

Shizuoka-Ken Kankyō Eisei Kagaku
Kenkyūsho Hōkoku 44(2001)
ISSN 1343-246X

静岡県環境衛生科学研究所報告

平成 13 年度

Bulletin
of
Shizuoka Institute of
Environment and Hygiene

No.44 2001

静岡県環境衛生科学研究所

は し が き

当研究所は、県民の生活に密着した環境保全、公衆衛生及び消費生活に関する各種の調査や研究に取り組んでいます。

21世紀は、人類の歴史に重要な意義をもつ「環境の世紀」になるといわれているなかで、今後問題化しそうな課題について県民の安全面からも高精度の機器の導入、組織的な研究体制の充実強化を図っていくとともに、最近の技術の高度化に対応できるよう研究機関相互の共同、連携を深めていく必要があると考えています。

このほど、平成13年度の研究成果がまとまりましたので、静岡県環境衛生科学研究所報告として発行することとなりました。

本編は、4部2支所（微生物部、医薬品生活部、環境科学部、大気・水質部、東部支所、西部支所）による研究の成果であり、その内容は、食品の汚染に関するものから、医薬品、残留農薬、更には大気や地下水の汚染実態の解明など広範囲の調査・研究に及んでおります。

本誌を御高覧の上ご批判、ご意見をいただければ幸いです。

平成14年8月

静岡県環境衛生科学研究所

目 次

論 文

微生物部

- 1 食品や海水からの耐熱性溶血毒 (TDH) 産生腸炎ビブリオ及びビブリオ・
パルニフィカスの検出状況について
.....大畑 克彦, 西尾 智裕, 杉山 寛治
秋山 真人..... 1
- 2 豚盲腸内容物から検出した NV(SRSV) 遺伝子の全ゲノム(塩基配列)の解析
.....杉枝 正明, 佐原 啓二, 稲吉 恵
秋山 真人..... 5
- 3 静岡県で分離された A 型インフルエンザウイルスのアマンタジンに対する
薬剤耐性について
.....佐原 啓二, 杉枝 正明, 稲吉 恵
秋山 真人..... 9
- 4 各種食品における黄色ブドウ球菌エンテロトキシン汚染実態とその検査法に関する研究
.....有田 世乃, 王 暁萌, 川森 文彦
増田 高志, 秋山真人.....13
- 5 浜名湖の麻痺性貝毒原因プランクトンの解析
.....西尾 智裕, 大畑 克彦, 杉山 寛治
秋山 真人, 郷田 淑明, 阿久津哲也
小泉 鏡子.....19
- 6 静岡県における C 型肝炎ウイルス (HCV) の血清疫学的研究
.....稲吉 恵, 佐原 啓二, 杉枝 正明
秋山 真人.....23

医薬品生活部

- 7 医薬品溶出試験の信頼性に関する研究 (第 2 報)
—溶出試験の変動要因に関する検討—
.....小和田和宏, 堀池あずさ, 植田 敦子
藤原 厚子, 山口善三郎, 浮島 美之
馬淵 博.....27
- 8 医薬品溶出試験の信頼性に関する研究 (第 3 報)
—試料の堆積と試料溶液の液性—
.....小和田和宏, 堀池あずさ, 植田 敦子
藤原 厚子, 山口善三郎, 浮島 美之
馬淵 博..... 31

9	院内製剤の品質確保に関する研究 (第一報) —院内製剤ジゴキシン散についての検討—	植田 敦子, 堀池あずさ, 小和田和宏 山口善三郎, 藤原 厚子, 浮島 美之 宮本 憲吾, 鍋田いづみ, 朝倉 侯子 見崎 芳枝	35
10	院内製剤の品質確保に関する研究 (第二報) —ワーファリン散予製剤の含量均一性評価—	堀池あずさ, 小和田和宏, 植田 敦子 山口善三郎, 藤原 厚子, 浮島 美之 宮本 憲吾, 鍋田いづみ, 朝倉 侯子 見崎 芳枝	39
11	農産食品の残留農薬一斉分析法に関する検討	高橋 真, 増田 敦子, 山下 敬子 坂根 弓子, 山口善三郎, 浮島 美之	45
12	いちごに関する調査研究	渡辺 武明, 影山 知子, 菅野 尚子 浮島 美之	51
13	PET ボトル入緑茶飲料の有効成分及び品質保持に関する調査研究 —その1 煎茶浸出液との成分比較—	菅野 尚子, 影山 知子, 渡辺 武明 浮島 美之	57
14	PET ボトル入緑茶飲料の有効成分及び品質保持に関する調査研究 —その2 開栓後の保存性—	菅野 尚子, 影山 知子, 渡辺 武明 浮島 美之	63
15	防腐・防かび・防虫処理等の薬剤処理が行われた廃木材のリサイクルに関する考察	浮島 美之, 古屋 佳宏, 前波 清隆 味岡 嘉輝	67

大気・水質部

16	富士山の大气環境保全のための総合調査	太田良和弘, 篠原英二郎, 鈴木 光彰 永田 嘉七, 池谷 静雄, 前嶋 孝明	75
----	--------------------	--	----

17 排水の臭気指数と水質について	永田 嘉七, 鈴木 光彰, 太田良和弘 篠原英二郎, 池谷 静雄, 前嶋 孝明	81
18 西駿河湾海域における植物プランクトンの変動機構に関する基礎的研究Ⅱ —瀬戸川からの栄養塩の流出負荷に関する研究—	平井 一行	85
19 河川における栄養塩類の流出特性に関する研究	渡辺 稔, 前嶋 孝明	89
東部支所		
20 非イオン界面活性剤分解生成物の生体影響評価 —活性汚泥処理によるノニルフェノールエトキシレートの分解除去—	山下 晶平, 遠藤 満, 深沢 博之	95
西部支所		
21 地下水の要監視項目などによる汚染実態の解明 (第2報)	中島 二夫, 小池 明, 杉浦 秀治 上野 千恵, 志村 修, 西川 雅高	101
他誌に発表した論文		105
学会・研究会の報告		111
表彰等		116

CONTENTS

PAPERS

Department of Microbiology

- 1 Isolation of Thermostable Direct Hemolysin Producing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from Seafoods and Seawater
K.Ohata, T.Nishio, K.Sugiyama
and M.Akiyama 1
- 2 Analysis of Whole Genome (Base Sequence) of Norwalk-like Viruses(SRSV) detected from the Caecum Contents of Pigs
M.Sugieda, K.Sahara, M. Inayoshi
and M. Akiyama 5
- 3 Incidence of Amantadine-resistant Influenza A Virus Isolated in Shizuoka Prefecture
K.Sahara, M.Sugieda, M.Inayoshi
and M. Akiyama 9
- 4 Investigation of Staphylococcal Enterotoxin Contamination in Retail Foods and Examination Method
Y.Arita, Xiao Meng Wang, F.Kawamori,
T.Masuda and M.Akiyama 10
- 5 Analysis of Toxic Dinoflagellata *Alexandrium catenella*, the Cause of Paralytic Shellfish Poison in the Lake Hamana
T. Nishio, K.Ohata, K.Sugiyama,
M.Akiyama, Y.Gohda, T. Akutsu
and K.Koizumi 19
- 6 Seroepidemiological Study on Hepatitis C Virus (HCV) Infection in Shizuoka Prefecture
M.Inayoshi, K.Sahara, M.Sugieda
and M.Akiyama 23

Department of Pharmaceutics and Consumer Science

- 7 Study on the Reliability in Drug Dissolution Test (II)

- Investigation of Variations in Dissolution Test —
 K.Owada, A.Horiike, A.Ueta
 A.Fujiwara, Z. Yamaguchi, Y.Ukishima
 and H.Mabuchi ————— 27
- 8 Study on the Reliability in Drug Dissolution Test (III)
 —Accumulated Sample and Acidity or Alkalinity of Sample Solutions—
 K.Owada, A.Horiike, A.Ueta,
 A.Fujiwara, Z.Yamaguchi, Y.Ukishima
 and H. Mabuchi ————— 31
- 9 Study on Guarantee of Quality for Hospital Preparation (I)
 —[Investigation for Digoxin Powder of Hospital Preparation—
 A.Ueta, A.Horiike, K.Owada,
 Z.Yamaguchi, A.Fujiwara, Y. Ukishima,
 K. Miyamoto, I. Nabeta, K. Asakura
 and Y.Misaki ————— 35
- 10 Study on Guarantee of Quality for Hospital Preparation (II)
 —Evaluation of Content Uniformity for Warfarin Powder—
 A.Horiike, K.Owada, A.Ueta,
 A.Fujiwara, Z.Yamaguchi, Y.Ukishima,
 K.Miyamoto, I.Nabeta, K.Asakura
 and Y.Misaki ————— 39
- 11 Development of Simultaneous Analytical Method for Pesticide Residues
 in Agricultural Products
 M.Takahashi, K. Masuda, T.Yamashita,
 Y.Sakane, Z.Yamaguchi and Y.Ukishima ————— 45
- 12 Studies on Nutrient Substances and Storage Quality of Strawberry
 T.Watanabe, T.Kageyama, N.Kanno
 and Y.Ukishima ————— 51
- 13 Study on Efficacious Contents and Preservation of Plastic Bottled Green Tea (I)

—In Comparison with a Cup of Tea about Ingredient—

N.Kanno, T.Kageyama, T. Watanabe
and Y.Ukishima ----- 57

14 Study on Efficacious Contents and Preservation of Plastic Bottled Green Tea (II)

—Preservation of Opened Drink—

N.Kanno, T.Kageyama, T. Watanabe
and Y.Ukishima ----- 63

15 Study on Recycling of Scraped Wood with which Medicine Processing of
Antiseptics, Antifungal Agents and Insecticides were Performed

Y.Ukishima, Y.Furuya, K.Maenami
and Y.Ajioka ----- 67

Department of Pollution Control

16 Research on Air Pollutants in Mt. Fuji

K.Ohtara, E.Shinohara, M.Suzuki,
K.Nagata, S.Iketani, T.Maejima,
Y.Nakajima and Y.Suzuki ----- 75

17 Study on Odor Index and Water Quality in Waste Water

K.Nagata, M.Suzuki, K.Ohtara,
E.Shinohara, S.Iketani and T.Maejima ----- 81

18 Fundamental Studies on the Changing Mechanism of Phytoplankton
in Western Coastal Region of Suruga Bay (II)

—Studies on the Loads of Nutritive salts running from Seto River—

K.Hirai ----- 85

19 Study on Runoff Characteristics of Nutritive salts in Rivers

M. Watanabe and T. Maejima ----- 89

Eastern Branch

20 Toxicity Evaluation of Degradation Products of Non-ionic Surfactants

—Removal of Nonylphenol Polyethoxylates in Activated Sludge Process—

S.Yamashita, M.Endo and H.Fukasawa ----- 95

Western Branch

21 Survey on Contamination of Metals in Groundwater (II)

T.Nakajima, A.Koike, H.Sugiura,

C.Ueno, O.Shimura and M.Nishikawa

101

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

105

PRESENTATIONS AT CONFERENCES AND/OR SOCIETY MEETINGS

111

COMMENDATION

116

食品や海水からの耐熱性溶血毒 (TDH) 産生腸炎ビブリオ 及びビブリオ・バルニフィカスの検出状況について

微生物部 環境微生物スタッフ 大畑克彦, 西尾智裕, 杉山寛治
秋山真人

Isolation of Thermostable Direct Hemolysin-Producing *Vibrio parahaemolyticus*
and *Vibrio vulnificus* from Seafoods and Seawater

Katsuhiko OHATA, Tomohiro NISHIO, Kanji SUGIYAMA
and Masato AKIYAMA

食品や環境中における耐熱性溶血毒 (TDH) 産生腸炎ビブリオ及びビブリオ・バルニフィカスの分布を明らかにするため、魚介類及び海水を検体として両菌の検出を行ったところ、魚介類 76 検体中アサリ及びアオヤギ各 1 検体計 2 検体 (2.6%) から TDH 産生腸炎ビブリオが検出された。なお非病原性株も含む腸炎ビブリオは 43 検体 (56.6%) から検出され、その汚染菌量は 0.3/g から 93,000/g であった。また、20 検体 (26.3%) の魚介類からビブリオ・バルニフィカスが検出され、その汚染菌量は 0.36/g から 2,000/g で、特に二枚貝であるアサリやアオヤギからは高頻度に検出された。

さらに海水からの腸炎ビブリオ (非病原株) とビブリオ・バルニフィカスの検出においては、採水定点による差が見られた。また両菌の検出にはほぼ同様の傾向があり、それらの検出と海水温には関連性が認められた。

Key words: 耐熱性溶血毒産生腸炎ビブリオ, ビブリオ・バルニフィカス, 魚介類, 海水
TDH-Producing *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, Seafoods, Seawater

はじめに

平成 13 年 6 月食品衛生法施行規則等の一部改正¹⁾が行われ、新たに生食用鮮魚介類等について腸炎ビブリオに関する成分規格が設けられた。そのため食品や環境における腸炎ビブリオの汚染状況を調査すること、なかでも耐熱性溶血毒 (Thermostable direct hemolysin) 産生腸炎ビブリオの汚染実態を把握することは極めて重要となっている。

さらに平成 13 年 8 月、静岡県西部地区において腸炎ビブリオと同属菌であるビブリオ・バルニフィカスの感

染による敗血症により死者が発生した²⁾。また熊本県³⁾や千葉県等においても同様の報告があり、なかには魚介類の生食に起因すると推定された事例もあった。そのため魚介類の生食の機会が特に多い日本においては、腸炎ビブリオ同様本菌の分布や季節的消長の解明が求められている。

材料及び方法

1 材料

平成 13 年 6 月から平成 14 年 3 月において市場等で購入したアサリ 30 検体, アジ 20 検体, アオヤギ 19 検体 (「生食用鮮魚介類」に該当するアオヤギ 3 検体を含む) 及びカキ (加工用又は殻付) 7 検体計 76 検体の魚介類について腸炎ビブリオとビブリオ・バルニフィカスの検出を試みた。

また平成13年6月から平成14年2月にかけて月1回ごと(11月及び1月は未実施)駿河湾内N港沖6定点(A~F)の海水について海水温を測定し、両菌の検出を試みた⁴⁾。

2 方法

魚介類はその25gを細切したものを、海水は約1Lをメンブランフィルターで濾過したフィルターをそれぞれアルカリペプトン水225mlで37℃, 18時間増菌培養後、mCPC(セロビオース・ポリミキシンB・コリスチン)寒天培地及びクロモアガービブリオ寒天培地に塗抹し、37℃, 18時間分離培養した。

またアルカリペプトン水を用いたMPN(最確数)増菌培養法による両菌の菌数測定も実施した。

腸炎ビブリオについてはクロモアガービブリオ寒天培地⁵⁾から、ビブリオ・バルニフィカスはmCPC及びクロモアガービブリオの両寒天培地から各々疑わしい集落を2%NaCl加TSI培地, NaCl(0%及び7%又は8%)加Nutrient Brothに接種して鑑別培養した。さらにビブリオ・バルニフィカスについて発育性状が一致した分離株は、PCR法⁶⁾により本菌に特異的なcytotoxin-hemolysin遺伝子保有の有無を確認して同定した。

なお一部の検体ではスクリーニング検査として増菌培養液を供試し、腸炎ビブリオの場合にはTDH遺伝子保有の有無をビブリオ・バルニフィカスの場合はcytotoxin-hemolysin遺伝子保有の有無を確認した。特にTDH遺伝子陽性と判定された検体については、腸炎ビブリオ抗K6血清を感作させた免疫磁気ビーズで処理後、クロモアガービブリオ寒天培地にて分離培養し、疑わしい集落を神奈川現象培地に接種してその溶血の有無を確認した。

血清型は、腸炎ビブリオでは市販のO及びK血清を用い、ビブリオ・バルニフィカスでは国立感染症研究所分与の01~07の抗血清を使用して型別した。

結果

TDH産生腸炎ビブリオが検出されたのは、魚介類76検体中アサリ1検体及びアオヤギ1検体(「生食用鮮魚介類」には該当せず)計2検体(2.6%) (表1)で、その分離菌株(神奈川現象陽性)の血清型はO3:K6であった。非病原株を含む腸炎ビブリオは43検体(56.6%)から検出され、その内訳はアサリ30検体中18検体(60%), アオヤギ19検体中16検体(84.2%, 「生食用鮮魚介類」3検体を含む), カキ7検体中3検体(42.9%)及びアジ20検体中6検体(30%)であった(表2)。なお、本菌が検出された魚介類43検体における魚介類別平均汚染菌量は、アサリ7,000/g, アオヤギ173/g, カキ94.6/g及びアジ7.5/gであった。また「生食用鮮魚介類」に該当するアオヤギ3検体の平均汚染菌量は0.79/gで、1検体が0.91/g, 2検体がともに0.73/gであった(表3)。

ビブリオ・バルニフィカスは、魚介類76検体中20検体(26.3%)から検出された。その内訳はアサリ30検体中13検体(43.3%), アオヤギ19検体中5検体(26.3%), カキ7検体中1検体(14.3%)及びアジ20検体中1検体(5%)であった。しかし「生食用鮮魚介類」に該当するアオヤギ3検体からは検出されなかった(表1)。本菌が検出された魚介類20検体における魚介類別平均汚染菌量は、アサリでは221/g, アオヤギでは13.4/g, カキ及びアジでは各々2.9/g, 36/gであった(表4)。なお、分離株の血清型はO1, O3, O4A, O6及びUT(型別不能)であった。

駿河湾内N港沖の海水6定点における腸炎ビブリオの月別検出状況は、6月が4定点, 7月が4定点, 8月が1定点, 9月が3定点, 10月が3定点及び12月が4定点において各々本菌が検出され、2月はいずれの定点からも検出されなかった(表5)。なおTDH産生腸炎ビブリオは

表1 TDH産生腸炎ビブリオ及びビブリオ・バルニフィカスの魚介類別検出状況

	TDH産生腸炎ビブリオ	ビブリオ・バルニフィカス
	陽性数/検体数 (%)	陽性数/検体数 (%)
アサリ	1/30 (3.3)	13/30 (43.3)
アオヤギ	1/19 (5.3) (0/3*)	5/19 (26.3) (0/3*)
カキ	0/7 (0)	1/7 (14.3)
アジ	0/20 (0)	1/20 (5)
計	2/76 (2.6)	20/76 (26.3)

* 「生食用鮮魚介類」に該当するアオヤギ

表2 腸炎ビブリオの魚介類別検出状況

	陽性数/検体数 (%)	
アサリ	18/30	(60)
アオヤギ	16/19	(84.2)
	*3/3	(100)
カキ	3/7	(42.9)
アジ	6/20	(30)
計	43/76	(56.6)

*「生食用鮮魚介類」に該当するアオヤギ

表3 腸炎ビブリオの魚介類別平均汚染菌量

	菌量/g	
アサリ	7,000	(0.91~93,000)
アオヤギ	173	(0.3~2,400)
	*0.79	(0.73~0.91)
カキ	94.6	(0.91~240)
アジ	7.5	(0.36~20)

*「生食用鮮魚介類」に該当するアオヤギ

表4 ビブリオ・バルニフィカスの魚介類別平均汚染菌量

	菌量/g	
アサリ	221	(0.91~2,000)
アオヤギ	13.4	(0.36~36)
カキ	2.9	(2.9)
アジ	36	(36)

表5 腸炎ビブリオ及びビブリオ・バルニフィカスの海水における月別検出状況

	陽性数/検体数						
	6月	7月	8月	9月	10月	12月	2月
<i>V. p</i>	4/6	4/6	1/6	3/6	3/6	4/6	0/6
<i>V. v</i>	NT	2/6	1/6	1/6	1/6	0/6	0/6
平均海水温(°C)	20.4	26.7	25.3	25.5	20.5	15.8	10.6

NT: Not Tested *V. p*: 腸炎ビブリオ *V. v*: ビブリオ・バルニフィカス

表6 腸炎ビブリオ及びビブリオ・バルニフィカスの海水における定点別平均汚染菌量

	A	B	C	D	E	F
<i>V. p</i>	1,590/100ml	1,390/100ml	12.9/100ml	30.5/100ml	0.51/100ml	13.3/100ml
<i>V. v</i>	8,300/100ml	250/100ml	<3/100ml	<3/100ml	<3/100ml	<3/100ml

A~F: 海水採取定点 *V. p*: 腸炎ビブリオ, *V. v*: ビブリオ・バルニフィカス

分離されなかった。

またビブリオ・バルニフィカスの検出状況は、7月が2定点、8月が1定点、9月が1定点、10月が1定点において各々陽性であったが、12月及び2月には検出されなかった(表5)。なお、分離菌株の血清型は04A、06及びUTであった。

さらに両菌の海水における6月から2月までの定点別平均汚染菌量は、A及びB定点において腸炎ビブリオは各々1,590/100ml、1,390/100ml、ビブリオ・バルニフィカスは各々8,300/100ml、250/100mlであった。しかし、C定点からF定点における腸炎ビブリオは0.51/

100mlから30.5/100mlの汚染菌量で、ビブリオ・バルニフィカスはいずれも検出限界以下であった(表6)。

なおN港沖海水の月別平均海水温は、6月:20.4°C、7月:26.7°C、8月:25.3°C、9月:25.5°C、10月:20.5°C、12月:15.8°C、2月:10.6°Cだった(表5)。

考 察

腸炎ビブリオに関しては、新たな成分規格として「生食用鮮魚介類」「むき身の生食用かき」「冷凍食品(生食用冷凍鮮魚介類)」において最確数1gあたり100以下と定められた。さらに平成14年6月からは生食用鮮魚介類

の加工基準中、海水の使用に関する規定が施行される¹⁾。今回供試した検体の中には「生食用鮮魚介類」に該当する食品としてアオヤギ3検体が含まれていたが、いずれも成分規格以下の汚染菌量で、TDH 産生菌は検出されなかった。しかし夏季に採取・検査したアサリや「生食用鮮魚介類」に該当しないアオヤギからは病原株であるTDH 産生菌が検出され、さらに腸炎ビブリオ総菌数の多い検体もあったので、貝類のむき身の処理工程時や海水からの「生食用鮮魚介類」等への二次汚染には充分注意する必要がある。なお本菌の分離培地として使用したクロモアガービブリオ寒天は酵素基質培地であるため、培地上の本集落(紫色)が他の集落に影響されにくく、分離が容易であった。今後はさらに優れた検出方法を検討し、特に食中毒発生時の原因食品からTDH 産生菌を分離できるようにするとともに継続してTDH 産生腸炎ビブリオの食品や環境中における汚染実態を把握していきたい。

ビブリオ・バルニフィカスに関しては健康人が感染することはほとんどないとされるが、肝疾患、免疫不全等の慢性基礎疾患を持つ人では敗血症から死に至ることもありうる。今回の調査で魚介類や沿岸海水中に生息していることがあらためてわかり、アジに比較して特に多数の二枚貝から検出されたのは、海水中に生息する本菌を濃縮する形で中腸腺に保菌してしまうためと思われる。特に検出率及び汚染菌量とも高かったアサリは一般的に生食するものではないが、それらの生息海域から採れた他の魚介類の汚染指標にもなりえる。また海水中におけるビブリオ・バルニフィカスの検出状況について、本菌の存在と海水温とは密接に関係があるという報告⁸⁾もあり、今回の検査では海水温が約15℃に下がった12月及びそれ以下になった2月には検出されなかった。さらに腸炎ビブリオとビブリオ・バルニフィカスにおける検出状況や汚染菌量は、海水の採取定点による差が顕著に見られ、すべての海域が一様に汚染されているものではないと考えられた。また両菌の月別検出状況はほぼ同様の傾向が認められた。

今回のデータが示すようにビブリオ・バルニフィカスが増殖した夏場の海水との接触やそれらの海水の汚染を受けた魚介類を生食することにより、夏場に本感染症が多発しているものと思われる。そのため本菌を増殖させないために採取された魚介類は迅速に冷蔵保管及び冷蔵流通させる等の管理が必要である。基礎疾患を抱える人は、本菌が検出される時期にはなるべく魚介類の生食を避け、充分加熱して食べる等の予防策が必要である。静岡県では、腸炎ビブリオによる食中毒防止対策の一環として例年7月から8月にかけて主に保健所による魚介類販売業及び飲食店営業における生食用魚介類取り扱い施

設の監視指導と衛生教育を行っている⁷⁾が、今後はこうした機会を通してビブリオ・バルニフィカスに関する知識の伝達や注意の喚起も望まれる。

今後、年間を通じた魚介類や海水における本菌の詳細な汚染状況の把握、分離菌株の病原性についての検討をしていく予定である。

今回の研究報告にあたり、供試検体である海水を採取してくださった静岡県東部食肉衛生検査所 郷田淑明課長に感謝申し上げます。

本調査の一部は、平成13年度厚生科学特別研究事業により実施した。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬品局食品保健部長：食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について、食発第170号、平成13年6月7日
- 2) 源馬均他：アルコール多飲者に発症し急激な経過を示した *Vibrio vulnificus* 敗血症の1例—静岡県、病原微生物検出情報、22、249-250 (2001)
- 3) 小野友道他：熊本県で発生した *Vibrio vulnificus* 感染症の集積、病原微生物検出情報、22、249 (2001)
- 4) 杉山寛治他：海水・海泥からの耐熱性溶血毒産生腸炎ビブリオの検出、静岡県環境衛生科学研究所報告、42、15-18 (1999)
- 5) 工藤由紀子他：二段階増菌方法および酵素基質培地を用いた腸炎ビブリオの検出方法の検討、第22回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集、34 (2001)
- 6) Hill, W.E. et al.: Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters, Appl. Environ. Microbiol., 57, 707-711 (1991)
- 7) 静岡県健康福祉部：平成13年静岡県の食中毒、平成13年の主要な食中毒防止対策、18-22 (2002)
- 8) 福島博他：日本海へ流出する一河川における *Vibrio vulnificus* の分布とその季節的変動、第22回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集、29 (2001)

豚盲腸内容物から検出したNV(SRSV)遺伝子の全ゲノム(塩基配列)の解析

微生物部 ウイルススタッフ 杉枝正明, 佐原啓二, 稲吉 恵, 秋山真人

Analysis of Whole Genome(Base Sequence) of Norwalk-like Viruses (SRSV)
detected from the Caecum Contents of Pigs

Masaaki SUGIEDA, Keiji SAHARA, Megumi INAYOSHI, and Masato AKIYAMA

我々は1997年にヒトのNorwalk-like viruses(NLVs)のRNAポリメラーゼ遺伝子を検出するプライマーを用いて、RT-PCR法により豚の盲腸内容物中からNLVs遺伝子を検出し、Genogroup IIに属することを報告した。

今回、同じ材料を用いて、前回解析した以降のポリメラーゼ領域(ORF1)の3'末端およびキャプシド領域(ORF2)全体の塩基配列の解析を試み、豚から検出したNLVs遺伝子が既にヒトで報告されているSub-groupsのどこに位置するかを調べた。

2株(Sw43/97, Sw918/97)のORF1の3'末端およびORF2の遺伝子の増幅は、既に決定していた豚の塩基配列から2両域(Forward、Reverse)のプライマーを設定し、逆転写のプライマーはヒトで報告されているORF2領域で比較的变化の少ない部分を選んで設定し、検出を試みた。その結果、豚のNLVsの遺伝子の塩基配列は、ヒトから検出されるNLVsのものとは大きく変化しており、Genogroup IIの独立したSub-groupに位置することが明らかになった。以上の成績から家畜などからのNLVsの検索には豚のNLVsの遺伝子の塩基配列に基づいたプライマーを用いれば、検出率の向上につながることを示唆された。

Key words: NV 遺伝子, 豚盲腸内容物, 全ゲノム, 遺伝子解析

Norwalk-like Virus, Caecum Contents of Pigs, Whole Genome, Genome Analysis

はじめに

小型球形ウイルス(SRSV)は、ヒト以外の哺乳動物からの検出報告例は殆んどなく実態が不明である。SRSVはヒトに食中毒を起こす病原ウイルスの一つとして注目されているが、感染源としての原因食品が特定されず不明で終息するケースが多い。従って食中毒などにおける感染経路、感染源などを追求するための種々の調査研究が求められている。

1997年、我々は既にヒトのNorwalk-like virus(NLVs)のRNAポリメラーゼ遺伝子を検出するプライマーを用いて、ブタの盲腸内容物中にNLVs遺伝子が存在することを確認し、遺伝子解析の結果、

Genogroup IIに属することを報告した。

今回、同じ材料を用いて、前回解析した以降のORF1(ポリメラーゼ領域)の一部およびORF2(キャプシド領域)の遺伝子検出および遺伝子解析を試み、ブタから検出したNLVs遺伝子が既にヒトで報告されているSub-Group中のどこに位置するかを調べた。

材料および方法

検査材料は、ポリメラーゼ領域を増幅するプライマー(NV35/36: 1st, NV81/82, SM 82, Nest)でNLVs遺伝子の検出されたブタ盲腸内容物(1997年採取、-80℃冷凍庫保存)を用いた。また、その検査材料は、前処理後、CTAB法により、RNAを抽出したものをRT-PCR用の試料とした。

遺伝子検出に使用したプライマーは既に決定していたブタの塩基配列から両域のプライマーを設定し、逆転写

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka, 420-8637, Japan)

のプライマーは Hawaii virus, Camberwell virus, Snow Mountain virus, Mexico virus の ORF 2 領域を比較し、比較的变化の少ない部分を選んで設定し、表1に示した以下の各プライマーでの組み合わせで実施した。

ORF1 領域の3'末端は, Sw4811/R5919(1st)・Sw4819/R5383(nest), ORF 2 領域は, Sw5293/R5919(1st)・Sw5335/R5875(nest), Sw5293/R6456(1st)・Sw5335/R6439(nest), Sw6345/R6801(1st)・Sw6351/R6711(nest), Sw5293/R6711(1st)・Sw5335/R5875(nest)を用い、目的とする ORF1 領域および ORF2領域の遺伝子増幅産物を検出した。

また、各プライマーを用いて検出した PCR 産物は、国立公衆衛生院、中島節子博士に依頼した。PCR 産物の塩基配列は T ベクターに組み込んで行われ、全体の塩基配列は各断片をつなぎ合わせて決定する方法で行われた。

表1 プライマーの塩基配列

プライマー	領域	塩基配列
Sw 4811	4550-4569	5'>ctctcaccgacgygrtcca
Sw 4819	4558-4577	5'>cgacgtgatccaggccayt
R5383*	5383-5385	5'>gcataaccatrtacattct
R5404*	5404-5385	5'>acttgcaattcaaadccrcc
Sw5293	5293-5312	5'>atgccccaggtagattttg
Sw5335	5335-5354	5'>atcttaacccttatctttca
R 5875*	5875-5859	5'>ccattttgkkggctgcac
R 5919*	5919-5902	5'>agagttgggtgdgtgccya
Sw5785	5785-5803	5'>ttagatgaactttctaattc
Sw5829	5829-5848	5'>ctgtacacaaatccccatga
R 6439*	6439-6420	5'>cattcctgggggagtagrca
R 6711*	6711-6692	5'>cctatraaagctccagccat
Sw6345	6345-6346	5'>tatccaggagagcagctyct
Sw6351	6351-6370	5'>ggagagcagcttctcttct
R6711*	6711-6692	5'>cctatraaagctccagcca
R6801*	6801-6782	5'>ttttcaaawtcaacttttt

* プライマー番号は Hawaii virus のシークエンスに基づいた(Lew et al.,1994)。

結 果

1 ORF1 領域3'の塩基配列

ORF1 領域3'の493bpの塩基配列の比較を表2に示した。

Sw 43/97, Sw 918/97 は既に報告されているヒト由来の代表株中の Genogroup I および Genogroup II のものと約 60%と約 70%のホモロジーを示した。

2 ORF2領域の塩基配列

既にヒト由来株で報告されている ORF2 領域全体とその3領域における塩基配列を比較し表3に示した。

豚の2株間では、ORF2 領域全体では 87.3%、3領域では 84.9~88.3%のホモロジーを示した。

ヒト由来株との比較では、ORF2 領域の1~921, 1312~1644 番目で約 60~70%, 922~1311 番目では約 50%のホモロジーであった。

表3 ORF2 領域の塩基配列の比較

株	ORF2			
	全領域 (1~1644)	区分1 (1~921)	区分2 (922~1311)	区分3 (1312~1644)
Sw43	100	100	100	100
Sw918	87.3	88.3	84.9	87.7
Mexico	67.2	68.4	59.5	72.1
Leeds	65.1	68.2	57.5	69.0
SMV	64.7	70.8	56.8	65.5
Hilling	66.1	70.0	57.7	67.6
Wortley	64.2	69.4	55.3	65.4
Hawaii	65.5	70.7	57.0	67.6
Seacrof	65.7	71.1	55.0	67.8
Lordsde	64.7	69.5	55.6	67.0
Va9720	64.3	69.0	56.5	65.1

ORF2 全体の塩基配列

Sw43, Sw918(1644), Mexico(1647), Leeds(1623), SMV(1629), Hillingdom (1623), Wortley (1608), Hawaii(1608), Seacroft (1653), Lordsdeale (1620), Va97207(1614)

考 察

1997年、我々は豚の盲腸内容物について、ヒトの NLVs 遺伝子を検出するRNAポリメラーゼ部分のプライマーを用いてRT-PCRを行い、肥育用の健康豚、1117 検体中4検体からNLVs 遺伝子を検出し、PCR 産物292bpの塩基配列の解析結果から、それらがNLVs 遺伝子の Genogroup II に属することを報告してきた^{1,2)}。最近、我々以外にもオランダの Poelら³⁾も豚、牛からのヒト型のNLVs 遺伝子の検出を試み、我々と同様な検出成績であったことを報告し、NLVs の病原体保有動物である可能性を示唆している。

今回、1997年既にNLVs の確認された材料を用い前回

表2 ORF1領域3'の塩基配列の比較

株	1a	1b	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1a Sw 43/97	100	96	78	80	80	79	82	84	70	67	68	65	67
1b Sw918/97	89	100	78	80	80	79	81	84	70	67	70	66	67
2 Mexico/89 *	72	72	100	90	88	89	88	79	61	62	61	59	58
3 Hawaii/72 *	73	74	77	100	98	98	95	80	67	66	66	63	65
4 Lordsdale/93*	72	73	78	87	100	96	93	80	66	65	65	63	65
5 Arg320RN*	73	73	78	85	85	100	94	71	66	65	65	63	65
6 MOH/99*	73	72	80	82	81	82	100	73	67	67	67	63	65
7 VA97207 *	73	74	71	71	72	79	81	100	65	65	67	62	62
8 Norwalk/68 **	64	64	61	63	62	61	63	61	100	89	92	81	83
9 Queen'sArms**	62	62	60	63	62	61	62	61	78	100	91	82	82
10 Southampton**	62	63	64	64	66	64	65	60	78	75	100	82	81
11 Desertshield **	62	61	63	64	64	61	62	62	72	75	74	100	95
12 VA98115/98 **	62	64	61	64	64	63	63	61	73	73	74	82	100

核酸\アミノ酸, *: Genogroup II, **: Genogroup I

解析した以降のポリメラーゼ領域とキャプシド領域全体の遺伝子検出を試み、その遺伝子産物の塩基配列を決定し、豚のNLVs遺伝子が既にヒトで報告されている遺伝子のどこに位置するかを調べた。その結果、ORF1領域3'の493bpの塩基配列で、既にヒトで報告されているGenogroup Iに属するNorwalk/68/US, Queen'Arms/Leeds/97, Southampton/91/UK, DesertShield395/90/US, VA98115/98/UKに約60%のホモロジーを示し、Mexico/89/Mex, Hawaii/71/US, Lordsdale/93/UK, Arg320RN/Arg, MOA/99/Hun, VA97207/97/USのGenogroup IIとは約70%のホモロジーを示し、Genogroup IIに位置していることが確認された。また、ORF2領域全体の塩基配列は既にGreenら⁴⁾がヒトで報告しているGenogroup IIのSub-groupsのどこに位置するかを調べるため代表株と比較すると、各代表株の922~1311番目に特異的なギャップが多数存在するためこの領域でのホモロジーは約50%と低かったが、他の領域では約60%であった。

系統樹による解析については表記していないが、Greenらがヒトで報告しているGenogroup Iの7つのSub-groups, Genogroup IIの8つSub-groupsとは独立したSub-groupに位置していることが見出され、ヒト由来とは異なることが示唆された。

現在、NLVsはヒト以外からの動物での検出報告例

現在、NLVsはヒト以外からの動物での検出報告例は少なく、その詳細も把握されていないが、今回の調査成績から得られた遺伝子の塩基配列に基づいたプライマーを使用することにより家畜などのNLVsの病原体、

保有の検索に有用であるものと思われる。

まとめ

1997年、豚の盲腸内容物についてヒトのNLVs遺伝子を検出するRNAポリメラーゼ部分のプライマーを用いてRT-PCRを行い、1117検体中4検体からNLVs遺伝子を検出し、塩基配列の解析結果から、それらがNLVsのGenogroup IIに属することを報告した。今回、そのうちの2サンプルについて前回解析した以降のポリメラーゼ領域とキャプシド領域の遺伝子検出を試み、以下の結果を得た。

- 1) 豚のNLVsの遺伝子の塩基配列は、ヒトから検出されるNLVs遺伝子のものとは相当変化していることが確認された。
- 2) 豚のNLVsの遺伝子は、ヒトで既に報告されているGenogroup IIのSub-groupsとは別の位置に独立していた。
- 3) 豚のNLVs遺伝子の塩基配列に基づいたプライマー使用が家畜などのNLVsの保有状況を把握するのに有用と思われた。

謝辞

本調査を実施するにあたり、遺伝子情報の提供および遺伝子解析を実施していただいた国立公衆衛生院の中島節子博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Sugieda, M. et al, :Detectin of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *arch virol.*, **143**, 1215-1221(1998)
- 2) 杉枝正明他:第 49 回日本ウイルス学会抄録集. 大阪 (2001)
- 3) Poel, WHM. et al, :Norwalk-like Calicivirus Genes in Farm Animals. *Emerg Infect Dis.*, **6:1**, 36-41(2000)
- 4) Green, G. at al, :Capsid Protein Diversity among Norwalk-like Viruses., *Virus Genes.*, **20:3**, 227-236(2000)

静岡県で分離された A 型インフルエンザウイルスの アマンタジンに対する薬剤耐性について

微生物部 ウイルススタッフ 佐原啓二, 杉枝正明, 稲吉 恵
秋山真人

Incidence of Amantadine-resistant Influenza A Virus
Isolated in Shizuoka Prefecture

Keiji SAHARA, Masaaki SUGIEDA, Megumi INAYOSHI,
and Masato AKIYAMA

1998年11月以降抗インフルエンザ薬として処方量が急増したアマンタジンに対して薬剤耐性を獲得したA型インフルエンザウイルスの出現, 流行が懸念されるため, 1999/2000シーズンから2001/2002シーズンに当研究所で分離したA型インフルエンザウイルス株について, アマンタジン感受性試験を行った. その結果, 126株中2株(1.6%)がアマンタジン耐性株と判定された. この2株はM2蛋白質膜通過部位の26番目または30番目のアミノ酸が変異しており, 遺伝子解析からもアマンタジン耐性株と確認された. 耐性株の2株は, 2000年1月末から2月上旬にA病院において採取された乳幼児の咽頭拭い液から分離したA香港型ウイルスで, 両症例とも塩酸アマンタジンとして5mg/kg/日を4日間内服していたことから, 両症例は耐性株に感染したのではなく, アマンタジン服用により耐性株が出現したと考えられた. 以上より, アマンタジンの処方量が急増した1999/2000シーズンから2001/2002シーズンまでの間, 静岡県内においてアマンタジンに対して耐性を獲得したインフルエンザウイルスの大量発生は確認されず, 耐性株の流行は起きていないと推察された.

Key words: アマンタジン, インフルエンザウイルス, 薬剤耐性
Amantadine, Influenza Virus, Drug Resistance

はじめに

アマンタジンは, 国内では1975年より抗パーキンソン薬, 脳梗塞後遺症治療薬として使用されてきたが, 1998年11月A型インフルエンザに対する効能・効果が追加され, 臨床の場では1999/2000シーズン以降, A型インフルエンザの予防・治療薬として処方量が急増した. しかしながら, A型インフルエンザウイルスはアマンタジンに対する耐性を獲得しやすく, アマンタジン耐性株の大量発生とその伝播が危惧されている¹⁾²⁾が, 国内ではアマンタジンの処方量が多い割には調査報告が少なく, その実態は不明な部分が多いのが現状である.

そこで, 本研究では静岡県内においてアマンタジン耐性株の流行状況を調べるため, 静岡県内のインフルエンザ患者から分離されたA型インフルエンザウイルス株について, アマンタジンに対する薬剤耐性の有無を調べた. また, 耐性株の検出された症例については, 病院の協力を得てアマンタジンの服用状況について調査した.

材料および方法

1 供試ウイルス株

1999年10月~2002年2月に県内の感染症発生動向調査の定点医療機関を受診した散発患者および学校集団かぜ患者から得られた咽頭拭い液またはうがい液を検体として, 当研究所でMDCK細胞により分離したインフルエンザウイルス169株のうち, 試験可能であった126株(Aソ連型63株, A香港型63株)について, アマンタジン感受性試験を行った. 供試ウイルス株のシーズン別では,

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka 420-8637, Japan)

表1 供試ウイルス株の月別検出状況 (1999/2000~2001/2002 シーズン)

ウイルス型 (亜型)	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
A(H1)型	0	0	1	43	14	5	63
A(H3)型	2	1	6	41	12	1	63
計	2	1	7	84	26	6	126

表2 供試ウイルス株の年齢別検出状況 (1999/2000~2001/2002 シーズン)

ウイルス型 (亜型)	年齢区分								計
	0-4	5-9	10-14	15-19	20-29	30-39	40-49	>50	
A(H1)型	18	20	14	0	5	4	1	1	63
A(H3)型	16	14	13	1	5	5	7	2	63
計	34	34	27	1	10	9	8	3	126

1999/2000 シーズン 62 株, 2000/2001 シーズン 12 株および 2001/2002 シーズン 52 株であり, 月別では 1 月~2 月を中心に 10 月~3 月までの期間に分離した株を用いた (表 1). 年齢別では学童や乳幼児を中心に 0 歳~76 歳の症例から分離した株であった (表 2).

2 アマンタジン感受性試験

96 ウェルプレートに単層培養した MDCK 細胞の培養液に塩酸アマンタジン $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ を添加したプレートと無添加プレートの各々に -80°C で保存された分離株の原液 $\sim 10^{-7}$ 希釈液 $50 \mu\text{l}$ を接種し, 35°C で 1 週間培養して細胞変性効果 (CPE) を観察すると共に, 培養上清の七面鳥赤血球またはモルモット赤血球に対する赤血球凝集 (HA) 活性の有無を調べて, 分離株の 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) を求めた.

塩酸アマンタジン添加により, TCID₅₀ が 10^{-1} 以上減少したものをアマンタジン感受性株, 10^{-1} 未満のものを耐性株と推定した. アマンタジン耐性株と推定された株については, ブラック法により作製したクローニングウイルスを用いた再試験においても TCID₅₀ の減少が 10^{-1} 未満のウイルスを耐性株と判定した.

3 遺伝子解析

耐性株と判定した株は, グアニジウムフェノール法 (Isogen-LS, ニッポンジーン) により RNA 抽出後, プライマーとして M2 蛋白質コード領域をカバーする 2 セット, 5' >GGACTCATCTAGCTCCAGT<3' (684-703) (M3F) および 5' >GTAGAACAAGGTAGTTTTT<3' (1026-1007) (M4R) を用いて前報³⁾のとおり RT 反応および PCR を実施した. 塩基配

列は蛍光自動シーケンサー (ABI PRISM™310, アプライドバイオシステムズ) を用いて PCR 産物から直接決定し, M2 蛋白質のアミノ酸配列を推定した.

結 果

1 アマンタジン耐性株の検出

アマンタジン感受性試験において, 126 株中 124 株が塩酸アマンタジン添加により TCID₅₀ が 10^{-1} 以上減少し, アマンタジン感受性株と推定された. 2 株 (1.6%) については, ブラック純化したウイルスについても TCID₅₀ の減少が 10^{-1} 未満となり, アマンタジン耐性株と判定された (表 3). 耐性株と判定された株は, いずれも A 香港型ウイルス (A/静岡/151/2000 および A/静岡/176/2000) で, この 2 株の抗原解析では抗 A/シドニー/05/97 (H3N2) 血清に対する HI 価が 640~1280 (ホモ価 1280) を示し, アマンタジン感受性株との違いは認められなかった.

2 アマンタジン耐性株の検出された症例

耐性株の検出された 2 症例は, 2000 年 1 月末から 2 月上旬に A 病院に入院中の乳幼児であった. 症例 1 は 2 歳 1 ヶ月齢女児, 症例 2 は 1 歳 5 ヶ月齢の男児で, 両症例とも第 2 病日から第 6 病日まで塩酸アマンタジンとして 1 日当り $5\text{mg}/\text{kg}$ を 4 日間内服していた. 症例 1 は第 6 病日に採取された咽頭拭い液から耐性株が分離された. 症例 2 は第 7・8 病日に一旦解熱し, 再発熱した第 9 病日に採取された咽頭拭い液から耐性株が分離された. (表 4).

3 アマンタジン耐性株の遺伝子解析

今回の調査で耐性株と判定された 2 株については, M2

表3 インフルエンザウイルス分離株のアマンタジン感受性試験結果

ウイルス型 (亜型)	TCID ₅₀ 減少度						計
	<10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
A(H1)型	0	11	32	16	2	2	63
A(H3)型	2	14	28	16	3	0	63
計	2*	25	60	32	5	2	126

* : アマンタジン耐性株

表4 アマンタジン耐性株の分離された症例の臨床経過

症例	病 日										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
No. 1	体温(°C)	39	39	37	36	38	37				
	AM投薬		○	○	○	○	○				
	耐性株分離						+				
No. 2	体温(°C)	39	高熱	高熱	高熱	36	39	37	37	40	38
	AM投薬		○	○	○	○	○				
	耐性株分離									+	

○ : 塩酸アマンタジンとして 5mg/Kg/day を内服

表5 アマンタジン耐性株における M2 蛋白質の変異箇所

部位	アミノ酸変異	塩基配列変異
26	Leu ¹⁾ → Phe	GTT → TTT
27	Val → Ala	GTT → GCT
	Val → Gly	GTT → GGT
	Val → Asp	GTT → GAT
30	Ala → Val	GCG → GTG
	Ala ²⁾ → Thr	GCG → ACG
31	Ser → Asn	AGT → AAT
	Ser → Arg	AGT → CGT
34	Gly → Glu	GGG → GAG

1) : A/静岡/151/2000 (H3)

2) : A/静岡/176/2000 (H3)

蛋白膜通過部位の遺伝子解析を行ったところ、A/静岡/151/2000が26番目のアミノ酸がロイシンからフェニルアラニンに、A/静岡/176/2000が30番目のアミノ酸がアラニンからスレオニンに変異しており、遺伝子解析の結果からも耐性株であることが確認された(表5)。

考 察

アマンタジンをインフルエンザウイルス感染症の治療薬として使用実績の長い欧米での調査によると、治療患者の約30%に耐性株が出現するとされているが、最近の調査によると流行株の中に存在する耐性株の出現頻度は2,017株中16株(0.8%)と報告されている⁹⁾。一方、国内における調査では、抗パーキンソン薬としてアマンタジンが常用されている新潟県内高齢者施設での報告⁹⁾があるが、全国的な実態は明らかでない。今回の調査で、静岡県内における散発の乳幼児患者からアマンタジン耐性株の存在が初めて確認された。また、その検出頻度は126株中2株(1.6%)であり、欧米での報告と比較して高い検出頻度であった。これは、国内でのアマンタジンの処方量が多いことに起因しているものと考えられる。

アマンタジン耐性株の出現機序としては、野外のウイルス中に少数ながら混在していた耐性株が、アマンタジン内服により耐性株のみが選別されて出現するとされている。今回アマンタジン耐性株の検出された症例は、いずれも塩酸アマンタジンとして5mg/kg/日を4日間内服していた。この調査結果から、これら2症例は耐性株に感

染したのではなく、アマンタジン服用により耐性株が出現したと考えられた。また、アマンタジンの処方量が急増した 1999/2000 シーズンから 2001/2002 シーズンまでの間、静岡県内においてアマンタジンに対する耐性のインフルエンザウイルスの大量発生は確認されず、懸念された耐性株の流行は起きていないと推察された。

今回耐性株と判定された株の M2 蛋白質膜通過部位の遺伝子解析では、A/静岡/151/2000 の 26 番目がロイシンからフェニルアラニンに、A/静岡/176/2000 の 30 番目がアラニンからスレオニンに変異していた。耐性株の M2 蛋白質のアミノ酸変異箇所は、26, 27, 30, 31 または 34 番目とされ⁶⁾⁷⁾、国内の調査では 27, 30 または 31 番目変異の存在が明らかにされている⁸⁾⁹⁾。今回、国内にも 26 番目のアミノ酸変異のある株が存在することが初めて明らかにされた。

2001 年には抗インフルエンザ薬として、国内で新たにノイラミダーゼ阻害薬が承認された。本薬剤は A 型ウイルス感染のみならず B 型ウイルス感染にも効果があり、アマンタジンと比較して耐性ウイルスの出現頻度が大幅に低いとされている。このことから、今後臨床の場ではノイラミダーゼ阻害薬の使用が主体となり、アマンタジンの処方量は減少することが予想されるが、薬価の問題、需要と供給のバランス等により、今後もアマンタジンは抗インフルエンザ薬の選択肢の一つとして存続するものと考えられる。本研究の成果により、アマンタジン耐性株の出現状況がほぼ明らかとなったので、今後も継続した調査の必要性はないと思われるが、アマンタジン処方量の変化などの状況に応じて耐性株の出現状況を調査する必要があると思われる。

謝 辞

遺伝子解析を実施して頂いた国立公衆衛生院中島節子分子疫学室長ならびに臨床データを提供して頂いた県立総合病院小児科上野山裕巳医長に感謝します。

文 献

- 1) Hayden, F. G. et al.: Emergence and apparent transmission of rimantadine resistant influenza A virus in families, *N. Engl. J. Med.*, **321**, 1696-1702 (1989)
- 2) Mast, E. E. et al.: Emergence and possible transmission of amantadine-resistant viruses during nursing home outbreaks of influenza A (H3N2), *Am. J. Epidemiol.*, **134**, 988-997 (1991)
- 3) 佐原啓二他: 静岡県で 1998 年の非流行期と次期流行シーズンに分離された B/Victoria/2/87 系統に属する B 型インフルエンザウイルスの疫学的解析, *感染症誌*, **74**, 481-485 (2000)
- 4) Ziegler, T. et al.: Low incidence of rimantadine resistance in field isolates of influenza A virus, *J. Infect. Dis.*, **180**, 935-939 (1999)
- 5) 斎藤玲子他: 新潟県内高齢者施設における A 型インフルエンザウイルスのアマンタジン耐性株 (Ser-31-Asn 遺伝子型, genotype) の出現頻度, *感染症誌*, **74**, 646-652 (2000)
- 6) Belshe, R. B. et al.: Genetic basis of resistance to rimantadine emerging during treatment of influenza virus infection, *J. Virol.*, **62**, 1508-1512 (1988)
- 7) Hay, A. J. et al.: The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine, *E. M. B. O. J.*, **4**, 3021-3024 (1985)
- 8) 増田寛樹他: A 型インフルエンザウイルスのアマンタジンに対する薬剤耐性株の出現頻度, 第 47 回日本ウイルス学会学術集会, 253 (1999)
- 9) 斎藤玲子他: 小児 A 型インフルエンザ感染に対するアマンタジン治療の検討, 特に耐性株に注目して, 第 48 回日本ウイルス学会学術集会, 109 (1999)

各種食品における黄色ブドウ球菌エンテロトキシン 汚染実態とその検査法に関する研究

微生物部 食品微生物スタッフ 有田世乃, 王 曉萌, 川森文彦
増田高志, 秋山真人

Investigation of Staphylococcal Enterotoxin Contamination
in Retail Foods and Examination Method

Yono ARITA, Xiao Meng WANG, Fumihiko KAWAMORI,
Takashi MASUDA and Masato AKIYAMA

県内の乳処理施設で採取した生乳およびおにぎりを中心とした市販食品について、黄色ブドウ球菌(以下 SA)、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン(以下、SE)を中心に各種細菌の検査を行った。生乳の直接検査ではいずれも SE は検出されなかったが、培養検査で 36/50 (72%) から SA が検出され、このうちの 14 検体 (28%) で SE 産生性を認めた。また市販食品では、13/54 検体 (24%) から増菌培養により SA が検出され、このうち 12 検体 (22%) で SE 産生性を認めた。一方、牛乳から SE を検出する方法として、大阪府立公衆衛生研究所法¹⁾(カゼイン・脂肪除去→脱塩→濃縮→ラテックス凝集反応、以下、大阪法)、濾過遠心法(カゼイン・脂肪除去→濾過遠心→ラテックス凝集反応)、VIDAS 法(酵素免疫測定法:ELISA)等を用いて検出感度の比較を行ったところ、いずれも食中毒の検査に有効と思われる検出感度(0.25ng/ml)を示し、さらにトリクロロ酢酸(TCA)による抽出・濃縮法(以下、TCA 法)により添加回収試験を行ったところ、大阪法より良好な結果が得られ、迅速で簡便な SE 抽出・濃縮法として有効であると思われる。

Key Words : 黄色ブドウ球菌汚染, 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン, TCA による抽出・濃縮法

Staphylococcus aureus contamination, staphylococcal enterotoxin,
extraction and concentration method by use of trichloroacetic acid

はじめに

2000 年 6~7 月にかけて、大阪市の乳処理工場で製造された低脂肪乳等を原因とする大規模 SA 食中毒が発生し、牛乳等の衛生管理と安全性確認が全国的な急務となった。これまで国内では牛乳や乳製品を原因とする SA 食中毒事例はほとんどなく、牛乳等からの SE 検出法もあまり検討されていなかった。そこで、乳製品等の衛生管理の向上と食中毒の防止に役立てるため、県内に流通している牛乳の原料となる生乳の SA 及び SE、市販食品の SA 汚染実態を調査した。また、牛乳からの SE 検出法と

して大阪法が考案されたが、この方法はやや煩雑で長時間を要する。そこで、我々は前処理方法の検討や市販の SE 検出キットとの検出感度の比較を行った。また、古くからタンパク質の沈澱剤として用いられてきた TCA による抽出・濃縮法では特殊な機器も不要で、さらに迅速かつ簡易であることから、この方法の有用性についても検討したので、その概要を報告する。

材料および方法

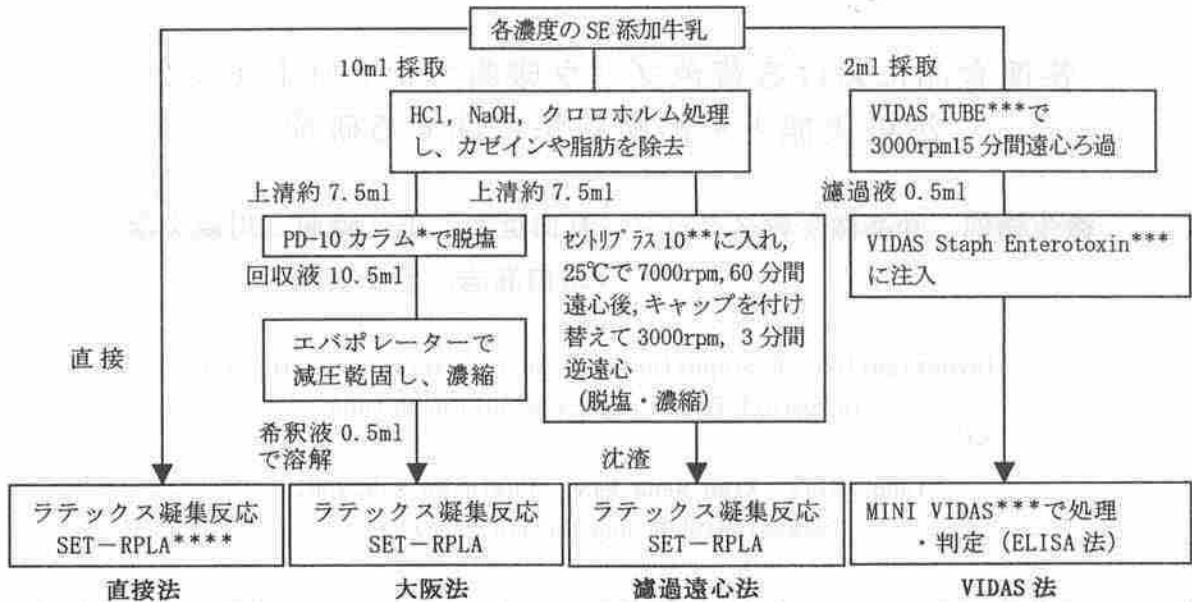
1 汚染実態調査

2001 年 6 月~9 月に県内(伊豆大仁, 富士宮, 富士)および県外(秋田, 山梨, 長野)の生産地で集乳し、乳処理施設に搬入された生乳(合乳, 個乳)50 検体を供試した。一般生菌数はスパイラル・プレーター(グンゼ産業)による表面塗抹法で行い、レーザーコロニーカウンター

