

# わが国で発生した *Salmonella*. Enteritidisによる食中毒の症状 及び潜伏時間の解析

## Analysis of Clinical Symptoms and Incubation Period of Food Poisoning Patients Caused by *Salmonella* Enteritidis

阿部 和男 渡辺 丈夫

Kazuo ABE, Takeo WATANABE

キーワード：サルモネラ，食中毒，症状，潜伏時間

Key Words : *Salmonella* , Food Poisoning , Clinical Symptoms , Incubation Period

1982～1995年までにわが国で発生した *Salmonella* Enteritidisを原因物質とする203事件を収集・整理し，食中毒事件別の患者の症状（下痢・嘔吐・発熱）の発生率及び潜伏時間について，学校給食・保育園給食とそれ以外の調理業態の2群に区分して解析した。その結果，学校給食・保育園給食を原因とする *S. Enteritidis*食中毒の各事件の多発潜伏時間の平均値はそれ以外の調理業態より有意に長かった。そこで今回，2群別の症状及び潜伏時間の特徴を表した原因菌種推定表を作成し解析に用いた。これによって学校給食・保育園給食ではその他の調理業態を原因とする *S. Enteritidis*食中毒より下痢の発生率は低く，かつ激しい症状を呈する患者の割合が低い事件が多いことが分かった。しかし，高い熱を呈する者の割合はやや高い傾向がみられた。このことから，学校給食・保育園給食の食中毒の原因究明に当たっては，長い潜伏時間と比較的軽度な下痢症状を呈するサルモネラ食中毒を考慮して調査する必要があると考えられる。

### 1 はじめに

1990年以降，わが国ではサルモネラ属菌による食中毒は著しく増加しており，その食中毒予防対策は食品衛生上重要な課題となっている。特に，患者発症の何日前まで遡って原因究明調査を実施すべきかを判断するための根拠となる食中毒の潜伏時間についての知見は，食中毒対策上重要である。しかし，サルモネラ属菌による食中毒の潜伏時間は一般的に8～48時間<sup>1)</sup>とされているにもかかわらず，わが国の小中学校及び保育園の給食（以下学校給食とする）を原因とするサルモネラ属菌による食中毒では，患者の平均潜伏時間が60～120時間と非常に長い事件が多く発生しており，本菌による潜伏時間についてはさらに検討が必要と思われる。

筆者らは，これまでに食中毒の原因究明のための疫学調査での活用を目的として過去の食中毒の疫学データ（原因菌種・患者の症状・潜伏時間等）を収集，整理及び解析し，原因菌種別に食中毒患者の症状及び潜伏時間の特徴を表した原因菌種推定表を作成し報告した<sup>2,3)</sup>。しかし，前報では学校給食を原因とする潜伏時間の長いサルモネラ食中毒については十分，解析されていないことからこれらを除いて集計し解析した。今回，*S. Enteritidis*食中毒について，学校給食とその他の調理業態による食中毒とを区分し，2群別の症状及び潜伏時間の特徴を表した原因菌種推定表を作成・解析した結果，若干の知見を得たので報告する。

### 2 材料及び方法

#### 2.1 事件データの収集

推定表の作成には，宮城県内で発生した食中毒事件の調査報告書，全国の都道府県及び政令指定都市から提供を受けた食中毒事件調査報告書の中で，症状（下痢・嘔吐・発熱）と潜伏時間が調査されている *S. Enteritidis*による単一暴露と推定された203事件を対象とした。次に，これらの食中毒事件について学校給食とそれ以外の調理業態（飲食店，旅館，病院給食，社会福祉施設，食品製造業，事業所，家庭）を原因とする食中毒の2群に区分して解析した。なお，調査項目別の調査件数を表1に示す。

表1 *S. Enteritidis*食中毒事件データの収集

調理実態	各症状の発生率 の調査件数	下痢・嘔吐の回数， 発熱体温の調査件数			潜伏時間 調査件数
		下痢	嘔吐	発熱	
学校・保育園給食	47	17	13	18	43
その他の調理業態	156	92	82	91	128
合計	203	109	95	109	171

#### 2.2 学校給食とそれ以外の調理業態を原因とする食中毒事件の多発潜伏時間の比較

学校給食とそれ以外の調理業態別に多発潜伏時間を算出し各群間で比較した。各群間における比較は一元配置

分散分析を用い、有意水準は危険度 1%未満( $P < 0.01$ )とした。なお、多発潜伏時間の算出方法については、項目 2.4.1 で示す。

2.3 各症状(下痢、嘔吐、発熱)の発生率別の事件構成割合と数値・記号化

各事件ごとに下痢・嘔吐・発熱を示した患者の割合、及びこれらの症状の程度(強度)について学校給食とそれ以外の調理業態別に解析した。

2.3.1 下痢発生の事件構成割合

S. Enteritidisによる各食中毒事件において、下痢を示した患者数の割合を下痢発生率として求め、これに従って事件を10%ごとに学校給食とその他の調理業態別に区分した。次に、下痢発生率に基づいて区分された事件の構成割合を求め、この事件の構成割合を、事件が全く見られない0%を(N)、2%未満(n)、2~5%未満(0)、 $10 \pm 5\%$ (1)、 $20 \pm 5\%$ (2)、以下同様に・・・ $80 \pm 5\%$ (8)、 $90 \pm 5\%$ (9)として数値・記号化した(表2)。なお、事件構成割合の数値・記号化においては、一部補正を行った(補正方法については、項目2.5.1で示す)。また、下痢患者の中で5回以上の下痢を示した者の割合を「5回以上の下痢発生率」として下痢強度の指標とし、下痢発生率の場合と同様に事件を区分し、各事件構成割合を算出して、それらを数値・記号化した(表2)。

2.3.2 嘔吐発生と事件構成割合

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

2.3.3 発熱発生と事件構成割合

発熱(37.0以上を示した者)を示した患者の割合を発熱発生率として求め、発熱発生率に基づいて区分された事件の構成割合を算出して、それらを数値・記号化した。また、発熱を示した患者の中で38.0及び39.0以上の発熱を示した割合をそれぞれ「38以上の発熱発生率」及び「39以上の発熱発生率」として求め、これに基づいて区分された各事件の構成割合を算出して、それらを数値・記号化した(表3)。

2.4 多発潜伏時間別の事件構成割合と数値・記号化

2.4.1 多発潜伏時間

各食中毒事件において、潜伏時間(3時間ごと)別に患者数を区分して、それに基づく患者発生率を求め、患者発生の最も多い潜伏時間を多発潜伏時間とした。なお、患者多発のピークが複数みられる場合には、患者発生が最も多い潜伏時間の区分の患者発生率が他のピークの発生率に比べ、5%以上高い場合にのみ多発潜伏時間とした。また5%以下の場合、両方の区分の中央値を多発潜伏時間として表した。

表2 学校給食・保育園給食施設におけるS. Enteritidis食中毒の下痢発生率に基づく事件構成割合と数値・記号化

下痢発生率 (%)	下痢発生			5回以上下痢発生		
	事件数	事件構成割合 (%)	数値・記号化	事件数	事件構成割合 (%)	数値・記号化
100	2	4.3	0	0	0	N
90~<100	9	19.1	2	0	0	N
80~<90	11	23.4	2	0	0	N
70~<80	8	17.0	2	1	5.9	1
60~<70	7	14.9	1	3	17.6	11.8*1
50~<60	7	14.9	1	1	5.9	11.8
40~<50	2	4.3	0	8	47.1	5
30~<40	0	0	n	2	11.8	1
20~<30	1	2.1	1.1	0	11.8	1
10~<20	0	0	N	0	0	N
0~<10	0	0	N	0	0	N
0	0	0	N	0	0	N
合計	47	100		17	100	

\* 1 (補正1) 下痢発生率30~<40%で事件構成割合は0%、発生率20~<30%で事件構成割合2.1%であることから、項目2.5.1の補正方法によりこれらを平均して表した。5回以上下痢発生率も同様に平均して表した。

表3 学校給食・保育園給食以外の調理業態におけるS. Enteritidis食中毒の発熱発生率に基づく事件構成割合の数値・記号化

下痢発生率 (%)	発熱発生			38以上の発熱発生		
	事件数	事件構成割合 (%)	数値・記号化	事件数	事件構成割合 (%)	数値・記号化
100	9	5.8	1	2	2.2	N
90~<100	23	14.7	1	12	13.2	15.9*1
80~<90	33	21.2	2	17	18.7	15.9
70~<80	29	18.6	2	16	17.6	1
60~<70	27	17.3	2	20	22.0	1
50~<60	18	11.5	1	16	17.6	1
40~<50	11	7.1	1	5	5.5	5
30~<40	4	2.6	0	3	3.3	1
20~<30	1	0.6	n	0	0	1
10~<20	1	0.6	n	0	0	N
0~<10	0	0	N	0	0	N
0	0	0	N	0	0	N
合計	156	100		91	100	

\* 1 (補正1) 項目2.5.1の補正方法により平均して15.9%とした。

2.4.2 多発潜伏時間と事件構成割合

学校給食以外の調理業態を原因とする食中毒については多発潜伏時間に基づいて事件を区分し、さらにそれらの事件構成割合を求め、数値・記号化した(表4)。

事件構成割合の数値・記号化においては、一部補正を行った(補正方法については、項目2.5.2で示す)。

なお、多発潜伏時間による事件数(事件構成割合)は一般に正規分布を示すが、今回、収集した学校給食を原因とする食中毒については、広範囲の潜伏時間で発生している上に件数が少なく、正規分布としての分布が不明確なために事件構成割合の数値・記号化は行わなかった。

表4 学校給食・保育園給食以外の調理業態におけるS. Enteritidis食中毒の多発潜伏時間に基づく事件構成割合と数値・記号化

多発潜伏時間	事件数	事件構成割合(%)	数値・記号化
6 ~ < 9	0	0	N
9 ~ < 12	14	10.9	8.6*2
12 ~ < 15	8	6.3	8.6
15 ~ < 18	11	8.6	1
18 ~ < 21	19	14.8	1
21 ~ < 24	22	17.2	2
24 ~ < 27	15	11.7	1
27 ~ < 30	7	5.5	6.6*2
30 ~ < 33	10	7.8	6.6
33 ~ < 36	4	3.1	3.9*2
36 ~ < 39	5	3.9	3.9
39 ~ < 42	6	4.7	3.9
42 ~ < 45	2	1.6	0.9*2
45 ~ < 48	0	0	0.9
48 ~ < 51	0	0	0.9
51 ~ < 54	1	0.8	0.9
54 ~ < 57	2	1.6	0.9
57 ~ < 60	2	1.6	0.9
60 ~ < 63	0	0	N
合計	128	100	

\* 2(補正2)多発潜伏時間9 ~ < 12の事件構成割合は10.9%、12 ~ < 15の事件構成割合は6.3%であることから、項目2.5.2の補正方法によりこれらを平均して表した。その他の区分でも正規分布に基づいて同様に平均して表した。

2.5 事件構成割合の補正と数値・記号化

2.5.1 各症状別による事件構成割合の補正と数値・記号化

下痢、嘔吐及び発熱を示した患者数の割合、及びこれらの各症状の程度(強度)による症状発生率については、各発生率における事件数(事件構成割合)は一般にほぼ正規分布を示しており、この分布を示さない場合、事件構成割合を平均して表した(表2の補正1)。

2.5.2 多発潜伏時間による事件構成割合の補正と数値・記号化

多発潜伏時間による事件が正規分布を示さない場合、事件構成割合を平均して数値・記号化した(表4の補正2)。

3 結 果

3.1 学校給食とそれ以外の調理業態における多発潜伏時間の比較

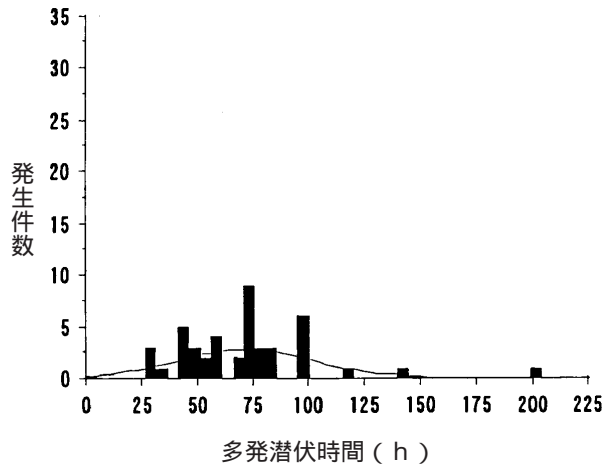
学校給食を原因とするS. Enteritidis食中毒の多発潜伏時間の平均値は71.6時間(27.0時間 ~ 204.0時間)で、それ以外の調理業態の24.1時間(7.0時間 ~ 59.0時間)より有意に長かった(表5、図1)。

表5 学校給食・保育園給食とその他の調理業態におけるS. Enteritidis食中毒の多発潜伏時間

	事例数	多発潜伏時間の平均値±標準偏差(h)	範囲(h)
学校・保育園給食	43	71.6±31.2	27.0~204.0
その他の調理業態	128	24.1±10.7*	7.0~59.0
合計	171	-	-

2群間の比較はANOVAを用いた後、Scheffeを使用して行った。\*P値<0.01

(A)学校給食・保育園給食(43件)



(B)その他の調理業態(飲食店、病院、家庭等)(128件)

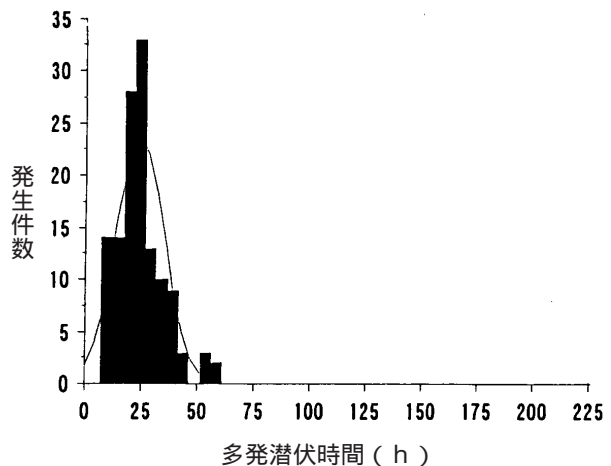


図1 学校給食・保育園給食とその他の調理業態におけるS. Enteritidis食中毒の多発潜伏時間

3.2 症状及びその強度に基づく事件構成割合の数値・記号化による原因菌種推定表

各症状における発生率に対応した事件構成割合について、学校給食とそれ以外の調理業態との2群に区分し、それぞれ原因菌種推定表を作成した。

3.2.1 学校給食におけるS. Enteritidis食中毒の事件構成割合

- ① 患者の下痢発生率が70～<100%の各区分で、S. Enteritidis食中毒事件の60%前後(数値合計6)が発生しており、高い下痢発生率を呈する事件がやや多い。また、下痢患者の中で5回以上の下痢を呈する者の割合が50%未満の事件は、S. Enteritidis食中毒事件の70%前後(数値合計7)にみられ、激しい下痢を呈する者の割合は高い事件は多とは言えない(表6)。
- ② 嘔吐発生率が0～<20%の事件がS. Enteritidis食中毒事件の80%前後(数値合計8)にみられ嘔吐発生率はかなり低い事件が多い。また、すべての事件で嘔吐患者の中の5回以上を呈する者が20%未満であり、激しい嘔吐を呈する者の割合が低い事件が大半である(表6)。
- ③ 発熱発生率が60～<80%の事件がS. Enteritidis食中毒事件の60%前後(数値合計6)にみられ高い発熱発生率の事件がやや多い。また発熱を呈する患者の中で38以上の発熱がみられる患者の割合が50～<80%の事件が事件全体の80%前後(数値合計8)だったが、38以上の患者の割合が90%以上の事件や39以上の患者の割合が40%以上の事件は1件もなかった(表6)。

3.2.2 学校給食以外の調理業態におけるS. Enteritidis食中毒の事件構成割合

- ① 患者の下痢発生率が90～<100%の各区分で、S. Enteritidis食中毒事件の50%前後(数値5)、80～100%の各区分では事件の80%前後(数値合計8)がこの区分で発生しており、学校給食よりも高い下痢発生率を呈する事件が多い。また、下痢患者の中で5回以上の下痢を呈する者の割合が50～<90%の事件は、事件全体の80%前後(数値合計8)もみられ、激しい下痢を呈する者の割合が高い事件が多い(表7)。
  - ② 嘔吐発生率が0～<30%の事件がS. Enteritidis食中毒事件の70%前後(数値合計7)にみられ嘔吐発生率は低い事件が多い。また、嘔吐患者の中で5回以上を呈する者が0%の区分では事件の30%前後(数値3)、10～<30%の区分では事件の40%前後(数値合計4)で軽い嘔吐を呈する事件が多いが、30～<60%の区分でも事件の30%(数値合計3)もみられ、嘔吐の強度のやや強く現れた事件も散発している(表7)。
- 発熱発生率が60～<90%の事件がS. Enteritidis食中毒事件の60%前後(数値合計6)にみられ高い発熱発生率の事件が多い。また発熱を呈する患者の中で38以上の発熱がみられる患者の割合が50%以上の事件が大半で、38以上の患者の割合が80%以上の区分では事件の40%前後(数値合計4)、39以上の患者の割合が40～<70%の区分で事件の30%前後(数値合計3)を占めており、高い発熱を呈する事件が多い(表7)。

表6 学校給食・保育園給食施設におけるS. Enteritidis食中毒の各症状に基づく事件構成割合の一覧表

各症状の発生率(%)	下痢・嘔吐・発熱発生率に基づく事件構成割合			下痢・嘔吐・発熱の症状の強度に基づく事件構成割合			
	下痢	嘔吐	発熱	5回以上の下痢発生率	5回以上の嘔吐発生率	38以上の発熱発生率	39以上の発熱発生率
100	0	N	N	N	N	N	N
90～<100	2	N	0	N	N	N	N
80～<90	2	n	1	N	N	1	N
70～<80	2	n	4	1	N	2	N
60～<70	1	n	2	1	N	3	N
50～<60	1	n	1	1	N	3	N
40～<50	0	n	1	5	N	1	N
30～<40	n	0	1	1	N	n	3
20～<30	n	1	0	1	N	n	5
10～<20	N	6	0	N	6	n	2
0～<10	N	2	N	N	3	N	1
0	N	0	N	N	1	N	N

表7 学校給食・保育園給食施設以外の調理業態におけるS. Enteritidis食中毒の各症状に基づく事件構成割合の一覧表

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

### 3.3 多発潜伏時間に基づく事件構成割合の数値・記号化による原因菌種推定表

学校給食以外の調理業態による*S. Enteritidis*食中毒について、区分された潜伏時間に対応した多発潜伏時間別の事件構成割合を数値・記号化して表4に示した。多発潜伏時間が21～<24時間で、事件の20%前後と最も多いが、7～<33時間に大半の事例が分布している。

## 4 考 察

学校給食を原因とする*S. Enteritidis*食中毒では、それ以外の調理業態によるものと比較すると多発潜伏時間は有意に長く、一方、下痢発生率や下痢患者中の5回以上の下痢を呈する者の割合が低い事例が多いことが分かった。嘔吐については2群ともに軽い事例が多く大きな差はみられなかったが、学校給食以外の調理業態では嘔吐患者中の5回以上の嘔吐を示す患者の割合が30～<60%に事例全体の30%前後分布するなど、嘔吐の強度の強く現れた事例も散発している。発熱については2群とも発熱発生率が高い事例が多いという共通点がみられたが、学校給食以外の調理業態では39以上の発熱発生率が40～<70%の事例が事例全体の30%前後にみられるなど、高熱を呈する患者の割合が高い事例が散発している点で学校給食との差がみられる。

一方、小田らは、1998年に福岡市の保育園給食を原因で発生した*S. Enteritidis*食中毒事件の平均潜伏時間が110時間と長く、かつ検食の検査結果から患者の摂取菌量は23～39個と極めて少なかったと推定し報告している<sup>4)</sup>。またその他の摂取菌量不明の長い潜伏時間を呈するサルモネラ食中毒の報告<sup>5-9)</sup>もみられることから、摂取菌量が潜伏時間や症状に影響して、2群間で潜伏時間や症状に差が生じている可能性が考えられる。この他にも学校給食の調理内容や調理形態、患者の若年齢との関連も考えられ、現在、その要因について解析を進めている。今回の調査結果から、学校や保育園の給食を原因とする食中毒の原因究明に当たっては、長い潜伏時間と比較的軽度な下痢症状を呈するサルモネラ食中毒を考慮して調査する必要があると思われる。

## 5 謝 辞

食中毒事件の情報を提供していただいた三重県鈴鹿保健所の長坂祐二先生及び桑名保健所の竹内義廣先生、奈良県を始めとする都道府県並びに政令指定都市の担当課の諸氏に感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Horinic RB. Nontyphoid salmonellosis. In Hoerprich PD, Jordan MC, Ronald AR, eds. Infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1949: 741-7.
- 2) 阿部和男, 品川邦汎: 食中毒疫学データに基づく原因菌種推定の試み: 1. 食中毒患者の症状及び潜伏期による推定表の作成: 食微誌, 1995; 12: 187-192
- 3) 阿部和男, 品川邦汎: 演習, 食中毒疫学データに基づく原因菌種推定の試み: 2. 原因菌種推定表の活用・演習: 日食微誌, 1996; 2: 257-260
- 4) 小田隆弘, 香月隆延, 椿本亮, 財津修一: 少数菌数の*Salmonella Enteritidis*による集団食中毒事件: 食微誌, 1998; 15: 167-172
- 5) Bille BO, Mellbin T, Nordbring F. An extensive outbreak of gastroenteritis caused by *Salmonella* Newport. I. Some observations on 745 known cases. Acta Med Scand 1964; 175: 557-67.
- 6) Seals JE, Parrott PL, McGowan JE, Feldman RA. Nursery salmonellosis: delayed recognition due to unusually long incubation period. Infect Control 1983; 4: 205-8.
- 7) Cowden JM, O'Mahony M, Bartlett CLR, Rana B, Smyth B, Lynch D, Tillett H, Ward L, Roberts D, Gilbert RJ, et al. A national outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 124 caused by contaminated salami sticks. Epidem Inf 1989; 103: 219-25.
- 8) O'Mahony M, Barnes R, Stanwell-Smith R, Dichens T, Jephcott A. An outbreak of *Salmonella* Heidelberg infection associated with a long incubation period. J Public Health Med 1990; 12: 19-21.
- 9) Nagai K, Mori T, Tsuda S, Izumiya H, Terajima J, Watanabe H. Prolonged incubation period of salmonellosis in an outbreak of *Salmonella Enteritidis* infection. Microbiol Immunol 1999; 43: 69-71.

## Genetic Analysis of Norwalk Virus (NV) Detected in the River Water and the Oysters

Yo UEKI<sup>1,5)</sup> Tomikazu ARITA<sup>1)</sup> Ikuo GOTO<sup>1)</sup>  
Chizuko SATO<sup>1)</sup> Yoko OKIMURA<sup>1)</sup> Hiroyuki SHIRAISHI<sup>1)</sup>  
Kazuo AKIYAMA<sup>2)</sup> Osamu HASHIMOTO<sup>3)</sup> Hiroaki ISHIKO<sup>3)</sup>  
Naokazu TAKEDA<sup>4)</sup> Toru WATANABE<sup>5)</sup> Tatsuo OMURA<sup>5)</sup>

Key words : Norwalk Virus , River Water , Oysters

### INTRODUCTION

Miyagi prefecture is located on northeast of Japan and characterized by marine products industries . Such as the oyster-farming is one of marine products industries in Miyagi prefecture . As oysters are often eaten raw in Japan ,the contamination of oysters with the non-bacterial agent concerned with the gastroenteritis has become a serious social problem . According to the report by Center for Disease Control and Prevention, USA( 2001 ) ,the shellfish tends to concentrate Norwalk virus( NV )in their digestive diverticula<sup>1)</sup> . Therefore , NV may be concerned with the acute gastroenteritis . However , owing to the inability to cultivate NV in cell lines and the genetic diversity of NV , the behavior of NV in the aquatic environment has been hardly known .The objective of this study is to investigate the distribution of NV in the river and the oysters cultivated at Sendai Bay , Miyagi and the homogeneity of NV by the genetic analysis .

### MATERIALS AND METHODS

The detection of NV was performed for 89 samples taken from 11 rivers that flow into three oyster-farming areas and 44 samples of oysters cultivated at the areas ( Figure 1 ) . These samples were collected by Miyagi prefectural government from September 1999 to March 2000 and from October 2000 to March 2001 .

NV was isolated from the sample of river water by the following procedures . Sample of river water ( 1 L ) was concentrated with polyethyleneglycol and centrifuged at 10 ,000 x g for 30 min . The supernatant was removed with aspirator . The pellet was suspended with 2 ml of distilled water . Viral RNA was purified with glass powder method .  
For the detection of NV from the sample of oyster , digestive

diverticula was separated from the oyster and frozen at - 80 for 2 hours . Then it was melted by adding the distilled water at 70 and centrifuged at 9 ,200 x g for 15 min .Viral RNA was isolated from the supernatant with DNA PREP ( ASAHI GLASS COMPANY ) .

RNA of NV was detected with RT-PCR method using primers designed as amplified polymerase regions ( Tables 1 and 2 ) . The RT profile was run with 37 for 1 hour and at 98 for 5 min . PCR profiles for NV series<sup>2)</sup> and Yuri series<sup>3,4)</sup> of primers were run with procedures in Table 3 . The PCR products of 330bp for NV series and 373bp for Yuri series were analyzed by 2.0% agarose gel electrophoresis , revealed by ethidium bromide ( EtBr ) staining , and Southern transferred to positively charged nylon membranes ( Roche Molecular Biochemicals , Indianapolis , Ind . ) for oligohybridization . The membranes were prehybridized for 3 hours at 58 then hybridized with digoxigenin-labelled probes at the same temperature .

Genotype of NV detected by RT-PCR method was determined by using the primer designed as amplified capsid regions ( Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratory INC . ) . Some of PCR products ( 161bp ) were cloned into plasmids with PCR-Script<sup>TM</sup> Amp Cloning Kit( STRATAGENE )and sequenced with the BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Kit ( Applied Biosystems ) and ABI PRISM 310 ( Applied Biosystems ) . The cloned NV gene was analyzed with Neighbor Joining method . The dendrogram of predicted phylogenetic relationship among strains of NV was created by GENETYX-MAC ( SOFTWARE DEVELOPMENT CO . , LTD . ) .

Table 1. Primers employed for the detection of NV by RT-PCR methods.

RT	NV series	Yuri series
RT	35'	MR 4
1 st .PCR	36	MR 3
2 nd .PCR	NV82 and SM82	Yuri22F and 22R

- 1 ) 保健環境センター 微生物部
- 2 ) 仙台保健福祉事務所塩釜総合支所
- 3 ) (株)三菱化学ビーシーエル研究開発部
- 4 ) 国立感染症研究所ウイルス第 2 部
- 5 ) 東北大学大学院工学研究科

Table 2. Sequences of primers.

NV series	35'	5'-CTTGTGGTTTGGAGGCCATA-3'
	36	5'-ATAAAAGTTGGCATGAACA-3'
	NV81	5'-ACAATCTCATCATCACCATA-3'
	NV82	5'-TCATTTTGGATGCAGATTA-3'
	SM82	5'-CCACTATGATGCAGATTA-3'
Yuri series	MR 3	5'-CCGTCAGAGTGGGTATGAA-3'
	MR 4	5'-AGTGGGTTTGGAGCCGTA-3'
	Yuri22F	5'-ATGAATGAGGATGGACCCAT-3'
	Yuri22R	5'-CATCATCCCCGTAGAAAGAT-3'

Table 3. Procedures for PCR with primers of NV and Yuri serieses.

(a) NV series			
1st . PCR	1 cycle of 94	for 3 min.	
	40 cycles of 94	for 1 min, 50	for 1min. and 72 for 1 min.
	1 cycle of 72	for 15min.	
2st . PCR	Same as 1st. PCR		
(b) Yuri series			
1st . PCR	5 cycle of 94	for 1 min, 51	for 2 min. and 60 for 4min.
	30 cycles of 94	for 1 min ,51	for 80sec. and 72 for 1 min.
2st . PCR	5 cycle of 94	for 1 min, 45	for 2 min. and 60 for 4min.
	30 cycles of 94	for 1 min , 45	for 80sec. and 72 for 1 min.

RESULTS AND DISCUSSIONS

NV were detected from 8 of 35 samples of river water and 12 of 35 samples of oyster in September 1999 to March 2000 , and 4 of 54 samples of river water and 11 of 44 samples of oysters in October 2000 to March 2001 , respectively( Figure 1 ).

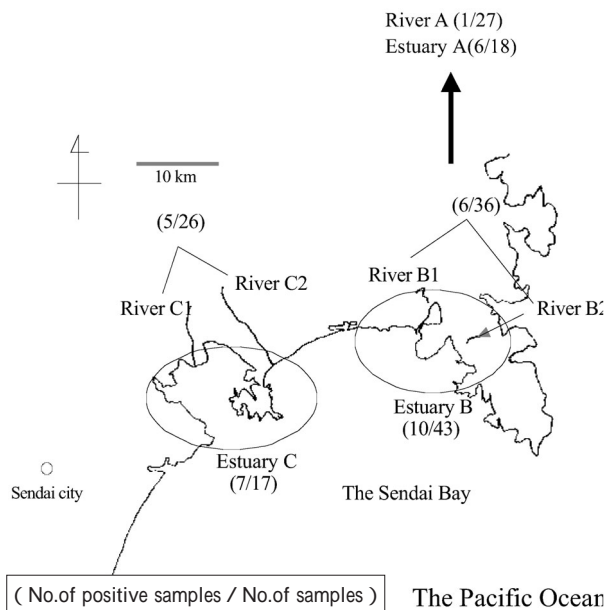


Figure 1. The research area and the results of detection of NV in the river and the oysters cultivated in the estuary. Estuary A and river A are located on 80km north from estuaries B and C. NV were detected from 1 of 27 samples in river A and 6 of 18 samples of oysters in estuary A.

These results indicated that rivers and oysters in Sendai Bay were contaminated broadly . In Japan ,outbreaks of gastroenteritis by NV through eating oysters occur mainly in winter . ThereforeSo , the rate of positive samples rises in winter related to these outbreaks .

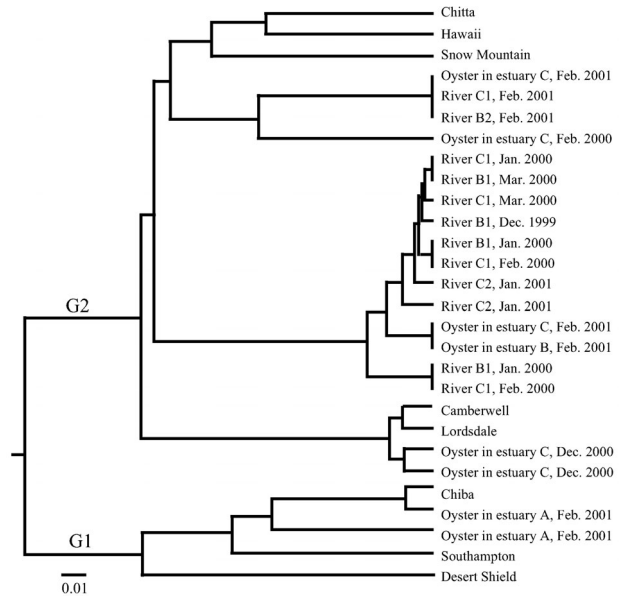


Figure 2. Dendrogram of predicted phylogenetic relationship among 28 strain of NV. The length of the abscissa to the connecting node is proportional to the genetic distance between sequences.

Twenty strains were obtained from 14 samples( 9 samples of river water and 5 samples of oysters ). Figure 2 shows the dendrogram of predicted phylogenetic relationship among 28 strains of NV . On the basis of sequences of nucleic acid and amino acids in the RNA dependent RNA polymerase ( RdRp ) regions and capsid regions ,NV was categorized into two groups ( G 1 and G 2 ). Strains in G 2 group are often detect-ed from outbreak of gastroenteritis by NV in Japan . Both groups of G 1 and G 2 had about 70 percent of homogeneity , respectively . The homogeneity between G 1 and G 2 groups was about 50 percents . Sequences of nucleic acid in the capsid regions of NV in rivers C 1 and C2 and oysters cultivated in estuary C were similar to those in rivers B 1 and B2 , and oysters cultivated in estuary B regardless of the sampling season . Only oysters cultivated in estuary A were categorized into G 1 group .Since estuary A is located on 80 km north from estuaries B and C , the difference may be related to this distance .

Sequence of nucleic acid in the capsid regions of NV in the oyster taken in estuary C in February 2001 is identical to that of NV in river C 1 at the same time . This result showed the possibility that NV transported from the river to the estuary was concentrated in the oyster . Through investigations into

the distribution of NV in the rivers and the oysters at the Sendai Bay , and the homogeneity of NV by genetic analysis , it shows that NV discharged from infected persons contributed through the river to the contamination of oysters in the estuary .

## REFERENCES

- 1) Center for Disease Control and Prevention ( 2001 ) .  
Norwalk-Like Viruses , Recommendations and Reports ,  
50( RR- 9 ) , 1-18 , June 1
- 2) Moe C.I. et al. : J Clin Microbiol 32 ; 642 ( 1994 )
- 3) Lew J.F. et al. : J Virol 68 ; 3391 ( 1994 )
- 4) Saito H. et al. : Microbiol Immunol 42 ; 439 ( 1998 )



# 1999/2000シーズンに分離されたAソ連型インフルエンザウイルス変異株の解析

## Antigenic Analysis of Influenza A Virus (H1) Isolated in 1999/2000 Season

後藤 郁男 植木 洋 佐藤 千鶴子  
沖村 容子 野呂 知世\*<sup>1</sup> 秋山 和夫

Ikuo GOTO, Yo UEKI, Chizuko SATO  
Yoko OKIMURA, Tomoyo NORO, Kazuo AKIYAMA

キーワード：A型インフルエンザウイルス，H1，抗原解析，塩基配列，遺伝子解析

Key Words：Influenza A Virus，H1，Antigenic Analysis，Nucleotide Sequence，Gene Analysis

1999/2000シーズンに分離され、抗原変異が示唆されたAソ連型インフルエンザウイルスについて血清学的及び分子生物学的に解析を実施したところ、同シーズンのワクチン株とHAタンパク抗原決定部位のアミノ酸配列が異なっていた。また、これら分離株の塩基配列並びにアミノ酸配列は2000/2001のワクチン株と類似しており、連続抗原変異した株であることが明らかとなった。

### 1 はじめに

インフルエンザが毎年流行し、再感染する理由の一つとして、インフルエンザウイルス表面抗原である赤血球凝集素（HA：hemagglutinin）の抗原変異があげられる。この抗原変異には、HAをコードしているインフルエンザウイルスゲノム第4分節上の塩基配列の変化による連続変異と、インフルエンザゲノムの再集合によって生ずる不連続変異がある<sup>1)</sup>。ここ最近、不連続変異によるパンデミックの可能性も指摘されているが<sup>2,3)</sup>、保健環境センターでは分離ウイルス株のHAに対する抗血清の反応性の違いをもとに、主に連続変異について解析を行い<sup>4)</sup>、シーズン中あるいは次シーズンの流行予測に資するデータ収集に務めている。

今回著者らは、1999/2000シーズンに仙台市在住のインフルエンザ患者よりHAの抗原性がワクチン株とは異なるインフルエンザウイルスを分離し、その血清学的及び分子生物学的解析を行い知見が得られたので報告する。

### 2 材料と方法

#### 2.1 ウイルスの分離・同定

調査研究の一環として仙台市内の医療機関で採取された咽頭拭い液を材料とし、トリプシン加MDCK細胞を用いた培養法により、インフルエンザウイルスの分離を行った。継代培養を2代実施して、MDCK細胞に細胞変性効果（CPE：cytopathic effect）が認められ、赤血球凝

\* 1 光ヶ丘スベルマン病院小児科

集能を有した検体をウイルス分離陽性とした。ウイルスの同定は、インフルエンザ同定用抗血清（国立感染症研究所分与、A/北京/262/95、A/シドニー/5/97、B/山東/7/97、B/山梨/166/98）による赤血球凝集抑制試験（HI：hemagglutinin inhibition test、0.5%モルモット赤血球使用）で行った。

#### 2.2 PCRによる型別判定

ウイルスゲノムの抽出はスマイテスト（住友金属）を使用した。PCRによるインフルエンザウイルスのHA型別判定は、高尾ら<sup>5)</sup>のミックスプライマーを用いたRT-PCR法で行った。

#### 2.3 シークエンス

Nakajimaら<sup>6)</sup>が報告したプライマーを使用し、インフルエンザウイルスHA遺伝子のHA 1領域を増幅した。増幅産物のシークエンスはダイターミネーター法によるダイレクトシークエンス（ABI PRISM 310、PERKIN ELMER）で行った。

#### 2.4 遺伝子解析

シークエンス結果の解析はパーソナルコンピューターソフト、GENTIX-MAC及びclustalxを使用した。

### 3 結果

#### 3.1 ウイルス分離及び抗原解析

1999/2000シーズンは共同研究医療機関より43件の咽頭拭い液が搬入され、そのうちAソ連型インフルエンザウイルスが9件、A香港型インフルエンザウイルスが4

件分離された。Aソ連型と同定された分離株はワクチン株A/北京/262/95の抗血清に対するHI価が低い傾向を示した。特に検体番号S31とS32はMDCK細胞に明瞭なCPEを起こし、赤血球凝集能も認められたものの、HI試験ではワクチン株に対するHI価が10倍と低値で、同定が困難であった(表1)。

表1 HI試験結果

分離されたAソ連型インフルエンザウイルスの抗原解析結果を示した。アンダーラインはホモ値を示す。

検体番号	参照株及び試験ウイルス株	抗血清			
		A/北京/262/95	A/シドニー/5/97	B/山東/7/97	B/山梨/166/98
A/北京/262/95	A/北京/262/95	320	< 10	< 10	< 10
A/シドニー/5/97	A/シドニー/5/97	< 10	640	< 10	< 10
B/山東/7/97	B/山東/7/97	< 10	< 10	160	< 10
B/山梨/166/98	B/山梨/166/98	< 10	< 10	< 10	160
S05	A/宮城/59/99	40	< 10	< 10	< 10
S20	A/宮城/72/99	160	< 10	< 10	< 10
S21	A/宮城/73/99	160	< 10	< 10	< 10
S26	A/宮城/81/99	80	< 10	< 10	< 10
S27	A/宮城/82/99	80	< 10	< 10	< 10
S30	A/宮城/87/99	40	< 10	< 10	< 10
S31	A/宮城/3/2000	10	< 10	< 10	< 10
S32	A/宮城/4/2000	10	< 10	< 10	< 10
S33	A/宮城/2/2000	80	< 10	< 10	< 10

検体番号S31, S32の分離ウイルスについて、インフルエンザ亜型の決定を目的にPCRを実施したところ、図1のようにAソ連型(H1)に特異的な512bpのバンドが検出され、両ウイルスはAソ連型インフルエンザウイルスと同定された(ウイルス名はそれぞれA/宮城/3/2000及びA/宮城/4/2000)。

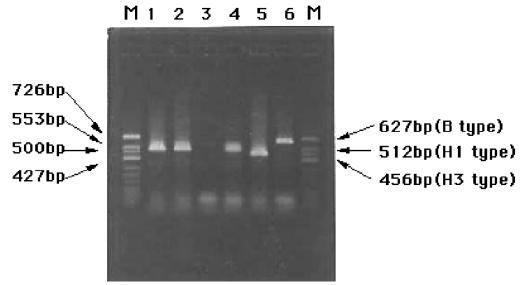


図1 インフルエンザ型別PCR

- 1 : 検体S31ウイルス培養上清
- 2 : 検体S32ウイルス培養上清
- 3 : Negative Control
- 4 : Aソ連型(H1) ウイルス
- 5 : A香港型(H3) ウイルス
- 6 : B型ウイルス
- M : Marker

### 3.3 シークエンス及びアミノ酸配列の比較

分離株A/宮城/3/2000及びA/宮城/4/2000はPCRの結果よりH1型と判明したが、HI試験での同定は困難であったことから、抗原性の変化が示唆された。そこで、この2つの分離株に加え、A/北京/262/95様の分離株A/宮城/2/2000のHA遺伝子のダイレクトシークエンスを実施し、ワクチン株A/北京/262/95(1999/2000シーズン)と、A/New Caledonia/20/99(2000/2001シーズン)との比較を行った(図2)。その結果、上述の3分離株はA/北京/262/95と30ないしは31塩基異なり(相同性は98.1%)、A/New Caledonia/20/99により類似していた(相同性は99.7%)。さらに、A/宮城/3/2000及びA/宮城/4/2000の両株とA/宮

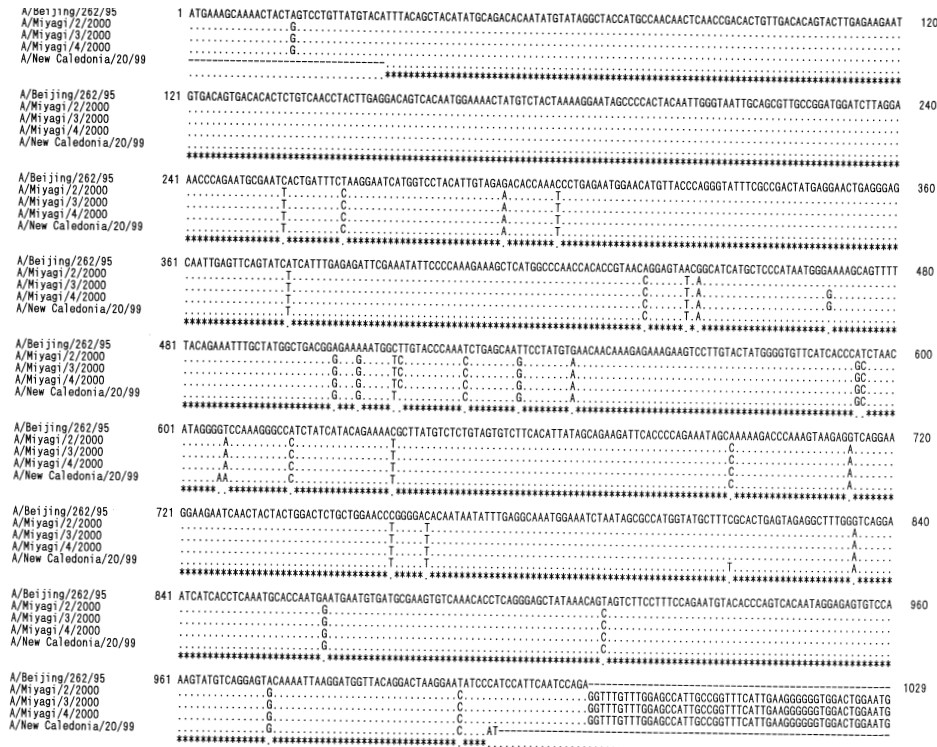


図2 分離株及びワクチン株HA1領域の塩基配列

A/Beijing/262/95株の塩基配列はLosalamos Laboratory Influenza Sequences Database (accession number ISDNAX127), A/New Caledonia/20/99株の塩基配列はEMBL (accession number AJ344014) より引用した。

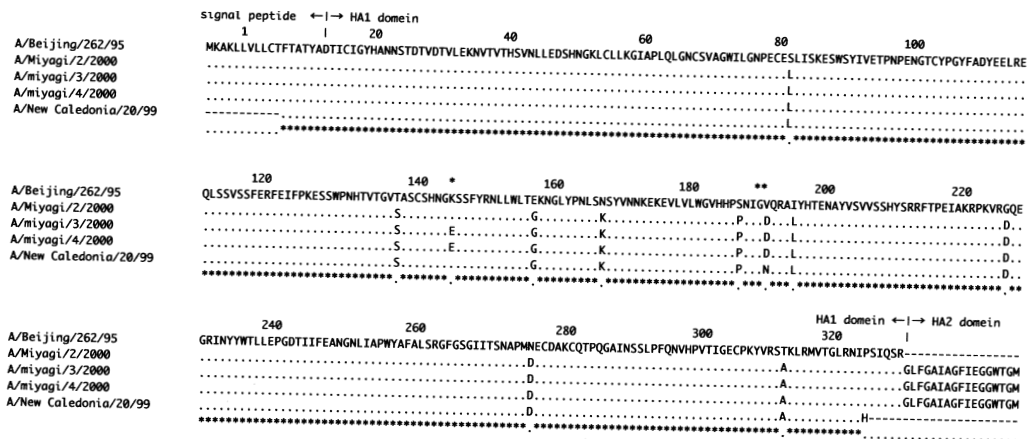


図3 分離株及びワクチン株HA1領域のアミノ酸配列

アミノ酸配列の番号はWinterら<sup>7)</sup>の報告に基づき付した。\* : 変異株のアミノ酸が他の株と異なる位置を示す。  
\*\* : 分離株のアミノ酸が2ワクチン株と異なる位置を示す。ワクチン株の引用は図2と同様。

城/2/2000を比較すると、第469番目の塩基が異なっていた(A G, 図2)。

また、得られたシーケンス結果を元に塩基配列から推定されるアミノ酸配列について、株間の比較を行ったところ、3分離株はワクチン株A/北京/262/95と10~11アミノ酸残基異なっており、塩基配列と同様にワクチン株A/New Caledonia/20/99に類似していた。そのうち2分離株は塩基配列を反映して、さらに第144番目のアミノ酸がLys Gluへと変化していた(図3、アミノ酸の位置は文献番号7のA/PR/8/83の配列を元に示した)。

