

## Distribution and Variation of the Air Temperature from 1990 through 2003 in Urban Areas of Hyogo Prefecture from the aspect of Heat Island Phenomenon

Masahide AIKAWA<sup>1\*</sup>, Takatoshi HIRAKI<sup>1</sup>, Satokazu SUMITOMO<sup>2</sup> and Jiro EIHO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Atmospheric Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, 654-0037, Japan,*

<sup>2</sup> *Hyogo Environmental Advancement Association*

The distribution and variation of the air temperature from 1990 through 2003 in urban areas in Japan were studied in terms of urban heat islands. The mean air temperature showed a spatial distribution reflecting the elevation above sea level. Some discriminative features were observed in diurnal variation depending on the distance from the sea. Increasing trends were observed for the daily mean, daily maximum, and daily minimum air temperature; in addition, a larger and clearer increasing trend was observed for the daily minimum air temperature than for the daily mean and daily maximum air temperature. Furthermore, the rate of the increases in the air temperature was much greater than those recorded in other studies. Although the diurnal range showed a decreasing trend, few significant trends were observed on hot day, summer day, and frost day.

### INTRODUCTION

Rising air temperatures in urban areas are a serious problem as they relate to climate change and urban heat islands. The distribution of the air temperature and its correlation with population and urbanization have been studied<sup>1-3</sup>. Some reports have demonstrated that urban air temperatures increase more on their own than they do as a result of climate change and that the rapid development of urban areas influences the magnitude and patterns of heat islands<sup>4-7</sup>. In addition, air temperature trends have recently been studied by using air temperature data recorded at meteorological observatories and by combining techniques, such as remote sensing<sup>8-13</sup>. On the other hand, the phenomenon of urban heat islands is

location-specific and has been attributed to population, geography, and energy consumption. Urban heat islands have been reported in the metropolitan areas of Tokyo<sup>14,15</sup> and in much smaller cities as well<sup>16,17</sup>. Some researchers, such as Mikami *et al.*<sup>18-23</sup> have thoroughly studied urban heat islands in the Tokyo metropolitan area. In the present study, a monitoring data set of air temperatures was analyzed to investigate the current conditions and identify some trend or variation in the air temperatures in Hanshin area, which is a 15 x 15 km area between the cities of Osaka and Kobe, two of the largest cities in Japan. The findings are reported below.

### MATERIALS AND METHODS

#### 2.1 Survey sites and period

Air temperatures were measured at six ambient air pollution monitoring stations in Hanshin area at three cities: Amagasaki (1 station), Nishinomiya (4 stations), and Takarazuka (1 station). The six

<sup>1</sup> 大気環境部    <sup>2</sup> ひょうご環境創造協会

\* 別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27  
兵庫県立健康環境科学研究所  
大気環境部 藍川昌秀

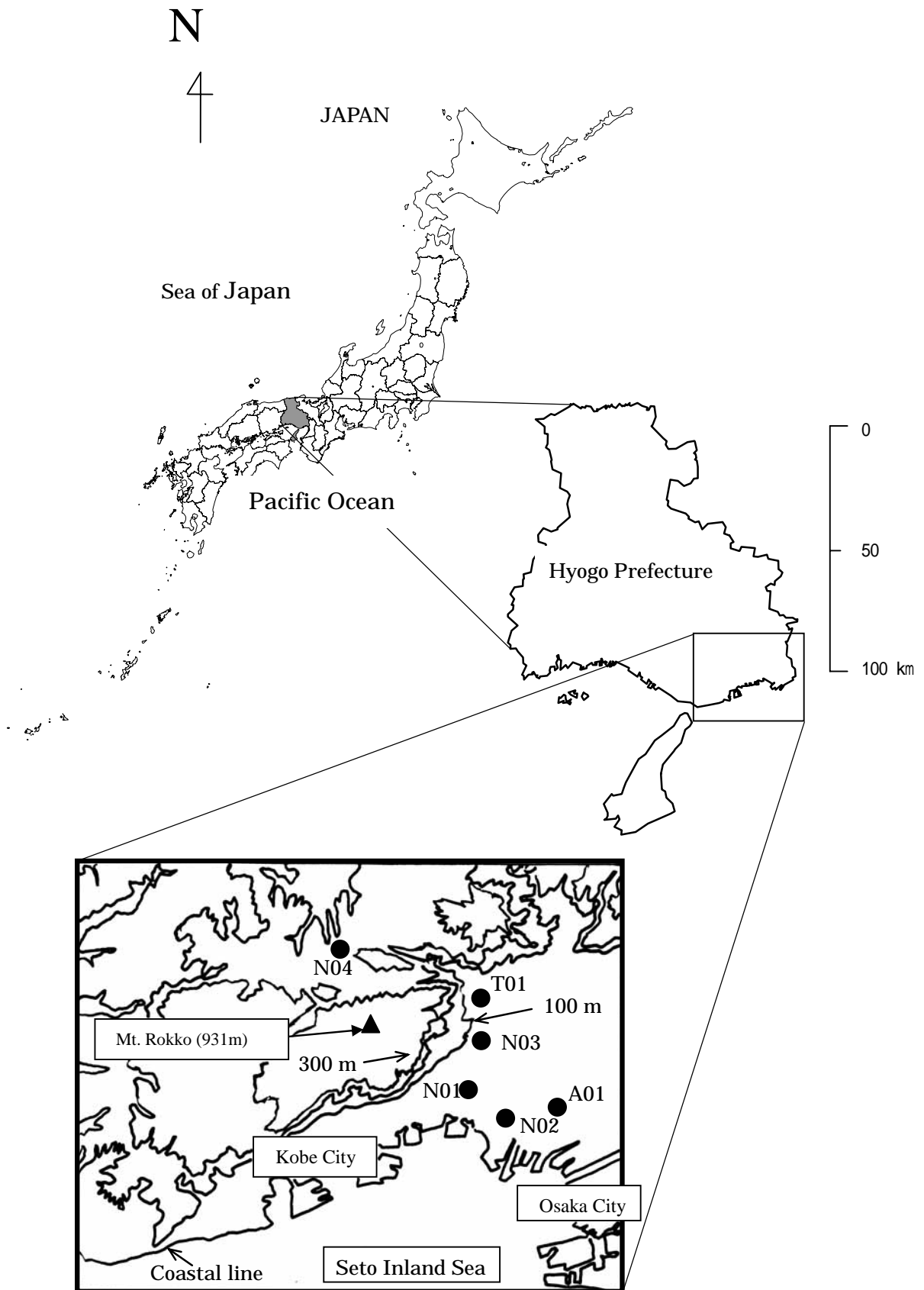


Figure 1 Location of the stations. A01 is located in Amagasaki City, N01, N02, N03, and N04 are located in Nishinomiya City, and T01 is located in Takarazuka City.

stations are in a 15 x 15 km area. The location of the stations is shown in Fig.1. Five of the stations, with the exception of N04, are located less than 50m above sea level (a.s.l.). Hansin area is between Osaka City (population 2,634,000/222 km<sup>2</sup>) and Kobe City (population 1,520,000/ 551 km<sup>2</sup>). The Hansin area is characterized by intensive industrial development and dense populations. On the other hand, Mt. Rokko (altitude 931 m), which runs east and west, is located in Kobe City. Station N04 is located north of Mt. Rokko, and stations N03 and T01 are at the east end of the mountain range. The characteristics of the six stations are shown in Table 1 and summarized as follows:

Table 1 Characteristics of the six stations

	Longitude	Latitude	Elevation above sea level m
A01	135°24'58"	34°43'19"	0
N01	135°20'38"	34°44'02"	3
N02	135°22'24"	34°42'53"	1
N03	135°21'18"	34°45'54"	50
N04	135°14'21"	34°49'25"	235
T01	135°21'28"	34°47'35"	40

A01: The air temperature was measured on the roof of 5-story building (about 19 m above the ground), where a thermometer shelter was installed. The roof was covered with grass.

N01: The air temperature was measured on the roof of 3-story building (about 10 m above the ground) of a City Hall. The roof is made of slate. The City Hall is surrounded by other buildings that block eastern winds.

N02: The air temperature was measured on the roof of a 4-story building (about 17 m above the ground). The roof is made of concrete.

N03: The air temperature was measured on the roof of a 2-story building (about 8 m above the ground). The roof is made of concrete.

N04: The air temperature was measured on the roof of a 2-story building (about 8 m above the ground). The roof is made of concrete.

T01: The air temperature was measured on the roof of a 2-story building (about 8 m above the ground). The roof is made of concrete. A thermometer box was installed on the concrete roof about 1.5 m above the roof level.

The air temperatures measured from January 1990 to December 2003 were used for analyses.

## 2.2 Data acquisition and analysis

### 2.2.1 Data acquisition

The air temperatures were measured hourly. The daily mean, maximum, and minimum air temperatures were used in the evaluations. The hourly air temperatures were measured using a thermometer with Japan Meteorological Agency Certificate.

### 2.2.2 Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test (K-S test) and the least-significant difference test were used to analyze the normality and the seasonal variation, respectively.

## RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Data distribution

The data distributions of the daily mean, maximum, and minimum air temperatures during the survey were tested by the K-S test, showing that none of them followed a normal distribution ( $p < 0.01$ ) at each station; therefore, it should be appropriate to use a median value rather than a mean value for comparison. The mean and median values for the daily mean, maximum, and minimum air temperatures are summarized in Table 2. The difference between the mean and median values was, however, not significantly large. In addition, the air temperature is usually shown and evaluated by the mean value. Therefore, air temperatures shown by mean values will be used for the following results and discussion.

Table 2 Mean and median values for daily mean, maximum, and minimum air temperatures

	Air temperature /°C					
	Daily mean		Daily maximum		Daily minimum	
	Mean	Median	Mean	Median	Mean	Median
A01	16.7	17.1	20.3	20.9	13.4	13.6
N01	16.0	16.0	19.5	19.7	12.7	12.6
N02	16.4	16.7	19.7	20.3	13.3	13.4
N03	16.0	16.4	19.8	20.3	12.4	12.4
N04	14.3	14.7	18.6	19.2	10.2	10.2
T01	15.9	16.2	19.8	20.4	12.3	12.4

### 3.2 Mean air temperature

The mean air temperatures of the daily mean, maximum and minimum from each station during the survey are summarized in Fig.2(a). The mean air temperatures from station N04 were lower than those from other stations. One reason that the mean air temperature at station N04 was lower than those from other stations is presumably the difference in elevation. Station N04 is located at an elevation of 235 m a.s.l. and would, therefore, be expected to have lower air temperatures because of its high elevation. Therefore, the mean air temperature at station N04 should be corrected to consider the effect of the elevation of the location. A temperature lapse of 0.6 °C/100 m was considered. The result of the correction is shown in Fig.2(b). The corrected mean air temperature for the daily maximum at station N04 was the same as that recorded at other stations. However, despite being corrected, the mean air temperature of the daily mean and the daily minimum air temperature were still lower than those from other stations.

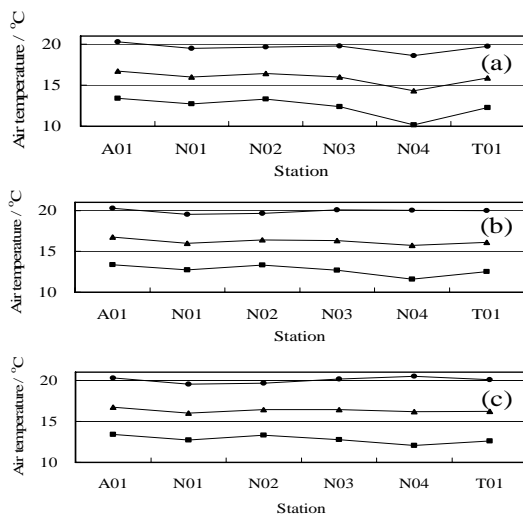


Figure 2 Mean air temperatures of daily mean, maximum and minimum from each station during the survey (a), corrected mean air temperatures of daily mean, maximum, and minimum using temperature lapse rate of 0.6 °C /100 m (b), and corrected mean air temperatures using temperature lapse rate of 1.0 °C /100 m in winter and spring and temperature lapse rate of 0.6 °C /100 m in summer and autumn (c). Filled triangle ( ), filled circle ( ), and filled square ( ) shows Daily mean, Daily maximum, and Daily minimum, respectively.

As mentioned in 2.1, station N04 is located north of Mt. Rokko. Fog frequently occurs in the vicinity of Mt. Rokko<sup>24-27</sup>; therefore, it is generally appropriate to apply a temperature- lapse rate of 0.6 °C/100 m for the correction. On the other hand, summer (June, July, and August) fog is common in the vicinity of Mt. Rokko and is uncommon in winter (December, January, and February). In addition, the relative humidity in summer and autumn (September, October, and November) (78.4 and 79.8% during the survey period, respectively) was significantly ( $p < 0.001$ ) higher than in winter and spring (March, April, and May) (75.6 and 70.8%, respectively). Taking these conditions into consideration, it is better to correct the air temperature using a temperature-lapse rate of 1.0 °C/100 m in winter and spring. The result is shown in Fig.2(c). Little difference was observed between station N04 and other stations in daily mean air temperatures; however, the daily maximum was a little higher, and the daily minimum was a little lower than those recorded at the other stations. The differences in the daily maximum and minimum air temperatures are discussed in more detail in 3.4. However, it can be concluded that the difference in the elevation of the stations is the main reason for the lower air temperature at station N04.

### 3.3 Diurnal variation

Figure 3 shows the diurnal variation in the air temperature in 2001 calculated by the hourly air temperature at each station. The air temperature at station N04 was low throughout the day, as a result of the elevation of the station.

Figures 3(a), 3(b), and 3(c) are drawn to compare clearly the individual stations. In Fig.3(a), stations N01, N02, and A01 had similar diurnal variations, although the daytime air temperatures at station N02 were slightly lower than those at stations N01 and A01. In Fig.3(b), the daytime (7:00 – 18:00) air temperature at station T01 was higher than that at station N02 and the night (19:00 – 6:00) air temperature at station T01 was lower than that at station N02. In Fig.3(c), air temperature at station N03 was the same as that at

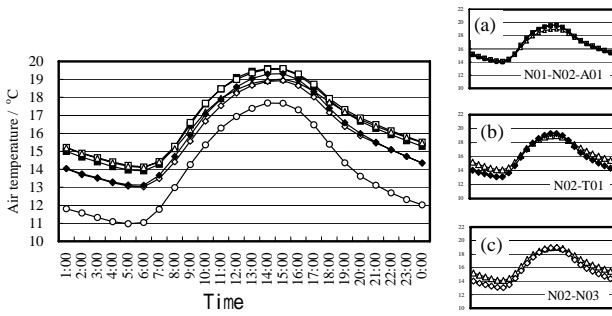


Figure 3 Diurnal variation in the air temperature in 2001 calculated by the hourly air temperature at each station. Figures 3(a), 3(b), and 3(c) compare the individual stations. Filled square ( ), open square ( ), open triangle ( ), open rhombus ( ), open circle ( ), and filled rhombus ( ) shows A01, N01, N02, N03, N04, and T01, respectively.

station N02 during the daytime (7:00 – 18:00) while air temperature at station N03 was lower at night (19:00 – 6:00). Stations N01, N02, and A01 are along the coast (approximately 2 km from the sea), which results in similar diurnal variations, i.e., relatively cool daytime and warm nighttime temperatures. In contrast, the nighttime air temperatures at stations T01 and N03 were lower than that from station N02, and the differences were presumably attributed to the fact that these stations are located inland (approximate 6 km and 9 km, respectively). Furthermore, station T01 is located 3 km further inland than station N03, which is probably responsible for the fact that the daytime air temperature at station T01 was slightly higher than those at stations N02 and N03.

The diurnal ranges, which is defined as the difference between the daily maximum and daily minimum air temperatures in the diurnal variation, were 5.7 °C (A01), 5.5 (N01), 4.9 (N02), 5.9 (N03), 6.7 (N04), and 6.2 (T01) at each station. The largest difference was observed at station N04. This is attributed to the distance from the sea. At station N04, the air temperature was the lowest, while the diurnal range was the largest, depending on the distance from the sea.

### 3.4 Trend of air temperature

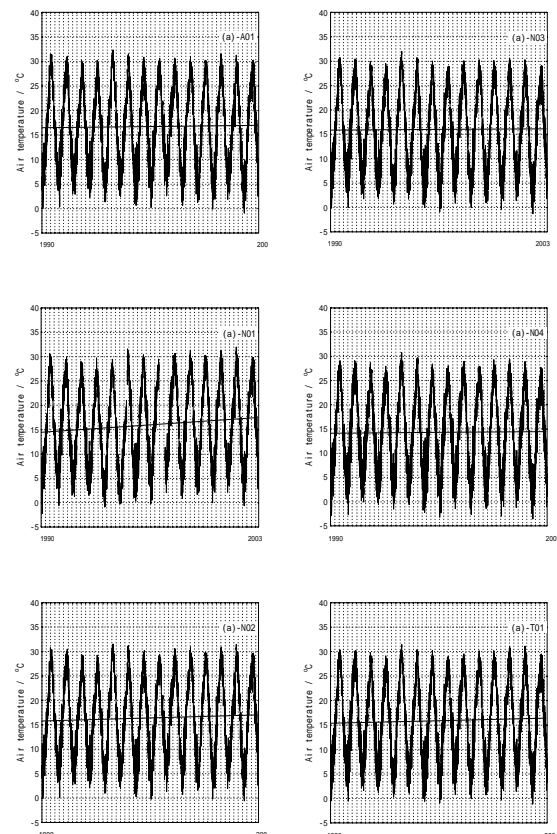
The air temperature trends are shown in Fig.4, which demonstrates increasing trends at each station. Increasing temperatures during the survey

Table 3 Increasing temperatures and trends in diurnal range during the survey

	°C·decade <sup>-1</sup>			
	Increasing air temperature			Trends in diurnal range
	Daily mean	Daily maximum	Daily minimum	
A01	0.34	0.35	0.36	0.02
N01	2.17	2.21	2.19	-0.33
N02	0.89	0.70	1.04	-0.41
N03	0.19	0.08	0.38	-0.02
N04	0.24	0.02	0.43	-0.12
T01	0.75	0.70	0.85	-0.15

are summarized in Table 3 together with the trends in diurnal range. The increasing trend was larger and clearer for the daily minimum air temperature than for the daily mean and daily maximum air temperatures for most stations. Larger increasing trends for the daily minimum air temperature were reported as relating to the phenomenon of urban heat islands<sup>5,17,28,29</sup>), suggesting the existence of an urban heat island in this area. In addition, the diurnal range showed a decreasing trend in most of stations, also supporting the idea that the urban heat island has grown in this area<sup>5</sup>).

The increasing rates for the daily mean, which are shown in Table 3, are much larger than those obtained in other studies<sup>5, 11, 30-34</sup>). This is



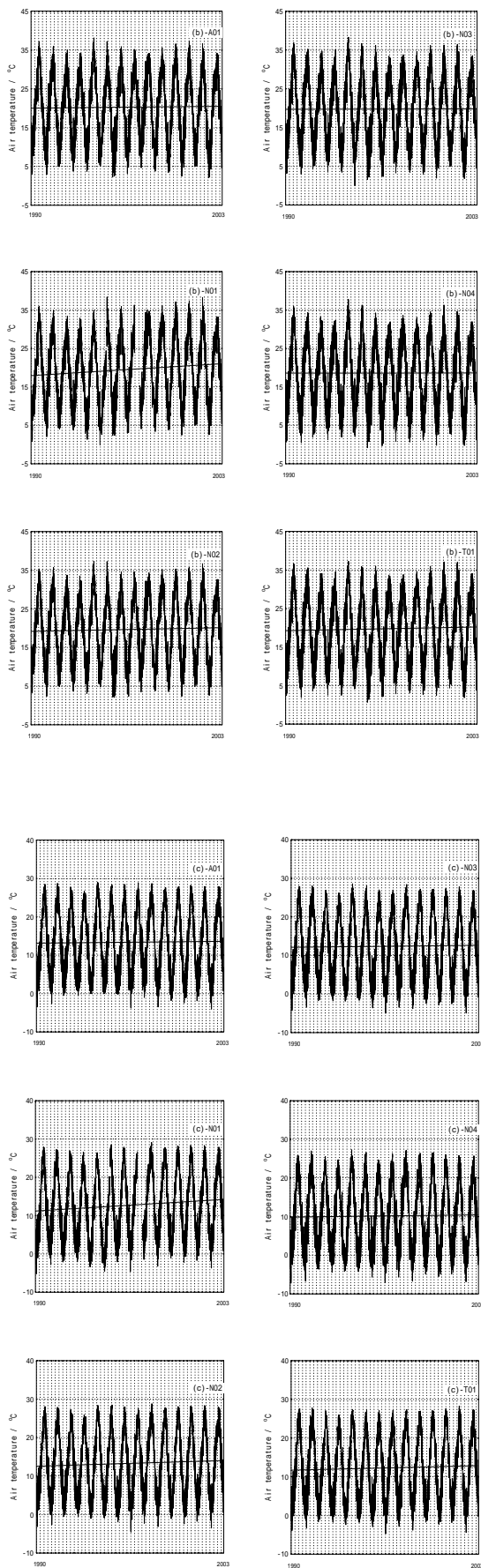


Figure 4 Air temperature trends for daily mean (a), maximum (b), and minimum (c).

presumably due to two reasons; i.e., one is the shorter coverage for the acquisition of air temperature data, and the other is that the 1990s was the warmest decade in the last century<sup>26)</sup>.

### 3.5 Hot day, summer day, and frost day

Figure 5 shows trends of the proportion of hot, summer, and frost days in a year. Hot day is defined as that in which the daily maximum air temperature is 30 °C and above; summer day, 25 °C and above; and frost day is defined as that in which the daily minimum air temperature is 0 °C and below. Few significant increasing or decreasing trends were observed. When the numbers of hot, summer, and

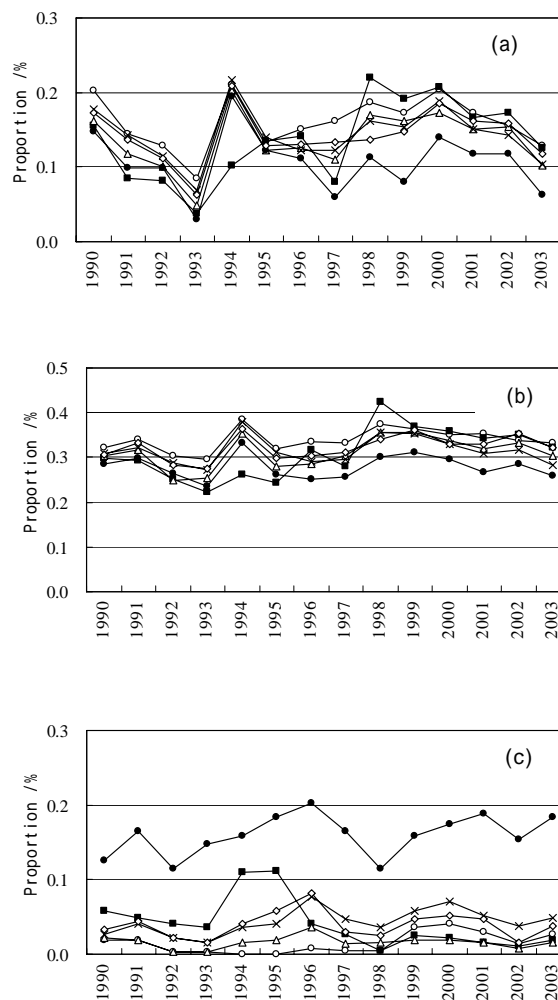


Figure 5 Trends of proportion of hot day (a), summer day (b), and frost day (c) in a year. Open circle (○), filled square (■), open triangle (△), cross mark (×), filled circle (●), and open rhombus (◇) shows A01, N01, N02, N03, N04, and T01, respectively.

frost days are considered, few characteristics of urban heat islands were detected in the study area.

## CONCLUSION

Air temperatures measured within a 15 x 15 km urban area in Hyogo Prefecture from 1990 through 2003 were studied. A homogeneous spatial variation of air temperatures was observed within the urban area by considering the elevation at which the monitoring station was located. A more significant increasing trend was observed in the daily minimum air temperature than in the daily mean and daily maximum air temperatures, and the decreasing trend was observed in the diurnal range, suggesting that the urban heat island has grown in this area.

## REFERENCES

- 1) Oke, T.R.: City size and the urban heat island. *Atmospheric Environment*, **7**, 769-779 (1973)
- 2) Oke, T.R. and Maxwell, G.B.: Urban heat island dynamics in Montreal and Vancouver. *Atmospheric Environment*, **9**, 191-200 (1975)
- 3) Oke, T.R., Spronken-Smith, R.A., Jauregui, E. and Grimmond, C.S.B.: The energy balance of central Mexico City during the dry season. *Atmospheric Environment*, **33**, 3919-3930 (1999)
- 4) Hinkel, K.M., Nelson, F.E., Klene, A.E. and Bell, J.H.: The urban heat island in winter at Barrow, Alaska. *International Journal of Climatology*, **23**, 1889-1905 (2003)
- 5) Zhou, L., Dickinson, R.E., Tian, Y., Fang, J., Li, Q., Kaufmann, R.K., Tucker, C.J. and Myneni, R.B.: Evidence for a significant urbanization effect on climate in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 9540-9544 (2004)
- 6) Weng, Q. and Yang, S.: Managing the adverse thermal effects of urban development in a densely populated Chinese city. *Journal of Environmental Management*, **70**, 145-156 (2004)
- 7) Fujibe, F.: Features of extremely high summertime temperatures in Japan in recent years. *Geographical Review of Japan*, **77**-3, 119-132 (2004) (in Japanese with English abstract)
- 8) Shuurmans, C.J.E. and Coops, A.J.: Seasonal mean temperatures in Europe and their interannual variability. *Monthly Weather Review*, **112**, 1218-1225 (1984)
- 9) Fujibe, F.: Temperature rising trends at Japanese cities during the last hundred years and their relationships with population, population increasing rates and daily temperature ranges. *Papers in Meteorology and Geophysics*, **46**, 35-55 (1995)
- 10) Cooter, E.J. and Leduc, S.K.: Recent frost date trends in the North-Eastern USA. *International Journal of Climatology*, **15**, 65-75 (1995)
- 11) Gallo, K.P., Owen, T.W., Easterling, D.R. and Jamason, P.F.: Temperature trends of the U.S. historical climatology network based on satellite-designated land use/land cover. *Journal of Climate*, **12**, 1344-1348 (1999)
- 12) Trombulak, S.C. and Wolfson, R.: Twentieth-century climate change in New England and New York, USA. *Geophysical Research Letters*, **31**, L19202.1-L19202.4 (2004)
- 13) Robeson, S.M.: Trends in time-varying percentiles of daily minimum and maximum temperature over North America. *Geophysical Research Letters*, **31**, L04203.1-L04203.4 (2004)
- 14) Ito, M., Udagawa, M. and Mikami, T.: Study on the distribution of the temperature in Tokyo. *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection* **1994**, 35-46 (1994) (in Japanese)
- 15) Ando, H., Shioda, T., Morishima, W., Kojima, S., Ishii, K., Izumi, T. and Mikami, T.: Spatial structure of summer temperatures over the urban area of Tokyo in 2002. *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection*, **2003**, 81-87 (2003) (in Japanese with English summary)
- 16) Park, H.-S.: Sky view factor of urban canyon and long-wave radiation balance caused by the nocturnal heat island. *Tenki*, **34**, 579-587 (1987) (in Japanese)
- 17) Kameyama, J., Ohkura, K., Ishizaka, J. and Hino, T.: Relationship between urbanization and warming in a medium size city. Case study on Miyazaki City. *Memoirs of the Faculty of Engineering, Miyazaki University*, **25**, 35-46 (1996) (in Japanese with English abstract)
- 18) Mikami, T., Taguchi, A., Ito, M., Udagawa, M., Sohoku, M. and Asakuno, K.: Spatial distribution of summer

- temperatures in Shinjuku district. *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection*, **1992**, 32-38 (1992) (in Japanese with English abstract)
- 19) Mikami, T., Udagawa, M., Ito, M., Sofuku, M., Asakuno, K. and Hamada, T.: The environment of large vegetated parks in central Tokyo: Part 1. *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection*, **1993**, 19-24 (1993) (in Japanese with English abstract)
- 20) Mikami, T., Udagawa, M. and Ito, M.: Long term variations of the diurnal temperatures ranges in Tokyo. *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection*, **1995**, 35-41 (1995) (in Japanese with English summary)
- 21) Mikami, T., Wakabayashi, M., Udagawa, M. and Ito, M.: Urban heat island phenomena in Tokyo. Part 1. Reproducibility simulation of present conditions by numerical model. *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection* **1997**, 38-48 (1997) (in Japanese with English summary)
- 22) Mikami, T., Wakabayashi, M., Udagawa, M. and Ito, M.: Urban heat island phenomena in Tokyo. Part 2. Measures for reducing heat island intensity and their effects. *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection*, **1997**, 49-56 (1997) (in Japanese with English summary)
- 23) Mikami, T.: Actual condition of urban heat island in Japan. *Environmental Information Science*, **32**, 32-36 (2003) (in Japanese)
- 24) Aikawa, M., Hiraki, T., Shoga, M. and Tamaki, M.: Fog and precipitation chemistry at Mt. Rokko in Kobe, April 1997- March 1998. *Water, Air and Soil Pollution*, **130**, 1517-1522 (2001)
- 25) Aikawa, M., Hiraki, T., Shoga, M. and Tamaki, M.: Characteristics of fog water and precipitation collected at Mt. Rokko in Kobe. *Report of the Hyogo Prefectural Institute of Environmental Science*, **33**, 43-49 (2001)
- 26) Aikawa, M., Hiraki, T., Shoga, M. and Tamaki, M.: Chemistry of fog water collected in the Mt. Rokko area (Kobe City, Japan) between April 1997 and March 2001. *Water, Air and Soil Pollution*, **160**, 373-393 (2005)
- 27) Aikawa, M., Hiraki, T., Shoga, M. and Tamaki, M.: Six-year trend and frequency distribution of the pH value of fog water collected on Mt. Rokko (Kobe City, Japan). *Bulletin of the Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences*, **1**, 1-5 (2005)
- 28) IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change): The Scientific Basis, eds. Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, M., van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A., Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K. (2001)
- 29) Arnfield, A.J.: Two decades of urban climate research: A review of turbulence, exchanges of energy and water, and the urban heat island. *International Journal of Climatology*, **23**, 1-26 (2003)
- 30) Jones, P.D., Groisman, P.Ya., Coughlan, M., Plummer, N., Jamason, N., Wang, W.-C. and Karl, T.R.: Assessment of urbanization effects in time series of surface air temperature over land. *Nature*, **347**, 169-172 (1990)
- 31) Karl, T.R., Jones, P.D., Knight, R.W., Kukla, G., Plummer, N., Razuvayev, V., Gallo, K.P., Lindsey, J., Charlson, R.J. and Peterson, T.C.: Asymmetric trends of daily maximum and minimum temperature. *Bulletin of the American Meteorological Society*, **74**, 1007-1024 (1993)
- 32) Easterling, D.R., Horton, B., Jones, P.D., Peterson, T.C., Karl, T.R., Parker, D.E., Salinger, M.J., Razuvayev, V., Plummer, N., Jamason, P. and Folland, C.K.: Maximum and minimum temperature trends for the globe. *Science*, **277**, 364-367 (1997)
- 33) Hansen, J., Ruedy, R., Sato, M., Imhoff, M., Lawrence, W., Easterling, D., Peterson, T. and Karl, T.: A closer look at United States and global surface temperature change. *Journal of Geophysical Research*, **106**, 23947-23963 (2001)
- 34) Kalnay, E. and Cai, M.: Impact of urbanization and land-use change on climate. *Nature*, **423**, 528-531 (2003)

---

#### 「原著」

#### ヒートアイランド現象の観点から見た兵庫県の都市域における気温の分布及び経年変化について

藍川 昌秀<sup>1</sup> 平木 隆年<sup>1</sup>  
住友 聡一<sup>2</sup> 英保 次郎<sup>1</sup>

#### 要約

一般環境大気測定局で測定されてきた気温データを、



ヒートアイランド現象の現況把握という観点から解析した。データは阪神地域（尼崎市，西宮市，宝塚市）において1990年から2003年に測定された気温データを用いた。

平均気温は観測地点の標高を反映した分布を示し，標高が高い地点で気温が低くなるという分布を示すものであった。

平均気温の日変化は，海岸からの距離を反映し，距離が遠くなるほど日較差（一日における最高気温と最低気温の差）が大きくなる傾向を示した。

対象期間中の経年変化は，日平均気温，日最高気温，日最低気温のいずれについても上昇傾向が観測されたが，日最低気温における気温上昇が最も顕著であった。

また，日較差は対象期間中減少する傾向が観測され，日最低気温における気温上昇が最も顕著であったことと合わせて考えると，阪神地域においてもヒートアイランド現象が進行していることが示唆された。

一方，真夏日，夏日，冬日，真冬日の増加・減少傾向は観測されなかった。

## [ ノート ]

### 兵庫県の簡易水道原水から検出された爬虫類由来のクリプトスポリジウム

辻 英高<sup>1\*</sup> 押部 智宏<sup>1</sup> 小野 一男<sup>2</sup> 山本 昇五<sup>3</sup> 近平 雅嗣<sup>1</sup>  
増田 邦義<sup>4</sup> 八木田 健司<sup>5</sup> 泉山 信司<sup>5</sup> 遠藤 卓郎<sup>5</sup> 山岡 政興<sup>1</sup>

Detection of *Cryptosporidium* derived from reptile in the source water of a public simple water supply , Hyogo Prefecture

Hidetaka TSUJI<sup>1\*</sup> , Tomohiro OSHIBE<sup>1</sup> , Kazuo ONO<sup>2</sup> , Shogo YAMAMOTO<sup>3</sup> , Masatsugu CHIKAHIRA<sup>1</sup> ,  
Kuniyoshi MASUDA<sup>4</sup> , Kenji YAGITA<sup>5</sup> ,  
Shinji IZUMIYAMA<sup>5</sup> , Takuro ENDO<sup>5</sup> and Masaoki YAMAOKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Infectious Disease Research Division , Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences , 2-1-29 , Arata-cho , Hyogo-ku , Kobe 652-0032 , Japan ,*

<sup>2</sup>*Kobe Tokiwa College ,* <sup>3</sup>*Hyogo Environmental Advancement Association ,*

<sup>4</sup>*Kobe Co-medical College and* <sup>5</sup>*Department of Parasitology ,*

*National Institute of Infectious Diseases*

*Cryptosporidium* oocysts were detected in the source water from a public simple water supply at Yamasaki town in Hyogo Prefecture. The oocysts were existed in a considerably short period of time during September to October, 2001, and the detected number up to 102 per 10L. It was not proved that the health of the inhabitant was damaged by the pathogen in the investigation period. Although isolated oocysts were morphologically identified as *C.parvum*, the amplification results by the polymerase chain reaction were not completely in agreement with *C.parvum*, and became it clear that they were *Cryptosporidium* sp. derived from reptiles, which Xiao et al. showed in their studies by the sequence analysis of 18S rRNA gene locus.

## はじめに

クリプトスポリジウムはApicomplexa 門 Sporozoasida 綱 , Eucoccidiorida 目 , Cryptosporidiidae 科に属する原生動物で , ヒトを含めた多種類の動物の消化管内に寄生する . 環境中ではオーシストで存在し , 経口摂取により体内に入ると消化管内で脱嚢したオーシスト中のスポロゾイトが , 主に小腸の上皮細胞に寄生する . スポロゾイトは上皮細胞の微絨毛に侵入し , 微絨毛内に形成された寄生胞内で無性生殖と有性生殖を繰り返して増殖する . 有性生殖により形成された新たなオー

<sup>1</sup>感染症部 <sup>2</sup>神戸常盤短期大学 <sup>3</sup>ひょうご環境創造協会

<sup>4</sup>神戸総合医療介護福祉専門学校

<sup>5</sup>国立感染症研究所寄生動物部

\* 別刷請求先 : 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所

感染症部 辻 英高

シストは、糞便とともに体外に排出される<sup>1)</sup>。クリプトスポリジウムは哺乳類、爬虫類、魚類などに寄生する多くの種類があることが知られており、げっ歯類における *C.muris* および *C.parvum* の発見以来、様々にその種類が分類されている<sup>1,2)</sup>。Xiaoら<sup>3)</sup>は、オーシストの形態学、自然宿主、遺伝学的特徴などから、クリプトスポリジウムを哺乳類に寄生する *C.parvum* など7種、トりに寄生する *C.baileyi* など3種、爬虫類に寄生する *C.serpentis* など2種、および魚に寄生する *C.mohnari* の13種に分類しており、この他にも命名されていない種類や、同一種内の Genotype の存在などを遺伝学的に明らかにしているが、ヒトに下痢を起こすクリプトスポリジウムのほとんどは *C.parvum* と *C.hominis* である<sup>3)</sup>。*C.parvum* は1976年ヒトへの感染が報告され<sup>1,4)</sup>、1980年代から後天性免疫不全症候群での致死性下痢症の原因として注目されるようになった<sup>5,6)</sup>。1983年以降には、散発的下痢症のみではなく、集団感染事例が数多く報告されている<sup>1)</sup>。

クリプトスポリジウムは環境中で数ヶ月間は感染力が保持され、また、直径4~5 μmと小型であるため通常の浄水処理では完全に除去できないこと、さらに、塩素に抵抗性であることから、水道水など水系を介しての集団感染が多い<sup>1)</sup>。米国ミルウォーキー市で1993年に *C.parvum* によって汚染された水道水による大規模な集団感染が起きている<sup>7)</sup>。また、国内では *C.parvum* の水道原水やビルの受水槽への混入による集団感染事例が報告されている<sup>8,9)</sup>。

水道水の定期検査で、2001年9月4日に兵庫県山崎町川戸地区の簡易水道の原水からクリプトスポリジウムのオーシストが検出された。このオーシストは、形態学的にヒトの病原種である *C.parvum* と同定されたが、遺伝子分析によって爬虫類(ヘビ)に寄生する種類であることが明らかになった。これまで国内で水道原水から爬虫類由来のクリプトスポリジウムが検出された報告はない。国内初発例として簡易水道から検出されたクリプトスポリジウムに対する住民の健康調査と、オーシストの混入原因を究明するために行った水源付近の調査結果、および原水から検出されたオーシストの形態学的、遺伝学的分析結果について報告する。

## 材料と方法

### 1. 住民の健康被害調査

住民の健康被害を調査するため、2001年9月5日、簡易水道を利用する川戸地区141戸(571名)の住民に対して問診票を配布し、併せて、戸別訪問による健康状態の調査を行った。なお、簡易水道は、湧き水の浅井戸からポンプで原水を汲み上げた後、塩素処理して給水されており、当時の一日最大給水量は105 m<sup>3</sup>で、給水人口は613人であった<sup>10)</sup>。

### 2. 検体

クリプトスポリジウムが検出された水源近郊の揖保川河川水、および水源周辺を流れる農業用水をそれぞれ、2001年9月6日に採取した。また、9月8日、および9日に下痢症状を呈した2名の便を検体として供した。さらに9月27日に水源周辺の土壌、および、カメ(クサガメ; *Chinemys reevesii*)1個体と、2種類のカエル(トノサマカエル; *Rana nigromaculata*, アカガエル; *Rana japonica japonica*)をそれぞれ3個体ずつ採取した。簡易水道の原水は、2001年9月4日から11月28日の期間に、8回採取した。採取した原水は、感染症検査マニュアル<sup>11)</sup>に従って、ポリエチレン製の採水袋に入れて試験機関へ搬入された。

### 3. 検体の集嚢子法

河川水、農業用水、および原水の集嚢子は既報<sup>2,13)</sup>に準じて行った。すなわち、検体10Lをセルロースアセテート膜(孔径1.2 μm)で加圧し、濾過濃縮した。膜面上の捕捉物の回収にはペンシル型超音波発生器(HeatSystems・Ultrasonics, 50 W, 23 KHz)を用いて捕捉物を剥離させ、0.15 M リン酸緩衝食塩水(pH 7.6)中に懸濁させた。懸濁液はダイナビーズ抗 *Cryptosporidium* キット(Dynal)を用いて免疫磁気ビーズ(IMS)を用いて濃縮した。ヒト糞便はクリプトスポリジウム症の診断マニュアル<sup>14)</sup>に基づいてシヨ糖浮遊法を行って集嚢子した。土壌試料については、Walkerら<sup>15)</sup>の方法とシヨ糖浮遊法<sup>14)</sup>を組み合わせた。すなわち、あらかじめメッシュ(ポアサイズ1 mm)でろ過した試料25gに分散剤(10 mM Tris, 0.1% Tween 80, pH 7.2)100 mLを加え、スターラーで15分間攪拌後、3,000 rpm(1,680 × g)で10分間遠心した。上清を除き分散剤を加えて同様の操作を3回行った後、分液ロート中に沈渣と分散剤100 mLを入れ、20分間シェーカーで攪拌した。その後、12,000 rpm(18,200 × g)で10分間遠心して上清を除いた沈渣に、それぞれシヨ糖液(比重1.2)を攪拌しながら加え、遠沈管をシヨ糖液で満たして20分間放置後、液表面から20 mLずつ分取した。分取液に10倍量の精製水を加え、12,000 rpm(18,200 × g)で10分間遠心後、精製水10 mLで沈渣を集め、IMS法で濃縮した。また、カメ(1個体)の腸管内容物については約5gを、2種類のカエル(それぞれ3個体)については種類ごとに腸管内容物1gを用いて、それぞれシヨ糖浮遊法による集嚢子を行った。

### 4. オーシストの形態学的同定

オーシストの形態学的同定は既報<sup>11,13,14)</sup>に準じて行った。すなわち、集嚢子した試料は、FITC (Fluorescein isothiocyanate) 標識抗 *Cryptosporidium* マウス IgM モノクローナル抗体液 (Crypt-a-Glo FL; Waterborne) および DAPI

(4', 6 - diamidino- 2-phenylindole; Sigma)による染色を行った。作製した標本は、微分干渉装置(BX-U-CD-3;OLYMPUS)付き落斜蛍光顕微鏡(BX60-34-FLB;OLYMPUS)を用いてB励起でオーシストに対する特異蛍光を観察し、さらに、UV励起でDAPIによるスポロゾイトの核の染色を確認した。また、ノマルスキー微分干渉装置を用いてスポロゾイトなどオーシストの構造を観察した。

## 5. オーシストのDNA抽出と精製

9月6日に採水した原水10Lからの集嚢子試料からDNAを抽出した。すなわち、IMS法で濃縮後の試料液を、12,000 rpm (11,900×g)で5分間遠心した沈査を蒸留水1 mLで1回洗浄し、100 µLのLysis buffer (10 mM Tris [pH8.0], 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45% Nonidet P-40, 0.45% Tween 20, 0.01% Proteinase K)を加え、55 1時間、95 10分間反応させた<sup>16,17)</sup>。その後QIA amp DNA mini Kit (QIAGEN)を用いてオーシストのDNAを精製した。

## 6. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; Polymerase Chain Reaction)

原水中のオーシストから抽出したDNAは、感染症検査マニュアル<sup>11)</sup>に基づき、No.1及び2のプライマー (Table 1)を用いて、それぞれ*Cryptosporidium*の18SリボゾームRNA (18S rRNA)<sup>16)</sup>、およびPolythreonin (Poly-T)<sup>18)</sup>遺伝子領域を増幅させた。さらに、No.3~6 (Table 1)を用いて、それぞれ18S rRNA<sup>19,20)</sup>、*Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP)<sup>21)</sup>、およびThrombospondin related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1 (TRAP-C1)<sup>22)</sup>の各遺伝子領域についての増幅を調べた。PCRはそれぞれの文献に記載の反応条件で行った。DNAポリメラーゼはTakara Ex Taq (Takara)を使用し、

Thermal Cycler MP TP-3000 (Takara)を用いて増幅させた。なお、陽性対照として子牛から分離された*C.parvum*株<sup>13,14)</sup>を用いた。

## 7. オーシストの遺伝子解析

原水検体から検出されたPCR産物はダイレクトシーケンシング法 (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, ABI PRISM model 310 ;Applied Biosystems)で塩基配列を調べ、Sequence Similarity Search Served by GenomeNet (BLAST), <http://blast.Genome.jp/>に登録の配列と比較した。

