

Shizuoka-Ken Kankyō Eisei Kagaku
Kenkyūsho Hōkoku 52(2009)
ISSN 1343-246X

静岡県環境衛生科学研究所報告

平成 21 年度

Bulletin
of
Shizuoka Institute of
Environment and Hygiene

No.52 2009

静岡県環境衛生科学研究所

活力ある多彩な産業と美しい自然環境に恵まれた本県では、「富国有徳の理想郷“ふじのくに”づくり」を進めており、徳のある人材の育成と豊かさの実現を図り、必要な場合には相互に助け合いながら、“ふじのくに”の「徳のある、豊かで、自立した」地域づくりを進めております。

これらの目標を達成するため、当研究所では現在、環境関係においては、「低炭素社会」、「循環型社会」、「自然共生社会」の3つの社会づくりを、保健衛生・消費生活関係においては「感染症・食中毒の未然防止と適切な医療」、「消費者の信頼確保」、「生産から流通・消費における食の安全確保」を目標に、ブナ林衰退の原因究明、河川や湖沼の水質環境基準超過の原因究明と浄化対策、不快害虫ヤンバルトサカヤスデの生態特性と侵入起源の解明、シックハウス症候群対策、環境や食品中の化学物質調査及び検査方法の検討、細菌やウイルスの迅速検査法の開発、薬剤耐性菌の出現状況調査などを行っています。

また、大学や他の研究機関等との共同研究も積極的に行っており、ファルマバレー構想関連創薬探索研究として「創薬の構造最適化等に関する研究」、課題研究として「富士山における水循環の解明と持続可能な地下水利用に関する研究」、共同研究として「マイクロガスセンサを利用した小型 GC 分析装置の開発と適合性に関する研究」、「地球温暖化がもたらす日本沿岸域の水質変化とその適応策に関する研究」等の研究を行っています。

この他にも、県民生活に密着した問題や将来問題化しそうな課題について、県民の期待に応えるよう日ごろから調査・研究に努めており、その実施に当たっては、学識経験者からなる外部評価委員会の評価を受けながら、効果的・効率的な推進とレベルアップに努めております。

ここに、平成 21 年度の調査・研究の成果を「静岡県環境衛生科学研究所報告」No 52 としてまとめましたので、御高覧の上、御批判、御指導をいただければ幸いです。

平成 23 年 2 月

静岡県環境衛生科学研究所長 松本昭司

目 次

論 文

微生物部

- 1 静岡県東部におけるマダニの分布状況ならびにマダニ, 野ネズミからの紅斑熱群リケッチアの検出
……………川森文彦, 湊 千壽, 飯田奈都子, 山田俊博, 長岡宏美, 杉山寛治……………1
- 2 浴槽水のレジオネラ属菌の迅速検査法の検討
……………神田隆, 高橋奈緒美, 八木美弥, 西尾智裕, 杉山寛治……………7
- 3 PBMC (peripheral blood mononuclear cell : 末梢血単核球) 中の HCV-RNA (C 型肝炎ウイルス核酸) の高感度検出に関する研究
—C 型慢性肝炎患者の Serotype 別の比較—
……………山田俊博, 湊 千壽, 長岡宏美, 川森文彦, 杉山寛治
静岡県立大学 食品栄養科学部 大橋典男
静岡県立総合病院 消化器センター 国立裕之……………13

医薬食品部

- 4 日本薬局方 β -メントールの試験法の問題点
—GC 法の適用について—
……………尾藤孝弘, 山本真也, 水野くみ子, 宮本憲吾, 上野千恵, 上村慎子,
栗田浩幸, 前田有美恵, 高橋一則, 西澤雅彦……………17
- 5 日本薬局方トリヘキシフェニジル塩酸塩錠の試験法の問題点
—HPLC 法の適用について—
……………尾藤孝弘, 山本真也, 宮本憲吾, 上村慎子, 前田有美恵, 高橋一則……………21
- 6 LC/MS/MS による動物用医薬品の一斉分析法に関する検討
……………影山知子, 前田友幸, 白井美樹, 小郷沙矢香, 中島美穂, 前田有美恵,
高橋一則……………25
- 7 ビタミンA, β カロテンを含有する栄養補助食品について
……………小林千恵, 相曾いずみ, 前田有美恵, 高橋一則…………… 31
- 8 豆類及び豆類加工品に含まれるミネラルについて
……………相曾いずみ, 小林千恵, 前田有美恵, 高橋一則…………… 37

環境科学部

- 9 家庭用医薬品・化粧品中の化学物質の排出実態調査について
……………金子亜由美, 今津佳子, 久米一成, 山下晶平, 中川寛基……………43
- 10 静岡県内の化学物質の環境リスク評価に関する研究
……………中川寛基, 久米一成, 神谷貴文……………49

11 HPLC 高感度分析手法による環境中のビスフェノール A 測定の適用性について	
.....山下晶平, 今津佳子.....	57
12 静岡県内の河川の内分泌かく乱化学物質の調査	
.....今津佳子, 金子亜由美	
独立行政法人 国立環境研究所 白石不二雄, 中島大介.....	63

大気・水質部

13 AOD(水族環境診断法)による新たな水質評価方法の検討	
—第1報 改善 AOD 法の検討—	
.....清水直美, 青木一永, 内山道春, 小池明.....	71
14 AOD(水族環境診断法)による新たな水質評価方法の検討	
—第2報 河川の水質評価—	
.....内山道春, 青木一永, 濱口浩太, 清水直美, 小池明.....	77
15 富士山静岡空港における低周波音について	
.....高木千佳, 篠原英二郎.....	85
16 富士山における大気汚染物質とブナ林の生育状況の関係について	
.....中西隆之, 太田良和弘, 石井聖.....	91
17 富士山静岡空港開港に伴う大気環境影響に関する研究 (第1報)	
—大気汚染物質及び揮発性有機化合物の実態調査—	
.....太田良和弘, 中西隆之, 石井 聖.....	97

他誌に発表した論文.....	103
----------------	-----

学会・研究会の報告.....	104
----------------	-----

表彰等.....	107
----------	-----

CONTENTS

PAPERS

Department of Microbiology

- 1 Distribution of Ticks in Eastern Part of Shizuoka Prefecture and Detection of Spotted Fever Group Rickettsiae from Ticks and Wild Rodents
Fumihiko KAWAMORI, Chihiro MINATO, Natsuko IIDA, Toshihiro YAMADA,
Hiromi NAGAOKA and Kanji SUGIYAMA1
- 2 Study of rapid detection of *Legionella* genes in bath water
Takashi KANDA, Naomi TAKAHASHI, Miya YAGI, Tomohiro NISHIO and
Kanji SUGIYAMA7
- 3 Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells
—Comparative studies of PBMC HCV-RNA between Serotype 1 and 2 in chronic
hepatitis C—
Toshihiro YAMADA, Chihiro MINATO, Hiromi NAGAOKA, Fumihiko KAWAMORI,
Kanji SUGIYAMA, Norio OHASHI and Hiroyuki KOKURYU.....13

Department of Drug and Food Science

- 4 Study on Purity Test and Determination of ρ -Menthhol in The Japanese Pharmacopoeia
—Application of Gas Chromatography—
Takahiro BITO, Masaya YAMAMOTO, Kumiko MIZUNO, Kengo MIYAMOTO, Chie UENO,
Mitsuko KAMIMURA, Hiroyuki KURITA, Yumie MAEDA, Kazunori TAKAHASHI
and Masahiko NISHIZAWA.....17
- 5 Study on Determination of Trihexyphenidyl Hydrochloride Tablets in The Japanese
Pharmacopoeia
—Application of High Performance Liquid Chromatography—
Takahiro BITO, Masaya YAMAMOTO, Kengo MIYAMOTO, Mitsuko KAMIMURA, Yumie MAEDA
and Kazunori TAKAHASHI.....21
- 6 Study of the Simultaneous Analytical Method for Residual Veterinary Drugs by LC/MS/MS
Tomoko KAGEYAMA, Tomoyuki MAEDA, Miki SHIRAI, Sayaka OGO, Miho NAKASHIMA,
Yumie MAEDA and Kazunori TAKAHASHI.....25

7	Vitamin A or β -carotene containing Supplement	
	Chie KOBAYASHI, Izumi AISO, Yumie MAEDA and Kazunori TAKAHASHI	31

8	Mineral Contents in Beans and Bean Processed Food	
	Izumi AISO, Chie KOBAYASHI, Yumie MAEDA and Kazunori TAKAHASHI	37

Department of Environment Science

9	A Survey of Pharmaceuticals and Personal Care Products Released into Household Effluents	
	Ayumi KANEKO, Yoshiko IMAZU, Kazunari KUME, Syouhei YAMASHITA and Hiroki NAKAGAWA	43

10	Research on Environmental Risk Evaluation of Chemicals in Shizuoka Prefecture	
	Hiroki NAKAGAWA, Kazunari KUME and Takafumi KAMITANI	49

11	Evaluation of Highly Sensitive Analytical Methods with High-Performance Liquid Chromatography for Bisphenol A and Application to the Measurements in Field Environments	
	Shohei YAMASHITA, Yoshiko IMAZU	57

12	Search for Endocrine Disruptors of River Water Sample in Shizuoka Prefecture	
	Yoshiko IMAZU, Ayumi KANEKO, Fujio SHIRAIISHI and Daisuke NAKAJIMA	63

Department of Pollution Control

13	A Study of Estimation Method of Water Quality by AOD	
	—Report 1 A Study of Improvement of AOD—	
	Naomi SHIMIZU, Katsunaga AOKI, Michiharu UCHIYAMA, and Akira KOIKE	71

14	A Study of Estimation Method of Water Quality by AOD	
	—Report 2 Estimation of River Water Quality—	
	Michiharu UCHIYAMA, Katsunaga AOKI, Kouta HAMAGUCHI, Naomi SHIMIZU and Akira KOIKE	77

15	Report of Low Frequency Noise around the Mt. Fuji Shizuoka Airport	
	Chika TAKAGI, Eijiro SHINOHARA	85

16	Effects of Air Pollutants to the Growth of the Beech Forest in Mt. Fuji	
	Takayuki NAKANISHI, Kazuhiro OHTARA and Satoru ISHII	91

17 Study of the Environmental Air in the Area of Mt.Fuji Shizuoka Airport(I) —Measurements of Air Pollutants and Volatile Organic Compounds— Kazuhiro OHTARA, Takayuki NAKANISHI and Satoru ISHII.....	97
--	----

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS	103
--	------------

PRESENTATIONS AT CONFERENCES AND/OR SOCIETY MEETINGS	104
---	------------

COMMENDATION	107
---------------------------	------------

静岡県東部におけるマダニの分布状況ならびにマダニ、 野ネズミからの紅斑熱群リケッチアの検出

微生物部 微生物スタッフ 川森文彦, 湊 千壽, 飯田奈都子,
山田俊博, 長岡宏美, 杉山寛治

Distribution of Ticks in Eastern Part of Shizuoka Prefecture and
 Detection of Spotted Fever Group Rickettsiae from Ticks and Wild Rodents

Fumihiko KAWAMORI, Chihiro MINATO, Natsuko IIDA,
 Toshihiro YAMADA, Hiromi NAGAOKA and Kanji SUGIYAMA

静岡県東部の47地点で4属13種, 2,202匹のマダニが採取された。日本紅斑熱の媒介種と考えられている *Haemaphysalis flava*, *H. longicornis*, *Ixodes ovatus* などが優勢種であった。また, *H. hystricis*, *H. formosensis*, *Dermacentor taiwanensis* は患者発生地(沼津市香貫山)に集中してみられ, *I. persulcatus* は富士山中腹(標高1,200m以上)に局限してみられた。マダニ612匹(12種)中149匹(24.3%)から紅斑熱群リケッチア(SFGR)の *gItA* 遺伝子がPCRにより検出された。PCR増幅産物についてRFLP解析を行ったところ9タイプに分類され, 11検体(*H. flava* 8, *H. formosensis* 2, *Amblyomma testudinarium* 1)が *Rickettsia japonica* と同タイプとなった。また, マダニ113匹(10種)について培養細胞(L929, HL-60)による分離を試みたところ, 患者発生地で採取された2匹(*H. hystricis*, *D. taiwanensis*)から *R. japonica* が分離された。野ネズミ16頭からSFGRは検出されなかったが, アカネズミ8頭中6頭から *R. japonica* に対する抗体が確認された。今回の調査により, 静岡県東部に多様なSFGRが存在していることが明らかとなった。

Key words: 紅斑熱, リケッチア, マダニ, 野ネズミ
 spotted fever, rickettsiae, tick, wild rodent

はじめに

日本紅斑熱(病原体: *Rickettsia japonica*)は, 1984年に馬原ら¹⁾により初めて報告されたマダニ媒介性の発疹を伴う熱性疾患であり, 四国や九州南部など温暖な地域で多発する傾向がみられ, 2003年以降, 全国で毎年50症例以上報告されている²⁾。本感染症は, 治療が遅れると重症化しやすく, これまでに死亡例も6例確認されている。また, 近年, *R. japonica* 以外の紅斑熱群リケッチア(spotted fever group rickettsiae; 以下 SFGR)による紅斑熱患者の発生が相次いでおり, 2004年には *R. helvetica* による症例³⁾が福井県で, 2008年には *R. heilongjiangensis* による症例⁴⁾が仙台市で確認されている。静岡県では2000年に県東部で1症例報告されて

いるが²⁾, これまで本格的な疫学調査はされてこなかった。そこで2008年から県東部においてマダニおよび野ネズミを対象とした疫学調査を実施したので, その概要を報告する。

材料および方法

1 マダニの採取調査

2008年4月から2009年12月にかけて, 県東部の47地点(標高10m~1,600m)において旗ずり法によりマダニの採取を行った(図1)。なお, 沼津市香貫山(患者発生地: 標高100m)においては, 2009年1月から12月まで毎月1回, 約1時間30分, 旗ずり法を行い, マダニ発生の季節消長を調査した。マダニの同定は, 実体顕微鏡下で, 形態的な特徴から判断した^{5, 6)}。

2 野ネズミの捕獲調査

2009年11月と12月に県東部の11地点においてシャーメントラップ(30~40トラップ/調査地)による

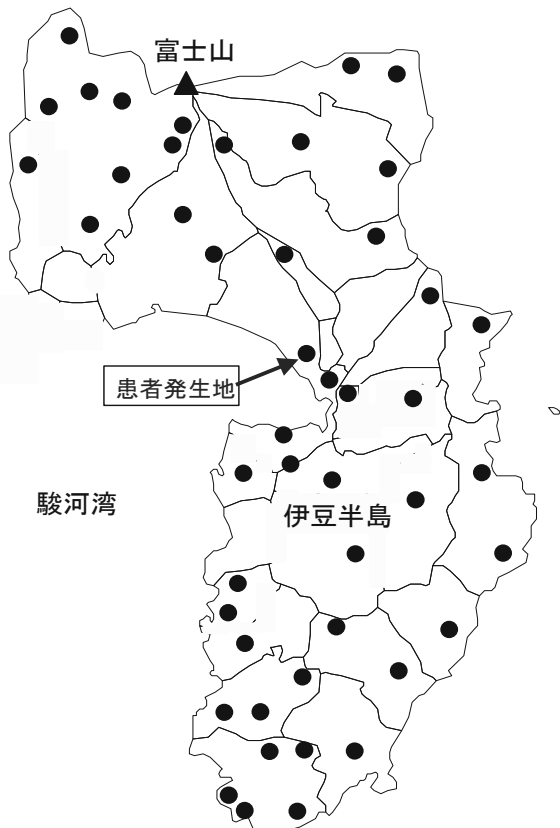


図1 マダニ採取調査地点(●)

野ネズミの捕獲を実施した。なお、餌としてサツマイモと魚肉ソーセージを用い、一晩設置し、翌朝回収した。

3 野ネズミからの PCR による SFGR 検出および抗 *R. japonica* 抗体の測定

野ネズミ生体については EDTA 加血液を弱遠心し、下層の血球部分 100~200 μ l を抽出対象とした。捕獲時に死んでいた個体については、心臓を細切し、バイオマッシャー(ニッピ)のチューブに入れ、ろ過遠心された心残血を対象とした。脾臓は、約 3mm 角を細切したものをを用いた。これらの材料について QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)を用い、添付説明書に従って DNA 抽出を行い、リケッチア属の 17-kDa 蛋白質をコードする遺伝子を対照とした片山ら⁷⁾の PCR 法により SFGR の検出を試みた。

野ネズミ生体の血漿を PBS(-)(日水製薬)で 20 倍希釈から 640 倍希釈まで 2 段階希釈を行った。*R. japonica* 感染 L929 細胞を塗抹した 12 ウェルコーティングスライドの各ウェルに希釈した血漿を 20 μ l ずつ滴下し、公定法⁸⁾に従って間接蛍光抗体により、抗体価を測定した。なお、2 次抗体は、FITC 標識ヤギ抗ラット IgG+IgM (Jackson)を用いた。

4 マダニからの PCR による SFGR 検出および PCR-RFLP によるタイピング

実体顕微鏡下でマダニの唾液腺を摘出し、QIAamp

DNA Mini Kit を用い、DNA の抽出を行ったものを PCR 用のテンプレートとした。

SFGR 検出用 PCR には、我々が設計した *gltA* 遺伝子の 752bp を増幅するプライマーセット(*gltA*-Fb, *gltA*-Rb)を用いた。PCR 用混合液は、Blend Taq -Plus-キット(東洋紡績)の DNA Polymerase 0.75U, 10 倍 buffer 2.5 μ l, dNTP mixture 各 200 μ M, プライマー 各 0.2 μ M および DNA 抽出液 2.5 μ l を添加し、蒸留水で総量 25 μ l に調整した。サーマルサイクリングは、94 $^{\circ}$ C, 3 分加熱後、94 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒 \rightarrow 56 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C \cdot 1 分を 40 サイクル実施し、最後に 72 $^{\circ}$ C \cdot 7 分エクステンションを行った。

アガロース電気泳動で約 750bp のバンドが確認された PCR 増幅産物について、4 種類の酵素 (*TaqI*, *RsaI*, *BspEI*, *MboI*; New England Biolabs)を用い、各酵素に添付されている説明書に従って制限酵素処理を行った後、4%アガロースで電気泳動を行い、切断パターンの組み合わせによるタイピングを試みた。なお、*BspEI* と *MboI* については、両酵素を混合し、処理を行った。

5 マダニからの SFGR の分離

マダニから無菌的に取り出した内臓を分離材料とした。マダニ内臓は牛胎児血清 10%加 RPMI1640 (日水製薬)で乳剤としものを L929 細胞および HL-60 細胞に接種した。接種後の培養液は、L929 には牛胎児血清 1%加 dulbecco's modified eagle's medium (sigma)を、HL-60 には牛胎児血清 10%加 RPMI1640 を用い、7 日間培養した後、培養細胞を接種材料とし、もう 1 代培養した。分離の有無の確認は、ディフ・クイック(シスメックス)染色によるリケッチア粒子の観察および PCR (プライマー: *gltA*-Fb, *gltA*-Rb)により行った。分離株については、*gltA* 遺伝子 (1030bp)と *rompA* 遺伝子 (493bp)の塩基配列をダイターミネーター法によるダイレクトシーケンスで決定し、菌種の同定を行った。

結果

1 マダニ採取状況

4 属 13 種, 2,202 匹のマダニが採取された(表 1)。*Haemaphysalis flava* (932 匹), *H. longicornis* (541 匹), *Ixodes ovatus* (164 匹)などが優勢種であり、これらの種類はいずれも分布域は広がったが、*I. ovatus* は標高 500m 以上の調査地に多い傾向がみられた(表 2)。成虫と若虫の両方が採取された種類が多かったが、*I. ovatus* と *H. kitaokai* は成虫の採取数が多いにもかかわらず、若虫はまったく採取できなかった。*H. hystricis* と *Dermacentor taiwanensis* は患者発生地である沼津市香貫山(標高 100m)のみで採取され、*H. formosensis* も南伊豆町で確認された 1 匹を除き香貫山で採取された。また、*Amblyomma*

表 1 静岡県東部におけるマダニ採取状況

マダニの種類	成虫		若虫	幼虫	計 (%)
	♀	♂			
<i>H. flava</i>	169	148	611	4	932(42.3)
<i>H. longicornis</i>	57	19	465		541(24.6)
<i>H. kitaokai</i>	79	63			142(6.4)
<i>H. formosensis</i>	7	8	96		111(5.0)
<i>H. megaspinosa</i>	13	4	82	5	104(4.7)
<i>H. hystricis</i>	9	6	13		28(1.3)
<i>I. ovatus</i>	82	82			164(7.4)
<i>I. turdus</i>	10		74	7	91(4.1)
<i>I. persulcatus</i>	6	12	29		47(2.1)
<i>I. nipponensis</i>		1			1(0.05)
<i>I. monospinosus</i>	1	1			2(0.1)
<i>A. testudinarium</i>			29	6	35(1.6)
<i>D. taiwanensis</i>	2	2			4(0.2)
計	435	346	1399	22	2202

testudinarium は、沼津市と伊豆半島のみで採取され、*I. persulcatus* は富士山中腹の標高 1,200m 以上の調査地のみで採取された(表 2)。

沼津市香貫山におけるマダニ発生の季節消長をみると 3 月をピークとし 2 月～5 月の間の採取数が多かったが、7 月と 8 月はまったく採取されず、9 月と 10 月も *H. formosensis* や *H. hystricis* が 1～2 匹確認されただけだった(表 3)。*H. flava*、*H. hystricis*、*I. ovatus*、*I. turdus* および *D. taiwanensis* の成虫は 1～6 月の間のみに採取されたが、*H. formosensis* と *H. megaspinosa* の成虫は 9～12 月の間にも確認された。

表 2 標高別マダニ採取状況

マダニの種類	各標高で採取されたマダニ数			
	200m 以下	200-500m	500-1000m	1000m 以上
<i>H. flava</i>	524	183	224	1
<i>H. longicornis</i>	276	236	28	1
<i>H. kitaokai</i>	44	43	50	5
<i>H. formosensis</i>	111			
<i>H. megaspinosa</i>	15	58	21	10
<i>H. hystricis</i>	28			
<i>I. ovatus</i>	29	11	85	39
<i>I. turdus</i>	91			
<i>I. persulcatus</i>				47
<i>I. nipponensis</i>		1		
<i>I. monospinosus</i>			2	
<i>A. testudinarium</i>	33	2		
<i>D. taiwanensis</i>	4			
計	1155	534	410	103

2 野ネズミにおける SFGR 検出状況および抗 *R. japonica* 抗体保有状況

6 市町(小山町 1 頭、御殿場市 1 頭、函南町 4 頭、伊豆市 3 頭、松崎町 3 頭、南伊豆町 4 頭)の 7 地点で捕獲された野ネズミ 16 頭(アカネズミ 12、ヒメネズミ 3、ヒミズ 1)について PCR で SFGR の検出を試みたが、血液、脾臓とも全頭陰性であった。捕獲時に生存していたアカネズミ 8 頭中 6 頭から *R. japonica* に対する抗体が確認され、高抗体価を保有する個体が多かった(表 4)。抗体保有野ネズミに地域的な偏りはなく、体重が 30g 未満の 2 頭のみが抗体陰性であった。

表 3 沼津市香貫山における月別マダニ採取状況

マダニの種類	ステージ	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計
<i>H. flava</i>	♀		2	8	9	8	5							32
	♂	3	4	10	5	5								27
	若虫	26	70	86	19	54	2					2	7	266
	幼虫											1		
<i>H. longicornis</i>	若虫					1	1							2
<i>H. formosensis</i>	♀						2			1	1		1	5
	♂						6							6
	若虫	11	16	32	9	18	1					2	4	93
<i>H. megaspinosa</i>	♀			1								1		2
	若虫		2	3	1									6
<i>H. hystricis</i>	♀			8	1									9
	♂		4	1	1									6
	若虫	3	8	1						1				13
<i>I. ovatus</i>	♀				1	1								2
	♂					3								3
<i>I. turdus</i>	♀		2		3	2								7
	♂													0
	若虫	5	23	21	7	7								63
	幼虫	1	5	1										7
<i>A. testudinarium</i>	若虫			1	1	6	2							10
<i>D. taiwanensis</i>	♀					1								1
	♂					1	1							2
計		49	136	173	57	107	20	0	0	2	1	6	12	563

表 4 アカネズミにおける
抗 *R. japonica* 抗体保有状況

捕獲地	性別	体重(g)	抗体価
小山町	♂	39.0	≥640
函南町	♂	18.4	<20
函南町	♂	54.2	≥640
伊豆市	♂	41.6	160
伊豆市	♀	38.6	320
南伊豆町	♀	42.8	≥640
南伊豆町	♂	48.9	320
南伊豆町	♂	28.8	<20

3 マダニにおける PCR による SFGR 検出状況および PCR-RFLP によるタイピング結果

マダニ 612 匹 (12 種, 25 地点) について PCR を用いて SFGR の *gltA* 遺伝子の検出を試みたところ, 149 匹 (24.3%) が陽性となった. マダニ陽性検体および SFGR 株 4 種 (*R. japonica*, *R. helvetica*, *R. asiatica*, *R. tamurae*) の PCR 増幅産物を 4 種類の制限酵素で処理したところ, 切断パターンは 10 タイプに分類された (表 5, 図 2). マダニ陽性検体の PCR-RFLP タイプは, TAM タイプを除く 9 タイプに分類された (表 6). *R. japonica* と同タイプの JAP タイプに分類されたのは 11 検体 (*H. flava* 8, *H. formosensis* 2, *A. testudinarium* 1) であったが, *H. flava* の 1 検体 (函南町) 以外は, 沼津市香貫山で採取されたマダニ由来の検体であった. 特徴的な PCR-RFLP 所見では, *H. longicornis* はすべて LON タイプに, *H. hystricis* はすべて PRI タイプに, *I. persulcatus* はすべて HEL タイプに分類された.

5 マダニからの SFGR の分離結果

マダニ 113 匹 (10 種, 8 地点) について培養細胞による

表 6 マダニからの PCR による紅斑熱群リケッチア検出状況および PCR-RFLP による分類

マダニの種類	検体数	PCR 陽性数 (%)	PCR-RFLP による分類								
			JAP	PRI	PEA	HEL	ASI	OR	LON	MON	CAN
<i>H. flava</i>	240	35(14.6)	8	14	4		1	1	6		1
<i>H. longicornis</i>	79	28(35.4)							28		
<i>H. kitaokai</i>	71	8(11.3)			5		3				
<i>H. formosensis</i>	29	12(41.4)	2	2	2		1		5		
<i>H. megaspinoso</i>	11	8(72.7)		6					1		1
<i>H. hystricis</i>	14	10(71.4)		10							
<i>I. ovatus</i>	117	33(28.2)				6	17		10		
<i>I. turdus</i>	11	1(9.1)							1		
<i>I. persulcatus</i>	14	6(42.9)				6					
<i>I. nipponensis</i>	1	1(100.0)									1
<i>I. monospinosus</i>	2	1(50.0)				1					
<i>A. testudinarium</i>	23	6(26.1)	1	1					4		
計	612	149(24.3)	11	33	11	13	22	1	55	1	2

表 5 PCR-RFLP による分類および該当菌種

分類	TaqI	RsaI	MboI+BspEI	該当菌種
JAP	T1	R1	M1	<i>R. japonica</i> など
PRI	T1	R2	M1	<i>Candidatus R. principis</i> *
PEA	T1	R3	M1	<i>R. peacockii</i> *
HEL	T1	R3	M2	<i>R. helvetica</i>
ASI	T1	R3	M4	<i>R. asiatica</i>
OR	T1	R3	M5	類似菌種なし
LON	T2	R2	M1	LON type*
TAM	T3	R2	M3	<i>R. tamurae</i>
MON	T4	R2	M3	<i>R. monacensis</i> *
CAN	T1	R4	M6	<i>R. canadensis</i> *

*:GenBank に登録されている塩基配列から切断パターンを推測

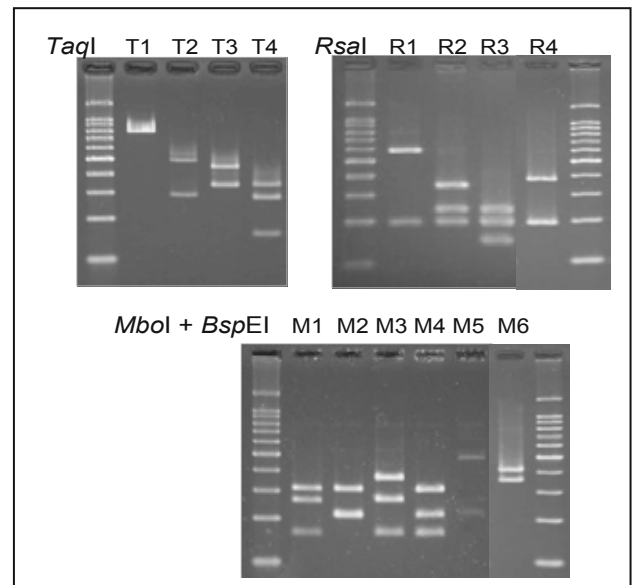


図 2 各制限酵素処理による PCR 増幅産物の切断パターン

表 7 マダニにおける紅斑熱群リケッチア分離状況

マダニの種類	検体数	分離陽性数 (リケッチア種類)
<i>H. flava</i>	37	0
<i>H. longicornis</i>	7	0
<i>H. kitaokai</i>	1	0
<i>H. formosensis</i>	17	0
<i>H. megaspinosa</i>	14	0
<i>H. hystricis</i>	13	1 (<i>R. japonica</i>)
<i>I. ovatus</i>	12	0
<i>I. persulcatus</i>	6	0
<i>A. testudinarium</i>	5	0
<i>D. taiwanensis</i>	1	1 (<i>R. japonica</i>)
計	113	2 (<i>R. japonica</i>)

分離を試みたところ、沼津市香貫山で採取された 2 匹

(*H. hystricis*, *D. taiwanensis*)から SFGR が分離された(表 7)。なお、2 陽性例とも L929 と HL-60 の両培養細胞で分離された。これらの分離株の *gltA* と *rompA* 遺伝子の塩基配列は、分離株同士はすべて同一で、*gltA* 遺伝子に関しては *R. japonica* (accession No. U59724) と 99.9% (1029/ 1030) 一致し、*rompA* 遺伝子では *R. japonica* (accession No. U83442) と 100% (496/496) 一致したことから、両分離株は *R. japonica* と同定された。

考 察

今回の調査で 4 属、13 種のマダニが採取されたが、1989～1991 年の全県を対象としたマダニ採取調査では、2 属 9 種 1,720 匹が採取されている⁹⁾。前回 1 匹だけ採取された *H. japonica* は今回採取されなかったが、今回新たに *H. formosensis*, *H. hystricis*, *I. turdus*, *A. testudinarium* および *D. taiwanensis* の 5 種類が確認された。*I. turdus* は東北から南西日本の広範囲に生息するが、他の 4 種類はいずれも主に九州、四国など温暖な地域に生息する種類であり、近年の温暖化の影響で、これらの南方系の種類の生息分布域の拡大あるいは生息密度の上昇が起こってきている可能性が考えられる。今回の調査では、採取数の上位の 3 種類(*H. flava*, *H. longicornis*, *I. ovatus*)は、いずれも西日本の調査結果から日本紅斑熱の媒介種と考えられている^{7, 10, 11)}。したがって、マダニ生息分布からは、静岡県での日本紅斑熱発生リスクは高いと考えられる。

県内の患者発生地での月別マダニ採取状況からは、春期に採取数が増加する種類が大半を占めた。しかし、全国の日本紅斑熱患者月別報告数をみると、1～4 月はほとんどなく、9 月の症例数が最も多くなっており²⁾、静岡県の 1 症例も 9 月に発生している。今回の調査では、9 月採取数は 2 匹のみであり、採取状況からこの時期のベクターを推

測することは難しい。マダニの生息状況を調べる手段としては、ほとんどの場合、フランネル製の旗を使い植生上のマダニを採取する方法を用いるが、この方法では採取しにくい様々な種類の幼虫や *I. ovatus* の若虫などが秋期の日本紅斑熱のベクターとなっていることも考えられる。

今回、野ネズミから SFGR の検出はできなかったが、抗 *R. japonica* 抗体保有アカネズミは、アカネズミ生体が捕獲されたすべての調査地で確認され、抗体価の高い個体が多かった。抗体陰性の 2 匹は、体重から若年齢と推測されるので、成熟個体は全頭抗体を保有していたことになる。したがって、*R. japonica* あるいは交差反応を有する他の SFGR の浸透度は、県東部の広域で非常に高いと思われる。SFGR の検出ができなかった原因としては、マダニ生息数の少ない 11 月と 12 月に捕獲を実施したので、SFGR 感染後の抗体のみしか確認できなかったことが考えられる。

今回、PCR-RFLP で 11 検体が JAP タイプに分類されたが、塩基配列を比較した今回の *gltA* 遺伝子領域では、*R. japonica* と *R. heilongjiangensis* は、100%塩基配列が一致しており、これら 2 菌種のどちらにより近縁かは判断できない。しかし、国内で *R. heilongjiangensis* を保有しているマダニはイスカチマダニのみと考えられており⁴⁾、このマダニは東北地方以北の採取報告しかなく北方系のマダニと考えられているので、JAP タイプの 11 検体から検出された SFGR は *R. japonica* あるいは極めて近縁なリケッチアであることが考えられる。福井県で感染例がみられた *R. helvetica* が含まれる HEL タイプは、13 検体みられたが、*I. monospinosus* の 1 検体以外は、富士山中腹の高鉢山(標高 1,600m)で採取された *I. ovatus* (6 検体) と *I. persulcatus* (6 検体)であったので、本県においても、標高の高い地域での *R. helvetica* による紅斑熱の発生には、注意していく必要があるものと思われる。

沼津市香貫山で採取された *H. hystricis* と *D. taiwanensis* の各 1 匹から *R. japonica* が分離された。*H. hystricis* は、西日本で高率に *R. japonica* が検出されている種類であるが¹²⁾、ヒト嗜好性があまり強くないので日本紅斑熱の主要なベクターと早計に断定することはできない。*D. taiwanensis* は、全国的にまれにしか採取されない種類であることから、SFGR 検査に供された数が極めて少ないこともあり、これまでの分離例は徳島県での 1 例のみである¹³⁾。今回の調査において様々な SFGR が PCR で検出されているが、培養細胞による分離では *R. japonica* だけしか分離されなかったため、今後、多くの種類の SFGR を分離できる培養系を検討していく必要があるものと思われる。

今回、PCR-RFLP で *R. japonica* と同タイプの JAP タイプに分類されたものが 11 検体、*R. japonica* が分離されたものが 2 検体あったが、函南町で採取された 1

検体以外は、すべて患者発生地である沼津市香貫山で採取されたものであった。この場所で季節消長の調査を行ったことからマダニ採取数が他の調査地より多く、SFGR 検出に供された検体数が、PCR 検査で 24.3% (149/612)、分離検査で 40.7% (46/113) を占めた。検体数が多かったことが、この調査地で *R. japonica* 分離あるいは *R. japonica* 類似遺伝子検出が陽性となった一要因になった可能性も考えられる。しかし、*R. japonica* が分離された種類は、この調査地のみで採取された南方系の *H. hystricis* と *D. taiwanensis* であった。香貫山は、今回の調査地の中で紅斑熱多発地である南九州¹⁴⁾ や四国¹²⁾ のマダニ相に最も類似しており、この地点で静岡初の紅斑熱患者が発生したことも納得できる調査結果となった。

今回の調査により、静岡県東部に多様な紅斑熱群リケッチアが存在していることが明らかとなった。*R. japonica* の分布域は限られていたが、近年、本菌以外の SFGR による紅斑熱が相次いで発生しているため、今回検出された SFGR の種類および地理的分布を踏まえ、今後の紅斑熱の発生に注意していく必要があるものと思われる。

文 献

- 1) 馬原文彦他:わが国初の紅斑熱リケッチア感染症, 感染症誌, **59**, 1165-72 (1985)
- 2) 感染研感染症情報センター:つつが虫病/日本紅斑熱 2005 年 12 月現在, 病原微生物検出情報, **27**, 27-28 (2006)
- 3) Noji, Y. et al. : The first reported case of spotted fever in Fukui prefecture, the northern part of central Japan, Jpn. J. Infect. Dis., **58**, 112-114 (2005)
- 4) 安藤秀二他:仙台市で確認された新しい紅斑熱リケッチア症, 感染症誌, **83**, 583-584 (2009)
- 5) 高田伸宏:病原ダニ類図鑑, 105-132, 金芳堂, 京都 (1990)
- 6) 藤田博己他:ダニと新興再興感染症, 53-68, SADI 組織委員会, 東京 (2007)
- 7) 片山 丘他:神奈川県, 島根県及び高知県で採取されたダニ類からの紅斑熱郡リケッチア DNA の検出, 感染症誌, **75**, 53-54 (2001)
- 8) 海保郁男:紅斑熱群リケッチア症診断マニュアル, 2-6, 国立感染症研究所レファレンス委員会, 東京 (2001)
- 9) 川森文彦:マダニの採取・同定法および静岡県における採取状況, 技術情報, **10**, 1-4 (1992)
- 10) 馬原文彦:日本紅斑熱の発見と臨床的疫学的研究, モダンメディア, **54**, 32-41 (2007)
- 11) 藤田博己他:ダニと新興再興感染症, 129-139, SADI 組織委員会, 東京 (2007)
- 12) 稲荷公一:愛媛県におけるマダニの分布状況及びマダニからの *Rickettsia japonica* の検出, 愛媛衛環研年報, **7**, 5-12 (2004)
- 13) Takada, N. et al. : First isolation of a rickettsia closely related to Japanese spotted fever pathogen from a tick in Japan, J. Med. Entomol., **31**, 183-185 (1994)
- 14) Noda, S. : Detection of Japanese spotted fever rickettsiae DNA from ixodid ticks in Osumi Peninsula of Kagosima Prefecture, Japan, Med. Entomol. Zool. **57**, 273-277 (2006)

浴槽水のレジオネラ属菌の迅速検査法の検討

微生物部 微生物スタッフ 神田隆, 高橋奈緒美, 八木美弥,
 西尾智裕, 杉山寛治

Study of rapid detection of *Legionella* genes in bath water

Takashi KANDA, Naomi TAKAHASHI, Miya YAGI,
 Tomohiro NISHIO and Kanji SUGIYAMA

浴槽水のレジオネラ属菌検査は、培養法が標準的な方法で結果が判明するまでに7日～10日間を要するため短時間で結果が得られる検査法が求められている。そこで、浴槽水から直接、核酸（DNA）を検出し、数時間で結果が得られる迅速検査法について検討した。まず、浴槽水等について培養法とDNA検出法であるリアルタイムPCR法（qPCR）とLAMP法の比較を行い、今回検討したDNA検出法は短時間で培養法と相関する結果が得られることを確認した。特に定量性ではqPCRがLAMP法より優れていた。また、各種泉質の温泉水からのDNA抽出は酵素溶菌法（カラム法）を用いることでPCR反応阻害もなく、市販の抽出キットが使えることを確認した。

しかし、通常のqPCRでは生菌と死菌両方のDNAを検出するため、生菌と死菌のDNAを鑑別する目的で検体をエチジウムモノアザイドで処理する方法を検討した結果、浴槽水中の生菌と死菌の状況をより正確に検出することができた。今回検討した迅速検査法で浴槽水中のレジオネラ属菌の状況を短時間で確認することが可能となり、菌分離を補完する迅速な検査方法として浴槽水の衛生管理や事故発生時の行政指導等に役立つと思われる。

Key words: レジオネラ属菌, 浴槽水, リアルタイムPCR, エチジウムモノアザイド
 Legionella, Bath water, Real Time PCR, Ethidium Monoazide

はじめに

レジオネラ属菌感染症は国内の患者報告数が増加傾向にあり、毎年、死者も報告されている重要な感染症の一つである。国内で感染経路が判明した事例のほとんどが入浴施設での感染である¹⁾。県内でも平成11年に死者を2名含む大規模な集団感染事例²⁾が発生し、これを契機に入浴施設のレジオネラ属菌対策として条例が施行され、行政検査として入浴施設の浴槽水のレジオネラ属菌検査を行っているが、しばしば浴槽水からレジオネラ属菌が検出されている。

一方、レジオネラ属菌の検査は培養法が標準的な方法で検査結果が出るまでに7日～10日間を要するため、浴槽水等の衛生管理や感染事故発生時には短時間で結果が得られる検査法が求められている。

そこで、迅速に浴槽水中のレジオネラ属菌の状況を確認する方法として、浴槽水から直接レジオネラ属菌の核酸（DNA）を検出する方法を検討した。

材料および方法

1 培養法とDNA検出法との比較

1) 浴槽水からのレジオネラ属菌培養法（遠心法）

浴槽水400mlを9,000rpm、30分間遠心し上清を捨て滅菌蒸留水4mlで沈渣を回収し100倍濃縮試料（原液）とした。この原液と原液をPBSで10倍希釈したものを50℃、20分間加熱処理した後、GVPC寒天培地（バイオメリュウ社、生培地）に各100μl塗抹し、37℃で培養した。分離株は定法により同定した。

2) 浴槽水からのレジオネラ属菌培養法（メンブランフィルター法）

検体（浴槽水）500mlをメンブランフィルター（直径47mm, 0.2μm, ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE）で吸引ろ過し、滅菌蒸留水（注射用蒸留水, 大塚製薬）50mlでフィルターおよびカップを洗浄吸引ろ過した。

吸引後、フィルターを滅菌チューブに回収し、滅菌蒸留水 5mlを加え、1 分間ボルテックスして、100 倍濃縮試料（原液）とした。この 100 倍濃縮試料を遠心法と同様の方法で分離培養した。

3) 浴槽水からの DNA 抽出法 (GL カラム法)

メンブランフィルター法の検体濃縮方法で 100 倍濃縮した試料 2mlを研究班（泉山）の方法³⁾に準拠してさらに 10 倍濃縮（最終 2,000 倍）し、Lysozyme, ProteinaseK 処理後、抽出 DNA を研究班の特注品であるモノリスカラム (GL サイエンス) で精製した。

4) 標準菌株を用いた検量線の作成と DNA の検出

標準菌株 (*Legionella pneumophila* NIIB0058 株, 30°C, 4 日培養) の希釈系列 (1~10⁶CFU) から GL カラム法で抽出精製した DNA を用いて、qPCR と LAMP 法で DNA を増幅し検量線を作成した。

DNA の増幅は qPCR には市販の CycleavePCR *Legionella* Detection Kit (TaKaRa) の試薬を用い、増幅装置は Dice (TaKaRa) を用いてほとんどのレジオネラ属菌に共通する 5S rRNA の特定の塩基配列を検出した。このキットの試薬には PCR 反応確認のためのインターナルコントロールが入っており、目的 DNA の有無にかかわらず PCR 反応自体が適切に行われたか否かを確認することが出来る。また、LAMP 法は市販の Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研) 試薬を用い、増幅装置は LA320-C (栄研) を用いてレジオネラ属菌に共通の 16S rRNA の特定の塩基配列を検出した。

5) 実検体を用いた核酸検出法の検討

県内の入浴施設で採取された実検体 74 検体 (温泉水 40 検体 (単純泉 18 検体, 塩化物泉 8 検体, 硫黄泉 5 検体, 硫酸塩泉 2 検体, その他 7 検体), 水道・井水 19 検体, モデル浴槽水 15 検体) について GL カラム法で DNA を抽出精製し、qPCR と LAMP 法を行い培養法と比較した。

また、qPCR については実検体 37 検体 (温泉水 31 検体 (塩化物泉 19 検体, 単純泉 8 検体, その他 4 検体), 水道水 6 検体) を追加して計 111 検体実施した。

2 市販 DNA 抽出キットによる核酸検出法の検討

標準菌株の希釈系列をから、モノリスカラム (GL サイエンス) を用いて抽出した DNA による qPCR と市販 DNA 抽出キット Fast Pure DNA Kit (TaKaRa) を用いて抽出した DNA による qPCR の検出感度、定量性を比較検討した。また、カラムで精製した DNA の溶出を 20 μ l \times 1 回と 50 μ l \times 2 回の方法で行い抽出した DNA 5 μ l で qPCR を行い、検出感度を比較した。

実検体 (温泉水) 102 検体 (フミン質有機物泉を含

む塩化物泉 44 検体, 硫酸塩泉 9 検体, 単純泉 14 検体, 硫黄泉 2 検体, 泉質不明 8 検体, 水道・井水 25 検体) についてメンブランフィルター法で 100 倍濃縮した試料から Fast Pure DNA Kit (TaKaRa) で DNA を抽出し、qPCR を行い培養法と比較した。

3 生菌死菌 DNA の鑑別法の検討

1) 生菌死菌鑑別 PCR 法の検討

標準菌株の菌液 (1.4 \times 10⁵ CFU) の生菌と加熱 (95°C, 5 分間) 死菌をエチジウムモノアザイド (EMA) 0, 10, 20, 40 μ g/ml で処理し、通常の PCR 行い両者を比較した。

EMA 処理は、濃縮した検体 2ml を遠心チューブに取り 13,000rpm, 4°C, 5 分間遠心し上清を除去した後、滅菌蒸留水を 500 μ l 加えボルテックスで混和した。各濃度になるように調整した量の EMA を添加し、転倒混和後、チューブを氷中に立て暗所で 10 分間反応させた後、チューブを氷上に横にして 250W の電球 4 個を 5 分間照射した。その後、13,000rpm, 4°C, 5 分間遠心し上清を除去した後、-20°C で凍結保存した。対照として濃縮検体を 13,000rpm, 4°C, 5 分間遠心し上清を除去したものを凍結保存した。

凍結保存した DNA 試料から Fast Pure DNA Kit (TaKaRa) を用いて DNA を 100 μ l 抽出して PCR を行った。PCR はレジオネラ属菌に特異的な 16S rRNA の特定の塩基配列を検出するプライマー (LEG448E, LEG854B)⁴⁾ を用いて PCR 反応 (95°C, 5 分 [95°C, 30 秒, 62°C, 30 秒, 74°C, 30 秒] \times 25 サイクル, 74°C, 5 分) を行い、電気泳動で 430bp の DNA 断片の確認を行った。

2) 生菌死菌 DNA の鑑別 qPCR 法の検討

標準菌株 (*Legionella pneumophila* NIIB0058 株, 35°C, 3 日培養) の希釈系列を作成し菌数を測定した。各希釈菌液 1ml から Fast Pure DNA Kit (TaKaRa) を用いて DNA を 100 μ l 抽出し、50 μ l ずつ小分けして -20°C で保存した。

qPCR は Chang ら⁵⁾ の報告に従い、レジオネラ属菌に特異的な 16S rRNA 遺伝子を検出するプライマー (LEG247F, LEG880), プローブ (P1) を用い、95°C, 30 秒, [95°C, 10 秒, 63.5°C, 1 分] 40 サイクルで、Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いテンプレート DNA 5 μ l で、DNA の増幅反応と検出は Dice (TaKaRa) を用いて行い、検量線を作成した。

3) 実検体の EMA 処理と qPCR

実検体 64 検体 (温泉水 46 検体 (単純泉 8 検体, 塩化物泉 35 検体, 硫酸泉 1 検体, その他 2 検体), 水道・井水 18 検体) についてメンブランフィルター法で 100

倍濃縮した試料から菌分離を行うとともに、各試料 2ml ずつ 2 本のマイクロチューブに分注し、1 本は EMA 処理を行い、1 本は対照として遠心し上清を除去した。EMA 処理は検体採取時の残留塩素濃度が 2.0mg/l 以上を EMA20 μg/ml、2.0mg/l 未満を EMA5 μg/ml で行い、Fast Pure DNA Kit (TaKaRa) で DNA を抽出し、qPCR を行い培養法と比較した。

4) 実験浴槽 (モノクロラミン消毒実験) の EMA-qPCR

実験浴槽を用いて、最初に浴槽および循環配管を洗浄した後、モノクロラミンを 3mg/l になるように調整し、毎日数人ずつ入浴した。実験 1 ではモノクロラミン消毒開始 4 日目から浴槽水 (CB) とろ過器内水を 18 日目までそれぞれ 9 回採取し、消毒を中止した。その後、44 日後に 1 回採取した。

実験 2 では消毒開始 5 日目～18 日目まで浴槽水とろ過器内水をそれぞれ合計 6 回採取し、18 日目に消毒中止し、その後、14 日目に各 1 検体採取した。

実験 1 および 2 で採取した検体について菌分離とともに EMA 処理と対照から DNA を抽出し、qPCR を行い分離菌数との相関を比較した。

結果および考察

1 DNA 検出法による検量線の作成

標準菌株の希釈系列 (1~10⁶CFU) から GL カラム法で抽出した DNA を用いて qPCR と LAMP の検量線を作成した。qPCR では全ての希釈系列のデータが採用でき、直線性も高かった (図 1)。しかし、LAMP 法では菌数が少ないものを採用すると直線性が悪くなった。

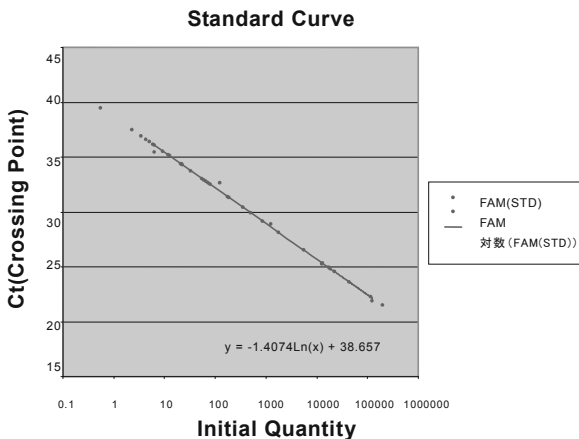


図 1 qPCR の検量線

2 実検体を用いた DNA 検出法の検討

実検体 (111 検体) から DNA を抽出し qPCR を行った結果、全ての検体でインターナルコントロールの増幅

がみられ、qPCR の増幅阻害が認められなかったことから、GL カラム法は温泉の成分にかかわらず DNA 抽出が可能なことが確認された。

培養法 (111 検体中陽性 48, 陰性 63) に対して qPCR (111 検体中陽性 70, 陰性 41) の陽性一致率は 89.6% (43/48), LAMP 法 (74 検体中陽性 33, 陰性 41) では 90.0% (27/30) で、ほぼ同等であった。

培養陰性で DNA 陽性の検体は qPCR で 42.9% (27/63), LAMP 法では 13.6% (6/44) であったが、これは死菌の DNA を検出した可能性が考えられ、検出された死菌 DNA を考慮した評価および生菌との識別が必要と思われた。

また、高濃度の培養陽性検体の一部で DNA が検出されなかったが、今回用いた qPCR のプライマーでは検出できないレジオネラ属菌が数種知られており、それらのレジオネラ属菌の可能性が考えられた (図 2)。

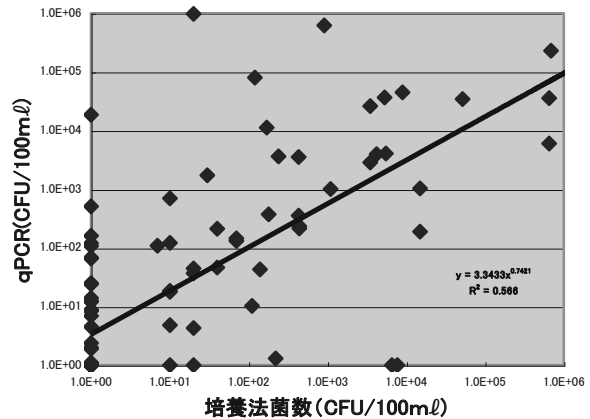


図 2 qPCR と培養法の相関 (111 検体)

qPCR と LAMP 法共に試験した 74 検体の比較では qPCR 陽性で LAMP 法陰性が 15% (11/74) で、LAMP 法陽性で qPCR 陰性が 1.4% (1/74) で偽陽性がないと仮定すると qPCR がより高感度と考えられた。

培養法と DNA 検出法の定量性を比較した結果、10² ~ 10³CFU/100ml 以上の浴槽水で両者に相関が認められた。qPCR と LAMP 法の菌数の比較ではさらにより相関が認められた。しかし、qPCR 法陽性の 10³CFU/100ml 以下の検体において LAMP 法では陰性となったものが多くみられ、LAMP 法では低濃度域の定量に検討が必要と思われた。

また、実験浴槽を用いた実験 (15 検体) では、適切に塩素管理され菌が検出されない期間と、無殺菌循環で菌数の増加した期間の菌数の変化を qPCR を用いて正確に把握することが出来た (図 3)。

以上の結果から、DNA 検出法として qPCR を採用した。

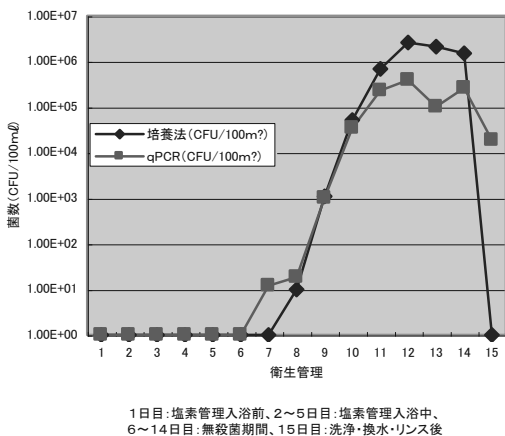


図3 モデル浴槽でのレジオネラ属菌数の推移

3 GL カラム法と市販 DNA 抽出キットの比較

標準菌液の希釈系列からモノリスカラム (GL サイエンス) と市販の DNA 抽出キットで抽出・精製した DNA で検量線を作成した結果、いずれも直線性の高い検量線が得られ、検出感度は 10CFU/tube であった (図4)。

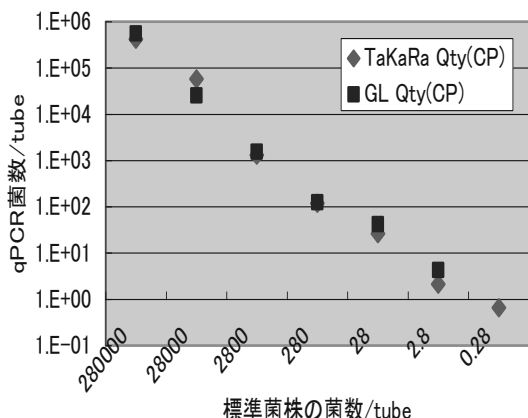


図4 GL カラム法と市販抽出キットの比較

市販キットによる抽出 DNA の溶出量を $20 \mu\ell \times 1$ 回と $50 \mu\ell \times 2$ 回で行った結果、どちらも直線性の高い検量線が得られたが、検出感度は $50 \mu\ell \times 2$ 回の方が高く、培養法 (10CFU/100ml) と同等の 5.5 CFU/100ml の検出が可能であった。

