

# B 調 查 研 究

## 論 文

# 宮城県におけるヒトパレコウイルス浸淫状況調査

## Epidemiological Study of Human Parecho Virus in Miyagi, Japan

阿部美和 木村俊介 鈴木優子 川端淑子\*1 植木 洋 佐藤俊郎\*2  
 Miwa ABE Shunsuke KIMURA Yuko SUZUKI Yoshiko KAWABATA  
 Yo UEKI Toshiro SATO

宮城県におけるヒトパレコウイルス (Human parechovirus:HPeV) の浸淫状況を把握するため、宮城県結核感染症発生動向調査事業病原体調査 (発生動向調査検体) と下水処理場流入水及び処理水について RT-PCR 法を用い HPeV 遺伝子の検出を試みた。発生動向調査検体 1,553 件中 18 件, 流入下水検体 79 件中 14 件から HPeV 遺伝子を検出した。HPeV 遺伝子陽性検体 32 件中遺伝子型を決定できた検体は 24 件で HPeV1 が 23 件, HPeV6 が 1 件であった。

キーワード: ヒトパレコウイルス; 発生動向調査; 流入下水

Key words: Human parechovirus; surveillance; wastewater influent

### 1 はじめに

ヒトパレコウイルス (HPeV) は主に小児の胃腸炎疾患や呼吸器疾患患者から検出され、これらの疾患との関連性が示唆されている。健常者や無症状幼児からの検出例も確認されている一方、無菌性髄膜炎、脳炎、心筋炎等との関連も指摘されている。HPeV は VP1 領域の遺伝子配列によって現在のところ 16 の遺伝子型 (分離ウイルスによる血清型は 8 型) に分類されている。今回、宮城県 (仙台市を除く) での浸淫状況を把握するため発生動向調査検体を対象に RT-PCR 法で HPeV 遺伝子の検出を試みた。また地域内での流行の把握を目的として、下水処理施設の流入下水、処理水についても調査を行ったので併せて報告する。

### 2 対象及び検査方法

#### 2.1 対象

2008 年 4 月から 2014 年 3 月までに発生動向調査で採取した糞便 748 件, 鼻咽頭拭い液 805 件, 計 1,553 件 (2008 年 4 月から 2009 年 3 月インフルエンザ対象検体を除く) と, 2012 年 7 月から 2014 年 2 月までに 3 カ所の下水処理場より採取された流入下水検体 79 件, 処理水検体 39 件を対象とした。(表 1, 2)

表 1 発生動向調査検体数

搬入期間	検体数	検体内訳	
		糞便	鼻咽頭拭い液
2008/4~09/3	91	70	21
2009/4~10/3	398	126	272
2010/4~11/3	323	172	151
2011/4~12/3	195	99	96
2012/4~13/3	278	126	152
2013/4~14/3	268	134	134
計	1,553	727	826

\*1 現 環境対策課 \*2 現 食肉衛生検査所

表 2 下水検体調査検体数

下水処理場	採取期間	流入下水	処理水
M下水処理場	2012/7~14/2	40	0
I下水処理場	2012/7~13/3	18	18
T下水処理場	2013/4~14/2	21	21
計		79	39

#### 2.2 方法

##### 2.2.1 検体処理

糞便は 10% 乳剤もしくはシードスワブの滅菌蒸留水洗浄液を 10,000rpm 10 分遠心分離した上清をウイルス遺伝子抽出材料とした。また鼻咽頭拭い液は、鼻腔もしくは咽頭を拭った綿棒を入れて攪拌した細胞接種用液をウイルス抽出液とした。流入下水及び処理水はポリエチレングリコール沈殿法で処理したものをウイルス濃縮液とした。

##### 2.2.2 RNA 抽出

QIAamp®Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いキット添付の説明書に従い RNA の抽出を行った。

##### 2.2.3 RT-PCR

###### 1) 逆転写反応

Superscript® II Reverse Transcriptase (200U/µl) 5×First Strand Buffer, 0.1M DTT, RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40U/µl), 2.5mM dNTP, random primer (100µmol/100µl), Distilled Water を用い, cDNA を作成した。

###### 2) PCR (polymerase chain reaction)

5' UTR 領域を対象とした PCR はプライマー ev22(+)/ev22(-) を使用する Joki-Korpela and Hyypia の方法<sup>1)</sup>を用いた。5' UTR 領域を対象とした PCR において陽性であった検体は、遺伝子型を決定するために VP1 領域を対象とした PCR を行った。1st PCR にプライマー Cap-parECHO-F/ Cap-parECHO-R を, nest PCR に VP1-parECHO-F1/ VP1-parECHO-R1 を用いる Pham らの方法<sup>2)</sup>によって行った。ただし 2013 年 4 月以降の

下水検体については5' UTR領域を対象としたPCRで明らかな陽性例を検出することができなかつたため、VP1領域を対象としたPCRを併用して行った。

#### 2.2.4 遺伝子解析

VP1領域を対象としたPCRにおいて陽性であった検体については、BigDye@Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, ABI 3130 Genetic Analyzerを用いてダイレクトシーケンスを行った。その後MEGA5 (molecular evolutionary genetics analysis, URL: <http://evolgen.bio.lse.tmu.ac.jp/MEGA/>)で塩基配列を決定しアライメントを行った。さらにDDBJ (DNA Data Bank of Japan, URL: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>)のclustalWを用い近隣接合法 (NJ法) で系統解析を行い、TreeExplorで系統樹を作成して遺伝子型を決定した。VP1領域を対象としたPCRで遺伝子型を決定できなかった発生動向調査検体については、5' UTR領域のPCR産物について塩基配列を決定後、DDBJ BLASTにより相同性を検索し、HPeVであることを確認した。

