

# Ⅲ 調査研究



### Ⅲ 調査研究 目次

#### 1. 調査研究

- (1) 福井県内の河川水中の医薬品類濃度とその変動要因  
和田理誠 他 ..... 38
- (2) 福井県内の河川水および下水に含まれる医薬品類の実態把握  
和田理誠 他 ..... 44

#### 2. ノート

- (1) 新型コロナウイルス感染症疑い検体における他の呼吸器ウイルス検出状況について  
高橋美帆 他 ..... 49
- (2) マイコトキシン一斉分析法の検討  
野田拓史 他 ..... 54
- (3) へしこ中のヒスタミン生成に関する研究（その1）～不揮発性アミン類一斉分析法の検討～  
土屋小百合 他 ..... 56
- (4) へしこ中のヒスタミン生成に関する研究（その2）～不揮発性アミン類含有量実態調査～  
六戸部真里 他 ..... 59

#### 3. 資料

- (1) 福井県における降水中の無機元素成分の解析  
岩井直樹 ..... 61
- (2) 藍藻*Microcystis aeruginosa*を用いた生長阻害試験方法の構築  
保月勇志 他 ..... 65



## 福井県内の河川水中の医薬品類濃度とその変動要因

和田理誠・三田村啓太

The Concentration of PPCPs in River Water in Fukui Prefecture and the Fluctuating Factors

Risei WADA, Keita MITAMURA

河川水に含まれる医薬品類調査を目的とし、LC/MS/MSを用いた一斉分析法の検討を行った。測定対象とした医薬品類は、都市部の研究報告で検出例の多い19種類とした。検討の結果、最適化した分析法について添加回収率試験とMQL試験を行い、河川水での調査に適用可能であることを確認した。また、確立した試験法を用いて、福井県内の河川水に含まれる医薬品類濃度を調査した。その結果、医薬品類濃度は流域および調査日により差異がみられ、流域人口および河川流量が影響していると考えられた。

## 1. はじめに

近年、ヒトや動物に使用された医薬品類が水環境中に流出し、水生生物に悪影響を及ぼす可能性が懸念されている<sup>1)</sup>。また、服用された医薬品類はし尿や糞便とともに、下水処理場等を通じて公共用水域に排出されるが、一部の医薬品類は一般的な下水処理では除去されにくいことが報告されている<sup>2,3)</sup>。さらに、近年、水環境中に存在する医薬品類に耐性を有する薬剤耐性菌に関する問題も懸念されている<sup>4)</sup>。

一方、公共用水域中に存在する医薬品類については、環境省の化学物質環境実態調査をはじめ、都市部の主要河川を対象とした調査研究事例は複数あるが<sup>5-8)</sup>、福井県内河川を対象とした研究報告はない。

そこで、本研究では水環境中の医薬品類の存在状況に関する知見を得るための手段として、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いた医薬品類一斉分析方法の確立を試みた<sup>9)</sup>。また、確立した分析法により、全国で検出例の多い医薬品類について、県内河川水の実態調査を行った。さらに本報では、各採水日における医薬品類濃度の増減に着目し、河川流量との関連性について評価検討した。

## 2. 実験方法

## 2.1 医薬品類の一斉分析法の検討

## 2.1.1 対象とする医薬品類の選定

医薬品類は、都市部の河川を対象とした研究報告において検出例の多いものを選定した<sup>5-8)</sup>。その結果、表1に示した19種類の医薬品類を対象とし、LC/MS/MS法による一斉分析法を検討した。

## 2.1.2 前処理方法および測定条件

試料の前処理は「平成27年度版 化学物質と環境<sup>10)</sup>」で示された試験法を参考とし、前処理における脱水工程とLC/MS/MS分析における移動相について検討した。その結果、最終的な前処理フローは図1、分析条件は表2および表3のとおりとなった。

前処理については、最初に試料200 mLをコンディショニングした固相カラム(Oasis HLB Plus)に通水し

表1 対象医薬品類

医薬品類	用途	使用対象
アジスロマイシン	抗菌薬	人用
アジルサルタン	降圧薬	人用
インドメタシン	鎮痛剤	人用
エリスロマイシン	抗菌薬	両用
カフェイン	眠気防止剤等	人用
カルバマゼピン	抗てんかん薬	人用
クラリスロマイシン	抗菌薬	人用
クロタミトン	鎮痒薬	人用
ケトプロフェン	解熱鎮痛剤	両用
ジクロフェナク	解熱鎮痛剤	人用
スルファメトキサゾール	抗菌薬	両用
スルファメラジン	抗菌薬	動物用
スルファモノメトキシ	抗菌薬	動物用
デキストロメトルファン	鎮咳薬	人用
テルミサルタン	降圧薬	人用
プロプラノロール	降圧薬等	人用
ベザフィブラート	脂質異常症治療薬	人用
リンコマイシン	抗菌薬	両用
レボフロキサシン	抗菌薬	人用

た後、固相カラムを超純水10 mLで洗浄し、窒素通気により固相中の水分を除去した。次に、メタノール5 mLで保持物質を溶出させ、0.5 mLまで濃縮後、メタノール/超純水混合液(1:1)で1 mLに定容して、LC/MS/MS分析用検体とした。

LC/MS/MSの測定条件については表2に示したとおりであり、MRM条件は表3のとおり設定し、標準溶液をLC/MS/MSに注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法により定量した。

測定に使用したLC/MS/MS装置は、LC部はNexera、MS部はLCMS-8050(ともに島津製作所製)で構成され、分離カラムはL-column2 ODS粒子径3 μm 2.1×150 mm(化学物質評価研究機構製)を用いた。移動相には0.1%ギ酸/10 mMギ酸アンモニウムおよびアセ

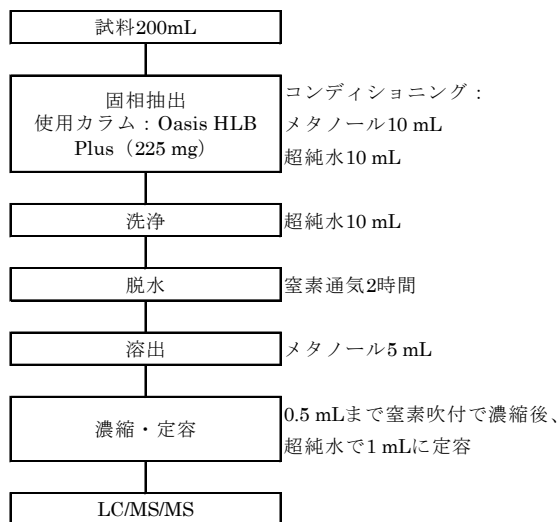


図1 前処理フロー

表2 LC/MS/MS 分析条件

使用機器	LC: Nexera (島津製作所)、 MS: LCMS-8050 (島津製作所)
使用カラム	L-column2 ODS 粒子径3 $\mu$ m 2.1 $\times$ 150 mm (化学物質評価研究機構)
移動相	A: 0.1%ギ酸/10 mM ギ酸アンモニウム B: アセトニトリル
グラジエント条件 (B相)	10%(0 min) $\rightarrow$ 70%(20 min) $\rightarrow$ 95%(20 min) $\rightarrow$ 95%(25 min) $\rightarrow$ 10%(25 min) $\rightarrow$ 10%(30 min)
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
カラム流量	0.2 mL/min
試料注入量	10 $\mu$ L
CIDガス圧力	270 MPa
インターフェース温度	300 $^{\circ}$ C
DL温度	250 $^{\circ}$ C
ヒートブロック温度	400 $^{\circ}$ C
ネブライザーガス流量	3 L/min
ヒーティングガス流量	10 L/min
ドライイングガス流量	10 L/min
検出器電圧	1.7 kV

表3 MRM 条件

医薬品類	イオン化法	定量イオン	確認イオン
アジスロマイシン	ESI(+)	750>591	750>158
アジルサルタン	ESI(+)	457>233	457>279
インドメタシン	ESI(+)	358>139	358>111
エリスロマイシン	ESI(+)	734>158	734>576
カフェイン	ESI(+)	195>138	195>110
カルバマゼピン	ESI(+)	237>194	237>193
クラリスロマイシン	ESI(+)	749>158	749>590
クロタミトン	ESI(+)	204>69	204>136
ケトプロフェン	ESI(+)	255>209	255>105
ジクロフェナク	ESI(+)	296>214	296>215
スルファメトキサゾール	ESI(+)	254>156	254>92
スルファメラジン	ESI(+)	265>156	265>108
スルファモノメトキシ	ESI(+)	281>156	281>108
デキストロメトर्फアン	ESI(+)	272>215	272>171
テルミサルタン	ESI(+)	515>276	515>497
プロプラノロール	ESI(+)	260>116	260>183
ベザフィブラート	ESI(+)	362>316	362>139
リンコマイシン	ESI(+)	407>126	407>359
レボフロキサシン	ESI(+)	362>318	362>261

トニトリルを用い、グラジエント分析を採用した。

### 2. 1. 3 妥当性評価

確立した分析方法の妥当性を評価するため、添加回収試験と定量下限 (MQL) 試験を実施した。添加回収試験は、超純水 200 mL に医薬品標準品が 50  $\mu$ g/L となるように添加し、4 回の繰り返し測定を行った。

MQL は、濃度 0.5  $\mu$ g/L の試料について 9 回の併行測定を行い、得られた定量値の標準偏差 ( $\sigma$ ) を 10 倍した値 (10 $\sigma$ ) とした。

### 2. 2 県内の河川水における実態調査

実態調査は、図2、図3および表4で示した地点 (A~L) の河川水を対象とした。採水は、2022年3月から2023年1月にかけて、2か月に1回の頻度で行った。ただし、2022年3月と2023年1月は異なる日について2回調査を実施した。(以下、1回目の調査結果をn1、2回目をn2と表記することとする。) また、流量と医薬品類濃度の比較のため、各主要河川および支川の上流部に位置する図3で示した地点の水位および流量情報を、

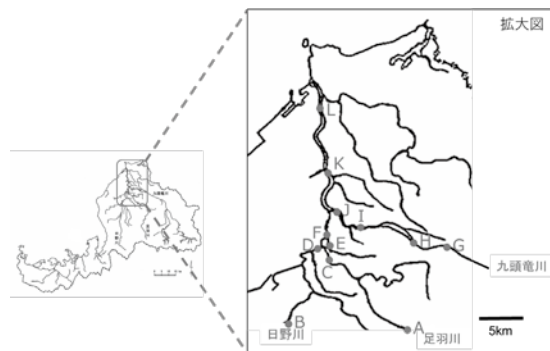


図2 県内河川の調査地点

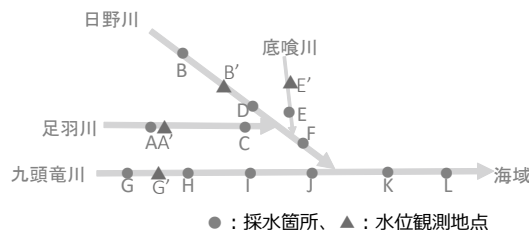


図3 調査地点と水位観測地点の概略図

表4 調査地点の詳細

記号	河川名	地点名
A	足羽川	天神橋
B	日野川	清水山橋
C	足羽川	水越橋
D	日野川	日光橋
E	底喰川	西野橋
F	日野川	明治橋
G	九頭竜川	鳴鹿橋
H	九頭竜川	福松大橋
I	九頭竜川	九頭竜橋
J	九頭竜川	高屋橋
K	九頭竜川	布施田橋
L	九頭竜川	新保橋

河川・砂防総合情報<sup>11)</sup>および水文水質データベース<sup>12)</sup>により入手した。さらに、各地点における過去の水位と流量のデータから水位-流量曲線を作成し、各採水日の水位から当日の推定流量を算出した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 医薬品類の一斉分析法の検討

##### 3.1.1 LC/MS/MS 分析における移動相の検討

過去の研究事例では、LC/MS/MS 分析での有機溶媒系の移動相にメタノールもしくはアセトニトリルが多く用いられている<sup>6,13)</sup>。そのため、これらの2種の移動相の違いについて検討した。

メタノールを用いた場合のカフェインのクロマトグラムを図4(a)に示した。図4(a)のとおり、ピーク形状がブロード状になり、定量に適さないことが判明した。そのため、アセトニトリルを用いたところ、カフェインのピークは図4(b)のとおり明瞭になり、同時分析した他の医薬品類のクロマトグラムにも問題がないことを確認した。これらの結果から、LC/MS/MS 分析における有機溶媒系の移動相としては、アセトニトリルに優位性があると判断した。

##### 3.1.2 前処理フローにおける脱水時間の検討

図1に示した前処理フロー中、固相カラムの脱水時間を10分間とした場合の、添加回収率試験結果を表5に示した。環境省の化学物質環境実態調査の分析法開発<sup>14)</sup>によれば、添加回収率の許容範囲は70~120%とされているが、極性の低いアジスロマイシンおよびクラリスロマイシンの添加回収率は、この範囲よりも低い結果となった。この原因として、溶出前の固相カラム中に残存する水分が問題であると推察されたため、対策として脱水時の窒素通気を2時間程度まで延長し、固相カラム重量が抽出前と同等になるまで十分に乾燥することとした。

##### 3.1.3 妥当性評価

上述した検討で最適化した分析条件による、添加回収試験(n=4)の結果を表6に示した。アジスロマイシンの添加回収率は76%、クラリスロマイシンは80%に向上し、その他全ての医薬品類についても70~120%の範

囲に入り、良好な結果が得られた。

それぞれの医薬品類のMQLを表7に示した。後述する河川水の実態調査では、環境省の「化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン<sup>15)</sup>」に基づき、水生生物の生態リスクを環境中濃度(MEC)と予測無影響濃度(PNEC)を用いて評価する。つまり、PNECよりもMQLが高いと生態リスクが評価できないため、MQL

表5 検討前の添加回収率

医薬品類	回収率(%)	CV(%)
アジスロマイシン	64	5.4
アジルサルタン	106	4.4
インドメタシン	87	2.2
エリスロマイシン	71	2.5
カフェイン	88	2.6
カルバマゼピン	97	1.3
クラリスロマイシン	62	5.7
クロタミトン	79	2.8
ケトプロフェン	84	4.0
ジクロフェナク	93	4.1
スルファメトキサゾール	91	1.0
スルファメラジン	80	1.2
スルファモノメトキシ	83	1.4
デキストロメトルファン	91	1.7
テルミサルタン	81	2.9
プロプラノロール	92	0.5
ベザフィブラート	87	0.5
リンコマイシン	106	1.9
レボフロキサシン	108	3.7

表6 検討後の添加回収試験結果

医薬品類	回収率(%)	CV(%)
アジスロマイシン	76	3.7
アジルサルタン	114	4.2
インドメタシン	97	2.6
エリスロマイシン	77	4.7
カフェイン	85	4.7
カルバマゼピン	85	4.2
クラリスロマイシン	80	2.5
クロタミトン	84	2.5
ケトプロフェン	88	3.2
ジクロフェナク	99	2.3
スルファメトキサゾール	82	1.9
スルファメラジン	77	2.8
スルファモノメトキシ	74	2.4
デキストロメトルファン	90	1.5
テルミサルタン	78	2.7
プロプラノロール	84	1.7
ベザフィブラート	90	4.0
リンコマイシン	87	1.9
レボフロキサシン	85	9.4

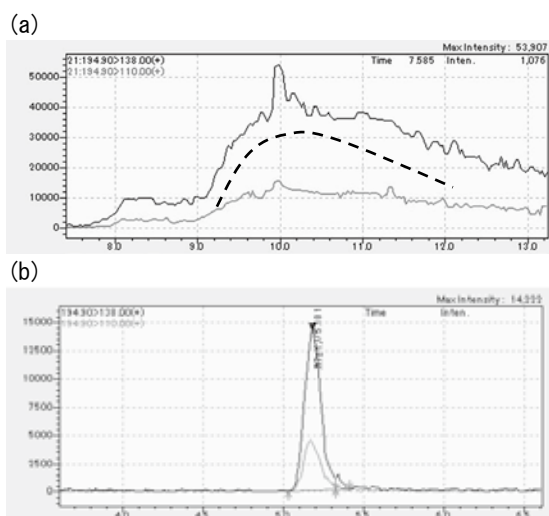


図4 カフェインのクロマトグラム  
(移動相B液: (a)メタノール、(b)アセトニトリル)

は PNEC よりも低値である必要がある。表 7 に示したとおり、全医薬品類の MQL は PNEC よりも低値となり、生態リスク評価が可能であることが確認された。

以上の結果から、本研究の検討で確立した分析法は河川水中の医薬品類の調査に活用できると判定した。

### 3. 2 医薬品類濃度と流域人口および河川流量の関係

#### 3. 2. 1 河川水中の医薬品類の検出状況

河川水の実態調査において、各医薬品類の検出状況を表 8 に示した。

調査対象の 19 種類の医薬品類中、14 種類は定量下限値以上で検出された。なお、地点毎の各医薬品類の濃度については、本書の別報「福井県内の河川水および下水に含まれる医薬品類の実態把握」に詳細を記載した。

#### 3. 2. 2 流域別の医薬品類濃度

各調査地点で検出された医薬品類毎の平均濃度を算出し、全ての医薬品類の平均濃度を合計した値を、各流域の流域人口密度とともに表 9 に示した<sup>16-18)</sup>。なお、定量下限値未満の医薬品類は除外した。

流域毎で濃度の差異が確認され、足羽川流域の上流（地点 A）が最も低く、続いて足羽川流域下流（地点 C）と九頭竜川上中流域（地点 G、H、I、J）がほぼ同程度であり、これらに比べて、日野川流域から九頭竜川下流域（地点 B、D、F、K、L）の濃度は高い傾向がみられた。日野川の支川であり、下水処理場放流口の直下にあたる底喰川の地点 E は特に高値であった。これらの濃度傾向は、表 9 に示す各流域の人口密度との関連性が高く、各流域で発生する生活排水が河川水の医薬品類濃度に影響を与えていることが推察された。