実検体 (102 検体) について市販キットで DNA を抽出し、 $5 \mu\ell$ をテンプレート DNA として qPCR を行った結果、全ての検体でインターナルコントロールが増幅され、市販の抽出キットもモノリスカラムと同様に qPCR の増幅阻害を起こす物質を除去できると考えられた。また、菌分離の成績との比較から死菌 DNA を検出するものの市販抽出キットで抽出した DNA による qPCR も培養法とほぼ関連することが確認された (図5)。

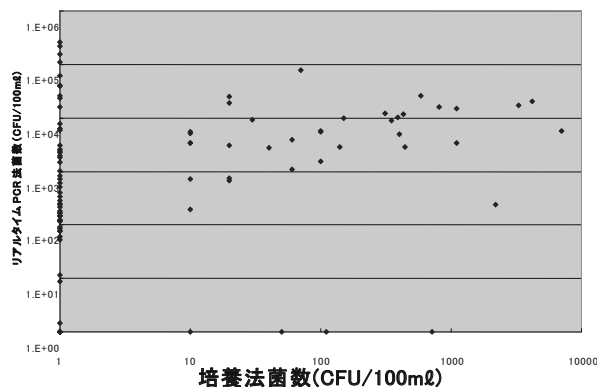


図5 市販 DNA 抽出キットによる qPCR

4 EMA 処理による生菌・死菌鑑別

通常の PCR で EMA の効果を確認した結果、生菌の試料は全ての EMA 濃度でレジオネラに特異的な DNA (430bp) が検出された。加熱死菌では EMA 濃度が $0 \mu\text{g/ml}$ では DNA が検出されたが、 $10 \sim 40 \mu\text{g/ml}$ では DNA は検出されなかった。この結果から、EMA 処理によって生菌と死菌の鑑別 PCR が可能であることが確認された (図6)。

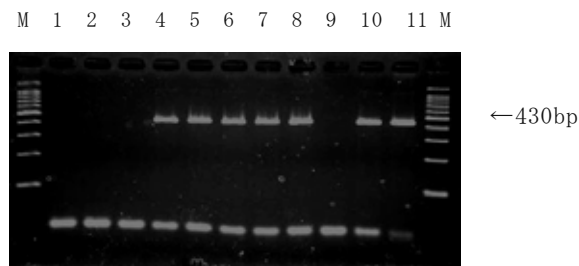


図6 EMA 処理による通常の PCR

M : マーカー, 1~4 : 加熱死菌, 5~8 : 生菌
9 : 陰性対照, 10, 11 : 陽性対照

EMA 処理濃度 :

1, 5 : $40 \mu\text{g/ml}$, 2, 6 : $20 \mu\text{g/ml}$
3, 7 : $10 \mu\text{g/ml}$, 4, 8 : $0 \mu\text{g/ml}$

標準菌株 (生菌) の希釈系列を用いて EMA 処理した DNA の検出に用いる qPCR を Dice (TaKaRa) で行った結果、直線性の高い検量線が得られ、レジオネラ属菌の定量的検出ができた。

そこで qPCR を用いて、実検体 64 検体について EMA-qPCR を行った結果、菌が分離された 25 検体のうち、15 検体 ($10 \sim 4,000 \text{CFU/100ml}$) の対照で DNA が検出され、これらの検体のうち EMA 処理で DNA が減少した検体には死菌 DNA が存在していたことが推測された。また、菌分離されなかった検体の多くでは DNA も検出さ

れなかったので死菌も存在しなかったと推測された。

しかし、菌分離陽性の検体のうち 10~220CFU/100ml の 10 検体で DNA が検出されなかったことから、検体の処理方法などさらに検体を増やして検討する必要があると思われた(図7)。

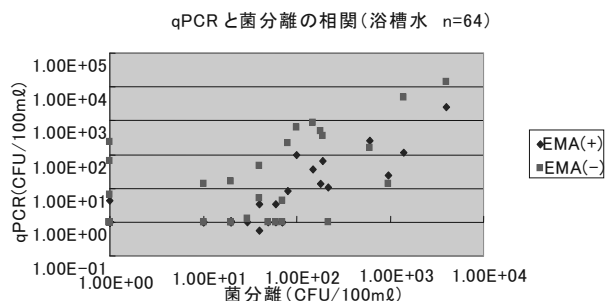


図7 EMA-qPCR と培養法の相関

また、実験浴槽(井水)でモノクロラミンの消毒効果の確認試験を実施した際に、菌分離と平行してEMA-qPCRを行った結果、実験1では、消毒実施期間の消毒4日目(CB3)~18日目(CB11)に採取した浴槽水からはレジオネラ属菌は分離されず、生菌のDNAも検出されなかったが、死菌のDNAは検出され徐々に減少した。また、消毒を中止して44日後(CB12)の浴槽水からはレジオネラ属菌が分離され、qPCRでも生菌と死菌のDNAが検出され分離菌数と定量的によく相関していた(図8)。

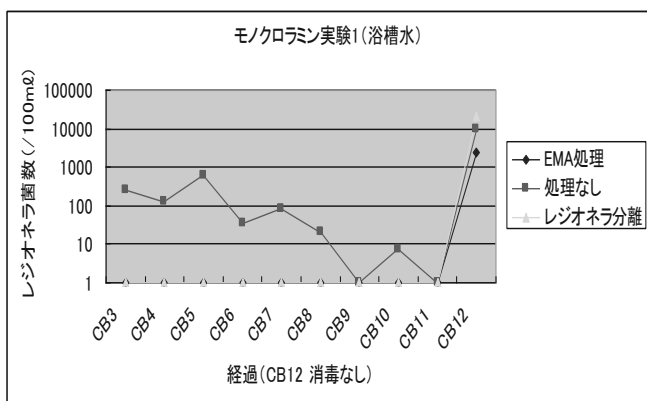


図8 モノクロラミン実験1(浴槽水)

実験2(消毒期間CB3~CB8、消毒中止後CB9)においても同様の成績が得られた(図9)。また、ろ過器内水も同様の結果であった。このことから、衛生管理された浴槽水をEMA処理しないで通常のPCRやqPCRを行った場合、死菌のDNAを検出してしまふ可能性があることが確認された。

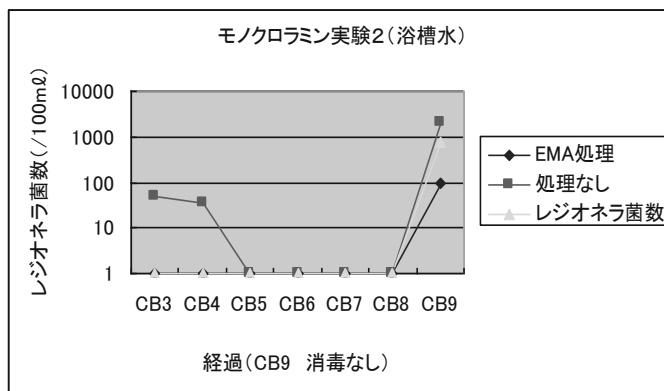


図9 モノクロラミン実験2(浴槽水)

以上のことからEMA処理とqPCRを組み合わせた方法は検体処理等について若干検討の余地あるものの浴槽水中のレジオネラ属菌の状況を迅速・簡便に把握する方法として実用性が高く、入浴施設の衛生管理のための検査方法として非常に有用であると考えられた。

まとめ

浴槽水中のレジオネラ属菌の有無を迅速に検出するための方法を検討した。

浴槽水等について培養法と核酸検出法としてリアルタイムPCR法とLAMP法の比較した結果、核酸検出法は短時間で培養法と相関する結果が得られることを確認した。特に定量性ではリアルタイムPCR法がLAMP法より優れていた。

各種泉質の温泉水からのDNA抽出は酵素溶菌法(カラム法)を用いることでPCR反応阻害もなく、市販の抽出キットが使えることを確認した。

しかし、通常リアルタイムPCR法では浴槽水中の生菌と死菌両方のDNAを検出してしまふため、生菌と死菌のDNAを鑑別する目的で検体をEMAで処理する方法を検討した結果、浴槽水中の生菌と死菌の状況をより正確に検出することができた。

以上の結果から、今回検討した迅速検査法で浴槽水中のレジオネラ属菌の状況を短時間で把握することが可能となり、菌分離を補完する迅速な検査方法として浴槽水の衛生管理や事故発生時の行政指導等に役立つと思われる。

本研究は平成19~21年度厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」(研究代表者 倉文明)によって行った。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：病原微生物検出情報，29，327-328（2008）
- 2) 杉山寛治他：生活環境水のレジオネラ汚染およびレジオネラ症患者調査－循環濾過式浴槽水を感染源とするレジオネラ症集団感染事例と検査－，静岡県環境衛生科学研究所報告，43，1-4（2000）
- 3) 遠藤卓郎他：DNA 抽出法の改良，厚生労働科学研究補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究 平成 20 年度総括・分担研究報告書（研究代表者 倉文明），25-35（2009）
- 4) Yamazaki, H. : Comparison of Detection Methods of *Legionella* Species in Environmental Water by Colony Isolation, Fluorescent Antibody Staining, and Polymerase Chain Reaction, *Microbiol. Immunol.*, 37(8), 617-622(1993)
- 5) Chang, B. et.al. : Specific Detection of Viable *Legionella* Cells by Combined Use of Photoactivated Ethidium Monoazide and PCR / Real-Time PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 147-153(2009)

PBMC(peripheral blood mononuclear cell:末梢血単核球)中のHCV-RNA (C型肝炎ウイルス核酸)の高感度検出に関する研究

—C型慢性肝炎患者のSerotype別の比較—

微生物部 微生物スタッフ 山田俊博, 湊 千壽, 長岡宏美,
川森文彦, 杉山寛治

静岡県立大学 食品栄養科学部 大橋典男

静岡県立総合病院 消化器センター 国立裕之*

Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells
—Comparative studies of PBMC HCV-RNA between Serotype 1 and 2 in chronic hepatitis C—

Toshihiro YAMADA, Chihiro MINATO, Hiromi NAGAOKA,
Fumihiko KAWAMORI, Kanji SUGIYAMA, Norio OHASHI and Hiroyuki KOKURYU

C型慢性肝炎(C-CH)患者の末梢血単核球(PBMC)中から、HCV-RNA本体であるプラス鎖RNAと複製を示すマイナス鎖RNAを、TaqManプローブを用いたリアルタイムPCR法およびSYBR-Greenの融解曲線分析によるRT-nested PCR法で検出し、これらのHCV診断における有用性を検討した。静岡県立総合病院消化器センターの協力を得て、インターフェロン(IFN)未治療のC-CH患者50例を対象とした。これら50例のHCV遺伝子型は、Serotype 1が28例、Serotype 2が22例であった。これら2群のPBMC中HCV-プラス鎖RNA量を比較した結果、Serotype 1群(平均±SD: 43,558±117,481 copies/PBMC/ml Blood)はSerotype 2群(平均±SD: 1,323±2,412 copies/PBMC/ml Blood)より有意に高かった($p < 0.01$; Mann-Whitney U test)。C-CH患者のIFN治療においてSerotype 1が抵抗性を示すことは明らかであるが、その理由は解明されていない。今回の我々の研究結果から、PBMC中のHCV-プラス鎖RNAがそのことに関与している可能性が示唆された。

Key words: C型慢性肝炎, 末梢血単核球, HCV-プラス鎖RNA, HCV-マイナス鎖RNA

Chronic hepatitis C, Peripheral blood mononuclear cell, Positive-strand HCV, Negative-strand HCV

はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)のゲノムは9,600塩基からなる一本鎖のプラス鎖RNAウイルスである。HCVには遺伝子型があり、11種類の大きなグループの遺伝子型が同定されている。本邦では、Genotype 1bが70%を占め、2a、2bもそれぞれ20%、10%を占めている¹⁾。Genotypeはインターフェロン(IFN)感受性と大きく関与することが明らかとなっている。すなわち、本邦で一番多いGenotype 1bはIFNに対する感受性が不良であり、Genotype 2a、

2bは良好である²⁾。厚生労働省のC型肝炎の治療ガイドラインでは、HCVの型によって治療方針が決定されるため、ウイルス型の決定は非常に重要である³⁾。本邦では、保険適応となっているSerotypeによるグルーピングで型分類が行なわれており、Genotype 1bはSerotype 1、Genotype 2a、2bはSerotype 2に分類される。また、同ガイドラインでは、血清中のHCV-RNA量が5 Log IU/ml(100 KIU/ml)以上はIFNの治療効果が得られにくい高ウイルス量であり、それ未満が低ウイルス量であるとしており、IFN治療に不可欠なマーカーとして位置づけている³⁾。現在の標準治療であるペグインターフェロン(PEG-IFN)とリビリンの併用療法⁴⁾において、難治療性であるSerotype 1型の高ウイルス量症例では、約半数はウイルス排除が得られておらず⁵⁾、治療効果を向上させるにはserotypeや血清中のHCV-RNA量

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

*: 京都桂病院 消化器センター

cDNA合成

(ReverTra Ace- α , TOYOBO)

5×RT Buffer	4.0
10 mM dNTPs	2.0
ReverTra Ace	1.0
10 pmol/ μ l anti-sense primer	1.0
10U/ μ l RNase inhibitor	1.0
Sterilized Water	6.0
抽出t-RNA	5.0
total	20.0μl

(ASTEC PC808)

30°C、10 min → 42°C、20 min
→ 99°C、5 min → 4°C、forever

LightCycler-PCR

(LightCycler FastStart DNA Master HybProbe, ロシユ)

Sterilized Water	7.0
10 pmol/ μ l F-primer	1.0
10 pmol/ μ l R-primer	1.0
4 pmol/ μ l TaqMan Probe	1.0
TaqMan Master Mix	5.0
合成cDNA	5.0
total	20.0μl

No.	
1	検量線用plasmid 1.0E+07
2	検量線用plasmid 1.0E+07
3	検量線用plasmid 1.0E+03
4	検量線用plasmid 1.0E+03
5	検量線用plasmid 1.0E+01
6	検量線用plasmid 1.0E+01
7	Negative control
8	検体1
9	検体2

	temp.	hold	slop	temp2.	step size	step delay	mode	
Denature	95°C	600 sec	20	0	0	0	none	1 cycles
PCR	95°C	15 sec	20	0	0	0	none	45 cycles
	60°C	10 sec	20	0	0	0	single	
	72°C	10 sec	20	0	0	0	none	
Cooling	40°C	30 sec	20	0	0	0	none	1 cycles

図1. PBMC 中の HCV-プラス鎖 RNA 定量の検出方法

だけでなく新しいマーカーを用い、個々の症例の抗ウイルス療法への反応性を考慮して治療期間や投与量を決定する必要性が指摘されている⁶⁾。最近の研究で、末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell : PBMC) から HCV-RNA が検出されることが明らかとなっており、さらに、血清中から検出されない場合でも PBMC 中からは検出可能であった症例が報告されていることから⁷⁾、PBMC はウイルス増殖の場として考えられる。そこで今回我々は、C型慢性肝炎患者の PBMC 中から HCV-RNA 本体であるプラス鎖 RNA と複製を示すマイナス鎖 RNA を TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法と SYBR-Green の融解曲線分析による Nested RT-PCR 法で検出し、抗ウイルス療法への反応性に関する新しいマーカーとしての有用性について検討した。

材料および方法

検体は、静岡県立総合病院消化器センターにおいて、検査の同意が得られた IFN 未治療の C-CH 患者 50 例の末梢血液を用いた。これら 50 例の血清中の HCV-RNA 量 (コバス TaqMan HCV オート, ロシユ), HCV 遺伝子型 (Serotype によるグルーピング), ALT (Alanine Aminotransferase; 肝機能の指標) は、静岡県立総合病院で測定を行なった。末梢血液から Ficcoll-Paque (GE Healthcare) を用いて PBMC を分離後、その total-RNA(t-RNA) を ISOGEN (ニッポンジーン) で抽出した。t-RNA から PolyA⁺由来 RNA (HCV-マイナス鎖 RNA が含まれる分画) を PolyAtract mRNA Isolation Systems (プロメガ) を用いて分離した。

PBMC 中の HCV-プラス鎖 RNA の定量的検出は、抽出した t-RNA を ReverTra Ace- α (TOYOBO) とサーマルサイクラー-ASTEC PC-808 (アステック) を用いて逆転写反応を行い、LightCycler

FastStart DNA Master HybProbe (ロシユ) と LightCycler (ロシユ) を用いて Real-time PCR 法による測定を行なった。検出部位は、高度に塩基配列が保存されている 5' noncoding region を選択し、新たにプライマー (Forward: 5' -AGC GTC TAG CCA TGG CGT TAG TAT-3', Reverse: 5' -TGA GCG GGT TGA TCC AAG AAA GGA-3') とプローブ (5' -FAM-AAC CGG TGA GTA CAC CGG AAT TGC CA-Iowa BLACK FQ-3') を設定した。検量線用プラスミド (GenBank Accession No. D11355 の 74~214 の部位を組み込んだものを日本遺伝子研究所に作製依頼) は、1.0E+07 copies/PCR, 1.0E+03 copies/PCR, 1.0E+01 copies/PCR の各濃度を用いた(図1)。

PBMC 中の HCV-マイナス鎖 RNA の定性的検出は、抽出した t-RNA から HCV-マイナス鎖 RNA が含まれる分画である PolyA⁺由来 RNA を分離し、Tth DNA polymerase Kit (プロメガ) とサーマルサイクラー-ASTEC PC-808 (アステック) を用いて Mn²⁺および EGTA (グリコールエーテルジアミン四酢酸) 存在下で逆転写反応、Mg²⁺存在下で 1st-PCR を行い、LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (ロシユ) と LightCycler (ロシユ) を用いて融解曲線分析による検出を行なった。検出部位は、高度に塩基配列が保存されている 5' noncoding region を選択し、GenBank Accession No. E09659 (first sense primer: 5' -ACT CCA CCA TAG ATC ACT CC-3'), E09660 (first anti-sense primer: 5' -AAC ACT ACT CGG CTA GCA GT-3'), E09661 (second sense primer: 5' -TCT TCA CGC AGA AAG CGT CTA GCC A-3'), E09662 (second anti-sense primer: 5' -CAA TTC CGG TGT ACT CAC CGG TTC C-3') 各プライマーを用いた(図2)。

PolyA+由来RNA

t-RNA 10μℓ → PolyA+由来RNAの分離
(PolyAtract mRNA Isolation Systems, プロカ)

cDNA合成 (Tth DNA Polymerase, プロカ)

10 × RT Buffer(7.5mM EGTA含)	2.0
10mM MnCl ₂	2.0
2.5 mM dNTP	2.0
20 pmol/μℓ sense primer	1.0
Tth polymerase	1.0
Sterilized Water	7.0
PolyA+由来RNA	5.0
total	20.0μℓ

(ASTEC PC808)

50°C、5 min → 95°C、20 min

1st PCR (Tth DNA Polymerase, プロカ)

10 × Chelate Buffer	8.0
25mM MgCl ₂	8.0
20 pmol/μℓ sense primer	1.0
Sterilized Water	63.0
total	80.0 μℓ

(ASTEC PC808)

95°C	5 min	} 35 cycles
94°C	30 sec	
57°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	
4°C	forever	

2nd LightCycler-PCR

(LightCycler FastStart DNA Master SYBRGreen I , ロシユ)

Sterilized Water	13.4
25 mM MgCl ₂	1.6
10 pmol/μℓ 2nd F-primer	1.0
10 pmol/μℓ 2nd R-primer	1.0
10 × LC SYBR-Master Mix	2.0
1st PCR産物	1.0

total 20.0μℓ

	temp.	hold	slop	temp2.	step size	step delay	mode	
Denature	95°C	600 sec	20	0	0	0	none	1 cycle
Touch down	95°C	15 sec	20	0	0	0	none	5 cycles
	66°C	10 sec	20	62 °C	1	1	none	
PCR	72°C	10 sec	20	0	0	0	single	20 cycles
	95°C	15 sec	20	0	0	0	none	
	62°C	10 sec	20	0	0	0	single	
Melting C.	72°C	10 sec	20	0	0	0	single	1 cycle
	95°C	0	20	0	0	0	none	
	67°C	15 sec	20	0	0	0	none	
	95°C	0	0.1	0	0	0	Continuous	
Cooling	40°C	30 sec	20	0	0	0	none	1 cycle

図2. PBMC中のHCV-マイナス鎖RNA定性の検出方法

結果

C-CH患者50例のHCV遺伝子型は、Serotype 1が28例、Serotype 2が22例であった。2群の血清中のHCV-RNA量は、Serotype 1群(平均±SD: 2,287±1,275 KIU/ml)とSerotype 2群(平均±SD: 2,291±1,659 KIU/ml)に有意差はなかった($p > 0.05$: Student t-test)。また、2群の血清中のALT値は、Serotype 1群(平均±SD: 99.0±135.5 IU/l)とSerotype 2群(平均±SD: 87.9±60.2 IU/l)に有意差はなかった($p > 0.05$: Welch t-test)。そして、これら2群のPBMC中HCV-プラス鎖RNA量を比較した結果、Serotype 1群(平均±SD: 43,558±117,481 copies/PBMC/ml Blood)はSerotype 2群(平均±SD: 1,323±2,412 copies/PBMC/ml Blood)より有意に高かった($p < 0.01$: Mann Whitney U test)(図3)。また、PBMC中のHCV-マイナス鎖RNAは、血清中のHCV-RNAが高ウイルス量で、Serotype 1群とSerotype 2群でPBMC中のHCV-プラス鎖RNAが高い値を示した上位5症例づつについて検出を行なったが、10例とも全て陰性であった。

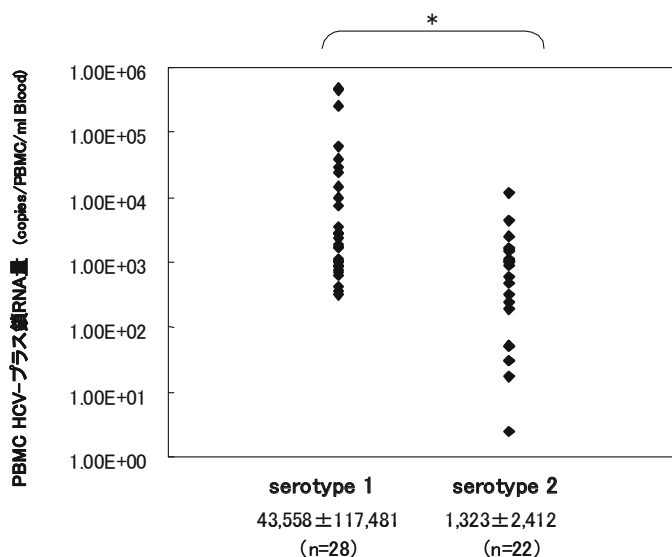


図3. 各 Serotype 群の PBMC 中の HCV-プラス鎖 RNA 量

* $p < 0.01$, Mann Whitney U test

考 察

今回対象とした C-CH 患者 (50 例) は, Serotype 1 群 (28 例) と Serotype 2 群 (22 例) において, 血清中の HCV-RNA 量と肝機能の指標である ALT 値に有意な差を認めない両群であったが, PBMC 中の HCV-プラス鎖 RNA 量が Serotype 1 群で有意に高かった. これまでにも PBMC から HCV-RNA が検出されることが報告されていたが⁷⁾, 今回の結果の様に Serotype の違いにより HCV-プラス鎖 RNA 量に多寡があることを示した報告はない. Serotype 1 は IFN 治療において, 抵抗性を示すことが知られており²⁾, 今回の我々の結果は, このことが PBMC における HCV 動態と深く関係している可能性を示唆している. すなわち, C-CH 患者の IFN 治療において, Serotype 1 が抵抗性であるのに対し, Serotype 2 が感受性であることを裏付ける根拠を示している可能性が考えられた. 一方, PBMC 中の HCV-マイナス鎖 RNA は, Serotype 1 および 2 において, 血清中の HCV-RNA が高ウイルス量で PBMC 中の HCV-プラス鎖 RNA が高値を示した検体においても検出されなかった. マイナス鎖は, 増幅の中間体と考えられ, その検出はウイルス増殖の直接的な証明になり得ると考えられるが^{8, 9)}, 今回の我々の結果からは, 臨床的意義に結びつかなかった. 今後は, Serotype 1 群における PBMC 中の HCV-プラス鎖 RNA 量について, IFN 治療との関連性について追究していきたい. Serotype 1 における治療抵抗性の原因が究明されれば, IFN 治療の奏効率の向上に繋がるのが考えられ, その診断マーカーとしての意義は高くなるものと考えられた.

文 献

- 1) Takada, N. et al.: Differences in the hepatitis C virus Genotypes in different countries, *J. Hepatol.*, **17**: 277-283 (1993)
- 2) Martinot-Peignoux, M. et al.: Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C, *Hepatology*, **22**: 1050-1056 (1995)
- 3) 厚生労働科学研究費補助金, 肝炎等克服緊急対策研究事業 (肝炎分野), 肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究, 平成 19 年総括・分担研究報告書, 1-11 (平成 20 年 3 月)
- 4) Berg, T. et al.: Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy, *Hepatology*, **37**: 600-609 (2003)
- 5) 飯野四郎他: Genotype 1 かつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎に対する PEG-インターフェロン α -2b とリバビリン 48 週併

用療法の有用性—インターフェロン α -2b とリバビリン 6 ヶ月併用療法との retrospective な比較, *肝胆膵*, **49**, 1099-1121 (2004)

- 6) 小池和夫編: 肝炎のインターフェロン治療 up to date 2009, 15-23, 日本メディカルセンター, 東京 (2008)
- 7) Radkowski, M. et al.: Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C, *Hepatology*, **41**: 106-114 (2005)
- 8) 川島哲也他: プラス鎖およびマイナス鎖 HCV-RNA の検出, *日本臨床*, **53**, 294-99 (1995)
- 9) 髭修平: C 型慢性肝炎の肝組織内 RNA 量の測定—プラス鎖 RNA マイナス鎖 RNA—, *日本臨床*, **62**, 417-421 (2004)

日本薬局方 *l*-メントールの試験法の問題点 - GC 法の適用について -

医薬食品部 医薬食品スタッフ 尾藤孝弘, 山本真也, 水野くみ子^{※1},
 宮本憲吾, 上野千恵, 上村慎子,
 栗田浩幸^{※2}, 前田有美恵, 高橋一則,
 西澤雅彦^{※3}

Study on Purity Test and Determination of *l*-Menthol
 in The Japanese Pharmacopoeia
 - Application of Gas Chromatography -

Takahiro BITO, Masaya YAMAMOTO, Kumiko MIZUNO,
 Kengo MIYAMOTO, Chie UENO, Mitsuko KAMIMURA,
 Hiroyuki KURITA, Yumie MAEDA, Kazunori TAKAHASHI
 and Masahiko NISHIZAWA

日本薬局方 *l*-メントール定量法は、水酸基のアセチル化後、未反応の無水酢酸を滴定する方法で、定量値に異性体が含まれてしまう問題があり、操作も煩雑である。そこで、ガスクロマトグラフィーによる分析法を検討したところ、特異性が高く、精度も良く簡便な分析が可能であった。

Key words: 日本薬局方, *l*-メントール, ピリジン, ガスクロマトグラフィー (GC)
 The Japanese Pharmacopoeia, *l*-menthol, pyridine, gas chromatography (GC)

はじめに

日本薬局方(以下、日局)は医薬品の性状および品質を示す基準書で、医薬品の規格、試験法などを記した公定書であり、医療や分析技術の発達にしたがい、定期的に改正が行われている。しかし、一部には問題のある試験法も残っており、県内の製造業者等からもこれらの改正を望む声がしばしば聞かれる。

当研究所では、平成 19 年度より日局試験法の問題点の改善を目的とする研究を行っており、これまでにウルソデオキシコール酸中の類縁物質試験に関する検討¹⁾および練り歯磨き中のジエチレングリコールの分析法の検討²⁾を行った。

l-メントールは、日局³⁾に記載されている医薬品で、

鎮痛・制痒作用や殺菌・防腐作用があり、内用としては、消化管の運動、分泌、吸収などの機能亢進や胃粘膜の鎮痛・鎮吐作用を目的として、外用としては、皮膚掻痒、神経痛、昆虫刺傷等に用いられる⁴⁾。また、その爽快な香気と清涼感から芳香、矯味、矯臭を目的としても用いられ、食品、飲料、たばこ、歯磨剤、化粧品などにも広く使用されている。*l*-メントールには図 1 に示すように

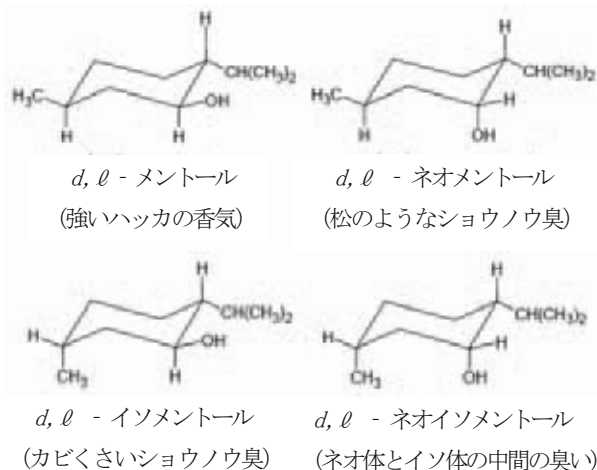


図 1 *l*-メントールとその異性体

静岡県環境衛生科学研究所
 (〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)
 Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
 (4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

- ※1: 東部健康福祉センター
- ※2: 厚生部生活衛生局薬事室
- ※3: 県民部環境局水利用室

異性体が存在し、これらの異性体は ℓ -メントールに比べて香気や清涼感が弱く、異なる香気を持つものもある⁴⁾。

日局 ℓ -メントール定量法は、無水酢酸でメントールの水酸基をアセチル化した後、残った無水酢酸を水で分解し、生じた酢酸を水酸化ナトリウム液で滴定する方法⁴⁾である。この方法によると、定量値には異性体も含まれることになる。また、操作が煩雑であるため誤差を生じる原因になりやすい。そこで、特異性の高い分離定量法であるガスクロマトグラフィー(以下、GC)による定量法の検討を行った。

調査方法

1 試料

ℓ -メントールおよびその異性体 (ℓ -イソメントール、 ℓ -ネオメントール、 d -メントール) は高砂香料工業(株)より提供を受けた。

2 試薬

試薬はいずれも和光純薬工業(株)製で、ピリジンは非水滴定用、無水酢酸は有機合成用、安息香酸 n -プロピルおよびエタノールは特級を用いた。

3 日局定量法(滴定法)

試料 2g にピリジン/無水酢酸混液(8 : 1) 20ml を加え、還流冷却器を付け、水浴上で 2 時間加熱した。その後、冷却器を水で洗い込み、1 mol/l 水酸化ナトリウム液で滴定した。試薬ブランクとの滴定量の差から ℓ -メントール含量を算出した。

4 GCによる定量法および純度試験法

1) 定量用試料溶液および標準溶液の調製

試料および標準物質をエタノールに溶かし、内標準物質として安息香酸 n -プロピルを加え、いずれも 1mg/ml とし、定量用試料溶液および標準溶液とした。

2) 純度試験用試料溶液および異性体標準溶液の調製

ℓ -メントールをエタノールに溶かし 10mg/ml とし、純度試験用試料溶液とした。また、異性体をエタノールに溶かし、5~100 μ g/ml の異性体標準溶液を調製した。さらに、ピークの分離確認用試料溶液として、純度試験用試料溶液に、 ℓ -イソメントールおよび ℓ -ネオメントールを ℓ -メントールに対し 0.05%、すなわち 5 μ g/ml 添加した。

3) 分析条件

装置 : GC2014 ((株)島津製作所製), 検出器 : 水素炎イオン化検出器, カラム : DB-WAX 内径 0.25mm, 長さ 30m, 膜厚 0.25 μ m (Agilent Technologies 製), カラム温度 : 130 $^{\circ}$ C, 注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C, 検出器温度 : 250 $^{\circ}$ C, キャリアガス : 窒素, スプリット比 : 20 : 1, 注入量 : 1 μ l

結果および考察

1 日局定量法(滴定法)

試験者 2 名により、 ℓ -メントール製品 6 ロットをそれぞれ 2 回ずつ試験した。分散分析による併行精度は 0.2% であった。

2 純度試験

ピークの分離確認用試料溶液のクロマトグラムを図 2 に、 ℓ -メントールおよび各異性体の保持時間を表 1 に示した。 ℓ -メントールに対し 0.05% の ℓ -イソメントールと ℓ -ネオメントールのピークは明瞭に検出され、いずれも ℓ -メントールのピークと完全分離した。 ℓ -イソメントールおよび ℓ -ネオメントールの各 10 μ g/ml 標準溶液について 6 回連続測定を行ったところ、ピーク面積の相対標準偏差は、それぞれ 2.8%, 1.1% であった。また、これらの検量線は、5~100 μ g/ml において、いずれも相関係数 0.9999 と良好な直線性を示した。これらの結果から、本試験法により ℓ -メントール中の 0.05% 以上の ℓ -体の異性体を検出し、定量できると考えられた。

ところで、原薬 GMP ガイドライン (Q7A)⁵⁾ では、既に使用実績のある原薬の不純物プロファイルの作成に当たっては、不純物の検出レベルは、新規原薬の不純物ガイドライン (Q3A-R)⁶⁾ と同様の 0.05~0.10% レベルが適切とされる。そのため、本試験法は、求められる既存原薬中の不純物の検出レベルを満たすと考えられた。

一方、表 1 に示したとおり、 d -メントールの保持時間は ℓ -メントールとほぼ一致しており、本試験条件では GC により d -体と ℓ -体を分離することはできなかった。その

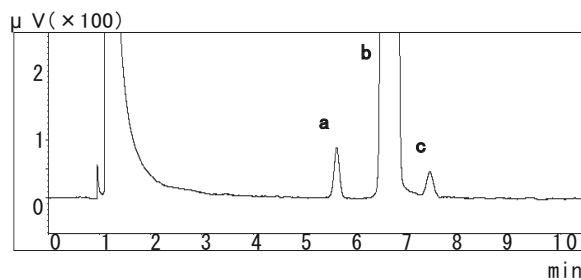


図 2 純度試験の分離確認用試料溶液のクロマトグラム

- a) ℓ -ネオメントール(5 μ g/ml)
- b) ℓ -メントール(10mg/ml)
- c) ℓ -イソメントール(5 μ g/ml)

表 1 ℓ -メントールおよびその異性体の保持時間

化合物	保持時間 (分)
ℓ -ネオメントール	5.8
ℓ -イソメントール	7.4
d -メントール	6.7
ℓ -メントール	6.7

ため、*l*-メントール中の *d*-メントールの検出はできないが、*d*-体の異性体については、日局に旋光度の規格が設定されているので、これに従う。

3 定量法

定量法の標準溶液のクロマトグラムを図3に示した。*l*-メントールのピークは保持時間 6.7 分、理論段数約 81,000 段、シンメトリー係数 1.0 であった。また、妨害となるピークも検出されなかった。検量線は濃度範囲 0.8~1.2mg/ml において、相関係数 0.9999 と良好な直線性を示した。1.0mg/ml の標準溶液について 6 回連続測定を行ったところ、ピーク面積比の相対標準偏差は 0.08% と再現性も良好であった。したがって、本試験法が *l*-メントールの定量において十分な精度を有することが明らかとなった。

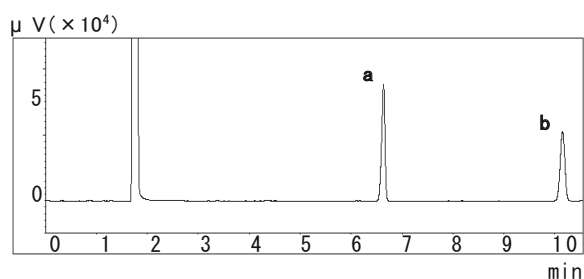


図3 定量法の試料溶液のクロマトグラム

- a) *l*-メントール(1mg/ml)
- b) 安息香酸 *n*-プロピル(1mg/ml)

まとめ

日局 *l*-メントールの定量法は、*l*-メントール以外の異性体も含めて定量値としており、操作が煩雑であるため、GC による定量法および純度試験法を検討した。その結果、簡便な方法で、*l*-メントールを特異的に精度よく分析できた。さらに、有害試薬と指定されないまでも不快臭を有する有機溶媒であるピリジンおよび反応性の高い無水酢酸を使用しないため作業者の負担を軽減することができた。

医薬品の品質管理上必要な公定試験法について問題点を改善することは、県内で製造、流通する医薬品の品質確保のためにも非常に有意義であると考えられる。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、御協力いただいた高砂香料工業株式会社に深く感謝致します。

文 献

- 1) 水野くみ子他：日本薬局方ウルソデオキシコール酸

中の類縁物質試験に関する検討，静岡県環境衛生科学研究所報告，No.50，37-40(2007)

- 2) 上村慎子他：練り歯磨き中のジエチレングリコールの分析，日本化粧品技術者会誌，42，No.1，36-39(2008)
- 3) 厚生労働省：第十五改正日本薬局方，平成 18 年 3 月 31 日付厚生労働省告示第 285 号
- 4) 日本薬局方解説書編集委員：第十五改正日本薬局方解説書，C-4451 -C-4459，廣川書店，東京(2006)
- 5) 厚生労働省医薬局長通知「原薬 GMP のガイドラインについて」，平成 13 年 11 月 2 日付け医薬発第 1200 号
- 6) 厚生労働省医薬局審査管理課長通知「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドラインの改定について」，平成 14 年 12 月 16 日付け医薬審発第 1216001 号

日本薬局方トリヘキシフェニジル塩酸塩錠の 試験法の問題点 -HPLC法の適用について-

医薬食品部 医薬食品スタッフ 尾藤孝弘, 山本真也, 宮本憲吾,
 上村慎子, 前田有美恵, 高橋一則

Study on Determination of Trihexyphenidyl
 Hydrochloride Tablets in The Japanese Pharmacopoeia
 - Application of High Performance Liquid Chromatography -

Takahiro BITO, Masaya YAMAMOTO, Kengo MIYAMOTO,
 Mitsuko KAMIMURA, Yumie MAEDA and Kazunori TAKAHASHI

日本薬局方トリヘキシフェニジル塩酸塩錠の定量法, 含量均一性試験法, 溶出試験法は呈色反応を利用した吸光度測定による試験法であり, 有害試薬であるクロロホルムおよびジクロロメタンを使用し, 操作が煩雑で誤差の原因となるおそれがある. そこで, 特異性の高い液体クロマトグラフィーを用いて, これらの問題点を解決することができる分析法を検討した. その結果, 日本薬局方試験法と同等以上の精度を有し, かつ有害試薬の削減により人体や環境への影響を低減できる分析法を確立した.

Key words: 日本薬局方, トリヘキシフェニジル塩酸塩, クロロホルム, ジクロロメタン,
 高速液体クロマトグラフィー
 The Japanese Pharmacopoeia, trihexyphenidyl hydrochloride, chloroform,
 dichloromethane, high performance liquid chromatography (HPLC)

はじめに

日本薬局方(以下, 日局)は医薬品の規格, 試験法などを記した公定書であり, 定期的に改正が行われている. しかし, 一部には問題のある試験法も残っており, 県内の製造業者等からもこれらの改正を望む声がしばしば聞かれる.

当研究所では, 平成19年度より日局試験法の問題点の改善を目的とする研究を行ってきた¹⁻³⁾.

また, 県の医薬品等品質確保対策事業のひとつとして, 当研究所で収去検査を行っており, その際, 日局トリヘキシフェニジル塩酸塩錠の試験法に問題点を見出した.

トリヘキシフェニジル塩酸塩(図1)は, 抗パーキンソン剤として用いられ, 錠剤, 散剤, 顆粒剤がある. 現在, 日局⁴⁾には, 原薬と錠剤が収載されている. 錠剤の

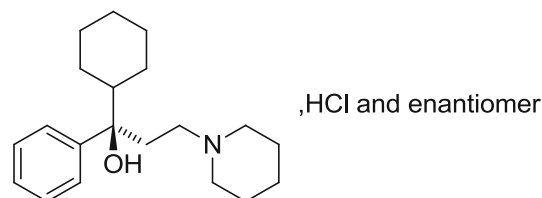


図1 トリヘキシフェニジル塩酸塩構造式

定量法と含量均一性試験法は, プロモクレゾールパープルによる呈色反応後, クロロホルムで抽出し, その吸光度を測定する方法である. この試験法の問題点は, 有機溶媒中の含水率によって吸光度が変化し, 再現性に乏しいこと⁵⁾, また, 日局技術情報2006⁶⁾(JPTI2006)において「使用について慎重に検討する溶媒」として挙げられているハロゲン化合物の1つであるクロロホルムを使用することである. さらに, 操作が煩雑であるため誤差の原因となるおそれがある. また, 溶出試験法も, 同様の呈色, 吸光度測定による方法で, 呈色試薬にプロモクレゾールグリーンを用い, ジクロロメタンで抽出する方法であり, 定量法や含量均一性試験と同様の問題点がある.

そこで、これらの試験項目について、特異性の高い液体クロマトグラフィーによる分析法を検討した。トリヘキシフェニジル塩酸塩錠には2mgと5mgの規格のものがあるが、より低濃度での試験法の検証のため、2mg錠をモデル製剤とした。

なお、散剤と細粒剤の溶出規格と試験法は日本薬局方外医薬品規格第三部⁷⁾に記載されており、HPLCによる方法であるため、試験法検討の際に参考とした。

調査方法

1 試料および試薬

含量均一性試験法および溶出試験法の検討用の試料として、日局トリヘキシフェニジル塩酸塩錠2mgの1製剤を用いた。

トリヘキシフェニジル塩酸塩の標準品として和光純薬工業(株)製の生化学用試薬を用いた。添加回収用の試料調製には賦形剤としてメルク製薬(株)製の日局乳糖(倍散用結晶)を用いた。その他の試薬は、和光純薬工業(株)製の特級以上のものを使用した。

2 日局定量法(呈色法)

日局トリヘキシフェニジル塩酸塩錠の定量法に従い、以下のとおり実施した。

粉末とした試料のトリヘキシフェニジル塩酸塩5mgに相当する量を取り、希塩酸、メタノールおよび水を加え試料溶液とした。別にトリヘキシフェニジル塩酸塩標準品を試料溶液と同様に調製し、標準溶液(50 μ g/ml)とした。試料溶液および標準溶液10mlずつを量り、プロモクレゾールパープル・リン酸水素二カリウム・クエン酸試液10mlおよびクロロホルム15mlを加え、遠心分離した。その後、それぞれのクロロホルム層10mlを量り、クロロホルムを加えて50mlとした。これらの液について、408nmにおける吸光度測定を行った。

3 HPLCによる定量法、含量均一性試験法と溶出試験法

1) 定量用試料溶液および標準溶液の調製

粉末とした試料のトリヘキシフェニジル塩酸塩約5mgに相当する量を取り、移動相に溶かし、50mlとした。この液を0.45 μ mのメンブランフィルターにてろ過し、試料溶液とした。別にトリヘキシフェニジル塩酸塩標準品を移動相で希釈し、標準溶液(100 μ g/ml)とした。これらの試料溶液と標準溶液各10 μ lについてHPLC測定を行った。

2) 含量均一性試験用試料溶液および標準溶液の調製

試料1錠を移動相に溶かし、50mlとした。この液を0.45 μ mのメンブランフィルターにてろ過し、試料溶液とした。別にトリヘキシフェニジル塩酸塩標準品を移動相で希釈し、標準溶液(40 μ g/ml)とした。この液10 μ lにつ

いてHPLC測定を行った。

3) 溶出試験用試料溶液および標準溶液の調製

日局トリヘキシフェニジル塩酸塩錠の溶出試験法に従い、得られた溶出液を試料溶液とした。別に標準品を溶出試験第2液で希釈し、標準溶液(2.2 μ g/ml)とした。この液50 μ lについてHPLC測定を行った。

4) 測定条件

装置：LC-2000plus(日本分光(株)製)、検出器：フォトダイオードアレイ検出器MD-2015plus(日本分光(株)製)、カラム：Mightysil RP18-GP 長さ150mm×内径4.6mm、粒子径5 μ m(関東化学(株)製)、カラム温度：30℃、移動相：pH3.0の0.05molリン酸塩緩衝液/メタノール混液(1:1)、流速：1.2ml/min、測定波長：210nm

結果および考察

1 定量法

1) 日局定量法(呈色法)

乳糖0.5gにトリヘキシフェニジル塩酸塩4, 5, 6mgを添加し、以下、試料溶液の調製と同様に操作して試料溶液の80, 100, 120%の3濃度について各3回の添加回収試験を行った。その結果、回収率は99.2~103.1%、併行精度は1.6%であった。

2) HPLCによる定量法

トリヘキシフェニジル塩酸塩標準溶液のクロマトグラムを図2に示した。トリヘキシフェニジルのピークは、保持時間10.5分、理論段数5,200段、シンメトリー係数1.1であった。また、試料溶液のクロマトグラムにおいても分析の妨害となるピークは検出されなかった。標準溶液について6回連続測定を行ったところ、ピーク面積の相対標準偏差は0.2%であり、特異性および再現性ともに良好であった。

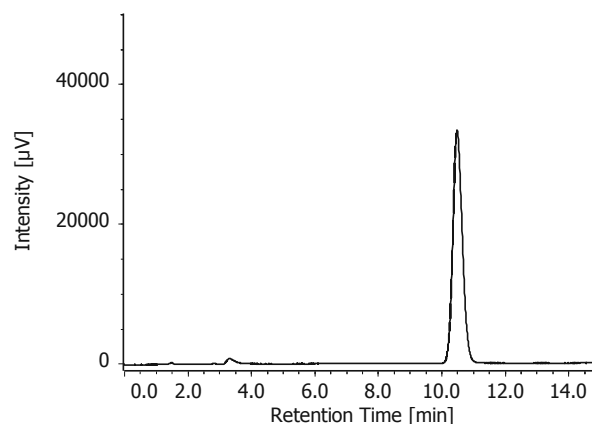


図2 定量法の標準溶液のクロマトグラム
トリヘキシフェニジル(100 μ g/ml)

検量線は濃度範囲 $80 \mu\text{g} \sim 120 \mu\text{g}/\text{ml}$ において相関係数 0.9999 と良好な直線性を示した。

また、乳糖 0.5g にトリヘキシフェニジル塩酸塩標準品を 4, 5, 6mg 添加し、以下、試料溶液の調製と同様に操作して試料溶液の 80, 100, 120% の 3 濃度について各 3 回の添加回収試験を行った。その結果、回収率は 99.5～101.8%, 併行精度は 0.7% といずれも良好であった。

以上の結果より、HPLC による定量法は呈色法と比較して同等以上の精度を有することが示された。また、有害なクロロホルムを使用せず、1 回 (n=6) の試験に必要な分析時間は呈色法と比較して約 1/2 であった。

2 含量均一性試験法

含量均一性試験では、錠剤の試料 1 錠をそのまま試験に供するが、試料溶液調製の際、試料に移動相を加えたとき、試料は容易に崩壊し、試験に支障が生じないことが確認できた。

また、標準溶液 ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$) について 6 回連続測定を行ったところ、ピーク面積の相対標準偏差は 0.2% であった。

検量線は標準溶液の 80～120% にあたる濃度範囲 $32 \sim 48 \mu\text{g}/\text{ml}$ において相関係数 0.999 と良好な直線性を示した。

以上の結果より、HPLC 法は、定量法と同様の試料溶液調製、同一の試験条件で、含量均一性試験にも十分適用できることが示された。

3 溶出試験法

トリヘキシフェニジルのピークは、保持時間 10.6 分、理論段数 7,800 段、シンメトリー係数 1.1 であった。また、試料溶液において、分析の妨害となるピークは検出されなかった。標準溶液について 6 回連続測定を行ったところ、ピーク面積の相対標準偏差は 0.8% であり、再現性は良好であった。

検量線は標準溶液の 80～120% にあたる濃度範囲 $1.76 \sim 2.64 \mu\text{g}/\text{ml}$ において相関係数 0.999 と良好な直線性を示した。

以上の結果より、HPLC 法は、定量法、含量均一性試験法と同一の試験条件で、溶出試験にも十分適用できることが示された。

まとめ

日局トリヘキシフェニジル塩酸塩錠の定量法、含量均一性試験法、溶出試験法は、有機溶媒の含水率によって吸光度が変化することが指摘されており、有害試薬であるクロロホルムやジクロロメタンを使用し、また操作が煩雑であるため誤差の原因となるおそれがある。そのため、HPLC による方法を検討した結果、有害試薬の削減により人体や環境への影響を低減し、試験時間の短縮が可

能となった。更に、定量法、含量均一性試験法、溶出試験法は、同一の HPLC 条件で試験が可能であり、医薬品製造所での品質試験において試験の効率化が期待される。

医薬品の品質管理に関する公定試験法について問題点を把握し、改善法を検討することは、県内で製造、流通する医薬品の品質確保のために有意義であると考えられる。

文 献

- 1) 水野くみ子他：日本薬局方ウルソデオキシコール酸中の類縁物質試験に関する検討，静岡県環境衛生科学研究所報告，No. 50，37-40 (2007)
- 2) 上村慎子他：練り歯磨き中のジエチレングリコールの分析，日本化粧品技術者会誌，42，No. 1，36-39 (2008)
- 3) 尾藤孝弘他：日本薬局方 *l*-メントール試験法の問題点—GC 法の適用について—，静岡県環境衛生科学研究所報告，No. 52，17-19 (2009)
- 4) 厚生労働省：第十五改正日本薬局方，平成 18 年 3 月 31 日付厚生労働省告示第 285 号
- 5) 日本薬局方解説書編集委員：第十五改正日本薬局方解説書，C-2806-C-2809，廣川書店，東京 (2006)
- 6) 財団法人日本公定書協会編：日本薬局方技術情報，39，じほう，東京 (2006)
- 7) 厚生労働省医薬局長通知「日本薬局方外医薬品規格第三部の一部改正について」，平成 13 年 12 月 25 日付け医薬発第 1411 号

LC/MS/MS による動物用医薬品の一斉分析に関する検討

医薬食品部 医薬食品スタッフ 影山知子, 前田友幸, 白井美樹,
 小郷沙矢香*, 中島美穂, 前田有美恵,
 高橋一則

Study of the Simultaneous Analytical Method
 for Residual Veterinary Drugs by LC/MS/MS

Tomoko KAGEYAMA, Tomoyuki MAEDA, Miki SHIRAI,
 Sayaka OGO, Miho NAKASHIMA, Yumie MAEDA
 and Kazunori TAKAHASHI

使用頻度が高い, または過去に違反事例がある等, 収去検査において分析の必要性が高い残留動物用医薬品の一斉分析法の検討を行った. 高感度・高選択性の分析が可能な LC/MS/MS を用い, 73 項目についてその測定条件を確立した. 前処理法は, 抽出溶媒にアセトニトリル:メタノール(7:3)を用い, 幅広い物性の動物用医薬品を抽出することを検討した. その結果, 検討した全ての試料において回収率が 70~120%かつ RSD20%以下の項目は 73 項目中 57 項目であった. 本法は, 広範囲の物性をもつ残留動物用医薬品の, 迅速かつ簡易な一斉分析法として有用であると考えられた.

Key words: LC/MS/MS, 動物用医薬品, 畜産食品, 一斉分析
 LC/MS/MS, veterinary drug, livestock product, simultaneous analysis

はじめに

畜水産物の飼育や養殖では, 生産性を高めるために, 疾病発生の予防や治療等の目的で抗生物質や合成抗菌性物質が用いられ, その使用量は年々増加している. 食品中に残留する動物用医薬品は, 食品衛生法に基づく規格基準によって規制されているが, 検疫所等で違反となる事例も散見されている.

この規格基準について平成 18 年 5 月 29 日からポジティブリスト制度が導入された¹⁾ことにより, 基準が設定されている動物用医薬品は, 制度施行前の 31 項目から約 250 項目に大幅に増加した. また, 抗生物質や合成抗菌性物質以外の動物用医薬品のうち, 基準が設定されていないものについては, 一律基準 (0.01ppm) が適用されることになった.

ポジティブリスト制度施行前に厚生労働省から示されていた試験法は, それぞれの動物用医薬品の物性ごとに

試験法が異なる個別試験的なものが多かった. 一方, 制度施行により増加した規制対象医薬品に対応するため, 新たに HPLC による一斉試験法 I, II および III (以下, 通知法) が通知された²⁾. しかしこれらの一斉試験法は, 適用対象とされている動物用医薬品全ての一斉分析を保証した試験法ではない. また, 各試験法において適用できる動物用医薬品が異なるため, 様々な種類の動物用医薬品を分析するためには, 複数の試験法を併用する必要があり, 多大な時間と労力を要する.

そこで, 使用頻度が高い, あるいは過去に違反事例がある等, 収去検査において分析の必要性が高い医薬品の効率的な一斉分析法の検討を行った. これらの医薬品はそれぞれ物性等が異なるため, 抽出には極性が異なる有機溶媒を混合することを試みた. また, 一律基準に対応するため, 高感度・高選択性の分析が可能な LC/MS/MS の分析条件の検討も行ったので, 報告する.

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

※: 中部健康福祉センター

分析方法

1 試料

あらかじめ動物用医薬品が残留していないことを確認した牛, 豚, 鶏の筋肉を試料とした.