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka 420-8637, Japan)



* PD10 カラム : アマシャムファルマシア ** セントリプラス 10 (分画分子量 10,000) : millipore
 *** VIDAS TUBE, VIDAS Staph Enterotoxin, MINI VIDAS : bioMerieux
 **** SET-RPLA : デンカ生研

図 1 SE 検出法

で菌数を測定した。大腸菌群数はリン酸緩衝液 (以下, PBS) で検体の 10 倍段階希釈を 3 段階作り, それぞれの希釈液 1ml にデソキシコレート寒天培地を 20ml 加えて混釈し, 35~37°C, 18~24 時間培養後に菌数を測定した。SA 数はコンラージ法により, 原乳及び PBS による 10 倍希釈液を 100 μ l ずつを卵黄加マンニット食塩培地, ペアードパーカー培地に塗抹後, 35°C~37°C, 48 時間培養し卵黄反応陽性の SA の典型的コロニー数を測定した。また, これらのコロニーは純培養後 PS ラテックス (栄研) により SA であることを確認した。牛乳からの直接 SE 検出には VIDAS 法 (図 1) を用いた。また, セレウス菌, エルシニア, リステリアの検査は食品衛生検査指針²⁾, 病原性大腸菌 0157 および 026 の検査は腸管出血性大腸菌 0157 の検査法³⁾ に準じて行った。なお, 026 分離では添加剤をソルビトールからラムノースに代えた CT-RMAC 培地を選択分離培地として使用した。

また, 県内東部, 中部, 西部のコンビニエンスストア及びスーパーマーケットの市販食品 54 検体 (おにぎり 33, 寿司 3, 焼きそば 4, 和菓子 3, 惣菜・サラダ 11) を供試した。一般生菌数, 大腸菌群数は生乳と同様に, SA の検査は食品衛生検査指針²⁾ に準じて行った。なお, SA 検査は食品の 10 倍乳剤の直接培養と増菌培養を行った。

2 SE 検出法の検討

1) 各種 SE 検出法の比較

市販牛乳 (乳脂肪分 3.6%, 無脂乳固形分 8.4%) に精製 A 型 SE (Toxin Technology, 以下 SEA) をそれぞれ

4, 2, 1, 0.5, 0.25 および 0.125ng/ml になるように添加し試験に用いた。これらの牛乳からの SE 検出は, 図 1 に示した 4 種類の方法 (直接法, 大阪法, 濾過遠心法, VIDAS 法) で行った。

2) TCA 法と大阪法による SE 回収試験

- ① 試料: 市販牛乳 (乳脂肪分 4.2%, 無脂乳固形分 8.9%)
- ② 標準直線の作成: 試料の牛乳を TCA 法 (図 2) および大阪法で抽出・濃縮した濃縮液に SEA を一定量 (0~1ng/ml) 添加し, VIDAS Staph Enterotoxin (bioMerieux, 以下 VIDAS), Transia Plate (MERCK, 以下 TP), SET-RPLA (デ

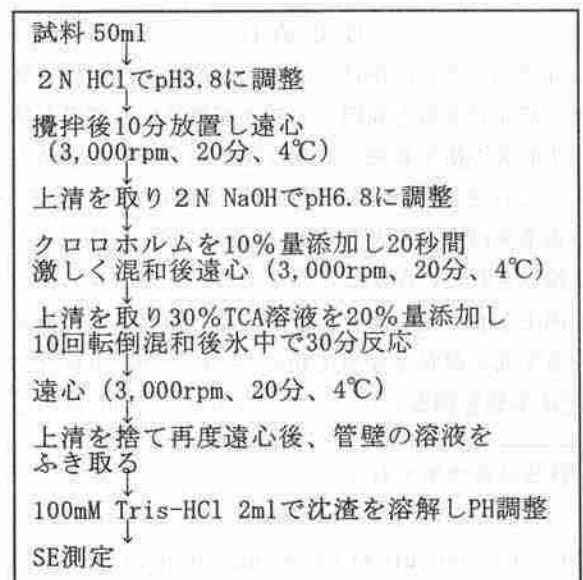


図 2 TCA 法

表1 生乳のSA検出状況

検体数	SA陽性数 (%)	SA菌数 (CFU/ml)				
		0	<10	10 ¹	10 ²	10 ³
50	36 (72)	14	1	17	13	5

表2 生乳の一般生菌数および大腸菌群数

検体数	一般生菌数 (CFU/ml)					
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
50	3	6	9	18	6	8

表3 生乳からの各菌の検出状況

検体数	各菌の陽性検体数 (%)			
	セリウス菌	エルシニア	リステリア	<i>E. coli</i> 0157, 026
50	4* (8)	1 (2)	3 (6)	0 (0)

* エンテロトキシン産生株は3検体

大腸菌群数 (CFU/ml)					
0	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
9	8	17	10	3	3

表4 市販食品のSA検出状況, 一般生菌数および大腸菌群数

食品	検査件数	SA陽性数 (増菌)	一般生菌数 (CFU/g)					大腸菌群数 (CFU/g)			
			<10	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	0	10 ¹	10 ²
おにぎり	33	9	8		15	5	4	1	31	2	
寿司	3				1	1	1		3		
焼きそば	4	1	2			1	1		4		
和菓子	3	1	2			1			3		
そうざい	8	2	1	1	1	2	3		7		1
サラダ	3					3			3		
計	54	13 (24%)	13	1	17	13	9	1	51	2	1

ンカ生研, 以下 RPLA) の各キットを用いて測定し, VIDAS と TP では標準直線を作成した。

③SEの抽出・濃縮: 試料の牛乳にSEAを添加(0.02, 0.04, 0.1ng/ml)し, TCA法と大阪法でSEを抽出・濃縮後各キットにより測定し, VIDAS, TPではSE標準直線から, RPLAでは凝集像からSE回収率を算出した。

3) 各種乳製品でのTCA法によるSE回収率の比較

①試料: 牛乳(乳脂肪分4.2%、無脂乳固形分8.9%), 低脂肪乳(同, 各1%, 10%), 脱脂粉乳(100gあたり脂質52.4g, 蛋白質34.8g), ヨーグルト(乳脂肪分3g, 無脂乳固形分3.5g), クリームチーズ(同, 各30g, 6.3g)を用いた。なお脱脂粉乳, ヨーグルト, クリームチーズについては滅菌蒸留水で10倍乳剤を作製し試験に供した。

②SEの抽出・濃縮: 各検体にSEAを添加(0.04ng/ml)し, TCA法でSEを抽出・濃縮後, 各キットにより測定し, SE標準直線等からSE回収率を算出した。

結果

1 汚染実態調査

SEは生乳の直接検査(VIDAS法)ではいずれからも検出されなかったが, 培養検査ではSAが36検体(72%)から検出され, 菌数は1~10³CFU/mlの範囲であった(表1)。このうちRPLAでSE産生のあったSAは14検体(28%)で, SE型の内訳はA型1検体, AおよびB型1検体, B型10検体, D型2検体であった。一般生菌数は10¹~10⁶CFU/mlで県内・県外産共に平均10⁵CFU/mlであった。

一方, 大腸菌群数は10¹~10⁵CFU/mlで平均10⁴CFU/ml, 41検体(82%)から検出された(表2)。その他の菌種の検出状況は表3のとおりであった。

おにぎりを主とした市販食品の検査では, SAは直接培養では1検体(10¹CFU/ml), 増菌培養で13検体(24.1%)から検出され, RPLAで12検体がSE(A型1, B型11)産生株であった。しかし, 今回SAが検出された検体のほとんどは同一店舗で製造されたものであった。また, 一般生菌数は平均10⁴CFU/ml, 大腸菌群数は10¹~10²CFU/mlで3検体(おにぎり2, そうざい1)から検出された(表4)。

2 SE検出法の検討

1) 各種SE検出法の比較

直接法では低濃度SEの検出が困難であったが, 大阪法および濾過遠心法ではどちらもRPLAで0.25ng/mlの検

表5 SE検出法の比較

添加量 ng/ml	直接法	大阪法	濾過遠心法	VIDAS法 (陽性 ≥ 0.13)
4	+(原液)	+(16倍)	+(4倍)	+(2.05)
2	-	+(8倍)	+(2倍)	+(1.16)
1	-	+(4倍)	+(原液)	+(0.59)
0.5	-	+(原液)	+(原液)	+(0.29)
0.25	-	+(原液)	+(原液)	+(0.14)
0.125	-	-	-	-(0.08)
陰性対照	-	-	-	-(0.01)

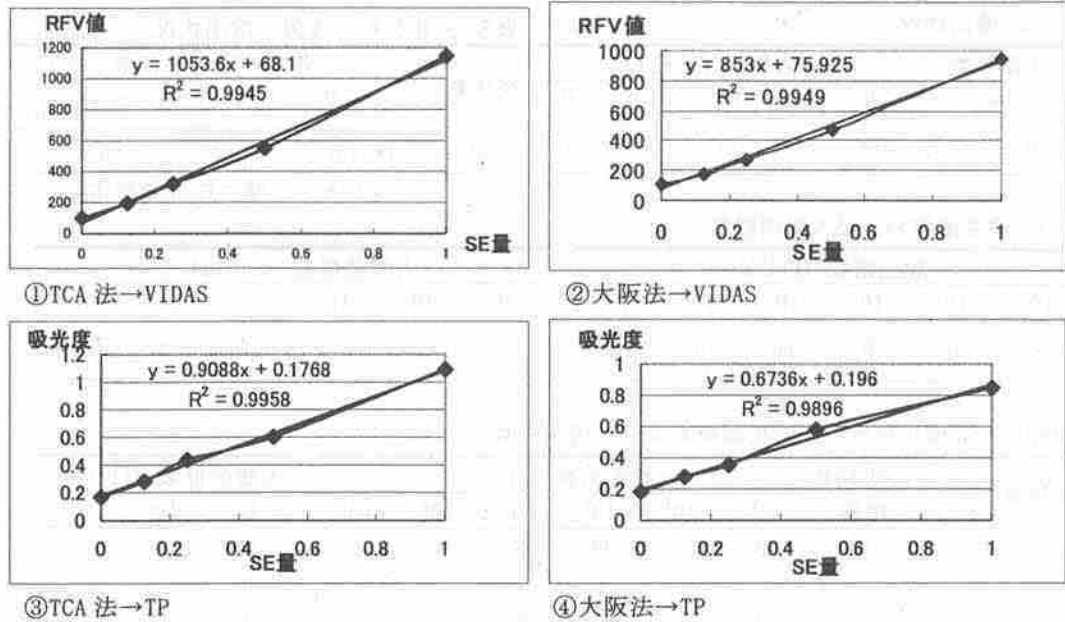


図3 TCA法および大阪法の標準直線

表6 RPLA法での凝集像

	0	0.125	0.25	0.5	1
原液	-	-	+	+	+
2倍	-	-	-	+	+
4倍	-	-	-	-	+
8倍	-	-	-	-	-
16倍	-	-	-	-	-

①TCA法→RPLA

	0	0.125	0.25	0.5	1
原液	-	-	+	+	+
2倍	-	-	-	+	+
4倍	-	-	-	-	+
8倍	-	-	-	-	-
16倍	-	-	-	-	-

②大阪法→RPLA

出が可能で、VIDAS法でもこれらと同等の検出感度を示した(表5)。

2) TCA法と大阪法によるSE回収試験

① 標準直線と各キットでの最少SE量

TCA法、大阪法それぞれの抽出液のVIDAS、TP測定でのSE標準直線のR²値はいずれも1に近く、実際の検出SE量に近い近似曲線が得られた(図3)。また、それぞれのキットのメーカー保証カットオフ値に基づいて標準直線から求めた最少SE量は、TCA法ではVIDASで0.31、TPで0.22、大阪法はVIDASで0.39、TPで0.27で、TCA法の方がやや感度が高かった。また、RPLAではどちらも0.25ng/ml以上の検出が可能であった(表6)。

②SE添加回収試験

SE添加牛乳での抽出・濃縮試験では、TCA法および大阪法により抽出・濃縮後各検出キットで測定した平均回収率は、TCA法51~54%、大阪法41~45%で、どのキットでもTCA法の回収率は大阪法に比べて良好であった。またTCA法では添加SE量の違いによる回収率の差も少なかった。(表7)

3) 各種乳製品でのTCA法によるSE回収率の比較

各種乳製品でのSE回収率は、ヨーグルトが53~63%と高く、クリームチーズが27~47%とやや低い値であったが、その他の食品ではほぼ同様の回収率を示した。また各検出キットの回収率は、RPLAで低かったがVIDASとTPではほぼ同様であった。(表8)

考察

寺山らによると東京都内の乳処理工場に搬入された生乳の65.9%からSAが検出され、このうちの41.6%はSE産生株であったと報告されている⁴⁾。我々の調査では乳処理工場に搬入された生乳72%からSAが検出され、このうち39%がSE産生株であり、東京都の報告と同様の結果であった。またSE型はC型が多く、次いでB型、A型と報告されているが⁴⁾、我々の調査ではB型産生株が広く分布していた。B型SEは、水分活性の低い食品では産生が抑制され食中毒の原因になることは少ないと考えられている⁵⁾が、栄養分豊富で水分活性の高い牛乳中ではA型産生株に比べて短時間で大量の毒素を産生する可能性も考えられる。また、ヒトのSA食中毒で最も多いA型産生株も今回の調査で2株検出され、注意が必要であ

表7 SE 添加回収試験での検出毒素量と回収率 (単位: ng/ml、() 内は回収率%)

①TCA 法 (試料 50ml→濃縮液量約 2.3ml)

添加 SE 量	VIDAS	TP	RPLA
0.02	*0.20 (46)	0.23 (53)	0.25 (58)
0.04	0.44 (50)	0.48 (56)	0.5 (58)
0.1	1.42 (56)	1.29 (59)	1 (46)
平均回収率%	51	56	54

②大阪法 (試料 20ml→濃縮液量約 0.8ml)

添加 SE 量	VIDAS	TP	RPLA
0.02	*0.19 (37)	*0.20 (40)	検出不能
0.04	0.43 (43)	0.49 (49)	0.5 (50)
0.1	1.09 (44)	1.14 (46)	1 (40)
平均回収率 (%)	41	45	45

*VIDAS、TP で測定値がカットオフ値以下のものは標準直線からの推定毒素量を示した。

表8 SE 添加乳製品からの検出毒素量と回収率 (単位: ng/ml、() 内は回収率%)

検査材料	VIDAS	TP	RPLA
牛乳 (特濃)	0.42 (47)	0.47 (52)	0.25 (28)
牛乳 (低脂肪)	0.49 (52)	0.49 (53)	0.25 (27)
スキムミルク	0.47 (51)	0.49 (54)	0.25 (28)
ヨーグルト	0.59 (62)	0.60 (63)	0.5 (53)
クリームチーズ	0.43 (46)	0.43 (47)	0.25 (27)
平均回収率 (%)	52	54	33

る。近年 HACCP システムの導入により乳製品の衛生管理は向上してきている。今回の調査の結果から、製品製造段階での不備がなければ直接食中毒発生につながるものではないが、万一不備が生じれば牛乳は SA 食中毒の原因食品となり得るため、生産段階からの十分な注意とともに原料の汚染を防ぐ対策が必要である。

厚生省通知「弁当およびそうざいの衛生規範」⁶⁾によると加熱食品は一般生菌数 $10^6/g$ 以下、大腸菌、SA 陰性、未加熱食品では一般性菌数 $10^6/g$ 以下とされており、今回調査した市販食品では一般生菌数はいずれも基準を満たしていたが、3 検体で大腸菌群が陽性であった。1990 年に当所で行なった流通食品の汚染実態調査の報告⁷⁾では、調理御飯類の 4.8% (3/62) から直接培養で SA が検出され、いずれも B 型 SE 産生株であった。これに比べると今回の結果では増菌培養での SA 検出率は 24.1% と高いが、直接培養では 1.85% (1/54) でやや少ない結果であった。また検出された SE の多くは B 型で、B 型 SE 産生株単独による食中毒は少ないとはいえ、他の型との複合産生による事例もあり⁸⁾、注意が必要である。増菌培養で検出された 12 検体のほとんどは同一店舗で製造され

ている製品由来であり、これらの店舗では二次汚染が発生していると考えられる。我が国では、1984 年までは SA 食中毒は年間 200 例以上の発生があったが、近年減少傾向を示し、1999 年には全食中毒事例の 2.6% までに減少している。この理由としては最大の原因食品であった“おにぎり”の自家製のものが減り、市販品の製造工程の機械化によるものと考えられている⁸⁾。1998 年の富士市での大手コンビニエンスストア向けおにぎりの調査⁹⁾で SA は検出されていないが、今回の調査ではコンビニエンスストアの製品 1 検体から SA が検出され、またスーパーマーケットの製品 7 検体からも検出されたことから一部のスーパーマーケットでは衛生管理が行き届いていない店舗があると思われた。最近ではおにぎりに代わって弁当を原因食品とするものが増加傾向にある⁸⁾ことから、弁当・そうざい類については今後も注意が必要である。

これまでの SE 食中毒での最少発症 SE 量は 1985 年のアメリカ合衆国のチョコレートミルクを原因とする事例から A 型 SE で 200ng 以下と推測¹⁰⁾されていたが、大阪市の事例では、原因となった低脂肪乳の SE 量は多くても 0.38ng/ml で、喫食量から算出した発症毒素量は 20~

100ng と推察されており¹¹⁾、この量の SE を RPLA で検出するには何らかの濃縮又は抽出法が必要となる。大阪法は当初、適切な方法として用いられてきたが、今回比較した濾過遠心法、VIDAS 法では前処理が省力化でき同等の検出感度を示したことから、牛乳等からの SE 検出法として有効であると思われた。

ここまで、大阪市での事件の発症 SE 量を参考に 0.25ng/ml の SE を検出する試験を行ってきたが、この間にも最少発症 SE 量の問題が討議され、SE が陰性であるというためには 0.1ng/ml 以下の検出感度が必要¹¹⁾とことから、TCA 法の検討に際しては、SE 添加量を最少 0.02ng/ml まで下げて試験を行った。これにより各 SE 検出キットのいずれにおいても TCA 法は大阪法より回収率が良好で、脱塩・濃縮の時間と煩雑な操作が短縮でき、また、その他の乳製品でもほぼ同様の回収率を得られたことから、SE 抽出・濃縮法として有効であると考えられた。しかし、RPLA では凝集像での判定のため回収率が不安定であり、チーズやヨーグルトでは成分等の違いから他の乳製品とやや回収率が異なったため、定量的に用いるには検定回数を増やして調査する必要があると思われた。抽出操作後の SE 検査キットによる検出率には大差がなかったため、検査施設の規模、機器整備状況、検査の目的 (SE 型別の要、不要) 等により選択するべきである。しかし、RPLA は半定量に使用できるが、その他のキットでは定量性が保障されていないため、定量検査に用いるには問題点が残る。今後は牛乳以外の食品における検査法、A 型以外の SE 検出法等の他、加熱処理によって SE のタンパク構造が変化し、血清学的検査法における抗原活性が低下するとの報告¹²⁾もあるため、尿素処理による再活性化¹³⁾等も今後の検討課題となった。

文 献

- 1) 浅尾 努：エンテロトキシン検査，第 13・14 回日本食品微生物学会学術セミナー，17-24 (2001)
- 2) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針 微生物編
- 3) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知，乳肉衛生課長通知：腸管出血性大腸菌 0157 の検査法について，H9. 7. 4，衛食第 207 号，衛乳第 199 号
- 4) 寺山 武他：生乳からの *Staphylococcus aureus* の検出と分離菌株の性状，エンテロトキシン産生性及びコアグラゼの検討，東京衛研年報，31-1，115-121 (1980)
- 5) 坂崎利一：食水系感染症と細菌性食中毒，336-359，中央法規出版
- 6) 厚生省環境衛生局食品衛生課長通知：弁当及びそう

- 7) 森 健他：流通食品の微生物汚染実態と試験法に関する研究，静岡県衛生環境センター報告 33，1-10 (1990)
- 8) 五十嵐英夫：国際学院埼玉短期大学研究紀要，22 (2001)
- 9) 島中 仁他：コンビニエンスストア向けおにぎりの細菌汚染状況調査及び汚染源の検討，第 35 回静岡県公衆衛生研究会，2 の 31-33 (1999)
- 10) Evenson ML et al. : An Outbreak of food poisoning involving chocolate milk, Int. J. Food Microbiol. 7, 311-316 (1988)
- 11) 五十嵐英夫：ブドウ球菌エンテロトキシンとその検査法，栄研器材株式会社「e s」, No.022
- 12) R. W. Bennett : The Biomolecular Temperament of Staphylococcal Enterotoxin in Thermally Processed Foods Journal of AOAC International, 75-1, 6-12 (1992)
- 13) M. Akhtar et al. : Effect of Urea Treatment of Recovery of Staphylococcal Enterotoxin A from Heat-Processed Foods, Applied and Environmental Microbiology, 62-9, 3274-3276 (1996)

浜名湖の麻痺性貝毒原因プランクトンの解析

微生物部 環境微生物スタッフ 西尾 智裕, 大畑 克彦, 杉山 寛治
秋山 真人, 郷田 淑明*¹, 阿久津 哲也*²
小泉 鏡子*³

Analysis of Toxic Dinofragellata *Alexandrium catenella*,
the Cause of Paralytic Shellfish Poison in the Lake Hamana

Tomohiro NISHIO, Katsuhiko OHATA, Kanji SUGIYAMA,
Masato AKIYAMA, Yoshiaki GOHDA, Tetsuya AKUTSU
and Kyoko KOIZUMI

1996年11月と1999年5月静岡県西部の浜名湖で植物性プランクトンである渦鞭毛藻類の *Alexandrium catenella* による麻痺性貝毒が発生した。浜名湖海泥より採取したシストを単離培養した *A. catenella* について遺伝子解析を行い、次の結果が得られた。①浜名湖の *A. catenella* は日本国内で発生しているプランクトンと同一の系統であった。②系統樹を作成したところ、浜名湖の *A. catenella* は、MI17 (Harima Nada, Japan) と TNY11 (Tanabe Bay, Japan) とほぼ同じ位置に配列された。

Key words: 麻痺性貝毒, 浜名湖, 制限酵素断片長多型, DNA シークエンス
Paralytic Shellfish Poison, the Lake Hamana, RFLP, DNA Sequence

はじめに

静岡県西部の浜名湖(汽水湖)産二枚貝の麻痺性貝毒の発生が、1996年11月¹⁾、1999年5月²⁾に報告されている。この浜名湖の麻痺性貝毒の原因は、植物性プランクトンである渦鞭毛藻類の *Alexandrium catenella*(以下、*A. catenella*) であるといわれている。そこで、今回、浜名湖海泥より採取したシストを単離培養した *A. catenella* の遺伝子解析を行ったので報告する。

材料および方法

1 材料

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka 420-8637, Japan)

*¹静岡県東部食肉衛生研究所

*²静岡県水産試験場浜名湖分場

*³静岡県水産試験場本場

1999年5月に浜名湖内の内浦湾底泥を採集し、水産試験場浜名湖分場において、*A. catenella* のシストを拾い出し、マルチプレートのホールに1つついれ、K培地で培養(20℃)し、発芽させた細胞3種を材料とした(表1)。

2 検査法

PCR-RFLP法³⁾およびシークエンス⁴⁾

培養細胞から市販キット「ISO PLANT II」(ニッポンジーン)を用いて核酸抽出を行い、*Alexandrium* 属に特異性のあるITS AプライマーとITS Bプライマーを用いてPCR法により5.8SrDNA領域の増幅⁵⁾を行った。PCR増幅

表1 培養した細胞の密度

No.	サンプル名	密度
1	9904U1-4	2,700 cell/ml
2	9904U1-6	3,800 cell/ml
3	9904U1-8	2,800 cell/ml

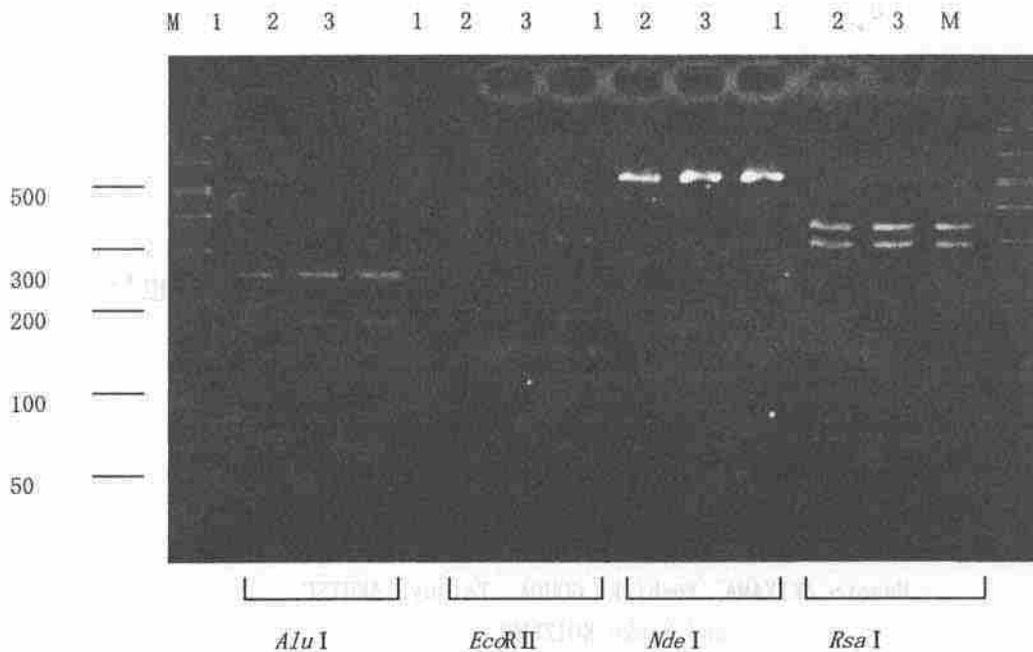


図1 各制限酵素による切断パターン

M 分子量マーカー
 Lane1 9904U1-6
 Lane2 9904U1-8
 Lane3 9904U1-4

増幅産物を *Alu*I, *Nde*I, *Eco*RI, *Rsa*I の制限酵素を用いて消化し、電気泳動を行い、RFLP(制限酵素断片長多型)により解析を行った。また、PCR 増幅産物のシーケンスを行い、DNA 解析ソフトを用いて、ホモロジー検索を行った。既報の各株の塩基配列⁴⁾を比較し、マルチプルアライメントを行った後、遺伝子距離を算出し、系統樹を NJ 法、UPGMA 法により作成した。

結果

1 PCR-RFLP 法

RFLP の比較から文献³⁾と同じく、日本国内で発生している *A. catenella* と同様なパターンとなり、国内で確認されているものと同一の系統と思われた(図1)。

2 シーケンス

PCR 産物の塩基配列を決定し、日本 DNA データバンクにアクセスし、データベースによる相同性検索を行ったところ、MI7 (Harima Nada, Japan) と 99.6% (513/515) の高い相同性を示した。また、得られた塩基配列を東京都立衛生研究所の林志直先生に遺伝子解析ソフト GENETYX を使い、各株の塩基配列を比較し、マルチプルアライメントを行い、遺伝子距離を算出し、系統樹を NJ 法、UPGMA 法により作成して頂いた。その結果、浜名湖産プランクトンは NJ 法では、MI7 と TNY11 (Tanabe Bay, Japan) とほぼ同じ位置に配列され、

[GENETYX-WIN : Evolutionary tree]
 Date : 2002.4.3
 Method: NJ
 Bootstrap Trial: 1000

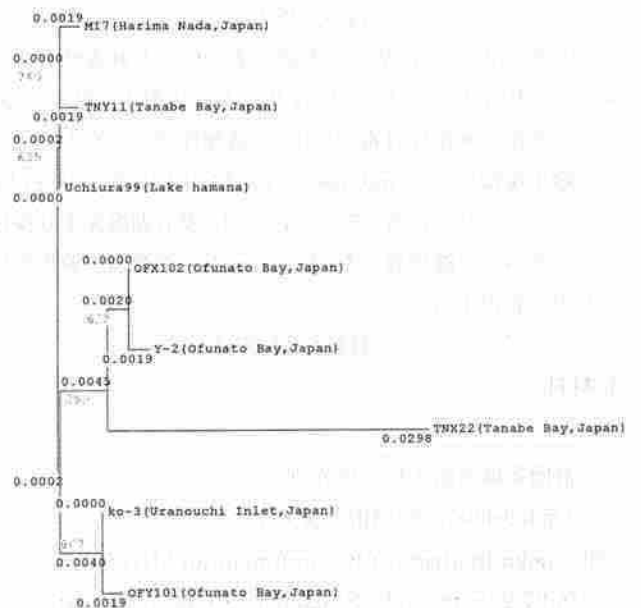


図2 NJ法による系統樹解析

[GENETYX-WIN : Evolutionary tree]
Date : 2002.4.3
Method: UPGMA

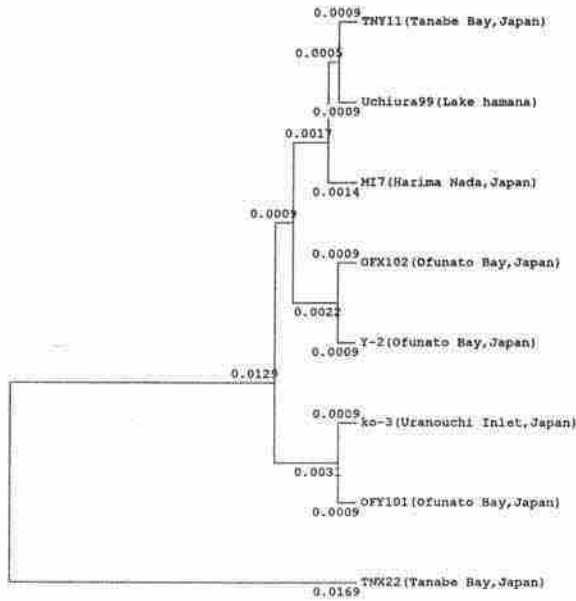


図3 UPGMA 法による系統樹解析

UPGMA 法では、TNY11 とほぼ同じであった (図2. 3)。

考 察

有毒渦鞭毛藻として知られる *Alexandrium* 属は、我が国では 11 種の発生が報告⁶⁾されている。特に、*A. catenella* および *A. tamarense* は、サキシトキシン (STX) やゴニオトキシン (GTX) を含む強力な神経毒を産生し、分布域も広いことから麻痺性貝毒の最大の原因藻となっている。*Alexandrium* 属は、形態学的に酷似種が多いため、分類には熟練が必要とされている。*Alexandrium* 属の分類による貝毒発生のモニタリングは、予知をするのに大変重要な手段である。今回、RFLP の比較によって *A. catenella* と *A. tamarense* の鑑別が容易に行えることが確認でき、貝毒原因プランクトンの迅速同定に有用であると思われた。

また、シークエンスを行い浜名湖産プランクトンは、日本国内で発生している *Alexandrium* 属とほぼ同じであり、特に和歌山県田辺湾、兵庫県播磨灘に生息する *Alexandrium* 属と近縁関係であることが示唆された。今後、貨物船のバラスト水の汚染による人為的な有毒藻の広域分布化が懸念される中、他種の突然発生が十分に予想される。従って、従来の形態分類のみだけでなく、遺伝的解析による方法で発生原因を追究し、系統的に分類することが、重要であると思われた。

謝 辞

今回の調査にあたり、遺伝子解析を実施して頂いた東京都立衛生研究所の林志直先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 興津知子他 : *Alexandrium catenella* による浜名湖産カキおよびアサリの麻痺性貝毒の調査, 静岡県環境衛生科学研究所報告, 39, 53-56 (1997)
- 2) 増田教子他 : 浜名湖産二枚貝の麻痺性貝毒成分分析, 静岡県環境衛生科学研究所報告, 42, 19-23 (1999)
- 3) Masao, A. et al.: RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM OF RIBOSOMAL DNA INTERNAL TRANSCRIBED SPACER AND 5.8S REGIONS IN JAPANESE ALEXANDRIUM SPECIES (DINOPHYCEAE), J. Phycol., 30, 857-863 (1994)
- 4) Masao, A. et al.: ANALYSIS OF ALEXANDRIUM (DINOPHYCEAE) SPECIES USING SEQUENCES OF THE 5.8S RIBOSOMAL DNA AND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER REGIONS, J. Phycol., 32, 424-432 (1996)
- 5) Yoshihiko, Sako.: Molecular identification of toxic marine dinoflagellates *Alexandrium* species, Arch. Hydrobiol. Spec. Issues. Advanc. Limnol., 54, 311-324 (1999)
- 6) 左古芳彦: 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium* の生活環と広域化, 月刊 海洋, 27, 628-635 (1995)

静岡県における C 型肝炎ウイルス (HCV) の血清疫学的研究

微生物部 ウイルススタッフ 稲吉 恵, 佐原 啓二, 杉枝 正明
秋山 真人

Seroepidemiological Study on Hepatitis C Virus (HCV) Infection
in Shizuoka Prefecture

Megumi INAYOSHI, Keiji SAHARA, Masaaki SUGIEDA,
and Masato AKIYAMA

2001年6月～10月に行ったC型肝炎検査において、HCV抗体保有者が感染者か感染既往者かの区別をつけて結果を通知するため、HCV抗体価測定とPCR法によるHCV RNAの検出を組み合わせて検査を行った。その結果から静岡県のHCV感染状況を把握するため、HCV抗体保有者について疫学的に解析した。PA価2,048倍以上の25件はRNA陽性でHCV感染者、PA価32倍と64倍の7件はRNA陰性でHCV感染既往者と判定した。HCV抗体陽性率は7.6%と高かったが、HCV抗体保有者の疫学的傾向は他県の報告とほぼ一致していると考えられた。C型肝炎対策の一環として始まった今回の検査において、適切な結果を通知することができたと考える。

Key words: C型肝炎, HCV, 血清疫学

Hepatitis C virus infection, HCV, seroepidemiology

はじめに

HCV感染者は、世界で1億8千万人、日本では200万人以上いるといわれている¹⁾が、そのうちの大半の人が自覚症状なく感染に気づいていない。HCVに感染すると慢性肝炎になる率が高く、肝硬変、肝がんへと移行する可能性があり²⁾、HCV感染者の慢性肝疾患死亡者が増加の一途をたどっている³⁾。これらの要因から、静岡県では2001年6月より検査希望者に対しHCV検査を開始した。HCV検査は通常、検査キットを用いたHCV抗体の検出が行われている⁴⁾。しかし抗体の検出のみでは、現在HCVに感染している状態(感染者)なのか、HCVは排除されてしまったが、抗体のみが体内に残っている状態(感染既往者)なのかの判定がつかない。感染者には医療との関係を考慮し、感染既往者には慢性肝疾患発病の危険性

は低く無用の不安を与えないためにも、HCV抗体保有者がHCV感染者か、HCV感染既往者かの区別をして、結果を通知する必要があると判断し、抗体価測定とPCR法を組み合わせて検査を行った。静岡県のHCV感染状況を把握するため、検査結果を疫学的に解析した。

材料および方法

1 材料

被検血清は、2001年6月～10月の間に、HCV・HIV両抗体検査を目的に、静岡県内の10保健所を訪れた受診者の血清422件を対象とした。各保健所で採血、遠心分離された血清は、当日中に4℃保存で当所へ搬入され、以後-80℃で保存し、検査に供した。

2 方法

1)ゼラチン粒子凝集反応(PA)法によるHCV抗体検査

スクリーニング検査としてオーソ HCVAbPA テストII(富士レビオ)でHCV抗体価の測定を行った。方法はマイクロタイター法であり、凝集のおこった最終希釈倍数を用いて、抗体(PA)価とした。PA価32倍以上のものを陽性とした。

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka 420-8637, Japan)

表1 HCV抗体検査とHCV RNA検出結果

PA 値	イムノクロマト法	RNA の検出	計	判定
≥2,048	(+)	(+)	25	HCV 感染者
64	(±) *	(-)	5	HCV 感染既往者
32	(-)	(-)	2	
<32	NT **	NT **	390	HCV 陰性者

*15分後の判定時に明瞭な陽性の線は表れなかったが、時間が経つと線が表れた。

**検査せず

2)イムノクロマト法によるHCV抗体検査

簡便で短時間のうちに結果がわかり、一般に広く使われているオースクイックチェイサーHCVAb (オース・クリニカル・ダイアグノスティックス)も確認のため併せて行った。テストプレートに検体を100μl 1滴下し、15分後に赤紫色の線が規定の位置に出現すれば抗体陽性、線が現れなければ陰性、15分後の判定時に明瞭な陽性の線は表れなかったが、時間が経つと線が表れたものを判定保留とした。

3)血中HCV RNAの検出

PA法で陽性を示した検体について、PCR法のアンプリコアHCV (ロシュ・ダイアグノスティックス)を行った。HCV核酸抽出後、逆転写反応によりDNAを合成、PCR反応後ハイブリダイゼーションを行い、発色による吸光度を測定、その数値からHCV RNA陽性と陰性を判定した。

結果

HCV抗体ならびにHCV RNAの測定結果を表1に示した。PA値32倍以上の検体は32件であり、全体の7.6%を占めた。イムノクロマト法ではPA値2,048倍以上の25件が陽性、64倍の5件は判定保留、32倍の2件は陰性であった。血中HCV RNAの検出ではPA値2,048倍以上の25件がRNA陽性であった。一方、PA値32倍と64倍の7件についてはすべてRNA陰性を示した。

以上の結果より、PA値2,048倍以上でRNAが検出された25件(5.9%)をHCV感染者、32倍と64倍でRNA陰性の7件(1.7%)をHCV感染既往者と判定した。また、同時に行ったHIV抗体検査は、422件すべて陰性であった。

感染者25件のうち60歳以上が13件と半数以上を占め、年齢層別検査数に占める感染者の割合は、年齢とともに増加し、70歳以上では35%を占めた。一方、感染既往者に年齢的な偏りは見られなかった(表2)。

感染者の性別による差はみられなかったが、感染既往者は女性の方がわずかに多かった(表3)。

表2 年齢階級別HCV検査結果 (%)

年齢層	検査数	HCV感染者	HCV感染既往者
<20	10	0 (0)	0 (0)
20~29	93	1 (1.1)	1 (1.1)
30~39	96	4 (4.2)	2 (2.1)
40~49	91	2 (2.2)	2 (2.2)
50~59	70	5 (7.1)	0 (0)
60~69	42	6 (14.3)	1 (2.4)
≥70	20	7 (35.0)	1 (5)
計	422	25 (5.9)	7 (1.7)

表3 男女別HCV検査結果 (%)

性別	検査数	HCV感染者	HCV感染既往者
男	205	13 (6.3)	2 (0.98)
女	217	12 (5.5)	5 (2.3)
計	422	25 (5.9)	7 (1.7)

表4 保健所別HCV検査結果 (%)

受付保健所	検査数	HCV感染者	HCV感染既往者
伊豆	14	0 (0)	1 (7.1)
熱海	9	1 (11.1)	0 (0)
御殿場	23	1 (4.3)	1 (4.3)
東部	105	7 (6.7)	2 (1.9)
富士	55	5 (9.0)	1 (1.8)
中部	30	1 (3.3)	0 (0)
志太榛原	73	2 (2.7)	0 (0)
中東遠	67	4 (5.9)	2 (2.9)
北遠	7	0 (0)	0 (0)
西部	39	4 (10.3)	0 (0)
計	422	25	7

抗体保有者の受付保健所による偏りはみられなかった。受付保健所別検査数に占める感染者の割合では、熱海(11.1%)、西部(10.3%)、富士(9.0%)が比較的高かった(表4)。

考 察

一般集団検診や供血者の約1%がHCV抗体陽性である^{5) 6)}との報告に比べ、HCVとHIV感染の機会を心配して保健所を訪れた受診者が対象となっているため、高いHCV陽性率を示した。これは自らのHCV感染状況を認識する機会を提供するという本事業の目的のひとつを果たしていると考えられる。また、HCV抗体陽性者の30%程度に感染既往が含まれる^{5) 7)}といわれているが、HCV抗体陽性者に占める感染既往者の割合は22%と、これまでと同程度であった。‘HCV抗体陽性’というスクリーニング検査結果のみではなく、感染者と感染既往者を区別した形で検査結果を通知したことから、感染既往者に無用の不安を与える等の結果通知時の混乱は避けられたと考える。

C型肝炎の特徴として、感染者が40歳以上に多く、年齢が上がるほど多くなる⁸⁾といわれているが、今回の結果からも、高い年齢層での感染率が高く、若い年齢層で低い値を示した。C型肝炎のもうひとつの特徴に地域差がみられるといわれており、静岡県でも1980年から1982年にかけて清水市興津地区におけるC型肝炎の流行を経験している^{9) 10)}ため、県中部地区に抗体陽性者が多い可能性が考えられたが、受付保健所による差はみられなかった。今回の受診者は検査を自ら希望してきた人に限定されているため全体像を把握できていない可能性も考えられるが、限局した地区のみの流行であり中部地区全体には影響を及ぼさなかった、または興津地区のC型肝炎流行の影響はすでにないことが考えられた。

供血者や高浸淫地域における報告^{11) 12)}ではHCV抗体陽性率にあきらかな男女差はみられないが、近年C型肝炎由来の肝がん死亡者は男性が女性より約3倍多い¹¹⁾。HCV感染が、急性感染で治癒するか慢性化するかは主として宿主の免疫応答により規定されていると言われており¹³⁾、今回の結果からもHCV感染者の性別による差はみられなかったが、女性に感染既往者が多かったことから、ウイルス排除のメカニズム解明には、今後男女差にも注目していく必要があると考える。

C型肝炎対策の一環として始まった今回の検査において、RNAの検出まで行ったことにより、適切な検査結果を通知することができたと考えられるが、HCV感染者を安価、簡便、かつ確実に見つけ出す検査の進め方は、検査状況の変化に伴い検討を続ける必要がある。静岡県の

HCV抗体保有者の傾向は他県の報告とほぼ一致していると考えられるが、HCV感染者検体の遺伝子型判定等を行い、静岡県のHCV感染状況について、今後さらに詳細な解析を行っていく予定である。

文 献

- 1) 相崎英樹他：C型肝炎，IDWR，3，8-11(2001)
- 2) David, O.W. et al.：医学ウイルス学，396-400，近代出版，東京(1996)
- 3) 広島県地域保健対策協議会環境保健委員会：ウイルス肝炎対策マニュアル，15-25(1995)
- 4) 吉澤浩司：HCV感染診断における問題点，68-75
- 5) 小山富子他：40歳以上の住民を対象としたC型肝炎ウイルス(HCV)健診体制確立の試み，予防医学ジャーナル，357，10-12(2000)
- 6) ウイルス肝炎研究財団：C型肝炎のすべて，社会保険出版社，東京
- 7) 片山恵子他：わが国における肝炎ウイルスキャリアの動向，医学のあゆみ，200，3-8(2002)
- 8) 吉澤浩司：病因論に基づいた肝炎・肝がん対策，岩手県予防医学協会(2001)
- 9) 山内眞義他：清水市興津・小島地域に流行した非A非B型肝炎の臨床的検討，肝臓，22，1678-1684(1981)
- 10) 内海勝夫他：清水市興津地区における散発性急性肝炎の臨床像特に1977年及び1980年発生病例について，肝臓，22，1685-1692(1981)
- 11) 吉澤浩司他：ウイルス肝炎，文光堂，東京(2002)
- 12) 佐田通夫他：覚醒剤濫用に関連した若年者のC型肝炎の流行に関する研究，非A非B型肝炎の臨床的総合研究平成12年度総括分担研究報告書，89-91(2001)
- 13) Takaki, A. et al.：Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single source outbreak of hepatitis C, Nat. Med, 6, 578-582(2000)

... (faded text) ...

... (faded text) ...

譯文

譯者

... (faded translated text) ...

... (faded translated text) ...

医薬品溶出試験の信頼性に関する研究 (第2報)

—溶出試験の変動要因に関する検討—

医薬品生活部 医薬食品スタッフ 小和田和宏, 堀池あずさ, 植田敦子
藤原厚子, 山口善三郎, 浮島美之
馬淵 博*

Study on the Reliability in Drug Dissolution Test (II)
— Investigation of Variations in Dissolution Test —

Kazuhiro OWADA, Azusa HORIIKE, Atsuko UETA,
Atsuko FUJIWARA, Zenzaburo YAMAGUCHI, Yoshiyuki UKISHIMA
and Hiroshi MABUCHI*

溶出試験は結果に影響を及ぼす変動要因の多いことで知られており, 我々は試験液の液性 (pH) やパドル回転数, 試料の落下位置が溶出率に及ぼす影響や賦形剤の種類やフィルムコート量の違いが溶出率の変動などに影響に関する検討結果を報告してきた。

今年度, 溶出試験液のイオン強度や脱気状態の違いが溶出率に及ぼす影響や, 自動測定とマニュアル測定の溶出率の違いについて調べた。さらに, 試料 (錠剤) の質量と溶出率の関係を検討し, 適切なサンプリング方法を考察すると共に, 試料の長期保管による溶出率の変化などについても検討した。溶出試験には多くの要因が試験検査結果を左右する可能性があることを深く認識し, 自らのデータの信頼性を向上させるとともに, 再評価事業においては個々の医薬品の溶出試験条件を設定する際に有効に活用し, 製薬メーカーにおける品質管理の一助としたい。

Key Words : 医薬品, 溶出試験, 信頼性, 変動要因, 医薬品再評価

Drugs, Dissolution Test, Reliability, Variation, Drug Revaluation

はじめに

溶出試験法は内用固形製剤からの主成分の溶出を試験する方法である。内用固形製剤の品質を一定水準に確保

し, 併せて著しい生物学的非同等性を防ぐことを目的に設定される¹⁾。医療用後発医薬品の中には, 銘柄やロットによって生物学的同等性が確保されていないものがあると考えられており, 厚生労働省では, これら医薬品の溶出試験規格を設定することにより品質再評価する事業を行ってきた。この医療用後発医薬品の再評価事業は平成10年度から始まり, 当所を含む10都府県の地方衛生研究所が溶出試験規格作りに関わっている。

溶出試験は試験結果に影響を及ぼす要因が多いことでも知られている^{2) 3)}とされており, 当所においても,

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka 420-8637, Japan)

*静岡県北遠健康福祉センター

解決すべきいくつかの課題が認められている。著者らは試験液の液性 (pH) やパドル回転数、試料の落下位置が溶出率に及ぼす影響について報告した⁴⁾。また、昨年度は賦形剤の種類やフィルムコート量の違いが溶出率の変動に与える影響を検討し、その結果を報告した⁵⁾。

本年度は溶出試験液のイオン強度や脱気状態の違いが溶出率に及ぼす影響や、自動測定とマニュアル測定の溶出率の違いについて調べた。さらに、試料 (錠剤) の質量と溶出率の関係を検討し、適切なサンプリング方法を考察すると共に、試料の長期保管による溶出率の変化などについても検討した。

調査方法

1 検体

医療用医薬品 (錠剤, カプセル剤, 散剤, 顆粒剤等)

2 試験方法

日本薬局方溶出試験法, 日本薬局方外医薬品成分規格第三部等にしたがって試験した。

3 溶出試験装置

- 1) 大日本精機 (株) 製溶出試験装置 RT-3Std
- 2) 富山産業 (株) 製溶出試験装置 NTR-6100A

結果及び考察

1 溶出率に影響を及ぼす試験液のイオン強度

溶出試験に用いる試験液の中に pH4.0 の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液がある。同じ pH でも緩衝液のイオン濃度が異なると溶出挙動が異なる場合がある³⁾。

今回は溶出試験の標準的な液性として用いられている 0.05mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液及びイオン濃度が高い局方酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0, 約 0.2 mol/L) の 2 種類を試験液として経時的な溶出挙動を比較検討した (図1)。

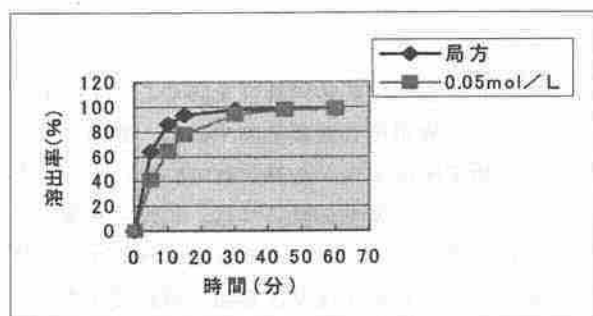


図1 試験液のイオン強度による溶出率の差

本製剤 (血管拡張剤, 散剤) の場合はイオン濃度が高い局方緩衝液の方が 0.05mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液に比べ、溶出の立ちあがり早く、溶出規格である

30 分後の溶出率は約 5 % 高かった。緩衝液を用いる場合は pH が同一でも組成が異なれば溶出試験の結果が異なることがあるので注意が必要である。

2 溶出率に影響を及ぼす試験液の導電率

製剤のなかには溶出に用いる試験液が水の場合、用いる日本薬局方精製水の導電率が溶出率に影響を及ぼす場合があるといわれている。そこで、ある血圧降下剤 (錠剤) について 4 種の導電率の水を用いて挙動を検討した結果、本製剤は導電率が高いほど溶出率が高くなることが確認できた (図2)。

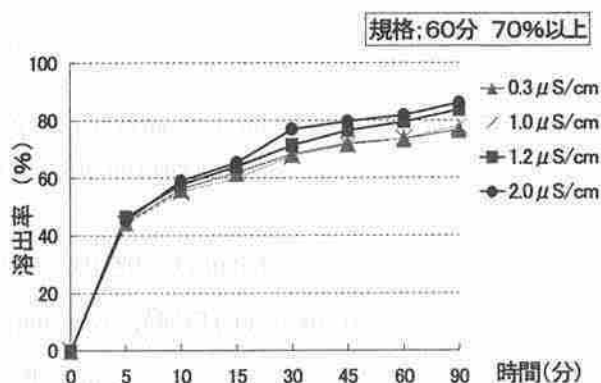


図2 試験液の導電率と溶出率

3 溶出率に影響を及ぼす脱気状態の違い

溶出率は試験液の脱気の状態にも影響を受ける³⁾といわれている。試験液の脱気方法には減圧, 加温, 攪拌, ガス置換あるいはこれらの組み合わせ等がある。そこで、著者らは、表1のような3種の脱気方法を用い、溶出挙動を比較検討した。本製剤 (細粒剤) の場合は 5, 10 分のサンプリング時には脱気方法の違いによる影響が考えられたが、サンプリングの時間が長くなるに従って溶出率には差がなくなるように思われた。水の脱気方法は溶出曲線の立ちあがり時に影響を与える可能性があると思われる。

表1 脱気方法の違いと溶出率 (%)

脱気方法	5分	10分	15分	30分	45分	60分
脱気なし	52.3	65.1	69.9	77.8	82.7	86.7
機械脱気	47.6	61.8	68.0	76.1	81.4	85.2
加温脱気	50.6	62.7	68.0	76.0	80.7	84.9
窒素置換	53.3	65.9	70.8	78.0	83.0	86.7

4 自動測定とマニュアル測定の溶出率の違い

厚生労働省の医療用医薬品の品質再評価事業に際して当所に導入された装置は全自動溶出試験装置であり、条件さえ合えば溶出液の採取から試料溶液の測定まで自動で行うことが可能である。しかし、局方の溶出試験法¹⁾は手動測定で行うことを想定して作成されていることか

ら、自動測定装置で得られた値が手動による値と違いがないことを確認しておく必要がある³⁾。当所において自動と手動の両方法で溶出率を測定し、得られた平均溶出率を比較すると、手動測定の結果が若干高めであることがわかった(表2)。この原因は明らかではないが、ベッセルから紫外可視吸光度計の配管までの容量(デッドボリューム)が影響していると思われる。

試験液の採取に自動サンプリングシステムを用いる場合、試験液中の挿入されたサンプリング管及び試験液採取時の循環流が溶出に影響を与えることも考えられるので、自動装置を用いる場合には注意が必要ともいわれている³⁾。

表2 自動測定とマニュアル測定の溶出率の違い

測定結果	検体数	割合
手動が高い	24	61.5%
差がない(1%未満)	9	23.1%
自動が高い	6	15.4%
計	39	100.0%

5 試料の質量と溶出率

溶出試験を実施するにあたり、500錠、1000錠など大包装品の中から溶出試験に供する「6錠」をどう選ぶかは大変悩むところである。錠剤の製造工程がしっかり管理されていて、混合均一性や打錠質量の均一性が確保さ

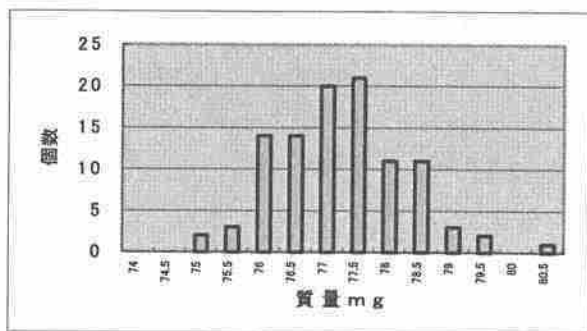


図3 錠剤100錠の質量の分布

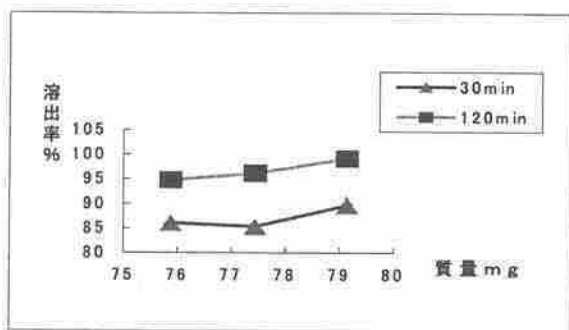


図4 錠剤の質量と溶出率

れていれば、どこからサンプリングしても問題はないはずである。

今回、ある血圧降下剤(錠剤)について質量のバラツキ具合を調べるとともに、それぞれの溶出率を求め、質量と溶出率の関係を調べた(図3)。約100錠の質量を測定し、質量のヒストグラムを作成したところ、正規分布に近いグラフが得られた。また、錠剤の溶出規格が設定されている30分後及びほぼプラトーに達している120分後の溶出率を求め、錠剤質量に対してプロットした。その結果、120分後の最終溶出率は錠剤の質量が大きいほど高く、小さいほど低かった(図4)。

これらのことから、医薬品の製造過程で十分混合均一性が管理されている場合、錠剤の質量のばらつきが最終溶出率に反映されることが判明した。錠剤質量も溶出結果に影響を及ぼす要因のひとつであり、試験に用いる錠剤は当然ランダムに6錠抜き取るのがやはり好ましいということになる。

6 試料の長期保管による溶出率の変化

医薬品は流通期間中、その有効性及び安定性を十分確保することが必要である。有効期間はいつでも医薬品の規格及び試験方法で自ら定めた規格範囲に適合していることが求められる。溶出試験においてもそれは例外ではない。しかし、製剤によっては、加速試験条件下(40℃, 75%RH)に保管した場合、経時的に溶出性に变化を示すものがあるといわれている。そこで、加速試験条件下に製剤を保管し、経時的に溶出率の変化を調べた(表3)。

今回の試験に用いた血圧降下剤(フィルムコート錠)の溶出率は保存1ヶ月目では若干下がったように思えたが、それ以降は変化が見られなかった。製剤のなかには加速試験条件での保管により溶出を開始するまでのラグタイムが長くなったり、溶出時間の延長が認められた例もあり⁶⁾、規格設定時や経時的安定性にはこれらの点にも注意が必要である。

