

ま え が き

平成 23 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災は、巨大な津波等により甚大な被害をもたらしました。また、福島第一原子力発電所の事故は放射能汚染という深刻な原子力災害を招きました。被災された方々に心よりお見舞い申し上げますとともに、一日も早い復興をお祈り申し上げます。

当センターにおいても、緊急的対応として、事故発生直後から環境放射線の監視や食品・飲料水などの放射性物質の検査を実施しているところであり、また、福島県への環境モニタリングチームとして、当センターからも職員を派遣してきたところでもあります。

環境分野については、魚の斃死等の水質汚濁事案や中国大陸からの影響による光化学オキシダントの広域的汚染問題があり、一方保健分野では、新型インフルエンザなどの新興・再興感染症の発生が懸念され、生肉の食中毒事件などが発生しています。

環境、保健両分野ともに、緊急時対応や健康危機管理対応が増加する中、県民の安全と安心を科学的、技術的側面から保障する機関としての役割を果たすべく、様々な調査研究に取り組んでいます。

これら環境と保健の両分野における調査研究について、岡山県環境保健センター年報を作成しましたので送付させていただきます。ご高覧いただけましたら幸いです。今後ともさらに地域の中核的な公的試験研究機関の使命を果たすべく、所員全員で取り組む所存ですので、より一層のご支援とご協力のほどお願い申し上げます。

平成 24 年 2 月

岡山県環境保健センター

所 長 岸 本 壽 男

目 次

調査研究・資料

環境科学部

大気科

【調査研究】

1. 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子PM2.5による大気汚染)
—第6報 PM2.5の自動測定機とマニュアル測定との比較—
林 隆義, 中桐未知代, 野村 茂, 小川 登, 片岡敏夫, 中桐基晴…………… 1
2. 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子PM2.5による大気汚染)
—第7報 PM2.5の多環芳香族炭化水素類の同時分析法の検討と濃度の特徴—
中桐未知代, 吉岡敏行, 林 隆義, 野村 茂, 中桐基晴…………… 9

水質科

【調査研究】

3. 児島湖に関する調査研究
(3) 溶存性有機物の挙動と郷内川の汚濁負荷について
鷹野 洋, 藤田和男, 難波 勉, 坂本祐基…………… 19
4. 児島湖の水質シミュレーション計算
藤田和男, 難波 勉, 坂本祐基, 鷹野 洋, 板谷 勉…………… 27
5. 有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究
—GC/MSを用いた水質中多環芳香族炭化水素(PAH)の多成分分析法の検討—
吉岡敏行, 藤原博一, 山辺真一, 浦山豊弘…………… 35
6. 有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究
—排出量が多い化学物質の水質実態調査—
吉岡敏行, 藤原博一, 山辺真一, 浦山豊弘…………… 43
7. 有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究
—岡山県の公共用水域における有機フッ素化合物の環境実態調査—
浦山豊弘, 吉岡敏行, 藤原博一, 山辺真一, 前田大輔…………… 51

放射能科

【資 料】

8. ほうれん草中U-238濃度と施肥の関係について(第3報)
森上嘉亮, 信森達也, 清水光郎, 西村佳恵, 宮崎 清…………… 59

細菌科

【調査研究】

9. 岡山県における食中毒及び感染症起因菌の疫学的解析
①下痢症・呼吸器感染症起因菌の疫学調査と検査法の検討(平成22年度)
中嶋 洋, 大畠律子, 石井 学, 檜原幸二, 仲 克巳…………… 63

10. 牛由来検体からのリステリア及びサルモネラの検出状況と岡山県におけるサルモネラの疫学的解析 (平成 22 年度)	
石井 学, 大畠律子, 仲 克己, 中嶋 洋	69
11. 結核疫学調査における結核菌 DNA 解析データベースの活用 (3)	
大畠律子, 石井 学, 中嶋 洋	73

ウイルス科

【調査研究】

12. 胃腸炎ウイルスの疫学的研究	
—電子顕微鏡を用いた胃腸炎ウイルスの検出(2005/06～2009/10 シーズン)—	
藤井理津志, 葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 榎原幸二, 濃野 信, 金谷誠久	79
13. 胃腸炎ウイルスの疫学的研究	
岡山県の散発性胃腸炎患者におけるノロウイルス, サポウイルスおよびアストロウイルスの流行疫学 (2008/2009 シーズン～2009/2010 シーズン)	
濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 木田浩司, 榎原幸二, 濃野 信, 金谷誠久	85
14. 胃腸炎ウイルスの疫学的研究	
—Real-time RT-PCR法によるヒトC群ロタウイルス検査法の開発—	
葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志	93
15. 岡山県における 2009～2010 年シーズンのインフルエンザ流行について	
葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩二, 藤井理津志, 川井睦子	99

【資 料】

16. 感染症流行予測調査(平成 22 年度ポリオ感染源調査)	
木田浩司, 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 羽原 誠	107

衛生化学科

【資 料】

17. 厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価	
大月史彦, 肥塚加奈江, 前田大輔, 山本 淳	109

他誌発表論文抄録	115
----------	-----

報告書等	119
------	-----

学会発表	124
------	-----

【調査研究】

環境中の大気汚染物質に関する研究 (微小粒子PM2.5による大気汚染)

—第6報 PM2.5の自動測定機とマニュアル測定との比較—

Comparison between manual method and automated analyzer mass concentrations of PM2.5

林 隆義, 中桐未知代, 野村 茂, 小川 登, 片岡敏夫, 中桐基晴 (大気科)
Hayashi Takayoshi, Michiyo Nakagiri, Shigeru Nomura, Noboru Ogawa,
Toshio Kataoka, Motoharu Nakagiri

要 旨

環境大気測定局においてPM2.5とSPMについて自動測定とマニュアル測定を並行して行い、その質量濃度を比較するとともに、マニュアル測定で採取された試料についてイオン成分及び金属成分の分析を実施した。PM2.5のマニュアル測定と自動測定の質量濃度はよく一致したが、SPMのマニュアル測定と自動測定の質量濃度はやや相関が低く、夏季に自動測定の値が高かった。イオン成分は過去の調査と同様の傾向を示した。金属成分はPM2.5、SPMとも質量濃度に占める割合は小さかったが、冬季に増加していた。

[キーワード：浮遊粒子状物質，PM2.5，自動測定機，マニュアル測定，成分分析]

[Key words：SPM, PM2.5, Automated analyzer, Manual method, Component Analysis]

1. はじめに

岡山県では、粒径 2.5 μm以下の微小粒子状物質(以下、「PM2.5」という。)について、平成 21 年 9 月のPM2.5に係る環境基準の告示以前より、岡山県南部に位置する岡山県環境保健センター(以下「センター」という。)屋上等において粒径 10 μm以下の浮遊粒子状物質(以下、「SPM」という。)等とともに調査を行い、その粒径成分ごとに質量重量及びイオン成分等を分析し、オキシダント高濃度、ワラ焼き及び黄砂といった特異的な事象の発生時や季節における状況の変化をとらえてきた¹⁾⁻⁵⁾。

一方、平成 23 年度から大気汚染防止法に基づき、自動測定機によるPM2.5の常時監視とマニュアル測定による成分分析が開始されることとなり、事前に環境大気測定局(以下、「測定局」という。)における状況を把握する必要性が生じた。

そこで、実際の測定局においてPM2.5とSPMのマニュアル測定を自動測定と並行して行い、既設の自動測定機とのデータ比較、イオン成分と金属成分の分析及びサンプリングに伴う問題点等の検討を行ったので報告する。

2. 調査方法

2.1 調査地点

平成 21 年度から環境省委託事業として、PM2.5自動測定機による試行調査が実施されている早島測定局を調査地点として選定した(図 1)。

早島測定局は図 1 に示すようにセンターの西方約 4 km の岡山市と倉敷市に挟まれた都窪郡早島町の中心部に位

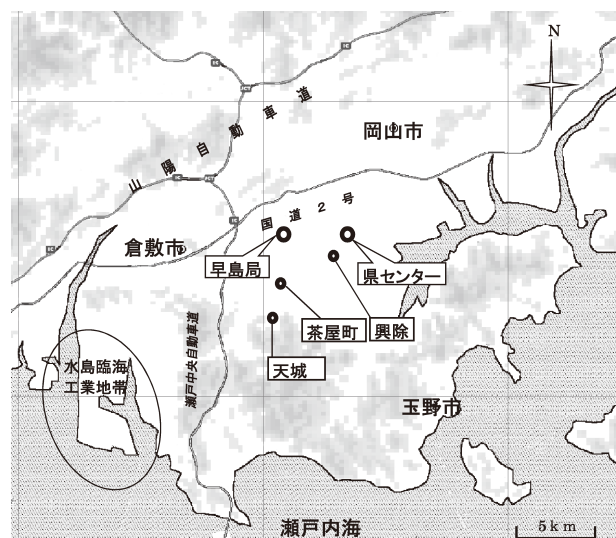


図 1 調査地点

表1 試料採取期間

採取場所：早島測定局

時期	期 間	検体数
初夏	2010/ 5/31 (月) - 6/ 5 (土)	5
夏季	2010/ 8/23 (月) - 8/27 (金)	4
秋季	2010/10/18 (月) - 10/21 (金)	4
初冬	2010/11/29 (月) - 12/ 3 (金)	4
冬季	2011/ 2/14 (月) - 2/18 (金)	4
合計		21

午前 10 時～翌日午前 9 時までの 23 時間捕集

表 2-1 マニュアル測定の捕集条件および秤量条件

	PM2.5	SPM
捕集用 ローボリウム エアサンプラー	PM2.5捕集用 ローボリウム エアサンプラー Rupprecht&Patashinic製 PARTISOL-FRM Model 2000-H	SPM捕集用 ローボリウム エアサンプラー FKS 新宅機械製、サイクロン式 10 μm φ 分級装置付
ろ紙	47mm φ 石英繊維ろ紙 PALLFLEX製 TISSUQUARTZ 2500QAT 8" x 10" から打ち抜き	同左
流量	16.7L/分	20L/分
捕集時間	1日(23時間) 午前10時から翌日午前9時 までの23時間	同左
秤量	ウルトラマイクロ天秤 Sartorius製 SE-2F 読み取り精度0.1 μg 静電気対策 ²⁴¹ Am装備	同左

表 2-2 イオンクロマトグラフの測定条件

測定装置	DIONEX製 LC25.1C25	
分離カラム	陰イオン IonPacAS12A	陽イオン IonPacCS12A
ガードカラム	IonPacAG12A	IonPacCG12A
溶離液	2.7mmol/L Na2CO3 / 0.3mmol/L NaHCO3	20mmol/L CH3SO3H
流量	1.5ml/min	1.0ml/min
サプレッサ	ASRS(リサイクルモード、電流値50mA)	CSRS(リサイクルモード、電流値60mA)
検出器	電気伝導度検出器	電気伝導度検出器
オープン温度	35°C	35°C
試料導入量	25ul	25ul

表 2-3 ICP/MSの測定条件

測定装置	島津製作所製 ICPM-8500		
高周波出力	1.2 kW		
クーラントガス	7.0 L/min		
プラズマガス	1.5 L/min		
キャリアガス	1.5 ml/min		
測定元素/質量数	Be 9	Al 27	V 51
	Cr 52	Mn 55	Fe 56
	Ni 60	Cu 65	Zn 66
	As 75	Se 82	Cd 111
	Pb 208		

置し、周囲は住宅地であるが、その南部はセンター周辺と同様に水田が広がっており、過去に実施したセンター屋上での調査と周辺環境に大きな変化はないと考えられた¹⁾⁻⁵⁾。

2.2 試料採取

平成 22 年 5 月から平成 23 年 2 月を初夏から冬季まで 5 時期に分けて各 4～5 日間、午前 10 時から翌日午前 9 時までの 23 時間を採取単位時間として PM2.5 と SPM のマニュアル測定を行い、計 21 検体を得た(表 1)。

2.3 装置及び使用条件

PM2.5 及び SPM のマニュアル測定は、各成分採取用のエアサンプラーに同一径(47 mm φ)の石英繊維ろ紙を装着し、1 日毎に午前 10 時～翌日午前 9 時までの 23 時間の捕集を行った。

PM2.5 の質量濃度の秤量は「環境大気常時監視マニュアル第 6 版」⁶⁾によれば、温度 21.5 ± 1.5°C、湿度 35 ± 5% の条件で行うこととなっているが、既存データとの比較及び天秤室の使用条件に合わせて、採取した試料は 24-72 時間、20°C、湿度 50% の条件でコンディショニング後、ウルトラマイクロ天秤で秤量した。サンプリング及び秤量に用いた機器等は表 2-1 に示すとおりである。

秤量後の PM2.5 及び SPM 採取 47 mm φ の石英繊維ろ紙を 1/4 カッターを用いて 4 等分し、それぞれ 1/4 を、「大気中微小粒子状物質 (PM2.5) 測定方法

暫定マニュアル改訂版」⁷⁾に従い、イオンクロマトグラフによる水溶性イオン 8 成分 (Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻) の分析(表 2-2)、ICP/MS による金属 13 成分 (Mn, Cr, Ni, Be, As, Al, Fe, Zn, Cu, V, Pb, Se, Cd) の分析(表 2-3)に供した。

また、早島測定局の自動測定機及びその周辺測定局 3 局(興除, 天城, 茶屋町)(図 1)に設置されている SPM 自動測定機は次のとおりである(表 3, 表 4)。

表3 早島測定局に設置されている自動測定機

項目	機種名		測定方式
PM2.5	Thermo Fisher Scientific	M-5030SHARP	β線吸収・光散乱ハイブリッド法
SPM	東亜D K K	DUB-32	β線吸収法
Ox	東亜D K K	GUX353	紫外線吸収法
NOx	堀場製作所	APNA-3700	化学発光法
風向・風速	光進電気工業	MVS-320	-

表4 早島局周辺の測定局のSPM自動測定機

測定局	機種名		測定方式
興除	東亜D K K	GFS-256S	β線吸収法
天城	島津製作所	BRAD-1000	β線吸収法
茶屋町	島津製作所	BRAD-1000	β線吸収法

3. 結果と考察

3.1 質量濃度の比較

マニュアル測定で得られたPM2.5及びSPMの21日間の質量濃度データと、同じサンプリング時間(午前10時～翌日午前9時までの23時間)において自動測定機から得られたPM2.5及びSPM 1時間値の平均値を示す(表5)。

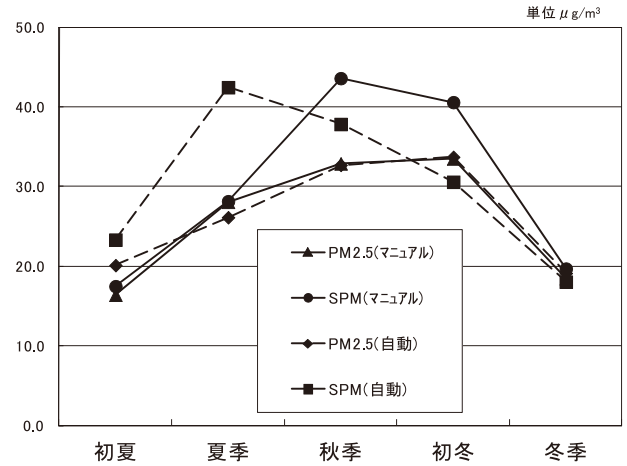


図2 PM2.5及びSPMのマニュアル測定と自動測定機の質量濃度比較

調査期間中、自動測定機の点検が2日(PM2.5は8/26、SPMは12/1)あり、この間自動測定機のデータが得られなかったため、この日を除く19日間の値を採取時期ごとに平均しその推移を示した(図2)。

PM2.5及びSPMの質量濃度のマニュアル測定結果は、若干の時期の差は見られるが、過去の結果と同様に夏季の終わりから初冬にかけて上昇し、冬季に低下した。

一方、SPM自動測定機の質量濃度の値は夏季に高い

表5 早島局におけるPM2.5及びSPMマニュアル測定と自動測定の比較

採取開始月日	天気	気温平均 °C	湿度平均 %	風速平均 m/s	Ox最大 ppb	NO最大 ppb	NO2最大 ppb	マニュアル測定			自動測定機		
								PM2.5 μg/m³	SPM μg/m³	PM2.5 /SPM	PM2.5 μg/m³	SPM μg/m³	PM2.5 /SPM
初夏	05月31日 月 晴れ	19.8	63.2	2.3	61	4	38	17.4	14.4	1.20	17.1	20.5	0.83
	06月01日 火 晴れ	20.6	60.8	2.2	64	5	23	6.2	8.2	0.76	14.7	14.9	0.99
	06月02日 水 晴れ	21.2	59.5	1.8	62	17	37	20.2	21.1	0.96	21.6	26.3	0.82
	06月03日 木 晴れ	21.2	63.4	1.8	67	6	26	18.7	22.4	0.83	21.5	26.3	0.82
	06月04日 金 晴れのち雨	22.5	52.5	1.6	86	11	42	19.5	21.2	0.92	25.7	28.6	0.90
平均		21.1	59.9	1.9	68	9	33	16.4	17.5	0.94	20.1	23.3	0.86
夏季	08月23日 月 晴れ	31.0	65.6	1.6	106	4	23	32.3	36.8	0.88	31.7	52.3	0.61
	08月24日 火 晴れ	30.7	64.6	1.7	105	8	18	31.0	24.3	1.27	28.1	41.7	0.67
	08月25日 水 晴れ	29.9	66.9	1.9	85	8	18	20.9	23.4	0.90	18.6	33.3	0.56
	08月26日 木 晴れ	30.2	65.0	2.1	64	7	16	11.3	8.6	1.32	点検	22.6	-
	平均		30.4	65.5	1.8	90	7	19	23.9	23.3	1.03	-	37.5
平均(点検除外)		30.5	65.7	1.8	99	7	20	28.1	28.2	1.00	26.1	42.4	0.62
秋季	10月18日 月 晴れ	18.2	66.8	0.8	66	37	35	43.0	59.8	0.72	43.8	51.2	0.86
	10月19日 火 晴れ	20.6	63.8	1.4	76	4	36	34.9	46.2	0.76	35.4	42.1	0.84
	10月20日 水 曇り	20.5	69.5	1.5	48	8	34	40.7	49.1	0.83	39.3	41.9	0.94
	10月21日 木 曇り時々雨	18.4	64.8	1.5	36	34	34	12.9	19.4	0.67	12.3	16.2	0.76
	平均		19.4	65.5	1.3	57	21	35	32.9	43.6	0.75	32.7	37.8
初冬	11月29日 月 晴れ	6.7	65.1	1.6	39	132	39	20.4	29.2	0.70	22.7	18.6	1.22
	11月30日 火 晴れ	8.8	72.7	0.8	20	140	37	55.4	64.9	0.85	56.7	50.5	1.12
	12月01日 水 晴れ	9.6	72.9	0.7	37	128	60	74.3	85.2	0.87	69.9	点検	-
	12月02日 木 晴れ	14.9	77.2	2.7	29	17	35	24.7	27.6	0.89	21.7	22.7	0.96
	平均		10.0	72.0	1.4	31	104	43	43.7	51.7	0.84	-	30.6
平均(点検除外)		10.1	71.7	1.7	29	96	37	33.5	40.6	0.83	33.7	30.6	1.10
冬季	02月14日 月 雪	0.9	88.0	点検	16	55	43	15.5	12.7	1.22	16.8	13.4	1.26
	02月15日 火 晴れ	2.0	72.4	1.0	42	100	43	19.6	23.3	0.84	18.7	17.7	1.05
	02月16日 水 晴れ	6.5	69.0	1.6	31	25	36	29.3	33.2	0.88	32.1	28.0	1.15
	02月17日 木 晴れ	10.7	73.9	2.8	40	7	23	9.5	9.6	0.99	8.9	13.1	0.68
	平均		5.1	77.4	1.8	32	47	36	18.5	19.7	0.94	19.1	18.0

サンプリング時間 開始10:00～終了翌日9:00 23時間 自動測定機の値はこの期間の1時間値を平均したもの
気温、湿度は、県環境保健センターの1時間ごとのデータの平均値を用いた

値を示したが、SPMマニュアル測定の値は、夏季はPM2.5と同程度であり、秋季が最も高かった(図2)。

これが、早島局のSPM自動測定機に特異的なものであるか確認するため、同じ期間で早島局周辺の測定局3局(興除、天城、茶屋町)のSPM自動測定機の値を比較したところ、いずれの測定局も早島局と同様の傾向を示していた(図3)。

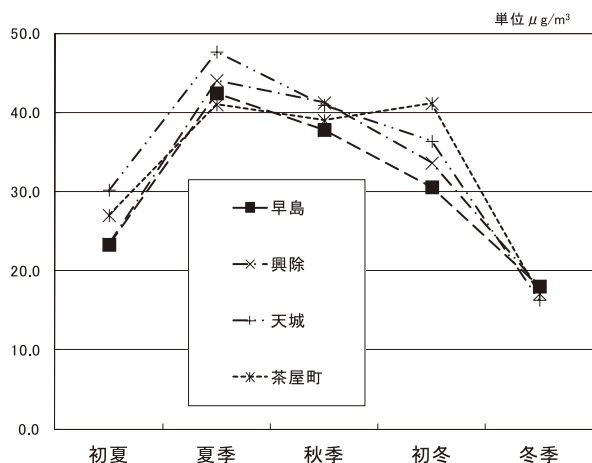


図3 SPM自動測定機の測定局別比較

SPM自動測定機は粉じん濃度を1時間値として逐次捉えているのに対し、SPMマニュアル測定は23時間連続捕集後の結果であるため、夏季の高温の状況では、捕集ろ紙からの低沸点成分の再揮散等の影響が推察される。すなわちSPMローボリウムエアサンプラは、PM2.5ローボリウムエアサンプラのように、捕集ろ紙の部分が外気温と5℃以上差が生じない機構となっていないことが影響している可能性が考えられる。

また、SPMマニュアル測定が秋季から初冬にかけて、SPM自動測定機よりも高値を示す(図2)原因として、稲刈り後のワラ焼きに伴う炭素成分の影響が考えられたが、炭素成分はPM2.5に多く含まれる⁵⁾ことから、PM2.5マニュアル測定値よりもSPMマニュアル測定値がより大きい今回の結果と一致しなかった。他の要因として、採取時と秤量時の湿度の違いや測定法(秤量法と β 線吸収法)の違いによるものが考えられるが、今後の検討が必要である。

PM2.5のマニュアル測定と自動測定機との比較では、自動測定機が点検中であった8/26のデータを除く20日間の質量濃度で比較したところ、相関係数 $r=0.986$ と両者は強い相関が得られたが、マニュアル測定に対する自

動測定機の一次回帰式の傾きが1を下回り、高濃度側において、秤量時の湿度を50%としたことによる吸湿や測定原理の違いが影響したのではないかと考えられた(図4-1)。

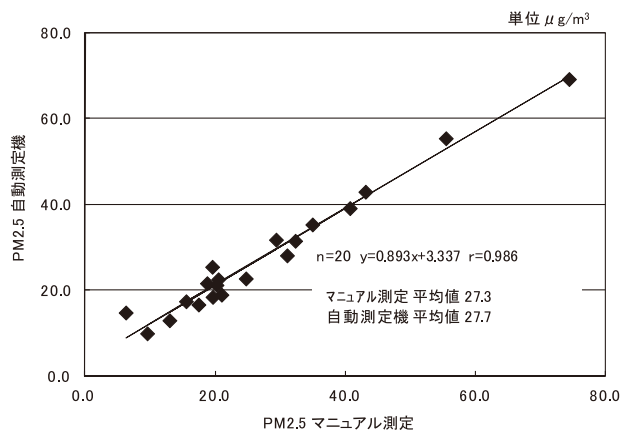


図4-1 PM2.5 マニュアル測定と自動測定機の相関

一方、SPMのマニュアル測定と自動測定の相関は、自動測定機が点検中の12/1のデータ除く20日間の質量濃度で比較したところ、相関係数 $r=0.823$ とPM2.5よりも低い相関であった(図4-2)。

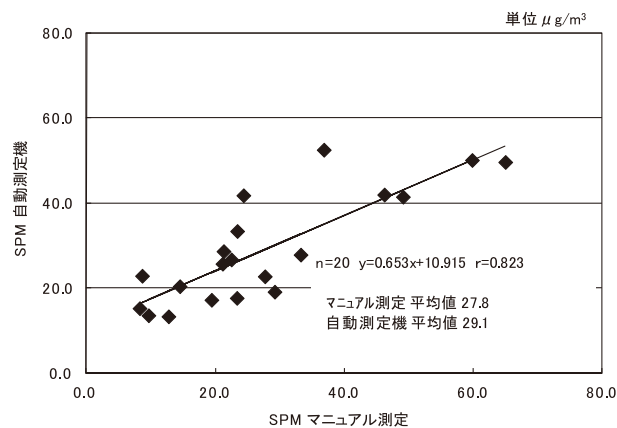


図4-2 SPM マニュアル測定と自動測定機の相関

マニュアル測定では、PM2.5値がSPM値を超えるという逆転現象が初夏から夏季の晴れた日によく見られ(表5)、前述のとおりSPM捕集ろ紙からの低沸点成分の再揮散の影響が考えられた。また、過去のセンターの測定結果も夏季に同様の傾向が認められている²⁾。

これに対して、自動測定機では初冬から冬季に逆転現象が認められている(表5)。このことについて米持らは水分量の影響に着目しているが⁸⁾、これに加えてSPM自動測定機は20℃1気圧に換算した標準流量(PM2.5自

動測定機は実流量)で求められるため、気温20℃以下では、SPM値が実流量に対して低く表される(気温0℃1気圧の大気の場合、気温20℃1気圧では約7.3%体積が増え、SPM値算出の分母が大きくなる)ことも原因の一つと考えられた。

3.2 水溶性イオン成分分析結果

採取期間別の水溶性イオン8成分の組成とその質量濃度を示す(表6, 図5)。

PM2.5及びSPMはNH₄⁺、NO₃⁻、SO₄²⁻がイオンの主成分であり、夏季にはNH₄⁺とSO₄²⁻が大部分を占め、NO₃⁻は、夏季に少なく秋季から冬季にかけてその割合が増大するという過去の調査データ⁴⁾と同様の傾向であった。

3.3 金属成分分析結果

採取期間別の金属13成分の結果を示す(表7, 図6)。

PM2.5中に占める金属成分の割合は、1.2~5.6%、SPMの場合は、2.4~6.4%であり、全ての時期でSPMの方がPM2.5よりも割合が大きかった。金属成分はいずれの粒子でも構成の主成分ではなかったが、PM2.5の金属成分は冬季に上昇することが確認された。一方SPMの金属成分は、初冬において最高値を示し冬季に低下した。しかし、1日ごとの変動が大きい季節変動をより詳しく捕らえるにはさらなるデータの蓄積が必要と思われる。

また、PM2.5、SPMともにFe、Al、Znの3金属の合計が金属成分全体の8~9割を占めていた。Alは主に周辺水田からの土壌由来と考えられるが、PM2.5の金属成分は秋季から初冬ではSPMと比較して少なく、Alの割合も小さいが、冬季には金属成分の組成、重量ともにSPMに近づいていた。

3.4 サンプルング手法の問題点

今回の調査の条件下では、1測定局におけるマニュアル測定としては大きな問題は認められなかったが、現状の手動でろ紙を交換する機種でローボリウムエアサンプラ1台/局の状況では24時間の採取を連続することは

表6 時期別PM2.5及びSPM中の質量濃度とイオン成分

		単位 $\mu\text{g}/\text{m}^3$									
		Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	その他	質量濃度
初夏	PM2.5	0.11	1.70	0.17	0.01	0.02	0.02	0.35	5.50	8.52	16.4
	SPM	0.37	1.33	0.16	0.04	0.15	0.06	0.90	4.96	9.51	17.5
夏季	PM2.5	0.14	3.11	0.19	0.01	0.04	0.03	0.07	8.44	11.84	23.9
	SPM	0.39	2.48	0.17	0.05	0.15	0.06	0.30	7.88	11.77	23.3
秋季	PM2.5	0.17	3.32	0.42	0.02	0.05	0.03	0.46	8.36	20.06	32.9
	SPM	0.55	2.73	0.40	0.08	0.22	0.19	1.69	7.32	30.40	43.6
初冬	PM2.5	0.15	3.38	0.46	0.01	0.05	0.21	3.35	6.34	29.74	43.7
	SPM	0.41	3.04	0.44	0.07	0.39	0.39	4.70	5.98	36.31	51.7
冬季	PM2.5	0.11	1.89	0.16	0.01	0.03	0.03	2.38	4.38	9.50	18.5
	SPM	0.31	1.89	0.15	0.04	0.12	0.08	2.38	3.71	11.01	19.7

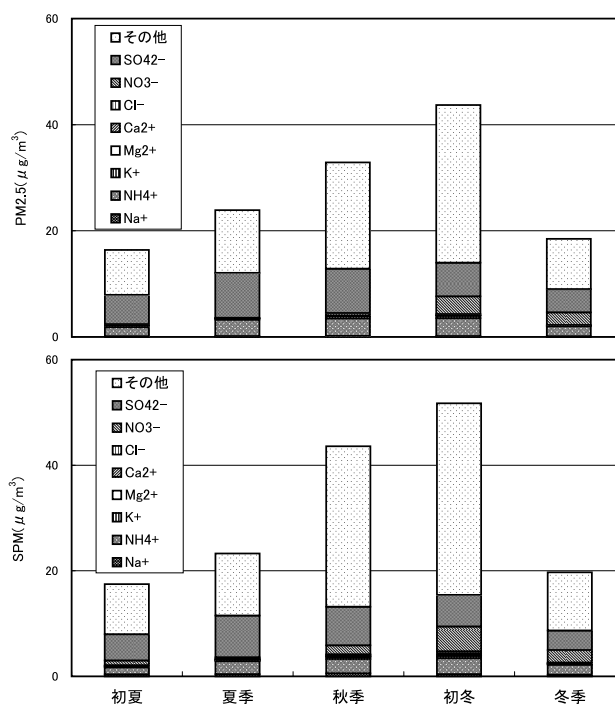


図5 PM2.5及びSPM中の質量濃度とイオン成分

不可能で、休日のろ紙の交換回収には対応が難しい。

また、今回は石英繊維ろ紙を使用した。環境省の示す「PM2.5の成分分析に係る基本的な情報について」⁹⁾には、金属等の無機元素成分の分析にはPTFEろ紙を用いることとされているが、現状の機器の状況では2種類のろ紙でのサンプリングはできない。

これに加えて、測定局が複数となり、サンプリング開始時間を同時(たとえば、午前0時)にすることは、移動及びろ紙の交換作業をきわめて短時間で行わなければならない、限られた人員では作業は難しい。ろ紙の自動交

表7 時期別PM2.5及びSPM中の質量濃度と金属成分

		ng/m ³													
		Fe	Al	Zn	Pb	Mn	Cu	Ni	V	Cr	As	Cd	Se	Be	合計
初夏	PM2.5	206.1	1.6	60.6	20.3	13.6	5.7	1.2	5.3	0.0	1.8	0.7	1.6	0.0	318.4
	割合(%)	64.7	0.5	19.0	6.4	4.3	1.8	0.4	1.7	0.0	0.6	0.2	0.5	0.0	100.0
初夏	SPM	545.1	0.0	125.2	19.8	27.6	9.4	3.7	5.6	0.5	1.6	0.7	1.4	0.0	740.4
	割合(%)	73.6	0.0	16.9	2.7	3.7	1.3	0.5	0.8	0.1	0.2	0.1	0.2	0.0	100.0
夏季	PM2.5	104.0	77.9	74.3	25.5	5.1	0.0	0.5	13.1	1.0	2.8	2.7	0.0	0.0	306.8
	割合(%)	33.9	25.4	24.2	8.3	1.7	0.0	0.1	4.3	0.3	0.9	0.9	0.0	0.0	100.0
夏季	SPM	317.9	188.4	115.2	26.6	12.9	7.2	2.6	12.5	3.3	3.4	3.6	0.5	0.0	694.2
	割合(%)	45.8	27.1	16.6	3.8	1.9	1.0	0.4	1.8	0.5	0.5	0.5	0.1	0.0	100.0
秋季	PM2.5	251.2	16.9	97.5	35.8	15.5	12.3	0.5	2.0	2.9	3.5	1.3	1.1	0.0	440.6
	割合(%)	57.0	3.8	22.1	8.1	3.5	2.8	0.1	0.4	0.7	0.8	0.3	0.3	0.0	100.0
秋季	SPM	553.5	294.1	102.3	35.6	24.6	16.7	1.8	2.1	2.2	3.7	1.3	1.1	0.0	1039.1
	割合(%)	53.3	28.3	9.8	3.4	2.4	1.6	0.2	0.2	0.2	0.4	0.1	0.1	0.0	100.0
初冬	PM2.5	282.5	17.0	133.4	46.4	34.0	10.9	2.3	5.4	0.9	4.7	2.1	2.9	0.0	542.5
	割合(%)	52.1	3.1	24.6	8.6	6.3	2.0	0.4	1.0	0.2	0.9	0.4	0.5	0.0	100.0
初冬	SPM	1027.1	484.6	168.1	47.7	63.3	22.1	3.9	6.0	2.0	4.9	2.1	3.0	0.0	1834.8
	割合(%)	56.0	26.4	9.2	2.6	3.5	1.2	0.2	0.3	0.1	0.3	0.1	0.2	0.0	100.0
冬季	PM2.5	392.2	482.9	69.1	24.0	16.5	7.7	23.7	3.4	15.2	2.3	1.0	1.8	0.1	1039.8
	割合(%)	37.7	46.4	6.6	2.3	1.6	0.7	2.3	0.3	1.5	0.2	0.1	0.2	0.0	100.0
冬季	SPM	517.3	589.0	69.7	22.6	18.0	10.8	18.8	3.4	8.4	2.2	0.9	1.6	0.0	1262.8
	割合(%)	41.0	46.6	5.5	1.8	1.4	0.9	1.5	0.3	0.7	0.2	0.1	0.1	0.0	100.0

換可能なエアサンプラを設置すれば対応可能であるが、捕集終了からろ紙回収までの時間ろ紙を安定的に保存できる機能が必要で高価なものとなり、整備は限られた自治体予算の中では難しく、選択と集中を進めていく必要がある。

4. まとめ

平成23年度から、自動測定機によるPM2.5の常時監視とマニュアル測定による成分分析が開始されることから、事前の状況把握のため、測定局においてPM2.5とSPMのマニュアル測定を行い既設の自動測定機とのデータ比較を行った。また、イオン成分及び金属成分の分析調査及びマニュアル測定による常時監視のサンプリングにともなう問題点の検討を行った。

- ① 早鳥測定局での、PM2.5とSPMの質量濃度のマニュアル測定は、既存のセンター屋上での調査結果と類似した結果であった。
- ② SPM自動測定機の値は夏季に高い値を示し、SPMマニュアル測定が秋季に高く、PM2.5のマニュアル測定と自動測定が初冬に高い値を示した。夏季のSPM自動測定機の測定結果は早鳥局周辺の3測定局も同じ傾向であり、SPMの自動測定とマニュアル測定の相関はあまり高くなかった。

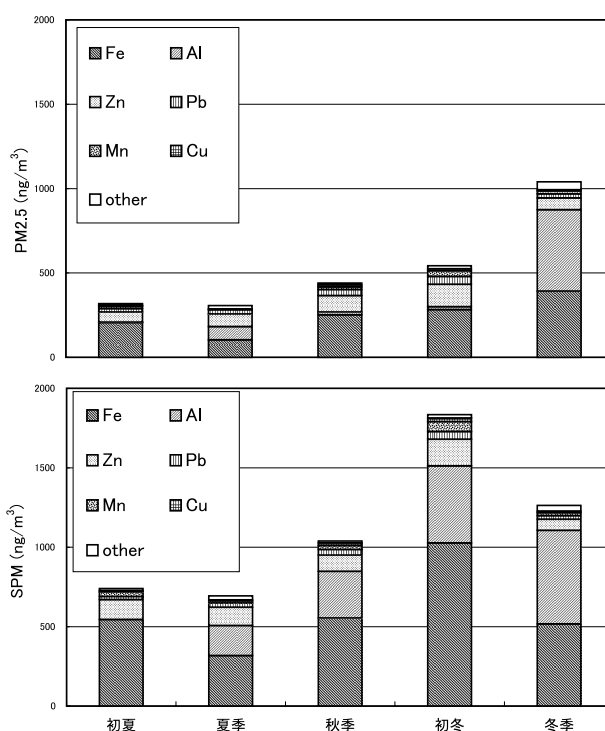


図6 PM2.5及びSPM中の金属成分

- ③ PM2.5では、自動測定機とマニュアル測定は、高い相関を示したが、高濃度側でマニュアル測定値がやや高い傾向を示した。これはマニュアル測定の秤量時の湿度が50%であることが原因の一つと考えられた。
- ④ PM2.5がSPMを上回る逆転現象はマニュアル測定では夏季に認められた。夏季のマニュアル測定による

逆転現象の原因はSPMのろ紙からの再揮散が考えられた。

- ⑤ 冬季の自動測定機における逆転現象の原因のひとつとして、SPMが標準流量を用いるのに対しPM2.5が実流量を用いているため、気温が20度以下になる冬季ではSPMの質量濃度が低く表されることが考えられた。
- ⑥ SPMのマニュアル測定が秋季から初冬にかけて高値を示す原因については、秤量時の湿度や測定方法の差によるもの等を含め今後の検討が必要である。
- ⑦ 水溶性イオン成分は、既存のデータと同じくPM2.5及びSPMは NH_4^+ 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} がイオン成分の大半を占め、 NO_3^- は夏季に少なく秋季から増加した。また、質量濃度に占めるイオン成分は、秋季から初冬にかけて減少し冬季に上昇した。
- ⑧ PM2.5及びSPM中に占める金属成分の割合は低く金属成分は粒子の主成分ではないが、冬季(SPMは初冬)にその割合が上昇した。金属成分の8～9割をFe、Al、Znの3金属が占めており、冬季にAlが増加した。Alは周辺水田からの土壌由来と推察された。
- ⑨ 常時監視に伴うPM2.5の成分分析を行うには、マンパワーの確保、測定局毎に複数台のローボリウムエアサンプラを設置することが必要であるが、限られた自治体予算の中では難しく、選択と集中を進めていく必要がある。

なお、本研究は、環境省に帰属する微小粒子状物質(PM2.5)モニタリング試行事業の測定データ(早島測定局におけるPM2.5自動測定機のデータ)の一部を用いており、公表(年報掲載)にあたり、「平成20年度微小粒子状物質(PM2.5)モニタリング試行事業実施要綱」に基づき環境省の承認を受けた。

参考文献

- 1) 杉山広和, 野村 茂, 石井 学, 門田 実, 前田 泉: 環境中の大気汚染物質に関する研究(PM2.5による大気汚染), 岡山県環境保健センター年報 31, 9-12, 2007
- 2) 杉山広和, 信森達也, 野村 茂, 前田 泉: 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子PM2.5による大気汚染)―第2報―, 岡山県環境保健センター年報 32, 7-10, 2008
- 3) 杉山広和, 信森達也, 前田 泉: 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子PM2.5による大気汚染)―第3報―, 岡山県環境保健センター年報 32, 11-16, 2008
- 4) 杉山広和, 石井尚志, 野村 茂, 門田 実, 前田 泉: 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子PM2.5による大気汚染)―第4報―, 岡山県環境保健センター年報 33, 1-5, 2009
- 5) 石井尚志, 野村 茂, 中桐未知代, 山辺真一: 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子PM2.5による大気汚染)―第5報―, 岡山県環境保健センター年報 34, 7-10, 2010
- 6) 環境省: 環境大気常時監視マニュアル 第6版(平成22年3月)
- 7) 環境省: 大気中微小粒子状物質(PM2.5)測定方法暫定マニュアル 改定版(平成19年7月)
- 8) 米持真一, 梅沢夏実, 長谷川就一, 松本利恵: 異なる測定法によるPM2.5測定結果の比較, 大気汚染学会誌 46, 131-138, 2011
- 9) 環境省水・大気環境局大気環境課: 「PM2.5の成分分析に係る基本的な情報について」平成22年9月1日 事務連絡

【調査研究】

環境中の大気汚染物質に関する研究 (微小粒子PM2.5による大気汚染)

—第7報 PM2.5の多環芳香族炭化水素類の同時分析法の検討と濃度の特徴—

Simultaneous analysis of Polynuclear aromatic hydrocarbons in PM2.5 and the feature

中桐未知代, 吉岡敏行*, 林 隆義, 野村 茂, 中桐基晴 (大気科) *水質科
Michiyo Nakagiri, Toshiyuki Yoshioka, Takayoshi Hayashi, Shigeru Nomura, Motoharu Nakagiri

要 旨

岡山県ではこれまでに微小粒子状物質 (PM2.5) について質量濃度, イオン成分分析, 炭素成分分析 (一部) を行ってきた。PM2.5の科学的知見を蓄積していくためには, その他の成分分析が必要不可欠である。その中でも今回, 発癌性が認められている Benzo [a] pyrene 等, 人体や生態への影響が大きい多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の多成分同時分析法を検討した。その結果, 最も分子量の小さい Naphthalene 以外は同時分析が可能であり, 稲わら焼きの時期に PM2.5 及び浮遊粒子状物質 (SPM) 中の PAHs が増加していることがわかった。また, PAHs と二酸化窒素濃度の間には正の相関が認められ, PAHs の分解に寄与することが知られているオキシダントや紫外線 B が高くなる夏季に PM2.5 及び SPM 中の PAHs が減少していた。

[キーワード: 粒子状物質, PM2.5, SPM, 多環芳香族炭化水素類 (PAHs)]

[Key words: Particulate matter, PM2.5, SPM, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)]

1. はじめに

微小粒子状物質 (以下「PM2.5」という。) は人の健康影響が懸念されている粒径 2.5 μ m 以下の微小粒子で, 平成 21 年 9 月に環境基準が定められた。環境省の示す今後のスケジュール (案)¹⁾ の中で平成 22 年度~平成 24 年度を目標に常時監視体制を構築することとなっている。岡山県ではこれまでに, 県南部の田園地帯に位置する県環境保健センター屋上及び自動車排出ガス測定局である長津大気測定局で PM2.5, 浮遊粒子状物質 (以下「SPM」という。) を測定し, 質量濃度, イオン成分, 炭素成分 (一部) について報告した^{2,3)}。

PM2.5 の科学的知見を集積するため, その他の成分についても調査する必要があるが, その中でも発癌性が認められている Benzo [a] pyrene 等の多環芳香族炭化水素類 (以下「PAHs」という。) は, 人体や生態への影響が大きいと考えられる。

そこで, 今後 PM2.5 成分分析の常時監視を進めるにあたり必要とされる PAHs の GC/MS を用いた同時分析

法の検討と, 平成 22 年度に採取した PM2.5, SPM 中のそれらの成分について調査したので報告する。

2. 実験方法

2.1 分析対象物質

環境省が「大気中微小粒子状物質 (PM2.5) 測定方法暫定マニュアル⁴⁾」(以下「暫定マニュアル」という。) に示す 19 物質に, 10 物質を加えた 29 物質の PAHs を対象とした。(表 1)

2.2 試薬

標準物質:

Naphthalene, 2-methylnaphthalene, 1-methylnaphthalene, Acenaphthylene, Acenaphthylene, Fluorene, Phenanthrene, Anthracene, Fluoranthene, Pyrene, Benz [a] anthracene, Chrysene, Benzo [b] fluoranthene, Benzo [k] fluoranthene, Benzo [a] pyrene, Indeno

[1,2,3-cd] pyrene, Dibenz [a,h] anthracene, Benzo [ghi] perylene はSUPELCO社製のPolynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix (18mix) を用いた。Triphenylene は和光純薬工業(株)製のH-235N (10 mg), Benzo [e] pyrene はSIGMA-ALDRICH社製の98% (100 mg), Perylene はSIGMA-ALDRICH社製, Dibenz [a,c] anthracene は和光純薬工業(株)製のRAH-018 (10 mg), Benzo [b] chrysene は和光純薬工業(株)製のH-183S (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Toluene), Picene は和光純薬工業(株)製のH-184S (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Toluene), Dibenzo [a,e] pyrene はCIL社製の10 mg,

Coronene は和光純薬工業(株)製のH-116S (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Toluene) o-Terphenyl, m-Terphenyl, p-Terphenyl は東京化成工業(株)製を用いた。

サロゲート用内部標準物質：全てCIL社製の内部標準物質を用いた。

内部標準物質：p-Terphenyl-d₁₄ は和光純薬工業(株)製の200-14651を用いた。

ジクロロメタン：環境分析用

ヘキサン：環境分析用

シリカゲルカートリッジ：LC-Si (1g/6mL)

SUPELCO (Glass Tube w/PTFE Frits)

表1 調査対象物質

物質名	略称	CAS No	環数	m/z(定量用)	m/z(確認用)	内部標準物質(サロゲート)	暫定マニュアル対象物質	IARCによる発がん性評価※1	主な発生源
Naphthalene	Nap	000091-20-3	2	128	127	Nap-d ₈		2B	ディーゼル燃料自動車
2-methylnaphtalene	2-M	000091-57-6	2	142	141	Nap-d ₈		-	
1-methylnaphtalene	1-M	000090-12-0	2	142	141	Nap-d ₈		-	
Acenaphthylene	Acy	000208-96-8	3	152	153	Ace-d ₁₀		-	
Acenaphthene	Ace	000083-32-9	3	153	154	Ace-d ₁₀		3	ディーゼル燃料自動車
Fluorene	Fle	000086-73-7	3	166	165	Ace-d ₁₀		3	
Phenanthrene	Phe	000085-01-8	3	178	176	Phe-d ₁₀		3	暖房
Anthracene	Ant	000120-12-7	3	178	176	Phe-d ₁₀		3	
Fluoranthene	Fla	000206-44-0	4	202	200	Fla-d ₁₀	○	3	暖房, ガソリン燃料自動車
Pyrene	Pyr	000129-00-0	4	202	200	Fla-d ₁₀	○	3	暖房, ガソリン燃料自動車
o-Terphenyl	o-T	000084-15-1	3	230	229	Fla-d ₁₀		-	
m-Terphenyl	m-T	000092-06-8	3	230	229	Fla-d ₁₀		-	
p-Terphenyl	p-T	000092-94-4	3	230	229	Fla-d ₁₀	○	-	
Benz[a]anthracene	BaA	000056-55-3	4	228	226	BaA-d ₁₂	○	2B	
Chrysene	Chr	000218-01-9	4	228	226	Chr-d ₁₂	○	2B	暖房
Triphenylene	Tri	000217-59-4	4	228	226	Chr-d ₁₂	○	3	
Benzo[b]fluoranthene	BbF	000205-99-2	5	252	253	BkF-d ₁₂	○	2B	
Benzo[k]fluoranthene	BkF	000207-08-9	5	252	253	BkF-d ₁₂	○	2B	
Benzo[e]pyrene	BeP	000192-97-2	5	252	253	BeP-d ₁₂	○	3	
Benzo[a]pyrene	BaP	000050-32-8	5	252	253	BeP-d ₁₂	○	1	
Perylene	Per	000198-55-0	5	252	253	BeP-d ₁₂	○	3	
Dibenz[a,c]anthracene	DcA	000215-58-7	5	278	276	IcP-d ₁₂	○	3	
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	IcP	000193-39-5	6	276	278	IcP-d ₁₂	○	2B	
Dibenz[a,h]anthracene	DhA	000053-70-3	5	278	276	IcP-d ₁₂	○	2A	
Benzo[b]chrysene	BbC	000214-17-5	5	278	276	BgP-d ₁₂	○	3	
Picene	Pic	000213-46-7	5	278	276	BgP-d ₁₂	○	3	
Benzo[ghi]perylene	BgP	000191-24-2	6	276	278	BgP-d ₁₂	○	3	
Dibenzo[a,e]pyrene	DaP	000192-65-4	6	302	304	Cor-d ₁₂	○	3	
Coronene	Cor	000191-07-1	7	300	301	Cor-d ₁₂	○	3	

※1 IARCによる発癌性評価⁵⁾

- 1: 人に対する発癌性が認められている。
- 2A: 人に対する発癌性がおそらくある。
- 2B: 人に対する発癌性が疑われる。
- 3: 人に対する発癌性が分類できない。

2.3 調査地点及び分析方法

調査地点を図1に示す。県環境保健センターの西方約4kmの岡山市と倉敷市に挟まれた都窪郡早島町の中心部に位置する早島大気測定局(以下「早島局」という。)で捕集を行った。本調査では、平成22年5月から平成23年2月を初夏から冬季まで5時期に分けて各4～5日間、午前10時から翌日午前9時までの23時間を採取単位時間としてPM2.5とSPMのマニュアル測定を行い、計21検体を得た(表2)。



図1 調査地点

表2 試料採取期間

採取場所：早島局

時期	期 間	検体数
初夏	H22/ 5/31 (月) - 6/ 5 (土)	5
夏季	H22/ 8/23 (月) - 8/27 (金)	4
秋季	H22/10/18 (月) - 10/22 (金)	4
初冬	H22/11/29 (月) - 12/ 3 (金)	4
冬季	H23/ 2/14 (月) - 2/18 (金)	4
合計		21

午前10時～翌日午前9時までの23時間捕集

表3 GC/MSの分析条件

装置	: Agilent6890(GC), JMS-AMsun(MS)
カラム	: DB-17MS 30m×0.25mm, 0.25μm (J&W)
キャリアーガス	: ヘリウム (1mL/min)
カラム温度	: 50°C (2min) -20°C/min-120°C (0min) -7°C/min-320°C (17min)
注入方法	: スプリットレス
注入口温度	: 280°C
注入量	: 1μL
インターフェース温度	: 240°C
イオン源温度	: 210°C
イオン化法	: EI法
イオン化電圧	: 70eV
イオン化電流	: 300μA
検出器電圧	: 700V

採取した試料は24-72時間、20°C、湿度50%の条件でコンディショニング後、ウルトラマイクロ天秤で秤量し、-20°Cで保存した。保存後のろ紙を常温に戻し、1/4カッターを用いて1/4にカットしたものを分析に供した。

分析は暫定マニュアルに準じて行った。分析フローを図2に示す。ろ紙に10ngのサロゲート用内部標準物質を添加し、超音波抽出は10mLのジクロロメタンで20分間、2回行った。抽出液に5～10mLのn-ヘキサンを加え、エバポレータで1mL以下まで濃縮させた。この操作を3回繰り返し、溶媒組成を転換し、最終的に1mL以下のn-ヘキサン溶液にした。

シリカゲルカートリッジを10mLのn-ヘキサンでコンディショニングした後、抽出液を負荷し、10%ジクロロメタン/n-ヘキサン10mLで溶出した。10mLの溶出液に窒素ガスを吹き付けて1mL以下まで濃縮し、これに内部標準物質を10ng添加し、n-ヘキサンで1mLに定容し測定用試料液とした。

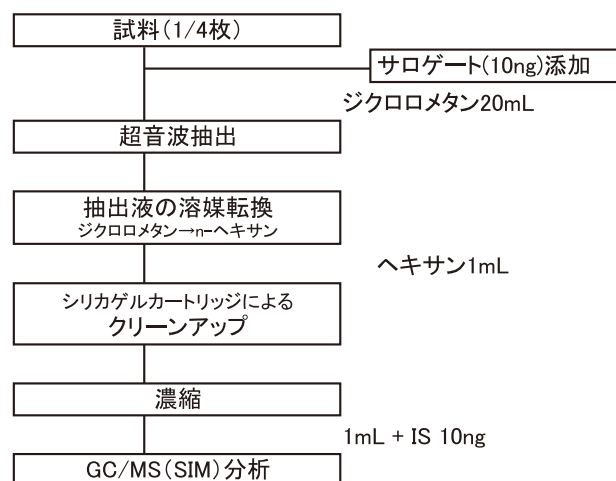


図2 分析フロー

GC/MSの条件を表3に示す。

2.4 抽出条件の検討

実際の試料及び添加回収・保存性試験は2.3に示すとおり暫定マニュアルに準じてジクロロメタン-超音波抽出した。抽出効率のよりよい方法を検討するため、トルエン-超音波抽出法及びトルエン-高速溶媒抽出法で添加回収試験をした。試験用ろ紙は、ブランク及び環境大気を捕集したろ紙を用い、10ngの標準物質添加前後のろ紙で回収率を求めた。

トルエン-超音波抽出法は2.3の抽出時においてジクロロメタンの代わりにトルエンを用いた。

トルエン-高速溶媒抽出法の高速溶媒抽出は表4の条件で行い、トルエン抽出液を得た。溶媒転換以降の操作は2.3と同様に行った。

表4 高速溶媒抽出の分析条件

抽出溶媒	: トルエン
抽出温度	: 125°C
保持圧力	: 1500psi
初期加熱時間	: 6分
静置時間	: 5分
フラッシュ容量	: 150%
加熱回数	: 3回
ページ時間	: 120秒
セルサイズ	: 11mL
合計抽出時間	: 25分/検体
溶媒使用量	: 約60mL/検体

2.5 添加回収及び保存性試験

2.5-1 サロゲート回収率試験

実試料へ添加したサロゲート添加量 ($Q_{i(sr)}$) と、回収された試料中のサロゲートの量 ($Q_{i(sr)}$) を用いて次式により回収率を求めた。サロゲート内標準は表1に示す内部標準物質を用い、シリンジスパイク用の内部標準物質はp-Terphenyl- d_{14} を使用した。

$$\text{サロゲート回収率 (\%)} = \frac{Q_{i(sr)}}{Q_{i(sr)}} \times 100$$

2.5-2 添加回収試験

1/4カットしたブランクろ紙に各10ngの標準物質を添加し、直ちに2.3の分析方法により分析し、回収率を求めた。

2.5-3 保存性試験

試料は秤量後-20°Cで保存したのち分析を行ったため、保存性を検討した。ブランク用の1/4カットされたろ紙

に各200ngの標準物質を添加し、-20°Cで9ヶ月間保存後、2.3と同様の抽出及び分析を行った。

2.6 検出下限値及び定量下限値

検量線作成時の最低濃度の標準溶液について5回測定を行い、得られた測定値を大気濃度 (PM2.5については23 m³, SPMについては27.6 m³を平均吸引流量とした) に換算し、その標準偏差を求めた。また、操作ブランク試験用の溶液について5試料以上測定し、同様に大気濃度に換算し、標準偏差を求めた。これらのうち、いずれか大きい方の標準偏差の3倍を検出下限値 (以下「MDL」という。)、10倍を定量下限値 (以下「MQL」という。) とした。

3 結果及び考察

3.1 GC/MS 測定の見直し

図3にPAHs29物質のクロマトグラムを示す。

本法では、Chrysene (Chr) と Triphenylene (Tri), Indeno [1,2,3-cd] pyrene (IcP) と Dibenz [a,h] anthracene (DhA) のクロマトグラムの分離ができなかったため、それぞれ1物質として扱ったが、これら以外は全て互いに分離できた。なお、分子量の大きい物質はややブロードなピークとなり、測定結果が定量下限値未満となる物質もあった。

3.2 抽出条件の見直し

抽出条件の見直しで求めた添加回収率を表5に示す。ジクロロメタン-超音波抽出法ではブランクろ紙で66～112%、環境大気捕集ろ紙で65～98%の回収率、トルエン-超音波抽出法ではブランクろ紙で58～108%、環境大気捕集ろ紙で51～115%の回収率、トルエン-高速溶媒抽出法ではブランクろ紙で30～135%、環境大気捕集ろ紙で-19～166%の回収率があった。この結果から、最も安定した回収率があったのはジクロロメタン-超音波抽出法であったので、暫定マニュアルに準じた方法で抽出することとした。

3.3 添加回収及び保存性試験結果

サロゲート回収率の結果を表6に示す。サロゲート回収率はNaphthalene- d_8 を除くと85%以上の回収率があり、良好であった。

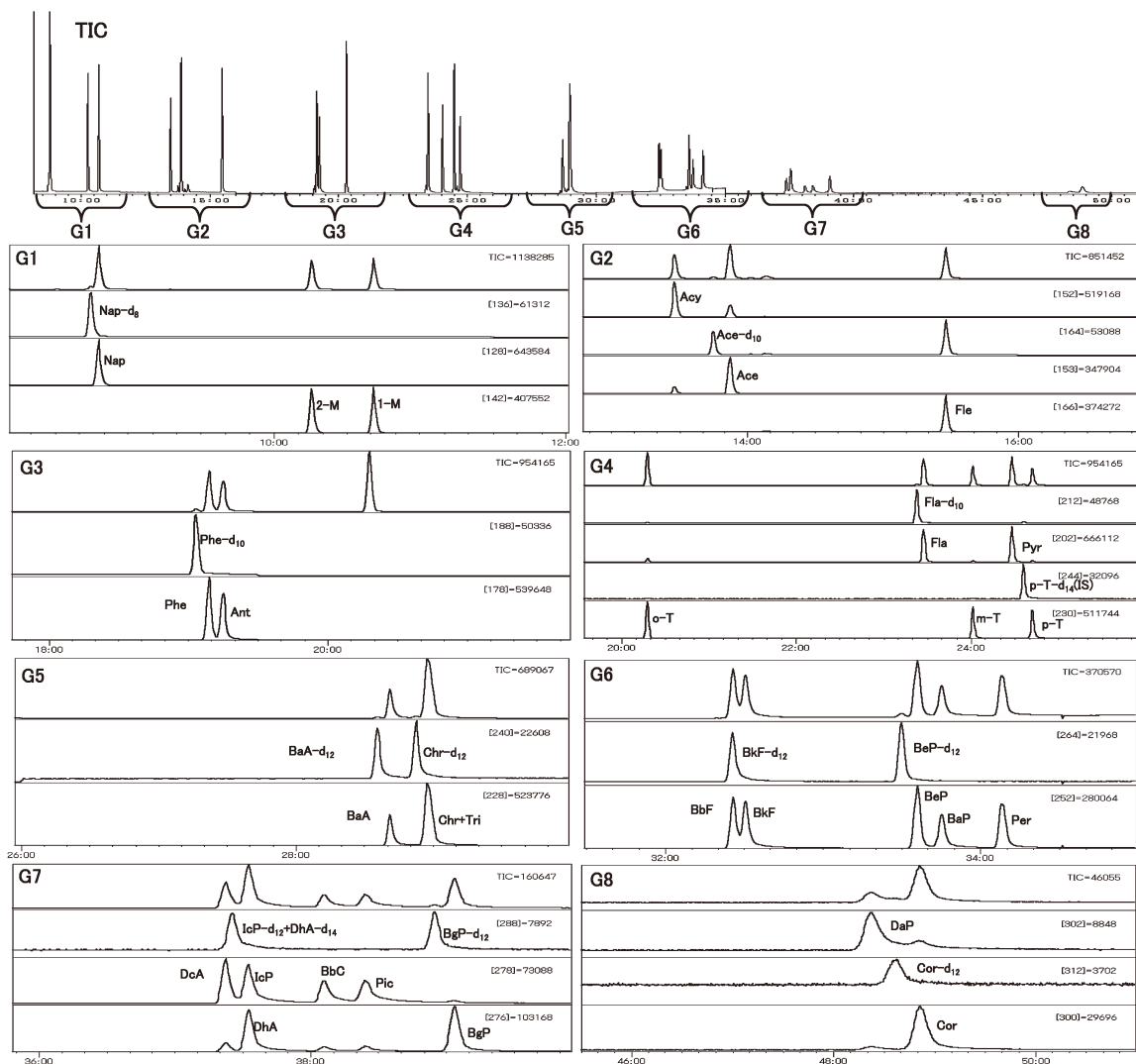


図3 PAHs標準物質のクロマトグラム

表5 抽出条件検討結果

使用したろ紙	添加回収試験結果 (%)					
	ブランクス紙(n=2)			環境大気捕集ろ紙(n=2)		
	ジクロロメタン 抽出方法	超音波	トルエン 超音波	トルエン ASE	ジクロロメタン 超音波	トルエン 超音波
Phe	77	108	—	65	84	—
Ant	88	85	73	77	81	-19
Flt	93	95	128	93	99	38
Pyr	81	86	82	83	91	43
o-T	84	75	65	74	75	67
m-T	77	76	71	88	77	77
p-T	75	72	69	77	82	76
BaA	112	107	106	96	106	115
Chr+Tri	101	96	95	88	97	125
BbF	103	94	100	97	101	121
BkF	99	91	85	84	95	77
BeP	95	91	96	90	89	91
BaP	90	64	36	83	53	28
Per	92	61	30	87	51	26
DcA	93	95	135	98	115	134
IcP+DhA	91	84	105	93	98	92
BbC	81	78	72	78	79	116
Pic	79	79	124	70	82	166
BgP	90	90	72	81	84	92
DaP	66	58	37	70	57	43
Cor	84	80	78	82	85	80
平均	88	84	83	84	85	79