2 検討項目

収去検査において分析の必要性が高い動物用医薬品の一斉分析を検討するため、静岡県西部食肉衛生検査所で実施した動物用医薬品使用状況調査結果³⁾や検疫所および他の地方衛生研究所等において公表された違反事例、検出事例等から選定した項目を中心に、表1-1および表1-2に示す73動物用医薬品を検討項目とした。

3 試薬等

1) 標準品

関東化学(株)製、林純薬工業(株)製、和光純薬工業(株)製、AccuStandard社製、Dr.Ehrenstorfer社製、Fluka社製、Riedel-de Haën社製またはSigma Aldrich社製の標準品および和光純薬工業(株)製混合標準液(PL-1-3)を用いた。

2) 標準原液および混合標準溶液

各標準品は、それぞれの溶解性に応じてメタノール、メタノール:アセトニトリル(1:1)またはアセトニトリルを用いて溶解し、100~1,000ppmの標準原液を作成した。標準原液と混合標準液を、濃度に応じて適宜混合し、アセトニトリル:水(4:6)で希釈し、混合標準溶液とし

た。

3) その他の試薬

アセトニトリルはLC/MS用、蒸留水はHPLC用、メタノール、ヘキサンおよび無水硫酸ナトリウムは残留農薬分析用を用いた。その他の試薬は特級を使用した。

4 装置および条件

1) 装置

高速液体クロマトグラフはWaters社製alliance2695、質量分析計はWaters社製Quattro micro APIを用いた。

2) HPLC条件

カラム:AtlantisT3 (Waters社製)

(2.1mmi.d.×150mm, 粒子径3μm)

カラム温度:40℃

流速:0.2mℓ/min

注入量:5μℓ

移動相:A液 0.1%ギ酸

B液 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液

表1-1 検討項目とMS条件(Aグループ)

No	項目名	R. T. (min)	定量用イオン測定条件				確認用イオン測定条件				フラグ ジョン		
			測定イオン(m/z)	CV(V)	CE(eV)	測定イオン(m/z)	CV(V)	CE(eV)					
1	スルファセタミド	10.6	215	→	156	10	10	215	→	108	10	20	
2	5-ヒドロキシチアベンダゾール	11.0	218	→	147	40	30	218	→	191	30	20	1
3	リンコマイシン	11.4	407	→	126	35	25	407	→	359	30	20	
4	クロビドール	11.7	192	→	101	50	30	192	→	192	40	15	
5	オキシテトラサイクリン	12.7	461	→	426	25	20	461	→	443	25	15	
6	シプロフロキサシン	12.9	332	→	314	25	20	332	→	231	40	35	
7	ダノフロキサシン	13.4	358	→	340	30	20	358	→	96	35	25	2
8	テトラサイクリン	13.5	445	→	410	30	10	445	→	154	30	25	
9	メトロプロラミド	13.7	300	→	227	30	15	300	→	184	30	30	
10	キシラジン	14.3	221	→	90	35	20	221	→	164	30	20	
11	クレンブテロール	14.5	277	→	203	30	15	277	→	132	20	30	
12	トリクロルホン	14.5	259	→	203	30	10	259	→	132	30	25	3
13	スルフィソゾール	14.8	240	→	92	20	25	240	→	156	30	25	
14	セファゾリン	14.8	455	→	323	20	10	455	→	156	20	15	
15	クロルテトロサイクリン	16.3	479	→	154	30	25	479	→	444	30	30	
16	ピリメタミン	16.9	249	→	177	50	30	249	→	198	50	35	4
17	ドキシサイクリン	17.2	445	→	428	20	15	445	→	154	20	30	
18	スルフィソキサゾール	18.7	268	→	156	20	15	268	→	92	20	20	5
19	チルミコシン	18.9	436	→	99	20	20	436	→	174	30	20	
20	2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール	17.8	186	→	139	-20	-10	186	→	96	-2	-30	
21	フロルフエニコール	18.1	356	→	336	-20	-10	358	→	185	-3	-20	6
22	クロルスロン	20.4	380	→	344	-30	-15	380	→	342	-3	-20	
23	プレドニゾン	22.3	361	→	343	20	10	361	→	147	20	20	
24	ヒドロコルチゾン	22.6	363	→	121	30	20	363	→	327	30	10	
25	タイロシン	23.4	917	→	174	65	40	917	→	772	65	30	7
26	チアムリン	23.8	494	→	192	30	20	494	→	119	30	40	
27	ベンジルペニシリン	23.3	335	→	217	30	15	335	→	220	40	15	
28	フルベンダゾール	24.5	314	→	282	30	20	314	→	123	30	35	8
29	デキサメタゾン	25.9	393	→	373	20	10	393	→	355	30	10	
30	エマメクチンB1a	28.7	886	→	158	50	40	886	→	82	30	40	
31	ファミフル	29.1	326	→	281	20	15	326	→	217	20	10	9
32	フェノブカルブ	29.1	208	→	95	30	15	208	→	152	30	10	
33	テメホス	31.5	467	→	419	30	30	467	→	125	35	25	10
34	アレスリン	31.8	303	→	135	15	10	303	→	91	20	40	
35	モネンシン	38.0	689	→	635	20	15	689	→	461	40	20	11

表1-2 検討項目とMS条件 (Bグループ)

No	項目名	R. T. (min)	定量用イオン測定条件				確認用イオン測定条件			ファンク
			測定イオン (m/z)	CV (V)	CE (eV)	測定イオン (m/z)	CV (V)	CE (eV)	ジョン	
36	レバミゾール	11.3	205 → 178	35	25	205 → 91	35	35		
37	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	11.5	240 → 133	40	25	240 → 198	20	20	1	
38	スルファジアジン	11.6	251 → 156	30	15	251 → 92	40	20		
39	チアベンダゾール	11.9	202 → 175	40	25	202 → 131	50	10		
40	スルファチアゾール	12.1	256 → 156	20	10	256 → 92	20	25		
41	トリメトプリム	12.2	291 → 123	35	25	291 → 230	40	25	2	
42	スルファピリジン	12.5	250 → 156	30	15	250 → 92	20	25		
43	オフロキサシン	12.7	362 → 261	20	25	362 → 318	30	10		
44	オルメトプリム	12.8	275 → 123	40	25	275 → 259	40	25		
45	スルファメラジン	13.2	265 → 156	20	15	265 → 172	20	15		
46	エンロフロキサシン	13.7	360 → 316	30	20	360 → 342	40	20		
47	チアンフェニコール	13.8	356 → 308	20	15	356 → 229	20	25	3	
48	オルビフロキサシン	14.1	396 → 267	40	35	396 → 378	40	20		
49	アンピシリン	14.3	350 → 114	20	15	350 → 106	20	20		
50	ネオスピラマイシン	14.3	699 → 174	40	30	540 → 174	50	20		
51	スピラマイシン	14.3	843 → 174	60	40	540 → 174	50	20	4	
52	スルファジミジン	14.5	279 → 186	30	15	279 → 92	30	30		
53	スルファメトキシピリダジン	14.6	281 → 156	30	20	281 → 92	30	30		
54	スルファモメトキシ	15.9	281 → 156	30	20	281 → 92	30	30		
55	スルファクロルピリダジン	16.5	285 → 156	20	15	285 → 92	20	25	5	
56	スルファドキシ	17.6	311 → 156	30	20	311 → 92	30	35		
57	スルファメトキサゾール	17.6	254 → 156	20	10	254 → 92	20	25		
58	オキシロニック酸	19.8	262 → 244	20	20	262 → 216	20	30		
59	エトバベート	20.8	238 → 206	25	10	238 → 136	40	20		
60	スルファジメトキシ	21.1	311 → 156	30	20	311 → 92	30	35	6	
61	スルファキノキサリン	21.2	301 → 156	20	15	301 → 92	10	25		
62	エリスロマイシン	21.7	734 → 158	30	35	734 → 576	30	20		
63	ナリジクス酸	24.2	233 → 215	30	15	215 → 187	30	20		
64	フルメキン	25.3	262 → 244	30	20	262 → 202	20	45		
65	スルファニトラン	26.1	336 → 156	30	10	336 → 134	40	20	7	
66	β-トレンボロン	27.2	271 → 253	40	20	271 → 165	40	20		
67	α-トレンボロン	27.7	271 → 253	40	20	271 → 165	40	20		
68	ピロミド酸	27.7	289 → 271	30	20	289 → 243	30	40		
69	ゼラノール	28.2	321 → 277	-20	-20	322 → 91	-45	-3	8	
70	ナフシリン	28.3	413 → 272	-20	-10	413 → 369	-20	-1		
71	ナイカルバジン	29.3	301 → 137	-20	-15	347 → 137	-10	-2	9	
72	酢酸メレンゲステロール	30.8	397 → 337	30	15	397 → 279	30	15	10	
73	イベルメクチン	35.6	897 → 753	70	45	897 → 329	70	55	11	

グラジエント条件 (A:B (分)) :

99:1 (0) → 80:20 (5) → 60:40 (20) → 0:100 (25)
→ 0:100 (40)

3) MS条件

イオン化モード: ESI positive, ESI negative
分析モード: Multiple Reaction Monitoring (MRM)
ソース温度: 120°C
脱溶媒温度: 350°C
コーンガス流量: 50ℓ/hr
脱溶媒ガス流量: 600ℓ/hr

5 試験溶液の調製

フードプロセッサで均一化した試料 5g を 100ml 遠沈管に採取し, 無水硫酸ナトリウム 10g, アセトニトリル:メタノール (7:3) 30ml およびアセトニトリル飽和 n-

ヘキサン 40ml を加えてホモジナイズした後, 3,000rpm で 5 分間遠心分離した. アセトニトリル層を 100ml ナスフラスコに分取し, 残ったヘキサン層と残渣にアセトニトリル:メタノール (7:3) 20ml を加えて 5 分間振とう抽出した後, 同様に遠心分離し, アセトニトリル層を先のナスフラスコに合わせた. n-プロパノール 10ml を加え, 減圧濃縮し, 完全に乾固させた. 残留物にアセトニトリル:水 (4:6) 1.0ml を加え, アセトニトリル飽和ヘキサン 1ml を加えて振とうした後, 遠心分離した. アセトニトリル・水層を取り, 0.2 μm フィルターでろ過し, 試験溶液とした. フローチャートを図1に示す.

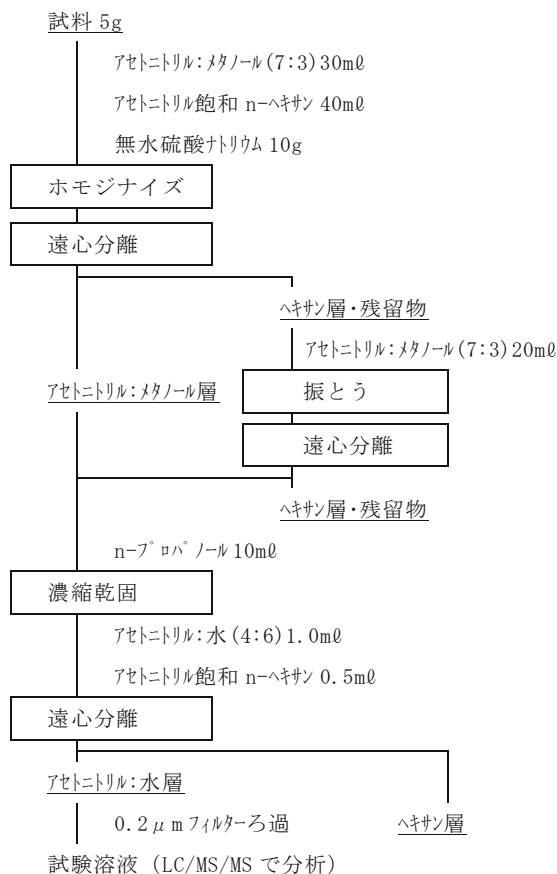


図 1 試験溶液調製方法

6 検量線の作成

各試料から調製した試験溶液に、各試料 5g (試験溶液 1mℓ) あたり 0.05 μg, 0.1 μg, 1 μg に相当する量の動物用医薬品を添加したマトリクス添加標準溶液を調製した。この標準溶液で検量線を作成し、MRM クロマトグラムのピーク面積から濃度を算出した。

結果および考察

1 HPLC 条件の検討

今回選定した項目は、極性が高いものから比較的低いものまで幅広い物性を有しているため、このような項目に対し保持や分離が可能な条件を検討した。

HPLC カラムは、動物用医薬品分析で一般的に使用され、幅広い極性に対応できるオクタデシルシリル化シリカゲルカラムについて検討した結果、極性の高い医薬品の保持が優れていた AtlantisT3 を用いることにした。

移動相は、通知法の測定条件を参考に、アセトニトリルとギ酸を用いた条件を検討した。アセトニトリル単独よりも、ギ酸を加えた方が、リテンションタイムが遅いイベルメクチン等のピーク形状が改善されたため、移動相は 0.1%ギ酸と 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液のグラジエント分析を採用した。

2 MS 条件

各標準原液をアセトニトリル:0.1%ギ酸(1:1)で希釈し、インフュージョン測定により直接 MS 部に導入し、イオン化条件の最適化を行った。なお、最も感度が強く得られたプロダクトイオンを定量用とし、次に高感度であったプロダクトイオンを確認用に選択することで、より選択性の高い分析が可能となった。

次に、各標準液について LC/MS/MS で単品測定を行い、リテンションタイムを確認した。各項目のリテンションタイムの時間差を考慮し、良好な分離と感度が得られるセグメントの設定を行った結果、検討対象物質を 2 グループ (A, B) に分け、それぞれ 11 ファンクションで測定することとした。決定した測定条件を表 1-1 および表 1-2 に示す。

以上の条件で、混合標準液 (0.5ppm) を 3 回繰り返して測定し、面積の再現性を調べた結果、RSD は 20%未満であり良好な結果が得られた。

3 検量線および定量下限値

LC/MS/MS で分析を行う際、試料由来のマトリクス成分がイオン化を促進または抑制し、定量を阻害することが知られている。そこで、同じ濃度の標準溶液とマトリクス添加標準溶液を測定し、比較したところ、マトリクス成分によるイオン化抑制または促進を受ける項目があった。このため、定量はマトリクス添加標準溶液による検量線で行うこととした。

マトリクス添加標準溶液を用いた検量線は、0.05ppm ~ 1ppm の範囲で、ベンジルペニシリン以外は相関係数 0.97 以上であった。

また、基準値が試料および項目ごとにそれぞれ異なるため、今回は、定量下限値として一律基準である 0.01ppm を目標値とし、各項目のマトリクス添加標準溶液が S/N ≥ 10 となる濃度を確認した。アンピシリン、スピラマイシンおよびイベルメクチンは、試料によってマトリクス添加標準溶液 0.05ppm (定量下限値換算: 0.01ppm) が測定できない場合があったが、その他の項目は全て 0.05ppm 以下が測定可能であった。なお、アンピシリンおよびスピラマイシンの定量下限値は 0.02ppm であったが、今回対象とした試料における基準値レベルの分析は可能であった。

4 前処理法の検討

検討項目とした動物用医薬品は物性等がそれぞれ異なる。物性が異なる多くの医薬品を同時に精製することは困難であること、LC/MS/MS は選択性に優れクロマトグラム上に妨害ピークが少ないことから、カラム精製を行わない通知法 I 法の改良を検討した。通知法 I 法で採用されているアセトニトリル抽出では、極性の高い物質は回

収率が低くなる事が報告されている⁴⁾。このため、抽出に極性が異なる溶媒を混合することとした。このような抽出溶媒としてアセトニトリル/水^{2,5)}、アセトニトリル/メタノール/メタリン酸²⁾、アセトニトリル/メタノール^{4,6)}等が報告されているが、抽出溶媒の濃縮乾固の工程における迅速性を考慮し、アセトニトリル/メタノールの混合溶媒を検討した。メタノール含量は30%および40%で比較した。40%で抽出した場合、最終試験溶液に目視

で確認できる程の夾雑物が多量に残ることがわかった。30%で抽出した場合は、最後に0.2μmフィルターに通すことで、夾雑物による影響を軽減することが可能であったため、抽出溶媒はアセトニトリル：メタノール(7:3)とした。

5 添加回収試験

試料に、混合標準溶液を0.1ppmになるように添加したときの回収率を求めた。結果を表2に示す。検討した全

表2 添加回収試験結果(n=3)

No	検討項目 (Aグループ)	牛		豚		鶏		No	検討項目 (Bグループ)	牛		豚		鶏	
		回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)			回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
1	スルファセタミド	111.0	1.8	97.7	0.8	90.9	2.8	36	レバミゾール	116.8	5.6	108.1	2.2	96.7	2.3
2	5-ヒドロキシ チアベンダゾール	104.8	3.1	96.1	1.9	95.3	4.2	37	5-β-ロピルスルホニル-1H- ベンズイミダゾール-2-アミン	103.9	4.7	90.7	4.2	81.8	7.1
3	リンコマイシン	112.3	0.9	103.7	0.8	99.3	3.8	38	スルファジアジン	114.1	5.3	105.9	1.2	114.1	1.8
4	クロピドール	116.3	5.6	101.6	2.7	99.0	2.3	39	チアベンダゾール	109.9	2.8	85.7	8.7	86.7	4.0
5	オキシテトラ サイクリン	55.2	4.7	64.0	1.9	64.1	1.4	40	スルファチアゾール	105.5	9.3	97.0	3.6	108.5	3.6
6	シプロフロキサシン	88.7	7.8	79.5	13.1	90.9	2.3	41	トリメトプリム	113.5	6.9	95.9	3.6	96.0	0.6
7	ダノフロキサシン	94.0	10.0	91.7	8.0	93.3	3.6	42	スルファピリジン	118.6	2.2	106.7	1.1	100.5	3.0
8	テトラサイクリン	63.0	5.2	67.9	6.6	66.9	3.1	43	オフロキサシン	105.0	2.3	108.3	7.4	105.9	3.4
9	メトクロプラミド	109.8	1.7	119.2	2.2	119.8	4.1	44	オルメトプリム	108.4	5.8	102.3	2.7	98.1	1.9
10	キシラジン	100.1	4.7	90.5	1.9	81.5	2.6	45	スルファメラジン	113.9	3.0	109.5	3.9	96.9	4.2
11	クレンプテロール	101.6	4.0	89.9	1.4	77.1	7.0	46	エンロフロキサシン	111.4	3.5	104.6	2.9	109.6	4.3
12	トリクロルホン	98.3	2.9	91.7	1.0	87.1	2.9	47	チアンフェニコール	113.1	12.4	105.1	2.0	98.1	3.9
13	スルフィソゾール	107.0	1.8	100.1	2.4	91.9	6.0	48	オルビフロキサシン	99.3	16.0	91.6	10.1	103.5	5.7
14	セファゾリン	94.3	13.4	90.4	5.8	81.0	1.5	49	アンビシリン	90.0	4.3	86.4	19.5	97.3	2.5
15	クロロテトラ サイクリン	43.0	6.2	50.4	4.4	50.1	1.5	50	ネオスピラマイシン	82.8	19.8	61.3	2.7	114.6	1.7
16	ピリメタミン	80.9	5.7	72.2	2.4	61.4	2.5	51	スピラマイシン	90.1	13.8	75.9	4.2	89.2	3.5
17	ドキシサイクリン	58.2	4.8	64.5	4.5	65.1	3.3	52	スルファジミジン	104.6	4.3	103.4	3.9	100.5	4.0
18	スルフィソキサゾール	103.2	0.5	97.7	0.5	93.5	2.7	53	スルファメトキシ ピリダジン	108.2	5.6	102.1	2.4	97.5	3.6
19	チルミコシン	102.2	3.1	91.0	6.8	91.5	2.2	54	スルファモノ メトキシ	115.2	6.8	108.1	2.0	98.3	5.1
20	2-アセチルアミノ- 5-ニトロチアゾール	93.9	9.1	99.1	2.8	85.1	4.8	55	スルファクロル ピリダジン	106.3	4.2	100.4	1.4	99.0	5.4
21	フロルフエニコール	106.4	15.0	113.9	4.0	93.1	8.3	56	スルファドキシ スルファメトキサ ゾール	98.9	1.4	101.1	7.6	119.4	0.5
22	クロルスロン	78.5	9.3	79.7	0.7	74.8	10.5	57	オキシソニック酸	110.6	3.6	100.0	3.7	109.5	3.7
23	ブレドニゾロン	88.8	6.3	80.7	6.6	90.2	4.6	58	エトパベート	106.1	6.8	104.7	2.3	87.3	3.0
24	ヒドロコルチゾン	96.2	9.8	91.7	1.4	84.3	5.7	59	スルファジメトキシ	97.0	2.4	99.7	6.1	118.6	2.0
25	タイロシン	99.0	6.3	74.7	13.8	87.1	8.9	60	スルファキノキサリン	102.7	1.8	99.9	1.4	94.3	4.2
26	チアムリン	108.2	3.1	101.9	1.7	86.7	6.0	61	エリスロマイシン	137.5	0.5	150.7	1.2	122.6	10.2
27	ベンジルベニシリン*	69.2	1.8	69.3	5.0	62.2	4.3	62	ナリジクス酸	92.9	6.7	88.7	2.6	83.7	1.2
28	フルベンダゾール	89.7	7.2	84.5	0.7	72.0	3.5	63	フルメキン	99.0	4.7	93.7	1.1	88.3	3.7
29	デキサメタゾン	91.0	5.6	92.2	3.3	82.9	4.5	64	スルファニトラン	95.9	6.1	86.4	1.4	81.7	9.4
30	エマメクチン B1a	69.7	4.6	66.8	3.9	53.9	7.6	65	β-トレンボロン	96.6	5.7	84.1	5.0	78.5	4.1
31	ファミブール	70.9	10.9	68.5	14.4	59.3	3.2	66	α-トレンボロン	89.3	7.2	82.1	3.7	76.3	2.8
32	フェノブカルブ	53.7	44.4	49.2	43.7	41.9	52.1	67	ピロミド酸	88.3	4.5	86.3	0.9	77.8	1.9
33	テメホス	9.5	113.3	11.3	117.9	6.6	110.4	68	ゼラノール	88.5	2.9	83.5	1.8	78.7	3.5
34	アレスリン	4.2	157.0	3.4	168.1	4.9	159.2	69	ナフシリン	109.7	7.0	104.1	4.8	111.5	12.5
35	モネンシン	20.3	105.1	14.9	88.2	18.3	106.4	70	ナイカルバジン	55.6	8.6	63.3	6.7	53.5	7.2
								71	酢酸メレンゲ ステロール	44.5	48.6	42.9	49.2	29.5	41.5
								72							
								73	イベルメクチン	23.6	50.8	23.4	32.7	15.3	38.0

*検量線の相関係数が低いため、回収率100%相当濃度のマトリクス添加標準溶液による1点検量線で回収率を計算した。

ての試料において、回収率 70~120%かつ RSD20%以下の項目は 73 項目中 57 項目であった。

今回、使用頻度が高い、あるいは違反事例がある動物用医薬品を中心とした一斉分析を目的としたが、通知法 I 法の対象外である項目のうち、使用頻度が高いセファゾリンやマイコプラズマ感染症に用いられるスピラマイシン等で良好な回収率が得られた。

同じく使用頻度が高いサルファ剤はアセトニトリル抽出では回収率が低くなる場合があることが報告されている⁴⁾が、本法では対象とした全てのサルファ剤で良好な結果が得られた。

一方、違反が散見されるテトラサイクリン系抗生物質は、アセトニトリル抽出ではほとんど回収されない⁷⁾が、本法では回収率 43.0~66.9%とメタノール抽出の効果が見られ、スクリーニング法としての有用性が示唆された。

まとめ

動物用医薬品 73 項目について、LC/MS/MS による一斉分析法を検討した。

- 1 73 項目について LC/MS/MS における測定条件を確立した。各項目ごとに定量用および確認用のプロダクトイオンを設定することで、より選択性の高い分析を可能とした。
- 2 検量線の相関係数 0.97 以上で、定量下限値が 0.01ppm 以下の項目は 69 項目であった。
- 3 前処理法は、通知法 I 法を改良し、抽出溶媒にアセトニトリル：メタノール (7:3) を用いた。0.1ppm 濃度の添加回収試験で、全ての試料において回収率 70~120%かつ RSD20%以下の項目は 57 項目であった。
- 4 本法は、広範囲の物性をもつ残留動物用医薬品の、迅速かつ簡易な一斉分析法として有用であると考えられた。

文 献

- 1) 平成 17 年厚生労働省告示第 499 号
- 2) 平成 17 年 11 月 29 日付け食安発第 1129002 号「食品に残留する農薬、飼料添加物または動物用医薬品の成分である物質の試験法について(一部改正)」
- 3) 杉本成子他：管内と畜場に搬入される家畜の動物用医薬品および飼料添加物の使用状況、第 43 回静岡県公衆衛生研究会抄録集、3A・58-3A・60(2007)
- 4) 遠藤美砂子他：オンラインカラム固相抽出/高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による筋肉中残留動物用医薬品の一斉分析、分析化学、56, 5, 317-326(2007)
- 5) 小林まなみ他：LC-MS による動物用医薬品分析、島津

評論、65, 1・2, 25-35(2008)

- 6) 山田良司他：LC/MS/MS を用いた筋肉中の残留動物用医薬品の多成分同時分析、生活衛生、49, 3, 152-160(2005)
- 7) 中尾朱美他：LC/MS/MS による畜水産食品中の残留動物用医薬品および合成抗菌剤の迅速一斉分析(II)、福岡市保健環境研究所報、30, 167-169(2005)

ビタミンA, β カロテンを含有する 栄養補助食品について

医薬食品部 医薬食品スタッフ 小林千恵, 相曾いずみ, 前田有美恵,
 高橋一則

Vitamin A or β -carotene containing Supplement

Chie KOBAYASHI, Izumi AISO, Yumie MAEDA
 and Kazunori TAKAHASHI

県民の食生活の向上および健康増進に役立てるため、栄養の補充が期待され利用者が多いビタミン類、ミネラル類を含む栄養補助食品の調査をした。その利用状況について静岡県職員を対象にアンケート調査を行った結果、ビタミン剤、ミネラル剤の飲用経験者は回答者の6割以上を占め、特に20代の飲用経験者の割合が高かった。また、過剰摂取等による健康への影響が懸念されているビタミンAと β カロテンを含む栄養補助食品の成分を分析したところ、両者とも商品に記載されているとおりの成分量が含まれていた。ビタミンAを含有する栄養補助食品の摂取については、耐容上限量の少ない子供が過剰摂取にならないように注意する必要があると考えられた。 β カロテンを含有する栄養補助食品については、近年喫煙者の過剰摂取による健康障害が報告されていることから、 β カロテンは緑黄色野菜等の食品から摂取することが望ましいと思われた。

栄養補助食品は、手軽に栄養補給ができるが過剰摂取になる可能性もあるため補足として利用し、様々な栄養成分を食事からバランスよく摂取することを若い年代からこころがける必要があると考えられた。

Key words: 栄養補助食品, ビタミンA, β カロテン, 耐容上限量
 supplement, vitamin A, β -carotene, tolerable upper intake level

はじめに

栄養補助食品は、健康増進や疾病予防が注目されており、特にビタミン類、ミネラル類を含む栄養補助食品の利用者は多い。これらは容易に入手が可能であるが、医薬品と異なり購入時に医師や薬剤師の意見を聞くことはあまりなく、自己判断で利用する状況であるため、過剰摂取等による健康への影響が懸念されている。

今回、県民に栄養補助食品の摂取に関する留意点について情報提供するため、静岡県職員を対象とした栄養補助食品の利用実態調査を行った。また、過剰摂取による健康への影響が懸念されるビタミンAと β カロテンを含有する栄養補助食品の成分分析、医薬品の品質の評価手法である崩壊試験を行い、栄養補助食品の品質について検討を行ったので報告する。

試料および方法

1 試料

静岡市内の販売店およびインターネットから購入したマルチビタミンと β カロテンを主成分とする栄養補助食品10銘柄、ビタミンA含有医薬品2銘柄を調査した(表1)。

表1 調査対象とした栄養補助食品および医薬品

銘柄No.		形状	原産国
1		ソフトカプセル	日本
2	マルチビタミン	錠剤	アメリカ
3		錠剤	日本
4		錠剤	アメリカ
5		錠剤	日本
6		ハードカプセル	アメリカ
7	β カロテン含有 サプリメント	ソフトカプセル	アメリカ
8		錠剤	日本
9		ソフトカプセル	アメリカ
10		ソフトカプセル	日本
11	医薬品(一般用)	錠剤	日本
12	医薬品(医療用)	錠剤	日本

2 試薬

ビタミン A (和光純薬工業(株)), β カロテン (和光純薬工業(株))

その他の試薬は, 特級またはそれ以上のものとした。

3 方法

1) 表示

商品に記載されている栄養成分等について調査した。

2) 栄養補助食品の利用実態調査

平成 21 年 6 月 1 日 (月) ~ 30 日 (火) の間, 静岡県職員を対象にサプリメントの飲用に関するアンケート調査を実施した。

3) 栄養補助食品のビタミン A, β カロテン含有量

①試料の調製

日本薬局方の各条に記載されている定量法を参考に, 形状が錠剤のものについては, 20 錠をすりつぶして均一にしたものを試料とした。また, ハードカプセルおよびソフトカプセルについては, 20 カプセル中の内容物を取りだし均一にしたものを試料とした。

②ビタミン A 試験溶液の調製

栄養表示基準における栄養成分等の分析方法 (高速液体クロマトグラフ法: レチノール (ビタミン A アルコール))¹⁾ に準じ, 試験溶液を調製した。

①により調製した試料 0.25g に 3%ピロガロール-エタノール液 5mL, 60%水酸化カリウム溶液 0.5mL, 1%塩化ナトリウム溶液 1mL を加え, 70°C 水浴中で 30 分間加熱した。水冷後, 1%塩化ナトリウム溶液 11.25mL, ヘキサノール-酢酸エチル (9:1 V/V) 7.5mL を加え, 5 分間振とうした。遠心分離 (1500rpm, 5 分間) 後, 上層を回収し, 下層にヘキサノール-酢酸エチル (9:1 V/V) 7.5mL を加え更に 2 回抽出した。回収した上層は, 40°C で減圧濃縮し残留物をエタノールに溶解し, メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過したものを HPLC 用試験溶液とした。

③ β カロテン試験溶液の調製

栄養表示基準における栄養成分等の分析方法 (高速液体クロマトグラフ法: α カロテン, β カロテン)¹⁾ を参考に試験溶液を調製した。

錠剤, カプセル形状の検体は, ①により調製した試料 0.1g を量りとり, 試験溶液の調製については, ②に従った。ソフトカプセル形状の検体は, 0.1g をクロロホルムに溶解し, 5 分間超音波処理したものを HPLC 用試験溶液とした²⁾。

4) 栄養補助食品の崩壊試験

栄養補助食品には溶けやすさに関する基準等がないため, 第十五改正日本薬局方「6.09 崩壊試験法」に準じ, 水に対する試験を行った。試験時間は, 形状が錠剤 (No. 2~5, 8) の場合は 30 分, ハードカプセルまたはソフト

トカプセル (No. 1, 6~7, 9~10) の場合は 20 分, 医薬品 (No. 11~12) は糖衣錠のため 60 分を適用し, 補助盤は使用せず に実施した。崩壊しなかった銘柄のみ第十四改正日本薬局方に準じ補助盤を使用し再度試験した。

4 HPLC 測定条件

1) ビタミン A の測定

栄養表示基準における栄養成分等の分析方法 (高速液体クロマトグラフ法: レチノール (ビタミン A アルコール)) に準じ, HPLC による測定を以下のとおり行った。なお, 本法による定量下限値は 0.13 μ g/mL である。

カラム: Mightysil RP-18 Aqua (4.6mm \times 150mm, 関東化学(株)), 移動相: メタノール: 水 = 92:8, カラム温度: 35°C, 流量 1.0mL/min, 検出器: フォトダイオードアレイ検出器 (325nm)

2) β カロテンの測定

栄養表示基準における栄養成分等の分析方法 (高速液体クロマトグラフ法: α カロテン, β カロテン) に準じ, HPLC による測定を以下のとおり行った。なお, 本法による定量下限値は 0.54 μ g/mL 未満である。

カラム: Mightysil RP-18 Aqua (4.6mm \times 150mm, 関東化学(株)), 移動相: メタノール: クロロホルム = 96:4, カラム温度: 40°C, 流量: 1.5mL/min, 検出器: フォトダイオードアレイ検出器 (455nm)

結果および考察

1 表示

1) ビタミン A, β カロテンの含有についての記載

商品に記載されている表示やインターネットによる情報から, β カロテンを主成分とする栄養補助食品が数多く販売されており, ビタミン A は, 主成分としてではなくマルチビタミンに含まれているものが販売されていることが判明した。また, 栄養成分表示等から No. 1, 2, 5~10 は β カロテン, No. 3, 4 はビタミン A が含有されていることが読み取れた。

2) 栄養補給等に関する記載

No. 1~4 のマルチビタミンのうち, No. 1, 3 には「健康成分や複数のビタミンが手軽に摂取できる」と記載されていた。また, No. 5~10 の β カロテン含有サプリメントのうち, No. 5, 6, 8 には「野菜が苦手な人, 食事が偏っている人に対して β カロテンを補給できる」と記載されていた。

2 静岡県職員を対象とした栄養補助食品の利用実態調査 (抜粋)

調査を実施したところ, 2,071 人 (男性 1,637 人, 女性 434 人) から回答が得られた。

2,071 人のうち, 錠剤やカプセル形状のビタミン剤・

ミネラル剤を現在飲んでいるまたは以前飲んでいたという「サプリメント飲用経験者」は、全体の 66.4%にあたる 1,375 人であった。年代別に回答者に対する飲用経験者の割合をみると、20代が 76.8%と最も高く、年代が上がるほど低くなった(図1)。また、ビタミン剤、ミネラル剤を飲もうと思った理由として「食生活の中で不足していると思ったから」が最も多く、飲用経験者の 62.0%(853 人)であった。また、使用量は「商品に記載のある用量を飲用している」が 83.3%(1,145 人)を占めた。

今回対象にした栄養補助食品の飲用経験については、飲用経験者のうちマルチビタミンは、52.1%(716 人)と最も多く、ビタミン A(β カロテン)が 9.1%(125 人)であった。

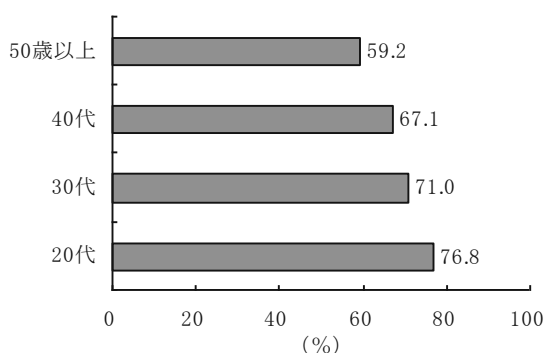


図1 回答者に対する飲用経験者の割合(年代別)

の耐容上限量は 2,700 μg/日とされている⁴⁾。また、平成 19 年国民健康栄養調査報告の中で、国民のビタミン A の摂取量は性・年齢階級平均 615 μg/日と示されているため、今回調査した栄養補助食品の一日摂取目安量を飲用することにより、過剰摂取による健康障害の可能性は考えにくいと思われる。しかし、ビタミン A の耐容上限量は、年齢層が若くなるほど少なくなり、10 歳未満では 1,200 μg/日以下となる⁴⁾。そのため、平均的なビタミン A を摂取している子供が 680 μg/日含む No. 4 を習慣的に摂取したり、砂糖を含みお菓子感覚で噛み砕いて摂取できる 560 μg/日含む No. 3 を食べ過ぎると耐容上限量を超える恐れがあるので、子供の摂取量については注意が必要と考えられる。

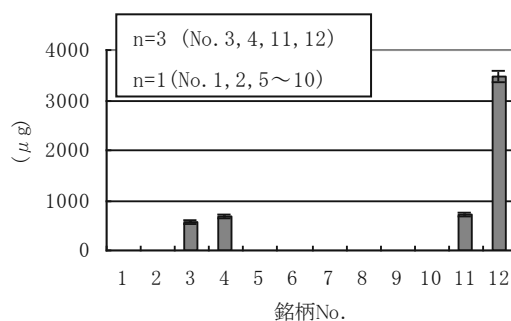


図2 ビタミンA<一日摂取目安量あたりの分析値>

3 栄養補助食品のビタミン A およびβ カロテンの含有量

No. 1~10 については、表示に記載されている一日摂取目安量あたりのビタミン A および β カロテンの分析値、No. 11 は成人の一日服用量あたりの分析値、No. 12 は治療目的に使用する場合の一日服用量の分析値をグラフに示し、銘柄ごとに比較をした(図2, 図3)。

1) ビタミン A 含有量

ビタミン A は、健康増進法に基づく栄養成分表示に記載がある銘柄 (No. 3, 4) に含有され、表示値との差は、健康増進法で規定されるビタミン A の許容範囲内(-20%~+80%)であった。また、医薬品である No. 11, 12 の含有量は、日本薬局方のビタミン A カプセルで規定される表示の含有幅(90.0%~130.0%)を参考に分析値と比較すると、規定内であることを確認した。その他の銘柄は、定量下限値(0.13 μg/mL)未満であった。

日本人の食事摂取基準(2010 年版)では、過剰摂取による健康障害に対する指標として耐容上限量(健康障害をもたらすリスクがないとみなされる習慣的な摂取量の上限)が設定されている³⁾。ビタミン A の場合、吐き気、頭痛などのビタミン A 過剰症が報告されており、肝臓へのビタミン A 過剰蓄積による肝臓障害を指標に 18 歳以上

2) β カロテン含有量

β カロテンの含有量は、銘柄によって大きく異なり、No. 2 の 14.9mg が最も多かった。栄養成分表示がある銘柄について、ビタミン A の許容範囲を参考に表示値との差を比較したところ、全ての銘柄が許容範囲内であった。また、No. 3, 4 と No. 11, 12 は定量下限値(0.54 μg/mL)未満であった。

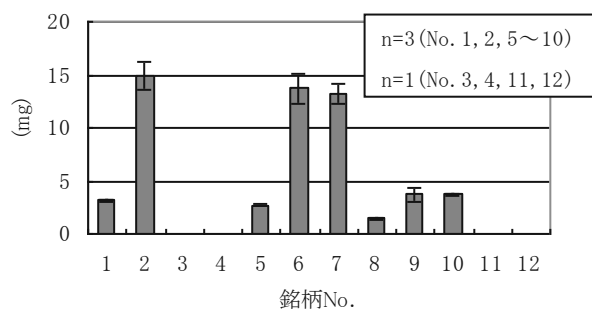


図3 β カロテン<一日摂取目安量あたりの分析値>

β カロテンは、体内でビタミン A が不足すると、必要量がビタミン A に変換されるため β カロテンの過剰摂

取によるビタミン A 過剰症は知られておらず、ビタミン A の耐容上限量に β カロテンは含まれない⁴⁾。また、β カロテンを含めカロテノイドは、抗酸化作用があるため発癌予防が期待されている物質でもあり過剰摂取による健康障害は知られていなかった。しかし、近年疫学調査において喫煙者が一日 20mg 以上の β カロテンをサプリメントとして約 6 年間摂取すると、肺がんのリスクが偽薬投与群よりも 16 倍増大することが報告されている^{5,6)}。さらに、サプリメントとして β カロテンを 20mg/日摂取すると、食事から適度に 1.7mg/日摂取する場合よりも血清レベルが 12 倍上昇する⁵⁾。そのため、同じ β カロテンであっても成分を濃縮したサプリメントからの摂取と食材からの摂取とでは、生体への吸収等には違いがあると考えられる。今回調査した β カロテン含有サプリメントは、最大で No. 2 の 14.9mg/日であったため一日摂取目安量を守ればリスクは少ないと考えられるが、栄養補助食品を継続して摂取するのではなく、β カロテンを含有する緑黄色野菜等の食品から継続して摂取することが望まれる。

4 栄養補助食品の崩壊試験

第十五改正日本薬局方に従い試験したところ、錠剤 2 銘柄 (No. 2, 8) とカプセル 3 銘柄 (No. 1, 6, 10) について適合しなかった。また、日本薬局方第十四改正では補助盤の使用が認められているため、適合しなかった錠剤 2 銘柄とカプセル 3 銘柄については、補助盤を使用して再度試験したところ、カプセル 3 銘柄は適合したが、錠剤 2 銘柄は適合しなかった (表 2)。

表 2 日本薬局方「6.09 崩壊試験法」による水に対する試験結果

銘柄No.	形状	試験結果 (補助盤なし)	試験結果 (補助盤使用)
1	ソフトカプセル	崩壊しない	崩壊した
2	錠剤	崩壊しない	崩壊しない
3	錠剤	崩壊した	-
4	錠剤	崩壊した	-
5	錠剤	崩壊した	-
6	ハードカプセル	崩壊しない	崩壊した
7	ソフトカプセル	崩壊した	-
8	錠剤	崩壊しない	崩壊しない
9	ソフトカプセル	崩壊した	-
10	ソフトカプセル	崩壊しない	崩壊した
11	錠剤	崩壊した	-
12	錠剤	崩壊した	-

補助盤の使用は、医薬品の試験の場合、崩壊の優れた製剤と悪い製剤を区別しにくくするものであるため、第十五回改正日本薬局方では、原則的に禁止されている⁷⁾。

今回実施した栄養補助食品の水に対する崩壊性について、10 銘柄中 5 銘柄 (No. 3~5, 7, 9) は、現在の日本薬局方 (第十五改正) の試験条件に適合するため現在求められている医薬品の崩壊性と同等であったが、補助盤を使用することで適合したカプセル 3 銘柄については崩壊性に優れているとは言えないと考えられた。

また、補助盤を使用しても適合しなかった錠剤 2 銘柄 (No. 2, 8) は、他の銘柄と比較すると胃の中で溶けにくく、β カロテン等の生体吸収への影響が懸念された。さらに規定時間後に崩壊せず残存した錠剤の大きさにはばらつきがあったため、錠剤の品質が不均一であると考えられた。

まとめ

- 1) ビタミン A, β カロテン含有栄養補助食品の摂取について
 - 1) 栄養補助食品に含有されるビタミン A, β カロテンは、商品に記載されているとおりの量が含まれていることがわかった。
 - 2) 年齢が若くなるほどビタミン A の耐容上限量が少なくなることから、特に子供に対してビタミン A 含有栄養補助食品が過剰摂取にならないように注意することが必要と考えられる。
- 2) 栄養補助食品の胃の中での溶けやすさ (崩壊性) について

今回調査した栄養補助食品は、半数以上の銘柄が医薬品に規定されている崩壊試験に適合したが、胃の中での溶けやすさに問題があると思われる銘柄もあった。
- 3) 栄養補助食品の利用実態等について

静岡県職員を対象にした栄養補助食品の利用実態調査から、若い年代 (20 代, 30 代) は栄養補助食品の利用者が多いことがわかった。また、平成 19 年国民健康栄養調査報告から 20 代, 30 代は、野菜摂取量が約 250g であり、40 歳以上と比較すると摂取量が少ないと報告されているため、特に若い年代が栄養補給を栄養補助食品に頼る傾向にあると思われた。

以上より、栄養補助食品は手軽に栄養補給ができるが、過剰摂取になる可能性もあるため補足として利用し、厚生労働省の施策の一つである「21 世紀における国民健康づくり運動」の野菜摂取量 350g を目標に食材から様々な栄養成分をバランスよく摂取することを若い年代からこころがけていく必要があると考える。

文献

- 1) 莊村多加志：栄養表示のための成分分析のポイント, 183-189, 中央法規出版 (株), 東京 (2007)

- 2) 莊村多加志：栄養表示のための成分分析のポイント, 193, 中央法規出版(株), 東京 (2007)
- 3) 安斉正郷：日本人の食事摂取基準 (2010 年版), 7, 第一出版(株), 東京 (2009)
- 4) 安斉正郷：日本人の食事摂取基準 (2010 年版), 144, 第一出版(株), 東京 (2009)
- 5) Albanes D, et al : α -Tocopherol and β -carotene Supplements and Lung Cancer Prevention Study : Effects of Base-line Characteristics and Study Compliance, Journal of the National Cancer Institute, Vol. 88, No.21, 1560-1570, (1996)
- 6) Jessie A. S, et al : Long-term Use of β -carotene, Retinol, Lycopene, and Lutein Supplements and Lung Cancer Risk : Results From the VITamins And Lifestyle (VITAL) Study, American Journal of Epidemiology, Vol. 169, No.7, 815-828 (2009)
- 7) (財)日本公定書協会：日本薬局方技術情報 2006 JPTI 2006, 216-217, (株)じほう, 東京 (2006)

豆類及び豆類加工品に含まれるミネラルについて

医薬食品部 医薬食品スタッフ 相曾いずみ, 小林千恵, 前田有美恵,
 高橋一則

Mineral Contents in Beans and Bean Processed Food

Izumi AISO, Chie KOBAYASHI, Yumie MAEDA
 and Kazunori TAKAHASHI

日本人のミネラル摂取不足が懸念されているため、体の栄養バランスを整え、健康を保つ観点から、日本の食卓にあがる機会が多い豆類及び豆類加工品のミネラル含量の違いを調査した。その結果、豆類は、日本人に不足しているカルシウム、カリウム、鉄、亜鉛を豊富に含み、一方、日本人が過剰摂取になっているナトリウムの含有量が少ない食品であることがわかった。また、豆類を煮たときのミネラルの減少率は、ミネラルの種類によって異なり、カリウムと鉄の減少は大きく、カルシウムと亜鉛の減少は小さかった。ミネラルは水に溶出するため、ミネラルを効率よく摂取するには煮汁の利用が大切であると考えられた。豆類加工品は、加工方法の違いによりミネラル量が異なっていた。炒る等水分を減少させた加工品はミネラル量が多く、煮た加工品は少なかった。また、味付けられた加工品はナトリウムが多かった。

Key words: ミネラル, 豆類, 加工品
 Mineral, Bean, Processed Food

はじめに

国民栄養・健康調査によると、日本人は、食生活において、カルシウム、鉄等のミネラルの摂取不足の状態にあると指摘されている¹⁾。また、ナトリウムの摂取過剰による高血圧の危険性が示唆され、近年では、亜鉛の摂取不足による味覚異常等が生じていることも報告されている^{1) 2)}。

古くから家庭の食卓に並ぶ豆類は、良質なたん白質を含むとともに、ナトリウム含有量が低く、カルシウムや鉄、亜鉛、カリウムなどのミネラルを豊富に含む食品である。また、豆類から作られた豆腐等の加工品は、日常よく目にする食品である。

そこで、豆類や豆類加工品のミネラル含有量の違いを明らかにし、体の栄養バランスを整え、健康を保つ観点から、豆類及びその加工品のミネラルについて情報提供する。また、ミネラルは水に溶け出し、調理方法の影響を大きく受けるため²⁻⁴⁾、その状況も、あわせて報告する。

調査対象および方法

1 調査対象

市内スーパーで、購入した豆類（乾燥豆）および豆類加工品を調査対象とした(表1)。

表1 調査対象

	種類	数量
豆類	大豆	9
	いんげん豆	7
	あずき	5
	ひよこ豆	2
豆類 加工品	いり大豆	2
	きな粉	3
	水煮	4
	えだまめ	3
	煮豆	4
	納豆	3
	豆腐	3

2 方法

1) 表示

JAS 法、食品衛生法に基づいた表示事項が記載されているかを確認した。また、遺伝子組替え食品の表示、商品の情報提供の状況について調査した。

2) ミネラル分析

ミネラルは、体内に必須とされるミネラルが 27 種類あ

り、一日の摂取量が 100mg 以上必要な主要ミネラルと、それ以下の微量ミネラルに分類される²⁾。主要ミネラルとして、ナトリウム、カリウム、カルシウムを分析した。微量ミネラルでは、鉄と亜鉛を分析した。

① 試験溶液の調製

調査対象のうち、乾燥豆は、ホモジナイザーで破砕後、ミルを用いて微細粉末にし、試料とした。加工品については、ホモジナイザーで破砕し試料とした。ミネラルの抽出は、乾式分解法と塩酸抽出法を用いた。カリウム、カルシウム、鉄、亜鉛は乾式分解法を用い、ナトリウムについては塩酸抽出法を用いた。

(1) 乾式分解法⁵⁾

飲食物試験法の 2.1.1.2 無機物質試料の調製法 1) 乾式分解⁵⁾を参考に分解した。

試料を約 5g 精秤し、磁器製ふた付きのつぼを灰化容器として用い、電気マッフル炉で 500℃、48 時間強熱した。試料中に水分を含む場合は、電気マッフル炉へ入れる前に、水浴で試料を蒸発乾固した。48 時間強熱しても、白～灰白色の灰が得られなかった試料については、白～灰白色の灰が得られるまで再度強熱した。

灰化物に 3 mol/l 塩酸溶液約 10ml を加え、水浴上で蒸発乾固した後、更に、3 mol/l 塩酸溶液約 10ml を加え、水浴上で数分間温めて溶解し、ろ紙 (5B) を用いてろ過し、50ml メスフラスコに受けた。ろ紙とろ紙を水洗し、ろ液に加え、全量 50ml の試験溶液とした。器具は、硝酸に浸漬後、イオン交換水ですすいで使用した。

(2) 塩酸抽出法⁶⁾

試料約 2g を精秤し、ポリエチレン瓶に入れ、1% 塩酸溶液 100ml を正確に加え、30 分間振とう後、ろ紙 (3B) でろ過し、試験溶液とした。

② 原子吸光分析法による定量

原子吸光度法⁶⁾を用いて、試験溶液中の濃度を測定した。濃度の高い試験溶液は 1% 塩酸溶液を用いて、適当な濃度に希釈した。カルシウムについては、測定時にストロンチウム 0.5% 濃度溶液になるように、ストロンチウム液を添加した。

標準液は、和光純薬工業(株)製のカリウム標準液 (K 1000)、ナトリウム標準液 (Na 1000)、カルシウム標準液 (Ca 1000)、鉄標準液 (Fe 1000)、亜鉛標準液 (Zn 1000) を 1% 塩酸溶液で希釈して用いた。

[原子吸光測定条件]

機器：(株)アナリティクイエナジャパン

contraAA300

フレーム：空気—アセチレン

測定波長：766nm (カリウム)、589nm (ナトリウム)、
422nm (カルシウム)、248nm (鉄)、
213 nm (亜鉛)

3) 調理によるミネラル量の変化

大豆をゆでた場合に、ミネラル量がどのように変化するかを調査した。

乾燥大豆 10g を精密に秤り、水 100ml を加え、24 時間浸漬した後、漬け汁ごと火にかけて 1 時間加熱した。加熱後、豆を取り出し、2) ミネラル分析と同様に分析した。

結果および考察

1 表示

JAS 法および食品衛生法に基づいて表示を確認したところ、問題となる食品はなかった。豆類 (農産物) については、どの商品も法律上必要とされる名称、原産地の記載があった。また、豆類加工品 (加工食品) も、法律上必要とされる名称、原材料、内容量、消費期限又は賞味期限、保存方法、製造者の記載があった。

遺伝子組換え食品については、使用の有無に対し消費者が関心を寄せている。食品衛生法では、遺伝子組換え農産物は「農産物名 (遺伝子組換え) 等」の表示を必要とし、遺伝子組換え農産物と遺伝子組換えでない農産物が分別流通しなかった農産物は「農産物名 (遺伝子組換え不分別) 等」の表示が必要とされる。一方、遺伝子組換えでない農産物は「農産物名 (遺伝子組換えでない)」の表示をする必要はなく、表示するかどうかは任意とされている⁷⁾。

今回、大豆の遺伝子組換え表示を調査したところ、「遺伝子組換え」と表示された商品はなかった。「遺伝子組換えでない」等の表示がされた商品は、農産物で 9 商品中 5 商品、加工食品で 22 商品中 17 商品あった。「遺伝子組換えでない」等の表示をするかどうかは、任意であるが、半数以上の商品が「遺伝子組換えでない」等の表示をしていた。販売者は積極的に遺伝子組換え食品でないことを表示していると考えられた。

一方、商品の安全性等について情報提供がどの程度行われているかを調査した。46 商品中 12 商品が、包装にホームページアドレスを掲載していた。4 商品が有機 JAS マークを記載しており、2 商品が農薬や化学肥料の使用回数を記載していた。また、4 商品が生産者や責任者名を記載していた。約半数の商品が情報提供を行っていることがわかった。

2 ミネラル分析

1) 豆類について

① 主要ミネラルについて

主要ミネラルの分析結果を図に示した(図1~3)。豆類には、カリウムとカルシウムが多く含まれており、ナトリウムはあまり含まれていないことがわかった。大豆、いんげん豆、あずき、ひよこ豆の4種類のうち、大豆は、カリウムとカルシウムを最も多く含んでいることがわかった。

国民健康・栄養調査によると、日本人はナトリウムの摂取量が過剰であると報告されている^{1) 8)}。ナトリウムの摂取量が増加すると、高血圧となる危険性が増す²⁾。一方、カリウムは、ナトリウムを体外に排泄するため、積極的に摂取することで、血圧の低下を招くことが知られている²⁾。調査した豆類は、ナトリウム含有量が少なく、カリウム含有量が多かったことから、高血圧の予防に適する食品であると考えられた。

カルシウムについては、豆の種類により含有量に違いがあった。大豆はカルシウム 110mg/100g と多く、あずきは 48.4mg /100g と少なかった。カルシウム源としてよく挙げられる牛乳(普通牛乳)110mg/100g⁹⁾と比較すると、大豆は、牛乳と同程度のカルシウムを摂取できる食品であることがわかった。

② 微量ミネラルについて

微量ミネラルの分析結果を図に示した(図4, 5)。

鉄は以前より摂取不足に悩まされているミネラルである^{1) 2)}。今回調査した4種類の豆は、大豆 5.9mg/100g を始め、鉄の含有量が高かった。鉄を多く含む食品としてレバー等が挙げられるが、特有のにおいと味覚から常に摂取することは難しい^{2) 9)}。一方、豆類は、加工品も多く出回り、食べやすい食品である。鉄の摂取源として、豆類は有効な食品であることがわかった。

亜鉛についても、大豆 4.4mg /100g、ひよこ豆 3.8mg/100g と、豆類は高い値を示した。亜鉛は古くから成長に関わるミネラルと言われ、亜鉛の不足は免疫機能の低下や味覚障害を招くと言われている^{2) 9)}。また、近年、ファーストフードに偏った食事や、極端なダイエット、老人における食事量の低下等を原因とした亜鉛不足が指摘されている^{10) 11)}。豆類は、かきなどの魚介類や肉類に次いで、亜鉛の含有量が多く、亜鉛不足の解消に役立つ食品であることがわかった。

2) 豆類加工品について

1)の分析結果から、豆類は、カリウム、カルシウム、鉄、亜鉛を豊富に含み、ナトリウムはあまり含まない食品であることがわかった。しかし、豆類は、数時間水に浸漬後、1時間程度煮る必要があり、調理に時間がかか

