



—輝くあおもり新時代—

活彩あおもり

ISSN 0917-1924

青森県環境保健センター研究報告

Bulletin

of

Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

No.6 1995

青森県環境保健センター

は じ め に

平成6年度の研究報告をお届けいたします。

報文は19編で、その内訳は微生物関係7編、理化学関係2編、公害関係9編、放射能関係1編となっています。

報文の内容としては、PCR法による病原遺伝子に着目した研究、農薬や有害環境汚染物質に係る一斉分析法の開発に関する研究、酸性雨に係る研究などであり、職員が日常業務のそれぞれの関わりのなかから課題としてとらえ、まとめあげたものでありますのでご一読を賜れば幸いに存じます。

当所も発足以来6年が経過しようとしています。関係各位のご支援のもと、着々と施設の整備が図られつつあります。また、去年は環境、放射能、食品の各分野において海外事情を視察する機会も与えられました。国際化時代を迎え、これからの業務の推進に役立てていきたいと思っております。

社会の高齢化、地球生態系の危機など、取り組まなければならない多くの課題が前途に横たわるなか、これらに対して着実に貢献できる組織のあり方について職員とともに考え、その実現に努力していく所存でありますのでご指導、ご鞭撻を賜れば幸甚に存じます。

平成8年1月

青森県環境保健センター

所長 内山 日出夫

目 次

I 報 文

遺伝子増幅法とサザンハイブリダイゼーションによる結核菌および非定型抗酸菌の検出 畑山 一郎 大友 良光 野呂キョウ 川村千鶴子 中村 敏彦	1
国内産ブタからの病原性 <i>Yersinia enterocolitica</i> 血清型O8 菌の分離例 大友 良光 長利 徳興 三上 稔之 野呂キョウ 畑山 一郎	6
青森県で分離された新型コレラ菌、NAGビブリオO139の性状とその毒素遺伝子解析 大友 良光 長利 徳興 三上 稔之 野呂キョウ 畑山 一郎	11
エコーウイルス感染によるアポトーシスの細胞レベルでの検出 三上 稔之 佐藤 孝 佐藤 允武 畑山 一郎	14
Nowalk virus関連SRSV遺伝子検出法の検討 佐藤 允武 斎藤 幸一 木村 淳子 三上 稔之 畑山 一郎 川名 林治	17
Porimerase Chain Reaction法によるHuman Immunodeficiency Virus 2 の検出 佐藤 孝 三上 稔之 佐藤 允武 畑山 一郎	22
青森県における温泉泉質経年変化 (1980-1989) 高橋 政教 桶田 幾代 野村 真美 小林 英一 村上 淳子 平出 博昭 秋山由美子 木村 淳子 小林 繁樹 石塚 伸一 早狩 進	27
GPCクリーンアップを用いた食品中の残留農薬分析法の検討 古川 章子 高橋 政教	35
遺伝子毒性発癌剤で誘発したマウス肝前癌病巣における クラス π Glutathion S-transferase II および核内癌遺伝子c-Junの発現 三浦 啓徳 高橋 政教 畑山 一郎	46
青森県における酸性降下物の特徴 早狩 進 松尾 章 村野健太郎	51
酸性雨解析におけるイオン組成の表現方法の検討 —トリリニア・ダイアグラムの応用— 早狩 進	59
固相抽出/高速液体クロマトグラフィー法による水中農薬の多成分同時分析 石塚 伸一 佐藤真理子 対馬 和浩	65

ヘッドスペース/GC/MS法による水中揮発性有機化合物の一斉分析 石塚 伸一 大久保英樹	71
事業場における窒素・燐の排出実態調査 三上 一	79
六ヶ所村及びその周辺地域における空間放射線の特性調査 庄司 博光 竹ヶ原 仁 奥野 直子 野田 正志 五十嵐 健 佐藤 信博	86
八戸市における降下ばいじん中のバナジウム 工藤 精一 岡 典子 坂上 素一 工藤 隆一 松尾 章	92
小川原湖の植物プランクトン ―湖全体の出現状況― 工藤 精一 奈良 忠明 小山田久美子 神 正志 柴田 幸伸 早狩 進	97
青森県南地域河川の水質評価 (第2報) ―馬淵川水系・奥入瀬川水系― 神 正志 工藤 精一	103
清浄地域と都市域の降水特性 ―名久井岳と八戸市の比較― 工藤 隆治 工藤 精一	109
II ノ ー ト	
青森県における貝毒調査結果 (平成6年) 堀内 諭 今井美代子 五十嵐 健 三浦 啓徳 古川 章子 高橋 政教	113
酸性湖沼の陸水学的調査研究 (III) ―宇曽利山湖 (恐山湖) の化学組成― 三上 一 早狩 進	116
湖沼の富栄養化に関する調査研究 (III) ―津軽十二湖王池における粒径別栄養塩類の挙動― 三上 一	123
六ヶ所村における陸水中トリチウム濃度調査 (II) 外崎久美子 工藤 英嗣 安達 大介 木村 秀樹	130
八戸市におけるアルカリろ紙法によるフッ化物調査結果について 三上 浩二 秋田谷礼治 工藤 隆治	134
III 他誌投稿抄録	137
IV 学会発表抄録	139

CONTENTS

I Original Articles

- Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Non-tuberculous Mycobacterium
by Polymerase Chain Reaction and Southern Hybridization
Ichiro HATAYAMA, Yosimitsu OHTOMO, Kyo NORO, Chizuko KAWAMURA
and Toshihiko NAKAMURA 1
- Isolation of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Serotype O8 from Domestic Pigs
Yoshimitsu OHTOMO, Yasunobu TOYOKAWA, Seiji KANEKO
and Tsutomu MARUYAMA 6
- Characterization of NAG-Vibrio O139, a New Type Cholera Isolated
in Aomori Prefecture and Gene Analysis of Its Toxin
Yoshimitsu OHTOMO, Tokuyo OSARI, Toshiyuki MIKAMI,
Yasunobu TOYOKAWA, Kyo NORO and Ichiro HATAYAMA 11
- Detection of Apoptotic Cells Induced by Echovirus Infection
Toshiyuki MIKAMI, Takashi SATOH, Nobutake SATOH and Ichiro HATAYAMA 14
- Study on the Detection Method for Nowalk Virus-related SRSV Gene
Nobutake SATOH, Koichi SAITOH, Junko KIMURA, Toshiyuki MIKAMI,
Ichiro HATAYAMA and Rinji KAWANA 17
- Detection of Human Immunodeficiency Virus-2 DNA by Polymerase Chain Reaction
Takashi SATOH, Toshiyuki MIKAMI, Nobutake SATOH and Ichiro HATAYAMA 22
- Water quality change of hot springs with the lapse of year
in the Aomori Prefecture (1980—1989)
Masanori TAKAHASHI, Ikuyo OKETA, Masami NOMURA, Eiichi KOBAYASHI,
Atsuko MURAKAMI, Hiroaki HIRAIDE, Yumiko AKIYAMA, Junko KIMURA,
Shigeki KOBAYASHI, Shin-ichi ISHIZUKA and Susumu HAYAKARI 27
- Studies on Analytical Methods for Residual Pesticides in Food Using GPC Clean-up
Akiko KOGAWA and Masanori TAKAHASHI 35
- Expression of Class π Glutathione S-transferase II and c-Jun in Preneoplastic
Foci of Mouse Livers Induced by Genotoxic Carcinogens
Hironori MIURA, Masanori TAKAHASHI and Ichiro HATAYAMA 46
- Characteristics of acid precipitates in the Aomori Prefecture
Susumu HAYAKARI, Akira MATSUO and Kentaro MURANO 51

Investigation on expression method of ion composition in acid rain analysis —Utilization of trilinear diagram— Susumu HAYAKARI	59
Simultaneous analysis of multi-component for pesticide in water by using solid phase extraction/high performance liquid chromatography Shin-ichi ISHIZUKA, Mariko SATOH and Kazuhiro TSUSHIMA	65
Simultaneous analysis of submergent volatile organic compound by using headspace/GC/MS method Shin-ichi ISHIZUKA and Hideki OHKUBO	71
Examination on actual discharge circumstances of nitrogen and phosphorus at a place of industry Hajime MIKAMI	79
Examination on characteristics of spatial radioactive rays in the Rokkasho Village and its circumferential regions Hiromitsu SHOJI, Hitoshi TAKEGAHARA, Naoko OKUNO, Masashi NODA, Ken IGARASHI and Nobuhiro SATOH	86
Vanadium in the dustfall in Hachinohe City Seiichi KUDO, Noriko OKA, Motoichi SAKAGAMI, Ryuji KUDO and Akira MATSUO	92
Phytoplankton in Lake Ogawara —Occurrence circumstances in allover lake— Seiichi KUDO, Tadaaki NARA, Kumiko OYAMADA, Masashi JIN, Yukinobu SHIBATA and Susumu HAYAKARI	97
Evaluation of water quality in the river of south-east district of Aomori Prefecture (No.2 Report) —Mabechi River system and Oirase River system— Masashi JIN and Seiichi KUDO	103
Characteristics of deposition on unpolluted area and urban area —Comparison between Mt. Nakui and Hachinohe City— Ryuji KUDO and Seiichi KUDO.....	109
II Notes	
Investigation on Shellfish Poison in Aomori Prefecture (1994) Satoshi HORIUCHI, Miyoko IMAI, Ken IGARASHI, Hironori MIURA, Akiko KOGAWA and Masanori TAKAHASHI	113

Limnological Studies on the Acid Lake (III)	
—Chemical composition in Lake Usoriyama (Ososesan-ko) —	
Hajime MIKAMI and Susumu HAYAKARI	116
Studies on Eutrophication of Lake (III)	
—Behavior of nutrients by each particle diameter in the Tsugaru-juniko Ohike—	
Hajime MIKAMI	123
Tritium Concentrations of Surface Water in Rokkasho Village (II)	
Kumiko TONOSAKI, Eiji KUDO, Daisuke ADACHI and Hideki KIMURA	130
Examination Results of Fluoride by Alkali Filter Paper Method in Hachinohe City	
Koji MIKAMI, Reiji AKITAYA and Ryuji KUDO	134
III Summaries of Other Publications	137
IV Abstracts of Presentation in Society Meetings	139

I 報 文

遺伝子増幅法とサザンハイブリダイゼーションによる 結核菌および非定型抗酸菌の検出

畑山 一郎 大友 良光 野呂キョウ 川村千鶴子¹ 中村 敏彦¹

Polymerase chain reaction (PCR) 法とdigoxigenin (DIG) 標識プローブによるサザンハイブリダイゼーション法を用いて、標準株結核菌および非定型抗酸菌の迅速同定を行なった。結核菌特異的プライマーは、結核菌に372bpDNA断片の特異的増幅を、また、抗酸菌共通プライマーは、結核菌および実験に用いたすべての非定型抗酸菌に620bpDNA断片の増幅をもたらした。これらのプライマーは、他の口内細菌DNAには結合して増幅反応をおこすことはなかった。*M.tuberculosis* の372bpPCR産物のDIG標識プローブによるサザンハイブリダイゼーションでは、結核菌由来の増幅DNAのみが特異的に認識され、PCR感度はさらに1000倍程度増加した。抗酸菌共通プローブを用いた場合にも同様の感度増大が認められた。この結果は、本プライマーを用いたPCRおよびサザンハイブリダイゼーションは結核菌と非定型抗酸菌の迅速鑑別同定に有効であることを示す。

Key word : Mycobacterium tuberculosis, non-tuberculous mycobacterium, polymerase chain reaction, southern hybridization.

1. はじめに

結核罹患率は、戦後急速に低下してきたものの依然としてわが国の主要な感染症である。最近ではその減少速度の鈍化が著しく、若年齢層ではむしろ増加傾向さえ伺われる。さらに、発展途上国からの在日外国人における結核の多発やAIDS症例における結核症の多発など深刻な問題となっている。

結核は、結核菌のほか非定型抗酸菌の感染により引き起こされる。結核菌および非定型抗酸菌の大半は増殖が遅く、その判定には、小川培地での培養検査による従来法では通常6乃至8週間という長期間を要するうえ、検出率においても問題がある。塗抹鏡検法では迅速な検出が可能であるものの検出感度は低く、小川培養法においても塗抹陰性検体での検出率はかなり低い。このような発病から診断に至るまでの遅れは、治療方針の決定や予後の判定に大きな支障をもたらすため、微量の結核菌および非定型抗酸菌の迅速検出法による早期診断が望まれている。

Polymerase chain reaction (PCR) 法は、微量の検体から特異的かつ迅速に特定の遺伝子を検出する方法で、多くの研究分野で活用されている。結核菌に関しても多くの報告¹⁻³⁾があるが、プライマーの特異性、感度の問題など改良しなければならない点があるため、本研究で我々は、結核菌特異的および抗酸菌共通のプライマーを用いたPCRによる標準株結核菌と非定型抗酸菌の迅速鑑別に関して検討した。さらに、Digoxigenin (DIG) 標識

プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによる検出感度の増加に関しても検討を加えた。

2. 材料と方法

2.1 試薬

アガロースLEはナカライテスクより、Taq DNA polymerase, dNTP, 50x TAEおよびエチジウムブロミドは和光純薬より入手した。DIG DNA Labeling KitとDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acidsはベーリンガー・マンハイム社から購入された。

2.2 鑄型の調整

標準結核菌株および非定型抗酸菌株は、結核予防会結核研究所の阿部千代治博士より恵与された。小川培地上で増殖中の菌を100 μ lの蒸留水に浮遊し、100 $^{\circ}$ Cで10分の加熱処理後、遠心およびDNA抽出操作なしに1 μ lの菌懸濁液(5 ngDNAを含む)を鑄型として使用した。

2.3 PCRの条件

結核菌に特異的なプライマー(TBプライマー)として、*M. bovis*のMPB70抗原遺伝子⁴⁾を増幅するように設定されたTB-1A, 5'-GAACAATCCGAGTTGACAA-3' とTB-1B, 5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3'を用いた。また、抗酸菌に共通なプライマー(MYCプライマー)として、*Mycobacterium*属の16SrRNA遺伝子⁵⁾の増幅をもたらすMYC246, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' とMYC_r266/267, 5'-CACGCT(C)CACAGTTAAGCC(T)GTを使用した。TBおよびMYCプライマーで増幅されるDNAのサイズは、各々372bpと620bpである。なお、MYCプライマーを用いた原法ではreverse

1: 青森県立中央病院検査部

transcription PCR (RT-PCR) であるが、今回はDNAを鋳型として用いた。TBおよびMYCプライマーによるPCRは、終濃度として各プライマー $1\mu\text{M}$ 、dNTP $200\mu\text{M}$ 、Taq DNA polymerase $0.025\text{U}/\mu\text{l}$ および鋳型DNAは特に記載がなければ 5ng の全量 $50\mu\text{l}$ のシステムで、変性 94°C (30秒)、アニーリング 68°C (1分)、伸長 72°C (1分)の40サイクルで行われた。遺伝子増幅装置としてRIKOH Twincubatorが使用された。

2・4 DNAのアガロースゲル電気泳動

PCR終了後の反応液 $5\mu\text{l}$ を使って、増幅されたDNAは、2%アガロースゲル電気泳動で分離された。電気泳動は、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムプロミドを含む $1\times\text{TAE}$ を泳動緩衝液として用いてSambrookら⁶⁾の方法に準じて行われた。DNAのバンドは、トランスイルミネーター上で写真に撮られた。DNAサイズマーカーとしてBioMarker (フナコシ) が用いられた。

2・4 サザンハイブリダイゼーション

M. tuberculosis の372bp PCR 生成物および *M. kansasii* の620bp PCR 生成物を DIG DNA Labeling KitによりDIG標識してプローブとした。泳動終了後、アガロー

スゲル中のDNAを 0.5N NaOH - 1.5M NaCl 処理により変性し、 0.5M Tris , $\text{pH}8.0$ - 1.5M NaCl で中和後、 $10\times\text{SSC}$ (standard saline citrate) でナイロン膜に転写した。ハイブリダイゼーションは、ベーリンガー・マンハイム社の実験プロトコールに従い、DIG標識プローブ濃度 $10\text{ng}/\text{ml}$ で 42°C 、15時間行われた。 $1\times\text{SSC}$ - $0.1\%\text{SDS}$ 溶液にて 68°C で洗浄後、DIG抗体とアルカリフォスファターゼ複合体を利用したDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic AcidsによりDNAの検出がなされた。X線フィルムへの露光時間は5分であった。

3. 結 果

図1に示すようにTBプライマーを用いた13種の抗酸菌株のPCRでは、*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*の結核菌群に372bpの増幅DNAが検出されたが、このプライマーは非定型抗酸菌DNAとは反応しなかった。結核菌群のうちヒトに感染するのは*M. tuberculosis*のみであることから、ヒト喀痰において372bpのバンドが検出された場合には*M. tuberculosis*の感染と判定できる。また、MYCプライマーによるPCRで

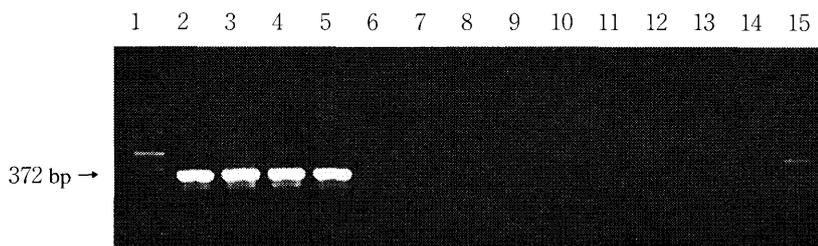


図1 TBプライマーによる結核菌および非定型抗酸菌のPCR。
1,15;DNA size marker, 2;*M. tuberculosis*, 3;*M. bovis*, 4;*M. africanum*,
5;*M. microti*, 6;*M. kansasii*, 7;*M. marinum*, 8;*M. scrofulaceum*,
9;*M. szulgai*, 10;*M. gordonae*, 11;*M. intracellulare*, 12;*M. avium*,
13;*M. chelonae* (*chelonae*), 14;*M. chelonae* (*abscessus*).

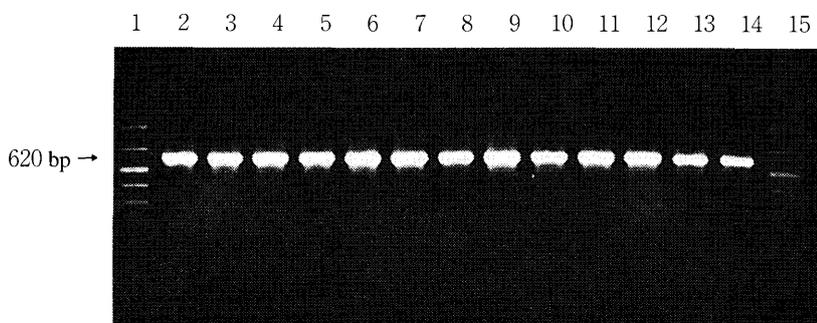


図2 MYCプライマーによる結核菌および非定型抗酸菌のPCR。
各レーンは図1と同じ

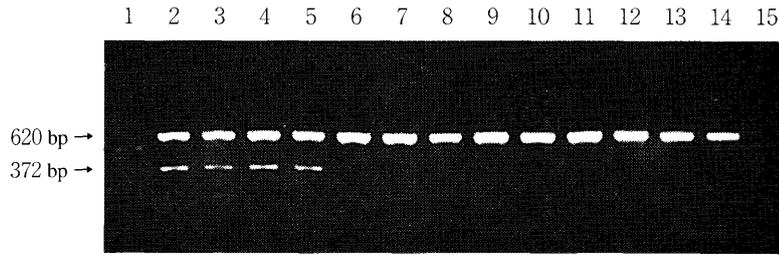


図3 TBとMYCの混合プライマーによる結核菌と非定型抗酸菌のPCR. 各レーンには図1と同じ

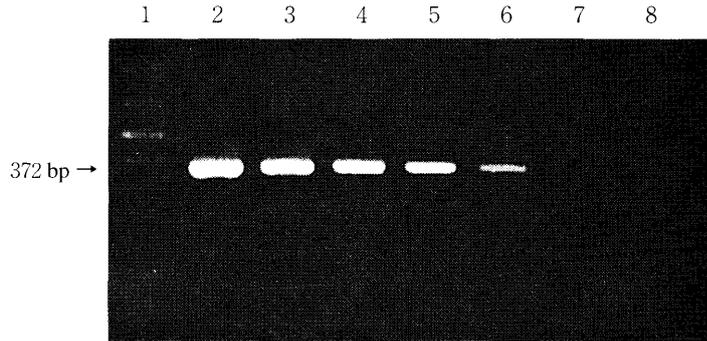


図4 *M. tuberculosis* のDNA量変化からみたPCRの検出感度. TBプライマーを用い, *M. tuberculosis* DNAを鋳型としてPCRを行なった. 鋳型DNAは5 ngから500fgまでの範囲で使用した. 1;DNA size marker, 2;5 ng, 3;500pg, 4;50pg, 5;5 pg, 6;500fg, 7;50fg, 8;5 fg.

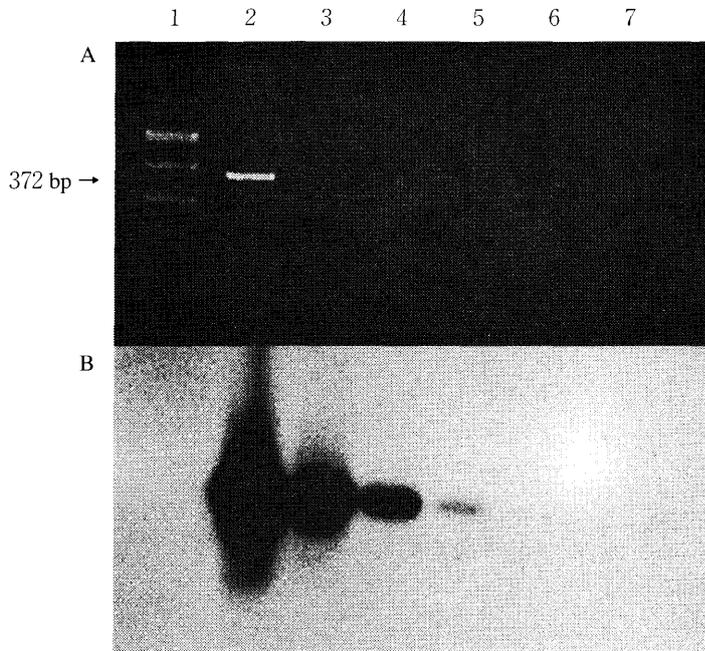


図5 TBプライマーによるPCRのサザンハイブリダイゼーションによる感度の増大.

TBプライマーによる*M. tuberculosis*のPCR終了後, 100ngから100fgまでのDNAを泳動した(A). そのアガロースゲルからナイロン膜に移されたDNAに対して, TBプライマーを用いた*M. tuberculosis*のPCR増幅DNAをDIG標識してプローブとし, サザンハイブリダイゼーションを行なって5分間の露光後現像した(B). 1;100ng DNA, 2;10ng, 3;1 ng, 4;100pg, 5;10pg, 6;1 pg, 7;100fg

は前記の4菌種に加えて, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. chelonae (chelonae)*, *M. chelonae (abscessus)*の9種の非定型抗酸菌すべてに620bpのバンドが認めら

れた(図2). TBおよびMYCプライマーを同時に用いた場合には, 図3に示したように*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*に372bpと620bpの2本のバンドが, また, それ以外の非定型抗酸菌には620bp

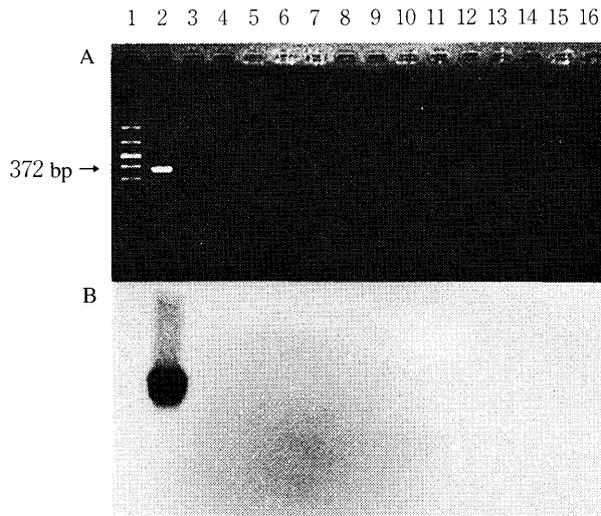


図6 TBプライマーによる口内細菌のPCRとサザンハイブリダイゼーションによる特異性の検討。

TBプライマーを用いて5 ngの各種口内細菌DNAについてPCRを行ない、その5 μ lを電気泳動に使用した(A)。Aのゲルについて、図5Bのようにハイブリダイゼーションを行なった(B)。

1;DNA size marker, 2;*M.tuberculosis*, 3;*S. marcescens*, 4;*P. aeruginosa*, 5;*P. fluorescens*, 6;*S. aureus*(MSSA), 7;*S. aureus*(MRSA), 8;*S. agalactiae*, 9;*S. milleri*, 10;*M. catarrhalis*, 11;*H. parainfluenzae*, 12;*H. influenzae*, 13;*S. pyogenes*, 14;*S. pneumoniae*, 15;Yeast, 16;*A. anitratus*.

のバンドのみが検出された。この結果は、上記混合プライマーを用いたヒト喀痰のPCRで2本のバンドが得られれば*M. tuberculosis*であり、620bp1本のバンドであれば非定型抗酸菌と判定できることを示す。

次に、鋳型DNAの量的変化に伴うPCRの感度について検討した。TBプライマーによる*M. tuberculosis*のPCRでは、図4のように鋳型DNA 5 ngから500fgまでは明瞭なバンドが確認されたが、50fg以下では検出が困難であった。さらに、TBプライマーによる*M. tuberculosis*のPCR産物の段階希釈による電気泳動上の感度に関して検討した結果、図5Aに示す様に、100ngのDNAは明瞭なバンドとして認められたが、10ng以下では検出不能であった。しかし、図5BのようにDigoxigenin標識プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションでは5分の露光時間で100pgのDNAまで検出でき、さらに、露光時間を長くすることで1 pgまで検出可能であった。このことは、本法は少なくとも1,000倍程度の感度増加をもたらすことを示す。非定型抗酸菌の場合も同様の結果が得られた(データ未発表)。

図6に示すように、TBプライマーでは*S.marcescens*, *P.aeruginosa*, *P.fluorescens*, *S.aureus* (MSSAおよびMRSA), *S.agalactiae*, *S.milleri*, *M.catarrhalis*, *H.parainfluenzae*, *H.influenzae*, *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*, Yeast, *A.anitratus*のような口内細菌DNAの増幅は、電気泳動(図6A)とサザンハイブリダイゼーション(図6B)において確認されなかったことから、また、MYCプライマーでも同様であったことから(データ未発表)、TBプライマーは結核菌特異的な、そしてMYCプライマーは抗酸菌群共通の遺伝子増幅をもたらすことが確認された。

4. 考 察

本研究において我々は、TBおよびMYCプライマーによるPCRが特異的に結核菌と非定型抗酸菌の迅速鑑別を可能にすることを示した。また、DIGを利用した非放射性プローブによるサザンハイブリダイゼーションは、感度をさらに1,000倍程度に増大させることから、本法はヒト喀痰からの結核菌と非定型抗酸菌のPCRにも応用できると考えられる。

結核は、結核菌あるいは非定型抗酸菌の感染により発症するため、結核菌と複数種ある非定型抗酸菌の迅速鑑別のみならず、非定型抗酸菌の菌種同定まで求められる。非定型抗酸菌症の原因となる主たる菌種は、*M. avium*, *M. intracellulare* および *M. kansasii* の3種で、本症の95%を占める。そのうち*M. avium*と*M. intracellulare*の2菌種は、従来の生化学的手法では同定が困難であり、ほとんどの抗結核薬に耐性を示してその感染は難治性である。この2菌種は、特定の薬剤に対する感受性に差があることが明らかになりつつあり、両菌種の迅速鑑別は今後の治療方針に大きく寄与するものと思われる。しかし、我々が本研究で用いた方法では、複数種存在する非定型抗酸菌の同定までは不可能であるため、それらの特異的塩基配列を利用した菌種同定の操作が必要であることから、現在、PCRダイレクトシーケンシングによる同定に関して検討を進めている。

文 献

- 1) Hance, A. J. et al.: Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol, Microbiol*, **3**, 843-849, 1988.
- 2) Sjobring, U. et al.: Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin*

- Microbiol., **28**, 2200-2204, 1990.
- 3) Takewaki, S. et al. : Genus-specific polymerase chain reaction for the mycobacterial dna J gene and species-specific oligonucleotide probes. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 446-450, 1993.
- 4) Cousins, D. B. et al. : Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 255-258, 1992.
- 5) Boddington, B. et al. : Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 1751-1759, 1990.
- 6) Sambrook, J. et al. : "Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd edition" 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Abstract

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Non-tuberculous Mycobacterium by Polymerase Chain Reaction and Southern Hybridization

Ichiro HATAYAMA¹, Yosimitsu OHTOMO¹, Kyo NORO¹, Chizuko KAWAMURA²
and Toshihiko NAKAMURA²

Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacterium in standard bacterial strains was attempted using polymerase chain reaction (PCR) and southern hybridization with digoxigenin (DIG) labeled probe. 372 bp fragment of DNA amplified specifically in *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* and *M. microti* by PCR with *M. tuberculosis* specific primer (TB primer), while the amplification of 620 bp fragment was noted in all mycobacterial strains by PCR with *Mycobacterium* common primer (MYC primer). These primers did not produce the specific amplification of DNA in the other oral bacteria. When southern hybridization was carried out with DIG-labeled PCR product of *M. tuberculosis* as a probe, the 372 bp fragment of *M. tuberculosis* was specifically recognized and the sensitivity was found to have increased by 1,000-fold. The same degree of increase was also found in the use of 620 bp PCR product as a probe. These results indicate that PCR with these primers and southern hybridization with DIG-labeled probe are thus shown useful for rapidly distinguishing *M. tuberculosis* from non-tuberculous mycobacterium.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, non-tuberculous mycobacterium, polymerase chain reaction, southern hybridization

1 : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment.

2 : Aomori Prefectural Central Hospital, Department of Clinical Laboratory.

国内産ブタからの病原性 *Yersinia enterocolitica* 血清型 O8 菌の分離例

大友 良光 豊川 安延 金子 誠二¹ 丸山 務²

1991年6月青森県野辺地町で発生した *Yersinia pseudotuberculosis* 血清群 5 a 菌による集団感染症の疫学調査を目的に市販ブタ肉 83検体、ブタ腸管内容物50検体、ネズミ10匹、環境水 8 検体の合計151検体について *Yersinia pseudotuberculosis* / *enterocolitica* の保菌調査を行った。その結果、市販ブタ肉から *Y. enterocolitica* 血清型 O3 菌10株、O5 菌13株、ブタ腸管内容物から *Y. enterocolitica* 血清型 O3 菌2株、O5 菌3株、O8 菌3株、ネズミから *Y. enterocolitica* 血清型 O5 菌3株、*Y. pseudotuberculosis* 血清群 5 a 菌1株が分離された。国内産ブタからの *Y. enterocolitica* 血清型 O8 菌の分離はわが国初のことであり、しかも分離3菌株はすべて病原性の性状をし、プラスミド上の病原性関連遺伝子 *vir F* と染色体上の付着性関連遺伝子 *ail* の保有も確認された。ネズミ由来の *Y. pseudotuberculosis* 血清群 5 a 菌は *vir F* が無く非病原性株であった。

key words : *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica* serotype O8, *Yersinia pseudotuberculosis*, biochemical characteristics, polymerase chain reaction

1. はじめに

Yersinia enterocolitica 血清型 O8 菌はヒトに重症の胃腸炎や敗血症を起こす細菌として知られ、その発生地はカナダ及びアメリカ合衆国に限られていた。しかし、1991年 Ichinohe ら¹⁾がわが国で初めて青森県黒石市の患者から本菌を分離して以来、当該地を含む津軽地域で多くの散発例²⁾が明らかとなり、その感染源について注目されている。一方、1991年6月³⁾、青森県野辺地町で *Y. pseudotuberculosis* 血清群 5 a 菌による学校給食を原因とする集団感染症が発生し、ブタ肉と野菜を用いた八宝菜が疑われたが原因食品は不明であった。そこで *Y. pseudotuberculosis* の感染源追究のため、市販ブタ肉、屠畜場の国内産ブタ腸管内容物、事件発生地で捕獲したネズミと環境水について *Y. pseudotuberculosis* 並びに *Y. enterocolitica* の保菌状況を調査した結果、国内産ブタの腸管から病原性を有する *Y. enterocolitica* 血清型 O8 菌が分離された。今回は、当該菌分離の経緯と分離菌の生物化学的性状、病原性状、そして薬剤感受性について報告する。

2. 材料と方法

2.1 材料

市販ブタ肉：1991年12月11日から12日にかけて青森県内の11保健所管内で取去された83検体を用いた。

ブタ腸管：1992年2月3日と4日に南部地区にある屠畜場で解体中のブタ小腸末端部をそれぞれ31、19検体、

合計50検体を採取した。

ネズミ：1992年5月26、27、30日に野辺地町の給食施設付近及び青森市内で粘着プレート（ラットストッパー、180mm×300mm、夏坂消毒）を用いて10匹捕獲した。

環境水：1992年2月25日に野辺地町と弘前市で河川水、沢水、湧水を各1ℓずつ8検体採取した。

2.2 方法

検体の前処理：市販ブタ肉50g、ブタ腸管内容物10g、ネズミの各種臓器9部位（綿棒によるいん頭ぬぐい液の他、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、直腸、腸管膜リンパ節）をそれぞれ滅菌ビニール袋（ストマッカー-80、100×150×0.09mm、オルガノ）に投入し滅菌ハサミで細かに切断し、滅菌生理的食塩水を市販ブタ肉とブタ腸管内容物には等量に、ネズミの各種臓器9部位にはそれぞれ10ml加え、ストマッカー（STOMAKER Lab blender 400）で1分間均等化して原液とした。環境水はその1ℓを0.45μmのフィルター（Adovantec）でろ過し、このフィルターを2mlの滅菌生理的食塩水に浸し原液とした。

直接分離培養方法：アルカリ処理法⁴⁾によって培養した。各種原液0.2mlに等量の0.4%KOH液を添加して30秒間混積し、その0.05mlをCIN基礎培地（Oxoid）の半分接種してコンラージ棒（日水）で塗布し、他の半分には当該液の1μℓを定量エーゼで塗布し25℃で48時間培養した。

増菌培養方法：市販ブタ肉とブタ腸管内容物は原液のそれぞれ25mlと10ml、ネズミの各種臓器9部位は原液各1ml、そして環境水は原液1mlを10倍量になるように1/15Mリン酸緩衝液（pH7.6）に接種し4℃で4週間培養

1：東京都立衛生研究所乳肉衛生研究科

2：麻布大学環境保健学部食品衛生学教室

した。また、市販ブタ肉は原液10mlを3,000rpmで30分間遠心し、沈渣は Kanagawa⁵⁾ による *Y. enterocolitica* の薬剤感受性試験成績をもとにエリスロマイシンを添加した (10 µg/ml) BHI培地 (Difco) 4 mlに接種し、これに好気性菌の発育を防ぐために滅菌流動パラフィン (和光) を重層して25℃で48時間及び4週間培養した。増菌培養後の分離培養は直接培養方法と同様にアルカリ処理法で行った。

分離同定法：CIN基礎培地上で *Yersinia* と思われる集落をHI寒天培地 (Difco) に釣菌し25℃で24時間培養後、著者製造血清並びに市販の *Y. enterocolitica* 及び *Y. pseudotuberculosis* 診断用免疫血清 (デンカ生研) を用いて凝集反応を行い、凝集のあった菌株については同定キット Api 20E (bioMérieux) を用いて同定した。*Y. enterocolitica* の生物型別は Wauters の方法⁶⁾ で行った。

病原性状検査：分離菌についてエスクリン分解性試験、ピラジナミダーゼ活性試験⁷⁾、自己凝集性試験⁸⁾、カルシウム依存性試験⁹⁾ の病原性状検査を行った。

PCR法による病原遺伝子検出：*Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* のプラスミド上の病原性遺伝子 *Vir F*¹⁰⁾、*Y. enterocolitica* の染色体上の付着性遺伝子 *ail*¹¹⁾、*Y. pseudotuberculosis* の染色体上の侵入性遺伝子 *inv*¹⁰⁾ に関する各プライマーを用い Twincubator (理工研) でPCRを行った。テンプレートは分離菌を3 mlのLブイヨン (Difco) に接種して25℃で18時間培養後その10 µlを

90 µlのTE緩衝液 (和光) に接種して5分間煮沸して準備した。

薬剤感受性試験：分離菌を感性ディスク用培地-N (日水) に塗布し、感受性ディスク (昭和ディスク, 日水) を用いて試験を行った。薬剤の種類はストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM), ゲンタマイシン (GM), テトラサイクリン (TC), アミノベンジルペニシリン (ABPC), ナリジクス酸 (NA), セファロリジン (CER) であった。

3. 結 果

3・1 菌分離成績

市販ブタ肉から *Y. enterocolitica* の血清型O3菌が10株とO5型菌が13株分離され、ブタ腸管内容物から *Y. enterocolitica* の血清型O3菌が2株、O5型菌が3株、O8型菌が3株分離され、ネズミから *Y. enterocolitica* の血清型O5菌が2株と *Y. pseudotuberculosis* の血清群5 a菌が1株分離され、環境水からは両菌種とも分離されなかった (表1)。ブタ腸管内容物からのO8型菌の分離はわが国初のことである。次に、市販ブタ肉からの *Y. enterocolitica* の分離数を培養方法別に見ると (表2)、直接分離培養法ではO3型菌が8株、O5型菌1株、リン酸緩衝液による増菌培養法ではO3型菌2株、O5型菌2株が分離され、直接培養におけるO3型菌の分離数が多かった。エリスロマイシン添加BHI培地による増菌

表1 *Yersinia enterocolitica* 及び *Y. pseudotuberculosis* 分離成績

検体の種類	検体数	菌 分 離 検 体 数				合 計
		<i>Y. pseudotuberculosis</i>				
		O3	O5	O8	5 a	
市販ブタ肉	83	10	13			23
ブタ腸管内容物	50	2	3	3		8
ネズミ	10		2		1	3
水	8					0
合計	151	12	18	3	1	34

表2 市販ブタ肉からの培養方法別 *Yersinia enterocolitica* 分離成績

培 養 方 法	血清型別分離菌数		合 計
	O3	O5	
直接塗抹法	8	1	9
リン酸緩衝液増菌培養法	2	2	4
エリスロマイシンBHI増菌培養法 (流動パラフィン重層)			
48時間培養	1	9	10
4週間培養	0	7	7

培養法では、48時間培養でO3型菌1株、O5型菌9株、4週間培養でO5型菌が7株分離され、従来の直接培養法やリン酸緩衝液による増菌培養法に比べO5型菌が多く分離された。

3・2 分離菌の血清型(群)別病原性状と病原遺伝子検出成績

分離した *Y. enterocolitica* のうち、表3に示したとおり血清型O3型菌12株は Wauters の生物型が3型で、そのうち11株はエスクリン非分解性、ピラジナミダーゼ非産生性、自己凝集性陽性、カルシウム依存性陽性であり病原性を有すると考えられ、PCR法により病原性遺伝子である *vir F* と *ail* の保有が判明した。しかし、他の1株

表3 *Yersinia enterocolitica* 及び *Y. pseudotuberculosis* の血清型別病原性状と病原遺伝子検出

菌種及び血清型 () は検体数	生物型	病原性状		病原遺伝子	
		エスクリン ピラジナミ ダーゼ	自己凝集性 カルシウム 依存性	<i>vir F</i> <i>ail</i>	<i>inv</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>					
O3 (11)	3	-	+	+	-
O3 (1)	3	+	-	-	-
O5 (18)	1	+	-	-	-
O8 (3)	3	-	+	+	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>					
5a (1)		+	-	-	+

は非病原性菌であった。O5型菌18株は生物型が1型で非病原性であった。*Y. pseudotuberculosis* 血清群5a群の1株は *inv* 遺伝子を保有していたが、*vir F* を保有しないため非病原性菌と考えられた。また、市販ブタ肉由来のO8型菌3株は生物型1型で *vir F* と *ail* 遺伝子を保有し病原性菌と考えられた(図1)。このO8型菌3菌株と同年に患者から分離された3株についての Api 20E に

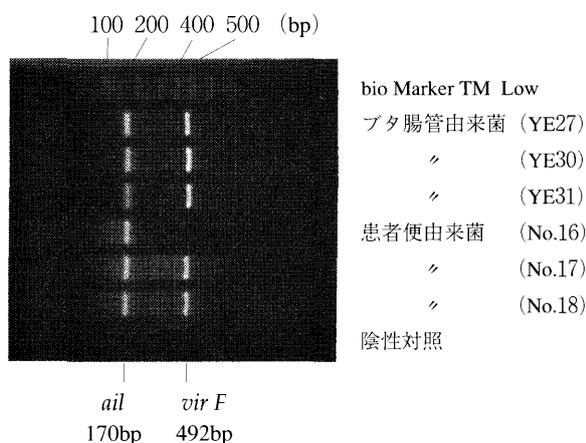


図1 *Yersinia enterocolitica* serotype O8 からのPCR法による病原性関連遺伝子検出成績

よる生物化学的性状検査では、ブタ腸管由来の1菌株(YE31)がサッカロース非分解菌であった以外はすべてコードNo.1155723の同一の性状を示した。

3・3 分離菌の薬剤感受性試験成績

分離菌の多くはSM, KM, GM, TC, NAに高い感受性を示し、ABPC, CERに抵抗性を示した(表4)が、*Y. enterocolitica* 血清型O5菌のうち2株はABPC, CERの他にSM, TCにも耐性を示した。今回分離された *Y. pseudotuberculosis* 並びに対照に用いた患者由来の *Y. enterocolitica* 血清型O8菌はCERに高い感受性を示し、ABPCには抵抗性を示した。

表4 *Yersinia enterocolitica* 及び *Y. pseudotuberculosis* の薬剤感受性試験成績

菌種と血清型(群)	数	SM	KM	GM	TC	ABPC	NA	CER
<i>Y. enterocolitica</i>								
O3	12	3+ ¹⁰ 2+ ²	3+	3+	3+	+ ⁹ - ³	3+	- ⁸ + ² 2+ ²
O5	18	3+ ¹³ 2+ ³ - ²	3+	3+ ¹⁷ 2+ ¹	3+ ¹⁶ - ²	+ ⁹ - ⁹	3+	- ⁹ + ³ 2+ ² 3+ ³
O8	3	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+
<i>Y. pseudotuberculosis</i>								
5a	1	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+
<i>Y. enterocolitica</i> 患者便由来O8								
	3	3+	3+	3+	3+	+ ² 2+ ¹	3+	3+

-: 非感受性, +: 弱感受性, 2+: 中等度感受性, 3+: 高感受性, また、符号の右上の数字は該当菌数を示す。

4. 考 察

わが国における病原性の *Y. enterocolitica* 血清型O8菌による感染者は1991年まで12名確認され^{1) 2)}、すべてが青森県の津軽地域に限られている。患者の多くが山間部の河川の上流部に居住していることから、感染の様式として当該菌に汚染された野生動物の糞便が沢水を汚染し、これを飲用することによって患者が発生する可能性が考えられた²⁾。このことに関し linuma ら¹²⁾ は新潟県浅草岳のノネズミ25匹中5匹から病原性の *Y. enterocolitica* 血清型O8菌を分離し、Hayasidani ら¹³⁾ は青森県津軽地区の山間部のノネズミ193匹中10匹から当該菌を分離しノネズミがヒトの感染症に重要な役割を演じていることを明らかにした。しかし、その一方で Ichinohe ら¹⁾ が報告したわが国初の症例では、ブタ肉の関与が示されていた。海外でも1981年 Doyle ら¹⁴⁾ がアメリカのブタの舌から、1991年 Tsai ら¹⁵⁾ が北部台湾産のブタ肉から病原性を有する菌を分離しており、ブタ肉がヒトへの重要な感染源の一つであることが示唆されていた。今回、著者らがブタ腸管から病原性を有する3菌株を分離したことにより、ブタ肉がヒトへの感染に重要な役割を担うことをあらためて示すこととなった。

分離された病原性 *Y. enterocolitica* 血清型 O 8 菌 3 株は生物化学的性状検査により 1 株がサッカロース非分解性状であった他はすべての性状が一致していた。このサッカロース非分解菌は Wauters の生物型には該当しないが、その他の生物化学的性状、血清型、病原性状が同一であることを考慮して 1 型として取り扱った。一方、今回分離された菌の多くは CER と ABPC に耐性、他の薬剤に感受性を示したが *Y. enterocolitica* 血清型 O 8 菌 3 株及び *Y. pseudotuberculosis* 血清群 5 a 菌とともに CER に感受性を示し、他との相違が見られた。また、市販ブタ肉に関し、増菌培養に従来のリン酸緩衝液を用いる方法と抗生物質 EM を添加した BHI に流動パラフィンを重ねる方法を併用した結果、後者の方法で多数の非病原性の *Y. enterocolitica* 血清型 O 5 菌が分離されたことは興味深い。この理由が本菌と他血清型菌との EM に対する感受性の差によるものか嫌気度の相違によるものかは今後検討を要する。また今回、非病原性ではあるが *Y. pseudotuberculosis* 血清型 5 a 菌が分離されたことは、1991 年の本菌による集団事例と関連して誠に興味ある成績と考えられる。

わが国の *Y. enterocolitica* 血清型 O 8 菌による感染症例はその後も着実に蓄積され続け 1995 年 8 月現在で既に 46 名に達している（未発表データ）。本菌による感染症の続発防止のためには、今後とも広範囲に本菌の汚染実態を把握し、ヒトへの感染ルートを解明し地域住民への注意を呼びかける必要があると考えられる。

稿を終えるに当たり、検体採取にご協力を戴いた県内 11 保健所、十和田食肉衛生検査所、県畜産試験場、県家畜保健衛生所、七戸町役場の関係各位、更にはヒト由来 *Y. enterocolitica* 血清型 O 8 菌の分与を戴いた弘前市医師会立成人病臨床検査センター齋藤雅明先生、*Y. enterocolitica* の *ail* プライマーの分与を戴いた秋田県衛生科学研究所八柳潤先生に深謝します。

文 献

- 1) Ichinohe, H. et al.: First isolation of *Yersinia enterocolitica* serotype O: 8 in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 846-847, 1991.
- 2) 齋藤雅明, 他: 青森県弘前地区における *Yersinia enterocolitica* 血清型 O: 8 感染症 (1984~1991). 感染症学雑誌, **68**, 960-965, 1994.
- 3) 豊川安延, 他: 青森県野辺地町における *Yersinia pseudotuberculosis* 血清型 5 a 菌による集団感染症. **67**, 36-44, 1993.
- 4) Aulisio, C. C. G. et al.: Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 135-140, 1980.
- 5) Kanagawa, Y.: Drug susceptibility of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Contr. Microbiol. Immunol.*, **9**, 127-135, 1987.
- 6) Wauters, G.: Correlation between ecology, biochemical behavior and antigenic properties of *Yersinia enterocolitica*. *Contr. Microbiol. Immunol.*, **2**, 38-41, 1973.
- 7) Kandlo, K. et al.: Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms. *J. Clin. Microbiol.*, **21**: 980-982, 1985.
- 8) Laird, W. J. et al.: Correlation of autoagglutination and virulence of yersiniae. *J. Clin. Microbiol.* **11**, 430-432, 1980.
- 9) Higuchi, K. et al.: Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. VI. A differential plating medium for the estimation of the mutation rate of avirulence. *J. Bacteriol.*, **81**, 605-608, 1961.
- 10) 金子誠二: PCR法を用いた *Yersinia enterocolitica* と *Yersinia pseudotuberculosis* の疫学性評価とその応用. メディヤサークル, **37**, 22-26, 1992.
- 11) Nakajima, H. et al.: Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by improved polymerase chain reaction method. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2484-2486, 1992.
- 12) Iinuma, Y. et al.: Isolation of *Yersinia enterocolitica* serovar O: 8 from free-living small rodents in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 240-242, 1992.
- 13) Hayashidani, H. et al.: Potential sources of sporadic human infection with *Yersinia enterocolitica* serovar O: 8 in Aomori prefecture, Japan. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1253-1257, 1995.
- 14) Doyle, M. P. et al.: Isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* from porcine tongues. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 661-666, 1981.
- 15) Tsai, S. J. et al.: Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in pork products from northern Taiwan. *Contr. Microbiol. Immunol.*, **12**, 56-62, 1991.

Abstract

Isolation of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Serotype O8 from Domestic Pigs

Yoshimitsu OTOMO¹, Yasunobu TOYOKAWA¹,
Seiji KANEKO² and Tsutomu MARUYAMA³

Aiming at an epidemiological study on mass-infections with *Yersinia pseudotuberculosis*, serotype-5a, an investigation on the carrying of *Yersinia pseudotuberculosis/enterocolitica* was made of a total of a total of 151 samples including 83 from pork obtainable at stores, 50 from intestine contents of pigs, 10 mice, and 8 water samples from the environment. The isolated bacteria were as follows : 10 and 13 strains of *Y. enterocolitica* serotype O3 and O5, respectively from the pork samples, 2 strains of *Y. enterocolitica* serotype O3 and each 3 strains of the species serotype O5 and O8 from the porcine intestinal contents, and 3 strains of *Y. enterocolitica* serotype O5 and one of *Y. pseudotuberculosis*, serotype 5a from the mice. The isolation of *Y. enterocolitica* serotype O8 from domestic pigs was the first time in our country and all of the three O8 types isolated was pathogenic. Furthermore, the presence of *virF* gene on virulence plasmid, and *ail*, gene related to cell adhesion was confirmed in the above strains. The strain of *Y. pseudotuberculosis*, serotype 5a from the mice which were found to be non-pathogenic due to a lack of *virF*.

Key words : *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*, Serotype, virulence plasmid, PCR method

1 : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

2 : Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

3 : Institute of public Health

青森県で分離された新型コレラ菌, NAGビブリオO139の性状と その毒素遺伝子解析

大友 良光 長利 徳與¹ 三上 稔之 野呂キョウ 畑山 一郎

1994年2月, タイ旅行帰りの黒石市在住の女性(52才)の下痢便から新型コレラと称されるNAGビブリオO139菌が分離された。分離菌は電子顕微鏡による観察で1本の鞭毛を有する湾曲した典型的なコレラ菌の形態を示したが, 菌体とその周囲にはO1コレラ菌には見られないcapsule(菌体を覆うタンパク質)のものと思われる像が見られた。また, 分離菌は生菌, 加熱菌ともに抗O139血清に凝集し, 生物化学的性状も対照のコレラ菌株とほぼ一致した。さらに, 分離菌株はコレラ毒素(CT)を産生し, PCR法によりCT遺伝子(ctx)も確認された。このctxは制限酵素Hinf I処理により対照のコレラ菌と同様に3つのバンド(183bp, 136bp, 61bp)に切断された。

Key words: *Vibrio cholerae* O139, NAG *Vibrio*, cholera toxin, *ctx* gene, polymerase chain reaction

1. はじめに

コレラ菌(*Vibrio cholerae*)は菌体の細胞壁に存在する抗原の相異により138種類の血清型(O1-O138型)に分けられている。この中にはヒトに水溶性下痢を引き起こすコレラ毒素(CT)を産生する菌と産生しない菌がある。コレラ菌のうちCT産生のO1コレラ菌は有史以来ヒトに7回の世界的流行(パンデミー)を起こしている。一方, O1コレラ菌以外のものはNAGビブリオと総称され, そのCT産生菌はヒトに散発性の下痢症や腸管外感染症を起こすに止まっている。しかし, 1992年10月, インド南部の港町マドラスで発生したNAGビブリオによるコレラ様下痢症の流行は, わずか数ヶ月で南インドから北東インドのカルカッタまで広がり, 1993年1月にはバングラデシュをはじめ東南アジア一帯に拡大した¹⁾。この菌は既知の138種類の抗血清に反応しなかったためNAGビブリオO139と命名されたが, 伝染力, CT産生性などが従来のO1コレラ菌と全く差がないことから新型コレラ菌とも呼ばれている。この菌はわが国では1994年4月までに, インド亜大陸及び東南アジアからの航空機による帰国者7名から分離されている^{2) 3)}。このうち第4番目の分離例は本県におけるものである⁴⁾。今回は, この菌株について各種性状検査とコレラ毒素遺伝子の解析を行ったので報告する。

2. 材料と方法

2・1 供試菌株

1994年2月, 黒石市在住の女性(52才)の下痢便から

分離された菌株(VCN9428)を用いた。この菌株は, タイ国際航空便で成田に帰国した者の中にコレラ患者がおりその同乗車の一人が黒石市在住者であったことから黒石保健所で検病調査を行ったところ, 帰郷後下痢症を呈していたため検便を行った結果分離されたものである。対照菌株として, 国立予防衛生研究所から分与のO139菌株(VCN9429)と1984年から1993年までに本県で確認された4件のコレラ事例で分離された4株のO1コレラ菌⁵⁾(VC8412, VC9013, VC9117, VC9220)を使用した。

2・2 分離菌の諸性状検査

菌の形態は電子顕微鏡(JEM-1200EX II, 日本電子社)により観察した。生物化学的性状検査は定法によるほか, 市販の同定キット, アピ20E(bioMérieux SA社)を用いて行った。血清型の確認は市販血清(デンカ生研)と国立予防衛生研究所分与の抗O139血清を用い, 生菌並びに100℃で1時間の加熱菌についてスライド凝集法により実施した。

2・3 CT産生能とCT遺伝子(ctx)解析

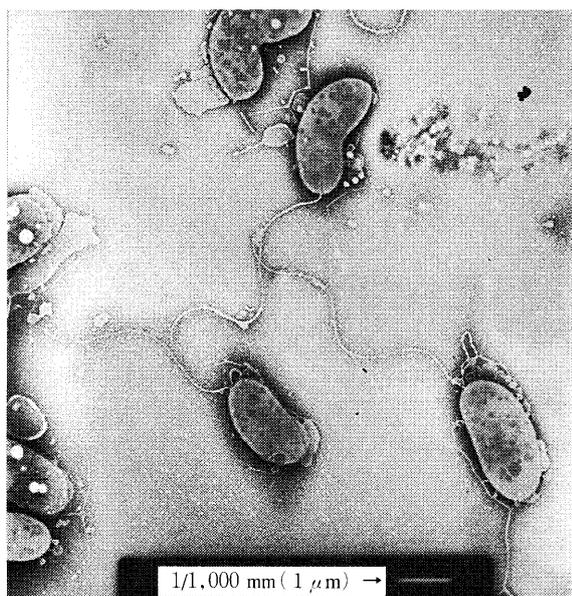
CT産生能検査はRPLAキット(デンカ生研)を用いて行った。CT遺伝子の解析は, 市販のプライマー(宝酒造社)を用いてPCR法によりctxを増幅し, それを制限酵素Hinf I(ニッポンジーン社)で切断し, 3%アガロースゲル電気泳動法を行い, 対照菌株の泳動パターンと比較した。

1: 黒石保健所

3. 結 果

3.1 分離菌の諸性状

電子顕微鏡による観察で分離菌株は1本の鞭毛を有する湾曲した典型的なコレラ菌の形態を示したが、菌体とその周囲にはO1コレラ菌にはないcapsule（菌体を覆うタンパク質）と思われる像がみられた（写真1）。分離菌の生物化学的性状は対照菌株と一致した（表1）。ま



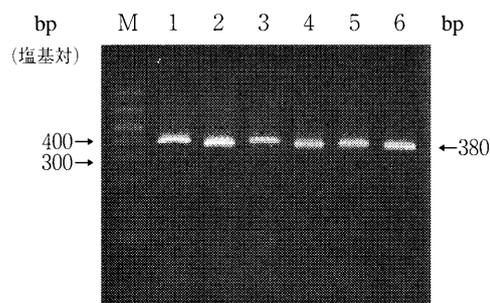
2%リンタングステン酸によるネガティブ染色

写真1 分離NAGビブリオO139の電子顕微鏡像

た、分離菌は生菌、加熱菌とも抗O139血清に凝集した。

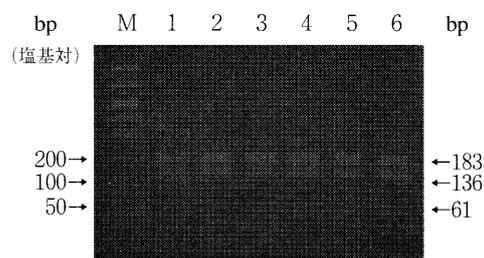
3.2 CT産生能とCT遺伝子(ctx)解析

供試菌株は全てCT産生能を有し、分離菌の毒素産生量は参考菌O139株と同一であった。PCR法により、すべて供試菌株は380bpのctxを持つことが確認され（写真2）、Hinf1処理によってもすべて3つのバンド（183bp, 136bp, 61bp）に切断された（写真3）。



M：マーカー（Bio Marker™ Low）
1：分離菌株
2：対照O139菌株
3-6：対照O1コレラ菌株

写真2 PCR法で増幅させたコレラ毒素遺伝子



M：マーカー（Bio Marker™ Low）
1：分離菌株
2：対照O139菌株
3-6：対照O1コレラ菌株

写真3 Hinf1によるコレラ毒素遺伝子切断パターン

表1 分離NAGビブリオO139菌の生化学的性状

菌株	ヒツジ赤血球溶血	ニワトリ赤血球凝集	VP反応	コレラ毒素産生	API20E同定コード, 血清型
NAG vibrio O139 (黒石株 '94)	+	+	+	+	5147124
NAG vibrio O139 (予研分与株)	+	+	+	+	5147124
<i>Vibrio cholerae</i> O1					
(野辺地株 '84)	+	+	+	+	5147124, El Tor OGAWA
(十和田株 '90)	+	+	+	+	5147124, El Tor INABA
(八戸株 '91)	+	+	+	+	5147124, El Tor OGAWA
(青森株 '93)	+	+	+	+	5147124, El Tor OGAWA

4. おわりに

1994年2月、青森県内で分離されたNAGビブリオO139菌株は、現在世界的な流行が懸念されている新型コレラ菌と同一の性状を示すことが判明した。このO139菌は、NAGビブリオが保有するcapsuleを持つ以外、諸性状も遺伝子構造もエルトル型O1コレラ菌とまったく差が認められていない。このため本菌は、1961年以來のコレラ第7次パンデミーの原因菌であるエルトルO1菌の変異したものと推測されており、この菌が今後第8次パンデミーを引き起こす可能性もあり、十分な監視が必要とされている。WHOではO139菌株による感染例をコレラとして扱っている。しかしながら、わが国ではNAGビブリオは食中毒の起因为菌として扱われ、しかもO139抗血清が市販されていないことから医療機関では単なる食中毒菌として処理される場合が考えられる。今回の本県の事例では、菌の迅速な同定によりコレラに準じた適切な対応が行われ、感染の拡大を阻止し得たが、今後十分な注意が必要である。

文 献

- 1) Albert, M, J.: *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2345-2349, 1994.
- 2) 倉園貴至, 他: *Vibrio cholerae* の新しい血清型O139の分離例について. *メディアサークル*, **39**, 355-358, 1994.
- 3) 国立予防衛生研究所, 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課: 〈特集〉コレラ. *病原微生物検出情報*, **15**: 121-122, 1994.
- 4) 国立予防衛生研究所, 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課: タイ旅行者からの *Vibrio cholerae* O139 分離 - 青森県. *病原微生物検出情報*, **15**, 76-77, 1994.
- 5) 大友良光: 青森県におけるコレラ発生状況について. *弘前医学*, **45**, 22-27, 1993.

Abstract

Characterization of NAG-Vibrio O139, a New Type Cholera Isolated in Aomori Prefecture and Gene Analysis of Its Toxin

Yoshimitsu OTOMO¹, Tokoy OSARI², Toshiyuki MIKAMI¹, Yasunobu TOYOKAWA¹,
Kyo NORO¹ and Ichiro HATAYAMA¹

A novel type *Vibrio cholerae* called NAG-vibrio O139 was isolated from watery stool of a 52-year old woman in Kuroishi City, who returned in February, 1994 from Thailand. Electro-microscopic observations revealed that the isolated strain had a flagellum and a curved shape specific to cholera. Also, some capsle-like pictures which could not be seen in cholera, type O1, were observed on and around the cell body. Both of the viable and heat-denatured cells of NGA-vibrio aggregated with anti-O139 serum and the biochemical properties of this strain were almost the same as those of the ordinary *V. cholerae* used as the control. The NAG-vibrio produced cholera toxin (CT) and the presence of CT gene (*ctx*) was digested by *Hinf* I, a restriction enzyme, it generated three fragments (183bp, 136bp and 61bp) similar to those from the control strain.

Key words: *Vibrio cholerae*, NAG vibrio O139, Cholera toxin, *ctx* gene, PCR method

1: Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

2: Aomori Prefectural Kuroishi Public Health Center

エコーウイルス感染によるアポトーシスの細胞レベルでの検出

三上 稔之 佐藤 孝 佐藤 允武 畑山 一郎

Biotin の代わりに digoxigenin (DIG) を用いた terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法の変法で, echovirus 9 (E9) 感染に伴うアポトーシスの誘導を細胞レベルで調べた。未感染GMK細胞におけるアポトーシス細胞の出現率は0.90%であった。10TCID₅₀のE9感染20時間後のアポトーシス細胞は2.56%で対照の2.8倍に, 100TCID₅₀では2.93%で3.3倍に, 1000TCID₅₀では5.46%で6倍に順次増加した。以上の結果, 本法はE9感染により早期に誘導される微量のアポトーシス細胞の定量的評価に有効であることを示す。

Key words : echovirus 9, apoptotic cell, TUNEL method.

1. はじめに

エンテロウイルス属のechovirus 9 (E9; Hill株) は, 特に乳幼児や低年齢の児童に経口感染し, 無菌性髄膜炎のような疾病を誘発して重篤な例も報告されている。E9の感染機構や宿主の反応機構の解明はウイルス学的重要性のみならず, 治療面における有効な情報を与えるものと考えられる。我々はin vitroでのE9感染により cytopathic effect (CPE; 細胞変性) に先立ちアポトーシスが誘導されることを電気泳動的にDNAの断片化として確認した¹⁾。しかし, この方法は, 感染細胞からDNAの抽出, DNAの定量, 電気泳動という数ステップの操作を必要とする他, 細胞全体の20%程度のアポトーシス細胞が存在しないと確認されないことから感染早期の微量のアポトーシス細胞の検出は困難であった。

最近, 細胞レベルでのアポトーシスの検出のための terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) -mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法²⁾ が多くの分野で利用されている。今回, 我々はbiotinの代わりに digoxigenin (DIG) を使用した方法³⁾ で, E9感染に伴うアポトーシスの誘導を検討した。

2. 材料と方法

試薬: Tissue Culture Chamber/SlidesはMILES社から, Eagleのminimum essential medium (EMEM) は日本製薬から, ApopTag; in situ apoptosis kitはoncor社から, 3, 3'-diaminobenzidineは和光純薬から, 牛胎児血清 (FBS) は大日本製薬から, ギムザ液メイグリンワルド染色液およびリリーマイヤーヘマトキシリンは武藤化学薬品から各々入手した。

ウイルス感染: 感染ウイルス量は50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) として表された。8 wellの

Tissue Culture Chamber/Slidesを用い, 10%FBSを含むEMEM中で 1.2×10^4 個のアフリカミドリザル腎細胞 (GMK) を5%CO₂, 37℃下で3日間培養した後, 1%FBSを含むEMEM中360μlに10,100および1000TCID₅₀のE9 (Hill株) を各40μl加えて5%CO₂, 35℃で感染実験を行った。感染20時間後の細胞をギムザ染色およびin situのアポトーシス検出に用いた。

ギムザ染色: 細胞をphosphate buffered saline (PBS) で洗浄, 乾燥後, メイグリンワルド染色液で5分間固定し, PH6.4に調整したギムザ液で50分間, 染色した⁴⁾。

アポトーシス細胞のin situ検出: 細胞は10%ホルマリン緩衝液で10分間の固定後, 自然乾燥された。以下の操作はApopTagを用いて行われた⁵⁾。スライド標本はPBSで5分間2回の洗浄の後, 20μg/mlのproteinase Kで15分間処理された。5分間の2%過酸化水素/PBSでの処理に続いてTdTによるdigoxigenin (DIG) 結合dUTPの3' DNA末端標識が37℃で60分間行われた。Peroxidase結合DIG抗体による30分の抗原抗体反応, 3, 3'-diaminobenzidineを基質とした発色反応の後, リリーマイヤーヘマトキシリンで対比染色を行った。アポトーシス細胞の出現率は1000個の細胞を観察して算出された。

3. 結果

E9のGMK細胞への感染により, 細胞破壊の形態的变化であるCPEが生ずるが, それに先立ち180bpを基本としたDNAのラダーが電気泳動的に確認された¹⁾。また図1に示すように, ギムザ染色では核の断片化を示す細胞の散在が認められた。しかし, 核断片化が認められる細胞の数は極めて低いため, ウイルス感染によるアポトーシス誘導の細胞レベルの計測にはギムザ染色は有効な方法ではなかった。

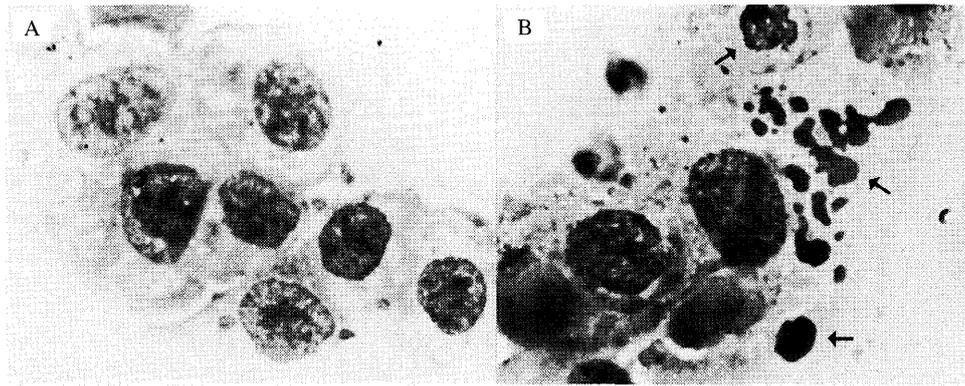


図1 ウイルス感染による核の形態変化

A; 未感染細胞 (ギムザ染色, 光顕800倍).
 B; 矢印はechovirus 9 感染による核の断片化およびクロマチンの凝集を示す (ギムザ染色, 光顕800倍).

そこで, DIGを使用したTUNEL法によりE9誘導アポトーシス細胞の検出を行った。未感染細胞 (図2 A) に対して1000TCID₅₀のE9感染20時間後の細胞は, 図2 Bのように茶褐色に染色される核を有する多くの細胞をもたらした。中には, 核変性に伴ってDNAが細胞に混入したため, 核と細胞質が共に反応を示す細胞も確認された。

次に10TCID₅₀, 100TCID₅₀および1000TCID₅₀のE9感染によるアポトーシス細胞の出現を計測した。感染20時間後のアポトーシス細胞の出現率を表1に示す。未感染を対照においても0.9%のアポトーシス細胞が観察されたが, 100TCID₅₀E9の感染では2.56%で2.8倍に, 10TCID₅₀では3.3倍に, そして1000TCID₅₀では5.46%の出現率で対照の6倍と順次増加した。これらの結果は, DIG使用

のTUNEL法はE9感染アポトーシスの細胞レベルにおける評価に有効であることを示す。

4. 考 察

DIGを用いたTUNEL法でE9感染によるアポトーシス細胞の検出に関して検討した。DNAラダーからみたアポトーシスの検出は, 細胞全体の20%以上のアポトーシス細胞の存在を要するため, E9感染で早期に生ずる微量の細胞レベルでのアポトーシスの評価には本法は極めて有効であることが確認された。しかし, TUNEL法はアポトーシスのみならず, DNAの複製や修復時の細胞をも検出するため, *in vitro*での増殖期の細胞での実験およびUV照射や活性酸素によるDNA切断実験では評価に

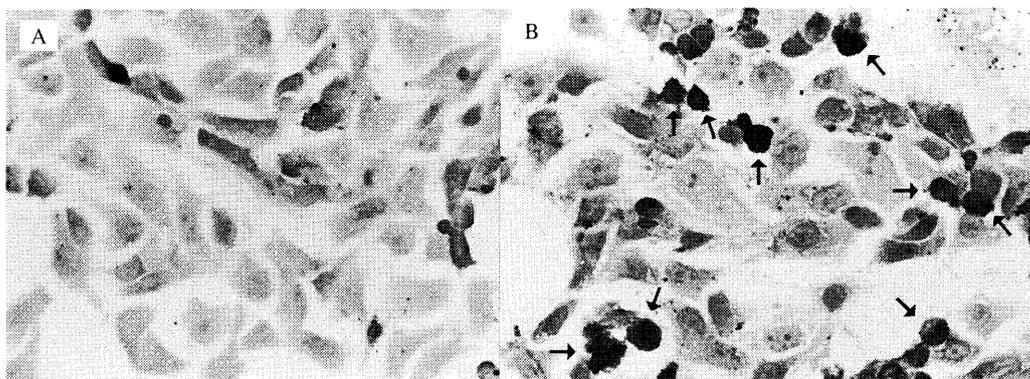


図2 E9 感染によるアポトーシス細胞の *in situ* 染色

A; 未感染細胞.
 B; echovirus 9 感染20時間後に *in situ* 染色を行い観察した。
 矢印は *in situ* 染色で茶褐色に反応しているアポトーシス細胞 (apoptotic cell) を示す (光顕800倍).

表1 アポトーシス細胞出現率

virus titer*	Apoptotic cell(%)	fold
—	0.90	1.0
10TCID ₅₀	2.56	2.8
100TCID ₅₀	2.93	3.3
1000TCID ₅₀	5.46	6.0

*50% Tissue culture infectious dose

注意を要する。我々は、buthionine sulfoximine (BSO) による細胞内酸化はE9感染に伴うアポトーシス誘導を顕著に抑制することを抽出DNAの電気泳動から明らかにしたが¹⁾ その抑制率の評価は困難であった。本法を適用することにより、BSOによるアポトーシスの抑制についての細胞レベルでの評価が可能となったため、TUNEL法によるBSOのE9誘導アポトーシスの抑制に関し現在検討を進めている。

文 献

- 1) 三上稔之, 他: エンテロウイルス感染によるアポトーシスの誘導, 青森県環境保健センター研究報告, **5**, 5-7, 1994.
- 2) Gavrieli, Y. et al.: Identification of programmed cell death In Situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, **119**: 493-501, 1992.
- 3) Gold, R. et al.: Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. *Lab Invest.*, **71**, 219-225, 1994.
- 4) Rovera, G. et al.: Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophagelike cells when treated with a phorbol diester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 2779-2783, 1979.
- 5) Manufacturer's instructions for ApopTag: In Situ Apoptosis Detection Kit (Oncor, Inc.).

Abstract

Detection of Apoptotic Cells Induced by Echovirus Infection

Toshiyuki MIKAMI¹, Takashi SATOH¹, Nobutake SATOH¹ and Ichiro HATAYAMA¹

Echovirus 9 (E9) -induced apoptosis was cytologically examined by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) method using digoxigenin (DIG) in place of biotin. The appearance of apoptotic cells was 0.9% in non-infected GMK cell. At 20 hr after the infection of 10, 100 and 1000TCID₅₀ of E9, the appearance rates were 2.8, 3.3 and 6.0-times of those of non-infected cells, respectively. It thus follows that since DIG-modified TUNEL method detects a few apoptotic cells, it should also be applicable to the quantitative evaluation of early induced apoptosis with E9 infection.