#### 4 考 察

A型インフルエンザウイルスのHAタンパクは、ウイルスエンベロープに埋め込まれている表面タンパクの一つで、スパイクと呼ばれる突起構造物を形成している。その機能は宿主細胞のレセプターに結合し、膜融合活性をもとにウイルス粒子の細胞内侵入を助けるもので、ウイルス感染において重要な役割を担っている。このHAはウイルス表面に露出していることから、中和活性を持つ抗体産生を誘導する抗原となり、生体においては感染抑制効果を生み出す。しかし、ウイルス遺伝子が頻繁に変異を起こすことからHAの抗原性が変化し、毎年のインフルエンザの流行は変異を起こしたウイルスが引き継ぐ形で発生する。我々をはじめとする全国の地方衛生研究所では、国立感染症研究所と連携を取りながら分離ウイルス株の抗原性について血清学的な解析を行い、インフルエンザの流行について情報提供を行っている<sup>8)</sup>。この血清学的な抗原解析は各シーズンのワクチン株に対する抗血清を中心に行われており、時として免疫学的に抗原変異を示唆するウイルスに遭遇する。今回著者らは抗原変異が疑われたAソ連型インフルエンザウイルスを分離し、従来の血清学的な解析に加え分子生物学的な解析を行うことによって、その詳細を明らかにした。すなわち、HA1フラグメントをコードしているインフルエンザウイルス第4分節遺伝子の塩基配列を解読したところ、3分離

株はワクチン株であるA/北京/292/95と特定の塩基の違いを保有しており、この違いがアミノ酸の変化をもたらしていた(図2, 3)。特に2変異株(A/宮城/3/2000, A/宮城/4/2000)は他の分離株(A/宮城/2/2000)と比較してさらに1アミノ酸残基が異なっていた。Catonら<sup>9)</sup>の解析によればHA1フラグメントの中でエピトープとなる部位が5カ所(図4 Sa, Sb, Ca1, Ca2, Cb領域)特定されているが、今回変異がみられたアミノ酸の位置はCa2領域にあたる(図4にその位置を示した)ことから、この部位の変異によりHI用抗血清との反応性の違いが生じたものと考えられた。しかも、このアミノ酸変異は塩基性側鎖を持つLysから酸性側鎖を持つGluへの変化であることから、単なるタンパク質一次構造の変化にとどまらず、高次構造に影響している可能性が高く、このことがHI用抗血清と反応性が乏しい理由と推察された。

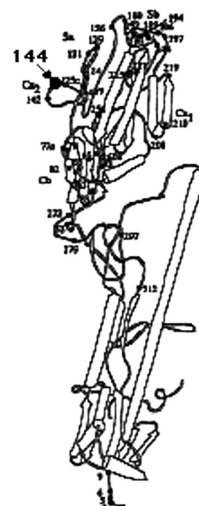


図4 インフルエンザウイルスHAタンパクの3次構造模式図

HA1量体にアミノ酸変異が認められた部位(144位)を示した(文献番号6より一部改変して引用)。  
Sa, Sb, Ca1, Ca2, CbはそれぞれAソ連型HA1領域における主要抗原決定部位を表す。

一般的にウイルス遺伝子にみられる塩基のpoint mutationは、ウイルスの複製過程においてゲノムRNAの相補鎖合成中に過った塩基を取り込むことによって生じる突然変異によるもので、インフルエンザの一回の感染サイクルにおける変異の発生率は、塩基座当たり $1.5 \times 10^{-5}$ であることが示されている<sup>10)</sup>。したがって、ウイルスの感染により生体内では多くの変異株が出現しうが、変異がウイルスの生存や感染増殖時に必要とされるタンパクに生じた場合は淘汰され、他者に感染することはまれである。アミノ酸において変異を起こした2分離株もその可能性が考えられるが、これらのウイルスは、同一時期の検体から分離されていること、また検体提供者は同一小学校の同一学年の児童であったこと（データは示していない）から、検体提供者には接点があり、分離された変異ウイルスは*in vivo*で感染能力を保有していたものと考えられた。なお、今回分離された変異株と同様に抗原解析用の抗血清に対して低いHI価を示すウイルス株が宮城県の2株を含め6都道府県で計15株分離されている<sup>11)</sup>。

また、明らかな抗原変異を伴った2分離株以外の株も、ワクチン株A/北京/262/95の抗血清に対するHI価は低い傾向を示したが、シーケンスの結果から、これらはA/北京/262/95から抗原連続変異したと考えられる次シーズンのワクチン株であるA/New Caledonia/20/99との相性がより高いことが判明した。全国の調査結果でも1999/2000シーズンは同類似株が71%を占め、A/New Caledonia/20/99様ウイルスの増加傾向が把握されている<sup>11)</sup>。この点に関しては分離ウイルスの血清学的抗原解析を行いさらに検討する必要がある。

本研究では、従来行われてきたインフルエンザウイルスの血清学的抗原解析に加え、分子生物学的な解析を行うことによって抗原変異が起りやすいインフルエンザ

ウイルスについて詳細な解析データが得られた。このことから、今後は分析方法の簡便化を図りながら両方法を実施・比較することによってインフルエンザ流行予測により寄与できるものと考えられた。

## 5 ま と め

- 1) 1999/2000シーズン分離インフルエンザウイルスはワクチン株と塩基、アミノ酸レベルで異なっていた。
- 2) 分離された変異株は、HA抗原決定基のアミノ酸が変化していた。
- 3) インフルエンザの分子生物学的解析は抗原解析法の一つとして有用であった。

## 参 考 文 献

- 1) B. N. Fields, et al: Fields Virology, Third Edition, 1397~1445 (1996)
- 2) H. Kida, et al: Current Topics in Medical Virology, 365~376 (1989)
- 3) 西村秀一: 日本臨床, 55(10), 2617~2626 (1997)
- 4) 上村弘他: 宮城県保健環境センター年報, 14, 46~50 (1996)
- 5) 高尾信一他: 広島県保健環境センター研究報告, 2, 9~13 (1994)
- 6) S. Nakajima et al: Microbiol. Immunol., 44(10), 841~847 (2000)
- 7) G. Winter et al: Nature, 292(2), 72~75 (1981)
- 8) 根路銘国昭他: 日本臨床, 55(10), 2527~2534 (1997)
- 9) A. J. Caton and G. G. Brownlee: Cell, 31, 417~427 (1982)
- 10) J. D. Parvin et al: J. Virol., 59, 377~383 (1986)
- 11) 国立感染症研究所発行: 病原微生物検出情報, 21(12), 262~265 (2000)

## 宮城県内で発生したレプトスピラ症

## Leptospirosis in Miyagi Prefecture

佐藤 千鶴子 後藤 郁男 植木 洋  
渡邊 節 沖村 容子 秋山 和夫  
白石 廣行\*<sup>1</sup> 林 千恵\*<sup>2</sup>

Chizuko SATO, Ikuo GOTO, Yo UEKI  
Setsu WATANABE, Yoko OKIMURA, Kazuo AKIYAMA  
Hiroyuki SHIRAISHI, Chi-e HAYASI

キーワード：PCR法，MAT法，*L. copenhageni*，レプトスピラ保有率

Key Words：PCR Method，MAT Method，*L. copenhageni*，Infection Rate of *Leptospira*

県内の医療機関より検査を依頼された症例は、*Leptospira copenhageni* を病原体とする重症型のレプトスピラ症（ワイル病）と確認した。本県は、*L. copenhageni* が地域的に広く分布しており、生活形態が多様化した現在、感染の機会は今後増えるものと考えられた。

## 1 はじめに

レプトスピラ症は、病原性レプトスピラの感染に起因する古くから知られた人獣共通感染症である。保菌動物であるネズミなどの齧歯類をはじめ家畜やペットが感染した場合、レプトスピラは腎臓に保菌され、ある一定期間尿中に排泄される。それにより汚染された水や土壌を介し、主に経皮的にヒトにも感染する。ヒトにおける臨床症状はレプトスピラの血清型によって軽症で経過するものから、黄疸や出血を伴い重篤で死亡することもあるワイル病まできわめて多彩であり、我が国では秋疫、七日熱などと呼ばれる地方病として農作業や土木作業従事者の間で発症していた。病原体は1915年に稲田、井戸両博士により世界で初めて発見、発表された<sup>1)</sup>。その後、世界各地で多くのレプトスピラが分離され、現在250以上の血清型が報告されている<sup>2)</sup>。主症状は発熱や黄疸、腎障害などで、感染後3～14日の潜伏期間を経て悪寒を伴う発熱で発症し、筋痛や眼球結膜の充血など様々な症状が生じ、黄疸や出血傾向が増強する場合もある。化学療法は、感染早期であればペニシリン系、テトラサイクリン系など多くの抗生物質の効果が認められるが、ストレプトマイシン(SM)がレプトスピラに最も有効であることが確認されている<sup>3)</sup>。

宮城県では、1924年に東北大で最初の患者が確認されて以来、増加傾向を示し、1933年には法定伝染病に準じる届け出伝染病として患者の把握とともに予防対策を講じてきた。1959年の患者報告数が800例を越す大流行後も、

\* 1 現 宮城県公衆衛生協会 \* 2 現 仙台市立病院

年間100例前後の患者を確認するなど全国でも有数のレプトスピラ症の多発県であったが、衛生環境の向上やワクチン接種の奨励などの予防対策により漸次低下し、1988年以降、患者報告は無かった。しかし、1999年に死亡した患者が、当センターにおける検査でレプトスピラ症と確認されたことから<sup>4)</sup>、県内でのレプトスピラ症に対する注意を喚起していたところ、2001年9月、医療機関から検査依頼された患者も、レプトスピラ症と確定したため、その症例と県内における今後の患者発生の可能性について報告する。

## 2 材料及び方法

検査材料は2001年8月31日、9月3日、10日、17日の4回にわたり採血された血液である。8月31日の検体は病院に保存されていた血清と抗凝固剤入りの全血で、その他は採血当日の全血である。これらの検体について実施した検査項目を表1に示した。

抗原検査は、暗視野顕微鏡によるレプトスピラの直接観察（以下鏡検）と、PCR法によるレプトスピラ遺伝子の検出を行った。鏡検は、スライドグラスに検体を直接塗布し、らせん運動をする菌体の有無を確認した。PCR法は、キアゲン社の『DNA Mini Kit』を使用しDNAの抽出を行い、F.MERIENら<sup>5)</sup>のプライマー（A：5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3'とB：5'-TTCCCCCATAGCAAGATT-3'）を用いポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の増幅を行った。遺伝子が検出されたPCR産物は、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。また、

抗体検査は、ワイル病の血清型である、*Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* (RGA株), serovar *copenhageni* (芝浦株) の2株と、秋疫の原因となる serovar *autumnalis* (秋疫A株), serovar *hebdomadis* (秋疫B株), serovar *australis* (秋疫C株) の3株、計5種類の抗原を使用し、顕微鏡学的凝集試験 (Microscopic Agglutination Test : MAT法) により定法<sup>6)</sup> に従い測定した。

表1 検査法一覧

採血日	8/31	9/3	9/10	9/17
抗原検査 鏡 検				
P C R				
抗体検査 M A T				

### 3 結 果

#### 3.1 症状及び経過

表2に症例の経過、入院時の臨床症状及び検査結果を示した。

症例は35歳の男性で、2001年8月27日頃より腰痛、下肢の痛みが出現したため、28日、近医の整形外科を受診した。鎮痛剤等の投与を受けたが改善せず、8月31日に仙台市立病院神経内科へ転院となった。同日、結膜充血と高度の黄疸および、血小板減少、腎障害などの検査結果からレプトスピラの感染を疑い、内科に転科入院となった。意識障害はなく聞き取りの結果、8月12日頃に広瀬川にて鮎釣りの際、遊泳をしていたことが判明し、SMおよびミノマイシン等による治療が開始された。図1に示すように、抗生物質投与後3～4日まで、腎機能値 (BUN, Cr) は上昇したが、尿量の回復と共に検査値も正常化し、黄疸の指標となる総ビリルビン値 (T-bil) も低下した。その後症状も安定し完治退院となった。当センターへの最初の検査依頼は9月3日であった。

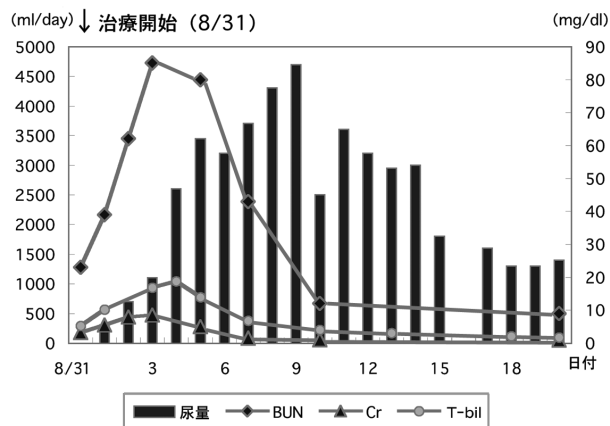


図1 治療開始後の検査結果の推移

表2 症状及び経過

症 例	男 性 35歳 (市内在住)
推定感染日	8月12日：広瀬川で遊泳
推定発症日	8月27日：腰痛および筋肉痛
受診経過	8/28 近医 整形外科 (鎮痛剤投与) 8/31 転院 仙台市立病院神経内科 同日 転科入院 市立病院内科
臨床所見 (8/31)	高度黄疸・結膜充血・下肢筋肉痛 腎不全・出血症状なし・発熱無し
検査成績 (8/31)	WBC (/ $\mu$ l) 13,200 BUN (mg/dl) 23 RBC ( $10^4$ / $\mu$ l) 336 Cr (mg/dl) 3.1 Plt ( $10^4$ / $\mu$ l) 6.6 GOT (IU/l) 41 FDP ( $\mu$ g/ml) 17.9 GPT (IU/l) 31 CRP (mg/dl) 15.9 T-bil (mg/dl) 5.2

#### 3.2 抗原検査

表1に示したとおり、8/31、9/3、9/10の検体を鏡検したが、レプトスピラの確認はできなかった。しかし、同血液について、PCR法によるレプトスピラ遺伝子の確認を行ったところ、図2に示すとおり8/31の検体で陽性対照 (PC) と同じ331bpの位置にバンドが検出された。このPCR産物についてダイレクトシーケンス法により解析を行った結果、塩基配列が確定した276bpで *L.interrogans* と完全に一致し、病原性レプトスピラによる感染である事が明らかとなった。

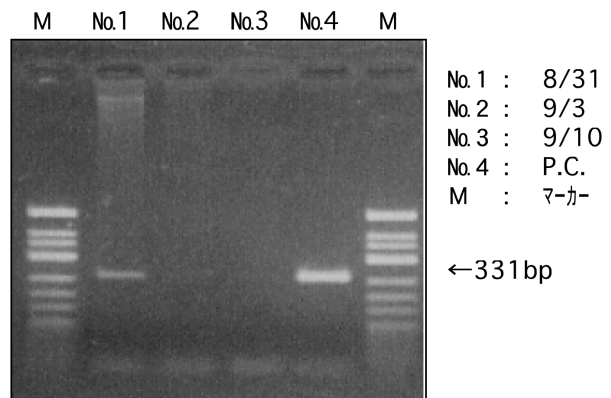


図2 レプトスピラ遺伝子の検出結果

#### 3.3 抗体検査

8/31、9/3、10、17の抗体測定結果を表3に示した。発病約2週間後の9/10の検体で、4倍以上の有意上昇が確認され、血清学的にレプトスピラ症であることが判明した。特に、ワイル病の原因血清型に含まれる芝浦株

に対して高い抗体上昇を示したことから、*L. copenhageni* に感染した可能性が大きいと考えられた。

表3 MAT法による抗体測定結果

採血日	8/31	9/3	9/10	9/17
RGA株	<10	20	1,280	1,280
芝浦株	<10	20	5,120	5,120
秋疫A株	<10	10	320	160
秋疫B株	<10	<10	320	20
秋疫C株	<10	<10	160	10

2.4 検査結果の推移

推定発病日(8/27)から最終採血日までの検査結果の推移を図3にまとめた。抗体価の推移は秋疫系の秋疫A株と、優位の抗体上昇を示した芝浦株をプロットした。抗体価は、発病8日目の9/3までほとんど上昇せず、1週間後の9/10の検査値で急激な上昇を示した。また、鏡検によるレプトスピラの確認はできなかったが、保存血である8/31(5病日)の検体で、PCR法によりDNA遺伝子を検出した。8/31の治療開始後の検体からは、遺伝子を検出することが出来なかった。

3.5 ネズミのレプトスピラ保有状況

1960年からの県内におけるネズミのレプトスピラ保有状況を図4に示した。保有率は、年により増減が見られるものの10~80%を示しており、患者報告がなかった1988年以降もほぼ同様の保有率を維持している。2001年の厚生科学研究による調査<sup>7)</sup>では、20頭の捕獲ネズミから8株(40%)のレプトスピラを分離し、そのうち5株はワイル病の病原体であることが確認されている。

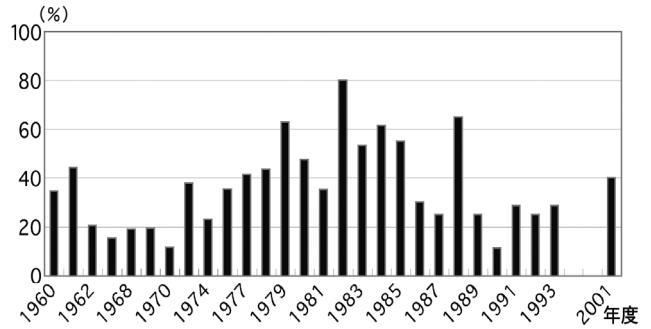


図4 県内におけるネズミのレプトスピラ保有状況

4 考 察

レプトスピラ症は病状の進行が極めて速く、治療は遅くとも第5病日までに開始することが望ましく、特にワイル病は、治療開始が遅れた場合しばしば重篤となり予後にも大きな影響を及ぼすといわれている<sup>8)</sup>。本症例も*L. copenhageni*を病原体とするワイル病であり、高度黄疸と出血傾向を示す重篤な状態であった。しかし、第5病日からの治療開始後、3~4日で腎機能およびビリルビン値は低下し(図1)速やかに回復した。一方、確定診断のための抗原および抗体検査は第8病日に依頼されたが、その時点で血清学的診断は出来なかった。しかし、第5病日に採取された保存血から遺伝子を確認し、レプトスピラ症の診断に寄与することが出来た(図2,3)。PCR法の早期診断における有用性は秋山ら<sup>9)</sup>により既に報告されているが、今回の症例では、治療開始以降の検体から遺伝子は確認されず、PCR法を活用するためには、発病日より近い検体の入手が必要であることが示唆された。

また、本症例が感染したと推測される*L. copenhageni*は、当センターのこれまでの調査より<sup>10)</sup>、過去に宮城県

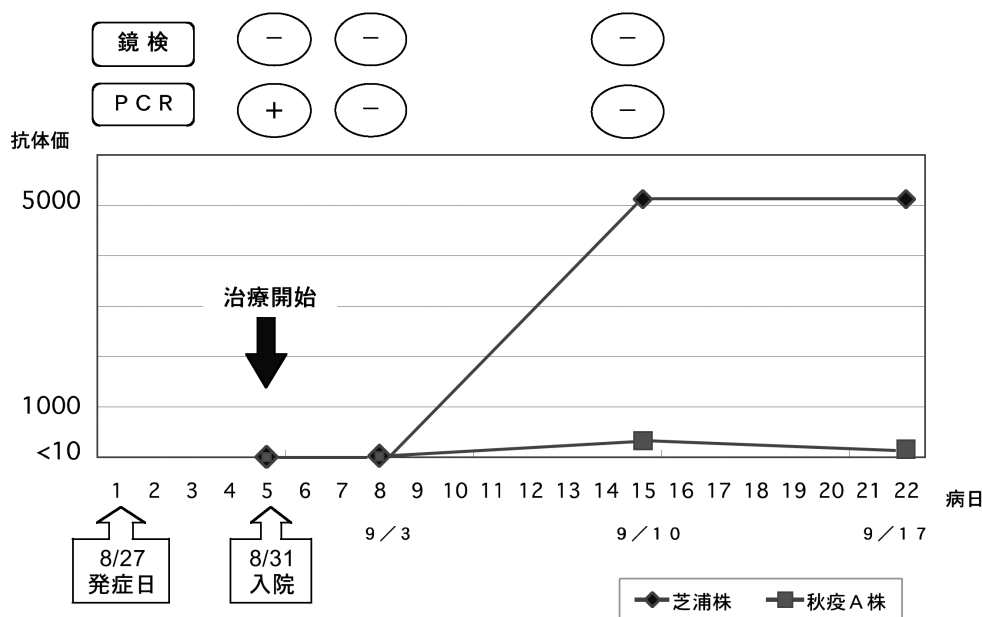


図3 検査結果の推移

内で確認されたワイル病患者の原因血清型であることが判明しており、本県は未だ同血清型レプトスピラの生息が優位と考えられる。また、本県が保菌動物の生息する土壌である事は、2001年に行った調査において、ネズミから高い確率でレプトスピラが分離された結果からも明らかである。

近年、生活様式は多様化し、アウトドアがレジャーとして定着するなど、レプトスピラに感染する機会は、遊泳で感染した本症例のように、より身近になり、患者の発生が危惧される。しかし、1999年に施行された感染症法では、レプトスピラ症は届け出対象疾患に含まれていないため、正確な患者発生を把握することは困難な状況である。医療機関への情報提供や感染の危険性を一般に還元するためにも、疫学調査の継続およびレプトスピラ患者の究明は不可欠であると考えられる。

## 5 ま と め

- 1) 本症例は県内に広く分布する *L. copenhageni* を病原体とするレプトスピラ症であることが判明した。
- 2) 本県は、保菌動物が生息する土壌であり、レプトスピラに感染する危険性は高いと推測された。
- 3) 生活様式が多様化した今日、感染の危険性を喚起する必要がある。

## 6 謝 辞

貴重な資料や検体を提供していただいた、仙台市立病院の先生方に深謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) 稲田龍吉：黄疸出血レプトスピラ病，日本医書出版，(1951)
- 2) 国立感染症研究所：レプトスピラ感染症パンフレット，厚生労働省 新興・再興感染症研究事業
- 3) Y. Kobayashi：J. Infect. Chemother. 7 (2001)
- 4) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局：病原微生物検出情報，21，2 (2000)
- 5) F. MERIEN，et al：J. Clin. Microbiol. 30 (1992)
- 6) S. FAINE：GUIDELINES FOR THE CONTROL OF LEPTOSPIROSIS，WHO OFFSET PUBLICATION No.67，(1982)
- 7) 増澤俊幸 他：回帰熱・レプトスピラ等の希少輸入細菌感染症の実態調査及び迅速診断法の確立に関する研究，厚生労働省 新興・再興感染症研究事業，(2002)
- 8) 小林 讓：化学療法の領域，17，12 (2001)
- 9) 秋山和夫 他：宮城県保健環境センター年報 第16号 (1998)
- 10) 秋山和夫 他：宮城県におけるワイル病，宮城県保健環境センター (1993)



## 宮城県における1歳6か月児神経芽細胞腫マス・スクリーニング事業 —10年間のまとめ—

Mass-screening for Neuroblastoma Targeting Children 18-month of Age in Miyagi Prefecture  
- through 10years -

菊地 奈穂子 氏家 恭子\*<sup>1</sup> 白石 廣行\*<sup>2</sup>  
林 富\*<sup>3</sup> 中村 潤\*<sup>3</sup> 土屋 滋\*<sup>4</sup>

Naoko KIKUCHI, Kyoko UJIIE, Hiroyuki SHIRAIISHI  
Yutaka HAYASHI, Megumi NAKAMURA, Shigeru TSUCHIYA

キーワード：神経芽細胞腫，マス・スクリーニング，1歳6か月児，Brodeur分類

Key Words：Neuroblastoma，Mass-screening，Children 18-month of Age，  
Classification of Brodeur

宮城県で行われた1歳6か月児を対象とした神経芽細胞腫マス・スクリーニング（以下18MS）について，事業開始から終了（1992年5月～2002年3月）まで約10年間の結果をまとめ，同時期に行った6か月児神経芽細胞腫マス・スクリーニング（以下6MS）の結果と比較したところ，高VMA群における陽性反応適中率は18MSが優れていた。また，6MS，18MSで発見された患児について，Brodeur分類（予後に関する分類）を用いて検討したところ，腫瘍が自然退縮すると思われるType 1 予後良好群の発見率が，6MSの81%に比較し，18MSでは57%と低かったことから，18MSがより効果的なMSと考えられる検討結果が得られた。しかし，同期間において18MS陰性または未受検で発症した5症例が確認され，すべて病期ⅣA，Type 3 治療困難群の重篤な症例であった。

### 1 はじめに

小児がんの一種である神経芽細胞腫は，神経冠細胞由来の細胞から発生し，カテコールアミンを産生・分泌する。そのため，腫瘍があるとカテコールアミン代謝産物のバニルマンデル酸（VMA），ホモバニリン酸（HVA）が尿中に大量排泄されることが多く，両物質を指標とする神経芽細胞腫マス・スクリーニングが可能である。

1984年7月厚生省の通知（児発第573号 厚生省児童家庭局長）に基づき，全国でマス・スクリーニングが開始された。宮城県では1985年から，「宮城県神経芽細胞腫検査実施要綱」により，6か月児を対象（1985～1991年までは全県在住児，1992年からは仙台市を除く県内在住児）に開始し，1988年から1991年までに患児14名（死亡0）を発見した（受検者数78,128名，精密検査数53名）。

しかし，この間6MSのみでは発見できない症例の存在が臨床的に明らかとなり，県内においても，6MSで陰性であったにもかかわらず，その後発症した児7名（死亡4）や，6MSを受けずにその後発症した児1名（死亡1）が確認された。

このため，6MS受検後に発症する患児の発見を目的に，1992年5月より宮城県単独事業で1歳6か月児（仙台市を除く県内在住児）を対象とした2回目のマス・スクリーニングを開始した。

今回，18MSの事業開始から終了まで（1992年5月～2002年3月）の約10年間の結果をまとめ，検討を加えたので報告する。

### 2 マス・スクリーニング実施方法

#### 2.1 対象

6MS及び18MSは，県内（仙台市を除く）に在住する6か月児及び1歳6か月児を対象とした。採尿セットは，生後3～4か月と1歳6か月の健康診査時に，保健師が神経芽細胞腫マス・スクリーニングについて説明し，保護者に配布した。健診を受けられなかった児については，家庭訪問等で個別に配布した。

なお，18MSの検査時期を1歳6か月としたのは，神経芽細胞腫は2歳までに50%，3歳までに75%が発見されていると言われていること<sup>1)</sup>，市町村の1歳6か月児健康診査で採尿セットを渡すことができることが理由である。

#### 2.2 検査方法

6MS，18MSともに既報のとおり実施した。<sup>2)</sup>

\* 1 がんセンター \* 2 (財)宮城県公衆衛生協会

\* 3 東北大学大学院医学系小児腫瘍学分野

\* 4 東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野

表1 宮城県（仙台市を除く）におけるマス・スクリーニング結果

MS 年度	1歳6か月児マス・スクリーニング（18MS）				6か月児マス・スクリーニング（6MS）			
	対象児数	検査数	精密検査数	患児数	対象児数	検査数	精密検査数	患児数
1992	11,791	7,912	4	0	12,928	11,538	12	1
1993	12,928	9,644	13	2	12,362	11,113	12	2
1994	12,362	8,975	0	0	12,451	10,879	10	3
1995	12,451	8,691	2	1	12,476	10,902	4	0
1996	12,476	8,928	2	0	11,906	10,365	11	4
1997	11,906	8,283	2	2	12,192	10,580	9	3
1998	12,192	8,089	3	2	11,997	10,031	13	1
1999	11,997	7,870	3	0	11,892	9,726	10	1
2000	11,892	7,347	0	0	11,865	9,650	9	4
2001	11,858	7,326	3	0	11,758	9,674	14	2
計	121,853	83,065	32	7	121,827	104,458	104	21

対象児数：受付期間の6か月前及び1年6か月前の届出出生数  
精密検査数：その年度に精密検査依頼となった数

検査数：初回受付検体数  
患児数：精密検査数の中で患児と診断された数

### 2.3 判定

VMA、HVAの測定値をクレアチニン値で換算した数値（クレアチニン換算値）を使用し、平均値+2.5SDをカットオフ値に設定した。6MSのカットオフ値はVMA 15.2µg/mgCRE、HVA 24.1µg/mgCRE。18MSのカットオフ値はVMA 13.5µg/mgCRE、HVA 24.3µg/mgCREとした。VMA・HVAそれぞれのクレアチニン換算値がカットオフ値以上を示した場合を異常高値と判定し、再採尿依頼（疑陽性）や精密検査依頼の判断基準とした。

（患児数/検査数）、陽性反応適中率（患児数/精密検査数）を算出し検討を加えた。

10年間の18MS対象児数は121,853名で83,065名が受検し、平均受検率は68.2%であった。その結果、32名を対象に精密検査を行い、7名の患児を発見した。患児発見率は0.0084%（7/83,065）、陽性反応適中率は21.9%（7/32）であった。

一方、同時期の6MS対象児数は121,827名で104,458名が受検し、平均受検率は85.7%であった。そのうち104名の精密検査を行い、21名の患児を発見した。患児発見率は0.0201%（21/104,458）、陽性反応適中率は20.2%（21/104）で18MSの適中率と差は認められなかった。

## 3 結果および考察

### 3.1 マス・スクリーニング結果

表1に年度毎で集計したマス・スクリーニング結果を示した。

対象児数は6MS、18MSともに受付期間の6か月前、1年6か月前の届出出生数。検査数は初回受付検体数。精密検査数は、その年度に精密検査依頼となった人数。患児数は、精密検査数の中で患児と診断された人数である。

また、平均受検率（検査数/対象児数）、患児発見率

（患児数/検査数）、陽性反応適中率（患児数/精密検査数）を算出し検討を加えた。

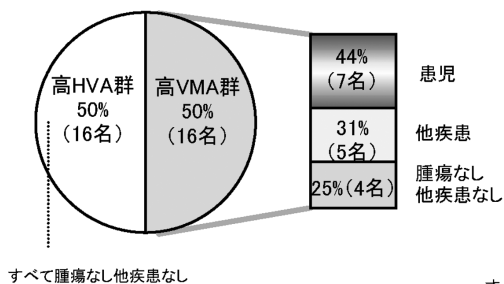
一方、同時期の6MS対象児数は121,827名で104,458名が受検し、平均受検率は85.7%であった。そのうち104名の精密検査を行い、21名の患児を発見した。患児発見率は0.0201%（21/104,458）、陽性反応適中率は20.2%（21/104）で18MSの適中率と差は認められなかった。

なお、18MSの平均受検率が6MSより約20%も低いのは、保護者が6MS陰性の結果で安心し、18MSへの関心が薄れたためと考えられる。

### 3.2 精密検査依頼時のVMA・HVA測定値に関する検討

3.1のとおり、18MSと6MSの陽性反応適中率に差は認められなかった。そこで、精密検査依頼となった児を対象とし、氏家らの方法<sup>3)</sup>を用いてVMAのみ、またはVMA・HVAともに、測定値がカットオフ値以上を示した群（高

18MS精密検査依頼数：32名



6MS精密検査依頼数：104名

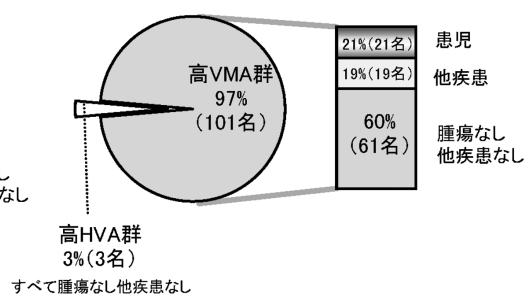


図1 高VMA群・高HVA群別の精密検査結果

VMA群)とHVAのみカットオフ値以上群(高HVA群)の2群に分けて検討した。その結果を図1に示した。

18MSで、精密検査依頼となった32名中16名は高VMA群であり、うち7名が患児と診断され、陽性反応適中率(患児数/高VMA群数)は43.8%(7/16)であった。残り9名中5名は他疾患の患者、4名は腫瘍や他疾患が認められなかった。

一方、6MSでは精密検査依頼となった104名中101名が高VMA群で、うち21名は患児であり、残り19名が他疾患、61名が腫瘍・他疾患なしで、陽性反応適中率(患児数/高VMA群数)は20.8%(21/101)であった。なお、18MS、6MSいずれにおいても高HVA群からの患児は発見されなかった。

以上の結果から、精密検査依頼時の高VMA群で陽性反応適中率を見る限り、18MSの適中率が6MSのそれを上回っており、18MSの有効性が示唆された。

3.3 マス・スクリーニング発見患児とBrodeur分類

神経芽細胞腫は多種の因子が複雑に交差し、予後が決まると言われている。一般的に予後不良因子としては、腫瘍発生部位が副腎や後腹膜であること、N-myc増幅が認められること、DNAploidyがdiploidやtetraploidであること、及び、日本小児外科学会の腫瘍の進行度に基づいた病期分類(病期I、II、III、IVA、IVB、IVS:数字大が予後不良、ただし、IVSは予後良好)などがある。更に、Brodeur分類<sup>4)</sup>によって、Type1予後良好群(自然退縮に向かうと思われるもの)、Type2治療有効群(治療が必要で化学療法に反応するもの)、Type3治療困難群(化学療法に反応し難いもの)にも分けられる。

18MSの10年間に発見された患児7症例について、各々の予後因子や分類をまとめたものを表2に示した。症例A・C・Eは、腫瘍発生部位が予後不良部位であったことや、病期がIIIであったこと等、予後因子に共通点が見られ、Brodeur分類もType2(42.9% 3/7)であった。また、腫瘍摘出手術も他の4症例に比べて容易ではなかった<sup>5)6)</sup>。症例B・D・F・Gは、発生部位や病期は異なっていたが、Brodeur分類ではすべてType1(57.1% 4/7)で

あった。

一方、6MS発見患児21症例のBrodeur分類は、Type2が4症例(19.0% 4/21)、Type1が17症例(81.0% 17/21)であった。

近年、マス・スクリーニングで発見される腫瘍は、自然退縮する可能性が大きいものが多いのではないかと等、6MSの有効性が疑問視され、検査時期を含めたマス・スクリーニングシステムの再検討が行われている。

今回、検討対象とした18MSと6MSで発見された症例のBrodeur分類を見る限り、Type1予後良好群の発見率は6MSで約80%であったのに対して、18MSでは約60%に減少しており、18MSの有効性(Type1発見率が少ないほど効果的なMSである)を示す成績が得られた事から、マス・スクリーニング検査実施時期を検討するための貴重なデータになると考えられる。

3.4 18MS発見患児の1症例

表2中の症例FにおけるVMA・HVA値の推移を図2に示した。本症例は6MSで要精密検査と判断されたものの、腫瘍は発見されなかったが、VMA・HVA測定値はカットオフ値以上を継続したため、要経過観察となった。しかし、保護者の都合により通院を中断した後、18MSを受検し、腫瘍が発見され患児と診断された。本症例は、一旦、VMA・HVA値が低下傾向を示し、カットオフ値以下になった後、再び上昇した特異な例であり、無治療経過観察を行う場合の参考になると考えられる。

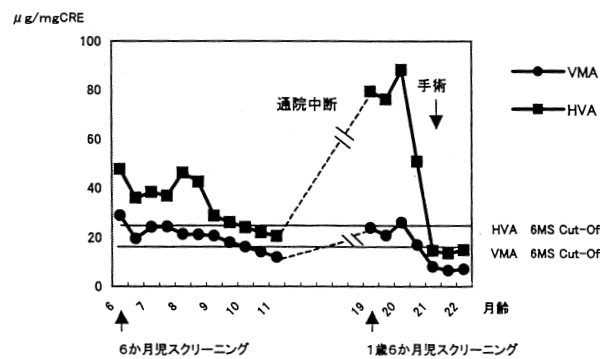


図2 18MS発見症例FにおけるVMA・HVA値の推移

表2 18MS発見患児

症例	性別	予後因子						Brodeur分類	予後	18MS測定値 <sup>2)</sup>		6MS測定値		
		精検依頼時年齢	腫瘍発生部位	病期 <sup>1)</sup>	嶋田分類	N-myc増幅	DNA ploidy			VMA (µg/mgCRE)	HVA (µg/mgCRE)	判定	VMA (µg/mgCRE)	HVA (µg/mgCRE)
A	女	1Y8M	副腎	III	UH	なし	aneuploid	Type2	生	53.4	147.2	陰性	14.3	21.6
B	女	1Y9M	副腎	II	FH	なし	aneuploid	Type1	生	27.5	31.4	陰性	8.4	13.4
C	女	1Y9M	副腎	III	FH	なし	aneuploid	Type2	生	17.2	31.3	陰性	13.8	23.0
D	男	2Y5M	後腹膜	I	FH	なし	aneuploid	Type1	生	29.6	38.2	陰性	9.3	17.6
E	女	1Y9M	後腹膜	III	FH	なし	diploid	Type2	生	22.8	57.0	陰性	8.0	12.8
F	女	1Y7M	縦隔	II	FH	なし	aneuploid	Type1	生	21.2	68.9	精検	19.4	36.0
G	女	1Y6M	縦隔	I	FH	なし	aneuploid	Type1	生	29.8	35.3	陰性	9.2	21.1

1 日本小児外科学会分類による  
2 精密検査依頼時の測定値

表3 スクリーニング陰性または未受検で発症した児

症例	性別	予後因子					Brodeur分類	予後	発症時		マス・スクリーニング測定値			
		発症年齢	部位	病期 <sup>1</sup>	嶋田分類	N-myc増幅			VMA (μg/mgCRE)	HVA (μg/mgCRE)	6MS 18MS	判定	VMA (μg/mgCRE)	HVA (μg/mgCRE)
a	男	2Y4M	副腎	ⅣA	UH	100以上	Type3	死	9.3	67.8	6MS 18MS	陰性	12.9	17.9
												未受検		
b	男	4Y5M	副腎	ⅣA	UH	30	Type3	死	264.5	413.1	6MS 18MS	陰性 陰性	8.7 6.8	19.4 20.2
c	男	5Y0M	副腎	ⅣA	UH	なし	Type3	生	586.5	220.8	6MS 18MS	陰性 陰性	10.8 11.0	14.4 17.9
d	男	1Y4M	副腎	ⅣA	FH	100	Type3	生	14.3	27.6	6MS 18MS	陰性	9.1	19.5
												受検時期に達せず		
e	女	2Y5M	副腎	ⅣA	UH	なし	Type3	生	247.2	329.6	6MS 18MS	陰性	14.7	23.6
												未受検		

1 日本小児外科学会分類による

3.5 18MS陰性または未受検等での発症例

今回の検査期間中に18MS陰性または未受検で発症が確認された5症例を表3に示した。5症例はすべて6MS陰性であった。しかも、症例b・cは18MS受検時にも陰性で、その後4歳5か月と5歳に発症した。また、症例a・eは、18MS未受検で、2歳以降に発症した。症例dは18MS受検時期に達する前の1歳4か月で発症したが、他の4症例と比較してVMA・HVA測定値がカットオフ値に近似しており、非分泌型の神経芽細胞腫であった。また、5症例のうち2症例が死亡するなど、すべて病期ⅣA、Type3治療困難群であった。

5症例の発症時期や病型から、現行のMSでは発見不可能であることが示され、今後、MSシステム全体の検討が必要であろう。

4 ま と め

宮城県で行われた約10年間の18MSにおいて、対象児121,853名に対し患児7名を発見したが、この検査期間中、18MS陰性または未受検で発症した5症例が存在し、うち2症例が死亡するなどすべて重篤な症例であった。

しかし、18MSは、6MSよりType2治療有効群の発見率が高い上に、精密検査依頼時の高VMA群において陽性反応適中率が高いなど、18MSの有効性が示唆された。

現在、厚生労働省による検査実施時期を含めたマス・スクリーニングシステムの検討が行われており、今回報告した宮城県における18MSの結果は、症例数は少ないものの貴重なデータになると考えられる。

このように、全国的に神経芽細胞腫マス・スクリーニングをめぐる状況に変化が見られ、宮城県においても18MSの単独事業が無くなったことから、6MSの対象県民が有効に受検できるように、更に周知徹底することが重要である。

参 考 文 献

- 1) 社会福祉法人 恩賜財団母子愛育会：改訂版 神経芽細胞腫マス・スクリーニング，2，26～34（1989）
- 2) 氏家恭子等：宮城県保健環境センター年報，19，165～168（2001）
- 3) 氏家恭子，菊地奈穂子，白石廣行，林富，中村潤，土屋滋：日本マス・スクリーニング学会誌，12，1，47～51（2002）
- 4) Brodeur GM，Nakagawara A: Molecular basis of clinical heterogeneity in neuroblastoma，Am J Pediatr Hematol Oncol 14，111～116（1992）
- 5) Hayashi Y，Ohi R，Yaoita S，Nakamura M，Kikuchi Y，Konno T，Tsuchiya S and Shiraiishi H: Problems of neuroblastoma screening for 6 month olds and results of second screening for 18 month olds，J Pediatr Surg，30，467～470（1995）
- 6) 林富，大井龍司，中村潤他：神経芽腫18ヶ月二次スクリーニング（二次マス）発見5例と二次マス陰性後発症2例の検討，平成9年度厚生省心身障害研究，72～75（1997）

## PCR法を用いた遺伝子組換え食品の検査

### An Examination of Genetically Modified Foods with PCR Procedure

渡邊 節 佐々木 美江 山口 友美  
後藤 郁男 畠山 敬 齋藤 紀行  
白石 廣行\*<sup>1</sup>

Setsu WATANABE, Mie SASAKI, Yumi YAMAGUCHI  
Ikuo GOTO, Takashi HATAKEYAMA, Noriyuki SAITO  
Hiroyuki SHIRAISHI

キーワード：遺伝子組換え作物，PCR，DNA抽出

Key Words : Genetically Modified Organism , PCR , DNA extraction

遺伝子組換え食品の検出技術を確立するため、国の通知に準じて大豆粉末、豆腐、トウモロコシ粉末及びスナック菓子を対象に組換え遺伝子の検出を行うと共に、DNA抽出方法の検討を行った。その結果、安全性未審査食品においてもPCR ( Polymerase Chain Reaction ) 法による定性感度は0.5%含有の検出が可能であった。また、シリカゲル膜法がCTAB ( Cetyl trimethyl ammonium bromide ) 法に比較し食品の種類に関係なく高率に抽出可能であった。さらに、水分含量が多い豆腐や加工工程で精製、加熱、添加物等があるスナック菓子ではDNAを抽出する前に検体をエーテル処理することにより抽出量が増加することが明らかとなった。

#### 1 はじめに

近年、遺伝子組換え技術を応用した作物が米国、カナダ等で栽培され、我が国でも遺伝子組換え作物及びそれらを原料とした加工食品が流通している。国では消費者の高い関心のなか、平成13年4月から遺伝子組換え食品の安全性審査を義務付け、組換え食品等の安全性確認のシステムを作ると同時に、遺伝子組換え作物を使用した食品に関して表示制度を設けた。<sup>1)</sup>平成13年3月には「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」を通知し<sup>2)</sup>、安全性未審査食品及び安全性審査済み食品の適正表示を確認するための検査方法を示した。

通知では安全性未審査食品検査はラテラルフロー法、定性PCR法、安全性審査済み食品検査ではELISA法、定量PCR法を用いるとされている。しかし、ラテラルフロー法やELISA法はタンパク質を検査対象とするため、材料を加工する間に物理化学的变化を受けた食品中の組換え体タンパク質の検出感度が低下すると考えられる。そこで我々は組換え遺伝子を増幅するPCR法を採用し、DNA抽出方法やDNA抽出前の処理方法について検討したので報告する。

#### 2 材料及び方法

##### 2.1 検査対象検体

###### 2.1.1 安全性審査済み食品

ラウンドアップ・レディ大豆 ( RRS ) をそれぞれ5%、1%、0.5%、0%含有する大豆粉末4件及び市販の豆腐9件を検査対象とし、大豆粉末は1検体3点並行で、市販豆腐は1検体2点並行で検査を実施した。

###### 2.1.2 安全性未審査食品

トウモロコシ粉末3件及び市販のトウモロコシ加工品 ( スナック菓子 ) 10件を検査対象とし、トウモロコシ粉末は1検体のみ、スナック菓子は1検体2点並行で検査を実施した。

なお、スナック菓子はDNA抽出量が少なかった2検体と、多量にDNAが抽出できた1検体について、試料そのもの、前処理として5分間60秒の湯洗いを2回実施し遠心したもの、5分間60秒の湯洗いを2回実施後エーテルで油分を除去し遠心したもの、さらに試料をエーテル処理後遠心したものの4系列に分けてシリカゲル膜法を用いてDNA抽出を行い比較した。

##### 2.2 DNA抽出法

大豆粉末、トウモロコシ粉末はそのまま2gを試料とした。豆腐はビニール袋内で均一にすり潰し、その2gを試料とした。スナック菓子はチョコレート等のコーティングがある部分を除去し120g秤量後粉碎し、うち2

\* 1 現 (財)宮城県公衆衛生協会

g を試料とした。試料からのCTAB法並びにシリカゲル膜法によるDNA抽出手順を図1に示した。DNA量の算出は、DNA抽出液から10 $\mu$ lを採り、精製水90 $\mu$ lを加えて紫外線可視分光解析システム(ベックマン社 DU650)を使用し吸光度(10倍希釈)を測定した。OD260nm及びOD280nmの値からDNA濃度(OD260nm値 $\times$ 50 $\times$ 希釈倍率)及びDNA純度(OD260nm/OD280nm)を計算し、定性用として10ng/ $\mu$ lとなるように希釈して用いた。

### 2.3 遺伝子の検出法

#### 2.3.1 大豆粉末・豆腐

DNA抽出液はレクチン遺伝子(Le1-n02, Le1-Taq)をプライマーとしてPCRを行い、大豆特有の内在性遺伝子を確認した後、組換え体遺伝子をP35S及びRRSプライマーを用いて検出した。PCRの反応液は通知に準じて1検体当たり10 $\times$ PCR Buffer2.5 $\mu$ l, 2mM dNTP mixture2.5 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub>溶液1.5 $\mu$ l, 20 $\mu$ M primer 5'溶液0.25 $\mu$ l, 20 $\mu$ M primer 3'溶液0.25 $\mu$ l, Ampli Taq 0.125 $\mu$ l, 精製水15.375 $\mu$ l, 試料DNA溶液2.5 $\mu$ l, 全量25 $\mu$ lで定性を行った。PCRは、95 $\cdot$ 10分反応後、95 $\cdot$ 30秒, 60 $\cdot$ 30秒, 72 $\cdot$ 30秒を1サイクルとして40サイクル増幅後、72 $\cdot$ 7分保った。PCR増幅反応液は2.5%アガロースゲル電気泳動により分離し、DNA増幅バンドをエチレンブロミドで染色し、電気泳動パターンを確認した。