# 結 果

## 1. 住民の健康調査

2001年9月5日に問診票、および、聞き取り調査によって2001年7月以降の健康調査を行った結果、住民2名が下痢を訴えたが、便は軟性だが水様性ではなかった。また、2001年9月6日以降、新たな患者は発生しなかった。

## 2. 患者および水源周辺の検査

患者および水源周辺で行ったクリプトスポリジウムの検査結果をTable 2に示した。下痢症状を呈していた2名の糞便、水源近郊の揖保川河川水、および水源周辺を流れる農業用水からオーシストは検出されなかった。また、水源付近2箇所から採取された土壌、水源付近に生息するカメ、および、カエルの、いずれの試料からもクリプトスポリジウムのオーシストは検出されなかった。

Table 1 PCR primers used in this study

No.	Target gene	Primer sequence (5'– 3')	Position *	PCR product(bp)	Reference
1	18S rRNA	AGT GCT TAA AGC AGG CAA CTG CGT TAA CGG AAT TAA CCA GAC	729-745 1,282-1,262	554	Awad-El-Kariem F.M., et al.(16)
2	Poly-T	CTC TTA ATC CAA TCA TTA CAA AGC AGC AAG ATA TGA TAC CG		518	Carraway.M., et al.(18)
3	18S rRNA	AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT AGT C TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC G	1-25 1,750-1,726	1,751	Xiao.L., et al (20)
4	18S rRNA	AAG CTC GTA GTT GGA TTT CTG TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG	602-622 1,039-1,019	438	Johnson.D.W., et al.(19)
5	COWP	CCC AAC ATT CCT GGT GTA GCT TC GAA CGC ACC TGT TCC CAC TCA ATG		1,033	Xiao.L., et al. (21)
6	Trap- C1	GGA TGG GTA TCA GGT AAT AAG AA CAA CTA GCC CAG TTC TGA CTC TCT GG		1,200	Spano.F., et al (22)

\*; Position within the 18S rRNA gene locus of *C.parvum* (GenBank accession no.AF093489)

Table 2 Examination of Cryptosporidial oocyst about human stool and water samples near the source water

Kind of samples	Date of sampling	Amount of sample	Number of oocysts
River water <sup>*1</sup>	Sept.6	10L	0
Water for agricultural use <sup>*2</sup>	Sept.6	10L	0
Stool <sup>*3</sup>	Sept.8	-	Negative <sup>*7</sup>
Stool	Sept.9	-	Negative
Soil <sup>*4</sup>	Sept.27	25 g each	0
Frog <sup>*5</sup>	Sept.27	1 g each	0
Tortoise <sup>*6</sup>	Sept.27	5 g	0

- \* 1; Ibo River
- \* 2; Waterway that flows in the vicinity of the well hut
- \* 3; Inhabitant of Yamasaki town
- \* 4; Collected from the front and back of the well hut
- \* 5; The bowels of frogs (*Rana nigromaculata* and *Rana japonica*)
- \* 6; Internal organs of a tortoise(*Chinemys reevesii*)
- \* 7; Quantitative evaluation was not executed

### 3. 原水中のオーシストの検出

原水中のオーシストの検出結果を Table 3 に示した。オーシストは2001年 9月 4 日から 11月 28 日の調査期間中, 10 L あたり最高 102 個が検出された。原水10 L あたりのオーシストは, 9月 27日に 1 個, 10月 9 日に 0.875 個と激減し, それ以降, 11月14 日, 11月28 日の2度の調査では検体の量をそれぞれ160, 180 Lに増やして調査したが, 検出されなかった。原水から検出されたオーシストの形態学的観察結果をFig.1: に, また, 対照としてウシ糞便から分離された*C.parvum*株<sup>13,14)</sup>を用いて同様に操作した結果をFig.1:

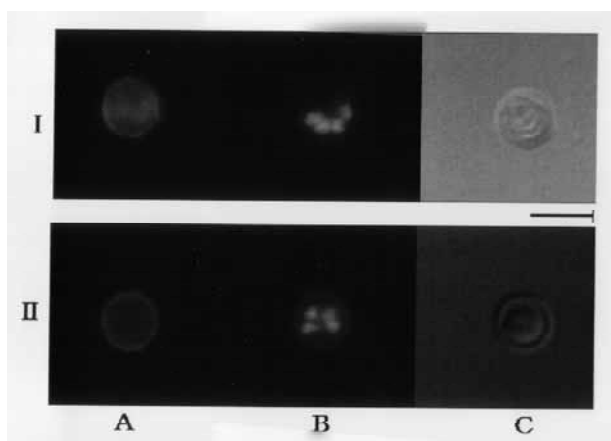


Fig.1 Morphological identification of *Cryptosporidium* oocyst from the source water by microscopy :  
 ;*Cryptosporidium* oocyst isolated from the source water, ;Oocyst of *C.parvum* strain isolated from the feces of calf. A; FA staining, B; DAPI counter staining, C; Nomarski interference contrast photomicrograph Bar represents 5 µm  
 Performed by Hyogo Environmental Advancement Association

Table 3 Detection of Cryptosporidial oocyst from the source water of a simple water supply in Yamasaki town

Date of sampling	Amount of sample	Number of oocysts	Number of oocysts/10L
Sept.4	10L	50 <sup>*1</sup>	50
Sept.6	10L	102 <sup>*1</sup>	102
Sept.11	10L	30	30
Sept.11	20L	150 <sup>*2</sup>	75
Sept.27	10L	1	1
Oct.9	80L	70	0.875
Nov.14	610L	0	0
Nov.28	180L	0	0

- \*1; Performed by Hyogo Environmental Advancement Association
- \*2; Performed by Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

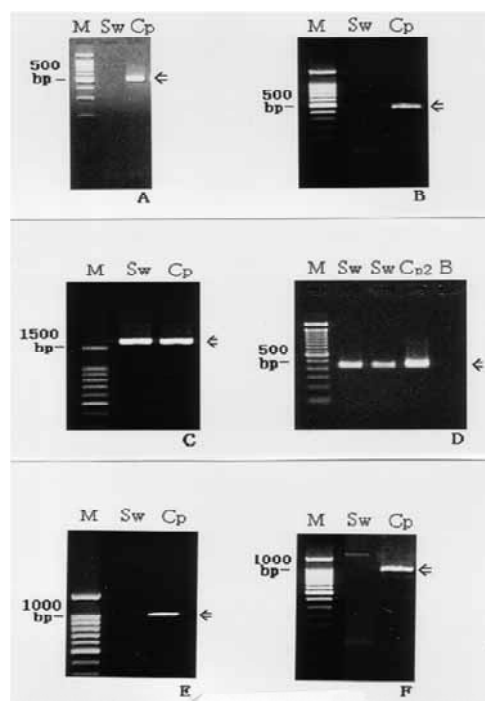


Fig.2 Agarose gel visualization of diagnostic polymerase chain reaction products of *Cryptosporidium* isolates from the source water of a simple water supply amplified with the primers designated in Table 1(No.1 ~ 6) : Amplification results of 18S rRNA gene(photogram A, C and D), Poly-T gene(photogram B), COMP gene (photogram E), and TRAP-C1 gene (photogram F) M; Molecular size marker, Sw; *Cryptosporidium* isolates from the source water, Cp, Cp2; *C.parvum* strains for positive control, B; Negative control, Each arrow shows the position of expected size of amplified fragment within the 18S rRNA gene(photogram A; 554 bp, C; 1,751 bp, D; 438 bp), Poly-T gene (photogram B; 518 bp), COMP gene (photogram E; 1,033 bp), and TRAP-C1 gene (photogram F; 1,200 bp). Photogram D was offered by Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

```

Query: 1  gatttctgttaattctcgatatatactacggtatgtatatgacattaacataattcat 60
          |||
Sbjct: 422 gatttctgttaattctcgatatatactacggtatgtatatgacattaacataattcat 481

Query: 61  attacttttatagtatatgaaattttactttgagaaaatagagtgcctaaagcaggcgt 120
          |||
Sbjct: 482 attacttttatagtatatgaaattttactttgagaaaatagagtgcctaaagcaggcgt 541

Query: 121 ttgccttgaatactccagcatggaataataaaggattttatcttcttattggttct 180
          |||
Sbjct: 542 ttgccttgaatactccagcatggaataataaaggattttatcttcttattggttct 601

Query: 181 aggaataaaaataatgattaataggacagttgggggcatttgtatttaacagtcagaggt 240
          |||
Sbjct: 602 aggaataaaaataatgattaataggacagttgggggcatttgtatttaacagtcagaggt 661

Query: 241 gaaatcttagatttgttaaagacaaactactgcgaaagcatttgccaaggatgttctca 300
          |||
Sbjct: 662 gaaatcttagatttgttaaagacaaactactgcgaaagcatttgccaaggatgttctca 721

Query: 301 ttaatcaagaacgaaagttaggggatcgaagacgatcagataccgtcgtagtcttaacca 360
          |||
Sbjct: 722 ttaatcaagaacgaaagttaggggatcgaagacgatcagataccgtcgtagtcttaacca 781

Query: 361 taaactatgccgactagagattggaggttgttcttactc 400
          |||
Sbjct: 782 taaactatgccgactagagattggaggttgttcttactc 821

```

Fig.3 Comparative Alignment of the 18S ribosomal RNA gene locus of *Cryptosporidium* isolates and *Cryptosporidium* sp. (Isolate Y; W11) : 100% of homology was obtained for the base arrangement of *Cryptosporidium* from which the upper row was obtained in this case (Query) and the lower berth in the base arrangement of *Cryptosporidium* sp. genotype W11 (Sbjct). (BlastN Score = 793 bits (400), and Identities = 400/400 (100%))

に示した。原水から検出されたオーシストは直径約4.5 μmの類円形で、蛍光抗体法で緑色のオーシスト壁 (A), DAPI染色で青色の蛍光を発する4個のスプロゾイトの核 (B), ノマルスキー微分干渉像でスプロゾイト様の内容物 (C) が観察された。これらの形態学的な観察の結果から、原水から検出されたクリプトスポリジウムのオーシストは、*C.parvum*のオーシストと判定された。

#### 4. PCRによるクリプトスポリジウム遺伝子の増幅

オーシストから抽出したDNAについて行ったPCRの結果をFig.2に示した。原水から検出されたオーシストのDNAはマニュアル<sup>11)</sup>に基づいた18S rRNA (Fig.2:A), およびPoly-T (Fig.2:B)遺伝子領域のいずれも増幅されなかった。一方、18S rRNA遺伝子領域において、Xiaoら<sup>20)</sup>のプライマー、および、Johnsonら<sup>19)</sup>のプライマーで増幅がみられ、それぞれ*C.parvum*のそれと一致した(Fig.2:C,D)。しかし、*C.parvum*に特異的なCOMP遺伝子領域 (Fig.2:E), およびTRAP-C1遺伝子領域 (Fig.2:F)は、いずれも増幅されなかった。

#### 5. 原水から検出されたクリプトスポリジウムの18S rRNA遺伝子配列

Johnsonら<sup>19)</sup>のプライマー (Table 1)を用いたPCR増幅産

物の塩基配列について、GenBankに登録されている生物由来の配列との同源性検索の結果、米国でstormwaterから分離されたヘビ由来のクリプトスポリジウム (Isolate Y: *Cryptosporidium* sp. Genotype W11) の塩基配列<sup>23)</sup>と100%一致した (Fig.3)。

## 考 察

クリプトスポリジウムの種の同定のための遺伝学的分析法として、PCR法やPCR-RFLP法、およびダイレクトシークエンス法が用いられている。これらの分析法のうちPCR法はクリプトスポリジウム症の主要な原因である*C.parvum*の検出や同定を目的としている<sup>24,25)</sup>。しかし、ヒトには*C.parvum*以外の種も感染をおこすと報告<sup>1,5,6)</sup>されており、感染の原因や感染経路を解明するためには、クリプトスポリジウムの種や遺伝子型を正確に同定する必要がある。

Awad-EI-Kariemら<sup>16)</sup>は18S rRNA領域についてPCRを行い、制限酵素*Mae*によるRFLP分析により、*C.parvum*を*C.baileyi*、および*C.muris*から区別している。また、Xiaoら<sup>21)</sup>はCOMP領域について制限酵素*Rsa*を用いたPCR-RFLP法によりクリプトスポリジウムを区別しているが、その中でデザインしたプライマーは*C.parvum*のそれぞれ human, monkey, bovine,

```

W11: 1   ggaaggg ttg ttt att tagataaagaaccaatatttttggtgactcataataactttac
C.parvum: .....aa.....
W11: 61  ggatcacattta-tgtgacatatcatcaagtttctgacctatcagctttagacggtagg
C.parvum: .....a..a.....
W11: 120 gtat tggcctaccgtggctatgacgggtaacggggaat tagggttcgattccggagaggg
C.parvum: .....a.....
W11: 180 agcctgagaaacggctaccacatctaaggaaggcagcaggcgcaaat tacccaatcct
C.parvum: .....
W11: 240 gacacagggaggtagtgacaagaaataacaa tacaggcccttacggctctgtaat tggaa
C.parvum: a t.....a t...t.....
W11: 300 tgagtaaagtataaacccctttacaagtaacaat tggagggcaagtctgggtgccagcagc
C.parvum: .....t.....
W11: 360 cgcggtaat tccagctccaatagcgtatataaaagt tgt tgcagt taaaagctcgtagt
C.parvum: .....
W11: 420 tgga t t t c t g t t a a t t c t c g t a-----tattatactacggtagtatatgacatttaaca
C.parvum: .....aa t fatataaaa...t ga a--...t...a t.....
W11: 474 taattcatattact-----tttatagtatatgaaattttactttgagaaaat tagagt
C.parvum: .....at t t t t...t.....
W11: 527 gct taaagcaggcgt t tgcct tgaatactccagcatggaaataataa taaggatt t t t a t c
C.parvum: .....a a.....t...a.....
W11: 587 t t t c t a t t g g t t c t a g g a t a a a a a t a t g a t t a a t a g g g a c a g t t g g g g c a t t t g t a t
C.parvum: ...t.....a.....g.....
W11: 647 t taacagtcagaggtgaaat t c t t a g a t t g t t a a g a c a a a c t a c t g c g a a a g c a t t t g
C.parvum: .....a.....
W11: 707 ccaagga t g t c t c a t t a a t c a g a a c g a a a g t t a g g g g a t c g a a g a c g a t c a g a t a c c g
C.parvum: .....t.....
W11: 767 t c g t a g t c t t a a c c a t a a a c t a t g c c g a c t a g a g a t t g g a g g t t g t t c c t t a c t c c t t
C.parvum: .....a.....

```

Fig.4 Alignment of the 18S ribosomal RNA gene of *Cryptosporidium* sp. Genotype W11 in the database of GenBank(824 base) and comparative alignment of the partial sequence within the 18S ribosomal RNA gene locus of *C.parvum* : W11; *Cryptosporidium* sp. Genotype W11 (GenBank accession no. AF262325) *C.parvum*.; *Cryptosporidium parvum* (GenBank accession no. AF093489) Dots indicate bases that are identical to the *Cryptosporidium* sp. Genotype W11. Sequence of the primer sets (Table 1 No.4) used for the analysis of base sequence indicate by the underline.

mouse, ferret, pig, marsupial Genotypeと*C.wairi*, および*C.meleagridis*は増幅できるが, *C.parvum* のdog Genotype, *C.felis*, *C.baileyi*, *C.serpentis*, *C.andersoni*, および*C.muris* は増幅できないとしている。Johnsonらのプライマー (Table 1) は, 18S rRNA 遺伝子領域内の position 602 から 1039 (*C.parvum*; AF093489) を増幅させるが, Champliandら<sup>26)</sup> によって, このプライマーは, *C.parvum*, *C.meleagridis*, *C.muris*, *C.baileyi* の 4 種類のクリプトスポリジウムの18S rRNA 遺伝子を増幅させることが確認されている。本事例で, 原水から分離されたオーシストは, 18S rRNA に設定された Johnson らのプライマーとのみ反応し, Poly-T, COMP, および TRAP-C1 遺伝子の各領域の検出を目的としたプライマーとは反応しなかった。GenBank 登録の *Cryptosporidium* sp. Genotype W11 (AF262325) の 18S rRNA 領域の塩基配列を, *C.parvum* (AF093489) の配列と比較したところ, Johnson らのプライマーは, PCR によって, Genotype W11 では 435 bp を, また, *C.parvum* では 438 bp を増幅させ (Fig. 4), 我々の結果と矛盾しない。

なお, Xiaoら<sup>27)</sup> は *Cryptosporidium* の 18S rRNA 遺伝子の領域内には種によって塩基配列が異なる部位 (position; 182-189, 273-286, 636-656, 689-699) があることを報告し, これらの部位を標的として PCR-RFLP 法やダイレクトシーク

エンス法により種の同定を行っている。本事例で検出されたオーシストは, PCR で *C.parvum* とは近縁種であるが異なる種に属することが示唆され, シークエンス解析により, *Cryptosporidium* sp. Genotype W11 と同じ配列をもつことが分かった。これらのことは, 未知の検体に対しては形態学的同定の後, PCR のみでなくシークエンス解析による種の同定が不可欠であることを示している。

本事例で原水から検出されたオーシスト数は最高 102 個/10 L であり, 国内の水道水の原水あるいは浄水中にクリプトスポリジウムが混入した事例で検出されたオーシスト数 (1~8 個/10 L)<sup>28)</sup> や, 国外で *C.parvum* による集団感染後の追跡調査において, 水道水などから検出されたオーシスト数 (1~9 個/10 L)<sup>29)</sup> に比較すると高い数値を示した。*C.parvum* のオーシストを用いた感染実験において Dupont ら<sup>30)</sup> は, 50% のヒトが感染をおこす投与量 ( $ID_{50}$ ) は 132 個であると推測している。また, 30 個の投与により, 5 人のうち 1 人が感染を引き起こしている。別の感染実験において  $ID_{50}$  は *C.parvum* の遺伝子型によって異なり, 9 個の投与量で感染が成立したと報告された<sup>31)</sup>。クリプトスポリジウムのヒトへの感染性を試験する方法として, 動物感染試験とヒト細胞株を用いた感染試験が示されて<sup>28)</sup> いるものの, 集団感染の患者に由来するオーシストは, 実験動物に対して感染が成立しない

ことが報告されている<sup>32)</sup>など、クリプトスポリジウムの感染性を評価する方法は確立されていない。

クリプトスポリジウムはその種によって宿主適合性を有し、爬虫類から分離されている *C. serpentis*, *C. saurophilum*, および *Cryptosporidium* sp. Genotype W11 は、宿主がヘビおよびトカゲのみ<sup>3)</sup>であり、ヒトからの分離例はない<sup>3)</sup>こと、本事例で検出されたクリプトスポリジウムのヒトへの感染性は下痢症患者からの病原体検出および健康調査によって証明されなかったことなどから、限りなく低いと思われる。しかし、HIV 患者など免疫機能が低下した人や、小児では *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* による感染例や、その他、*C. muris* による感染例も報告されており<sup>1,5)</sup>、爬虫類由来のクリプトスポリジウムのヒトへの感染の可能性は排除できない。本事例のように自然環境に存在するクリプトスポリジウムが水源の汚染原因になり得ることから、ヒトのみならず環境試料についても多種類のクリプトスポリジウムを効率的に検出・同定できる方法を確立しておくことが必要であろう。

## 要 旨

兵庫県内の簡易水道原水から 2001 年 9 月にクリプトスポリジウムのオーシストが検出された。水源から検出されたオーシストは 10 L あたり、最高 102 個に達し、9 月から 10 月の短期間に存在した。この期間、本病原体による住民の健康被害は証明されなかった。検出されたオーシストは形態学的には *C. parvum* と同定されたが PCR の結果は *C. parvum* と完全に一致せず、18S rRNA 領域のシークエンス解析により、Xiao らが示した爬虫類由来のクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium* sp. Genotype W11) であることが明らかになった。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、調査にご協力いただいた兵庫県生活衛生課水道係、ならびに山崎および龍野健康福祉事務所の関係者に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Current, W. L. and Garcia, L. S.: Cryptosporidiosis *Clin. Microbiol. Rev.*, **4**, 325-358(1991)
- 2) Xiao, L., Sulaiman, I., Fayer, R. and Lal, A. A.: Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **93**, 687-691(1998)
- 3) Xiao, L., Fayer, R., Ryan, J. and Upton, S. J.: *Cryptosporidium*

Taxonomy: Recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**, 72-97(2004)

- 4) Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., Holscher, M. A. and Yardley, J. H.: Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastro-enterology*, **70**, 592-598 (1976)
- 5) CDC: Cryptosporidiosis: Assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *MMWR*, **31**, 589-592(1982)
- 6) Hunter, P. R. and Nichols, G.: Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**, 145-154(2002)
- 7) MacKenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B. and Davis, J. P.: A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.*, **331**, 161-167 (1994)
- 8) 黒木俊郎: クリプトスポリジウムによる集団下痢症発生事例. 病原微生物検出情報. **15**, No. 11 (1994)
- 9) 羽賀道信, 山田勉: 汚染された水道水によるクリプトスポリジウムの集団発生. 病原微生物検出情報. **17**, No. 9 (1996)
- 10) 兵庫県健康福祉部生活衛生課: 山崎町において発生したクリプトスポリジウム検出による給水停止事例について. 2002年3月
- 11) 小野一男, 辻 英高, 増田 邦義, 川村 隆: 「感染症検査マニュアル」クリプトスポリジウム症. 兵庫県立衛生研究所, 2000年4月
- 12) 小野一男, 辻 英高, 増田 邦義, Rai, S. K., 宇賀 昭二, 松村 武男, 川村 隆: 水系腸管病原性原虫 *Cryptosporidium* の検査法の検討. 兵庫県立衛生研究所年報, **32**, 101-112 (1997)
- 13) 小野一男, 辻 英高, 島田 邦夫, 増田 邦義, 遠藤 卓郎: 河川水からの *Cryptosporidium* と *Giardia* の検出状況. 感染症学雑誌, **75**, 201-208(2001)
- 14) 遠藤卓郎, 八木田健司, 増田剛太, 黒木俊郎: クリプトスポリジウム症を中心とした原虫性下痢症診断のマニュアル. 国立感染症研究所, 東京 (2000)
- 15) Walker, M. J., Montemagno, C., Bryant, J. C. and Ghiorse, W. C.: Method detection limits of PCR and immunofluorescence assay for *Cryptosporidium parvum* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2281-2283(1998)
- 16) Awad-el-Kariem, F. M., Warhurst, D. C. and McDonald, V.: Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and



- endonuclease restriction. *Parasitology*, **109**, 19-22 (1994)
- 17) 古谷宏二, 八木田健司, 遠藤卓郎, 村上晋一, 都 築俊文, 木村浩男: クリプトスポリジウム原虫に関する研究 (第 1 報) 糞便内 *Cryptosporidium parvum* オーストの検出と同一のための PCR 法と免疫酵素染色法 北海道立衛生研究所報, **47**, 1-7 (1997)
- 18) Carraway, M., Tzipori, S. and Widner, G.: A new restriction fragment length polymorphism from *Cryptosporidium parvum* identifies genetically heterogeneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts. *Infect. Immun.*, **65**, 3958-3960 (1997)
- 19) Johnson, D. W., Pieniazek, N. J., Griffin, D. W., Misener, L. and Rose, J. B.: Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3849-3855 (1995)
- 20) Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante A. A., Montali, R. J., Fayer, R. and Lal, A. A.: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1578-1583 (1999).
- 21) Xiao, L., Limor, J., Morgan, U. M., Sulaiman, I. M., Thompson, R. C. and Lal, A. A.: Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 5499-5502 (2000)
- 22) Spano, F., Putignani, L., Guida, S. and Crisanti, A.: *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Exp. Parasitol.*, **90**, 195-198 (1998)
- 23) Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J., Royer, M. and Lal, A. A.: Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 5492-5498 (2000)
- 24) McLaughlin, J., Pedraza-Diaz S., Amar - Hoetzeneder C. and Nichols G. L.: Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic Cryptosporidiosis. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3153-3158 (1999)
- 25) McLaughlin, J., Amar-Hoetzeneder C. and Pedraza-Diaz S. and Nichols G. L.: Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 3984-3990 (2000)
- 26) Champliand, D., Gobet, P., Naciri, M., Vagner, O., Lopez, J., Buisson, J. C., Varga, I., Harly, G., Mancassola, R. and Bonnin A.: Failure to differentiate *Cryptosporidium parvum* from *C. meleagridis* based on PCR amplification of eight DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1454-1458 (1998)
- 27) Xiao, L., Morgan, U. M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R. C., Fayer, R. and Lal, A. A.: Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3386-3391 (1999)
- 28) 日本水道協会: クリプトスポリジウム-解説と試験方法- . 東京 2003
- 29) Howe, A. D., Forster, S., Morton, S., Marshall, R., Osborn, K. S., Wright, P. and Hunter, P. R.: *Cryptosporidium* oocysts in a water supply associated with a Cryptosporidiosis outbreak. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 619-624 (2002)
- 30) DuPont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B. and Jakubowski, W.: The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.*, **332**, 855-859 (1995)
- 31) Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., Crabb, J. H., Sterling, C. R. and DuPont, H. L.: Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.*, **180**, 1275-1281 (1999)
- 32) 山本徳栄: 水道水汚染によるクリプトスポリジウム症の集団発生. 埼玉医科大学雑誌, **28**, T-77-84 (2003)

## [ ノート ]

# 鶏肉及び人から分離された *Salmonella* Infantis の薬剤感受性試験 及び分子疫学解析

西海弘城\* 辻英高 福永真治 山岡政興

Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Salmonella* Infantis  
isolated from chicken and human

Hiroki NISHIUMI\*, Hidetaka TSUJI, Masaharu HUKUNAGA and Masaoki YAMAOKA

Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and  
Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

We used antimicrobial susceptibility and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) to study the genetic relatedness of 19 isolates of *Salmonella enterica* serovar Infantis (*S. Infantis*) isolated from chicken and human. All isolates from chicken were at least resistant to streptomycin and tetracycline. PFGE was able to discriminate between chicken and human isolates of *S. Infantis*. PFGE was useful as epidemiological tools for *S. Infantis*. Moreover, antibiotic patterns of *S. Infantis* corresponded to that of PFGE considerably.

## はじめに

サルモネラは腸炎ピブリオと並んで我が国における主要な食中毒原因菌の一つである。近年、サルモネラに汚染された鶏卵や卵加工品を原因食品とした食中毒が多発し、大きな社会問題となっている。一方、食肉も重要なサルモネラ感染源と考えられており、特に鶏肉では 20～50%がサルモネラで汚染されている<sup>1,2,3)</sup>。*Salmonella* Infantis(以下 *S. Infantis*)は、鶏肉から頻繁に分離されるサルモネラの一つであり、近年の薬剤耐性菌の増加傾向と合せてサルモネラ感染症を拡大させるのではないかと考えられている。

そこで、兵庫県下で分離された *S. Infantis* について、薬剤感受性試験を実施すると共にパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を用いて遺伝子型別を試み、疫学的解

析における本法の有用性について検討した。また、薬剤感受性パターンと遺伝子型別との関連性についても検討を行った。

## 材料と方法

### 1. 菌株

2004年4月から2005年6月に県内で市販されている鶏肉から分離された *S. Infantis* 16株及び定期検診で健康保菌者から分離された3株を試験に供した。

### 2. 薬剤感受性試験

米国臨床検査標準委員会(NCCLS)の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準<sup>4)</sup>に基づき、市販の感受性試験用ディスク(センシディスク:BD)を用いて行った。使用薬剤はアンピシリン(ABPC; 10 µg)、セフトキシム(CTX; 30 µg)、ゲンタマイシン(GM; 10 µg)、カナマイシン(KM; 30 µg)、ストレプトマイシン(SM; 10 µg)、テトラサイクリン(TC; 30 µg)、シプロフロキサシン(CPFX; 5 µg)、ナリジクス酸(NA; 30 µg)、スルファメトキサゾール/トリメトプリム

感染症部

\* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29  
兵庫県立健康環境科学研究所センター  
感染症部 西海弘城

合剤(SXT ; 23.75/1.25 µg) , クロラムフェニコール(CP ; 30 µg) , トリメトプリム(TMP ; 5 µg) , ホスホマイシン (FOM ; 50 µg)の12剤を用いた .

3. 薬剤耐性遺伝子の解析

SM 耐性遺伝子(*aadA1*) , TC 耐性遺伝子(*tetA*)について , それぞれの遺伝子に特異的なプライマー(Table 1)を用いてPCRにより検出を行った PCR反応は95 5分変性後 , 95 30秒 , 60 30秒 , 72 30秒を1サイクルとして35サイクルの増幅を行い , さらに72 で7分間追加伸長反応を行った .

Table 1. PCR primers used in this work

Gene	Size(kb)	Primer	Sequence 5'-3'	Reference
<i>aadA1</i>	526	aadA1F	GTGGATGGCGGCTGAAG	Sandvang et al (5)
		aadA1B	ATTGCCAGTCGGCAGCG	
<i>tetA</i>	210	tetAF	GCTACATCTGCTTGCCTT	Ng et al(6)
		tetAB	CATAGATCGCCGTGAAGA	

4. PFGE 法による遺伝子解析

Tryptosoy broth で一晩静置培養し Ribot らの方法<sup>7)</sup> に準じてプラグを作成した . プラグは 30U の *Bln* 及び *Xba* I で 37 , 2 時間処理した . 電気泳動は , 0.5×TBE buffer , 1%アガロースゲル , 電圧 6V/cm , パルスタイム 2.2-54.2 秒 , 泳動時間 19 時間で CHEF DR II (BIO-RAD) を用いて行った . 泳動後 , エチジウムブロマイドで染色し , 切断パターンを比較した . 菌株間の相違は 2 つの菌株において共有される DNA 断片の割合 (Dice 係数 :  $S_D$ ) を計算することによって調べた . この Dice 係数は , 公式 :  $S_D = 2 n_{xy} / (n_x + n_y)$  に従って計算した .  $n_x$  は分離菌株 X からの DNA 断片総数 ,  $n_y$  は分離菌株 Y からの DNA 断片総数 ,  $n_{xy}$  は 2 つの分離菌株で共通の DNA 断片数を示す . この  $S_D$  値が 1.0 に近いほど , それら 2 つの分離株は近縁種であることを示す . 算出された Dice 係数をもとにデンドログラムを UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) 法で MEGA 3<sup>8)</sup>を用いて作成し , 菌株間の相関を比較した .

結 果

1. 兵庫県で分離された *S. Infantis* の薬剤感受性

兵庫県における 2004 年 9 月から 2005 年 4 月にかけて分離された鶏肉由来株は , すべてが薬剤耐性株であり , それぞれ 2 剤以上の多剤耐性を示した (Table 2) . 鶏肉由来株は 5 剤耐性が最も多く (7 株 : 44%) , 以下 4 剤耐性 (4 株 : 25%) , 2 剤耐性 (3 株 : 19%) の順で , 3 剤耐性と 6 剤耐性が 1 株 (6%) ずつだった . 薬剤耐性パターンは , 同一販売店由来の菌株間ではお互いに同一で , 7 つの店由来

Table 2. Drug resistance pattern of *S. Infantis* strains isolated from chicken and human

Resistance Pattern	Number of isolates (%)	
	Human	chicken
ABPC, KM, SM, TC, SXT, TMP		1(6)
ABPC, SM, TC, SXT, TMP		3(19)
KM, SM, TC, SXT, TMP		4(25)
SM, TC, SXT, TMP		4(25)
KM, SM, TC		1(6)
SM, TC	1(33)	3(19)
Susceptible	2(67)	
Total	3(100)	16(100)

の菌株は 6 つのパターンを示した (Table 3) .

一方 , 健康保菌者由来株 3 株のうち 2 株は , すべての薬剤に感受性を示し , 1 株は SM 及び TC の 2 剤に対して耐性を示した (Table 2 , 3) . 兵庫県で分離された鶏肉及び人由来の *S. Infantis* 19 株のうち 17 株はすべて , 少なくとも SM と TC の 2 剤以上に耐性を示し , すべての薬剤耐性株からは , SM 耐性遺伝子 *aadA1* 及び TC 耐性遺伝子 *tetA* が検出された . 一方 , 人から分離された感受性株 2 株からはいずれの耐性遺伝子も検出されなかった .

Table 3. Characteristics of *S. Infantis* isolated from chicken and human.

No.	Shop	Source	Resistance Pattern	PFGE	
				<i>Bln</i>	<i>Xba</i>
1	A	Chicken	KM, SM, TC	B1	X1
2		Chicken	SM, TC, SXT, TMP	B2	X2
3		Chicken	SM, TC, SXT, TMP	B2	X2
4	B	Chicken	SM, TC, SXT, TMP	B2	X2
5		Chicken	SM, TC, SXT, TMP	B2	X2
6		Chicken	KM, SM, TC, SXT, TMP	B3	X2
7		Chicken	KM, SM, TC, SXT, TMP	B3	X2
8	C	Chicken	KM, SM, TC, SXT, TMP	B3	X2
9		Chicken	KM, SM, TC, SXT, TMP	B3	X2
10	D	Chicken	ABPC, KM, SM, TC, SXT, TMP	B4	X3
11		Chicken	SM, TC	B5	X4
12	E	Chicken	SM, TC	B5	X4
13	F	Chicken	SM, TC	B3	X5
14		Chicken	ABPC, SM, TC, SXT, TMP	B6	X3
15	G	Chicken	ABPC, SM, TC, SXT, TMP	B6	X3
16		Chicken	ABPC, SM, TC, SXT, TMP	B7	X6
17	-	Human	SM, TC	B8	X7
18	-	Human	Susceptible	B9	X8
19	-	Human	Susceptible	B10	X9

2. 兵庫県で分離された *S. Infantis* の PFGE による遺伝学的解析

PFGE による解析の結果 , 33.3 ~ 668.9kb に出現したバンド数は *Bln* I では 7 ~ 11 本 , *Xba* I では 16 ~ 20 本だった . これらのうち 1 本でも差異が見られた場合 , それぞれ異なるパターンとし , 任意に B1 ~ B10 (*Bln* I) , X1 ~ X9 (*Xba* I) と分類した (Fig. 1 , 2) . 鶏肉由来株 16 株は *Bln* I で 7 種類 (B1 ~ B7) , *Xba* I で 6 種類 (X1 ~ X6) のパターンを示した . 複数の菌株が分離された 4 販売店のうち 3 店の菌株の PFGE パターンは *Bln* I , *Xba* I いずれで処理された場合においてもお互いに同一であったが , G 店の 3

株は2種類のパターンが混在していた (Table 3, 4). 健康保菌者由来株3株は *Bln* I 及び *Xba* I でそれぞれ3種類 (B8 ~ B10, X7 ~ X9) のパターンを示し, 鶏肉由来株と PFGE パターンが一致する例は見られなかった. UPGMA 法で菌株間の相関を調べたところ, 88%の similarity で *Bln* I では5つクラスターに (Fig.3), *Xba* I では4つのクラスターに分かれた (Fig.4). また, *Bln* I の10パターンでは5.5%以上, *Xba* I の9パターンは84.7%以上の相関を示した (Fig.3, 4).

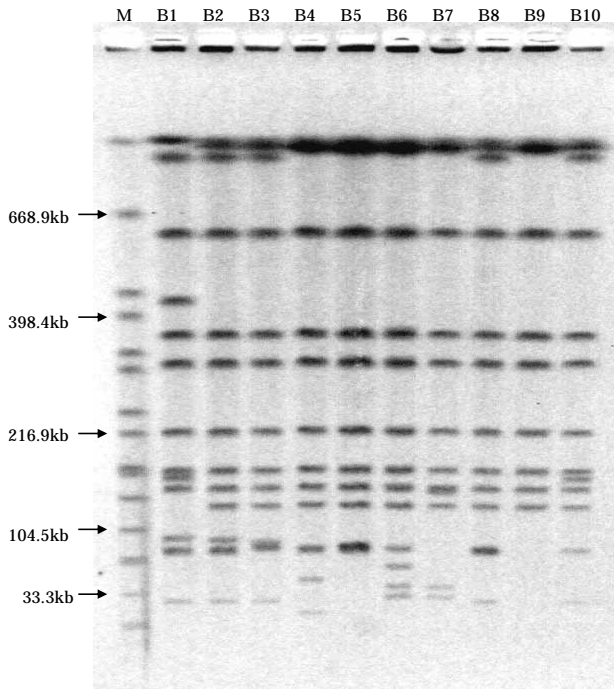


Fig.1. PFGE pattern of *Bln* I-digested chromosomal DNA of *S. Infantis*.  
B1 to B7 : isolated from chicken, B8 to B10: isolated from human.  
M: *Xba* I-digested chromosomal DNA of *S. Braederup* H9812

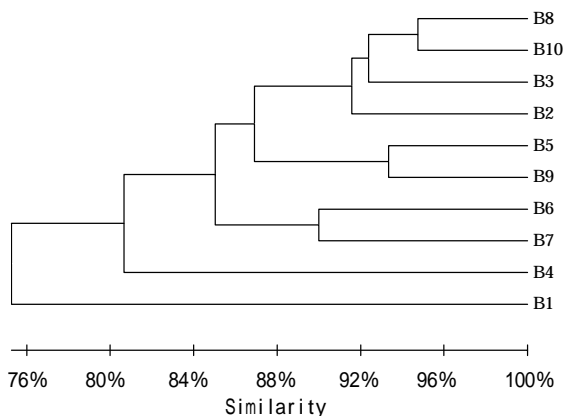


Fig.3. Dendrogram illustrating the clustering of PFGE patterns of *S. Infantis* genomic DNA digested with *Bln* I.

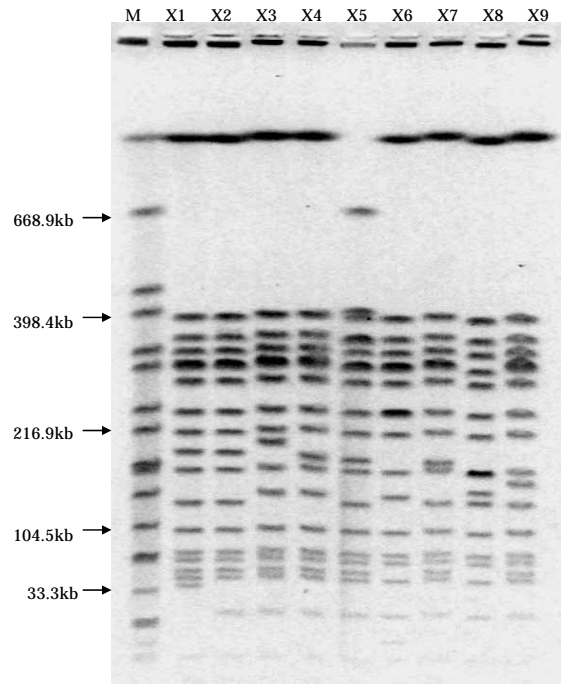


Fig.2. PFGE pattern of *Xba* I-digested chromosomal DNA of *S. Infantis*.  
X1 to X6 : isolated from chicken, X7 to X9: isolated from human.  
M: *Xba* I-digested chromosomal DNA of *S. Braederup* H9812

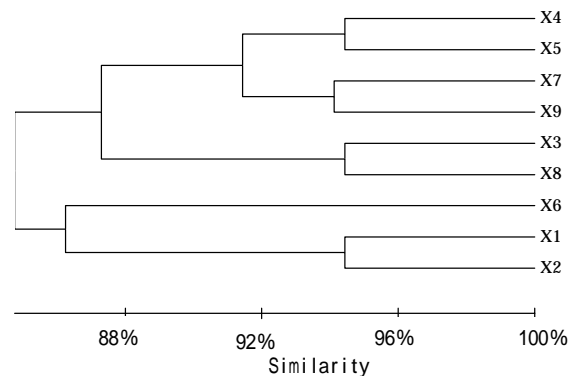


Fig.4. Dendrogram illustrating the clustering of PFGE patterns of *S. Infantis* genomic DNA digested with *Xba* I.

*Bln* I と *Xba* I の PFGE の結果を二次元で解析した (Table 4). B3 を示した5菌株はさらに X2 と X5 に分類された. これに対して, X2 に属する8株は B2 と B3 に分けられ, X3 を示した3株は B4 と B6 に分けられ, *S. Infantis* 19 株は 11 種類のパターンに分類された (Table 3, 4).

Table 4. Classification of types in isolated *S. Infantis* based on PFGE patterns with restriction enzyme, *Bln* I and *Xba* I

		:isolated from chicken									:isolated from human	Number of strains
		<i>Xba</i> I										
		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9		
<i>Bln</i> I	B1	1									1	
	B2		4								4	
	B3		4				1				5	
	B4			1							1	
	B5				2						2	
	B6			2							2	
	B7						1				1	
	B8							1			1	
	B9								1		1	
	B10									1	1	
Number of strains		1	8	3	2	1	1	1	1	1	19	

3. 薬剤感受性による型別及び *Bln* I と *Xba* I の二次元解析による型別間の相関

兵庫県の鶏肉及び人から分離された *S. Infantis* 19 株の薬剤感受性による型別を *Bln* I と *Xba* I を使用した PFGE パターンの型別と比較した (Table 3) . 薬剤耐性パターンは 6 つ、二次元 PFGE パターンでは 8 つに分類された . 販売店 A ~ D 由来の 10 菌株においては、薬剤感受性と二次元 PFGE パターンが 1:1 に対応し、販売店ごとに異なっていた . 販売店 E, F 由来の 3 株は SM と TC の 2 剤耐性株で、薬剤感受性では区別できなかったが、PFGE では店によって B5/X3 と B3/X5 に分けられた . 販売店 G 由来の 5 剤耐性 3 株は 2 群に分かれた . また、PFGE の二次元解析により、鶏肉由来株と人由来株はお互いに異なる領域に位置した (Table 4) .

考 察

安藤ら<sup>9)</sup>は鶏から分離された *S. Infantis* 28 株の薬剤感受性を調べた結果、全ての株が SM と TC を含む 2 剤以上の薬剤に対して耐性を示したと報告している . また、中村ら<sup>10)</sup>は人及び鶏から分離された *S. Infantis* 65 株の薬剤感受性を調べた結果、食中毒由来株及び 1 株を除く健康保菌者由来株は全て感受性を示し、鶏由来株は少なくとも SM と TC の 2 剤に対して耐性を示したと報告している . 一方、竹田ら<sup>11)</sup>は散発下痢症患者の他、鶏、豚等の動物から分離された *S. Infantis* 70 株の薬剤感受性を調べ、散発下痢症患者由来 6 株中 5 株及び豚由来株 1 株を除く動物由来 63 株が多剤耐性株であり、多剤耐性株は SM と TC を含む 2 剤以上の薬剤に対して耐性を示したと報告している . 今回、鶏肉由来株は全ての株が SM と TC

を含む 2 剤以上の薬剤に対して耐性を示し、これらの報告と一致した . また、鶏肉由来株がすべて多剤耐性を示したのに対し、健康保菌者由来 3 株のうち 2 株は薬剤感受性を示したことから、健康保菌者から分離された *S. Infantis* は鶏肉とは異なる経路による感染であることが示唆された . 薬剤感受性試験の結果から得られたこの鶏肉由来株と人由来株に差異が存在するとして示唆を PFGE による分子生物学的解析によって明確に証明することができた . 以上の結果から PFGE による分子生物学的解析は *S. Infantis* の疫学解析のための有力な手段となることが分かった . また、人由来あるいは鶏肉由来を問わず薬剤耐性株はすべて SM と TC を含む薬剤に対して耐性を示し、他の報告と一致したことから、我が国の鶏は SM 及び TC 耐性遺伝子を獲得した *S. Infantis* が広く侵淫していることが示唆された .

*Bln* I または *Xba* I による PFGE 法による 2 次元解析を行った結果、鶏肉由来株は由来毎に区別することができた . 一方、今回分離された菌株の PFGE パターンは、健康保菌者由来株を含めて *Bln* I では 75.5% 以上、*Xba* I では 84.7 % 以上の高い相似性を示しており、遺伝学的に非常に近縁なものが広く分布していると考えられた .

*S. Infantis* は、鶏肉から頻りに分離されるサルモネラの一つであり、サルモネラ感染症を拡大させる新たな原因となりうると思われる . また、近年、*S. Infantis* の多剤耐性について問題となっており、今後も、菌株数を増やし、有症者由来株も加えて、この血清型の動向を監視し続けていく必要がある .