#### 3. 2. 3 医薬品類濃度と河川流量

それぞれの調査地点における河川水中で検出された医薬品類の総濃度について、全調査日の平均値を算出し、その平均濃度に対する各調査日の総濃度の比率を図 5

に示した。なお、マーカーは表 4 に従って、それぞれの調査地点が属する河川別に同じものを使用してプロットした。

医薬品類の総濃度は調査日によって異なり、それぞれの地点の医薬品類総濃度の増減は、同じ河川水中であれば同様の傾向を示した。つまり、図 5 では足羽川で 2022 年 5 月と 2022 年 11 月に高く、日野川と九頭竜川で 2022 年 3 月の 1 回目、2022 年 5 月および 2022 年 11 月に高く、底喰川では 2022 年の 1 月および 2023 年 3 月に高い傾向がみられた。

河川水に流入する医薬品類の発生源としては日常生

表 8 河川水中の医薬品類の検出状況

医薬品類	最小値～最大値
アジスロマイシン	<LOQ～29
アジルサルタン	<LOQ～15
インドメタシン	<LOQ～5
エリスロマイシン	<LOQ～11
カフェイン	<LOQ～248
カルバマゼピン	<LOQ～3
クラリスロマイシン	<LOQ～50
クロタミトン	<LOQ～111
ケトプロフェン	<LOQ～6
ジクロフェナク	<LOQ～8
スルファメトキサゾール	<LOQ～22
スルファメラジン	<LOQ～<LOQ
スルファモノメトキシ	<LOQ～<LOQ
デキストロメトルファン	<LOQ～<LOQ
テルミサルタン	<LOQ～139
プロプラノロール	<LOQ～<LOQ
ベザフィブラート	<LOQ～71
リンコマイシン	<LOQ～<LOQ
レボフロキサシン	<LOQ～3

<LOQ:定量下限値未満 単位:ng/L

表 7 検討後の MQL 試験結果

医薬品類	MQL(ng/L)	PNEC(ng/L)
アジスロマイシン	1.5	19
アジルサルタン	0.5	880000
インドメタシン	1.0	83000
エリスロマイシン	1.0	20
カフェイン	1.2	5200
カルバマゼピン	0.9	30
クラリスロマイシン	0.7	20
クロタミトン	1.9	3500
ケトプロフェン	2.1	160
ジクロフェナク	0.8	66
スルファメトキサゾール	0.8	100
スルファメラジン	0.8	780
スルファモノメトキシ	0.7	570
デキストロメトルファン	0.7	160
テルミサルタン	0.8	1600
プロプラノロール	0.7	10
ベザフィブラート	0.7	10000
リンコマイシン	0.7	78
レボフロキサシン	1.3	79

表 9 各流域における医薬品類濃度

流域	流域人口密度 (人/km <sup>2</sup> )	地点	医薬品類濃度 (ng/L)
足羽川流域	19 <sup>*1</sup>	A	3
		C	17
		G	19
九頭竜川上中流域	55	H	14
		I	18
		J	20
		B	83
日野川流域	330	D	100
		F	83
		K	63
九頭竜川下流域	220	L	80
		E	256
底喰川流域	3400 <sup>*2</sup>	E	256

\*1 A 地点流域の池田町、福井市の旧美山町の流域人口密度とした。

\*2 底喰川に放流される下水処理場の処理人口/流域面積とした。



## 4. まとめ

LC/MS/MS 法による医薬品類の一斉分析法の検討を行った。LC/MS/MS 分析の有機溶媒系の移動相はアセトニトリルが適当であり、前処理工程においては固相カラムの脱水操作が重要であった。最適化した試験法は妥当性評価により、河川水中の医薬品類調査に適用可能であると判定された。

確立した試験法を用いて、福井県内の河川水における医薬品類濃度を調査した。河川水中で多種類の医薬品類が検出され、その濃度は流域や採水日により、差異がみられた。その要因として、医薬品類濃度と流域内の人口密度および河川流量との関連性が確認された。この結果より、流域人口が多いほど、つまり、流域内で発生する生活排水が多いほど負荷量が増えることが示唆された。また、河川流量が少ないほど希釈効果が小さくなるため、医薬品類濃度が高くなると考えられた。

## 参考文献

- 1) 清野敦子, 古庄早苗, 益永茂樹 : わが国の水環境中における人用・動物用医薬品の存在, 水環境学会誌, **27**(11), 685-691(2004)
- 2) 成宮正倫, 奥田隆, 中田典秀, 山下尚之, 田中宏明, 佐藤和志, 末岡峯数, 大岩俊雄 : 下水処理過程における医薬品類の存在実態と挙動, 環境工学研究論文集, **46**,175-186(2009)
- 3) 真野浩行, 岡本誠一郎 : 都市河川における医薬品類の挙動と水生生態系への影響, 土木技術資料, **57**(2), 20-23(2015)
- 4) 木下輝明, 小田智子, 渡邊喜美代, 山崎貴子, 飯田春香, 角田徳子, 小杉有希, 村上昂, 井田美樹, 斎藤育江, 猪又明子, 守安貴子 : 東京都における環境水中抗微生物薬の存在実態及び河川水中カルバペネム耐性菌の検出状況, 東京都健康安全研究センター研究年報, **71**, 225-232(2020)
- 5) 鈴木俊也 : 水環境中のヒト用医薬品の存在実態及び環境中濃度の予測, 東京都健康安全研究センター研究年報, **63**, 69-81(2012)
- 6) 西野貴裕, 加藤みか, 宮沢佳隆, 東條俊樹, 市原真紀子, 浅川大地, 松村千里, 羽賀雄紀, 吉識亮介, 長谷川瞳, 宮脇崇, 高橋浩司, 片宗千春, 下間志正 : 国内都市域の水環境中における生活由来化学物質の環境実態解明及び生態リスク評価, 環境化学, **30**, 37-56(2020)
- 7) 宇野映介, 豊福星洋, 戸渡寛法, 平野真悟, 小原浩史, 松尾友香 : 福岡市における水環境中の PPCPs の存在実態と季節変動および生態リスク初期評価, 福岡市保健環境研究所報, **39**, 51-57(2014)
- 8) 小森行也, 鈴木穰 : 生活排水の処理状況が異なる都市域小河川における医薬品の存在実態と生態リスク初期評価, 水環境学会誌, **32**, 133-138(2009)
- 9) 和田理誠, 三田村啓太 : 医薬品類一斉分析法の検討, 福井県衛生環境研究センター年報, **20**, 51-53(2022)
- 10) 環境省 : 平成 27 年度版化学物質と環境 <https://www.env.go.jp/chemi/kurohon/2015/index.html>
- 11) 福井県 : 河川・砂防総合情報

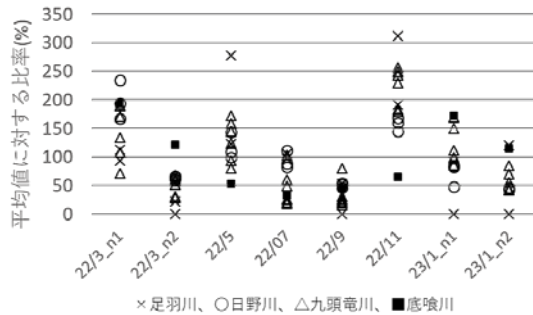


図5 医薬品類総濃度の平均値に対する比率

表10 医薬品類総濃度と流量の相関係数

河川名	地点	流量
足羽川	A	-0.60
	C	-0.56
日野川	B	-0.65
	D	-0.60
	F	-0.32
九頭竜川	G	-0.64
	H	-0.86
	I	-0.96
	J	-0.82
	K	-0.90
	L	-0.90

表11 地点Eの医薬品類総濃度と水位の相関係数

河川名	地点	水位
底喰川	E	-0.82

活等の生活排水が考えられ、その発生量が日ごとに大きく変動するとは考えにくい。そのため、各河川における河川水中の医薬品類濃度の増減には河川流量が影響していると考えられた。つまり、河川流量が少なければ、流入した医薬品類の濃度を薄める効果が小さくなり、河川水中の医薬品類濃度は高くなると考えられる。そこで、医薬品類濃度と河川流量の関連性について評価した。

医薬品類総濃度と各河川における河川流量の相関係数を表10に示した。ただし、底喰川については流量データがなかったため、医薬品類総濃度と水位との相関係数を算出し、表11に示した。

表10のとおり、多数の地点において医薬品類総濃度と河川流量の間には強い負の相関が示され、表11の医薬品類総濃度と水位についても負の相関がみられた。このことは、河川流量が多いと希釈効果が大きくなり、河川水中の医薬品類濃度が低くなり、また、河川流量が少ないと希釈効果が小さくなり、河川水中の医薬品類濃度が高くなることを意味している。つまり、河川水中の医薬品類濃度は河川流量の影響を受けやすいことが示された。

- <https://sabo.pref.fukui.lg.jp/bousai/main.html>
- 12) 国土交通省：水文水質データベース  
<http://www1.river.go.jp/>
- 13) 小西 千絵, 宝輪 勲, 中田 典秀, 小森 行也, 鈴木 穰, 田中 宏明：環境中医薬品の LC・MS/MS による一斉分析法の検討, 環境工学研究論文集, **43**, 73-82(2006)
- 14) 環境省：化学物質環境実態調査実施の手引き(令和2年度版)(2021)
- 15) 環境省：化学物質の環境リスク評価関連  
<http://www.env.go.jp/chemi/risk/index.html>
- 16) 福井県：河川整備計画  
<https://www.pref.fukui.lg.jp/doc/kasen/kasenseibi.html>
- 17) 福井県：環境白書(令和4年度版)(2023)
- 18) 国土交通省：九頭竜川流域誌  
<https://www.kkr.mlit.go.jp/fukui/siryou/grabia/index.html>

## 福井県内の河川水および下水に含まれる医薬品類の実態把握

和田理誠・三田村啓太

Occurrence of PPCPs in River Water and Wastewater in Fukui Prefecture

Risei WADA, Keita MITAMURA

福井県内の河川水および下水処理場の流入水と放流水について、医薬品類の実態調査を実施した。河川水については、人口密度の高い流域において高濃度で検出される傾向がみられた。一方、下水処理場については、県内で使用量の多い医療用医薬品の多くが、流入水で高濃度を示した。また、放流水中で高濃度を示した医薬品類の多くは河川水中でも高濃度で検出され、市街地等からの下水を集め放流する下水処理場が河川に対する大きな負荷源となっていることが示唆された。複数の抗菌薬は、下水処理場での除去率が低く、河川水中でも高濃度で検出され、特にクラリスロマイシンは、河川水中の生態リスク評価で注意を要するべき医薬品類であることが確認された。

## 1. はじめに

近年、ヒトの病気や怪我の治療に用いられている医薬品類が新たな環境汚染物質として注目されている<sup>1)</sup>。使用された医薬品類の一部は、糞便やし尿、その他生活排水として排出され、下水道や浄化槽などの生活排水処理施設によっても除去されずに残存したものは環境中に排出される<sup>2,3)</sup>。医薬品類は生体に対して生理活性があり、低濃度で特異的に作用するため、環境中において、水生生物への悪影響や水環境中における新たな薬剤耐性菌の出現等も招くことが懸念される<sup>4)</sup>。

福井県の令和3年度末における汚水処理人口普及率は97.1%であり、その内、下水道が82.2%を占めている<sup>5)</sup>。下水道については、その処理水が河川へ流入する医薬品類に対する寄与が大きいとする報告があるものの<sup>6)</sup>、国内外を問わず、河川水と下水の関連性を詳細に調査した研究事例は少ない。

以上のような背景から、本研究では、県内河川中の医薬品類濃度の実態を把握するとともに、その主要な負荷源と考えられる下水中の医薬品類濃度を処理前後で調査し、得られた結果について考察を行った。

## 2. 実験方法

## 2.1 分析方法

表1に示した都市部の河川水で過去に検出例の多い19種類の医薬品類を対象とし<sup>7-10)</sup>、LC/MS/MS法による一斉分析法で定量した。分析方法は、本書の別報「福井県内の河川水中の医薬品類濃度と河川流量との関係」に詳細を記載した。分析用試料としては、河川水は採水した試料をそのまま、下水はガラス繊維ろ紙(GMF150、孔径1 μm、Whatman製)によりろ過し、ろ液を超純水により10倍希釈したものをを使用した。

## 2.2 河川水の実態調査

河川水の実態調査は、図1、図2および表2で示した地点(A~L)を対象とした。採水は、2022年3月から

表1 対象医薬品類

医薬品類	用途	使用対象
アジスロマイシン	抗菌薬	人用
アジルサルタン	降圧薬	人用
インドメタシン	鎮痛剤	人用
エリスロマイシン	抗菌薬	両用
カフェイン	眠気防止剤等	人用
カルバマゼピン	抗てんかん薬	人用
クラリスロマイシン	抗菌薬	人用
クロタミトン	鎮痒薬	人用
ケトプロフェン	解熱鎮痛剤	両用
ジクロフェナク	解熱鎮痛剤	人用
スルファメトキサゾール	抗菌薬	両用
スルファメラジン	抗菌薬	動物用
スルファモノメトキシシン	抗菌薬	動物用
デキストロメトルファン	鎮咳薬	人用
テルミサルタン	降圧薬	人用
プロプラノロール	降圧薬等	人用
ベザフィブラート	脂質異常症治療薬	人用
リンコマイシン	抗菌薬	両用
レボフロキサシン	抗菌薬	人用

2023年1月にかけて、2か月に1回の頻度で行った。ただし、2022年3月と2023年1月は異なる日について2回調査を実施した。

調査結果で最高値を示した濃度について、環境省の「化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン<sup>11)</sup>」を参考に、MEC(環境中濃度)をPNEC(予測無影響濃度)で除した値による生態リスク評価を行った。なお、ここで使用したPNECデータは文献情報から収集した<sup>11-14)</sup>。

## 2.3 下水処理場流入水と放流水の調査

下水処理場の流入水と放流水に含まれる医薬品類について調査した。調査対象としたのは、県内の下水処理場3か所(X、Y、Z)であり、Xは2022年5月、8月、10月および12月に、YおよびZは2022年8月、10月および12月に採水を行った。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 河川水における実態調査

##### 3.1.1 河川水中の医薬品濃度

各調査地点の河川水で検出された医薬品類の平均濃度を図3に、総濃度に占める各医薬品類の割合を図4に示した。横軸については、流域毎に区分した。全流域に共通して、カフェイン、クロタミトンおよびテルミサルタンが他の医薬品類に比べて高濃度で検出されていた。過去の調査報告においても、これらの医薬品類の検出濃度は高い傾向にあり<sup>8)</sup>、本調査との整合性がみられた。

また、日野川流域から九頭竜川河口および底喰川は、足羽川流域および九頭竜川上中流域と比較して、多種類の医薬品類が検出されていた。これらの河川の流域には、大規模な病院が多数存在しており、また、病院排水中では多種類の医薬品類が高濃度で検出された報告事例があるため<sup>15)</sup>、病院排水が下水処理場を介し、流入したと考えられた。各流域における医薬品濃度の差異につい

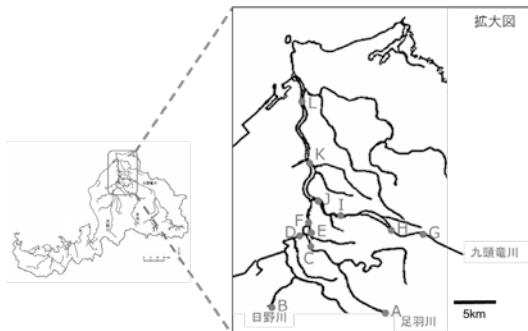


図1 県内の調査地点

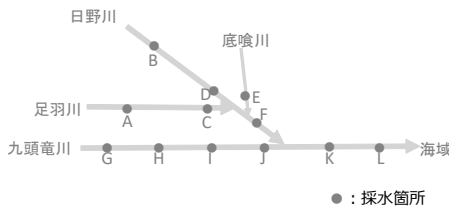


図2 県内の調査地点の概略図

表2 調査地点の詳細

記号	河川名	地点名
A	足羽川	天神橋
B	日野川	清水山橋
C	足羽川	水越橋
D	日野川	日光橋
E	底喰川	西野橋
F	日野川	明治橋
G	九頭竜川	鳴鹿橋
H	九頭竜川	福松大橋
I	九頭竜川	九頭竜橋
J	九頭竜川	高屋橋
K	九頭竜川	布施田橋
L	九頭竜川	新保橋

ては、本書の別報「福井県内の河川水中の医薬品濃度と河川流量との関係」より、各流域の人口密度と医薬品濃度には関連性があり、生活排水が医薬品濃度に影響を与えていることが推察されたが、この結果より大規模な病院からの下水も要因の一つと考えられた。

また、多種類の医薬品類が特に高濃度を示した底喰川流域の地点Eは、下水処理場放流口の直下にあたり、かつ、他の地点と比べて河川流量が少ない。このことから、放流水中の医薬品類が、河川水で希釈される程度が他地点よりも低く、高値を示したのと考えられる。このことは、これまでの都市部の河川を対象とした研究調査においても、流量が少ない小河川に下水処理場放流水が流入する地点において医薬品濃度が特に高値を示した報告事例<sup>9)</sup>があり、本調査結果と整合する。

##### 3.1.2 河川水の生態リスク評価

次に、各地点での河川水の調査結果で最高値を示した濃度を対象として実施した、生態リスク評価結果を表3に示した。なお、表の最下欄には都市部河川を対象とした過去の調査報告の最高値を示した<sup>8-10)</sup>。また、全ての地点で定量下限値未満の医薬品類は除外した。

表3に示したとおり、アジスロマイシンを除くほとんどの医薬品類について、最高濃度を示したのは地点Eであった。ただし、それらの最高値は都市部河川の最高値と比べて1~2桁オーダー低い結果であった。都市部の流域人口密度は、地点Eの位置する底喰川に比べ約1桁高く、これは都市部では河川流量に対して流入負荷量がより多いことを意味する。したがって、都市部は地点Eに比べ高濃度を示し、生態リスクも高まるものと考えられる。これら市街地の河川への流入負荷は下水処理場を介しており、本調査の地点Eでは河川流量に占める下水処理場放流水の割合は1割程度であるのに対し、都市部で最高値を示した地点の混入割合が9割程度と高いことと合致している<sup>16)</sup>。