#### ①CTAB法

##### 粉碎試料

CTAB緩衝液  
55 30分放置 攪拌

##### 均質化溶液

フェノール/クロロホルム混合液  
懸濁 7500 $\times$ g 15分

##### 水層

クロロホルム/イソamilアルコール混合液  
懸濁 7500 $\times$ g 15分

##### 水層

等容量イソプロピルアルコール  
混和 7500 $\times$ g 10分 上清捨てる

##### 沈殿

70%エタノール  
7500 $\times$ g 1分

##### 沈殿

2~3分真空乾燥  
TE緩衝液 混和後15分放置 混和完全溶解  
RNaseA 37 30分  
CTAB緩衝液  
クロロホルム/イソamilアルコール懸濁  
7500 $\times$ g 10分 上清捨てる

##### 水層

イソプロピルアルコール  
混和 7500 $\times$ g 10分 上清捨てる

##### 沈殿

70%エタノール  
7500 $\times$ g 1分

##### 沈殿

2~3分真空乾燥  
水50 $\mu$ l

DNA抽出溶液

#### 2.3.2 トウモロコシ粉末・スナック菓子

DNA抽出液はZEIN遺伝子(Zein n-5', Zein n-3')をプライマーとしたPCRを行いトウモロコシ特有の内在性遺伝子を確認後、通知に準じてCBH1st(CaM03-5', CBH02-3') CBH2nd(Cry9C-5', 35Ster-3')のプライマーで組換え遺伝子を検出した。以下は大豆と同様に行った。なお、内在性遺伝子を確認できなかった検体については組換え体の検出を行わなかった。

#### 2.4 遺伝子のシーケンス

遺伝子組換え体豆腐について、RRSプライマーでPCRを行い、PCR生成物についての全塩基配列をシーケンス(パーキンエルマー社: 310 Genetic Analyser)を使用し、ダイターミネーター法で解析した。

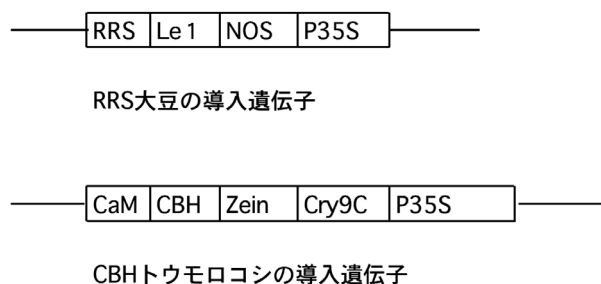


図2 遺伝子検出に用いたプライマーの位置

#### ②シリカゲル膜法

##### 粉碎試料

API緩衝液, RNaseAを加え混和  
65 15分

##### AP2緩衝液

氷上5分 3000 $\times$ g 5分

##### 上清

2回に分けて負荷

##### QIAshredder spin column

負荷毎10000 $\times$ g 4分

##### 溶出液

1.5倍量AP3緩衝液・エタノール  
混合液を数回に分けて負荷

##### mini spin column

1回の負荷毎に1000 $\times$ g 1分

溶出液を捨てる

AW緩衝液を捨てる

1回の負荷毎に1000 $\times$ g 1分

溶出液を捨てる

mini spin columnを10000 $\times$ g 15分

65の水70 $\mu$ lずつ負荷10000 $\times$ g 1分

水を再度70 $\mu$ l負荷

DNA抽出溶液

(厚生労働省 食発第110号通知より抜粋)

図1 試料からのDNA抽出法

### 3 結 果

#### 3.1 PCR法の検知感度

遺伝子組換え体含有が5%、1%、0.5%及び0%と明確な検体についてPCR法で遺伝子の検出を実施した。図3にRRSプライマーを用いた結果を示した。遺伝子組換え体含有が0.5%以上の検体から検出が可能であり、DNA含有量に比例してバンドに濃淡が認められた。さらに、対象のDNA部位とPCR産物の塩基配列が同一であることはPCR産物のシーケンスを実施し、組換え部分と一致することを確認した。

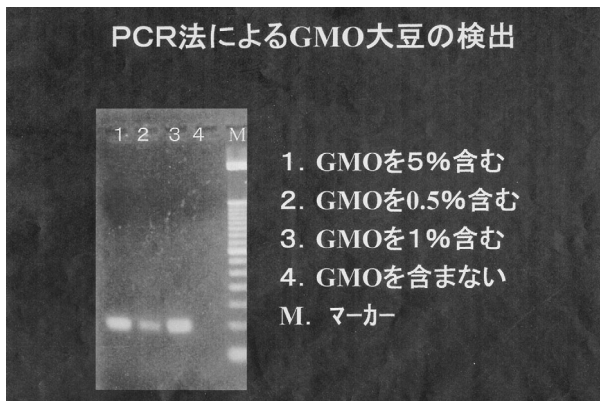


図3 PCR法による遺伝子組換え大豆の検出

#### 3.2 抽出方法の検討

大豆粉末、豆腐、トウモロコシ粉末、スナック菓子からのDNA抽出をCTAB法及びシリカゲル膜法の2法で実施した結果を表1に示した。シリカゲル膜法ではすべての検体から抽出できたが、CTAB法では高濃度のDNA量が抽出できた検体がある一方、PCR法の検査に必要な10ng/μlを抽出できない検体もあった。

#### 3.3 食品の組換え遺伝子検出

大豆粉末、豆腐、トウモロコシ粉末及びスナック菓子の組換え遺伝子検査をシリカゲル膜法とCTAB法の2法でDNAを抽出し実施した結果を表2、表3、表4、表5に示した。複数並行で行ったものは、一点でも検出した場合を組換え遺伝子陽性とした。はじめにDNA抽出溶液

が種特異性のある内在性遺伝子を含んでいることを確認し、次にそれぞれの組換え遺伝子用プライマーを用いて組換え遺伝子の検出を行ったが、豆腐検体番号1、2、3及び5から組換え遺伝子を検出した。また、スナック菓子の検体番号3、4及び10のCTAB法によるDNA抽出溶液からは、内在性遺伝子が2点とも確認できず組換え遺伝子検査はできなかった。それに対してシリカゲル膜法では2点中1点で内在性遺伝子が確認でき、組換え遺伝子検査が可能であった。確認できた検体からは安全性未審査食品のスターリンクは検出しなかった。

表2 大豆粉末の組換え遺伝子検査結果

抽出方法	試料番号	1	2	3	4
CTAB法1	Le1n02	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-
	RRS	+	+	+	-
CTAB法2	Le1n02	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-
	RRS	+	+	+	-
CTAB法3	Le1n02	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-
	RRS	+	+	+	-
判 定		陽性	陽性	陽性	陰性
抽出方法	試料番号	1	2	3	4
シリカゲル膜法1	Le1n02	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-
	RRS	+	+	+	-
シリカゲル膜法2	Le1n02	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-
	RRS	+	+	+	-
シリカゲル膜法3	Le1n02	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-
	RRS	+	+	+	-
判 定		陽性	陽性	陽性	陰性

+ : 陽性 - : 陰性

表1 抽出方法の比較

方法	検体名	検体数	DNA抽出範囲 (ng/μl)	平均抽出量 (ng/μl)	DNA純度
シリカゲル膜法	大豆粉末	12	47.9 ~ 94.1	71.9	1.96 ~ 2.54
	豆腐	18	19.3 ~ 62.7	42.1	1.76 ~ 1.98
	トウモロコシ粉末	3	63.7 ~ 68.9	66.8	1.76 ~ 1.82
	スナック菓子	20	21.2 ~ 88.1	45.1	1.28 ~ 1.64
C T A B 法	大豆粉末	12	60.2 ~ 218.6	137.3	1.71 ~ 2.34
	豆腐	18	3.8 ~ 35.2	14.9	0.71 ~ 2.78
	トウモロコシ粉末	3	38.8 ~ 55.9	49.9	1.51 ~ 1.77
	スナック菓子	20	10.1 ~ 183.5	67.6	0.91 ~ 1.70

表3 豆腐の組換え遺伝子検査結果

抽出方法	試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CTAB法1	Le1n02	+	+	+	+	/	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-	/	+	+	+	+
	RRS	+	+	+	/	/	-	-	/	/
CTAB法2	Le1n02	+	+	+	+	+	+	+		+
	P35S	-	-	-	-	-	-	-		-
	RRS	/	/	/	/	/	/	/		/
判定		陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
抽出方法	試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
シリカゲル膜法1	Le1n02	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	P35S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RRS	/	/	/	/	/	/	/	/	/
シリカゲル膜法2	Le1n02	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	P35S	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	RRS	+	+	+	/	+	/	/	/	/
判定		陽性	陽性	陽性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性

+ : 陽性 - : 陰性 / : 検査不要

表4 トウモロコシ粉末の組換え遺伝子検査結果

抽出方法	試料番号	1	2	3
CTAB法	ZEIN	+	+	+
	CBH1st	-	-	-
	CBH2st	/	/	/
判定		陰性	陰性	陰性
シリカゲル膜法	ZEIN	+	+	+
	CBH1st	-	-	-
	CBH2st	/	/	/
判定		陰性	陰性	陰性

+ : 陽性 - : 陰性 / : 検査不要

### 3.4 DNA抽出前処理

スナック菓子ではDNAを抽出できない検体が多かったことから、スナック菓子4, 6, 8の検体を粉碎後湯洗いあるいはエーテル脱脂の前処理を行い、DNA抽出量の比較を検討した結果を表6に示した。スナック菓子4はコーン、植物油、砂糖、食塩のみの単純な油処理で作られており、原料そのままあるいはエーテル処理がDNA抽出に適していた。また、スナック菓子8はコーンの他ソース、チーズ、乳製品や魚肉エキス等の24種類、スナック菓子6はコーンの他、ソース、砂糖等10種類と多くの材料で作られていたが、エーテル処理することでDNA抽出量が増加する傾向が認められた。

表5 スナック菓子の組換え遺伝子検査結果

抽出方法	試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CTAB法1	ZEIN	+	+			+	+	+	+	+	
	CBH1st	-	-			-	-	-	-	-	
	CBH2st	/	/			/	/	/	/	/	
CTAB法2	ZEIN	+	+				+	+	+	+	
	CBH1st	-	-				-	-	-	-	
	CBH2st	/	/				/	/	/	/	
判定		陰性	陰性	/	/	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	/
抽出方法	試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
シリカゲル膜法1	ZEIN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	CBH1st	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	CBH2st	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
シリカゲル膜法2	ZEIN	+	+	+		+	+	+	+	+	+
	CBH1st	-	-	-		±	-	±	-	-	-
	CBH2st	/	/	/		-	/	-	/	/	/
判定		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

+ : 陽性 - : 陰性 ± : 疑陽性 / : 検査不要



表6 前処理方法の比較

(ng/μl)

スナック菓子	前処理なし	湯洗い	湯洗い+エーテル	エーテル
No.4	32.3	4.5	3.7	28.8
No.6	35.1	82.7	16.8	41.0
No.8	15.8	17.1	10.1	25.4

#### 4 考 察

市販品の遺伝子組換え食品の検出法の技術確立を目的として、大豆とトウモロコシを検査対象に組換え遺伝子検出を行った。組換え遺伝子検査には定性法と定量法が示されているが、今回我々は安全性未審査食品に対して用いられる定性法を行った。その結果、遺伝子組換え体の含有量が明確な大豆粉末において0.5%以上の検体から組換え遺伝子が探知でき、PCR法が安全性未審査食品の検査に有用であることが確認できた。このことから、今回検査した市販豆腐で「遺伝子組換え大豆は不使用」と表示されていた4件が陽性と確認されたことは、0.5%以上の組換え体含有があったと推測された。現在の表示記載は、遺伝子組換え農作物と非遺伝子組換え農作物を生産、流通及び加工の各段階で管理者が分別生産流通管理し、その旨を証明する書類を確認した上で行われている。この分別生産流通管理が適切に行われている場合は、意図しない混入があったとしてもおおむね5%以下とされている。今回、PCR法の検出感度は0.5%以上であったが、定性検査のため法律上規制を受ける5%を越え含有していたかは確認できなかった。海外依存の食品が増えている現状では、食の安全を確保するため定量検査を行い、適正表示を確認する必要があると思われる。

一方、トウモロコシ粉末及びスナック菓子では安全性未審査のスターリンクの遺伝子組換え体は検出されなかった。大豆粉末とトウモロコシ粉末は原料に近い形態で、DNAを大量に純度も高く抽出できたが、加工食品のスナック菓子での抽出は量及び純度も低い傾向であった。これは食品加工工程中の加熱、pH、油分、他のタンパク質等添加物によりDNA自体の断裂や消失、あるいはDNA抽出溶液に不純物が残存した結果と考えられた。そのた

め、遺伝子検出では食品からいかに高純度かつ高濃度のDNAを抽出するかが重要であると思われ、抽出効率を比較するため、通知のCTAB法とシリカゲル膜法の2法を検討した。

試料中のタンパク質を変性・除去後、DNAをエタノール析出し回収するCTAB法は、原料や原料に近い形状を示す試料からDNAを多量に抽出可能であった。しかし、検体間でのばらつきが大きいこと、加工品からの抽出量が少ないこと、有機溶媒を使用する上、手技が煩雑で長時間を要するなどの短所も認められた。

一方、シリカゲルメンブランにDNAを吸着させるシリカゲル膜法は、加工品においてもPCRを実施するに十分なDNA量が抽出可能であること、純度の高いDNAが抽出できること、抽出方法が簡便である等の長所があり、通常検査での有用性が示された。

次に、加工工程の多いスナック菓子では、シリカゲル膜法でもDNA抽出の効率が低いことから、粉碎後湯洗いやエーテル処理と脱塩、脱脂等添加物の除去を試みた。その結果多くの食材が使用されているスナック菓子の複合食品からのDNA抽出は、何らかの前処理が抽出量を増加させると考えられ、今後さらに検討する必要がある。

#### 参 考 文 献

- 1) 平成12年3月31日付農林水産省告示第517号「遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第7条第1項及び生鮮食品品質表示基準第7条第1項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準
- 2) 平成13年3月27日付食発第110号「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」

## 宮城県内の温泉施設におけるレジオネラ属菌実態調査（第2報）

### Isolation of *Legionella* Species from Hot Springs in Miyagi Prefecture

佐々木 美江 山口 友美 畠山 敬  
渡邊 節 齋藤 紀行 白石 廣行\*<sup>1</sup>

Mie SASAKI, Yumi YAMAGUTI, Takashi HATAKEYAMA  
Setsu WATANABE, Noriyuki SAITO, Hiroyuki SHIRAIISHI

キーワード：レジオネラ，アメーバ，水垢，PFGE

Key Words : *Legionella* , Amoeba , Fur , PFGE

昨年度，レジオネラ属菌が検出された施設について清掃方法や殺菌方法を指導した後に，継続調査したところ良好な結果が得られた。また，アメーバが検出された浴槽からはレジオネラ属菌が高率（71%）に検出されることが確認された。

#### 1 はじめに

レジオネラ症は，主に高齢者や免疫力の低下している易感染者がレジオネラ属菌の感染によって引き起こす日和見感染症で，高齢化社会では重要な感染症の一つである。国内の発生は，平成12年に83件，平成13年に151件確認され，宮城県内では平成12年，13年にそれぞれ3名の患者が報告されている。レジオネラ症の感染源は24時間風呂あるいは温泉・入浴施設<sup>1)</sup>または空調などであるが，近年の生活の多様化と共にこれらの設備や施設が拡大し，社会的にも本感染症の発生動向には注意が払われている。この背景のなか，平成13年3月に静岡県の複合レジャー施設で，同年6月に茨城県の入浴施設で，また平成14年1月には東京都内の公衆浴場が感染原と疑われる，レジオネラ肺炎による死者が確認されるなど，レジオネラ属菌による事件が相次いで発生し，本感染症に対する行政サイドの対策の不備が明らかとなっている。

そこで多くの温泉地が存在している宮城県では，行政と検査が一体となり温泉施設での感染防止対策を模索し，平成12年度から「温泉施設におけるレジオネラ属菌の生息調査」を実施してきた。平成12年度は，30施設101件の温泉水について調査を行い，約40%の浴槽水からレジオネラ属菌を検出すると共に，レジオネラ属菌と水垢の関連性について考察した。今年度は新たな施設を加えて，レジオネラ属菌の生息実態調査を実施した。また，レジオネラ属菌除去方法を検討事項に加え，継続調査を実施し，更に，水垢中のアメーバとレジオネラ属菌の関係について詳細に調査するため，浴槽水中のアメーバ生息調査を併せて実施したので報告する。

\* 1 現 財 宮城県公衆衛生協会

#### 2 材料及び方法

##### 2.1 レジオネラ属菌生息実態調査

平成12年度（第Ⅰ期調査）にレジオネラ属菌が検出された17施設と，新たに加えた4施設の合計21施設を対象とし，6月（第Ⅱ期調査）と11月（第Ⅲ期調査）の2回にわたり実施した。各施設の貯湯タンク・注湯口・浴槽から各々温泉水を採取すると共に浴槽周辺のふきとりも行い検体とした。なお，第Ⅱ期，第Ⅲ期調査での検体数は，温泉水が113件，ふきとりが65件であった。検査項目は昨年と同様にpH，水温，一般細菌数，ECについて実施した。

##### 2.2 継続調査

第Ⅰ期，Ⅱ期調査後，保健所にレジオネラ属菌を除去するための薬剤処理，水垢（アメーバ）の除去等の施設への指導を依頼し，施設において実施後，レジオネラ属菌の検出状況を再確認した。

##### 2.3 レジオネラ属菌の検出方法

レジオネラ属菌の検出及び培養後の同定は昨年と同様に行った。ただし，分離培地はWYO培地にMWY培地（自家調整）を加えて行った。

##### 2.3 アメーバの生息調査

アメーバの生息調査は20施設45浴槽を対象に，検出方法は図1の「新版レジオネラ症防止指針」に基づき実施した。すなわち，大腸菌塗抹培地は大腸菌を予め60で不活化し，無栄養寒天培地に塗布して作製した。アメーバ検査の検体として浴槽水は，原水あるいは50倍濃縮した1 mLを大腸菌塗抹培地に塗布して30で培養した。培養中は毎日，顕微鏡で観察し，プラーク形成が認められた場合，アメーバ陽性とした。

2.4 菌株のDNA解析

DNA解析はパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を国立感染研究所<sup>2)</sup>の方法に準じて行った。

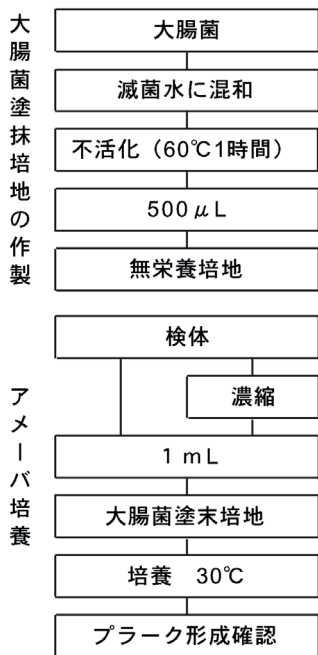


図1 アメーバの検査方法

3 結果

3.1 レジオネラ属菌検出状況

レジオネラ属菌の検出状況を新規施設、継続施設別に図2に示した。レジオネラ属菌は、全施設で見ると温泉水からは48%、ふきとりからは40%検出された。しかし、新規施設、継続施設別に結果を比較すると、継続施設の温泉水からは43%、新規施設では63%と新規施設の検出率が高くなった。一方、ふきとりでは両施設ともほぼ同じ検出率であった。

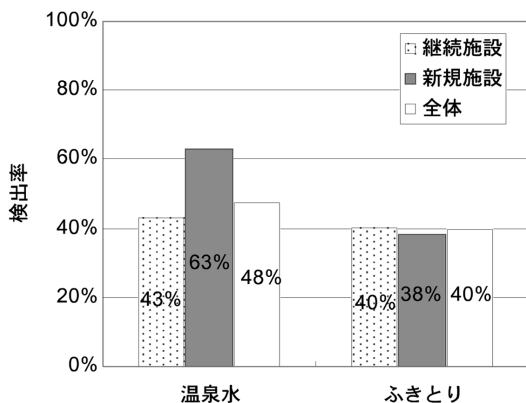


図2 レジオネラ属菌検出状況

3.2 継続調査

平成12年度の調査（第Ⅰ期調査）でレジオネラ属菌が検出された16施設について、行政指導と平行して第Ⅱ期、

Ⅲ期調査を継続して実施した。その結果、16施設のうち図3に示すようにレジオネラ属菌陽性の施設は第Ⅱ期調査で10施設（63%）、第Ⅲ期調査では7施設（44%）と明らかに減少傾向が認められた。

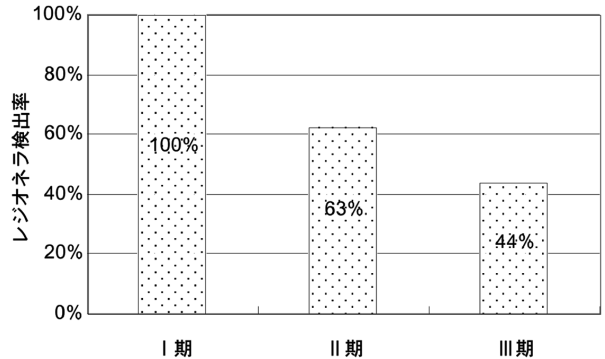


図3 継続施設のレジオネラ属菌検出率

3.3 アメーバ生息調査

今回、レジオネラ属菌の検出と同時に実施したアメーバ検査の結果、図4示すようにアメーバは45浴槽中14浴槽（31%）から検出された。更にレジオネラ属菌の検出率とアメーバの検出状況を比較すると、アメーバが検出された14浴槽中10浴槽（71%）から、アメーバが検出されなかった31浴槽中7浴槽（23%）からレジオネラ属菌が検出され、アメーバが生息する浴槽から高率にレジオネラ属菌を検出した。（図5）

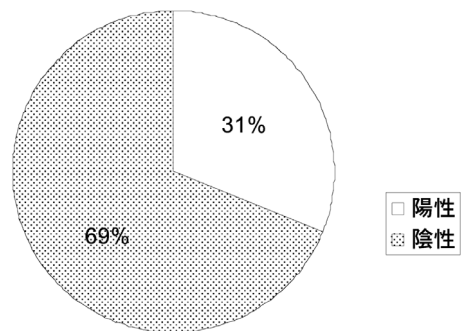


図4 浴槽中のアメーバ検出率

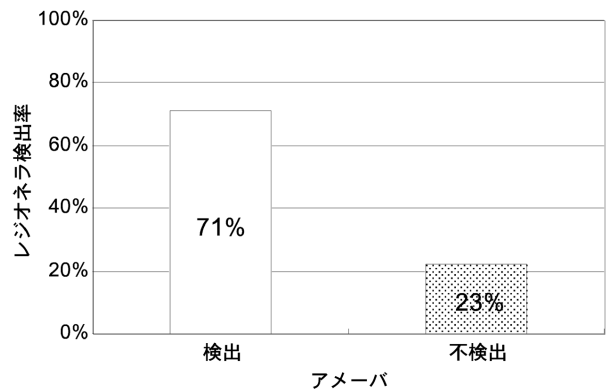


図5 レジオネラ属菌とアメーバ

### 3.4 検出菌株の分析

#### 3.4.1 血清型

検出されたレジオネラ属菌の菌種は95%が*L.pneumophila*、他に*L.bozemanii*、*L.micdadii*、*Legionella sp*であった。なお、*L.pneumophila* 血清群は、血清群 4、5 が多く検出された。(図 6)

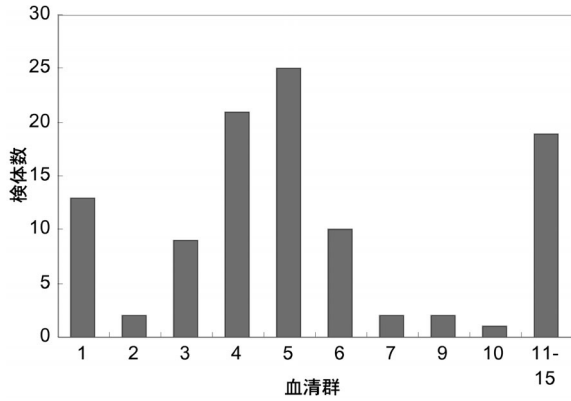


図 6 検出された*L.pneumophila*の血清群

#### 3.4.2 PFGE解析

同一源泉のA・B施設とそれぞれ源泉が異なるCとD施設から分離された*L.pneumophila* 血清群 6 の13菌株についてDNA解析を行い、その泳動パターンを図 7、8 に示した。なお、A施設においては、a、b浴槽から分離した菌株を対象とした。

A施設のa浴槽でPFGEパターンを比較すると第Ⅱ期調査で検出された1から4菌株は同一パターンを示した。第Ⅲ期調査では検出した5、6菌株間では同一であったが、前述の1～4菌株とはPFGEパターンは異なっていた。

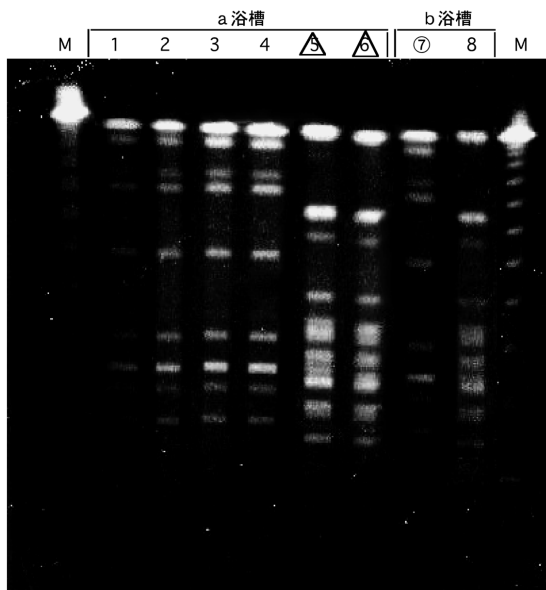


図 7 A施設で検出された菌株のPFGEパターン

：菌株 7 は第Ⅰ期調査で検出  
 ：菌株 4、8 は第Ⅱ期調査で検出  
 ：菌株 5、6 は第Ⅲ期調査で検出

次にb浴槽からは第Ⅰ期、Ⅱ期調査で検出された7、8菌株間では異なっていたが、7菌株はa浴槽の第Ⅱ期調査で検出された1～4菌株と一致していた。

次に、B施設の同一浴槽から異なる調査時期に検出された1、2、3菌株は、同一パターンを示した。なお、源泉の異なるC、D施設から検出された菌株とは、異なることも確認された。

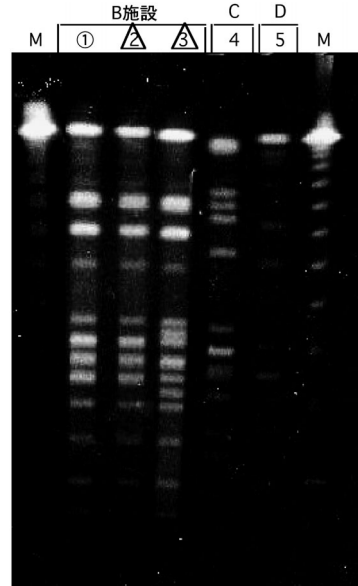


図 8 B、C、D施設で検出された菌株のPFGEパターン

：菌株 1 は第Ⅰ期調査で検出  
 ：菌株 4、5 は第Ⅱ期調査で検出  
 ：菌株 2、3 は第Ⅲ期調査で検出

## 4 考 察

近年、公衆浴場・温泉などを利用後、レジオネラ症を発症する事例報告が報告されている。平成14年7月、宮崎県日向市で、温泉からの感染が疑われる患者242名(2名死亡)の集団感染も報道されており、温泉施設での感染事故防止の方策は急務である。そこで、行政と検査とが一体となって感染防止策を模索するため、宮城県では平成12年度からレジオネラ属菌調査事業を実施している。その結果、調査した半数近い温泉水からレジオネラ属菌が検出され、他県と同様に汚染していることが明らかになった<sup>3)</sup>。今年度の新たな調査施設は4施設とし、昨年レジオネラ属菌が検出された17施設については、継続して生息実態調査を行うと共に薬剤処理、水垢(アメーバ)の除去等で汚染を防止することが可能か検討した。生息実態調査では、昨年と同様に温泉水48%、ふきとり40%からレジオネラ属菌が検出された。しかし、昨年レジオネラ属菌が検出された16施設に対して協力を依頼し、薬剤処理や水垢(アメーバ)の除去、電動ブラシによる物理的な清掃等を指導し、その後、6月(第Ⅱ期調査)と11月(第Ⅲ期調査)の2度にわたり継続して検査を行ったところ、第Ⅱ期調査は63%、第Ⅲ期調査では44%とレジオネラ属菌の検出率が明らかに減少する傾向が見られ

た。これは電動ブラシなどによる清掃や換水ろ過装置を薬剤によって処理し、水垢（ぬめり）等を排除したためと考えられた。

また、今回の調査でレジオネラ属菌の検出と同時にアメーバの検出を試みた結果、30%の浴槽からアメーバが検出され、その浴槽の70%からレジオネラ属菌が検出された。レジオネラ属菌は浴槽水中では発育せず、特定のアメーバ内で増殖すること<sup>5)</sup>が知られている。昨年 of 我々の調査でも水垢（アメーバ）から高率にレジオネラ属菌を検出すると共に<sup>4)</sup>、水垢にはアメーバが関与していることを明らかにした。これらの調査成績からレジオネラ属菌の増殖を防ぐには水垢の清掃が第一義的な対策と考えられた。そこで浴槽の化学的殺菌に加え、電動ブラシの使用あるいは配管の清掃電動ブラシの使用あるいは配管の清掃を実施することが、レジオネラ属菌の汚染防止に有効であると推測された。

次にPFGE解析の結果、同一浴槽から異なる時期に検出された*L.pneumophilla*の同一血清群の菌株は、同一パターンを示していた。このことは、浴槽の清掃等が不完全で同一菌株が生存していたと推測され、汚染原因の追求にPFGE解析は有用であると考えられた。すなわち、同一施設の異なる浴槽から同じPFGEパターンが検出された場合は、貯湯タンクまたは配管など浴槽に温泉水が注水される前の共通する部分を汚染と捉え、これに対して、検査時期ごとに異なるPFGEパターンである場合は、新たなレジオネラ属菌が混入していると推定し、対策を講じることが可能であろう。今後、更に行政指導と協力して調査を進めたいと思う。

## 5 ま と め

- (1) レジオネラ属菌の増殖には、アメーバが関与していることが確認された。
- (2) 物理的な清掃と薬剤処理を併用することはレジオネラ属菌の除去に有用と考えられた。
- (3) 同一血清型であっても様々なPFGEパターンが得られることから、レジオネラ属菌においてもPFGE解析は有用であった。

## 6 謝 辞

本調査を行うにあたり生活衛生課環境衛生班、大崎保健所環境公害班、仙南保健所環境公害班の担当職員の方々に多大なるご協力を賜り深く感謝します。

## 参考文献及び資料

- 1) 峯下昌道他：循環式浴槽が感染源と考えられたレジオネラ肺炎の1例，感染症誌，73臨増，156（1999）
- 2) 前川潤子：レジオネラのDNA検査法，平成10年度希少感染症診断技術研修会資料，13～14（1998）
- 3) 五十嵐美佳子他：新潟県におけるレジオネラ属菌の生息実態に関する研究，新潟県保健環境科学年報15，73～77（2000）
- 4) 佐々木美江他：宮城県内の温泉施設におけるレジオネラ属菌実態調査（第1報），宮城県保健環境センター年報19，62～64（2001）
- 5) 小畑勝則：レジオネラ対策におけるアメーバの重要性，防菌防塵誌Vol 30，No.5，217～223（2002）

## 宮城県内の市販魚介類及び海水・海泥からの ビブリオ・バルニフィカスの検出

Isolation of *Vibrio vulnificus* from Sea-food , Sea-water and Sea-mud in Miyagi Prefecture

齋藤 紀行 佐々木 美江 山口 友美  
畠山 敬 渡邊 節 白石 廣行\*

Noriyuki SAITO , Mie SASAKI , Yumi YAMAGUCHI  
Takashi HATAKEYAMA , Setsu WATANABE , Hiroyuki SHIRAISHI

キーワード：ビブリオ・バルニフィカス，市販魚介類，海水・海泥

Key Word : *Vibrio vulnificus* , Sea-food , Sea-water , Sea-mud

基礎疾患を有するヒトへ重篤な感染を起こすビブリオ・バルニフィカスの宮城県内の生息状況と流通魚介類汚染実態を明らかにするため，県内沿岸部1定点の海水・海泥を定期的に採取，また魚介類を定期的に購入し菌検出を行った。その結果，定点では7月から9月の海水・海泥から，また県内産のアサリ3件からVvが検出され，宮城県内の沿岸部にもVvが生息することが確認された。

### 1 はじめに

ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus* : Vv) は腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus* : Vp) と同じビブリオ属に分類される海洋細菌である。Vvによる感染症はVpと同様，魚介類の喫食により発症し，重篤な場合は急激な壊死性筋膜炎から敗血症を起こし死に至る。我が国での患者発生は過去20年間で約100件と少ないが，韓国では年間約35件<sup>1)</sup>，米国では年間約90件の発生が報告されている<sup>2)</sup>。昨年，熊本県内で7月から10月にかけて魚介類の生食を原因とするVv感染患者が8名発生し3名が死亡<sup>3)</sup>，また静岡県内でも1名の患者が発生し死亡している。Vv感染のハイリスク群として肝疾患あるいは糖尿病等の基礎疾患保有者が挙げられており，前述の死亡患者はいずれも肝臓障害の持病を持っていた。我が国には，ハイリスク群となるC型肝炎ウイルス感染者100~200万人，B型肝炎ウイルス感染者120~140万人，糖尿病患者700万人，大量飲酒者200万人，がいと推計されている<sup>4,5)</sup>。また，日本人の食習慣に魚介類の生食があることからVv感染症が発生する可能性はこれまで確認された数字より高いと考えられる。

そこで，宮城県内におけるVv感染症の発生予防の資料に供すること目的として，県内の沿岸部のVv生息状況を定期的に1定点の海水・海泥について，また市中流通魚介類のVv汚染状況調査を市販魚介類についてVv検索を実施した。なお，Vpの検出状況についても同時に調査した。

\* 現 宮城県公衆衛生協会

### 2 方法と材料

#### 2.1 調査期間

調査は平成13年4月から平成14年3月まで行った。ただし，食品についてのVv検査は6月から，海水・海泥についてのVv検査は7月から実施した。

#### 2.2 調査材料

##### (1) 海水・海泥

宮城県名取市閉上の汽水域（増田川河口）を検査定点とし，月に1度，海水約500ml，海泥約100gを採取しこれを検体とした。

##### (2) 市販魚介類食品

月に1度，小売店よりアジ2件，アサリ2件，県内産海産物（ホタテ，ホヤ等）1件を購入し検査対象食品とした。更に，Vp食中毒事例等で搬入された県内産の魚介類の一部についても検査対象検体とした。

#### 2.3 検査方法

- (1) 使用培地：海水・海泥の増菌用としてアルカリペプトン水培地（APW），分離用としてTCBS，mCPC（Cellobiose-PolymyxinB-Colistin 変法寒天，日水製薬）培地を，確認用として3%食塩加TSI及びLIM，0，6，8，10%食塩加ペプトン水（食塩耐塩試験），及びアラビノース培地を用いた。
- (2) 海水：海水100mlにAPW粉末2gを加えこれを原液とし，原，10倍，100倍（場合によっては1000，10000倍）希釈液について各3本をMPN管で培養した。翌日，各MPN管からTCBS及びCPC培地でVv及びVpを分離し，菌株の生化学的性状確認を行った結果を基に100ml当

たりのMPN値を算出し、菌数とした。

- (3) 海泥：海泥20gをAPW180mlに加えこれを10倍液とし、100倍、1000倍の希釈液を調整し、海水と同様にしてVv、Vpの1g当たりの菌数(MPN値)を求めた。
- (4) 食品：それぞれの検体(アジのエラ、アサリのむき身、ホタテの中腸腺、ホヤのむき身)25gをPBS 225mlに添加し袋の上から手揉みにより混和させ、これを10倍希釈液とした。更にアルカリ性ペプトンで希釈を行い海水と同様にしてVv、Vpについての1g当たり菌数(MPN値)を求めた(生食用魚介類の成分規格規準による)。
- (5) 菌種の同定：分離した菌株はそれぞれの確認培養での生化学的性状試験よりVv、Vpの菌種を確認し、Vpは市販抗血清(デンカ生研)でO、K抗原を、Vvは国立感染症研究所より分与された血清でO抗原型を決定した。
- (6) 遺伝子検索：PCR法によりVvの菌株はVv特異溶血毒素遺伝子Vvh<sup>6)</sup>を、Vpは特異遺伝子LDH<sup>7)</sup>の確認を行った。

### 3 結 果

#### 3.1 食品からのVvの検出状況

市中に流通しているアジ、アサリ及びその他の食品についてVp及びVvの汚染状況調査を行いMPNの結果を表1に示した。また、食品別のVp及びVvの検出状況を表2・表3に示した。アジはいずれも県外産で、Vpは8~11月に検査した8検体のうち5検体から検出されたが、MPN値は3.6~15と低値であった。一方、Vvはいずれのアジ検体からも検出されなかった。アサリは主に県内産であり、Vpは7~9月の6検体全てから検出され、そのうち9月の1検体はMPN値が240と高値を示した。一方、Vvは県内産の7月の1検体と9月の2検体から検出された。次に、県内産海産物を中心に20検体について調査を行った結果、Vvは全く検出されなかった。しかし、7月に発生した食中毒事件の原因食品であった「タコ」のVpMPN値が93で、TDH陽性の血清型O3：K6が検出された。更に、10月に食中毒関連食品として調査した「かき」3検体のうち、1検体からMPN値460と高値を示すTDH陽性のO3：K6株が検出された。

表2 魚介類からのビブリオ・バルニフィカスの月毎検出状況

	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	総計
アジ	0/2	0/1	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/19
アサリ	0/2	1/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	3/20
その他	0/1	0/2	0/3	0/6	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/20
合計	0/5	1/5	0/7	2/10	0/7	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3/59

表1 魚貝類のビブリオ・バルニフィカス及び腸炎ビブリオ汚染状況

検体採取日 平成13~14年	検体種類	Vv (MPN) (MPN/g)	Vp (MPN) (MPN/g)
6月	アジ	<3	<3
	アジ	<3	<3
	アサリ	<3	<3
	アサリ	<3	<3
7月	ホタテ	<3	<3
	たこ	<3	93
	アサリ	<3	14
	アサリ	9.1	23
	アサリ	<3	<3
8月	イシモチ	<3	<3
	ホタテ	<3	3.6
	ホタテ	<3	<3
	ホタテ	<3	<3
	アサリ	<3	3.6
	アサリ	<3	9.1
9月	アサリ	<3	3.6
	アサリ	<3	3.6
	アサリ	<3	23
	アサリ	<3	<3
	ホヤ	<3	<3
	ホタテ	<3	0.72
	ホタテ	<3	0.3
	ホタテ	<3	3.9
10月	ホタテ	<3	0.36
	ホタテ	<3	0.91
	アサリ	<3	<3
	アサリ	<3	3.6
	アサリ	3.6	240
	アサリ	6.2	93
	アサリ	<3	3.6
	アサリ	<0.3	<3
	アサリ	<3	15
	アサリ	<3	<3
11月	アサリ	<3	<3
	アサリ	<3	93
	かき	<3	460
	かき	<3	93
12月	アサリ	<3	<3
	アサリ	<3	9.1
	アサリ	<3	<3
	アサリ	<3	<3
	かき	<3	<3
1月	アサリ	<3	<3
	アサリ	<3	<3
	アサリ	<3	<3
	かき	<3	<3
2月	アサリ	<3	<3
	アサリ	<3	<3
	アサリ	<3	<3
	かき	<3	<3
3月	アサリ	<3	<3
	アサリ	<3	<3
	アサリ	<3	<3
	ホタテ	<3	<3





Vpと酷似していることから菌の分離及び同定は困難である。そこで我々は、mCPC培地で菌を分離したのうち特異的なVvの生化学的性状を示す菌株を選択し、更にPCR法で、VVh遺伝子の確認を行い菌種を決定した。

定点調査での結果、Vpは海水・海泥中に5～8ヶ月間継続して検出されたが特に海水温が高くなる7～9月の海水・海泥中から高い菌数が検出された。Vvは7月～9月の宮城県内の海水・海泥中から少ない菌数であるが検出された。一方、魚介類食品においては、Vpは高率に検出されるが、Vvはほとんど検出されず7月（検出率：50%）と9月（検出率：100%）に流通していた宮城県産のアサリから検出された。このことからVvは県内のアサリが生息する沿岸部あるいは汽水域に生息し、7～9月に旺盛に増殖すると思われる。Vvが検出された検体からは必ずVpも検出されるが、多量の菌数のVpが検出される検体からVvが検出されない場合もあり、VvとVpの生息に相関性は確認できなかった。

今回、菌検出用として培地として使用したmCPC培地にはVv以外のビブリオあるいは腸内細菌の発育を抑制するために高濃度のコリスチン、ポリミキシンBが添加されている。しかし、阻止剤の濃度が高いためVvの発育が強く抑制されることから、測定された菌数は実際の生息数より低く測定されている可能性があり、県内の沿岸部には測定値より高値のVvが生息していると思われる。

これまで県内でVvの患者発生は確認されていないが、県内にVvのハイリスク群が数多くいること、また県内沿岸部でVvの生息あるいはVv汚染食品の流通が確認されたことから、Vv感染症患者発生の可能性が充分あると考えられる。今後、Vv感染症の発生動向に注意を払うと共にVvの生息調査を継続して行う必要があると思われる。

### 参 考 文 献

- 1) Communicable Diseases Monthly Report, 12 (2001)
- 2) Mead PS, et al: Eerg Infect Dis 5, 607 (1999)
- 3) 宮坂次郎 他: Vibrio vulnificus感染症事例と食品・環境調査について, 衛生微生物技術協議会 第23回研究会講演抄録集, p39 (2002)
- 4) 厚生省の指標 国民衛生の動向 (2001)
- 5) 岡谷明 他: 糖尿病有病率に関する疫学データの収集, 健康日本21糖尿病分科会 (1999)
- 6) 佐藤征 他: 中耳炎および敗血症例から分離された Vibrio vulnificusのPCR, 感染症学雑誌, 75, 307～312 (2001)
- 7) Taniguchi H et al: Comparison of the nucleotid sequences of the genes for the thermostabledirect hemolysin and the thermolabile hemolysin from Vibrio parahaemolyticus. Microb. Pathog., 1, 425～432 (1986)

## HPLC分析対象農薬の多成分一斉分析法の開発

### The Development of Multicomponent Simultaneous Analysis Method of HPLC Analysis Object Pesticides

長船 達也 氏家 愛子 曾根 美千代  
大江 浩

Tatsuya OSAFUNE, Aiko UJIIE, Michiyo SONE  
Hiroshi OOE

キーワード：残留農薬，HPLC，一斉分析法

Key Words : Pesticide Residue , HPLC , Simultaneous Analysis Method

平成13年度告示法により HPLC 分析対象となっている農薬について，一斉分析法の開発を検討したところ，16種農薬の分析が可能となった。8種農産物からの標準添加回収率は，ほぼ60～110%の範囲内であり，変動係数も良好であった。なお，この方法での定量下限値は，各農薬とも0.005 µg/g以下であった。

#### 1 はじめに

食品衛生法では，平成13年5月現在217種（平成14年4月現在229種）の農薬について残留基準が定められているが，これらを告示法に従い分析することは，膨大な時間と労力が必要とされる。そのため理化学部では，従来よりGC/MSおよびHPLC（ポストカラム蛍光分析）を用いた簡便かつ迅速な一斉分析法の検討<sup>1,2)</sup>を行っており，上記農薬のうち85種（異性体，代謝物を含め101種）についての分析が可能となっている。また，他の検査機関においても同様の検討がなされているが，報告の多くはGCまたはGC/MSによる一斉分析法についてであり，ポストカラム法でのN-メチルカーバメート系農薬を除き，HPLCによる一斉分析法の報告<sup>3)</sup>は数少ない。

そこで筆者らはHPLC分析対象農薬（紫外光検出）51種のうち加水分解，置換基修飾，pH調整等の特別な方法によらず，抽出工程を併せることが可能と考えられる24種の農薬について，一斉分析法の開発を検討し，良好な結果を得たので報告する。

#### 2 分析対象農産物・農薬および試薬・装置

##### 2.1 分析対象農産物

いちご，きゅうり，トマト，馬鈴薯，日本なし，大根，白菜，ほうれん草の8種類農産物

##### 2.2 検討対象農薬

エトフェンプロックス，エトベンザニド，シクロスルファミロン，ヘキシチアゾクス，ペンシクロン，ペントキサゾン，テブフェノジド：関東化学㈱

クミルロン，クロフェンテジン，クロリムロンエチル，クロ

ルフルアズロン，ジクロメジン，ダイムロン，フェンピロキシメート(E)，メタベンズチアズロン：和光純薬工業㈱

ジフルベンズロン，ヘキサフルムロン，ルフェヌロン：Dr. Ehrenstorfer

トリベヌロンメチル，シプロジニル，シラフルオフェン：Riedel-de Haen

フルフェノクスロン：林純薬工業㈱

各農薬標準品について，1000 µg/mlの標準原液（メタノール溶液，但しクロフェンテジン，クロルフルアズロン，シクロスルファミロン，テフルベンズロンについてはアセトニトリル溶液）を調製，冷蔵保存をし，検量線作成用には0.05，0.1，0.25，0.5，1.0 µg/mlのメタノール溶液を用時調製した。