#### 2.2.5 PCR産物のクローニング

VP1領域を対象としたPCR産物からダイレクトシーケンスで遺伝子型を決定できなかった流入下水検体についてはTOPO TA Cloning kits (invitrogen)を用いてクローニングを行い、得られた産物より遺伝子型別を行った。

### 3 結果

発生動向調査検体では糞便検体748件中13件(検出率1.7%)からHPeV遺伝子が検出され、そのうち遺伝子型を決定することができた10件はHPeV1であった。一方鼻咽頭拭い液805件から5件のHPeV遺伝子が検出され、遺伝子型を決定することができた3件のうち2件はHPeV1、1件がHPeV6であった(表3)。18件の陽性例の年齢割合は0歳が38.9%(7/18)、1歳が27.8%(5/18)であり、3歳以下が94.4%(17/18)を占めた。また男女比に差はなかつた。検出時期は3月4月以外の通年であり、他の病原体を検出しなかつた症例のうち最も多い症状は下痢で、次いで発熱、上気道炎であった。一方下水処理場流入下水検体79件中14件(検出率17.7%)よりHPeV遺伝子が検出され、遺伝子型はすべてHPeV1であり(表4)、検出時期は8月~12月であった。しかし、処理水39件からHPeV遺伝子は検出されなかつた。発生動向調査検体及び流入下水検体から検出されたHPeV遺伝子のうちVP1領域の塩基配列を決定できた27例について系統樹を作成した(図1)。系統樹解析により2012年に検出された発生動向検体と流入下水検体の一部が同じクラスターを、また、2013年に検出された検体も同様に2つクラスターを形成した。

表3 発生動向調査HPeV遺伝子陽性検体

年齢(歳)	性別	検査材料	採取月日	臨床診断	症状	遺伝子型	その他検出病原体	
08-S10	2	M	鼻咽頭拭い	2008年 5月20日	手足口病	記載なし	型不明	無
08-S17	2	F	鼻咽頭拭い	2008年 6月28日	ヘルパンギーナ	発熱・下痢	型不明	無
08-S115	1	M	糞便	2009年 1月 8日	感染性胃腸炎	嘔吐・嘔気	HPeV1	NoVG II
09-S81	1	F	鼻咽頭拭い	2009年 7月22日	ヘルパンギーナ	発熱	HPeV1	無
09-S95	0(11ヶ月)	M	糞便	2009年 8月 6日	感染性胃腸炎	下痢	HPeV1	無
09-S183	0(8ヶ月)	F	糞便	2009年10月 4日	感染性胃腸炎	下痢	HPeV1	無
09-S242	3	F	鼻咽頭拭い	2009年10月27日	インフルエンザ	発熱・上気道炎	HPeV1	インフルエンザAH1N1
09-S345	19	F	糞便	2010年 2月 9日	感染性胃腸炎	下痢・嘔吐・腹痛・嘔気	HPeV1	NoVG II
10-S173	3	F	糞便	2010年12月14日	感染性胃腸炎	下痢・嘔吐・腹痛	HPeV1	NoVG II
10-S297	1	F	糞便	2011年 2月16日	感染性胃腸炎	発熱・下痢	HPeV1	NoVG II EAEC
12-S98	1	M	糞便	2012年 9月24日	感染性胃腸炎	下痢	HPeV1	無
12-S103	0(11ヶ月)	F	糞便	2012年 9月26日	感染性胃腸炎	下痢	型不明	無
13-S44	0(11ヶ月)	M	糞便	2013年 7月25日	感染性胃腸炎	下痢	HPeV1	無
13-S51	0(8ヶ月)	M	鼻咽頭拭い	2013年 8月26日	手足口病	口内炎・水疱 (丘疹)・下痢	HPeV6	CA6
13-S75	1	M	糞便	2013年10月21日	感染性胃腸炎	発熱・上気道炎・下痢	型不明	無
13-S78	0(7ヶ月)	M	糞便	2013年10月23日	感染性胃腸炎	発熱・上気道炎・下痢	型不明	無
13-S87	2	M	糞便	2013年11月20日	感染性胃腸炎	下痢	HPeV1	無
13-S127	0(9ヶ月)	F	糞便	2013年12月12日	感染性胃腸炎	下痢・嘔吐	HPeV1	無

表4 流入下水 HPeV 遺伝子陽性検体

採取日	下水処理場	遺伝子型
2012年 8月 8日	M	HPeV1
2012年 8月 22日	I	HPeV1
2012年 9月 5日	I	HPeV1
2012年 9月 19日	I	HPeV1
2012年 9月 19日	M	HPeV1
2012年 10月 3日	I	HPeV1
2012年 10月 17日	I	HPeV1
2012年 11月 7日	I	HPeV1
2013年 8月 21日	M	HPeV1
2013年 9月 18日	T	HPeV1
2013年 10月 9日	M	HPeV1
2013年 10月 23日	M	HPeV1
2013年 11月 6日	M	HPeV1
2013年 12月 4日	T	HPeV1