## 要 旨

鶏肉および人から分離された *S. Infantis* 菌株間で薬剤感受性試験及び PFGE による DNA 切断パターンの比較を行った。鶏肉由来株はすべて少なくとも SM 及び TC を含む耐性株だった。PFGE による遺伝学的解析によって鶏肉及び人由来の *S. Infantis* は互いに異なることが明確に示され、PFGE は *S. Infantis* の疫学マーカーとして十分な解析力を有することがわかった。また、薬剤耐性パターンと遺伝子型別はほぼ一対一での関連性が示された。

## 謝 辞

菌株の収集に協力いただいた県下健康福祉事務所の関係諸氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 山中千恵子, 山本恭子, 森田陽子, 中尾昌史, 梅迫誠一, 市村國俊: 食肉におけるサルモネラ, カンピロバクター, エルシニア, リステリアの検出状況. 奈良衛研年報, **28**, 116-119(1994)
- 2) 安岡富久, 高橋富世, 出口祐男: プロイラー・鶏肉におけるカンピロバクターおよびサルモネラ菌の検出. 高知衛研報, **41**, 37-41(1995)
- 3) 保科健, 糸川浩司, 福島博, 板垣朝夫, 五明田孝: 食肉の流通過程における *Salmonella* 汚染状況. 島根衛公研所報, **35**, 29-33(1993)
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Approved Standard M2-A7. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard 7th ed. NCCLS, Wayne, Pa. (2000)
- 5) Sandvang, D. Aarestrup, F. M. Jensen, L. B.: Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**, 37-41(1998)
- 6) Ng, L. K. Mulvey, M. R. Martin, I. Peters, G. A. Johnson, W.: Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**, 3018-21. (1999)
- 7) Ribot, E. M. Fitzgerald, C. Kubota, K. Swaminathan, B and Barret, T. J.: Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*, **39**, 1889-1894 (2001)
- 8) Kumar, S. Tamura, K. Nei, M.: MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, **5**, 150-163(2004)
- 9) 安藤陽子, 小野一晃, 辻りえ, 増谷寿彦, 藤原有紀子, 倉園貴至, 柳川敬子: 市販鶏肉のサルモネラ汚染調査と *Salmonella* *Infantis* の PFGE 法による解析. 日本食品微生物学雑誌, **20**, 123-127(2003)
- 10) 中村寛海, 長谷篤, 石井營次: 大阪市内で分離されたヒトおよび鶏由来 *Salmonella* *Infantis* の薬剤感受性. 大阪市環科研所報, **66**, 59-63(2004)
- 11) 竹田義弘, 東久保靖, 小川博美: 広島県内の動物と散発事例患者から分離されたサルモネラの疫学的比較検討. 広島県保環センター研報, **10**, 19-27(2002)

## [ ノート ]

## 鉱物油による環境汚染時の GC-MS を用いた汚染成分の分析事例

藤原 英隆\* 鈴木 元治 吉岡 昌徳 中野 武

Case Study of Analysis for Pollution Constituents with GC-MS in the Oil Spill Accident

Hidetaka FUJIWARA\* , Motoharu SUZUKI , Masanori YOSHIOKA and Takeshi NAKANO

*Environmental Safety Division , Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences , 3-1-27 Yukihiro-cho, Suma-ku , Kobe, 654-0037 , Japan*

Qualitative analysis of the samples contaminated with mineral oil spill, kerosene, light oil and heavy oil (A) was done by using GC-MS, and the constituents of n-alkanes and aromatic hydrocarbons were compared. In the case of the sample from oil spill accident, it was confirmed that the polluted constituents were changed as a result of the movement and the difference of behavior in the medium. It is also confirmed that the pollutant was similar to the constituents in heavy oil (A). Samples from the dumping site by illegal oil manufacturer have shown the influence from mixing kerosene and heavy oil (A) in manufacturing process.

## はじめに

鉱物油による環境汚染が発生する主な事例としては、工場や事業場等で燃料貯蓄用タンク及びその配管等の破損により油の流出が発生した場合、タンカーやタンクローリー等での運搬中に流出事故が発生した場合、廃油や不正軽油製造工程から排出される硫酸ピッチ・スラッジ等の油分を含む廃棄物の不法投棄が発生した場合等が挙げられる。

このような事例において汚染原因の究明や汚染拡大の防止及び汚染浄化のための対策を講じる上で汚染物質の成分に関する情報は非常に重要である。油分の一般的な分析としては n-ヘキサン抽出物質試験法<sup>1)</sup>がある。しかしこの方法では汚染物質について、n-ヘキサン抽出物質の量として把握することは可能であるがその成分の把握は不可能であり、成分情報を得るためには GC-MS 等を用いた定性分析が必要となってくる。一般に鉱物油は脂肪族炭化水素類と芳香族炭化水素類等により構成されており、鉱物油の種類によりそれぞれの構成比が異なる傾向があることが知られている<sup>2)</sup>。

今回このような鉱物油の特性を踏まえ、実際に県下で発生した重油流出事故及び不正軽油製造に伴う廃棄物の不法投棄事例について、GC-MS を用いた油分中の炭化水素に関する定性分析を行い、代表的な脂肪族直鎖炭化水素と芳香族炭化水素類の成分について相対強度等を用いた市販の油類との比較を行ったので報告する。

## 方 法

## 1. 試料の採取

## 1) 重油流出事故事例

燃料用 A 重油貯留タンクからの重油流出事故発生現場において、タンク内の A 重油（市販品）、タンク直近の汚染土壌（試料 A-1）、流出現場付近の掘削孔における油膜を含む浸出水（試料 A-2）、流出現場付近の油膜を含む水路水（試料 A-3）の 3 試料を採取した。

## 2) 不正軽油製造に伴う廃棄物の不法投棄事例

不正軽油製造に伴い発生した硫酸ピッチ等の大量不法投棄現場における、掘削作業時の油分を含む浸出水（試料 B-1, B-2）2 試料を採取した。

## 2. 試薬及び標準品

n-ヘキサンは和光純薬工業株式会社、PCB 試験用、灯油

安全科学部

\* 別刷請求先：〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究センター  
安全科学部 藤原 英隆

Table 1 GC/MS operation conditions

Gas chromatograph	HP-5890 (Agilent Technologies)
Mass spectrometer	JEOL JMS-AM150
Column	Agilent Ultra-2 (25m × 0.20mm ; 0.33 μm)
Carrier gas	Helium(Flow rate ; 1mL/min)
Oven temp	50 (2min) - 12 /min - 300 (2min)
Injection mode	Splitless(purge on time ; 1.5min)
Injection temp.	200
Ion source temp.	230
Interface temp.	250
Ionization voltage	70eV
Ionization current	300 μA
Injection volume	2 μL
MS mode	scan (50-400)

軽油は市販品を使用した。

### 3. 試料からの鉱物油成分の抽出

#### 1) 土壌試料

試料約 0.25mg を共栓付試験管中で n-ヘキサン 10mL により約 5 分間超音波抽出し、n-ヘキサンにより 10 倍に希釈し分析試料とした。

#### 2) 水質試料

重油流出事故事例：試料約 150mL を n-ヘキサン約 5mL で抽出後、n-ヘキサンにより 20 ~ 100 倍に希釈し分析試料とした。

不正軽油事例：試料約 5mL を n-ヘキサン約 10mL で抽出後、n-ヘキサンにより 100 ~ 1000 倍に希釈し分析試料とした。

### 4. GC/MS 分析条件

n-ヘキサン抽出試料について、GC/MS のスキャンモードによる定性分析を行った。分析条件を Table 1 に示す。

## 結果及び考察

### 1. トータルイオンクロマトグラム(TIC)の比較

2 事例の試料と、比較対照としての灯油、軽油、A 重油について定性分析を行い、各試料の Fig.1 (A) のトータルイオンクロマトグラム(TIC)を得た。

今回の分析条件では、灯油については炭素数 9 ~ 17 ( $C_9 \sim C_{17}$ ) の直鎖型<sup>2)</sup>の脂肪族炭化水素類を示すほぼ等間隔のピークが検出され、さらに分岐型<sup>2)</sup>の脂肪族炭化水素類の小さいピークも多数検出された。軽油及び A 重油<sup>3)</sup>は脂肪族炭化水素類については両者類似しており、いずれも今回の分析条件では炭素数 9 ~ 25 ( $C_9 \sim C_{25}$ ) の直鎖型脂肪族炭化水素類のピークが検出され、灯油と同様に分岐型の脂肪族炭化水素類の小さいピークも多数検出された。灯油に比べ軽油及び重油ではリテンションタイムの遅いピーク(高沸点成分)が強く検出されたことが特徴的であった。これらは中牟田らの報告<sup>2) 3)</sup>とも類似した結果であった。

重油流出事故において、直近土壌(試料 A-1)と掘削孔浸

出水(試料 A-2)では、A 重油と比較すると  $C_{13}$  までのピークが相対的に減少し、水路水(試料 A-3)では  $C_{14}$  までのピークが相対的に減少し炭素数が多い方にシフトしているのが特徴的であった。

不正軽油の浸出水(試料 B-1, B-2)は、比較的類似したクロマトグラムを示しており、重油流出事故の試料と比較して  $C_9 \sim C_{13}$  のピークが強く検出され、灯油と重油を合わせたような TIC の形状となっているのが特徴的であった。

### 2. フラグメントイオンピーク強度比パターンの比較

#### 1) 直鎖型脂肪族炭化水素類について

各試料について、炭素数 9 ~ 25 ( $C_9 \sim C_{25}$ ) の直鎖型脂肪族炭化水素類のフラグメントイオンに相当するピーク強度比 ( $C_9 \sim C_{25}$  の各ピーク強度 /  $C_9 \sim C_{25}$  のピーク強度の和 × 100) のパターンを Fig.1 (B) に示す。

灯油については、 $C_9 \sim C_{17}$  のフラグメントイオンピークが現れ、 $C_{10}$  を頂点として高沸点成分側の  $C_{17}$  に向け減少していく形のパターンとなった。軽油及び重油についても、 $C_9 \sim C_{25}$  のフラグメントイオンピークが現れ、両試料とも  $C_{16}$  を頂点とするほぼ同型のパターンとなった。重油流出事故の直近土壌(試料 A-1)では、 $C_9 \sim C_{24}$  のフラグメントイオンピークが現れ  $C_{16}$  を頂点とする軽油及び重油に類似するパターンとなった。重油と比べ頂点である  $C_{16}$  のピークが高く、相対的に  $C_{17} \sim C_{24}$  の高沸点成分が増大し、 $C_9 \sim C_{15}$  の低沸点成分が減少するパターンとなった。掘削孔浸出水(試料 A-2)ではさらにパターンの頂点が高沸点成分側の  $C_{17}$  にシフトしており、直近土壌(試料 A-1)と同様に高沸点成分が増大し、低沸点成分が減少するパターンとなった。水路水(試料 A-3)では、試料 A-1 と試料 A-2 と比較して高沸点成分の増大と、低沸点成分の減少が顕著なパターンとなっている。これらは、サンプリング位置が試料 A-1 A-2 A-3 の順に漏洩場所からの距離が増大したことに伴う、汚染物の一部成分の移動中の揮散<sup>4)</sup>、生物分解、クロマト効果<sup>2,5)</sup>や移動媒体(土壌、水質)への溶解性の違い<sup>2,4,5)</sup>等種々の要因により高沸点成分、低沸点成分の挙動の違いが現れた結果であると推測され、また現場の状況(時間経過、位置関係、地形・地質、温度等)の把握の重要性が示唆された。

不正軽油事例の浸出水(試料 B-1, B-2)では、 $C_9 \sim C_{25}$  フラグメントイオンピークが現れ、 $C_{10}$  を頂点とするが  $C_{15}$  にも頂点を有する特徴的なパターンとなった。これは、TIC の形状のところでも述べたが、ちょうど灯油と A 重油のピークの特徴を合わせ持った形状を有しており、不正軽油製造工程における灯油成分と重油成分の混合によると推測される。

#### 2) 芳香族炭化水素について

灯油、軽油及び重油には多種の芳香族炭化水素<sup>6,7)</sup>が含有されるが、今回はそれらのうちナフタレン、メチルナフタレ



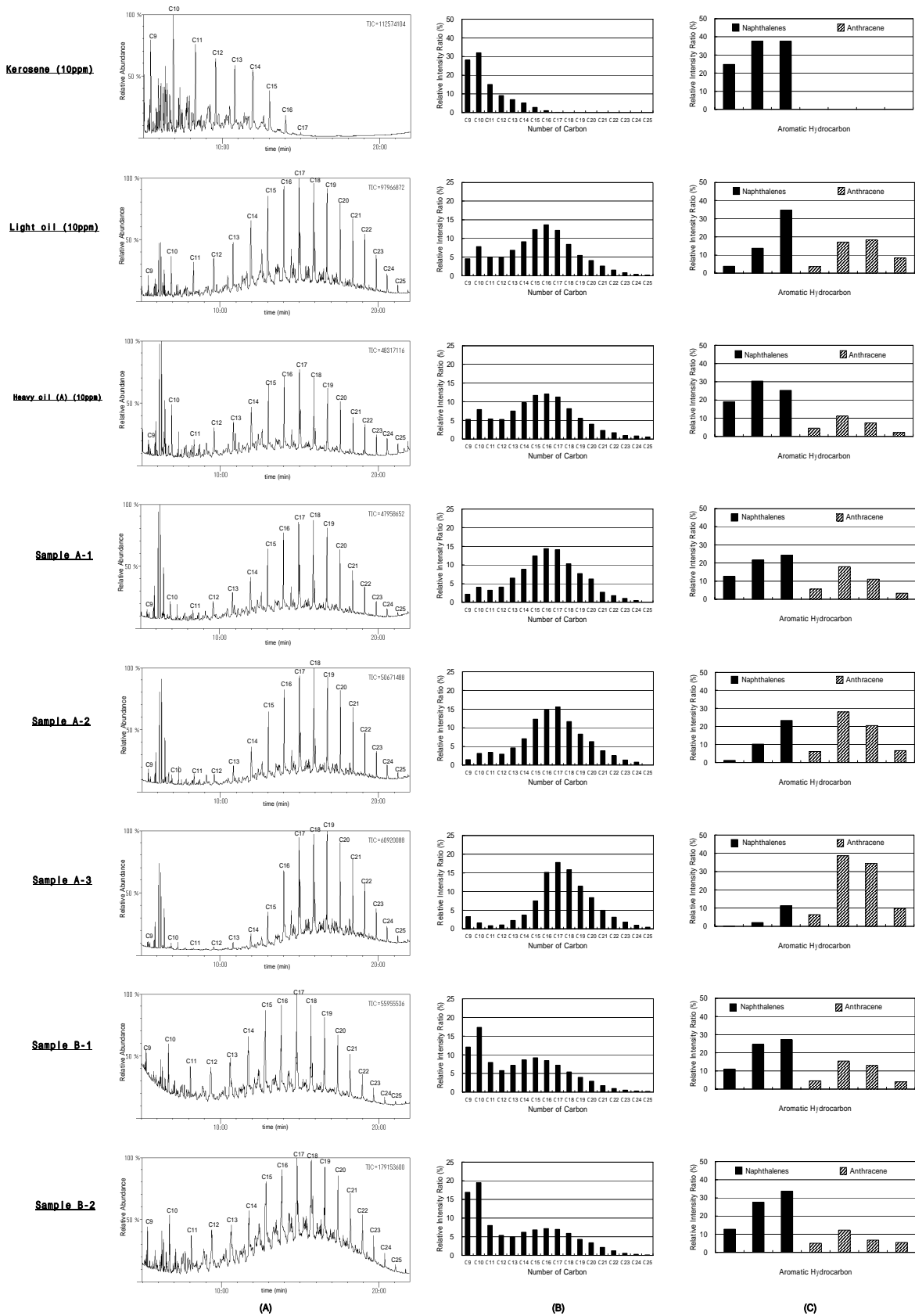


Fig.1 Results of GC-MS analysis  
 (A) Total ion chromatograms (B) Relative intensity ratio of n-alkanes  
 (C) Relative intensity ratio of aromatic hydrocarbons  
 Naphthalene, Methyl naphthalene, Dimethyl naphthalene, Anthracene,  
 Methyl anthracene, Dimethyl anthracene, Trimethyl anthracene

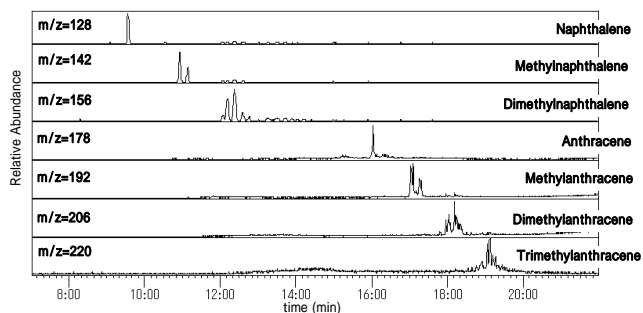


Fig.2 Mass chromatogram of aromatic hydrocarbons in heavy oil

ン、ジメチルナフタレン、トリメチルナフタレン、アントラセン、メチルアントラセン、ジメチルアントラセン、トリメチルアントラセンに着目し、Fig.2 に示すそれぞれ特徴的なフラグメントイオンに相当するピーク強度比(各芳香族炭化水素の強度 / 7種類の芳香族炭化水素の強度の和 × 100)のパターンをFig.1 (C)に示す。

灯油では、今回の分析条件においてはナフタレン類の3物質が検出されたのに対し、軽油及びA重油ではナフタレン類とアントラセン類7物質全てが検出された。軽油とA重油を比較するとピーク形状に相違が見られ、軽油ではジメチルナフタレンのピークが高いが、A重油ではメチルナフタレンのピークが高かった。

重油流出事故の直近土壌(試料A-1)では、A重油に近いパターンが確認された。掘削孔浸出水(試料A-2)と水路水(試料A-3)ではナフタレン類のピークが減少する傾向が見られ、脂肪族直鎖炭化水素の場合と同様に移動に伴う成分の変化が推測される。

不正軽油事例の浸出水(試料B-1, B-2)では、パターン形状やナフタレン類とアントラセン類のピーク割合から見てA重油に近いパターンが確認された。

### 3. 脂肪族直鎖炭化水素と芳香族炭化水素の強度比の比較

全ての試料について、今回の分析条件で検出された脂肪族直鎖炭化水素の強度の和と芳香族炭化水素の強度の和を比較したものをFig.3に示す。

灯油及び軽油については脂肪族直鎖炭化水素の強度割合が高く、A重油においては芳香族炭化水素の強度割合が高いのが特徴であった。

重油流出事故の3試料(試料A-1~A-3)では、芳香族炭化水素の強度割合が高くA重油と類似する結果であった。

不正軽油事例の2試料(試料B-1, B-2)では、芳香族炭化水素の強度割合が高いが、重油流出事故の試料と比較して、脂肪族直鎖炭化水素の割合が増加する傾向が見られた。この原因としては、脂肪族直鎖炭化水素のフラグメントイオンピーク強度比パターンの比較で述べた理由と同様に、不正軽油

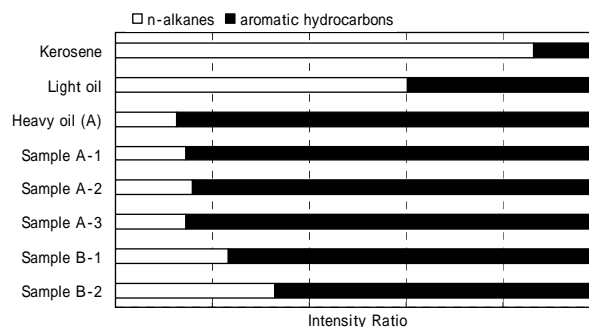


Fig.3 Intensity ratio between n-alkanes and aromatic hydrocarbons

製造工程における灯油成分とA重油成分の混合によると推測される。

## まとめ

重油流出事故事例の試料、不正軽油事例の試料について市販の灯油、軽油、A重油を対照にしてGC-MSによる定性分析を行った。

重油流出事後の試料については、得られたTIC及びフラグメントイオンピーク強度比パターンの比較から漏洩場所からの距離の増大や移動媒体の変化による汚染物の一部成分の分離が確認され、脂肪族直鎖炭化水素と芳香族炭化水素の強度比の比較から、A重油に類似した成分を有することが確認された。

不正軽油事例の試料では、TIC及びフラグメントイオンピーク強度比パターン及び脂肪族直鎖炭化水素と芳香族炭化水素の強度比の比較から、汚染物成分において不正軽油製造の工程における灯油成分と重油成分の混合による特徴が確認された。

## 謝 辞

本研究に当たり、試料の採取にご協力を頂きました兵庫県環境局環境整備課、北播磨及び西播磨県民局環境課の関係者の方々に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 日本規格協会編：JISハンドブック(53)環境測定(水質)、2002年版、p.1090-1091、日本規格協会、東京(2002)
- 2) 中牟田啓子、福嶋かおる、松原英隆、神野健二：鉱物油による環境汚染時の原因究明調査法の検討。環境化学、11、815-826(2001)
- 3) 中牟田啓子、木下誠、小林登茂子：福岡市内を流通しているA重油と軽油の識別方法。福岡市保健環境研究所年報、No.28、

97-100 (2003)

- 4) 中牟田啓子, 松原英隆: 福岡市内で使用されている鉱物油の全成分及び水溶性成分のGC/MSによる分析. 福岡市保健環境研究所年報, No.23, 135-144 (1998)
- 5) 山中栄美, 松原英隆: 鉱物油の全成分及び水溶性成分のGC/MSによる分析. 福岡市保健環境研究所年報, No.21, 87-92

(1996)

- 6) 柴田康行: 石油成分の分析について. 環境化学, 7, 577-593 (1997)
- 7) 劔持堅志, 荻野康夫, 松永和義, 森他忠繁, 緒方正名: 油汚染時における化学成分のスクリーニング分析, 環境化学, 7, 561-576 (1997)

## [ ノート ]

# 水田地域における河川水中農薬調査

吉田 光方<sup>1\*</sup> 藤森 一 男<sup>2</sup>

The Study of Pesticide in the River Water around the Paddy Area

Mihoko YOSHIDA<sup>1\*</sup> and Kazuo FUJIMORI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Environmental Safety Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe 652-0032, Japan and* <sup>2</sup>*Project Planning and Information Division*

The pesticide concentrations and flow rates in the river water were analyzed, and the behavior of pesticide loads around the paddy area was studied.

The detection of the herbicide is related to the rice-planting dates. The detection of the fungicide is effected by not only the load from paddy fields but also aerial application. This behavior of fungicide is more complicated than the herbicide because of the various dates and methods of application.

## はじめに

近年、多種多様な農薬が生産・販売され、農耕地やゴルフ場をはじめと広く散布されている。その一方で、環境汚染に対する関心は高まり、農薬が多少なりとも生態リスクをもつ<sup>1),2)</sup>ことによる人体影響や水質汚濁への不安は増している。このような状況のなか、公共用水域における農薬に関する測定・研究は数多くなされてお<sup>3)-8)</sup>、兵庫県においても環境中での農薬の監視を目的とした測定を実施している<sup>9)</sup>。これらの調査結果からは低濃度ながら、水田で使用された農薬の河川への流出が指摘されている。

当センターでは、年1~6回の割合で常時監視の観点から環境基準及び要監視項目の16農薬成分、並びにゴルフ場農薬の暫定指導指針値設定農薬45成分を分析している。その一方で、工場やゴルフ場などの事業所と異なり、排水基準が設けられておらず、また栽培品種及び適用時期ごとに多種類の農薬を効果的に使い分けている農耕地に

おいては、実際に使用されている農薬数及び散布時期に対応して全ての環境への影響を把握しきれていない状況である。

兵庫県内における耕地面積63000haの約6割を占める39800haの水田地域<sup>10)</sup>において使用される農薬についての詳細な調査は過去に事例がない。さらに、春先における除草剤散布及び夏季の無人ヘリコプターによる空中防除などは水稲栽培の省力化に貢献する一方で、環境中への拡散は看過できない問題であり現状を把握する必要がある。

そこで本研究では、兵庫県中央部に位置する水田地域において河川水中の農薬82種類の濃度変動を調べ、とりわけ農薬が多く散布される春~夏にかけ採水頻度をあげ調査した結果、いくつかの知見が得られたので報告する。

## 方 法

### 2.1 調査地点

#### 2.1.1 地域の概要

調査対象地域は、兵庫県の中央部に位置する多可郡加美町内の多田地区とした。加美町は面積84.06km<sup>2</sup>、人口7,398人(2005年7月現在)の自然豊かな町であり、千ヶ峰に源流を發する多田川沿いに築かれた棚田は、農林

<sup>1</sup>安全科学部、<sup>2</sup>現 企画情報部

\* 別刷請求先：〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27  
兵庫県立環境科学研究所センター  
安全科学部 吉田 光方

水産省「日本の棚田百選」にも選ばれ、県下でも有数の水稲栽培地域である。

多田地区の水田では、コシヒカリを中心に、酒米の山田錦も生産されている。多田地区内の2004年度の水稲作付け面積は3734a（みのり農業協同組合加美町営農経済センター調べ）であった。多田地区の田植えは、例年5月連休～中旬にかけ行われている。この地区の田植えは、多田地区から下流に広がる西脇などの地域と比較して、半月～1月程度早く行われる。

### 2.1.2 採水地点

調査地点の概略図をFig.1に示す。

多田川は、河川長さ約5kmの小河川であり、杉原川に合流し、さらに西脇市内で1級河川の加古川へと続いている。調査地点は、水田からの排水の影響を最も受けると考えられる動態観測点として多田川の流末付近のG橋（以下、地点Gと示す）を、上流部観測点として杉原川のI橋（以下、地点Iと示す）を、下流部観測点として多田川と杉原川の合流後、約1km下流に位置する杉原川のT橋（以下、地点Tと示す）と、さらに約10km下流のK橋（以下、地点Kと示す）の4地点を選定した。

## 2.2 調査方法

### 2.2.1 採水時期

調査は、2004年4月26日から2005年2月14日までおよそ10ヶ月にわたり行った。

採水は、田植えの時期や稲の生育状況に左右される農薬散布の時期を考慮して行った。農薬使用量の多い春から夏にかけては少なくとも週に1回の頻度で採水し、なかでも田植え時期で除草剤が集中的に散布されたと推察される5月中旬は毎日、空中散布が実施された後は約6

時間おきに数回と高頻度で採水した。

農薬の使用が少なくなった秋以降は2～3週間に1回の頻度で各地点49回、延べ196の河川表層水を採取した。

### 2.2.2 採水方法

採水は、午前中から昼にかけて上流部から下流部へと順に、ステンレス製のバケツを橋上からおろして河川流心で行った。流量は、プロペラ式流量計（東邦電探製；CM-1B型電気流量計）を用い流心で測定し、川幅、水深を乗じてもとめた。pHは、pHメーター（堀場製作所製；pHメーターD-12）を用いて測定した。

## 2.3 調査対象農薬

調査では、種類別分類により殺虫剤（insecticides）21種類、殺菌剤（fungicides）24種類、除草剤（herbicides）37種類の合計82種類の農薬を対象とした。これら農薬の選定根拠は、人の健康の保護に関する環境基準値<sup>11)</sup>や指針値<sup>12),13)</sup>が定められていること、また対象地域の水田で大量に使用されていると推定されることによった。

また対象農薬の使用場所としては、主に水田で使用されると推定される農薬が24種類、ゴルフ場が29種類、両方での使用が想定されるものが27種類であった。1,3-ジクロロプロペン（D-D剤）及びECPの2種類は、野菜などの栽培時に畑の土壌くん蒸剤や処理剤などに利用される薬剤であり、どちらにも属さないものと分類された<sup>14)</sup>。

## 2.4 分析方法

チウラム、オキシ銅など19農薬は、河川水500mLをWaters社製PS-2カートリッジに吸着させ、アセトニトリルで溶出したのちHPLCで分析を行った。

1,3-ジクロロプロペンは河川水10mLをヘッドスペース法で、その他62農薬は河川水500mLをWaters社製PS-2、AC-2カートリッジに吸着させ、ジクロロメタンで溶出し、内標準物質としてヘキサクロロベンゼン-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>及びフルオランテン-d<sub>10</sub>を添加後、GC/MSによる分析に供した。装置の測定条件など詳細は既報<sup>15),16)</sup>に準じた。

## 結果および考察

### 3.1 使用農薬及び推定散布量

調査対象の多田地域において、2004年度に使用された農薬の詳細をTable1に示した。

a（水田直接散布）は、田植え前及び田植え直後に個々の農家が稲の苗箱に施用した殺虫殺菌剤、及び水田に直接散布した除草剤についてまとめたものである。これらの薬剤の多田地域における対象面積は、作付け面積のほ

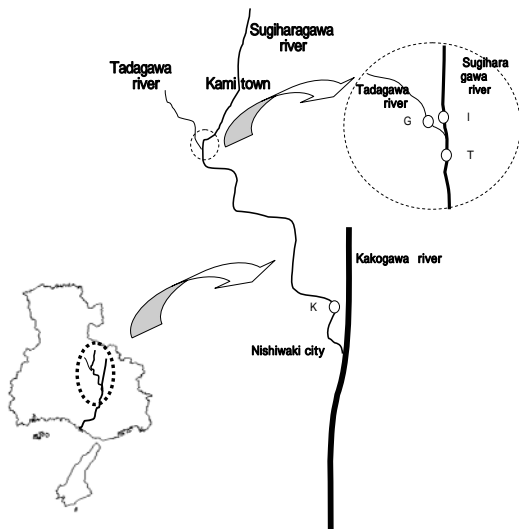


Fig.1 Map of sampling sites

Table 1 Data for application of pesticide

a: paddy field application

target area(a)	application time	pesticide / commercial name	component%	application rate (Kg,mL/a)	assumed application volume (kg)
3734	April ~ May	insecticide & fungicide / Digital coratop actar a granule	thiamethoxam 2% pyroquilon 12%	0.1 kg	7.5 45
3734	April ~ May	herbicide / Shokinie F	bromobutide 18% pentoxazone 4%	50 mL	34 7.5
3734	April ~ May	herbicide / Joystar granule	cafenstrole 2.1% dymron 4.5% cyhalofop-butyl 1.5% bensulfuron-methyl 0.51%	0.1 kg	7.8 5.6 17 1.9

b: aerial application

species of rice	target area(a)	application time (day)	pesticide / commercial name	component%	application rate (Kg,mL/a)	assumed application volume (kg)
Koshihikari	796	June(6/28)	fungicide / Coratop granule12	pyroquilon 12%	0.1 kg	9.5
Koshihikari	2299	July(7/23)	fungicide / Kasurabvalidasol	fthalide 15%	10 mL	3.4
Koshihikari	2258	August(8/12)	insecticid / Mr.Joker EW	silafuofen 19%	5 mL	2.1
Yamadanishiki	110	July(7/28)	insecticide & fungicide / Amistar torebos SE	ethofenprox 10% azoxystrobin 8%	10 mL	0.1 0.1
Yamadanishiki	110	August(8/21)	fungicide / Kasurabvalidasol	fthalide 15%	10 mL	0.2

とんど全域で使用されることから、3734 a とした。薬剤は、「水稲病害虫防除ごよみ」(みのり農業協同組合配布資料)に記されている薬剤の商品名とその含有成分量を示した。使用基準は、薬剤ごとに定められている単位面積あたりの散布量である。

推定散布量は、以下の計算式により求めた。

推定散布量(kg) = 対象面積(a) × 使用基準(kg/a) × 含有量

この推定散布量と、実際に2004年度にみのり農業協同組合加美町営農経済センターで販売したそれぞれの薬剤量(同センターからの聞き取り)とを比較すると、3種類ともに8割以上が使用された結果となり、各農家が必要分だけ農薬を購入し、使用基準を遵守して散布されたと推察された。

b(空中散布)は、稲の生育時6~8月にかけて農家が同協同組合に依頼して、病害虫駆除のため無人ヘリコプターによる空中散布で使用した殺虫殺菌剤、殺虫剤、殺菌剤についてまとめたものである。対象地域における空中散布は、いずれの日も早朝から午前中にかけて実施された。薬剤の散布は、稲を風圧で痛めない程度の高さから、液状の農薬を噴霧する方法により行われた。

前述の水田直接散布の農薬使用とは異なり、希望する農家の水田にのみ集中して散布されるため、対象面積は使用薬剤や品種により大きく変化している。栽培量の違いからコシヒカリ対象の薬剤散布面積が山田錦対象面積よりも広がっている。コシヒカリのなかでも、7,8月の薬剤散布面積は、6月の場合と比較して広く、対象地域全域の6割以上の2300aの水田において空中散布が依頼された。

推定散布量は、上述したように、対象面積に使用基準

及び含有量を乗じることで求めた。この推定散布量と実際に空中散布に使用した薬剤量(同協同組合聞き取り)とは、概ね合致した。

以上から、本調査で分析対象とした農薬成分のうち、多田地域での農薬散布推定量は、殺菌剤のピロキロン(aとbの合計)が55kgと最も多く、次いで除草剤のプロモブチド34kg、ダイムロン17kg、ペントキサゾン、カフェンストロール、殺菌剤のチアメトキサムが各々7.5~7.8kgと続き、ほか殺菌剤のフサライド(b表2段の合計)3.6kg、殺虫剤のシラフルオフェン2.1kgであった。

### 3.2 検出された農薬の種類の特徴

Table2に調査対象とした82種の農薬名、及び検出数の調査結果を示した。左から順に種類別分類ごとに農薬名、使用場所、検出頻度、各採水地点ごとの最小及び最大濃度、検出数及び定量下限値を示している。

調査した82種類の農薬のうち一度でも検出された農薬は17種類であり、内訳は、殺虫剤が4種、殺菌剤が5種、除草剤が8種であった。検出されたこれらの農薬は、種類別分類ごとに、検出数の多いものから順に記した。いずれの項目においても基準値及び指針値を超過しているものはなかった。

検出数が全検体の2割以上に相当する40を超えて検出された農薬は、殺菌剤のピロキロン及び除草剤のプロモブチド、プレチラクロール、ペントキサゾン、ダイムロン、カフェンストロールの6種であった。これらはいずれも水田で主に使用されると考えられる農薬である。また、上記6種のうちプレチラクロールを除く5種は、3.1で記述した推定散布量の上位5種と合致し、散布量の多いものが高頻度で検出される結果となった。



Table1に記されていないプレチラクロールは2004年度の「水稻病害虫防除ごよみ」に掲載されておらず、加美町全域で使用されてはいるわけではないが、水稻栽培地域において以前から汎用されている除草剤であることから、検出されたと考えられる。なお、みのり農業協同組合での2004年度販売実績量に含有成分量を乗じたプレチラクロール推定散布量は0.5kgであった。

次に、上記6種よりは少なかったが、10回を超えて検出された農薬は、殺菌剤のイソプロチオラン、トリシクラゾール、フサライド及び除草剤のピリブチカルブ、メフェナセットの5種であった。

それ以外に、殺虫剤のシラフルオフェン、殺菌剤のフルトラニル、除草剤のシメトリンなど、残り6種類の農薬は、検出回数は10回未満であったが、短期間に集中して検出されたり、1地点でのみ検出された。

検出された農薬を種類別分類ごとに、各月の全検出数を採水日数で除して各月の農薬平均検出数を求めた。この農薬平均検出数を月別、地点別にFig.2に示した。

検出数が最も多い除草剤は、4~5月が使用最盛期であるため(Table1)、上流部3地点(地点G, I, T)においては、5月を最大に徐々に減少した。一方、杉原川下流の地点Kにおいては5月よりも6月の検出数が多く、7,8月に減少する結果となった。このように検出数のピークの時期が地点によりずれるのは、上流部の3地点の田植えの時期が5月上旬に開始されるのに対し、下流域の西脇地域では半月~1月程度田植えが遅れる(みのり農業協同組合聞き取り)ことに起因すると考えられる。

これに対して、殺菌剤は5~7月に全ての採水地点で検出され、除草剤のような減少傾向は見られなかった。

殺虫剤は7,8月に局地的に検出された。

### 3.3 濃度変動の特徴

#### 3.3.1 変動パターンの分類

河川中の濃度の経時変化には、農薬が継続して検出される山型と、単発で検出されるスポット型の2種類のパターンがみられた。前者の代表的な例をFig.3に、後者

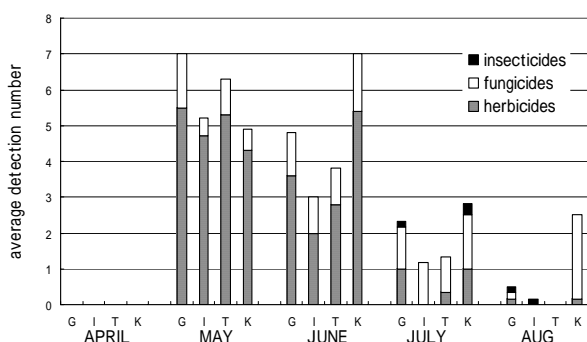


Fig.2 Monthly variations in the detection of pesticide

の例をFig.4にまとめた。前者のパターンには、殺菌剤と除草剤が当てはまり、殺虫剤は該当しなかった。図中では、上段から順に地点G, I, T, Kにおける濃度変化を示す。

#### 3.3.2 山型変動(検出継続型)パターン

##### (1) 殺菌剤

殺菌剤のピロキロン(Fig.3-a)は5月下旬に最初に検出されて以来、8月上旬まで約2月半にわたり、継続して0.25~2.2µg/Lの濃度が検出された。ピロキシロンの濃度は、杉原川や加古川と比較して流域規模の小さい多田川(Fig.1参照)の地点Gで比較的高く、ピロキロンが空中散布された(Fig.3-a矢印で示す)前後の6月下旬の採水日に最高濃度が測定された。多田地区の空中散布の日以前にも高濃度で検出されているのは、同時期に空中散布を依頼せず各自で農薬を散布する水田も存在することに起因するものと考えられる。

地点Gにおいて、6月下旬に集中して高濃度が検出された原因としては、多田地区で使用されるピロキロン推定散布量55kgの約2割に相当する9.5kgが6月下旬に集中して空中散布されたことによると推測される。

上述のようにピロキロンは、地点Gにおいては、急激な濃度の上昇がみられたが、その下流域にあたる地点Tでの濃度上昇は非常に緩やかであった。これは、地点Gが位置する多田川のこの時期における流量は1~11万m<sup>3</sup>/dayであるのに対し、地点Tが位置する杉原川の流量は、約3倍の7~33万m<sup>3</sup>/dayであったことから、希釈効果により、地点Tの濃度変動が緩和されたと考えられる。

一方、この地域から約10km下流に位置する地点Kは、濃度変動幅が0.34~1.5µg/Lであり、最高濃度は上流部の地点Gと大差はなかったが、その検出時期が7月上旬にずれた。これは、田植え時期の違いによりもたらされた稲の生育時期の差を反映したと考えられる。

##### (2) 除草剤

(1)の殺菌剤と同様に山型を呈する変動パターンの除草剤は、ダイムロン、プロモブチド、ペントキサゾン、カフェンストロール、プレチラクロールの5種類であった。代表例としてダイムロンとプロモブチドについてFig.3-b, 3-cに示す。

ダイムロンは、5月上旬に最初に検出されて以来、6月下旬まで約2か月にわたり、概ね継続して0.12~5.4µg/Lの濃度が検出された。上流部3地点(地点G, I, T)に限れば、検出期間は6月上旬までの約1か月であり、継続して検出された。下流部の地点Kでは、最初の検出は5月中旬であり、検出されなかった時期をはさみながら断続的に6月下旬まで約1月半にわたり、0.12~1.4µg/Lの濃度が検出された。上流部3地点の濃度が、検出開始当初に



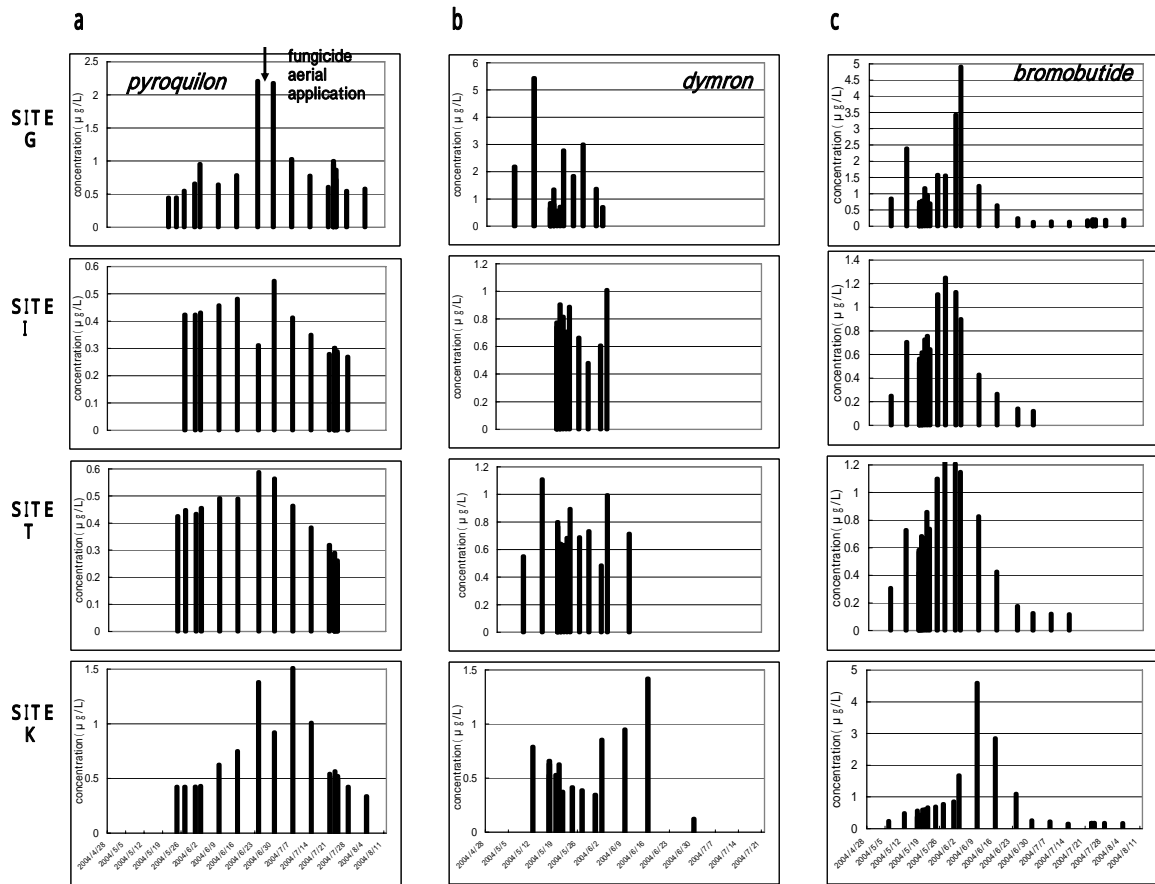


Fig.3 Variations in the concentrations of pesticides over an extended period of time