表3 加速試験条件下に保管した製剤の溶出率の変化

保存期間(月)	最大溶出率(%)	最小溶出率(%)	平均溶出率(%)	標準偏差
0	91.9	77.0	86.9(18)	4.0
1	91.5	68.5	79.7(12)	5.8
2	85.9	69.9	79.5(12)	5.1
3	84.4	74.5	80.3(12)	3.0
6	85.2	73.9	79.0(6)	3.8

まとめ

平成 10 年度に医療用医薬品の品質再評価事業が始まり、当所にも 6 連式の全自動溶出試験装置が導入され、これを契機に溶出試験を頻繁に行うようになった。しかし、溶出試験自体の経験が浅いこと、また、導入された装置が自動溶出試験器であったこと、溶出試験そのものが結果に影響を与える要因が多いことなどから、試験検査結果にばらつきを生じた事例に遭遇した。

そこで、平成 12 年度より当所の調査研究のテーマにこの溶出試験を取り上げ、「医薬品溶出試験の信頼性に関する研究」として、各種の変動要因が試験結果に及ぼす影響について検討してきた。その結果、試験液の液性や脱気状態など試験液の要因や、試料の落下位置、サンプリング方法などの試験装置や条件側の要因、さらに、賦形剤の種類やコーティング量、錠剤の質量のばらつきなど製剤側の要因、自動測定とマニュアル測定の比較など試験検査結果に影響を及ぼすといわれている様々な要因があることがわかった。

【溶出試験結果に影響を及ぼすと思われる要因】

- ・ 温度、液性、試験液量、時間、回転数、規格
- ・ 試験液：液性 (pH)、イオン濃度、脱気状態
- ・ 試料投入：試料の落下位置、顆粒剤等での投入方法 (分散投入)
- ・ 装置：機種、ベッセルやパドルの材質、配管等への吸着、パドル位置と高さ、パドルかバスケットか、シンカーの使用の有無
- ・ 操作法：サンプリング方法、ろ過方法、自動とマニュアル、溶出プロファイルと規格試験 (サンプリング回数)
- ・ 試料：含量の均一性、質量のばらつき、コーティング剤等賦形剤の種類や量、製造方法 (条件)、保存による経時的変化
- ・ 測定：分析法 (試料溶液と標準溶液の液性)、特異的な検出法、試料溶液中の主成分の濃度

今後はこれらの要因が試験検査結果を左右する可能性があることを深く認識して自らのデータの信頼性を向上させるとともに、再評価事業においては個々の医薬品の溶出試験条件を設定する際に有効に活用し、製薬メーカーにおける品質管理の一助としたい。

平成 11 年 3 月に行われた日本薬学会年会⁷⁾では、当所並びに国立医薬品食品衛生研究所を除く他の公的研究機関からの発表はなく、この地衛研等の公的研究機関での溶出試験に関する研究は始まったばかりと言える。製薬メーカーにおいても種々の研究を実施しているが、研

究対象が自社の製品に限られるため、幅広く研究するには公的研究機関の役割は不可欠と考えられる。また、平成 13 年度の厚生科学研究で国立医薬品食品衛生研究所が中心になり、溶出試験の変動要因の研究をスタートさせたが、当所は他の公的研究機関に率先してこの問題に取り組んでいる。

文 献

- 1) 厚生労働省：第十四改正日本薬局方：平成 13 年 3 月 30 日付厚生労働省告示第 111 号
- 2) 鹿庭なほ子：試験室共同実験による溶出試験結果の変動性の研究、医薬品研究、28 (7)、505-511 (1997)
- 3) 日本公定書協会：日本薬局方技術情報 (JPTI) 2001、235-239、(株)じほう、東京 (2001)
- 4) 馬淵博他：医薬品溶出試験の規格等に関する検討 (第一報)、静岡県環境衛生科学研究所報告、42、69-72 (2000)
- 5) 馬淵博他：医薬品溶出試験の信頼性に関する研究、静岡県環境衛生科学研究所報告、43、29-31 (2001)
- 6) 神奈川県薬剤師会：平成 10 年度医薬品試験検査実施結果報告書、(1999)
- 7) 日本薬学会：日本薬学会第 120 年会講演要旨集、4、129 (2000)

医薬品溶出試験の信頼性に関する研究 (第3報)

—試料の堆積と試料溶液の液性—

医薬品生活部 医薬食品スタッフ 小和田和宏, 堀池あずさ, 植田敦子
藤原厚子, 山口善三郎, 浮島美之
馬淵 博*

Study on the Reliability in Drug Dissolution Test (III)

— Accumulated Sample and Acidity or Alkalinity of Sample Solutions —

Kazuhiro OWADA, Azusa HORIIKE, Atsuko UETA,

Atsuko FUJIWARA, Zenzaburo YAMAGUCHI, Yoshiyuki UKISHIMA,

and Hiroshi MABUCHI*

厚生労働省では平成10年より医薬品の溶出試験を用いて、医療用医薬品の品質を再評価する事業を行っている。当研究所は他の9都府県の地衛研と共にこの事業に参画し、メーカーより提出された溶出試験規格(案)の妥当性検証や厚生労働省が溶出試験規格を決定する際の助言等の役割を担っている。各都府県で分担検討した品目の中には、メーカーの示した溶出条件や試験検査方法では試験規格(案)の妥当性を検証できない事例も少なくなかった。本報は当所における溶出規格の妥当性検証および国一斉医薬品監視指導に係る収去試験で実施した溶出試験の結果から、試験方法や試験条件の設定に問題があったと思われる事例を紹介する。

事例1は先発メーカーの示した溶出条件では設定された試験規格(案)の妥当性を検証できない事例であった。また、事例2は溶出試験装置によって得られた溶出液をHPLCで分析する際の試料溶液の調製方法に関する事例で、試料溶液の液性を標準溶液のそれに合わせる必要があった。これらの検討結果が有効に活用され、適切な溶出試験条件や試験方法が設定されることが望まれる。

Key Words : 医薬品, 溶出試験, 品質再評価, 試料の堆積, 試料溶液の液性

drugs, dissolution test, reevaluation of drugs, accumulated sample,
acidity or alkalinity of sample solution

はじめに

医薬品はその有効性や安全性が常に確保され、保証されていることが必要である。一方、医療の現場では、同じ成分・含量の医薬品にもかかわらず、メーカーやロットの違いによる有効性の相違が問題となっている。特に、この相違は後発品に多いとされ、薬価の低い後発品の市場拡大を阻害する要因となっている。そこで、厚生労働

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka 420-8637, Japan)

*静岡県北遠健康福祉センター

省では平成10年より医薬品の溶出試験を用いて、医療用医薬品の品質を再評価する事業¹⁾を行ってきた。その結果、医療用医薬品の品質が保証され、安心して医療用医薬品を使用することができ、後発品の使用拡大により医療保険財政にも貢献できるものと考えている。

当研究所は東京都や大阪府等9都府県の地衛研と共にこの事業に参画し、メーカーより提出された溶出試験規格(案)の妥当性検証や厚生労働省が溶出試験規格を決定する際の助言等の役割を担っている。また、溶出規格が設定され、日本薬局方外医薬品規格(局外規)に記載された品目は次年度、医薬品等一斉監視指導において収去検査が実施され、その品質確保が図られている。

各都府県で分担検討した品目の中には、先発メーカーの示した溶出条件や試験検査方法では試験規格(案)の妥当性を検証できない事例も少なくなかった。そこで、今回は当所における本事業の役割分担を紹介すると共に、規格の妥当性検証または国一斉医薬品監視指導により実施した溶出試験の結果の中から、試験方法や試験条件の設定に問題があったと思われる事例を紹介する。

地方衛生研究所(規格検討班)の役割分担

- 1 先発、後発メーカーの[予試験結果]をもとに[基準液性]を決定する。
- 2 先発メーカーが作成した[公的溶出試験(案)]をもとに[時間、規格]を決める。
- 3 公的規格(案)をもとに標準製剤で案の妥当性検証を行う。[実際の試験で確認]
- 4 地方衛生研究所のデータを参考に[公的規格試験法]を検討する。日本薬局方外医薬品成分規格第三部収載。

調査方法

1 検体

血圧降下剤A(錠剤)

血圧降下剤B(ニブラジロール錠)

2 試験方法

日本薬局方²⁾溶出試験法、日本薬局方外医薬品成分規格第三部、医療用医薬品品質再評価公的規格試験法(案)等にしながら試験した。

3 溶出試験装置

- 1) 大日本精機(株)製溶出試験装置 RT-3Std
- 2) 富山産業(株)製溶出試験装置 NTR-6100A

結果及び考察

1 試料が堆積するため、設定された試験条件で成分の溶出が見られない事例(検体A)

血圧降下剤Aの溶出試験規格(案)の妥当性検証を分

担した際、当所での pH4.0 の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(0.05mol/L)における経時的な溶出挙動を調べ、メーカーの示した溶出曲線と比較した。当所における溶出曲線はメーカーのそれに比べ立ち上がりが遅かった(図1)。また、本品の規格設定時間(案;30分)の溶出率は表1に示したようにメーカーの実測値に比べ25%ほど低かった。

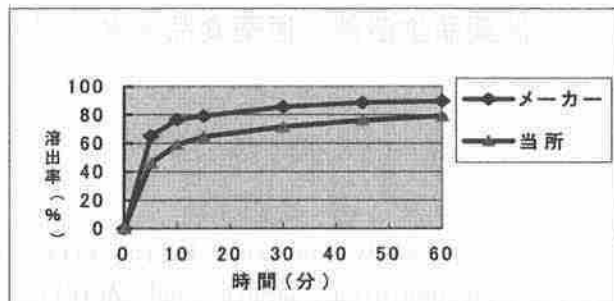


図1 メーカーと当所の溶出曲線

表1 メーカーと当所の30分溶出率の比較

ベッセル	1	2	3	4	5	6
メーカー	97.6	96.9	99.1	92.2	82.9	91.6
当所	66.7	73.8	62.1	76.0	64.0	63.8

注; 数値は溶出率(%)

溶出率に差が出た原因を検討するにあたり、試験液の脱気状態の違いが考えられたので、試験液の脱気方法(加温、脱気装置)を変え、溶出率に差が出るか検討した。加温脱気による溶出率は脱気装置による脱気で得た値に比べ若干高かったが、規格案(80%以上)を満たすには至らなかった(表2)。

表2 脱気方法による溶出率の比較

脱気方法	脱気装置			加温脱気	
1	66.7	72.5	69.5	78.3	75.7
2	73.8	68.4	73.2	77.5	74.1
3	62.1	74.9	75.7	78.5	79.7
4	76.0	69.7	74.1	75.6	69.4
5	64.0	69.8	68.5	69.1	70.7
6	63.8	68.1	69.3	70.0	70.6
平均	67.7	70.6	71.7	74.8	73.4

注; 数値は溶出率(%)

ところで、本製剤は試験液に投入するとすぐ崩壊し、ベッセルの底に山のように堆積した。そこで、溶出率の低い原因が試料の堆積によるのではないかと考えられたため、通常のサンプリングのあと、ガラス棒で堆積物を舞い上がらせてサンプリングした(約5回転)。さらに、ガラス棒でベッセル内を激しく攪拌(30回程度)してサンプリングした結果を表3に示した。その結果、わずか

表3 サンプルングの違いによる溶出率の変化

ベッセル	通常サンプリグ	舞いあがせる	激しく攪拌
1	68.8%	76.6%	84.5%
2	67.1	66.9	82.7
3	69.4	75.7	84.5
4	69.1	76.4	83.4
5	68.3	70.0	82.4
6	67.8	68.0	75.8
平均	68.4	72.3	82.2

に舞い上がらせた場合に溶出率は数%, 激しく攪拌すれば10%以上上昇することがわかった。

また, 溶出試験は通常ベッセルの回転は毎分50回転で行うが, 堆積した試料を攪拌させるため, 回転数を75回転として溶出挙動を調べた。75回転における溶出率は50回転に比べ顕著に上昇し, 30分での溶出率は約94.1%となり, 60分では約100%に達することがわかった(表4)。

表4 75回転による溶出挙動

溶出時間	5分	10分	15分	30分	45分	60分
1	71.3	81.3	87.1	92.9	94.6	95.3
2	74.9	85.5	90.8	90.7	98.0	98.4
3	73.2	88.5	94.0	97.8	99.8	98.4
4	70.5	85.7	89.3	95.0	95.2	98.4
5	71.6	85.7	88.8	95.1	96.5	98.2
6	69.4	82.7	89.4	93.1	92.1	97.0
平均	71.8	84.9	89.9	94.1	96.0	98.3

注; 数値は溶出率(%)

以上の結果から, 本製剤は試料が崩壊と同時にベッセルの底に堆積し, 溶出されにくい状態になっていると考えられた。当所とメーカーの示した溶出率との差は明らかではないが, ベッセルの形状によって堆積物の山のつき方が異なり, 溶出率に差が出るのではないかとも思われた。

2 HPLC試料溶液調製の問題事例(検体B)

本年度の国一斉医薬品監視指導において, 溶出規格が設定され, 日本薬局方外医薬品成分規格第三部に収載された品目の溶出試験を実施した。その中で, 血圧降下剤ニブラジロール錠(3mg, 6mg)が規格を満たさなかった。当該品目の試験液性は水で, 溶出規格は3mg錠が90分70%以上, 6mg錠は60分70%以上であった。

表5に示したように当所の試験結果はいずれも規格に適合しなかったが, メーカーの出荷時検査及び再試験結果は規格に適合していた。この結果を受け, 薬事指導室の指示のもと, メーカーの試験担当者との試験液や脱気方法, HPLC条件など比較したが, 両者の結果が異なる原因

表5 メーカーと当所のデータの比較(n=6)

錠剤の種類	溶出率	
	3mg錠	6mg錠
当所の結果	1回目 38.3~50.2%	43.1~56.4%
	2回目 40.8~44.0%	48.1~58.2%
メーカーの結果	出荷時 81.9~88.7%	82.4~89.1%
	再試験 81.7~96.1%	89.9~92.1%

はつかめなかった。そこで, メーカーとともに3mg錠を用いてクロスチェックを行い, 溶出率の差について原因を検討することとした。

両者によるクロスチェックの結果, 当初溶出率が異なる原因と予想していた溶出試験装置や用いる「水」の影響はなく, 分析に用いたHPLCの違いによる溶出率の差であることがわかった(表6)。すなわち, 同じ溶出液でも当所のHPLC1を用いた場合に溶出率が低く, 当所のHPLC2及びメーカーのHPLCはほぼ同じ値が得られた。そこで, HPLCにより差が出た理由を検討することにした。

表6 メーカーとのクロスチェックの結果

溶出装置	試験液	HPLC 1 当所	HPLC 2 当所	HPLC メーカー
当所	メーカー	43.6±9.2	80.7±7.8	81.1±8.4
メーカー	メーカー	52.7±5.8	84.7±6.1	83.0±7.7
メーカー	当所	49.1±3.5	82.6±6.6	83.7±7.2
当所	メーカー	40.1±3.5	79.7±6.3	81.0±6.1

注; 数値は溶出率(%)

まずHPLCのカラムが原因かどうかを確認するため, HPLC1及び2のカラムを相互に交換し, それぞれ溶出率を比較した。その結果を表7に示したが, HPLC1及び2のカラムを入れ替えても溶出率は変わらなかった。溶出率に違いが出る理由はカラムではなく, HPLCの機種の違いによることが窺われた。HPLC1は本年度7月に定期点検を行っており, また, 当該品の試験を行った前後に実施した別の溶出試験においては試験結果の異常は見られなかった。

表7 カラム交換による溶出率の比較

HPLC	カラム1	カラム2
HPLC 1	35.9%	36.1%
HPLC 2	72.9%	72.3%

また, HPLC1のニブラジロールのピークのシンメトリ係数は1.05(本法の規定2.0以下), 理論段数9300(本法の規定3000以上), 試験の再現性(ピーク面積の相対標準偏差)0.18~0.80%(本法の規定1.0%以下)と良

好であった。ポンプ流量やカラム圧力は一定でベースラインノイズも少なく、ピークの保持時間も安定していた。

このような状況の中、溶出率が HPLC 1 で低かった原因として考えられたのは、試料溶液と標準溶液の液性の違いであった。すなわち、試料溶液は「水」、標準溶液は標準品溶解時に「0.1mol/L 塩酸」を用いており、酸性である。そこで、得られた溶出液に「0.1mol/L 塩酸」を 1mL あたり 20 μ L 添加し試料溶液の液性を標準溶液に近づけて HPLC で測定を行った。

表 8 にその結果を示したが、溶出液「水」に少量の塩酸を添加し、標準溶液の液性に近づけた場合、HPLC 1 を用いた場合でも溶出率は 80% 台になることがわかった。また、HPLC 2 においても塩酸添加により数%溶出率が上がったことから、HPLC 1 は HPLC 2 よりも液性の違いによる影響を受けやすいと思われた。

表 8 塩酸添加による溶出率の変化

溶出装置	試験液	塩酸	HPLC 1	HPLC 2
当所	当所	なし	43.6 \pm 9.2	80.7 \pm 7.8
		添加	84.3 \pm 7.9	84.7 \pm 7.7
当所	メーカー	なし	40.1 \pm 3.5	79.7 \pm 6.3
		添加	84.9 \pm 7.0	測定せず

注：数値は溶出率（%）

この液性による溶出率の変化についての理由は明らかではないが、ニブラジロール錠の溶出試験を行う場合、溶出液を採取したあと HPLC に注入する段階で塩酸を加え、標準溶液の液性に合わせる操作を行う必要があることがわかった。この操作を追加することにより、HPLC の機種間差を無くすことが可能であり、公的試験法としてより適格な試験法に改善できるものと思われた。

まとめ

溶出試験を指標とした医療用医薬品の品質再評価事業において溶出試験規格(案)の妥当性検証を行い、また、規格設定された品目について収去検査を実施しているが、溶出試験結果に影響を及ぼす要因^{3)~7)}は複雑であると痛感させられる。

今回の事例 1 は先発メーカーの示した溶出条件や試験検査方法では設定された試験規格(案)の妥当性を検証できない事例であった。また、事例 2 は溶出試験装置によって得られた溶出液を HPLC で分析する際の試料溶液の調製方法に関する事例で、現在、溶出規格検討班で試料溶液の調製方法を標準溶液の液性に合わせるための試験方法の変更を検討している。先発メーカーと地衛研の溶出試験結果が一致しない事例はこれだけではないが、

これらの検討結果が有効に活用され、適切な溶出試験条件や試験方法が設定されることが望まれる。

文 献

- 1) 厚生省医薬安全局長通知：医療用医薬品の品質に係る再評価の実施等について、平成 10 年 7 月 15 日付医薬発第 634 号
- 2) 厚生労働省：第十四改正日本薬局方：平成 13 年 3 月 30 日付厚生労働省告示第 111 号
- 3) 鹿庭なほ子：試験室共同実験による溶出試験結果の変動性の研究、医薬品研究、28 (7), 505-511 (1997)
- 4) 日本公定書協会：日本薬局方技術情報 (JPTI) 2001, 235-239, 株式会社 併じほう, 東京 (2001)
- 5) 馬淵博他：医薬品溶出試験の規格等に関する検討(第一報)、静岡県環境衛生科学研究所報告、42, 69-72 (2000)
- 6) 馬淵博他：医薬品溶出試験の信頼性に関する研究、静岡県環境衛生科学研究所報告、43, 29-31 (2001)
- 7) 小和田和宏他：医薬品溶出試験の信頼性に関する研究(第 2 報)、静岡県環境衛生科学研究所報告、44, 投稿中 (2002)

院内製剤の品質確保に関する研究 (第一報)

— 院内製剤ジゴキシン散についての検討 —

医薬品生活部 医薬食品スタッフ

県立総合病院 薬剤部

植田 敦子, 堀池あずさ, 小和田和宏
山口善三郎, 藤原厚子, 浮島美之
宮本憲吾, 鍋田いづみ, 浅倉 侯子
見崎 芳枝

Study on Guarantee of Quality for Hospital Preparation (I)
— Investigation for Digoxin Powder of Hospital Preparation —

Atsuko UETA, Azusa HORIIKE, Kazuhiro OWADA,
Zenzaburo YAMAGUCHI, Atsuko FUJIWARA, Yoshiyuki UKISHIMA,
Kengo MIYAMOTO, Izumi NABETA, Kimiko ASAKURA,
and Yoshie MISAKI

院内製剤の品質保証体制を確立することにより, 製造段階から服用まで途切れることなく, 有効性および安全性を有する医薬品を患者に提供することが可能となる。

本報告では, 院内製剤の安定性および均一性を確認するため, 賦形剤の混合等の操作を含む院内製剤 (散剤) であるジゴキシン散の定量法を検討した。試験的に, 院内製剤ジゴキシン倍散の定量を試みたところ, 期待された定量値が得られず, 主薬が薬袋へ特異的に付着することが判明した。また, 主薬の付着には賦形剤の種類や量が影響することが明らかになった。院内製剤に関し常に同一の品質を確保するためには, より高度な手順書等の作成及びその手順書等の遵守が必要と考えられる。

Key words: 院内製剤, 品質確保, ジゴキシン散

Hospital Preparation, Guarantee of Quality, Digoxin Powder

はじめに

当所では, 今年度から調査研究として, 県立総合病院薬剤部と共同で, 「院内製剤の品質確保に関する研究」を行っている。

院内製剤は患者のさまざまな病態に対応するため, 必要不可欠のものである^{1) 2)}。院内製剤の品質保証体制を確立することにより, 製造段階から服用まで途切れることなく, 有効性および安全性を有する医薬品を患者に提供することが可能となる^{2) 3)}。

今回, 院内製剤の安定性および均一性を確認するため, 賦形剤の混合等の操作を含む院内製剤 (散剤) であるジゴキシン散の定量法の検討を行った。また, 実際に賦形剤をいくつかの条件で加え調剤したジゴキシン散を用い, 賦形剤等が及ぼす影響について検討を行ったのでその結果を

報告する。

定量法の検討

ジゴキシン散の日本薬局方⁴⁾の定量法 (UV 法) は用いる試薬の毒性が強く, 操作が煩雑であったため, 簡便な定量法 (HPLC 法) について, 米国薬局方⁵⁾を参考に検討した。

1 試験方法

1) 試料溶液の調製

ジゴキシン散の分包品 (表示量 0.1mg) を 100mL のメスプラスコにとり, エタノール (95) 50mL を入れ超音波抽出後, 精製水で正確に 100mL とし, さらに超音波抽出後メンブランフィルター (0.45 μ m, 水系) でろ過し, 試料溶液とした。

2) 標準溶液の調製

定量用ジゴキシン 0.01g を精密に量り, エタノール (95) で正確に 100mL とし, この液 5mL を正確にとり, エタノール (95) で正確に 50mL とした。さらに, この液

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka 420-8637, Japan)

5mL を正確にとり、エタノール (95) を 20mL 加え、精製水で正確に 50mL とし、標準溶液とした。

3) 定量

試料溶液および標準溶液 50 μL につき、次の条件で、液体クロマトグラフ法により試験を行い、ジゴキシンのピーク面積を測定した。

HPLC 条件	
検出器:	紫外可視吸光度計 (230nm)
カラム:	Inertsil ODS 3V 4.6mm×15cm, 5 μm
カラム温度:	40℃付近の一定温度
移動相:	水/アセトニトリル混液 (7 : 3)
流量:	1.0mL/min
検出感度:	ATT4

2 試験法の妥当性の確認

上記の試験方法について、その妥当性を確認した。

1) 試験の再現性

標準溶液 (1.0 μg/mL) を用い、ジゴキシンの保持時間及びピーク面積の再現性を確認したところ (表 1)、良好な結果が得られた。代表的なチャートを図 1 に示した。

2) 直線性

標準溶液 (0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 μg/mL) を用い、検量線を作成したところ、ほぼ原点を通り、相関係数 0.9994 の良好な直線が得られた (図 2)。

3) 添加回収

当所で調製したジゴキシンの 3,000 倍散にさらにジゴキシンを 0.05mg 添加し、その回収率を求めたところ、回収率は良好であった (表 2)。

表 1 試験の再現性

	CV (%)
保持時間	0.39 (n=6)
ピーク面積	0.88 (n=6)

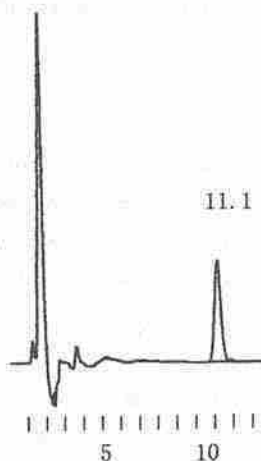


図 1 代表的なジゴキシンのチャート

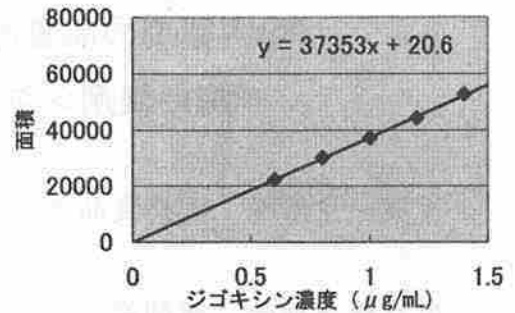


図 2 直線性

表 2 添加回収

	回収率 (%)
1	99.9
2	100.5
3	100.0
平均	100.1
CV (%)	0.32

ジゴキシンの定量(その 1)

県立総合病院薬剤部で試験的にジゴキシンの 3,000 倍散の分包品 (表示量 0.1mg) を作成し、当所でその均一性の確認を試みた。

1 ジゴキシンの 3,000 倍散の調製方法



1 包当り: 質量 0.3 g, ジゴキシンの表示量 0.1mg

2 定量

調製したジゴキシンの 3,000 倍散を定量法 A, B の二つの方法で定量し比較した。また、包装を開封し取り出した内容物の質量 (通常服用する方法で取り出せる散剤の質量) を測定した (表 3)。

定量法 A: 包装を開け、通常服用するのと同様にメスフラスコに移し、定量した。

定量法 B: 包装を開け、A と同様にメスフラスコに移し、さらに包装に付着している散剤をエタノールでメスフラスコに洗いこみ、定量した。

表3 定量法A, Bの結果

	内容物の質量(g)	定量値*(%)
定量法A (n=6)	0.2937 (CV3.3%)	71.4 (CV5.4%)
定量法B (n=6)		93.9 (CV3.9%)

* 定量値は、表示量 (1包 0.1mg) に対する割合

通常服用する方法で取り出せる散剤の質量のばらつきは小さく、分包装の均一性が確認できた。また、その質量 (0.2937g) は仕込み量 (1包当り 0.3g) の97.9%であった。

定量法A, Bの比較により、薬袋に付着していたと考えられるジゴキシンの量は0.0225mgで全体の22.5%であり、ジゴキシンの方が賦形剤よりも、薬袋に付着しやすい性質があるのではないかと考えられた。

ジゴキシンの定量(その2)

県立総合病院薬剤部で、ジゴキシンの定量(その1)の結果を踏まえ、最適な倍散調製方法を検討するため、賦形剤である乳糖の量や種類を変えたジゴキシンの分包装品(すべて表示量は0.1mg)6種類(表4)を作成し、当所において定量法Aを用いて定量した(表4)。①~③で使用した倍散用結晶乳糖に比べ、④~⑥で使用した日本薬局方乳糖「ホエイ」粉末(以下「粉末乳糖」と略す。)は粒子が細かいものであった。

表4に示したとおり、粒子が細かい乳糖を使用したもの(④~⑥)の方が定量値は高く、また賦形剤が多いほど定量値は高いという結果が得られた。

ジゴキシン表示量に対する割合の最も高かったジゴキシン散⑥を10包とり、それぞれ包装から内容物を取り出

表4 6種類の試験品の相違点および定量結果

	乳糖の種類	1包の質量	定量値*(%)
① 3,000倍散 (n=5)	倍散用結晶乳糖	0.3g	64.4 (CV2.1%)
② 5,000倍散 (n=6)	倍散用結晶乳糖	0.5g	71.9 (CV2.8%)
③ 10,000倍散 (n=6)	倍散用結晶乳糖	1.0g	79.7 (CV3.5%)
④ 3,000倍散 (n=6)	粉末乳糖	0.3g	81.1 (CV5.9%)
⑤ 5,000倍散 (n=6)	粉末乳糖	0.5g	87.8 (CV6.9%)
⑥ 10,000倍散 (n=6)	粉末乳糖	1.0g	90.6 (CV2.7%)

* 表示量はすべて1包 0.1mg

* 定量値は、表示量 (1包 0.1mg) に対する割合

し、その質量を測定した(表5)。1包中の散剤の質量(内容物)0.9784gは仕込み量(1.0001g)の97.8%であり、ばらつきは小さく均一性が確認できた。

また、ジゴキシン散⑥をジゴキシン散の定量(その2)の定量法Bの洗いこみ法により定量した(表6)。定量法A, Bによる差はごく僅かであった。

ジゴキシン散の定量(その1)では、ジゴキシンの方が賦形剤よりも薬袋に付着しやすいのではないかとという結果が得られたが、今回の検討により、乳糖の種類を変えること、および量を増やすことにより、薬袋への付着はほぼ改善されることがわかった。

また、表6の結果より約7%程度のジゴキシンについては、薬袋に分包装される前の段階の分包装機やジゴキシン散と賦形剤として加える乳糖を混合する容器等に付着している可能性があった。増し仕込みをしない院内製剤においては、少量の主薬損失は防ぐことのできないものである。

表5 ジゴキシン散⑥の1包の平均質量

	散剤の内容物の質量(g)
ジゴキシン散⑥ (n=10)	0.9784g (CV2.5%)

表6 ジゴキシン散⑥の定量結果(定量法B)

	表示量*に対する割合(%)
ジゴキシン散⑥ (n=3)	92.3 (CV2.6%)

* 表示量は1包 0.1mg

まとめ

院内製剤の品質確保を目的として、賦形剤の混合等の操作を含む院内製剤(散剤)であるジゴキシン倍散の定量を試みたところ、期待された定量値が得られず、分包装した薬袋へ主薬の付着が生じていることがわかった。また、主薬の付着には賦形剤の種類や量が影響することが明らかになった。

すべての製剤に関して、賦形剤の種類や量が主薬含量に影響するという事は考えにくい。今回のジゴキシンのように主薬含量の少ない、薬理活性の強い薬剤については、十分な注意を払う必要があると思われる。このような製剤に関して、常に同じ品質を確保するためには、より高度な手順書等の作成およびその遵守が、また施設間差を防止するためには、情報の共有化が重要である。

また、主薬含量の少ない製剤(錠剤等)の製薬メーカーでの商品化や、散剤が付着しにくい薬袋の材質の検討も必要ではないかと思われる事例であった。

今回の検討結果をもとに、さらに他の製剤についても検討を行い、恒常的に同一の品質を持つ院内製剤が供給され

るシステムの確立に役立てていきたい。

文 献

- 1) 松原 肇他：これからの院内製剤のあり方，月刊薬事，37，10，2179-2186(1995)
- 2) 郡 修徳他：院内製剤の必要性和現況，月刊薬事，37，10，2135-2140(1995)
- 3) 徳村忠一：医薬品の安定性と院内製剤，PHARM TECH JAPAN，16，5，769-775(2000)
- 4) 厚生労働省：第十四改正日本薬局方(2001)
- 5) U S P : The United States Pharmacopeia XXII(1990)

院内製剤の品質確保に関する研究 (第二報) — ワーファリン散予製剤の含量均一性評価 —

医薬品生活部 医薬食品スタッフ 堀池あずさ, 小和田和宏, 植田 敦子
山口善三郎, 藤原厚子, 浮島美之
県立総合病院薬剤部 宮本 憲吾, 鍋田いづみ, 浅倉 侯子
見崎 芳枝

Study on Guarantee of Quality for Hospital Preparation (II)
—Evaluation of Content Uniformity for Warfarin Powder—

Azusa HORIIKE, Kazuhiro OWADA, Atsuko UETA,
Atsuko FUJIWARA, Zenzaburo YAMAGUCHI, Yoshiyuki UKISHIMA,
Kengo MIYAMOTO, Izumi NABETA, Kimiko ASAKURA,
and Yoshie MISAKI

院内製剤であるワーファリン散予製剤中のワルファリンカリウムの含量均一性評価を行うため, HPLCによる分析方法を検討し, 良好な精度及び真度を有することを確認した. この分析方法を用いて予製剤及び分包品について測定したところ, 分包品ではジゴキシン散のような薬袋への特異的な吸着は見られなかった. しかし, 予製剤の調製方法において, 賦形剤である乳糖との混合比を正確にするため, ワーファリン錠粉碎後の秤量操作が必要であることが示唆された.

Key words: 院内製剤, 品質確保, ワーファリン散, 含量均一性

Hospital Preparation, Guarantee of Quality, Warfarin Powder, Content Uniformity

はじめに

医薬品は, その有効性及び安全性を確保するために, 開発段階における製剤設計から, 製造・流通段階に至るまでの品質保証体制が確立されている¹⁾. その後の段階においても, 病院や薬局における調剤時の品質管理を適正に行うことを目的とし, 含量均一性試験や安定性試験等が実施されることが望ましい²⁾. 当所では今年度より, 県立総合病院薬剤部と共同で院内製剤の分析方法及び予製剤や分包品の調剤上の問題点等について検討を行っている.

本論文では, 第一報³⁾のジゴキシン散に続き, 錠剤粉碎操作を含むワーファリン散予製剤について, 分析方法の検討及び含量均一性評価を行ったので報告する.

ワルファリンカリウム分析方法の検討

1 材料

- 1) ワーファリン錠 (日局ワルファリンカリウム錠: エーザイ株式会社製, 1mg/錠, 1錠平均質量 0.2506g)
- 2) 乳糖 (メルクホエイ株式会社製, 倍散調製用結晶)

2 予製剤の調製方法

表1に示した病院におけるワーファリン散予製剤の調製方法をもとに, 約15%のスケールで調製を行い, 錠剤粉末と乳糖との混合比を 3.75g : 2.25g とした (表2).

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-Andō, Shizuoka 420-8637, Japan)

表1 病院におけるワルファリン散予剤の調製方法

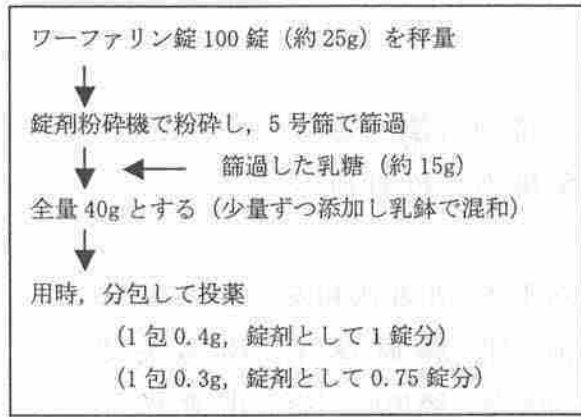
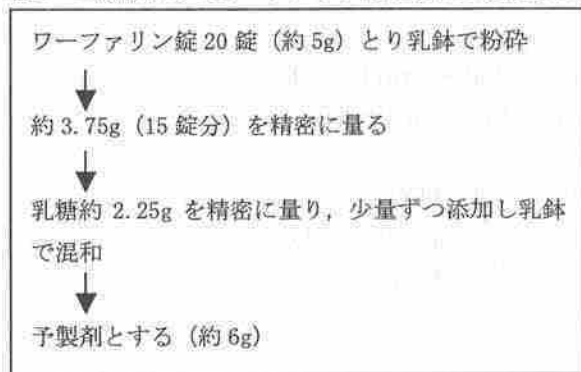


表2 当所におけるワルファリン散予剤の調製方法



3 試験溶液の調製

1) 試料溶液の調製

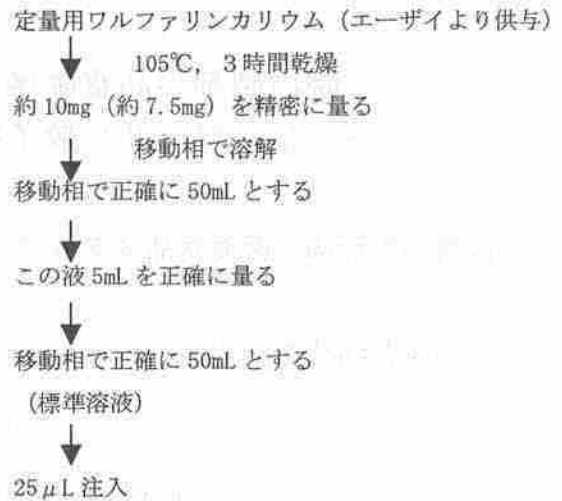
後述する抽出条件 (抽出溶媒, 抽出回数) の検討結果をもとに以下に示す試料溶液調製方法を用いた。

予製剤約 0.4g (0.3g) 精秤 (遠心沈殿管)



25 μL 注入

2) 標準溶液の調製



4 HPLC 試験条件

ジーエルサイエンス (株) HPLC データ集⁴⁾ を参考に、以下に示す試験条件を設定した。

装置: 日立 L-6000 シリーズ

検出感度: ATT 5 (日立 D-2500)

検出器: 紫外可視分光光度計 (測定波長: 220nm)

カラム: CHIRACEL OD-RH, 4.6mm × 150mm, 5 μm

(ダイセル化学工業株式会社製)

カラム温度: 40°C 付近の一定温度

移動相: 0.2M リン酸塩緩衝液 (pH 2.5) * / アセトニトリル混液 (1 : 1)

*0.2M リン酸塩緩衝液 (pH 2.5) 調製方法

KH₂PO₄ (試薬特級) 13.61g を水に溶かし, 正確に 500mL とし, リン酸で pH 2.5 に調整する。

流量: 光学異性体の 2 本のピーク保持時間が約 6.6 分及び約 8.5 分となるように流量を調整 (0.8mL/min, 圧力 45 kg/cm²)

カラムの実測値

理論段数: 6.6 分のピーク (7700), 8.5 分のピーク (7500)

シンメトリー係数: 6.6 分のピーク (1.0), 8.5 分のピーク (1.0)

分離度: 5.4

5 直線性と定量におけるピーク面積の選択

ワルファリンカリウムは光学異性体であることから, 定量において, 保持時間 6.6 分付近と 8.5 分付近に 2 本のピークが検出される (図1)。

5 段階濃度の標準溶液に対し, 各ピーク面積及びこれらの合計面積ともに直線性を有し, 相関係数はいずれも r = 0.9999 であったことから, 定量値等の算出にはピーク合

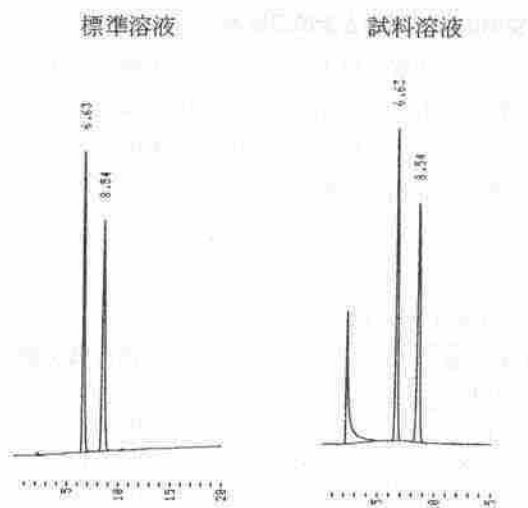


図1 代表的なクロマトグラム

計面積値を採用することとした (表3)。また 2 本のピーク面積比は全濃度においてほぼ 1 : 1 であった。図2に、ピーク合計面積の検量線を示した。

表3 ワルファリンカリウム各ピークの直線性

濃度 (mg/50mL)	ピーク面積値		
	6.6分	8.5分	合計
0.624	222215	221893	444108
0.832	296578	296895	593473
1.040	367790	369316	737106
1.248	437567	438200	875767
1.456	509624	511617	1021241
検量線の 相関係数	r=0.9999	r=0.9999	r=0.9999

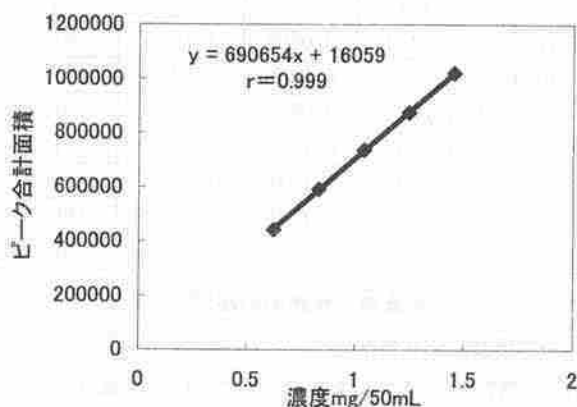


図2 ワルファリンカリウムの検量線

6 抽出条件の検討

1) 抽出溶媒の検討

試料：ワーファリン錠を粉末化し、1錠分(0.25g)を精密に量る

抽出溶媒：水、メタノール、エタノール(95)、移動相の4種

定量用ワルファリンカリウム及び試料を各抽出溶媒で調製し定量値を比較したところ、表4に示した結果が得られた。

このことから、抽出溶媒としては95%以上となった移動相または水が適切であると考えられた。

また、標準品を水及び移動相に溶解し0.6~1.4mg/50mLの濃度範囲で検量線を作成し、直線性及び注入再現精度を比較したところ、ともに相関係数0.9999、注入再現性も0.30%以内で良好な結果が得られた(表4)。

表4 抽出溶媒の検討結果

抽出溶媒	定量値 (%)	検量線の相関係数	注入再現精度 (n=7のCV)
メタノール	86.1	—	—
エタノール(95)	85.7	—	—
水	95.3	0.9999	0.20%
移動相	97.0	0.9999	0.29%

2) 抽出回数の検討

試料：ワーファリン錠を粉末化し、1錠分(0.25g)を精密に量る

抽出溶媒：水、移動相

抽出回数1, 2, 3回ごとの定量値を求め、必要な抽出回数を検討した。すなわち、試料を抽出溶媒30mLで5分間超音波抽出し、遠心して上澄液を集め50mLにメスアップした溶液(T1)、残留物に抽出溶媒30mLを加えて同様の操作を行い50mLとした溶液(T2)及び残留物をさらにも

表5 抽出回数と定量値 (%)

溶媒	T1	T2	T3	合計
水	93.0	1.6	0	94.6
	92.1	0.9	0	93.0
	94.2	0.8	0	95.0
平均	93.1	1.1	0	94.2
移動相	98.7	0.4	0	99.2
	97.7	0.4	0	98.1
	94.7	0.5	0.1	95.2
平均	96.5	0.4	0	97.5

う 1 回抽出した溶液 (T3) を調製し、定量を行った (表 5)。

抽出溶媒は、移動相が最適で、1 回目の抽出でほぼ全量が抽出できることがわかった。この検討結果から、試料溶液の調製は、1 回目に 30mL で行い、残留物をさらに 15mL で抽出し、全抽出液を合わせて 50mL にメスアップすることにした。

7 錠剤の併行精度と添加回収率

検討した抽出条件で、錠剤中のワルファリンカリウム含量について併行精度を確認した。

試料：ワーファリン錠を粉末化し、1 錠分 (0.25g) を精密に量る

抽出溶媒：移動相

6 回の併行測定の結果、変動係数 (CV) は 0.44% と良好な結果であった。また、1 錠 (平均質量 0.25g) 当たりの理論含量は 0.98435mg であった (表 6)。

表 6 錠剤の併行精度

試料秤量 (g)	定量値 (%)	1 錠中理論含量 (mg)
0.2615	99.2	0.9919
0.2566	98.5	0.9854
0.2547	98.4	0.9838
0.2582	97.8	0.9785
0.2651	98.4	0.9836
0.2471	98.3	0.9829
平均	98.4	0.9843
標準偏差	0.4	—
変動係数	0.44%	—

1 錠あたり 質量 0.25g、ワルファリンカリウム表示量：1mg

次に、錠剤の粉末に約 5 及び 10% のワルファリンカリウムを添加し、回収率を求めたところ、平均回収率は 97.6 ± 3.1% (CV3.2%) と良好であった (表 7)。

表 7 錠剤への添加回収率

試料秤量 (g)	理論含量 (mg)	添加量 (mg)	検出量 (mg)	回収率 (%)
0.2545	1.0021	0.052	1.0547	101.2
0.2533	0.9973	0.052	1.0468	95.2
0.2517	0.9910	0.052	1.0416	97.3
0.2534	0.9977	0.104	1.0944	93.0
0.2535	0.9981	0.104	1.1022	100.1
0.2525	0.9942	0.104	1.0971	98.9
平均				97.6

8 予製剤の併行精度と添加回収率

ワーファリン錠を粉末化したものと乳糖を所定量混合した予製剤 0.4g 中のワルファリンカリウム含量について、6 回測定を行い併行精度を確認した (表 8)。また、錠剤粉末の場合と同様に予製剤へワルファリンカリウムを添加し、添加回収実験を行った (表 9)。

表 8 予製剤の併行精度

試料秤量 (g)	定量値 (%)	1 錠中理論含量 (mg)
0.4127	98.2	0.9820
0.4053	98.5	0.9849
0.4054	98.5	0.9852
0.4067	99.1	0.9909
0.4125	98.2	0.9819
0.4231	99.1	0.9909
平均	98.6	0.98597
標準偏差	0.4	—
変動係数	0.42%	—

ワルファリンカリウム表示量：2.5mg/g

(ワーファリン錠の粉末：3.7521g 乳糖：2.2518g を混合)

6 回の測定の結果、変動係数は 0.42% と良好な結果であった。

また、1 錠 (平均重量 0.25g) 当たりの理論含量は 0.98597mg で、錠剤の検討結果とほぼ一致する良好な結果であった。

次に、予製剤に約 5 及び 10% のワルファリンカリウムを添加し、回収率を求めたところ、平均回収率は 98.8 ± 2.7% (CV2.7%) と良好であった。

表 9 予製剤の添加回収率

試料秤量 (g)	理論含量 (mg)	添加量 (mg)	検出量 (mg)	回収率 (%)
0.4150	1.0437	0.0608	1.1028	97.2
0.4084	1.0271	0.0608	1.0849	95.1
0.4005	1.0072	0.0608	1.0663	97.2
0.4035	1.0148	0.1216	1.1377	101.1
0.4034	1.0145	0.1216	1.1385	102.0
0.4199	1.0560	0.1216	1.1779	100.2
平均				98.8

含量均一性評価の検討

1 当所で調製した予製剤

当所で調製した予製剤を約 0.3g ずつ精密に量り、空の薬袋に入れシーラーで分包 (手分包) した 6 包について定量を行った。3 包 (①~③) は、薬袋を開け通常服用するように遠沈管に移して試料を量りとり、3 包 (④~⑥)

は移した後、葉袋に付着している散剤を移動相で洗い込んで試料溶液を調製した(表10)。

通常服用する方法で、定量値が約95%となりワルファリンカリウムでは、ジゴキシンのように特異的に葉袋に付着しやすい性質はないものと考えられる。洗い込む方法では97.1%で、予製剤を分包せず直接量りとして測定した値より1.5%ほど低かった。

本予製剤では、分包品としたとき、葉袋の内側全体に粉末が付着するため、開封や洗い込みの操作の際、ある程度のロスが考えられる。また、内容物を移す際、袋をこすりあわせるようにして粉末を取らないと、ほぼ同量の試料を得ることが難しかった。

表10 当所予製剤の分包品定量結果

分包量 (g)	試料秤量 (g)	1包あたりの含量 (mg)	定量値 (%)
①0.2997	0.2873	0.7188	95.8
②0.3003	0.2933	0.7130	95.1
③0.2995	0.2921	0.7096	94.6
平均		0.7138	95.2
④0.3046		0.7233	96.4
⑤0.3033		0.7302	97.4
⑥0.3025		0.7312	97.5
平均		0.7282	97.1

1包当り 質量0.3g, ワルファリンカリウム表示量: 0.75mg
予製剤の定量値: 97.6%

2 病院で調製した予製剤

病院で調製した予製剤について、1と同様に当所で分包品を作り、含量を測定した結果を表11に示した。

表11 病院予製剤の当所分包品定量結果

分包量 (g)	試料秤量 (g)	1包あたりの含量 (mg)	定量値 (%)
①0.2968	0.2878	0.6802	90.7
②0.3008	0.2929	0.6936	92.5
③0.2914	0.2812	0.6760	90.1
平均		0.6833	91.1
④0.2980		0.6818	90.9
⑤0.2988		0.6852	91.4
⑥0.3016		0.6868	91.6
平均		0.6846	91.3

1包当り 質量0.3g, ワルファリンカリウム表示量: 0.75mg
予製剤の定量値: 93.5%

定量値は、どちらの方法でも約91%で、当所予製剤を分包したときに比べ4~6%ほど低い値であった。

3 病院分包品

病院で作製した分包品6包につき、①~③は通常服用するように試料を量りとり、④~⑥は葉袋を溶媒で洗い込んで試料溶液を作成した。ただし、洗い込んだ検体では、①~③の平均試料秤量値に、袋に残留する試料量の平均(0.009g)を加算した0.2876gを試料秤量とした(表12, 13)。

院分包品の定量値は、どちらの方法でも約91%であった。また、変動係数は、通常服用する方法で1.6%、洗い込む方法で0.6%であった。

表12 病院分包品の定量結果

試料秤量 (g)	1包あたりの含量 (mg)	定量値 (%)	
①0.2779	0.6791	90.5	
②0.2940	0.7008	93.4	
③0.2631	0.6885	91.8	
平均	0.2786	0.6895	91.9
④	0.6907	92.1	
⑤0.2876	0.6828	91.0	
⑥	0.6853	91.4	
平均	0.2876	0.6863	91.5

1包当り 質量0.3g, ワルファリンカリウム表示量: 0.75mg
予製剤の定量値: 93.5%

表13 予製剤の葉袋への付着質量

種類	分包量 (g)	秤量 (g)	付着質量 (g)	付着率 (%)
当所予製剤	0.2998	0.2909	0.0089	2.97
病院予製剤	0.2963	0.2873	0.0090	3.04

以上の検討内容を表14にまとめた。

当所予製剤を直接秤量して測定した含量を100%とすると、通常服用の試料採取方法では約97%となり、ワルファリンカリウム含量の約3%の葉袋への付着が考えられる。これは葉袋への付着質量の割合とも一致することから、ワルファリンカリウムは乳糖等の賦形剤と均等に付着していると考えられる。病院の予製剤についても、その差は2.4%であった。

当所及び病院予製剤の定量値の差約5%については、病院での実際の調製方法に起因する差であると考えられる。すなわち、100錠を粉碎したあと、乳糖を加えて全量を40gとしており、粉碎や篩過、混合の工程での損失分が補われていない。錠剤粉末を所定量とってから乳糖と混合するこ

表 14 試料形態及び採取方法の違いによる定量値の比較

試料形態 (採取方法)	病院予製剤 当所分包	病院予製剤 病院分包	当所予製剤 当所分包
分包あり 洗い込みなし (通常服用)	91.1 (93.3)	91.9 (94.2)	95.2 (97.5)
分包あり 洗い込みあり	91.3 (93.5)	91.5 (93.8)	97.1 (99.5)
分包なし (直接秤量)	93.5 (95.8)	—	97.6 (100)

() 内の数字は、当所予製剤を直接秤量して定量した含量を100としたときの各含量値

とにより、含量は向上すると考えられる。

また、病院の分包品と病院予製剤を当所で分包したものは、分包機への付着分により含量に差が生じると考えられたが、今回の検討では認められなかった。

まとめ

今回検討したワーファリン散予製剤の含量均一性評価では、分包品については、第一報のジゴキシン散で見られたような葉袋への成分の特異的な吸着は見られなかったが、病院における現在の調製方法では、分包前の予製剤の段階で約5%の損失があることが示唆された。その後の分包機、葉袋への付着分を考慮して、最終的な服用段階までに、なるべく成分の損失を抑えられるように、乳糖との混合前に粉末化した錠剤の質量を量り、所定の混合量であることを確認することが望ましい。

院内製剤(予製剤)では、特に用量の低いものについてその含量の均一性評価を適切に行うことは非常に重要であると思われる。調剤の過程で、含量が低下する、あるいはばらつく原因を究明し、服用直前の品質を保証する体制を作ることが、院内製剤の質の信頼性を向上させ医療過誤防止の一助となると思われる。

文 献

- 1) 仲佐啓詳他：病院薬局における医薬品の品質確保，月刊薬事，39，6（1997）
- 2) 仮屋蘆博子他：院内製剤の品質試験と評価，月刊薬事，39，6，（1997）
- 3) 植田敦子他：院内製剤の品質確保に関する研究（第一報）－院内製剤ジゴキシン散についての検討－，静岡県環境衛生科学研究所，44：投稿中（2001）
- 4) ジーエルサイエンス（株）：総合カタログ27，300

5) 厚生労働省：第十四改正日本薬局方(2001)

農産食品の残留農薬一斉分析法に関する検討

医薬品生活部 医薬食品スタッフ 高橋 真, 増田 教子, 山下 敬子
坂根 弓子*, 山口 善三郎, 浮島 美之

Development of Simultaneous Analytical Method for
Pesticide Residues in Agricultural Products

Makoto TAKAHASHI, Kyoko MASUDA, Takako YAMASHITA,
Yumiko SAKANE*, Zenzaburo YAMAGUCHI, and Yoshiyuki UKISHIMA

年々増加する農産食品中の残留農薬基準に対応するためには、一斉分析法の開発が必須な状況となっている。当所では、従前から一斉分析法の検討を行い業務に取り入れてきている¹⁾。しかし、この方法はGCにより分析を行う項目を対象としており、近年の基準設定において増加傾向の見られるHPLCを用いる農薬についての検討を行う必要性が高まってきた。そこで今回はHPLCを用いて分析を行う項目について、現在使用している一斉分析法に取り込むことを検討したところ、類似の前処理や検出波長などを有する11農薬について、従来法を若干改良することにより、同時に分析を行うことが可能となり、分析項目の充実を図ることができた。

Key words: 残留農薬, 一斉分析法, 農産食品, HPLC

Pesticide Residues, Simultaneous Analysis, Agricultural Products, HPLC

はじめに

食品の安全確保のために厚生労働省は、残留農薬基準を毎年設定しており、平成4年には26項目であった基準は、平成14年2月現在217項目となっており、今後も基準設定は続けられていく予定である。現在、告示で示されたこれらの農薬の分析法の多くは個別分析となっており、100通りを超える状況となっている。しかし、その全ての分析を行うには、多大な時間と労力が必要であり、限られた人員や予算内で行う日常業務には不向きである。そのため、当所では以前から、より多くの農薬を同時に分析可能な一斉分析法の検討を行い日常業務に取り入れてきた¹⁾。今回は、従来GCを中心に分析を行ってきた一斉分析法にHPLCを用いる項目(以下HPLC項目)を追加することを目的として検討を行った。

材料および方法

1 試薬

標準品は市販の農薬標準品を用い、その他の試薬については残留農薬分析用、HPLC用または特級を使用した。NH₂ミニカラムはBond Elut NH₂及びSep-Pak NH₂を用いた。

2 検討方法

1) 項目の選定

現在までに残留基準の設定が行われている農薬のうちHPLCを用いた分析を行うものについて、検出方法、検出波長などに類似性があり、現在当所で行っている一斉分析法を応用できる可能性のある項目を選定し、今回の検討項目とした。

2) HPLCでの一斉分析条件の検討

選定した農薬をHPLCで一斉に分析するための条件検討を行った。各農薬の標準溶液を用いて、カラム、UV波長、グラジエント条件等の検討を行った。

3) 従来法における回収率の検討

今回検討を行う農薬について、従来から当所で行って

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka 420-8637, Japan)

*静岡県中部保健所

いる一斉分析法の前処理を行った場合の回収率について、標準溶液を用いて検討した。まず、抽出、精製の各ステップでの各農薬の回収率について検討を行い、更に、全体を通した前処理での回収率を測定した。

4) 精製法の追加

検討を進める過程で、検体の作物の種類により HPLC で分析を行う際に、多くの妨害成分が見られる場合があり、従来法に精製工程を追加する必要が生じた。そこでミニカラムによる精製法について検討を行った。