表6 サロゲート回収率

物質名	サロゲート回収率 (%)
Nap-d8	64
Ace-d10	89
Phe-d10	100
Flt-d10	100
BaA-d12	100
Chr-d12	95
BkF-d12	89
BeP-d12	85
IcP-d12	96
BgP-d12	88
Cor-d12	98

PAHs23 物質の添加回収試験結果と保存性試験結果を表7の右列に示す。なお、回収率が「-」となっている物質は、今回添加回収試験及び保存性試験を行わなかった。添加回収試験結果は全て97%以上の残存率であり、保存性試験結果ではNaphthalene (Nap) 以外すべて90%以上の残存率で良好であった。この結果から、最も分子量の小さいNapは保存中に揮散したものと考えられる。

これらの結果から、Nap以外は同時分析可能であることが確認できた。

3.4 検出下限値及び定量下限値結果

MDL及びMQLを表7に示す。MDLはPM2.5で0.012～2.442ng/m³、SPMで0.010～2.035ng/m³、MQLはPM2.5で0.041～8.140ng/m³、SPMで0.034～6.783ng/m³であった。

有害大気汚染物質測定方法マニュアル⁶⁾に示すBenzo[a]pyrene (BaP)の目標MQL(0.011ng/m³)と比較すると満たしていないが、有害大気汚染物質測定時より捕集量が大幅に少ないため、目標MQLはこれより大きくなると思われる。

3.5 PM2.5とSPMとのPAHs総量の関係

PM2.5とSPMの各PAHsの総量(以下「t-PAHs」という。)の関係は図4のとおりであった。t-PAHsは保存性回収率とサロゲート回収率の悪かったNapを除く全てのPAHsの総和である。初冬にPM2.5とSPM共にt-PAHsの高い濃度が観測され、平成22年12月1日は特に濃度が高かった。秋から初冬にかけて早鳥大気測定局の周辺では稲わら焼きが行われており、PAHsは炭素と水素を含む化合物の燃焼過程において生成するため、この期間にPAHsの濃度が高かった原因は稲わら焼きの影響と考えられる。

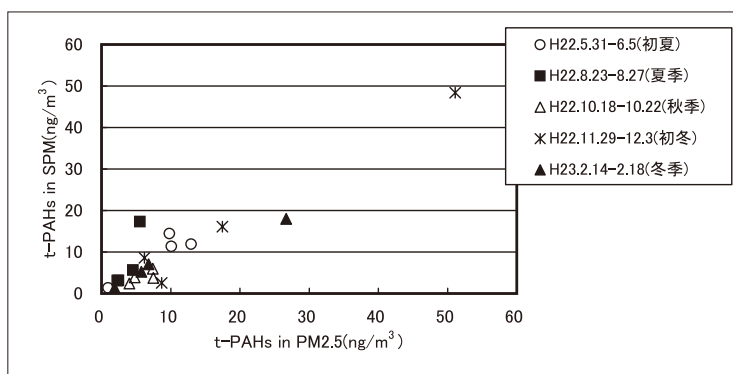


図4 PM2.5とSPM中のt-PAHs質量の相関関係(採取日毎)

表7 検出下限値及び定量下限値

物質名	吸引流量(m ³)		最終液量(mL)	MDL(ng/m ³)		MQL(ng/m ³)		検量線範囲(ng/mL)	添加回収試験回収率(%)	保存性試験回収率(%)
	PM2.5	SPM		PM2.5	SPM	PM2.5	SPM			
Nap	23	27.6	1	2.442	8.140	2.035	6.783	0.02 ~ 100	100	26
2-M	23	27.6	1	0.852	2.840	0.710	2.367	0.02 ~ 100	100	100
1-M	23	27.6	1	0.356	1.188	0.297	0.990	0.02 ~ 100	100	96
Acy	23	27.6	1	0.074	0.247	0.062	0.206	0.02 ~ 100	99	100
Ace	23	27.6	1	0.073	0.244	0.061	0.203	0.1 ~ 100	100	100
Fle	23	27.6	1	0.058	0.193	0.048	0.160	0.1 ~ 100	100	100
Phe	23	27.6	1	0.069	0.231	0.058	0.193	0.02 ~ 100	100	100
Ant	23	27.6	1	1.449	4.829	1.207	4.024	0.1 ~ 100	100	100
Fla	23	27.6	1	0.066	0.219	0.055	0.182	0.03 ~ 100	100	100
Pyr	23	27.6	1	0.063	0.209	0.052	0.174	0.03 ~ 100	100	100
o-T	23	27.6	1	0.063	0.209	0.052	0.174	0.03 ~ 100	97	92
m-T	23	27.6	1	0.063	0.209	0.052	0.174	0.1 ~ 100	100	100
p-T	23	27.6	1	0.060	0.199	0.050	0.166	0.1 ~ 100	100	100
BaA	23	27.6	1	0.068	0.228	0.057	0.190	0.1 ~ 100	100	99
Chr+Tri	23	27.6	1	0.065	0.217	0.054	0.181	0.03 ~ 100	-	-
BbF	23	27.6	1	0.071	0.236	0.059	0.196	0.2 ~ 100	100	100
BkF	23	27.6	1	0.012	0.041	0.010	0.034	0.2 ~ 100	100	100
BeP	23	27.6	1	0.069	0.230	0.058	0.192	0.1 ~ 100	100	100
BaP	23	27.6	1	0.160	0.532	0.133	0.444	0.2 ~ 100	100	100
Per	23	27.6	1	0.065	0.216	0.054	0.180	0.2 ~ 100	100	100
DcA	23	27.6	1	0.062	0.206	0.052	0.172	0.5 ~ 100	100	100
IcP+DhA	23	27.6	1	0.015	0.050	0.013	0.042	0.5 ~ 100	100	100
BbC	23	27.6	1	0.056	0.186	0.047	0.155	2 ~ 100	-	-
Pic	23	27.6	1	0.058	0.193	0.048	0.161	2 ~ 100	-	-
BgP	23	27.6	1	0.094	0.315	0.079	0.262	0.1 ~ 100	100	90
DaP	23	27.6	1	0.082	0.274	0.068	0.228	3 ~ 100	-	-
Cor	23	27.6	1	0.082	0.275	0.069	0.229	1 ~ 100	-	-

3.6 各物質の組成比と物質間の相関関係

PM2.5とSPM中の各成分組成比(Napを除く)を図5に示す。全体ではBenzo[b]fluoranthene(BbF)が最も多く次いでBenzo[a]pyrene(BaP)が多かった。秋季には1-methylnaphthalene(1-M)や2-methylnaphthalene(2-M)の濃度が高くなった。

採取日毎にPM2.5及びSPMにおける28物質(Napを除く)の単相関を求めた結果を表8に示す。あわせて、t-PAHsとの相関も求めた。検体数が21であるため、

自由度20のときの相関係数の検定表(ピアソン)⁷⁾によると、危険率1%の値は0.537、危険率5%の値は0.423である。危険率5%で相関を有するものを薄い灰色で、危険率1%で相関を有するものを濃い灰色で示した。Phenanthrene(Phe)と4環以上の物質でそれぞれ相関を有することがわかった。これは下尾ら⁸⁾の報告にあるように4環以上の物質には分解性が低い物質が多いためと考えられる。

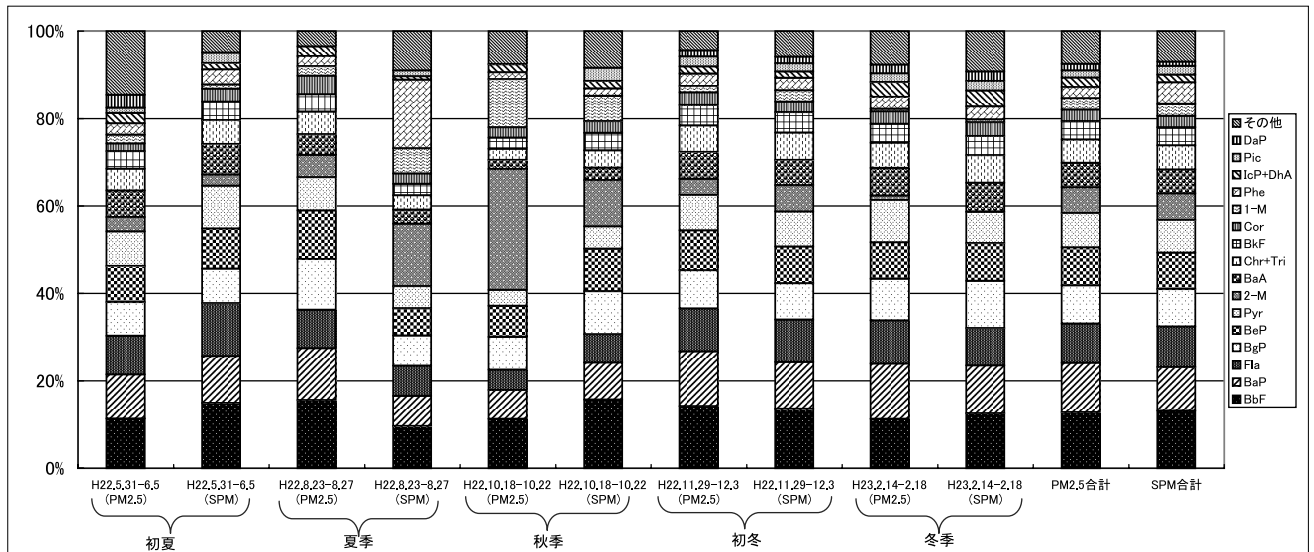


図5 PM2.5及びSPM中のPAHs組成比

表8 PM2.5及びSPM中の各PAHs間の濃度相関(n=21)

PM2.5	2-M	1-M	Acy	Ace	Flc	Phe	Ant	Fla	Pvr	o-T	m-T	p-T	BaA	Chr+Tri	BbF	BkF	BeP	BaP	Per	DaA	IcP+DhA	BbC	Phe	BgP	DaP	Cor	
2-M	1																										
1-M	0.935	1																									
Acy	0.488	0.713	1																								
Ace	0.129	0.452	0.778	1																							
Flc	0.068	0.395	0.712	0.985	1																						
Phe	-0.014	0.150	0.244	0.354	0.419	1																					
Ant	0.331	0.584	0.808	0.905	0.891	0.185	1																				
Fla	-0.079	-0.007	-0.002	0.062	0.115	0.925	-0.115	1																			
Pvr	-0.086	-0.004	0.005	0.104	0.141	0.901	-0.100	0.988	1																		
o-T	0.064	0.385	0.713	0.979	0.991	0.317	0.905	0.006	0.031	1																	
m-T	0.028	0.357	0.692	0.982	0.993	0.401	0.869	0.117	0.152	0.989	1																
p-T	0.073	0.396	0.708	0.976	0.995	0.400	0.887	0.096	0.120	0.995	0.994	1															
BaA	-0.068	0.026	0.031	0.165	0.203	0.898	-0.055	0.950	0.966	0.100	0.215	0.193	1														
Chr+Tri	-0.047	0.048	0.047	0.157	0.208	0.943	-0.038	0.976	0.973	0.100	0.209	0.194	0.981	1													
BbF	-0.031	0.014	-0.044	0.118	0.078	0.903	-0.123	0.976	0.959	-0.027	0.077	0.068	0.959	0.981	1												
BkF	-0.039	0.070	0.079	0.196	0.251	0.950	0.025	0.970	0.965	0.144	0.250	0.237	0.973	0.993	0.980	1											
BeP	-0.049	0.015	-0.014	0.075	0.130	0.911	-0.086	0.979	0.972	0.024	0.115	0.119	0.975	0.990	0.996	0.988	1										
BaP	-0.060	0.001	-0.040	0.063	0.105	0.888	-0.131	0.970	0.978	-0.003	0.115	0.092	0.987	0.988	0.983	0.979	0.991	1									
Per	-0.043	0.201	0.274	0.621	0.664	0.905	0.413	0.792	0.812	0.579	0.669	0.651	0.858	0.858	0.780	0.880	0.817	0.806	1								
DaA	-0.041	0.265	0.549	0.839	0.882	0.753	0.684	0.533	0.548	0.827	0.877	0.869	0.588	0.607	0.506	0.646	0.550	0.521	0.808	1							
IcP+DhA	-0.125	0.079	0.225	0.492	0.532	0.768	0.295	0.810	0.833	0.434	0.524	0.499	0.839	0.847	0.790	0.872	0.820	0.819	0.923	0.839	1						
BbC	-0.148	-0.115	-0.144	-0.029	-0.006	0.769	-0.255	0.882	0.901	-0.116	0.001	-0.033	0.918	0.900	0.894	0.903	0.924	0.708	0.400	0.761	0.949	1					
Phe	-0.078	-0.057	-0.132	-0.065	-0.014	0.803	-0.244	0.919	0.906	-0.120	-0.016	-0.025	0.944	0.946	0.958	0.983	0.952	0.955	0.924	0.398	0.717	0.949	1				
BgP	-0.059	0.006	-0.017	0.076	0.125	0.908	-0.100	0.978	0.977	0.017	0.129	0.110	0.978	0.990	0.990	0.987	0.995	0.814	0.543	0.835	0.915	0.953	1				
DaP	0.000	0.302	0.549	0.892	0.848	0.800	0.688	0.582	0.589	0.789	0.894	0.897	0.598	0.637	0.539	0.651	0.575	0.546	0.897	0.833	0.426	0.429	0.573	1			
Cor	-0.082	-0.087	-0.157	-0.121	-0.068	0.812	-0.279	0.906	0.887	-0.168	-0.072	-0.076	0.911	0.922	0.944	0.905	0.936	0.940	0.651	0.354	0.694	0.856	0.936	0.947	0.370	1	
t-PAHs	0.038	0.154	0.152	0.249	0.293	0.955	0.076	0.965	0.966	0.186	0.292	0.278	0.975	0.990	0.968	0.993	0.980	0.973	0.895	0.669	0.879	0.871	0.913	0.979	0.700	0.886	1

SPM	2-M	1-M	Acy	Ace	Flc	Phe	Ant	Fla	Pvr	o-T	m-T	p-T	BaA	Chr+Tri	BbF	BkF	BeP	BaP	Per	DaA	IcP+DhA	BbC	Phe	BgP	DaP	Cor
2-M	1																									
1-M	0.988	1																								
Acy	0.816	0.814	1																							
Ace	0.024	0.030	0.117	1																						
Flc	0.216	0.225	0.256	0.621	1																					
Phe	0.789	0.736	0.952	0.181	0.523	1																				
Ant	0.264	0.307	-0.176	-0.169	-0.117	-0.233	1																			
Fla	0.035	0.038	0.040	0.137	0.805	0.392	-0.110	1																		
Pvr	-0.003	0.005	-0.007	0.110	0.778	0.345	-0.099	0.995	1																	
o-T	-0.304	-0.266	-0.147	0.446	0.177	-0.182	-0.213	-0.131	-0.111	1																
m-T	-0.259	-0.227	-0.129	0.089	0.353	0.079	-0.304	0.438	0.170	0.184	1															
p-T	-0.010	0.066	0.005	0.103	0.630	0.265	0.046	0.746	0.775	0.187	0.549	1														
BaA	-0.011	0.027	-0.001	0.051	0.710	0.322	-0.110	0.934	0.957	-0.013	0.528	0.871	1													
Chr+Tri	-0.006	0.030	-0.001	0.089	0.750	0.333	-0.047	0.953	0.970	-0.011	0.534	0.898	0.981	1												
BbF	0.012	0.042	0.009	0.077	0.750	0.347	-0.038	0.967	0.979	-0.104	0.488	0.862	0.977	0.991	1											
BkF	-0.018	0.012	-0.021	0.078	0.748	0.319	-0.033	0.982	0.978	-0.057	0.506	0.869	0.976	0.995	0.995	1										
BeP	0.002	0.035	0.006	0.073	0.740	0.342	-0.056	0.980	0.976	-0.076	0.511	0.864	0.984	0.993	0.998	0.996	1									
BaP	-0.018	0.020	-0.007	0.061	0.728	0.327	-0.064	0.949	0.968	-0.036	0.538	0.892	0.988	0.997	0.993	0.995	0.996	1								
Per	-0.079	-0.039	-0.040	0.094	0.733	0.294	-0.106	0.935	0.957	0.041	0.580	0.884	0.985	0.988	0.979	0.987	0.987	0.992	1							
DaA	0.038	0.069	0.103	0.162	0.795	0.423	-0.101	0.942	0.943	-0.062	0.391	0.786	0.936	0.941	0.965	0.954	0.964	0.949	0.944	0.964	0.949	0.880	0.880	1		
IcP+DhA	-0.070	-0.322	-0.223	0.205	0.771	0.325	-0.140	0.865	0.883	0.236	0.499	0.868	0.930	0.929	0.913	0.926	0.925	0.830	0.851	0.892	0.925	0.892	0.880	0.880	1	
BbC	-0.144	-0.086	-0.103	0.140	0.808	0.194	-0.109	0.832	0.847	0.239	0.530	0.861	0.883	0.892	0.876	0.874	0.876	0.887	0.897	0.850	0.878	0.880	0.880	0.880	1	
Phe	-0.018	0.024	-0.069	0.139	0.754	0.379	-0.080	0.931	0.938	-0.078	0.421	0.814	0.941	0.950	0.970	0.958	0.967	0.958	0.948	0.906	0.880	0.880	0.880	0.880	1	
BgP	-0.024																									

3.7 常時監視項目との関連性

3.7-1 二酸化窒素との関係

PM2.5中のPAHsと二酸化窒素(以下「NO₂」という。)との関係を図6-Iに示した。NO₂の値は早鳥局での常時監視結果から、採取時での最高濃度を用いた。図6-Iでは丸で示した値によって相関関係に強く影響していることも考えられるため、その値を外したグラフを図6-IIに示した。図6-IIから、PM2.5中のt-PAHsとNO₂との間に危険率1%で相関を有することがわかった。小田ら⁹⁾も大気中のBaPと窒素酸化物(以下「NO_x」という。)で正の相関があったと報告している。PAHsとNO₂は両者とも燃焼によって生じるため、このような結果が得られたと考えられる。

3.7-2 オキシダント、紫外線Bとの関係

PM2.5中のPAHsとオキシダント(以下「Ox」いう。), 紫外線B(以下「UVB」という。)との関係を図7に示した。SPM中のPAHsとそれらの関係を図8に示した。図中ではPAHsを環の数で分類し、t-PAHsを棒グラフで、OxとUVBを折れ線グラフで示した。PAHsとUVBの濃度を左側に、Oxの濃度を右側に示した。Oxは早鳥局での常時監視結果から採取時の1

時間値(日最高値), UVBは早鳥測定局から約4kmしか離れておらず(図1), 影響もほぼ同じと考えられるため,

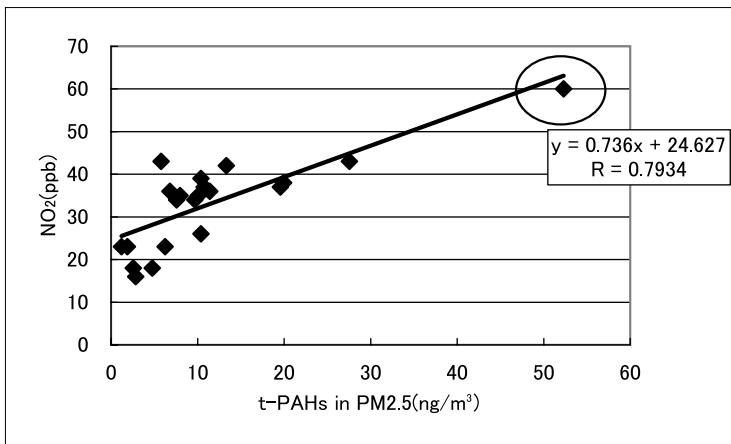


図6-I PM2.5中のt-PAHsと二酸化窒素との相関関係(n=21)

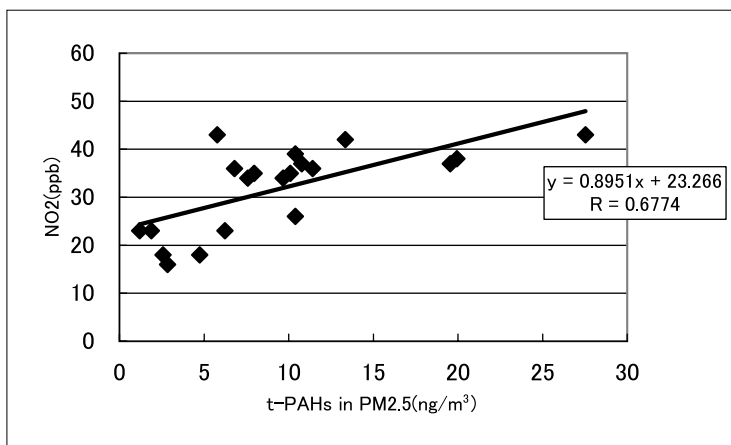


図6-II PM2.5中のt-PAHsと二酸化窒素との相関関係(n=20)

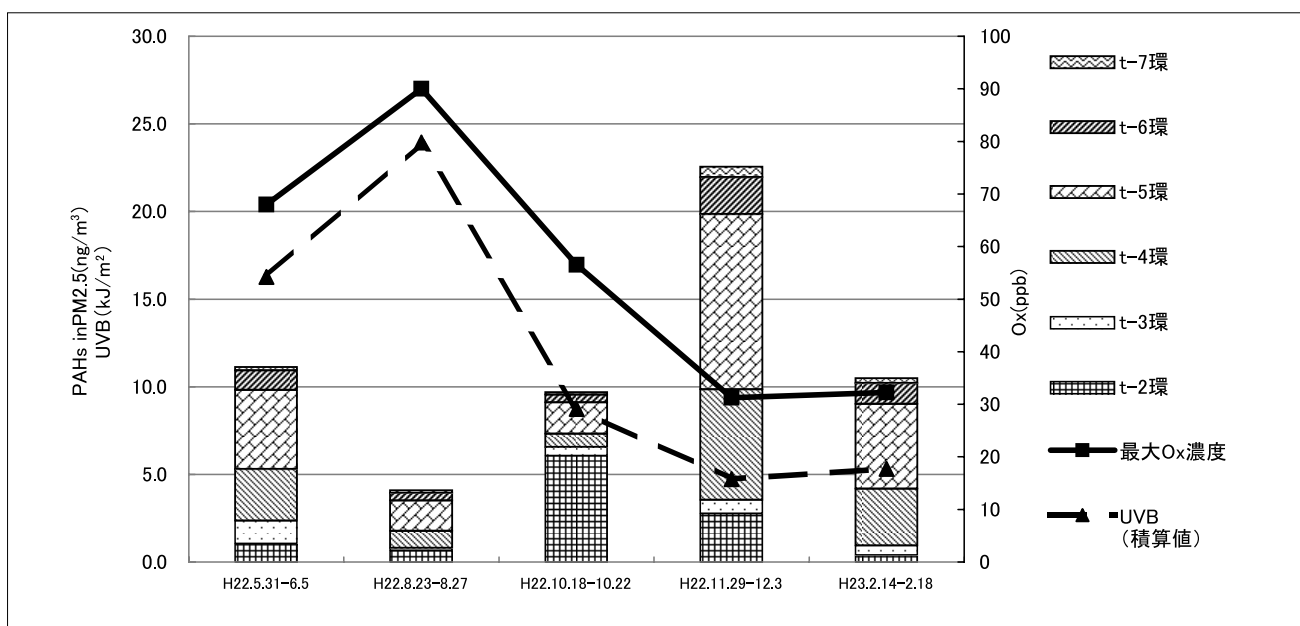


図7 PM2.5中のPAHsとオキシダント及び紫外線Bとの関係

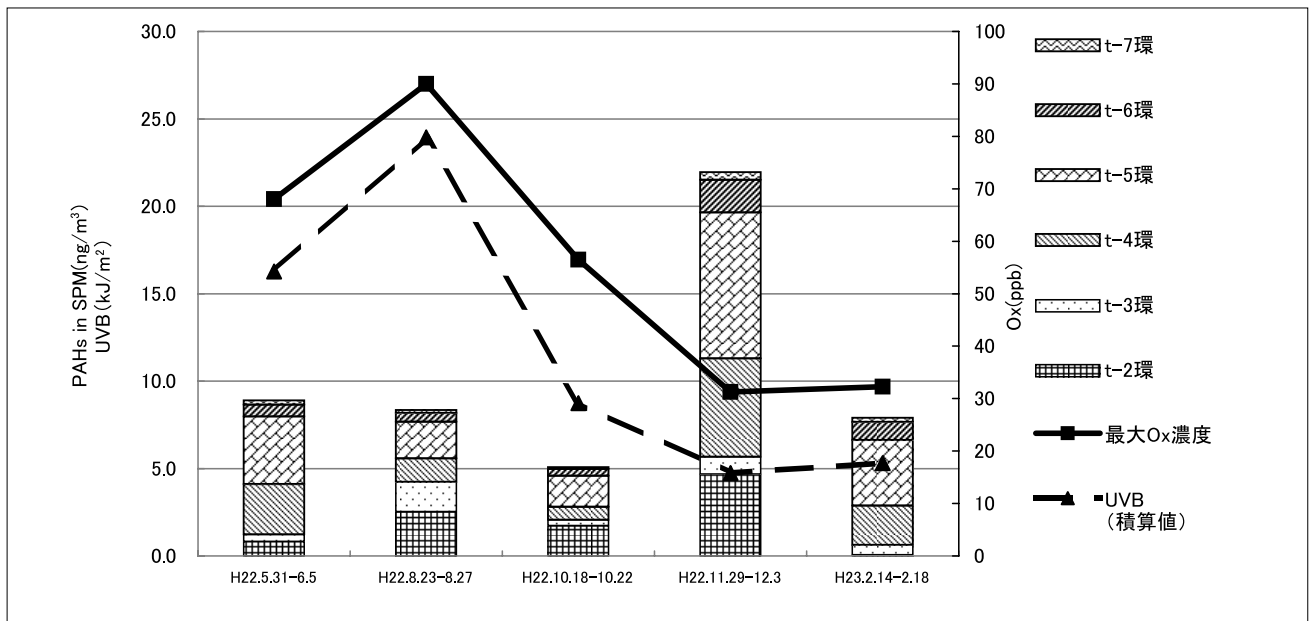


図8 SPM中のPAHsとオキシダント及び紫外線Bとの関係

県環境保健センターでの測定結果から採取時の1時間値(積算値)を用いた。図7及び図8から、夏季(8月23日～8月26日)に採取したPM2.5とSPMでt-PAHsの濃度が低い傾向にあった。この時期はOxとUVBの濃度が共に高かった。PAHsは物質によって、光やO₃やラジカル種などによる酸化分解が起こることが知られている¹⁰⁾。PAHsの光分解性は物質によって異なるが、AnthraceneやBenzo[a]pyreneは光分解性が大きいことが知られており、今回の調査でも、これらの物質は夏季に減少していた。これらのことから、OxとUVBの濃度が高かった夏季にt-PAHsが減少したと考えられる。特にSPMより粒径の小さいPM2.5の方が質量あたりの表面積が大きいので、OxやUVBと反応しやすいことにより、その影響をより強く受けたのではないかと考えられる。

4 まとめ

早島局で延べ21日間PM2.5及びSPMを捕集し、PAHsの同時分析法の検討、測定を行ったところ次に示す結果を得た。

- 1) 分子量の最も小さいNapは保存性試験で低い回収率であったが、それ以外のPAHsについては高い回収率と保存性が認められ、またサロゲート回収率も良好であった。
- 2) ChrとTri, IcPとDhAのクロマトグラムは分離が

できなかったが、それ以外のPAHsは全て分離でき同時分析が可能であったが、分子量の大きい物質はややブロードなピークとなっていた。PM2.5を23時間採取し1/4分割したサンプル量では分子量の大きい物質の感度がやや不足であるため、カラム・分析条件の再検討が必要である。

- 3) PAHsの成分組成比ではBbFが最も多く、次いでBaPが多かった。また、PM2.5及びSPM中のt-PAHsは初冬に濃度が高く、稲わら焼きの影響を受けていると考えられた。
- 4) Pheと4環以上の物質はそれぞれ相関が認められ、同じ挙動を示すことがわかった。
- 5) 常時監視項目との比較では、NO₂とは正の相関が認められ、OxやUVBが高くなる夏季にPAHsの濃度が低かった。

今回は一般環境大気測定局である早島局でのみ測定を行ったが、今後は自動車からの影響を確認するため自動車排出ガス測定局とバックグラウンドとして他の一般環境大気測定局で測定したいと考えている。

文 献

- 1) 環境省：微小粒子状物質の成分分析に係る基礎的な情報について 別添3 微小粒子状物質の対策に向けた今後のスケジュール(案) 平成22年9月 http://www.env.go.jp/air/osen/pm/ca/100901_

an3.pdf

- 2) 杉山広和, 石井尚志, 野村茂, 門田実, 前田泉: 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子状物質PM2.5による大気汚染), 岡山県環境保健センター年報 33, 1-5, 2009
- 3) 石井尚志, 野村茂, 中桐未知代, 山辺真一: 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒PM2.5による大気汚染), 岡山県環境保健センター年報 34, 7-10, 2010
- 4) 環境省: 大気中微小粒子状物質(PM2.5)測定方法暫定マニュアル 改定版 平成19年7月
<http://www.env.go.jp/air/report/h19-03/index.html>
- 5) IARC (International Agency for Research on Cancer): Agents Classified by the IARC Monographs
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>
- 6) 環境省 水・大気環境局 大気環境課: 有害大気汚染物質測定方法マニュアル
排出ガス中の指定物質の測定方法マニュアル 平成23年3月
- 7) 渡邊宗孝, 寺見春恵: ビギナーのための統計学 共立出版株式会社
- 8) 下尾和歌子, 下濃義弘, 田中克正: 山口県内における多環芳香族炭化水素類の濃度分布, 山口県環境保健センター所報 第51号(平成20年度)
- 9) 小田淳子, 山辺真一, 杉山広和, 田上啓之, 前田泉: 県内における有害大気汚染物質の地域特性に関する研究(Ⅱ), 岡山県環境保健センター年報, 25, 4-6 (2000)
- 10) <http://www.aist.go.jp/NIRE/publica/news-2000/2000-11-2.htm>

【調査研究】

児島湖に関する調査研究 (3) 溶存性有機物の挙動と郷内川の汚濁負荷について

Studies on the Lake KOJIMA

(3) Behavior of Dissolved Organic Matter and Pollution Loading from the GOUNAI river

鷹野 洋, 藤田和男, 難波 勉, 坂本祐基 (水質科)

Hiroshi Takano, Kazuo Fujita, Tsutomu Nannba, Yuuki Sakamoto

要 旨

指定湖沼の児島湖について、水質汚濁の一因と考えられる溶存態有機物や栄養塩の分解挙動を調べたところ、高温期には有機物は分解されたが、低温期には溶存態有機物はほとんど分解されなかった。アンモニア態窒素は高温期には硝化作用で減少したが、低温期には増加する傾向であった。リン酸態リンは年間を通して増加する傾向であった。流入河川では倉敷川支流の郷内川が上流部の生活排水と農業排水で汚濁しており、非灌漑期には倉敷川の汚濁負荷量の30%～50%を占め、郷内川の浄化対策が必要であった。郷内地区は下水道工事が行われており、今後生活系負荷は減少すると考えられた。

[キーワード：児島湖、溶存態有機物、栄養塩、生活排水、汚濁負荷量]

[Key words : Lake KOJIMA, Dissolved Organic Matter, Nutrients, Waste water, Pollution Loading]

1. はじめに

指定湖沼に指定されている児島湖は、湖沼水質保全計画の策定や実施、下水道整備や湖底の浚渫など、岡山県、流域市町及び国による水質改善対策の進展により、平成21年度は昭和60年度の指定以来初めて窒素の環境基準1 mg/Lを達成した。しかし、CODとリンについては改善傾向にはあるものの、未だ環境基準の達成には至っていない^{1), 2)}。

ところで、全国の湖沼の中には水質改善が緩やかになったり、悪化の傾向に転じているところもあり、これらの水質改善を阻んでいる要因として、生物学的に難分解性の溶存態有機物(DOM)の蓄積・増加が考えられている^{3), 4)}。児島湖では有機物の半分以上をDOMが占めている⁵⁾ことから、DOMの挙動を知ることは今後の浄化対策を考える過程において重要である。

今回、児島湖水の分解実験を行い、DOM等の分解特性を調べたので報告する。また、倉敷川支流の郷内川は生活系と農地系の負荷量が極めて大きく、郷内川から児島湖へ流入するDOMや栄養塩の割合も大きかったので、汚濁負荷の特徴と削減の方法について検討した。

2. 方法

2.1 調査地点

児島湖内の調査地点は図1(a)に示す5地点、倉敷川支流の郷内川は図1(b)の6地点である。

2.2 採水頻度

採水は概ね毎月1回、天候が安定した上旬から中旬頃に行った。試料は速やかに持ち帰り、分析に供した。

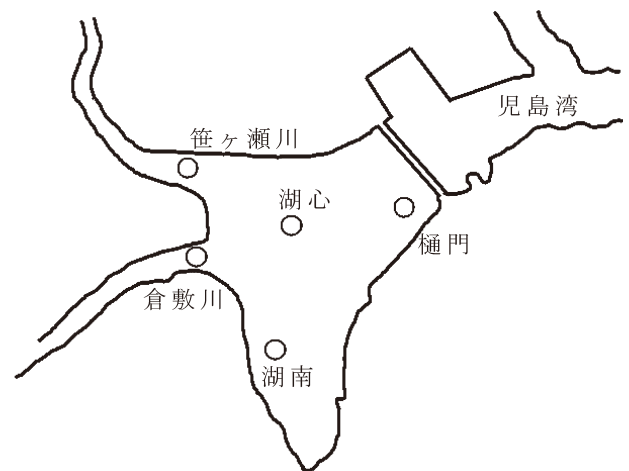


図1(a) 児島湖の調査地点



図1 (b) 倉敷川と郷内川の調査地点

2.3 分析方法

溶存酸素 (DO), COD, BOD, 全窒素 (T-N), 全リン (T-P), 懸濁物 (SS), 強熱減量 (IL) は試料全量を, 溶存態窒素 (D-N), 硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$), 亜硝酸態窒素 ($\text{NO}_2\text{-N}$), アンモニア態窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$), 溶存態リン (D-P), リン酸態リン ($\text{PO}_4\text{-P}$) は whatman GF/C でろ過したろ液を JIS K0102 にしたがって分析した。全有機炭素 (TOC) と溶存態有機炭素 (DOC) は島津製 TOC-VCSH で測定した。懸濁態 COD, 懸濁態窒素, 懸濁態リン, 懸濁態 TOC はそれぞれの全量から溶存成分を差し引いて求めた。流量は東洋電探製 TX-105X で求めた流速に河川の断面積を乗じて求めた⁶⁾。

有機物の分解試験は採水時の水温で 24 日間静置培養し, その後分析に供した。一般に DOM の分析では 20°C , 100 日間の振とう培養が行われている⁷⁾が, 児島湖の滞留日数は平均 20 日と短い⁸⁾ため, 培養日数は平均滞留日数に近い 24 日間とした。また, 培養温度は児島湖の水温が夏期は約 30°C , 冬期は約 5°C まで変化する²⁾ことから, 採水時の水温とした。

3. 結果及び考察

3.1 平成 22 年度の児島湖

平成 22 年 (2010 年) 度は気象庁から異常気象情報が出されるほど全国的に夏期は高温であった⁹⁾。児島湖流域も例外ではなく岡山気象台の平均気温は 30.5°C と平年値よりも 2.6°C も高くなり, 降水量も 7 月下旬から 8 月中旬の 1 ヶ月間は 11 mm の降雨しかなく, 平年値の 90.5 mm に比べて少なかった¹⁰⁾。そのような異常高温の影響と思われるが, 7 月から 9 月にかけて児島湖で 13 年ぶり¹⁾

に藍藻の *Anabena* sp. と *Microcystis aeruginosa* のアオコが発生した。また, 平成 23 年 (2011 年) 1 月は湯水の影響¹⁰⁾で児島湖の滞留日数が長くなり⁸⁾, 珪藻の *Cyclotella* sp. が大増殖したことが, Chl-a の平均値が前年よりも高くなった要因と考えられる (図 2)。

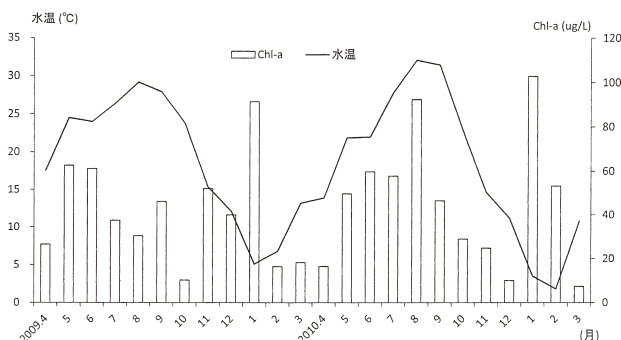


図 2 湖心における水温と Chl-a の変動

3.2 有機物の分解特性

図 3 に全 COD (T-COD) と溶存態 COD (D-COD) の分解実験の結果を示した。T-COD は未ろ過の試料をそのまま密封し, D-COD は whatman GF/C でろ過したろ液を密封したものを採水時の水温に設定した恒温器内で培養したものであり, 数字は 0 日目から 24 日後の値を差し引いており, グラフは 24 日間の分解試験期間における有機物の減少量を表している。

T-COD は 2009 年 6 月には分解前に 8.1 mg/L であったものが分解後は 5.0 mg/L となり, 分解率が 38% になるなど春期から夏期にかけて高い分解率を示したが, 秋期から冬期には分解率が悪くなり, 2010 年 12 月には分解前に 4.3 mg/L であったものが分解後は 3.9 mg/L となり, 分解率は 9.3% に低下した。T-COD は年間をとおしては 10% ~ 40% 程度分解されたが, 季節変動が激しいことと, 低温期に分解されにくい傾向が見られた。

2010 年 4 月からはろ液の分解試験も行った。2010 年 7 月には分解前の D-COD 5.4 mg/L が分解後に 4.4 mg/L と分解率が 18% になり, 春期から夏期にかけては 10% ~ 20% の分解率を示したものの, 秋期から冬期の低温期には分解率が 0% ~ 2.5% と殆ど分解されなかった。したがって, D-COD は高温期には 80 ~ 90%, 低温期には 95% 以上は難分解性有機物 (DOM) で占められていると考えられた。

図 4 に T-COD と D-COD の変動を示したが, 浄化作用を受けにくい D-COD = DOM が年間平均で 4.7 mg/L ,

T-CODに対する割合では約70%も存在しており、CODがなかなか減少しない一因と考えられた。

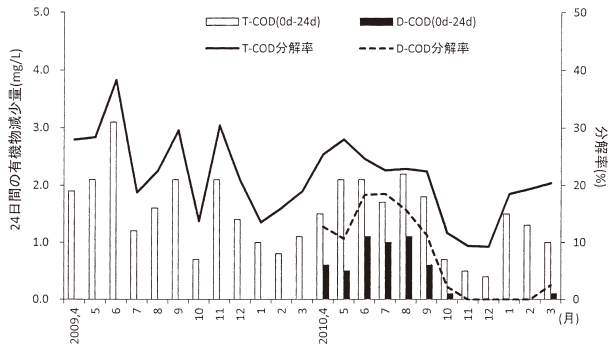


図3 湖心におけるT-CODとD-CODの分解

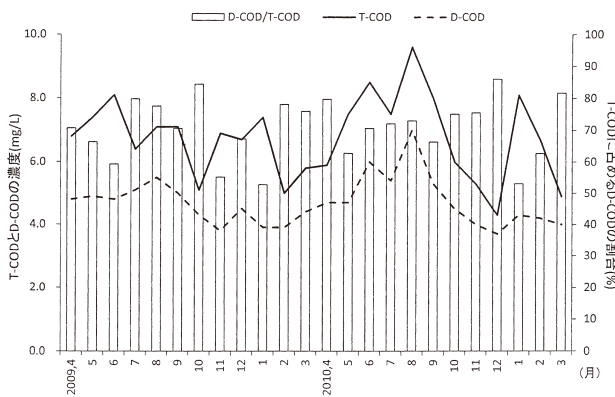


図4 湖心におけるT-CODとD-CODの変動

3.3 栄養塩の分解特性

栄養塩の分解に伴う挙動を調べ、図5にNH₄-NとPO₄-Pの増減を示した。CODの場合とは異なり、培養後に増加した場合をy軸の正方向にプロットしている。

平成21年度のNH₄-Nは増減の変動は小さかったが、高温期に減少し、低温期に増加する傾向が見られた。平成22年度は8月にアオコが発生と1月は珪藻の増殖が観測された。NH₄-Nは8月には培養前に0.031 mg/Lであったものが培養後に0.557 mg/Lに、1月には0.010 mg/Lであったものが0.302 mg/Lにそれぞれ増加した。これとは対照的に懸濁性有機物の指標である強熱減量(IL)は8月には9.3 mg/Lが2.4 mg/Lに、1月には9.6 mg/Lが5.6 mg/Lそれぞれ減少しており、試料中に含まれていた藻体が分解したことにより分解産物としてNH₄-Nが増加したと考えられる。反対に、平成22年11月には分解前に0.224 mg/LであったNH₄-Nが分解後は0.010 mg/Lに減少している。これは分解前のTOCが3.0 mg/Lと児島湖の平均値4.7 mg/Lの2/3程度と有機物が少なく、有機

物の分解によるNH₄-Nの供給が減少して、水中の酸素によってNO₂-NやNO₃-Nに酸化されたと考えられる。平成22年8月をアオコによる特異なデータとして考えると、NH₄-Nは高温期にはNO₂-NやNO₃-Nに酸化されて減少するが、低温期には増加する傾向にあると考えられる。

一方、PO₄-Pは一部の例外はあるものの全体的に増加の方向であった。PO₄-PはNH₄-NがNO₂-NやNO₃-Nになるような形態変化が殆どなく、有機物の分解に伴って供給されたPO₄-Pは溶存態のまま存在するか、懸濁物として沈殿すると考えられる。

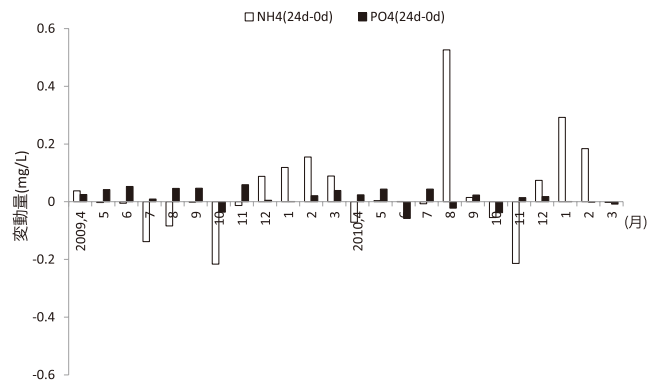


図5 分解実験におけるNH₄-NとPO₄-Pの変動

3.4 郷内川の変動

3.4.1 藤戸橋

児島湖の主要な流入河川である倉敷川の調査を行ったところ、倉敷川の中流で合流している郷内川の窒素、リン濃度が非常に高濃度であることが判明し(図6)、倉敷川への負荷も大きいことが推測されたため、郷内川を対象として栄養塩等の調査を行った。(図1(b))

郷内川は倉敷川流域で唯一の自然河川であり、上流部は自然豊かな丘陵地帯であるが、中流域より下流は水田

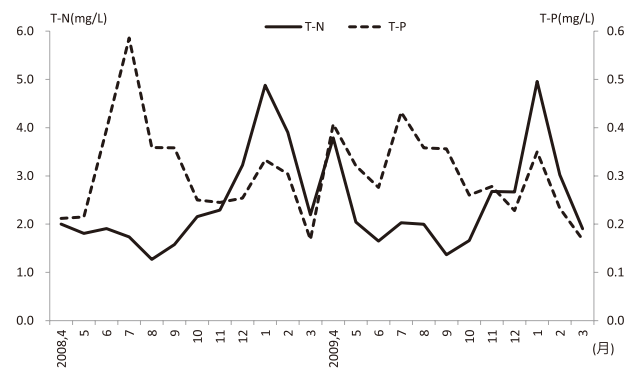


図6 藤戸橋における窒素とリンの濃度変動

が多く、住宅開発も盛んに行われている¹⁾。測定点として図1(b)に示した郷内川の郷内上橋、藤戸橋及び福江川とし、合流地点直下の倉敷川稔橋を比較対象とした。図7(a)に藤戸橋のCODとBOD、図7(b)に稔橋の濃度変動を示したが、藤戸橋のCODは平均で7.8 mg/Lと稔橋の平均COD 5.6 mg/Lの約1.5倍と明らかに高く、夏期のみならず冬期にも濃度が上昇する傾向があった。図8(a)に藤戸橋、図8(b)に稔橋の全窒素と全リンを示したが、これらも藤戸橋は稔橋の約1.5倍程度であり、上流部からの汚濁負荷が大きいことがうかがえた。また、藤戸橋の特徴として夏期にリンが、冬期には窒素、リンの濃度が上昇していることであり、2種類の汚濁源が存在すると考えられた。

3.4.2 郷内上橋

藤戸橋の上流部である郷内上橋の結果を図9(a)にCODとBOD、図9(b)に窒素とリンの変動を示した。郷内上橋は8月にリンが0.619 mg/Lと高濃度を示し、藤

戸橋で夏期に見られるリンの高濃度はさらに上流部の影響があると考えられた。郷内上橋の上流部には住宅団地が2ヶ所あり、河川沿いは住宅が密集するとともに、水田と山林の占める割合も大きくなっている¹⁾。図10(a)に郷内上橋での水量を示したが、夏期の8月は 2.6×10^3 t/dと農業用水の増加にともない郷内川の水量は増加するが、冬期の2月は 0.5×10^3 t/dと極端に減少し、約5倍の水量差が生じている。しかし、8月のリン濃度は0.62 mg/Lと2月の0.53 mg/Lに比べて高い濃度を示した。

ところで、郷内上橋の上流部では岡山県により水田の原単位調査が行われているが、計測されたリンの原単位は4.88 kg/年/haであり、これまで全国で調査された原単位の中でも大きい値を示している¹⁾。したがって、この流域の土壌はリンの保持性が悪く、水系へ漏れやすい性質と考えられ、郷内上橋の夏期に見られるリンの高濃度は水田からの負荷と考えられた。

一方、冬期には窒素とリンが共に高い濃度となったが、周辺の水田は一期作で冬期は耕作されていないことか

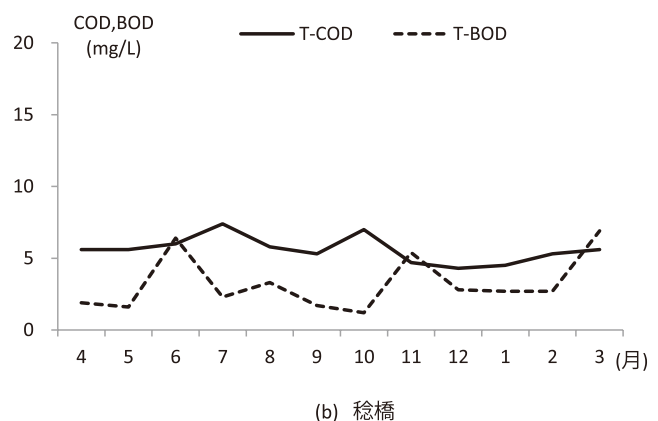
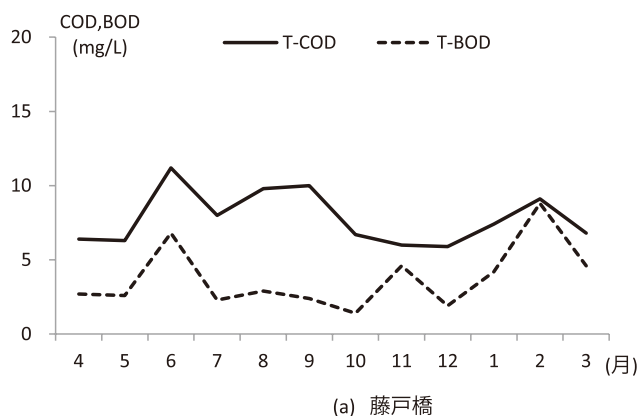


図7 藤戸橋と稔橋におけるCODとBODの変動

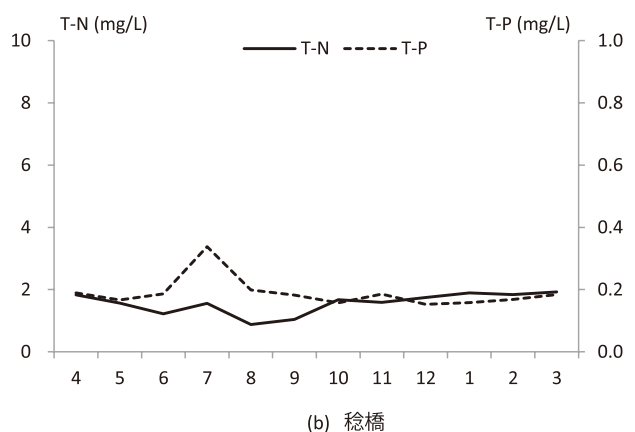
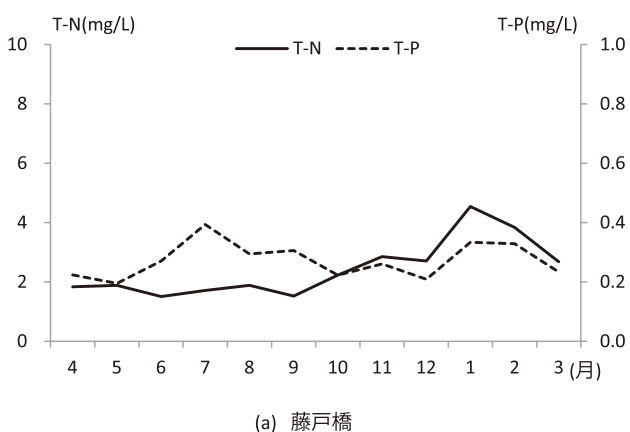
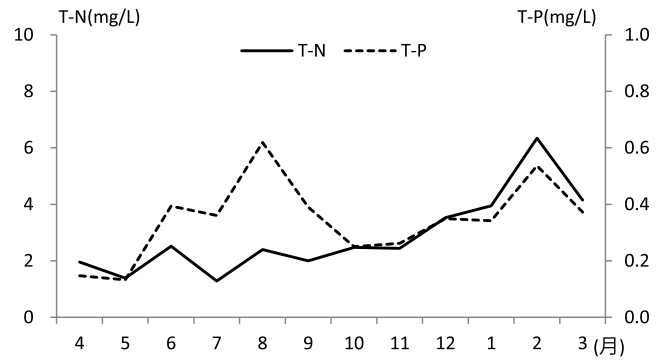
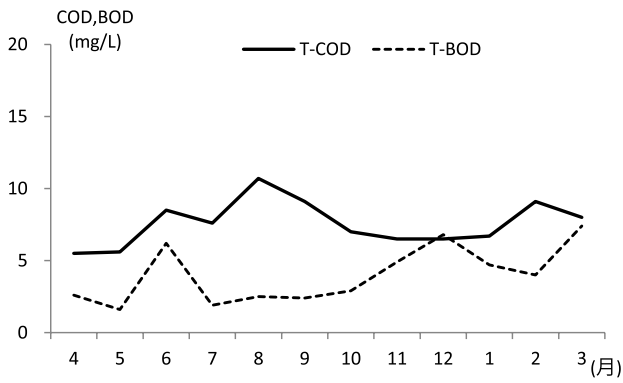


図8 藤戸橋と稔橋におけるT-NとT-Pの変動

ら、別の要因が考えられた。郷内川上橋での水量を図10(a)に示したが、冬期は水量が減少して汚濁源からの負荷が河川で希釈されていないこと、窒素とリンがほぼ同じような濃度変化を示していることから、定常的に河川に流入する生活系排水が汚濁源と考えられた。

3.4.3 福江川

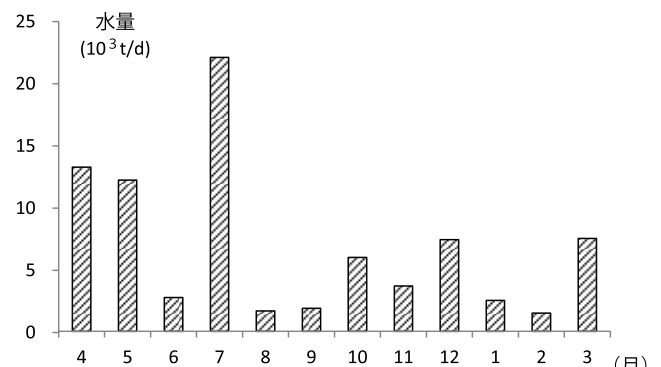
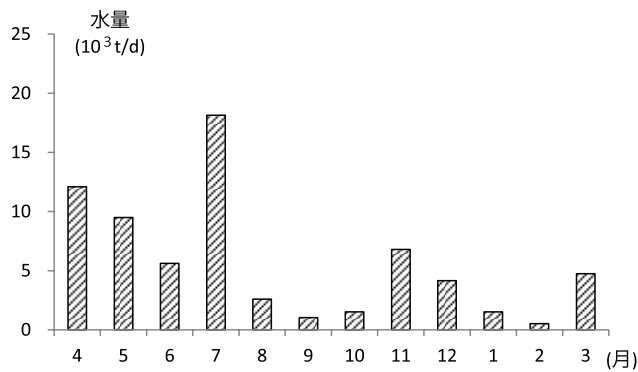
郷内上橋では福江川が郷内川へ合流しており(図1(b)), 郷内川に与える影響は大きいと思われる。図11(a)にCODとBODを示したが、夏期以外はBOD/COD比が高く、冬期にはCODよりもBODが高くなる場合が見ら



(a) COD, BOD

(b) T-N, T-P

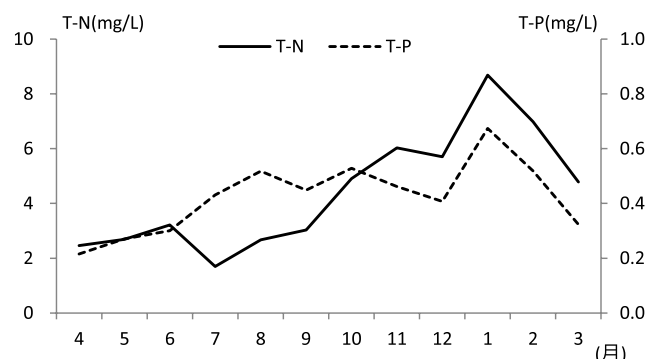
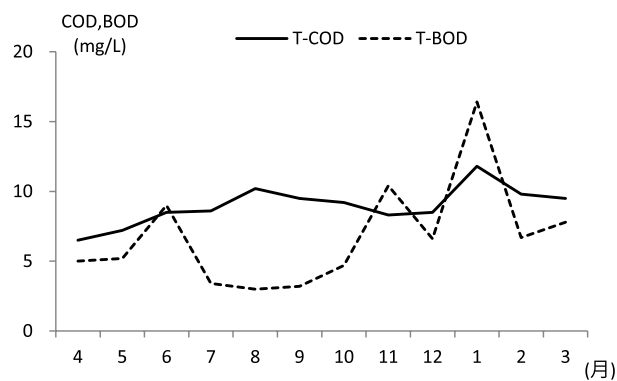
図9 郷内上橋における汚濁物質の変動



(a) 郷内上橋

(b) 福江川

図10 郷内上橋と福江川の水量変化



(a) COD, BOD

(b) T-N, T-P

図11 福江川における汚濁物質の変化

れ、未分解の有機物が多いことが推測された。図 11 (b) には窒素とリンの濃度変化を示したが、窒素は秋期から冬期に非常に高くなり、特に窒素が 8.6 mg/L と高くなっていた。これは藤戸橋の冬期に見られた窒素の濃度ピークと良く合致していた。リンはほぼ 1 年をとおして高濃度のままであったが、冬期に向かって高くなり、1 月は 0.67 mg/L と最大となっていた。図 10 (b) に示すように、福江川も灌漑期 (6 月～9 月) は農業用水の増加によって汚濁物は希釈されるが、非灌漑期 (10 月～5 月) になると農業用水がなくなり、生活排水が主要な水源になるとともに主要な汚濁源になっていると考えられる。

藤戸橋の濃度変化は夏期は郷内川上流の水田排水、秋期から冬期は生活排水が影響していることが明らかとなった。

3.4.4 郷内川の汚濁負荷量

これまで郷内川の水質について検討したが、採水と同時に水量を測定しており、濃度と水量から負荷量を算出し、図 12 (a) から (d) に各採水地点での窒素とリンの負

荷量の変動を示した。郷内上橋と福江川の負荷量の合計は藤戸橋の負荷量とほぼ同量であり、上流での負荷が下流の汚濁を左右していることが明らかとなった。また、稔橋に対する郷内川の負荷割合を図 13 に示したが、灌漑期 (6 月～9 月) は 1%～4% 程度であるものの、非灌漑期 (10 月～5 月) は 10%～20%、春期は 20%～50% にも達し、非灌漑期に児島湖へ倉敷川から流入する負荷の主要な部分を郷内川が占めていることが明らかとなった。

郷内川は冬期に窒素、リンの濃度や負荷量が増加することから、要因として生活系排水の負荷が考えられた。そこで、土地利用形態が割合に単純で、河川からの負荷量が大い福江川について、統計資料^{11), 12)}と原単位¹¹⁾から窒素の発生負荷量を算出し、河川流量で割って濃度換算したものを図 14 に示した。年間の濃度レベルと変動パターンが観測結果とほぼ一致しており、福江川は主に生活系負荷、ついで農地系負荷によって汚濁し、郷内川へ流入していることが明らかとなった。