Key words : echovirus 9, apoptotic cell, TUNEL method

¹ : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

Norwalk virus 関連SRSV遺伝子検出法の検討

佐藤 允武 齋藤 幸一¹ 木村 淳子 三上 稔之 畑山 一郎 川名 林治²

冬季に集団発生する食中毒様ウイルス性胃腸炎のおもな病原の1つと考えられているNV関連SRSV遺伝子の検出について、散发の急性胃腸炎から得られたSRSVを用い、RT-PCR法で検討を行った。その結果、NV35, 36, 51, 3の4つのプライマーの組み合わせで検出率8%~80%の成績を得たが、これら4つを合わせた混合プライマーが84%と最も効率よくNV関連SRSV遺伝子を検出したことからスクリーニングとしてこの混合プライマーを用い、疑わしい検体を個別のプライマーで確認する方法が経済的、且つ、効果的と考えられた。

Key words : Acute Gastroenteritis, RT-PCR method, SRSV gene

1. はじめに

Small round structured virus (SRSV) は冬季に乳児の下痢症や急性胃腸炎からしばしば検出されるウイルスで、特に、最近では集団で発生する食中毒疑いの原因不明事例の重要な病原体として注目されてきており¹⁾、公衆衛生上、迅速な原因の究明が求められている。

現在のところ、当該ウイルスは細胞による培養が不能であることから検査には主として電子顕微鏡および血清学的なウェスタンブロット法が用いられているが、前者の形態観察では $10^9 \sim 10^{10}/\text{ml}$ のウイルス粒子が必要とされており²⁾、また後者では培養不能のためウイルスの確保が容易でないことに加え、検査時間を要するなど難点が多かった。

近年、微生物領域における検査法として遺伝子診断法が注目されてきていることから今回、我々は散发の急性胃腸炎から得たSRSVを用い、Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法の基礎的検討を行ったのでその結果について報告する。

2. 材料と方法

2・1 ウイルス材料とウイルスRNA抽出

小児科を受診して臨床的に急性胃腸炎と診断され、電子顕微鏡により、確認された便由来の25のSRSVおよびSRSVと同じRNAウイルスのカリシウイルス4、アストロウイルス2、エンテロウイルス3、ロタウイルス3の計4種12ウイルス材料を用いた³⁾。

電顕試料は図1に示すとおり、便を10~20%乳剤として遠心処理後、等量のダイフロン処理、さらに150,000×g

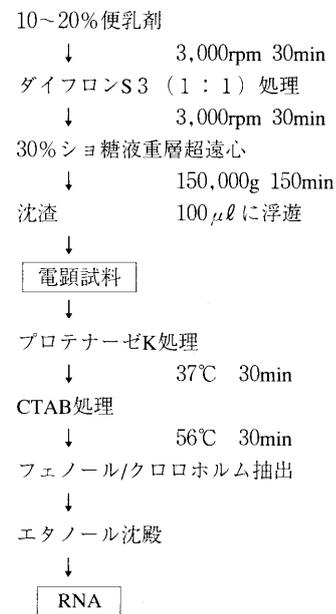


図1 電顕試料作成とウイルスRNA抽出

150minの超遠心操作で得られた。

ウイルスRNAは電顕試料を出発材料として、プロテナーゼK処理後、Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 処理を行い、フェノール/クロロホルム法により抽出された。

2・2 RT-PCR

図2に示すようにRNA PCR KIT (TAKARA) を用い、抽出RNAを鋳型として42°C 45分の逆転写酵素によりcDNAを合成後、これを図3に示すPCR試薬に加えて熱変性94°C 3分後、熱変性94°C 1分、アニーリングはプライマーにより40~53°C 80秒、合成72°C 1分の3ステップ

1 : 岩手県衛生研究所

2 : 社会保険いわて健康管理センター

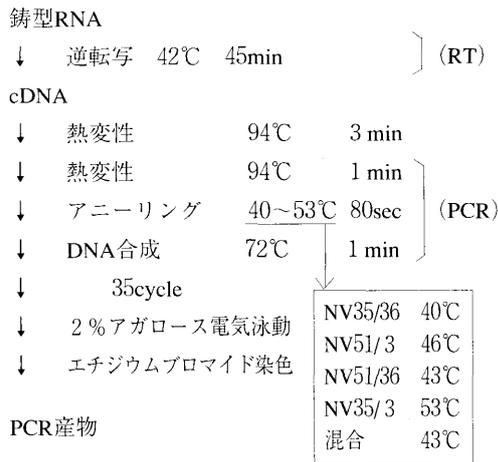


図2 RT-PCR法

を1サイクルとし35サイクルでcDNAの増幅を行った。

増幅後、PCR産物を2%アガロースで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色をおこないトランスイルミネーターで観察後写真撮影した。

プライマーはMoeら⁴¹⁾のNorwalk virus (NV) ポリメラーゼ領域の35/36, 51/3のほか、51/36, 35/3の組み合わせに加えて、上記の混合プライマーを使用した(図4)。これらプライマーによるPCR産物のサイズは混合プライマーを除き、上から470bp, 206bp, 404bp, 272bpである。

個別プライマー		混合プライマー	
H ₂ O	38.75 μ l	H ₂ O	36.25 μ l
10× Buffer	5.0 μ l	10× Buffer	5.0 μ l
dNTPs Mix (20mM)	0.5 μ l	dNTPs Mix (20mM)	0.5 μ l
プライマー-1 (40 μ M)	1.25 μ l	プライマー-1 (40 μ M)	1.25 μ l
プライマー-2 (40 μ M)	1.25 μ l	プライマー-2 (40 μ M)	1.25 μ l
Taq ポリメラーゼ (5 U/ μ l)	0.25 μ l	プライマー-3 (40 μ M)	1.25 μ l
cDNA	3.0 μ l	プライマー-4 (40 μ M)	1.25 μ l
計	50.0 μ l	Taq ポリメラーゼ (5 U/ μ l)	0.25 μ l
		cDNA	3.0 μ l
		計	50.0 μ l

図3 反応液の調整

2・3 サザンハイブリダイゼーション法

PCR産物の共通内部配列であるNV遺伝子4761~4790の30merのオリゴヌクレオチドの3'末端にDIG Oligonucleotide Tailing Kit (ペーリンガーマンハイム社)を用いてジゴキシゲニン (DIG) をテイリング法でラベルしてプローブとした。PCR産物の2%アガロースゲル電気泳動に続いて、ゲルのアルカリ処理によるDNAの変性、中和処理、ナイロンフィルターへの転写後、UV照射によるDNAのフィルターへの固定を行い、ハイブリダイゼーションに使用した。サザンハイブリダイゼー

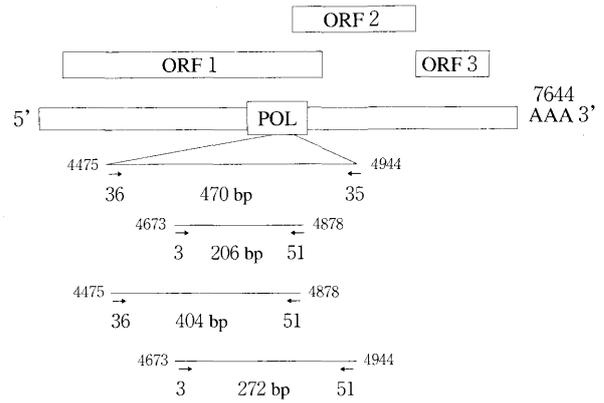


図4 ノーウォークウイルスのゲノムとプライマー

ションにはDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (ペーリンガーマンハイム社)を用いた。42°C16時間のハイブリダイゼーションに続いて、アルカリフォスファターゼ (AP) 結合DIG抗体による処理後、APの基質PPDとの発光反応をX線フィルム上で行った。

3. 結果

3・1 各種プライマーによるNV関連SRSV遺伝子の検出

用いたプライマーによるNV関連SRSV遺伝子の検出状況を不検出も含め5段階で表1に示した。

検出率は混合プライマーが84%、次いで、個別の51/36が80%、35/36が44%、51/3が40%、35/3が8%の

表1 各種プライマーによるNV関連SRSV遺伝子の検出

No.	Code No.	35/36 (470bp)	51/3 (206bp)	51/36 (404bp)	35/3 (272bp)	混合プライマー	電顕
1	GT-91-664	-	2+	1+	-	206 (2+) ※ ¹	2+※ ²
2	GT-91-698	-	-	1+	-	404 (1+)	3+
3	GT-92-667	-	2+	1+	-	206 (2+)	±
4	GT-92-9	2+	-	3+	-	404 (3+)	1+
5	GT-92-51	3+	2+	3+	-	404 (3+)	1+
6	GT-92-60	3+	3+	3+	3+	206 272 (3+)	2+
7	GT-92-68	-	-	2+	-	404 (2+)	±
8	GT-92-106	2+	1+	3+	-	404 (3+)	±
9	GT-92-115	2+	-	3+	-	404 (3+)	±
10	GT-92-193	1+	±	3+	-	404 (3+)	3+
11	GT-92-564	-	-	-	-	-	2+
12	GT-92-589	-	-	2+	-	404 (1+)	2+
13	GT-92-608	-	-	1+	-	-	2+
14	GT-93-32	2+	1+	3+	-	404 (3+)	1+
15	GT-93-35	2+	1+	3+	-	404 (3+)	2+
16	GT-93-57	-	1+	-	-	206 (1+)	2+
17	GT-93-66	-	-	-	-	-	±
18	GT-93-72	-	-	2+	-	404 (1+)	2+
19	GT-93-86	-	-	3+	-	404 (3+)	±
20	GT-93-93	1+	-	3+	-	404 (3+)	±
21	GT-93-115	-	-	-	-	-	±
22	GT-93-121	-	±	-	-	206 (2+)	±
23	GT-93-213	2+	1+	3+	-	404 (3+)	3+
24	GT-93-510	-	-	1+	2+	272 (2+)	2+
25	GT-93-526	3+	2+	3+	-	206~470(1~3+)	2+
検出率		11/25 (44%)	10/25 (40%)	20/25 (80%)	2/25 (8%)	21/25 (84%)	

※¹バンドサイズと染色度 ※²目視によるウイルス判定

順で、混合プライマーが最も高い検出率を示した。また、混合プライマーは51/36で特異的に検出されたNo13の1例を除いて、少なくとも1組のプライマーで増幅される検体をすべて検出した。しかし、検出されるバンドの多くは1本程度であった。

図5に検出頻度の低かった35/3プライマーを除いた10

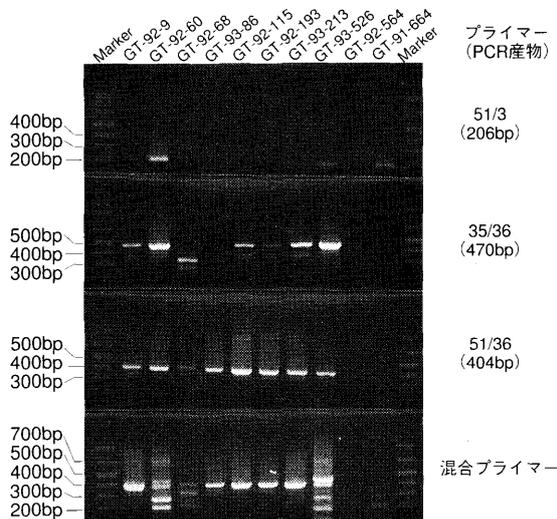


図5 各種プライマーによるNV関連SRSV遺伝子の検出

検体のプライマー別の結果を示した。35/36におけるGT-92-68の検体は検出バンドの位置からみて非特異的と考えられるが、検出検体の他のすべてはそれぞれの個別プライマーの目的とする位置にみられた。

また、混合においても一部非特異的のバンドが認められたが、多くは目的とする位置に検出された。

PCRの結果と電子顕微鏡観察によるウイルス粒子数とは表1に示すように総体的に相関しなかった。

3・2 カリシウイルス等4種12ウイルスのPCR

カリシウイルス等の計4種12ウイルスの混合および個別プライマー2組(51/3, 35/36)のPCR結果を図6に示した。

混合プライマーでは非特異的と考えられるバンドが一

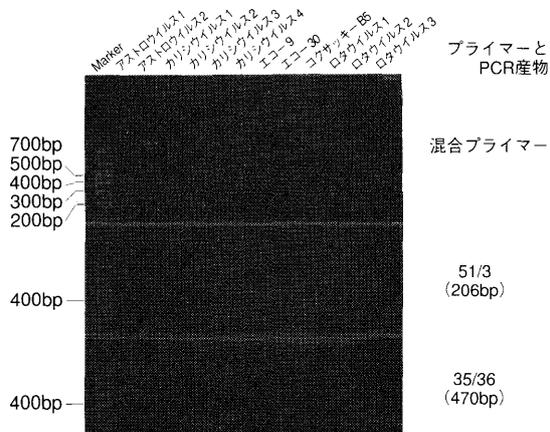


図6 カリシウイルス等12ウイルスのRT-PCR

部観察されたが、NVプライマーの標的とするバンドは4種12ウイルスにおいては認められなかった。

3・3 サザンハイブリダイゼーション

PCR産物の206bpサイズ2検体、272bp1検体、404bp2検体、470bp2検体の計7検体のサザンハイブリダイゼーションの結果を図7に示した。

7Aはアガロースゲルにおける電気泳動像、7Bはサザンハイブリダイゼーションの結果である。7Bにおける反応には強弱の差異が認められるものの、7検体のシグナルがすべて目標とする電気泳動像のそれぞれのバンドの位置に認められ、検出されているバンドが特異的であることが確認された。

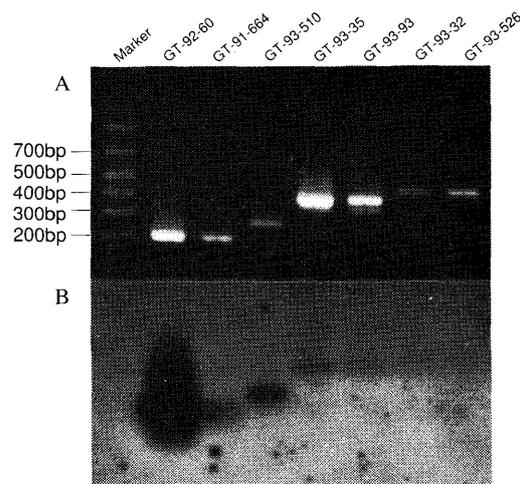


図7 サザンハイブリダイゼーション

4. 考 察

SRSVの検査は前述のように細胞培養系が確立されていないことから主に電顕やウェスタンブロット法によって行われているが、各々の検査法にはそれぞれ難点があるため、より簡便で感度のよい迅速検査法の開発が急務となっていた。

このような背景の中、微量の遺伝子を鋭敏に検出するPCR法が注目され⁵⁾、多くの研究者により応用されてこの一両年でSRSV検出についての研究報告はかなりみられるようになった。急性胃腸炎の複数の集団発生を対象とした調査研究では検出率が数%から数十%の幅広い数値の報告が多い^{11) 6) 7)}。その要因としてはSRSVの遺伝子的多型に加え、プライマーの種類および検体の善しあし等が考えられるが、特に、使用するプライマーが検出率に大きくかかわっているように思える。今回の散発患者由来のウイルス材料においてもプライマーによって8~80%と大きな差異が認められ、うち、51/36プライマーは検出率が80%と混合プライマーに匹敵するほど高かった。遺伝子的に多型と考えられるSRSVの検出に対して当該プライマーはかなり有用と考えられるが、しかし、

51/3で検出される検体で少数ではあるが不検出がみられたように1組のプライマーだけでの対応にはやはり限界があるように思われる。今回、プライマー35, 36, 51, 3の混合プライマーによるRT-PCRが最も効率よくNV関連SRSVを検出したことからスクリーニングとしてこの混合プライマーを用い、疑わしい検体を51/36などの個別のプライマーで確認する方法が最も経済的、且つ効率的と考える。

混合プライマーは個別プライマーが検出するバンドをすべて検出するわけではないが、少なくとも1組のプライマーで増幅される検体からは51/36の1例を除き、すべて検出したことから推測すると非常に有用と考える。

複数の個別プライマーが増幅する検体の混合プライマーによる検出バンドの数は多くは1本であるが、そのバンドについては表1の検出状況からおおよそ推測が可能であった。すなわち、複数の個別プライマーによって検出されるバンドにおいて染色度が同じぐらいの場合にはサイズの短い方を、明らかに差がある場合にはサイズに関係なく強く染色されるバンドを一般に検出する傾向にあった。

これはプライマーの結合部位となる鋳型の塩基配列の違いおよびPCR産物のサイズが関係していると考えられるが、この点については今後、各々のPCR産物のプライマー結合部位のシーケンスを行い、追究する予定である。

以上、電子顕微鏡で確認されたSRSV材料によるRT-PCR結果について考察したが、混合プライマーの検出率は多くの報告に比較して非常に高く良好であった。ウイ

ルス材料が散発の患者由来であることと3年間の東北地域で得たウイルスを対象としていることから推測すると、本法は少なくとも東北地方に浸淫している遺伝子的に多型なSRSVの検出には極めて有用であると考えられる。

文 献

- 1) Etsuko T. Utagawa et al.: Epidemiology of viral gastroenteritis outbreaks in Japan. International Symposium on viral Gastroenteritis, Sapporo, 1995.
- 2) 山口淳二: ウイルス実験学 総論, 国立予防衛生研究所学友会編, 改訂二版, 丸善株式会社, 東京, 1989.
- 3) 斎藤幸一: 小児急性胃腸炎の電顕的およびウイルス学的研究—特にsmall round structured virusの疫学的特徴—. 岩手医誌 46(2): 145-153, 1994.
- 4) Moe, CL et al.: Application of PCR detect Norwalk virus in fecal specimens from outbreaks gastroenteritis, *J. Clin. Microbiol.* 32 (3) 642-648, 1994⁵⁾.
- 5) 猪狩 淳: 臨床微生物学におけるPCRの役割. 臨床検査37 (2): 119-122, 1993.
- 6) 林 志直: 急性胃腸炎のウイルス検査. 検査と技術 23 (1) 33-40, 1995.
- 7) 岩崎 明 ほか: RT-PCR法を用いた急性胃腸炎患者からのSRSV検出状況. 第42回日本ウイルス学会総会, 東京, 1994.

Abstract

**Study on the Detection Method
for Norwalk Virus-related SRSV Gene**

Nobutake SATO¹, Koichi SAITO², Junko KIMURA¹, Toshiyuki MIKAMI¹,
Ichiro HATAYAMA¹ and Rinji KAWANA³

An investigation was made on a detection method using RT-PCR for the NV-related SRSV gene. This virus is regarded as one of the pathogens of viral gastroenteritis like food-poisoning which occasionally occurs during winter season. The SRSV gene isolated from sporadic acute gastroenteritis was used as the subject. The detection rates were in the range from 8 to 80 % for a combined use of primers, NV 35, 36, 51 and 3. When a mixed primer consisting of all four was used, the highest detection rate of 84% was obtained. Thus, we concluded that the method which samples were screened with mixed primer and followed by PCR with each primer, is a most economical and effective for screening of NV-related SRSV.

Key word : Acute Gastroenteritis, RT-PCR methods, SRSV gene

1 : Aomori prefectural Institute of Public Health and Environment

2 : Iwate prefectural Institute of Public Health

3 : Iwate Health Control Center of Social Insurance

Polymerase Chain Reaction 法による Human Immunodeficiency Virus - 2 の検出

佐藤 孝 三上 稔之 佐藤 允武 畑山 一郎

LTR, *env*, *pol* に対する primer を用いて, 検出用 DNA を鋳型とした human immunodeficiency virus-2 (HIV-2) の nested polymerase chain reaction (nested PCR) による迅速検出について検討した。LTR, *env*, *pol* 領域の primer は, HIV-1 とは結合せず HIV-2 DNA を特異的に増幅させた。LTR, *env*, *pol* の増幅 DNA 断片は, 理論値と一致して各々 374bp, 510bp, 337bp であった。特に *pol* 領域の PCR では 1 コピーの DNA が検出可能であった。また, digoxigenin (DIG) 標識した *pol* の PCR 産物をプローブとした southern hybridization により, PCR の検出感度はさらに増大したことから, 両法の併用は HIV-2 の検出に加えて HIV-1 と HIV-2 の鑑別に有効であることが判明した。

Key words : human immunodeficiency virus-2, polymerase chain reaction, southern hybridization.

1. はじめに

形態学的には human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) と極めてよく似ている HIV-2 は, 1986年に西アフリカで初めて確認された。HIV-2 は, HIV-1 と比べて感染後の発症時期は遅いが, 発症すれば HIV-1 同様, 重篤な経過をたどる。HIV-2 感染の確認検査としては, HIV-1 と同じように感染者血清によるウエスタンブロット法が主流であるが, その感度, 特異性が共に近年多くの分野で活用されている遺伝子検査法と比べて低いことから HIV-1 との鑑別は勿論のこと, HIV-2 感染の確認に関しても非常に困難であるのが現状である。また, 抗体価の低い感染ステージでのプロウイルス検索の必要性も踏まえて, HIV-2 遺伝子の迅速検出法の確立が望

まれている。我々は, 最近 polymerase chain reaction (PCR) による HIV-1 遺伝子の迅速検出法について報告した¹⁾が, 本研究では 3 組の primer セットを用いた nested PCR (二段階 PCR) 法による HIV-2 の遺伝子検出に関し検討した。また, digoxigenin (DIG) 標識プローブでの southern hybridization の特異性や検出感度に関しても検討した。

2. 材料と方法

試薬: アガロース LE はナカライテスクから, Taq DNA polymerase, dNTP, 50×TAE およびエチジウムブロミドは和光純薬から入手した。SepaGene は三光純薬, Hyperfilm-ECL は Amersham 社から購入した。DIG DNA

表 1 HIV-1 および HIV-2 の primer の塩基配列

	primer		sequence (5' → 3')	gene	size
HIV-1 プライマー	SK145A	outer	CCCACAAGATTTAAACACCA	gas	
	SK431A		TGAAGGGTACTAGTAGTTCC		
	SK145 ²⁾	inner	AGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT		
	SK431		TGCTATGTCAGTTCCTTGGTTCTCT		
HIV-2 プライマー	2LTR A ³⁾		CTGAGACTGCAGGGACTTCCAGAAGGG	LTR	374bp
	2LTR B		AAGCAGAAAGGGTCCTAACAGACCAGGGT		
HIV-2 プライマー	2EA ⁴⁾	outer	GCTAGGGTCTTGGGTTTTCTCGGCACAGCAGG	env	
	2EB		CAAGAGGCGTATCAGCTGGCGGATCAGGAA		
	2EC	inner	GGGATAGTGACAGCAACAGCAACAGCTGTTG		
	2ED		GGGAGGGGAAGAGAACACTGGCCTATA		
HIV-2 プライマー	2polA ³⁾	outer	AGGGGAGGCTATACATGGGCAAGTAAATGC	pol	555bp
	2polB		CTGCCTTCTCTGAAATAGACCCGAAAA		
	2polC	inner	CAGTACATGTTGCAAGTGGATTTATAGA		
	2polD		CTTCTTTTAAATTCATGCAATGAACTGCC		

2) Nucl. Acids Res., 18,999 (1990) 3) J. Virol., 65, 2816 (1991) 4) Nature, 358, 495 (1992).

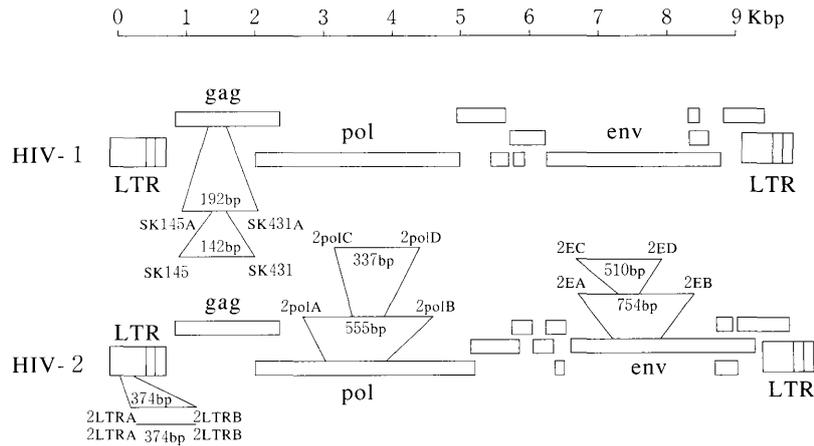


図1 HIV-1およびHIV-2の遺伝子地図

Labeling KitとDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic AcidsはBoehringer Mannheim社から、BioMarkerはフナコシから購入した。

鋳型DNAおよびprimer：検出用HIV-1およびHIV-2のDNAは、国立予防衛生研究所から恵与された。また、IFA用スライドガラスにアセトン固定されたHIV-1感染細胞からSepaGeneでDNAを抽出し鋳型として用いた。primerは、図1に示すようにHIV-1のgag、HIV-2のLTR、env、およびpolの領域が増幅されるように作成された。gag、env、pol領域の増幅はouter primerとinner primerを用いたnested PCRによるのに対し、LTRの場合は同じprimerを使用した2回PCRで行われた。HIV-1およびHIV-2の遺伝子地図とPCRによる増幅領域を図2に示す。PCR：nested PCRでのTaq DNA polymerase, dNTP, outerおよびinner primerの終濃度は、各々0.025U/ μ l, 200 μ M, 0.4 μ Mであった。鋳型DNAとして、検出用DNAの場合は1から20コピー、抽出DNAの場合は20ngを使用した。1st PCRは、全量50 μ lのシ

テムで変性93 $^{\circ}$ C (2分), アニーリング56 $^{\circ}$ C (2.5分), 合成71 $^{\circ}$ C (3分)を1サイクルとして30サイクルで行った。1st PCR終了後、5 μ lの反応溶液を2nd PCRに用いた。2nd PCRは、全量55 μ lのシステムで行ったほかは組成、温度、時間ともに1st PCRと同様であった。LTR領域の増幅に用いた2回PCRはnested PCRと同じ条件であった。PCRは、DNA増幅装置Twincubator (RIKOH KAGAKU)で行われた。

DNAのアガロース電気泳動：PCR終了後の5 μ lを0.5 μ l/ml ethidium bromide (EB)を含む2%アガロースによる電気泳動に使用した⁵⁾。泳動緩衝液として、上記濃度のEBを含む1 \times TAEを用いた。DNAサイズマーカーとしてBioMarkerを使用した。

southern hybridization：HIV-2 pol領域のPCR産物(337bp) 30ngをDIG DNA Labeling KitにてDIG標識したものをプローブとして用いた。電気泳動終了後のアガロースゲルの0.5N NaOH-1.5M NaCl処理でDNAを変性し0.5M Tris (PH8.0) -1.5M NaClで中和後10 \times

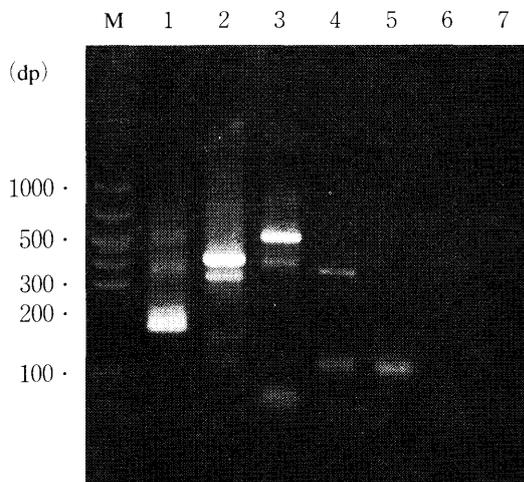


図2 Nested PCRによるHIV DNAの検出

各レーンにおける鋳型とprimerの組み合わせは以下のようである。M:DNAサイズマーカー, 1:HIV-1とgag primer, 2:HIV-2とLTR primer, 3:HIV-2とenv primer, 4:HIV-2とpol primer, 5:試薬コントロール, 6:HIV-2とLTR primer (1st PCR), 7:HIV-2とpol primer (1st PCR)。鋳型としてHIV-1は5ng DNA, HIV-2は20コピーを使用した。

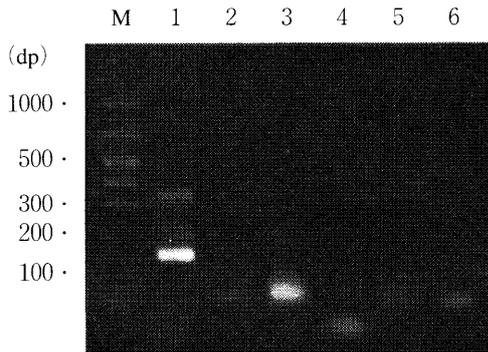


図3 PCRにおけるprimerの特異性

各レーンにおける鋳型とprimerの組み合わせは以下のようである。M;DNAサイズマーカー, 1;HIV-1とgag primer, 2;HIV-2とgag primer, 3;HIV-1とLTR primer, 4;HIV-1とenv primer, 5;HIV-1とpol primer, 6;試薬コントロール。鋳型の量は図2と同様であった。

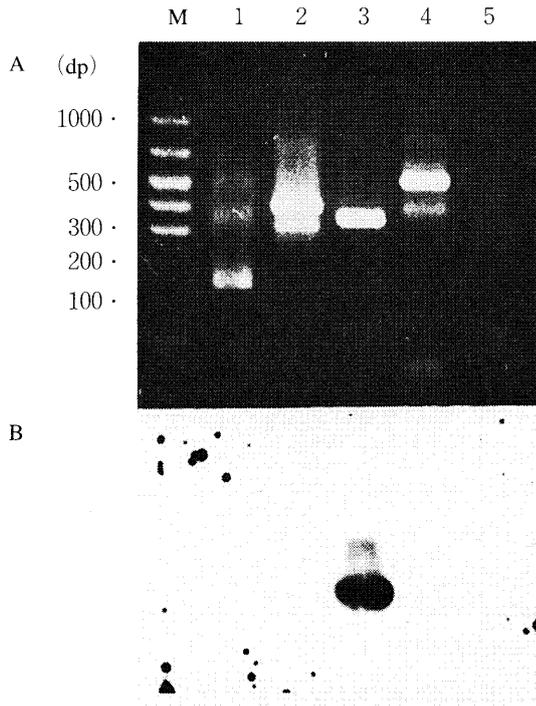


図4 Southern hybridizationによる増幅DNAの特異的検出

(A)アガロースゲルによるDNAの電気泳動。(B)DIG標識 pol primer増幅DNAをプローブとしたSouthern hybridization。

各レーンにおける鋳型とprimerの組み合わせは以下のようである。M;DNAサイズマーカー, 1;HIV-1とgag primer, 2;HIV-2とLTR primer, 3;HIV-2とpol primer, 4;HIV-2とenv primer, 5;試薬コントロール。鋳型の量は図1と同様であった。

standard saline citrate (SSC) でナイロン膜に転写した。

Boehringer Mannheim社の実験プロトコールに従ってDIG標識プローブ濃度10ng/mlで42℃, 15時間のhybridizationを行った。1×SSC-0.1%SDS溶液による68℃での洗浄後, DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acidsを用いてDIG抗体とアルカリフォスファターゼ複合体を利用したDNA検出が行われた。露光にはHyperfilm - ECLを使用した。

3. 結 果

HIV-1およびHIV-2のPCRの結果を図3に示す。HIV-1のgag領域のPCRは, lane 1のように142bpの増幅DNAのバンドを, またlane 2, 3, 4に示されるようにHIV-2のLTR, env, pol領域のPCRは各々374bp, 510bp, 337bpのバンドをもたらした。これらの結果は図1の理論値と一致する。HIV-2のLTRの1st PCR (lane 6)で

は微量の374bpのバンドが確認されたが, pol領域の場合(lane 7)には検出されなかった。次にprimerの特異性に関して検討した。HIV-2 DNAにHIV-1のgag領域増幅用primerを, またHIV-1 DNAにHIV-2の各々LTR, env, pol領域増幅用primerを使用してPCRを行った。結果は, 図4に示すように, いずれの場合にも特異的DNAの増幅は認められず, 上記primerはそれぞれのHIV DNAに特異的に結合することが確認された。

次に, southern hybridizationによるプローブの特異性および感度の増大に関して検討した。まず, DIG標識したHIV-2 pol領域のPCR増幅DNAをプローブとして, 図5AのHIV-1およびHIV-2増幅DNAについて解析したところ, 図5Bに示すようにHIV-2 pol領域PCRの増幅DNAのみが検出された。この結果からプローブの特異性が明らかにされ, 低濃度の増幅DNAの検出に本法が有効であることが判明した。そこで当該プローブを用い

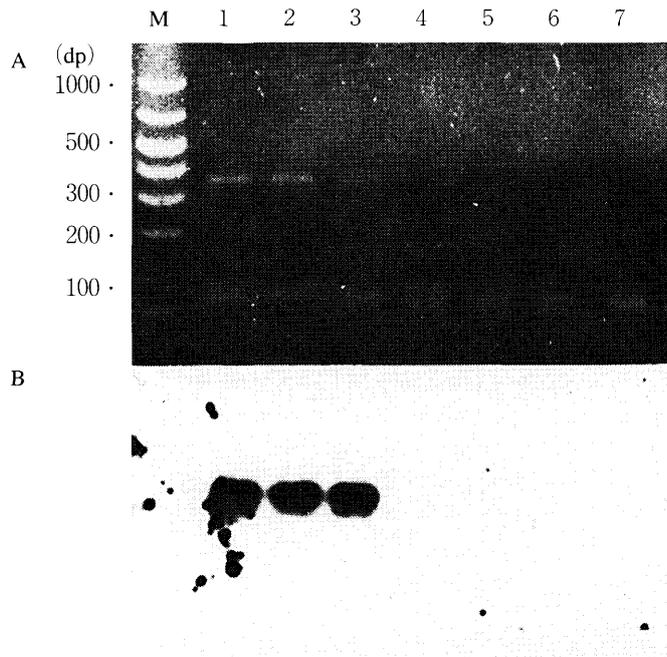


図5 Nested PCR および southern hybridization のHIV-2 検出感度

(A) アガロースゲルによるDNAの電気泳動。(B) DIG標識 *pol* primer 増幅DNAをプローブとした southern hybridization. 各レーンの内容は以下に示す. M; DNAサイズマーカー, 1; 20コピーの HIV-2, 2; 5 コピー, 3; 1 コピー, 4; 0.5 コピー, 5; 0.1 コピー, 6; 0.05 コピー, 7; 試薬コントロール

た southern hybridization の感度について調べた。図 6 A に ように *pol* 領域の PCR は、HIV-2 DNA が 1 コピー (lane 3) あれば検出可能であることを示す。しかし、5 ないし 20 コピーに比べて極めて薄いバンドであるのに対し、図 6 B に示すように southern hybridization では 1 コピーでも明瞭なシグナルを与えた。この結果は PCR に続く DIG 標識プローブによる southern hybridization は感度増大に有用な手法であることを示す。なお、0.5 コピー以下の PCR では DNA の増幅は確認されなかった。

4. 考 察

本研究結果は感染能欠損 DNA を鋳型とした実験ではあるが、LTR, *env*, *pol* 領域の PCR は HIV-2 遺伝子を特異的に増幅させたことから、AIDS 患者あるいは感染者に対しても充分活用できることを示唆する。また、DIG 標識プローブでの southern hybridization は、PCR の検出感度をさらに増大させた。このことは、PCR と southern hybridization の併用が HIV-2 の検出および現在使用されているスクリーニング検査や、確認試験のウエスタンブロット法では困難な HIV-1 と HIV-2 の型鑑別に極めて有効であることを示す。

HIV 感染においては、血中ウイルス粒子の増加、プロウイルスとしての潜在、HIV 抗体の上昇といった経時的变化が認められる。今回は、HIV DNA に関する PCR

でありプロウイルスを対象としたものだった。しかし実際の HIV 感染では抗体検査に加えてウイルス粒子の検出が重要となる。現在 reverse transcription-PCR (RT-PCR) による HIV RNA の迅速検出法に関して検討しているところである。

文 献

- 1) 三上稔之, 他: アセトン固定感染細胞からの HIV 遺伝子の検出. 青森県環境保健センター研究報告, **4**, 1-3, 1993.
- 2) Kwok, S. et al.: Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 999-1005, 1990.
- 3) Allan, J. S. et al.: Species-specific diversity among simian immunodeficiency viruses from African Green Monkeys. *J. Virol.*, **65**, 2816-2828, 1991.
- 4) Gao, F. et al.: Human infection by genetically diverse SIV_{SM}-related HIV-2 in West Africa. *Nature*, **358**, 495-499, 1992.
- 5) Sambrook, J. et al.: "Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd edition" 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Abstract

Detection of Human Immunodeficiency Virus-2 DNA by Polymerase Chain Reaction

Takashi SATO¹, Toshiyuki MIKAMI¹, Mobutake SATOH¹ and Ichiro HATAYAMA¹

The rapid detection of human immunodeficiency virus-2 (HIV-2) DNA was attempted by the nested polymerase chain reaction (nested PCR) with primers for LTR, *env* and *pol*. By nested PCR with these primers, only HIV-2 DNA was amplified specifically without amplification of HIV-1. Amplified DNA fragments of LTR, *env* and *pol* were 374bp, 510bp and 337bp, respectively, these values being consistent with theoretical size. Primer for *pol* could detect one copy of HIV-2 DNA. The sensitivity of PCR increased by southern hybridization with the digoxigenin (DIG) -labeled PCR product of *pol* as a probe. PCR and southern hybridization with DIG-labeled probe are thus shown useful for distinguishing HIV-1 from HIV-2 and for detecting HIV-2.

Key words : human immunodeficiency virus-2, polymerase chain reaction, southern hybridization

1 : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

青森県における温泉泉質経年変化 (1980-1989)

高橋 政教 桶田 幾代 野村 眞美 小林 英一
村上 淳子 平出 博昭 秋山由美子 木村 淳子
小林 繁樹 石塚 伸一 早狩 進

1980年4月から1989年3月の10年間、県内120源泉の泉質経年変化調査を実施した。その結果24源泉において療養泉泉質経年変化が認められた。また、トリリニヤードイアグラムを用いた領域区分では、20源泉がアルカリ非炭酸塩 (NaCl型) に属していたことから化石水の性質をもつ源泉は泉質変化する可能性が高いと推測される。また、これら泉質経年変化の要因としては降雨、海水位等の自然現象由来よりも、温泉の開発に伴う乱掘、過剰揚湯等の人為的要因に起因しているものと考えられる。温泉の源泉保護及び適正利用を図る目的で泉質経年変化について継続的に調査し、そのメカニズムについて究明する必要がある。

Key words : hot springs, lapse of years, trilinear-diagram

1. はじめに

本県は、全国でも有数の温泉に恵まれた県である。表1に示すように、平成6年度における源泉総数は954本で全国第5位、湧出量は143,449ℓ/分で第5位、温泉地数は127ヶ所で第3位となっている¹⁾。これらの温泉はレクリエーション及び医学的治療を目的として広く県民に利用されている。しかし、温泉の医学的治療は泉質によって異なるため、泉質が変化している場合には身体に重要な悪影響を及ぼす危険性がある。

一方、温泉はその複雑な湧出機構等により泉質が変化する可能性がある。そのため当所では、1980年より温泉の源泉保護と適正利用を図る目的で県内温泉の泉質経年変化調査を継続的に実施している²⁻¹⁰⁾。

今回、1980年から1989年の10年間に実施した県内温泉における泉質経年変化調査の結果について報告する。

2. 調査方法

2・1 対象源泉

対象は1980年4月から1989年3月の10年間当所で調査した120ヶ所の源泉。

2・2 調査項目及び調査方法

調査項目はpH、蒸発残留物、泉温、陽イオンとして、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、陰イオンとして Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 HCO_3^- 、遊離成分として CO_2 、 H_2S である。なお、泉温については10ヶ所の源泉で湧出箇所が密閉されているため測定できなかった。

現地調査および試験室における化学成分の分析は、環境庁自然保護局監修、鉱泉分析法指針¹¹⁾ (昭和53年5月改訂) に準じて行った。

3. 調査結果

3・1 調査源泉の地域分布

各源泉の調査地域分布を表2、図1に示した。県内63市町村中28市町村の120源泉について調査した。市町村別にみると岩木町が15ヶ所と最も多く、ついで五所川原市13ヶ所、青森市12ヶ所等の順であった。

表3に平成6年度末の県内市町村別源泉数を示した。市町村別にみると青森市が195と最も多く、ついで大鰐町128、平賀町62、岩木町58の順になっている。また、現在温泉のないのは蟹田町、市浦村、南郷村、階上町の4町村である。青森県においては弘前市を中心として南及び中津軽郡が温泉に恵まれており、東津軽郡及び三戸郡では温泉が少ない。

3・2 温泉の化学成分

(1) 泉温について

表4に鉱泉分析法指針による泉温の分類を示した。本県における温泉の特徴は高温泉の源泉が比較的多いことである。表1に示すように42度以上の高温泉は大分県では75.4%、鹿児島県64.8%、静岡県63.3%、ついで青森県61.5%となっている。本調査でも高温泉の源泉は79.1%と高い比率であった。地域別にみると、青森市及び南津軽郡においては高温泉の比率が高く、東津軽郡及び三戸郡では高温泉の比率は低い¹⁰⁾。

(2) pH値について

表5に鉱泉分析法指針による液性の分類を示した。本調査における源泉のpH値は中性が51.7%と最も多く、ついで弱アルカリ性が37.5%、弱酸性16.7%等の順であった。酸性泉は青森市の酢ヶ湯地域の源泉である。

(3) 溶存物質について

表1 温泉利用状況（平成6年度末）¹⁾

	温泉地数	源泉総数 (A+B)	利用源泉数 (A)		未利用源泉数 (B)		湧出量 (ℓ/分)		温度別源泉数		
			自噴	動力	自噴	動力	自噴	動力	25度未満	24度以上 42度未満	42度以上
大分県	54	4,621	1,048	2,883	273	417	85,696	152,638	62	614	3,482
鹿児島県	71	2,679	454	1,190	344	691	55,479	133,527	58	545	1,736
静岡県	80	2,259	109	1,196	53	901	16,512	112,896	84	314	1,452
北海道	206	1,989	509	789	374	317	153,259	139,010	158	391	1,062
熊本県	50	1,220	214	554	79	373	19,379	80,484	30	478	688
青森県	127	954	108	452	58	336	16,775	126,674	24	221	587
長野県	177	944	310	385	122	127	52,587	64,950	159	255	410



図1 調査源泉の地域分布

表6に鉱泉分析法指針による浸透圧の分類を示した。低張性源泉が77.5%と圧倒的に多く、次いで高張性源泉13.3%、等張性源泉9.2%の順であった。高張性源泉は

すべて塩化物泉であった。

(4) 泉質について

表7に鉱泉分析法指針による療養泉泉質による分類を示した。本調査では塩化物泉が52.6%と最も多く、ついで単純温泉（アルカリ性単純温泉も含む）の23.3%、硫黄泉9.2%、硫酸塩泉8.3%、炭酸水素塩泉及び鉄泉2.5%、酸性泉及び単純冷温泉0.8%であった。

なお、泉質が重複するものについては、本調査では特殊成分および陰イオンの主成分により分類した。（例：Na-Cl泉、Na-Cl・SO₄、Na・Ca-Cl・HCO₃泉等は塩化物泉、含S・Na-Cl泉は硫黄泉）。

3・3 療養泉泉質経年変化について

表8に療養泉泉質経年変化結果を示した。120源泉中24源泉に療養泉泉質変化が認められた。即ち、20%の高い割合で泉質変化が認められた。

地域別にみると青森市及び大鰐5ヶ所、碓ヶ関村2ヶ所等の順であった。

泉質変化が認められた源泉を泉質別に分類すると、塩化物泉が11ヶ所と圧倒的に多く、ついで硫黄泉4ヶ所、硫酸塩泉及び単純温泉3ヶ所等の順であった。

表2 調査源泉の地域分布

地域	調査箇所	地域	調査箇所	地域	調査箇所	地域	調査箇所
《市部》		《東津軽郡》		西目屋村	1	中里町	1
青森市	12	平館村	2	相馬村	1	柏村	1
弘前市	3	野辺地町	1	《西津軽郡》		《上北郡》	
八戸市	3	《南津軽郡》		岩崎村	1	上北町	4
五所川原市	13	大鰐町	8	鱒ヶ沢町	2	《三戸郡》	
黒石市	4	碓ヶ関村	9	深浦町	2	十和田湖町	3
十和田市	3	平賀町	11	《北津軽郡》		《下北郡》	
三沢市	10	《中津軽郡》		板柳町	1	風間浦村	2
むつ市	3	岩木町	15	鶴田町	1	川内町	2
						大畑町	1

表3 市町村別源泉数（平成6年度末）¹⁾

地 域	調査箇所						
《市 部》		岩 崎 村	3	《北津軽郡》		《三 戸 郡》	
青 森 市	195	稲 垣 村	5	鶴 田 町	9	脇 野 沢 村	1
弘 前 市	55	車 力 村	2	中 里 町	4	大 間 町	1
八 戸 市	31	柏 村	7	小 泊 村	3	川 内 町	8
五所川原市	31	鯡ヶ沢町	6	市 浦 村	0	佐 井 村	1
黒 石 市	45	深 浦 町	12	金 木 町	5	東 通 村	2
十 和 田 市	10	《中津軽郡》		板 柳 町	11	大 畑 町	18
三 沢 市	24	西 目 屋 村	5	《上 北 郡》		風 間 浦 町	10
む つ 市	15	岩 木 町	58	東 北 町	8	《下 北 郡》	
《東津軽郡》		相 馬 村	3	上 北 町	24	倉 石 村	1
平 内 町	2	《西津軽郡》		下 田 町	8	南 郷 村	0
蟹 田 町	0	平 賀 町	62	六ヶ所村	3	福 地 村	1
今 別 町	1	浪 岡 町	9	野 辺 地 町	7	新 郷 村	2
蓬 田 村	1	常 盤 村	2	七 戸 町	6	五 戸 町	2
平 館 村	2	田 舎 館 村	6	十和田湖町	15	三 戸 町	3
三 厩 村	1	碓ヶ関村	33	百 石 町	3	田 子 町	3
《南津軽郡》		藤 崎 町	6	天 間 林 村	3	名 川 町	1
木 造 町	6	大 鰐 町	128	横 浜 町	1	南 部 町	1
森 田 村	6	尾 上 町	6	六 戸 町	11	階 上 町	0

表4 泉温による分類

種 類	泉 温	源泉数	百分率(%)
冷 鉱 泉	25℃未満	0	0
低 温 泉	25℃以上34℃未満	10	9.1
温 泉	35℃以上42℃未満	13	11.8
高 温 泉	42℃以上	87	79.1

表5 液性による分類

種 類	pH	源泉数	百分率(%)
酸 性	3 未満	3	2.5
弱 酸 性	3 以上 6 未満	2	16.7
中 性	6 以上 7.5 未満	62	51.7
弱アルカリ性	7.5 以上 8.5 未満	45	37.5
アルカリ性	8.5 以上	8	6.6

表6 浸透圧による分類

種 類	溶存物質総量(g/kg)	源泉数	百分率(%)
低 張 性	8 未満	93	77.5
等 張 性	8 以上 10 未満	11	9.2
高 張 性	10 以上	16	13.3

これら泉質変化は、1) 特殊成分であるS、H₂S、Fe及びCuの変化によるもの9源泉、2) 陰イオンのSO₄²⁻、HCO₃⁻の変化によるもの9源泉、3) 蒸発残留物の変

表7 療養泉泉質による分類

泉 質 名	源 泉 数	百分率(%)
塩 化 物 泉	63	52.6
単 純 温 泉	28	23.3
硫 黄 泉	11	9.2
硫 酸 塩 泉	10	8.3
炭 酸 水 素 塩 泉	3	2.5
鉄 泉	3	2.5
酸 性 泉	1	0.8
含 銅 単 純 温 泉	1	0.8

化によるもの5源泉、4) 泉温の低下によるもの1源泉であった。

3・4 泉質変化した源泉の主要成分について

表9の1～2に泉質変化の認められた24源泉の泉温、蒸発残留物、Ca²⁺/Mg²⁺値、HCO₃⁻/Cl⁻+SO₄²⁻+HCO₃⁻値を示した。Ca²⁺/Mg²⁺値、HCO₃⁻/Cl⁻+SO₄²⁻+HCO₃⁻値は地下水の流動状況を推察する重要な指標である。これらの結果からNo.3、5、6、7、9、10、11、17、20、21の源泉においては地下水が混入しているものと推測される。特に、No.6、9、10の3源泉ではNa-Cl泉から単純温泉に泉質が変化しており、地下水混入による泉質変化の典型例である。

表8 療養泉泉質の経年変化した源泉

No.	調査地域	調査年月	泉 質 名	No.	調査地域	調査年月	泉 質 名
1	青森市	昭和37.9	含S・酸性Al・Ca・Mg-SO ₄ ・Cl泉	13	大鰐町	昭和46.5	Na・Ca-Cl・SO ₄ 泉
1'	〃	昭和55.9	含S・酸性Al・Fe(II)・Ca・Mg-SO ₄ ・Cl泉	13'	〃	昭和57.8	Na・Ca-Cl泉
2	青森市	昭和45.8	含S・酸性Al・Ca・Mg-SO ₄ ・Cl泉	14	大鰐町	昭和39.12	Na・Ca-Cl・SO ₄ 泉
2'	〃	昭和55.9	酸性Al-SO ₄ ・Cl泉	14'	〃	昭和57.8	Na・Ca-Cl泉
3	青森市	昭和38.10	Na・Ca-SO ₄ 泉	15	大鰐町	昭和39.12	Na・Ca-Cl・SO ₄ 泉
3'	〃	昭和56.9	Na・Ca-SO ₄ ・HCO ₃ 泉	15'	〃	昭和57.8	Na・Ca-Cl泉
4	青森市	昭和39.9	酸性Al・Ca・Mg-SO ₄ ・Cl泉	16	大鰐町	昭和39.12	Na・Ca-Cl・SO ₄ 泉
4'	〃	昭和55.9	含S・酸性Al・Fe(II)・Ca・Mg-SO ₄ ・Cl泉	16'	〃	昭和57.8	Na・Ca-Cl泉
5	青森市	昭和37.10	Na・Ca-SO ₄ 泉	17	大鰐町	昭和57.7	Na・Ca-Cl・SO ₄ 泉
5'	〃	昭和63.9	Na・Ca-SO ₄ ・HCO ₃ 泉	17'	〃	昭和60.6	Na・Ca-Cl泉
6	弘前市	昭和44.12	Na-Cl泉	18	黒石市	昭和50.10	Na-Cl・SO ₄ 泉
6'	〃	昭和56.9	単純温泉	18'	〃	昭和62.9	単純温泉
7	八戸市	昭和47.11	含Cu・単純温泉	19	岩木町	昭和34.7	含S・Ca・Na・Mg-Cl・HCO ₃ 泉
7'	〃	昭和56.4	単純温泉	19'	〃	昭和55.6	Na・Mg-Cl・HCO ₃ 泉
8	木造町	昭和53.4	Na-Cl・HCO ₃ 泉	20	鶴田町	昭和50.2	Na-Cl泉
8'	〃	昭和59.11	Na-Cl泉	20'	〃	昭和58.6	Na-HCO ₃ ・Cl泉
9	十和田市	昭和49.11	Na-Cl泉	21	鱒ヶ沢町	昭和41.5	Ca・Na-SO ₄ ・Cl泉
9'	〃	昭和61.1	単純温泉	21'	〃	昭和59.11	Na・Ca・Fe(II)-SO ₄ ・HCO ₃ ・Cl泉
10	三沢市	昭和54.7	Na-Cl泉	22	岩崎村	昭和47.11	単純温泉
10'	〃	平成元.5	単純温泉	22'	〃	昭和59.11	冷鉱泉
11	碓ヶ関村	昭和36.8	含Fe(II)Na-Cl泉	23	平館村	昭和35.9	単純温泉
11'	〃	昭和59.1	Na-Cl泉	23'	〃	昭和57.4	Na・Ca-SO ₄ 泉
12	碓ヶ関村	昭和40.8	含Fe(II)Na・Ca-Cl・HCO ₃ 泉	24	野辺地町	昭和39.6	含S・Ca-SO ₄ 泉
12'	〃	昭和62.8	Na・Ca-Cl・HCO ₃ 泉	24'	〃	昭和55.7	Ca-SO ₄ 泉

3・5 主要成分の経年変化について

表10に今回調査した120源泉の主要化学成分変化について示した。大きく変化した項目は泉温、蒸発残留物、Na⁺、Ca²⁺、Cl⁻、SO₄²⁻、HCO₃⁻である。

泉温についてみると、5℃以上上昇した源泉は5ヶ所に対して、下降は31ヶ所であり約30%の源泉で泉温が下降していた。

蒸発残留物では、増加した源泉は16ヶ所（12.5%）に対し、減少は60ヶ所（50%）であり蒸発残留物の変化が主要成分として最も著しかった。

一方、陽イオンではNa⁺の減少が著しく、ついでCa²⁺、Mg²⁺が減少していた。陰イオンではCl⁻の減少した源泉が最も多く、ついで、HCO₃⁻、SO₄²⁻の順で減少していた。特にNa⁺、Cl⁻の減少した源泉は40%以上であった。

3・6 トリリニャーダイアグラムについて

図2にトリリニャーダイアグラムによる領域区分を示した。トリリニャーダイアグラムの特徴は水質組成を領域区分できることである。

それぞれの領域の属する試料は次のような組成をもつ。

- I アルカリ土類重碳酸塩【Ca（HCO₃）₂型】
- II アルカリ重碳酸塩（NaHCO₃型）

III アルカリ土類非重碳酸塩（CaSO₄又はCaCl型）

IV アルカリ非碳酸塩（NaCl型）

普通の淡水はI、IIとこれに接する領域にあり、IIは被圧地下水的性質をもつ水が多い。IIIは鉱山、火山性の水に多くみられるタイプであり、IVは化石水的性質をもつ水に多く、その典型が海水である¹²⁾。

今回泉質経年変化した24源泉をこの領域区分で分類すると、IIIの領域が4源泉、IVの領域が20源泉であった。これらの結果から推察すると化石水的性質をもつ源泉は泉質経年変化する可能性が高いものと考えられる。

また、図2に泉質経年変化した24源泉中イオン組成変化の大きかった9源泉を示した。No.7及び20はIVからIIに、No.11はIIIからIVに、No.19はIIIからIIの領域を移行していた。

4. 考 察

1980年から1989年の10年間、県内120源泉について泉質経年変化調査の結果、24源泉に泉質変化が認められた。また、現在泉質変化していない源泉においても、泉温、蒸発残留物、Na⁺、Ca²⁺、Cl⁻、HCO₃⁻、SO₄²⁻等の項目が大きく変化していた源泉が多いことから、これらの源泉のいくつかは将来において泉質変化する可能性があ

表9-1 泉質変化した源泉の主要成分

項目	調査時期	検体 No.											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
泉温 (℃)	前調査	38.0	96.5	55.0	41.0	55.0	37.0	27.0	63.0	46.0	46.2	47.0	41.5
	本調査	63.0	89.5	47.0	41.0	54.1	35.7	26.0	45.0	41.0	-	43.7	42.1
蒸残 (g/kg)	前調査	2.45	8.34	1.61	2.79	1.61	3.99	0.77	9.73	4.71	1.65	12.2	6.06
	本調査	3.78	7.16	1.25	2.44	1.37	0.98	0.51	7.60	0.31	0.88	8.27	4.42
Ca ²⁺	前調査	4.31	1.34	4.77	1.48	4.77	1.53	3.90	1.76	11.7	3.73	0.69	5.31
	本調査	3.33	2.73	11.0	7.81	10.0	2.17	9.00	1.72	24.0	6.58	2.67	5.07
Mg ²⁺	前調査	4.31	1.34	4.77	1.48	4.77	1.53	3.90	1.76	11.7	3.73	0.69	5.31
	本調査	3.33	2.73	11.0	7.81	10.0	2.17	9.00	1.72	24.0	6.58	2.67	5.07
HCO ₃ ⁻ ×100	前調査	0	0	19.7	0	22.6	5.80	53.7	3.62	3.59	11.7	13.8	36.3
Cl ⁻ +SO ₄ ²⁻ +HCO ₃ ⁻	本調査	0	0	33.6	0	38.3	14.3	133	2.21	46.3	16.9	14.7	41.9

備考：－は測定不能

表9-2 泉質変化した源泉の主要成分

項目	調査時期	検体 No.											
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
泉温 (℃)	前調査	68.5	72.0	67.0	74.5	56.0	60.0	51.2	53.5	32.5	26.0	40.0	37.7
	本調査	56.0	58.0	59.0	59.8	50.0	54.1	52.5	39.0	31.0	23.0	40.0	38.0
蒸残 (g/kg)	前調査	1.78	3.32	1.80	2.82	1.50	1.18	2.53	20.1	2.55	0.23	0.53	1.64
	本調査	1.50	2.41	2.02	2.18	1.00	0.89	1.60	2.67	2.13	0.23	1.25	1.69
Ca ²⁺	前調査	24.3	32.8	28.2	50.8	29.2	16.5	1.88	1.38	8.56	16.5	0.02	1289
	本調査	29.2	25.2	24.6	29.4	31.5	13.4	1.09	1.12	13.8	13.4	1280	1042
Mg ²⁺	前調査	24.3	32.8	28.2	50.8	29.2	16.5	1.88	1.38	8.56	16.5	0.02	1289
	本調査	29.2	25.2	24.6	29.4	31.5	13.4	1.09	1.12	13.8	13.4	1280	1042
HCO ₃ ⁻ ×100	前調査	12.5	9.0	14.0	80.8	14.7	16.2	5.07	11.9	34.6	47.6	27.0	3.71
Cl ⁻ +SO ₄ ²⁻ +HCO ₃ ⁻	本調査	1.47	8.31	13.3	10.3	20.9	19.0	6.33	64.8	37.4	43.4	0	3.19

表10 主要化学成分の経年変化

項目	泉温 (5℃以上 変化した 源泉)	T・R (200mg/kg 以上変化 した源泉)	Na ⁺ (50mg/kg 以上変化 した源泉)	Ca ²⁺ (50mg/kg 以上変化 した源泉)	Mg ²⁺ (30mg/kg 以上変化 した源泉)	Cl (50mg/kg 以上変化 した源泉)	SO ₄ ²⁻ (50mg/kg 以上変化 した源泉)	HCO ₃ ⁻ (50mg/kg 以上変化 した源泉)
増加 (%)	5ヶ所 (4.5%)	15ヶ所 (12.5%)	16ヶ所 (13.3%)	6ヶ所 (5.0%)	6ヶ所 (5.0%)	6ヶ所 (5.0%)	9ヶ所 (7.5%)	15ヶ所 (12.5%)
減少 (%)	31ヶ所 (28.2%)	60ヶ所 (50.0%)	51ヶ所 (42.5%)	20ヶ所 (16.7%)	5ヶ所 (4.5%)	48ヶ所 (40.0%)	27ヶ所 (22.5%)	30ヶ所 (25.0%)

備考：TRは蒸発残留物

るものと予測される。

温泉水中の溶解成分は経時的に変化することはよく知られている。その主な原因は湧出量の変化に従属する二次的変化である。湧出量の変化をおこさせる例として、降雨、気圧、海水位、河川水位、湖沼水位、地下水位、揚水状況等の時間的変化が温泉水の地下における流動状況に変化を与え、それによって2種類以上の温泉水や地下水または海水との混合比が変動したり、あるいは地中での流速変化が化学成分の溶出機構に影響して、結果的に温泉水中の溶存成分の経時的変化として表れる¹³⁾。しかし、これらによる溶存成分変化は、一般的に可逆的なことが多く、これによって温泉の泉質が変化することは少

ないものと思われる。

一方、温泉の泉質は経年的にも変化する。その原因の最大なものは温泉開発に伴う乱掘、過剰揚湯などにより地下における流動状況や他の地下水の混合率変化によるものである¹³⁾。このような例は温泉の衰退現象として全国的に問題になっている¹⁴⁻¹⁷⁾。

本調査において泉質変化した24源泉中10源泉では、明らかに地下水が混入していたためと考えられる。これらの泉質変化は過剰揚湯等の人為的要因によるものと推測される。また、ガス成分であるH₂Sの消長は温泉水からガスの遊離、または、温泉源の変化等が考えられる。

温泉の泉質は湧出地の地質層によって決定される。津

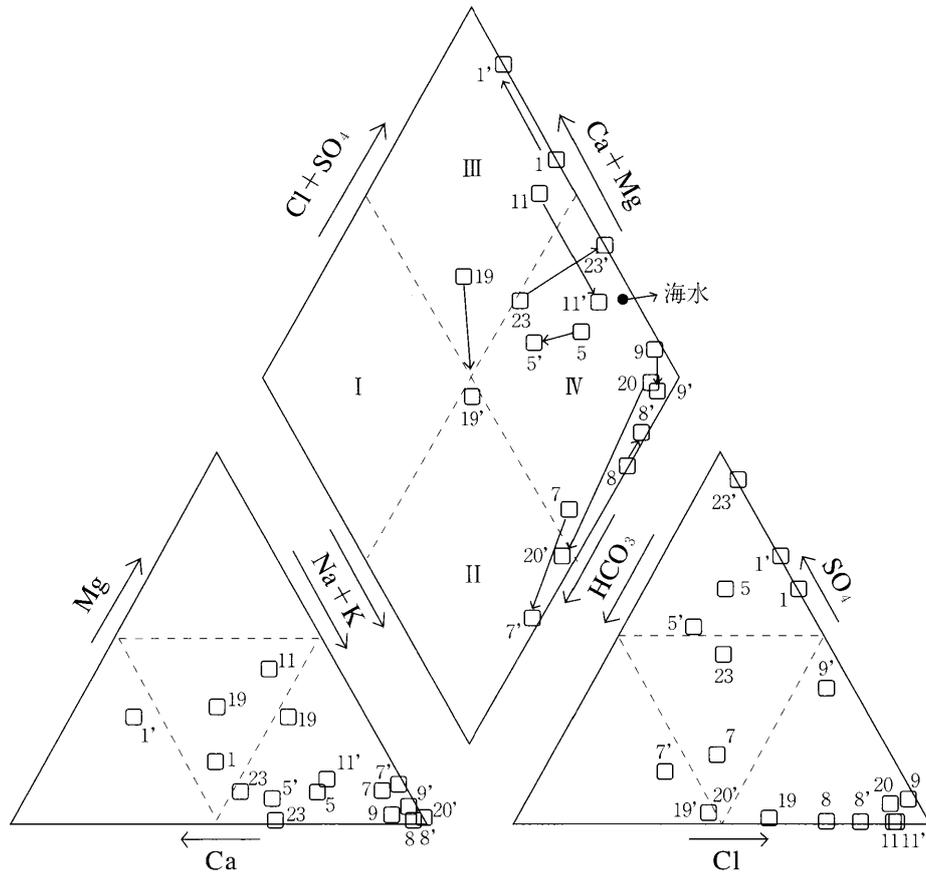


図2 トリリニヤーダイアグラム (meq・%)

軽平野全域及び小川原湖周辺（三沢市，十和田市等）の温泉の多くは，地質的に石油鉍床型（仮称）の温泉とされている。これらはいずれも塩分を多量に含み，いわゆる化石水の地下水が主体をなしているものと考えられている。そのため温泉水の補給機能が著しく劣るため，長期間の揚湯による地下水混入，あるいは枯渇の可能性があると報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。本調査においても，泉質変化が認められた源泉の大部分は，石油鉍床型の温泉であった。

昭和53年5月15日付環境庁自然保護局施設整備課長通知により，温泉の再分析については，おおむね10年ごとに見直しすることが妥当であるとされている。これに従って多くの県では10年ごとに再分析することを行政的に指導している。本県においても，同様に指導することが望ましいと考えられる。また，温泉所有者に対して温泉は泉質変化する可能性があることを認識させ，同時に温泉の源泉保護及び適正利用を図ることを啓蒙させなければならない。

5. ま と め

1980年から1989年の10年間，当所で実施した県内温泉の泉質経年変化について検討したところ次のとおりであった。

- (1) 120ヶ所の源泉中24ヶ所の源泉において泉質経年変化が認められた。これら泉質変化は，1) 特殊成分であるS, H₂S, Fe及びCuの変化によるもの9源泉，2) 陰イオンのSO₄²⁻, HCO₃⁻の変化によるもの9源泉，3) 蒸発残留物の変化によるもの5源泉，4) 泉温の低下によるもの1源泉であった。
- (2) 地域別にみると，青森市の源泉が最も泉質変化しており，ついで大鰐町，碓ヶ関村の順であった。
- (3) 120源泉についてみると，泉温の下降した源泉は31ヶ所，蒸発残留物の減少した源泉が60ヶ所あり，これらの多くの源泉では地下水が混入しているものと考えられる。
- (4) 主要化学成分についてみると，陽イオンではNa⁺が減少した源泉が51ヶ所，陰イオンではCl⁻が減少した源泉が48ヶ所と最も多かった。

- (5) 泉質経年変化した24源泉についてトリリニャーダイヤグラム領域区分で分類すると、化石水の性質をもつ源泉が多かった。

謝 辞

本調査にご協力いただいた県自然保護課および各保健所担当者の方々に深く感謝致します。

文 献

- 1) 環境庁自然保護局施設整備課：都道府県別温泉利用状況（平成6年3月末現在）
- 2) 高橋政教，他：青森県の温泉経年変化について（第一報），青森県衛生研究所報，**18**，33-37，1981.
- 3) 高橋政教，他：青森県の温泉経年変化について（第二報），青森県衛生研究所報，**19**，28-32，1982.
- 4) 野村眞美，他：青森県の温泉経年変化について（第三報），青森県衛生研究所報，**21**，28-33，1984.
- 5) 秋山由美子，他：青森県の温泉経年変化について（第四報），青森県衛生研究所報，**23**，22-26，1986.
- 6) 小林繁樹，他：青森県の温泉経年変化について（第五報），青森県衛生研究所報，百沢地域温泉の現状と経年変化，**24**，18-23，1987.
- 7) 小林繁樹，他：青森県の温泉経年変化について（第六報），青森県衛生研究所報，**25**，28-33，1988.
- 8) 石塚伸一，他：青森県の温泉経年変化について（第七報），一多変量解析法による八甲田山地域温泉群の比較及び経年変化の検討一，青森県衛生研究所報，**26**，11-34，1989.
- 9) 石塚伸一，他：青森県の温泉経年変化について（第八報），一小川原湖周辺地域温泉群の泉質経年変化の検討一，青森県環境保健センター研究報告，**1**，44-60，1990.
- 10) 高橋政教，他：青森県の温泉泉質経年変化（第九報），一津軽地域の温泉群の泉質経年変化について一，青森県環境保健センター研究報告，**4**，23-37，1993.
- 11) 環境庁自然保護局監修：鉱泉分析法指針（改訂），温泉工学会，1978.
- 12) 地下水ハンドブック編集委員会編：地下水ハンドブック，367，建設産業調査会，東京，1979.
- 13) 湯原浩三，瀬野錦蔵：温泉学，177-181，地人書院，東京，1977.
- 14) 益子安，他：温泉水の過剰摂取と枯渇現象について（その2）一湯ヶ島温泉および周辺地域の温泉について一，温泉工学誌，**11**，1-22，1976.
- 15) 辻沢広，他：白浜温泉の経年変化について，和歌山県衛生研究所年報，**24**，63-69，1978.
- 16) 渡辺啓司，他：県内温泉の衛生化学的研究(1)，東山温泉の泉質について，福島県衛生公害研究所報，**27**，49-57，1979.
- 17) 田中勝美，他：滋賀県における温泉の泉質について，滋賀県環境衛生センター，**16**，120-125，1981.
- 18) 青森県環境保健部：青森県津軽平野地域における温泉群の研究，24-25，1980.
- 19) 青森県環境保健部：温泉ゆう出地基礎調査委託業務報告書（野辺地町・東北町・七戸町），1-8，1988.
- 20) 青森県環境保健部：温泉ゆう出地基礎調査委託業務報告書（三沢市・下田町・百石町・八戸市），51-58，1992.

Abstract

Water quality change of hot springs with the lapse of year in the Aomori Prefecture (1980—1989)

Masanori TAKAHASHI¹, Ikuyo OKETA¹, Masami NOMURA¹,
Eiichi KOBAYASHI¹, Atsuko MURAKAMI¹, Hiroaki HIRAIDE¹,
Yumiko AKIYAMA¹, Junko KIMURA¹, Shigeki KOBAYASHI¹,
Shin-ichi ISHIZUKA¹ and Susumu HAYAKARI¹

An examination on water quality change of hot springs with the lapse of year on 120 spring sources in this prefecture has been carried out for 10 years since April 1980 through March 1989. As a consequence, in 14 spring sources, a spring water quality change in the recuperation spring with the lapse of year was recognized. In addition, in a territorial division using the trilinear diagram, because 20 spring sources belonged to the alkaline non-carbonate type (NaCl type), it is made a guess that the spring sources with a nature like a fossil water has a high possibility of spring water quality change. In addition, as the factors of spring water quality change with the lapse of year, it is thought they are originated from the artificial factors such as a reckless excavation, excessive pumping up of hot spring and so forth accompanied with a development of hot spring, rather than they are originated from the natural phenomena like the rain fall, sea water level and so on. For a purpose of aiming at the spring source protection and proper utilization of hot spring, it is required for examining the spring water quality change successively and investigating its mechanism.