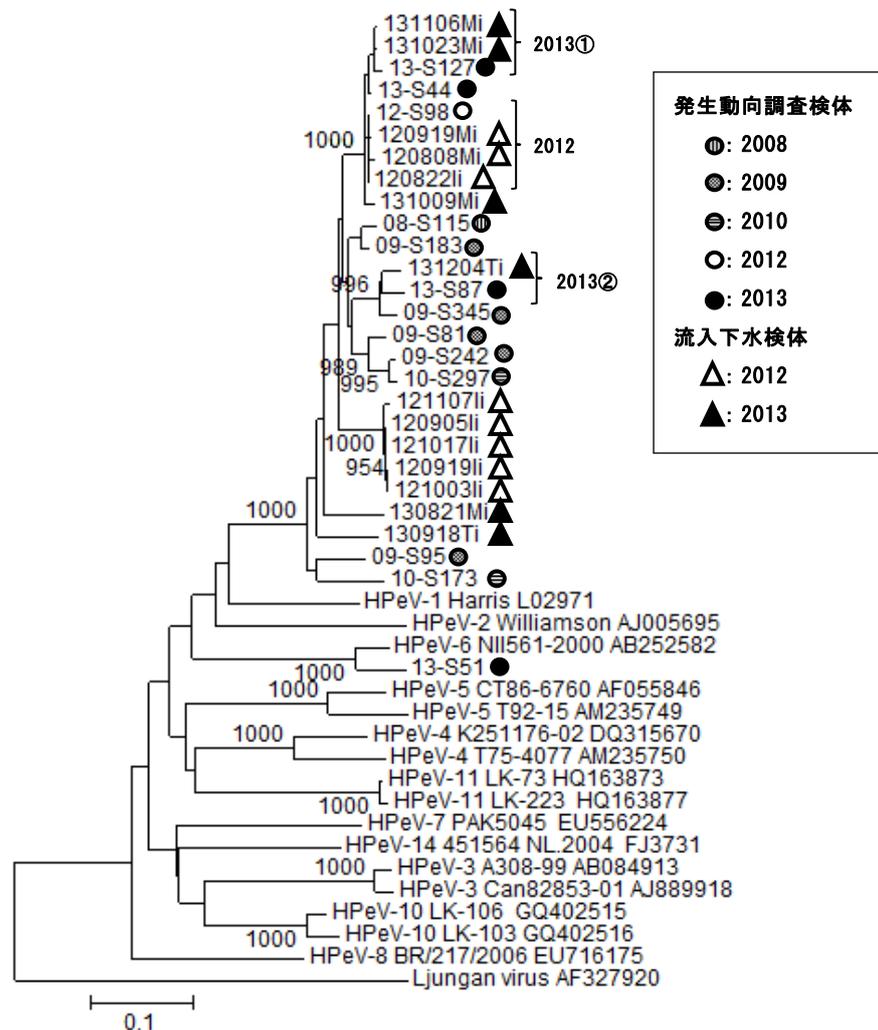


図1. HPeV VP1 領域塩基配列に基づく系統樹 (NJ法)

#### 4 考察

今回の調査では発生動向調査検体 1,553 件中 18 件 (検出率 1.2%) から HPeV 遺伝子を検出し、そのうちの 12 件は HPeV1, 1 件が HPeV6 であった。HPeV のうち臨床検体から検出される遺伝子型の多くは HPeV1 と HPeV3 であるが、今回の調査で HPeV3 は確認されなかった。国立感染症研究所病原微生物検出情報 (IASR, <http://www.nih.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/230-iasr-data/2968-iasr-table-v-p.htm>)

によれば 2008 年と 2011 年には全国的に HPeV3 の検出が多く報告されているものの、本調査では 2011 年採取検体から HPeV 遺伝子が検出されず、宮城県内での流行を確認することはできなかった。また 2008 年採取検体 (インフルエンザ対象検体を除く) から検出した HPeV 遺伝子のうち 2 件は VP1 領域による遺伝子型別ができなかった。この 2 件が HPeV3 であ

る可能性は否定できないが、宮城県内では HPeV3 の伝播がなかったか、その頻度が少なかったことが考えられた。IASR での遺伝子型別集計は HPeV1, 2, 3 のみのため全国での HPeV6 の報告数は不明であるが、HPeV6 は新潟県で発見された遺伝子型<sup>3)</sup>であり、愛知県<sup>4)</sup>、愛媛県<sup>5)</sup>で検出報告があったことから報告例は少ないものの広域で検出される遺伝子型であると考えられる。遺伝子型不明を含めた HPeV 遺伝子陽性患者の年齢は 0~19 歳で 1 歳以下が半数を占めており、既報と同様に乳幼児での感染が多いことを示した。今回の調査では 18 件中 13 件が感染性胃腸炎の臨床診断であった。一般に感染性胃腸炎の流行時期は冬~春で起病病原体として主にノロウイルス、A 群ロタウイルス、サポウイルスなどが検出され、報告数が減少する夏~秋の胃腸炎では病原性大腸菌などの細菌やアデノウイルス 40/41 型が検出されることが多い。今回の調査では流入下水検体から HPeV 遺伝子が 8~12 月まで継続的、断続的に検出され、発生動向調査検体も 8~12 月までの期間に 61.1% (11/18) が検出されている。そのため夏~秋の、特に 1 歳以下の乳幼児については HPeV による胃腸炎も注意する必要がある。HPeV 遺伝子の系統樹解析により発生動向調査検体と流入下水検体の