##### 2.3 装置

HPLC：島津LC-10A

検出器：フォトダイオードアレイ検出器SPD-M10AV  
カラム：Inertsil ODS-3（4.6mm i.d x 250mm）

##### 2.4 試薬

アセトニトリル，アセトン，n-ヘキサン，メタノール：残農分析用，関東化学㈱

メタノール：HPLC用，和光純薬工業㈱

塩化ナトリウム，硫酸ナトリウム（無水）：残農分析用，関東化学㈱

Mega Bond Elut SAX/PSA：Varian

#### 3 方法

##### 3.1 HPLC分析条件の検討

24種の農薬標準品について，まずアイソクラティック

分析により保持時間，吸収スペクトル，吸収極大を確認したのち，すべての農薬を60分程度で分析できるような分離条件（グラジュエントおよび検出波長）を検討した。

3.2 定量下限値の同定

標準溶液のクロマトグラムにおけるS/N比（S/N=10）から算出した。

3.3 精製用ミニカラムSAX/PSAでの溶出条件の検討

ルーチン分析で使用している精製用ミニカラム，SAX/PSA（陰イオン交換カラム）での溶出条件を検討した。

3.4 農産物での添加回収試験

当部での検査対象品である8種類の農産物（平成12年度検査品を主に）を用いて添加回収試験を行った。

3.5 平成13年度農産物の残留農薬検査

平成13年度の8種農産物における対象農薬物における分析対象農薬の残留調査を実施した。

4 結 果

4.1 HPLC分析条件

24種の農薬のうち，検討した分離条件下では感度もしくはピーク形状の悪いもの4種（クミルロン，クロリムロンエチル，シクロスルファミロン，ルフェヌロン），保持時間が重なりピークの分離ができなかったものうち，二者択一で除外したものの4種（当部の検査対象品に残留基準値の設定がなかった農薬：エトベンザニド，ジクロメジン，ダイムロン，テブフェノジド）を除く16種農薬を60分の分析時間に収めることができた（図1）。

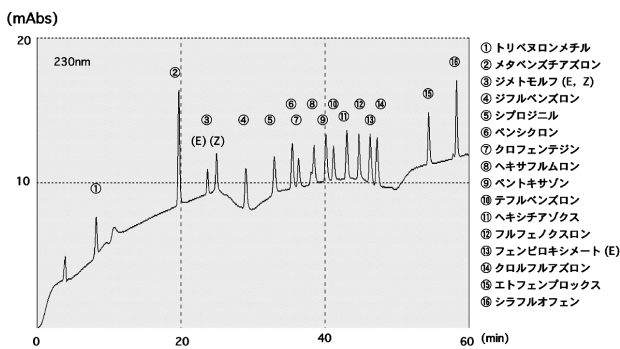


図1 16種農薬クロマトグラム

カラム温度：50  
 測定波長：230～270nm  
 流 速：0.8ml/min  
 移動相：A- 精製水，B-MeOH

グラジュエント：	A	B
0 min	60%	40%
20min	30%	70%
25min	30%	70%
40min	15%	85%
45min	15%	85%
55min	0%	100%
60min	0%	100%

4.2 定量下限値

上記のHPLC分析条件において，最も感度の高い測定波長から算出した定量下限値は，各農薬とも0.005 μg/g以下であった。この値は，当部検査対象品での残留基準値をすべて下回るものであった。

4.3 精製用ミニカラムSAX/PSA溶出条件

16種農薬が，ルーチンで用いているカラム溶出条件（アセトン/n-ヘキサン：70%）で十分に溶出されるかを確認するため，混合標準をSAX/PSAに添加し，アセトン/n-ヘキサン濃度を30%，50%，70%に変え10mlで溶出を行った。その結果，すべての農薬について50%濃度画分までに溶出が確認された（図2）。

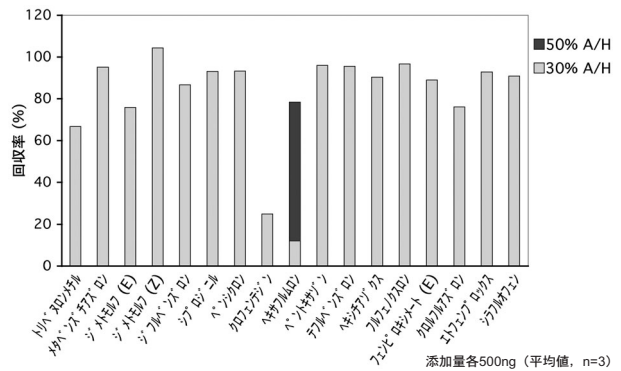


図2 SAX/PSA溶出条件検討結果

ここでトリベヌロンメチルの回収率の低さについては溶液濃縮乾固時の揮発損失によるもの，クロフェンテジンについてはカラム間でのバラツキが非常に大きく，全く回収されない場合があったことによるものと考えられた。

これらについては，試料中に添加したときにマトリクスの影響により改善される場合があるため，手法を変更せずルーチンでの条件で溶出を行うこととした。

4.4 添加回収試験

以下に示したルーチン操作に基づき 8種農産物での添加回収試験を行ったところ，16種農薬の農産物からの回収率は作物種によって違いはあったが，ほぼ60～110%の範囲内であり，変動係数も良好なものであった（表1）。

操作手順

試料秤量 20 g + 各農薬 1 μg添加

CH<sub>3</sub>CN抽出 50ml × 2

遠心分離

塩析・脱水 NaCl 7 g，Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20g

濃縮乾固

ミニカラム精製（SAX/PSA）

試料負荷 30% Acetone/Hexan 5 ml  
 溶 出 70% Acetone/Hexan 10ml

濃縮乾固・定容 Methanol 2 ml

HPLC分析

4.5 残留農薬検査

8種農産物における残留農薬検査の結果，作物由来の夾雑ピークに妨害されない分析対象農薬について，検出されたものはなかった（表2）。

5 ま と め

- (1) 検討対象とした24種の農薬のうち16種について，一斉分析法を開発することができた。
- (2) この方法を用い，平成13年度農産物の残留検査を実施したところ，16種農薬について検出されたものはなかった。

(3) しかし問題点として，農産物の種類や個体によっては，農薬ピークが作物由来の妨害ピークの影響をかなり受けることがあった。

(4) 上記問題を解決するためには，試薬類を用いた夾雑物のクリーンアップやLC/MSの導入による高精度な分析等の検討が必要である。

6 参 考 文 献

- 1) 菊地秀夫 氏家愛子 新目眞弓 大江浩：宮城県保健環境センター年報，19，173（2001）
- 2) 菊地秀夫 氏家愛子 新目眞弓 大江浩：宮城県保健環境センター年報，18，70（2000）
- 3) 高附巧 根本了 豊田正武他：食品衛生学雑誌，40（4），314（1999）

表1 16種農薬の添加回収率（n=3）

	いちご		きゅうり		トマト		馬鈴薯		日本なし		大根		白菜		ほうれん草	
	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)	Rec. (%)	C.V. (%)
1 トリベヌロンメチル	-	-	-	-	-	-	-	-	62	13	-	-	-	-	69	5
2 メタベンズチアズロン	90	3	94	2	89	3	91	5	89	6	-	-	93	8	95	3
3 ジメトモルフ(E)	79	5	-	-	103	10	50	9	71	21	-	-	-	-	89	8
ジメトモルフ(Z)	85	4	105	8	97	7	89	8	98	8	-	-	-	-	84	5
4 ジフルベンズロン	93	11	73	14	73	7	61	10	73	9	106	10	87	8	90	6
5 シプロジニル	74	4	88	4	94	3	76	7	86	5	97	2	83	3	94	3
6 ペンシクロン	88	9	-	-	86	8	89	6	89	9	103	9	80	8	79	5
7 クロフェンテジン	53	12	79	11	61	13	31	96	76	5	75	12	85	4	71	4
8 ヘキサフルムロン	77	5	81	4	67	4	77	6	63	8	-	-	87	2	79	3
9 ペントキサゾン	88	4	77	6	109	7	112	6	91	5	91	5	82	2	76	2
10 テフルベンズロン	95	7	102	9	95	7	70	8	94	5	99	3	84	3	90	2
11 ヘキシチアゾクス	-	-	98	3	-	-	-	-	74	5	75	7	82	10	107	2
12 フルフェノクスロン	101	4	92	3	107	6	74	9	87	5	112	3	84	5	85	5
13 フェンピロキシメート(E)	88	8	-	-	-	-	-	-	83	7	89	2	-	-	-	-
14 クロルフルアズロン	94	3	70	9	106	8	-	-	75	8	84	3	81	7	82	3
15 エトフェンブロックス	95	3	-	-	93	10	75	9	89	6	97	9	79	5	-	-
16 シラフルオフェン	85	6	-	-	-	-	-	-	-	-	78	27	-	-	-	-

- : 妨害ピークと重なり検出不能

表2 平成13年度農産物の残留農薬検査（n=3）

	いちご			きゅうり			トマト			馬鈴薯			日本なし			大根			白菜			ほうれん草		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1 トリベヌロンメチル																								
2 メタベンズチアズロン																								
3 ジメトモルフ(E)																								
ジメトモルフ(Z)																								
4 ジフルベンズロン																								
5 シプロジニル																								
6 ペンシクロン																								
7 クロフェンテジン																								
8 ヘキサフルムロン																								
9 ペントキサゾン																								
10 テフルベンズロン																								
11 ヘキシチアゾクス																								
12 フルフェノクスロン																								
13 フェンピロキシメート(E)																								
14 クロルフルアズロン																								
15 エトフェンブロックス																								
16 シラフルオフェン																								

□ N.D.    □ 妨害ピークと重なり検出不能

## 魚介類中のPCB濃度と残留形態

## A Profile of PCB Isomers in Seafood

氏家 愛子 長船 達也 大江 浩

Aiko UJIIE, Tatsuya OSAFUNE, Hiroshi OOE

キーワード：PCB，コプラナPCB，異性体，魚介類

Key Words：PCB，CoplanerPCB，Isomer，Seafood

宮城県産魚介類を中心としたPCB異性体の残留濃度を調査したところ、県内湾産の魚介類は主に#101, #118, #138, #153が高い比率で残留しており、PCB濃度は1.0ng/g(牡蠣歌津産)~35ng/g(銀鮭志津川産)で同種間年変動は小さかった。総PCBに対するコプラナPCBの割合は8.9%(シジミ)~17%(スズキ)であり、牡蠣では#118が、シジミでは#118, #105, #167が、スズキ、銀鮭では#118, #105, #167, #156, #180, #170が主要なコプラナ異性体であった。1999年~2001年のトータルダイエットスタディ 群試料によるPCBs一日摂取量は1.2~1.9µg/dayであり、暫定一日摂取許容量(300µg/day)の1/250~1/150であった。

## 1 はじめに

ポリ塩化ビフェニル(以下PCBs)は、1950年代から1972年に生産が中止になるまでの約20年間に、約6万トンが生産され、不燃性、低揮発性、絶縁性等の性質から、熱媒体、可塑剤、トランス等の絶縁油、複写紙などに使用されてきた。しかし、最近、新聞紙上で蛍光灯に使用されたPCBsによる室内汚染が話題となったように、約5万トンが未回収で残っていると推定されている。さらに、1990年代に入り、都市ごみ等の焼却工程からPCBsが副生成することが確認されている。

魚介類等に残留するPCBsの濃度については、1972年から当部において調査が始まり、1980年まで、のべ約110種の魚介類について約290件の検査をしてきた。1981年以降は内湾数ヶ所のスズキを対象としたモニタリング的検査に移行しており、PCBs濃度も最近10年間は0.01ppm~0.03ppmと内湾魚介類の暫定基準値の1/100以下で横ばい状態となっている。

しかし、魚介類等の残留PCBsは、環境中の汚染状況を反映するものであるため、異性体組成を明らかにすることにより、宮城県内魚介類の汚染の由来を推定できると考えられる。そこで、四重極型GC/MSによるPCBsの異性体毎の定量法について検討を行い、県内産魚介類及びマ-ケットバスケット方式によるト-タルダイエットスタディ(以下TDS) 群等を対象として異性体組成の調査を実施し、若干の知見が得られたので報告する。

## 2 分析方法

PCBs異性体の保持時間既知のカラム,SGE HT 8(50m

×0.22mm径,膜厚0.25µm)により、各同族体Window用のCustom PCB Mix(2.5µg/ml, AccuStandard Inc.)及びカネクロ-ル(以下KC)300,400,500,600標準溶液(和光純薬工業(株)製Polychlorodiphenyltri-,Polychlorodiphenyltetra-,Polychlorodiphenylpenta-,Polychlorodiphenylhexaをn-ヘキサンで希釈調整)を測定し、176本のピーク-クの同定を行った。

これをHP-5Ms(25m×0.25mm径,膜厚0.25µm)で測定し、SGE HT 8によるピークと照合することにより、HP-5Msカラムでの約120種の異性体の保持時間を決定した。定量には、各同族体Window用のCustom PCB Mix(2.5µg/ml, AccuStandard Inc.)を使用し、Windowピーク以外はWindowピークの最初と最後の平均Abundanceで作成した検量線で行った。この方法により、KC等量混合標準液aprox.1µg/mlが±10%の誤差で定量可能であった。煩雑なデータ処理は、GC/MSの定量値(Abandance)をcsvファイルにし、Microsoft Excellで最終濃度までの変換様式ファイルを作成して簡便化を図った。

試料の前処理は、試料10gにKOH/エタノールアルカリ下で加熱還流後、ヘキサン抽出、硫酸処理、シリカゲルミニカラム精製後、検液とした。GC/MSはHP6890/5973(拡張モード)、パルススプリットレス注入法による。

GC/MS条件 1)

カラム:SGE HT 8(50m×0.22mm径,膜厚0.25µm)

カラム温度:130(1min)20/min 220(0min)

5/min 320(5min)

流量:1.0ml/min(線速度29cm/sec),

コンスタントフローモード

注入口温度：280 ，パルスドスプリットレス注入，  
 パルス圧：55psi，パルス時間：2 min  
 トランスファーライン温度：300

測定イオン：塩素数（定量イオン，確認イオン）

- 1 (188, 190), 2 (222, 224)
- 3 (255.9, 257.9), 4 (292.9, 289.9)
- 5 (325.9, 323.9), 6 (359.8, 361.8)
- 7 (393.7, 395.7), 8 (429.7, 427.7)
- 9 (463.7, 461.7), 10 (497.6, 499.6)

GC/MS条件 2)

カラム：HP- 5 MS (30m x 0.25mm径, 0.25 μm)  
 カラム温度：70 (2min) 8 /min 300 (5min)  
 流量：1.18ml/min (線速度40cm/sec),  
 コンスタントフローモード  
 注入口温度：250 ，パルスドスプリットレス注入，  
 パルス圧：30psi，パルス時間：2 min  
 トランスファーライン温度：300 ，  
 測定イオンは1)と同じ。

### 3 調査対象

対象品目は、主として1998年度から2001年度にル・チ

ン業務，調査研究で使用した魚介類を使用した。県内養殖魚介の銀鮭と牡蠣，汽水域に定住する宮城県産および他県産シジミと底質，近海回遊魚のスズキ（可食部，肝臓），南氷洋で捕獲されたミンク鯨，マ・ケットバスケット方式によるTDS- 群（魚介類），鰯（県外産）の計44試料について分析を行った。TDS- 群は1999年度は35種，2000年度は34種，2001年度は37種の魚介類で調製した試料であり，鰯は，2001年度の調製時に使用したものを分析した。

### 4 結果と考察

#### 4.1 標準添加回収率

魚介類等10g（底質30g）に，Window用のCustom PCB Mixを10ng添加し，試料調整と同様に操作し，GC/MSの試料溶液とした。結果を表1に示す。

標準添加回収率は，10ng添加の場合，1塩素ビフェニール，9塩素ビフェニールで約70%～80%と若干低く，10塩素ビフェニールで約20%～50%と低い回収率であった。また，逆に，#169（3,3',4,4',5,5'-），#189（2,3,3',4,4',5,5'-）の回収率が約120%～150%と高い傾向が認められた。10塩素ビフェニールは，KOH/エタノール存在下での

表1 魚介類等への標準添加回収率 (スズキのみn=3, その他n=1)

添加量 (ng)	CI数	スズキ	銀鮭	牡蠣	シジミ	鰯	TDS	鯨肉	鯨脂	底質
Biphenyl	0	10	20	10	20	10	10	10	10	20
# 1	1	94.7 ± 5.9	102	78.1	87.5	74.8	74.6	98.0	89.0	69.3
# 3	1	101 ± 5.3	109	92.6	105	101	77.7	85.7	83.8	81.8
# 10	2	105 ± 5.9	119	103	108	98.1	88.7	126	123	117
# 15	2	104 ± 2.7	117	104	118	90.5	94.7	117	138	106
# 19	3	116 ± 8.3	116	109	72.0	103	118	96.3	113	113
# 37	3	104 ± 4.4	103	100	103	103	103	146	98.2	97.6
# 54	3	104 ± 4.4	103	100	103	103	103	146	98.2	97.6
# 77	4	116 ± 4.5	107	109	108	104	124	119	104	108
#104	4	102 ± 3.2	101	97	101	98.5	97.3	110	96.9	96.4
#126	5	128 ± 2.9	122	115	123	117	125	126	107	110
#155	5	110 ± 7.3	105	108	103	101	91.1	113	101	106
#169	6	132 ± 1.1	124	109	125	111	126	126	113	119
#188	6	115 ± 4.0	109	108	107	106	104	110	100	100
#189	7	132 ± 1.0	138	123	120	127	122	147	140	117
#202	7	116 ± 2.5	111	110	107	112	108	114	102	103
#205	8	134 ± 2.5	139	120	128	118	137	143	135	111
#208	8	125 ± 1.5	118	110	112	118	105	117	103	92.1
#206	9	111 ± 3.8	122	95.8	108	98.4	103	132	114	110
#209	9	93.3 ± 3.3	102	87.3	102	88.2	81.7	105	101	75.1
	9	104 ± 1.2	103	82.8	102	91.0	89.8	108	106	79.6
	10	48.4 ± 2.8	52.0	34.6	58.6	46.8	49.8	52.3	51.0	31.9
										47.3
										21.9

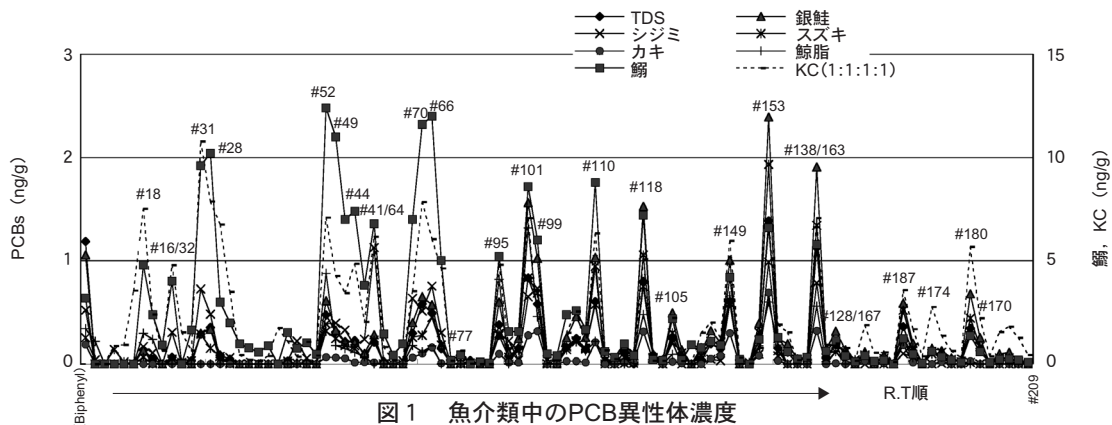


図1 魚介類中のPCB異性体濃度

1時間の加熱還流により脱塩素が起きるのではないかと考えられ、今後、試料調整には加熱還流によらない抽出法を検討する必要がある。

4.2 PCBs濃度

県内産魚介類等のPCBsの異性体組成について、図1に示す。比較対照としてKC300:400:500:600(1:1:1:1)の異性体組成を併せて示したが、県内産魚介類、県外産鰯、ミンク鯨の脂肪、TDS-群いずれの試料でもKC中含有濃度の高い異性体が高いパターンを示している。

PCBs濃度の同種年間変動(平均値)は小さく、県内産魚介類中PCBs濃度は、1.0ppb(牡蠣歌津産)~35ppb(銀鮭志津川産)で内湾魚介類(可食部)の暫定基準値3ppmの1/3000~1/85であった。県外産鰯は220ppbと高い濃度であった。(図2)

また、採取地域別にPCBs濃度をみると、図3(牡蠣)に示すように、地域による濃度差が認められ、民家、工場立地の多い気仙沼湾、石巻湾、松島湾産で高い濃度を示した。また、シジミでは貞山運河、利根川産のものが他地域より高い濃度を示した。利根川産のシジミは昨年度の残留農薬濃度調査では青森県産等シジミと同様、農薬濃度の低いシジミであったが、PCBs濃度については傾向を異にしている。スズキは、回遊魚であり、養殖牡蠣や汽水域に生息するシジミほど濃度差はなかったが、石巻東部産のものが比較的高い値を示した。

4.3 PCBs総量に対する比率の高い残留異性体

KC300, 400, 500, 600及び魚介類等の残留PCBsについて、総PCBsに対する比率が5%以上の異性体を表2に示す。#99(2,2',4,4',5-)は、KC500中の比率が5%未満であるが、逆に魚介類中で比率が増加したものである。KC400, 500で比率の高い14,5塩素体である#41/64~#95は、

シジミ、鯨脂を除いてほとんどが5%未満に低下しており、田辺ら<sup>1)</sup>のバイカルアザラシを対象としたPCBsの調査結果(#52, #70, #95は分解代謝されやすい。)と一致している。一方、フェニル骨格の2,4,5-位が塩素化された#101(2,2',4,5,5'-), #118(2,3',4,4',5-), #138(2,2',3,4,4',5-), #153(2,2',4,4',5,5'-)が5%以上の高い比率で残留していた。同様な結果は、中野らの調査<sup>2)</sup>でも報告されている。2,3,6-位が塩素化された#110(2,3,3',4',6-)及び#149(2,2',3,4',5',6-)はKC500, 600にそれぞれ約10%程度含有している異性体であるが、2,6-位に塩素が配位している異性体は、脱塩素化が進みやすいと考えられ、魚介類中、特に魚類では5%未満に低下している。

また、南氷洋で捕獲されたミンク鯨の肉には、PCBの異性体は#99だけが検出され、鯨皮には#52(2,2',5,5'-), #70(2,3',4',5-), #95(2,2',3,5',6-), #99, #101が検出されたが、いずれの異性体もKC400, 500中の含有量が高い異性体である。

表2 PCBs総量に対する比率の高い異性体 (%)

	TDS-X群	銀鮭	スズキ	カキ	シジミ	鯨脂
#41/64					7.7	
#52						8.4
#66					5.2	
#70						7.9
#95						
#99				7.9	5.0	
#101	5.8	6.9	5.4	6.9		13
#110				5.3	6.5	
#118	5.6	6.8	6.9	7.8	5.1	
#138	7.9	8.5	8.7	8.0	5.4	5.4
#149				7.4		6.3
#153	9.7	11	13	17	6.7	5.8
合計	29	33	34	60	42	46

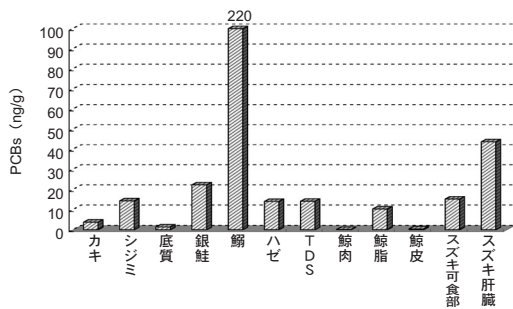


図2 魚介類中のPCBs濃度

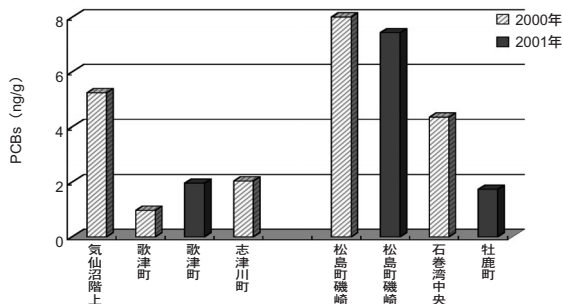


図3 牡蠣中のPCBs濃度

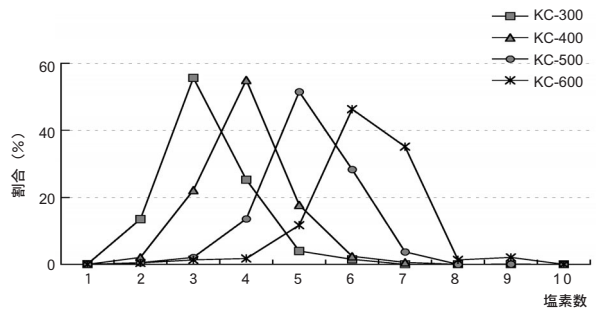


図4-1 KC300~600のPCBs同族体割合

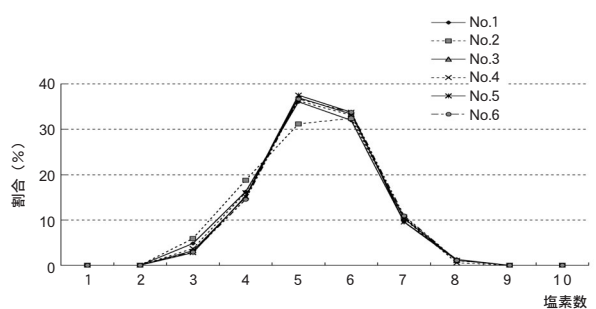


図4-2 養殖銀鮭中のPCB同族体別割合

#### 4.4 PCBs同族体

KC300, 400, 500, 600中のPCBs同族体パターン及び魚介類等のPCBs同族体パターン(ex. 銀鮭, TDS-X群)を図4-1~4-3に示す。銀鮭, スズキ, 牡蠣, 十三湖産及び中国産シジミ, ミンク鯨, 1999, 2000年度のTDS-X群は, 5塩素または6塩素同族体の比率が最大値を示すパターンを示した。シジミは, 利根川産及び閉上(貞山運河)産が, 4塩素同族体を最大とするパターンを示し, 地域差が認められた。シジミが生息する貞山運河の底質中のPCBsは, 低塩素体の比率が高くなっている。

また, 牡蠣についても若干の地域差が認められ, 民家, 工場立地の多い気仙沼産, 石巻湾産及び松島磯崎産牡蠣は, 4塩素同族体の比率が約15%~25%と, 歌津産, 志津川産牡蠣に比べ3~5倍高くなっている。

2001年のTDS-X群は前2年間と異なり, 4塩素同族体の比率が最大であり, TDS-X群の試料調整に用いた県外産鰯の寄与率が約44%とかなり大きいものとなっている。この鰯のPCBs濃度は220ng/gで県内産養殖銀鮭やスズキの10倍以上の濃度であったが, KC400中に5%以上の高い比率で含有している4塩素体の異性体, #49(2', 4'5'-), #52, #66(2'3', 4'4'-), #70が高い割合で残留しており, 県内産魚介類のパターンと傾向を異にしている。

#### 4.5 コプラナPCBs濃度 (Co-PCBs)

魚介類及びKC300~600のCo-PCBs濃度を図5に示す。

魚介類中の残留Co-PCBs濃度の合計は, シジミの8.9%からスズキ可食部の17%であり, KC500, 600の14~15%と比較すると, 県内湾で養殖されている牡蠣及び銀鮭や, 近海回遊魚のスズキは, ほぼ, 同程度の値であった。

図6-1~6-4に, KC300~600及び銀鮭, 牡蠣およびTDS-X群の総PCBsに対するCo-PCB異性体の割合を示す。

KC300及びKC400中のCo-PCBsはそれぞれ, 全体の1.5%, 5.8%で, KC500, 600に比べるとCo-PCBsの含有量は低いものとなっており, KC300及び400では#77, #118, #105が, KC500及びKC600では#118, #105のほか#167, #156, #180, #170が主要な含有異性体となっている。KC600では#180が特に高く総PCBsの約11%含有しており, #126, #170とともにKC600による汚染の指標となると考えられる。また, 燃焼過程で生成するとされる#169は, KC300~600には検出されなかった。

県内湾で養殖されている銀鮭, 近海回遊魚のスズキ(可食部, 肝臓)及び1999~2000年TDS-X群の主なCo-PCBs異性体は, #118, #105, #156, #180, #170であり, シジミでは#118, #105が主なCo-PCBs異性体であった。また, 利根川産シジミ中には#123(約3%)以外のCo-PCBsは検出されなかった。一方, 貞山運河底質中には, 紙製品の主要異性体<sup>3)</sup>の1つである#114が高い割合で存在していた。

養殖牡蠣は, #118が主要異性体となっており, 歌津産, 牡鹿産牡蠣では, 紙製品の主要異性体の1つである#114の割合が高いものとなっている。また, 気仙沼産, 松島磯崎産の牡蠣には, KC600に特徴的な#126, #180が検出

されている。

また, 南氷洋で捕獲されたミンク鯨の皮, 肉中には, Co-PCBsは検出されず, 脂肪組織にのみ, 5, 6塩素体の#118, #105, #114, #123, #126, #167のCo-PCBが検出された。

以上のことから, 宮城県の内湾の魚類中のPCBsは主としてKC500, KC600による汚染と考えられ, 燃焼過程で

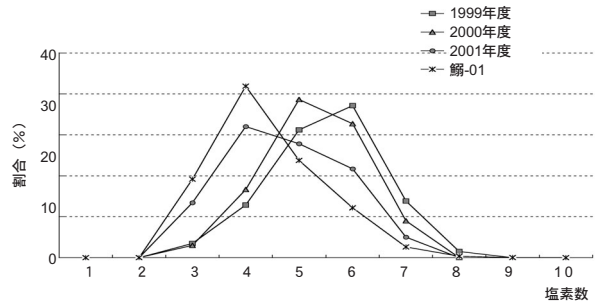


図4-3 TDS-X群中のPCB同族体別割合

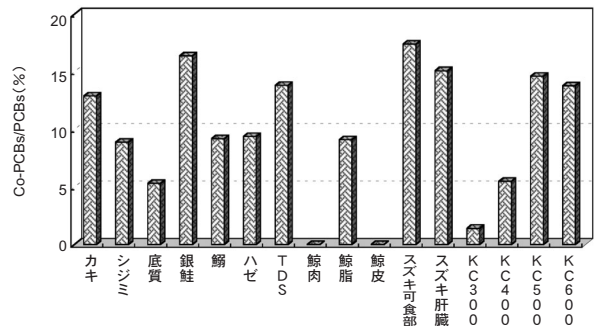


図5 魚介類中のCo-PCBs濃度

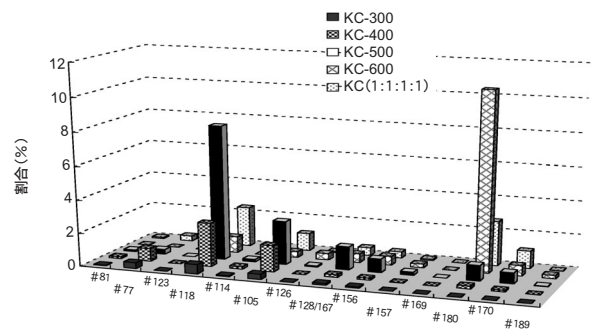


図6-1 KC300~600のコプラナPCBの含有割合

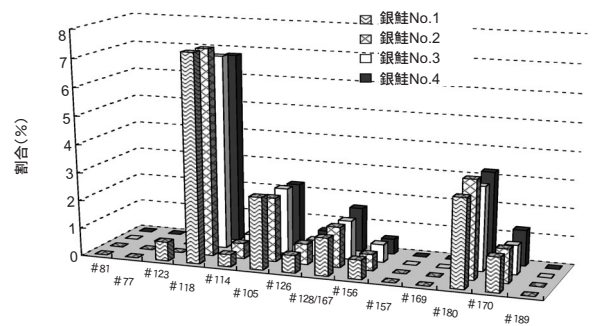


図6-2 養殖銀鮭中のコプラナPCBの含有割合



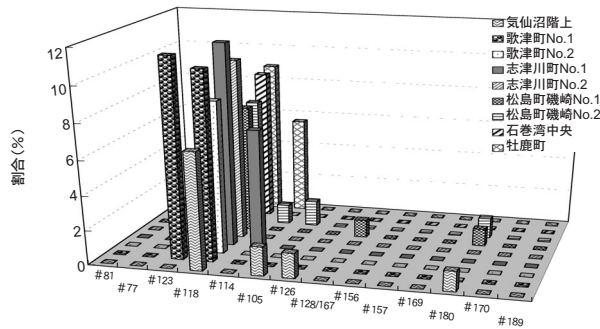


図 6-3 養殖牡蛎中のコプラナPCBの含有割合

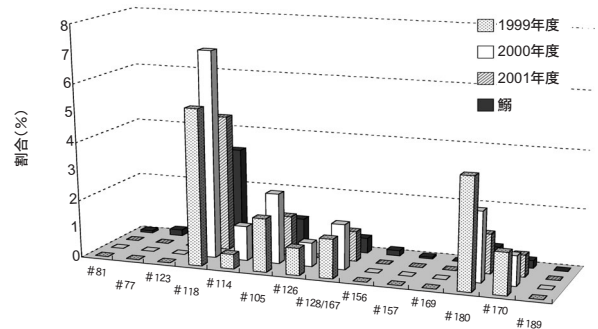


図 6-4 TDS-X群中のコプラナPCBの含有割合

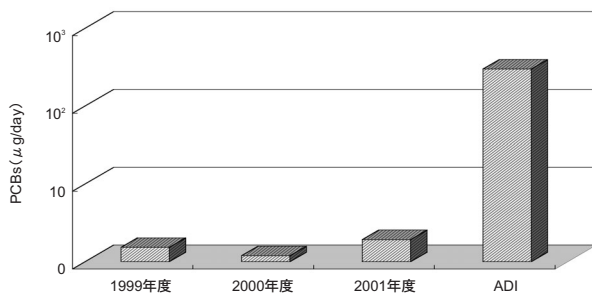


図 7 TDS-X群によるPCBs一日摂取量

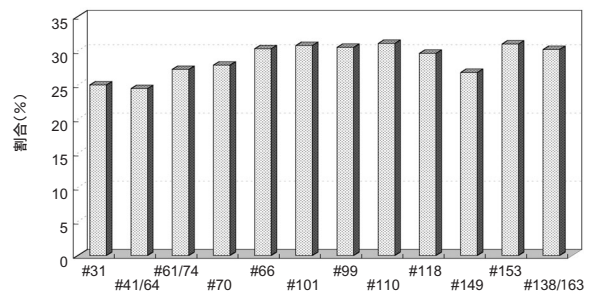


図 8 砂だしによる異性体の減衰率

生成するPCBs等による新たな汚染源の影響は、今のところないと考えられた。また、貞山運河産シジミは、農業排水や閉上地区の家庭雑排水等が流入する汽水域に生息しており、KC400、KC500による汚染であると考えられた。

4.6 PCBs一日摂取量

TDS-X群中PCBs濃度及び1999年、2000年、2001年度の魚介類一日摂取量(120.6g, 97.0g, 110.8g)から計算した、PCBsの成人一人当たり一日摂取量を図7に示す。

PCBs一日摂取量は1.2~1.9 μg/dayであり、暫定一日摂取許容量(300 μg/day)の1/250~1/150であった。桑原ら<sup>4)</sup>によると、大阪在住成人の1994年~1998年の5ヶ年間のPCBs一日摂取量(TDSによる全群)は、約0.2~0.5 μg/dayであり、X群からの寄与が全体の約76%であるとしていることから、大阪在住成人の摂取量と比較すると約3~10倍高い摂取量となっている。

4.7 シジミの砂だしによるPCBsの減衰

砂だしによるPCBs異性体濃度の減衰を図8に示す。

砂だし前後の同族体濃度の減衰率は、24%~34%であった。異性体濃度の減衰率は、前後の試料溶液濃度の差の絶対値が1 ng/ml以上のものだけについて減衰率を計算したものであるが、いずれの異性体も約25~30%の減衰率であった。

5 まとめ

- 1) 四重極型GC/MSによるPCBs異性体の定量法を検討し、煩雑なデータ処理をMicrosoft Excellを使用した簡便化を図り分析法を確立した。
- 2) この分析法を使用し、試料の調整をアルカリ加熱還流により標準添加回収試験を行ったところ、10塩素ビ

フェニールは脱塩素が起きるのではないかと考えられ、試料調整には加熱還流によらない抽出法を検討する必要がある。

- 3) 県内産魚介類中PCBs濃度は、1.0ng/g(牡蠣歌津産)~35ng/g(銀鮭志津川産)で同種間年変動(平均値)は小さかった。この濃度は、内湾魚介類(可食部)の暫定基準値3 μg/gの1/3000~1/85であった。また、県外産鰯は220ng/gで県内産と比べ高い濃度であった。
- 4) 県内産魚介類、県外産鰯、ミンク鯨の脂肪、TDS-X群いずれの試料でも、KC中含有濃度の高い異性体が高濃度で残留するパターンを示した。
- 5) 宮城県内産魚介類のPCBs異性体約120種について異性体組成を調査したところ、県内産魚介類のPCBsは、主として定常化したKC500、KC600による汚染と考えられ、燃焼過程で生成するPCBs等による新たな汚染源の影響は、今のところないと考えられた。
- 6) TDS-X群によるPCBs一日摂取量は1.2~1.9 μg/dayであり、暫定一日摂取許容量(300 μg/day)の1/250~1/150であった。

参考文献

- 1) 田辺信介, 中田晴彦; ぶんせき, 638~646, 9(1998)
- 2) 中野武, 松村千里, 丹野恵一, 後藤操, 北本寛明, 真嶋由貴恵, 奥野俊博; 第17回全国環境研究所交流シンポジウム予稿集, p16(2002)
- 3) 酒井伸一; 第18回環境科学セミナー講演予稿集, p13~18(2001)
- 4) 桑原克義, 堀伸二郎; 月刊フードケミカル, 99~110, 9(1999)

# 食品中のアフラトキシン分析法の検討

## A Study of Analysis of Aflatoxins in Foods

高橋 紀世子 赤間 仁 大江 浩

Kiseko TAKAHASHI, Hitoshi AKAMA, Hiroshi OOE

キーワード：アフラトキシン，高速液体クロマトグラフィー，ミニカラム，多機能カラム

Key Words: Aflatoxins, HPLC, Mini Column, Multifunction Column

公定法<sup>\*</sup>のクロロホルム抽出 フロリジルオープンカラム精製に代わる 種々の市販ミニカラムを用いた抽出を検討した。Bond Elut Jr SAXは廉価でナッツ類の回収率は良いが、カラム負荷で溶媒変換の必要があった。多機能カラム Isolute Multimodeはナッツの種類と、アフラトキシンの一部で回収率が70%台に低下するものがあった。多機能カラム MycoSep及びMultiSepはナッツ類及び香辛料の分析において簡易で良い回収率が得られた。( \*この試験法は平成14年3月26日付け食監発第0326001号で廃止となった。)

### 1 はじめに

アフラトキシン(以下AF)は真菌が産生するカビ毒で、微量で強い発ガン性物質であることから各国で食品に対して規制値(日本ではAF<sub>B1</sub>が10ppb以下)を設けており、特に近年の輸入食品の種類や量の増加によるAFの汚染が食品衛生上の問題となっている。

食品中のAFの分析法は昭和46年通知「環食第128号」<sup>\*</sup>で規定されているが、操作が煩雑で多くの操作時間を必要とし、抽出等にクロロホルム等の毒性の高い溶媒を多用し、シリカゲルTLCを行うこととされている。

一方、高速液体クロマトグラフィーを用いる測定法が上村等<sup>1)</sup>、食品衛生検査指針<sup>2)</sup>及び衛生試験法注解<sup>3)</sup>に示されているが、抽出溶媒はクロロホルム、クリーンアップはフロリジルオープンカラムを使用する方法であり、回収率でも満足する方法とはいえない。

これらの問題に対処するために、人にも環境にもクリーンな市販ミニカラムを用いた方法について報告されるようになってきた<sup>4)5)6)7)8)</sup>。そこで今回、これらの市販カラムでのナッツ類及び香辛料のAF分析の有用性を検討した結果について報告する。( \*この試験法は平成14年3月26日付け食監発第0326001号で廃止となった。)

### 2 方法

#### 2.1 試料

市販品のナッツ類(ピーナッツ、カシューナッツ、アーモンド、ピスタチオ、マカダミアナッツ)及び香辛料(白コショウ、黒コショウ、一味唐辛し、ナツメグ)

#### 2.2 試薬及び器具

クロロホルム、アセトン、n-ヘキサン(残留農薬分析

用・和光純薬<sup>(株)</sup>及び関東化学<sup>(株)</sup>)アセトニトリル、メタノール(液体クロマトグラフィー用及び残留農薬分析用・和光純薬<sup>(株)</sup>及び関東化学<sup>(株)</sup>)、トリフルオロ酢酸(以下TFA東京化成<sup>(株)</sup>、MERCK)、無水トリフルオロ酢酸(以下無水TFA東京化成<sup>(株)</sup>)、アフラトキシン標準試薬(B1、B2、G1、G2シグマ製)、Bond Elut Jr SAX 500mg (Varian製)、Isolute Multimode 500mg 3ml (International Solvent Technology製)、MultiSep #226、#228・MycoSep#228 (TM Labs. Inc. 製)

#### 2.3 抽出及び精製方法

1) フロリジルオープンカラム 上村等<sup>1)</sup>の方法に準じて実施。試料10gを水湿潤後クロロホルム 50ml、10分振とう抽出、脱水後遠心分離し、残渣をクロロホルム 25mlで10分振とう抽出後遠心分離する。クロロホルム層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水する過、フロリジルカラム(無水硫酸ナトリウム 5g、フロリジル0.7g、無水硫酸ナトリウム0.1g)精製、溶媒乾固後4ml定容とする。半量を溶媒除去後、TFA0.1mlを添加後密栓、攪拌し15分間冷暗所放置し、水/アセトン(9/1) 9mlを加え溶解する。

2) BOND ELUT Jr SAX (500mg) カラム 試料10gをアセトニトリル40mlで1分バイオトロン抽出、遠心分離後上清を分取し、溶媒除去(50%)、10%アセトン/ヘキサン10mlに(以下A/H)溶解、2mlをSAXカラムに負荷する。10% A/H10ml洗浄後、50% A/H10mlで溶出、溶媒除去する。以下1)と同様に処理する。

3) ISOLUTE MULTIMODEカラム 穂山等<sup>6)</sup>の方法に準じ、試料10gをアセトニトリル/水(9/1) 40mlで1分間バイオトロン抽出後遠心分離。上清 2mlを

MULTIMODEカラムに負荷し流出液を分取する。アセトニトリル/水(9/1) 1mlで溶出し、負荷流出液と溶出液を合わせ溶媒除去する。

以下1)と同様に処理する。

4) MycoSep#226, MultiSep#228カラム 穂山等<sup>8)</sup>の方法に準じ、試料10gを3)と同様に処理し、上清5mlをMycoSep#226カラムに負荷し最初に溶出する1mlを窒素パージ溶媒除去後TFA処理し、水/アセトニトリル(9/1)で1mlとする。

香辛料についてはMultiSep#228を用い、試料10gをアセトニトリル/水(9/1) 80mlで30分振とうし、以下同様に処理する。溶出液0.5mlを窒素パージ溶媒除去し、0.1mlTFAで処理、水/アセトニトリル(9/1) 0.4mlを加え溶解する。

2.4 HPLC測定条件

HPLC：島津LC10及びHP1100 カラム：東ソー(株)製 TSKgel ODS-80Ts及びGL社Inertsil ODS- II 移動相：20%アセトニトリル 流速：1 ml/ml 蛍光検出器：Ex365nm Em 450nm 注入量：10 µl

3 結果及び考察

1) フロリジルオープンカラム

この方法は、公定法に準じたクロロホルムを用いた抽出法で、平成10年度に作成した当部のSOPであるが、標準物質でのカラム精製以降からの回収率は(表1)、AF G1, B1, G2, B2 各々平均値(n=3)で52, 79, 57, 81%と、G1, G2の回収率が低く、またバラツキも大きかった。

表1 オープンフロリジルカラム回収率 (%)

	1	2	3	AV.	STD.	CV.%
G 1	61	43	53	52	8.8	16.9
B 1	88	66	82	79	11.4	14.5
G 2	69	46	58	57	11.7	20.3
B 2	93	69	83	81	12.3	15.1

標準添加濃度試料換算 10ppb

2) BOND ELUTE Jr SAX (500mg) カラム

このカラムは陰イオン交換型カラムであるが、負荷及び溶出を順相カラム的な使用をすることで、ナッツ類での回収率は81~100%であり、1)の方法より簡便で優れていた(表2)。ピーナッツに標準添加した時のHPLCクロマトを図1に示した。HPLCでの分離カラムはTSKgel 80TsとInertsil ODS- 2の両方ともに良く分離できた。この方法では試料からの抽出液であるアセトニトリルを、カラムに負荷する際にはアセトン/ヘキサンに変換する必要があるが、オープンカラム作成より簡便で、カラム1本の単価は廉価である。

3) ISOLUTE MULTIMODEカラム

逆相、イオン交換からなる多機能カラムである。抽出液をそのままカラムに負荷出来る利点があるが、ピー

表2 SAXカラム回収率 (%)

	peanut			cashew		
	AV.	STD.	CV.%	AV.	STD.	CV.%
G 1	82	6.05	7.8	81	3.23	4.0
B 1	91	1.59	1.8	92	0.61	0.7
G 2	86	4.02	4.7	93	2.69	2.9
B 2	100	1.42	1.4	98	2.09	2.1