Key words : hot springs, lapse of year, trilinear-diagram

¹ : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

GPCクリーンアップを用いた食品中の残留農薬分析法の検討

古川 章子 高橋 政教

食品衛生法改正に伴う規制対象農薬及び農産物の増加に対処するため、75農薬（有機塩素系、有機リン系、含窒素系、ピレスロイド系）の多成分一斉分析法について検討した。抽出からクリーンアップまでの操作を一本化し、さらにクリーンアップ法としてGPC（ゲル浸透クロマトグラフィー）を用いた結果、妨害物質である色素、脂肪等の除去も容易で、操作も簡略化出来た。

この方法をりんご、玄米、しじみ貝に適用した結果、含窒素系の5農薬（ピリミカール、エチオフェンカルブ、メトリブジン、クロフェンテジン、プロバモカルブ）では50%未満の低い回収率であったが、その他の農薬ではすべて60%以上の回収率が得られ、多成分一斉分析法として十分適用出来るものと考えられる。

Key words : simultaneous analysis, residual pesticides, gel permeation chromatography

1. はじめに

食糧供給における輸入食品の割合は、カロリーベースで見ると平成5年には63%となり、我々が摂取する食品の半分以上が輸入食品に依存している状況にある。

このような状況に対処するため、農薬の規格基準は平成4年以降順次改正され、現在130種類以上の農産物について108農薬の基準が設定されている。この基準は今後も更に増加する見込みである。

農薬の分析については、試験法が告示されているが¹⁻⁵⁾、これらの方法は基本的には個別分析法であり、その数も50種余りの多岐にわたるため、この様な多数の農薬の検査を行うには限られた人員と分析機器では不可能である。したがって、分析法の省力化及び迅速化を図ると共に、多成分一斉分析法の開発が必要である。

分析法の省力化及び迅速化の障害となる要因の1つとして、食品に由来する色素や油脂成分等妨害物質の除去法があげられる。従来、クリーンアップ法としてはアセトニトリル・ヘキサン分配、凝固法、シリカゲル等吸着剤によるカラムクロマトグラフィー等が多用されてきたが、煩雑な操作やエマルジョンの発生等から長時間を要したり、脂質類の除去効果が不十分である等検討すべき点も多かった。

近年、多成分一斉分析のためのクリーンアップ法としてゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）の有用性が多数報告されている⁶⁻¹¹⁾。そこで、告示法では農薬の系統毎に異なっている抽出からクリーンアップまでの操作を一本化し、さらにクリーンアップ法としてGPCを用いることを前提として多成分一斉分析法の検討を行った。その結果、若干の知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2・1 試料

玄米、りんご、しじみ貝の3種類を用いた。

2・2 試薬

(1) 農薬標準品

ア 有機塩素系農薬 (17) : α -、 β -、 γ -、 δ -BHC, pp'-DDE, pp'-DDT, pp'-DDD, エンドリン, デイルドリン, アルドリン, ヘプタクロル, ヘプタクロルエポキシド, キャプタン, ジコホール, ジクロフルアニド, カプタホール, クロルベンジレート

イ 有機リン系農薬 (25) : EPN, エディフェンホス, エトプロホス, エトリムホス, キナルホス, クロルピリホス, クロルピリホスメチル, α -クロルフェンビンホス, β -クロルフェンビンホス, ジクロルボス, ジメトエート, ダイアジノン, テルブホス, トリクロルホン, パラチオン, パラチオンメチル, フェニトロチオン, フェンチオン, フェントエート, ホサロン, マラチオン, プロチオホス, フェンスルホチオン, ピリミホス, チオメトン

ウ ピレスロイド系農薬 (10) : シハロトリン, シベルメトリン, デルタメトリン, トラロメトリン, ピレトリン, フルシトリネート, フルバリネート, ペルメトリン, フェンバレレート, シフルトリン

エ 含窒素系農薬 (23) : アルジカルブ, エチオフェンカルブ, オキサミル, カルバリル, クロルプロファム, チオベンカルブ, ピリミカール, フルトラニル, プレチラクロール, ベンダイオカルブ, ペンディメタリン, メトリブジン, メプロニル, キノメチオネート, クロフェンテジン, ジエトフェンカルブ, ビテルタノール, プロバモカルブ, プロピコナゾール, メフェナセット, イソ

プロカルフ、エスプロカルフ、レナシル

これらの標準品は和光純薬㈱、林純薬㈱、ジーエルサイエンス㈱及びナノゲン社製を用いた。

(2) 農薬標準溶液

各農薬の1000ppmアセトン溶液を作製し、これらを原液とした。検量線用標準溶液は、系統別に原液を混合し、次のような濃度範囲にアセトン又はヘキサンで適宜希釈して調製した。

有機塩素系

(0.1-0.2) ~ (0.01-0.02) ppm, ヘキサン溶液

有機リン系

(0.25-1.25) ~ (0.025-0.125) ppm, アセトン溶液
含窒素系

(1.0-6.0) ~ (0.1-0.6) ppm, アセトン溶液

ピレスロイド系

(0.2-3.0) ~ (0.02-0.3) ppm, ヘキサン溶液

また、添加回収試験には、検量線用標準溶液の2倍濃度のアセトン溶液を調整し、その1mlを添加した。

(3) コーンオイル：市販品をGPC溶出液で希釈して用いた。

(4) クロロフィル：和光純薬㈱のクロロフィルオイルをGPC溶出液で希釈して用いた。

(5) β -カロチン：和光純薬㈱特級試薬をGPC溶出液で希釈して用いた。

(6) 各種有機溶剤及び無水硫酸ナトリウム：和光純薬㈱の残留農薬試験用を用いた。但し、シクロヘキサンは液体クロマトグラフ用を用いた。

(7) フロリジルミニカラム：フロリジルセップバックプラス（ウォーターズ）

(8) ろ過助剤（セライト545）：和光純薬㈱

(9) 塩化ナトリウム：関東化学㈱の残留農薬試験用

2・3 装 置

(1) ガスクロマトグラフ

ア 本体：㈱島津製作所製，GC-14A（FPD，FTD，ECD検出器）

イ データ処理装置：㈱島津製作所製，C-R 5 A

ウ キャピラリーカラム：DB-1，DB-17，DB-210，CBJ-608

(2) GPC装置

ア 送液ポンプ：日立製作所製，655A-11型液体クロマトグラフ

イ 検出器：日立製作所製，L-4200紫外-可視検出器

ウ データ処理装置：日立製作所製，833Aデータプロセッサー

エ カラム：ジーエルサイエンス㈱製，内径20mm×長さ500mm（ステンレス製）

オ 充填剤：バイオラッド社製 Bio-Beads S-X 3（200~400メッシュ）

カ 移動相：シクロヘキサン/ジクロロメタン（1：1）混液

(3) バイオトロン：ヤマト ウltraデスパーサー LK-21

(4) ロータリーエバポレーター：ヤマトRE-51

(5) セップバックバキュームマニホールド（減圧型）：ウォーターズ

2・4 試験溶液の調製法

図1に分析のフローを示した。

(1) 抽出操作

均一化した試料25gをとりアセトン100mlを加えてバイオトロンで3分間攪拌抽出し、ろ過助剤4gを積層したロートで吸引ろ過した。残留物にアセトン100mlを加えて同様に処理した後、ろ液を合わせてロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。

濃縮液に15%塩化ナトリウム溶液100ml及びジクロロメタン50mlを加え、5分間振とうした。

ジクロロメタン層を分取後、水層にジクロロメタン50mlを加えて同様に処理し、有機層を合わせて、無水硫酸ナトリウム30gを充填したカラムで脱水した。次いで、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、窒素気流中で乾固した後、ジクロロメタン/シクロヘキサン（1：1）混液を加えて2.5mlとした。不溶物のある場合は遠心分離を行い、上清を用いた。

なお、玄米については抽出溶媒は30%含水アセトンを用い、リン酸3mlを加えて抽出した。また、しじみ貝については試料量は10gとした。

(2) GPCによるクリーンアップ操作

溶出溶媒はジクロロメタン/シクロヘキサン（1：1）混液を用い、その流量は5ml/minとした。

上記濃縮液の2mlをGPCカラムに注入し、最初の溶出液80mlは廃棄し、つぎの溶出液90mlを分取した。

ただし、しじみ貝については、有機塩素系15農薬のみの測定であったため、最初の溶出液100mlは廃棄し、つぎの溶出液70mlを分取した。

分取した溶液はロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、窒素気流中で乾固した後アセトン2mlに溶解してリン系及び含窒素系農薬のGC分析をおこなった。

(3) ミニカラムによるクリーンアップ操作

塩素系及びピレスロイド系農薬については、検液のアセトン1mlを乾固させた後、15%酢酸エチル/ヘキサン混液1mlに溶解しフロリジルミニカラムに負荷した。次いで同溶媒による溶出液10mlを分取し、乾固後ヘキサン1mlに溶解してGC分析を行った。

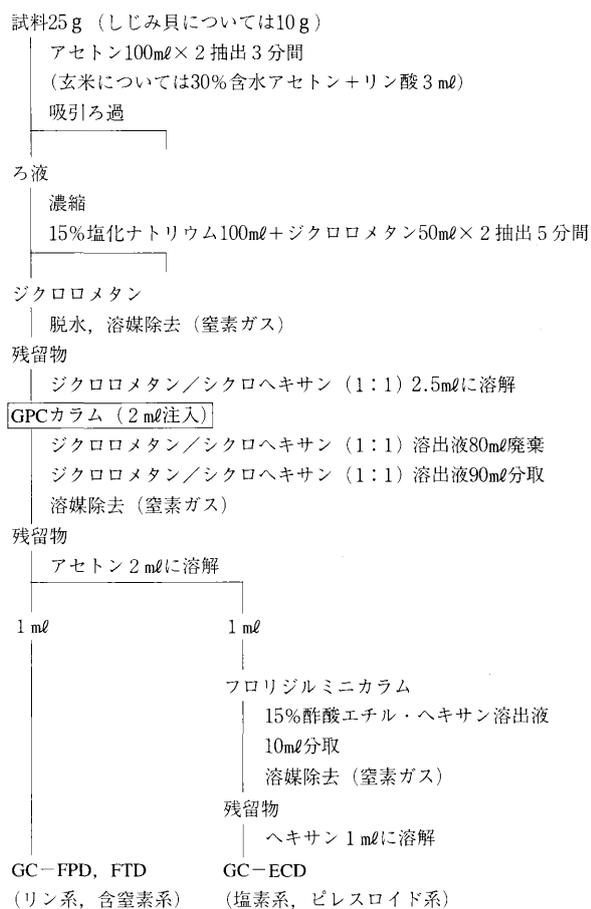


図1 農産物中の残留農薬分析法

2.5 ガスクロマトグラフの測定条件

(1) 有機塩素系農薬

検出器: ECD

カラム①: DB-1 (内径0.32mm×30m, 膜厚0.25 μ m)
カラム温度: 80 $^{\circ}$ C-15 $^{\circ}$ C/min-150 $^{\circ}$ C (5min) - 8 $^{\circ}$ C/min-230 $^{\circ}$ C (4min)

注入口温度: 250 $^{\circ}$ C 検出器温度: 300 $^{\circ}$ C

キャリアガス: ヘリウム 2kg/cm²

メイクアップガス: 窒素 30ml/min

注入方式: スプリット法 注入量: 1 μ l

カラム②: CBJ-608 (内径0.53mm×30m, 膜厚0.83 μ m)
カラム温度: 180 $^{\circ}$ C (1min) - 3 $^{\circ}$ C/min-200 $^{\circ}$ C-40 $^{\circ}$ C/min-260 $^{\circ}$ C (6min)

注入口温度: 250 $^{\circ}$ C 検出器温度: 300 $^{\circ}$ C

キャリアガス: ヘリウム 0.7kg/cm²

メイクアップガス: 窒素 30ml/min

注入方式: スプリット法 注入量: 1 μ l

(2) 有機リン系農薬

検出器: FPD (リンフィルター)

カラム①: DB-1 (内径0.32mm×30m, 膜厚0.25 μ m)

カラム温度: 60 $^{\circ}$ C (2min) - 20 $^{\circ}$ C/min-180 $^{\circ}$ C-7 $^{\circ}$ C/min-265 $^{\circ}$ C (1min)

注入口温度: 240 $^{\circ}$ C 検出器温度: 280 $^{\circ}$ C

キャリアガス: ヘリウム 1kg/cm²

メイクアップガス: 窒素 30ml/min

水素及びAir: 0.6kg/cm²

注入方式: スプリットレス法 注入量: 2 μ l

カラム②: DB-210 (内径0.25mm×30m, 膜厚0.25 μ m)

カラム温度: 60 $^{\circ}$ C (2min) - 10 $^{\circ}$ C/min-235 $^{\circ}$ C (10min)

注入口温度: 240 $^{\circ}$ C 検出器温度: 280 $^{\circ}$ C

キャリアガス: ヘリウム 2kg/cm²

メイクアップガス: 窒素 30ml/min

水素及びAir: 0.6kg/cm²

注入方式: スプリットレス法 注入量: 2 μ l

(3) 含窒素系農薬

検出器: FTD

カラム: DB-17 (内径0.25mm×30m, 膜厚0.25 μ m)

カラム温度: 60 $^{\circ}$ C (2min) - 20 $^{\circ}$ C/min-180 $^{\circ}$ C-10 $^{\circ}$ C/min-280 $^{\circ}$ C (30min)

注入口温度: 270 $^{\circ}$ C 検出器温度: 280 $^{\circ}$ C

キャリアガス: ヘリウム 1.5kg/cm²

メイクアップガス: ヘリウム 30ml/min

水素及びAir: 0.55kg/cm²

注入方式: スプリットレス法 注入量: 2 μ l

(4) ピレスロイド系農薬

検出器: ECD

カラム: DB-1 (内径0.32mm×30m, 膜厚0.25 μ m)

カラム温度: 80 $^{\circ}$ C-20 $^{\circ}$ C/min-240 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C/min-280 $^{\circ}$ C (2min)

注入口温度: 250 $^{\circ}$ C 検出器温度: 300 $^{\circ}$ C

キャリアガス: ヘリウム 1.9kg/cm²

メイクアップガス: 窒素 50ml/min

注入方式: スプリット法 注入量: 1 μ l

3. 結果及び考察

3.1 ガスクロマトグラフによる農薬標準品の分析

今回は、平成6年6月9日までに残留基準値が設定された103農薬の中で、誘導体化等個別操作を必要とせず、ECD-, FPD-, FTD-GCで分析可能な73農薬及びヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシドの計75農薬について検討を行った。表1に系統別における各農薬の保持時間、図4~8に標準溶液の主なクロマトグラムを示した。ただし、有機塩素系のクロルベンジレート、カプタホールは分析の都合上、ピレスロイド系に含めてGC分析を行った。

有機塩素系農薬についてはDB-1, CBJ-608カラムともに15農薬すべて分離したが、DB-1では β -BHC

表1-1) 系統別農薬標準溶液の保持時間、GPCの溶出範囲及び農産物等における農薬添加回収率

農薬名	保持時間 (R.T.) (min)		GPCの溶出範囲 (mL画分)	添加濃度 (ppm)	回収率 (%) ²⁾			検出限界 (ppm)
	DB-1	CBJ-608			玄米	りんご	しじみ貝	
有機塩素系	DB-1	CBJ-608						
α-BHC	7.18	4.742	120~140	0.008 (0.01) ¹⁾	90.0	70.0	77.5	0.001 (0.0025)
β-BHC	7.719	6.243	150~170	0.008 (0.01)	82.5	87.5	92.5	0.001 (0.0025)
γ-BHC	8.283	5.975	120~140	0.008 (0.01)	85.0	90.0	90.0	0.001 (0.0025)
δ-BHC	8.623	7.606	140~170	0.008 (0.01)	97.5	90.0	97.5	0.001 (0.0025)
PP'-DDE	16.495	10.118	110~130	0.008 (0.01)	97.5	92.5	107.5	0.001 (0.0025)
PP'-DDT	18.538	11.783	110~130	0.0128 (0.016)	100.0	102.5	100.0	0.0016 (0.004)
PP'-DDD	17.465	11.123	110~130	0.0128 (0.016)	95.0	95.0	102.5	0.0016 (0.004)
エンドリン	16.778	10.917	110~130	0.008 (0.01)	102.5	100.0	112.5	0.001 (0.0025)
デILDリン	16.305	10.248	110~130	0.008 (0.01)	97.5	95.0	107.5	0.002 (0.0025)
アルドリ	13.284	8.189	110~120	0.008 (0.01)	70.0	75.0	87.5	0.002 (0.0025)
ヘブタクロ	12.011	7.108	110~130	0.008 (0.01)	95.0	90.0	90.0	0.001 (0.0025)
ヘブタクロエボキソ	14.481	9.233	110~130	0.008 (0.01)	87.5	97.5	97.5	0.001 (0.0025)
キャプタン	14.198	10.394	110~130	0.016	90.0	72.5		0.002
ジコホル	19.934	13.801	110~130	0.016	92.5	97.5		0.002
ジクロフルアニ	12.855	9.099	100~120	0.016	87.5	100.0		0.002
有機リン系	DB-1	DB-210						
EPN	18.366	24.465	100~120	0.048	95.0	87.0		0.006
エディフェンホ	16.829	20.928	100~120	0.048	115.0	96.0		0.006
エトプロホ	9.594	14.006	90~110	0.02	100.0	91.5		0.0025
エトリムホ	11.441	14.881	100~110	0.02	70.0	91.5		0.0025
キナルホ	13.986	17.98	100~110	0.02	90.0	87.0		0.0025
クロルピリホ	13.101	16.533	100~120	0.02	90.0	96.0		0.0025
α-クロルフェン	13.776	18.526	90~110	0.02	107.5	93.0		0.0025
β-クロルフェン	13.986	18.831	90~110	0.02	102.5	90.0		0.0025
ジクロロホ	6.569	10.35	110~130	0.02	87.5	63.0		0.0025
ジメトエ	10.236	17.097	110~130	0.032	97.5	99.0		0.004
ダイアジノ	11.144	14.255	90~100	0.02	82.5	90.0		0.0025
テルブホ	10.948	14.492	90~110	0.02	95.0	64.5		0.0025
トリクロルホ	2.377	4.791	110~120	0.1	105.0	67.5		0.0125
パラチオ	13.101	19.024	100~120	0.02	95.0	87.0		0.0025
パラチオメチ	11.934	18.295	110~130	0.02	95.0	96.0		0.0025
フェニトロチ	12.525	18.585	110~120	0.02	97.5	91.5		0.0025
フェンチオ	12.968	17.023	110~120	0.02	97.5	69.0		0.0025
フェントエ	13.986	18.153	100~110	0.02	90.0	84.0		0.0025
ホサロ	19.228	26.487	100~120	0.1	100.0	93.0		0.0125
マラチオ	12.802	18.114	90~110	0.02	95.0	100.5		0.0025
プロチオホ	15.166	17.938	100~110	0.02	100.0	90.0		0.0025
フェンスルホ	15.915	24.282	90~110	0.048	122.5	102.0		0.006
クロルピリホ	12.017	15.857	100~130	0.02	92.5	94.5		0.0025
ピリミホメチ	12.683	16.147	90~110	0.02	100.0	88.6		0.0025
チオメト	10.236	14.183	110~120	0.04	75.0	— ³⁾		0.005

1) しじみ貝については () に示す。 2) 回収率は2回測定の平均値 3) 測定せず

の位置に妨害ピークが検出され、CBJ-608カラムではジコホルの検出感度が悪かったことから、2つのカラムを併用した。

有機リン系農薬についてはDB-1カラムは約20分で25農薬が出終わるが、パラチオンとクロルピリホ、キナルホとβ-クロルフェンビンホス及びフェントエ

ト、ジメトエとチオメトンがそれぞれ同じ保持時間で分離が悪いことから、農薬ごとの定量が必要な場合は約27分と時間がかかるが分離のよいDB-210カラムを用いた。なお、メタミドホス、アセフェートはシャープなピークが得られず、感度が悪かったことから今回は対象としなかった。

表1-(2) 系統別農薬標準溶液の保持時間、GPCの溶出範囲及び農産物等における農薬添加回収率

農薬名	保持時間 (R.T.) (min)		GPCの溶出範囲 (mL/画分)	添加濃度 (ppm)	回収率 (%) ¹⁾		検出限界 (ppm)
	DB-17				玄米	りんご	
含窒素系	DB-17						
(Aグループ)							
アルジカルブ	4.365		100~120	0.08	79.1 (70.6) ²⁾	96.1	0.01
オキサミル	5.409		100~120	0.08	109.6 (108.5)	102.7	0.01
クロルプロファミ	11.539		100~130	0.16	97.4 (95.8)	96.1	0.02
ベンダイオカルブ	12.932		100~130	0.08	101.0 (95.5)	95.1	0.01
ピリミカーブ	14.383		100~110	0.04	37.2 (99.6)	99.7	0.005
エチオフェンカルブ	14.726		110~120	0.16	40.1 (ND)	66.7	0.02
メトリブジン	15.057		120~140	0.08	ND (62.4)	62.2	0.01
チオベンカルブ	15.3		100~120	0.08	107.4 (106.9)	103.3	0.01
カルバリル	15.598		120~140	0.16	104.6 (104.5)	109.6	0.02
プレチラクロール	16.666		90~100	0.16	101.5 (105.3)	93.3	0.02
キノメチオネート	17.188		120~140	0.08	98.1 (89.4)	101.5	0.01
メプロニル	18.758		100~120	0.48	110.5 (113.2)	100.6	0.06
(Bグループ)							
クロフェンデジン	7.622		110~130	0.24	79.6 (75.4)	22.6	0.03
プロパモカルブ	8.847		ND	0.16	ND (-) ³⁾	ND	0.02
イソプロカルブ	10.909		100~120	0.08	94.9 (90.7)	92.0	0.01
エスプロカルブ	14.776		90~110	0.08	89.5 (93.0)	99.1	0.01
ジエトフェンカルブ	14.968		90~110	0.24	91.9 (92.7)	96.7	0.03
ペンディメタリン	15.704		100~110	0.16	93.0 (109.9)	98.5	0.02
フルトラニル	16.999		100~110	0.48	98.9 (108.9)	100.0	0.06
プロピコナゾール	18.887	18.969	90~110	0.2	96.3 (105.5)	96.2	0.025
レナシル	20.732		110~130	0.16	98.2 (106.2)	100.8	0.02
ピテルタノール	23.741	24.195	90~110	0.4	106.1 (115.8)	101.8	0.05
メフェナセット	24.48		100~120	0.2	99.8 (104.3)	97.3	0.025
ピレスロイド系	DB-1						
(Aグループ)							
クロルベンジレート	8.219		100~120	0.16	95.0	97.5	0.02
カプタホール	8.785		110~130	0.016	60.0	85.0	0.002
シハロトリン	9.984	10.136	80~100	0.04	85.0	90.0	0.005
ベルメトリン	10.697	10.801	90~110	0.24	85.0	90.0	0.03
シベルメトリン	11.472	11.561	90~110	0.08	95.0	97.5	0.01
	11.672						
フルバリネート	12.63	12.687	80~100	0.04	100.0	97.5	0.005
デルタメトリン	13.033		90~110	0.02	105.0	102.5	0.0025
(Bグループ)							
ビレトリン	8.068	8.472	80~100	0.16	85.0	77.5	0.02
	8.594	9.856					
	10.345	10.509					
シフルトリン	11.2	11.282	90~100	0.08	85.0	72.5	0.01
	11.385						
フルシトリネート	11.67	11.854	90~100	0.08	95.0	82.5	0.01
フェンバレレート	12.313	12.52	90~100	0.08	100.0	90.0	0.01
トラロメトリン	13.037		90~110	0.16	115.0	165.0	0.02

1) 回収率は2回測定の平均値 2) リン酸を添加せずに抽出したときの回収率 3) 測定せず

含窒素系農薬はDB-17カラムでの保持時間から、各々のピークが重ならないように2グループに分け、FTDにより分析を行った。

プロピコナゾール、ピテルタノールはそれぞれ2本の異性体ピークとして検出された。また、クロフェンデジンは注入口温度が230℃以上では分解するとされている

が、分解物ピークの方がシャープで感度もよい¹²⁾ことから270℃で分析した。ただし、図7は230℃におけるクロマトグラムを示した。

ピレスロイド系農薬についてはDB-1カラムでの保持時間から、含窒素系農薬と同様2グループに分けて分析した。

なお、シハロトリン、ペルメトリン、フルバリネート、フルシトリネート、フェンバレレートは2本、シベルメトリン、シフルトリンは3本、ピレトリンは6本の異性体ピークとして検出された。

3・2 抽出操作

りんご、しじみ貝からの抽出にはアセトンを用い、水分の少ない玄米については抽出率を高めるために30%含水アセトンを用いた。また、玄米については、均質化物のpHが中性付近での農薬の分解を防ぐためにリン酸も加えた¹³⁾。

転溶溶媒としては、ヘキサン、酢酸エチル等多用されているが、水溶性の比較的高いジメトエート等も良好に抽出され、さらに転溶の際に有機層が下層に来て操作がしやすいことからジクロロメタンを用いることとした。

3・3 GPCによるクリーンアップ操作

(1) GPC装置の構成

GPC装置としては専用機が市販されているが、高価であり汎用性に乏しいことから、古いHPLC装置(紫外検出器付き)にGPC用のステンレスカラムを取り付け、インジェクターに5mlのサンプルローディングループを取り付けて手動で注入した。

(2) GPCカラムの溶出溶媒の検討

GPCカラムの溶出溶媒としては、ジクロロメタン/シクロヘキサン(1:1)混液及び酢酸エチル/シクロヘキサン(1:1)混液がよく用いられていることから、この2種類の溶媒について検討した。ただし、流量は5ml/minとした。

すなわち、クロロフィル、β-カロチン、コーンオイル及び有機塩素系農薬(15農薬)の混合溶液2mlをGPCカラムに注入し、上記2種類の溶媒で溶出した時の農薬とこれら妨害物質との分離状況を、紫外検出器によるクロマトグラムから調べた(図2)。

その結果、どちらの溶媒においてもクロロフィル、コーンオイル、β-カロチンは農薬より先に溶出したが、酢酸エチル混液においては、これら妨害物質と農薬の分離が悪く、農薬画分の中に妨害物質が混入していると予想された。これに対し、ジクロロメタン混液では妨害物質の溶出が終わった後に農薬の溶出が始まり、妨害物質は農薬と分離除去できることが確認された。酢酸エチル混液の場合は、樹脂の膨潤度が不十分のため、GPCの分子ふるい効果が発揮されなかったものと思われる。

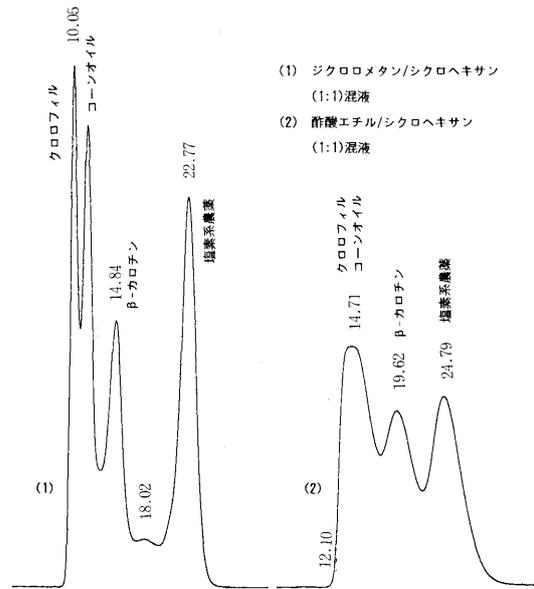


図2 植物油脂、色素と農薬の分離状況
(測定波長250nmにおけるUVクロマトグラム)

以上の結果から、本法においては溶出溶媒として、ジクロロメタン/シクロヘキサン(1:1)混液を用いることとした。

(3) 脂肪、色素、農薬のGPC溶出範囲及び画分ごとの溶出率の測定

GPCによる各農薬の正確な溶出範囲を把握するため、有機塩素系、有機リン系、含窒素系及びピレスロイド系の系統別農薬混合溶液(検量線用標準溶液の10倍濃度、GPC溶出液に溶解)の2mlをGPCカラムに負荷して溶出液を10mlずつ分取した。各画分の溶出液を濃縮乾固し、得られた残留物をアセトンに溶解、一定容とした後GCで分析して系統別農薬のGPC溶出範囲と画分ごとの溶出率を求めた。これらの結果を図3に示した。また、各農薬のGPC溶出範囲は表1に示した。

その結果、ピレスロイド系の3農薬(ピレトリン、シハロトリン、フルバリネート)が80ml画分に約2%溶出したがその他の農薬はすべて90~170ml画分に溶出した。ただし、含窒素系のプロパモカルブは170mlまでには溶出しなかった。これについては、プロパモカルブの水溶性が非常に高いことからGPC溶出液に十分溶解しなかったものと考えられる。

また、脂肪、色素については、これらの含有量の高い大豆、にんじん、ほうれん草を用い、図1の分析法に準じて得られた抽出液2mlをGPCカラムに負荷して溶出液を10mlずつ分取した。脂肪は重量法、色素は吸光度法(クロロフィルは657nm、カロチノイドは507nm)により測定してそれぞれのGPC溶出範囲と画分ごとの溶出率を求めた(図3)。

その結果、にんじんの色素は50~80ml画分に93.8%、90ml画分に6.2%、ほうれんそうの色素は50~80ml画分に99.5%、90ml画分に0.5%、また、大豆の脂肪は50~80ml画分に98.4%、90ml画分に1.6%溶出し、色素及び脂肪は50~80ml画分に93.8~99.5%溶出した。

したがって、溶出液の80ml画分までは廃棄し、90~170ml画分までを分取することとした。

3・4 フロリジルミニカラムによるクリーンアップ操作
有機リン系及び含窒素系農薬を対象とする場合は、GPCで精製後、直接GCで測定することが可能であった。

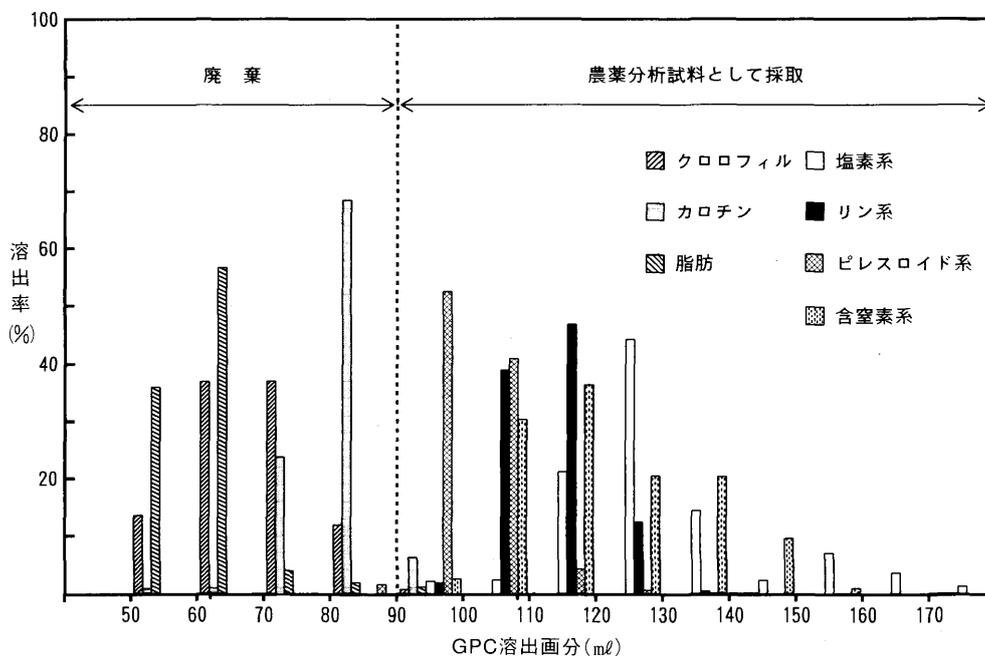


図3 GPCカラムによる脂肪、色素、農薬の溶出パターン

しかし、有機塩素系、ピレスロイド系農薬については、他の検出器より高感度で妨害を受けやすいECD-GCによる測定であることから、GPCによる精製だけでは妨害成分の除去が不十分であり再精製が必要であった。

そこで、操作の簡単なミニカラムによる精製を検討した。

精製カラムは、クロロフィル等の脂溶性色素や油脂成分等脂質類除去効果のあるフロリジルを使用し、溶出溶媒として15%酢酸エチル/ヘキサン混液及び15%エチルエーテル/ヘキサン混液を用いたときの各農薬の溶出状況を調べた。

すなわち、上記2種類の溶媒に溶かした有機塩素系及びピレスロイド系農薬の混合溶液1mlをそれぞれカラムに負荷した後、同じ溶媒で溶出し、溶出液を5~10mlずつ分取してGCにより各農薬の画分ごとの溶出率を求めた。結果を表2に示した。

酢酸エチル混液の場合、有機塩素系、ピレスロイド系農薬ともに10mlの溶出でほとんど回収できた。

一方、エチルエーテル混液の場合、有機塩素系についてはキャプタン、ジクロフルアニドの溶出が遅く、キャプタンは35ml画分までに溶出しなかった。その他の有機塩素系農薬は酢酸エチル混液と同様、10mlの溶出でほと

んど回収できた。ピレスロイド系(Aグループ)については全体に溶出が遅くフルバリネートについては30ml、クロルベンジレートについては50mlの溶出が必要であった。

以上の結果より、溶出溶媒としては15%酢酸エチル/ヘキサン混液を用い、溶出液10mlを分取することとした。

3・5 添加回収実験

しじみ貝、りんご、玄米に一定濃度の系統別農薬混合溶液1mlを添加して1時間放置した後、図1に示した方法により操作し各農薬の添加回収率を求めた。結果を表1に示した。

りんごについては、揮発性、分解性の高い有機リン系のジクロロボス、テルブホス、トリクロルホン、フェンチオン及び含窒素系のエチオフェンカルブ、メトリブジンが60~70%、同じく含窒素系のクロフェンテジン、プロバモカルブが30%未満であったが、その他の農薬はすべて70%以上の回収率であった。

玄米については、有機塩素系のカプタホールが60%、含窒素系のピリミカブ、エチオフェンカルブ、メトリブジン、プロバモカルブが50%未満であったが、その他の農薬はすべて70%以上の回収率であった。

表2 フロリジルミニカラムによる有機塩素系及びピレスロイド系農薬の溶出パターン

農薬名	添加量 (μg)	15%酢酸エチル/ ヘキサン			15%エチルエーテル/ヘキサン						
		5	10	15m $\frac{1}{2}$ 画分	5	10	15	20	25	30	35m $\frac{1}{2}$ 画分
有機塩素系											
α -BHC	0.1	72.0	0	0	75.8	0	0	0	0	0	0
β -BHC	0.1	97.0	0	0	99.5	0	0	0	0	0	0
γ -BHC	0.1	81.0	0	0	86.8	0	0	0	0	0	0
δ -BHC	0.1	95.3	0	0	98.8	5.0	0	0	0	0	0
PP'-DDE	0.1	91.0	0	0	95.5	0	0	0	0	0	0
PP'-DDT	0.16	99.8	0	0	100.6	0	0	0	0	0	0
PP'-DDD	0.16	92.3	0	0	96.4	0	0	0	0	0	0
エンドリン	0.1	96.0	0	0	90.7	0	0	0	0	0	0
ディルドリン	0.1	90.7	0	0	87.0	4.8	0	0	0	0	0
アルドリン	0.1	83.5	0	0	82.7	0	0	0	0	0	0
ヘプタクロル	0.1	82.2	0	0	81.3	0	0	0	0	0	0
ヘプタクロルエポキシド	0.1	88.6	0	0	92.5	0	0	0	0	0	0
キャプタン	0.2	14.6	70.2	0	0	0	0	0	0	0	0
ジコホール	0.2	95.8	0	0	107.1	0	0	0	0	0	0
ジクロフルアニド	0.2	53.0	38.7	0	0	0	18.8	37.0	23.0	7.6	0
ピレスロイド系											
(Aグループ)		10	20	30m $\frac{1}{2}$ 画分	10	20	30	40	50	60m $\frac{1}{2}$ 画分	
クロルベンジレート	2.0	91.0	0	0	0	0	41.7	39.9	28.6	0	
シハロトリン	0.5	94.3	0	0	81.9	24.9	0	0	0	0	
ペルメトリン	3.0	94.9	0	0	99.4	0	0	0	0	0	
シベルメトリン	1.0	98.2	0	0	71.9	24.7	0	0	0	0	
フルバリネート	0.5	93.5	0	0	17.6	69.6	6.1	0	0	0	
デルタメトリン	0.25	91.2	0	0	54.1	38.7	0	0	0	0	
(Bグループ)											
ピレトリン	2.0	102.7	0	0							
フルシトリネート	1.0	99.0	0	0							
トラロメトリン	2.0	119.7	0	0							

ただし、玄米の含窒素系については表1-(2)に示すように、リン酸を加えない中性状態の抽出でピリミカープ、メトリブジンの回収率がそれぞれ99.6, 62.4%と上昇し、エチオフェンカルブは逆にNDとなった。しかし、エチオフェンカルブについては、回収率のばらつきが大きくGPC操作中にスルホキシド体に変化したとの報告もあることから再度検討する必要がある。その他の農薬についてはpHによる違いはみられなかった。

クロフェンテジンは玄米とりんごの回収率に大きな差がみられたが、この要因についても今後検討が必要である。プロバモカルブはどちらもNDであったが、3・3(3)で述べたようにGPC操作で溶出されないことも大きな要因と考えられる。

また、オキサミル、エチオフェンカルブについては、GC検液の溶媒の種類により回収率に差がみられ、オキサミルではN-ヘキサンを用いたときは玄米19.7, りんご43.9%を示したのに対し、アセトン及び酢酸エチルではどちらも100%近い値を示した。オキサミルは水溶性

が非常に高いため極性の低いN-ヘキサンには十分に溶解しなかったものと考えられる。また、エチオフェンカルブでは酢酸エチルを用いたときはどちらも20%未満を示したのに対し、N-ヘキサン、アセトンでは玄米約40%, りんご約60%を示した。従って、他の系統の農薬も含め溶媒と回収率の関係については検討する必要がある。

しじみ貝については、有機塩素系の12農薬のみ分析したが、すべて77%以上の回収率であった。

本法における検出限界は、有機塩素系では0.001~0.002ppm, 有機リン系では0.0025~0.0125ppm, 含窒素系では0.005~0.06ppm, ピレスロイド系では0.002~0.03ppmであり、含窒素系の5農薬以外の農薬については、日常分析に用いる多成分分析法として十分有用な方法であると考えられた。

図4~8に、本法により調整した玄米試験溶液の有機塩素系、有機リン系、含窒素系及びピレスロイド系のガスクロマトグラムを示した。

有機塩素系、ピレスロイド系のクロマトグラムでは溶媒ピークの後に夾雑ピークがかなりみられたが、これらのピークの後に農薬が出始めたことから妨害にはならず、農薬測定が可能であった。

ただし、有機塩素系のDB-1カラムでは、 β -BHC及びキャプタンに近接した位置に妨害ピークが検出され、CBJ-608カラムではジコホルの感度が悪かったことから定量には2つのカラムを用いた。なお、有機塩素系、ピレスロイド系については、試薬ブランクも農薬無添加玄米と殆ど同様なクロマトグラムを示したことから、これら夾雑ピークの大半は玄米に由来するものではなく試薬由来の不純物によるものと考えられた。

有機リン系については妨害ピークのないクロマトグラムが得られた。

含窒素系については微小ピークが多少みられたが、測定の際に妨害となるピークは検出されなかった。

4. ま と め

(1) 食品衛生法で残留基準が告示された農薬73種類を含む75種類の農薬（有機塩素系、有機リン系、含窒素系、ピレスロイド系）について、GPCクリーンアップを用いた多成分一斉分析法の検討を行った。

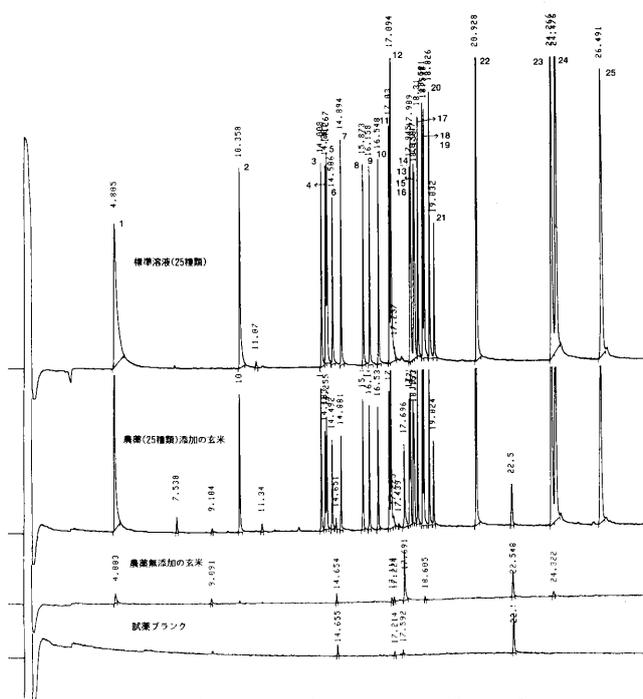


図6 FPD/GDクロマトグラム（有機リン系農薬）
（DB-210カラム）

1:トリクロルホン 2:ジクロルポス 3:エトプロホス 4:チオメトン
5:ダイアジノン 6:テルブホス 7:エトリムホス 8:クロルピリホスメチル
9:ピリミホスメチル 10:クロルピリホス 11:フェンチオン 12:ジメトエート
13:プロチオホス 14:キナルホス 15:マラチオン 16:フェントエート
17:メチルパラチオン 18: α -クロルフェンピホス 19:フェントロチオン
20: β -クロルフェンピホス 21:パラチオン 22:エディフェンホス
23:フェンスルホチオン 24:EPN 25:ホサロン

(2) GPCクリーンアップを用いることにより妨害物質の色素、脂肪等が容易に除去でき、操作も迅速化できた。

(3) りんご、玄米、しじみ貝を用い、本法による添加回収試験を行った結果、含窒素系農薬のピリミカブ、エチオフェンカルブ、メトリブジン、クロフェンテジン、

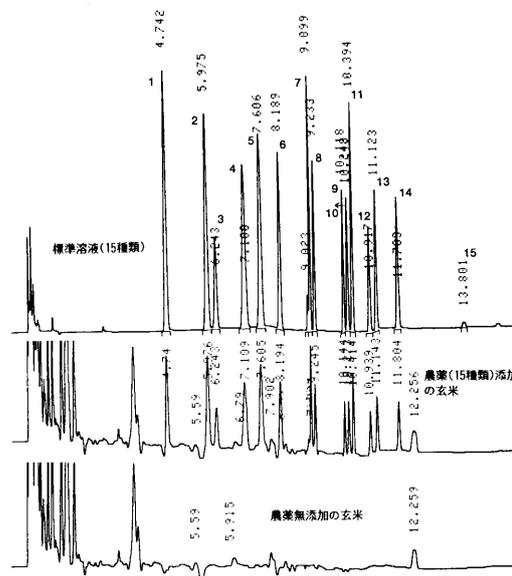


図4 ECD/GCクロマトグラム（有機塩素系農薬）
（CBJ-608カラム）

1: α -BHC 2: γ -BHC 3: β -BHC 4:ヘプタクロル 5: δ -BHC
6:アルドリン 7:ジクロフルアニド 8:ヘプタクロルエポキシド 9:
PP'-DDE 10:デイルドリン 11:キャプタン 12:エンドリン 13:PP'-
DDD 14:PP'-DDT 15:ジコホル

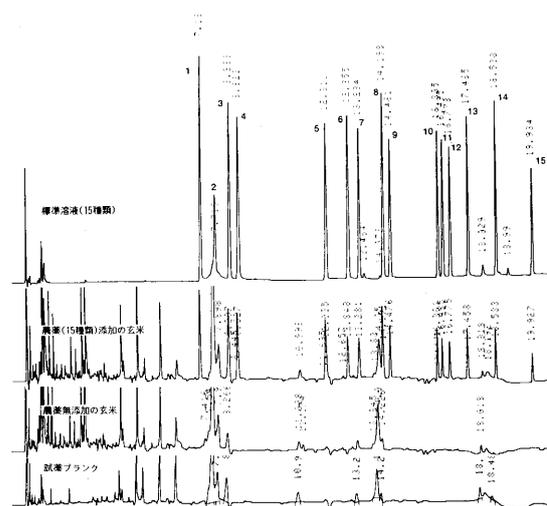


図5 ECD/GCクロマトグラム（有機塩素系農薬）
（DB-1カラム）

1: α -BHC 2: β -BHC 3: γ -BHC 4: δ -BHC 5:ヘプタクロル
6:ジクロフルアニド 7:アルドリン 8:キャプタン 9:ヘ
プタクロルエポキシド 10:デイルドリン 11:PP'-DDE 12:エンド
リン 13:PP'-DDD 14:PP'-DDT 15:ジコホル

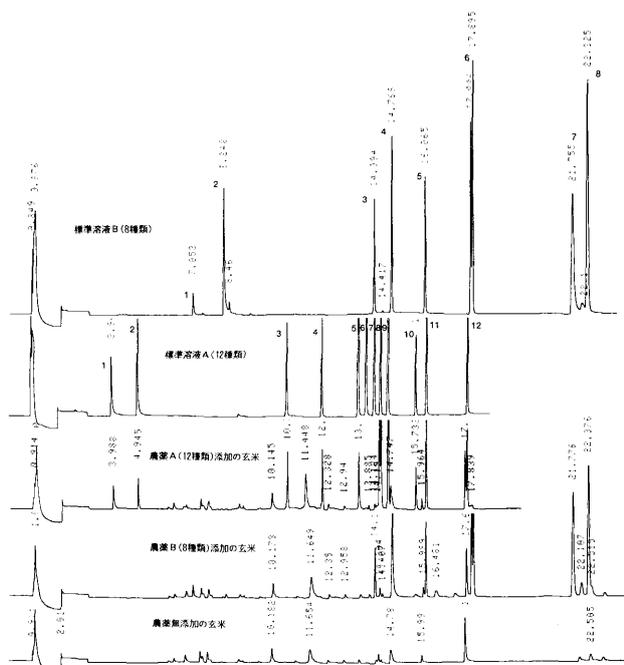


図7 FTD/GCクロマトグラム (含窒素系農薬)
(DB-17カラム)

(Aグループ)

1: アルジカルブ 2: オキサミル 3: クロルプロファム 4: ベンダイオカルブ
5: ビリミカブ 6: エチオフェンカルブ 7: メトリブジン 8: チオベンカ
9: カルバリル 10: プレチラクロール 11: キノメチオネート 12: メブ
ロニル

(Bグループ)

1: クロフェンテジン 2: プロパモカルブ 3: ジエトフェンカルブ 4: ベンデ
イメタリン 5: フルトラニル 6: プロピコナゾール 7: ビテルタノール
8: メフェナセツト

プロパモカルブでは50%未満であったが、その他の農薬
ではすべて60%以上の回収率が得られた。

(4) 以上の結果から、GPCクリーンアップを用いた本法
は、他の農産物への適用、低回収率農薬の検討等により
多成分一斉分析法として十分適用可能と考えられる。

5. 文 献

- 1) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準の一部改正，
平成4年10月27日，第239号，1992.
- 2) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準の一部改正，
平成5年3月4日，第68号，1993.
- 3) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準の一部改正，
平成5年9月14日，第200号，1993.
- 4) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準の一部改正，
平成6年6月9日，第199号，1994.
- 5) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準の一部改正，
平成7年8月14日，第161号，1995.
- 6) 斎藤 勲，他：愛知県衛生研究所報，31，19-23，
1981.
- 7) 渡部正敏，他：名古屋市公害研究所報，19，45-52，
1989.

(Aグループ)

1: クロルベンジレート 2: カプタホール
3: シハロトリン 4: ベルメトリン 5: シベルメトリ
6: フルバリネート 7: デルタメトリン

(Bグループ)

1: ビレトリン 2: シフルトリン 3: フルシトリネー
ト 4: フェンバレレート 5: トラロメトリン

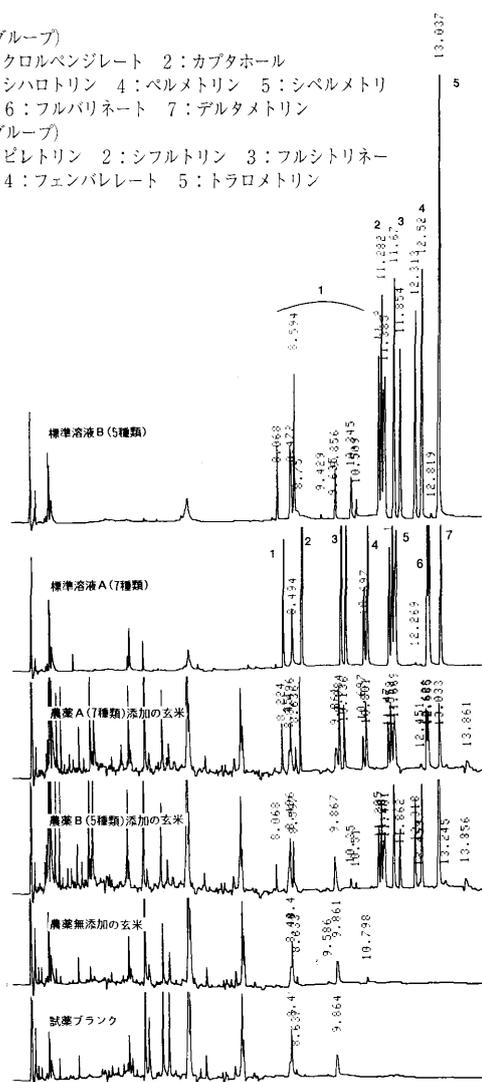


図8 ECD/GCクロマトグラム (ピレスロイド系農薬)
(DB-1カラム)

- 8) 山本 優，他：札幌市衛生研究所年報，18，129-
135，1991.
- 9) 山本 優，他：札幌市衛生研究所年報，20，124-
132，1993.
- 10) 斎藤行雄，他：富山県衛生研究所年報，16，210-
214，1993.
- 11) 斎藤行雄，他：農産物中残留農薬の系統的分析法の
検討，第31回全国衛生化学協議会年会，52-53，
1994.
- 12) 厚生省生活衛生局食品化学課，平成5年度第2回食
品残留農薬分析法講習会講義資料，143-153，
1993.
- 13) 外海泰秀，他：食品衛生学雑誌，33，5，449-457，
1992.

Abstract

Studies on Analytical Methods for Residual Pesticides in Food Using GPC Clean-up

Akiko KOGAWA¹ and Masanori TAKAHASHI¹

A study of a simultaneous determination for multicomponents was made with 75 kinds of pesticides including organochlorine, organophosphorus, organonitrogen and pyrethroid pesticides so as to take appropriate measures for the increase in the pesticides and agricultural products which became the objects of regulation following the revision of the Food Sanitation Law.

A new method was developed by unifying the several steps from extraction to clean-up and using gel permeation chromatography for the clean-up. Thus, we could easily eliminate the interfering substances such as pigments, lipids, etc., as well as simplifying the procedures. When this method was applied to apples, unpolished rice and corbiculae, recoveries were less than 50% for 5 kinds of organonitrogen pesticides (pirimicarb, ethiofencarb, metribuzin, clofentezine and propamocarb), but recoveries of all the other pesticides used was 60% or more. This method was found to be satisfactorily usable for the simultaneous analysis of pesticides.

Key words : Simultaneous analysis, Residual pesticides, Gel permeation chromatography

1 : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

遺伝子毒性発癌剤で誘発したマウス肝前癌病巣における クラスπ Glutathione S-transferase II および核内癌遺伝子c-Junの発現

三浦 啓徳 高橋 政教 畑山 一郎

Diethylnitrosamine (DEN), 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-MeDAB), N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) で誘発されたマウス肝前癌病巣におけるクラスπ Glutathione S-transferase II (GST-II) および癌遺伝子産物c-Junの発現を免疫組織化学的に検討した。上記3種の遺伝子毒性発癌剤による雄マウスの病巣では、GST-II陰性/c-Jun陽性の表現型が主体である一方、雌においてはGST-II陽性/c-Jun陽性の病巣が大多数を占めた。以上の結果は、このような発現様式は遺伝子毒性発癌剤で誘発されるマウス肝前癌病巣に共通するものであることを示唆する。

Key words : genotoxic carcinogens, mouse hepatocarcinogenesis, glutathione S-transferase II, c-Jun, immunohistochemistry

1. はじめに

Glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18) は、発癌物質を含む種々の求電子性化合物のグルタチオン(GSH)抱合反応を触媒する解毒酵素である¹⁾。GSTは、GSH抱合活性に加えてGSH peroxidase 活性や leukotriene C₄合成活性を有し、ヘム、ビリルビン、ステロイドホルモンの結合蛋白としても働く多機能酵素である¹⁾。この酵素は肝臓に多量に存在し、多くのアイソザイムをもつが、ラット、マウス、ヒトの細胞質GSTは、それらの酵素学的、免疫学的、そして遺伝子構造の類似性から種を越えてα, μ, π, θの4クラスに分類される。それらのアイソザイムのうち、ラット正常肝にほとんど存在しないクラスπGST-Pは、ラット肝化学発癌過程において早期に誘発される前癌病巣に特異的に発現してくる²⁾。このことから、GST-Pが、これまで使用されてきたγ-glutamyltransferase (GGT) や adenosine triphosphatase (ATPase) に代わって、ラット肝前癌の免疫組織化学的マーカーとして活用されるようになってきている。

一方、マウスは遺伝子的、染色体学的にヒトと高い類似性を有するため、ヒト発癌機構の解析に用いられてきたが、ラットと異なり肝前癌病巣にはGGTやATPaseの発現変化が認められず、有用なマーカーの開発が望まれてきた。

マウス肝にはGST-I, -II, -IIIの3種の主要なGSTアイソザイムがあり、各々α, π, μクラスに属している³⁾。雄マウス肝には、ラットと違って多量のクラスπGST-IIが存在するが、雌における発現量は雄の5%と性差が顕著であり、その発現はテストステロンにより制御されている³⁾。免疫組織化学的にも、雄肝は組織全体に強い

染色態度をとる一方、雌は極めて弱い染色性を示す。最近、我々は、diethylnitrosamine (DEN) で誘発された雄マウス肝前癌病巣ではGST-IIの低下、逆に、雌では発現増加があるため、各々GST-II陰性巣および陽性巣として検出され、マウス肝前癌の優れたマーカーになることを報告した⁴⁾。しかし、腫瘍マーカーとしては雌雄にかかわらず同一の発現パターンを示し、しかも陽性巣として検出できる方が有用性は高い。我々は、その様なマーカーの探索に加えて、DENによるマウス肝化学発癌での癌遺伝子発現の解析を進める過程で、核内癌遺伝子産物c-Junが雌雄の前癌病巣に特異的に発現してくることを見出した⁵⁾。

このように、DENによって誘発された雄マウス肝前癌病巣は、GST-II陰性/c-Jun陽性として、また雌の病巣はGST-II陽性/c-Jun陽性として検出される⁵⁾。DENのような化学発癌物質の多くは、cytochrome P-450により代謝的活性化を受けた後、最終発癌物質としてDNAへの結合による塩基の組み換えや切断などの修飾をもたらす。その結果、種々の癌遺伝子の異常活性化や癌抑制遺伝子の不活性化を伴って発癌が成立する。このようにDNAに変異をもたらす発癌物質は遺伝子毒性発癌剤と称され、直接にはDNAを傷つけない非遺伝子毒性発癌剤と区別されている。これまで報告してきたDEN誘発マウス肝前癌におけるGST-IIとc-Junの発現パターンは、DENに特異的なものか或は遺伝子毒性発癌剤に共通した様式であるかどうかは不明であるため、今回、DENを含む3種の遺伝子毒性発癌剤で誘発したマウス肝前癌病巣および自然発生肝腫瘍に関してGST-IIとc-Junの発現を免疫組織化学的に検討した。

2. 材料と方法

2・1 試薬

DENは和光純薬, 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-MeDAB) は第一化学薬品, *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) はナカライから各々購入された。Vectastain ABC-POキットはフナコシから入手した。

2・2 マウス肝化学発癌

日本クレアから購入した雄C3H/Heと雌C57BL/6マウスの交配によりB6C3F₁を得た。図1に示すように, DENは生後15日齢のB6C3F₁マウスに10mg/kg体重で1回腹腔内投与され, 雄は24週, 雌は40週でエーテル麻酔下で屠殺された。3'-MeDABは0.5mg/mouseで10から18日齢のマウスに5回の腹腔内隔日投与後, DENと同じ時点で屠殺された。ENUは, 雄についてのみ検討された。



図1 マウス肝化学発癌のプロトコール

(A) Diethylnitrosamine, (B) 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene, (C) *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (D) 自然発生腫瘍

生後12日に0.5mmole/kg体重で1回腹腔内投与し, 30週後に観察された。自然発生肝腫瘍は, 雄のC3H/HeとB6C3F₁マウスにのみ認められた。

2・3 抗体とプローブ

GST-II抗体は既報³⁾のようにウサギに作製された。c-Jun (AB-1) 抗体は, Oncogene science社から購入された。また, プローブとして³²P標識したGST-II cDNA (pGM211)⁶⁾とラットc-jun cDNA (pRJ101)⁷⁾を用いた。

2・4 免疫組織化学

各時点で屠殺されたマウスから肝臓を摘出し, 中葉と左葉の一部を3mm厚にスライスし, 冷アセトンで3日間固定した。ベンゼンによる置換後, パラフィンに包埋し, 6μm厚の連続断片を作成した。脱パラフィン操作に続いて, 第1抗体として4,000倍希釈のGST-II抗体および10倍希釈のc-Jun抗体を使用した。それ以降の操作はVectastain ABCキットを用いてAvidin biotin peroxidase complex (ABC) 法によった。3,3'-diaminobenzidineを基質とした発色反応の後, リリーマイヤーのヘマトキシリンによる対比染色を行なった。

2・5 ノーザンハイブリダイゼーション

正常マウス肝および肝前癌組織からのRNAの抽出は, Chomczynskiの方法⁸⁾に準じてなされた。RNAは, 10μgのtotal RNAを使用し, 1.5%アガロースゲルでの電気泳動により分離された。ニトロセルロース膜へ転写されたRNAは, UV照射で固定された。³²P標識プローブでのノーザンハイブリダイゼーションは, 10x Denhardt's / 0.1%SDS / 6x SSC / 10% dextran sulfate 溶液中で65℃, 16時間行われた⁹⁾。ハイブリダイゼーション終了後のニトロセルロース膜は, 1x SSC / 0.1% SDSにて65℃で30分2回洗浄され, コダックXRP-5フィルムに感光された。

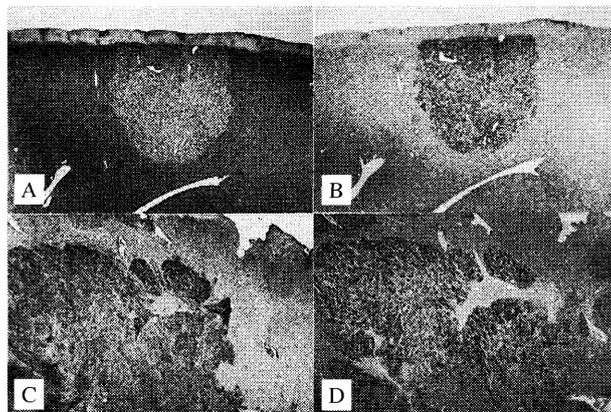


図2 DEN誘導マウス肝前癌病巣のGST-IIとc-Junの免疫組織化学

(A) 雄マウスのGST-II免疫染色 (B) 雄マウスのc-Jun免疫染色
(C) 雌マウスのGST-II免疫染色 (D) 雌マウスのGST-II免疫染色
倍率32x

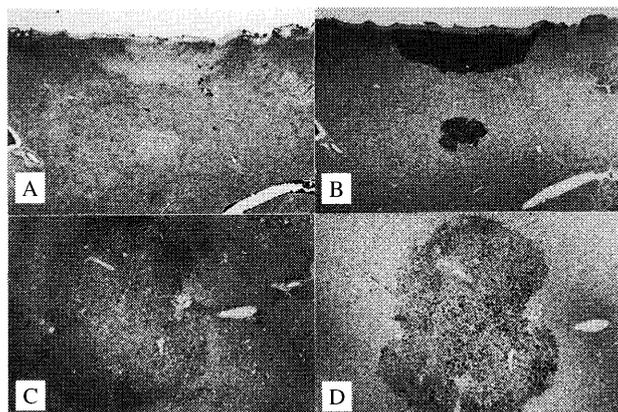


図3 3'-MeDAB誘導マウス肝前癌病巣のGST-IIとc-Junの免疫組織化学

(A) 雄マウスのGST-II免疫染色 (B) 雄マウスのc-Jun免疫染色
(C) 雌マウスのGST-II免疫染色 (D) 雌マウスのGST-II免疫染色
倍率32x

表1 DEN, 3'-MeDAB, ENU誘発および自然発生雄マウス肝前癌病巣におけるGST-IIとc-Junの発現パターン

発癌剤	匹数	前癌病巣の数				
		全前癌病巣数	MII(-)/Jun(+)	MII(0)/Jun(+)	MII(-)/Jun(0)	MII(0)/Jun(0)
DEN	6	84	80 (95%)	2 (2%)	2 (2%)	0
3'-MeDAB	6	41	34 (83%)	4 (10%)	2 (5%)	1 (2%)
ENU	9	25	24 (96%)	0	0	1 (4%)
自然発生	3	5	5 (100%)	0	0	0

MII;GST-II, (+);陽性, (-);陰性, (0);変化なし

表2 DENおよび3'-MeDAB誘発雌マウス肝前癌病巣におけるGST-IIとc-Junの発現パターン

発癌剤	匹数	前癌病巣の数				
		全前癌病巣数	MII(-)/Jun(+)	MII(0)/Jun(+)	MII(-)/Jun(0)	MII(0)/Jun(0)
DEN	5	50	45 (90%)	5 (10%)	0	0
3'-MeDAB	7	27	23 (85%)	4 (15%)	0	0

MII;GST-II, (+);陽性, (-);陰性, (0);変化なし

3. 結 果

正常マウス肝のGST-IIの免疫組織化学は、既報⁴⁾のように、雄が肝全体に強い染色性を示す一方、雌では極めて弱く、著明な性差が確認された。また、c-Junは、雌雄共に陰性であった。多くのDEN誘発マウス肝前癌病巣におけるGST-IIの発現は、図2Aおよび2Cに示されるように、雄で陰性、逆に雌で陽性だった。c-Junの場合は、雌雄ともに陽性であったが、核よりも細胞質における染色性が強かった。また、雌に対して雄の方がよ

り強い染色性を示す傾向があった(図2Bと図2D)。3'-MeDABで誘発された典型的な病巣は、図3のように、DENの場合と同様、雄でGST-II陰性/c-Jun陽性、雌でGST-II陽性/c-Jun陽性の表現型であった。ENU発癌系においては雄のみで検討されたが、DEN, 3'-MeDABの系と同じ表現型が多数を占めた(データ未発表)。さらに、雄のB6C3F₁とC3H/Heマウスに生じた自然発生肝腫瘍もGST-II陰性/c-Jun陽性巣として検出された。

上述の各遺伝子毒性発癌剤で誘発されたマウス肝前癌

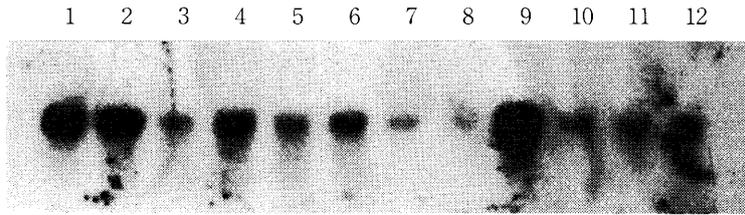


図4 正常雌雄マウス肝とDEN誘導肝前癌病巣のGST-II mRNAの発現変動
1と2; 正常雄肝, 3から6; 雄肝前癌病巣, 7と8; 正常雌肝,
9から12; 雌肝前癌病巣

病巣および自然発生肝腫瘍におけるGST-IIとc-Junの発現パターンを分類したところ、表1に示すように、雄におけるGST-II陰性/c-Jun陽性の病巣は、DENの場合95%、3'-MeDABで83%、ENUで96%そして自然発生腫瘍で100%と主体を占めた。また、雌では表2のように、GST-II陽性/c-Jun陽性の病巣がDENで90%、3'-MeDABで85%であった。

次に、正常マウス肝と肝前癌病巣におけるGST-IIとc-JunのmRNAのレベルを、ノーザンハイブリダイゼーションで解析した。図4のように、正常雌雄マウス肝ではGST-II mRNAの発現に顕著な性差が認められ、雄が雌の20倍程度高く発現していた。それに対し、雄前癌では著明な低下、雌前癌では増加が確認され、免疫組織化学の結果と一致した。また、図4は、雌雄の病巣におけるGST-II mRNAレベルは同程度であり、正常雌雄マウス肝の中間のレベルに位置するようになることを示す。一方、免疫組織化学的にc-Jun陽性を示す前癌病巣では、正常肝と同様にmRNAの明確な発現は認められなかった。

4. 考 察

本研究において、DEN、3'-MeDAB、ENUの3種の遺伝子毒性発癌剤で誘発されたマウス肝前癌病巣は、雄でGST-II陰性/c-Jun陽性、雌でGST-II陽性/c-Jun陽性の表現型が主体を占めることが明らかにされた。この結果は、そのようなGST-IIとc-Junの発現パターンは、全ての遺伝子毒性発癌剤で生じた前癌病巣に共通したものであることを示唆する。また、雄マウスの自然発生肝腫瘍でも同様の発現様式をとることから、肝前癌全般にみられる現象とも考えられる。しかし、クロフィブレートを代表とするペルオキシゾーム増殖剤のような非遺伝子毒性発癌剤で誘発したマウス肝前癌病巣において検討する必要がある、現在その研究は進行中である。

マウス前癌病巣におけるGST-IIは、正常雌雄マウス肝の中間レベルの発現を示したが、GST-IIの生理的発現調節はテストステロンによって行われている⁴⁾ので、病巣での発現制御機構として以下のことが考えられる。(1)雌雄の肝前癌病巣におけるテストステロン濃度が同じ

レベルとなる。(2)正常肝細胞と異なり、テストステロン受容体の数およびホルモンに対するアフィニティが前癌細胞で同一となる。(3)テストステロンは、epidermal growth factor (EGF)の合成、分泌を促進し、肝細胞のEGF受容体(EGFR)を介してGST-IIの発現を調節しているとも考えられるので、病巣におけるEGFRレベルの変動が想定される。

免疫組織化学的には前癌病巣において強いc-Junの発現をみたが、mRNAは検出されなかった。使用したプローブはラットのc-jun cDNAであったが、このプローブは、免疫組織化学的には非常に弱い染色性を示すマウス肺のc-jun mRNAを特異的に検出する(未発表)ことから、マウスc-jun mRNAと反応することが確認されている。一方、今回用いたc-Jun抗体は、DNA結合ドメインの合成ペプチドに対する抗体であり、その部分はJunファミリーのJunBやJunDと高いホモロジーを有するため、それらが免疫組織化学的に反応した可能性がある¹⁰⁾。現在、マウス前癌病巣のc-jun, junB, junDのreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)でその点を解明すべく検討を進めている。

文 献

- 1) Tsuchida, S. et al.: Glutathione transferase and cancer. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **27**, 337-384, 1992.
- 2) Satoh, K. et al.: Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: A new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3964-3968, 1985.
- 3) Hatayama, I. et al.: Developmental and hormonal regulation of the major form of hepatic glutathione S-transferase in male mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **140**, 581-588, 1986.
- 4) Hatayama, I. et al.: Sex-dependent expression of class pi glutathione S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis in B6C3F1 mice.

- Carcinogenesis*, **14**, 537-538, 1993.
- 5) Nakano, H. et al. : c-Jun expression in single cells and preneoplastic foci induced by diethylnitrosamine in B6C3F1 mice : Comparison with the expression of pi-class glutathione S-transferase. *Carcinogenesis*, **15**, 1853-1857, 1994.
- 6) Hatayama, I. et al. : A cDNA sequence coding a class pi glutathione S-transferase of mouse. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 4606, 1990.
- 7) Sakai, M. et al. : Structure and expression of the rat c-jun messenger RNA : Tissue distribution and increase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, **49**, 5633-5637, 1989.
- 8) Chomczynski, P. et al. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, **162**, 156-159, 1987.
- 9) Sambrook, J. et al. : "Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition" Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- 10) Miura, H. et al. : Expression of c-Jun and glutathione S-transferase II (GST-II) in mouse hepatic foci induced by genotoxic carcinogens. 54th Ann. Meet. Jpn. Cancer Assoc. (abstract), p76, 1995.

Expression of Class π Glutathione S-transferase II and c-Jun in Preneoplastic Foci of Mouse Livers Induced by Genotoxic Carcinogens

Hironori MIURA¹, Masanori TAKAHASHI¹ and Ichiro HATAYAMA¹

The expression of class π glutathione S-transferase II (GST-II) and c-Jun was immunohistochemically examined in preneoplastic hepatic foci of mice induced by three genotoxic carcinogens, diethylnitrosamine, 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene and N-ethyl-N-nitrosourea. GST-II negative and c-Jun positive foci were predominant in males, while GST-II positive and c-Jun positive foci were predominant in females. The result indicates that the expression pattern is common for mouse hepatic foci induced by genotoxic carcinogens.

Key words : genotoxic carcinogens, mouse hepatocarcinogenesis, glutathione S-transferase II, c-Jun, immunohistochemistry

¹ : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

青森県における酸性降水物の特徴

早狩 進 松尾 章 村野 健太郎¹

青森県内の都市部、太平洋側、日本海側及び山岳地帯を代表する4局において、1991年度から1994年度の4年間にわたって1週間毎の通年酸性降水物調査を行った結果、4局の年平均pH値は、4.76~5.06の間にあり、全国平均より高めであった。年平均pH値の推移では日本海側が上昇傾向、都市部が下降傾向であった。通年調査によってNa⁺濃度やnss-SO₄²⁻濃度、NO₃⁻/nss-SO₄²⁻比(N/S比)の季節変動が明らかになり、特にN/S比は、4局とも0.3~0.6の範囲内で夏季に高く冬季に低い山型の季節変化を示した。イオン当量濃度の4局月平均値を用いた因子分析によってバリマックス回転を行ったところ、比較的近距离輸送による汚染度を表す第1因子、北西季節風の長距離輸送による汚染度を表す第2因子及びイオン成分の増加を伴わずにpHの低下をもたらす第3因子に分類された。

Key words : acid precipitation, ion deposition, factor analysis, pH, SO₄²⁻

1. はじめに

当所では、平成元年度からろ過式簡易採取装置を用いた酸性降水物調査を継続しているが、八甲田山を含めた複数の地点に観測網を広げた1991年度からの調査結果を元に、統計手法を用いて季節及び地域特性について解析を加えた結果、知見を得たので報告する。

2. 調査方法

2.1 調査地点 (地点図1参照)

- 青森県環境保健センター屋上 (以後環保センター局)
- 八甲田山田茂落岳 (以後八甲田局)
- 鱈ヶ沢町勤労青少年スポーツセンター (以後鱈ヶ沢局)
- 六ヶ所放射線監視局 (以後六ヶ所局)

2.2 調査期間

- 1991年4月~1995年3月
- (但し、鱈ヶ沢局は1992年4月~1995年3月)

2.3 採取・分析方法

環境庁型のろ過式簡易採取装置(冬期間は雪採取装置)により、1週間毎(一部2週間)に通年採取した降水のろ液について、酸性雨等調査マニュアル¹⁾に準じてpH、EC、Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、NH₄⁺、SO₄²⁻、NO₃⁻、Cl⁻を分析した。

3. 結果と考察

3.1 pHについて

1991年度から1994年度の間の降水量で重み付けを行ったpH平均値は、環保センター局で4.96、八甲田局で

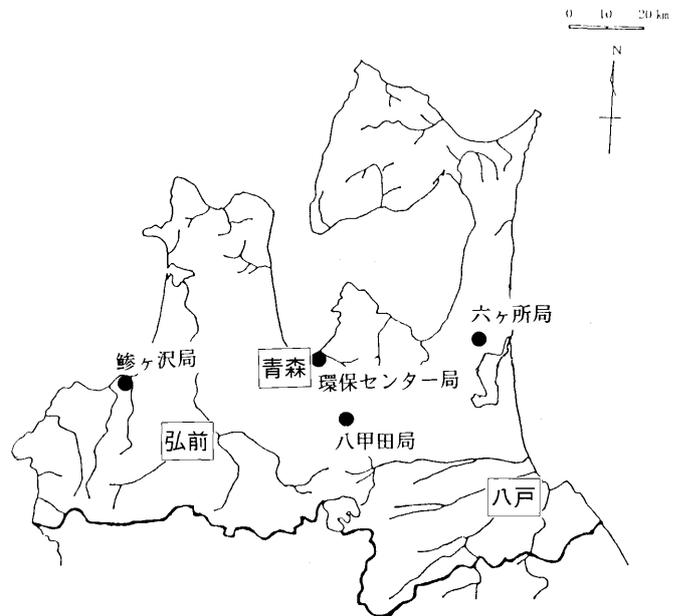


図1 調査地点図

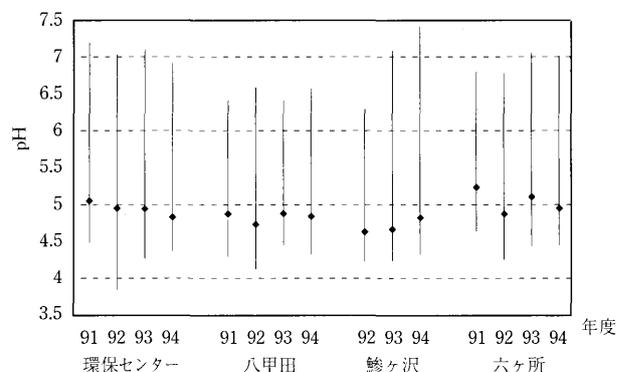


図2 pH年平均値と週最大・最小値

1: 国立環境研究所

4.86, 鯉ヶ沢局で4.76, 六ヶ所局で5.06であり, 全国公害研協議会が行った酸性雨全国調査結果報告書²⁾(以後全公研調査報告書と記す)による1991年度から1993年度までのpH全国平均値4.7より全局とも高めであった。

各局のpH年平均値の推移(図2参照)によると, 鯉ヶ沢局では上昇傾向がみられたが, 環保センター局では逆に下降傾向がみられた。

環保センター局は市街地にあるため, 道路の白線に含まれているCaが乾性降水物としての過式採取装置に採取され, 雨水のpHの中和作用に寄与していたものと考えられるが, 1993年4月からスパイクタイヤが禁止されたことによって, 環保センター局の非海塩Ca²⁺沈着量は91年度以降61.5, 60.2, 56.9, 34.0 (meq/m²)と減少してきている。

スパイクタイヤ粉じんによるCaの影響は3月~4月に現われることが多く, pH月平均値の推移(図3参照)でも, 環保センター局で3~4月にpHの上昇が顕著であり, 同様な傾向は, 六ヶ所局にもみられた。それに対し, 標高が約1,300mの八甲田局や冬季季節風の風上側に位置する鯉ヶ沢局ではそのような傾向はみられなかった。

国立公園内の清浄地域にある八甲田局におけるpHは, 夏季に高く冬季に低い季節変化が顕著であった。

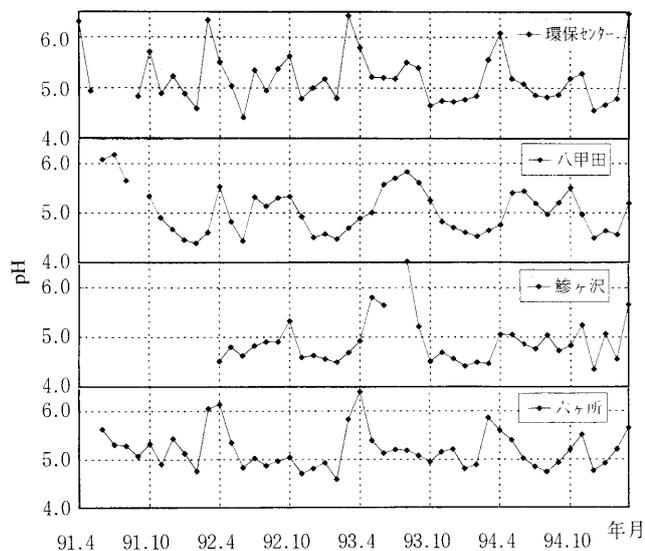


図3 各局のpH月平均値の推移

1週間単位のpHの4ヶ年間の頻度分布(図4参照)を求めたところ, 各局とも4.6~5.1の範囲が最も多く, いわゆる酸性雨とみなされるpH5.6未満の雨は, 環保センター局で61.1%, 八甲田局で72.9%, 鯉ヶ沢局で83.5%, 六ヶ所局で73.5%を占めており, 最も西側に位置する鯉ヶ沢局で酸性雨の占める比率が高かった。

また, 同じ1週間単位のpHと降水量の関係について,

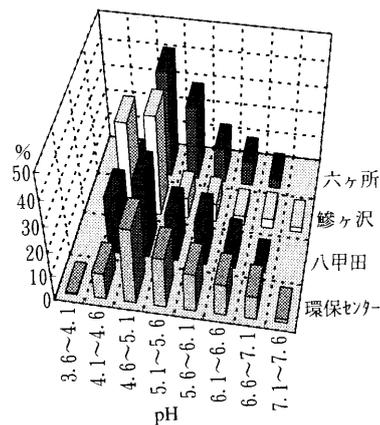


図4 pHの頻度分布

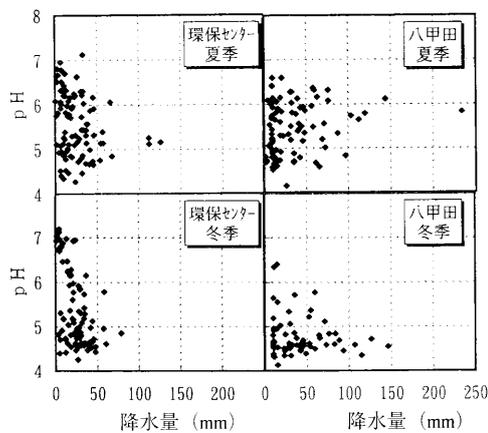


図5 降水量とpHの関係

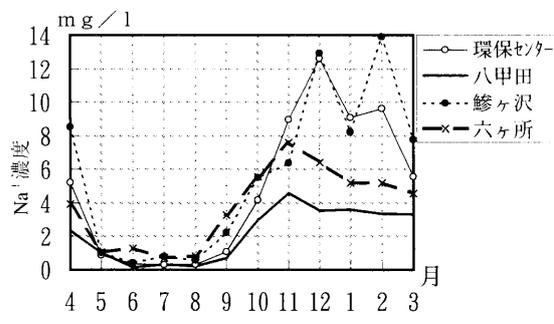


図6 Na⁺濃度の季節変化

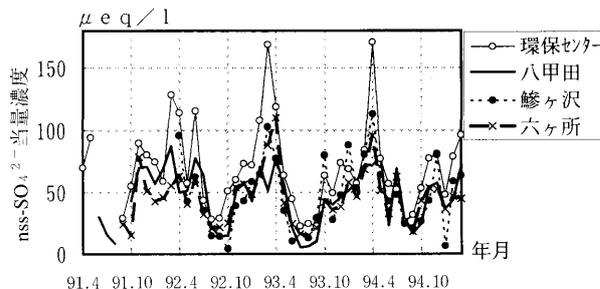


図7 nss-SO₄²⁻当量濃度の経月変化

環保センター局と八甲田局とで夏季と冬季に分割して比較したところ（図5参照）、降水量が多くなれば、八甲田局では夏季にpH6.0に取れんし、冬季にはpH4.5に取れんする傾向が見られた。冬季の環保センター局と八甲田局は降水量の増大につれて同程度のpH値に取れんすることから、冬季には地域的な影響を受けるというよりも、季節風の影響下で広域的にpHの低い雨・雪が降っているものと思われる。

3・2 各成分濃度

海塩の影響を示すNa⁺濃度（mg/l）の季節変化（図6参照）では、北西からの季節風が卓越する冬季に海岸に近い環保センター局や鯨ヶ沢局でNa⁺濃度の上昇が著しいが、内陸の高地にある八甲田局でもその影響は現われていた。

そこで、Na⁺濃度を元に海塩由来の硫酸イオンを差し引いた、非海塩由来の硫酸イオン（以後nss-SO₄²⁻）濃度（μeq/l）の経月変化（図7参照）をみると、各局とも冬季にnss-SO₄²⁻濃度が上昇し、季節風の卓越する時期とよく一致しており、特に環保センター局のピークが顕著であった。

3・3 各成分沈着量

nss-SO₄²⁻沈着量（meq/m²）は、雨量の変動の影響も受けるため、nss-SO₄²⁻濃度ほど顕著な季節変化はみられないが、やはり冬季にピークが現れる傾向があった（図8参照）。

nss-SO₄²⁻濃度では、環保センター局の上昇が著しかったが、沈着量では八甲田局の上昇が目立っていた。

NO₃⁻沈着量の季節変化（図9参照）は、nss-SO₄²⁻沈着量と比較して特徴的な季節変化がみられなかった。

ところが、NO₃⁻とnss-SO₄²⁻の沈着量の当量比（以下N/S比と記す）を求めると、0.3~0.6の範囲内で夏季に高く冬季に低い山型の季節変化を示し、冬季は4局のN/S比の値が約0.3に取れんすることが確かめられた（図10参照）。

このことは、夏季と冬季ではNO₃⁻とnss-SO₄²⁻の発生源に質的違いがあり、冬季は全局が広域的な発生源機構の影響を受けている可能性を示している。

全公研調査報告書によって示された本州日本海側の冬季0.36、夏季0.50というN/S比の値とほぼ一致しており、本県において冬季にNO₃⁻よりnss-SO₄²⁻が増加する傾向は、本州日本海側に共通な特徴と考えられる。

1991年度から1994年度までの4ヶ年間の各局の陽イオン・陰イオン沈着量の組成比（図11参照）によると、全イオン沈着量に対する陰イオンの比率は環保センター局の50.2%から八甲田局の51.1%までの間にあり、若干陰イオン過多であった。