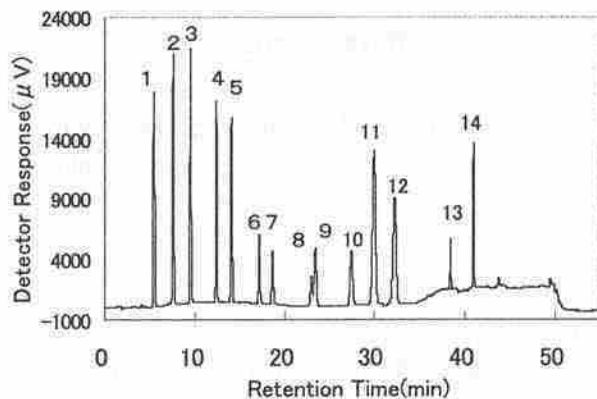
5) HPLC 項目の従来法への追加

今回検討した HPLC 項目を従来法に追加するためには、精製段階で各分析機器へ供するサンプルの採取法など、細部の調整が必要となる。そこで、実際の業務として実施しやすい形にアレンジし、実試料を用い分析法全体の問題点の有無について検討を行った。

結果

1 項目の選定

告示分析法等における前処理方法、HPLC での分析条件等が類似しているものを選定し、図1に示した13項目14成分について検討を行った。なお、テフルベンズロン、フェンピロキシメート(Z体)は標準品入手の関係、ルフエヌロンについては検討途中で告示が行われたことから項目追加したため、当初の回収率試験等では除外されている。



- | | | |
|--------------|------------------|-------------------|
| 1 シモキサニル | 6 ヘキサフルムロン | 11 フェンピロキシメート(E体) |
| 2 メタベンズチアズロン | 7 テフルベンズロン | 12 クロルフルアズロン |
| 3 ジクロメジン | 8 ルフェヌロン | 13 エトフェプロックス |
| 4 ジフルベンズロン | 9 フェンピロキシメート(Z体) | 14 シラフルオフェン |
| 5 テアフェノジド | 10 フルフェクスロン | |

図1 13農薬14成分同時分析のHPLCクロマトグラム

2 HPLC 条件の検討

各農薬の UV スペクトルについてフォトダイオードアレイ検出器を用いて測定し、最適検出波長を検討した。250nm 付近に極大を持つ農薬もあったが、200nm が最大となるものもいくつかみられた。そこで、検出波長を 210

～250nm に設定して検討対象農薬のすべてについて感度が得られ、妨害の影響が少ない波長を求めたところ、240nm が適当であることがわかった。

次に、対象農薬の同時分析が可能なグラジエント条件の検討を行ったところ、下記の条件により図1に示すとおり14成分を分離することができた。

装置：日本分光 GULLIVER

カラム：Mightysil RP-18 GP (φ4.6×250mm, 5μm, 関東化学)

カラム温度：40℃

検出波長：240nm

移動相：アセトニトリル・水のグラジエント
グラジエント条件は図2のとおり

流速：0.8mL/min

注入量：20μL

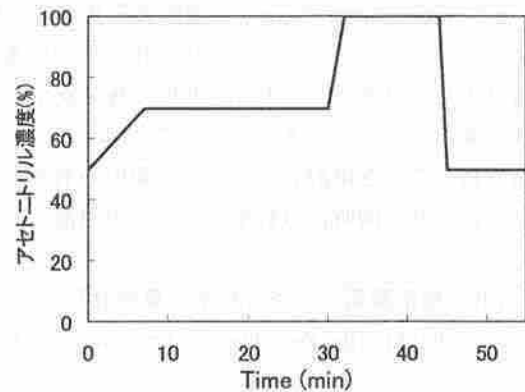


図2 移動相のグラジエント条件

3 従来法における回収率の検討

各精製段階での回収率について検討を行った。表1にフロリジルカラムにおける回収率を示した。一部の農薬について、フロリジルカラムにおける溶出溶媒を追加することで、いずれの農薬もほぼ80%以上の回収率が得られ、従来の前処理方法が応用可能であることが明らかになった。

表1 フラクション別回収率 (フロリジルカラム)

農薬名	回収率 (%)						
	Fr. 0	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3-40	Fr. 3-50	合計(40)	合計(50)
シモキサニル	0.0	0.0	3.0	81.2	97.2	84.2	100.2
メタペンズチアズロン	0.0	0.0	100.7	0.0	0.0	100.7	100.7
ジクロメジン	0.1	0.0	2.7	79.2	92.3	82.0	95.1
ジフルヘンズロン	0.3	0.0	103.5	0.0	0.0	103.8	103.8
テブフェノシト	0.0	0.0	99.5	0.0	1.3	99.5	100.8
ヘキサフルムロン	0.0	24.1	99.9	2.2	0.0	126.2	124.0
フルフェノクスロン	0.0	0.0	114.1	15.7	0.0	129.8	114.1
クロルフルアズロン	0.0	0.0	98.0	0.0	0.0	98.0	98.0
フェンビロキシメート(E体)	0.1	0.0	109.5	0.0	0.0	109.6	109.6
エトフェンブロックス	0.0	107.9	5.5	0.0	0.0	113.4	113.4
シアフルオフェン	0.0	56.4	22.8	0.0	0.0	79.2	79.2

*メタペンズロンについては標準品入手の関係で検討から外れている。

*従来法ではFr. 0はヘキサン, Fr. 1はエーテル:ヘキサン(15:85), Fr. 2はアセトン:ヘキサン(30:70)で溶出を行っている。

*追加としてFr. 3-40はアセトン:ヘキサン(40:60), Fr. 3-50はアセトン:ヘキサン(50:50)で溶出を行った。

*合計(40)はアセトン:ヘキサン(40:60), 合計(50)はアセトン:ヘキサン(50:50)の場合の回収率の合計

4 精製法の追加

従来法については、標準溶液を用いた場合、前述のとおり回収率も良好であったが、実サンプルに応用したところ、作物により妨害ピークが多数見られ、フロリジルカラムのみの精製では定量が困難な場合があることがわかった。そこで、更なる精製法としてミニカラム処理の追加について検討を行った。

今回対象としたHPLC項目の多くは、告示において精製法にアミノプロピルミニカラム(NH₂)を使用しており、まずこの方法から検討を行った。Bond Elut NH₂ 及び Sep-Pak NH₂ ミニカラムについて各農薬の標準溶液を用いて比較を行った。

NH₂ ミニカラムのコンディショニング、試料のアプライ、Fr. 1の溶出にはエーテル:ヘキサン(3:7)を用い、Fr. 2についてはアセトン:ヘキサン(3:17)で溶出を行っ

た。

表2に示すように Bond Elut NH₂ ではシモキサニル、ジクロメジンが殆ど回収されない他、フルフェノクスロンについては妨害により200%を超える回収率を示している。

一方、Sep-Pak NH₂ の場合はメタペンズチアズロンが二つのフラクションに分かれるものの、全体的に回収率が安定していた。これらのことから精製法の検討には Sep-Pak NH₂ ミニカラムを用いることとした。

また、実サンプルを用いて検討を行ったところ、従来法におけるフロリジルカラム処理のエーテル・ヘキサン溶出面分(Fr. 1)については、HPLC分析時の夾雑ピークが比較的少ないことがわかった。そこで、Fr. 1については、NH₂ ミニカラム処理を省略し、フロリジルカラム処理のアセトン・ヘキサン溶出面分(Fr. 2)のみについて

表2 NH₂ミニカラムの比較

農薬名	回収率 (%)					
	Bond Elut			Sep-Pak		
	Fr. 1	Fr. 2	合計	Fr. 1	Fr. 2	合計
シモキサニル	0.0	0.0	0.0	0.0	27.9	27.9
メタペンズチアズロン	0.0	117.6	117.6	25.4	74.4	99.8
ジクロメジン	0.0	0.2	0.2	0.0	67.4	67.4
ジフルヘンズロン	0.0	112.8	112.8	0.0	116.0	116.0
テブフェノシト	0.0	111.2	111.2	0.0	106.8	106.8
ヘキサフルムロン	0.0	73.3	73.3	0.0	110.7	110.7
テフルヘンズロン	12.8	113.1	125.9	0.0	108.9	108.9
フルフェノクスロン	73.0	146.7	219.7	13.7	105.9	119.6
クロルフルアズロン	0.0	110.5	110.5	0.0	97.1	97.1
フェンビロキシメート(E体)	114.1	3.2	117.3	105.9	0.0	105.9
エトフェンブロックス	118.1	0.0	118.1	109.0	0.0	109.0
シアフルオフェン	111.6	0.0	111.6	119.8	0.0	119.8

*フェンビロキシメート(2体)及びフルフェノクスロンについては標準品入手の関係で検討から外れている。

*Fr. 1はエーテル:ヘキサン(3:7), Fr. 2はアセトン:ヘキサン(3:17)で溶出を行った。

表3 各種農産物における回収率

番号	農薬名	フラクション	回収率 (%)					
			イチゴ	ミカン	茶	バナナ	パプリカ	ニンニク
1	シモキサニル	Fr. 1-Fr. 2	4.4	7.2	16.0	0.0	56.3	46.7
2	メタベンズチアズロン	Fr. 2-NH2-1	6.3	22.5	16.1	45.2	49.4	39.5
		Fr. 2-NH2-2	83.4	61.7	71.6	50.6	39.4	49.1
		計	89.7	84.1	87.7	95.8	88.8	88.7
3	ジクロメジン	Fr. 1-Fr. 2	4.1	0.0	8.6	0.0	44.0	30.8
4	ジフルベンズロン	Fr. 2-NH2-2	98.3	98.3	96.5	101.7	90.3	108.6
5	テブフェノト	Fr. 2-NH2-2	101.2	99.7	95.9	104.7	109.0	108.3
6	ヘキサフルムロン	Fr. 2-NH2-2	96.2	91.4	90.9	110.8	53.5	111.8
7	テフルベンズロン	Fr. 2-NH2-2	98.4	88.9	108.3	137.6	208.7	114.0
8	ルフェヌロン	Fr. 2-NH2-2	100.4	86.8	60.8	106.4	98.0	118.8
9	フェンピロキシメート(Z体)	Fr. 2-NH2-1	68.8	92.1	76.3	104.0	97.9	82.7
10	フルフェノクスロン	Fr. 2-NH2-2	102.0	101.0	96.6	111.1	100.9	109.4
11	フェンピロキシメート(E体)	Fr. 2-NH2-1	89.5	100.2	105.7	106.0	106.7	96.3
12	クロルフルアズロン	Fr. 2-NH2-2	96.8	95.3	93.3	111.5	71.7	109.9
13	エトフェンプロックス	Fr. 1	85.9	116.1	75.4	91.0	73.2	80.9
14	シラフルオフェン	Fr. 1	76.3	115.4	85.9	74.6	60.0	109.9

実施することとした。この画分については、NH₂ ミニカラム処理によりクロマトグラム上の妨害除去に効果が見られ、一斉分析法への追加精製手段として有効であることがわかった。

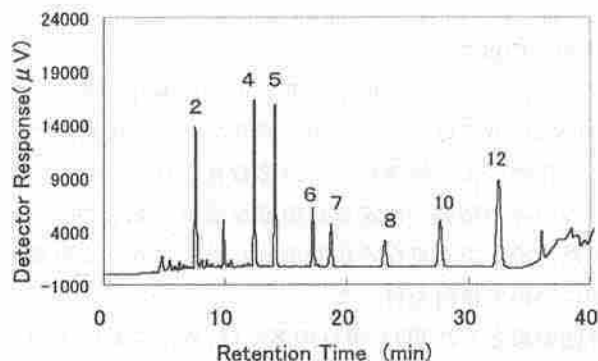
図1のクロマトグラムで近接していたフェンピロキシメート(Z体)とルフェヌロンについてはNH₂ ミニカラムでの溶出画分が異なるため、定量時には分別定量が可能であった。

また、実サンプルとして各種農産物 20g に各農薬を 0.1ppm となるように添加し、回収率を測定したところ、表3に示したような結果が得られた。

このときの定量下限値は 0.05ppm であった。

シモキサニル及びジクロメジンについては、作物により回収率が著しく低い結果になり、フロリジルカラム等での損失があったものと思われる。また、これらの農薬が溶出するフロリジルカラムの Fr. 3 については、実サンプルにおいて回収率が非常に不安定であった。これらのことから、この2農薬については今回の検討からは除外し、今後の検討課題とした。

上記以外の 11 農薬 12 成分については、パプリカの場合に妨害等の影響があり、回収率に若干ばらつきが見られたが、他の作物においては良好な回収率が得られ、多くの作物に対して、有効な前処理法であることが確認された。代表的なクロマトグラムとしてミカンに各農薬を 0.1ppm 添加したものの Fr. 2 の NH₂-2 について図3に示した。妨害ピークも少なくこの画分に溶出する 8 種の農薬を回収率よく検出している。また、個々には示さなかったが、他の画分に溶出する 3 農薬 4 成分についても妨害の少ない良好なクロマトグラムが得られた。

図3 ミカンFr. 2-NH₂-2のHPLCクロマトグラム

しかし、オレンジなど果皮を含む柑橘類や生姜等では多量の妨害物質が除去されずに残り、定量が困難であることもわかり、これらについては今後新たな精製法についての検討が必要であった。

5 HPLC 項目の従来法への追加

今回検討した HPLC 農薬は検出感度などから 10 倍濃縮相当の試験液が必要と考えられ、また、HPLC 分析時のサンプルはアセトニトリルに溶解する必要があるため、サンプリングなどの細部の設定変更を行うことにより、一連の一斉分析法を確立することができた。野菜・果実の場合の分析方法について図4に示した。

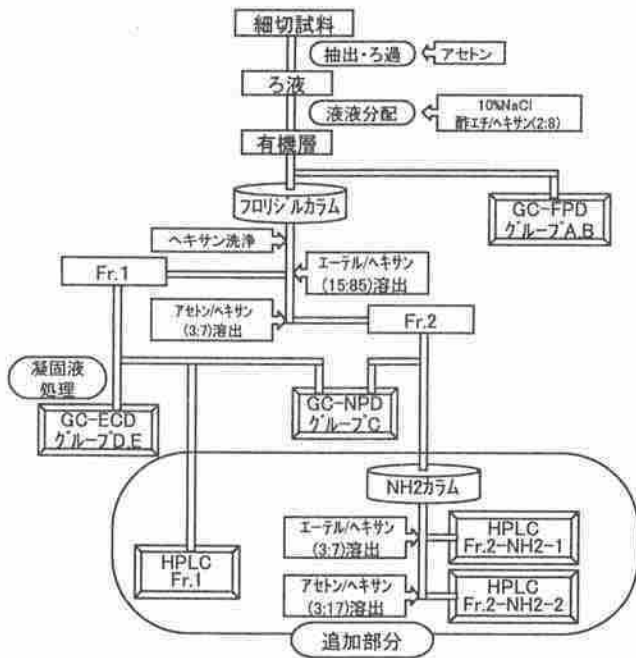


図4 確立した残留農薬一斉分析法 (野菜・果実)

考察

当所において従来から実施してきた残留農薬の一斉分析法は、分析対象がGCによる分析を行う農薬に限られてきたが、近年、分析にHPLCを用いる農薬が増加していること、定量性の問題から分析機器がGCからHPLCに分析法が変更される農薬が見られることなど、HPLC法の重要性が増してきている。

そこで、従来の分析法を基本骨格として残し、HPLC項目をより効率的に迅速に分析でき得る方法を確立するという方針で、13農薬14成分について各種検討を行ったところ、11農薬12成分について適用可能な分析法を確立することが出来た。

今回確立した分析法を各種作物に応用したところ、大部分の作物において各農薬の回収率は良好であり、前処理にかかる時間も抑えることができ、効率的で実用的な分析法であることがわかった。

しかし、基準設定時に告示された分析方法でも妨害により定量が困難とされる果皮が含まれる柑橘類や生姜などの作物ではHPLCのクロマトグラム上に非常に多くの妨害物質が見られ、これらの作物については新たな精製手段などの検討が必要であることがわかった。

また、農薬が検出された場合の確認手段としては、厚生労働省の告示等で示されているようにLC/MSが考えられるが、当所には現在までに整備されておらず、現状ではフォトダイオードアレイ検出器などによる確認のみに限られる。妨害等の多いサンプルで検出された場合においては信頼性の面でLC/MSが遙かに優れており、今後、HPLC項目が増えていくことから考えても早期整備が望

まれる。

今回確立した分析法については、学会等で報告を行った他^{2),3)}、既にSOPを作成しており、日常の残留農薬分析業務に取り入れられている。今後も更に多くの項目に対応できるように現在行っている一斉分析法についての改良などを行っていきたい。

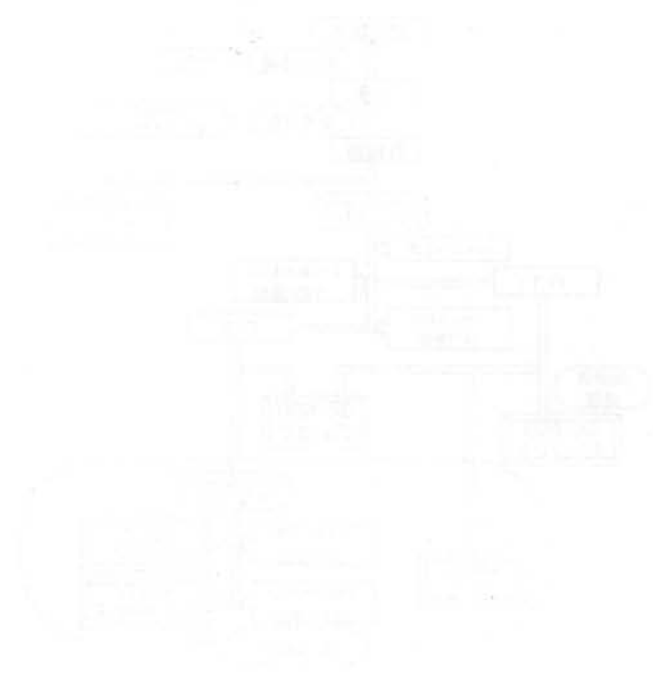
まとめ

残留基準が設定されており、分析にHPLCを用いる農薬について一斉分析法の検討を行ったところ以下の結果を得た。

- 1 検討した11農薬12成分を一斉に分析可能なHPLC条件を確立した。
- 2 前処理法について、当所で行っている一斉分析法を標準溶液について応用したところ、良好な回収率が得られた。
- 3 実サンプルの前処理には従来法へのNH₂ミニカラム処理の追加が効果的であった。
- 4 各種の作物に応用したところ多くの作物で良好な回収率が得られ、効率的で迅速性に優れた一斉分析法を確立できた。
- 5 柑橘類など一部の作物については、今後更に精製法を検討する必要がある。
- 6 確立した一斉分析法についてSOPを作成し、日常の業務に反映させることが出来た。

文献

- 1) 高橋真他：農産食品中の残留農薬スクリーニング法の検討、第36回全国衛生化学技術協議会年会抄録、42-43 (1999)
- 2) 坂根弓子他：農産食品中の残留農薬スクリーニング法の検討(第2報)第37回全国衛生化学技術協議会年会抄録、70-71 (2000)
- 3) 増田教子他：農産食品中の残留農薬スクリーニング法の検討(第3報)第38回全国衛生化学技術協議会年会抄録、20-21 (2001)



いちごに関する調査研究

医薬品生活部 生活科学スタッフ

渡辺 武明, 影山 知子, 菅野 尚子
浮島 美之

Studies on Nutrient Substances and Storage Quality of Strawberry

* Takeaki WATANABE, Tomoko KAGEYAMA, Naoko KANNO,
and Yoshiyuki UKISHIMA

市販のいちご(品種「章姫」)について, 価格変動, 栄養成分の特徴, 冷蔵庫保管中の栄養成分の変化について調査検討した。価格は季節変動や店舗による違いが認められた。糖分, ビタミンC, 酸度は, 商品によって最大で1.5倍程度の差が認められた。ビタミンC量の平均値は, 五訂日本食品標準成分表の成分値とほぼ一致し, 豊富に含まれていた。糖酸比の測定結果から, 章姫は, 酸味に対して甘味が多い傾向が認められた。冷蔵庫に保管した場合, 蔗糖の減少が明らかであった。糖分, ビタミンC, 糖酸比等には明らかな変化は認められなかった。

Key words: いちご(章姫:あきひめ), 糖分, ビタミンC, 酸度

Strawberry(AKIHIME), Sugar Content, Ascorbic Acid, Titratable Acidity(Citrate Equv.)

はじめに

いちごは子どもから大人まで幅広い人気を保ち, 果物の人気投票ナンバーワンといわれている¹⁾。もともと春から初夏にかけての食べ物であったが, ハウス栽培の普及と育苗技術の進歩で, 今日では11月~6月頃まで大変長期間にわたって流通するようになった²⁾。静岡県は日照量が多く温暖な気候に恵まれ, 県東部, 中部, 中遠地区を主産地としていちご栽培が盛んで, 全国有数のいちご生産県であり, いちごは県民にとって大変身近でなじみ深い食べ物である。いちごは耐病性, 実の大きさ, 収穫量, 味, 外観, 栽培の難易, 日持ちの良さなどの品種特性と産地の特性等を考慮して全国的に多くの品種が栽培され, 品種改良が進められているが, 現在, 静岡県内では静岡県生まれの品種「章姫(あきひめ)」が主流で, 店頭販売品の大半も章姫が占めている。今回, 市販の章姫について価格変動, 成分の特徴, 保管中の成分の変化等について調査検討したので報告する。

調査方法

1 実施時期

価格調査:平成13年11月~平成14年3月
テスト:平成13年12月~平成14年2月

2 対象商品

1) 価格調査

スーパーマーケット9店(静岡市5店, 富士市4店)で販売されていたパック入りの章姫

2) 成分調査

章姫:パック入り15検体, 箱入り2検体(表1)

3 調査項目及び方法

1) 価格

毎月数回, 一番ポピュラーな商品の価格を調べた。「あさどりいちご」「〇〇さん宅いちご」や「見切り品」「ジャム用」等の表示のあるものは除外した。

2) 糖度

均一化した試料(原則として1パックまたは1箱から無作為に150g以上採取し, へたを除いてホモジナイザーで1分弱ホモジナイズしたもの, 以下同じ)適量を約15mL容量の遠沈管にとり, 毎分約3000回転で5分間遠心分離し, 上清の中層部を糖度計(関アタゴ製デジタル糖度計パレット100)のプリズムに滴下して糖度を測定した。

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka 420-8637, Japan)

3) 糖分 (果糖, ぶどう糖, 蔗糖)

栄養成分等の分析方法等(平成8年5月厚生省告示第146号栄養表示基準別表第1の第3欄に掲げる方法)の6. 糖類(2)高速液体クロマトグラフ法に準じた。水抽出液中の蔗糖は大変分解し易かった(冷蔵庫保管で一晩後4分の1に減少。中和処理後冷蔵庫保管した場合でも一晩経つと20%以上の減少が認められた)ので、均一化から測定までの操作は2時間以内とした。

<HPLC 条件>

装置: 島津製 LC-10ADVP 送液ユニット, RID-10A 示差屈折計検出器, CTO-10ACVP カラムオープン SIL-10ADVP オートインジェクタ

カラム: CAPCELL PAK NH₂ UG80 (5 μ m, 4.6mmI.D. \times 250mm, 備産生堂製)

ガードカラム: Mightysil NH₂ (5 μ m, 4.6mmI.D. \times 5mm, 関東化学(株)製)

カラム温度: 30 $^{\circ}$ C 移動相: アセトニトリル・水 (7:3)

流速: 1mL/min 試料注入量: 10 μ L

4) ビタミンC

池ヶ谷ら³⁾の高速液体クロマトグラフ法(HPLC法)に準じて、還元型ビタミンC及びビタミンC(酸化型ビタミンCと還元型ビタミンCの和)を測定した。

<HPLC 条件>

装置: 島津製の LC-10ADVP 送液ユニット, SPD-10AVP

UV-VIS 検出器, CTO-10ACVP カラムオープン SIL-10ADVP オートインジェクタ

カラム: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 4.6mmI.D. \times 250mm, ジェールサイエンス(株)製)

ガードカラム: GLカート (Inertsil ODS-3 5 μ m, ジェールサイエンス(株)製)

カラム温度: 25 $^{\circ}$ C 移動相: 1%メタリン酸溶液
流速: 1mL/min 試料注入量: 10 μ L

5) 酸度

均一化した試料約5gを正確に秤りとり、蒸留水約100mL、フェノールフタレイン試液数滴を加え、紅色を呈するまで0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液で滴定する。中和に要した水酸化ナトリウムの量に対応するクエン酸量(%)を計算式で求め、酸度とした。

結果及び考察

1 調査店舗で販売されていた章姫について

生産地表示は、すべて静岡県内であった。県内の地域名を表示したものと地域名までは表示していないものがあつた。出回り当初の11月中、下旬を除くと、販売品の主要生産地域がある程度決まっている店、特に決まっていな店、季節によって変わる店等の特徴が認められた。静岡市でも富士市でも地元品以外の県東部や県西部産の章姫も販売されていて、その状況は季節や店舗によって

表1 章姫のテスト結果

検体	購入日	生産者	販売店舗	包装形態	価格	総内容量	平均重量	個数	還元型VC	酸化型VC	V C	果糖	ぶどう糖	蔗糖	糖分	糖度	酸度	糖酸比
No.					円	g	g		mg/100g		%	%	%	%	%	%	%	%
1	12/23	I	A	パ	580	331	33.1	10	48.8	3.6	52.4	—	—	—	—	9.6	0.60	16.0
2	12/25	I	B	パ	398	305	12.7	24	52.9	4.3	57.2	—	—	—	—	9.7	0.57	17.0
3	12/27	II	C	パ	598	309	20.6	15	63.5	4.4	67.9	—	—	—	—	9.6	0.67	14.3
4	12/29	III	D	パ	580	328	36.5	9	48.9	4.0	52.9	2.15	2.33	2.35	6.83	9.7	0.55	17.6
5	1/9	I	B	パ	298	320	32.0	10	64.6	4.4	69.0	—	—	—	—	12.0	0.56	21.4
6	1/12	IV	B	箱	780	448	29.9	15	62.2	4.0	66.2	2.54	2.33	3.52	8.39	10.5	0.53	19.8
7	1/23	V	A	箱	680	436	29.1	15	66.5	4.6	71.1	3.01	2.68	3.05	8.74	11.2	0.54	20.7
8	1/23	II	A	パ	380	322	16.1	20	59.7	3.9	63.6	2.14	1.87	2.02	6.03	8.8	0.58	15.2
9	1/27	VI	C	パ	498	320	40.0	8	61.3	2.2	63.5	2.70	2.52	2.88	8.10	10.7	0.59	18.1
10	1/27	VI	C	パ	498	306	30.6	10	59.7	3.5	63.2	2.83	2.56	2.68	8.07	10.9	0.57	19.1
11	2/5	I	E	パ	480	329	22.0	15	51.6	4.2	55.8	2.15	1.93	2.95	7.03	9.4	0.44	21.4
12	2/5	I	E	パ	250	315	45.0	7	49.5	3.7	53.2	2.69	2.44	2.70	7.83	10.4	0.52	20.0
13	2/8	II	F	パ	580	309	25.8	12	47.6	2.6	50.2	2.16	1.96	2.00	6.12	8.3	0.50	16.6
14	2/24	II	A	パ	398	332	22.1	15	74.1	4.7	78.8	2.69	2.36	3.10	8.15	10.8	0.57	18.9
15	2/25	III	D	パ	380	294	26.7	11	52.8	4.5	57.3	2.58	2.37	2.44	7.39	9.6	0.52	18.5
16	2/26	VII	G	パ	580	345	28.8	12	56.8	3.7	60.5	2.42	2.22	2.97	7.61	9.9	0.49	20.2
17	2/26	II	B	パ	348	315	24.2	13	53.2	6.1	59.3	2.36	2.13	2.26	6.75	9.0	0.57	15.8

販売店舗: A, Dは富士市, 他は静岡市 包装形態: パはパック入り, 箱は箱入り 総内容量: 1包装中のいちごの総重量
平均重量: 1包装中のいちご1個の平均重量 個数: 1包装中のいちごの個数

差が見られた。

2 テストした章姫について (表1)

1 包装中のいちごの「総内容量 (へたを含む)」, 「1 個当たりの平均重量」及び「個数」は, パック入りでは「294~345g (平均約 319g)」, 「12.7~45.0g」, 「7~24 個」, 箱入り (2 検体) では「436g, 448g (平均 442g)」, 「29.1g, 29.9g (平均 29.5g)」, 「15 個」であった。

3 いちご(章姫)の価格

価格は, 季節, 店舗, 品物のランク, 販売方法等により違いが認められた。11 月上旬から販売が始まり, 下旬には調査店舗全てで販売されていた。出回り当初の 11 月上旬から中旬が調査期間を通じて一番高価で, 最低でも約 600 円で, 多くは 680~980 円であった。11 月末から 12 月上旬になると価格は急落し, 一番高い店でも 600 円以下となり, 500 円位が主流となった。その後, クリスマスの頃になると, 100 円程度値上がりした店が多くなったが, 正月明けから下がり始め, 下旬にはほぼ 400~500 円となって大半の調査店舗で 400 円以下の商品が販売されるようになった。2 月に入ると全体としては 400~500 円が変わらないが, 500 円位の商品が半数近くに増え, 月末まで続いた。3 月に入ると, 全体的に価格は下がり, 1 月下旬と同等かそれ以下の価格となった。店舗による価格差はかなり認められ, 12 月以降 3 月上旬まで 400 円以下の価格を維持した店, 反対に, 400 円以下の商品をほとんどまたは全く見かけなかった店があった。販売方法については, 一時的に比較的低価格で販売したり, 2 パックで割引したり, 数種類の価格の章姫を併売する等弾力的な対応をする店舗が認められた。

なお, 参考のため同時に販売されていた箱入りの価格を調べたところ (4 店舗で計 10 回調査), パック入りの 1.4~2.6 倍 (平均 2.0 倍) であった。箱入りにはパック入りの約 1.4 倍量のいちごが入っていると仮定した場合 (表1の総内容量データで計算, $442/319 \approx 1.4$), 同じ重量当たりの価格は, 箱入りが約 1~1.9 倍 (平均 1.4 倍) であった。箱入りはやや割高の傾向があるが, いちごの大きさや形状が比較的そろっており, また, 2 段重ねでない包装形態であるため, 外観で品質チェックを行い易い利点も認められた。

4 章姫の成分について

いちごの成分は, 品種, 気候, 天候, 苗の状態, 栽培時の諸条件, 個体差等種々の要因の影響を受けると言われるが, 市販品では通例, 品種以外の要因はほとんど不明である。

1) 糖度及び糖分 (果糖, ぶどう糖, 蔗糖の合計) (表1)

いちごの甘さは糖分と酸味のバランスにあると言われる。糖度は光の屈折 (濃い溶液中ほど屈折する) を利用

した測定値で, 糖以外の物質の影響を受けるため糖分とは異なるが, 測定が簡便で汎用性も高いことから, 糖分を主成分とする食品の品質管理の面で多用されている。糖度, 糖分は日照時間に左右されるので, 晴れが続いた日のいちごは甘いと言われている。

糖度は 8.3~12.0% (平均 10.0%) であった。糖分 (下記参照) との相関係数は 0.957 で, かなり相関が認められ, 糖度が糖分量の指標となることが本テスト結果でも明らかであった。

糖分は 6.03~8.74% (平均 7.46%) で, 検体によって最大で 1.4 倍の差が認められた (図 1)。糖分が最多の No. 7 と 2 番目に多かった No. 6 はいずれも箱入りであった。箱入りはパック入りに比べて価格が割高であるが, テストした 2 検体とも糖分が多く, 選別されていることを感じさせられた。また, 1 個当たりの平均重量が 30g 付近の商品に糖分の多いものがやや多かったが, これは, 箱入りの 2 検体が該当するためとも考えられる。

糖の組成比は, 果糖 30.3~35.5% (平均 33.4%), ぶどう糖 27.5~34.1% (平均 30.6%), 蔗糖 32.7~42.0% (平均 36.0%) で, 平均値で見るとほぼ 3 等分され, 蔗糖がやや多く, ぶどう糖がやや少なめであった。

検体による糖組成比の差は, 果糖 5.2%, ぶどう糖 6.6%, 蔗糖 9.3% で, 蔗糖は他の糖に比べて差が大きめであった。完熟と表示があった No. 7 の果糖, ぶどう糖, 蔗糖の組成比は, 34.4%, 30.7%, 34.9% で, 全検体の平均値と近似していて, この点で特異性は認められなかった。なお, 検体数が少ないこともあり, 糖分と販売時期, 生産地域等の間に明確な相関は認められなかった。

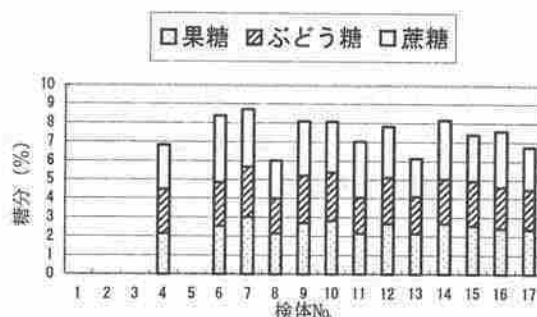


図 1 糖分含量

2) ビタミンC

食品中のビタミンCは, L-アスコルビン酸 (以下「還元型ビタミンC」という) とL-デヒドロアスコルビン酸 (以下「酸化型ビタミンC」という) として存在している。両者の効力値は同等とみなされ, 五訂日本食品標準

成分表⁴⁾ (以下「五訂成分表」という) では、両者の合計をビタミンCの成分値としている。

いちごはビタミンCの女王といわれ⁵⁾、ビタミンCが多く含まれている。ビタミンCは、風邪を予防したりストレスを緩和させる等の効果があると言われ、また、癌予防などに関する報告も見られる。

ビタミンCは50.2~78.8mg/100g (平均61.3mg/100g) 含まれていた (表1, 図2)。検体により最大1.6倍と大きな差が認められた。平均値は、五訂成分表のいちご(生)のビタミンC成分値(62mg/100g: 露地栽培のものど施設栽培のものを一括表示したもの)とほぼ一致していた。箱入りの2検体 (No.7, No.6) には、71.1mg/100g 及び66.2mg/100g 含まれ、テストした17検体中の2番目と5番目に多く含まれていたが、パック入りで、より多くビタミンCを含む検体も認められた。成人1日のビタミンC所要量は100mgである⁶⁾。今回テストした章姫の測定値から計算すると、パック入りの場合は、およそ1パックの半分量、箱入りの場合は5~6粒に相当した。

ビタミンCの組成は、含量の多少にかかわらず、還元型ビタミンCが90~96% (平均93%) で大半を占め、酸化型ビタミンCは全体の10%以下であった。

なお、糖分同様、ビタミンCも販売時期、生産地域等との間に明確な相関は認められなかった。

ところで、五訂成分表のいちご(生)のビタミンC値は62mg/100gで、四訂成分表の値(80mg/100g)の8割以下に減少している。この理由としては、五訂成分表では、測定方法が従来のヒドラジン法(比色法)から、より精度の高いとされる高速液体クロマトグラフ法に変更されたことが主な要因の一つと思われる。成分表の改定(平成12年11月)から比較の日が浅いこともあって、パンフレット、書籍等で四訂成分表の80mg/100gという値やヒドラジン法(比色法)によると思われる測定値を目にすることが多い。ビタミンC値を評価する場合には測定法を確認する必要があると思われる。



図2 ビタミンC含量

3) 酸度

いちごの酸味の主要素は、クエン酸、リンゴ酸など

で、特にクエン酸が多くを占めるという。クエン酸は穏やかで爽快な酸味を呈し、リンゴ酸は爽快で、かすかに苦みを有する酸味を有する⁷⁾など、それぞれの特色を持っている。酸度は、アルカリ滴定で求めたいちご中の酸の量をクエン酸量(%)に換算して表したもので、酸味を規定している。適度な酸味は、いちごに甘いだけでなくコクやジューシーさを与えて味に深みを与える。いちごの味の評価基準の一つとして、糖度と酸度の比を求めた糖酸比(後述)がよく用いられている。

酸度は0.44~0.67% (平均0.55%) で、最大で1.5倍の差が見られたが、大半の検体は0.5~0.6%の範囲内であった(表1, 図3)。酸度は熟度とともに減少すると言われるが⁸⁾、完熟と表示があったNo.7の酸度は0.54%で、全検体の平均値0.55%と近似していて、特異性は認められなかった。また、酸度とビタミンCに相関は認められず、酸味が強いほどビタミンCが多いという関係は認められなかった。なお、検体数が少ないこともあり、酸度と販売時期、生産地域等との間に明確な相関は認められなかった。

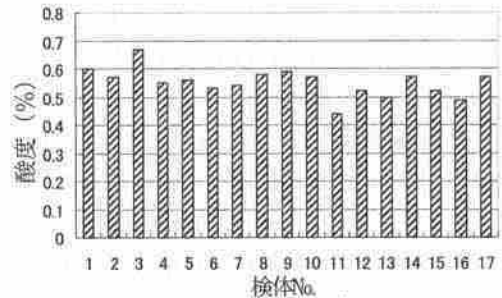


図3 酸度

4) 糖酸比

糖酸比は酸度に対する糖度の比を示したもので、糖度÷酸度で算出される。数値が大きいほど酸味に対して甘味が多いことを示している。糖酸比は14.3~21.4 (平均値18.3) で、検体によって最大約1.5倍の差が認められた(表1)。平均値で見ると、対照として測定した他県産4品種の測定値(12.3, 16.6, 17.7, 17.8)に比べて大きく、章姫は酸味に比べて甘味が多い傾向が認められた。

5 冷蔵庫保管による成分の変化について

いちごは購入したらなるべく早く食べるのが一番と言われる。やむおえず買い置きしたり食べ残して冷蔵庫に保管した場合の成分等の変化はどうであろうか。粒のそろった箱入りのいちご7箱(1箱にいちご各15個入り)を購入し、購入当日、冷蔵庫保管1, 2, 3, 4, 5, 7日後に各12個ずつを無作為に取り出し、成分等を試験した。保管中に重量の減少が若干あったので(下記2)重量の項参照)、栄養成分である糖分とビタミンCの含量は、こ

表 2 冷蔵庫保管による変化

保管日数	重量変化	果糖	ぶどう糖	蔗糖	糖分	還元型VC	酸化型VC	VC	糖度	酸度	糖酸比
日		%	%	%	%	mg/100g				%	
0	100	2.53	2.33	3.54	8.40	62.3	3.9	66.2	10.5	0.53	19.8
1	99.7	2.46	2.25	3.43	8.15	62.6	4.0	66.6	10.2	0.56	18.2
2	99.5	2.52	2.30	3.20	8.01	62.6	4.0	66.6	10.2	0.56	18.2
3	99.1	2.57	2.37	3.23	8.17	63.4	5.5	68.9	10.5	0.54	19.4
4	98.5	2.64	2.37	3.06	8.08	63.0	3.9	66.9	10.7	0.54	19.8
5	98.1	2.68	2.42	2.92	8.02	64.8	3.8	68.6	10.5	0.56	18.8
7	97.0	2.76	2.46	2.80	8.01	64.3	3.8	68.1	11.0	0.58	19.0

重量変化：保管前を 100 g とした時の保管後の重量

糖分（果糖、ぶどう糖、蔗糖）及びビタミンC（VC）は、保管前の重量 100g 当たりの含量

糖度、酸度は保管後の重量 100g 当たりで測定

の重量減少分を考慮して保管前の重量 100g 当たりで示し、味に関係の深い糖酸比については、保管後の重量当たりで測定した糖度及び酸度から算出した（表 2）。

1) 外観上の変化

保管期間が長くなると、果皮のつやが減少して鮮度が低下したように感じられるものがあり、部分的に果皮のくずれや変色が多少目立つもの、へたが元気がないものが現れるようになった。

2) 重量

徐々に減少し、3日で約1%、5日で2%、1週間後3%の減少が認められた。主に水分の揮散によるものと思われる（表 2）。

3) 糖分（果糖、ぶどう糖、蔗糖の合計）

蔗糖含量が3日で約1割、1週間で約2割の顕著な減少傾向を示し、果糖、ぶどう糖は微増の傾向が認められた。その結果、糖分全体としては、明白な増減傾向は認

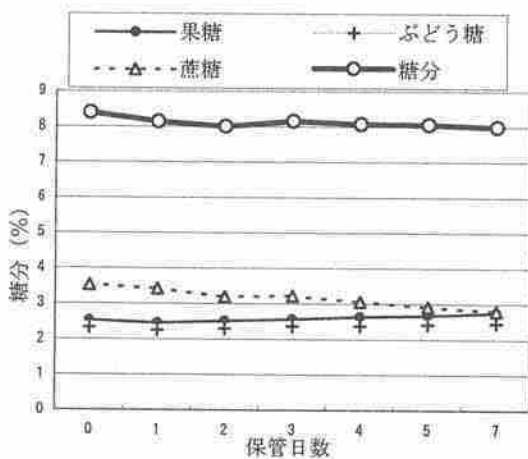


図4 冷蔵庫保管時の糖分含量の変化

められなかった（表 2、図 4）。蔗糖は果糖とぶどう糖から成る二糖類で、加水分解して果糖とぶどう糖を生じるが、蔗糖の分解量に比して、果糖とぶどう糖の量が微増にとどまり、上記結果になったものと思われる。

4) ビタミンCと糖酸比

ビタミンC量、酸化型ビタミンCと還元型ビタミンCの比率は、1週間の冷蔵庫保管を通じて個体差によるデータのばらつきの範囲内と思われ、分解等による減少や比率の変化は認められなかった（表 2、図 5）。糖酸比も同様に変化は認められなかった（表 2）。

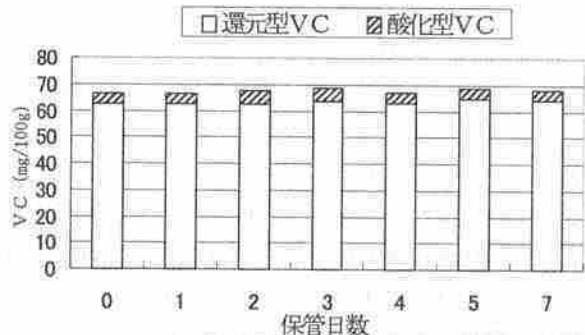


図5 冷蔵庫保管時のVC含量の変化

5) 色や香りと成分の関係

保管テストの検体を用いて、いちごの色や香りと成分（糖分、ビタミンC、酸度）の関係について同時に調査した。色については2回（0、4日後）、香りについては5回（1、2、3、5、7日後）実施した。

その結果、果皮の赤い色の特に濃いものが糖分が多いとは言えない結果であった（図 6）。また、甘い香りが強いものは弱いものに比べて糖分は大きな違いはなかったが、酸度が低く、その結果糖酸比が高い傾向が認められた（図 7）。ビタミンCについては、色、香りとの関係は認められなかった。

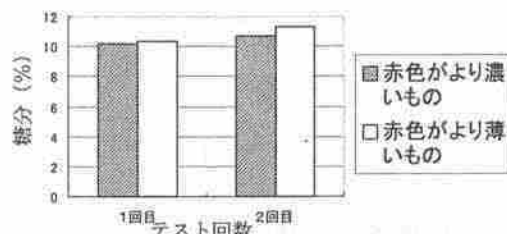


図6 いちごの色と糖分

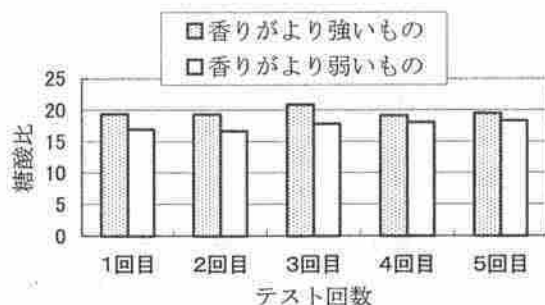


図7 いちごの香りと糖酸比

まとめ

市販のいちご「章姫」について、価格変動、成分の特徴、保管中の成分の変化等について調査検討した。

- 1 価格には、季節変動、店舗による違い、販売方法等による違いが認められた。季節変動は、出回り始めの11月が一番高く、以後急落するがクリスマス前後にやや上がり、1月下旬と3月が特に安かった。
- 2 糖度と糖分には相関が認められた。
- 3 糖分は 6.03~8.74% (平均 7.46%) 含まれ、検体によって最大 1.4 倍の差が認められた。糖分の組成比は、果糖、ぶどう糖、蔗糖がほぼ等分に含まれていた。
- 4 ビタミンCは 50.2~78.8mg/100g (平均 61.3mg/100g) 含まれ、平均値は五訂成分表の値 (62mg/100g) と近似していた。ビタミンCの 90% 以上は還元型であった。
- 5 糖酸比 (酸度に対する糖度の比) は 14.3~21.4 (平均 18.3) で、他県産 4 品種の値 (12.3, 16.6, 17.7, 17.8) に比べて大きく、章姫は酸味に対して甘味が多いという結果であった。
- 6 いちごを冷蔵庫に保管すると、次第に色つやが減少して鮮度の低下が感じられた。蔗糖は 1 週間で 2 割減少し、重量は同 3% の減少が認められた。糖分、ビタミンC、酸度は 1 週間後も明白な変化は認められなかった。
- 7 いちごの色、香りと成分の関係について調べたところ、甘い香りの強いものは糖酸比が高い傾向が認められた。

謝 辞

本調査研究の実施にあたり、独立行政法人農林水産消費技術センター横浜センター龍口久子氏、独立行政法人九州沖縄農業研究センター曾根一純氏、静岡県農業試験場竹内 隆氏、大場聖司氏の皆様方に御指導御助言をいただきました。ここに深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 木村雅行:そだててあそぼう, 14, イチゴの絵本, 1, 社団法人 農山漁村文化協会 (2001)
- 2) 農林水産省 農林水産消費技術センター (現 独立行政法人 農林水産消費技術センター) 編:大きな目小さな目, 55, 5 (2001)
- 3) 池ヶ谷賢次郎他:茶の分析法, 茶業研究報告, 71, 55-57 (1990)
- 4) 科学技術庁資源調査会編:五訂日本食品標準成分表, 17-18 (平成 12 年 12 月)
- 5) イラスト版 食材の本 3(くだもの・まめ編)合同出版(株) (1997)
- 6) 第六次改定日本人の栄養所要量, 厚生省 (1999)
- 7) 井坂洋司:ウスターソース類の実態調査, 食の科学, 57-68, 1987 年 2 月
- 8) 稲葉昭次他:岡山大学報 (52), 25-36 (1978)

PETボトル入緑茶飲料の有効成分及び品質保持に関する調査研究

-その1 煎茶浸出液との成分比較-

医薬品生活部 生活科学スタッフ 菅野 尚子, 影山 知子, 渡辺 武明
浮島 美之

Study on Efficacious Contents and Preservation of Plastic Bottled Green Tea
- In Comparison with a Cup of Tea about Ingredient -

Naoko KANNO, Tomoko KAGEYAMA, Takeaki WATANABE,
and Yoshiyuki UKISHIMA

PET ボトル入緑茶飲料について、化学成分の含有量等を調査し、商品の特徴別比較や煎茶浸出液との比較を行った。低温抽出タイプの緑茶飲料は、従来のタイプに比べ、遊離アミノ酸の含有量が平均値において高くなっており、カテキン類については、含有量及び組成割合ともにエステル型カテキンが少なく、渋味の強い成分が抑えられている傾向にあった。また、煎茶浸出液においては、遊離アミノ酸及びビタミンCが2煎目までにそのほとんどが溶出してしまふのに対し、カテキン類及びカフェインは3煎目でもまだかなりの量が残存していた。経済性・ごみ問題等も考慮すると、小型のPETボトル入緑茶飲料はできるだけ携帯用として利用する等の使い分けが望ましいと考えられる。

Key words : 遊離アミノ酸, カテキン類, カフェイン, ビタミンC, 低温抽出

Free amino acids, Catechins, Caffeine, Vitamin C, Low-temperature extraction

はじめに

緑茶は従来、茶葉を急須に入れ煎じて飲むのが慣習とされてきたが、最近では容器入りの緑茶飲料として購入する機会が増えてきている。PET ボトルや缶入りの緑茶飲料は、その手軽さから、これまであまりお茶を飲んでいなかった若い人たちにも好まれており、さらには消費者の健康志向や、一昨年来の新商品の発売により、景気低迷の中、売上げを大きく伸ばしている。ところで、これら緑茶飲料にはカテキン類等の有効成分が、茶葉を煎じて飲む緑茶と比較し、どの程度含まれているのか消費者にとって気になるところであり、また、価格や廃棄物の問題等も考え合わせると、状況に合わせた利用の仕方が必要であると思われる。そこで、今回はPETボトル入りの緑茶飲料について、化学成分の含有量等を調査し、商品の特徴別比較や煎茶浸出液との比較を行った。

調査方法

1 実施時期

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
(4-27-2, Kita-ando, Shizuoka 420-8637, Japan)

2001年9月から2001年11月

2 調査対象

静岡市内で市販されている、350ml または 500ml の小型PETボトル入緑茶飲料 17 銘柄である。概要は、表1に示した。以下、これらの商品を総称して「PET 緑茶」とする。なお、表1中「低温抽出茶」とは、2000年から販売され始めた、茶葉を低温で抽出することにより旨味成分をより多く引き出したという商品を意味し、「通常抽出茶」とはそれ以外の商品を意味する。また、低温抽出茶の中で、原材料に「緑茶抽出物」を含有するものが2銘柄あった。単価の平均値は、通常抽出茶が25円/

表1 調査した商品

単価 (円/100ml)	通常抽出茶 (銘柄数)	低温抽出茶 (銘柄数)
20	2	1
21~25	0	1
26~30	4	6 ^{注)}
31~35	0	1
36~40	0	0
41~45	0	2
計	6	11

注) うち2銘柄は原材料に緑茶抽出物を含む

表2 煎茶の浸出条件

	湯量 (ml)	湯温 (°C)	浸出時間 (秒)
1煎目	150	70	120
2煎目	150	80	60
3煎目	150	90	60

100ml, 低温抽出茶が30円/100mlとなっており, 低温抽出茶の方が高めであった。

煎茶浸出液については, 清水市内で市販されている, 価格が1,000円/100gの上級煎茶葉を用いて, 平成10年度に農林水産消費技術センターが行った「煎茶浸出液の品質調査」¹⁾における方法を参考に, 浸出液を調製した。すなわち, 茶葉(5g)を量り取ったピーカーに, あらかじめ所定の温度に保った蒸留水を注ぎ一定時間浸出後, 直ちにこし網で濾し氷水で冷却した。試験液は, 1煎目, 2煎目, 3煎目の3液とし, 各液の浸出条件は, 表2のとおりとした。また, 浸出終了から次の浸出開始までの時間間隔は15分とした。

3 調査項目及び方法

1) 遊離アミノ酸

PET緑茶または煎茶浸出液を, ポリビニルポリピロリドン(PVPP)で除タンニン処理した後, 後藤らの方法²⁾に従い, オルトフタルアルデヒド(OPA)によるプレカラム誘導体化HPLC法で分離, 定量した。調査した遊離アミノ酸は, アスパラギン酸(Asp), グルタミン酸(Glu), アスパラギン(Asn), セリン(Ser), グルタミン(Gln), アルギニン(Arg), テアニン, γ -アミノ酪酸(GABA)の8種であり, 内部標準物質にはグリシルグリシンを用いた。

HPLC条件: カラム, Develosil ODS-HG-5(4.6mm×150mm, 野村化学㈱製); 移動相, A液[5mMクエン酸緩衝液(pH=6.0):アセトニトリル=19:1(v/v)]及びB液[5mMクエン酸緩衝液(pH=6.0):アセトニトリル=3:7(v/v)]のグラジエント[試料注入時(A95%, B5%), 5分後(A88%, B12%), 20分後(A78%, B22%), 25分後(A5%, B95%), その後35分まで25分後の混合割合を維持, 35.01分に試料注入時の割合(A95%, B5%)に戻りその後45分まで維持]; カラム温度, 40°C; 流量, 1ml/min; 検出, RF(励起波長340nm, 蛍光波長450nm); 試料の注入, 反応混合液(OPA試薬200 μ l, メルカプト試薬200 μ l及び試料20 μ l)中の5 μ lを直ちに注入。

2) カテキン類及びカフェイン

PET緑茶または煎茶浸出液から, 末松ら³⁾の方法に従い, 水とアセトニトリルの等量混合液を用いてカテキン類及びカフェインを抽出し, 寺田らの方法⁴⁾によりHPLCで同時分離定量を行った。調査したカテキン類は, エピガロカテキン(EGC), カテキン(C), エピカテキン(EC), エピガロカテキンガレート(EGCg), エピカテキンガレート(ECg)の5種である。

HPLC条件: カラム, Develosil ODS-HG-5(4.6mm×150mm, 野村化学㈱製); 移動相, A液(0.1%アセトニトリル及び5%N,N-ジメチルホルムアミド含有の0.1%リン酸溶液)及びB液(アセトニトリル)のグラジエント[試料注入時(A99%, B1%), 30分後(A85%, B15%), 40分後(A10%, B90%), 40.01分に試料注入時の割合(A99%, B1%)に戻りその後65分まで維持]; カラム温度, 43°C; 流量, 1ml/min; 検出, UV(波長280nm); 試料注入量, 15 μ l

3) 総カテキン量/総アミノ酸量

上記1)及び2)の結果から各成分を合計し, 総アミノ酸量及び総カテキン量とし, これらの比(総カテキン量/総アミノ酸量)を算出した。

4) ビタミンC

茶の分析法⁵⁾の9(ビタミンC)に記載の方法に従い, HPLC法により還元型及び酸化型のビタミンCを定量した。試料は, PET緑茶または煎茶浸出液から, ビタミンCを2%メタリン酸で室温抽出することにより調製した。

HPLC条件: カラム, Inertsil ODS-3(5 μ m, 4.6mm×250mm, ジーエルサイエンス㈱製); 移動相, 1%メタリン酸水溶液; カラム温度, 25°C; 流量, 1ml/min; 検出, UV(波長242nm); 試料注入量, 20 μ l

結果及び考察

1 遊離アミノ酸

煎茶に含まれる主なアミノ酸は, テアニン, グルタミン酸, アルギニン, アスパラギン酸, セリンであり, この5種で全アミノ酸量の90%近くを占めている。特にテアニンは, 茶葉中に最も多く含まれているアミノ酸であり, 緑茶の旨味の主体をなしている。

表3は, PET緑茶の, 各遊離アミノ酸の含有量の平均値及び標準偏差を示したものである。それによると, 低温抽出茶の方が, アルギニンを除き平均値は高くなっているものの, 標準偏差についてもアスパラギン及びグルタミンを除いてかなり大きく, 銘柄によってばらつきがみられることがわかった。また, 表には示していないが, 原材料に「緑茶抽出物」を含有する2銘柄については, 他に比べ旨味成分が特に多く含まれているとはいえなかった。

煎茶浸出液における含有量については, 表4に示した。各アミノ酸とも1煎目, 2煎目, 3煎目の順に溶出量が減少していくが, 1煎目及び2煎目の溶出量の合計は, 全体の溶出量の約9割を占め, 2煎目までに旨味成分の大部分が溶出していることがわかった。また, 総アミノ酸量を算出すると, 煎茶浸出液(3煎目までの平均値)はPET緑茶の4.1倍(2.0~6.1倍)となっており, PET緑茶は煎茶浸出液に比べ旨味成分が薄くなっていることがわかった。

さらに, PET緑茶及び煎茶浸出液における各遊離アミ

表3 PET緑茶中の遊離アミノ酸含有量
(単位: $\mu\text{g/ml}$)

	通常抽出茶 ^(注)	低温抽出茶 ^(注)
Asp	9.7 \pm 0.9	11.9 \pm 3.3
Glu	12.0 \pm 2.1	16.8 \pm 4.6
Asn	1.4 \pm 0.5	1.7 \pm 0.5
Ser	3.7 \pm 0.4	3.8 \pm 0.9
Gln	2.9 \pm 1.2	3.1 \pm 1.3
Arg	5.2 \pm 1.5	5.2 \pm 2.5
テアニン	36.2 \pm 12.1	42.7 \pm 19.3
GABA	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2

注) 値は、平均値 \pm 標準偏差

表4 煎茶浸出液における遊離アミノ酸含有量の変化 (単位: $\mu\text{g/ml}$)