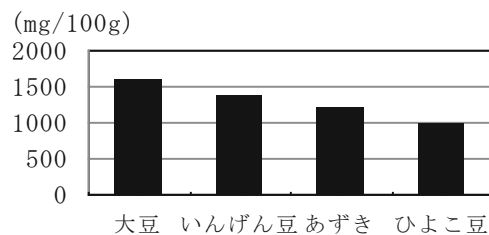


図1 豆類のカリウム含有量

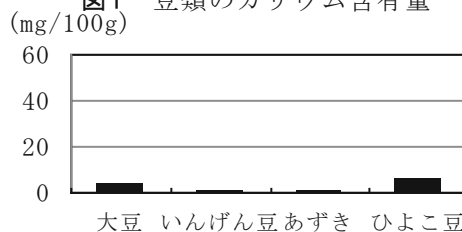


図2 豆類のナトリウム含有量

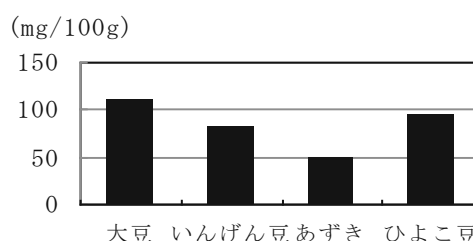


図3 豆類のカルシウム含有量

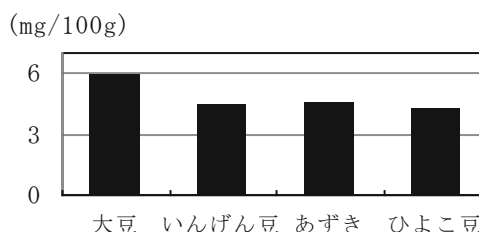


図4 豆類の鉄含有量

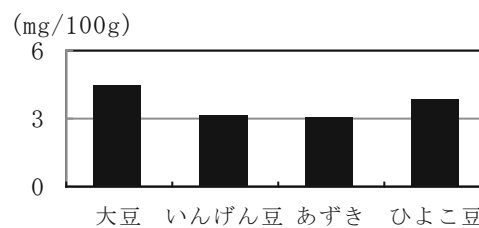


図5 豆類の亜鉛含有量

る。一方、日常よく食べる豆は、加工品であることが多い。そこで、豆類加工品は、ミネラルをどの程度含むかを調査した。比較のために、1)で分析した大豆(以下、加工前的大豆)を示した(図6, 7)。

分析の結果、豆類加工品は、加工方法の違いにより、ミネラル含有量が異なることがわかった。豆類加工品を加工方法から3つに分類した。炒り大豆ときな粉は炒った加工品とし、水煮、えだまめ、煮豆は煮た加工品とし、他に豆腐とした。納豆は蒸して発酵させた加工品だが、煮るという調理法に近いので、煮た加工品に分類した。

炒った加工品である炒り大豆等は、カリウム、カルシ

ウム、鉄、亜鉛を豊富に含み、ナトリウムをほとんど含んでいなかった。加工前的大豆と比べると、炒り大豆等は、カリウム、カルシウム、鉄、亜鉛の含有量が若干高く、ナトリウムは同程度であった。カリウム等が高かった理由は、炒ることにより、食品中の水分が減少し、相対的にカリウム等の割合が増したためと推測された。

煮た加工品である水煮等は、加工前的大豆と比較すると、カリウム、カルシウム、鉄、亜鉛の含有量が半分以下であった。乾燥した大豆を水で戻すと重量が2倍になることから³⁾、大豆を加工することにより、カリウム等の含有量は1/2程度になると予測していた。しかし、分析の結果、1/2より少なくなっており、加工品によっては、1/6になっているものもあった。これは、ミネラル成分が水中に溶け出し²⁻⁴⁾、損失が生じていることが原因だと考えられた。一方、ナトリウムについては、豆類加工品は、加工前的大豆より多く含んでおり、特に煮豆と納豆で高い値であった。これは、調味料の影響によるものと推察されたが、味付けをしていないはずの水煮もナトリウムを含んでいた。このナトリウムは、水道水中のナトリウム¹²⁾による影響だと推測された。

豆腐は、カリウム、カルシウム、鉄、亜鉛について、加工品の中で最も低い値を示した。豆腐は、大豆を砕いて煮た後に、おからと豆乳に分け、豆乳に凝固剤を入れて固めた食品である⁸⁾。加工中におからの成分を除くため、ミネラル量が少なかったと考えられた。

3) 調理によるミネラルの変化

豆類は煮ることにより、ミネラル含有量にどの程度変化が生じるかを調査した(図8)。

カリウムが33%、鉄が58%と大きな減少を示した。カルシウムと亜鉛は減少率が10%以下と少なかった。ささげのミネラル損失についての報告によると、水中で加圧

加熱調理をした場合、カリウム、鉄が大きな損失を示し、カルシウムと亜鉛は損失が少ないという¹³⁾。一方、Alajajiらは、煮沸、加圧加熱、マイクロウェーブ加熱調理法のうち、マイクロウェーブ調理が最もミネラルの損失が少ないと報告している¹⁴⁾。豆類に含まれるミネラルを十分に摂取するためには、煮汁の利用を含め、調理方法が大切であることがわかった。

まとめ

豆類および豆類加工品に含まれるミネラルについて調査をしたところ、以下の結果が得られた。

- 1 豆類および豆類加工品は、ミネラルが豊富に含まれる食品であった。
- 2 豆類は、日本人に不足しているカルシウム、カリウム、鉄、亜鉛が豊富に含まれていた。また、ナトリウムの含有量は少なかった。
- 3 豆類加工品に含まれるミネラルは、加工方法の違いにより、ミネラル含有量が異なっていた。炒る等水分を減少させた加工品はミネラル量が増加し、煮た場合は減少した。また、味付けにより、ナトリウムが増加した。
- 4 豆類を煮たときのミネラルの減少率は、ミネラルの種類によって異なり、カリウムと鉄の減少は大きく、カルシウムと亜鉛の減少は小さかった。ミネラルを効率よく摂取するためには、煮汁の利用が大切であると考えられた。

文 献

- 1) 厚生労働省：平成19年度国民健康・栄養調査，30-32，東京（2007）
- 2) 糸川喜則編：ミネラルの辞典，120-486，(株)朝倉書店，東京（2004）

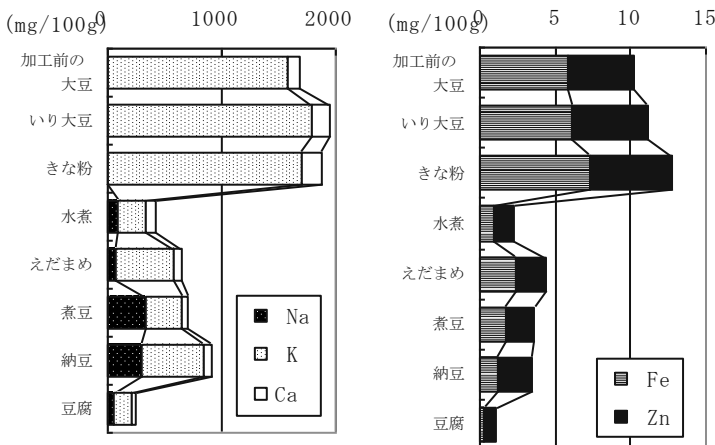


図6 豆類加工品のナトリウム、カリウム、カルシウム含有量

図7 豆類加工品の鉄、亜鉛含有量

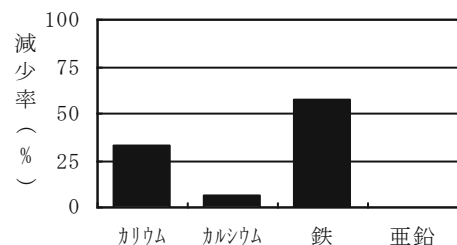


図8 調理によるミネラルの損失

- 3) 調理科学研究会編：調理科学，360-539，(株)光生館，東京（1984）
- 4) 下田吉人他編集：調理と科学，76-89，(株)朝倉書店，東京（1976）
- 5) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2005，166-171，金原出版(株)，東京（2005）
- 6) (財)日本食品分析センター：栄養表示のための成分分析のポイント，84-136，中央法規出版(株)，東京（2007）
- 7) 食品衛生研究会編集：平成 22 年版食品衛生小六法 II（通知・実例），1114-1151，新日本法規出版(株)，東京（2009）
- 8) 実務出版編集部：2009 オールガイド五訂増補食品成分表，54-337，実務出版(株)，東京（2009）
- 9) 中村丁次監修：最新改訂版からだに効く栄養成分バイブル，80-113，(株)主婦と生活社，東京（2006）
- 10) 中屋豊：よくわかる栄養学の基本としくみ，149-202，(株)秀和システム，東京（2009）
- 11) 遠藤久美子ら：食品中ミネラルの存在形態と調理消耗，研究ジャーナル，18（7），16-21（1995）
- 12) 厚生労働省：水道法第 4 条の規定に基づく水質基準に関する省令，東京（2003）
- 13) F.Rincon, G.Ros, J.L.Collins:Mineral Loss in Cowpeas[Vigna unguiculata (L.) Walp]by Pressure Heating in Water, Journal of Food Science, 58, 856-858(1993)
- 14) A.Alajaji, Tarek A. El-Adawy : Nutritional composition of chickpea (Cicer arietinum L.)as affected by microwave cooking and othe traditional cooking methods, Journal of Food Composition and Analysis, 19, 806-812 (2006)

家庭用医薬品・化粧品中の化学物質の排出実態調査について

環境科学部 環境科学スタッフ 金子亜由美, 今津佳子, 久米一成,
 山下晶平, 中川寛基

A Survey of Pharmaceuticals and Personal Care Products Released into Household Effluents

Ayumi KANEKO, Yoshiko IMAZU, Kazunari KUME,
 Syouhei YAMASHITA and Hiroki NAKAGAWA

近年, 家庭から排出される医薬品や化粧品中の化学物質による汚染が注目されている。静岡県においても下水処理場の流入水および放流水の調査から, 下水処理場放流水に合成ムスク香料, かゆみ止めや昆虫忌避剤(以下, 香料等)が含まれている例が見出されている。そこで, 県内の河川水の香料等の濃度や下水処理場等の処理施設から排出される香料等の実態把握のため, 調査を行った。その結果, 河川の調査から下水処理場の下流では一時的に香料等の濃度が高くなる傾向があった。下水処理場やコミュニティープラントの調査から, これらの処理場の放流水の濃度や量は流入水よりも低い傾向が見られた。また, アカヒレに対する毒性試験を行った結果, 県内河川水の濃度では毒性は確認されなかった。

Key words: 家庭排水, 合成ムスク香料, DEET, クロタミトン
 household effluent, synthetic musk fragrance, DEET, crotamiton

はじめに

近年, 医薬品やパーソナルケア製品中の化学物質による河川等の汚染が注目され, 下水処理水, 河川, 生物中の医薬品や紫外線吸収剤, 合成香料等の調査が行われている¹⁻⁷⁾。虫よけスプレーに使用されるディート(DEET), 湿疹や乾皮症などのかゆみ止め成分のクロタミトン(Crotamiton), 石鹼や合成洗剤に使用される合成ムスク香料のガラクソリド(HHCB)およびトナリド(AHTN)(表1)が家庭由来の化学物質として県内の下水処理場放流水中にも確認されている^{1, 8)}。これらの物質の毒性は低いものの, その性質上生物への影響があると考えられる。また, 合成香料は脂溶性が高いことから小型鯨類や貝類などの生物への蓄積が懸念され^{4, 7)}, ゼブラフィッシュに対してエストロゲン・アントゴニスト活性を示すという報告がある⁹⁾。

これらの家庭由来の化学物質は生活排水として排出され, 下水処理場などで処理されているが, 完全に

は除去されていない。また, 県内の公共下水道の普及率は54.7%(平成19年末)で, 合併浄化槽で処理されたり, 未処理で河川に排出されたりする量も無視でき

表1 調査対象物質

物質名	用途	構造式
DEET	昆虫忌避剤	
Crotamiton	かゆみ止め	
HHCB	合成ムスク香料	
AHTN	合成ムスク香料	

静岡県環境衛生科学研究所
 (〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)
 Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
 (4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

ない。そこで、香料等4種類の化学物質について、県内河川、下水処理場、合併浄化槽などの調査をしたので報告する。

調査方法

1 河川と下水処理場等の流入水、放流水の調査

1) 河川水の調査

家庭由来の化学物質が流入する河川水の香料等の濃度を把握するため、下水処理場の放流口上流、下流の河川水(河川A~F)について調べた。採水は春期(2008年4月~6月)、夏期(2008年8月)、冬期(2009年1月)の年3回行った。調査地点を表2に示す。放流口下流での河川の合流による濃度の変化を調べるため、夏期および冬期にはD-3, E-2, F-5の3地点を追加した。

表2 河川水の調査地点

水系	調査地点
巴川	A-1 (放流口上流), A-2 (放流口下流)
瀬戸川	B-1 (放流口上流), B-2 (放流口下流)
菊川	C-1 (放流口上流), C-2, 3 (放流口下流)
太田川	D-1 (放流口上流), D-2, 3, 4 (放流口下流)
太田川	E-1 (放流口上流), E-2, 3 (放流口下流)
太田川	F-1 (放流口上流), F-2, 3, 4, 5 (放流口下流)

2) 流入水および放流水の調査

生活排水の処理方法ごとの香料等の排出量を調べるため、県西部の逆川に処理水を放流している下水処理場1箇所およびコミュニティープラント(以下、コミプラ)2箇所の流入水および放流水を採水した。また、合併浄化槽からの放流水のみが流れている住宅地内の水路2箇所で採水した。調査地点を図1および表3に示す。

3) 逆川の調査

香料等の排出量から算出した河川水の香料等の濃度と実測した濃度を比較するため、逆川について、香料等の河川水の濃度を調べた。調査地点を図1および表4に示す。調査は春期(2009年4月)、夏期(2009年9月)、冬期(2009年11月, 12月)の4回行い、採水および河川の流量を測定した。

2 河川水、流入水および放流水の分析

1) 試薬

1, 3, 4, 6, 7, 8-Hexahydro-4, 6, 6, 7, 8, 8-hexamethylcyclopenta γ -2-benzopyran(HHCB), 7-Acetyl-1, 1, 3, 4, 4, 6-hexamethyl-1, 2, 3, 4-tetra-hydronaphthalene(AHTN)はPromchem製, N-Ethyl-o-crotonotoluidide (Crotamiton)は

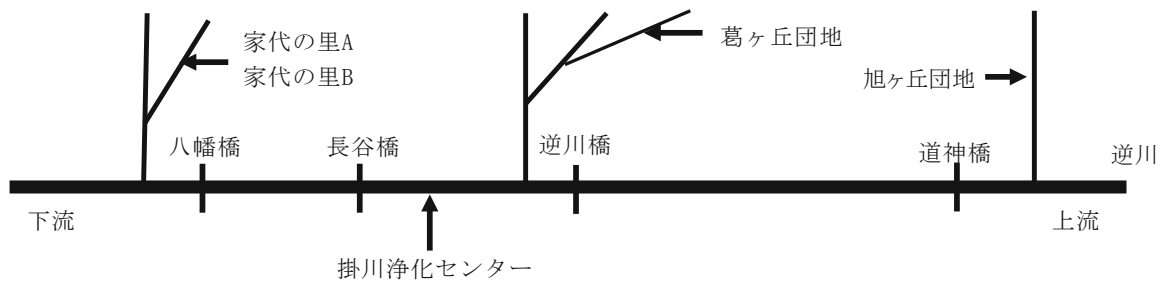


図1 調査地点位置図

表3 流入水および放流水の調査地点

調査地点	処理方式	処理人口	汚水処理量 (m ³ /日) (調査月)	検体
掛川浄化センター 公共下水道	標準活性汚泥法	11354人	5000 (5月), 5000 (8月), 5400 (11月)	流入水 放流水
旭ヶ丘団地 コミプラ	長時間ばっ気方式	1231人	320 (5月), 320 (8月), 340 (11月)	流入水 放流水
葛ヶ丘団地 コミプラ	長時間ばっ気方式	1866人	550 (5月), 830 (8月), 570 (11月)	流入水 放流水
家代の里A 合併浄化槽	—	210人	29 (4月), 38 (7月), 63 (9月) 17 (11月), 96 (12月)	放流水
家代の里B 合併浄化槽	—	210人	74 (4月), 57 (7月), 56 (9月) 34 (11月), 49 (12月)	放流水

* 合併浄化槽の汚水処理量は、採水時の流量 (m³/秒) を、一日あたりに換算した値

表4 逆川の調査地点

調査地点	周辺の状況
道神橋	上流に公共下水道の整備された地域はない。上流にコミプラー箇所、農業集落排水処理施設一箇所がある。
逆川橋	周辺は市街地で、公共下水道が整備されている。この地点の下流で、合流する河川がある。
長谷橋	下水処理場放流口の下流。八幡橋までの間に、合流河川はない。
八幡橋	周辺は農地、病院など、住宅はあまりない。

Ardrich 製, N, N-Diethyl-m- toluamide (DEET) およびその他の試薬は和光純薬製を使用した。

2) 前処理および分析

各試料の前処理および分析は、平岡ら¹⁾の方法を一部変更して行った。河川水 20, 下水処理場等の放流水 500ml, 流入水 100ml を、それぞれガラス繊維ろ紙 (ADVANTEC GA-100) でろ過し、ろ液を固相 (日本ウォーターズ Oasis HLB ガラスカートリッジ) に通水、吸着させた。ジクロロメタン/メタノール 9:1, 16ml で溶出させ、ロータリーエバポレーターで約 2ml に濃縮、更に窒素パーズで濃縮後、アセトン 1ml (河川水は 500 μl) に溶解して GC/MS の試料とした。

GC/MS 条件

GC : Agilent6890A

MS : JEOL GCMATE II

カラム : DB5-MS, 30m × 0.25mm × 0.1 μm

カラム温度 : 60°C (1min) → 10°C/min → 280°C (5min)

インジェクター温度 : 250°C

インターフェイス温度 : 280°C

イオン源温度 : 200°C

3 アカヒレに対する毒性試験

香料等のアカヒレ (コイ科) に対する毒性を試験するため、県内河川水の香料等の最高濃度を基準として、蒸留水 100ml に 1, 5, 25, 50, 100 倍の濃度となるように香料等のアセトン溶液 10 μl (4 種類混合) を添加した。この溶液を入れたシャーレに、アカヒレ (体長 13~18mm) を 7 匹ずつ入れて、25°C の恒温槽で 48 時間観察した。

結果と考察

1 河川と下水処理場等の流入水, 放流水の調査

1) 河川水の調査

調査結果を図2に示す。下水処理場放流口下流の地

点2の濃度が放流口の上流側の地点1の濃度を上回り、下水処理場から香料等が排出されて河川水の濃度が高くなる傾向がみられた。より下流の地点3, 4, 5では調査河川は少ないが、流下するにしたがって濃度が低くなる傾向がみられた。河川での香料等の動態は確かめていないが、地点3から5までの間に河川の合流がない地点もあることから、希釈だけではなく、揮発、吸着や分解などによって、河川水中の濃度が低くなったと推察された。上流側の地点1でも香料等が検出され、下水処理場以外からの流入もあることがうかがえた。また、DEETは夏期に濃度が高くなり、ほかの3つの物質は冬期に濃度が高くなる地点が多かった。DEETは春期や冬期には検出されないところが多く、下水処理場の処理水と同様の結果となった。虫よけという用途から、夏に多く使用されているためと思われた。DEET以外の3つの物質については、下水処理場の調査では、季節での変化は見られないことから⁸⁾、使用量の季節変化によるものではなく、河川での分解、吸着¹²⁾や流量の変化など別の要因があると考えられた。

2) 流入水および放流水の調査

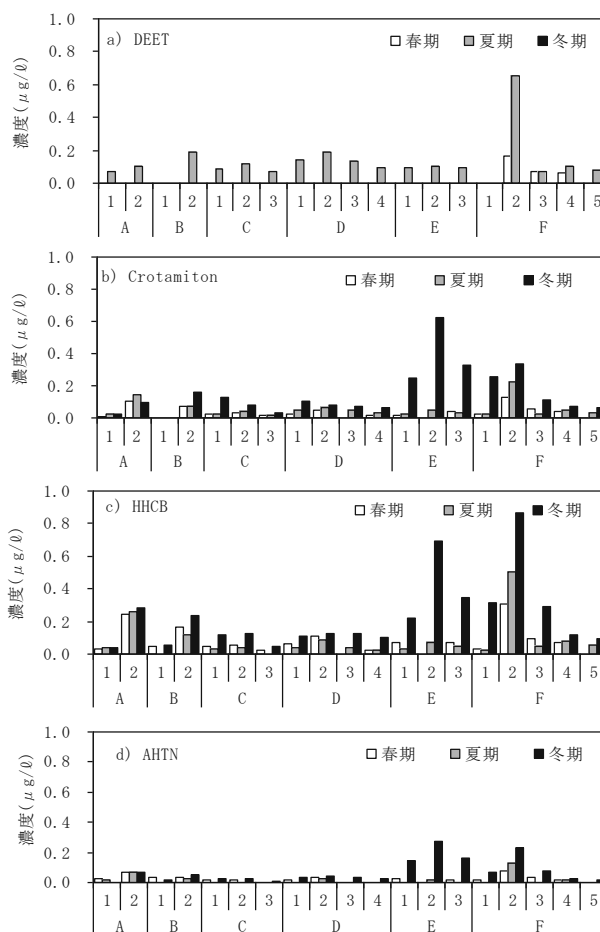


図2 河川水中の香料等の濃度 (春期のD-3, E-2, F-5は欠測)

下水処理場，コミプラの流入水および下水処理場，コミプラ，合併浄化槽の放流水の調査結果を図3に示す。図中の「流入水」は，下水処理場およびコミプラの流入水の各調査結果をあわせて，その最大値，最小値，平均値を示している。平均値でみると，下水処理場，コミプラ，合併浄化槽のいずれも流入水よりも放流水の濃度が低くなっていたことから，これらの処理によって，香料等が除去されていることが確認された。しかし，合併浄化槽では，処理効率のばらつきが大きかった。

図3に示した流入水または放流水の香料等の濃度と表3に示した各処理の汚水処理量および処理人口から，下記の式により①未処理，②下水処理場放流水，③コミプラ放流水④合併浄化槽放流水での香料等の排出原単位を求めた。

$$\begin{aligned} & \text{排出原単位 (mg/日・人)} \\ & = \text{放流水または流入水中の濃度 (mg/m}^3\text{)} \\ & \quad \times \text{汚水処理量 (m}^3\text{/日) / 処理人口 (人)} \end{aligned}$$

ただし，「未処理」の排出原単位の算出には下水処理場

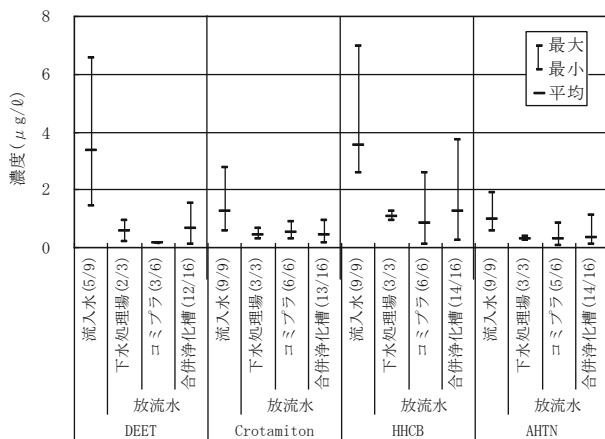


図3 流入水および放流水中の香料等の濃度
「流入水」は下水処理場とコミプラの流入水
括弧内は検出数/検体数

表5 処理ごとの香料等の排出原単位

	DEET*	Crotamiton	HHCB	AHTN
未処理	1.62	0.43	1.22	0.34
下水処理場	0.41	0.20	0.49	0.13
コミプラ	0.05	0.15	0.23	0.08
合併浄化槽	0.21	0.09	0.33	0.07

(単位 mg/日・人)

* DEETは夏期 (7~9月) のみ

およびコミプラの流入水の濃度を，「下水処理場」および「コミプラ」の原単位については，放流水の濃度を使用した。「合併浄化槽」の原単位については，香料等の濃度と流量および人口から排出原単位を算出した。また，いずれの処理でも，汚水処理量や流量は調査時期によって異なることから，調査ごとに排出原単位を算出し，年間の平均値を算出した。ただし，DEETは夏期 (7~9月) の結果から算出した (表5)。平均値でみると，いずれの処理でも，未処理と比較して排出原単位は少なく，処理によって香料等が除去されていることを確認した。

3) 河川への排出量

河川の流量および香料等の濃度の日内変動および水路内や河川での香料等の減少はないものとして，表5の排出原単位，表6に示した各調査地点より上流の各処理ごとの汚水処理人口および河川の流量から，下記の式により各地点の河川水の濃度を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{河川水の濃度 (} \mu\text{g/l)} \\ & = \Sigma \{ (\text{排出原単位 (mg/日・人)})_i \\ & \quad \times (\text{上流の汚水処理人口 (人)})_i \} \\ & \quad \times 1000 / \text{河川の流量 (l/日)} \end{aligned}$$

各地点の汚水処理人口 (表6) は掛川市の統計資料¹⁰⁾から推計した。河川水の香料等の濃度の実測値と計算値を表7に示した。排出原単位と河川流量から算出した濃度は，実際の河川水の香料等の濃度と比べ，1倍から13倍と大きくなった。調査した河川では，各調査地点に生活雑排水を未処理で排出している人口は約60%であった。下水処理場などの処理をした場合の排出原単位と比較して未処理の排出原単位が大きいため，未処理で排出される香料等は河川への排出量の80%以上となり，未処理の排出原単位と人口が河川水の濃度に大きく寄与する結果となった。今回，河川へ排出さ

表6 調査地点上流の汚水処理人口

	道神橋	逆川橋	長谷橋	八幡橋
未処理	11,200	17,000	31,500	44,200
下水処理場	500	7,400	9,200	10,600
コミプラ*	2,500	2,500	4,400	4,400
合併浄化槽	3,700	5,700	10,500	14,800
合計	17,900	32,600	55,600	74,000

(単位: 人)

* コミプラには，農業集落排水処理施設を含む

表7 河川水の濃度

調査地点	DEET		Crotamiton			HHCB			AHTN		
	実測値	計算値	平均	実測値 (最小~最大)	計算値	平均	実測値 (最小~最大)	計算値	平均	実測値 (最小~最大)	計算値
道神橋	0.08	0.46	0.09	(0.05 ~ 0.13)	0.10	0.12	(0.06 ~ 0.18)	0.28	0.03	(0.01 ~ 0.06)	0.08
逆川橋	0.05	0.64	0.08	(0.01 ~ 0.14)	0.14	0.12	(0.01 ~ 0.23)	0.39	0.04	(<0.01 ~ 0.06)	0.11
長谷橋	0.14	0.77	0.09	(0.06 ~ 0.12)	0.15	0.15	(0.10 ~ 0.25)	0.42	0.03	(0.02 ~ 0.04)	0.11
八幡橋	0.13	1.65	0.10	(0.06 ~ 0.17)	0.17	0.12	(0.05 ~ 0.20)	0.47	0.03	(0.01 ~ 0.04)	0.13

(単位: μg/l)

れてからの分解や吸着などによる香料等の濃度変化は考慮していないので、各地点での計算値を多く見積もっていると思われた。また、汚水処理人口についても課題があった。下水処理場やコミプラでは、実際に近いデータが得られたが、合併浄化槽と未処理については、市全体の汚水処理人口から合併浄化槽1に対して未処理3と割り振った。このため、未処理の人口を過大あるいは過小に評価している可能性がある。濃度の算出については、調査する地域の人口特性、河川等での分解、吸着などの課題があることを確認した。

2 アカヒレに対する毒性試験

4物質を混合し、県内河川の最高濃度の100倍の濃度とした場合でも、死亡するアカヒレは観察されず、県内の河川水の香料等の濃度では、エストロゲン結合活性¹⁾、エストロゲンの抑制作用と合わせて、生物への影響は確認されなかった。

まとめ

県内の河川水の調査から、下水処理場の下流では一時的に合成ムスク香料や家庭用医薬品の濃度が高くなる傾向があることを確認した。下水処理場やコミュニティプラントの調査から、放流水の濃度や量は流入水よりも低く、合成ムスク香料や家庭用医薬品は除去されていることを確認した。合併浄化槽については、処理効率のばらつきが大きい、平均で見ると流入水よりも濃度や量が低かった。これらの処理により、合成ムスク香料や家庭用医薬品の河川への排出は抑えられていた。

処理ごとに算出した排出原単位と人口などから河川水の濃度を算出した結果、実際の河川水の濃度よりも高い濃度となった。調査対象の施設の数、調査回数が少ないこと、河川での動態を考慮していないこと、調査対象地域の選択の問題から、計算上未処理で排出される量の影響が大きくなったことなど、多くの課題があることが判明した。

今回調査対象とした合成ムスク香料や家庭用医薬品は、生活排水の流入する県内の河川水に含まれることがわかったが、アカヒレに対する毒性の試験から、県内河川水の濃度は、すぐに生き物に影響がある濃度ではないと思われた。

謝辞

本調査にあたり、御助言、御指導いただきました静岡県立大学名誉教授五島廉輔先生、流入水および放流水の採水、資料提供にご協力いただいた掛川市経済建設

部下水整備課および中遠環境保全株式会社の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) 平岡一世他：下水処理場放流水中の化学物質の存在実態調査，静岡県環境衛生科学研究所報告，**49**，65-70(2006)
- 2) Staci L. Simonich et al.：Removal of Fragrance Material during U.S. and European Wastewater Treatment. *Environ Sci. Technol.* **36**，2839-2847(2002)
- 3) Staci L. Simonich et al.：Trace Analysis of Fragrance Materials in Wastewater and Treated Wastewater. *Environ Sci. Technol.* **34**，959-965(2000)
- 4) Haruhiko Nakata：Occurrence of Synthetic Musk Fragrances in Marine Mammals and Sharks from Japanese Coastal Water. *Environ Sci. Technol.* **39**，3430-3434(2005)
- 5) 亀田豊他：環境中の香料及び紫外線吸収剤の多成分同時分析手法の確立と環境中濃度の把握，水環境学会誌，31(1)，39-46(2008)
- 6) 小林義和他：多成分医薬品類の下水処理場における存在実態と活性汚泥処理による除去特性，第41回日本水環境学会年会講演集，366(2007)
- 7) 石本裕生他：カキを指標にした日本沿岸域の合成香料汚染マップの作成，第15回環境化学討論会講演要旨，724-725(2006)
- 8) 金子亜由美他：下水処理場排水に含まれる合成香料・家庭用医薬品の調査，静岡県環境衛生科学研究所報告，**50**，69-72(2007)
- 9) Richard H. M. M. Schreurs et al.：In Vitro and in Vivo Antiestrogenic Effects of Polycyclic Musks in Zebrafish, *Environ. Sci. Technol.* **38**，997-1002(2004)
- 10) 掛川市市民課：掛川市大字別世帯数・人口一覧(平成20年11月)(2008)
- 11) 掛川市下水整備課：掛川市の下水道事業(平成19年度版)(2008)
- 12) 花本征也他：淀川水系における医薬品類の挙動に関する考察，第43回水環境学会年会講演集(2009)

静岡県内の化学物質の環境リスク評価に関する研究

環境科学部 環境科学スタッフ 中川寛基, 久米一成, 神谷貴文

Research on Environmental Risk Evaluation
 of Chemicals in Shizuoka Prefecture

Hiroki NAKAGAWA, Kazunari KUME and Takafumi KAMITANI

近年、環境リスクの概念が導入され、化学物質の暴露濃度と有害性（ハザード）を加味した評価や優先的に削減すべき化学物質の選定が必要とされている。

本研究では、富士市東名高速道路以南の地域での有害大気汚染物質濃度分布をパッシブサンプラーを用いた多地点同時パッシブサンプリング手法によって測定し、産総研-暴露・リスク評価大気拡散モデル（AIST-ADMER）Ver. 2.5 のサブグリッド機能（100mグリッド）を利用して推測した。さらに前述の方法にて導出した有害大気汚染物質濃度を基に独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）が提供するリスク評価ツールを用いて、ホルムアルデヒド、ベンゼン、トルエン、キシレンの4物質についてリスク評価を行った。

その結果、実測値から求めた濃度分布図と、PRTR届出データを基にAIST-ADMERを利用して作成した濃度分布図を比較すると、高濃度地域での濃度分布傾向は類似している部分があった。リスク評価では、ホルムアルデヒド、ベンゼンおよびトルエンのAIST-ADMER推測値において、ヒト健康へのリスクの懸念があり、適切な管理や詳細な調査が必要と判定された。

本研究で行った大気中化学物質濃度の予測とリスク評価手法は、今後行政での活用やサンプリング調査が必要な地点のスクリーニング等での利用が期待される。

Key words: 多地点同時パッシブサンプリング, 大気拡散モデル, 吸入暴露評価, リスク評価
 simultaneous passive sampling in multisite, atmospheric dispersion model, inhalant exposure assessment, risk assessment

はじめに

化学物質を取り扱う事業者が、どれだけ化学物質を環境へ排出しているかについて自ら把握して届け出ることにより、化学物質の自主的な管理を促進し、環境保全上の支障を未然に防止することを目的に、化学物質排出移動量届出制度（PRTR制度）が1999年に施行され、その排出量データが毎年、経済産業省および環境省から公表されている。2007年度PRTRデータによると、静岡県は化学物質の総届出排出量・移動量が23,633トンであり、そのうち68.8%を占める大気への排出量は全国で2番目に多い（全国比7.75%）¹⁾。このため、静岡県では大気中の化学物質による短期的な影

響のみならず、長期的な暴露による健康被害のリスクを把握することが必要であると考えられる。

化学物質に対するリスク評価を行うためには、化学物質ごとの暴露量および有害性情報が必要である。本研究では、PRTRデータと産総研-暴露・リスク評価大気拡散モデル（AIST-ADMER）Ver. 2.5 のサブグリッド機能（100mグリッド）を用いて、環境リスク評価を行うにあたっての暴露評価への適用可能性を探り、多地点同時パッシブサンプリング手法によりAIST-ADMERの適合性を確認し、リスク評価を行ったので、これについて報告する。

調査方法

1 多地点同時パッシブサンプリング調査

1-1 調査対象地域の選定および試験方法

PRTRデータで揮発性有害化学物質（VOCs）の大気中への排出量が比較的多い富士地域を対象地域として選

出し、東名高速道路以南の東西方向 8km (1~16)、南北方向 5km (A~J) の範囲を独自に 500m グリッドに切り分けた (全 160 グリッド)。この中で、測定地点が分散するように 42 グリッドを抽出し、多地点同時パッシブサンプリング調査を実施した。調査地点のグリッド区分と測定地点の概要を図 1 に示す。

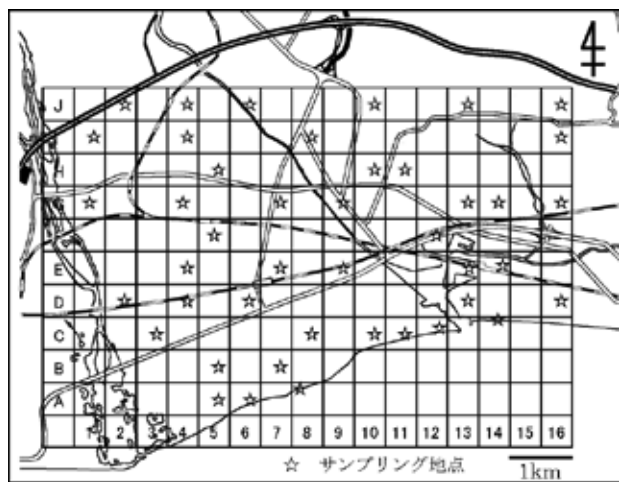


図 1 グリッド区分と測定地点の概要

調査グリッド内の公共施設等敷地内の樹木などに、地上より 2m 前後の高さに、フードをかぶせたパッシブサンプラー (アルデヒド用: DNPH パッシブガスチューブ, VOCs 用: 活性炭パッシブガスチューブ各 1 つずつ、どちらも柴田科学製) を 2009 年 7 月 (夏季) と 2010 年 1 月 (冬季) に 24 時間設置し、VOCs を吸着させた。トラベルブランクを 3 サンプル、二重測定を 5 地点で行った。サンプリング風景を図 2 に示す。

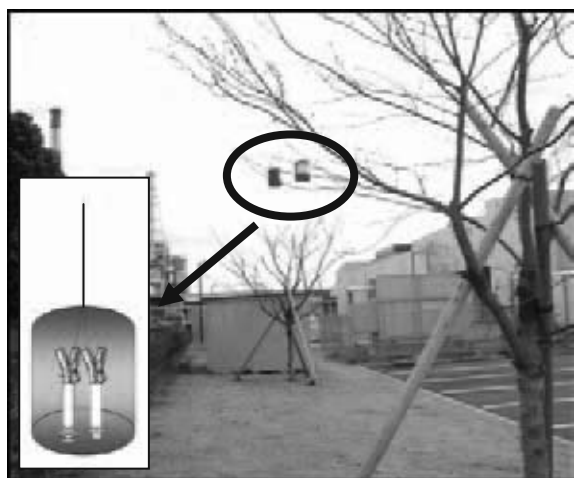


図 2 サンプリング風景 (二重測定) と装置概要

1-2 分析方法

ホルムアルデヒドはアセトニトリル (HPLC 用、和光純薬工業製) を用いて溶出し、HPLC で分析した。ホルムアルデヒド以外の VOCs は二酸化炭素 (作業環境測定用、和光純薬工業製) を用いて溶出し、GC/MS で分析した。以上の方法は房家らのパッシブサンプラーを用いた有害大気汚染物質濃度分布調査方法²⁾に準じた。HPLC および GC/MS 分析条件を表 1 および表 2 に示す。また、MS の測定質量数 (m/z) を表 3 に示す。

表 1 HPLC 使用機器および分析条件

使用機器	ポンプ: PU-2089 オートサンプラー: AS-2059plus カラムオープン: CO-2065plus UV検出器: UV-2077plus (JASCO製)
分離カラム	Wakosil-DNPH-II, φ4.6mm×150mm
カラム温度	40°C
流速	1.0ml/min
試料注入量	400 μl
検出器波長	360nm
移動相	A: Wakosil DNPH溶離液A B: Wakosil DNPH溶離液B C: 水 D: アセトニトリル
グラジエント	C: D=70:30 (0min) → A: C=70:30 (0.1min) → B: C=70:30 (20min) → B=100 (30min) → C: D=70:30 (30.1min) → C: D=70:30 (40min)

表 2 GC/MS 使用機器および分析条件

使用機器	GC: 6890N Network System, 768313 Series Injector, 7683 Series Auto Sampler (Agilent Tech. 社製)
使用カラム	MS: Jms-Q1000GC (日本電子社製) EQUITYTM-1 (SUPELCO社製)
カラム温度	60m×0.25mm×1.0 μm 35°C (5min) →3°C/min→100°C- 8°C/min→250°C (5min)
キャリアーガス	He
試料注入量	1 μl
インジェクションモード	Split (スプリット比10)
インターフェース温度	250°C
イオン化法	EI (70eV)
SIMサイクルタイム	0.04sec

表 3 MS 測定質量数 (m/z)

	定量用イオン	確認用イオン
ベンゼン	78	51
トルエン	91	92
キシレン	91	106
トルエン-d8	98	100

パッシブサンプラーの捕集量から大気中濃度への換算には雨谷ら³⁾⁴⁾および静岡県環境衛生科学研究所の換算式⁵⁾を用い、その結果から Gsharp version 2.0 (日本電子計算機)を用いて濃度分布図を作成した。

1-3 試薬・器具・調査対象物質

○HPLC 分析 (ホルムアルデヒド分析)

アセトニトリル：HPLC 用 (和光純薬工業製)，
Wakosil DNP 溶解液 A および B：和光純薬工業製

パッシブサンプリング用カートリッジ：DNP パッシブガスチューブ (アルデヒド・ケトン用) (柴田科学製)，HPLC：PU-2089plus (ポンプ)，AS-2059plus (オートサンプラー)，CO-2065plus (カラムオーブン)，UV-2077plus (UV 検出器) (JASCO 製)，Wakosil DNP 2 (使用カラム，内径 4.6mm×150mm)

○GC/MS 分析 (ホルムアルデヒド以外の VOCs14 物質の分析*)

メタノール：特級 (和光純薬工業製)，二硫化炭素：作業環境測定用 (和光純薬工業製)，トルエン-d8：シグマアルドリッチ社製

パッシブサンプリング用カートリッジ：パッシブガスチューブ (VOCs 用) (柴田科学製)，GC：6890N Network System，768313 Series Injector，7683 Series Auto Sampler (Agilent Technologies)，MS：Jms-Q1000GC (日本電子社製)

*VOCs14 物質：クロロホルム，1,1,1-トリクロロエタン，ベンゼン，テトラクロロメタン，トリクロロエチレン，トルエン，テトラクロロエチレン，エチルベンゼン，キシレン，スチレン，1,3,5-トリメチルベンゼン，1,2,4-トリメチルベンゼン，1,4-ジクロロベンゼン，1,2,3-トリメチルベンゼン

2 AIST-ADMER 解析

2-1 使用ソフトおよび使用データ

AIST-ADMER Ver. 2.5 のサブグリッド機能⁶⁾を用いて、夏季と冬季の大気中 VOCs 濃度を 100m メッシュの解像度で推定した。

事業所排出量データは、PRTR けんさくくん (経済産業省)を用いて得られる富士市内の事業所からの平成 19 年度年間 PRTR 届出排出量データと静岡県発行の平成

19 年度 PRTR データを利用した。気象データは AIST-ADMER に内蔵された 2007 年 7 月平均および 2007 年 1 月平均のアメダスデータを利用した。AIST-ADMER を用いた推測に利用したデータの一覧を表 4 に示す。

表 4 利用したデータの種類の種類と資料

データの種類の種類	出典
1 平成19年度 事業所排出量データ	経済産業省製造産業局化学物質管理課：PRTRけんさくくん，PRTR届出データ (2007)
2 平成19年度 すそ切りおよび非対象業種排出量データ	静岡県県民部環境局生活環境室：平成19年度PRTR報告書 (2009)
3 平成20年度 富士市自動車保有台数	静岡県企画部政策推進局生活統計室：車種別・市町別自動車保有台数 (2008)
4 平成17年度 幹線道路自動車通過台数	静岡県土木部道路企画室：道路交通センサス報告書平成17年度一般交通量調査 (2006)
5 道路区間延長 (2005)	上記4と同じ
6 混雑時平均旅行速度 (2005)	上記4と同じ
7 車種別・旅行速度区分別の THC (総炭化水素) 排出係数	環境省環境管理技術室調べ (2007)
8 平成19年度 自動車 (ホットスタート) に係る対象化学物質排出量の対THC比率	環境省，東京都および業界団体の実測データに基づき環境省が設定 (2003)
9 平成19年度 冷始動時THC排出係数	環境省環境管理技術室調べ (2003)
10 平成15年度 車種別・業態別の始動回数 (回/日)	上記9と同じ
11 平成19年度 THC排出量に対する対象化学物質排出量の比率 (コールドスタート)	環境省環境管理技術室 (2004)
12 化学物質の分解係数・乾性沈着速度・バックグラウンド濃度・洗浄比	中西準子他：詳細リスク評価書シリーズトルエン (2005) ・ホルムアルデヒド (2009) ・ベンゼン (2008) ・キシレン (2009)
13 平成17年 富士市人口	静岡県企画部政策推進局生活統計室：平成17年 国勢調査 (2006)

2-2 対象地域と推測の方法

VOCs 濃度分布を推測する範囲は、パッシブサンプリングで選定した地域とほぼ同様になるように設定した。

PRTR 届出が義務付けられている事業所からの排出量は点源排出量データとして AIST-ADMER に入力した。キシレンとトルエンに関しては、静岡県全体の PRTR 届出外年間総排出量⁷⁾として推定されている量を AIST-ADMER に内蔵されている事業所数指標データを用いて 1km グリッドで振り分けた。

ベンゼンおよびホルムアルデヒドは年間総排出量の 75%程度が自動車由来であり⁷⁾⁸⁾，そのうち自動車のホットスタートとコールドスタートによる増分排出量でそのほとんどを占めているため，その影響を無視できない。そこでホットスタートによる排出については，富士市内の道路交通センサスに記載されている幹線道路について，100m グリッドの解析度で単位グリッド当たりの排出量を求めて加算した。コールドスタート増分に係る排出については，富士市自動車保有台数に年間始動回数，始動 1 回当たりの全炭化水素 (Total hydrocarbon：THC) 排出係数および対象化学物質排出量の対 THC 比率を乗じて求めた⁹⁾年間総排出量を

AIST-ADMER 内蔵の夜間人口指標データにより 500m グリッドで振り分けて加算した。以上のデータを用いて、各物質の大気中濃度を 100m グリッドの解析度で推測し、濃度分布図を作成した。

3 リスク評価

独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）の化学物質管理センターが提供しているリスク評価方法¹⁰⁾を参照しながら化学物質の無毒性量（NOAEL）または最小毒性量（LOAEL）および不確実係数（UFs）を決定し、本研究で得られた大気中 VOCs 濃度をリスク評価体験ツールに入力してリスク評価を行った。UFs は個人差、種差、LOAEL、作用部位等の要因を考慮した数値の積とした。リスク評価の流れを図 3 に示す。

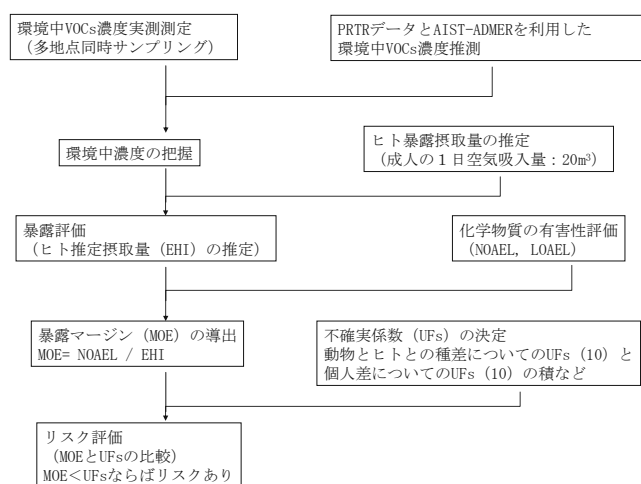


図 3 リスク評価の流れ

結果と考察

1 多地点同時パッシブサンプリング調査

多地点同時パッシブサンプリング調査結果を表 5 に示す。また、トラベルブランクは N.D であった。

ホルムアルデヒドを除く VOCs のうち、ベンゼン、トルエン、キシレン以外は GC/MS 分析の検出下限値を下回る調査地点が多かったため、暴露評価を行わなかった。

ホルムアルデヒド等 4 物質のうち、地点間濃度の差で最大値/最小値が最も大きい物質はトルエン（夏季 38.3、冬季 36.1）で、最も小さい物質はホルムアルデヒド（夏季 2.99、冬季 2.37）であった。これらは、事業所からの排出量が多いトルエンと、自動車からの排出量が多いホルムアルデヒドなど排出源の相違が地点間の濃度格差に影響したことが推測された。

表 5 多地点同時パッシブサンプリング調査結果

夏季結果	ホルムアルデヒド	ベンゼン	トルエン	キシレン
最大値	5.12	2.32	158	4.56
最小値	1.71	<0.357	4.13	0.178
幾何平均値	2.94	1.18	10.4	0.829
最大値/最小値	2.99	>6.50	38.3	25.6

冬季結果	ホルムアルデヒド	ベンゼン	トルエン	キシレン
最大値	3.55	3.85	195	4.86
最小値	1.50	1.14	5.41	1.15
幾何平均値	2.09	1.95	13.3	1.81
最大値/最小値	2.37	3.38	36.1	4.23

*最大値, 最小値, 幾何平均値: $\mu\text{g}/\text{m}^3$

対象 4 物質について夏季と冬季の結果を比較すると、ベンゼン、トルエン、キシレンの 3 物質は冬季に大気中濃度が高かった。ベンゼンは冬季調査の 2 地点において、環境基準（1 年平均値が $3\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下）で設定されている値を超過したが、両地点とも PRTR 届出データにおけるベンゼンの高排出事業所近傍であった。一方、ホルムアルデヒドは夏季で大気中濃度が高かったが、これについては中西ら⁸⁾よりホルムアルデヒドの約 7~9 割が光化学反応により生じていると推察がなされており、本研究で夏季濃度が高かったのもこのためであると考えられる。

2 多地点同時パッシブサンプリング手法および AIST-ADMER 解析との比較

表 4 に示すデータと AIST-ADMER を用いて求めた大気中 VOCs 濃度推測結果を表 6 に示す。

表 6 AIST-ADMER 大気中 VOCs 濃度推測結果

夏季結果	ホルムアルデヒド	ベンゼン	トルエン	キシレン
最大値	12	8.5	864	5.2
最小値	0.060	0.33	7.1	0.27
幾何平均値	0.33	0.71	41	1.0
最大値/最小値	200	26	122	19

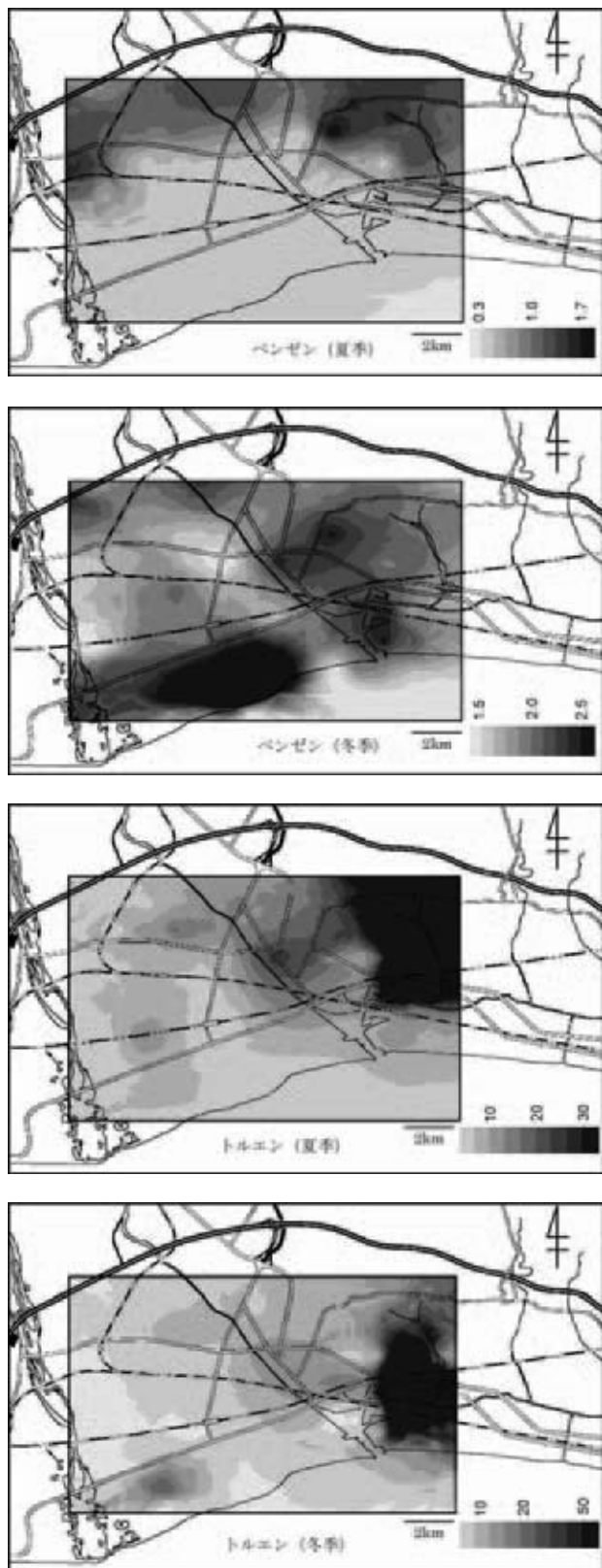
冬季結果	ホルムアルデヒド	ベンゼン	トルエン	キシレン
最大値	27	12	400	3.8
最小値	0.25	0.36	4.0	0.48
幾何平均値	0.55	0.78	33.0	1.2
最大値/最小値	108	33	100	7.9

*最大値, 最小値, 幾何平均値: $\mu\text{g}/\text{m}^3$

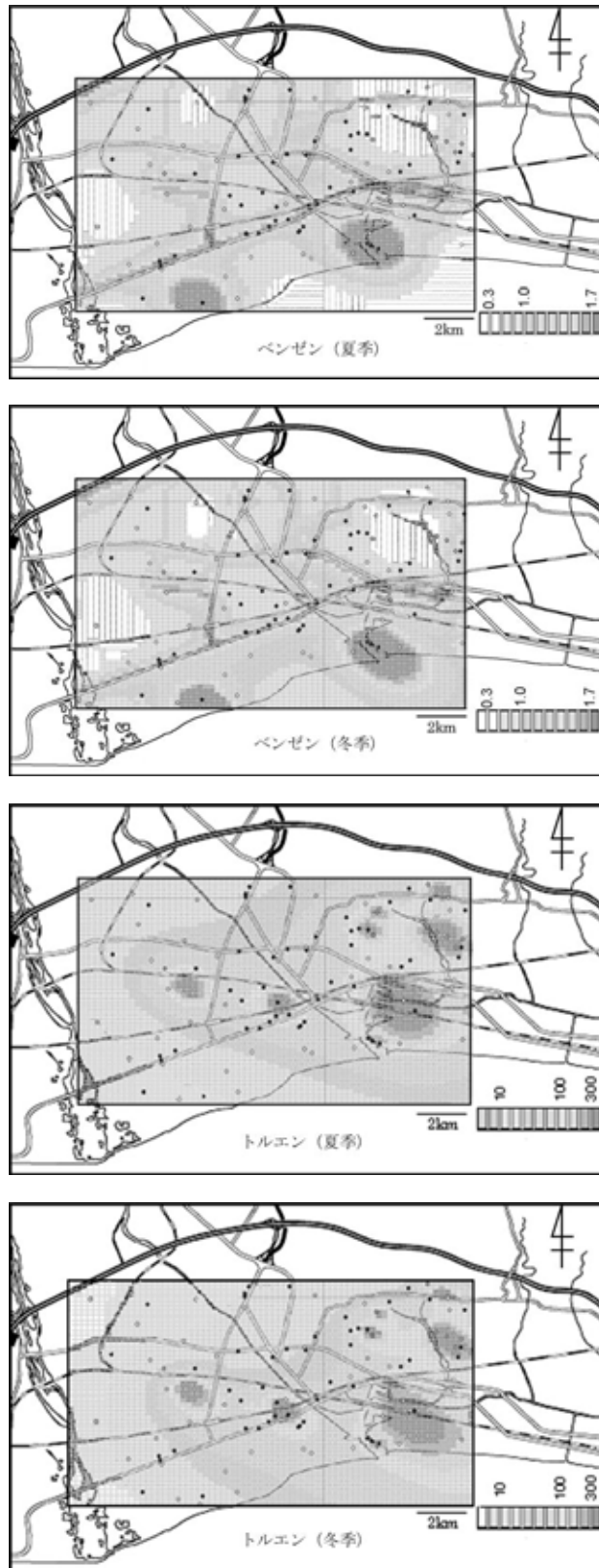
また、多地点同時パッシブサンプリング調査結果および AIST-ADMER 大気中 VOCs 濃度推測結果から濃度分