なお、図の凡例に示したTsmとは、Na⁺から換算した

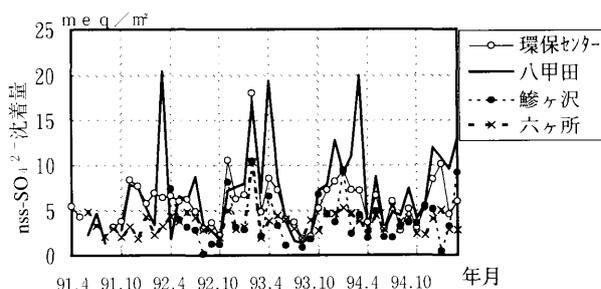


図8 nss-SO₄²⁻沈着量の経月変化

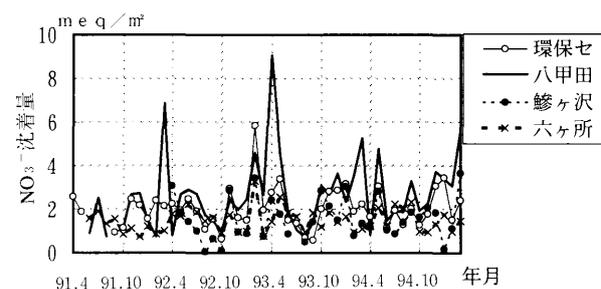


図9 NO₃⁻沈着量の経月変化

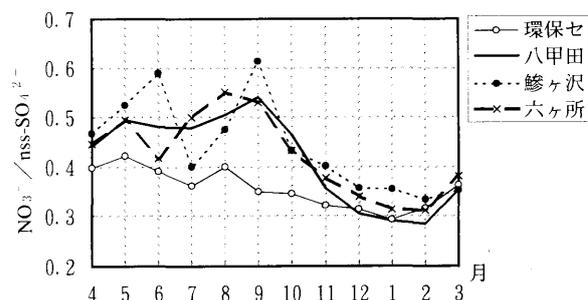


図10 N/S比の季節変化

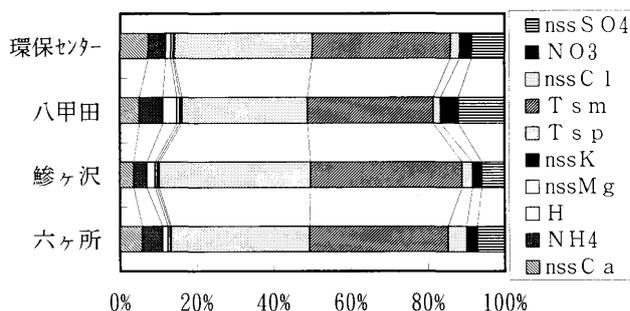


図11 陽イオンと陰イオンの組成比

海塩成分合計量の内陰イオン成分の合計量を、Tspとは陽イオン成分の合計量を表し、いずれもNa沈着量から下記の式により換算したものである。

$$T_{sm} = ss-C l^{-} + ss-S O_4^{2-}$$

$$= Na^{+} \times (1.166 + 0.120)$$

$$T_{sp} = Na^{+} + ss-K^{+} + ss-C a^{2+} + ss-M g^{2+}$$

$$= Na^{+} \times (1 + 0.021 + 0.043 + 0.227)$$

沈着量の比較では、海塩成分合計量が環保センター局で718、八甲田局で492、鯉ヶ沢局で608、六ヶ所局で440 (meq/m²)、また非海塩成分の合計量はそれぞれの局で233, 241, 167, 163 (meq/m²)となっており、海塩の影響は環保センター局が強いという結果であった。

非海塩成分の累積沈着量を比較すると(図12参照)、総量では、鯉ヶ沢局と六ヶ所局が類似しており、環保センター局と八甲田局が類似していた。但し、八甲田局は、環保センター局よりnss-SO₄²⁻、NO₃⁻が多く、nss-Ca²⁺が少ないという特徴があった。

特に、八甲田局における1993年度の年間nss-SO₄²⁻沈着量の105meq/m²という値は、全公研調査報告書によると、桜島等の影響の強い九州地区を除くと秋田県、新潟県、石川県と共に全国の上位に位置していた。

但し、沈着量はイオン当量濃度×降水量で求めるため、その局の降水量の多少が沈着量の値に影響する。測定期間中の年平均降水量は環保センター局で1,207、八甲田局で1,973、鯉ヶ沢局で1,041、六ヶ所局で1,259mmを記録し、八甲田局は山岳地帯に位置するため、海岸付近の3局に比べて6～9割ほど降水量が多く、それが沈着量の増大に寄与していた。ちなみに、非海塩成分の累積当量濃度で比較すると他の3局より低い値であった(図13参照)。

環保センター局と八甲田局について、非海塩成分の沈着量の違いを明らかにするために、夏季と冬季における降水量と非海塩総沈着量との関係を図14に表した。

その結果、冬季には2局とも降水量が増大すると、沈着量がそれにつれて増大し、環保センター局は回帰式の傾きが0.116(相関係数0.556)、八甲田局では傾きが0.110(相関係数0.708)を示す直線に沿っていた。それに対し、夏季には降水量が増大しても総沈着量が頭打ちとなる傾向があった。

このことから、夏季には乾性降下物や初期降雨のウォッシュアウトによってもたらされた非海塩成分が、その後の非海塩成分の少ない雨水によって希釈される効果があるものの、冬季には雨水あるいは雪が観測局上空に運ばれてくる以前から非海塩成分を多く含んでいるため、降水量が増えても希釈効果が働かないものと思われる。

このことは、冬季の非海塩成分が大陸からの長距離輸送によってもたらされた可能性があることを示唆しており、降水量の多い八甲田局をnss-SO₄²⁻沈着量で全国の上位地点に押し上げる要因となっている可能性がある。

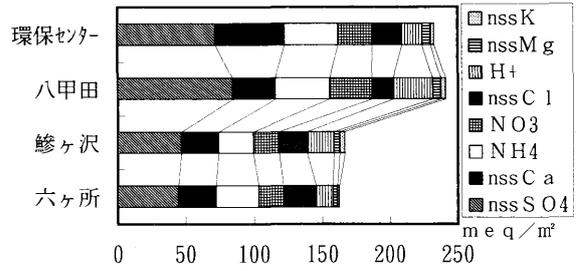


図12 非海塩成分の累積沈着量

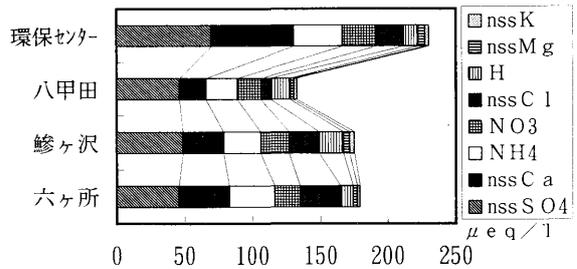


図13 非海塩成分の累積当量濃度

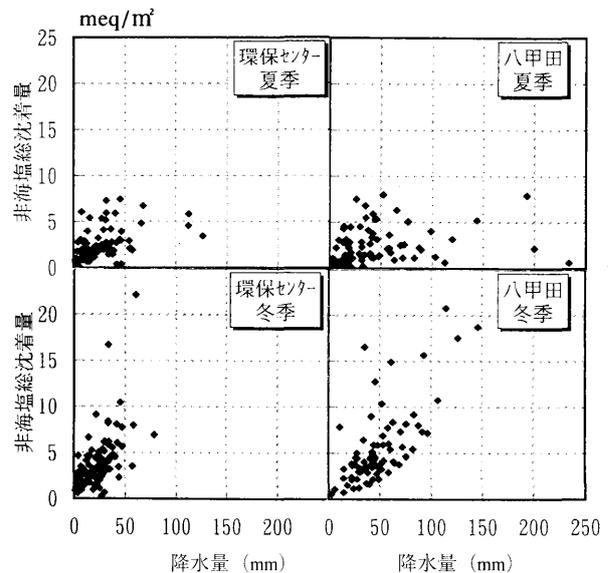


図14 降水量と非海塩総沈着量の関係

3・4 各成分濃度の統計解析

一般的には、酸性雨の解析を行う場合沈着量で評価することが多いが、降水量に違いがありすぎる4局を評価するため、あえてH⁺、nss-K⁺、nss-Ca²⁺、nss-Mg²⁺、NH₄⁺、nss-SO₄²⁻、NO₃⁻、nss-Cl⁻の8非海塩成分のイオン当量濃度について統計解析を試みた。

全局の月平均値168サンプルを用いて主成分分析を試みた結果、表1の相関係数行列より得られた主成分分析の固有値表(表2参照)に示すとおり、第1～2主成分までの固有値がそれぞれ4.49、1.35と1以上を示し、第3成分も0.90となり、第3成分までの累積寄与率が84%

表1 相関係数行列

	H	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	nssK	nssCa	nssMg	nssCl	nssSO ₄ ²⁻
H	1.000							
NH ₄ ⁺	0.003	1.000						
NO ₃ ⁻	0.037	0.824	1.000					
nssK	0.089	0.610	0.647	1.000				
nssCa	0.247	0.701	0.768	0.513	1.000			
nssMg	0.224	0.521	0.490	0.425	0.473	1.000		
nssCl	0.207	0.332	0.161	0.229	0.327	0.584	1.000	
nssSO ₄ ²⁻	0.176	0.829	0.907	0.635	0.804	0.618	0.321	1.000

(注：以後表中のイオン荷電の表記省略)

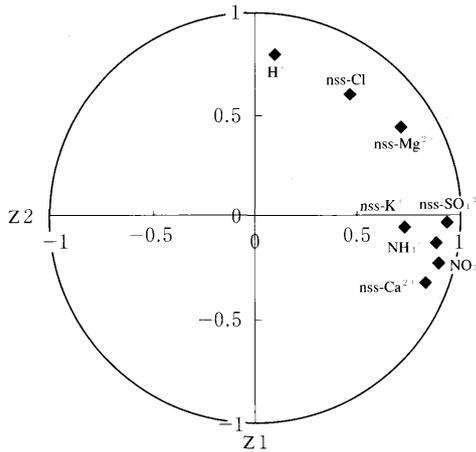


図15 主成分分析の因子負荷量

となった。

図15に2つの主成分の負荷量散布図を示したが、第1主成分はすべての符号が正であり、総合的な大きさを表す因子と考えられ、第2主成分はプラス側にnss-Cl⁻、H⁺、nss-Mg²⁺、マイナス側にNO₃⁻、nss-Ca²⁺、nss-K⁺、nss-SO₄²⁻、NH₄⁺が配置され、人為起源のイオンの強さをマイナスに、自然由来のイオンの強さをプラス側に持つ因子とみなすことができた。

主成分分析による因子得点の散布図(図16参照)では、Z1座標が-2でZ2座標が-0.5付近を起点として約±

表3 因子分析の固有値表(回転前後)

	回転前の因子負荷量			回転後の因子負荷量		
	因子1	因子2	因子3	因子1	因子2	因子3
H	0.088	0.751	-0.498	0.013	0.139	0.895
NH ₄ ⁺	0.859	-0.100	-0.028	0.832	0.238	-0.032
NO ₃ ⁻	0.912	-0.219	-0.237	0.967	0.039	0.018
nssK	0.665	-0.025	-0.108	0.652	0.156	0.071
nssCa	0.823	-0.287	0.201	0.788	0.273	-0.325
nssMg	0.662	0.334	0.158	0.485	0.559	0.164
nssCl	0.457	0.579	0.550	0.127	0.908	0.083
nssSO ₄ ²⁻	0.964	-0.015	-0.172	0.943	0.227	0.130
固有値	4.275	1.152	0.714	3.814	1.365	0.963
寄与率	0.534	0.144	0.089	0.477	0.171	0.120
累積寄与	0.534	0.678	0.768	0.477	0.647	0.768

表2 主成分分析の固有値表

	主成分負荷量		
	Z1	Z2	Z3
H	0.091	0.797	-0.562
NH ₄ ⁺	0.888	-0.130	-0.048
NO ₃ ⁻	0.901	-0.227	-0.229
nssK	0.739	-0.055	-0.251
nssCa	0.839	-0.324	0.231
nssMg	0.715	0.433	0.246
nssCl	0.466	0.595	0.570
nssSO ₄ ²⁻	0.948	-0.029	0.159
固有値	4.486	1.353	0.898
寄与率	0.561	0.169	0.112
累積寄与	0.561	0.730	0.842

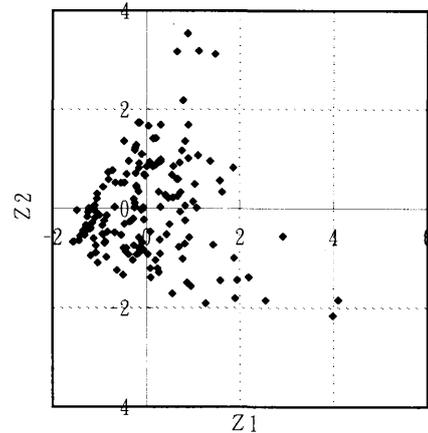


図16 主成分分析の因子得点

45度の範囲に分布していることが確認できた。この図から因子分析を用いれば、直交回転によって人為汚染度と自然寄与度を分離できると予想されたために、因子分析に切り替えさらにバリマックス回転を行った。

表3に回転する前と回転した後の因子分析固有値表を示した。回転前の固有値は主成分分析とあまり違いはないが、バリマックス回転後の因子負荷量(図17参照)で

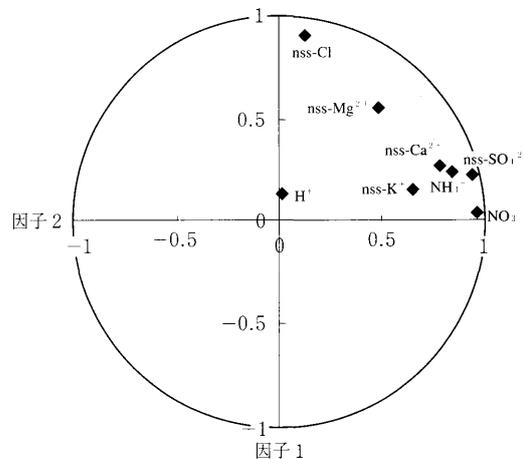


図17 因子回転後の因子負荷量

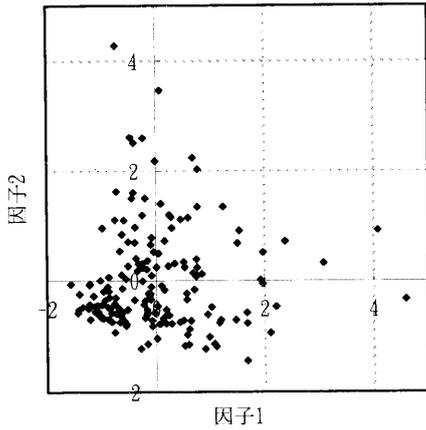


図18 因子回転後の因子得点

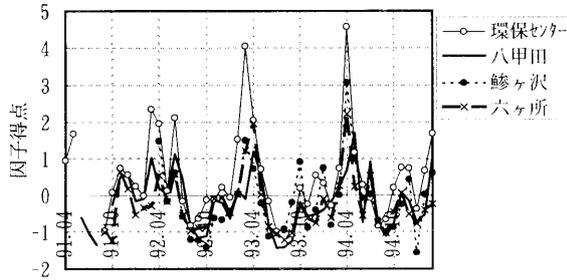


図19 因子回転後の因子1得点の経月変化

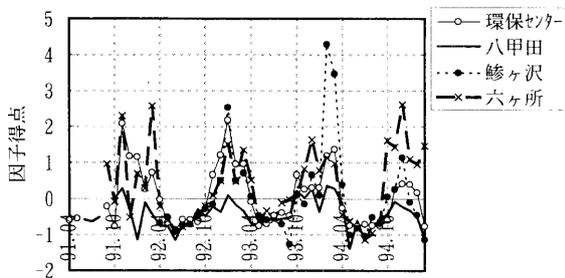


図20 因子回転後の因子2得点の経月変化

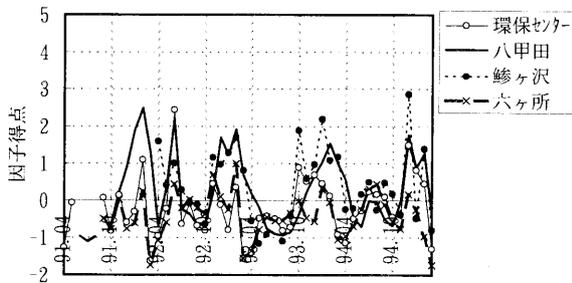


図21 因子回転後の因子3得点の経月変化

は、因子1側には NO_3^- 、 nss-Ca^{2+} 、 nss-K^+ 、 NH_4^+ 、 nss-SO_4^{2-} が、因子2側には nss-Cl^- 、 nss-Mg^{2+} が主たる成分として配置され、 H^+ だけはどの項目ともかけ離れていて、因子3の主要な成分となっていた。

回転後の因子得点(図18参照)は、図16の主成分分析の因子得点図を反時計回りに約45度回転した図に酷似していた。

因子得点の経月変化を因子1~3について、それぞれ図19~21に示した。それによると、因子1では3~4月に高得点を示すケースが多いが、因子2では11月~3月の間で高得点を示す明瞭な周期性を示していた。因子3では因子1~2ほど強いピークは見られず、周期性も見られなかった。

因子1で1σ以上のケースは延べ21回あったが、環保センター局10回、八甲田局5回、鯉ヶ沢局3回、六ヶ所局3回と環保センター局で約半分を占めていた。また、月別延べ出現頻度の多かったのは4月8回、3月7回、5月3回、6月2回と春季に集中していた。

一方、因子2で1σ以上のケースは延べ22回あり、環保センター局7回、八甲田局0回、鯉ヶ沢局4回、六ヶ所局11回と海岸に近い3局で高得点を占めていた。また、月別延べ出現頻度で多かったのは1月7回、2月7回、3月5回と冬季に集中していた。

また、因子3で1σ以上のケースは延べ26回あり、環保センター局3回、八甲田局12回、鯉ヶ沢局11回、六ヶ

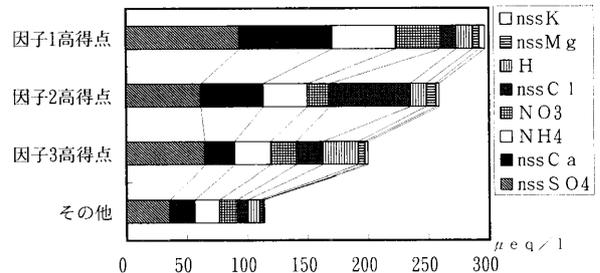


図22 因子1~3高得点時の非海塩累積当量濃度

所局0回と西よりの3局で高得点を占めていた。また、月別延べ出現頻度で多かったのは2月8回、1月5回、12月4回、3月3回、6月3回と冬季から春季に及んでいた。

因子1~3の高得点時とそれ以外の時に分類し、それぞれの非海塩イオン累積当量濃度の平均を図22に示した。それによると、因子1高得点時297、因子2高得点時259、因子3高得点時200、それ以外の時114(μeq/l)と因子1高得点時の雨水が一番非海塩イオンを多く含んでいた。それに対し、同じ分類を Na^+ 濃度について行くと、それぞれ151、431、241、108(μeq/l)という値を示し、因子2高得点時に海塩の影響が強かった。同じ

くpHについて分類すると、それぞれ、4.87, 4.89, 4.53, 5.00と因子3高得点時のpHが一番低く、因子1, 2高得点時でもその他の時に比べてpHが1以上も低いことから、因子分析によって3因子の高得点時は比較的pHの低い月を抽出していた。

因子1高得点時には nss-SO_4^{2-} , nss-Ca^{2+} , NH_4^+ , NO_3^- 等の人為汚染質が多いにもかかわらず因子3高得点時ほどpHが低くならないのは、その内でも nss-Ca^{2+} の影響が強く現れたものと思われる。今後、Ca濃度はさらに低下すると予想されるので、因子1の高得点時にはpHは低下する方向に向かうものと懸念される。

因子2高得点時は、他の因子の高得点時に比べて nss-Cl^- , nss-Mg^{2+} が多く、海塩成分も約2~3倍多くなっており、北西季節風が卓越する時期と一致していた。

しかしながら、因子2高得点時でもpHが4.89とその他の時に比べて低いのは、海塩の影響ということは考えられず、北西からの季節風が卓越する冬季にその季節風によって、大陸から汚染物質がもたらされたためと考えられる。

因子3高得点時は、冬季から春季と広がりがあるため高得点要因を特定できないが、 Na^+ 濃度が因子1高得点時と因子2高得点時の中間に位置し、非海塩成分が3因子の中でも一番少ないにもかかわらず因子2高得点時よりも nss-SO_4^{2-} 濃度が高く nss-Ca^{2+} 濃度が低いという特徴から考えて、冬季において季節風が比較的弱いながら汚染質だけが持ち込まれた場合や、春季においてCa成分の舞い上がり等が収まった後などにpHの低い降雨・雪があった場合等が含まれているものと思われる。

以上、4局、4年間、8つの非海塩イオン当量濃度の月平均値を用いて行った因子分析にバリマックス回転を加えることによって、比較的距離汚染源による地域汚染度を表す第1因子、長距離輸送による広域的汚染度を表す第2因子、さらにイオン成分の増加は目立たないがpHの低下が著しい第3因子を抽出することができた。

今後、これらの知見を元にトラジェクトリー解析等を加えて週単位のデータ解析を深めたい。

4. ま と め

青森県内の都市部、太平洋沿岸、日本海沿岸、及び山岳地帯を代表する4局において、4年間にわたって1週間毎の通年酸性降水物調査を行った結果、以下の知見が得られた。

(1) 年平均pH値は、4.76~5.06の間にあり、全国平均

より高めであった。年平均pH値の推移では鯉ヶ沢局が上昇傾向、環保センター局が下降傾向であった。1993年4月にスパイクタイヤが禁止されたことにより、都市部の非海塩Ca沈着量が減少し、それによってpHの中和効果も減少した。1週間平均のpHの頻度分布によると、pH5.6未満の降水物は61.1~83.5%を占め、鯉ヶ沢局が一番多かった。また、八甲田局のpHは、降水量の増加につれて夏季は6.0、冬季は4.5に収束する傾向が見られた。

(2) 北西季節風が卓越する冬季に Na^+ 濃度が上昇するが、1,300mの高地の八甲田局でも海塩の影響は現れていた。 nss-SO_4^{2-} 濃度も季節風の卓越する時期に上昇する傾向があった。

(3) 八甲田局は nss-SO_4^{2-} 濃度では目立たないが、 nss-SO_4^{2-} 沈着量では上昇が目立つのは、八甲田局の年降水量が他の3局より6~9割程多いことによる。

(4) $\text{NO}_3^-/\text{nss-SO}_4^{2-}$ 比は、4局とも0.3~0.6の範囲内で夏季に高く冬季に低い一山型の季節変化を示していた。

(5) 環保センター局と八甲田局の非海塩成分の沈着量は、冬季に降水量の増加につれて沈着量も増加する傾向が見られたが、夏季には、降水量が増加しても頭打ちとなる傾向があった。

(6) イオン当量濃度の4局月平均値を用いた主成分分析の結果、総合的な大きさを示す第1主成分と、人為汚染がマイナス、自然由来がプラスを示す第2主成分が抽出された。

(7) 同じデータを用いた因子分析によってバリマックス回転を行ったところ、近距離輸送による汚染度を表す第1因子、北西季節風によって運ばれた長距離輸送による汚染度を表す第2因子及びイオン成分の増加を伴わずにpHの低下をもたらす第3因子に分類することができた。

なお、この研究に用いた八甲田局のデータは、国立環境研究所との共同研究「バックグラウンド地域における酸性物質等の動態の解析に関する研究」により得られたものである。

文 献

- 1) 環境庁大気保全局：酸性雨等調査マニュアル，1990.
- 2) 全国公害研協議会：酸性雨全国調査結果報告書，全国公害研会誌，20(2)，58-130，1995.

Abstract

Characteristics of acid precipitates in the Aomori Prefecture

Susumu HAYAKARI¹, Akira MATSUO¹ and Kentaro MURANO²

At 4 stations representing 4 regions, namely the city parts, Pacific side, Japan Sea side and mountainous side in the Aomori Prefecture, an acid rain examination throughout the year in every one week has been carried out for 4 years since the fiscal year 1991 through fiscal year 1994. As a consequence of it, an annual mean value of pH was between 4.76~5.06, and therefore they were a little bit higher than an average of the whole country. Concerning to a transition in annual mean value, in Japan Sea side it had an upward trend, and in the city parts it has a downward trend. By an examination throughout the year, the seasonal fluctuation of Na^+ concentration, nss-SO_4^{2-} concentration and $\text{NO}_3^-/\text{nss-SO}_4^{2-}$ ratio has been confirmed, and especially N/S ratio was in a range between 0.3~0.6 in all 4 stations as well, and it has shown a seasonal change with one peak, namely high in summer and low in winter.

When a BARIMAX rotation has been executed by applying the factor analysis using the monthly mean values of ionic equivalent concentration of 4 station, they were classified into 3 kinds of factors, that is the first factor representing a pollution level caused by a transportation in a relatively short distance, and the second factor representing a pollution level caused by a transportation in a long distance, and the third factor lowering of pH values without increase of ion concentrations.

Key words: acid precipitates, pH, H^+ , SO_4^{2-}

1 : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

2 : National Institute for Environmental Studies

酸性雨解析におけるイオン組成の表現方法の検討

—トリリニア・ダイアグラムの応用—

早狩 進

地下水等の解析に広く用いられているトリリニア・ダイアグラムを酸性雨解析用に用いるために改良し、 $H^+ + nss-K^+ + nss-Mg^{2+}$, NH_4^+ , $nss-Ca^{2+}$, NO_3^- , $nss-SO_4^{2-}$, $nss-Cl^-$ の非海塩成分だけで構成する酸性雨ダイアグラムを提案する。

また、その酸性雨ダイアグラムの右側に位置する陰イオン3成分で構成される三角形に、 $NO_3^- / nss-SO_4^{2-}$ 比が0.5に相当する傾きの補助線を加えることによって、陰イオン組成の表現力を高めることが可能である。

Key words : Acid precipitation, Trilineardiagram

1. はじめに

地下水や温泉水のイオン組成をグラフに表現する方法として、トリリニア・ダイアグラム¹⁾(以後単にダイアグラムと記す)が広く用いられている。

ダイアグラムは量的な表現には適していないが、6成分による組成の特徴を2次元で表現でき、しかも多数の試料の情報を一つのグラフに表わすことができるという特徴をもっている。

しかしながら、このままでは雨水のイオン組成を表現する方法として適当ではないので、酸性雨解析に適したダイアグラムを検討したので報告する。

2. 原図の表現方法

基本的なダイアグラムの表現方法は、図1に示すとおり、左側の三角形に陽イオン3成分($Na^+ + K^+$, Ca^{2+} , Mg^{2+})を、右側の三角形に陰イオン(SO_4^{2-} , Cl^- , HCO_3^-)を、中央の菱形にそれらの合成要素($Cl^- + SO_4^{2-}$, $Ca^{2+} + Mg^{2+}$)を配置し、三角形の各頂点を100%、それに対応する底辺を0%としてプロットしたものである。

たとえば、図のNo. 1は陽イオンでは $Na^+ + K^+$ が約25%、 Ca^{2+} が約46%、 Mg^{2+} が約29%であることを示しており、陰イオンでは SO_4^{2-} が約8%、 Cl^- が約24%、 HCO_3^- が約68%であることを示している。

菱形からは、 $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ が約75%、 $Cl^- + SO_4^{2-}$ が約32%であることがわかる。

3. 酸性雨のイオン成分の配置の試み

酸性雨のイオン成分は、 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , H^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- で表現される。

ダイアグラムでは陽イオン、陰イオンそれぞれ3成分だけしか表現できない上、酸性雨調査では通常 HCO_3^-

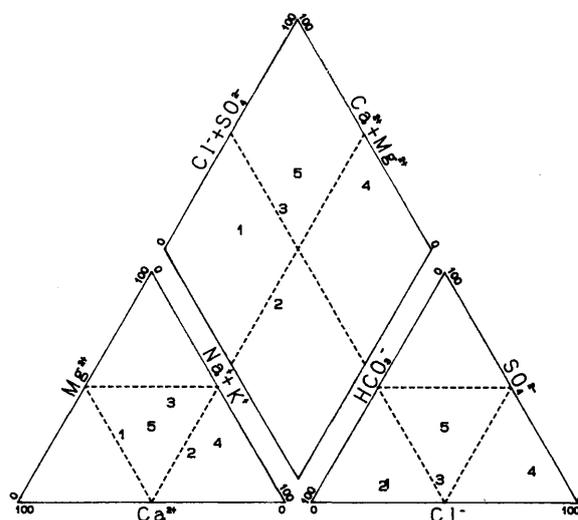


図1 基本的なダイアグラムの例

の測定を行っていないため、このままでは利用できない。

そこで、以下に青森県内4地点の実測値を用いた2つのケースによる作図を試みた。

表1 酸性雨測定データの例

局	(meq/m ³)								
	H ⁺	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
No. 1	14.7	337.0	39.3	10.0	70.4	84.0	417.8	25.2	112.4
No. 2	32.1	259.1	54.0	10.4	59.0	68.5	329.8	39.2	136.0
No. 3	17.7	264.9	28.1	8.4	48.4	63.4	335.4	18.8	76.8
No. 4	10.6	220.9	31.2	6.4	39.5	53.9	292.2	18.4	73.3

元になるデータとして用いた青森県内4地点の年平均沈着量(1991~1994年度)は、表1のとおりである。

3・1 Na⁺をそのまま使用した場合

表1の9項目のデータを6成分にまとめる必要があるため、表2に示すとおりH⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺をまとめ

表2 ダイアグラム用データ (第1案)

局	$H^+ + Na^+ + K^+ + Mg^{2+}$	NH_4^+	Ca^{2+}	NO_3^-	SO_4^{2-}	Cl
No. 1	445.7	39.3	70.4	25.2	112.4	417.8
No. 2	370.1	54.0	59.0	39.2	136.0	329.8
No. 3	354.4	28.1	48.4	18.8	76.8	335.4
No. 4	291.8	31.2	39.5	18.4	73.3	292.2

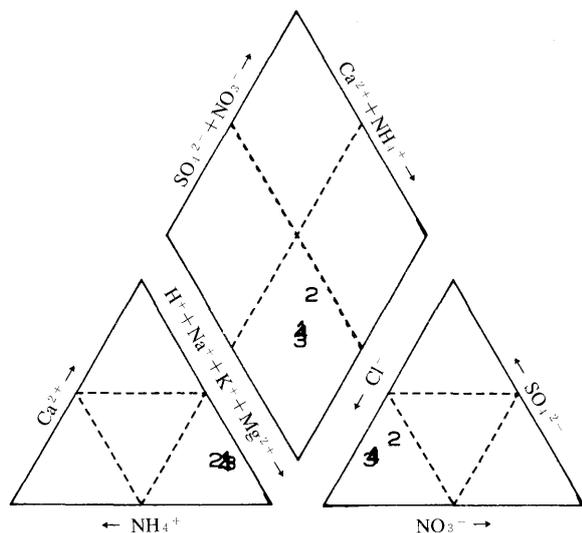


図2 第1案によるダイアグラム

表3 ダイアグラム用データ (第2案)

局	$H^+ + nssK^+ + nssMg^{2+}$	NH_4^+	$nssCa^{2+}$	NO_3^-	$nssSO_4^{2-}$	$nssCl^-$
No. 1	25.1	39.3	55.9	25.2	72.0	24.9
No. 2	46.7	54.0	47.9	39.2	104.9	27.7
No. 3	23.8	28.1	37.0	18.8	45.0	26.5
No. 4	16.1	31.2	30.0	18.4	46.8	34.6

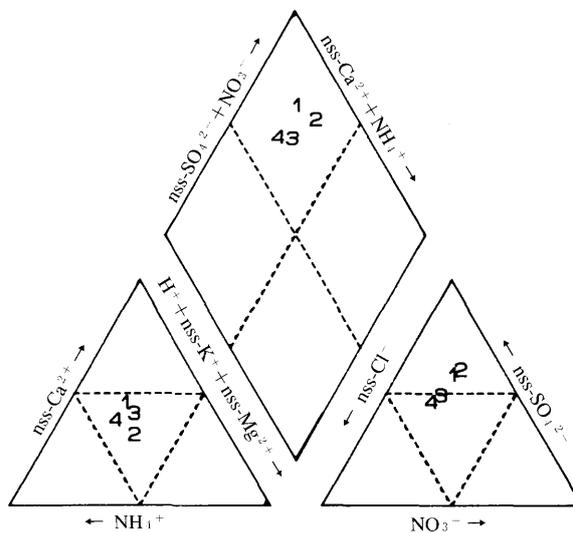


図3 第2案によるダイアグラム

て6成分として作図した(図2参照)。

その結果、陽イオンでは Na^+ が、陰イオンでは Cl^- が圧倒的な量を占めるため、陽イオンでは右下に、陰イオンでは左下に集まる傾向があり、菱形では、 Na^+ と Cl^- がほぼ等量であるため、菱形の上下の頂点を結ぶ直線上に集まる傾向が見られた。No. 2局が菱形の上の方に位置することから、比較的海塩の影響を受けない地点であることが読みとれるものの、それ以外のイオン成分の情報を読みとることは困難である。

3・2 海塩成分を除去した場合

酸性雨の評価を行う場合、pHに海塩成分があまり影響しないことから、非海塩成分に着目することが多く、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} の5成分は Na^+ を元に海塩分を差し引いて $nss-K^+$ 、 $nss-Ca^{2+}$ 、 $nss-Mg^{2+}$ 、 $nss-Cl^-$ 、 $nss-SO_4^{2-}$ として評価される。

そこで、非海塩成分であるそれら5成分に NH_4^+ 、 H^+ 、 NO_3^- を加えた8成分を元に、比較的量の少ない H^+ 、 $nss-K^+$ 、 $nss-Mg^{2+}$ を1成分にまとめて、 $H^+ + nss-K^+ + nss-Mg^{2+}$ 、 NH_4^+ 、 $nss-Ca^{2+}$ 、 NO_3^- 、 $nss-SO_4^{2-}$ 、 $nss-Cl^-$ の6成分で表3のとおりデータを作成し、作図を行った。

その結果、図3に示すとおり、第1案よりは広がりがあり、非海塩成分の組成比を表現するために有効であると考えられたので、以後この分類によるダイアグラム

(以後酸性雨ダイアグラムと記す)を元に酸性雨の評価を試みた。

4. 酸性雨ダイアグラムによる評価

ダイアグラムの検討に用いた4局の過去4ヶ年間の酸性雨の月間値を元にプロットを行うと(図4参照)、No. 1局とNo. 4局が比較的類似しており、No. 3局が特に陽イオンにおいて他の3局よりは全体に散らばる傾向があり、陰イオンでは他の3局より Cl^- が多くなる方向に広がる傾向があり、その両方の影響から菱形部分で他の3局よりも全体的に広がりが見られた。

そこで、期間中を夏季(5~10月)と冬季(11~4月)に分類し再度プロットし直したところ、図5に示すとおり NH_4^+ の場合夏季の散らばりが激しいが、冬季は20~30%の範囲に収まってしまうことが確認できた。

$nss-Cl^-$ では、逆に夏季より冬季において高い方に広がりを持つことが確認できた。

なお、図4及び図5において4局とも陰イオン上のプロットが約40度の傾きをもった点線の上に集中していることが特徴的である。

これは、陰イオンの三角形の3辺の中点を結んでできた逆三角形(点線でできた三角形)の上辺の中点と、元の実線の三角形の左下の頂点を結んだ直線は、特殊な直線であり、右上側の底辺との交点は、その底辺を3等分

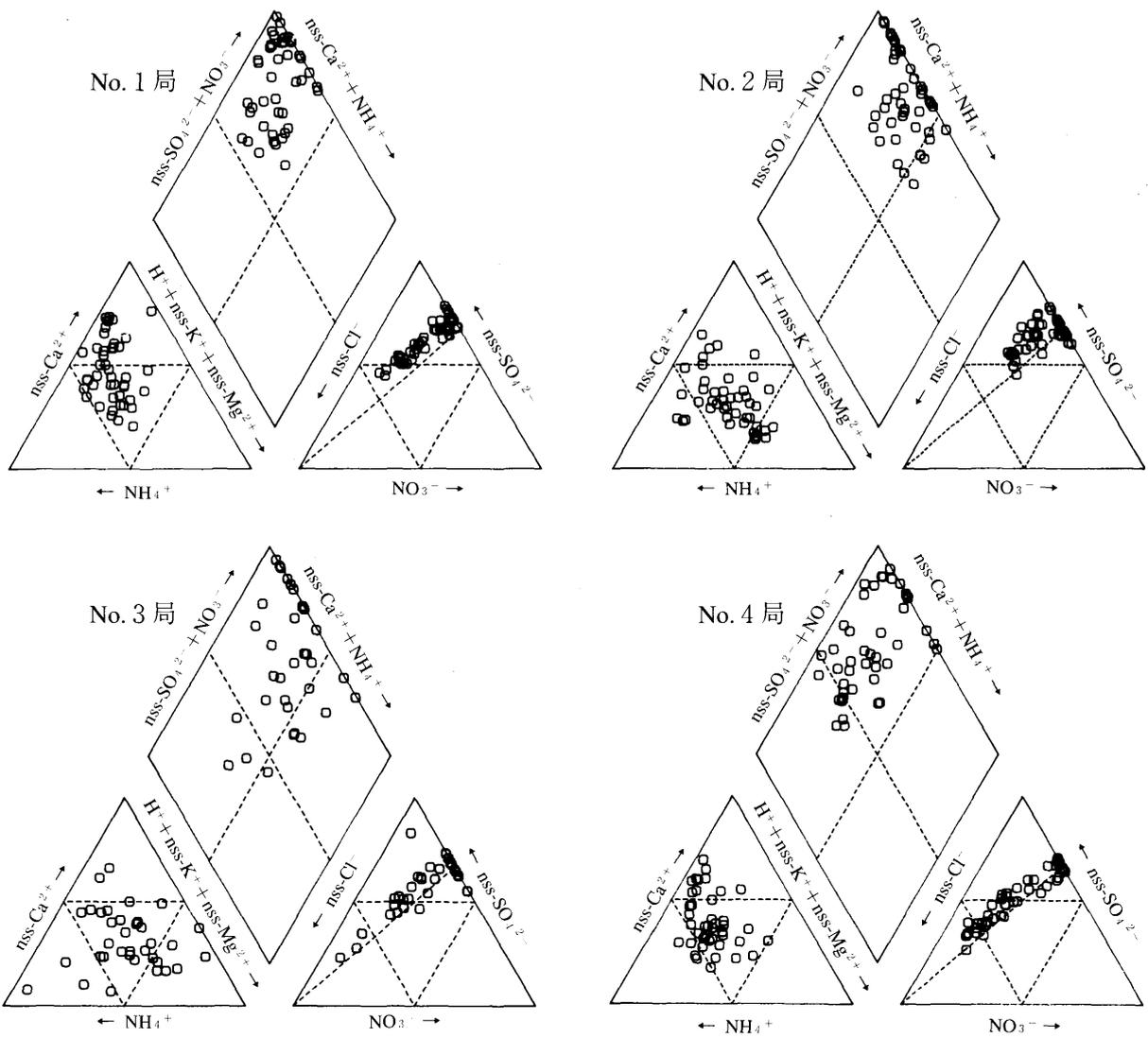


図4 県内4局の酸性雨ダイアグラム

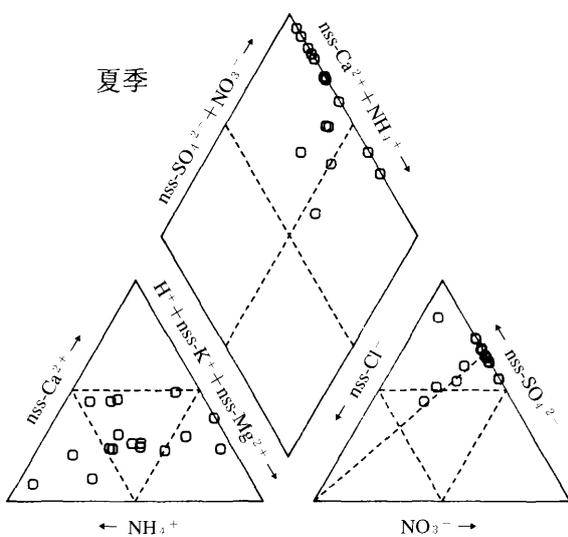


図5 No.3局の夏季の酸性雨ダイアグラム

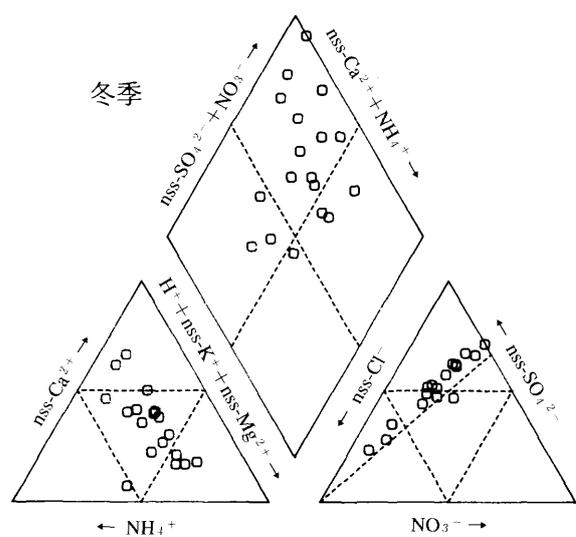


図6 No.3局の冬季の酸性雨ダイアグラム

する2点のうちの上方の1点に相当する。その直線上のどの点からも左上側の底辺に下ろした垂線の長さに対し、下側の底辺に下ろした垂線の長さはちょうど2倍になる位置である。

このことは、 NO_3^- より nss-SO_4^{2-} の組成比が2倍であることを示しており、 $\text{NO}_3^-/\text{nss-SO}_4^{2-}$ いわゆるN/S比が0.5にあたる位置であることを表している。

この補助線を利用して図を見直すと、No.3局の冬季は補助線より上方にありN/S比が0.5より小さく、夏季には0.5の直線上に値が集まることがわかる。

同じく図4を見直すと、全般的にN/S比が0.5を下回るケースが多いが、特にNo.1局は全期間0.5以下であった。

全国公害研協議会が行った酸性雨全国調査結果報告書²⁾(以後全公研調査報告書と記す)によると、N/S比は0.2~0.8の範囲に収まることが多いので、他の地点でも陰イオンは図4と同様に補助線の近くに集中することが

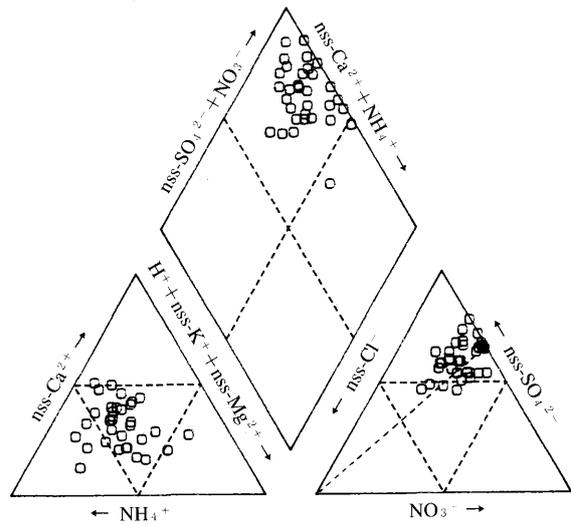


図7 北海道・東北33地点の年平均値

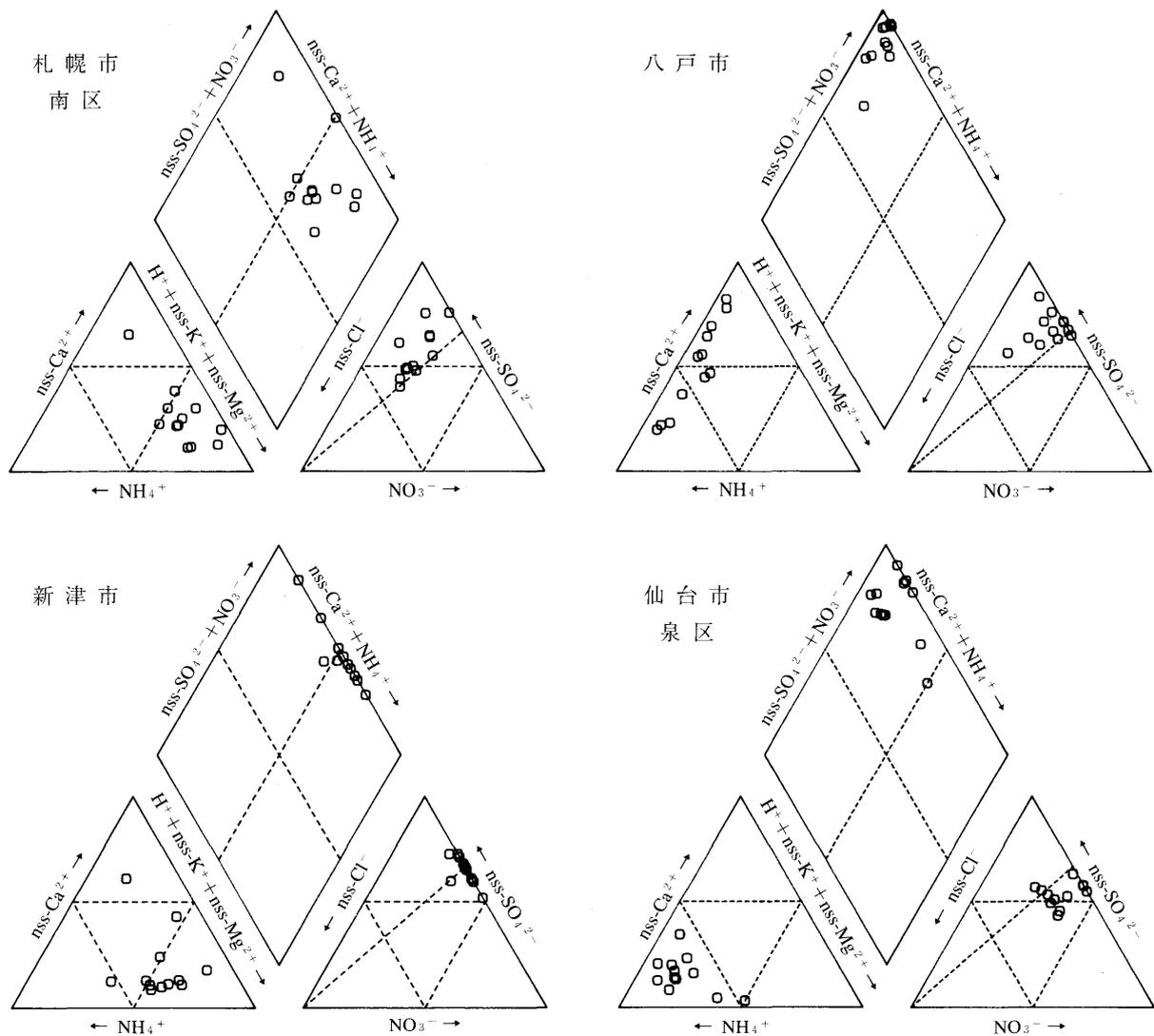


図8 北海道・東北の特異点の月間値

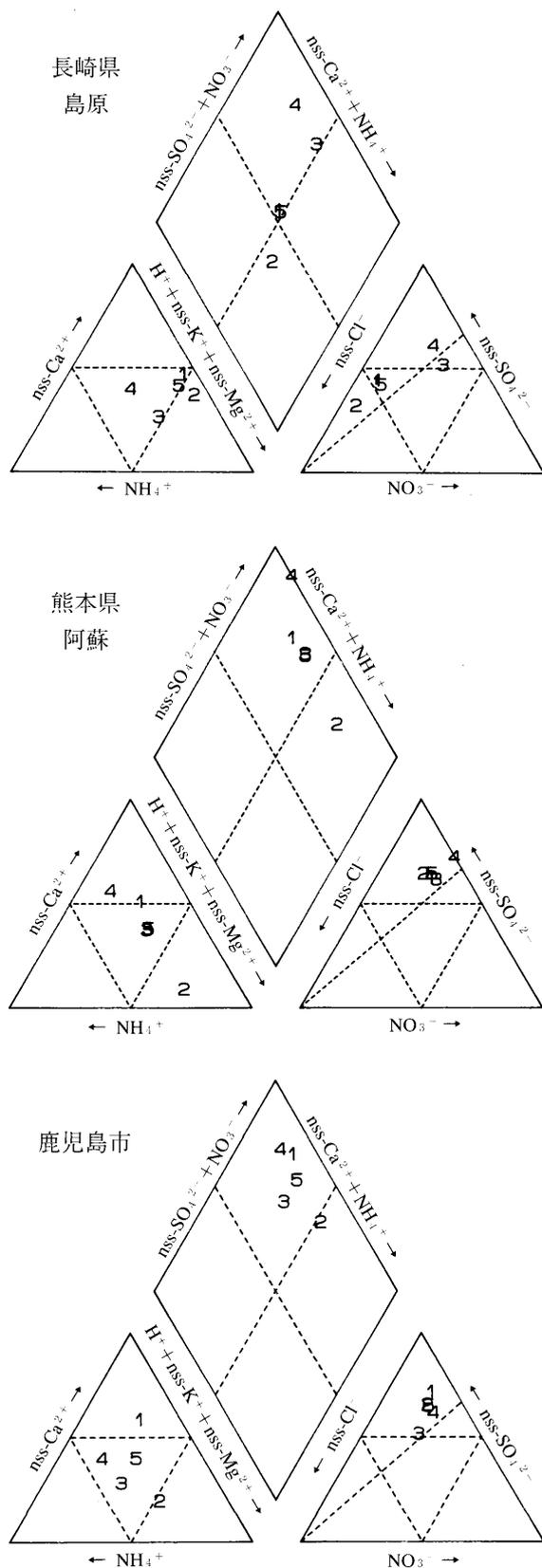


図9 九州地区で火山の影響のある地点

予想されるため、酸性雨ダイアグラムを評価するにあたって、この補助線は重要な役割をはたすものと期待される。

5. 他県の酸性雨データに用いた場合

全公研調査報告書に記載されている北海道・東北支部の酸性雨調査地点33地点の年平均値をプロットすると、図7のような広がりを示した。年平均値であるため、比較的集中しているが、その中から特徴的な4地点を選びその月平均値を図8に示した。それによると、日本海側の2地点で H^+ 等の占める率が高く、北方の2局でN/S比が通年0.5以下となるという特徴があった。

また、同じ全公研調査報告書のデータから、火山の影響が強く年間の $nss-SO_4^{2-}$ 沈着量の多い上位3局の季節変化を図9に示した。なお、No.1～5はそれぞれ春、夏、秋、冬、年間を表す。

それによると、島原では他の2地点に比べて $nss-Cl^-$ の変化が大きく、阿蘇では H^+ 等の変化が大きく NH_4^+ の変化が少ない等の特徴が認められた。また、3地点とも、夏季に H^+ 等が最大となる傾向があった。

6. まとめ

地下水等の解析に広く用いられているトリリニア・ダイアグラムを酸性雨解析用に用いることを目的として、 $H^+ + nss-K^+ + nss-Mg^{2+}$ 、 NH_4^+ 、 $nss-Ca^{2+}$ 、 NO_3^- 、 $nss-SO_4^{2-}$ 、 $nss-Cl^-$ の6成分で構成する酸性雨ダイアグラムを考案した。

H^+ 、 $nss-K^+$ 、 $nss-Mg^{2+}$ を1成分にまとめることの功罪についてさらに検討する余地はあるが、非海塩成分だけで構成される酸性雨ダイアグラムは、充分利用価値のあることを確かめることができた。

特に、酸性雨の年間の季節平均値や月間値を1枚のグラフに表現できるようになったことにより、年間の降雨組成の変動傾向を評価できるようになった。

また、陰イオンの3成分で構成される右側の三角形に、 $NO_3^- / nss-SO_4^{2-}$ 比が0.5に相当する傾きの補助線を加えることによって、陰イオン組成の表現力を高めることができることを確認した。

今回、作図に用いたものは、N88-BASICにより自作したものであるが、新たに表1の9成分濃度データ又は表3の非海塩8成分沈着量データから酸性雨ダイアグラムを、さらに水質6成分濃度データからトリリニア・ダイアグラムも作図できる表計算ソフトExcelのアドイン・ソフトとして提供可能である。

文 献

- 1) 地下水ハンドブック編集委員会：地下水ハンドブック，367，建設産業調査会，東京，1979.
- 2) 全国公害研協議会：酸性雨全国調査結果報告書，全国公害研会誌，20 (2)，58-130，1995.

Abstract

Investigation on expression method of ion composition in acid rain analysis — Utilization of trilinear · diagram —

Susumu HAYAKARI¹

By improving a trilinear · diagram which is widely used for analyzing the groundwater and so forth, so as to use it for analyzing the acid rain, the acid rain diagram composed only of non-sea salt constituents such as H^+ +nss- K^+ +nss- Mg^{2+} , NH_4^+ , nss- Ca^{2+} , NO_3^- , nss- SO_4^{2-} and nss- Cl^- is proposed.

In addition, by adding an auxiliary line with a gradient, in which a ratio of $NO_3^-/nss-SO_4^{2-}$ corresponds to 0.5, to a triangle composed of 3 anion constituents and positioned on the right hand side of this acid rain diagram, it is possible to elevate an expression power of anion composition.

Key words: Acid rain, Trilinear · diagram

1 : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

固相抽出／高速液体クロマトグラフィー法による 水中農薬の多成分同時分析

石塚 伸一 佐藤真理子 対馬 和浩

水中農薬の固相抽出／高速液体クロマトグラフィー法を用いた多成分同時分析について検討した。まず、試料水のpHを3.5に調整した後、測定対象物質をポリマー系の固相カートリッジで抽出し、アセトニトリル／リン酸緩衝液 (pH 2.8) を溶離液に用い、フォトダイオードアレイ検出器付きHPLC分析装置で多成分同時分析を行った。検量線は、HPLC注入絶対量で2~100ngまで直線性があり、検量線の相関係数はいずれの物質も0.999以上であった。2ng注入時の変動係数 (n=3) は、いずれの物質も1.2~2.1%であった。この方法により添加回収試験を行ったところ、いずれの物質の回収率もほぼ90%以上、変動係数は10%以下と良好であった。この方法により、分析の効率化が図られると同時に、人体及び環境に有害である有機溶媒の使用量も大幅に低減することができた。

Key words : multiple component analysis, photo diode array, high performance liquid chromatography, solid phase extraction, pesticide in water

1. はじめに

ゴルフ場排水の農薬分析は、概ね、気化し易い物質についてはガスクロマトグラフィー／質量分析法 (GC/MS) で、気化しにくい物質については高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) で行われている。このうちHPLCを用いる従来の分析方法は、各農薬毎に溶媒抽出後それぞれ異なる条件でHPLC分析を行うという方法であった。この方法は、大量の有機溶媒を使用すること、及び個別分析であるため分析の効率が悪いという問題点があった。

そこで今回、分析の無害化及び効率化を図るため、ジクロロメタン等人体に有害な試薬を用いない抽出方法すなわち、固相カートリッジを用いて抽出する方法及びフォトダイオードアレイ検出器付きHPLCで多成分を同時に分析する方法を検討した。

さらに、メコプロップについても、従来のメチル化後GC/MSで分析する方法は、メチル化にあたって有害な試薬を用いる上、操作が煩雑であるため、今回、この物質も同時にHPLCで分析する方法を検討したので、その結果を報告する。

2. 方 法

2・1 試薬・器具

アセトニトリル	和光純薬製	HPLC用
メタノール	和光純薬製	HPLC用

水	超純水 (ミリQ水)
KH ₂ PO ₄	和光純薬製 特級
固相カラム	ウォーターズ社製 Sep-Pak PS-2 (ポリスチレン系ゲル)
固相抽出用定流量装置	ウォーターズ社製 Sep-Pak コンセントレーター
標準物質	和光純薬製 残留農薬分析用 (オキシシン銅は完全に溶解しないため、超音波にかけ均一な懸濁液としてから希釈し、標準溶液を作成した。)

2・2 HPLC分析装置

HPLC	島津製作所製 LC-10
検出器	フォトダイオードアレイ SPD M10A
オートインジェクター	SIL 10A
分離カラム	化学品検査協会 L-Column (高純度シリカODS系 4.6mm×15cm)
溶離液	アセトニトリル/50mmolリン酸緩衝液 (pH 2.8) =10/11
カラム温度	40℃
流量	1.0ml/min
サンプル注入量	20μl
検出波長	アシュラム : 270nm オキシシン銅 : 250nm チウラム, メコプロップ, ペンスリド : 230nm

表2 農薬の従来分析法

農 薬	抽出溶媒	測定機器	HPLC移動相
ア シ ュ ラ ム	酢酸エチル	HPLC	メタノール, 酢酸, 水
オ キ シ ン 銅	ジクロロメタン	HPLC	アセトニトリル, 水, EDTA-2 Na
チ ウ ラ ム	ジクロロメタン	HPLC	アセトニトリル, 水
ベ ン ス リ ド	ジクロロメタン	HPLC	アセトニトリル, 水
メコプロップ	ジクロロメタン	メチル化後 GC/MS	—

3. 結果及び考察

3・1 従来分析法

今回、検討対象物質としたのは、アシュラム等の5物質であり、これらの環境基準値等は表1に示すとおりである^{1) 2)}。これら物質の従来分析法は、表2に示すとおり、アシュラム、オキシシン銅、チウラム、ベンスリドについては、溶媒抽出後それぞれ異なる条件でHPLC分析を行い、メコプロップについては溶媒抽出後ジアゾメタンでメチル化し、GC/MS分析する方法であった。

この方法だと、1検体当たり、ジクロロメタン等の有機溶媒を約1ℓも用いるため、分析者の健康上、及び環境汚染の観点からも問題があった。また、個別分析であるため分析の効果が悪かった。

更に、メコプロップのメチル化に際しては、発癌性のあるN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンを試薬として用いるため、分析操作及び取り扱いが厄介であった。

表1 基準値一覧表 (単位: mg/ℓ)

物質名	タイプ	環境水質		ゴルフ場排水	
		環境基準値	評価指針値	環境庁指針値	厚生省指針値
アシュラム	除草剤	—	—	2	0.2
オキシシン銅	除草剤	0.04	—	0.4	0.04
チウラム	殺菌剤	0.006	—	0.06	0.006
ベンスリド	除草剤	—	0.1	1	0.1
メコプロップ	除草剤	—	—	0.05	0.005

3・2 検討の方針

前述のとおり、従来法では種々問題があったため、今回、人体及び環境に有害なジクロロメタン等の有機溶媒を大量に用いないこと、及び多成分同時分析により分析の効率化を図ることを目標とした。そこで、5成分を固相カートリッジで同時抽出後、フォトダイオードアレイ検出器付きHPLC（逆相分配クロマトグラフィー）で同時分析する方法を検討した³⁾。

3・3 HPLC分離カラムの検討

HPLC分離カラムには大別して、シリカゲルODS系とポリマー系（ポリウレタン系）の2種類がある。

従来、シリカゲル系のカラムだと充填剤中の不純物（金属）によって、今回の検討対象物質のうち、オキシシン銅の分析が不可能であった。そこでTSK-gel Enviropak

GIのようなポリマー系のものが使用されていたが、最近シリカゲル系カラムの中に金属含有量の極めて少ない高純度シリカゲルを基材とし、かつ、完全なエンドキャッピングにより、残存シラノールの影響の排除されたsuper endcapping ODSが市販されるようになってきた。

シリカゲル系カラムは耐圧性、経済性の点でポリマー系のものより優れているので、これが使えるかどうかを検討した。その結果、オキシシン銅についても使えることが分かった。

3・4 フォトダイオードアレイ検出器

測定波長を設定するために、フォトダイオードアレイ検出器により各農薬の吸収スペクトルを測定したところ図1のとおりであった。

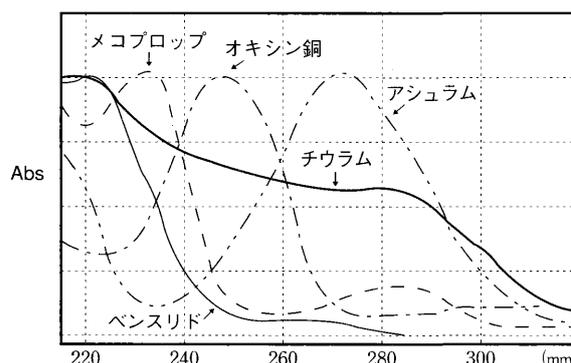


図1 農薬のスペクトル

この吸収スペクトルの極大吸収波長及び低波長側だと他の妨害物質の影響を受けやすいことを合わせ考慮し、各物質の測定波長を設定した。

このようにフォトダイオードアレイ検出器だと吸収スペクトルの測定が可能であり、保持時間に加えてスペクトル情報も得ることができ、物質の確認に有用である。

公定法では、チウラムと想定されるピークが検出された場合、フォトダイオードアレイにより吸収スペクトルを確認することになっている⁴⁾。

また、測定波長として、一度に多数の波長を設定できるため、同時分析にあたっては、必要不可欠の検出器である。

三次元表示のクロマトグラムを例を図2に示す。

なお、フォトダイオードアレイ検出器を用いた場合、

1 検体で300KB程度の情報量となるため、大量のデータ処理が可能でかつハードディスク容量等の大きいパソコンを整備しておかないと、オートインジェクターがあっても連続分析が困難になるので留意する必要がある。

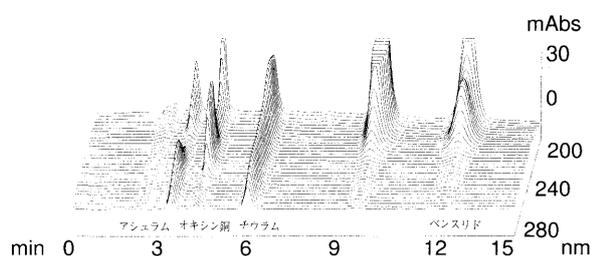


図2 三次元表示のクロマトグラムの例

3・5 移動相のpHによる保持時間の変動

5物質を同時に分析するためには、各物質の保持時間が十分離れている必要がある。

そこで、最適分離条件を見出すために、移動相のpHを変えて保持時間の変動を検討した。その結果、表3のとおり、オキシソ銅とメコプロップの保持時間はpH依存性があり、このことを利用してpHを2.8に設定することで、5物質が良く分離することが分かった。クロマトグラムの例を図3に示す。

表3 移動相のpH変化による保持時間の変動

pH	(min)		
	2.5	2.8	3.0
アシユラム	2.2	2.2	2.2
オキシソ銅	2.2	2.5	2.8
チウラム	4.3	4.3	4.3
メコプロップ	5.0	4.8	4.5
ベンスリド	15.7	15.7	15.7

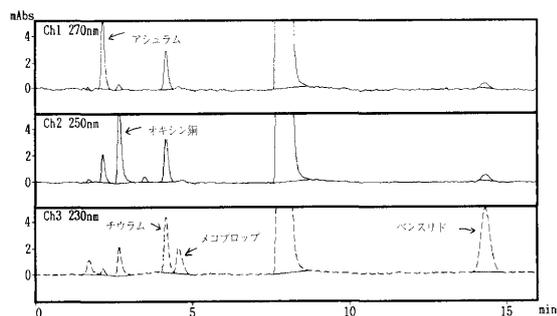


図3 HPLCクロマトグラムの例

3・6 検量線

各物質ともHPLC注入絶対量で2~100ngまで直線性があった。物質によってはベンスリドのように1000ngまで直線性のあるものもあった。

検量線の相関係数はいずれの物質も0.999以上であった。2 ng注入時の応答値の変動係数 (n=3) は、いずれの物質も1.2~2.1%であった。検量線の例を図4に示す。

このことから、試料水を200ml、最終定容液を1ml、

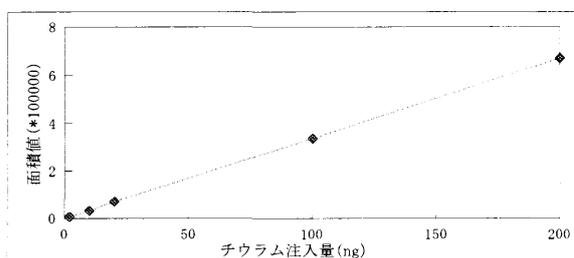


図4 検量線の例

HPLC注入量を20 μ lとしたときには、試料水の農薬濃度は0.0005mg/lまで定量できることになり、環境基準値の1/10まで十分定量可能ということになる。

ここで、試料量を200mlとしたのは、アシユラムは、固相に200ml以上通水すると破過するためである⁵⁾。

3・7 固相抽出条件の検討

従来、測定対象物質の抽出にあたっては溶媒抽出法が広く用いられてきた。一方、溶媒抽出法は、多量の有機溶媒を使用するため分析者の健康影響上及び環境汚染上問題となる。また、多くの場合、エマルジョンを生成し、分析操作が煩雑になるという欠点がある。このため、最近、固相抽出法が注目されている。固相抽出法は、測定対象物質を吸着剤に捕捉した後、少量の有機溶媒で溶出する方法である。従って、固相抽出法を用いることにより、有機溶媒の使用量の低減と分析操作の省力化が可能となる。

さて、今回の検討対象物質の中でオキシソ銅は金属錯体であるため、固相への保持はpHに依存することが考えられるため、抽出時の試料水のpH条件について検討した。使用した固相カートリッジはポリマー系のSep-Pak PS-2である。

その結果、中性ではアシユラム、オキシソ銅の捕捉状況が悪く、回収率はそれぞれ、0、30%であった。従って、多成分同時分析するためにはpHを3.5に調整する必要があった。

また、今回検討した分析方法において、回収率、分析精度を向上させるためのポイントは、固相のコンディショニングを十分に行うこと、固相からの溶出速度は1 ml/min程度にゆっくり行うことであった。

今回、押し込み式のコンセンレーターを使用したので、操作が容易かつ再現性があるので便利であった。なお、抽出後の固相の水分除去は遠心分離で十分であった。

3・8 tC₁₈固相カートリッジによる添加回収試験

固相カートリッジには、分離モードの種類として順相分配モード、逆相分配モード、イオン交換モードの3種類があり、充填剤の種類としては、シリカゲル系、ポリマー系、フロリジル系、アクセル系などの種類がある。

今回、固相カートリッジとして、逆相分配モードのポリマー系であるPS-2及び、逆相分配モードのシリカゲル系であるtC₁₈の2種類について検討した。

まず最初に、シリカゲル系のtC₁₈について検討した。

超純水200mlにアシュラム2.5 μ g、オキシシン銅5 μ g、チウラム5 μ g、ベンスリド25 μ gを添加し、pHを3.5に調整した後、tC₁₈に通水した。

結果を表4に示す。

シリカゲル系ではアシュラム、オキシシン銅が全く回収できなかった。アシュラムについては、イオン交換系のAccell QMAが効果的との報告もあり⁶⁾、QMAとPS-2を直列に連結したものをを用いるのも有効であろう。

表4 tC₁₈による回収率及び変動係数
(単位：%)

物質名	回収率	変動係数
アシュラム	0	—
オキシシン銅	0	—
チウラム	102	2.1
ベンスリド	99	2.2

3・9 PS-2固相カートリッジによる添加回収率の検討

前述のとおり、シリカゲル系だと多成分同時分析ができなかったため、次にポリマー系のPS-2で検討した。

なお、ポリマー系には、PS-2とほぼ同じタイプのPS-1という固相カートリッジがあるが、これは粒径が25 μ mと細かいため、試料水の通水にあたっては目詰まりがおりやすく、実用上不便さがあった。その後、粒子径が50 μ mのPS-2が市販され、通水時の目詰まりのトラブルもなく使い易くなった。

超純水200mlに標準物質を2.5~25 μ g添加し、pHを3.5に調整した後、回収試験を行った。結果は、表5に示すとおり、いずれの物質の回収率もほぼ90%以上、変動係数は10%以下と良好であった。従って、多成分同時分析にはポリマー系の固相カートリッジを用いる必要があった。

HPLCへの注入はオートインジェクターを使用すれば、注入量の再現性があるうえ、自動連続分析もできるので分析効率の向上を図るためには、是非必要な装置である。

なお、水中に残留塩素が存在するとチウラムが回収されない。この現象を利用して、チウラムと想定される物質が検出された場合、塩素処理を行いピークが消失する

かどうかを確認する方法が利用できる。

表5 添加回収試験 (PS-2)

(n=3)

農薬名	添加量 (μ g)	回収率 (%)	変動係数 (%)
アシュラム	2.5	91	8.4
オキシシン銅	5.0	112	9.0
メコプロップ	5.0	96	5.0
チウラム	5.0	87	3.8
ベンスリド	25	96	4.9

3・10 固相からの溶出分画試験

固相から溶出させるときの必要溶媒量を検討するため、溶出パターンを求めた。その結果、表6、図5のとおり、2mlで十分であることが分かった。実際の操作時には安全を見込んで、3mlで溶出することとした。従来はこれら5物質の分析の抽出操作のために1試料水当たり約1 ℓ の有機溶媒を用いていたので、有機溶媒使用量の大幅な低減を図ることができた。

表6 固相カートリッジからの溶出分画試験

分画量	溶出率 (%)				
	0~0.5	~1.0	~1.5	~2.0	~2.5ml
アシュラム	96.5	3.5	0		
オキシシン銅	38.9	49.6	9.8	1.6	0
チウラム	71.2	28.8	0		
メコプロップ	39.5	49.7	7.8	0	
ベンスリド	62.6	37.4	0		

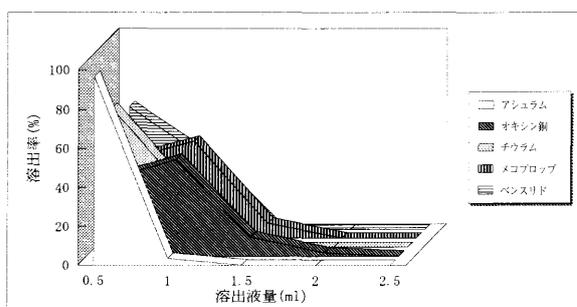


図5 固相カートリッジからの溶出分画試験

3・11 分析フローシート

以上の検討結果から分析フローシートを図6のとおりとした。

3・12 実サンプルの測定例

この方法を河川水、地下水等に用いて分析したところ、十分適用可能であった。

ゴルフ場排水の水に標準物質を添加し、この測定方法で分析したHPLCクロマトグラムを例を図7に示す。

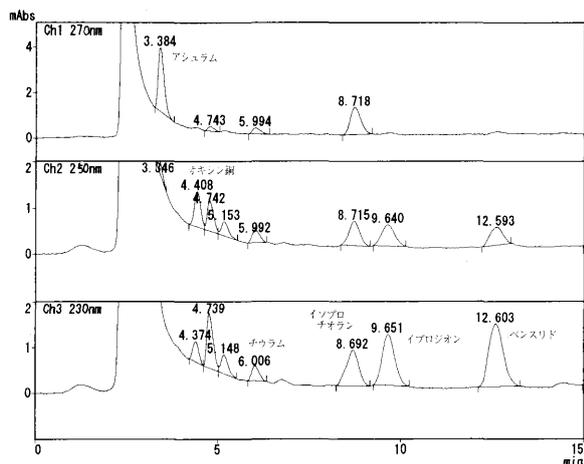


図7 ゴルフ場排水への標準物質添加クロマトグラム例

4. ま と め

HPLCを用いた水中農薬の分析にあたり、分析の無害化及び効率化を図るため、ジクロロメタン等人体に有害な試薬を用いない抽出方法すなわち、固相カートリッジを用いて抽出する方法及びフォトダイオードアレイ検出器付きHPLCで多成分を同時に分析する方法を検討した。

(1) HPLC分離カラムの検討

ポリマー系カラムの他に、金属含有量の極めて少ない高純度シリカゲルを基材とし、かつ、完全なエンドキャッピングにより、残存シラノールの影響の排除されたシリカゲル系ODSカラムも使用可能であった。

(2) フォトダイオードアレイ検出器

フォトダイオードアレイ検出器を用いることにより、吸収スペクトルの測定ができるうえ、一度に多数の測定波長を設定できるため、多成分同時分析が可能となった。

(3) 移動相のpHによる保持時間の変動

オキシシン銅とメコプロップの保持時間はpH依存性があり、このことを利用して、pHを2.8に設定することで、5物質の分離が可能となった。

(4) 検量線

HPLC注入絶対量で2~100ngまで直線性があった。検量線の相関係数はいずれの物質も0.999以上であった。2ng注入時の応答値の変動係数(n=3)は、いずれの物質も1.2~2.1%であった。

(5) 固相抽出条件の検討

固相通水時の試料水のpHが中性ではアシュラム、オキシシン銅の捕捉状況が悪く、回収率はそれぞれ、0.30%であった。従って、多成分同時分析するためにはpHを3.5に調整する必要があった。回収率、分析精度を向上させるためのポイントは、固相のコンディショニングを十分に行うこと、固相からの溶出速度を1ml/min程度にゆっくり行うことであった。押し込み式のコンセントレ

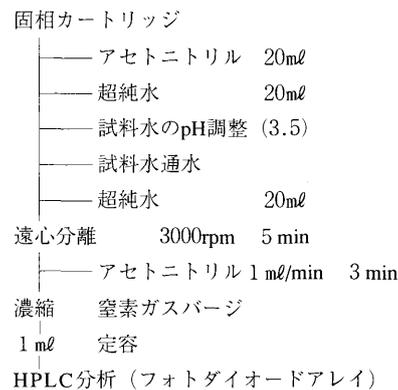


図6 分析フローシート

ーターが便利であった。

(6) 固相カートリッジの種類

シリカゲル系ではアシュラム、オキシシン銅が分析できなかった。従って、多成分同時分析にはポリマー系の固相カートリッジを用いる必要があった。

(7) 固相抽出による添加回収率の検討

超純水200mlに標準物質を2.5~25μg添加し、pHを3.5に調整した後、回収試験を行ったところ、いずれの物質の回収率もほぼ90%以上、変動係数は10%以下と良好であった。

(8) 固相からの溶出分画試験

固相から溶出させるときの必要溶媒量を検討するため、溶出パターンを求めた。その結果、3mlで十分であることがわかった。従来はこれら5物質の分析の抽出操作のために1試料水当たり約1ℓの有機溶媒を用いていたので、有機溶媒使用量の大幅な低減を図ることができた。

文 献

- 1) 環境庁水質保全局長通知：ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針について、平成2年5月24日。
- 2) 環境庁：環境庁告示第16号、水質汚濁に係る環境基準の一部を改正する件、1993. 3. 8.
- 3) 厚生省生活衛生局水道環境部監修：上水試験方法・解説、1993年版、81-84、(株)日本水道協会、東京、1993.
- 4) 環境庁水質保全局水質管理課長通知：チウラムの検定方法について、環水管第27号、環水規第21号、平成6年1月25日。
- 5) 村井伸顕、他：固相カートリッジを用いた農薬の分析方法(II)、第43回全国水道研究発表会講演集、666-668、平成4年5月。
- 6) 月岡忠、他：高速液体クロマトグラフィーによる環境水中のアシュラムの簡易定量方法、環境技術、19, No10, 652-665, 1990.