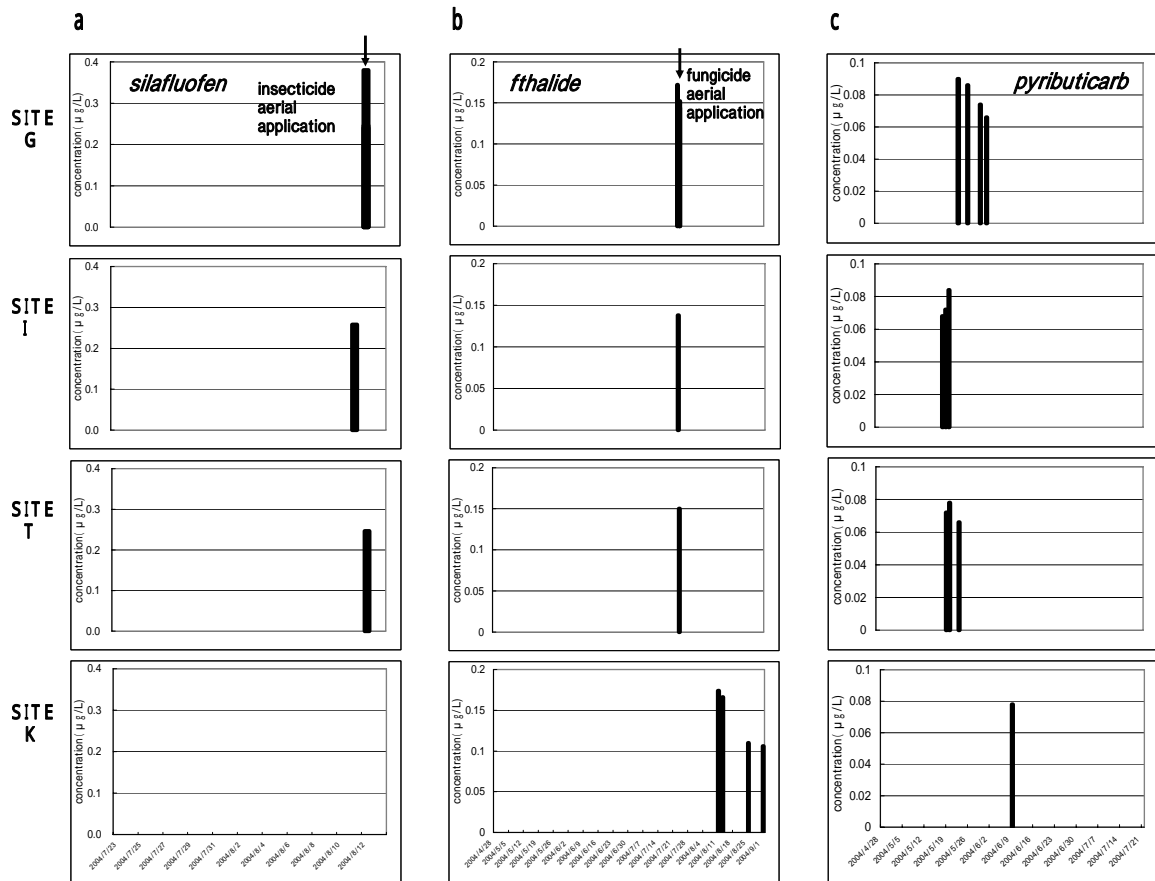


Fig.4 Variations in the concentration of pesticides over short periods of time

最高濃度に近い値を記録し、徐々に低減して約1ヶ月で検出されなくなったのに対し、地点Kの濃度は、検出開始当初は一定濃度を維持し、その後約1ヶ月でピークを迎えた。この傾向は、同じく山型パターンを呈するほかの除草剤に関しても同様のことが言える。このように濃度ピークの時期が地点により大きくずれるのは、3.2で述べたように田植え時期の違いに起因すると推察される。すなわち、上流部3地点の濃度変動は多田地区の除草剤流出の影響だけを受けるのに対し、地点Kは上流部からの影響に加え、地点K周辺において、1月遅れで実施される田植えの影響が現われるため、本来ならば田植え当初に高濃度で検出される農薬のピークが後ろにずれ込むことになると考えられる。

プロモブチドは、5月上旬に最初に検出されて以来、8月上旬に至る約3ヶ月にわたり、概ね継続して0.12~4.9 µg/Lの濃度が検出された。検出期間は上流部3地点と下流部の地点Kでは類似したが、ダイムロンと同様に地点Kの濃度ピークの時期が大きく遅れた。一方、前述のダイムロンやほかの除草剤のいずれもが、5月上旬の田植え開始時期から、遅くとも6月下旬までの約2ヶ月後には検出されなくなるのに対して、プロモブチドはさらに1月後の8月上旬まで長期にわたり検出された。その一因として、他除草剤よりも非常に多い散布量の影響によると考えられるが、詳細は不明である。

### 3.3.3 スポット型変動(検出単発型)パターン

#### (1) 殺虫剤

殺虫剤は、本調査で検出されたシラフルオフェン、MEP、マラチオン、エトフェンブロックスの4種類すべてがスポット型変動パターンを示した。代表例としてシラフルオフェンの場合をFig.4-aに示す。

殺虫剤のシラフルオフェンは、多田地区での空中散布日(Fig.4-a 矢印で示す)8月12日の10時~22時の12時間に、地点G、Tで0.24~0.38 µg/Lの濃度が4回観測され、その前日には地点Iにおいて0.26 µg/Lの濃度が観測された。このようにシラフルオフェンは、全調査期間中において、空中散布日の約1日半の短期間に5回検出されただけであった。

また、図には示していないが、殺虫剤のエトフェンブロックスは、10月6日に地点Kで1回だけ検出され、濃度は0.044 µg/Lであった。この時期は、水稻栽培期間や水田の落水時期をはずれており、Table1に示される空中散布とも関係づけ難い。この殺虫剤は、ゴルフ場での使用も考えられることから、その負荷源として、水田以外の可能性も検討する必要がある。

#### (2) 殺菌剤

殺菌剤は、3.3.2(1)で述べたピロキロンを除き、本

調査で検出されたフサライド、イソプロチオラン、トリシクラゾール、フルトラニルの残り4種類がスポット型変動パターンを示した。上流部3地点における各々の殺菌剤の検出時期は、概ね一致していた。代表例としてフサライドをFig.4-bに示す。

殺菌剤のフサライドは、多田地区のコシヒカリに対し7月23日(Fig.4-b 矢印で示す)に3kgが空中散布されたと推定され(table1)、7月23日の22時~7月24日の10時の12時間に地点G、Tで0.14~0.17 µg/Lの濃度が4回観測された。7月23日の10時には地点Iにおいて0.14 µg/Lの濃度が観測された。地点Kにおいては、8月11日~9月1日にかけて断続的に5回検出され、濃度は0.11~0.17 µg/Lであった。これらの観測結果から、フサライドについても、上流部3地点において、空中散布の影響が認められると推察される。

#### (3) 除草剤

除草剤は、3.3.2(2)で述べたダイムロン、プロモブチドなど5種類を除き、本調査で検出された残り3種類がスポット型のパターンとなった。代表してピリブチカルブをFig.4-cに示す。

ピリブチカルブは5月中旬~6月上旬までの約半月間、各地点で単発的に0.07~0.09 µg/Lの濃度が得られた。地点Iでは、5月19日~21日までの3日間、地点Tでは5月20日~24日までの4日間検出されたが、下流の地点Kでは6月9日の1日のみ検出された。このピリブチカルブの濃度変動の結果から5月中下旬に上流部の地点I、Tで検出された本成分は、下流地点Kにたどり着くまでに希釈され、当センターの分析法では定量下限値未満となり消失すると考えられる。一方、6月9日に地点Kで検出された本成分は、検出時期が大きくずれていることから、他地域からの流入であるものと考えられる。

### 3.4 空中散布の影響

3.3.2(1)及び3.3.3(1)(2)の結果から、河川水中の濃度変動と空中散布とが関係付けられる農薬は、殺虫剤のシラフルオフェン(Fig.4-a)と殺菌剤のピロキロン(Fig.3-a)、フサライド(Fig.4-b)の3種類であると考えられる。殺菌剤のピロキロンに関しては、田植え時に水田に直接施用する粒剤の影響もあわせて考える必要があるが、殺虫剤のシラフルオフェンと殺菌剤のフサライドに関しては、多田地区の空中散布日付近にのみ、上流部3地点(地点G、I、T)で農薬が検出され、その影響は短期かつ局所的であるといえる。したがって、空中散布に使用される農薬類の調査に際しては、調査地点及び時期について特に注意を払う必要があると思われる。

また、空中散布で使用された上記2種の農薬の検出時

期が短い理由として、散布量の違いのほかに、ヘリコプターを使用する散布方法によるところが大きいと思われる。すなわち、ある時期に集中して、かつ数時間のみの散布であること、加えて河川へ流出しやすい形状で散布されることが、その一因であろうかと推察される。空中散布では、液状の薬剤を上空から噴霧するため、農薬の一部は霧散しながら稲の葉の表面に付着するが、残りの薬剤は即座に水田水と混ざり合うと考えられる。このことは、Table1 及び 3.1 に記した水田直接散布の薬剤が粒状であり、水田中で徐々に溶解しながら効果を維持する性状とは大きく異なっている。

## 結 論

ほぼ 1 年をとおして県下中央部に位置する水田地域を対象として農薬 82 種類について調査を行った。その結果 17 種類の農薬が検出され、その流出の状況については、使用用途や施用・散布方法等、さまざまな要因によりいくつかの傾向が観察された。

検出された 17 種類のうち 12 種類は主として水田でのみ使用され、残り 5 種類は水田・ゴルフ場の両方での使用が想定される農薬であった。また、高頻度で検出された農薬は、推定散布量の多い農薬と合致し、散布量の多いものが高頻度で検出される結果となった。これらの結果は、これまでの調査結果<sup>15)</sup>と同様に、使用量の多い農薬が環境中に流出しやすいことを示唆している。

河川中における除草剤の検出は、田植えの時期に依存していた。除草剤は、田植え初期に集中して散布されるため、その時期に高濃度で検出された。広範囲の水田地域を流れる河川においては数箇所の異なる水田の田植え時期の影響を受けるため、地点により検出数及び濃度のピークは 5 月または 6 月に分かれたが、7、8 月まで徐々に減少しながらも長期にわたり除草剤の検出が継続した。

また、殺菌剤の検出に関しては、水田に直接施用されるものからの影響もさることながら、空中散布による単発的な検出も確認された。除草剤とは異なり、散布方法や散布時期も様々であるため、環境への流出状況はさらに複雑であると考えられた。

殺虫・殺菌剤の空中散布による河川水への影響は、短いものでは 1 日半で消失するため、環境への負荷を調査するには採水日のタイミングが重要であることが示唆された。

## 謝 辞

本研究は、環境省の「平成 16 年度農薬残留対策総合調査」の委託事業の一環として行われたものである。

本事業を実施するにあたり調査計画策定などにご尽力いただいた兵庫県健康生活部環境局水質課の村松和夫主査、採水及び情報提供にご協力いただいた笹倉丈夫課長補佐をはじめとする兵庫県北播磨県民局県民生活部環境課の方々、並びに農薬使用実績及び水稲栽培に関する情報を提供いただいたみのり農業協同組合加美町営農経済センターの岸本浩センター長に謝意を表します。

## 文 献

- 1) 中西準子: 環境リスク学 - 不安の海の羅針盤 -, 日本評論社(2004)
- 2) 月岡忠, 寺沢潤一, 吉田徹也, 山本明彦, 小沢秀明, 佐藤守俊, 丸山節子: 野鳥突然死の原因究明, 長野県衛生公害研究所研究報告, **22**, 25-31 (1999)
- 3) 沼辺明博, 永洞真一郎: 環境中における農薬の動態及び環境影響の逡減に関する研究, 北海道環境科学研究所所報, **27**, 97-101 (2000)
- 4) 築地邦晃, 伊藤美穂, 中南真理子: イネいもち病防除薬剤の河川における消長, 岩手県農業研究センター研究報告, **1**, 1-8 (2000)
- 5) 村上加枝, 下田喜則, 小中ゆかり, 松木司, 佐伯彩路, 矢野泰正, 大倉健二, 世良勝利: 河川からの農薬検出状況, 広島市衛生研究所年報, **19**, 92-94 (2000)
- 6) 西沢憲彰, 次田啓二, 落位勅: 福井県内河川における農薬汚染実態調査 (第5報) 三方湖流域における実態調査, 福井県環境科学センター年報, **28**, 114-121 (1999)
- 7) 石塚伸一, 工藤健, 大久保英樹: ベンチオカーブの水田における挙動及び河川への流出状況, 青森県環境保健センター研究報告, **8**, 27-33 (1997)
- 8) 永洞真一郎, 沼辺明博, 村田清康: 農用地からの農薬流出調査, 北海道環境科学研究所所報, **24**, 78-80 (1997)
- 9) 兵庫県: 平成 16 年度公共用水域及び地下水の水質の測定に関する計画 (2004)
- 10) 兵庫県企画管理部管理局統計課: 平成 15 年兵庫県統計書, p.58-62, 兵庫(2005)
- 11) 水質汚濁に係る環境基準について. 昭和 46 年 12 月 28 日付環境庁告示第 59 号
- 12) 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針について. 平成 2 年 5 月 24 日付環水土第 77 号, ほか平成 3 年 7 月 30 日付

環水土第 109 号,平成 4 年 12 月 21 日付環水土第 187 号  
など

13) 環境庁水質保全局長通知:公共用水域等における農薬の  
水質評価指針について.平成 6 年 4 月 15 日付環水土第  
86 号

14) 香月繁孝,数賀山靖,後藤宗玄:農薬便覧・第 8 版 p.1108,  
社団法人農山漁村文化協会,東京(1999)

15) 吉田光方子,鄭小萍,藤森一男:加古川下流域における  
農薬の濃度変動,兵庫県立健康環境科学研究センター年  
報,2,162-167(2003)

16) 藤森一男,吉田光方子:河川中における農薬の濃度,第  
14 回環境化学討論会講演要旨集,674-675(2005)

17) 上杉康彦,上路雅子,腰岡政二:第 3 版(1997)最新農薬  
データブック p.351 (株)ソフトサイエンス社,東京(1997)

## 【ノート】

## 河川水中のエストロゲン様活性測定における 酵母ツーハイブリッド・アッセイ法と レセプターバインディングアッセイキットの比較

北本寛明\* 古武家善成 中野 武

Comparison of the yeast two-hybrid assay with receptor binding assay kit for the measurement of estrogenic activity in river waters

Hiroaki KITAMOTO\*, Yoshinari KOBUKE and Takeshi NAKANO

*Environmental Safety Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27 Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, 654-0037, Japan*

The conventional yeast two-hybrid assay used as a measurement technique of estrogenic activity in river waters was reviewed in the points of sensitivity and operability. From the performance comparison with another improved yeast two-hybrid assay and two commercial kits for estrogen receptor binding assay, improved method which medium was adjusted to neutral condition was considered to be the most substitutable.

### はじめに

内分泌攪乱化学物質は、ごく微量で生物に影響を及ぼす可能性があるとして、各国で問題視されている。環境省の SPEED'98<sup>1)</sup>では、約70種が内分泌攪乱の疑いがある化学物質の候補に挙げられ、生物に対する環境汚染化学物質のホルモン様作用等が危惧されてきた。また、2005年には今後の対応方針である ExTEND2005<sup>2)</sup>が発表された。

環境中有機化学物質のモニタリングでは、GC/MS や LC/MS などの機器分析が現在の主流となっている<sup>3)</sup>が、環境中化学物質の評価手法の一つとして、バイオアッセイも用いられるようになってきた<sup>4) 8)</sup>。

バイオアッセイの1つに、遺伝子組み換え酵母を用いてエストロゲン様活性測定を行う方法がある。この方法は、2つの遺伝子が組み込まれた酵母を用いる測定法<sup>9) 11)</sup>

である(名称については必ずしも統一されていないが、本報告では、他の報告例<sup>7), 12)</sup>に合わせて酵母ツーハイブリッド・アッセイ法と表記する)。著者らも、1998年度より実施している河川の内分泌攪乱化学物質モニタリング調査<sup>13)</sup>の中で、2002年度よりこの方法を用いたエストロゲン様活性の測定を行ってきた。

酵母ツーハイブリッド・アッセイ法は、in vitro でエストロゲン様活性を持つ化学物質の試験ができるだけではなく、種々の化学物質が混在している環境試料の包括的なエストロゲン様活性測定においても有効な方法である。しかし、測定操作が煩雑なことや分析に時間を要すること、また商品化が難しく一般には普及させにくいなどの問題点も挙げられる。

一方、レセプターバインディングアッセイキットはいくつか市販されているが、コアクチベーターを介した、より生体内に近い反応系により検出を行うキットも市販されるようになってきた。しかし、コアクチベーターが用いられているキットに関する報告例はまだ少ない。

そこで、感度と操作性の面から代替手法を検討するため、河川水試料を用いて、酵母ツーハイブリッド・アッ

安全科学部

\* 別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究センター

安全科学部 北本寛明

セイ法の従来法とその改良法<sup>14), 15)</sup>, および比較的短時間で結果が得られるコアクチベーターを用いたレセプター (hER) バインディングアッセイ法のキット2種を比較した。

## 材料と方法

### 1. 試料

兵庫県下の主だった河川下流域 14 地点において各 12L の河川水を採取し, 検討試料として用いた。

### 2. 試薬および機器

17-β-エストラジオール (E2) 市販標準品およびジメチルスルホキシド (DMSO) は, 和光純薬工業の生化学用を用いた。メタノールおよび酢酸エチルは残留農薬・PCB 試験用以上の純度のものを用いた。

試料水のろ過にはグラスファイバーフィルター GF/C (Whatman 社) を用い, 試料水処理には Sep-Pak Plus tC18 カートリッジカラム (tC18) と CSP-800 カートリッジカラム (CSP-800) (共に Waters 社) を用いた。カートリッジカラムへの通水には, Sep-Pak Concentrator (Waters 社) を用いた。

試料の濃縮にはターボバップ (Zymark 社) を用いた。酵母ツーハイブリッド・アッセイ法用の 96 穴マイクロタイタープレートには, Nalge Nunc International 社の F96 polysorp nunc-immuno plate を用いた。マイクロプレートリーダーは, Microplate reader model 680 (BIO-RAD 社) を用い, 検量線の作成と濃度の算出には, パーソナルコンピューター用のデータ解析ソフトウェア, マイク

ロプレート マネージャー 5.2 PC ウィンドウズ用 (BIO-RAD 社) を用いた。

### 3. 試料水の前処理方法

試料水 12L をグラスファイバーフィルターで吸引ろ過し, 通水後のグラスファイバーフィルターを 1.5mL 程度のメタノールにより洗浄し, その洗液とろ過後の試料水を合わせてろ過試料水とした。カートリッジカラムとして, 機器分析で多用される tC18 と, 変異原性試験用の試料水前処理にも使用されている CSP-800 とを用い, ろ過試料水を, tC18, CSP-800 の順に連結したカラム 4 組 (3L/組) に Sep-Pak Concentrator を用いて上向き流速 15mL/分で通水した。カートリッジカラムを通気乾燥後, メタノール, 酢酸エチルの順に各 10mL で溶出を行い, 各画分を別々のガラス容器に回収した。ターボバップを用いた高純度窒素吹き付けにより 1mL 程度まで濃縮し, DMSO 500 μL を添加後, さらに高純度窒素吹き付けにより, メタノールおよび酢酸エチルを完全に除去し, 最終的に DMSO で 1mL に調製 (12,000 倍濃縮) したものを試料液とした。

### 4. 測定

酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の従来法および改良法を用いて試料水の前処理法について検討するとともに, 選定した抽出画分を用いて前述の 2 法と, 市販レセプターバインディングアッセイキット 2 法の合計 4 方法を用いてエストロゲン様活性測定における感度と操作性に関する比較検討を行った。

各アッセイ法の概略について, Table 1 に示した。

Table 1 Outline for estrogenic activity assays

Method	Time	Assay flow
<b>Yeast two-hybrid assay<sup>*1</sup></b> (hER- )		Reaction with sample in medium Measurements at 600, 420, 550nm Calculation of -galactosidase activity conversion to conc.
<b>Conventional</b>	3days (Containing preculture)	Using pH5.8 medium
<b>Improved<sup>*2</sup></b>	3days (Containing preculture)	Using pH7.1 medium containing 0.1M PIPES buffer
<b>Estrogen receptor-binding assay</b> (hER- )		Conversion to conc.
<b>Kit A</b>	4hr	Add sample and ER- into coactivator coated plate wells Binding reaction Reaction with HRP-antibody Measurement at 450nm
<b>Kit B</b>	24hr	Add sample and TIF2-BAP <sup>*3</sup> into ER- coated plate wells Binding reaction Reaction with BAP Measurement at 405nm

\*1 : Strain from Nishihara lab. , Osaka Univ.

\*2 : Improved by Nakamuro et.al(2005)

\*3 : Transcriptional Intermediate Factor - Bacterial Alkaline Phosphatase

PIPES is one of good buffer, piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid).

hER- is meant human estrogen receptor .

酵母ツーハイブリッド・アッセイ法では、ヒトエストロゲンレセプター 遺伝子と GAL4DBD をつないだコンストラクトと、GAL4AD とコアクチベーターの TIF2 をつないだコンストラクトが組み込まれた酵母株（大阪大学西原研究室より分与）を用いた。その測定原理<sup>11)</sup>は、ヒトエストロゲンレセプターと結合する化学物質と酵母を反応させると、化学物質のエストロゲン様活性強度に応じた量の  $\beta$ -ガラクトシダーゼが産生される。これに発色試薬を添加し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの触媒作用による試薬の発色強度を吸光値として測定することにより、得られた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ量を元に、エストロゲン様活性強度を求める方法である。

従来法<sup>9)-11)</sup>では pH5.8 の培地中で試料を反応させるが、中室らが開発した改良法<sup>14), 15)</sup>では、酵母株は従来法と同一であるが、反応培地の pH が PIPES 緩衝液により pH7.1 に変更されている。改良法は、反応の妨害物質であるフミン質の影響が抑えられ検出感度が上がるとされる。

エストロゲンレセプター バインディングアッセイ法は、ヒトエストロゲンレセプター、コアクチベーターおよび試料を反応させ、エストロゲン様活性を発色強度として検出する。キット A は、検出に HRP 標識抗体が用いられており、キット B は酵素標識コアクチベーターによる検出が用いられている。酵素を介した発色強度は対象化学物質に結合した酵素複合体の酵素量に依存する。

各方法の操作は、報告書<sup>10) 11)</sup>もしくは添付説明書に従って行った。

## 結果および考察

### 1. 前処理方法の検討

tC18 および CSP-800 のそれぞれのメタノール、酢酸エチル抽出画分について、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の従来法と改良法により、エストロゲン様活性を測

定した (Table 2)。エストロゲン様活性物質の検出率には、カートリッジカラムの捕集効率、溶媒の溶出効率および測定法による違いが影響すると考えられる。カートリッジカラムの捕集効率については、従来法では 2 段目に接続した CSP-800 から溶出画分で多少検出されたが、改良法では、試料 3 の場合を除き CSP-800 から溶出画分での検出はなかった。表には示していないが、CSP-800 の捕集効率も検討するために、試料 2 についてカラムの連結順を逆転させて通水し、改良法で測定したところ、1 段目に接続した CSP-800 の溶出液からは検出されず、2 段目の tC18 では検出された。これらの結果から、今回の検討にはメタノール画分の結果を用いることとした。

溶媒の溶出効率については、従来法では酢酸エチル画分でも多少検出されたが、改良法では、試料 1 の場合を除き酢酸エチル画分での検出はなかった。これらの結果から、今回の検討には tC18 の結果を用いることとした。

一方、測定法に関しては、表に示されるように、酸性条件下で反応を行う従来法と中性条件下で反応を行う改良法とで検出率が異なる結果が得られた。1 段目に接続した tC18 のメタノール画分を比較すれば、試料 9 での検出の違いから改良法の高感度性が認識されるが、tC18 の酢酸エチル画分を比較すれば、従来法の方が検出数は多かった。同様の結果は 2 段目に接続した CSP-800 のメタノール画分に関しても得られた。

この原因は必ずしも明確でないが、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法は、活性の促進物質によるアゴニスト作用と抑制物質によるアンタゴニスト作用の相互作用<sup>16)</sup>により、最終的に活性値が得られるアッセイ法である。したがって、カラムに捕集されにくい画分や溶媒で溶出されにくい画分に関しては、反応培地の pH の違いにより、アゴニスト作用とアンタゴニスト作用のバランスが変化したのではないかと推測される。両作用のバランスの問題に関しては今後の検討が必要である。

Table 2 Discussion about pretreatment method  
Pretreatment cartridge column are connected in the order named on table up to bottom, and through the sample water.

Method	Solid-phase extraction	Extracting solvent	Sample No.														Detection rate
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Conventional	tC18	Methanol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	8/14	
		Ethyl acetate	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	3/14	
	CSP-800	Methanol	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	5/14	
		Ethyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14	
Improved	tC18	Methanol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	9/14		
		Ethyl acetate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/14		
	CSP-800	Methanol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/14		
		Ethyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14		

+ : Detected, - : Not detected

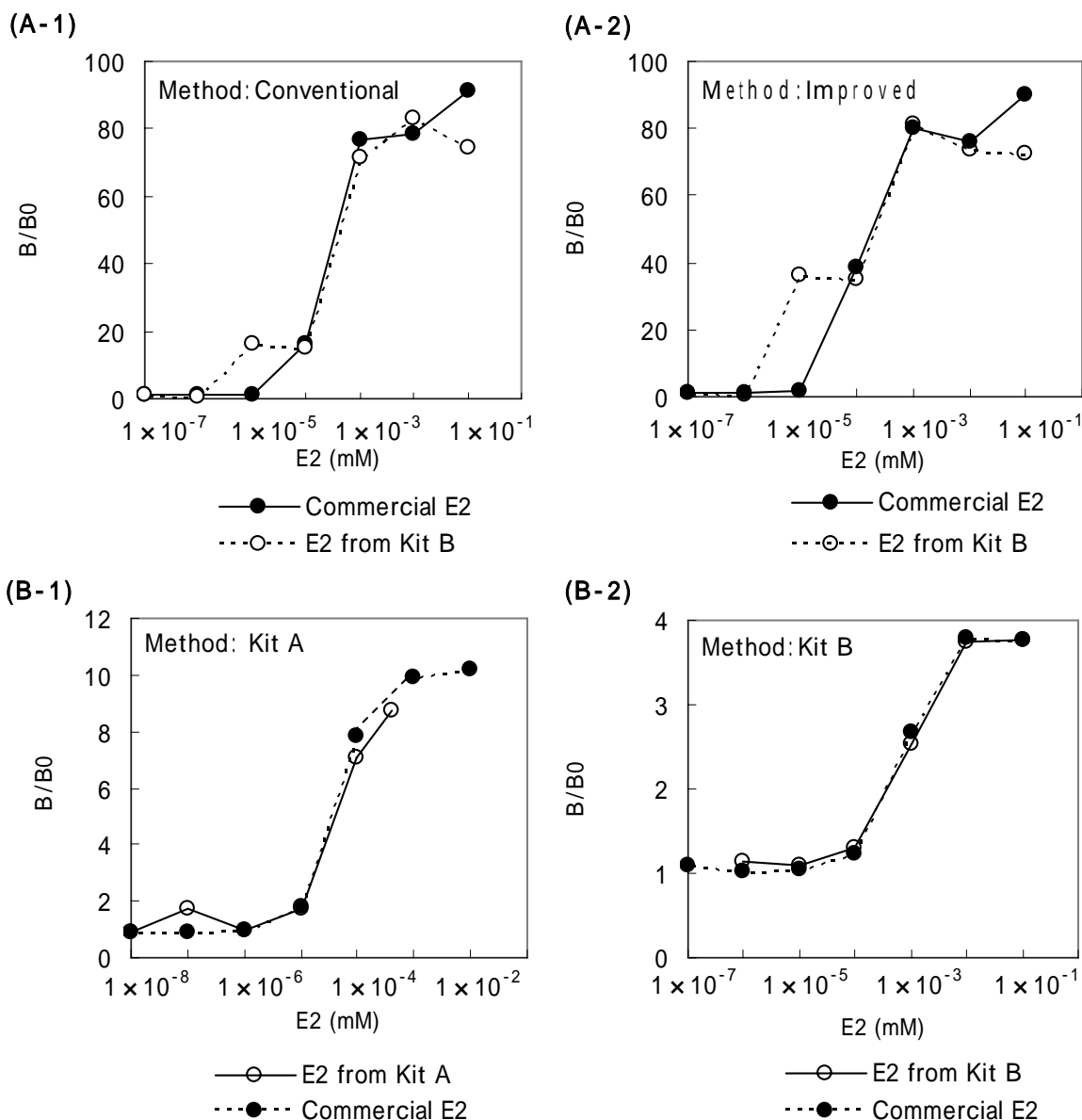


Fig.1 Comparison of standard E2 measurements

(A-1): Comparison of standard measurements by conventional Yeast two-hybrid assay using commercial E2 and Kit B contained E2.

(A-2): Comparison of standard measurements by improved Yeast two-hybrid assay using commercial E2 and Kit B contained E2.

(B-1): Comparison of standard measurements by Kit A using Kit A contained E2 and commercial E2.

(B-2): Comparison of standard measurements by Kit B using Kit B contained E2 and commercial E2.

試料水の前処理方法については検討すべき点があるが、今回のエストロゲン様活性測定法の比較では、Table 2においてエストロゲン様活性の検出率が最も高い、tC18のメタノール抽出画分を試料に用いて行うこととした。

## 2. 標準品の測定比較

Fig.1 に、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法による市販 E2 標準品およびキット B 添付 E2 標準品の測定結果

と、キット法によるキット添付標準品および市販 E2 標準品の測定結果を示した。

A-1, A-2 に示す酵母ツーハイブリッド・アッセイ法による結果では、 $1 \times 10^{-1}$  mM 濃度で活性値に多少の乱れが生じたり、キット B の添付標準品の場合に  $1 \times 10^{-5}$  mM の値が高くなった。

一方、B-1, B-2 に示すキット法では、各キット添付標準品と市販標準品はよく一致する結果が得られた。これ



Table 3 Comparison of coefficients of variation measured by four assays using standard E2

17 -estradiol (mM)	Yeast two-hybrid assay				Receptor binding assay kit	
	(-galactosidase activity value)				(Absorbance)	
	Conventional	Improved			Kit A	Kit B
0	4.2	9.9			9.3	9.3
1 × 10 <sup>-8</sup>	-	-			9.7	-
1 × 10 <sup>-7</sup>	3.8	7.0			9.5	-
1 × 10 <sup>-6</sup>	10.4 (23.2)	7.7 (33.0)			13.2	1.5
1 × 10 <sup>-5</sup>	17.1 (80.3)	7.6			4.4	4.7
1 × 10 <sup>-4</sup>	3.0	1.5			2.3	2.6
4 × 10 <sup>-4</sup>	-	-			0.9	-
1 × 10 <sup>-3</sup>	3.7	1.6			-	1.4
1 × 10 <sup>-2</sup>	4.1	3.3			-	1.2
1 × 10 <sup>-1</sup>	11.3	2.9			-	2.7
<b>CV(%)</b>	<b>Max.</b>	17.1 (80.3)	9.9 (33.0)		13.2	9.3
	<b>Min.</b>	3.0	1.5		0.9	1.2
	<b>Ave.</b>	7.2 (16.7)	5.2 (8.4)		7.0	3.3

Numbers in parentheses indicate CV% values calculated except deviated data

らの結果から、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法では市販標準品を用い、キット法では各キット添付標準品を用いて、検量線を作成しても、特に問題は無いと判断された。

3. 各アッセイ法の精度

酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の従来法と改良法、およびキット A, B について、活性測定時の精度に関して

変動係数を用いて検討した。

Table3 に、標準品の3重測定結果から得られた変動係数 (CV%) を示した。なお右側に括弧が付されている値については、3重測定のうちハズレ値を除外して計算して CV% を示し、括弧内にはハズレ値を除外する前のデータから算出した CV% を参考として示した。

酵母ツーハイブリッド法の従来法および改良法については -ガラクトシダーゼ活性値を、キット法については

Table 4 Comparison of coefficients of variation measured by four assays using water samples

Sample No.	Yeast Two-hybrid assay		Receptor binding assay kit		
	Conventional	Improved	Kit A	Kit B	
1	0.9	-	20.7	13.8	
2	2.1	4.0	66.1	4.0	
3	2.4	1.1	4.0	19.8	
4	7.3	2.3	-	2.1 (31.9)	
5	8.4	2.9	-	14.2	
6	4.3	3.2	-	16.4 (35.3)	
7	9.1	2.0	-	16.1	
8	7.7	2.0	-	35.9 (174.4)	
9	-	2.9	-	2.0	
10	-	-	-	44.0 (62.6)	
11	-	-	8.7	30.3 (163.3)	
12	-	-	-	9.9	
13	-	-	-	18.2	
14	-	-	-	6.5 (24.6)	
<b>CV (%)</b>	<b>Max.</b>	9.1	4.0	66.1	44.0 (174.4)
	<b>Min.</b>	0.9	1.1	4.0	2.0
	<b>Ave.</b>	5.3	2.6	24.9	16.6 (24.2)

Numbers in parentheses indicate CV% values calculated except deviated data

各吸光値を、それぞれ用いて算出した 3 重測定の CV%を示した。

ハズレ値を除外しない前は、従来法では  $1 \times 10^{-5}$  nM および  $1 \times 10^{-6}$  nM の E2 濃度で変動係数が比較的大きく、改良法では  $1 \times 10^{-6}$  nM で変動係数が比較的大きくなった。しかし、3 重測定のうち、明らかに他の吸光値と異なるハズレ値を除外して補正することにより、従来法、改良法共に、CV%値は低く抑えられた。すなわち、測定を 3 重測定で行い異常値を除去すれば、精度の良い結果が得られると判断される。

Table 4 には、同様の検討を試料水について行った結果を示した（括弧の表示についても同様である）。

Table 4 の場合と異なり、キット法による測定値で変動係数が大きくなる結果が得られた。キット A については、試料 1, 2 で比較的大きな CV%値が示されているが、これは、3 重測定値がいずれも変動係数、1 測定値のみ明らかにハズレ値と判断できないために、補正ができなかったことによる。キット B については補正が可能であったが、補正後も CV%値が 44%となる場合も見られた。

測定対象と手法は異なるが、厚生労働省通知<sup>17)</sup>によれば、食品中アレルゲンの ELISA 検査における変動係数に対し、3 重測定の CV%値が 20%以上の場合には再測定することとされている。ここで対象とされている測定値は吸光値であると解釈されていることから、吸光値から換算した濃度ベースでは、CV 値は 20%を超えると考えられる。しかし、この点を考慮しても、試料水に対するキット法の変動係数は多少大きいと言える。

Table 4 に示されたように、標準品を用いた場合にはキット法の変動係数は小さかったことから、キット法を実試料に適用する場合には、それに適した試料の前処理法の改良を行う必要があると考えられる。

#### 4. 実測値の比較

4 種類の測定法による河川水中のエストロゲン様活性値測定結果を Fig.2 に示した。

図では、試料 1 から 8 までは従来法で値の高かったものの順に、試料 9 以降は従来法で測定値が得られなかった試料が集まるように配列した。試料 1 の改良法の値は検出上限値以上であった。

活性値の大きさについて比較すると、従来法では 0.001 ~ 0.01 nM 程度、キット A では 0.0001 ~ 0.001 nM 程度、改良法では 0.001 ~ 0.1 nM 程度、キット B では 0.001 ~ 0.1 nM 程度と、測定方法による違いが見られた。

また、前述したように、検出率についても、従来法で 8/14、改良法で 9/14、キット A で 4/14、キット B で 14/14 と、それぞれ異なる結果が得られた。

本試料については同時に機器分析を行い、内分泌攪乱作用が疑われる PCB、ビスフェノール A、ノニルフェノール、4-t-オクチルフェノールなどの化合物、および E2 を測定したが、今回は、これらの濃度とそれぞれのエストロゲン様活性値との間に有意な相関関係は認められなかった。

Fig.3 に各測定法間で有意な相関が得られた結果を示した。図中に破線で囲んで示した試料は、従来法では測定値が得られなかったが、定量下限値のおよそ 1/10 である 0.0001 nM を当てはめて、相関係数を求めた。図に示されるように、従来法と改良法、従来法とキット B、改良法とキット B の間には、危険率 1%で有意(\*\*)な正の相関が得られた。図中の相関係数は原データによる結果(図中の両軸は、見やすいように対数目盛りにしてある)であるが、両データを対数変換した場合でも、(A)および(B)に関しては、相関係数は、それぞれ危険率 1%および 5%で有意であった。したがって、従来法と改良法および従来法とキット B の間の正の相関は明瞭と考えられる。

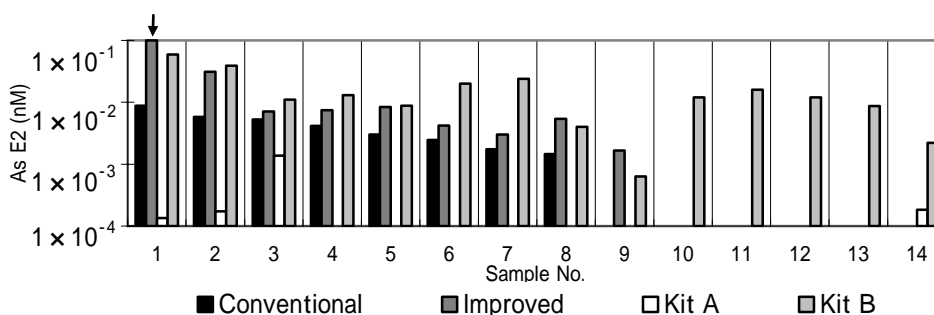


Fig.2 Comparison of estrogenic activity values of water samples measured by four assays

The estrogenic activity in the river waters was measured by 4 methods. Yeast two-hybrid assay are Conventional and Improved, Receptor binding assay are Kit A and Kit B. Arrowhead graph was over the maximum limit 0.1 nM.

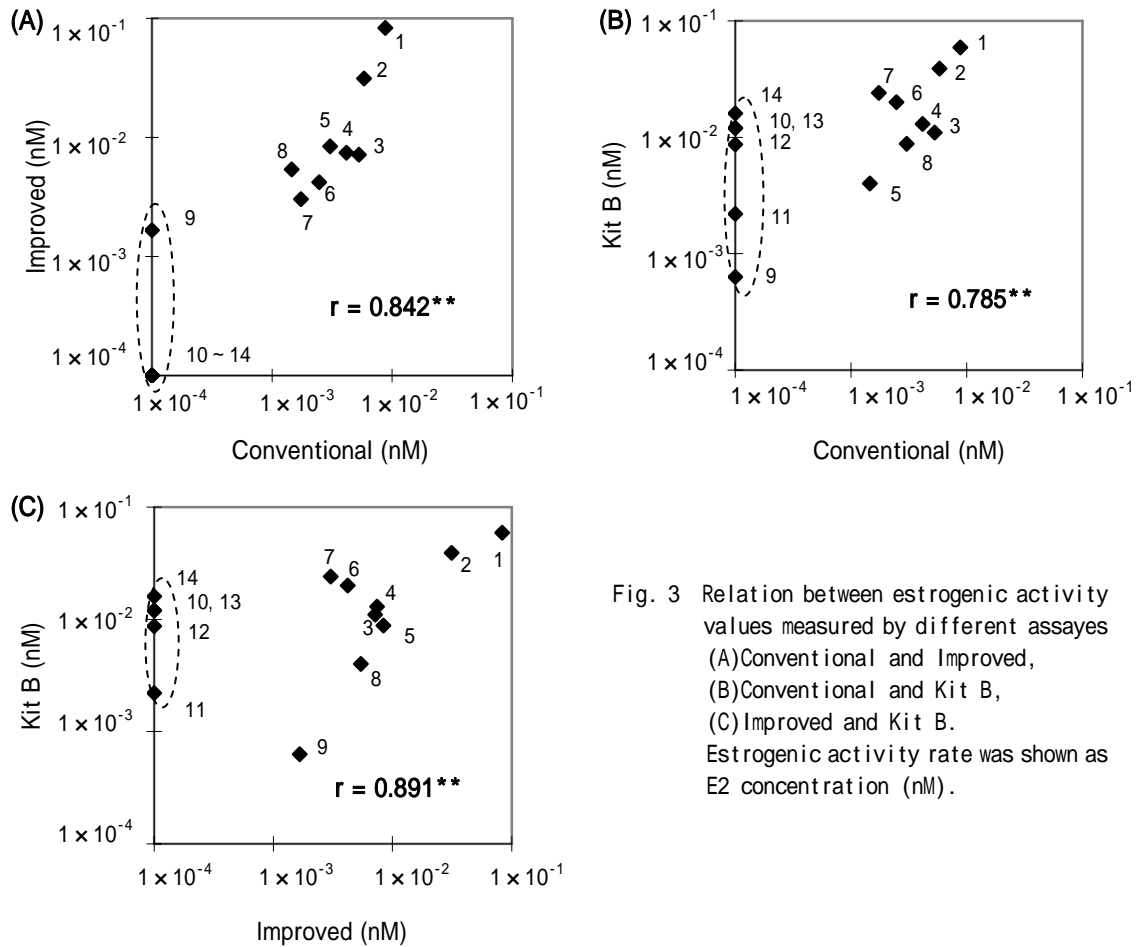


Fig. 3 Relation between estrogenic activity values measured by different assays (A)Conventional and Improved, (B)Conventional and Kit B, (C)Improved and Kit B. Estrogenic activity rate was shown as E2 concentration (nM).

