2000)

[資料]

兵庫県におけるウエストナイルウイルスに関する蚊のサーベイランス
(2005年～2007年)

押部 智宏* 稲元 哲朗 山岡 政興** 近平 雅嗣

Field Survey of Mosquitoes Associated with Control Measures
to West Nile Fever in Hyogo Prefecture (2005 ~ 2007)

Tomohiro OSHIBE*, Tetsuro INAMOTO, Masaoki YAMAOKA** and Masatsugu CHIKAHIRA

*Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and
Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

Surveillance for West Nile Virus (WNV) in mosquitoes was carried out during summer 2005-2007 in Hyogo prefecture. The mosquitoes were collected by the dry ice trapping method using CDC light traps in the fixed trapping points. 9037 mosquitoes from all fixed trapping points were sampled. These mosquitoes samples have tested negative for WNV. The species of the collected mosquitoes were *Culex pipiens*, *Aedes albopictus*, *Cx. tritaeniorhynchus*, *Anopheles sinensis*, *Armigeres subalbatus*, and *Aedes togoi*. From this result, we supposed that *Cx. pipiens* and *Ae. albopictus* were dominant species in urban area and *Cx. tritaeniorhynchus* was dominant species in the area near the fields of rice and storage reservoir. *Cx. pipiens*, *Ae. albopictus* and *Cx. tritaeniorhynchus* were important as WNV vector in Hyogo prefecture.

I はじめに

ウエストナイル熱は、39℃以上の発熱、頭痛、筋肉痛などの感冒様の症状となり、重症化すると方向感覚の欠如、麻痺、昏睡、痙攣などの髄膜炎・脳炎症状を呈する感染症である。北米大陸で1999年から流行が急速に拡大し、2003年にはアラスカを除くほぼ全域に広がった¹⁾。米国では、2007年の患者数が3,623人、死者は121人に達し²⁾、カナダでも2,351人の患者が発生し深刻な状況となっている。

この病原体であるウエストナイルウイルス (WNV) の侵入や発生動向を知る上で、ウイルスの感染源を形成する鳥類や媒介蚊の感染状況を調査することが

有効とされている³⁾。ウイルスの流行地域である米国やカナダでは患者の発生状況、死亡した鳥類や媒介蚊あるいは高感受性で終宿主となっている馬のサーベイランスを継続して実施している。

日本では、今のところWNVの報告はないがその侵入時に備えるために、鳥類及び蚊のサーベイランスのための技術に習熟することは、防疫対策の備えとして重要である。

今回我々は、これらのことを踏まえて兵庫県におけるWNVの侵入監視および県内市街地に生息する蚊の分布状況を把握するため、2005年～2007年の3シーズンにわたり蚊の捕集調査を実施したので報告する。

II 材料と方法

1. 実施期間および捕集地点
- 1.1 研究センター定点の捕集調査
県立健康環境科学研究所センター (神戸市兵庫区)

感染症部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所センター

感染症部 押部 智宏

**現 神戸大学医学部

敷地内 (Fig.1) の2ヶ所を定点に、2005年6月1日から11月9日までの92回、2006年6月1日から10月30日までの71回、2007年6月12日から9月21日までの45回、3シーズンの合計208回蚊を捕集した。

1.2 健康福祉事務所及び食肉衛生検査センターでの捕集調査

2005年は7月25日～28日及び9月23日の2回、健康福祉事務所敷地内の13定点 (Fig.1) で、2006年は宝塚、社及び福岡健康福祉事務所敷地内の3定点で合計10回 (7月4, 10, 24日, 8月1, 7, 21日, 9月4, 11, 25日, 10月2日) 蚊を捕集した。2007年は福岡健康福祉事務所、食肉衛生検査センター (加古川市) 及び西播磨食肉衛生検査所 (たつの市) の3定点で6回 (7月9, 23日, 8月6, 21日, 9月3, 18日) 蚊を捕集した。



Fig.1 Map of the fixed trapping points of mosquitoes
 Kobe:Kobe city (Hongo ward) (This research center),
 Kakogawa 1:South of Kakogawa city (Kakogawa Health and Welfare office),
 Kakogawa 2:North of Kakogawa city (Hongo Prefectural Meat Inspection Center),
 Tatsuno 1:Center of Tatsuno city (Tatsuno Health and Welfare office),
 Tatsuno 2:North of Tatsuno city (Nishi Harima Meat Inspection Center).

2. 蚊の捕集方法

蚊の捕集には、ドライアイスを誘引剤としてCDC ライトトラップ (John, W. Buck Company) を用いた。1回当りの捕集時間は、研究センター定点では約24時間とし、研究センター以外の定点調査では約48時間とした。

3. 蚊の種の同定

捕集した蚊は弓背ら¹⁾の標基同定表に基づいて動物を吸血する雌蚊のみを対象に分類した。この中で、アカイエカ (*Culex pipiens pallens*) とオカイエカ (*Cx. pipiens molestus*) は外見上区別できないため、これらはアカイエカ (*Cx. pipiens*) と分類した。

4. ウイルス検査

定点毎の捕集蚊を分類後、同一種50匹を1プール (1検体) としてマイクロチューブに入れ、0.2%ウシ血清アルブミン加リン酸緩衝液を750 μ l 加えマルチピーズシュocker (安井器械) で破砕した。この乳剤の遠心上清からQIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出したRNAについて、RT-PCR法でWNVのE領域およびNSVと日本脳炎ウイルスで共通するNS3領域を増幅した。使用したプライマーや反応条件等は、ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル (国立感染症研究所)²⁾ に準じた。

III 結果

1. 蚊の捕集成績

1.1 研究センター定点の捕集調査

研究センター定点での捕集調査の結果を Table 1 に示した。

2005年～2007年の3シーズンにわたる調査では3種類4,020匹の蚊が捕集された。調査日数の最も多かった2005年は92回で合計1,734匹が捕集され、最も少ない2007年は45回で948匹が捕集された。しかし、シーズン毎に1調査日当たりの平均捕集数を比較すると、各々18.8匹、18.7匹、21.1匹 (平

Table 1 Number of collected mosquitoes at the fixed trapping points of this research center (Kobe)

Species	2005		2006		2007		Total	
	Mosquitoes	(% of total)	Mosquitoes	(% of total)	Mosquitoes	(% of total)	Mosquitoes	(% of total)
<i>C. pipiens</i>	890	(51.1)	893	(50.0)	308	(32.3)	1,791	(44.3)
<i>A. albopictus</i>	380	(21.7)	344	(18.2)	642	(67.7)	2,226	(55.6)
<i>A. tritaeniorhynchus</i>	4	(0.2)	0	(0.0)	0	(0.0)	4	(0.1)
Total	1,734	(100)	1,738	(100)	948	(100)	4,020	(100)

均 19.6 匹) となり、シーズン毎の大きな差は見られなかった。

捕集蚊は、ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) が 2,236 匹 (55.4%), アカイエカ 1,789 匹 (44.5%) の順に多く、コガタアカイエカ (*Cx. tritaeniorhynchus*) 5 匹 (0.1%) と他の 2 種類に比べて極めて少なかった。

その構成を比較すると、2005 年はアカイエカがヒトスジシマカよりも多かったのに対して、2006 年と 2007 年は逆にヒトスジシマカが多く捕集された。

捕集数の推移を月別に見ると (Fig. 2), 2005 年はヒトスジシマカが 9 月、アカイエカが 6 月にピークを示したが、アカイエカは平均して少なく明確なピークはなかった。2007 年はヒトスジシマカが 6 月から 9 月にかけて漸増した。アカイエカは調査開始の 6 月から 8 月まで多く捕集され 9 月には減少しており、明確なピークは見られなかった。ヒトスジシマカ及びアカイエカの捕集数の推移は調査シーズンによって大きく異なっていたが、3 シーズンを併せた

月別の捕集数の推移では、ヒトスジシマカが 7 月、アカイエカが 6 月にピークを示した。

1.2 健康福祉事務所及び食肉衛生検査センターでの捕集調査

県内の定点で捕集された蚊は 3 シーズン分を合わせると 6 種類 5,017 匹であった (Table 2)。その種類は多い順にコガタアカイエカ 3,445 匹 (69%), ヒトスジシマカ 754 匹 (15%), アカイエカ 472 匹 (9.4%), シナハマダラカ (*Anopheles sinensis*) 330 匹 (6.6%), オオコロヤブカ (*Armigeres subalbatus*) 14 匹 (0.28%), トウゴウヤブカ 2 匹 (0.04%) であった。

アカイエカ、ヒトスジシマカは全ての定点で捕集された。コガタアカイエカが捕集されたのは 6 定点、シナハマダラカは 5 定点であった。

1 調査日当たりの平均捕集数では、最も多く捕集されたのは福崎定点の 271 匹で、次いでたつつ-2 定点で 87.5 匹、加古川-2 定点で 61.8 匹の順であった。最も少なかったのは、船原定点の 2.0 匹で、次に

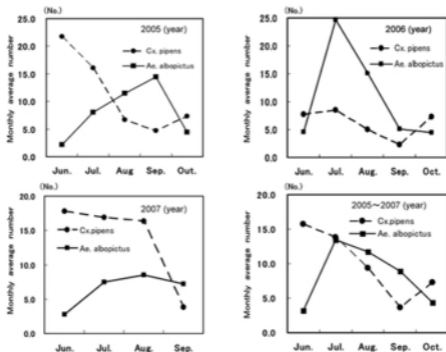


Fig. 2 Monthly average number of collected mosquitoes per day in the fixed point of this research center (Kobe)