Abstract

Simultaneous analysis of multi-component for pesticide in water by using solid phase extraction/ high performance liquid chromatography

Shin-ichi ISHIZUKA¹, Mariko SATO¹ and Kazuhiro TSUSHIMA¹

A simultaneous analysis of multi-component has been investigated by using a solid phase extraction/high performance liquid chromatography for the pesticide in water. After adjusting pH of the sample water at 3.5 first of all, the object material to be measured was extracted by using a polymeric solid phase cartridge, and then it was eluted using acetonitrile of 3 ml. Subsequently, by making the end capping high purity silica ODS the separation column, and by using acetonitrile/phosphoric acid buffer solution (pH 2.8) as an eluate, a simultaneous analysis of multi-component has been carried out, by using the HPLC analysis device with a photo diode array detector. A calibration curve had a linearity up to 2 ~100 ng of HPLC absolute injection quantity, and moreover a correlation coefficient of calibration curve was above 0.999 at any materials. In case of injection of 2 ng, coefficient of variation was 1.2 ~2.1% at any materials. When an addition and recovery test have been performed by this method, the good results have been obtained, that is, a recovery factor was about above 90% at any materials and coefficient of variation was below 10%. Through this method, an analysis was made more efficient, and at the same time a consumption of the organic solvent harmful to the human health and environment could be substantially reduced.

Key words : multi-component analysis, photo diode array,
high performance liquid chromatography,
solid phase extraction, pesticide in water

¹ : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

ヘッドスペース/GC/MS法による水中揮発性有機化合物の一斉分析

石塚 伸一 大久保英樹

水試料中の揮発性有機化合物23種類についてオートサンプラーヘッドスペース/GC/MSを用いて、一斉分析可能な測定条件の検討を行った。分離カラムに60mキャピラリーカラム (DB-624) を用い、22mlのバイアルビンに試料水を10ml入れ、NaCl3gとメタノール1 μ lを添加した後、気液平衡温度60度、ニードル温度120度のオートサンプラーヘッドスペース/GC/MS法で分析した結果、全物質とも0.2~300ppbの広いダイナミックレンジで、応答値が直線性を示し、検量線の相関係数は0.999以上であり、一斉分析が可能であった。バイアルに20ppbの標準溶液を入れ、保持時間の変動及び、応答値の再現性をみたところ、変動係数は全物質ともそれぞれ、0.3%以下、5%以下と良好であった。0.2ppbにおける繰り返し分析実験の結果、全物質ともS/N比は3以上、変動係数は、ほぼ10%以下と良好であり、水道水質基準では公定法に採用されていない物質でも、本法で測定可能であった。

Key words : simultaneous determination, headspace/GC/MS analysis, volatile organic compounds, water pollution

1. はじめに

近年、多種多様な化学物質が生産、利用されるに伴い、新たな有害化学物質による環境汚染を防止する必要ができた。このため、平成5年3月8日に水質に係る環境基準が大幅に改正され¹⁾、その中で、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、四塩化炭素、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、1,1,1-トリクロロエタン、1,1,2-トリクロロエタン、1,1-ジクロロエチレン、c-1,2-ジクロロエチレン、c, t-1,3-ジクロロプロペン、ベンゼンの11項目にわたる揮発性有機化合物が追加された。また、この改正にあたり、新たに要監視項目が設定され、この中に、クロロホルム、t-1,2-ジクロロエチレン、1,2-ジクロロプロパン、1,4-ジクロロベンゼン、トルエン、キシレンの6項目の揮発性有機化合物が設定された。

環境基準の改正に続いて、平成5年12月27日には水質汚濁防止法に基づく排水基準も見直され²⁻³⁾、揮発性有機化合物については、従来のトリクロロエチレン、テトラクロロエチレンに加えて、ジクロロメタン、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン、1,1-ジクロロエチレン、c-1,2-ジクロロエチレン、1,1,1-トリクロロエタン、1,1,2-トリクロロエタン、c, t, -1,3-ジクロロプロペン、ベンゼンについて排水基準が追加、改定された。

更に、平成6年2月25日、「特定水道利水障害の防止のための水道水源水域の水質の保全に関する特別措置法」が制定され、クロロホルム、プロモジクロロメタン、ジプロモクロロメタン、プロモホルムの4物質、いわゆるトリハロメタン類も分析する必要がでてきた。

このような各種基準値改正に伴い、公定分析方法に、

パージ・トラップGC/MS法又はヘッドスペースGC/MS法が新たに採用された⁴⁾。

当所では、従来、テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン等の有機塩素化合物については、有機溶媒を使用した液々抽出後、GC/ECDで分析していた。

しかし、この分析方法では、抽出溶媒自身が分析の妨害となることやベンゼンなどECD分析に向かない物質が追加される等、従来の分析システムでは対応できない状態となった。

そこで、今回、これら新規追加物質の分析にあたり、分析の効率化を図るため、環境基準項目及び要監視項目の中の揮発性有機化合物及びトリハロメタン類の計23物質が一斉に分析できるように、オートサンプラーヘッドスペース/GC/MSを用いた測定方法の検討を行った。

2. 方 法

2・1 試 薬	
メタノール	和光純薬製 残留農薬用
水 (希釈水)	エビアン水 (ミネラルウォーター)
標準原液	和光純薬製 23VOC混合標準液
NaCl	和光純薬製 特級
2・2 装 置	
ヘッドスペース	パーキン・エルマー HS-40
GC/MS	島津製作所 QP-5000
分離カラム	J&W社製 DB-624 (長さ60m, 内径0.32mm, 膜厚1.8 μ m)
バイアル	容量22ml (試料水を10ml入れ, PTFE コートブチルゴムセブタム, 星型ス プリング, アルミキャップで密封す

る。)

装置の測定条件を表1に示す。

表1 測定条件

ヘッドスペースサンプラー部					
気液平衡温度	60度				
気液平衡時間	30分				
ニードル温度	120度				
トランスファーライン温度	120度				
インジェクション時間	0.15秒				
加圧時間	3分				
ニードル引き上げ時間	0.5分				
キャリアーガス圧力	120kpa				
GC部					
キャリアーガス	ヘリウム				
キャリアーガス圧力	100kpa				
気化室温度	100℃				
カラム温度	40℃ (1分) - 10℃/min - 200℃ (10min)				
MS部					
イオン化法	EI法				
イオン化電圧	70eV				
イオン化電流	60μA				
インターフェイス温度	230℃				
測定モード	SIM法 (定量用)				
測定質量数					
No.	物質名	m/z	No.	物質名	m/z
1	1,1-ジクロロエチレン	96	13	c-1,3-ジクロロプロペン	75
2	ジクロロメタン	84	14	トルエン	92
3	t-1,2-ジクロロエチレン	96	15	t-1,3-ジクロロプロペン	75
4	c-1,2-ジクロロエチレン	96	16	1,1,2-トリクロロエタン	99
5	クロロホルム	83	17	テトラクロロエチレン	166
6	1,1,1-トリクロロエタン	97	18	ジブロモクロロメタン	129
7	四塩化炭素	119	19	m-キシレン	105
8	ベンゼン	52	20	p-キシレン	105
9	1,2-ジクロロエタン	62	21	o-キシレン	105
10	トリクロロエチレン	130	22	ブロモホルム	173
11	1,2-ジクロロプロパン	63	23	1,4-ジクロロベンゼン	146
12	ブロモジクロロメタン	85			

3. 結果及び考察

ヘッドスペースGC/MS法は、試料水をバイアル等の容器に密封して一定温度に加熱し、水中と気相中の揮発性有機化合物の濃度が平衡になるまで保持した後、気相

の一部をGC/MSに導入するものである⁵⁻⁶⁾。

今回、前述の23物質の一斉分析が可能となるように、分離部、検出部、抽出・導入部、データ処理部及び分析システム全体についての検討を行った。

分析システム構築の検討にあたっては、環境水及び排水の環境基準項目、要監視項目、排水規制項目、トリハロメタン類の一斉分析が可能であること、環境基準値の1/10の濃度まで測定できること、環境基準値の濃度における応答値の変動係数が概ね10%以下であることを目標とした。

なお、23物質のうち、1, 3-ジクロロプロペンはc-体とt-体の合計値、キシレンはo-, m-, p-体の合計値が基準値、指針値として設定されている。

3・1 分離部 (GC部)

揮発性有機化合物の分析には、一般にDB-624系、AQUATIC系、VOCOL系等のキャピラリーカラムが用いられている。ここでは、DB-624を使用した。

分離条件を検討した結果、分離カラムの温度設定を40度から200度まで毎分10度の昇温分析とすることにより、23物質は、ほぼ分離可能となった。TICクロマトグラムの例を図1に示す。

ただし、「ベンゼンと1, 2-ジクロロエタン」及び「キシレンのm-体とp-体」は分離できなかった。

GC部で分離できないベンゼンと1, 2-ジクロロエタンは、測定質量数が異なるのでMS部で分離定量が可能である。キシレンのm-体とp-体の異性体は、MS部でも区別できないが、基準値はo-, m-, p-体の合計値であるから、実用上は問題がない。

約20分で測定対象物質は全て溶出したが、妨害物質を追い出すため、目的物質が流出し終わってから更に10分間200度で温度を保持することとした。

3・2 検出部 (MS部)

(1) 測定質量数

質量数の設定にあたっては、各化合物のマススペクトルから比較的高質量側で強度の大きいものを選び、SIM

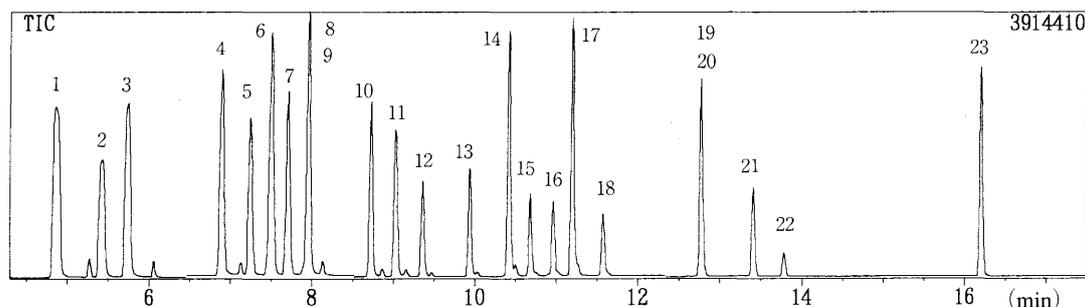


図1 GC/MSクロマトグラムの例 (注: 図中のNo.は表1の物質No.に対応している)

法で測定した。また、イオンセット機能を用い、モニターイオンを5つのグループに分け、同時に測定するイオン数を少なくし、検出感度の低下を防いだ。質量数の設定にあたっては、分離カラムからSi(CH₃)₃のm/z 73及びSi同位体からのm/z75の妨害があるので留意する必要がある。

ベンゼン、トルエン、キシレンは、他の物質より相対的に感度が大きい。これらの物質は、車の排ガス、マジックインク（採取現場で筆記用具として使用される）、化学物質分析室内からのコンタミを受けやすい物質であり、たまに、異常に高濃度が混入していることがあった。GC/MSには、検出器を保護するため、極めて高濃度の物質が検出器に流入してくると、検出器のフィラメントをoffにする機構がついている。こうなると、その物質の保持時間以降に流出してくる物質は分析不可能となる。その対策としては、タイムプログラムでゲインを変えることや、別の質量数を用いることが考えられる。これらの物質については、意図的に強度の弱い質量数を使うことによって、途中でゲインを変えずに他の物質と同時に分析することができた。

ところで、検出器にMSを用いることにより、物質の同定には、保持時間に加えて、その物質特有の質量数、参照イオンとの相対強度比等の情報が活用できる。更に、必要があれば、マススペクトルも測定できるので有用である。

(2) 検出器のゲインの検討

測定試料水は、河川水、清浄地下水、汚染地下水、汚染排水であることを考慮し、広い濃度範囲について測定可能な検出器のゲインについて検討した。

今回の検討物質のなかで基準値、指針値の最も低い濃度は四塩化炭素、c, t-1, 3-ジクロロプロペンの2ppbである。従って、定量下限値として0.2ppbを目標とした。また、汚染排水も測定することから、高濃度側として300ppbを目標とした。すなわち、測定範囲として、0.2ppb~300ppbを目標として設定し、この濃度範囲の測定できるダイナミックレンジを有する検出器ゲインを検

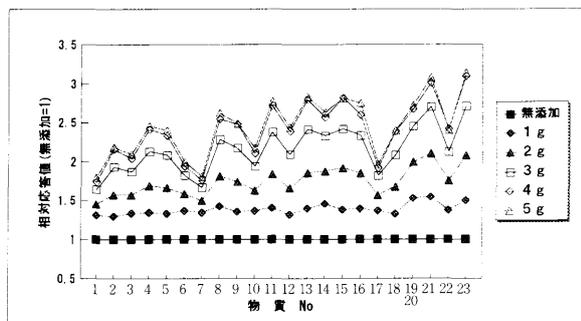


図2 応答値に及ぼすNaCl添加量の影響

討した。

その結果、ゲインを1.3に設定することで、全物質とも0.2ppb~300ppbにおいて応答値が直線性を示し、測定可能であることが分かった。ここで、物質によっては、これ以下でも、またこれ以上でも測定できる物質もあった。

なお、この検出器ゲインは、今後、装置の状態に応じて、変更する必要がある。

3・2 抽出・導入部 (HS部)

ヘッドスペースの場合に、測定に影響を与える因子は、イオン強度、気液平衡温度、共存物質等であり、これらについて検討した。

(1) 応答値に及ぼすNaCl添加量の影響

一般にイオン強度が大きいほど、揮発性有機化合物は気相に多く分配されることが知られており、そのため、普通、NaClが試料水に添加されている。そこで、NaClの添加量を0, 1, 2, 3, 4, 5gと変化させた場合のMSの応答値に及ぼす影響を検討した。

その結果、図2のとおり、NaClの添加量が多い程、応答値は大きくなった。試料水10mlに3g添加することにより、応答値は無添加の時の1.6倍~2.7倍程度大きくなった。5g添加では4g添加とほぼ同じ応答値であった。添加効果の大きかった物質は、キシレンと1, 4-ジクロロベンゼンであった。

従って、応答値の増加及びNaClを溶解させる操作の簡便化もあわせて考慮し、3g添加することとした。

ここで、NaClの添加量に応じて応答値も変動することから、NaCl量は正確に添加し、標準溶液と同じ濃度に調製する必要がある。

表2 応答値への平衡温度等の影響 (相対応答値)

No.	物質名	平衡温度		NaCl
		メタノール 60/30度	100/1μℓ	
1	1,1-ジクロロエチレン	1.2	0.94	1.6
2	ジクロロメタン	1.3	1.05	1.9
3	t-1,2-ジクロロエチレン	1.2	0.97	1.9
4	c-1,2-ジクロロエチレン	1.2	0.96	2.1
5	クロロホルム	1.2	0.94	2.1
6	1,1,1-トリクロロエタン	1.1	0.95	1.8
7	四塩化炭素	1.1	0.97	1.7
8	ベンゼン	1.2	0.91	2.3
9	1,2-ジクロロエタン	1.4	0.94	2.2
10	トリクロロエチレン	1.2	0.93	1.9
11	1,2-ジクロロプロパン	1.2	0.92	2.4
12	プロモジクロロメタン	1.3	0.93	2.1
13	c-1,3-ジクロロプロペン	1.4	0.92	2.4
14	トルエン	1.2	0.92	2.3
15	t-1,3-ジクロロプロペン	1.8	0.87	2.4
16	1,1,2-トリクロロエタン	1.6	0.91	2.3
17	テトラクロロエチレン	1.2	0.95	1.8
18	ジプロモクロロメタン	1.5	0.94	2.1
19	m,p-キシレン	1.2	0.96	2.5
20	o-キシレン	1.2	0.96	2.7
21	プロモホルム	1.8	0.97	2.1
22	1,4-ジクロロベンゼン	1.5	0.95	2.7

(2) 気液平衡温度

一般に、バイアル中で揮発性有機化合物を気・液両相に分配させる時、平衡温度が高い程気相濃度が高くなる。

一方、高温で分配した場合には水蒸気がシリンジ内で凝縮をおこしたり、共存物質も気相に分配しやすくなるという問題点がある。

その解決のため、シリンジの温度を120度に上げること及び気液平衡温度を上げ過ぎないこととした。

気液平衡温度を30度及び60度とし、応答値に及ぼす影響をみたところ、表2のとおり60度の方が30度の1.1~1.8倍程度、応答値が大きくなった。

物質の中では、プロモホルム、c,t-1,3-ジクロロプロペン、ジブromクロロメタン、1,4-ジクロロベンゼンの増加率が大きかった。

従って、気液平衡温度は60度に設定することとした。

(3) メタノール添加の影響

標準溶液はメタノール溶液であり、検量線作成の際、バイアルの中にメタノールが混入するのは避けられない。

そこで、メタノール添加による応答値の状況を見た。その結果、表2のとおり、メタノール量が多くなるにしたがって応答値は、1.0~0.9と僅かに低めになるものの、100 μ l添加してもほとんど影響がなかった。

従って、標準溶液とマトリックス合わせのため、試料水10ml中にメタノール1 μ l添加することとしたが、標準溶液を作成するときは、バイアル中のメタノール濃度を厳密に合わせなくても良い。

(4) バイアル中の保存性

バイアル中の揮発性有機化合物の保存性をみるために、標準溶液をバイアルに密封し、室温及び冷蔵庫に放置し、一定時間経過後に各物質の濃度を測定した。結果を図3、4に示す。その結果、冷蔵庫保管の方が室温保管より保存性が良かった。

室温における揮発性有機化合物濃度は、3時間後に3~5%減少し、6時間後には10%減少、1日後には20%の減少がみられた。1日経過するとあとは6日目までは大きな減少はみられず、ほぼ同じ濃度であった。

減少率の大きな物質は、c-及びt-1,3-ジクロロプロペンで、6日後には50~60%も減少した。c-及びt-1,3-ジクロロプロペンは冷蔵庫保管だと6日後でも15~20%程度の減少であった。

(5) HSとGCの連結

当所のHS装置は、GCと完全に連動していないので、それぞれの装置の分析サイクルタイムを同調させる必要がある。

GCの分析所要時間が約30分、カラム恒温槽が初期設定温度に復帰するまでに15分を要する。従って、安全を

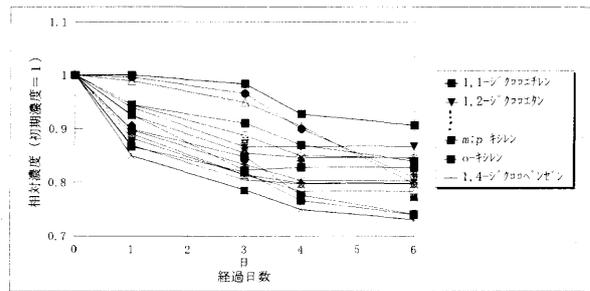


図3 バイアル中の保存性 (冷蔵庫保管)

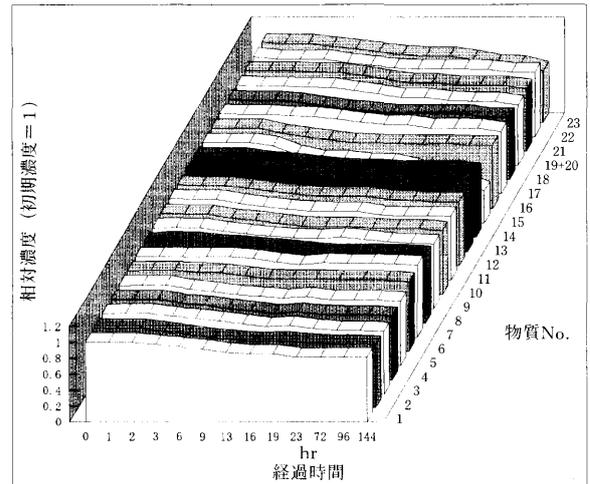


図4 バイアル中の保存性 (室温保管)

見込んでヘッドスペース分析サイクル時間を50分に設定することとした。こうすることで、GC/MSが分析している間に、HS装置は次のサンプルを60度に加熱し、気液平衡化を同時に行っているため、分析時間の効率が図られるようになった。

(6) オートサンプラーの使用

GCへの注入にあたって、ガスタイトトリンジを用いる手動方式だと、注入量のばらつき、シリンジとサンプルの温度差によるシリンジ内への吸着など再現性に問題がある上、分析精度は分析者の熟練度に左右される。この点、オートサンプラーだと、注入量は一定であり、かつ、シリンジの温度を120度と高温に設定することが可能であり、シリンジへの吸着がない。従って、再現性を向上させるためには、オートサンプラーの使用が必要不可欠である。

3・4 データ処理部

分析システムには自動データ処理装置が搭載されている。しかし、自動データ処理装置ではベースライン補正など処理しきれない部分もあるので、定量ピークのウィンドウなどでデータ処理状況を目視で確認し、必要があ

れば、手で補正するなど、装置の機械的な処理まかせにしないことが必要であった。

従って、ピークの波形処理にあたっては、自動データ処理においてはできるだけピークをひろい、その後、分析者がそのデータの確認を行うこととした。

定量パラメータの設定にあたっては、応答値として面積値を用い、原点を通る最小自乗法で検量線を作成するいわゆる絶対検量線法を採用した。必要があれば、標準添加法も有用であろう。内標準物質を用いると内標準自体の応答値の変動が激しく、かえって誤差要因となることがあるので、今回は用いなかった。

データ処理後のデータ保存については、TICデータであれば、1検体につき約1MBにもなり、データ量は膨大になるので、保存媒体には光磁気ディスク(MO, 126MB)を用いることとした。

3・4 HS/GC/MS分析システム全体の検討

(1) 保持時間の再現性

バイアルに20ppbの標準溶液を入れ、連続12日間の保持時間の変動をみた。

その結果、表3のとおり全物質とも変動係数は0.3%以下と良好であった。

(2) 応答値の再現性

バイアルに20ppbの標準溶液を入れ、連続6回分析を行ったところ、表3のとおり応答値の変動係数は全物質とも5%以下と良好であった。

(3) 0.2ppbの繰り返し実験

測定下限の目標として設定した0.2ppbにおけるS/N比は3以上であり、また、変動係数は表3のとおり概ね10%以下と結果は良好であった。

(4) 検量線の直線範囲

0.2~300ppbにおける検量線の相関係数は0.999以上であり、直線性は良好であった。また、前述したように、0.2ppbにおける繰り返し実験から、定量下限値として0.2ppbが設定可能である。

(5) 水

標準溶液の作成や高濃度試料の希釈に用いる水は、揮発性有機化合物による汚染がないこと、かつ安価で容易に入手できることが求められる。

そこで、各種の水の汚染状況を調査した。

蒸留水、イオン交換水、超純水、水道水、エビアン水(ミネラルウォーター)を測定したところ、超純水からジクロロメタンが20ppb、蒸留水からプロモホルム5ppb、ジブロモクロロメタン1.2ppb、プロモジクロロメタン0.3ppbが検出された。水道水からは、総トリハロメタンが数ppb検出された。エビアン水からは揮発性有機化合物が検出されず、一番汚染が少なかった。蒸留水、イオン交換水については建物内の雰囲気からの汚染であり、

表3 再現性試験

(変動係数, 単位%)

No.	物質名	保持時間 20ppb 12日間	応答値 20ppb 6回連続	応答値 0.2ppb 6回連続
1	1,1-ジクロロエチレン	0.26	1.7	7.6
2	ジクロロメタン	0.23	2.1	7.7
3	t-1,2-ジクロロエチレン	0.25	1.8	9.5
4	c-1,2-ジクロロエチレン	0.20	2.3	5.3
5	クロロホルム	0.19	2.7	1.9
6	1,1,1-トリクロロエタン	0.19	1.2	11
7	四塩化炭素	0.18	1.0	7.9
8	ベンゼン	0.18	2.3	5.8
9	1,2-ジクロロエタン	0.18	2.4	2.4
10	トリクロロエチレン	0.17	2.9	10
11	1,2-ジクロロプロパン	0.17	3.0	8.6
12	プロモジクロロメタン	0.17	2.5	11
13	c-1,3-ジクロロプロペン	0.16	4.5	3.7
14	トルエン	0.15	2.4	5.8
15	t-1,3-ジクロロプロパン	0.15	3.3	6.6
16	1,1,2-トリクロロエタン	0.14	3.9	9.4
17	テトラクロロエチレン	0.14	1.3	9.2
18	ジブロモクロロメタン	0.15	1.5	6.2
19	m,p-キシレン	0.13	1.5	5.6
20	o-キシレン	0.13	1.0	12
21	プロモホルム	0.12	1.4	3.1
22	1,4-ジクロロベンゼン	0.11	2.8	6.7

もちろんその時の分析作業状況によって異なってくるが、これらは常に汚染されていることに十分留意する必要がある。

(6) 室内の汚染状況

室内汚染の状況を調べるために、当所の水質試験室、屋上出入り口、天秤室、空調室、ガスクロ室、ガスマス室、データ処理室、特殊公室、大気室にエビアン水の入ったビーカーを一日放置し、水中の揮発性有機化合物を分析した。水質試験室でクロロホルム0.2ppb、屋上出入り口でジクロロメタン0.3ppb、ガスクロ室でジクロロメタン20ppbが検出された。ページ・トラップ法によりTICを測定し汚染物質を検索したところこれらの物質の他に、アセトン、ヘキサン、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、キシレン等の当所分析室で使用されている有機溶媒が検出された。

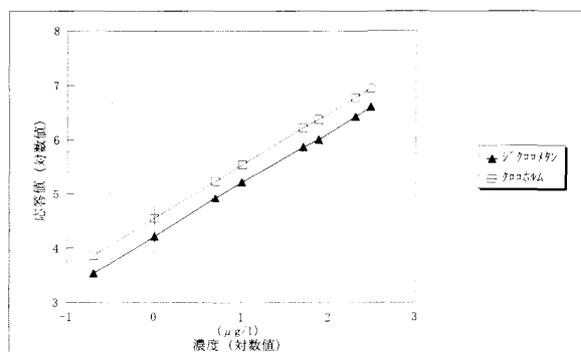


図5 検量線の例

分析室の作業内容によっては、これらの物質はもっと高濃度になることや、他の物質も検出されることが予想される。

(7) 試薬

NaClは特級を無処理のまま使用して問題はなかった。また、残留農薬用のメタノールについても問題はなかった。ヘッドスペース法では、試薬からのコンタミに関しては特に問題になることはなかった。

(8) トリハロメタン類測定時の留意事項

今回検討した分析システムでは、トリハロメタン類も測定できるように考慮したが、この際、オートサンプラーヘッドスペース法を用いているので、次のことに注意が必要であった。すなわち、残留塩素が存在しているまま、ヘッドスペースのサンプルラックにバイアルを並べて置くと、放置している間及び気液平衡過程でトリハロメタン類、特にブrom化された物質が生成されるので、アスコルビン酸を0.1g程度添加し、残留塩素を完全に分解することとした。

(9) 揮発性有機化合物分析システムの構築・評価

揮発性有機化合物分析システムの構築にあたり、抽出・導入方法には大きく、パージ・トラップ法とヘッドスペース法の2つの方法があり、どちらを採用するかという使い分けの問題がある。

ヘッドスペースの利点としては、測定濃度範囲が広いこと、装置や流路が汚染されがたいこと、操作が簡便であること、水中の濁りの影響を受けがたいこと、汚染水と非汚染水を同時に測定できること等があげられる。

ただし、全量注入法であるパージ・トラップに比べて感度が低いという特徴がある。

しかし、この感度の点については、近年装置の改良が進んでおり、今回検討した結果、測定対象物質については、問題なく測定できることが分かった。

環境基準の改正に先立ち、平成4年12月21日に水道水水質基準が大幅に改正され⁷⁾、その中に今回検討した揮発性有機化合物が追加されている。しかし、水道水水質基準の公定測定法にはパージ・トラップ-GC/MS法は採用されているが、四塩化炭素、1,1,2-トリクロロエタン、1,2-ジクロロエタン、c, t-1,3-ジクロロプロペンについてはヘッドスペース法は採用されていない。当時のヘッドスペース/GC/MS法では、これからの物質について感度不足のためと思われるが、今回検討の結果、これらの物質についても、ヘッドスペース/GC/MS法で0.2ppbまで測定可能であった。

一方、パージ・トラップ法は、感度が高いが、装置の取り扱いが難しいこと、測定対象物質が装置内に残留する危険性があること、直前に測定したサンプルの影響を受ける可能性があること、また、希釈水にはエビアン水

を用いているが、これは硬水であり、スケールが析出し取り扱いに困ること、更に、ダイナミックレンジが狭いので、清浄地下水から汚染水まで測定するような場合には不向きであること、水分がMSに流入して起こるシャットダウンの問題等がある。(ヘッドスペースにおいては、今まで、シャットダウンが起きた事はない。)

以上、総合的にみると、感度の面ではパージ・トラップ法が優れているが、分析効率、一斉分析、装置の取り扱い、メンテナンスの面でヘッドスペース法が優れているといえよう。

ただし、今回検討対象外の物質であった、かび臭の場合、ヘッドスペース法ではまだ、感度不足のため適用できない。

従って、総合的な揮発性有機化合物分析システムは、かび臭にはパージ・トラップ/GC/MS法、かび臭以外の揮発性有機化合物にはヘッドスペース/GC/MS法と使い分けるのが適当と考える。

(10) 分析操作のフロー

これまでの検討結果から、分析操作のフローは図6のとおりとした。

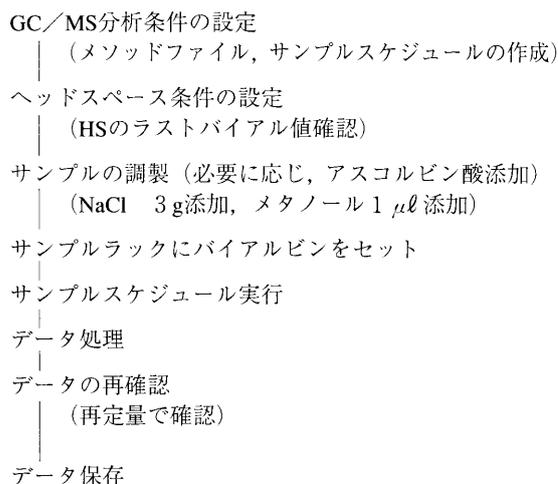


図6 分析操作フロー

4. ま と め

水試料中の揮発性有機化合物23種類についてオートサンプラーヘッドスペース/GC/MSを用いて、一斉分析可能な測定条件の検討を行った。

(1) 分離状況

分離カラムに60mのDB-624を用い、40℃から200℃までの昇温分析により、ほぼ、分離可能となった。

ただし、「ベンゼンと1, 2-ジクロロエタン」及び「キシレンのm-体とp-体」は分離できなかった。

GC部で分離できないベンゼンと1, 2-ジクロロエ

タンは、設定質量数が異なるのでMS部で分別定量可能である。キシレンのm-とp-体の異性体は、MS部でも区別できないが、基準値はo-, m-, p-体の合計値であるから、実用上は問題がない。

(2) 検出部

ゲイン、測定質量数を適切に設定することにより、全物質とも0.2ppb~300ppbの広いダイナミックレンジにおいて応答値が直線性を示した。

(3) 抽出・導入部

応答値に及ぼすNaCl添加量、気液平衡温度、メタノール添加量の影響を検討したところ、試料水10mlにNaClを3g、メタノールを1μl添加し、バイアルの気液平衡温度を60℃に設定するのが適当であった。

(4) 保存性

標準溶液をバイアル中に密封し、保存性を検討したところ、室温放置では、6時間後に10%減少、1日後に20%の減少がみられた。1日経過するとあとは6日目までは大きな減少は見られず、ほぼ同じ濃度であった。

減少率の大きな物質は、c, t-1, 3-ジクロロプロペンで6日後には50~60%も減少した。

冷蔵庫保管の方が保存が良く、c, t-1, 3-ジクロロプロペンは冷蔵庫だと6日後でも15~20%程度の減少であった。

(5) 再現性の検討

バイアルに20ppbの標準溶液を入れ、保持時間の変動及び、応答値の変動をみたところ、変動係数は全物質ともそれぞれ、0.3%以下、5%以下と良好であった。

(6) 検量線

0.2~300ppbにおける23物質の検量線の相関係数は全

て、0.999以上であり、直線性は良好であった。また、0.2ppbにおけるS/N比は3以上かつ、繰り返し実験における応答値の変動係数は全物質ともほぼ10%以下と良好であった。

以上、22mlのバイアルビンに、試料水を10ml入れ、NaCl 3gとメタノール1μlを添加し、気液平衡温度60度、ニードル温度120度のオートサンプラーヘッドスペース/GC/MS法で0.2~300ppbまでの広いダイナミックレンジで、一斉分析が可能であった。

本法により、地下水、河川水、排水と幅広い試料について測定を行ったところ、いずれも十分適用可能であった。

文 献

- 1) 環境庁：水質汚濁に係る環境基準の一部を改正する件、環境庁告示第16号、平成5年3月8日。
- 2) 政令第401号：水質汚濁防止法施行令の一部を改正する政令、平成5年12月27日。
- 3) 総理府令第54号：排水基準を定める総理府令の一部を改正する総理府令、平成5年12月27日。
- 4) 環境庁：排水基準を定める総理府令の規定に基づく環境庁長官が定める排水基準に係る検定方法、環境庁告示第2号、平成6年1月10日。
- 5) 丹保憲仁：水道とトリハロメタン、1版、技報堂出版(株)、東京、1983。
- 6) 環境庁水質保全局水質規定課：環境水質分析法マニュアル、初版、環境化学研究会、つくば、1993。
- 7) 厚生省：水質基準に関する省令、厚生省令第69号、平成4年12月21日。

Abstract

Simultaneous analysis of submergent volatile organic compound by using headspace/GC/MS method

Shin-ichi ISHIZUKA¹ and Hideki OHKUBO¹

As for 23 kinds of the volatile organic compound in the water samples, an investigation of measurement conditions, by which a simultaneous analysis become possible, has been carried out by using an autosampler headspace/GC/MS. By using the 60m capillary column (DB-624) for a separation column, a sample water of 10ml was put into the vial of 22ml, and then after adding the NaCl of 3 g and methanol of 1 μ l, it was analyzed through utilizing an autosampler headspace/GC/MS method with a vapor-liquid equilibrium temperature of 60°C and needle temperature of 120°C. As a consequence of it, any of all materials have shown a linearity of response values in a wide dynamic range of 0.2~300ppb, and correlation coefficients of any calibration curves were above 0.999, and therefore a simultaneous analysis was possible. When examining a variation of retention time and reproducibility of response value after putting a standard solution of 20ppb into the vial, the coefficient of variation was good at any materials, namely below 0.3% and 0.5%. As a result of the repeated analytical experiments in case of 0.2ppb, S/N ratio and coefficient of variation were good at any materials, namely S/N ratio was above 3 and coefficient of variation was approximately below 10% respectively. Furthermore even materials, which was not adopted in the official regulation according to a water quality standard for drinking water, was possible to be measured by this method.

Key words : simultaneous analysis, headspace/GC/MS method, volatile organic compounds, water pollution

¹ : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

事業場における窒素・燐の排出実態調査

三上 一

1993～95年の3ヶ年間に、排水量50m³/日以上30業種、184事業場における窒素・燐の排出実態調査を行った。その結果、全体で窒素は平均19mg/ℓ (0.11～200mg/ℓ)、燐は平均7.4mg/ℓ (0.016～330mg/ℓ)と両者ともに分布幅が大きかった。業種別にみると、窒素は生し尿処理施設が平均値52mg/ℓ (0.81～200mg/ℓ)で最も高く、次いで、水産食料品製造業、合併処理方式のし尿処理施設が続き、燐は水産食料品製造業が平均値27mg/ℓ (0.13～330mg/ℓ)と他の業種に比較して著しく高かった。

窒素・燐の負荷量調査では水産食料品製造業では燐が、下水道終末処理施設では窒素が高く、生し尿処理施設では窒素・燐とも高いことから、これらの施設では窒素、燐負荷量の削減が望まれる。

Key words : waste-water, nitrogen & phosphorus and pollutant loading

1. はじめに

湖沼・内湾等の閉鎖性水域は魚介類をはじめとして生産性が高く、生物多様性に富む豊かな水圏であるとともに水源や観光をはじめとするレクリエーションの場としても有用な場であることから、良好な水質保全が望まれている¹⁾。

近年、これらの水域において流域から流入する過剰な窒素・燐による植物プランクトンが異常増殖する富栄養化が進行し、アオコ、赤潮、青潮を引き起こし魚類類死等を招き、水産、利水等に多大な被害をもたらす事例が発生していることから大きな問題となっている。

富栄養化防止対策として、湖沼法が制定²⁾され(1985年)、青森県においても陸奥湾が窒素、或いは、燐が海洋性植物プランクトンの著しい増殖のおそれのある海域として指定された(1993年)。

窒素・燐の増大は流域内における人間活動に起因する生活雑排水とともに、事業場排水の影響も大きいことから事業場における窒素・燐に係る排出基準値³⁾が設定された。

今回、青森県における事業場からの窒素・燐の排出実態⁴⁾を把握するため、主に津軽・下北地方における排水量50m³/日以上30業種からの窒素・燐の排出実態調査を行ったので報告する。

2. 調査方法

調査期間は1993～95年の3ヶ年間で、30業種、184事業場を対象とし、総検体数は343である(表2)。

分析方法はT-Nはベルオキシニ二硫酸カリウム分解ー紫外外部吸光度法、T-Pは硝酸一過塩素酸分解後、モ

リブデン青吸光度法によった。

3. 結果と考察

3・1 業種別の全窒素と全燐の分布状況

今回、業種別の排水中における窒素・燐の濃度特性を把握するため、対象とした30業種を7類型に分類して、その分布特性を検討した(表1)。

表1 対象事業場と区分

No	業 種	施設番号	事業場数	検体数
1	水産食料品製造業	3	24	67
2	飲料製造業	10	8	20
3	旅館業	66-2	29	33
4	合併し尿処理施設	72(合)	50	71
5	生し尿処理施設	72(生)	12	24
6	下水道終末処理施設	73	9	18
7	そ の 他	-	52	110

今回、調査対象とした事業場を7類型に区分するに当たり、事業場数の数が比較的多い業種と(66-2, 68-2, 72(合)), 処理施設の規模が大きい業種(72(生), 73)を選定するとともに、特定施設番号3の水産食料品製造業は陸奥湾沿岸域に点在するホタテ加工場が主で、特定施設番号10の飲料製造業は弘前市を中心とする津軽地域のリング加工場が主であるが、両者ともに代表的な地場産業の1つであることから地域特性を示す業種として選定した。

また、特定施設番号72のし尿処理施設を原水の特長から合併処理方式のし尿処理施設と生し尿処理施設に区分

表2 事業場排水中のT-N, T-Pの含有量 (平均: 最小~最大)

施設番号	業種	N 事業場数	n 検体数	T-N (mg/l)		T-P (mg/l)	
				平均	範囲	平均	範囲
—	全	184	343	19	0.11-200	7.4	0.016-330
2	畜産食料品製造業	4	12	14	1.8-32	3.6	0.54-11
3	水産食料品製造業	24	67	29	0.75-130	27	0.13-330
4	野菜・果実等保存食料品製造業	5	9	3.2	0.80-8.7	0.52	0.016-1.8
5	みそ・しょう油製造業	3	9	5.4	1.6-18	2.6	0.34-12
8	パン・菓子製造業	1	4	3.4	1.5-5.6	0.66	0.056-1.2
9	米菓製造業	2	6	5.2	0.50-14	7.9	0.066-34
10	飲料製造業	8	20	1.3	0.11-3.4	0.43	0.092-1.1
11	有機質肥料製造業	1	2	15	10-20	1.3	0.87-1.7
16	めん類製造業	1	3	0.66	0.16-1.3	0.10	0.022-0.22
17	豆腐又は煮豆製造業	3	9	4.4	0.34-24	0.23	0.10-0.56
19	繊維製品製造業	1	3	7.5	6.8-8.6	0.20	0.14-0.30
23	パルプ・紙又は紙加工品製造業	1	1	1.6	—	0.21	—
53-イ	ガラス製品製造業	2	3	16	1.0-46	6.6	0.26-19
64	ガス供給業	1	1	0.22	—	0.10	—
64-2	水道施設	2	2	0.74	0.38-1.1	0.094	0.078-0.11
65	酸又はアルカリによる表面処理施設	1	3	1.9	0.59-3.8	0.15	0.091-0.27
66	電気メッキ施設	4	7	2.2	0.88-4.0	0.32	0.056-0.56
66-2	旅館業	29	33	14	0.87-110	1.8	0.054-12
66-3	共同調理場	3	5	6.3	0.58-10	1.2	0.068-2.6
67	洗濯業	5	10	6.6	1.8-16	5.8	0.39-19
68	写真現像業	1	1	0.14	—	0.28	—
68-2	病院	8	12	22	3.4-72	2.8	1.1-6.1
69	と畜業	1	3	17	4.4-26	3.7	1.0-5.8
69-2	中央卸市場	2	3	12	11-13	1.3	1.2-1.3
71	自動式車両洗浄施設	2	3	1.6	0.86-2.2	0.32	0.10-0.68
71-2	科学技術施設	1	1	23	—	0.85	—
71-3	一般廃棄物処理施設	4	6	4.3	0.47-9.7	0.27	0.072-0.65
72	し尿処理施設(合併)	42	59	25	2.0-100	2.9	0.27-9.7
72	し尿処理施設(生)	12	24	52	0.81-200	6.5	0.12-47
73	下水道終末処理施設	9	18	15	5.9-22	1.5	0.17-9.4
74	共同排水処理施設	2	4	27	4.0-38	3.5	0.64-5.5

するとともに、特定施設番号68-2の病院と72の合併処理施設の原水及び処理方式に類似点が多く認められることから、両者を72(合)とし、生し尿処理施設72(生)と区分した。残りの業種についてはその他の業種とし、便宜上、ここでは31業種とした(表2)。

窒素濃度は全検体数(n=343)で平均値19mg/l、濃度範囲は0.11~200mg/lと分布幅が大きいが、およそ70%が1~30mg/lの範囲に分布していた。

窒素の排水基準値である120mg/lを超えたものは水産食料品製造業1施設、生し尿処理施設3施設の2業種4施設であった。

業種別に窒素の分布状況をみると、生し尿処理施設は平均値で52mg/lで、同じし尿処理施設である合併処理方式や水産食料品製造業をはじめとする他の業種と比較

すると2倍以上の高濃度であり、濃度範囲も0.81~200mg/lと大きく、しかも高濃度側に分布が広がるのが他の業種には見られない特徴であった。

次いで、窒素濃度が高いのは水産食料品製造業(平均値29mg/l:以下同じ)、合併処理方式のし尿処理施設(25mg/l)で、これに下水道終末処理場(15mg/l)、旅館業(14mg/l)が比較的低い濃度で続き、飲料製造業(1.3mg/l)は最も低かった。その他の区分の業種では共同排水処理施設や科学技術施設等、一部の業種では窒素濃度が高いものがみられるが、おしなべて窒素濃度は低かった。業種別に窒素の分布状況をみると、飲料製造業と下水道終末処理施設の両者では濃度範囲が小さいが、残りの業種は濃度範囲が大きく、窒素の分布状況には業種による差が認められた(図1)。

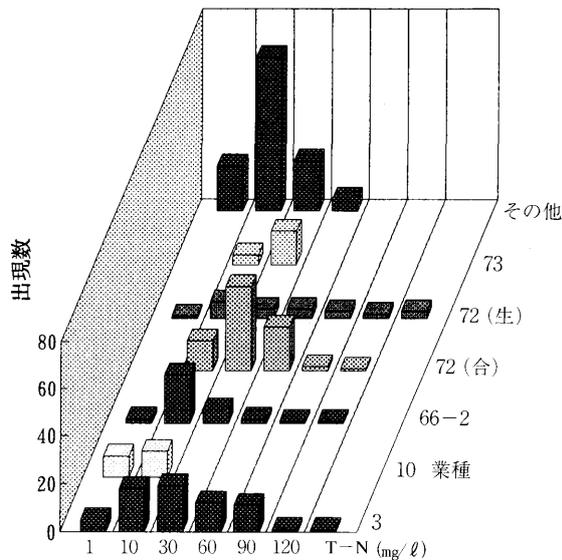


図1 業種別にみた窒素の分布状況

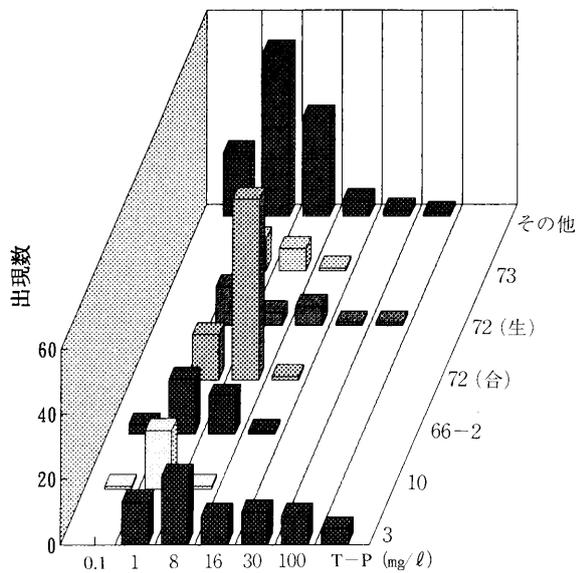


図2 業種別にみた燐の分布状況

燐濃度は全体で平均値7.4mg/l、濃度範囲は0.016~330mg/lと窒素よりも分布幅が大きく、およそ80%が1~8mg/lの範囲に分布していた。

燐の排水基準値である16mg/lを超えたものは29検体で、窒素と比較すると多く、このうち、水産食品製造業が12施設25検体であった。これは、水産食品製造業では保存剤としてポリリン酸化合物を使用する例が見受けられることから、その使用法や処理法を検討する必要がある。

水産食品製造業のほかに、燐の排水基準値を超えた業種は米菓製造業、ガラス製品製造業、洗濯業、生し尿処理施設が各々1施設で、全体では5業種16施設であることから、今回、調査対象とした事業場では燐の削減対

策^{5,6,7)}が、特に、水産食品製造業では重要であるといえる。

業種別に燐の分布状況を見ると、水産食品製造業が平均値27mg/lで、排水基準値16mg/lを大幅に超えるとともに、濃度分布も0.13~330mg/lと他の業種に比べて著しく大きかった。

次いで、生し尿処理施設(6.5mg/l)が高く、これに合併処理方式のし尿処理施設(2.9mg/l)、旅館業(1.8mg/l)、下水道終末処理施設(1.5mg/l)が比較的低い濃度で続き、飲料製造は平均値0.43mg/lとなり、窒素と同様に最も低かった。その他の区分の業種でガラス製品製造業、洗濯業等では燐濃度が高いものがみられたが、おしなべて燐濃度は低かった。業種別に燐の分布状況を見ると、飲料製造業、旅館業、合併処理方式のし尿処理施設及び下水道終末処理施設では濃度が小さく、窒素と同様に業種による差が認められた(図2)。

3・2 T-N/T-P比

植物プランクトンは窒素・燐を栄養塩類として摂取し、増殖するが、出現する植物プランクトンの優先種はT-N/T-P比に大きく影響されるといわれる。

また、水域におけるT-N/T-P比の変化は植物プランクトンを食餌とする魚類生態系にも変化をもたらすことから、水域でのT-N/T-P比の変化は水産の場でも関心⁸⁾を集めている。

今回、対象とした多くの事業場の排水は直接、或いは、公共用水域を通して湖沼や内湾等の閉鎖性水域に流入することから、T-N/T-P比について検討した。

T-N/T-P比の分布状況を見ると、全体では平均値

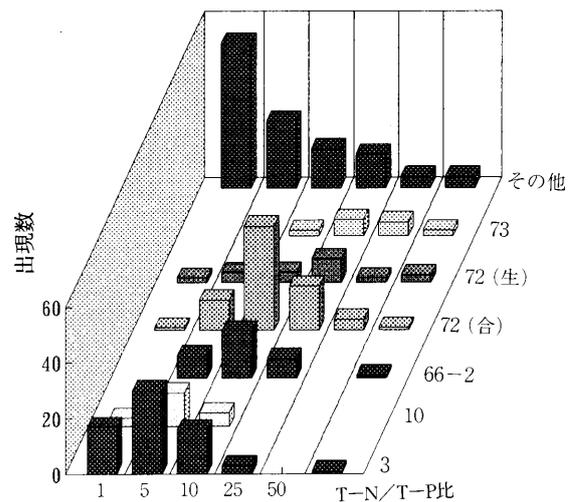


図3 業種別のT-N/T-P比の分布状況

13、分布幅は0.09~330と大きく、およそ65%が5~10の範囲に分布していた。

業種別にT-N/T-P比の分布状況を見ると、水産食

- (1) I 類型：3 業種
 麵類製造業 (16)，ガス供給業 (64)，水道施設 (64-2)
- (2) II 類型：11 業種
 野菜・果実等保存食料製造業 (4)，パン・菓子製造業 (8)，飲料製造業 (10)，豆腐又は煮豆製造業 (17)，繊維製品製造業 (19)，パルプ・紙又は紙加工製造業 (23)，酸又はアルカリによる表面処理施設 (65)，電気メッキ施設 (66)，写真現像業 (68)，自動式車両洗浄施設 (71)，一般廃棄物処理施設 (71-3)
- (3) III 類型：12 業種
 畜産食料品製造業 (2)，みそ・しょう油製造業 (5)，有機質肥料製造業 (11)，旅館業 (66-2)，共同調理場 (66-3)，病院 (68-2)，と畜業 (69)，科学技術施設 (71-2)，合併方式し尿処理施設 (72(合))，共同排水処理施設 (74)
- (4) IV 類型：4 業種
 米菓製造業 (9)，ガラス製品製造業 (53-イ)，洗濯業 (67)，生し尿処理施設 (72(生)) 4
- (5) V 類型：1 業種
 水産食料品製造業 (3)

ここで、類型別に分類した31業種における窒素と磷についてみると、水産食料品製造業 (3)，生し尿処理施設 (72(生))，下水道終末処理施設 (74)，合併処理方式のし尿処理施設 (72(合)) 及び旅館業 (66-2) の5業種では窒素・磷ともに濃度が高く、事業場数や処理施設の規模等を考慮すると、これらの業種では何らかの窒素・磷削減対策の必要性を伺わせる。

また、T-N/T-P比からみると、多くの業種ではその比が10以下であった。全国的にみると、洗剤の無磷化や磷の高度処理により排水中の磷濃度は低下し、窒素濃度は暫増する傾向にあることが指摘されている。

今回、対象とした多くの事業場ではT-N/T-P比からみると、相対的に磷濃度が高いことから、より磷の削減対策が求められるようである (図4)。

3・4 窒素・磷の負荷量

ここでは、負荷量の算定には届出台帳に記載されている日間の平均排水量 (m³/日) を用いて、各施設の負荷量の分布状況やその特性について検討した。

窒素負荷量が全体で平均値30kg/日、負荷量の範囲は0.009~1100kg/日であった。窒素負荷量の分布の状況をみると、負荷量が1kg/日以下であるものは58施設121検体、1~10kg/日であるものが87施設149検体で、およそ80%の施設、検体数ともにこの範囲にあった。更に、窒素負荷量が100~500kg/日であるものが6施設11検体で、窒素負荷量が500kg/日以上が3施設7検体で、大規模処理施設である生し尿処理施設と下水道終末処理場が該当していた。

特に、下水終末処理施設では窒素濃度は15mg/lと、窒素濃度は他の業種と比較して高くないが、負荷量で見ると他の施設に比べて著しく高いことから、事業場排水を評価するうえで、濃度とともに負荷量の把握も重要であることがわかる。

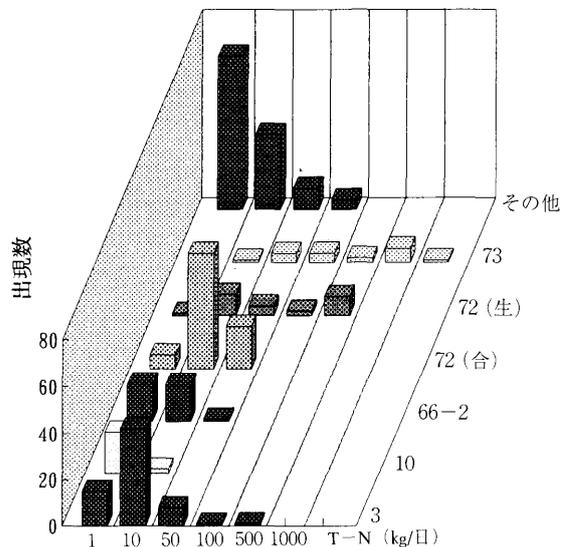


図5 窒素負荷量の分布状況 (n=343)

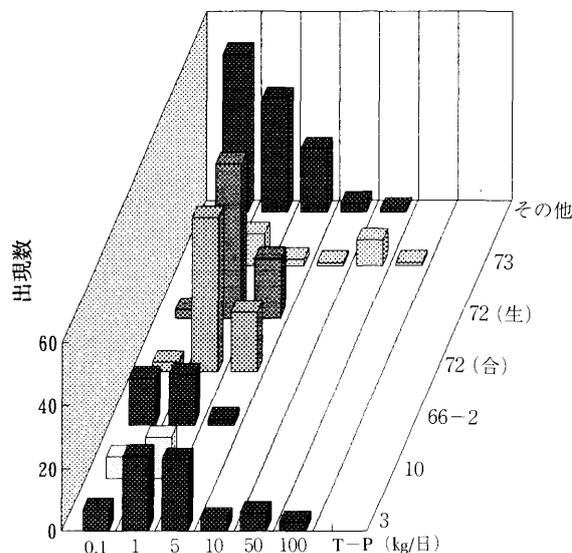


図6 磷負荷量の分布状況 (n=343)

磷の負荷量は全体では平均値3.3kg/日、負荷量の範囲は0.002~99kg/日で、窒素の負荷量の約1/10であった。

磷の負荷量の分布をみると、負荷量が0.1kg/日以下であるものが43施設84検体で、0.1~1kg/日であるものが90施設148検体で、およそ70%がこの範囲にあった。

更に、磷負荷量が10~50kg/日であるものが8施設24検体で、磷負荷量が50kg/日以上であるものが2施設5検体で、水産食料品製造業と下水道終末処理施設が該当していた。

今回の負荷量調査で窒素・磷の負荷量が大きい水産食料品製造業、生し尿処理施設及び下水道終末処理施設の3業種のうち、磷負荷量が高い水産食料品製造業では多くの事業場でポリリン酸化合物を使用するためである。

一方、生し尿処理施設では磷の負荷量に比べて、窒素の負荷量が高く、分布幅も大きいのが特徴である。これは、生し尿処理施設では窒素の高度処理法として嫌気性処理による脱窒を行っている施設が多く見受けられるが、施設により処理効果に差があるため窒素負荷量の分布幅が大きくなるとともに、処理効果の低下により窒素が高負荷となると考えられることから、施設や工程毎の処理効果の把握や適切な維持管理法が検討されてよいものと思われる。

表4 事業場負荷量の総計 (n=184)

項目	負荷量 (kg/日)
排水量	252,900
BOD	4,310
SS	2,690
T-N	4,720
T-P	474

注) 排水量は (m³/日)

次に、対象とした184事業場から環境中に放出される負荷量の算出と業種別の寄与を求め、業種別にみた対策の必要性等について検討した。

なお、ここでは窒素・磷と同時に測定したBOD (CODを含む)とSSも追加し、5項目を用いた。

事業場から排出されるBOD、SS、窒素、磷の負荷量を見ると、窒素の負荷量が最も大きく、次いで、BODがほぼ同じ負荷量であるが、磷の負荷量は最も小さく窒素負荷量の約1/10であった(表4)。

窒素・磷に関してみると、湖沼で発生するアオコは窒素1mgから50mg、磷1mgから1,000mgの植物プランクトンが生成されるといわれている。利用可能な窒素・磷の形態は植物プランクトンにより異なるが、ここでは全て利用されるものとし、植物プランクトンの生成量を見積もると、窒素は236トン、磷は474トンとなり、負荷量では約1/10である磷から生成される植物プランクトンは窒素に比べて2倍になる。更に、窒素は脱窒菌等の微生物代謝の過程でガス態となり、水圏から除去される成分であるが、磷は水圏-土壌圏に残存することからより長期的な影響をもたらすと同時に、多くの閉鎖性水域では

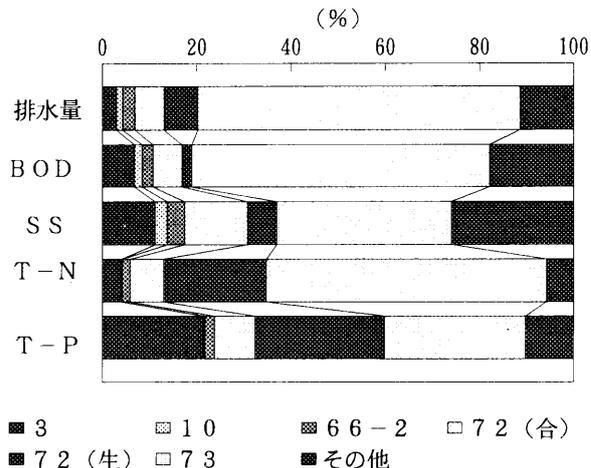


図7 業種別の負荷量の割合

磷が植物プランクトンの増殖の制限因子となる傾向にあることから、対象とした事業場では、磷の対策がより必要と思われる。

業種を7類型に区分し、業種別の負荷量の実態について検討した。

負荷量と密接に関連する排水量をみると、下水道終末処理施設は施設が9と少ないものの、総排水量のおよそ70%を占め、生し尿処理施設、合併処理方式のし尿処理施設が比較的総排水量大きいほか、残りは排水量が小さかった。

窒素の負荷量をみると、下水道終末処理施設がおよそ60%、生し尿処理施設がおよそ20%であり、総窒素負荷量のおよそ80%が両者に由来している。

磷の負荷量をみると、下水道終末処理施設がおよそ30%、生し尿処理施設がおよそ30%、水産食料品製造業がおよそ20%であり、総磷負荷量のおよそ80%がこの3業種で占められていた。

窒素、磷の排水基準値からみると、水産食料品製造業において磷の排水基準値を大幅に超えるほか、多くの場合、基準値を下回っているが、生し尿処理施設、下水道終末処理施設では窒素、磷の負荷量が他の業種に比べて極めて大きいことから、これらの業種では負荷量削減に向けた対策が講じられてよいものと思われる。

更に、今回の実態調査では50m³/日以上を施設を対象としたが、水産食料品製造業をはじめとする50m³/日未満の施設の多くは処理設備を有していないことから、これらの施設でも窒素・磷の排出実態を把握することが必要と思われる。

4. ま と め

今回、湖沼及び閉鎖性海域に直接、或いは、公共用水域を通して、排出される事業場からの窒素・磷に係わる

排出基準値が設定されたことから、1993～1995年の3ヶ年間に排水量50m³/日以上30業種184事業場における排水中の窒素・燐の実態調査を行った。

その結果、

- (1) 窒素の排出濃度の全平均値は19mg/ℓ (0.11～200mg/ℓ) で業種別にみると、生し尿処理施設が窒素濃度が最も高く、水産食料品製造業、合併処理方式のし尿処理施設が比較的高い濃度であった。
- (2) 燐の排出濃度の全平均値は7.4mg/ℓ (0.016～330mg/ℓ) で、業種別にみると、水産食料品製造業は平均27mg/ℓとなり、多くの施設では燐の排水基準値を超えていた。
- (3) 窒素・燐の濃度レベルからみると、水産食料品製造業、生し尿処理施設、下水道終末処理施設、合併方式し尿処理施設及び旅館業では窒素・燐濃度が高い傾向にあった。
- (4) T-N/T-P比からみると、その比が10以下であるものが多いことから、燐の及ぼす影響が大きいことが示唆された。
- (5) 負荷量調査では下水道終末処理施設と生し尿処理施設から排出される窒素・燐の負荷量が極めて大きいことから、両施設では窒素・燐の削減に向けた対策が検討されてよいものと思われる。

- (6) 水産食料品製造業では燐濃度とともに、燐の負荷量も大きいことから燐の削減に向けた早急な対策が必要と考えられる。

文 献

- 1) 第6回世界湖沼会議：'95霞ヶ浦人と湖沼の調和－持続可能な湖沼と貯水池の利用を目指して、1995.
- 2) 環境庁水質保全局監修：湖沼の水質保全－その現状と新しい精度. 地球社, 1986.
- 3) 志々目友博：内湾の環境保全－閉鎖性海域の環境の現状と対策の動向. 環境化学会誌 8 (4), 439-447, 1995.
- 4) 根岸勝信：事業場排水の全リン, 総窒素調査. 青森県公害センター所報第7号, 95-100, 1985.
- 5) 赤壁哲朗, 他：兵庫県における事業場からの窒素の排出実態について. 全公研会誌, 15, 2, 31-36, 1990.
- 6) 梅本 論, 他：リン排出量削減のための排水実態調査. 兵庫県公害研究所研究報告12号, 31-37, 1980.
- 7) 梅本 論, 他：兵庫県における産業系排水に対する燐削減対策. 全公研会誌, 16, 2, 19-24, 1991.
- 8) 日本水学会監修：水産学シリーズ95－水域の窒素：リン比と水産生物. 恒星社厚生閣, 1993.

Abstract

Examination on actual discharge circumstances of nitrogen and phosphorus at a place of industry

Hajime MIKAMI¹

An examination on actual discharge circumstances of nitrogen and phosphorus at 184 places of industry of 30 types of industry discharging a drainage quantity above 50m³/day has been carried out for 3 years from 1993～1995. As a result, in overall discharging quantity was, 19 mg/l (0.11～200mg/ℓ) in average for phosphorus, and 7.4mg/ℓ (0.016～330mg/ℓ) in average for phosphorus, and therefore the both were large in distribution width. Having a good look at each type of industry, as for nitrogen, a raw human waste treatment plant had the highest mean value of 52 mg/ℓ (0.18～200mg) and it was followed by a marine food products manufacture, and then by a human waste treatment plant installed with a combined treatment method. As for phosphorus, a marine food products manufacture had a mean value of 27 mg/ℓ (0.13～330 mg/ℓ) and it had a remarkably higher value compared with other type of industry. In an examination on the loading amount of nitrogen and phosphorus, because the phosphorus was high in a marine food products manufacture, the nitrogen was high in a final sewerage treatment plant, and both nitrogen and phosphorus were high in a raw human waste treatment plant, it is expected that a loading amount of nitrogen and phosphorus will be reduced in these plants.

Key words : waste water, nitrogen, phosphorus, loading

1 : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

六ヶ所村及びその周辺地域における空間放射線の特性調査

庄司 博光 竹ヶ原 仁 奥野 直子
野田 正志 五十嵐 健 佐藤 信博

六ヶ所村とその周辺地域において、空間放射線の特性を把握するため、in-situ測定及び土壌中の放射性核種濃度の測定を行った。調査地域の空間放射線は、U系列、Th系列、K-40の自然放射性核種の寄与がほとんどであり、平均の線量率は、約24nGy/hであった。土壌中での放射性核種の深度分布を調査した結果、自然放射性核種は均一分布を、人工放射性核種はほぼ指数関数分布をしていることが確認された。

Key words : in situ measurement, Uranium series nuclides, Thorium series nuclides, Potassium

1. はじめに

原子燃料サイクル施設に係る環境モニタリングの一環として、県及び設置者である日本原燃(株)は、平成元年4月から、六ヶ所村及びその周辺地域において、空間放射線の測定を実施している。モニタリングステーションの連続モニタ、熱蛍光線量計(TLD)及びモニタリングカーによる空間放射線の測定結果には、測定地点及び測定時期による差異がみられているが、その要因を説明できるような調査は、まだ十分なされていない。

そこで、各地点における空間放射線の特性を把握し、今後のモニタリング結果の評価に資するため、平成5年、6年度に、空間γ線スペクトル測定及び周辺土壌中の放射性核種濃度の測定を行ったので、その結果を報告する。

2. 調査方法

2.1 調査地点

原子燃料サイクル施設に係るモニタリングとして、県及び日本原燃(株)が、空間放射線の測定を実施している35地点について調査を行った。調査地点を図1に示す。

2.2 調査時期

平成5年9月～11月及び平成6年6月～9月の積雪のない期間に調査を実施した。また、測定は降水のない状況下で行った。

2.3 調査項目及び調査方法

(1) 空間γ線スペクトルの測定及び解析

可搬型のGe半導体検出器を地上高1mに設置し、空間γ線スペクトルを6000秒間測定し、得られたデータから、U系列、Th系列、K-40及びCs-137の核種別に線量率の寄与を算出した。

使用した機器等の仕様を以下に示す。

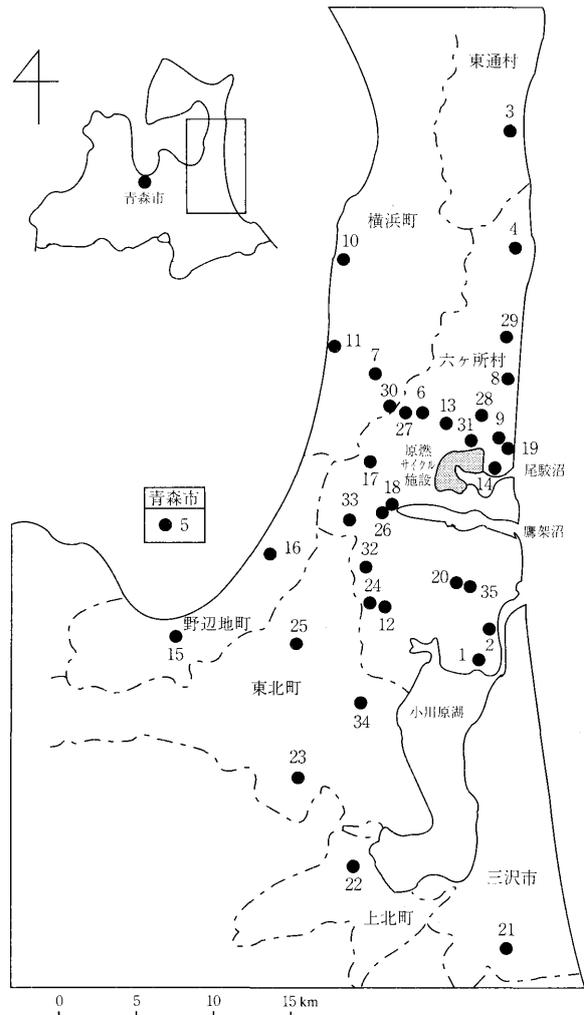


図1 調査地点

①検出器：ORTEC GEM-15190-P
 相対効率 16.0%
 分解能 Co-60(1332keV)に対して1.64keV

②MC A：DAVIDSON MODEL2056-B
 チャンネル数 4096ch

③解析プログラム：セイコーEG&G in-situ分析プログラム (HASL-258¹⁾ 準拠)
 放射性核種の土壌中での分布については、自然放射性核種は均一分布を、人工放射性核種は指数関数分布 ($\alpha = 0.33\text{cm}^{-1}$) を仮定して、解析を行った。

また、U系列核種及びTh系列核種による線量率は、それぞれPb-214, Bi-214, 及びAc-228, Tl-208の γ 線ピーク計数率から算出した。

(2) 空間線量率の測定

NaI (TI) シンチレーションモナ アロカ MAR-251B (2" ϕ \times 2" NaI (TI) シンチレーション検出器, DBM方式, 測定エネルギー範囲0.05~3 MeV) の検出器を、空間 γ 線スペクトルを測定したGe半導体検出器と同じ位置に設置し、空間線量率を600秒間測定した。

(3) 土壌の採取及び測定

ステンレス製採土器 (50mm ϕ , 200mm深) を用いて、検出器直下及びそこから1~1.5m離れた地点の土壌を十字形に計5ポイント採取し、併せて1試料とした。採取した試料について、水分、強熱減量、 γ 線放出核種 (対象核種：Pb-214, Bi-214, Pb-212, Ac-228, Tl-208, K-40及びCs-137) の測定を行った。

また、平成5年度の調査地点の中から、Cs-137濃度が比較的高かった3地点 (No. 7, 8, 15) を選定し、地表面から30cmまでの土壌について、6層に分けて採取し、 γ 線放出核種の測定を行った。

なお、土壌中の γ 線放出核種の測定は、日本分析センターに委託した。

3. 結果及び考察

3・1 解析の前提条件と実際の測定状況

今回、スペクトルデータの解析に用いたin-situ分析プログラムは、次の条件を前提にしたものである。

- ① 測定場所は、周囲に建築物等のない、広い平坦地 (無限平面) であること。
- ② 土壌密度は、 $1.60\text{g}/\text{cm}^3$ であり、その組成は、

Al ₂ O ₃	13.5%
Fe ₂ O ₃	4.5%
SiO ₂	67.5%

CO ₂	4.5%
H ₂ O	10.0%

であること。

③ U系列, Th系列及びK-40の自然放射性核種は、土壌中で、水平方向にも、深さ方向にも、均一に分布すること。

④ 人工放射性核種は、土壌中で、水平方向には均一分布、深さ方向には指数関数分布をしていること。

しかし、今回の調査は、現在の調査地点における空間放射線の特徴を把握し、将来、線量レベルに変動がみられた場合に、原因を究明するための基礎的データを得ることを目的としたものであり、上記の条件を考慮して測定場所を選定したものではない。

従って、測定地点の中には、地形に起伏や段差があったり、周囲に構築物がある状況下で測定したものが多いが、今回の解析では、それらの影響は考慮していない。

3・2 空間線量率測定結果

(1) 全線量率とNaI線量率の比較

in-situ測定が、多くの条件を前提とした解析であるのに対し、NaI (TI) シンチレーションモナによる測定は、検出器に入射した γ 線束に関する情報のみから線量率を求めるものである。従って、検出器位置における線量率をより正しく測定できると考えられるが、検出器の自己汚染成分や、3 MeV以下の宇宙線成分を含むため、in-situ測定の値より、若干高め傾向を示すと推定される。

図2に両者の関係を示す。図中の番号は、測定地点のNo.である (以下、同じ)。in-situ測定による全線量率とNaI線量率の間には、良好な直線関係が得られていることから、今回の調査では、解析の前提条件を満足できなかった地点が多いが、それらの地点においても、地形等の測定条件が、前提から大きくはずれていなかったものとする。

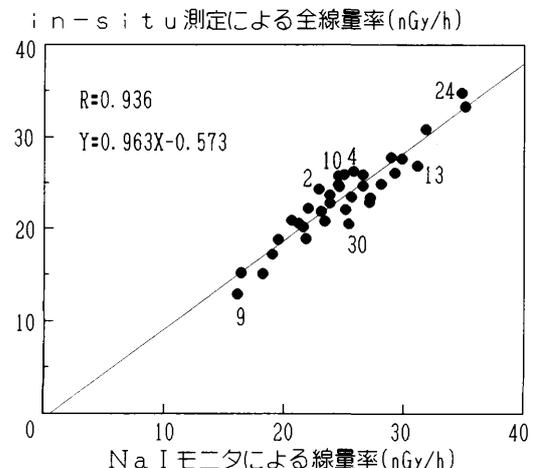


図2 NaI線量率と全線量率の関係

回帰式から比較的是ずれた地点のうち、No. 9, 13, 30の状況は、いずれも段差や起伏のある地点であり、検出器が周囲に比べて地形的に高い場所に設置されたため、in-situ測定による線量率が低めに評価されたものとする。また、No. 2, 4, 10, 24は、人工的に手の加えられた地点であり、付近に構築物があったり、土壌が周辺と異なっていたことが影響したものとする。

(2) 全線量率と核種別寄与

in-situ測定によって得られた線量率測定結果を、表1及び図3に示す。

全線量率は、13.0~35.2nGy/hの範囲で、平均で23.9nGy/hであった。最も線量率の低かったNo. 9の地点は、前述したように、in-situ測定では、真の線量率より低めに算出された地点である。また、No. 7, 24, 31の3地点は、若干高い線量率となっているが、No. 7は牧草地、No. 24, 31は人工的な構築物のある場所であり、その地域の代表的な線量率を反映していないと考える。

全線量率に占める核種別の寄与についてみると、U系列、Th系列及びK-40の自然放射性核種による寄与がほとんどであり、フォールアウト核種であるCs-137の寄与は、最も高い地点で15%程度(線量率として2.6nGy/h)であった。全線量率に対するU系列、Th系列、K-40の寄与は、地点毎で異なるものの、Th系列が24~53%を

表1 in-situ測定による核種別線量率
(単位:nGy/h)

核種	範囲	平均値
U系列	3.1~13.9	6.1
Th系列	4.0~16.1	9.6
K-40	4.7~11.1	7.4
Cs-137	0.11~2.6	0.78
合計	13.0~35.2	23.9

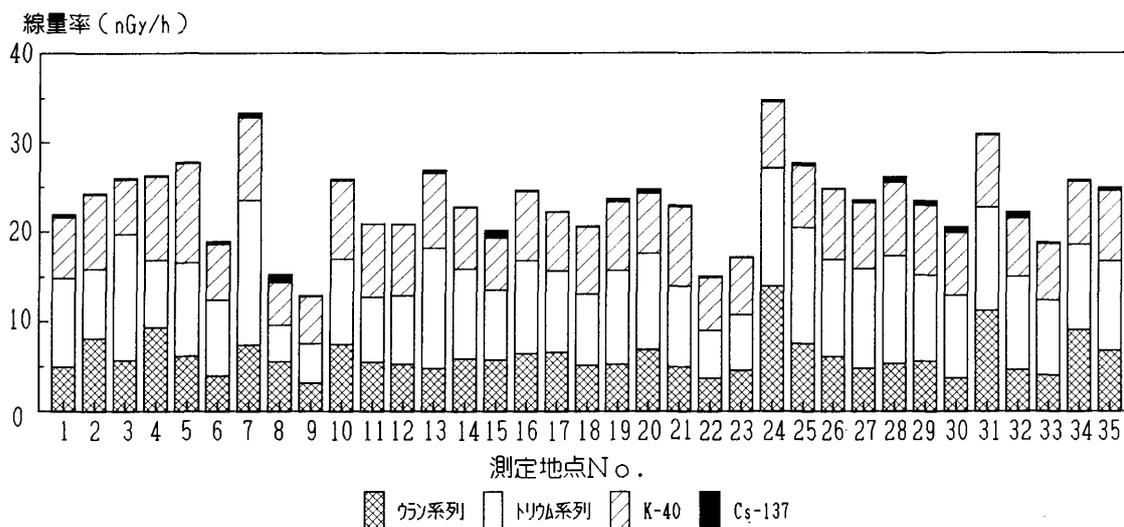


図3 in-situ測定による核種別線量率

占め、平均値でも約40%を占めた。

(3) 線量率の地域分布と地質依存性

in-situ測定から得られた線量率の地域分布と核種毎の寄与率を図4に示す。ただし、その地域を代表していないと考えられる地点は、除外した。例えば、モニタリングステーション等のように、建築工事等により、元来その地域を覆っていたと考えられる土壌が客土されたと考えられる地点や、農耕地のように本来の土質が保たれていないと考えられる地点である。