標準添加濃度試料換算 5 ppb

n = 3

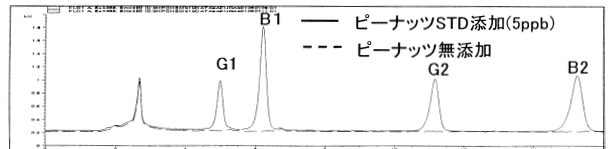


図1 BOND Elute Jr SAXカラムでの標準添加 (移動相：25%アセトニトリル)

ナッツのG1とカシューナッツのG1, B1で回収率が70%程度と低かった(表3)。また、HPLC測定において、移動相25%アセトニトリルではTSKgel ODS-80TsカラムではB1への妨害ピークが分離出来なかったがInertsil ODS- 2では分離可能であった(図2)。

表3 multimodeカラム回収率 (%)

	peanut			armond			cashew		
	AV.	STD.	CV.%	AV.	STD.	CV.%	AV.	STD.	CV.%
G 1	71	2.42	3.4	93	9.9	72	72	6.80	9.5
B 1	83	3.26	3.9	87	8.4	70	70	6.81	9.7
G 2	98	1.30	1.3	101	6.0	97	97	7.07	7.3
B 2	105	2.66	2.5	100	6.6	94	94	5.91	6.3

標準添加試料換算 5 ppb

n = 3

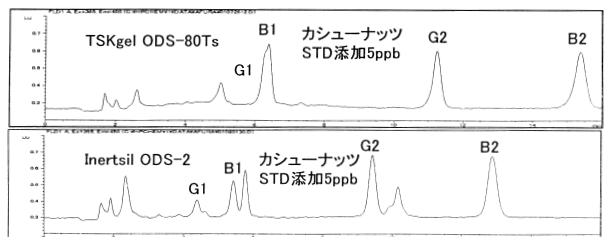


図2 ISOLUTE MULTIMODEカラムでの標準添加 (移動相：25%アセトニトリル)

4) MycoSep#226#228, MultiSep#228カラム

3)と同様に逆相、イオン交換からなる多機能カラムで、抽出液をそのまま負荷出来、簡便な方法である。

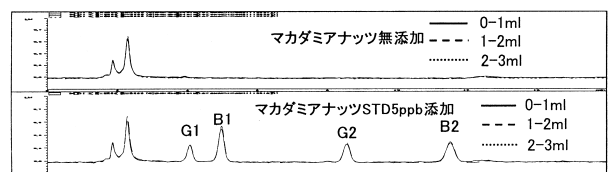


図3 MycoSep#226カラムでの標準添加 I (移動相：25%アセトニトリル)

図3にマカダミアナッツの無添加と標準添加し MycoSep#226カラム精製したクロマトを示した。最初の1mlと次の1mlを分取して測定したクロマトの重ね書きを示したが妨害ピークは出ていない。ナッツの種類によっては、カラムを通すことにより妨害物質も溶出してくるため、最初の1mlを分取することとした。

ピスタチオは移動相25%アセトニトリルではG1とRtが一致する妨害ピークがあり(図4), 移動相を初期5分間20%アセトニトリルとし, 16分で25%アセトニトリルとすることで妨害ピークと分離出来た。

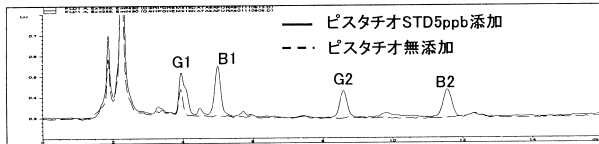


図4 MycoSep#226カラムでの標準添加Ⅱ (移動相: 25%アセトニトリル)

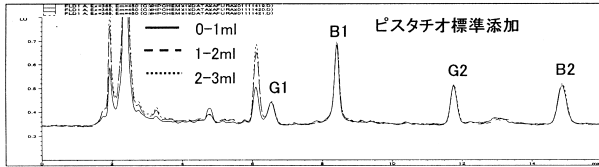


図5 MycoSep#226カラムでの標準添加Ⅲ (移動相: 20%アセトニトリル5分 16分で25%アセトニトリル)

また, カラムを通すにつれてG1前の妨害ピークが増加した(図5)。ピーナッツ, カシューナッツ及びアーモンドでのMycoSep#226カラム精製での最初の1mlを分取したクロマトを図6に示した。また, 表4に示したように, 暫定規制値のあるナッツ類での標準添加回収率は良好であった。

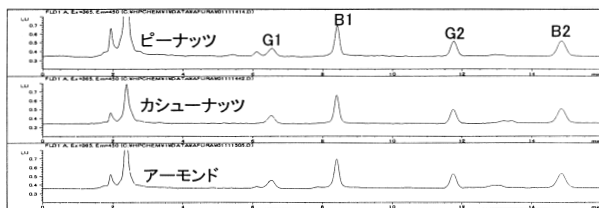


図6 MycoSep#226カラムでの標準添加Ⅳ 添加濃度 (5 ppb) (移動相: 20%アセトニトリル5分 16分で25%アセトニトリル)

香辛料(一味唐辛子, ナツメグ, 白コショウ, 黒コショウ)ではMultiSep#228カラムを用い, ナッツ類と同じ操作法で処理すると, 一味唐辛子以外ではG2が妨害物質と重なるため, 20%アセトニトリルの一定濃度とすることで分離が可能となったが回収率が低く, 特にG2, B

表4 MycoSep#226カラム回収率 (%)

	peanut	macadamia	pistatio	cashew	armond
G1	98 ± 1.5	97 ± 2.8	98 ± 3.1	98 ± 1.8	98 ± 0.97
B1	97 ± 1.3	95 ± 2.2	102 ± 4.0	98 ± 4.9	98 ± 2.8
G2	98 ± 4.1	97 ± 2.3	97 ± 3.2	98 ± 1.5	97 ± 2.6
B2	97 ± 3.3	94 ± 2.6	99 ± 4.1	99 ± 4.1	96 ± 1.3

標準添加濃度試料換算 5 ppb

n = 3

2では約30%であった。

原因としてはTFA処理後に赤褐色で血餅状の沈殿が出来, 10%アセトンや10%アセトニトリルに完全に溶解しないためと考えられた。この不溶物は50%アセトニトリルでは溶解したが, AFの回収率は約80%程度であり, 全体のピークも妨害が大きかった。

そこで, 試料10gに対して抽出溶媒を倍量の80mlとすることで, TFA処理後の問題もなくなり, 満足する回収率が得られた(図7, 表5)。MycoSep型は手動による押し出しタイプであるため, 流速がコントロールし難いがMultiSep型はシリンジタイプのため流速コントロールが可能である。

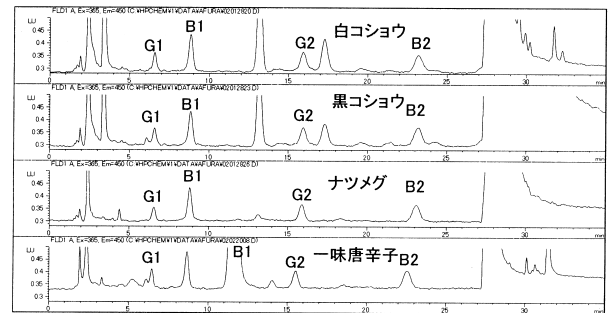


図7 MultiSep#228カラムでの標準添加Ⅴ 添加濃度 (10ppb) (移動相: 20%アセトニトリル 25分で90%アセトニトリル)

表5 MultiSep#228カラム回収率 (%)

	白コショウ	黒コショウ	ナツメグ	一味唐辛子
G1	87 ± 2.8	89 ± 2.3	86 ± 1.1	91 ± 3.9
B1	96 ± 5.5	97 ± 3.7	90 ± 4.1	96 ± 3.0
G2	95 ± 5.9	91 ± 4.2	94 ± 2.5	94 ± 5.7
B2	83 ± 1.6	91 ± 3.2	81 ± 0.6	85 ± 5.2

標準添加濃度試料換算 10ppb

n = 3

両方のタイプでの香辛料の回収率を検討したが回収率には差はなく, MultiSep型の方がややクロマトがきれいであった。

また, TFA処理に用いる試薬について文献によっては無水TFAとTFAの両方が記載されているが, 試料無添加の標準だけのピーク面積比を検討すると, 無水TFAでは, B1が76~83%, B2が56~63%と低く, 普通のTFA

を用いる方が感度は高いことがわかった(表6)。

表6 無水TFA/TFA (%)

STD濃度	5 ppb	10ppb	20ppb
G 1	99	97	97
B 1	76	83	81
G 2	99	97	97
B 2	56	59	63

n = 2

以上種々のカラムを検討したが、ナッツ類は多機能カラムMycoSep#226, 香辛料は多機能カラムMultiSep#228, MycoSep#228で回収率が良く, 簡便であると考えられた。

カラム1本当たりの単価は,SAXカラムやMultimodeカラムの4倍程度と高価であるが, カラム負荷の際の溶媒変換がなく, 操作が容易である。

なお, これら多機能カラムによるアフラトキシンの試験法が, 平成14年3月26日付け食監発第0326001号により, 採用された。

#### 5) 検出下限及び定量下限

AF 0 25ppbでのHPLC再現性試験結果を表7に示した。標準での検出下限値を3 とすると0.05ppb, 定量下限値

表7 0.25ppbの再現性試験

	AV	std	3	10
G 1	0.264	0.011	0.03	0.11
B 1	0.263	0.011	0.03	0.11
G 2	0.286	0.015	0.05	0.15
B 2	0.250	0.014	0.04	0.14

10 $\mu$ l 注入

n = 5

を10 とすると0.15ppbとなる。多機能カラムMycoSep, MultiSepを用いた場合の試料換算(試料10G・注入量10 $\mu$ l)の定量下限値は, ナッツ類では0.6ppb, 香辛料は1.2ppbとなる。

## 4 ま と め

- 1) フロリジルオープンカラムでの回収率は, AFG1, B1, G2, B2で各々52, 79, 57, 81%でありG1, G2の回収率が低かった。
- 2) BOND ELUT Jr SAX(500mg)カラムはナッツ類での回収率は81~100%であり, カラムも廉価であるが, カラム負荷の際に抽出溶媒を変換する必要がある。
- 3) 多機能カラムISOLUTE MULTIMODEカラムはピーナッツのG1, カシューナッツのG1, B1の回収率で70%程度と低かった。
- 4) 多機能カラムMycoSep#226はナッツ類, MycoSep#228, MultiSep#228カラムは香辛料で良い回収率を示し, 操作も簡便である。

定量下限値はナッツ類で0.6ppb, 香辛料で1.2ppbである。

なお, これら多機能カラムによるアフラトキシンの試験法が, 平成14年3月26日付け食監発第0326001号により, 採用された。

## 文 献

- 1) Hisashi Kamiura et al.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68, 458 (1985)
- 2) 食品衛生検査指針
- 3) 衛生試験法注解1990版
- 4) 衛生試験法注解2000版
- 5) Trucksess et al.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 77, 1512 (1994)
- 6) Hiroshi Akiyama et al.: J. Food Hyg. Soc. Japan 37, 195 (1996)
- 7) 合田幸広等: 食衛誌 Vol. 42, No. 1, 56 (2001)
- 8) 穂山浩等: 日本食品衛生学会第81回学術講演会(平成13年5月)講演要旨集

## OASISカートリッジを精製法に使用したフォトダイオードアレイ検出器付き HPLCによる食肉中残留動物用医薬品の同時分析法の検討（第2報）

A Study of Simultaneous Determination of Residual Veterinary Drugs in Meats after Cleanup  
with OASIS Cartridge by HPLC with Photo Diode Array Detector ( No. 2 )

赤間 仁 高橋 紀世子 石川 潔  
大江 浩

Hitoshi AKAMA , Kiseko TAKAHASHI , Kiyoshi ISHIKAWA  
Hiroshi OOE

キーワード：HPLC，残留動物用医薬品，同時分析，OASISカートリッジカラム，  
フォトダイオードアレイ検出器

Key words：HPLC，Residual Veterinary Drugs，Simultaneous Determination，  
OASIS Cartridge Column，Photo Diode Array Detector

昨年度に引続き，OASISカートリッジカラムを精製法に使用して，フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフィーを用いた多種動物用医薬品の同時分析法の検討を行ったところ，抽出方法等に今後の課題は残ったものの，豚，牛，鶏肉について16種類の分析が可能となった。

### 1 はじめに

平成14年3月現在，食品衛生法により基準値の定められた動物用医薬品は22種であり，答申中のもの4品目を含めると26種類に上っている。これらの医薬品については個別法が示されているが年々増加する基準物質を個別に分析することは多くの労力と時間を要し，多くの医薬品を速やかに分析することはますます困難になってきている。

当部では，平成12年度から堀江らの方法<sup>1)~4)</sup>に基づき，メタリン酸：アセトニトリル：メタノール混合液の除蛋白抽出液を用い，OASIS HLBカートリッジカラムでの妨害物除去をおこない，フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフィーによる簡便で効率的な一斉分析法の検討を行ってきたところである。

平成13年度は，昨年度の対象とした動物用医薬品にサルファ剤等10品目を加えた21品目の一斉分析法の検討を行ったので報告する。

### 2 分析対象物質等

#### 2.1 分析対象食品及び動物用医薬品

検討食品は，牛肉（筋肉），豚肉（筋肉），鶏肉（筋肉）とした。

対象動物用医薬品は，第1報で分析可能となったキノキサリン-2-カルボン酸（QCA），5-ヒドロキシ-チアベンダゾール（TBZm），5-プロピルスルフォニル-1H-ベ

ンズイミダゾール-2-アミン（ABZm），チアベンダゾール（TBZ），スルファジミジン（SDD），フルベンダゾール（FBZ），ゼラノール（ZNL），-トレンボロン（-TB），-トレンボロン（-TB），スルファモノメトキシシン（SMM），オキシリン酸（OXA）11種類に加え，クロルテトラサイクリン（CTC），オキシテトラサイクリン（OTC），スルファメラジン（SMR），スルファジメトキシシン（SDMX），スルファキノキサリン（SQX），ピリメタミン（PYR）フラドリゾン（FZ），オルメトプリム（OMP），トリメトプリム（TMP）及びチアンフェニコール（TPC）の21種類とした。

#### 2.2 装置

HPLC：ヒューレットパッカード社（現：Agilent）HP 1100

検出器：フォトダイオードアレイ検出器

蛍光検出器

カラム：TSK-GEL ODS 80Ts（4.6mm i.d.×150mm）

Wakosil-II 5C18RS（4.6mm i.d.×150mm）

#### 2.3 分析条件

流速：0.7ml/min

カラム温度：40

測定波長：DAD 220nm，241nm，265nm，305nm，350nm

（5チャンネル）

FLD Ex 280nm Em 320nm

移動相：A：0.025M - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH3.0)

B：アセトニトリル/A：(80/20)

グラジエント条件：

	A	B
0min	95%	5%
10min	95%	5%
24min	70%	30%
33min	70%	30%
40min	30%	70%
45min	0%	100%
55min	0%	100%

2.4 試薬等

カートリッジカラム：

Waters OASIS HLB 3cc 60mg Extraction Cartridges

Waters OASIS HLB 6cc 500mg LP Extraction Cartridges

標準試薬：QCA, TBZm, ABZm, FBZ, ZNL, -TB, -TB：林純薬工業(株) TBZ：和光純薬工業(株) SDD, OXA, OTC, CTC, SMR, TMP：SIGMA SMM：第一農薬(株) SDMx, OMP：第一製薬(株)

SQX：大日本製薬(株) TPC：エーザイ(株) PYR：福寿製薬(株) FZ：上野製薬(株)

標準原液：各動物用医薬品100 $\mu$ g/mlメタノール溶液(ただし、FZについては、DMSO約10mlにあらかじめ溶解後100mlとした。)

標準添加回収用標準液：CTC, OTCについては、それぞれ5 $\mu$ g, 2 $\mu$ g/ml, 他の医薬品については1 $\mu$ g/mlアセトニトリル溶液とした。

標準添加回収用標準液：CTC, OTC

については、それぞれ5 $\mu$ g, 2 $\mu$ g/ml, 他の医薬品については1 $\mu$ g/mlアセトニトリル溶液とした。

2.5 分析方法

検量線：20ppb, 50ppb, 100ppb, 250ppb, 1000ppb

(ただし、SDMX, CTC, SQX, OTC, SMM, QCAについては最低濃度50ppbで検量線を作成)

分析フロー：(図1)

検体	凍結保存品約100gを細切にする。
試料	10g 0.25%メタリン酸：CH <sub>3</sub> CN：MeOH(6：2：2)を100ml加える (除タンパク、抽出液はあらかじめ4℃に氷冷)
抽出	パイオトロン(1min) (氷冷下；約4℃)
静置	氷冷下(4℃)15分
ろ過	桐山No.5C+ハイフロースーパーセル 2~3mm厚 ろ紙を除タンパク抽出液で湿润しハイフロースーパーセルを敷く
濃縮	45℃ 20~25mlまで ロータリーエバポレータ
抽出	OASIS HLB500 活性化：MeOH 5ml, H <sub>2</sub> O 5ml
負荷	
洗浄	H <sub>2</sub> O 20ml
溶出	100% MeOH 15ml
濃縮	45℃ 乾固直前まで
N <sub>2</sub> バージ	
溶解	アセトニトリル/0.025MKH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH3.0) (25/75) 1mlで溶解
HPLC	HP-1100

図1 分析フロー

3 検討内容

3.1 グラジエント条件の検討

STD21物質の混合標準液について前報のグラジエント条件で分離を試みたが、ピークが混み合い分離がうまくいかなかった。

各食肉のブランクの妨害ピークがチャートの前半(0~20分)部分と後半(45分以後)部分に集中してみられることから、STDのピーク位置を妨害ピークからはずすために、ホールド時間を2回組み込み分析時間45分の条件を55分に延長し、グラジエントの傾斜を調整することで、チャート前半でのSTDピークの分離の改善を試みたところ、TPC, OMP, TMPを除く18種類について良好な分離が可能となった(図2)

ただし、CTCについては移動相の性質上リーディングは改善されなかった。

(採用したグラジエント条件の詳細：2.3 参照)

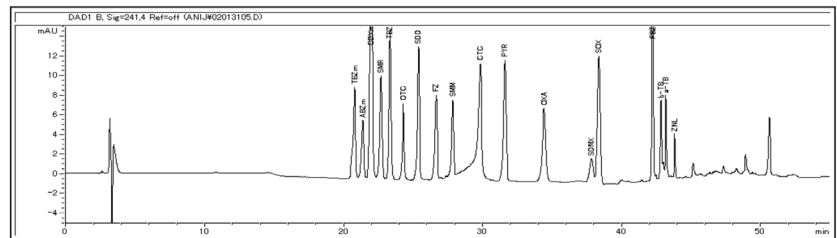


図2 標準18物質の分離状況(241nm) 濃度1ppm

図2は241nmでのSTDピークの分離状況であるが、感度及び妨害ピークの状況等を勘案し各医薬品の選択波長は表1のとおりとした。

表1 選択波長

チャンネル	波長(nm)	医薬品名
DAD A	280	SMR
DAD B	241	SMM
DAD C	265	SQX
DAD D	305	PYR
DAD E	350	SDMX
		SDD
		ZNL
		TBZm
		CDXm
		OTC
		FZ
		SQX
		FBZ
		-TB
		-TB
FLD 1	Ex280	ABZm
	Em 320	TBZ
		OXA

3.2 カラムによる分離の試行

今回のグラジエント条件では分析1検体あたり10分間の測定時間延長となるため、前報のグラジエント条件(45分)でWakosil-II 5 C18RSによるSTD分離の検討も行ったが、STDピークの分離状況はTSK-GEL ODS 80Tsと変わらず十分な分離は得られなかった。

このことから、カラムをTSK-GEL ODS80Tsに絞って検討をおこなった。

3.3 定量下限値向上のための検討

牛肉の筋肉中の残留基準値であるZNL (0.002ppm) 及び -TB (0.002ppm) の定量下限値を確保するために、試料重量を 5 g から 10 g に増やし濃縮率を 5 倍から 10 倍に上げて検討を行った。

まず、20ppbの低濃度の標準溶液で 5 回の繰り返し試験を行い、定量下限値を機器の性能上確保可能かどうかの確認を行った(表 2)。

QCA, SDMX, CTC, SQX, OTC, SMMの 6 医薬品については、STD20ppbでは感度が得られなかったが、これらQCA等の基準値である50ppb (0.005ppm) の濃度では18種類すべての医薬品について感度がとれている。

なお、-TBについては、基準値の約10分の1の感度が得られた。

表 2 STD20ppb繰り返し試験 n = 5

物質名	AV	CV%	検出限界3	10	定量下限値	基準値	判定
TBZm	17.80	3.055	0.0016	0.005	0.0005	0.10 ppm	
ABZm	16.80	1.757	0.0009	0.003	0.0003	0.10 ppm	
QCA	0.00	-	-	-	-	0.005 ppm	
TBZ	18.75	1.129	0.0006	0.002	0.0002	0.10 ppm	
SDD	23.15	2.574	0.0018	0.006	0.0006	0.10 ppm	
FBZ	22.68	1.384	0.0009	0.003	0.0003	0.01 ppm	
-TB	20.04	1.399	0.0008	0.003	0.0003	0.002 ppm	
-TB	20.24	1.182	0.0007	0.002	0.0002	0.01 ppm	
ZNL	25.84	10.490	0.0081	0.027	0.0027	0.002 ppm	x
OXA	18.90	1.742	0.0010	0.003	0.0003	- ppm	
SMR	18.86	2.107	0.0012	0.004	0.0004	- ppm	
PYR	23.99	3.290	0.0024	0.008	0.0008	- ppm	
SDMX	0.00	-	-	-	-	- ppm	
FZ	18.69	2.935	0.0016	0.005	0.0005	- ppm	
CTC	0.00	-	-	-	-	和 0.2 ppm	x
SQX	0.00	-	-	-	-	- ppm	
OTC	0.00	-	-	-	-	和 0.2 ppm	x
SMM	0.00	-	-	-	-	- ppm	

注：基準値の項の「和」の表記は、TC, CTC, OTCの値の和を示す。

しかしZNLについては、定量下限値が10で0.027となり、濃縮換算値(低量下限値)も基準値を確保できないという結果になった。

一方で、コーデックス委員会が設定した「食品中の動物用医薬品残留分析法に関する適格性許容基準」によると、「濃度10ppbから100ppbの試験にかかる変動係数は20%以内、回収率は70~110%の範囲である試験法を採用する。」と述べられており、この基準を満たす試験法としては採用し得るといえる。

(ZNLの回収率については、後述の表3参照)

3.4 抽出方法の検討(図3)

試料重量を 5 g から 10 g に増加したことにより、OASIS HLB 3 cc 60mg では負荷の際に目詰まりを起こし、うまくいかないことからOASIS HLB 6 cc 500mg を用い検討を行った。

また、溶出が十分行えるかどうかを確認するために、メタノールを10mlずつ2回に分けて溶出しSTDの溶出状況を見たところ図3のとおり結果となった。

SQX, FBZ, QCA, -TB, -TB等にやや溶出残がみられたが、その他の医薬品については10mlで十分溶出が行える状況であった。

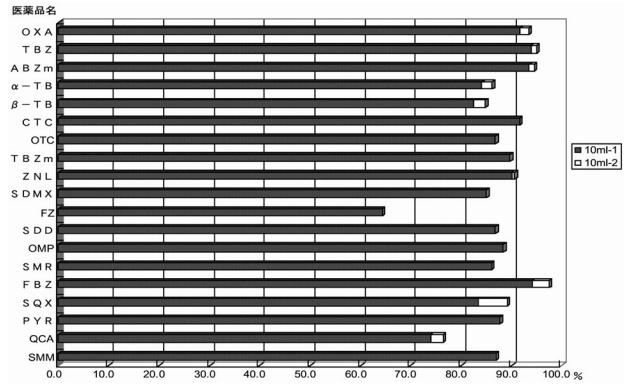


図 3 HLB500抽出試験

したがって、活性化及び洗浄については60mgと同様に、活性化はメタノール 5 ml, 水 5 mlで操作し、付加後の洗浄は水20mlで行い、溶出については妨害物質の溶出を考慮してメタノールを10mlから15mlに増やし行うこととした。(FZについては、試料に添加したときに回収率が改善されている。(後述表3参照))

3.5 クリーンナップ

グラジエント条件を確定し、牛肉でのHLB60mgとHLB500mgでのクリーンナップの状況を従来法と比較したところ、以下のようなチャートが得られ、どちらも同様の状況であった。(試料 5 g, 牛肉(凍結試料), 保存期間約 6 ヶ月を使用した。)

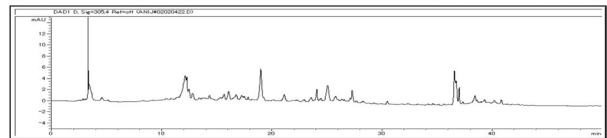


図 4 - 1 HLB60mgでの牛肉(筋肉)のクリーンナップ(305nm)

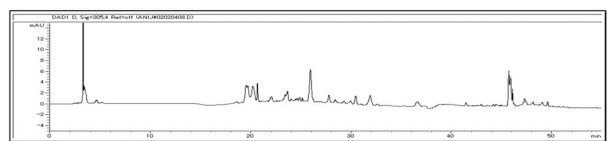


図 4 - 2 HLB500mgでの牛肉(筋肉)のクリーンナップ(305nm)

3.6 肉種によるクリーンナップの比較

次に試料重量10gとし、牛肉(筋肉), 豚肉(筋肉), 鶏肉(筋肉)のそれぞれのクリーンナップの状況を比較して見たところ、牛肉, 豚肉, 鶏肉ともに同様の夾雑物のピーク形状を示しているが、図4に示した牛肉の夾雑物ピークとは14分から17分及び43分以降のピーク形状が大きく異なる。

この違いについては、14分から17分にかけてのピークは図5-1から3で、肉の種類による違いがみられないことから、操作の条件(温度, 静置時間, ろ過等)による違いが原因である可能性が高いと思われる。(牛肉については新鮮肉を、豚肉, 鶏肉については(凍結試料)保存期間約 6 ヶ月を各10g使用した。)



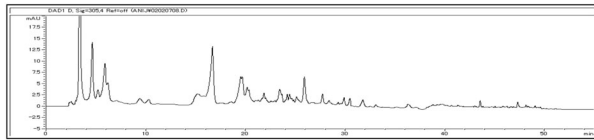


図5-1 牛肉(筋肉)(305nm)

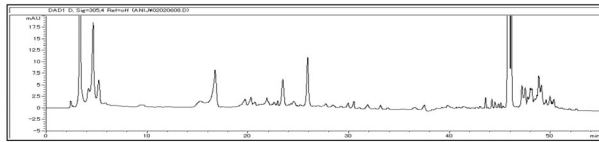


図5-2 豚肉(筋肉)(305nm)

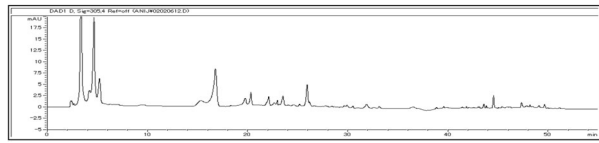


図5-3 鶏肉(筋肉)(305nm)

カートリッジカラムの充填剤のポリウムは約8倍であるので試料重量を2倍にしたことによる保持不足はないと考えられたが、医薬品を保持するのと同様に妨害物質もまた保持してしまうことから、60mgと比べるとやはり妨害ピークの面積も増加した。

3.7 牛(筋肉), 豚(筋肉), 鶏肉(筋肉)への添加回収率

添加回収のチャートについては、図6のとおりであるが、夾雑物の溶出は60mg(図3)とは異なりチャート前半に目立った。

添加回収に使用した牛肉, 豚肉, 鶏肉の夾雑物ピークの残留パターンは、肉種が異なるにもかかわらず類似していた。(図6-1, 2, 3)

しかし、精製の状況やカートリッジのロットなどの影響が原因かは不明であるが、検討の都度パターンが異なっていた。(図5と図6は、同一肉, 同一日の分析チャートである。)

添加回収率の状況については、表3に示したとおりの結果となった。

TBZm以下SQXまでの16種類の医薬品については各肉種ともに60%以上の回収率を得ることができたが、前報で良好であったSMMに関しては、妨害ピークとリテンションタイムが一致し定量ができなかった。

OTCについては、前報同様に回

表3 標準添加回収率(%)

(n=3)

	添加量 ( $\mu\text{g}/10\text{g}$ )	牛肉平均	豚肉平均	鶏肉平均
TBZm	1	66.2	83.1	86.2
ABZm	1	81.3	80.4	83.3
QCA	1	76.4	80.5	79.7
TBZ	1	80.5	81.6	86.3
SDD	1	98.1	95.9	80.1
FBZ	1	86.7	94.9	91.0
-TB	1	59.7	62.5	70.1
-TB	1	74.7	78.4	81.1
ZNL	1	79.4	81.6	85.2
OXA	1	88.3	90.6	89.8
SMR	1	75.8	81.9	87.6
PYR	1	85.2	80.7	77.8
SDMX	1	60.1	68.4	68.6
FZ	1	76.3	76.0	84.0
CTC	5	67.9	66.6	80.8
SQX	1	80.1	86.5	88.3
OTC	2	52.1	59.7	24.6
SMM	1	206.1	150.6	267.9

回収率が低いため、モニタリングとしては活用できるが、テトラサイクリン系3物質の定量は公定法によらなければならない。

また、定量が可能な医薬品であっても、低波長側に妨害物質のスペクトルが検出され、220nmから350nmまでの全ての領域で標準と同じスペクトルが得られないものもあり、定性には、たとえばリファレンススペクトルの波長領域を250nmから350nm(高波長側)に限定して同定するなどの注意が必要であった。

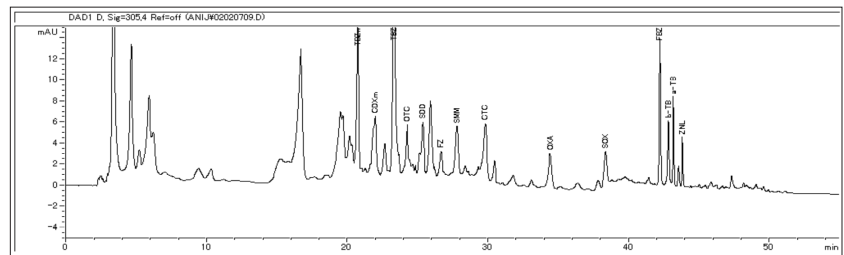


図6-1 牛肉(筋肉)での標準添加回収(305nm)

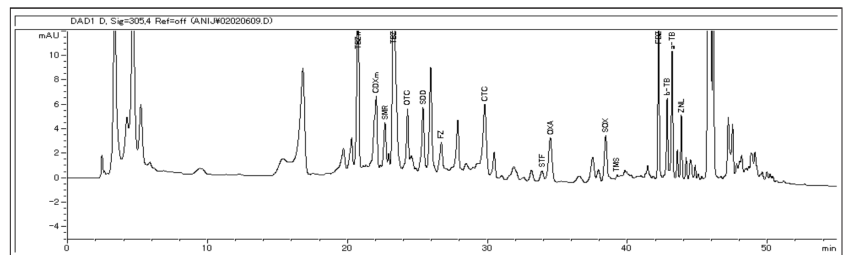


図6-2 豚肉(筋肉)での標準添加回収(305nm)

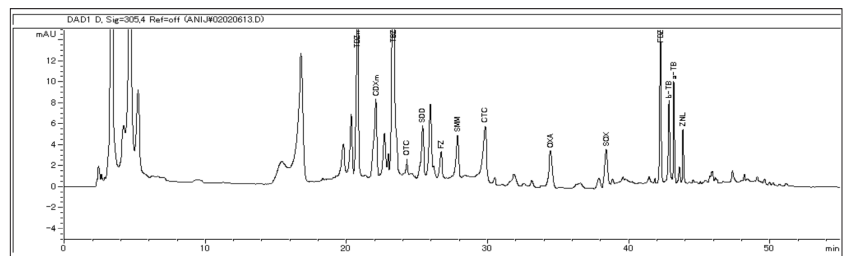


図6-3 鶏肉(筋肉)での標準添加回収(305nm)

#### 4 結果と考察

今回の検討の結果最終的に16種の医薬品について抽出操作が簡便な一斉分析が可能となったが、除蛋白抽出液の温度の保持や、15分の放置時間への注意及びハイフロースーパーセルを用いた桐山ルートによるろ過行程でかなりの時間（1検体あたり約10分）を要するなどの問題が残った。

また、ろ過には試料重量を10gに増やしたことで目詰まりがみられ、ろ過能力が限界であることから、定量下限値を上げるためにこれ以上試料重量を多くするには、別のろ過方法を検討しなければならない。

今回検討した医薬品のうち16種類について良好な回収率が得られたが、除タンパク抽出液の妨害の除去効果が肉種・部位により異なることから現時点では試料によって全ての医薬品をいつも正確に定量できると言い難く、妨害除去をコンスタントに行うためのさらなる検討を要する。

また、基準値が設定されていない動物薬は、リテンションタイムとスペクトルからその残留を判定することは可能であるが、低濃度の基準値が定められているZNLなどを、妨害に左右されることなく正確に定性、定量するためには、今後、質量分析器付き高速液体クロマトグラフィーによる一斉分析法の検討が必須となるものと考えられる。

#### 参考文献

- 1) 石井理枝他：食品衛生学誌No.35, 173～179 (1994)
- 2) 堀江正一他：食品衛生学誌No.39, 383～343 (1998)
- 3) 氏家愛子他：宮城県保健環境センター年報No.17, 74～78 (1999)
- 4) 石川潔他：宮城県保健環境センター年報No.19, 171～172 (2001)

## ダイオキシン類における簡易分析法の検討

## Studies on Simplified Analysis of Dioxins

中村 朋之 清野 陽子 鈴木 滋  
加藤 謙一 高橋 正弘

Tomoyuki NAKAMURA, Yoko KIYONO, Shigeru SUZUKI  
Ken-ichi KATO, Masahiro TAKAHASHI

キーワード：ダイオキシン類，簡易分析，イオントラップ型GC/MS  
卓上型二重収束GC/MS

Key Words : Dioxins , Simplified Analysis , Ion trap GC/MS , Bench Top Double  
Focusing GC/MS

国立環境研究所との共同研究の一環として環境標準試料を用い簡易分析法開発にむけての検討を行った。簡便な精製処理を行った試料を低分解能型GC/MSであるイオントラップ型GC/MS,卓上型二重収束GC/MSを用いて分析を行い、併せて高分解能GC/MSにより得られた定量値との比較も行った。この結果各種分析機器間において数値的に大きな相違は認められず、TEQ値としては比較的近似した結果を示した。

## 1 はじめに

ダイオキシン類については、平成12年1月のダイオキシン類対策特別措置法の施行を受け、都道府県知事が大気、土壌、水質、底質といった環境媒体におけるモニタリングの義務が課せられた。しかしながら分析法については工程が複雑かつ煩雑であるため最終的な数値確定までに時間を要し、結果を反映した緊急調査への迅速な対応は難しい状況にある。こうした状況を解決するために、現在簡易分析法の開発が待たれており、国としても簡易分析法のマニュアル化へ向けて準備を行っている。今回国立環境研究所との「地方公共団体環境研究機関との共同研究」の一環として環境標準試料を用い、簡易な精製を行った検液により低分解能GC/MSを中心とした分析装置における比較検討を行ったので報告する。

## 2 分析方法

### 2.1 試薬類

PCDDs/DFs及びCo-PCBの標準溶液はWellington及びCIL社製、有機溶媒はダイオキシン類分析用を使用し、その他の試薬についてはPCB分析用または特級以上のものを使用した。

### 2.2 分析試料

以下に示した国立環境研究所所有の環境標準試料を使用した。

CRM 12：海底質試料 (Lot No. -)

CRM 16：河川底質試料 (Lot No. 476)

CRM 20：湖沼底質試料 (Lot No.1068)

CRM 21：土壌試料 (Lot No. 167)

### 2.3 測定機器

#### 2.3.1 イオントラップ型GC/MS (ITMS)

サーモクエスト製GC: TRACE GC2000, MS: Finnigan POLARISを用いた。分析カラムは、BPX-5(60m × 0.25mm i.d. d<sub>r</sub>=0.25μm, SGE製)を使用した。

#### 2.3.2 卓上型二重収束磁場型GC/MS (LRMS)

SGE社製のSCLV (Solvent Cut Large Volume) インジェクションシステムをGCに搭載したヒューレットパッカー製GC:HP6890及び日本電子製MS:GC-mate IIを用いた。分析カラムは、プレカラムとしてBPX-5(7m × 0.25mm i.d. d<sub>r</sub>=0.25μm, SGE製)、分析カラムとしてBPX-5(30m × 0.15mm i.d. d<sub>r</sub>=0.15μm, SGE製)を使用した。

#### 2.3.3 高分解能二重収束磁場型GC/MS (HRMS)

分析値の比較対象として、HRGC/HRMSによる分析を行った。装置はヒューレットパッカー製GC:HP6890、日本電子製MS:JMS 700を使用し、測定にはSP-2331(30m × 0.25mm i.d. d<sub>r</sub>=0.20μm, Supelco製)及びPTE-5(30m × 0.25mm i.d. d<sub>r</sub>=0.25μm, Supelco製)の2種類のカラムを用いた。

### 2.4 分析方法

#### 2.4.1 分析装置間の分析値の比較

図1に示した工程に従って分析を実施した。抽出工程では高速溶媒抽出装置(以下ASEと略記)を用い、精製

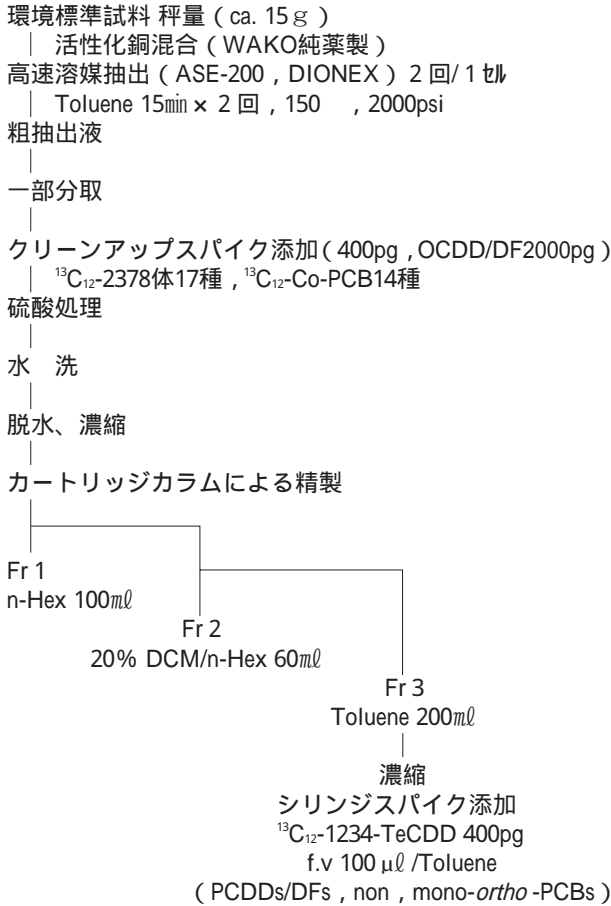


図1 分析工程

過程では多層シリカゲルカラムと活性炭カラムを連結させたカートリッジカラムによる方法<sup>1)</sup>で行った。

2.4.2 分析機器の測定条件

ITMSは、既報<sup>2)3)</sup>に準じ、MS/MSによる測定を実施した。LRMSについては表1、HRMSは表2にそれぞれ分析機器の測定条件を示した。一般的に低分解能MSと呼ばれるITMS, LRMSについてはカラムバックの影響を考え、微極性カラム1種類のみ使用し、高分解能MSについては公定法どおり、2種の極性の異なるカラムを使用した。

3 結果及び考察

3.1 分析値の評価

分析機器間におけるトータルTEQ値の比較結果を表3に示し、PCDDs/DFs並びにCo-PCBsについて比較したものを図2、3に示した。TEQ値を算出するにあたって、2,3,7,8位置換異性体がNDのものについては、対象化合物の検出下限値の1/2にTEFを乗じた。この結果得られたトータルTEQ値はほぼ同様な結果が得られたものの、HRMSの結果と比較して、若干ながら低めに検出されるものもあり、過小評価される懸念も示唆された。またPCDDs/DFsとCo-PCBによる差を見てみると、前者が概ね近似した定量値を示したのに対し、後者は少々ばらつく

表1 測定条件 (LRMS)

装置 GC: HP-6890 MS: JEOL GC-Mate II

GC条件  
 使用カラム:  
 4~8-PCDDs/DFs, Co-PCB用  
 プレカラム: BPX-5 7m × 0.25mm 膜厚0.25μm SGE社製  
 分析カラム: BPX-5 30m × 0.15mm 膜厚0.15μm SGE社製  
 カラム温度: 80 (0min) 20 /min 320 (5.12min) -70 /min  
 180 (1min) 5 min 320 (1.5min)  
 注入法: スプリットレス 注入口温度: 320  
 キャリアーガス流量: 1.0ml/min 注入量: 2μl

MS条件  
 測定モード: E(+)  
 イオン化電流: 300μA イオン化電圧: 40V  
 イオンマルチ電圧: R=500: 500V, R=3000: 650V  
 イオン源温度: 280 PFKインレット温度: 70  
 インターフェース温度: 290 分解能: 500, 3,000

表2 測定条件 (HRMS)

装置 GC: HP-6890 MS: JEOL JMS-700

GC条件  
 使用カラム  
 1 7,8-PCDDs/DFs用  
 カラム: PTE-5 30m × 0.25mm 膜厚0.25μm スベルコ社製  
 カラム温度: 120 (1.5min) 30 /min 200 (0min) 5 /min  
 240 (0min) 30 /min 290 (7.17min)  
 2 4~6-PCDDs/DFs用  
 カラム: SP-2331 30m × 0.25mm 膜厚0.20μm スベルコ社製  
 カラム温度: 120 (1.5min) 25 /min 200 (0min) 2 /min  
 240 (0min) 20 /min 270 (8.8min)  
 3 Co-PCB用  
 カラム: PTE-5 30m × 0.25mm 膜厚0.25μm スベルコ社製  
 カラム温度: 120 (1min) 30 /min 200 (0min) 5 /min  
 270 (10.34min)  
 注入法: スプリットレス 注入口温度: 260  
 キャリアーガス流量: 1.0ml/min 注入量: 2μl

MS条件  
 測定モード: E(+)  
 イオン化電流: 600μA イオン化電圧: 40eV  
 イオンマルチ電圧: 1.4kV 加速電圧: 10kV  
 イオン源温度: 260 PFKインレット温度: 80  
 インターフェース温度: PTE-5: 260 SP-2331: 270  
 インレットパイプ温度: PTE-5: 260 SP-2331: 270  
 分解能: 10,000(10%valley)

結果となった。これは、TEFが0.1とCo-PCB中でTEQへの寄与率が最も大きい3,3',4,4',5-PeCB (IUPAC No. #126)の定量結果が大きな要因であることがわかっており、Co-PCBsからのTEQ算出にあたっては、本異性体の確実な定量の必要性が確認された。次にTEQ算出に關与する2,3,7,8位置換異性体17種並びにコプラナーPCB (Co-PCB) 12種類について分析値の相違を確認した。一部異性体については分析カラムの分離状況によりHRMSと比較して、高値になるものが観察された。これら結果の一例について海底質試料の結果を図4に示した。全体的には大きな定量値の相違は認められなかったが、低分解能MSにおいて内部標準物質への妨害等が見られた一部の化合物において数値の差が認められた。

表3 トータルTEQ値の比較  
単位: pg-TEQ/g

	HRMS	LRMS (R=500)	LRMS (R=3000)	ITMS
海底質	61	58	69	69
河川底質	45	42	40	40
湖沼底質	11	9.4	10	13
土壌	110	99	110	100

注) TEQ値算出の際、検出下限値以下の異性体に関しては、検出下限値の1/2をTEFに乗じた

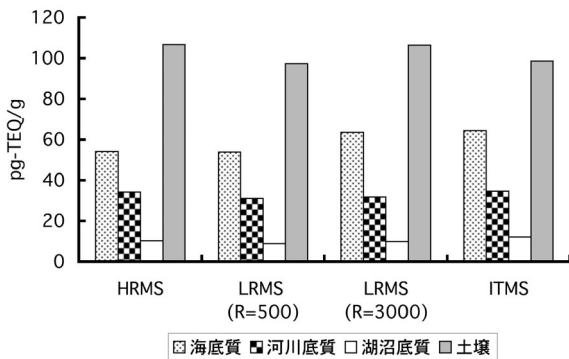


図2 PCDDs/DFsにおけるTEQ値の比較

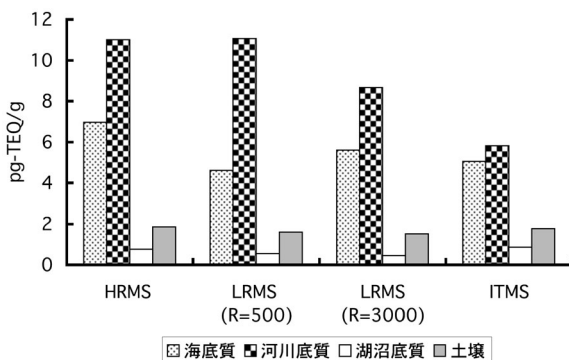


図3 Co-PCBにおけるTEQ値の比較

### 3.2 各機種における課題

今回分析に供した各分析機器において幾つかの課題が認められたので、今後に向けての取り組みと併せて考察する。

ITMSにおけるMS/MS条件について、剣持ら<sup>4)</sup>は試料中に存在するマトリクス量によりイオン化条件を制御する必要性を論じている。標準系列を用いた際の装置の検出下限は2,3,7,8-TCDDで0.5pg以下は得られているが実試料では、マトリクスの影響を受けて約1pg近傍までの感度低下が認められた。この点を踏まえ今後、イオン化条件の再検討と併せ、取込みイオン数の制限、スキャンタイムの延長等最適条件の更なる検討が必要である。

LRMSは二重収束磁場型MSの小型機であり、今回はSCLVインジェクションシステム搭載機を使用した。SCLVについては試料溶液中のマトリクス濃度が高い場合に装置パフォーマンスの限界が観察され、最適条件に