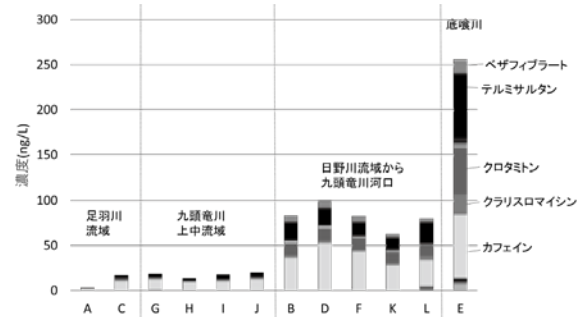


図3 各流域における医薬品濃度

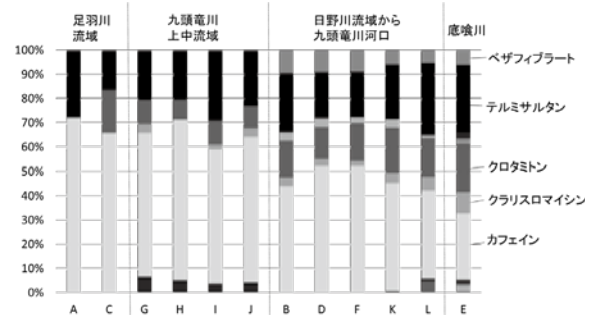


図4 各流域における医薬品濃度の割合

次に、生態リスクの高い医薬品類の種類に着目すると、多くの地点において、抗菌薬であるエリスロマイシンとクラリスロマイシンの生態リスクが 0.1 以上となった。これは、ガイドライン判定によれば、「情報収集に努める必要があるレベル」に該当する。抗菌薬は概して多くの地点で検出されるとともに、PNEC が低く、生態リスクが高くなる傾向があるが、エリスロマイシンとクラリスロマイシンは特にリスクが高く、注意すべき医薬品類に該当することが確認された。

### 3. 2 下水処理場における実態調査

#### 3. 2. 1 流入水中の医薬品類濃度

下水処理場の流入水で検出された医薬品類濃度の平均値を算出し、結果を図5に示した。また、厚生労働省のNDBオープンデータ<sup>17)</sup>から2020年度に福井県で使用された医薬品量を算出したものを図6に示した。なお、このデータは医療用医薬品に関する使用量であり、一般用医薬品は含まれていない点に留意する必要がある。

図5および図6より、ケトプロフェン、ベザフィブラートおよびクラリスロマイシン等の使用量が多い医薬品類については、流入水の医薬品類濃度も高い傾向がみられた。ただし、最も使用量が多いケトプロフェンについては、下水処理場流入水中の医薬品類濃度は第4位であり、使用量と医薬品類濃度の順位が一致していない。この理由として、ケトプロフェンはテープ剤として使用されることが多く、人体への吸収量が少ないため、使用量に対して排泄物として下水に混入する比率が少ないことが要因として考えられた。このように、下水に流入する医薬品類の量は、使用量だけでなく使用方法の違いが影響することが示唆された。

また、流入水中に高濃度で検出されたカフェインについては、図6に示したとおり医療用医薬品としては使用されていないことから、流入水中のカフェインはコーヒー等の飲料に由来するものと推察された。

#### 3. 2. 2 放流水中の医薬品類濃度

下水処理場の放流水中で検出された医薬品類濃度の平均値を図7に示した。また、比較のため、全調査地点の河川水中の医薬品類濃度の平均値を算出し、図8に示した。放流水中に高濃度で検出されたのはテルミサルタン、クロタミトンおよびクラリスロマイシンであり、河川水でも高濃度で検出されていた。このことから、河川水中に含まれる医薬品類の負荷源として、下水処理場放

流水の寄与率が高いと推察された。

一方、カフェインについては、下水処理場放流水中の濃度は先述した医薬品類に比べると低いが、河川水中では最も高濃度で検出されている。この事実は、河川へ医薬品類を流入させる負荷源として下水処理場以外があることを示唆しているが、本調査ではその負荷源の特定には至らなかった。

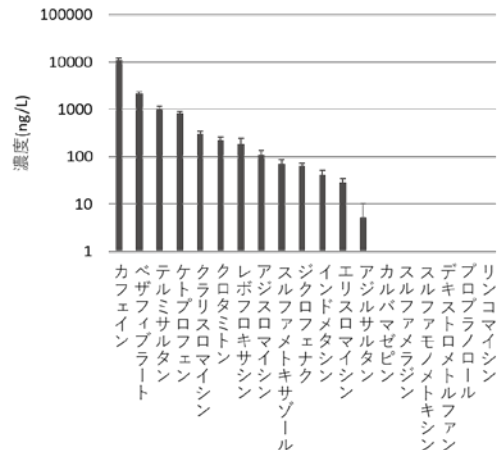


図5 下水処理場流入水中の医薬品類濃度

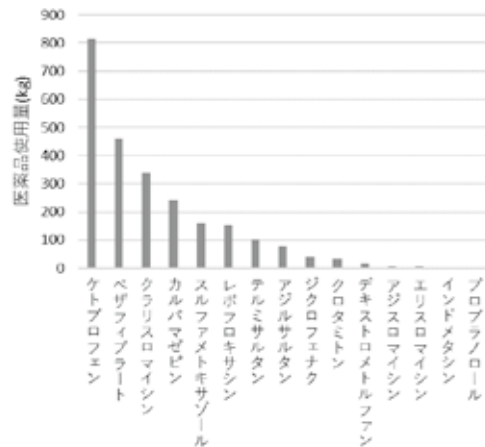


図6 県内の医療用医薬品の使用量

表3 河川水の生態リスク評価

分類	抗菌薬					眠気防止剤	抗てんかん薬	降圧薬		脂質異常症治療薬	鎮痛剤	解熱鎮痛剤		鎮痙剤
	レボフロキサシ	アジスロマイシン	エリスロマイシン	クラリスロマイシン	スルファメトキサゾール			カフェイン	カルバマゼピン			アジサルタン	テルミサルタン	
A	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	7	<LOQ	<LOQ	4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
B	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10	3	82	<LOQ	<LOQ	42	18	<LOQ	5	<LOQ	32
C	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	19	<LOQ	<LOQ	7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	9
D	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10	<LOQ	131	<LOQ	<LOQ	40	27	<LOQ	6	<LOQ	36
E	3	4	11	50	22	248	3	15	139	71	5	5	8	111
F	<LOQ	<LOQ	<LOQ	7	3	127	<LOQ	<LOQ	33	28	<LOQ	5	<LOQ	31
G	<LOQ	<LOQ	4	3	<LOQ	23	<LOQ	<LOQ	11	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	8
H	<LOQ	<LOQ	3	<LOQ	<LOQ	17	<LOQ	<LOQ	10	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	6
I	<LOQ	<LOQ	3	3	<LOQ	19	<LOQ	<LOQ	14	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	8
J	<LOQ	<LOQ	4	3	<LOQ	25	<LOQ	<LOQ	13	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	9
K	<LOQ	<LOQ	3	8	<LOQ	72	<LOQ	<LOQ	29	14	<LOQ	6	<LOQ	36
L	<LOQ	29	3	11	3	49	3	<LOQ	46	10	<LOQ	4	<LOQ	38
PNEC	79	19	20	20	100	5200	30	880000	1600	10000	83000	160	66	3500
都市部最高値	110	220	230	1200	230	12000	700	24	1500	450	180	130	2200	1700

<LOQ:定量下限値未満

1>MEC/PNEC≥0.1

MEC/PNEC≥1

単位: ng/L



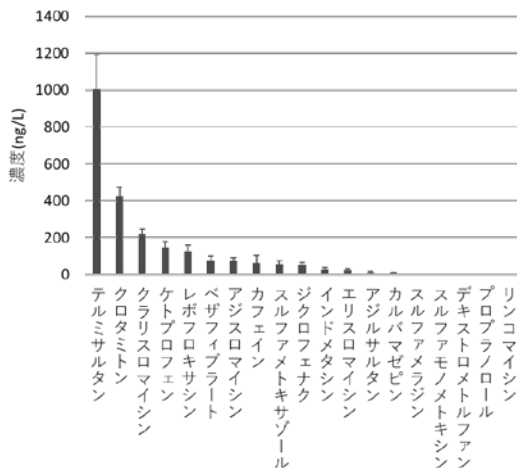


図7 下水処理場放流水中の医薬品類濃度

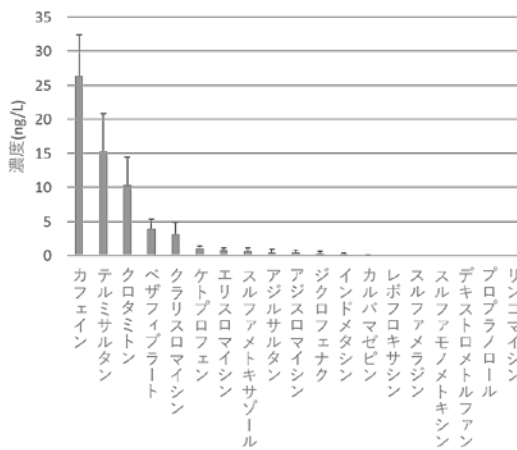


図8 河川水中の医薬品類濃度

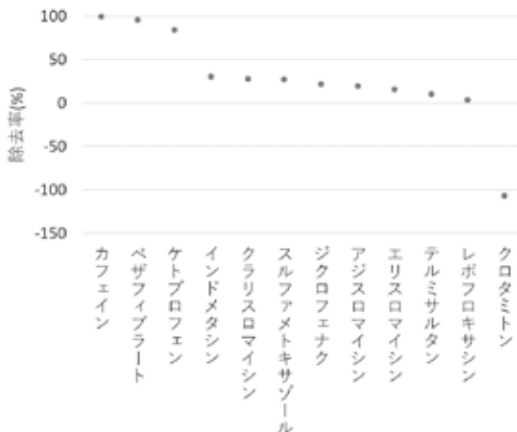


図9 医薬品類の除去率

表4 下水処理場放流水の生態リスク評価

分類	抗菌薬					眠気防止剤	抗てんかん薬	降圧薬		脂質異常症治療薬	鎮痛剤	解熱鎮痛剤		鎮痙剤
	レボフロキサシン	アジスロマイシン	エリスロマイシン	クラリスロマイシン	スルファメトキサゾール			アジメサルタン	テルミサルタン			ベザフィブラート	インドメタシン	
X	265	134	33	387	80	383	<LOQ	<LOQ	1814	242	71	267	113	509
Y	217	93	36	266	217	134	45	46	1003	147	78	249	83	696
Z	<LOQ	50	36	204	<LOQ	<LOQ	30	59	565	25	<LOQ	53	33	577
PNEC	79	19	20	20	100	5200	30	880000	1600	10000	83000	160	66	3500

<LOQ:定量下限値未満

1 > MEC/PNEC ≥ 0.1

10 > MEC/PNEC ≥ 1

MEC/PNEC ≥ 10

単位: ng/L

また、レボフロキサシンについては、下水処理場放流水中の濃度は高い方から第5位であったが、河川水中では第14位であった。レボフロキサシンは光分解しやすく、底質にも吸着しやすいとされているため<sup>19)</sup>、河川での流下過程で濃度が減衰した可能性が考えられる。

### 3. 2. 3 下水処理過程における医薬品類の除去率

下水処理場毎に流入水と放流水の濃度の差から医薬品類の除去率の平均値を算出した結果を図9に示した。

カフェイン、ベザフィブラートおよびケトプロフェンの除去率は80%以上であり、特にカフェインの除去率は99%以上であった。しかし、上記以外の医薬品類の除去率は低く、放流水中において特に高濃度で検出されたテルミサルタンの除去率は約10%であった。また、クロタミトンは-100%程度となり、除去率が負となったことは、流入水よりも放流水中の濃度が高いことを示している。これについては、既報でも同様の報告があり、生体内で形成された抱合体が、下水処理により脱抱合することが原因と考えられている<sup>19)</sup>。

なお、抗菌薬のスルファメトキサゾール、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンおよびレボフロキサシンについても50%以下の低値であった。抗菌薬については、都市部の下水処理場でも除去率が低いことが報告されている<sup>2)</sup>。

### 3. 2. 4 下水処理場放流水による生態リスク評価

それぞれの下水処理場放流水で検出された最高値について生態リスク評価を行った結果を表4に示した。なお、全ての下水処理場で定量下限値未満の医薬品類は除外した。

抗菌薬の生態リスクは高い傾向にあり、特にクラリスロマイシンの生態リスクは10以上となった。クラリスロマイシンは下水処理場での除去率が低く、放流水中に比較的高濃度で含まれる。そのため、河川水中でも検出されやすく、かつ、生態リスクが高いレベルに該当するため、最も注意を払うべき医薬品の一つであると考えられた。

## 4. まとめ

福井県内の河川水および下水処理場の流入水と放流水に含まれる医薬品類について実態調査を行うとともに、生態リスク評価を行った。その結果、以下のことが分かった。

- 1) 河川水中の医薬品類濃度は、人口の多い流域において高濃度で検出された。このことから、それぞれの地域で発生する生活排水が河川水の医薬品類濃度に影響を与えていると考えられた。
- 2) 河川水中に含まれる医薬品類濃度の最高値は、都市部と比較して1~2桁オーダー低い結果となった。この

原因の一つとして、流域人口密度、河川流量に占める下水処理場放流水の混入割合の差異が影響していると推察された。

- 3) 使用量の多い医療用医薬品が、下水処理場流入水中に高濃度で検出される傾向がみられた。ただし、使用方法の違いにより下水への流入が少ないと考えられる医薬品類があった。また、下水中のカフェインは飲料由来と考えられた。
- 4) 下水処理場放流水中に高濃度で検出された医薬品類が、河川水中でも高濃度で検出されたことから、河川水中に含まれる医薬品類の負荷源として、下水処理場放流水の寄与は大きいと考えられた。ただし、カフェインについては下水処理で除去率が高いにもかかわらず、河川水中では最も高濃度で検出されていることから、下水処理場以外の負荷源が存在することが示唆された。
- 5) 河川水と下水処理場放流水の生態リスク評価により、下水処理場で生態リスクが高い傾向にあった抗菌薬の生態リスクは河川水中においても高く、特にクラリスロマイシンは高値であった。クラリスロマイシンは下水処理場での除去率が低いことから、河川水中でも検出されやすく、最も注意をはらうべき医薬品類の一つであると考えられた。

## 参考文献

- 1) 清野敦子, 古庄早苗, 益永茂樹: わが国の水環境における人用・動物用医薬品の存在, 水環境学会誌, **27**(11), 685-691(2004)
- 2) 成宮正倫, 奥田隆, 中田典秀, 山下尚之, 田中宏明, 佐藤和志, 末岡峯数, 大岩俊雄: 下水処理過程における医薬品類の存在実態と挙動, 環境工学研究論文集, **46**, 175-186(2009)
- 3) 真野浩行, 岡本誠一郎: 都市河川における医薬品類の挙動と水生生態系への影響, 土木技術資料, **57**(2), 20-23(2015)
- 4) 木下輝明, 小田智子, 渡邊喜美代, 山崎貴子, 飯田春香, 角田徳子, 小杉有希, 村上昂, 井田美樹, 斎藤育江, 猪又明子, 守安貴子: 東京都における環境水中抗微生物薬の存在実態及び河川水中カルバペネム耐性菌の検出状況, 東京都健康安全研究センター研究年報, **71**, 225-232(2020)
- 5) 福井県ホームページ:  
<https://www.pref.fukui.lg.jp/doc/kasen/gesui/title-fu-kyu.html>
- 6) 杉下 寛樹, 山下 尚之, 田中 宏明, 田中 周平, 藤井 滋穂, 宝輪 勲, 小西 千絵: 淀川流域の下水処理場放流水と支川における医薬品の存在実態, 環境工学研究論文集, **44**, 307-312(2007)
- 7) 鈴木俊也: 水環境中のヒト用医薬品の存在実態及び環境中濃度の予測, 東京都健康安全研究センター研究年報, **63**, 69-81(2012)
- 8) 西野貴裕, 加藤みか, 宮沢佳隆, 東條俊樹, 市原真紀子, 浅川大地, 松村千里, 羽賀雄紀, 吉識亮介, 長谷川瞳, 宮脇崇, 高橋浩司, 片宗千春, 下間志正: 国内都市域の水環境における生活由来化学物質の環境実態解明及び生態リスク評価, 環境化学, **30**, 37-56(2020)
- 9) 宇野映介, 豊福星洋, 戸渡寛法, 平野真悟, 小原浩史, 松尾友香: 福岡市における水環境中の PPCPs の存在実態と季節変動および生態リスク初期評価, 福岡市保健環境研究所報, **39**, 51-57(2014)
- 10) 小森行也, 鈴木穰: 生活排水の処理状況が異なる都市域小河川における医薬品の存在実態と生態リスク初期評価, 水環境学会誌, **32**, 133-138(2009)
- 11) 環境省: 化学物質の環境リスク評価関連  
<http://www.env.go.jp/chemi/risk/index.html>
- 12) 南山瑞彦, 小森行也, 北村友一, 村山康樹, 鈴木穰, 北村清明: 生理活性物質の水環境中での挙動と生態系影響の評価方法に関する研究, 平成 22 年度下水道関係調査研究年次報告書集, 土木研究所資料第 4212 号, 239-265(2011)
- 13) 高澤嘉一, 西野貴裕, LC-MS/MS による分析を通じた生活由来物質のリスク解明に関する研究, 第 36 回全国環境研究所交流シンポジウム予稿集, 2-3(2021)
- 14) European Medicines Agency: Assessment report  
[https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/ent-report/edarbi-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/ent-report/edarbi-epar-public-assessment-report_en.pdf)
- 15) Azuma T: Newly designed water treatment systems for hospital effluent, Yakugaku Zasshi, **138**(3), 289-296(2018)
- 16) 宮原正太郎, 谷口千歳: 御笠川浄化センター放流水における水質改善の背景, 福岡市保健環境研究所報, **27**, 97-100(2001)
- 17) 厚生労働省ホームページ:  
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/000177182.html>
- 18) 花本征也: 確率論的モデルと現地調査とに基づく河川流下過程における医薬品類の光分解に関する研究, 博士論文(2013)
- 19) 小森行也, 岡安祐司, 鈴木穰, 南山瑞彦: 化学物質から市民の生活環境を守る下水道, 土木技術資料, **54**(12), 14-17(2012)