	1煎目	2煎目	3煎目
Asp	35.7	25.0	5.13
Glu	50.5	36.0	7.12
Asn	2.56	1.91	0.48
Ser	20.5	15.8	4.50
Gln	66.1	52.3	13.0
Arg	44.8	40.0	12.4
テアニン	241	193	48.5
GABA	2.96	2.33	0.57

表5 PET緑茶及び煎茶浸出液における遊離アミノ酸の組成割合 (単位: %)

	通常抽出茶 ^(注)	低温抽出茶 ^(注)	煎茶浸出液 ^(注)
Asp	13.9 \pm 2.3	14.3 \pm 2.3	6.7 \pm 1.1
Glu	17.2 \pm 4.2	20.5 \pm 5.7	9.5 \pm 1.6
Asn	1.9 \pm 0.7	2.0 \pm 0.4	0.5 \pm 0.0
Ser	5.3 \pm 1.0	4.6 \pm 0.8	4.5 \pm 0.3
Gln	3.9 \pm 0.8	3.5 \pm 0.5	14.2 \pm 0.0
Arg	7.3 \pm 1.7	5.9 \pm 0.9	11.4 \pm 2.0
テアニン	49.7 \pm 6.4	48.4 \pm 6.6	52.5 \pm 0.5
GABA	0.8 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	0.6 \pm 0.0

注) 値は、平均値 \pm 標準偏差

アミノ酸の組成割合を表5に示した。低温抽出茶は、通常抽出茶に比べ、グルタミン酸の占める割合は高いものの、品質上重要なアミノ酸であり、旨味効果が大きいといわれているアルギニン及びテアニンの割合は相対的に低くなっていた。また、茶種によっても異なるが、本調査で調製した煎茶浸出液の場合、アスパラギン酸及びグルタミン酸の占める割合はPET緑茶の場合の約半分と低いが、グルタミン及びアルギニンは2~3倍の高い割合を占めていた。

2 カテキン類及びカフェイン

1) カテキン類

カテキン類は通称、茶のタンニンと呼ばれ、緑茶に渋味を与えている。緑茶のカテキン類は、エピカテキン(EC)、エピガロカテキン(EGC)、エピカテキンガレート(ECg)、エピガロカテキンガレート(EGCg)の4種が主要とされ、本調査では、この他にカテキン(C)を加えた5種の含有量を調査した。なお、渋味の程度は遊離型のもは弱く、エステル型(ガレート)の方が強烈である。カテキンの生理作用については、近年盛んに研究されており、抗酸化作用、抗菌作用、抗ガン作用、消臭作用等、さまざまな効能が確認されている。

表6は、PET緑茶の各カテキン含有量の平均値及び標準偏差を示したものである。それによると、低温抽出茶は通常抽出茶に比べ、エステル型カテキン(EGCg及びECg)の含有量が少なく、渋味の強い成分が抑えられている傾向にあった。さらに、低温抽出茶においてはEGCの方がEGCgより多いが、通常抽出茶においてはその逆である傾向がみられ、抽出温度による溶出量の差が確認された⁴⁾。

煎茶浸出液(表7)について見てみると、各カテキンとも1煎目、2煎目、3煎目の順に溶出量が減少していくが、3煎目は全体の16~27%を占めており、カテキン類は3煎目においてもかなりの量が摂取できると考えられた。また、総カテキン量を算出すると、煎茶浸出液(3煎目までの平均値)はPET緑茶の5.5倍(4.4~7.4倍)となっており、PET緑茶は煎茶浸出液に比べカテキン類の濃度もかなり薄いことがわかった。

表6 PET緑茶中のカテキン類の含有量
(単位: $\mu\text{g/ml}$)

	通常抽出茶 ^(注)	低温抽出茶 ^(注)
EGC	71.4 \pm 8.6	74.8 \pm 19.6
C	27.3 \pm 6.2	27.6 \pm 4.0
EC	21.8 \pm 1.8	21.2 \pm 4.4
EGCg	79.2 \pm 10.3	68.0 \pm 11.2
ECg	20.7 \pm 2.9	17.5 \pm 3.1

注) 値は、平均値 \pm 標準偏差

表7 煎茶浸出液におけるカテキン類の含有量の変化 (単位: $\mu\text{g/ml}$)

	1煎目	2煎目	3煎目
EGC	579	421	195
C	30.0	25.1	13.6
EC	199	147	72.6
EGCg	635	498	365
ECg	94.9	77.1	62.4

さらに、PET緑茶及び煎茶浸出液におけるカテキン類の組成割合を表8に示した。組成割合で比較しても、低温抽出茶の方が渋味の強いエステル型カテキン(EGCg及びECg)が少ない傾向にあった。また、煎茶浸出液にお

表 8 PET 緑茶及び煎茶浸出液におけるカテキン類の組成割合 (単位: %)

	通常抽出茶 ^(注)	低温抽出茶 ^(注)	煎茶浸出液 ^(注)
EGC	32.4±3.2	35.4±3.9	33.7±5.5
C	12.3±1.8	13.3±1.3	2.0±0.1
EC	9.9±0.8	10.1±1.0	11.9±1.4
EGCg	35.9±2.5	32.7±3.3	45.2±5.6
ECg	9.4±1.2	8.4±1.1	7.2±1.4

注) 値は、平均値±標準偏差

いては、茶葉中で最も含有量の多いカテキンである EGCg の割合が高くなっていた。さらに、EGC 及び EGCg の合計割合は、煎茶浸出液では約 8 割であり、緑茶カテキンの特徴⁷⁾がみられたが、PET 緑茶ではどの銘柄もやや低い 7 割程度となっていた。この理由としては、PET 緑茶での C の割合が大きいことから、製造工程における加熱殺菌によって、EC 及び EGCg のエピマー化が起こったためではないかと考えられた。

2) カフェイン

カフェインは、中枢神経を興奮させるため、適量 (1~5mg/kg 体重) 摂取した場合には、大脳への刺激や、覚醒、強心及び利尿作用等の効果があるが、過量 (15~30mg/kg 体重) の場合には、強い不眠、心悸亢進、けいれん等を起こすことがある。

表 9 PET 緑茶及び煎茶浸出液におけるカフェインの含有量

	含有量 (µg/ml)
通常抽出茶 ^(注)	113±13
低温抽出茶 ^(注)	111±16
煎茶浸出液 (1 煎目)	439
煎茶浸出液 (2 煎目)	279
煎茶浸出液 (3 煎目)	120
煎茶浸出液 (平均値)	279

注) 値は、平均値±標準偏差

表 9 に、PET 緑茶及び煎茶浸出液におけるカフェインの含有量を比較した結果を示した。PET 緑茶においては、通常抽出茶と低温抽出茶との間に含有量の差はみられなかった。また、煎茶浸出液においては、1 煎目、2 煎目、3 煎目の順に溶出量が減少したが、3 煎目においても全体の 14.3% のカフェインが溶出していた。さらに、PET 緑茶と煎茶浸出液 (3 煎目までの平均値) とで比較すると、煎茶浸出液は PET 緑茶の 1.9~3.2 倍 (平均 2.5 倍) のカフェインを含有しており、煎茶浸出液 200ml のカフェイン量は、大体 PET 緑茶 (500ml) 1 本分に相当すると考えられた。

3 総カテキン量/総アミノ酸量

緑茶の味は、カテキン類の渋味と、アミノ酸の旨味の

表 10 PET 緑茶及び煎茶浸出液における総カテキン量/総アミノ酸量

	総カテキン量/総アミノ酸量
通常抽出茶 ^(注)	3.2±0.9
低温抽出茶 ^(注)	2.7±1.0
煎茶浸出液 (1 煎目)	3.3
煎茶浸出液 (2 煎目)	3.2
煎茶浸出液 (3 煎目)	7.7
煎茶浸出液 (平均値)	4.7

注) 値は、平均値±標準偏差

バランスで決まるといわれているが、これを左右するのが茶葉の種類と、茶葉を浸出するときの温度及び時間である。すなわち、茶葉の浸出温度が高いほど、また浸出時間が長いほど、アミノ酸の溶出量が多くなるが、カテキン類の溶出量もそれに勝って多くなる。そこで、渋味と旨味の比である「総カテキン量/総アミノ酸量」を算出し、結果を表 10 に示した。この場合、値が大きいほど渋味が強く、小さいほど旨味が強いことを示す。PET 緑茶については、平均値で見ると低温抽出茶の方が通常抽出茶より小さく、旨味が勝っていたが、中には非常に高い値を示し渋味が強いと思われる銘柄 (1 銘柄、値 5.1) もあった。煎茶浸出液においては、1 煎目より 2 煎目の方が若干低い値であったが、これは 2 煎目の浸出温度が低め (80℃) であったことが影響しているものと思われる。また、3 煎目は値が 2 倍となり、渋味が増すと考えられた。

4 ビタミン C

ビタミン C は、各種茶の中で緑茶特有のものといってよく、発酵させた紅茶には全く含まれず、半発酵のウーロン茶にもわずかに含有するだけである。効能としては、抗酸化やガン予防等があり、PET 緑茶には茶葉自体由来するビタミン C のほかに、食品添加物 (酸化防止剤) として添加されている。また、ビタミン C には、酸化型ビタミン C (DAsA) と還元型ビタミン C (AsA) があり、両者とも効力は同じである⁸⁾。なお、緑茶のビタミン C は、AsA が大部分であり、DAsA は少量である。

表 11 に、PET 緑茶及び煎茶浸出液における総ビタミン

表 11 PET 緑茶及び煎茶浸出液における総ビタミン C の含有量

	含有量 (µg/ml)
通常抽出茶 ^(注)	211±71
低温抽出茶 ^(注)	236±95
煎茶浸出液 (1 煎目)	141
煎茶浸出液 (2 煎目)	86.3
煎茶浸出液 (3 煎目)	22.8
煎茶浸出液 (平均値)	83.3

注) 値は、平均値±標準偏差

C (DAsA と AsA の合計値) の含有量を比較した結果を示した。PET 緑茶においては、平均値で低温抽出茶の方が若干高いものの、標準偏差も大きく銘柄間でばらつきがみられた。これは、酸化防止剤として添加された量等にも影響しているものと思われた。煎茶浸出液においては、1煎目及び2煎目で9割以上が溶出していた。また、本調査の煎茶浸出液(1~3煎目の平均値)は、五訂食品標準成分表の値(6mg/100ml)と比較すると高めであった。なお、ビタミンCの含有量だけは、煎茶浸出液よりもPET緑茶の方が多く、煎茶浸出液の1.2~5.2倍(平均2.7倍)のビタミンCがPET緑茶に含まれていた。

まとめ

- 1 低温抽出茶は、通常抽出茶に比べ、遊離アミノ酸の含有量においてアルギニンを除き平均値は高くなっているものの、銘柄によりばらつきがみられた。また、カテキン類については、含有量及び組成割合ともにエステル型カテキン(EGCg及びECg)が少なく、渋味の強い成分が抑えられている傾向にあった。さらに、渋味と旨味の比である「総カテキン量/総アミノ酸量」については、平均値が小さく旨味が勝る傾向にあったが、中には非常に高い値を示し渋味が強いと思われる銘柄もあった。
- 2 エピガロカテキン(EGC)及びエピガロカテキンガレート(EGCg)の合計割合は、煎茶浸出液では約8割であったが、PET緑茶ではどの銘柄もやや低い7割程度となっていた。この理由としては、PET緑茶でのカテキン(C)の割合が高いことから、製造工程における加熱殺菌によって、エピカテキン(EC)及びEGCgのエピマー化が起こったためではないかと考えられた。
- 3 カフェインについては、通常抽出茶と低温抽出茶との間に含有量の差はみられなかった。また、ビタミンCの含有量については、平均値で低温抽出茶の方が若干高いものの、酸化防止剤として添加された量の違いから銘柄間でばらつきがみられた。
- 4 各成分の含有量において比較すると、煎茶浸出液の方がPET緑茶に比べ、総アミノ酸量は2.0~6.1倍、総カテキン量は4.4~7.4倍、カフェイン量は1.9~3.2倍多く含まれており、茶葉から淹れる緑茶には有効成分が圧倒的に多く含まれていることがわかった。ビタミンCのみPET緑茶の方が1.2~5.2倍多く含まれていたが、これは茶葉由来の他に添加されていることによるものである。
- 5 煎茶浸出液においては、遊離アミノ酸、カテキン類、カフェイン及びビタミンCのいずれも1煎目、2煎目、3煎目の順に溶出量が減少していくが、遊離アミノ酸及びビタミンCが2煎目までにそのほとんどが溶出してしまうのに対し、カテキン類及びカフェインは3煎目においてもまだかなりの量が残存していた。また、このことから3煎目は苦渋味がかなり勝っていると考えられた。

なお、PET緑茶は茶葉から淹れる緑茶に比べ、本調査の場合、価格が2~4倍とかなり割高であり、またPETボトル入飲料の利用は、ごみを増やすことにもつながる。分別収集と再資源化が進んでいるとはいえ、PETボトルの消費量は近年急激に増加しており、回収後のリサイクル処理が追いついていないのが実情である。経済性やごみ問題も考慮に入れると、生活のあらゆる場面でこれらの飲料を利用するのは好ましくなく、例えば家庭で緑茶を飲む時は、急須で淹れて濃厚な緑茶の味を楽しみ、小型PETボトルは外出先に携行する時に利用する等の使い分けをすることが望ましいと考えられる。さらに、飲用後の空き容器は、一人一人がリサイクルを心がけることが大切である。

最後に、茶の分析法について御指導・御助言をいただきました。静岡工業技術センターの佐田康稔副主任及び茶業試験場の渡瀬隆也技師に深謝いたします。

文献

- 1) 大きな目小さな目 46, 2-3, 農林水産消費技術センター(1999)
- 2) 後藤哲久他:緑茶中の主要アミノ酸のOPAによるプレカラム誘導体化高速液体クロマトグラフィーによる分析, 茶研報, 77, 29-33(1993)
- 3) 末松伸一他:緑茶中のカフェイン, カテキン類の測定のための新しい抽出法, 食科工誌, 42, 419-424(1995)
- 4) 寺田志保子他:各種茶(緑茶, 半発酵茶, 紅茶)浸出液およびティードリンクス中のカフェイン, カテキン組成, 日食工誌, 34, 20-27(1987)
- 5) 池ヶ谷賢次郎他:茶の分析法, 茶研報, 71, 43-74(1990)
- 6) 山西貞:お茶の科学, (株)裳華房, 東京(1992)
- 7) 後藤哲久他:市販緑茶の個別カテキン類とカフェインの分析, 茶研報, 83, 21-28(1996)
- 8) 湖之上康元他:日本茶全書, (社)農山漁村文化協会, 東京(1999)

1. 本報告は、我が国の経済成長と社会進歩の歴史を振り返り、今後の発展に向けた課題を明らかにすることを目的とする。

2. 戦後、我が国は高度経済成長を遂げ、世界経済の発展に大きく貢献した。この成長を支えたのは、国民の努力と政府の適切な政策であった。

3. しかし、近年は少子高齢化の進展や格差の拡大など、新たな課題が生じている。これらに対処するためには、持続可能な成長戦略の構築が不可欠である。

4. 本報告では、これらの課題を踏まえ、政府、企業、市民が連携して取り組むべき政策や施策を提言する。

5. 持続可能な成長を実現するためには、教育の充実や人材育成の強化が重要である。また、環境保護と経済成長の両立を図る必要がある。

6. 政府は、これらの課題を克服するためのリーダーシップを発揮し、適切な政策を実施する責任を負う。

7. 企業は、社会貢献活動を通じて社会の発展に貢献し、持続可能な経営を実現するべきである。

8. 市民は、社会の発展のために自らの力を尽くし、社会のルールを遵守する責任を負う。

9. 以上を踏まえ、本報告は、我が国の未来を明るく輝かせるための道筋を示すことを目指す。

10. 本報告の作成には、関係機関や専門家からの貴重なご意見をいただきました。ここに感謝申し上げます。

11. 本報告は、今後の政策決定の参考として提供される。

12. 本報告の発行は、関係機関との連携によるものである。

13. 本報告は、関係機関や専門家からの貴重なご意見をいただきました。ここに感謝申し上げます。

14. 本報告は、今後の政策決定の参考として提供される。

15. 本報告の発行は、関係機関との連携によるものである。

16. 本報告は、関係機関や専門家からの貴重なご意見をいただきました。ここに感謝申し上げます。

17. 本報告は、今後の政策決定の参考として提供される。

18. 本報告の発行は、関係機関との連携によるものである。

19. 本報告は、関係機関や専門家からの貴重なご意見をいただきました。ここに感謝申し上げます。

20. 本報告は、今後の政策決定の参考として提供される。

21. 本報告の発行は、関係機関との連携によるものである。

22. 本報告は、関係機関や専門家からの貴重なご意見をいただきました。ここに感謝申し上げます。

23. 本報告は、今後の政策決定の参考として提供される。

24. 本報告の発行は、関係機関との連携によるものである。

PETボトル入緑茶飲料の有効成分及び品質保持に関する調査研究 —その2 開栓後の保存性—

医薬品生活部 生活科学スタッフ 菅野 尚子, 影山 知子, 渡辺 武明
浮島 美之

Study on Efficacious Contents and Preservation of Plastic Bottled Green Tea (II)
- Preservation of Opened Drink -

Naoko KANNO, Tomoko KAGEYAMA, Takeaki WATANABE,
and Yoshiyuki UKISHIMA

前報に引き続きPETボトル入緑茶飲料について、開封後の保存性に関する調査を行った。保存温度の違いによる飲料中の一般生菌数、濁りの発生及び褐色度の変化を調べた結果、高い温度条件下では早い段階から細菌の増殖、カビの発生及び品質の低下が著しいことがわかった。これらの飲料は夏季に飲用される機会が多いので、飲み残しを保存する場合は必ず冷蔵庫に入れ、早めに飲みきることが重要であると考えられた。

Key words: 一般生菌数, 濁り, 褐変

Standard Viable Count, Cloudiness, Browning

はじめに

広く普及している小型PETボトルは、「リキャップできる」という安心感から、飲み残しを室温に長時間放置したり、外出先で持ち歩いたりすることも想定される。また、緑茶飲料の場合、カテキンの抗菌作用から「日持ちがするのでは」と期待されていることも少なくない。そこで、これらPETボトル入緑茶飲料について、消費者が過信しがちな開栓後の保存性を調査することにした。

調査方法

1 実施時期

平成13年12月

2 調査対象

前報において調査したPETボトル入緑茶飲料（以下、PET緑茶）のうちの1銘柄（内容量350ml）を選び、製造番号が同一の12検体を調査対象とした。

なお、調査した17銘柄に関し、開栓後の取扱い

に関する表示を確認したところ、「すぐに飲む」が11銘柄、「冷蔵庫に入れ、早めに飲む」が2銘柄、「早めに飲む」、「冷蔵庫に入れなるべく早く飲む」、「すみやかに飲む」が各1銘柄、記載なしが1銘柄となっていた。

3 調査方法

当所職員9名に昼食時、PET緑茶を約半量口飲みしてもらったものについて、飲用直後、1日後、3日後及び7日後における5℃（冷蔵庫内を想定）、20℃（冬期の室内を想定）及び30℃（夏期の屋外を想定）保存時の、飲料中の一般生菌数及び濁り、並びに飲料の褐色度を調査した。調査を行うPET緑茶は、開栓直前まで室温に放置し、開栓時に飲用開始、飲用終了後に再び栓をして、各温度に設定したインキュベータ内に横に倒した状態で保存した。

1) 一般生菌数

標準寒天培地法（35℃、48時間）に基づき、測定した。

2) 濁り

試料をPETボトルに入った状態で、振りながら蛍光灯の光にかざして、茶沈殿物以外の濁りがみられないか観察し、カビ発生の目安とした。

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka 420-8637, Japan)

3) 褐色度

試料を蒸留水で 10 倍希釈した溶液の 400nm における吸光度を測定した。

結果及び考察

1 一般生菌数

飲用直後の飲料中の生菌数を表 1 に示した。ここで、A~I の 9 検体は飲用に供したものであり、J~L の 3 検体は飲用に供せず、開栓しただけのものである。飲用に供した A~I については、I 検体 (F) が 10^3 個/ml を超え、4 検体 (B, C, G, H) が 10^2 個/ml を超えていたほかは、 10^2 個/ml 未満であった。また、開栓直後の J~L については、菌が検出されなかった。このことから、A~I における菌の汚染は、口飲みにより飲料中に移行した口内細菌によるものと考えられた。なお、保存性試験においては、A~C 及び J を 5℃ 試験区に、D~F 及び K を 20℃ 試験区に、G~I 及び L を 30℃ 試験区に設定し、J~L は対照として、各試験区 3 検体の平均値を経日変化の値とした。

表 1 飲用直後の一般生菌数 (個/ml)

検体	生菌数	試験区
A	6.3×10	5℃
B	2.7×10^2	5℃
C	1.3×10^2	5℃
D	<30 (9)	20℃
E	3.4×10	20℃
F	1.1×10^3	20℃
G	1.1×10^2	30℃
H	8.3×10^2	30℃
I	5.7×10	30℃
J	<30 (0)	5℃
K	<30 (0)	20℃
L	<30 (0)	30℃

<30 の () 内は実測値

保存性試験のうち、一般生菌数の変化を図 1 に示した。30℃ 試験区においては、1 日後には 10^3 個/ml に、3 日後には 10^7 個/ml 以上に、急速に菌が増加した。この菌数の増加は、既に飲料中に存在していた口内細菌が増殖したのと考えられるが、本結果をみる限り、30℃ の温度条件下で 1 日を経過したものについては、品質保持上好ましくない状態にある可能性があると思われた。また、5℃ 及び 20℃ 試験区においては、菌数は増加せず、わずかに減少する

傾向にあった。従って、気温の高い夏季においては、飲料の飲み残しを常温に放置することは避けるべきであり、速やかに冷蔵庫に保存した方がよいと考えられた。

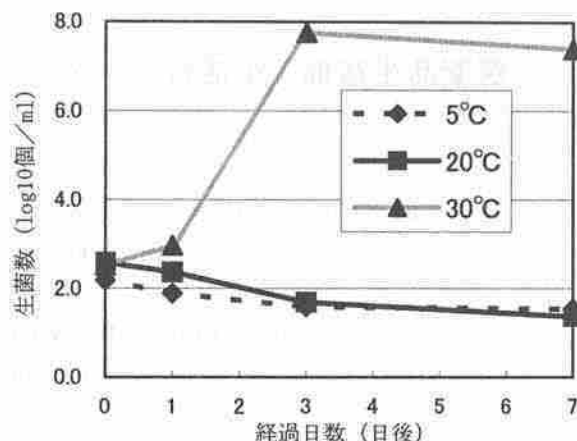


図1 飲料中の一般生菌数の変化

2 濁り

カビ発生の目安として、目視による濁りの発生の有無を表 2 に示した。30℃ 試験区においては、3 日後に濁りが発生し、菌の汚染以外にもカビ発生の可能性が示唆された。また、5℃ 及び 20℃ 試験区においては、7 日間では濁りの発生が認められなかったものの、20℃ 試験区は 10 日後に、5℃ 試験区は 1 ヶ月後に濁りの発生が認められた。本調査はあくまで目視による確認であるため、実際にカビが発生したのはもっとそれ以前であることも考えられ、また実際に飲用される場合には、本調査よりも過酷な条件が想定されるため、カビ発生の可能性もより高くなる。従って、一般生菌数の場合と同様、飲み残しを置く場合には必ず冷蔵保存し、できるだけ早く飲みきることが重要であると考えられた。

表 2 濁りの発生

経過日数	5℃	20℃	30℃
0	×	×	×
1	×	×	×
3	×	×	○
7	×	×	○

3 褐色度

緑茶の水色は、空気中に放っておくと次第に褐色に変化する。これは、空気中の酸素と水分の存在によりカテキン類が酸化され、重合生成物ができるため¹⁾である。緑茶の品質低下には、味、色及び香り

文 献

- 1) 木村進他:食品の変色の科学, 関光琳, 東京(1995)

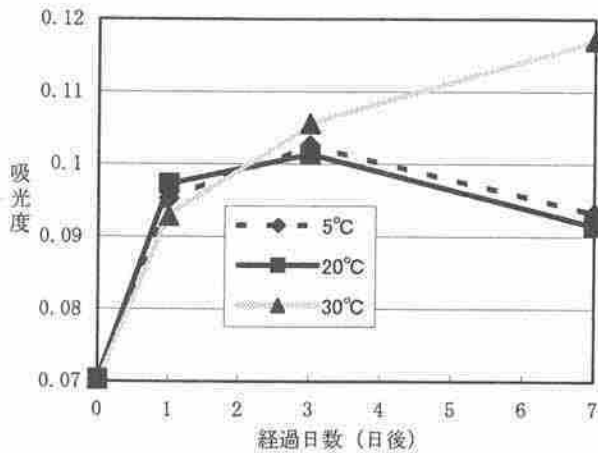


図2 飲料の褐変度 (λ=400nm、10倍希釈)

が目安として挙げられるが、本調査ではその一つである色の変化、すなわち褐変を取り上げ、400nmにおける吸光度の変化を調べ、結果を図2に示した。それによると、30°C試験区における吸光度の増大が最も大きく、褐変が進んでいると考えられたが、5°C及び20°C試験区においては、ほぼ同様の変化を示した。褐変を促進する要因としては、温度、水分、酸素及びpHが挙げられる¹⁾が、本調査の場合は温度の高い条件下で褐変がより一層進んだと考えられた。従って、褐変を防止するには低温で保存することが重要であり、また開栓と同時に飲料が空気中の酸素に触れることになるため、早めに飲みきる方がよいと考えられた。

まとめ

本調査の結果、30°Cのような温度の高い条件下では、早い段階から細菌の増殖、カビの発生及び品質の低下が著しいことがわかった。また、実際に消費者がPET緑茶を飲用する場合には、携帯のため高温で長時間振とうしたり、ふたを開けっ放しにしたりするなど、本調査よりも過酷な条件下であることも予想され、その場合には、衛生状態の悪化や品質の低下がより一層早く進む可能性がある。PET緑茶は夏季に飲用される機会が多いので、飲み残しを保存する場合は必ず冷蔵庫に入れ、できるだけ早く飲みきることが重要であると考えられた。

最後に、保存性試験について御指導・御助言をいただきました。当所微生物部食品微生物スタッフの増田高志主幹に深謝いたします。



The graph illustrates the relationship between the two variables over time. The solid line, representing the first series, shows a peak at the second time point followed by a sharp decline. The dashed line, representing the second series, follows a similar but less pronounced path, also peaking at the second time point and ending at the same low value as the first series at the final time point.

Further analysis of the data points reveals that the rate of change for both series is highest between the first and second time points. The convergence of both series at the final time point suggests a common endpoint or a similar final state for both variables being tracked.

The overall trend for both series is an initial increase followed by a decrease, with the first series exhibiting a more significant drop at the final time point compared to the second series.

防腐・防かび・防虫処理等の薬剤処理が行われた廃木材のリサイクルに関する考察

医薬品生活部

環境科学部

有機性廃棄物プロジェクト

管理部

浮島美之

古屋佳宏

前波清隆

味岡嘉輝

Study on Recycling of Scraped Wood with which Medicine Processing of Antiseptics, Antifungal Agents and Insecticides were Performed

Yoshiyuki UKISHIMA, Yoshihiro FURUYA, Kiyotaka MAENAMI,
and Yoshiteru AJIOKA

建設資材再資源化法（建設リサイクル法）が平成14年5月に施行される。そこで有害物を多く含み、主として建築物に多用されてきた防腐剤、防かび剤、防虫剤等の木材保存剤がどのような経緯で使用されてきたか調べた。また、建物の解体処理により発生し、有害な薬剤の残留が懸念される薬剤処理廃木材のリサイクルと、最終処分を行う際の現状の問題点について考察を行った。

Key words : 廃木材, 防腐剤, 防かび剤, 防虫剤, リサイクル

Scrap wood, Antiseptics, Antifungal Agent, Insecticides, Recycling

はじめに

薬剤処理を行った木材としては、木材の保存を目的として防腐剤、防かび剤、防虫剤等の処理を行った保存処理木材の他に、難燃処理木材、WPC(Wood Plastic Combination)、アセチル化木材、セラミック木材等がある。

本論文では有害物を多く含み、主として建築物に多用されてきた木材保存剤について、木材の薬剤処理の経緯と、建物の解体処理により発生し、有害な薬剤の残留が懸念される薬剤処理廃木材のリサイクルについて、また最終処分を行う際の現状の問題点について考察したので報告する。

木材の保存を目的とした薬剤処理については、防腐能力、防かび能力、防虫能力等の観点からの研究が多く、これら薬剤の毒性等については、主として薬剤処理工場における労働衛生、廃水処理対策等の観点から検討されてきた。

一方、建物の解体等による薬剤処理廃木材を再生利用する場合の製品の安全性や、燃焼による熱回収、埋立処分を行う際の環境汚染防止策等の研究はあまり行われてこなかった。しかし、建設資材再資源化法（建設リサイクル法）が平成14年5月に施行されるのを期に、各方面で研究が着手される見込みである。

建設資材再資源化法の概要

建設資材再資源化法（建設リサイクル法）の概要は以下のとおりである。特に薬剤処理木材に関しては、CCA(銅、クロム、砒素)処理木材の取扱いに当たって有害物質等の発生の抑制について規定している。しかし、過去に木材に使用されたCCA以外の多種類の薬剤に関しては規定されていない。

1 分別解体及び再資源化等の促進

- 1) 建設資材の開発、製造から建築物等の設計、建設資材の選択、建設工事の施工、廃棄等に至る各段階において循環型社会経済システムを構築
- 2) 優先順位として第一に発生の抑制、第二に建設資材の再利用、第三にマテリアル・リサイクル、第

静岡県環境衛生科学研究所

(420-8637, 静岡市北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka, 420-8637, Japan)

四にサーマル・リサイクル，最後に最終処分

- 3) 関係者による適切な役割分担の下でそれぞれが連携しつつ参加
- 4) 分別解体等の技術力の確保，解体工事を行う者に対する情報提供，適正な施工の監視・監督
- 5) 対象建設工事のみならずそれ以外の工事に係る再資源化等の促進
- 6) 都道府県の実情に応じた対応

2 排出抑制のための方策

- 1) 計画・設計段階の取組の実施
- 2) 建築物等の長期的使用，再使用
- 3) 耐久性の向上，長寿命設計
- 4) 端材の発生が抑制される施工方法の採用，建設資材の選択
- 5) 技術開発，維持修繕体制

3 目標の設定等再資源化の促進のための方策

- 1) 平成22年度再資源化等目標

コンクリート塊，建設発生木材，アスファルト塊=95%

- 2) 国の直轄事業では平成17年度までに最終処分量ゼロ
- 3) 必要な再資源化施設の確保
- 4) コスト削減等に資する技術開発
- 5) 再資源化により得られた物の利用の促進
- 6) コンクリート塊，建設発生木材，アスファルト塊の再資源化の具体的方策
- 7) プラスチック，石膏ボードなど特定建設資材以外の建設資材に係る分別解体及び再資源化等の促進，特定建設資材としての指定の検討

4 再資源化により得られた物の利用促進のための方策

- 1) リサイクル材の需要の創出及び拡大
- 2) 安全性・自然環境保全への配慮
- 3) 関係者によるリサイクル材の利用・選択，開発・製造，品質基準・規格化による品質確保
- 4) 国による率先利用
- 5) 国の直轄事業における具体的利用方法

5 意義に関する知識の普及

- 1) 環境教育，環境学習，広報活動等
- 2) 講習の実施，資料の提供等

6 その他重要事項

- 1) 費用の適正な負担
- 2) 各種情報の提供
- 3) フロン類，非飛散性アスベスト，CCA処理木材等の取扱いに当たっての有害物質等の発生の抑制
- 4) ライフ・サイクル・アセスメント

特に，防蟻・防蟻を目的とした CCA 処理木材につ

いては，次のような「解説」がある。

不適正な焼却を行った場合には，砒素を含む有毒ガスが発生するほか，焼却灰に有害物である六価クロム及び砒素が含まれる。このため CCA 処理木材については，それ以外の部分と分離・分別し，それが困難な場合には，CCA が注入されている可能性がある部分を含めて，これをすべて CCA 処理木材として焼却又は埋め立てを適正に行う必要がある。また，この施設の整備等について関係者による取組が行われることが必要である。なお，この CCA 処理木材については，残存する CCA に関する経済的な判別・分離・処理技術が未確立であること等の課題があるため，これらの課題について技術的・経済的な面からの調査・検討を行い，適正かつ能率的な CCA 処理木材の分離・回収，再資源化のための技術開発，施設整備等の必要な措置を講じ，CCA 処理木材の再資源化の推進に努める必要がある。

なお，先述したように CCA 以外の木材に使用されてきた多種類の薬剤に関しての「解説」はない。

建設用木材へ使用された薬剤

我が国では 1872 年に，クレオソート油加圧注入枕木が使用された。その後 1900 年代に入って多くの薬剤が出現したが，生物に対する残留毒性等が明らかとなり，使用禁止となった薬剤も数多くある。建築物は，数十年経過した後に解体されることが多いため，木材に対する過去の使用薬剤の概要を知ることが必要である。以下に主な防腐剤，防かび剤，防虫剤の使用経過を解説する。

なお，木材保存剤等に関連する主な法令等の規制は，薬剤処理木材が廃棄物として処理される場合に適用される廃棄物取締法の他，化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法），毒物及び劇物取締法，消防法，労働安全衛生法，大気汚染防止法，水質汚濁防止法等が関与している。

1 防腐剤

1950 年代には，クレオソート油，フェノール類，無機フッ素化合物，PCP（ペンタクロロフェノール）等が使用された。1960 年代には有機錫化合物，クロロフクリン系化合物，CCA（銅，クロム，砒素）系防腐剤が使用されるようになった。その後 CCA の使用が多くなったが，その毒性，排水基準の強化により，現在日本ではほとんど使用されていない。

現在は，水溶性の防腐剤としてアルキルアンモニウム化合物系（AAC），硼素・アルキルアンモニウム化合物系（BAAC），銅・アルキルアンモニウム化合物系（ACQ），銅・硼素・アゾール化合物系

(CUBAZ), 銅・アゾール化合物系 (CUAZ)等が用いられている。油溶性の防腐剤としては、ナフテン銅 (NCU), ナフテン酸亜鉛 (NZN)等が用いられている。また、乳化性防腐剤としては、ナフテン銅 (NCU), ナフテン酸亜鉛 (NZN)等と共に、パーサチク酸亜鉛 (VZN)+ピレスロイト系殺虫剤、トリアゾール系防腐剤+有機リン系殺虫剤等が使用されている。

2 防かび剤

水銀化合物は、1960年代の後半まで用いられていたが、その後は人畜への毒性や環境汚染問題への関心の増大と共に使用されなくなった。トリクロロフェノール (TCP), ペンタクロロフェノール (PCP)等のクロロフェノール類も多用されてきたが、工業的に生産されるクロロフェノール類には不純物としてダイキシンが含有されていることもあって世界的に使用禁止の方向にある。

現在は、2-チオシアノメチルチオホソチアゾール (TCMTB)+メチレンビスチオシアネート (MBT), クロロタロン (TPN)+カーベンタジン (アリバントール)+アサコナゾール, 8-オキシキノリン銅+カーベンタジン, 3-エト-2-プロピニルアチルカーボメート (IPBC)+アルキルアンモニウム化合物 (AAC, ジテシリンメチルアンモニウムクロリド等), 硼酸+アルキルアンモニウム化合物等の防かび用混合薬剤が使用されている。

3 防虫剤

かつてはディルトリン, エントリン, アルトリン, ヘプタクロル, γ -BHC, DDT等の塩素系殺虫剤が使用されていたが、難分解性, 生物への蓄積性, 残留毒性の面から1971年以降使用が中止されている。代わってクロルピリンが多用されるようになったが、これも1986年に使用が禁止となり、有機リン系殺虫剤クロルピリンが主役を務めてきた。

クレオソート油, CCA (銅, クロム, 砒素), アルキルアンモニウム化合物系 (AAC), 銅・アルキルアンモニウム化合物系 (ACQ), ナフテン銅 (NCU), ナフテン酸亜鉛 (NZN), パーサチク酸亜鉛 (VZN)+ピレスロイト系等の薬剤も防腐を兼ねて使用された。

近年は合成ピレスロイト系薬剤や、カーボメート系薬剤等が主に使用されている。

建設用木材に使用された主な薬剤の

物理化学的性質と毒性

過去から現在に至るまで建設用木材に使用されてきた主な薬剤の名称, 化学式, 分子量, 性状, 急性経口毒性等について, 防腐・防かび剤を表1に, 防虫剤を表2に示した。

廃木材からの使用薬剤の判別法

廃木材から使用された薬剤を判別または推定する方法は, 多種類の薬剤に対応して, 分別現場で迅速・安価に結果を出せる試験法であることが要求される。

木材に使用した薬剤を, 薬剤名を指定して定量分析を行うことは技術的には可能であるが, 長時間の分析に加え, 高価な分析費用を要する。したがってこれを過去に使用した可能性のある薬剤すべてに適用するのは現実的ではない。

一部木材用薬剤に対しては, 呈色試薬が用意されているが, 過去に使用された可能性のある多種類の薬剤に適用することはできない。農業, クロルピリン等の有機薬剤には, EIA (酵素免疫測定)法で適用できるものがあるが, 薬剤の抽出操作が必要となり, また各薬剤別に試験を行う必要がある。蛍光 X線分析法は, 化学的な前処理を必要とせず, 金属, 塩素等の定性を行うことができ, 無機性の薬剤及び塩素系化合物等については使用薬剤の推定を行うことが可能と考えられるが, 実際に薬剤を使用した木材で検討する必要がある。

いずれにしても, 薬剤を使用した可能性のある木材について, 分別現場等で確認するためには, 薬剤の系統的な迅速分析法を今後十分検討する必要があると考える。

建物の解体における薬剤処理廃木材の分別

木材に対する各種薬剤の使用は, 輸入先の国における薬剤処理, 薬剤処理工場における処理, 新築現場での薬剤処理, 建築後の防ありを主たる目的とした薬剤処理等多岐にわたっている。また, 処理方法も表面処理, 加圧注入処理等が行われている。

これら薬剤処理された木材は, 建築の際に土台部分を中心にかなり広い範囲で使用されている可能性がある。これらを背景として, 数十年前に建築された建物のどの部分にどのような薬剤が使用されているのかを予め察知するのは, かなり難しいものと考えられる。

現在, 建物を解体する際, 解体現場での分別はほとんど行われず, 建設廃材のリサイクル工場等で主として金属, 石膏ボード, 木材等の分別回収が行われている。ここで薬剤使用廃木材を分別することは, 過去に多種類の薬剤が使用されてきた可能性のあること, これらの薬剤を迅速・的確に見極める判別法が完成されていないこと等を考えると極めて難しい状況となっている。

薬剤処理廃木材のリサイクル, 処理方法について

現在各方面でリサイクル, 処理方法の検討が進められており, 新たな技術の出現が予想されるが, 現時点で考えられる薬剤処理廃木材のリサイクル, 処

表1 木材防腐・防かび剤

一般名又は商品名 (化学名)	化学式:分子量	性状	急性経口毒性 LD50(mg/kg)	使用状況
昇汞	HgCl ₂ : 271.52	白色、透明の両すい体結晶	37(ラット)	1960年代後半まで使用
硫酸銅	CuSO ₄ ·5H ₂ O: 249.69	青色結晶性粉末	50(ウサギ)	CCAとして多用
塩化亜鉛	ZnCl ₂ : 136.30	白色結晶性粉末	200(モルモット)	
硫酸亜鉛	ZnSO ₄ : 161.45	白色結晶	2200(ラット)	
フッ化ナトリウム	NaF: 41.99	無色結晶	52(ラット)	1950年代から使用
フッ化カルウム	KF: 58.10	無色結晶	245(ラット)	1950年代から使用
珪フッ化ナトリウム	Na ₂ SiF ₆ : 188.06	無色六方晶系結晶	125(ラット)	1950年代から使用
珪フッ化亜鉛	ZnSiF ₆ : 209.47	無色透明六方晶系柱状晶	100(ラット)	1950年代から使用
珪フッ化マグネシウム	MgSiF ₆ : 166.41	無色三方晶系結晶		1950年代から使用
無水亜硫酸	As ₂ O ₃ : 197.82	結晶系又は無定型ガラス状	34.4-63.5(マウス)	CCAとして多用
亜硫酸ナトリウム	NaAsO ₂ : 191.88	白色粉末	18(ラット亜硫酸イオンとして)	CCAとして多用
砒酸ナトリウム	Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O: 312.01	無色結晶又は粉末性結晶		CCAとして多用
重クロム酸ナトリウム	Na ₂ Cr ₂ O ₇ ·2H ₂ O: 298.00	橙黄色結晶	180(マウス)	CCAとして多用
酸化第二銅	CuO: 79.54	黒色粉末又は粒状	1000(ラット)	CCAとして多用
水酸化第二銅	Cu(OH) ₂ : 97.56	青緑色	1,000(ラット)	現在使用中
ほう酸	B ₃ O ₃ : 61.84	無色又は白色の結晶	(人成人致死量20g)	現在使用中
八ほう酸二ナトリウム	Na ₂ B ₈ O ₁₃ ·4H ₂ O: 412.61			現在使用中
ナフテン酸銅	Cu(C ₉ H ₇ (CH ₂) _n COO(R)) ₂	緑色液体	>6,000(マウス)	現在使用中
ナフテン酸亜鉛	Zn(C ₉ H ₇ (CH ₂) _n COO(R)) ₂	黄褐色液体	4,920(ラット)	現在使用中
パーサチック酸亜鉛	Zn(C·COO·CH ₃ ·R ₁ ·R ₂) ₂ R ₁ , R ₂ : アルキル基(合計炭素数9)	淡黄色液体	2.0ml/kg(マウス♂)	現在使用中
モリブデン酸カリウム	K ₂ MoO ₄ ·5H ₂ O: 328.22	無色固体		現在使用中
クレオソート油		黒色又は濃黄褐色粘り性の油状液体	433(マウス)	現在使用中
トリクロロベンゼン	C ₆ H ₃ Cl ₃ : 181.45	無色油状液体	300(マウス♂)	
ジニトロクロロベンゼン	C ₆ H ₃ N ₂ O ₄ Cl: 202.55	柱状晶		
TCP (2,4,6-トリクロロフェノール)	C ₆ H ₃ OCl ₃ : 197.45	淡褐色個体	820(ラット)	1950年代から使用
PCP (ペンタクロロフェノール)	C ₆ OHCl ₅ : 266.32	白色針状結晶	50(ラット)	1950年代から使用
2,4-ジニトロフェノール	C ₆ H ₃ N ₂ O ₅ : 184.11	無色又は黄色結晶	30(ラット)	1950年代から使用
4,6-ジニトロ- <i>o</i> -クレゾール	C ₇ H ₅ N ₂ O ₅ : 198.13	黄色柱状晶	24(マウス)	1950年代から使用
<i>o</i> -フェニルフェノール (オキシビフェニル)	C ₁₂ H ₁₀ O: 170.21	針状晶	900(マウス)	1950年代から多用された
α -クロルナフタリン	C ₁₀ H ₇ Cl: 163	無色油状液		1960年代に使用
ジクロルナフタリン	C ₁₀ H ₆ Cl ₂ : 197	無色板状晶		1960年代に使用
TBTO (トリブチルスズオキシド)	C ₂₄ H ₅₄ OSn ₂ : 596.1	無色～淡黄色液体	122(マウス)	1960年代に使用
リグニンスルホン酸		黄褐色の粉末	6,036(マウス)	現在使用中
サンブラス	C ₆ H ₇ BrI ₂ O ₃ : 460.8	灰白色粉状結晶	641(ラット♂)	現在使用中
IF-1000 (<i>p</i> -クロロフェニル-3-ヨードプロパキル基の塩)	C ₁₀ H ₈ ClIO ₂ : 322.53	淡黄色液体	1,250(マウス)	現在使用中
IBPC (3-ヨード-2-ニトロプロピルチル基の塩)	C ₈ H ₁₂ INO ₂ : 281.09	白色顆粒状結晶	1,059(ラット♀)	現在使用中
DDAC (ジデシルジメチルアンモニウムクロリド)	C ₂₂ H ₄₈ NCl: 362.09	無色ないし淡黄色固体	490(ラット)	現在使用中
塩化ベンザルコニウム	C ₆ H ₅ CH ₂ N(CH ₂) ₂ RCl R: C ₁₄ H ₂₇ -C ₁₈ H ₃₇		200(モルモット)	現在使用中
TBZ (2-(4-チアゾリル)-1H-ベンゾイミダゾール)	C ₁₀ H ₇ N ₃ S: 201.25	白色粉末	3,000(マウス)	現在使用中
TCMTB (2-(チオシアメチルチオ)ベンゾチアゾール)	C ₉ H ₆ N ₂ S ₂ : 206.3		1,590(ラット)	現在使用中
シプロコゾール	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₃ O: 291.78	白色結晶性固体	1,115(ラット♂)	現在使用中
アサコゾール	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ N ₃ O ₂ : 300.16	ベージュあるいは褐色の粉末	402(ラット)	現在使用中
デブコゾール	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O: 307.83	白色又はベージュ色の結晶性粉末	>5,000(ラット)	現在使用中
MBT (メチレンビスチオシアネート)	C ₃ H ₂ N ₂ S ₂ : 130	黄色粉末	27.5(マウス)	現在使用中
2-フェニルフェノール	C ₁₂ H ₁₀ O: 170.21	針状結晶	2,000(ラット)	現在使用中
イソチアゾリン	C ₁₁ H ₁₉ NOS: 213.3	淡黄色液体		現在使用中
NCH-Al (トリス-(<i>n</i> -シクロヘキシル)アセチルアミンシキニトアルミニウム)	C ₁₈ H ₃₃ N ₆ O ₆ Al: 456	黄色味を帯びたペレット	5,610(ラット)	現在使用中
フルメシロックス	C ₁₄ H ₂₇ NO ₃ : 251.3	淡茶色の粘り性液ないし結晶状	3,780(ラット)	現在使用中
TPN (クロロクロニル)	C ₈ Cl ₄ N ₂ : 265.9	無色結晶	>10000(ラット)	現在使用中
カーベンダジン (グリヘンテール)	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ : 179.1	淡褐色又は淡灰色粉末	>15000(ラット)	現在使用中
8-オキシキノリン銅	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂ Cu: 331.7	黄緑色結晶	7000(マウス)	現在使用中

表2 木材防虫剤

一般名又は商品名 (化学名)	化学式:分子量	性状	急性経口毒性 LD50(mg/kg)	使用状況
ディルトリン	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O: 380.9	結晶	38(マウス)	1971年使用中
ヘプタクロル	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ : 373.3	白色結晶	68(マウス)	1971年使用中
アルトリン	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ : 364.9	無色結晶	44(マウス)	1971年使用中
γ-BHC	C ₆ H ₆ Cl ₆ : 290.9	白～褐色粉末	88(ラット♂)	1971年使用中
DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ : 354.5	無色結晶	113(ラット♂)	1971年使用中
トキサフェン	C ₁₀ H ₁₀ Cl ₈ : 413.8	黄色ワックス状固体	80(ラット♀)	1971年使用中
チオタン (エンドスルファン)	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S: 407.0	褐色結晶	40-60(マウス)	1971年使用中
エントリン	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O: 380.9	白色結晶	7.5-17.5(ラット)	1971年使用中
テロトリン (イソベンザン)	C ₉ H ₄ Cl ₈ O ₈ : 411.8	白色結晶	4.8(ラット)	1971年使用中
クロルデン	C ₁₀ HCl ₉ : 409.76(主成分)	琥珀色の粘りような液体	145(マウス)	1986年使用禁止
TBTO (トリブチルスズオキシド)	C ₂₄ H ₅₄ OSn ₂ : 596.1	無色～淡黄色液体	122(マウス)	
スミチオン (フェントロチオン)	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS: 277.2	黄褐色液体	570-800(ラット)	
ダイアジノン	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS: 304.4	暗褐色液体	80-135(マウス)	
マラソン	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂ : 330.4	琥珀色液体	2800(ラット)	
バイジット (フェンチオン)	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂ : 278.3	無色液体	190-315(ラット♂)	
o-ジクロロベンゼン	C ₆ H ₄ Cl ₂ : 147.01	無色透明液体	500(ラット)	
p-ジクロロベンゼン	C ₆ H ₄ Cl ₂ : 147.01	白色結晶	500(ラット)	
臭化メチル	CH ₃ Br: 94.95	無色透明揮発性液体	(許容濃度 19mg/m ³)	
NAC (カルバリル)	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂ : 201.2	白色結晶	500(ラット♀)	
ホキシム	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃ PS: 298.3	淡黄色油状	1,935(マウス♂)	現在使用中
クロルピリホス	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS: 350.62	白色粒状結晶	88(マウス♂)	現在使用中
フェニトロチオン	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS: 277.24	黄褐色油状	330(ラット♂)	現在使用中
ピリダフェンチオン	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS: 340.03	白～淡黄色結晶	405(マウス♂)	現在使用中
ジクロロフェンチオン	C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ O ₃ PS: 315.2	無色液体	136(ラット♀)	現在使用中
プロベタンホス	C ₁₀ H ₂₀ NO ₄ PS: 281.3	淡黄～淡褐色の液体	62(マウス♀)	現在使用中
テトラクロロピリンホス	C ₁₀ H ₉ Cl ₄ O ₄ P: 365.99	白色結晶性固体	2,500～5,000(マウス)	現在使用中
カルバリル	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂ : 201.2	白色結晶性固体	438(マウス♀)	現在使用中
フェノカルブ	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂ : 207.28	僅かな特異臭のある結晶性固体	173～182(マウス)	現在使用中
プロホクスル	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃ : 209.25	特異臭のある結晶性粉末	32～42(マウス♀)	現在使用中
ベルメリン	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃ : 391.3	黄褐色油状液	430(ラット♂)	現在使用中
α-シベルメリン	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃ : 416.32	白色～淡黄色結晶固体	57(ラット♂)	現在使用中
シフェトリン	C ₂₄ H ₂₅ NO ₃ : 375.45	黄色～黄褐色の液体	311(マウス♂)	現在使用中
ピフェントリン	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂ : 422.87	類白色固体	47(ラット♀)	現在使用中
シフルトリン	C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃ : 434.31	粘りような黄褐色液体又は塊、無臭	113(マウス♂)	現在使用中
トラメスリン	C ₂₂ H ₁₉ Br ₄ NO ₃ : 665	黄褐色の非晶固体	54(マウス♂)	現在使用中
エトフェンプロックス	C ₂₅ H ₂₈ O ₃ : 376.5	白～微黄色の結晶	>42,880(ラット)	現在使用中
シラフルオフェン	C ₂₅ H ₂₉ FO ₃ Si: 408.59	淡黄色油状液		現在使用中
TPIC (1,3,5-トリ-n-プロピル-1,3,5-トリア ジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオン)	C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O ₃ : 255.3	無色液体	2,871(ラット♂)	現在使用中
イミタクロピリト	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂ : 255.68	白色結晶	98(マウス♀)	現在使用中
アセタミプリト	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄ : 222.69	白色結晶	146(ラット♀)	現在使用中
BDCP (4-ブロム-2,5-ジクロロフェノール)	C ₆ H ₃ OCl ₂ Br: 241.9	白色結晶	1,370(マウス♀)	現在使用中
カプリン酸	C ₁₀ H ₂₀ O ₂ : 172.27	白色結晶又は塊	>10,000(ラット)	現在使用中
S-421 (オクタクロロジプロピルエーテル)	C ₆ H ₆ Cl ₈ O: 377.7	無色又は淡黄色澄明液	7,010(マウス♀)	現在使用中
IBTE (2-(ホルナン-2-イルオキシ)エチル=チオ シアネート)	C ₁₃ H ₂₁ NOS: 239.38	微黄色～黄褐色澄明液体	622(マウス♂)	現在使用中
MGR264 (N-(2-エチルヘキシル)-ピシクロ (2,2,1)-ヘプター-5-エン-2,3-ジカル ボキシイミド)	C ₁₇ H ₂₅ NO ₂ : 275.39	無色～淡黄色澄明液体	4,980(マウス)	現在使用中

理方法について列挙してみた。

1 チップ化して紙・パルプの原料

理論的には可能と考えられるが、木材に使用された各種の薬剤の挙動と、その最終処理対策、さらに製造する紙製品の品質管理等での課題が多いと考える。

- 1) 金属等の夾雑物の除去
- 2) 使用薬剤による化学反応
- 3) 薬剤の製品への移流
- 4) 集合材等の接着剤への対応
- 5) 繊維強度の確保
- 6) 排水、排煙処理
- 7) コスト（経済性）

2 チップ化してボード等に加工

実際に研究を行っているところもあるが、良好な製品ができて、その製品が将来廃棄物となったとき、薬剤の使用実態がさらにわかりにくくなるとともに、薬剤がそのまま残存し、問題の先送りといった一面もある。

3 廃木材からの使用薬剤の資源回収

CCA 処理を行った木材をチップ化し、0.25~1N 硫酸を用いて 80~100℃で約 5 時間抽出すると各金属成分の約 95%が除去できる。しかし抽出液中の金属濃度が低いこと、硫酸イオンの除去が十分行えないこと、排水基準に適合させることが難しい等により実用化に至るまでに解決すべき問題が多くある。

CCA 処理木材からの金属の抽出を目的として、超臨界二酸化炭素にアセチルアセトンを経絡剤として用いて抽出すると、銅とクロムについては回収率

が比較的良かった。しかしヒ素の回収率は低かった。この方式も実用化には課題が残る。

4 焼却をして熱回収

現時点では、薬剤処理を行った廃木材の処理に関しては、焼却して熱回収を行う方法が、実用化の可能性が大きいと考える。塩素系を含む有機薬剤は、ダイオキシン対策を施した高温燃焼炉では分解され、金属類の大半は、焼却灰に移行することが予想される。煤塵は水洗して脱塩素を行い、焼却灰とともにセメント原料にしたり、焼却灰を熔融スラグにして建設・土木用資材に再活用したり、焼却灰をセメントブロックに封入すること等が考えられる。

なお、ヒ素等の低沸点金属が木材焼却の際にどのような挙動をするのか検討し、これらによる環境汚染を防止するための措置を講ずる必要がある。

5 埋立処分

有害物質が周辺の環境に影響を与えないための対策を施した産業廃棄物最終処分場に、薬剤処理廃木材を埋立て処分することは、関係法令に抵触することはない。しかし木材に使用した薬剤がそのまま残存し、廃棄物の量がかさみ、さらに産業廃棄物の最終処分場の余裕がなくなりつつあることから、必ずしも適切な方法とは考えられない。

以上の結果から、図1に薬剤処理廃木材を中心とした建設用廃材のリサイクルフローシートの例を示す。

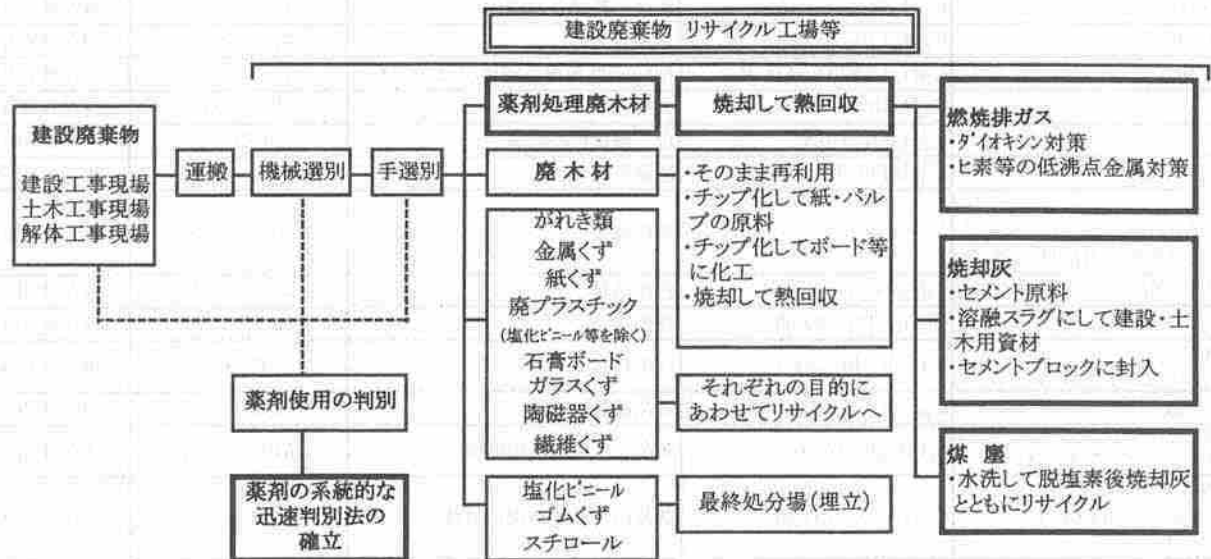


図1 薬剤処理廃木材を中心とした建設廃材リサイクルフローシートの例

今後の薬剤処理のあり方について

現在、自動車製造業界等では、使用している各部品についてリサイクルを行うことを想定して設計・製造している。

今後、建設資材業界、建設業界等でもこの考え方を取り入れ、建設資材等のリサイクルに十分配慮した建設システムを導入する必要がある。

すなわち、予め保存処理木材に識別マークを付す等により、建物の解体の際に、薬剤処理した木材がどのような種類の薬剤が使用されているかを含めて明確・迅速に判別できる状態とし、更に分別した後の安全なリサイクルシステムの構築を図ることが必要と考える。