平成 21 年度現在の郷内地区の下水道整備率は約 12%

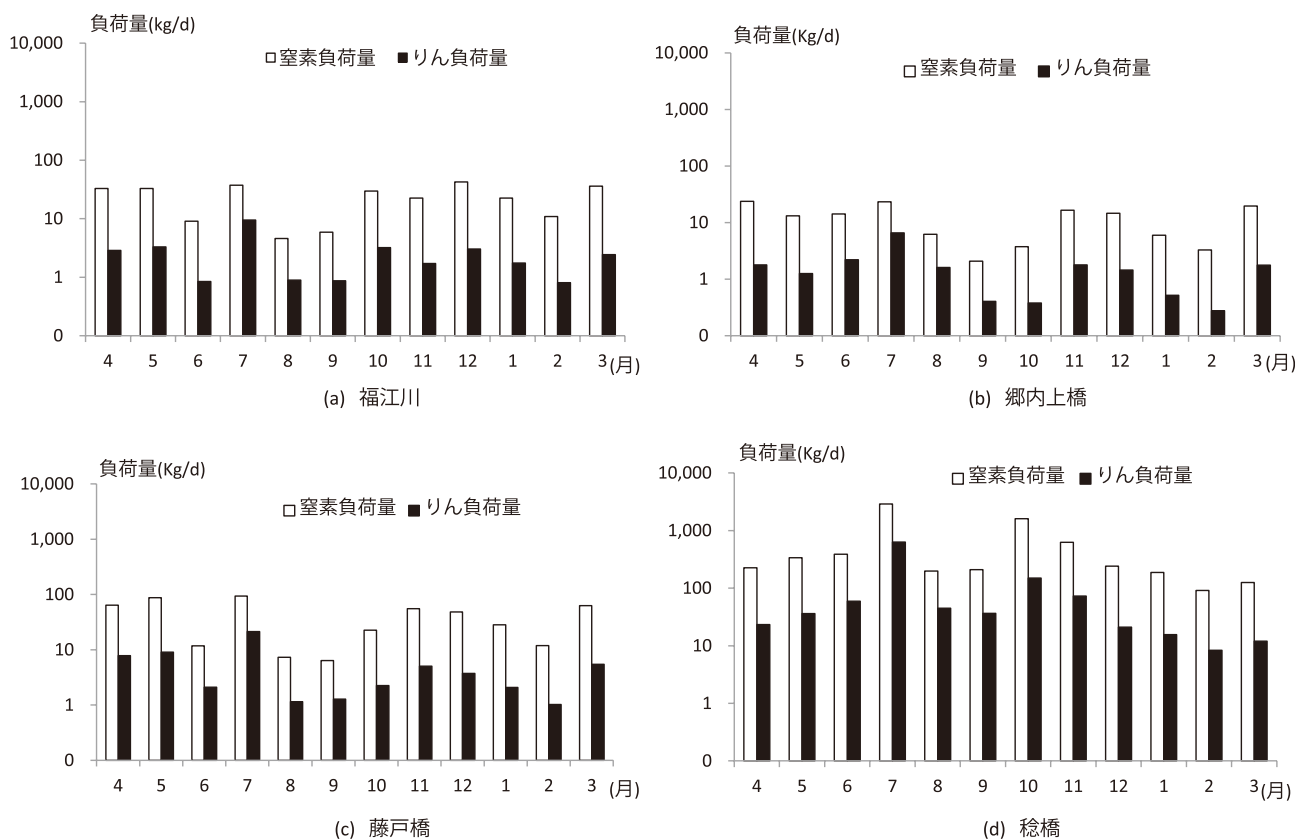


図 12 郷内川における汚濁負荷量の変動

と低くなっているが、下水道工事は盛んに行われており、下水道整備が完了すれば福江川や郷内川からの生活系負荷は大きく減少し、郷内川の負荷も大部分が削減されると思われる。

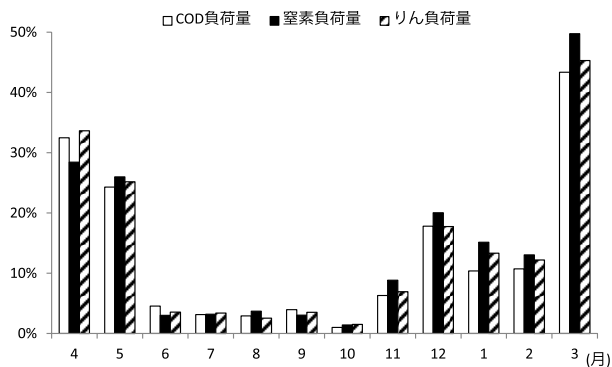


図 13 穂橋に対する藤戸橋の負荷割合の変動

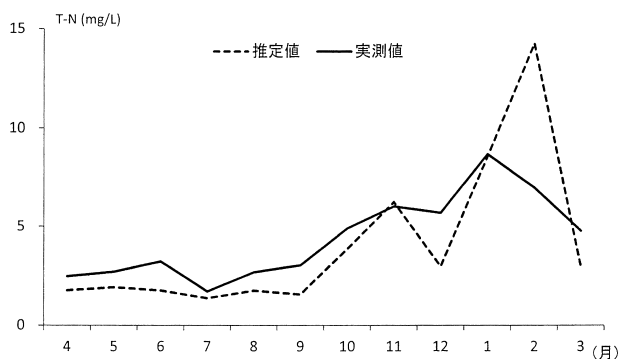


図 14 福江川における窒素の実測値と原単位による推定値

4. まとめ

児島湖の水質と流入河川の状態を調査し、以下のよう
な結果を得た。

平成 22 年度の児島湖は夏期のアオコ発生と冬期の珪藻増殖で水質は悪化した。T-CODは年間をとおして 10%～30%程度分解したが、D-CODは高温期でも 10%～20%程度の分解率であった。NH₄-Nは高温期に減少し、低温期に増加する傾向を示し、PO₄-Pは年間をとおして増加する傾向であった。

郷内川の上流での濃度及び負荷量は下流の変動とほぼ

一致した。原単位や水量から計算すると、灌漑期(6月～9月)は水田排水、非灌漑期(10月～5月)は生活排水が郷内川からの主要な汚濁源と考えられた。郷内川からの負荷量は、非灌漑期には倉敷川の負荷量の 30%～50%に達し、児島湖の主要な負荷源と考えられた。

郷内地区の下水道整備が完了すれば生活系負荷は大きく減少し、児島湖への負荷量の大幅な削減が期待される。

引用文献

- 1) 岡山県環境文化部環境管理課：児島湖ハンドブック(平成 22 年度版), 2011
- 2) 岡山県：平成 21 年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2010
- 3) 全国湖沼環境保全対策推進協議会：全国湖沼資料集, 平成 10 年度～平成 20 年度
- 4) 環境省水環境部：湖沼水質保全対策・総合レビュー検討調査報告書③琵琶湖編, 2005
- 5) 野上, 西, 島村, 宮永：児島湖流域河川における有機汚濁物質の特性, 水環境学会誌, Vol.28, No.3, 2005
- 6) (社)日本河川協会：建設省河川砂防技術指針(案)同解説 調査編, 山海堂, 東京(2006)
- 7) 小松, 今井, 松重, 奈良, 川崎：三次元励起蛍光スペクトル法による霞ヶ浦湖水及び流域水中 DOM の特性評価, 水環境学会誌, Vol.31, No.5, 2008
- 8) 岡山県：平成 15 年度～平成 20 年度児島湖縮切堤防樋門操作月報
- 9) 気象庁：平成 22 年(2010 年)夏の異常気象分析検討会報道発表資料
- 10) 岡山地方気象台：2010 年 7 月, 8 月, 2011 年 1 月気象月報
- 11) 岡山県：児島湖総合水質改善対策推進事業委託業務報告書, 2002
- 12) 倉敷市資料

【調査研究】

児島湖の水質シミュレーション計算

Simulation Calculation of Water Quality of Lake Kojima

藤田和男, 難波 勉, 坂本祐基, 鷹野 洋, 板谷 勉 (水質科)

Kazuo Fujita, Tsutomu Nanba, Yuuki Sakamoto, Hiroshi Takano, Tsutomu Itadani

要 旨

児島湖湖心および主な流入河川である笹ヶ瀬川および倉敷川において、CODと窒素・リンについて、最近の4年間(2007～2010年度)にかけての調査結果をモデル式に当てはめシミュレーション計算を行った。過去10年分の結果(1997～2006年度)を用いて計算した場合CODの平均値は8.6 mg/Lで、実測値の7.3 mg/Lと比べて高かったが、最近の4年間の結果を用いて計算した場合7.2 mg/Lで計算結果は実測値とより一致した。

[キーワード：COD, 窒素, リン, 児島湖, シミュレーション計算]

[Key words : COD, Nitrogen, Phosphorus, Lake Kojima, Simulation Calculation]

1 はじめに

水質の把握および対策効果の策定のためには水質シミュレーション計算が有効であり、そのためには湖沼の水質を表す計算モデルが必要である。水質調査を行った後その結果を判断し、近い将来の水質を予測することでその調査結果が有効なものとなる。計算プログラムはその湖沼の調査結果をもとに計算式の定数を決定し、実際の湖沼の水質をよく表しかつ取り扱いの簡単なものが望ましいと考えられる。ここではこれまでに得られた結果をもとに数式のみから児島湖の水質モデルを組み立てシミュレーション計算を試みる。

これまでの報告において、水の濁りに関する項目(懸濁態COD(P-COD)、懸濁態TOC(POC)、SS、強熱減量(IL)、Chl.a)と懸濁態窒素(以下P-N)および懸濁態リン(以下P-P)がほぼ直線的な関係にあること¹⁾が明らかとなっており、現況再現のためのシミュレーション計算を行ってきた²⁾³⁾。前報では1997～2006年度の10年間のデータをまとめ、入力変数(流入水の水質、水温、日射、平均滞留時間)を周期的に変動するものとして表し児島湖の計算モデルを作った⁴⁾。本報では前報以降の2007～2010年度の4年分のデータを用いてシミュレーション計算を行い、計算式および結果を検討した。また、前報ではシミュレーション計算に際し月毎の入力値(水質、水温、日射、平均滞留時間)を当該の1ヶ月間変化

しないものとして一定値を与えていたが、実際には連続的に変化して推移してゆくものと考えられ、本報では計算値と実測値の差の低減を目的として連続的に変化するものとして与え計算した。その結果児島湖の水質の値や季節変化をシミュレーション計算で表せたので報告する。

2 材料および方法

2.1 調査地点および測定方法

調査地点は、図1に示すように、児島湖の2大流入河川の笹ヶ瀬川の笹ヶ瀬橋、倉敷川の倉敷川橋、および児島湖の湖心の3地点とし、月1回採水し、分析に供した。また岡山県の公共用水域調査結果^{5～8)}を用いてデータを補足した。

COD、全窒素(T-N)、全リン(T-P)、NO₃-N、NO₂-N、NH₄-N、PO₄-Pは工場排水試験法K0102⁹⁾に準じて測定した。なお、サンプルをろ紙(Whatman, GF/C)によりろ過し、ろ液のCODを溶存態COD(D-COD)とし、CODからD-CODを差し引いた値を懸濁態COD(P-COD)とした。懸濁態窒素(P-N)および懸濁態リン(P-P)についてもP-CODと同様にろ液との差から懸濁態の値を求めた。

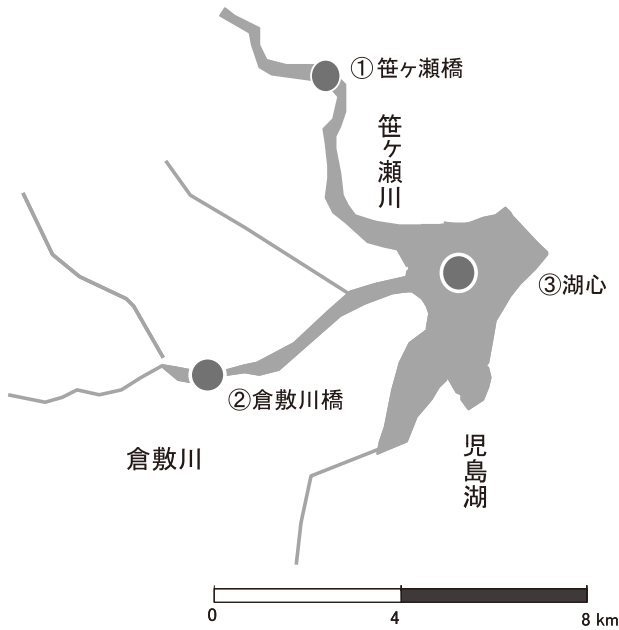


図1 調査地点

2.2 水質モデル

水域の生態系のモデルを図2に示す。計算式中の定数値はおもに報告値¹⁰⁾等に従っており、これらを図中に併せて示す。その他、湖の平均滞留時間¹¹⁾、2大流入河川である笹ヶ瀬川および倉敷川の水質^{4)~8)}および流入水量¹¹⁾、日射量(日本気象協会)を用いた。モデル式中の各項目(P-N, P-P, Chl.aおよびP-COD)間の関係式について、実測値(1997~2009年度)から得られた関係式⁴⁾を用いた(図3)。このモデルに基づくシミュレーション計算は数値計算ソフトウェアScilabを用いて行った。このソフトウェアは1990年にINRIA(フランス国立情報学自動制御研究所)で開発された数値計算ソフトであり、その特徴はフリーソフトウェアであること、計算にあたり従来のプログラム言語と比較して複雑なプログラミングを必要としないこと、微分方程式をブロック線図で表現して計算できる機能(Scicos)が付属しておりシミュレーション計算プログラムを比較的容易に作成できること¹²⁾である。計算プログラムを図4に示した。

植物プランクトンの増殖をCODで表すこととし、以下の式¹⁰⁾により計算した。

$$\begin{aligned} \frac{dA-COD}{dt} &= (\text{流入}) + (\text{増殖}) - (\text{死滅}) - (\text{沈降}) - (\text{流出}) \\ &= \left(\frac{A-COD_{in}}{\tau} \right) + (\mu \cdot A - COD) - (k_d \cdot K_T \cdot A - COD) - \left(\frac{k_{sp}}{H} \cdot A - COD \right) - \left(\frac{A-COD}{\tau} \right) \end{aligned}$$

$$K_T = \theta^{T-12}$$

ここで、A-COD：植物プランクトン態COD (mg/L), A-COD_{in}：流入水の植物プランクトン態COD (mg/L), μ ：比増殖速度 (1/day), k_d ：死滅速度 (1/day), K_T ：水温に関する影響因子 (-), θ ：水温に係る定数 1.04 (-), T：水温 (°C), k_{sp} ：植物プランクトン沈降速度 (m/day), H：水深 (m), τ ：平均滞留時間 (day) である。また植物プランクトンの死滅により生ずる有機物の沈降速度は、 k_s ：有機物沈降速度 (m/day) で表した。

式中の μ (比増殖速度) は以下の式¹⁰⁾で定義した。

$$\begin{aligned} \mu &= \text{最大比増殖速度} \times (\text{窒素因子}) \times (\text{リン因子}) \times (\text{光因子}) \times (\text{温度因子}) \\ &= \mu_{max} \left(\frac{N_d}{K_N + N_d} \right) \cdot \left(\frac{P_d}{K_P + P_d} \right) \cdot \left(\frac{E}{K_E + E} \right) \cdot \left(\frac{T}{T_S} \cdot \exp \left(\frac{T_S - T}{T_S} \right) \right)^3 \end{aligned}$$

ここで μ_{max} ：最大比増殖速度 (1/day), N_d ：無機態窒素 (mg/L), P_d ：無機態リン (mg/L), K_N ：窒素半飽和定数 (mg/L), K_P ：リン半飽和定数 (mg/L), E：日射量 (cal/cm²/day), K_E ：日射量半飽和定数 (cal/cm²/day), T_S ：増殖に最適な水温 (°C) である。

窒素については、以下の式¹⁰⁾で定義した。

$$(\text{全窒素}) = (\text{懸濁態窒素}) + (\text{溶存態窒素})$$

$$= (\text{植物プランクトン態窒素}) + (\text{有機態窒素}) + (\text{無機態窒素})$$

$$\frac{d(T-N)}{dt} = \frac{d(A-N)}{dt} + \frac{d(O-N)}{dt} + \frac{d(D-N)}{dt}$$

$$(\text{植物プランクトン態窒素}) = (\text{クロロフィルa}) \times (\text{換算係数})$$

$$\frac{d(A-N)}{dt} = \xi_N \cdot \frac{d(\text{Chl.a})}{dt}$$

$$(\text{有機態窒素}) = (\text{流入}) + (\text{植物プランクトンの死滅}) - (\text{沈降}) - (\text{流出})$$

$$\frac{d(O-N)}{dt} = \left(\frac{O-N_{in}}{\tau} \right) + (\xi_N \cdot k_d \cdot K_{TW} \cdot \text{Chl.a}) - \left(\xi_N \cdot \frac{k_L}{H} \cdot \text{Chl.a} \right) - \left(\xi_N \cdot \frac{O-N}{\tau} \right)$$

$$(\text{無機態窒素}) = (\text{流入}) - (\text{植物プランクトンによる吸収})$$

$$+ (\text{植物プランクトン分解による供給}) + (\text{底泥からの溶出}) - (\text{流出})$$

$$\frac{d(D-N)}{dt} = \left(\frac{I-N_{in}}{\tau} \right) - (\xi_N \cdot G_p \cdot \text{Chl.a}) + f_N \cdot K_{TW} \cdot (O-N) + \left(\frac{D_N}{H} \right) - \left(\frac{I-N}{\tau} \right)$$

ここで、T-N：全窒素 (mg/L), D-N：溶存態窒素 (mg/L), A-N：植物プランクトン態窒素 (mg/L), O-N：有機態窒素 (植物プランクトンの死滅によって生ずる) (mg/L), I-N：無機態窒素 (NO₃-N + NO₂-N + NH₄-N) (mg/L), I-N_{in}：流入水の無機態窒素 (mg/L), ξ_N ：植物プランクトンと窒素の換算係数 (-), k_{SN} ：有機態窒素沈

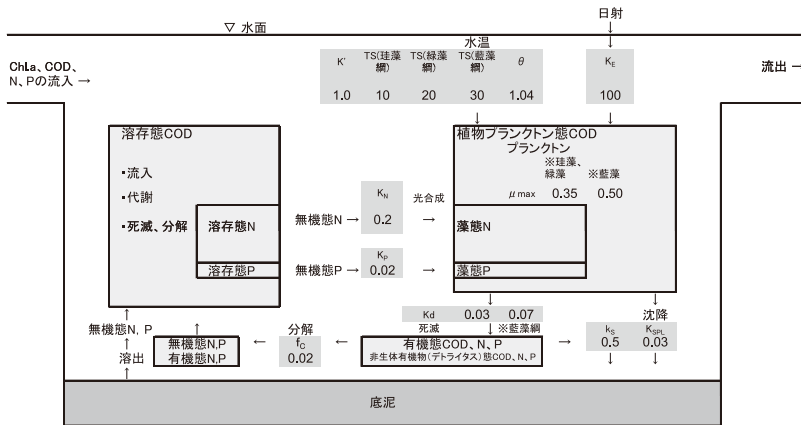


図2 計算モデル(概念図)

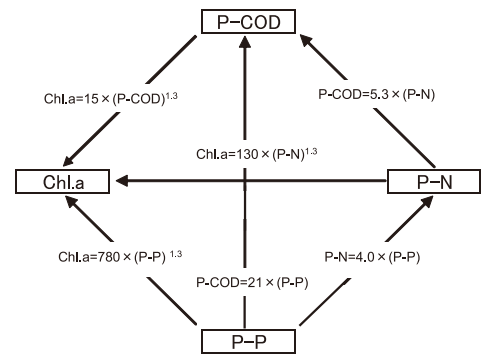


図3 P-COD, T-N, T-PおよびChl.aの関係

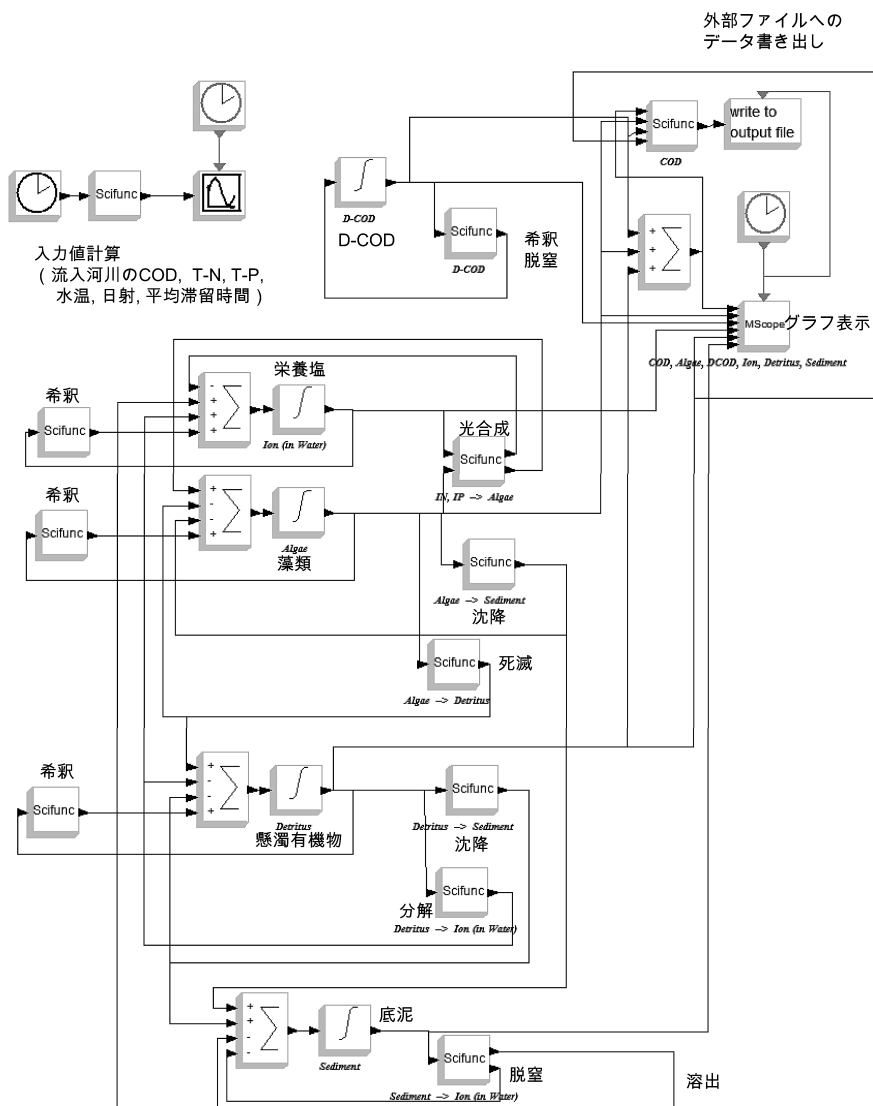


図4 計算プログラム

数値計算ソフトScilabによるブロック線図
 図中の記号 に生態系を構成する各要素(栄養塩、藻類、懸濁有機物、底泥、D-COD)の値(COD、窒素およびリン成分)、 に各要素の変化率(光合成、沈降、死滅、分解、溶出、脱室および希釈)を設定。

降速度 (m/day), f_N : 有機態窒素分解速度 (1/day), D_N : 底泥からのI-N溶出速度 (g/m²/day)である。なお, P-N (懸濁態窒素) は, A-NとO-Nの合計値である。

また, リンについては窒素と同様に,

$$\frac{d(T-P)}{dt} = \frac{d(A-P)}{dt} + \frac{d(O-P)}{dt} + \frac{d(D-P)}{dt}$$

$$\frac{d(A-P)}{dt} = \xi_p \cdot \frac{d(Chl.a)}{dt}$$

$$\frac{d(O-P)}{dt} = \left(\frac{O-P_{in}}{\tau} \right) + (\xi_p \cdot k_d \cdot K_{TW} \cdot Chl.a) - \left(\xi_p \cdot \frac{k_i}{H} \cdot Chl.a \right) - \left(\xi_p \cdot \frac{O-P}{\tau} \right)$$

$$\frac{d(D-P)}{dt} = \left(\frac{I-P_{in}}{\tau} \right) - (\xi_p \cdot G_p \cdot Chl.a) + f_p \cdot K_{TW} \cdot (O-P) + \left(\frac{D_p}{H} \right) - \left(\frac{I-P}{\tau} \right)$$

ここで, T-P: 全リン (mg/L), P-P: 懸濁態リン (mg/L), D-P: 溶存態リン (mg/L), A-P: 植物プランクトン態リン (mg/L), O-P: 有機態リン (植物プランクトンの死滅によって生ずる) (mg/L), I-P: 無機態リン (PO₄-P) (mg/L), I-P_{in}: 流入水の無機態リン (mg/L), ξ_p : 植物プランクトンとリンの換算係数 (-), k_{SP} : 有機態リン沈降速度 (m/day), f_p : 有機態リン分解速度 (1/day), D_p : 湖底からのI-P溶出速度 (g/m²/day)であり, P-P (懸濁態リン) は, A-PとO-Pの合計値とした。

2大流入河川である笹ヶ瀬川および倉敷川からの流入水量が児島湖全体の流入水量の84% (平成10年度から16年度の平均値)¹¹⁾とその殆どを占めることから, 以下の式で計算された値を流入水の水質とし, 月毎に計算した。

$$x_{in} = \frac{x_{in}(S) \times L(S) + x_{in}(K) \times L(K)}{L(S) + L(K)}$$

ここで, x_{in} : 各項目 (Chl.a, COD, T-N, I-N, T-P, PO₄-P) の流入濃度 (mg/L), $x_{in}(S)$: 笹ヶ瀬川からのxの流入濃度 (mg/L), $x_{in}(K)$: 倉敷川からのxの流入濃度 (mg/L), L(S): 笹ヶ瀬川の流量 (m³/sec), L(K): 倉敷川の流量 (m³/sec)である。

流入水の植物プランクトン種 (綱)として珪藻綱を設定し, 最適水温を珪藻綱12℃¹⁰⁾とした。

現況再現計算の入力値となる流入水の水質 (COD, T-N, T-P), 水温, 平均滞留時間および湖心の水質 (COD) は年度毎に似た増減を繰り返す傾向が見られることか

ら, 周期的なパターンの解析に用いられる正弦曲線¹³⁾により近似した。

$$y(t) = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i \sin(2\pi\omega t - b_i)$$

ここでy: 水温 (℃), 平均滞留時間 (day) またはP-COD (mg/L), t: 時間 (day), a_0 : 平均値 (振幅の中心となる値, ℃, dayまたはmg/L), a_i : 振幅 (℃, dayまたはmg/L), ω : 周期 (day), b_i : 位相 (day), i: 近似式の次数 (-)である。

3 結果および考察

3.1 流入水の水質

基礎となるデータについて公共用水域調査結果^{5~8)}により一部データを補足し, D-CODおよびP-CODは前報⁴⁾の関係式から計算した。

流入河川の水質 (COD) は, 過去10年 (1997~2006年度) の実測値を基にした場合平均7.4 mg/Lであるが, 公表されているCODの実測値 (公共用水域^{5~8)}, 2007~2009年度の3年間に基づく流入河川のCODの平均値は6.4 mg/Lであり1.0 mg/L減少していた。流入河川のT-Nの平均値も過去10年 (1997~2006年度) の値を基にした場合1.9 mg/Lであるが最近 (公共用水域, 2007~2009年度) の値を基にした場合1.5 mg/Lに減少, 同じくT-Pも過去10年の値を基にした場合0.22 mg/Lであるが最近 (公共用水域, 2007~2009年度) の値を基にした場合0.18 mg/Lに減少していた。

笹ヶ瀬川 (笹ヶ瀬橋) および倉敷川 (倉敷川橋) の水質と流量から, 最近4年間 (2007~2010年度) の児島湖への流入水のCODを月毎にプロットした (図5a, 各値を■, 平均値を□で表記)。これを前報⁴⁾と同様に正弦曲線で近似し (同図, 実線で表記), また過去10年間 (1997~2006年度)⁴⁾の月毎の平均値 (同図, ○で表記) および近似曲線 (同図, 破線で表記) を併せて示した。水質の周期的なパターンを前報⁴⁾と比較すると正弦曲線の位相や振幅はあまり変わらず a_0 (平均値) が減少しており, 過去10年間と比べて流入水のCODが減少している傾向が見られた。T-NおよびT-Pについても同様に月毎の測定値, 平均値から近似曲線を求め, CODと同様に過去10年間と比べて流入水の値が減少していることが伺われた (図5bおよびc)。

図5(d~f)に最近4年間の近似曲線を実線で、前報⁴⁾の過去10年間(1997年~2006年度)からの近似曲線を破線で示し、実測値(当センターおよび公共用水域^{5~8)})を併せて示す。過去10年間の値は最近4年間の実測値と比べいずれの項目(COD, T-NおよびT-P)とも平均値がやや高かった。

流入水の水質(COD, T-N, T-P)が過去10年間(1997~2006年度)と比較して最近4年間(2007~2010年度)で減少しているが、その要因の一つとして県が実施している農業用水の導入水量の増加¹¹⁾が考えられ、このことについて検討した。過去10年(1997~2006年度)の導入量の平均値は44.1(万m³/day)、最近4年(2007~2010年度)の導入量平均値は59.0(万m³/day)¹¹⁾で14.9(万m³/day)増加している。この増加分は児島湖への流入水

量143(万m³/day)¹¹⁾の10%にあたり、取水場所(旭川合同堰、高梁川合同堰および高梁川笠井堰)の水質及び水量(23.2, 12.3および12.1万m³/day)¹¹⁾を併せて計算すると流入水のCOD, T-NおよびT-Pを希釈によりそれぞれ5.9%, 5.2%および8.6%減少させると推算された。一方実測値から見たCOD, T-NおよびT-Pの減少量はそれぞれ14%, 21%および18%であった。このことから過去10年(1997~2006年度)と最近4年(2007~2010年度)の流入水水質の差の要因の2~4割は農業用水の導入によるものと推算されたが、ここではそれ以外の差を説明できず、今後データの検証や他の要因(公共下水道, 浄化槽, 施肥方法の変化等)も含めて検討する必要があると考えられた。

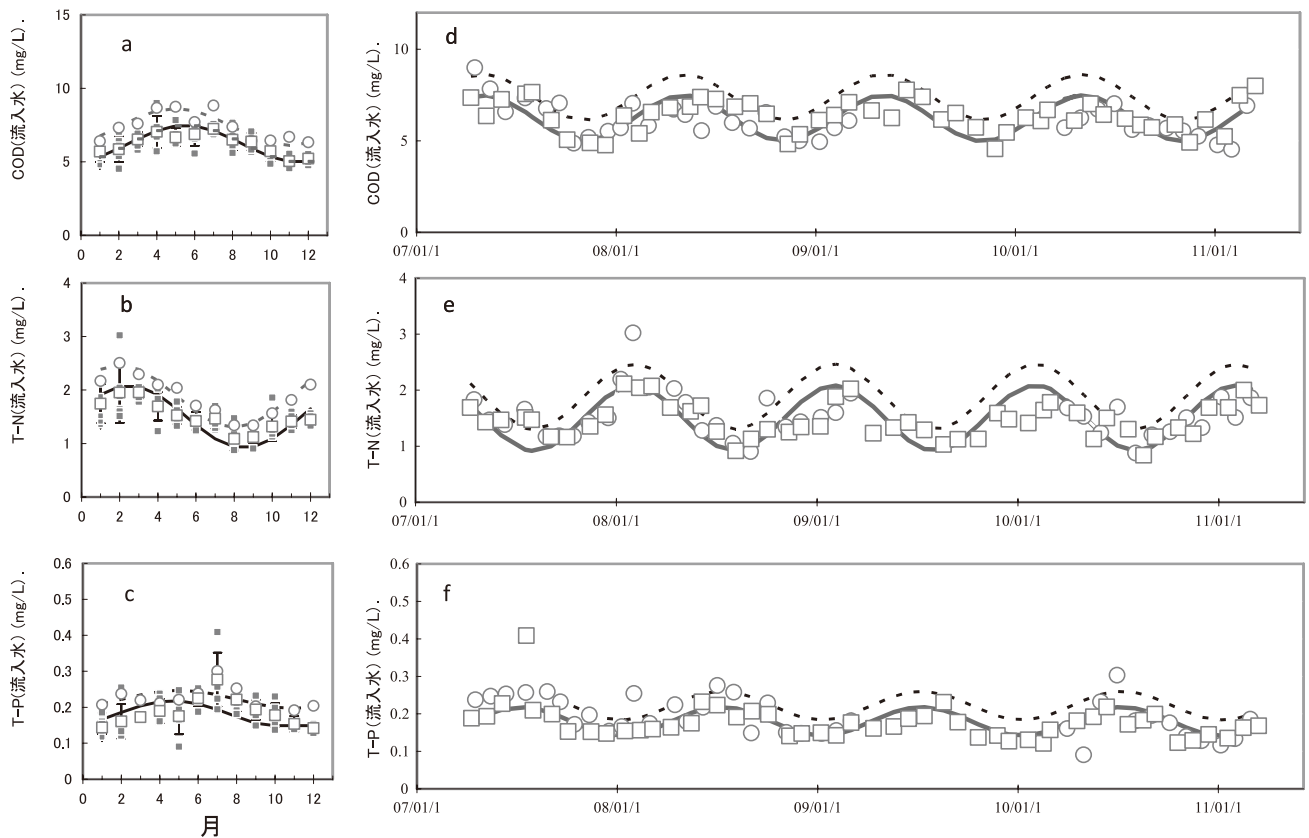


図5 流入河川のCOD、T-NおよびT-Pの計算値

a~c: 月毎の値

■: 測定値, □: 平均値, —: 計算値(近似値), ⊥および⊥: 誤差範囲(1σ)
(2007~2010年度), ○: 平均値(1997~2006年度)

d~f: 2007年度~2010年度の値

○: 実測値(当センター)からの計算値, □: 実測値(公共用水域)からの計算値
——: 2007~2010年度の値からの計算値
-----: 1997~2006年度の値からの計算値

3.2 湖水のシミュレーション計算

図6に最近4年間(2007年～2010年度)の流入水の水質に基づく湖心での水質(COD, P-COD, D-COD, T-NおよびT-P)のシミュレーション計算(図中の実線)および実測値を示す。また過去10年間(1997年～2006年度)の流入水水質を用いたシミュレーション計算(図中の破線)を併せて示す。児島湖湖心のCODおよびP-

CODの実測値は春期に高く秋期から冬期にかけて低い傾向がみられシミュレーション計算では再現された。シミュレーション計算の結果について、CODの平均値は、過去10年(1997～2006年度)の流入水の値を基に計算した場合平均8.6 mg/Lであったが、最近4年間(2007～2010年度)の値を用いて計算した場合平均7.2 mg/Lで1.4 mg/L減少した。これは報告値(公共用水域、(2007～

2009年度)^{5)～8)}でのCODの平均値7.3 mg/Lに近かった。P-CODの平均値(センター実測値)は2.0 mg/Lだがシミュレーション計算の平均値は2.4 mg/Lで20%高い値であった。T-Nはシミュレーション計算の平均値が1.1 mg/Lで公表されている公共用水域のT-N平均値(2007～2009年度の3年間)1.2 mg/Lより8%低い値であった。T-Pはシミュレーション計算の平均値が0.17 mg/Lで公表されている公共用水域T-P平均値(2007～2009年度の3年間)0.19 mg/Lより10%低い値であった。計算値と実測値の差の要因については今後とも検討する必要がある。

最近4年間での流入水の水質の改善傾向が今後とも長期的に継続するのか、直近の4年間でのみみられた傾向であるのかは今後の調査結果から検討する必要がある。

児島湖の水質について上述で数理モデルに基づきシミュレーション計算を行ったが、1つの式(時間のみを変数とする正弦曲線)で近似した場合、扱いが容易であると考えられ、最近4年間(2007～2010年度)の水質(COD)の

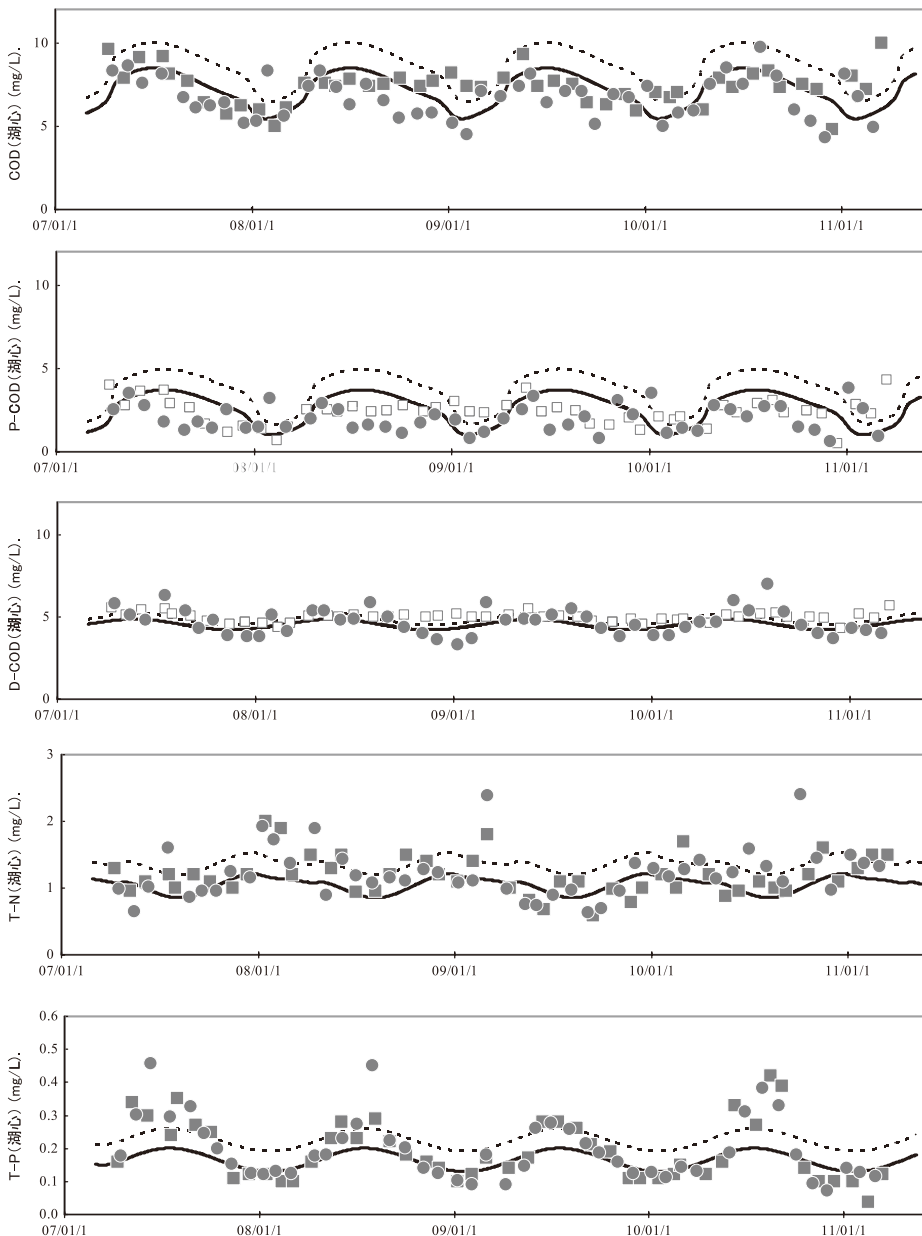


図6 児島湖のCOD, T-NおよびT-Pの実測値および計算値

- : 実測値(当センター)
- : 実測値(公共用水域)
- : 実測値(公共用水域、CODとD-CODの関係式⁴⁾から計算)
- : シミュレーション計算値(2007～2010年度の値から計算)
- - - : シミュレーション計算値(1997～2006年度の値から計算)

フーリエ級数¹³⁾による近似を図7に示す。最も単純な近似式は以下

$$\text{COD} = 7.0 + 0.94 \cdot \sin\left(\frac{2\pi t}{T} + 5.3\right)$$

で表された。より短い周期の正弦曲線を重ねあわせた近似式

$$\text{COD} = 7.0 + 0.94 \cdot \sin\left(\frac{2\pi t}{T} + 5.3\right) + 0.46 \cdot \sin\left(2 \cdot \frac{2\pi t}{T} + 1.9\right) + 0.34 \cdot \sin\left(3 \cdot \frac{2\pi t}{T} + 2.3\right) + 0.16 \cdot \sin\left(4 \cdot \frac{2\pi t}{T} + 1.6\right)$$

では春期に高く秋期および冬期の2月に低いパターンとして表された。

シミュレーション計算の応用として現状の評価および将来の予測が考えられる。流入水の水質を構成している各因子の寄与率を算定できれば、例えばある因子に対してどのような浄化施策を行えばどれだけの水質改善効果があるかについて推算出来ると考えられ、今後の課題として流入水の要因別の評価が考えられる。

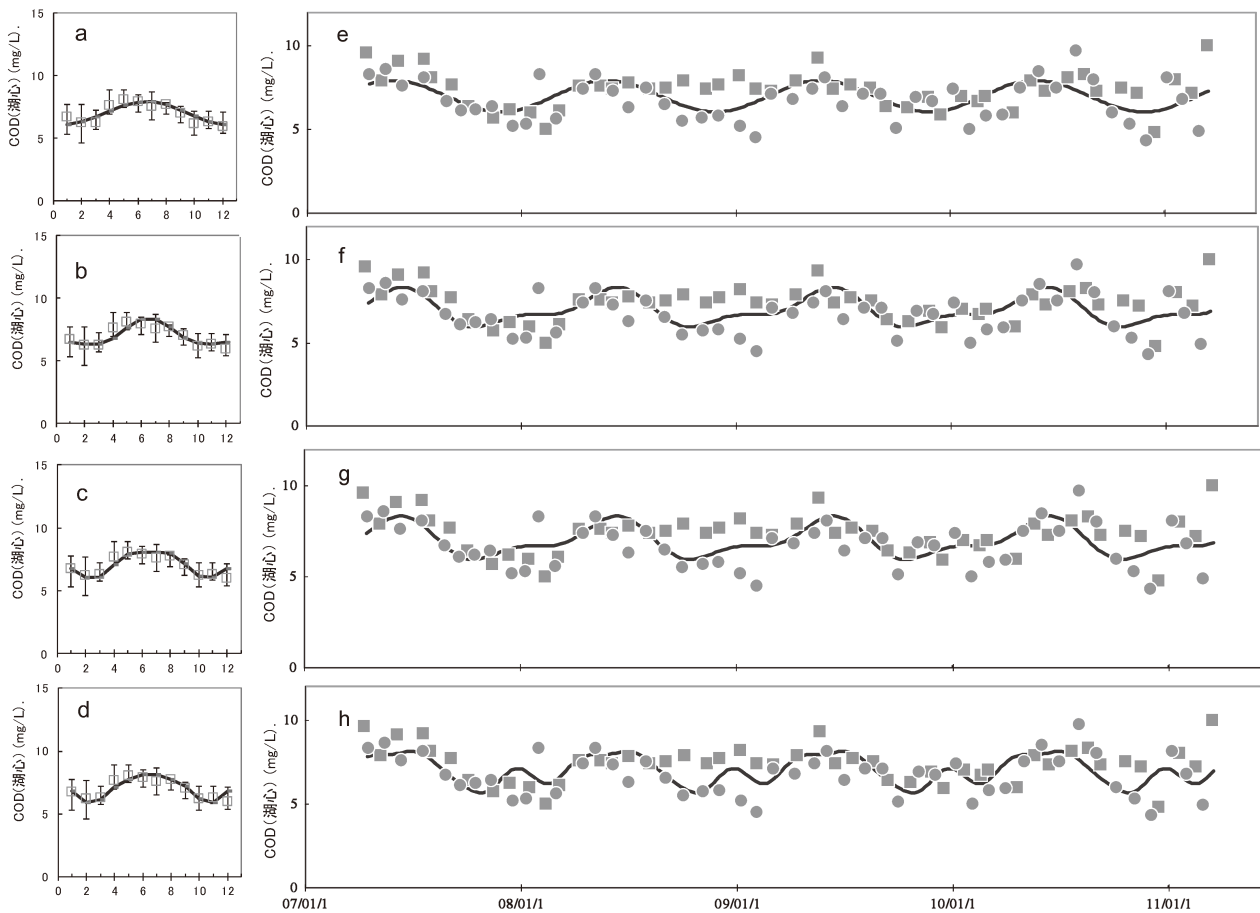


図7 児島湖のCODのフーリエ級数による近似

a~d: 月毎の値
 □: 平均値, —: 計算値(近似値), ⊕および⊖: 誤差範囲(1σ)
 e~h: 2007年度~2010年度の値
 ●: 実測値(当センター), ■: 実測値(公共用水域)
 —: 近似値

$$\text{COD}(mg/L) = a_0 + \sum_{n=1}^{\infty} b_n \left(\sin n \cdot \frac{2\pi t}{T} + \theta \right) \text{ において、}$$

$$a: \text{COD} = 7.0 + 0.94 \cdot \sin\left(\frac{2\pi t}{T} + 5.3\right)$$

$$b: \text{COD} = 7.0 + 0.94 \cdot \sin\left(\frac{2\pi t}{T} + 5.3\right) + 0.46 \cdot \sin\left(2 \cdot \frac{2\pi t}{T} + 1.9\right)$$

$$c: \text{COD} = 7.0 + 0.94 \cdot \sin\left(\frac{2\pi t}{T} + 5.3\right) + 0.46 \cdot \sin\left(2 \cdot \frac{2\pi t}{T} + 1.9\right) + 0.34 \cdot \sin\left(3 \cdot \frac{2\pi t}{T} + 2.3\right)$$

$$d: \text{COD} = 7.0 + 0.94 \cdot \sin\left(\frac{2\pi t}{T} + 5.3\right) + 0.46 \cdot \sin\left(2 \cdot \frac{2\pi t}{T} + 1.9\right) + 0.34 \cdot \sin\left(3 \cdot \frac{2\pi t}{T} + 2.3\right) + 0.16 \cdot \sin\left(4 \cdot \frac{2\pi t}{T} + 1.6\right)$$

4 まとめ

水質測定結果をモデル式に当てはめ、最近4年間(2007～2010年度)のシミュレーション計算を行った。計算結果は、COD(平均値)が7.2 mg/Lで実測値の7.3 mg/Lと近い値であった。T-Nは計算結果の平均値が1.1 mg/Lで実測値の1.2 mg/Lと比べて8%低い値であった。T-Pは計算結果の平均値が0.17 mg/Lで実測値の0.19 mg/Lと比べて10%低い値であった。

文 献

- 1) 藤田和男, 山本 淳, 小野 質, 北村雅美, 斎藤直己: 児島湖下流域の内部生産(4)—植物プランクトンのP-CODおよび窒素・リン—, 岡山県環境保健センター年報, 28, 13-16, 2004
- 2) 藤田和男, 北村雅美, 斎藤直己: 児島湖下流域の内部生産(5)—植物プランクトンのP-COD, クロロフィルaおよび窒素・リン—, 岡山県環境保健センター年報, 29, 27-31, 2005
- 3) 藤田和男, 鷹野 洋, 坂本祐基, 板谷 勉, 宮崎 清: 児島湖におけるクロロフィルaおよびCODと栄養塩(窒素・リン)の関係, 岡山県環境保健センター年報, 33, 13-18, 2009
- 4) 藤田和男, 鷹野 洋, 坂本祐基, 板谷 勉, 剣持堅志: 児島湖におけるクロロフィルaおよびCODと栄養塩(窒素・リン)の関係(2), 岡山県環境保健センター年報, 34, 17-24, 2010
- 5) 岡山県: 平成19年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2007
- 6) 岡山県: 平成20年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2008
- 7) 岡山県: 平成21年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2009
- 8) 岡山県: 平成22年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2010
- 9) 平河喜美男編: 工場排水試験法 JIS-K0102, 42-44, 日本規格協会, 東京, 1998
- 10) 岡山県, (株)ウェスコ: 平成3年度児島湖水質保全計画基礎調査業務報告書, 83, 1992
- 11) 岡山県: 児島湖ハンドブック, 50, 2008
- 12) 橋本洋志: Scilab/Scicosで学ぶシミュレーションの基礎, 5, オーム社, 東京, 2008
- 13) 大石進一: フーリエ解析, 7, 岩波書店, 東京, 1989

【調査研究】

有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究

—GC/MSを用いた水質中多環芳香族炭化水素 (PAH) の多成分分析法の検討—

Study for Simultaneous Analysis Method of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in Water by GC/MS

吉岡敏行, 藤原博一, 山辺真一, 浦山豊弘 (水質科)

Toshiyuki Yoshioka, Hiroichi Fujiwara, Shinichi Yamabe, Toyohiro Urayama

要 旨

フルオランテンを含む多環芳香族炭化水素 (PAH) の水質分析法を検討した。前処理方法は、ヘキサン抽出を行い、シリカゲルカートリッジカラムで精製し、GC/MS-SIM測定を行った。検討の結果、検出下限値は0.069ng/Lとなり、従来の分析方法に比べて100倍以上の高感度分析方法が確立できた。保存水質試料を分析したところ、ほとんどの試料からフルオランテンを検出した。

[キーワード：フルオランテン, PAH, GC/MS, 多成分分析]

[Key words : Fluoranthene, PAH, GC/MS, Simultaneous analysis]

1 はじめに

当センターは、最新の化学物質情報の入手や分析技術の習得等を目的に、毎年、環境省が実施する化学物質環境実態調査に参画し、化学物質の新規分析法を開発し、環境中の濃度の把握に努めている。今回、平成22年度化学物質環境実態調査でフルオランテンの水質分析法について検討した。

フルオランテンはPAHのひとつで、有機物質の不完全燃焼により生成する。主な発生源は、化石燃料や排ガス等があり、水環境保全に向けた取り組みのための要調査項目に選定されている。環境省が実施した平成15年度調査では、38調査地点すべてで不検出(検出下限値13ng/L)であった¹⁾。

既存の分析法として、要調査項目等調査マニュアル^{2,3,4)}等にPAHの分析法があり、フルオランテンの目標検出下限値は10ng/Lである。しかし、今回の目標検出下限値は0.6ng/Lであり、さらなる高感度化が求められた。既存の分析法を参考にヘキサン抽出後にシリカゲルカートリッジで精製し、GC/MS-SIM測定する分析法を検討し、既存分析法に比べて100倍以上の高感度分析方法が確立できたので報告する。

2 実験方法

2.1 分析フロー及び前処理工程における検討

今回検討した分析フローを図1に示す。

前処理工程では、抽出方法とカラムクリーンアップについて検討を行った。抽出方法はヘキサンによる液々抽出とディスク型固相抽出を比較した。カラムクリーンアップは、シリカゲルカートリッジカラムとフロリジルカートリッジカラムについて標準物質の溶出パターンを確認した。

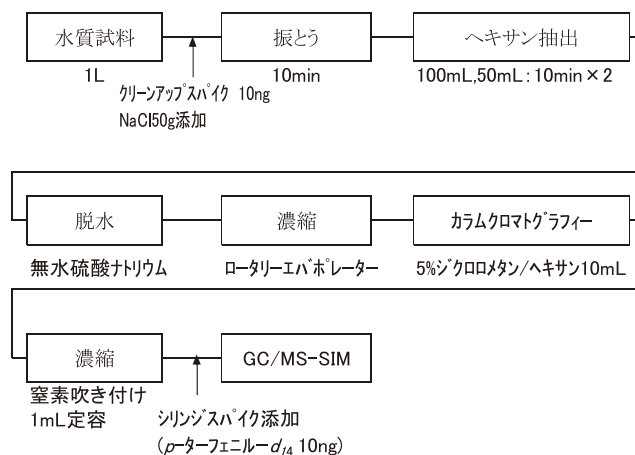


図1 分析フロー

2.2 GC/MSの測定条件

今回検討したGC/MSの測定条件を表1に、モニターイオンを表2に示す。測定対象物質は、2環のナフタレンから6環のコロネンまでの29物質とした。d体がある物質はクリーンアップスパイクを内標準とし、d体がない物質は保持時間が近いクリーンアップスパイクを内標準として定量した。シリンジスパイク(p-terphenyl-d14)は、クリーンアップスパイクの回収率の計算に用いた。

2.3 分解性スクリーニング試験及び保存性試験

化学物質環境実態調査実施の手引き(平成20年度版)²⁾

表1 GC/MSの測定条件

[GC/MS条件]	
GC/MS	: GC: Agilent7890, MS: JMS-Amsun
使用カラム	: DB-17MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm (J&W)
カラム温度	: 50°C (2 min) - 20°C /min - 120°C (0 min) - 7°C /min - 320°C (17min)
注入口温度	: 280°C
注入方法	: スプリットレス(パージ開始時間1.5min)
注入量	: 1 μL
キャリアーガス	: ヘリウム 1 mL/min(定流量)
インターフェース温度	: 240°C
イオン源温度	: 210°C
イオン化電圧	: 70eV
検出モード	: SIM

表2 モニターイオン

対象物質	定量イオン(Q)	参照イオン(I)	クリーンアップスパイク 又はシリンジスパイク	定量イオン(Q)
Naphthalene	128	127	Naphthalene-d8	136
2-methylnaphthalene	142	141		
1-methylnaphthalene	142	141		
Acenaphthylene	152	153		
Acenaphthene	154	153	Acenaphthene-d10	164
Fluorene	166	165		
Phenanthrene	178	176	Phenanthrene-d10	188
Anthracene	178	176		
Fluoranthene	202	200	Fluoranthene-d10	212
Pyrene	202	200		
o-terphenyl	230	229		
m-terphenyl	230	229		
p-terphenyl	230	229	p-terphenyl-d14	244
Benzo(a)anthracene	228	226	Benzo(a)anthracene-d12	240
Chrysene+Triphenylene	228	226	Crysene-d12	240
Benzo(b)fluorene	252	253		
Benzo(k)fluorene	252	253	Benzo(k)fluoranthene-d12	264
Benzo(e)pyrene	252	253	Benzo(e)pyrene-d12	264
Benzo(a)pyrene	252	253		
Perylene	252	253		
indeno(1,2,3-cd)pyrene	276	278	indeno(1,2,3-cd)pyrene-d12	288
Dibenzo(a,h)anthracene	278	276		
Dibenzo(a,c)anthracene	278	276		
Benzo(b)crysene	278	276		
Picene	278	276		
Benzo(g,h,i)perylene	276	278	Benzo(g,h,i)perylene-d12	288
Dibenzo(a,e)pyrene	302	300		
Coronene	300	302	Coronene-d12	312

に基づき、分解性スクリーニング試験を実施した。試験液は精製水を用いてpH5とpH7、pH9のものを作成し、対象物質の濃度が0.1μg/Lになるように添加し、1時間後及び7日後(明所及び暗所に保存)にヘキサン抽出を行い、GC/MSで測定した。

保存性試験は、河川水に対象物質の濃度が10ng/Lになるように添加し、添加直後及び7日後及び14日後、1ヶ月(冷暗所に保存)にヘキサン抽出を行い、GC/MSで測定した。

2.4 装置検出下限値及び分析法の検出下限値と定量下限値

装置検出下限値(IDL)及び測定方法の検出下限(MDL)と定量下限(MQL)は、化学物質環境汚染実態調査の手引き(平成20年度版)²⁾に従って実施した。IDLは、検量線に用いる最低濃度の標準液を7回繰り返し分析し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。MDLとMQLは、旭川(乙井手堰)の水質試料からフルオランテンが検出されたため、精製水で希釈した試料(河川水0.3L+精製水0.7L)を7個作成し、分析フローに従い前処理を実施した後、GC/MSで測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。

2.5 添加回収試験及び水質試料の分析

河川水は、旭川(乙井手堰)の水質試料1Lに標準物質を2ng添加し、海水は水島沖の水質試料1Lに標準物質を6ng添加し、分析フローに従い前処理を実施した後、GC/MSで測定した。

また、公共用水域の保存水質試料(平成22年10月～12月採取)を分析し、対象物質の検出の有無を確認した。

3 検討結果及び考察

3.1 GC/MS測定条件の検討結果

対象物質のGCカラムでの分離状況を図2に示す。クリセンとトリフェニレンは保持時間が重なり、お互いにピークが分離できなかったが、その他の物質は分離することができた。また、保持時間の遅いジベンゾ(a,e)ピ

レンとコロネンはピーク幅が広く、GCカラムと昇温条件等を再検討する必要がある。

フルオランテンの検量線を図3と図4に示す。0.100 ~ 5.0ng/mLの低濃度領域、0.100 ~ 100ng/mLの高濃度領域でも相関の高い直線性のある検量線が得られた。