# 新型コロナウイルス感染症疑い検体における 他の呼吸器ウイルス検出状況について

高橋美帆・小和田和誠・坂井伸成・永田暁洋・岩崎理美・横山孝治・東方美保

## Detection of Other Respiratory Viruses in Suspected COVID-19 Specimens

Miho TAKAHASHI, Kazuaki KOWADA, Nobushige SAKAI,  
Akihiro NAGATA, Satomi IWASAKI, Koji YOKOYAMA, Miho TOHO

### 1. はじめに

2019年12月に中国武漢市を中心に流行が広がった新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、現在も変異を繰り返しながら流行を繰り返している。2020年1月28日に日本では指定感染症に定められ、全数届出対象疾患とされた。福井県衛生環境研究センター（以下、「当センター」）においても、COVID-19疑い検体が初めて搬入された2020年2月17日から新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の検査を実施してきた。2022年3月31日時点で4,485件の陽性を確認しているが、発熱や呼吸器疾患様症状を呈しているにもかかわらず陰性と判定された患者検体は数多く存在していた。また、人々の感染予防対策の徹底や軽症者の受診控え、重い呼吸器症状を呈した患者の多くがCOVID-19疑い例となったために、当センターに搬入されたインフルエンザやインフルエンザ様疾患の検体は著しく減少した<sup>1,2)</sup>。そのため、コロナ禍における県内のCOVID-19以外の呼吸器感染症の流行状況は不明瞭であった。

COVID-19が疑われた患者の中に他の呼吸器感染症ウイルスによる患者が紛れ込む可能性が考えられたため、発熱や呼吸器疾患様症状を呈しているが、2020年2月から2022年3月までに当センターで実施したSARS-CoV-2遺伝子検査では陰性となった検体について、代表的な呼吸器ウイルスの検出を試みたので報告する。また、同期間中の感染症発生動向調査事業において、本県で報告された呼吸器感染症の検出状況と比較をしたので併せて報告する。

### 2. 方法

#### 2.1 検査対象

2020年2月17日から2022年3月21日までに、COVID-19疑いとして採取された唾液もしくは鼻咽頭拭い液検体のうち、SARS-CoV-2遺伝子検査が陰性かつ肺炎症状を呈した患者もしくは発熱、鼻症状、喉症状、頭痛、倦怠感のうち2つ以上の症状を呈した患者の検体を対象とした。また、疫学情報から同居と推測された患者の検体は、代表として1検体を選択した。さらに、COVID-19の流行状況によって搬入検体数や陰性検体数の変動が大きかったため、毎月の上限を45検体とした。計561例の検体を供試した。年別の検体数は、2020年は362検体、2021年は147検体、2022年は52検体であった。

感染症発生動向調査事業においては、2020年2月4日から2022年3月31日までに、インフルエンザまたはインフルエンザ様疾患疑いとして採取された鼻咽頭拭い液、

63検体を供試した。年別の検体数は、2020年は32検体、2021年は27検体、2022年は4検体であった。

#### 2.2 対象ウイルス

A, B型インフルエンザウイルス（FluA型, FluB型）、AH1pdm インフルエンザウイルス（Flu A(H1N1)pdm）、RSウイルス（RSV）、ヒトメタニューモウイルス（HMPV）、ライノウイルス（HRV）、パレコウイルス（HPeV）、ヒトボカウイルス（HBoV）、アデノウイルス（HAdV）、パラインフルエンザウイルス1~4型（HPIV1~4型）、エンテロウイルス（EV）、コロナウイルス（HCoV）229E・OC43・NL63・HKU1の18種類を対象とした。

また、発生動向調査事業においてはFlu4種（AH1pdm, AH3, B型山形系統, B型ビクトリア系統）、RSV, HMPV, HBoV, HRV/EV, HAdV, HPIV1~4型, HCoV4種（229E, OC43, NL63, HKU1）を対象とした。

#### 2.3 検査方法

検査はMalhotraらの方法<sup>3)</sup>に従い、マルチプレックスリアルタイムRT-PCR法で行った。

発生動向調査事業においては、Fluの検出は国立感染症研究所のマニュアル<sup>4)</sup>に従い、リアルタイムRT-PCR法で行った。またRSVおよびHCoV4種は既報<sup>5)</sup>に従い、それ以外のウイルスについては国立感染症研究所のマニュアル<sup>6-10)</sup>に従い、RT-PCR法で検査を実施した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 供試検体の年代別割合

供試検体の患者年齢は0歳2か月から98歳までの幅広い年齢層（中央値：39歳）であり、10歳未満の検体数が52検体（9%）、10代が53検体（9%）、20代が94検体（17%）、30代が89検体（16%）、40代が68検体（12%）、50代が62検体（11%）、60代が59検体（11%）、70代が38検体（7%）、80代以上が46検体（8%）であった（図1）。成人の検体は全検体の8割以上を占めていた。

#### 3.2 呼吸器感染症ウイルスの検出結果

供試した561検体のうち、82検体から13種のウイルスが検出され、検出率は14.6%であった。HRVは25例（検出率：4.5%）、HPIVは15例（2.7%）検出され、その内訳は2型が1例、3型が10例、4型が4例であった。HMPVは11例（2.0%）、HCoVは11例（2.0%）で、その内訳は、NL63が2例、OC43が9例であった。HAdVは10例（1.8%）、HBoVは9例（1.6%）、



RSVは3例(0.5%)、FluとEVは2例ずつ(0.4%)検出され、FluはどちらもB型(ビクトリア系統)であった(表1)。また、重複感染例が5例あり、その内訳は、HPIV2型とHMPV、HCoV OC43とHCoV NL63とHAdV、HAdVとHBoV、HAdVとRSV、HAdVとHPIV3型であった。

年代別検出率は、10歳未満の小児や10代において高く、20代および50代以上で低い傾向がみられた(表2)。

多検体(n>5)から検出されたウイルスについて、患者の年齢層で比較すると、HRVやHMPVは10歳未満から80代まで幅広い年齢層で検出されていた。一方で、HPIVやHAdVは10歳未満から40代で検出され、50代以上の検出はなかった。また、HMPVやHRV、HPIV、HAdVの年代別検出率は成人が半数以上の割合を占めていた(図2)。HMPVでは11症例中5症例において肺炎等の下気道症状がみられ、その年代内訳は10歳未満、30代、40代、70代、80代に1症例ずつであった。

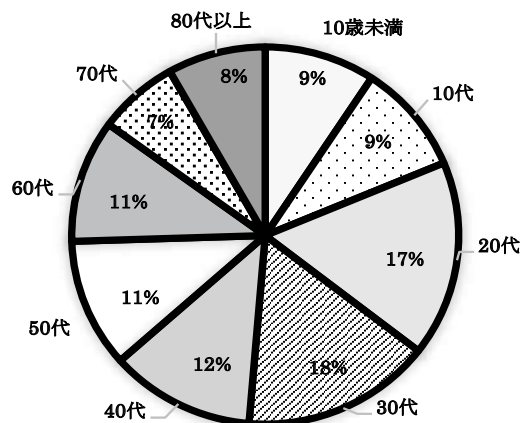


図1 供試検体の患者年代別割合

表1 検体採取月別・ウイルス別検出結果

検体採取月	対象検体数	検出数	検出ウイルス内訳									
			Flu	RSV	HMPV	HRV	HPIV	HPeV	HBoV	HAdV	EV	HCoV
2020年 2月	24	11	1	1	4	1	-	-	-	1	-	3
3月	42	11	1	-	4	1	2	-	2	-	-	2
4月	45	5	-	-	3	-	-	-	-	1	-	3
5月	45	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
6月	39	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7月	39	3	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
8月	41	4	-	-	-	3	-	-	-	1	-	-
9月	34	4	-	-	-	3	-	-	-	1	-	-
10月	32	5	-	-	-	4	-	-	-	-	1	-
11月	15	4	-	-	-	3	-	-	-	-	1	-
12月	6	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2021年 1月	6	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
2月	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
3月	3	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
4月	8	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5月	22	4	-	-	-	-	-	-	2	1	-	1
6月	10	4	-	1	-	-	1	-	1	3	-	-
7月	22	10	-	1	-	-	9	-	-	-	-	-
8月	19	3	-	-	-	2	1	-	-	1	-	-
9月	25	4	-	-	-	2	1	-	-	1	-	-
10月	16	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11月	8	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
12月	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2022年 1月	21	3	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-
2月	15	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3月	16	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
計	561	82	2	3	11	25	15	0	9	10	2	11

※2020年3月1例(HPIVとHMPV)、4月1例(2種類のHCoVとHAdV)、2021年6月2例(HAdVとHBoV、HAdVとRSV)、8月1例(HPIVとHAdV)の重複感染例を含む

※検出型内訳 Flu:B型(ビクトリア系統)2例、HPIV:2型1例3型10例4型4例、HCoV:NL632例OC439例

表2 年代別検出率

	10歳未満	10代	20代	30代	40代	50代	60代	70代	80代以上	全体
対象数(例)	52	53	94	89	68	62	59	38	46	561
検出数(例)	23	12	7	17	9	6	2	4	2	82
検出率(%)	44.2	22.6	7.4	19.1	13.2	9.7	3.4	10.5	4.3	14.6

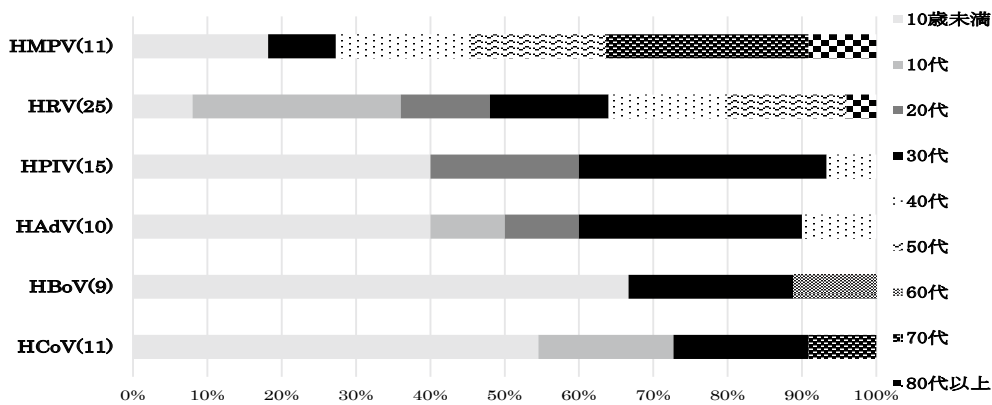


図2 検出ウイルス別患者年代内

### 3. 3 感染症発生動向調査事業における呼吸器感染症ウイルスの検出状況

2020年2月から2022年3月までの間に、インフルエンザまたはインフルエンザ様疾患疑いで当センターに搬入された検体は63検体あり、そのうち45検体において呼吸器感染症ウイルスが検出された。患者の年齢は、0歳4か月から44歳までで、主に小児（中央値：3歳）であった（図3）。検出された呼吸器ウイルスは、HRVが12例（検出率：19.0%）、FluBとRSVが9例ずつ（14.3%）、HPIVが8例（12.7%）、Flu A(H1N1)pdmが6例（9.5%）、HAdVとHBoVが2例（3.2%）、HMPVが1例（1.6%）であり、FluBは全てB型（ビクトリア系統）、HPIVは全て3型であった。また、重複感染例は5例あり、その内訳は、RSVとHMPV、RSVとHPIV3型、RSVとHBoVが1例ずつ、RSVとHRVが2例であった。

検出されたウイルスについて検体採取月別にまとめた結果、インフルエンザウイルスは2020年3月の検出を最後に、2022年3月まで一度も検出されなかった。一方で、HRVは年間を通して様々な時期に検出されており、RSV A/BやHPIV3型は2021年6-8月の期間に複数の検出がみられた（図4）。

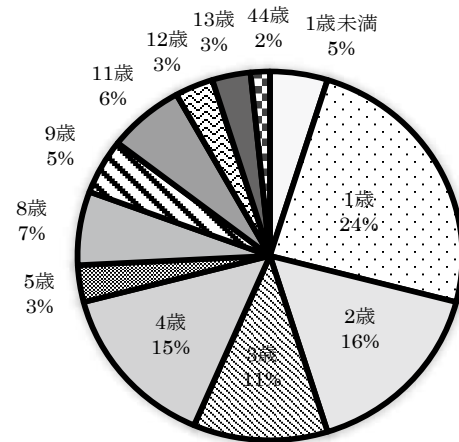


図3 感染症発生動向調査検体の患者年代別割合

(検出数)

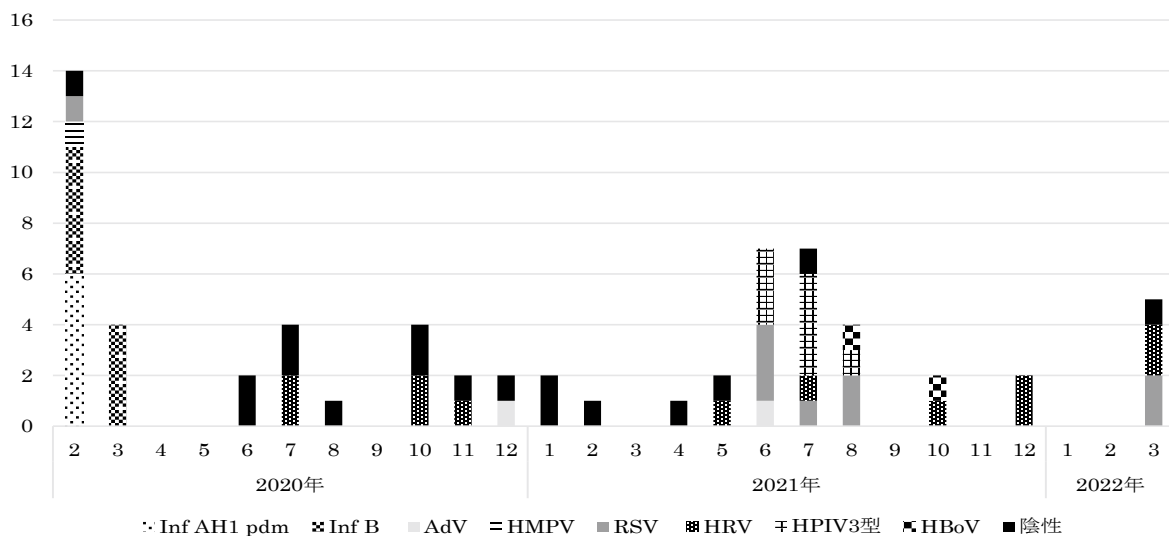


図4 感染症発生動向調査事業における検体採取月別の呼吸器ウイルスの検出状況

### 3. 4 考察

#### 3. 4. 1 調査対象期間中の呼吸器感染症ウイルスの検出状況等

8割以上の成人検体を含む供試検体から検出された82検体のうち、主流を占めていたのは、HRVやHPIV、HMPV、HCoVであった。一方で、9割以上の小児検体を含む感染症発生動向調査での主流はHRVやRSV、HPIVであった。なおHRVは、コロナ禍以前と比べ検出数は減少したが、季節を問わずに検出されていた。

HPIV3型に着目すると、2021年の7月から8月にかけて、供試検体から10検体検出され、半数は5歳以下の検体で、その発症日は6月末から7月上旬に集中していた。感染症発生動向調査においても、同年6月中旬から8月中旬にかけて2歳以下の検体からHPIV3型が8検体検出されたことから、こども園等での集団感染が起きていた可能性が考えられる。同様にRSVについても感染症発生動向調査では2021年の6月から8月に6検体、供試検体では同年6月から7月にかけて2検体検出され、計8検体中7検体が10代以下の検体であり、小児における流行の可能性が考えられた。また、成人における検出状況を見ると、HPIV3型は7月の中旬ごろから検出されていること、RSVの唯一の成人症例については孫の先行発症を確認できていることから、小児の流行が先行して、成人への流行に繋がる可能性が考えられた。森川らの報告<sup>14)</sup>においても、HPIV3型とRSVの成人の流行は、小児の流行に先行して検出する結果ではなかったと報告されている。感染症発生動向調査における全国状況では、2021年の5-8月にRSVの検出<sup>12)</sup>および6-7月にHPIV3型の検出<sup>13)</sup>が集中していたことが報告されている。

#### 3. 4. 2 調査対象期間中に検出されたウイルスと不検出であったウイルスの特徴

インフルエンザウイルスやHMPVはCOVID-19が流行し始めた2020年2月から4月の検体からは検出されたが、5月以降の検体からは検出されなかった。これは、COVID-19の流行により、マスクの着用やアルコール等による手指消毒、人との物理的距離をとることなどの予防策が徹底されたこと、海外からの感染者の流入を抑えるための厳しい措置を実施されたことなどが、呼吸器感染症ウイルスの流行抑制に寄与したことに起因すると推察される。一方で、コロナ禍においても複数検出がみられたHRVやHAdVなどはいずれもエンベロープを持たないウイルスで、アルコール消毒に対して抵抗性を持つため、厳しい感染予防策が実施されている中でも一定程度検出されたのではないかと推測している。加えて、全国における感染症発生動向調査の結果では、特に厳しい感染対策が行われた2020年において、他の呼吸器ウイルスがほとんど検出されていない中、HRVとHAdVは一定の検出があり、同様の傾向であったことが示唆された<sup>14,15)</sup>。また、2021年に小児での流行が認められたHPIV3型やRSV A/Bは2020年では同ウイルスの流行が抑制していた<sup>16,17)</sup>ことから感受性者が多く、加えてマスクの着用や手指消毒の徹底が難しい年齢のため、感染が引き起こされ流行に繋がったのではないかと推測している。