布図を作成し、対象4物質のうち例としてベンゼンおよびトルエンの濃度分布図を図4に示す。図4より、高排出事業所周辺で大気中濃度が高値を示す傾向にあ

ることがわかった。しかし、年間の総排出量の75%程度が自動車から排出されているベンゼン⁷⁾は排出事業所周辺に加え、富士地域一帯に広がっている結果とな



パッシブサンプリングによる実測値



ADMER 計算値

図4 多地点同時パッシブサンプリング調査結果およびAIST-ADMER大気中VOCs濃度推測結果 (単位: $\mu\text{g}/\text{m}^3$)

った。図には示していないが、ホルムアルデヒドではベンゼンと、キシレンではトルエンと同様の分布を示していた。

多地点同時パッシブサンプリング手法では特定の日時における実際の暴露状況を知ることができ、より環境実態を反映しているため、年間を通して平均的に事業所から化学物質が排出されているとして計算したAIST-ADMERによる結果と比べると、ベンゼンではA-6グリッド周辺の事業所からの排出による影響が確認できなかった。この理由として、夏季の測定日時にベンゼンの使用が少なかった可能性および当日の主風向が海側に向いていた可能性があるが、夏季調査日の主風向は南南西で、平均風速は南南西で最も大きかったことから、高排出事業所から排出されたベンゼンは海側に流されたことが考えられる。夏季の調査日の調査地点A-6に最も近い風向風速観測地点(D-6)での夏季および冬季の風配図を図5に示す。

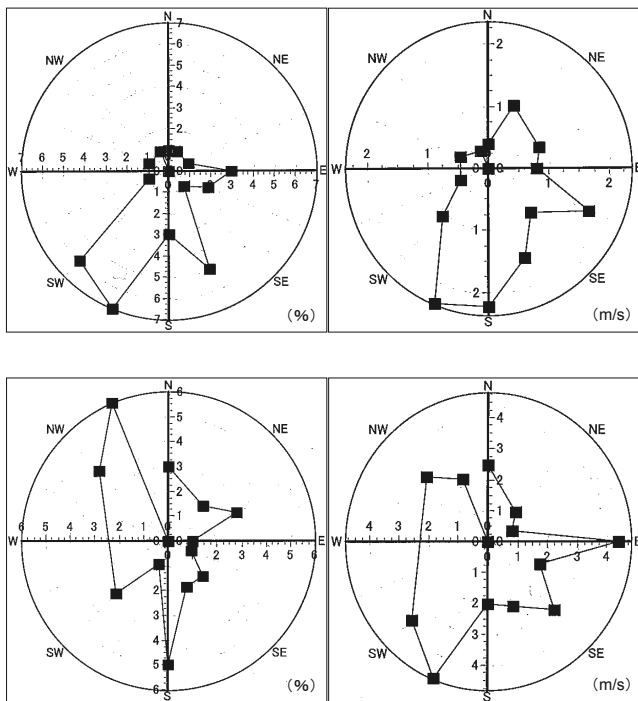


図5 風配率(左)および平均風速(右)
夏季風配図(上段)および冬季風配図(下段)

以上のことから、多地点同時パッシブサンプリング手法ではとらえきれない長期暴露をAIST-ADMERでは評価できる可能性が示唆された。

多地点同時パッシブサンプリング手法による大気中VOCs濃度とAIST-ADMERによる大気中VOCs濃度の推計結果がどの程度相関しているかを確認するため、夏季と冬季の結果を合わせて多地点同時パッシブサンプリ

ング調査地点ごとの実測値とAIST-ADMER計算値の比較を図6に示す。

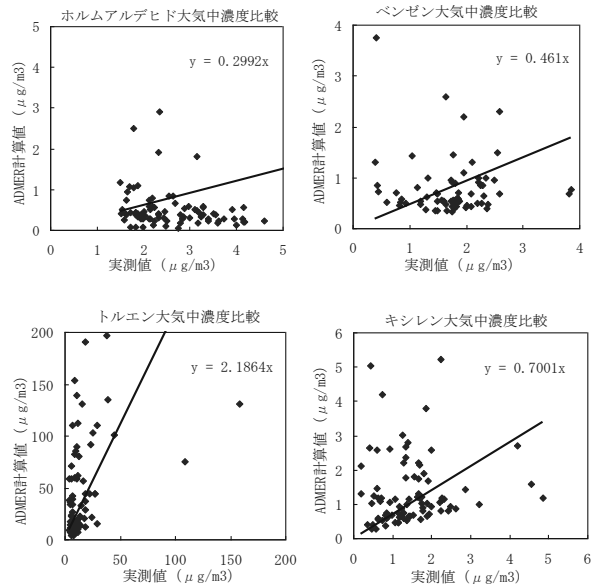


図6 地点ごとの実測値とADMER計算値の比較

図6に示したように、実測値とADMER計算値の関係は必ずしも1:1の関係ではなく、ベンゼンにおいてはADMER計算値の方がやや低く見積もられる傾向にあった。キシレンは1:1かやや低く見積もられ、トルエンは計算値のほうが高く見積もられる傾向にあった。ホルムアルデヒドにおいてはADMERでの推測値がかなり低く見積もられており、これは前述のとおりホルムアルデヒドの約7~9割が光化学反応によって2次的に生じているためであると考えられ、事業所からの排出と自動車からの排出のみを考慮した推測では結果に大きな差が出るものと考えられた。

なお、PRTRデータは年間の総量であり、排出源の位置や形状、濃度、時間変化等のデータの記載がなく、AIST-ADMERを用いた濃度分布の解析や暴露評価の推計には限界があり、予測で導かれた環境中VOCs濃度は必ずしも実測値と一致しないため、化学物質の高濃度地域におけるパッシブサンプラーを用いた実測測定により濃度補正する必要があると考えられる。あるいは本研究ではAIST-ADMERを用いた推測にPRTRデータを利用した点源排出および自動車からの排出量等の単純なデータ入力しか行わず、検討が不十分であったため、AIST-ADMERに入力するデータやこのソフトで使用するデータをうまく利用できれば推測値をより実測値へ近づけることができる可能性がある。

3 リスク評価

多地点同時パッシブサンプリング手法で得られた大気中 VOCs 濃度の最高値でリスク評価を行った結果、調査対象 4 物質においてリスクなしと判定された。AIST-ADMER を用いた推測値では、ホルムアルデヒド、ベンゼンおよびトルエンにおいてリスクの懸念があると判定され、適切な管理あるいはより詳細な調査の必要性が示唆された。リスク評価の結果を表 7 に示す。

表 7 リスク評価の結果

		ホルムアルデヒド ベンゼン トルエン キシレン			
環境中濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) (最大値)	①多地点 同時サン プリング 結果	5.1 (夏季)	3.9 (冬季)	195 (冬季)	4.9 (冬季)
	②AIST- ADMER 推測値	27 (冬季)	12 (冬季)	864 (夏季)	5.2 (夏季)
EHI ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$)	①	2	1.54	78	1.9
	②	11	4.8	346	2.1
LOAEL (mg/m^3)		0.1 ^{*1} (NOAEL)	0.31 ^{*2} ($\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$)	78 ^{*3}	870 ^{*4}
UFs		10	100	300	1000
MOE	①	20	201	400	179012
	②	3.7	65	90	167308
リスクの有無	①	無	無	無	無
	②	有	有	有	無
リスクありと 判定された調 査地点数	①	0/160	0/160	0/160	0/160
	②	1/160	1/160	1/160	0/160
		8/4000 (冬季)	28/4000 (夏季)	64/4000 (夏季)	0/4000

*1 ホルムアルデヒドの NOAEL : $0.1\text{mg}/\text{m}^3$ 、ヒト暴露における鼻咽頭粘膜への刺激、30 分間平均値としての指針値

*2 ベンゼンの LOAEL : $0.31\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 、ヒト疫学データとして中国天津市の横断的調査によるベンゼンの血液毒性が平均濃度 1ppm 以下で認められた報告から

*3 トルエンの LOAEL : $78\text{mg}/\text{m}^3$ 、ヒト暴露における神経行動機能および生殖発生への影響（自然流産率の上昇）、女性労働者（平均作業従事年数は 5.7 年）。8 時間の作業中に時間加重平均で $332\text{mg}/\text{m}^3$ (88ppm) に暴露。

*4 キシレンの LOAEL : $870\text{mg}/\text{m}^3$ 、妊娠ラット暴露における出生児の中樞神経系発達への影響、1 日 6 時間、妊娠 4 日目から 20 日目まで、生殖発生毒性

まとめ

多地点同時パッシブサンプリング調査結果を基に作成した濃度分布図と AIST-ADMER を利用した推測の結果を基に作成した濃度分布図を比較すると、環境中濃度には異なる地点が見られるものの、高排出事業所付近での濃度分布の傾向には類似している部分があった。このため AIST-ADMER を利用した大気中 VOCs 濃度推測手法は、サンプリング調査が必要な地点のスクリーニング等での利用が期待される。同時に NITE のリスク評価手法を利用して化学物質のリスク評価を行うことにより、優先的に削減すべき化学物質にあらかじめ検討をつけることができるとともに、今後行政で活用できると考えられる。

文 献

- 1) 静岡県県民部環境局生活環境室：平成 19 年度 PRTR 報告書，静岡（2009）
- 2) 房家正博他：パッシブサンプラーによる工場周辺の有害大気汚染物質濃度分布調査，静岡県環境衛生科学研究所報告，47，69-72（2004）
- 3) 雨谷敬史他：パッシブサンプラーを用いたベンゼンおよびその誘導体の多成分分析法，生活環境中の汚染物質測定マニュアル，201-220（2004）
- 4) 雨谷敬史他：パッシブサンプラーを用いた揮発性有機ハロゲン化合物の多成分分析法，生活環境中の汚染物質測定マニュアル，221-241（2004）
- 5) 静岡県環境衛生科学研究所居住環境スタッフ：居住環境中の有害化学物質の低減化に関する研究，9-14，静岡（2008）
- 6) 独立行政法人産業技術総合研究所ホームページ：AIST-ADMER Ver.2.5 操作マニュアル，<http://www.aist.riss.jp/software/admer/>
- 7) 中西準子他：詳細リスク評価書シリーズ 18 ベンゼン，52，丸善株式会社，東京（2008）
- 8) 中西準子他：詳細リスク評価書シリーズ 17 ホルムアルデヒド，丸善株式会社，東京（2009）
- 9) 環境省 PRTR インフォメーション広場ホームページ：平成 19 年度 PRTR 届出外排出量の推計方法 <http://www.env.go.jp/chemi/prtr/result/todok edegaiH19/syousai/12-1.pdf>
<http://www.env.go.jp/chemi/prtr/result/todok edegaiH19/syousai/12-2.pdf>
- 10) NITE ホームページ：<http://www.safe.nite.go.jp>

HPLC高感度分析手法による 環境中のビスフェノールA測定の実用性について

環境科学部 環境科学スタッフ 山下晶平, 今津佳子

Evaluation of Highly Sensitive Analytical Methods with High-Performance Liquid Chromatography for Bisphenol A and Application to the Measurements in Field Environments

Shohei YAMASHITA, Yoshiko IMAZU

大気・河川等の環境中から採取した試料に含まれるビスフェノール類の分析には、一般にガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) を用いて定量するが、対象物質の検出において感度が十分とはいえない場合が多い。

本研究では、ビスフェノール A (BPA) を主としたビスフェノール類の分析において、より汎用性の高い高性能液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた 2 種類の高感度分析手法の実用性を検討した。第一の手法として、試料を HPLC に大量に注入して感度を向上させる手法 (大量注入法)、第二の手法として、ジピレン誘導体化により、蛍光検出器における蛍光の発光強度を高めることで感度を向上させる手法 (エキシマー蛍光誘導体化法) を検討した。両手法のビスフェノール類標準試料に対する定量性を検討した上で、実際に静岡県内の河川から採取した試料水中のビスフェノール類の分析に適用した。その結果、大量注入法では夾雑物による影響が大きく、ビスフェノール類に対して物質選択性を付与しない限り、定量は困難であることが分かった。一方、エキシマー蛍光誘導体化法では高感度かつ物質選択性も良好で、特に BPA の実環境測定への適用が可能であると考えられた。

Key words: ビスフェノール類, 液体クロマトグラフィー, 蛍光検出, エキシマー蛍光

bisphenols, liquid chromatography, fluorometric detection, excimer fluorescence

はじめに

近年、内分泌かく乱化学物質はダイオキシンと並ぶ環境汚染化学物質の中核となっている。環境省は平成 22 年に、EXTEND2010¹⁾として今後の化学物質の内分泌かく乱作用問題に関する対応方針を示した。この中でビスフェノール A [2, 2' -bis(4-hydroxyphenyl)propane] (BPA) について、メダカに対し内分泌かく乱作用を有することが推察される試験結果が示された。一方、BPA の安全基準としての耐容許容摂取量や食品衛生法によるポリカーボネート樹脂製食器からの溶出基準が定められているが、最近になって国立医薬品食品衛生研究所が、胎児や新生児に対しては現在の安全基準より

少ない量でも生殖機能を乱す可能性があることを実験で確認し、基準の見直しが必要だと指摘した²⁾。このような背景から、低用量の BPA に関する人体への暴露影響について再検討するためには、製品からの暴露に限らず、環境中におけるこれらの化学物質濃度に関しても、より詳細に調査していくことが必要である。また、EXTEND2010 において内分泌かく乱作用を有するとされる物質のうち、静岡県が実施している未規制化学物質調査事業において対象とするノニルフェノール、4-t-オクチルフェノール、BPA、o,p'-DDT、p,p'-DDE の中でも、BPA は例年、高頻度かつ高濃度で検出される場合が多い。

ビスフェノール類の環境中濃度の計測は GC/MS を用いて定量^{3,4)}する 경우가多いが、機器が比較的高価であるため、保有する分析機関も限定される。さらに分析前処理過程の煩雑さや、試料を濃縮しても低濃度試

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

料に対する分析感度が十分とはいえないことが課題として挙げられる。そこで本研究では、分析機器としてより汎用性の高い高性能液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた高感度分析手法として、以下の2種類の手法についてBPAの実環境測定への適用性を検討した。第一の手法として、カルボニル化合物やBPA、アルキルフェノール類を簡便かつ高感度で検出できる分析手法である大量注入法^{5,6)}の適用性を検討した。第二の手法として、吉田らが報告しているジピレン誘導体化によるラベル化を利用したエキシマー蛍光誘導体化法^{7,8)}の適用性を検討した。これは、特殊蛍光現象のひとつであるエキシマー蛍光を誘導体化分析法に導入した方法であり、詳細は後に述べる。以上の2手法についてビスフェノール類標準試料の定量性に関して検討した上で、実際に河川水中のビスフェノール類の測定を試みた。さらに測定値の妥当性を評価するために、同じ試料をGC/MSで測定し、データを比較することとした。なお、HPLCを用いたビスフェノール類の分析手法に関しては、他にもいくつか報告が見られ、検出器として、蛍光検出器^{7,8)}、電気化学検出器⁹⁾、質量検出器¹⁰⁾等が利用されているが、本研究では蛍光検出器を用いた。

方法

1 対象物質

本研究において主とする対象物質はBPAであるが、この他に構造が類似していて、HPLC分析時にリテンションタイムが近いと考えられる物質として、ビスフェノールE [4,4'-ethylidenediphenol] (BPE)、ビスフェノールF [4,4'-methylenediphenol] (BPF)の2物質も対象とした。

2 試薬

ビスフェノールA標準品(環境分析用;和光純薬工業(株)製)、4,4'-エチリデンジフェノール(試薬特級;和光純薬工業(株)製、BPE)、4,4'-メチレンジフェノール(試薬特級;和光純薬工業(株)製、BPF)、メタノール5,000(残留農薬・PCB試験用;和光純薬工業(株)製)、アセトニトリル5,000(残留農薬・PCB試験用;和光純薬工業(株)製)、t-ブチルメチルエーテル5,000(残留農薬・PCB試験用;和光純薬工業(株)製、TBME)、ヘキサン5,000(残留農薬・PCB試験用;和光純薬工業(株)製)、1mol/l塩酸(容量分析用;和光純薬工業(株)製)、10%アンモニア水(試薬;和光純薬工業(株)製)、硫酸ナトリウム(無水)(残留農薬試験・PCB試験用;関東化学(株)製)、メタノール(高速液体クロマトグラフ用;和光純薬工業(株)製)、

アセトニトリル(高速液体クロマトグラフ用;和光純薬工業(株)製)、炭酸カリウム(試薬特級;和光純薬工業(株)製)を用いた。トリメチルシリル(TMS)化による誘導体化試薬として、N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド(環境分析用;和光純薬工業(株)製、BSTFA)を用いた。ジピレン誘導体化試薬として、4-(1-ピレン)プタノイルクロリド(Toronto Research Chemicals Inc.製、PBC)を用いた。水は蒸留水をMilli-Q Gradient A10(Millipore Co.製)を用い、精製して使用した。

3 装置および測定条件

1) HPLC

液体クロマトグラフはLC-10Avpシリーズ((株)島津製作所製)、ポンプはLC-10ADvp((株)島津製作所製、2台による2液混合系)、検出器は蛍光検出器RF-10AXL((株)島津製作所製)を用いた。大量注入法およびエキシマー蛍光誘導体化法によるHPLC分析条件を表1および表2に示す。

表1 HPLC分析条件(大量注入法)

Column	XBridge C8, (4.6mm i.d. × 150mm, 5 μm; Waters Co.)
Wave length	Ex 275nm, Em 300nm
Oven	40°C
Flow	1.0ml/min
Inj. vol.	20 μl ~ 400 μl
Eluent	Methanol (A) : Water (B)
condition	30% A and 70% B hold from 0.0 to 0.1 min 50% A up to 80% and 50% B down to 20% 100% A hold from 12.0 to 17.0 min 30% A and 70% B hold from 17.0 to 30.0min

表2 HPLC分析条件(エキシマー蛍光誘導体化法)

Column	TSKgel Super Octyl, (4.6mm i.d. × 100mm, 2 μm; Tosoh Co.)
Wave length	Ex 345nm, Em 475nm
Oven	24°C
Flow	1.0ml/min
Inj. vol.	10 μl
Eluent	70% Acetonitrile : 30% Water
condition	Analysis time 30min, Isocratic

2) GC/MS

ガスクロマトグラフは6890シリーズ(Agilent Technologies Inc.製)、質量分析計はJms-GC mate II(日本電子(株)製)を用いた。分析条件を表3に示す。

す。

表3 GC/MS 分析条件

Column	DB-5MS (0.25mm i. d. × 30m, df 0.10
Oven	60°C hold from 0.0 to 1.0min 60°C up to 280°C at 10.0°C/min 280°C hold 5.0min
Inj. temp	250°C
Det.	MSD, SIM, transfer line 280°C
Flow	He, 1.0ml/min, constant, set at 60°C
Inj. vol.	10 μl, splitless (purge on time 1min)
Ionization	70eV
Monitor ions	BPA-TMS: 357.1, 372.2 BPE-TMS: 179.1, 358 BPF-TMS: 343.1, 344.1

4 HPLC 高感度分析法に関する検討

1) 大量注入法による定量性

試料液を HPLC に大量注入するためには、注入したビスフェノール類を一旦カラム前段に保持する必要がある。このために本手法では分析開始時に移動相のメタノール/水の比率を 30:70 にすると共に、試料液も同じ比率とすることで、ビスフェノール類のリテンションタイムを遅延させた。BPA は蛍光検出器による検出が可能であり、少なくとも蛍光を発しない夾雑物の影響を除外できる。また、今回予備的に UV 検出器を用いて同量の BPA を検出した結果、蛍光検出器はこの 20 倍程度の感度で検出できることが分かった。そこで注入量を増大して、さらに感度を向上させる検討をした。測定に用いた HPLC は試料液を 1~500 μl 注入できるサンプルループを備えている。注入量をそれぞれ 20, 100, 200, 400 μl と段階的に変えたときのビスフェノール類のピーク半値幅（ピーク高さの 1/2 の位置における時間として求めた）およびリテンションタイムの変化を調べた。そのために、ビスフェノール類の混合標準液を希釈して、それぞれ所定の注入量において HPLC に注入されるビスフェノール類の重量が 0.5ng となるように試料を調製した。さらに、ビスフェノール類の試料濃度とピーク面積値の関係について調べた。

2) エキシマー蛍光誘導体化法による定量性

ピレンは蛍光寿命が比較的長い芳香族炭化水素であり、2 つの分子が互いに近接して存在するとき、基底状態では安定な二量体をつくらないが、1 つの分子が励起光を吸収して励起状態となると、他の基底状態の分子と会合して励起二量体 (excited-state dimer, エキシマー) を形成する。エキシマー蛍光は 2 個の蛍光分子間で生じる分子間エキシマー蛍光と同一分子内に

存在する分子内エキシマーがあり、前者が高濃度でのみ観測されるのに対し、後者は低濃度でも観測される。ピレンの場合、モノマーからの蛍光は 375nm 付近に蛍光極大があるが、エキシマー蛍光は 475nm 付近へシフトする¹¹⁾。一方、今回対象としたビスフェノール類はいずれも 1 対の水酸基を有することから、ピレン化合物を水酸基に反応させることで分子内エキシマーを形成する。これにより、475nm 付近においてビスフェノール類を選択的に検出できると考えた。試料液注入量を 10 μl とし、ビスフェノール類の試料濃度とピーク面積値の関係について調べた。なお、PBC によるビスフェノール類の反応率については、定量範囲の最大である 250 μg/l の蛍光誘導体化標準試料を、大量注入法の HPLC 条件 (表1) で分析した結果、ピークが検出されず、反応率 100% と見なした。

3) 定量下限値

静岡県が実施している静岡県内河川の未規制化学物質調査の際に、BPA 濃度測定は濃縮試料に対して、GC/MS を用いて定量するが、その定量範囲は 10~100 μg/l である。これに対して、HPLC による定量範囲は 2.5~250 μg/l とした。5 μg/l の混合標準試料を用い、10 回繰り返し測定した値の標準偏差、分析法の検出限界および定量下限値を求めた。

5 固相カートリッジによる捕集および抽出

1) 分析前処理

ビスフェノール類の捕集には、固相カートリッジ Oasis HLB Glass 5cc/200mg (Waters Co. 製) を用いた。固相のコンディショニングとして、TBME 10ml, メタノール 10ml, 水 10ml をカートリッジに順次通した。1mol/l 塩酸を加えて pH3.0 とした試料水 (大量注入法は 200ml, エキシマー蛍光誘導体化法は 500ml, GC/MS による従来法では 1000ml とした) を、上記カートリッジに 10ml/min で通し、ビスフェノール類を固相に保持した。さらにこの固相に水 10ml を通して洗浄した。固相の脱水に真空ポンプを、さらには遠心分離器 (3000rpm, 10min) を用いた。抽出は 16ml 程度のメタノール/TBME (10:90 v/v) を用いた。

大量注入法における試料の溶媒は 30%メタノール水溶液であることは前にも述べたが、エキシマー蛍光誘導体化法ではアセトニトリル、また GC/MS による従来法ではヘキサンと、試料の調製方法が異なる。従ってここからの操作方法については以下に個別に述べる。

① 大量注入法による試料の調製

上記操作を終えた段階では、まだ固相から完全に脱水することができない。すなわち抽出した試料液を常

温で窒素パージすると 300 μ l 程度の水溶液が残留する。大量注入法における試料は 30%メタノール水溶液なので、これにメタノール 300 μ l を加え、さらに水を加えて 1ml にメスアップすることで、HPLC 分析試料を調製した。

② エキシマー蛍光誘導体化法による試料の調製

この方法は誘導体化の際に水が存在すると、誘導体化試薬である PBC との反応を阻害するため、完全に脱水する必要がある。そこでメタノール/TBME (10:90 v/v) で抽出した 16ml 程度の試料液をさらに 2~3ml 程度まで濃縮した後、ヘキサンを加えてビスフェノール類をヘキサン相に転溶し、さらに無水硫酸ナトリウムで脱水した。得られた溶液を常温で窒素パージして乾固させた。次に 5mM PBC/アセトニトリル溶液 500 μ l および 2M 炭酸カリウム水溶液 10 μ l を加え、100°C で 30 分間加熱した。氷冷した後、得られた溶液を HPLC 分析試料とした。

③ GC/MS による試料の調製

BSTFA による誘導体化のためには、エキシマー蛍光誘導体化法と同様に完全に脱水する必要がある。従って脱水に関して、上記②と同様の操作を経て乾固させた後、ヘキサンを加えて 500 μ l とし、さらに BSTFA 200 μ l を加えて 30°C で 30 分間加熱した。得られた溶液を GC/MS 分析試料とした。

2) 添加回収率

大量注入法とエキシマー蛍光誘導体化法とで分析前処理操作が異なるため、それぞれの添加回収率を調べた。大量注入法では、ビスフェノール類濃度 50 μ g/l 程度の混合標準液 200ml を固相で捕集したときの回収率を調べた。エキシマー蛍光誘導体化法では、標準試料濃度 60 μ g/l 程度の試料水 500ml を固相で捕集したときの回収率を調べた。

6 実環境試料の測定

静岡県内の河川において実際に試料を採取し、大量注入法およびエキシマー蛍光誘導体化法により分析した。測定結果を評価するために、従来法として GC/MS を用いて同じ試料を分析した。河川における試料採取は 2 回に分けて実施し、測定は以下の 6 地点とした。

① 第 1 回試料採取地点

採取年月日：平成 21 年 10 月 19 日

採取地点：菊川（国安橋）、萩間川（東中歩道橋）、湯日川（岩留橋）計 3 地点

② 第 2 回試料採取地点

採取年月日：平成 21 年 11 月 4 日

採取地点：大井川（富士見橋）、坂口谷川（寄子橋）、

勝間田川（竹橋）計 3 地点

結果と考察

1 HPLC 高感度分析法に関する検討結果

1) 大量注入法による定量性

注入量に対するビスフェノール類のピーク半値幅およびリテンションタイムを表 4 および表 5 に示す。いずれのビスフェノール類についても、ピーク半値幅・リテンションタイム共に注入量による変化は僅かで、十分に各物質の分離性が確保されていた。

表 4 HPLC 試料注入量によるピーク半値幅

Inj. vol. (μ l)	Peak half width (min)		
	BPA	BPE	BPF
20	0.13	0.14	0.14
100	0.13	0.14	0.14
200	0.14	0.14	0.14
400	0.17	0.15	0.15

表 5 HPLC 試料注入量によるリテンションタイム

Inj. vol. (μ l)	Retention time (min)		
	BPA	BPE	BPF
20	8.14	9.01	9.95
100	8.14	9.01	9.95
200	8.13	9.00	9.94
400	8.12	8.99	9.93

試料注入量 20 μ l で各標準物質濃度を段階的 (2.5~250 μ g/l) に変えたときのピーク面積値を図 1 に示す。いずれの物質も高い直線性を示した。

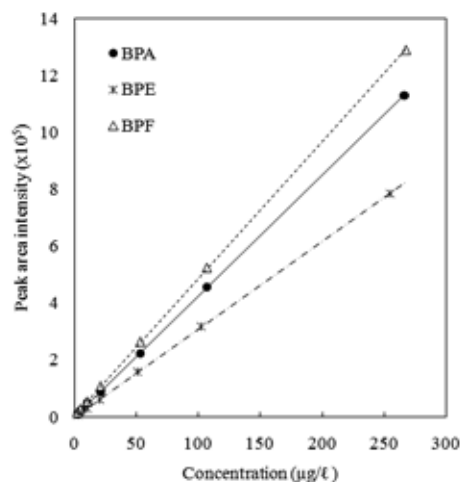


図 1 ピーク面積と試料濃度

表 6 に試料注入量 20 μ l で 5 μ g/l の試料を測定したときの分析法の検出限界 (MDL) および定量下限 (DL) を示す。なお、この結果は注入量が 20 μ l の場合であるので、400 μ l 注入した場合には定量下限値はこの値

の 1/20 程度になるといえる。

表6 分析法の検出限界 (MDL) および定量下限 (DL)

Compounds	Conc. ($\mu\text{g}/\ell$)		RSD (%)	MDL ¹⁾ ($\mu\text{g}/\ell$)	DL ²⁾ ($\mu\text{g}/\ell$)
	Mean	SD			
BPA	5.7	0.71	12	1.3	7.1
BPE	4.9	0.59	12	1.1	5.9
BPF	5.2	0.92	18	1.7	9.2

1) MDL = $t(n-1, \alpha) \times \text{SD}$ (t test by significance level 5%, n=10)

2) DL = $\text{SD} \times 10$

2) エキシマー蛍光誘導体化法による定量性

エキシマー蛍光誘導体化したビスフェノール類について、検量線の最大濃度である $250 \mu\text{g}/\ell$ の試料を大量注入法と同様に $20 \mu\ell$ 注入したところ、蛍光検出器の最大検出強度を超えたため、注入量は $10 \mu\ell$ とした。各標準物質濃度を段階的 ($2.5 \sim 250 \mu\text{g}/\ell$) に変えたときのピーク面積値を図2に示す。いずれの物質も高い直線性を示した。

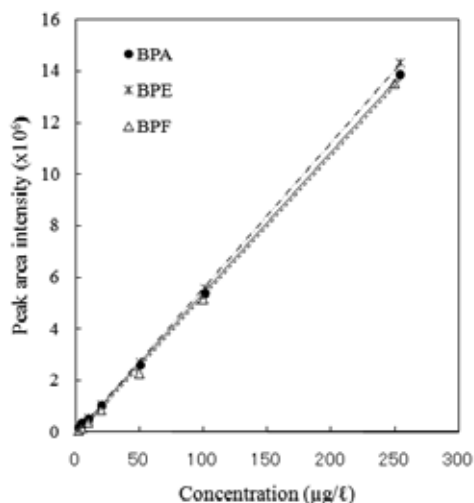


図2 ピーク面積と試料濃度

注入量 $10 \mu\ell$ で $5 \mu\text{g}/\ell$ の試料を測定したときの分析法の検出限界 (MDL) および定量下限 (DL) を表7に示す。

表7 分析法の検出限界 (MDL) および定量下限 (DL)

Compounds	Conc. ($\mu\text{g}/\ell$)		RSD (%)	MDL ¹⁾ ($\mu\text{g}/\ell$)	DL ²⁾ ($\mu\text{g}/\ell$)
	mean	SD			
BPA	5.2	0.028	0.55	0.052	0.28
BPE	5.4	0.020	0.37	0.037	0.20
BPF	5.7	0.027	0.49	0.049	0.27

1) MDL = $t(n-1, \alpha) \times \text{SD}$ (t test by significance level 5%, n=10)

2) DL = $\text{SD} \times 10$

誘導体化せずにビスフェノール類を大量注入法で検出

した場合に比べて、蛍光誘導体化したものを検出した場合には 20 倍以上感度が向上することが分かった。

2 固相カートリッジによる添加回収率

大量注入法およびエキシマー蛍光誘導体化法における添加回収率を表8および表9に示す。

表8 大量注入法における回収率 (%)

Compounds	Mean	RSD
BPA	124	4.5
BPE	100	3.0
BPF	98.7	0.55

(n=4)

表9 エキシマー蛍光誘導体化法における回収率 (%)

Compounds	Mean	RSD
BPA	101	15
BPE	101	17
BPF	62.8	15

(n=5)

エキシマー蛍光誘導体化法における回収率に関して、大量注入法の結果と比べるとばらつきが大きく、BPF については回収率自体が低かった。エキシマー蛍光誘導体化法では、大量注入法では必要のない試料液の脱水処理が必要となるために、抽出したビスフェノール類を他の溶媒に転溶する。今回、転溶溶媒としてヘキサンを用いたが、この脱水過程においてばらつきの拡大や回収率の低下が起きたことが考えられた。

3 実環境試料の測定結果

1) 大量注入法の適用性

今回、ビスフェノール類の検出に蛍光検出器を用い、試料を大量注入することで、蛍光を発する物質のみを選択的かつ高感度に検出することを狙いとして、大量注入法を実環境試料測定に適用した。しかしながら、夾雑物の中に蛍光を発する物質が多く、ピーク分離が十分でなかったことから、いずれの河川試料に対しても定量が困難であった。

2) エキシマー蛍光誘導体化法の適用性

エキシマー蛍光誘導体化法および GC/MS を用いた従来法による測定結果を表10および表11に示す。なお、定量下限値は濃縮前の試料液濃度レベルで、エキシマー蛍光誘導体化法では $0.001 \mu\text{g}/\ell$ 、従来法では $0.010 \mu\text{g}/\ell$ とした。

表10 エキシマー蛍光誘導体化法による定量値(μg/l)

河川名	BPA	BPE	BPF
菊川	0.015	0.006	<0.001
萩間川	0.043	0.010	0.009
湯日川	0.002	0.008	0.004
大井川	0.172	0.005	0.009
坂口谷川	0.004	0.010	<0.001
勝間田川	0.007	0.009	<0.001

表11 GC/MS による定量値(μg/l)

河川名	BPA	BPE	BPF
菊川	0.010	<0.01	<0.01
萩間川	0.031	<0.01	<0.01
湯日川	<0.01	<0.01	<0.01
大井川	0.148	<0.01	<0.01
坂口谷川	<0.01	<0.01	<0.01
勝間田川	0.002	<0.01	<0.01

BPE, BPF については、いずれの河川においても相対的に濃度が低く、GC/MS による定量ができなかった。BPA については、GC/MS でも 6 河川中 4 河川の定量結果が得られたので、この結果とエキシマー蛍光誘導体化による定量値を比較した結果、良く一致した。

まとめ

今回、BPA の実環境測定に対して、HPLC を用いた 2 種類の高感度分析手法である大量注入法およびエキシマー蛍光誘導体化法の適用性を検討した。大量注入法では試料液の注入量を通常の 20 倍まで増大することで検出感度の向上を図った。一方エキシマー蛍光誘導体化法ではジピレン誘導体化により検出感度が向上した。いずれも GC/MS を用いた従来法に比べて約 20 倍感度の高い分析が可能となることが分かった。

河川から採取した試料の測定に関して、大量注入法では蛍光を発する夾雑物による妨害の影響が大きく、定量が困難であった。ただし、大気中のビスフェノール類の測定への適用性に関しては検討の余地を残しているため、今後確認していくことが必要である。

一方、エキシマー蛍光誘導体化法では、従来法による定量結果と良く一致した。ただし、回収率のばらつき等、分析前処理方法に起因する精度に関して課題が残されている。また、今回検出された BPA の測定データ数が少なく、さらに静岡県による過去の調査実績において今回の測定値よりも高いオーダーで観測された地点も多いため、今後引き続きデータを蓄積し、実環境測定への適用性について確認していく必要がある。

謝辞

本研究にあたり、御指導いただいた福岡大学薬学部吉田秀幸准教授に深謝します。

文献

- 1) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針-EXTEND2010-, 環境省(2010)
- 2) 「ビスフェノール A 安全性 食品委に評価依頼 厚労省 国内外で懸念の報告」, 日本経済新聞社, 2008年7月9日朝刊
- 3) 矢口久美子他: ディスク型固相を用いた環境水中のアルキルフェノール及びビスフェノール A の分析法, 東京都立衛生研究所年報, **53**, 229-233 (2002)
- 4) 渡邊雅之他: 離解処理により古紙から発生するビスフェノール A 等の化学物質の分析とエストロゲン活性, 環境化学, **14**, 65-71 (2004)
- 5) Fusaya M. et al. : Development of a highly sensitive method for determining atmospheric carbonyl compounds by passive sampling and application of the method to a survey of indoor air, Intern. J. Environ. Anal. Chem., **84**, 1035-1044 (2004)
- 6) 房家正博他: ビスフェノール A, アルキルフェノール類の大量注入 HPLC/蛍光検出法による高感度分析手法の開発, 環境化学, **16** (4), 661-667 (2006)
- 7) Yoshida H. et al. : Liquid chromatographic determination of bisphenols based on intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization, Analytica Chimica Acta, **488**, 211-221 (2003)
- 8) 常友盛勝他: エキシマー蛍光誘導体化法によるハロゲン化ビスフェノール類の液体クロマトグラフ分析, 分析化学, **53**, 1501-1505 (2004)
- 9) 宮川弘之他: HPLC-ECD による缶入り茶飲料中のビスフェノール A の分析, 東京都衛生研究所年報, **51**, 160-165 (2000)
- 10) 浦木陽子他: アスコルビン酸含浸捕集剤を用いた大気中アルキルフェノール類及び各種農薬類の LC/MS 一斉分析法の開発と実態調査, 川崎市郊外研究所年報, **30**, 5-9 (2003)
- 11) Lehrer S. S. : Intramolecular pyrene excimer fluorescence: A probe of proximity and protein conformational change, Methods in Enzymology, **278**, 286-295 (1997)

静岡県内の河川の内分泌かく乱化学物質の調査

環境科学部 環境科学スタッフ 今津佳子, 金子亜由美

独立行政法人 国立環境研究所 白石不二雄, 中島大介

Search for Endocrine Disruptors of River Water Sample in Shizuoka Prefecture

Yoshiko IMAZU, Ayumi KANEKO,
 Fujio SHIRAIISHI and Daisuke NAKAJIMA

2008年度に静岡県西部の仿僧川流域にて、エストロゲン受容体等を導入した遺伝子組換え酵母を用いる酵母アッセイ法¹⁻³⁾により、5種類の核内受容体への結合活性を調査したところ、2地点で顕著な甲状腺ホルモン受容体(以下、TR)結合活性が認められた。

そこで、2009年度は、その中で最も活性が高かった地点で試料水を採取し、逆相液体クロマトグラフィーで分離しグルーピングして分画した試料のTR結合活性を測定した。さらに、TR結合活性測定対象の分画および濃縮作業の合理化のため、グルーピング画分のうちTR結合活性が認められた1画分を詳細に分画し、ガスクロマトグラフ/質量分析法を用いてTR結合活性を有する可能性のある化学物質の検索を試みた。その結果、定性できる可能性のあるピークが20種類検出されたが化学物質として同定するには至らなかった。これらは意図せずに生成した未知の化学物質の可能性もあり、今後、TR結合活性を確認しながら定性分析を進める必要があると考えられた。

Key words: バイオアッセイ, 甲状腺ホルモン受容体, 河川水, ガスクロマトグラフ/質量分析法
 bioassay, thyroid hormone receptor, river water, gas chromatography mass spectrometry

はじめに

内分泌かく乱化学物質の問題への対応策としては、その作用が疑われる化学物質の濃度を把握することがまず考えられたが、これだけでは未知の化学物質による影響や複数の化学物質による複合的な作用について考察することはできない。そこで、近年、未知の化学物質の影響や複合的な作用を検出できる手法の一つとして、各種のホルモン受容体遺伝子を導入した酵母を用いる酵母アッセイ法が開発され、環境水等の調査に利用されている¹⁾⁻³⁾。この方法を用いて2007年度および2008年度に県内河川を調査したところ、国立環境研究所が調査した国内80地点(2007年度)および106地点(2008年度)の平均値を超える受容体結合活性を示す地点が確認された⁴⁾。

2008年度に、3種類の受容体に対する結合活性が県内で上位であった仿僧川の流域をさらに調査したところ⁴⁾、仿僧川のD地点付近で顕著なTR結合活性が認められた。

酵母アッセイ法で用いた酵母より複雑な脊椎動物の体内では、当該受容体結合反応以外の恒常性維持機構や解毒機構などが働くため、酵母アッセイ法で活性が高いことが直ちに生体への悪影響を示唆するとは限らない。しかし、甲状腺ホルモンは、両生類の変態や鳥類の羽化、哺乳動物の知能成育などに重要な役割を果たしている。そして、この河川水に認められた活性の原因物質が不明であり、生体に悪影響を与える可能性を否定できないため、こうした影響の有無を確認するための端緒として、原因物質を調べる必要があると考えられた。

そこで、本研究では、当該地点の河川水について、TR結合活性を有する可能性のある化学物質の検索を試みたので報告する。

調査方法

1 試料採取

静岡県環境衛生科学研究所
 (〒420-8637, 静岡市葵区北安東4-27-2)
 Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
 (4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

試料水は、2009年4月9日に仿僧川のD地点付近で、河川表層からステンレス製バケツを用いて約30ℓを採取した。

試料容器は、純水とアセトン300で洗浄し200℃2時間以上加熱処理した金属蓋付きガロン瓶を用いた。

試料水は4℃で冷蔵保存し、翌日ディスク固相への吸着を実施した。

2 固相抽出およびフロリジル分画

2.1 固相抽出

試料水を1ℓずつに分け、ガラス繊維ろ紙でろ過して懸濁物質を除去し、10mlの酢酸：メタノール：水(1：9：90)を加え、液性を酸性側とした。

続いて、その試料水を、あらかじめメタノール20mlおよび超純水20mlでコンディショニングした固相ディスクに吸引マニホールドを用いて通水した。通水後の固相ディスクを超純水約20mlで洗浄し、38℃で1.5時間乾燥後、アルミホイルとポリ袋で密閉して-20℃以下で冷凍保存した。固相ディスクからの溶出にあたっては、再度38℃で乾燥し、メタノール3mlで2回尖突試験管内に溶出し、溶出液を窒素気流下で濃縮乾固した(以下、C18-MeOH試料)。

2.2 フロリジル分画

試料水10分のC18-MeOH試料を試験管攪拌機および超音波洗浄器を用いてヘキサン：ジクロロメタン(3：1)約1mlに溶解・懸濁させ、フロリジルカラム(コンディショニング条件：ヘキサン約2.5ml×2回)に重層後、ヘキサン：ジクロロメタン(3：1)約2.5mlで2回尖突試験管内に溶出し極性の低い画分を得た。次に、10%アセトン・ジクロロメタン溶液約2.5mlで2回別の尖突試験管内に溶出し、中程度の極性の画分を得、最後に、メタノール約2.5mlで2回別の尖突試験管内に溶出し、極性が比較的高い画分を得た(以下、FL-MeOH画分)。

これら3種類の画分を、窒素気流下で濃縮乾固し、-20℃で冷凍保存した。

3 TR結合活性の測定

TR結合活性はTR遺伝子導入酵母アッセイ³⁾による白石らの方法で測定した。

4 逆相液体クロマトグラフィーを用いたメタノール溶出画分の分画

4.1 グルーピングによる分画

フロリジル分画により得た試料水10分のFL-MeOH画分を試料として、逆相液体クロマトグラフィー(以下、逆

表1 逆相LCを用いたグルーピングによる分画の条件

LC装置	島津 LC-20vp シリーズ	
カラム	Shim-pack VP-ODS 4.6mm φ × 150mm	
移動相	A:2Mm 酢酸, B:メタノール	
	0分→30分	A:B=80:20
	30分→120分	A:80→0 B:20→100 (リニアグラジエント)
	120分→300分	A:B=0:100
カラム温度	室温	
流速	0.5ml/分	
検出器	島津 紫外吸収検出器 SPD-20A	
測定波長	254 nm	
サンプルループ	容量 5ml	
試料(注入量)	FL-MeOH 画分(試料水 10分)	
分取装置	島津 フラクションコレクタ FRC-10A)	
分取方法	保持時間	
	0分~250分	2.5ml (5分) × 50本
	保持時間	
	250分~300分	25ml(50分) × 1本
分取試料のグルーピング	分画 I	保持時間 0~50分
	分画 II	保持時間 50~85分
	分画 III	保持時間 85~110分
	分画 IV	保持時間 110~145分
	分画 V	保持時間 145~300分

相LC)で分離と分取を行い、クロマトグラム上のピークを参考にグルーピングして分画した。

逆相LCを用いたグルーピングによる分画の条件を表1に示す。

FL-MeOH試料を逆相LCに注入するにあたっては、全量を注入するため濃縮乾固した試料に対して初期移動相0.2mlで5回溶解と回収を繰り返して注入した。

具体的には、濃縮乾固した尖突試験管内のFL-MeOH試料に、逆相LCの初期移動相である2mM酢酸：メタノール(80:20)を0.2ml加えて溶かし、250μlのガスタイトシリンジ(試料注入装置に適合する針を装着したもので190μl以上を取り、試料注入装置にシリンジを刺し、6方バルブを切替え、サンプルループ(容量5ml、初期移動相で置換済み)に気泡に注意しながらゆっくりと注入した。次に、サンプルループを流路から切り離れたままの状態、針ごとガスタイトシリンジを取り外した。そして、尖突試験管内に残った試料を回収し注入するため、初期移動相0.2mlを加えて溶かしシリンジに取りサンプルループへ注入することを4回繰り返したのち、シリンジを刺したまま6方バルブを切替えてサンプルループを流路に接続し、サンプルループ内の試料溶液(合計約

1m ℓ)をカラムに注入した。

グルーピングした画分は、分取容器ごとにアセトン 0.5~1m ℓ で3回ずつ濃縮容器に洗いこみ、溶媒がほとんどなくなるまで減圧濃縮した。次に各グルーピング画分をアセトン 1m ℓ ずつで5回尖突試験管に洗いこみ、それを窒素気流下で濃縮乾固し、TR 結合活性測定用の試料とした。

4.2 詳細分画用試料の調製

詳細分画のための試料として、試料水 1 ℓ 分の FL-MeOH 試料を表 1 のグラジエント条件下逆相 LC で分離し、保持時間 100 分~155 分の溶出液を分取して分画IVと同様に濃縮乾固したものを調製した。これを分画IVとの区別のため、分画IV'と呼ぶことにする。分画IVに比べて分取する保持時間の範囲を広げた理由は、室温下の逆相 LC で \pm 10 分間の保持時間の変動を見込んだためである。

4.3 詳細分画

前項で調製した分画IV'を、表 2 に示す条件下、初期移動相である 2mM 酢酸:メタノール(1:1)を用いて、4.1 の FL-MeOH 試料の注入と同様の方法で全量注入し、逆相 LC で分離し、保持時間 5 分毎に分取し詳細分画した。

詳細分画した各画分は、分画IVと同様に減圧濃縮後窒素気流下で濃縮乾固し、次項のガスクロマトグラフ/質量分析法(以下、GC/MS)用試料溶液の調製に用いた。

5 ガスクロマトグラフ/質量分析法用試料溶液の調製

5.1 誘導体化前の GC/MS 用試料溶液の調整

表 2 逆相 LC による詳細分画の条件

LC 装置	島津 LC-20vp シリーズ
カラム	Shim-pack VP-ODS 4.6mm ϕ \times 150mm
移動相	A:2mM 酢酸:メタノール(1:1), B:メタノール 0 分 \rightarrow 5 分 A:B=100:0 5 分 \rightarrow 235 分 A:100 \rightarrow 60 B:0 \rightarrow 40 (リニアグラジエント) 235 分 \rightarrow 260 分 A:60 \rightarrow 20 B:40 \rightarrow 80 (リニアグラジエント) 260 分 \rightarrow 300 分 A:B=20:80
カラム温度	室温
流速	0.5m ℓ /分
検出器	島津 紫外吸収検出器 SPD-20A
測定波長	254 nm
サンプルループ	容量 5m ℓ
試料(注入量)	画分IV'(試料水 1 ℓ 分)
分取装置	島津 フラクションコレクタ FRC-10A)
分画方法	詳細分画 1~52 保持時間 5 分毎 \times 52 詳細分画 53 保持時間 260-300 分

GC/MS 用試料溶液の調整にあたっては、まず、尖突試験管中の濃縮乾固した詳細画分に、アセトン 100 μ ℓ ずつを加えて溶かし、それぞれ 100 μ ℓ ガラスインサート入りのバイアル瓶 2 本ずつに約 50 μ ℓ ずつ分注した。そのうち各 1 本ずつを誘導体化前の測定用試料溶液とした。

本溶液 1 μ ℓ は、試料水約 10m ℓ 分の詳細画分を含む。

残りの各 1 本ずつは、次項のトリメチルシリル誘導体化に用いた。

5.2 GC/MS 用試料溶液のトリメチルシリル誘導体化

C18-MeOH 画分の中で最も極性が高い FL-MeOH 画分を GC/MS で測定するにあたり、GC による分離に適さない揮発性の低い成分が多いと予測されたため、詳細画分の半分をトリメチルシリル誘導体化(以下、TMS 化)して測定した。

100 μ ℓ ガラスインサート入りのバイアル瓶に取った詳細画分約 50 μ ℓ に、TMS 化剤として N, O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミドを 10 μ ℓ ずつ加え密栓して攪拌後、パラフィン伸展器上で 30 $^{\circ}$ C \cdot 1 時間反応させ、試料溶液とした。

本溶液 1 μ ℓ は、試料水約 8m ℓ 分の詳細画分を含む。

6 ガスクロマトグラフ/質量分析法による測定

6.1 GC/MS 条件

詳細画分を、TMS 化前および TMS 化後の試料溶液について、GC/MS による測定を実施した。

その測定条件を表 3 に示す。なお、スキャン範囲を区切って 2 回測定したのは、スキャン範囲の拡大による感度低下を避けるためである。

6.2 検出されたピークの分類

GC/MS 測定により検出されたピークを、保持時間およびマススペクトル上のベースイオンピークの質量電荷比(以下、m/z)ごとに分類した。スキャン範囲 m/z 50~500 の測定結果と m/z 350~800 の測定結果では、m/z 350~500 の間にない限りベースイオンピークが異なる結果となるが、同一詳細画分で保持時間の差が \pm 1 秒以内かつ検出されたイオンピークに矛盾がなければ同一のピークとして分類した。そして、各保持時間のピークの定性にあたっては、両方のスキャン範囲条件を通して信号値が最大のイオンピークをベースイオンピークとして扱った。

6.3 強度不足のピークの除外

マススペクトル上にイオンピークが 3 種類以上検出されていない保持時間のピークは、ライブラリ検索が不能であり、質量分析部の分解能 500 では、信号強度の強弱にかかわらず定性のための情報が得がたいため、以降の検討の対象から除外した。

6.4 実験室内汚染等に由来するピークの除外

表 3 詳細画分の GC/MS 測定条件

GC 部	Agilent 6890 シリーズ	
カラム	DB-5MS 0.25mm φ × 30m × 0.1 μ m D	
キャリアガス	ヘリウム(1mℓ/分 定流量)	
カラム槽温度	60°C(1分)	
	→10°C/分	
	→280°C(15分又は20分)	
注入口温度	250°C	
試料導入法	スプリットレス方式	
試料注入量	1 μ ℓ	
MS 部	日本電子 MS-BU25 GC mate II	
分解能	500	
接続部温度	280°C	
イオン化法	電子イオン化法(70eV)	
イオン源温度	200°C	
測定モード	スキャン測定	
スキャン範囲	1回目 m/z 50-500	
	2回目 m/z 350-800	
データ取り込み	誘導体化前の詳細画分 1~53:	
時間	11分-38分	
	誘導体化後の詳細画分 1~48:	
	12分-33分	
	誘導体化後の詳細画分 49~53:	
	11分-38分	

フタル酸エステル類特有の m/z 149, 167^{5), 6)} 等のイオンピークの組み合わせおよびシリコン系化合物特有の m/z 147, 281, 355 等⁵⁾ の組み合わせが認められた保持時間のピークは、実験室内汚染の可能性が高いため、以降の検討の対象から除外した。

6.5 データ処理

各保持時間のピークのマススペクトルについては、ライブラリ検索のほか、フラグメントイオンや分子イオンの組成式や式量の推定に役立てるため、以下のような検討を可能な範囲で行った。

- 安定同位体関連のイオンピークを除く m/z 最大値を拾い出し小数第一位を四捨五入して整数とした。以下、F1 という記号で表す。
- m/z F1-15 等のフラグメントイオンピークの有無。
- m/z F1+1~F1+5 のイオンピークの強度比%の算出
- TMS 化された化合物で検出される m/z 73 および m/z 147 のフラグメントイオンピークの有無
- m/z F1 のイオンピーク中の窒素、酸素およびケイ素原子の数の推定
- 最も存在量の多い安定同位体存在量 100% に対し 3% 以上の存在量%の安定同位体を有する主な原子について、

m/z F1 のイオンピーク中の原子数の推定

- 不足水素指標および同位体パターン推定結果を参考に m/z F1 のイオンピーク中の炭素原子数の絞込み

7 試薬・器具

アセトン 300: 残留農薬・PCB 試験用 300 倍濃縮検定品 (和光純薬工業製), アセトン, ジクロロメタン, ヘキサンおよびメタノール: 残留農薬・PCB 試験用 5000 倍濃縮検定品 (和光純薬工業製), 酢酸: 試薬特級 (和光純薬工業製), N, 0-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド: 環境分析用(和光純薬工業製)

ガラス繊維ろ紙: グレード GF/C, (直径 47mm, ワットマン製), 固相ディスク: エムポアディスク C18FF (直径 47mm, 3M 製), フロリジルカラム: ボンドエルト-FL (500mg/3mℓ, バリアン製), 100 μ ℓ ガラスインサート(不活性化処理済, GL サイエンス製)

分取液体クロマトグラフ装置: LC-20vp シリーズ (島津製作所製, 検出器: 紫外吸収検出器 SPD-20A, 試料注入装置: マニュアルインジェクタ 7725i 型(サンプルループ容量 5mℓ, レオダイン製), 試料分取装置: フラクシオンコレクタ FRC-10A), カラム: Shim-pack VP-ODS 4.6mm φ × 150mm (島津製作所製)

ガスクロマトグラフ/質量分析装置: JMS-BU25 型 GC メイト(日本電子製, ガスクロマトグラフ部: Agilent 6890 シリーズ, 質量分析部: MS-BU25 GC mate II, 試料自動注入部: Agilent 7683 自動液体サンブラ), カラム: Agilent J&W DB-5MS (Agilent 製)

結果と考察

1 FL-MeOH 画分およびグルーピング画分の TR 結合活性

FL-MeOH 画分およびグルーピング画分の TR 結合活性を酵母アッセイ法³⁾で測定した結果を表 4 に示す。活性の高さは、同等の活性を示す L-3, 5, 3'-トリヨードチロニン(以下, T3. 構造式を図 1 に示す。)の濃度として示した。

グルーピング画分の TR 結合活性を測定した結果, 画分 I, II, III および V では検出下限値未満であった。画分 IV の活性は, グルーピング画分前の FL-MeOH 画分の活性に対し約 97% であった。

2 詳細画分の GC/MS 測定結果

前項の 5 つのグルーピング画分のうち画分 IV にのみ TR 結合活性が認められたが, ベースラインの安定を基準にして溶出完了を判断した場合, 試料水 10 分の成分の分画に逆相 LC だけで 5 時間以上要した。そこで, TR 活性測定対象の分画および濃縮作業の合理化のため, 画分 IV と

表 4 FL-MeOH 画分およびグレーピング画分の
TR 結合活性

採水 年月日	画分	TR 結合活性 (T3 換算 ng/ℓ)
2009/4/9	FL-MeOH 画分	210
〃	画分 I	<12
〃	画分 II	<12
〃	画分 III	<12
〃	画分 IV	204
〃	画分 V	<12