Table 2 Number of collected mosquitoes at the fixed trapping points in Hyogo prefecture

Region	Trapping Point ^a	Year	Collection number of times	Mosquito Species										Total	SD		
				<i>A. albopictus</i> (1)	<i>C. pipiens</i> (2)	<i>C. annulirostris</i> (3)	<i>A. stimulans</i> (4)	<i>A. subhalictus</i> (5)	<i>A. nigri</i> (6)								
Hanshu	Ashiya	2005	2	6	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	(5)
	Takaresuka	2005	2	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	(20)
		2006	10	49	0	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	96	(34)
East-Harima	Izumi	2005	2	11	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	(0)
	Kakogawa-1	2005	2	73	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75	(35)
	Kakogawa-2	2007	6	327	0	95	146	24.2	2	0	0	0	0	0	0	570	(91.8)
North-Harima	Asahi	2005	2	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	(5)
	Yasuiro	2005	2	3	0	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	9	(20)
		2006	10	117	0	23	0	0	18	0	0	0	0	0	0	407	(48.7)
Center-Harima	Fukuzaki	2005	2	3	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	(38.5)
		2006	10	125	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	225	(136)
		2007	6	124	0	118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	242	(271)
West-Harima	Tatsuno-1	2005	2	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	(2.5)
	Tatsuno-2	2007	6	10	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	(81.5)
	Ako	2005	2	2	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	(0)
Tajima-Tsuta	Toyouka	2005	2	14	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	(2)
	Wakayama	2005	2	14	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	(18.5)
	Kabusa	2005	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	(2)
Asagi	Saizumi	2005	2	7	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	(11.5)
Total				354		412		3,445		120		14		2		5,017	

^a Mosquitoes / Collection number of times

^b Kakogawa-1:South of Kakogawa city (Kakogawa Health and Welfare office), Kakogawa-2:North of Kakogawa city (Hyogo Prefectural Meat Inspection Center), Tatsuno-1:Center of Tatsuno city (Tatsuno Health and Welfare office), Tatsuno-2:North of Tatsuno city (Tajima-Harima Meat Inspection Center).

芦屋及び赤穂定点でどちらも5.0匹、明石定点の5.5匹であった。

捕集された蚊の種類がアカイエカとヒトスジシマカの2種類と最も少なかったのは阪神地域の3定点、加古川-1 定点、明石定点、たつの-1、洲本定点の7定点であった。また、福崎及びたつの-2の2定点では捕集された蚊が5種類で最も種類が多かった。

同じ市内である加古川-1 と加古川-2 定点及びたつの-1 とたつの-2 定点を比較すると、加古川-1 やたつの-1 定点ではアカイエカ及びヒトスジシマカの2種類のみが捕集され1調査日当たりの平均捕集数はそれぞれ35匹、2.5匹であった。これに対して、加古川-2 やたつの-2 定点では、それぞれ4種類と5種類の蚊が捕集され、平均捕集数は61.8匹及び87.5匹で、その主体はコガタアカイエカであった。このように同じ市内の定点であっても捕集される蚊の種類や数に大きな違いが見られた。

2. 蚊からの WNV 検出

捕集されたすべての蚊について WNV 遺伝子およびフラビウイルス遺伝子の検出を行ったが全て陰性で

あった。

IV 考察

研究センター定点の3シーズンの定期捕集調査 (Table 1) では、ヒトスジシマカとアカイエカとコガタアカイエカの3種類が捕集されたものの、コガタアカイエカは3シーズン合わせて5匹にとどまり、ヒトスジシマカとアカイエカの2種類が主体を占めていた。このヒトスジシマカとアカイエカの構成を3シーズンの合計と比較するとほぼ1:1となり、これは近隣の大阪府の市街地における調査と同様の結果であった¹⁰⁾。また、捕集数の推移を月別にみると (Fig. 2) シーズンによって変動が見られたものの、3シーズンを合わせるとアカイエカが6月に、ヒトスジシマカは7月にピークを示した。アカイエカの捕集が6月にピークとなったのは、その活動が春季の比較的早い時期から活発となり、盛夏になって最高気温が32℃を超えるると成虫の生存期間が著しく減少すること¹¹⁾によるものであると考えられる。一方、ヒトスジシマカは他の種類の蚊と比較して春季の出

現や活動時期が遅いため⁹⁾、7月が捕集のピークとなったと考えられた。

県内定点の捕集調査 (Table 2) では、全ての定点からアカイエカ、ヒトスジシマカが捕集された。このうちで、アカイエカ、ヒトスジシマカのみが捕集されたのは7定点で、特にこれら7定点の周辺はいずれも研究センター定点と同様にビルや住宅などの建物、道路の側溝、雨水マスなどの人工物が比較的多い地域であった。アカイエカ、ヒトスジシマカが雨水マス、人工容器、汚水溜、下水溝などで多く発生する生態を考慮すると、これらはビル、住宅、道路の側溝等の人工物がある市街地を中心としたヒトの生活圏で生息していることが考えられた。

今回の調査ではコガタアカイエカが3,445匹と最も多く捕集され、捕集された6定点は、すべて近隣に水田や畑がある市街地で、都市部等で近隣に水田や畑が少ない定点では捕集されなかった。また、1調査日あたりのコガタアカイエカの捕集数が多かったのは福崎定点やたつの-2 定点で、トラップの設置場所は水田や畑の隣接地であった。これらの現象から県内の水田やため池を発生源として、その周辺に分布しているものと思われる。

近隣に水田のない都市部の研究センター定点でも僅かながらコガタアカイエカが捕集されたが、これはコガタアカイエカを含むイカ類は数 km の飛翔能力をもち、産卵を求めて探索行動を行うことから⁹⁾、遠くの発生源から僅かながら飛翔してきたものとも考えられた。

捕集された蚊の種類が最も多く、1調査日あたりの平均捕集数も最も多かった福崎及びたつの-2 は、トラップを水田や畑の隣に設置した定点であった。蚊の種類による生態学的特徴を考慮すると、水田発生性であるといわれるコガタアカイエカ、シナハマダラカ¹⁰⁾は定点周辺の水田から発生し、たい肥等の有機物を好むオオクロヤブカ¹¹⁾は畑やその周囲の茂みが発生源であると考えられた。

これらのことから水田、畑やその周囲の茂み等では、多様な種類の蚊が発生しており、その分布密度も比較的高くなっていることが考えられ、このことは今回の調査でも確認された。

同じ市内である加古川-1 及び加古川-2 定点、あるいはたつの-1、たつの-2 定点では捕集される蚊の種類や数に違いが見られた。これは加古川-1、たつの-1 定点はビルや住宅などが多く、加古川-2、たつの-2 の定点は田畑が多い地域であるためと考えられるが、このように比較的狭い地域でも蚊の生

息状況が大きく異なることがあるため、蚊の種類や生息数や分布状況をより正確に把握するには、より狭い範囲での成虫の捕集調査に加えて幼虫の種類と発生量を把握することが必要と思われる。

今回の調査で捕集されたすべての蚊から WNV は検出されなかったが、捕集された6種類の蚊はいずれも WNV を媒介する可能性があり¹²⁾、特にすべての定点から捕集されたアカイエカ、ヒトスジシマカ及びコガタアカイエカについては県内における WNV のベクターとして重要であると考えられた。また、今回最も多く捕集されたコガタアカイエカは日本脳炎ウイルスの媒介蚊でもあり、県内飼育のブタで毎年日本脳炎ウイルスに対する抗体が確認されていることから¹³⁾、日本脳炎の感染リスクは依然として存在することが明らかとなった。

また、シナハマダラカ等のハマダラカ類はマラリアを媒介するとされている¹⁴⁾、国内では1947年に約12,000例の患者が報告されたが、近年はすべてが輸入例であり国内発生は報告されていない¹⁵⁾、しかし、今回の調査で少なからず捕集されておりマラリアの国内発生についても注目する必要がある。

蚊および野鳥の WNV のサーベイランスは、全国の自治体で行われている。今のところ WNV が国内に侵入したとの報告はないが、北米を中心に流行が続いていることから、今後も引き続きウイルスサーベイランスを行う必要があると考えられた。

V まとめ

兵庫県における WNV の保有監視および県内市街地に生息する蚊の分布の把握を目的として、3シーズンにわたり蚊のサーベイランスを行った。その結果、6種類9,037匹の蚊が捕集され、WNV 検査を行ったがすべて陰性であった。6種類の蚊はいずれも WNV を媒介する可能性があるが、特に、すべての定点から捕集されたアカイエカ、ヒトスジシマカや最も多く捕集されたコガタアカイエカが重要であると考えられた。

謝辞

本調査の遂行に当たり蚊の捕集、同定法、ウイルス検査法等の技術的な研修、指導をしていただきました大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課の弓指孝博先生、青山幾子先生、本調査の企画調整、総括をしていただきました県疾病対策課、県生活衛生課の関