#### 3. 4. 3 呼吸器感染症ウイルスに罹患した患者の年代的特徴

年代別検出率の結果に着目すると、10歳未満や10代の

検出率が非常に高いことがわかる。呼吸器感染症を引き起こすウイルスのほとんどが乳幼児時期に1度は罹患すると考えられており、成長と共に免疫を獲得していき症状が軽くなっていく。そのために検出率は乳幼児の時期に高くなる傾向にある<sup>18)</sup>。一方で成人の呼吸器感染症については小児と比べて疫学や臨床像など未だ明らかになっていないことが多い。Brancheらの報告<sup>19)</sup>によると、高齢者ではウイルス排出量自体が小児に比べ少ないと報告されており、本研究においても高齢者での検出率の低値の一因になった可能性が考えられる。また、ウイルス別に患者年齢層をみると、10代未満の小児が感染の主体となっているウイルスが複数あるが、HRVやHMPVでは成人でも多数検出されており、HMPVでは肺炎等の下気道症状がみられた患者は1-2歳の乳幼児にとどまらず、30-40代や70-80代でも肺炎を引き起こしていたことが本研究で明らかになった。HMPVは乳幼児や高齢者では下気道感染症となるが、年長児や健康成人では上気道感染症が主とされ、成人への肺炎症例は稀であると考えられていたが、本研究では比較的若い30代、40代の成人においても肺炎症状を引き起こしていたことが明らかになり、成人において注視していく必要がある呼吸器ウイルスの一つであることが示唆された。また、呼吸器感染症ウイルスの多くが、免疫不全の患者やCOPD等の肺疾患や心疾患をもつ高齢者で重症化を引き起こし、慢性疾患の増悪に繋がった例も多数報告されている<sup>20)</sup>。健康な成人においても、米空軍内でHAdV14型による大規模なアウトブレイク<sup>20)</sup>が起り得たことから、いまや呼吸器感染症ウイルスは小児のみの注視にとどまることなく、リスク因子を抱える人や高齢者にも重点を置く必要があると考えられる。

## 4. まとめ

本研究において、県内のCOVID-19流行期における他の呼吸器感染症ウイルスの動向が明らかになった。コロナ禍において複数検出が認められたウイルスはアルコールに対し抵抗性をもつウイルスが多く、呼吸器感染症の予防には場所を選ばずに使用できるアルコール消毒に加え、手洗いの重要性があらためて確認された。また、県内での成人における呼吸器感染症の実態把握に繋がるまたとない機会になり、HMPV A/Bが成人において注視していくべきウイルスの一つであることが明らかになった。2023年3月13日からマスクの着用が個人の判断に委ねられ、同年5月8日にCOVID-19は2類相当から5類感染症へと位置づけが移行したことにより、コロナ禍以前の生活様式に戻りつつある。そのため、今まで流行が見られなかったウイルスについても感受性者の増加が考えられることから、大流行となる可能性がある。保育園や幼稚園、老健施設等でのアウトブレイクに繋がる恐れもあることから、今後も呼吸器感染症ウイルスについての動態把握が重要と考えられる。

## 謝辞

検体の採取および搬入、情報提供等に御協力いただきました健康福祉センターおよび医療機関の皆様へ深謝いたします。

## 参考文献

- 1) 感染症発生動向調査ウイルス検査結果（患者数），福井県衛生環境研究センター年報, **19**, 14(2020)
- 2) 感染症発生動向調査ウイルス検査結果（患者数），福井県衛生環境研究センター年報, **20**, 16(2021)
- 3) Malhotra B, Swamy MA, Reddy PV, et al.:Evaluation of custom multiplex real-time RT-PCR in comparison to fast-track diagnostics respiratory 21 pathogens kit for detection of multiple respiratory viruses, *Virology Journal*, **13**(2016)
- 4) 国立感染症研究所：インフルエンザウイルス診断マニュアル（第4版），25-28(2018)
- 5) 五十嵐映子 他：福井県におけるコロナウイルスの検出, 福井県衛生環境研究センター年報, **16**, 50-52 (2017)
- 6) 国立感染症研究所：ヒトメタニューモウイルス, 18-24(2008)
- 7) 国立感染症研究所：ボカウイルス検査マニュアル, 4-8(2009)
- 8) 国立感染症研究所：ライノウイルス検査マニュアル, 14-21(2009)
- 9) 国立感染症研究所：咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査、診断マニュアル（第3版），16-20(2018)
- 10) 国立感染症研究所：パラインフルエンザウイルス検査マニュアル, 8-21(2009)
- 11) 森川佐依子 他：SARS-CoV-2 陰性検体からの呼吸器ウイルスの検出-COVID-19 流行時の呼吸器ウイルスの動向 2020 および 2021 年度-, 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所年報, **6**, 37-43(2022)
- 12) 国立感染症研究所感染症疫学センター：週別診断名別 Respiratory syncytial virus 分離・検出報告数, 2021&2022 年  
<https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/ot/2022/data2022101j.pdf>
- 13) 国立感染症研究所感染症疫学センター：週別診断名別 Parainfluenza virus 3 分離・検出報告数, 2021&2022 年  
<https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/ot/2022/data2022105j.pdf>
- 14) 国立感染症研究所感染症疫学センター：週別病原体別下気道炎由来ウイルス, 2020&2021 年  
<https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/ot/2021/data2021119j.pdf>
- 15) 国立感染症研究所感染症疫学センター：週別病原体別上気道炎由来ウイルス, 2020&2021 年  
<https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/ot/2021/data2021121j.pdf>
- 16) 国立感染症研究所感染症疫学センター：週別診断名別 Respiratory syncytial virus 分離・検出報告数, 2020&2021 年  
<https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/ot/2021/data2021101j.pdf>
- 17) 国立感染症研究所感染症疫学センター：週別診断名別 Parainfluenza virus 3 分離・検出報告数, 2020&2021 年  
<https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/ot/2021/data2021105j.pdf>
- 18) Li ZJ, Zhang HY, Ren LL, et al. :Etiological and epidemiological features of acute respiratory infections in China, *Nature Communications*, **12**(2021)
- 19) Branche AR, Walsh EE, Formica MA, et al.: Detection of respiratory viruses in sputum from adults by use of automated multiplex PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, **52**, 3590-3596(2014)
- 20) Walter JM, Wunderink RG.: Severe Respiratory Viral Infections: New Evidence and Changing Paradigms, *Infectious Disease Clinics of North America*, **31**, 455-474(2017)

# マイコトキシン一斉分析法の検討

野田拓史・田中宏和

Study of Simultaneous Analysis Method for Mycotoxin

Takumi NODA, Hirokazu TANAKA

## 1. はじめに

マイコトキシンとは、かびの産生する二次代謝産物のうち、ヒトや動物に健康被害を引き起こす化合物の総称である。その中でも食品汚染の事例が多く報告され、食品衛生上重要なマイコトキシンとして、*Aspergillus* 属の産生するアフラトキシン、オクラトキシン、ステリグマトシスチン、*Fusarium* 属が産生するトリコテセン系マイコトキシン（デオキシニバレノール、ニバレノール、T-2 トキシン、HT-2 トキシン等）およびその他のフザリウムトキシン（フモニシン、ゼアラレノン）、*Penicillium* 属が産生するシトリニン、パツリンなどがある<sup>1,2)</sup>。湿潤かつ温暖なわが国の気候は、かびの生育に適した環境であり、気象条件や生産、貯蔵時の管理や取扱いなどによっては、農産物に健康影響への悪影響が無視できない汚染がおこる可能性がある。マイコトキシンによる健康被害の発生を未然に防止するためには、汚染実態を把握し、その汚染の程度に応じて、生産段階や貯蔵段階において必要かつ適切な対策をとることが不可欠である。そのため、農林水産省により麦類や米の生産や貯蔵段階での対策をまとめた指針やガイドラインが作成されている<sup>3)</sup>。

コシヒカリ発祥の地である本県では、コシヒカリを超える米として「いちほまれ」が開発され、一般財団法人日本穀物検定協会の令和4年産米の食味ランキングで特A評価を獲得している。このように本県では上質な米の開発や生産が盛んに行われているところだが、農林水産省の示す適切な生産・管理を怠った場合、マイコトキシンによる米の汚染が懸念されるところである。

そこで、県内産の米を対象として汚染実態調査を実施することとし、今回は、LC-MS/MSを用いた14種のマイコトキシン一斉分析法の検討を行った。検討内容は、MS条件（イオン化、MRM トランジション）およびHPLC条件（分析カラム、移動相等）であり、各項目について最適化した後、定量限界および検量線の範囲・直線性について評価したので、その結果を報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 測定対象

過去の報告等<sup>4,5)</sup>から米を汚染するとされる14種のマイコトキシンを下記のとおり選定した。

アフラトキシン B1、アフラトキシン B2、アフラトキシン G1、アフラトキシン G2、オクラトキシン A、オクラトキシン B、ステリグマトシスチン、シトリニン、デオキシニバレノール、ニバレノール、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ジアセトキシシルペノール、ゼアラレノン（以下、それぞれ「AFB1」、「AFB2」、「AFG1」、「AFG2」、「OTA」、「OTB」、「STC」、「CIT」、「DON」、「NIV」、「T-2」、「HT-2」、「DAS」および「ZEN」という。）

### 2.2 試薬等

#### 2.2.1 標準品および使用溶媒等

標準品：富士フィルム和光純薬社製または関東化学社製の標準品を使用した。

混合標準溶液：各標準品をアセトニトリルで  $1 \mu\text{g/mL}$  となるように混合希釈し調製した。

使用溶媒等：アセトニトリル、メタノール、超純水および酢酸アンモニウムは、富士フィルム和光純薬社製の液体クロマトグラフ用またはLC/MS用を使用した。

#### 2.2.2 評価用標準溶液の調製

混合標準溶液（各  $1 \mu\text{g/mL}$ ）を  $5\text{mM}$  酢酸アンモニウム水溶液： $5\text{mM}$  酢酸アンモニウム含有メタノール（9:1）混液中で希釈し調製した。

#### 2.2.3 検量線用標準溶液の調製

混合標準溶液（各  $1 \mu\text{g/mL}$ ）を  $5\text{mM}$  酢酸アンモニウム水溶液： $5\text{mM}$  酢酸アンモニウム含有メタノール（9:1）混液中で希釈し、各  $0.5$ 、 $1$ 、 $2$ 、 $5$ 、 $10\text{ng/mL}$  の検量線用標準溶液を調製した。

### 2.3 装置および測定条件

装置：液体クロマトグラフ質量分析計 Prominence 20A/3200Q TRAP（島津製作所/Sciex）、カラム：TSKgel ODS 100V 粒子径  $5 \mu\text{m}$ 、 $2.0\text{mm i.d.} \times 150\text{mm}$ （東ソー）、移動相：A液  $5\text{mM}$  酢酸アンモニウム水溶液、B液  $5\text{mM}$  酢酸アンモニウム含有メタノール、グラジエント条件：B液  $10\%(0\text{min}) \rightarrow 90\%(10\text{min}) \rightarrow 90\%(15\text{min})$ 、流速： $0.2\text{mL/min}$ 、カラム温度： $40^\circ\text{C}$ 、注入量： $10 \mu\text{L}$ 、MRM条件：表1のとおり。

表1 各化合物のMRM トランジション

イオン化	ESI Positive (+)				
化合物名	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	OTB
定量イオン	313>285	315>287	329>243	331>313	370>205
確認イオン	313>241	315>259	329>200	331>115	370>103

イオン化	ESI Positive (+)				
化合物名	HT-2	T-2	DAS	ZEN	STC
定量イオン	442>263	484>305	385>308	319>283	325>281
確認イオン	442>215	484>185	385>230	319>187	325>310

イオン化	ESI Negative (-)			
化合物名	CIT	DON	NIV	OTA
定量イオン	249>205	295>265	371>281	402>358
確認イオン	249>175	355>265	311>281	402>167

## 3. 結果および考察

### 3.1 MS条件の検討

測定は選択的にイオンをモニタリングするMRMモードで行った。評価用標準溶液をインフュージョン法でMS

部へ直接導入し、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) のポジティブとネガティブの両モードでスキャン測定することにより、プリカーサーイオンを選定した。次に、解析ソフト (Analyst) の最適化ツールを用いてプロダクトイオンおよび MS パラメータ (コリジョンエネルギーおよび電圧等) の最適化を行い、MS 条件を決定した。

### 3. 2 HPLC 条件の検討

当センターでは過去にフザリウムトキシシン一斉分析法の検討を行っており<sup>6)</sup>、その際に得られた知見をもとに HPLC 条件の検討を行った。

分析カラムについて、既報では ODS カラムを使用したところ、位置異性体である 3-アセチルデオキシニバレノールと 15-アセチルデオキシニバレノールを分離することができなかったことから、これらを分離可能な ADME カラムを採用していたが、今回の測定対象にはそのような位置異性体は含まれていないため ODS カラムを使用することとした。

移動相に用いる有機溶媒について、既報ではメタノールからアセトニトリルに変更したところ、感度が最大で 1/10 程度まで減少していたため、メタノールを使用することとした。

移動相の pH について、既報の検討で pH が低下するにつれて、ポジティブモードで測定する化合物の感度は上昇し、逆に、ネガティブモードで測定する化合物の感度は減少することが分かっている。今回の測定対象の中では、ネガティブモードで測定する DON および NIV の感度が最も低かったため、pH 調整は行わないこととし、添加する酢酸アンモニウムの濃度は 5mM とした。

グラジエント条件について、メタノール濃度を初期濃度 10% から 10 分かけて 90% まで上昇させ 5 分間 90% を維持する条件にしたところ、すべての化合物を良好に測定することができた (図 1)。また、AFB1 と AFB2 および AFG1 と AFG2 はそれぞれ違いが二重結合の有無のみであり質量数の差は僅かであるが、本条件で測定した際の保持時間はそれぞれ AFB1 が 10.9 分、AFB2 が 10.7 分、AFG1 が 10.3 分、AFG2 が 10.0 分であり、HPLC によりこれらの化合物を良好に分離することができた。

### 3. 3 定量限界および検量線の範囲・直線性

最適化した条件を用いて 0.5ng/mL の混合標準溶液を測定したところ、すべての化合物のピークが  $S/N \geq 10$  であったため、定量限界を 0.5ng/mL とした。

次に、0.5-10ng/mL の範囲で混合標準溶液を測定し検量線を作成した。その結果、すべての化合物で相関係数 0.999 以上の検量線となり、この範囲で良好に定量できることを確認した。

## 4. まとめ

LC-MS/MS を用いたマイコトキシシン一斉分析法の検討を行った。既報を参考に最適化した条件によりすべての対象化合物を良好に分離・測定することができた。

確立した分析法の性能評価を行った。定量限界は 0.5ng/mL であり、0.5-10ng/mL の範囲で定量可能であった。

今後は、前処理法の検討を行い、試験法の妥当性を確認した上で、県内産の米等の汚染実態調査を実施する予定である。

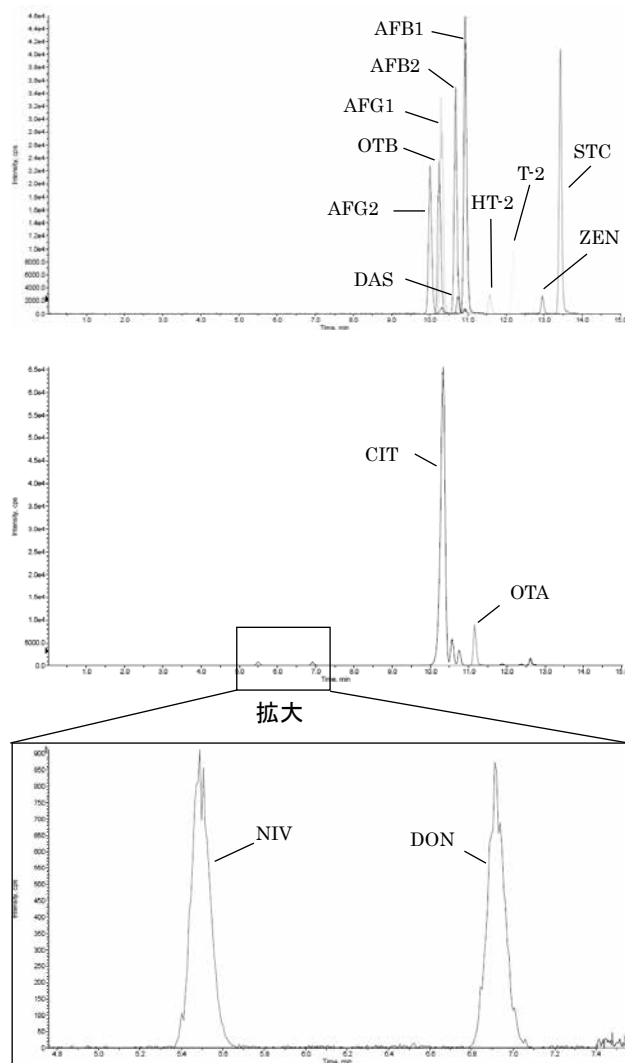


図 1 各化合物のクロマトグラム  
(上段 ESI(+)) 下段 ESI(-))

## 参考文献

- 1) 小西良子 他：食品衛生検査指針理化学編 2015 第 6 章 5.マイコトキシシン, 562-647, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京(2015)
- 2) 永山敏廣 他：衛生試験法・注解 2020 2.2 天然有毒物質試験法, 304-324, 金原出版株式会社, 東京(2020)
- 3) 農林水産省：食品のかび毒に関する情報 [http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk\\_analysis/priority/kabidoku/index.html](http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/kabidoku/index.html)
- 4) 田形卓巳 他：コメを汚染する黄変米毒産生菌株の効率的な検出を目指して, 麻布大学雑誌, **28**, 85(2017)
- 5) 一戸正勝：米に着生するカビ, *Mycotoxins*, **40**, 11-14(1994)
- 6) 酒井康行 他：フザリウムトキシシン一斉分析法の検討, 福井県衛生環境研究センター年報, **15**, 72-77(2016)



# へしこ中のヒスタミン生成に関する研究（その1） ～不揮発性アミン類一斉分析法の検討～

土屋小百合・六戸部真里・柴田祐子・田中宏和

Studies on a Rapid Simultaneous Analysis Method for Non-volatile Amines in the Fermented Food  
“HESHIKO”

Sayuri TSUCHIYA, Mari MUTOBE, Yuko SHIBATA, Hirokazu TANAKA

## 1. はじめに

へしこは福井県の郷土料理のひとつであり、秋から冬に豊富にとれたサバを室内で乳酸発酵させて作られる昔ながらの保存食である。現在では、保存食としての価値は少なくなったが、独特の風味や芳香が好まれ、嗜好品として食べられている。

ヒスタミンは、サバやイワシなどの赤身魚等に多く含まれるヒスチジンが微生物の働きにより脱炭酸されることで生成される。ヒスタミンを多く蓄積した食品を喫食すると、アレルギー様の症状を呈する食中毒を引き起こす。また、他の不揮発性アミン類が共存することによりその作用が増強されるともいわれている<sup>1)</sup>。糠発酵食品であるへしこについても、ヒスタミン食中毒が懸念される。そのため、当センターにおいても分析法の構築が求められる。