一部が同じクラスター形成していることから流入下水検体はヒト-ヒト間の伝播を反映しているものと考えられた。流入下水検体の検出率は発生動向調査と比較して高く、市中での流行状況の指標として非常に有効であると考えられた。

## 参考文献

- 1) Joki-Korpela.P and T.Hyypia: *Clinical Infectious Diseases*,26,p.129(1998)
- 2) Pham.N.T, Q.DTrinh, N.Maneekarn, H.Shimizu, S.Okitsu,M.Mizuguchi,andH.Ushijima: *Journal of Clinical Microbiology*, 48,p.115(2010)
- 3) K.Watanabe, M. Oie, M.Higuchi, M. Nishikawa, and M. Fujii: *Emerging Infectious Diseases* , 13, p.889,(2007)
- 4) M.Ito, T.Yamashita, H.Tsuzuki, Y. Kabashima, A. Hasegawa, S.Nagaya, M.Kawaguchi, S.Kobayashi, A.Fujiura, K.Sakae, and H. Minagawa: *Journal of Clinical Microbiology* ,48,p. 2683(2010)
- 5) 青木里美, 山下育孝, :第53回日本臨床ウイルス学会プログラム抄録集,p.S89(2012)

# 宮城県内における近年の腸管出血性大腸菌感染症の動向

## Recent trend of Enterohemorrhagic Escherichia coli Infection in Miyagi

木村 葉子 渡邊香織 山口友美 後藤郁男\*1  
畠山 敬 渡邊 節 佐藤俊郎\*1

Yoko KIMURA, Kaori WATANABE, Yumi YAMAGUCHI, Ikuo GOTO,  
Takashi HATAKEYAMA, Setsu WATANABE, Toshiro SATO

近年の腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は、主流である O157 や O26 以外の血清型を原因とする事例が全国的に増加傾向にある。そこで、県内（仙台市を除く）で過去 5 年間に分離された EHEC を精査し、その発生動向を検証したところ、全国と同様に O157、O26 以外の血清型の増加が確認された。さらに、EHEC145 による広域感染症事例、O 抗原型が変化した事例などの特徴的な事例が含まれている事が判明した。また、平成 25 年度に検出した EHEC の発症と病原因子との関連性を調査した結果、菌の付着等に関わる *eaeA* の保有率に相違があり、発症に *eaeA* が関与している可能性が示唆された。

キーワード：腸管出血性大腸菌；血清型；O 抗原遺伝子；*eaeA*

Key words: Enterohemorrhagic *E.coli*; serotype; O antigen gene; *eaeA*

### 1 はじめに

EHEC 感染症は、感染症法において三類感染症に指定されており、全数把握疾患として、診断した医師は保健所に届出することが義務づけられている。過去 10 年間における有症者と無症状病原体保有者を合わせた全感染者数は毎年 4,000 人前後の報告で推移している<sup>1)</sup>。EHEC の代表的な血清型としては O157 や O26 が知られており、血清型別の検出頻度を年度別に見ると、平成 15 年では O157 が 70%、O26 が 20%と、この 2 つの血清型で全体の 90%を占めていたが、平成 23 年には O157 が 59%、O26 が 21%、平成 24 年は O157 が 53%、O26 が 27%と、ここ最近の 2 年間は 80%まで減少しており、特に O157 の減少が顕著である<sup>1)</sup>。このように近年の EHEC 感染症は、これまで主流となっている O157、O26 以外の血清型を原因とする事例が全国的に増加傾向にある。

そこで本研究では、県内で過去 5 年間に分離された EHEC を精査し、その発生動向を検証した。さらに EHEC における発症と病原因子との関連性を調査したので報告する。

### 2 対象及び検査方法

#### 2.1 対象

EHEC の発生動向の検証には、平成 20～24 年度に分離された患者由来の EHEC 菌株 189 株、患者家族や接触者の便から検出した 198 株及び水から検出した 1 株の計 388 株を対象とした。また、平成 25 年度に O157、O26、O 血清型不明（OUT）の初発患者より検

出した 39 株については、発症と病原因子との関連性について調査を実施した。

#### 2.2 方法

##### 2.2.1 EHEC 分離同定

菌の分離は、平板培地には DHL 寒天培地（栄研化学）、クロモアガーSTEC（関東化学）、各種糖を添加した CT・マッコンキー寒天培地（自家調整）等の選択培地を使用し、増菌培地には mEC 培地（日水製薬）を使用した。平板培地上に発育した疑わしいコロニーについて、TSI 寒天培地（栄研化学）、LIM 培地（日水製薬）に接種し、生化学性状を確認した。大腸菌が分離された場合は血清型別試験を実施した。ペロ毒素の有無は、EVT-1・EVT-2 及び EVS-1・EVS-2（TAKARA）を用いた PCR 法によるペロ毒素遺伝子の検出と、VTEC-RPLA「生研」（デンカ生研）を用いた逆受身ラテックス凝集反応による毒素産生試験により確認した。