まとめ

薬剤処理廃木材について、薬剤の分類ごとに迅速に分別できる有用な判別手法の確立を急ぐ必要がある。また、判別手法の確立と併せて、建物の解体現場または建設廃材のリサイクル工場等における、適切な分別作業手順整備や、薬剤ごとに分別された廃木材を適切にリサイクルする処理方法が開発も必要である。今後は、これらについての研究が進み、有用な手法の開発が期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、助言と参考文献を紹介していただいた、静岡工業技術センター池上元一主幹、林業技術センター小野和博主任研究員、同渡井純副主任に深謝します。また、薬剤処理木材の歴史的経緯等についてお教えいただいた清水港木材産業組合テクノロジーチーム池上喜宏次長、さらに、建設廃材のリサイクルの現状について視察させていただいた(株)三和建商リサイクルセンター八木暹代表取締役様に深謝します。

文献

- 1) 河村賢三：建設リサイクル法の基本方針の概要，木材保存，23，3，100-108（2001）
- 2) （社）日本木材保存協会広報委員会：社団法人日本木材保存協会20年史，木材保存，24，3，161-164（1998）
- 3) 布村昭夫：木材保存との30年，木材保存，20，6，295-306（1994）
- 4) 須貝与志明：日本木材工業組合30年の歩み，木材保存，22，6，294-297（1996）
- 5) （財）日本木材加工技術協会：農林省林業試験場編集 木材工業ハンドブック初版，東京（1958）
- 6) （財）日本木材加工技術協会：農林省林業試験場編集 木材工業ハンドブック第5版，東京（1967）
- 7) 井上嘉幸：実用木材加工全書 10 木材の劣化と防止法，森北出版，東京（1972）
- 8) （社）日本木材保存協会：木材保存学，文教出版，大阪（1982）
- 9) （社）日本木材保存協会：木材保存学入門，（社）日本木材保存協会，東京（1992）
- 10) （社）日本木材保存協会：木材保存学入門改訂版，（社）日本木材保存協会，東京（2001）
- 11) 酒井温子他：日本農林規格認定の木材保存剤を加圧注入した杭の被害経過，木材工業，56，1，17-22（2001）
- 12) 木材防腐工業組合：木材防腐の手帳，（非売品）
- 13) （社）日本木材保存協会薬剤部会：木材保存剤ガイドライン改訂版，（社）日本木材保存協会，東京（2001）
- 14) 環境庁環境化学物質研究会：環境化学物質要覧，丸善，東京（1988）
- 15) 上杉康彦他編集：最新農薬データブック第3版，ソフトサイエンス社，東京（1997）
- 16) 化学工業日報社：4771の化学商品，東京（1971）
- 17) 化学工業日報社：12093の化学商品，東京（1993）
- 18) 化学工業日報社：14102の化学商品，東京（2002）
- 19) 土居修一：木材保存剤，木材保存，19，3，117-123（1993）
- 20) 野村安宏：木材防かび剤，木材保存，19，6，298-303（1993）
- 21) 手嶋勇人他：木材防虫剤，木材保存，20，2，93-99（1994）
- 22) 石田英生：加圧木材保存処理方法，木材保存，21，2，84-88（1995）
- 23) 林晃史：防蟻剤としてのピレスロイド，木材保存，22，1，2-13（1996）
- 24) 志澤寿保：木材保存剤の安全性，木材保存，20，3，142-162（1994）
- 25) 志澤寿保：木材保存剤の揮散性と安全性について，木材保存，24，5，291-318（1998）
- 26) 遠藤茂寿：リサイクル・リユースのための判別技術，資源と環境，9，103-108（2000）
- 27) 地球環境編集部：焼却灰のセメント原料化，

- 地球環境, 2001.11, 79-89 (2001)
- 28) 浦邊真郎: ごみ焼却残渣リサイクルの特徴と課題, 環境技術, 30, 295-299 (2001)
- 29) 谷川充: 講演会「保存処理剤のリサイクル利用技術ならびに安全廃棄技術」に参加して, 木材保存, 20, 5, 266-267 (1994)
- 30) 疋田洋子: 解体材の再利用—循環型社会をめざして—, 木材保存, 26, 1, 4-16 (2000)
- 31) 竹下幸俊他: 超臨界二酸化炭素による CCA 処理木材からの金属抽出の試み—銅・クロムの抽出—, 木材保存, 26, 1, 17-22 (2000)
- 32) 佐野寛: 自然エネルギーの中におけるバイオマスの位置, 環境技術, 30, 490-497 (2001)
- 33) 本田淳裕: バイオマスエネルギー—生物資源・廃棄物の有効利用—, 財団法人省エネルギーセンター, 東京 (1986)
- 34) 栗崎宏: これからの木材保存, 木材保存, 24, 3, 215-216 (1998)
- 35) 角田郁夫: 保存処理廃材のリサイクル, 木材保存, 24, 2, 95-99 (1998)
- 36) 山田優: 建設廃材の再資源化, 環境技術, 29, 421-426 (2000)

富士山の大气環境保全のための総合調査

大気・水質部

大気・騒音環境スタッフ

静岡大学

太田良和弘, 篠原英二郎, 鈴木光彰

永田嘉七, 池谷静雄, 前嶋孝明

中島賢邦, 鈴木 款

Research on Air Pollutants in Mt. Fuji

Kazuhiro OHTARA, Eijiro SHINOHARA, Mitsuaki SUZUKI

Kashichi NAGATA, Shizuo IKETANI, Takaaki MAEJIMA

Yoshikuni NAKAJIMA, and Yoshimi SUZUKI

富士山の環境保全を目的として富士山山麓の大气環境負荷の把握を行った。県内の代表的な市街地との比較では汚染されていないが、オキシダント、PM_{2.5}等、環境基準等を上回る項目もみられ、必ずしも清浄地域とはいえない状況であった。さらに、移動発生源起源と考えられる窒素酸化物及び一酸化炭素濃度が年々顕著に増加しており、局地的な大気汚染の進行が把握された。これらの汚染状況は主に夜間の顕著な濃度上昇によるものであり、観光公害の影響が懸念された。これらの環境負荷の起源を推定するため粒子状物質に関して濃度実態を詳細に調査した。

Key words: 富士山, 浮遊粒子状物質, PM_{2.5}, 観光公害

Mt. fuji, Suspended Particulate Material, PM_{2.5}, Tourist Pollution

はじめに

富士山の生物圏への環境負荷は、従来からいわれている酸性雨等の湿性大気汚染物質だけでなく、二酸化硫黄等の大気汚染物質や対流圏オゾンといったような様々な要因の複合影響が想定される。しかし、富士山山麓においては、これら環境負荷の直接的な発生源は存在しておらず、また移流による負荷を想定した場合においても、近隣の富士工業地域あるいは関東地方等といったように、起源については未だ不明な部分が多い。本研究は、富士山の環境保全の一環として、大気環境を総合的に調査することにより富士山山麓への環境負荷を把握することを目的とした。

調査方法

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-Andō, Shizuoka 420-8637, Japan)

1 調査期間

1) 夏期調査

2001年6月11日から7月10日

2) 冬期調査

2001年11月1日から11月15日

2 調査地点

1) 富士山 (調査地)

富士山5合目水ヶ塚公園敷地内 (裾野市須山2308番5外; 図1参照) (以下、調査地とする)

調査地は富士・富士宮工業地域を望む富士山南側中腹部 (標高1435m) にあり、富士山スカイライン、表富士周遊道路の基点として夏期の富士山登山時期には規制により観光車輛の指定駐車場となるが、調査期間中は若干の自動車の往來がある程度の閑散とした公園である。

また、比較対照として以下の大気常時監視測定局の大気常時監視データについて調査期間分を抜粋して用いた。

2) 工業地域

富士救急医療センター (富士市津田蓮台場217番)

調査項目	略号	測定方法
浮遊粒子状物質	SPM	β線吸収法 (JIS B7954)
二酸化硫黄	SO ₂	溶液導電率法 (JIS B7952)
窒素酸化物	NO ₂ , NO, NO _x	ザルツマン試薬を用いる吸光光度法 (JIS B7953)
一酸化炭素	CO	非分散型赤外分析計を用いる方法 (JIS B7951)
オキシダント	O _x	中性ヨウ化カリウム溶液を用いる吸光光度法 (JIS B7957)
炭化水素	NMHC, CH ₄ , THC	水素炎イオン化検出法 (JIS B 7956)
風向・風速	WD, WS	矢羽根法

表1 調査項目一覧

3) 市街地

島田市役所 (島田市中央町1番の1)

3 調査項目

1) 大気環境モニタリング

調査地に大気環境測定車を設置し、表1に示した項目について全期間連続モニタリングし、1時間毎のデータを得た。

2) 粒子状物質

大気環境測定車近傍にアンダーセン型ロウポリウエアサンプラー (以下LV; 東京ダイレック製AN-200) 及びアンダーセン型ハイポリウムエアサンプラー (以下HV; 柴田科学製AH-600) を設置し、表2に示した期間に調査を行った。なお、LVでは吸引流量28.3L/minで粒子を3段階 (0.43~2.1未満, 2.1~11未満, 11μm以上) に分級し、石英ろ紙上に捕集した。得られた試料は、それぞれ20℃, 50%RHの恒温恒湿状態で約24時間放置後、0.01mgの感度を有する天秤で重量測定し、捕集量から粒子状物質 (以下PM) 濃度を算出した。また、HVでは吸引流量556L/minで約1日間、粒子を5段階 (1.1未満, 1.1~2.0未満, 2.0~3.3未満, 3.3~7.0未満, 7.0μm以上) に分級し、石英ろ紙上に捕集した。得られた試料は、それぞれ300℃1時間の熱処理後、高感度窒素炭素分析装置 (住化分析センター製NC-90A) により炭素量を測定し、捕集量から元素状炭素粒子 (以下EC) 濃度を算出した。

また、比較対照として島田市役所にLVのみ設置し、表2に示した期間に同様の調査を行った。

調査結果

1 気象概況

調査期間中の県下の天候及び風の状況は以下のとおりであった。

1) 夏期調査

東海地方は6月5日に梅雨入りとなり梅雨前線の影響で曇りや雨の日が多く特に14~15日, 19~20日は大雨となった。しかし、6月後半から7月上旬は太平洋高気圧が西に張

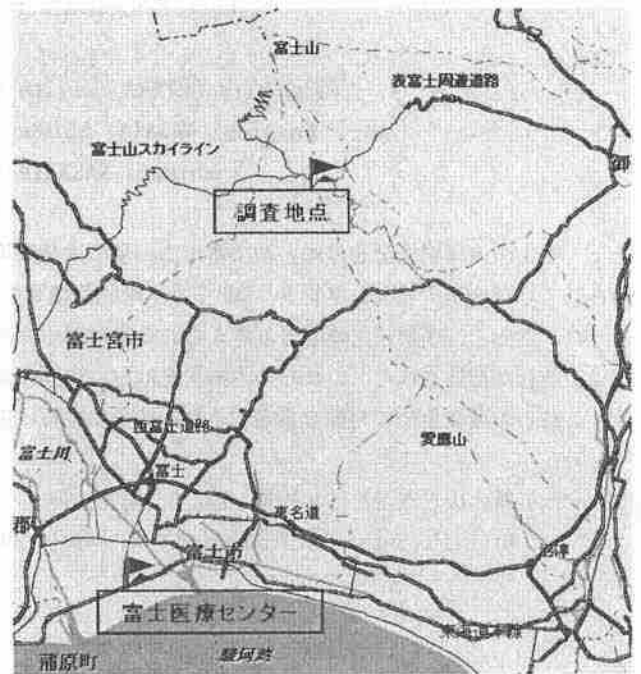


図1 調査対象地点

表2 粒子状物質調査概要

分類	地点	器具	採取期間
MS1	富士山	LV	6/27 14:30~6/29 12:07
MS2			6/29 14:40~7/03 13:50
MS3			7/03 14:00~7/06 14:25
HS1		HV	6/27 14:30~6/29 12:07
CS2	市街地	LV	6/29 10:00~7/03 09:35
CS3			7/03 10:00~7/06 10:00
MW1	富士山	LV	11/05 13:45~11/07 13:45
MW2			11/07 14:00~11/09 14:00
HW2		HV	11/07 14:00~11/09 14:00
CW1	市街地	LV	11/05 09:00~11/07 09:00
CW2			11/07 09:15~11/09 09:15

分類の意味: M (富士山LV); H (富士山HV); C (市街地LV); S (夏); W (冬)

り出し、6月30日以外は概ね晴れた^{1), 2)}。なお、表2中の分

類上では S2期で雨が降った他は概ね晴れた。

表3 大気環境測定結果概要

単位:ppm(PMはmg/m3, NMHCはppmC)

地点 (調査期間)		SPM	PM2.5	SO2	NO	NO2	NOx	CO	Ox	NMHC
富士山・夏 (2001.6.11~7.10)	AVG	0.020	0.031	0.004	0.005	0.005	0.009	0.6	0.050	0.20
	DMAX	0.040	—	0.004	0.017	0.011	0.028	1.4	0.083	0.32
	MAX	0.111	0.036	0.027	0.092	0.036	0.126	5.5	0.144	1.16
工業地域・夏 (2001.6.11~7.10)	AVG	0.059	—	0.008	0.012	0.028	0.040	—	0.032	0.27
	DMAX	0.111	—	0.020	0.039	0.039	0.075	—	0.061	0.59
	MAX	0.195	—	0.039	0.119	0.059	0.155	—	0.136	2.15
市街地・夏 (2001.6.11~7.10)	AVG	0.044	0.043	0.008	0.008	0.020	0.028	—	0.036	0.18
	DMAX	0.083	—	0.031	0.024	0.027	0.048	—	0.059	0.28
	MAX	0.354	0.050	0.146	0.040	0.043	0.074	—	0.134	0.66
富士山・冬 (2001.11.1~11.15)	AVG	0.007	0.015	0.004	0.006	0.005	0.011	0.5	0.041	0.19
	DMAX	0.019	—	0.011	0.012	0.009	0.018	0.9	0.051	0.28
	MAX	0.060	0.019	0.076	0.081	0.026	0.102	5.3	0.061	1.05
工業地域・冬 (2001.6.11~7.10)	AVG	0.034	—	0.006	0.029	0.030	0.059	—	0.012	0.33
	DMAX	0.064	—	0.011	0.049	0.039	0.079	—	0.021	0.45
	MAX	0.107	—	0.029	0.109	0.064	0.146	—	0.060	3.39
市街地・冬 (2001.6.11~7.10)	AVG	0.018	0.020	0.005	0.021	0.019	0.040	—	0.016	0.23
	DMAX	0.038	—	0.015	0.050	0.023	0.066	—	0.029	0.29
	MAX	0.077	—	0.048	0.124	0.041	0.141	—	0.058	0.71
(参考) 過去の調査 富士山 (AVG)	2000年夏	0.025	0.020	0.005	0.003	0.003	0.007	0.4	0.042	0.23
	1999年夏	0.008	—	0.003	0.003	0.003	0.006	0.3	0.026	0.17

AVG:期間平均値 DMAX:日平均最大値 MAX:時間最大値

3 粒子状物質濃度(単位: $\mu\text{g}/\text{m}^3$)

富士山における平均風速は 2.4m/sで南西の風が卓越していた。また、風速 0.5m/s未満の静穏状態は全観測時間中の 3.6%であった。

2) 冬期調査

東海地方は低気圧と高気圧が交互に通過し天気は周期的に変化した。5~6日にかけては日本海低気圧と寒冷前線の影響で大雨となった³⁾。なお、表2中の分類上ではW1期で大雨が降り、W2期では一時雨が降ったが概ね晴れた。

富士山における平均風速は2.6m/sで南西の風が卓越していた。また、風速0.5m/s未満の静穏状態は全観測時間中の 2.5%であった。

2 大気環境濃度

全調査地点の大気環境測定結果を表3に示す。

大気常時監視測定項目のうち、夏期は全調査地点でOxが環境基準を超過していた。また、市街地の夏の SPM、富士山の冬のOxについては短期的に環境基準を超過していた。

富士山と工業地域の比較においては、Oxを除き全ての項目について富士山の方が清浄であった。一方、富士山と市街地の比較においては、平均的にはOxを除き富士山の方が清浄であるが、表3中太字で示した項目のように短期的に富士山のほうが高濃度に汚染される場合もあった。なお、COについては表3中では比較データが無いが、県内一般大気環境測定局の平成12年度の平均0.4ppm⁴⁾に対し 0.6ppmと明らかに濃度が高い状況にあった。また、表3中に参考に示した過去の測定結果⁵⁾との比較において、窒素酸化物及び一酸化炭素濃度について増加傾向がみられた。

分類	濃度単位: $\mu\text{g}/\text{m}^3$			割合*
	PM2.5 <2.1 μm	PM2.5~10 2.1~11 μm	PM10 total	
MS1	29	3.5	33	0.89
MS2	33	5.2	38	0.86
MS3	36	4.8	41	0.88
富士山(夏)平均	33	4.5	37	0.88
CS2	36	6.4	42	0.85
CS3	50	8.6	59	0.85
市街地(夏)平均	43	7.5	51	0.85
MW1	10	3.0	13	0.77
MW2	19	3.0	22	0.86
富士山(冬)平均	15	3.0	18	0.83
CW1	15	4.5	20	0.77
CW2	25	8.1	33	0.75
市街地(冬)平均	20	6.3	26	0.76

*:PM2.5/PM10

表4 粒子状物質調査結果

表5 元素状炭素粒子調査結果

分類	濃度単位: $\mu\text{gC}/\text{m}^3$				
	EC2.5 <2.0 μm	EC2.5~10 2.1~7.0 μm	EC10 total	割合*2	
HS1	濃度	5.3	3.3	8.7	0.61
	含有率 ¹⁾	18	94	27	
HW2	濃度	1.8	0.47	2.2	0.82
	含有率	9.4	15	9.9	

*1: EC/PM100 (%)

*2: EC2.5/EC10

富士山及び市街地のPM調査結果を表4に示す。表中では実際の定義とは異なるが、便宜上、粒径 2.1 μm 未満の微小粒子をPM2.5、粒径 2.1~11 μm 未満の粗大粒子をPM2.5~10、

これらの合算値をPM10と表記した。富士山と市街地の比較において、PM2.5の平均値は夏期がそれぞれ33, 43で、冬期が15, 20となり全て市街地の濃度が高かった。また、夏期と冬期の比較においては全般的に夏期の方が濃度は高かった。

なお、市街地については米国のPM2.5に関する新基準(年平均値15)を全て上回っていた。また、PM2.5のPM10中に占める割合は全て7割以上であった。

4 元素状炭素粒子濃度(単位: $\mu\text{gC}/\text{m}^3$)

富士山のEC調査結果を表5に示す。表中では便宜上PMと同様な定義でEC2.5等を表記した。ECの季節の違いによる傾向はPM2.5と同様であった。夏期の粗大粒子の濃度が高かったため、EC2.5のEC10中に占める割合は6割程度であった。ECのPM中の含有率は季節及び粒径により異なり、微小粒子中の含有率は夏期及び冬期それぞれ18, 9.4%で、関東浮遊粒子状物質合同調査結果⁶⁾のそれぞれ28(9~64), 25(7~28)%と比較して低い傾向にあった。

考 察

富士山の大气環境は、Ox, PM2.5を除く項目については他地点との比較から清浄地域であると考えられる。しかし、Oxについては、他の測定地点と比較して明らかに濃度が高く、観光客への人体影響のみならず、樹木等の生物圏への悪影響も懸念される。この原因としては、Oxと反応性の高い一酸化窒素等の昼間の濃度が市街地と比較して低いため分解反応が進行せず高濃度に維持されたためと考えられる⁷⁾。高濃度Oxの発生については、成層圏オゾンの降下、都市域からの広域的な移流、窒素酸化物及び炭化水素の光化学反応による二次生成等の複合影響が考えられる⁸⁾が、それぞれの寄与の割合については不明である。

PM2.5に関しては調査手法が異なること、調査が短期間であることから米国基準と単純に比較は行えないが、清浄地域と想定された富士山においても高い濃度レベルが確認された。PMについて特徴的なこととしてPM2.5~10は、季節、地点間の差はほとんどなく $3\sim 9\mu\text{g}/\text{m}^3$ であるのに対し、PM2.5は濃度域が $10\sim 50\mu\text{g}/\text{m}^3$ と大きいことである。PM2.5は全体に対する相対割合も高いため、PMの濃度状況はPM2.5が支配的であることがわかった。

次に調査地の大气環境の特徴として、NO, NOx, CO, NMHCのように、一時的ではあるが市街地よりも明らかに汚染された状態が観測されることが挙げられる。特にCOについては最大値で5.5ppmという自動車排ガス測定局に近い濃度状況になることがあった。これらは自動車排ガス中に多く含まれる物質であること、工場等たる固定発生源が周囲に存在しないことから、図1中に示した道路及び調査地である公園内の駐車場に往来する自動車に由来するものと想定される。特にCOについては大規模固定発生源が存在しなければ汚染由来

は自動車に限定できる。

そこで自動車による汚染実態を確認するため、COの

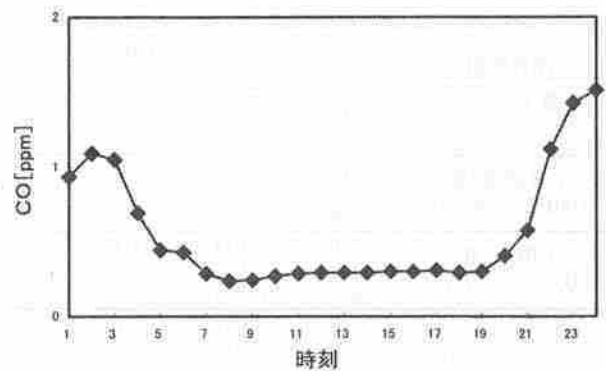


図2 時刻別平均濃度(2001年夏期・CO)

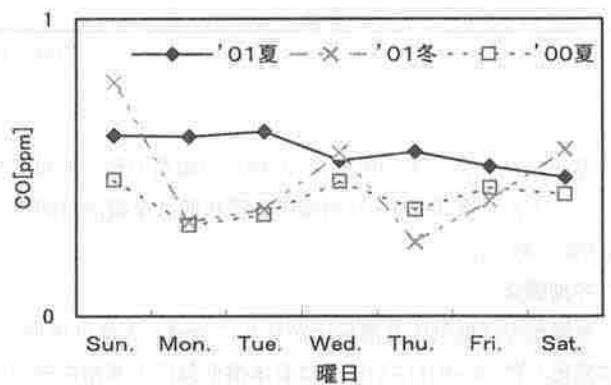


図3 曜日別平均濃度(CO)

時刻別平均濃度(日変動)及び曜日別平均濃度(週変動)をそれぞれ図2, 図3に示した。一般的な都市大気において、日変動は朝方及び夕方極大ピークがみられる二山形で⁸⁾、週変動は休日に極小ピークを示すことが知られている⁹⁾。しかし、調査地の日変動は夜半に極大ピークを示す一山型で、平均濃度差が最大で1.3ppmと明らかに都市大気状況と異なり、夜半に自動車の往来が集中していることが推定される。また、週変動においても都市大気状況と異なり、2000年夏期及び2001年冬期では休日に極大ピークがみられ、自動車の往来が休日に多いことがわかる。なお、2001年夏期においてはその傾向が不明瞭であるが、他の時期と比較して濃度レベルが高いことから曜日に関わらず自動車の往来が多く、これが平均値を増加させた原因であると考えられる。なお、これらの傾向はNOについても同様に確認された。

次に、ディーゼル排ガスの指標物質といわれている¹⁰⁾ ECについて注目すると、微小粒子中の含有率が都市域の平均と比較して低いことから、ディーゼル車の影響は都市域ほど多

くないことが推定される。しかし、COの濃度状況等から多数の自動車の影響が示唆されることから、調査地においてはガソリン車の往來が大気環境に特異的に影響を与えている可能性が高いと考えられる。

まとめ

富士山山麓において大気環境測定車等により総合的に大気環境を調査したことにより以下のことがわかった。

- 1) 富士山水ヶ塚公園における大気環境は、県内の代表的な市街地との比較では汚染されていないが、オキシダント、PM_{2.5}等、環境基準を上回る項目もみられ、必ずしも清浄地域とはいえない状況であった。また、これらの移流及び二次生成が想定される大気汚染物質の濃度は、冬期より夏期が顕著に高かった。
- 2) PM_{2.5}～10は、季節、地点間の差はほとんどないのに対し、PM_{2.5}は季節、地点間の違いにより濃度変動が大きく、全体に対する相対割合も高いため、PMの濃度状況はPM_{2.5}が支配的であることがわかった。
- 3) 移動発生源起源と考えられるNO_x及びCO濃度が年々顕著に増加しており、局地的な大気汚染の進行が把握された。これらの汚染状況は主に夜間の顕著な濃度上昇によるもので、主にガソリン車の影響と考えられた。

以上のことから調査地においては、ガソリン車等の影響により局所的に大気が汚染されており、いわゆる観光公害が懸念される。そのため当該地点においては、今回の調査の主たる目的である富士山全体の総合的な大気環境の把握は困難であるが、観光公害の把握の目的としては重要である。今回の調査で当該地点が観光公害の影響を受けていることが懸念されたことから今後は定期的に大気環境の状況を把握していく必要があると考えられる。

文献

- 1) 静岡地方気象台：静岡県の気象概況 2001年6月，3，静岡(2001)
- 2) 静岡地方気象台：静岡県の気象概況 2001年7月，3，静岡(2001)
- 3) 静岡地方気象台：静岡県の気象概況 2001年11月，3，静岡(2001)
- 4) 静岡県環境部大気環境室他：大気汚染及び水質汚濁等の状況物質調査 平成12年度，9，静岡(2001)
- 5) 太田良和弘他：大気測定車による大気環境測定結果について（裾野市須山水ヶ塚公園），8，静岡(2001)
- 6) 関東地方環境対策推進本部大気環境部会：平成11年度関東浮遊粒子状物質合同調査報告書，18-21，東京(2001)
- 7) 篠原英二郎他：富士山水ヶ塚公園（二合目）における大気環境調査について，第25回環境保全・公害防止研究発表会講演要旨集，79(1999)
- 8) 北川徹三：光化学スモッグの新解析，49-97，安全工学協会，神奈川(1982)
- 9) 河村武：都市の大気環境，45-60，東京大学出版会，東京(1979)
- 10) 飯豊修司：各種発生源中の炭素成分，環境技術，15，9，16-37，東京(1986)

Faint, illegible text on the left side of the page, possibly bleed-through from the reverse side.

Faint, illegible text at the top right of the page.

Second block of faint, illegible text in the middle right section.

Third block of faint, illegible text at the bottom right of the page.

排水の臭気指数と水質について

大気・水質部 大気騒音環境スタッフ 永田嘉七, 鈴木光彰, 太田良和弘
篠原英二郎, 池谷静雄, 前嶋孝明

Study on Odor Index and Water Quality in Waste Water

Kashichi NAGATA, Mitsuaki SUZUKI, Kazuhiro OHTARA,
Eijiro SHINOHARA, Shizuo IKETANI and Takaaki MAEJIMA

静岡県は、3町に悪臭防止法に基づく臭気指数規制を導入し、2001年4月より施行した。それに伴い3町内の事業場の排水には臭気指数基準が設定され、1年後から規制されることとなっている。そこでこれら地域等に立地している事業場の排水の悪臭状況や水質の性状を調査することにより、排水の臭気指数基準値に対する問題の把握および臭気指標が水処理管理に利用できないか等調査した。

Key words : 臭気指数, 排水の臭気指数規制

Odor Index, Regulation of Odor Index of Waste Water

はじめに

静岡県は、悪臭苦情の問題等の解決のために、2000年9月、悪臭防止法に基づく臭気指数規制を3町（御前崎町、金谷町、菊川町）に導入し、2001年4月に施行した。そこで、それらの町長はその1年後から事業場を規制することとなった。臭気指数規制は、敷地境界（空気）、気体排出口（ガス）及び排水口（排水）の3方式で構成されており、排水の規制を本県が全国ではじめて実施した。

そこで、これら地域を主に県内に立地する排水臭気に関係する事業場の臭気状況を調査し、規制基準値との比較検討を行い、排水臭気の問題点の把握を行った。

また、同時に排水の水質等を調査し、排水の臭気指標と排水の水質との関係を検討し、臭気指標が水処理管理項目として利用できないか検討した。

調査方法

1 調査期間

2001年4月～10月

2 調査対象事業場

調査の対象事業場は、過去の悪臭苦情調査等をベースに、臭気指数規制導入の3町をはじめ県内の事業場で排水臭気が強そうな事業場をあらかじめピックアップし、事前調査を実施した後、その中から表1に示すとおり13事業場を調査対象として選定した。

3 試料の採取方法等

1) 試料の採取方法

試料の採取方法は、嗅覚測定法マニュアル（排水水試料編）¹⁾に基づき、事業場の排水口で試料採取を行い、密封後クーラーボックスに保管し、出来るだけ早く測定した。

2) 測定項目

①臭気指数：嗅覚測定法マニュアル（排水水試料編）

②水質

pH：JISK0102 12に定める方法

BOD：JISK0102 21に定める方法

COD：JISK0102 17に定める方法

TOC：JISK0102 22に定める方法

島津製作所製 TOC計(TOC-5000A)

硫化物イオン：JISK0102 39に定める方法

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka, 420-8637, Japan)

調査結果及び考察

1 実態調査結果

1) 各事業場排水の臭気指数及び水質を表1に示す。

表1 調査結果表

業種	排水の種類	PH	臭気強度	臭気指数	BOD (mg/l)	COD (mg/l)	TOC (mg/l)	硫化物イオン
堆肥製造工場1	総合排水*	7.3	3.5	16	55.2	48.4	62.3	0.099
養豚場1	総合排水*	8.1	4.5	34	524	755	952	0.286
鯉節製造工場1	処理途中水	8.1	4.5	36	1260	380	966	1.04
養豚場2	総合排水*	7.4	2.5	19	36.8	76	54	0.11
堆肥製造工場2	総合排水*	7.1	3	14	55.2	25.1	41.6	0.081
醤油製造業	総合排水*	7.1	2	11	7.2	157	144	0.161
	原水	3.9	4.5	35	1750	1540	1670	0.845
下水処理場	原水	6.9	3.5	39	91.2	56.6	80.3	0.141
魚腸骨処理場1	総合排水*	6.3	3.5	28	314	284	311	0
水産食料品製造業	総合排水*	6.4	1.5	24	16.3	25.2	20.9	0.011
鯉節製造工場2	原水	6.4	4.5	29	2600	1570	2160	0.558
魚腸骨処理場2	処理水*	7.9	2.5	13	1.11	3.77	5	0
畜産食料品製造工場	総合排水*	5.2	3.5	29	667	329	351	0
クラフトパルプ製造工場	原水	7.1	3.5	35	40.2	173	107	0.238
	処理水	7.2	3	33	170	301	192	0.413
	原水	9.1	4.5	65	998	1140	633	3.29
	原水	6.9	3	35	258	315	196	0.152
	処理水	7.1	2.5	29	4.9	22	14.7	0

注) 排水の種類で*を付したものは、排出水である。

表2 臭気指数度数分布

臭気指数範囲	度数
10 ~ 20	5
20 ~ 30	5
30 ~ 40	7
40 ~ 50	0
50 ~ 60	0
60 ~ 70	1

表3 業種別調査結果

業種分類	平均	最大値	最小値
畜産農業 養豚場	27	34	19
畜産食料品製造業 肉製品製造業1)	29		
水産食料品製造業 鯉節製造業3)	33	36	29
	水産缶詰製造業1)	24	
調味料製造業 醤油製造業	23	35	11
試料・肥料製造業 魚腸骨処理場	21	28	13
	堆肥製造業	15	16
パルプ製造業 クラフトパルプ製造業2	31	33	29
下水道業 下水処理場1) 2)	39		

注 1) 1個のデータである。

2) この排水は処理を行っていない原水である。

3) この最大値の臭気指数は排水処理途中の排水である。

表4 主要業種別排出水の臭気指数

業 種 分 類		平均	最大値	最小値
1	畜産農業 養豚場	18	31	5
2	飼料・肥料製造工場 魚腸骨処理場	30	46	18
	獣骨処理場	26	41	15
	その他の飼・肥料製造工場	26	55	3
3	食料品製造工場 畜産食料品製造工場	30	49	7
	その他の食料品製造工場	21	35	13
	水産食料品製造工場	34	49	6
	農産食料品製造工場	29	50	5
4	化学工場 クラフトパルプ製造工場	26	43	14
	その他の化学工場	26	46	10
5	その他の製造工場 繊維工場	19	29	9
6	サービス業・その他 下水処理場	15	23	6
	その他のサービス業	19	33	9
	し尿処理場	7	16	3

今回の調査結果から、現行の排水臭気指数規制値 34 を上回った事業場はなかった。

また全サンプルの平均値は 29、最大値は 65、最小値は 11 であり、排水の臭気指数度数分布は表 2 に示すとおりで、30～40 の度数が最多であった。

2) 今回の調査結果を業種別に示すと表 3 のとおりである。この中では食料品製造業の醃製工場や養豚場の排水の臭気指数が高かったが、悪臭苦情が多い堆肥製造業や魚腸骨処理場の排水の臭気指数は高くなかった。

環境省が、排水の臭気指数規制を設定する際に実施した業種別調査結果³⁾を表 4 に示した。

これによると排水の臭気指数が高い業種は、水産食料品や畜産食料品などの食料品製造業であり、今回の調査結果とほぼ一致していた。

2 排水の臭気指数と水質及び排水処理等に関して

排水の臭気指数の測定方法等の報告^{3) 4) 5) 6) 7)}はあるが、排水の臭気指数と水質及び排水処理等に関する研究は少ない。そこで表 1 のデータを用いて、排水の臭気指数と水質及び排水処理について検討を行った。

1) 排水の臭気指数と水質

排水の臭気指数と水質の相関関係を下に示す。

	BOD	COD	TOC	硫化物イオン	臭気強度
臭気指数	0.371	0.509	0.316	0.783	0.606

注) 数字は相関係数

排水の臭気は、におい物質が水中に溶存できず空气中に揮散し、においが生ずるものと考えられる。

この臭気の発生原因として、排水にもともと溶存している臭気物質が揮散するケースと、排水が排水処理工程で腐敗を起こして臭気を生成・揮散するケースなどが考えられる。

今回の調査では、パルプ製造工場は前者であると考えられるが、その他の水産食料品製造工場などは後者であると考えられる。一般的な排水の有機汚濁指標である BOD、COD、TOC は臭気指数と相関係数が低く、排水のにおいの強さを良好に推定することが難しいと思われる。

しかし、排水中の硫化物イオンは、排水の臭気指数と 0.8 程度の相関を示し、有機汚濁性排水においては排水のにおいに関する有用な項目のひとつと考えられる。

2) 排水処理による臭気指数等の変化

排水処理による臭気指数等の変化の調査結果を表 5 に示す。今回調査した排水処理方法は、生物処理の活性汚泥法及び接触酸化法であった。活性汚泥法は TOC で 90%以上、硫化物イオンで 80%以上の削減率を示したが、臭気指数では削減率の高いものとそうでないものに分かれた。

表5 臭気指数の排水処理による削減率

排水処理	処理による削減率 (%)			業種
	臭気指数	TOC	硫化物イオン	
活性汚泥法	69	91.4	81.9	醤油製造工場
	17	92.6	100	パルプ製造工場
接触酸化法	6	0以下	0以下	パルプ製造工場

臭気指数による削減率の差異は、事業場の排水に含まれるにおい物質の違いと思われる。パルプ工場の主なにおい物質は、硫黄系物質である硫化メチルであり、逆に醤油製造工場には硫化メチルが含まれていないと推定される。

なお、当該パルプ工場の接触酸化排水処理施設は、運転開始後あまり経過しておらず、十分性能が発揮できなかったと思われる。

まとめ

- 1 今回調査した事業場の排水臭気指数は、すべて現行の排水臭気指数規制値（3号規制値）34以下であった。
- 2 今回の調査結果から臭気指数の高かった業種は、水産食料品製造業や畜産農業などであった。
- 3 排水の臭気指数と硫化物イオンは今回の試験項目の中では良い相関を示した。
- 4 排水の臭気指数は活性汚泥法などの生物処理で低下させることができるが、有機汚濁指標と比べると削減率は低かった。

文献

- 1) 環境庁大気保全局大気生活環境室編：嗅覚測定法マニュアル（排水試料編）（2000）
- 2) 重岡久美子：排水における臭気指数の実態調査結果 - 苦情発生事業場の特徴と臭気発生要因を中心として - 臭気の研究 153, 16-20 (2000)
- 3) 大迫政彦：排水の臭気指数に係る規制基準設定の考え方, 臭気の研究 153, 3-11 (2000)
- 4) 高橋一彰：排水に係る悪臭苦情の実態調査結果, 臭気の研究 153, 12-15 (2000)
- 5) 高橋道正他：排水臭気指数測定方法, 臭気の研究 153, 21-24 (2000)
- 6) 辰市祐久他：排水からの臭気測定の検討, 東京都環境科学研究所報告 1999, 171-176

西駿河湾海域における植物プランクトンの変動機構に関する基礎的研究Ⅱ -瀬戸川からの栄養塩の流出負荷に関する研究-

大気・水質部 水質環境スタッフ 平井一行

Fundamental Studies on the Changing Mechanism of Phytoplankton
 In Western Coastal Region of Suruga Bay II
 -Studies on the Loads of Nutritive salts running from Seto River-

Kazuyuki HIRAI

COD は植物プランクトンの現存量に影響されると考えられている。植物プランクトンの増殖には N, P, Si などの栄養塩が必要とされ、これらの一部は河川から供給されると考えられている。瀬戸川からの年間の栄養塩の流出量は期間推定法および LQ 推定法によると、それぞれ DIN が 449 トンと 433 トン、 $PO_4\text{-P}$ が 6.6 トンと 9.8 トン、 $SiO_2\text{-Si}$ が 657 トンと 610 トンと推定され、その量は月ごとに大きく変動した。その結果、夏季においては河川からの供給量が沿岸海域の栄養塩濃度を左右し、植物プランクトンの増殖に影響を与えている可能性が示唆された。さらに、平成 13 年 7~8 月にかけての N/P は 1~7 で、栄養塩のうち N が植物プランクトンの増殖の制限因子であった可能性が高いと考えられた。また、冬季における河川からの栄養塩の供給は植物プランクトンの増殖にはほとんど影響を及ぼし得ないものと推察された。

Key words: 西駿河湾海域, 植物プランクトン, 栄養塩, 負荷, 瀬戸川

Western Coastal Region of Suruga Bay, Phytoplankton, Nutritive Salts, Load, Seto River

はじめに

静岡県の海域では水質汚濁の指標とされる COD については、90%の環境基準点で基準値を達成している¹⁾。

しかし、近年では西駿河湾海域で COD の基準超過がみられる傾向があり^{2) 3) 4)}、その原因の究明と汚濁防止の対策を講ずる必要が生じている。COD は植物プランクトンの現存量に影響を受けることが多いと考えられ⁵⁾、これまでの研究から植物プランクトンの増殖には西駿河湾海域では水温下降期において、N, P, Si などの栄養塩が影響を及ぼしていることが推定されている⁶⁾。これらの栄養塩は河川からの流出、海域においては湧昇流や秋季では温度躍層崩壊に伴う上下循環による底層からの供給が考えられている⁷⁾。

本研究では河川からの栄養塩の流出量について推定し、それらが沿岸海域の栄養塩濃度及び植物プランクトンの増殖に与える影響について考察することとした。

材料及び方法

1 採水および分析方法

平成 13 年 1 月から 12 月にかけて概ね旬ごとに瀬戸川河口域および焼津沖の海域(図 1)で、それぞれ表層と 5 m 深で採水した。採水直後に水温を測定し、表 1 の方法によって各栄養塩の濃度を求めた ($NH_4\text{-N}+NO_3\text{-N}+NO_2\text{-N}$ を DIN とした)。

なお、焼津沖の 5 m 深で採取した海水 200 ml については GF/B フィルター (Whatman 社) でろ過し、DMF により抽出した後に蛍光光度計により測定し、植物プランクトンの現存量の指標であるクロロフィル a (Chl-a) を求めた。

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-Andō, Shizuoka, 420-8637, Japan)



図1 調査点図 (○は流量, ◎は栄養塩を調査)

表1 水質項目と分析方法

水質項目	分析方法
NH ₄ -N	JIS K0102 42.2 インドフェノール青吸光光度法
NO ₂ -N	JIS K0102 43.1.1 ナフチルエチレンジアミン吸光光度法
NO ₃ -N	JIS K0102 43.2.3 銅・カドミウムカラム還元 -ナフチルエチレンジアミン吸光光度法
PO ₄ -P	JIS K0102 46.1.1 モリブデン青吸光光度法
SiO ₂ -Si	JIS K0101 44.1.1 モリブデン黄吸光光度法

2 瀬戸川の流量の推定

平成9年1月から平成13年12月にかけて月1回、本研究所が新横内橋と勝草橋で行った流量調査結果と同時期に新横内橋で静岡県島田土木事務所が行った水位の調査結果から新横内橋での水位と新横内橋と勝草橋での合計流量との関係を求めた。

3 瀬戸川からの負荷量の推定

1) 期間推定法による負荷量

平成13年1月から12月に旬ごとの調査日における新横内橋での水位から推定した新横内橋と勝草橋での瞬間合計流量に、その調査日の瀬戸川河口域での栄養塩の濃度を乗じ、旬ごとの負荷量を求め、月ごとに集計した。

2) LQ推定法による負荷量

平成13年1月から12月の調査日ごとの新横内橋での水位から求めた瞬間流量 (Q: トン/秒) と各栄養塩の瞬間負荷量 (L: g/秒) との関係を求め、同期間の毎日の新横内橋での平均水位から求めた日平均流量から、日負荷量を求め、月別に積算した。

結 果

平成9年1月から平成13年12月にかけて行った新横内橋での水位および新横内橋と勝草橋での流量の調査から新横内橋と勝草橋での合計流量 (Y: トン/秒) と新横

内橋の水位 (X: cm) との関係は

$$Y = 0.30X - 1.62 \quad r^2 = 0.75$$

が得られた。

また、新横内橋での水位から求めた瞬間流量 (Q: トン/秒) と各栄養塩の瞬間負荷量 (L: g/秒) には表2の関係式が得られ、LQ推定法および期間推定法で求めた瀬戸川からの栄養塩の流出負荷量を図2~4に示した。

表2 栄養塩ごとの瞬間流量 (Q) と瞬間負荷量 (L) との関係

栄養塩	関係式	r ²
DIN	$L = 2.27Q^{1.16}$	0.81
PO ₄ -P	$L = 0.12Q^{0.74}$	0.64
SiO ₂ -Si	$L = 2.99Q^{1.19}$	0.93

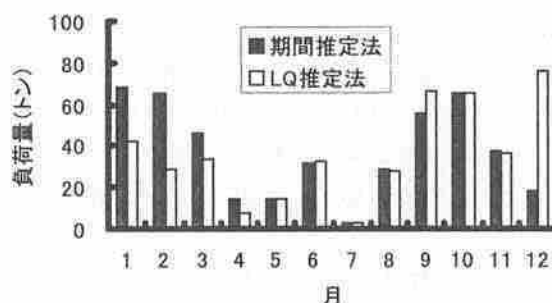


図2 DINの月別負荷量の推移

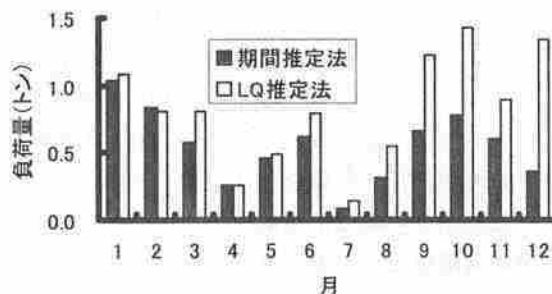


図3 PO4-Pの月別負荷量の推移

DIN, PO₄-P, SiO₂-Si は瀬戸川から1~3月にかけてはそれぞれ月30トン、1トン、50トンほどの流出負荷量があることが期間推定法およびLQ推定法によって推定された。1~3月に比べると4~8月はそれぞれ減少し、9~12月は増加する傾向がみられた。いずれの栄養塩も7月にはほとんど流出していなかった。年間の流出負荷量は期間推定法およびLQ推定法によるとそれぞれDIN

が 449 トンと 433 トン, $PO_4\text{-P}$ が 6.6 トンと 9.8 トン, $SiO_2\text{-Si}$ が 657 トンと 610 トンと推定された。

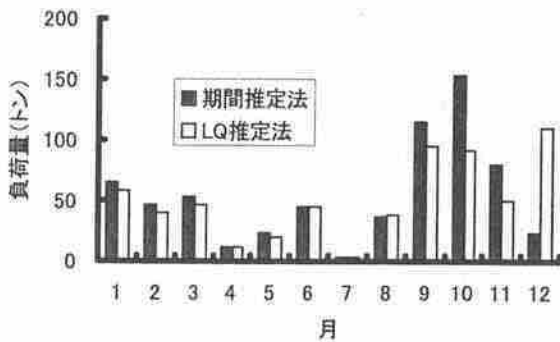


図4 $SiO_2\text{-Si}$ の月別負荷量の推移

焼津沖の 5m 深における水温, Chl-a, DIN, $PO_4\text{-P}$, $SiO_2\text{-Si}$ の平均の月別推移を図 5 ~ 9 に示した。

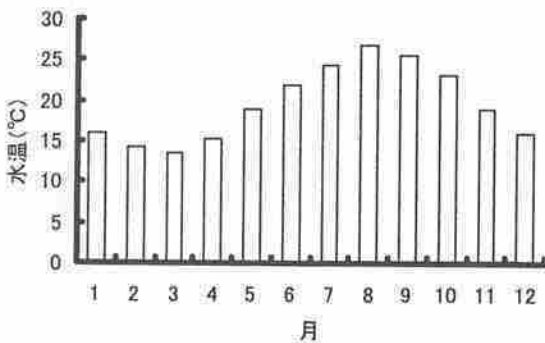


図5 焼津沖の水温の月別推移

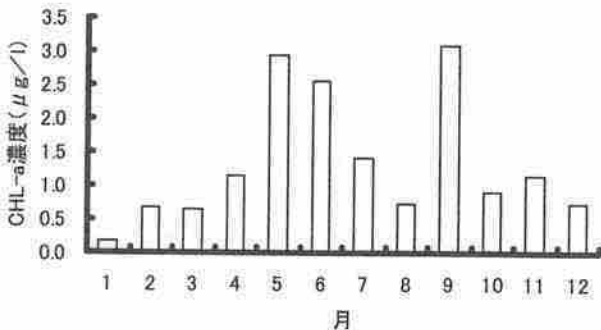


図6 焼津沖5m深のChl-a濃度の月別平均

水温は月平均 13.6°C の 3 月から 26.7°C の 8 月にかけて 2.5°C/月の割合で上昇し、それ以降は 2°C/月の割合で緩やかに下降する変動を示した (図 5)。Chl-a 濃度は 5, 6 月および 9 月に平均 3 µg/l 以上となったが、その他の月は概ね 2 µg/l 以下であった (図 6)。DIN は

0.2mg/l 以下で推移したが 7 月が概ね 0.01mg/l 以下と特に低かった (図 7)。 $PO_4\text{-P}$ では 5 ~ 7 月および 9 月が 0.01mg/l 以下と水温が高い時期に濃度が低かった (図 8)。それとは反対に $SiO_2\text{-Si}$ では 1 水温が下がる 11 ~ 3 月にやや濃度が低い傾向がみられた (図 9)。

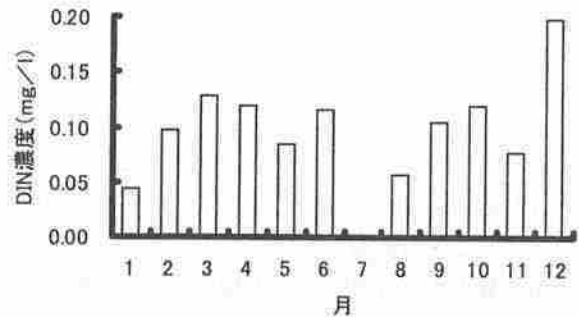


図7 海域における5m深のDIN濃度の月別平均

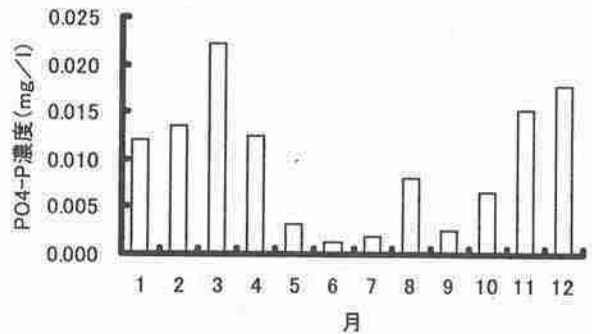


図8 焼津沖5m深の $PO_4\text{-P}$ 濃度の月別平均

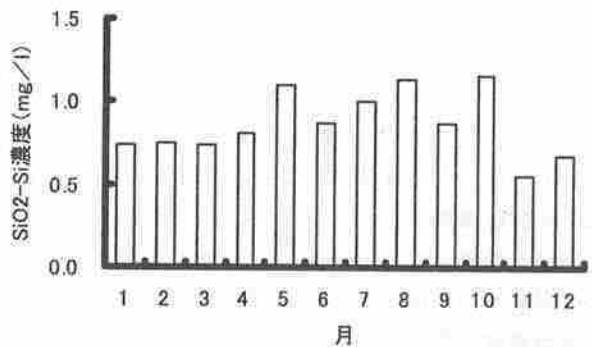


図9 焼津沖5m深の $SiO_2\text{-Si}$ 濃度の月別平均

考 察

水温は 3 ~ 8 月にかけて上昇し (図 5)、7, 8 月には水温躍層が形成され、上下の混合はみられにくくなる⁷⁾ 8)。特に 7, 8 月は水温は高く、植物プランクトンの増殖には好適な条件である。しかし、水温躍層形成のために増殖に必要な N, P が下層から供給されず、また、河川からの供給も少ないために (図 2, 3)、海域での 5 m 深の N, P の濃度は低いものと考えられる (図 7, 8)。その結果、

植物プランクトンの増殖が制限され、Chl-a 濃度が比較的低い結果となったものと考えられる。この期間の $\text{SiO}_2\text{-Si}$ は河川からの供給は少ないものの (図4), 海域には 0.8mg/l 以上あり (図9), $\text{SiO}_2\text{-Si}$ が植物プランクトンの増殖の制限因子とはなり得ないものと考えられる。

好適な光, 水温, 塩分条件下では N-P 比⁹⁾, N-P-Si 比¹⁰⁾ など N, P, Si の相対的割合と絶対量で制限され, 植物プランクトンの種類により異なるが, 概ね N/P が 16 の割合が増殖に適しているもの⁹⁾ と考えられている。

月ごとの海域での N/P を算出すると平成 13 年 7~8 月の N/P は 1~7 と 16 以下で, N が制限因子であった可能性が高い。この時期には河川からの N の供給が特に少なかったことも影響しているものと考えられる。

水温が低下する 9 月には水温躍層も徐々に崩壊し^{7) 8)}, また, 河川からの N, P 供給も多くなり (図2, 3), その結果, 植物プランクトンの増殖が可能となり, Chl-a 濃度が高くなったものと考えられる (図6)。しかし, 翌月の 10 月も同様の栄養環境であったにもかかわらず, Chl-a 濃度が 9 月と比べて低く, このことは捕食の影響など栄養環境以外の要因にあるものとも考えられる。

水温が低下する 11~3 月には河川からの栄養塩の供給も増加し (図2, 3), 水温躍層も崩壊し上下混合が盛んになる^{7) 8)} が, 水温の低下によって植物プランクトンの増殖が減少するものと考えられる (図6)。その結果, 栄養塩が消費されず, 海域では栄養塩濃度の高い状態が保持される。この中で, 11~12 月は $\text{SiO}_2\text{-Si}$ の濃度がやや減少する傾向があり, この水温下降期に増殖する植物プランクトンの $\text{SiO}_2\text{-Si}$ に対する高い要求度が認められた結果⁶⁾ と良く符合する。

平成 13 年における瀬戸川からの栄養塩の供給量は月ごとに大きく変動し, 7 月には極めて少なかったことが特徴的であった。夏季では, 特に河川からの供給量が海域の栄養塩濃度を左右し, その結果, 植物プランクトンの増殖を制限している可能性が示唆された。一方, 冬季には河川からの流出および上下混合による供給が海域の栄養塩濃度を高めている。しかし, 水温の低下が植物プランクトンの増殖を抑制しているため, 冬季の河川からの栄養塩の供給は植物プランクトンの増殖にはほとんど影響を及ぼし得ないと推察される。さらに, 植物プランクトンに消費されずに蓄積された栄養塩は水温が上昇する 5, 6 月の増殖に大きく影響するものとも考えられた。

まとめ

1) 新横内橋と勝草橋での合計流量 (Y : トン/秒) と新横内橋の水位 (X : cm) との関係は $Y=0.30X-1.62$ $r^2=0.75$ が得られた。

2) 年間の瀬戸川からの流出負荷量は期間推定法および LQ 推定法によるとそれぞれ DIN が 449 トンと 433 トン, $\text{PO}_4\text{-P}$ が 6.6 トンと 9.8 トン, $\text{SiO}_2\text{-Si}$ が 657 トンと 610 トンと推定された。

3) 西駿河湾海域の中央海域に流出する瀬戸川からの栄養塩の供給量は月ごとに大きく変動し, 平成 13 年 7 月は極めて少なかった。

4) 夏季では, 水温躍層が発達することために河川からの供給が海域の栄養塩濃度を左右し, 植物プランクトンの増殖を制限している可能性が示唆された。

5) 平成 13 年 7~8 月にかけての N/P は 1~7 と 16 以下で栄養塩のうち, N が制限因子であった可能性が高いと考えられた。

6) 冬季の河川からの栄養塩の流出は植物プランクトンの増殖にはほとんど影響を及ぼし得ないと推察された。

謝 辞

この研究は駿河湾深層水プロジェクト研究の一部として行い, 採水などに御協力いただいた長谷川漁業実践団各位および新横内橋での水位のデータを提供くださった静岡県土木事務所各位に深謝の意を表します。

文 献

- 1) 静岡県環境部環境政策室: 平成 11 年度版環境白書, 1-347 (1999)
- 2) 静岡県環境衛生科学研究所: 平成 9 年度静岡県公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1-375 (1998)
- 3) 静岡県環境衛生科学研究所: 平成 10 年度静岡県公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1-369 (1999)
- 4) 静岡県環境衛生科学研究所: 平成 12 年度静岡県公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1-383 (2001)
- 5) 日本水環境学会: 日本の水環境行政, ぎょうせい, 1-51 (1999)
- 6) 平井一行: 西駿河湾海域における植物プランクトンの変動機構に関する基礎的研究 I, 静岡県環境衛生科学研究所報告 (43), 55-59, (2000)
- 7) 東海大学海洋学部編: 新版・駿河湾の自然, 1-343, 静岡新聞社, 静岡 (1996)
- 8) 中村保昭: 水産海洋学的見地からみた駿河湾の海洋構造について, 静岡県水産試験場研究報告 (17), 1-153 (1982)
- 9) A. C. Redfield, B. H. Ketchum and F. A. Richard: The influence of organisms on the composition of sea-water, Wiley Interscience, 2, 26-77 (1963)
- 10) 渡辺正孝: 沿岸域における赤潮の発生機構, 用水と排水, 28, 45-53 (1986)