ヒスタミンを含む不揮発性アミン類の一斉分析法については、ダンシルクロライドで誘導体化した後に蛍光検出器付液体クロマトグラフで測定する分析法が、食品衛生検査指針に示されているが、前処理が煩雑であり迅速性に欠ける。そこで、迅速性に優れた LC-MS/MS を用いた分析法<sup>2) -4)</sup>を検討した。

## 2. 方法

### 2. 1 試料

福井県内で製造または販売されているへしこ製品3検体を用いた。

### 2. 2 測定対象

測定対象とした不揮発性アミン類はアグマチン (Agm)、カダベリン (Cad)、ヒスタミン (Him)、フェネチルアミン (Phm)、プトレシン (Put)、スペルミジン (Spd)、トリプタミン (Tpm)、チラミン (Tym) の8種類とした。

### 2. 3 試薬等

標準品：アグマチン硫酸塩 (Trc Canada)、カダベリン二塩酸塩標準品 (富士フィルム和光純薬(株)、食品分析用)、ヒスタミン二塩酸塩標準品 (富士フィルム和光純薬(株)、食品分析用)、2-フェネチルアミン (富士フィルム和光純薬(株)、特級)、プトレシン二塩酸塩標準品 (富士フィルム和光純薬(株)、食品分析用)、スペルミジン (富士フィルム和光純薬(株)、食品分析用)、トリプタミン (Sigma-aldrich、analytical standard)、チラミン塩酸塩標準品 (富士フィルム和光純薬(株)、食品分析用) を使用した。

混合標準原液：各標準品を0.1N塩酸に溶解し、1000ppm単体標準液を調製した。次に、この単体標準液を1 mL ず

つ正確に量り取り、移動相で全量10 mLとして100ppm混合標準原液を調製した。

移動相試薬等：アセトニトリル、メタノールおよびギ酸は、富士フィルム和光純薬(株)製の LC-MS/MS 用を、塩酸は富士フィルム和光純薬(株)の特級を、1mol/L ギ酸アンモニウムは富士フィルム和光純薬(株)製の HPLC 用を使用した。

### 2. 4 機材等

固相カラム：Sep-Pak Vac 6cc(500 mg)C18 Cartridges (Waters)

メンブランフィルター：DISMIC 13HP 0.20 $\mu$ m (アドバンテック東洋(株))

### 2. 5 装置および測定条件

装置：液体クロマトグラフ質量分析計 Prominence 20A/3200Q TRAP (株島津製作所/AB Sciex)

流速：0.4 mL/min

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

注入量：10 $\mu$ L

イオン化：ESI Positive (+)

MRM 条件：表1のとおり。

表1 MRM 条件

化合物名	Agm	Cad	Him
定量イオン	131.2>72.2	103.1>86.2	112.1>95.1

化合物名	Phm	Put	Spd
定量イオン	122.1>105	89.1>72.2	146.2>72.2

化合物名	Tpm	Tym
定量イオン	161.2>144.1	138.2>121.2

### 2. 6 分析カラムおよび移動相の検討

過去に報告されている方法<sup>2) -4)</sup>を参考に不揮発性アミン類を同時に保持し、良好な分析感度を得ることができる分析カラムおよび移動相の条件を検討した。

検討した分析カラム：Xbridge BEH Hilic 粒子径 5.0  $\mu$ m、2.1mmi.d.×150mm (Waters)

検討した移動相：①A液：0.45%ギ酸 60mM ギ酸アンモニウム水溶液、B液：アセトニトリル、②500mM ギ酸アンモニウム (pH4.0)：アセトニトリル：水：メタノール = 10:60:10:20

### 2. 7 検量線範囲および定量限界の検討

検量線範囲を確認するため、混合標準溶液 (各不揮発性

アミン類が、0.1、0.3、0.5、5、10、20、50 ng/mL) を測定し、相関係数を算出した。ベースラインからの分離が明確に確認できた濃度を各不揮発性アミン類の最低濃度とした。

また、各不揮発性アミン類の検量線の最低濃度において、S/N 比を求め、検量線範囲内で定量が可能か確認した。

## 2. 8 前処理方法

過去に報告されている方法<sup>2),3)</sup>を参考に以下の方法で実施した。フローを図1に示した。

凍結粉碎した試料 1.0g に精製水を加え、40mL に定容後、セラミックホモジナイザーを入れて5分間振とうした。次に、遠心分離 (3000rpm、5分間) し、上清 1mL を分取し、0.1%ギ酸アセトニトリル 4mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した。その後、遠心分離 (3000rpm、5分間) し、上清 0.8mL を分取し、移動相を用いて 10mL に定容した。さらに、5mL をメタノール 6mL、60%アセトニトリル水溶液 6mL の順でコンディショニングした C18 固相カラム (500mg/6mL) に負荷し、移動相 4mL で洗浄後、移動相を用いて 10mL に定容し、0.20 $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

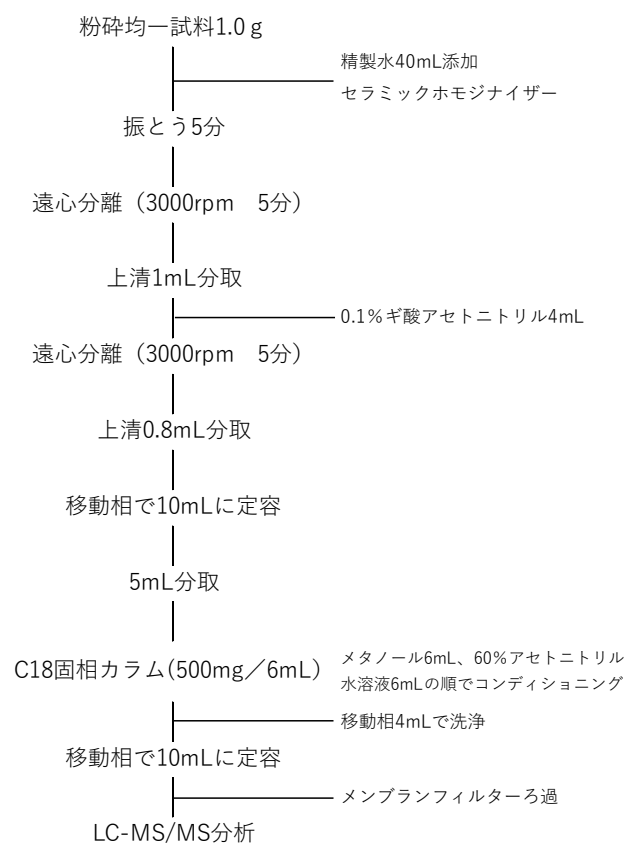


図1 分析法フロー

## 2. 9 マトリックス効果の検証

へしこ製品中に含まれる夾雑成分の影響が懸念されることから、マトリックス効果の検証を行うこととした。

予め不揮発性アミン類が含まれていないことを確認した試料3検体について、図1に示す方法で調製した試験溶液に混合標準液を 20ng/mL となるように添加し、添加濃度と定量値の比を算出し、検証した。

## 2. 10 妥当性評価

「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号) に準じて、真度、併行精度および室内精度を評価した。

予め不揮発性アミン類が含まれていないことを確認した試料に試料中濃度 100 $\mu$ g/g になるよう混合標準溶液を添加した試料を用いた。検査者 1 名が添加試料を 1 日 2 併行、5 日間繰り返し測定した。

## 3. 結果および考察

### 3. 1 分析カラムおよび移動相

不揮発性アミン類は、高極性塩基性化合物であり、それぞれの構造は大きく異なる。先行事例<sup>2)-4)</sup>でも使用されていた親水性クロマトグラフィーである HILIC カラムを用いて測定したところ、良好に分離できたため、このカラムを使用することとした。

移動相は、まず、A 液に 0.45%ギ酸 60mM ギ酸アンモニウム水溶液、B 液にアセトニトリルを用いた方法、同 A 液および B 液を用いてグラジエントを行う方法を検討したが、すべての不揮発性アミン類のピークは確認できなかった。そのため、宇川らの報告<sup>4)</sup>に示される 500mM ギ酸アンモニウム (pH4.0): アセトニトリル: 水: メタノール = 10:60:10:20 (アイソクラティック) で測定したところ、すべての不揮発性アミン類が良好に分析できた。以上から、500mM ギ酸アンモニウム (pH 4.0): アセトニトリル: 水: メタノール = 10:60:10:20 (アイソクラティック) が適当であると判定された。

### 3. 2 検量線範囲および定量限界

Agm、Cad、Him および Tpm は 0.1~50ng/mL、Phm は 0.3~50ng/mL、Put、Spd および Tym は 5~50ng/mL の範囲で相関係数 0.995 以上の良好な直線性が得られた。その結果を表2に示した。

また、すべての不揮発性アミン類の検量線の最低濃度において、S/N 比を求めたところ、すべて S/N $\geq$ 10 を満たしており、検量線の範囲内で定量が可能であることが確認された。

表2 検量線範囲・直線性

	相関係数	定量限界濃度のS/N比	範囲 (ng/mL)
Agm	1.0000	30.9	0.1-50
Cad	0.9999	20.8	0.1-50
Him	0.9997	150	0.1-50
Phm	0.9997	10.7	0.3-50
Put	1.0000	25.5	5-50
Spd	0.9997	81.0	5-50
Tpm	0.9999	11.6	0.1-50
Tym	0.9999	17.8	5-50



### 3. 3 マトリックス効果の検証および対策

マトリックス効果の検証結果を図2に示した。すべての不揮発性アミン類において70~110%となり、マトリックスの影響は低いと考えられた。ただし、Himについては、75~76%と低く、他の不揮発性アミン類に比べ、マトリックスの影響を受けやすいと考えられた。

Him についてのマトリックス効果対策として、試験溶液を移動相を用いて2倍に希釈して測定したところ、Himの回収率は107~111%となり、マトリックス効果の低減が確認された。そのため、Him については、試験溶液を2倍希釈して測定することが適当と判断した。

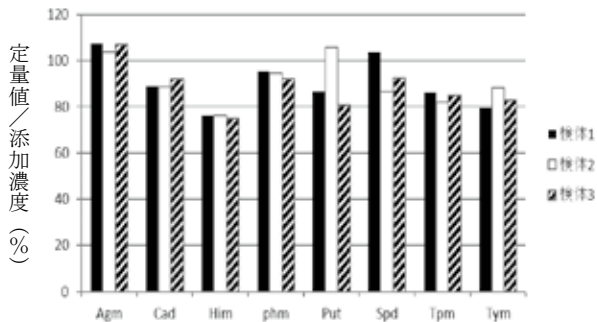


図2 マトリックス効果検証結果

### 3. 4 妥当性評価

妥当性評価の結果を表3に示した。真度は75.3~108.1%、併行精度は2.4~9.1%、室内精度は2.8~11.8%となり、すべての不揮発性アミン類で、真度、併行精度および室内精度について、良好な結果となった。

表3 妥当性評価結果

	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
Agm	104.5	2.4	2.8
Cad	88.1	5.7	6.7
Him※	108.1	3.4	4.8
Phm	91.5	4.5	4.6
Put	91.4	9.1	9.4
Spd	105.7	6.6	11.8
Tpm	75.3	4.8	5.5
Tym	75.9	8.5	11.4
ガイドライン 目標値	70~120	10未満	15未満

※Himについては試験溶液を2倍希釈し測定

## 4. まとめ

糠発酵食品であるへしこ中に含まれる不揮発性アミン類の一斉分析に適用できる方法を検討した。

LC-MS/MSにてHILICカラムを用い、500mMギ酸アンモニウム (pH 4.0) : アセトニトリル : 水 : メタノール

=10 : 60 : 10 : 20 混液移動相を用いたアイソクラティック分析により、不揮発性アミン類8物質を良好に分析することができた。

また、C18固相カラムを用いた精製工程を含む一斉分析法で妥当性評価を行ったところ、測定対象とした不揮発性アミン類全てにおいて、選択性、真度、併行精度および室内精度について、ガイドラインの判定基準を満たす良好な結果が得られた。

以上から、本報で評価検討した分析法は、へしこ製品の汚染実態調査に十分活用できると判断された。また、本分析法は、食品衛生検査指針に示された方法より簡便で分析時間の短縮化が図れることから、ヒスタミン食中毒が疑われる健康危害発生時に迅速に原因を特定する上で有効であると考えられた。

## 参考文献

- 1) 井部明弘：発酵食品に含まれるアミン類，東京都健康安全研究センター研究年報，55，13~22（2004）
- 2) 瀧澤裕，千葉美子，高橋美保：LC/MS/MSを用いた不揮発性アミン類分析法の妥当性評価，宮城県保健環境センター年報，33，81~82（2015）
- 3) 茶屋真弓，穂積和佳，岩元由佳，原田卓也，吉田純一：LC/MS/MSによる不揮発性アミン類の迅速分析法の検討と鮮魚中のヒスタミン産生菌の分離について，鹿児島県環境保健センター年報，19，56~63（2018）
- 4) 宇川夕子，伊藤志穂，大谷友香，望月美菜子，井上智，四宮博人：食品中のヒスタミン等不揮発性アミン類等の一斉分析法の検討，愛媛県立衛生環境研究所年報，20，6~9（2017）

# へしこ中のヒスタミン生成に関する研究（その2） ～不揮発性アミン類含有量実態調査～

六戸部真里・土屋小百合・柴田祐子・田中宏和

Contents of Non-Volatile Amines in the Fermented Food “HESHIKO”

Mari MUTOBE, Sayuri TSUCHIYA, Yuko SHIBATA, Hirokazu TANAKA

## 1. はじめに

ヒスタミンは、食品中に含まれるアミノ酸であるヒスチジンから生成される化学物質で、ヒスタミンによる食中毒は例年全国で10件程度（患者数200人程度）報告されている。食品に含まれるヒスタミンの基準値は、日本では設定されていないが、Codexでは衛生および取扱基準としてヒスチジンを多く含む魚種の加工品を対象に20mg/100g、発酵食品である魚醬には40mg/100gを定めている。ヒスチジンは、サバやイワシ等の赤身魚に多く含まれ、これらの魚を常温に放置する等、不適切な温度管理が行われると、細菌（ヒスタミン生成菌）が増殖し、この細菌が持つヒスチジン脱炭酸酵素によってヒスタミンが生成される。ヒスタミンは熱に安定であることから、一度生成されると加熱調理によっても分解されず、多量に摂取した際には、アレルギー様症状を発症する。またヒスタミンと共存する不揮発性アミン類を同時に摂取することによりヒスタミンの代謝酵素が阻害され、毒性が強くなると言われている。<sup>1)</sup>そこで、福井県の特産品である「へしこ」は、サバを塩漬けにし、さらに糠漬けにする発酵食品であり、細菌の生育に好条件の環境で作られていることから、今回、へしこ中のヒスタミン生成に関する研究（その1）の検討で得られた分析法を用いて、県内産へしこ製品について不揮発性アミン類の含有量実態調査を行ったので、その結果を報告する。

## 2. 方法

### 2.1 試料

県内産へしこ10製品A～Jを選定し、ロットによる違いも調査するため同製品を令和3年度および令和4年度に1検体ずつ購入した。よって10製品計20検体の実態調査を行った。

また不揮発性アミン類の含有量に影響が出ないよう、すべての検体は入手してから検査まで-20度の冷凍庫で保管していた。

### 2.2 測定対象不揮発性アミン類

アグマチン(Agm)、カダベリン(Cad)、ヒスタミン(Him)、フェネチルアミン(Phm)、プトレシン(Put)、スペルミジン(Spd)、トリプタミン(Tpm)、チラミン(Tym)

### 2.3 試薬および器具

標準品は、アグマチン硫酸塩はTrc Canada製、カダベ

リン二塩酸塩、ヒスタミン二塩酸塩、2-フェネチルアミン、プトレシン二塩酸塩、スペルミジンおよびチラミン塩酸塩は富士フィルム和光純薬(株)製、トリプタミンはSigma-Aldrich製を用いた。

アセトニトリル、メタノール、ギ酸、1mol/Lギ酸アンモニウム溶液、塩酸は富士フィルム和光純薬(株)製、超純水はメルク(株)製の超純水製造装置MILLIPORE Advantage3&Referenceにより精製したものをを用いた。

固相カラムはWaters製のSep-Pak Vac 6cc(500mg) C18 Cartridges、メンブレンフィルターはアドバンテック東洋(株)製のDISMIC 13HP 0.20μmを使用した。

### 2.4 分析方法

#### 2.4.1 試料の採取および前処理

図1のとおり。

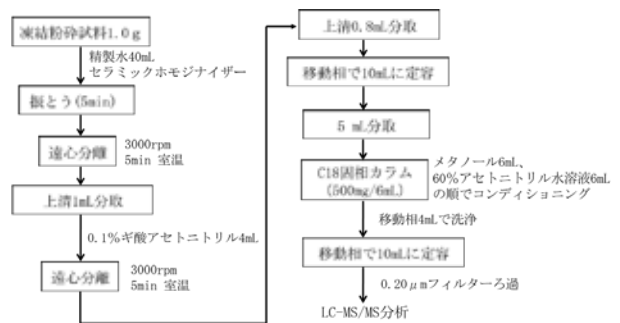


図1 分析方法のフローチャート

#### 2.4.2 測定条件

表1のとおり。

表1 LC-MS/MS 測定条件

装置	LC部：Prominence 20A（株島津製作所製） MS部：3200Q TRAP（SCIEX社製）
カラム	Xbridge BEH HILIC (Waters社製, 2.1×150mm, 5μm) カラム温度：40℃
イオン化法	エレクトロスプレー法
流速	0.4mL/min
注入量	10μL
移動相	500mM ギ酸アンモニウム (pH4.0) : アセトニトリル : 水 : メタノール = 10 : 60 : 10 : 20

### 3. 結果と考察

表2 不揮発性アミン類含有量

( $\mu\text{g}/\text{g}$ )