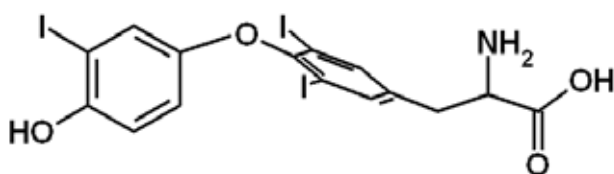


図 1 L-3,5,3'-トリヨードチロニン(T3)の構造式
(分子式: $C_{15}H_{12}I_3NO_4$, 分子量: 650.976)

同等の画分を再度調製して詳細に分画し, GC/MS で分取 LC において活性を有する画分の前後の前後に溶出する成分の検出および TR 結合活性を有する可能性のある化学物質の検索を試みた。

2.1 検出されたピークの種類結果

画分 IV' から分画し調製した詳細画分をそれぞれ GC/MS でスキャン測定したところ, フラグメントイオンを 3 種類以上検出でき, マススペクトル間の比較が可能な強度のピークが TMS 化前で 5 種類, TMS 化後で 15 種類検出された。

これらのピークについて, ライブラリ検索を行ったところ, マススペクトルが比較的類似していると考えられる候補物質はあったが, 最も信号強度が強いピークであっても一致すると断定できる結果は得られなかった。本研究で調査対象とした TR 結合活性のある化学物質は, 排水処理や環境水中で意図せずに生成した未知の化学物質である可能性もある。これらの化学物質の同定のためには, 化学イオン化法や電子エネルギーを下げた電子イオン化を行う等温的な条件でイオン化して分子量を求めたり, 十分な信号強度が得られるよう精製と濃縮を進めるとともに, 当該物質とマススペクトルの類似性が高い化学物質を同じ条件で測定し, GC の保持時間と組み合わせで類似点と相違点を比較検討する必要があると考えられた。

しかし, 多数の画分から類似性を比較できるピークを検出できたことは, 逆相 LC による分画と濃縮の条件の改

善に役立つと考えられる。室温下で単一波長をモニターする逆相 LC では, 分画の特に初期段階で多数の物質のピークが重なり合い, 測定の回ごとにクロマトグラムが大きく変化し, 前の回の分画の区切りを正確に再現することが困難であった。しかし, LC のクロマトグラム上で活性のある画分と隣接するピークに対応する化学物質を GC/MS でモニターすることにより, TR 結合活性を有する化学物質を間接的に追跡できるようになれば, 分画の妥当性を確認しながら, より効率良く濃縮精製できるようになる可能性がある。

次に, 検出された 20 種類のピークの特徴と m/z F1 のイオンピーク中の原子数の推定値を表 5 に示す。

表 5 では, 各ピークを TMS 化前後に分け, 詳細画分ごとに保持時間順に示した。

TMS 化後に検出された 15 種類のピークの中に, TMS 化前の 5 種類のピークに対応するものがあるかどうかは確認できなかったが, 15 種類のうちの多くは TMS 化前には揮発性や信号強度の不足で検出できなかったものが, TMS 化されて保持時間が変化し, 安定性および揮発性が増加し, それにより検出感度が増加してイオンピークを 3 種類以上検出可能な信号強度で新たに検出されるようになったものと考えられた。

2.2 各保持時間のピークの特徴に関する考察—詳細画分 27, 保持時間 21 分 56 秒のピークを例として—

以下, マススペクトルから得られる情報が比較的多かった詳細画分 27, 保持時間 21 分 56 秒のピークを例にとって考察する。当該画分のトータルイオンクロマトグラムを図 2 に, 当該ピークのマススペクトルを図 3 に示す。

このマススペクトルについてライブラリ検索を実施したところ, 類似度が高いものとして, 安息香酸の骨格を持つ化学物質やステロイド骨格を持つ化学物質が示された。しかし, フラグメントイオンの有無や強度比が大きく異なることから, 同一の化学物質とみなすのは困難であった。

次に, マススペクトルにおけるイオンピークの m/z の最大値 F1 を拾い出し, m/z F1-15 の検出状況を調べた。ただし, 安定同位体を含むと推測される相対的強度が弱いイオンピークは F1 の候補から除外した。図 3 の例では, 図 3b 中の m/z 458.3 の小数第一位を四捨五入して整数とした 458 を F1 とした。

これらの事項に着目した理由は, 電子イオン化法を用いた場合, マススペクトル上に分子イオンピークが検出されない場合もあるとされているが, 分子イオンピーク M からメチル基が脱離した M-15 のイオンピークや, 水分子が脱離した M-18 のイオンピークなどのあることは, 分子イオンピークの確認になるとされているためであ

る⁸⁾。

また、TMS 化した物質は、特有のマススペクトルを示し、分子イオンピークは非常に小さいか検出されない場合が多いが、M-15 のフラグメントイオンピークが観測され、これから分子量を求めることができるとされている⁷⁾。

る⁷⁾。

m/z F1 の同位体イオンピークの強度比をもとに検討すると、図 3 の例では、表 5 に示したように、m/z F1+2 の強度比が明らかに各原子の同位体存在量を下回っているため、塩素原子 (³⁵Cl の存在量を 100% としたときの ³⁷Cl

表 5 ガスクロマトグラフ/質量分析法(GC/MS)で検出されたピークの特徴

TMS 化	詳細画面番号	GC 保持時間	イオンピーク質量電荷比 (m/z)		F1-15 イオンピークの検出状況	m/z F1 付近のイオンピーク強度比(※2)			TMS 基関連イオンピークの検出状況(※3)		m/z 最大値 F1 に対応するイオン中の原子数推定値 (※4)			
			ベースピーク	最大値 F1 (※1)		F1 +1	F1 +2	F1 +3	m/z 73	m/z 147	塩素	臭素	ケイ素	炭素
前	46	18分40秒	178	290	不検出	<66	<66	<66	(不検出)	(不検出)	—	—	—	—
	46	22分27秒	69	410	検出	38	<10	<10	(不検出)	(検出)	0	0	0~2	21~30
	53	11分43秒	213	213	検出	<39	<39	<39	(不検出)	(不検出)	0~1	0	0	8~13
	53	12分01秒	172	187	検出	<25	33	<25	(不検出)	(不検出)	1	0	0	8~10
	53	18分03秒	75	313	不検出	29	<29	<29	(不検出)	(不検出)	—	—	—	—
後	19	12分14秒	205	258	不検出	<37	<37	<37	検出	検出	—	—	—	—
	19	15分13秒	189	390	不検出	42	18	<18	検出	検出	—	—	—	—
	26	14分14秒	131	272	不検出	<71	<71	<71	検出	不検出	—	—	—	—
	27	21分56秒	458	458	検出	37	15	4	検出	検出	0	0	2~4	24~27
	35	12分55秒	277	277	不検出	<52	<52	<52	不検出	検出	—	—	—	—
	40	22分14秒	469	600	不検出	<83	<83	<83	不検出	不検出	—	—	—	—
	44	22分28秒	131	409	検出	<37	<37	<37	検出	不検出	0~1	0	1	22~27
	53	12分18秒	257	257	不検出	21	<21	<21	検出	不検出	—	—	—	—
	53	14分23秒	285	300	検出	<52	<52	<52	検出	不検出	0~1	0	1	15~19
	53	14分50秒	379	379	不検出	29	14	<14	不検出	不検出	—	—	—	—
	53	15分22秒	299	299	不検出	<49	<49	<49	検出	不検出	—	—	—	—
	53	16分18秒	313	328	検出	28	9	<7	検出	検出	0	0	2~3	17~21
	53	18分04秒	341	356	検出	29	9	<9	検出	不検出	0	0	1	21~23
	53	19分27秒	75	353	検出	<66	<66	<66	検出	不検出	0~2	0	1	20~24
	53	19分44秒	353	528	不検出	<56	<56	<56	不検出	不検出	—	—	—	—

※ 1: 当該保持時間のピークのマススペクトル中、検出された質量電荷比(以下、m/z)の最大値を小数第一位で四捨五入し整数とし、F1 という記号で表す。ただし、同位体イオンピークと推測されるものは F1 の候補から除外した。

※ 2: m/z が F1+1, F1+2 および F1+3 のイオンピークの強度比を F1 の強度比を 100% として示した。なお、対応するイオンピークが検出されなかった場合の強度比は、同一のマススペクトル中で最も強度が弱いイオンピークの強度比未満として表した。

※ 3: TMS 基の指標となり得る m/z 73(TMS 基 1 箇所以上)および m/z 147(TMS 基 2 箇所以上)のイオンピーク⁷⁾の検出状況

※ 4: m/z (F1-15)イオンピークの検出^{7), 8)}など、m/z F1 が分子イオンピークである可能性がある場合に記載した。

塩素原子および臭素原子の数は、安定同位体の存在量⁸⁾から推定した。

ケイ素原子の数は、安定同位体の存在量⁸⁾並びに TMS 基の指標となり得る m/z 73 および m/z 147 のイオンピーク⁷⁾の検出状況を参考に推定した。

炭素原子の数は、炭素原子の安定同位体の存在量⁸⁾並びに F1 の値と塩素、臭素およびケイ素原子の数の推定値を組み合わせ、GC/MS 装置に付属のデータ処理ソフトによるライブラリ検索結果、同位体パターン推定結果および不足水素指標⁸⁾を参考に矛盾が少ないと考えられる数を推定した。

の存在量 32.5%)および臭素原子 (^{79}Br の存在量を 100%としたときの ^{81}Br の存在量 98%)は含まれていないと考えられた。

一方、TMS 化の指標となり得る m/z 73 および m/z 147 のフラグメントイオンピーク⁷⁾が両方とも検出されており、 m/z F1 のイオンは、最低 2 箇所 TMS 化されていると考えられた。このことと TMS 化されやすい官能基の構造を考え合わせると、酸素原子又は硫黄原子が合計 2 個以上、TMS 化された官能基がすべてカルボキシル基である場合は、4 個以上含まれると推測できる。このとき、TMS 化反応に伴う分子量の増加は、TMS 化 1 箇所あたり 72da である⁷⁾。たとえば、分子量を 458、TMS 化された官能基がすべて水酸基であると仮定した場合には、TMS 化された官能基は 4 箇所以下と推定した。

次に、 m/z F1+1 イオンピークの強度比に着目すると、このイオンピークの強度比に寄与するものは、有機化合物の多くでは、主にケイ素原子 (^{28}Si の存在量を 100%としたときの ^{29}Si の存在量 5.1%)、炭素原子 (^{12}C の存在量を 100%としたときの ^{13}C の存在量 1.11%)および窒素原子 (^{14}N の存在量を 100%としたときの ^{15}N の存在量 0.36%)の同位体である。窒素原子数については、分子量を指標とした窒素ルール⁸⁾があるが、推定作業の単純化のため、表 5 では、F1-15 イオンピークが確認され、F1 が奇数である場合に窒素原子 1 個を含むと仮定した。

m/z F1+1 のイオンピークは、1 原子が同位体に置換されたイオンに由来し、 m/z F1+2 や m/z F1+3 と比較して存在量%が計算しやすく、それぞれの原子の数に同位体の存在量%を掛けたものの合計値に近いものとなる。これら

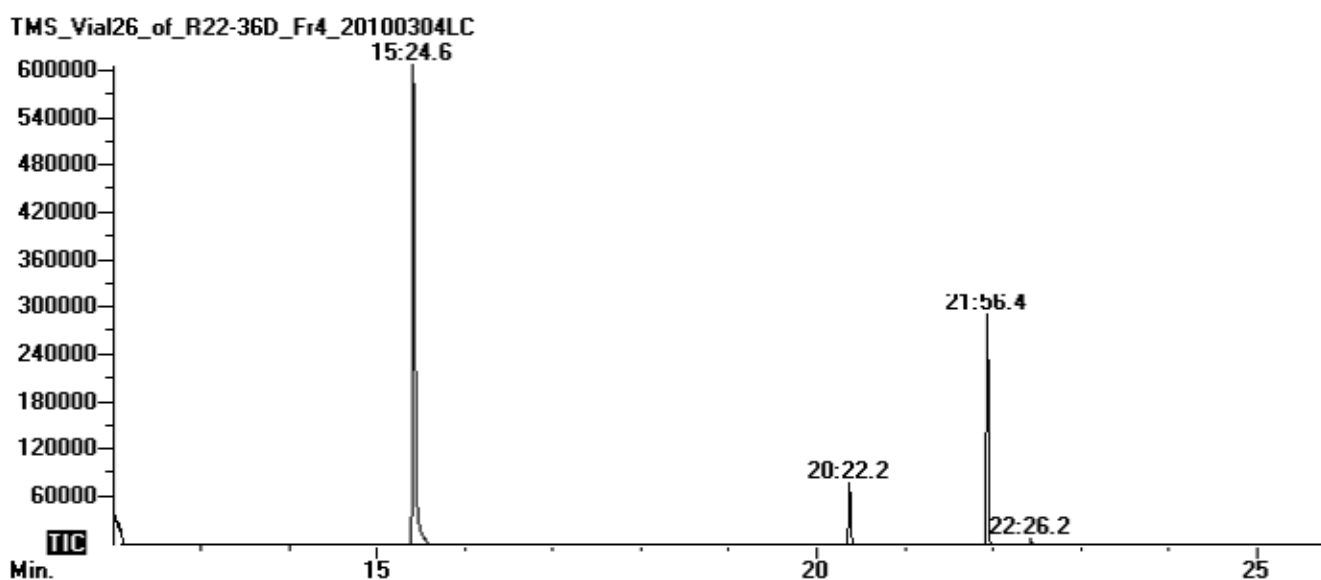


図 2 トリメチルシリル誘導体化後の詳細画分 27 (バイアル番号 26) のトータルイオンクロマトグラム(スキャン範囲 m/z 50~500)

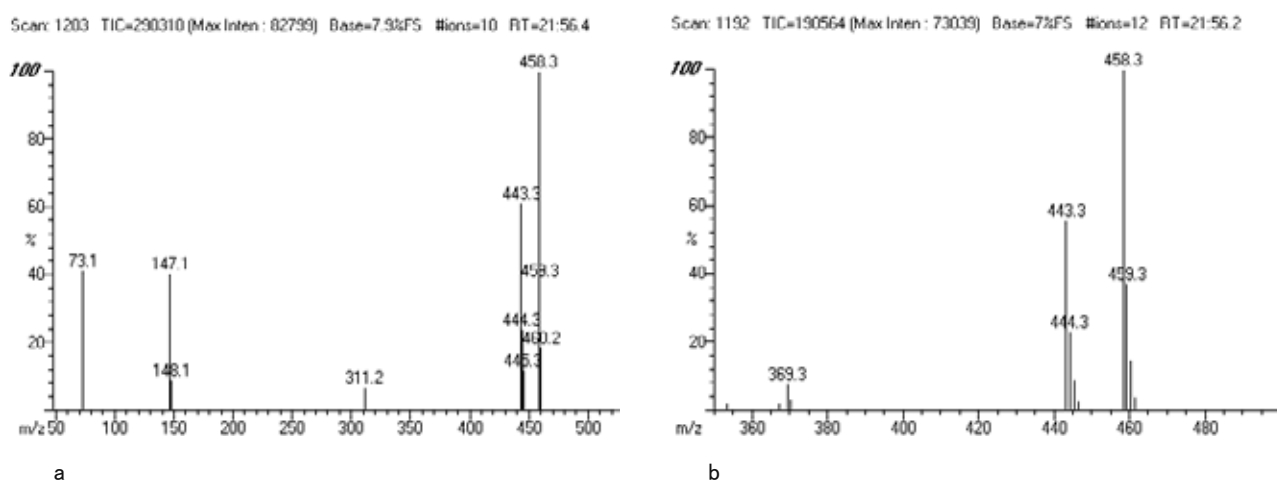


図 3 トリメチルシリル誘導体化後の詳細画分 27 から検出された保持時間 21 分 56 秒のピークのマスペクトル
a: スキャン範囲 m/z 50-500, b: スキャン範囲 m/z 350-800(表示は 350-500)

のことから、ケイ素原子および炭素原子の数を推定し、同位体パターン計算用ソフトウェアの計算結果と不足水素指標を参考に推定の範囲を絞って表 5 に記載した。

2.3 T3 の化学構造と TMS 化反応について

内因性リガンド T3 は図 1 に示したとおり、ハロゲン中最も質量数が大きいヨウ素原子を 3 個と疎水性のベンゼン骨格を 2 個のほか、受容体との水素結合に寄与できるフェノール性水酸基およびカルボキシル基とアミノ基が組み合わされたアミノ酸の構造を有している。

そのため、本研究で検出および定性を試みた TR 結合活性を有する化学物質も、受容体との結合に必要な構造として、これらの構造のいずれかを持っている可能性は十分にある。そして、TMS 化試薬は、これらの構造のうちフェノール性水酸基やカルボキシル基に対し反応性を有するとともに、反応後の物質は反応前と比較して揮発性が増すため、TR 結合活性を有する化学物質を TMS 化した化学物質のフラグメントイオンの m/z と信号強度が MS の測定範囲内であれば、GC/MS で検出できる可能性があると考えられた。

まとめ

仿僧川で採水した試料水を固相抽出後フロリジル分画して得た FL-MeOH 画分を、逆相 LC で分画後グルーピングし、5 つの大きな画分とした。それぞれについて TR 結合活性を測定したところ、そのうちの画分 IV に FL-MeOH 画分の約 97% にあたる活性が認められた。

さらに、TR 結合活性を有する可能性のある化学物質を検索して、TR 活性測定対象の画分および濃縮作業を合理化するため、画分 IV と同様に調製した画分 IV' について逆相 LC で詳細に分画し、詳細画分について GC/MS で測定した。その結果、ライブラリのマススペクトルとの比較が可能な強さのピークが検出されたが、活性を有する可能性のある化学物質の同定には至らなかった。これらの化学物質の中には、排水処理の過程や環境水中などで意図せずに生成した未知の化学物質が含まれている可能性もある。

河川水中の TR 結合活性が高い物質について、固相抽出、フロリジル分画および逆相 LC による分画によりこれらを含む試料の濃縮が可能となったことから、この手法により他の活性物質についても濃縮が可能と考えられた。ただし、当初の目的である活性を有する化学物質の特定に至らなかったため、さらに TR 活性測定対象の画分および濃縮作業の合理化等についての検討が必要と考えられた。

今後は、国立環境研究所の協力を得ながら活性を有する化学物質の検索を進めていく予定である。

文 献

- 1) 白石不二雄：内分泌攪乱物質の環境計測手法としてのバイオアッセイ，全国環境研会誌，27，4，214-219 (2002)
- 2) 白石不二雄他：酵母 Two-Hybrid System による簡便なエストロゲンアッセイ系の開発，環境化学，10，1，57-64 (2000)
- 3) 白石不二雄他：In vitro バイオアッセイを用いる河川水の暴露モニタリングに関する基礎的研究 — その 2：全国河川水試料の年変動（2 年間の比較）—，第 18 回環境化学討論会講演要旨集，620-621 (2009)
- 4) 今津佳子他：静岡県内の河川の各種受容体導入酵母アッセイによる内分泌かく乱活性の評価，静岡県環境衛生科学研究所報告，51，37-42 (2008)
- 5) 新津隆士他：10 年使える有機スペクトル解析，56-69，三共出版(株)，東京 (2005)
- 6) JIS ハンドブック 53 環境測定 II (水質)，1450-1458，財団法人日本規格協会，東京 (2008)
- 7) Blau, K. et al. : Handbook of derivatives for chromatography, 2nd edition, John Wiley & Sons, Ltd (1993) ; 中村洋：分離分析のための誘導体化ハンドブック，287-293，丸善(株)，東京 (1996)
- 8) Silverstein, R. M. et al. : Spectrometric identification of organic compounds, seventh edition, John Wiley & Sons, Inc (2005) : 荒木峻他：有機化合物のスペクトルによる同定法—MS, IR, NMR の併用—第 7 版，15-40，(株)東京化学同人，東京 (2006)

AOD(水族環境診断法)による新たな水質評価方法の検討 -第1報 改善 AOD 法の検討-

大気・水質部 水質環境スタッフ 清水直美, 青木一永, 内山道春,
 小池明

A Study of Estimation Method of Water Quality by AOD

-Report 1 A Study of Improvement of AOD-

Naomi SHIMIZU, Katsunaga AOKI, Michiharu UCHIYAMA,
 and Akira KOIKE

AOD (Aquatic Organisms environment Diagnostics: 水族環境診断法) を指標に取り入れた水質評価を行うにあたり, その供試魚の安定供給および凍結濃縮時の安全性向上について検討を行った。

生物検定の供試魚は, 入手しやすい市販のアカヒレを使用することとし, 自前供給を目指して増殖法を検討した。市販のアカヒレの感受性は文献値に比べやや鈍かったが, 県内河川の検定では汚濁状況に応じ AOD 値も応答することが確認できた。その増殖については孵化直後の稚魚に酵母懸濁液を給餌すること等で生存率が向上し, 供試魚の自前供給が可能となった。

また, 室内での操作を考慮して凍結濃縮時の冷媒剤をエタノールから不凍液に変更したが, COD や金属等の回収率はほぼ 90%以上と良好で, エタノールと差はないと確認された。

Key words: AOD, アカヒレ, 生物検定

Aquatic Organisms environment Diagnostics, *Tanichthys albonubes*, Bioassay method

はじめに

公共用水域における水質汚濁の状況は, 従来環境基準の達成状況で評価しており, BOD など有機汚濁を主要評価項目としてきた。しかし, より良好な水環境が求められるようになった現在, 水生生物の保全をも含む総合的な評価が望まれるが, 現在行政において AOD 調査 (Aquatic Organisms environment Diagnostics: 水族環境診断法) を取り入れている事例は決して多くはない。その理由としては, 供試生物の感受性により結果が影響されること, 濃縮作業や供試生物の確保に労力や費用が掛かることなどが挙げられ, これらの技術的課題の解決が求められる。

そこで本研究では AOD を指標に取り入れ, 総合的に水質を評価できる新しい水質評価手法の確立を目指す。そのためには, 市販されているアカヒレ *Tanichthys*

albonubes (コイ科, 中国原産の温帯魚) の毒性感受性を確認するとともに, 安定供給にむけたアカヒレの増殖法の確立, 凍結濃縮法の安全性の向上について検討が必要と考え, 改善を試みたのでその結果を報告する。

実験方法

1 AOD 法

AOD とはアカヒレやヌカエビなどを生物試験に用い, 48 時間経過後の半数致死濃度 (48hrLC50) を求めることにより試験水の毒性を評価するものである。ただし, 通常の河川水は毒性が低いため, 凍結濃縮によってその中の有害物質の濃度を高め, 検出する。¹⁾ 濃縮は原水を 1 倍 (100%) とし, 1.8 倍 (180%), 3.2 倍 (320%), 5.6 倍 (560%), 10 倍 (1000 倍), 18 倍 (1800%) の 6 段階とし, 48 時間経過後の死亡率が 50%をはさむ濃縮率から Doudoroff の作図法により, 48hrLC50 を求める。

図 1 に AOD 試験のフローシートを示した。

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and hygiene

(4-27-2, kita-ando, Aoi-ku, shizuoka, 420-8637, Japan)

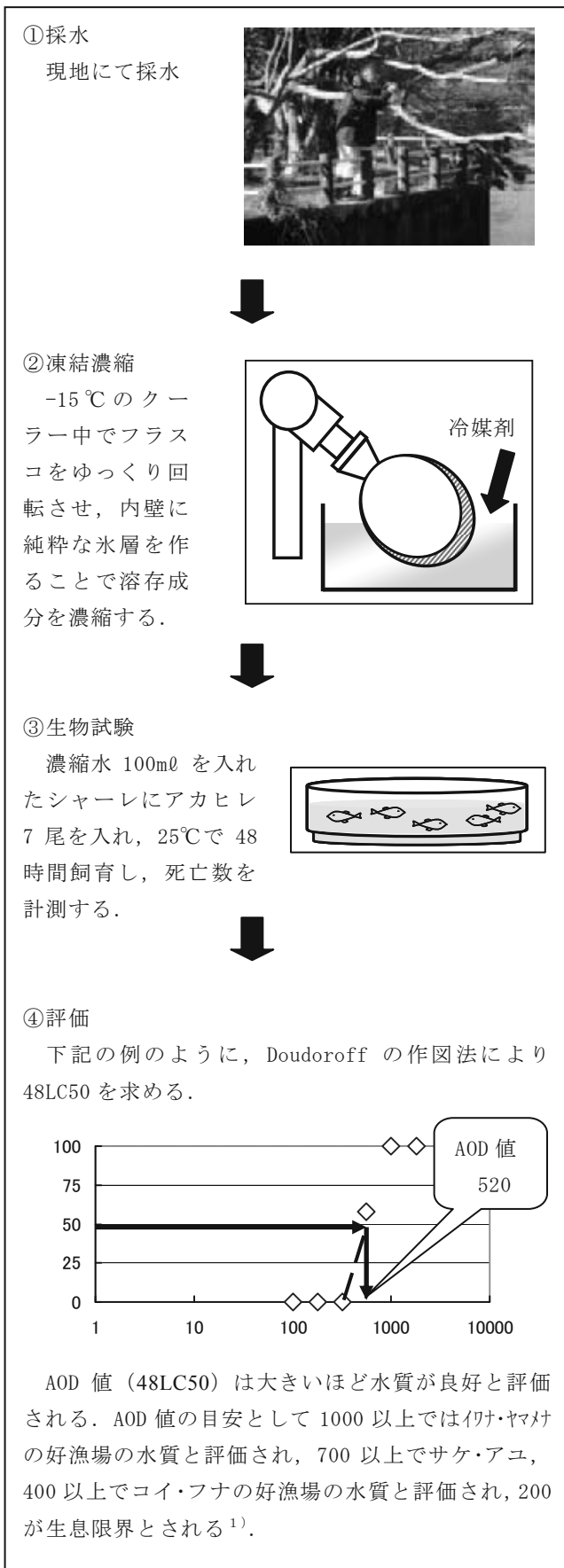


図1 AOD 試験のフローシート

2 市販アカヒレの供試魚としての感受性の確認

アカヒレの感受性試験は、宮城県保健環境センターにおいて実施された NH₄-N と無機炭素 (IC) の相乗による急性毒性に対する Ca の添加試験²⁾を参考とした。試験水は表1のとおり調整し、AOD 試験結果を文献値と比較した。

また、表2の県内河川の水質分析および AOD 試験を実施し、アカヒレの感受性を確認した。

表1 感受性試験溶液の成分

試験水	NH ₄ -N	Ca	IC
1			Na ₂ CO ₃ : 120 mg/ℓ
2		0 mg/ℓ	NaHCO ₃ : 120 mg/ℓ
3	25mg/ℓ		Na ₂ CO ₃ : 120 mg/ℓ
4		200 mg/ℓ	NaHCO ₃ : 120 mg/ℓ

表2 河川調査地点および流域の状況

河川 (地点名)	流域の状況
瀬戸川 (築地, 豊田橋)	浄化センター排水が流入する地点の上流, 下流
中河内川末端	安倍川の河口から約 22.5km 地点で合流し, 民家はほとんどない。
巴川 (上流, 巴大橋)	上流部は民家がほとんどない。巴大橋は生活排水が流入する地点
朝比奈川 (新横内橋)	H19 年度公共用水域水質測定において pH9 以上が多い地点

3 供試魚の安定した供給の確立

アカヒレは体長 20~30mm のコイ科の温帯魚で、観賞用として広く飼育されている。その飼育は容易で、循環ろ過装置を取り付けた水槽を 26℃ に保ち、市販の小型魚用飼料を与えれば繁殖も可能である。

計画している AOD 試験では、アカヒレが多数必要となるため、実際に飼育を行い、繁殖を効率的に行うための検討を行った。

4 凍結濃縮時の冷媒剤の違いによる回収率の確認

AOD の凍結濃縮には冷媒剤としてエタノールが用いられるが、安全性確保のため表3に示した成分の不凍液を用いることを試みた。これにより COD, NO₃-N および Pb・Cu・Cr の金属類の回収率および不凍液の操作性に問題がないか検討する。

COD, NO₃-N は採水した河川水の水質を測定の上そのまま供試した。金属類は表4の濃度で各標準液を添加し、凍結濃縮した。COD については 1.8 倍 (180%) か

ら 18 倍 (1800%) の 5 段階濃縮で, NO₃-N と金属類は 10 倍濃縮した 1000%液で回収率を測定した. なお, NO₃-N についてはイオンクロマトグラフ法で, 金属類については原子吸光法(ファーンネス)により測定した.

表3 不凍液の成分, 使用法

銘柄 (製造元)	成分 (%)	使用法
A-ブライン	プロピレングリコール 63%	水で 60% に希釈して使用
SB-PFP	添加剤 2%	
(ショーワ櫛)	水 35%	

表4 凍結濃縮の回収率試験の試験用溶液

項目	供試水	濃度	調整
COD	瀬戸川	2.3 mg/l	豊田橋にて採水
NO ₃ -N	麻機遊水池	1.10 mg/l	遊水池にて採水
Pb	脱イオン水	11.2 μg/l	脱イオン水+標準液
Cu	脱イオン水	7.54 μg/l	同上
Cr	脱イオン水	7.09 μg/l	同上

結果と考察

1 市販アカヒレの供試魚としての感受性の確認

アカヒレは AOD での使用例が多く, 各種薬剤等の感受性に関するデータがそろっており, 広く生物試験に使用されている. そのアカヒレは選抜系統のものが用いられており, 神奈川県で実施された AOD 試験^{3,4)}でも選抜系統のアカヒレが供試魚として使用されていた. しかし, 今回の試験では供試魚を大量に使用するため, 入手しやすい安価な市販のアカヒレの使用を前提に,

過去の報告による毒性試験のデータと感受性を比較検討した.

感受性試験結果は表5に示したとおりで, 今回の試験に供したアカヒレは文献値に対しいずれの条件においても死亡率が低く, 感受性が低いと思われた.

しかし, 河川水質調査の AOD 値は表6に示したように最大で>1800 から最小で 523 と, 測点ごとに差が見られた. 生活系の負荷が大きいと予想される瀬戸川の豊田橋の AOD 値は築地の 1342 に対し 523 と低下しており, 同じく巴川の巴大橋の AOD 値は上流の 1193 に対し 911 と低下している. このことから, 今回使用した市販のアカヒレで河川水質の差を評価することは可能と判断し, 増殖を進めることとした.

なお, AOD 値は NH₄-N 濃度が高い地点で低下する傾向が見られた (表7).

表6 各測点の濃縮率別死亡率および AOD 値 単位:%

濃縮率	瀬戸川		中河内	巴川	朝比奈川	
	築地	豊田橋	川末端	上流	巴大橋	新横内橋
100	0	0	0	0	0	0
180	0	0	0	0	0	0
320	0	0	0	0	0	0
560	0	57.1	0	0	14.2	14.2
1000	0	100	0	28.5	0	0
1800	100	100	0	100	100	28.5
AOD	1342	523	>1800	1193	911*	>1800*

*:1000%を除き 560%と 1800%を結んで 48hrLC50 を算出

表5 感受性試験結果

供試水の濃度 (%)		実験値				文献値 ⁴⁾			
		NH ₄ -N : 25mg/l				NH ₄ -N : 25mg/l			
		Ca:0mg/l		Ca:200mg/l		Ca:0mg/l		Ca:200mg/l	
		NaHCO ₃ : 120mg/l	Na ₂ CO ₃ : 120mg/l	NaHCO ₃ : 120mg/l	Na ₂ CO ₃ : 120mg/l	NaHCO ₃ : 120mg/l	Na ₂ CO ₃ : 120mg/l	NaHCO ₃ : 120mg/l	Na ₂ CO ₃ : 120mg/l
開始時	pH	7.06	7.02	7.10	7.05	7.15	7.08	7.17	7.02
終了時	pH	8.30	8.03	7.95	7.78	8.38	8.36	8.30	8.54
生 経 死 過 状 時 況 間	0.5	7+	7+	7+	7+	7+	7+	7+	7+
	1	7+	7+	7+	7+	7+	7+	7+	7+
	2					1+6-	7+	6+1-	7+
	3	7+	7+	7+	6+1-	7-	4+3-	6+1-	7+
	6	7+	7+	7+	6+1-		7-	4+3-	4+2±1-
	12	7+	7+	7+	6+1-				
24	7+	7+	7+	4+3-			1+6-	7-	
	48	7+	7+	7+	4+3-			7-	

※ + : 生存個体, - : 死亡個体, ± : 横転など異常を示した個体

表7 県内河川の水質 単位:mg/l (pH, AODを除く)

河川 地点	瀬戸川		中河内川		巴川		朝比奈川	
	築地	豊田橋	末端	上流	巴大橋	新横内橋		
AOD	1340	520	>1800	1193	911	>1800		
pH	7.5	7.4	7.8	8.4	7.4	8.3		
BOD	<0.5	1.5	0.6	0.7	1.2	<0.5		
COD	1.2	2.8	0.6	2.2	3.9	1.3		
T-N	1.97	4.46	0.39	1.89	3.38	1.49		
NO ₃ -N	2.19	1.59	0.43	1.78	2.06	1.47		
NO ₂ -N	0.00	0.19	0.00	0.00	0.42	0.00		
NH ₄ -N	0.14	2.53	0.08	0.10	0.58	0.08		
T-P	0.031	0.059	0.006	0.074	0.354	0.023		
PO ₄ -P	0.031	0.042	0.003	0.058	0.296	0.016		
Zn	0.004	<0.001	<0.001	0.002	0.010	<0.001		

2 供試魚確保のためのアカヒレ繁殖法の確立

アカヒレは26℃で飼育中に繁殖行動・産卵が見られたが、産卵行動を起こすタイミングがつかみにくく、親魚による卵・孵化稚魚の共食いなど表8に示す飼育上の問題点が明らかとなった。またその後の飼育において、孵化後の稚魚の生育歩留まりが低いことも判明した。表8に示したこれらの課題について検討を加え、解決を図った。

表8 アカヒレの飼育・増殖にあたっての問題点

No	課題
1	産卵行動が不定期で、親魚と卵を分離できない
2	雄同士で優位争いにより下位の雄が消耗する
3	集団飼育の中で、雌が十分に摂食できない
4	孵化直後の稚魚は共食いの対象となる
5	孵化3日後以降に稚魚の生存率が急低下する

1) 親魚の雌雄分離飼育

図2のように、親魚の雌雄分離飼育により以下のメリットが確認でき、課題のNo.1~3について解決された。

- ・ 雌雄を産卵箱で一緒にすると直ちに産卵行動を始めるようになり、産卵時期の調整が可能となった。
- ・ 雄成魚だけを過密に飼育することで、優位争いがなくなった。
- ・ 雌の摂食が十分にできるようになり、産卵後1~2週間で次の産卵が可能となった。



図2 雌雄を隔離した親魚水槽

2) 産卵用隔離容器の製作

稚魚の混入防止のため、周囲を不織布で覆った12cm×12cm×15cmのトリカルネット製かご容器を作成し、産卵用隔離容器とした。容器底部は沈降卵排出のため不織布なしとした(図3)。

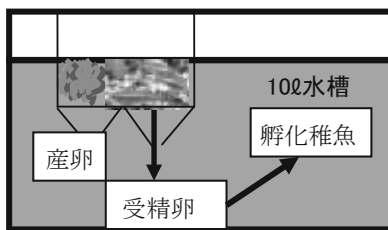


図3 産卵用隔離容器のイメージと設置状況(右写真)

この産卵用隔離容器を100容の小型水槽と組み合わせ、雌雄各2尾を収容することでペアリング後1~3日で産卵を得られるようになり、産卵後雌を入れ替えることにより連続した繁殖が可能となった。構造的に、稚魚の共食いは皆無に近くなり、効率が向上した。

この産卵用隔離容器の採用により、課題のNo.4が解決された。

しかし、250容以上の大型産卵容器に多数の親魚を収容して繁殖を試みた場合、稚魚の取り出しや水槽掃除などの作業性が悪く、産卵数も親魚数には比例しなかった。

3) 孵化稚魚への給餌の検討

アカヒレの稚魚の生存率が孵化3日後以降に急低下するのは、孵化時に持っていたヨークサック(栄養袋)を使い切った後の摂食に問題があると考えられた。一般に稚魚はバクテリア等を摂食するが、海水魚の稚魚に餌として与えるシオミズツボワムシの生産法にヒントを得て、イーストを直接与えてみることにした。

ただし、イーストは栄養価が低いため、市販のパン酵母(ドライイースト)に砂糖とウナギ用配合飼料を

加えて発酵させた。この懸濁液を孵化後 1 週間にわたり給餌した結果、275 尾が得られ、課題の No. 5 について解決された。

しかし、イースト懸濁液の給餌は孵化水槽の水質が悪化しやすく、水質管理が重要となることも判明した。

以上 1) ~ 3) の対策によりアカヒレの増殖が安定し、自前で供試魚の供給が可能となった。

3 凍結濃縮時の冷媒剤の違いによる回収率の確認

AOD の凍結濃縮には冷媒剤としてエタノールが用いられるが、引火性があり、危険物の扱いとなることから取扱には注意が必要である。この作業は開放系で行うため、エタノールに代わって不凍液を用いることを試みた。

エタノールを冷媒剤とした場合、各成分とも 85~99% 程度の回収率で濃縮可能とされているが、不凍液を用いた場合の回収率は表 9~11 のとおりであった。COD は 1800% 濃縮で回収率は 80% に達しなかったが、このほかは良好であった。また、NO₃-N と金属 (Pb, Cu Cr) も 1000% 濃縮で回収率は 90~110% と良好であった。よって、不凍液を凍結濃縮時の冷媒剤としてもエタノールと変わらないことが確認された。

また、不凍液による粘性の増大は問題とならなかった。

表 9 不凍液使用時の COD の回収率

	原水	180%	320%	560%	1000%	1800%
COD (mg/ℓ)	2.3	3.8	6.5	13.1	22.5	32.9
回収率 (%)	—	91.8	88.3	100	97.8	79.5

表 10 不凍液使用時の NO₃-N の回収率

	原水	1000%	回収率 (%)
NO ₃ -N (mg/ℓ)	1.10	10.0	90.8

表 11 不凍液使用時の重金属の回収率

	原水	1000%	回収率 (%)
Pb (μg/ℓ)	11.2	108.8	96.6
Cu (μg/ℓ)	7.5	85.2	113.1
Cr (μg/ℓ)	7.0	70.3	99.1

まとめ

市販されているアカヒレの毒性感受性の確認、アカヒレの増殖法、不凍液による凍結濃縮時の回収率について検討を加えた。得られた知見は以下のとおりであ

った。

1. 市販のアカヒレの毒性感受性は、選抜系統の文献値に比べ低かった。
2. ただし、県内河川水質調査の AOD 値は測点ごとに差が見られ、測定地点周辺の汚染源の状況に対応した変化を示していると判断され、非選抜系統のアカヒレを用いても水質評価は可能と判断した。
3. 親魚の雌雄分離飼育、産卵用隔離容器の製作、孵化稚魚への初期飼料の検討により試験用アカヒレの自給が可能となった。
4. 不凍液による凍結濃縮においても COD, NO₃-N, 金属の回収率は良好で、エタノールの代替品になることが確認された。

文献

- 1) 狩谷貞二他:アカヒレ・ヌカエビによる東北地方及び関東地方の河川水の毒性評価, 国立公害研究所研究報告, 114, 125-127 (1988)
- 2) 斎藤善則ほか: 各種排水の急性毒性について—し尿処理場排水の急性毒性, 宮城県保健環境センター, 第 5 号, 138-140, (1987)
- 3) 原田武憲: 神奈川県公害センター研究報告, 8, 18-25, (1986)
- 4) 原田武憲: 神奈川県公害センター研究報告, 10, 1-11, (1988)

AOD(水族環境診断法)による新たな水質評価方法の検討 —第二報 河川の水質評価—

大気・水質部 水質環境スタッフ 内山道春, 青木一永, 濱口浩太,
清水直美, 小池明

A Study of Estimation Method of Water Quality by AOD

—Report 2 Estimation of River Water Quality—

Michiharu UCHIYAMA, Katsunaga AOKI, Kouta HAMAGUCHI
Naomi SHIMIZU and Akira KOIKE

従来の水質分析に水生生物を用いた AOD (水族環境診断法) を併用した県内河川等の水質評価を行ったところ, 大部分の地点の AOD 値は 700 以上と, アユの生息に適する良好な水質と評価されたが, 一部では AOD 値で 200 未満となり, 魚類の生息には厳しい地点もあった。

逆川における通年調査では, 周辺流域の負荷源を反映して測定地点ごとに異なる AOD 値が得られたほか, 降水量・流量等の影響による AOD 値の季節変動が確認された。

BOD と AOD 値は必ずしも比例関係がなく, BOD が低いにもかかわらず AOD 値が低い事例が確認された。これにより, 生活系などの有機物汚濁以外に水生生物への影響が大きい事例があることが明らかとなり, AOD による総合的な水質の評価は, 水生生物への影響を考える上で有用であると考えられた。

Key words: AOD, アカヒレ, 生物検定

Aquatic Organisms environment Diagnostics, Tanichthys albonubes, Bioassay method

はじめに

公共用水域における水質汚濁状況は環境基準の達成状況で評価されており, 有機物汚濁指標である BOD・COD 評価では改善が見られる。しかし, 今日においてはより良好な水環境が求められており, 環境省では「水生生物の生息状況の適応性」の指標として平成 15 年度に全亜鉛を定めたところである。

このような状況の中当所では BOD などの環境基準項目の水質分析だけではなく, 生物検定を組み合わせた新しい水質評価手法, 水族環境診断法(AOD: Aquatic Organisms environment Diagnostics) の運用の簡便化を検討した。¹⁾ この AOD を生物検定手法として, 従来の化学分析と組み合わせて静岡県内の河川や池の水質評価を行うとともに, 水質評価手法としての有用性について検討したので結果について報告する。

調査方法

1 河川調査

1) 地点別河川調査

表 1 に示す県内河川について水質および AOD 調査を行った。調査項目および分析方法を表 2 に示す。AOD 調査の凍結濃縮は 1 倍 (100%) ~ 18 倍 (1800%) の 6 段階とし, 48 時間検定を行ってその半数致死濃度値から AOD 値を求めた。

2) 通年調査

逆川は県西部の掛川市内を流下する太田川水系の 2 級河川である。上流部は茶畑地帯で, 下流部は掛川市街を流れ, 市浄化センターからの排水も流入することから, 土地利用系および生活系の負荷が流入すると予想されることから選択した。

調査は平成 19 年 11 月から平成 20 年 10 月まで月 1 回の水質および AOD 調査を実施した。調査地点および流域の状況は表 3 および図 1 にまとめた。

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and hygiene

(4-27-2, kita-ando, Aoi-ku, shizuoka, 420-8637, Japan)

表 1 河川調査地点および流域の状況

調査日	地点名(河川)	流域の状況
2008.7	築地(瀬戸川)	浄化センター上流
	豊田橋(瀬戸川)	浄化センター下流
2008.7	中河内川末端	安倍川上流部森林
2008.8	巴川上流(巴川)	山林, 茶畑
	巴大橋(巴川)	市街地下流
2008.9	新横内橋(朝比奈川)	市街地, 畑地
	丸子川基点(丸子川)	山林, 茶畑
2008.11	長田(丸子川)	市街地
	ぺったん橋(丸子川)	水田, 畑地
	くすのき橋(潤井川)	市街地
2009.1	富鷹橋(潤井川)	水田, 製紙工場群
	前田橋(潤井川)	水田, 住宅地

表 2 調査項目および分析法

調査項目	分析法
流量	流量計
pH	ガラス電極法
EC	EC計
DO	ウィンクラーアジ化ナトリウム変法
BOD	ウィンクラーアジ化ナトリウム変法
COD	酸性法
SS	環境庁告示付表9
TOC(全有機態炭素)	TOC計(不揮発性有機体炭素)
T-N(全窒素)	ペルオキシニ硫化カリウム分解法
T-P(全リン)	ペルオキシニ硫化カリウム分解法
NO ₃ -N	イオンクロマトグラフ
NO ₂ -N	イオンクロマトグラフ
NH ₄ -N	イオンクロマトグラフ
PO ₄ -P	イオンクロマトグラフ
Zn*	原子吸光法(ファーンズ)

*:Pb, Cr, Cu, Cdは測定したが、検出限界未満であった。

表 3 逆川における調査地点および流域の状況

St.	地点名	流域の状況
1	大野	山林, 茶畑
2	宮前橋	山林, 茶畑, 集落排水
3	鞍下橋	畑地, 水田, 工業地帯
4	逆川橋	市街地
5	新長谷橋	市街地, 浄化センター
6	曙橋	畑地, 市街地

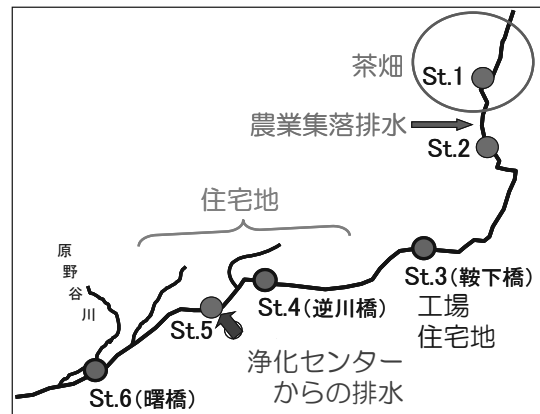


図 1 逆川の測点

2 池水調査

丹野池(菊川市)は牧の原台地の茶畑地帯の直下であり、丹野川へ流出する農業用ため池である。かつては茶畑の施肥に由来するpH低下が著しく、池内に魚類が生息できない時期もあった。

池水調査は平成20年4月から平成21年2月まで月1回の水質およびAOD調査を実施した。調査地点および流域の状況は表4および図2にまとめた。

表 4 丹野池における調査地点と状況

St.	地点名	流域の状況
A	吊橋(流入河川の1つ)	周辺台地上は茶畑
B	丹野池大橋(流入口)	池への河川流入部
C	越流堤(池尻)	丹野川への流出堰

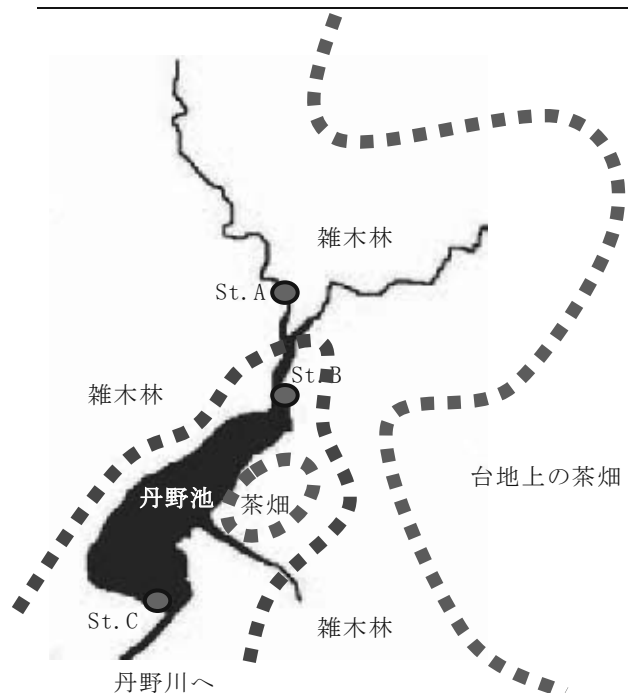


図 2 丹野池の測点

3 水質評価手法としての AOD の有用性

河川等の水質分析結果と AOD 値から、これらの相似・相違を検討し、AOD による水質評価手法としての有用性を考察した。なお、AOD 値の測定は前報¹⁾により行った。

結果と考察

1 河川調査

1) 地点別河川調査

各河川での水質分析結果および AOD 値を表5に示した。AOD 値については 700 以上でアユの生産に適する²⁾としているが、県内河川の各測定地点の AOD 値は概ね 1000 以上あり、良好な水質を示す地点が多かったが、一部の地点では 700 未満があった。

瀬戸川は藤枝市の山間に発し、東流して焼津港北に注ぐ中河川である。その築地における AOD 値は 1340 であったが、浄化センターからの排水が流入している豊田橋では 520 に低下した。

安倍川上流部の森林地帯を流れる中河内川末端にあたる合流点付近で採水を行ったが、AOD 値は 1800 以上ときわめて良好であった。

巴川は静岡市を東流して清水港に注ぐ中河川である。山林や茶畑となっている上流部での AOD 値は 1193 であったが、住宅地の中にある巴大橋では 911 に低下した。

朝比奈川は藤枝市東部から南流して焼津港北に注ぐ中河川である。その新横内橋は公共用水域水質測定において pH が 8.6 を超過する事例の多い地点であるが、

今回の AOD 値は 1800 以上ときわめて良好であった。

丸子川は静岡市西部を発し、安倍川右岸末端に合流する中河川である。その起点周辺は山林や茶畑となっているが、市街地を流下する間に AOD 値は 1076 から 784 に低下した。その後市街地を抜けたぺったん橋では AOD 値も 1800 以上に回復した。これは丸子川が天井川で、長田を通過後に河川水が礫の間を通過することにより浄化されたことも一因と考えられる。

潤井川は富士山西麓から富士宮市・富士市を経て田子の浦港に注ぐ中河川である。富士宮市街地の直下であるくすのき橋、富鷹橋、最下流の前田橋とも AOD 値は 1800 以上と良好であった。

AOD 値が低かった豊田橋では NH₄-N が 2.53mg/l、また長田では BOD が 6.5mg/l と高かった。一方、生活系排水の流入が少ない中河内川および朝比奈川等では AOD 値は 1000 以上あり、BOD は 0.5 未満から 1.4mg/l、NH₄-N は 0.00 から 0.14mg/l と低かった。このことから、豊田橋および長田での AOD 値が低下は浄化センターや市街地からの生活系排水の流入が原因と推察された。

なお、潤井川は市街地からの負荷があるものの、表6のとおり他の 4 河川に比べ流量が大きいため AOD 値が低下しなかったと考えられる。

また、表7に各河川での採水日および採水当日までの降水量の累計を示した。瀬戸川においてはまとまった降雨があったが、それ以外の各河川では降雨の影響はなかったと考えられる。

表5 県内河川の水質分析結果 単位:mg/l (pH, AODを除く)

河川 地点	瀬戸川		中河内川		巴川		朝比奈川		丸子川		潤井川	
	築地	豊田橋	末端	上流	巴大橋	新横内橋	起点	長田	ぺったん橋	くすのき橋	富鷹橋	前田橋
AOD 値	1340	520	>1800	1193	911	>1800	1076	748	>1800	>1800	>1800	>1800
pH*	7.5	7.4	7.8	8.4	7.4	8.3	7.4	7.4	7.4	7.2	7.4	7.7
BOD** (基準)	<0.5 (3)	1.5 (3)	0.6 (1)	0.7 未設定	1.2 (5)	<0.5 (2)	1.4 (5)	6.5 (5)	3.1 (5)	1.1 (2)	1.7 (2)	1.5 (2)
COD	1.2	2.8	0.6	2.2	3.9	1.3	0.9	4.2	2.3	1.7	1.5	1.7
T-N	1.97	4.46	0.39	1.89	3.38	1.49	1.5	3.83	1.98	1.68	1.85	1.93
NO ₃ -N	2.19	1.59	0.43	1.78	2.06	1.47	1.27	2.03	1.59	1.46	1.67	1.78
NO ₂ -N	0.00	0.19	0.00	0.00	0.42	0.00	0.00	0.29	0.16	0.15	0.15	0.16
NH ₄ -N	0.14	2.53	0.08	0.10	0.58	0.08	0.00	0.88	0.07	0.11	0.10	0.05
T-P	0.031	0.059	0.006	0.074	0.354	0.023	0.010	0.239	0.093	0.149	0.180	0.165
PO ₄ -P	0.031	0.042	0.003	0.058	0.296	0.016	0.010	0.172	0.073	0.134	0.147	0.141
Zn	0.004	<0.001	<0.001	0.002	0.010	<0.001	0.007	0.004	0.005	0.017	0.018	0.011

*: pH の環境基準は 5.8~8.6 **: BOD の環境基準は下段 () 内

表 6 各河川の流量* (参考値) 単位:m³/S

河川	地点	平均	最大	最小
瀬戸川	勝草橋	1.16	2.84	0.14
中河内川	—	—	—	—
巴川	巴大橋	1.69	2.90	0.89
朝比奈川	新横内橋	1.03	2.20	0.25
丸子川	ぺったん橋	1.17	3.50	0.00
潤井川	くすのき橋	8.15	12.70	4.90

*:平成20年度公共用水域測定結果より

表 7 各河川における採水日と降雨の状況

採水日	河川	アメダ		降水量累計* mm		
		地点	当日	3日以内	7日以内	
H20.7.3	瀬戸川	高根山	0	0.5	107.5	
H20.7.28	中河内川	梅ヶ島	0	0	2.0	
H20.8.4	巴川	清水市	0	4.0	19.0	
H20.9.10	朝比奈川	高根山	0	13.5	35.0	
H20.11.20	丸子川	静岡市	0	2.0	2.0	
H21.1.21	潤井川	富士市	0	16.5	16.5	

*:降水量は採水日から遡った累計値

2) 通年調査

逆川の各地点での水質およびAOD値を表8に示した。AOD値はいずれの地点も平均で1000以上あったが、St.4,5,6では最小値で200程度ないし未満と、魚類の生息には厳しい水質を示す時期もあった。

逆川のAOD値の通年変動は表9に示すように3つのパターンに分類され、その代表としてSt.1,3,5を図3に示した。

St.1,2を含むグループの水質はBODが低いがNO₃-N濃度が高いという特徴があり、土地利用系、特に茶畑の施肥の影響³⁾が推察された。St.3は常にAOD値が

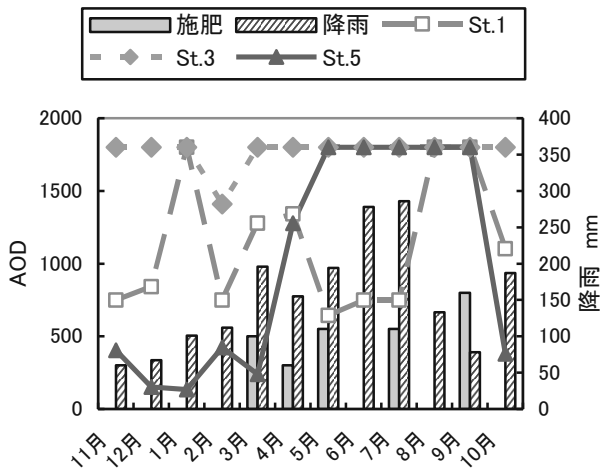


図3 逆川におけるAOD値の変動と降水量・施肥量

高く、顕著な負荷源がないと考えられた。St.4,5,6を含むグループの水質はBOD・CODおよびNH₄-N濃度が高いという特徴があり、また降水量・流量が大きい夏季のAOD値は高、降雨が減少し流量が小さい冬季のAOD値は悪化する傾向にある。よってここでは恒常的な負荷源と流量による希釈の関係が推察され、生活系の負荷の影響が大きいと考えられた。斎藤ら⁴⁾は窒素がNH₄-N体で存在すると毒性が強くなったことを報告しているが、逆川下流においてもNH₄-N濃度が高い場合にAOD値が低下した。