係者の方々、本調査にご協力いただきました健康福祉事務所の健康増進課および業務・生活衛生課の関係者の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) 倉根一郎：ウエストナイル熱，日本ウイルス学会誌，**53**，1-6(2003)
- 2) 今井長兵衛：ウエストナイルウイルスの米国侵入と流行実態，生活衛生，**48**，252-260(2004)
- 3) CDC：2007 West Nile Virus Activity in the United States.
http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&controlCaseCount07_detailed.htm
- 4) 小林健生他：ウエストナイル熱媒介蚊に関するガイドライン，p1-15，国立感染症研究所，東京（2003）
- 5) 弓指孝博，瀧見子，斎藤浩一，西村平和，石田誠良，大竹敏，奥野良信：大阪府におけるウエストナイル対策に関する蚊のサーベイランス（平成 15 年度報告），大阪府公衛研所報，**42**，57-63(2004)
- 6) 高崎智彦，倉根一郎：ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル Ver.4，p. 7，国立感染症研究所，東京（2005）
- 7) 素木得一：衛生昆虫，p543-552，北隆館，東京（1958）
- 8) 山岡政興，押部智宏：1992 年～2006 年の兵庫県における日本脳炎ウイルスの自然生態，兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要，**4**，49-53(2007)
- 9) 感染症週報，p11-14 国立感染症研究所，東京（2002）

[資料]

大気中揮発性有機化合物の濃度トレンドと健康リスク評価

岡田 泰史* 中野 武

Health Risk Assessment and Concentration Trend of
Atmospheric Volatile Organic Compounds

Yasushi OKADA* and Takeshi NAKANO

*Environmental Safety Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and
Environmental Sciences, 3-1-27 Yukihira-cho, Suma-ku, Kobe, Hyogo 654-0037, Japan*

To grasp health effect for an exposure to Volatile Organic Compounds (VOCs), health risk assessment has been carried out using atmospheric VOCs measurements during the last five years and the existing data on health effect evaluation. As a result, excess cancer incidence of some substances was more than 10^3 of criterion. And so from these substances concentration trend, the state and characteristic of environmental pollution were considered. This result suggested to be needed that emissions reduction measures should be proceeded from health effect standpoint.

I はじめに

揮発性有機化合物 (VOC) は、大気汚染防止法で「大気中に排出され、又は飛散した時に気体である有機化合物」と定義されており、(1) 大気排出量が多い (2) 事業場、自動車、家庭など発生源が多岐に渡っている (3) 光化学スモッグを引き起こす物質である光化学オキシダントの生成原因となる (4) 発がん性や神経障害などの有害性がある、といった特徴を有する成分が多く含まれている。

そのため、VOCの人への暴露量やVOC暴露による健康影響を把握することが重要である。地域毎の長期的な環境濃度測定により、暴露量の推定が可能となるが、VOCの成分により有害性の強弱が大きく異なるため、環境濃度の把握のみでは人への健康影響は不明である。そこで、健康影響を加味した評価が必要となる。

ここでは、最近5年間の環境濃度測定結果と既存の健康影響評価情報を用いることにより、地域におけるVOC暴露による健康リスクについて評価を行った。

その結果、健康リスクが判定基準よりも高いと推測された物質については、濃度トレンド等、さらに詳細な解析を行い、地域毎の汚染状況とその特徴について考察することにより、リスク低減対策を提案した。

II 方法

1. 環境濃度の測定方法

測定地点は一般環境2地点 (三田・豊岡)、道路沿道1地点 (芦屋)、固定発生源周辺1地点 (高砂) の計4地点である (Fig. 1)。調査期間は2003年4月から2008年3月までであり、この期間中、毎月1回の頻度で採取を行った。

測定対象物質はVOCのうち、健康リスクがある程度高いとして優先取組物質^①に選定されている11物質、及び優先取組物質以外でPRTRデータ^②において大気排出量が多い5物質とした (Table 1)。

これら16物質の採取及び分析は、既報^③に示した方

安全科学部

*別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究所センター

安全科学部 岡田 泰史



Fig. 1 Location of sampling sites

法で行った。なお、アセトアルデヒド及びホルムアルデヒドは高砂を除く3地点で採取した。

2. リスク値の算出方法

リスク値の算出には、発がん性の有害影響の場合はハザード比 (HQ) を、また発がん影響の場合はがんの過剰発生率 (ΔR) を以下に示す式により算出した⁶⁾。

$$\begin{aligned}
 HQ &= AC / RFC \\
 \Delta R &= CR \times AC \\
 \left(\begin{array}{l} AC: \text{平均一日暴露濃度 } (\mu\text{g}/\text{m}^3) \\ RFC: \text{吸入参照濃度 } (\mu\text{g}/\text{m}^3) \\ CR: \text{ユニットリスク (per } \mu\text{g}/\text{m}^3) \end{array} \right)
 \end{aligned}$$

ここで、吸入参照濃度とは一生経吸入暴露されたも有害影響が生じない濃度のことであり、また、ユニットリスクとは吸入の場合、ある物質 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の大気濃度で一生経暴露された時の過剰発がん率のことである。

なお、国内の基準濃度 (大気環境基準値、大気指針値、室内濃度指針値) は吸入参照濃度と同様の概念で設定されているため、本研究では基準濃度を吸入参照濃度として適用し、ハザード比の算出に用いた。ただし、塩化ビニルモノマー、1,3-ブタジエン、1,2-ジクロロエタン、ベンゼンは、発がん影響から基準濃度が設定されているため、US EPA (米国環境保護庁) の参照濃度⁷⁾を使用した。また、ユニットリスクは US EPA で評価されたもの⁸⁾を使用した。

Table 1 Health assessment information on measured substances

	Reference concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Unit risk ⁸⁾ (per $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Vinyl chloride monomer	100 ⁷⁾	1.4E-6
1,3-Butadiene	2 ⁷⁾	1.0E-5
Acrylonitrile	2 ⁷⁾	4.0E-5
Dichloromethane	350 ⁷⁾	4.7E-7
Chloroform	18 ⁷⁾	2.3E-5
1,2-Dichloroethane	Not Assessed	2.6E-5
Benzene	50 ⁷⁾	2.2~7.0E-6
Trichloroethylene	200 ⁷⁾	Not Assessed
Tetrachloroethylene	200 ⁷⁾	Not Assessed
Acetaldehyde	18 ⁷⁾	2.2E-6
Formaldehyde	100 ⁷⁾	1.3E-5
Toluene	240 ⁷⁾	Not Assessed
Xylene	870 ⁷⁾	Not Assessed
Ethylbenzene	2600 ⁷⁾	Not Assessed
Styrene	220 ⁷⁾	Not Assessed
p-Dichlorobenzene	240 ⁷⁾	Not Assessed

a) Reference concentration for chronic inhalation exposure, Environmental Protection Agency, U.S.A.

b) Guideline value for hazardous air pollutant to reduce health risks, Ministry of the Environment, Japan

c) Environmental quality standard (air quality), Ministry of the Environment, Japan

d) Guideline value for indoor air concentration, Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan

e) Quantitative estimate of carcinogenic risk from inhalation exposure, Environmental Protection Agency, U.S.A.

各物質の参照濃度及びユニットリスクを Table 1 に示す。ここで、ベンゼンのユニットリスクは範囲として算出されているため、リスク値の算出には範囲の中央の値である 5.0×10^{-6} を用いた。

III 結果および考察

1. 各物質の検出状況

各物質の地点別平均濃度及び検出下限値を Table 2 に示す。

ここで、平均濃度は各地点における 2003 年 4 月から 2008 年 3 月までの測定結果 (n=60) の算術平均値を記載した。ただし、検出下限値未満 (ND) の検体が存在する場合には、当該検出下限値に 1/2 を乗じて得られた値を用いて平均値を算出した。

優先取組物質では、アセトアルデヒド、ホルムアルデヒドが全地点において比較的高濃度で検出された。また、塩化ビニルモノマー、1,3-ブタジエン、アクリロニトリル、1,2-ジクロロエタンは固定発生源周辺地点である高砂が他の地点よりも高い濃度で検出された。

PM₁₀ データにおいて大気排出量が多い物質では、トルエン、キシレン、エチルベンゼン、p-ジクロロベンゼンが全地点において比較的高濃度で検出され

Table 2 VOCs concentration in sampling sites

	Average concentration ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)				Detection limit ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
	Sanda	Toyooka	Ashiya	Takasago	
Vinyl chloride monomer	0.036	0.018	0.035	1.4	0.0030
1,3-Butadiene	0.16	0.11	0.19	0.38	0.013
Acrylonitrile	0.15	0.096	0.13	0.34	0.0030
Dichloromethane	1.7	2.0	1.8	1.9	0.030
Chloroform	0.29	0.26	0.28	0.53	0.013
1,2-Dichloroethane	0.089	0.071	0.090	0.41	0.013
Benzene	1.9	1.6	2.0	1.8	0.030
Trichloroethylene	0.17	0.08	0.24	0.33	0.030
Tetrachloroethylene	0.23	0.12	0.36	0.15	0.030
Acetaldehyde	3.5	3.0	4.4	-	0.15
Formaldehyde	3.5	2.9	4.9	-	0.20
Toluene	15	11	15	10	0.030
Xylene	7.4	7.1	8.5	3.8	0.030
Ethylbenzene	4.5	2.8	5.2	2.1	0.030
Styrene	0.98	0.69	0.98	1.7	0.060
p-Dichlorobenzene	11	2.4	6.1	2.8	0.050

a) April 2003 - March 2008 (n=60)