製品	Agm	Cad	Him	Phm	Put	Spd	Tpm	Tym
A (R3)	10	ND	1,554	98	42	ND	ND	926
A (R4)	21	ND	268	22	38	87	ND	346
B (R3)	6	ND	2,010	15	91	ND	34	161
B (R4)	16	ND	1,118	35	ND	ND	ND	165
C (R3)	4	2	1,347	ND	37	ND	ND	ND
C (R4)	13	ND	547	10	ND	ND	1	205
D (R3)	7	ND	78	ND	ND	ND	ND	ND
D (R4)	5	ND	532	12	ND	30	13	200
E (R3)	5	86	2,752	118	553	ND	25	202
E (R4)	24	ND	25	ND	ND	51	ND	ND
F (R3)	8	ND	ND	ND	40	ND	ND	ND
F (R4)	17	ND	ND	ND	48	31	ND	ND
G (R3)	4	ND	123	ND	35	ND	ND	ND
G (R4)	11	5	544	ND	ND	30	ND	ND
H (R3)	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H (R4)	7	ND	ND	ND	25	ND	ND	ND
I (R3)	5	ND	71	ND	46	ND	ND	ND
I (R4)	10	ND	5	ND	ND	ND	ND	ND
J (R3)	3	ND	102	ND	ND	29	ND	ND
J (R4)	10	ND	ND	ND	ND	44	ND	ND
ND<	0.5	0.5	1	1.5	25	25	0.5	25

20 検体について、不揮発性アミン類の含有量を調査した結果を表2に示した。

Himの検出率は75%、含有量はND~2,752  $\mu\text{g}/\text{g}$  とその他不揮発性アミン類に比べ高く検出され、製品間およびロット間において含有量に差が生じた。特にロット間で差が大きく生じたのはEの製品であり、E(R3)の検出量は2,752  $\mu\text{g}/\text{g}$  と20検体のうち最高値を示したが、E(R4)の検出量は25  $\mu\text{g}/\text{g}$  と低い値を示した。一方、F、H、I、Jの製品については、両ロットも不検出またはわずかな検出であり、その他不揮発性アミン類の含有量も低かった。

このことから、へしこの加工段階において、ヒスタミン生成菌が増殖するかどうかにより含有量に差が生じると考えられる。

また、Him量の多い検体は、その他不揮発性アミン類の含有量も高い傾向を示した。ただし、A(R3)とC(R3)のようにHim量が同程度の検体であっても、その他不揮発性アミン類の含有量を比較すると差があることがわかる。これら不揮発性アミン類を同時に摂取することによりHimの代謝酵素が阻害され、毒性が強くなると言われていることから、C(R3)に比べてA(R3)の製品を摂取した場合に、健康被害のリスクが高くなると考えられる。

### 4. まとめ

今回、へしこ中のヒスタミン生成に関する研究(その1)の検討で得られた分析法を用いて、県内産へしこ製品について不揮発性アミン類の含有量実態調査を行った。

お酒のアテやお茶漬けに使用されるへしこは、塩分を多く含むことから、一度に喫食する量は少ないとみられ、仮に一度の喫食量を10g程度と想定した場合、今回調査した

検体の中にはHimの無毒性量50mgに達する含有量の検体はなかった。しかし、検体ごとのばらつきが大きいことや、Codexの魚醤の基準を超えるHim量の検体もあったことから、へしこによる健康被害のリスクは無視できないと考える。さらに、Himに対する感受性は個人差が大きいことや、その他不揮発性アミン類による影響も考慮しなければならない。

HimについてはCodexにおいて基準値が設定されているが、その他不揮発性アミン類については基準値が設定されておらず、その含有量実態はほとんど明らかにされていない。そのため、Himと不揮発性アミン類を同時に分析し、これらの含有量を把握することも重要と考える。

へしこの製造において、Himの生成は危害要因の一つであり、不揮発性アミン類のモニタリングと併せて加工段階での衛生管理のあり方について検証する必要があると考える。

今後は、得られた結果を保健所等と共有し、県内製造業者のHACCP管理の向上に繋げていきたい。

### 参考文献

- 1) 井部明弘：発酵食品に含まれるアミノ類，東京都健康安全研究センター研究年報，55，13~22（2004）
- 2) 国際連合食糧農業機関(FAO)/世界保健機関(WHO)：Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products, Joint FAO/WHO Expert Meeting Report；(2013)  
[http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/Histamine/Histamine\\_AdHocfinal.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Histamine/Histamine_AdHocfinal.pdf)

## 福井県における降水中の無機元素成分の解析

岩井 直樹

Analysis of Inorganic Elements in Rainwater in Fukui Prefecture

Naoki Iwai

## 1. はじめに

福井県では、昭和 42 年度から酸性雨調査を開始し、平成 3 年度からは全国の酸性雨調査を統一的に実施する全国環境研協議会の酸性雨広域大気汚染調査に参画し、その中で当県の地域特性の把握に努めてきた。

この調査では、降水の pH だけでなくイオン成分も対象とし、日本海側で  $H^+$  や  $SO_4^{2-}$  の沈着量が多いことなどを明らかにしてきた<sup>1,2)</sup>。さらに平成 24 年度からは近畿・東海・北陸の地方環境研究所とともに無機元素成分を加えた調査に取り組んできた。

本報では、平成 24～令和 4 年度に実施した酸性雨調査のうち、無機元素成分に関して成分構成や経年・年間変動について解析した結果を報告する。

## 2. 方法

## 2. 1 調査地点等

- (1) 調査地点 福井県衛生環境研究センター屋上（福井市原目町）
- (2) 採取方法 降水時のみ受水部が開く降水時間開放型採取装置（WET ONLY 採取）を用い、原則 1 週間単位で降水を採取
- (3) 調査項目 降水量、pH、電気伝導率（EC）、イオン成分 7 項目、無機元素成分 21 項目  
無機元素成分は試料に硝酸を添加後、ICP-MS により測定
- (4) 対象期間 平成 24～令和 4 年度
- (5) 大気中の無機元素成分調査の調査地点と試料採取時期
  - ① PM<sub>2.5</sub> …大気汚染測定局福井局（福井市豊島町）で四半期ごとに 14 日間、1 日単位採取（H25～）
  - ② 有害大気汚染物質 …大気汚染測定局福井局で四半期ごとに 1 日（24 時間）採取

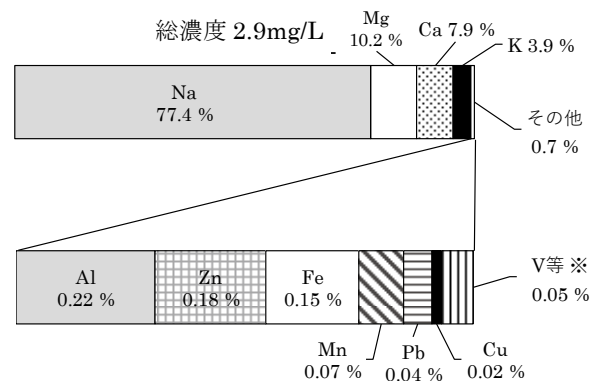
## 3. 結果および考察

## 3. 1 降水中の無機元素成分濃度と構成比

降水中の無機元素成分について、平成 24～令和 4 年度までの平均濃度および構成比を図 1 に示した。分析対象とした 21 無機元素成分の合計濃度は、11 年間の平均で 2.9 mg/L であり、そのうち Na、Mg、Ca および K の 4 項目で 99% を占めていた。また、これら 4 成分は、イオン成分の測定結果から、大部分がイオン成分で構成されていた。なかでも Na および Mg は、約 9 割を占め、そのイオン成分が既報<sup>3)</sup>により海塩起源と推察されている。また、Na と Mg の濃度比率 (1:0.127) が、海水中の  $Na^+$  と  $Mg^{2+}$  組成比 (1:0.12)<sup>4)</sup> にはほぼ等しいことから、Na および Mg は主に海塩起源であると

考えられる。このため、無機元素成分総量は海塩の影響を大きく受けると考えられる。

これらの 4 元素を除く、「その他」には Al、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Mo、Ag、Cd、Tl および Pb の 17 元素が含まれるが、その構成比は合計 0.7% とごくわずかであった。



成分割合は小数点第一位以下を四捨五入して表示しているため、合計は 100% にならない。

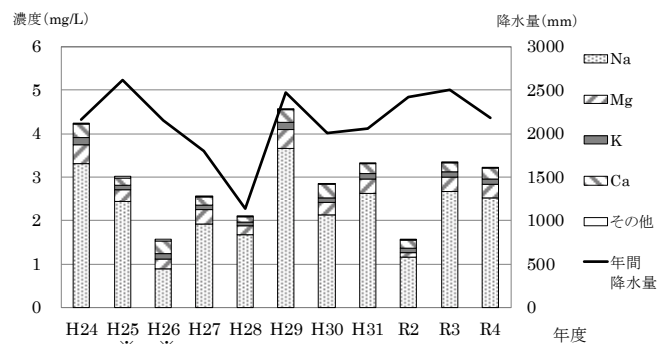
※ V 等：V、Cr、Co、Ni、As、Se、Mo、Ag、Cd、Sb および Tl

図 1 降水中の無機元素成分の構成比

## 3. 2 無機元素成分濃度と構成比の経年変動

次に無機元素成分の年平均濃度の推移を図 2 に、構成比の推移を図 3 に示した。

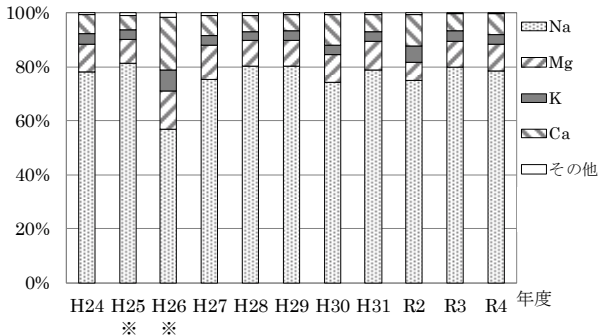
無機元素成分の平均濃度は年度により大きく増減している。一方、主成分の構成比は 3.1 項で示したのものから大きな変化はない。総濃度の変動は、無機元素成分のおよそ 9 割を占める Na および Mg が主に海塩由来であり、海域・沿岸部の風況や降水量等の気象変動の影響を強く受けているためと考えられる。



※ Na、Mg は H25 年度に 7 週間分、H26 年度に 9 週間分の欠測期間があり、K、Ca は H25 年度に 14 週間分の欠測期間があるため、参考値

図 2 降水中の無機元素成分平均濃度の経年変動





※図2の注釈に同じ

図3 降水中の無機元素成分濃度の構成比

### 3.3 微量無機元素成分の濃度と構成比

次に、イオン成分を主体とするNa、Mg、CaおよびK以外の無機元素成分の調査期間の平均濃度と総濃度に対する比を表1に示した。

Al、FeおよびZnを除くといずれも構成比は0.1%未満とごくわずかであった。ただし、これらの中には公共用水域や地下水の環境基準項目や要監視項目とされているものがあり、検出状況によっては河川や地下水等への影響が懸念される。基準等項目に該当するものがZnを含め9元素あり(当該元素を以下、「水質基準金属元素」という。)、そのうち6元素が最大濃度で基準の10分の1以上検出されており、PbおよびZnは基準値を超過していた。

表1 微量無機元素成分の濃度と構成比

	平均濃度 (mg/L)	総濃度に対する比率	最大濃度 (mg/L)	基準等項目※
Al	0.0064	0.22%	0.25	
V	0.00018	<0.01%	0.0032	
Cr	0.00007	<0.01%	0.0021	
Mn	0.0021	0.07%	0.034	○ (0.2)
Fe	0.0042	0.15%	0.085	
Co	0.000033	<0.01%	0.0009	
Ni	0.00025	<0.01%	0.0044	○ (-)
Cu	0.00044	0.02%	0.089	
Zn	0.0051	0.18%	0.062	◎ (0.03)
As	0.00034	0.01%	0.0039	◎ (0.01)
Se	0.00025	<0.01%	0.0036	◎ (0.01)
Mo	0.00018	<0.01%	0.0062	○ (0.07)
Ag	0.000013	<0.01%	0.00044	
Cd	0.000041	<0.01%	0.00047	◎ (0.003)
Sb	0.000085	<0.01%	0.0012	○ (0.02)
Tl	0.000018	<0.01%	0.00039	
Pb	0.0013	0.04%	0.014	◎ (0.01)

※ ◎：環境基準、○：要監視項目

かっこ内は環境基準値または指針値 (単位：mg/L)

### 3.4 水質基準金属元素の濃度推移

#### 3.4.1 PbおよびZnの高濃度出現状況

表2に降水中の濃度が環境基準値を超過したPbおよびZnについて、基準超過時の採取期間を示した。

Pbは、基準値超過は総検体500中6検体(週)で、全体の約1%と少ないが、いずれも調査を開始したH24年度からH25年度と調査期間初期に見られ、おおむね冬季に出現していた。

この高濃度時を対象に、降雨のあった時間帯の上空1500mを起点とする後方流跡線を図4に示した。いずれの高濃度時もそのほとんどが大陸を経由しており、高濃度時のPbの発生源が主に越境由来であった可能性がある。

Znは、11検体で基準値超過しており、調査期間の前半(H24～29年度)に8検体、後半(H30年度～R4年度)に3検体であり、R2年度以降は超過していない。Pbと同様に調査期間後半の出現頻度が減少していた。しかし出現時期は2～5月が中心であり、Pbと傾向が異なっていた。

表2 PbとZnの高濃度(基準値超過)の出現時期

年度	Pb	Zn
H24	5.28 ~ 6.4	H24.3.26 ~ 4.1
	1.7 ~ 1.15	4.1 ~ 4.9
	1.15 ~ 1.21	5.7 ~ 5.14
	3.4 ~ 3.11	5.28 ~ 6.4
H25	12.2 ~ 12.9	12.27 ~ 1.6
	12.27 ~ 1.6	
H26		2.2 ~ 2.9
H29		2.19 ~ 2.26
H30		10.1 ~ 10.9
		2.12 ~ 2.18
R1		2.3 ~ 2.10

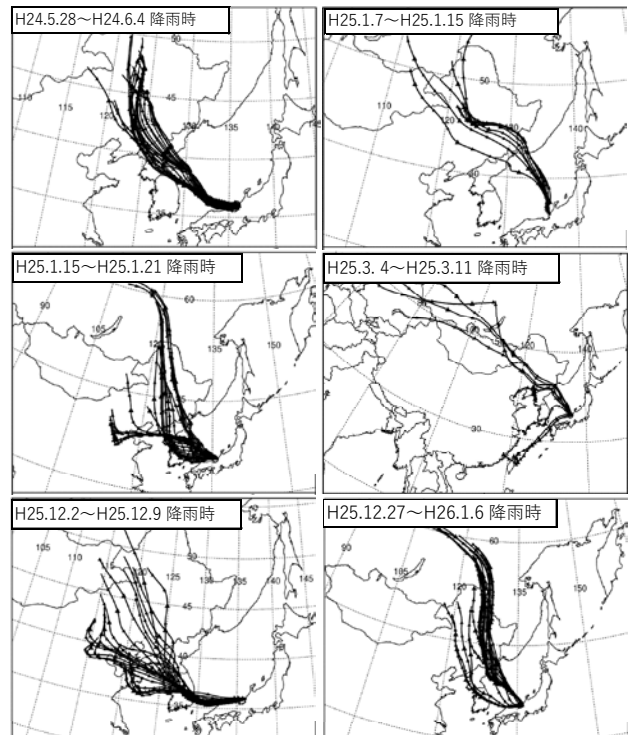


図4 Pb高濃度時(0.01 mg/L以上)の後方流跡線

### 3. 4. 2 水質基準金属元素の濃度の経年推移

図 5(1)および図 5(2)に降雨中の水質基準金属元素および大気中の同元素濃度(PM<sub>2.5</sub>および有害大気)の経年変動を示した。また、図 5(2)には pH ならびに主要陰イオン成分である SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>および NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の推移を併せて示した。

なお、2.1 項のとおり大気中の元素に係る調査は、調査地点が降水調査地点から 4 km 南西に位置する福井局であり、また、試料採取期間も異なることに留意が必要である。また、PM<sub>2.5</sub> 成分分析と、有害大気については、公表されている R3 年度までの結果を使用した。

調査期間の前半(H24~29 年度)と後半(H30~R4 年度)の降水中の各平均値は、Mn を除きいずれの元素も低下していた。

大気中の元素濃度(PM<sub>2.5</sub>および有害大気)についても同様の傾向を示しており、大気中の水質基準金属元素の濃度低下が降水中の濃度低下と関係していることが推察された。

この傾向は、図 5(2)に示した SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>および NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の濃度低下や pH の上昇とも連動していた。