Fig.3 を用いて、改良法およびキット B の測定値の特徴について検討した。

Fig.3(A)において、改良法では活性値が得られたが、従来法では活性値が得られなかった試料 9 と、従来法、改良法双方で活性値が得られた試料 1~8 に関する改良法の活性値を比較すると、前者は後者より全て小さい。従来法と改良法とは正の相関を示していることから、試料 9 に関しては、エストロゲン様活性物質の濃度が低いために従来法では測定できなかったが、改良法では感度が高いために測定可能となったと解釈される。

改良法は、試料水中の主要な妨害物質であるフミン酸の影響を従来法より低減できることから、活性が全体的に増加したものと考えられた。また、反応を pH5.8 の培地で行う従来法に比べ pH7.1 で反応を行う改良法では、化学物質の構造も安定しているのではないかと考えられる。

次に、Fig.3 (B) においてキット B に着目すると、従来法、改良法共に酵母ツーハイブリッド・アッセイ法では活性が得られなかった試料 10~14 に対するキット B の測定値は、全て定量下限以上の値であった。すなわち、キット B では、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によ

り活性値が得られるかどうかに関わりなく、全ての試料で測定値が得られたことになる。このことは、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法とキット法との反応機序の違いにより生じたものと考えられる。すなわち、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法は、酵母の細胞壁（および細胞膜）を通過した化学物質群がエストロゲン 受容体にリガンドとして結合し、アゴニスト作用やアンタゴニスト作用を発現するのに対して、酵母を反応に用いないキット B では、細胞壁通過による化学物質群の選別が起こらず、試料水中の化学物質が直接エストロゲン 受容体にリガンドとして結合し、アゴニスト作用やアンタゴニスト作用を発現するために、このような違いが出たと考えられる。

#### 5. 従来法との代替性

各測定法の特徴について Table 5 にまとめた。測定時間については、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法では、活性測定反応に先立って行う前培養と活性の高い単クローンの選定を含めて 3 日間程度を要するのに対し、キット B では 24 時間、キット A では 4 時間で測定が完了することから、キット法を評価できる。

Table 5 Characteristics of different methods

Items	Estrogenic activity assay		Yeast two-hybrid assay		Receptor binding assay kit	
	Conventional	Improved	Kit A	Kit B		
Assay time			G	F		
Variation	G	G	I	I		
Detection rate / Sensitivity	F	G	I	G		
Measurement of highly concentrated water sample	F	G	I	G		
Cost performance	G	G	I	F		
Substitutability for conventional method		F	I	I		

G:good F:fair I:insufficient

変動については、試料測定において変動係数が少なかった酵母ツーハイブリッド・アッセイ法を評価できる。

検出感度については、改良法とキット B で高い結果が得られたが、感度は共に従来法の数倍～10 倍程度であり、従来法と比較して十分な検出率と感度が得られたと考えられる。

コストパフォーマンスについては、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法は安価に測定可能なことから、市販品であるキット法（特にキット A）は劣ると言える。

これらの点を総合的に検討すれば、キット B および改良法による代替の可能性について、以下のように判断された。

キット B は検出率・感度や高濃縮試料への対応が良好であり、コストもキット法では比較的良かった。しかし、反応機序の面で従来法と異なることから、従来法と単純に置き換えることは難しいと考えられる。キット B を代替法として用いる場合には、河川水中のエストロゲン様活性の新たな総合評価法として、モニタリングによる経年データを蓄積していく必要がある。

改良法については、簡便性の面では、反応培地の pH 調整の手間が増えること、当面は従来法との併用が必要であることなどから、問題点は残るが、高感度であり高濃縮試料への対応面でも優位であることから、従来法と代替可能な方法であると考えられる。改良法を代替法として用いる場合には、同一試料の測定でも従来法と活性値が異なったことから、当初は 2 つの方法で同時に試料の分析を行い、データの蓄積を行う必要がある。また、プレート法<sup>18)</sup>など他の改良法との組み合わせることにより、測定の煩雑性を低減し測定時間を短縮する試みが必要であると考えられる。

## 要 旨

兵庫県下の河川水のエストロゲン様活性測定に用いている酵母ツーハイブリッド・アッセイ従来法に関し、高感度かつ簡便な代替法を見出すために、同改良法および

エストロゲンレセプターバインディングアッセイキットを対象に、その性能を比較検討した。

1. 前処理法の検討結果より、カートリッジカラムとして Sep-Pak Plus tC18、溶出溶媒としてメタノールを用いた画分が今回のアッセイ法の比較には妥当と判断された。
2. 標準品を用いた変動係数の検討の結果、3 重測定のうち明らかに逸脱した値があればそれを削除することにより、改良法、キット法共に有効であることがわかった。
3. 実試料を用いた変動係数の検討の結果、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法に比べキット法で変動係数が大きくなる傾向が認められた。酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の改良法では、変動係数は小さく良好な結果が得られた。
4. 試料の実測値比較により、従来法と改良法、従来法とキット B、改良法とキット B の間に有意な正の相関が得られた。このことから、各測定値について、従来法と改良法およびキット B を比較した結果、改良法とキット B は、従来法の数倍から 10 倍程度感度が高いことがわかった。また、酵母の細胞壁を介する酵母ツーハイブリッド・アッセイ法と、細胞壁を介さないキット B では、測定されている化学物質が異なる可能性が示唆された。
5. 各アッセイ法の特徴を検討した結果、いくつかの課題は残るが、改良法は、従来法の代替法として最も適していると結論された。

## 謝 辞

酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の酵母株の分与および測定法をご指導いただきました、大阪大学西川淳一助教授に深謝いたします。また、酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の改良法についてアドバイスをいただきました、摂南大学中室克彦教授に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 環境庁:内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について-環境ホルモン戦略計画 SPEED'98- 2000年11月版. pp.124 (2000)
- 2) 環境省:化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について-EXTENS2005-, pp.33 (2005)
- 3) 環境庁水質保全局水質管理課:外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質,底質,水生生物). pp.160 (1998)
- 4) 田中宏明,小森行也,玉本博之,斉藤正義,高橋明宏:下水中の環境ホルモンの分析方法とエストロゲン様活性の総括指標化. 用水と廃水,44(1),15-20 (2002)
- 5) 鎌田素之,眞柄泰基:浄水処理における内分泌攪乱化学物質の挙動. 用水と廃水,44(1),28-33 (2002)
- 6) 川越保徳:廃棄物処分場浸出水で検出される環境ホルモン物質とエストロゲン様活性. 用水と排水,44(1),61-67 (2002)
- 7) 白石不二雄:内分泌攪乱化学物質の環境計測手法としてのバイオアッセイ. 全環研会誌,27(4),214-319 (2002)
- 8) 深澤均:酵母ツーハイブリッド・アッセイ法によるエストロゲン活性測定の実環境水への応用. 全環研会誌,27(4),233-239 (2002)
- 9) Tsutomu Nishihara, Jun-ichi Nishikawa, Tomohiro Kanayama, Fumi Dakeyama, Koichi Saito, Masayoshi Imagawa, Satoshi Takatori, Yoko Kitagawa, Shinjiro Hori, and Hideo Utsumi:Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay. *Journal of Health Science*, 46(4), 282-298 (2000)
- 10) 西川淳一,西原力:酵母を用いたツーハイブリッド試験. 井上達監,今井清,長村義之,加藤正信,菅野純編,内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法, p.20-27,シュプリンガー・フェアラーク東京,東京 (2000)
- 11) 西原力,西川淳一:酵母 Two-Hybrid System を用いたエストロゲン作用活性の検出法. 日薬理誌, 118, 203-210 (2001)
- 12) 渡邊雅之,深澤均,白石不二雄,白石寛明,塩澤竜志,寺尾良保:解離処理により発生するビスフェノール A 等の化学物質の分析とエストロゲン活性. 環境化学, 14(1), 65-71 (2004)
- 13) 古武家善成,松村千里,鶴川正寛,藤原英隆,北本寛明:兵庫県内河川における内分泌攪乱化学物質の分布特性および PRTR データから得られた環境排出量との関係. 兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要, 1, 60-66 (2004)
- 14) 中室克彦,坂崎文俊,竹内勉,上野仁,奥野智史:環境水中のエストロゲン様物質の高感度検出のための酵母 two-hybrid 法の改良. 第 55 回全国水道研究発表会要旨集, 602-603 (2004)
- 15) 中室克彦,竹内勉,坂崎文俊,奥野智史,上野仁:改良酵母 two-hybrid 法とヒメダカピテロジェニンアッセイを用いた環境水中のエストロゲン様物質の評価. 日本薬学会年会講演要旨集, 125(3), p.177 (2005)
- 16) 白石不二雄,白石寛明,西川淳一,曾家義博,佐野友春,彼谷邦光,西原力,森田昌敏:酵母を用いたエストロゲン・アンタゴニストアッセイ系の開発と有機スズへの応用. 環境化学, 11(1), 65-73 (2001)
- 17) 厚生労働省:アレルギー物質を含む食品の検査方法について. 厚生労働省医薬局食品保健部長通知,食発第 1106001 号(平成 14 年 11 月 6 日)
- 18) 川越保徳,福永勲,西川淳一,西原力:酵母 Two-hybrid システムによるエストロゲン様活性測定法の簡便化に関する検討. 環境化学, 10(1), 65-72 (2000)

[ ノート ]

## 人工干潟における植物プランクトンの内部生産と 貧酸素化に伴う底質有機物量の変化

宮 崎 一\* 山 崎 富 夫

Effects of the Internal Production of Phytoplankton and Oxygen Deficiency on Changes  
of Organic Substances in the Sediment at the Artificial Tidal Flat

Hajime MIYAZAKI\* and Tomio YAMASAKI

*Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and  
Environmental Sciences, 3-1-27 Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, 654-0037, Japan*

Chlorophyll-a(Chl-a), dissolved oxygen(DO), and ignition loss(IL) were monitored in the Amagasaki artificial tidal flat. DO was changed by various factors, especially, the growth of phytoplankton influenced on the increase of DO. The change of IL showed the organic substances originated in phytoplankton were decomposed rapidly under the high water temperature in summer.

These results suggested that it is important to carry out reductions of pollution loads of nutrition salts to restore the environment in the artificial tidal flat created in the eutricated sea which has the high potential of the internal production.

### はじめに

近年、沿岸域の水環境について、従来から行われている化学的評価に加えて、生物多様性の回復・保全、および健全な物質循環の回復を旨とした環境の回復・修復の必要性が認識されてきた。国においても、2003年1月1日に自然再生推進法が施行され、2003年4月1日に自然再生基本方針の決定により、本法律の本格的運用が開始された。

このような背景から、兵庫県尼崎市の南部工業地帯にあって、閉鎖性による海水交換の悪さ、垂直護岸の建設等により長期にわたり栄養塩が蓄積したために環境悪化

が著しい尼崎港内に、財団法人国際エメックスセンターが環境省の補助を受け、環境修復のための実証試験を行うための人工干潟を造成し、当センターを含む産学官の複数の機関の連携の下、調査研究がなされた<sup>1)2)</sup>。

我々は、生物多様性の回復による環境修復を目的とした第1段階として、この人工干潟を利用してアサリを育て、その過食性を利用した水質浄化実験を行ってきた<sup>2)</sup>。この実験に際しては、生物に対して致命的な影響を与える貧酸素化の出現を予測することが重要な課題であるが、当センターでは植物プランクトンの現存量を示す海水中のクロロフィル-a(Chl-a)およびpHのモニタリングによって貧酸素化の発生予測が可能であることを報告している<sup>3)</sup>。

一方、底質中に生息するアサリ等のベントスは一般に有機汚濁の進行により、貧酸素化に寄与する泥分の増加によって生残率が低下する等、底質の性状によって大きな影響を受ける<sup>4)</sup>。特に、尼崎港のような富栄養化海域

水質環境部

\* 別刷請求先：〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27  
兵庫県立健康環境科学研究センター  
水質環境部 宮 崎 一

では過剰増殖した植物プランクトンが枯死後、海底上に大量に堆積し、この結果、底質の泥分の増加による粒度の変化、底層の酸素消費量の増大等がベントスの生存に悪影響を及ぼすことが懸念されるが、植物プランクトンを介した水質・底質間の有機物の移行と酸素消費についての継続的な知見は少ない。

本報では、ベントスの生息場としての底質の重要性を鑑み、底質の性状に影響を与える要因として、植物プランクトンの内部生産を捉え、枯死沈降後の底質の有機物量、溶存酸素(DO)の量的変化から水質・底質間の相互作用を把握し、水質・底質浄化に貢献するベントスの良好な環境条件を見出すための検討を行ったので報告する。

## 調査方法

### 1. 尼崎港内人工干潟

Fig.1 に調査地点および人工干潟概要図を示す。人工干潟の形状規模は長さ約 32m、幅約 8m であり、干潟前面に砂留潜堤(OP+0.3m)を設置し、OP+1.0m の高さまで 1/50

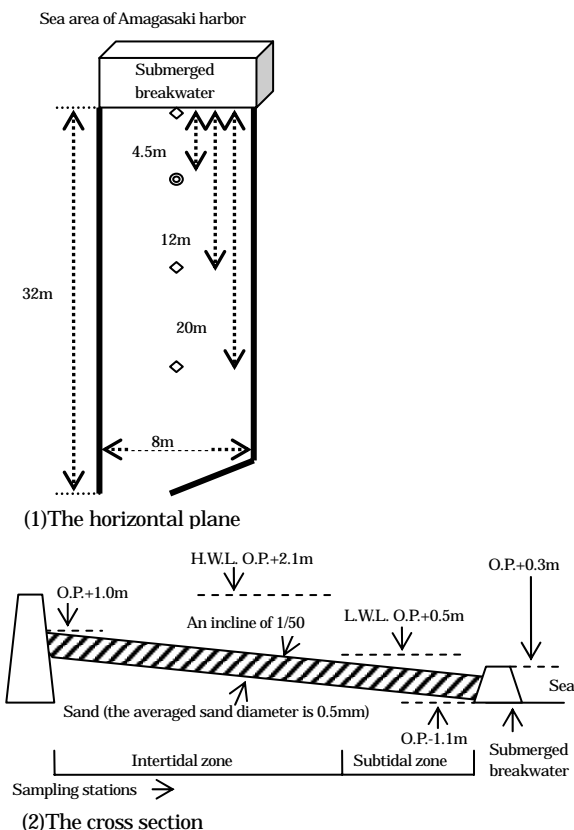


Fig.1 Schematic view of artificial tidal flat in Amagasaki experimental site

Marks of show sampling stations of DO(dissolved oxygen), water temperature and salinity and IL(ignition loss). Marks of show sampling station of DO, water temperature, salinity, Chl-a(chlorophyll-a) and IL. O.P. means the lowest water level in Osaka bay.

勾配にて砂を撒き造成したものである<sup>12)</sup>。

砂は 2002 年 3 月に新規に搬入した清浄な砂(調査開始以降含泥率(粒径 63 μm 未満の粒子の重量百分率)3%未満で推移)である。全リン、全窒素等の栄養塩、および全有機炭素(TOC)、強熱減量(Ignition Loss; IL)の有機物指標値は、貧酸素化が見られない播磨灘等の海域の底質と同程度に低く<sup>5)</sup>、調査開始時には底質(人工干潟造成のために搬入した砂)による大量の酸素消費は考えられない状態であった。

今回は、人工干潟において潜堤からの距離が 0m; 4.5m; 12m; 20m の、横方向から見た中間地点を調査地点として、水質に関しては、水温、塩分、溶存酸素量(DO)、クロロフィル-a(Chl-a)、底質に関しては有機物指標値として IL を測定した。

### 2. 試料採取方法および分析方法

調査は 2002 年 3 月 15 日から 2004 年 11 月 10 日まで、1 ヶ月に 1 回以上モニタリング調査を行った。なお、貧酸素化の発生が予想された、7 月から 10 月初旬まで 1 週間に 1~2 回の頻度で行った。全調査期間を通じて人工干潟内で水深が 2m を超えることはなかったため、水質調査の水深は表層とした。

表層水は塩化ビニル製バケツにより採水し、ポリエチレン製ビンに入れクーラーボックス中で冷蔵保存の上、試料水として実験室へ持ち帰った。試料水 500ml をあらかじめ 450 で 4 時間加熱処理したガラス繊維濾紙(GF-C; Whatman 社製)によりろ過し、ろ紙上に分離、残留された固形分について、Chl-a の分析に供した。DO 測定用試料は DO 測定用フラン瓶に採水後、常法<sup>6)</sup>に従い直ちに固定し持ち帰った。

水温と塩分は、クロロテック(model ACL208-DK; アレック電子(株)製)により現地測定を行った。Chl-a については海洋観測指針<sup>7)</sup>に従い分析を行った。

底質は、スコップを用いて底質表層 5cm の底質を採取し、ポリプロピレン製カップに入れクーラーボックス中で冷蔵保存の上、実験室へ持ち帰った。

なお、今回の調査においては、水質に関しては、地点間によるデータの有意な差が見られなかったため、潜堤から 4.5m 地点のデータを、また、底質に関しては底質試料特有の地点間のばらつき誤差を防ぐため、4 地点の平均値を代表値として、以下の解析に供した。

## 結果

### 1. Chl-a の経時変化

Fig.2 に Chl-a の経時変化を示した。2002, 2003 および

2004年度のいずれにおいても、22 を超える水温と十分な日射量が得られた夏季の7月上・中旬にピーク(2002年度82  $\mu\text{g/L}$ (P.02 : Fig.2 および Fig.3 におけるピーク(Peak)を示す .P.03 および P.04 についても同様.) , 2003年度33  $\mu\text{g/L}$ (P.03) 2004年度40  $\mu\text{g/L}$ (P.04) を示した .その後漸減し 秋季から冬季は20  $\mu\text{g/L}$ 以下で推移した .富栄養化海域であることから海水中の栄養塩濃度が高いことを反映して、尼崎港の Chl-a は 2002 年度平均値が19.6  $\mu\text{g/L}$  であり、半自然干潟である赤穂市唐船海岸の同年度平均値が 2.11  $\mu\text{g/L}$ <sup>8)</sup>であることから、人工干潟の Chl-a は年間を通じて半自然干潟の Chl-a を大きく上回った .

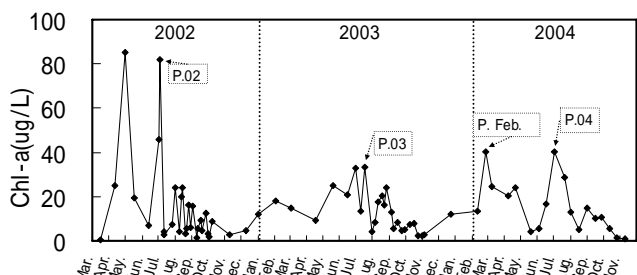


Fig.2 Change of chlorophyll-a(Chl-a)

## 2. DO の経時変化

Fig.3 に DO の経時変化を示した .6月から11月の長期間にわたり人工干潟の DO は、人工干潟の周辺海域である尼崎港内における成層構造の発達による海水の垂直混合の阻害および有機物の分解により発生した貧酸素水の流入の影響が認められ、研究プロジェクトが尼崎港内において設定した水質改善目標値である、3.0  $\text{mg/L}$ <sup>2)</sup>を下回った .一方、2004 年度 2 月(P.Feb. ( Fig.3 におけるピーク(Peak)を示す .) ) , 2002 年度 7 月(P.02)には植物プランクトンの増殖に由来すると考えられる DO のピークが認められた .また、水深が浅いことから 12 月または 1 月のような冬季には、風または波浪による海水の攪拌による DO の上昇が認められた .このように DO は尼崎港内の貧酸素化、内部生産された植物プランクトンによる酸素生産、風または波浪による海水の攪拌等の要因で変動した .

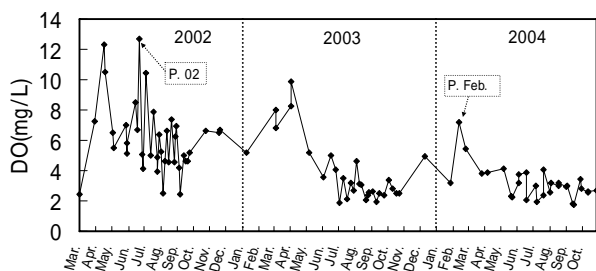


Fig.3 Change of dissolved oxygen(DO)

## 3. IL の経時変化

Fig.4 に IL の経時変化を示した .IL は周年変化を示し、2002 年度には 6 月から 8 月(2.13~2.29%(Max.02 : Fig.4 における 2002 年度の最大値を示す点 .) ) , 2003 年度には 6 月から 7 月(2.31~2.42%(Max.03 : Fig.4 における 2003 年度の最大値を示す点 .) ) , 2004 年度には 6 月(2.47%(Max.04: Fig.4 における 2004 年度の最大値を示す点 .) )となり、各年度の最大値を検出した .毎年高い IL が検出された後、いずれも 7 月から 8 月中には人工干潟への搬入直後と同等な IL 値(1.5%未満)に減少し各年度の最小値となった(2002 年度 8 月 : 1.43%(Min.02 : Fig.4 における 2002 年度の最小値を示す点 .) ) , 2003 年度 8 月 : 1.28%(Min.03 : Fig.4 における 2003 年度の最小値を示す点 .) ) , 2004 年度 8 月 : 1.44%(Min.04 : Fig.4 における 2004 年度の最小値を示す点 .) ) .この減少以降、IL 値は次年度の夏季までゆるやかに増加する傾向を示した .

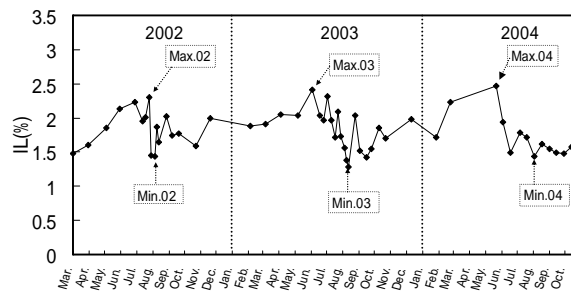


Fig.4 Change of ignition loss(IL)

## 考 察

一般に海域では、植物プランクトンの現存量を示す Chl-a が海水中の内部生産由来の有機物量を示す .近年の大阪湾奥海域では、COD の総量規制により陸域からの負荷が減少し、海域での内部生産由来の有機物が海水中の DO の消費に対して大きな影響を与えていると考えられる<sup>9)</sup> .人工干潟においては、Chl-a 量は夏季にピークを示し、また、富栄養化海域であることを反映して、年間を通じて半自然干潟を大きく上回った .このことから、DO 消費要因としての内部生産有機物の蓄積は、夏季に最高になること、富栄養化に応じて蓄積量が増大することが考えられた .なお、海域の生態系に大きな影響を有する塩分については、淀川に隣接する干潟としては通常値の範囲内である 8.56~30.26 の範囲で推移し、生態系に深刻な影響を与える数値ではなかった .

DO については、6 月から 11 月の長期間にわたり貧酸素化が認められたが、2002 年 7 月 ; 2004 年 2 月には植物プランクトンの増殖に由来すると考えられる DO のピークが



認められ、酸素生産者として植物プランクトンが海水中の DO 増加に強く関与することが示された。このように、Chl-a と DO のモニタリング結果から、DO の増減に対する植物プランクトンの強い影響が示された。

IL は Chl-a のピークが認められた 7 月前後に各年度の最高値まで増加し、その直後に各年度の最小値まで減少が認められる急激な変動を示した。このことは、夏季初頭まで底質に蓄積した植物プランクトン由来の有機物が夏季の高水温下で速やかに分解されることを示している。これに伴い DO もまた速やかに消費されることから貧酸素化を促進するものと考えられる。なお、底質の粒度については、調査期間を通じて砂分が 75%以上を維持し、泥分が 3%を超えることはなかったため、植物プランクトン等の生物の枯死体から生じた泥分の蓄積のような、貧酸素化に寄与するとともにベントスの生息環境に悪影響を及ぼすような変化は認められなかった。

人工干潟内では潮汐による海水交換により、成層構造の発達による海水の垂直混合の抑制の影響が軽微である。そのため人工干潟内では、貧酸素化が発生する要因としては、人工干潟の周辺海域からの貧酸素水の流入、人工干潟内での酸素消費がある。

人工干潟では、今回のモニタリング調査結果から貧酸素化は IL の急速な減少が認められた 7~8 月に先立つ 6 月から始まり 11 月まで継続的に認められた。このことは、

の影響が初夏から晩秋までの長期間にわたり継続していることを示している。夏季の水温上昇に伴う微生物の活性化とともに増加する底質の有機物分解由来の DO 消費が主な消費要因である。は、7 月~9 月に最も貧酸素化することから高水温時に貧酸素化を促進することが示唆された。また、以外には、低水温下で生物分解が少なくなる冬季に蓄積した植物プランクトン、ベントスの枯死体等由来の有機物に対する夏季の高水温における微生物の活性化に伴う分解促進、が考えられる。一般に冬季には生物生産量が減少するため、夏季に過剰増殖した植物プランクトン由来の有機物の影響には及ばないが、我々の調査時に人工干潟内ではムラサキガイが低水温で枯死することが認められていることから、環境条件の変化による生物の大量死には注意しておく必要がある。なお、今回の調査からは詳述することは困難であるが、酸素消費に直接に繋がる要因として、微生物による分解が容易な有機物（易分解性有機物）の蓄積が考えられる。については、IL が毎年ほぼ近い値まで減少することから、秋季から夏季初頭まで蓄積する易分解性有機物は毎年大部分が夏季に分解されると考えられる一方、次年への易分解性有機物の持ち越しはほとんどないと考えられる（IL の最小値以下は難分解性有機物を示す）。こ

のことは易分解性有機物の分解による酸素消費の効果が短期間で現れる形で貧酸素化に加担することを示し、易分解性有機物の蓄積を抑制することの重要性が示唆されている。今後は有機物の分解性の難易度を考慮した水質および底質のモニタリングが必要である。

今回の結果から、人工干潟内で内部生産された植物プランクトンに由来する有機物が速やかに分解され DO を消費することが明らかになった。環境修復の目的から富栄養化海域に造成される人工干潟では内部生産量は多く、内部生産された有機物による DO 消費がベントスの生存を脅かす恐れがあるため、内部生産の抑制のための富栄養化防止が求められる。今後の環境修復の順調な進展のためには、有用ベントスを含む生物生息に必要な人工干潟のような場の造成と同時に、内部生産抑制のため従来から採用されている栄養塩類（全磷、全窒素）の総量規制等の汚濁負荷の削減施策を実施することが重要である。

## ま と め

1. 尼崎港内において造成された人工干潟において、Chl-a、DO、IL の関係を検討した。貧酸素化については、植物プランクトンの内部生産の増大による有機物の供給と高水温下での微生物の活性化による酸素消費量増加の影響が認められた。
2. IL の変動から、夏季初頭まで底質に蓄積した植物プランクトン由来の有機物が夏季の高水温下で速やかに分解されることが示された。特に易分解性有機物については、短期間で分解され、貧酸素化に加担することが示された。
3. 内部生産量が多い富栄養化海域の人工干潟における環境修復の順調な進展のためには、栄養塩類の総量規制等の汚濁負荷の削減施策を実施することが重要である。

本調査研究は（財）国際エメックスセンターが環境省から受託したプロジェクト研究「閉鎖性海域における最適環境修復技術のパッケージ化」の一環として行ったものの一部である。

## 謝 辞

現地調査においては、武庫川下流浄化センター、赤穂漁業協同組合を始めとする地元関係者の方々のご理解とご協力を頂いたことに感謝します。

## 文 献

- 1) 環境省補助事業，2001 年度環境技術開発等推進事業[実用化研究開発課題]，閉鎖性海域における最適環境修復技術のパッケージ化（環境修復技術のベストミックスによる物質循環構造の修復）研究開発成果報告書，6-8～6-10，6-30～6-37，6-79～6-107，財団法人国際エメックスセンター（2002）
- 2) 環境省補助事業，2002 年度環境省委託業務結果報告書，閉鎖性海域における最適環境修復技術のパッケージ化（環境修復技術のベストミックスによる物質循環構造の修復）研究開発成果報告書，5-1～5-7，5-13～5-30，財団法人国際エメックスセンター（2003）
- 3) 宮崎 一，山崎 富夫：水質変化から見た人工干潟における海水の貧酸素化について，兵庫県立健康環境科学研究所センター年報，2，130-135，(2003)
- 4) 社団法人全国沿岸漁業振興開発協会：沿岸漁場整備開発事業増殖場造成計画指針ヒラメ・アサリ編（平成 8 年度版）139-141(1997)
- 5) 2001 年度環境省委託業務結果報告書，瀬戸内海環境情報基本調査-播磨灘・燧灘・別府湾-(資料編)，45-65，77-93，105-121，社団法人瀬戸内海環境保全協会（2002）
- 6) 工場排水試験方法 JIS K 0102，日本規格協会，東京，94-96（1998）
- 7) 気象庁編：海洋観測指針，114-122，日本気象協会(1999)
- 8) 宮崎 一，山崎 富夫，谷本 高敏，木幡 邦男，樋渡 武彦：富栄養化海域における環境悪化と二枚貝の生残率の関係，用水と廃水，47(2)，54-61(2005)
- 9) Hajime Miyazaki, Akira Yoshimura, Ikuyo Kamimura, Masakazu Furuki, Kunio Kohata, and Masataka Watanabe : The Long-Term Changes Of the Water Quality and the Management of Pollution Load in Osaka Bay, With Rivers to the Sea(Abstracts), 3rd International Conference of the Environmental Management of Enclosed Coastal Seas(EMECs), Stockholm Sweden, 188-190(1997)

## [Notes]

## Preliminary Study on Measurement of Air Temperature for Monitoring of Heat Island Phenomenon

**Masahide AIKAWA\* , Takatoshi HIRAKI and Jiro EIHO**

*Atmospheric Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and  
Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, 654-0037, Japan*

To examine the effects of various conditions on air temperature measurement, air temperature was measured under different conditions at different sites at one six-story building before a network for monitoring air temperature was developed. The mean air temperatures measured at the south-facing sites were higher than those at the roof site and the north-facing sites, while the north-facing sites showed approximately the same mean air temperatures as the roof site. However, the diurnal range observed at the roof site was larger than those observed at the north-facing sites although the air temperature at the roof site was measured in a thermometer shelter. When air temperatures were measured without any shelters, it could provide available data to measure air temperatures in the shade at the north-facing site.

### I INTRODUCTION

Air temperature has been measured from the standpoint of not only the detection of climate change but also the survey of urban heat islands<sup>1-4)</sup>. When air temperature is measured, the site should be selected carefully according to the purpose of the study. When the purpose is to study urban heat islands, the measurements should be taken in an urban area. It is preferable that air temperature be measured 1.5 m above ground by a thermometer which is placed in a thermometer shelter on the grass; however, the optimal conditions cannot always be achieved. In the current study, the different conditions under which air temperatures are measured, including differences in measuring devices, were examined.

### MATERIALS AND METHODS

#### 2.1 Research site and period

In April 2005, air temperatures were measured under different conditions at nine sites at one six-story building, the Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences. Air temperature was measured at the following sites and under the following conditions:

Site A: On the roof (about 25 m above ground), with the thermometer placed inside a thermometer shelter. The area where the thermometer shelter was placed was covered with a tarpaulin.

Site B: On the sixth-floor south-facing balcony (about 21 m above ground).

Site C: On the sixth-floor north-facing balcony (about 21 m above ground).

Site D: On the fifth-floor south-facing balcony (about 17 m above ground).

Site E: On the fifth-floor north-facing balcony (about 17 m above ground).

Site F: On the third-floor south-facing balcony (about 9 m above ground).

---

大気環境部

\* 別刷請求先：〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27  
兵庫県立健康環境科学研究センター  
大気環境部 藍川昌秀

Site G: On the third-floor north-facing balcony (about 9 m above ground).

Site H: The first-floor south-facing veranda. \*

Site I: The first-floor north-facing veranda.

On each balcony and veranda, thermometers were placed in the shade and, where possible, away from air conditioners.

## 2.2 Measurement devices and frequency

Air temperatures were measured by two kinds of thermometers (type I: Thermo Recorder TR-72U, T&D Corporation, Nagano, Japan; type II: Thermochron type G, KN Laboratories, Inc., Osaka, Japan). The measurement resolutions of the Thermo Recorder TR-72U and Thermochron type G are 0.1°C and 0.5°C, respectively. The measurement accuracies of Thermo Recorder TR-72U and Thermochron type G are  $\pm 0.3^\circ\text{C}$  and  $\pm 1^\circ\text{C}$ , respectively.

Air temperatures were measured at 10-minute intervals, and hourly mean air temperatures were used for analyses.

## RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Comparison of measurement devices

The differences in daily air temperatures as measured with the two devices are shown in Fig. 1. The vertical and horizontal axes show the differences in air temperature according to the device used and the time of measurement shown by day, respectively. The daily mean, daily maximum, and daily minimum air temperature are depicted in Fig. 1 (a), (b), and (c), respectively. The differences in daily mean air temperature (Fig. 1 (a)) were between approximately  $-0.2^\circ\text{C}$  and  $+0.7^\circ\text{C}$ , which shows that air temperature can be measured within the precision of each device shown in 2.2. Each site had site-specific differences; i.e., the differences were constant and without large variations, which shows that the differences were determined by a device-specific quality. The differences in the daily maximum air temperature (Fig. 1 (b)) were between approximately  $-1.0^\circ\text{C}$  and  $+1.0^\circ\text{C}$ , showing that the daily maximum air temperature can also be measured within the precision of each device, though variations in the

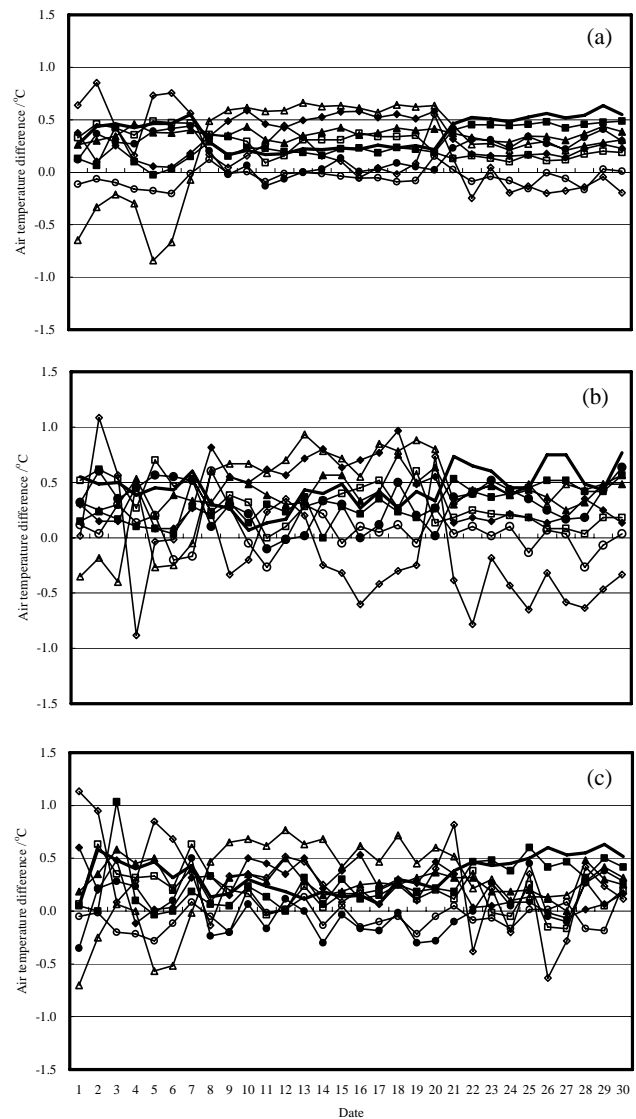


Figure 1 Differences in daily air temperatures as measured with the two devices. (a), (b), and (c) are drawn for daily mean, daily maximum, and daily minimum air temperature, respectively. No mark, open circle ( ), filled circle ( ), open square ( ), filled square ( ), open triangle ( ), filled triangle ( ), open rhombus ( ), and filled rhombus ( ) shows Site A, Site B, Site C, Site D, Site E, Site F, Site G, Site H, and Site I, respectively.

daily maximum were larger than those of the daily mean air temperature. The differences in daily minimum air temperature (Fig. 1 (c)) were between approximately  $-0.3^\circ\text{C}$  and  $+0.8^\circ\text{C}$ , which shows that the daily minimum air temperature can also be measured within the precision of each device. Variations in the daily minimum were smaller than those of the daily maximum air temperature. Thus,

the differences in measurement devices are conceivably within the precision of each device.

### 3.2 Comparison of sites

#### 3.2.1 Time-varying comparison

The differences in air temperature between the roof site (Site A) and the floor sites (Sites B ~ I) are shown in Fig.2. The vertical axis shows the differences in air temperature, i.e., the air temperature at Site A minus the air temperatures at Sites B ~ I, and the horizontal axis shows the time by hour. Large open circles show the time of 0:00. As shown in Fig.2, the differences in air temperature between the roof site and the south-facing sites generally showed negative values; in other words, the air temperatures at the south-facing sites (Sites B, D, F, H) were higher than the air temperature at the roof site irrespective of the time although a diurnal variation was observed. In contrast, the differences in air temperature between the roof site and the north-facing sites (Sites C, E, G, I) showed both a negative value and a positive value, depending on the time. The difference in air temperature showed a positive value in the daytime and a negative value at night; in other words, the air temperatures at the roof site were higher and lower than those at the north-facing sites during the day and at night, respectively.

Figure3 (a) demonstrates the differences in daily mean air temperature between the roof site (Site A) and the floor sites (Sites B ~ I). As for

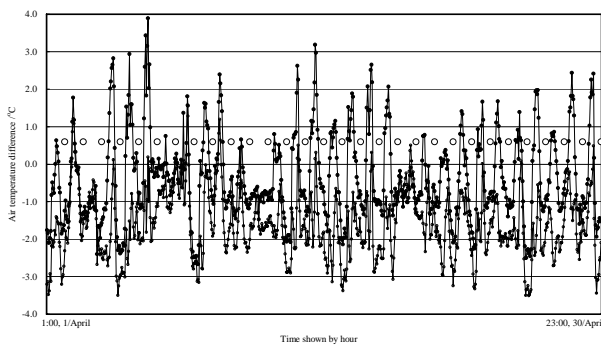


Figure 2 Differences in air temperature between the roof site and the mean of south-facing sites (○), north-facing sites (□) based on hourly mean air temperature. Large open circles show the time of 0:00.

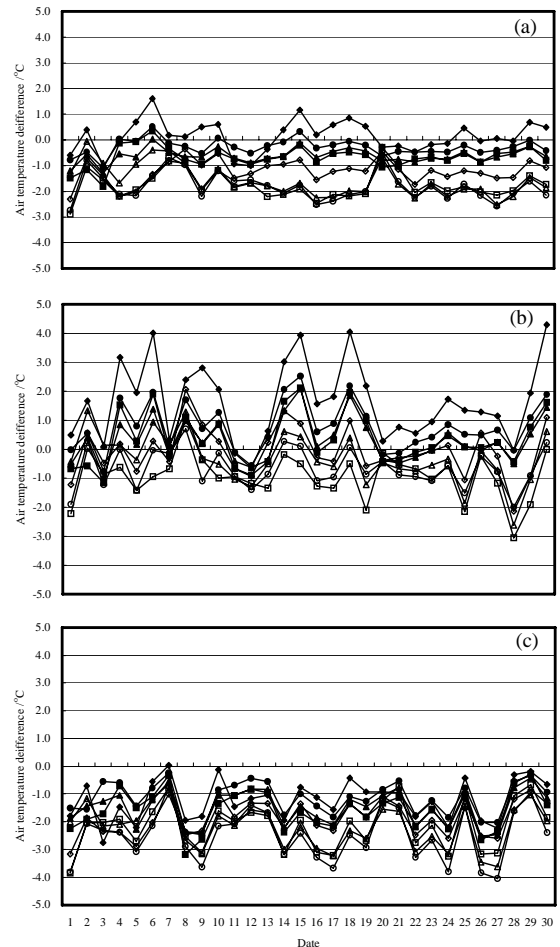


Figure 3 Differences in air temperature between the roof site(Site A)and the floor sites(Sites B~I) (a), (b), and (c) are drawn for daily mean, daily maximum, and daily minimum air temperature, respectively. Open circle (○), filled circle (●), open square (□), filled square (■), open triangle (△), filled triangle (▲), open rhombus (◇), and filled rhombus (◆) shows Site A – Site B, Site A - Site C, Site A - Site D, Site A - Site E, Site A - Site F, Site A - Site G, Site A - Site H, and Site A - Site I, respectively.

the north-facing sites (Sites C, E, G, I), the differences in daily mean air temperature were approximately within  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ , while for the south-facing sites (Sites B, D, F, H), the daily mean air temperatures at the south-facing sites were generally higher, in a range of  $2.5^{\circ}\text{C}$ , than those at the roof site.

Figure3 (b) demonstrates the differences in daily maximum air temperature between the roof site (Site A) and the floor sites (Sites B ~ I). The differences in daily maximum air temperature between the roof site and the north-facing sites

(Sites C, E, G, I) were between approximately -1°C and +4°C, while those between the roof site and the south-facing sites (Sites B, D, F, H) were between approximately -3°C and +1°C.

The differences in the daily minimum air temperatures between the roof site (Site A) and the floor sites (Sites B ~ I) are shown in Fig.3 (c). The roof site mostly showed lower air temperatures than the floor sites. In addition, the differences were larger at the south-facing sites (Sites B, D, F, H). The differences were up to 4°C at the south-facing sites and up to 3°C at the north-facing sites.

### 3.2.2 Statistical comparison

Some statistical parameters of air temperature are summarized in Table 1. The air temperatures at the south-facing sites were higher than those at the roof site and the north-facing sites, which is consistent with the result shown in 3.2.1. At the roof site, not only the standard deviation (S.T.D.) but also the relative standard deviation, defined as S.T.D./mean, was larger than those at other sites, showing that the diurnal range of air temperature at the roof site was larger than those at other sites although the air temperature at the roof site was measured in a thermometer shelter.

Table 1 Some statistical parameters of air temperature.

	n	Mean	Median	Minimum	Maximum	S.T.D. <sup>1)</sup>	R.S.D. <sup>2)</sup>	(Max.-Min.)/mean
Site A	720	15.3	15.7	6.0	27.3	3.7	24.0%	1.39
Site B	720	17.1	17.1	8.8	27.0	3.4	19.7%	1.06
Site C	720	15.6	15.9	7.0	25.4	3.3	21.1%	1.18
Site D	720	17.1	16.9	8.3	27.3	3.4	20.1%	1.11
Site E	720	16.0	16.3	7.1	25.7	3.3	20.7%	1.16
Site F	720	17.1	17.2	8.8	26.7	3.4	19.7%	1.05
Site G	720	16.0	16.2	7.5	25.8	3.3	20.5%	1.15
Site H	720	16.5	16.6	8.8	26.2	3.3	19.7%	1.05
Site I	720	15.2	15.4	7.9	23.0	3.0	19.8%	0.99

1) S.T.D.shows standard deviation.

2) R.S.D.shows S.T.D./mean.

## CONCLUSION

The conditions under which air temperature is measured were examined in preparation for the development of a network to monitor air temperature. At a six-story building, air temperatures measured at the south-facing sites showed higher mean values than those measured at the north-facing sites and the roof site. In contrast, air temperatures

measured at the north-facing sites showed mean values similar to those measured in the roof site. However, the diurnal range at the roof site was larger than those at the north-facing and south-facing sites. When air temperatures were measured without any shelters, it could provide available data to measure air temperatures in the shade at the north-facing site.

The error produced by using different devices was within the precision of each device.

## REFERENCES

- 1) Oke, T.R.: City size and the urban heat island. *Atmospheric Environment*, **7**, 769-779 (1973)
- 2) Jones, P.D., Groisman, P.Ya., Coughlan, M., Plummer, N., Jamason, N., Wang, W.-C., Karl, T.R.: Assessment of urbanization effects in time series of surface air temperature over land. *Nature*, **347**, 169-172 (1990)
- 3) Easterling, D.R., Horton, B., Jones, P.D., Peterson, T.C., Karl, T.R., Parker, D.E., Salinger, M.J., Razuvayev, V., Plummer, N., Jamason, P., Folland, C.K.: Maximum and minimum temperature trends for the globe. *Science*, **277**, 364-367 (1997)
- 4) Gallo, K.P., Owen, T.W., Easterling, D.R., Jamason, P.F.: Temperature trends of the U.S. historical climatology network based on satellite-designated land use/land cover. *Journal of Climate*, **12**, 1344-1348 (1999)

## 「ノート」 ヒートアイランド現象解明に係る気温測定に関する予備的研究

藍川 昌秀<sup>\*</sup> 平木 隆年 英保 次郎

## 要 約

気温測定網を構築するにあたり、気温測定の条件を検討するために予備実験として、6階建てビル内の異なる条件（高さ及び方位）の地点で気温測定を行った。南側に面した地点で測定された平均気温は北側に面した地点及び屋上で測定された平均気温よりも高い値を示した。一方、北側に面した地点で測定された平均気温は屋上で測定された平均気温とほぼ同じ値を示す一方、北側に面した地点での日較差は屋上での日較差よりも小さい値を示した。このことから、百葉箱等が利用できない場合、

ランダ等の雨のかからない、北側の日陰で気温を測定することにより、ある程度利用可能な気温データを測定できることが示された。

## [ ノート ]

# PM<sub>2.5</sub> 長期モニタリングのためのサンプラーの試作

吉 村 陽\* 小 坂 浩

## Performance of Prototype Sampler for Monitoring of PM<sub>2.5</sub> Long Term Average Concentration

Akira YOSHIMURA\* and Hiroshi KOSAKA

*Atmospheric Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27 Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, 654-0037, Japan*

A low volume sampler for monitoring of the long-term average of the PM<sub>2.5</sub> concentration was produced experimentally and evaluated the performance. This Long-term Average sampler (LTA sampler) consists of two impaction stages to remove particles larger than 10 μm and 2.5 μm in aerodynamic diameter. PM<sub>2.5</sub> is collected on a quartz filter of a diameter of 110 mm. The LTA sampler was evaluated in a field study by comparison with the NILU sampler. Measurements of PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>(10-2.5)</sub> mass concentrations showed good agreement between the two methods.