ついて今後の検討の必要性が認められた。装置の応用として高沸点側のマトリクスを除去でき、より確実なダイオキシン成分を得られるようなパラメーターの開発により、より効果的な測定が可能であると推測された。装置感度の検出下限は約0.2pgであったが、ネイティブである<sup>12</sup>C<sub>12</sub>-PCDDの測定チャンネルにおいて内部標準物質<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PCDFからの妨害が観察され、2,3,7,8置換異性体以外の化合物においても定量性に問題を残す形となった。分解能を500から3000に上げたことで僅かながらマスクロマトの改善は認められたが、低分解能MSの限界が認められた。低分解能MSによる測定においても、発生源予測のための道具として利用を考えた場合、可能な限り異性体パターンを抑える必要があり、TEFを有する異性体以外の確実な分離定量も考慮に入れる必要がある。これにより使用する内部標準物質の削減等今後改善すべき課題が多く認められた。

## 4 まとめ

ダイオキシン類の簡易分析法開発に向け、精製工程を簡便化し、低分解能MSによる分析を行い、測定装置間の相違を検討した。その結果数値的に大きな差は認められず、TEQ値としては比較的近似した傾向を示した。TEQ値を算出するにあたっては、スクリーニング的に低分解能GC/MSにおいても分析が可能であることが示唆されたが、発生源解明に向けて詳細な異性体情報を得るための分析を検討する際には、各分析機器において更なる最適条件の検討が必要であることが確認された。

## 5 謝辞

本共同研究を実施するにあたり、国立環境研究所より環境標準試料を供与頂きました。感謝申し上げます。

また本共同研究期間中、御指導並びに御助言を頂きました国立環境研究所高澤嘉一氏には深く謝意を表します。また、共同研究者の山形県環境保全センター佐藤氏、栃木県保健環境センター伊東氏には持参した試料の高分解能GC/MSによる測定を実施して頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。最後に多忙中、終始御指導、御助言を頂き、また研究の遂行にあたり格段のご配慮をいただきました国立環境研究所伊藤主任研究員、橋本主任研究員に深く謝意を表します。

## 参考文献

- 1) 松村千里等：第8回環境化学討論会講演要旨集，202～203（1999）
- 2) 中村朋之等：第9回環境化学討論会講演要旨集，248～249（2000）
- 3) 中村朋之等：第10回環境化学討論会講演要旨集，310～311（2001）
- 4) 剣持由紀夫等：第11回廃棄物学会研究発表会講演文集，1268～1270（2000）

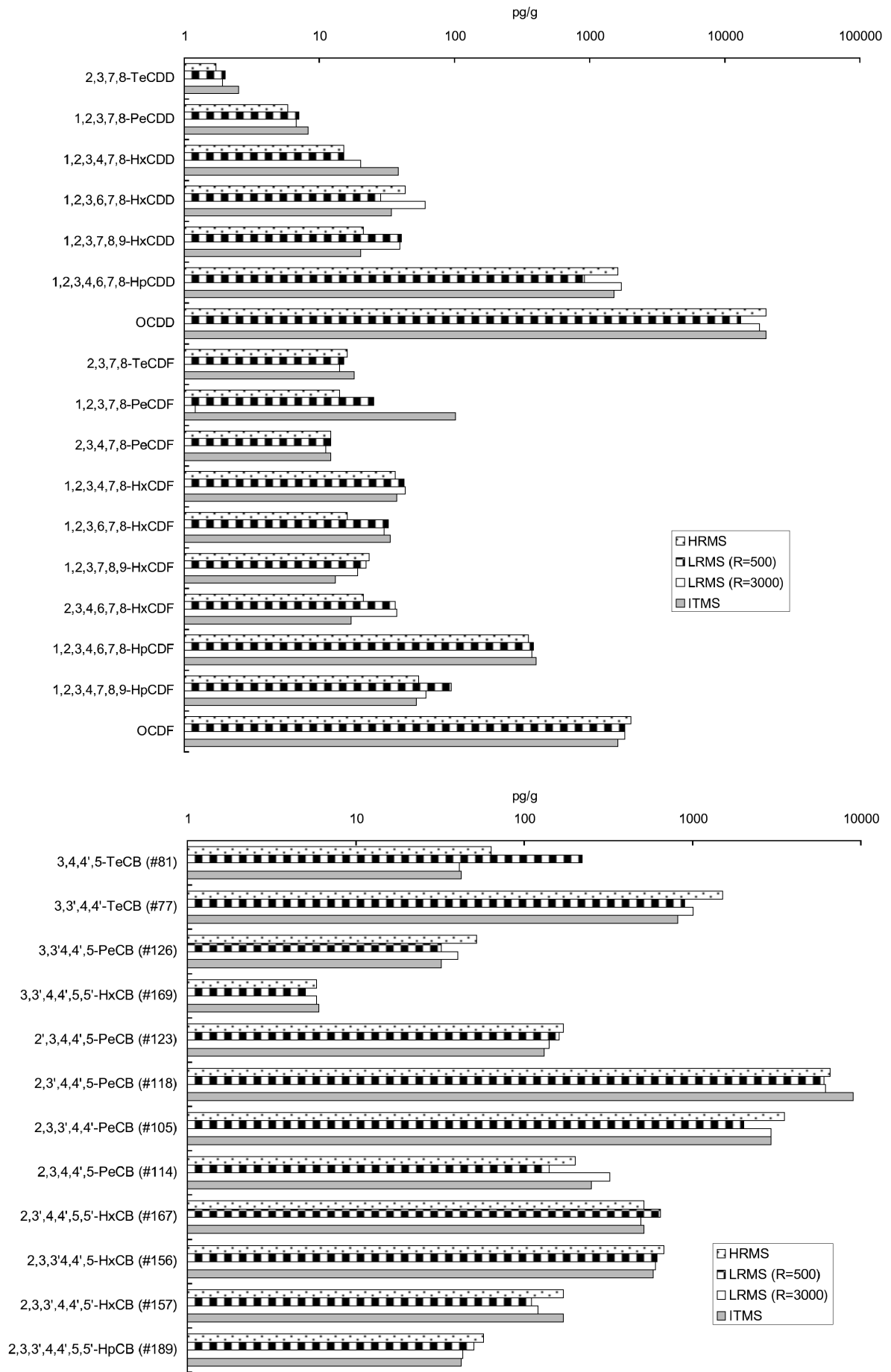


図4 海底質における異性体比較

# 生活環境におけるホルムアルデヒドの挙動に関する調査

## Fate of Formaldehyde in Dwelling Environment

佐々木 ひとえ\* 泉澤 啓 佐藤 真貴子  
佐藤 好克 斎藤 善則 高橋 正弘

Hitoe SASAKI, Kei IZUMISAWA, Makiko SATO  
Yoshikatsu SATO, Yoshinori SAITO, Masahiro TAKAHASHI

キーワード：室内環境，ホルムアルデヒド，アセトアルデヒド，揮発性有機化合物

Key Words：Dwelling Environment，Formaldehyde，Acetaldehyde，  
Volatile Organic Compounds

県内の室内空気汚染対策後の住宅について、入居前、及び入居後のホルムアルデヒド等の実態調査を実施した。その結果、ホルムアルデヒドは、入居前、及び入居後共に、指針値を超えたところはなく、低ホルムアルデヒド規格材使用による効果が確認できた。

アセトアルデヒドは、入居後に指針値を超えた住宅が1棟あったが、全体的に見れば入居後の方が低い傾向を示した。

VOCは、一部の化合物（トルエンは入居前、p-ジクロロベンゼンは入居後）が指針値を超えた。しかし、住宅完成後時間経過に伴い、低減する傾向が見られた。

常時換気システムの無い住宅は入居後に、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、VOCのほとんどの項目で濃度が上昇した。

ホルムアルデヒド濃度測定において、HPLC法と検知管法を比較したところ、検知管法による濃度レベルの確認は可能であった。

入居前に比べ入居後に濃度が高くなった化合物もあり、居住者が室内空気汚染を防止できるような生活スタイルを啓発していくことも重要と思われた。

### 1 はじめに

最近の住宅は快適性・省エネルギー性を追求した高气密・高断熱住宅が普及しており、この気密性の高まった室内でさまざまな空気汚染の問題が起きている。室内空気ホルムアルデヒドについては、平成9年に厚生省（現厚生労働省）の室内空気汚染に関する検討会で指針値が設定された。また、平成12年には住宅の品質確保の促進に関する法律が施行され、こうした状況の中で、住宅メーカーにおいて、建材や内装材の低ホルムアルデヒド規格材の使用等による室内空気汚染防止対策が推進されている。

そこで今回、室内空気汚染対策が施された新築住宅について、入居前および入居後のホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、および揮発性有機化合物（以下VOCとする）の測定を実施し、汚染防止対策後の住宅の現状を把握するため実態調査を行った。

また、ホルムアルデヒドについて、検知管による簡易測定法との比較もあわせて実施した。

\* 現 大崎広域水道事務所

### 2 調査対象住宅

低ホルムアルデヒドの建材を使用して建てられた新築の一般住宅について、入居前調査を6棟行った。さらに、協力の得られた4棟について入居後調査を入居3週間～5か月後に行った。

調査時期は平成13年10月から平成14年3月で、測定地点は室内と室外を1か所ずつ行い、室内は居間中央の高さ1.3m付近で測定した。また、室外は室内と同じ高さで外壁から1m以上離れた地点で行った。

アンケート調査は入居前には建物情報等、入居後には居住者の生活スタイル等についてアンケートを実施した。

### 3 方 法

採取方法、および分析方法は厚生労働省の室内空気中化学物質の測定マニュアルに基づいて行った。

#### 3.1 採取方法

##### 3.1.1 入居前調査

試料採取にあたり、住宅の開口部すべてを30分間開放した後5時間以上密閉し、吸引速度1 l/minで30分間空気

を採取した。なお、常時換気システムを有する住宅においては、密閉中も採取中も換気システムを稼働させた。

室内は30分間の試料採取を2回行い、測定値の平均値を得た。室外は吸引速度 1 l/minで30分間1回の採取とした。

空気捕集にはホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドはWaters製Sep-Pak XpoSurアルデヒドサンプラー、VOCは柴田科学製活性炭チューブを使用した。

### 3.1.2 入居後調査

日常生活を普段どおりにしている状態で、入居前と同じ居間の空気を吸引速度100ml/minで24時間採取した。室外も同様に行った。空気捕集剤は入居前調査に同じ。

### 3.2 分析方法

#### 3.2.1 ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド

空気中のホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドをDNPH捕集剤で吸着、誘導体化させる。これをアセトニトリルで溶出し、高速液体クロマトグラフで測定した。測定条件を表 - 1 に示す。

なお、ホルムアルデヒドの定量下限値は未使用の捕集管5本について操作ブランクを求め、捕集量を入居前30L、入居後144Lとした場合の濃度 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) を算出し、その標準偏差  $\times 10$  の値とした。

#### 3.2.2 VOC

空気中のVOCを活性炭に吸着させ、これを二硫化炭素で溶出し、GC/MSでVOC41化合物 (表 - 2) を測定した。測定条件を表 - 3 に示す。

VOCの定量下限値は検量線作成時の最低濃度0.1mg/lを5回測定し、捕集量を入居前30L、入居後144Lとした場合の濃度 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) を算出し、その標準偏差  $\times 10$  の値とした。

#### 3.2.3 簡易測定法 (検知管法)

入居前住宅について、ガステック製ホルムアルデヒド検知管No91PLを使用し、吸引速度200ml/minで30分間空気を捕集し測定した。空気採取はDNPH-HPLC法と同時に行った。

機器	Waters製 2690		
カラム	Waters製 Symmetry C18 5 $\mu\text{m}$ 3.9 $\times$ 150mm		
移動相	A : 精製水	B : アセトニトリル	
グラジェント	min	A : %	B : %
		80	20
	10	40	60
	30	40	60
流速	1 ml/min		
検出	360nm		
注入量	20 $\mu\text{l}$		

表2 VOC測定対象化合物

脂肪族炭化水素	ヘキサン, ヘプタン, オクタン, ノナン, デカン, ウンデカン, ドデカン, トリデカン, テトラデカン, ペンタデカン, ヘキサデカン, 2,4-ジメチルペンタン, 2,2,4-トリメチルペンタン
芳香族炭化水素	ベンゼン, トルエン, エチルベンゼン, m-p-キシレン, o-キシレン, スチレン, 1,3,5-トリメチルベンゼン, 1,2,4-トリメチルベンゼン, 1,2,3-トリメチルベンゼン, 1,2,4,5-テトラメチルベンゼン
テルペン類	- ビネン, リモネン
ハロゲン類	トリクロロエチレン, テトラクロロエチレン, クロロホルム, 1,1,1-トリクロロエタン, 1,2-ジクロロエタン, 1,2-ジクロロプロパン, p-ジクロロベンゼン, 四塩化炭素, クロロジプロモメタン
エステル類	酢酸エチル, 酢酸ブチル
ケトン類	メチルエチルケトン, メチルイソブチルケトン
アルコール類	ブタノール
アルデヒド類	ノナール, デカノール

表3 GC/MSの測定条件

カラム	J&W DB- 1 0.25mm $\times$ 60m $\times$ 1 $\mu\text{m}$
温度条件	40 (5分) 10 /min 280 (5分)
試料注入法	スプリットレス
試料注入量	1 $\mu\text{l}$
注入口温度	250
検出器温度	280
検出法	SIM

## 4 結果および考察

### 4.1 アンケート結果

#### 4.1.1 入居前アンケート

調査住宅6棟は、一戸建住宅でそれぞれ完成直後ないし1年経過後までの住宅であった。そのうち、常時換気システム設置住宅は4棟であった。ホルムアルデヒド対応状況では、床フローリングは5棟がホルムアルデヒド放散量の1番低い日本農林規格 (JAS) のF<sub>co</sub>規格を、1棟がF<sub>ci</sub>規格を使用していた。壁および天井に使用されたビニルクロスや接着剤も低ホルムアルデヒド規格材を使用している住宅が多かった。

#### 4.1.2 入居後アンケート

調査住宅4棟は、入居後3週間から5か月経過時に測定を行った。常時換気システム設置住宅は3棟であった。測定時期は冬場の暖房使用期間中で、電気による蓄熱式が2棟、石油ファンヒーター使用が2棟だった。在室時間では1棟が日中留守にしていた。居間に設置した購入3か月以内の家具は1~3個であった。また、防虫剤を居間に保存していた住宅が1棟あった。

### 4.2 調査結果

現在までに指針値が設定された化合物、および濃度は表 - 4 のとおりである。

ホルムアルデヒドの入居前後の結果を図 - 1 に、アセトアルデヒドの結果を図 - 2 に示す。

VOCの入居前後の結果を図 - 3 ~ 7 に示す。

また、入居前の住宅について住宅完成から調査日まで



の経過月数と濃度の関係を図 - 8 ~ 10に示す。

ホルムアルデヒド測定におけるHPLC法と検知管法との比較結果を図 - 11に示す。

なお、室外結果は検出下限付近の低濃度であった。

表 4 指 針 値

化合物名	指針値 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
トルエン	260
エチルベンゼン	3800
スチレン	220
キシレン	870
p-ジクロロベンゼン	240
ノナール	41
テトラデカン	330
ホルムアルデヒド	100
アセトアルデヒド	48
T V O C	400

4.2.1 入居前結果

- ① ホルムアルデヒドはA住宅が指針値 ( $100\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) に近かったのを除くと $23 \sim 45\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。この住宅が高めの値を示したのは、床フローリング材が他の住宅より放散量の大きいF<sub>C1</sub>規格だったことや、調査時に付いていたカーテンの加工剤による影響の可能性も考えられる。
- ② トルエンは最大 $1200\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、最小 $3.2\mu\text{g}/\text{m}^3$ で指針値 ( $260\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) を超えた住宅が1棟あった。
- ③ 各住宅の最大濃度を示した化合物は3棟が -ピネン、残り3棟はトルエンであった。 -ピネンが高かった住宅はすべて木造在来工法であった。
- ④ ハロゲン類はすべての住宅で検出されなかった。
- ⑤ 総揮発性有機化合物 (TVOC) は最大 $2100\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、最小 $23\mu\text{g}/\text{m}^3$ で、完成後1か月以内に調査した住宅ではすべてTVOCは暫定目標値 $400\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超えていた。また、完成後5か月以上過ぎた住宅では数 $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。
- ⑥ 住宅完成から調査日までの経過月数と濃度の関係を見ると、ホルムアルデヒドは時間経過で低くなる傾向はみられなかったが、これは低ホルムアルデヒド建材 (F<sub>C0</sub>) 使用により元々放散が少ないためと考えられる。アセトアルデヒドとVOCは住宅完成後時間経過に伴い低くなる傾向がみられた。また、VOCが低い値を示したB住宅、およびE住宅は夏以前に完成した住宅だったため、夏場の高温による自然のベイクアウト効果で化学物質が放散したため、調査時に低い値を示したものと考えられる。

4.2.2 入居後結果

- ① ホルムアルデヒドは $31 \sim 55\mu\text{g}/\text{m}^3$ の範囲内となり、入居前に高かったA住宅は $37\mu\text{g}/\text{m}^3$ と低下した。常時換気システムの無いD住宅が上昇し、 $55\mu\text{g}/\text{m}^3$ となった。

- ② アセトアルデヒドはD住宅が $76\mu\text{g}/\text{m}^3$ と入居前の2倍以上の値となり、指針値 ( $48\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) を超えた。
- ③ P-ジクロロベンゼンはD住宅が $310\mu\text{g}/\text{m}^3$ と指針値 ( $240\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) を超えた。これは居間に防虫剤を保存していたことが原因であった。
- ④ 暖房に開放式石油ファンヒーターを使用しているD、F住宅は、電気による暖房器具を使用しているA、C住宅に比べ、脂肪族炭化水素が高かった。
- ⑤ TVOCは最大 $1700\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、最小 $300\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。最大値を示したD住宅は常時換気システムの無い住宅であった。

4.2.3 入居前後の比較

- ① ホルムアルデヒドについては、A住宅を除けば入居前に比べ入居後は10~70%程度高くなった。居住者の持ちこんだ家具等の影響が考えられるが、平成11年度の東京都の調査結果とほぼ同程度であった。
- ② アセトアルデヒドについては、D住宅を除けば入居後の方が低い傾向を示した。これはVOCと同様調査時期の影響と考えられる。
- ③ TVOCではD住宅以外は入居後の方が低い傾向にあった。D住宅の入居前調査は12月で気温の低い時期だったが、入居後の調査は暖房による加温のため放散量が大きくなったものと考えられる。また、調査した居間に衣類の防虫剤を保存していたことや、換気システムの無い住宅であったことも一因と考えられる。

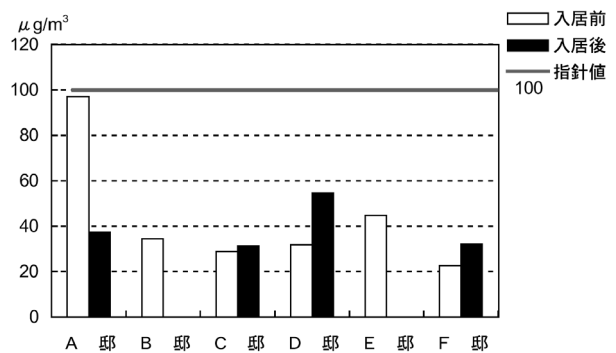


図 1 ホルムアルデヒド

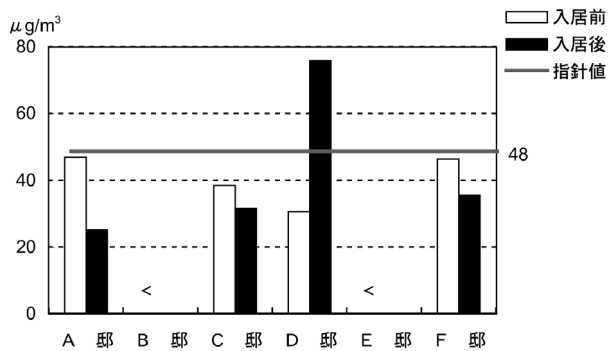


図 2 アセトアルデヒド

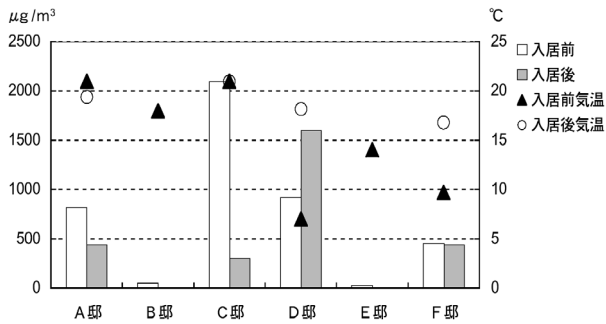


図3 TVOC (入居前後)

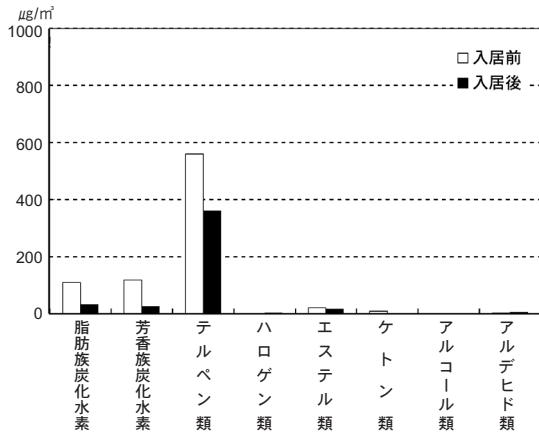


図4 A邸

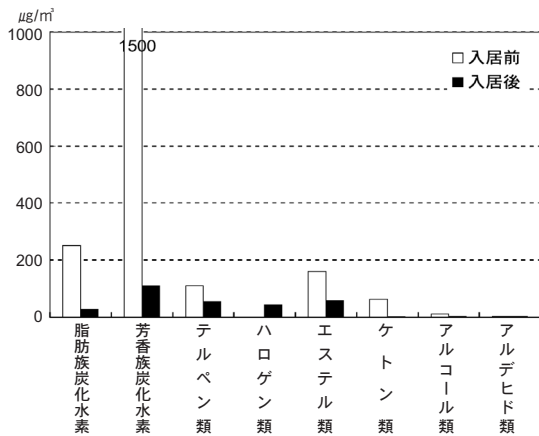


図5 C邸

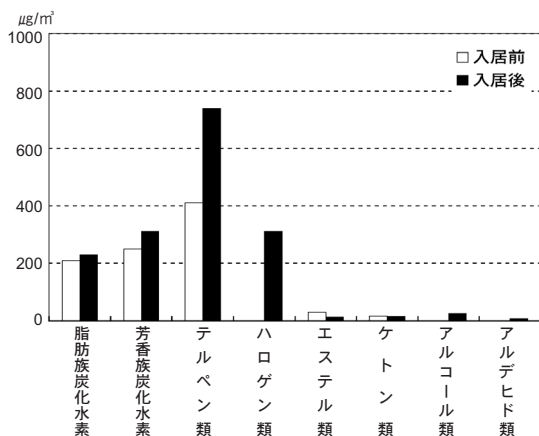


図6 D邸

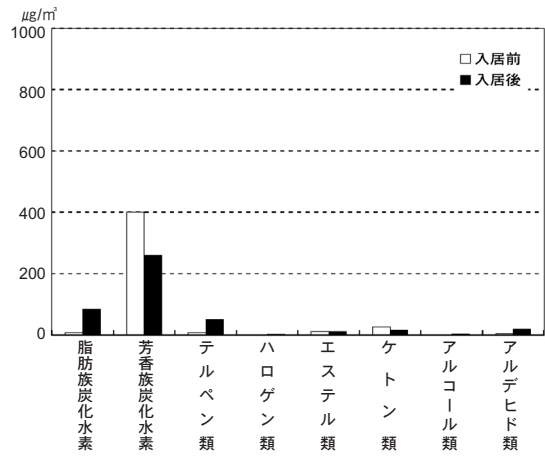


図7 F邸

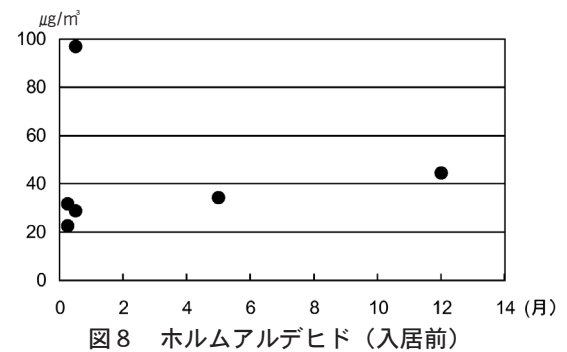


図8 ホルムアルデヒド (入居前)

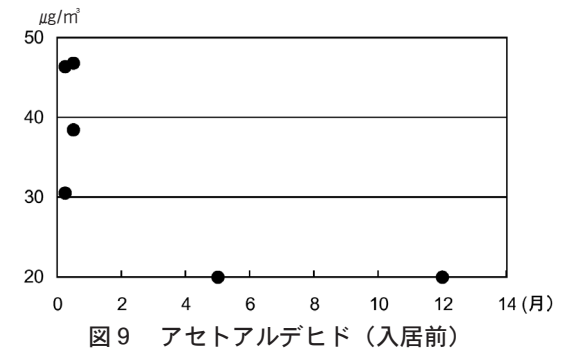


図9 アセトアルデヒド (入居前)

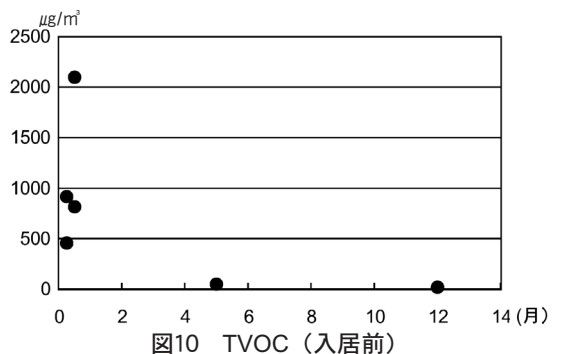


図10 TVOC (入居前)

#### 4.2.4 HPLC法と検知管法との比較

- ① 両方法を比較すると、0.03ppm以上では検知管法が低値を示し、それ以下では高めになる傾向がみられた。相関係数は0.773であった。
- ② 今回の調査では低ホルムアルデヒド材を使用した住宅での調査のため、全体的に低濃度域での比較だったこ

とや試料数が少なかったため、明確な比較結果は得られなかった。しかし、検知管法での濃度レベルの確認は可能と思われた。

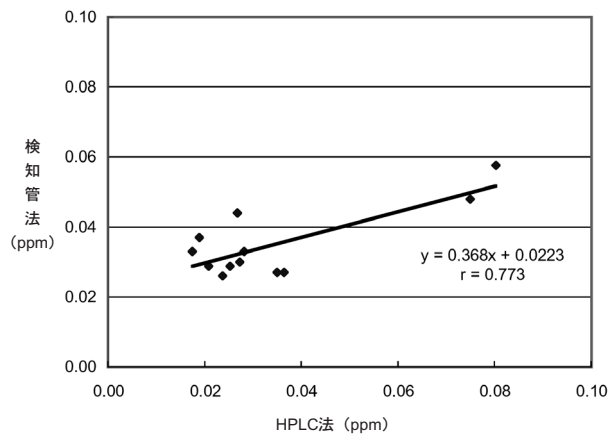


図11 HPLC法と検知管法との比較

## 5 ま と め

今回の調査結果からホルムアルデヒドについては、指針値を超えたところはなく、低ホルムアルデヒド規格材の使用による室内空気汚染防止対策の効果が確認できた。VOCについては一部の化合物の個別指針値が設定されたものの、その対応についてはまだ不十分で、一部指針値を超過した。しかし、住宅完成後時間経過に伴いVOCが低減する傾向がみられたことから、入居前に十分にVOCを放散させ換気を行うこと（ベイクアウト）により、VOCの低減は可能と推察された。

また、入居前に比べ入居後に濃度が高くなった化合物もあり、居住者が室内空気汚染を防止できるような生活スタイルを啓発していくことも重要と思われた。

## 参 考 文 献

- 1) 瀬戸博他：東京都立衛生研究所年報，51，p229（2000）

# 畜産系堆肥化施設のLCAによる評価について

## Evaluation by LCA of a stockbreeding system composting institution

泉澤 啓 佐藤 好克 斎藤 善則  
高橋 正弘

Kei IZUMISAWA, Yoshikatsu SATO, Yoshinori SAITO  
Masahiro TAKAHASHI

キーワード：廃棄物，LCA，畜産，堆肥

Key Words : Waste , LCA , Stockbreeding , Compost

仙北地区のA町にある環境配慮型畜産系堆肥化施設を対象として、LCA手法を用いて「収集」「堆肥製造」「流通・販売」「排ガス処理」の各工程についてのインベントリー分析及び環境影響評価項目の設定と評価を行った。インベントリー分析の結果、堆肥製造1t当たりのエネルギーの消費は、電力96kW、水50kg、軽油456kgであり、CO<sub>2</sub>22.5kg、SO<sub>x</sub>0.021kg、NO<sub>x</sub>0.026kg、窒素4.5kgが発生していることが解った。また、堆肥製造経費では1tあたり1,023円で全製品の70%以上が販売されなければ利益が見込めないため販路の確保が重要な課題であること、環境影響評価では本モデル施設では密閉構造で脱臭装置を備えていること、排水がクローズであることから環境に対する負荷が少ないが、冬期間の土壌脱臭装置の機能低下や一部開放したままの作業による臭気の漏出が懸念される等の問題点があきらかとなった。

### 1 目 的

平成12年度の調査の結果、畜産系施設はいわゆる野積みから高度処理である強制発酵施設まで処理方法に差があり、悪臭や汚水等の環境問題を引き起こしている施設も多く種々の問題があることが分かった。

今回、平成10年11月からA町で環境配慮型として稼働した堆肥化施設をモデル施設として原料・製造・製品等の各段階における環境負荷等を中心としたインベントリー分析を行い、LCAの手法を用いて環境影響評価を行った。

### 2 検討対象施設

仙北地区のA町にある畜産系堆肥化施設を対象施設とした。なお、この施設はA町が国及び県の補助を受け設置したもので、その諸元は表-1のとおりである。

表-1

処 理 方 式	スクープ式連続発酵処理	
処 理 能 力	原 料	10 t/日
	製 品	5 t/日 1,400 t/年
	製 造 期 間	24 日
脱 臭 施 設	土壌脱臭 (50 m <sup>3</sup> /min)	
ふ ん 尿 収 集 地 域	A町全域	
対象地区別頭羽数	牛	1,375 頭
	豚	49 頭
	採 卵 鶏	30 羽
	ブロイラー	28,000 羽
従 業 員 数	1.8 人	

### 3 堆肥製造に関するインベントリー分析対象範囲の検討

#### 3.1 項目の決定

堆肥の製造に係る環境負荷項目として、エネルギー消費、水消費、排ガスを対象にした。また、排水、廃棄物の発生は対象外とした。

#### 3.2 機能と機能単位

堆肥の機能は 扱いやすく汚物感を除く、有害生物の除去と雑草の種子の死滅、植物への栄養補給、土壌の物理性改善であり、肥料・土壌改良材として使用される。

対象施設の製品である堆肥の販売は、1t単位の直販ばら売りが主で、年間1,400tを生産しているが、90%以上が主に量り売りで農家に直接販売される。また、袋詰め(15kg/袋)での販売は年間120t(8,000袋)で8.6%程度である。よって直販ばら売りの1tを機能単位とした。

#### 3.3 対象製品の仕様

表-2

区分	全窒素	リン酸	カリウム	炭素率	含水率
成分値 (%)	2.0	3.0	3.2	14	41

#### 3.4 システム境界

堆肥製造プロセスは図-1のとおりである。

なお、プロセスの区分は次のとおりとした。

堆肥のライフサイクルに関するプロセス

堆肥のライフサイクルで使用される飼料・包装資材の製造に関するプロセス

堆肥のライフサイクルの各ステージで必要となるユーティリティ（発電，水供給，廃水処理等）に関するプロセス

堆肥のライフサイクルの各ステージで使用される資本財（包装資材等の製造工場，堆肥製造設備等）の建設とその維持・管理に関するプロセス

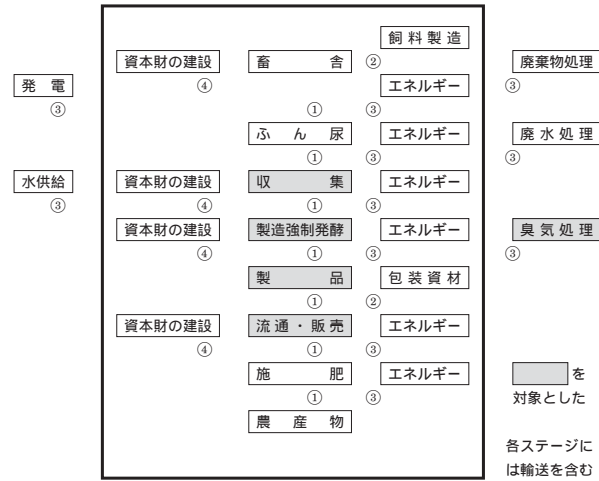


図-1

今回は，対象ステージを「収集」「製造強制発酵」「流通・販売」「臭気処理」とした。また，ユーティリティに関するプロセスの検討を主とし，資本財に関するプロセスを検討から除いた。

#### 4 堆肥製造のインベントリー分析

インベントリー分析対象プロセスから「ふん尿収集フロー」「強制発酵施設の堆肥製造フロー」「販売」「脱臭（排ガス）処理フロー」を作成し各フローから調査項目を設定した。

##### 4.1 各フローの設定

###### 4.1.1 ふん尿収集フロー

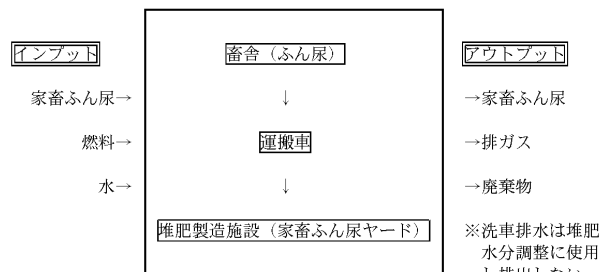


図-2

###### 4.1.2 強制発酵施設の堆肥製造フロー

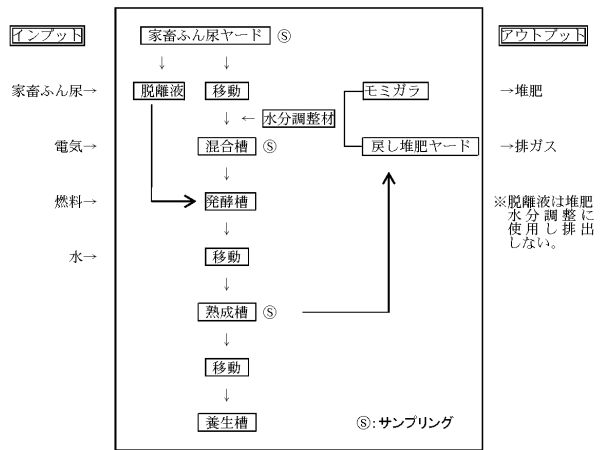


図-3

###### 4.1.3 流通・販売フロー

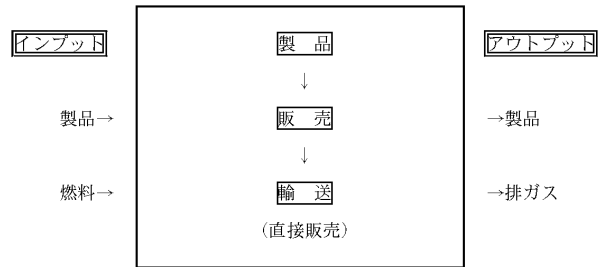


図-4

###### 4.1.4 排ガス（脱臭）処理フロー

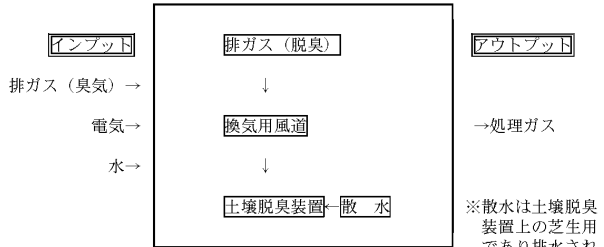


図-5

#### 4.2 データの収集

##### 4.2.1 聞き取り調査および文献等からデータ収集した項目

- (イ) インプット：エネルギー消費（電気・ガソリン・軽油），水消費（洗浄水）
- (ロ) アウトプット：製品（堆肥），排ガス

##### 4.2.2 測定によるデータ収集

- (イ) 測定目的  
発生している悪臭物質等の確認と，窒素負荷量及び脱臭設備の機能確認を行うため，堆肥発酵中に発生する二酸化炭素，アンモニア等について実測した。
- (ロ) 試料採取場所 図-3に示す。

(ハ) 発生ガスの確認

- ① 測定年月日 平成14年1月15日から4月26日（6日間）
- ② 測定項目：二酸化炭素，アンモニア，メチルメルカプタン，トリメチルアミン，硫化水素
- ③ 測定法：検知管
- ④ 測定結果：表-3のとおりであった。
  - ・二酸化炭素の濃度は，原料のふん尿を投入するふん尿ヤードで最も高い値を示した。
  - ・アンモニア及びトリメチルアミンは，混合槽で高い値を示した。アンモニア濃度2,000ppmは文献値と一致した。
  - ・硫化水素の発生は確認できなかった。

表-3 単位：ppm

測定場所	ふん尿ヤード	混合槽入口	熟成槽
二酸化炭素	20,000	300	600
アンモニア	24	2,000	13
メチルメルカプタン	4	0.5	0.5
トリメチルアミン	80	7,600	3.0
硫化水素	<0.1	<0.1	<0.1

(ニ) 発生ガス中の窒素量

- ① 堆肥の発酵に伴い，窒素濃度は低下する。堆肥化工程では排水が出ないので，原料中の窒素はアンモニア等のガスとして放出される。ふん尿・発酵槽・堆肥中の窒素量から負荷量を求めた。
- ② 測定法：N-（1-ナフチル）エチレンジアミン吸光光度法
- ③ 測定結果：表-4のとおりであった。
 

堆肥の発酵に伴い，窒素濃度は低下する傾向が見られ，最終製品（完熟堆肥）では原料に比べ47%にまで減少したのに対して，燐濃度は殆ど変わらなかった。

表-4 g/kg乾

	窒素	燐	水分含量(%)
ふん尿	8.6	3.5	64
発酵槽	5.2	5.0	50
堆肥	4.1	3.6	45

- ④ 堆肥1tあたりの窒素負荷量
 

ふん尿1tを堆肥化するにあたって窒素が4.5kg/t乾減少している。これは，アンモニア，トリメチルアミン等のガス状窒素化合物としての放出が考えられ，環境に対する窒素負荷量は4.5kg/t乾である。

(ホ) 脱臭装置の処理

処理前，処理後の排ガス濃度の測定結果は表-5のとおりで，アンモニアが12ppmから2.0ppm以下，トリメチルアミンが78ppmから1.0ppm以下と二酸化炭素以外の物質の土壤脱臭装置の効果が確認された。

表-5 単位：ppm

	処理前	処理後
二酸化炭素	480	490
アンモニア	12	<2.0
メチルメルカプタン	<0.5	<0.5
トリメチルアミン	78	<1.0
硫化水素	<0.5	<0.5

4.2.3 堆肥製造のインベントリー分析結果  
インベントリー分析結果を表-6に示す。

表-6 単位：1t当たり

		収集	堆肥製造	流通・販売	排ガス処理
物質フロー(t)		10	5	5	
資源消費	ふん尿(t)	10	5	5	
電力	使用電力量(kw)		16		80
水消費(kg)		30	10		10
排ガス	CO <sub>2</sub> (kg)		5.7		
	窒素(kg)		4.5		
排水	洗車排水	-	-		
	洗浄排水		-		
輸送 (場内移動を含む)	輸送手段	トラック(軽油)	トラック(軽油) 撒布車(軽油) バキューム車(軽油)	トラック(軽油)	
	積載量(t)(台)	2t×5台	2t×2台 1t×1台 0.5t×1台	2t×5台	
	輸送距離(km)	20		25	
	燃料消費(kg)	136	48	171	
	CO <sub>2</sub> 排出量(kg)	6.5	2.3	8.1	
	SO <sub>x</sub> 排出量(kg)	0.008	0.003	0.010	
	NO <sub>x</sub> 排出量(kg)	0.010	0.004	0.013	

堆肥1t当たりの製造から販売までのエネルギー消費は，電力96kW，水50kg，軽油456kgであり，排ガスはCO<sub>2</sub>22.5kg，SO<sub>x</sub>0.021kg，NO<sub>x</sub>0.026kg，アンモニア等に含まれる窒素分として4.5kgが発生した。

5 環境影響評価項目の設定

5.1 評価項目の検討

堆肥化施設についてはLCA手法を適用した例は少なく，定量的な評価の他に定性的な評価を付け加える必要があることから，インベントリー分析のほかに，環境汚染の有無・大小等を評価の基本とした環境影響評価項目について設定した。評価項目及び評価のポイントは表-7のとおりである。

表-7

評価項目	評価のポイント		
収	①ふん尿収集車両	・運搬中ふん尿が漏れ出ない構造の車両を使用しているか。	
		密閉式運搬車を使用している。	+1
		一般トラックをシート等で脱離液等がこぼれないように措置し使用している。	0
		一般トラックを使用している。	-1
集	②水分含量	・ふん尿の水分が多い場合は、発酵の促進が不十分で有害物質の分解が不十分だったり、臭気発生の原因となることがあるため、受け入れ、出荷時の水分確認を行っているか。	
		受け入れ・出荷時に水分確認を行っている。	+1
		出荷時のみ水分確認を行っている。	0
		水分確認は行っていない。	-1
堆肥	③ふん尿保管設備	・ふん尿が雨水等で洗い出されることがなく、脱離液等が周囲を汚染することがない構造であるか。	
		保管場所は屋根があり、床面は不透液製材料で構築され、尿・脱離液等の保管設備も適切である。	+1
		保管場所等は適切であるが、周囲が脱離液等で汚染されている。	0
		雨水等に対する処置がない。	-1
堆肥	④堆肥製造設備	・堆肥製造中に雨水等で洗い出されることがなく、脱離液等が周囲を汚染することがない構造であるか。悪臭対策のために密閉された構造か。	
		堆肥製造中に雨水等で洗い出されることがなく、脱離液等が周囲を汚染することがない構造であるか。悪臭対策のために施設は開放されていない。	+1
		堆肥盤等があり、周囲を汚染しない措置がされている。	0
		保管設備に屋根も床もなく、尿だめは素堀である。	-1
製	⑤切り替えし	・発酵促進のため切り返しを行う必要があるが、切り返しにより堆肥化の迅速化を行うことができるため、処理量が多くなり放置されるふん尿の減少につながる。	
		切り返しを定期的に行っている。	+1
		適宜切り返しを行っている。	0
		切り返しを行っていない。	-1
通	⑥製品保管設備	・製品は雨水等で洗い出されることがなく染み出ない構造か。	
		製品は雨水等で洗い出されることがない恒久的な構造である。	+1
		製品は雨水等で洗い出されないよう措置してある。	0
		製品は雨水等で洗い出される構造である。	-1
販	⑦包装資材	・包装資材はリサイクル・分解性等の環境配慮製品であるか。	
		リサイクル・分解性等の環境配慮製品である。	+1
		リサイクル化が計画された素材である。	0
		リサイクル・分解性等の環境配慮製品でない。	-1
売	⑧製品の販売	・製品（堆肥）の販売が確保されているか。販路が確保されていないと製品が滞り、製造がストップしてしまう事が懸念される。	
		販路が確保されている。	+1
		販路が確保されているが十分でない。	0
		販路が確保されていない。	-1
公	⑨排ガス（悪臭）処理	・堆肥は分解過程で多量の二酸化炭素、悪臭物質（アンモニア、メルカプタン、硫化水素等）を発生するので、悪臭物質の除外設備をもうけているか。この場合処理方式により環境負荷に違いがでることを考慮する。	
		生物処理設備がある。	+1
		処理設備あり。	0
		処理設備はない。	-1
害	⑩施設の構造	・施設は密閉され、排ガス等が施設外に漏出していないか。	
		施設は密閉構造である。	+1
		施設は密閉構造であるが、開放して作業を行っている。	0
		施設は密閉構造でない。	-1
防	⑪排水処理	・水処理を行っているか。水質検査の結果は良好か。	
		発生する汚水あるいは処理水は水分調整に使用すること等により処理し、環境中に排水を出さないようにしているか。	
		排水は出ない。	+1
		水処理を行っている。	0
止	⑫廃棄物処理	・廃棄物の発生はあるか。堆肥製造工程からの廃棄物の発生はほとんどないが普通である。	
		廃棄物が出ない。	+1
		廃棄物を適切に処理。	0
		廃棄物が多く放置されている。	-1
周	⑬周辺の住民	・施設周辺に民家があるか。施設周辺に民家がある場合に、公害苦情の発生が懸念される。	
		周辺に民家がない。	+1
		周辺に民家があるが苦情は発生しない。	0
		周辺に民家が多く苦情が発生する。	-1
境	⑭施設の植栽	・施設周辺に植栽が施され、周辺の環境に配慮されているか。	
		植栽が施され、周辺の環境に配慮している。	+1
		植栽が施されているが、周辺の環境に配慮されていない。	0
		植栽が施されていない。	-1