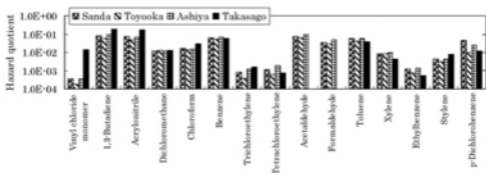


Fig. 2 Health risk estimation for VOCs by hazard quotient

た。

しかし先に述べたように、環境濃度の把握のみでは人への健康影響の度合いは不明である。そこで、得られた平均濃度を平均一日暴露濃度と仮定して、リスク値（ハザード比、がん過剰発生率）を算出した。

2. リスク値による評価

まず、非発がん性の有害影響を評価するため、各物質のハザード比を地点別に算出した。結果を Fig. 2 に示す。

ここで、ハザード比による判定基準では、1 以上で有害影響リスクが懸念されると判定される¹⁾。

ハザード比は、高砂の1,3-ブタジエン、アクリロ

ニトリルでそれぞれ 1.9×10^3 、 1.7×10^3 と比較的高い値となったものの、全地点、全物質で判定基準である1を下回っていた。従って、現時点で非発がん性の有害影響リスクはないと考えられる。

次に、発がん影響を評価するため、各物質のがん過剰発生率を地点別に算出した。結果を Fig. 3 に示す。

ここで、がん過剰発生率による判定基準では、 1.0×10^{-6} 以上で発がんリスクが懸念されると判定される¹⁾。

がん過剰発生率は、高砂で1,3-ブタジエン、アクリロニトリル、クロロホルム、1,2-ジクロロエタンが、芦屋でベンゼンが、また全地点でホルムアルデヒドが判定基準である 1.0×10^{-6} を超過していた。

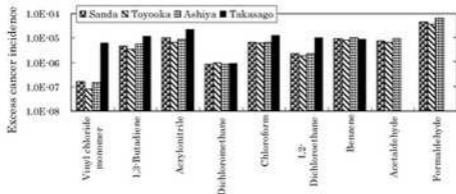


Fig. 3 Health risk estimation for VOCs by excess cancer incidence

3. 地点毎の汚染状況とその特徴

上述の評価で判定基準を超過した物質については濃度トレンド等、さらに詳細な解析を行った。ここではクロロホルム、ベンゼン、ホルムアルデヒドを一例として、解析結果をもとに、地域毎の汚染状況とその特徴について考察し、リスク低減対策を提案した。各物質の年平均濃度の推移及び季節別平均濃度を Fig. 4 に示す。

3.1 クロロホルム

がん過剰発生率で判定基準を超過した高砂では、年平均濃度は減少傾向となっており、事業所の自主的取組による排出抑制の効果が現れていることが示唆された。また、季節変動では、春季と冬季の濃度が高く、発生源の排出状況や気象条件の影響を受けていることが推測された。

以上から、クロロホルムによる健康リスク低減のためには、事業所からの排出抑制対策が必要であるものの、対策は比較的進んでいると考えられる。

3.2 ベンゼン

がん過剰発生率で判定基準を超過した芦屋では、年平均濃度は減少傾向で、2005年度以降は他地点との濃度差が小さくなっており、ガソリン中のベンゼンの含有量規制が強化されたこと（2000年1月〔5体積%以下→1体積%以下〕）による排出抑制の効果が現れていることが示唆された。また、季節変動は全地点で夏季から冬季にかけて増加傾向となっており、大気安定度の影響をうけていることが推測された。

以上から、ベンゼンによる健康リスク低減のためには、自動車排ガスからの排出抑制対策が必要であるものの、対策は比較的進んでいると考えられる。

3.3 ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドは自動車など移動体からの排出量が多いことから、年平均濃度は道路沿道地域の芦屋で他地点よりも高くなっている。

しかし、交通量が少ないと考えられる一般環境地域の三田と豊岡においても比較的高濃度で検出されており、がん過剰発生率では全地域で判定基準超過という結果になった。そこで、三田と豊岡に着目して季節変動をみると、共に春季から夏季にかけて濃度が増加し、そこから減少に転じて冬季に最も低い濃度という傾向を示した。このことから、一般環境地域では光化学反応による二次生成の寄与が大きいことが推測された。

以上から、ホルムアルデヒドによる健康リスク低減のためには、自動車排ガスからの排出抑制対策に加えて二次生成の抑制対策が必要と考えられる。

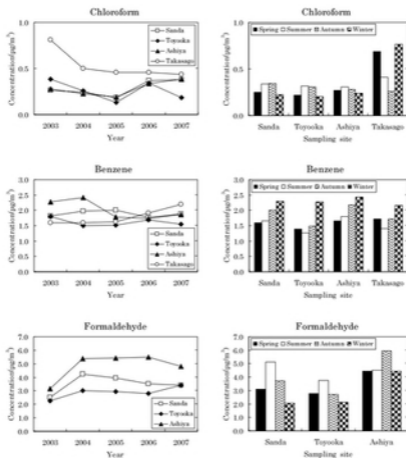


Fig. 4 VOCs concentration trend in sampling sites

The left graphs show the transition of annual average concentration.

The right graphs show seasonal average concentration.

IV まとめ

最近5年間の環境濃度測定結果と既存の健康影響評価情報を用いることにより、地域におけるVOC暴露による健康リスクについて評価を行った。

物質毎にリスク値（ハザード比、がん過剰発生率）を算出し、判定基準を超過した物質については、さらに詳細な解析を行った。

その結果、リスク低減対策として、クロロホルムでは事業所からの排出抑制、ベンゼンでは自動車排ガスからの排出抑制、またホルムアルデヒドでは自動車排ガスの排出抑制及び二次生成の抑制が必要と考えられた。

この内、ホルムアルデヒドについては、対策があまり進んでいないことから、今後リスク低減手法などについて検討していく必要がある。

謝辞

本稿を終えるにあたり、試料採取にご協力いただきました兵庫県農政環境部環境管理局大気課及び兵庫県下各県民局環境課の皆様へ深く感謝いたします。

文 献

- 1) 中央環境審議会：今後の有害大気汚染物質対策のあり方について（第2次答申）（1996）
- 2) 兵庫県：平成18年度PRTRデータの概要（2008）
(<http://www.kankyo.pref.hyogo.jp/JPN/apr/topic/new-prtr/h18kekka/h18prtrsuyukei.htm>)
- 3) 岡田泰史，吉岡昌徳：PRTRデータと環境濃度の比較による大気中揮発性有機化合物の評価。兵庫県立健康環境科学研究センター紀要，1，67-77（2005）
- 4) Sekizawa, J., Ohtawa, H., Yamamoto, H., Okada, Y., Nakano, T., Hirai, H., Yamamoto, S., and Yasuno, K. : Evaluation of human health risks from exposures to four air pollutants in the indoor and the outdoor environments in Tokushima, and communication of the outcomes to the local people. *J. Risk Res.*, 10(6), 841-851 (2007)
- 5) U.S.EPA : IRIS database for risk assessment. (2008)
(<http://www.epa.gov/iris/subst/index.html>)
- 6) (独)製品評価技術基盤機構化学物質管理センター：化学物質のリスク評価について，4-5(2007)
- 7) 環境省環境保健部環境リスク評価室：化学物質の環境リスク評価，6，25-26(2008)
- 8) 経済産業省製造産業局化学物質管理課，環境省環境保健部環境安全課：平成18年度PRTRデータの概要－化学物質の排出量・移動量の集計結果－，187(2008)

[資料]

兵庫県におけるPM_{2.5}汚染の実態把握調査(1)

中坪 良平* 吉村 陽 池澤 正 平木 隆年

Investigation of the Actual Condition concerning PM_{2.5} Air Pollution
in Hyogo Prefecture (1)Ryouhei NAKATSUBO*, Akira YOSHIMURA, Tadashi IKESAWA
and Takatoshi HIRAKI*Atmospheric Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and
Environmental Sciences, 3-1-27 Yukihira-cho, Suma-ku, Kobe, Hyogo 654-0037, Japan*

In order to make clear the actual condition of the air pollution caused by fine particles (PM_{2.5}) in Hyogo prefecture, monitoring of PM_{2.5} concentration have been carried out for four years at two sites in Ashiya and Suma. In Ashiya, the annual means of the PM_{2.5} and the coarse particles (PM_{10-2.5}) mass concentrations changed in the range of 17.5~19.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and 9.6~10.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectively. In Suma, the annual means of the PM_{2.5} and the PM_{10-2.5} mass concentrations changed in the range of 17.2~18.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and 10.1~11.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectively. And those concentrations in both sites are almost identical. The PM_{10-2.5} concentration showed the characteristic seasonal variation with the amount of the yellow sand blown into Japan. On the other hand, the PM_{2.5} concentration was high also in summer due to the secondary particles. The significant difference between the mass concentrations in Ashiya and Suma of both PM_{2.5} and PM_{10-2.5} was not seen and the correlation was very high. Therefore, a possibility that those concentrations were predominated by the large-scale factor was suggested.