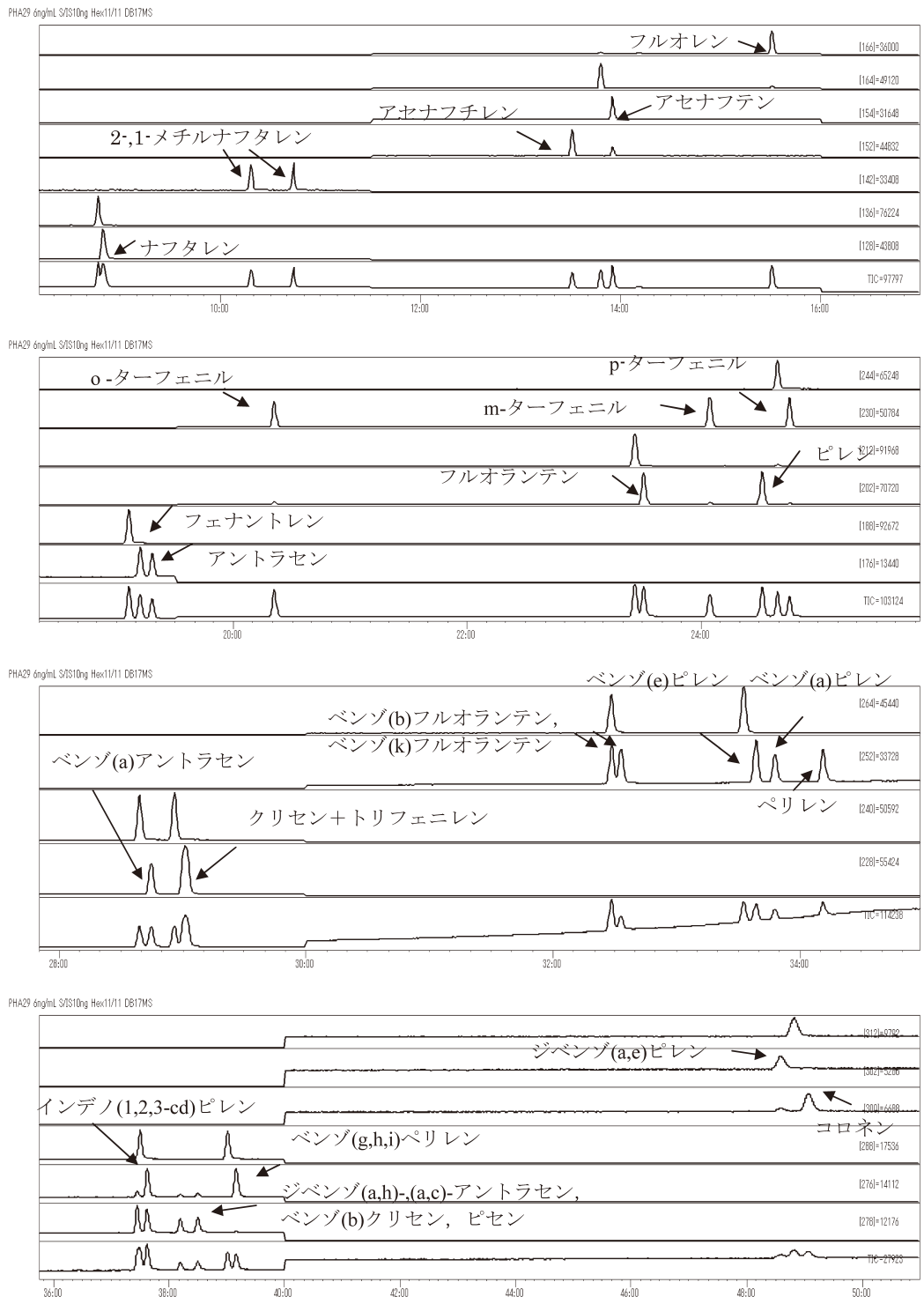


図2 標準物質のクロマトグラム

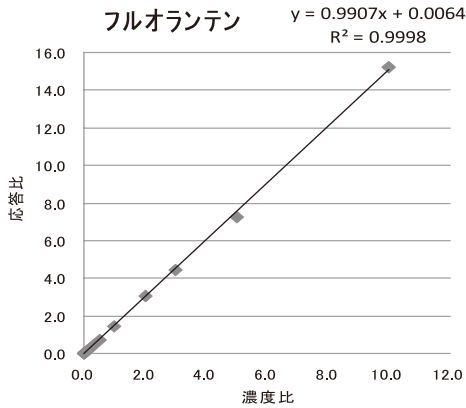


図3 検量線：フルオランテン
 サロゲート物質 10.0ng/mL
 対象物質濃度範囲 0.100 ~ 100ng/mL

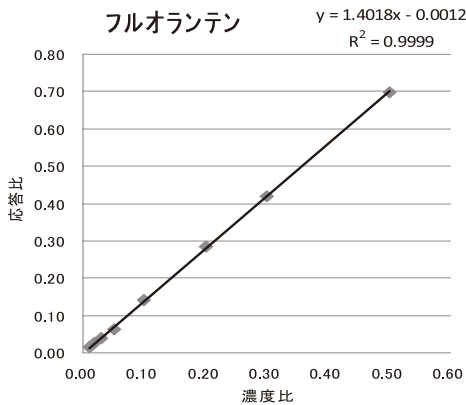


図4 検量線：フルオランテン
 サロゲート物質 10.0ng/mL
 対象物質濃度範囲 0.100 ~ 5.00ng/mL

3.2 前処理工程の検討結果

抽出法として溶媒抽出と固相ディスクを検討し、その結果を図5～図7に示す。ヘキサン抽出(精製水0.1L+10ng)では、ガラス容器のアセトン洗い込みを考慮してアセトンを0～10%添加したが、アセトン10%程度では回収率に大きな違いは見られなかった。4種類の固相ディスク(精製水0.5L+50ng, 酢酸メチル20mL溶出)の回収率は、フルオランテンではいずれの固相も回収率は80%以上であった。PAHは、環数が少なくなるほど回収率は低下した。また、環数が増加するほどガラス容器への残存率が高くなり、アセトンによるガラス容器の洗い込みが必要と考えられる。固相ディスク法は試料量を1L以上に増加させることができるメリットがあるが、今回は、操作が平易なヘキサンによる液液抽出法を採用した。

シリカゲルカートリッジカラム(1g)とフロリジル

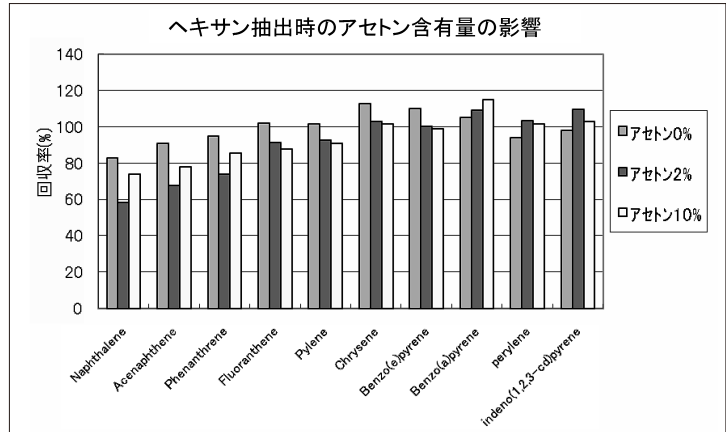


図5 溶媒抽出の検討結果

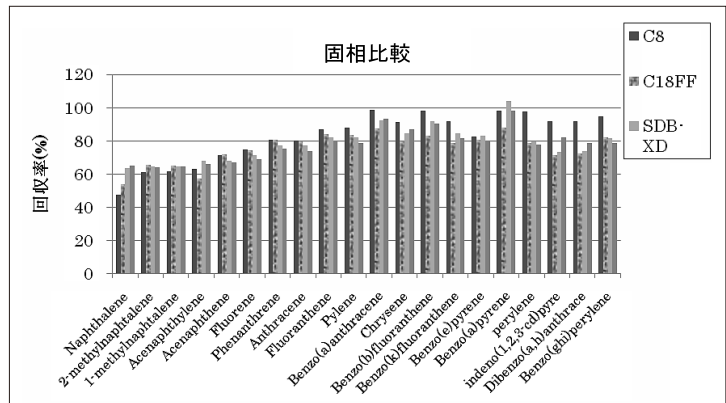


図6 固相抽出の検討結果

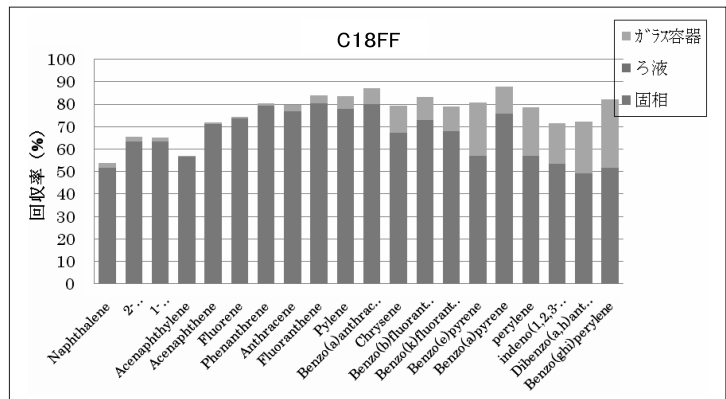


図7 固相抽出の検討結果

カートリッジカラム(1g)の溶出パターンを図8と図9に示す。ヘキサン10mLで洗浄したカートリッジカラムに標準物質10ng添加し、溶出液を順次、流したところ、シリカゲルカートリッジカラムでは5%ジクロロメタン/ヘキサン5mLでほぼ溶出した。実際の分析フローでは、5%ジクロロメタン/ヘキサン10mLで溶出することとした。一方、フロリジルカートリッジカラムでは、環数が高いものはジクロロメタン含有量が多くないと溶出しなかったことや、回収率が悪い物質があったため、採用しなかった。

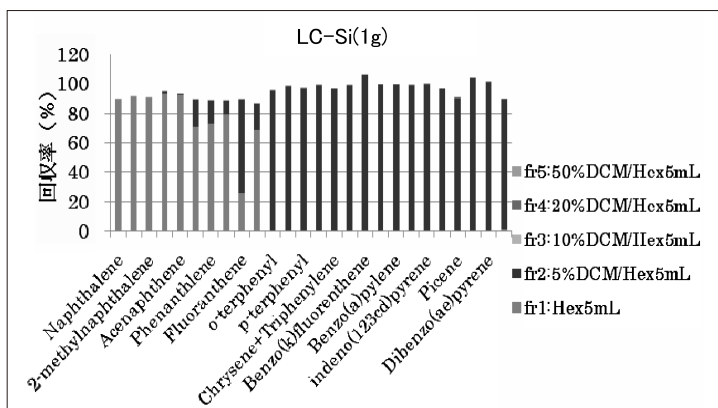


図8 シリカゲルカートリッジカラムの溶出パターン

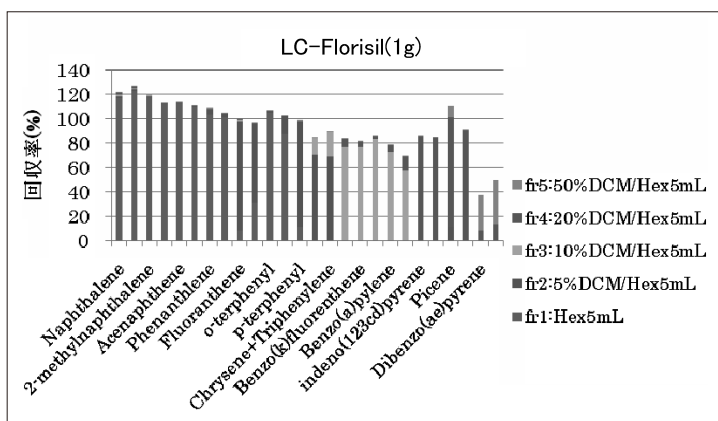


図9 フロリジルカートリッジカラムの溶出パターン

表3 分解性スクリーニング試験結果

物質名	初期濃度 (µg/L)	pH	1時間放置後の残存率(%)	7日間放置後の残存率(%)	
				暗所	明所
Naphthalene			102	65	67
Acenaphthene			93	71	56
Phenanthrene			96	74	0
Fluoranthene			97	82	82
Pylene			94	82	53
Chrysene		pH5	100	81	77
Benzo(e)pyrene			94	80	64
Benzo(a)pyrene			102	80	1
perylene			100	78	3
indeno(1,2,3-cd)pyrene			111	81	67
Naphthalene			102	69	68
Acenaphthene			92	74	61
Phenanthrene			92	79	9
Fluoranthene			94	84	83
Pylene			94	84	31
Chrysene	0.1	pH7	98	84	72
Benzo(e)pyrene			89	84	58
Benzo(a)pyrene			88	84	6
perylene			86	82	10
indeno(1,2,3-cd)pyrene			92	82	58
Naphthalene			100	69	60
Acenaphthene			92	75	60
Phenanthrene			92	81	25
Fluoranthene			94	86	83
Pylene			93	86	8
Chrysene		pH9	98	86	72
Benzo(e)pyrene			87	81	49
Benzo(a)pyrene			91	77	7
perylene			89	72	13
indeno(1,2,3-cd)pyrene			96	67	72

3.3 分解性スクリーニング試験及び保存性試験結果

分解性スクリーニング試験結果を表3に示す。明らかに光分解が認められた物質は、フェナントレン、ピレン、ベンゾ(a)ピレン、ペリレンであった。そのため、試料採取から測定に至る工程で光を遮蔽する必要があり、試料採取時には水試料は褐色ビンに採集し、前処理工程でも紫外線をカットする照明や褐色ガラスの使用が望ましいと考えられた。

保存性試験結果を表4に示す。14日後まではほとんど濃度変化は見られなかったが、1ヶ月後には、一部の物質(アセナフチレン、ベンゾ(a)ピレン、ペリレン、ベンゾ(c)クリセン等)で回収率が悪くなったことから、試料採取後、2週間以内に分析することが望ましいと考えられた。また、ナフタレンは保存期間中に回収率が200%を超過したことから、実験室内でのコンタミネーションがあると考えられた。確認実験としてミリQ水1Lを溶媒洗浄(ジクロロメタン及びヘキサン)したものと無洗浄のものを分析したところ、溶媒洗浄したミリQ水のナフタレンは0.3ng/L未満であったが、無洗浄のミリQ水のナフタレンは2.4ng/L検出され、実験室中でのナフタレン汚染が確認された。したがって、ナフタレンを分析する場合は、試料を保存することは望ましくなく、直ちに分析する必要があると考えられた。

3.4 IDL及び分析法のMDLとMQL

IDL及びMDL, MQLを表5に示す。IDLは0.044ng/L, MDLは0.069ng/L, MQLは0.18ng/Lであり、要求感度を十分満足できる分析方法を開発することができた。

3.5 添加回収試験

添加回収試験結果を表6に示す。海水の回収率は90~122%, 河川水の回収率は96~124%と良好な結果であった。無添加の海水及び河川水には、ピレンより環数の少ない物質が検出され、河川水より海水の濃度が高い傾向で

あった。

サロゲートの回収率は、64～96%であり、揮発性の高いナフタレン-d₈は回収率が低かった。

公共用水域の試料採取地点を図10、分析結果を表7に示す。試料は、平成22年10月から12月に採取した水質試料を冷蔵保存し、平成23年4月に分析を行った。フルオランテンは12試料すべてから検出され、最も高かったのは児島湖湖心で1.4ng/L、最も低かったのは布原橋（高梁川水系）で0.63ng/Lであった。従来の分析法では検出できなかった低濃度ではあるが、フルオランテンがさまざまな水域から検出され、広く環境中に存在していることが明らかとなった。その他のPAHでは、フェナントレンやピレンもすべての試料から検出された。なお、ナフタレンが0.6～3.5ng/L検出されたが、保存性試験の結果から実験室内からの汚染が考えられるため、水試料は採取後、直ちに分析する必要があると考えられた。

4 まとめ

フルオランテンを含む多環芳香族炭化水素（PAH）の水質分析法について検討し、次の結果を得た。

- 1) 水質試料1Lをヘキサン抽出し、シリカゲルカートリッジカラムでクリーンアップ後、最終液量1mLとし、GC/MS法で測定する方法でMDLは0.069ng/L、MQLは0.19ng/Lであった。既存の分析法に比較して検出限界を大幅に下げることができ、環境水中のフルオランテンを検出できる分析法が確立できた。
- 2) 添加回収試験の結果、フルオランテンを含むPAH等29物質が一斉分析できた。
- 3) フルオランテンには光分解性は認められなかったが、フェナントレンやベンゾ(a)ピレン、ピレン、ペリレン等は光分解性が認められ、PAHの同時分析時には、試料採取から測定の各工程で紫外線を遮蔽する必要があった。

表4 保存性試験結果

河川水に添加	直後	7日後	14日後	1ヶ月後
Naphthalene	124%	208%	187%	143%
2-methylnaphthalene	120%	102%	108%	55%
1-methylnaphthalene	109%	98%	95%	56%
Acenaphthylene	104%	89%	76%	17%
Acenaphthene	103%	83%	94%	63%
Fluorene	112%	102%	105%	74%
Phenanthrene	100%	85%	102%	67%
Anthracene	107%	102%	94%	39%
Fluoranthene	101%	90%	90%	89%
Pylene	101%	88%	94%	82%
o-terphenyl	86%	78%	79%	58%
m-terphenyl	106%	96%	93%	86%
p-terphenyl	111%	103%	101%	90%
Benzo(a)anthracene	104%	93%	97%	41%
Chrysene+triphenylen	97%	89%	85%	81%
Benzo(b)fluoranthene	97%	95%	101%	84%
Benzo(k)fluoranthene	91%	92%	82%	78%
Benzo(e)pyrene	105%	95%	103%	91%
Benzo(a)pyrene	118%	75%	95%	10%
perylene	97%	74%	65%	2%
Dibenzo(ac)anthracen	93%	76%	96%	26%
indeno(1,2,3-cd)pyre	103%	87%	96%	63%
benzo(b)crysene	109%	81%	81%	0%
picene	112%	76%	89%	74%
Benzo(ghi)perylene	99%	94%	102%	60%

表5 IDL及びMDL, MQL

物質名	IDL (ng/mL)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL試料換算値 (ng/L)
フルオランテン	0.044	1	1	0.044

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
フルオランテン	1	1	0.069	0.18

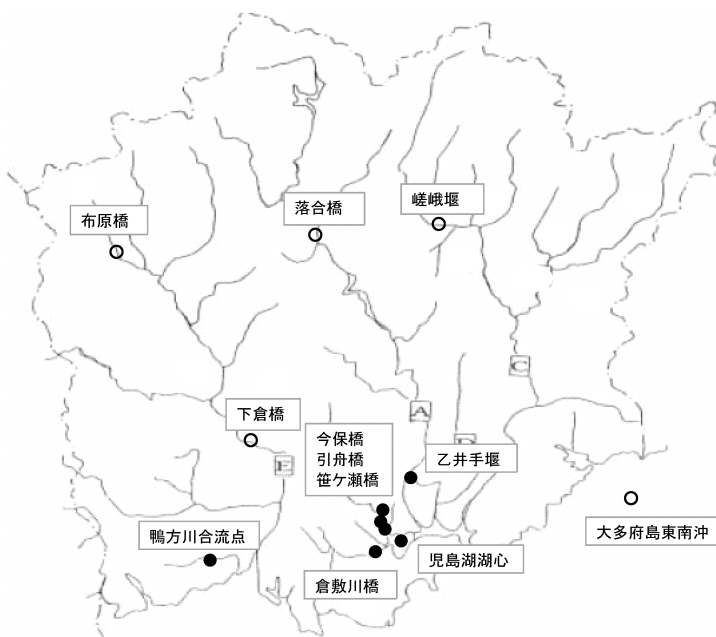


図10 試料採取地点

表6 添加回収試験結果

	海水 無添加	海水 (1L+6ng)	サロゲート 回収率	河川水 無添加	河川水 (1L+2ng)	サロゲート 回収率
Naphthalene	9.0	107%	63%	2.9	103%	64%
2-methylnaphthalene	3.9	120%		0.99	124%	
1-methylnaphthalene	4.3	121%		1.0	112%	
Acenaphthylene	1.3	105%		0.37	106%	
Acenaphthene	7.1	101%	89%	0.36	104%	81%
Fluorene	1.7	103%		0.27	98%	
Phenanthrene	3.1	100%	87%	0.76	103%	84%
Anthracene	N.D	103%		N.D	96%	
Fluoranthene	1.3	99%	90%	0.48	110%	89%
Pylene	0.78	100%		0.27	108%	
o-terphenyl	N.D	95%		N.D	101%	
m-terphenyl	N.D	100%		N.D	108%	
p-terphenyl	N.D	103%		N.D	107%	
Benzo(a)anthracene	N.D	102%	105%	N.D	105%	94%
Chrysene+						
triphenylene	N.D	90%	105%	N.D	106%	94%
Benzo(b)fluoranthene	N.D	92%		N.D	104%	
Benzo(k)fluoranthene	N.D	98%	104%	N.D	100%	95%
Benzo(e)pyrene	N.D	92%	97%	N.D	107%	93%
Benzo(a)pyrene	N.D	106%		N.D	96%	
perylene	N.D	93%		N.D	97%	
Dibenzo(ac)anthracene	N.D	90%		N.D	99%	
indeno(1,2,3-cd)pyrene	N.D	106%	109%	N.D	100%	96%
benzo(b)crysene	N.D	119%		N.D	100%	
picene	N.D	122%		N.D	102%	
Benzo(ghi)perylene	N.D	97%	103%	N.D	100%	94%
dibenzo(ae)pyrene	N.D	101%		N.D	103%	
coronene	N.D	93%	105%	N.D	116%	93%

海水: 水島沖(n=6平均値)

河川水: 旭川 乙井手堰(n=6平均値)

無添加(n=2平均値)

表7 公共用水域の分析結果

ng/L	高梁川水系			旭川水系			吉井川水系			笹ヶ瀬川水系			倉敷川水系	児島湖	海域
	布原橋	下倉橋	鴨方川合流点	落合橋	乙井手堰	嵯峨堰	引舟橋	今保橋	笹ヶ瀬橋	倉敷川橋	湖心	大多府島 東南沖			
Naphthalene	1.2	0.74	0.73	0.62	0.66	0.67	0.66	0.60	0.65	0.62	0.65	3.5			
2-methylnaphthalene	0.73	0.69	0.71	0.68	0.69	0.69	0.67	0.69	0.69	0.71	0.71	1.3			
2-methylnaphthalene	0.80	0.76	0.69	0.69	0.71	0.73	0.70	0.69	0.70	0.70	0.68	0.95			
Acenaphthylene	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D			
Acenaphthene	0.35	0.22	N.D	N.D	N.D	0.21	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.45			
Fluorene	0.65	0.64	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.85			
Phenanthrene	0.63	0.84	0.38	0.39	0.40	0.63	0.39	0.41	0.38	0.44	0.47	0.79			
Anthracene	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D			
Fluoranthene	0.63	0.72	0.74	0.70	0.77	0.64	0.66	0.79	0.84	0.94	1.4	1.2			
Pylene	0.67	0.67	1.4	0.68	0.69	0.68	0.92	1.4	1.5	1.4	1.8	1.2			
o-terphenyl	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.67	N.D	N.D			
m-terphenyl	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D			
p-terphenyl	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D			
Benzo(a)anthracene	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.83	N.D			
Chrysene+Triphenylene	N.D	N.D	0.60	N.D	N.D	N.D	0.58	0.63	0.67	0.69	0.82	0.68			
Benzo(b)fluoranthene	N.D	N.D	0.45	N.D	N.D	N.D	0.44	0.54	0.64	0.71	1.16	0.69			
Benzo(k)fluoranthene	N.D	N.D	0.42	N.D	N.D	N.D	0.41	0.44	0.46	0.44	0.58	0.45			
Benzo(e)pyrene	N.D	N.D	0.36	N.D	N.D	N.D	N.D	0.44	0.50	0.49	0.92	0.52			
Benzo(a)pyrene	N.D	N.D	1.2	N.D	N.D	N.D	N.D	1.2	1.2	1.2	1.4	1.3			
Perylene	N.D	N.D	0.68	N.D	N.D	N.D	N.D	0.74	0.73	0.74	0.95	0.75			
indeno(123cd)pyrene	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D			
Dibenzo(ah)anthracene	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	1.4	N.D			
Dibenzo(ac)anthracene	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D			
Benzo(b)crysene	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D			
Picene	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D			
Benzo(ghi)perylene	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	1.6	N.D			
Dibenzo(ae)pyrene	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D			
Coronene	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D			

- 4) ナフタレンは保存中に実験室内での汚染が確認され、直ちに分析しなければならないことが判明した。その他のPAHは2週間程度、安定であった。
- 5) 保存水質試料を分析した結果、数種類のPAHがng/Lで検出された。

なお、本研究は環境省委託の平成22年度化学物質環境実態調査と連携して実施した。

文 献

- 1) 要調査項目の検出状況について：環境省HP

http://www.env.go.jp/council/09water/y095-13/mat06_3.pdf

- 2) 環境省環境管理局水環境部企画課：要調査項目等調査マニュアル(水質, 底質, 水生生物)平成15年3月
- 3) 環境庁環境保健部環境安全課：化学物質と環境 平成9年度化学物質分析法開発調査報告書 176-227 1997
- 4) 環境庁環境保健部環境安全課：化学物質と環境 平成10年度化学物質分析法開発調査報告書(その2) 1-70 1998

【調査研究】

有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究

—排出量が多い化学物質の水質実態調査—

Environmental survey of chemicals with many discharges in public waters

吉岡敏行, 藤原博一, 山辺真一, 浦山豊弘 (水質科)

Toshiyuki Yoshioka, Hiroichi Fujiwara, Shinichi Yamabe, Toyohiro Urayama

要 旨

N,N'-ジメチルホルムアミドや1,4-ジオキサン等の水溶性化学物質と同時分析可能な23種類の化学物質の水質分析法について検討し、公共用水域における環境実態調査を実施した。前処理はタンデム固相抽出、測定はGC/MS-SIMで行った。調査の結果、児島湾水域においてN,N'-ジメチルホルムアミドが比較的高い濃度で検出された。また、低濃度であるが検出率が高かった物質は、p-トルイジンとカンファーであった。

[キーワード：PRTR, 環境調査, GC/MS, 多成分分析]

[Key words : Pollutant Release and Transfer Register, Environmental Survey, GC/MS, Simultaneous analysis]

1 はじめに

「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律」(化管法)によりPRTR (Pollutant Release and Transfer Register: 化学物質排出移動量届出制度)が平成11年に制定され、特定化学物質の排出量データが明らかになっている^{1, 2)}。図1に示すとおり、N,N'-ジメチルホルムアミドの公共用水域への排出量は減少傾向であるが、全国的にも排出量が比較的多く、2008年度には岡山県下では7,600 kg/年が旭川に排出されていた。N,N'-ジメチルホルムアミドは、第一種指定化学物質に指定され、溶剤(有機合成・ポリ

マー・色素用)や試薬(ホルミル化剤)等の用途がある物質で、常温では水に溶けやすい液体で揮発性があり、環境省が実施した過去の全国調査では最大6,600ng/Lが検出されていた³⁾。

岡山県における水溶性化学物質の環境実態調査はほとんど実施されておらず、今回、水溶性化学物質を含む23物質の多成分分析法を検討し、公共用水域での環境実態を調査したので報告する。

2 調査方法

2.1 調査期間及び調査地点

試料採取は、平成22年6月に図2と図3に示す主要な環境基準点48地点で行った。また、図4に示す児島湾水域では、試料採取は平成22年8月にも2回行った。水試料の採取は、橋の場合は流心で、堰と児島湾水域は護岸からバケツを用いて採取した。

2.2 分析方法

既存の分析法^{4, 5, 6, 7)}をもとにN,N'-ジメチルホルムアミドと1,4-ジオキサンを含む23物質の多成分分析法を検討した。対象物質を表1に、分析フローを図5に示す。固相抽出はあらかじめコンディショニング(ジクロロメタン5mL, アセトン10mL, 精製水15mL)したSep-

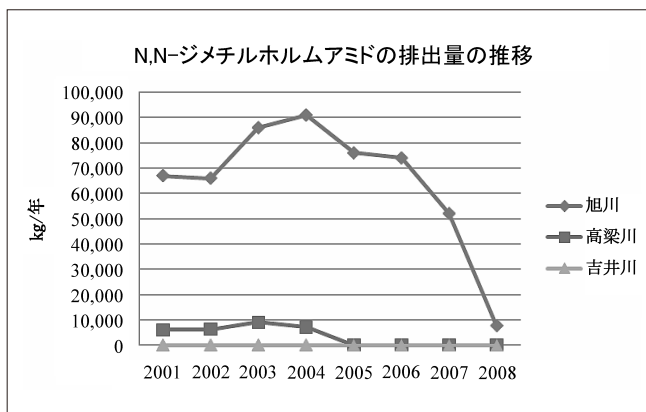


図1 N,N'-ジメチルホルムアミドの公共用水域への排出量 (岡山県環境管理課HP²⁾から作成)

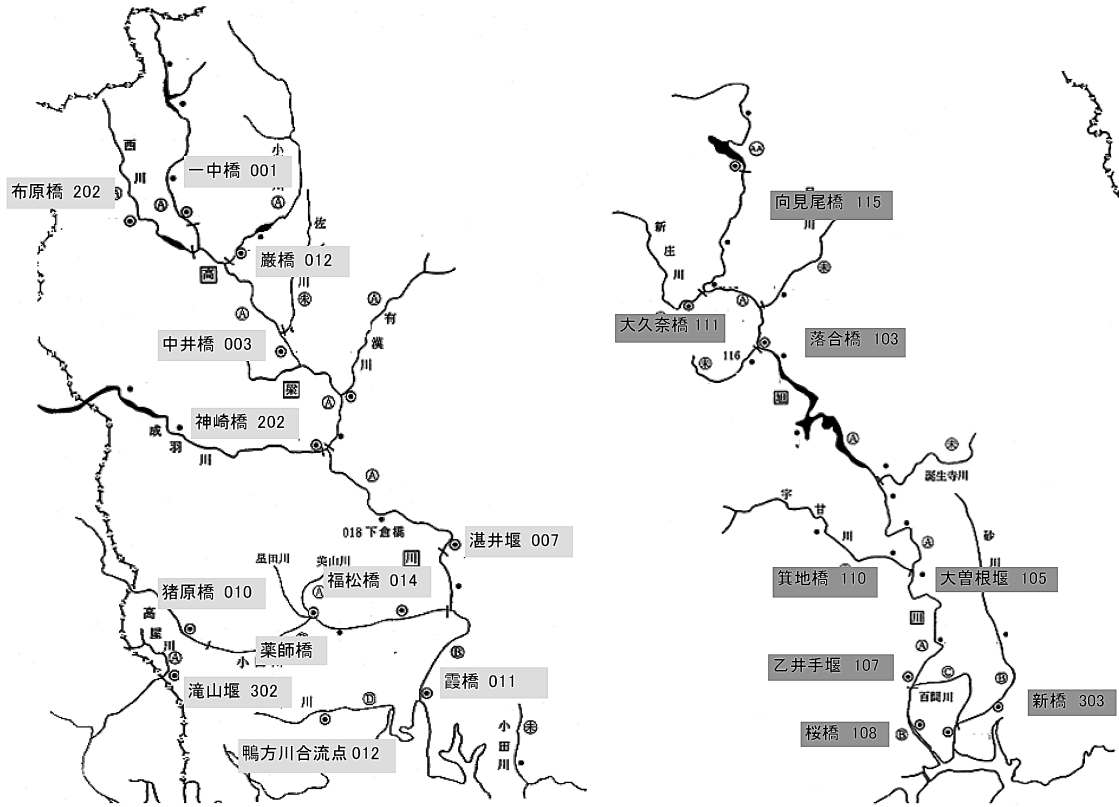


図2 調査地点(高梁川水系, 旭川水系)

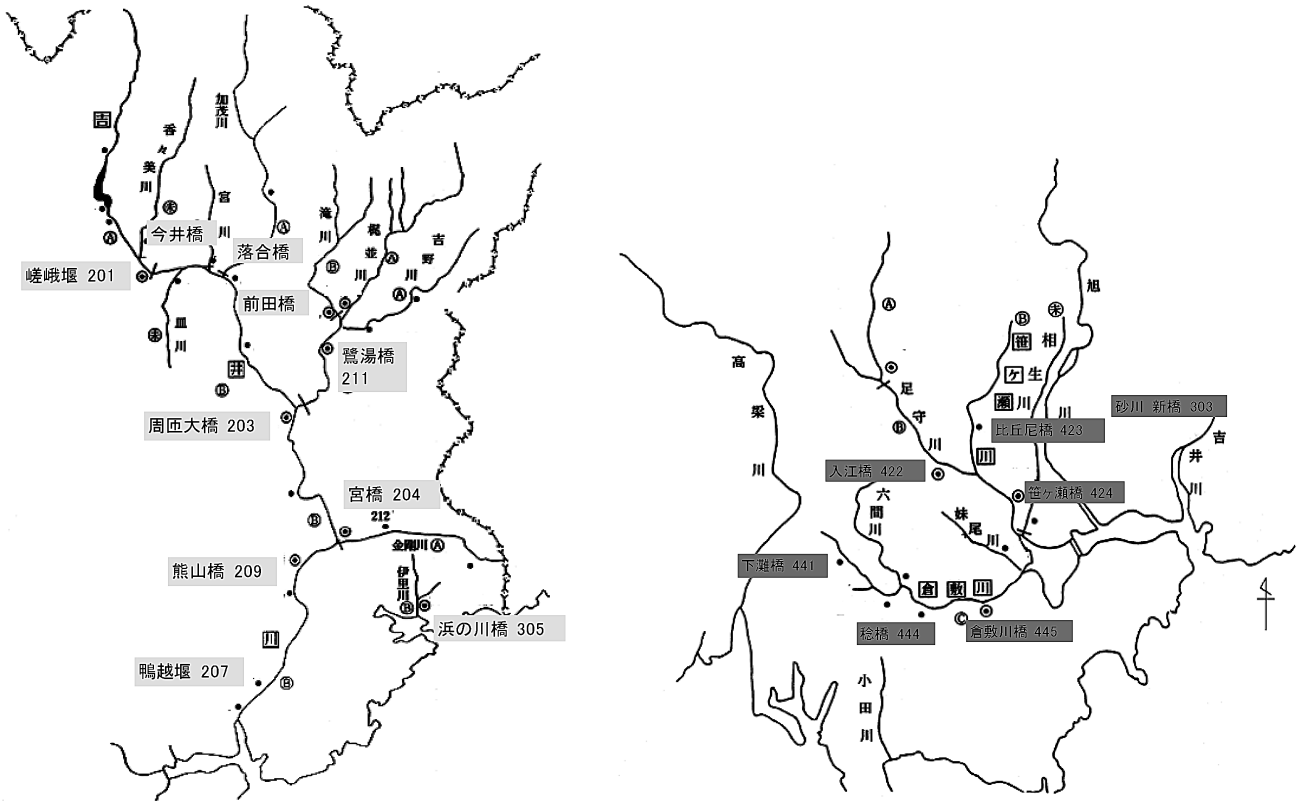


図3 調査地点(吉井川水系, 児島湖流域)



図4 調査地点(児島湾水域)

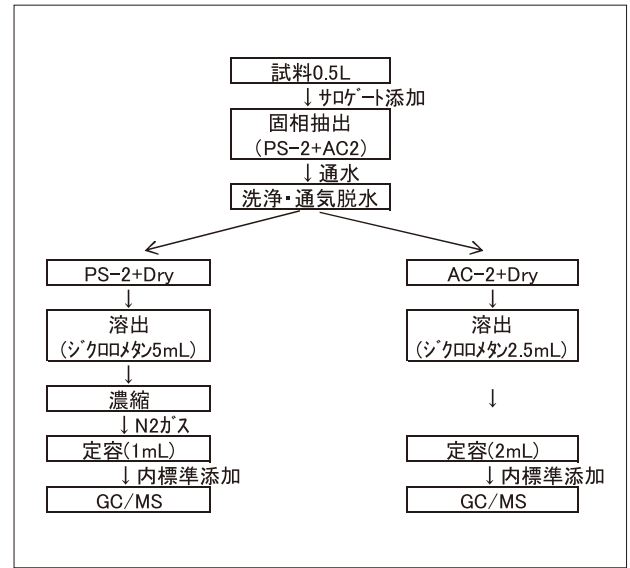


図5 分析フロー

表1 対象物質

対象物質	定量イオン (Q)	参照イオン (I)	サロゲート 又は内標準	定量イオン (Q)	検出下限値 (ng/L)
1,4-Dioxane	88	58	1,4-Dioxane-d8	96	100
N,N-dimethylformamide	73	44	N,N-dimethylformamide-d7	80	40
ethylbenzene	91	106	ethylbenzene-d10	98	20
1,3,5-triethylbenzen	147	133			20
p-dichlorobenzene	146	148			20
1,3,5-trichlorobenze	180	182			20
(+)-Camphor	95	152			10
2MIB	95	107	2MIB-d3	110	10
1,2,4-trichlorobenze	180	182			20
1,2,3-trichlorobenze	180	182			20
naphthalene	128	127	naphthalene-d8	136	20
geosmin	112	55	geosmin-d3	115	10
p-toluidine	106	107			2
m-toluidine	106	107	o-toluidine-d9	112	2
2,6-dimethylpyridin	107	106			5
2-ethylpyridin	106	107			5
2,4-dimethylpyridin	107	106			5
2,3-dimethylpyridin	107	106			5
3-ethylpyridin	107	106			5
4-ethylpyridin	107	106			5
3,5-dimethylpyridin	107	106			5
3,4-dimethylpyridin	107	106			5
N-methylanilin	106	107			5

Pak PS-2 (waters社製 265 mg) と AC-2 (waters社製 400 mg を 2 個) を連結し、試料水を通水した後、精製水で洗浄し、通気脱水した。それぞれの固相カートリッジカラムを種類ごとに分けて、固相の下に Dry カートリッジカラム (ジーエルサイエンス社製, InertSep Slim J Dry 2.8g) を取り付け、ジクロロメタンで目的物質を溶出しながら脱水を行った。AC-2 には N,N-ジメチルホルム

アミドと 1,4-ジオキサンが溶出し、その他の 21 物質は PS-2 に溶出した。AC-2 溶出液は、対象物質が揮発しやすいことから濃縮操作は行わず、2mL に定容した。

GC/MS の測定条件を表 2 に示す。d 体がある物質はサロゲートを内標準とし、d 体がない物質は保持時間が近い内標準で定量した。また、内標準は、サロゲートの回収率の計算に用いた。

表2 GC/MSの測定条件

〔GC/MS条件〕	
GC/MS	: GC: Agilent7890, MS: JMS-Amsun
使用カラム	: DB-WAX 30m,0.25mm,0.5um (J&W)
カラム温度	: 50°C(2min)-5°C/min-160°C(0min)-10°C/min-200°C(5min): 33min
注入口温度	: 200°C
注入方法	: スプリットレス(パージ開始時間1.5min)
注入量	: 1 μL
キャリアーガス	: ヘリウム 1 mL/min(定流量)
インターフェース温度	: 200°C
イオン源温度	: 200°C
イオン化電圧	: 70eV
検出モード	: SIM

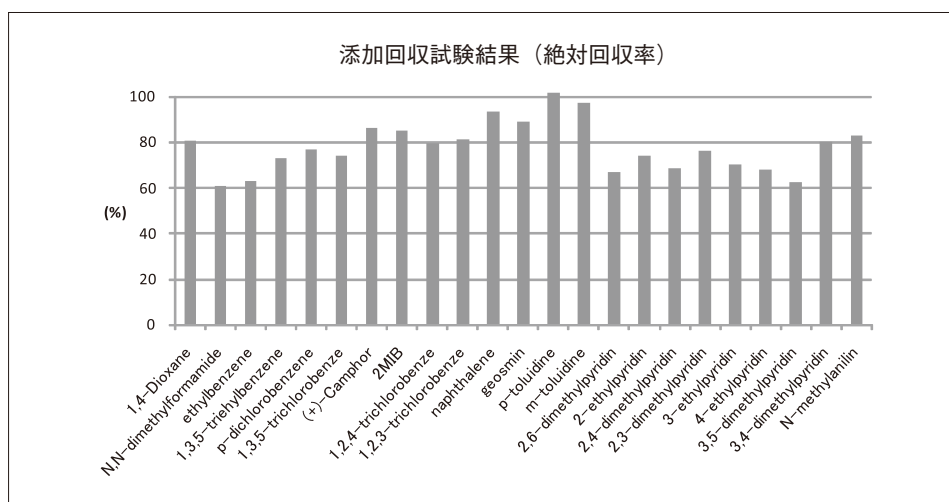


図6 添加回収試験結果

2.3 添加回収試験

精製水 0.5Lに標準物質を 200ng添加し、分析フローに従い前処理を実施した後、GC/MSで測定した。定量は内標準を用いて絶対回収率を計算した。

3 検討結果及び考察

3.1 添加回収試験結果

図6に添加回収試験時の対象物質の絶対回収率を示す。対象物質はいずれも揮発性が比較的高く、濃縮時の損失が考えられたが、すべての物質の絶対回収率は60%以上であった。実際の分析では、1,4-ジオキサン及びN,N-ジメチルホルムアミド、エチルベンゼン、2-メチルボルネオール(2-MIB)、ジェオスミンはサロゲートによる定量を行った。なお、水試料におけるAC-2からのサロゲートの回収率は、1,4-ジオキサン-d₈が平均94%、N,N-ジメチルホルムアミド-d₇が平均80%であり、ジクロロメタン 2mLで溶出することに特に、問題はなかった。

3.2 公共用水域の検出状況

検出率の高かった物質は、p-トルイジン(検出率50%)、N,N-ジメチルホルムアミド(検出率44%)、カンファー(検出率21%)であり、その結果を図7～9に示す。その他の物質はほとんど検出されなかった。

p-トルイジンにはo-トルイジンとm-トルイジンの異性体があり、トルイジンとして化学物質排出把握管理促進法で第一種指定化学物質に指定され、水質汚濁に係る要調査項目に選定されている。P-トルイジンの主な用途は、添加剤、色素(塗料、顔料)、有機合成原料等である。最も高い濃度であったのは、旭川水系宇甘川(集水域は吉備高原)の高津橋で37ng/Lが検出された。里見川の鴨方川合流点(浅口市)や高屋川の滝山堰(井原市)でもほぼ同じレベルで検出されていた。また、児島湾水域では低濃度ではあるが、いずれの地点からも検出されており、これらの水域には何らかの発生源があるものと推察された。なお、既報⁷⁾ではo-トルイジンの最大濃度は吉井川の熊山橋で10ng/L検出されたが、m-トルイジンは

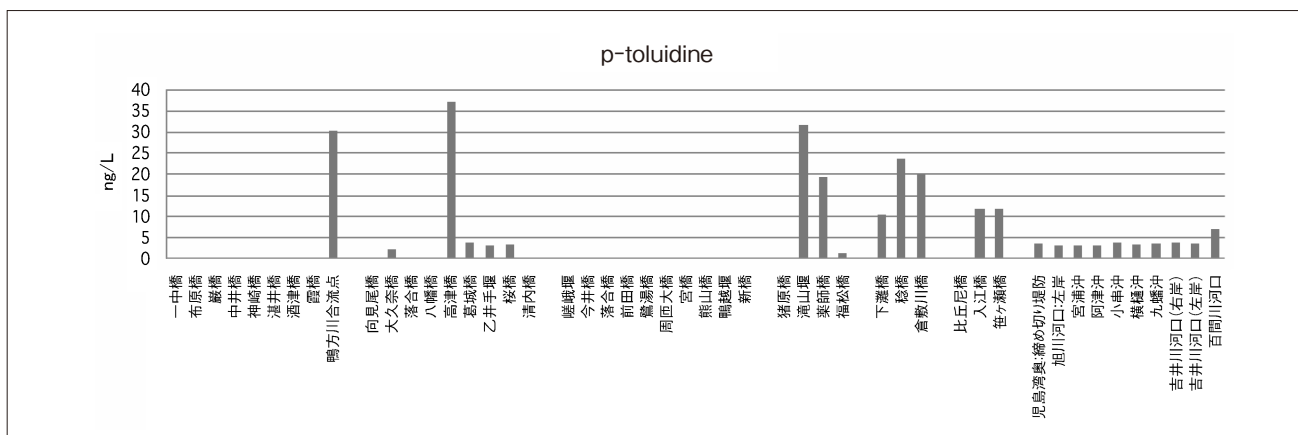


図7 p-トルイジンの検出状況

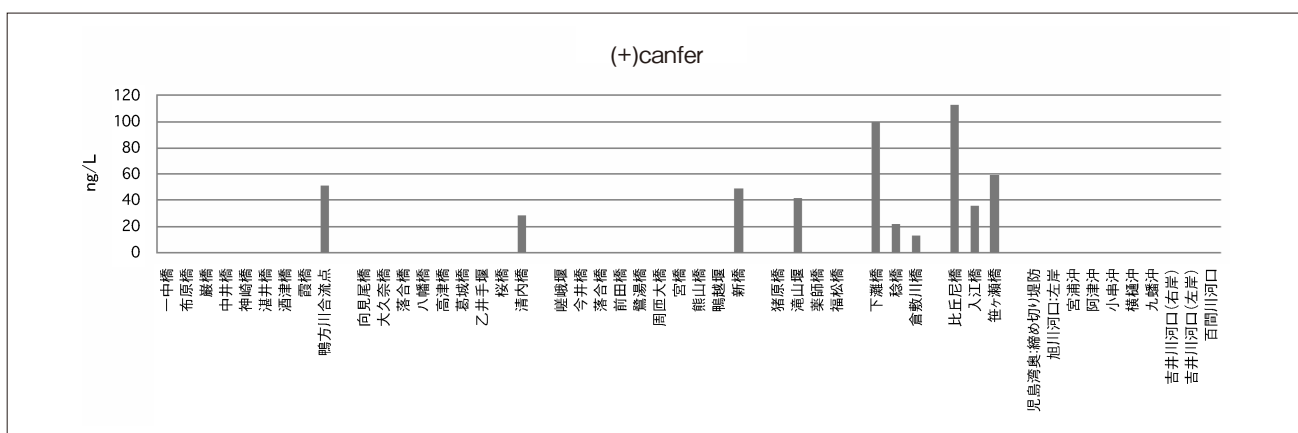


図8 カンファアの検出状況

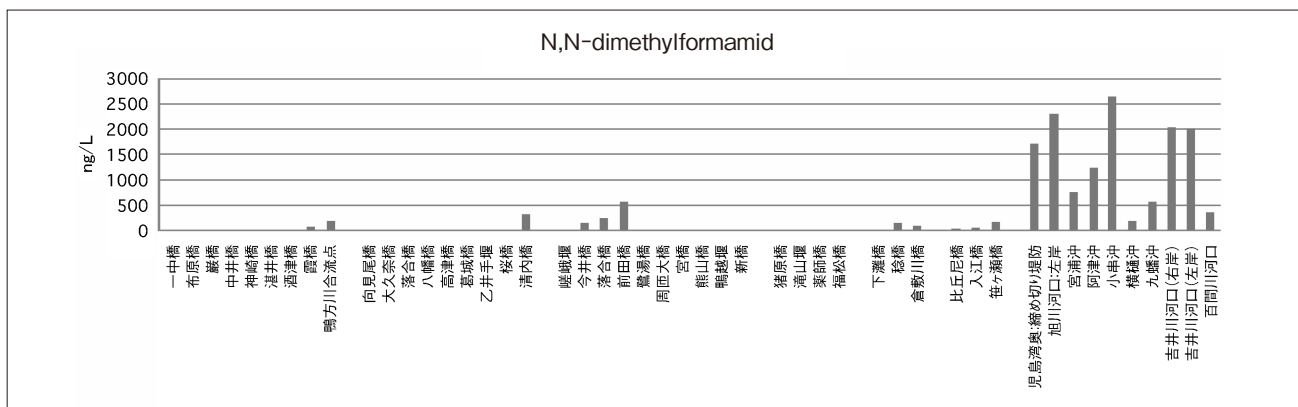


図9 N,N-ジメチルホルムアミドの検出状況

ほとんど検出されなかった。環境省の化学物質の環境リスク評価⁸⁾では、p-トルイジンの水質最大濃度(PEC)が0.006 $\mu\text{g/L}$ 未満、PNEC(予測無影響濃度)が0.11 $\mu\text{g/L}$ であることから、PEC/PNEC比が0.05未満となり、生態リスク評価は現時点では必要ないとしている。今回検出された最大値でPEC/PNEC比を計算すると、0.34となり、0.1を超過するが1未満であることから情報収集

に努める必要があると考えられるレベルにあり、今後も継続的な環境調査が必要と考えられた。

カンファアはクスノキの精油の主成分であり、防虫剤や医薬品、ニトロセルロースの可塑剤等の用途がある。最も高い濃度は、笹ヶ瀬川の比丘尼橋(岡山市)で110ng/Lが検出された。検出された地点は、倉敷川の3地点、笹ヶ瀬川水系の3地点、里見川の鴨方川合流点、

百間川の清内橋，砂川の新橋等であり，いずれも小河川の下流域で生活排水の影響を強く受けている地点であった。

N,N-ジメチルホルムアミドの平成22年6月の検出状況は，児島湾水域が最も高濃度で湾出口の小串で2,600ng/Lであった。試料採取時の宇野港の潮位を図10に示す。濃度が2,000ng/Lを超過していた旭川河口及び吉井川河口（児島湾北側）は満潮時に試料採取し，その他の地点（児島湾南側）は干潮時に試料を採取した。この物質の排出源は旭川であるが，潮位を考慮せず試料採取を行ったため明瞭な濃度傾向が見られなかった。

平成22年8月には干潮時及び満潮時に試料採取を再度行い，その時の分析結果を図11に示す。干潮時には，最も濃度が高かったのは旭川河口で600ng/Lであり，児島湾の出口に向かうほど濃度が低下していた。一方，

満潮時は横樋が270ng/Lと最も高く，6月に最高濃度を示した湾出口の小串は40ng/Lであった。6月と8月の濃度を比較すると最大で70倍以上の差が見られ，採取時期や潮位の状況により大きな差があった。

環境省の化学物質の環境リスク評価¹⁰⁾ではPECが0.1 μ g/L未満，PNECが71,000 μ g/Lであることから，PEC/PNEC比が0.000001となり，生態リスク評価は現時点では必要ないとしている。今回検出された最大値でPEC/PNEC比を計算すると，0.00004となり，児島湾水域でも現時点で生態リスク評価は必要ない結果となった。しかし，今回検出された濃度は過去の調査と比較して同等レベルの濃度であり，PRTRデータから排出量は減少しているが，検出された濃度の変動が大きいことから，今後も継続的な環境調査が必要と考えられた。

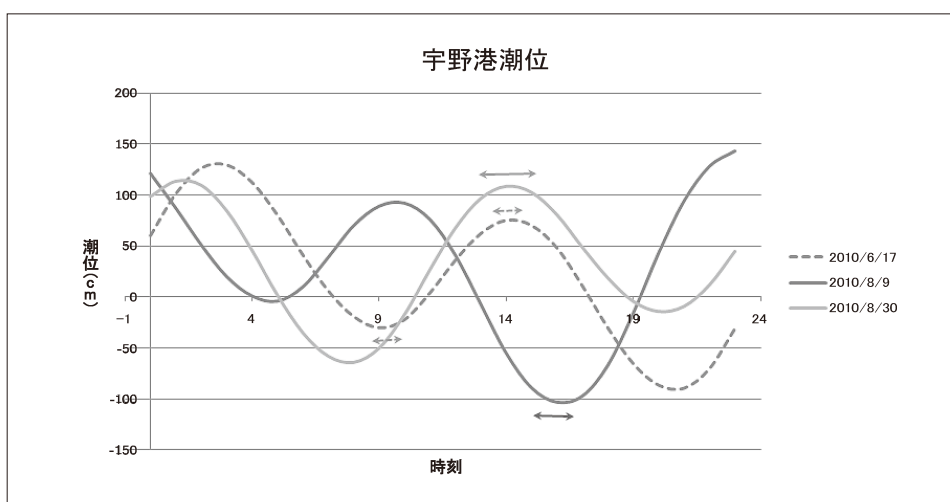


図10 試料採取時の潮位（気象庁HP⁹⁾から作成）

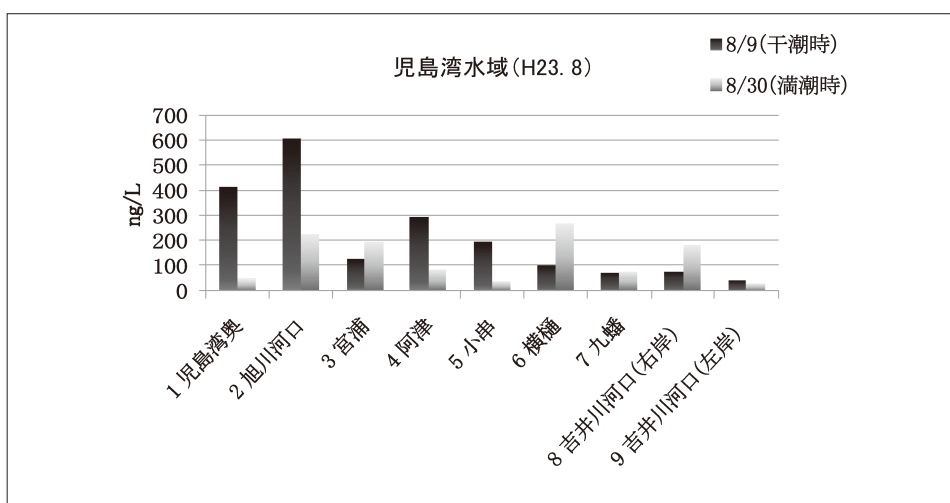


図11 児島湾におけるN,N-ジメチルホルムアミドの検出状況

4 まとめ

N,N-ジメチルホルムアミドと1,4-ジオキサンを含む23物質の多成分分析法を検討し、公共用水域の環境実態調査を実施し、次の結果を得た。

- 1) PS-2とAC-2のタンデム固相抽出による23物質の多成分分析法を検討し、絶対回収率は60%以上であった。
- 2) 公共用水域で検出率が高かった物質は、p-トルイジン、N,N-ジメチルホルムアミド、カンファーであった。
- 3) p-トルイジンは、旭川水系宇甘川の高津橋で最大37ng/Lが検出され、PEC/PNEC比は0.34となり、情報収集に努める必要があると考えられるレベルであった。
- 4) N,N-ジメチルホルムアミドは、児島湾水域で最大2,600ng/L検出され、潮位や採取時期により最大50倍程度の濃度差があった。
- 5) N,N-ジメチルホルムアミドのPEC/PNC比は0.00004となり、児島湾水域でも現時点で生態リスク評価は必要ないと考えられるレベルであった。

文 献

- 1) PRTRインフォメーション広場：環境省環境保健部環境安全課
<http://www2.env.go.jp/chemi/prtr/prtrinfo/index.html>
- 2) PRTRデータの公表について：岡山県環境管理課

http://www.pref.okayama.jp/seikatsu/kankanri/prtr/prtr_kouhyou.htm

- 3) 環境省環境保健部環境安全課：平成18年度版化学物質と環境，2007
- 4) 門上希和夫，佐藤健司，古賀実：14種の水溶性化学物質による北九州地方の水環境汚染，環境化学，Vol.3，No.1，pp.15-23，1993
- 5) 環境庁環境保健部環境安全課：平成9年度化学物質分析法開発調査報告書(N,N-ジメチルホルムアミド：新潟県保健環境科学研究所)，pp.141-152，1998
- 6) 安部明美：1,4ジオキサンによる水環境汚染の実態と施策—地方試験研究機関の仕事に着目して—，神奈川県環境科学センター研究報告，29，53-63，2006
- 7) 吉岡敏行，剣持堅志，藤原博一，中桐基晴，前田大輔：有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究—GC/MSを用いた水質中トルイジンとメチルナフタレンの同時分析法の検討—，岡山県環境保健センター年報，No.34，41-50，2010
- 8) 環境省環境保健部環境リスク評価室：化学物質の環境リスク評価 第5巻，2006
- 9) 気象庁：潮汐・海面水位のデータ
<http://www.data.kishou.go.jp/db/tide/dbindex.html>
- 10) 環境省環境保健部環境リスク評価室：化学物質の環境リスク評価 第1巻，2002

【調査研究】

有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究

—岡山県の公共用水域における有機フッ素化合物の環境実態調査—

The Environmental Survey on Contamination of Organic Fluorinated
Compounds in Surface Water of Okayama Prefecture

浦山豊弘, 吉岡敏行, 藤原博一, 山辺真一 (水質科), 前田大輔 (衛生化学科)

Toyohiro Urayama, Toshiyuki Yoshioka, Hiroichi Fujiwara, Shinichi Yamabe, Daisuke Maeda

要 旨

岡山県下の公共用水域における有機フッ素化合物の実態調査を実施した。県下の河川, 海域等 68 地点において有機フッ素化合物 17 物質について調査したところ, 12 物質がいずれかの地点で検出された。特にペルフルオロオクタン酸 (PFOA) は, すべての地点で検出され, 米国環境保護庁 (EPA) の飲料水基準と比較して低濃度であったものの, 有機フッ素化合物が広範囲に分布していることが確認された。

[キーワード: 有機フッ素化合物, 多成分分析, 水質, 環境実態, LC/MS/MS]

[Key words: Organic Fluorinated Compounds, Simultaneous analysis, Water,
Environmental Survey, LC/MS/MS]

1 はじめに

ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS), ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) に代表される有機フッ素化合物は, 泡末消火剤, コーティング剤, フッ素樹脂の製造補助剤等様々な用途に用いられてきた。しかし, 近年の研究で, 生物に対する蓄積性や難分解性が指摘されており, また, その汚染は世界中に広がっていることが確認されている。このため, PFOSは残留性有機汚染物質を規制するストックホルム条約の対象物質に追加され, また, わが国においても 2002 年に PFOS 及び PFOA が化学物質審査規制法の第二種監視化学物質に指定され, 2010 年 4 月に PFOS 及びその塩は第一種特定化学物質に指定された。

PFOS等の環境中の濃度は, 環境省が全国の河川水等の調査を実施し, 近畿地方の河川水から高濃度の PFOA が検出されたことが報告¹⁾されている。

一方, 岡山県下の公共用水域における有機フッ素化合物の実態は不明なため, 県下の河川, 海域等 68 地点において, PFOS, PFOA のほか鎖長が異なる類縁物質を加えた計 17 物質について調査した。

2 調査方法

2.1 調査対象物質

製造工場の自主的な対応により鎖長の異なる化合物への転換²⁾が行われていることから, PFOS, PFOA のほか鎖長が異なる類縁物質を加えた 17 物質を調査対象とした。

PFOSに代表されるペルフルオロアルキルスルホン酸は, PFOS (C8) のほか, PFBS (C4), PFHxS (C6), PFDS (C10) の 4 物質とした。

PFOA に代表されるペルフルオロアルキルカルボン酸は, PFOA (C8) のほか, PFBA (C4), PFPeA (C5), PFHxA (C6), PFHpA (C7), PFNA (C9), PFDA (C10), PFUdA (C11), PFDaA (C12), PFTTrDA (C13), PFTTeDA (C14), PFHxDA (C16), PFODA (C18) の 13 物質とした。

2.2 調査地点及び調査期間

調査地点を図 1 に示す。

一級河川の高梁川及び支流 11 地点, 旭川及び支流 8 地点, 吉井川及び支流 12 地点, 主要二級河川の笹ヶ瀬

川及び支流3地点、倉敷川3地点、里見川1地点、伊里川4地点、その他旭川の分流である百間川及び支流2地点、高屋川1地点の計45点について平成22年5月から8月に調査した。

海域については、関西地方に近い海域である播磨灘北西部3地点及び牛窓地先海域3地点、都市河川等が流入し閉鎖性水域である児島湾水域10地点、石油コンビナートが立地する水島海域3地点及び備讃瀬戸1地点の計20地点について調査した。

また、平成22年10月から12月にも、布原橋(高梁川水系西川)、下倉橋(高梁川)、落合橋(旭川)、嵯峨堰(吉井川)、鴨方川合流点(里見川)、今保通学橋、笹ヶ瀬橋(笹ヶ瀬橋)、引舟橋(足守川)、倉敷川橋(倉敷川)、大多府島東南沖(播磨灘北西部)の11地点について調査した。

2.3 分析方法

分析フローを図2に示す。また、LC/MS/MSでの測定条件を表1に示す。

3 結果及び考察

3.1 PFOS

PFOSの測定結果を表2に示す。今回の調査で68地点中36地点から検出され、米国EPA基準200ng/Lの1/40以下であったが広範囲に分布していることが確認された。

3.2 PFOA

PFOAの測定結果を表3に示す。全ての地点で検出され、広範囲に分布していることが確認されたが、多くの地点の濃度は10ng/L未満であり、米国EPA飲料水基準400ng/Lと比較して低濃度であった。

河川でPFOAが5ng/L以上となっている笹ヶ瀬川、倉敷川、里見川、百間川の地点はBODの年間平均値³⁾が2mg/Lを超えている地点であり、都市河川の汚濁の高い地点ほど濃度が高くなる傾向にあると判断された。また、50ng/L以上の地点のある金剛川及び伊里川ではBODの年間平均値はそれぞれ1.0mg/L、1.5mg/Lであり前述の傾向とは異なっており何らかの排出源があるものと推測された。

海域では、児島湾水域の濃度が他の調査海域よりも高めであり、都市河川等が流入し閉鎖性水域で濃度が高めになる傾向にあると判断された。また、石油コンビナートのある水島海域は牛窓地先海域や播磨灘北西