(AOD: NH₄-N= 151:2.85, 131:7.23, 240:1.86)

逆川における採水日と降雨の状況を表10に示した。採水前に降雨のあった2月は、St.1,3において土地利用系の負荷流入によってAOD値が下がり、St.5では希釈されてAOD値は向上している。St.1は5月,6月,7月とAOD値が低下したが、これは採水前の降雨で肥料成分が流入したためと推察された。このように河川のAOD値は流域の状況と降雨の影響をよく反映しており、水質評価手法として十分な応答性を持つと思われる。

また、逆川のSt.1ではBODが低いにもかかわらず、AOD値も低い事例が確認された。(AOD: BOD= 644: 0.8)

表 8 逆川における各調査地点の水質

単位:mg/l (pH, AODを除く)

河川	逆川						
	地点	St.1	St.2	St.3	St.4	St.5	St.6
AOD値	平均値	1133	1393	1707	1368	1001	1335
AOD値	Max	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800	>1800
AOD値	Min	644	748	1076	214	134	240
pH	Max	7.9	8.0	8.7	8.9	8.9	8.1
pH	Min	6.5	6.6	6.7	6.8	6.8	6.8
BOD	平均値	0.8	1.4	1.5	2.9	4.1	2.8
COD	平均値	2.9	4.1	3.7	5.4	6.3	5.2
T-N	平均値	6.43	5.67	3.66	3.87	4.80	3.72
NO ₃ -N	平均値	5.71	4.70	3.03	2.76	2.17	2.35
NO ₃ -N	Max	7.82	6.90	5.02	4.18	3.19	3.60
NO ₃ -N	Min	4.02	2.42	0.73	1.05	0.97	1.20
NO ₂ -N	平均値	0.00	0.04	0.08	0.25	0.28	0.25
NH ₄ -N	平均値	0.05	0.18	0.15	0.54	1.71	0.66
NH ₄ -N	Max	0.15	0.97	0.87	2.62	7.23	3.14
NH ₄ -N	Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Zn	平均値	0.011	0.007	0.005	0.006	0.009	0.008

(平成20年11月5日~平成21年10月19日)

n=12

表 9 逆川における水質の特徴

	水質の特徴	該当 St.	推定負荷源
I	BOD は低い、NO ₃ -N 濃度が高い	St. 1, 2	茶畑の施肥
II	常に AOD 値が良好	St. 3	—
III	BOD および NH ₄ -N 濃度が高く、AOD 値は流量に比例する	St. 4, 5, 6	生活系排水

表 10 逆川における採水日と降雨の状況

採水日	降水量累計 mm		
	当日	3日以内	7日以内
H20.11.5	0	0	0
H20.12.4	0	0	35.5
H21.1.7	0	0	0
H21.2.3	0	25.5	65.0
H21.3.12	0	4.5	4.5
H21.4.13	0	0	0
H21.5.7	0	59.5	59.5
H21.6.26	0	61.5	83.5
H21.7.23	0	35.5	35.5
H21.8.17	0	0	72.0
H21.9.9	0	0	0
H21.10.19	0	5.5	5.5

掛川アメダスデータより

2 池水調査

丹野池の各地点での水質および AOD 値を表 11 に示す。流入河川の St. A では平均で 841 あったが、最小値は 208 と低く魚類の生息には厳しい水質の時期もあった。一方、池内の St. B および C の AOD 値は平均で 1000 以上あった。最小値でも 700 以上を保っており、年間を通じて魚類の生息が可能であることが確認された。

丹野池の水質は全般に BOD が低く、NO₃-N 濃度が極めて高いという特徴がある。St. A においてはさらに pH が 4.6 から 5.7 と低い点が特徴に追加される。

丹野池の AOD 値の時系列変動を図 4 に示した。St. A の AOD 値は約 200 から 600 であるが、時に 1300 以上に改善する場合もあった。St. B, C での AOD 値は約 700 から 1800 以上の範囲にあった。

表 12 において降雨前後の AOD 値および各項目を比較すると、全ての地点 NO₃-N 濃度が低下したほか、St. A では pH が改善し、併せて AOD 値も上昇している。よって、St. A の AOD 値は降雨の影響で一時的に改善されることが示唆された。これを表 13 に示した採水時の降

水量と照合すると、4月および2月の St. A の AOD 値は降雨により高まっていると考察された。6月の St. A は降雨直後にもかかわらず AOD 値が低い、茶畑での肥料施用時期であるため、かえって悪化したと考えられる。

また逆川と同様に、丹野池においても BOD が低いにもかかわらず AOD 値も低い事例が確認された。

(AOD : BOD = 214 : 1.9, 206 : 0.4, 487 : 0.2)

表 11 丹野池における各調査地点の水質

単位:mg/l (pH, AOD を除く)

河川 地点	丹野池		
	St. A	St. B	St. C
平均值	887	1043	1149
AOD 値	Max	>1800	1673
	Min	208	748
pH	Max	5.7	7.1
	Min	4.6	6.5
BOD	平均值	0.6	0.7
COD	平均值	0.9	1.6
T-N	平均值	19.7	14.8
	平均值	19.35	15.18
NO ₃ -N	Max	23.02	18.69
	Min	11.43	10.02
NO ₂ -N	平均值	0.00	0.06
	平均值	0.03	0.03
NH ₄ -N	Max	0.12	0.09
	Min	0.00	0.00
Zn	平均值	0.009	0.006

(平成 20 年 4 月 23 日～平成 21 年 2 月 3 日)

n = 11 5月:欠測, 11月:9日, 12日測定

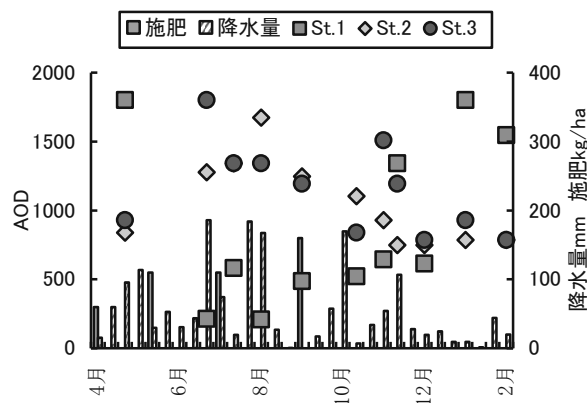


図 4 丹野池における AOD 値の変動と降水量・施肥量

表 12 丹野池における降雨前後の水質
単位:mg/ℓ (pH, AOD を除く)

地点	St. A		St. B		St. C	
	前	後	前	後	前	後
AOD 値	644	1342	930	748	1509	1193
pH	4.9	5.5	6.9	6.7	7.0	7.0
BOD	1.1	<0.5	0.9	0.8	1.2	0.8
COD	0.8	0.9	2.3	1.4	3.1	2.7
T-N	22.41	14.43	17.10	10.44	15.95	13.27
NO ₃ -N	21.61	14.55	17.69	11.01	16.05	13.72
NO ₂ -N	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12	0.00
NH ₄ -N	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Zn	0.006	0.007	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

(平成 20 年 11 月 9 日および 12 日) 降水量 80.5mm

表 13 丹野池における採水日と降雨の状況

採水日	降水量累計 mm		
	当日	3 日以内	7 日以内
H21.4.23	0	55.5	55.5
H21.6.26	0	71.0	96.5
H21.7.14	0	1.0	24.5
H21.8.17	0	6.5	26.5
H21.9.2	0	0	0
H21.10.20	0	7.0	7.0
H21.11.9	0	0	0
H21.11.12	60.5	80.5	80.5
H21.12.2	0	6.0	17.5
H22.1.6	6.0	9.5	9.5
H22.2.3	20.0	24.0	50.0

菊川・牧の原アメダスデータより

3 水質評価手法としての AOD 法の有用性

県内河川等 116 点のデータから得られた AOD と BOD の相関を図 5 にプロットした。河川類型では BOD の環境基準とともに河川水質の利用目的の適応性が示されており、それに対応する AOD 値²⁾ は表 14 に示した。

BOD が水生生物の生息環境状況との相関が高いのであれば、図 5 で AOD: BOD は 400:5, 700:3, 1000:2 を結ぶ線を中心にプロットされると予想された。しかし、実際には低 BOD の領域で AOD 値も低い事例があった。

BOD が高いが AOD 値も高い事例としては手賀沼の報告⁴⁾ があり、また利根川最上流部(草津温泉)では低 pH の影響で BOD が低いながら AOD 値も低い事例⁵⁾ があった。また、狩谷ら⁵⁾ は BOD が 10 以下では AOD 値と一定の相関は見出せないこと、BOD は魚類の生息環

境条件の判断基準として適用できないことが示唆されると論じている。

今回 BOD が低いにもかかわらず AOD 値も低い事例が存在することが確認されたことから、BOD と AOD 値は必ずしも比例しないことが強く示唆された。実際、今回の調査での AOD と BOD の相関係数は -0.232 と低かった。

以上の結果から、水生生物への影響を考察するには従来の環境基準だけでは不足で、AOD による評価を併用することが望ましいと考えられた。

表 14 河川類型と BOD 基準値および相当する AOD 値

類型	河川類型と基準値		相当する AOD ²⁾	
	BOD*	水産 (水産生物種)	生物評価	AOD 値
AA	1 以下	—	—	—
A	2 以下	1 級 (ヤマメ, イナ等)	水産用水基準	1000
B	3 以下	2 級 (サ科, アユ等)	アユ好漁場	700
C	5 以下	3 級 (コイ, フナ等)	コイ, フナ好漁場	400
—	—	—	生息限界	200

*: 単位 mg/ℓ

また、AOD と各分析項目との相関係数は表 15 に示したが、各項目とも高い相関係数は得られなかった。図 6 に示した AOD と NH₄-N の相関では、NH₄-N 濃度 1mg/ℓ 以上で相関が高いように思えるが、NH₄-N が低濃度でも AOD 値も低い事例が確認された。このことは、AOD 値が複合的な毒性を示していると推察された。

表 15 県内河川等における AOD と各項目の相関係数

分析項目	相関係数
pH	0.288
BOD	-0.232
COD	-0.068
T-N	-0.415
NO ₃ -N	-0.324
NO ₂ -N	-0.183
NH ₄ -N	-0.433
Zn	-0.179

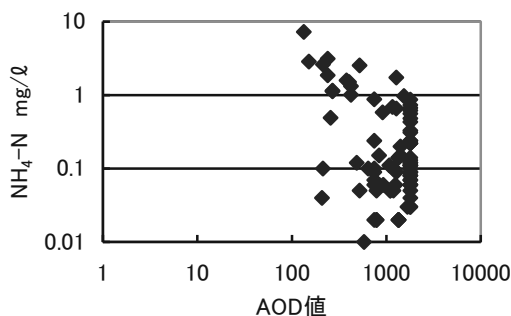


図6 県内河川等の AOD と NH₄-N の相関 (両対数)

まとめ

AOD による静岡県内の河川等の水質評価を行うとともに、これを通じて AOD の水質評価手法としての有用性の判定を試みた。得られた知見は以下のとおりであった。

1. 県内河川の AOD 値は概ね 700 以上あり良好な水質を示す地点が多かったが、一部では 700 を下回る地点もあった。
2. 河川の AOD 値は流域の負荷源や降水量・流量等の状況をよく反映していると推察された。
3. 河川および池での通年調査では AOD 値の変動が確認され、これも降水量・流量等の影響を反映していると推察された。
4. 県内河川等で BOD が低いにもかかわらず AOD 値も低い事例が複数確認された。このことから、水生

生物への影響を評価する上で、BOD だけでは適正な評価は困難と考えられた。

5. AOD 値は各分析項目とも高い相関係数は得られなかった。これは AOD 値が複合的な毒性を示しているためと推察された。
6. 以上より、従来の化学分析に併せて AOD による評価を行うことは、水生生物への影響を考える上で有用であると考えられた。

文 献

- 1) 清水直美他：AOD (水族環境診断法) による新たな水質評価方法の検討 第一報, 静岡県環境衛生科学研究所報告, 53, (2010)
- 2) (財)国土開発技術研究センター: 漁業影響調査報告書- 漁業影響調査の手引き -, 421 (1985)
- 3) 静岡県農業水産部研究調整室: 静岡県土壌肥料ハンドブック, 163-166, (2005)
- 4) 玉井信行他: 河川生態環境工学- 魚類生態と河川計画- 24, (財) 東京大学出版会 (1993)
- 5) 狩谷貞二・大内絹子: アカヒレ・ヌカエビによる東北地方及び関東地方の河川水の毒性評価, 国立公害研究所研究報告, 114, 133-134 (1988)

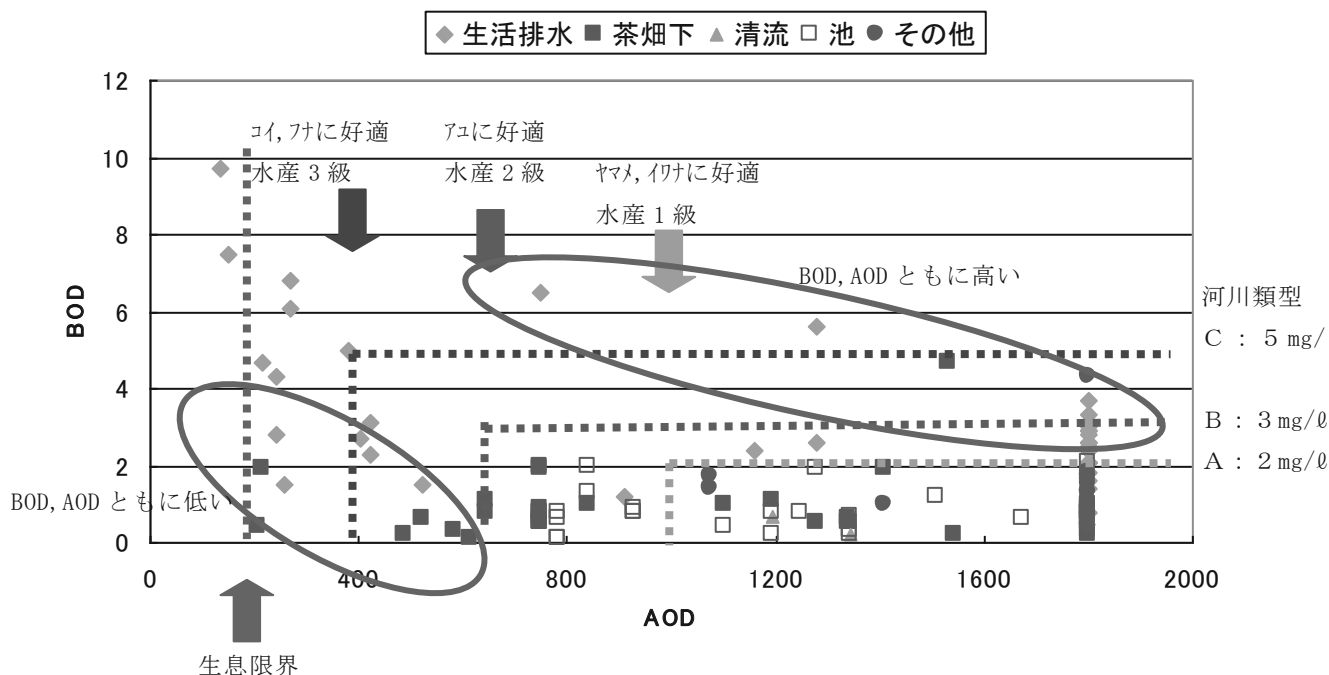


図5 県内河川等の AOD と BOD の相関

富士山静岡空港における低周波音について

大気・水質部 大気・騒音環境スタッフ 高木千佳, 篠原英二郎

Report of Low Frequency Noise around the Mt. Fuji Shizuoka Airport

Chika TAKAGI, Eijiro SHINOHARA

富士山静岡空港が2009年6月に開港となり、航空機が与える周辺環境への影響が懸念される。本報告では、航空機による影響のうち知見やデータが不足している低周波音についてその発生状況を調査し、富士山静岡空港開港に伴う周辺環境の影響について検討した。

富士山静岡空港に離発着する航空機から発生する低周波音について、滑走路中心から南東約2.4kmの飛行直下である地点Aと空港の北東約1kmの地点Bで受音状況調査を行った。その結果、低周波音の周波数特性として、着陸機は各機により異なる傾向を示したが、離陸機は40Hz付近に卓越周波数が見受けられた。20Hz以下の超低周波音域で音圧レベルが総体的に高い傾向を示したのは、風雑音によるものと推察された。低周波音は、構成する波長が長いこと空気吸収による影響が少なく、距離減衰と気象条件による影響が支配的であることが示唆された。

Key words: 低周波音, 航空機騒音, 富士山静岡空港
 Low frequency noise, Aircraft noise, Mt. Fuji Shizuoka Airport

はじめに

富士山静岡空港が2009年6月に開港し、航空機が与える周辺環境への影響が懸念される。このため、大気汚染および航空機騒音については調査が実施され監視が行われているが、航空機騒音調査については、環境基本法(平成5年法律第91号)第16条第1項で定められた航空機騒音に係る環境基準について、富士山静岡空港周辺における達成状況を確認するものである。一方、騒音のなかでも周波数が概ね1~100Hzの範囲の音である低周波音による影響について、近年、風力発電施設などで問題となっている。この低周波音については、2004年6月に環境省より「低周波音問題の手引書」¹⁾が公表され、固定発生源に関する苦情に対して低周波音が原因であるか否かの判断をするための評価指針が規定されたところである。航空機による低周波音について、1978年度頃までは、飛行音・エンジンテスト等

による苦情も多かったが、近年は飛行コースの分散化・飛行高度の高度化・エンジンテスト時対策などが講じられている。しかし、示された評価指針は、固定発生源から発生する低周波音に関してのものであり、航空機等の移動発生源から発生する低周波音については示されていない。移動発生源から発生する低周波音についての知見やデータが不足している現状である。

本報告では、富士山静岡空港における航空機による低周波音の発生状況を調査したので、その結果について報告する。

調査方法

1 調査地点

空港周辺で実施される航空機騒音調査の調査地点のうち、離発着方向の状況や、機体が目視確認しやすく周囲からの低周波音が少ないなどの現地状況から地点を選定した。

調査地点の概要を図1および表1に示す。

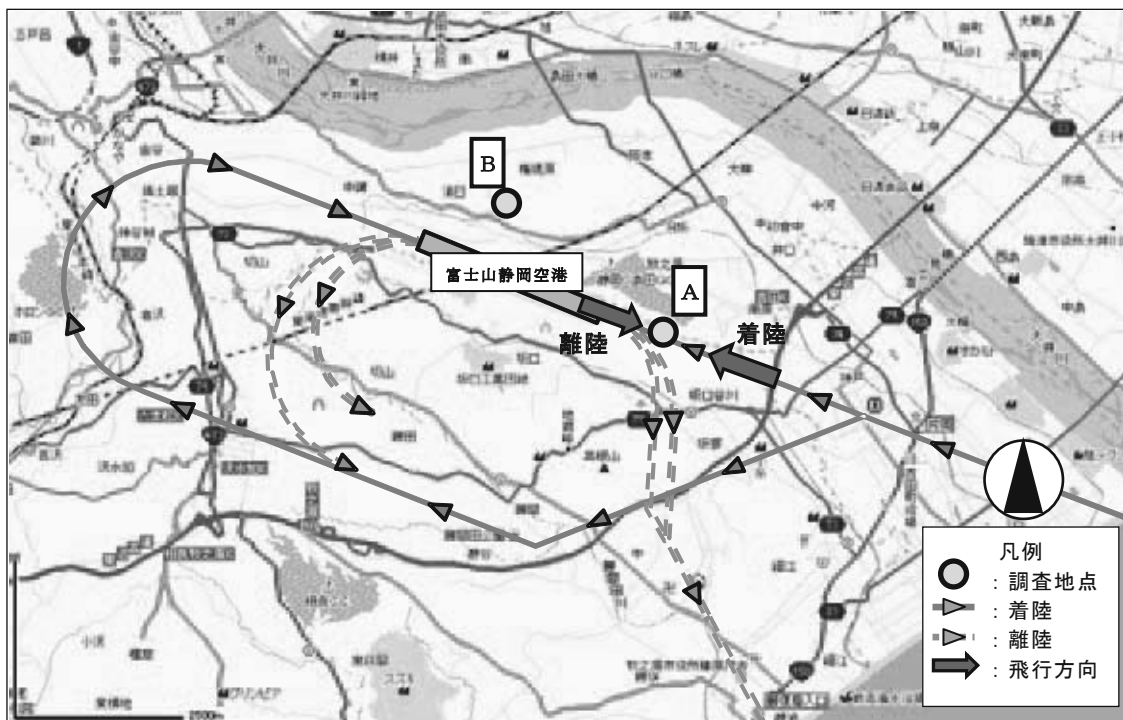


図 1 調査地点概要

表 1 調査地点の概要

地点	調査地点	用途地域	地域類型	滑走路中央からの距離	標高	飛行状況
A	空港進入施設用地横（島田市船木）	都市計画区域内の用途地域の定めのない地域	Ⅱ型	2400m	約97m	直下
B	原の平公民館（島田市湯日）	都市計画区域外	Ⅱ型	1000m	約76m	仰角 20度以下

2 調査時期および測定方法

空港周辺で実施される航空機騒音調査に合わせ、夏の2回を予定していたが、夏の調査のみとなった。

これは、冬の調査予定期間中に、低周波音測定に著しい影響を与える風の影響が大きくなり、富士山静岡空港における風速（10分平均）が5m/s以上となった日が大部分を占め、調査に適さなかったためである。

低周波音の測定は、「低周波音の測定方法に関するマニュアル」²⁾に準拠し、低周波音レベル計を用いて、G特性音圧レベルおよび1/3オクターブバンド音圧レベル（1～80Hz）について発生時の最大値を読み取った。

航空機騒音は、環境基本法第16条第1項で定められた「航空機騒音に係る環境基準について」³⁾および「航空機騒音監視測定マニュアル」⁴⁾で定める方法に準じて行い、航空機騒音の自動監視装置を用いて、発生時の最大値を読み取った。

また、あわせて1/3オクターブバンド音圧レベル（12.5～16kHz）についても、1/1・1/3オクターブ実時間分析カードを装着した騒音計を用いて発生時の最大値を読み取った。

なお、マイクロホンの高さは、1.5mとした。調査概要を表2に、調査項目と使用機器を表3に示す。

表 2 調査概要

地点	調査日	観測機種
A	2009. 8. 26 (木)	<着陸機> ERJ170-100STD型 2機、MD-90-30型 1機、B737-900型 1機、B737-700型 1機、A321-231型 1機 <離陸機> ERJ170-100STD型 1機、MD-90-30型 1機、B737-900型 1機、B737-700型 1機、A321-231型 1機
B	2009. 8. 25 (水)	<着陸機> ERJ170-100STD型 2機、MD-90-30型 1機、B737-900型 1機、B737-700型 1機、A321-200型 1機、A319-112型 1機 <離陸機> MD-90-30型 1機、B737-900型 1機、B737-700型 1機、A321-200型 1機

表 3 調査項目と使用機器

地点	調査項目	使用機器
A	低周波音 G特性音圧レベル ($L_{G,max}$) , 1/3オクターブバンド音圧レベル(1~80Hz)	低周波音レベル計 (リオン NL-18A)
	航空機騒音 A特性音圧レベル ($L_{A,max}$) , 1/3オクターブバンド音圧レベル(12.5Hz~16kHz)	航空機騒音自動監視装置(日東紡績音響 DL-100/PT), 騒音計+1/1・1/3オクターブ実時間分析カード (リオン NL-32+NX-22RT)
B	低周波音 G特性音圧レベル ($L_{G,max}$) , 1/3オクターブバンド音圧レベル(1~80Hz)	低周波音レベル計 (リオン NL-18A)
	航空機騒音 A特性音圧レベル ($L_{A,max}$) , 1/3オクターブバンド音圧レベル(12.5Hz~16kHz)	航空機騒音自動監視装置(日東紡績音響 DL-100/PT), 騒音計+1/1・1/3オクターブ実時間分析カード (リオン NL-32+NX-22RT)

結果と考察

1 低周波音の受音状況

地点Aにおける着陸機による結果を図2に、離陸機による結果を図3に示す。地点Aは、飛行経路直下にあたり、着陸機の場合は約100m上空を、離陸機の場合は約300m上空を飛行していることになる。周波数特性として、着陸機については各機によって異なったが、離陸機については卓越周波数が40Hz付近に見られた。

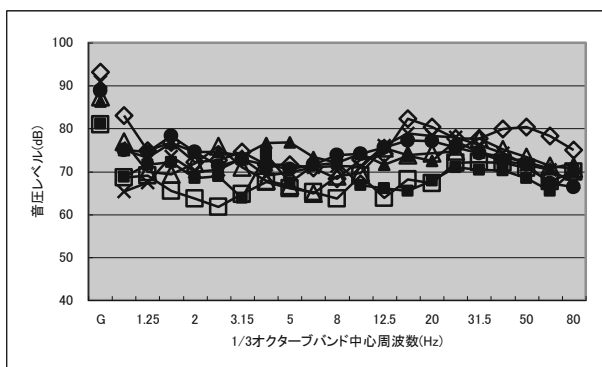


図2 周波数分析結果 (地点A, 着陸機)

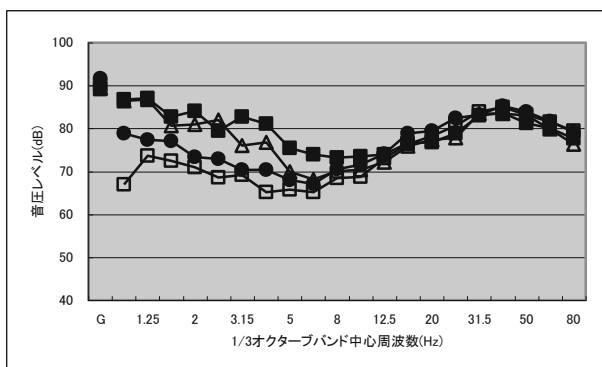


図3 周波数分析結果 (地点A, 離陸機)

地点Bにおける着陸機による結果を図4に、離陸機による結果を図5に示す。地点Bは、滑走路の真横に位置し、滑走路より50m程度低い位置になる。着陸機の場合は、滑走路端付近から滑走路に接地し完全に停止するまでの間を測定することになる。また、離陸機の場合は、離陸滑走から離陸上昇(約400m)までの間を測定することになる。

周波数特性として、着陸機については減速方法が異なるためか各機によって異なったが、離陸機については卓越周波数が50Hz付近に見られた。

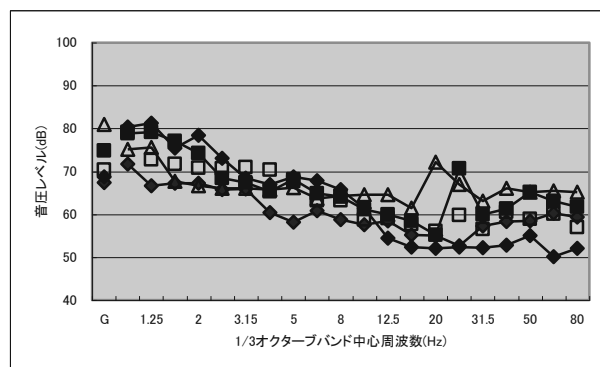


図4 周波数分析結果 (地点B, 着陸機)

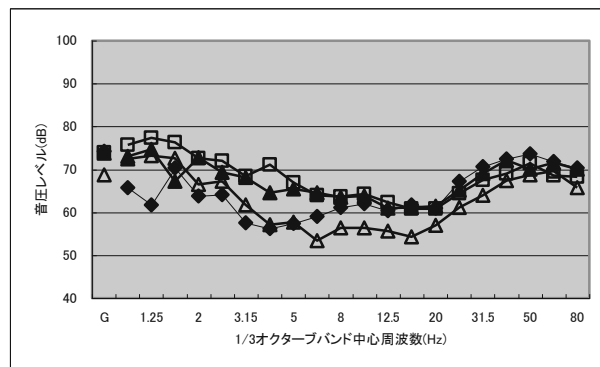


図5 周波数分析結果 (地点B, 離陸機)

2 風雑音の影響

今回、風による影響を考慮してマイクロホンには直径 20cm の防風スクリーンを装着した。これによって、防風スクリーンなしに比べ約 20dB の低減効果²⁾を図ったが、それでも風雑音の影響が見られた。風雑音は、風が強くなると増大し、対象となる低周波音の音圧レベルが小さいほど影響が大きいことが知られている。

また、20Hz 以下の超低周波音域では平均風速 0.25m/s 時に比べ平均風速 2.9m/s では、8~26dB の上昇がみられ周波数が低い程その差が大きいという報告²⁾がある。地点Aおよび地点Bにおける風速は、一番近い気象観測地点である富士山静岡空港の結果から 3~5m/s であった。低周波音の周波数特性を調べたデータ^{2),5)}と比較すると、超低周波音域の音圧レベルが高い。これらから、地点Aおよび地点Bともに、超低周波音域で値が高いのは、風雑音によるものと推察される。

富士山静岡空港における風向風速を表4と図6に示す。

表4 富士山静岡空港における風速

地点	調査日	風速 (10分平均、m/s)
A	平成21年8月26日(木)	3.4~4.8
B	平成21年8月25日(水)	2.7~4.9

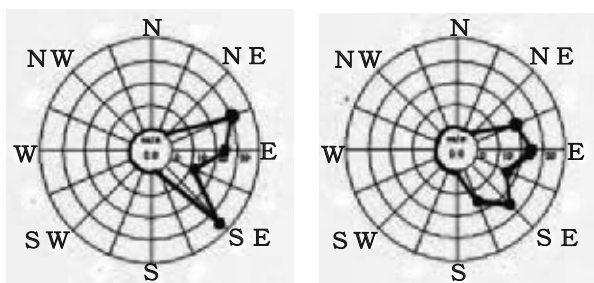


図6 富士山静岡空港における風配図

3 地点の違いによる影響

地点Aおよび地点Bの離着陸機別に周波数帯ごとの音圧レベルをパワー平均した結果を図7に示す。

着陸機は、地点Aと地点Bでは観測する航空機の状態が異なり、地点Bでは接地後の減速作業に伴う音も含むものである。このため、地点Aと地点Bでは周波数特性が異なっていた。離着陸機については、40~50Hz が卓越する周波数特性を示し、地点Bでは、地点Aに比べ 10dB 程度低い値で推移した。

低周波音は波長が長いため、地表面吸収や空気吸収による音の超過減衰はきわめて低く、数 km 離れた地点への伝搬は気温と風向風速に大きく影響される。

地点Bでは、気温は地表より上空の温度が低い状態であり、風は 3m (10 分平均)前後のほぼ順風であった。音の長距離伝搬に関する報告⁶⁾によれば、この気象条件では低周波音域での超過減衰は低い状態にあったと推察される。距離減衰のみを考えると、線音源として 8~9dB 程度減衰すると考えられ、同日測定ではないが、地点Aと地点Bの音圧レベルの差は距離減衰によるものにはほぼ一致した。

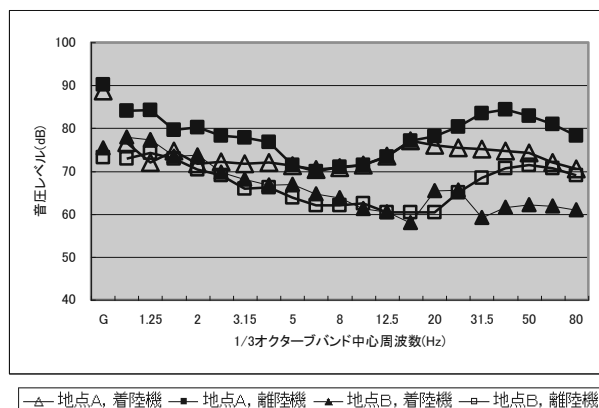


図7 周波数分析結果 (パワー平均)

4 暗騒音との比較

地点Aおよび地点Bにおいて、航空機騒音がない時間帯である暗騒音について測定した結果を図8に示す。鳥やセミ、虫の鳴いている状態、無風や風がそよいでいる時、車やバイクの通過時などの様々な状況の結果である。

超低周波音域で値が高いのは、風雑音によるものと推察される。地点Bは、周辺を行きかう車両等の音が絶えずあり、50Hz が卓越する周波数特性を示しているが、これらは道路交通等によるものと考えられる¹⁾。地点Aは、茶畑に囲まれている地点であり、調査時は農作業等もなく車両等の通過も少なかったことから、地点Bに比べ全体的に低い結果であった。

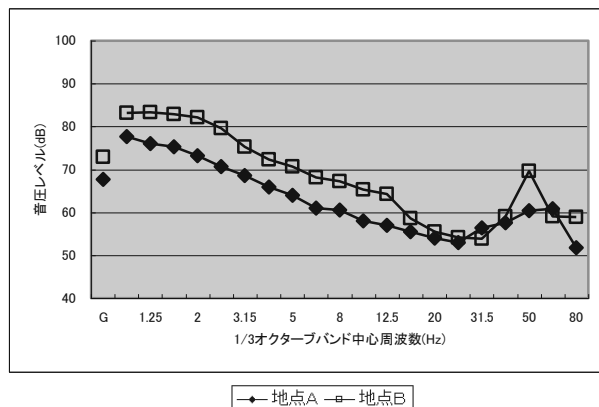


図8 周波数分析結果 (暗騒音)

地点Aおよび地点Bの暗騒音をパワー平均し、最大値および最小値を示した結果に低周波音の受音状況を重ね合わせたものを図9に示す。

地点Aにおいては、10Hz以上の周波数帯で暗騒音の範囲からはずれて高値で推移した。地点Bにおいては、暗騒音より高値となった周波数帯もあるが、ほぼ暗騒音の範囲に入っていた。

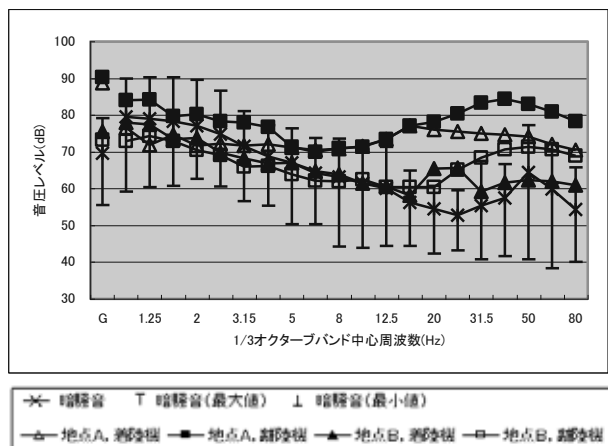


図9 周波数分析結果（暗騒音および航空機）

5 航空機騒音との比較

G特性音圧レベルと航空機騒音のA特性音圧レベルについて地点Aおよび地点Bにおける離着陸機別の関係を図10に示す。

G特性音圧レベルは、航空機騒音のA特性音圧レベルに対し約10dB高めに推移している。これは風雑音の影響によりG特性音圧レベルが高くなっていることが考えられる。

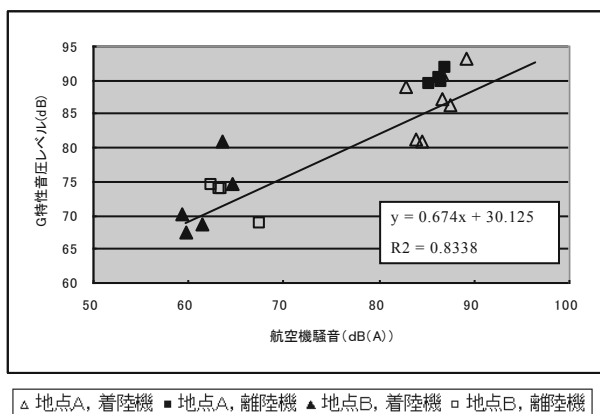


図10 航空機騒音とG特性音圧レベル

6 航空機騒音の周波数分析

地点Aおよび地点Bの離着陸機別に航空機騒音の周波数帯ごとの音圧レベルをパワー平均した結果を図11に示す。着陸機は、地点Aおよび地点Bでは観測す

る航空機の状態が異なり、周波数特性に違いが生じている。離陸機については、ほぼ同様の周波数特性を示した。

周波数特性の違いはあるものの、着陸機については125Hz以上の周波数帯で、離陸機については100Hz以上の周波数帯で地点Aと地点Bの差が20dB以上となり、低周波音域に比べその差が大きくなった。

地点Bでは、音の長距離伝搬に関する報告⁶⁾によれば、気温と風の影響から中高音域で超過減衰が生じていたと推察される。また、気温と湿度に依存する空気吸収について、夏季において中音域から周波数の増加とともに減衰の程度が増加し、その減衰値が1~65dB/kmになるという結果が報告されている⁷⁾。これらから、同日測定ではないが、地点Aと地点Bの音圧レベルの差は、距離減衰に気温、風および空気吸収による超過減衰が生じて大きな差となったと考えられる。

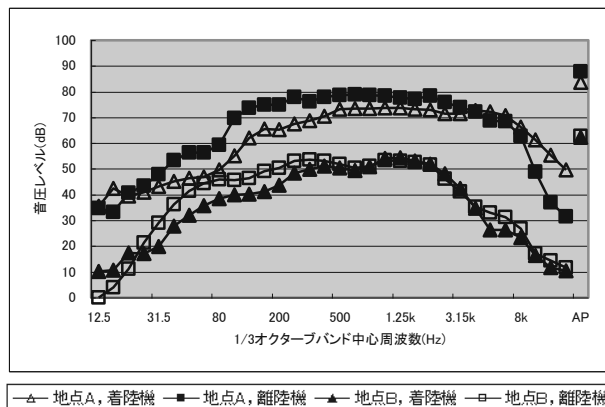


図11 航空機騒音の周波数分析

まとめ

富士山静岡空港に離発着する航空機から発生する低周波音について、滑走路中心から南東約2.4kmの飛行直下である地点Aと空港の北東約1kmの地点Bにおける受音状況は次のとおりであった。

- 1) 低周波音の周波数特性として、着陸機は各機により異なる傾向を示したが、離陸機は40Hz付近に卓越周波数が見受けられた。
- 2) 20Hz以下の超低周波音域で音圧レベルが総体的に高い傾向を示したが、風雑音によるものと推察された。
- 3) 航空機から発生する低周波音は、構成する波長が長いいため空気吸収による影響が少なく、距離減衰と気象条件による影響が支配的であることが示唆された。

文 献

- 1) 環境省環境管理局大気生活環境室：低周波音問題の手引書，平成 16 年 6 月
- 2) 環境庁大気保全局：低周波音の測定方法に関するマニュアル，平成 12 年 10 月
- 3) 環境庁：航空機騒音に係る環境基準について，昭和 48 年 12 月 27 日，環境庁告示第 154 号
- 4) 環境庁大気保全局：航空機騒音監視測定マニュアル，昭和 63 年 7 月
- 5) 石橋雅之他：航空機から発生する低周波音について，千葉県環境研究センター年報第 4 号，Vol. 4, pp84-85, 2004
- 6) 吉久光一：音の長距離伝搬に関する実験的研究，騒音制御，Vol. 28, No. 4, pp224-231, 2004
- 7) 吉久光一他：音の長距離伝搬に及ぼす空気の音響吸収の影響－一年間の気象観測データを用いた検討－，騒音制御，Vol. 28, No. 4, pp256-263, 2004

富士山における大気汚染物質とブナ林の生育状況の関係について

大気・水質部 大気・騒音環境スタッフ 中西隆之, 太田良和弘, 石井聖

Effects of Air Pollutants to the Growth of the Beech Forest in Mt. Fuji

Takayuki NAKANISHI, Kazuhiro OHTARA and Satoru ISHII

全国的なブナ林の衰退が報告されており、ブナ林衰退の一因としてオゾンをはじめとした大気汚染物質の影響が指摘されている。富士山のブナ林において大気環境を調査したところ、二酸化硫黄、一酸化窒素、二酸化窒素および窒素酸化物は周辺市街地に比べ低濃度であったが、オゾン濃度は周辺市街地と同程度であり、ブナの衰退の一因となる可能性があった。

また、大気環境調査と並行して、ブナの個体別に複数回にわたり目視衰退度調査や葉緑素量調査を実施することで、ブナ個体の衰退の進行状況や大気環境に対する感受性を推察できる可能性があることがわかった。

Key words: ブナ林, 富士山, オゾン, 大気汚染物質
 Beech Forest, Mt. Fuji, Ozone, Air Pollutants

はじめに

ブナ林は、わが国の冷温帯を代表する森林であり、北海道南部から九州まで広範囲に分布し、自然性の高い極相林として存続している森林も多く、また生物多様性が豊かな森林として保全されている地域も多くある。しかし、最近、丹沢（神奈川県）、富士山（静岡県）、立山（富山県）、英彦山（福岡県）など、図1に示したように全国各地でブナ林の衰退が報告されており¹⁾、静岡県では富士山のほかに函南原生林、天城連山で衰退が確認されている。

ブナ林衰退の原因として、オゾン(O₃)などのガス状大気汚染物質や酸性霧の関与、ブナハバチ等の虫害、台風等の風害、温暖化や少雪化、林床植生の退行等を含めた土壌乾燥化、シカの食害等が指摘されている¹⁾。

しかし、個別要因の衰弱～枯死への寄与度合いや、それらの複合影響については解明されていない。

また、ブナの生育状況を把握する衰退度評価、樹木活性調査、下層植生調査、環境要因等に関する調査方法は衰退地域によって様々であり、これまで全国的な衰退状況の把握、衰退原因の検討はほとんど行われていなかった。このような状況の中、国立環境研究所と



図1 ブナ林の衰退が報告されている地域（黒塗）

地方公共団体環境研究機関の共同研究として「ブナ林衰退地域における総合植生モニタリング手法の開発」が立ち上がり、全国のブナ林域の状況を定量的に解析、比較する手法を検討している。本県も2008年度より共同研究へ参画し、これまでにブナ林衰退状況の評価方法、樹木活性・環境計測調査手法について検討してきた。

今回、同共同研究の一環として実施した富士山ブナ林域と周辺の大気環境調査および樹木活性・生理活性調査の結果について報告する。また、富士山調査地点との比較対象地点として函南原生林で実施した調査結果も併せて報告する。

調査方法

1 調査地点および調査対象木の概要

富士山は円錐形の独立峰で植生は図2に示すように典型的な垂直分布をしており、ブナ林は人工林や二次林とともに標高約 900m~1600mに存在する²⁾。調査は富士山 2 合目標高 1460m地点（富士山スカイライン・登山区間分岐点付近）の国有林内で、ブナの葉が展開する5月から落葉する前の10月にかけて実施した。調査地点ではブナ9本を選定し、富士山スカイラインからの距離により3本ずつA, B, Cの3グループに分類した。調査対象ブナの概要は表1のとおりである。

函南原生林は函南町の北部、箱根外輪山の一つ鞍掛山（標高1004m）の南西斜面に位置し標高860m付近から来光川上流域の標高550m付近に広がり、ブナは標高700m~780mに点在している。調査は原生林内に設置された「学習の道」沿いで実施し、ブナを8本選定し、富士山と同様に5月から10月にかけて調査を行った。各調査地点の位置関係は図3に示すとおりである。

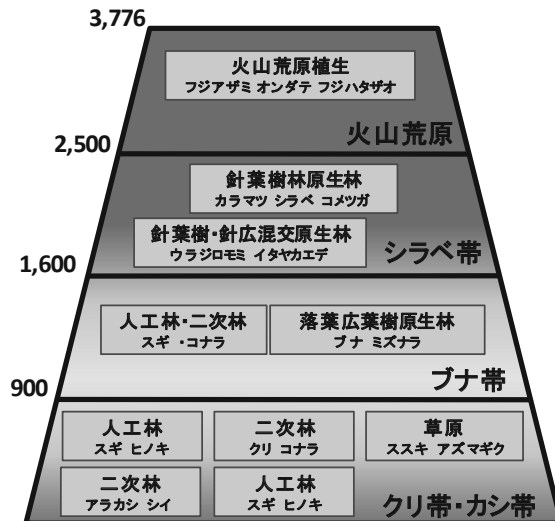


図2 富士山の植生・垂直分布図
静岡県 HP 富士山 100 年プロジェクト 3776 構想より

表1 富士山調査対象ブナの概要

	胸高直径 m	樹高 m	道路からの距離 m
A	①	0.4	15
	②	0.4	15
	③	0.1	6
B	④	0.1	6
	⑤	0.15	8
	⑥	0.07	7
C	⑦	0.2	9
	⑧	0.12	8
	⑨	0.07	7

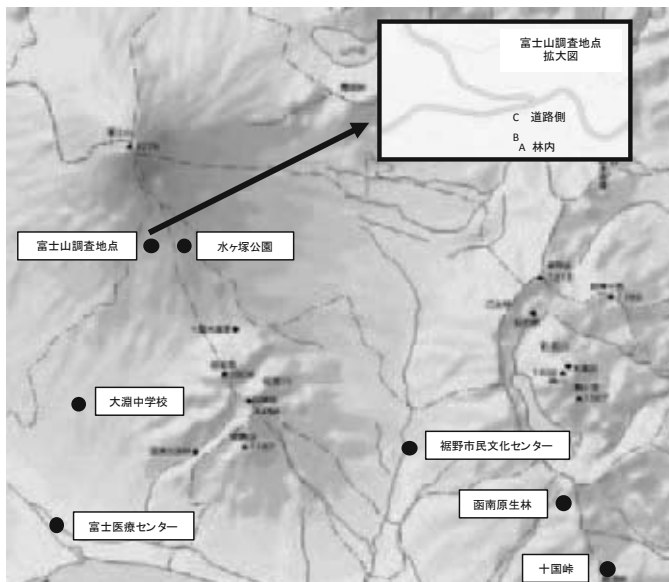


図3 ブナ調査地点および周辺大気環境調査地点

2 大気環境調査・温湿度調査

神奈川県丹沢山では大規模なブナの衰退や枯損が報告されており、これに大気中のO₃が関与している可能性が指摘されている。ブナはO₃に対する感受性が高く、O₃により生長が阻害されることがオープントップチャンパー実験やO₃の曝露実験により明らかにされている³⁻⁵⁾。そこで、富士山のブナ林調査地点においてブナ衰退の要因となり得るO₃濃度や他の大気汚染物質の環境調査を実施し、富士山調査地点におけるブナの生育・衰退状況との関係性について調査した。山間部における大気環境調査は、利用可能な電源の確保が困難なことから、電源が不要なパッシブサンプラー（以下、

サンプラー）を使用した。調査項目はO₃、二酸化硫黄(SO₂)、一酸化窒素(NO)、二酸化窒素(NO₂)および窒素酸化物(NO_x)の5項目とした。大気濃度は、サンプラーを大気中に約1ヶ月間曝露させた後イオンクロマトグラフ（ダイオネクス製 DX-500）で定量した⁶⁾。サンプラーは富士山・函南原生林の調査地点に各2箇所、市街地の大気常時監視測定局（裾野市民文化センター、富士市立大淵中学校）敷地内に設置しサンプリングを実施した。サンプラーを設置するシェルター内には温湿度レコーダー（藤田電機製作所製 WATCH LOGGER KT-200/275）を設置し、調査地点の温度、湿度を1時間毎に計測した。

表 2 プナ目視衰退度判定基準

	樹勢	樹形	枝の生長量	梢端の枯損	枝葉の密度	葉の変形度	葉の大きさ	葉色	葉の障害
0点	旺盛 被害なし	自然の樹形	正常	なし	枝葉 バランス良	正常	正常	正常	健全
1点	被害有るが 目立たない	若干乱れあるが 自然形に近い	少ないが 目立たない	多少あるが 目立たない	枝葉バランス 少し乱れあり	少し変形	少し小さい	少し異常	少しある
2点	明らかに 異常	崩壊かなり進行	短く細い	かなり多い	やや疎	明らかに 変形	明らかに 小さい	異常	明らかに ある
3点	劣悪・回復の 見込無し	完全に 崩壊 奇形化	極端に細い	著しく多い	枯葉多 著しく疎	変形が 著しい	著しく 小さい	著しく異常	著しく 多い
4点	枯死	枯死 枯死寸前	—	枯死	—	—	—	—	—

3 樹木活性・生理活性調査

1) 目視衰退度調査

調査対象ブナの衰退状況を把握するため共同研究内で作成した「ブナ生理活性調査マニュアル」に従い目視衰退度調査を実施した。衰退度は表 2 に示す 9 項目について 4~5 段階で評価した。共同研究開始当初は、調査を葉の展開から落葉の間に 1 回実施していたが、2009 年の調査では 5 月と 10 月の計 2 回実施した。

2) 葉緑素量調査

目視による樹木衰退度の評価は、簡便な方法であるが、精度や客観性に検討の余地がある。一方、葉緑素量により樹木の生理活性を測定する方法は、総合性に欠けるものの精度や定量性の点で有効である可能性がある。そこで、主として作物の栄養診断用に使用されている葉緑素計（コニカミノルタ製 SPAD-502）を用いて、調査対象ブナの葉緑素量（SPAD 値：葉緑素濃度と比例する値）を測定し、ブナの生理活性調査に有効であるか検討した。測定は、調査対象ブナ 1 本につき、太陽光が直接当たる側の枝 3 本を選定し、各枝から 10 枚ずつ、計 30 枚の葉で計測する方法で実施した。葉は、各枝の最大、最小の葉を除外した中程度の大きさの葉をランダムに選定した。

結果

1 調査地点の大気汚染の状況

富士山・函南調査地点の大気環境調査結果と周辺市街地との期間平均値比較を表 3 に、調査地点と周辺市街地の月平均 O₃ 濃度の推移を図 4 に示した。富士山・函南調査地点における SO₂, NO, NO₂ および NO_x 濃度は市街地の約 1/8~約 1/2 以下と非常に低い濃度であった。一方、O₃ 濃度だけは、20ppb~28ppb と、市街地と同程度の汚染が確認された。O₃ 濃度の月平均値は、富士山・函南調査地点では 5 月から 6 月にかけて 30ppb を超える他の月より高い濃度となり、市街地と同様に春季に濃度が高く夏季に低くなる推移傾向を示した。

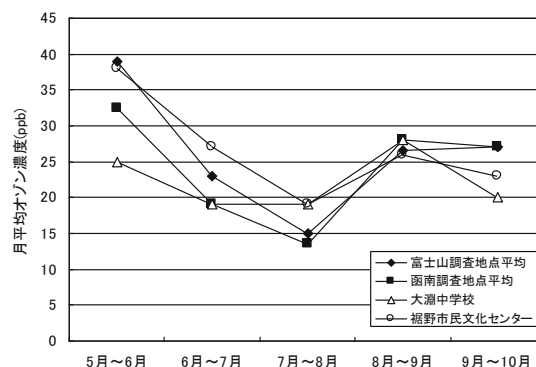


図 4 月平均オゾン濃度の推移

表 3 プナ調査地点の大気環境測定結果と周辺市街地との期間平均値比較（期間 2009. 5. 12~10. 21）

地点	O ₃ ppb	SO ₂ ppb	NO ppb	NO ₂ ppb	NO _x ppb	温度 ℃	湿度 %
富士山・林内(Aグループ横)	25	1	1	3	4	14	87
富士山・道路側(Cグループ横)	27	1	1	3	4	14	87
函南・原生林入口	28	1	2	4	6	18	92
函南・原生林内(大ブナ跡)	20	1	1	4	5	18	83
大淵中学校	22	2	6	16	22	22	68
裾野市民文化センター	27	2	8	18	25	23	66

表 4 ブナ目視衰退度調査結果 (調査員 2 名の平均値)

	樹勢	樹形	枝生長量	梢端の枯損	枝葉密度	葉の変形度	葉の大きさ	葉色	葉障害	平均衰退度
富士山 5 月	1.00	0.72	0.89	0.56	1.44	0.78	1.56	0.44	1.06	0.94
富士山 10 月	1.11	0.83	1.28	1.00	1.44	0.94	0.89	1.00	1.33	1.09
富士山衰退進行度(%)	11	15	44	79	0	21	-43	127	25	16
函南 5 月	1.00	1.13	0.94	0.63	0.69	0.13	0.69	0.38	0.81	0.71
函南 10 月	1.06	1.00	1.13	0.94	1.50	0.25	0.38	0.56	1.25	0.90
函南衰退進行度(%)	6	-12	20	49	117	92	-45	47	54	27

2 富士山・函南調査地点におけるブナの衰退度

5月と10月に実施した目視衰退度調査結果を表4に示す。各項目の衰退度は調査員2名による評価の平均値で示し、平均衰退度は各項目の合計点の平均値とした。衰退進行度は各衰退度を $[(10月/5月) \times 100 - 100]$ (%)として算出した。全調査対象ブナの5月と10月の平均衰退度は0.71~1.09であり、ブナ林全体では軽度の衰退状況であった。項目別には、富士山では「梢端の枯損」「葉色」、函南では「枝葉密度」「葉の変形度」で衰退が大きく進行していた。「葉の大きさ」は5月から10月にかけて葉が成長し衰退度に対して大きなマイナス要因となるため、調査項目としてふさわしくないと考え、以下の考察では「葉の大きさ」の項目は除外した。表1で示した富士山調査地点の調査対象ブナの平均衰退度は図5に示すように、5月と10月の平均衰退度を比較すると、道路から離れているAグループで衰退が進行し、B・Cグループでは調査対象ブナ6本中5本で平均衰退度が1.00を超えていたが調査期間中の平均衰退度の変動は小さかった。

3 葉緑素量(SPAD値)調査結果について

2009年の富士山調査地点と函南調査地点のSPAD値平均値の推移を図6に示す。5月に函南調査地点のSPAD値が富士山調査地点のSPAD値を大きく上回ったが、その後は有意な差は無かった。