I はじめに

空気動力学径が2.5 μm 以下の微小粒子状物質 (PM_{2.5}) の健康影響については、死亡率等との関連が米国の疫学研究¹⁾等で報告されている。米国は2006年9月にPM_{2.5}に関する環境の基準を強化し²⁾、WHOは同年10月にPM_{2.5}の大気質ガイドラインを新たに設定した³⁾。さらに同年6月にPM_{2.5}の年平均値に関する基準と達成時期を告示した⁴⁾。日本では1999年に、「微小粒子状物質暴露影響調査検討会」が環境庁に設置され、PM_{2.5}の暴露と健康影響との関

連を明らかにすることを目的に各種調査研究が継続的に実施されてきた。2007年7月に調査報告書が出され⁵⁾、また同年5月には、諸外国の科学的知見を蓄積しPM_{2.5}の健康影響を評価するため、「微小粒子状物質健康影響評価検討会」が設置され、2008年4月にその検討結果が報告された⁶⁾。その中では、疫学知見ならびに毒理学知見から、PM_{2.5}が人々の健康に影響を与えていることが支持されるとして、さらに定量的な評価に関する考察を進める必要があるとしている。

一方、上記の考察を進める上で必要となるPM_{2.5}の測定に関する日本国内での報告例は、名古屋市での測定⁷⁾や埼玉県での測定⁸⁾、環境省の調査報告⁹⁾等があるが、未だ少ないのが現状である。兵庫県では、PM_{2.5}による大気汚染の実態を2週間程度の平均濃度で把握することを目的としたサンプラーを製作し¹⁰⁾、

大気環境部

*別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究所センター

大気環境部 中坪 良平

PM_{10} の長期平均濃度のモニタリングを実施してきた。本報告では、それらの結果から、兵庫県内の2地点における PM_{10} 濃度の長期トレンドを中心に報告する。

2 方法

2.1 PM_{10} モニタリング地点および期間

PM_{10} のモニタリングは、芦屋市精選町（芦屋市校舎分庁舎屋上、地上高約10m：以下「芦屋」）、神戸市須磨区行平町（当センター3階ベランダ、地上高約10m：以下「須磨」）の2地点で実施した（Fig. 1）。

モニタリング地点周辺の詳細図をFig. 2(a), (b)に示した。2地点とも兵庫県南東部の阪神圏内に位置し、自動車SOx・PM法の対策地域に指定されている。芦屋のモニタリング地点の約25m南には、国道43号とその上を高架構造で阪神高速3号神戸線が走っている。須磨のモニタリング地点の約60m西には阪神高速3号神戸線が高架構造で走り、約260m南西には国道2号が走っている。

モニタリングは、須磨では2001年8月から、芦屋では2003年10月から開始した。本報告では、並行してモニタリングを実施した2003年10月から2007年9月までの結果をとりまとめた。

2.2 PM_{10} の捕集と濃度測定

当センターで制作した PM_{10} サンプラナーを用いて、インパクター分級方式により石英繊維フィルター（PALLFLEX 2500QAT-EP、φ110mm）上に PM_{10} 粒子を捕集した。またインパクタープレート上にも石英繊維フィルター（同上、φ90mm）を載せ、粒径が10～2.5 μ mの粗大粒子（ $PM_{10-2.5}$ ）も捕集した。捕集フィルターは、原則として毎月1日と16日に交換し、約2週間周期のサンプリングを連続して実施した。フィルターの秤量は、セミマイクロ天秤（Mettler社製、AE240、秤量下限10 μ g）を使用し、秤量前にフィルターを2413m（アメリカニウム）線源にかざし静電気を除去した。フィルターは、捕集前後に相対湿度50%に調整されたデシケーターに24時間以上放置し、室内を室温約20℃、相対湿度が約50%となるように調節して秤量した¹²⁾。捕集前後の差を PM_{10} 、 $PM_{10-2.5}$ の質量とし、それら採気量（ m^3 ）で除して質量濃度（ $\mu g/m^3$ ）とした。 PM_{10} 濃度と $PM_{10-2.5}$ 濃度を足したものを粒径10 μ m以下の粒子（ PM_{10} ）の濃度とした。



Fig.1 Location of the sites. (a)Ashiya and (b)Suma, Hyogo Prefecture.



Fig.2 Detailed location of the sites. (a)Ashiya and (b)Suma. The double circle is measurement point. A line shows the proximity road.

2.3 浮遊粒子状物質 (SPM) 濃度の測定値

SPM濃度の測定値は、芦屋市内および神戸市内に設置されている大気汚染常時監視測定局のうち、一般大気測定局で得られた一時間測定値を用いた。SPM濃度の測定方法はβ線吸収法である。

III 結果と考察

3.1 2週間測定値および年平均値の推移

Fig. 3(a), (b)に $PM_{2.5}$ および $PM_{10-2.5}$ の2週間測定値と、 $PM_{10}/PM_{2.5}$ 比の推移を示した。 $PM_{2.5}$ 濃度の2週間測定値は、芦屋では $8.7\sim 28.0\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度範囲で推移し、平均は $18.5\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、須磨では $9.4\sim 27.2\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度範囲で推移し、平均は $17.8\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。一方、 $PM_{10-2.5}$ 濃度の2週間測定値は、芦屋では $5.0\sim 26.6\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度範囲で推移し、平均は $10.0\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、須磨では $5.4\sim 25.3\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度範囲で推移し、平均は $10.7\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。 $PM_{10}/PM_{2.5}$ 比は、芦屋では $0.45\sim 0.76$ の範囲で推移し、平均は 0.65 、須磨では $0.47\sim 0.73$ の範囲で推移し、平均は 0.63 であった。

Table 1に $PM_{2.5}$ および $PM_{10-2.5}$ 濃度の年平均値を示した。年平均値は、モニタリング開始(2003年10月)から1年毎の平均値とした。芦屋における $PM_{2.5}$ および $PM_{10-2.5}$ 濃度の年平均値は、それぞれ $17.5\sim 19.5\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、 $9.6\sim 10.8\mu\text{g}/\text{m}^3$ の範囲、須磨における $PM_{2.5}$ および $PM_{10-2.5}$ 濃度の年平均値は、それぞれ $17.2\sim 18.4\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、 $10.1\sim 11.6\mu\text{g}/\text{m}^3$ の範囲で推移していた。

Table 2に、環境省が示した「微小粒子状物質暴露影響調査報告書」²⁾(以下、「環境省報告」と称す)から自動測定機 (TEOM) による $PM_{2.5}$ 濃度の全国の年平均値を示した。モニタリング期間の区切りや採取方法が異なるため一概には比較できないが、本研究で得られた $PM_{2.5}$ 濃度の年平均値は、都市部に近い濃度で推移していた。

また、環境省報告における $PM_{2.5}$ 濃度の年平均値は、道路沿道で低下傾向がみられているが都市部や非都市部は明確な経年変化がみられていない。本研究で得られた $PM_{2.5}$ 濃度の年平均値も同様に、明確な経年変化はみられなかった。米村³⁾は、2000年から埼玉思北部の一般環境において、フィルター法による $PM_{2.5}$ の観測を実施しており、1週間毎の質量濃度と主要成分の経年変化を報告している。その中で $PM_{2.5}$ 質量濃度については明確な変化がみられず、その原因については硫酸塩等の二次粒子の、近年の増加傾

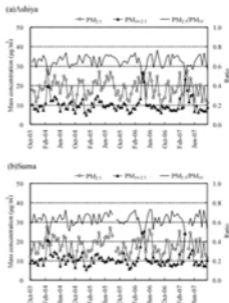


Fig.3 Trends of measured values of $PM_{2.5}$ and $PM_{10-2.5}$, $PM_{10}/PM_{2.5}$ ratio.

Table 1 Annual mean of mass concentration with 95% confidence interval of $PM_{2.5}$ and $PM_{10-2.5}$.

Year ^{a)}	2003	2004	2005	2006
Ashiya				
$PM_{2.5}$ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	19.0 ± 1.7	19.5 ± 1.8	18.0 ± 2.0	17.5 ± 1.8
$PM_{10-2.5}$ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	10.8 ± 1.4	9.6 ± 1.0	10.2 ± 1.9	9.6 ± 1.6
Data number	23	24	24	23
Suma				
$PM_{2.5}$ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	18.2 ± 1.6	18.4 ± 1.7	17.2 ± 1.7	17.3 ± 1.7
$PM_{10-2.5}$ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	11.6 ± 1.4	10.2 ± 0.9	11.1 ± 1.9	10.1 ± 1.6
Data number	23	23	24	23

a) from October to following September

Table 2 Annual mean of mass concentration of $PM_{2.5}$, which the Ministry of the Environment investigated using the TEOM.