##### 2.2.2 菌株の遺伝子解析

分離した EHEC 菌株は、全て制限酵素 *Xba* I を用いたパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法を実施した。CHFF Mapper（BIO RAD 社）を用い、パルスタイム 2.2～54.2 秒、泳動時間 19 時間の条件で行った。解析には Fingerprinting II（Dice）を用いて遺伝子型を比較した。

##### 2.2.3 病原因子保有状況調査

平成 20 年に調理従事者等の検便検査の項目が変更され、EHEC については血清型が O157 のみであったものが、全ての EHEC が対象となった<sup>2)</sup>。その結果、県内では無症状病原体保有者が増加してきている。

\*1 現 食肉衛生検査所

表 1 大腸菌病原因子検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	PCR産物 サイズ(bp)
<i>eaeA</i>	mSK1	CCGGCACAAGCATAAGC	310
	eaekas_a	TGGCAAAATGATCTGCTG	
<i>bfpA</i>	EP1	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC	326
	EP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	
<i>aggR</i>	AggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254
	AggRkas2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	
<i>astA</i>	EAST-1S	GCCATCAACACAGTATATCC	106
	EAST-1AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC	

そこで EHEC における発症と病原因子との関連を調べるため、平成 25 年度の対象 39 株について、菌の定着等に関わる 4 種類の病原因子 (*eaeA*, *bfpA*, *aggR*, *astA*) の保有状況について、表 1 に示したプライマーを用いて PCR 法により検索し、症状との関連性を検証した。

### 3 結果

#### 3.1 過去 5 年間における EHEC 検出状況

平成 20~24 年度に検出された EHEC を O157, O26, その他の血清型に分け、その検出割合を比較したものを図 1 に示した。宮城県では O26 の割合が多い特徴があることが報告されているが<sup>3)</sup>、この 5 年間においても同様の傾向が確認された。また、平成 23 年度から O157, O26 以外の血清型の割合が特に増加し、全体の約 50%を占めていた。

表 2 に、県内の O157, O26 以外の血清型の検出状況を示した。事例数、血清型の種類とも年々増加傾向にあり、平成 20 年度では 12 事例 6 種類であったが、平成 24 年度では 22 事例 10 種類であった。また、平成 22 年度からは OUT 株が毎年検出されており、その大半は無症状病原体保有者からの検出であった。

さらに個々の事例について検証を行った結果、複数の特徴的な事例が含まれていることが判明した。

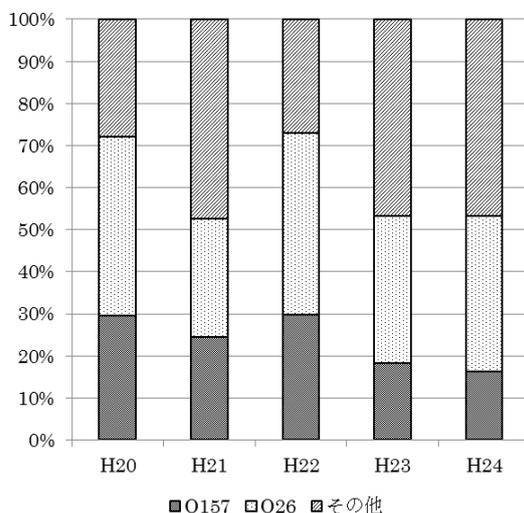


図 1 県内で検出した EHEC の血清型別割合の推移

表 2 O157, O26 以外の血清型検出状況

年度	事例数	血清型数	種類
H20	12	6	O91,O103,O111,O119,O121,O146
H21	10	5	O74,O103,O111,O121,O145
H22	17	7	O91,O103,O111,O121,O124,O127a,OUT
H23	22	8	O15,O55,O91,O103,O111,O121,O145,OUT
H24	22	10	O6,O55,O74,O91,O103,O111,O121,O145,O159,OUT

#### 3.2 特徴的な事例の検証

##### 3.2.1 EHEC0145 による広域感染症事例

平成 24 年度は県北部で同時期に 3 件の O145 事例が発生した。本事例を含め、過去 5 年間の 5 事例について PFGE 法による遺伝子型の比較を行った結果、平成 24 年度の事例から検出された菌株は他年度に検出したものと明らかに異なる遺伝子型を示しており、県内で新たなタイプの O145 株が広範囲で流行していたことが明らかとなった (図 2)。