### はじめに

PM<sub>2.5</sub> (空気動力学径が 2.5 μm 以下の大気中微小粒子状物質) の測定方法は、2000 年 9 月に「大気中微小粒子状物質 (PM<sub>2.5</sub>) 質量濃度測定方法暫定マニュアル」<sup>1)</sup> (以下暫定マニュアルという) として環境庁 (現環境省) から示された。暫定マニュアルにはフィルターによる測定方法と自動測定機による測定方法の 2 種類の方法が規定されている。フィルターによる測定方法は 1997 年 6 月に米国で公示された標準測定法 (Federal Reference Method, 以下 FRM)<sup>2)</sup> を基本としたものであり、24 時間ごとにフィルターを交換する必要があり、フィルターの秤量も 1 μg 単位の読み取りが可能な化学天秤を使用するなど、PM<sub>2.5</sub> 濃度を継続的にモニタリングするには経費や労力の負担が大きい。他方の自動測定機については測定誤差の問題

があることが指摘されており<sup>1,3,4)</sup>、モニタリングのための導入は進んでいない。

空気動力学径が 10 μm 以下の浮遊粒子状物質 (SPM) は 1 時間値をもとに環境基準への適合を評価するため、公定法としてベータ線吸収法などの自動測定機によるモニタリングが行われているが、同時にロウポリウムサンプラーを利用したフィルターによる 1 ヶ月連続サンプリングも一般環境大気測定局などで長期間にわたって行われてきた。このサンプリングによるデータからは SPM の月平均濃度のトレンドに加え、SPM の化学組成の特徴が明らかにされる<sup>5)</sup> など、重要なデータの収集に用いられてきた。

そこで筆者らは PM<sub>2.5</sub> のモニタリングにおいても SPM と同様のフィルターを用いた長期間の平均濃度測定によって汚染実態を把握することを目的としたサンプラーを試作し、測定精度について調べた。

### 材料と方法

#### 2.1 LTA サンプラーの製作

新たに試作した PM<sub>2.5</sub> サンプラー (Long Term Average

大気環境部

\* 別刷請求先：〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27  
兵庫県立健康環境科学研究所センター  
大気環境部 吉 村 陽



Sampler, 以下「LTA サンプラー」という)は、質量濃度測定の基本であるフィルター法を用いた。PM<sub>2.5</sub>をろ過捕集するフィルターは、一般的なロウボリウムサンプラーによるSPMの1ヶ月サンプリングに用いられるものと同じ110mmの石英フィルター(PALLFLEX, TISSUQUARTZ 2500QAT-UP)とし、2週間程度の長期連続サンプリングが出来るようにした。粒子の分級はこれまで様々な種類のものが開発、利用されているインパクト方式を用いた<sup>6-10)</sup>。インパクトの主な仕様をTable 1に示す。インパクトはアルミニウム製で2段のステージからなり、それぞれ30個の円形オリフィスを有する。1段目で粒径10 $\mu$ m以上、2段目で2.5 $\mu$ m以上の粒子をそれぞれ50%カットし、1,2段目を通じたものをPM<sub>2.5</sub>としてバックアップフィルターでろ過捕集することにより、PM<sub>2.5</sub>とPM<sub>10</sub>を同時に測定できるようにした。1,2段目のインパクトプレートは外径90mm、内径25mmのドーナツ型で石英フィルターを載せて粒子をインパクトさせた。インパクトで正確に分級を行うためには流量を一定に保つことが必須であるため、インパクトの後ろにマスフローコントローラ(コフロック, 3655)、真空ポンプ(日東工器, VP0625)の順に接続し、流速16.7L/minで運転した。サンプラーの筐体はロウボリウムサンプラー(新宅機械, S2)を改造して使用した。

## 2.2 LTA サンプラーの精度評価

### 2.2.1 LTA サンプラーの2重測定

2台のLTAサンプラーで同時にサンプリングを行い、PM<sub>2.5</sub>とPM<sub>(10-2.5)</sub>(空気動力学径が2.5~10 $\mu$ mの粒子)濃度を2重測定してLTAサンプラーによる測定の再現性を評価した。サンプリングの時間は1~2週間程度とし、場所は県立健康環境科学研究センター須磨庁舎の3階ベランダで2001年6月から2003年5月にかけて行った。フィルターの秤量は、セミマイクロ天秤(Mettler, AE240, 秤量下限10 $\mu$ g)を使用し、フィルターは使用前後にそれぞれ相対湿度50%に調整されたデシケータに24時間以上保存後秤量した。天秤の使用時は天秤を設置している秤量室内も概ね相対湿度が50%となるように加湿器と除湿機で調節した<sup>11)</sup>。

Table 1 Characteristics of the LTA impactor

	1st stage	2nd stage
Flow Rate (L/min)	16.7	16.7
Orifice		
Number	30	30
Diameter (mm)	2.65	1.05
Average velocity through jet (m/sec)	1.68	10.7
Particle diameter <sup>a)</sup> ( $\mu$ m)	10	2.5

a) Theoretical diameter of particle having 50% efficiency of impacting

### 2.2.2 NILU サンプラーとの並行測定

次に、LTAサンプラーによるPM<sub>2.5</sub>, PM<sub>(10-2.5)</sub>濃度の精度について調べるため、LTAサンプラーと市販のNILUサンプラーを並行運転して両者のPM<sub>2.5</sub>, PM<sub>(10-2.5)</sub>濃度を比較した。NILUサンプラーは、LTAサンプラーと同様に空気動力学径が10 $\mu$ m以上及び2.5 $\mu$ m以上の粒子を50%カットする2段のインパクト(東京ダイレック)方式で分級しており、インパクトを装着したフィルターホルダ(NILU)をマスフローコントローラと真空ポンプに接続して流速20.0L/minで運転した。インパクトプレートは外径48mm、内径18mmのドーナツ型で捕集面には石英フィルターを使用した。バックアップフィルターには米国FRMで規定されている47mmのテフロンフィルター(PALLFLEX, TK15-G3M)を使用した。NILUサンプラーはインパクトプレートやバックアップフィルターの直径がLTAサンプラーの半分以下のため長期間連続運転には適さず、24時間程度の短期間サンプリングに適している。ここではLTAサンプラーは長期(2週間連続)サンプリングしたのに対し、NILUサンプラーは短期(3または4日間連続)サンプリングして3または4日ごとにフィルターを取り替え、得られた測定値から2週間平均値を算出した。並行運転は2000年9月から2001年3月まで行った。分級特性を調べる方法としては、粒径が既知の単分散エアロゾルを用いる方法<sup>12)</sup>もあるが、本報では行わなかった。

### 2.2.3 NILU サンプラーの精度評価

また、LTAサンプラーとNILUサンプラーの比較測定を行う前に、FRMで規定されているインパクトを備えたPM<sub>2.5</sub>サンプラー(紀本電子, 以下「KMTサンプラー」とNILUサンプラーとの並行運転を行い、NILUサンプラーによるPM<sub>2.5</sub>測定値の精度を確かめた。KMTサンプラーはオイルを含浸させたガラスフィルター上に2.5 $\mu$ m以上の粒子をインパクトさせて粒子の跳ね返りや再飛散を防ぎ<sup>2)</sup>、PM<sub>2.5</sub>粒子を47mmのテフロンフィルター(PALLFLEX, TK15-G3M)にろ過捕集した。サンプリングは1999年6月に幹線道路近傍で行い、サンプリング時間は24時間とした。

### 2.2.4 その他のサンプラーとの並行測定

さらに、サイクロン方式の分級装置を備えた2種類のサンプラー(SCCサンプラー, FKSサンプラー)をLTAサンプラーと並行運転させて測定値を比較した。

SCCサンプラーは、空気動力学径が2.5 $\mu$ m以上の粒子を50%カットするサイクロン方式の分級装置として市販されているシャープカットサイクロン(R&P, SCC)<sup>13)</sup>をロウボリウムサンプラー(新宅機械, FKS)の筐体に取り付けたもので、流量をニードルバルブで16.7L/minに調節して運転した。LTAサンプラーとの並行運転は2000年

12月から2001年6月まで実施し、運転時間はLTAサンプラーと同じ2週間で、PM<sub>2.5</sub>を110mmの石英ろ紙(PALLFLEX, TISSUQUARTZ 2500QAT-UP)上にろ過捕集した。

FKSサンプラーはSPMのサンプリング用として国内で普及しているロウポリウムサンプラー(新宅機械, FKS)で、SPMを110mm石英ろ紙上にろ過捕集した。流量をニードルバルブで20L/minに調節してLTAサンプラーと同じ2週間の連続運転を行った。分級は空気動力学径が10μm以上の粒子を100%カットするサイクロン方式を用いたLTAサンプラーとの並行運転は2003年4月から2005年4月まで実施した。

### 結果および考察

#### 3.1 LTAの2重測定

各サンプラーの並行運転による測定値を線形回帰分析した結果をTable2にまとめて示した。また、LTAサンプラーの2重測定結果をPM<sub>2.5</sub>についてはFig.1、PM<sub>(10-2.5)</sub>についてはFig.2に示した。LTA1に対するLTA2の回帰直線は、PM<sub>2.5</sub>では切片が-0.01、傾斜が1.01であり、10~30μg/m<sup>3</sup>の濃度範囲において精度は良好であった。95%信頼区間は切片が-0.87~0.86、傾斜が0.97~1.06であり、両者の測定値に有意な差は認められなかった。PM<sub>(10-2.5)</sub>の回帰直線も切片が0.16、傾斜が1.00で精度は良好であったが、殆どの測定値が5~15μg/m<sup>3</sup>の間に集中しており、20~50μg/m<sup>3</sup>の間で精度の確認は出来なかった。95%信頼区間は切片が-0.11~0.42、傾斜が0.99~1.02であり、両者の測定値に有意な差は認められなかった。

#### 3.2 LTAとNILUの相関

LTAサンプラーとNILUサンプラーで測定したPM<sub>2.5</sub>およびPM<sub>(10-2.5)</sub>濃度の相関をそれぞれFig.3、Fig.4に示した。PM<sub>2.5</sub>の回帰直線の切片は0.26、傾斜は1.04で95%信頼区間は切片が-4.38~4.89、傾斜が0.81~1.28であり、有意差は認められなかった。PM<sub>(10-2.5)</sub>についても回帰直線の95%信頼区間は切片が-0.69~1.82、傾斜が0.97~1.18であり、有意差は認められなかった。LTAサンプラーで測定したPM<sub>2.5</sub>濃度とPM<sub>(10-2.5)</sub>濃度は、一定の精度を保っていることが示された。

#### 3.3 NILUとKMTの相関

NILUサンプラーとKMTサンプラーで測定したPM<sub>2.5</sub>濃度の相関をFig.5に示した。回帰直線の切片は-5.52、傾斜は1.34で95%信頼区間は切片が-9.13~-1.92、傾斜が

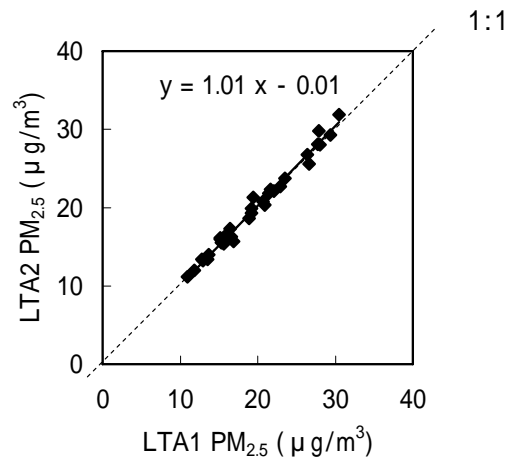


Fig.1 Comparison of PM<sub>2.5</sub> mass concentration for the LTA2 with LTA1.

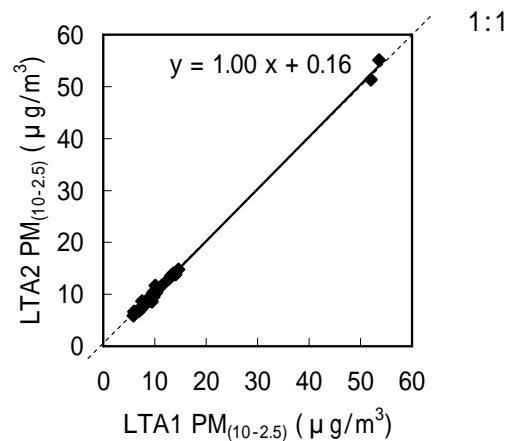


Fig.2 Comparison of PM<sub>(10-2.5)</sub> mass concentration for the LTA2 with LTA1.

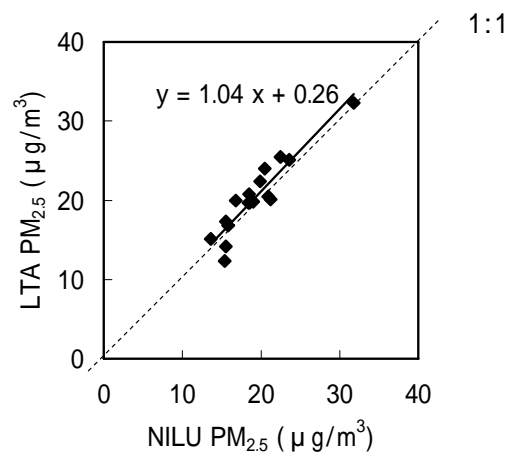


Fig.3 Comparison of PM<sub>2.5</sub> mass concentration for the LTA with NILU.

1.15~1.52 であり、両者の測定値には系統的な差が観測された。NILU 測定値は KMT 測定値に比べて高濃度域で高くなる傾向があった。これは粒子濃度が高濃度のときに、NILU サンプラーにおいて 2.5 $\mu\text{m}$  以上の粒子がサンプリング中に再飛散し  $\text{PM}_{2.5}$  として捕集された可能性が考えられる。しかし本報では短期間の調査でサンプル数が 10 と少なく、濃度の分布に偏りがあった。両者の比較を厳密に行うためには、サンプル数を増やして詳細な比較調査を実施する必要があると思われる。

### 3.4 LTA と SCC の相関

LTA サンプラーと SCC サンプラーで測定した  $\text{PM}_{2.5}$  濃度の相関を Fig.6 に示した。SCC に対する LTA の回帰直線の切片は 0.67、傾斜は 0.85 で 95%信頼区間は切片が -3.39 ~ 4.73、傾斜が 0.70 ~ 1.01 であり、両者の測定値に有意な差は認められなかった。LTA サンプラーによる  $\text{PM}_{2.5}$  の測定値は一定の精度を有していることが示された。

### 3.5 LTA と FKS の相関

LTA サンプラーによる  $\text{PM}_{10}$  濃度と FKS サンプラーによる SPM 濃度の相関を Fig.7 に示した。LTA サンプラーによる  $\text{PM}_{10}$  は分級特性が 50%カットであるのに対し、FKS サンプラーによる SPM は 100%カットであることから、理論上は  $\text{PM}_{10}$  濃度が SPM 濃度より低い値をとることはない。FKS による SPM 濃度に対する LTA による  $\text{PM}_{10}$  濃度の回帰直線の切片は 3.92、傾斜は 0.99 であった。特に切片の 95%信頼区間が 1.28 ~ 6.56 と正の値となり、LTA による  $\text{PM}_{10}$  濃度は FKS による SPM 濃度に比べ、非常に近い値を示しながらも有意に高く、理論と矛盾しない結果が得られた。

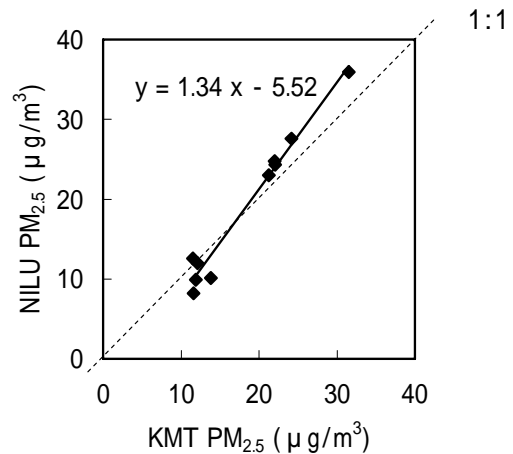


Fig.5 Comparison of  $\text{PM}_{2.5}$  mass concentration for the NILU with KMT.

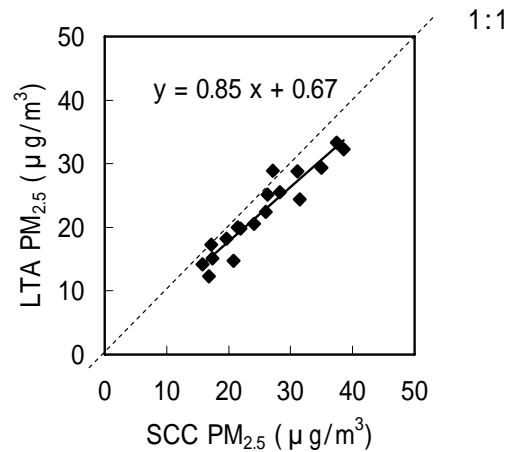


Fig.6 Comparison of  $\text{PM}_{2.5}$  mass concentration for the LTA with SCC.

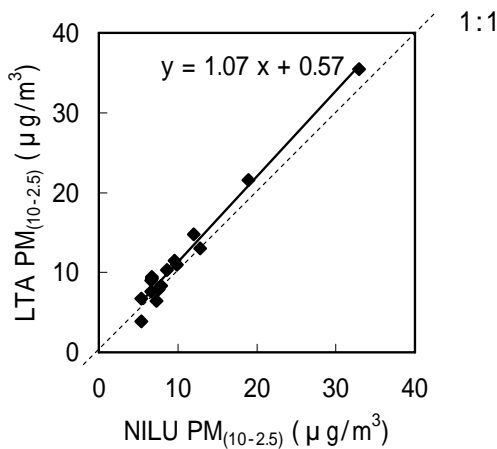


Fig.4 Comparison of  $\text{PM}_{(10-2.5)}$  mass concentration for the LTA with NILU.

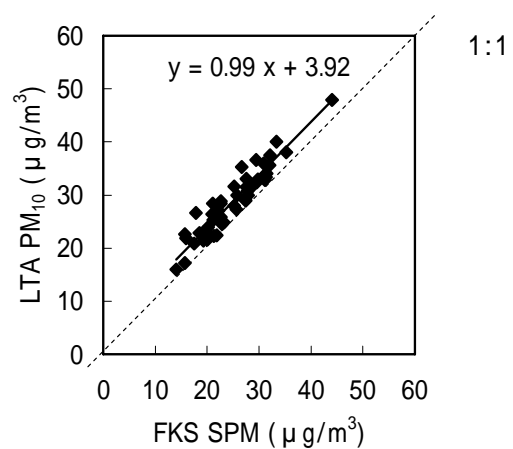


Fig.7 Comparison of mass concentration for the  $\text{PM}_{10}$  (LTA) with SPM. (FKS)

Table 2 Results of Regression

Regression of y on x			n	95% confidence interval		correlation coef.
y	x			intercept	slope	
LTA2	LTA1	PM <sub>2.5</sub>	35	-0.87 ~ 0.86	0.97 ~ 1.06	0.993
		PM <sub>(10-2.5)</sub>	35	-0.11 ~ 0.42	0.99 ~ 1.02	0.999
LTA	NILU	PM <sub>2.5</sub>	16	-4.38 ~ 4.89	0.81 ~ 1.28	0.931
		PM <sub>(10-2.5)</sub>	16	-0.69 ~ 1.82	0.97 ~ 1.18	0.986
LTA	SCC	PM <sub>2.5</sub>	18	-3.39 ~ 4.73	0.70 ~ 1.01	0.947
LTA	FKS	PM <sub>10</sub> , SPM	48	1.28 ~ 6.56	0.89 ~ 1.10	0.944
NILU	KMT	PM <sub>2.5</sub>	10	-9.13 ~ -1.92	1.15 ~ 1.52	0.986

これらのことからLTA サンプラーによるPM<sub>10</sub>の測定が正確に行われていることが示唆された。

### 3.6 秤量誤差の影響

フィルター法による質量濃度測定では、フィルターの秤量誤差が測定精度に大きく影響する。石英フィルターの秤量はFRMで規定されたテフロンフィルターの秤量に比べ、相対湿度の影響を受けて秤量誤差を生じやすく、当センターの測定環境下では110mmの石英フィルターに捕集した粒子の秤量精度は平均で36 µg/filterであった<sup>11)</sup>。この値を用いてLTA サンプラーによるPM<sub>2.5</sub>濃度の誤差を見積ると、フィルターに捕集した粒子重量の95%信頼区間の幅は90 µgとなる。LTA サンプラーによる2週間サンプリングでは336m<sup>3</sup>の大気をサンプリングするため、流量測定の誤差を無視すれば粒子濃度の95%信頼区間の幅は0.27 µg/m<sup>3</sup>となる。このようにLTA サンプラーを用いたPM<sub>2.5</sub>濃度の測定において、フィルターの秤量誤差に起因する粒子濃度の誤差は、大気中の粒子濃度に比べて十分小さいと考えられる。

## まとめ

PM<sub>2.5</sub>による大気汚染の実態を長期間の平均濃度測定によって把握することを目的として、新たにPM<sub>2.5</sub>用サンプラーを試作し、測定精度について調べた。このサンプラーは質量濃度測定の基本であるフィルター法を用いており、PM<sub>2.5</sub>の2週間程度の平均濃度を測定することを目的として製作した。2台のLTA サンプラーでPM<sub>2.5</sub>とPM<sub>(10-2.5)</sub>濃度を2重測定した結果、両者の測定値に有意な差は認められずLTA サンプラーによる測定の再現性は良好であった。LTA サンプラーと市販のNILU サンプラーでPM<sub>2.5</sub>とPM<sub>(10-2.5)</sub>濃度を並行測定した結果についても両者の測定値に有意な差は認められなかった。フィルターの秤量誤差に起因する粒子濃度の誤差も、大気中

の粒子濃度に比べて十分小さいと考えられた。この結果、LTA サンプラーは2週間平均のPM<sub>2.5</sub>濃度をモニタリングするためのサンプラーとして十分利用できることが確認された。

LTA サンプラーを用いた2週間連続サンプリングについては、1)質量濃度測定の基本法であるフィルター法であること、2)PM<sub>2.5</sub>とPM<sub>10</sub>の濃度を同時に測定できること、3)フィルター交換のための経費や労力の負担を軽減できること、4)サンプラーが安価であること、5)フィルターを化学分析に利用できるなどの利点がある。今後はLTA サンプラーを用いたPM<sub>2.5</sub>の長期平均濃度のモニタリングを県下で実施していく予定である。

## 文 献

- 1) 環境庁大気保全局企画課：大気中微小粒子状物質(PM<sub>2.5</sub>)質量濃度測定方法暫定マニュアル(2000)
- 2) USEPA: National Ambient Air Quality Standards for Particulate Matter; Final Rule, Federal Register, Vol.62, No.138 (1997)
- 3) Allen, G., Sioutas, C., Koutrakis, P., Reiss, R., Lurmann, W.F., and Roberts, T.P.: Evaluation of the TEOM Method for Measurement of Ambient Particulate Mass in Urban Areas, *J. Air & Waste Manage. Assoc.* **47**, 682-689 (1997)
- 4) Ayers, G.P., Keywood, M.D., and Gras, J.L.: TEOM vs. manual gravimetric methods for determination of PM<sub>2.5</sub> aerosol mass concentrations, *Atmos. Environ.*, **33**, 3717-3721 (1999)
- 5) 環境庁大気保全局大気規制課：平成8年度一般環境大気測定局測定結果報告(1997)
- 6) de la Mora, F., Hering, S.U., Rao, N., and McMurry, P.H.: Hypersonic Impaction of Ultrafine Particles, *J. Aerosol Sci.* **21**, 169-187 (1990)

- 7) Marple, V.A., Rubow, K.L., Turner, W., and Spengler, J.D.: A Microorifice Uniform Deposit Impactor (MOUDI): Description, Calibration and Use, *Aerosol Sci. Technol.* **14**, 434-446 (1991)
- 8) California Environmental Protection Agency, Air Resources Board Research Division: Further Evaluation of a Two-Week Sampler for Acidic Gases and Fine Particles, Final Report (1996)
- 9) Philip Demokritou, Seung Joo Lee, and Petros Koutrakis: Development and Evaluation of a High Loading PM<sub>2.5</sub> Speciation Sampler, *Aerosol Sci. Technol.* **38**, 111-119 (2004)
- 10) Sheldon K. Friedlander: Smoke, Dust, and Haze, 2nd Edition, p.171-174, Oxford University Press, New York (2000)
- 11) 吉村陽, 小坂浩, 小山太八郎, 玉置元則: 浮遊粒子状物質測定用フィルター秤量時の相対湿度変化が精度に及ぼす影響, *環境技術*, **32**, 811-817 (2003)
- 12) ACGIH: Air Sampling Instruments for evaluation of atmospheric contaminants, 9th Edition, p.318-328 (2001)
- 13) Kenny, L.C., Gussman, R., Meyer, M., Development of a Sharp-Cut Cyclone for Ambient Aerosol Monitoring Applications, **32**, 338-358, (2000)

## 兵庫県内における感染症地域別流行ランク基準値の設定

山本昭夫\* 大 嶋 香保理

Calculation on a regional basis for the epidemic rank criteria of  
infectious diseases in Hyogo

Akio YAMAMOTO\* and Kahori OHSHIMA

*Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health  
and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

### I はじめに

現行の感染症法では感染症を感染力や罹患した場合の重篤性等から 1~5 類感染症に類型分けしている。そのうち 5 類感染症は、厚生労働省<sup>1)</sup>によると「感染症発生動向調査を行い、その結果等に基づいて必要な情報を国民一般や医療関係者に提供・公開していくことによって、発生・まん延を防止すべき感染症」とされており、中でも定点把握の対象となる感染症は感染症発生動向調査の中心的疾病となっている。結果の提供・公開の方法としては、厚生労働省が開発した感染症警報システム<sup>2,3)</sup>が最も端的なものといえようが、既に報告したように保健所（健康福祉事務所）単位の運用には、保健所管内の定点数の少なさを、全国一律の基準の適用など問題がある<sup>4,5)</sup>。このため、インフルエンザについてのみ全国的に利用されているのが現状となっている。

著者らは地域での流行状況を表現する方法として、国の感染症警報システムとは別に「流行ランク」のシステムを考案した。手法的には警報システムと同様であるが、地域別の基準値を採用すること、保健所管内より広い地域を評価対象とすること、5段階の流行状況として表現する方法とした。本資料ではランク分けの基準値設定を中心に報告する。

### 方 法

#### 1. 対象疾病及び期間

兵庫県内における 1999 年第 14 週から 2003 年第 13 週までの 4 年間の感染症発生動向調査の患者データを用いた。対象とした疾病は、5 類感染症の定点把握感染症のうちインフルエンザ及び小児科疾病の咽頭結膜熱、A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎、感染性胃腸炎、水痘、手足口病、伝染性紅斑、突発性発しん、百日咳、風しん、ヘルパンギーナ、麻しん、流行性耳下腺炎の計 13 疾病である。

#### 2. 評価単位としての地域区分

流行ランクについては、これまでの研究<sup>4,5)</sup>により安定した評価が可能な定点数である 6 定点が可能な限り地域内に含まれることを基準に、二次医療圏域を基本として、政令都市は独立した地域に（神戸市、姫路市、尼崎市、西宮市）、阪神南と阪神北は一つの地域に（阪神地域）、中播磨と西播磨も一つの地域に（中西播磨地域）、残りは二次医療圏域をそのまま用いた（東播磨地域、北播磨地域、但馬地域、丹波地域、淡路地域）<sup>5)</sup>。インフルエンザについては全ての地域で 6 定点以上を確保できたが、小児科疾病においては丹波地域（4 定点）、淡路地域（5 定点）が 6 定点を満たすことが出来なかった。

#### 3. 流行ランクとその基準値

流行ランクは、評価単位の地域区分ごとに上述した 4 年間の疾病ごと週ごとの定点あたり患者数からパーセンタイルを算出し、定点あたり患者数の実数 0 から 50 パーセンタイ

感染症部

\* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29  
兵庫県立健康環境科学研究センター  
感染症部 山本昭夫

ル未満をランク0, 50パーセンタイル以上80パーセンタイル未満をランク1, 80パーセンタイル以上90パーセンタイル未満をランク2, 90パーセンタイル以上98パーセンタイル未満をランク3, 98パーセンタイル以上をランク4とした。ランク4は国の警報開始基準値が95~99パーセンタイルの間で切りの良い数値としていることに、ランク3は国の警報継続基準値が90パーセンタイル前後の数値としていることに準拠した。ランク1及び2の基準については特に根拠はないが、以前に沖ら<sup>6)</sup>がそれらのパーセンタイルでランク分けしていることを参考にした。

なお、パーセンタイル値の算出には SPSS ver.11.0J for Windows を用いた。

## 結 果

兵庫県全県と地域別に算出したインフルエンザの流行ランク基準値は表1に、同じく小児科対象疾病の流行ランク基準値は表2に示したとおりである。地域別流行ランク基準値についてながめてみると、ランク4基準値では神戸市が最低となっている疾病が多く、表3に示したように、対象となっ

表1 インフルエンザの流行ランク基準値 (定点あたり患者数)

地域	定点数	インフルエンザ ランク			
		1	2	3	4
全県	198	0.05	3.32	11.78	30.79
神戸市	48	0.02	2.47	9.14	21.10
尼崎市	15	0.00	3.67	12.68	23.81
姫路市	17	0.00	5.71	17.05	44.54
西宮市	14	0.00	1.71	9.60	22.87
阪神	24	0.13	2.89	7.82	22.56
東播磨	25	0.00	2.36	10.93	33.17
北播磨	13	0.00	4.20	12.51	38.16
中西播磨	17	0.06	2.96	10.67	34.50
但馬	11	0.00	3.95	12.85	48.67
丹波	6	0.00	1.43	7.00	30.94
淡路	8	0.00	1.83	12.14	48.96

表3 地域別基準値の最高/最低比

	ランク4基準値			ランク3基準値		
	最高/ 最低比	最高	最低	最高/ 最低比	最高	最低
インフルエンザ	2.32	淡路	神戸市	2.44	姫路市	丹波
咽頭結膜熱	21.82	淡路	東播磨	10.00	丹波	東播磨
A群溶血性レンサ球菌咽頭炎	5.81	淡路	神戸市	5.47	淡路	神戸市
感染性胃腸炎	1.69	淡路	神戸市	1.59	姫路市	丹波
水痘	2.93	淡路	神戸市	2.50	姫路市	神戸市
手足口病	6.26	淡路	神戸市	2.14	姫路市	神戸市
伝染性紅斑	4.56	北播磨	中西播磨	5.50	北播磨	中西播磨
突発性発しん	3.30	姫路市	中西播磨	3.64	姫路市	淡路
百日咳	10.93	丹波	神戸市	注1)	尼崎市	注2)
風しん	4.43	但馬	神戸市	注1)	西宮市	注2)
ヘルパンギーナ	3.01	姫路市	但馬	4.29	姫路市	但馬
麻しん	9.60	尼崎市	丹波	注1)	尼崎市	丹波
流行性耳下腺炎	7.02	丹波	神戸市	3.67	丹波	神戸市

注1) 最低値が0

注2) 但馬、丹波、淡路の3地域が該当

た13疾病のうち8疾病において神戸市が最低値であった。また、淡路地域では基準値の高い疾病が多く、6疾病において最高値を示した。地域差の比較的小さい疾病はインフルエンザ、感染性胃腸炎、水痘、突発性発しん、ヘルパンギーナで、比較的大きい疾病は咽頭結膜熱、百日咳、麻しんであった。特に咽頭結膜熱での差が著しかった。

ランク3基準値についても神戸市が低い疾病が多い傾向が認められたが、基準値の高い地域は神戸市以外の政令市(姫路市、尼崎市、西宮市)が多い傾向がみられた。

## 考 察

今回の検討は、対象となる感染症の流行の程度を、当該地域での過去の定点当り患者数の分布から基準値を設定し、5段階にランク分けしようとするものであった。流行という概念についてはLastの「疫学辞典」<sup>7)</sup>に記載されている定義を基礎とした。これは国の警報・注意報システムの根拠となった論文の考察において一般的な流行の定義として紹介されているものである。その定義は「地域社会やある地域において、ある疾病、健康に関係した特殊な行動、あるいはその他健康に関係した出来事が、正常な期待値をはっきりと超過して発生すること。」と記載されている。また、「流行性は、同一地域での、特定集団中の、同一季節におけるその疾病の通常の頻度との関係によるといえる。」ランク4基準値である98パーセンタイル以上を「正常な期待値をはっきりと超過して」いる状態と考えた。問題点は、後にも述べるが、百日咳や風しんのように基準値算出の基礎とした期間中に一般的な意味での流行といえるほどの患者発生がみられなかった場合、基準値が非常に低い値となり、用いる人に違和感を与える可能性があることである。しかし、このシステムの目的は、地域における疾病の異常な発生につながる可能性のある事象を出来るだけ早期に見出し、関係機関に注意を喚起することにあるので、その意味では有用ではないかと考えている。実用化に当たっては試験的運用を行い、その中で注意深

表4 国の警報・注意報基準値(定点あたり患者数)

	警報開始基準値	警報継続基準値	注意報基準値
インフルエンザ	30	10	10
咽頭結膜熱	1.0	0.1	-
A群溶血性レンサ球菌咽頭炎	4	2	-
感染性胃腸炎	20	12	-
水痘	7	4	4
手足口病	5	2	-
伝染性紅斑	2	1	-
突発性発しん	4	2	-
百日咳	1.0	0.1	-
風しん	3	1	1
ヘルパンギーナ	6	2	-
麻しん	1.5	0.5	0.5
流行性耳下腺炎	5	2	3

表2 小児科疾患の流行ランク基準値(定点あたり患者数)

地域	定点数	咽頭結膜熱				A群溶血性				感染性胃腸炎			
		ランク				ランク				ランク			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
全県	128	0.09	0.20	0.32	0.54	0.69	0.98	1.16	1.50	6.26	10.08	12.49	17.96
神戸市	31	0.03	0.10	0.16	0.26	0.26	0.48	0.55	0.85	6.19	9.68	11.29	16.65
尼崎市	10	0.10	0.30	0.51	1.45	1.20	1.90	2.50	3.53	5.50	9.40	13.11	19.95
姫路市	11	0.18	0.45	0.82	1.95	0.91	1.47	1.92	2.53	5.55	12.51	17.18	24.86
西宮市	9	0.00	0.22	0.44	0.78	0.39	1.00	1.56	2.42	6.00	11.93	15.68	24.88
阪神	16	0.06	0.19	0.25	0.60	0.50	0.95	1.31	1.73	6.28	10.01	13.07	18.46
東播磨	16	0.00	0.06	0.13	0.25	0.75	1.31	1.69	2.05	5.38	9.00	12.24	22.69
北播磨	8	0.00	0.38	0.75	1.71	0.63	1.13	1.50	2.85	6.94	11.13	12.88	18.83
中西播磨	11	0.09	0.27	0.45	0.98	0.55	1.36	1.82	3.65	6.45	11.18	13.37	17.99
但馬	7	0.00	0.00	0.14	0.43	0.29	0.71	1.01	1.86	5.86	10.46	12.31	17.14
丹波	4	0.00	0.75	1.25	3.21	0.25	0.75	1.25	4.16	4.38	8.50	10.78	19.57
淡路	5	0.00	0.20	0.40	5.46	1.40	2.40	3.00	4.93	3.80	10.08	14.84	28.13

地域	定点数	水痘				手足口病				伝染性紅斑			
		ランク				ランク				ランク			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
全県	128	2.03	2.54	2.98	3.68	0.26	0.88	2.13	8.77	0.17	0.38	0.52	0.81
神戸市	31	1.31	1.94	2.26	2.82	0.10	0.71	1.32	4.08	0.13	0.30	0.49	0.78
尼崎市	10	1.80	2.70	3.20	3.98	0.30	0.90	1.50	8.40	0.20	0.50	0.80	1.38
姫路市	11	2.95	4.73	5.65	8.00	0.45	1.82	2.84	11.72	0.18	0.36	0.64	1.00
西宮市	9	1.39	2.36	3.12	4.78	0.11	0.78	1.89	10.07	0.22	0.56	0.78	1.40
阪神	16	1.63	2.38	2.81	3.44	0.19	0.69	1.78	6.82	0.19	0.44	0.63	0.99
東播磨	16	2.19	3.69	4.13	5.34	0.25	1.03	2.26	15.68	0.06	0.31	0.51	0.90
北播磨	8	1.81	3.00	3.89	6.98	0.25	1.13	2.14	5.68	0.13	0.63	1.50	2.83
中西播磨	11	1.55	2.45	3.00	4.30	0.18	1.00	2.09	6.35	0.09	0.18	0.27	0.62
但馬	7	1.71	3.14	4.29	6.81	0.29	1.29	2.57	9.87	0.14	0.43	0.86	1.55
丹波	4	1.75	3.25	4.53	7.00	0.13	1.00	2.25	6.46	0.00	0.25	0.75	2.41
淡路	5	1.60	3.60	5.22	8.26	0.00	0.64	2.00	25.56	0.00	0.20	0.60	1.56

地域	定点数	突発性発しん				百日咳				風しん			
		ランク				ランク				ランク			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
全県	128	0.91	1.11	1.17	1.24	0.02	0.03	0.05	0.08	0.01	0.02	0.04	0.06
神戸市	31	0.74	0.94	1.06	1.26	0.00	0.03	0.03	0.06	0.00	0.03	0.03	0.06
尼崎市	10	0.80	1.00	1.20	1.68	0.00	0.10	0.20	0.38	0.00	0.10	0.10	0.28
姫路市	11	2.00	2.55	2.91	3.60	0.00	0.09	0.18	0.27	0.00	0.00	0.09	0.26
西宮市	9	0.78	1.13	1.44	1.67	0.00	0.00	0.11	0.20	0.00	0.00	0.11	0.11
阪神	16	0.88	1.13	1.25	1.49	0.00	0.00	0.06	0.13	0.00	0.06	0.06	0.25
東播磨	16	1.19	1.56	1.81	2.19	0.00	0.06	0.06	0.18	0.00	0.00	0.06	0.13
北播磨	8	0.88	1.25	1.50	2.23	0.00	0.13	0.13	0.25	0.00	0.00	0.01	0.13
中西播磨	11	0.55	0.73	0.91	1.09	0.00	0.00	0.09	0.26	0.00	0.00	0.09	0.18
但馬	7	0.57	0.86	1.14	1.52	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.29
丹波	4	0.75	1.00	1.28	1.75	0.00	0.00	0.00	0.71	0.00	0.00	0.00	0.25
淡路	5	0.40	0.60	0.80	1.20	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.10

地域	定点数	ヘルパンギーナ				麻しん				流行性耳下腺炎			
		ランク				ランク				ランク			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
全県	128	0.10	1.62	3.74	7.34	0.04	0.11	0.20	0.44	1.07	1.33	1.58	2.48
神戸市	31	0.06	0.90	2.91	6.16	0.00	0.13	0.19	0.29	0.74	0.97	1.16	1.51
尼崎市	10	0.10	1.30	3.41	9.99	0.00	0.30	1.00	2.40	1.05	1.80	2.41	3.90
姫路市	11	0.27	4.20	8.58	18.08	0.00	0.18	0.27	0.62	1.27	2.64	3.36	5.07
西宮市	9	0.11	0.78	3.01	7.65	0.00	0.11	0.22	0.87	0.67	1.24	1.67	2.83
阪神	16	0.06	1.13	2.20	6.54	0.06	0.19	0.31	1.44	0.94	1.50	1.88	3.05
東播磨	16	0.13	1.65	4.14	8.10	0.00	0.06	0.13	0.43	0.88	1.56	2.38	4.54
北播磨	8	0.00	1.28	3.29	6.23	0.00	0.00	0.13	0.38	1.06	2.38	3.75	6.91
中西播磨	11	0.00	1.65	3.37	8.94	0.00	0.09	0.09	0.42	0.55	2.20	2.91	4.48
但馬	7	0.00	0.86	2.00	6.00	0.00	0.00	0.14	0.29	1.00	2.43	3.30	6.38
丹波	4	0.00	2.25	5.25	9.71	0.00	0.00	0.00	0.25	0.75	2.25	4.28	10.60
淡路	5	0.00	1.00	2.62	8.46	0.00	0.00	0.20	0.40	0.70	2.20	3.20	5.60



く検証を行う必要があると考える。

「疫学辞典」中の「同一季節における」という規定については今回の検討から除外している。ヘルパンギーナのように毎年ほとんど決まった時期に同程度の患者発生が見られる疾病では、この規定を採用すると、多くの患者が発生しているのに流行とはみなされなくなる不都合がある。しかし、一方でこの規定を除外すると季節外れの患者相対的多発という異常があっても流行とはみなされない事態が生ずる。これらの点についても今後の検討課題である。

比較のために表 4 に国の警報・注意報基準値を示した。方法に述べたように、ランク 4 の基準値は国の警報開始基準値に、ランク 3 の基準値は警報継続基準値に方法論的にはほぼ相当すると考えられる。しかし、算出される基準値は当然のことながら算出の基礎となった期間中の当該地域における発生患者数によって変わってくる。すなわち、期間中に大きな流行のあった場合は基準値も高くなり、一般的な意味での流行が見られなかった場合は基準値も低くなる。この観点を踏まえながら国の警報基準値と比較を行った。なお、国の警報システムでは表 4 にみられるように注意報基準値も定められていて、ほぼ警報継続基準値と同じ値であるが、設定されている疾病が限られていることから、今回の比較検討からは除外した。

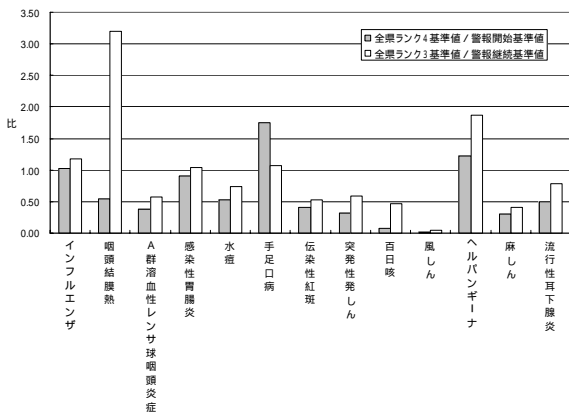


図 1 兵庫県全県流行ランク基準値と国の警報基準値の比較

図 1 に兵庫県全県のランク 3, 4 の基準値と国の警報基準値の比較を示した。兵庫県全県のランク 4 基準値についてみると、インフルエンザ、感染性胃腸炎及びヘルパンギーナは国の警報開始基準値と大差なかったが、手足口病は高く、それら以外の多くの疾病では国の警報開始基準値より低値を示した。特に百日咳と風しんの兵庫県全県のランク 4 基準値は全国の警報開始基準値より大幅な低値を示した。ランク 3 基準値についてもランク 4 とほぼ同様で、全県の基準値は国の警報継続基準値と比較して、インフルエンザ、感染性胃腸炎、手足口病では大差なく、咽頭結膜熱、ヘルパンギーナで

は高値を示し、それらを除く 8 疾病において低値を示した。

表 5 に 1993～1997 年と 2000～2003 年における全国と兵庫県の平均年間定点あたり患者数を示した。平均年間定点あたり患者数の全国と兵庫県の比は、1993～1997 年及び 2000～2003 年のいずれにおいても 0.5～1.3 の間に位置し、大きな違いは見られなかった。平均年間定点あたり患者数の 1993～1997 年と 2000～2003 年の比は、風しんにおいては全国も兵庫県もそれぞれ 0.04 と 0.02 で、患者数の激減がみられたほか、百日咳と麻疹で全国も兵庫県もほぼ半減していた。全国の警報開始基準値は 1993～1997 年の患者数から算出しているのに対して、今回の兵庫県の流行ランク基準値は 2000～2003 年に近い 1999 年第 14 週から 2003 年第 13 週の患者数を用いているので、全国的な患者数の減少は基準値の低下の方向に作用する。風しんの基準値が大幅に低下したのは全国的な患者数の激減で説明が可能であるが、百日咳の基準値低下はそれだけでは説明がつかない。近年の兵庫県内での百日咳患者報告状況を見ると、年間を通じて散発的に患者報告はあるものの複数の保健所で同時に患者発生することが少なく、県全体での定点あたり患者数は極めて低い状況にあることが基準値の大幅低下に関係していると考えられる。

兵庫県内における基準値の地域差について述べると、著者らが行った近畿圏における検討<sup>4)</sup>では、一般に管内の定点数と定点あたり患者数は反比例する傾向にあったことから、ランク 4 基準値において神戸市(インフルエンザ定点 48 カ所、小児科定点 31 カ所)の基準値が低く、淡路地域(インフルエンザ定点 8 カ所、小児科定点 5 カ所)の基準値が高かったことは、その理由については明らかではないものの、一般的傾向として理解が可能である。しかし、ランク 3 基準値においては、神戸市を除く政令市に基準値の高い疾病が多かったことは、例えば人口密集地の方が流行しやすいなど、別の要因も関与している可能性が考えられる。

## まとめ

- 1) 感染症に関する国の警報システムとは別に地域での流行状況を表現する方法として「流行ランク」のシステムを考案した。
- 2) 手法的には警報システムと同様であるが、地域別の基準値を採用すること、保健所管内より広い地域を評価対象とすること、警報・注意報という表現を用いず、5 段階の流行状況として表現することとして基準値を算出した。
- 3) 算出に用いた患者数データの地域的、時期的相違により、その間の流行の有無、大小から、国の警報基準値から予想される数値より大きな隔たりのある流行ランク基準値となった疾病が一部にみられた。
- 4) 同様に兵庫県内の地域による差も認められた。

表5 1993-1997年と2000-2003年の平均年間定点あたり患者数の比較

	平均年間定点あたり患者数				兵庫県と全国の比		2000-2003年と	
	1993-1997年		2000-2003年		1993-1997年	2000-2003年	1993-1997年の比	
	全国	兵庫県	全国	兵庫県			全国	兵庫県
	A	B	C	D	B/A	D/C	C/A	D/B
インフルエンザ	185.85	156.66	159.94	152.10	0.84	0.95	0.86	0.97
咽頭結膜熱	2.86	2.86	8.45	10.27	1.00	1.21	2.96	3.59
A群溶血性連鎖球菌咽頭炎	30.49	17.54	52.64	37.46	0.58	0.71	1.73	2.14
感染性胃腸炎	173.64	178.00	294.62	354.80	1.03	1.20	1.70	1.99
水痘	76.52	60.41	87.84	99.72	0.79	1.14	1.15	1.65
手足口病	33.49	24.35	49.51	49.63	0.73	1.00	1.48	2.04
伝染性紅斑	11.29	7.14	16.18	13.20	0.63	0.82	1.43	1.85
突発性発しん	35.61	31.71	40.22	45.83	0.89	1.14	1.13	1.45
百日咳	1.83	1.55	0.71	0.89	0.85	1.25	0.39	0.57
風しん	22.68	29.02	0.95	0.65	1.28	0.69	0.04	0.02
ヘルパンギーナ	35.14	35.03	45.37	50.35	1.00	1.11	1.29	1.44
麻しん	9.32	7.85	6.40	3.81	0.84	0.59	0.69	0.48
流行性耳下腺炎	45.75	31.75	54.10	55.85	0.69	1.03	1.18	1.76