Year ^{a)}	2003	2004	2005	2006
Rural area	14.7	13.8	14.4	13.8
Urban area	20.1	19.2	19.9	19.5
Roadside	25.5	23.7	22.2	21.6

a) from April to following March

向を描している。米国の $PM_{2.5}$ 環境基準（年平均値 $15\mu g/m^3$ ）と比較すると、本研究で得られた $PM_{2.5}$ 濃度の年平均値は高く、今後 $PM_{2.5}$ 濃度の低減対策を考える上では、二次粒子の低減対策が重要であると考えられる。

3.2 月平均値の変動パターン

Fig. 4(a), (b)に $PM_{2.5}$ および $PM_{10-2.5}$ 濃度の芦屋と須磨における月変動を示した。各月の濃度は四年間の平均値とした。 $PM_{2.5}$ および $PM_{10-2.5}$ 濃度の変動パターンは芦屋と須磨で類似していた。 $PM_{2.5}$ 、 $PM_{10-2.5}$ ともに春季に高濃度を示し、この理由は、 $PM_{2.5}$ に比べ $PM_{10-2.5}$ でその傾向が顕著なことから黄砂の影響によるものと推測できる。日本に飛来する黄砂の空気動力半径は $4\mu m$ 前後にピークがあることが知られており、また、本研究で $PM_{10-2.5}$ の高濃度事例が確認された期間は、全国的に黄砂が観測される時期と一致していた¹¹⁾。

一方、 $PM_{2.5}$ 濃度は、春季の他、夏季に高濃度となる傾向を示した。夏季に高濃度となる要因としては、紫外線等の光エネルギーが強く光化学反応が活発になり、大気中のガスが粒子化してできる二次粒子の生成が促進されるためと推測できる。二次粒子は粒径が小さく、 $PM_{10-2.5}$ よりも $PM_{2.5}$ に多く含まれている¹²⁾。Fig. 3の $PM_{2.5}/PM_{10-2.5}$ 比についてみると、夏季に高くなる傾向がみられ、最も高い値を示したのは、芦屋では2006年8月、須磨では2006年6月であった。

3.3 モニタリング地点間の相関

Fig. 5(a), (b)に $PM_{2.5}$ 、 $PM_{10-2.5}$ について、芦屋と須磨で得られた2週間測定値の相関を示した。 $PM_{2.5}$ 濃度について、測定値の回帰直線の傾きは1.03、切片は0.08、決定係数は0.89となり地点間で高い相関を示した。また、傾きの95%信頼区間は0.96~1.11、切片の95%信頼区間は-1.31~1.48であり、両地点の測定値に有意差は認められなかった。 $PM_{10-2.5}$ 濃度について、測定値の回帰直線の傾きは0.97、切片は-0.36、決定係数は0.94となり地点間で高い相関を示した。傾きの95%信頼区間は0.92~1.02、切片の95%信頼区間は-0.94~0.21であり、両地点の測定値に有意差は認められなかった。

$PM_{2.5}$ 、 $PM_{10-2.5}$ 濃度とも、両地点の測定値に有意差が認められず、また、地点間の相関が非常に高かった。これは、 $PM_{2.5}$ 、 $PM_{10-2.5}$ 濃度の2週間ごとの変動パターンが類似していることを示している。Fig. 6に、兵庫県が設置している大気汚染常時監視測定局のう

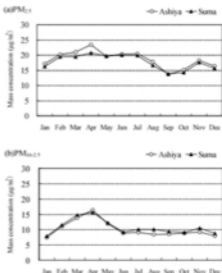


Fig. 4 Monthly variation of mass average concentration. (a) $PM_{2.5}$ and (b) $PM_{10-2.5}$. Each monthly mean is the average of four years.

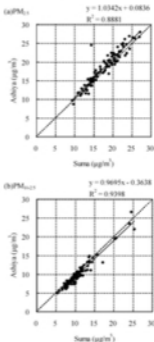


Fig. 5 Correlation of all measured values of the mass concentration between Ashiya and Suma. (a) $PM_{2.5}$ and (b) $PM_{10-2.5}$.

ち、芦屋市内の一般局(3局)と神戸市内の一般局(13局)で2007年度に測定されたSPM濃度の相関を示した。各値は、市内全一般局の1時間値の平均である。回帰直線の傾きは1.03, 切片は-0.33, 決定係数は0.90となり、1時間値にもかかわらず高い相関を示した。傾きの95%信頼区間は1.03~1.04, 切片の95%信頼区間は-0.55~-0.12となり、わずかに芦屋で高濃度を示す傾向がみられたが、ほぼ1:1に分布していた。

米持ら⁸⁾は、PM_{2.5}の主要成分のうち硫酸塩の割合が最も高く、夏季にはPM_{2.5}質量濃度の半分以上を占めると報告している。また藍川ら¹²⁾は、硫酸イオンによる汚染が、半球規模での影響により濃度が支配されていることを指摘している。これらの報告と本研究結果を考慮すると、SPM, PM₁₀, PM_{2.5}等の粒子状物質濃度が、局所的ではなく、より広域的な要因により支配されている可能性が示唆された。

IV まとめ

兵庫県内のPM₁₀による汚染実態を把握するため、芦屋と須磨の2地点で、PM₁₀濃度の連続測定を4年間実施した。芦屋におけるPM₁₀およびPM_{2.5}濃度の年平均値は、それぞれ17.5~19.5 μg/m³, 9.6~10.8 μg/m³の範囲、須磨におけるPM₁₀およびPM_{2.5}濃度の年平均値は、それぞれ17.2~18.4 μg/m³, 10.1~11.6 μg/m³の範囲で、2地点ともほぼ横ばいに推移していた。PM_{2.5}濃度については、春季に観測される黄砂の影響により特徴的な季節変動を示した。一方、PM₁₀濃度については、二次粒子の影響により夏季にも濃度が高くなる傾向がみられた。また、PM_{2.5}濃度、PM₁₀濃度ともに測定地点間の有意差がみられず、相関が非常に高かったことから、広域的な要因により濃度が支配されている可能性が示唆された。

文献

- 1) Dockery, D.W., Pope, C.A., Xu, X.P., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, E.G: An association between air pollution and mortality in 6 United-States cities, *New England Journal of Medicine*, **329**, 1753-1759 (1993)
- 2) USEPA: National Ambient Air Quality Standards for Particulate Matter: Final Rule, *Federal Register*, Vol.71, No.200 (2006)

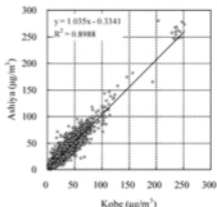


Fig.6 Correlation of all measured values of the SPM mass concentration between all monitoring sites in Ashiya and Kobe city.

3) WHO: Air quality guidelines. Global update

2005, Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide (2006)

4) EU: Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe (2008)

5) 環境省: 微小粒子状物質暴露影響調査報告書 (2007)

6) 環境省: 微小粒子状物質健康影響評価検討会報告書 (2008)

7) 中島寛則, 酒井哲男, 北瀬勝, 山神高紀子: 名古屋市におけるPM₁₀濃度の成分濃度と発生源寄与率について, *名古屋市環境科学研究所報*, **32**, 13-17 (2002)

8) 米持真一, 梅沢夏実, 松木利志: 埼玉県北部のPM_{2.5}濃度と化学組成の5年間の観測結果, *大気環境学会誌*, **42**, 129-142 (2007)

9) 吉村陽, 小坂浩: PM₁₀長期モニタリングのためのサンブラーの試作, *兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要*, **2**, 56-61 (2005)

10) 吉村陽, 小坂浩, 小山太八郎, 王置元剛: 浮遊粒子状物質測定用フィルター秤量時の相対湿度変化が精度に及ぼす影響, *環境技術*, **32**, 51-56 (2003)

11) 気象庁ホームページ: [地球環境のデータバンク] 黄砂 (URL: http://www.data.kishou.go.jp/obs-env/kosahp/kosa_data_index.html)

12) 笠原三紀夫: 粒子状大気汚染の現状と今後の課

題-PM_{2.5}導入の意義を考える-, 大気環境学会誌,
37, 96-107(2002)

13) Aikawa,M, Hiraki,T Yamagami,M, Kitase,M,
Nishikawa,Y, Uno,I: Regionality and
particularity of survey site from the viewpoint

of the SO₂ and SO₄²⁻ concentration in ambient
air in a 250 x 250-km region of Japan,
Atmospheric Environment, 42, 1389-1398
(2008)

[資料]

兵庫県に飛来した黄砂中成分に関する調査

藤原 拓洋* 平木 隆年 藍川 昌秀 吉村 陽 坂本 美徳

Studies on Chemical Components of Asian Dust in Hyogo

Takuhiro FUJIWARA*, Takatoshi HIRAKI, Masahide AIKAWA,
Akira YOSHIMURA and Minori SAKAMOTO*Atmospheric Environmental Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and
Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, 654-0037, Japan*

Chemical analysis of TSP (Total Suspended Particles) was carried out when Asian Dust episodes were observed, in order to study the Asian Dust in Hyogo Prefecture. TSP concentration was 272 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ at maximum, and the average was 119 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ during the period of Asian Dust. Large correlation was observed between the concentrations of 7 metals (Mg, Al, Ca, Fe, Mn, Ni, Cr), 6 water-soluble components (SO_4^{2-} , NO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Sr^{2+}) and the TSP concentration. The rate of the particle whose diameter is larger than $2.5\mu\text{m}$ was large when high concentration of Asian Dust was observed. The enrichment factor (EF) suggests that Ca, Fe and Mg originated from Asian Dust itself, while Ni and Zn originated from other sources except Asian Dust.