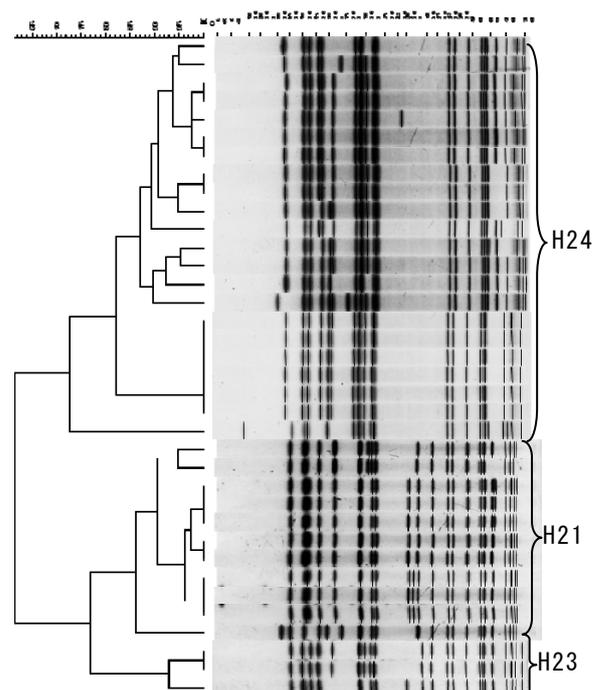


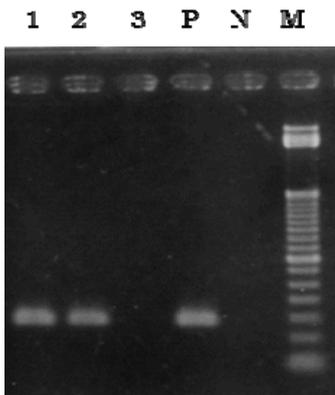
図 2 O145 の PFGE 解析結果

3.2.2 O 抗原型が変化した事例

平成 24 年度に家族内で発生した O26 事例では、患者を含む家族 10 名を調査し 5 名から EHEC を検出した。このうち 4 名から O26:H11 VT1 株を検出したが、残り 1 名からは OUT:H11 VT1 株が検出された。そこで O26 の O 抗原遺伝子 *wzx* を検出するプライマーを用いた PCR 法及び PFGE 法による精査の結果、OUT 株についても O26 抗原遺伝子を保有しており、血清型が変化したものであることが判明した（表 3、図 3、4）。

表 3 O26 抗原遺伝子検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー名	塩基配列(5'→3')	PCR産物 サイズ(bp)	文献
wzx	F	GCGCTGCAATTGCTTATGTA	152	4)
	R	TTTCCCCGCAATTTATTCAG		



- ・ レーン1：本事例O26株
- ・ レーン2：本事例OUT株
- ・ レーン3：他事例OUT株

図 3 O26wzxPCR 結果

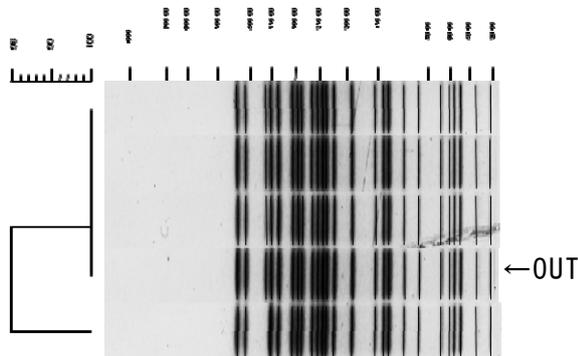


図 4 O26PFGE 解析結果

3.3 病原因子保有状況

各血清型の症状の有無と病原因子の保有状況を表 4 に示した。症状については、O157 では 100%，O26

では 92%の人が症状を呈していたのに対し、OUT ではわずか 20%であった。病原因子の保有状況については、*eaeA* の保有に相違が見られ、O157 及び O26 では 100%保有していたが、OUT では 33%にとどまった。また、有症者については 100%の保有率であることから、EHEC 感染症の発症に *eaeA* が関与している可能性が唆された。*eaeA* 以外の病原因子については、明確な関連性は認められなかった。

表 4 病原因子保有状況

血清型	症状あり	<i>eaeA</i>	<i>bfpA</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>
O157	12/12(100%)	12/12(100%)	0	0	0
O26	11/12(92%)	12/12(100%)	0	0	3/12(25%)
OUT	3/15(20%)	5/15(33%)	0	0	2/15(13%)

4 考察

O157, O26 以外の血清型を原因とする EHEC 感染症事例は、近年全国的に増加傾向であるが、宮城県においても同様で、その傾向は全国より顕著であることが確認された。この傾向の理由の一つとして、遺伝子検査の導入が考えられる。EHEC のうち、培養による分離法が確立されている血清型は O157, O26 を含め数種類のみである。遺伝子検査によりベロ毒素の有無が早期に判明することから、培養のみでは分離が難しい血清型についても検出できる確率が高くなり、その結果検出数が増加しているものと思われる。

平成 24 年度の O145 広域感染症事例では、人や食品を介した感染の可能性が考えられ、各保健所において調査を実施したものの原因究明には至らなかった。複数の保健所が関わる事例については、関係機関の連携を強化し、原因究明をする必要があると考える。O26 の事例で検出された OUT 株は、同一事例の中で O 抗原型が何らかの原因により変化したものであった。本事例のように O 抗原型が変化したもの以外にも、初発患者の届出と異なる血清型の EHEC を本人や家族から検出する事例は年間複数発生しており、EHEC の検査は当初の想定とは異なる結果を生じる場合が少なくない。事例に的確に対応するためには、疫学情報に加え、遺伝子検査法などを駆使しながら様々な可能性を想定して検査を進めていくことが重要であると考えられる。

EHEC の発症と病原因子との関連性について、O157, O26 の感染者の多くは発症者または有症者として発見されるが、OUT は職場の定期検便などから無症状病原体保有者として届出されることが多い。EHEC の発症機序には、菌の腸管付着に関わる因子に係る遺伝子である *eaeA* が関与しているとの報告がある<sup>5)~7)</sup>。今