5.2 堆肥製造経費について

堆肥1t製造する場合のユーティリティー経費について試算したところ表-8のとおりであった。

表-8

項目	収入	支出	差し引き
金額	5,165円	4,142円	1,023円
		内訳	
		電気代	1,240円
		労働費	2,880円
		軽油代	22円

5.3 評価項目及び堆肥製造経費の評価結果

5.3.1 評価項目の評価結果

モデル施設を堆肥製造評価表により評価検討したところ次のとおりであった。

- ① ふん尿収集車両については、搬入は農家が一般トラックを使用しており覆いをしていないため、ふん尿の飛散流出するおそれがある（-1）。
- ② 受け入れ・出荷時に水分確認を行っている（+1）。
- ③ ふん尿保管設備は、屋根があり床面は不透液製材料で構築されている（+1）。
- ④ 堆肥製造設備は壁及び屋根等で密閉されている（+1）。
- ⑤ 切り返しは、タイマーにより自動的に実施している（+1）。
- ⑥ 製品保管設備は建て屋内にあるため、雨水等による流出はない（+1）。
- ⑦ 製品の包装資材は、リサイクル・分解性等の環境配慮製品である（0）。
- ⑧ 販売は農家等への小分け販売が主であり、袋詰め製品の販路が不十分である（-1）。
- ⑨ 堆肥の発酵過程において、窒素、アンモニア、二酸化炭素等のガス等が発生するが、二酸化炭素を除くガスは土壤脱臭処理される。ただし、冬期間の積雪による土壤脱臭装置の能力低下が考えられる。（0）。
- ⑩ 施設は密閉された施設ではあるが、シャッター等が故障しており一部開放状態で作業を行っている（0）。
- ⑪ 排水はクロードシステムになっており、場内や車両の洗浄排水も含めて地下貯留槽に一時的に溜め混合槽において水分調整時に使用している（+1）。
- ⑫ 廃棄物となる残さ等はすべて戻し堆肥として利用している（+1）。
- ⑬ 周辺に民家はあるが少数であり苦情は発生しない（0）。
- ⑭ 自然の地形を利用した植栽が施され、周辺の環境に配慮している（+1）。

5.3.2 堆肥製造経費

堆肥生産1tあたり1,023円の収入となる。ただし、平成13年の販売実績は全量の70%であり61円の赤字であった。

## 6 結果及び考察

堆肥製造工程のうち、「収集」「堆肥製造」「流通・販売」「排ガス処理」工程についてインベントリー分析を行い、評価表を作成し評価項目を決定し、これによりモデル施設について評価を行った。

今回のモデル施設は臭気等が屋外に漏出ししない密閉構造とし脱臭装置も備えている。この脱臭装置は大気中に排出される窒素分の環境負荷低減に効果的である。また排水はクローズドで環境に配慮された施設であった。また、水分含量による受け入れ時搬入制限やタイマーによる繰り返し作業から安定した製品の供給が可能となっている。ただし、冬期間の土壌脱臭装置の機能低下や一部開放したままの作業による臭気の漏出が懸念される。インベントリーの分析結果では、堆肥製造時に堆肥1t当たり電力96kW、水50kg、軽油456kgが消費され、排ガスはCO<sub>2</sub>22.5kg、SO<sub>x</sub>0.021kg、NO<sub>x</sub>0.026kg、窒素4.5kgが発生することがわかった。特に排ガス処理工程では80kWと使用している電力全体の83%が消費されている。

堆肥製造経費では1tあたり1,023円の収入となるが、全製品の70%以上が販売されなければ利益が見込めないため、販路の確保が重要な課題となっている。

LCA手法は、製品開発や企業における環境負荷を削減するためには大変有効な手法である。しかし、LCAの対象は同一機能を有する製品であり、そのために異なる材料や製品について比較をすることはきわめて難しいと言われている。特に畜産業では家畜の種類が多種であり、餌、ふん尿成分が異なるため強制発酵施設ごとに同一の機能単位等を設定しインベントリーデータについて考慮する必要がある。

また、現在環境負荷全体を総合的に評価する指標が確立されておらず、特にLCAを実際に行うためには収集し

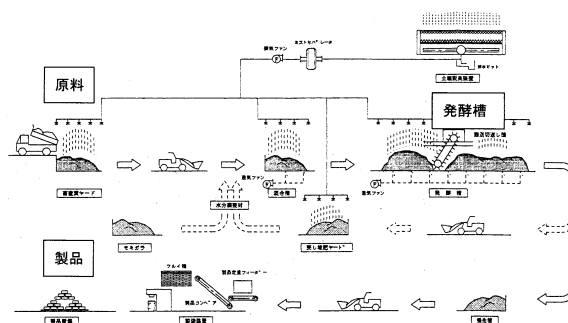
たデータの質を担保する必要がある、それには膨大な量のデータを収集しなくてはならない。そして、そのデータは透明性が確保されるとともに公平である必要があり、作成されたデータベースは定期的に更新される必要がある。

今回、畜産における資源循環についてLCA手法を用いたの評価を行ったが、現在LCIについてのデータ等は多くなく、取り扱うふん尿の種類や堆肥の成分が施設ごとに異なるため、より多くのデータを収集し積み上げていく事が今後の課題となる。

## 参考文献

- 1) 環境庁企画調整局環境研究技術課：ライフサイクルインベントリー分析の手引き
- 2) 社団法人中央畜産会：堆肥化施設設計マニュアル
- 3) 財団法人畜産環境整備機構：家畜ふん尿処理・利用の手引き

(参考) 堆肥製造工程





# 道路に面する地域における環境騒音測定方法に関する検討（第3報） －除外すべき音の処理方法について－

Examination on the Measurement Method of Environmental Noise in Roadside ( 3rd Report )  
- A Method of Exclusion Noise -

菊地 英男 高橋 誠幸 鈴木 康民

Hideo KIKUCHI, Seiko TAKAHASHI, Yasutami SUZUKI

キーワード：環境騒音，沿道騒音，等価騒音レベル，除外音処理

Key Words : Environmental Noise, Roadside Noise, LAeq, Method of Exclusion Noise

道路交通センサスの対象としている，交通量等の異なる12路線を抽出し検討した結果，除外音で最も多かったのはその他の音が約39%で，次いで自然音が約31%であった。また，除外音の種類別に騒音レベルの平均値を見ると，いたずら等測定に付随する音が約93dB(A)と最も高く，次いで突発音約85dB(A)であった。24時間連続測定して得られたLAeq,10minの真値と実測値についてレベル差を見ると±1dB(A)以内に80%以上，±2dB(A)以内に90%以上のデータが含まれることが判った。最後に，今回のデータに既存の除外音処理方法を適用した結果，いずれの方法も適切に処理を行っているとは言い切れなかったため，新たな処理方法を検討した結果，的中率，誤認率ともバランスの良い処理方法として「LAmaxの95dB(A)以上，又はLAeqの1.96以上のデータを除外する」方法を提案した。

## 1 目 的

平成10年9月に「騒音に係る環境基準」が改正され，評価手法が従来の中央値(L<sub>50</sub>)から等価騒音レベル(LAeq)に変更になり，翌年4月から施行されている。また，平成12年4月には環境庁(現環境省)から技術的な助言として「環境騒音に係る環境基準の評価マニュアル」(以下「マニュアル」と言う。)が示され，このマニュアルに基づき環境騒音の測定・評価を行うこととなっている。

しかし，当該マニュアルでは測定の詳細について不明確な部分があるため，「道路に面する地域に係る環境騒音の測定方法」を策定するために，これまで年間を代表する騒音レベルの測定時期，観測時間を代表する騒音レベルの実測時間及び1時間交通量を推定するために必要な観測時間等について検討を行ってきた。今回は，除外すべき音(以下「除外音」と言う。)の効率的な処理方法について検討を行ったので報告する。

## 2 調査方法

県内の道路交通情勢調査(以下「道路交通センサス」と言う。)の対象となっている道路で，交通量等の異なる12路線を対象とし，官民境界における騒音レベルを200ms間隔で24時間連続測定したデータを騒音計本体のメモリーに格納すると同時に，レベルレコーダで騒音レベルを24時間連続記録した。このレコーダによる騒音レベルの波形に道路交通騒音以外で聴取出来た音の種類を全て記録し，後日騒音計に格納した測定データと付き合わせ，除外音の特定を行った。

## 3 調査対象道路の状況等

対象とした12路線の道路状況等を表1に示す。交通量については平成11年度の道路交通センサスの結果から12時間交通量を基本として，車種別の昼夜率から24時間換算交通量を算出している。総交通量は約1,000台から32,000台程度であり，大型車混入率は10%から28%程度であった。また，制限速度は40km/h及び50km/hであった。

表 1 対象道路状況等

道路名	道路交通 番号	測定地点	交通量(台/24時間)				等価交通量 (台/24h)	大型車 混入率 (%)	車線数	制限速度 (km/h)
			二輪車	小型車	大型車	合計				
白石柴田線	4134	柴田線船岡	141	12,713	1,362	14,216	18,938	9.6	2	50
国道6号	1034	巨理町倉庭	47	14,369	4,936	19,352	36,465	25.5	2	50
国道4号	1022	三本木町新町	208	23,752	8,211	32,171	60,639	25.5	4	50
国道4号	1023	古川市稲場	149	23,062	8,962	32,173	63,244	27.9	4	50
国道45号	1047	石巻市門脇	93	16,620	3,944	20,657	34,331	19.1	2	50
塩釜巨理線	4025	岩沼市下野郷	35	8,350	1,145	9,530	13,500	12.0	2	40
国道45号	1040	松島町普賢堂	147	15,188	4,571	19,906	35,754	23.0	2	50
国道398号	1132	築館町新田	67	7,503	936	8,506	11,751	11.0	2	40
巨理大河原川崎線	4036	角田市岡	51	6,324	870	7,245	10,261	12.0	2	50
気仙沼陸前高田線	4103	気仙沼市東中才	69	2,875	441	3,385	4,914	13.0	2	40
愛島名取線	6020	名取市植松	30	2,739	621	3,390	5,543	18.3	2	40
越河角田線	66005	角田市南町	36	768	99	903	1,246	11.0	2	40

注1) 交通量は、道路交通センサスの24時間換算交通量を用いた。

2) 等価交通量は、大型車、二輪車とも小型車とのパワーレベルの比を用いて小型車に換算したものである。

## 4 調査結果

### 4.1 騒音レベル及び除外音の種類

沿道において騒音レベルを200ms間隔で連続測定したデータを10分間隔で集計し、除外音を全て除いた場合(以下「真値」と言う。)と除外音を除かない実測値について、時間区分毎の等価騒音レベル(LAeq)を求めた結果を表2に示す。昼間については実測値66~76dB(A)、真値62~76dB(A)であり、実測値と真値を地点毎に比較するとほとんどの地点では1dB(A)以内であるが、1dB(A)を超える所が3地点あり、最大6.2dB(A)であった。また夜間については実測値57~75dB(A)、真値53~75dB(A)で、実測値と真値のレベル差が1dB(A)を超える所も3地点あり、最大4.4dB(A)であった。実測値と真値が最も離れている地点は角田市南町であり、交通量が最も少なく、町の中心部で測定したデータである。

表 2 等価騒音レベル(LAeq) (dB(A))

測定地点	昼 間			夜 間		
	処理前	処理後	前-後	処理前	処理後	前-後
柴田町	69.9	69.7	0.2	65.8	65.7	0.1
巨理町	75.5	75.5	0.0	75.4	75.3	0.1
三本木町	71.5	70.5	1.0	70.4	70.4	0.0
古川市	76.1	75.9	0.2	74.8	74.7	0.1
石巻市	75.5	74.9	0.6	72.1	72.0	0.1
岩沼市	71.6	71.7	-0.1	67.0	67.1	-0.1
松島町	73.9	70.4	3.5	69.6	67.9	1.7
築館町	69.5	69.3	0.2	61.7	61.1	0.6
角田岡	70.4	70.5	-0.1	63.4	61.7	1.7
気仙沼市	70.2	67.4	2.8	56.7	55.9	0.8
名取市	65.6	65.5	0.1	58.2	58.0	0.2
角田南町	67.9	61.7	6.2	57.6	53.2	4.4

注) 処理前とは測定データをそのまま集計したもの、処理後は除外音を全て除去したデータを集計したもの。

次に、12路線の測定点で得られた除外音の種類毎の騒音レベル平均値及び発生回数を集計したものを表3に示す。地点毎に除外音の種類や発生回数は異なっているが、ここでは全体を概観する。時間区分毎に見ると、全ての地点で夜間よりも昼間での発生回数が多かった。又、1日を通した除外音毎の発生回数は、人声や犬の鳴き声等のその他の音が1,094回(39.1%)と最も多く、次いで鳥の鳴き声等の自然音が866回(30.9%)、救急車や改造車の爆音等の突発音が401回(14.3%)の順であった。反対に最も少なかったのは、マイクロホンに対するいたずら行為等測定に付随する音の12回(0.4%)であった。除外音の種類毎の騒音レベルについては算術平均値で示しており、測定に付随する音が約93dB(A)と最も高いが、昼間のみ発生しており、子供がマイクロホンの前で大声を張り上げたものである。次いで突発音が85dB(A)程度、航空機騒音や鉄道騒音等の他で評価する音が約76dB(A)の順であり、他の種類の除外音は70dB(A)以下であった。

### 4.2 除外音の発生頻度

各地点において観測された等価騒音レベル10分値(以下「LAeq,10min」と言う。)のうち実測値と真値のレベル差毎の累積発生頻度を表4に示す。24時間連続測定して得られるLAeq,10min144個のデータに対し、除外音の影響を受けたのは巨理町の44個から柴田町の122個と地点によりバラツキが大きい。又、各地点とも真値と実測値のレベル差が±1.0dB(A)以内に約80~95%以上、±2.0dB(A)以内に90~100%のデータが含まれることが判った。これらのことから、LAeq,10minに±1.0dB(A)以上影響を与える除外音は5~20%程度、±2.0dB(A)以上では5%程度と考えられる。

表3 除外音の種類毎の騒音レベルと発生回数

時間区分	他で評価		建設作業音		自然音		突発音		測定に付随する音		その他		合計
	平均値	回数	平均値	回数	平均値	回数	平均値	回数	平均値	回数	平均値	回数	回数
昼間	77.2	271 (11.3)	65.2	118 (4.9)	61.6	838 (34.9)	84.0	331 (13.8)	93.7	12 (0.5)	65.9	830 (34.6)	2,400 (100.0)
夜間	71.5	39 (9.7)			50.6	28 (7.0)	86.8	70 (17.5)			56.6	264 (65.8)	401 (100.0)
全日	76.5	310 (11.1)	65.2	118 (4.2)	61.2	866 (30.9)	84.5	401 (14.3)	93.7	12 (0.4)	63.7	1,094 (39.1)	2,801 (100.0)

注) 表の平均値の単位はdB(A)であり、nの欄中下段( )は発生回数の割合(%)である。

表4 LAeq, 10minに対する真値と実測値のレベル差毎の累積発生割合

測定地点	±1.0dB以内	±2.0dB以内	±3.0dB以内	±4.0dB以内	±5.0dB以内	全データ数	除外音含むデータ数
柴田町	96.5	97.9	99.3	100.0		144	122
亘理町	98.6	100.0				144	44
三本木町	97.9	97.9	98.6	99.3	99.3	144	61
古川市	97.9	99.3	99.3	100.0		144	54
石巻市	90.3	93.1	96.5	100.0		144	56
岩沼市	87.5	95.1	99.3	99.3	100.0	144	98
松島町	86.8	93.8	96.5	96.5	97.2	144	84
築館町	88.2	93.1	96.5	97.9	97.9	144	45
角田市岡	79.2	90.3	93.8	96.4	97.9	144	87
気仙沼市	81.3	93.1	97.2	97.2	97.9	144	83
名取市	90.3	95.8	97.2	98.6	98.6	144	78
角田市南町	91.0	94.4	94.4	95.8	95.8	144	72

注) 表中全データ数と除外音を含むデータ数の単位は回であり、他の欄の単位は%である。

## 5 除外音の処理方法の検討

### 5.1 既存の除外音処理方法の適用性

マニュアルによる除外音の処理方法は①無人あるいは測定員が常時監視できない場合は、分析時に実測時間を細かく区分して、除外すべき音が発生したときの時間区分のデータを除いて統計処理する。②測定員が常時監視している場合は、一時中止ボタンで測定を中止して、適切な時間が経過後、測定を再開、継続するとしている。しかし、②の測定員が常時監視することは現実的でないため、各自治体においては①の方法について様々な手法により除外音処理を行っているが、現在入手している処理方法は以下の4種類である。

#### (1) 大阪府方式<sup>1)</sup>

① L5 LAeq, 500s L50 > 30dB(A)

かつ②トレンドとLAeq, 10minの差

1観測時間内に5dB以上 1個

又は、1観測時間内に4dB以上 2個以上

#### (2) 愛知県方式<sup>2)</sup>

① L Amaxが100dB(A)以上

かつ② LAeq > L5

#### (3) 長野県・川崎市方式<sup>3)</sup>

プラス検定 (n = 50以上)

$T(x_k) = (x_k - x) /$  (危険率1%)

#### (4) 宮城県暫定方式

① L Amax 90dB(A)

かつ② Amax - L5 15 ~ 20dB(A)以上

かつ③ LAeqの前後のレベル差 4dB(A)以上

初めに、今回の測定結果にそれぞれの方法を適用してその妥当性について検討した。検討の方法は、それぞれの方法を用いた計算結果により除外データと判断された値で、真値と実測値のレベル差が±1dB(A)以上のものについては的中とし、その他のものについては誤認として比較した結果を表5に示す。この中での中率が最も高いのは大阪方式であるが、誤認率もかなり高い結果であった。又、他の方式も中率は10~20%程度であり、いずれの方法でも除外音処理を適切に行っているとは言いがたい結果であった。

表5 既存の処理方式毎の的中率及び誤認率

処理方式	的中		誤認		補データ数	除外対象データ数
	データ数	比率(%)	データ数	比率(%)		
大阪方式	31	28.4	77	71.3	108	109
愛知方式	12	11.0	0	0.0	12	109
長野・川崎方式(LAeq)	10	9.2	1	9.1	11	109
長野・川崎方式(LAmax)	17	15.6	2	1.8	19	109
宮城暫定方式	22	20.2	1	4.5	23	109

注) 的中率は中データ数を除外対象データ数で除し、誤認率は誤認データ数を総補足データ数で除したものである。

### 5.2 新たな除外音処理方法の検討

既存の処理方法では除外音処理を適切に行っていない

かったため、ここではL Aeq, L Amaxに着目し、測定されたデータを正規分布と仮定し、各地点毎に得られたL Aeq,10minの全データを時間区分ごとに平均値と標準偏差を算出し、レベルの高いデータの2.5% (1.96) 及び5% (1.65) を除外する方法とL Amaxが90dB(A), 95dB(A)及び100dB(A)以上のデータを除外する方法並びに前記2種類の方法を組み合わせた方法の3通り9種類の処理方法を比較した結果を表6に示す。L Aeq及びL Amaxの標準偏差を用いた方法は1.96 及び1.65 のいずれの場合もL AeqよりL Amaxを対象にしたほうが比較的良く除外処理されているが、的中率が50%以下であった。また、L Amaxの設定レベルを用いた方法は、90dB(A)以上のデータを除外した場合の的中率が70%程度と高いが、誤認率が約80%あるため有効なデータであるにもかかわらず除外する確率が大きい。95dB(A)の場合は的中率が50%、誤認率が25%程度と比較的よく除外処理されているものと思われる。100dB(A)の場合は、的中率、誤認率とも極端に低下する。

最後に、95dB(A)以上のデータを除外する方法が有効であることから、さらに的中率を上昇させるべく改善を行った結果、L Aeqを用いた1.96 及び1.65 と組み合わせることにより、的中率が約5%改善され55%となった。誤認率については、L Aeqの1.96 を用いた場合30%程度、1.65 の場合は40%程度であった。

これらのことを総合すると、的中率と誤認率のバランスの最も良い除外音の処理方法は、L Amaxの95dB(A)以上又はL Aeqの1.96 以上のデータを除外する方法が適切であると思われる。

なお、新処理方式の妥当性を検討するために、解析に使用したL Aeq,10minの真値に対する実測値と新処理方式で除外処理を行ったデータの平均値と標準偏差を求めた結果を表7に示す。真値と実測値のレベル差の平均値は0.1~ -0.6dB(A)、標準偏差は0.2~3.2dB(A)の範囲であった。これに対して、新処理方式の場合は真値とのレベル差の平均値が0.2~ -0.1dB(A)、標準偏差は0.1~1.3dB(A)の範囲であり、平均値に偏りがなく、標準偏差のバラツキが小さいため、真値と良く整合がとれており、この処理方法の有効性が確認された。

表6 処理方式の違いによる的中率及び誤認率

処理方式	的中		誤認		補足データ数	除外対象データ数
	データ数	比率(%)	データ数	比率(%)		
1.96 (L Aeq)	27	24.8	8	22.9	35	109
1.96 (L Amax)	41	37.6	24	36.9	65	109
1.65 (L Aeq)	34	31.2	26	43.3	60	109
1.65 (L Amax)	53	48.6	44	45.4	97	109
90dB以上(L Amax)	76	69.7	293	79.4	369	109
95dB以上(L Amax)	55	50.5	20	26.7	75	109
100dB以上(L Amax)	16	14.7	1	5.9	17	109
95dB以上又は1.96 (L Aeq)	60	55.0	27	31.0	87	109
95dB以上又は1.65 (L Aeq)	60	55.0	43	41.7	103	109

注) 的中率は的中データ数を除外対象データ数で除し、誤認率は誤認データ数を総補足データ数で除したものである。

表7 新値と実測値及び新処理方式の差の標準偏差等

地点	真値と実測値の差		真値と新処理方式の差	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
柴田町	-0.2	0.548	-0.1	0.301
亘理町	0.0	0.232	0.0	0.087
三本木町	-0.1	1.335	0.0	0.150
古川市	-0.1	0.374	-0.1	0.215
石巻市	-0.3	0.851	-0.1	0.411
岩沼市	0.1	0.802	0.2	0.639
松島町	-0.6	2.339	-0.1	0.431
築館町	-0.1	1.369	0.0	0.968
角田岡	-0.3	1.452	-0.1	1.266
気仙沼市	-0.1	2.155	0.2	1.260
名取市	-0.1	0.901	-0.1	0.786
角田南町	-0.6	3.193	0.0	0.377

dB(A)

## 6 まとめ

「騒音に係る環境基準」の改正により、騒音レベルの評価・測定方法が示されたが、運用にあたっては自治体に一任されている。このため自治体においては、環境騒音を測定するための方法を策定・活用し実態調査に努めているところであり、特に「除外すべき音の処理方法」については、データの信頼性の確保等に重要な部分である。

今回は、道路に面する地域について検討するため、道路交通センサスで対象としている道路で、24時間交通量が1,000~32,000台程度、大型車混入率が10~28%程度の12路線を抽出した。除外音で最も多かったのは人の声や犬の鳴き声等のその他の音が約39%で、次いで鳥の鳴き声等の自然音が約31%、救急車や改造車の爆音等の突発音が14%の順であった。また、除外音の種類毎に騒音レベルの平均値で見ると、いたずら等測定に付随する音が約93dB(A)と最も高く、次いで突発音の約85dB(A)、航空機騒音や鉄道騒音の他で評価する音の約76dB(A)の順であった。

1地点当たり24時間連続測定してL Aeq,10minが144個得られるが、これらのデータに対して除外音の影響を受けたのは44個から122個と地点によりバラツキが大きい。また、真値と実測値についてL Aeq,10minのレベル差を見ると±1dB(A)以内に80%以上、±2dB(A)以内に90%以上のデータが含まれることが判った。

今回の測定結果に、既存の除外音処理方法を適用した結果、いずれの方法も適切に除外音処理を行っているとは言えなかった。そこで、新たな処理方法を検討した結果、的中率、誤認率ともバランスの良い処理方法として「L Amaxの95dB(A)以上、又はL Aeqの1.96 以上のデータを除外する」方法を提案した。この新処理方法について解析に用いたデータを用い妥当性を検討した結果、平均値は真値の平均値に対して偏りがなく、標準偏差のバラツキも小さいため適切な処理方法であると思われる。

以上今回は新たな処理方法を提案したが、十分な検証

がなされていないため、今後検証を行う必要があると同時に更に効率的な除外音処理方法を確立する必要があるものと思われる。

#### 参考文献等

- 1) 下元健二他，道路に面する地域における無人測定時の「除外すべき音」の影響除去に関する検討，大阪府公害監視センター所報 21，pp.71～75（2000）
- 2) 奥田文敏他，自動車交通騒音におけるL AeqとLAN，愛知県環境調査センター所報 27，pp.51～56（1999）
- 3) 沖山文敏他，L Aeqによる環境騒音の自動測定で異常音の影響を除く方法とその効果，日本騒音制御工学会講演論文集，pp.131～138（1998）

# 臭気指数規制による魚腸骨処理場等の評価

## Evaluation of Fish Meal Plants Using Odor Regulation by Odor Index

新垣 康秀 宮城 英徳 菊地 英男  
鈴木 康民 梶原 光弘\*

Yasuhide ARAGAKI, Hidenori MIYAGI, Hideo KIKUCHI  
Yasutami SUZUKI, Mitsuhiro KAJIWARA

キーワード：臭気指数規制，嗅覚測定法，三点比較式臭袋法，五点比較式臭袋法

Key Words：Odor Regulation by Odor Index，Odor Measurement Method by Olfaction，  
Triangle Odor Bag Method, Two-fifth Odor Bag Method

魚腸骨処理場等5施設（測定地点10地点）の気体排出口及び敷地境界線において臭気ガスを採取し，同一試料ガスについて，三点比較式臭袋法及び五点比較式臭袋法で臭気指数を算出し，両測定法による規制基準の適合状況について評価したところ，全施設の測定地点で同等であった。魚腸骨処理場等は，現在，宮城県公害防止条例に定める五点比較式臭袋法で規制しているが，悪臭防止法の三点比較式臭袋法を採用しても，規制の適用が可能であることが分かった。

### 1 はじめに

石巻市，塩竈市及び気仙沼市に立地する魚腸骨処理場等から発生する悪臭については，悪臭防止法の物質濃度規制では対応が困難であるとして，昭和50年代から宮城県公害防止条例（以下「条例」と言う。）の嗅覚測定法（五点比較式臭袋法）で規制指導を行っている。

しかし，平成7年に悪臭防止法が一部改正され，物質濃度規制の他に嗅覚を用いた規制方式（臭気指数規制）も導入することができるようになった。これを踏まえ，魚腸骨処理場等について臭気指数規制の測定法である三点比較式臭袋法を導入した場合の条例との整合性等について検討した。

### 2 方 法

#### 2.1 調査期間

平成10年12月～平成12年9月

#### 2.2 調査対象事業場

調査対象事業場は操業状況等の関係から鶏ガラ・フェザー処理場1施設，魚腸骨処理場8施設中4施設の計5施設を選定した。表1に調査対象事業場の概要を示す。

A事業場については，食鶏処理場から排出される鶏ガラ及びフェザーを8～20t/日処理し，チキンミールやフェザーミールを製造している。B～E事業場については，水産加工場や小売店などから排出される魚残さいを40～50t/日処理し，フィッシュミール及び魚油を製造

している。

臭気対策としては，クッカー（蒸煮施設），プレス（圧搾施設），ドライヤー（乾燥施設）等から発生する高濃度臭気は脱臭炉やボイラーで燃焼脱臭されている。また，建屋臭気についてはD事業場で薬液洗浄，E事業場では酸・オゾン水洗浄を行っている。

表1 調査対象事業場の概要

事業場名	主原料	平均処理量 (t/日)	主製品	臭気対策
A	鶏ガラ フェザー	20 8	チキンミール， フェザーミール	ボイラー脱臭
B	都市魚残さい 加工魚残さい	50	フィッシュミール， 魚油	脱臭炉
C	都市魚残さい 加工魚残さい	45	フィッシュミール， 魚油	ボイラー脱臭
D	加工魚残さい	40	フィッシュミール， 魚油	ボイラー脱臭 薬液洗浄（建屋臭気）
E	加工魚残さい	40	フィッシュミール， 魚油	ボイラー脱臭 酸・オゾン水洗浄 （建屋臭気）

\* 現 環境省

2.3 調査方法

2.3.1 臭気ガスの採取

気体排出口（煙突及び洗浄塔）においては、ポンプ（近江オドエアサービス<sup>（株）</sup>製フレックスポンプAC型）で排出ガスをフレックスサンプラー20D（同上製）の臭袋に20L採取した。また、サンプリングが可能な敷地境界線においては、風下の高さ1.5mの地点で、においが最も強く感じられる時に条例施行規則<sup>1)</sup>に定める減圧容器で30秒以内に上記と同様な臭袋に20L採取した。採取した試料ガスは、翌日のパネル判定用に供した。

2.3.2 嗅覚測定

1) 五点比較式臭袋法による臭気指数の算出

採取した試料ガスは、条例施行規則の五点比較式臭袋法により臭気指数を算出した。

2) 三点比較式臭袋法による臭気指数等の算出

1)と同じ試料ガスについて、臭気指数及び臭気排出強度の算定の方法（平成7年9月13日付け環境庁告示第63号）により、敷地境界線においては臭気指数、気体排出口においては排出口の高さに応じて臭気指数（15m未満）または臭気排出強度（15m以上）を臭気指数第2号規制基準算定システムソフトにより算出した。なお、算出した臭気排出強度の値は条例との比較がしやすいように、臭気指数に換算した。

2.4 敷地境界線における規制基準案

本県で過去に実施した調査及び今回実施した調査の中から、魚腸骨処理場等の測定結果を解析し、臭気指数規制の敷地境界線における規制基準案を検討した。

2.5 規制基準等の適合状況

2.4で求めた規制基準案を今回測定した魚腸骨処理場に当てはめ、臭気指数規制及び条例規制の適合状況を比較検討した。

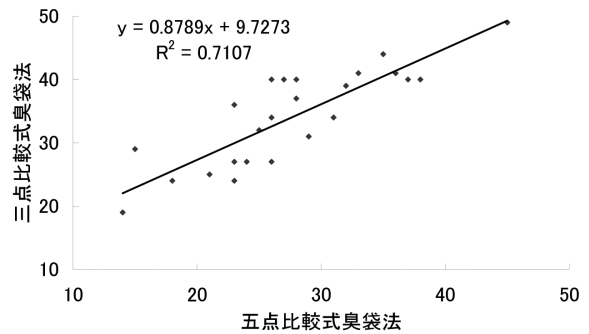


図1 五点比較式臭袋法と三点比較式臭袋法の関係

3 結果及び考察

3.1 敷地境界線における規制基準案

魚腸骨処理場等の測定結果（件数25件）を解析したところ、図1に示すように五点比較式臭袋法と三点比較式臭袋法は危険率1%で相関があり、三点比較式臭袋法で測定した臭気指数は、五点比較式臭袋法の臭気指数に比べて平均で6高い結果となった。

現在、本県の悪臭防止法の規制地域では、臭気強度2.5に相当する物質濃度で規制している。さらに、悪臭法令研究会編集のハンドブック「悪臭防止法」<sup>2)</sup>によると、業種による違いはあるものの、臭気強度2.5に対応する臭気指数は10～15の範囲内である。これらのことから、条例の敷地境界線における規制基準が、臭気指数10（五点比較式臭袋法）であるので、条例との適合性を図るためには、その最大値の15（三点比較式臭袋法）程度が望ましいと考えられた。

3.2 規制基準等の適合状況

表2に規制基準等の適合状況を示すが、3.1から悪臭

表2 規制基準等の適合状況

事業場名	測定地点	悪臭防止法		公害防止条例		備考
		測定値 <sup>1)</sup> (規制基準案 <sup>2)</sup> )	適合状況	測定値 <sup>3)</sup> (規制基準)	適合状況	
A	ボイラー出口	31 (35)		29 (30)		煙突高さ15m
	ボイラー出口	29 (37)		15 (30)		煙突高さ13m
	敷地境界線	27 (15)	×	23 (10)	×	周辺最大建物高さ15m
	敷地境界線	36 (15)	×	23 (10)	×	
B	脱臭炉出口	24 (55)		23 (30)		煙突高さ25m 周辺最大建物高さ11m
C	ボイラー出口	27 (28)		24 (30)		煙突高さ13m
	敷地境界線	19 (15)	×	14 (10)	×	周辺最大建物高さ9.4m
D	洗浄塔出口	41 (34)	×	36 (25)	×	洗浄塔高さ7.5m 周辺最大建物高さ13m
E	ボイラー出口	24 (36)		18 (30)		煙突高さ18m, 洗浄塔高さ13m
	洗浄塔出口	40 (29)	×	37 (25)	×	周辺最大建物高さ16m

1) 三点比較式臭袋法の臭気指数, 2) 臭気指数15に対応, 3) 五点比較式臭袋法の臭気指数

防止法の敷地境界線における規制基準案は臭気指数15（三点比較式臭袋法）とした。また、気体排出口における規制基準案は、臭気指数15を上記の臭気指数第2号規制基準算定システムソフトに入力して求めた。

悪臭防止法の臭気指数2号規制（気体排出口規制）においては、気体排出口の高さが周辺最大建物高さに比べて高い場合（B事業場が該当）は、気体排出口から排出されるガスは建物によって余り影響されないため、規制基準案は原則として高く（緩く）なる。一方、気体排出口の高さが周辺最大建物高さに比べて高くない場合（B以外の事業場が該当）は、建物によるダウンドラフト等の影響を大きく受けるようになるため、規制基準案は原則として低く（厳しく）なる。このようなことから、悪臭防止法の測定値と規制基準案を、条例の測定値と規制基準と比較した場合、B事業場では測定値と規制基準案で特に大きな差がでていた。しかし、今回の調査結果からは、悪臭防止法の適合状況と条例の適合状況は、全測定地点で同じであった。

#### 4 ま と め

現在操業中の魚腸骨処理場等5施設（測定地点10地点）の気体排出口及び敷地境界線において臭気ガスを採取し、同一試料ガスについて、三点比較式臭袋法及び五点比較式臭袋法で臭気指数を算出したところ、両測定法の規制基準の適合状況については、全測定地点で同じであった。このことは、魚腸骨処理場等については、現在、条例に定める五点比較式臭袋法で規制しているが、悪臭防止法の三点比較式臭袋法を採用しても、規制の適用が可能であることが分かった。

#### 参 考 文 献

- 1) 宮城県公害防止条例施行規則（昭和46年宮城県規則第67号）
- 2) 悪臭法令研究会編：ハンドブック「悪臭防止法」, p370~371（平成11年6月）



## 降水成分の時間変化と降水強度

### A Study for Changes of Components and Intensity of Precipitation

佐藤 信俊 北村 洋子 中村 栄一  
宮城 英徳 鈴木 康民

Nobutoshi SATO, Yoko KITAMURA, Ei-ichi NAKAMURA  
Hidenori MIYAGI, Yasutami SUZUKI

キーワード：酸性雨，自動測定，降水強度，水素イオン濃度比率

Key Words : Acid Rain , Automated Instruments , Intensity of Precipitation ,  
Ratio of Hydrogen-Ion Concentration

新たな指標値である水素イオン濃度比率（rH），汚染導電率（ECp）と降水強度との関係について検討したところ，幾つかの典型的な降水について大気汚染の影響を上空，地上に区別して説明できることが分かった。

#### 1 はじめに

酸性雨の生成メカニズムは，雲粒生成に関する上空大気の影響と，成長した雨滴が落下過程で受ける地上付近の大気の影響とに区別して考える必要がある。また，この違いは大気汚染の起源と深く関係する。すなわち，地域で発生する大気汚染物は主に地上付近に拡散し，上空での汚染物は主に大陸など他の地域から移流したものである。

従って，酸性雨を測定することは，地上における大気汚染物の測定だけでは得られない上空大気汚染状況を知るための重要な手段となる。大陸からの酸性化成分の長距離輸送については，近年コンピュータ解析による多くの報告があるが，地域における酸性雨測定結果を元に上空大気汚染状況を考察した例は少ない。また，本県では酸性雨による植物や土壌などへの影響は必ずしも顕在化していないが，地域における大気汚染が酸性雨にどの程度寄与しているかは，大気汚染防止対策を推進する上で重要であり興味深い。

以上の観点から，著者らは降水成分濃度と大気中のSO<sub>2</sub>，SPMとの関係について検討し，大気汚染物が降水強度に依存して取込まれることを報告<sup>1)2)</sup>している。今回は，百川ら<sup>3)</sup>，仁平ら<sup>4)</sup>が示した指標（rH値；水素イオン濃度比率，ECp；汚染導電率）を用いて，降水中成分の時間変化と降水強度について解析し，降水現象における大気汚染物質の取込みと酸性雨の発生メカニズムについて考察する。

#### 2 方法

降水の測定は，県内2地点（仙台市，丸森町）に設置した酸性雨自動測定装置を用い，降水0.5mmごとに分画して，pH，ECの2項目を自動測定した。酸性雨自動測定装置及び設置場所等は以下のとおりである。

仙台局：DKK製DRM - 200E(S)（仙台市内県警本部庁舎屋上に設置）

丸森局：柴田科学KK製Model AW301（丸森町大内の山村広場脇に設置）

解析に使用したデータは，2000年4月から2002年3月までの降水の中から幾つかの典型的な降水パターンを有する降水を選択した。

また，測定項目であるpHとECは，その降水の特徴を表現するには不都合な点が多いため，仁平ら<sup>4)</sup>が酸性雨評価のために導入した指標値ECp及びrHを活用した。なお，指標は，以下の①，②（②'）式によって定義される。

ECpは，通常の導電率（EC）からpH（水素イオン）による導電率を引いた値で，水素イオン以外の総イオン濃度に近似的に比例する。

一方，rHは，②式で示すように陽イオン濃度の総和に対する水素イオン濃度の占める割合である。また，陽イオン濃度の総和と陰イオン濃度の総和は等しいことから，rHはECpとpHだけで表すことができる（②'）。

$$EC_p = EC - \lambda_H [H^+] \quad \text{①}$$

$$r_H = \frac{[H^+]}{[H^+] + \sum [Mi^+]} \quad \text{②}$$

$$\sum [Mj^-] = [H^+] + \sum [Mi^+] \quad (\because \text{陽イオン} = \text{陰イオン})$$

$$EC_p = \sum \lambda_i [Mi^+] + \sum \lambda_j [Mj^-]$$

$$\equiv \lambda_o (\sum [Mi^+] + \sum [Mj^-])$$

よって

$$r_H \equiv \frac{2 \lambda_o [H^+]}{EC_p + \lambda_o [H^+]} \quad \text{②'}$$

EC	:	降水中の電気導電率 (S/cm)
$\lambda_H$	:	水素イオンの極限導電率 (=349.8 Scm <sup>2</sup> /eq)
$\lambda_i, \lambda_j$	:	陽イオンiまたは陰イオンjの極限導電率
$\lambda_o$	:	水素イオン、水酸イオンを除くイオンの平均極限導電率 (=67.19 Scm <sup>2</sup> /eq)
[H <sup>+</sup> ]	:	水素イオンの濃度 (eq/cm <sup>3</sup> )
[Mi <sup>+</sup> ]	:	水素イオン以外の陽イオンiの濃度 (eq/cm <sup>3</sup> )
[Mj <sup>-</sup> ]	:	水素イオン以外の陰イオンjの濃度 (eq/cm <sup>3</sup> )

### 3 結果及び考察

#### 3.1 降水の時系列変化図

図1は丸森局における自動測定結果の時系列図である。それぞれ横軸は降水開始からの時間[h]を表し、縦軸はECpが[ $\mu S/cm$ ]、rHが[%]、pHが[ $\times 10$ ]のスケールで折れ線グラフ、降水強度は第2軸(右)[mm/h]のスケールで上端からの棒グラフとして表示した。

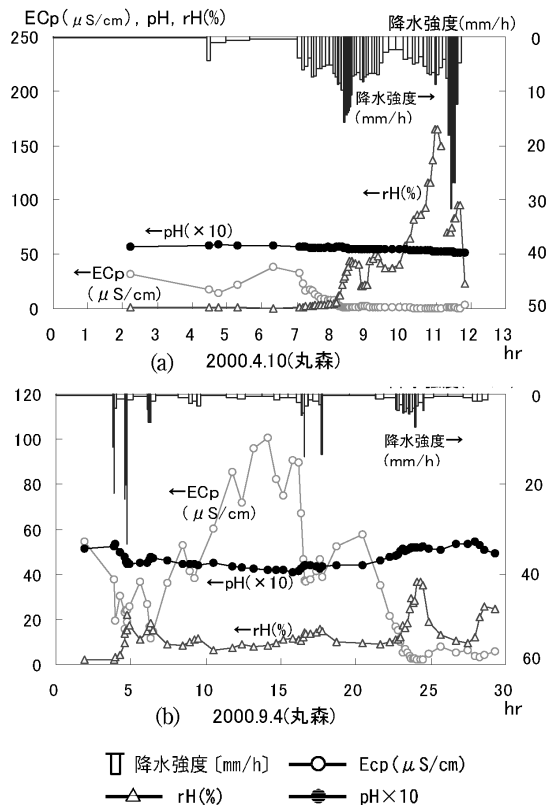


図1 典型的な降水の時系列変化

上図(a)は比較的ECpの変動が小さくrHの変動が大きい例である。降水開始後8時間経過した頃から降水強度の上昇に伴いECpが低下した。一方、rHは同時間帯に急激

に上昇し、降水強度の変化に連動して増減する傾向が認められる。

下図(b)は比較的rHの変動が小さくECpの変動が大きい例である。降水開始後5~20時間のECpを見ると、弱い降水強度の時間が長いほどECpが上昇し、降水強度が強くなると減少することが分かる。

なお、rHは本来100%を超えることはないが、図1(a)では約180%まで上昇した。これは、rHが②'式により近似的に算出された指標であることに起因する。従って、ECが小さくpHが低いほどrHは大きくなり、特にECp=0のときはrH=200%になる。実際には降水強度が増すと、仙台局では特にpHが低目に測定されるため、水素イオンによる導電率が高めに見積もられ、結果としてECpが負になる。しかし、これらの誤差を考慮しても相対的な変動として評価するには十分である。

#### 3.2 降水強度とECp及びrHの関係

ECp、rHと降水強度との相関関係を確認するため、図2,3に典型的な降水事例について、各項目の分布を考慮して両対数で示す。なお、図中の印は降水の始めを示し、降水順に直線で結んだ。

図2は図1(a)と同じ4月10日の仙台局(a)と同日の丸森局(b)の降水であり、2つの局で類似した傾向が見られる。すなわち、(イ)ECp、rH、pHとも降水初期には降水強度に対する変化が少なく、図では 4から6個のデータは横軸に対し平行に推移した。(ロ)その後は、降水強度7~8mm/h付近でECpとpHは急激に低下、rHは同様に急激に上昇しているのが分かる。また、(ハ)それ以降の強い降水強度ではpHが低下したままで降水初期と同様に横軸に平行に推移し、降水強度には依存しない。ECp、rHについても、丸森局では同様の傾向が認められたが、仙台局ではECpの計算値が負となったことからECp、rHはプロットしていない。

以上のことから、同降水には少なくとも(イ)~(ハ)の3つの異なる過程が存在し、仙台局、丸森局の両局でほぼ同じ現象が発生していたと考えられる。

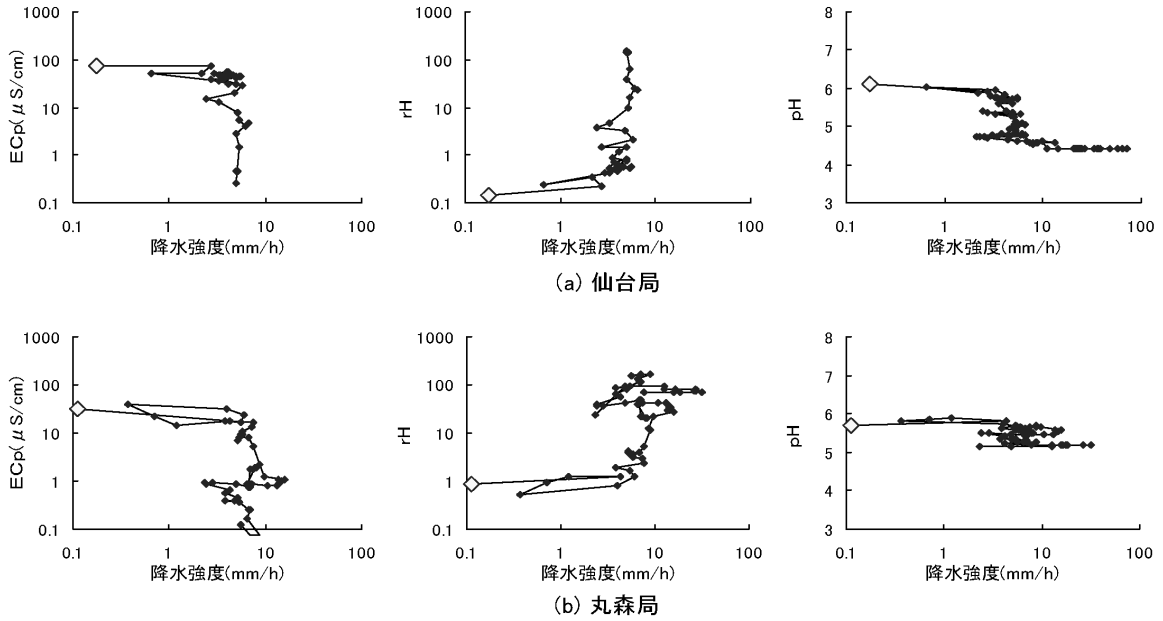


図2 ECp, rH, pHの降水強度変化 (2000年4月10日)

一方、図3では、ECpは降水強度と極めて良い相関関係が認められ、降水強度が強いほど低下した。rHについては、降水初期( ~ 4個のデータ)に急激に増加し、その後は降水強度に対してわずかな増加傾向が認められる。pHについては、rHと対照的に降水初期に急激に減少し、その後はrHと同様に降水強度に対してわずかな増加傾向が認められる。なお、これらの現象は降水強度が雲粒を成長させる水蒸気の供給速度に依存すると考えると矛盾がない。

ここでは典型的な2つの降水事例について示したが、他の降水でも図2の初期降水時の傾向を有するものと図3に類似したものが多く見られる。

3.3 pH-EC図

図4に丸森局における典型的なpH-EC図を示した。見やすくするため、図中には式②'でrHを一定(1.0, 0.1, 0.01, 0.001)とするpHとECの関係性をrH曲線として、またECpを一定(0.50, 100, 150 μS/cm)とするpHとECの関係をECp曲線として補助線をプロットした。