I はじめに

黄砂はタクラマカン砂漠やゴビ砂漠、黄土地帯などの乾燥・半乾燥地域において、低気圧の発生などにより数千メートルの上空にまで巻き上げられた鉱物・土壌粒子が偏西風に乗って拡散し、東アジア・西太平洋地域を中心に広く対流、降下する現象である。日本において黄砂の飛来は2月から増加し始め、4月にピークを迎える¹⁾。

黄砂の飛来は、精密機器工場への侵入、海洋表層のプランクトンへのミネラルの供給など、社会活動や生態系に対してさまざまな影響を及ぼすと考えられている²⁾。また近年の研究により、黄砂中に重金属などの有害大気汚染物質が含まれている可能性が指摘されている³⁾。環境省の調査で日本海側を中心とした一部の地域で黄砂の観測が行われているが、兵

庫県内での実態調査はほとんど行われていない。よって、兵庫県に飛来する黄砂の輸送状況や化学成分の解明は、人の健康影響の評価のためにも重要である。本報告は兵庫県に飛来する黄砂の実態を把握することを目的として、黄砂時の大気中の浮遊粉じん（以下TSPとする）の粒径や化学的性質について調査したので、その結果を報告する。

II 方法

1. 試料の採取

1.1 ハイボリュームエアサンプラーによる捕集

調査期間は環境省の「黄砂実態解明調査」に合わせて、2007年5月8～10日、12～14日、26～28日を黄砂日とし、また独自に7月18～20日を非黄砂日と設定した。捕集場所は兵庫県立健康環境科学研究所センター（神戸市須磨区、北緯34度38分57.232秒、東経135度7分55.243秒）屋上とし、TSPをハイボリュームエアサンプラー（紀本電子工業社製 MODEL-1208）を用いて、流量1000L/minで24時間、石英繊維ろ紙（Pallflex社製 2500QT-UP）上に捕集した。TSP

大気環境部

*別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究所センター

大気環境部 藤原 拓洋

を捕集する前後の石英繊維ろ紙は、気温20℃、湿度50%のデシケーター内に24時間以上静置した後、電子天びん(METTLE TOLEDO社製 AE240)を用いて重量を測定し、重量法によってTSP濃度を求めた。

1.2 ローボリュウムエアサンプラーによる捕集

インパクターを装着したローボリュウムエアサンプラー(新宅機械製作所製 S2型)を用いた2段ろ紙法によって、粒径 $2.5\mu\text{m}$ 超、 $2.5\mu\text{m}$ 以下のそれぞれの粒子を流量 $20\text{L}/\text{min}$ で分級捕集した。捕集はハイボリュウムエアサンプラー捕集と同時にを行った。捕集後のろ紙は、ハイボリュウムエアサンプラー捕集したろ紙と同様の方法で秤量し、各粒径別粒子量を求めた。

2. 前処理

金属分析に供するろ紙は、有害大気汚染物質測定方法マニュアルにしたがって前処理を行った。その方法を以下に示す。

ハイボリュウムエアサンプラーによってTSPを捕集したろ紙から必要量(49.28 μm^2)を分取した。分取したろ紙はテフロン製圧力容器に入れ、硝酸10ml、硝酸化水素1ml、ふっ化水素酸2mlを加えた後、マイクロウェーブ分解装置(CEM社製 M852000)を用いて分解した。分解試料をホットプレート上で乾固後、超純水で50倍希釈した硝酸溶液に溶解させ、孔径 $0.45\mu\text{m}$ のディスクポゼブルフィルターでろ過し、上記の硝酸溶液で10mlにメスアップしたものを金属分析用試料とした。

水溶性成分分析に供するろ紙については、直径47nmのボンナでくりぬき、超純水を加え攪とう後、孔径 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターでろ過したものを水溶性成分分析用試料とした。

3. 化学分析

10種の金属(Mg, Al, Ca, Fe, Sr, Mn, Ni, Zn, Pb, Cr)は原子吸光分光光度計(日立 Z-8200)を用いて分析した。10種の水溶性成分(F, Cl, NO₃⁻, SO₄²⁻, Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺)については、イオンクロマトグラフ(ダイオネクス DX-300)を用いて分析した。

III 結果

1. 大気中の金属濃度

ハイボリュウムエアサンプラー捕集によって得られたTSP濃度をFig.1、金属濃度をFig.2に示す。

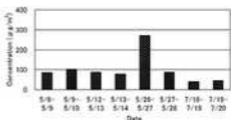


Fig.1 Concentration of TSP during Asian Dust events (5/8-5/9,5/9-10,5/12-13,5/13-14,5/26-27,5/27-28) and non Asian dust events (7/18-19,7/19-20).

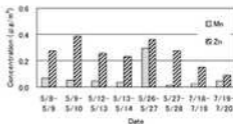
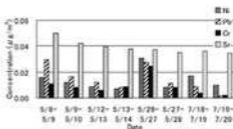
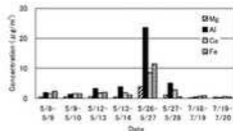


Fig.2 Concentration of metals during Asian Dust events (5/8-5/9,5/9-10,5/12-13,5/13-14,5/26-27,5/27-28) and non Asian dust events (7/18-19,7/19-20).

黄砂時に捕集された TSP 濃度は $78 \sim 272 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $119 \mu\text{g}/\text{m}^3$) で、調査期間中であつても TSP 濃度が高かつたのは 5 月 26～27 日であつた。なお、黄砂時の平均 TSP 濃度は非黄砂時 ($43 \mu\text{g}/\text{m}^3$) の約 2.8 倍、最高 TSP 濃度は非黄砂時の約 6.3 倍であつたことから、TSP 濃度は黄砂の規模に比例して上昇すると考えた。各元素濃度は、Hg: $0.45 \sim 3.90 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $1.19 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Al: $1.29 \sim 23.55 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $6.49 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Ca: $1.60 \sim 8.56 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $3.04 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Fe: $0.52 \sim 11.44 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $3.16 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Sr: $0.035 \sim 0.050 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $0.041 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Mn: $0.014 \sim 0.296 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $0.087 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Ni: $0.007 \sim 0.031 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $0.014 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Zn: $0.23 \sim 0.39 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $0.30 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Pb: $0.008 \sim 0.030 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $0.018 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Cr: $0.006 \sim 0.025 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $0.011 \mu\text{g}/\text{m}^3$) であつた。各元素濃度が高かつた日は成分によって異なり、Hg, Al, Ca, Fe, Sr, Mn, Ni, Cr については 5 月 26～27 日 Zn は 5 月 9 日～10 日、Pb は 5 月 8 日～9 日に最高濃度を示した。

2. 粉じん中の水溶性成分濃度

ハイボリュームエアサンプラー捕集によって得られた水溶性成分濃度を Fig.3 に示す。黄砂時の水溶性成分濃度の変動範囲は、F⁻: $N, B, < 2.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $2.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Cl⁻: $0.35 \sim 1.69 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $0.91 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、NO₃⁻: $3.91 \sim 17.47 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $5.72 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、SO₄²⁻: $4.5 \sim 27.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $12.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Na⁺: $0.6 \sim 3.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $1.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、NH₄⁺: $1.5 \sim 5.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $3.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、K⁺: $0.4 \sim 1.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $0.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Mg²⁺: $0.2 \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $0.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Ca²⁺: $1.3 \sim 8.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $2.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、Sr²⁺: $N, B, < 0.088 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $0.046 \mu\text{g}/\text{m}^3$) であつた。各水溶性成分濃度が高かつた日は、F⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ は 5 月 26 日～27 日、Cl⁻ は 5 月 27 日～28 日、Na⁺ は 5 月 9 日～10 日であつた。

3. 粒径別浮遊粉じん量

ローボリュームエアサンプラー捕集によって得られた TSP の粒径別粒子量の割合を Fig.4 に示す。割合は各粒径の粒子重量を総粒子重量で除して算出した。その結果、高濃度の TSP が観測された 5 月 26 日～27 日は、粒径 $2.5 \mu\text{m}$ 超の粒子の割合が $2.5 \mu\text{m}$ 以下の粒子に比べて多く 60% であつたのに対し、その他の日では、 $2.5 \mu\text{m}$ 超の粒子の割合は 50% 未満であつた。

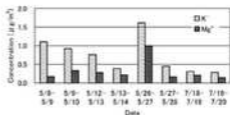
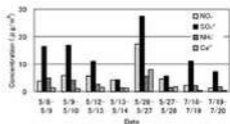
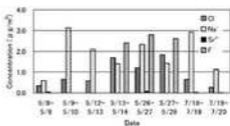


Fig.3 Concentration of water-soluble components during Asian Dust events (5/9-10, 5/12-13, 5/13-14, 5/26-27, 5/27-28) and non Asian Dust events (7/18-19, 7/19-20).

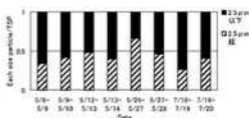


Fig.4 The rate of each size particle in TSP during Asian Dust events (5/9-10, 5/12-13, 5/13-14, 5/26-27, 5/27-28) and non Asian Dust events (7/18-19, 7/19-20).

Table 1 Correlation coefficient between chemical components concentration during Asian Dust events.