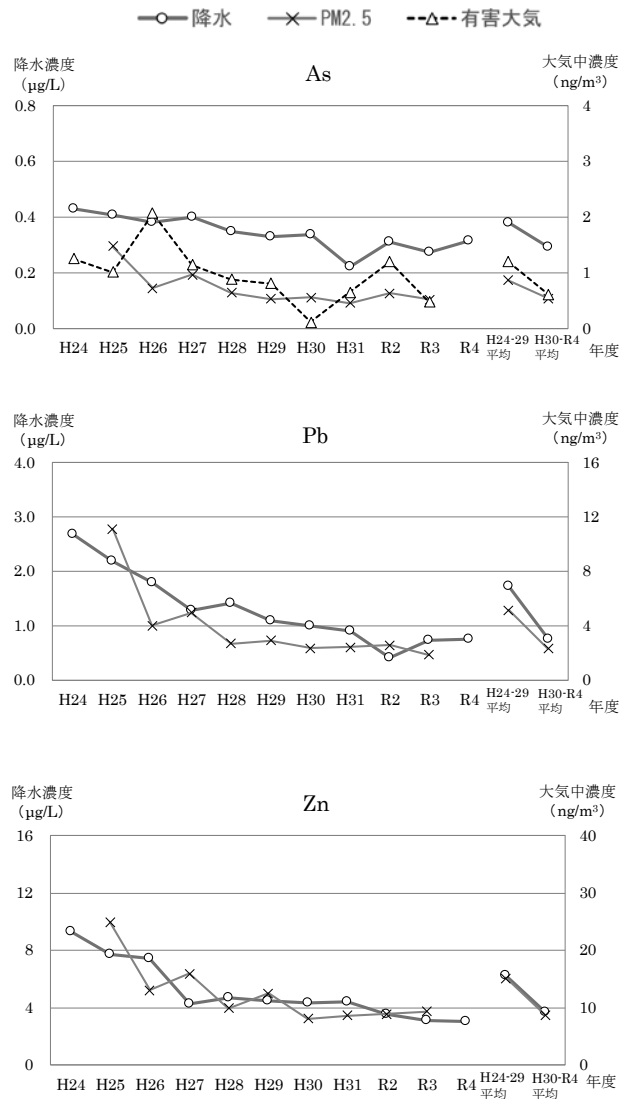
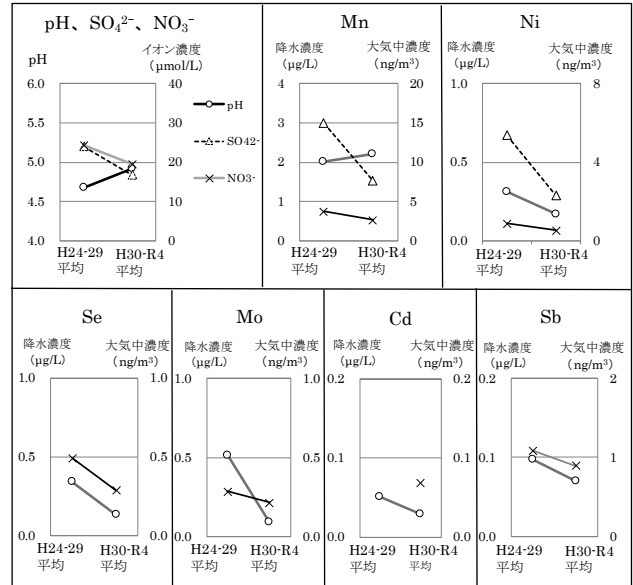


図 5(1) 降水中と大気中の水質基準金属元素の濃度推移

○—降水    ×—PM<sub>2.5</sub>    --△--有害大気



※ PM<sub>2.5</sub> の Cd 濃度は H30 年度から測定  
大気中濃度は H30~R3 年度までの平均

図 5(2) 降水中と大気中の水質基準金属元素の濃度推移

### 3. 4. 3 水質基準金属元素の年間変動

次に、水質基準金属元素の年間変動を図 6 に、沈着量の変動を図 7 に示した。また、各水質基準金属元素および SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>の各月濃度を年間平均濃度で除したものを図 8 に示した。

また、全データを用いた水質基準金属元素および SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>の間の相関係数を表 3 に示した。

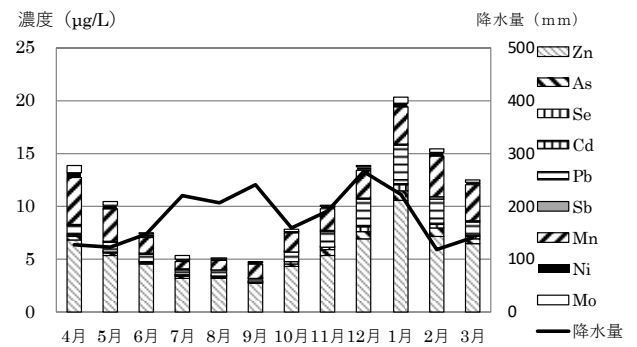


図 6 降水水質基準金属元素等の月別濃度 (平均値)

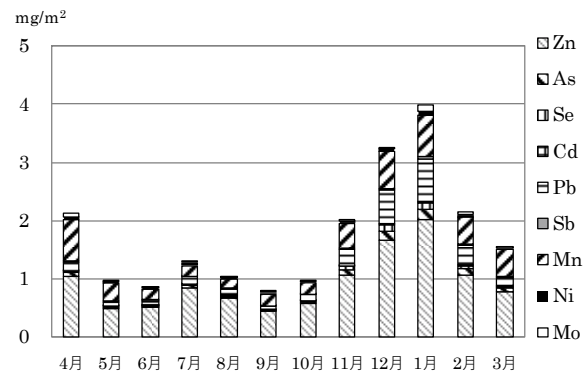
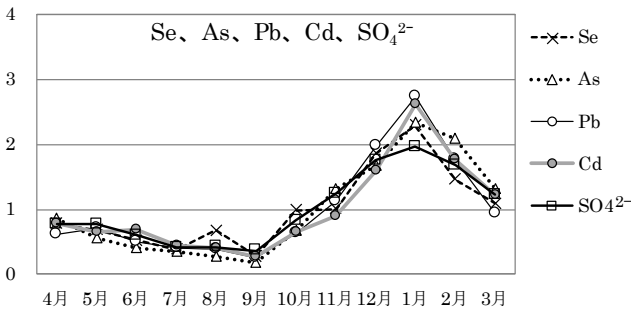


図 7 降水水質基準金属元素の月別沈着量 (平均値)

## 4. まとめ

濃度比（月平均/年間平均）



濃度比（月平均/年間平均）

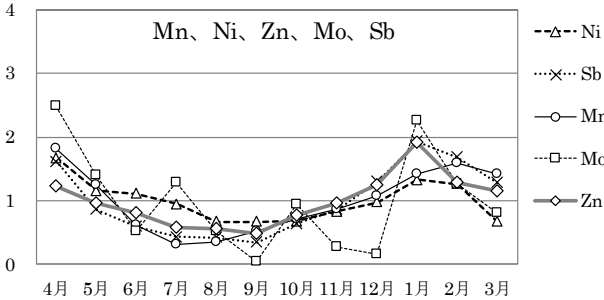


図8 各水質基準金属元素およびSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>の年間濃度変動

3.4.1 項のとおり Pb の高濃度時は冬季に集中していたが、Mo を除く他の水質基準金属元素の濃度と沈着量も同様に1月を中心に高くなる傾向を示していた。ただし、図8のとおり、冬季とその他の季節で大きな差があるAs、Se、Cd、Pbと差が小さいその他の元素に大別された。

前者の変動傾向は、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>の変動とも類似しており、表3のとおり、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を含めた各成分間で相関がみられた。

このことから、当該成分グループは、主な発生源が同じである可能性がある。そしてPbの高濃度時が越境由来と推察されたこと、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>が既報<sup>3)</sup>において冬季にその6割が移流由来と推察されていることから、これら成分の冬季における主たる発生源は越境由来と推察された。

なお、Znは先のグループ成分と相関がみられたが、表2や図8のとおり高濃度出現時期や年間濃度の幅も異なることから、これらグループとは異なる発生源の影響を受けている可能性がある。

表3 水質基準金属元素とSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>の濃度の成分間の相関係数

	As	Se	Cd	Pb	Zn	Mn	Ni	Mo	Sb
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.76	0.71	0.79	0.73	0.75	0.68	0.38	0.07	0.73
As		0.56	0.75	0.70	0.63	0.56	0.32	0.10	0.76
Se			0.70	0.68	0.70	0.54	0.33	0.25	0.55
Cd				0.80	0.76	0.61	0.36	0.17	0.75
Pb					0.71	0.36	0.32	0.12	0.59
Zn						0.66	0.41	0.04	0.69
Mn							0.38	-0.02	0.69
Ni								0.00	0.54
Mo									0.05

降水中の無機元素成分濃度はイオン成分を多く含むNa、Mg、CaおよびKが大部分を占めている。年度による総濃度の変動は、海塩由来と推察されるNaおよびMgの変動によるものであり、主要元素の構成比率に大きな変化はない。

公共用水域や地下水の環境基準項目や要監視項目である9元素のうち、PbとZnで公共用水域や地下水に係る基準値超過が調査期間前半(H24~H29年度)を中心に見られた。直近5年間の平均濃度はその前の期間に対し、ほとんどの元素で減少傾向にあり、大気中の同元素濃度の低下、降水中のpHの上昇およびSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>等のイオン成分濃度の低下と連動していた。

Pbの基準値超過は調査期間初期(H24~H25年度)の冬季に限られ、その原因として越境由来の可能性が推察された。

水質基準金属元素はほとんどが冬季に高い。特に、As、Se、CdおよびPbは高濃度を示しており、その要因として越境由来が示唆された。

## 参考文献

- 1) 藤田大介: 福井県における酸性沈着調査結果—平成21~30年度の調査結果について—, 衛生環境研究センター年報, 19, 68-71 (2020)
- 2) 落井勅, 植山洋一: 県内4地点における酸性降下物調査結果について, 衛生環境研究センター年報, 7, 82-86 (2008)
- 3) 高岡大 他: 全国からみた福井県の酸性雨の特徴とその要因, 福井県衛生環境研究センター年報, 16, 36-45 (2017)
- 4) 野崎義行: 最新の海水の元素組成表(1996年版)とその解説, 日本海水学会誌, 51-5 (1997)

# 藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いた生長阻害試験方法の構築

保月勇志・吉舎直輝

Establishment of the growth inhibition test using cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*

Takeshi HOZUKI, Naoki KISA

## 1. はじめに

福井県の三方五湖と北潟湖はいずれも淡水と海水が混ざる汽水湖である。汽水湖は、河川の末端に位置する地理的条件から、流域の負荷が集積しやすい水域<sup>1)</sup>であり、流域の水田、畑、住居、事業場等の排水中に含まれる栄養塩や化学物質等が湖に集積することとなる。このことにより、有機汚濁が進行しやすく、一方で、湖に棲息する生物としては流域からの化学物質等の影響を直接受けやすい環境となる。

湖水中の植物プランクトンは有機汚濁の主要因であるとともに、一次生産者として水圏生態系の基底をなす生物である。そのバイオマス量や種構成は、湖沼の水質や水圏生態系を左右する極めて重要な要素である。

そのため著者らは、令和3年度から、「微生物を用いた試験による湖沼環境の影響評価に関する研究」を開始した。この研究では、湖内の植物プランクトンが流域負荷から受ける増殖や生長阻害の影響を室内実験系の生物応答試験を用いて評価することを目的としている。今回、流入水による湖内の植物プランクトンの生長阻害の影響を評価するために、藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いた生長阻害試験を構築したので報告する。

## 2. 方法

生長阻害試験は、事業場排水の管理方法として米国などで採用されている全排水毒性 (Whole Effluent Toxicity: WET) 試験<sup>2,3)</sup>を参考とした。ただし、WET試験において広く用いられている緑藻のムレミカヅキモ (*Raphidocelis subcapitata*) は、国内種でないことや、三方五湖および北潟湖に存在しないため、これまで当該湖で観測されている種であり、またフローサイトメーターで測定可能な種として藍藻の *Microcystis aeruginosa* を試験生物として採用した。また、作業の省力化と試料量の削減を図るため、培養容器として従来の三角フラスコに代えてウェルプレートを採用した。

構築した試験系の精度評価については、コントロール試験(n=6)を実施し、藻類生長阻害試験の規範となっている OECD テストガイドラインの評価基準<sup>3)</sup>と比較した。

### 2.1 培養

試験に用いた *Microcystis aeruginosa* (NIES-102)は、国立環境研究所微生物系統保存施設から分譲を受け、シリコ栓付き試験管を用いて、MA 培地により維持培養した。前培養は、ガラス製三角フラスコ(300mL)に OECD 培地 100mL を入れ、維持培養液を 1mL 程度添加し、シリコ栓をして 5 日～7 日培養した。本試験は表 1 の条件で行った。

表 1 試験条件

試験生物	藍藻 <i>Microcystis aeruginosa</i> (NIES-102)
培地	OECD 培地濃縮液 I、III、IV：富士フィルム和光純薬㈱社製 OECD 培地濃縮液 II (FeCl <sub>3</sub> ・6H <sub>2</sub> O 64 mg/L、Na <sub>2</sub> EDTA・2H <sub>2</sub> O 100 mg/L)：フィルターろ過滅菌 (用時調整)
温度	25℃
初期濃度	100,000 cell/mL
照明条件	明期 10 時間、暗期 14 時間
照度	20 μ photons/m <sup>2</sup> /s
振とう	50 rpm
培養容器	γ 滅菌済みの PS 製 6 穴ウェルプレート (Corning 社製)
容量	5 mL

### 2.2 細胞濃度の計数

細胞濃度の計数は、0、1、2、3、4、7 日目に行い、フローサイトメーター (Beckman Coulter 社製 CytoFLEX) を用いて計数した。なお、i 日から j 日の期間における生長速度は次式により算出した。

$$\text{生長速度 } i-j = \frac{\ln(\text{細胞濃度 } j) - \ln(\text{細胞濃度 } i)}{j-i} \quad (\text{単位: day}^{-1})$$

## 3. 結果

### 3.1 構築した試験系の精度確認

OECD テストガイドラインでは、バイオマス量が初期値の 16 倍になること、併行試験間の区間成長速度および平均成長速度の変動係数 (CV) がそれぞれ 35%未満、10%未満であることが求められている<sup>3)</sup>。

コントロール試験における生長曲線は図 1 のとおりであり、細胞濃度が初期値の 16 倍となるまで 7 日を要したが、試験期間中は対数増殖していることを確認した。また、生長速度のばらつきは、区間成長速度 (1~2 日、2~3 日、3~4 日、4~7 日) の CV の最大値は 19%、平均成長速度の CV が 2%であり OECD テストガイドラインの基準を満たすことを確認した (表 2)。

## 4. 考察

### 4.1 試験生物

今回の研究では、試験生物として藍藻 *Microcystis aeruginosa* (NIES-102) を選定した。本株は初期濃度の 16 倍になるまで 1 週間を要することがわかったが、基本的に 3 日間で試験が終了する *Raphidocelis subcapitata* と比較した場合、試験中のサンプリングの回数が増えること



や、管理が煩雑になる点が短所として挙げられる。また、環境水を試料に用いる際は、試験期間中に農薬などの化学物質が分解するおそれがあることなどへの留意が必要である。しかし、*Microcystis aeruginosa* は三方五湖や北潟湖の優占種になったことがある種であることから、実際の湖において起こりうる水環境への影響を捉えるためには有効であり、また、周辺住民の水環境への理解を促す点でも有効であると考えられた。

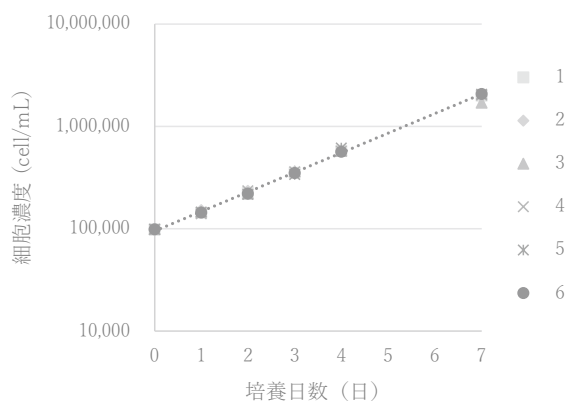


図1 コントロール試験の生長曲線

#### 4.2 ウェルプレートを用いた試験

本研究では、ウェルプレートを用いた試験系を構築することで、従来の三角フラスコを用いた試験系に比べて作業を省力化でき、また、試料量の削減が可能であることが確認できた。しかし、本試験系を構築するにあたって、ウェルプレートの使用にはいくつかの注意点があることがわかった。

1点目は、試験期間中に培養液の蒸発を防ぐ必要があることである。これは、振とうにより液面が揺れることで水分が蒸発しやすく、またウェルプレートが密閉されていないため蒸気がウェルプレートの系外に逃げやすいことが原因と考えられた。ウェルプレートを用いた試験系では試料量が少ないため、少量の蒸発でも細胞濃度への影響は大きい。この対応策として、本体とカバーの間に透明なシールをする方法<sup>4)</sup>が有効であった。

2点目は、試験期間中の光条件を各ウェル間で一定にする

必要がある点である。この対応として、各プレートを細胞濃度の測定毎に180度回転させる方法<sup>5)</sup>が有効であった。なお、複数のプレートを使用する場合は、培養器の中の光条件が一定ではないため、設置する位置もランダムにするなどの工夫が必要である。さらに、環境水を評価する際には、容器の素材がPS等のプラスチックであることにより一部重金属や農薬が吸着する可能性がある点にも注意する必要があると考えられる。

## 5. まとめ

藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いた生長阻害試験を構築し、コントロール試験を実施したところ、OECDテストガイドランの評価基準に適合した。本試験系では、ウェルプレートを使用することにより省力化が実現できたが、いくつかの留意点があることもわかった。今後は、確立した試験法を用いて、三方五湖および北潟湖の流入河川を対象とした調査を実施する予定である。

## 謝辞

本研究は、文部科学省「特別電源所在県科学技術振興事業費補助金」により実施したものです。感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) 環境省：日本の汽水湖～汽水湖の水環境の現状と保全～(2014)
- 2) 環境省・国立環境研究所：生物応答を用いた排水管理法(検討案)(2013)
- 3) OECD：Fresh Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, Guidelines for the Testing of Chemicals NO.201 (2006)
- 4) Environment and Natural Resources in Canada：Biological test method: growth inhibition test using a freshwater alga, Environmental Protection Series (2007)
- 5) Wisconsin Department of Natural Resources Bureau of Watershed Management：Aquatic Life Toxicity Testing Methods Manual (2004)

表2 生長阻害試験の評価

	細胞濃度(cell/mL)						平均生長速度	区間生長速度 (day <sup>-1</sup> )						
	0 day	1 day	2 day	3 day	4 day	7day		1-7day	0~1	1~2	2~3	3~4	4~7	CV
1	98,900	143,260	225,390	352,720	580,160	1,993,680	0.43	0.37	0.45	0.45	0.50	0.41	11%	
2	98,900	152,640	236,070	353,260	573,720	1,969,530	0.43	0.43	0.44	0.40	0.48	0.41	7%	
3	98,900	147,140	220,460	364,820	578,200	1,710,530	0.41	0.40	0.40	0.50	0.46	0.36	13%	
4	98,900	140,610	235,820	360,160	573,850	2,025,740	0.43	0.35	0.52	0.42	0.47	0.42	14%	
5	98,900	146,270	217,810	340,230	615,560	2,062,720	0.43	0.39	0.40	0.45	0.59	0.40	19%	
6	98,900	144,430	220,900	351,720	567,790	2,082,040	0.44	0.38	0.42	0.47	0.48	0.43	9%	
							平均値	0.43	<35% *					
							SD	0.01						
							CV	2%	<10% *	*OECD TG201の評価基準				