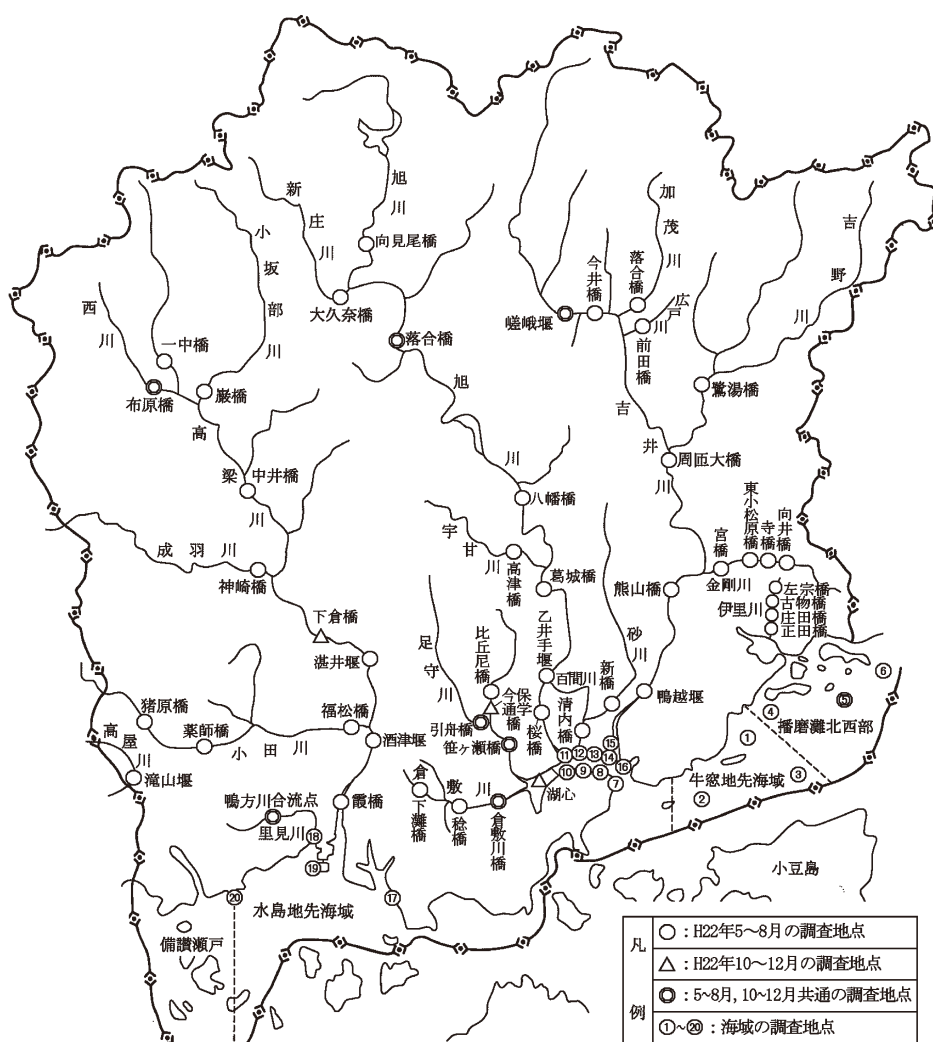


図1 調査地点

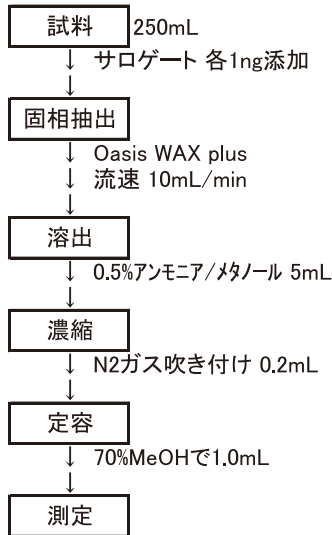


図2 分析フロー

表1 測定条件

(LC条件)	
カラム:	Atlantis T3 3 μ m 2.1mm ϕ \times 150mmL
移動相:	A: 10mM酢酸アンモニウム、B: アセトニトリル
0~5min	A: 80→55 B: 20→45 linear gradient
5~15min	A: B=55:45
15~15.1min	A: 55→10 B: 45→90 linear gradient
15.1~22min	A: B=10:90
22~22.1min	A: 10→80 B: 90→20 linear gradient
22.1~30min	A: B=80:20
流量:	0.2mL/min
カラム温度:	40°C
注入量:	10 μ L
(MS条件)	
使用機種:	Micromass Quattro micro API
キャピラリー電圧:	0.5kV
ソース温度:	100°C
デソルベーション温度:	500°C
コーンガス流量:	50L/h
デソルベーションガス流量:	600L/h
イオン化法:	ESI Negative SRM

表2 ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) 測定結果

(単位: ng/L)

		PFOS			
		H22 5-8月	H22 10-12月	H21 6-8月	
定量下限値		0.4	0.1	0.4	
高梁川及び支流	高梁川 一中橋	nd	-	nd	
	西川 布原橋	nd	nd	nd	
	小坂部川 巖橋	nd	-	nd	
	高梁川 中井橋	nd	-	nd	
	成羽川 神崎橋	nd	-	nd	
	高梁川 下倉橋	-	0.2	-	
	高梁川 湛井堰	nd	-	0.4	
	小田川 猪原橋	nd	-	0.4	
	小田川 薬師橋	0.5	-	1.9	
	小田川 福松橋	nd	-	1.2	
	高梁川 酒津堰	nd	-	0.5	
	高梁川 霞橋下流	nd	-	nd	
旭川及び支流	旭川 向見尾橋	nd	-	nd	
	新庄川 大久奈橋	nd	-	nd	
	旭川 落合橋	nd	nd	nd	
	旭川 八幡橋	nd	-	nd	
	宇甘川 高津橋	nd	-	0.4	
	旭川 葛城橋	nd	-	nd	
	旭川 乙井手堰	nd	-	nd	
	旭川 桜橋下流	nd	-	1.3	
吉井川及び支流	吉井川 嵯峨堰	nd	nd	nd	
	吉井川 今井橋	nd	-	nd	
	加茂川 落合橋	nd	-	nd	
	広戸川 前田橋	1.4	-	0.8	
	吉野川 鷺湯橋	nd	-	-	
	吉井川 周匝大橋	0.6	-	1.1	
	金剛川	向井橋	0.6	-	-
		寺橋	0.5	-	1.1
		東小松原橋	0.6	-	1.1
	吉井川 宮橋	0.5	-	0.6	
吉井川 熊山橋	0.6	-	1.3		
吉井川 鴨越堰	0.6	-	1.9		
笹ヶ瀬川等	笹ヶ瀬川 比丘尼橋	2.4	-	-	
	笹ヶ瀬川 今保通学橋	-	1.4	-	
	足守川 引舟橋	0.9	0.6	-	
	笹ヶ瀬川 笹ヶ瀬橋	1.1	1.7	-	
倉敷川	下灘橋	0.8	-	-	
	稔橋	1.2	-	-	
	倉敷川橋	1.4	2.5	-	
児島湖	湖心	-	2.0	-	
高屋川	滝山堰	1.8	-	3.0	
里見川	鴨方川合流点	4.9	3.6	-	
砂川	新橋	0.8	-	2.3	
百間川	清内橋下流	0.9	-	0.8	
伊里川	左宗橋	nd	-	-	
	古物橋	1.4	-	-	
	庄田橋	2.2	-	3.9	
	正田橋	1.7	-	1.8	
海域		PFOS			
		H22 5-8月	H22 10-12月	H21 6-8月	
牛窓地先海域	①錦海湾	nd	-	-	
	②前島南西	nd	-	-	
	③前島東南	nd	-	-	
播磨灘北西部	④長島西南	nd	-	-	
	⑤大多府島東南沖	nd	0.1	-	
児島湾	⑥鹿久居島東沖	nd	-	-	
	⑦向小串	0.8	-	-	
	⑧阿津	1.2	-	-	
	⑨宮浦	0.9	-	-	
	⑩児島湾奥	1.3	-	-	
	⑪旭川河口	0.6	-	-	
	⑫横樋	0.9	-	-	
	⑬百間川河口	1.5	-	-	
	⑭九幡	0.9	-	-	
	⑮吉井川河口	1.2	-	-	
⑯テイカ	1.0	-	-		
水島地先海域	⑰児島通生	nd	-	-	
	⑱玉島大橋下	nd	-	-	
	⑲玉島ハーバー	nd	-	-	
備讃瀬戸	⑳青佐鼻	nd	-	-	

表3 ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) 測定結果

(単位: ng/L)

			PFOA		
			H22 5-8月	H22 10-12月	H21 6-8月
定量下限値			0.4	0.1	0.4
高梁川 及び 支流	高梁川	一中橋	0.8	-	0.7
	西川	布原橋	0.9	0.1	0.2
	小坂部川	巖橋	0.5	-	0.5
	高梁川	中井橋	2.9	-	2.4
	成羽川	神崎橋	1.0	-	0.6
	高梁川	下倉橋	-	1.9	-
	高梁川	湛井堰	2.2	-	1.6
	小田川	猪原橋	1.4	-	1.5
	小田川	薬師橋	1.7	-	8.6
	小田川	福松橋	2.0	-	7.6
	高梁川	酒津堰	2.2	-	2.7
	高梁川	霞橋下流	1.8	-	2.4
旭川 及び 支流	旭川	向見尾橋	0.7	-	0.4
	新庄川	大久奈橋	0.6	-	0.5
	旭川	落合橋	1.4	0.1	0.8
	旭川	八幡橋	0.8	-	1.1
	宇甘川	高津橋	1.7	-	1.9
	旭川	葛城橋	1.6	-	1.7
	旭川	乙井手堰	2.0	-	2.4
吉井川 及び 支流	旭川	桜橋下流	1.6	-	4.4
	吉井川	嵯峨堰	0.7	0.3	0.8
	吉井川	今井橋	1.5	-	1.7
	加茂川	落合橋	1.2	-	1.4
	広戸川	前田橋	3.4	-	6.2
	吉野川	鷺湯橋	0.9	-	-
	吉井川	周匝大橋	2.4	-	3.7
	金剛川	向井橋	5.4	-	-
		寺橋	11	-	25
		東小松原橋	56	-	117
吉井川	宮橋	33	-	51	
吉井川	熊山橋	3.4	-	5.8	
吉井川	鴨越堰	3.2	-	5.9	
笹ヶ瀬川 等	笹ヶ瀬川	比丘尼橋	8.3	-	-
	笹ヶ瀬川	今保通学橋	-	7.7	-
	足守川	引舟橋	7.6	4.6	-
	笹ヶ瀬川	笹ヶ瀬橋	6.2	6.0	-

		PFOA		
		H22 5-8月	H22 10-12月	H21 6-8月
倉敷川	下灘橋	2.8	-	-
	稔橋	6.1	-	-
	倉敷川橋	6.3	9.1	-
児島湖	湖心	-	10	-
高屋川	滝山堰	4.2	-	8.5
里見川	鴨方川合流点	6.9	7.2	-
砂川	新橋	6.8	-	10
百間川	清内橋下流	6.8	-	2.7
伊里川	左宗橋	7.0	-	-
	古物橋	160	-	-
	庄田橋	690	-	880
	正田橋	230	-	210

海域		PFOA		
		H22 5-8月	H22 10-12月	H21 6-8月
牛窓地先 海域	①錦海湾	2.7	-	-
	②前島南西	1.3	-	-
	③前島東南	1.5	-	-
播磨灘 北西部	④長島西南	2.0	-	-
	⑤大多府島東南沖	2.3	0.9	-
	⑥鹿久居島東沖	2.1	-	-
児島湾	⑦向小串	4.8	-	-
	⑧阿津	5.8	-	-
	⑨宮浦	5.4	-	-
	⑩児島湾奥	7.7	-	-
	⑪旭川河口	4.2	-	-
	⑫横樋	5.9	-	-
	⑬百間川河口	8.2	-	-
	⑭九幡	5.0	-	-
	⑮吉井川河口	4.3	-	-
	⑯テイカ	4.4	-	-
水島地先 海域	⑰児島通生	1.2	-	-
	⑱玉島大橋下	2.2	-	-
	⑲玉島ハーバー	1.0	-	-
備讃瀬戸	⑳青佐鼻	1.2	-	-

部と同等の濃度であり、コンビナートはPFOAの濃度に影響していないと判断された。

流域毎の状況を以下に示す。

3.2.1 高梁川流域

上流域が低濃度、中・下流域で濃度が上昇する傾向であった。上流より下流の方が濃度が高いのはBODの年間平均値の傾向とも一致していたが、濃度が上昇する中流域の中井橋は高梁市の市街地より上流でありBODの年間平均値も0.8 mg/Lと決して高くないため、何らかの排出源があるものと推測されたが、原因となる排出源は特定できなかった。

3.2.2 旭川流域

上流域より中・下流域で濃度が高くなる傾向であったが、落合橋よりも下流の八幡橋で濃度が減少していた。両地点のBODの年間平均値は同等であり、間にある旭川ダムが関係しているのではないかと推測された。

3.2.3 吉井川流域

上流域から下流域に向かって徐々に濃度が上昇していた。流入河川では、広戸川の前田橋で周辺の河川よりも濃度が高めであり、BOD等の測定結果はないが汚濁が高いとは考えられないので何らかの排出源があると推測された。また、金剛川の東小松原橋で56ng/Lと他の調査地点と比べて高濃度であることが確認され、金剛川の

BODの年間平均値は0.6～1.0 mg/Lと決して高くないため、何らかの排出源がある可能性が疑われた。

3.2.4 笹ヶ瀬川及び支流、倉敷川、里見川、百間川及び支流

市街地を流れる笹ヶ瀬川及び支流、倉敷川、里見川、百間川ではいずれもPFOAが5ng/L以上となっている地点があるが、BODの年間平均値が2 mg/Lを超えている汚濁の高い地点であるため、都市河川の汚濁の高い地点ほど濃度が高くなる傾向にあると判断された。

3.2.5 伊里川

伊里川は水量の非常に少なく特定の排出源の影響を受けやすい河川であるが、古物橋で160ng/L、庄田橋で690ng/Lなど、他の多くの調査地点が10ng/L未満であることと比較して高濃度であった。しかし、2段階で濃度が上昇しており分布が単純ではなく、排出源の特定には至らなかった。

3.2.6 海域

調査水域のうち、児島湾水域で4.2～8.2ng/Lと他の調査海域の1.0～2.7ng/Lよりも高めであり、都市河川が流入し閉鎖性水域で濃度が高くなる傾向にあると判断された。

また、石油コンビナートの沿岸である水島海域では牛窓地先海域や播磨灘北西部と同等の濃度となっており、水島コンビナートはPFOAの濃度に影響していないと判断された。

3.3 その他の有機フッ素化合物の測定結果

その他の有機フッ素化合物の測定結果を表4に示す。調査した類縁物質15物質のうち10物質がいずれかの地点で検出された。

3.3.1 ペルフルオロアルキルスルホン酸 (PFOSの類縁物質)

PFBS (C4) は、65地点中22地点で検出された。100ng/L以上の検出があったのは、PFOAが100ng/L以上であった伊里川の古物橋、庄田橋、正田橋であり、PFBSの濃度は191～475ng/Lであった。これらの地点でPFOSは1.4～2.2ng/Lであったので、PFOSから代替物質の

PFBSへの転換が進んでいるものと判断された。

それ以外の検出地点では、笹ヶ瀬川、倉敷川、里見川、百間川で検出されているのは、都市河川の汚濁の高い地点で検出又は濃度が高くなるPFOSやPFOAの傾向と同じであるが、BODの年間平均値0.7 mg/Lの猪原橋(高梁川水系小田川)や、BODの年間平均値1.0 mg/Lで1つ上流の栗子橋と同等である周匝大橋(吉井川)などで検出されているのは何らかの排出源があるものと推測された。

3.3.2 ペルフルオロアルキルカルボン酸 (PFOAの類縁物質)

PFNA (C9) が65地点中48地点で検出されるなど、12物質中8物質が検出されており、PFOA以外にも広範囲に分布していることが確認された。

また、PFOAが100ng/L以上であった伊里川の3地点では、検出された8物質が全て検出された。

①PFBA (C4)

68地点中15地点で検出された。検出地点のうち伊里川の3地点はPFOAが100ng/L以上であった地点である。笹ヶ瀬川流域、倉敷川、百間川、児島湖、児島湾で検出されている地点があるのは都市河川の汚濁の高い地点で濃度が高くなるPFOAと同様の傾向であるが、落合橋(加茂川)、前田橋(広戸川)はBOD等の測定結果はないが汚濁が高いとは考えられず周辺の河川でも検出されていないため何らかの排出源があるものと推測された。里見川は汚濁の高い地点に該当するが、PFBAは他の都市河川の5倍程度の濃度となっており、何らかの排出源により濃度が上乘せされている可能性も考えられた。

②PFPeA (C5)

68地点中4地点で検出された。検出地点は伊里川及び金剛川であり、いずれもPFOAが50ng/L以上であった地点であった。

③PFHxA (C6)

68地点中30地点で検出された。検出地点のうち伊里川及び金剛川はPFOAが30ng/L以上であった地点であり、そのほかの笹ヶ瀬川、里見川、百間川、児島湾は都市河川の汚濁の高い地点で濃度が高くなるPFOAと同様の傾向であった。

牛窓地先海域及び播磨灘北西部は、このPFHxAが

表4 その他の有機フッ素化合物の測定結果

(単位: ng/L)

		ヘルフルオロアルキルスルホン酸			ヘルフルオロアルキルカルボン酸												
		PFBS (C4)	PFHxS (C6)	PFDS (C10)	PFBA (C4)	PFPeA (C5)	PFHxA (C6)	PFHpA (C7)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUdA (C11)	PFDoA (C12)	PFTrDA (C13)	PFTeDA (C14)	PFHxDA (C16)	PFODA (C18)	
定量下限値		0.4	0.4	0.4	4	2	2	1	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
高梁川 及び支流	高梁川	一中橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	西川	布原橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
		(10-12月)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	小坂部川	巖橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	高梁川	中井橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	成羽川	神崎橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	高梁川	下倉橋(10-12月)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	高梁川	湛井堰	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	小田川	猪原橋	0.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	小田川	薬師橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
小田川	福松橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
高梁川	酒津堰	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
高梁川	霞橋下流	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
旭川 及び支流	旭川	向見尾橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	新庄川	大久奈橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	旭川	落合橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
		(10-12月)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1	0.4	nd	nd	nd	nd	nd	
	旭川	八幡橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	宇甘川	高津橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	旭川	葛城橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
旭川	乙井手堰	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
旭川	桜橋下流	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
吉井川 及び支流	吉井川	嵯峨堰	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
		(10-12月)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	吉井川	今井橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	加茂川	落合橋	nd	nd	nd	5	nd	nd	nd	0.8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	広戸川	前田橋	nd	nd	nd	8	nd	nd	1	1.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	吉野川	鷺湯橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	吉井川	周匝大橋	2.0	0.4	nd	nd	nd	nd	nd	2.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
		向井橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.9	nd	nd	nd	nd	nd	
	金剛川	寺橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7	1.7	3.5	0.7	nd	nd	nd	nd	
		東小松原橋	nd	nd	nd	nd	5	11	18	8.0	11	3.4	nd	nd	nd	nd	
金剛川	宮橋	nd	nd	nd	nd	nd	7	13	4.0	5.2	1.6	nd	nd	nd	nd		
吉井川	熊山橋	1.3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.3	0.4	nd	nd	nd	nd	nd		
吉井川	鶴越堰	1.0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.9	0.8	nd	nd	nd	nd	nd		
笹ヶ瀬川 及び支流	笹ヶ瀬川	比丘尼橋	0.5	1.3	nd	nd	nd	3	4	2.7	0.7	0.4	nd	nd	nd	nd	
	笹ヶ瀬川	今保通学橋(10-12月)	0.8	0.8	nd	4	nd	3	2	3.1	0.6	0.4	nd	nd	nd	nd	
	足守川	引舟橋	nd	nd	nd	nd	nd	3	3	1.5	0.7	nd	nd	nd	nd	nd	
		(10-12月)	1.0	nd	nd	4	nd	2	1	1.0	0.4	nd	nd	nd	nd	nd	
笹ヶ瀬川	笹ヶ瀬橋	nd	nd	nd	nd	nd	3	3	2.2	0.7	0.4	nd	nd	nd	nd		
笹ヶ瀬川	(10-12月)	0.6	0.5	nd	nd	nd	2	2	2.8	0.7	0.6	nd	nd	nd	nd		
その他河川	倉敷川	下灘橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
		稔橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.2	1.0	0.9	nd	nd	nd	nd	
		倉敷川橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.5	1.1	0.4	nd	nd	nd	nd	
	倉敷川	(10-12月)	0.6	0.8	nd	5	nd	4	3	3.8	1.0	0.9	nd	nd	nd	nd	
	児島湖	湖心(10-12月)	0.6	0.7	nd	4	nd	4	3	3.8	1.2	0.7	nd	nd	nd	nd	
	高屋川	滝山堰	0.8	1.6	nd	nd	nd	nd	1	7.7	1.4	0.8	nd	nd	nd	nd	
	里見川	鴨方川合流点	0.7	3.2	nd	22	nd	4	3	5.1	1.1	0.4	nd	nd	nd	nd	
		(10-12月)	0.4	2.1	nd	24	nd	3	1	4.0	0.6	nd	nd	nd	nd	nd	
	砂川	新橋	0.5	nd	nd	nd	nd	2	2	4.5	0.6	1.1	nd	nd	nd	nd	
	百間川	清内橋下流	0.7	nd	nd	4	nd	2	2	5.4	1.0	2.1	nd	nd	nd	nd	
伊里川	左宗橋	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.2	nd	nd	nd	nd	nd		
	古物橋	370	nd	nd	17	21	65	45	22	31	3.8	3.3	nd	nd	nd		
	庄田橋	480	nd	nd	69	190	580	280	150	260	60	36	nd	nd	nd		
	正田橋	190	nd	nd	20	67	180	89	44	73	20	22	nd	nd	nd		
海域	牛窓地先 海域	①錦海湾	0.5	nd	nd	nd	nd	17	nd	0.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
		②前島南西	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9	nd	0.9	nd	nd	nd	nd	nd	
		③前島東南	nd	nd	nd	nd	nd	nd	13	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
		④長島西南	nd	nd	nd	nd	nd	nd	16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	播磨灘 北西部	⑤大多府島東南沖	0.4	nd	nd	nd	nd	nd	16	nd	0.9	0.6	nd	nd	nd	nd	
		(10-12月)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	11	nd	0.4	nd	nd	nd	nd	nd	
		⑥鹿久居島東沖	nd	nd	nd	nd	nd	nd	16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
		⑦向小串	nd	nd	nd	4	nd	3	2	1.5	0.6	0.5	nd	nd	nd	nd	
	児島湾	⑧阿津	nd	nd	nd	nd	nd	7	2	2.1	1.3	0.7	nd	nd	nd	nd	
		⑨宮浦	nd	nd	nd	nd	nd	5	2	2.3	1.1	0.5	nd	nd	nd	nd	
		⑩児島湾奥	nd	nd	nd	nd	nd	5	2	2.7	1.2	0.6	nd	nd	nd	nd	
		⑪旭川河口	nd	nd	nd	nd	nd	3	1	0.9	0.6	0.4	nd	nd	nd	nd	
		⑫横樋	nd	nd	nd	nd	nd	7	2	2.2	0.9	0.5	nd	nd	nd	nd	
		⑬百間川河口	0.5	nd	nd	5	nd	3	3	3.9	1.4	0.7	nd	nd	nd	nd	
		⑭九幡	nd	nd	nd	nd	nd	6	2	1.9	0.8	0.4	nd	nd	nd	nd	
		⑮吉井川河口	0.4	nd	nd	5	nd	4	2	1.5	0.7	0.4	nd	nd	nd	nd	
⑯テイカ	0.5	nd	nd	5	nd	6	2	1.4	0.7	0.5	nd	nd	nd	nd			
水島地先 海域	⑰児島通生	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
	⑱玉島大橋下	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
	⑲玉島ハーバー	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
備讃瀬戸	⑳青佐島	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
検出地点数		22	8	0	15	4	30	28	48	32	26	3	0	0	0	0	

PFOA (C8) の5倍以上であるという特徴があり両海域全体が同様の傾向であったが、播磨灘北西部流入する伊里川ではPFHxAとPFOAは同等の濃度であった。

そこで、近府県による調査結果を確認したところ、兵庫県の河川においてPFHxA (C6) が8割占める地点があり⁴⁾、大阪府の海域ではPFHxA (C6) とPFOA (C8) が同程度かPFHxA (C6) の方が高い傾向にあり⁵⁾、牛窓地先海域及び播磨灘北西部の傾向と一致していた。

④PFHpA (C7)

68地点中28地点で検出された。検出地点のうち伊里川及び金剛川はPFOAが10ng/L以上の地点であり、金剛川の寺橋は他の多くの調査物質が検出されている地点よりも上流であるが、PFOAも同様の傾向であり、何らかの小さな排出源が存在するか大気粉塵等何らかの媒体経由の拡散があるものと推測された。

他の検出地点については、都市河川の汚濁の高い地点で濃度が高くなるPFOAと同様の傾向であった。

PFHxA (C6) がPFOSより数倍高い濃度で検出された牛窓地先海域及び播磨灘北西部では当物質の検出はなかった。

⑤PFNA (C9)

68地点中48地点で検出され、PFOAの次に検出地点数が多かった。

検出地点のうち伊里川及び金剛川はPFOAが10ng/L以上の地点であり、笹ヶ瀬川水系、倉敷川、里見川、百間川、児島湾で検出されているのは都市河川の汚濁の高い地点で濃度が高くなるPFOAと同様の傾向であったが、上流部の布原橋(西川)、向見尾橋(旭川)で検出される一方、旭川の下流部で検出されないなど濃度分布が単純でなく、原因を推測することが困難な水域もあった。

⑥PFDA (C10)、PFUdA (C11)

PFDA (C10) は68地点中32地点、PFUdA (C11) は26地点で検出された。

検出地点のうち伊里川及び金剛川はPFOAが50ng/L以上の地点のある水域であり、笹ヶ瀬川水系、倉敷川、里見川、百間川、児島湾で検出されているのは都市河川の汚濁の高い地点で濃度が高くなるPFOAと同様の傾向であった。

なお、PFDA (C10) は他の調査物質が検出されている地点より上流の向井橋(金剛川)、左宗橋(伊里川)で新たに検出されており、大気粉塵等何らかの媒体経由で拡

散しやすい物質であると考えられた。

⑦PFDoA (C12)、PFTrDA (C13)、PFTeDA (C14)、PFHxDA (C16)、PFODA (C18)

PFDoA (C12) は、伊里川の3地点でのみ検出され、PFTrDA (C13)、PFTeDA (C14)、PFHxDA (C16)、PFODA (C18) はいずれの地点でも検出されなかった。

鎖長が長い類縁物質が環境水から検出されていないのは兵庫県による調査結果⁴⁾とも一致しているが、大阪府による大気の調査結果⁶⁾では、PFTrDA (C13)、PFTeDA (C14) も検出されており、鎖長が長くなるほど土壌粒子等への吸着性が増すため環境水からは検出されにくいものと推測された。

3.4 PFOS・PFOA濃度の季節変動

平成22年5～8月と10～12月の測定結果を比較したところ、PFOAは布原橋(高梁川上流支流)、落合橋(旭川中流)、嵯峨堰(吉井川上流)、大府島東南沖(海域)で10～12月に濃度が減少しており、5～8月よりも10～12月に濃度が減少する傾向が確認されたが、下倉橋(湛井堰と比較)(高梁川中流)、今保通学橋(比丘尼橋と比較)及び笹ヶ瀬橋(笹ヶ瀬川)、鴨方川合流点(里見川)は濃度が同等であり、都市河川の汚濁の高い地点や何らかの排出源の存在が疑われる地点では季節による濃度の変動は小さいものと推測された。

PFOSについては、10～12月の調査で試料量を増加させて下限値を下げたため新たに検出された地点もあるが、季節による濃度の変動は確認できなかった。なお、数値を比較ができた両期に調査し検出されている地点は都市河川の汚濁の高い水域である。

3.5 PFOS・PFOA濃度の経年変化

平成21年度の調査結果と比較したところ、PFOSについては、平成21年度に検出された地点の多くで不検出または濃度の低下が確認され、使用抑制による排出量低減の影響が認められた。

PFOAについては、薬師橋・福松橋(小田川)、前田橋(広戸川)、滝山堰(高屋川)などで濃度が減少しており特定の排出源での使用削減の影響が推測されたが、一級河川や都市河川の濃度は流況等による変動の範囲内と考えられ、実態濃度は大きく変化していないと推測された。

今後、PFOS、PFOAの使用抑制や代替物質への転換が進むことが考えられるため、濃度、組成の経年変化を追跡調査する必要があると考えられる。

4 まとめ

平成22年度に岡山県下の公共用水域における有機フッ素化合物の実態調査を実施したところ、以下のことが判明した。

- 1) PFOSは68地点中36地点から、PFOAは全地点から検出され、広範囲に分布していることが確認された。
- 2) PFOAの濃度分布は都市河川や都市河川が流入する閉鎖性海域等汚濁の高い地点で濃度が高くなる傾向にあったが、何らかの排出源が存在すると推測される地点もあった。
- 3) 石油コンビナートの沿岸である水島水域は他の調査海域と同等濃度であり、水島コンビナートは有機フッ素化合物の濃度に影響していないと判断された。
- 4) 鎖長が異なるPFOAの類縁物質についても、PFBA(C4)からPFUdA(C11)まで多くの物質が検出された。PFOSの類縁物質では炭素数4のPFBS(C4)が比較的多くの地点で検出された。
- 5) いずれの地点からも検出されなかったのは鎖長が長

い物質で、土壌粒子等への吸着性が増すため環境水からは検出されにくいものと推測された。

- 6) 季節間の比較では、5～8月よりも10～12月にPFOAの濃度が減少した地点もあったが、季節による濃度の変動は小さい地点が多かった。
- 7) 平成21年度と平成22年度の調査結果を比較したところ、PFOSの濃度が減少している傾向にあり、PFOAも一部の地点では濃度が減少していたが、多くの地点ではPFOAの濃度はほぼ横ばいであった。

文 献

- 1) 環境省：化学物質と環境，平成15年度版
- 2) ダイキン，フッ素化学製品におけるPFOA全廃
<http://www.daikin.co.jp/press/2007/071221/index.html>
- 3) 岡山県環境文化部長官環境管理課，平成22年度公共用水域水質測定結果，<http://www.pref.okayama.jp/page/detail-115257.html>
- 4) 松村千里ら，第19回環境化学討論会要旨集，p488-489，2010
- 5) 上堀美知子ら，第13回日本水環境学会シンポジウム講演集，p3-4，2010
- 6) 上堀美知子ら，第19回環境化学討論会要旨集，p500-501，2010

【資 料】

ほうれん草中U-238濃度と施肥の関係について(第3報)

Relationships between concentration of U-238 in spinach and fertilization

森上嘉亮, 信森達也, 清水光郎, 西村佳恵, 宮崎 清(放射能科)

Yoshiaki Morikami, Tatsuya Nobumori, Mitsuo Shimizu, Yoshie Nishimura, Kiyoshi Miyazaki

要 旨

リン酸肥料の施肥量を変えた圃場で栽培したほうれん草を用いて, ほうれん草, 土壌及び土壌中から水または希硝酸で抽出されるU-238濃度を調査した。土壌中から水で抽出されるU-238濃度と植物体中U-238濃度に相関が見られたことから, ほうれん草は, 降雨により土壌から水に移行したU-238を吸収していることが示唆された。

[キーワード: U-238, 肥料, 相関]

[Key words: U-238, Fertilizer, Relationships]

1 はじめに

U-238(以下, U)は約45億年の半減期をもつ天然放射性核種であり, 自然環境中に普遍的に存在している。岡山県では独立行政法人日本原子力研究開発機構人形峠環境技術センター(以下「人形峠センター」)周辺の環境放射線等の監視測定を行っている。施設周辺の土壌, 樹葉, 野菜などを採取し, U濃度を測定しているが, 平成19年度に天王地区の畑でサンプリングしたほうれん草に過去の測定データの約10倍に相当する, 0.099Bq/kg生のUが検出された。この原因は, 聞き取り調査などから, リン酸肥料を大量に施肥したことによると考えられた^{1), 2)}。一般的に, リン酸肥料中にはUが不純物として多く含まれることが知られている³⁾。施肥されたリン酸肥料中Uの植物体への吸収を調査するため, 栽培実験を行った。筆者らによる先の調査において^{4), 5)}, 単純な施肥の増加のみにより, ほうれん草中Uが増加しないことがわかった。そこで, ほうれん草のU吸収の動態について調査するため, 土壌からUの抽出実験を行い, 相関を検討した。

2 調査方法

2-1 材料及び栽培方法

岡山市西大寺地区の畑を畦波で仕切り, 肥料濃度を変えた圃場を調製した。一般的なリン酸肥料の施肥量は15 kg/aであるが, A: 0倍(0 kg/a), B: 0.5倍(7.5 kg/a),

C: 1倍(15 kg/a), D: 2倍(30 kg/a), E: 4倍(60 kg/a), F: 8倍(120 kg/a)の6種類を調製した。

各圃場に播種し, 散水等を行い生育させた。

栽培種: ほうれん草(株サカタのタネ製サンライト)

リン酸肥料: 野菜一番(三興株式会社製, リン酸全量10%)

当該肥料中U-238濃度を測定したところ, 0.38±0.06Bq/g乾であった。

栽培場所: 岡山県岡山市西大寺地区畑

栽培時期: 秋期(10月播種)

2-2 試料採取方法, 分析項目及び方法

試料採取方法は文部科学省編環境試料採取法に準拠した。ほうれん草は収穫期にサンプリングし, 根を取り除き, 蒸留水で洗浄後, 105℃で乾燥させた。乾燥物の重量を量り水分率を求め, 乾燥物を粉碎したものをデシケーター内で室温保存した。土壌は表層0-5cmを採取し, 乾燥後, 2mmのふるいでふるい分けたものを室温にて保存した。

ほうれん草の分析については文部科学省編ウラン分析法に準拠した。前処理として, ピーカーに乾燥試料500mgを量りとり, 硝酸を10mL加え時計皿をして, ホットプレート上で蒸発乾固した。試料の色が白くなるまで, 硝酸を加え, 蒸発乾固の操作を繰り返した。放冷後, メンブランフィルター(0.45µm)で吸引濾過し, メスフラスコに移し, 1%硝酸で25mLに希釈後, ICP-MS(ICPM8500,

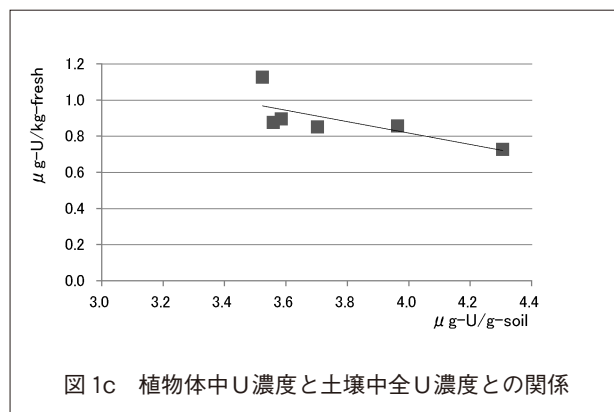
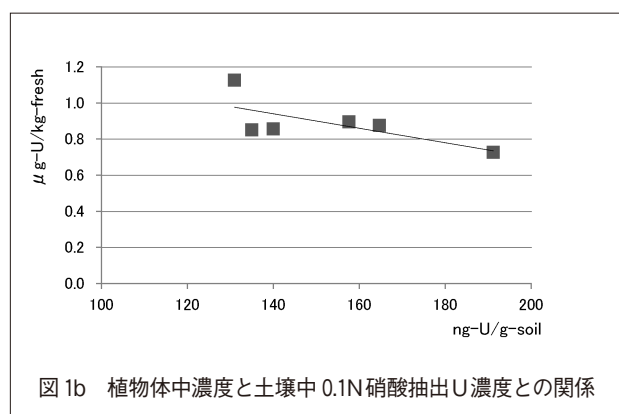
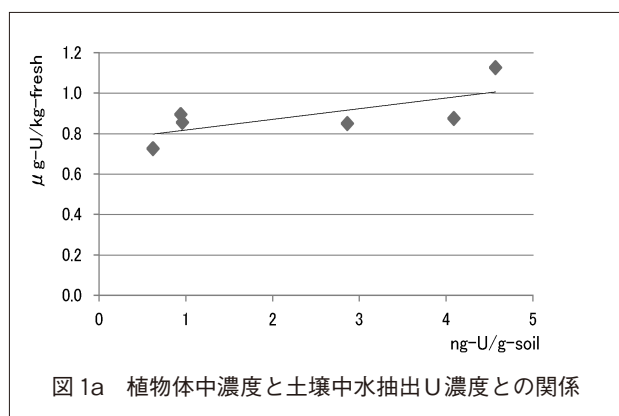
島津製作所製)で測定した。なお、SPEX社製SRM: 1570aを用いて回収率補正を行った。

土壌の分析について、全U測定は文部科学省編ゲルマニウム半導体検出器によるガンマ線スペクトロメトリーに準拠した。すなわち、試料をU8容器に詰め、高純度ゲルマニウム半導体検出器(ULB-GR3019, CANBERRA社製)で測定した。また、土壌から水で抽出されるU(以下水抽出U)及び0.1N硝酸で抽出されるU(以下硝酸抽出U)の分析は、土壌5gを分液漏斗に量りとり、純水又は0.1N硝酸50mLを加え、8h浸透抽出する。その後、メンブランフィルター(0.45 μ m)で吸引濾過し、ICP-MS(ICPM8500, 島津製作所製)で測定した。

3 結果及び考察

3-1 土壌中U濃度と植物体中U濃度の関係(図1)

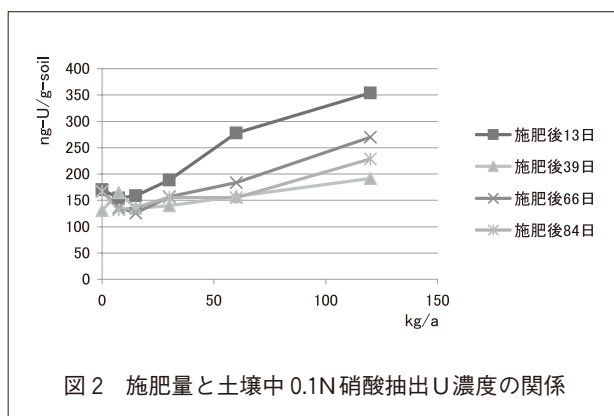
土壌中全U濃度、水抽出U濃度及び硝酸抽出U濃度と植物体中U濃度との相関を検討したところ、水抽出U濃度(図1a)のみに正の相関が認められ、硝酸抽出U濃度(図1b)及び全U濃度(図1c)は逆相関を示し、ほうれん草が、雨により土壌から水浸出されたUを根からの水分吸収に伴って吸収していることが示唆された。



3-2 施肥量と硝酸抽出U濃度の関係(図2)

施肥量と硝酸抽出U濃度の関係について検討したところ、①施肥量が増加すると共に、硝酸抽出U濃度が増加した。②施肥後、時間経過と共に硝酸抽出U濃度が減少した。

このことから、肥料中Uは施肥後早期においては、容易に0.1N硝酸に浸出されるが、時間の経過とともに土壌に強く吸着され、浸出されなくなったものと推察された。



3-3 施肥量と水抽出U濃度の関係(図3)

施肥量と水抽出U濃度の関係について検討したところ、①施肥後早期においては、施肥量が増加すると共に、水抽出U濃度が減少した。②施肥後、時間経過とともに、水抽出U濃度が無施肥土壌と同水準程度に戻った。

このことは、施肥によるpH低下が大きく影響したため、水抽出U濃度が減少し、その後、雨の中和作用により、水抽出Uが無施肥土壌と同水準まで上昇したものと推察された。

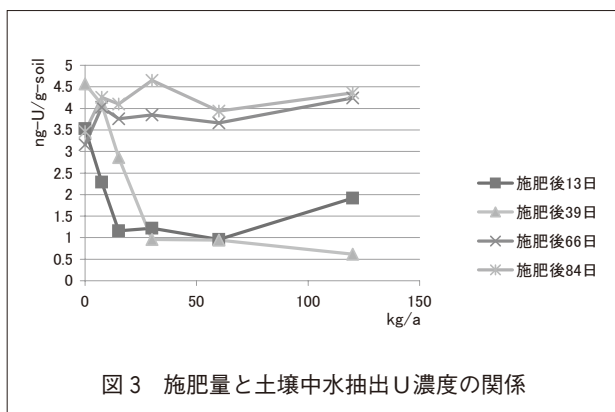


図3 施肥量と土壤中水抽出U濃度の関係

4 まとめ・今後の展開

土壤の抽出実験により、ほうれん草が根からの水分吸収によりUを吸収していることが推察された。

施肥と抽出成分U濃度の関係を調査することで、施肥量の増加は、0.1N硝酸抽出Uを大幅に増加させるが、時間の経過と共に土壤に吸着されていく様子を観察することができた。一方、ほうれん草中Uに影響を与える水抽出Uは施肥直後には大きく減少する。このことにより、今回の栽培実験において、単純な施肥の増加のみでは植物体中U濃度を上昇させないことが判明した。

今後、ほうれん草が高濃度になった原因の究明を目的とし、経根以外の吸収経路として、葉面吸収を検討するために、葉面への付着量を変えた栽培実験を行う。

文 献

- 1) 岡山県環境保健センター編：人形峠周辺の環境放射線等測定報告書(1980～2009)
- 2) 森上嘉亮, 道広憲秀, 清水光郎, 宮崎清：土壤および植物中のRa-226またはフッ素のU-238との濃度関係について, 岡山県環境保健センター年報, 32, 75-81, 2008
- 3) 田上恵子, 内田滋夫：U/Th比を用いたリン鉱石原料のリン酸肥料施用による農耕地土壤中ウラン増加割合の推定, RADIOISOTOPES, 55, 71-78, 2006
- 4) 森上嘉亮, 道広憲秀, 信森達也, 清水光郎：ほうれん草中U-238濃度と施肥の関係について, 岡山県環境保健センター年報, 33, 85-86, 2009
- 5) 森上嘉亮, 信森達也, 清水光郎, 西村佳恵, 宮崎清：ほうれん草中U-238濃度と施肥の関係について(第2報), 岡山県環境保健センター年報, 34, 55-57, 2010

【調査研究】

岡山県における食中毒及び感染症起因菌の疫学的解析

①下痢症・呼吸器感染症起因菌の疫学調査と検査法の検討(平成22年度)

Epidemiological Studies on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Corynebacterium ulcerans* in Okayama Prefecture (FY2010) and Examination of Rapid Detection Methods for *Legionella*

中嶋 洋, 大島律子, 石井 学, 植原幸二*, 仲 克巳** (細菌科)

*岡山赤十字病院第一小児科, **くらしき作陽大学現代食文化学科

Hiroshi Nakajima, Ritsuko Ohata, Manabu Ishii, Kouji Narahara*

and Katsumi Naka** (Department of Bacteriology)

要 旨

志賀毒素産生性大腸菌(STEC)感染症, レジオネラ症およびコリネバクテリウム・ウルセランスによる感染症対策の予防と対策に資するため, 平成22年度に県内で分離されたSTECの疫学解析を実施した。また, レジオネラの迅速検査法の検討及びコリネバクテリウム・ウルセランスのヒトおよび動物保菌調査を実施した。STECは, ヒト由来株63株中血清型O157:H7は毒素型STX1,2(50.8%), STX2(17.5%)が, O26:H11はSTX1(25.4%)が検出され, これらの血清型がSTEC全体の93.7%を占めた。牛のSTEC保菌率は12.6%で, 牛内臓1検体(2.9%)からO血清群157が検出された。レジオネラの迅速検査法として新たに検討した生菌を検出する逆転写反応後のリアルタイムPCRは, 培養法とほぼ同程度の検出率であった。ヒトおよび牛からコリネバクテリウム・ウルセランスの分離を試みたが, 本年度は陰性であった。これらの結果をもとに, 更に継続調査を行い, 感染症予防対策に役立てる必要があると考える。

[キーワード: 志賀毒素産生性大腸菌, レジオネラ, コリネバクテリウム・ウルセランス, 疫学]

[Key words: shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Legionella*, *Corynebacterium ulcerans*, epidemiology]

1 はじめに

岡山県下で毎年多数の患者を出している志賀毒素産生性大腸菌(以下STECと略す)の感染源・感染経路の究明や発生予防を目的として, ヒトや食品由来株の収集と動物からの分離菌株を用いて疫学解析を行っている。また, レジオネラ症の発生予防を目的として, 感染源となる浴槽水などの衛生管理に迅速な結果が得られる遺伝子検査法の確立を検討している。ジフテリア様毒素を産生するコリネバクテリウム・ウルセランスについては, 過去に県内で患者が発生したことから, 感染源と考えられる動物の保菌状況を調査している。これらの菌種を対象とした調査は長期間継続して実施しており, 本報告では平成22年度の結果を報告する。

2 材料及び方法

(1) 菌株及び検体

県内で平成22年度にヒトから分離されたSTEC株63株と, 牛直腸便348検体, 牛糞堆肥25検体, 牛肉22検体および牛内臓(肝臓, 小腸, 大腸, センマイ等)35検体を用いた。

レジオネラの検査および検査法の比較には浴槽水等30検体を, コリネバクテリウム・ウルセランスの調査にはヒト咽頭スワブ1検体と牛病畜の関節液7検体及び乳汁3検体を用いた。

(2) 検査法

各菌種の検査は, 以下の方法で実施した。

1) 生化学的性状試験

STECの性状試験はIDテストEB20(日水)を, コリネバクテリウムはApiコリネ(バイオメリュ)を用いて菌の同定を行った。

2) 血清型別

STEC及びレジオネラの血清型別は, 病原性大腸

菌免疫血清及びレジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いて実施した。

3) STEC毒素(STX)型別およびジフテリア毒素遺伝子の保有

STECの毒素型別は、ラテックス凝集反応による大腸菌ベロ毒素検出用キット(デンカ生研)及びPCR法¹⁾により実施した。コリネバクテリウムのジフテリア毒素遺伝子保有は、PCR法²⁾により実施した。

4) パルスフィールドゲル電気泳動法によるDNAパターンの解析

STECのパルスフィールドゲル電気泳動法(以下PFGEと略す)は、寺嶋ら³⁾のプロトコールにより実施した。また、DNAパターンによる型別(以下PFGE型と略す)は、国立感染症研究所に依頼して実施した。

(3) レジオネラの迅速検査法

レジオネラの迅速検査法は、リアルタイムPCR法(タカラバイオ:以下qPCR法)、逆転写反応後のリアルタイムPCR法⁴⁾(以下RT-qPCR法)および生菌を検出するための逆転写反応後のリアルタイムPCR法⁵⁾(以下LC RT-qPCR法)を用いて行った。定量値は、既知濃度のレジオネラ菌液(長崎 80-045 株)およびキット付属のプラスミドDNA溶液を使用し、各検査法のCt値から検量線を作成して求めた。

3 結果及び考察

3.1 岡山県内で分離されたSTECの疫学調査

平成22年度のヒト由来STEC月別検出状況を、表1に示した。

表1. ヒト由来STEC月別検出状況

月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	計
分離株数	1	3	9	10	10	15	5	3	0	2	5	0	63
(%)	1.6	4.8	14.3	15.9	15.9	23.8	7.9	4.8	0.0	3.2	7.9	0.0	

表2. ヒトから検出されたSTECの血清型・毒素型

血清型	毒素型	株数	(%)
O103:H2	1	1	1.6
O145:H-	2	1	1.6
O145:H-	1,2	1	1.6
O157:H7	2	11	17.5
O157:H7	1,2	32	50.8
O26:H11	1	16	25.4
O91:HUT	1	1	1.6
計		63	

本年度収集した63株は、12月と3月を除いたすべての月で検出され、特に6月～9月は14.3～23.8%と高率に検出された。本年度は例年に比べ分離株数がやや少なかった昨年度より、さらに分離株が減少した。これは、夏期を中心にしたSTEC感染症の多発傾向は毎年続いているため、それ以外の時期における発生数の減少が一因ではないかと思われる。

検出されたSTECの血清型・毒素型を、表2に示した。

STECの血清型・毒素型は7種類に分類され、このうちO血清群157は43株で分離株全体の68.3%を占め、O157:H7 STX1,2(50.8%)、O157:H7 STX2(17.5%)が検出された。その他O26:H11 STX1も16株(25.4%)と検出率が高かったが、これ以外に3種類のO血清群の菌が分離され、それらの検出率は低かった。

STEC O血清群157及び26のPFGE型を、表3-1及び表3-2に示した。

O157:H7 STX1,2は17種類、同STX2は9種類の計26種類に型別され、多様なPFGE型株により感染していたことが示された。O26:H11 STX1は分離株数が少なかったにもかかわらず、6種類のPFGE型に分類された。いずれのO血清群においても、家族であったり同一焼肉店での喫食など、疫学的関連が確認された株間では、PFGE型が同一かほぼ同一のPFGEパターンを示し、疫学情報と良く一致していた。

牛直腸便、牛糞堆肥、牛肉および牛内臓からのSTEC検出状況及び検出されたSTECの血清型・毒素型を、表4及び5に示した。

牛直腸便 348 検体中 STEC は 44 検体 (12.6%) から検出されたが、O 血清群 157 は検出されなかった。牛糞堆肥 25 検体および牛肉 22 検体は STEC 陰性であったが、牛内臓 35 検体中 1 検体 (2.9%) から O 血清群 157 が検出され、この検体からは他に O 血清群 159 と型別不能 (以下 OUT) の STEC 2 株が同時に検出された。血清型・毒素型は 26 種類に分類され、OUT は 45 検体中 40 検体 (88.9%) を占めた。O 血清群 157 は牛内臓 (肝臓, 大腸, 心臓, ミノ, ホルモンのミックス) からのみ検出され、検出率は 2.9% と低かったが、牛の STEC 保菌はヒトへの感染源として注意を要するため、さらに継続した保菌実態調査が必要であると考えられる。

表 3-1. STEC O157 の PFGE 型

血清型	毒素型	PFGE型	株数	備考
O157:H7	2	f315	1	家族
		f316	1	
		f331	1	
		f335	1	
		f336	1	
		f34	1	
		f488	1	
		f491	1	
	f497	1		
	1,2	c109	1	
		c148	1	
		c293	1	
		c57	1	
		e772	2	家族、焼肉店で喫食
		f320	1	
		f321	1	
		f323	1	家族
		f324	2	
		f333	1	
		f334	2	
		f439	1	e772の2株と同一の焼肉店で喫食
		f490	1	
		f495	1	e772,f439株と同一の焼肉店で喫食
		f53	1	
		f779	1	
		degadation	5	4株はe772,f439,f495の4株と同一の焼肉店で喫食
計				33

表 3-2. STEC O26 の PFGE 型

血清型	毒素型	PFGE型	株数	備考
O26:H11	1	f18	1	
		f21	1	
		f82	2	家族
		f84	4	家族
		f86	7	家族
		f120	1	
計			16	

3.2 レジオネラ迅速検査法の検討

レジオネラの迅速検査法について検討した結果を、表 6 と図 1-1 および 1-2 に示した。

レジオネラは培養法により浴槽水 8 検体 (26.7%) から検出され、その菌種と血清型は *L.pneumophila* (1 群, 5 群, 6 群, 8 群, 9 群, UT), *L.gormanii* であった。

迅速検査法による結果は、培養法の検出感度である 10cfu/100ml 以上を陽性とした場合、qPCR 法が 13 検体 43.3%, RT-qPCR 法は 14 検体 46.7% が陽性となった。生菌と死菌の両遺伝子を検出するこれらの検査法は、培養法に比べて高感度でより多くの検体からレジオネラが検出された。本年度検討を行った生菌を検出する LC RT-

表 4. 牛由来検体からの STEC 検出状況

検体名	検体数	陽性検体数 (O157)	検出率 (%) (O157)
直腸便	348	44 (0)	12.6 (0)
牛糞堆肥	25	0 (0)	0 (0)
牛肉	22	0 (0)	0 (0)
牛内臓	35	1* (1)*	2.9 (2.9)
合計	373	45 (1)	12.1 (0.3)

*: 重複 (1 検体から 3 種類の血清型株を検出)

表 5. 牛由来 STEC の血清型・毒素型

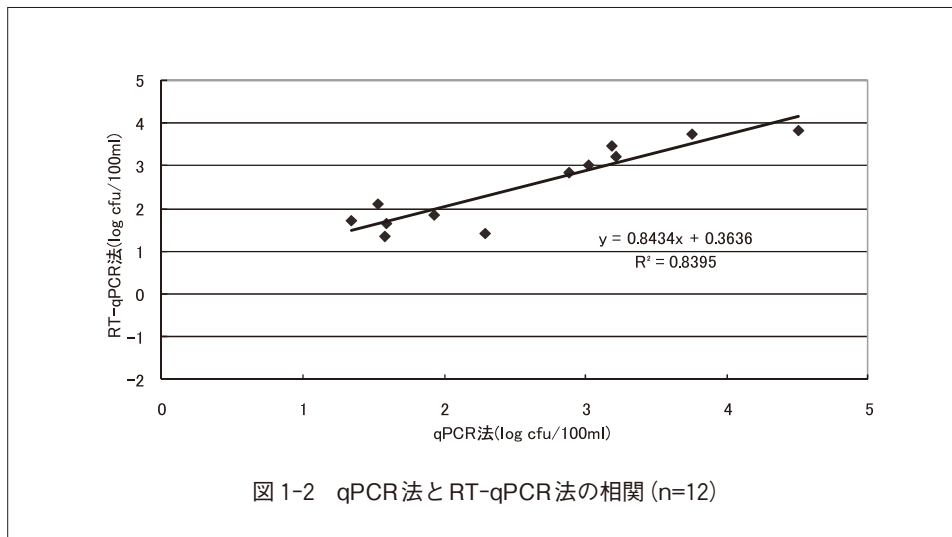
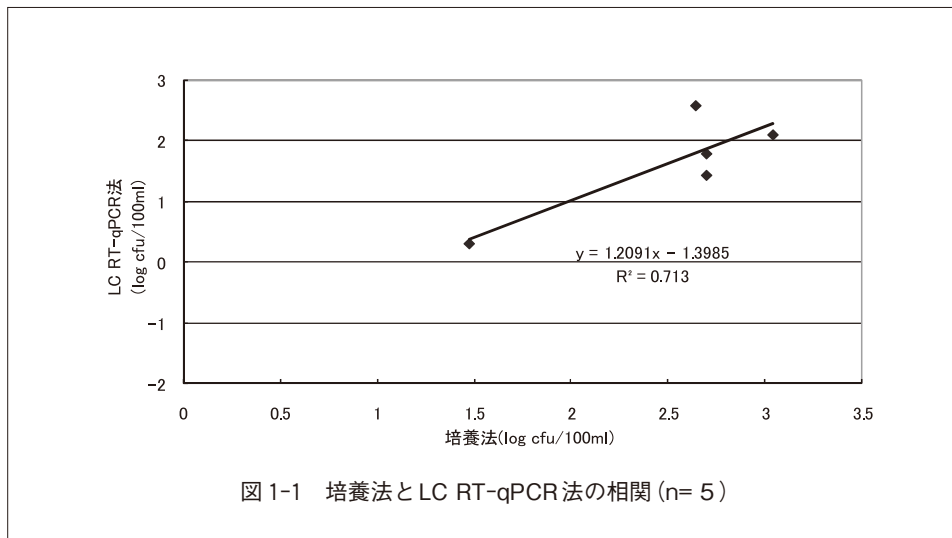
由来	血清型	毒素型	陽性検体数	(%)
牛直腸便	O124:H19	2	1	2.2
	O168:HUT	2	1	2.2
	O25:HUT	2	1	2.2
	O29:H21	2	1	2.2
	O47:HUT	2	1	2.2
	O74:H28	2	1	2.2
	O91:H28	1,2	1	2.2
	OUT:H20	2	1	2.2
	OUT:H-	2	14	31.1
	OUT:H11	2	2	4.4
	OUT:H16	1	1	2.2
	OUT:H18	2	1	2.2
			1	2.2
		1,2	1	2.2
		2	3	6.7
		1	1	2.2
		1,2	1	2.2
		2	4	8.9
		2	1	2.2
	牛内臓	OUT:HUT	1	1
		1,2	1	2.2
OUT:H51		2	1	2.2
OUT:H51		2	1	2.2
計			45	

*陽性検体数は重複を含む。(%)は陽性検体中の割合

表 6. 浴槽水の検査法別レジオネラ検出結果 (n=30)

検査法	陽性検体数	検出率(%)	検出菌名(血清群)
培養法	8	26.7	<i>L. pneumophila</i> (1群、5群、6群、8群、9群、UT)、 <i>L. gormanii</i> 菌数: 10~1,100cfu/100ml
qPCR法*	17(13)	56.7(43.3)	
LC RT-qPCR法**	7	23.3	
RT-qPCR法*	22(14)	73.3(46.7)	
陽性検体計***	17		

* (): 10cfu/100ml以上検出
 * * : Ct(18h)<34かつ△Ct≥1
 * * * : 10cfu/100ml以上検出



qPCR法は、7検体23.3%が陽性となり、レジオネラ陽性検体における培養法との定量値の相関は比較的良好であったが、培養法陽性でLC RT-qPCR法陰性となった検体があり、検出率は培養法より低かった。これは、培養法により検出された菌数がいずれも10~20cfu/100mlと少

ない検体であったことから、少量の菌に汚染された検体においても確実に菌を検出できるように、検査法の改良を検討する必要があると思われる。qPCR法とRT-qPCR法の定量値の相関は、培養法とLC RT-qPCR法よりさらに良好であった。

3.3 コリネバクテリウム・ウルセランスの検出状況

コリネバクテリウム・ウルセランスの検出結果を、表7に示した。

表7. *C.ulcerans* 調査結果

	検体名	検体数	結果
ヒト	咽頭スワブ	1	陰性
牛	関節液	7	陰性
	乳汁	3	陰性

耳鼻咽喉科を受診した患者の咽頭スワブ1検体と、牛病畜の関節液7検体および乳汁3検体を検査したが、いずれの検体からも本菌は検出されなかった。昨年度の調査では猫の咽頭スワブ5検体(4.1%)から本菌が検出されていることから、本菌のヒトへの感染事例や動物の保菌状況を明らかにするため、引き続き調査を実施する必要があると考える。

なお、レジオネラ迅速検査法についての検討は、平成22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)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」の研究班で、コリネバクテリウム・ウルセランスの調査は、平成22年度厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)「ワンヘルズ理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究」の研究班による調査の一環として実施したものである。

謝 辞

本調査の実施に際して、PFGE型別をお願いしました

国立感染症研究所の寺嶋 淳先生、菌株の分与や検体採取にご協力いただきました関係機関の先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) 小林一寛：腸管出血性大腸菌の同定法 2. PCR法. 臨床検査, 36, 1334 ~ 1338, 1992
- 2) Pallen, M.J.: Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the polymerase chain reaction, *J.Clin.Pathol.*, 44, 1025-1026, 1991
- 3) 寺嶋 淳, 泉谷秀昌, 三戸部治郎：食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究. 新興・再興感染症研究事業平成15年度総括・分担研究報告書2004, 10 ~ 21, 2004
- 4) 遠藤卓郎, 烏谷竜哉, 青木紀子, 山本純子, 泉山信司：RT-qPCRを用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討, 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, 37-50, 2009
- 5) 中嶋 洋：浴槽水等のレジオネラ属菌検出状況と迅速検査法の検討(平成22年度), 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)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成22年度総括・分担研究報告書, 78-88, 2011