	TSP	Al	Ca	Fe	Mg	Mn	Ni	Sr	Zn	Pb	Cr	F	Cl	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	M ⁺	Ca ²⁺	Sr ²⁺	
TSP	1																					
Al	0.87 ^{**}	1																				
Ca	0.96 ^{**}	1.00 ^{**}	1																			
Fe	0.96 ^{**}	0.96 ^{**}	0.95 ^{**}	1																		
Mg	0.96 ^{**}	0.96 ^{**}	1.00 ^{**}	0.95 ^{**}	1																	
Mn	0.96 ^{**}	0.95 ^{**}	0.94 ^{**}	1.00 ^{**}	0.94 ^{**}	1																
Ni	0.94 ^{**}	0.86 ^{**}	0.89 ^{**}	0.96 ^{**}	0.90 ^{**}	0.97 ^{**}	1															
Sr	-0.26	-0.30	-0.30	-0.15	-0.37	-0.12	0.07	1														
Zn	0.56	0.30	0.44	0.49	0.40	0.51	0.58	0.04	1													
Pb	0.56	0.46	0.48	0.63	0.50	0.65	0.81	0.61	0.43	1												
Cr	0.96 ^{**}	0.95 ^{**}	0.95 ^{**}	0.97 ^{**}	0.94 ^{**}	0.97 ^{**}	0.96 ^{**}	-0.13	0.45	0.67	1											
F	0.46	0.62	0.61	0.38	0.56	0.37	0.25	-0.74	-0.12	-0.16	0.51	1										
Cl	0.08	0.26	0.25	-0.02	0.21	-0.04	-0.17	0.02 [*]	-0.27	-0.52	0.10	0.90 ^{**}	1									
NO ₃ ⁻	0.95 ^{**}	0.97 ^{**}	0.97 ^{**}	0.96 ^{**}	0.96 ^{**}	0.97 ^{**}	0.91 ^{**}	-0.32	0.56	0.50	0.97 ^{**}	0.45	0.08	1								
SO ₄ ²⁻	0.97 ^{**}	0.89	0.72	0.85 [*]	0.74	0.87 ^{**}	0.93 ^{**}	0.26	0.75	0.83 ^{**}	0.90	-0.07	-0.45	0.81	1							
Na ⁺	0.35	0.22	0.25	0.28	0.27	0.28	0.19	-0.35	0.75	-0.16	0.13	-0.11	-0.10	0.42	0.38	1						
NH ₄ ⁺	0.63	0.47	0.50	0.69	0.52	0.71	0.83 ^{**}	0.50	0.66	0.93 ^{**}	0.66	-0.29	-0.64	0.59	0.95 ^{**}	0.19	1					
K ⁺	0.63 [*]	0.70	0.72	0.87 ^{**}	0.74	0.86 ^{**}	0.95 ^{**}	0.30	0.65	0.86 ^{**}	0.82 ^{**}	-0.06	-0.46	0.80	0.96 ^{**}	0.25	0.95 ^{**}	1				
M ⁺	0.96 ^{**}	0.95 ^{**}	0.95 ^{**}	0.97 ^{**}	0.95 ^{**}	0.97 ^{**}	0.91 ^{**}	-0.28	0.59	0.50	0.92 ^{**}	0.40	0.04	1.00 ^{**}	0.83 ^{**}	0.46	0.62	0.82 ^{**}	1			
Ca ²⁺	0.96 ^{**}	0.96 ^{**}	0.96 ^{**}	0.96 ^{**}	0.96 ^{**}	0.97 ^{**}	0.92 ^{**}	-0.32	0.45	0.53	0.96 ^{**}	0.54	0.16	0.96 ^{**}	0.78	0.26	0.56	0.77	0.97 ^{**}	1		
Sr ²⁺	0.83 [*]	0.80	0.80	0.89 ^{**}	0.80	0.89 ^{**}	0.95 ^{**}	0.22	0.36	0.88 ^{**}	0.92 ^{**}	0.25	-0.18	0.78	0.84 ^{**}	-0.11	0.81	0.90 ^{**}	0.78	0.83 ^{**}	1	

* : p<0.05 ** : p<0.01

4. 各成分濃度間の相関係数

黄砂時における各成分濃度間の相関係数を Table 1 に示す。黄砂の飛来と各成分濃度との間に相関があるかどうか調べるため、TSP と各成分濃度間の相関係数を算出した結果、TSP と金属成分の Al, Ca, Fe, Mg, Mn, Ni, Cr の間で高い相関が認められた。また、TSP と水溶性成分の SO₄²⁻, NO₃⁻, Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ の間にも高い相関が見られた。

5. 各成分の濃縮係数

黄砂発生源の土壌と黄砂時に捕集した TSP の金属成分の組成の違いを明らかにするため、7 種の金属について黄砂標準試料 (CJ-2) の値¹⁾を元に濃縮係数 (Enrichment Factor:EF) を算出した。この EF は(1)式で算出した。

$$EF = \frac{[X]_{\text{Aerosol}}/[Al]_{\text{Aerosol}}}{[X]_{\text{Reference}}/[Al]_{\text{Reference}}} \quad (1)$$

X は対象元素、[X]_{Aerosol} は試料中の X 成分濃度、[X]_{Reference} は黄砂標準試料 CJ-2 中の X 成分濃度である。Al は地殻中における存在量が金属元素の中で最も多く、地殻の主要構成成分であることから¹⁾、本調査では、Al 濃度を基準として EF を算出した。EF が 1 に近い場合、その対象元素は黄砂起源、1 から大き



Fig.5 Enrichment Factor (EF) of 7 metals. ○:EF when the highest concentration TSP was observed.

く外れた場合は黄砂以外の起源による付加が起こっていると考えられる¹⁾。

Fig.5 に 7 種の金属元素の EF を示し、最高濃度の TSP が観測された 5 月 26 ~ 27 日のデータを○印で示した。これを見ると、Ca, Fe, Mg は EF が比較的 1 に近く、Ni, Zn については EF が 1 から離れており、黄砂以外の起源からの付加が示唆された。尚、Cr, Pb については黄砂標準試料のデータが得られていないため、EF は算出していない。

IV 考察

兵庫県に飛来する黄砂の実態を把握するため、黄砂時のTSPを捕集し、化学分析をおこなった。本調査期間中において最高で $272 \mu\text{g}/\text{m}^3$ のTSP濃度が観測され、黄砂時の平均TSP濃度は $119 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。最高濃度の黄砂時には、TSP量中の粒径 $2.5 \mu\text{m}$ 超の割合が高く、大規模な黄砂時には粗大粒子が多く飛来していることが示された。粒径 $2.5 \mu\text{m}$ 超の粗大粒子には土壌や海塩などの自然起源の粒子、粒径 $2.5 \mu\text{m}$ 以下の微小粒子にはディーゼル排ガスなど燃焼過程から排出される粒子や二次生成粒子が多く含まれていると考えられており⁶⁾、大気汚染物質の黄砂による影響を評価するために、今後は粒径別の成分分析を行うこと及び黄砂標準試料を独自に詳細に分析することで、各成分について由来を明らかにする必要がある。

また、化学分析を行った結果、Al, Caなど7種の金属濃度、 NO_3^- , SO_4^{2-} など6種の水溶性成分濃度について、黄砂時のTSP濃度との間に高い相関性が見られた。この結果から、黄砂の影響によってこれらの成分濃度が上昇したことが示唆された。また、7種の金属についてEFを算出した結果、Ca, Fe, Mgは黄砂起源であり、Ni, Znは黄砂以外の起源による付加が起っていることが考えられた。

V 要旨

兵庫県に飛来する黄砂の実態を把握するため、黄砂時のTSPを捕集し、化学分析をおこなった。最大で $272 \mu\text{g}/\text{m}^3$ のTSP濃度が観測され、黄砂時の平均TSP濃度は $119 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。Al, Caなど7種の金属濃度、 NO_3^- , SO_4^{2-} など6種の水溶性成分濃度について、黄砂

時のTSP濃度との間に高い相関性が見られた。TSPの粒径別捕集を行った結果、高濃度の黄砂時には、粒径 $2.5 \mu\text{m}$ 超の粗大粒子の割合が高くなることが示された。また、EFを算出した結果、Ca, Fe, Mgは黄砂起源であり、Ni, Znは黄砂以外の起源に由来することが示唆された。

文献

- 1) 環境省地球環境局環境保全対策課：黄砂問題検討会報告書 (2005)
- 2) 岩坂泰信：黄砂その謎を追う。p. 49. 紀伊國屋書店 (2006)
- 3) 日置正, 中西貞博, 向井人史, 村野健太郎：日本海沿岸で粒径別連続採取したエアロゾル中の水溶性イオン種および微量元素成分による長距離輸送現象の解析-2002年春季の黄砂イベントを中心に-。エアロゾル研究, **21**, 160-175 (2006)
- 4) 環境庁大気保全局大気規制課：有害大気汚染物質測定方法マニュアル (1997)
- 5) Nishikawa, M., Hao, Q., Morita, M. : Preparation and Evaluation of Certified Reference Materials for Asian Mineral Dust. *Global Environmental Research*, **4**, 103-113 (2000)
- 6) 岩田通午, 吉田大三監修：土の環境圏。p182-183, フジ・テクノシステム, 東京 (1998)
- 7) 成田洋, 宇井剛史, 植松光夫：2001年春季におけるアジア大陸から西部北太平洋への地殻起源元素および人為起源元素の大気輸送。地球化学, **39**, 1-15 (2005)
- 8) 杉山英俊, 斉藤剛：環境大気中における多環芳香族炭化水素の粒径別濃度分布と季節変動。神奈川健康環境科学センター研究報告, **27**, 70-76 (2003)