河川における栄養塩類の流出特性に関する研究

大気・水質部 水質環境スタッフ 渡辺 稔, 前嶋 孝明

Study on Runoff Characteristics of Nutrients in Rivers

Minoru WATANABE and Takaaki MAEJIMA

静岡県の中部地方を流れる朝比奈川水系において、降雨時における富栄養化の原因物質である栄養塩類（窒素、リンおよびケイ素）の流出調査を行った。降雨時には窒素、リンおよびケイ素に関して降雨による流域の面源からの流出が認められた。また、農地（茶畑、果樹園等）を流域に有する支川からの栄養塩類の流出特性を把握するため、流出負荷量と降雨の関係について解析を行い、河川における栄養塩類の流出特性に関する知見が得られた。

Key words : 水環境, 面源, 栄養塩類, 流出特性

Water Environment, Nonpoint Source, Nutritive salts, Runoff Characteristics

はじめに

従来、海域、湖沼等の水環境の富栄養化防止のために事業場等の特定汚染源から排出される窒素、リン等の栄養塩類の削減が望まれているが、これらの負荷の削減対策に加えて、市街地、農地、山林等の非特定汚染源いわゆる面源から流出する栄養塩の削減も望まれている。近年、“面源から水環境への栄養塩類の流出に関する研究”は全国的に行われており^{1~16)}、静岡県においても朝比奈川水系における栄養塩類の流出に関する調査を行ったのでその結果について報告する。

方法

1 調査期日

2001年7月から10月にかけて行った。

2 調査水系と調査地点

朝比奈川は、駿河湾に流入する瀬戸川の支流で本川の調査地点として横内橋、羽佐間橋、榎橋、玉取橋の4点と林地を流域に有する青羽根川、沢Aの調査地点を図1に示す。



図1 朝比奈川水系調査地点 (○)

3 調査方法

1) 栄養塩類の流出に関する調査

青羽根川と沢Aについては、無降雨時と降雨時に窒素、リンおよびケイ素の流出負荷量 (g/S) の調査を行った。また朝比奈川本川における状況を明らかにする

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-Ando, Shizuoka, 420-8637, Japan)

表1 調査項目および試験方法

調査項目	略号	試験方法
気温		ガラス製棒状温度計
水温		水温計
透視度		透視度計
流量		流速は電気流速計、水深はポールによる計測
浮遊物質	SS	環境庁告示第59号付表9
全窒素	T-N	JISK0102 45.2 紫外線吸光光度法
溶存態窒素	DT-N	ガラス繊維ろ紙(GA100 アドバンテック)によるろ過水:JISK0102 45.2 紫外線吸光光度法
亜硝酸態窒素	NO ₂ -N	JISK0102 43.1.1 ナフチルエチレンジアミン吸光光度法
硝酸態窒素	NO ₃ -N	ISK0102 43.2.3 銅・カドミウムカラム還元-ナフチルエチレンジアミン吸光光度法
懸濁態窒素	P-N	(T-N)から(DT-N)を差し引いた値
全リン	T-P	JISK0102 46.3.1 ペルオキシ二硫酸カリウム分解法
溶存態リン	DT-P	ガラス繊維ろ紙(GA100 アドバンテック)によるろ水:JISK0102 46.3.1 ペルオキシ二硫酸カリウム分解法
リン酸態リン	PO ₄ -P	JISK0102 46.1.1 モリブデン青(アスコルビン酸還元)吸光光度法
懸濁態リン	P-P	(T-P)から(DT-P)を差し引いた値
ケイ酸態ケイ素	SiO ₂ -Si	JISK0101 44.1.1 モリブデン黄吸光光度法

ために同河川の4地点において調査を行った。調査項目および試験方法を表1に示す。

2) 栄養塩類の流出に関する解析方法

無降雨時と降雨時における河川水中の窒素およびリンの形態別割合(%)について、それぞれの特性を明らかにした。

また無降雨日が10日間続いた7月10日(晴天時)の流出負荷量(g/s)を晴天時流出負荷量とし、降雨時における流出負荷量(g/s)から晴天時流出負荷量を差し引いて得られた負荷量を降雨による流出負荷量(g/s)とした。このようにして求めた採水時刻における流出負荷量と降雨量を用いて検討を行った。

結果および考察

朝比奈川水系における調査結果を表2-1から表2-4に示した。また、支川である青羽根川の末端における窒素とリンの形態別割合(%)を表3に示した。

1 無降雨時における流出特性(濃度による解析)

1) 窒素

無降雨時は朝比奈川の玉取橋と榎橋、支川の青羽根川末端の河川水中にはSSはほとんどゼロなので、SSに関わる窒素の濃度P-Nは、沢Aにおいても7月10日は同様に極めて低かった。このように無降雨時は本川、支川および沢AではT-Nの100%もしくは100%近くは溶存態窒素であり、その形態は、ほとんどがNO₃-Nであった。

2) リン

無降雨時は朝比奈川の玉取橋と榎橋、支川の青羽根

川末端では窒素と同様に、SSに関わる懸濁態リンの濃度はゼロであり、全リン(T-P)の100%が溶存態リンであった。リンの形態別には、PO₄-Pは玉取橋で100%、榎橋では71.4~88.9%、青羽根川末端では87.9~100%であった。

表2-2に沢A末端における水質等調査結果を示した。8月16日の調査結果では、PO₄-Pは全リンの78.6%、PO₄-P以外の溶存態リンが7.1%含まれ、SSに関わる懸濁態リンがT-Pの14.3%を占めていた。これは沢A末端における採水時の状況から沢の河床からの沈殿物の巻き上がりに原因すると考えられた。

すなわち、懸濁態リンの一部は河床に沈殿、巻き上がりにより再流出していると考えられる。

2 降雨時における流出特性(濃度による解析)

1) 窒素

小雨時(日雨量:4mm)は無降雨時におけると同じように朝比奈川の本川の玉取橋と榎橋、支川の青羽根川末端では、P-Nはゼロであり、河川水の全窒素量の100%が溶存態窒素であり、その形態についてみると100%がNO₃-Nであって、無降雨時と同様であった。

9月11日(日雨量が39mm)の結果は、表2-3および表2-4に示したように本川では、SSが140mg/l(玉取橋)、192mg/l(榎橋)と高く、SSに関わる窒素は0.17mg/l(玉取橋)、0.08mg/l(榎橋)であり、無降雨時と小雨時がゼロであったのに対して少量ではあるが測定された。玉取橋と榎橋において、DT

表2-1 水質等調査結果 (青羽根川末端)

2001年月日	無降雨時		降雨時		
	7月10日	8月16日	9月3日	9月11日	10月1日
採水時刻	10:12	14:00	10:10	14:05	14:15
天候	快晴	曇	小雨		大雨
気温(°C)	29	30.2	21.5		22.2
水温(°C)	23.3	26.5	20.8		19.4
透視度(cm)	>30	>30	>30		14
流量(m ³ /S)	0.021	0.012	0.048	1.733	6.710
SS(mg/l)	<1	1	<1	11	46
T-N(mg/l)	2.65	2.00	2.80	4.02	1.48
DT-N(mg/l)	2.65	2.00	2.80	4.02	1.42
P-N(mg/l)	0	0	0	0	0.06
NO ₂ -N(mg/l)	0.004	0.002	0.001	0.005	-
NO ₃ -N(mg/l)	2.25	1.87	2.80	4.00	-
T-P(mg/l)	0.014	0.033	0.004	0.024	0.048
DT-P(mg/l)	0.014	0.033	0.004	0.019	0.023
P-P(mg/l)	0	0	0	0.005	0.025
PO ₄ -P(mg/l)	0.014	0.029	0.002	0.014	-
SiO ₂ -Si(mg/l)	6.898	7.188	6.602	5.084	5.758
*日雨量(mm)	0	0	4	39	90

*宮島における降雨量

表2-3 水質等調査結果 (朝比奈川玉取橋)

2001年月日	無降雨時		降雨時		
	7月10日	8月16日	9月3日	9月11日	10月1日
採水時刻	9:55	13:45	9:52		14:00
天候	快晴	曇	小雨		大雨
気温(°C)	27.8	27.2	20.5		22.1
水温(°C)	23.0	25.6	20.3		19.3
透視度(cm)	>30	>30	>30		2.5
流量(m ³ /S)	0.078	0.093	0.175	-	-
SS(mg/l)	<1	<1	<1	140	670
T-N(mg/l)	1.32	1.88	1.64	2.03	2.58
DT-N(mg/l)	1.32	1.82	1.64	1.86	1.45
P-N(mg/l)	0	0.06	0	0.17	1.13
NO ₂ -N(mg/l)	0.002	0.001	0.001	0.009	-
NO ₃ -N(mg/l)	1.26	1.71	1.64	1.67	-
T-P(mg/l)	0.004	0.009	0.008	0.081	0.250
DT-P(mg/l)	0.004	0.009	0.008	0.028	0.043
P-P(mg/l)	0	0	0	0.053	0.207
PO ₄ -P(mg/l)	0.004	0.009	0.001	0.009	-
SiO ₂ -Si(mg/l)	6.088	6.592	6.484	4.882	4.300
*日雨量(mm)	0	0	4	39	90

*宮島における降雨量

表2-2 水質等調査結果 (沢A末端)

2001年月日	無降雨時		降雨時		
	7月10日	8月16日	9月3日	9月11日	10月1日
採水時刻	10:45	14:25	10:36		14:44
天候	快晴	曇	小雨		大雨
気温(°C)	27.0	29.0	21.0		22.9
水温(°C)	21.7	24.8	20.5		19.8
透視度(cm)	>30	>30	>30		8.0
流量(m ³ /S)	0.006	0.003	0.005	0.181	1.293
SS(mg/l)	<1	7	<1	14	90
T-N(mg/l)	0.80	1.15	1.09	1.51	1.49
DT-N(mg/l)	0.79	1.03	1.09	1.29	1.19
P-N(mg/l)	0.01	0.12	0	0.22	0.30
NO ₂ -N(mg/l)	<0.001	<0.001	<0.001	0.004	-
NO ₃ -N(mg/l)	0.79	1.03	1.09	1.12	-
T-P(mg/l)	0.014	0.028	0.014	0.033	0.136
DT-P(mg/l)	0.014	0.024	0.012	0.028	0.038
P-P(mg/l)	0	0.004	0.002	0.005	0.098
PO ₄ -P(mg/l)	0.014	0.022	0.012	0.025	-
SiO ₂ -Si(mg/l)	7.168	7.188	6.992	5.356	5.496
*日雨量(mm)	0	0	4	39	90

*宮島における降雨量

表2-4 水質等調査結果 (朝比奈川榎橋)

2001年月日	無降雨時		降雨時	
	7月10日	8月16日	9月3日	9月11日
採水時刻	10:31	14:37	10:26	14:37
天候	快晴	曇	小雨	
気温(°C)	27.3	31.0	20.3	
水温(°C)	25.4	27.0	22.0	
透視度(cm)	>30	>30	>30	
流量(m ³ /S)	0.168	0.123	0.379	13.540
SS(mg/l)	<1	<1	<1	192
T-N(mg/l)	1.43	1.34	1.75	2.51
DT-N(mg/l)	1.38	1.32	1.75	2.43
P-N(mg/l)	0.05	0.02	0	0.08
NO ₂ -N(mg/l)	0.004	0.003	0.003	0.013
NO ₃ -N(mg/l)	1.38	1.04	1.75	2.29
T-P(mg/l)	0.009	0.014	0.004	0.086
DT-P(mg/l)	0.009	0.014	0.004	0.043
P-P(mg/l)	0	0	0	0.043
PO ₄ -P(mg/l)	0.008	0.010	0.001	0.023
SiO ₂ -Si(mg/l)	6.012	6.070	5.976	4.780
*日雨量(mm)	0	0	4	39

*宮島における降雨量

表3 窒素とリンの形態別割合 (%)
青羽根川末端

形態	2001年 採水年月日 時刻				
	7.10 10:12	8.16 14:00	9.3 10:10	9.11 14:05	10.1 14:00
DON+NH ₄ -N	14.9	6.4	0	0.4	
NO ₂ -N	0.2	0.1	0	0.1	95.9
NO ₃ -N	84.9	93.5	100	99.5	(DT-N)
P-N	0	0	0	0	4.1
PO ₄ -P	100	87.9	50	58.4	47.9
(DT-P)-(PO ₄ -P)	0	12.1	50	20.8	(DT-P)
P-P	0	0	0	20.8	52.1
日雨量(mm)	0	0	4	39	90

-Nは1.86 mg/l, 2.43 mg/lであり, T-Nに対してその占める割合はそれぞれ 91.6%, 96.8%であった。DT-NのうちNO₃-Nは, 玉取橋では全窒素の82.3%, 下流の榎橋では91.2%を占めていた。NO₂-Nは玉取橋で0.009 mg/l, 榎橋では0.013 mg/lであり, 本川の流量が無降雨時と比較して著しく増加していたにもかかわらず, NO₂-Nが無降雨時よりも明らかに高い濃度を示した。支川の青羽根川の末端でSSは14 mg/lで, T-Nは1.51 mg/l, SSに関わる窒素は0.22 mg/lでT-Nの14.6%を占めていた。DT-Nは1.29 mg/lで, そのうちNO₃-Nは1.12 mg/lであり, T-Nの74.2%であった。

10月1日(日雨量が90 mm/日)は, 本川の榎橋において調査時の流量は無降雨時(流量:0.168 m³/s)のおよそ170倍であった。本川の玉取橋, 羽佐間橋および横内橋の3地点では, SSは535~670 mg/lで本川の河川水は極めて多量のSSを含んでいた。SSに関わる窒素は0.62~1.13 mg/l, 平均0.86 mg/l (n=3), そのT-Nに対する割合は27.8~43.8%, 平均34.5%であった。青羽根川の末端では6.710 m³/sで, 7月10日の無降雨時の流量(0.021 m³/s)の320倍であった。この時のSSは46 mg/lで, T-Nは1.48 mg/l, そのうち溶存態窒素は1.42 mg/lで, T-Nの95.9%を占め, SSに関わる窒素は4.1%であった。

また沢Aの流量は1.293 m³/sで, 7月10日の無降雨時(0.006 m³/s)の216倍であった。この時のSSは90 mg/lで, T-Nは1.49 mg/l, そのうち溶存態窒素は1.19 mg/lで全窒素の79.9%を占め, SSに関わる窒素は20.1%であった。

2) リン

小雨時はP-Pは各地点でゼロであり, T-Pの100%が溶存態リンであり無降雨時と同様であった。溶存態リンであるPO₄-Pの全リンに対して占める割合を調査地点毎にみると, 玉取橋で12.5%, 榎橋で25%, 支川の青羽根川の末端では50%であり, いずれ

の調査地点においてもPO₄-P以外の溶存態リンが含まれていた。沢A末端のT-Pの濃度は0.014 mg/l, 溶存態リンはT-Pの85.7%であり, 溶存態リンは全て無機性リンのPO₄-Pであった。

9月11日は, 日雨量が39 mm/日であり, 前日の10日は台風による豪雨がもたらされた。このような状況下における朝比奈川水系の水質は, 玉取橋, 榎橋, 羽佐間橋, 横内橋のSS濃度(mg/l)は高く(140, 192, 181, 131 mg/l), SSに関わるリンの濃度(mg/l)は, 順に, 0.053, 0.043, 0.086, 0.043であり, 全リンに対して占める割合(%)は同様に順に, 65.4, 50.0, 64.2, 50.0であった。このように濁った河川水のT-P中の50%以上がSSに関わるリンで, 玉取橋で0.009 mg/l, 榎橋, 羽佐間橋, 横内橋では一様に0.023 mg/lであり, PO₄-Pの全リンに対する割合は, 順に11.1, 26.7, 17.2, 26.7%であった。本川ではPO₄-Pは溶存態リンの32.1~53.5%を占めていたが, このことはPO₄-P以外の溶存態リンが比較的大きい割合で含まれていることを示している。PO₄-P以外の溶存態リンの全溶存態リンに対して占める割合が無効雨時と比較すると降雨時に大きいことから, この種のリンが降雨により流域の面源から流出していると考えられる。ここで, PO₄-P以外の溶存態リンとして溶存態有機リンが考えられる。

日雨量90 mmの10月1日の本川のSSは高く, 玉取橋で670 mg/l, 羽佐間橋で535 mg/l, 最も下流側の横内橋では630 mg/lであり, T-Pは順に0.250, 0.235, 0.292 mg/lで, 今回の調査結果の中で最大であった。これを日雨量4 mmの9月3日の調査と比較すると玉取橋で31倍, 横内橋では24倍の濃度であった。SSに関わるリンは玉取橋で0.207 mg/l, 羽佐間橋で0.158 mg/l, 横内橋では0.245 mg/lであり, SSに関わるリンの全リンに対する割合は, 順に82.8, 67.2, 83.9%であった。このように大雨時にはSSに関わるリンの濃度が溶存態リンの濃度を大きく上回った。

3 降水による栄養塩類の流出特性

1) 窒素

降雨のあった調査日の採水時刻における瞬間負荷量は, 表2中の流量(m³/s)と濃度(mg/l)の積で求めた流出負荷量と, この流出負荷量から晴天時の流出負荷量を差し引いて求めた降雨による流出負荷量(表4*の値)である。調査当日の雨量(日雨量)が0~39 mmでは流出した全窒素の負荷量の100%が溶存態窒素であり, その100%もしくは100%近くはNO₃-Nであったが, 調査当日に90 mmの降雨があった10月1日の調査では, 溶存態窒素とSSに関わる窒素の流出が認めら

れた。調査によれば、青羽根川の流域には針葉樹林と広葉樹林の森林、茶畑等の畑作地域、果樹園の樹園地域が存在している。NO₃-Nの一部とSSに関わる窒素は流域に存在する畑地や林地から降雨により表面流出していると考えられる。畑地等農業地域における発生負荷として肥料、作物残査等があり、これらに原因する窒素は降水により表面流出して水系に達していると考えられている。

2) リンおよびケイ素

表5に青羽根川末端におけるリンおよびケイ素の流出負荷量と降雨状況について示した。

①リン

降雨状況は、9月3日の前1日～2日は0mm、9月11日の前日は豪雨であった。また、10月1日(日降雨量90mm)の前の9月23日から29日の期間は降雨量がゼロであり、前日の30日は29mmであった。

降水によるリンの流出負荷量についてみると、調査当日の雨量が多い時程、溶存態リンとSSに関わる懸濁態リンの両方の流出負荷量が増大し、懸濁態リンの割合が増加し、溶存態リンの割合が減少した。溶存態リンの流出負荷量の一部はPO₄-Pであったが、PO₄-

P以外の溶存態リンの流出が認められ、溶存態有機リンが降水により青羽根川の流域の面源から流出していると考えられる。河川水中のSS濃度が大きいことと、SS試験ろ紙上のSSの外観から、畑地等の土壌の流亡、河床堆積物の流出が考えられる

②ケイ素

ケイ素(SiO₂-Si)は調査当日の降雨量が多いほど流出負荷量が増大した。

まとめ

1 2000年度実施した降雨時調査の結果、ウォッシュアウトがおこること、降雨により大量の栄養塩類が流出すること、栄養塩類についてはウォッシュアウトがおこらない降雨でも大量に流出することが判明した。2001年度は、朝比奈川水系において異なる降雨状況下で栄養塩類(N, P, Si)の流出に関する調査を実施した。

2 無降雨時

河川水中の全窒素(T-N)の100%もしくは100%近くは溶存態窒素であり、その形態は極めて低濃度の

表4 青羽根川末端における窒素の流出負荷量と降雨状況

(流出負荷量: g/s, 降雨状況: 日雨量 mm)

2001年 月日時刻	流量 (m ³ /s)	SS	NO ₂ -N	NO ₃ -N	T-N	DT-N	P-N	日雨量 (mm)
7/10 10:12	0.021	0	0.000	0.047	0.056	0.056	0	0
8/16 14:00	0.012	0.0	0.000	0.022	0.024	0.024	0	0
9/3 10:10	0.048	0	0.000	0.134	0.134	0.134	0	4
*		0	0.000		0.078	0.078	0	
9/11 14:05	1.733	19	0.009	6.932	6.967	6.967	0	39
*		19	0.009	6.885	6.911	6.911	0	
10/1 14:00	6.710	309	-	-	9.931	9.528	0.403	90
*		309			9.875	9.472	0.403	

* 降雨による流出負荷量: 流出負荷量 (g/s) - 晴天時負荷量 (g/s)

表5 青羽根川末端におけるリン、ケイ素の流出負荷量と降雨状況

(流出負荷量: g/S, 降雨状況: 日雨量 mm)

2001年 月日時刻	流量 (m ³ /S)	SS	PO ₄ -P	T-P	DT-P	P-P	SiO ₂ -Si	日雨量 (mm)
7/10 10:12	0.021	0	0.0003	0.0003	0.0003	0	0.145	0
8/16 14:00	0.012	0	0.0003	0.0004	0.0004	0	0.086	0
9/3 10:10	0.048	0	0.0001	0.0002	0.0002	0	0.317	4
*		0	0	0	0	0	0.172	
9/11 14:05	1.733	19	0.0243	0.0416	0.0329	0.0087	8.811	39
*		19	0.024	0.0413	0.0326	0.0087	8.666	
10/1 14:15	6.710	309		0.1758	0.0491	0.1267	38.636	90
*		309		0.1755	0.0488	0.1267	38.491	

* 降雨による流出負荷量: 流出負荷量 (g/s) - 晴天時負荷量 (g/s)

NO₃-Nを含むものの、ほとんどがNO₃-Nであった。玉取橋と榎橋、青羽根川末端における河川水中の全リンの100%が溶存態リンであった。リンの形態についてみると、玉取橋で100%がPO₄-P、榎橋ではPO₄-Pは71.4~88.9%、青羽根川末端では87.9~100%であった。

3 小雨時

小雨時(日雨量:4mm)は無降雨時におけると同じように朝比奈川の本川の玉取橋と榎橋、支川の青羽根川末端ではSSはほとんど含まれず、P-Nの濃度はゼロであり、全窒素量の100%が溶存態窒素であり、その形態についてみると100%がNO₃-Nであって、無降雨時と同様であった。

4 降水による栄養塩類の流出特性

降水により流出していた負荷量の窒素の形態についてみると、日雨量が0~39mmで、流出した全窒素量の負荷量の100%が溶存態窒素であり、その100%もしくは100%近くはNO₃-Nであったが、日雨量が90mmの10月1日の調査では、溶存態窒素とSSに関わる窒素の流出が認められた。NO₃-Nの一部とSSに関わる窒素は流域に存在する面源である畑地や林地から降雨により表面流出していると考えられる。

降水によるリンの流出負荷量についてみると、調査当日の雨量が多い程、溶存態リンとSSに関わるリン:懸濁態リンの両方の流出負荷量が増大し、割合(%)は懸濁態リンの割合が減少した。溶存態リンの流出負荷量の一部はPO₄-Pであったが、PO₄-P以外の溶存態リンの流出が認められ、溶存態有機リンが考えられた。またケイ素(SiO₂-Si)は調査当日の降雨量が多い程流出負荷量が増大した。

5 面源からの流出

1) 畑地等農業地域における窒素の発生負荷として肥料、作物残渣等があり、これらに原因する窒素は降水により表面流出もしくは浸透して水系に達していると考えられ、今後の研究が必要である。

2) リンは降水により流域の面源から流出していると考えられ、畑地等からの土壌の流亡等が考えられ、今後の研究が必要である。

文 献

- 1) 瀧本俊晴他:河川における環境負荷流出特性について、静岡県環境衛生科学研究所報告, 43, 81-87 (2000)
- 2) 川口浩史他:降雨時における河川水質の変動と懸濁物質の流出特性に関する研究, 第36回日本水環境学会年会講演集, 10, (2002)
- 3) 阿部 聡他:利根川上流部各流域の窒素・リン濃度調査, 第36回日本水環境学会年会講演集, 101, (2002)
- 4) 池田正芳他:烏川・鑄川における高い窒素濃度とその原因, 第36回日本水環境学会年会講演集, 103 (2002)
- 5) 秋田尚美他:酸・アルカリ連続抽出による河川懸濁物中の生物利用可能リンの測定, 第36回日本水環境学会年会講演集, 106, (2002)
- 6) 梅本 諭他:自動採水システムによる降雨時調査-降雨強度と栄養塩類濃度変動状況-, 第36回日本水環境学会年会講演集, 107, (2002)
- 7) 駒井幸雄他:小集水域における溪流河川水質の変動からみた流出プロセスの推定, 第36回日本水環境学会年会講演集, 111, (2002)
- 8) 坂田慶太郎他:山地, 森林流域からの汚濁負荷流出, 第36回日本水環境学会年会講演集, 208, (2002)
- 9) 福岡県の森林地帯における窒素の負荷量と流出量, 第36回日本水環境学会年会講演集, 209, (2002)
- 10) 山田俊郎他:森林土壌からの窒素成分の流出, 第36回日本水環境学会年会講演集, 209, (2002)
- 11) 井手惇一郎他:森林域(人工ヒノキ林)からの栄養塩降雨時流出特性-御手洗水試験流域におけるケーススタディー-, 第36回日本水環境学会年会講演集, 211, (2002)
- 12) 小池由記他:柑橘類樹園地からの流出水質特性に関する調査研究, 第36回日本水環境学会年会講演集, 213, (2002)
- 13) 上村一真他:赤野井湾集水域における水田由来汚濁物の流出特性, 第36回日本水環境学会年会講演集, 215, (2002)
- 14) 太田陽子他:出水時を考慮した水質成分負荷量の推定と流域土地利用との関係, 第36回日本水環境学会年会講演集, 216, (2002)
- 15) 竹谷直起他:施肥と灌漑方式に着目した水田からの汚濁流出に関する調査, 第36回日本水環境学会年会講演集, 217, (2002)
- 16) 杉山信広他:連続抽出分画による河川水中懸濁態リンの降雨時流出解析, 第36回日本水環境学会年会講演集, 105, (2002)

非イオン界面活性剤分解生成物の生体影響評価 -活性汚泥処理によるノニルフェノールエトキシレートの分解除去-

東部支所 山下晶平, 遠藤 満, 深沢博之

Toxicity Evaluation of Degradation Products of Non-ionic Surfactants
 -Removal of Nonylphenol Polyethoxylates in Activated Sludge Process-

Shohei YAMASHITA, Mitsuru ENDO, and Hiroyuki FUKASAWA

非イオン界面活性剤の中でも生分解速度が低いノニルフェノールポリエトキシレート (NPnEO) について, 活性汚泥法を用いた実験により NPnEO の除去効果を調べた。また NPnEO のうち, オキシエチレン鎖数が 1 ($n=1$) あるいは 2 ($n=2$) のノニルフェノールモノエトキシレート (NP1EO), ノニルフェノールジエトキシレート (NP2EO) が内分泌攪乱作用を示す可能性が最近報告されている¹⁾ため, NP1-4EO ($n=1\sim4$) についてはエストロゲン活性の変化等を調べることで評価した。

実験の結果, NP1-4EO は投入直後短時間で汚泥に吸着すること, さらに 1 日後にはほぼ分解除去されることが示され, NPnEO 除去に対する活性汚泥処理の有効性が確認された。

Key words: 非イオン界面活性剤, 活性汚泥, ノニルフェノールポリエトキシレート
 Non-ionic Surfactants, Activated Sludge, Nonylphenol Polyethoxylates

はじめに

近年, 非イオン界面活性剤は泡ぎれの良さや洗剤としてのコンパクト化等の利便性から生産量が急激に増加し, 現在では界面活性剤全体の約 4 割を占めている²⁾。それらは生活環境項目の COD, BOD には影響するものの, そのもの自体は排水基準項目として扱われていないのが現状である。平成 11~12 年度において, 非イオン界面活性剤の一種であるヘプタオキシエチレンドデシルエーテル (以下, C_{12} POE₇ と表す) に対し活性汚泥法を適用し, 99% の分解効率を確認した。なお, この物質は JIS K 0102 (工場排水試験方法) における非イオン界面活性剤の測定方法で用いられる標準物質である。一方, 同様に非イオン界面活性剤の一種であるアルキルフェノールポリエトキシレート (APE) は分子構造にベンゼン環を有するため生分解速度が遅く, 特にアルキル基にノニル基を有するノニルフェノールポリエトキシレート (NPnEO) でオキシエノエトキシレート (NP1EO), ノニルフェノールジエトキシレン (EO) 鎖数

が 1 あるいは 2 のノニルフェノールモノエトキシレート (NP2EO) が内分泌攪乱作用を示す可能性が最近の調査により報告されている。これら APE は日本国内では, メーカーの自主規制により家庭用製品としての製造はされていないものの, 工業用として洗浄剤, 分散剤等, 多くの用途に使用されている。

本研究では NPnEO を対象として活性汚泥処理を検討した。NPnEO の分解経路としては, 好気条件下で EO 鎖の末端からこの EO の減少を伴って進行し, NP2EO や NP1EO を生成することが提唱されている¹⁾。今回は, このことを踏まえ, NPnEO の分解性と, 分解に伴う内分泌攪乱作用の変化について最近強度指標として用いられているエストロゲン (女性ホルモン) 様活性を, 反応系における上澄水と汚泥 (メタノール抽出分) の両画分について調べた。

試薬

1 対象物質

- Polyethylene Glycol Mono-4-nonylphenyl Ether ($n=7.5$) 東京化成工業 (株) 製 (NPnEO)
- Polyethylene Glycol Mono-4-nonylphenyl Ether ($n=2$) 東京化成工業 (株) 製 (NP1-4EO)

2 非イオン界面活性剤の定量 (TBPE 法) に用いた試薬

静岡県環境衛生科学研究所東部支所
 (〒410-0055, 沼津市高島本町 1-3)
 Eastern Branch Office, Shizuoka Institute of
 Environment and Hygiene (1-3, Takashima-honcho, Numazu,
 410-0055, Japan)

- ・ヘプタオキシエチレンドデシルエーテル (水質試験用) 和光純薬工業 (株) 製 (C₁₂POE₇)
- ・テトラプロモフェノールフタレインエチルエステルカリウム塩 (1級) 和光純薬工業 (株) 製 (TBPE)
- ・エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (特級) 和光純薬工業株式会社製 (EDTA・2Na)
- ・塩化カリウム (特級) 和光純薬工業 (株) 製
- ・炭酸水素カリウム (特級) 和光純薬工業 (株) 製
- ・水酸化カリウム (特級) 和光純薬工業 (株) 製
- ・トルエン (特級) 和光純薬工業 (株) 製
- ・メタノール (特級) 和光純薬工業 (株) 製

3 エストロゲン様活性の測定に用いた試薬

- ・Minimal SD Agar Base CLONTECH 製
- ・Minimal SD Base CLONTECH 製
- ・-Leu/-Trp DO Supplement CLONTECH 製
- ・リン酸水素二ナトリウム七水和物 (特級) 和光純薬工業 (株) 製
- ・リン酸二水素ナトリウム七水和物 (特級) 和光純薬工業 (株) 製
- ・塩化カリウム (特級) 和光純薬工業 (株) 製
- ・硫酸マグネシウム七水和物 (特級) 和光純薬工業 (株) 製
- ・2-メルカプトエタノール (1級) 和光純薬工業 (株) 製
- ・Zymolyase 20T 生化学工業 (株) 製
- ・2-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside 東京化成工業 (株) 製 (ONPG)
- ・炭酸ナトリウム (特級) 和光純薬工業 (株) 製
- ・メタノール (特級) 和光純薬工業 (株) 製

実験方法

50L の円筒型タンク (内径 480mm) に試験直前まで 24 時間空曝気した下水処理場の返送汚泥 15L と Polyethylene Glycol Mono-4-nonylphenyl Ether (n≒7.5) (以下 NPnEO と表す) 20mg/l の水溶液 15L を投入し、全体として 30l の系において、平均曝気量 3.5ml/min, MLSS4500±50mg/l で処理を行った。なお、この NPnEO の n≒7.5 という値は EO 鎖数の平均値であり、n が 1~14 程度の NPnEO で構成される試薬である。試験は上澄水・汚泥の両画分について 4 日間における NPnEO 濃度とそれに起因すると考えられるエストロゲン様活性の経時変化を調べた。

測定方法

1 TBPE 法による非イオン界面活性剤濃度の測定

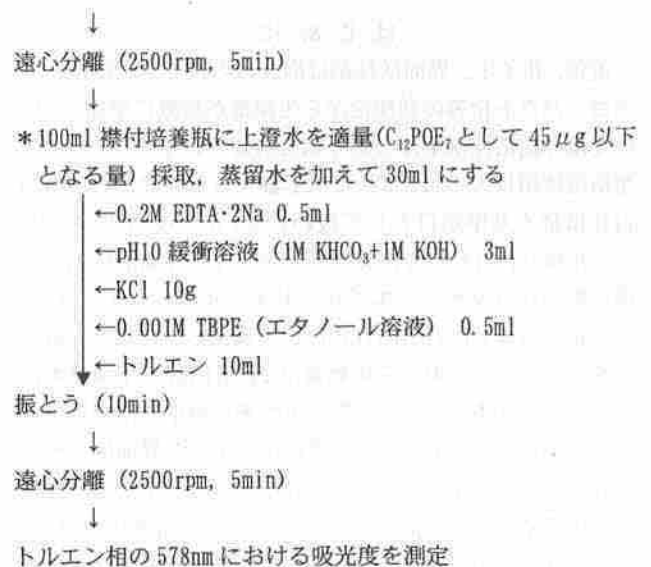
非イオン界面活性剤の定量において、公定法ではテトラ

チオシアナトコバルト (II) 酸吸光光度法 (CT 法) が用いられるが、やや感度不足、操作が煩雑で分析時間が長い、ブランク値が高い、1 データを得るのに多量の試料を必要とする等の問題点がある。トリプロモフェノールフタレインエステル (TBPE) による吸光光度法^{3),4)}は CT 法に比べ数十倍感度が高く、迅速簡便であり、CT 法による測定値とも良く一致することから本研究で採用した。この方法は、アルカリ性条件下で塩化カリウムを加えることにより、非イオン界面活性剤の錯イオンを生成させ、発色試薬である TBPE を加えてイオン対を形成させる。このイオン対を水相からトルエン相に抽出分離して、その吸光度から非イオン界面活性剤濃度を定量する方法である (CT 法、TBPE 法ともに原理はイオン対抽出)。なお、濃度は CT 法、TBPE 法とも C₁₂POE₇ による換算値である。

測定は反応系における上澄画分と汚泥画分 (メタノール抽出分) とに分離してそれぞれについて行った。吸光度は日立 150-20 型ダブルビーム分光光度計を用いて測定した。以下に上澄画分、汚泥画分における非イオン界面活性剤の定量操作を示す。なお、汚泥画分における非イオン界面活性剤濃度は、メタノール抽出後に蒸留水で希釈し上澄画分と同じ体積としたときの濃度を測定したものである。

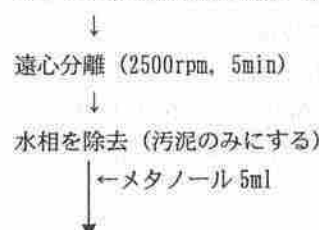
1) 上澄画分の非イオン界面活性剤濃度の測定

ガラス製遠心沈殿管に検水 (混合系) 50ml 採取



2) 汚泥画分の非イオン界面活性剤濃度の測定

ガラス製遠心沈殿管に検水 (混合系) 50ml 採取



除去した水相と同じ体積になるよう蒸留水を加える



遠心分離 (2500rpm, 5min)



以下, 1) *からと同様の操作を行う

2 HPLC による NP1-4EO 濃度の測定

現在, 非イオン界面活性剤濃度測定の公定法は CT 法のみであり, 前述したように CT 法にしても, TBPE 法にしても, $C_{12}POE_7$ による換算値である。さらに, これらの方法はいずれもイオン対抽出によるもので, 錯イオン形成によるものである。今回の TBPE 法はアルカリ金属と EO 鎖 ($-CH_2CH_2O-$)_n の部位がクラウンエーテルのように配位して錯陽イオンを形成するものである。 $C_{12}POE_7$ の抽出は, この EO 鎖数 n が 4 以上から抽出され始め, 6 以上でほぼ完全に抽出されることが確認されている。つまり, n の数が 1 あるいは 2 のような EO 鎖数の低い NPnEO は抽出されない可能性が非常に高い。しかもこの EO 鎖数の低い NPnEO の中でも特に, NP1EO, NP2EO が内分泌攪乱作用を示唆されており, EO 鎖数の低い NPnEO 濃度の把握が重要であると考えられる。

そこで今回, HPLC を用いて EO 鎖数が 1~4 の NP1-4EO を定量することにした。標準液として Polyethylene Glycol Mono-4-nonylphenyl Ether (n=2) をメタノールに溶解し調整した。採取した検水 (混合系) は遠心分離 (2500rpm, 5min) して上澄水と汚泥とに分離した後, 上澄画分, 汚泥画分 (メタノール抽出分) について前処理を, 以下 1), 2) に示す小森ら⁹⁾ の方法に準じて行った。

1) 上澄画分の前処理

上澄水をガラス繊維ろ紙 (孔径 1 μ m) でろ過して 250ml を得た。このろ液は, メタノール 10ml, 超純水 10ml でコンディショニングした固相カラム (Sep-Pak tC_{18}) に 10ml/min 通水した。固相カラムは 30 秒程度通気して脱水した後, メタノール 10ml を 1ml/min で溶出した。溶出液はメタノールを加え 25ml とし, 測定試料とした。

2) 汚泥画分の前処理

遠心分離 (2500rpm, 5min) により検水 (混合系) 200ml から分離した汚泥にメタノール 20ml を加えて 10 分間振とう抽出した後, 再度同じ条件で遠心分離した。このメタノール抽出を 2 回繰り返した。次にメタノール抽出液をロータリーエバポレータでメタノールがなくなるまで濃縮した後残った水溶液を, メタノール 10ml, 超純水 10ml でコンディショニングした固相カラム (Sep-Pak tC_{18}) に 10ml/min で通水した。固相カラムは 30 秒程度通気して脱水した後, メタノール 10ml を 1ml/min で溶出した。溶出

液はメタノールを 50ml とし, 測定試料とした。

3) HPLC 測定条件

測定には (株) 島津製作所製 VP シリーズを用いた。HPLC の測定条件を表 1 に示す。n の値が 1~4 の NPnEO を 1 つのピークとして検出し, NP1-4EO 濃度として算出した。なお, 汚泥画分における NP1-4EO 濃度は, 上澄画分と同じ体積の溶液における濃度として換算したものである。一方, この分析結果から得られた NP1-4EO の上澄水への添加回収率は 89.6%であった。

表 1 HPLC 測定条件

Column	: WAKO-Ag119
Mobile Phase	: A: H ₂ O : B: CH ₃ OH
Flow Rate	: 1.0ml/min
Temperature	: 40°C
Inj. Vol.	: 10 μ l
Detection	: SPD-M10Avp, 225nm
[Gradient Program]	
Time (min)	%B
0.00-9.00	60.00
14.00-16.00	100.00
17.00-20.00	60.00

3 酵母 Two-Hybrid 法によるエストロゲン様活性の測定

今回用いた酵母 Two-Hybrid 法によるエストロゲン様活性測定¹⁰⁾の原理を図 1 に示す。組替え体酵母にテスト物質が接触すると, テスト物質が細胞壁を透過してエストロゲンレセプターと結合し, これが転写因子として働く。そして予めプロモーターの下流に導入しておいた β -ガラクトシダーゼ遺伝子が発現するというものである。この β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現量, すなわち β -ガラクトシダーゼ活性を比色定量により測定し, エストロゲン様活性の指標とした。

1) 上澄画分の前処理

上澄水をガラス繊維ろ紙 (孔径 1 μ m) でろ過してろ液 500ml を得た。以下, 2 の 1) と同様の方法で固相カラム (Sep-Pak tC_{18}) に通水, さらにはメタノール 10ml を 1ml/min で溶出した後, 1ml に濃縮し測定試料とした。

2) 汚泥画分の前処理

検水 (混合系) 200ml を採取し, 2 の 2) と同様の方法で汚泥を分離, メタノール抽出, メタノール除去後の水溶液を固相カラム (Sep-Pak tC_{18}) に通水, そしてメタノール 10ml を 1ml/min で溶出した後, 純窒素吹き付けにより 1ml に濃縮し測定試料とした。

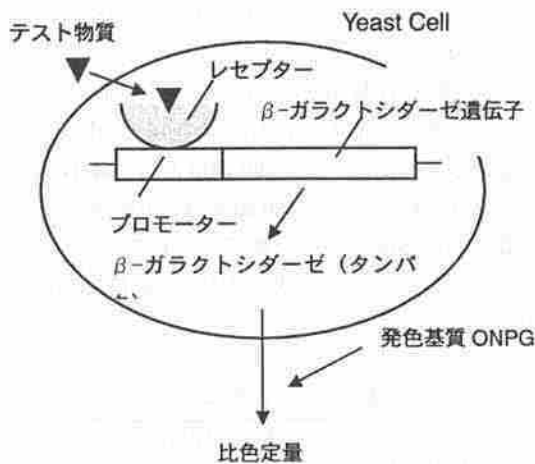


図1 酵母 Two-Hybrid 法の原理

3) 酵母 Two-Hybrid 法における操作

SD プレート上に生育した組換え体酵母を 2 白金耳採取し、1ml の SD 培地に接種した後、30℃で 12 時間前培養した。次に別途調製した SD 培地 200 μl を 1.5ml マイクロチューブに分注し、前培養液 50 μl を加えた後、1)、2) で得られた上澄画分および汚泥画分の試料 2.5 μl を添加して、30℃、50rpm で 4 時間回転培養した。次いで、この培養液 150 μl を採取して 600nm の吸光度から菌体量を測定し、残りの培養液 100 μl を遠心分離 (15000rpm, 5min) した。遠心分離後、上清を除去して得られた菌体に Zymolyase 20 T 溶液 200 μl を加えて 15 分間静置し細胞壁を溶解させた。その後、発色基質である 2-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) 溶液 40 μl を添加し 30 分反応させた後、1N Na₂CO₃ を 100 μl 加えて反応を停止させた。これを遠心分離 (15000rpm, 5min) した後、反応液の 420nm および 550nm における吸光度を測定し、β-ガラクトシダーゼ活性 (Unit) を次式により算出した。

$$U(\text{Unit}) = (\text{OD}_{420} - 1.75 \cdot \text{OD}_{500}) \cdot 10^3 / t \cdot v \cdot \text{OD}_{600}$$

OD: 吸光度 t=30min, v=0.05ml (前培養液)

なお比較のため、最もエストロゲン様作用が強いとされる 17β-エストラジオール溶液 10⁻⁵mol/l を同様に 2.5 μl 採取し、活性値を測定したところ、948unit であった。表 2 に試験に用いた培地および緩衝液等、各組成を示す。

表 2 培地および緩衝液組成等の組成

SD plate	Minimal SD Ager Base	46.7g
	-Leu/-Trp DO Supplement	0.64g
	Distilled Water	1000ml
	pH=5.8	
SD base	Minimal SD Base	26.7g
	-Leu/-Tr DO Supplement	0.64g
	Distilled Water	1000ml
	pH=5.8	
Z buffer	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	16.1g
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5.5g
	KCl	0.75g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.246g
	Distilled Water	1000ml
	pH=7.0	
Zymolyase 20T solution	Zymolyase 20 T	10mg
	β-mercaptoethanol	27 μl
	Z buffer	10ml
ONPG solution	2-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	40mg
	Z buffer	10ml

結果と考察

1 TBPE 法による非イオン界面活性剤濃度の経時変化

図 2 に試験開始時から 24 時間経過時までの非イオン界面活性剤濃度 (C₁₂POE₇ 換算) の経時変化を示す。

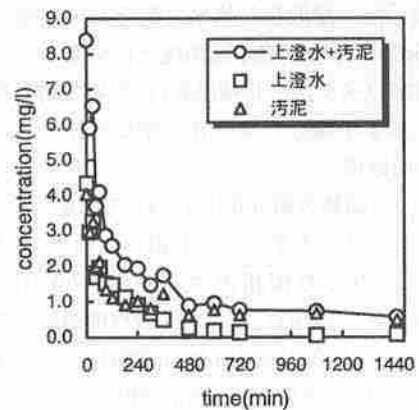


図 2 処理時間と濃度

試験開始時にタンクに投入した 15l の NPnEO 水溶液は 20mg/l であるが、TBPE 法によるこの測定値は 16.5mg/l であった。この数値の差は実験方法の 2 の冒頭でも述べたように測定値が C₁₂POE₇ 換算であること、および EO 鎖数の低い NPnEO は検出されにくいことによるものである。従ってこの方法によって検出される NPnEO は EO 鎖数の高い NPnEO (n が 5~6 以上と推測される) の濃度として捉えること

ができる。TBPE 法においては、この濃度を公定法と同様に非イオン界面活性剤濃度として評価した。

15L の NPnEO 水溶液はタンク中で返送汚泥 15L と混合して全体として 30L となるため、投入時、反応系では非イオン界面活性剤濃度はおよそ 2 倍希釈されることになる。図 1 が示すように試験開始時の界面活性剤濃度は上澄画分・汚泥画分合わせて 8.38mg/l となり、理論計算による値とほぼ一致した。このことから、TBPE 法において検出される NPnEO に関しては、汚泥からも良好に抽出されることが示唆された。また、除去効果に関しても 24 時間経過時に上澄画分において残留する NPnEO 濃度が 0.07mg/l 程度と非常に高い除去率が得られた。一方、汚泥画分においては 0.5mg/l 程度残留していることが分かった。しかし 24 時間経過時の除去率は、上澄画分・汚泥画分合わせると 93.1% とかなり高い値を示した。

2 NP1-4EO 濃度とβ-ガラクトシダーゼ活性の経時変化

上澄・汚泥の両画分について、各種測定により得られた NP1-4EO 濃度及びβ-ガラクトシダーゼ活性 (unit) を以下に示すグラフ (図 3, 図 4) にまとめた。

1) 上澄画分における経時変化

図 3 に試験開始時から 4 日経過時までの上澄画分における NP1-4EO 濃度及びβ-ガラクトシダーゼ活性 (unit) の変化を示す。

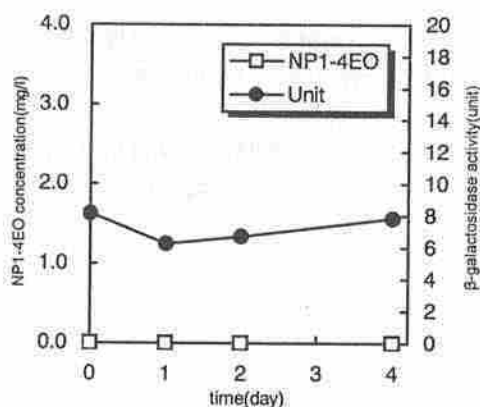


図 3 処理時間と濃度及びβ-ガラクトシダーゼ活性

NP1-4EO 濃度は試験開始時から 4 日経過時までの測定値全てが不検出となった。試料の濃縮倍率は 10 倍と低倍率であるため、さらに詳細な濃度を得るためには今後微量分析が必要となる。しかし、投入した原料の NPnEO には NP1-4EO が存在することが明らかであるにも関わらず、投入直後においても NP1-4EO は、上澄画分にはほとんど存在しないことがこの結果から明らかとなった。一方、β-ガラクトシダーゼ活性についても、大きな変化が見られず、常に 8unit

程度の数値を示した。試験開始前 (NPnEO 投入前) に採取した上澄画分の活性が 3.8unit であり、これに比べて若干数値が高いため、分解により NP1-4EO あるいはその他、β-ガラクトシダーゼ活性を示す物質が微量に生成し、残留している可能性が考えられた。

2) 汚泥画分における経時変化

図 4 に試験開始時から 4 日経過時までの汚泥画分における NP1-4EO 濃度及びβ-ガラクトシダーゼ活性 (unit) の変化を示す。

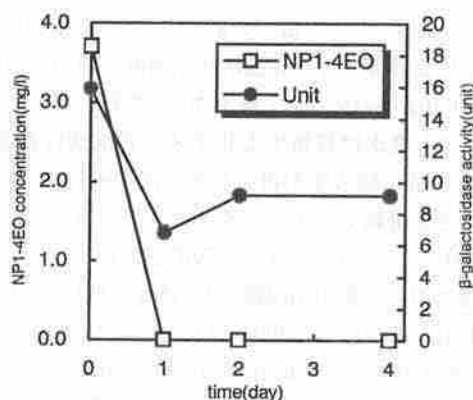


図 4 処理時間と濃度及びβ-ガラクトシダーゼ活性

NP1-4EO 濃度は試験開始時に 3.7mg/l であった。1) の上澄画分において、試験開始時に NP1-4EO が検出されなかったことと合わせて考えると、NP1-4EO は汚泥に急速に吸着されることが結論として導かれる。このことは EO 鎖数の低い NP1-4EO が、EO 鎖数の高い NPnEO に比べて疎水性が高いため汚泥に吸着しやすいためと考えられた。また、1 日経過時から 4 日経過時までの結果については上澄画分と同様に全てが不検出となった。汚泥画分については濃縮倍率がおよそ 4 倍と、上澄画分に比べてさらに低倍率で測定したため、これについても詳細な濃度の把握が今後必要である。一方、β-ガラクトシダーゼ活性は試験開始時に 15.9unit と若干高い数値を示した。このときの NP1-4EO 濃度が 3.7mg/l と、HPLC 分析においても検出されており、β-ガラクトシダーゼ活性がこの NP1-4EO に起因することが考えられた。また、試験開始前 (NPnEO 投入前) に採取した汚泥画分の活性が 0.7unit であり、これに比べるとやはり数値が高いため、汚泥にも NP1-4EO あるいはその他、β-ガラクトシダーゼ活性を示す物質が微量に存在している可能性が考えられた。ちなみに本試験において、同時に 200mg/l のノニルフェノール (NP) について同様の方法でβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した結果、750unit であった。汚泥画分は 200ml の混合液から抽出しているため、1ml の濃縮液は水溶液にしておよそ 200 倍濃縮したものを

測定したことになる。NP1mg/lの水溶液を200倍濃縮して200mg/lを得たと考えれば、NP1-4EOとNPのおおよその比較ができる。すなわち、試験開始時の汚泥画分におけるNP1-4EO3.71mg/lを200倍濃縮した試料についてβ-エストラジオール活性を測定すると15.9unit、これに対し、NP1mg/lを同様に200倍濃縮したものを測定すると750unitということになり、今回の処理系で検出されたβ-エストラジオール活性が非常に低いものであることが分かった。

まとめ

TBPE法による非イオン界面活性剤濃度について、投入した溶液15L中から16.5mg/l検出され、これに対して24時間の処理で上澄水に残留する非イオン界面活性剤濃度は0.07mg/lと高い除去率が得られた。汚泥画分においても0.49mg/lと上澄画分に比べて若干高い値を示したが、両画分を合わせると93.3%と高い除去率を示した。

TBPE法において検出が困難なEO鎖数の低いNPnEOすなわちNP1-4EOについてはHPLC分析を行った。試験開始時(NPnEO投入直後)に汚泥画分から3.71mg/lのNP1-4EOが検出されたことに対し、上澄・汚泥の両画分とも4日間の処理ですべて不検出となった。このことからNP1-4EOは投入後、短時間で汚泥に吸着すること、さらに1日後にはほぼ分解除去されることが示された。

一方、エストロゲン様活性すなわちβ-ガラクトシダーゼ活性に関して、上澄画分はいずれも8unit程度と、活性としてはかなり低い値であった。汚泥画分についてはNPnEO投入時に15.9unitと若干高い数値を示し、これがHPLC分析により検出されたNP1-4EOに起因することが考えられた。また、上澄・汚泥の両画分とも試験開始前(NPnEO投入前)に比べてβ-ガラクトシダーゼ活性はわずかであるが高い値を示し、NP1-4EOあるいはその他活性を示す物質が微量に残留している可能性が示唆された。しかしながら、今回の処理系で検出されたβ-エストラジオール活性はNPに比べ、非常に低いことが分かった。

以上、NPnEO除去に対する活性汚泥処理の有効性が確認されたが、処理後において微量に残留していると思われる物質については今後さらに検討を要する。今回検討した活性汚泥法は好気条件における処理法であるが、NPnEOは嫌気条件下で最終的にNPを生成することが報告されている¹⁾。従ってNPnEOを活性汚泥処理したときに、処理水に微量なエストロゲン様活性を示す物質が残留していると、最終的に河川や海の底質中に蓄積する可能性がある。また、嫌気条件下ではNPを生成するため、エストロゲン様活性はこのときかなり上昇することが考えられる。このようなことから微量物質の除去が必要であり、活性汚泥処理をオ

ゾン処理や過酸化水素処理⁷⁾等と組み合わせることでより効果が得られることが考えられる。

謝辞

この研究を実施するにあたり、酵母Two-Hybrid法によるエストロゲン様活性の測定にご協力頂いた静岡大学農学部森林資源科学科の西田友昭教授及び木材化学研究室の鈴木一隆氏並びに同研究室の皆様へ深謝します。

文献

- 1) 宇都宮暁子：ノニルフェノールエトキシレートとその分解生成物の微量分析法と環境濃度、シンポジウム「非イオン界面活性剤に関する最近の動向」講演要旨集、15-16 (2001)
- 2) 日本水環境学会 [水環境と洗剤研究委員会] 編：非イオン界面活性剤と水環境、技報堂出版、東京 (2000)
- 3) 笠原一世他：水中のポリオキシエチレン型非イオン界面活性剤のイオン抽出/吸光度定量、第6回環境科学討論会要旨集、129-130 (1997)
- 4) 芝原滋啓：市街河川水中のポリオキシエチレン型非イオン及び陰イオン界面活性剤の定量、富山大学理学部生物圏環境科学科卒業論文、17-18 (1998)
- 5) 小森行也他：活性汚泥処理プロセスにおける非イオン界面活性剤の挙動、第36回下水道研究発表会講演集、700-701 (1999)
- 6) 羽田崇：リグニン分解酵素による内分泌攪乱物質のエストロゲン様活性物質の除去、静岡大学農学部森林資源科学科修士論文、19-20 (2000)
- 7) 水野忠雄他：オゾンおよび過酸化水素併用処理におけるノニルフェノールエトキシレートの分解特性、水環境学会誌、25, No. 1, 46-52 (2002)

地下水の要監視項目などによる汚染実態の解明 (第2報)

西部支所 中島 二夫, 小池 明, 杉浦 秀治
上野 千恵, 志村 修
国立環境研究所 西川 雅高

Survey on Contamination of Metals in Groundwater

Tsugio NAKAJIMA, Akira KOIKE, Hideharu SUGIURA,
Chie UENO, Osamu SIMURA, and Masataka NISHIKAWA

これまでの地下水の調査結果から, 窒素肥料の過剰施肥により地下水の酸性化及び硝酸性窒素による汚染が明らかになった。さらに, これらの地下水からニッケル(要監視項目)やコバルトが検出された。この2種類の金属の大半は, 苦土肥料に含まれる蛇紋岩から地下水の酸性化にともない溶出されると推定された。

Key words: 地下水, ニッケル, 蛇紋岩
Groundwater, Nickel, Serpentine

はじめに

県西部地域のA町とB町の地下水(井戸水)の調査結果から, これらの地域の地下水は酸性化しており, 中でもpHの低い地下水からニッケル(要監視項目)とコバルトが検出された。これらの金属は, 健康被害を生ずる恐れがあるので発生源と地下水への溶出機構を解明する必要がある。このため本研究を実施した。