富士山調査地点における2008年と2009年の5月から10月のSPAD値平均値の推移を図7に示す。2008年

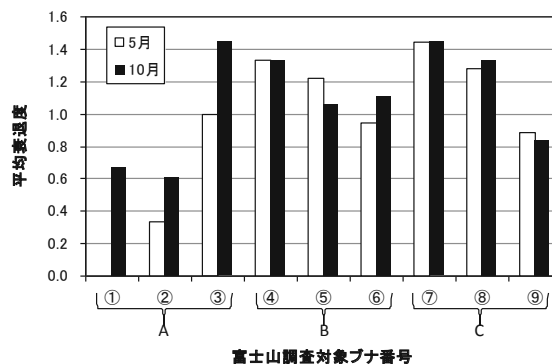


図 5 富士山調査地点 調査対象ブナの平均衰退度

5月調査ではSPAD値に各グループ間の差は見られなかった。その後8月までSPAD値は増加し、10月の調査時にはSPAD値は減少していた。特にAグループのSPAD値はB・Cグループと比較して大きく乖離した。2009年の調査で再現性を確認したところ、AグループのSPAD値は8月調査時をピークに減少し、9月から10月にかけて大きく減少した。

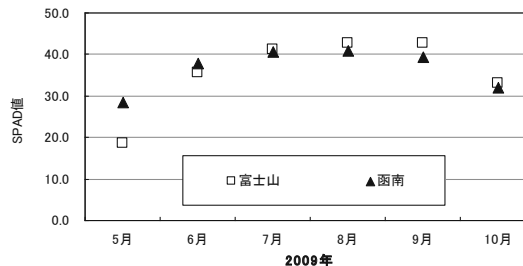


図 6 富士山・函南 SPAD 値経月変化 (2009 年)

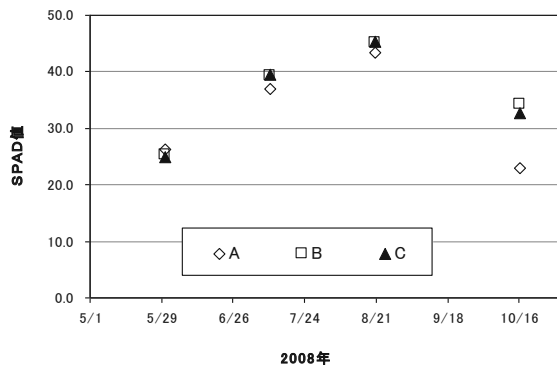
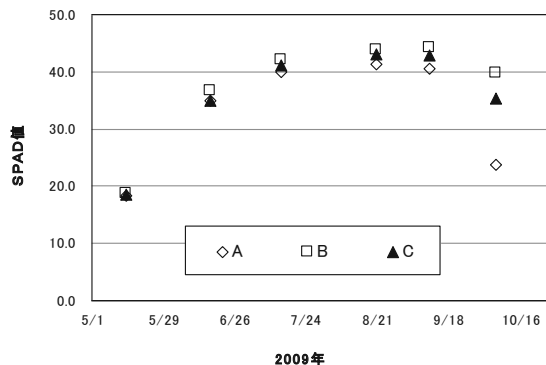


図 7 富士山グループ別 SPAD 値経月変化 (2008 年, 2009 年)



考察

1 調査地点の大気環境について

富士山調査地点(2合目標高1460m)の大気環境は、 O_3 を除き周辺市街地と比較して清浄である。 O_3 は周辺市街地と同程度の濃度を示し、その要因としては、光化学オキシダント(Ox)と反応性の高い NO の濃度が市街地と比較して低いため Ox の分解反応が進行せず高濃度が維持されたことが考えられる⁷⁾。富士山調査地点における Ox の発生については周辺に Ox 発生に関与するような直接的な発生源は存在していないことから、対流圏 O_3 の降下、都市域からの広域的な移流等の複合影響などが考えられるが、それぞれの寄与の度合いについては不明である。

また、今回の調査では O_3 濃度は市街地と同程度であったが、当所で2001年夏季に図3に示した富士山調査地点から東約2kmの富士山水ヶ塚において実施した大気環境調査では、 Ox 濃度が日平均で50ppbと周辺市街地と比較して約14ppb高く、時間値では最大140ppbを超える高濃度となる日が観測されており⁸⁾、今後富士山調査地点のブナ林が高濃度の O_3 に曝露される可能性がありブナへの影響が懸念される。

比較調査地点の函南原生林の大気環境は、過去の大気環境モニタリング調査から富士山調査地点と異なる状況が予想されたが、調査した5項目全てで富士山調査地点と差は無かった。周辺市街地との比較においても富士山調査地点と同様に Ox は市街地と同程度の濃度であり、その他の項目は周辺市街地と比べ低い濃度であった。1995年に図3に示した函南原生林の南東に位置する十国峠で実施した大気環境調査では、 Ox の日平均値が43ppbと周辺市街地より約15ppb高く、1時間値では150ppbを超過する高濃度が観測されることもあったことから、富士山調査地点と同様に、今後高濃度の O_3 に曝露される可能性がある⁹⁾。

2 ブナの生育状況と大気環境について

目視衰退度調査結果から富士山調査地点のブナは軽度の衰退状況にあることが示された。衰退の進行状況については図5に示したとおり、5月から10月の6ヶ月間の調査期間中にAグループで衰退が進行する傾向が見られた。表8に示したとおりAグループは他のグループに比べ「葉」に関する項目の衰退が進行しており、このことがAグループの平均衰退度を増加させた要因になったと考えられる。また、図7に示したSPAD値の調査結果からも、Aグループの葉が他のグループよりも被害を受けていたことが推察される。被害の例として図8(写真)に葉に生じた斑点の様子を示す。Aグル

ープの葉が他のグループに比べて被害を受けた原因については、樹齢や日照の状況など様々な要因が考えられるが、ブナ苗への O_3 の人工的な曝露実験では、 O_3 がブナ苗のSPAD値を低下させることがわかっており^{3, 4)}、また、武田らが神奈川県丹沢山地で行ったオープントップチャンバー実験では環境中の O_3 を除去した場合に、除去しない場合に比べてブナの黄葉、落葉が早まり、葉のSPAD値が有意に低下した⁵⁾ことから O_3 による影響が一因として考えられる。今回の調査では表3に示したとおりグループ間の大気環境に差が無かったことから、Aグループの O_3 に対する抵抗力が低下していたことが、葉の被害を促進させ、SPAD値の低下へ繋がったことが推察される。 O_3 に対する抵抗力を低下させる要因としては、土壤の乾燥などによる水分ストレスの影響、ブナハバチによる食害やこれらの複合影響の関与が指摘されている¹⁰⁾。今後は、引き続き O_3 を中心とした大気環境調査を継続し、ブナの衰退との因果関係が指摘されている水分ストレス等の調査手法について検討していくことが課題である。

表8 「葉」に関する衰退度・富士山グループ別比較

項目	グループ	5月	10月	衰退進行度(%)
葉の変形度	A	0.17	0.67	300
	B	1.00	1.33	33
	C	1.17	0.83	-29
葉色	A	0.17	1.50	800
	B	0.50	0.50	0
	C	0.67	1.00	50
葉障害 (斑点など)	A	0.67	1.00	50
	B	1.00	1.33	33
	C	1.50	1.67	11



図8 ブナの葉に生じた斑点の様子

3 樹木活性調査(目視衰退度調査)の有効性

共同研究の開始当初、目視衰退度調査はブナの葉が展開してから落葉するまでに1回実施することとされていたが、SPAD値と衰退度に関連性が見出せなかったことから2009年より調査開始時と終了前の2回実施することが提案された。今回、調査期間中に2回実施することにより、葉に生じた衰退の傾向を確認することができた。今後は、調査員間の評価のバラツキを抑えるために詳細な判定基準を考察していくことが課題である。

4 生理活性調査(葉緑素量調査)の有効性

先に述べたように、葉緑素計によるSPAD値の測定結果は、葉の被害状況を調査するにあたり有効である。

単一木のSPAD値測定ではSPAD値の増減を判断できないに過ぎないが、調査する対象木を増やし、周辺の大気環境調査や目視衰退度調査と組み合わせることにより、衰退の進行状況や大気汚染物質への感受性の推察に利用することができる可能性がある。

まとめ

富士山のブナ林域において、ブナ林およびその周辺の大気環境調査、樹木活性・環境計測手法の検討を行い、以下の結果を得た。

- 1 富士山調査地点および周辺市街地の大気環境を調査した結果、 O_3 の期間平均値は周辺市街地と同程度の濃度であり、 SO_2 、 NO 、 NO_2 および NO_x は周辺市街地に比べ低い濃度であった。この傾向は函南調査地点でも確認された。
- 2 今回調査した富士山調査地点、函南調査地点のブナの衰退状況は軽度である。
- 3 富士山調査地点のブナは衰退の進行に個体差が見られた。また、林内に位置する個体では半年間の調査期間中に「葉」の衰退が大きく進行していた。
- 4 目視衰退度調査は従来、葉の展開後から落葉前に1度の実施であったが、複数回実施することで葉に生じた衰退状況を把握できる。
- 5 SPAD値測定は大気環境調査や目視衰退度調査と組み合わせ、複数木で実施することにより衰退の進行状況や大気汚染物質への感受性を推察することができる。

謝辞

本研究を実施するにあたり、調査地点の提供に御尽力いただいた静岡森林管理署、箱根山禁伐林組合、富

士市役所環境保全課ならびに静岡県東部農林事務所の関係者の皆様に深謝いたします。

文献

- 1) 清水英幸:「ブナ林衰退地域における総合植生モニタリング手法の開発」に関する共同研究の推進について、「ブナ林域総合植生モニタリング」第3回ワークショップ, 5-6 (2009)
- 2) <http://www.pref.shizuoka.jp/kankyoku/ka-070/fujisanpage/100/3776project.htm>
- 3) 武田麻由子:丹沢山地の大気中オゾンがブナ苗に及ぼす影響, 大気環境学会誌, **50**(2), 107-117 (2007)
- 4) 河野吉久:樹木に及ぼす酸性物質の長期慢性影響評価に関する研究, 大気環境学会誌, **36**(2), 47-59 (2001)
- 5) 伊豆田猛:樹木に対するオゾンの影響に関する実験的研究, 大気環境学会誌, **36**(2), 60-77 (2001)
- 6) 中西隆之:N式パッシブサンプラーによる簡易大気汚染測定手法の実用化の検討, 静岡県環境衛生科学研究所報告, **51**, 87-92 (2008)
- 7) 篠原英二郎: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) 太田良和弘:富士山の環境保全のための総合調査, 静岡県環境衛生科学研究所報告, **44**, 75-79 (2001)
- 9) 太田良和弘:函南地区の大気環境及び函南原生林について、「ブナ林域総合植生モニタリング」第3回ワークショップ, 19-20 (2009)
- 10) 山根正伸:ブナ林の衰退機構と再生の方向, 平成13~18年度丹沢山地のブナ林衰退機構の解明に関する研究報告書, 104-111

富士山静岡空港開港に伴う大気環境影響に関する研究（第1報）

—大気汚染物質および揮発性有機化合物の実態調査—

大気・水質部 大気・騒音環境スタッフ 太田良和弘, 中西隆之, 石井 聖

Study of the Environmental Air in the Area of Mt.Fuji Shizuoka Airport(I)
—Measurements of Air Pollutants and Volatile Organic Compounds—

Kazuhiro OHTARA, Takayuki NAKANISHI and Satoru ISHII

2009年6月に開港した富士山静岡空港および周辺地域で、空港開港に伴う大気環境への影響を実態把握することを目的として、大気環境測定車等により大気環境調査を行った結果、調査地域内の大気環境の状況は低い濃度レベルで推移し、光化学オキシダント（Ox）を除き環境基準を達成していた。

島田市金谷のOxと非メタン炭化水素の濃度レベルは、近隣の常時監視局と比較して高い状況であったが、その他の項目は同等かまたは低い濃度レベルであった。

空港開港前後の大気環境状況は、二酸化窒素、二酸化硫黄、ジクロロメタン、トリクロロエチレンの環境基準制定項目やエチルベンゼン、キシレン等の芳香族系VOCsの濃度減少がみられたのに対し、塩化ビニルモノマー、1,3-ブタジエン、アクリロニトリルのように優先取組物質で顕著に増加傾向を示したものがみられた。

パッシブサンプラーにより空港および周辺地域の7地点で調査した結果、空港では窒素酸化物の濃度レベルが比較的高い状況であったが、Oxについてはむしろ空港より離れた地点の濃度レベルが高かった。

Key words: 富士山静岡空港, 光化学オキシダント (Ox), 揮発性有機化合物 (VOCs)

Mt.Fuji Shizuoka Airport, Photochemical Oxidant, Volatile Organic Compounds (VOCs)

はじめに

静岡県では、国内遠隔地や近隣アジア諸国との新たな交流の発展を牽引する基盤として、牧之原市と島田市にまたがる地方管理空港「富士山静岡空港」を2009年6月4日に開港した。空港開港においては、自然環境の変化、大気汚染、騒音・振動等の生活環境の変化、生態系への影響等が懸念されることから、1988年から大気環境および環境騒音等の事前調査が開始され、1995年に環境影響評価書¹⁾の公告を経て空港建設工事が着手された。また、2004～2006年の延べ1年間をかけて富士山静岡空港の建設地周辺地域において開港直前の大気環境および環境騒音の事前調査を行った²⁾。今回、空港の開港により空港周辺環境の状況が大きく

変化することが想定されるため、大気環境測定車等による大気環境調査を実施し、空港開港に伴う大気環境への影響を実態調査したので報告する。

調査方法

1 調査地点

富士山静岡空港と周辺の交通整備状況の概要を図1



図1 富士山静岡空港建設地位置図

出典：静岡空港リーフレット（静岡県空港建設局）

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)



図 2 環境調査地点位置図

表 1 調査地点一覧

地点記号	調査地点名	距離 ^{*1}	標高(m)	調査項目
①	空港駐車場	0	170	N式 ^{*2} (SO _x 、NO _x 、O _x)、VOCs ^{*3}
②	島田市下湯日(旧ビジターセンター)	0.7	80	N式(SO _x 、NO _x 、O _x)、VOCs
③	牧之原市坂口(空港榛原連絡事務所)	0.7	80	N式(SO _x 、NO _x 、O _x)、VOCs
④	牧之原市坂部(坂部区民センター)	3	20	N式(SO _x 、NO _x 、O _x)、VOCs
⑤	島田市南原(南原公民館)	3.6	30	N式(SO _x 、NO _x 、O _x)、VOCs
⑥	島田市猪土居(民有地)	4.2	200	N式(SO _x 、NO _x 、O _x)、VOCs
A	島田市金谷(お茶の郷博物館)	4.6	200	大気測定車 ^{*4} (全項目)、N式、VOCs
B	吉田町片岡(吉田町郷土資料館)	6.1	20	O ₃
C	島田市初倉(初倉小学校)	3.8	40	SO ₂ 、O ₃

* 1: 距離は①空港駐車場からの直線距離(km)

* 2: N式は簡易測定法による硫黄酸化物、窒素酸化物、オゾンの調査器具

* 3: VOCsはベンゼン等、主に発ガン性を示す揮発性有機化合物

* 4: 大気測定車、SO₂、O₃は自動測定器を利用した公定法の測定

に示す。次に、環境調査実施地点の概要を図 2 および表 1 に示す。なお、調査地域周辺の大気環境については、大気常時監視測定データを比較参照した。

各測定地点と空港からの位置関係は表 1 に示すとおりで、各地点毎に半径 1km 以内に存在する主要な環境負荷は以下のとおりである。

地点①の空港駐車場は、ターミナルエプロン東端の消防庁舎駐車場で主滑走路からの距離 250m、空港に出入りする全ての車両が走行するターミナル周回道路から 40m 程度の距離に位置するが、直近には通常一般車両の出入りはない。

地点②の下湯日は、空港アクセス道路の島田ルートに沿って位置する。

地点③の坂口は、空港アクセス道路の榛原・吉田 IC ルートの沿線に位置する。

地点④の坂部は、北 200m に空港アクセス道路の榛原・吉田 IC ルートがあり、航空機の離陸経路の直下に位置する。

地点⑤の南原は、南東 850m に東名高速道路、南 650m に公営クリーンセンターが位置している。

地点⑥の猪土居は、空港アクセス道路の牧之原・金谷ルートと国道 473 号線および同バイパスの交差点近傍に位置する。

地点 A の金谷は、100m へだてて北西から南東を周回するように国道 473 号線が通過し、航空機の進入経路の直下に位置する。O_x 発令区分は島田・志太地区に該

当し、島田市役所測定局、焼津市役所測定局、藤枝市大気測定局が地域代表性を担っている。

地点Bの吉田は、南東500mに国道150号線が通過し、航空機の進入経路の直下に位置する。Ox発令区分は榛原地区に該当し、牧之原市役所測定局が地域代表性を担っている。

地点Cの初倉は、南50mに県道島田榛原線が通過し、航空機の進入経路の直下に位置する。Ox発令区分は島田・志太地区に該当している。二酸化硫黄(SO₂)の常時監視を行う測定局であるが、今回、春～秋期のみ臨時にOx計を設置した。

2 調査期間

調査期間の概要を表2に示す。調査期間については、大気環境が季節により異なることが予想されるため四季毎に調査した。

3 調査項目

調査項目の概要を表3に示す。大気試料の採取は、大気環境測定車については地上高4m、その他の地点では原則地上高3mに統一した。

大気環境測定車等の自動測定器での1時間値連続測定以外に、N式パンプサンプラーによる長期間暴露採取³⁾により期間平均濃度を求めた。

VOCsについては、公定法で定められている年平均値の算出方法(年12回の24時間採取・分析)と統計的に近似できる年4回の1週間平均化採取法^{4) 5)}により年平均値を求めた。

調査結果および考察

1 大気環境濃度

大気環境測定車等の公定法(自動測定器)による大気環境調査結果および周辺常時監視測定局の結果を表4に、VOCs調査結果を表5に示す。

(1) 自動測定器による環境基準等の適否判定

地点A金谷は各項目とも低い濃度水準で推移し、Oxを除き全ての項目で環境基準未満であった。Oxの時間最高値は91ppbで注意報発令レベルまでには至らなかった。

地点B吉田はOxが環境基準超過であったが、時間最高値は81ppbで注意報発令レベルまでには至らなかった。

地点C初倉はOxが環境基準超過であったが、時間最高値は86ppbで注意報発令レベルまでには至らなかった。他地点と比較してSO₂濃度が高いのが特徴的で、事前調査と同様の傾向であった²⁾。

表2 調査期間概要(2009年度)

地点	項目	春 (空港開港後)		夏		秋	冬	
		I	II(繁忙期)	I	II(繁忙期)			
A, ①~⑥	N式	6/22~7/23	7/23~8/12	8/12~8/19	9/18~10/9	12/9~12/28	12/28~1/4	
A	測定車	6/10~7/22	7/23~8/31	9/1~10/9	12/9~1/4	-		
B, C	O ₃	-	-	8/13~8/19	-	-	12/29~1/4	
①	測定車(空港部)	6/22~29	8/14~8/21	8/12~8/19	10/2~10/9	-	12/28~1/4	
A	VOCs	6/22~29	8/14~8/21	8/12~8/19	10/2~10/9	-	12/28~1/4	
①		6/15~22	-	8/14~8/21	10/2~10/9	-	12/28~1/4	
②		6/15~22	-	8/7~8/14	10/2~10/9	-	12/28~1/4	
③, ④		6/15~22	-	8/7~8/14	10/2~10/9	-	12/28~1/4	
⑤		6/15~22	-	8/7~8/14	10/2~10/9	-	12/28~1/4	
⑥		6/22~29	-	8/10~8/17	10/2~10/9	-	12/28~1/4	

表3 調査項目概要

調査項目	略号	測定方法	測定頻度	
二酸化硫黄	SO ₂	紫外線蛍光法(JIS B7952)	毎時間連続測定	
浮遊粒子状物質	SPM	β線吸収法(JIS B7954)		
オキシダント	Ox	紫外線吸収法(JIS B7957)		
二酸化窒素, 一酸化窒素, 窒素酸化物NO ₂ , NO, NO _x		化学発光法(JIS B7953)		
一酸化炭素	CO	NDIR法(JIS B7951)		
非メタン炭化水素, メタン, 全炭化水素	NMHC, CH ₄ , THC	水素炎イオン化検出法(JIS B 7956)		
風向, 風速	WD, WS	風車型パルス式(気象業務法)		
N式サンプラー	N式	暴露採取-溶媒抽出-IC法		2~4週間
揮発性有機化合物	VOCs	容器減圧採取-GCMS法		7日間

表 4 静岡空港周辺大気環境調査結果（春～秋期：2009.6.10～10.9，冬期：2009.12.9～2010.1.4）

地点	項目	Ox* ¹ ppb	NO ppb	NO ₂ ppb	NO _x ppb	SO ₂ ppb	CO ppm	SPM μg/m ₃	NMHC ppmC
A金谷	平均値	27	3	8	11	1	0.3	16	0.15
	日平均最高値	52	15	17	29	5	0.4	66	0.25
	時間最高値	91←	57	31	67	22	0.7	112	0.40
【事前調査】	過去平均値* ²	25	4	14	18	5	0.3	25	0.10
	日平均最高値	67	13	26	38	12	0.6	51	0.30
	時間最高値	129←	76	47	110	19	1.0	85	1.16
B吉田	平均値	23	—	—	—	—	—	—	—
	日平均最高値	49	—	—	—	—	—	—	—
	時間最高値	81←	—	—	—	—	—	—	—
C初倉	平均値	25	—	—	—	5	—	—	—
	日平均最高値	28	—	—	—	20	—	—	—
	時間最高値	86←	—	—	—	67	—	—	—
	過去平均値	—	—	—	—	9	—	—	—
島田市役所	平均値	25	5	12	17	2	—	23	0.09
	日平均最高値	52	34	29	63	7	—	61	0.22
	時間最高値	89←	148	44	182	42	—	99	1.00
	過去平均値	32	—	—	—	17	—	46	0.30
牧之原市役所	平均値	25	3	12	15	—	—	—	—
	日平均最高値	49	14	25	35	—	—	—	—
	時間最高値	79←	71	47	100	—	—	—	—
	過去平均値	27	11	18	28	—	—	—	—

注)環境基準等を超過した項目は ← を付記した

*1:Oxについては春～秋期の期間を対象とした

*2:過去平均値の調査期間【春～秋期:2006.5.10～10.5, 冬期:2006.1.11～2.10】

(2) VOCs 環境基準等の適否判定

VOCs については全ての項目について環境基準値等より低い濃度レベルであった。地点①空港では p-ジクロロベンゼンやブタン等，他地点より高濃度となる物質がみられた。一方，地点④南原ではジクロロメタンおよび地点⑤坂部のトルエン等，周辺事業場等の影響と想定される高濃度な物質がみられ，地域性を反映した結果が得られた。

2 空港開港前後の濃度推移

地点 A 金谷における事前調査結果と今回の大気環境調査の結果を表 4 に，期間平均値の濃度相対較差を図 3 に示す。また，事前調査と今回の VOCs の年平均値の濃度相対較差を図 4 に示す。なお，濃度相対較差は現在と過去の結果の差分を平均値で除し百分率で表したもので，正の値が濃度上昇，負の値が濃度低下を示す。有害大気汚染物質測定方法マニュアルによる判定基準を参考に，相対較差 30%以上を有意な較差と判定した。

空港開港前後の濃度推移は，NO₂，SO₂および SPM に明確な減少傾向が確認された。一方，増加傾向が明確に確認されたのは NMHC のみであった。周辺測定局の過去と現在の平均値を比較すると，Ox で 2～7ppb，NO で 8ppb，NO₂ で 6ppb，SO₂ で 4～15ppb，SPM で 23 μg/m³

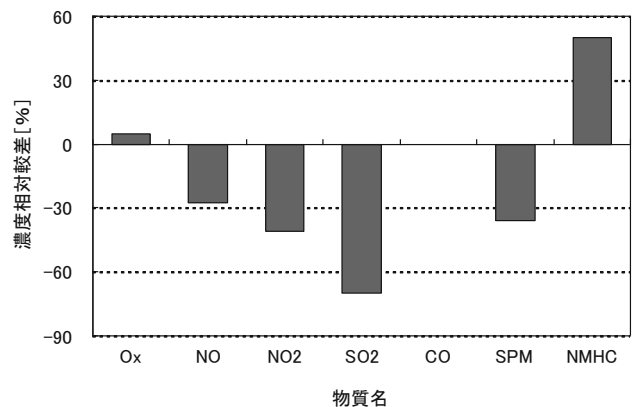


図 3 空港開港前後の濃度相対較差 (A 金谷)

の濃度低下がみられている。このことから，空港開港後の NO_x，SO₂ の濃度低下は周辺測定局と同様に燃料改質等の環境負荷の低減の効果によるものと考えられる。一方，Ox，SPM，NMHC の濃度推移は周辺測定局の濃度低下の傾向と異なることから，空港開港に伴う環境負荷の影響を受けたと想定される。

VOCs については物質により傾向が異なるが，ジクロロメタン，トリクロロエチレン (TCE) のような環境基準制定項目やエチルベンゼン，キシレン等の芳香族系 VOCs の濃度減少がみられた一方，塩化ビニルモノマー，

表 5 静岡空港周辺 VOCs 調査結果

単位：μg/m³

項目	①空港	②下湯日	③坂口	④坂部	⑤南原	⑥獅土居	A 金谷	基準値等
塩化ビニルモノマー	0.031 0.014* ~ 0.049	0.028 0.014* ~ 0.057	0.024 0.012* ~ 0.053	0.031 0.020 ~ 0.047	0.027 0.013* ~ 0.054	0.031 0.011* ~ 0.058	0.031 0.013* ~ 0.058	10 G
1,3-ブタジエン	0.075 0.050 ~ 0.10	0.043 0.033 ~ 0.051	0.051 0.034 ~ 0.081	0.069 0.039 ~ 0.11	0.081 0.060 ~ 0.096	0.052 0.039 ~ 0.058	0.053 0.037 ~ 0.069	2.5 G
アクリロニトリル	0.048 0.040 ~ 0.060	0.052 0.037* ~ 0.075	0.044 0.025* ~ 0.078	0.069 0.039 ~ 0.092	0.051 0.043 ~ 0.059	0.041 0.034* ~ 0.049	0.064 0.042* ~ 0.10	2 G
ジクロロメタン	0.74 0.40 ~ 1.1	0.66 0.38 ~ 0.90	0.63 0.38 ~ 0.85	1.7 0.87 ~ 2.8	0.74 0.39 ~ 0.96	0.70 0.39 ~ 1.0	0.69 0.39 ~ 0.97	150 S
クロロホルム	0.44 0.08 ~ 0.94	0.16 0.067 ~ 0.27	0.18 0.069 ~ 0.34	0.22 0.077 ~ 0.31	0.20 0.068 ~ 0.35	0.11 0.067 ~ 0.13	0.15 0.079 ~ 0.22	18 G
1,2-ジクロロエタン	0.11 0.064 ~ 0.15	0.11 0.067 ~ 0.19	0.10 0.063 ~ 0.18	0.11 0.074 ~ 0.19	0.11 0.067 ~ 0.19	0.10 0.062 ~ 0.15	0.11 0.061 ~ 0.18	1.6 G
ベンゼン	0.75 0.60 ~ 1.1	0.69 0.54 ~ 1.0	0.64 0.47 ~ 1.0	0.73 0.49 ~ 1.0	0.85 0.71 ~ 1.1	0.78 0.56 ~ 1.2	0.71 0.55 ~ 1.10	3 S
トリクロロエチレン	0.11 0.045* ~ 0.21	0.10 0.030* ~ 0.21	0.10 0.043 ~ 0.21	0.12 0.048 ~ 0.25	0.11 0.041* ~ 0.22	0.10 0.045 ~ 0.22	0.10 0.046* ~ 0.20	200 S
テトラクロロエチレン	0.075 0.050 ~ 0.091	0.073 0.060* ~ 0.091	0.070 0.056* ~ 0.084	0.091 0.067 ~ 0.12	0.074 0.038* ~ 0.099	0.066 0.041* ~ 0.088	0.080 0.065 ~ 0.096	200 S
エチルベンゼン	0.70 0.25 ~ 1.0	0.48 0.20 ~ 0.74	0.41 0.18 ~ 0.66	0.65 0.25 ~ 1.2	0.67 0.37 ~ 0.91	0.62 0.24 ~ 1.1	0.54 0.22 ~ 0.81	-
総キシレン	1.1 0.49 ~ 1.6	0.68 0.37 ~ 0.94	0.58 0.27 ~ 0.98	0.86 0.43 ~ 1.2	1.3 0.66 ~ 1.9	1.1 0.42 ~ 2.5	0.82 0.40 ~ 1.2	870 W
p-ジクロロベンゼン	1.8 0.14 ~ 5.8	0.62 0.076 ~ 1.1	0.67 0.061 ~ 1.7	0.97 0.17 ~ 1.9	1.0 0.082 ~ 1.8	0.42 0.064 ~ 0.64	0.85 0.28 ~ 1.4	-
スチレン	0.20 0.076 ~ 0.28	0.15 0.035 ~ 0.22	0.20 0.056 ~ 0.46	0.28 0.056 ~ 0.44	0.27 0.10 ~ 0.44	0.12 0.079 ~ 0.15	0.20 0.060 ~ 0.29	260 W
トルエン	3.6 1.3 ~ 5.5	0.5 0.20 ~ 0.74	3.3 0.94 ~ 5.8	5.3 1.2 ~ 7.8	7.7 1.8 ~ 15	3.5 1.3 ~ 6.0	5.2 1.2 ~ 8.6	260 W
イソブタン	5.7 1.0 ~ 11	0.68 0.37 ~ 0.94	0.80 0.64 ~ 0.91	1.1 0.95 ~ 1.4	1.2 0.99 ~ 1.4	1.0 0.91 ~ 1.2	0.80 0.76 ~ 0.87	-
ブタン	11 1.6 ~ 22	0.62 0.076 ~ 1.1	1.4 1.1 ~ 1.5	1.9 1.6 ~ 2.5	2.1 1.6 ~ 2.6	1.7 1.4 ~ 2.3	1.4 1.2 ~ 1.5	-
ペンタン	1.1 0.82 ~ 1.4	0.15 0.035 ~ 0.22	0.68 0.49 ~ 0.80	0.89 0.78 ~ 1.0	1.2 0.94 ~ 1.6	1.1 0.78 ~ 1.7	0.74 0.68 ~ 0.86	-
ヘキサン	0.73 0.45 ~ 0.94	0.61 0.40 ~ 0.78	0.57 0.39 ~ 0.90	0.74 0.42 ~ 0.92	0.88 0.53 ~ 1.1	0.69 0.46 ~ 1.2	0.55 0.37 ~ 0.75	-
トリメチルベンゼン	0.56 0.27 ~ 0.72	0.40 0.20 ~ 0.52	0.38 0.23 ~ 0.60	0.52 0.20 ~ 0.71	0.79 0.41 ~ 1.1	0.60 0.30 ~ 1.2	0.48 0.27 ~ 0.63	-
ウンデカン	4.2 0.16 ~ 12	0.87 0.13 ~ 2.0	0.73 0.13 ~ 2.1	1.0 0.14 ~ 2.4	1.2 0.19 ~ 2.6	0.97 0.15 ~ 2.4	1.1 0.20 ~ 2.3	-

注1) 上段に平均値を下段に濃度範囲を示した。

注2)*: 定量下限値未満 (数値は実測値を参考値として示し、平均値の算出にも採用した)

注3) S: 環境基準項目, G: 環境指針項目, W: WHO欧州地域事務局のガイドライン値 (参考基準値)

1,3-ブタジエン、アクリロニトリルのように優先取組物質で顕著に増加傾向を示したのもみられた。増加物質で航空機および自動車から排出が予想されるのは1,3-ブタジエンであるが、その他の物質については原因不明である。

3 空港周辺地域の測定地点毎の比較

N式パッシブサンプラーによる調査結果およびVOCsの中で最も濃度が高いトルエンの測定地点毎の季節別相対濃度を図5に示す。なお、図中の地点は、①空港を中心として北西方向を左側に、南東方向を右側に配列した。

地点①空港ではNOの濃度レベルが比較的高い状況であったが、空港に距離が近い地点②および地点③は空港が高濃度を示したにもかかわらず低濃度であり、空港本体からの環境負荷は深刻な状況ではないと想定された。いっぽう空港から距離が離れた地点⑥のNOx

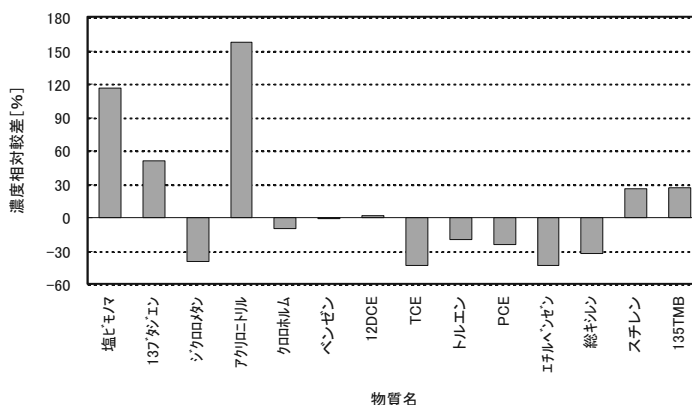


図4 空港開港前後のVOCs濃度相対較差 (A 金谷)

のようにアクセス道路からの環境負荷等により濃度レベルが高いと想定されるものや、地点⑤のトルエンのように近隣の固定発生源からの環境負荷等により濃度レベルが高いと想定されるものがみられた。

0x については他の項目と異なり空港より離れた地点の濃度レベルが高かった。一般的に NOx 濃度の高い地点は、分解反応により 0x 濃度が低下するためこのような傾向がみられたと考えられる。しかし NOx 濃度と完全に負の関係となっているわけではなく、VOCs 濃度との関係や標高等地形的な影響も想定されるため、今後は大気拡散モデルにより詳細な環境影響評価を行い実測値を検証し、空港からの周辺大気環境への影響を推計する手法を確立し行政施策に役立てる。

まとめ

2009年6月に開港した富士山静岡空港および周辺地域で、空港開港に供なう大気環境への影響を実態把握することを目的として、大気環境測定車等により大気環境調査を行った結果、調査地域内の大気環境の状況は低い濃度レベルで推移し、0x を除き環境基準を達成していた。

空港開港前後の大気環境状況は、NO₂、SO₂、ジクロロメタン、トリクロロエチレンの環境基準制定項目やエチルベンゼン、キシレン等の芳香族系 VOCs の濃度減少がみられたのに対し、塩化ビニルモノマー、1,3-ブタジエン、アクリロニトリルのように優先取組物質で顕著に増加傾向を示したものがみられた。

今後は大気拡散モデルにより詳細な環境影響評価を行い実測値を検証し、空港からの周辺大気環境への影響を推計する手法を確立し行政施策に役立てる。

謝辞

本研究を実施するにあたり、調査地点の選定や調査場所の提供等に御尽力いただいた関係各市の環境保全担当部署、島田市初倉小学校ならびに県空港関係部署の皆様に深謝いたします。

文献

- 1) 静岡県：静岡空港整備事業に係る環境影響評価書 1995年1月、静岡(1995)
- 2) 太田良和弘：富士山静岡空港環境事前調査について、静岡県環境衛生科学研究所報告，49, 103-108(2006)
- 3) 中西隆之：N式パッシブサンプラーを用いた簡易大気汚染測定手法の確立，静岡県環境衛生科学研究所報告，50, 123-128(2007)
- 4) 姫野修司：長時間捕集測定による年間平均濃度の推定精度の向上，大気環境学会誌，38, 67-77 (2003)
- 5) 田子 博：キャニスターを用いた大気中揮発性有機化合物の1週間平均化採取法の検討，環境化学，16, 99-105 (2006)

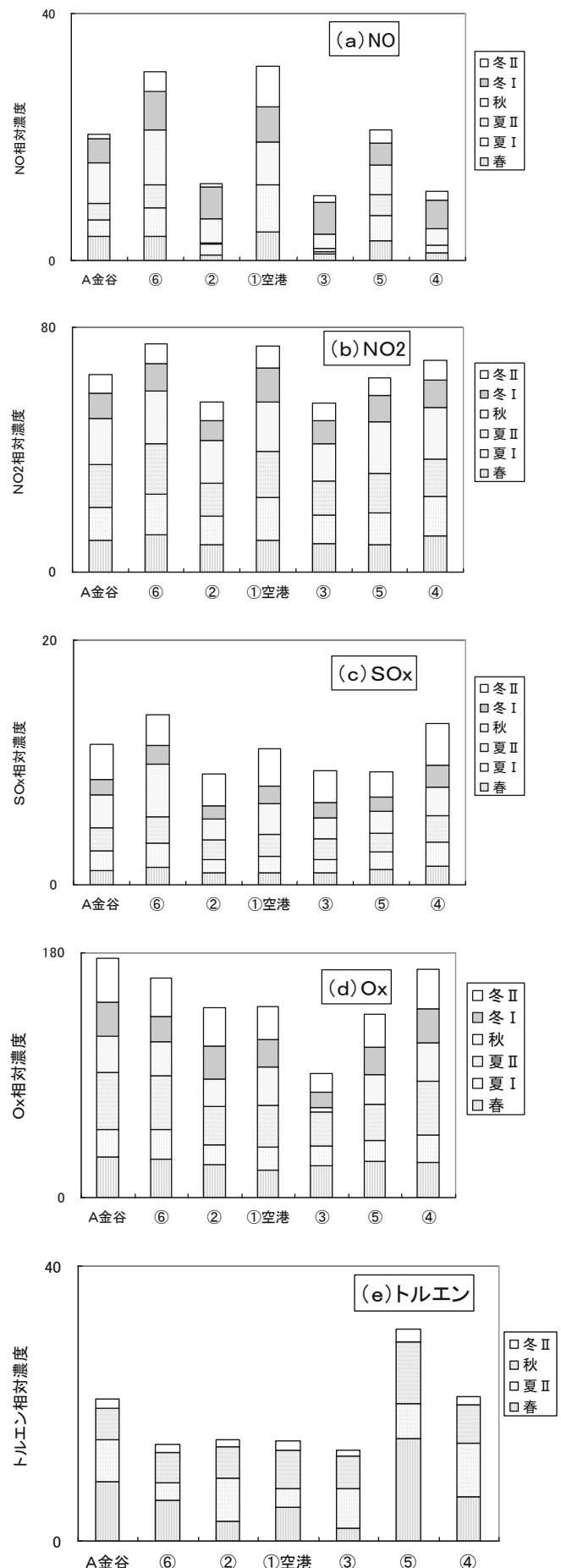


図5 測定地点間の季節別相対濃度

他誌に発表した論文

環境科学部

- 1) 施肥削減が進行する牧之原台地を集水域とした小河川、湧水及び井水の硝酸性窒素濃度の推移

村中康秀

静岡県農林技術研究所報告第2号 17~25 (2009)

茶園が集積した台地とその周辺部の小河川、湧水、井水を長期にわたりモニタリングした。22 河川中 18 河川において地下水の環境基準値である 10mg/L を超過しており、22 河川中 17 河川で有意な硝酸性窒素濃度の減少が認められた。これは茶園での施肥量削減の影響と考えられた。硝酸性窒素流出量には、減少傾向は認められなかった。これは流水量の期間変動が大きいことが一因と考えられた。湧水においても 9 地点中 7 地点で硝酸性窒素濃度の減少傾向が見られた。井水については有意な減少傾向を示した地点は 6 地点中 1 地点のみだった。

- 2) 吸着燃焼式マイクロガスセンサを利用した可搬型ガスクロマトグラフの開発と実環境測定への適用性に関する研究

山下晶平, 久米一成, 豊田和弘, 荘田隆博, 伊東祐介, 植松彰一

大気環境学会誌 第 45 巻第 1 号 1~9(2010)

室内の揮発性有機化合物 (VOCs) の気中濃度を、簡易に現場で測定できる装置の開発を目的として、吸着燃焼式マイクロガスセンサを用いた可搬型ガスクロマトグラフの開発を行った。厚生労働省による VOCs の室内濃度指針値を目安とし、トルエン、*o*-キシレン、スチレンおよび酢酸ブチルに対する試作機の検出特性等を調べた。最終的にフィールド試験として、家具工場および陶芸工房において測定を実施した。測定対象とした室内において主にトルエンが検出され、試作機による測定値と従来法による測定値は、0.02ppm~2ppm 以上の定量範囲においてよく一致した。

微生物部

- 1) サルモネラ属菌による大規模食中毒事例の発生要因について

長岡宏美, 山崎 恵, 高木千佳, 森 健, 飯田卓見, 木村雅芳, 廣井みどり, 川森文彦, 杉山寛治

病原微生物検出情報 Vol. 30 No. 8 207-209 (2009)

2007 年 9 月 18 日, 19 日の両日, 静岡県内の仕出し屋で調整した仕出し弁当を喫食した 9,844 人中 1,148 人が, 9 月 19 日午後 3 時頃より下痢, 腹痛, 発熱, 嘔吐等の症状を呈し, 調査の結果 *Salmonella* Enteritidis による食中毒であることが判明した。

本事件は提供食数の多いことと, 2 日間にわたり患者の発生をみたことから, 患者数 1,000 人を超える 2007 年次最大の食中毒事件となったので, その概要を報告するとともに発生要因について考察した。

- 2) 特集 ウイルス性食中毒について

長岡宏美

平成 21 年静岡県の食中毒 静岡県厚生部監修 78-83

(2010)

ウイルス性食中毒の原因物質として最も代表的なウイルスはノロウイルスであり, 平成 9 年に, 食品を介して感染性胃腸炎を引き起こすウイルスが食中毒起因物質に指定されて以来, ノロウイルスによる食中毒の発生件数や患者数は原因物質中の常に上位を占めている。その他のウイルスとしては, サポウイルス, A 群および C 群ロタウイルス, アストロウイルス, A 型および E 型肝炎ウイルスなどが挙げられる。

本稿では, 近年爆発的な流行を呈しているノロウイルスを中心に, 最近発生数が増加し注目されているサポウイルス, アストロウイルス, E 型肝炎ウイルスについて, その疫学と流行の特徴について概説した。

学会・研究会の報告

環境科学部

- 1) 静岡県におけるヤンバルトサカヤスデの発生状況について
神谷貴文
第 32 回日本土壌動物学会大会 (つくば市)
2009. 6. 6~7 (つくば)
- 2) 静岡県内の河川の酵母アッセイ法による受容体結合活性の調査
今津佳子, 河合渉, 金子亜由美, 中島大介, 鎌田亮, 白石不二雄
第 18 回環境化学討論会 (つくば市)
2009. 6. 9~10 (つくば)
- 3) マイクロガスセンサを利用した可搬型 GC 分析装置の開発と実環境測定への適用性に関する研究 (第 1 報)
山下晶平, 久米一成, 豊田和弘, 荘田隆博, 伊東祐介, 植松彰一
第 50 回大気環境学会年会 (横浜市)
2009. 9. 16~18 (横浜)
- 4) 静岡県の河川の「環境ホルモン」作用は? ~県内 32 河川の全国平均との比較調査~
今津佳子, 河合渉, 金子亜由美, 中島大介, 鎌田亮, 白石不二雄
平成 21 年度第 1 回静岡県研究機関成果発表会 (静岡市)
2009. 10. 23 (静岡)
- 5) 居住環境中の揮発性有機化合物の動態及びその低減化に関する研究
久米一成, 堀池利行, 本間信行, 山下晶平, 林凌
第 36 回環境保全・公害防止研究発表会 (富山市)
2009. 10. 29~30 (富山)
- 6) 静岡県内 32 河川の酵母アッセイ法による受容体結合活性の調査
今津佳子
平成 21 年度国立環境研究所との共同研究ミーティング (つくば市)
2009. 12. 1 (つくば)
- 7) ホルムアルデヒド高濃度暴露に関する調査研究(1)
久米一成, 林凌, 榊原啓之, 大浦健, 雨谷敬史, 下位香代子
室内環境学会年会 2009 年度総会 (東大阪市)
2009. 12. 14~15 (東大阪)
- 2) 循環ろ過式浴槽モデルにおけるクロラミン B の消毒効果
杉山寛治, 神田隆, 高橋奈緒美, 泉山信司, 八木田健司, 遠藤卓郎
第 36 回日本防菌防黴学会
2009. 9. 15 (大阪)
- 3) 静岡県のマダニから検出された紅斑熱リケッチア DNA の解析
川森文彦, 湊千壽, 飯田奈都子, 山田俊博, 長岡宏美, 杉山寛治, 大橋典男
第 148 回日本獣医学学術集会
2009. 9. 27 (鳥取市)
- 4) 静岡県におけるサポウイルス感染事例の疫学的解析
長岡宏美, 湊千壽, 山田俊博, 川森文彦, 杉山寛治
第 24 回地研全国協議会関東甲信静支部ウイルス研究部会
2009. 10. 5 (東京)
- 5) 肉用鶏から分離された基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生菌群の解析
廣井みどり, 山崎史恵, 原田哲也, 高橋奈緒美, 飯田奈都子, 野田佳宏, 八木美弥, 西尾智裕, 神田隆, 杉山寛治, 大橋典男
日本食品微生物学会 30 周年記念学術総会
2009. 10. 20 (東京)
- 6) 冷凍流通食品の微生物汚染調査および流通温度帯におけるリステリアの挙動
飯田奈都子, 小澤一弘, 三輪憲永, 増田高志, 杉山寛治, 川森文彦, 廣井みどり, 森田妃美子, 小沼博隆, 岡田由美子, 春日文子
日本食品微生物学会 30 周年記念学術総会
2009. 10. 21 (東京)
- 7) 静岡県のマダニから検出された紅斑熱リケッチア DNA の解析
川森文彦, 湊千壽, 山田俊博, 長岡宏美, 杉山寛治, 大橋典男
第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会
2009. 11. 7 (東京)
- 8) 静岡県における新型インフルエンザ検査状況
湊千壽, 山田俊博, 長岡宏美, 川森文彦, 杉山寛治
第 46 回静岡県公衆衛生研究会
2010. 1. 27 (静岡)

微生物部

- 1) 市販 DNA 抽出キットを用いたレジオネラ核酸検出法の検討
神田隆, 高橋奈緒美, 杉山寛治, 泉山信司, 倉文明, 遠藤卓郎
第 36 回日本防菌防黴学会
2009. 9. 14 (大阪)
- 9) 高感度な HCV RNA 検出系の構築に関する研究
山田俊博, 湊千壽, 長岡宏美, 川森文彦, 杉山寛治
第 46 回静岡県公衆衛生研究会

2010. 1. 27 (静岡)
- 10) 結核菌の VNTR 法による分子疫学解析の有用性
八木美弥, 西尾智裕, 神田隆, 杉山寛治, 杉山祐美, 刑部瞳
第 46 回静岡県公衆衛生研究会
2010. 1. 27 (静岡)
- 11) 家庭飼育猫の鼻汁から分離されたジフテリア毒素原性 *Corynebacterium ulcerans* の性状
神田隆, 飯田奈都子, 廣井みどり, 八木美弥, 西尾智裕, 野田佳宏, 杉山寛治, 小川高, 小宮貴子, 高橋元秀
第 46 回静岡県公衆衛生研究会
2010. 1. 27 (静岡)
- 12) 冷凍流通食品の微生物汚染調査および流通温度帯におけるリステリアの挙動
飯田奈都子, 小澤一弘, 三輪憲永, 増田高志, 杉山寛治, 川森文彦, 廣井みどり, 森田妃美子, 小沼博隆, 岡田由美子, 春日文子
第 46 回静岡県公衆衛生研究会
2010. 1. 27 (静岡)
- 13) 静岡県におけるサポウイルスによる集団胃腸炎事例の疫学的解析
長岡宏美, 湊千壽, 山田俊博, 川森文彦, 杉山寛治
第 46 回静岡県公衆衛生研究会
2010. 1. 27 (静岡)
- 14) 肉用鶏から分離された基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌群の解析
廣井みどり, 高橋奈緒美, 飯田奈都子, 野田佳宏, 八木美弥, 西尾智裕, 神田隆, 杉山寛治, 山崎史恵, 原田哲也, 大橋典男
第 46 回静岡県公衆衛生研究会
2010. 1. 27 (静岡)
- 15) 肉用鶏から分離された基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌群の解析
廣井みどり, 高橋奈緒美, 飯田奈都子, 野田佳宏, 八木美弥, 西尾智裕, 神田隆, 杉山寛治, 山崎史恵, 原田哲也, 大橋典男
平成 21 年度地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会
2010. 2. 5 (横浜)
2009. 10. 20~21 (佐賀)
- 2) LC/MS/MS による動物用医薬品一斉分析法の検討
影山知子, 前田友幸, 白井美樹, 中島美穂, 前田有美恵, 高橋一則, 小郷沙矢香
第 46 回全国衛生化学技術協議会年会
2009. 11. 12~13 (岩手)
- 3) 健康食品中医薬品成分の迅速検査法について (指定薬物への適用に関して)
宮本憲吾, 山本真也, 尾藤孝弘, 上村慎子, 栗田浩幸, 前田有美恵, 高橋一則
第 46 回全国衛生化学技術協議会年会
2009. 11. 12~13 (岩手)
- 4) 栄養補助食品に含有されるビタミン A, β カロテン等について
小林千恵, 相曾いずみ, 前田有美恵, 高橋一則
第 46 回静岡県公衆衛生研究会
2010. 1. 27 (静岡)
- 5) 静岡県内に流通する食品の残留農薬調査について
前田友幸, 白井美樹, 影山知子, 中島美穂, 前田有美恵, 高橋一則
第 46 回静岡県公衆衛生研究会
2010. 1. 27 (静岡)
- 6) HPLC による既存医薬品の不純物管理ープロカイン塩酸塩を例にー
上村慎子, 尾藤孝弘, 水野くみ子, 黒見公一, 上野千恵, 栗田浩幸, 前田有美恵, 小和田和宏, 坂根弓子, 山本政利, 西澤雅彦, 高橋一則
第 46 回静岡県公衆衛生研究会
2010. 1. 27 (静岡)
- 7) 日本薬局方トリヘキシフェニジル塩酸塩錠の試験法の問題点について
尾藤孝弘, 山本真也, 宮本憲吾, 上村慎子, 前田有美恵, 高橋一則
第 46 回静岡県公衆衛生研究会
2010. 1. 27 (静岡)
- 8) 日本薬局方トリヘキシフェニジル塩酸塩錠の試験法の問題点ーHPLC 法の適用についてー
尾藤孝弘, 山本真也, 宮本憲吾, 上村慎子, 前田有美恵, 高橋一則
平成 21 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研究会
2010. 2. 19 (千葉)

医薬食品部

- 1) HPLC による既存医薬品の不純物管理ープロカイン塩酸塩を例にー
上村慎子, 尾藤孝弘, 水野くみ子, 黒見公一, 上野千恵, 栗田浩幸, 前田有美恵, 小和田和宏, 坂根弓子, 山本政利, 西澤雅彦, 高橋一則
第 46 回全国薬事指導協議会総会
- 9) 新規抗インフルエンザウイルス剤の探索
小郷尚久, 村上宏起, 濱中大一, 鈴木紳之, 清水基宏, 鈴木康夫, 鈴木隆, 浅井章良
日本薬学会第 130 年会
2010. 3. 28-30 (岡山)

大気・水質部

- 1) 函南原生林におけるブナ生理活性調査結果
太田良和弘, 中西隆之
ブナ林衰退地域における総合モニタリング手法の開発の第1回検討会
2009. 8. 27 (北海道)
- 2) ブナの生理活性調査等の経過報告
中西隆之, 太田良和弘
ブナ林衰退地域における総合モニタリング手法の開発の第1回検討会
2009. 8. 27 (北海道)
- 3) 乾性沈着調査におけるN式バッシブ法の検討
中西隆之, 太田良和弘
平成21年度全国環境研協議会関東甲静支部大気専門部会
2009. 9. 8 (山梨)
- 4) 森林からの水質汚濁負荷量について
内山道春, 小池明, 青木一永, 清水直美
平成21年度全国環境研協議会関東甲静支部水質専門部会
2009. 10. 23 (栃木)
- 5) 農地(茶園, 水田), 森林からの汚濁負荷量について
内山道春, 小池明, 青木一永, 清水直美
第36回環境保全・公害防止発表会
2009. 10. 30
- 6) 函南原生林におけるブナ生理活性調査および大気環境調査について
太田良和弘, 中西隆之
ブナ林衰退地域における総合モニタリング手法の開発の第2回検討会
2010. 3. 14 (神奈川)
- 7) 富士山麓におけるブナの生理活性調査および大気環境調査について
中西隆之, 太田良和弘
ブナ林衰退地域における総合モニタリング手法の開発の第2回検討会
2010. 3. 14 (神奈川)

表 彰 等

環境科学部

- 1) (財)住友財団 2009 年度環境研究助成 (～2010 年度)
「外来不快害虫ヤンバルトサカヤスデの生態特性
と侵入起源の解明」
平成 21 年 10 月 20 日
神谷貴文, 飯田奈都子

微生物部

- 1) 地方衛生研究所全国協議会 60 周年記念学術貢献賞
平成 21 年 6 月 4 日
レジオネラ・プロジェクト研究グループ
- 2) 地方衛生研究所全国協議会 会長表彰
平成 21 年 10 月 20 日
杉山寛治
- 3) 第 46 回静岡県公衆衛生研究会第 3 分科会優秀賞
「肉用鶏から分離された基質特異性拡張型 β ラクター
マーゼ (ESBL) 産生菌群の解析」
平成 22 年 1 月 27 日
廣井みどり

医薬食品部

- 1) 独立行政法人医薬基盤研究所 「保健医療分野におけ
る基礎研究推進事業」 研究助成 (平成 19 年度～)
「化合物ライブラリーの管理とデータベースの構築及
びリード化合物の合成に関する研究」
平成 21 年 4 月 1 日
小郷尚久
- 2) 独立行政法人医薬基盤研究所 「保健医療分野におけ
る基礎研究推進事業」 研究助成 (平成 21 年度～)
「Aggrus を標的とした低分子化合物の開発研究」
平成 21 年 4 月 1 日
小郷尚久

編集委員

杉山 文人（くらし・環境部管理局技監兼副所長）
瀧本 俊晴（環境科学部長）
杉山 寛治（微生物部長）
高橋 一則（医薬食品部長）
鈴木 守正（大気水質部長）
鈴木 恒雄（企画調整課長）

静岡県環境衛生科学研究所報告
（第52号）

平成23年2月

編集発行 静岡県環境衛生科学研究所
静岡市葵区北安東4丁目27-2
電話 (054) 245-7655

E-mail kanki@pref.shizuoka.lg.jp

インターネットホームページ

<http://www6.shizuokanet.ne.jp/eikanctr>

印刷所 有限会社東海美術社
静岡市葵区古庄2丁目3-21
電話 (054) 263-1700（代）



ともに創る、ゆたかな暮らし。
静岡県 暮らし・環境部