また、今回の調査地域の表層地質の概要図を図5示す²⁻⁶⁾。第三紀の地層は、北部の東通村から六ヶ所村の山間部にかけて、中新世の地層である泊安山岩層(集塊岩、安山岩、角礫凝灰岩)及び鷹架層(砂岩)が発達し、南部には鮮新世の甲地層(砂岩、シルト)が広がり、半島中央部は広く火山灰に覆われている。また、海岸線、湖沼群及びその流入河川に沿って、第四紀沖積低地堆積物が広がり、小川原湖流入河川上流部には洪積層の河岸段丘・扇状地堆積物が広がっている。

図4の調査地点の多くは、沖積低地堆積物や火山灰地帯であるが、比較的高い線量率を示したNo. 3及び25は、それぞれ第三系の泊安山岩層及び甲地層に位置する地点であり、環境科学技術研究所による報告⁷⁾と同様の傾向を示した。

(4) Ac-228とTl-208及びPb-214とBi-214の関係

Ac-228のγ線ピーク計数率から算出したTh系列核種の寄与線量率と、Tl-208のγ線ピーク計数率から算出したTh系列核種の寄与線量率の関係を図6に、同様にPb-214とBi-214から算出したU系列の寄与線量率の関係を図7に示す。

どちらも親娘関係にあることから高い正の相関を示しているが、Pb-214とBi-214の関係を表した回帰式の傾

きが、約0.7と少し小さい値となった。後述するように土壤中の放射性核種濃度の実測値では、両者の関係は比較良好であったことから、この原因について次のように推測した。

計算に用いたプログラムでは、ラドンとその娘核種は土壤中に固定されたままであると仮定しており、大気中

への拡散は考慮していないので、大気中にPb-214、Bi-214が存在する場合、in-situ測定結果に正の誤差を与えることとなる。

大気中のPb-214、Bi-214が、in-situ測定結果に与える影響について、次のように考えた。土壤中に分布したPb-214の放出 γ 線は、低いエネルギーであるため、

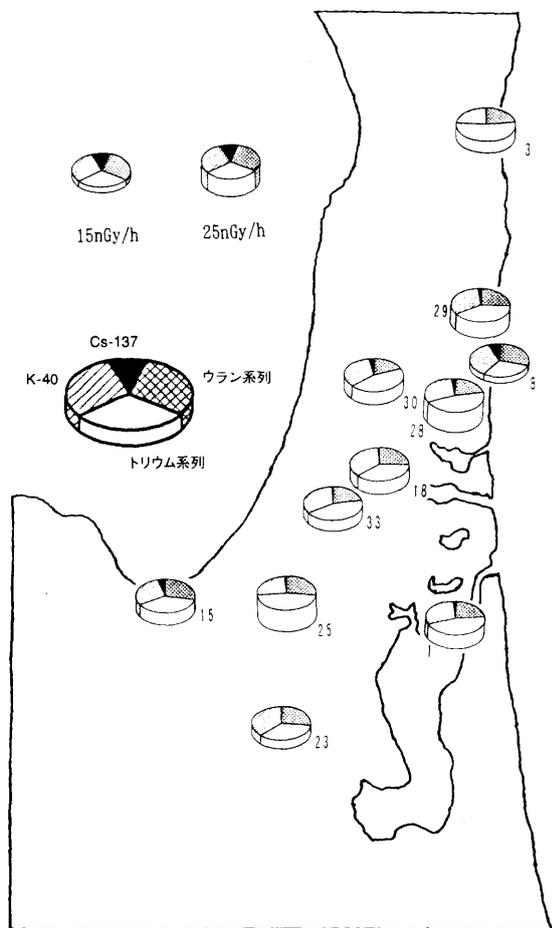


図4 線量率分布図

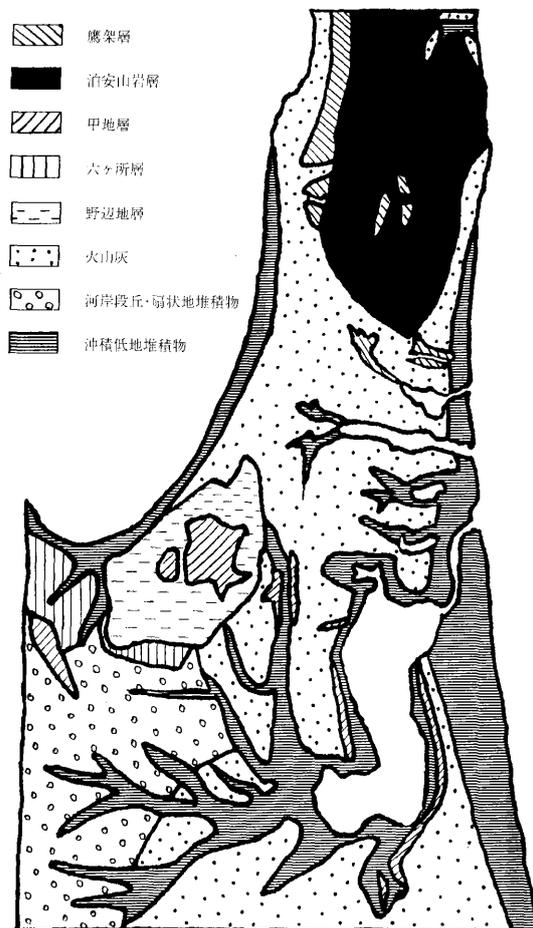


図5 表層地質概要図

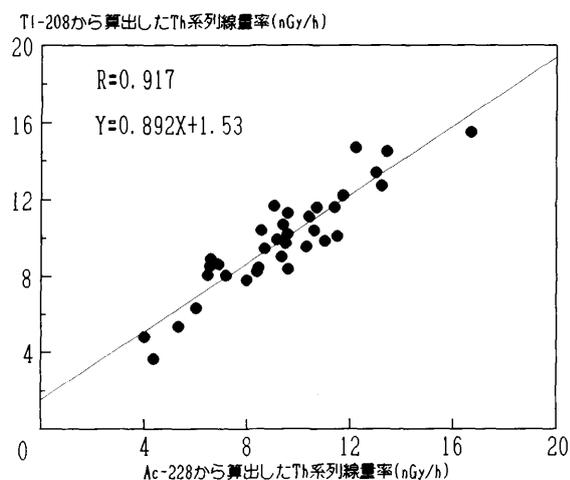


図6 Ac-228, Th-208から算出したTh系列核種の線量率

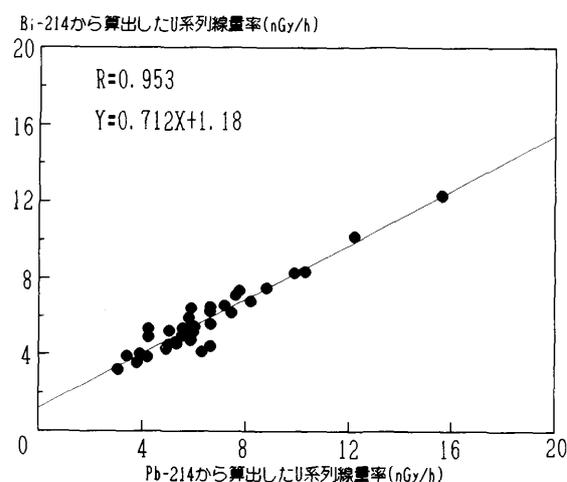


図7 Pb-214, Bi-214から算出したU系列核種の線量率

検出器に直接線として入射する割合が、Bi-214の放出γ線に比べて小さいと考えられる。従って、空中線源のPb-214, Bi-214を、土壌中均一分布線源として解析した場合、土壌中のU系列による線量率をどちらも高く評価することとなるが両者が放射平衡にあると仮定してもPb-214から算出した線量率がより大きく評価されることが予想される。

今後の調査にあたっては、同時に大気中のラドンとその娘核種濃度を把握し、定量的に評価することが必要と考える。

3・3 土壌中の放射性核種濃度測定結果

(1) 核種毎の濃度と核種間の関係

調査地点で採取した土壌を、乾燥細土 (< 2 mm) にして、γ線放出核種濃度を測定した結果を表2に示す。

また、UNSCEAR1982年報告による土壌中の典型的なU-238, Th-232, K-40の濃度を表3に示すが、今回の調査結果は、これとほぼ同じレベルであった。

土壌中の放射性核種濃度間を関係を表4に示すが、U系列及びTh系列に属する核種の間では、ほぼ良好な直線関係が得られた。

表2 土壌中の放射性核種濃度分析結果
(単位: Bq/kg乾)

核種	範囲	平均値
Pb-214	3.9 ~ 33.7	16.4
Bi-214	3.3 ~ 28.2	14.7
Ac-228	2.5 ~ 49.8	20.9
Pb-212	5.1 ~ 50.6	23.3
Tl-208	1.9 ~ 17.7	7.7
K-40	111 ~ 382	242
Cs-137	ND ~ 35.5	12.0

注) Bi-212 からTl-208 への分岐比は、0.36である。

表3 土壌中の典型的なU-238, Th-232, K-40の濃度
(UNSCEAR 1982年報告より)

核種	典型的な濃度	平均値
U-238	10 ~ 50	25
Th-232	7 ~ 50	25
K-40	100 ~ 700	370

表4 土壌中の放射性核種濃度間を関係

核種 y	核種 x	回帰式 $y = ax + b$		相関係数
		a	b	
Bi-214	Pb-214	0.885	0.244	0.973
Pb-212	Ac-228	1.06	1.11	0.984
Tl-208	Ac-228	0.354	0.262	0.976
Tl-208	Pb-212	0.340	-0.250	0.990

注) Bi-212 からTl-208 への分岐比は、0.36である。

(2) 土壌中の放射性核種の深度分布

土壌中の放射性核種濃度 (A) の深度分布は、深さをxとして、次式で近似される。

$$A_x = A_0 \exp(-\alpha x)$$

A_0 : 地表面での核種濃度

α : 浸透係数 (cm^{-1})

x: 深さ (cm)

本調査では、土壌中の放射性核種の分布について、U系列, Th系列, K-40については均一分布 ($\alpha = 0$) を、Cs-137については指数関数分布 ($\alpha > 0$) を仮定して解析を行った。

そこで、仮定の妥当性を確認するために、平成5年度の調査地点の中から、土壌中のCs-137濃度が比較的高かった3地点を選んで、放射性核種の深度分布を調査した。土壌試料は、空間放射線に寄与すると考えられる地表面から30cmまでを、0-5cm, 5-10cm, 10-15cm, 15-20cm, 20-25cm及び25-30cmの6層に分けてコアサンプルとして採取し分析に供した。調査を行った地点の概況を表5に、その結果を図8に示す。

K-40の深度分布をみると、3地点ともほぼ均一に分布しており、自然放射性核種の分布についての仮定は、妥当であったと考える。

Cs-137の深度分布をみると、No.7の地点を除いて

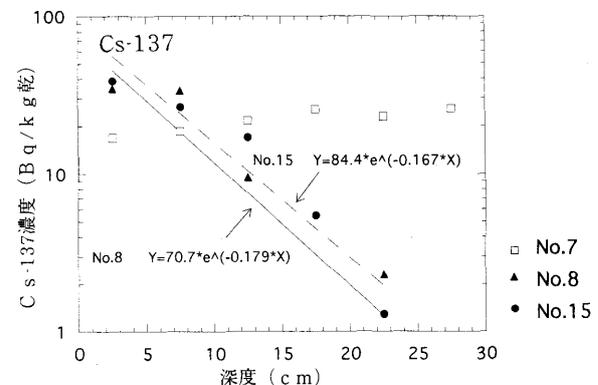
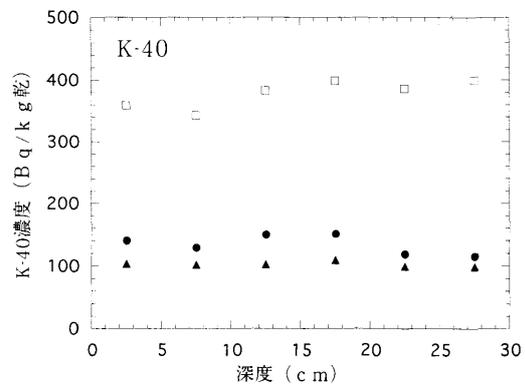


図8 放射性核種の土壌中での深度分布

表5 放射性核種の深度分布調査地点の概況

No.	付近の状況	土壌の外観等
7	牧草地	黒土, 水分40%, I.L.19%
8	裸地・草地	黒色砂質, 水分10%, I.L.2.8%
15	草地・樹木有り	上層: 黒土, 下層: 黄色土, 水分30%, I.L.9.8%

は、ほぼ指数関数的な分布をしていることが確認された。No. 7は農耕地であり、土壌が混合されているために、ほぼ均一分布になったものと考えられる。また、今回の調査では、浸透係数 α を「発電用軽水型原子炉施設の安全審査における一般公衆の線量当量評価について（平成元年3月27日、原子炉安全基準専門部会報告書）」により、 $\alpha = 0.33 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ として解析しているが、No. 8, 15の深度分布から算出された値を用いて解析すると、Cs-137による線量率は、約1割程度増加することとなる。しかし、深度分布を調査したデータ数が少ないことから、全線量率に占めるCs-137の寄与がごくわずかであることから、浸透係数は 0.33 cm^{-1} をそのまま使用した。

4. ま と め

六ヶ所村及びその周辺地域において、平成5, 6年度に空間 γ 線スペクトル測定と土壌中の放射性物質濃度の測定を行った結果は、次のとおりである。

- (1) in-situ測定による全線量率と、NaI(Tl)シンチレーションモニタによる線量率の測定結果は、よく一致した。
- (2) 空間放射線は、ほとんどがU系列, Th系列, K-40

の自然放射性核種の寄与によるものであった。

- (3) 空間線量率の地域分布は、第三系に位置する地点が、沖積低地堆積物や火山灰地帯に比べ、高い線量を示した。
- (4) in-situ測定で、U系列核種による線量率を測定する場合、大気中のラドン及びその娘核種の影響を定量的に把握すべきである。
- (5) 自然放射性核種は、土壌中で均一分布を、人工放射性核種は、混合されていない土壌中でほぼ指数関数分布をしていることが確認された。

文 献

- 1) Beck, H. L. et al.: In Situ Ge (Li) and NaI (Tl) Gamma-Ray Spectrometry, HASL-258, 1972.
- 2) 青森県: 土地分類基礎調査 陸奥横浜, 1970.
- 3) 青森県: 土地分類基礎調査 平沼, 1970.
- 4) 青森県: 土地分類基礎調査 野辺地, 1989.
- 5) 青森県: 土地分類基礎調査 七戸, 1990.
- 6) 青森県: 土地分類基礎調査 三沢, 1981.
- 7) 環境科学技術研究所: 平成4年度排出放射性物質影響事前調査報告書, 40-86, 平成5年3月.

Abstract

Examination on characteristics of spatial radioactive rays in the Rokkasho Village and its circumferential regions

Hiromitsu SHOJI¹, Hitoshi TAKEGAHARA¹, Naoko OKUNO¹,
Masashi NODA¹, Ken IGARASHI¹ and Nobuhiro SATO¹

In order to grasp the characteristics of spatial radioactive rays, the in situ measurement and concentration measurement of radioactive nuclides in soil have been carried out in the Rokkasho village and its circumferential regions. Almost all of the spatial radioactive rays in the examined regions were contributed by the natural radioactive nuclides of U series, Th series and K-40, and an exposure rate in average was about 24 nGy/h. As a consequence of examination on the depth distribution of radioactive nuclides in soil, it was confirmed that the natural radioactive nuclides were forming a homogeneous distribution, but the artificial radioactive nuclides were approximately making an exponential distribution.

Key words: in situ measurement, uranium series nuclides, thorium series nuclides, potassium

¹: Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

八戸市における降下ばいじん中のバナジウム

工藤 精一 岡 典子 坂上 素一 工藤 隆治 松尾 章

八戸市内の降下ばいじん中の不溶性バナジウムについて、代表的4地点の昭和53年と16年後の平成6年を比較すると、平成6年のV降下量の平均値は1/3未満となっており顕著な減少がみられた。また、昭和53年にみられたV降下量が季節的に多い特徴は、平成6年のV降下量の減少とともにほとんどみられなくなっており、スプライン法により求めたV降下量の等降下量分布も平成6年は昭和53年より0.4kg/km²/月以上の範囲が狭くなっていた。

八戸市におけるV降下量の減少の要因は、主に重油良質化に伴うVの含有量の減少や道路粉じんの飛散減少等が考えられる。

Key words : deposit gauge method, insoluble vanadium, Hachinohe City

1. はじめに

バナジウムは土壌等に含有されており^{1) 2)}自然界に広く存在するとともに、重油には数10ppmから200ppm程度含有され^{1) 3)}重油等化石燃料の燃焼により発生する指標元素として知られている^{4) 5)}。

本県でのバナジウムについての報告は、砂鉄を原料とする工場からの大気中への排出影響について昭和48年に浮遊粉じんの調査例⁶⁾がみられるが、それ以降環境中のバナジウムについての報告はみられない。

八戸市では、昭和52年まで操業していた砂鉄工場が閉鎖し、当該工場からのバナジウムの影響がなくなったことから、著者らは、大気中の化石燃料等の影響を把握するため降下ばいじんの不溶性成分中のバナジウムについて昭和53年に調査を行い、さらに、16年後の平成6年に調査を行った。この両年のバナジウム降下量について相対的に比較検討したので報告する。

表1 調査地点の概要

St.	地点名	用途地域
1	第二魚市場	工業
2	八戸市庁	商業
3	機械金属試験所	工業専用
4	旭ヶ丘小学校	第1種住専
5	第二千葉幼稚園	未指定
6	八戸測候所	住居
7	鮫小学校	住居
8	新産都市会館	工業専用
9	八戸市農協	未指定
10	桔梗野小学校	第1種住専

2. 調査方法

2.1 調査期間

昭和53年1月~12月

平成6年1月~12月

2.2 調査地点

八戸市内10地点(図1, 表1)

(St. 9の八戸市農協は昭和53年, St. 10の桔梗野小学校は平成6年のみの調査地点)

2.3 調査方法

1ヶ月毎に回収を行っている降下ばいじんの不溶性成分を酸分解(6N-HCl+30% H₂O₂)した後、バナジウム(以下、V)を原子吸光法(亜酸化窒素-アセチレン高温フレーム)により分析した。

なお、八戸市内の各地点の降下ばいじん中の溶解性V降下量は3ヶ月分を合わせて分析しても、0.2kg/km²/月未満と少ないため不溶性V降下量(以下、V降下量)を測定し解析した。

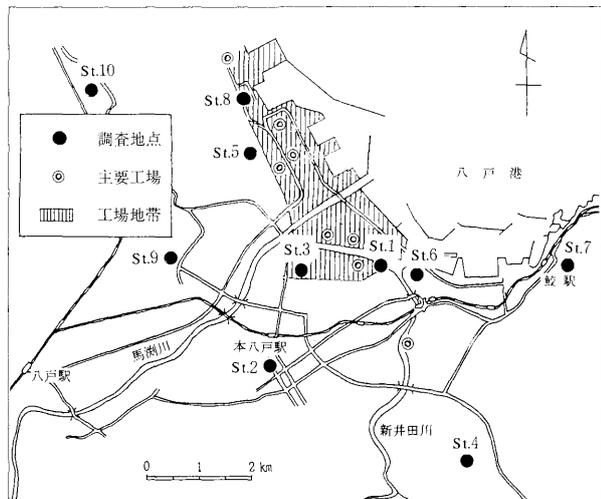


図1 調査地点

3. 結果と考察

3・1 V降下量及びV含有量

八戸市内の工場、ビル暖房等のV発生源を勘案し、表1に示した調査地点の内から第二魚市場（以下、魚市場）、八戸市庁（以下、市庁）、機械金属試験所（以下、金試）、旭ヶ丘小学校（以下、旭ヶ丘小）の代表的な4地点（以下、4地点）を選び、昭和53年と平成6年の降下ばいじん中のV降下量、V含有量及び不溶性全量の年平均値を表2に示した。V降下量は平成6年が昭和53年の1/5～3/4に、V含有量は八戸市庁以外は2/3に減少しており、特に、V降下量（4地点の平均値）は昭和53年の0.87kg/km²/月から平成6年の0.27kg/km²/月へと1/3未満となる顕著な減少がみられた。

そこで、昭和53年及び平成6年の4地点のV降下量の経月変化を図2に示した。これらの地点では、平成6年に比較し昭和53年のV降下量の多い季節をみると魚市場、市庁、金試でそれぞれ異なっている。昭和53年にV降下量が多い要因は、風向を測定している魚市場の昭和53年と平成6年の各季節の風向頻度に大きな違いがみられないことから、風向の違いによるものではないと考えられる。

魚市場では昭和53年の冬季及び秋季（1～2月は及び11月～12月）にV降下量が1.1～1.7kg/km²/月と多いが、この期間のV含有量の平均値が288ppmと高いこともあり、北西側の近傍の工場のボイラー等の重油燃焼施設か

らの排出の影響が大きい⁷⁾と考えられる。

また、市庁は昭和53年のV降下量が冬季から春季（1～5月及び12月）にかけ0.83～2.0kg/km²/月と多い。冬季はビル暖房ボイラーの重油燃焼による影響も考えられるが、春季は3～4月の不溶性全量が25～28kg/km²/月と多いことから、高橋ら、野田らが述べている道路粉じん中のVによる影響^{8) 9)}及び土壌の舞上りが考えられる。

さらに、金試の昭和53年のV降下量は春季から夏季（5～8月）にかけ1.2～1.8kg/km²/月と多い傾向を示したが、この季節に吹く偏東風により北東側の工場地帯からの排出の影響を受けているものと考えられる。

上記の3地点で昭和53年にV降下量が季節的に多い特徴は、平成6年にはV降下量が各地点で一様に少なくなったためほとんどみられなくなり、金試の8月に多少みられるだけである。

なお、旭ヶ丘小は昭和53年3月に多少多いV降下量を示したが、昭和53年及び平成6年とも平均値は0.3kg/km²/月未満と低く八戸市におけるV降下量のバックグラウンド地点とみられる。

3・2 V降下量の等降下量分布

昭和53年、平成6年の冬季の1月と夏季の7月について両年の各9地点におけるV降下量をもとに、等降下量分布をスプライン法により作成し図3に示した。

昭和53年1月には、等降下量線の間隔が狭くV降下量1.4kg/km²/月以上の範囲が魚市場及び市庁付近の2箇所

表2 V降下量、V含有量及び不溶性全量の年平均値

St.	地点名	V降下量 (kg/km ² /月)		比 ②/①	V含有量 (ppm)		比 ④/③	不溶性全量(t/km ² /月)		比 ⑥/⑤
		①昭和53年	②平成6年		③昭和53年	④平成6年		⑤昭和53年	⑥平成6年	
1	第二魚市場	1.07	0.33	0.31	203	138	0.68	5.26	2.40	0.46
2	八戸市庁	1.00	0.20	0.20	100	97	0.97	10.02	2.07	0.21
3	機械試験所	1.11	0.36	0.32	152	103	0.68	7.30	3.48	0.48
4	旭ヶ丘小	0.29	0.21	0.72	130	87	0.67	2.23	2.41	1.08

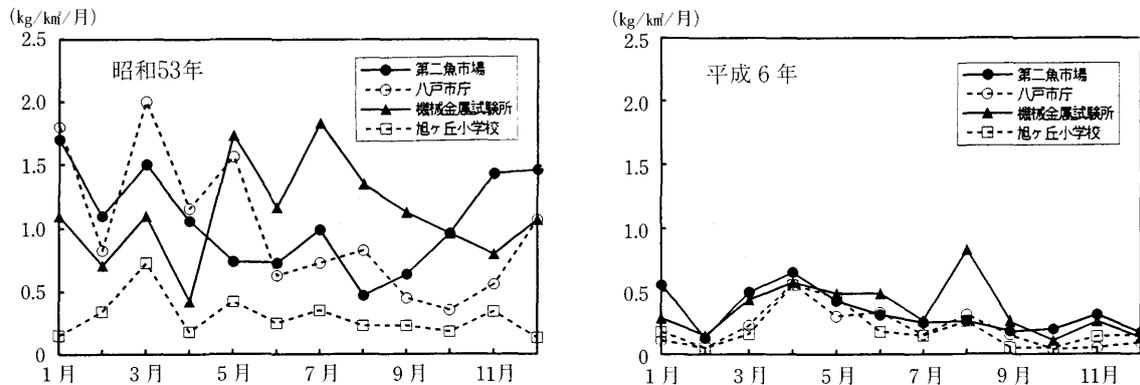


図2 V降下量の経月変化

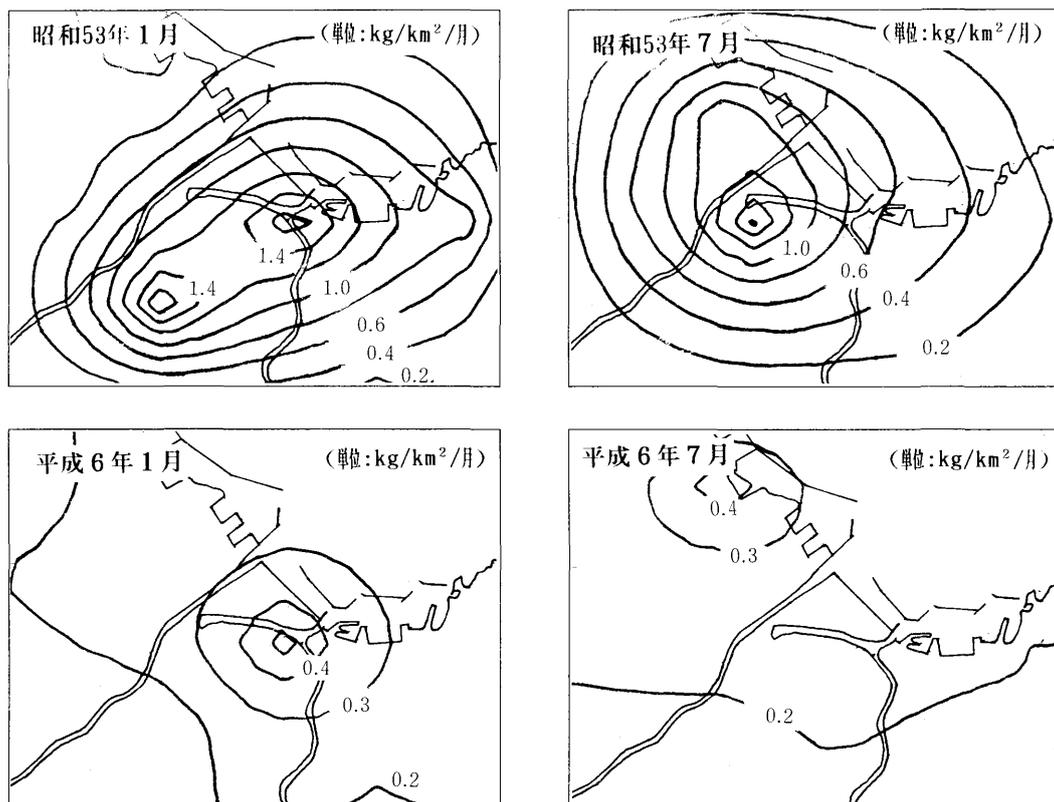


図3 V降下量の等降下量分布

にみられるが、平成6年1月には1.0kg/km²/月以上を示す範囲はなくなり、0.4kg/km²/月以上の範囲もかなり狭くなっている。

また、昭和53年7月は金試付近にV降下量1.4kg/km²/月以上の範囲がみられるが、平成6年7月には最多地点も新産会館に移り、0.4kg/km²/月以上の範囲も狭くなっていることがわかる。

このように平成6年のV降下量が減少したのは、図4に示した八戸市内の燃料使用量の目安となる大手12工場の原重油使用量が、昭和53年度の1.23×10⁶kℓ/年から平成6年度の0.80×10⁶kℓ/年へと減少したことも要因の一つとみられるが、重油の良質化により硫黄分が昭和53年度の0.96%から平成6年度の0.68%へ低減しており、飯村らが述べている硫黄分の減少に伴う重油のV含有量の減少¹⁾⁵⁾が大きく影響しているとみられる。また、工藤らの述べているスパイクタイヤ規制による道路粉じんの飛散減少¹⁰⁾によりVを含有する粉じんが減少したこともV降下量低減の要因と考えられる。

なお、石炭については図4に示したように、平成6年度の使用量、硫黄含有量とも昭和53年度より増加している。しかし、前述のとおりV降下量が減少していることから、八戸市内における石炭燃焼施設からのVの排出量も、真室らが述べているように少ないもの⁴⁾と推定される。

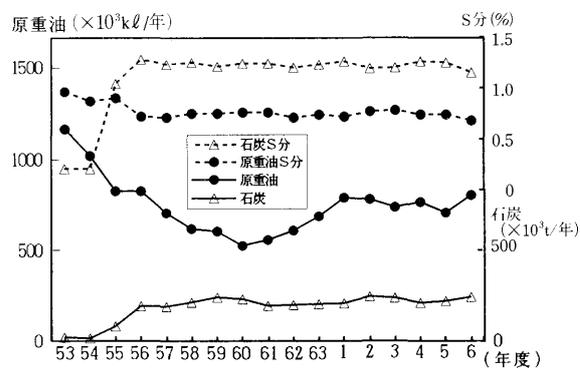


図4 燃料使用量等経年変化 (大手12工場)

3・3 V降下量とnss-SO₄²⁻降下量の関係

降下ばいじんの溶解性成分であるnss-SO₄²⁻ (非海洋起源硫酸イオン) 降下量 (t/km²/月) は重油等の硫酸化物の影響をうける項目と考えられることから、魚市場と市庁についてV降下量との散布図を図5に示した。

魚市場では、昭和53年にV降下量及びnss-SO₄²⁻降下量とも多かったものが、平成6年には両項目とも顕著な減少傾向がみられる。これに対し、市庁はV降下量のみが減少しており、重油燃焼施設以外からの影響もうかがわれる。

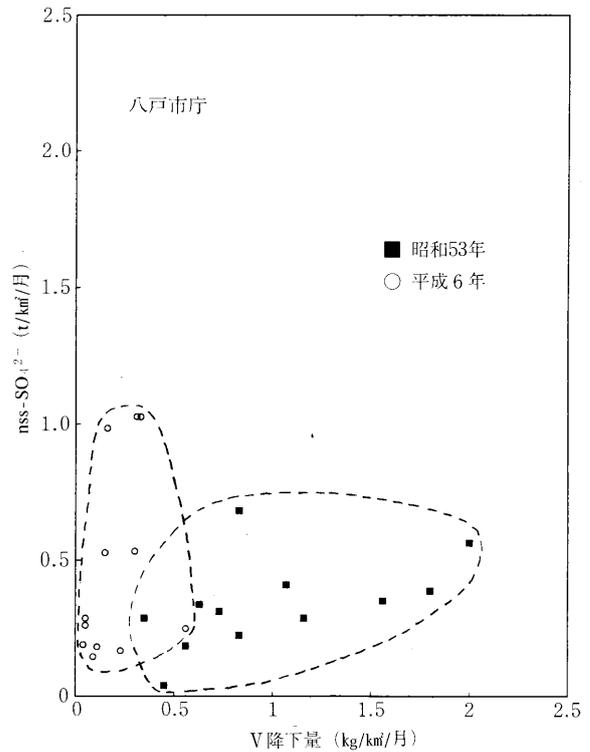
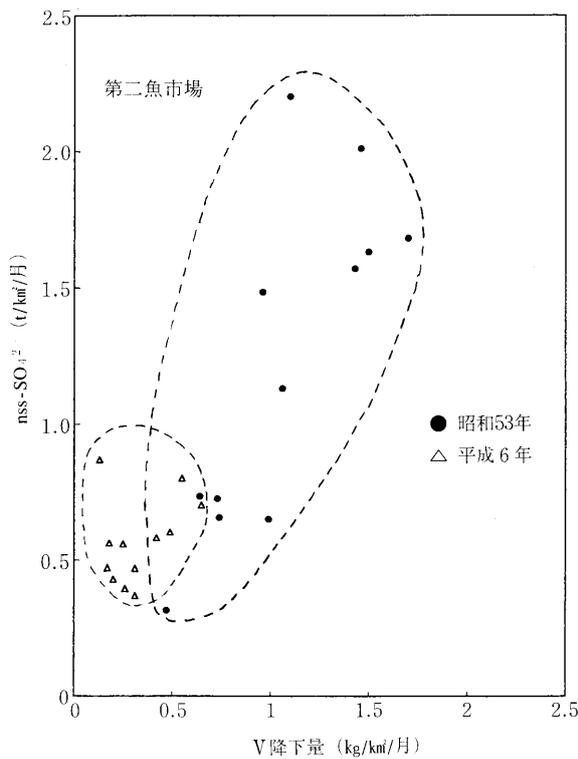


図5 V降下量とnss-SO₄²⁻降下量の関係

表3 V降下量とnss-SO₄²⁻降下量の相関

St.	地点名	昭和53年	平成6年
1	第二魚市場	$Y=1.229X-0.081$ ($r=0.7832*$)	$Y=0.312X+0.446$ ($r=0.3293$)
2	八戸市庁	$Y=0.158X+0.181$ ($r=0.5057$)	$Y=0.730X+0.320$ ($r=0.3203$)
3	機械試験所	$Y=0.207X+0.270$ ($r=0.5679$)	$Y=0.337X+0.241$ ($r=0.3704$)
4	旭ヶ丘小	$Y=0.210X+0.125$ ($r=0.3658$)	$Y=0.103X+0.120$ ($r=0.2797$)

(注) Y: nss-SO₄²⁻降下量, X: V降下量, n=12, *: 1%有意

また、4地点のV降下量との回帰式及び相関係数を表3に示した。昭和53年の魚市場のみがV降下量とnss-SO₄²⁻降下量の正の相関がみられ、Vの回帰直線の係数も大きいことから、重油燃焼施設からの排出影響が大きいことを示唆している。平成6年に、相関を示す地点がないのは、重油の良質化により、硫黄分及びVの含有量が低くなりnss-SO₄²⁻降下量及びV降下量が減少し、バラツキが大きくなったことによるとみられる。

4. ま と め

昭和53年と16年後の平成6年の八戸市内の降下ばいじん不溶性V降下量を相対的に検討し次の知見を得た。

(1) 八戸市内の代表的4地点の昭和53年、平成6年の降下ばいじん不溶性V降下量の平均値を比較すると、

平成6年のV降下量は昭和53年の1/3未満となる顕著な減少がみられた。

(2) V降下量は、昭和53年には魚市場が冬季及び秋季に、八戸市庁が冬季から春季にかけて、機械金属試験所が春季から夏季にかけて多い傾向がみられたが、平成6年には各地点で一様に少なくなったため季節的な特徴がほとんどみられなくなっていた。

(3) スプライン法で解析したV降下量の等降下量分布をみると、平成6年は昭和53年より冬季、夏季とも0.4kg/km²/月以上の範囲が狭くなっており、八戸市内での減少傾向が明らかになった。

(4) 昭和53年のV降下量とnss-SO₄²⁻降下量相関がみられた魚市場は、近傍の工場の重油燃焼施設からの排出の影響が大きかったものとみられる。

(5) V降下量の減少の要因は、主に重油の良質化によるVの含有量の低下やスパイクタイヤ規制によるVを含有する道路粉じんの飛散減少等が考えられる。

文 献

- 1) National Research Council 編, 木村正己, 他訳: 環境汚染物質の生体への影響2, クロム・バナジウム, 東京化学同人, 東京, 1977.
- 2) 小林隆: 土壤中微量重金属の天然賦存量および毒性等について, 岡山県公害防止センター研究報告, 2(1), 57-69, 1974.

- 3) 輝沼清：重油燃焼灰からのバナジウム・ニッケルの回収の問題点, *PPM*, **3**, 34-45, 1973.
- 4) 真室哲雄, 他：ボイラより放出される浮遊粒子の元素組成, *大気汚染学会誌*, **14**(7), 32-39, 1979.
- 5) 飯村晃：油燃焼施設におけるバナジウム・ニッケルの燃料中含有量と排出量, *千葉県公害研究所研究報告*, **19**(2), 11-16, 1987.
- 6) 和泉四郎, 他：むつ市におけるバナジウム調査, *青森県公害センター所報*, **1**, 55-59, 1975.
- 7) 吉田毅, 他：疾風型重合汚染における大気汚染濃度の評価に関する検討(2), *青森県公害センター所報*, **6**, 7-17, 1983.
- 8) 高橋陽子, 他：スパイクタイヤによる大気汚染と道路粉じんの実態調査(第2報), *仙台市衛生研究所報*, **12**, 259-291, 1982.
- 9) 野田正志, 他：青森県南地域における道路粉じん調査(III), *青森県公害センター所報*, **8**, 72-82, 1987.
- 10) 工藤隆治, 他：青森県南地域における道路粉じん調査(VI) -法規制の効果について-, *青森県環境保健センター研究報告*, **4**, 86-90, 1993.
- 11) 神奈川県：神奈川県大気汚染調査研究報告, **16**, 45-55, 昭和49年2月.

Abstract

Vanadium in the dustfall in Hachinohe City

Seiichi KUDO¹, Noriko OKA¹, Motoichi SAKAGAMI¹, Ryuji KUDO¹ and Akira MATSUO¹

Concerning to an insoluble vanadium in the dustfall in Hachinohe City, when its quantity was compared at 4 representative measurement points between in 1978 and 1994 (after 16 years), a mean value of V precipitated amount in 1994 has become less than 1/3 and consequently a remarkable decrease has been seen. In addition, the distinctive features, V precipitated amount has seasonally increased, observed in 1978 have become scarcely to be found together with a decrease of V precipitated amount in 1994. As for the iso-precipitated amount distribution obtained by the spline technique also, a range more than 0.4kg/km²/month has become narrower in 1994 than that in 1978.

Regarding to the factors for a decrease of V precipitated amount in Hachinohe City, it is thought that V content is decreased accompanied with making a heavy oil better in quality, a flying road dust is reduced and so forth as the main causes.

Key words : deposit gauge method, insoluble vanadium, Hachinohe City

¹ : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

小川原湖の植物プランクトン — 湖全体の出現状況 —

工藤 精一 奈良 忠明 小山田久美子
神 正志 柴田 幸伸 早狩 敏男

小川原湖の植物プランクトンの湖全体の出現状況を見ると、出現種の62%は珪藻類が占めており、主な出現種は *Cocconeis placentula*, *Diatoma elongatum*, *Cyclotella* sp.等の淡水や汽水湖で普通に観測される種であった。また、アオコの原因である藍藻類の *Microcystis* や *Anabaena* は非常に少なく、カビ臭の原因である *Phormidium* や *Oscillatoria* も少なかった。
なお、植物プランクトンの出現種からみた小川原湖の水質の状況は、貧腐水性～ α 中腐水性である。

Key words : Lake Ogawara, phytoplankton, brackish water

1. はじめに

小川原湖は、青森県で最も面積の広い湖で、汽水湖である。同湖の富栄養化の動向及び湖内部の汚濁機解明にあたっては、水質と水生生物との関連性を把握していくことが重要である。

そのためには、水生生物の調査解析が不可欠であり、同湖についてはこれまで水質の理化学的データについての報告¹⁾²⁾は比較的多いが、水生生物の報告例は少ない。

著者らは、昭和57年から12年にわたり湖内の動植物プランクトンや底生生物の調査を実施してきたが、ここでは、植物プランクトンを対象に、種組成、種類数の推移、優占種等の出現状況について解析したので報告する。

2. 調査方法

2.1 調査期間

昭和57年度～平成5年度（4～6回/年）

2.2 調査地点

調査地点（図1）のSt.1（上下層）は、土場川及び七戸川の河口付近であり、St.4（上中下層）は湖心部、St.6（上下層）は太平洋に流入する高瀬川付近である。

なお、採取水深は、St.1の下層（底泥上1m）が約9m、St.6の下層が約10m、St.4の中層が10m、下層が約23mである。

2.3 採取方法及び分析

地点毎に2ℓを採水し、ホルマリン原液15mlを加え、植物プランクトンを固定した。

植物プランクトンの分析は、海洋観測指針に準じ種別の細胞数を計測する方法で行った。

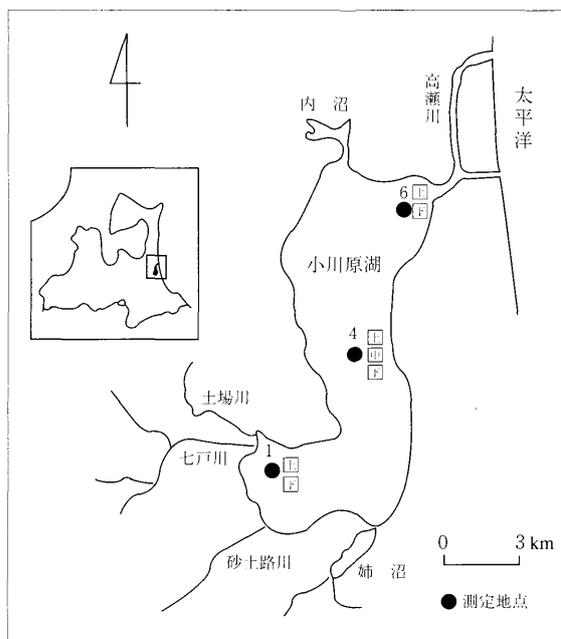


図1 調査地点

3. 結果と考察

3.1 種組成

昭和57年度～平成5年度の総出現種は、藍藻類21種、緑藻類82種、珪藻類215種、黄色鞭毛藻類4種、渦鞭毛藻類12種、ミドリムシ藻類12種の計346種であり、珪藻類が出現種の62%を占めている。

昭和59年度～平成5年度における種類数の構成割合の推移を見ると、珪藻類が全ての年度で約60～80%を占めている。緑藻類は昭和59～60年度の14%から昭和61年度

表1 出現回数の多い上位10種

順位	出現種	出現回数	概要
1	<i>Cocconeis placentula</i>	57	各地の湖沼，河川で普通
1	<i>Diatoma elongatum</i>	57	淡水域に多いが，塩分の少ない汽水にも出現
3	<i>Cyclotella</i> sp.	56	—
4	<i>Cymbella ventricosa</i>	55	各地に最も普通
5	<i>Rhoicosphaenia curvata</i>	54	淡水及び汽水に産し，各地に普通
6	<i>Amphora ovalis</i>	53	各地の湖沼から報告され，かなり広く分布
6	<i>Melosira varians</i>	53	各地に普通
6	<i>Synedra ulna</i>	53	ごく普通で，広く分布
9	<i>Achnanthes lanceolata</i>	52	各地の湖沼，河川，鉱泉から報告され広く分布
10	<i>Achnanthes minutissima</i>	51	かなり広い地域から報告されている
10	<i>Gomphonema parvulum</i>	51	温泉，鉱泉，湖沼など各地に広く分布

(注) 上記の種は，いずれも珪藻類，調査回数：59回

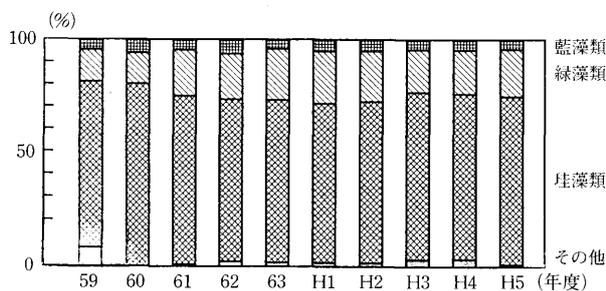


図2 種類数の構成割合の推移

には21%となり，昭和60年度以前よりやや増加しているようにみられる。また，藍藻類は10%以下ではほぼ一定に推移しており，大きな変化は認められない(図2)。

3・2 種類数の経時変化

昭和59年度～平成5年度の種類数の経時変化をみると，藍藻類，緑藻類，珪藻類及びその他を併せた各月の種類数は昭和62年4月の最高86種から昭和63年4月の最低38種類の間で推移している。夏期から秋期に種類数が多くなる年度が多いが，春期に高い年度などさまざまな変動をしており，一定の季節変動パターンはみられない。

このうち，昭和63年度の4月及び平成4年度の7月に

は，その前後の時期と比較して種類数が少なくなっている。

また，種類別の経時変化をみると，平成3年度までは4月または5月の緑藻類の種類数が10種類以下と，他の時期(夏～冬期)と比較して少ない傾向にあったが，平成4年度以降は11～15種類観測され，他の時期と同程度の種類数となっている(図3)。

今後，pH等の水質の変化や水温等の自然現象を考慮した解析が必要である。

3・3 主な出現種

昭和57年度～平成5年度の湖全体の出現種のうち出現回数の多い上位10種は，いずれも珪藻類の*Cocconeis placentula*，*Diatoma elongatum*，*Cyclotella* sp.等である。

出現回数が最多の*Cocconeis placentula*や*Diatoma elongatum*は，59回の調査のうち57回とほぼ毎回のように出現しており，第10位の*Achnanthes minutissima*や*Gomphonema parvulum*でも51回の出現回数である。

これらは，いずれも各地の淡水や汽水湖に広く分布し，普通にみられる種であることから，小川原湖は一般的な植物プランクトンが多く生息する湖沼であるとみられる

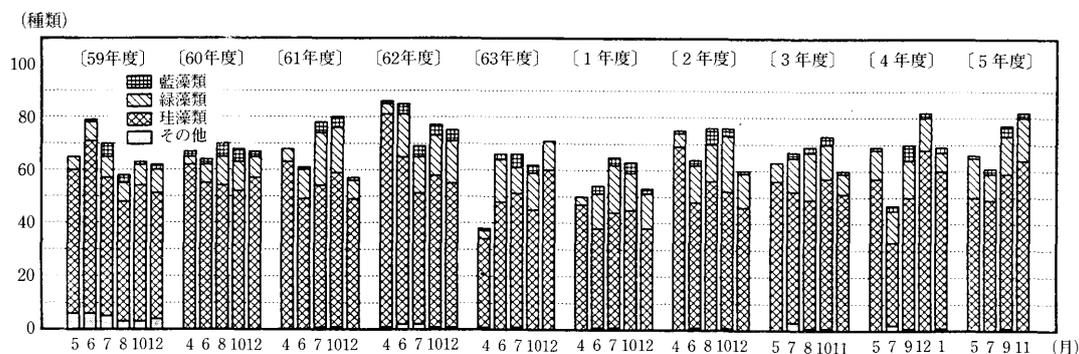


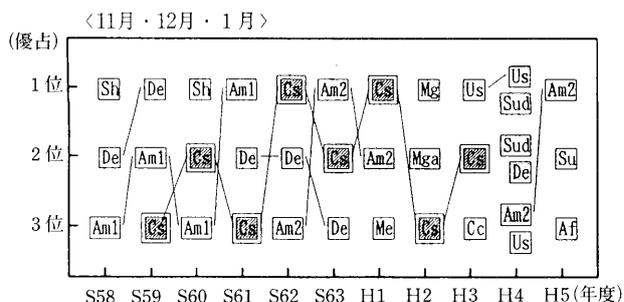
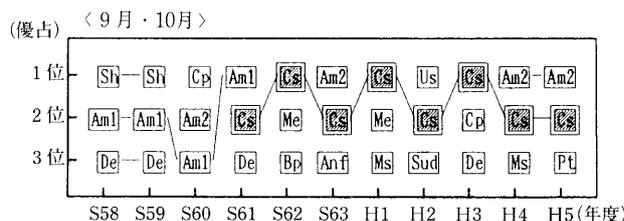
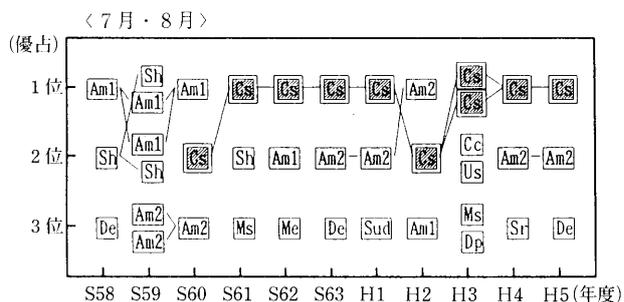
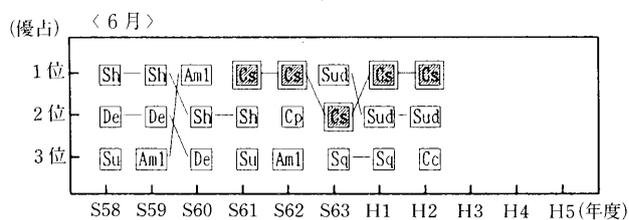
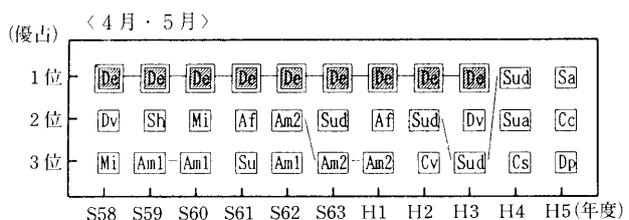
図3 種類数の経時変化

が昭和59年8月にSt. 1上層で998,400cells/lの最大値を示し、*Stephanodiscus hantzschii*の昭和59年6月のSt. 1上層での849,600cells/lや*Achnanthes minutissima*の平成5年9月のSt. 6上層での705,280cells/lが多い例である。

3.5 優占種

昭和58年度～平成5年度の優占回数（第3位まで）は、いずれも珪藻類で*Cyclotella* sp., *Achnanthes minutissima*, *Diatoma elongatum*, *Achnanthes microcephala*の順位となっている。

優占種の経時変化は、全体的には珪藻類が多いが、昭和61年度までは*Achnanthes microcephala*や*Stephanodiscus hantzschii*が1位を占めることが多い。昭和61年度以降の年度では*Cyclotella* sp.や*Achnanthes minutissima*が1位となるケースが多く、*Diatoma elongatum*は調査年度全般にわたり1位となるケースが多くなっている。また、平成2年度以降は*Ulothrix subconstricta*等の緑藻類が断続的に優占種上位3種に上ってきており、珪藻類が優占していた平成元年度までとは傾向が変化してきているこ



- (藍藻類)
 Me : *Merismopedium elegans*
 Ms : *M. sp.*
 Pt : *Phormidium tenue*
- (緑藻類)
 Anf : *Ankistrodesmus falcatus*
 Dp : *Dictyosphaerium pulchellum*
 Sq : *Scenedesmus quadricauda*
 Us : *Ulothrix subconstricta*
- (珪藻類)
 Am1 : *Achnanthes microcephala*
 Am2 : *A. minutissima*
 Af : *Asterionella formosa*
 Bp : *Bacillaria paradoxa*
 Cp : *Cocconeis placentula*
 Cc : *Cyclotella comta*
 Cs : *C. sp.*
 Cv : *Cymbella ventricosa*
 De : *Diatoma elongatum*
 Dv : *D. vulgare*
 Mg : *Melosira granulata*
 Mga : *M. granulata v. angustissima*
 Mi : *M. italica*
 Sh : *Stephanodiscus hantzschii*
 Sa : *Synedra acus*
 Sr : *S. rumpens*
 Su : *S. ulna*
 Sua : *S. ulna v. amphirhynchus*
 Sud : *S. ulna v. danica*

☐ : 上位に多く優先する種

注) 一年度で同季節に2回データがあるもの(データが重なる場合)は、上段下段に分けて記した。

図5 優占種上位3種の季節変動

とが考えられる (表2)。

優占種を季節別にみると、珪藻類がほとんど優占しているが、上位3種の変動は、昭和61年度及び平成4年度を境にその変動にやや変化がみられる。

昭和60年度までは、4月、5月には*Diatoma elongatum*が優占するものの、6月には*Stephanodiscus hantzschii*が優占する。7～10月には*Achnanthes microcephala*や*Stephanodiscus hantzschii*が、11月～1月には*Stephanodiscus hantzschii*や*Diatoma elongatum*が交互に優占する。

昭和61年度～平成3年度までは、4月、5月は前年度までと同様に*Diatoma elongatum*が優占するのが特徴であるが、6～10月には*Cyclotella* sp.が上位に優占するケースが増え、夏期～冬期にかけ藍藻類の*Merismopedium* sp. や*Merismopedium elegans*が上位3位に入ってきているのが注目される。

平成4年度以降は、4月、5月には*Synedra ulna* v. *danica*や*Synedra acus*等が優占するようになり、7～10月には*Cyclotella* sp., *Achnanthes minutissima*等が優占する。また、11月～1月には*Synedra ulna* v. *danica*, *Achnanthes minutissima*や緑藻類の*Ulothrix subconstricta*が優占するようになる (図5)。

3・6 アオコ等を形成する種の生育状況

アオコ発生の原因とされる藍藻類の*Microcystis*や*Anabaena*は、前者の*Microcystis aeruginosa*が平成3年8月にSt.4下層で1 cells/ℓ出現しているだけであり、また後者の*Anabaena* sp. が昭和62年6月にSt.1下層で700cells/ℓ (St.1下層の細胞数の0.9%)出現しているだけであり、これらの藍藻類の細胞数に占める割合は非常に少ない。

これは、藤木ら³⁾ 青木ら⁴⁾ が述べているように水温、窒素/リンの比及び塩素イオンの影響によると考えられる。

表3 優占回数の多い上位10種の汚濁階級指数

順位	優 占 種		優占回数	汚濁階級指数
1	<i>Cyclotella</i> sp.	コマルケイソウの一種	44	—
2	<i>Achnanthes minutissima</i>	マガリケイソウ	36	3
2	<i>Diatoma elongatum</i>	ヨコスジケイソウ	36	1
4	<i>Achnanthes microcephala</i>	マガリケイソウ	22	2
5	<i>Stephanodiscus hantzschii</i>	ステファンディスカス	17	2～3
6	<i>Synedra ulna</i> v. <i>danica</i>	ナガケイソウ	16	2
7	<i>Dictyosphaerium pulchellum</i>	ディクティオスフェリウム	9	2
7	<i>Asterionella formosa</i>	ホシガタケイソウ	9	1～3
9	<i>Cyclotella comta</i>	コマルケイソウ	8	3
10	<i>Cocconeis placentula</i>	コパンケイソウ	7	1

(注) 汚濁階級指数

- 1：貧腐水性 (汚濁は非常にわずか)
- 2：β中腐水性 (汚濁は中くらい)
- 3：α中腐水性 (汚濁は強い)
- 4：強腐水性 (汚濁は非常に強い)

また、淡水赤潮の原因とされる渦鞭毛藻類の*Peridinium*の最大細胞数は、平成3年7月に*Peridinium* sp. がSt.4上層で3,900cells/ℓ (4.3%)であり少ない。渦鞭毛藻類の*Gymnodinium*も散見されるが、最大細胞数は昭和59年5月のSt.6上層の*Gymnodinium aeruginosum*が12,360 cells/ℓ (15.2%)で少ない。

さらに、カビ臭の原因とされている藍藻類の*Phormidium*や*Oscillatoria*も散見されるが、*Phormidium tenue*の最大細胞数は平成5年9月にSt.6上層で43,780cells/ℓ (4.8%)であり、*Oscillatoria* sp. も平成4年9月St.4上層で14,400cells/ℓ (4.3%)で、優占種となっている珪藻類に比較すると少ない細胞数である。

これらのことから、植物プランクトンからみた小川原湖については、アオコ等の発生に関与する種の大量発生はみられず、顕著な富栄養化の進行はないと考えられる。

3・7 植物プランクトンからみた水質の状況

昭和58年度～平成5年度の優占回数 (5位まで)の多い上位10種は緑藻類の*Dictyosphaerium pulchellum*以外は珪藻類である。汚濁階級指数の範囲から概略的な水質汚濁状況^{5)~7)}をみると、*Diatoma elongatum*や*Cocconeis placentula*の汚濁階級指数は1であり、*Achnanthes minutissima*や*Cyclotella comta*の汚濁階級指数は3で、汚濁階級指数は1～3の広い範囲にわたっている。

これらの優占種の生息水域は、貧腐水性～α中腐水性の水域となっている (表3)。

4. ま と め

小川原湖の植物プランクトンの種組成、種類数の推移及び優占種等の出現状況について解析した結果、次の知見を得た。

- (1) 総出現種は346種で珪藻類が出現種の62%を占めており、種組成は、珪藻類が全ての年度で60～80%を占めている。
- (2) 種類数の経時変化では、珪藻類が多いが、一定の季節変動パターンはみられない。
- (3) 主な出現種は、*Cocconeis placentula*, *Diatoma elongatum*, *Cyclotella* sp.等の珪藻類であり、淡水や汽水湖で普通に観測される種である。
- (4) 優占回数の多い上位5種は、*Cyclotella* sp., *Achnanthes minutissima*, *Diatoma elongatum*, *Achnanthes microcephala*, *Synedra ulna* v. *danica*で、いずれも珪藻類である。
- (5) アオコの原因である藍藻類の*Microcystis*や*Anabaena*は非常に少なく、カビ臭の原因である*Phormidium*や*Oscillatoria*も少ない。
- (6) 植物プランクトンの出現種からみた小川原湖の水質の状況は、貧腐水性～α中腐水性である。

謝 辞

本解析に当たり貴重な情報及び御助言をいただいた(株)日本環境科学研究所の八田泰之氏及び鎌塚之代氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 奈良忠明, 他: 汽水小川原湖の水質環境と植物プランクトン, 青森県公害センター所報, **7**, 46-54, 1985.
- 2) 工藤精一, 他: 小川原湖湖心部における水質の鉛直分布, 全国公害研究会誌, **19**(3), 2-7, 1994.
- 3) 藤木尚志, 他: 全国湖沼データの解析による藍藻類の優占化と環境因子との関係, 水環境学会誌, **18**, 901-908, 1995.
- 4) 青木啓子, 他: 北湯湖の水質と植物プランクトンについて (第2報), 福井県公害センター年報, **17**, 115-124, 1987.
- 5) 東京都: 水生生物調査結果報告書, 昭和61年度.
- 6) 東京都: 水生生物調査結果報告書, 昭和62年度.
- 7) 日本生態学会環境問題専門報委員会: 環境と生物指標 2-水界編-, 共立出版, 東京, 1975.
- 8) 小川カオル: 手賀沼の植物プランクトン, 千葉県水質保全研究所年報, 昭和61年度, 129-135, 1986.
- 9) 森下薫, 他: 陸水域の水生生物・調査方法・指標性, 環境と測定技術, **22**(3), 13-30, 1995.
- 10) 滋賀県立衛生環境センター: 琵琶湖のプランクトンデータ集 (植物プランクトン), 1985年3月.
- 11) 水野寿彦: 淡水プランクトン学入門, 東海大学出版会, 東京, 1984.

Abstract

Phytoplankton in Lake Ogawara — Occurrence circumstances in allover lake —

Seiichi KUDO¹, Tadaaki NARA¹, Kumiko OYAMADA¹,
Masashi JIN¹, Yukinobu SHIBATA¹ and Toshio HAYAKARI¹

Having a good look at the occurrence circumstances of phytoplankton in Lake Ogawara for allover lake, 62% of the occurrence species were dominated by the diatom algae. And the major occurrence species were *Cocconeis placentura*, *Diatoma elongatum*, *Cyclotella* sp. and so forth, and they were the species usually observed in the fresh water lake and brackish water lake. In addition, *Microcystis* and *Anabaena* of the blue-green algae, a cause of the water bloom, were rarely found, and moreover the *Phormidium* and *Oscillatoria*, a cause of musty odor, were observed a little as well.

Moreover the water quality circumstances of Lake Ogawara viewing from the occurrence species of phytoplankton, are oligosaprobic ~ α mesosaprobic state.

Key words : Lake Ogawara, phytoplankton, brackish water

¹ : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

青森県南地域河川の水質評価 (第2報)

— 馬淵川水系, 奥入瀬川水系 —

神 正志 工藤 精一

青森県南地域の馬淵川, 奥入瀬川について, 平成元~5年度までのBOD等の水質測定結果を用い統計的解析を行い, 前報¹⁾の昭和59~63年度までの結果と比較することにより, 水質の総合特性と類似性及び水質状況の変化について検討をした。その結果, 馬淵川水系では上流域と下流域及び, 支川の浅水川の3グループに分けられ, 上流域で下流域より有機的汚濁度が高く, 浅水川で最も総合的汚濁度が高くなっていた。上流域及び浅水川では水質は改善傾向にあり, 下流域では悪化傾向にあった。また奥入瀬川では下流域と上流域のグループに分けられ, 下流域で汚濁度が高くなっていた。水質は全域で改善傾向にあった。

Key words : Mabechi River, Oirase River, evaluation of water, load amount

1. はじめに

馬淵川, 奥入瀬川は青森県南地域を貫流する代表的な河川である。著者らは, 昭和59~63年度までの両川の水質汚濁評価について前報で報告したが¹⁾, 今回はその結果に平成元~5年度までのデータを加え主成分分析を行い, 水質の総合特性及び類似性について比較検討するとともに, その水質状況の変化について把握したので報告する。

2. 調査方法

2.1 調査期間

昭和59年度から平成5年度

2.2 水質測定地点 (図1)

(1) 馬淵川水系

本川の梅泉橋, 名久井橋, 櫛引橋, 尻内橋, 大橋, 及び支川熊原川の留ヶ崎橋, 支川浅水川のなかの橋の計7地点

(2) 奥入瀬川水系

馬門橋, 十和田橋, 御幸橋, 幸運橋, 開運橋の5地点

2.3 水質の解析方法

(1) 解析は昭和59年度から平成5年度までの公共用水域水質測定結果²⁻¹¹⁾を用い, 昭和59年度から昭和63年度までの5年間と平成元年度から平成5年度までの5年間に分け, 地点及び分析項目ごとにそれぞれの5年間の平均値を求め, 主成分分析に供した。

(2) 解析項目はpH, DO, BOD, SS, 大腸菌群数を使用し, 大腸菌群数は常用対数に変換し用いた。

(3) 主成分分析の合成変数はZ₃までとした。



図1 馬淵川・奥入瀬川水系の水質調査地点

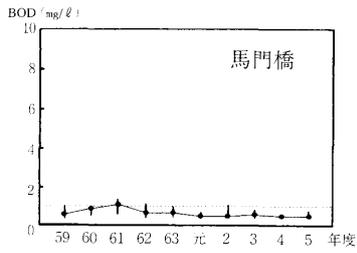
2.4 分析方法

分析方法は表1のとおり。

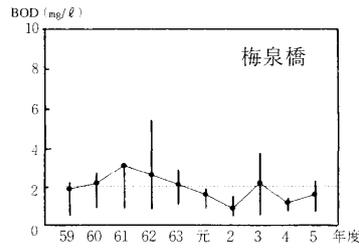
表1 分析方法

項目	分析方法
pH	ガラス電極法 (JIS K0102)
DO	ウインクラーアジ化ナトリウム変法 (JIS K0102)
BOD	ウインクラーアジ化ナトリウム変法 (JIS K0102)
SS	GFPろ過法 (JIS K0102)
Coli	BGLB培地による最確数法

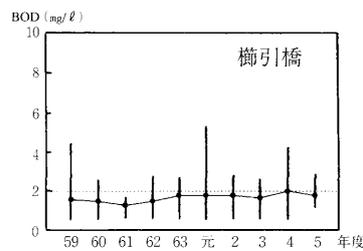
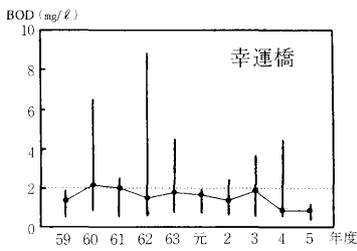
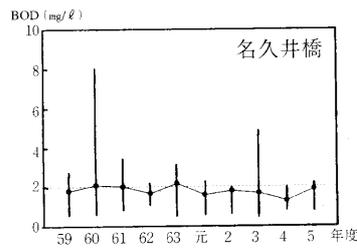
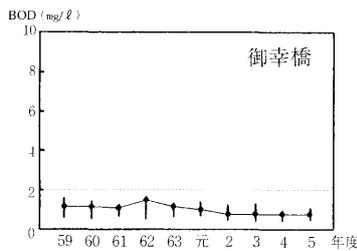
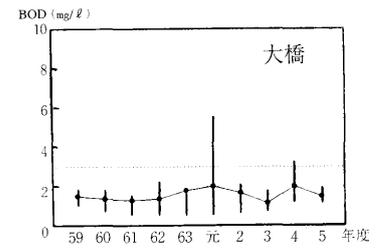
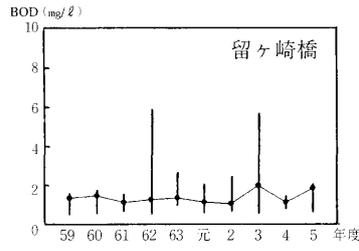
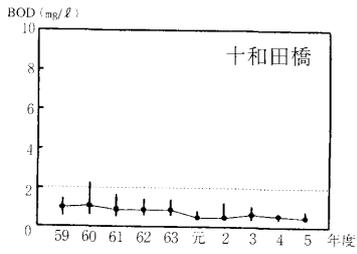
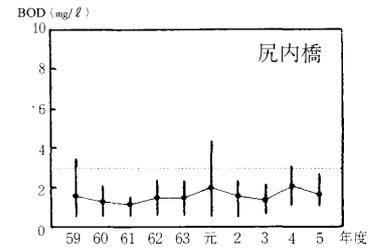
奥入瀬川水系



馬淵川水系



馬淵川水系



凡例

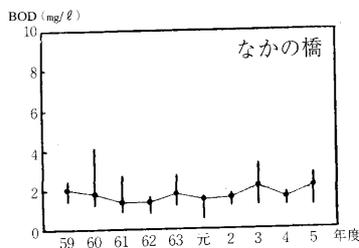
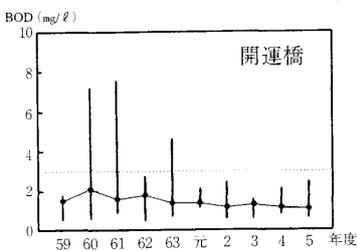
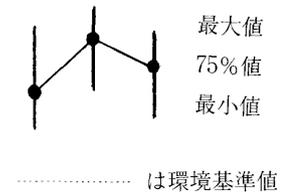


図2 測定地点のBOD経年変化

3. 結果及び考察

3.4 馬淵川水系

(1) 水質の概要

馬淵川水系の梅泉橋では、昭和60～63年度の間BODが環境基準値を超えている。その後平成元、2年度と基準値を満たし減少傾向がみられたが、平成3年度に再び基準値を超え、その後は基準値内で推移している。その他の地点のBODはほぼ横ばいで推移しており、概ね環境基準値を満たしている（図2）。

SSは概ね環境基準値を満たしているが、支川のなかの橋ではかなり高い値がみられる。また大腸菌群数はすべての地点で環境基準値を超えている。

(2) 主成分分析

主成分分析の結果、 Z_1 はSSの負荷量が最も高くまたBOD、大腸菌群数の負荷量も高いことから総合的汚濁度を表す成分と考えられる。 Z_2 はBODの負荷量が高くなっていることから有機的汚濁度を表す成分と考えられる（表2）。

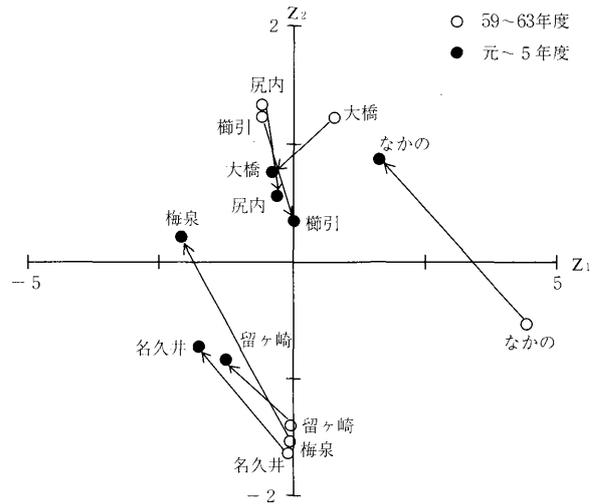
スコア散布図で平成元～5年度までの5年間と昭和59～63年度までの5年間のスコアからその推移をみると、前報において有機的汚濁度が高いと判断された上流域の梅泉橋、名久井橋では総合的汚濁度、有機的汚濁度ともに減少方向に向かい、そこで1グループを形成しており、有機的汚濁度が低いと判断された下流域では尻内橋、櫛引橋で総合的汚濁度及び、有機的汚濁度が、大橋では有機的汚濁度が増加方向に向かい、そこで1グループを形成している。上流域では水質は改善傾向、下流域では悪化傾向にあるということが出来る（図3）。

平成元～5年度の5年間では総合的汚濁度は上流域で下流域より低くなっているが、有機的汚濁度は依然として下流域より上流域で高くなっている。また昭和59～63年度の5年間では、梅泉橋、名久井橋ともに有機的汚濁度が高く岩手県内からの汚染が考えられたが、平成元～5年度の5年間では、梅泉橋の有機的汚濁度が大きく減少しているのに対し名久井橋では依然として高いことから、岩手県側の汚染とともに青森県側（梅泉橋から名久井橋の間）での汚染も大きいことが確認された。この地域は三戸町、南部町など住宅地も多く、下水道設備等の普及も遅れていることから生活系排水による負荷量大きいものと考えられ、今後はこれらの地域での水質改善等の啓蒙活動を推進していく必要があると思われる。

前報で最も汚濁度が高いと判断された浅水川のなかの橋では依然として総合的汚濁度が高く他の地点と分類されるが、総合的汚濁度及び、有機的汚濁度ともに大きく減少しており水質は改善傾向にある。流域住民への生活排水対策の啓蒙活動の効果があったものと思われ、これらの事業は今後も継続していく必要があると思われる。

表2 固有値・寄与率・固有ベクトル*・負荷量**
(馬淵川水系：合成変数 Z_3 まで記載)

成分	合成変数 Z_1	合成変数 Z_2	合成変数 Z_3
固有値	2.5017	1.1554	0.6445
寄与率	0.5003	0.7314	0.8603
1 pH	-0.4706*	-0.7444**	-0.3520
2 DO	-0.3611	-0.5712	-0.6310
3 BOD	0.3597	0.5689	-0.5949
4 SS	0.5811	0.9191	-0.0543
5 Coli	0.4255	0.6730	-0.3479
			-0.3740
			-0.7300
			-0.5860



〔 Z_1 と Z_2 に対するスコア散布図〕

図3 主成分分析解析結果（馬淵川水系）

(3) 流入負荷量

昭和63年度と平成5年度の名久井橋より下流のBODの流達負荷量と流入負荷量^{12, 13)}を比較すると、流達負荷量は全ての地点で増加している。また流入負荷量では、名久井橋～櫛引橋（A→A'）でわずかに増加しているが、その他の区間では減少している。名久井橋～櫛引橋では畜産系の負荷量が増加している。流入負荷量が大きく減少している尻内橋～大橋（C→C'）及び大橋～河口（D→D'）では生活系排水による負荷量が減少しており、この地域での下水道の整備等がすすんだことが原因となっている。名久井橋～櫛引橋（A'）、大橋～河口（D'）では工場排水による負荷量が最も大きくなっておりこれらの負荷量軽減が望まれる。またその他の流域では生活排水による負荷量が大きく流域地域での下水道や合併浄化槽等の整備が望まれる（図4、5）。

平成5年度は昭和63年度に比べ流量（低水流量）が3割ほど多く降雨量が多かったことが予想される。流入負荷量が増えていない割には流達負荷量が増えていることから、降雨等の影響による自然由来の負荷量が増加したことが考えられる。

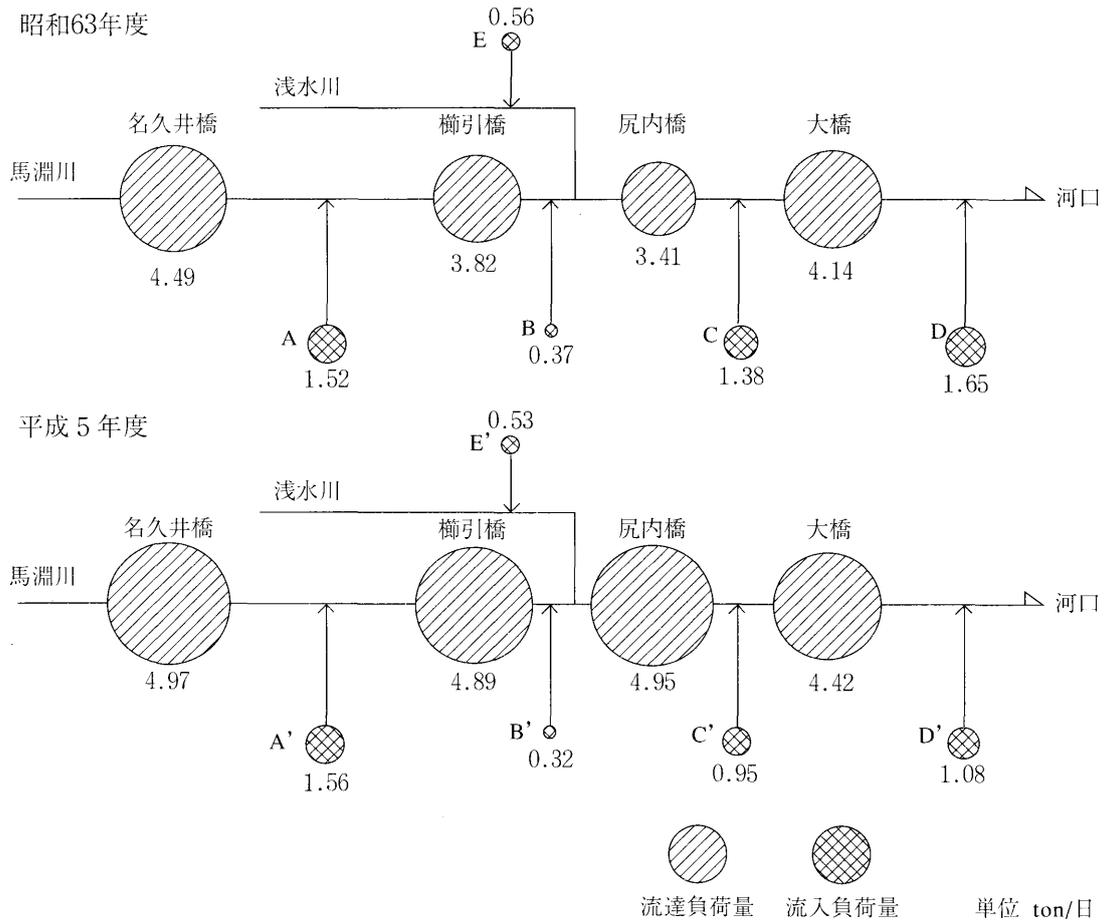


図4 馬淵川の流達負荷量・流入負荷量

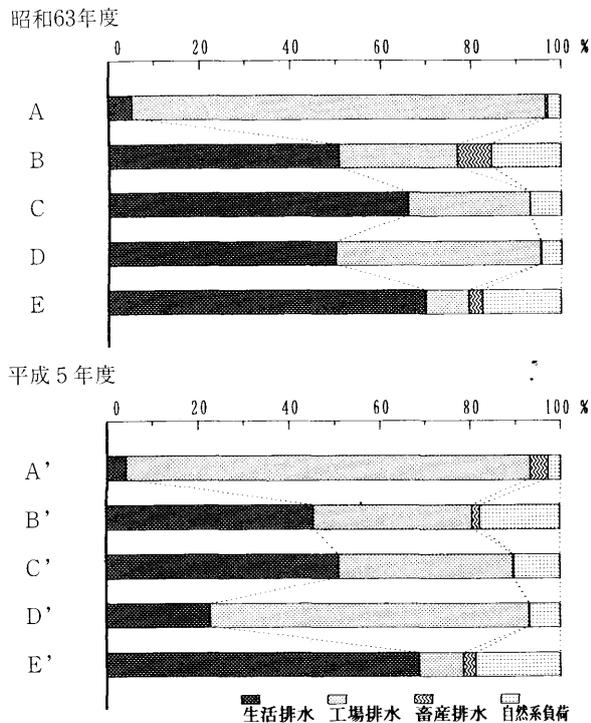


図5 流入負荷量の種類別割合

流達負荷量は昭和63年度及び平成5年度とも名久井橋が最も大きくなっている。主成分分析の結果でも有機的汚濁度は上流域で下流域より高くなっており、上流域での負荷量の削減が望まれる。

3・2 奥入瀬川水系

(1) 水質の概要

昭和59～平成5年度のBODは全ての地点で概ね環境基準値を満たしており、ほぼ横ばいあるいは減少傾向をしめしている。SSは御幸橋より上流域では概ね環境基準値を満たしているものの、幸運橋、開運橋では平成2年度まで頻りに環境基準値を超えている。また大腸菌群数は環境基準値を超えている。

(2) 主成分分析

主成分分析の結果Z₁はBOD、SS、大腸菌群数の負荷量が高いことから総合的汚濁度を表す成分と考えられる。寄与率が75%を超えており全変動の大部分が説明される(表3)。

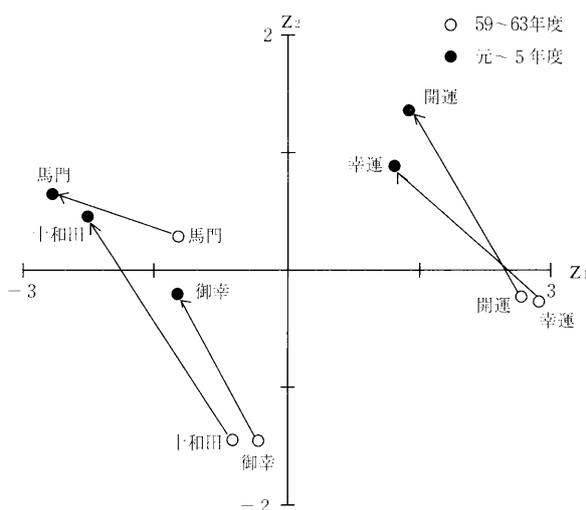
平成元～5年度の5年間と昭和59～63年度までの5年間のスコアからその推移をみると、全ての地点で総合的汚濁度は減少の方向に向っており、水質は全流域で改

善傾向にあるといえる。この河川の流域市町村では「奥入瀬川の清流を守る条例」の設定も決まっており、今後ますます水質改善がすすむことが期待される（図6）。

また水質は改善傾向にあるものの下流域の幸運橋、開運橋では依然として総合的汚濁度の高い状態が続いており、清浄な上流域と分類される。この地域での下水道、合併浄化槽の整備、促進、事業場排水の負荷量軽減が望まれる。

表3 固有値・寄与率・固有ベクトル*・負荷量**
(奥入瀬川水系：合成変数Z₃まで記載)

成分	合成変数Z ₁	合成変数Z ₂	合成変数Z ₃
固有値	3.8413	0.8466	0.1529
寄与率	0.7683	0.9376	0.9682
1 pH	-0.4836* -0.9478**	0.1133 0.1043	0.3135 0.1226
2 DO	-0.2399 -0.4702	-0.9583 -0.8817	-0.0736 -0.0288
3 BOD	0.4981 0.9761	-0.0474 -0.0436	0.4106 0.1606
4 SS	0.4786 0.9380	-0.2493 -0.2294	0.5270 0.2061
5 Coli	0.4811 0.9430	-0.0668 -0.0615	-0.6721 -0.2628



〔Z₁とZ₂に対するスコア散布図〕

図6 主成分分析解析結果（奥入瀬川水系）

4. ま と め

- (1) 平成元～5年度の水質測定結果をみると馬淵川、奥入瀬川ともにBODは概ね環境基準値を達成している。SSは一部地点で基準値を超えているものの、大半の地点で基準値をみたしている。大腸菌群数は全地点で環境基準値を超えている。
- (2) 馬淵川水系では上流域で水質は改善傾向にあるが、下流域では悪化傾向にある。また依然として上流域で下流域より有機的汚濁度が高く、この流域での負荷量軽減が望まれ、水質改善等の啓蒙活動を推進していく必要がある。浅水川では水質が大きく改善されており、生活排水対策の啓蒙活動の効果があったものと思われる。
- (3) 奥入瀬川水系では全流域で水質は改善傾向にある。上流域の水質は良好であるが、下流域では総合的汚濁度が高く、生活排水、事業場排水等による影響が依然として考えられ、これらの負荷量軽減が望まれる。

文 献

- 1) 神 正志，他：青森県南地域河川の水質汚濁評価（第1報），青森県環境保健センター研究報告，5，73-78，1994
- 2) 青森県：公共用水域水質測定結果，昭和59年度
- 3) 青森県：公共用水域水質測定結果，昭和60年度
- 4) 青森県：公共用水域水質測定結果，昭和61年度
- 5) 青森県：公共用水域水質測定結果，昭和62年度
- 6) 青森県：公共用水域水質測定結果，昭和63年度
- 7) 青森県：公共用水域水質測定結果，平成元年度
- 8) 青森県：公共用水域水質測定結果，平成2年度
- 9) 青森県：公共用水域水質測定結果，平成3年度
- 10) 青森県：公共用水域水質測定結果，平成4年度
- 11) 青森県：公共用水域水質測定結果，平成5年度
- 12) 青森県：八戸地域公害防止計画実施状況等調査，昭和63年度
- 13) 青森県：八戸地域公害防止計画実施状況等調査，平成5年度

Abstract

**Evaluation of water quality in the river of
south-east district of Aomori Prefecture
(No.2 Report)**

— Mabechi River system and Oirase River system —

Masashi JIN¹ and Seiichi KUDO¹

As for Mabechi River and Oirase River of south-east district of Aomori Prefecture, by using the water quality measurement results such as BOD and so forth from a fiscal year 1989 to a fiscal year 1993, and moreover by comparing them and furthermore by comparing them with the results described in the previous report since a fiscal year 1984 through a fiscal year 1988, the overall characteristics and similarity of water quality, as well as, a change in water quality circumstances have been investigated. As a result, Mabechi River system was classified into 3 groups, namely, the upper stream area, lower stream area and Asamizu River that is a tributary stream, and an organic pollution was higher in the upper stream area than that in the lower stream area, and the overall pollution was the highest in Asamizu River. The water quality in the upper stream area and Asamizu River was in an improving tendency, and conversely in the lower stream area it was in deteriorating tendency. In addition, Oirase River was classified into 2 groups, namely, the lower stream area and upper stream area, and a pollution was high in the lower stream area. The water quality was in improving trend in total areas.