5) 流行ランクにおける「流行」の概念はLastの「疫学辞典」にある「正常な期待値をはっきりと超過して発生すること」に基礎を置き、異常な発生を早期に発見することを第一義としているが、保健・医療現場、あるいは一般の住民の「流行」の概念と大きくかけ離れてはならず、実施に当たっては注意深い検証が必要である。

## 文 献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課：感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律概要．日本医師会編，感染症の診断・治療ガイドライン2004，p.20-24，医学書院，東京（2005）
- 2) 村上義孝，橋本修二，谷口清州，淵上博司，永井正規：感染症発生動向調査に基づく感染症流行の特徴の評価．日本公衛誌，47，925-935（2000）
- 3) 永井正規，橋本修二，村上義孝，小坂 健，進藤奈邦子，淵上博司：感染症発生動向調査に基づく流行の警報・注意報および全国年間罹患数の推計 - その2 - .平成13年度厚生科学研究「定点サーベイランスの評価に関するグループ」研究

報告書，pp171-174(2002)

- 4) 川村 隆，山本昭夫，沖 典男，田中英樹，細川裕平，稲松登：保健所行政への科学的支援システム構築による地方衛生研究所の機能強化 - 感染症対策の情報面における地研の科学的支援 - .平成12年度厚生科学研究事業分担研究報告書「地方衛生研究所の地域保健行政への科学的支援システムの構築に関する研究」，p.54-63(2001)
- 5) 山本昭夫，松村益代，沖 典男，田中英樹：厚生労働省感染症警報発生システムの県内における活用に関する研究．兵庫衛研報，36，133-138(2001)
- 6) 沖 典男，鳥橋義和，川村 隆，中川直子，平山博史，峯川好一，内原弘恵，得津勝治，城戸 亮：患者情報を用いた感染症流行マップ情報．平成9年度厚生科学研究報告書「地方衛生研究所における感染症サーベイランス情報の解析に関する研究」，p.188-192(1998)
- 7) 重松逸造，春日 斉，柳川 洋監訳：疫学辞典，第1版，p.146，日本公衆衛生協会，東京（1987）  
Last M.J.(ed.): A Dictionary of Epidemiology, First edition(1983)





## [ 資 料 ]

インターネット販売の強壯用健康食品における  
医薬品成分の調査結果

三橋隆夫\* 祭原ゆかり 秋山由美 市橋啓子

Analytical Results of Medicinal Substances in Tonic Health Foods Purchased by  
Internet

Takao MITSUHASHI\*, Yukari SAIHARA, Yumi AKIYAMA and Keiko ICHIHASHI

Health Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental  
Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

## はじめに

近年の健康ブームにより、いわゆる健康食品の需要が急増している。これらの製品は瘦身、老化防止、強壯効果などを目的として販売されているが、効果を高めるために医薬品成分を不法に添加している事例が多数報告されている<sup>1-3)</sup>。我が国では、医薬品成分は薬事法により使用や販売が厳しく制限されている。そのため、本質的には食品である健康食品に、医薬品成分が添加された場合は無承認無許可医薬品に該当し、その製造や販売は禁止される。医薬品成分が不法添加された健康食品が原因の健康被害が頻発していることから、厚生労働省はその対応要領<sup>4)</sup>を策定し、監視を強化している。兵庫県においても2001年から健康食品の試験検査を実施しており、これまでに多数の違反品を発見してきた<sup>5)</sup>。

インターネットを通じて多種多様の健康食品を個人が容易に入手できるようになっているが、その安全性は不透明であり、健康被害発生のおそれがあるのが現状である。今回はインターネットで流通している健康食品のうち、強壯や男性機能亢進効果を標ぼうした製

品に着目し、医薬品成分の調査を実施したので結果を報告する。

## 方 法

## 1. 試料

2004年9月にインターネットを通じて強壯や男性機能亢進効果を標ぼうしている9品目の健康食品を購入し、試料とした(表1)。なお、これらの健康食品には、具体的な効能などは表示されておらず、医薬品成分は含有していないことになっていた。

## 2. 調査対象の医薬品成分

男性機能亢進効果を有する医薬品成分は現在3種化合物が開発されており、シルデナフィル(商品名パイアグラ、国内承認済み)、バルデナフィル(商品名レ

表1 調査した試料(健康食品)

No	製品名	剤型及び内容量	購入価格(円)
1	MORE(モア)	カプセル, 0.40g×2個	6,000
2	プライドNo.1	カプセル, 0.25g×2個	2,800
3	クコ ラブオー	錠剤, 0.80g×6個	8,300
4	EE(イーイー)	カプセル, 0.40g×4個	8,500
5	ジンジンスーパー	カプセル, 0.48g×6個	6,160
6	シャングリラ	カプセル, 0.30g×6個	6,000
7	VIGEL FOR MEN	カプセル, 0.55g×8個	6,160
8	Vantassio(ベンタジオ)	カプセル, 0.55g×4個	4,760
9	ラ***ン	カプセル, 0.35g×20個	5,000

健康科学部

\* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所センター

健康科学部 三橋隆夫

ピトラ、国内承認済み）及びタダラフィル（国内未承認）がある。健康食品には、これらの医薬品成分以外に、その構造の一部を変えた類似体を添加した事例も認められる<sup>6),7)</sup>。本調査では上記3成分の他に、標準品が入手できたシルденаフィル類似体のホンデナフィルを加えて計4成分を対象成分とした（図1）。

### 3. 試薬

- 1) 標準品：シルденаフィル、バルデナフィル、タダラフィル及びホンデナフィルは標準品が市販されていないため、国立医薬品食品衛生研究所から分与されたものを用いた。各成分5mgをメタノールに溶かし全量10mLとしたものを各標準原液とした（500µg/mL）。これを適宜メタノールで希釈して標準溶液を調製した。
- 2) 試薬及び試液：メタノール及びアセトニトリルはHPLC用、その他の試薬は市販の特級品を用いた。

### 4. 装置及び測定条件

- 1) 高速液体クロマトグラフ（HPLC）  
島津製作所製 LC-10A シリーズ（SPD-M10A 型 フォトダイオードアレイ検出器付）  
LC 条件：カラム；XTerra Phenyl（Waters 社製、4.6mm i.d. × 150mm, 3.5µm）、移動相；10mM ギ酸アンモニウム溶液/アセトニトリル（11:9）、カラム温度；40℃、流速；0.8mL/min、検出波長；280nm（定量）、200~370nm（定性）、注入量；10µL。
- 2) 高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS）  
Agilent 社製 1100 シリーズ LC/MS システム  
LC 条件：上記 HPLC と同様（但し注入量は1µL）  
MS 条件：イオン化法；ESI ポジティブ、キャピ

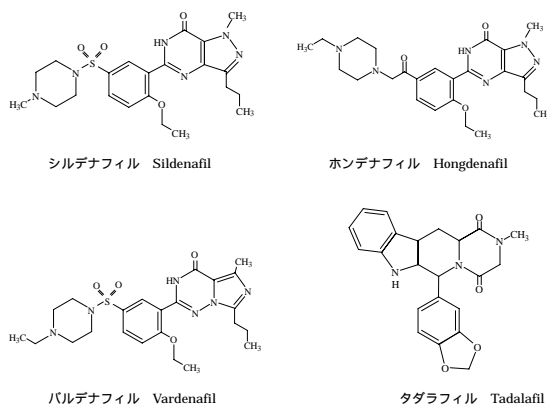


図1 調査対象の医薬品成分の化学構造

ラー電圧；4,000V、コーン電圧；100V及び350V、脱溶媒温度；350

### 5. 試料溶液の調製

厚生労働省から通知された方法<sup>8),9)</sup>に準じた。錠剤は粉碎したもの、カプセルは内容物の約0.20gを正確に共栓付き試験管に量りとり、28%アンモニア水0.5mLを加え混和した後、酢酸エチル3mLを加え10分間振とう抽出した。次いで3,500rpmで10分間遠心分離後、酢酸エチル相を分取し、残留物にさらに酢酸エチル3mLを加えて同様に操作した。酢酸エチル相を合わせて減圧下で溶媒を留去した後、残留物にメタノールを加えて溶かし全量10mLとしたものを試料溶液とした。なお、試料溶液中の医薬品成分の濃度が高いときには、メタノールで希釈した。

### 6. 医薬品成分の定性及び定量

本調査では、医薬品成分の定性試験にはUVスペクトル、HPLC及びLC/MSを用いた。標準溶液と試料溶液について、UVスペクトル、ピークの保持時間及びマススペクトルを比較することにより、含有成分の特定と確認を行った。さらに、含有が確認された成分についてはHPLCを用いて、試料中の含有量を測定した。

## 結果及び考察

### 1. UVスペクトル

4種医薬品成分のUVスペクトルを図2に示した。各

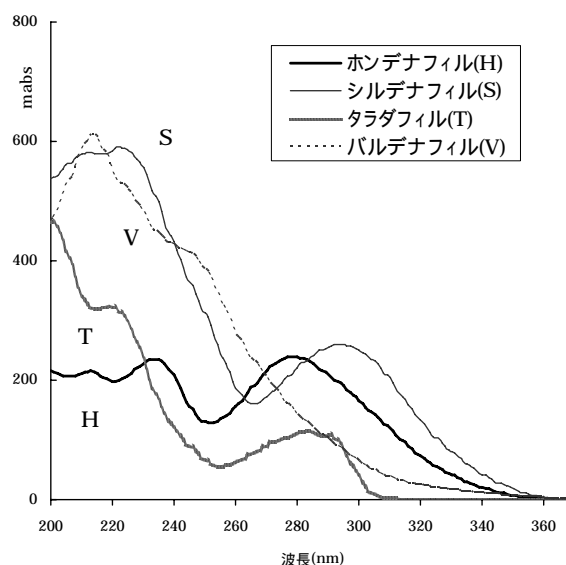


図2 4種医薬品成分のUVスペクトル

混合標準溶液（各250µg/mL）におけるHPLCの各ピークについてUVスペクトルを測定したものの

成分の吸収スペクトルはそれぞれ異なったパターンを示し、シルデナフィルは 225nm 及び 295nm 付近、ホンデナフィルは 235nm 及び 278nm 付近、タダラフィルは 220nm 及び 285nm 付近、またバルデナフィルは 218nm 付近に極大吸収が存在した。

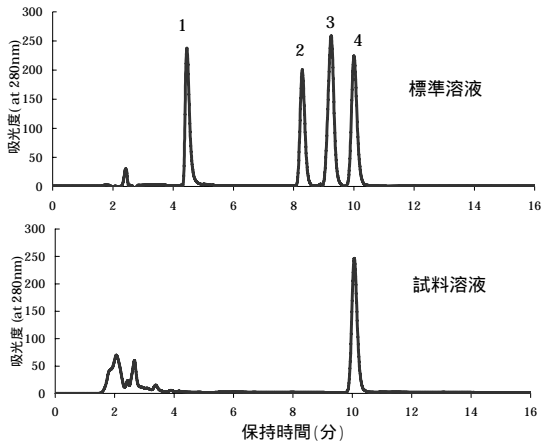


図3 混合標準液及び試料溶液(No.1)のHPLC クロマトグラム  
 1: ホンデナフィル, 2: タダラフィル,  
 3: バルデナフィル, 4: シルデナフィル  
 各成分濃度: 250 µg/mL, 測定波長: 280nm

2. HPLC

4 種成分を混合した標準溶液(各 250 µg/mL)及び試料溶液(No.1)の HPLC クロマトグラム例を図 3 に示した。測定波長は、4 種成分の同時測定が可能な 280nm とした。各成分の保持時間はホンデナフィル約 4.5 分、タダラフィル約 8 分、バルデナフィル約 9 分及びシルデナフィル約 10 分であった。試料溶液を測定した結果、No.9 を除いた 8 試料でいずれかの成分の存在が疑われた。試料 No.1,2 ではシルデナフィル, No.3,4 ではホンデナフィル, No.5,6,7,8 ではタダラフィルと、標準溶液の保持時間に一致するピークが認められ、各成分を含有することが推定された。なお、バルデナフィルと一致するピークは全ての試料溶液で認められなかった。さらに各成分と推定される試料溶液のピークについて、UV スペクトルを測定し標準品のものと比較した結果、それぞれ推定された成分のスペクトルとほぼ一致した。

3. LC/MS

HPLC での測定結果を確認するために、LC/MS による質量分析を行った。ポジティブモードでマスペクトル

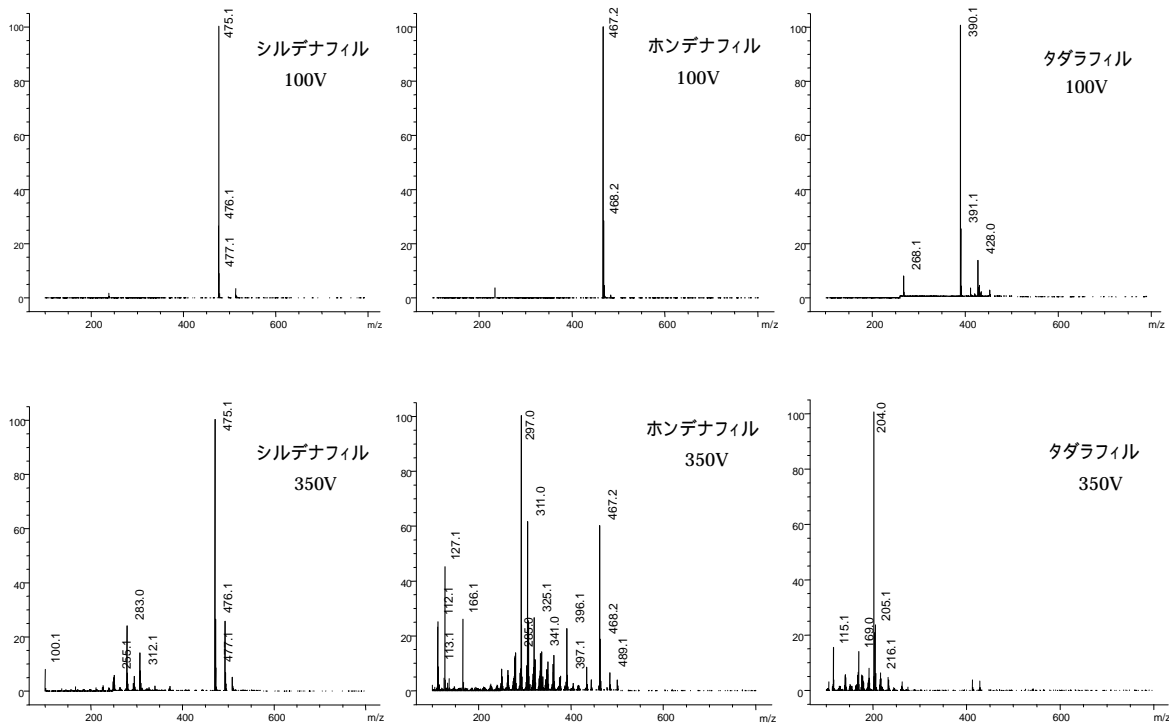


図4 シルデナフィル、ホンデナフィル及びタダラフィルのマスペクトル

標準溶液の各成分濃度: 250 µg/mL

測定条件: カラム XTerra Phenyl (4.6mm i.d. x 150mm, 3.5 µm),

移動相; 10mM ギ酸アンモニウム溶液/アセトニトリル (11:9), 流速; 0.8mL/min

MS 条件: イオン化法; ESI ポジティブ, キャピラリー電圧; 4,000V, コーン電圧; 100V 及び 350V

を測定し、プロトン付加した分子イオンピーク[M+H]<sup>+</sup>及び生成するフラグメントイオンのパターンを用いて物質を同定した。コーン電圧が100Vのときは主に[M+H]<sup>+</sup>イオンが生成し、電圧を350Vに上げると各成分に特徴的なフラグメントイオンが生成した。図4にシルデナフィル、ホンデナフィル、タダラフィルの100Vと350Vでのマススペクトルを示した。それぞれm/z476[M+H]<sup>+</sup>、m/z467[M+H]<sup>+</sup>、m/z390[M+H]<sup>+</sup>の分子イオンピークとフラグメントイオンが認められた。試料溶液をLC/MS分析したところ、No.1,2はシルデナフィル、No.3,4ではホンデナフィル、No.5,6,7,8ではタダラフィルと完全に一致したマススペクトルが得られた。本調査では、UVスペクトル及びマススペクトルで2段階に確認しており、高い信頼性で含有成分を特定することができた。

#### 4. 検量線

シルデナフィル、ホンデナフィル、タダラフィルの各標準溶液を用いて検量線を作成した。ピーク面積から作成した検量線は、5 ~ 500 µg/mLの範囲で良好な直線性を示し、相関係数はそれぞれ r = 0.999, r = 0.998, r = 0.998であった。

#### 5. 試料中の医薬品成分の含有量

医薬品成分の含有が確認された試料(No.1~8)についてHPLCによる定量を行った。各試料に含まれる医薬品成分及び含有量を表2に示した。今回調査した8試料は、シルデナフィル、ホンデナフィル又はタダラフィルのいずれかを含んでいたが、複数成分を含有するものはなかった。なお、シルデナフィルは国内で25mgと50mg錠が承認されており、同レベル又はやや高い含有量であった。タダラフィルは米国では5mg, 10mg及び20mg錠が承認されており、3試料(No.6,7,8)は同レ

ベルであり、No.5は米国20mg錠の2倍以上の含有量であった。

## ま と め

1. インターネットで流通する健康食品のうち、強壮や男性機能亢進を標ぼうした製品を調査したところ、9製品中8製品という高い割合で医薬品成分(シルデナフィル、ホンデナフィル、タダラフィル)が検出された。
2. 健康食品の中には正規の医薬品と同レベルの有効成分を含有するものがあった。これらの製品は医薬品と同等の作用を有すると推定され、安易な摂取は問題があると考えられる。
3. 医薬品成分の類似体の添加例も、この数年増加しており、本調査でもシルデナフィルの類似体であるホンデナフィルが確認された。このような類似体については、効果や副作用などの情報が少ないため、危険性が高い。現在、インターネットを利用し、健康食品を簡単に入手することができる。しかし、安全性に関しては問題が多く、今後も厳しく監視する必要があると考えられる。

## 謝 辞

試料入手や情報収集等に協力して頂いた県庁薬務課の関係者に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) 西岡千鶴, 野崎香織, 山下みよ子, 毛利孝明, 塚本武: 香川県における健康食品中の医薬品成分について。香川県環境保健研究センター所報, 2, 84-93 (2003)
- 2) 最所和宏, 花尻瑠理, 河村麻衣子, 合田幸広: 平成15

表2 健康食品中の医薬品成分の試験結果

No	製品名	医薬品成分	含有量 (1カプセルまたは1錠当り*)
1	MORE(モア)	シルデナフィル	43mg
2	プライド No.1	シルデナフィル	74mg
3	クコ ラブオー	ホンデナフィル	82mg*
4	EE(イーイー)	ホンデナフィル	60mg*
5	ジンジンスーパー	タダラフィル	44mg
6	シャングリラ	タダラフィル	25mg
7	VIGEL FOR MEN	タダラフィル	4.8mg
8	Vantassio(ベンタジオ)	タダラフィル	4.5mg
9	ラ***ン	いずれの成分も検出しない	-



- 年度無承認無許可医薬品の買い上げ調査について - 強壯用健康食品 - .第41回全国衛生化学技術協議会年會要旨集, p.170-171 (2004), 山梨
- 3) 小島 尚, 関田節子: エフェドラアルカロイドを含む個人輸入健康食品の医薬品成分に関する検討. 医薬品研究, **35**, 22-28 (2004)
- 4) 厚生労働省医薬局長通知: 健康食品・無承認無許可医薬品健康被害防止対応要領について. 平成14年10月4日, 医薬発第1004001号
- 5) 吉岡直樹, 市橋啓子, 寺西 清: 甲状腺ホルモン等の医薬品混入の認められた健康食品中のその他の合成化学成分の検索. 兵庫健環研年報, **1**, 124-129 (2002)
- 6) 守安貴子, 重岡捨身, 袁輪佳子, 岸本清子, 安田一郎: 健康食品中に含有されていた新規シルデナフィル類似体について. 東京健安研年報, **55**, 7377 (2004)
- 7) M.-H.Shin, M.-K.Hong, W.-S.Kim, Y.-J.Lee and Y.-C.Jeong: Identification of a new analogue of sildenafil added illegally to a functional food marketed for penile erectile dysfunction. Food Additives and Contaminants, **20**, 793-796(2003)
- 8) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知: ホンデナフィルの分析方法について. 平成16年10月12日, 薬食監麻発第1012006号
- 9) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知: ホモシルデナフィルの分析方法について. 平成15年12月26日, 薬食監麻発第1226003号

## [ 資 料 ]

# 兵庫県における河川底質重金属濃度の長期変動傾向とその評価

駒井幸雄\* 竹田洋子 梅本 諭

Long- term changes and evaluation of heavy metal concentrations in river bottom  
sediments of Hyogo Prefecture

Yukio KOMAI\*, Yoko TAKEDA and Satoshi UMEMOTO

*Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and  
Environmental Sciences, 3-1-27 Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, 654-0037, Japan*

## はじめに

公共用水域の水質については水質汚濁防止法に基づく水質の測定計画によって監視が行われており<sup>1)</sup>このうち、人の健康に関わる環境基準項目(健康項目)にはカドミウム、鉛、ヒ素、水銀など 26 項目(2005 年現在)が含まれている。

一方、底質は水質と密接な関係を有し河川環境の評価において重要な要素であるため、環境基準はないものの水質調査を補完するものとして位置づけられる。兵庫県内全域の河川底質中の重金属(カドミウム、鉛、銅、亜鉛、総水銀、マンガン、クロム、ニッケル、およびヒ素)については、1978 年から 1981 年に行われた全域調査結果(56 河川 215 地点)によって、濃度レベルと分布傾向の特徴が報告<sup>2-4)</sup>されている。その結果、兵庫県の河川底質中重金属濃度の特徴として、(1) 超塩基性岩地域ではニッケルやクロムが、丹波帯ではマンガンがいずれも高濃度であるが、堆積岩においても砂岩が分布する地域ではいずれの重金属も総じて低濃度を示すように地質が大きく影響していること、(2) 過去の非鉄金属鉱山の鉱業活動の影響を受けた地点では鉱床の種類に対応した重金属濃度の違いが見られること、(3) 事業場排水との関係では、阪神間の工業地帯の河川では工場排水に起因して

多くの重金属は高濃度を示し、皮革排水が流入する河川では特異的にクロムが高濃度であること、等が明らかにされた。

これと平行して、1975 年からは環境基準点を中心に、河川では 21 河川 33 地点(2005 年度)、海域では 12 地点(2005 年度)において年 1 回の頻度で重金属等を対象とした底質調査が実施されており<sup>1)</sup>、長期のデータの蓄積がなされている。

そこで、本報では底質環境の変化について検討するために、1978 年～2004 年の 27 年間の兵庫県下の代表的な河川における底質中重金属汚染濃度の長期変動について評価を行ったので報告する。

## 調査方法

### 1. 調査地点

底質調査のモニタリング地点のうち、一級河川である猪名川 - 神崎川(軍行橋、辰巳橋)、加古川(板波橋、相生橋)、揖保川(竜野大橋、王子橋)と、二級河川のうち鉱山廃水や皮革排水の影響を受けた市川(神崎橋、工業用水取水点)、および皮革関連のニカワ排水の影響を受けた夢前川(夢前橋、才崎橋)の 5 河川 10 地点について検討を行った。各調査地点の位置を図 1 に示す。

### 2. 採泥方法

底質調査は、1978 年～2004 年の間の 5 月から 10 月の期間に各地点ごとに原則として同じ月に実施した。調査地点の流水部分の全体から、スコップを用いて数力所で

水質環境部

\* 別刷請求先：〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27  
兵庫県立健康環境科学研究センタ -  
水質環境部 駒井幸雄

採泥し,その場で2mmのフルイでふるって混合し,ビニール袋に入れて持ち帰った。河口近くで水深があり河川に直接入れない地点(辰巳橋,相生橋,工業用水取水点)については,橋上から円筒型採泥器(ドレッジ)を用いて採泥した。なおこれらの地点では原則として左右および中央の3カ所で採泥しているが,中央部は浚渫が行われたり採泥できない場合もあったので右岸地点の結果で代表させることとした。また,工業用水取水点は1997年から右岸側においてスコップで採取した。

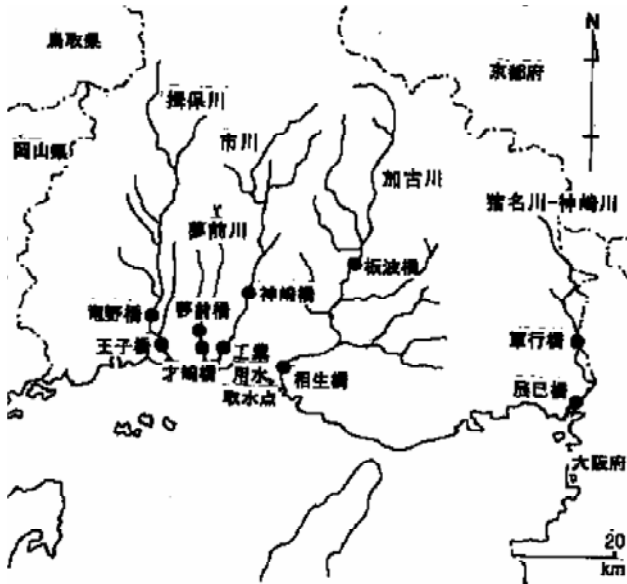


図1 調査地点図

### 3 分析方法

底質の前処理と分析は底質調査方法<sup>5)</sup>に準じて行った。遠沈処理した湿泥について含水率, 強熱減量 (Ignition loss: IL), および総水銀を測定し, その他の重金属項目については, 風乾後に約 100 μm 以下に微粉碎し, 硝酸-塩酸抽出をした。カドミウム, 鉛, 銅, および亜鉛は DDTC-酢酸 n-ブチル抽出を行い, クロム・ニッケル・マンガンは MIBK により除鉄処理後にいずれも原子吸光光度法で測定した。ヒ素については水素化物発生-吸光光度法(1996年度からは原子吸光光度法)で分析した。結果は全て乾泥あたりの濃度で示した。

## 結果と考察

### 1 河川底質の重金属濃度の経年変化

1978年~1982年と2000年~2004年のそれぞれ5年間の平均値と両者の比(1978年~1982年の平均値/2000年~2004年の平均値)と併せて表1に示す。項目によって違いはあるものの大部分の地点の平均値の比は1以下となり, 2000年以降の重金属濃度は1980年前後に比べて減少している。なお, 2000年~2004年の平均値が1978年~1982年の平均値より20%以上高い値を示した地点と項目は, 揖保川王子橋(ヒ素, マンガン), 市川神崎橋(ヒ素), 夢前川夢前橋(ヒ素, マンガン), 夢前川才崎橋(亜鉛)であるが, この原因については不明である。

代表例として重金属のうち鉛, ヒ素, および亜鉛の変

表1 1978年-1982年 および 2000年-2004年における底質中重金属等の平均濃度

		含水率 %	IL %	Pb mg/kg	Cu mg/kg	Cd mg/kg	Zn mg/kg	As mg/kg	Mn mg/kg	Ni mg/kg	Cr mg/kg	Hg mg/kg
猪名川 - 神崎川	1978-1982(A)	21.9	1.4	41.4	61.62	0.44	210	7.26	476	14.3	14.7	0.009
	2000-2004(B)	20.7	1.2	28.7	44.53	0.23	207	7.52	393	11.4	11.9	0.005
	B/A 比	0.9	0.8	0.7	0.7	0.5	1.0	1.0	0.8	0.8	0.8	0.6
加古川	1978-1982(A)	53.9	16.1	197	334	5.20	1850	15.68	330	95.9	260	0.95
	2000-2004(B)	35.2	6.0	99.2	137	1.56	468	9.28	222	31.6	65.6	0.57
	B/A 比	0.7	0.4	0.5	0.4	0.3	0.3	0.6	0.7	0.3	0.3	0.6
加古川	1978-1982(A)	21.0	1.7	21.4	21.3	0.20	91.5	8.16	522	11.6	10.4	0.020
	2000-2004(B)	21.1	1.1	8.83	7.69	0.10	46.5	6.32	396	9.28	6.26	0.010
	B/A 比	1.0	0.6	0.4	0.4	0.5	0.5	0.8	0.8	0.8	0.6	0.5
加古川	1978-1982(A)	59.4	10.9	46.5	53.5	0.75	217	10.24	359	28.9	27.2	0.13
	2000-2004(B)	54.8	9.5	39.7	46.7	0.52	192	9.86	393	23.0	22.9	0.090
	B/A 比	0.9	0.9	0.9	0.9	0.7	0.9	1.0	1.1	0.8	0.8	0.7
揖保川	1978-1982(A)	21.7	1.7	14.42	21.48	0.14	60.2	9.30	408	14.6	21.7	0.010
	2000-2004(B)	21.0	1.6	15.14	18.82	0.12	77.3	11.7	469	14.6	16.0	0.009
	B/A 比	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9	1.3	1.3	1.1	1.0	0.7	0.9
揖保川	1978-1982(A)	25.5	1.9	18.70	16.24	0.16	60.7	4.16	270	12.5	27.0	0.018
	2000-2004(B)	21.5	1.3	13.12	12.30	0.10	63.1	7.08	397	11.2	44.8	0.010
	B/A 比	0.8	0.7	0.7	0.8	0.6	1.0	1.7	1.5	0.9	0.2	0.6
市川	1978-1982(A)	22.7	1.7	297	228	2.91	2210	33.4	688	9.73	11.7	0.013
	2000-2004(B)	22.1	1.6	198	154	1.52	1620	55.3	636	10.5	9.66	0.015
	B/A 比	1.0	1.0	0.7	0.7	0.5	0.7	1.7	0.9	1.1	0.8	1.2
市川	1978-1982(A)	29.5	4.0	105	94.4	1.78	710	13.7	237	12.4	1010	0.14
	2000-2004(B)	23.0	1.4	44.3	45.1	0.86	406	9.08	227	13.0	42.0	0.020
	B/A 比	0.8	0.3	0.4	0.5	0.5	0.6	0.7	1.0	1.1	0.0	0.1
夢前川	1978-1982(A)	23.5	1.9	17.6	9.39	0.17	73.2	6.75	252	8.59	12.2	0.023
	2000-2004(B)	24.3	1.6	13.9	10.2	0.10	75.3	8.90	298	8.40	6.52	0.013
	B/A 比	1.0	0.8	0.8	1.1	0.6	1.0	1.3	1.2	1.0	0.5	0.6
夢前川	1978-1982(A)	22.6	1.7	12.8	9.10	0.10	47.6	5.80	222	7.98	148	0.021
	2000-2004(B)	22.9	1.4	12.5	8.61	0.10	61.8	5.92	230	7.86	63.0	0.008
	B/A 比	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	1.3	1.0	1.0	1.0	0.4	0.4

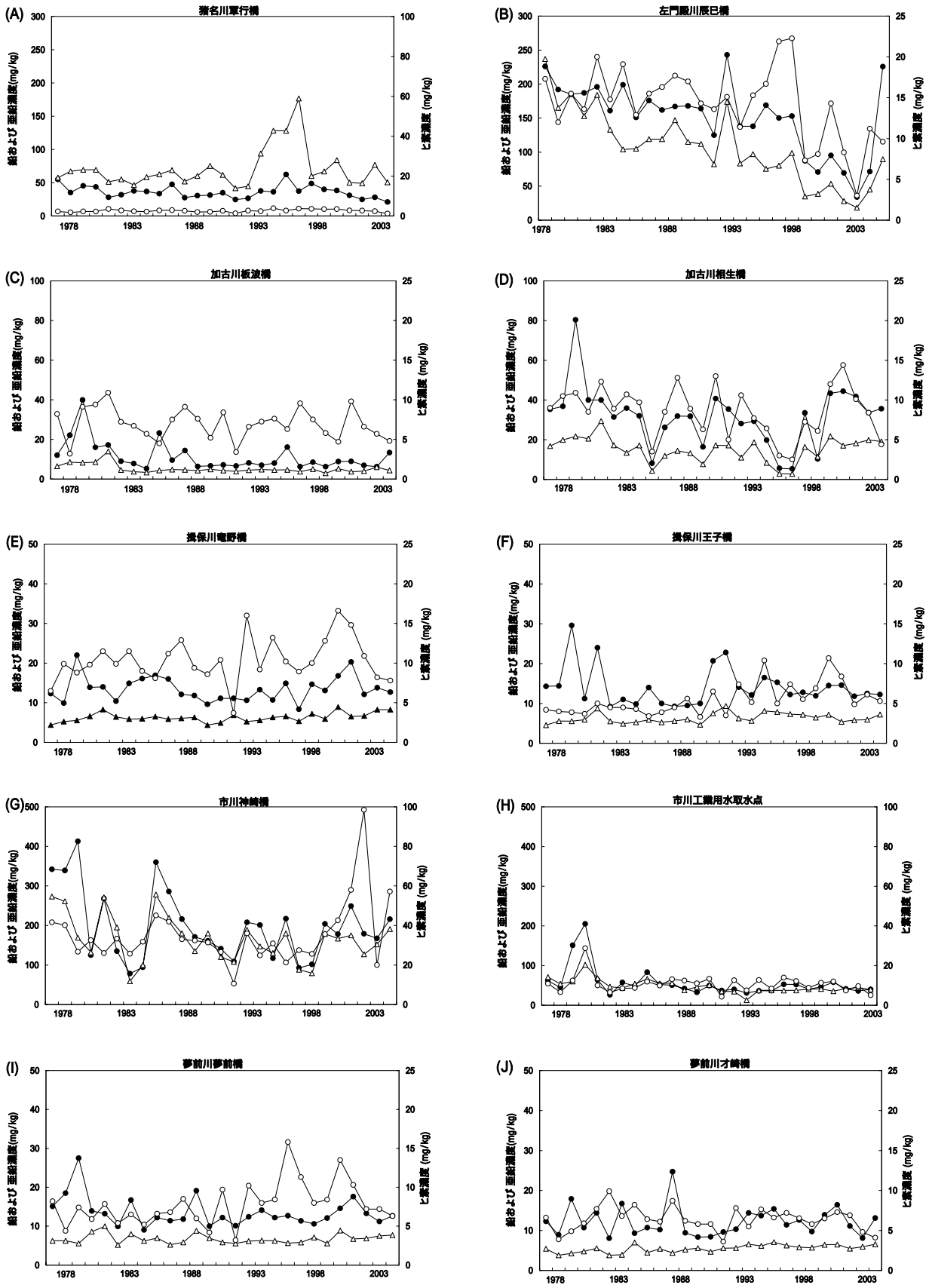


図2 底質中のヒ素、鉛、および亜鉛濃度の経年変化  
 ○：ヒ素、●：鉛、△：亜鉛、 亜鉛の濃度は 1/10のスケールで示している。

動傾向について各河川ごとの結果を図 2 に示す。いずれの地点においても、項目によって異なるとはいえ調査年ごとの変動が大きい。各河川ごとの変動の特徴は以下の通りである。

猪名川軍行橋と左門殿川辰巳橋の経年変化をそれぞれ図 2-(A) と (B) に示す。軍行橋では一定の傾向は認められないが、ヒ素濃度は 1995 年 5 月の調査では 11.6 mg/kg に上昇し、2001 年以後は減少傾向を示している。この濃度上昇は、1995 年 1 月の阪神淡路大震災後に、高濃度のヒ素を含む湧水の影響により水中のヒ素濃度が増加した<sup>6,7)</sup>こととの関連が示唆される。辰巳橋はいずれも減少傾向を示しているが、最近 2 年間の増加は底質の粒度の変化との関係が推察される。

加古川板波橋 (図 2-(C)) のヒ素は年によって濃度差が見られる。鉛と亜鉛の場合は、1978 年～1982 年ごろまでは相対的に濃度は高いが、それ以降は濃度レベルはやや低下しているものの一定の変動傾向は認められない。加古川相生橋 (図 2-(D)) の場合、年によって濃度差が大きく変動傾向が特定できないことから、データの平滑化のために時系列分析の移動平均法により 5 年間の移動平均をとった結果 (図 3-(A)) から、1998 年まで減少傾向にあ

るが 2000 年～2004 年には増加していることが認められる。

揖保川では、竜野橋 (図 2-(E)) と王子橋 (図 2-(F)) の場合も変動は大きいですが、一定の傾向は認められない。

市川神崎橋 (図 2-(G)) は、日本有数の銅・鉛・亜鉛を含む鉱床をもつ生野鉱山から約 40 km 下流に位置しているが、その影響によって重金属の濃度レベルは県内河川の中でも高い<sup>2,4)</sup>。5 年間の移動平均法の結果を図 3-(B) に示すが、各年ごとのバラツキはあるもののヒ素を除くと全体として減少する傾向が認められる。下部の工業用水取水点 (図 2-(H)) の場合は、いずれの重金属も全体として減少する傾向にある。神崎橋に比べて重金属の濃度は低いですが、これは神崎橋と工業用水取水点の間において流域からの重金属負荷が相対的に小さいために、結果として重金属濃度は希釈されたものと考えられる。

夢前川 (図 2-(I), 図 2-(J)) については才崎橋の亜鉛がやや増加傾向を示す以外は一定の傾向は認められない。

以上のように、河川底質中の重金属濃度は、過去 26 年間を通して見ると、一時的な濃度増加はあっても全体として明確な上昇傾向を示した地点はなく、減少傾向を示すか横ばいであった。本報で示す以外の地点についても同様の結果であり、少なくとも河川底質中重金属の汚染は進行しておらず、むしろ減少傾向にあることが示唆された。

日本では、1970 年代以降さまざまな水質汚濁源対策 (排水基準の設定と事業場排水規制の強化、下水道整備および生活排水対策の進展、あるいは総量規制による COD 等の負荷量削減など) が実施されてきた。兵庫県も地場産業である皮革産業排水対策や “生活排水 99% 大作戦” をスロ - ガンに生活排水処理率を 94.7% (2003 年度末) にするなど、独自の諸施策を積極的に行ってきた。その結果、兵庫県も含めた全国の水質の健康項目に関わる環境基準超過検体率は 1971 年度以降急激に減少しており<sup>8)</sup>、底質は水質の変化に対応した変化をしているものと考えられる。

## 2 濃度変動と底質の性状との関係

河川底質の重金属濃度は底質粒度の違いによって濃度変動が大きくなる<sup>9-11)</sup>ので、重金属濃度の変化を評価する場合には、底質の粒度との関係の評価が必要であることが指摘<sup>12)</sup>されている。そこで、いずれも感潮域に位置するという共通の堆積環境にあり長期には減少傾向を示していたにもかかわらず、最近数年に限ると濃度上昇が認められる左門殿川辰巳橋と加古川相生橋について、濃度変化の原因について詳細な検討を加えた。なお、辰巳橋の鉛の濃度は 175 mg/kg であり、相生橋の 34.0 mg/kg

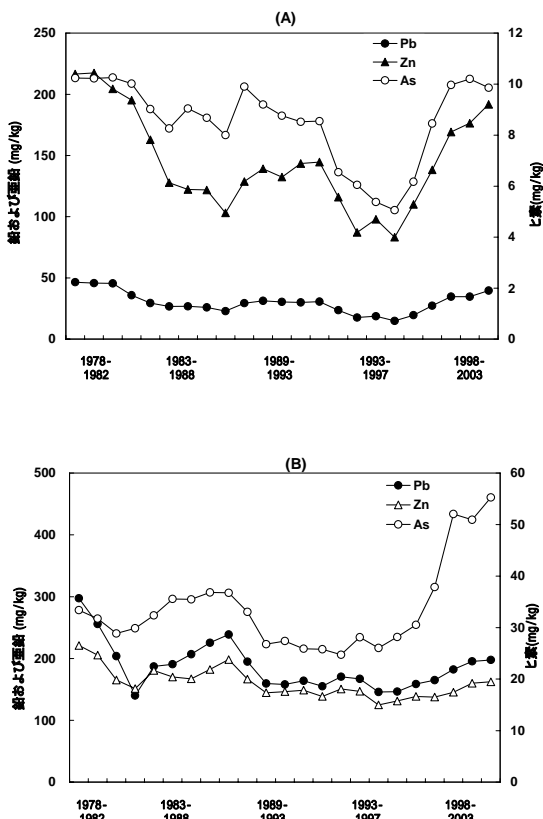


図 3 加古川相生橋および市川工業用水取水点の底質中におけるヒ素、鉛、および亜鉛濃度の 5 年間移動平均値  
A: 加古川相生橋, B: 市川工業用水取水点  
亜鉛の濃度は 1/10 のスケールで示している。

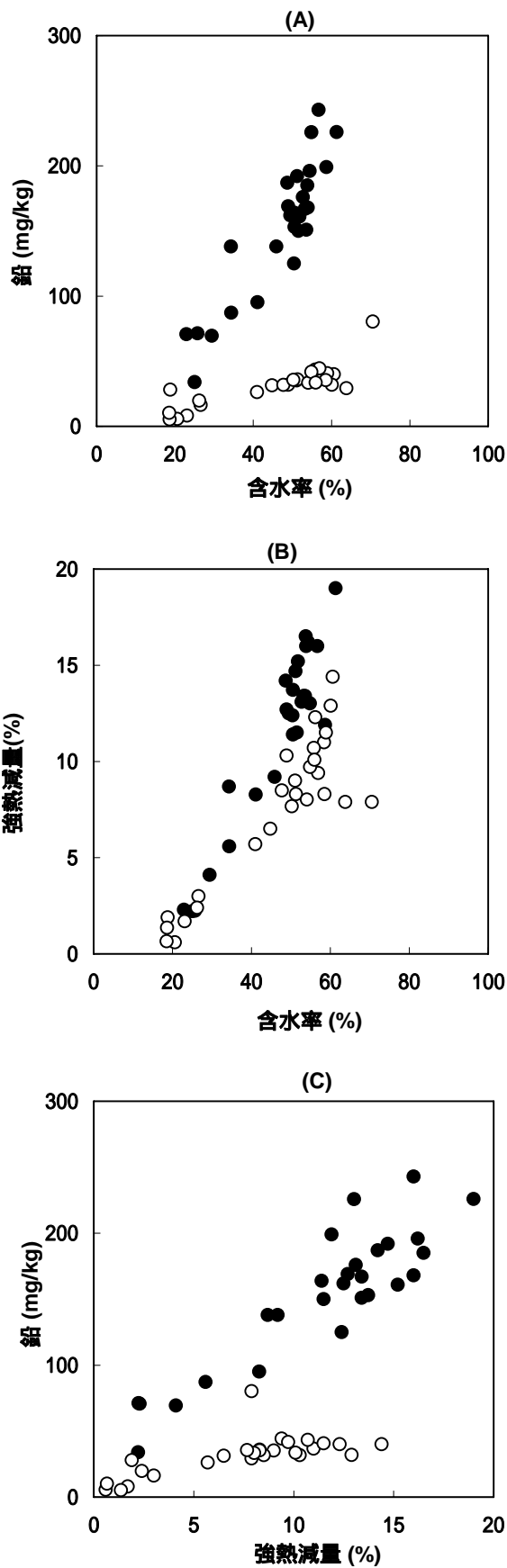


図4 感潮域の河川底質中における含水率，強熱減量，および鉛の相互関係  
 ○：左門殿川辰巳橋      ●：加古川相生橋

の約5倍高い。辰巳橋は、人口密度が高く日本を代表する工業地帯に立地する多数の事業場からの排水や生活排水の影響を受けてきた神崎川の下流域にあり、相生橋の流域に比べてはるかに有機物や重金属の負荷が大きいという背景の違いによるものである。

粒度組成の測定がされていないので、含水率を粒度の間接的な指標<sup>12)</sup>とした。含水率と有機物量の指標であるIL、ILと鉛、および含水率と鉛との関係を散布図として図4(A)～(C)に示す。いずれの項目間においても正の相関関係が認められる。一般に感潮域の地点は、塩分の上昇による凝集作用により粘土やシルトなど微細な粒子が堆積しやすい環境にある。それに伴って有機物や重金属も同時に沈積するため、粒度変化に対応して有機物量や重金属濃度も変化していることが推察されるが、図4に示されている相互関係はそのことを裏付けている。