実験方法

1 蛇紋岩の調製および分析

文献から, 苦土肥料¹⁾に含まれている蛇紋岩は, ニッケル含有量²⁾が多い。このことから, ニッケルの発生源は,

蛇紋岩と推定して以下の実験を行った。

1) 蛇紋岩の粉末化

蛇紋岩(産地: 静岡県静岡市口坂本)試料を岩石カッターで厚さ2~3mm程度の板状に切断した後, 整形用小型ハンマーで径2~5mm程度に粗割した。これらの粗割試料をFRITSCH社製Pulverisette5型ボールミル(容器, ボールともにメノウ製のものを使用)を用い, 回転数300rpm, 処理時間20分で粉末化した。

2) 組成の分析

粉末化した蛇紋岩100mgを過塩素酸分解法³⁾で処理した後, 得られた分解液をフレイム原子吸光法でニッケル, コバルト及びマグネシウムを定量した。

2 土壌の調製

地下水の調査を行った農耕地に隣接した山林の斜面の土壌(細粒黄色土)を風乾⁴⁾し, 中小礫, 木片等を除き, 土塊, 団粒を粗砕した後, 非金属製の2mmのふるいを通わせて得た土壌を十分混合し, 試料とした。

3 金属類の溶出方法

1) 溶出液の調整

溶出液のpH変化に伴う蛇紋岩及び土壌からの溶出挙動を解明するために溶出液⁵⁾のpHを1~8に変化させ

静岡県環境衛生科学研究所 西部支所

(〒430-0915, 静浜松市東田町87)

Western Branch Office, Shizuoka Institute of
Environment and Hygiene

(87, Higashi-tamati, Hamamatu, 430-0915, Japan)

て検討を行った。pHは、pH1は0.1M塩酸溶液、pH2は0.012M塩酸溶液、pH3~6は0.1Mの酢酸-酢酸アンモン緩衝溶液、pH7~8は0.1Mの酢酸アンモン-アンモニア溶液により調製した。

2) 蛇紋岩からの金属類の溶出

溶出試験操作は、土壤環境基準⁴⁾で規定されている金属の検定方法に準じて行った。土壤環境基準では、試料と溶出液とを重量体積比10%の割合で混合し、かつその混合液が500ml以上になるように規定されている。本実験では、蛇紋岩(試料)100mg、溶出液を40mlにして行った。溶出は、pH1~8に調製した各溶出液40mlに蛇紋岩100mgをそれぞれ添加し、室温(おおむね27℃)常圧(おおむね1気圧)で振とう機(あらかじめ振とう回数を毎分約200回に、振とう幅を4cm以上5cm以下に調整したもの)を用いて6時間振とうした。以上の操作を行って得られた試料液を10~20分程度静置後、毎分3000回転で遠心分離した後の上澄み液を定量ろ紙(JIS5B)でろ過し、これを蛇紋岩からの溶出液とした。

3) 土壌からの各成分の溶出

溶出試験操作は、土壤環境基準⁴⁾で規定されている金属の検定方法に準じて行った。土壤環境基準では、試料と溶出液とを重量体積比10%の割合で混合し、かつその混合液が500ml以上になるように規定されている。本実験では、土壌(試料)2g、溶出液を40mlにして行った。溶出は、pH1~8に調製した各溶出液40mlに土壌2gをそれぞれ添加し、室温(おおむね27℃)常圧(おおむね1気圧)で振とう機(あらかじめ振とう回数を毎分約200回に、振とう幅を4cm以上5cmに調整したもの)を用いて6時間振とうした。以上の操作を行って得られた試料液を10~20分程度静置後、毎分3000回転で遠心分離した後の上澄み液を定量ろ紙(JIS5B)でろ過し、これを土壌からの溶出液とした。

4 金属類の土壌への吸着

1) ニッケル及びコバルトの土壌への吸着

ニッケル標準液(Ni 1000mg/l)及びコバルト標準液(Co 1000mg/l)を用いて、pH1~8の各溶出液のニッケル及びコバルト濃度が2mg/lになるように調製した溶出液40mlに、それぞれ土壌2gを添加し、振とう、遠心分離、ろ過を土壌からの溶出実験と同様に行い、溶出液のニッケル及びコバルト濃度をフレイム原子吸光法で測定した。土壌への吸着量⁶⁾は、土壌添加前の濃度と土壌添加及び振とう後の濃度から算出した。

結果および考察

1 地下水のpHと陽イオン濃度の関係

1998年~2000年に、県西部地域のA町とB町の14地

点の地下水(井戸水)を調査^{7)・8)・9)}した。

地下水のpHとニッケル、コバルト濃度との関係をそれぞれ(図1)、(図2)に示す。

1) pHとニッケル濃度との関係

地下水のニッケル濃度は、pHが低くなるにしたがって高くなる傾向が認められた。

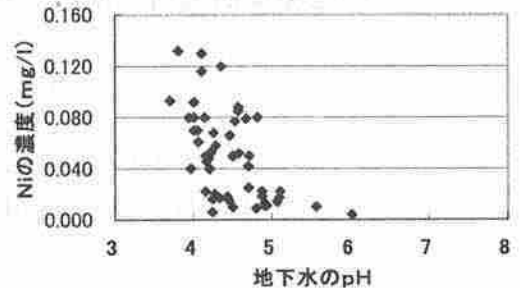


図1 地下水のpHとNiの関係

2) pHとコバルト濃度との関係

地下水のコバルト濃度は、pHが低くなるにしたがって高くなる傾向が認められた。



図2 地下水のpHとCoの関係

2 蛇紋岩を原料に使用した肥料について

平成12年度の静岡県における肥料の出荷実績(表1)から、蛇紋岩が苦土(酸化マグネシウム)肥料等に使用されていた。

表1 蛇紋岩を原料に使用した肥料銘柄一覧

品名	平成12年度県下 出荷実績(t)
クドゲン	704.0
フィールドアップ	4.6
苦土重焼燐 28%	61.0
苦土重焼燐 35%	2144.6
BM 重焼燐 35%	23.0
ホウ素重焼燐 35%	133.6
ハイマグボロン重焼燐	15.6
スーパーハイマグ重焼燐	77.0
焼燐 20%	66.0
砂状焼燐	385.2

資料提供：静岡県経済協同組合連合会生産資材部

3 蛇紋岩の組成および蛇紋岩からの溶出成分

1) 蛇紋岩の組成

分析結果(表2)から、蛇紋岩は、ニッケルおよびコバルトを含み、特にマグネシウムの含有率が高いことが明らかになった。

表2 蛇紋岩の成分

金属類	含有率	単位/蛇紋岩
Ni	1840	mg/kg
Co	82.8	mg/kg
Mg	17.0	%

2) 蛇紋岩からのニッケルの溶出

ニッケルの蛇紋岩からの溶出(図3)は、溶出液のpHが微アルカリ性から中性付近では極めて僅かであったが、pHが低くなるにしたがって高くなる傾向が認められた。

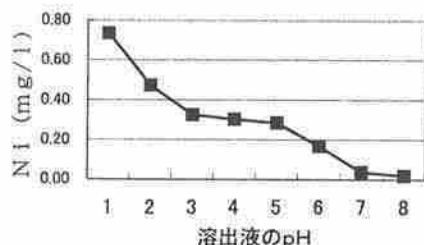


図3 Niの蛇紋岩からの溶出

3) 蛇紋岩からのコバルトの溶出

コバルトの蛇紋岩からの溶出(図4)は、ニッケルと同様に微アルカリ性から中性付近では、極めて僅かであったがpHが低くなるに従って高まる傾向が認められた。また、ニッケルに比べ低い濃度であった。

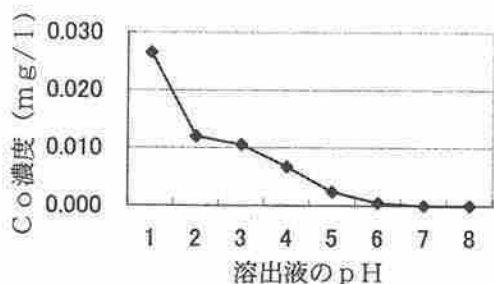


図4 Coの蛇紋岩からの溶出

4 金属類の土壌からの溶出

ニッケル及びコバルトの細粒黄色土(2g)からの溶出

(図5)は、pH1~pH8の範囲では認められなかった。

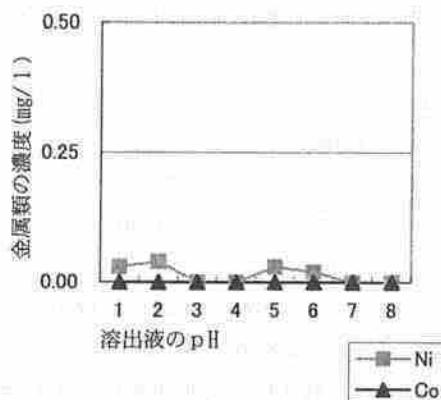


図5 金属類の土壌からの溶出

5 金属類の土壌への吸着

ニッケル及びコバルトの土壌への吸着量は、土壌添加前の濃度から土壌を添加し6時間振とう後の濃度を差し引いた値から求めた。実験の結果(図6及び図7)から、これら2種類の金属の土壌への吸着は、微アルカリ性で高く、逆に強酸性で極めて低く、pH3~pH6の範囲で、両者の中間の値(吸着率20%~50%)であった。

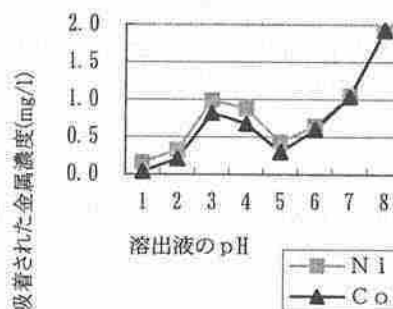


図6 NiとCoの土壌への吸着

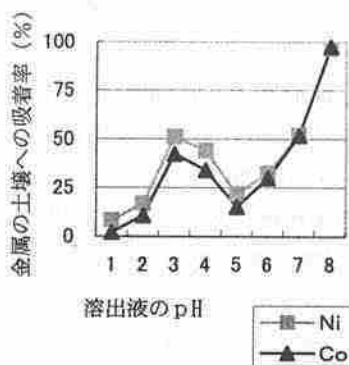


図7 NiとCoの土壌への吸着率

まとめ

- 1) 蛇紋岩を原料にした肥料が、県内で広く使用されている。
- 2) 蛇紋岩は、ニッケルとコバルトを含んでおり、特にマグネシウム含有量が高い。
- 3) 蛇紋岩から、溶液のpHが低くなるにしたがって、高い濃度のニッケル及びコバルトが溶出された。
- 4) 土壌へのニッケル及びコバルトの吸着は、弱アルカリ性の溶液で高く、逆に強酸性の溶液で極めて低く、この間のpH領域では、両者の中間の値であった。

以上のことから、酸性化した地下水に含まれるニッケル（要監視項目）及びコバルトは、苦土（酸化マグネシウム）肥料の原料に使用されている蛇紋岩に由来し、地下水の酸性化に伴って溶出されると推定された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、貴重なご指導、ご助言を頂きました東海大学海洋学部福江正治教授、工業技術院中国工業技術研究所平田静子博士、蛇紋岩の提供と粉末化をして頂いた静岡大学理学部石川剛志博士に感謝いたします。

文 献

- 1) 化学工業日報社：10889の化学商品，16-19，化学工業日報社，東京（1979）
- 2) 山形登：微量元素—環境科学特論，156-157，産業図書，東京（1979）
- 3) 安西徹郎他：土壌機能モニタリング調査のための土壌、水質及び植物体分析法，95-98，日本土壌協会，東京（2001）
- 4) 平成6年（1994）2月21日環境庁告示第二十五号付表
- 5) 上嶋英機他：65-Ⅲ汚染土壌における有害物質の計測・評価手法の高度化に関する研究，65-Ⅲ-1-4，工業技術院中国工業技術研究所（1998）
- 6) Rymond, N. Y. et al. : pH influence on selectivity and retention of heavy metals in some clay soils, Can. Geotech. J. 30. 823-824, (1993)
- 7) 中島二夫他：西部地域（小笠）地域の窒素による地下水等汚染調査（第1報），静岡県環境衛生科学研究所報告，41, 113-117, (1998)
- 8) 中島二夫他：西部地域（小笠）地域の窒素による地下水等汚染調査（第2報），静岡県環境衛生科学研究所報告，42, 143-146, (1999)
- 9) 中島二夫他：地下水の要監視項目などによる汚染実態の解明，静岡県環境衛生科学研究所報告，43, 95-98, (2000)

他誌に発表した論文

管理部

1) インフルエンザ流行予測の研究

—「インフルエンザの発生動向分析と流行予測—

宮本秀樹

厚生科学（健康科学総合）研究—「科学的根拠及び情報を提供する地方衛生研究所の試験検査機能の強化に関する研究」

分担研究報告書（上木隆人班）P18～27, 2001.4

(1) インフルエンザの感染症発生動向調査・週報（過去15年間）の統計・疫学的分析より、季節差、地域差、年令差等が認められた。また、A型株の流行開始は新型（不連続抗原変異）株の出現がなく、大流行が少ないため（患者100万人以上2回）、本県及び全国とも定点当り罹患数が1.0以上を示す第50週前後、流行ピークは第5週前後、流行終了時は第10週以降にある事が判った。しかし、今シーズン（2000/2001）は全国的に7～10週遅れて流行し始め、流行ピークは3月にずれて、大流行はなかった。

(2) 本県及び全国の過去3シーズンの流行株亜型のウイルス学的・遺伝学的分析から、1998/99シーズンはA/H3N2型とB型が2峰性に、1999/2000シーズンはA/H1N1とA/H3N2型が同時混在して、1峰性に流行した。今シーズンは本県でA/H1N1 1株、A/H3N2 1株、B型16株、全国でA/H1N1 57株、A/H3N2 36株、B型36株が分離されている（第7週現在）。なお、本県と全国で脳炎・脳症発生株（A・B型）が過去2シーズンに91～77%、78～55%ずつ分離されている。

更に、本県では過去3シーズンにヘラルド株（前兆株）として、1998/99シーズンにはB型（7月、11月、全国最初）、1999/2000シーズンにはA/H3N2型（10月）、2000/2001シーズンにはB型（8月、12月、全国最初）、A/H1N1型（12月）が検出された。そのうち、1998/99シーズンのB/静岡/1/98株がワクチン推奨株として国内及び国際登録され、国内、国外（米CDC、WHO、台湾）でも取り上げられ、高く評価された。

(3) 他方、過去3シーズンの本県民のインフルエンザ・ウイルス抗体価の血清疫学的分析から、5才毎の全年令階層別の抗体保有率が高いA型株（防御能があるHI価40以上）は、A/シドニー/5/97、A/横浜/8/98、A/モスクワ/10/99、A/パナマ/2007/99株で、B型株はB/ハルビン/09/94株であった。

逆に、その抗体保有率が低いA型株はA/北京/262/95、A/ニューカレドニア/20/99株で、B型株はB

/北京/243/97、B/山東/7/97、B/山梨/106/98株であった。

また、小児（0～19才）、成人（20～59才）及び老人（60才以上）の3年令階層別に抗体価を比べると、各々に高低を示すウイルス株が見られ、そのうち免疫力が高い株に対してかなり流行阻止力（防御力）が推定できるが、その低い株に対してはワクチン未接種者中心に今後流行する可能性が考えられた。

よって、今シーズン（2000/2001）は前2シーズンにおけるA/シドニー/5/97（H3N2）株に対するワクチン効果と、平年よりも低温且つ多湿（多雨・多雪）の気候の影響により、本県及び全国とも例年になく流行が遅れ、且つ小規模（1/10～1/50）となっていると考えられた。

2) Molecular Epidemiological Analysis of STEC

(Shiga Toxin-Producing *E. coli*) Infection in Japan
Hideki MIYAMOTO

Mutation Research, Vol. 483 (Suppl. 1), S146, Oct. 21
～26, 2001 (Shizuoka)

Methods: Several analyses of STEC infection in Shizuoka and all Japan in 1987-2001 were done by molecular genetic, epidemiological methods, by using human, bovine and food samples. DNA types of PFGE patterns by enzyme (Xba I) treatment, O & H serotypes, Shiga Toxin (ST) types, Multi-Drug Resistance (MDR) to 10 antibiotics and Phage Typing (PT) of STEC O157 by Canadian LCDC system were applied.

Results: (I) Epidemiological analysis of 300 human STEC isolates in Shizuoka, 1987-2001, revealed high incidences of 1) Healthy carriers (13-22%), 2) Familial infection (49%) and 3) Infected children (55%) under 10 years, by contrast with low incidences of 4) Mortality (0-0.13%) and 5) HUS (4-5%).

(II) Molecular genetic analysis of 300 human and 228 bovine STEC isolates clarified high incidences of 1) O157 strains (73%) among STECs and 2) ST-1 & ST-2 double-producing strains (65%) with a few ST-1 single-producing O157 strains in man, suggesting genetic evolutionary process through Stx-2 deletion after Stx-1 duplication.

3) Main popular DNA types in 1987-1999 were IIa/a'

(Sakai, 42%) and IIIb/b' (13%) in PFGE Types I-VII by NIID (Japan) Classification.

4) Genetic variants (5%) were so often observed with a few different DNA bands in the same diffuse outbreak or the same familial infections.

5) MDR strains (18-20%) vs 1-5 antibiotics (SM/ SM-TC, ABPC-FOM/ ABPC-SM-TC/ ABPC-SM-TC-KM-NA) were segregated under R-plasmid control.

6) Fourteen PTs of man, 21 PTs of bovine, and both common 8 PTs (PT-1, 8, 14, 21, 32, 34, 39 & 54) were detected.

Summary : DNA (PFGE), ST, O & H, PT and MDR types are all useful as genetic or etiologic markers to follow-up mutational steps in diffuse or large-scaled outbreaks.

3) Comparison of Immunopathological Findings of Amyloid Degeneration, etc. between Alzheimer Disease and CJD & Prion Disease in Human and Animals

Hideki MIYAMOTO

9th International Conference : Peace through Mind / Brain Science, Jan. 30-Feb. 1, 2002 (Hamamatsu)

The clarification of the pathogenesis in Alzheimer disease (AD) is a big, urgent research theme, because AD and senile dementia have much increased in the advanced elderly society in Japan as well as European countries. On the other hand, a new variant type of Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) and bovine spongiform encephalopathy (BSE) have become recent, big social topics in Japan as well as Europe in 1996-2001.

(1) Alzheimer disease (AD) showed 3 major histopathological changes of senile plaques (SP), neurofibrillary tangles (NFT) and microangiopathy in the aged brain tissue (cerebral cortex & hippocampus) with H-E, Congo-Red (C-R) and silver stains by light microscopy (LM).

(2) The SP cores were Congo-philic amyloid fibrils of intermediate filaments (100A), while the SP periphery and NFTs were argyrophilic filaments by electron microscopy (TEM) after silver strains.

(3) The amyloid fibrils (ASb) of the SP cores never reacted with anti- μ (IgM), anti- γ (IgG), anti-protein AA, anti-prealbumin (PA) or anti-prion sera and silver grains. The ASb fibrils are unique to the aged brain and quite distinct from the SP periphery

and NFTs of AD, and CJD prions.

(4) On the other hand, a sporadic type of CJD and sheep scrapie showed spongiform changes and homogeneous, vacuole structures in the brain tissues in LM & TEM, while CJD prions showed amyloid protein nature with C-R & immunoenzyme (PAP) strains and TEM.

(5) Specific anti-prion antibodies reacted with CJD prions (Kuru plaques) and murine prions inoculated into the brain from scrapie sheep, while they never reacted with SP cores of AD.

Therefore, AD pathogenesis is quite different from those of prion diseases including human CJD & Kuru, and BSE, scrapie and experimental mouse model.

(6) Amyloid β -fibrils are Congo-philic insoluble protein showing birefringence on polarization, and intermediate filaments (100A) of anti-parallel, twisted, β -pleated sheet conformation. Amyloid proteins are internationally classified into 6 main types: AL (Ig VL part), AA & AF (PA) in systemic amyloidosis, and ASb/Asc (Ig?, C?, PA?, others), AE (prohormones) & AD (keratin?) in localized amyloidosis. Taken together, basic and medical, comprehensive and cooperative studies of AD, CJD and prion diseases (BSE, scrapie, etc.) should be done at gene and protein levels, since ASb & prion proteins are controlled by AD genes, closely linked to Down syndrome, on Chromosome 20.

微生物部

1) 静岡県におけるヒトおよび牛由来腸管出血性大腸菌 O157 のフェージ型

増田 高志, 三輪 憲永, 寺井 克哉

川村 朝子, 秋山 眞人, 光崎 研一

日本獣医師会雑誌 54 (6) : 489~494 (2001)

1987~1999年に静岡県内で腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157が190株(ヒト由来140株, 牛由来50株)検出された。このうち184株(96.8%)がフェージ型別され, ヒト由来株は17の型(1, 2, 4, 8, 14, 21, 23, 24, 28, 31, 32, 33, 34, 37, 45, 54および61型), 牛由来株は11の型(1, 8, 14, 23, 32, 33, 34, 39, 54, 63および74型)に分けられた。おもなフェージ型はヒト由来株が2, 4, 21および32型, 牛由来株が14, 23, 34および54型であり, 8のフェージ型(1, 8, 14, 23, 32, 33, 34および54型)が両由来株に共通していた。また, 集団感染例のフェージ型は21型と

34 型, 家族内感染例のおもなファージ型は 2, 32 型などであり, 同一の集団感染例や家族内感染例からの検出株はすべて同一のファージ型であった。以上の成績からファージ型別は疫学マーカーの一つとして有用であることが示唆された。

2) 静岡県におけるアマンタジン耐性 A 型インフルエンザウイルスの検出状況

佐原 啓二, 杉枝 正明, 長岡 宏美

秋山 眞人, 上野山裕巳, 中島 節子

感染症学雑誌 75 (7): 576~577 (2001)

1999 年 10 月~2000 年 3 月に静岡県内の感染症発生動向調査の定点医療機関を受診した散発患者および学校集団かぜ患者から分離された A ソ連型 29 株, A 香港型 33 株について, アマンタジン存在下および非存在下における TCID₅₀ を比較することにより薬剤耐性を調べた。その結果, 62 株中 2 株 (3.2%) がアマンタジン耐性株と判定された。M2 蛋白質膜通過部位のアミノ酸解析では 1 株は 26 番目, 他の 1 株は 30 番目に変異しており, 国内にも 26 番目のアミノ酸変異のある株の存在が確認された。今回, 耐性株の検出された 2 症例は, いずれも A 病院に入院中の乳幼児でアマンタジンが処方されていた。アマンタジン耐性株の出現については監視体制を強化し今後の動向に注目する必要があると考えられる。

3) 食肉等から分離された腸管出血性大腸菌 O157 およびサルモネラの薬剤耐性

三輪 憲永, 秋山 眞人, 久島 昌平

福馬 幸哉, 重茂 克彦, 品川 邦汎

獣医畜産新報 54 (9), 749-751 (2001)

腸管出血性大腸菌 O157 (STEC O157) およびサルモネラ感染症の感染源として, 食肉および畜産製品, あるいは家畜の糞便による二次汚染食品等が重要視されている。これらの食品における, 各種薬剤に対する耐性菌の検出状況を把握することは, 人感染者の医療および家畜・家畜生産衛生の立場からきわめて重要である。

今回, 牛肉等から分離された STEC O157 および鶏肉等から分離されたサルモネラの薬剤耐性状況を調査した。調査の結果, STEC O157 は SM および OTC に対して耐性を示す株が多くみられた。また, サルモネラは SM, KM および OTC に対する耐性株が多かった。また, STEC O157 は 5 剤に耐性を示すものが 1 株みられたが, 全体的には多剤耐性株の検出率は低く, 232 株 (74.8%) がすべての薬剤に対して感受性を示した。

一方, サルモネラは 5 剤に対して耐性を示すものが

5 株, 4 剤耐性 20 株, 3 剤耐性 84 株と多剤耐性を示すものが多く, 感受性株は 57 株 (19.9%) のみであった。さらに, 牛由来 STEC O157 および鶏由来サルモネラの薬剤耐性株検出状況は人由来株のそれと類似点があり, また人の治療薬として多く用いられている薬剤に対して耐性を示すものも見られ, 今後とも薬剤耐性株の出現状況について監視する必要があると考えられる。

4) Survival and growth of enterotoxin-positive and enterotoxin-negative *Clostridium perfringens* in laboratory media

Norinaga Miwa, Takashi Masuda,

Asako Kawamura, Katsuya Terai

and Masato Akiyama

International J. Food Microbiol. 72: 233~238 (2002)

The survival and growth characteristics of enterotoxin-positive and enterotoxin-negative *Clostridium perfringens* were compared. Spores of *C. perfringens* were heated and incubated in laboratory media to simulate the cooking and inadequate storage of cooked food.

In our experiment, enterotoxin-positive and enterotoxin-negative spores were heated and incubated individually and it was found that spores of enterotoxin-positive strains were more heat-resistant than spores of the enterotoxin-negative strains.

In another experiment, cocktails of enterotoxin-positive and enterotoxin-negative spores were heated and incubated. At the time of inoculation, the ratio of enterotoxin-positive spores to enterotoxin-negative spores was about 1:100. In the case of high-temperature heat treatment, the number of enterotoxin-negative spores decreased to below that of enterotoxin-positive spores after heating, and enterotoxin-positive strains grew to high levels during incubation. In the case of low-temperature heat treatment, the number of enterotoxin-negative spores remained almost unchanged after heating and enterotoxin-positive strains did not grow to high CFU levels during incubation.

5) 免疫磁気ビーズ法および酵素基質培地を用いた TDH 産生性腸炎ビブリオ O3:K6 の自然汚染貝からの

検出

工藤由紀子, 杉山 寛治, 仁科 徳啓
斎藤 章暢, 中川 弘, 市原 智
小沼 博隆, 長谷川純子, 熊谷 進

感染症学雑誌 75 (11) : 955~960 (2001)

日本において主要な食中毒の原因である腸炎ビブリオの検出を, 1999年までにTDH産生性腸炎ビブリオ血清型 O3:K6 が海水またはアサリから分離されたことのある海域のアサリについて行った. 方法は2%食塩加 TSB での6時間と食塩ポリミキシンブイオンでの18時間の2段階増菌培養を行った.

この培養液1mlを用いて腸炎ビブリオK6抗原に対する免疫磁気ビーズ法を行い, 特に血清型 O3:K6 の効率的分離を行った. また, 従来の TCBS 培地に加え, 腸炎ビブリオ特異的分離用に開発された酵素基質培地を用いた. この結果, TDH産生性腸炎ビブリオ O3:K6 の自然汚染貝からの分離は66ロット中3ロット(4.5%)で陽性であった. また, 分離した腸炎ビブリオの4,265コロニー中6コロニーがTDH産生性 O3:K6(0.14%)であった.

6) レジオネラ感染症調査および浴槽水のレジオネラ防除対策

杉山 寛治, 西尾 智裕, 大畑 克彦
郷田 淑明, 秋山 真人, 張 凡非
宮本 秀樹

大同生命厚生事業団「第7回地域保健福祉研究助成報告書

レジオネラ感染症の発生実態を調査するとともに, 生活環境水(浴槽水, 冷却塔水など)のレジオネラ汚染調査を実施した. さらに, 生活環境水からのレジオネラ除菌法を検討し, 特に循環濾過式浴槽水のレジオネラ防除対策の確立を目指した. 実機を用いた検査で, 濾過装置内の濾過材の過熱殺菌(1日1回, 66℃, 10分間, 逆洗浄時に実施)と塩素殺菌(0.3ppm 常時注入)が効果的であることを実証した.

医薬品生活部

1) 医薬品収去検査における試験方法の問題点

堀池あずさ, 馬淵 博, 小和田和宏
山口善三郎, 永野 隆夫

防菌防黴学会誌, Vol. 29, No. 8, 525~531 (2001)

近年, 分析法バリデーションへの関心が高まる中で, 地方衛生研究所で実施している医薬品等収去検査においても, 「室内(間)再現精度」や「頑健性」といった観点

から試験方法の検討を行うことにより, 医薬品等に対する品質評価の意義が高まるものと思われる. 今回, 試験結果にばらつきを生じたり, 良好な再現性が得られなかった収去検査事例について, その原因を考察するため, 試験方法の変動要因という点から検討を行った. その結果, 承認書等に詳細な情報が記載されていないことによる「試験者」の解釈や手法の違い, また「装置」や「試験日」による差が試験結果にばらつきを生じる原因になったことが考えられた. このような品質を評価する上で大きな影響を及ぼす試験条件については, 分析法の開発時に「頑健性」として十分検討するとともに, 各試験室において, SOP等に明確に規定し, 「室内再現精度」をしっかり把握することが重要である.

環境科学部

1) Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from waste paper recycling plants

Chemosphere, 44, 973-979 (2001)

Hitoshi Fukazawa, Kentaro Hoshino,
Tatsushi Shiozawa, Hidetsuru Matsushita
and Yoshiyasu Terao

Chlorinated derivatives of bisphenol A were detected in the final effluents of eight paper manufacturing plants in Shizuoka, Japan, where thermal paper and/or other printed paper is used as the raw material. Their amounts were determined by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) after treatment with N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, and ranged from traces to 2.0 μg/l. They are likely produced by chlorination of bisphenol A, which was released into the effluents from the pulping process of wastepaper, during or after bleaching with chlorine.

2) Identification of co-mutagenic chlorinated harmans in final effluent from a sewage treatment plant

Mutation Research, 491, 65-70 (2001)

Hitoshi Fukazawa, Hidetsuru Matsushita
and Yoshiyasu Terao

Harman (1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole) reacted readily with sodium hypochlorite in an aqueous medium to give the mono-chlorinated derivatives, which reportedly have greater co-mutagenic activity than

harman in the presence of *o*-toluidine toward *Salmonella typhimurium* TA98 with S9 mix. Mono-chlorinated harmans were detected by concentration using blue rayon (BR) and GC/MS analysis in the final effluent from a sewage treatment plant in Shizuoka, Japan. The amounts adsorbed for 24h were 1-45 ng/gBR for mono-chlorinated harman and 110-730 ng/gBR for harman.

3) 富士市における有害大気汚染物質濃度の調査結果について (1)

—各種有害化学物質の汚染状況、相関性および大気常時監視局の地域代表性についての検討—

房家 正博, 雨谷 敬史, 大浦 健
杉山 智彦, 杉崎 充, 松下 秀鶴

環境化学 Vol.11, No.3, pp.525-537 (2001)

1999年8月と12月に富士市内を1kmメッシュに区分することにより、35地点で芳香族炭化水素、多環芳香族炭化水素、アルデヒド類、揮発性有機ハロゲン化合物などの有害大気汚染物質73種の濃度を一斉に調査した。ベンゼンやホルムアルデヒド濃度は主要幹線道路周辺に高濃度な地点があり、これらの物質による汚染と自動車排ガスとの関連が示唆された。多種類の多環芳香族炭化水素が特定の地点で高くなっている傾向がみられ、これらの地点での汚染には発生量の多い特定の発生源からの影響が考えられた。また、クロロホルム、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンなどの有機ハロゲン化合物は、特定の地点で高い値を示しており、付近に発生源が存在する可能性が示唆された。さらに、35地点の濃度変化をもとに、物質相互の単相関を求めた結果では、芳香族炭化水素、多環芳香族炭化水素及びアルデヒド類はそれぞれの物質群に属する化合物どうしの相関は高く、特に冬季に高い相関係数を示した。

4) 富士市における有害大気汚染物質濃度の調査結果について (2)

—各種有害化学物質の濃度分布図の作成と汚染原因の推定—

房家 正博, 篠原英二郎, 雨谷 敬史
大浦 健, 杉山 智彦, 杉崎 充
村上 篤司, 松下 秀鶴

環境化学 Vol.11, No.3, pp.539-547 (2001)

富士市内の有害大気汚染物質調査結果の中から20物質を選定し、その測定値と補間計算結果から各物質の濃度分布図を作成した。そして、この濃度分布図の高濃度区域と発生源との関連を調べた。その結果、

1) ベンゼンやホルムアルデヒドの濃度は主要幹線道路沿いに高いことが認められた。また、トルエンやアセトアルデヒドもベンゼンやホルムアルデヒドと同様の分布を示した。

2) PAHsの濃度は特定の工場から発生するばいじんと関連が考えられた。

3) トリクロロエチレンやテトラクロロエチレンの高濃度区域とそれらの使用事業場との関連が認められた。クロロホルムもその使用事業場付近で高濃度となったが、工場での使用量は少なく、別の要因によるものと考えられた。

5) An Analytical Method for Benzene and Its Alkyl Derivatives by using Passive Sampler and Its Application to a Survey on Indoor/Outdoor Pollution in Shimizu City, Japan

Exhibition, Paper No.1119, Orland, FL, USA,
24-28 June (2001)

Takashi AMAGAI, Takeshi OHURA, Olansandan,
Masahiro FUSAYA and Hidetsuru MATSUSHITA

We developed a method utilizing a passive sampler for analysis of benzene and its alkyl derivatives. The method consists of collection by a passive sampler, extraction with carbon disulfide by mechanical shaking, and analysis with GC/MS. The passive sampler is a porous polytetrafluoroethylene tube uniformly packed with activated charcoal. For 24-h sampling, the amount of benzene collected was so small that benzene present as an impurity in the carbon disulfide (100 ppb) interfered with the analysis of the collected benzene. When the benzene in the carbon disulfide was reduced by distillation (final concentration < 30 ppb), this method could be successfully used to measure benzene in the environmental air. The method was applied to a field survey on indoor/outdoor pollution by benzene and its derivatives in Shimizu City, Japan. Sampling was performed in 25 houses in the summer of 2000. Benzene and 13 alkyl benzene derivatives were detected by 24-h sampling. Air concentrations were calculated from equations derived from the results of simultaneous measurements by active and passive samplers. Concentrations of these compounds, except benzene and toluene, were higher indoors than outdoors.

6) An Analytical Method for Volatile Organohalogen

Compounds Using a Passive Sampler and Its Application to a Survey on Indoor/Outdoor Pollution in Fuji and Shimizu Cities, Japan

Exhibition, Paper No. 1120, Orland, FL, USA, 24-28 June (2001)

Takeshi Ohura, Mitsuru Sugisaki, Takashi Amagai, Masahiro Fusaya and Hidetsuru Matsushita

An analytical method for quantifying volatile organohalogen compounds (VOHCs) using a passive sampler was employed to survey indoor and outdoor pollution in Fuji and Shimizu Cities, Japan. The method consisted of collection of the compounds using a passive sampler, extraction with carbon disulfide by mechanical shaking, and analysis by GC/ECD. The passive sampler was a porous polytetrafluoroethylene tube uniformly packed with activated charcoal. Sampling was performed at 22 houses in Fuji City during summer, 1999, and 25 houses in Shimizu City during summer, 2000. Air concentrations were calculated using equations derived from the results of simultaneous measurements by active and passive samplers. Among VOHCs, indoor concentrations of carbon tetrachloride, and trichloroethylene were almost the same as outdoor concentrations. Trihalomethane concentrations were elevated where chlorinated tap water was used, with the highest concentrations in bathrooms and the next highest in kitchens. In some houses in Fuji City, 1,1,1-trichloroethane concentrations were elevated, and a particular type of wallpaper was found to be an emission source. Tetrachloroethylene concentrations were elevated in rooms containing dry-cleaned clothes. Concentrations of p-dichlorobenzene, a chemical found in insect repellants, varied considerably from room to room.

大気・水質部

1) 三宅島噴火と静岡県下の大気汚染

— 常時監視局がとらえた火山性ガスの影響 —

篠原英二郎、村上篤司

環境と測定技術 VOL.28、No.12 : 31

36(2001)

静岡県内に設置された大気常時監視局の1時間値は、平成12年8月25日以降、通常時をはるかに上回る高濃度

の二酸化硫黄(SO₂)や浮遊粒子状物質(SPM)をとらえていた。これは8月中旬から活発化した三宅島雄山の噴火活動による火山性ガスの影響と考えられた。そこで、平成12年度の静岡県大気常時監視結果をまとめるとともに、この間に高濃度を示した8月25、28日と9月13から16日について時系列で濃度補間計算を行い、コンター図を作成し汚染の広がりを推定した。

また、静岡県上空と三宅島上空の高層風の風向・風速データから汚染物質の到達時間の推定を試みた。

2) 水環境の浄化・保全と水質浄化の評価の手法

および下水処理に関する研究(1)

渡辺 稔

水処理技術 Vol.43.No2, Vol.44.No3

水処理技術 43(2) : 19~27(2002)

水環境の浄化・保全と水質浄化の評価の手法

および下水処理に関する研究(2)

渡辺 稔

水処理技術 43(3) : 3~8 (2002)

水環境の浄化、保全を目的として水質浄化の評価の手法と下水処理の研究を行った。本研究において、水のBOD/COD比に関して回分式活性汚泥処理実験装置と人工河道実験装置を使用して実験室において実験的に検討した。さらに、水のBOD/COD比に関して河川と下水処理場のフィールドにおいて検討を行った。

河川等の水環境においては生物学的自然浄化作用により有機物の無機化、水質の安定化が行われており、水質の安定の程度を示すBOD/COD比や生物学的浄化作用による生物学的分解性有機物の除去の程度を示すC-BOD/COD比を用いる水質浄化の評価の手法は静岡県の浄化センターで実際に適用したところ有効であった。その結果、下水処理への糸状性細菌の浄化能の有効活用、下水処理の指針等の水環境の浄化、保全の上で有用な知見が得られた。

学会・研究会の報告

管理部

- 1) 食品検査施設における内部精度管理の実施状況と
問題点

三輪憲永, 浅岡龍郎

第 38 回静岡県公衆衛生研究会 14.2.14(静岡)

- 2) インフルエンザの発生動向分析と血清疫学分析

宮本秀樹

第 47 回東海公衆衛生学会学術大会

2001. 7. 28(名古屋)

- 3) Molecular Epidemiological Analysis of STEC

(Shiga Toxin-Producing *E. coli*) Infection in Japan

Hideki MIYAMOTO

8th International Mutagens (8 ICEM)

2001. 10. 21~10. 26 (Shizuoka)

- 4) インフルエンザの発生動向分析と血清疫学分析

宮本秀樹

第 60 回日本公衆衛生学会総会

2001. 10. 31~11. 2(香川)

- 5) Comparison of Immunopathological Findings of
Amyloid Degeneration, etc. between Alzheimer
Disease and CJD & Prion Diseases in Human and
Animals

Hideki MIYAMOTO

8th International Conference : Peace through
Mind/Brain Science

2002. 1. 30~2. 1(Hamamatsu)

- 6) 静岡県と全国における STEC 感染症等の最近の発生動
向

宮本秀樹

第 38 回静岡県公衆衛生研究会

2002. 2. 14(静岡)

微生物部

- 1) 静岡県におけるアマンタジン耐性 A 型インフルエン
ザウイルス株の検出状況

佐原啓二, 杉枝正明, 長岡宏美

秋山真人, 中島節子

第 42 回日本臨床ウイルス学会 2001. 6. 7
(名古屋)

- 2) 牛乳中の黄色ブドウ球菌エンテロトキシン検出法お
よび産生能の検討

有田世乃, 川森文彦, 増田高志

秋山真人

平成 13 年度日本獣医公衆衛生学会(中部)

2001. 8. 26(長野)

- 3) HIV スクリーニング検査法として HIV DUO を
用いた場合の検査成績

稲吉 恵, 佐原啓二, 杉枝正明

秋山真人

第 16 回地研関東甲信静支部ウイルス研究会

2001. 10. 11(長野)

- 4) 静岡県内の小学校で集団発生した A 群ロタウイルス
下痢症について

杉枝正明, 佐原啓二, 稲吉 恵

秋山真人

第 16 回地研関東甲信静支部ウイルス研究会

2001. 10. 12

- 5) 野菜汚染病原菌の野菜洗い水等における増殖態度

増田高志, 秋山真人, 金子誠二

斎藤章暢, 正木広幸, 後藤公吉

仁科徳啓, 宮原美智子, 小沼博隆

第 22 回日本食品微生物学会 2001. 10. 18(大阪)

- 6) 患者, 家畜および鶏肉から分離されたカンピロバク
ターの薬剤感受性

川森文彦, 秋山真人, 久島昌平

重茂克彦, 品川邦汎

第 22 回日本食品微生物学会 2001. 10. 19

(大阪)

- 7) ほうれん草でのサルモネラの増殖態度

宮原美智子, 小沼博隆, 増田高志

金子誠二, 斎藤章暢, 正木広幸

後藤公吉, 仁科徳啓

第 22 回日本食品微生物学会 2001. 10. 19

(大阪)

- 8) 鶏肉のカンピロバクターの汚染菌数と血清型
後藤公吉, 柴折浩幸, 小野一晃
川森文彦, 齋藤志保子, 三澤尚明
品川邦汎
第22回日本食品微生物学会 2001. 10. 19
(大阪)
- 9) 牛乳(加工乳を含む)からのブドウ球菌エンテロトキシンTCA抽出・濃縮方法の検討
山本茂貴, 楠美敬子, 重茂克彦
浅尾 努, 五十嵐友二, 伊藤嘉典
牛山正志, 小笠原純, 杉山純一
尾上洋一, 花形吾郎, 増田高志
山縣 尚, 山口敬治, 品川邦汎
第22回日本食品微生物学会 2001. 10. 19
(大阪)
- 10) 魚介類, 海水からの *Vibrio vulnificus* の検出
杉山寛治, 西尾智裕, 大畑克彦
郷田淑明
第22回日本食品微生物学会 2001. 10. 18
(大阪)
- 11) 静岡県内で2000年非流行期と次期流行期に分離されたB型インフルエンザの疫学的解析
佐原啓二, 杉枝正明, 稲吉 恵
秋山真人, 中島節子
第50回日本感染症学会東日本地方総会
2001. 11. 1 (東京)
- 12) ブタから検出した Norwalk-like viruses 遺伝子のORF1 3' 末端及びORF2の塩基配列の解析
杉枝正明, 中島節子
- 13) 野菜汚染病原菌の野菜洗い水等における増殖態度
増田高志, 有田世乃, 川森文彦
秋山真人, 金子誠二, 齋藤章暢
正木広幸, 後藤公吉, 仁科徳啓
宮原美智子, 小沼博隆
第14回地研全国協議会関東甲信静支部細菌部会
2002. 2. 14 (横浜)
- 14) 牛乳の黄色ブドウ球菌汚染状況およびTCA法による黄色ブドウ球菌エンテロトキシン抽出法の検討
有田世乃, 王 曉萌, 川森文彦
増田高志, 秋山真人
- 第38回静岡県公衆衛生研究会 2002. 2. 14
(静岡)
- 15) ヒト, イヌ, ネコおよび野鳥におけるカンピロバクター保有状況
川森文彦, 有田世乃, 王 曉萌
増田高志, 秋山真人
第38回静岡県公衆衛生研究会 2002. 2. 14
(静岡)
- 16) 食中毒発生事例における迅速な対応事例
花枝 清, 山内久世, 中村康子
向後勝成, 長谷川 久, 袴田達次
花村悦男, 中川美乃里, 米倉克昌
寺井克哉, 長岡宏美, 遠藤 寿
清水五郎, 松林澄勇, 有田世乃
川森文彦, 増田高志, 秋山真人
第38回静岡県公衆衛生研究会 2002. 2. 14
(静岡)
- 17) ブタのインフルエンザウイルス抗体調査における血清処理の比較検討
池ヶ谷朝香, 中澤美歌乃, 林 道明
加藤秀夫, 竹内常雄, 佐原啓二
第38回静岡県公衆衛生研究会 2002. 2. 14
(静岡)
- 18) 静岡県内に飛来したカモ類のインフルエンザウイルス保有状況
佐原啓二, 稲吉 恵, 杉枝正明
秋山真人
第38回静岡県公衆衛生研究会 2002. 2. 14
(静岡)
- 19) HCV検査の実施状況について
—HIV DUOを用いた場合の検査成績—
稲吉 恵, 佐原啓二, 杉枝正明, 秋山真人
第38回静岡県公衆衛生研究会 2002. 2. 14
(静岡)
- 20) HIVスクリーニング検査法の検討
—HIV DUOを用いた場合の検査成績—
稲吉 恵, 佐原啓二, 杉枝正明, 秋山真人
第38回静岡県公衆衛生研究会 2002. 2. 14
(静岡)

21) 食品や環境からのピブリオ・バルニフィカス及び耐熱性溶血毒 (TDH) 産生腸炎ピブリオの検出状況について

大畑克彦, 西尾智裕, 杉山寛治
郷田淑明, 秋山真人

第 38 回静岡県公衆衛生研究会 2002. 2. 14
(静岡)

22) ピブリオ・バルニフィカスと腸炎ピブリオの食品と環境からの検出状況

西尾智裕, 大畑克彦, 杉山寛治
郷田淑明, 秋山真人

第 14 回関東甲信静支部細菌研究部会
2002. 2. 15 (横浜)

23) レジオネラ症の散発および集団感染事例と検査

杉山寛治, 西尾智裕, 大畑克彦
郷田淑明, 秋山真人

第 17 回日本環境感染学会 2002. 2. 15 (大阪)

医薬品生活部

1) 医薬品等の収去検査における業務管理

—外部査察とヒヤリハット事例—

小和田和宏, 堀池あずさ, 植田敦子
山口善三郎, 浮島美之, 久保田昭彦
藤原厚子

第 38 回全国薬事指導協議会総会 2001.9. (東京)

2) 油処理バック

菅野尚子, 影山知子, 渡辺武明

第 31 回関東甲信越静商品テスト機関ブロック連絡会議 2001.10. (横浜)

3) 医薬品等の試験検査における問題事例

小和田和宏, 堀池あずさ, 馬淵 博
山口善三郎, 永野隆夫, 久保田昭彦

第 34 回東海薬剤師学術大会 2001.11. (岐阜)

4) 静岡県残留農薬分析法検討会における精度管理に関する取組み

—農薬標準溶液を中心として—

増田敦子, 高橋 真, 坂根弓子
山口善三郎, 永野隆夫, 阿部勇治
杉山直子, 前林公男, 田中申明
伊東聡子, 木俣智香子, 進士一男

小杉国宏

第 34 回東海薬剤師学術大会 2001.11. (岐阜)

5) 医薬品等の収去検査における問題点

山口善三郎, 植田敦子, 堀池あずさ
小和田和宏, 浮島美之, 久保田昭彦

第 38 回全国衛生化学技術協議会年会
2001.11. (千葉)

6) 静岡県における地方衛生研究所としての GMP への関わり

小和田和宏, 植田敦子, 堀池あずさ
山口善三郎, 浮島美之, 久保田昭彦

第 38 回全国衛生化学技術協議会年会
2001.11. (千葉)

7) 医薬品等製造所を対象とした品質管理実習指導について

堀池あずさ, 植田敦子, 小和田和宏
山口善三郎, 浮島美之, 久保田昭彦

第 38 回全国衛生化学技術協議会年会
2001.11. (千葉)

8) 農産食品中の残留農薬スクリーニング法の検討 (第 3 報)

増田敦子, 山下敬子, 高橋 真
坂根弓子, 山口善三郎, 浮島美之
久保田昭彦

第 38 回全国衛生化学技術協議会年会
2001.11. (千葉)

9) 医薬品等の試験方法設定上の問題点について

堀池あずさ

平成 13 年度第 2 回医薬品等製造業者品質管理講習会 2002.2. (静岡)

10) 静岡県残留農薬分析法検討会における精度管理に関する取組み

山下敬子, 増田敦子, 高橋 真
山口善三郎, 浮島美之, 杉山直子
中野昌枝, 前林公男, 伊東聡子
木俣智香子, 風間広弥, 進士一男
小杉国宏

第 38 回静岡県公衆衛生研究会 2002.2. (静岡)

11) 食品分野における固相マイクロ抽出 (SPME) 法の

応用について

高橋 真, 増田教子, 山下敬子

山口善三郎, 浮島美之

第 38 回静岡県公衆衛生研究会 2002.2.(静岡)

12) 院内製剤の品質確保に関する研究

植田敦子, 堀池あずさ, 小和田和宏

山口善三郎, 藤原厚子, 浮島美之

宮本憲吾, 鍋田いづみ, 浅倉侯子

見崎芳枝

第 38 回静岡県公衆衛生研究会 2002.2.(静岡)

13) 医薬品溶出試験規格設定時の問題事例

小和田和宏, 堀池あずさ, 植田敦子

山口善三郎, 藤原厚子, 浮島美之

馬淵 博

第 38 回静岡県公衆衛生研究会 2002.2.(静岡)

14) 医薬品等の試験法設定上の問題点について

堀池あずさ, 植田敦子, 小和田和宏

山口善三郎, 藤原厚子, 浮島美之

第 38 回静岡県公衆衛生研究会 2002.2.(静岡)

15) 医薬品溶出試験の問題点の把握とその対応(第 3 報)

小和田和宏, 堀池あずさ, 植田敦子

山口善三郎, 藤原厚子, 浮島美之

馬淵 博

第 38 回静岡県公衆衛生研究会 2002.2.(静岡)

16) 医薬品製造所における分析法バリデーションの実施状況について

堀池あずさ, 植田敦子, 小和田和宏

山口善三郎, 浮島美之, 西澤雅彦

若松雄二

第 38 回静岡県公衆衛生研究会 2002.2.(静岡)

17) 医薬品等の試験法設定上の問題点について

植田敦子, 堀池あずさ, 小和田和宏

山口善三郎, 浮島美之

平成 13 年度地方衛生研究所全国協議会

関東甲信静支部 理化学研究部会

2002.2.(川崎)

18) ハチミツから検出されたクロルテトラサイクリンについて

高橋 真, 増田教子, 山下敬子

山口善三郎, 浮島美之

平成 13 年度地方衛生研究所全国協議会

関東甲信静支部 理化学研究部会

2002.2.(川崎市)

環境科学部

1) 静岡県清水市における大気汚染実態調査結果

(その 3) アルデヒド類と有機ハロゲン化合物

房家正博, 篠原英二郎, 雨谷敬史

大浦 健, 杉山 智彦, 杉崎 充

村上篤 司, 松下秀鶴

第 10 回環境化学討論会 2001.6 (松山)

2) 清水市における一般家庭の室内外空気中のアルデヒド及び有機ハロゲン化合物濃度調査(2000 年夏季)

房家正博, 雨谷敬史, 大浦 健

杉山智彦, 杉崎 充, 松下秀鶴

第 42 回大気環境学会 2001.10 (北九州)

3) においセンサーの適応性

房家正博

第 42 回大気環境学会(臭気環境分科会)

2001.10 (北九州)

4) ビスフェノール A の塩素置換体の生成とそのエストロゲン活性

深澤 均, 渡邊雅之

第 17 回全国環境研究所交流シンポジウム

2002.2.(つくば)

5) 塩素化アルキルフェノール類の内分泌かく乱作用 - 酵母 Two hybrid 法によるエストロゲン試験による測定 -

渡邊雅之

平成 13 年度東海地区公害試験研究機関会議化学

物質分科会 2002.01(名古屋)

6) 静岡県清水市における大気汚染実態調査結果(その

1) 多環芳香族炭化水素

大浦 健, 雨谷敬史, 杉山智彦

房家正博, 村上篤司, 松下秀鶴

第 10 回環境化学討論会 2001.06 (松山市)

7) 静岡県清水市における大気汚染実態調査結果(その

2) ベンゼンおよびその誘導体

雨谷敬史, 大浦 健, 杉山智彦
房家正博, 村上篤司, 松下秀鶴

第 10 回環境化学討論会 2001.06 (松山市)

渡邊雅之

平成 13 年度東海地区公害試験研究機関会議化学
物質分科会 2002.01 (名古屋市)

- 8) 清水市一般家庭内におけるベンゼンおよびその誘導
体とアルデヒド濃度調査 (夏季・冬季)

雨谷敬史, 烏蘭参丹, チャンティン, 大
浦 健, 房家正博, 松下秀鶴

平成 13 年度室内環境学会 2001.12 (東京都)

- 9) 清水市における一般家庭内における多環芳香族炭化
水素濃度調査 (夏季・冬季)

大浦 健, 安波理恵, 杉山智彦,
雨谷敬史, 房家正博, 松下秀鶴

平成 13 年度室内環境学会 2001.12 (東京都)

- 10) 清水市一般家庭内における有機リン化合物及び有機
ハロゲン化合物濃度調査 (夏季・冬季)

千賀芳紀, 雨谷敬史, 大浦 健
杉崎 充, 房家正博, 松下秀鶴

平成 13 年度室内環境学会 2001.12 (東京都)

- 11) Identification of comutagenic chlorinated harmans
in final effluent from a sewage treatment plant

8 th International Conference on Environmental
Mutagens (Shizuoka) Oct.21, 2001

Tatsushi Shiozawa, Hitoshi Fukazawa and
Yoshiyasu Terao

- 12) Bisphenol A の塩素付加によるエストロゲン活性の
増強

西川淳一, 白石不二雄, 深澤 均
渡邊雅之, 小宇田智子, 寺尾良保
白石寛明, 森田昌敏

第 4 回環境ホルモン学会 2001.12. (つくば市)

- 13) ビスフェノールAの塩素置換体の生成とそのエスト
ロゲン活性

深澤 均, 渡邊雅之

第 17 回全国環境研究所交流シンポジウム
2002.2 (つくば市)

- 14) 塩素化アルキルフェノール類の内分泌かく乱作用
-酵母 Two hybrid 法によるエストロゲン試験による測
定-

大気水質部

- 1) 水温下降期における]植物プランクトンの変動とその
機構について

平井一行

東海地区環境試験研究機関会議第 51 回水質分科
会 2001.9.7 (四日市)

- 2) 三宅島噴火に伴う静岡県下の大気汚染実態

篠原英二郎, 村上篤志, 松下秀鶴

第 42 回大気環境学会年会 2001.1.10.6 (北九州)

- 3) 静岡県における有害大気汚染物質調査

太田良和弘

第 42 回大気環境学会年会 2001.10.6 (北九州)

- 4) 静岡県の臭気環境について

永田嘉七

第 28 回環境保全・公害防止研究発表会
2001.11.1 (仙台)

- 5) 静岡県における臭気指数規制導入の経過

永田嘉七

大気環境学会関東支部悪臭部会 2002.3.15 (東京)

東部支所

- 1) Theoretical Approach to Annoyance Response
of Human induced by Noise

Shoji Takeshita

表 彰 等

微生物部

- 1) 大同生命地域保健福祉研究助成
「各種食品の黄色ブドウ球菌エンテロトキシン汚染実態とその検出法に関する検討」
平成13年10月24日
有田世乃, 川森文彦, 増田高志
佐々裕一郎, 秋山真人
- 2) 静岡県公衆衛生研究会 会長表彰 (優秀演題)
「食品や環境からのピブリオ・バルニフィカス及び耐熱性溶血毒 (TDH) 産生腸炎ピブリオの検出状況について」
平成14年2月14日
大畑克彦, 西尾智裕, 杉山寛治
郷田淑明, 秋山真人
- 3) 静岡県公衆衛生研究会 会長表彰 (優秀演題)
「HCV 検査の検査状況について」
—HCV 抗体および RNA 検査成績—
平成14年2月14日
稲吉 恵, 佐原啓二, 杉枝正明
秋山真人

医薬品生活部

- 1) 地方衛生研究所全国協議会 関東甲信静支部長表彰
平成13年6月29日
小和田和宏
- 2) 静岡県公衆衛生研究会 会長表彰 (優秀演題)
「医薬品製造所における分析法バリデーション実施状況について」
平成14年2月14日
堀池あずさ, 植田敦子, 小和田和宏,
山口善三郎, 浮島美之

学 位 取 得

微生物部

- 1) 博士 (獣医学) 麻布大学
「腸管出血性大腸菌 O157 : H7 (—) の疫学的解析に関する基礎的研究」
平成13年9月30日
増田 高志

編集委員

平林 勘吾 (管理部)
秋山 真人 (微生物部)
浮島 美之 (医薬品生活部)
古屋 佳宏 (環境科学部)
前嶋 孝明 (大気・水質部)
竹下 昭二 (東部支所)
志村 修 (西部支所)

静岡県環境衛生科学研究所報告
(第44号)

平成14年 8月30日

編集発行 静岡県環境衛生科学研究所
静岡市北安東4丁目27-2
電話 (054) 245-0201 (代)

E-mail アドレス

eikanctr@shizuokanet.ne.jp/eikanctr

インターネットホームページ

<http://www2.shizuokanet.ne.jp/eikanctr>

印刷所 (有) 東海美術社
静岡市古庄2丁目3-21
電話 (054) 263-1700(代)