回の調査でも O157, O26 は全て *eaeA* を保有していたのに対し, OUT の約 6 割は保有していなかった。また有症者においては保有率が 100% という結果となり, これらの報告を支持するものであると思われる。しかし, *eaeA* 以外の病原因子 *bfpA*, *aggR*, *astA* については, 今回の結果から発症との明確な関連性は確認できなかった。これらの解明は今後の課題であると考ええる。

### 参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：腸管出血性大腸菌感染症 2014 年 4 月現在。病原微生物検出情報 35 : 117-118, 2014.
- 2) 平成 20 年 6 月 18 日付厚生労働省通知 食安発第 0618005 号
- 3) 山口友美, 田村広子, 佐々木美江, 島山敬, 御代田恭子, 秋山和夫：宮城県保健環境センター年報, 22, 42 (2004)
- 4) Appl. Environ. Microbiol. 70 1830 (2004)
- 5) Boerlin P, McEwen S, Boerlin-Petzold F, et al. Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-1 Escherichia coli and Disease in Humans. J Clin Microbiol. 1999;37(3):497 - 503.
- 6) 熊谷奈々子, 須釜久美子, 平澤恭子, 長沢正秋, 渡部啓司：福島県衛生研究所年報, 23, 39-42 (2005)
- 7) 中居真代, 宮崎麻由, 那須務, 佐藤由紀, 渡邊節, 沖村容子：宮城県保健環境センター年報, 30, 23-26 (2012)

# Q(Quenching)プローブを用いた LAMP 法によるノロウイルスの検出

## Detection of Norovirus using Loop-Meditated Isothermal Amplification Assay (LAMP) with Quenching Probe

植木 洋 木村俊介 鈴木優子 阿部美和 佐藤俊郎\*1 真砂佳史\*2 大村達夫\*2  
Yo UEKI, Shunsuke KIMURA, Yuko SUZUKI, Miwa ABE, Toshiro SATO,  
Yoshifumi MASAGO, and Tatsuo OMURA

多検体からノロウイルス (NoV) 遺伝子を短時間で検出するために loop-mediated isothermal amplification 法と消光プローブを組み合わせた検査方法 (Q-LAMP 法) を開発した。NoV 遺伝子の検出に一般に用いられている通知法の定量 PCR 法と同一検体から抽出した RNA を用いて結果を比較したところ、下水検体では 63.5%、カキ検体では 75.0% の一致率が確認された。特に、下水検体では定量 PCR 法陽性で Q-LAMP 法陰性の検体が 8 検体であったのに対し、定量 PCR 法陰性で Q-LAMP 法陽性の検体が 15 件確認され、Q-LAMP 法は NoV 遺伝子の検出方法として有効であることが示唆された。

キーワード：Q-LAMP 法；定量 PCR 法；ノロウイルス；カキ；下水  
Key words：Q-LAMP; quantitative PCR; norovirus; oyster; sewage

### 1 はじめに

ノロウイルス (NoV) 遺伝子の検出法は一般に平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号の通知 (以下 通知法) <sup>1)</sup> の定量 PCR 法または RT-PCR 法で行われている。定量 PCR 法は検出感度と特異性に優れているが一度に検査できる検体数に制約があり、通知法に従った場合 15 検体と、一方 RT-PCR 法は胃腸炎症状を示した臨床検体などのウイルス濃度が高い検体には適してはいるものの、ウイルス濃度が低い検体には引き続き nested PCR を実施し、ウイルス遺伝子を増幅する上に、サザンハイブリダイゼーションやシーケンシングなどで増幅された遺伝子の確認が必要になり、検査結果が得られるまで数日間を要する。これらの問題を解決すべく loop-mediated isothermal amplification 法 (LAMP 法) に消光プローブ (QProbe) を組み合わせた手法 (以下 Q-LAMP 法) を開発し、流入下水及びカキからの NoV 遺伝子の検出に適用し定量 PCR 法と結果の比較を行った。

### 2 検査材料と方法

#### 2.1 Q-LAMP 法で検出可能な NoV 遺伝子型の検討

Q-LAMP 法で検出可能な NoV の遺伝子型を把握するため、分子疫学的解析で遺伝子型が既知の NoV 遺伝子を含む試料について、Q-LAMP 法で NoV 遺伝子の検出を行った。対象とした遺伝子群は、GI 群は GI/1, GI/4, GI/7, GI/8, GI/10, GI/11, GI/14, GII 群は

GII/3, GII/4, GII/6, GII/13 とした。なお、検体はいずれも感染性胃腸炎患者便から抽出した RNA とした。

#### 2.2 カキ検体への適用

平成 25 年 10 月に県内の下水処理施設の処理水放流口近傍にカキを垂下した。その後 12 月から 1 月の期間に毎週 10 個体ずつ採取し (平成 26 年第 1 疫学週を除く) 計 80 個体を検査対象とした。

#### 2.3 下水検体への適用

県内の 2 か所の下水処理施設で平成 25 年 4 月から平成 26 年 2 月までに採水した 63 件を対象とした。一施設では流入下水 (最初沈殿地越流水) と処理水 (塩素添加前) を採取し、他施設では流入下水のみ採水した。

#### 2.4 検査方法

##### 2.4.1 検体からのウイルス RNA 抽出

カキ中腸腺からのウイルス抽出は細胞破砕法 <sup>2)</sup> で行った。一方、下水検体のウイルス濃縮はポリエチレングリコール沈澱法で行い、流入下水は 50 倍、処理水は 500 倍に濃縮した。ウイルス RNA の抽出は QIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen) を用いて行った。