神崎川では水質汚濁防止対策の特長として、川底に堆積したヘドロの浚渫事業<sup>13)</sup>があり、1961年度～1970年度と1971年度～1996年度までの2回にわたって実施されている。含水率は1998年までの34.3%～61.3%に比べて1998年以降は23%～41%と明らかに減少し、底質はヘドロから砂質に変化していた。浚渫は一定の河川区間ごとに順次行われているため時間的なずれを生じているが、底質の性状の変化は浚渫の影響である。しかし、2004年における辰巳橋の含水率は54.8%に増加しているように再び泥質になり、重金属濃度も上昇している。こうした含水率の増加は、辰巳橋の堆積環境によって再びヘドロ状底質が堆積したことや上流からの微細粒子の移動・再堆積が起こったことが推察され、それに伴って重金属の濃度が一時的に上昇したものと考えられる。

そこで、粒度の影響を除くために、含水率に対する鉛、亜鉛、ヒ素濃度の比を求めその経年変動を図5-(A)に示す。粒度を考慮した場合も、全体として減少傾向にある。神崎川流域の下水道普及率(2003年度末)<sup>13)</sup>は兵庫県側で98%以上、大阪府側で95%以上と進展している。下水処理施設は重金属の除去を直接の対象とはしていないものの、処理工程を通して重金属もまた一定の除去がなされる<sup>14)</sup>。このように辰巳橋では浚渫による汚染底質の除去や流入負荷削減対策の効果が伺われる。

鉛については、亜鉛やヒ素とは異なり含水率の変化を考慮しても2003年、および2004年と濃度上昇にある。汚濁対策が進展する中で鉛の濃度上昇の原因は不明であるが、今後の変化を見ていく必要がある。

相生橋では、年によって底質の含水率が大きく異なる場合があり、その影響による濃度変動も大きいと思われる。そこで、辰巳橋と同様に、含水率で補正した結果を図5-(B)に示す。特に含水率が20%～30%となる砂質底質

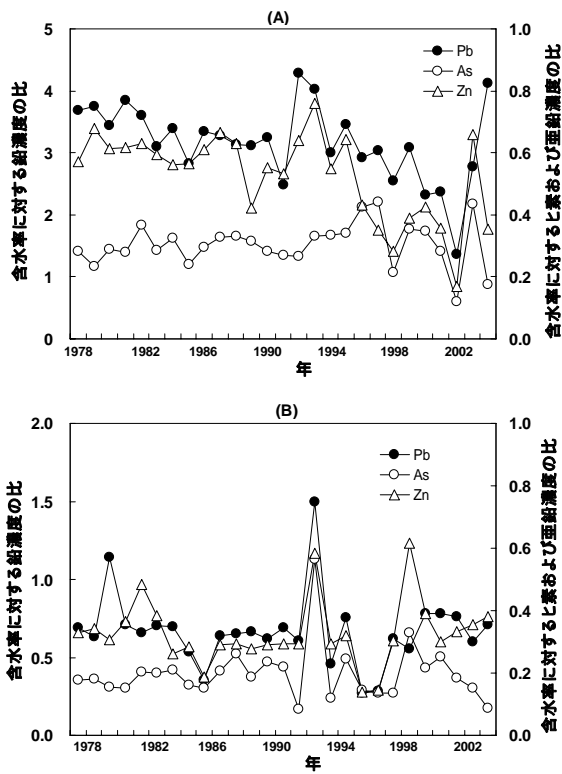


図5 感潮域の河川底質中における含水率に対する鉛、亜鉛、およびヒ素の比の経年変化  
A:左門殿川辰巳橋, B:加古川相生橋

の変動が顕著である。しかし、1998年以降については少なくとも全体として増加する傾向は認められない。ヒ素のように、含水率を考慮しない場合には増加傾向を示す(図2-(D))が、これを考慮すると逆に減少するパターンを示す場合もある。

本報では粒度の間接的な指標として含水率を用いているため、特に含水率の変化が小さい砂質の場合の精度は悪く詳細な議論は難しい。しかし、相生橋の流域には金属製品製造工場や釣り針製造業、および下水処理施設等からの排水が流入しているものの、両地点間の流域にある市町の生活排水処理率は83.1%~98%と水質汚濁対策は進展しており、今のところ相生橋の底質中の重金属濃度に影響を及ぼすような新たな汚濁源は考えられない。このことから、ここ数年見られる重金属濃度の増加は、この地点の底質が細粒化したことに伴うものと推察される。

### 3 底質中のクロム濃度の変化と汚染源との関係

#### 3.1 経年変化の特徴

猪名川の川西市域、市川の姫路市域、揖保川の龍野市域などでは、皮革のクロムなめし工程で生じた高濃度の有機物とクロムを含んだ排水が河川に直接流入し、夢前川の姫路市域には皮革のシェーピング屑を原料としたニカワ工場からの排水が流入していた。皮革関連工場は、

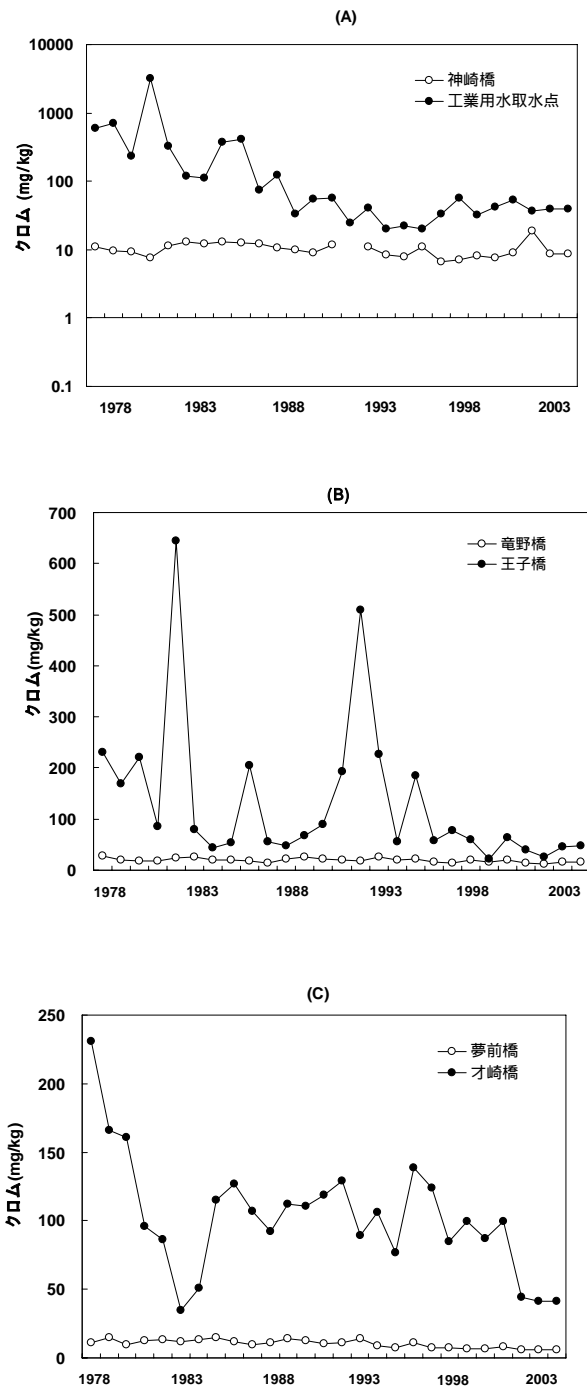


図6 市川、揖保川、および夢前川底質中のクロム濃度の経年変化  
A:市川(工業用水取水点の1993年は欠測), B:揖保川, C:夢前川

それぞれ関係する河川の二つの調査地点の間に立地しているため、上流側と下流側地点における1978年~1982年の平均値(表1)には著しい濃度差がある。2000年~2004年においても上流側地点の6.5 mg/kg~16.0 mg/kg に対して下流側地点は42.0 mg/kg~65.6 mg/kg と濃度は高い。揖保川龍野橋は、他の地点に比べて相対的に高い濃度であるが、揖保川上流にはクロム濃度が高い塩基性岩が分布しており地質的な影響<sup>4)</sup>と思われる。

上記の4河川のうち、他の産業排水や下水処理施設などの影響が大きいと考えられる猪名川 - 神崎川以外の3河川について、底質中のクロム濃度の変化を図6に示す。上流側の地点の底質中のクロム濃度はいずれも10 mg/kg ~ 20 mg/kg 前後の濃度で推移しており、それぞれ人為的汚染の影響が無い場合のバックグラウンド値と見なされる。一方、下流側地点は、いずれも1978年当時は高濃度であり、例えば市川では底質の性状が有機物の多いヘドロ状であったとはいえ3,200 mg/kg (1981年)の濃度も検出されていた。経年的には、市川(図6-(A))および揖保川(図6-(B))は明らかな減少傾向を示している。しかし、夢前川(図6-(C))の場合は1983年から再び上昇し、1985年~2001年の間はほぼ100 mg/kg 前後の濃度で推移しながら2002年以降に再び減少しているように、市川及び揖保川とは大きく異なるパターンを示していた。

### 3.2 水質の変化との関係

皮革排水は高濃度の有機物とクロムを含む特徴があるので、河川水への影響を見るために BOD および全クロムの濃度変動を図7に示す。なお、平均値の計算において、表記下限値未満の濃度(クロムは、0.01 mg/L 未満)の場合は、表記下限値を使用した。図中には、それぞれの河川における皮革関連排水の処理開始と流入が停止した時期を示している。市川工業用水取水点の BOD の年平均値は 15.6 mg/L (1978 年)であったが、1979 年以降の皮革排水の処理対策の進展と共に減少し、1987 年には 2.1 mg/L となって以降 1 mg/L 前後で推移している。全クロムの平均濃度も、0.11 mg/L (1977 年)から 0.047 mg/L (1983 年度)へと減少し、1986 年度以降は 0.01 mg/L 以下であるように BOD の変化と対応している。

揖保川関係の皮革工場排水処理は、他の地域よりも遅い 1994 年に、しかし段階的ではなく全ての排水について終末処理場での処理が開始された。その結果、1994 年を境に揖保川王子橋の BOD の年平均値は 16 mg/L ~ 35 mg/L から 3.7 mg/L に急減し翌年以降は 1 mg/L 前後となった。全クロムの平均濃度も 1994 年以前には 0.05 mg/L ~ 0.024 mg/L と常時検出されていた状態から全て 0.01 mg/L 以下になり、水質は劇的に改善された。

市川工業用水取水点と揖保川王子橋の底質中のクロム濃度は、いずれも水質に対応して次第に減少している。しかし、初期の濃度減少は大きいのが次第に緩やかになっており、水質に比べてその変化は小さいという共通の特徴を示した。2000 年~2004 年の底質中クロムの平均濃度は、市川工業用水取水点の場合 42 mg/kg だが上流側の神崎橋よりも 4 倍も高く、揖保川王子橋の場合も、44.8 mg/kg であるが、上流側の竜野橋と比べれば 2~3 倍高い濃度である。

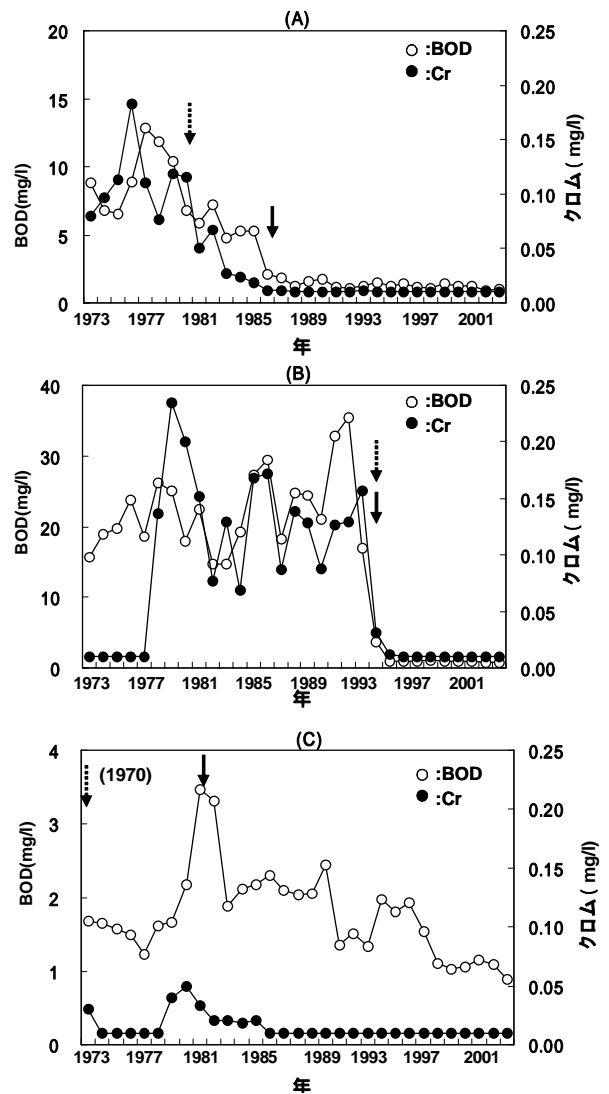


図7 市川、揖保川、および夢前川水質におけるBODとクロム濃度の経年変化  
A: 市川工業用水取水点 B: 揖保川王子橋  
C: 夢前川蒲田橋(クロム濃度のうち、1973年度は広栄橋、1974年度は才崎橋、および1977年度~1978年度は京見橋の測定値である。)  
矢印(実線)は下水処理施設での処理が開始された年を示す。  
矢印(波線)は、前処理場での排水処理開始年を示す。

このように、皮革排水流入の影響が全く無くなった時点で水質は短期に顕著な回復を示すが、底質の場合は時間的に遅れがあること、底質濃度は初期の頃に大幅な濃度減少は見られるが10~20年を経ても、なお非汚染地点の濃度レベルまでは低下しないことが明らかになり、汚染底質の回復には相当の時間を要することが示された。

### 3.3 夢前川におけるクロム濃度とその原因

夢前川才崎橋は常時監視の水質測定地点ではないので、約1km上流の蒲田橋の水質調査結果を使用した。BODの変化を図7-(C)に示す BOD の年平均値は 0.9 mg/L ~ 3.5 mg/L



であり、一定の変動傾向は示していない。ニカワ工場排水は1970年から前処理場への流入が始まり、1979年からは全ての排水が下水処理施設で処理されている。

蒲田橋では1973年度～1974年度および1977年度～1978年度にはクロムの測定がされていないので、下流に位置する広栄橋(1973年度)、才崎橋(1974年度)および京見橋(1977年度～1978年度)の測定結果を使用した。クロム濃度の表記下限値は1979年度～1980年度の場合は0.05 mg/L、1981年度～1985年度の場合は0.02 mg/L、それ以外の年度は全て0.01 mg/Lと異なっていたが、1973年5月に唯一0.07 mg/Lの濃度が検出されたことを除くと全て表記下限値未満であった。したがって、図7-(C)における1979年～1985年のクロム濃度の増加は、測定年度の表記下限値の違いによる見かけ上のものであり、実際の濃度変動とは無関係である。

才崎橋において長期に底質中のクロム濃度が100 mg/kg前後で推移している原因を調べるために、1996年に図8に示す夢前橋(Y1)と才崎橋(Y4)の間にある新蒲田橋(Y2)と蒲田橋(Y3)の底質を調べたところ、新蒲田橋で66 mg/kg、蒲田橋では84 mg/kgのクロムが含有されていた。夢前橋と新蒲田橋の間には上流の菅生川右岸で分岐し、ニカワ工場が立地する地区(A地区)付近を通り途中に機械・電気関係の製造工場のそばを流れる農業用水路(B水路)が合流している以外に、他の水路等からの流入は認められなかった。このことから、才崎橋でクロム濃度が高い原因として、(1)ニカワ関連の排水がこの時点でもある程度流入している、(2)過去に堆積したクロム汚染の堆積物が水路に残存している、(3)全く別の汚濁源が存在することが考えられた。

そこで、1996年と1997年に周辺の詳細調査を行った結果を図8に示す。分岐された直後のB水路の底質中クロム濃度(Y5)は9 mg/kgであったが、A地区より下流の地点(Y6)では50 mg/kgと上昇し、機械・電気関係の製造工場の下流地点(Y7)ではほとんど変化はなく、夢前川に流入する直前のB水路流末(Y8)では62.5 mg/kgとY2に近い濃度であった。この水路の下流で合流する別の水路(C水路)の5地点(Y9～Y13)の底質中クロム濃度は、11 mg/kg～48 mg/kgであり、地点ごとの濃度差は大きかった。

以上のことから、(1)についてはその可能性が示唆されたこと、(2)については、B水路は浅くて流れがあり堆積物も非常に少ないことから、過去のクロムで汚染された堆積物が残存しているとは考えられないこと、(3)については、機械・電気関係の製造工場の影響は認められないが、C水路の底質のクロム濃度は48 mg/kgであったことから、この水路からの可能性は全く否定できなかった。し

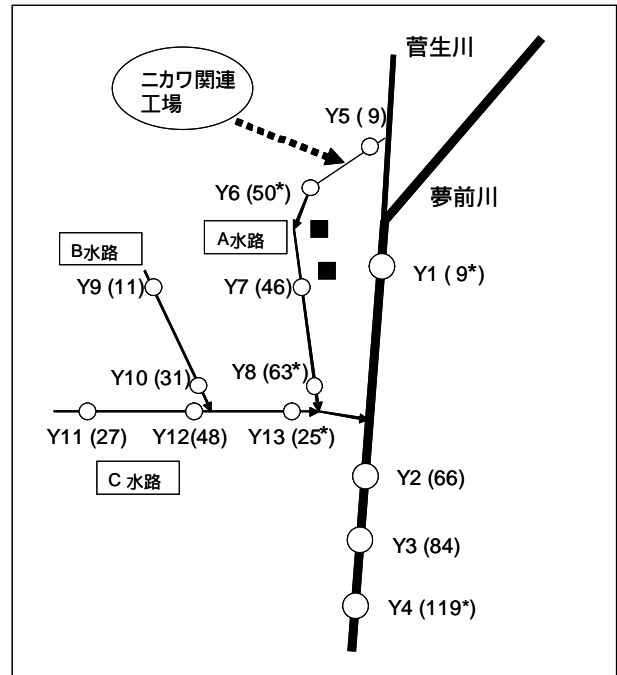


図8 夢前川および農業用水路の底質中クロム濃度の分布状況

\*1996年と1997年における調査結果の平均値

Y1: 夢前橋 Y2: 蒲田橋 Y3: 新蒲田橋

Y4: 才崎橋 ■: 電機工場

かし、C水路流末では30 mg/kgとB水路の1/2の濃度であり、水路の大きさや水量の程度から考えて、才崎橋の底質中のクロム濃度を支配するとは考えられなかった。このように、底質調査の結果は1985年以降においても引き続きニカワ工場に関わる排水が何らかの形で才崎橋の底質に影響を及ぼしていた可能性を示唆したが、これを裏付けるような直接・間接のデータについては得ることができなかったことから、原因を特定するには至らなかった。

いずれにしても2002年以降で見ると、濃度は40 mg/kg程度に減少している。この濃度は汚染の影響を全く受けていなかった夢前橋に比べて依然として4倍程度高いとはいえ、市川や揖保川においてクロムを含んだ排水が流入しなくなってから一定の年数を経た時点における濃度と同レベルである。才崎橋において長期にわたって続いていたクロム汚染もようやく改善されつつあると考えられる。

## 要 旨

兵庫県で年1回実施している河川底質調査結果に基づき、代表的地点における重金属濃度の1978年から2004年に至る26年間の長期的な変動について検討し、以下の

結果を得た。

- (1) 河川底質中の重金属濃度は、過去 26 年間を通して見ると、一時的な濃度増加はあっても全体として明確な上昇傾向を示した地点はなく、減少傾向を示すか横ばいであり、少なくとも河川底質中重金属の汚染は進行しておらず、むしろ減少傾向にあることが示唆された。
- (2) 左門殿川辰巳橋と加古川相生橋は、長期には減少傾向を示すが、最近数年に限ると濃度上昇が認められた。しかし、底質の粒度組成を考慮すると、左門殿川辰巳橋の重金属濃度は減少傾向を示し、浚渫による汚染底質の除去や流入負荷削減対策の効果と考えられること、相生橋については全体として増加する傾向は認められず、いずれの場合も重金属濃度の増加は底質が細粒化したことに伴うものと推察された。
- (3) 皮革関連排水によるクロム汚染を受けた市川工業用水取水点および揖保川王子橋では、排水の直接の流入が無くなると共に底質中のクロム濃度は水質に遅れて減少したが、10~20 年を経ても非汚染底質の 2~4 倍程度高い濃度を示しており、底質の改善のためには相当の時間を要することが明らかになった。
- (4) 1985 年からニカワ関連排水の流入がないにもかかわらず、高いクロム濃度で推移し最近減少が認められるように、市川や揖保川とは異なる挙動を示した夢前川才崎橋の周辺の底質調査結果は、1985 年以降においても引き続きニカワ工場に関わる排水が何らかの形で才崎橋の底質に影響を及ぼしていた可能性を示唆したが、原因を特定するには至らなかった。

## 文 献

- 1) 兵庫県環境局水質課：(昭和 53 年度～平成 17 年度) 公共用水域における水質測定結果報告書
- 2) 駒井幸雄，芦田賢一：河川底質中の重金属第 2 報 平均値の推定，兵庫県公害研究所研究報告，No. 16, 44-49 (1984)
- 3) 駒井幸雄，芦田賢一：河川底質中の重金属第 3 報 Cr と Ni の分布の特徴とその要因，兵庫県公害研究所研究報告，No. 17, 66-70(1985)
- 4) 駒井幸雄，芦田賢一：河川底質中の重金属第 4 報 Cu, Pb, Zn, As, Mn の分布の特徴，兵庫県公害研究所研究報告，No. 18, 98-105(1986)
- 5) 環境庁：底質調査方法，昭和 63 年 9 月 8 日 環水管第 127 号環境庁水質保全局通知(1988)
- 6) 和田桂子，福島実：兵庫県南部地震後の猪名川流域河川表流水中におけるヒ素濃度の消長，水環境学会誌，20, 860-864(1997)
- 7) 芦田賢一，山本淳，古武家善成：猪名川水系におけるヒ素およびその他重金属の空間的・時間的分布とその要因，水環境学会誌，24, 466-472(2001)
- 8) 環境省：平成 15 年度版環境白書，財務省印刷局(2004)
- 9) 駒井幸雄，芦田賢一：河川堆積物の採取法の問題点について，兵庫県公害研究所研究報告，No. 8, 81-82(1976)
- 10) 芦田賢一，駒井幸雄：河川堆積物の試料採取法について，兵庫県公害研究所研究報告，No. 9, 49-54(1977)
- 11) 駒井幸雄，芦田賢一：河川堆積物の試料採取法について，兵庫県公害研究所研究報告，No. 12, 27-30(1980)
- 12) 芦田賢一，駒井幸雄：底質分析をめぐる濃度変動 重金属を中心として - ，日本水環境学会誌，16, 11-16 (1994)
- 13) 例えば，神崎川水質汚濁対策連絡協議会：委員会資料，1-105(2001)
- 14) 駒井幸雄，古武家善成，清木 徹，永淵 修，村上和仁，小山武信，蛭灰谷 喬：瀬戸内海における底質中重金属濃度の分布と変化，日本水環境学会誌，21, 743-750 (1998)

## [ 資 料 ]

## 兵庫県北部の温泉の飲用利用基準からみた泉質特性

矢野美穂\* 川元達彦 巻幡希子 英保次郎

Ingredient Characteristics of Hot Springs in North Area of Hyogo Prefecture : Related with Drinking Standard of Hot Springs

Miho YANO\*, Tatsuhiko KAWAMOTO, Nobuko MAKIHATA and Jiro EIHO

*Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

## はじめに

兵庫県は422の源泉(2005年3月現在)を有しており、なかには飲用利用許可を得て飲用にも利用している源泉がある。しかしながら、飲用利用許可の条件となる温泉の飲用利用基準は、一ヵ月程度温泉地に滞在する一般の温泉利用者を対象として設定されており、長期に亘り温泉を利用する地域住民等については必ずしも適合しないため、利用実態に応じて考慮することが必要<sup>1)</sup>とされている。

また、温泉水は、その起源が多種多様であるため種々の成分を含有しており、誤った利用方法や利用施設の管理の不備のために人に健康影響を与える場合が想定される。一方、温泉の飲用利用基準で定められた基準項目はヒ素、フッ素等の6項目のみであり、各都道府県に対して行ったアンケート調査結果<sup>2)</sup>からも飲用利用基準の見直しを必要とする意見が多数あった。特に、メタホウ酸は温泉水中に高濃度に含まれることから、環境省が飲用利用基準改訂に向けて検討を講じている項目の一つである<sup>3)</sup>。

今回の報告では、兵庫県内の飲用利用許可施設数の半数以上を占める北部の源泉を対象として、飲用利用基準からみた泉質特性について検討した。温泉水は温泉の形

成過程で接触する地質や熱源の影響を受け、それぞれの成分的特徴を有する。既報<sup>4)</sup>により、対象とした地域の源泉を分類し、飲用利用基準及び飲用利用基準への追加が検討されている項目に焦点を当て、それらの濃度分布とこれらに影響を与える因子について考察したので、その結果を報告する。

## 方 法

## 1. 調査源泉

図1に、1965年3月から2005年3月までの期間に当センターで温泉分析を行った兵庫県内の297源泉の地点を示した(源泉が密集している地域については必ずしも全源泉を示していない)。今回の報告では、図1中で実線より北部の1市3町から湧出する64源泉を調査対象とした。

## 2. 検討項目

検討項目は、飲用利用基準に定められたヒ素、フッ素、銅、鉛、水銀、遊離炭酸及び追加が検討されているメタホウ酸とした。

## 3. 試料及び分析方法

飲用に利用される温泉水は、浴槽に供給される温泉水とは異なり加水等の処理を行うことなく源泉水が直接供給されていることから、分析試料は源泉水とした。試料の採水は原則として源泉の湧出口で行ったが、湧出口での採水が困難な場合のみ湧出口にできるだけ近い位置で行うこととした。検討項目の分析方法は、鉱泉分析法指

水質環境部

\* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29  
兵庫県立健康環境科学研究所センター  
水質環境部 矢野美穂

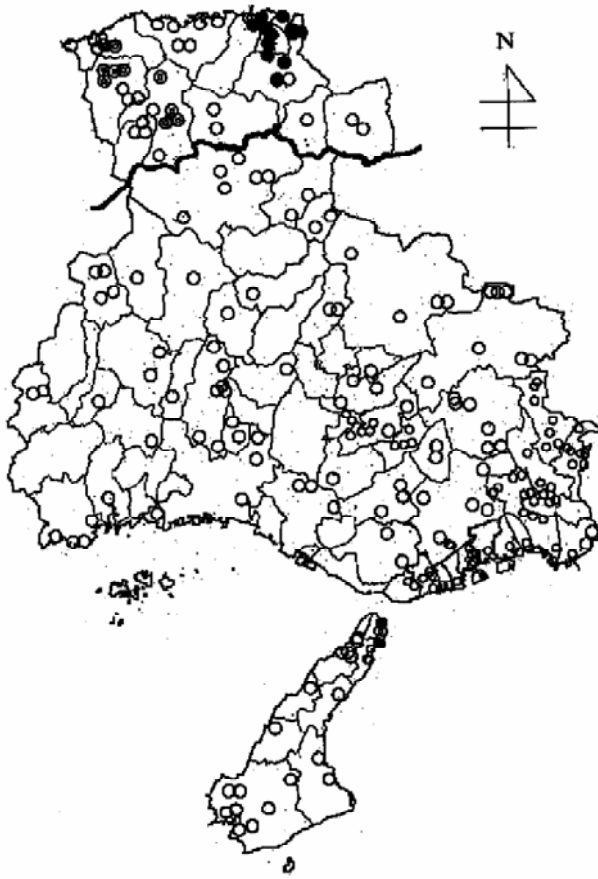


図1 兵庫県下の源泉地点

○：海岸型温泉， △：グリーンタフ型温泉，  
●：その他の温泉

注1) 1965年3月から2005年3月までの期間に当センターで分析を行った297源泉

注2) 源泉が密集している地域については、全ての源泉を示すことができていない

針及び上水試験方法に従った。また、各項目の定量下限値は、ヒ素については0.010mg/kg、フッ素は0.050mg/kg、銅及び鉛は0.020mg/kg、遊離炭酸は0.01mg/kg、水銀は0.0001mg/kg、メタホウ酸は0.050mg/kgとした。

## 結果および考察

### 1. 飲用利用基準項目及びメタホウ酸の濃度分布

対象源泉水中の飲用利用基準項目及びメタホウ酸の濃度分布を図2に示した。

#### 1) ヒ素

64源泉におけるヒ素の濃度範囲はN.D.～0.60mg/kgであり、中央値は0.050mg/kgであった。この値は兵庫県下の297源泉の中央値0.010mg/kgの5倍高い値であり、北部の源泉の多くはヒ素濃度が高いことが明らかとなった。しかし、全国の平均値0.34mg/kg<sup>5)</sup>と比較すると本県北部の平均値は0.064mg/kgと低濃度レベルにあった。

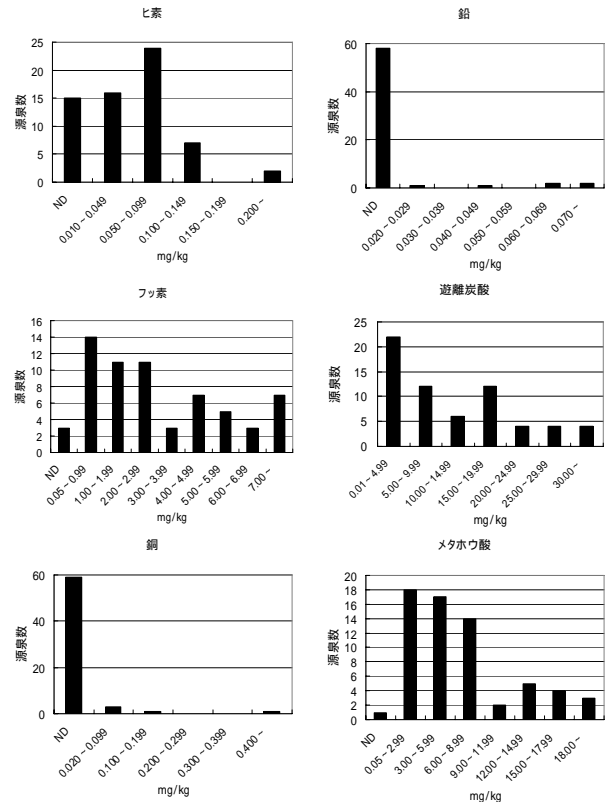


図2 兵庫県北部源泉水中のヒ素、フッ素、銅、鉛、遊離炭酸及びメタホウ酸の濃度分布

飲用利用基準には、1日に温泉水を1000mL飲用した場合の各項目の総摂取量制限の値(総摂取量)が示されている<sup>1)</sup>。ヒ素の総摂取量は0.3mgであることから、最高濃度0.60mg/kgを示した温泉は現時点では飲用利用許可を受けていないが、飲用利用許可を受ける場合には1日の飲用総量は計算式(0.3/ヒ素濃度×1000)により500mLまでとなり制限量の揭示が必要である。また、総摂取量0.3mgは水道水質基準におけるヒ素の基準値が0.05mg/Lであった当時の水道水質基準値をもとに設定されたものであり、現在では水道水質基準値が0.01mg/Lとなっていることから、今後、飲用利用基準における総摂取量も論議の対象になるものと考えられる。今後は、新たに掘削された源泉の泉質に注視していくとともに、既存の源泉についても再分析を行う等飲用利用の監視強化が必要と考える。

#### 2) フッ素

フッ素の濃度範囲はN.D.～12.3mg/kg、中央値2.10mg/kgであり、兵庫県下の297源泉の中央値1.96mg/kgと比べ僅かに高い傾向にあった。一方、全国の平均値1.9mg/kg<sup>5,6)</sup>に対して本県北部の平均値は3.16mg/kgであったことから、全国平均値の1.7倍と高い濃度レベルであった。また、飲用利用基準で定めるフッ素の1日の総摂取量は1.6mgであり、最高濃度12.3mg/kgを示した温泉は

既に飲用利用許可を受けているが、計算式（1.6/フッ素濃度×1000）により1日の飲用総量は130mLまでに制限されることを飲用上の注意事項として掲示している。また、全ての対象源泉のフッ素濃度を総摂取量と比較した場合、フッ素の項目により飲用制限が必要となる源泉数は61%と多く、フッ素の摂取は斑状歯やフッ素症を引き起こす<sup>7)</sup>とされていることから、飲泉上の監視強化が必要な項目であることが明らかとなった。

3) 銅、鉛、遊離炭酸、水銀

銅及び鉛の検出濃度範囲は、それぞれ N.D. ~ 3.35mg/kg, N.D. ~ 0.1mg/kg, 中央値は共に N.D. と低く、検出率についてもそれぞれ 7.8%, 9.4% と低かった。銅及び鉛の最高濃度を示した温泉は、共に現時点では飲用利用許可を受けていないが、飲用利用許可を受ける場合には、銅の最高濃度 3.35mg/kg を示した温泉については、飲用利用基準で定める 1 日の総摂取量 2.0mg から 1 日の飲用総量は計算式（2.0/銅濃度×1000）により 590mL まで、鉛の最高濃度 0.1mg/kg を示した温泉については、飲用利用基準で定める 1 日の総摂取量 0.2mg から 1 日の飲用総量は計算式（0.2/鉛濃度×1000）により 500mL までの制限量の掲示が必要となる。

遊離炭酸の濃度範囲は、0.01 ~ 456mg/kg, 中央値 9.23mg/kg であり、1 回の飲用の総摂取量 1000mg に対して、いずれの温泉についても制限する必要はなく問題となる濃度レベルではなかった。

水銀については、全試料から全く検出されなかった。

これら 4 項目については、ヒ素及びフッ素と比較して検出頻度及び濃度が低く直ちに問題となる濃度レベルにはなかった。

4) メタホウ酸

メタホウ酸は飲用利用基準の項目にはないが、全国的に高い検出率及び検出濃度の実態があることから追加項目として検討されている<sup>3)</sup>。メタホウ酸の濃度範囲は N.D. ~ 27.3mg/kg, 中央値 5.00mg/kg であり、兵庫県下の 297 源泉の中央値 5.87mg/kg と同程度の値であった。全国の平均値 38.2mg/kg<sup>5)</sup> との比較では、本県北部の平均値は 6.69mg/kg と低濃度レベルであった。

一方、平成16年4月に施行された水道水質基準では、「ホウ素およびホウ素化合物」が基準項目となり基準値 1.0mg/L が設定された。この値は、ラットにホウ酸を投与した催奇形性試験の結果<sup>8)</sup> から耐容一日摂取量 0.096 mg/kg/day が算出され、水道水の寄与率40%、人の平均体重50 kg, 1日に飲用する水の量2L の条件のもとに設定されたものである。これをメタホウ酸に換算すると 4.0 mg/L となる。温泉の飲用利用基準における総摂取量は主に水道水質基準値に2L を掛けた値が用いられており、

この方法を適用すると総摂取量は8.0 mg となる。また、比較的水質が類似していると考えられるミネラルウォーターの製造基準は、ホウ酸として30mg/L 以下であり、メタホウ酸に換算すると21.3mg/L 以下となる。今回検討した64源泉の中には、これらの値を超える源泉（それぞれ7源泉, 2源泉）が存在することから、メタホウ酸については、早期の飲用利用基準の設定が望まれる。

2. ヒ素、フッ素、メタホウ酸濃度に影響を与える要因

温泉の成分は岩石との熱水反応や地上への上昇通路の地層に影響される<sup>9)</sup>ことが報告されている。我々は既報<sup>4)</sup>において、兵庫県北部の温泉を泉質特性から海岸型温泉及びグリーンタフ型温泉に分類できることを報告した。海岸型温泉は現在の海水と火山岩との相互作用により形成された温泉であり、グリーンタフ型温泉は緑色凝灰岩に浸透した天水中に硫酸カルシウムが溶解し形成された温泉である。これらは温泉水中の塩素イオンを基準イオンとして、硫酸イオン及びカルシウムイオンとの濃度比から分類される。この方法に従って、今回の対象源泉を分類した結果、海岸型温泉が17源泉、グリーンタフ型温泉が21源泉であった。これらの温泉群別にヒ素及びフッ素濃度と泉温との相関関係を検討した。その結果、ヒ素については図3に示すように海岸型温泉及びグリーンタフ型温泉共に、有意な相関関係が認められた（それぞれ  $r=0.874$  及び  $r=0.574$ , 共に  $p<0.01$ ）。また、図4に示すようにフッ素についても同様に海岸型温泉及びグリーンタフ型温泉それぞれについて有意な相関関係が認められ

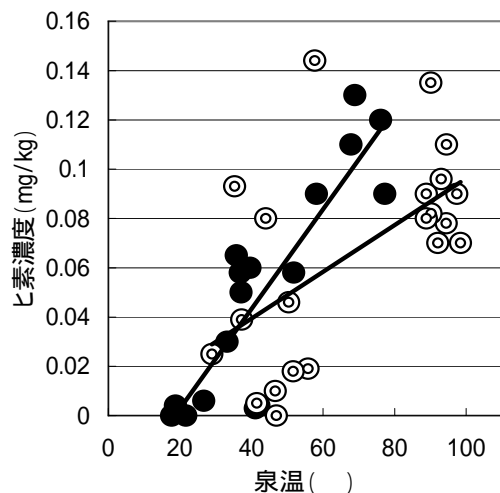


図3 ヒ素濃度と泉温との関係  
 海岸型 (○)  $y = 0.002X - 0.0377$  ( $r = 0.874$ )  
 グリーンタフ型 (●)  $y = 0.0009X + 0.0013$  ( $r = 0.574$ )

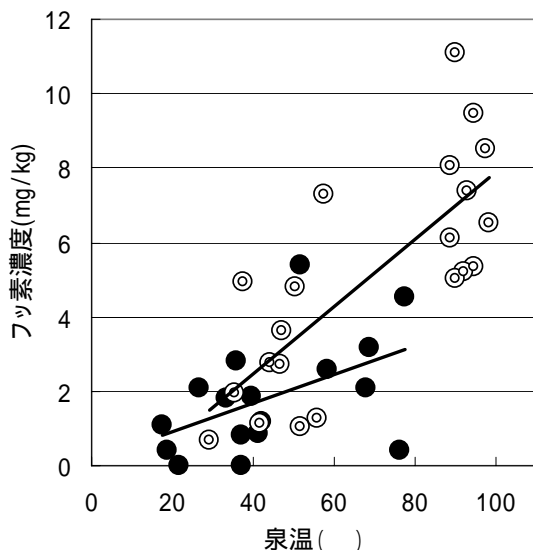


図4 フッ素濃度と泉温との関係  
 海岸型 ( )  $y = 0.0384X + 0.136$   
 $(r = 0.490)$   
 グリーンタフ型 ( )  $y = 0.0979X - 1.79$   
 $(r = 0.767)$

た(それぞれ  $r=0.490$ 及び  $r=0.767$   $p<0.05$ 及び  $p<0.01$ ).

ヒ素については、久保田<sup>10)</sup>がグリーンタフ地域である新潟平野及び宍道低地帯から湧出する温泉水中のヒ素濃度について調査し、基盤花崗岩類及びグリーンタフ火山岩類分布域では、堆積岩分布域と比較して温泉水中のヒ素濃度が高い傾向があることを報告している。フッ素については、中牟田<sup>11)</sup>高橋<sup>12)</sup>が花崗岩から湧出する温泉水中のフッ素濃度が高い傾向を示すこと、甘露寺<sup>13)</sup>が流紋岩質の酸性岩からフッ素の溶出することを報告している。さらに、淵<sup>5)</sup>甘露寺<sup>13)</sup>はヒ素、フッ素等の濃度と泉温との間で正の相関関係が認められたことを報告している。これらの報告は、今回我々が対象としたグリーンタフ(緑色凝灰岩)、花崗岩及び流紋岩が広く存在している北部地域<sup>14,15)</sup>から湧出する温泉について、上記の我々の研究結果を論理的に裏付けるものと考えられる。

今回我々が明らかにした本県北部においてヒ素及びフッ素濃度が高いこと、海岸型温泉及びグリーンタフ型温泉においてヒ素及びフッ素濃度が泉温に相関して高くなることは、今後の温泉の飲用利用に関する指導において有用な知見であると考えられる。

一方、メタホウ酸については、泉温との相関は得られなかった。これは、地質からのメタホウ酸の溶出に対し泉温の影響が小さいためと推測された。

## まとめ

温泉水中の飲用利用基準項目及びメタホウ酸について、兵庫県北部の64カ所の源泉について調査した結果、以下の知見が得られた。

1. 兵庫県北部に位置する温泉水中のヒ素及びフッ素濃度は、兵庫県全体の濃度レベルよりも高い傾向にあった。
2. 銅、鉛、水銀については検出濃度及び検出率が低く、遊離炭酸についても低濃度であった。
3. メタホウ酸の濃度レベルは、水道水質基準やミネラルウォーターの規格基準との比較から、これらの基準値を超える温泉水が認められ、温泉の飲用利用基準への追加設定が望まれる。
4. 海岸型温泉及びグリーンタフ型温泉において、温泉水中のヒ素及びフッ素濃度と泉温との間には高い正の相関があることが明らかとなった。
5. ヒ素及びフッ素濃度が高い泉質の特性を明らかにし、今後の飲泉に関する指導において有用な知見が得られた。

## 謝辞

本研究の遂行に当たり、貴重な資料及び情報の提供を頂いた県業務課ならびに豊岡及び洲本健康福祉事務所業務・生活衛生課の皆様へ感謝いたします。また貴重な意見等を提供頂きました全日本検数協会顧問寺西清博士及び(財)中央温泉研究所長甘露寺泰雄博士に深く感謝いたします。

## 文献

- 1) 環境庁自然保護局長通知:「温泉の利用基準について(通知)」,昭和51年7月12日,環自企第424号
- 2) (財)中央温泉研究所:平成9年度温泉の各種利用基準等に関する調査,環境庁業務報告書(1998)
- 3) (財)中央温泉研究所:平成10年度温泉の各種利用基準等に関する調査,環境庁業務報告書(1999)
- 4) 矢野美穂,川元達彦,巻幡希子,谷本高敏:兵庫県北部の温泉の源泉水質,兵庫県立健康環境科学研究所年報,1,42-48(2004)
- 5) 淵 祐一,安藤章夫,山田謙吾:大分県下の温泉について(第3報),大分県公害衛生センター年報,10,48-57(1982)
- 6) 桶田幾代,野村真美,高橋政教,小林英一:青森県内における温泉中のフッ素濃度について,青森県衛生研究所報,17,31-33(1980)

- 7) 日本環境管理学会:改定3版水道水質基準ガイドブック, p.55-58, 丸善株式会社, 東京(2004)
- 8) Price C. J. et al.: Developmental toxicity NOAEL and postnatal recovery in rats fed boric acid during gestation. *Fundamental and applied toxicology*, **32**, 179-193 (1996)
- 9) 湯原浩三, 瀬野錦蔵: 温泉学第9版, p.21-22, 地人書館, 東京(1991)
- 10) 久保田喜裕, 横田大樹, 石山 豊: 新潟平野, 宍道低地帯における温泉水中のヒ素濃度, *地球科学*, **55**, 11-22 (2001)
- 11) 中牟田啓子, 広田敏郎, 松原英隆: 福岡市における地下水のフッ素汚染について, *福岡市保健環境研究所報*, **26**, 98-102 (2001)
- 12) 高橋政教, 平出博昭, 高橋ひとみ, 村上淳子, 阪崎俊璽, 安田徳彦, 石塚伸一: 青森県の温泉中のヒ素およびフッ素含有量について, *青森県環境保健センター研究報告*, **9**, 21-26 (1998)
- 13) 甘露寺泰雄, 高橋 保, 堀内公子: 塩原温泉の化学成分と温泉水の賦存流動状況との関係に関する地球化学的考察, *温泉工学会誌*, **28**, 2-13 (2002)
- 14) 兵庫県土地地質図編纂委員会: 兵庫の地質, 初版, p.154-159, 189-196, 兵庫県, 兵庫(1996)
- 15) 兵庫県土地地質図編纂委員会: 兵庫の地質, 初版, 兵庫県地質図, 兵庫県, 兵庫(1996)