Key words : Mabechi River, Oirase River, evaluation of water quality, load amount

1 : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

清浄地域と都市域の降水特性 — 名久井岳と八戸市の比較 —

工藤 隆治 工藤 精一

青森県南地域の年加重平均pHが、全国的にみて高く推移している要因について検討した。

その結果、平成5年度において名久井岳では、 NH_4^+ 、 nss-K^+ による H^+ の減少が大きく、 NO_3^- 、 nss-SO_4^{2-} による H^+ の増加が小さいことにより、pHが高くなっていたことが示された。また、八戸市では、 nss-SO_4^{2-} による H^+ の増加に対し、 NH_4^+ 、 nss-Ca^{2+} による H^+ の減少が特に大きいことにより、pHは5.81と全国でも高い値となっていたことが示された。さらに、八戸市では都市活動、海域の影響を受けていることが明らかになった。

Key words : acid rain, unpolluted area, urban area

1. はじめに

青森県南地域の年加重平均pHは、名久井岳5.1 (H3~H6平均)、八戸市5.4 (H元~H6平均)と全国的にみて高く推移している。

また、平成5年度の青森県における酸性雨調査結果では、日本海側の鱒ヶ沢町pH4.70、中央部の青森市pH4.95、八甲田山pH4.90に対し、太平洋側は六ヶ所村pH5.11、名久井岳pH5.28と高く、特に八戸市はpH5.81と酸性雨の定義とされるpH5.6を超えていた(図1)。

今回、青森県南の清浄地域と考えられる名久井岳と、都市域である八戸市の降水特性について検討し、若干の知見を得たので報告する。

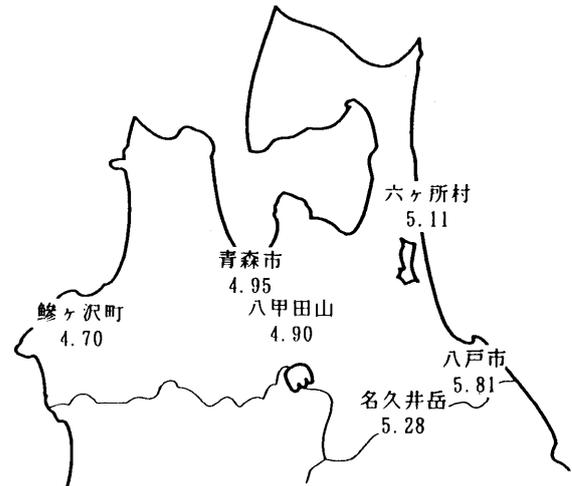


図1 青森県の降水 pH (平成5年度)

2. 調査方法

- 2.1 調査期間 平成3年4月~6年3月
- 2.2 採取間隔 一週間毎
- 2.3 採取方法 ろ過式採取装置(11月~3月はポリバケツ)によるろ液
- 2.4 分析方法 酸性雨等調査マニュアル¹⁾による。

3. 結果および考察

3.1 全国的な位置づけ

平成5年度酸性雨全国調査結果報告書²⁾の、大気汚染局等を除く123局のデータより各成分毎に平均濃度順位を出し全国的な位置づけを見た(図2)。

名久井岳の年度平均では、降水量および H^+ 濃度は全国最下位レベルであり、また NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Ca^{2+} 濃度も低かった。海塩成分濃度は全国中位よりやや低く、 NH_4^+ 濃度は中位よりやや高かった。また K^+ 濃度は、他

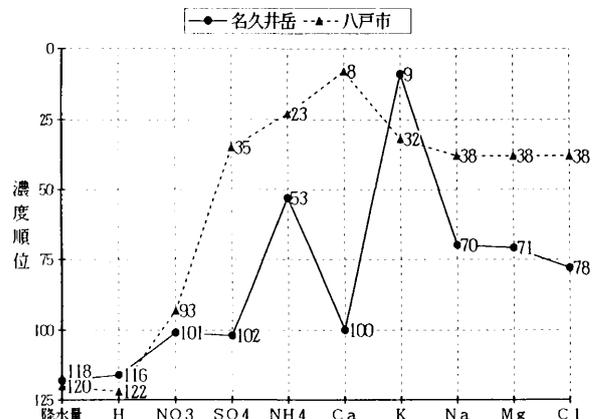


図2 濃度順位 (平成5年度)

(清浄30局による重回帰式)

$$H^+ (\mu eq/l) = 10.974 + 0.014 * Na^+ - 0.547 * NH_4^+ - 0.622 * nssK^+ - 0.238 * nssCa^{2+} + 0.485 * NO_3^- + 0.274 * nssSO_4^{2-} \quad (式1)$$

(重相関係数 R=0.735)

表1 名久井岳の各成分の水素イオン濃度増減値

($\mu eq/l$)	Na ⁺	NH ₄ ⁺	nss-K ⁺	nss-Ca ²⁺	NO ₃ ⁻	nss-SO ₄ ²⁻	H ⁺ 計算値	H ⁺ 実測値
清浄局平均	0.91	-9.75	-1.22	-3.55	7.28	9.28	13.92	13.95
名久井岳	0.45	-12.70	-3.32	-2.89	5.96	7.33	5.80	5.25
差	-0.46	-2.95	-2.10	0.66	-1.32	-1.95	-8.12	-8.70

表2 八戸市の各成分の水素イオン濃度増減値

($\mu eq/l$)	Na ⁺	NH ₄ ⁺	nss-K ⁺	nss-Ca ²⁺	NO ₃ ⁻	nss-SO ₄ ²⁻	H ⁺ 計算値	H ⁺ 実測値
清浄局平均	0.91	-9.75	-1.22	-3.55	7.28	9.28	13.92	13.95
八戸市	1.08	-17.12	-1.68	-9.70	6.76	12.08	2.39	1.55
差	0.17	-7.37	-0.46	-6.15	-0.52	2.80	-11.53	-12.40

表3 八戸市と名久井岳の降水濃度の相関 (平成3～5年度)

項目	降水量	SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	Cl ⁻	NH ₄ ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	H ⁺
同成分間の相関係数 (r)	0.83	0.55	0.75	0.60	0.51	0.41	0.60	0.35	0.57	0.49
濃度比 (八戸市/名久井岳)	-	1.74	1.14	2.76	1.33	3.68	2.41	1.00	2.59	0.40

(n=139, r>0.21は危険率1%で有意)

の成分に対し著しく高く、全国でも上位に位置した。

名久井岳の季節的特徴として、春季はH⁺濃度以外の各成分は高い傾向があり、とりわけNO₃⁻ (50位)、SO₄²⁻ (54位)、Ca²⁺ (23位) 濃度は他の季節より高かった。夏季はNH₄⁺濃度 (27位) が高く、海塩成分濃度 (Na⁺81位、Mg²⁺97位、Cl⁻93位) は低かった。冬季は降水量 (82位) H⁺濃度 (67位) が高く、K⁺濃度 (66位) は低かった。

八戸市の年度平均では、降水量およびH⁺濃度は全国最下位レベルであり、またNO₃⁻濃度も低かった。Ca²⁺濃度は全国上位に位置し、SO₄²⁻、NH₄⁺、海塩成分濃度も高めであった。

八戸市の季節的特徴として、春季はH⁺濃度が全国最下位であり、NO₃⁻ (36位) を除く他の成分は10位台と全般的に順位が高かった。また冬季は降水量 (93位) がやや高く、NH₄⁺ (72位) は低めであった。

3・2 pH上昇の要因

全国清浄30局の平成5年度平均当量濃度より、H⁺濃度を目的として重回帰分析を行い、重回帰式 (式1) を得た。

式1によるH⁺濃度計算値と、pH測定によるH⁺濃度実

測値の差は、名久井岳0.55、八戸市0.84と、ずれの割合は大きく見えるものの、清浄局平均との差では、計算値と実測値は7%程度のずれであり、式1による計算値とpH測定による実測値は、よく一致しているものと考えられた。

次に、清浄局の平均値、および名久井岳、八戸市の値を代入し、成分毎のH⁺濃度増減値の差を求めた。

全国清浄30局平均と比較し、名久井岳ではNH₄⁺、nss-K⁺によるH⁺減少が大きく、NO₃⁻、nss-SO₄²⁻によるH⁺の増加が小さいことにより、pHが高くなっていたことが示された (表1)。

同様に、八戸市では、nss-SO₄²⁻によるH⁺の増加に対し、NH₄⁺、nss-Ca²⁺によるH⁺の減少が特に大きいことにより、pHは全国でも高い値となっていたことが示された (表2)。

3・3 降水の類似性

名久井岳と八戸市の平成3年度から5年度において、同じ成分では相関がみられ、降水量、NO₃⁻で相関が高かった (表3)。

pHは、ほとんどすべての検体で八戸市が名久井岳よ

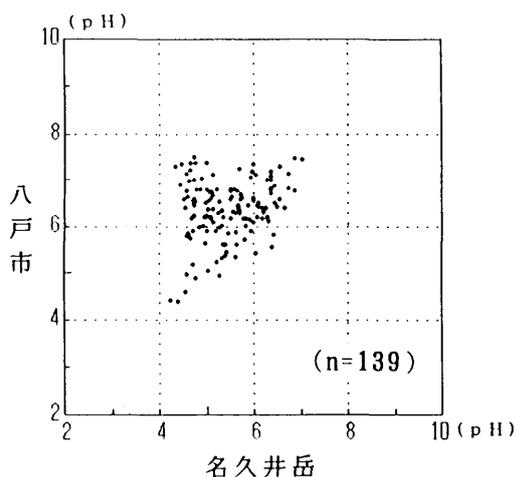


図3 pH散布図

り高く（図3）、また他の成分も八戸市は名久井岳に対し同等もしくは高濃度である場合が多かった（表3）。

八戸市と名久井岳は、距離が20kmと比較的近いことから、雲の中や、高層での雨水成分濃度はほぼ似かよっているものと考えられ、八戸市では降水過程での取り込みや乾性沈着により、自然、人為的影響を受け、その結果として、名久井岳より成分濃度が高くなっているものと推察された。

3・4 八戸市の降水特性

八戸市と名久井岳の降水成分の差が、臨海工業都市である八戸市の特性を示すものと考えられたことから、当量濃度の差により変動因子の推定を行った（表4、図4）。

第一因子は、 Na^+ 、 Cl^- 、 Mg^{2+} の海塩由来成分が抽出され、海域に近いところから海塩の影響を強く受けていることが示された。

第二因子は nss-SO_4^{2-} 、 NO_3^- が抽出され燃焼の影響とみられ、風向出現頻度との相関よりNW～WNWの風向時に濃度が高くなる傾向があり、臨海工業地帯のばい煙の重合汚染の影響がうかがわれた。また NH_4^+ は、 nss-SO_4^{2-} 、 NO_3^- ほど大きくなかったが、この第二因子で大きかった。

第三因子は nss-Ca^{2+} が抽出され、WNW～Wの風向時に濃度が高くなる傾向があり、国道45号線等の道路粉じん、市街地の影響が考えられる他に固定発生源としてセメント・石灰工場の影響も考えられた。

表4 当量濃度差による因子分析結果（平成3～5年度）

項目	直交回転後	風向出現頻度との相関
第一因子	Na^+ 、 Cl^- 、 Mg^{2+}	
第二因子	nss-SO_4^{2-} 、 NO_3^-	NW : 0.28 WNW : 0.24
第三因子	nss-Ca^{2+}	WNW : 0.42 W : 0.40

($n=139$, $r>0.21$ は危険率1%で有意)

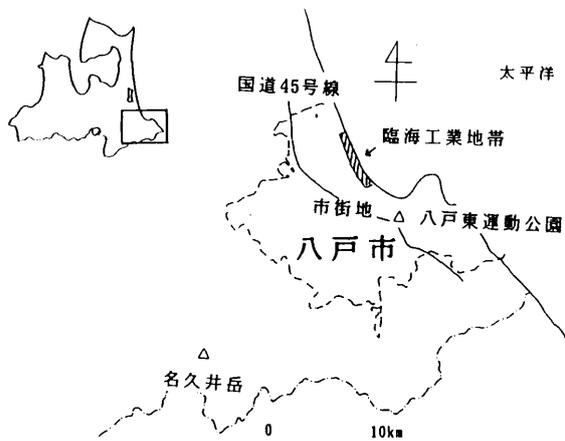


図4 測定地点図

4. まとめ

青森県南の清浄地域と考えられる名久井岳と、都市域である八戸市の降水特性について、全国清浄局と比較検討した結果は次の通りである。

- (1) 名久井岳では NH_4^+ 、 nss-K^+ による H^+ の減少が大きく、 NO_3^- 、 nss-SO_4^{2-} による H^+ 増加が小さいことにより、pHが高くなっていたことが示された。
- (2) 八戸市では nss-SO_4^{2-} による H^+ の増加に対し、 NH_4^+ 、 nss-Ca^{2+} による H^+ の減少が特に大きいことにより、pHは5.81と全国でも高い値となっていたことが示された。また、八戸市では都市活動、海域の影響を受けていた。

文 献

- 1) 環境庁大気保全局：酸性雨等調査マニュアル（改訂版）、平成2年3月
- 2) 全国公害研協議会編集委員会：酸性雨全国調査結果報告書、全国公害研会誌、20、1-130、1995。

Abstract

**Characteristics of deposition on unpolluted area and urban area
— Comparison between Mt. Nakui and Hachinohe City —**

Ryuji KUDO¹ and Seiichi KUDO¹

The factors, an annual weighted average pH has been shifting high in the south-east district of Aomori Prefecture from a nationwide view point, have been investigated.

As a result, at 1993, in Mt. Nakui, it was shown that pH has become high by a large reduction of H^+ through NH_4^+ and nss- K^+ and by a little increase of H^+ through NO_3^- and nss- SO_4^{2-} . And in Hachinohe City, due to an especially large reduction H^+ through NH_4^+ and nss- Ca^{2+} compared with an increase of H^+ through nss- SO_4^{2-} , it was shown that pH has become a high value of 5.81 even in total country. Furthermore it was made clear that Hachinohe City has been subjected to an influence of urban activities and ocean region.

Key words : acid rain, unpolluted area, urban area

1 : Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

II ノ 一 ト

青森県における貝毒調査結果 (平成6年)

堀内 諭 今井 美代子 五十嵐 健 三浦 啓徳 古川 章子 高橋 政教

Investigation on Shellfish Poison in Aomori Prefecture (1994)

陸奥湾海域のホタテガイについて、下痢性及び麻痺性貝毒の毒力調査を行った。下痢性貝毒は、前年より毒力の検出時期が遅く、規制期間が短縮したが毒力最高値は上昇した。麻痺性貝毒は規制値を超えなかった。流通貝については、20検体中7検体が規制値を超え、依然として、出荷自主規制期間中に中腸腺付きの生ホタテガイが出回っていた。

key words: scallop, Diarrhetic Shellfish Poison, Paralytic Shellfish Poison

1. はじめに

本県では、ホタテガイの毒化状況の把握、毒化機構の解明等を目的として、昭和53年度から、国の委託事業として県水産部を中心に「赤潮貝毒監視事業」を実施している。当所でも、本事業の一環として、昭和53年度から継続して下痢性及び麻痺性貝毒の毒力調査を行ってきた。今回は、平成6年の調査結果について報告する。

2. 調査方法

2・1 試料

陸奥湾海域に定点から採取したホタテガイ及び流通貝を試料とした。

2・2 調査期間

平成6年2月～平成6年11月

2・3 検査方法

下痢性及び麻痺性貝毒検査は、厚生省の定めた公定法¹⁾²⁾に準じて行った。

3. 結果および考察

3・1 陸奥湾定点毒化状況

(1) 下痢性貝毒

ア 青森定点

青森定点の毒化状況を表1に示す。垂下養殖貝(以下、養殖貝とする)は、昨年より³⁾57日遅く5月10日(5/10とする。以下同じ)に0.3～0.4MU/gが検出され、7/5に規制値(可食部あたり0.05MU/g)を超えた。7/5から8/2まで毒力が検出され、7/5と8/2は中腸腺あたりの毒力1.0～1.5MU/gで昨年よりも高い値を示した8/23以降は毒力が検出されなかった。

地まき貝は昨年より70日遅く5/30に初めて毒力が検

出され、中腸腺あたり0.52～0.60MU/gで可食部あたりの値が規制値を越えた。その後は毒力が検出されなかった。

イ 野辺地定点

野辺地定点の毒化状況を表1に示す。養殖貝は昨年より21日遅く4/4に初めて毒化が認められ、毒力は中腸腺あたり0.42～0.50MU/gで規制値を超えた。それ以降は4/25まで毒力が検出され、5/10～7/5までは不検出だったものの7/18、8/2と規制値を越える毒力が検出された。その後は毒力が検出されなかった。

地まき貝は、昨年より13日遅く3/28に毒力が検出され、4/4と8/2に規制値に満たない毒力が検出された以外は不検出であった。

(2) 麻痺性貝毒

陸奥湾2定点の養殖貝及び地まき貝については、表1のとおりすべて不検出(可食部あたり)であった。

3・2 ホタテガイの出荷自主規制期間

陸奥湾でのホタテガイの出荷自主規制期間を表2に示した。

陸奥湾海域養殖貝の規制期間は、4月8日から9月16日までの162日間であった。これは、昨年に比べ規制開始が21日遅く、解除が16日早く、期間全体で35日短縮された。

陸奥湾海域地まき貝の規制期間は、6月2日から9月19日までの110日間であった。昨年に比べ規制開始が52日遅く、解除が24日早く期間全体で33日短縮された。

3・3 流通貝の貝毒調査結果

夏季一斉取締りに伴う流通貝の調査結果を表3に示す。

20検体について調査を行ったが、7検体が下痢性貝毒の規制値を超えており、その値は、可食部あたり0.05～

表1 陸奥湾定点における貝毒調査結果

				(MU/g)			
青 森 定 点				野 辺 地 定 点			
調査年月日	垂下養殖貝		地まき貝	調査年月日	垂下養殖貝		地まき貝
	下痢性貝毒	麻痺性貝毒	下痢性貝毒		下痢性貝毒	麻痺性貝毒	下痢性貝毒
平6.2.16	ND(ND)	(ND)	ND(ND)	平6.2.16	ND(ND)	(ND)	ND(ND)
3. 7	ND(ND)		ND(ND)	3. 7	ND(ND)		ND(ND)
3.15	ND(ND)	(ND)	ND(ND)	3.15	ND(ND)	(ND)	ND(ND)
3.23	ND(ND)		ND(ND)	3.23	ND(ND)		ND(ND)
3.31	ND(ND)			3.28	ND(ND)		0.3(0.04)
4. 1			ND(ND)	4. 4	0.42~0.50		0.40~0.42
4. 4	ND(ND)		ND(ND)		(0.050 ~0.060)		(0.048 ~0.050)
4.11	ND(ND)	(ND)	ND(ND)	4.11	0.3~0.4	(ND)	ND(ND)
					(0.036 ~0.048)		
4.19			ND(ND)	4.19			ND(ND)
4.25	ND(ND)		ND(ND)	4.25	0.3~0.4		ND(ND)
					(0.033 ~0.044)		
5. 2			ND(ND)	5. 2			ND(ND)
5.10	0.3~0.4		ND(ND)	5.10	ND(ND)		ND(ND)
	(0.030 ~0.040)						
5.16			ND(ND)	5.16			ND(ND)
5.23	ND(ND)	(ND)	ND(ND)	5.23	ND(ND)	(ND)	ND(ND)
5.30			0.52~0.60	5.30			ND(ND)
			(0.051 ~0.059)				
7. 5	1.0~1.5			7. 5	ND(ND)		ND(ND)
	(0.082 ~0.12)						
7.18	1.75~1.0	(ND)	ND(ND)	7.18	0.75~1.0		ND(ND)
	(0.058 ~0.077)				(0.068 ~0.090)		
8. 2	1.0~1.5	(ND)	ND(ND)	8. 2	0.6~0.75		0.4~0.5
	(0.087 ~0.131)				(0.052 ~0.065)		(0.032 ~0.040)
8.23	ND(ND)		ND(ND)	8.22	ND(ND)		ND(ND)
8.29	ND(ND)		ND(ND)	8.29	ND(ND)		ND(ND)
9. 5	ND(ND)	(ND)	ND(ND)	9. 5	ND(ND)	(ND)	ND(ND)
9.12	ND(ND)		ND(ND)	9.13	ND(ND)		ND(ND)
11.16	ND(ND)	(ND)	ND(ND)	11.16	ND(ND)	(ND)	ND(ND)

ND：下痢性貝毒（中腸腺）は0.3MU/g未満
 麻痺性貝毒は0.875MU/g未満
 ()：可食部

0.59MU/gであった。

4. ま と め

(1) 下痢性貝毒について平成6年度は、陸奥湾海域において、昨年より13日遅く3月23日に初めて毒力が検出され、8月上旬まで続いた。そのうち養殖貝では前年より21日遅く規制値を越え、解除は16日早く、規制期間は35日短縮された。

地まき貝は前年より52日遅く規制値を越え、解除は24

日早く、規制期間が33日短縮された。

(2) 下痢性貝毒の毒力の最高値は、陸奥湾海域の養殖貝において、青森定点1.0~1.5MU/g、野辺地定点0.75~1.0MU/gであった。

地まき貝は、青森定点0.5MU/g、野辺地定点1.0MU/gであった。

平成6年は、前年に比べて毒力は低く、毒化期間が短かった。

(3) 麻痺性貝毒は、陸奥湾海域においてすべて不検出で

表2 ホタテガイ出荷自主規制期間

海 域	貝の種類	貝毒の種類	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (月)
陸奥湾	垂下養殖 地まき	下痢性				4/8	—————				9/16	(162日間)		
								6/2	—————				9/19	(110日間)

表3 流通貝の貝毒調査結果

No.	貝の種類	ボイル・ 生貝の別	採捕場所	採捕月日	貝毒の 種 類	毒 力		収去先
						可食部あたり		
1	ホタテガイ	生	陸奥湾東田沢	7. 6	下痢性	0.29以上	0.39未満	青 森 市
2	ホタテガイ	生	陸奥湾清水川	7. 6	下痢性	0.10以上	0.14未満	青 森 市
3	ホタテガイ	生	陸奥湾小湊	7. 6	下痢性	0.16以上	0.21未満	青 森 市
4	ホタテガイ	生	陸奥湾東田沢	7. 6	下痢性	0.22以上	0.33未満	青 森 市
5	ホタテガイ	生	東通村野牛	7. 5	下痢性	0.05未満		青 森 市
6	ホタテガイ	生	北海道知内	—	下痢性	0.05未満		青 森 市
7	ホタテガイ	生	—	—	下痢性	0.50以上	0.59未満	弘 前 市
8	ホタテガイ	生	—	—	下痢性	0.05以上	0.10未満	弘 前 市
9	ホタテガイ	生	陸奥湾平内	7. 6	下痢性	0.05未満		黒 石 市
10	ホタテガイ	生	北海道知内	7. 3	下痢性	0.14以上	0.19未満	五所川原市
11	ホタテガイ	生	—	—	下痢性	0.05未満		五所川原市
12	ホタテガイ	生	陸奥湾野辺地	—	下痢性	0.05未満		十和田市
13	ホタテガイ	生	北海道木古内	—	下痢性	0.05未満		三 沢 市
14	ホタテガイ	生	—	—	下痢性	0.05未満		七 戸 町
15	ホタテガイ	生	—	—	下痢性	0.05未満		七 戸 町
16	ホタテガイ	生	陸奥湾野辺地	—	麻痺性	0.875未満		八 戸 市
17	ホタテガイ	生	陸 奥 湾	7. 4	麻痺性	0.875未満		八 戸 市
18	シューリ貝	ボイル	ニュージーランド	7. 2(仕入日)	麻痺性	0.875未満		青 森 市
19	パーナ貝	—	ニュージーランド	4.18	麻痺性	0.875未満		青 森 市
20	ホタテガイ	生	陸 奥 湾	—	麻痺性	0.875未満		む つ 市

あった。

(4) 流通貝の調査では、20検体中7検体が下痢性貝毒の規制値を超え、出荷自主規制期間中に中腸腺付きのホタテガイが出回っていることから、関係機関の監視指導等の強化及び徹底が必要であると考えられる。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：下痢性貝毒検査法，昭和56年5月
- 2) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：麻痺性貝毒検査法，昭和55年5月
- 3) 三浦啓徳他：青森県における貝毒調査調査結果（平成4年），青森県環境保健センター研究報告，5，81-83,1994.

酸性湖沼の陸水学的調査研究 (Ⅲ) — 宇曽利山湖 (恐山湖) の化学組成 —

三上 一 早狩 進

Limnological Studies on the Acid Lake (Ⅲ) - Chemical composition in Lake Usoriyama (Osoresan-ko) -

pH3.4~3.8の火山性無機酸性湖である宇曽利山湖 (恐山湖) の水質構造と負荷量の収支を把握するため、湖内及び流入河川における化学組成について調査した。その結果、pHは1.6~7.1で、アニオン及びカチオンの組成比はpHと関連し、水質は地質、火山・温泉活動の影響を強く受けていた。負荷量の収支をみると、湖内の水質は境内にある酸性河川及び温泉水に類似した水質の流入、或いは、湧出から形成されているものと考えられる。

key words: acid lake, Usoriyama-ko (Osoresan-ko), chemical composition and balance of loading.

1. はじめに

宇曽利山湖 (恐山湖) は下北半島のほぼ中央部に位置する恐山山頂部に形成された pH 3.4~3.8の火山性無機酸性のカルデラ湖であるが、コイ科ウグイをはじめとする生物活動が盛んな湖内¹⁾として知られている。

著者等は同湖沼及びその周辺地域を取り巻く水-底質-生物系を巡る生態系を把握するため、前報において水環境^{2, 3)}、底質環境^{4, 5)}について報告した。

今回、同湖沼を巡る水質構造及び負荷量の収支を把握するため、湖内及び流入河川における化学組成⁶⁾について調査したもので報告する。

2. 調査方法

湖内は1993年8月26日 (No. 1~4) に表層水を、河川は9月2日 (No. 5~11, 14~23) 及び9月22日 (No. 12~13) に採水した (図2)。

No. 7は湖内に流入しない自噴温泉であり、No. 9は境内から流出する河川があるが、生活雑排水が混入し、No. 10は唯一の流出河川である正津川である。

対象項目は流量、水温、pH、EC、 HCO_3^- 、 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 NH_4^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} の13項目である。

3. 結果と考察

3.1 水温

宇曽利山湖は那須火山帯の北端に位置し、日本三大霊場の一つである円通寺境内を中心とする湖岸北~北東部には多数の噴気泉が点在し、湖水及び河川水は火山・温泉活動に強く影響⁷⁾を受けているものと考えられる。

ここでは、水温の分布状況から温泉や火山活動の影響について検討した。

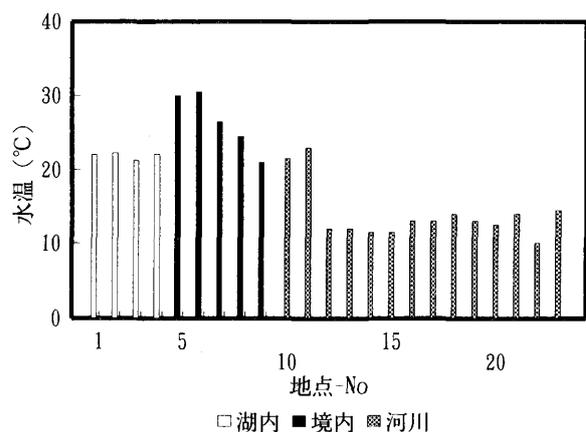


図1 水温の分布

水温は10.0~30.5℃と大きな差が認められたが、水温の水平分布状況をみると、

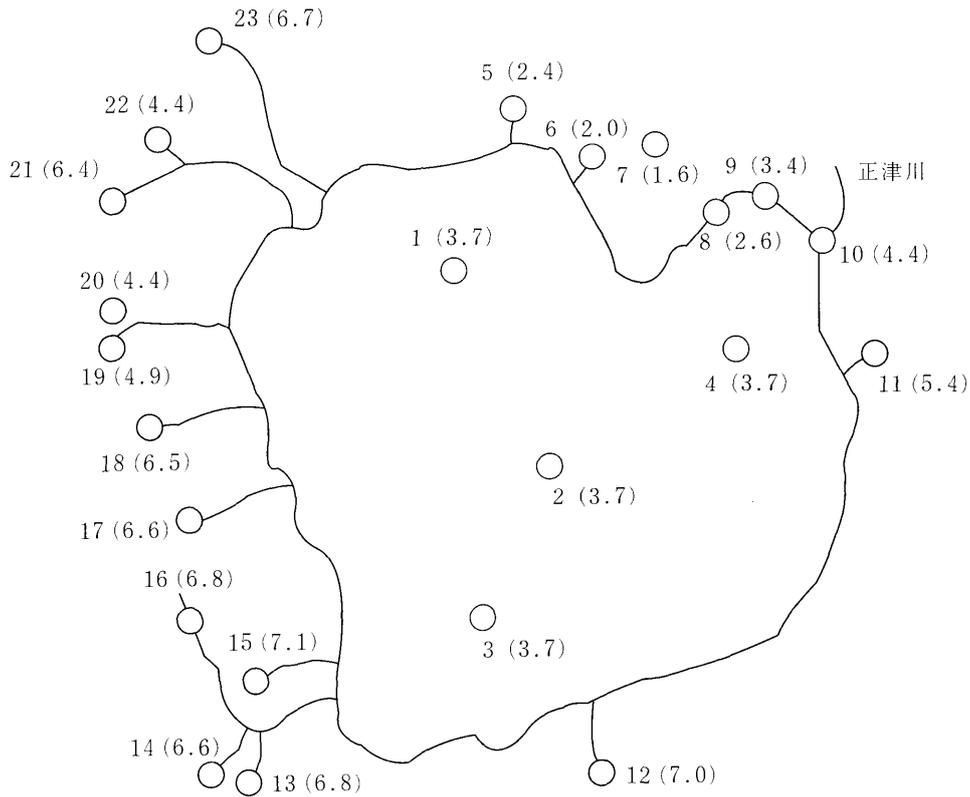
I群: 湖岸北~北東部の境内に位置する河川、自噴温泉で、21.0~30.5℃と水温が高い群 (No. 5~11)。

II群: 湖内で、水温は22.0~22.2℃とほぼ同じ (No. 1~4)。

III群: 湖岸南~南西部に位置し、水温が10.0~14.5℃と低い群 (No. 12~23)。

の3群の地域に区分されるようである。

I群は水温が高く、温泉が含まれ、更に、笹流川 (No. 11) には温泉水が流入していることから、I群は



() 内の数字はpHである。

- | | | | |
|------------------|-----------|----------------|----------------|
| 1 : 湖内 (最深部) | 2 : 湖心 | 3 : 湖内 (流入河川側) | 4 : 湖内 (流出河川側) |
| 5 ~ 6 : 無名川 (境内) | 7 : 自噴温泉 | 8 : 無名川 (境内) | 9 : 無名川 (境内) |
| 10 : 正津川 | 11 : 笹流川 | 12 : 丸山橋 | 13 : 湯ノ沢橋 |
| 14 ~ 15 : 無名川 | 16 : 大尽沢川 | 17 : 荒川 | 18 ~ 21 : 無名川 |
| 22 : 頭無川 | 23 : 無名川 | | |

図2 調査地点図

温泉・火山の影響が大きいことが示唆された。

一方、Ⅲの河川は調査期間が8～9月の夏季にもかかわらず水温が低いことから、多くの河川では湧出が考えられる。

Ⅱ群は、両群の中間に属することから湖内の水質は両地域の影響を受けていることが示唆される。(図1)

3.2 流量

宇曾利山湖には乾河川を含めておよそ40河川が流入しているといわれている。このうち、湖岸南東部から南西部の林道沿いのおよそ20河川と湖岸北部の円通寺境内から北東部にはおよそ10河川が湖内に流入し、岸北東部の正津川は唯一の流出河川である。今回、湖岸南東部から南西部の林道沿いに位置する一部の河川を除いた18河川の流量を測定した。

唯一の流出河川である正津川の流量は214,012m³/日

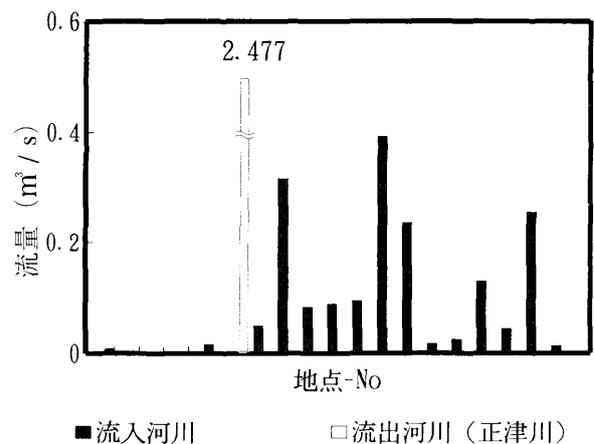


図3 流量の分布

で、流入17河川の総流量は152,181m³/日となり、(流入量) / (流出量) 比は0.71で、流出量に対して流入量が

およそ30%ほど少なかった。

流入河川を円通寺境内にある4河川(No.5~9)と湖岸南西部13河川(No.10~23)の2地域に区分し、地域の流入河川の流量をみると、境内にある4河(No.5~9)の流量は86.4~1296m³/日、湖岸南西部13河川の流量は1123.2~33868.8m³/日で、各々の計は2246.4m³/日、150595m³/日となり、境内にある河川の総流入流量に占められる割合はおよそ1.5%となり、境内にある河川は著しく流量が少なかった(図3)。

3・3 水質の概要

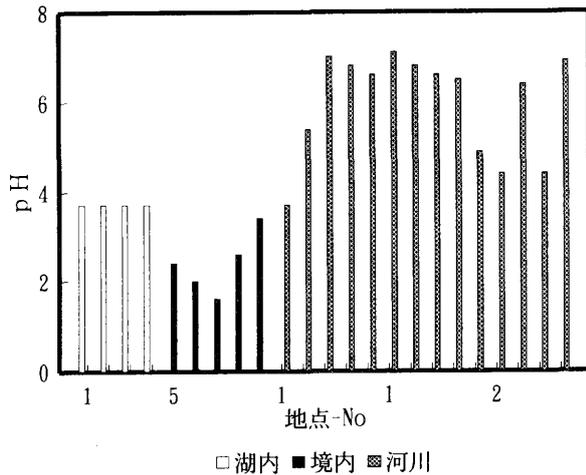


図4 pHの分布

pHは1.6~7.1で、分布幅は著しく大きい、

I群：湖岸北~北東部に位置し、pH1.6~酸性3.4の著しい強酸性を示す自噴温泉及び河川群

II群：湖内でpH3.4とほぼ同じpHを示す群

III群：湖岸南西部に位置し、pH4.4~7.1の弱酸性~中性を示す河川群

の3群に分類されることから、水質構造には地域差が認められるようである。(図2, 4)。

一方、溶解性成分の現存量の指標であるECの分布状況を見ると、全体で66~10000μS/cmで分布幅が極めて大きい、地域別にみるとpHと同様に3群に区分され、

I群：2400~100000μS/cm

II群：240~250μS/cm

III群：66~370μS/cm

となり、強酸性水域ではECが他の地域に比べて極めて大きいのが特徴である。

ここで、pHとECの関係をみるとpHが低くなるとECが高くなり、両者には負の関係が認められた(図5)。

3・4 溶解性成分の濃度

溶解性成分をアニオンはHCO₃⁻、NO₃⁻、Cl⁻、SO₄²⁻の4成分に区分し、カチオンはH⁺、NH₄⁺、Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺の6成分に区分して水質構造について検討した。

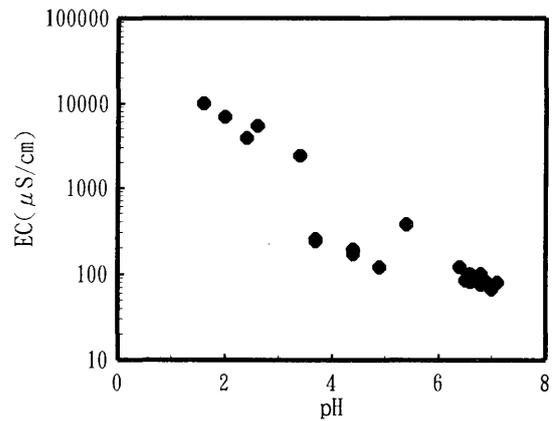


図5 PHとECの関係

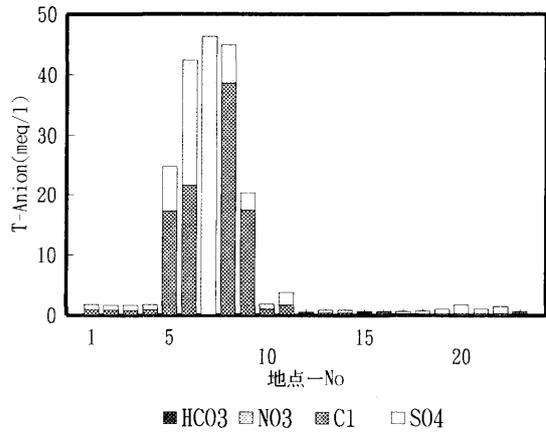


図6 アニオンの分布

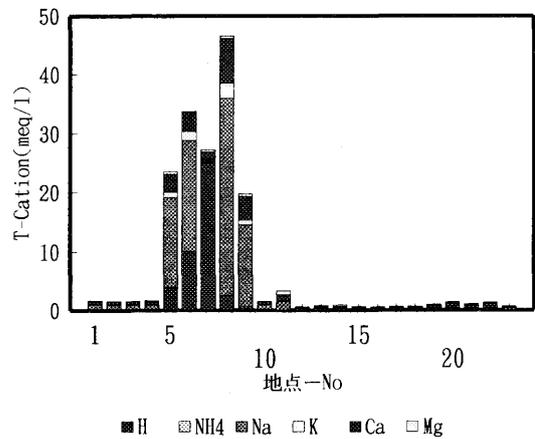


図7 カチオンの分布

アニオンはHCO₃⁻：0~0.23meq/l、Cl⁻：0.09~38.6meq/l、NO₃⁻：0.001~0.056meq/l、SO₄²⁻：0.07~46.2meq/lで、アニオン4成分の総計を地域別にみると、

I群：20.2~46.3meq/l (No.5~9)

II群：1.63~1.72meq/l (No.1~4)

III群：0.57~3.81meq/l (No.10~23)

となり、I群に属す強酸性水域ではアニオン成分が他の地域に比べて著しく高かった(図6)。

カチオンは H^+ : 0~25.1meq/l, NH_4^+ : 0~0.02meq/l, Na^+ : 0.25~33.4meq/l, K^+ : 0.01~2.5meq/l, Ca^{2+} : 0.21~7.5meq/l, Mg^{2+} : 0.09~0.70meq/lで、カチオン6成分の総計を地域別にみると、

I群: 19.7~46.4meq/l

II群: 1.61~1.72meq/l

III群: 0.59~3.38meq/l

となり、アニオンと同様に強酸性水域ではカチオン成分が著しく高かった(図7)。

地点毎におけるアニオンの総計は0.57~46.3meq/l, カチオンの総計は0.59~46.4meq/lで、イオンバランス(T-Anion/T-Cation)は平均で1.06(0.92~1.70)となる。自噴温泉水(No.7)ではイオンバランスが1.70とアニオン成分が多いが、今回、対象とした Na^+ 等のカチオン成分以外にAl, Fe等の重金属類の関与が考えられることから酸性水域では重金属類の影響も見逃せないものと思われる。自噴温泉水(No.7)を除いた残りのイオンバランスは平均1.04(0.92~1.26)となり、アニオンとカチオンはほぼ同じ濃度であることから多くの地点における水質構造はこれらのイオンから構成されていることが示唆された。

一方、成分別にみると多くの地点では酸性雨中の主要な成分である NO_3^- , NH_4^+ が他の成分に比較して小さく、酸性雨では殆ど検出されない HCO_3^- がpHの上昇とともに増加するのが特徴である。

3.5 pHとイオン当量比の関係

著者等は宇曾利山湖及び流出河川における底質中の重金属類の分布状況は地域特性、特に、pHの影響を強く受けていることを指摘した。

今回、対象とした地点と前回に調査を行った地点を比較すると、pH1.6~3.4の強酸性河川(No.5~8)の4地点が追加された以外はほぼ同じ地点であること、更に、底質と同様に水質もほぼ3群に区分されることから、ここでは、pHとアニオン及びカチオン組成比に注目して宇曾利山湖の水質構造の検討を試みた。

pHと組成比の関係をみると、pH1.6を示す温泉水(No.7)は最もpHが低く、 SO_4^{2-} と H^+ の両成分が90%以上を占め、他の地点とは大きく異なっていた。

これを除いた地点で、pHとアニオン成分である HCO_3^- , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} の組成比との関係をみると、いずれの地点においても NO_3^- の比が無視できるほど小さいことから、ここでは NO_3^- を除いた3成分の組成比とpHとの関係をみると、

(1) 強~弱酸性水域に属し、 Cl^- と SO_4^{2-} の2成分から成る型(No.1~6, 8~10, No.19, 20, 22)

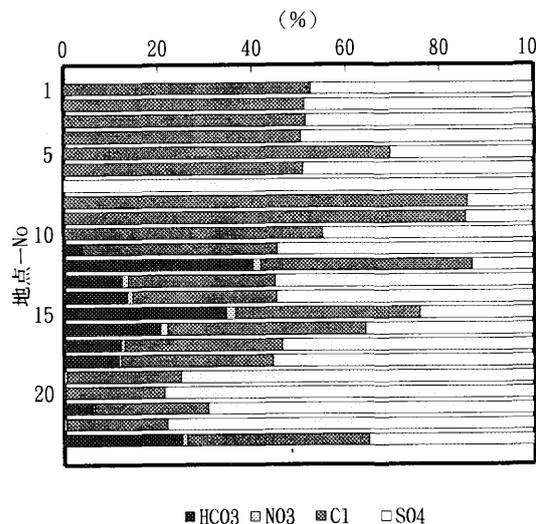


図8 アニオンの組成比

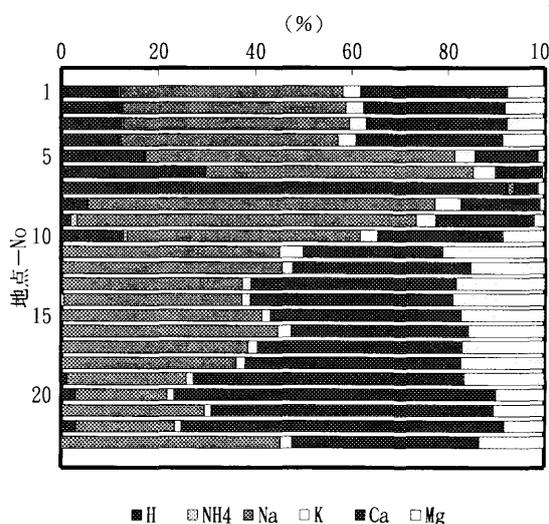


図9 カチオンの組成比

(2) 中性水域に属し、 HCO_3^- , Cl^- 及び SO_4^{2-} の3成分から成る型(No.11~18, 23)の2つの型に大きく分類された。

先に区分されたI~III群の地域と上記により区分された型の関連をみると、(1)の型に区分され、II群に位置する湖内(含む正津川: No.10)は $Cl^- \geq SO_4^{2-}$ となり、アニオン濃度は湖内ではほぼ均一であると見なすことができる。

一方、I群の属している4河川は酸性変質帯に位置⁷⁾し、3河川(No.5, 8, 9)は Cl^- 型で、残りの河川(No.6)は $Cl^- - SO_4^{2-}$ 型になることから、この地域では温泉・火山活動による影響が最も顕著に現われているものと思われる。

III群の河川群のうち、弱酸性河川を除く河川は HCO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} の3成分から成るが、pHとこれらの組成比の関係をみると、pHの上昇とともに HCO_3^- , Cl^- の2成分の組成比が大きくなり、これに伴い SO_4^{2-} が減少

する傾向が認められた。(図8)。

pHとカチオン成分である H^+ 、 NH_4^+ 、 Na^+ 、 k^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} との組成比の関係をみると、いずれの地点においても NH_4^+ 、 k^+ 濃度が低く、 Na^+ と Ca^{2+} がカチオンの主要成分となるが、 H^+ 、 Mg^{2+} はpHにより異なる挙動を示していた。pHとカチオン4成分の関係をみると、

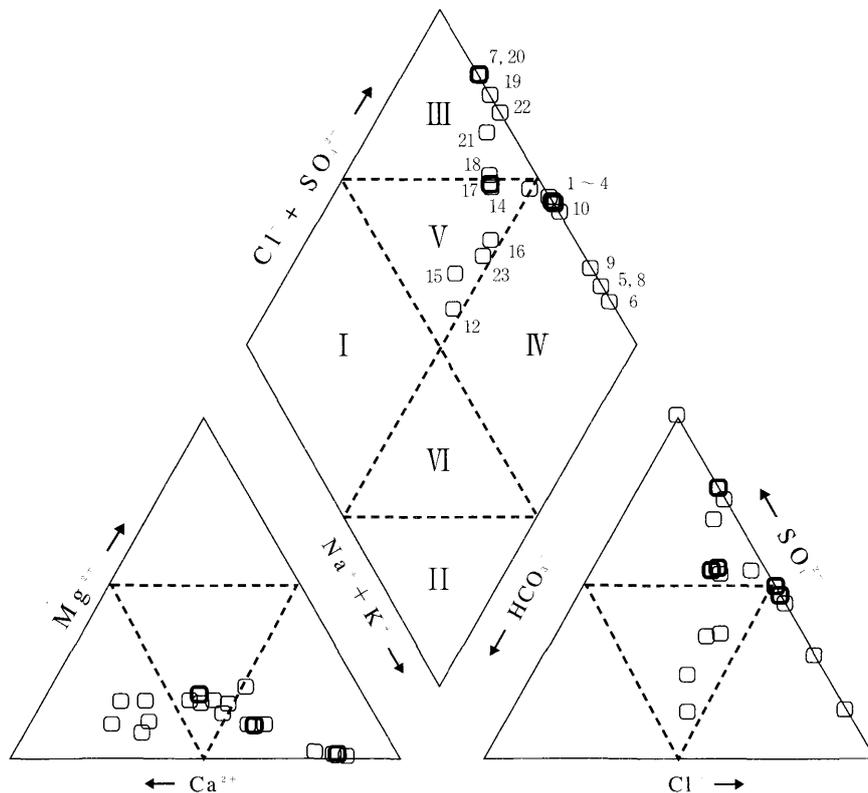
(1) 強～弱酸性水域に属し、pHの低下に伴い H^+ 、 Na^+ の

組成比がおおきくなり、 Ca^{2+} の組成比が減少する型

(2) 中性水域に属し、pHの上昇に伴い Na^+ の組成比が大きくなるとともに、 Ca^{2+} の組成比が減少し、 Mg^{2+} の寄与も大きくなる型

の2つの型に大別され、アニオンと同様な傾向が認められた(図9)。

3・6 キーダイヤグラムによる水質の分類



I : $Ca(HCO_3)_2$ 型 (淡水)

III : $CaSO_4$ or $CaCl_2$ 型 (鉱山, 火山性の水)

V : 中間型 (淡水)

II : $NaHCO_3$ 型 (淡水)

IV : Na_2SO_4 or $NaCl$ 型 (海水)

図10 キーダイヤグラムによる水質分類

地下水調査等では水質構造や生成機構を解明するためキーダイヤグラムが用いられている。これにより湖内及び流入河川の水質を区分すると、水質には片寄りがみられ、大きく3つの型に区分された(図10)。

3つの型に区分された水質と地点との関係をみると、概ね、3地域に区分された。

- (1) IV型に属し、温泉水(No. 7)を除く強酸性性水域の湖内及び湖岸北部に位置する河川群(No. 1~10)
- (2) V型に属し、最南西部のNo. 23を含む北東~南西部

に位置する中性河川群(No. 11~18)

- (3) III型に属し、温泉水(No. 7)を含む湖岸南西部に位置する弱酸性河川群(No. 19~22)となり、水質は地域毎に大きく異なり、いずれも地質や火山・温泉の影響を受けるとともに組成比を反映していた(図11)。

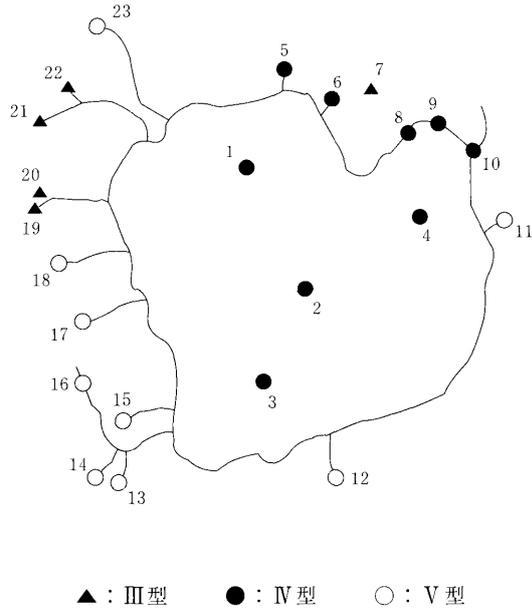


図11 キーダイアグラムによる水質と地域の関係

3.7 負荷量の収支

水質特性や生成機構を知るうえで各成分濃度とともに物質収支の明らかにすることは重要である。

水収支をはじめとする物質収支を把握するためには湧出、漏水、蒸散量等を的確に把握することが必要であるが、今回、唯一の流出河川である正津川と流入17河川を対象として負荷収支を求め、宇曽利湖及び流出入河川の水質構造について検討した。

流入河川についてみると、キーダイアグラムにより水質は3群に区分されることから、図11に従い流入河川を3群に分類し、各々の流入負荷量を以下のとおりとした。

- Ip (IV) : 湖岸北部の境内に位置し、流量が小さい強酸性の河川群からの負荷量
- Ip (V) : 湖岸南西部に位置し、比較的流量が大きい中性河川群からの負荷量
- Ip (III) : 湖岸南西部に位置し、弱酸性の河川群からの負荷量

とし、負荷量の収支をみると、アニオンは、 Cl^- 、 SO_4^{2-} が、カチオンでは H^+ 、 Na^+ が流出荷量に比較して流入負荷量が少なく、 Ca^{2+} と Mg^{2+} の流出入の負荷量はほぼ等しかった。湖内は強酸性で、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の湖底への沈降・堆積がないものと考えられることから宇曽利山湖での Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の起源は湖岸南西部に位置する弱～中性河川に由来するものと思われる。

Cl^- と Na^+ は流入負荷量が流出負荷量より少ない成分であるが、各々の流出負荷量をみると、 Cl^- は222eq/日、 Na^+ は160eq/日で、 Cl^- が Na^+ に比べておよそ40%ほど多

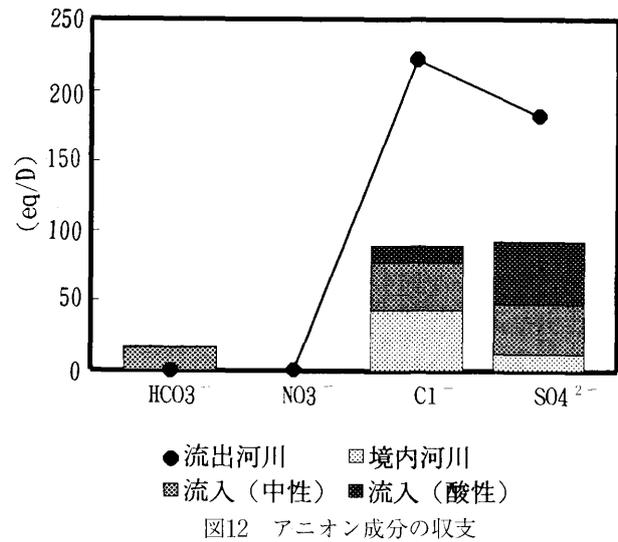


図12 アニオン成分の収支

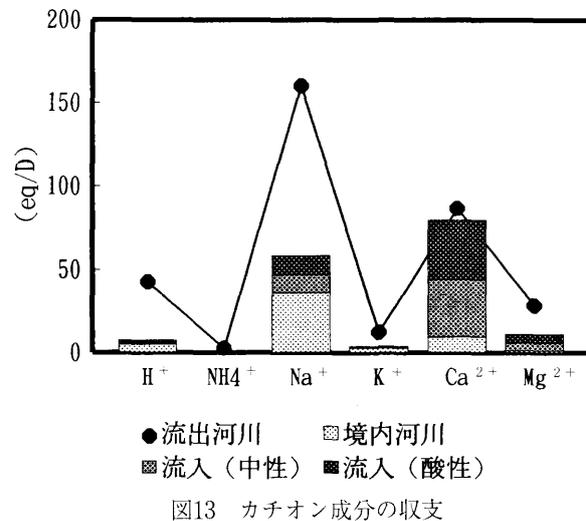


図13 カチオン成分の収支

かった。

今回、南西部の一部の河川では調査を実施しなかったが、これらの多くの河川は溶解性成分に乏しい中性河川であるものと考えられること、更に、湖岸北部の円通寺境内には対象とした河川以外に流出河川が見当たらないことから、湖内では境内の河川に類似し、 Cl^- に富んだ化学組成をもつ湧水があるものと考えられる。

SO_4^{2-} も流入負荷量が少ない成分の1つであるが、同じアニオン成分である Cl^- と比較すると、 Cl^- は境内の強酸性河川から流入する量が多く、 SO_4^{2-} は南西部の弱～中性河川から流入する量が多いことから、 Cl^- と SO_4^{2-} では起源は差があり、 Cl^- とは別に湖内では温泉水と同様に SO_4^{2-} に富んだ化学組成をもつ湧水が考えられる。

また、 SO_4^{2-} は他の成分と異なり硫酸塩還元菌等の微生物代謝を受ける成分で、水圏から大気圏に移送される可能性が大きいことから、 SO_4^{2-} の物質収支を把握⁹⁾するうえで、微生物代謝による影響を考慮する必要があるものと考えられる。

ま と め

今回、pH3.4~3.8の火山性無機酸性湖である宇曾利山湖（恐山湖）の水質構造と物質収支を把握するために湖内及び流入河川における化学組成について調査した。

その結果、

- (1) pHは1.6~7.1で、湖岸北部の円通寺境内に位置する温泉及び流入河川はpH1.6~3.4で、湖内はpH3.7の強酸性で、残りの流入河川はpH4.4~7.1の弱~中性河川であった。
- (2) 溶解性成分は境内内の強酸性水域では著しく高かった。
- (3) pHとイオン当量比との関係を見ると、温泉水は SO_4^{2-} 、 H^+ が90%以上を占め、他の地点とは大きく異なっていた。
- (4) pHとアニオンの関係を見ると、強酸性水域は Cl^- 、 SO_4^{2-} から成り、南西部に位置する流入河川ではpHの上昇とともに HCO_3^- の組成比が多くなった。
- (5) pHとカチオンの関係をみてみると、強酸性水域はpHの低下にともない、 H^+ 、 Na^+ の組成比が大きくなり、 Ca^{2+} の組成比が小さくなった。南西部に位置する流入河川ではpHの上昇とともに Na^+ の組成比が大きくなり、 Ca^{2+} の組成比が小さくなり、強酸性水域とは逆の傾向がみられた。
- (6) キーダイヤグラムにより水質は3つの型に区分され、境内にある温泉、河川及び湖岸南西部の弱酸性河川水は温泉・火山活動の影響を強く受けているものと考えられた。
- (7) 負荷量の収支をみると、湖内水質は境内の温泉水及び河川水と類似した化学組成をもつ水質の流入、或いは、

湧出から形成されているものと考えられた。

文 献

- 1) 平成6年度環境庁業務委託結果報告書：酸性雨調査研究・陸水影響調査－陸水生態系影響調査，青森県，1994.
- 2) 三上 一，他：酸性湖沼の陸水学的調査研究－宇曾利山湖（恐山湖）の水質環境．青森県公害調査事務所報，9，80-90，1988.
- 3) 三上 一，他：酸性湖沼の陸水学的調査研究－宇曾利山湖（恐山湖）の生物環境．第22回水質汚濁学会講演集，179-180，1988.
- 4) 三上 一，他：酸性湖沼の陸水学的調査研究－宇曾利山湖（恐山湖）の底質環境．青森県環境保健センター研究報告，1，70-83，1990.
- 5) 三上 一，他：酸性湖沼の陸水学的調査研究－宇曾利山湖（恐山湖）の底質環境．第28回日本水環境学会講演集，594-595，1990.
- 6) 三上 一，他：酸性湖沼の陸水学的調査研究（Ⅲ）－宇曾利山湖（恐山湖）の化学組成．第25回日本水環境学会年会講演集，340-341，1991.
- 7) 酒井軍治朗，他：恐山地域（薬研地域を含む）における温泉群の研究，青森県衛生部，1967.
- 8) 原 宏：陸水の化学－降水．季刊化学総説，14，69-78，1992.
- 9) 竹内準一，他：硫酸還元菌の計数法および硫酸還元活性法の測定法．水質汚濁研究，11，(1)，38-49，1988.

湖沼の富栄養化に関する調査研究 (Ⅲ) — 津軽十二湖王池における粒径別栄養塩類の挙動 —

三上 一

Studies on Eutrophication of Lake (Ⅲ) — Behavior of nutrients by each particle diameter in the Tsugaru-juniko Ohike —

津軽十二湖沼群の王池東湖湖心における粒径別栄養塩類の鉛直分布について調査した。その結果、窒素・磷の鉛直分布では、底泥からアンモニア性窒素、磷酸態磷の溶出が認められるとともに、下層では粒子態成分は全粒子態成分の半分を占めていることから、微少な成分が湖沼の富栄養化に及ぼす影響は大きいことが示唆された。

key words : lake , Tsugaru - juniko, eutrophication, nutrients.