【調査研究】

牛由来検体からのリステリア及びサルモネラの検出状況と岡山県におけるサルモネラの疫学的解析(平成22年度)

Detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* from the Internal Organs and Rectum Fecess of Cattle and Epidemiological Study on *Salmonella* in Okayama Prefecture (2010)

石井 学, 大島律子, 仲 克己*, 中嶋 洋(細菌科)

*くらしき作陽大学現代食文化学科

Manabu Ishii, Ritsuko Ohata, Katsumi Naka*, Hiroshi Nakajima

要 旨

リステリア及びサルモネラは重篤な症状を起こす感染症の起原因菌であり、サルモネラは岡山県下でも毎年多数の食中毒が発生している。このため、両菌の感染予防や発生時の原因究明、感染拡大防止に役立てるため、岡山県内の動物の保菌状況及び食肉の汚染状況を調査した。平成22年度に岡山県内の2施設から採取した牛直腸便339検体、牛糞堆肥25検体と、市販の牛ホルモン57検体についてリステリア及びサルモネラの分離を試みたところ、牛直腸便66検体、牛糞堆肥11検体及び牛ホルモン9検体からリステリアを分離した。サルモネラは牛直腸便15検体、牛糞堆肥1検体から分離された。リステリアの血清型は1/2bが69検体で最も多く、サルモネラの血清型は全てO4群のH型別不能株であった。また、腸管感染症疑い患者便89検体からもリステリア及びサルモネラの分離を試みたが、いずれも検出されなかった。平成22年度に岡山県内で分離された食品由来サルモネラ株15株を収集して血清型別を実施した結果、S. Infantisが最も多かった。

[キーワード：リステリア, サルモネラ, 牛, 疫学]

[key words : *Listeria*, *Salmonella*, Cattle, epidemiology]

1 目的

Listeria monocytogenes (以下*L.monocytogenes*と略)は食中毒や、人の髄膜炎、死産、敗血症等の起原因菌である他、主として反芻畜にも脳炎、死産等を引き起こす人畜共通感染症起原因菌である。米国のCDCは、国内で毎年約2,500例の重症感染例が発生し、そのうち約500人が死亡していると報告している。五十君によると、日本における重症化したリステリア症は年間83人と推計され¹⁾、発生はまれであるが、欧米に比べても極端に少ないものではないと報告されている。平成13年に北海道で発生した我が国で初めての食品媒介リステリア症の集団発生は、リステリアに汚染されたナチュラルチーズが感染源であることが判明した²⁾。国内でリステリア症の発生が少ない理由は不明であるが、食肉の平均20%が汚染されていることが当センターの研究で判っている³⁾。また、県内のリステリア症患者、動物及び食肉

から分離された菌株の生化学的性状と病原性に関する遺伝子の保有についても検討している⁴⁾。サルモネラについては、岡山県下では毎年多数のサルモネラ食中毒が発生しており、感染源・感染経路の究明や感染症の発生予防に役立てることを目的として分離株を収集し、食品や動物から検出された菌株とともに疫学解析を行い、流行株の把握に努めている。

2 方法

2.1 材料

平成22年度に県内の2施設の牛から採取した直腸便339検体及び牛糞堆肥25検体及び市販の牛ホルモン57検体についてリステリア及びサルモネラの検査を行なった。

平成22年度に県内の病院で採取された腸管感染症疑い患者便(以下、患者便)についてもリステリア及びサ

ルモネラの検査を行なった。

また、平成22年度に県内で分離された食品由来株15株(鶏肉由来13株、豚肉由来1株、野菜由来1株)を収集し、サルモネラの血清型別を実施した。

2.2 方法

牛直腸便、牛糞堆肥、牛ホルモン及び患者便は9倍量の1/15M PBS(pH7.6)に懸濁した。*L.monocytogenes*の検査は、その1mLをUVM Modified Listeria Enrichment Broth(DIFCO) 10mLに接種して30℃、48時間増菌後、PALCAM-Listeria-Selective agar(supplement 添加: MERCK; 以下、PALCAM 培地)及びCHROMagar™ Listeria 寒天平板(CHROMagar社: フランス; 以下、CHROMagar 培地)に塗抹して、37℃、48時間分離培養を行った。PALCAM 培地上でのエスクリン分解能又はCHROMagar 培地上でのハロー形成能が見られたコロニーをTSYEA 培地で再分離した後、SIM 確認培地に接種して25℃、48時間培養後の傘状発育と、カタラーゼ試験陽性を確認した。さらに、Beutin 培地(自家製、5%羊血液添加)による溶血性、ラムノース、マンニト、キシロースの分解試験を行い、同定した。同定した株について、リステリア型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて血清型別を実施した。

サルモネラの検査は前述の懸濁液1mLをセレナイト培地10mLに接種し、37℃、18-24時間増菌後、白糖加SS寒天培地(日水)で37℃、18-24時間培養した。疑わしいコロニーをTSI及びSIM 確認培地で性状を確認し、腸内細菌同定用キットEB-20(日水)で同定した。収集した菌株についてはサルモネラ免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて血清型別を実施した。

2.3 PCR法によるhlyA遺伝子の確認

生化学的性状試験で*L.monocytogenes*陽性と判定された菌株について、hlyA 遺伝子の保有をPCR法で確認した。即ち、TSYEA 培地で増殖させた菌を滅菌ミリQ水

に浮遊させ、100℃、10分間加熱後急冷し、8,000rpm、10分間遠心した上清をPCR法に使用した。PCR法はGene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を使用して、94℃3分間熱変性し、94℃、1分間、55℃、1分間、72℃、1分間を30サイクル行い、さらに72℃7分間伸長反応を行った。

使用したプライマー⁵⁾は次のとおりである。

プライマー hlyA1

5'-ATTTTCCTTCACTGATTGC-3'

プライマー hlyA2

5'-CACTCAGCATTGATTTGCCA-3'

PCR増幅産物(276bp)の確認は、増幅産物を滅菌ミリQ水で5倍希釈したのち、マイクロチップ電気泳動装置MCE-202 MultiNA(島津製作所; 以下、MultiNA)を用い、試薬キットとしてDNA-1000キットを用いた。

3 結果

3.1 牛直腸便、牛糞堆肥、牛ホルモン及び患者便からの*L.monocytogenes*及びサルモネラの検出状況

牛直腸便、牛糞堆肥、牛ホルモン及び患者便からの*L.monocytogenes*の検出状況は表1のとおりであった。

*L.monocytogenes*は、牛の直腸便339検体中66検体(19.5%)、牛糞堆肥25検体中11検体(44.0%)、牛ホルモン57検体中9検体(15.8%)から検出され、すべての株がhlyAを保有していたが、患者便からは検出されなかった。分離株の血清型は、直腸便では1/2bが56検体(84.8%)、UTが6検体(9.1%)、4bが3検体(4.5%)、3bが1検体(1.5%)、牛糞堆肥では1/2bが10検体(90.9%)、UTが1検体(9.1%)、牛ホルモンでは1/2aが5検体(55.6%)、1/2bが3検体(33.3%)、1/2cが1検体(11.1%)であった。リステリアが検出された牛糞堆肥はそのほとんどが発酵初期のものであり、十分に発酵が進んだ牛糞堆肥からはリステリアは検出されなかった。

表1 牛由来検体及び患者便からの*L.monocytogenes*の検出状況

	牛直腸便	牛糞堆肥	牛ホルモン	患者便
検体数	339	25	57	89
検出数(率)	66(19.5%)	11(44.0%)	9(15.8%)	0(0.0%)
血清型	1/2b : 56(84.8%) UT : 6(9.1%) 4b : 3(4.5%) 3b : 1(1.5%)	1/2b : 10(90.9%) UT : 1(9.1%)	1/2a : 5(55.6%) 1/2b : 3(33.3%) 1/2c : 1(11.1%)	

表2 牛由来検体及び患者便からのサルモネラの検出状況

	牛直腸便	牛糞堆肥	牛ホルモン	患者便
検体数	339	25	57	89
検出数(率)	15(4.4%)	1(4.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
血清型	いずれも O4 群 H 型別不能株			

表3 収集した食品由来のサルモネラ菌株の血清型

	鶏肉由来	豚肉由来	野菜由来
検体数	13	1	1
血清型	<i>S. Infantis</i> : 10 株 (76.9%) <i>S. Braenderup</i> : 1 株 (7.7%) <i>S. Schwarzengrund</i> : 1 株 (7.7%) <i>S. Eppendorf</i> : 1 株 (7.7%)	<i>S. Infantis</i>	O7 群 H 型別不能株

牛直腸便、牛糞堆肥、牛ホルモン及び患者便からのサルモネラの検出状況は表2のとおりであった。

サルモネラは牛の直腸便 339 検体中 15 検体 (4.4%)、牛糞堆肥 25 検体中 1 検体 (4.0%) から検出され、分離株の血清型はいずれも O4 群 H 型別不能株であった。牛ホルモン及び患者便からはサルモネラは検出されなかった。

3.2 収集したサルモネラ菌株の血清型

収集した食品由来のサルモネラ菌株の血清型は表3のとおりであった。

鶏肉由来の 13 株では 10 株が *S. Infantis* で最も多く、他の 3 株は *S. Braenderup*, *S. Schwarzengrund*, *S. Eppendorf* であった。豚肉由来の 1 株は *S. Infantis*, 野菜由来の 1 株は O7 群 H 型別不能株であった。

4 考察

今回、牛の直腸便から *L. monocytogenes* が 19.5% 検出されたが、同一施設において直腸便及び牛糞堆肥からそれぞれ 84.8%, 90.9% と比較的高率に同じ血清型のリステリアが検出された。また、サルモネラも牛の直腸便から O4 群 H 型別不能株が 4.4% 検出され、飼料のリステリア及びサルモネラによる汚染あるいは施設内での相互感染の可能性が考えられた。県内では毎年多数のサルモネラ食中毒が発生していることから、サルモネラによる食中毒発生予防対策あるいはリステリアによる感染症予防対策として施設の衛生管理を十分に実施することが重要であり、引き続き調査を行って汚染実態を把握していく

必要があると思われる。

食品由来のサルモネラの血清型は、鶏肉検体では *S. Infantis* が最も多く、過去の調査からも、食鳥の本菌汚染が恒常化していることが示されたことから、鶏肉を介したヒトへの感染が懸念される。そのほか、豚肉検体からも *S. Infantis* が検出されており、食鳥・食肉処理場をはじめ、食肉あるいはその加工品の衛生管理の重要性が示された。

文 献

- 1) 五十君 静信：食品由来のリステリア菌による健康被害，食品衛研究，53(4)，19-23，2003
- 2) 五十君 静信：リステリア症の概況と対策，月刊 フードケミカル，21(5)，32-37，2005
- 3) 狩屋英明，大島律子，中嶋 洋，国富泰二：動物を含めた環境中及び調理用食肉のリステリア汚染状況，岡山県環境保健センター年報，28，73-77，2004
- 4) 狩屋英明，大島律子，中嶋 洋：食肉及び牛直腸内容物から検出されたリステリアの生化学的性状と病原遺伝子保有状況並びにその遺伝子系統解析，岡山県環境保健センター年報，31，99-102，2007
- 5) Ermolaeva, S., Karpova, T., Novella, S., Wagner, M., Scortti, M., Tartakovskii, I., Vazquez-Boland, J.A. : A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogenes* based on induction of lecithinase activity by charcoal, Int.J.Food Microbiol., 82, 87-94, 2003

【調査研究】

結核疫学調査における結核菌DNA解析データベースの活用(3)

Application to epidemiological investigation with
DNA database of *Mycobacterium tuberculosis* (3)

大島律子, 石井 学, 中嶋 洋 (細菌科)

Ritsuko Ohata, Manabu Ishii and Hiroshi Nakajima (Department of Bacteriology)

要 旨

岡山県では、平成11年度から県内の結核新登録患者から分離された結核菌のDNA解析を実施し、その結果を菌株情報と融合させてデータベース化し、結核の感染源・感染経路の究明や二次感染の予防など結核対策に活用している。平成22年度は、Restriction fragment length polymorphism (RFLP)解析およびVariable number of tandem repeats (VNTR)解析を実施し、結果を感染源究明に活用した。

[キーワード：結核菌, データベース, RFLP解析, VNTR解析]

[Key words : *M.tuberculosis*, database, RFLP analysis, VNTR analysis]

1 はじめに

岡山県では、結核の感染源・感染経路の究明や二次感染予防を目的に、RFLP解析法およびVNTR解析法を用いて結核菌のDNA解析を行い、菌株情報と融合させたデータベースを構築して感染事例の疫学調査に活用している^{1), 2)}。RFLP解析法は、結核菌遺伝子に特異的に存在し、出現する場所や個数が菌株毎に異なる塩基配列を検出し、その電気泳動パターンの違いで型別する方法である。VNTR解析法は、結核菌遺伝子に存在する数十塩基のDNAの繰り返し配列の数を測定する方法である。従来、解析能力の高いRFLP解析法が世界的標準法であったが、操作が煩雑で長時間を要し、解析結果が画像で示されるため検査機関間でのデータの比較が難しいことが欠点であった。そのため、操作が簡単で結果を数値化できるVNTR解析法の標準化が検討され、RFLP解析法と同等の解析能力を持つ標準法として、2008年にJATA(12)-VNTR解析法が確立された³⁾。当県でも、平成20年度からJATA(12)-VNTR解析法の導入を開始し、平成22年度は、78株を解析してRFLP解析結果との比較によりその有用性を検討し、集団感染事例を含む4つの感染事例の感染源究明に活用したので、その概要を報告する。

2 材料および方法

(1) 平成22年度のDNA解析対象株

県内の医療機関または検査機関において分離された結核菌のうち、以下の条件に該当した78株が搬入された。

- i) 60歳以下の塗抹陽性患者(結核予防法第29条適用者)の菌株
- ii) 保健所から依頼のあった菌株
 - ・ 社会福祉施設等(集団生活等)で発生した患者(利用者, 職員)の菌株
 - ・ 接客業・看護師・保健師・保育士・教員・医師等の菌株
 - ・ その他保健所長が必要と判断した患者の菌株

これらのうち、十分なDNA量が得られた67株でRFLP解析を行い、全株でVNTR解析を実施した。

(2) 安全対策

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(平成10年法律第114号)(以下「感染症法」と略す)第56条の25、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行規則(平成10年厚生省令第99号)(以下「感染症法施行規則」と略す)第31条の36及び特定病原体等の運搬に係る容器等に関する基準(平成19年厚生労働省告示第209号)に従って

菌株を運搬した。

搬入された菌株の管理は、感染症法第56条の24、25および感染症法施行規則第31条の29、30に適合した施設で行った。

結核菌のDNA抽出は、バイオセーフティーレベル3の施設内でN95微粒子用マスクを装着し、クラスIIの安全キャビネットを使用して行った。

(3) 菌株からのDNA抽出

DNA抽出は、小川培地上の菌体からDNA抽出キットISOPLANT(ニッポンジーン)を用いて行った。

(4) RFLP解析

67株のRFLP解析は定法^{4),5)}に従って実施し、RFLPパターンのクラスター解析は、解析ソフトBioNumerics ver6.5 (APPLIED MATHS)を用いてUPGMA法で行った。解析結果は、保健所からの菌株情報と併せてデータベースに登録した。平成22年度末現在、1126株が登録されている。

(5) VNTR解析

全78株でVNTR解析を実施した。VNTR解析は、

前田らの方法³⁾に従い、結核菌ゲノムの12ヶ所の繰り返し配列のコピー数を調べて結核菌の型別を行うJATA(12)-VNTR解析法を用いた。

(6) 事例の感染源究明

2つの集団感染事例(表1 事例1と事例2)、院内感染が疑われた1事例(表1 事例3)および施設内感染が疑われた1事例(表1 事例4)の4事例について、患者から分離された結核菌のDNA解析により感染源を検討した。

3 結果

(1) RFLP解析結果

67株のRFLP解析の結果、平成12～15年度に見られた類似性の高い流行株グループI～III¹⁾に属すると思われる株は18株(26.9%)であった(図1)。

67株中、パターンが一致したのは⑤および事例2の2組5株であった。

データベースに登録されている過去の菌株との比較では、4株が一致した(図1 ①, ②, ③, ④)。

表1 事例の概要

事例	No.	所管保健所	患者	届出時年齢	届出	発病	RFLPパターン	VNTR型	事例概要
1	616	K	a	68	20020516	不明	一致	未実施	2010年3月に発病した患者cは、2002年5月に結核登録され、同年6月に死亡した患者bの接触者健診対象者であった。患者c分離株の遺伝子型をデータベース中のb分離株と比較したところ一致し、cの感染源は8年前接触したbと推測された。一方、患者aはbの家族でbからの感染と判明しており、他にbの接触者1名が発病し、2名が感染していた。従って、cの発病により、集団感染*の定義に該当する事例となった。
	630	K	b	63	20020515	不明			
	1277	O	c	73	20100511	20100300			
2	1285		d	75	20101028	20100700	一致	一致	患者d,e,fは同じ施設の入所者で、2年前の初発患者発病後相次いで発病し、分離株の遺伝子型が一致したため施設内感染と考えられた。さらに、施設内には感染者3名の存在も判明しており、集団感染*に該当する事例となった。
	1287	K	e	41	20090714	20090700			
	1342		f	61	20101224	不明			
3	1279		g	64	20100629	不明	相違	相違	患者g,h,i,jはX病院から転院後、転院先で相次いで結核発病が判明したため、X病院での院内感染が疑われた。しかし、4名からの分離株の遺伝子型は全て異なっていたため、それぞれ別の感染源と考えられた。
	1343	K	h	86	20101102	不明			
	1344		i	91	20101117	20101025			
	1347		j	75	20100823	不明			
4	1246	T	k	85	20100403	20090300	一致	一致	患者kとlはY病院またはY病院関連施設内で接触があった。また、患者mはk,lとY病院関連施設内の同じフロアで食事する等の接触があった。3名からの分離株の遺伝子型が一致したため、3名はY病院またはY病院関連施設内で感染したと考えられた。
	1247	M	l	92	20100525	不明			
	1353	M	m	86	20110201	不明			

*結核集団感染(厚生労働省定義)
同一の感染源が、2家族以上にまたがり、20人以上に結核を感染させた場合をいう。
ただし、発病者1人は6人が感染したものと患者数を計算する。

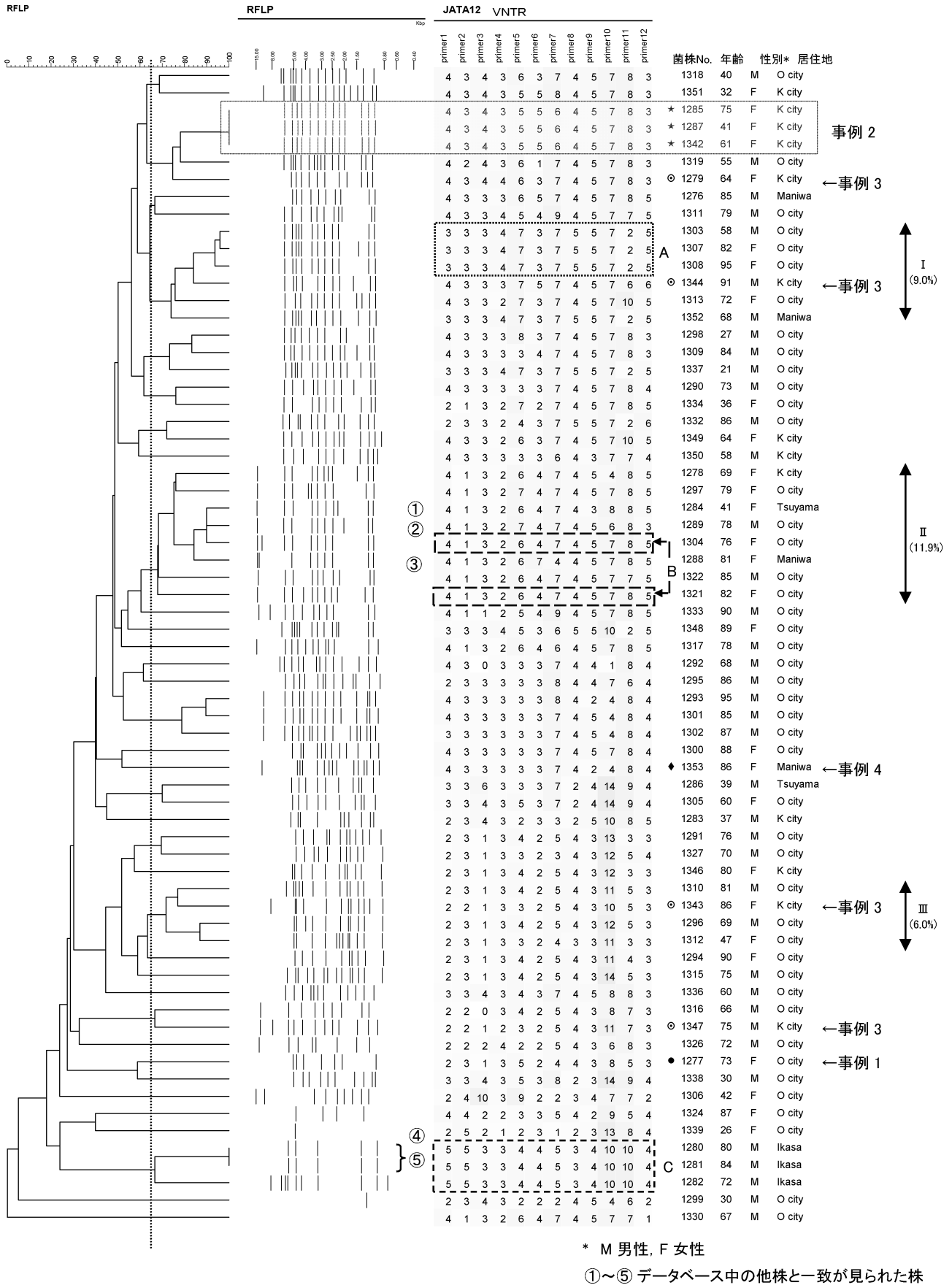


図1 H22年度に解析した結核菌67株のRFLPパターンの系統樹およびVNTR型

(2) VNTR解析結果

78株のVNTR解析の結果、集団感染事例(表1 事例2)を含む5組15株が一致した。78株のうち、RFLP解析ができた67株では、RFLPパターンが一致した⑤および事例2ではVNTR型も一致したが、VNTR型が一致した株間でRFLPパターンが異なった株も3組8株認められた(図1 A, B, C)

(3) 事例の検討結果

事例1は、患者cからの分離株の遺伝子型が8年前の接触者bの分離株と一致し、感染源はbと推測された。この事例では8年前のbの接触者健診で患者aを含む2名の発病と2名の感染が確認されており、患者cの発病により、8年を経過して集団感染となった。事例2は、同一施設の入所者3名からの分離株の遺伝子型が一致し、施設内感染と考えられた。この施設では他に初発患者1名と感染者3名が確認されており、集団感染となった。事例3は、同じ病院から転院した患者4名がそれぞれ結核を発病したため院内感染が疑われたが、4名からの分離株の遺伝子型が異なり、それぞれ別の感染源と判明した。事例4は、同じ病院あるいはその関連施設で接触のあった3名からの分離株の遺伝子型が一致したため、3名の患者は同一感染源から院内感染または施設内感染したものと考えられた。(表1)

4 考察

67株のRFLP解析結果から、依然として流行株グループI～Ⅲに属する株が18株(26.9%)存在し、主要な感染源となっていることが推測された。

67株中、データベースに登録されている過去の菌株とRFLPパターンが一致した①、②、③および④について、一致株との関連性を検討した。①は2組4株の家族内感染を含む8株と一致したが、県内で多く見られる流行株のパターンに含まれるため偶然一致の可能性もあり、関連性は不明であった。②と一致した株は、②の患者とは離れた地域に居住する高齢者から10年前に分離された株であり、③と一致した株も③の患者とは離れた地域に居住する高齢者から8年前に分離された株であった。④は、日本人に多く見られRFLP解析では解析能が低い1本バンドのパターンで、RFLPデータベース中の過去に解析した18株と一致したが、これらのうち、VNTR型が判明している11株とは型が異なった。また、

その他の7株はいずれも7年以上前に④の患者とは離れた地域に住む高齢者から分離された株であった。これらのことから、②、③および④では一致した株間の関連性は低いと考えられた。

67株中、パターンが一致した⑤は、同じ病院の患者からの分離株であり院内感染または検査室内汚染が疑われたが、保健所の疫学調査の結果、患者一人は寝たきりで病院内での両者の接点がないことと、検査センターでの菌検査では検体搬入日が1日異なり安全キャビネットは使用後消毒してUV照射していることから院内感染および検査室内汚染の両方とも否定された。⑤のRFLPパターンは、流行株とは異なり特徴的で、RFLPデータベース中の他株との一致も見られなかったため、共通の感染源の可能性が否定できず、患者の年齢(80歳と84歳)と居住地から、過去に同じ感染源から感染し年月を経て同一時期に発病したことが推測された。また、⑤とRFLPパターンが65%以上の類似性を示し、VNTR型が一致したNo.1282は、⑤と同一起源の菌が遺伝子変異した後にNo.1282に感染した可能性が考えられた。

78株のVNTR解析の結果、VNTR型が一致した5組15株では、集団感染事例(表1 事例2)を除く4組12株の患者の関連性は見いだせなかった。RFLP解析ができた67株との比較では、RFLPパターンとVNTR型は概ね相関していたが、RFLPパターンが一致した株間ではVNTR型も一致したのに反して、VNTR型が一致した株間でRFLPパターンが異なった株が見られたことから(図1 A, B, C)、RFLP解析法がVNTR解析法よりも僅かに解析能が高い可能性が示唆された。しかし、VNTR解析法は少量のDNAしか得られなかった菌株でも解析可能で迅速な結果還元につながり、疫学調査上非常に有効な手段であるため、今後、両法の比較株数を増やしてVNTR解析法の解析能について詳細な検討を行う予定である。

事例の感染源究明では、今回の4事例において遺伝子解析は非常に有用であった。特に、事例1は初発患者および接触者の感染・発病から8年を経過して「集団感染」に該当したが、遺伝子解析を実施しなければ感染源の究明には至らなかったと思われる。遺伝子解析の普及により今後このような事例が増えることが予想されるが、このような事例と多くの患者が2年以内に発病する通常の「集団感染」とでは疫学調査や患者への対応等も異なる

ため、結核の「集団感染」の定義を改めて検討する必要があると思われた。

文 献

- 1) 大畠律子, 中嶋 洋: 結核対策における地域ベースの結核菌RFLP解析の意義, 日本公衆衛生雑誌, 52, 736-745, 2005
- 2) 大畠律子, 石井 学, 中嶋 洋: 結核疫学調査における結核菌DNA解析データベースの活用(2), 岡山県環境保健センター年報, 34, 69-72, 2010
- 3) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗 聡, 菅原 勇, 加藤 誠: 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型(VNTR)分析システム, 結核, 83, 673-678, 2008
- 4) 高橋光良, 阿部千代治: IS6110をプローブとしたRFLP分析による結核菌の亜分類, 日本細菌学雑誌, 49, 853-857, 1994
- 5) 高橋光良: 結核菌挿入断片IS6110をプローブとした結核の分子疫学, 資料と展望, No.17, 43-57, 1996

【資 料】

胃腸炎ウイルスの疫学的研究

—電子顕微鏡を用いた胃腸炎ウイルスの検出(2005/06～2009/10シーズン)—

Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama

—Detection of Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis by Electron Microscopy over five seasons from 2005/06 to 2009/10—

藤井理津志, 葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 檜原幸二*, 濃野 信**, 金谷誠久*** (ウイルス科)

Ritsushi Fujii, Mitsutaka Kuzuya, Masako Hamano, Kouji Kida,

Kouji Narahara, Shin Nouno and Tomohisa Kanadani

*岡山赤十字病院小児科

**のうの小児科

*** (独)国立病院機構 岡山医療センター小児科

要 旨

岡山県内における感染性胃腸炎の流行状況と電子顕微鏡(EM)法による胃腸炎ウイルスの検出状況の関連性を検討するため、岡山県内で2005年9月～2006年8月, 2006年9月～2007年8月, 2007年9月～2008年8月, 2008年9月～2009年8月及び2009年9月～2010年8月に採取した散発患者糞便(合計2270件)についてEM法によるウイルス検索を行ったところ, ロタウイルス(RV)様粒子385件(17.0%), アデノウイルス様粒子22件(1.0%), 小型球形ウイルス(SRSV)様粒子271件(11.9%), RV様粒子とSRSV様粒子の混合7件(0.3%)が観察された。5シーズンで感染性胃腸炎の流行状況と胃腸炎ウイルスの検出状況を対比させたところ, SRSVの検出状況は感染性胃腸炎の流行状況を反映していたが, RVの検出状況は感染性胃腸炎の流行状況を反映しないシーズンが多かった。

[キーワード: 小型球形ウイルス, ロタウイルス, 電子顕微鏡法]

[Key words: Small round structured virus, Rotavirus, Electron microscopy]

1. はじめに

A群ロタウイルス(ARV), C群ロタウイルス(CRV), 及びノロウイルス(NoV), サポウイルス(SV), アストロウイルス(AstV)等の小型球形ウイルス(SRSV)は感染性胃腸炎の主要原因ウイルスであり, 毎年多くの患者が発生している^{1)～9)}。したがって, これらのウイルスの流行状況を解明することは予防対策上不可欠である。

また, 感染性胃腸炎は感染症発生動向調査事業に基づき, 5類感染症として患者定点での患者数が把握されているが, 原因となる病原体の検査は限定的にしか行われていない。

そこで, 感染性胃腸炎起因ウイルスを検査し, 感染性胃腸炎患者数との関連性を把握することを目的に, 協力

医療機関を受診した散発性感染性胃腸炎患者から網羅的に採取した糞便から, 電子顕微鏡(EM)法による胃腸炎ウイルスの検索を行っている。

以上により, 平成22年度は2009年9月～2010年8月(2009/10シーズン)に散発した感染性胃腸炎患者の糞便について, ロタウイルス(RV), アデノウイルス(ADV)及びSRSVを検出するためEM法によるウイルス検索を行った。また, 2005年9月～2006年8月(2005/06シーズン), 2006年9月～2007年8月(2006/07シーズン), 2007年9月～2008年8月(2007/08シーズン)及び2008年9月～2009年8月(2008/09シーズン)に採取された糞便のウイルス検索結果と併せて, 感染性胃腸炎の流行状況と対比させることによって, ウイルスの流行状況と

感染性胃腸炎患者数との関連性を調査した。

2. 材料と方法

(1) 感染性胃腸炎患者発生状況

岡山県感染症発生動向調査事業に基づき、2005/06シーズン、2006/07シーズン、2007/08シーズン、2008/09シーズン及び2009/10シーズンの定点医療機関当たりの感染性胃腸炎患者数(1週間に1カ所の定点医療機関を受診した感染性胃腸炎患者数の平均値)を週別に集計した。

(2) EM法によるウイルス検索

2005/06シーズン、2006/07シーズン、2007/08シーズン、2008/09シーズン及び2009/10シーズンに岡山地区(岡山赤十字病院、独立行政法人国立病院機構岡山医療センター)及び玉野地区(のうの小児科)の感染性胃腸炎患者各々513名、1648名及び109名、合計2270名から糞便を採取した。

RV、ADV及びSRSVのEM法による検索は既報と同様にネガティブ染色法で行った¹⁰⁾。

3. 結果

(1) 患者発生状況

岡山県感染症発生動向調査事業に基づく、2005/06シーズン、2006/07シーズン、2007/08シーズン、2008/09シーズン及び2009/10シーズンにおける岡山県の感染性胃腸炎の週別定点当たり患者数は図1～5に示すとおりであった。

2005/06シーズンでは、第45週(11月)に急増し、第49週(12月)にはピークの10.87人に達した。第50週(12月)以後は減少傾向に転じたものの、第3週(1月)

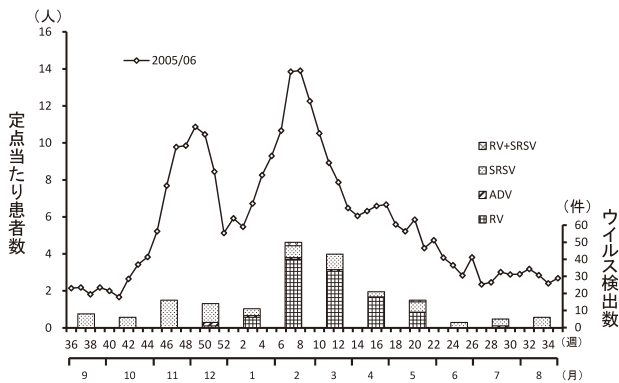


図1 感染性胃腸炎の週別定点当たり患者数と月別ウイルス検出状況(2005/06)

には再び上昇に転じ、第8週(2月)には二番目のピークとしてシーズン最多の13.91人に達し、その後は漸減傾向となった(図1)。

2006/07シーズンでは、第45週(11月)に急増し、第46週(11月)にはピークの25.54人に達し、2006/07シーズンで最多となった。第47週(11月)以後は漸減傾向となった(図2)。

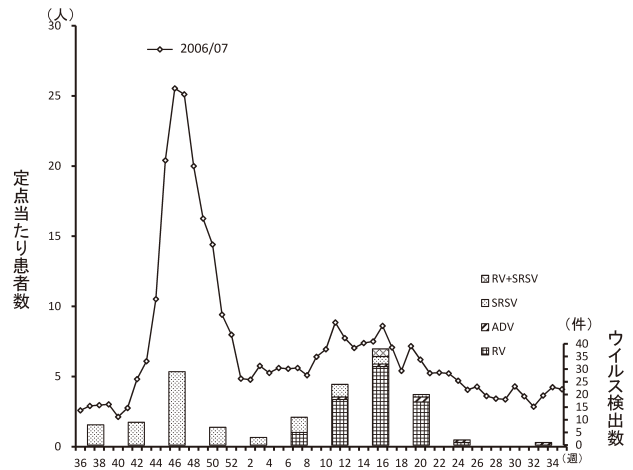


図2 感染性胃腸炎の週別定点当たり患者数と月別ウイルス検出状況(2006/07)

2007/08シーズンでは、第48週(12月)に急増し、第50週(12月)にはピークの20.19人に達し、2007/08シーズンで最多となった。第51週(12月)以後は減少傾向に転じたものの、第8週(2月)には再び上昇に転じ、第11週(3月)には二番目のピークの16.59人に達し、その後は漸減傾向となった(図3)。

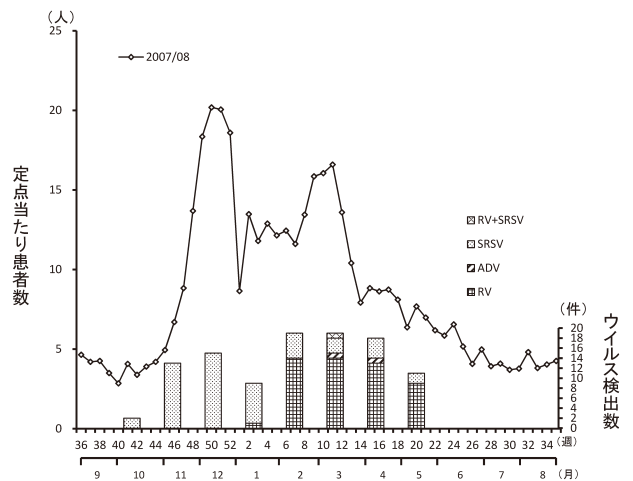


図3 感染性胃腸炎の週別定点当たり患者数と月別ウイルス検出状況(2007/08)

2008/09 シーズンでは、第49週(12月)に急増し、第52週(12月)にはピークの17.06人に達し、2008/09シーズンで最多となった。第53週(12月)以後は漸減傾向となった(図4)。

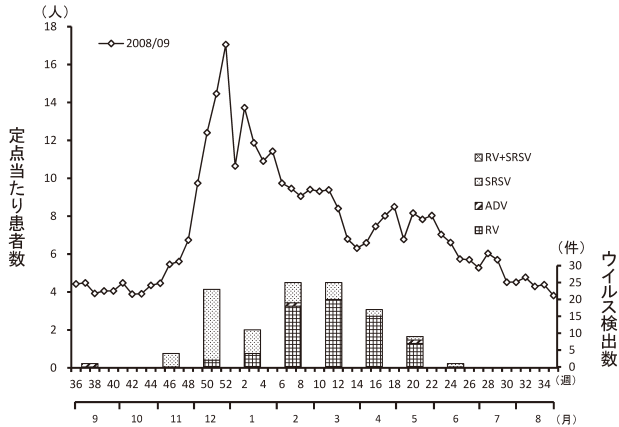


図4 感染性胃腸炎の週別定点当たり患者数と月別ウイルス検出状況(2008/09)

2009/10 シーズンでは、第2週(1月)に急増し、第4週(1月)にはピークの19.91人に達し、2009/10シーズンで最多となった。第7週(2月)以後は漸減傾向となった(図5)。

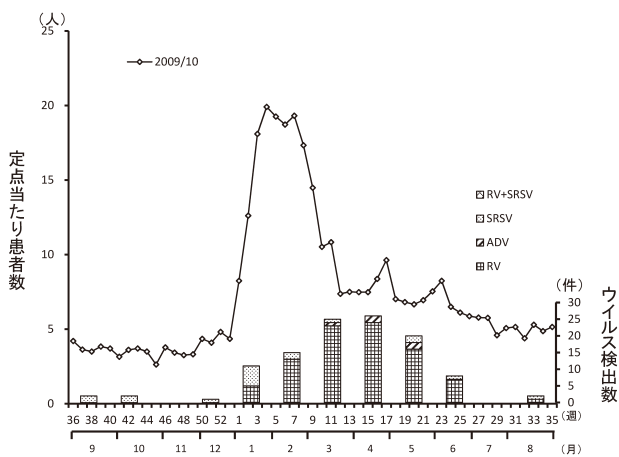


図5 感染性胃腸炎の週別定点当たり患者数と月別ウイルス検出状況(2009/10)

(2) ウイルス検出状況

表1に示すとおり、合計2270件の散発患者糞便よりRV 385件(17.0%)、ADV 22件(1.0%)、SRSV 271件(11.9%)、RVとSRSVの混合7件(0.3%)、計685件(30.2%)のウイルス様粒子がEM法により観察された。また、各機関からの検体採取状況及びウイルス検出状況は表1に示すとおりであった。

各シーズン毎の月別ウイルス検出状況は表1に示すとおり、以下の様な状況であった。

2005/06 シーズンでは、合計533件の散発患者糞便よりRV 107件(20.1%)、ADV 6件(1.1%)、SRSV 83件(15.6%)、RVとSRSVの混合3件(0.6%)、計199件(37.3%)のウイルス様粒子がEM法により観察された。RVは2006年2～5月に多く検出され、ADVは2005年12月～2006年3月に検出され、SRSVは2005年11月、12月に多く検出された。

2006/07 シーズンでは、合計418件の散発患者糞便よりRV 72件(17.2%)、ADV 6件(1.4%)、SRSV 71件(17.0%)、RVとSRSVの混合3件(0.7%)、計152件(36.4%)のウイルス様粒子がEM法により観察された。RVは2007年2～5月に多く検出され、ADVは2007年3～6月、8月に検出された。SRSVはシーズンを通して検出されたが、2006年11月に特に多く検出された。

2007/08 シーズンでは、合計435件の散発患者糞便よりRV 51件(11.7%)、ADV 2件(0.5%)、SRSV 52件(12.0%)、RVとSRSVの混合1件(0.2%)、計106件(24.4%)のウイルス様粒子がEM法により観察された。RVは2008年2～5月に多く検出され、ADVは2008年3月、4月に検出された。SRSVはシーズンを通して検出されたが、2007年11～12月に特に多く検出された。

2008/09 シーズンでは、合計438件の散発患者糞便よりRV66件(15.1%)、ADV 3件(0.7%)、SRSV 47件(10.7%)、計116件(26.5%)のウイルス様粒子がEM法により観察された。RVは2009年2～5月に多く検出され、ADVは2008年9月、2009年2月、5月に検出された。SRSVは2008年11月～2009年3月に検出されたが、2008年12月に特に多く検出された。

2009/10 シーズンでは、合計446件の散発患者糞便よりRV 89件(20.0%)、ADV 5件(1.1%)、SRSV 18件(4.0%)、計112件(25.1%)のウイルス様粒子がEM法により観察された。RVは2010年2～5月に多く検出され、ADVは2010年3～5月に検出された。SRSVはシーズンを通して検出されたが、2010年1月に特に多く検出された。

4. 考察

冬期を中心とするウイルス性胃腸炎患者の発生ピークは12月をピークとするSRSVと2, 3月をピークとするRVにより, 二峰性の発生曲線を持つ傾向が指摘されている¹¹⁾が, 標準的な二峰性の発生パターンを示したのは, 2005/06シーズンと2007/08シーズンのみで, 他の3シーズンでは標準的な二峰性の発生パターンとは異なり, 一峰のみの発生ピークを示した(図1~5)。

ウイルス検出状況と患者発生状況の関係は, 2005/06シーズンではSRSVが11, 12月に多く検出され, RVは2~5月に多く検出されていたことから, 12月, 2月をピークとする二峰性の患者発生状況と一致していた(図1)。

2006/07シーズンではSRSVが11月に特に多く検出され, RVは2~5月に多く検出されたため, 11月をピークとする一峰性の患者発生状況とSRSVの検出状況は一致したが, RVの検出状況とは一致しなかった(図2)。

2007/08シーズンではSRSVが11~12月に多く検出され, RVは2~5月に多く検出されていたことから, 12月, 3月をピークとする二峰性の患者発生状況と一致していた(図3)。

2008/09シーズンではSRSVが12月に特に多く検出され, RVは2~5月に多く検出されたため, 12月をピークとする一峰性の患者発生状況とSRSVの検出状況は一致したが, RVの検出状況とは一致しなかった(図4)。

2009/10シーズンではSRSVが1月に特に多く検出され, RVは2~5月に多く検出されたため, 1月をピークとする一峰性の患者発生状況とSRSVの検出状況は一致したが, RVの検出状況とは一致しなかった(図5)。

また, 2009/10シーズンでは, 標準的な12月より遅れて第4週(1月)にピークに達した。一峰目の発生ピークは11月から12月になる場合が多い¹¹⁾ため, 2009/10シーズンの発生ピークが1月であったことは他シーズンとは大きく異なっていた。この理由として, 10~12月に新型(AH1pdm型)インフルエンザの大きな流行があった(岡山県感染症発生動向調査事業)ことが何らかの影響を及ぼした可能性があると考えられる。

以上により, 11月から2月頃までの感染性胃腸炎の流行シーズンでは, SRSVの検出状況は患者数の増減を反映していることが判明したため, この時期にSRSVの検査を行うことで感染性胃腸炎の流行を予測できる可能

性が示唆されたと考えられる。

EM観察でSRSV様粒子が観察された検体については, 今後, さらに, NoV, SV, AstVの同定を行い, 同定不能な検体については, 同定法を検討するための検査材料として収集していく必要がある。

文 献

- 1) Matsumoto, K., Hatano, M., Kobayashi, K., Hasegawa, A., Yamazaki, S., Nakata S., Chiba, S., Kimura, Y.: An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren, *J. Infect. Dis.*, 160, 611-615, 1989
- 2) Oishi, I., Yamazaki, K., Minekawa, Y.: An occurrence of diarrheal cases associated with group C rotavirus in adults, *Microbiol. Immunol.*, 37, 505-509, 1993
- 3) Otsu, R.: A mass outbreak of gastroenteritis associated with group C rotaviral infection in schoolchildren, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 21, 75-80, 1998
- 4) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇, 中山 俣槻, 結縁栄次, 片山健一, 光信泰昇, 井上康二郎: 岡山県内で初めて確認されたヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 岡山県環境保健センター年報, 24, 55-59, 2000
- 5) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇: 教育研修施設において発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 病原微生物検出情報, 21, 169-170, 2000
- 6) 国立感染症研究所 感染症情報センター: ノロウイルスの流行 2006/07シーズン, 病原微生物検出情報, 28, 277-278, 2007
- 7) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 橋原 幸二, 濃野 信, 金谷誠久: 胃腸炎ウイルスの研究(2007年度), 岡山県環境保健センター年報, 32, 115-127, 2008
- 8) 吉田徹也, 粕尾しず子, 畔上由佳, 内山友里恵, 薩摩林一代, 白石 崇: アストロウイルス血清型8型の検出-長野県: 病原微生物検出情報, 30, 14-15, 2009
- 9) 小林慎一, 藤原範子, 水谷恵美, 安達啓一, 伊藤 雅,

- 安井善宏, 山下照夫, 平松礼司, 下岸 協, 皆川洋子, 大嶋誠司, 林 克巳, 野田耕平, 丹羽哲久, 子安春樹: 給食弁当を原因としたサポウイルスによる大規模食中毒事例—愛知県, 病原微生物検出情報, 31, 322-323, 2010
- 10) 藤井理津志, 葛谷光隆, 濱野雅子, 小倉 肇: C群
ロタウイルスの免疫学的検査法による検出, 岡山県環境保健センター年報, 24, 42-45, 2000
- 11) 上羽 修, 藤井理津志, 谷本浩一: ウイルス下痢症に関する研究 第2報 1988/87年冬期の検出ウイルスについて, 岡山県環境保健センター年報, 11, 132-135, 1987

【調査研究】

胃腸炎ウイルスの疫学的研究

岡山県の散発性胃腸炎患者におけるノロウイルス, サポウイルスおよびアストロウイルスの流行疫学
(2008/2009 シーズン～2009/2010 シーズン)

Epidemiological Studies on Noroviruses, Sapoviruses and Astroviruses from Sporadic cases of
Gastroenteritis in Okayama (2008-2010)

濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 木田浩司, 楯原幸二*, 濃野 信**, 金谷誠久*** (ウイルス科)

Masako Hamano, Ritsushi Fujii, Mitsutaka Kuzuya, Kouji Kida,

Kouji Narahara, Shin Nouno and Tomohisa Kanadani

*岡山赤十字病院小児科

**のうの小児科

*** (独)国立病院機構 岡山医療センター小児科

要 旨

2008/2009年シーズンおよび2009/2010年シーズン(2008年9月～2010年8月)の散発性胃腸炎患者糞便1,024件のうち,電子顕微鏡検索(EM)法で小型球形ウイルス(SRSV)様粒子が観察された84件について,逆転写PCR法によりノロウイルス(NoV),サポウイルス(SaV)およびアストロウイルス(AstV)を検索した。また,EM法でロタウイルス(RV)様粒子またはアデノウイルス(ADV)様粒子が観察された196件について,それぞれ,酵素抗体(ELISA)法によるA群ロタウイルス(ARV)とC群ロタウイルス検索,イムノクロマト(IC)法によるADVの検索を実施した。その結果,NoVが41件,SaVが11件,AstVが10件,ARVが182件,ADVが14件から検出された。シーズンごとの検出数では,ARV,ADVは変化がなかったのに対して,NoV,SaV,AstVは,ともに,2009/2010年シーズンは2008/2009年シーズンの1/2～1/4にとどまった。また,検出時期についてもNoV,SaV,AstVともに2009/2010年シーズンは前シーズンに比べて遅くなる傾向が見られた。検出ウイルスの一部について遺伝子解析を行ったところ,NoVではGII/4が大部分を占め,GII/3,GII/6も検出された。検出されたGII/4株は,両シーズンともにGII/4 2006b類似株であった。一方AstVでは,1型が主流であったが,3型,4型も検出された。

[キーワード:ノロウイルス,サポウイルス,アストロウイルス,分子疫学,PCR法]

[Key words:Norovirus,Sapovirus,Astrovirus,Molecular epidemiology,Gastroenteritis]

1 はじめに

ウイルス性胃腸炎の主要な原因の1つである小型球形ウイルス(SRSV)は,細胞・実験動物により人工的に増殖させる技術が確立されていないウイルス群であるが,このうちCalicivirus科に属するNorovirus属のNorwalkvirus(以下NoV),Sapovirus属のSapporovirus(以下SaV),Astrovirus科のAstorovirus(以下AstV)についてはその遺伝子情報¹⁾に基づいた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(以下逆転写PCR)法での検出が可能となった。これに伴い,

感染症対策と食品衛生対策の両面で最も行政ニーズの高いNoVについては,①ヒト由来のNoVは,大きく2つの遺伝子群Genogroup I:GIとGenogroup II:GIIに分かれ,ウイルス表面蛋白をコードするcapsid領域の遺伝子配列により,GI,GIIともに多数の遺伝子型:genotypeに分かれる²⁾ことや②同一検体中に複数の遺伝子型のNoVが存在する場合があること^{3)～5)},③異なる2つの遺伝子型の遺伝子が部分的に組みかわったと考えられる「キメラ株」^{6),7)}や,同一の遺伝子型内で遺伝子

が部分的に大きく変異した「同一遺伝子型内変異株」⁸⁾が存在すること等が明らかになってきた。このようにNoVはきわめて多様であるため、その流行状況を予測して対策をとるためには、継続的な監視と事例解析が不可欠である。また、NoV以外のSRSVであるSaV、AstVについても、SaVは5つの遺伝子群GI(以下SaV-GI)～GV(SaV-GV)⁹⁾、AstVは8血清型(以下AstV-1～AstV-8)に分かれ¹⁰⁾、それぞれの血清型に対応する遺伝子型が存在する¹¹⁾等NoV同様多様なウイルスの存在が明らかになっているが、その流行疫学については不明な点が多く、解明していく必要がある。

2010年度は、感染性胃腸炎におけるNoV、SaVおよびAstVのトータルな流行状況をあきらかにするため、2008/2009と2009/2010の2シーズンの散発胃腸炎患者検体でウイルス検索を行い、検出状況を総合的に解析するとともに、検出されたNoV、SaVおよびAstVについて遺伝子解析を行った。

2 材料と方法

(1) 対象

2008年9月～2009年8月(2008/2009年シーズン)および2009年9月～2010年8月(2009/2010年シーズン)に県内で採取された散発胃腸炎患者糞便1,024件のうち、ウイルス様粒子が観察された280件(感染症発生動向調査検体49件を含む)を用いた。

(2) 方法

電子顕微鏡検索によりSRSV様粒子が観察された糞便について、既報¹²⁾と同様に前処理、RNA抽出を行った。抽出されたRNAは、oligo-dT primer(Invitrogen社)とpd(N)6 random hexamer(Takara Bio社)により逆転写を行い、c-DNAを合成した。

NoVの検出は、Step One Plus(ライフテクノロジー社)とGene Expression Master Mix(同)でTaqMan-MGB Probeを用いて、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知に準拠したリアルタイム法¹³⁾で実施し、10コピー以上と判定されたものをPCR陽性とした。陽性検体は、GSK系の従来法PCRで増幅したDNAを鋳型にpolymerase/capsid junction領域約300塩基の配列を決定し、遺伝子型を判定した。

SaVは、NoVと同様の機器・試薬でOkaらのTaqMan-MGB Probeリアルタイム法¹⁴⁾で検索した。陽性検体は、

Okadaらの従来法PCR¹⁵⁾によりORF1領域の一部約430塩基を増幅し、得られた産物約390塩基の配列を決定し、遺伝子型を判定した。

AstVもまた、NoVと同様の機器・試薬で横井らのTaqMan-MGB Probeリアルタイム法¹⁶⁾で検索した。陽性検体については、NoelらのRT-PCR法¹⁷⁾によりORF2領域の一部約410塩基を増幅し、得られた産物約370塩基の配列を決定して遺伝子型を判定、系統解析を行った。

電子顕微鏡検索によりロタウイルス(RV)様粒子が観察された糞便については、市販ELISAキット(ロタクロン：TFB社)により、A群ロタウイルス(ARV)とFujiiらのELISA法¹⁸⁾によりC群ロタウイルス検索を実施した。また、電子顕微鏡検索によりアデノウイルス(ADV)様粒子が観察された糞便については、市販キット(ラビッドテスト ロタアデノ：第一化学薬品)をもちいたイムノクロマト法により、ADV検索を実施した。

月別定点あたり感染性胃腸炎患者数は、感染症発生動向調査の報告週対応表に基づき、毎週の報告数を4週または5週加算したものを対応する月の患者報告数とし、小児科定点数54で除して算出した。

3 結果

(1) ウイルス検出状況

EM法でウイルス様粒子が観察された検体の内訳は、SRSV様粒子が84件、RV様粒子が182件、ADV様粒子が14件であった。

SRSV様粒子が観察された84件から、NoVが41株、SaVが11株、AstVが10株検出された。このうち、同一検体からNoVとSaVが検出された例が2件みられた。また、NoV、SaV、AstVいずれのPCRでも陰性であった「その他のSRSV」が24株みられた。RV様粒子が観察された182件は、すべてARVと同定された。また、ADV様粒子が観察された14件は、すべてADVであることが確認された(表1)。

シーズンごとのウイルス検出数を比較すると、NoV、SaV、AstVでは、2008/2009年シーズンがそれぞれ33株、8株、8株であったのに対して、2009/2010年シーズンは8株、3株、2株で、前シーズンの1/2～1/4にとどまった。一方、ARVとADVについては、2008/2009年シー

ズンがそれぞれ 87 株, 6 株, 2009/2010 年シーズンは 95 株, 8 株と大きな変化はみられなかった。検出時期についても, NoV, SaV, AstV では, 2008/2009 年シーズンがそれぞれ 11 月～3 月, 12 月～2 月, 2 月～5 月であったのに対して, 2009/2010 年シーズンは 1 月～3 月, 1 月～5 月, 6 月～8 月と, 前シーズンより遅くなる傾向が見られた。感染症発生動向調査における感染性胃腸炎の患者数を表 2 に, 定点あたり患者数とウイルス検出状況を図 1 に示す。ウイルス性胃腸炎の主流行期である 11 月～3 月の定点あたり患者数は,

2008/2009 年シーズンが 22.3～58.6 人, ピークが 12 月から 1 月であったのに対して, 2009/2010 年シーズンは 16.4 人～74.6 人, ピークが 2 月で, NoV, SaV, AstV における 2009/2010 年シーズンの検出数の減少と検出時期の遅れは, 同シーズンの患者数の推移とよく一致していた。

(2) NoV, SaV および AstV の遺伝子解析

NoV19 株についての遺伝子解析の結果, すべて GII に属しており, GII/3: 2 株, GII/4: 15 株, GII/6: 2 株であった(図 2)。GII/3 および GII/4 は両シーズン

表 1 ウイルス検出状況

ウイルス		NoV	SaV	AstV	その他の SRSV*	RotaA	ADV	総計
2008/2009 シーズン	9月						1	1
	10月							0
	11月	1			3			4
	12月	21	2**		7	5		35
	1月	8	3		1	5	3	20
	2月	1	3	1	2	22	2	31
	3月	2		2	2	28		34
	4月			3		19		22
	5月			2		8		10
	6月				1			1
7月							0	
8月							0	
	小計	33	8	8	16	87	6	158
2009/2010 シーズン	9月				3			3
	10月				2			2
	11月							0
	12月				1		1	2
	1月	5	1		1	5	1	13
	2月	2	1**			13		16
	3月	1				24	1	26
	4月					28	2	30
	5月		1		1	18	2	22
	6月			1		7		8
7月						1	1	
8月			1				1	
	小計	8	3	2	8	95	8	124
総計		41	11	10	24	182	14	282

* NoV, SaV, AstV の PCR がいずれも陰性であったもの
 ** NoV と同一検体からの検出 1 件を含む

表 2 感染性胃腸炎 月別患者数

		9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月
2008/2009 シーズン	患者数(人)	1131	898	1203	2898	3163	2034	2172	1651	1664	1640	1122	1160
	定点あたり 患者数(人)	20.9	16.6	22.3	53.7	58.6	37.7	40.2	30.6	30.8	30.4	20.8	21.5
2009/2010 シーズン	患者数(人)	792	754	885	951	3178	4030	2738	1737	1889	1443	1145	1336
	定点あたり 患者数(人)	14.7	14.0	16.4	17.6	58.9	74.6	50.7	32.2	35.0	26.7	21.2	24.7

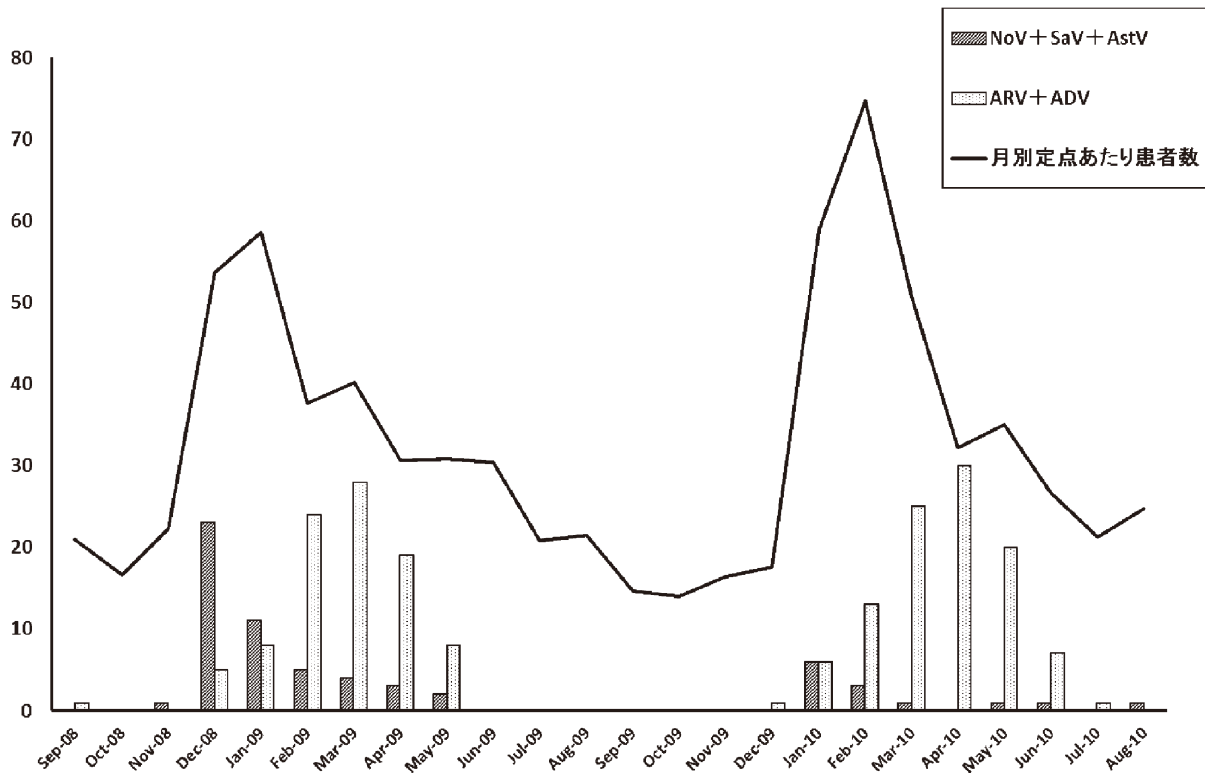


図1 感染性胃腸炎月別定点あたり患者数とウイルス検出状況
(2008年9月～2010年8月)