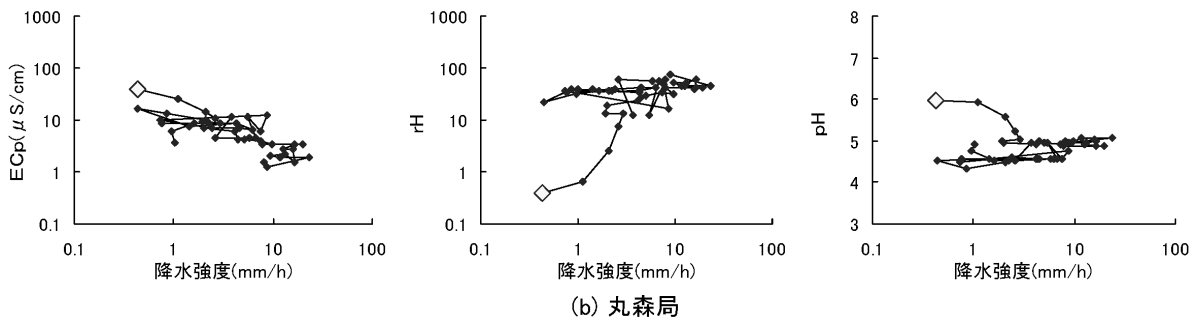


図3 ECp, rH, pHの降水強度変化 (2000年10月23日)

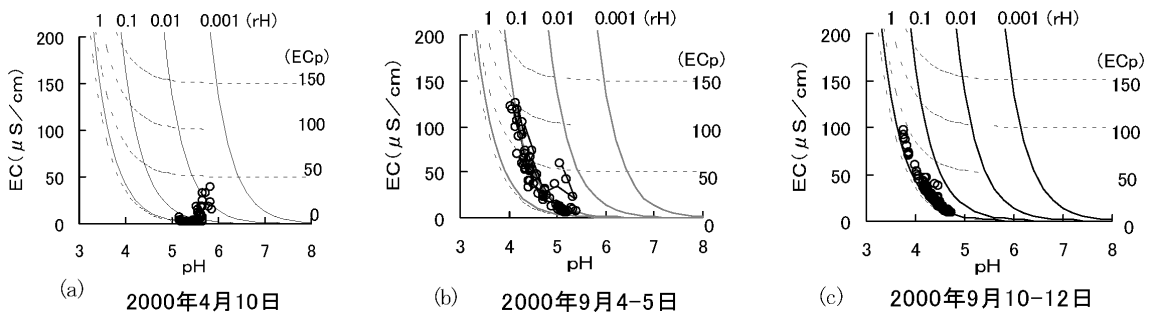


図4 pH-EC図 (丸森)

図4の降水(b),(c)ではrHが異なるものの、それぞれ同じrH曲線に沿って分布している。これに対して、降水(a)は、rH曲線に直交する分布となっており、大きな違いが認められる。また、降水(b)では降水初期(～2mm)に観測された低rHが降水量の増加とともに上昇し、rH=0.1の曲線に沿う一群に合流している。一方、降水(c)は、降水(b)と類似しているが、rH=1.0の曲線に沿って分布している点が違う。

rHの定義は降水中の全陽イオンに対する水素イオンの割合であり、降水中のイオン組成を強く反映する指標である。また、降水(雲粒)は上空大気に含まれる微粒子が核となり形成されることから、同じ起源の汚染大気であれば、汚染粒子の濃度は違っても、構成イオンの組成割合は同じと考えられる。従って、降水中のイオンについても同様であり、イオン濃度が変化しても組成割合つまりrHは変化しないことになる。

図4の(b),(c)のrHの違いは、(b)における降水初期の一部を除けば相似的であり、降水(雲粒)を発生させた上空大気中の汚染物も(b)ではrH 0.1,(c)ではrH 1.0のイオン組成であったと推定できる。ただし、降水が大気中を落下する過程でrHを変化させる程の汚染物等の取り込みがない場合である。

地上の汚染大気はいずれ対流等により上空大気と混合することになるが、短い時間には必ずしも混合していない。従って、大まかに見れば地上は地域の汚染、上空は他地域からの移流の影響を強く受けていると考えることができる。

また、大陸等から中長距離を移流し十分に混合・拡散された気団であれば、雲粒が生成される上空大気中の汚染物は、地域レベルで見れば濃度の差は生じて、イオンの組成割合は概ね同じものと考えられる。従って、図

4(a)に見られるようなrHの著しい変化は、前線や低気圧の通過など激しい気象変化によって生じることが考えられる。

以上をまとめると、図4(a)については、はじめrH 0.01の上空大気がrH 1.0の大気と激しく混合し、その後rH 1.0の上空大気に入れ替わった降水、(b)は降水初期に地上付近の汚染大気の影響を受け、地上大気の浄化に伴って、上空大気の影響をそのまま反映した降水、(c)は、地上大気の影響が小さく降水初期から上空大気によるrH 1.0が観測された降水と考えることができる。

#### 4 ま と め

酸性雨自動測定装置の結果から汚染導電率( ECp ), 水素イオン濃度比率( rH ), pH及び降水強度について考察し、以下のことが分かった。

- (1) 時系列図から、典型的な降水としてrHの変化が大きい場合とECpの変化が大きい場合に区別した。
- (2) 降水強度との相関図から、降水強度に依存する場合と依存しない場合に区別できた。
- (3) pH-EC図から、上空大気による降水への影響について考察することができた。

#### 参 考 文 献

- 1) 「洗浄係数を用いた酸性雨解析」佐藤信俊 他：宮城県保健環境センター年報，15，82(1997)
- 2) 「酸性雨に対する大気汚染物質の影響」佐藤信俊 他：宮城県保健環境センター年報，15，86(1997)
- 3) 「酸性雨自動測定結果について(第2報)」百川和子 他：宮城県保健環境センター年報，9，81(1991)
- 4) 「降水pHの評価に関する一考察」仁平 明 他：宮城県保健環境センター年報，16，68(1998)

# 北海道・東北における積雪成分調査結果 — 分布と汚染源の推定について —

## Snow Cover Survey in Northern Japan - Distribution of Components and Their Sources -

北村 洋子 佐久間 隆 木戸 一博  
佐藤 信俊 鈴木 康民

Yoko KITAMURA, Takashi SAKUMA, Kazuhiro KIDO  
Nobutoshi SATO, Yasutami SUZUKI

キーワード：積雪，濃度分布，汚染源

Key Words: Snowfall, Distribution of Components, sources

平成7年から11年までの5カ年間、北海道・東北地域における合同の積雪成分調査を行い、平成13年度に5カ年分の取りまとめを行った。その結果、以下のような2,3の知見を得たので報告する。pH-EC図及びEcp, rH値から大まかに2つの群に分けられ、地域的な影響が推察される。また、アメダスデータを基に積雪に關与した降雪時のバックドラジェクトリー解析を行った結果、主に大陸の3方向からの軌跡が認められた。

### 1 はじめに

本県では、平成7年から11年度までの5カ年間、北海道・東北ブロック積雪成分合同調査に参加し、積雪成分の調査を実施してきた。平成13年度に5カ年分の取りまとめの報告書を作成しているところであるが<sup>1)</sup>、その中で宮城県が担当している部分について若干の知見を得たので報告する。

### 2 調査方法

測定地点：北海道・新潟を含む東北地域で、65地点（内、5年間共通調査地点は54地点）宮城県分は平成7年～9年までは3地点（栗駒町：栗駒，川崎町：笹谷，小野田町：漆沢），平成10年と11年は1地点（小野田町：漆沢）であった。

日時：原則として2月中旬～2月下旬までの最大積雪期間に積雪の深さを測定し、積雪全層を採取

測定項目：溶解後、水量、pH、EC、降水量、 $Cl^-$ 、 $SO_4^{2-}$ 、 $NO_3^-$ 、 $NH_4^+$ 、 $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、積雪水量、密度、各調査点の降水量及び積雪量等の気象データを収集（ただし、ここで示す降水量は採取した積雪水量から求めたもので、試料採取日までの積雪から雪解けによる減量を引いた値であり、通常の降水と同一視する事は出来ない。）

測定方法：pHメーター、導電率計、イオンクロマトグラフ法、密度は深さから算出

### 3 結果及び考察

#### 3.1 指標値からみた特徴

##### 3.1.1 pH-EC図及びEcp, rH値<sup>2), 3)</sup>について

積雪成分結果をEcp, rH値の等値線を加えたpH-EC曲線図にプロットしたものを図1に示す。

各年度において、ほぼ同様に $rH=0.1$ の等値線上又はその周辺に分布する地点（Ⅰ群）と、それから明らかに逸脱して、 $rH$ が0.01あるいは0.01以下に分布する地点（Ⅱ群）が認められる。

Ⅰ群では、年度毎の若干のバラツキは見られるものの、低ECほど $rH$ は大きく、またECの減少に伴ってpHが増加する傾向が認められた。また、Ⅱ群については平成9年度で高Ecp域にグルーピングされた地点は、日本海側の秋田県男鹿市本山、山形県舟形町長者原及び太平洋側の青森県六ヶ所村千歳平神社である。低Ecp域にグルーピングされた地点は青森県の太平洋沿岸の階上岳、法光寺、大黒森、福島県中通りの羽島で、他の年度でも観測される場合が多く、地域的な特徴と思われる。 $rH$ が小さくなる要因としては、①水素イオン濃度の変化はないが、中性の塩類が加わり陽イオン濃度が増加する場合、②カルシウムやアンモニウムイオン等により中和反応が起きた場合、が考えられる。

##### 3.1.2 濃度分布について

各項目の分布は年度毎に大きな違いは認められなかった。平成9年度の降水量、pH、EC、 $H^+$ 、Ecp、rHの分布を図2に示す。

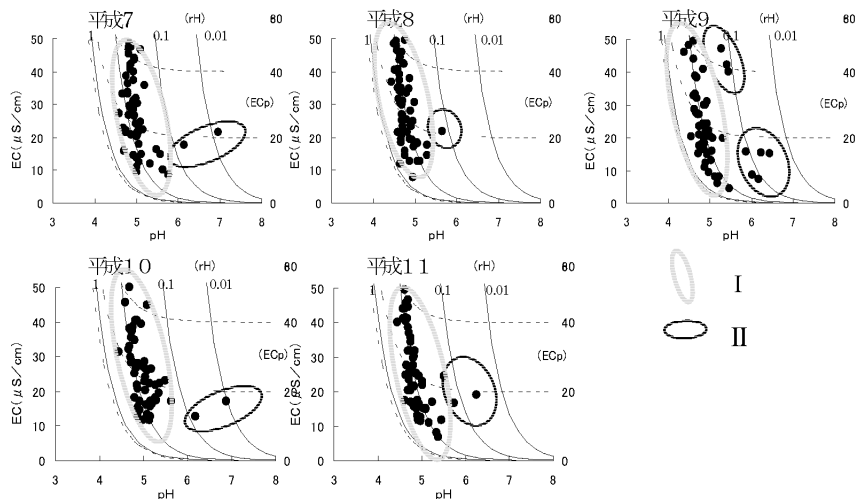


図1 pH-EC曲線図

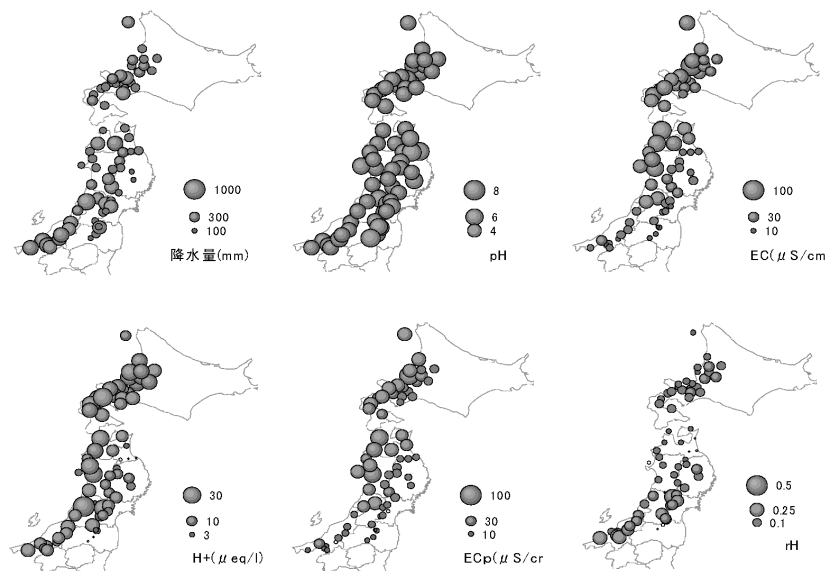


図2 ECp, rH等の分布 (平成9年度)

これに依ると、ECpとECとはほぼ同様な分布であり、北海道の日本海側から東北北部の日本海側で高く、東北南部及び太平洋側で低い様子が伺える。一方rHの分布はECpとは異なり、青森県から秋田県にかけて低く、山形県、宮城県、新潟県および北海道で高い傾向が見られる。この分布は、本調査で測定した他のイオン等とは異なるものであり、一見、降水量（採取した積雪水量より求めた）の少ない地域でrHが低い傾向が見られる。この傾向は他の年度でも見られ、前述でも述べたように、何らかの地域的な影響によるものと考えられる。

### 3.2 降雪に影響を与える発生源の推定

#### 3.2.1 降雪期の特徴

平成12年度について、各都道府県1ヶ所のサンプリング地点を任意に選択し、最寄りのアメダス局の積雪、降水量、気温と採取日との関係を表1及び図3に示す。

表1 積雪採取地点の降雪状況

道県名	積雪採取地点	アメダス局名	積雪期間	降雪回数
北海道	大滝村三階滝	大滝	11月26日～2月9日	31
北海道	黒松内町黒松内ブナ林	黒松内	11月27日～2月7日	56
青森県	名川町法光寺	三戸	1月21日～2月25日	14
秋田県	六郷町瀧尻公園入口	横手	1月21日～2月24日	32
岩手県	遠野市滝沢公民館	遠野	2月7日～2月8日	2
宮城県	仙台市泉区泉ヶ岳	新川	1月16日～2月27日	6
山形県	舟形町長者原	新庄	1月21日～2月14日	21
福島県	天栄村羽鳥	湯本	1月21日～2月15日	8
新潟県	妙高高原町赤倉	関山	1月20日～2月10日	12

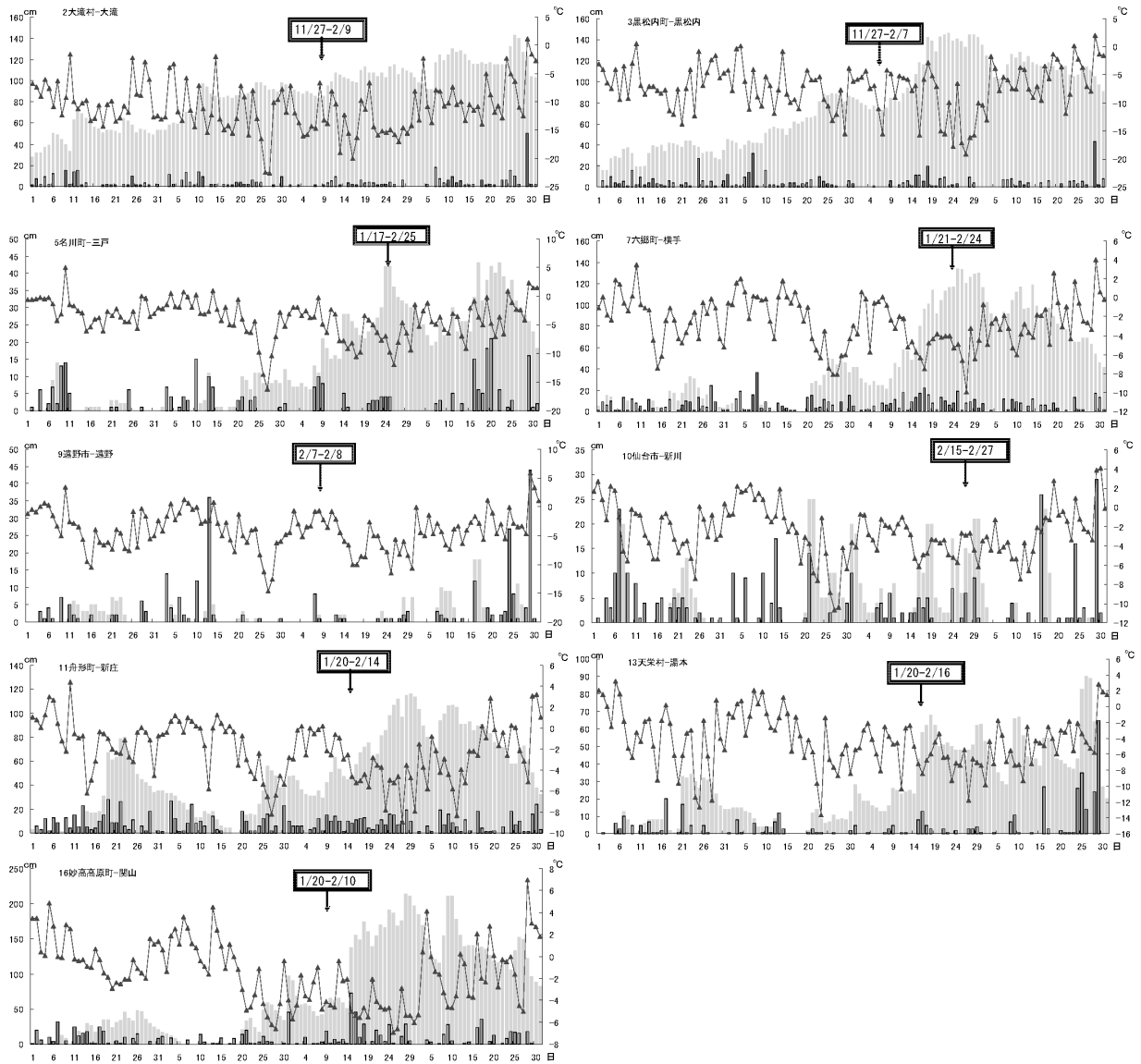


図3 アメダス局における積雪の状況

これに依ると、北海道の各地点では12月初めには既に根雪になっており、降雪初期から採取日までの期間が積雪期間となっている。一方、新潟県や福島県、宮城県等の東北南部の各地点では、12月中旬の雪は融け、1月になってから新たに積雪となったところもある。従って積雪に直接関与した降水期間は採取地点毎にまちまちであった。

### 3.2.2 バックトラジェクトリーによる発生源の推定

上記の9地点について積雪期間中に観測された2mm以上の降雪を抽出し、降雪開始時刻の上空1,000mを起点とし、100時間前に遡る降雪気塊のバックトラジェクトリー解析を行った結果を図4に示す。

この期間、対象とした降雪の回数で最も多かったのが

北海道黒松内で56回、最も少なかったのが、岩手県遠野で2回と大きな開きがあった。日本海側の南部地域では、主に①ロシア沿海州・シベリアを起源とする軌跡と朝鮮半島・中国東北地方を横断するものとに分類される。一方、太平洋側の地域では、①ロシア沿海州・シベリアを起源とする軌跡が中心となっている。また、積雪期間が長い北海道の各地の軌跡は①ロシア沿海州・シベリア、②朝鮮半島・中国東北地方に加え、③サハリン・オホーツク海までの広い地域を起源としており、広範囲の発生源の影響を受けているものと思われる。秋田県横手でも北海道の状況によく似ている。今回対象とした全軌跡で酸性化成分の発生量が最も多いとされている中国南部地域からのものは確認されなかった。

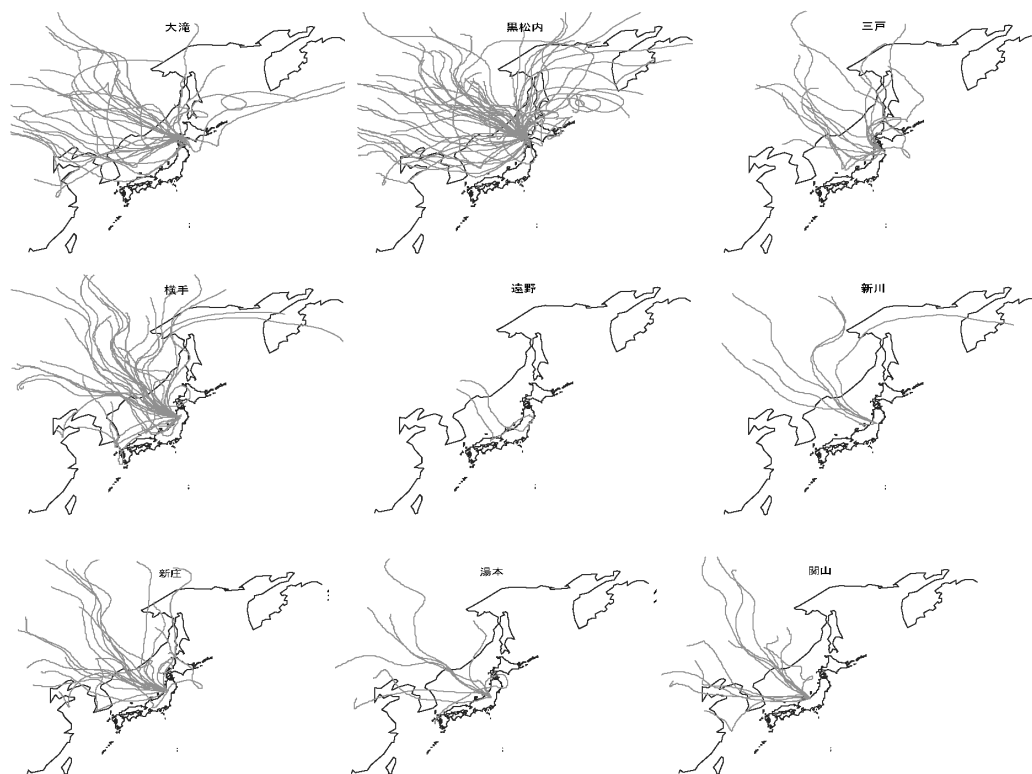


図4 各地点の降雪期間におけるバックトラジェクトリー

#### 4 ま と め

地点毎の積雪期間は、高緯度ほど、日本海側ほど長く、数日から3ヶ月と大きな開きがあった。pHの分布などから地域的な差違が認められた。バックトラジェクトリーによる軌跡からは、①ロシア沿海州・シベリア、②朝鮮半島・中国東北地方、③サハリン・オホーツク海を起源とするものが認められたが、酸性化成分の大きな発生源とされている中国南部からの軌跡は認められなかった。

#### 参 考 文 献

- 1) 全国環境研協議会北海道・東北支部酸性雨調査専門部会：積雪成分合同調査報告書 - 5年間のまとめ -
- 2) 「降水pHの評価に関する一考察」仁平 明，榎野光

永，中村栄一，佐久間隆，木戸一博，須藤幸蔵：宮城県保健環境センター年報，16，68（1998）

3) 「酸性雨のE C pによる評価法について」百川和子，氏家愛子，加賀谷秀樹，佐藤信俊，仁平 明，宮崎栄一郎：全国公害研会誌，18(2)，11（1993）

4) (財)気象業務支援センター：アメダス観測年報（時別値テキストファイル版）1999年（2000）

(財)気象業務支援センター：アメダス観測年報（時別値テキストファイル版）2000年（2001）

5) "NOAA ARL Real-time Environmental Application and Display System-Hysplit 4":

<http://www.arl.noaa.gov/ready/hysplit4.html>



## 松島湾櫃ヶ浦干潟調査 (第二報)

## Analysis of Tidal Flat, Hitsugigaura in Matsushima Bay

小山 孝昭 清野 茂 阿部 郁子  
 三沢 松子 阿部 公恵 吾妻 正道\*<sup>1</sup>  
 渡部 正弘 牧 滋 栗野 健 阿部時男  
 佐藤 健一\*<sup>2</sup> 井上 公人\*<sup>3</sup> 高村 栄治\*<sup>3</sup>

Takaaki KOYAMA, Shigeru SEINO, Ikuko ABE  
 Matsuko MISAWA, Kimie ABE, Masamichi AZUMA  
 Masahiro WATANABE, Takeshi AWANO, Shigeru MAKI, Tokio ABE  
 Ken-ichi SATO, Kimito INOUE, Eiji TAKAMURA

キーワード：干潟，リフレッシュ事業，松島湾

Key Words : Tidal Flat, Refresh Project, Matsushima Bay

本県では松島湾の水質汚濁の防止と改善を進めるため平成2年度から松島湾リフレッシュ事業計画が開始され、松島湾リフレッシュマスタープランに基づき、湾全体の海域環境を総合的、計画的、長期的に改善して松島湾の再生を目指しているところである。この事業の一環として平成5年度から15年計画で松島湾リフレッシュ事業環境改善効果評価調査を実施している。浚渫及び覆砂事業を実施完了した干潟の一つである松島湾櫃ヶ浦（ひつぎがうら）干潟について、12年度の報告<sup>1)</sup>に引き続いて13年度も調査を行ったので報告する。

## 1 はじめに

日本三景の一つであり、優れた景勝地として広く人々に親しまれている松島湾は、近年の周辺地域の都市化の進展による生活排水流入その他の汚濁要因の増加に伴い、また地形的に閉鎖性海域であることにより水質が悪化し、水産業や観光事業等への影響が危惧されてきている。平成5年度に土木・農政・水産・畜産など関係機関の連携のもと、実現性・経済性・効果の即効性等を考慮しつつ松島湾の水質を改善させ、併せて水産動物の生活環境保全・維持などを図るための方策を検討し、「松島湾リフレッシュマスタープラン」が策定された。マスタープラン目標値は、COD(75%値)が $2.0\text{mg}/\ell$ (湾内平均) $3.0\text{mg}/\ell$ (湾奥部)、T-N(年平均値)が $0.30\text{mg}/\ell$ 、T-P(年平均値)が $0.30\text{mg}/\ell$ 、透明度(視覚的にきれいな水質)とされた。

平成13年度は、干潟における水質浄化効果の検証を目的として調査を実施することにした。そこで、松島湾内の干潟における物質循環(窒素、燐等の動向)を把握し、松島湾全体の水質浄化効果に与える影響について検証するとともに、干潟のあり方、今後の整備の方向性について検討するため、浚渫、覆砂事業が終了した松島湾内の櫃ヶ浦を対象に平成12年度に引き続いて調査を行ったの

\* 1 現 仙南・仙塩広域水道事務所

\* 2 現環境対策課 \* 3 国際航業株

で、概要を報告する。

## 2 調査方法

## 1) 調査時期 (13年度実施分)

夏期調査 平成13年9月17日から18日まで

冬期調査 平成14年3月7日から8日まで

## 2) 調査地点 櫃ヶ浦(図1のとおり)

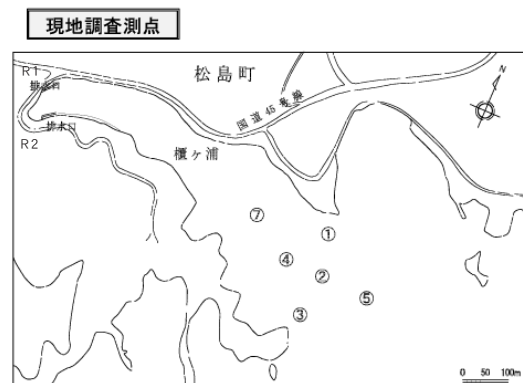


図1 現地調査測点

## 3) 調査方法

自動採水装置(ISCO社製MODEL-2100改良型)による連続採水調査(図1中1~3)

夏期は1時間毎に採水、冬期は1.5時間ごとに採水。

スポット採水調査

- (夏期は図1中4～5及び7, 冬期は4)
- 鉛直分布調査(図1中1～5及び7。夏期のみ)
- 多項目水質計(堀場製U-21型)
- 流速計による流況調査
- (流速計は, 自動採水機と同じ場所に設置)
- 流入河川負荷調査(図1中R1及びR2)

4) 調査項目

- 室内分析項目: pH, SS, COD, D-COD, T-N, D-T-N, T-P, D-T-P, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P, クロロフィル-a, フェオフィチン-a, Cl<sup>-</sup>, DO(スポット, 流入負荷)
- 現場調査項目: 気温, 透視度, 透明度
- 多項目水質計: 水温, 濁度, DO, 塩分

3 結果及び考察

3.1 鉛直分布

調査地点で水温, DO, 塩分, 濁度を測定した。12年度の夏期調査結果では調査結果をみると, 水温及び塩分は上下層間の差は少なく, DOは下層にいくほど低く, 濁度は逆に高くなる傾向が見られた。13年度は濁度が高く, 全体的に上下の差が少なかった。冬期調査では12年度は水温及び塩分は上下の差が少ない傾向を示したが, DOは下層では高く, 濁度は各地点でデータのばらつきが多く異なった傾向を示した。

3.2 pH

12年度13年度の夏期及び冬期の連続調査では変化は少なく安定していた。

3.3 SS

12年度と13年度の夏期の連続調査結果では, 13年度の方が台風の影響による巻き上げにより高くなっていた。冬期も13年度は3月に調査したため風の影響による巻き上げにより高くなっていた。

3.4 COD及びD-COD

12年度及び13年度の連続調査結果では, 13年度の夏期は台風の影響による巻き上げがあったにもかかわらず前年とほとんど変化がなかった。冬期において同様の傾向が見られた。

3.5 窒素(T-N, D-T-N, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N)

13年度の夏期の連続調査結果では, T-N, D-T-N, はそれぞれ12年度の約2倍程度の結果など高い数値を示していた。また, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N及びNH<sub>4</sub>-Nは, 夏期では前年度の4～5倍の数値を示していた。

これは台風の影響による巻き上げが要因と考えられた。冬期は比較的变化が少なかった。

3.6 磷(T-P, D-T-P, PO<sub>4</sub>-P)

13年度の夏期の連続調査結果では, T-P及びD-T-Pでは1.5倍から2倍の結果を示していた。冬期は, 変化がなくほとんど同様な結果だった。

3.7 クロロフィル-a及びフェオフィチン-a

クロロフィル-aの13年度の夏期調査結果は前年の1.5～2倍程度の数値となっており巻き上げによる影響と考えられた。フェオフィチン-aの夏期調査結果は前年とほとんど同じだった。

3.8 塩化物イオン

12年度の夏期調査結果では, 潮汐, 時間による大きな変化はなく, 数値的に18000mg/ℓ前後で安定していたが, 13年度は約14500mg/ℓで低くなっていた。これは台風による降雨の影響によるものと考えられた。冬期調査では12年度は約20000mg/ℓ前後で, 13年度は約18000mg/ℓで季節的変動を考慮するとほとんど変化がなかった。

3.9 流入負荷

流入水は, 雨の際の自然水の流入が大部分を占め晴天時はほとんど流れていない状況であった。13年度は調査前に台風がたびたび発生したためその影響による雨水の流入が多かったと考えられた。水質はD-T-N, D-T-P, NO<sub>3</sub>-N, PO<sub>4</sub>-Pそれぞれ日によって傾向が異なった。

3.10 考察

(1) 連続調査

13年度夏期調査結果では, 12年度に比べると台風による影響でT-N, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N及びNO<sub>3</sub>-Nが大きく変化していた。しかし, pH, COD及びD-COD, T-Pはほとんど変化がなかった。クロロフィル-aは, やや上昇が見られたがフェオフィチン-aはあまり変化がなかった。

(2) 物質収支

夏期と冬期では夏期の数値の変動が大きく冬期は変動が少なく安定した数値となっていた。安定していた12年度の夏期のデータから分析結果及び流向流速結果をもとに収支計算を実施した。計算は干潟区域を一つのボックスと考え図2の簡易計算式を用いて行った。

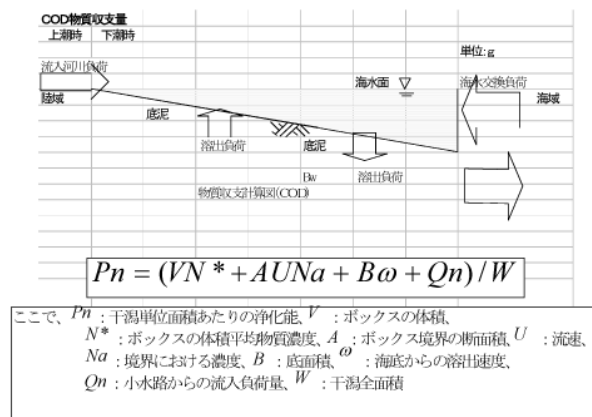


図2 物質収支計算式

水質浄化効果と他の干潟における浄化効果はを比較すると表1のとおりとなった。

表1 浄化能比較表<sup>2)</sup>

項目	単 位	櫃ヶ浦	伊勢湾	一色干潟	盤洲干潟	干潟実験施設
		(本調査結果) (現地調査・8月)	林 (現地調査)	(佐々木) (現地調査・7月)	(中田・畑) (シミュレーション・1月)	(細川他) (実験・6月)
COD	(g/m <sup>3</sup> /潮汐)	0.32(2潮汐)	0.2~0.4	-	-	-
SS		4090.08	-	6238.2	-	1183.2
ON		3.04	-	177.6	-9.8	6.1
IN	(mg/m <sup>3</sup> /day)	-9.7	-	-119.3	-	0.1
OP		5.01	-	32.1	-	-0.5
IP		-3.15	-	-40.2	-	-0.3

COD, N, Pの櫃ヶ浦への物質収支をみると、櫃ヶ浦の浄化能として他の干潟「港湾における干潟との共生マニュアル」によると同程度の値を示しており特にSSでは一色干潟よりは少ないものの水質改善効果が見られた。一方N, Pでは有機体窒素・燐の除去効果が見られ、逆に無機態窒素・燐が増加する結果が見られた。また他との比較では一色干潟よりも小さい値となっているが、干

潟実験施設での値と同程度の値を示していた。これらの結果は干潟での物質沈降や生物等による浄化効果と推定される。

#### 4 おわりに

干潟は稚魚の育成場等の種々の重要な機能を有しているが、その中の一つに浄化能力があり、今回の調査では干潟の水質浄化効果を示す結果が得られた。

#### 参 考 文 献

- 1) 小山孝昭他：松島湾櫃ヶ浦干潟調査宮城県保健環境センター年報，19，131～135（2001）
- 2) 運輸省港湾局編集(財)港湾空間高度化センター・港湾・海域環境研究所：港湾における干潟との共生マニュアル

表2 松島湾櫃ヶ浦干潟調査

#### 1 夏期調査結果

調査月日	採水地点	12.8.28~29			13.9.17~18		
		2			2		
		平均	最大	最小	平均	最大	最小
pH		7.84	7.88	7.78	7.87	7.9	7.77
COD	mg/l	3.39	4.3	2.84	3.05	3.78	2.58
D-COD	mg/l	2.66	2.89	2.25	2.15	2.5	1.79
SS	mg/l	10.7	24.5	5.5	16.65	27.3	11.3
cl-	mg/l	17992	18700	17300	14554	15200	14400
chl-a	μg/l	1.28	2.08	0.87	3.24	8.7	1.4
phe-a	μg/l	2.55	4.65	1.5	3.72	5.08	2.02
T-N	mg/l	0.3460	0.3851	0.2932	0.6045	0.7375	0.5534
D-T-N	mg/l	0.2930	0.3628	0.2056	0.5328	0.5753	0.4706
T-P	mg/l	0.0599	0.071	0.0525	0.0667	0.079	0.0585
D-T-P	mg/l	0.0471	0.061	0.0412	0.0508	0.0577	0.0432
NH <sub>4</sub> -N	mg/l	0.0779	0.1294	0.0082	0.1739	0.2092	0.1434
NO <sub>2</sub> -N	mg/l	0.0046	0.0058	0.0029	0.0162	0.0172	0.0145
NO <sub>3</sub> -N	mg/l	0.0015	0.0075	<0.0001	0.1792	0.1939	0.1588
PO <sub>4</sub> -P	mg/l	0.0327	0.0454	0.0217	0.0485	0.0541	0.0419

#### 2 冬期調査

調査月日	採水地点	12.2.7~8			14.3.18~19		
		2			2		
		平均	最大	最小	平均	最大	最小
pH		8.20	8.22	8.18	8.24	8.29	8.17
COD	mg/l	2.19	3.47	1.82	2.34	3.16	1.85
D-COD	mg/l	1.88	3.13	1.43	1.81	2.11	1.37
SS	mg/l	2.36	3.3	1	6.11	12.6	3
cl-	mg/l	20121	21600	18300	18079	18400	17800
chl-a	μg/l	0.41	0.55	0.3	-	-	-
phe-a	μg/l	0.57	0.67	0.46	-	-	-
T-N	mg/l	0.1735	0.3241	0.1429	0.1975	0.2590	0.1706
D-T-N	mg/l	0.1376	0.1913	0.1261	0.1563	0.1880	0.1333
T-P	mg/l	0.0135	0.0196	0.0096	0.0104	0.0191	0.0041
D-T-P	mg/l	0.0089	0.0124	0.0059	0.0058	0.0139	0.0020
NH <sub>4</sub> -N	mg/l	0.0163	0.0358	0.0101	0.0114	0.0270	0.0027
NO <sub>2</sub> -N	mg/l	0.0015	0.0019	0.0013	0.0015	0.0021	0.0011
NO <sub>3</sub> -N	mg/l	0.0104	0.0164	0.008	0.0026	0.0051	0.0006
PO <sub>4</sub> -P	mg/l	0.0032	0.0046	0.002	0.0073	0.0099	0.0055

## 水道施設における生物学的な水質調査

### Biological Research for Public Water Supply Systems

那須 務 名村 真由美 郷右近 順子\*<sup>1</sup>  
菅原 優子 川野 みち 加藤 玲子  
梅津 幸司 助野 典義\*<sup>2</sup> 千葉 圭子  
後藤 つね子 日野 久美子 氏家 雪乃  
小林 妙子 及川 敏彦 大場 修\*<sup>3</sup>  
大庭 和彦\*<sup>4</sup>

Tsutomu NASU, Mayumi NAMURA, Junko GOUKON  
Yuko SUGAWARA, Michi KAWANO, Reiko KATO  
Koji UMETSU, Noriyoshi SUKENO, Keiko CHIBA  
Tsuneko GOTO, Kumiko HINO, Yukino UJIIE  
Taeko KOBAYASHI, Toshihiko OIKAWA, Osamu OBA  
Kazuhiko OBA

キーワード：公共水道，降雨，水質

Key Words : Public Water Supply Systems , Rainfall , Water quality

宮城県内の、ろ過施設を有していない水道施設の原水及び栓水について、水質調査を実施した。その結果、従属栄養細菌の把握は、水道原水の安全性を確保するための適切な指標になると推察された。

#### 1 はじめに

厚生労働省は、水道水の安全を確保するための細菌学的汚染指標として大腸菌、糞便性大腸菌群、糞便性連鎖球菌及びウェルシュ菌芽胞等の検査を求めている。

今回は、水質管理の資料を得る目的で、ろ過施設を有していない12の水道施設の原水及び栓水について、上記指標菌のほかに、上水試験方法で汚染指標とされる一般細菌、従属栄養細菌、好気性芽胞菌を加え、さらに地形や降雨（降雪）などの自然状態の影響を加味しながら、実態調査を行った。

#### 2 方法

##### 2.1 調査地点（図1）

対象とした施設の水源は湧水7、浅層地下水3、深層地下水2箇所、その所在地から丘陵地の施設と低地の施設に分類した。

丘陵地：湧水A（川崎町）、湧水B（白石市）、湧水C、浅層地下水H、浅層地下水I（蔵王町）、湧水E、浅層

地下水J（鳴子町）、深層地下水K（岩出山町）

低地：湧水D（蔵王町）、湧水F、湧水G（涌谷町）、深層地下水L（南郷町）

##### 2.2 調査時期（表1）

降雨期及び降雪期を含む平成13年5月から平成14年2月までに計7回の調査を行った。

##### 2.3 採水日の降雨（表1）

対象施設に近い鳴子町、鹿島台町、川崎町及び白石市におけるアメダスのデータから、採水日以前の3日間の降水量の合計が、20mm以上の時を降雨日とした。

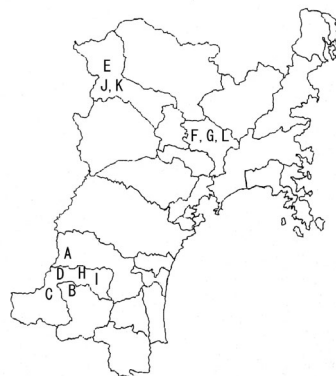


図1 採水施設

\* 1 現 総合衛生学院

\* 2 現 財団法人 宮城県環境事業公社

\* 3 現 瀬峰病院

\* 4 現 仙台保健福祉事務所塩釜総合支所

## 2.4 検査方法と項目

上水試験方法<sup>1)</sup>に基づいて、次の検査を実施した。

- ① 一般検査項目：気温、水温、残留塩素
- ② 理化学検査項目：色度、濁度、pH、過マンガン酸カリウム消費量
- ③ 細菌検査項目：大腸菌群、大腸菌、糞便性大腸菌群、大腸菌群、糞便性連鎖球菌、好気性芽胞菌、ウェルシュ菌芽胞、一般細菌、従属栄養細菌（R2A寒天培地、25℃、7日間培養）

## 3 結 果

### 3.1 一般検査項目（表1）

#### 3.1.1 採水時の降雨

延べ81回の採水日（ポイント）のうち、19日（23%）が降雨日であった。なお、降雨量の最高値は60mmであった（7月18日、湧水A）。

#### 3.1.2 気温、水温

最高気温は32℃であり（7月23日、浅層地下水J及びL）、最低気温は-0.8℃であった（1月29日、湧水G）。最高水温は20.5℃であり（7月23日、深層地下水Lの原水）、最低水温は3.1℃であった（1月29日、湧水Eの原水）。

#### 3.1.3 残留塩素

栓水での最高値は1mg/L（湧水A、E及び浅層地下水J）であった。また、4ポイント（4.9%、施設数3）では、残留塩素が検出されなかった。

### 3.2 理化学検査項目（表2）

#### 3.2.1 色 度

最高値は5度であった（浅層地下水I及びJの原水）。

#### 3.2.2 濁 度

最高値は2度であった（浅層地下水Jの原水）。

#### 3.2.3 pH

原水では6.2（浅層地下水J）～7.7（湧水B、D及びG）、栓水では6.3（湧水A）～7.8（湧水D）であった。

#### 3.2.4 過マンガン酸カリウム消費量

最高値は7mg/L（6月14日、浅層地下水Iの原水）であった。

### 3.3.1 大腸菌群・大腸菌（表3）

原水では大腸菌群は延べ47ポイント（58%、施設数10）から検出され、大腸菌は延べ15ポイント（19%、施設数8）から検出されたが、栓水では双方とも検出されなかった。

また、深層地下水K及びLでは原水、栓水ともに大腸菌群及び大腸菌は検出されなかった。

#### 3.3.2 糞便性大腸菌群

原水では延べ15ポイント（19%、施設数6）から検出されたが、栓水からは検出されなかった。

また、深層地下水K及びLでは原水、栓水ともに検出されなかった。

#### 3.3.3 糞便性連鎖球菌

原水では延べ22ポイント（27%、施設数9）から検出されたが、栓水では検出されなかった。

さらに、湧水A、D、浅層地下水H及びIの原水から

は、*E. faecalis* が検出された。

また、深層地下水K及びLでは原水、栓水ともに検出されなかった。

#### 3.3.4 好気性芽胞菌

原水では延べ13ポイント（16%、施設数6）から検出され、栓水では1ポイント/81ポイント（1.2%、施設数1）から検出された。

また、深層地下水K及びLでは原水、栓水ともに検出されなかった。

#### 3.3.5 ウェルシュ菌芽胞

全施設の原水及び栓水から検出されなかった。

#### 3.3.6 一般細菌（以下一般菌と略す。）

原水では延べ55ポイント（68%、施設数12）から検出され、最高値は280cfu/mL（5月31日、浅層地下水Iの原水）であった。また、栓水では11ポイント（13%、施設数10）から検出され、最高値は14cfu/mL（5月31日、浅層地下水J）であった。

#### 3.3.7 従属栄養細菌（以下従属菌と略す。）

原水では39ポイント（95%、施設数12）から検出され、最高値は5,520cfu/mL（8月30日、浅層地下水Hの原水）であった。また、栓水では32ポイント（78%、施設数10）から検出され、最高値は300cfu/mL（11月28日、湧水G）であった。

## 4 考 察

今回は、水質に影響すると思われる水源種別や、地形あるいは降雨量についても調査の範囲を広げて検討した。降雨量については、最高値が60mmであったものの、検査項目への影響は認められなかった。また、水源種別や立地条件では水質の差異が認められなかった。

さらに、それぞれの対象施設の理化学検査結果は大きな差がなかったこと及び原水で汚染指標菌が恒常的に検出されなかったこと、栓水はすべて水質基準に適合していたことから、調査対象施設は適正に管理されていると考えられた。

次に、浄水処理過程や消毒課程での細菌の挙動を評価するには従属菌の方が一般菌より優れているといわれている事実を確認するため<sup>1)2)</sup>施設ごとの従属菌と一般菌との集落数について比較検討した。

どの施設でも従属菌は一般菌より $10^1 \sim 10^3$ cfu/mL多く検出された（表2）。特に、浅層地下水Hでは、従属菌が一般菌より $10^2 \sim 10^3$ cfu/mL多く検出された（図2）。

さらに、湧水Gでは栓水（残留塩素0.3mg/L検出）のHPCが原水より $10^1 \sim 10^2$ cfu/mL多く検出され（11月28日及び2月19日、図3）、中間での汚染の可能性が示唆されるとともに、従属菌の測定感度の高さが確認された<sup>1)2)</sup>。

アメリカ環境保護局では、栓水の従属菌を500cfu/mL以下と定めている（EPA's Drinking Water Standards）。

今回の調査で示された従属菌 > 一般菌の傾向や湧水Gの例を加味すると、給水システムを監視する上で従属菌の検査は高感度であり、細菌の現存量を測る重要な検査項目であることを確認した。<sup>2)</sup>