1. はじめに

湖沼は上水道や工業・農業用水等の貴重な水資源として重要であるばかりでなく、生物種の保存の場としても注目されることから、良好な水辺環境の保存と創設が求められている。

湖沼の富栄養化に関する調査・研究では主に水圏及び底質における窒素・磷等の栄養塩類の物質循環や富栄養化をもたらす植物プランクトン等の生物調査が行われているが、近年、その存在にあまり注目されていなかった大きさが0.2~2 μm 程度の微少なプランクトンであるピコプランクトンの存在が注目されているとともに、ピコプランクトンが湖沼の富栄養化に大きな影響を及ぼすことが指摘されている。

ここでは、津軽十二湖沼群の代表的な湖沼である王池湖心における粒径別の窒素・磷等の栄養塩類の鉛直方向における挙動について調査したので報告する。

2. 調査方法

調査は1994年7月19日、9月9日及び10月27日で、王池の東湖湖心においてバンドン採水器により0, 2, 5, 10, 20mの層別採水を行った(図1)。

対象項目は水温、透明度、pH、DO、COD、SS、蒸発残留物、T-N、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、T-P、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、Chl-aの14項目である。窒素、磷及びクロロフィル-aについてはWhatman GF/D (孔径約3 μm)、GF/C (孔径約1.2 μm)及びGF/F (孔径約0.7 μm)により粒径分画を行った。

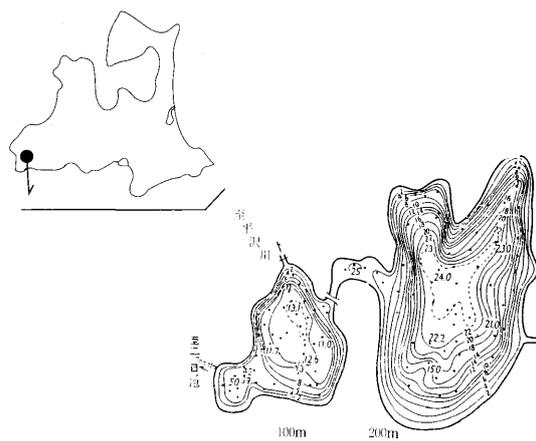


図1 調査地点

3. 結果と考察

3.1 水質の概況

王池は津軽国定公園である西津軽郡岩崎村の津軽十二湖湖沼群を形成している代表的な湖沼である。同湖沼は東湖と西湖からなるが、調査対象とした東湖は湖面積39,200 m^2 、最大水深24.0mで、水深が比較的深い湖沼である。

水深が深い湖沼での垂直方向における植物プランクトン等の生物生産量や物質循環に水温が大きな影響をもつことから、東湖湖心での水温の分布についてみた。

王池では7, 9, 10月ともに5m前後の比較的浅い層に水温躍層が形成され、それ以降では水温が4~5℃と急激な低下が認められた(図2)。

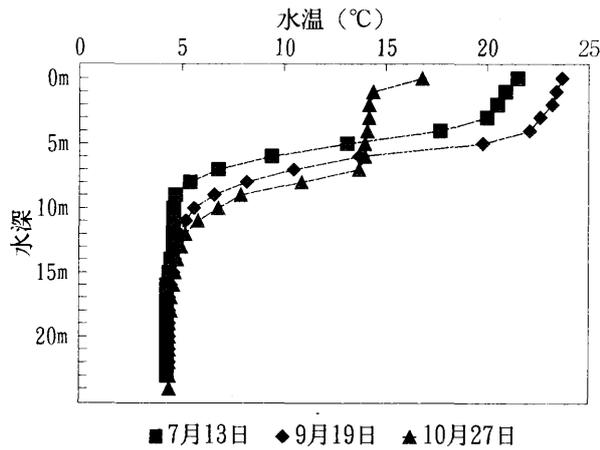


図2 水温の鉛直分布

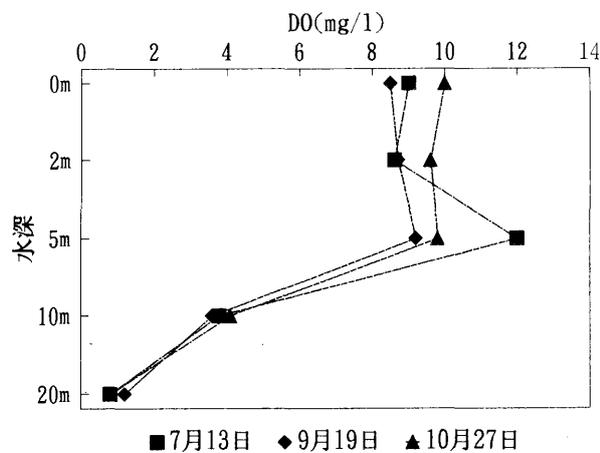


図3 溶存酸素の鉛直分布

水温に大きく依存する溶存酸素の鉛直分布にも季節変動が認められず、調査期間中はほぼ同じ鉛直分布を示していた(図3)。溶存酸素は水温躍層が形成される0mから5mまでは12~8.5mg/l、10mでは3.6~4.1mg/l、20mでは0.8~1.2mg/lであった。酸素飽和率は0mから5mまでは飽和~過飽和の状態であるが、10mでは29.7~34.4%に低下し、20mでは6.4~9.6%と嫌気状態にあり、著しい硫化水素臭を発していた。

通例、温帯地域に位置する水深が比較的深い湖沼では気温の変化に応じて水温の鉛直構造は変遷するが、王池では夏~秋季ともに水温の鉛直構造に季節変動が見られず、ほぼ同じ水温構造を示すこと³⁾が特徴であり、以下のためと考えられる。

水深が深い湖沼では、嫌気状態にある水質では底泥から鉄、マンガン等の重金属類や磷酸態磷、アンモニア性窒素等が溶出することが知られているが、蒸発残留物とSSの鉛直分布をみると、王池では水深が深くなるとともに両者は増加の傾向にあった。

ここで、蒸発残留物からSSを差し引いた量を溶解性

成分と見なして、鉛直分布を見ると(平均(最小~最大):以下同じ)、

0mから5m:107.7mg/l (105.4~111.4mg/l)

10m:111.6mg/l (110.1~112.7mg/l)

20m:115.2mg/l (110.7~118.7mg/l)

で、溶解性成分も蒸発残留物、SSと同様に水深が深くなるとともに増加していることから、底泥からの溶解性成分の溶出が認められる。このため、水深が深くなるとともに湖水は溶出に由来する溶解性成分に富み、上層と下層では密度差が大きくなり、気温の低下する秋季でも全層に及ぶ湖水の上下混合が行われないため、水温構造がほぼ同じと考えられる。

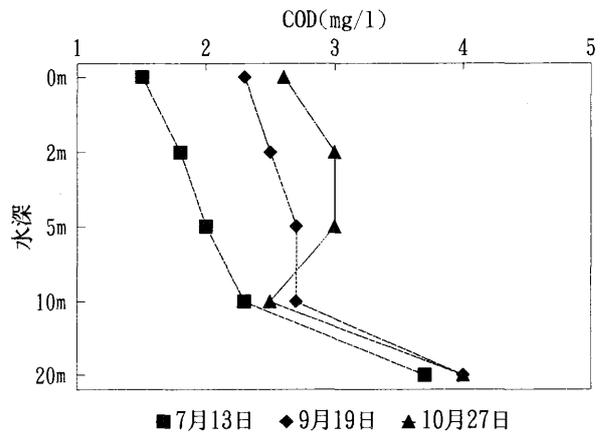


図4 CODの鉛直分布

CODの鉛直分布をみると、CODの全平均値は2.7mg/l (1.5~4.0mg/l)で、水深が深くなるとともにCODは増加する傾向にあり、特に、20mではCODの増加が著しかった(図4)。

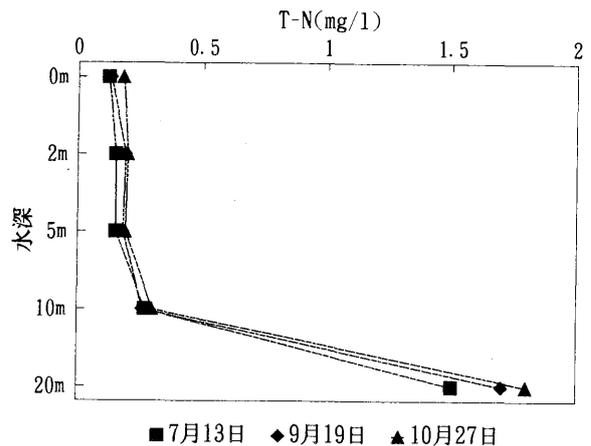


図5 総窒素の鉛直分布

総窒素の鉛直分布をみると、総窒素の全平均値は0.50mg/l (0.12~1.82mg/l)であった。

水深別に総窒素をみると、

0mから10m:0.19mg/l (0.12~0.30mg/l)

20m : 1.71mg/l (1.55~1.82mg/l)

で、0mから10mまでは総窒素は比較的低い濃度であるが、20mでは総窒素の増加が著しかった(図5)。

Whatmanガラス繊維濾紙GF/F(孔径約0.7μm)により溶解性窒素と粒子態窒素に区分すると、

溶解性窒素 : 0.38mg/l (0.05~1.62mg/l)

粒子態窒素 : 0.13mg/l (0.05~0.20mg/l)

で、20mでの総窒素の著しい増加は溶解性窒素が高いためである。

溶解性窒素を構成している硝酸性窒素、亜硝酸性窒素及びアンモニア性窒素についてみると、20mでアンモニア性窒素が1.34~1.60mg/lと高いほかは、いずれも不検出であることから、20mでの総窒素の著しい増加はアンモニア性窒素に起因していた。

アンモニア性窒素は有機物が微生物等により分解され、無機化する過程で生成されるが、嫌気状態にある底泥では土壌粒子に吸着、或いは、間隙水中のアンモニア性窒素が溶出することから、20mではアンモニア性窒素が底泥から溶出しているものと考えられる。

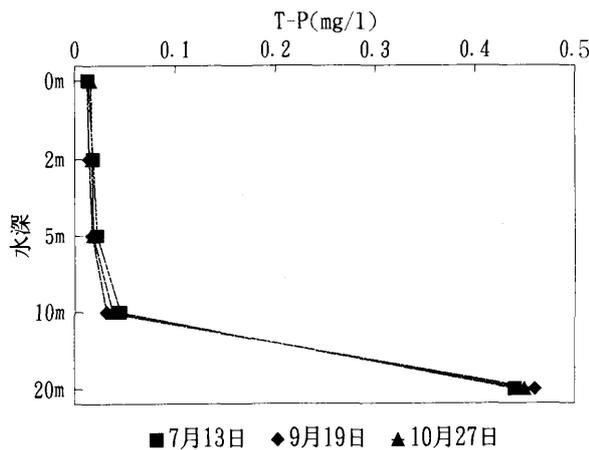


図6 総磷の鉛直分布

総磷の鉛直分布をみると、総磷の全平均値は0.108mg/l (0.012~0.462mg/l)であった。

水深別に総磷をみると、

0mから10m : 0.022mg/l (0.012~0.045mg/l)

20m : 0.453mg/l (0.444~0.462mg/l)

で、総窒素と同様に20mでの増加が著しかった(図6)。

窒素と同様に溶解性磷と粒子態磷に区分すると、

溶解性磷 : 0.044mg/l (0.004~0.212mg/l)

粒子態磷 : 0.064mg/l (0.006~0.291mg/l)

となり、窒素とは異なり、溶解性磷、粒子態磷ともに高かった。磷もアンモニア性窒素と同様に嫌気的な状態にある底泥から溶出するが、20mでは窒素は溶解性窒素のみが高く、磷は溶解性磷及び粒子態磷ともに高いことから、20mでは粒子態窒素と粒子態磷の成因に差があるこ

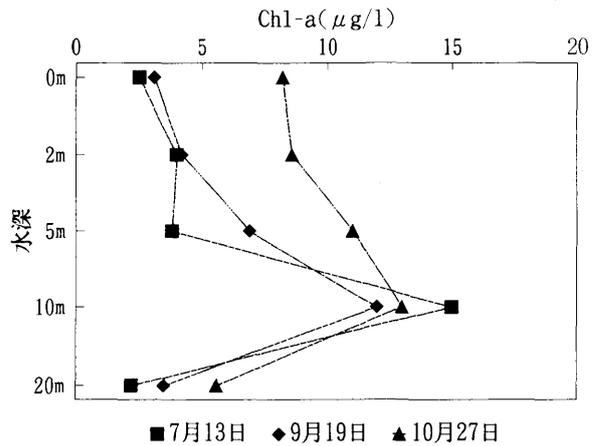


図7 クロロフィル-aの鉛直分布

とがわかる。

クロロフィル-aの鉛直分布をみると、クロロフィル-aの全平均値は6.9μg/l (2.2~15μg/l)であった。

水深別にみると、0mから10mまでは水深が深くなるとともにクロロフィル-aが高くなり、特に、水温躍層の形成がみられる水深10mではクロロフィル-aは14μg/l (13~15μg/l)と最も高いことから、10mでは植物プランクトンの増殖が盛んであることが示唆された(図7)。

3.2 粒子態窒素・磷及びクロロフィル-aの動態

近年、微少なプランクトンであるピコプランクトンが湖沼の富栄養化に大きな影響を与える可能性があることが示唆²¹⁾されており、更に、ピコプランクトンが栄養塩類の循環に関与していること²²⁾が指摘されている。

ここでは湖沼の富栄養化と密接に関連している窒素、磷及びクロロフィル-aを粒径分画することにより、王池で出現したプランクトンの大きさや粒径分画された粒子態の窒素、磷及びクロロフィル-aの現存量及びその生成機構との関係について検討した。

粒径分画はWhatmanガラス繊維濾紙GF/D(孔径約3μm)、GF/C(孔径約1.2μm)、及びGF/F(孔径約0.7μm)を用いて、湖水をろ過することにより行った。

各々のガラス繊維濾紙に捕捉される粒子態成分は

GF/F : 0.7~1.2μm

GF/C : 1.2~3.0μm

GF/D : 3.0μm以上

の3態に粒径分画され、GF/Dでは3μm以上の大型のプランクトンが、GF/C及びGF/Fでは3μm以下のピコプランクトンが捕捉されること²¹⁾が認められている。

全粒子態窒素の鉛直分布をみると、7、9、10月とも類似した鉛直分布を示しており、

0mから20m : 0.13mg/l (0.05~0.20mg/l)

0 mから5 m : 0.09mg/l (0.07~0.11mg/l)
 10mから20m : 0.19mg/l (0.18~0.19mg/l)

で、10m以深の深水層では全粒子態窒素は0mから5 mの表層部に比べて、2倍ほど高かった(図8 a~8 c)。

20mでは底泥からのアンモニア性窒素が溶出することから、0mから10mまでの窒素を総窒素と粒子態窒素に区分すると、

総窒素 : 0.19mg/l (0.12~0.30mg/l)
 全粒子態窒素 : 0.11mg/l (0.05~0.20mg/l)

で、総窒素の57.9%が粒子態窒素であることから、プランクトンに起因する粒子態窒素は窒素循環サイクルの重要な役割を果たしているものと思われる。

次いで、粒子態窒素とプランクトンの大きさとの関係を見るため、粒子態窒素を粒径分画すると、

GF/F : 0.02mg/l (0~0.06mg/l)
 GF/C : 0.04mg/l (0~0.16mg/l)
 GF/D : 0.07mg/l (0.02~0.14mg/l)

で、玉池では分画粒径が大きくなるほど粒子態窒素が高くなることから、GF/Dにより捕捉される3 μm以上の大型のプランクトンが粒子態窒素の主要な供給源であると考えられるが、GF/C及びGF/Fにより捕捉される微少なプランクトンに由来すると考えられる粒子態窒素もほぼ同程度であることから微少なプランクトンの存在は無視できないものと思われる。

特に、植物プランクトンの増殖が盛んに行われている10mでは、GF/Cにより捕捉される粒子態窒素が高く、9月と10月の秋季には全粒子態窒素の50%以上であることから、大きさが1.2~3 μm程度のプランクトンの増殖が優位を占めていることが推察される。

玉池では透明度が7月と9月で4.5m、10月で2.7mであり、水温、溶存酸素及びクロロフィル-aから植物プランクトンの鉛直方向での棲息状況を推定すると、0mから10mまでは有光層で植物プランクトンの増殖が盛んであるが、20mでは微生物による呼吸・分解活動が優先する無光層と見なすことができる。

これにより、全粒子態窒素の鉛直分布からプランクトンの生息状況を推察すると、2mと10mでは全粒子態窒素が高く、5mでは低下するという変動型を示していることから、2mと10mで生物生産が活発であることが示唆されるとともに、捕捉される粒子態窒素の構成比に差が認められることから出現した生物相に大きな変遷があるものと思われる。一方、無光相である20mで、全粒子態窒素濃度が高いのは沈降、或いは、底泥表層部に堆積している植物プランクトン等の枯死体が微生物による分解物されると考えられ、粒子態窒素の成因にあるものと考えられる。

全粒子態窒素の鉛直分布は、

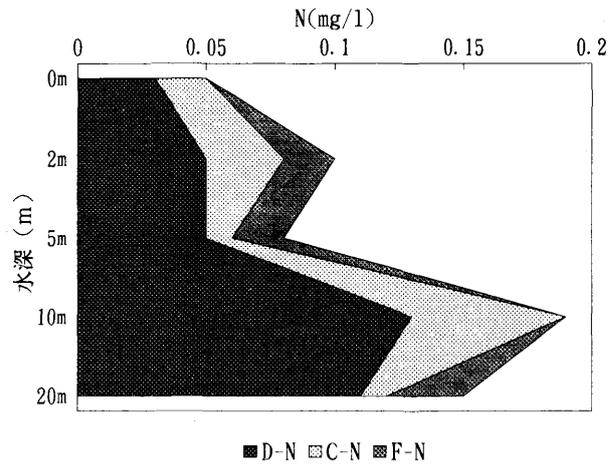


図8 a 粒径別窒素の鉛直分布 (7月13日)

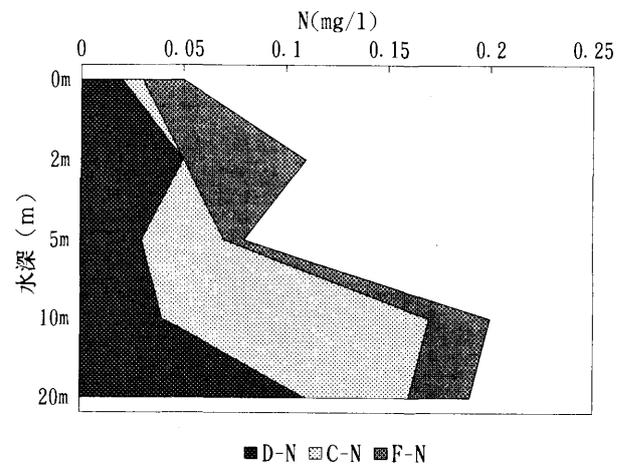


図8 b 粒径別窒素の鉛直分布 (9月19日)

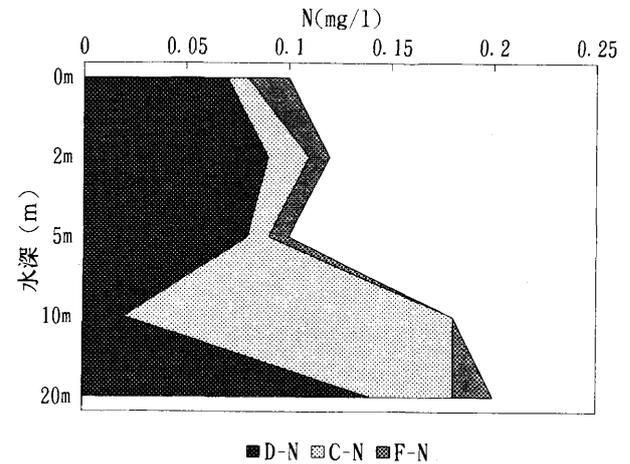


図8 c 粒径別窒素の鉛直分布 (10月27日)

0 m~20m : 0.031mg/l (0.006~0.291mg/l)
 0 m~5 m : 0.010mg/l (0.006~0.012mg/l)
 10m : 0.029mg/l (0.025~0.033mg/l)
 20m : 0.261mg/l (0.243~0.291mg/l)

で、20mでは粒子態窒素に比べて粒子態窒素の増加が著し

いのが特徴で、粒子態窒素と粒子態磷では成因に差が認められた (図9 a~9 c)。

20mではアンモニア性窒素と同様に磷酸態磷も底泥から溶出することから、20mを除いた0mから10mまでの磷を総磷と粒子態磷に区分すると、

総磷：0.022mg/l (0.012~0.045mg/l)

全粒子態磷：0.015mg/l (0.006~0.033mg/l)

で、総磷の68.2%が粒子態磷であり、その割合は窒素の57.9%とほぼ同じであることから、0mから10mまでの粒子態磷は粒子態窒素と同様にプランクトンに由来しているものと考えられる。

粒子態窒素と同様に粒子態磷を粒径分画すると、

0mから20mでは

GF/F：0.009mg/l (0~0.048mg/l)

GF/C：0.024mg/l (0~0.145mg/l)

GF/D：0.031mg/l (0.004~0.174mg/l)

0mから10mでは

GF/F：0.002mg/l (0~0.010mg/l)

GF/C：0.003mg/l (0~0.012mg/l)

GF/D：0.009mg/l (0.004~0.019mg/l)

で、0mから10mでは粒子態窒素と同様に分画粒径が大きくなるとともに粒子態磷が高くなり、粒子態窒素と似た挙動を示すことから、粒子態磷もプランクトンに由来するものと見なすことができる。

植物プランクトンの増殖の制限因子はN/P重量比により決定されるが、湖水中のN/P重量比が植物プランクトンの優先種を決定する要因とされていることから、粒径分画された粒子態窒素と粒子態磷のN/P重量比についてみると、

GF/Fは1：8.5

GF/Cは1：14

GF/Dは1：6.1

で、GF/Cにより捕捉されたプランクトン中のN/P重量比がGF/F及びGF/DのN/P重量比より2倍ほど高かった。

植物プランクトンは $(CH_2O)_{106}(NH_3)_{16}H_3PO_4$ を構成成分としており、そのN/P重量比は7.2であるが、粒径別に区分されたN/P重量比をみると、

$GF/D \leq GF/F < GF/C$

で、N/P重量比が大きいかほど窒素に比較して磷の要求度が低く、磷に乏しい湖水でも増殖が可能であると考えられる。N/P重量比が増殖する植物プランクトンの優先種を決定する大きな要因の1つであることが示唆されることから、N/P重量比と出現する植物プランクトン種との関係について検討がされてよいものと思われる。

次に、20mで粒子態磷が著しく高い要因として以下のことが考えられる。湖水中の磷の消長、循環は生物活動に起因するものもほかに、溶存酸素量に乏しい深水域で

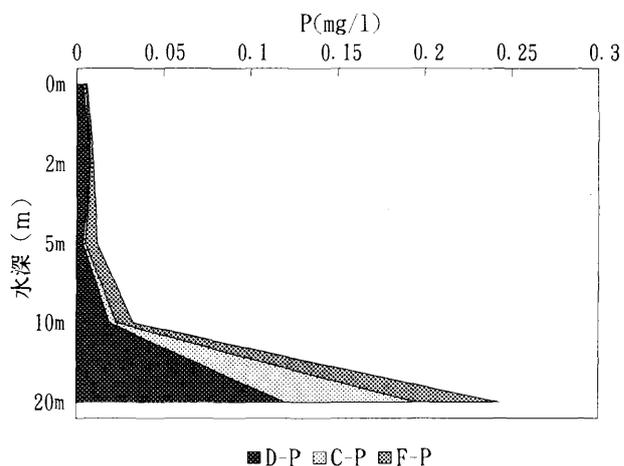


図9 a 粒径別磷の鉛直分布 (7月13日)

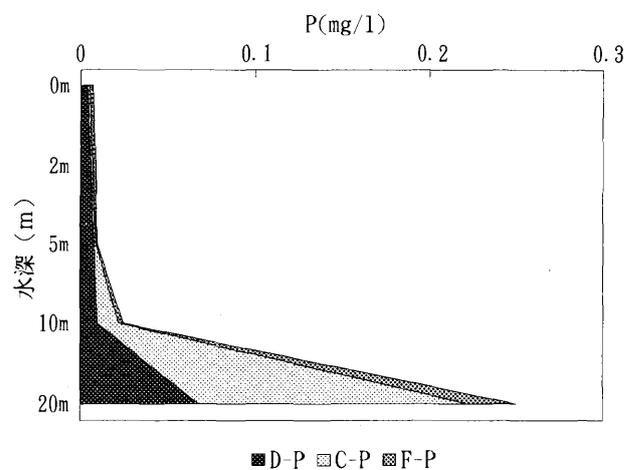


図9 b 粒径別磷の鉛直分布 (9月19日)

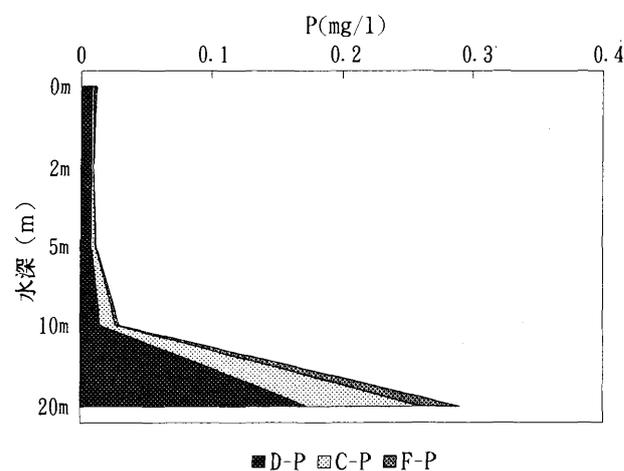


図9 c 粒径別磷の鉛直分布 (10月27日)

の底泥-間隙水-湖水を巡る磷の酸化還元反応による循環に大別される。

一般的に水深が深く、嫌気的な還元条件下にある深水域では底泥から溶出した磷と鉄は還元されて $Fe_3(PO_4)_2$ として不溶化されるが、硫酸塩還元菌により生成した

S^{2-} と $Fe_3(PO_4)_2$ が反応して、 FeS は沈殿し、 PO_4^{3-} は溶出すること⁵⁾が知られている。

表1 溶存酸素、磷及び鉛直分布

項目/水深	0-10m	20m
DO (mg/l)	3.6~12	0.8~1.2
PO4-P (mg/l)	< 0.003~0.009	0.059~0.215
P-P (mg/l)	0.006~0.033	0.243~0.291
T-Fe (mg/l)	0.02~0.05	1.1~1.2
S-Fe (mg/l)	< 0.02~0.04	0.03~0.05

注) P-P: 全粒子態磷 T-Fe: 全鉄
S-Fe: 溶解性鉄

溶存酸素量により好気的な0mから10mと嫌気的な20mに区分すると、20mでは磷酸態磷、粒子態磷及び全鉄の3者ともに増加し(表1)、更に、採水時にはいずれも強い硫化水素臭を発していたことから S^{2-} の存在していると見なすことができることから、20mでは底泥から溶出した多くの磷は上記の反応に従い、 $Fe_3(PO_4)_2$ の型で粒子態磷として捕捉されたものと考えられる。

クロロフィル-aは $6.9 \mu g/l$ ($2.2 \mu g/l \sim 15 \mu g/l$)であるが、これを粒径分画すると、

GF/F: $0.1 \mu g/l$ ($0 \sim 0.5 \mu g/l$)

GF/C: $2.6 \mu g/l$ ($0 \sim 8.6 \mu g/l$)

GF/D: $4.2 \mu g/l$ ($0.9 \sim 9.4 \mu g/l$)

で、粒子態窒素及び粒子態磷と同様な傾向にあったが、GF/Fで捕捉される微少な植物プランクトンに由来すると考えられるクロロフィル-a量が著しく少ないのが特徴であった(図10a~10c)。GF/Fで捕捉されたクロロフィル-aが粒子態窒素及び粒子態磷に比較して少ないのは、GF/Fの孔径が $0.7 \mu m$ と小さいため、微少な植物プランクトンのほかにクロロフィル-aを欠く粒径の小さい細菌類が多く捕捉されたためと考えられる。

粒径分画されたクロロフィル-aの鉛直分布をみると、夏季(7月13日)と秋季(9月19日, 10月27日)では差が認められた。夏季にはクロロフィル-aと粒子態窒素の鉛直分布は極めて類似しているが、秋季にはGF/Dにより補足された大型プランクトンに由来する粒子態窒素とクロロフィル-aの鉛直分布をみると、粒子態窒素は2mで高く、クロロフィル-aは5mで高いことから、2mでは大型の動物プランクトンが、5mでは大型の植物プランクトンの増殖が優位であることが推測されることから、プランクトン種の同定を含めた検討が必要である。

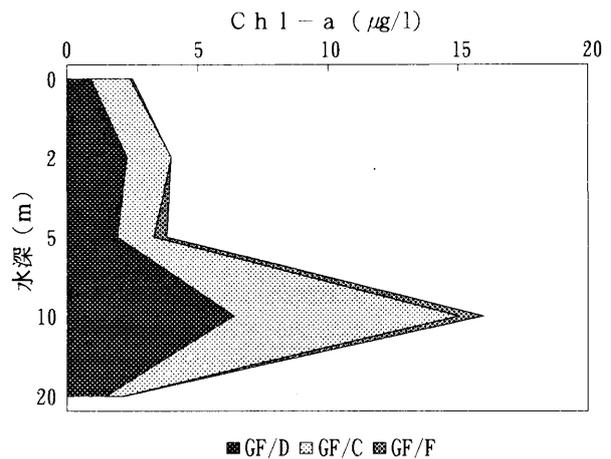


図10a 粒径別クロロフィル-aの鉛直分布(7月13日)

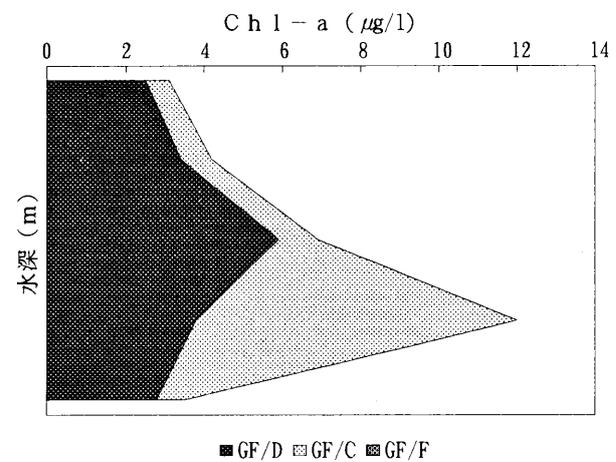


図10b 粒径別クロロフィル-aの鉛直分布(9月19日)

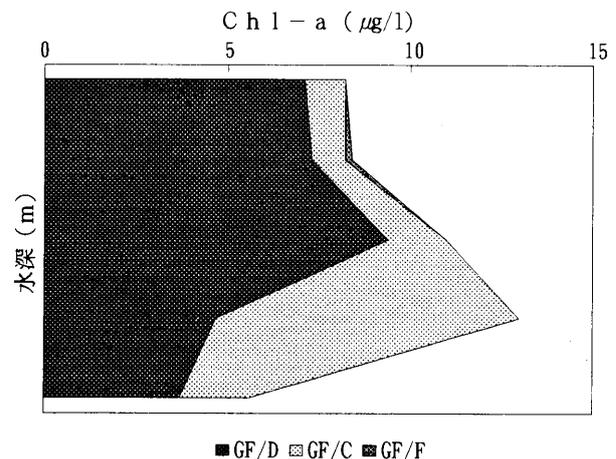


図10c 粒径別クロロフィル-aの鉛直分布(10月27日)

窒素、磷及びクロロフィル-aをGF/D, GF/C, GF/Fにより粒径分画することにより、粒子態成分の構成比をみると(表2)、GF/Dにより捕捉される大型プランクトンに起因すると考えられる粒子態成分が50%以上を占め、残りはGF/C及びGF/Fにより補足される微少な粒子態成

表2 粒子態成分の構成比 (平均：%)

項目/濾紙	GF/D	GF/C	GF/F
N	53.7	31.6	14.7
P-1	48.3	38.1	14.6
P-2	62.2	18.2	19.6
P-3	46.1	40.3	13.6
Chl-a	61.4	37.7	0.9

注) P-1 : 0m~20m P-2 : 0m~10m P-3 : 20m

分で占められることから、微少なプランクトンの影響は無視できないことが示唆される。

更に、粒子態成分が湖沼の有機物汚濁に与える影響をみるため、湖沼の代表的な有機物汚濁指標の1つであるCODを例にみると、

GF/D : 0.5mg/l

GF/C : 0.3mg/l

GF/F : 0.2mg/l

で、王池の平均COD2.7mg/lのうち、全粒子態成分によるCODの上昇は1.0mg/lで、CODの37.0%が粒子態成分に起因するが、その存在があまり注目されなかった大きさが1μm以下の微少なプランクトンに起因すると考えられるCODが半分を占められていることから、湖沼の富栄養化を考えるうえで微少な成分の影響は無視できないものと思われる。

5. ま と め

今回、津軽十二湖沼群の代表的な湖沼である王池の東湖湖沼心における窒素、磷及びクロロフィル-aを粒径分画をし、鉛直分布をみると

- (1) 水温の鉛直分布では季節変動が認められず、特異な水温構造がみられた。
- (2) 水深20mの最下層部では底泥からのアンモニア性窒素及び磷酸態磷の溶出により、窒素及び磷の増加が著しかった。
- (3) Whatman GF/D, GF/C及びGF/Fにより窒素、磷及びクロロフィル-aを粒径分画すると、3者ともに粒径が大きくなるとともに、現在量が大きいことから、大型のプランクトンに由来する粒子態成分が優位であるが、微少なプランクトンに由来すると考えられる粒子態成分も無視できないものと思われる。
- (4) 粒子態窒素と粒子態磷の鉛直分布をみると、0mから10mでは生物活動に由来し、20mでは非生物由来と考えられることから、両者の成因に差が認められた。

文 献

- 1) 一瀬 諭, 他:琵琶湖におけるピコプランクトンの異常増殖-1989~1990- (1) ピコプランクトンおよび他のプランクトン相. 滋賀県立衛生環境センター所報, 26, 138-147, 1991.
- 2) 山中 直, 他:ピコプランクトンの異常増殖に伴う水質変動(第2報)-栄養塩類の動態-. 滋賀県立衛生環境センター所報, 27, 25-32, 1992.
- 3) 吉村 信:湖沼学, 生産技術センター(昭和51年)
- 4) 小山 忠四郎:湖沼における浄化作用, 用水と廃水, 18 (4), 59-69, 1976.

表1 二又川の河川水中³H濃度

採取地点	³ H濃度 (Bq/L)
F-1	*
F-2	*
F-3	*
F-4	*
F-5	*
F-6	0.71±0.18
F-7	0.68±0.18
F-8	0.90±0.19
F-9	0.98±0.19
F-10	0.94±0.19
F-11	1.1 ±0.19

*は、検出限界以下(計数値がその計数誤差の3倍以下)を示す。

(底層水/表面水)

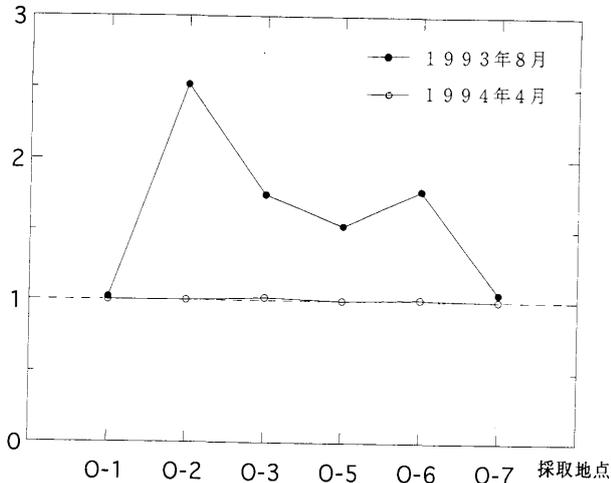


図2 尾駱沼における表面水に対する底層水の塩分の比

表2 湖沼水(尾駱沼)中³H濃度と塩分

採取地点	³ H濃度 (Bq/L)		塩分	
	表面水	底層水	表面水	底層水
0-1	0.80±0.032	0.88±0.031	10.2	10.3
0-2	0.85±0.032	0.90±0.033	10.4	10.4
0-3	0.80±0.031	0.82±0.032	10.3	10.5
0-4	0.85±0.032		10.4	
0-5	0.90±0.032	0.83±0.052	10.3	10.3
0-6	0.83±0.052	0.86±0.054	10.4	10.5
0-7	0.83±0.052	0.63±0.055	10.5	10.5
0-8	0.86±0.052		10.5	
0-9	0.76±0.052		10.9	
0-10	0.83±0.052		11.5	

検出限界以下であるが、支流では、F-6で0.71、F-11で1.1Bq/Lと高く、河口付近のF-8では0.90Bq/Lであった。この傾向は前回の調査結果と同様である。宮本ら²⁾は、この地域の河川・湖沼などの表面水は浅層と中層(フォールアウトトリチウムが浅層の2~3倍高い)の地下帯水層の地表面流出による涵養をうけていると報告している。上流の³H濃度が下流より低くなっているのは、中層地下水に対する浅層地下水の流入量の比が大きいと考えられる。この³H濃度を前回と比較すると、今回の調査結果は、上流のF-1~5では前回より若干低く、雪解け水の影響も考えられるが、河口に近いF-6~8では前回の調査とほぼ同じ値であった。

(2) 湖沼水(尾駱沼)の一般水質特性

水温、pH、塩分および溶存酸素については、前回と異なる傾向を示した。前回の調査では、各項目とも特に湖心付近で表面水と底層水に明確な違いがみられたが、今回は表面水と底層水ではほぼ同じ結果となった。この時期の尾駱沼においては、湖沼水がよく循環していることがわかる。

表2に湖沼水(尾駱沼)の塩分を示す。今回の結果は10.2~11.5であり、海水の流入は前回の8月に比較して小さい。また、採取地点による違いも今回は小さくなっている。

図2に表面水に対する底層水の塩分の比を示す。前回の8月は、湖心付近で塩分の比(底層水/表面水)が1.5~2.5であったのに対し、今回はどの地点でも約1であった。

(3) 湖沼水(尾駱沼)中³H濃度

尾駱沼における湖沼水の³H濃度を表2に示す。湖沼水の³H濃度は、表面水で0.76~0.90Bq/L、底層水で0.63~0.90Bq/Lであり、地点や深度による違いはほとんどみられなかった。これらの結果は、流入する二又川の河川水中³H濃度より若干低く、降水(1993年度平均、約0.6Bq/L)より若干高い傾向にあった。

尾駱沼における塩分と³H濃度の関係を図3に示す。これは、1993年8月の調査結果に、河口付近における二又川の河川水と沿岸海域における海水の結果を加えて作成しなおしたものに、1994年4月の調査結果を重ねたものである。海水は、環境モニタリングを実施している3地点³⁾において、1994年5月10日および10月25日に採取したもので、³Hについては電解濃縮後500分測定した結果の平均値(0.29±0.031Bq/L)、塩分についてもこの6試料の平均値(33.9)を用いた。1994年4月の結果は、塩分、³H濃度とも採取地点や深度により違いが小さいが、1993年8月の結果(河川水(二又川)および海水を含む)から得られる相関によくのっている。これらの結果から、時期とは無関係に湖沼水の塩分と³H濃度の間

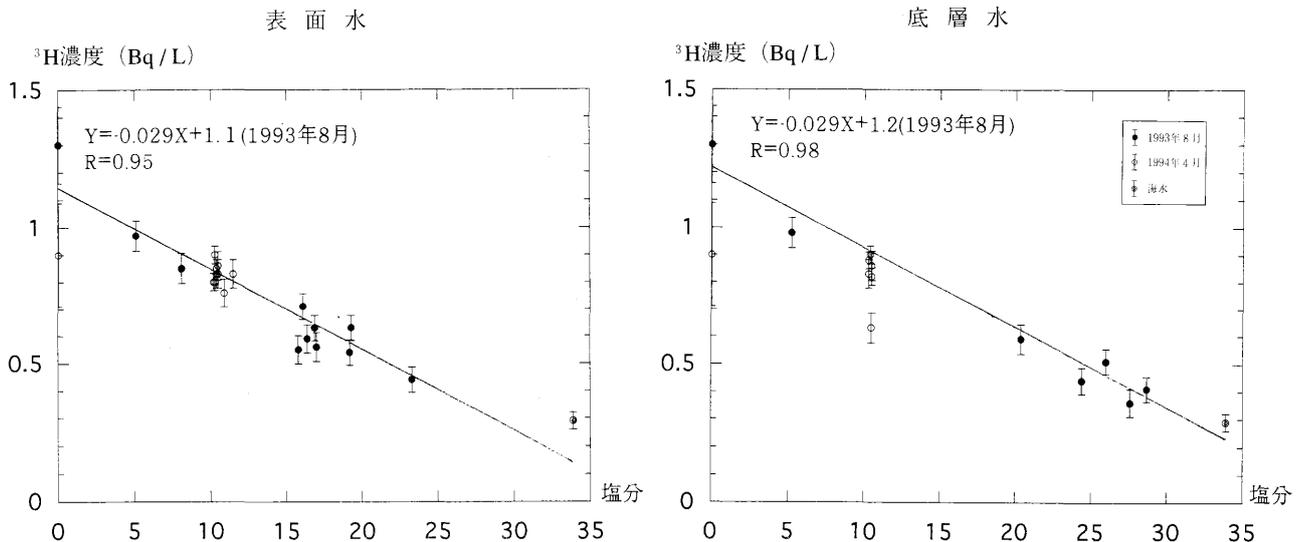


図3 尾駁沼における塩分とトリチウム濃度の関係

には一定の負の相関があり、湖沼水中³H濃度は海水の尾駁沼への流出入の変動に伴って変動するものと考えられる。また、今回の4月のように湖沼水の循環が大きい時期には、塩分や³H濃度の地点や深度による違いがほとんどみられないため、湖沼水の³H濃度等は1地点の表面水の採取により代表させることが可能である。

3・2 鷹架沼と流入河川

(1) 河川水中³H濃度

鷹架沼に流入する河川水の³H濃度を表3に示す。河川水中³H濃度は、室ノ久保川で0.81~0.98Bq/L、後川で1.1~1.3Bq/L、前川で1.2Bq/Lであった。室ノ久保川と後川の河川水中³H濃度については、前回の調査とほぼ同じ値であり、井上ら⁴⁾による1994年6月と9月の調査結果ともよく一致していることから、季節変動がほとんどないことがわかる。前川については、前回よりやや低めの値となり、雪解け水の影響も考えられる。

(2) 湖沼水（鷹架沼）の一般水質特性

水温および塩分については、各地点とも表面水と底層

水でほぼ同じ結果であり、前回と同じ傾向を示した。

(3) 湖沼水（鷹架沼）中³H濃度

鷹架沼における湖沼水中³H濃度を表4に示す。湖沼水の³H濃度は、表面水で0.78~1.5Bq/L、底層水で0.65~1.2Bq/Lであり、降水より若干高い傾向にあった。これらの結果は前回の結果とほぼ一致しており、流入する河川水とほぼ同じレベルであった。

4. ま と め

河川水の³H濃度は、いくつかの地点で前回より低い値となったが、全体的には雪解け水による濃度低下はほとんど認められなかった。また、前報⁴⁾および井上ら⁶⁾の調査結果から、湖沼へ流入する地点における河川水中³H濃度は、降水より高く、季節変動がほとんどないものと思われる。

尾駁沼における湖沼水中³H濃度および塩分は、前回

表3 鷹架沼周辺の河川水中³H濃度

採取地点		³ H濃度 (Bq/L)
室ノ久保川	R-2	0.98±0.21
	R-3	0.81±0.21
後川	R-4	1.1±0.21
	R-5	1.1±0.22
	R-6	1.1±0.22
	R-8	1.3±0.22
前川	R-7	1.2±0.22

表4 湖沼水（鷹架沼）中³H濃度

採取地点	³ H濃度 (Bq/L)	
	表面水	底層水
T-1	0.88±0.18	
T-2	0.87±0.18	
T-3	1.0±0.19	0.66±0.18
T-4	0.78±0.19	0.65±0.19
T-5	1.4±0.19	1.2±0.19
T-6	0.95±0.18	0.65±0.18
T-7	1.1±0.19	1.2±0.18
T-8	1.3±0.18	
T-9	1.5±0.18	

の1993年8月と比較して、採取地点や深度による違いが小さく、湖沼水がよく循環していることがわかる。また、尾駮沼の湖沼水の ^3H 濃度と塩分の関係をみると、前回の8月と今回の4月の結果が同じ相関にのってきていることから、湖沼水中 ^3H 濃度は塩分から推定できる可能性がある。そのためには、尾駮沼に流入する二又川の河川水や海水の ^3H 濃度等の季節変動をさらに細かく把握する必要がある。

鷹架沼の湖沼水中 ^3H 濃度は、前回の1993年9月とほぼ同じ結果であった。今回と前報¹⁾の調査結果から、鷹架沼の湖沼水中 ^3H 濃度は、季節とは無関係に降水より高く、流入する河川水とほぼ同じレベルであると思われる。

次回は、尾駮沼における ^3H 濃度等の季節変動をより詳細に把握するために、4月～11月に調査を実施する予定である。

文 献

- 1) 外崎久美子, 他: 六ヶ所村における陸水中トリチウム濃度調査 (I), 青森県環境保健センター研究報告, 5, 45-50, 1994.
- 2) 宮本霧子, 他: 青森県六ヶ所村における陸水圏の水循環, 日本放射線影響学会第38回大会講演要旨集, 321, 1995.
- 3) 青森県: 原子燃料サイクル施設に係る環境放射線等モニタリング構想, 基本計画及び実施要領 (平成7年6月改訂)
- 4) 放射線医学総合研究所: 放射能調査研究報告書 (平成4年度), 55-64, 1993.
- 5) 放射線医学総合研究所: 放射能調査研究報告書 (平成5年度), 60-65, 1994.
- 6) 放射線医学総合研究所: 放射能調査研究報告書 (平成6年度), 43-49, 1995.

表1 平成6年度フッ化物測定結果

測定地点	F ⁻ (μg/100cm ³ /日)												平均値	最大値	最小値	
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月				
市庁	0.1	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1	
機械金属	0.2	<0.1	<0.1	0.3	0.2	0.3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.3	<0.1
旭ヶ丘小	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1
農協	<0.1	<0.1	0.2	0.1	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	<0.1
第二千葉幼	<0.1	<0.1	0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1
第二魚市場	0.4	0.2	0.1	0.2	0.2	<0.1	0.2	<0.1	0.2	<0.1	0.5	0.1	0.2	0.5	<0.1	<0.1
鮫小	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1
二中	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1
衛生センター	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	0.2	<0.1	0.1	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	<0.1
丸万中田	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1
桔梗野小	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
東部処理場	1.2	0.8	0.6	0.6	0.6	1.8	0.8	0.7	0.7	0.5	1.3	0.6	0.9	1.8	0.5	0.5

(統計数理研究所/高木廣文) を使用し行った。なお、定量下限値の0.1μg/100cm³/日未満のデータは、0.05μg/100cm³/日として処理した。

3. 結果と考察

3.1 年平均値の経年変化

八戸市内のフッ化物濃度の年平均値は、図2のとおり減少傾向にある。

平成6年度の測定結果(表1)では定量下限値の0.1μg/100cm³/日未満のデータが72%と多く、東部処理場、第二魚市場及び機械金属以外は平均値が0.1μg/100cm³/日未満であった。特に濃度が高い東部処理場を除く平成6年度の年平均値は定量下限値未満の0.08μg/100cm³/日だった。

昭和60~62年度までの急減は、昭和60年度におけるA工場のフッ化物排出改善対策、昭和60年度からの磷鉱石使用量の減少及び昭和62年秋フッ化物発生施設廃止による使用停止が原因と思われる。

その後の減少は、図3から原料転換に伴う磷酸副生物の使用減が大きいのと思われる。

また、蛍石の原料使用量の影響が小さいのは、湿式処理装置等の低減効果が大きいのと思われる。

3.2 各測定地点の類似性

10年間の測定データの基礎統計の箱ヒゲ図(図4)から、フッ化物の発生源となりうる鉄鋼業、窯業・土石製品製造業等に近い東部処理場及び第二魚市場が他の測定地点に比べ特に値が高かった。

さらに、共分散行列を用いた10年間のデータによる主成分分析(図5)から、東部処理場、第二魚市場、その他の測定地点の3グループに分けられ、主に寄与率70%と高い第1主成分のフッ化物の測定値の高低が寄与していると考えられる。

3.3 測定地点の見直し

中道らによると、フッ化物等濃度分布図において、高濃度範囲が発生源近傍に年々縮小され、フッ化物と風

向との相関では、第二魚市場の西側で、W系の風向と、東側でE系の風向と正の相関があったとの報告があり、さらに3・1及び3・2の結果を踏まえ、平成7年度から農協、第二千葉幼、鮫小、二中、丸万中田及び桔梗野小を削減し、測定地点を発生源近傍四方位及びバックグラウンドの郊外に配置することとした。

4. まとめ

(1) 八戸市内12地点の昭和60年度から平成6年度までの10年間のアルカリろ紙法によるフッ化物濃度年平均値の経年変化は、減少傾向にある。

原因は、フッ化物排出改善対策、磷鉱石の使用量の減少及び原料転換に伴う磷酸副生物の使用減が大きいのと思われる。

(2) 平成6年度の測定結果では定量下限値の0.1μg/100cm³/日未満のデータが72%と多く、東部処理場、第二

[箱ヒゲ図作成のための5数要約値など]

変数名	標本	最小値	第1四分位	中央値	第3四分位	最大値	四分位偏差
市庁	115	0.05	0.050	0.10	0.200	0.80	0.075
機械金属	117	0.05	0.050	0.20	0.400	2.10	0.175
旭ヶ丘小	110	0.05	0.050	0.05	0.100	0.50	0.025
農協	110	0.05	0.050	0.10	0.300	2.40	0.125
第二千葉幼	115	0.05	0.050	0.10	0.300	1.20	0.125
第二魚市場	108	0.05	0.300	0.65	1.200	2.90	0.450
鮫小	120	0.05	0.050	0.10	0.200	0.50	0.075
二中	114	0.05	0.050	0.05	0.200	1.80	0.075
衛生センター	117	0.05	0.050	0.10	0.200	1.30	0.075
丸万中田	113	0.05	0.050	0.10	0.300	0.60	0.125
桔梗野小	118	0.05	0.050	0.05	0.100	3.60	0.025
東部処理場	73	0.20	0.800	1.30	2.200	4.60	0.700

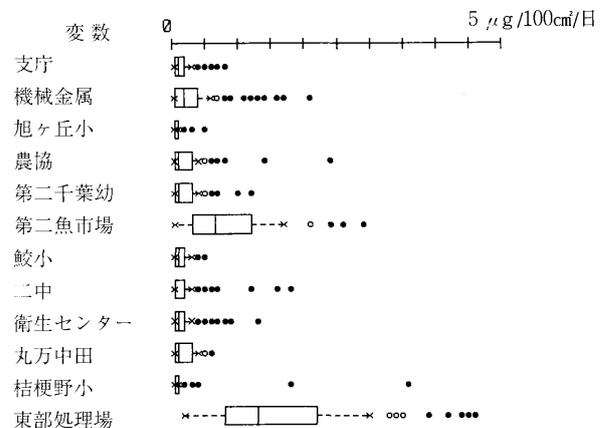


図4 10年間の測定結果の箱ヒゲ図

魚市場及び機械金属以外は平均値が $0.1 \mu\text{g} / 100\text{cm}^3$ /日未満であった。

(3) 10年間の測定データの基礎統計の箱ヒゲ図から、フッ化物の発生源に近い東部処理場及び第二魚市場が他の測定地点に比べ特に値が高かった。

(4) 共分散行列を用いた主成分分析から、東部処理場、第二魚市場、その他の測定地点の3グループに分けられ、主にフッ化物の測定値の高低が寄与していると考えられた。

(5) 平成7年度から(1)~(4)の結果に基づき、6地点を削減し、測定地点を発生源近傍四方位及びバックグラウンドの郊外に配置した。

謝 辞

本調査にご協力いただいた八戸市環境保全課及び測定地点の方々に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 中道 敬, 他: アルカリろ紙法による八戸市の環境大気評価, 青森県環境保健センター研究報告, 5, 85-89, 1991.
- 2) 鈴木寿秋, 他: 八戸市における環境大気中のフッ化物濃度, 青森県公害センター所報, 7, 82-86, 1985.

【主成分分析：主成分負荷量】（分散・共分散による）

変数名	成分 1	成分 2
1) 市庁	4.65048D-02	8.97032D-02
2) 機械金属	1.12384D-01	2.15669D-01
3) 旭ヶ丘小	2.89558D-02	2.49062D-02
4) 農協	9.94614D-02	1.41376D-01
5) 第二千葉幼	7.19203D-02	1.11911D-01
6) 第二魚市場	3.50539D-01	9.10453D-01
7) 鮫小	5.39522D-02	1.30594D-02
8) 二中	6.40956D-02	1.65097D-01
9) 衛生センター	4.08412D-02	3.54978D-02
10) 九万中田	6.50131D-02	7.16952D-02
11) 桔梗野小	7.62519D-02	9.09880D-03
12) 東部処理場	2.01268D+00	-1.93017D-01
固有値	4.22318D+00	9.87781D-01
累積固有権	4.22318D+00	5.21096D+00
寄与率 (%)	69.648	16.290
累積寄与率 (%)	69.648	85.938
カイ2乗値	1182.205	585.375
(自由度)	(77)	(65)
有意確率	0.00000	0.00000

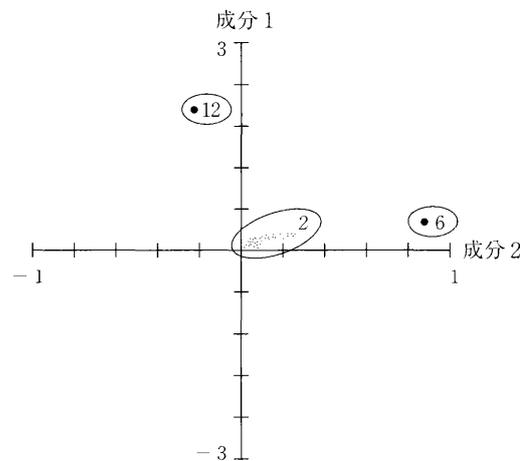


図5 主成分分析（10年間）

Ⅲ 他誌投稿抄録

他誌投稿抄録

c-Jun expression in single cells and preneoplastic foci induced by diethylnitrosamine: Comparison with the expression of pi class glutathione S-transferase. H.Nakano¹, I.Hatayama, K.Satoh¹, S.Suzuki¹, K.Sato¹, and S.Tsuchida¹. *Carcinogenesis*, 15: 1853-1857,1994.

Diethylnitrosamine で誘発したマウス肝前癌病巣は、Glutathione S-transferase II (GST-II) が雄で陰性、雌で陽性となるが、癌遺伝子産物 c-Jun は雌雄の病巣で陽性となることが免疫組織化学的に明らかにされた。c-Jun は、マウス肝前癌病巣のマーカーとして活用されている GST-II に比べて、より優れていることが判明した。

1: 弘前大学医学部第2生化学

Neuronal degradation in the brain of brindled mice: Combined histochemical and biochemical studies on cytochrome oxidase and superoxide dismutase activities. N.Yoshimura¹, I.Hatayama, K.Sato², K.Kida³, and S.Usutami³. *Neuropathol.*, 14: 81-90,1994.

Brindled mouse (BM) は、銅代謝に関連した遺伝子に異常をもつマウスで、ヒトの Menkes 病のモデル動物として利用されている。生後10日のBM脳の cytochrome oxidase と superoxide dismutase 活性は、正常の30%と50%であり、生後2週で全動物が死亡する。しかし、生後1週で CuCl₂ 1回投与により上記酵素の活性は漸増し、6ヶ月後には正常レベルとなり死亡することはなかった。それらの酵素活性は組織化学的結果と一致した。

1: 弘前大学医学部第2病理学
2: 弘前大学医学部第2生化学
3: 弘前大学医学部公衆衛生学

雌雄マウス肝前癌病巣における核内癌遺伝子産物および glutathione S-transferase II (GST-II) 発現の免疫組織化学的検討. 中野 創¹, 畑山一郎, 鈴木伸作¹, 佐藤公彦¹, 腫瘍マーカー研究会誌, 14: 113-115,1994.

GST-II は雄マウスの肝前癌病巣で陰性、雌マウスで陽性となるのに対し、c-Jun は雌雄共に陽性となることから、マウス肝化学発癌機構解析のための優れた指標蛋白であることが判明した。

1: 弘前大学医学部第2生化学

タイ旅行者からの *Vibrio cholerae* O139 分離 大友良光, 豊川安延, 長利徳興¹: 病原微生物検出情報月報. 15(4), 4-5, 1994.

(要旨省略: 本文参照)

1: 黒石保健所

青森県弘前地区における *Yersinia enterocolitica* O:8 感染症 (1984-1991) 齋藤雅明¹, 山口美佳子¹, 豊川安延, 大友良光, 金子誠二², 丸山 務³: 感染症学雑誌, 68(8), 960-965, 1994.

1984年1月から1991年12月にかけて、青森県弘前地区の開業医を受診した患者より分離された *Yersinia enterocolitica* 保存118株の細菌学的検査を行い、11例の血清型 O:8 菌による感染症が確認された。分離された11菌株のうち9菌株は糞便から、2菌株は虫垂内容物から分離された。分離菌株はすべて Wauters の生物型が1型で、42メガダルトンの病原性プラスミドを保有し、自己凝集性とカルシウム依存性が陽性であった。患者は45才の1例を除いてすべて15才以下であった。患者7人は山間部、3人は都市部、1人は平野部に居住していた。感染源はすべての事例で不明であった。

1: 弘前市医師会立成人病検診センター
2: 東京都立衛生研究所 乳肉衛生研究科
3: 国立公衆衛生院 衛生獣医学部

わが国初の *Salmonella* Enteritidis ファージ型13a 菌による集団食中毒 大友良光, 野呂キョウ, 佐藤真理子¹, 伊東とし子¹, 深尾隆史¹: 病原微生物検出情報月報, 16(1), 3, 1995.

1994年9月2日、弘前保健所管内の保育園で昼食を摂取した73名(職員11名, 園児62名)中15名(発病率20.5%)が平均6回の下痢(100%), 38-39℃の発熱(93%), 腹痛(27%)をともなって発病した。当初、食中毒ではなく風邪や自家中毒と診断されていたが、園児のうち患者15名全員、有症者9名中4名、無発症者39名中23名、並びに職員のうち無発症者10名中4名便から *Salmonella* Enteritidis (SE) が分離された。分離43株のファージ型は全て13a型であった。分離株は数十メガダルトンのプラスミドを保有し、薬剤感受性試験では用いた8種類の薬剤にすべて高い感受性を示した。昼食のシェウマイ、ジュガイモのベーコン炒め、メロンから SE が分離されたが感染源は不明であった。

1: 弘前保健所

Yersinia enterocolitica 血清型O:8菌による感染症の
予防に関する研究 大友良光, 三上稔之, 畑山一郎,
佐藤允武: 腫大生命厚生事業団第20回(平成5年度)
「医学研究助成」報告集, 12-13, 1995.

Yersinia enterocolitica 血清型O:8菌の感染源を追及
し, 本菌感染症の予防に資する目的で, 患者の発症状況
を調査する一方, 市販食肉, 野性小型動物, 環境水, 土
壌の保菌調査を行った。感染者は1987年10月から1994年
9月までに, 7月をピークとする夏期に津軽地区の山間
部を中心に40名が確認された。その多くは15才以上の子
供で, 主症状は39℃前後の発熱, 腹痛, 下痢, 嘔吐で,
白血球増加, CRP上昇, 赤沈の亢進が見られた。分離菌
株はすべてWautersの生物型1型で, 2株以外は病原性
の性状を示した。1992年と1993年に3回にわたって捕獲
したノネズミ等204匹(4.9%)から本菌が分離されると
ともに, 6月と7月の環境水それぞれ1検体からの本菌
が分離されたため, 感染源の一つにノネズミが挙げられ,
その感染ルートに環境水が関与することが示唆された。

氷核細菌の分離と同定 関康秀¹, 関幸子², 佐藤幸三
郎², 大友良光, 篠島健二³: 青森大学・青森短期大学研
究紀要, 17, 53-62, 1995.

青森市八甲田山で早霜の付いた植物の葉から*Pseudomonas
fluorescens* 1株, *P. chlororaphis* 3株, *Bacillus cereus* 1
株, *Enterobacter agglomerans* 1株を分離し Vali の小滴
凍結法により氷核活性を測定した結果, いずれの菌株も
氷核活性を示すことが明らかとなった。このうち, *P.
chlororaphis*, *B. cereus*, *E. agglomerans* における報告例は
今回が初めてである。また, *P. fluorescens* はもっとも高
い値を示し, -5℃以上で氷晶核となるclass Aと判定
された。

1: 青森大学社会学部

2: 青森大学工学部

3: 東北電力(株)応用技術研究所

氷核菌の研究 1. 氷核菌の検索と *Pseudomonas fluorescens*
AOMORI-1の活性化条件 関幸子¹, 佐藤幸三郎¹,
関康秀², 大友良光: 青森大学雪国環境研究, 1, 23-
32, 1995.

Pseudomonas fluorescens AOMORI-1株の培養ろ液
について氷核活性測定時のpHの影響と培養後の温度条
件について調べたところ, 至適pHは6.2であること, 培
養後の活性測定前に6℃の低温状態に置くことで活性が
高まること, さらに, 菌体そのものに氷核活性のある
ことが判明した。

1: 青森大学工学部

2: 青森大学社会学部

小川原湖湖心部における水質の鉛直分布 工藤精一
澤山修悦 柞木田むつみ 対馬和浩 奈良忠明 中村哲
夫 西館 篤: 全国公害研会誌, 19(3), 2-7, 1994.

1989年の春期から冬期にかけ小川原湖湖心部の水質の
鉛直分布調査を実施した。

その結果, 夏期には18m層以深, 冬期には21m層以深
で貧酸素水塊の存在が確認された。水温は, 夏期に表層
から深水層にかけ2つの躍層が形成され緩やかな水温の
低下がみられたのに対し, 冬期は下層にかけ明瞭な躍層
が形成されていた。塩素イオン, 硫酸イオン, 硫化物イ
オンは, 夏期及び冬期とも下層で急増がみられた。また,
栄養塩類のアンモニア性窒素, リン酸性リンや溶存態鉄,
溶存態マンガンの下層での急増もみられ, 底泥からの溶
出が考えられた。

IV 学会等発表抄録

学会発表抄録

ホタテ煮汁中の抗腫瘍多糖 (第3報) - 抗腫瘍活性の差
違 内沢秀光¹, 高谷芳明¹, 市田淳治¹, 一戸秀隆¹,
佐々木基一², 石田邦夫², 三浦啓徳, 木村淳子, 畑山一
郎, 松江 一¹: 第67回日本生化学会, 大阪市, 1994. 9.
7-10

ホタテ貝煮汁より得られたアクチナーゼE処理グリコ
ーゲンは、マウス腹腔内移植した Meth A腫瘍細胞に対
して強い抗腫瘍活性を示す一方、カキ由来のグリコーゲ
ンには活性は認められなかった。また、ホタテグリコー
ゲンは、diethylnitrosamineによるマウス肝化学発癌にお
いてアデノーマの発生を著明に抑制した。グリコーゲ
ンの TCA 処理により活性が消失することから、多くの分
岐鎖を有するグリコーゲンが抗腫瘍活性を発現するもの
と考えられた。

1: 青森県産業技術開発センター

クラスPiグルタチオンS-トランスフェラーゼの表皮特
異的発現機構 中野 創¹, 柿崎育子¹, 玉井克人²,
鈴木伸作¹, 畑山一郎¹, 佐藤公彦¹, 今川正良¹, 土田成
紀¹: 第67回日本生化学会, 大阪市, 1994. 9. 7-10

ラットの肝前癌マーカーである GST-P の遺伝子の
2.5kb 上流にはエンハンサー GPE1 が、また 100~400b 上
流にはサレンサーが確認されている。しかし、正常ラッ
ト表皮由来 FRSK 細胞に種々の長さの GST-P 遺伝子調節
領域を連結した CAT 遺伝子を導入して転写活性を調べ
たところ、GPE1 の有無にかかわらず CAT 活性には影響
なかったことから、表皮細胞では GPE1 は GST-P の構
造的発現に関与している cis 配列ではないと考えられる。

1: 弘前大学医学部第2生化学

2: 弘前大学医学部皮膚科

3: 大阪大学薬学部代謝

増殖変異株細胞 FM 3 A-M 2 の樹立とその性状 村上修
¹, 畑山一郎, 草野敬久²: 第67回日本生化学会, 大阪市,
1994. 9. 7-10

細胞増殖とエネルギー代謝の関連を明らかにするた
め、解糖系の遺伝子に変異を生じた細胞を樹立し、その
性状を調べた。FM 3 A 細胞を突然変異誘起物質 MNG
で処理することにより得られた増殖抑制株 FM 3 A-M 2
は、2-および3-ホスホグリセリンの酸の培地への添加
では増殖しなかったが、ホスホエノールピルビン酸添加
で野生株と同程度の増殖を示した。この結果から、FM

3 A-M 2 はエノラーゼ遺伝子に、あるいはエノラーゼ
遺伝子の発現に関わる経路に変異の生じた細胞であるこ
とが判明した。

1: 弘前大学教育学部生物

2: 広島女子大学家政

グリコゲンのマウス肝化学発癌に対する抑制効果 三
浦啓徳, 内沢秀光¹, 高谷芳明¹, 一戸秀隆¹, 松江 一¹,
中野 創², 佐藤公彦², 土田成紀², 畑山一郎: 第53回
日本癌学会, 名古屋市, 1994. 10. 19-21

Diethylnitrosamine によるマウス肝化学発癌系にホタテ
貝の Actinase E 処理グリコーゲンを投与することで、免疫
組織化学的に肝前癌病巣であることが証明されている
Glutathione S-transferase (GST-II) 変異巢および癌遺伝
子産物 c-Jun 陽性巢の数、占有面積は、雌雄マウスで激
減した。このことは、Actinase E 処理ホタテ貝グリコー
ゲンには原発性肝癌発生に対する抑制効果のあることを示
す。

1: 青森県産業技術開発センター

2: 弘前大学医学部第2生化学

3453'-4'-pentachlorinated biphenyl によるマウス肝実
質細胞における glutathione S-transferase II の誘導:
C57BL 系と DBA 系の比較 青木康展¹, 松本 理¹, 丹
野恵一¹, 畑山一郎: 第20回環境トキシコロジーシンポ
ジウム, 東京, 1994. 9. 21-22

C57BL と DBA マウス肝初代培養細胞を用いて PenCB
の Glutathione S-transferase II (GST-II) 誘導能に関して
検討した。Ah 受容体 (AhR) を有する C57BL では、
cytochrome P-450 IAI mRNA は PenCB で著明に誘導さ
れたが、AhR 欠損の DBA では弱い誘導を示した。しか
し、GST-II は逆に DBA で強く誘導される事から、PenCB
による GST-II の発現誘導は、AhR とは異なる経路で生
ずるものと考えられる。

1: 国立環境研究所

PCR 法と培養法による野ネズミおよびブタからの病原
性エルシニア属菌の検出 金子誠二, 石崎直人, 伊藤
武, 小久保彌太郎, 大友良光, 豊川安延: 第117回日本
獣医学会, 東京都, 1994, 4, 1-4.

野ネズミ46匹, ブタ盲腸内容物63検体及びブタ糞便8
検体を用いて PCR 法と従来の培養法により病原性エル
シニア属菌の検出を行った。その結果、培養法では野ネ
ズミ13匹, ブタ盲腸内容物6検体及びブタ糞便1検体か

ら、PCR法ではそれぞれ39匹、24検体、8検体からエルシニア属菌が分離され、PCR法が培養法で分離されない病原性エルシニア属菌の検出に有用であることが判明した。

1：東京都立衛生研究所乳肉衛生研究科

Yersinia enterocolitica O8 感染症が連続する青森県津軽地方の疫学調査 林谷秀樹¹、大友良光、豊川安延、齋藤雅明²、金子賢一¹、小管句子¹、加藤雅彦¹、小川益男¹：第117回日本獣医学会、東京都、1994、4、1-4。

(要旨省略：本誌の学会等発表抄録「Sources of sporadic human infection with *Yersinia enterocolitica* serovar O: 8 infection in Aomori prefecture, Japan.」参照)

1：東京農工大農学部獣医学科家畜衛生

2：弘前市医師会立成人病検診センター

有機物水晶核による凍結効果 佐藤幸三郎¹、関康秀²、関幸子¹、大友良光、篠島健二³：平成6年度日本雪氷学会東北支部研究発表会、青森市、1994、6、2-3。

(要旨省略：本誌の他紙投稿抄録「氷核細胞の分離と同定」参照)

1：青森大学工学部

2：青森大学社会学部

3：東北電力(株)応用技術研究所

Epidemiology of *Yersinia enterocolitica* serovar O: 8 infection in Tsugaru area in Japan. 6th international symposium on *Yersinia*, Rome (Italy), 1994, Sep. 25-28. Y. OHTOMO, Y. TOYOKAWA, M. SAITO¹, M. YAMAGUCHI¹, S. KANEKO², T. MARUYAMA³.

During the period from January 1984 to December 1994, *Y. enterocolitica* serovar O: 8 organisms were isolated from thirty sporadic cases of thirty-one patients with mainly fever, diarrhea, and abdominal pain in Tsugaru area of Aomori prefecture. Of all isolates, twenty-eight were from stool, two from appendix, and one from ulcer of hips. These strains were belonging to biovar (Wauters) 1, harboring 42 megadalton virulence plasmid, positive for autoagglutination and calcium dependency. Twenty cases occurred in summer. Twenty-nine were simple case and one (2 patients) was intrafamiliar. Seventeen patients were male, then twenty-

eight were under 15 years old and three were over a 45. One patient handled raw pork and four ate cooked pork. Most of the patients were living in the mountainous area and keeping dogs. Infectious sources were unknown, but it would be supposed that raw pork, dogs, wildlife animals, and stream water might be contaminated by pathogenic *Y. enterocolitica* serovar O: 8.

1：Adult Diseases Examination Center of Hirosaki Municipal Association

2：The Tokyo Metropolitan Research Laboratory Public Health

3：The Institute of Public Health Tokyo

Sources of sporadic human infection with *Yersinia enterocolitica* serovar O: 8 infection in Aomori prefecture, Japan. 6th international symposium on *Yersinia*, Rome (Italy), 1994, Sep. 25-28.

H. HAYASHIDANI¹, Y. OHTOMO, Y. TOYOKAWA, M. SAITO², K. KANEKO¹, J. KOSUGE¹, H. KATO¹, M. OGAWA¹, G. KAPPERUD³.

In November 1992, June and August 1993, rectal contents of 204 small wildliving animals, 50 water samples of dale stream or river and 8 soil samples were collected in Aomori prefecture and examined for the presence of the O8 bacteria to clarify the source of the infection. The results obtained were as follows: 1. The O8 bacteria were isolated from 10 (5.2%) of 193 wild-living rodents in June (9/107) and August (1/23) 1993, but not in November 1992. 2. From May to September 1993, 12 human cases were found to be infected with the O8 bacteria living in the same districts where the wild-living rodents harbouring the O8 bacteria were trapped. 3. Three different REAP patterns were observed in the strains of wild-living rodents and human cases. Two of the REAP patterns were the same between wildliving rodents and human cases. From these findings, wild-living rodents seem to play an important role as sources of human *Y. enterocolitica* O: 8 infection.

1：Tokyo University of Agriculture and Technology

2：Adult Diseases Examination Center of Hirosaki Municipal Medical Association

3：National Institute of Public Health, Oslo, Norway

***Yersinia enterocolitica* 血清型O8感染症の発生状況** 齋藤雅明¹、山口美佳子¹、月足正辰¹、鈴木咲子¹、大友

良光：第35回東臨技研究発表会，新潟市，1994，10，7－8.

(要旨省略：本誌の学会等発表抄録「Epidemiology of *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 infection in Tsugaru area in Japan.」参照)

1：弘前市医師会立成人病検診センター

微生物氷晶核の利用に関する基礎実験 佐藤幸三郎¹，関 幸子¹，関 康秀²，大友良光，篠原健二³：1994年日本雪氷学会全国大会，金沢市，1994，9，26－30.

(要旨省略：本誌の他誌投稿抄録「氷核細菌の分離と同定」参照)

1：青森大学工学部

2：青森大学社会学部

3：東北電力㈱応用技術研究所

有機物氷晶核 I (微生物による凍結効果) 佐藤幸三郎¹，関 幸子¹，関 康秀²，大友良光，篠原健二³：第11回日本雪氷学会大会，長岡市，1994，1，2－23.

(要旨省略：本誌の他紙投稿抄録「氷核細菌の分離と同定」参照)

1：青森大学工学部

2：青森大学社会学部

3：東北電力㈱応用技術研究所

青森県で分離された NAG ビブリオ O139 の性状とその毒素遺伝子解析 大友良光，野呂キョウ，畑山一郎，長利徳興¹：平成6年度青森県環境保健部職員研究発表会，青森市，1995，2，3.

(要旨省略：本文参照)

1：黒石保健所

エンテロウイルス感染・増殖に伴う apoptosis について 三上稔之 木村淳子 佐藤充武 畑山一郎：平成6年度環境保健部職員研究発表会 (第29集)，青森市，1995，2，3. アデノウイルス，ヘルペスウイルス，エイズウイルスなどの感染増殖によってアポト-シスの生ずることが報告された。そこで今回，他のウイルス，特に無菌性髄膜炎や手足口病等の病因ウイルスであるエンテロウイルスの感染増殖によるアポト-シスについて検討した。結果，E9に加えてエンテロウイルス群のポリオウイルス III，エンテロウイルス71，CoxB5，CoxA10と16，さらにHSV-1の感染増殖に伴うアポト-シスと共に強弱の差は

あるが，いずれの場合にもアポト-シスが確認された。

Buthionine sulfoximine によるエンテロウイルスの増殖抑制. 三上稔之 木村淳子 佐藤充武 畑山一郎：第35回日本臨床ウイルス学会，大阪府，1994，6，9.

細胞内レドックス状態の調節によりウイルスの増殖を制御可能と考え，生体内還元剤グルタチオン (GSH) の合成を阻害することでGSHレベルの低下をもたらし，細胞内を酸化状態にする化合物 Buthionine sulfoximine (BSO) のエンテロウイルスの増殖に及ぼす効果を調べた。結果，対照ではウイルス感染4日目にCPEは完全に抑制され，未感染細胞同様の細胞形態を示した。

アセトン固定感染細胞からのPCRによるHIV遺伝子の検出 三上稔之 畑山一郎 木村淳子 大友良光 佐藤充武 西舘 篤：青森県感染症研究会，弘前市，1994，8，6.

(要旨省略：PCR法によるHIV遺伝子の検出，第21回青森県臨床衛生検査学会，青森市，1994，5，2)

IFA用スライドガラスに乾燥，アセトン固定してある微量のHIV-1感染細胞からDNAを抽出しNested PCR (2段階PCR) 法を用いてHIV-1遺伝子の検出を試みた。その結果はHIV-1を鋳型にした場合は，少なくとも10ヶで検出可能であった。またDNA1ヶでは数回に1回の割合で検出された。感染細胞から抽出し，増幅したDNAは陽性コントロールと同じ位置にバンドを確認した。サイズマーカーを基に計測した結果，このバンドは142bp (塩基対) であり目的のサイズと一致した。

津軽地域の温泉群の泉質経年変化について 坂崎俊爾 村上淳子 今井美代子 高橋政教 平出博昭：平成6年度環境保健部職員研究発表会，青森市，1995，2，3.

温泉の適正利用及び泉源保護の目的で，津軽30ヶ所の源泉について泉質経年変化調査を実施した。その結果5ヶ所の源泉において療養泉泉質の経年変化が認められた。温泉の医学的治療は泉質によって異なるため，泉質が変化している場合，時として身体に重要な悪影響を与えることもある。従って，これら源泉については早急に再調査の必要がある。一方，温泉所有者に対しては，温泉はその複雑な湧出機構等により泉質は変化する可能性があることを認識させ，10年ごとに再分析することが望ましいことを啓蒙する必要がある。

名久井岳における酸性雨と沢水の調査 工藤隆治 野田正志 工藤精一 中村哲夫：第35回大気汚染学会，盛岡市，1994，11，16. 第20回北海道・東北ブロック公害研究連絡会議，新潟県，1994，10，19.

名久井岳中腹において降水と沢水の調査を行った結果，降水は，降雪季にpHが低くなる傾向があった。また沢水は，春先において硝酸イオン濃度の増加が確認されたが，pHの低下はみられなかった。

降水の影響は，直には沢水に反映されておらず，また沢水の総アルカリ度は40度(0.8meq/l)と高いことから，当沢水が酸性化する恐れはほとんどないと考えられた。

八戸市における大気中のメタン濃度 工藤精一 工藤志保 工藤隆治 中村哲夫：第35回大気汚染学会，盛岡市，1994，11，16.

地球温暖化ガスの一つであるメタンについて，八戸市における大気汚染常時監視データを用い濃度変化の解析を行った。

その結果，八戸市内3局のメタン濃度は1986年度から1992年度までの7年間に年約1%の割合で上昇していた。また，箱ひげ表示による解析を行ったところ，八戸第二魚市場局の経月変化の中央値は7月に最小値を，10月に最大値を示し，濃度変化は夏期から秋期にかけ大きい傾向を示した。さらに，夏期の日変化では，夜間から早朝にかけて濃度変動が大きく中央値は高いが，日中には濃度変動が小さくなるとともに中央値も低くなる傾向がみられた。この要因として，夏期に増加するOHラジカルとの反応による広域的なメタンの削減の影響が大きいと考えられる。

八戸市における環境大気中有機塩素化合物濃度 岡典子 工藤精一 中村哲夫：第35回大気汚染学会，盛岡市，1994，11，16.

(要旨省略：第21回環境保全・公害防止研究発表会，大阪市，1994，11，15.)

八戸市内の代表的な5地点において，拡散型簡易サンプラーを用い大気中有機塩素化合物の1ヶ月平均濃度の実態調査を1994年2月と6月に実施した。

その結果，1,1,1-トリクロロエタンと四塩化炭素については地域及び時期によらず同程度の汚染状況であった。トリクロロエチレンとテトラクロロエチレンについては，6月は2月に比べ全域で増加しており，工専地域では約4~20倍のレベルであった。

道路沿道における窒素酸化物—NO, NO₂同時測定用サンプラーを用いて— 岡典子 三上浩二 工藤精一：平成6年度環境保健部職員研究発表会，青森市，1995，2，3.

平成5年度の夏季及び冬季に，NO, NO₂同時測定用サンプラーを用いて，大気汚染自動測定機が設置されていない交通量の多い十和田市及び三沢市の3地点で窒素酸化物濃度(NO, NO₂)の実態調査を行った。3地点の窒素酸化物濃度は，道路の風下方向となる冬季に夏季よりも高かったが，県内唯一の自動車排出ガス測定局である八戸市六日町局の平成5年度の濃度より低いレベルであった。

正月中における八戸市の大気汚染状況 坂上素一 秋田谷礼治 工藤隆治 坂本正昭：平成6年度環境保健部職員研究発表会，青森市，1995，2，3.

八戸市の大気汚染物質バックグラウンド濃度を把握するため，八戸市庁局，第二魚市場局，八戸保健所局の昭和53年度及び平成4年度の正月中におけるSO₂, NO_x, SPM濃度について検討した。その結果，八戸保健所局は工場発生源の影響が最も少ないと考えられ，その元日の大気汚染物質濃度日平均値SO₂0.002ppm, NO_x0.016ppm, SPM0.014mg/m³が八戸市のバックグラウンド濃度と推測された。

青森県南地域河川の水質評価 神正志 早狩敏男 小山田久美子 柴田幸伸 工藤精一：平成6年度環境保健部職員研究発表会，青森市，1995，2，3.

青森県南地域の馬淵川，奥入瀬川について，BOD等の水質測定結果を用い統計的解析を行い，水質の総合特性と類似性について検討した。両川ともBOD, SSは概ね環境基準値を達成しているが，大腸菌群数は基準値を超えていた。主成分分析の結果では，馬淵川水系では上流域と下流域及び，支川の浅水川の3グループに分けられ，上流域で下流域より汚濁度が高く，浅水川で汚濁度が最も高くなっていた。また，奥入瀬川では河口付近と上流域のグループに分けられ，河口付近で汚濁度が高くなっていた。

グリコゲンのマウス肝化学発癌に対する抑制効果 三浦啓徳，内村秀光¹，高谷芳明¹，一戸秀隆¹，松江一¹，中野創²，佐藤公彦²，土田成紀²，畑山一郎：第53回日本癌学会，名古屋市，1994，10，19-21.

Diethylnitrosamineによるマウス肝化学発癌系にホタテ

貝の Actinase E 処理グリコゲンを投与することで、免疫組織化学的に肝前癌病巣であることが証明されている Glutathione S-transferase (GST-II) 変異巣および癌遺伝子産物 c-Jun 陽性巣の数、占有面積は、雌雄マウスで激域した。このことは、Actinase E 処理ホタテ貝グリコゲンには原発性肝癌発生に対する抑制効果のあることを示す。

- 1：青森県産業技術開発センター
- 2：弘前大学医学部第2生化学

ホタテ貝由来グリコーゲンのマウス肝化学発癌抑制効果
三浦啓徳 木村淳子 内沢秀光¹、高谷芳明¹、松江 一¹、
一戸秀隆²、高橋政教、畑山一郎：平成6年度青森環境
保健部職員研究発表会、青森市、1995, 2, 3.

(要旨省略：第53回日本癌学会抄録参照)

- 1：青森県産業技術開発センター
- 2：青森ともや

編集委員

石塚 伸一 大久保英樹 伊藤 博
大友 良光 小山田久美子 木村 淳子
竹ヶ原 仁

青森県環境保健センター研究報告

(平成七年度)

平成8年1月発行

編集発行 〒030 青森市東造道1-1-1
TEL 0177-(36)5411
青森県環境保健センター
所長 内山日出夫
印刷 〒038 青森市石江字三好120の20
(有) こがわ印刷
TEL 0177-(66)2345(代)

(環境保護の為、再生紙を使用しています。)