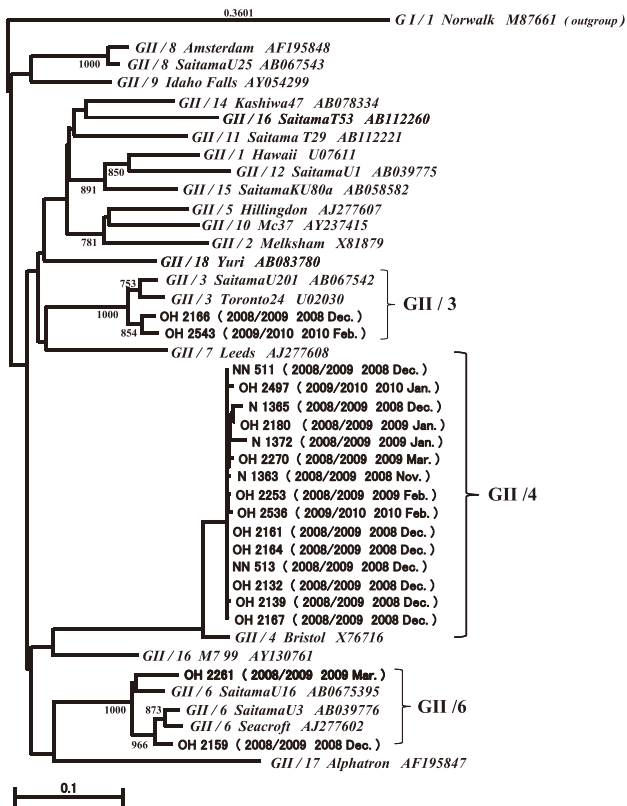


図2 検出NoVのpolymerase/capsid junction領域の系統樹
Lordsdale株 5102-5366 相当の 265bp, NJ法, Bootstrap1000回,
斜字: レファレンス株, 末尾に Accession No. を記載

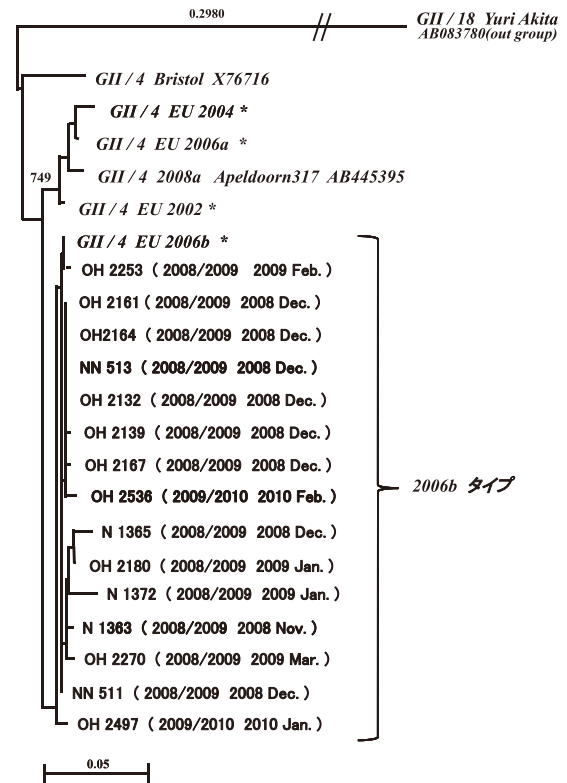


図3 検出NoV GII/4のpolymerase/capsid junction領域の系統樹
Lordsdale株 5102-5366 相当の 265bp, NJ法, Bootstrap1000回,
斜字: レファレンス株, 末尾に Accession No. を記載,
*: Eurosurveillance databaseより引用

にわたって検出されたが、遺伝的に大きな隔たりはみられなかった。これに対してGII/6は2008/2009年シーズンにのみ検出されたが、OH 2159株がレファレンス株であるGII/6 SaitamaU3株やGII/6 Seacroft株と同一クラスターを形成したのに対し、OH 2261株は別のレファレンス株であるGII/6 SaitamaU16とクラスターを形成し、遺伝的にやや異なる株であった。GII/4に属する15株と遺伝子型内レファレンス株の系統樹を、図3に示す。遺伝子型内変異株が知られているGII/4については、15株すべてが2006bタイプであった。

SaVは2009年1月に採取されたOH 2196株1株の塩基配列が決定され、SaV-GI/1であった。

8株のAstVについての遺伝子解析の結果、1型:6株、3型:1株、4型:1株であった(図4)。1型は両シーズンとも検出されたが、2008/2009年シーズン検出株5株がレファレンス株であるDresden株と同一クラスターを形成したのに対し、2009/2010年シーズンに検出されたOH 2817株(2010年8月採取)は、Dresden

株と相同性が89.8%で、別のレファレンス株であるOxford株(相同性96.0%)とクラスターを形成し、遺伝的にやや異なる株であった。

4 考察

2008/2009年シーズンおよび2009/2010年シーズンの散発胃腸炎患者からのウイルス検出状況は、シーズンによりNoV、SaVおよびAstVの検出数と検出時期が大きく異なっており、2009/2010年シーズンは、ともに前シーズンに比べて検出数が減少し、検出時期も遅くなる傾向であった。われわれは、2007年度の報告¹⁹⁾で、各ウイルスの検出時期に関する解析から、NoV、SaV、AstVがそれぞれ時期をずらして流行していると推定したが、検出時期の遅れは、この推定を裏付けると考えられる。また、特に11月から12月にかけてのNoVの検出数減少と患者数の減少から、同時期の感染性胃腸炎の原因ウイルスはNoVであることが改めて明らかになった。2009/2010シーズンは、新型インフルエンザの流行したシーズンであり、とくに10月～12月にかけてはもっとも患者が多発した時期であった。したがって手洗い等の感染防止策がきわめて長期間にわたって通常より厳重に実践されていたと考えられ、こうした社会的状況がNoVの検出数減少に関与した可能性がある。検出されたNoVの遺伝子型は、両シーズンともGII/4 2006b類似株が大部分を占めた。GII/4は、2006/2007シーズン以降、全国の地方衛生研究所からの病原体検出報告でも常に最も多く報告されており²⁰⁾、このシーズン以降全国的に胃腸炎の多発を引き起こしたGII/4 2006bの流行は、2009/2010シーズンまで継続していたものと推察され、4シーズンにわたって県内の主流型であったことになり、こうした長期にわたる流行による感受性者の減少が検出数の減少につながった可能性も考えられた。なお、2008年11月以降国内で流行しているGII/4 2008a²¹⁾は、今回は確認されなかった。また、GII/4のほかGII/3とGII/6も検出された。これらの遺伝子型は、2008年4月～2009年3月の集団事例でみられた株と同じであり、GII/6が2系統流行していた点も一致していた²²⁾。AstVは、検出時期が3月～6月に集中しており、1型が大部分を占める点は以前の報告²⁰⁾と同様であったが、2010年8月に採取された1株がOxford類似株で、同じ1型ながら前シーズンまでのDresden類似株とかなり異

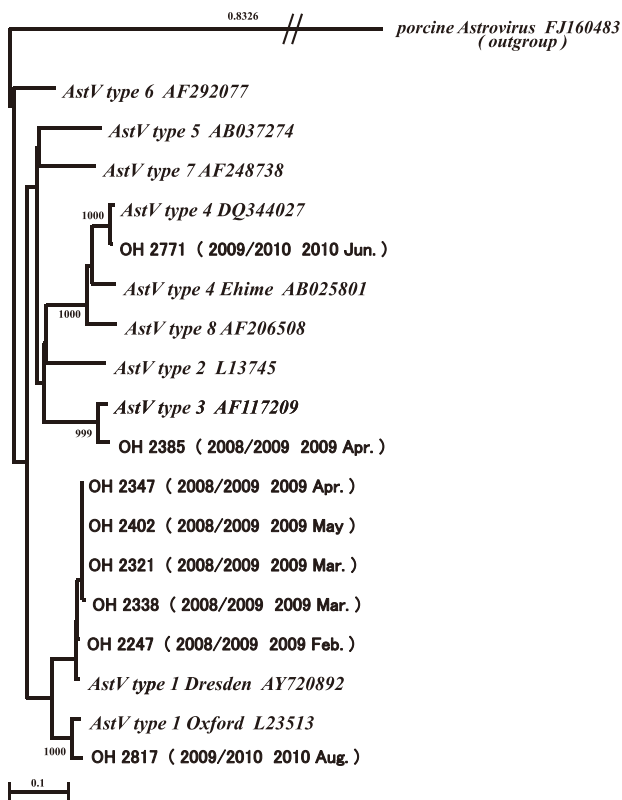


図4 検出AstVのORF2の部分領域の系統樹
AstV type2 レファレンス株 4561-4933 相当の 373bp, NJ法,
Bootstrap 1000回, 斜字: レファレンス株, 末尾に Accession
No. を記載

なっており、今後この系統のウイルスが主流となるのか、今後とも監視していく必要があると考えられる。

文 献

- 1) Jiang,X.,Wang,M.,Wang,K.and Estes, M.K. : Sequence and genomic organization of Norwalk virus, *Virology*, 195, 51-61, 1993
- 2) 片山和彦：胃腸炎関連カリシウイルス（ノロウイルス，サポウイルス）総論，病原微生物検出情報（IASR），24，312-314，2003
- 3) Hamano,M.,Kuzuya,M.,Fujii,R.,Ogura,H.,Yamada M., : Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by Noroviruses in Okayama, Japan, *J. Med. Virol.*, 282-289, 2005
- 4) Sugieda,M.,Nakajima,K.,Nakajima,S. : Outbreak of Norwalk-like virus associated gastroenteritis traced to shellfish, Coexistence of two ge-notypes in one specimen, *Epidemiol.Infect.*, 116, 339-346, 1996
- 5) Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K. : Coexistence of plural genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan, *J Clin Microbiol*, 42, 2988-2995, 2004.
- 6) Reuter,G.,Krisztalovics,K.,Vennema,H.,Koopmans, M.,Szucs,G. : Evidence of the etiological predominance of Norovirus in gastroenteritis outbreaks—Emerging new-variant and recombinant Noroviruses in Hungary, *J.Med.Viol.*,76, 598-607, 2005
- 7) Bull,R.A.,Tu,E.T.V.,McIver,C.J.,Rawlinson,W. D.,White,P.A. : Emergence of a new Norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis, *J.Clin.Microbiol.*, 327-333, 2006
- 8) Kroneman,A.,Vennema,H.,Harris,J.,Reuter,G.,Bonsdorff,C-H.von, Hedlund,K-O.,Vainio,K.,Jackson,V.,Pothier,P.,Koch,J.,Schreier,E.,Böttiger,B.,Koopmans,M. : Increase in norovirus activity reported in Europe *Eurosurveillance Weekly*, 11, 12, 2006
- 9) Hansman, GS., Takeda, N., Oka, T., Oseto, M., Hedlund, KO.,katayama, K. : Intergenogroup recombination in Sapoviruses, *Emerging Infect. Dis.*,11, 1916-1920, 2005
- 10) Sakon, N., Yamazaki, K., Utagawa, E., Okubo, Y., Oishi, I. : Genomic characterization of human astrovirus type6 Katano virus and the establishment of rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus, *J.Med.Virol.*,61, 125-131, 2000
- 11) Mèndez-Toss,M.,Griffin,D.D.,Galva,J.,Contreras,J. F.,Puerto,F.I.,Mota,F.,Guiscafrè,H., Cedillo,R.,Muñoz, O.,Herrera,I.,López,S.,Arias,C.F.:prevalence and Genetic Diversity of Human Astroviruses in Mexican Children with Symptomatic and Asymptomatic Infections, *J.Clin.Micobiol.*,42, 151-157, 2004
- 12) 濱野雅子，藤井理津志，葛谷光隆：胃腸炎ウイルスの研究（平成14年度），岡山県環境保健センター年報，27，45-61，2003
- 13) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知：ノロウイルスの検出法について，食安監発第1105001号，平成15年11月5日
- 14) Oka T., Katayama K., Hansman G.S., Kageyama T.,Ogawa S., Wu F.T., White P.A., Takeda N. : Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, *J.Med. Virol.* 78, 1347-1353, 2006
- 15) Okada M., Yamashita Y., Oseto M., and Shinozaki K. : The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers, *Arch. Virol.* 151, 2503-2509, 2006
- 16) 横井一，北橋智子：Real-time RT-PCR法によるアストロウイルス遺伝子の検出，感染症雑誌，83(2)，120-126，2009
- 17) Noel,J.S., Lee,T.W., Kurtz,J.B., Glass,R.I., Monroe,S. S. : Typing of Human Astroviruses from Clinical Isolates by Enzyme Immunoassay and Nucleotide Sequencing, *J.Clin.Microbiol.*,33, 797-801, 1995
- 18) Fujii, R., Kuzuya, M., Hamano, M., Yamada, M.,Yamazaki, S. : Detection of human group

- Crotaviruses by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, J.Clin. Microbiol., 31 (5), 1307-1311, 1992
- 19) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 榎原幸二, 濃野 信, 金谷誠久: 胃腸炎ウイルスの研究 (2007年度), 岡山県環境保健センター年報, 32, 115-127, 2008
- 20) 国立感染症研究所感染症情報センター: 病原体検出情報システム データベース, 感染症サーベイランスシステム (一般には非公開)
- 21) 田村 務, 田澤 崇, 渡邊香奈子, 渡部 香, 昆美也子, 三好龍也, 内野清子, 吉田永祥, 松尾光子, 西口智子, 田中智之, 北元憲利, 本村和嗣, 佐藤裕徳: ノロウイルス GII/4 の 2008a 亜株の動向とイムノクロマト法の改良, 病原微生物検出情報 Vol.31, 316-317, 2010
- 22) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 榎原幸二, 濃野 信, 金谷誠久: 胃腸炎ウイルスの研究 (2008年度), 岡山県環境保健センター年報, 33, 113-125, 2009

【調査研究】

胃腸炎ウイルスの疫学的研究

—Real-time RT-PCR法によるヒトC群ロタウイルス検査法の開発—

Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama

—Development of Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Method for the Detection of Human Group C Rotaviruses—

葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志 (ウイルス科)

Mitsutaka Kuzuya, Masako Hamano, Kouji Kida, and Ritsushi Fujii

要 旨

Real-time RT-PCR法によるヒトC群ロタウイルス(ヒトCRV)の検査法について検討した。既報のプライマー及びプローブの一部改変を加えることで、ほぼ全てのヒトCRV株を特異的かつ定量的に検出できる系を確立した。検証の結果、確立した方法はヒトCRVのみを特異的に検出できること、糞便中の非特異物質等の影響を受けないこと、さらに良好な定量性を示すことなどがわかった。なお、検出限界はアッセイあたり10コピーであった。本法を用いて県内の下水を調査したところ、11,000～4,146,000コピー/LのヒトCRVが存在すること、及びウイルス量は3月下旬頃がピークであることなどが今回初めて明らかになった。今回確立したReal-time RT-PCR法は、Conventional nested RT-PCR法とほぼ同等の感度を有するのみならず、約3時間半程度で結果が判明すること、検体中のウイルスを定量的に検出できるなど、ヒトCRV集団発生事例の感染経路究明等に大いに役立つものと期待される。

[キーワード：ヒトC群ロタウイルス, Real-time RT-PCR, TaqMan MGB probe, 定量的検出, 流入下水]

[Key words : human group C rotavirus, Real-time RT-PCR, TaqMan MGB probe, quantitative detection, influent sewage warter]

1 はじめに

ロタウイルスはレオウイルス科に属する2本鎖のRNAを遺伝子として持つウイルスであり、ヒトおよび動物の重要な胃腸炎起因ウイルスとして知られている¹⁾。ウイルス粒子は二重の殻(内殻および外殻)で構成されており、内殻蛋白の抗原性やウイルス遺伝子の違いによりA～G群に分類されている。これらのうち、ヒトに病原性を有するのはA、BおよびC群である¹⁾。

ヒトA群ロタウイルスは小児胃腸炎の主要な病原体であり、我が国における患者数は年間約80万人に及ぶと推定されている²⁾。ヒトB群ロタウイルスは、1982～87年に中国で発生した集団胃腸炎の病原体として確認された後、インドやバングラディッシュにおける胃腸炎例からも散発的に検出されたものの、それ以外の地域における検出例はない。ヒトC群ロタウイルス(ヒトCRV)は主に年長児～成人に胃腸炎を起し、日本をはじめ世

界各地に広く分布していることがわかっている。本ウイルスの検出頻度はさほど高くないものの、しばしば食中毒様の集団胃腸炎を引き起すため公衆衛生上問題視されている。我が国におけるヒトCRV集団発生事例は、1988年に福井県で発生した大規模事例(有症者675名)以降、2006年までに計19例が報告されている³⁾。推定感染経路については、ヒト→ヒト感染が大部分を占めるものの、食品等が原因と思われるケースも散見される。

ヒトCRVの検査については、我々が開発した⁴⁾逆受身血球凝集反応法により迅速・簡便な検出が可能であり、実際の事例においてその有効性が確認されている^{5)～7)}。しかしながら、その検出感度は約 10^7 個/mLであるため、推定原因食品や病日を経過した患者糞便、及び環境試料中などに含まれる極微量のウイルスを検出することは困難である⁶⁾。一方ノロウイルス検査においては、Real-time RT-PCR法による特異的かつ高感度な検査法が既

に確立されており⁸⁾、患者の特定のみならず食品や環境水中などの検査にも広く応用されている^{9), 10)}。そこで、ヒトCRVの特異的で高感度な検出を目的として、Real-time RT-PCR法に基づく検査法について検討を行った。

2 材料及び方法

2.1 供試検体

Real-time RT-PCR法の特異性を確認するため、ヒトCRV陽性糞便3検体(検体番号: N1217, OH1250, OH1603), 陰性糞便5検体(検体番号: OH1517, OH1557, OH2213, OH2230, OH2334), 及び動物由来CRV株3検体(ブタCRV: Cowden株, OS999株, ウシCRV: Shintoku株)の培養上清をそれぞれ供試した。また環境試料として、2009年1月~2010年1月に県内のA下水処理場で採取された流入下水23検体を、片山らが報告している陰荷電膜濃縮法¹¹⁾により1,250倍に濃縮したものを試料として用いた。

2.2 コントロールプラスミド

Real-time RT-PCR法の検証及び定量用コントロールとして、ヒトCRVの代表的な株である¹²⁾OK118株, OK450株及びK9304株の外殻糖蛋白(VP7)遺伝子を、それぞれプラスミドpUC19にクローニングして作成した組み替えプラスミド^{13), 14)}を使用した。

2.3 逆転写反応によるcDNAの合成

市販のQIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen社製)を用いて検体からウイルスRNAを抽出し、既報の方法^{6), 13)}に従ってVP7遺伝子のcDNAを合成した。すなわち、抽出したRNA 4 μ LにVP7遺伝子の両端に相補的なプライマー(5'-GGC ATT TAA AAA AGA AGA AGC TGT-3'及び5'-AGC CAC ATG ATC TTG TTT ACG C-3', 各25 μ M)及びDMSOをそれぞれ1 μ Lずつ添加し97 $^{\circ}$ C 5分間熱変成後、氷中で急冷した。次に5 \times First-strand buffer (Invitrogen社製) 4 μ L, 2.5mM dNTPs

(Takara社製) 4 μ L, Recombinant RNase inhibitor (40U/ μ L: Takara社製) 0.5 μ L, Nuclease free water 2.5 μ L及びSuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen社製) 1 μ Lをそれぞれ加えて20 μ Lとし、42 $^{\circ}$ C 60分間逆転写反応を行った後、70 $^{\circ}$ C 15分の加熱により酵素を失活させた。

2.4 Real-time RT-PCR法

Real-time RT-PCR法に使用したプライマー及びプローブは基本的にLoganら¹⁵⁾の報告に従ったが、フォワードプライマーについては一部改変を加えた(表1)。TaqMan gene expression master mix (Life technologies社製)の反応液18 μ L(フォワード及びリバースプライマー各0.6 μ M, TaqMan MGB プローブ0.2 μ Mを含む)に合成したcDNA 2 μ Lを加えて20 μ Lとし、StepOnePlus (Life technologies社製)を用いて増幅及び検出を行った。反応条件は50 $^{\circ}$ C 2分, 95 $^{\circ}$ C 10分の後、熱変性(95 $^{\circ}$ C 15秒)及びアニール・伸長反応(60 $^{\circ}$ C 1分)のサイクルを45回繰り返した。解析は、StepOne Software v2.1 (Life technologies社製)を用いた。

2.5 Conventional RT-PCR法

Real-time PCR法と従来法によるRT-PCR法(Conventional RT-PCR法)との一致性を検証するため、逆転写反応で合成したcDNAについて、既報の方法⁶⁾に従いnested PCR法(2段階でPCRを行う高感度な検出法)による検査を実施した。

3 結果

3.1 Real-time RT-PCR法の検討

まず最初に、Loganら¹⁵⁾の報告に従って作製したプライマー及びプローブを使用した検査系について、既知のコピー数に調整したOK118株, OK450株及びK9304株のコントロールプラスミドを用いて検証を行った。その結果、すべてのプラスミドで特異増幅が確認されたも

表1 Real-time RT-PCR法のプライマー及びプローブ配列

プライマーまたは プローブ名	塩基配列(5'-3')	部位	文献
CRV_TqM_F2	CCATTAGATACTACAAGTAATGGAATYGG	652-680	本研究
CRV_TqM_Rev	TGGGTGTCATTTGATACAACCTCA	731-708	Loganら ¹⁴⁾
CRV_TqM_Prb	(FAM) CAGCTAGTACAGAAACTT (MGB/NFQ*)	689-706	Loganら ¹⁴⁾

* MGB: Minor Groove Binder, NFQ: Non Fluorescent Quencher

の、OK450株プラスミドのCt値(増幅曲線がThreshold lineと交差した増幅サイクル数)が、OK118及びK9304株プラスミドの値に比べ同一コピー数において8サイクル程度多く、十分な検出感度が得られていないことがわかった。そこで、プライマー及びプローブ配列についてOK118株、OK450株及びK9304株のVP7

遺伝子配列とのマッチングを検討したところ、OK450株に関してフォワードプライマーの3'端付近に2カ所のミスマッチが存在し、これが感度低下の原因であると考えられた。そこで、このミスマッチを回避すべく新たなプライマーを設計・合成し(表1)、同様に検証実験を行ったところ、OK450株プラスミドの感度低下は解消された。

3.2 Real-time RT-PCR法の特異性及び検出感度

Real-time RT-PCR法の特異性について、ヒトCRV陽性糞便3検体及び陰性糞便5検体に加え、ブタCRV2株及びウシCRV1株を用いて検討を行った。その結果、ヒトCRV陽性糞便のみで特異的増幅が認められ(データを示さず)、本法がヒトCRVのみを特異的に検出できること、及び糞便中の非特異物質等の影響を受けないことがわかった。

次に、Real-time RT-PCR法の定量性及び検出感度を調べるため、OK118株、OK450株、及びK9304株プラスミドを1～100,000copies/tubeの範囲で10倍段階希釈を行って測定した。その結果(図1)、いずれのプラスミドにおいても10～100,000copies/tubeの範囲で、プラスミド希釈の対数値とCt値との間に明確な比例関係が認められ($R^2=0.999\sim 0.9998$)、またプラスミド濃度が10倍濃くなるにしたがいCt値が3.3～3.5ずつ低下していた。このことから本検査法は良好な定量性を有していることがわかった。なお、いずれのプラスミドでも1copy/tubeでは増幅がみられなかったことから、本法の検出感度はアッセイあたり10コピーであると考えられた。

3.3 流入下水の測定結果

環境試料中等に極微量存在するヒトCRVを検出できるのかについて検討するため、流入下水23検体についてReal-time RT-PCR法による定量検査と同時に、Conventional RT-PCR法による検査を実施した。結果は表2に示すように、Real-time RT-PCR法とConventional RT-PCR法の結果はよく一致しており、両法はほぼ同等の感度を有することがわかった。定量結果から、2009年1月～7月に採取された流入下水1Lあたり11,000～4,146,000コピーのウイルス遺伝子が存在することが明らかとなり、また3月下旬を定量値のピークとする検出パターンが認められた。

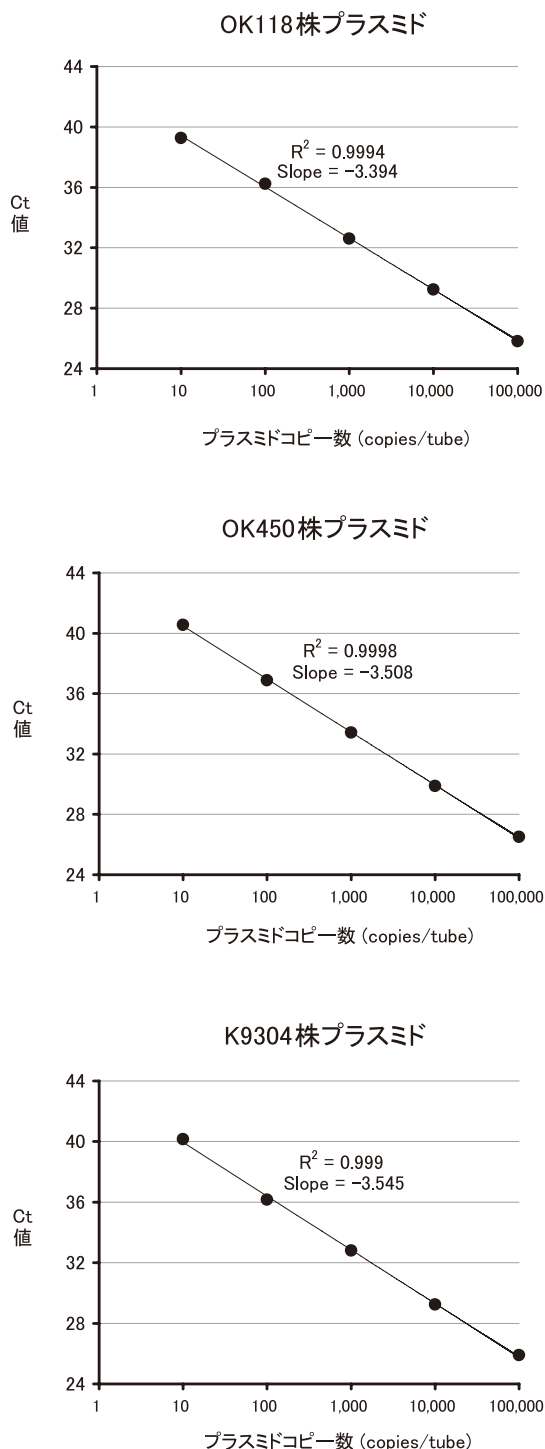


図1 コントロールプラスミドの測定結果
各プラスミドを10倍段階希釈し、Real-time RT-PCR法で測定した。

表2 流入下水の遺伝子検査法による測定結果

検体番号	検体採取日 (月/日/年)	Real-time RT-PCR定量値 ($\times 10^3$ copies/L)	Conventional RT-PCR 検査結果	
			1st PCR	2nd PCR
WW-02	1/27/09	220	-	+
WW-04	2/10/09	572	-	+
WW-06	2/25/09	146	-	+
WW-08	3/10/09	1,408	-	+
WW-10	3/24/09	4,146	-	+
WW-11	4/7/09	2,006	-	+
WW-13	4/21/09	82	-	+
WW-15	5/19/09	42	-	+
WW-17	6/2/09	11	-	+
WW-19	6/16/09	24	-	+
WW-21	6/30/09	14	-	+
WW-23	7/14/09	781	-	+
WW-25	7/28/09	18	-	+
WW-27	8/11/09	<10	-	-
WW-29	8/25/09	<10	-	-
WW-31	9/8/09	<10	-	-
WW-35	10/13/09	<10	-	-
WW-37	10/27/09	<10	-	-
WW-39	11/10/09	<10	-	-
WW-41	11/24/09	<10	-	-
WW-43	12/8/09	<10	-	-
WW-45	12/22/09	<10	-	-
WW-48	1/19/10	<10	-	-

4 考 察

Real-time RT-PCR法に基づくヒトCRVの検出系は、これまでにMelegら¹⁶⁾がサイバークリーンを用いた系を、Loganら¹⁵⁾がTaqManプローブを用いた系をそれぞれ報告している。しかしながら、Melegらの方法はヒトCRVのみを特異的に検出できず、またLoganらの方法も、分離株や臨床検体等を用いた検証実験が行われていないなどの問題点がみられる。実際、今回の検討においてLoganらの報告したオリジナルの検査系では、フォワードプライマーにある2カ所のミスマッチのためにOK450株をうまく検出することができなかった。そこで今回、プライマーに一部改変を加えることで、ほぼ全てのヒトCRV株を特異的かつ定量的に検出できる検査系を確立することができた。さらに検証実験の結果、今回の方法はヒトCRVのみを特異的に検出できること、糞便中の非特異物質等の影響を受けないこと及び良好な定量性を示すことなどがわかった。また、検出限界もアッセイあたり10コピーと十分な感度を有していた。

我々はこれまでに、ヒトCRVの迅速・簡便な検出法としてモノクローナル抗体を用いた逆受身血球凝集反応

法を開発してきた⁴⁾。本法の検出感度は 10^7 個/mLとさほど高くないものの、集団発生時における患者便からのCRV検出には十分な感度を有することがわかっている^{5)~7)}。しかしながら病日が経過した患者便など、ウイルス量が少ないと思われる検体では陰性となるケースもあるため⁶⁾、推定原因食品などの検査には用いることができない。このような場合には、高感度な2段階増幅法によるConventional RT-PCR法による検査が必要となるが、本法は結果判明までに最低でも10時間を要し、また定量的な検出は不可能である⁶⁾。今回確立したReal-time RT-PCR法は、Conventional RT-PCR法と同等の感度を有するのみならず、約3時間半程度で結果が判明すること、検体中のウイルスを定量的に検出できるなど、ヒトCRV集団発生事例の感染経路究明等に大いに役立つものと期待される。さらに今回、流入下水中のヒトCRVの検出も可能であったことから、飲料水などが感染源と疑われる事例の原因究明等にも適用可能であると思われる。

ヒトCRVはその検出頻度が比較的低いにもかかわらず、住民の多くが本ウイルスに対する抗体を保有している¹⁷⁾など、その流行実態については不明な点が多い。Melegら¹⁶⁾は、2005年2月~12月にかけて流入下水中のCRVを定量的に検査し、下水中に多量のヒトCRVが存在することを明らかにした。さらに、ウイルス量のピークは3~4月であり、特に流域人口の多い処理場の流入下水から最も多量のウイルスが検出されたことを報告している。しかしながらその一方で、調査期間中にヒトCRV感染者はわずか1名しか確認されず、ヒトCRVに感染しても明らかな症状を示さない人が多いのではないかと考察している。我々も、県内下水処理場で採取した流入水中に11,000~4,146,000コピー/Lという多量のヒトCRVが存在することを今回初めて明らかにした。さらに、ウイルス量は3月下旬頃にピークとなるなどMelegらの報告と同様であり、またこれは、我々が既に報告した我が国におけるヒトCRVの流行時期¹²⁾とも一致するものであった。今後さらに長期間にわたって下水中のヒトCRVの動態を調べるとともに、感染者のサーベイランスも同時に行うことで、本ウイルス流行実態の解明が進むものと思われる。

文 献

- 1) 小林宣道, 浦沢正三: ロタウイルス, ウイルス, 50, 157-172, 2000
- 2) 中込とよ子, 中込 治: ロタウイルスワクチンの現状と展望, 病原微生物検出情報, 26, 14-16, 2005
- 3) 葛谷光隆: ロタウイルス感染症, 公衆衛生, 71, 991-993, 2007
- 4) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nakabayashi, T., Tsunemitsu, H., et al.: Rapid detection of human group C rotaviruses by reverse passive hemagglutination and latex agglutination tests using monoclonal antibodies, J. Clin. Microbiol., 31, 1308-1311, 1993
- 5) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇, 中山 俣槻ら: 岡山県内で初めて確認されたヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 岡山県環境保健センター年報, 24, 55-59, 2000
- 6) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇: 教育研修施設で発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 感染症学雑誌, 77, 53-59, 2003
- 7) 葛谷光隆, 濱野雅子, 西島倫子, 藤井理津志, 小倉 肇ら: 保健福祉施設で発生したC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 病原微生物検出情報, 26, 100-101, 2005
- 8) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S. et al.: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on Real-time quantitative reverse transcription-PCR, J. Clin. Microbiol. 41: 1548-1557, 2003
- 9) Hamano, M., Kuzuya, M., Fujii, R., Ogura, H., Yamada, M.: Epidemiology of Acute Gastroenteritis Outbreaks Caused by Noroviruses in Okayama, Japan, J. Med. Virol., 77, 282-289, 2005
- 10) Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S.: Application of cation-coated Filter Method to Detection of Noroviruses, Enteroviruses, Adenoviruses, and Torque Teno Viruses in the Tamagawa River in Japan, Appl. Environ. Microbiol., 71, 2403-2411, 2005
- 11) 片山浩之: 新たなウイルス濃縮方法の開発と水道水および水道水源調査への適用, モダンメディア, 52, 185-190, 2006
- 12) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nishijima, M., Ogura, H.: Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture, Japan, between 1986 and 2005, J. Med. Virol., 79, 1219-1228, 2007
- 13) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nakamura, J., Yamada, M., et al.: Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes, J. Clin. Microbiol., 34, 3185-3189, 1996
- 14) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Yamada, M., Shinozaki, K., et al.: Survey of human group C rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993, J. Clin. Microbiol., 36, 6-10, 1998
- 15) Logan, C., O'Leary, J. J., O'Sullivan N.: Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children, J. Clin. Microbiol., 44, 3189-95, 2006
- 16) Meleg, E., Banyai, K., Martella, V., Jiang, B., Kocsis, et al.: Detection and quantification of group C rotaviruses in communal sewage, Appl. Environ. Microbiol., 74, 3394-3399, 2008
- 17) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Ohata, R., Ogura, H., et al.: Seroepidemiology of human group C rotavirus in Japan based on a blocking enzyme-linked immunosorbent assay, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 8, 161-165, 2001

【調査研究】

岡山県における 2009～2010 年シーズンのインフルエンザ流行について

Epidemics of influenza in Okayama Prefecture during 2009 to 2010 season

葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩二, 藤井理津志, 川井睦子* (ウイルス科)

*岡山県保健福祉部健康対策課

Mitsutaka Kuzuya, Masako Hamano, Kouji Kida, Ritsushi Fujii and Mutsuko Kawai

要 旨

2009～10年シーズンの岡山県におけるインフルエンザは、2009年4月中旬にメキシコ及び北米で出現したブタ由来のH1N1亜型の新型(AH1pdm型)インフルエンザウイルスの蔓延により、近年に類をみない大規模な流行が引き起こされた。患者発生状況やウイルス検査成績などから、6月下旬～7月下旬の発生初期、7月下旬～8月下旬の拡大期、10月以降の蔓延期と県内の流行が推移したことがわかった。さらに、年齢別患者発生状況を過去の流行と比較した結果、学齢期にあたる5～19歳で多数の患者が発生したことが明らかとなり、集団生活の機会が多い年齢層を中心にAH1pdm型の感染が広まったことがわかった。なお、AH1pdm型株のオセルタミビル(商品名:タミフル)耐性変異について調査したところ、耐性株が1例のみ確認された(出現頻度1.28%)。耐性株は、タミフルの治療投与開始後5日目の検体から分離されたことから、薬剤投与にともない出現した可能性が強く示唆された。

[キーワード: 岡山県, インフルエンザウイルス, インフルエンザ様疾患集団発生, 感染症発生動向調査, 疫学解析]

[Key words: Okayama Prefecture, Influenza virus, Outbreak of influenza, Infectious disease surveillance, Epidemiological analysis]

1 はじめに

2009年4月中旬に、これまでのAソ連型(AH1型)インフルエンザウイルス(Infl.V)株とは抗原性の異なるブタ由来のH1N1亜型の新型(AH1pdm型)Infl.Vがメキシコ及び北米を中心に発生し、その後世界各国に広がっていった¹⁾。岡山県でも2009～2010年シーズン(2009/10シーズン)にAH1pdm型の大規模な流行が認められたため、本流行の詳細を明らかにするため、学校等におけるインフルエンザ様疾患の集団発生(Infl.集団)の患者発生状況、及び岡山県感染症発生動向調査事業(発生動向調査)に基づくインフルエンザ患者の発生状況を調査した。また、患者から採取された咽頭拭い液等についてInfl.Vの検出及び分離を行うとともに、分離されたウイルスについて抗原性解析等を実施した。

2 材料及び方法

2.1 インフルエンザ患者発生状況

Infl.集団患者数については、岡山県保健福祉部健康対策課がとりまとめた「インフルエンザ様疾患施設別発生

状況報告」をもとに集計した。また、発生動向調査の週別患者情報に基づき、定点医療機関当たりのインフルエンザ患者数(一週間に1ヵ所の定点医療機関を受診したインフルエンザ患者数の平均値)を算出・集計した。

2.2 ウイルス検査材料

AH1pdm型Infl.Vの国内流行初期における患者確認のためのサンプル調査(2009年5月～7月)、その後2009年8月～2010年3月に実施された入院・重症患者を対象とした入院サーベイランス、及び集団発生の早期探知を目的としたクラスターサーベイランス、さらに検査定点医療機関を対象とした病原体サーベイランス(2009年6月～2010年5月)で搬入された検体を検査材料とした。なお、サンプル調査及び入院・クラスターサーベイランスについては、おもに迅速検査で「A型陽性」と判定された検体を対象とした。最終的に、県内7ヵ所の保健所管内において計524人の患者から咽頭拭い液または鼻腔拭い液が採取・搬入された(表1)。

2.3 遺伝子検出法に基づくA型Infl.Vの検査

遺伝子検出法に基づくA型Infl.Vの検査については、

表1 インフルエンザウイルス検査成績

検体採取保健所	検体採取年月	検体数	陽性数	同定結果			
				AH1pdm型	AH3型	A型 (型別不能)	B型 (ヒ7トリ系統)
岡山市保健所	2009. 5	28	24	0	24	0	0
	6	7	5	2	3	0	0
	7	16	9	7	2	0	0
	8	17	16	13	3	0	0
	9	5	4	3	0	1	0
	10	11	11	10	0	1	0
	11	11	8	8	0	0	0
	12	19	19	19	0	0	0
	2010. 1	20	19	19	0	0	0
	2	4	4	4	0	0	0
	4	1	1	1	0	0	0
	5	1	1	1	0	0	0
	小計	140	121	87	32	2	0
備前保健所 (東備支所分を含む)	2009. 5	1	1	0	1	0	0
	6	1	0	0	0	0	0
	7	4	4	4	0	0	0
	8	7	7	7	0	0	0
	9	2	1	1	0	0	0
	12	1	1	1	0	0	0
	2010. 4	2	2	2	0	0	0
	小計	18	16	15	1	0	0
倉敷市保健所	2009. 5	7	7	0	7	0	0
	6	9	8	0	7	1	0
	7	5	4	4	0	0	0
	8	2	0	0	0	0	0
	9	4	3	3	0	0	0
	10	17	13	13	0	0	0
	11	31	29	29	0	0	0
	12	22	20	20	0	0	0
	2010. 1	7	5	5	0	0	0
	小計	104	89	74	14	1	0
備中保健所 (井笠支所分を含む)	2009. 5	4	4	0	4	0	0
	6	1	0	0	0	0	0
	7	3	2	2	0	0	0
	8	8	7	7	0	0	0
	9	1	0	0	0	0	0
	10	25	24	24	0	0	0
	11	39	32	32	0	0	0
	12	6	6	6	0	0	0
	2010. 1	11	10	10	0	0	0
	2	2	1	1	0	0	0
	3	1	1	1	0	0	0
5	1	1	0	1	0	0	
小計	102	88	83	5	0	0	
備北保健所 (新見支所分を含む)	2009. 5	8	1	0	1	0	0
	6	3	0	0	0	0	0
	10	2	2	2	0	0	0
	11	6	5	4	0	1	0
	12	19	17	17	0	0	0
	2010. 1	14	13	11	0	2	0
	2	10	9	9	0	0	0
3	1	1	1	0	0	0	
5	6	3	1	0	0	2	
小計	69	51	45	1	3	2	
真庭保健所	2009. 6	1	1	0	1	0	0
	10	1	1	1	0	0	0
	11	2	1	1	0	0	0
	12	3	2	2	0	0	0
小計	7	5	4	1	0	0	
美作保健所 (勝英支所分を含む)	2009. 5	1	0	0	0	0	0
	6	1	1	0	1	0	0
	7	1	1	1	0	0	0
	8	6	5	5	0	0	0
	9	2	0	0	0	0	0
	10	8	8	8	0	0	0
	11	32	29	28	0	1	0
	12	20	19	19	0	0	0
	2010. 1	8	7	7	0	0	0
	2	2	2	2	0	0	0
	5	3	3	0	1	0	2
小計	84	75	70	2	1	2	
合 計		524	445	378 (84.9%)	56 (12.6%)	7 (1.6%)	4 (0.9%)

国立感染症研究所(感染研)から示された「病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ(2009年5月 ver.1)」に従って実施した。なお、2009年11月以降は一部改定された同マニュアル(2009年11月 ver.2)に従った。検体140 μ Lより市販のRNA抽出キット(QIAamp Viral RNA Mini Kit:株式会社キアゲン)を用いてウイルスRNAを60 μ Lの緩衝液に抽出後、マニュアルに従い作成したプライマー及びプローブを用いてReal-time RT-PCR法、もしくはConventional RT-PCR法を行いウイルス遺伝子を増幅・検出した。なお、AH1pdm型についてはReal-time RT-PCR法及びConventional RT-PCR法の片方または両方で、季節性のAH1型、A香港型(AH3型)についてはConventional RT-PCR法で検査を行った。遺伝子検査法によりA型のM遺伝子と各亜型のHA遺伝子が同時に検出された場合を各亜型ウイルス陽性と判定し、M遺伝子のみが検出された場合はA型(型別不能)とした。

2.4 ウイルス分離及び抗原性解析

ウイルス分離はMDCK細胞を使用して行った²⁾。採取した咽頭または鼻腔拭い液を培養細胞に接種後、盲継代2~3代後に細胞変性効果のみられた検体について、モルモット赤血球を用いて定法に従い³⁾赤血球凝集(HA)試験を実施した。HA試験によりInfl.Vの存在が疑われた検体について、AH1pdm型ワクチン株[A/California/7/2009(H1N1pdm)], AH3型ワクチン株[A/Uruguay/716/2007(H3N2)], 山形系統⁴⁾に属するB型Infl.V(山形系B型Infl.V)標準株(B/Bangladesh/3333/2007)及びビクトリア系統⁴⁾に属するB型Infl.V(ビクトリア系B型Infl.V)ワク

チン株(B/Brisbane/60/2008)に対する抗血清(いずれも感染研より分与)を用いた赤血球凝集阻止(HI)試験³⁾により型別及び抗原性解析を実施した。

2.5 AH1pdm型Infl.V株のオセルタミビル耐性変異の検出

感染研が作成した「抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスAH1N1pdm-NA遺伝子解析実験プロトコール」に基づき、AH1pdm型株のオセルタミビル耐性変異の有無について検査を行った。すなわち、ウイルスRNA 5 μ Lを鋳型としOneStep RT-PCR Kit(株式会社キアゲン)によってノイラミニダーゼ(NA)遺伝子の一部を増幅し、シークエンサー(Genetic Analyzer 3500:Life technologies社製)により塩基配列を決定した。決定された塩基配列をアミノ酸配列に変換後、NAのN末端から数えて275番目のアミノ酸がヒスチジンの場合をオセルタミビル感受性、チロシンの場合を耐性と判定した。

3 結 果

3.1 患者発生状況

発生動向調査における県全体のインフルエンザ患者数の推移を図1に示した。2009年第35週(8月下旬)に定点医療機関当たりの(定点当たり)患者数がインフルエンザ流行開始の目安とされる1.0人を超えた後、3週間ほどは小康状態にあったものの、第39週(9月下旬)より再び患者が増加しはじめ、第42週(10月中旬)に注意報レベルに相当する定点当たり5.0人を超えた。その後は患者が急激に増加し、第46週(11月中旬)には警報レベルの35.2人に達し、第48週(11月下旬)にピーク(50.7人)に達した。その後、患者数は減少に転じ、第53週(12

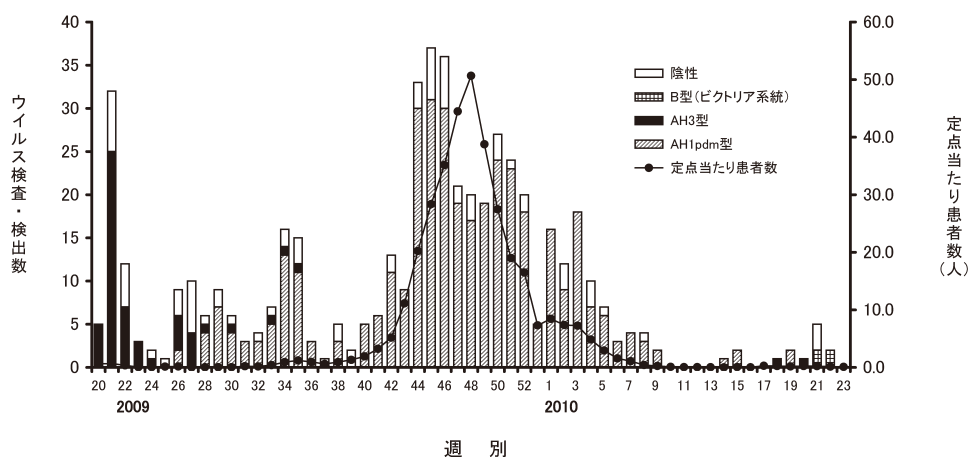


図1 週別のインフルエンザウイルス検出状況

カラムが型別のウイルス分離数を、折れ線が県全体の定点医療機関当たり(定点当たり)患者数を示す。

月下旬)には定点当たり10.0人を、さらに2010年第8週(2月下旬)には1.0人を下回り流行はほぼ収束した。地区別患者数推移をみると(図2)、いずれの地区においても2009年第48週頃をピークとした一峰性の流行パターンが認められたが、倉敷・井笠地区においてはピーク時の患者数が71.5人に達するなど、他地区に比べ流行が拡大していた。次に、流行規模の目安となる

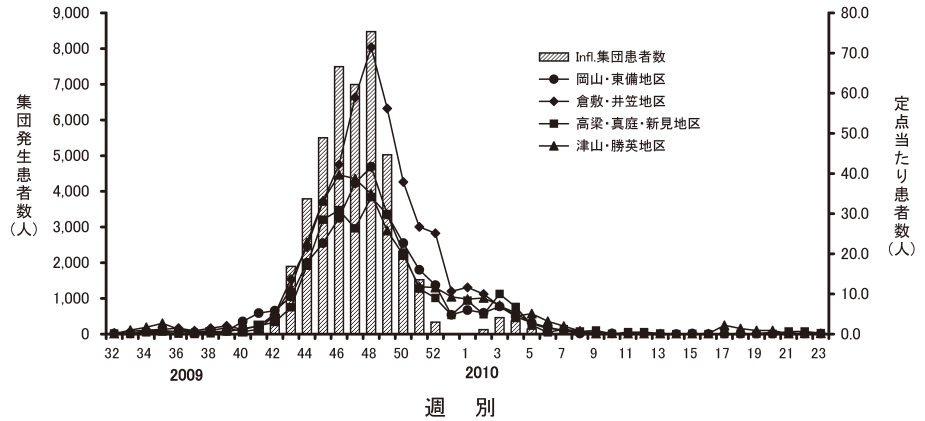


図2 週別のインフルエンザ患者発生状況

カラムが学校等におけるインフルエンザ様疾患の集団発生(Infl.集団)患者数を、折れ線が発生動向調査における地区別の定点医療機関当たり(定点当たり)患者数を示す。

定点当たり患者総数(前年の第26週から翌年の第27週までの総計)を算出したところ、352.7人と過去10シーズン中で最多であり(図3)、近年に類をみない大規模な流行であったことがうかがわれた。

一方、Infl.集団患者発生状況を見ると(図2)、インフルエンザ流行期に入ってから2週間を経過した2009年9月10日(第37週)に、シーズン初の集団発生が岡山市内の中学校で確認されてから患者数の増加は緩やかであったが、流行が注意報レベルに達した第42週からは急激な増加に転じ、第48週にピーク(8,477人)を迎えた。その後、患者数は第51週にかけて急激に、その後は徐々に減少していき、2010年第9週(3月上旬頃)にいったん患者は報告されなくなったものの、第15週~第22週には少数例ながら集団発生が認められた。最終的な届出患者総数は46,045人と、過去10年間では最も多く(図3)、またInfl.集団発生患者報告数の正確な記録が残っている1982年以降でも最多であった。

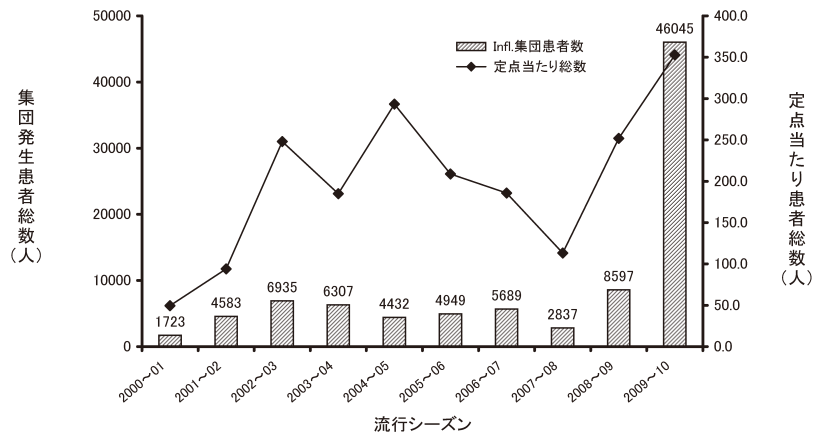


図3 過去10シーズンのインフルエンザ患者総数の推移

カラムがInfl.集団発生患者総数を、折れ線が定点医療機関あたり(定点当たり)患者総数を示す。

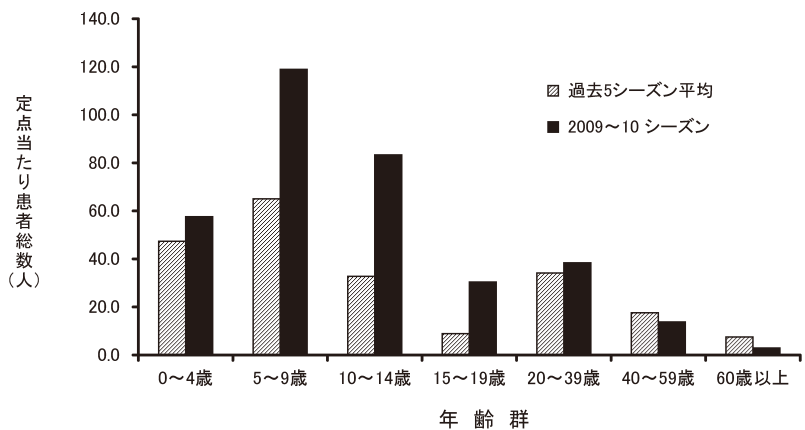


図4 年齢群別定点当たりインフルエンザ患者数の比較

さらに、今回の流行がどのような年齢層に広がったのかを明らかにするため、年齢群別の定点当たり患者総数を過去5シーズンの平均値と比較した(図4)。その結果、0~4歳群及び20歳以上の年齢群では過去5シーズンの平均とほとんど差がみられなかった

のに対し、5~19歳においてはいずれの年齢群においても平均を大きく上回っており、特に学齢期の子供達を中心に流行が拡大したことが示唆された。さらに、今シーズンの定点当たり患者総数(352.7人)が過去5シーズン

の平均値(210.5人)の約1.5倍であったのに対し、Infl. 集団患者発生総数(46,045人)は過去5シーズンの平均値(5,301人)の約9倍に達していたことも、このことを裏付けるものと考えられた。

3.2 ウイルス検査成績

インフルエンザ患者からの検体採取状況及びウイルス検出状況は表1及び図1に示すとおりである。524検体中445検体(84.9%)からInfl.Vが検出され、その内訳はAH1pdm型が378件(84.9%)、AH3型が56件(12.6%)、A型(型別不能)が7件(1.6%)、及びビクトリア系B型が4件(0.9%)であった。サンプル調査が開始された2009年5月中旬(第20週)より、おもに県南部地域で採取された検体が持ち込まれ約1ヶ月間で55検体に達したが、これらの検体からはいずれもAH3型Infl.Vのみが検出された。県内でAH1pdm型Infl.Vが初めて確認されたのは、ハワイ旅行から帰国しインフルエンザを発症した岡山市内の患者から6月24日(第26週)に採取された検体であった。それ以降7月20日頃(第30週)までは、海外からの帰国者を中心にAH1pdm型Infl.Vが検出されたが、その後はAH1pdm型の流行が早期に発生した関西もしくは関東方面への旅行歴を有する患者や、部活動の合宿や試合等で感染したと思われる患者から相次いでAH1pdm型Infl.Vが検出されるようになった。そして8月下旬(第35週)以降は、感染経路が特定できない患者からもAH1pdm型が検出されるようになり、本ウイルスが県内で拡散しはじめたものと考えられた。なお、この頃になるとAH3型はほとんど検出されなくなった。9月に入って検体数がやや減少したものの、患者が増加傾向を示した10月頃(第41週)から再び検体数が増え始め、年末～年始にかけて県下全域から多数の検体が持ち込まれた。検査の結果、これらの検体からはいずれもAH1pdm型Infl.Vのみが検出された。その後の患者数減少とともに検体数も漸減し、2010年3月(第10週)に入るとほとんど検体は搬入されなくなった。4月～5月(第14週～第22週)にも散発的な患者発生にとともに十数例の検体について検査を行ったが、前半はAH1pdm型及びAH3型Infl.Vが、後半はビクトリア系B型Infl.Vがそれぞれ検出または分離された。

3.3 ウイルスの抗原性解析

遺伝子検査用に搬入された検体の一部についてMDCK細胞を用いてウイルス分離を試みたところ、

AH1pdm型Infl.Vが66株、ビクトリア系B型Infl.Vが4株、AH3型Infl.Vが2株それぞれ分離された。まず最初にAH1pdm型Infl.V分離株の抗原性について、ワクチン株であるA/California/7/2009(H1N1pdm)を基準にHI試験により比較解析を行ったところ(図5)、66株中64株(97.0%)がワクチン株とほぼ類似した抗原性(HI価で4倍以内の差)を有することがわかった。なお、シーズン終了間際の2010年第15週(6月上旬)には、HI価で8倍の差を示す株が2株検出された。次にビクトリア系B型Infl.Vについても同様に、ワクチン株のB/Brisbane/60/2008を基準に比較したところ、4株すべてがHI価で4倍以内の抗原性の差にとどまっていた(データを示さず)。最後にAH3型Infl.Vの2株(2010年第18週及び第20週に検出)についても解析したところ、いずれもワクチン株のA/Uruguay/716/2007(H3N2)とは抗原性が大きく異なる株(HI価で16倍及び32倍の差)であることが明らかになった。さらに、感染研におけるAH3型Infl.V分離株の詳細な抗原性解析の結果、A/Perth/16/2009株と抗原的に類似していることがわかった。

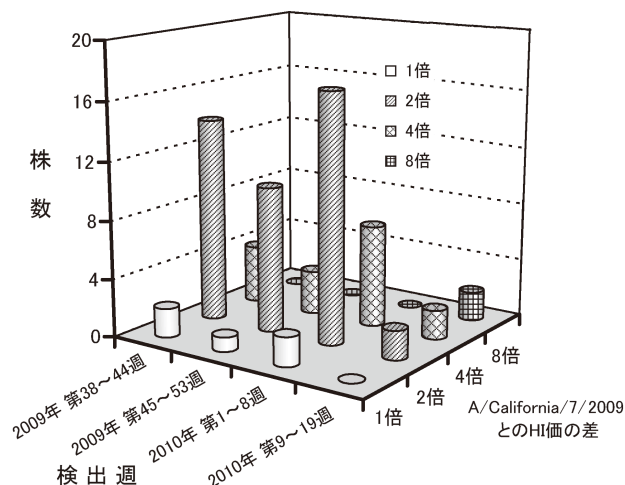


図5 検出時期別のAH1pdm型インフルエンザウイルス分離株の抗原性解析

AH1pdm型ワクチン株のA/California/7/2009株を基準とし、HI試験により抗原性を比較した。

3.4 AH1pdm型Infl.Vのオセルタミビル耐性変異の有無

2009年9月～2010年5月に検出されたAH1pdm型Infl.V計78株についてオセルタミビル耐性変異の有無について検査したところ、2010年1月に美作保健所管内の医療機関で採取された検体より分離された1株のみ

が耐性変異を有することが明らかになった(耐性株出現頻度:1.28%)。なお医療機関への聞き取り調査の結果、耐性株が分離された検体はオセルタミビル治療投与開始5日目に採取されたものであることがわかった。さらに感染研における詳細な解析の結果、当該株のオセルタミビルに対するIC50の値は41.78nMと感受性株(0.10~0.37nM)に比べ高い値を示し、同薬剤に対して耐性を獲得していることが確認された。その一方で、ザナミビルに対しては感受性を保持していた。

4 考 察

2009/10シーズンの岡山県においては、ウイルス検出結果等からメキシコ及び北米で出現したAH1pdm型Infl.Vが県内にも侵入し、本ウイルスにより近年に類をみない大規模な流行が引き起こされたことが明らかになった。AH1pdm型Infl.Vは、いわゆる季節性のAH1型Infl.Vとは抗原性が大きく異なり、またブタ・鳥・ヒトウイルス由来の遺伝子交雑体であることが明らかにされている^{1),5)}。そのため、ほとんどの国民が同ウイルスに対して抗体を保有しておらず⁶⁾、全国的に大規模な流行に至ったものと考えられる。全国情報によると⁷⁾、AH1pdm型流行は2009年第31週に沖縄県で始まり、その後第38週に東京都、第40週には北海道、福岡県、愛知県で定点当たり患者数が相次いで10.0人を超え、その後全国的な流行になったとみられる。また、流行のピークは例年より2ヵ月ほど早い2009年第48週に迎えたこともわかっている。岡山県では、定点当たり患者数が10.0人を超えたのは第43週と、流行が先んじていた地域よりやや遅かったものの、流行のピークは第48週とほぼ全国と同様な傾向であった。

2009/10シーズンの岡山県では3種類のInfl.Vが確認され、その割合はAH1pdm型が84.9%、AH3型が12.6%、及びビクトリア系B型が0.9%であった。また検出時期などから、2009年第27週頃(6月下旬)までは主にAH3型Infl.Vが、それ以降2010年第15週(4月中旬)までは主にAH1pdm型Infl.Vが、さらに第21週(5月下旬)以降はビクトリア系B型Infl.Vがそれぞれ流行していたと考えられた。全国の状況を見ると⁷⁾、AH1pdm型が98.1%、AH3型が0.6%、B型(9割以上がビクトリア系統)が1.3%であり、また流行時期もAH3型→AH1pdm型→ビクトリア系B型の順となるなど、本県と同様な傾向であった。

一方、抗原性解析結果から、県内で分離されたAH1pdm型Infl.V及びビクトリア系B型Infl.Vについては、いずれもワクチン株に類似した抗原性であり、またAH3型Infl.Vはワクチン株のA/Uruguay/716/2007と抗原的に異なることがわかったが、感染研における全国分離株の解析⁸⁾においても、ほぼ同様な結果が得られていた。

2009年4月中旬にメキシコ及び北米で確認されたAH1pdm型Infl.Vが、早くも同年5月9日には成田空港検疫において検知され、その後5月16日に神戸市、ついで5月17日大阪府内で確定例患者の確認があり、兵庫県内、大阪府内の高校を中心にした集団感染が発生した⁹⁾。そこで、地域での学校閉鎖や濃厚接触者に自宅待機を要請するなどの対策が行われた結果、兵庫県内や大阪府内での一般社会への広がりはいったん抑えられた。しかしながら、6月中旬頃から再び大都市を中心に日本各地で患者発生が相次いだ⁹⁾。岡山県でも、国内確定例が初めて確認されたと同時にA型インフルエンザ患者に対するウイルス検査を実施し、6月24日には海外から帰国したインフルエンザ患者からAH1pdm型Infl.Vを初めて検出した。それ以降約1ヵ月間は、海外渡航歴のある患者もしくはその関係者からの検出にとどまっていたが、しだいに国内蔓延地域への旅行歴を有する患者も加わり、8月下旬には感染経路が特定できない患者からもAH1pdm型が検出されるようになった。そして、10月頃より患者数の増加とともに多数のAH1pdm型Infl.Vが検出され、同ウイルスが県内に広く蔓延していったものと思われる。以上のことから、県内においてAH1pdm型の流行が6月下旬~7月下旬の発生初期、7月下旬~8月下旬の拡大期、10月以降の蔓延期と移り変わっていったことがうかがわれた。

今シーズンの患者発生状況を過去の流行と比較したところ、特に学齢期にあたる5~19歳で多数の患者が発生していたことが明らかになった。全国情報でもほぼ同様な傾向を示していたことから⁹⁾、集団生活をする機会が多い年齢層が今回の流行の中心となったことが推察された。その一方で、流行前のAH1pdm型に対する国民の抗体調査では⁶⁾、学齢期とそれ以外の年齢層の間に抗体保有状況の明らかな差はみられていなかったことから、今後の流行においてこれらの年齢層に感染が広がる可能性も考えられる。

県内の AH1pdm 型 Infl.V 株のオセルタミビル(商品名: タミフル)耐性変異について調べたところ、耐性株が 1 例のみ確認されたのみで(耐性株出現頻度 1.28%), 全国調査¹⁰⁾の値(1.13%)と同様に低率であり、また今のところ耐性株が拡大する傾向も見られていない。しかしながら検出された耐性株は、タミフルの治療投与により出現した可能性が強く示唆されたことから、今後同薬剤の使用にともない耐性株が増加してくる可能性も考えられる。さらに、前シーズン流行した季節性の AH1 型分離株のほとんどが耐性株であったことから¹¹⁾、季節性 AH1 型耐性株と AH1pdm 型株との間で遺伝子再集合が起こり、AH1pdm 型耐性株が出現する可能性も否定できない。したがって、今後とも薬剤耐性株の発生状況を監視していくことは重要であると思われる。

文 献

- 1) 国立感染症研究所 感染症情報センター：新型インフルエンザ—パンデミック(H1N1)2009 2009 年 5～9 月, 病原微生物検出情報, 30, 255-256, 2009
- 2) 飛田清毅：MDCK 細胞によるインフルエンザウイルスの分離, 臨床とウイルス, 4, 58-61, 1976
- 3) 根路銘国昭：インフルエンザウイルス, 微生物検査必携, ウイルス・クラミジア・リケッチア検査, 第 II 分冊, 各論 1, 厚生省監修, 第 3 版, 2-24, 日本公衆衛生協会, 東京, 1987
- 4) Nerome, R., Hiromoto, Y., Sugita, S., Tanabe, N., Ishida, M., Matsumoto, M., Lindstrom, S. E., Takahashi, T., Nerome, K.: Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism. Arch. Virol., 143, 1569-1583, 1998.
- 5) 堀本泰介, 山田晋弥, 河岡義裕：新型 H1N1 インフルエンザ—ウイルス学の立場から—, ウイルス, 60, 3-8, 2010
- 6) 多屋馨子, 佐藤 弘, 新井 智, 荒木和子, 山本久美ら：パンデミック(H1N1)2009 に対する国民の抗体保有状況調査—2009 年度感染症流行予測調査より—, 病原微生物検出情報, 31, 260-261, 2010
- 7) 国立感染症研究所 感染症情報センター：インフルエンザ 2009/10 シーズン, 病原微生物検出情報, 31, 248-250, 2010
- 8) 岸田典子, 高下恵美, 藤崎誠一郎, 徐 紅, 伊東玲子ら：2009/10 シーズンの季節性および新型インフルエンザ分離株の解析, 病原微生物検出情報, 31, 253-260, 2010
- 9) 岡部信彦, パンデミックインフルエンザ対策チーム：パンデミック(H1N1)2009 発生から 1 年を経て, 病原微生物検出情報, 31, 250-251, 2010
- 10) 国立感染症研究所 インフルエンザ研究センター第一室, 全国地方衛生研究所, 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター, 独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源情報部門, 新型インフルエンザ(A/H1N1pdm)オセルタミビル耐性株(H275Y)の国内発生状況[第 2 報], 病原微生物検出情報, 31, 174-178, 2010
- 11) 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 野田邦広：岡山県における 2008～2009 年シーズンのインフルエンザ流行について, 岡山県環境保健センター年報, 34, 91-96, 2010

【資 料】

感染症流行予測調査(平成22年度ポリオ感染源調査)

Surveillance of Polio in Okayama Prefecture (2010-2011)

木田浩司, 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 羽原 誠* (ウイルス科)

*保健福祉部健康推進課

Koji Kida, Masako Hamano, Ritsushi Fujii, Mitsutaka Kuzuya and Makoto Habara

要 旨

厚生労働省委託事業である感染症流行予測調査の一環として、ポリオウイルス野生株の進入監視を目的として感染源調査を実施した。岡山市の健康な保育園児60名を対象に、平成22年8月に採取した糞便検体からポリオウイルスの分離を試みたが、全て陰性であり、ポリオウイルス野生株の進入は認められなかった。

[キーワード：感染症, サーベイランス, ポリオウイルス]

[Key words : Infectious disease, Surveillance, Polio virus]

1 はじめに

厚生労働省委託事業である感染症流行予測調査は、予防接種が実施されている様々な感染症に対する集団免疫の把握状況(感受性調査)及び病原体の検索等の調査(感染源調査)を行うことで、総合的に疾病の流行を予測するとともに、予防接種事業の効果的な運用を図ることを目的としている。本年度、岡山県で実施したポリオウイルスの感染源調査はその一環であり、我が国では1993年以降確認されていないポリオウイルス野生株の国内進入を監視するために重要である。

2 材料及び方法

(1) 検体

岡山市内のU保育園の健康な園児60人(0～1歳20人, 2～3歳20人, 4～6歳20人)から、ポリオ生ワクチン投与後2ヶ月以上経過した平成22年8月2日～8月13日の期間に糞便を採取し、試験に供した。

(2) ウイルスの分離

感染症流行予測調査実施要領(平成22年度)及び伝染病流行予測検査術式(平成7年度)¹⁾に従い、FL細胞及びRD18S細胞を使用してウイルスを分離した。

(3) ウイルスの同定

細胞変性効果(cytopathic effect ; CPE)の形態からポリオウイルスの属するエンテロウイルス属であると

推測されたものは、病原体検出マニュアル²⁾の「ヘルパンギーナ」の項に従い、VP4-VP2部分領域のRT-PCRを実施した。次に、Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザ(life technologies社)を用いたダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、DNA Data Bank of Japan (DDBJ)のBLAST検索によって型を同定した。

電子顕微鏡による形態観察でレオウイルス科であると推測された検体については、Learyらの方法³⁾に従い、L1領域のRT-PCR法を実施した後、エンテロウイルスと同様に塩基配列を決定し、BLAST検索によって型を同定した。

CPEの形態からアデノウイルス科であると推測された検体は、病原体検出マニュアル²⁾の「アデノウイルス性結膜炎」の項に従い、FL細胞を用いた中和試験で型を同定した。

3 結果及び考察

表1に本調査で分離されたウイルスを年齢群別に示した。ポリオウイルスの分離はすべて陰性であった。その他のウイルスとしてコクサッキーウイルスA群4型(CA4)2株(2歳児1人, 3歳児1人), コクサッキーウイルスB群1型(CB1)6株(0歳児1人, 1歳児5人), アデノウイルス1型(AD1)1株(1歳児1人), ヒトレオ

表1 年齢群別ポリオ及びその他のウイルス分離成績

年齢群 (歳)	検体数	ウイルス分離					合計
		ポリオ	CA4	CB1	AD1	Reo2	
0～1	20	0	0	6	1	0	7
2～3	20	0	2	0	0	2	4
4～6	20	0	0	0	0	2	2
合計	60	0	2	6	1	4	13

ウイルス2型(Reo2)4株(3歳児2人, 5歳児2人)が分離された。

CA4は岡山県内の感染症発生動向調査では7月に6株, 8月に1株分離され, コクサッキーウイルスA群の中では最も多かった。全国的(平成22年度)には6月～8月に多く検出され, コクサッキーウイルスA群の中では最も報告数が多かった⁴⁾。全国的な分離状況を考えると, 本県にも年度を通じた本ウイルスの広範な浸淫があった可能性が高いと考えられる。

CB1は岡山県内の感染症発生動向調査では7月～11月に16株分離され, コクサッキーウイルスB群の中では最も多かった。全国的(平成22年度)には7月～11月に多く検出され, コクサッキーウイルスB群の中ではCB4に次いで報告数が多かった⁴⁾。全国的な分離状況を考えると, 本県にも年度を通じた本ウイルスの広範な浸淫があった可能性が高いと考えられる。

AD1は岡山県内の感染症発生動向調査(平成22年度)では全く分離されていないが, 全国的には年度を通じて多く分離され, アデノウイルス2型, 3型に次いで3番目に報告数が多かった⁴⁾。全国的な分離状況を考えると,

本県にも年度を通じた本ウイルスの広範な浸淫があった可能性が高いと考えられる。

Reo2は岡山県内の感染症発生動向調査(平成22年度)では全く分離されておらず, 全国的にも報告されていない。これは, ヒトレオウイルスは感染してもほとんどが無症状であり, 感染症発生動向調査は有症者を対象としていることが一因であると考えられる。

本調査は, 第一義的にはポリオウイルスの感染源を特定する目的で実施されるが, 感染症発生動向調査では掴みきれないウイルスの浸淫状況を推察できる点で意義深い。調査の性格上, 短期間に県全域を対象に実施することは困難だが, 今後も継続的な調査が望まれる。

文 献

- 1) 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課・国立予防衛生研究所流行予測事業委員会：伝染病流行予測検査術式, 1995
- 2) 国立感染症研究所他：病原体検出マニュアル
- 3) Leary T.P., Erker J.C., Chalmers M.L., Cruz A.T., Wetzell J.D., Desai S.M., Mushahwar I.K., Dermody T.S.: Detection of mammalian reovirus RNA by using reverse transcription-PCR: sequence diversity within the lambda3-encoding L1 gene, J. Clin. Microbiol. 40 (4), 1368-1375, 2002
- 4) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 結核感染症課：病原微生物検出情報, Vol.32, No.4, 374, 2011

【資 料】

厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価

Validity Evaluation of Simultaneous Method of Residual Veterinary Drugs by
Guideline of The Ministry of Health, Labor and Welfare

大月史彦, 肥塚加奈江, 前田大輔, 山本 淳 (衛生化学科)
Fumihiko Otsuki, Kanae Koeduka, Daisuke Maeda, Jun Yamamoto

要 旨

サルファ剤を主とする動物用医薬品 23 種について, LC/MS/MSを用いて一斉分析する方法について検討を行い, その妥当性について厚生労働省ガイドラインにより評価を実施した。その結果, 本分析法は妥当であると判断できた。なお, 食品の種類によっては回収率が低く, 同位体標準物質による回収率補正が必要となるため, 前処理法の更なる改善が望まれる。しかし, 分析法は妥当であると評価できたので, SOPを作成し, 動物用医薬品検査を実施した。

[キーワード: 動物用医薬品, 妥当性評価, LC/MS/MS法]

[Key words: Veterinary Drugs, Validity Evaluation, LC/MS/MS]

1 はじめに

動物用医薬品は, 家禽等を病気や寄生虫から守るために用いられているが, その食品への残留については, 食品衛生法で基準が設定されており, 平成 18 年 5 月 29 日のポジティブリスト施行以降は, 残留基準が設定されていないものについては, 0.01ppm の一律基準を超えて残留してはならないとされている。

このような経緯と, 県民の食への安全・安心の関心の高まりを踏まえ, 残留動物用医薬品のモニタリング検査を実施することを決定した。

動物用医薬品の分析法としては, 厚生労働省から「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法III(畜水産物)」として, LC/MS/MSを用いる一斉分析法が示され¹⁾ ている。LC/MS/MS法は, 農薬の一斉分析等でも用いられている高い選択性・再現性を持つ有効な手段である。

しかしながら, 示されている分析法は, 水系溶媒であるメタリン酸を多く用いて抽出を行った後, これを濃縮する作業がある等, 作業が煩雑で時間がかかる難点がある。動物用医薬品の一斉分析法の, 特に前処理に関する文献等^{2~4)}では, 有機溶媒と二種類の固相カラムを用いることにより, 簡単かつ確実にクリーンアップを行える方法があったため, これを参考とした。

今回著者らは, 同法を参考として動物用医薬品の一斉

分析法の検討を行い, その妥当性について, 厚生労働省ガイドライン⁵⁾により妥当性評価を実施したので結果を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

市販のエビ, サケ, ホタテ, タコ, イカ, 鶏肉, 豚肉, 牛肉, カニを試料として用いた。

2.2 試薬

1) 動物用医薬品標準原液: β -トレンボロン(和光純薬工業株式会社製)10.00 mg, エトパバート(和光純薬工業株式会社製)10.00 mg, オルメトプリム(和光純薬工業株式会社製)10.00 mg, 酢酸メレンゲステロール(和光純薬工業株式会社製)10.00 mg, スルファキノキサリン(Riedel-deHaën製)10.00 mg, スルファクロルピリダジンナトリウム(和光純薬工業株式会社製)10.81 mg, スルファジアジン(Riedel-deHaën製)10.00 mg, スルファジミジン(和光純薬工業株式会社製)10.00 mg, スルファジメトキシシン(Riedel-deHaën製)10.00 mg, スルファチアゾール(Alfa Aesar製)10.00 mg, スルファドキシシン(Riedel-deHaën製)10.00 mg, スルファニトラン(Riedel-deHaën製)10.00 mg, スルファピリジン(Riedel-

deHaën製) 10.00 mg, スルファメトキサゾール (Riedel-deHaën製) 10.00 mg, スルファメトキシピリダジン (和光純薬工業株式会社製) 10.00 mg, スルファメラジン (Riedel-deHaën製) 10.00 mg, スルファモノメトキシシン-水和物 (和光純薬工業株式会社製) 10.64 mg, ゼラノール (純度 89.6%) (林純薬工業株式会社製) 11.16 mg, チアンフェニコール (和光純薬工業株式会社製) 10.00 mg, トリメトプリム (Riedel-deHaën製) 10.00 mg, レバミゾール塩酸塩 (和光純薬工業株式会社製) 11.78 mg, チアベンダゾール (和光純薬工業株式会社製) 10.00 mg, スルファジアジン-d₄ (林純薬工業株式会社製) 10.00 mg, スルファジメトキシシン-d₆ (和光純薬工業株式会社製) 10.00 mg, スルファチアゾール-d₄ (Toronto Research Chemicals製) 10.00 mg, スルファメトキサゾール-d₄ (林純薬工業株式会社製) 10.00 mgをそれぞれ正確に量り取り, スルファクロルピリダジナトリウムは90%アセトニトリル水溶液で, その他はアセトニトリルで10mLに定容し, 各々1,000 μ g/mLの標準原液とした。このうち, スルファキノキサリン, ゼラノール, チアベンダゾールは冷蔵すると再結晶するので, 使用時に再溶解する等注意が必要であった。

- 2) 動物用医薬品標準液1:1)で調整した標準原液を各々0.1mL取り, アセトニトリルで10mLに定容し, 10 μ g/mLの標準液とした。
- 3) 動物用医薬品標準液2:2)で調整した動物用医薬品標準液1を各々0.1mL取り, アセトニトリルで10mLに定容し, 0.1 μ g/mLの標準液とした。
- 4) 動物用医薬品混合標準液: 動物用医薬品混合標準液PL-2-1 (和光純薬工業株式会社製) 20.0 μ g/mLを0.1mL, 2)で調整した動物用医薬品標準液1のうち, スルファジアジン-d₄, スルファジメトキシシン-d₆, スルファチアゾール-d₄, スルファメトキサゾール-d₄を各々0.2mL取り, 10%アセトニトリル溶液で10mLに定容し, 0.2 μ g/mLの混合標準液とした。
- 5) 動物用医薬品混合添加標準液 (高濃度): 動物用医薬品混合標準液PL-2-1 (和光純薬工業株式会社製) 20.0 μ g/mLを0.25mL, 2)で調整した動物用医薬品標準液1のうち, スルファジアジン-d₄, スルファジメトキシシン-d₆, スルファチアゾール-d₄, スルファメトキサゾール-d₄を各々0.5mL取り, アセトニ

リルで50mLに定容し, 0.1 μ g/mLの混合添加標準液 (高濃度) とした。

- 6) 動物用医薬品混合添加標準液 (低濃度): 動物用医薬品混合標準液PL-2-1 (和光純薬工業株式会社製) 20.0 μ g/mLを0.025mL, 2)で調整した動物用医薬品標準液1のうち, スルファジアジン-d₄, スルファジメトキシシン-d₆, スルファチアゾール-d₄, スルファメトキサゾール-d₄を各々0.5mL取り, アセトニトリルで50mLに定容し, 0.01 μ g/mLの混合添加標準液 (低濃度) とした。
- 7) C18カートリッジカラム: Varian社製のHF MEGA Bond Elut C18 (1g,6mL)を85%アセトニトリル溶液10mLでコンディショニングして用いた。
- 8) アルミナカートリッジカラム: Waters社製のSep-Pak Plus Alumina B (1g,6mL)を85%アセトニトリル溶液10mLでコンディショニングして用いた。
- 9) その他の試薬は特級品及びLC/MS用を使用した。

2.3 装置及び測定条件

1) LC

HPLC: 島津製 LC-20A 高圧グラジエントシステム
カラム: Waters社製 XTerra MS C18 3.5 μ m (2.1 mm I.D. x 15 cm)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

移動相: A液 (0.1%ギ酸水溶液) と B液 (0.1%ギ酸アセトニトリル)

グラジエント条件: A/B=99/1 (0min) \rightarrow 20/80 (35min) \rightarrow 2/98 (40-45min) \rightarrow 99/1 (50-60min)

移動相流量: 0.2mL/min

試料注入量: 5 μ L

保持時間: 表1に示した

2) MS/MS

MS: Applied Biosystems製 API3200 QTrap

インターフェース: Turbo V source

測定法: MS/MSモード

条件1 (ポジティブイオン化) —

イオン化モード: ESI positive mode

イオン源温度: 600 $^{\circ}$ C

イオン化電圧: 5500V

測定イオン (precursor ion/product ion): 表1に示した

条件2 (ネガティブイオン化) —

イオン化モード：ESI negative mode

イオン源温度：500℃

イオン化電圧：-4500V

測定イオン (precursor ion/product ion)：表1に示した

表1 保持時間及び測定イオン (precursor ion/product ion)

No	化合物名	保持時間 /分	測定イオン(定量) /amu	測定イオン(定性) /amu
1	レバミゾール	8.4	205.1/178.2	205.1/91.1
2	チアベンダゾール	9.4	202.1/175.1	202.1/131.0
3	トリメトプリム	9.8	291.1/230.3	291.1/123.0
4	スルファジアジン	9.3	251.0/156.1	251.0/91.9
5	オルメトプリム	10.4	275.1/123.1	275.1/259.3
6	スルファチアゾール	10.0	256.0/155.9	256.0/92.2
7	スルファピリジン	10.3	250.0/92.1	250.0/156.0
8	スルファメラジン	10.8	265.1/92.0	265.1/156.0
9	チアンフェニコール	11.8	355.9/308.0	357.1/73.1
	チアンフェニコール(neg)*		353.9/185.2	353.9/79.0
10	スルファジミジン	12.1	279.1/186.3	279.1/92.1
11	スルファメキシピリダジン	12.5	281.1/156.2	281.1/91.9
12	スルファモメトキシ	13.6	281.0/156.1	281.0/91.9
13	スルファクロピリダジン	14.0	285.0/156.2	285.0/92.1
14	スルファドキシ	14.9	311.0/156.2	311.0/92.0
15	スルファメキサゾール	14.8	254.0/156.0	254.0/92.0
16	エトパベート	17.2	238.0/206.1	238.0/136.0
17	スルファジメトキシ	17.4	311.1/156.0	311.1/92.0
18	スルファキノキサリン	17.6	301.0/155.9	301.0/92.1
19	スルファニトラン	20.7	336.1/134.1	336.1/65.0
	スルファニトラン(neg)		334.0/135.9	334.1/137.1
20	β-トレンボロン	21.7	271.2/115.0	271.2/128.3
21	α-トレンボロン	22.1	271.2/115.0	271.2/128.3
22	酢酸メレンゲステロール	30.3	397.3/337.2	397.3/279.3
23	ゼラノール(neg)	23.2	321.1/277.2	321.1/62.8
	スルファジアジン-d ₄	9.5	255.1/160.1	255.1/95.9
	スルファチアゾール-d ₄	10.2	260.0/159.9	260.0/96.2
	スルファメキサゾール-d ₄	14.9	258.0/160.0	258.0/96.0
	スルファジメトキシ-d ₆	17.4	317.1/156.0	317.1/92.0

* (neg) はネガティブイオン化

2.4 前処理操作

1) 抽出

粉碎した試料約1gを50mLポリプロピレン遠沈管に取り、添加試料には、動物用医薬品混合添加標準液(高濃度)又は(低濃度)1mLを添加混合し、30min静置した。これにアセトニトリル10mL、添加試料については同9mLを加え、2minホモジナイズした。これを3000rpmで5min遠心分離後、上清を20mLビーカーに移した。これに、水1.8mLを加え混合し、クリーンアップ用試料とした。

2) クリーンアップ

コンディショニング済みの固相カラムを上側にC18

カートリッジカラム、下側にアルミナカートリッジカラムとして連結した。1)のクリーンアップ用試料全量を連結カラムに負荷し、負荷液を採取した。次いで85%アセトニトリル溶液8mLを用いて溶出し、先の負荷液と合わせた。これに、1-プロパノール3mLを加え、40℃減圧下で乾固直前まで濃縮し、10%アセトニトリル溶液で1mLに定容後、0.45μmフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

2.5 検量線

検量線は、2.2.4)の動物用医薬品混合標準液0.2μg/mLを10%アセトニトリル溶液を用いて希釈し、0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2μg/mLの混合標準液を調整し、その5μLをLC/MS/MSに注入し、ピーク面積法により検量線を作成した。

3 結果および考察

3.1 LCカラムの選択

HPLCカラムは、化合物等の構造からODSカラムが適していると思料された。

用いた動物用医薬品混合標準液PL-2-1(和光純薬工業株式会社製)の付属データで、Wkosil-II 3C18 HG(和光純薬工業株式会社製)が使用されていたため、これを用いて確認したところ、スルフィド結合を有する物質でテーリングが見られた。そこで、当科において残留農薬検査等に幅広く用いているXTerra MS C18 3.5μm(Waters社製)を用いたところ、良好なピーク形状が得られ、また分離もよくなったため、これを使用することとした。

3.2 移動相条件の選択

移動相は、ピークの分離や圧力等を勘案し、0.1%ギ酸アセトニトリル-0.1%ギ酸水溶液を用いた。

移動相は、2.3.2)のとおり、グラジエントとした。圧力低下を狙い、スタート時のアセトニトリルの割合を1%から5%まで変化させたところ、保持時間の短い高極性物質が保持されなくなったため、アセトニトリル1%でスタートすることとした。

また、試験溶液のアセトニトリルが増加すると、試料の溶解性はよくなるものの、20%以上でピークの分離等が見られたため、最終の定容溶媒は、試料の溶解性とピーク形状の両立ができる10%アセトニトリル溶液とした。

3.3 MS/MS条件の選択

MS/MS条件の最適化はインフュージョンによる測定イオンの選択と、ESIのイオン化条件の選択で行った。

インフュージョンによる測定イオンの選択は、2.2.3)の0.1μg/mL動物用医薬品標準液2を各々用いて行い、表1の結果を得た。

またESIのイオン化条件は、イオン化温度と試験溶液のギ酸の有無を検討したところ、ピーク強度はイオン化温度により異なり、350 << 400 < 500 ≒ 600℃であり、そのばらつきも500～600℃が小さかった。また、ギ酸を含有していると、低濃度域においてイオン化が弱くなる傾向が見られたので、ギ酸は入れないこととした。

3.4 抽出操作とクリーンアップ

抽出操作は文献²⁾を参考に実施した。なお、固相カラムについて、類似の特性を持つ他社製品としてSupelco Discovery DSC-18, Supelco Supelclean LC-Alumina-B(共にSIGMA-ALDRICH社製)も検討したが、本実験においては通液性、操作性、回収率等の点からHF

MEGA Bond Elut C18(Varian社製), Sep-Pak Plus Alumina B(Waters社製)の組み合わせが最適であった。

3.5 妥当性評価試験

妥当性評価試験の結果を表2-1, 2-2に示した。妥当性評価は平成19年11月の厚生労働省が示した妥当性評価に関するガイドライン通知⁵⁾に従い実施した。

妥当性評価は、エビ、サケ、豚肉をそれぞれ甲殻類、魚類、肉類の代表として用いて、1名が1日1回(2併行)を5日間実施する枝分かれ実験計画で行った。また、添加濃度は定量限界(一律基準濃度)である0.01ppmの低濃度と、高濃度として0.1ppmの2種類で実施した。

妥当性評価の結果、エビ、豚肉については、一部で回収率が目標にわずかに達しないものの、回収率、精度ともにおおむね良好な結果であった。

妥当性評価に先立ち、エビ、サケ、ホタテ、タコ、イカ、鶏肉、豚肉、牛肉、カニ、それぞれについて、前処理操作及び測定を行い、今回の動物用医薬品が検出されないブランク試料であることを確認した。このとき、サ

表2-1 妥当性評価試験結果(添加濃度0.01ppm, 低濃度)

No	化合物名	エビ			サケ			豚肉		
		回収率 (%)	併行精 度 RSD (%)	室内精 度 RSD (%)	回収率 (%)	併行精 度 RSD (%)	室内精 度 RSD (%)	回収率 (%)	併行精 度 RSD (%)	室内精 度 RSD (%)
1	レバミゾール	77.5	6.1	8.8	48.4	9.1	16.4	75.2	10.2	10.3
2	チアベンダゾール	84.5	2.3	5.1	82.0	3.2	5.3	92.8	4.0	4.0
3	トリメトプリム	79.6	10.8	10.8	74.0	5.6	8.8	78.6	7.2	7.2
4	スルファジアジン	61.3	4.8	11.6	49.9	11.3	11.3	77.8	7.6	9.7
5	オルメトプリム	77.4	5.1	7.0	75.1	7.1	7.6	60.0	8.7	9.8
6	スルファチアゾール	71.1	7.9	12.6	56.9	4.2	4.3	86.1	6.6	6.6
7	スルファピリジン	82.0	5.3	8.1	73.4	10.0	10.0	101.2	10.2	10.2
8	スルファミラジン	72.1	8.6	8.6	80.7	5.7	5.8	85.3	3.0	5.9
9	チアンフェニコール	84.5	18.0	18.0	99.1	14.3	16.7	79.5	20.6	20.6
	チアンフェニコール(neg)	74.7	4.1	5.2	100.6	10.2	10.2	100.6	10.2	10.2
10	スルファジミジン	92.1	5.4	8.0	81.7	6.5	6.5	87.4	6.5	8.0
11	スルファメキシピリダジン	86.6	4.0	4.0	73.8	4.7	6.9	91.1	8.8	9.2
12	スルファモノメトキシ	104.6	2.9	7.0	75.0	4.0	6.1	106.7	4.9	4.9
13	スルファクロピリダジン	82.3	6.4	7.3	71.3	4.3	10.3	102.3	7.2	7.2
14	スルファドキシ	81.9	3.6	6.4	77.9	5.8	5.8	87.7	6.0	7.1
15	スルファメキサゾール	78.3	4.2	5.5	60.5	4.5	8.9	98.4	5.7	5.9
16	エトバベート	77.8	3.4	4.2	90.5	1.6	2.4	93.7	4.1	4.2
17	スルファジメトキシ	83.2	5.9	6.6	79.9	4.4	5.2	91.1	7.4	7.4
18	スルファキノキサリン	88.7	3.0	5.8	88.4	6.8	6.8	90.2	6.4	6.4
19	スルファニトラン	95.1	8.7	9.0	122.6	11.6	12.8	102.8	11.9	12.0
	スルファニトラン(neg)	89.1	4.7	9.3	103.5	4.2	4.7	103.5	4.2	4.7
20	β-トレネボロン	79.7	10.9	13.8	99.7	12.8	12.8	91.0	7.4	7.4
21	α-トレネボロン	77.5	7.0	8.3	97.2	15.2	15.2	85.9	7.9	8.3
22	酢酸メレンゲステロール	93.4	9.1	9.1	69.6	7.7	7.7	105.9	9.9	9.9
23	ゼラノール(neg)	83.3	3.5	10.1	84.3	3.8	4.2	84.3	3.8	4.2
	スルファジアジン-d ₄	92.6	3.9	7.3	103.1	2.6	3.6	89.4	5.1	5.1
	スルファチアゾール-d ₄	96.0	4.8	7.3	93.2	3.1	4.3	89.2	5.0	5.0
	スルファメキサゾール-d ₄	93.9	2.0	3.5	93.0	2.7	3.1	94.8	3.5	3.5
	スルファジメトキシ-d ₄	100.4	1.8	3.6	99.9	3.1	4.3	91.7	3.2	3.7

はガイドラインの目標値を満足していない。

表2-2 妥当性評価試験結果(添加濃度0.1ppm, 高濃度)

No	化合物名	エビ			サケ			豚肉		
		回収率 (%)	併行精 度 RSD (%)	室内精 度 RSD (%)	回収率 (%)	併行精 度 RSD (%)	室内精 度 RSD (%)	回収率 (%)	併行精 度 RSD (%)	室内精 度 RSD (%)
1	レバミゾール	77.9	2.4	4.9	53.0	23.0	23.0	79.5	12.4	12.4
2	チアベンダゾール	91.9	2.6	2.6	87.1	6.6	6.6	92.3	11.5	12.5
3	トリメトプリム	91.3	5.1	5.1	86.4	4.3	7.5	81.3	12.1	13.5
4	スルファジアジン	82.0	2.4	4.1	73.3	4.8	5.7	89.7	11.5	11.7
5	オルメトプリム	89.4	1.6	4.3	86.4	6.0	8.8	69.1	11.7	14.9
6	スルファチアゾール	90.6	6.7	7.5	82.0	5.7	6.4	83.8	10.3	12.0
7	スルファピリジン	90.7	2.7	4.1	90.0	5.6	6.8	89.3	10.0	11.2
8	スルファミラジン	87.0	3.8	4.7	82.8	6.2	6.2	95.0	12.7	12.7
9	チアンフェニコール	105.5	4.6	5.7	103.0	10.9	10.9	89.0	12.6	12.8
	チアンフェニコール(neg)	87.1	2.7	2.7	86.5	10.7	11.8	96.1	10.0	12.2
10	スルファジミジン	98.9	2.7	4.0	87.1	5.1	6.4	89.3	12.5	12.5
11	スルファメキシピリダジン	93.8	2.3	3.9	85.0	4.1	6.9	87.2	12.4	12.4
12	スルファモノメトキシ	97.4	1.3	3.1	87.4	7.1	7.5	90.3	11.9	12.1
13	スルファクロピリダジン	92.0	1.4	3.8	78.9	6.1	6.8	90.6	10.2	11.6
14	スルファドキシ	95.0	1.7	3.7	87.2	4.7	6.0	90.0	12.3	12.6
15	スルファメキサゾール	93.9	2.5	2.6	86.6	6.7	7.0	93.9	12.6	12.6
16	エトバベート	92.2	0.9	1.5	89.5	8.8	8.8	93.0	13.2	13.2
17	スルファジメトキシ	100.2	1.5	2.0	98.5	6.6	7.3	90.8	12.6	12.6
18	スルファキノキサリン	94.3	2.8	2.8	90.3	4.3	8.9	88.8	12.4	12.4
19	スルファニトラン	111.7	2.3	2.3	107.4	8.4	9.6	102.2	10.5	10.9
	スルファニトラン(neg)	87.0	3.1	3.1	102.7	12.8	13.2	92.0	9.1	9.9
20	β-トレネボロン	95.0	3.6	3.6	91.2	5.3	8.2	87.3	11.9	13.6
21	α-トレネボロン	90.0	4.3	4.3	86.1	6.9	7.0	95.2	15.4	15.4
22	酢酸メレンゲステロール	89.0	2.5	2.7	76.8	8.0	8.0	88.2	17.6	17.6
23	ゼラノール(neg)	83.9	2.4	3.7	82.8	9.6	10.8	86.6	14.3	14.3
	スルファジアジン-d ₄	87.5	4.2	4.2	77.6	5.2	5.3	81.5	12.4	12.4
	スルファチアゾール-d ₄	88.3	3.2	5.4	81.9	5.0	6.8	84.5	11.7	11.7
	スルファメキサゾール-d ₄	88.0	2.6	2.6	84.8	7.5	7.5	88.9	11.1	12.4
	スルファジメトキシ-d ₄	93.8	1.2	1.8	91.8	5.6	7.7	86.9	11.7	12.5

はガイドラインの目標値を満足していない。

ケは特に夾雑物が多く残り、前処理も難しかったことから、最も厳しい条件の検査対象であると思われた。

実際の結果でも、サケは回収率が低いものが多く、上記のブランク試料の確認時の予想と一致する結果となった。ただし、サケは回収率が低いものの、精度は良好であり、サロゲートを使用した場合の目標回収率 40%は満足しているため、サロゲート使用により妥当な分析法であると考えられた。

なお、豚肉の高濃度では、1 実験でサンプルの突沸が起こったため、特異的に回収率が悪くなり、回収率の低下と精度の悪化につながったものと考えられた。

3.6 添加回収試験

添加回収試験 (n=1) の結果を表 3 に示した。添加回収試験は今回妥当性評価未実施の、ホタテ、タコ、イカ、鶏肉、牛肉、カニに、高濃度の 0.1ppm を添加して行った。

表 3 添加回収試験結果 (回収率%) (n=1, 添加濃度 0.1ppm)

No	化合物名	ホタテ	タコ	イカ	鶏肉	牛肉	カニ
1	レバミゾール	82.0	75.8	83.0	72.9	54.5	93.9
2	チアベンダゾール	85.7	77.0	76.1	82.3	75.8	80.5
3	トリメトプリム	99.6	85.1	79.0	85.8	89.2	98.4
4	スルファジアジン	79.2	75.7	74.9	82.0	60.3	73.1
5	オルメトプリム	95.3	80.1	82.0	82.8	72.7	93.2
6	スルファチアゾール	81.4	70.3	73.9	84.9	82.2	81.0
7	スルファピリジン	86.3	71.3	77.7	89.5	86.7	91.7
8	スルファメラジン	83.6	71.2	76.7	83.7	88.0	81.9
9	チアンフェニコール	102.0	109.0	98.5	104.0	90.9	109.0
	チアンフェニコール (neg)	90.8	88.3	91.4	88.1	95.3	93.9
10	スルファジミジン	93.4	81.1	80.6	95.0	91.2	93.8
11	スルファメトキシピリダジン	88.9	74.6	80.8	90.9	90.1	84.2
12	スルファモノメトキシ	90.2	87.1	90.9	91.8	94.9	88.5
13	スルファクロルピリダジン	97.8	84.8	86.0	95.9	90.8	77.3
14	スルファドキシ	95.1	87.1	89.2	95.4	98.0	93.0
15	スルファメトキサゾール	94.1	87.6	85.6	98.1	93.9	90.6
16	エトバベート	88.7	86.8	88.7	88.9	89.6	90.1
17	スルファジメトキシ	104.0	98.4	100.0	105.1	106.1	99.9
18	スルファキノキサリン	92.4	88.0	82.4	87.9	87.8	90.1
19	スルファニトラン	109.7	107.8	104.9	104.9	110.7	114.6
	スルファニトラン (neg)	96.8	95.0	94.1	96.0	99.0	96.7
20	β-トレンボロン	94.5	92.6	98.0	92.3	93.8	93.2
21	α-トレンボロン	91.0	89.1	89.7	89.7	101.0	93.8
22	酢酸メレンゲステロール	89.8	73.1	82.5	84.6	80.8	80.9
23	ゼラノール (neg)	90.1	84.5	87.8	87.4	84.5	87.6
	スルファジアジン-d ₄	75.3	66.3	70.2	78.2	61.2	68.0
	スルファチアゾール-d ₄	83.6	67.8	73.6	84.2	80.9	77.4
	スルファメトキサゾール-d ₄	90.7	80.0	86.7	93.4	88.0	83.3
	スルファジメトキシ-d ₆	92.2	93.4	91.9	100.0	103.9	96.7

はガイドラインの目標値を満足していない。

牛肉で回収率が低い項目があるものの、その他では良好な回収率となっていることから、今後追加で妥当性評価試験を実施し、対象の食品を拡大することが可能であると思われた。

4 まとめ

著者らは、今回 LC/MS/MS を用いて、サルファ剤を主とする動物用医薬品 23 種を一斉分析する方法について検討を行った。また、当該分析法について厚生労働省ガイドラインに基づき妥当性評価を実施し、分析法の妥当性を確認した。食品の種類によっては目標値が満足できないため、クリーンアップ法の更なる改善や同位体標準物質 (サロゲート) の使用が必要であると考えられた。

本結果に基づき、SOP を作成し、実際に行政検査としての動物用医薬品検査を実施した。

〈文献〉

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について、食安発第 0124001 号、平成 17 年 1 月 24 日、2005
- 2) 藤田瑞香, 田口修三, 尾花裕孝：ガラスビーズ粉碎法を用いた LC/MS/MS による畜水産食品中のサルファ剤の分析, 食品衛生学雑誌, 49, 411-415, 2008
- 3) 藤田光穂, 田村航, 戸澤孝大, 米谷俊：動物用医薬品等通知一斉試験法の加工食品への適用, 食品衛生学雑誌, 49, 416-421, 2008
- 4) 甲斐茂美, 赤星猛, 岸美智子：高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を用いた畜産物中の動物用医薬品の分析, 神奈川県衛生研究所研究報告, 36, 19-22, 2006
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて、食安発第 1115001 号、平成 19 年 11 月 15 日、2007

他誌発表論文抄録

Whole-genome characterization of human group C rotaviruses : identification of two lineages in the VP3 gene

Dai Yamamoto, Souvik Ghosh, Mitsutaka Kuzuya, Yuan-Hong Wang, Xuan Zhou,
Mamta Chawla-Sarkar, Shyamal Kumar Paul, Masaho Ishino, and Nobumichi Kobayashi

Journal of general virology, 92 : 361-369, 2011

Group C rotavirus (GCRV) is distributed worldwide as an enteric pathogen in humans and animals. However, to date, whole-genome sequences are available only for a human strain (Bristol) and a porcine strain (Cowden). To investigate the genetic diversity of human GCRVs, nearly full-length sequences of all 11 RNA segments were determined for human GCRVs detected recently in India (v508), Bangladesh (BS347), China (Wu82 and YNR001) and Japan (OH567 and BK0830) and analysed phylogenetically with sequence data for GCRVs published previously. All the RNA segments of human GCRV strains except for the VP3 gene showed high levels of conservation (>93% nucleotide sequence identity, >92% amino acid sequence identity), belonging to a single genetic cluster distinct from those of animal GCRVs. In contrast, the VP3 genes of human GCRVs could be discriminat-

ed into two clusters, designated M2 and M3, that were distinguished phylogenetically from those of porcine and bovine GCRVs (clusters M1 and M4, respectively). Between M2 and M3, amino acid sequence identity of the VP3 gene was 84.1-84.7%, whereas high identities were observed within each cluster (92.3-97.6% for M2, 98.2-99.3% for M3). Sequence divergence among the four VP3 clusters was observed throughout the amino acid sequence except for conserved motifs, including those possibly related to enzyme functions of VP3. The presence of obvious genetic diversity only in the VP3 gene among human GCRVs suggested that either the M2 or M3 VP3 gene of human GCRVs might have been derived through reassortment from an animal GCRV or from an unidentified human GCRV strain belonging to a novel genogroup.

日本紅斑熱の1例：岡山県初発例

川上万里，梅川康弘，田原研司，木田浩司，藤井理津志，岸本壽男

肝臓，Vol.51，714-721，2010

抄録

日本紅斑熱の岡山県初発例を経験した。症例は64才女性。高熱，紅斑，刺し口を有し，肝障害と血小板数の低下を認めた。皮疹が四肢末梢に強いこと，手掌にも認めたことがつつが虫病との鑑別点となった。副作用のため短期間の投与となったが，ミノサイクリンが奏功した。後日ペア血清において抗体価(免疫蛍光抗体法)の

有意な上昇が認められ，痂皮のPCR法では日本紅斑熱DNAが抽出された。本疾患は4類届出感染症であり，近年報告数が増加し，新たに届出をする県が増えている。治療が遅れると致命的となることもあるため，高熱と皮疹を伴う肝障害症例を診た際には常に本症も念頭におき，疑えばすぐに治療を開始することが重要である。

Pre-DICを併発しpolymerase chain reaction (PCR)法で診断したツツガムシ病の1例.

森 志朋, 櫻井英一, 赤坂俊英, 坂田明子, 安藤秀二, 岸本壽男.

臨床皮膚科.64 : 512-516, 2010

抄録

76歳, 女性。初診の2週間前から発熱, 悪寒が出現した。近医で感冒の診断で点滴治療を受けたが, 症状は改善せず, 皮疹も出現してきたため, 当院救急外来を受診した。血液検査上, 肝機能障害と炎症反応があり, 消化器肝臓内科に入院し, スルペラゾン^(R)の投与を開始した。皮疹につき当科に紹介された。右肘窩に黒色痂皮を付す紅斑と, 顔面を含む全身にも紅斑を散見した。血

液検査では, DIC score 6点であり, 自験例をpre-DIC (DIC準備状態)を併発したツツガムシ病と考えた。FOY^(R)に加えて, ミノサイクリン^(R)の点滴を開始したところ, 皮疹, 全身症状とも速やかに改善した。発症から約1か月, 血清抗体価の有意な上昇はなかったが, polymerase chain reaction (PCR)法により *Orientia tsutsugamushi* Karp型と確定した。

Rickettsia heilongjiangensis 国内感染の第一症例の確認経過と感染源調査.

安藤秀二, 坂田明子, 花岡 希, 川端寛樹, 藤田博己, 黒澤昌啓, 斉藤若奈, 矢野泰弘, 高田伸弘, 酒井克朗, 勝見正道, 関根雅夫, 小黒美舎子, 熊谷正憲, 岸本壽男.

病原微生物検出情報.31 : 136-137, 2010

平成20年8月, *R. heilongjiangensis*感染患者が仙台市で確認された。症状は日本紅斑熱と同様に, 発熱と発疹に加え, 刺し口も認められた。刺し口の痂皮を用いたPCRによりリケッチア遺伝子が検出され, そのシーケンス解析から *R. heilongjiangensis*が確定し, IFAとIPAによる抗体価は *R. japonica*と *R. heilongjiangensis*に同程度のIgMおよびIgGの有意上昇が認められた。このことから, 感染推定地域の現地調査を実施した。調査地点は従来の日本紅斑熱が発生するような山林等と明

らかに異なり, 日当たりのよい河川敷で, 北方系のマダニであるイスカチマダニ (*Haemaphysalis concinna*)から *R. heilongjiangensis*が分離同定された。シーケンス解析の結果, 患者のものと一致した。感染推定地域を中心に, マダニ類の経時定点調査を行い, 仙台市内の河川流域に *H. concinna*が優占種として年間を通じて生息, 生活環を成立させていることが確認された。

*H. concinna*が生息する北日本地域においては同様の患者が発生している可能性が示唆される。

リケッチア感染症(つづが虫病・日本紅斑熱)小児科診療

岸本壽男

小児の治療指針 2010 増刊号.73 : 141-142, 2010

リケッチア感染症(つづが虫病・日本紅斑熱)小児科診療について概説した。

つづが虫病, エーリキア症, Q熱, オウム病, 日本紅斑熱, 肺炎クラミジア 感染症日本紅斑熱

岸本壽男

家庭医学大全科 6 訂版 法研 (東京) : 2495-2498, 2010

つづが虫病, エーリキア症, Q熱, オウム病, 日本紅斑熱, 肺炎クラミジア感染症日本紅斑熱の診断治療について概説した。

報 告 書 等

コリネバクテリウムに関する研究

高橋元秀, 中嶋 洋 他

ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究
(厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
平成 22 年度 総括・分担研究報告書, 32-42, 2011

平成 22 年度までの調査結果では, 野外活動時間の多いイヌやネコは本菌を保菌あるいは本菌に感染している可能性が高い。感染した動物からは動物への菌の伝播がおこり感染が成立する。感染動物では排菌量が多いた

めに, 免疫力が低下している人はイヌ, ネコにおいては感染リスクが高いことが考えられる。しかし, 現在までに限られた畜産動物の検体については当該菌は陰性である。

イヌ・ネコにおけるジフテリア毒素産生 *C.ulcerans* の保菌調査状況 —岡山県におけるイヌ・ネコ保菌状況—

中嶋 洋 他

病原微生物検出情報 IASR, Vol.31, 206-207, 2010

2009 年 8 月～9 月にイヌ 27 検体, ネコ 85 検体について調査し, 分離した菌株について Api コリネを用いて同定した。その結果, 1 地区のネコ 4 検体から分離された菌株の Glycogen の分解は陰性となり, Api コリネでは *C.pseudotuberculosis* と判定された。他の異なる地区のネコ 1 検体から分離された菌株は *C.ulcerans* と同定された。これらの菌株はいずれもジフテリア毒素原性試験

が陽性 (Tox⁺) であった。しかし, Api コリネで *C.pseudotuberculosis* と同定された 4 株について *rpoB* 遺伝子の塩基配列解析を実施した結果, *C.ulcerans* の配列と 100% 一致した。したがって, *rpoB* 遺伝子の塩基配列の結果からこれら 5 株は最終的に *C.ulcerans* と同定され, ネコ 85 検体中 5 検体 (5.9%) から *C.ulcerans* Tox⁺ を分離した。

食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究

中嶋 洋, 大島律子, 石井 学 他

食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究
(厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
平成 22 年度 総括・研究分担報告書, 116-124, 2011

中四国ブロックでは, 平成 22 年度はパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) と IS-printing System による腸管出血性大腸菌 O157 菌株の精度管理と, 各県で発生した事例においてこれらの分子疫学手法を応用して解析し, その有用性を評価した。精度管理では各施設とも両方法によりほぼ同様の結果を示しおおよそ良好であったが, 一部の施設において IS-printing System により他の施設と異なったバンドが増幅されたり, 増幅バンドのコード化に単純なミスが見られた。今後もより安定した結果を得るために, 精度管理の必要性が示され

た。各県の事例発生において, IS-printing System は簡単・迅速な疫学解析ツールとして有用性が再確認され, 特殊な機器も不要なことから保健所の検査課などで充分活用できる方法であり, さらに応用の場が広がるものと考えられる。昨年度一部の県で検討した MLVA 法については特別な機器が必要であるため, 今後機器の整備ができた県を加えて検討していく予定である。また, 本年度はインターネット経由で国立感染症研究所に設けた PFGE データ用サーバーへのアクセスを検討し, 接続可能であることを確認した。

同一飲食店利用者における腸管出血性大腸菌 O157 : H7 VT1,2 感染症の続発事例について

大島律子, 石井 学

食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究
(厚生労働科学研究補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
平成 22 年度 総括・研究分担報告書, 125-126, 2010

平成 22 年 9 月～10 月にかけて, 岡山県内の飲食店 D 店の利用者およびその家族が相次いで腸管出血性大腸菌 O157 : H7 VT1,2 に感染したため, 患者等分離株の分子疫学解析を実施した。8 名から分離された株は, PFGE 法および IS-printing system により 3 つの型に分

類され, 各型の検出時期は D 店での喫食時期と相関があった。従って, 今回の続発事例は, 単一ではなく複数の腸管出血性大腸菌 O157 : H7 VT1,2 による感染が D 店を介して発生したものと推察された。

腸管出血性大腸菌 O157 の IS-printing System を用いた分子疫学解析

石井 学, 大島律子, 中嶋 洋

食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究
(厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
平成 22 年度 総括・研究分担報告書, 127-131, 2011

平成 22 年度に岡山県内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 株 31 株について, IS-printing System を用いて分子疫学解析を行なった結果 16 のパターンに分類され, 疫学的な関連が見られた菌株は同じパターンを示した。また, 多検体を同時に解析する手法として, 昨年が続いてマイクロチップ電気泳動法の適用の可能性について

検討した。マイクロチップ電気泳動法は少数の増幅バンドの解析には適しているが, 多数の増幅バンドの解析や増幅バンドのサイズが接近している場合は, 増幅バンドのサイズを正確に判定できないため, IS-printing System に適用することは難しいと思われた。

浴槽水等のレジオネラ属菌検出状況と迅速検査法の検討 (平成 22 年度)

中嶋 洋

公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究
(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)
平成 22 年度 総括・分担研究報告書, 78-88, 2011

平成 22 年度は浴槽水等 30 検体について, 迅速検査法 (リアルタイム PCR 法, 逆転写反応後のリアルタイム PCR 法および MWY 液体培地を用いた生菌を検出するリアルタイム PCR 法) と培養法を併用してレジオネラ属菌の検査を行った。培養法では浴槽水 30 検体中 8 検体 (26.7%) からレジオネラ属菌が検出され, それらの菌種および血清群は *L.pneumophila* 1 群, 5 群, 6 群, 8 群, 9 群, 型別不能 (UT) と *L.gormanii* で, 3 検体は複数の血清群の菌が検出された。迅速検査法の検出率を比較す

ると, 逆転写反応後のリアルタイム PCR 法 (46.7%), リアルタイム PCR 法 (43.3%), MWY 液体培地を用いた生菌を検出するリアルタイム PCR 法 (23.3%) の順に高かったが, 培養法と各検査法の間で両法ともに陽性の検体における定量値の相関は, MWY 液体培地を用いた生菌を検出するリアルタイム PCR 法 ($R^2=0.713$) が培養法と最も強い相関を示した。今後培養法の陽性結果との定性的な一致率を向上させるための検討が必要と考える。

岡山県におけるA群ロタウイルス検出状況と血清型分布の最近の動向

葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志, 岸本壽男 (岡山県環境保健センター)
金谷誠久, 西村恵子 (独立行政法人国立病院機構 岡山医療センター)

病原微生物検出情報, Vol.32, 71-72, 2011

岡山県内におけるA群ロタウイルス(ARV)流行状況を把握するため, 2004年9月~2010年8月までの6シーズンにウイルス性胃腸炎を疑う患者から, できるだけバイアスのかからない形で採取された1,975検体の糞便を検査対象とし, 市販キットによりARV検査を行うとともに, 陽性例について逆転写PCR法もしくはシーケンスによりG型を同定した。検査の結果, 485検体(24.6%)からARVが検出された。検出率にシーズンによる大きな変動はみられなかった。ARVはシーズンを問わず年明けより検出され始め, 3~4月頃に検出ピークが認められた。ARV陽性485検体のG型別を行った結果, 6シーズンを通してのG

型別相対頻度はG3型(38.8%), G1型(31.3%), G9型(21.9%), G2型(7%), G4型(0.4%)の順であった。シーズン別の優占G型は, 2004/05, 2008/09及び2009/10シーズンがG3型, 2005/06及び2007/08シーズンがG9型, 及び2006/07シーズンがG1型であり, 一般にG1型が優占であるというこれまでの状況とは異なっていた。最近6シーズンの岡山県におけるARV流行は, ウイルス検出率に大きな変動は認められなかったが, シーズンにより優占G型がめまぐるしく変化していることが明らかになった。特に近年ではG3型及びG9型の増加傾向が顕著であり, これらのウイルスの流行動向には十分な注意が必要である。

Q熱コクシエラの生態系における感染リスク評価に関する研究

岸本壽男, 木田浩司, 葛谷光隆, 濱野雅子, 中嶋 洋, 藤井理津志 他

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
ワンヘルズ理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究 総括・分担研究報告書, 11-13, 2011

Q熱コクシエラの生態系における感染リスク評価に関する研究の一環として、昨年に引き続き、ウシにおける *Coxiella burnetii* の抗体保有率および遺伝子検出率について検討した。これまでにヒト、イヌ、ネコを対象に疫学調査を実施したが、抗体陽性率は過去に報告された値と比較して低かった。しかし昨年、北海道の5牧場のウシ 431 頭について疫学調査を実施したところ、陽性率は 10.4% であり、一定の感染リスクが疑われた。そこで、今回は津山市食肉処理センターに全国から搬入された食用ウシを対象に、抗体疫学調査と遺伝子疫学調査を実施した。検体については岡山県食肉衛生検査所の協力を得て、2009 年から 2010 年に津山市食肉処理センターへ食用として搬入されたウシ 266 頭(健康牛 141 頭及び病畜 125 頭)から採取した血清と全血を対象とした。血清抗体価は、昨年同様に抗原として *C. burnetii* 感染 BGM

細胞を用い、間接蛍光抗体法にて測定し、封入体と細胞質内粒子の染色像を確認したものを陽性、封入体のみの染色像を確認したものを擬陽性とした。遺伝子検出は全血から抽出した DNA を用いて Real-time PCR で実施した。その結果、血清抗体価陽性を示した検体はなく、遺伝子も全検体陰性であった。抗体価の擬陽性は 3% 程度に見られたが、健康牛、病畜の差はなく、地域別、年度別でも大きな差は認めなかった。擬陽性の判定については、*C. burnetii* に特異的な抗体とは判定できないため、今回の結果からは、国内の食用ウシの *C. burnetii* 侵淫率は低く、感染リスクとしては高くないものと考えられた。今後さらにウシの数を増やして検討するとともに、他の家畜や野生動物についても検討することが必要と考えられた。

本邦における環境中における A 型肝炎ウイルスの侵淫状況

田中智之, 入谷展弘, 石橋哲也, 山下育孝, 阿部勝彦, 飯塚節子, 田村 務,
吉田徹也, 小原真弓, 葛谷光隆, 内野清子, 石井孝司

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業): A 型肝炎発生報告増加に対する食品衛生上の原因究明と予防対策, 2011

2010 年春季の A 型肝炎多発の原因究明の一助とするために A 型肝炎ウイルス(HAV)の本邦への汚染状況について、カキ関連ノロウイルス感染食中毒事例、市販カキ等における HAV 汚染実態、下水処理施設での流入水・放流水について HAV 遺伝子の検出を試みた。その結果、

カキ関連ノロウイルス感染食中毒事例および市販カキから HAV 遺伝子は検出されなかった。しかし、2010 年 5 月の下水処理施設流入水から HAV 遺伝子が検出された。コピー数は 5copy/mL であった。AJ299464 NOR-21/Norway_3A 株と 95% の相同性がみられた。

学 会 発 表

No.	題 名	発 表 者	学 会 名
1	肺炎クラミジア感染症の疫学と診断の問題点	岸本壽男	第50回日本呼吸器学会
2	水質中農薬類の一斉分析	浦山豊弘	第19回環境化学討論会
3	急性感染性電撃性紫斑病を合併した日本紅斑熱症例の臨床ならびに関連する疫学情報について	岸本壽男, 木田浩司, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志 ほか	第25回中四国ウイルス研究会
4	リステリアの汚染状況について	石井 学	第56回中国地区公衆衛生学会
5	ほうれん草のウラン吸収について	森上嘉亮	2010 日本放射化学会 年会 ・ 第54回放射化学討論会
6	岡山県におけるイヌのA群ロタウイルス保有状況と性状解析	葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 木田浩司, 岸本壽男	平成22年度獣医公衆衛生学会中国地区学会
7	岡山県における紅斑熱群リケッチア侵淫状況	木田浩司, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 高田伸弘, 藤田博己	平成22年度獣医公衆衛生学会中国地区学会
8	ズーノーシス・医師からのアプローチ オウム病・Q熱を例に	岸本壽男	第10回人と動物の共通感染症研究会学術集会
9	紅斑熱群リケッチアの岡山県におけるサーベイランス	木田浩司, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 高田伸弘, 藤田博己	第65回日本衛生動物学会 西日本支部大会

No.	題 名	発 表 者	学 会 名
10	岡山県におけるP[8]サブタイプb型A群ロタウイルスの流行状況について	葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志	第58回日本ウイルス学会学術集会
11	全国大会・老健医療研究会共催進シンポジウム「老健施設の感染症対策」 1. インフルエンザと感染症胃腸炎	岸本壽男	第21回 全国介護老人施設大会
12	2009年冬季～2010年春季の岡山県における手足口病の流行	濱野雅子, 葛谷光隆, 木田浩司, 藤井理津志, 岸本壽男	第60回日本感染症学会西日本地方会学術集会
13	o-トルイジン, 1-メチルナフタレン, 2-メチルナフタレン (水質) の分析	吉岡敏行	平成22年度 化学物質環境実態調査 環境科学セミナー
14	L-チロキシン及び3,3', 5-トリヨード-L-チロニン (L-チロキシンの代謝物) (水質) の分析	浦山豊弘	平成22年度 化学物質環境実態調査 環境科学セミナー
15	1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリオクチル (水質) の分析	浦山豊弘	平成22年度 化学物質環境実態調査 環境科学セミナー
16	岡山県に生息するヌートリア及び付着マダニにおけるリケッチア保有状況	木田浩司, 中本 敦, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 城ヶ原貴道, 小林秀司	第3回日本リケッチア臨床研究会・第17回リケッチア研究会合同研究発表会
17	食肉処理場に搬入された牛のQ熱コクシエラ汚染実態調査	木田浩司, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 福士秀人, 大屋賢司	第3回日本リケッチア臨床研究会・第17回リケッチア研究会合同研究発表会
18	岡山県公共用水域データベースの構築と汚濁負荷量	鷹野 洋	第45回日本水環境学会年会

岡山県環境保健センター年報 第35号

(平成22年度)

平成24年2月29日発行

編集・発行 岡山県環境保健センター
〒701-0298 岡山市南区内尾739-1
TEL(086)298-2681(代表) FAX(086)298-2088

ホームページ http://www.pref.okayama.jp/soshiki/kakuka.html?sec_sec1=185