##### 2.4.2 Q-LAMP 法

Q-LAMP 法は「ノロウイルス G1 検出試薬キット」と「ノロウイルス G2 検出試薬キット」 (栄研化学) を使い、添付書に従い遺伝子群別に試薬を調整した。すなわち、1 テストあたり、2 倍 Reaction Mix 12.5 $\mu$ L, Primer Mix 2.5 $\mu$ L, Distilled Water 3.0 $\mu$ L を加え 95 $^{\circ}$ C 5 分加温後、5 分氷冷した。その後 Enzyme Mix 1.0 $\mu$ L と 10 $\mu$ M の QProbe 1.0 $\mu$ L 添加し検体から抽出した RNA を 5 $\mu$ L 加えた。63 $^{\circ}$ C 90 分の反応後、解離曲線解析を行うために 95 $^{\circ}$ C 15 秒加温の後 40 $^{\circ}$ C から 90 $^{\circ}$ C に

\*1 現 食肉衛生検査所

\*2 東北大学未来科学技術共同研究センター

0.2°C/秒で温度を上昇させた。経時的蛍光強度の測定は Applied Biosystems の PRISM 7900HT Fast リアルタイム PCR システムを用いた。プローブの塩基配列は GI 群が GIQP : GAT GGC GTC TAA GGA C, 同じく GII 群が GIIQP : ATG AAG ATG GCG TCG AAT GAC (下線部は Locked Nucleic Acid) とし、各プローブの 3' 末端を蛍光色素で標識した。

Q-LAMP 法の結果の解析は、以下の二方法で行った。①解離曲線解析にて検体ごとに蛍光値を測定した。次に、95°Cの蛍光強度値に乗ずることで当該蛍光強度値が 1 となる補正係数を検体ごとに求め、この係数を、各検体で得られたすべての蛍光強度に乗ずることで補正蛍光強度値を求めた。さらに各検体の補正蛍光強度値を、陰性コントロールにおける同一温度の補正蛍光強度値にて割り、その値に 100 を乗じ蛍光消光率とした。得られた蛍光消光率を、温度に対してプロットしたグラフを作成し、陽性コントロールと比較した。②解離曲線解析にて検体ごとに微分蛍光値を取得した。次に、90°Cの微分蛍光値に乗ずることで、当該微分蛍光値が 1 となる補正係数を検体ごとに求め、この補正係数を、各検体で得られたすべての微分蛍光値に乗ずることで補正微分蛍光値を求めた。その後、各検体の補正微分蛍光値から、陰性コントロールにおける同一温度の補正微分蛍光値を差し引いて得られたデータを温度に対してプロットし、得られたグラフを、同様の方法で作成した陽性コントロールと比較した。

#### 2.4.3 定量 PCR 法

定量 PCR 法は通知法<sup>1)</sup>に準じて行った。すなわち、NoV の遺伝子型 GI 群の検出にはプライマー COG1F 及び COG1R (各 100pmol/μL), TaqMan プローブ RING1-TP (a) 及び RING1-TP (b) (各 4pmol/μL) を、NoV の遺伝子型 GII 群の検出にはプライマー COG2F, COG2R, ALPF (各 100pmol/μL), TaqMan プローブ RING2AL-TP (4pmol/μL) を用いて GI 群、

GII 群別々に反応を行った<sup>3)</sup>。反応条件は 50°C 2分, 95°C 10分の熱処理後、95°C 15秒, 56°C 1分の反応を 45回で行い、各遺伝子群の増幅曲線及び検量線を確認した。

定量 PCR 用ノロウイルス GI 群, GII 群コントロール DNA は、国立感染症研究所感染症情報センター第六室より分与されたものを用いた。また、定量値は蛍光強度が閾値に達した場合に検量線から求めた値を用い、通知法に従い各遺伝子群 duplicate で 10 コピー/well 以上を陽性とした。

### 3 結果

Q-LAMP 法で検出可能な GII 群 NoV の遺伝子型について、補正微分蛍光値を用いて解析した結果を図 1 に示す。

解離曲線解析では、増幅完了後、95°Cで 15秒間加熱し、40°Cに下げた後、0.2°C/秒で 90°Cまで温度を上昇させ、その間蛍光強度ならびに微分蛍光値を連続的に測定した。さらに、得られた蛍光強度より前述の解析方法にて補正微分蛍光値を算出した。

QProbe は、標的遺伝子に結合することで蛍光消光し、解離することで蛍光を発する。このため、解離曲線解析により得られた補正微分蛍光値は、標的遺伝子が存在した場合、QProbe との解離に起因する蛍光変化が最も著しい温度において、最も低い値を示す。このため、補正微分蛍光値を温度に対してプロットしたグラフでは負のピーク (以下 解離ピーク) が観察される。一方、標的遺伝子が存在しない場合、蛍光変化は発生しないため解離ピークは確認されない。このように Q-LAMP 法では、解離ピークの有無を確認することにより、標的遺伝子を検出することが可能になる。

今回の検討では陰性コントロールを除くすべての検体で 71°C付近を頂点とする解離ピークが確認された。この結果より、GII 群遺伝子は GII/3, GII/4, GII/6,

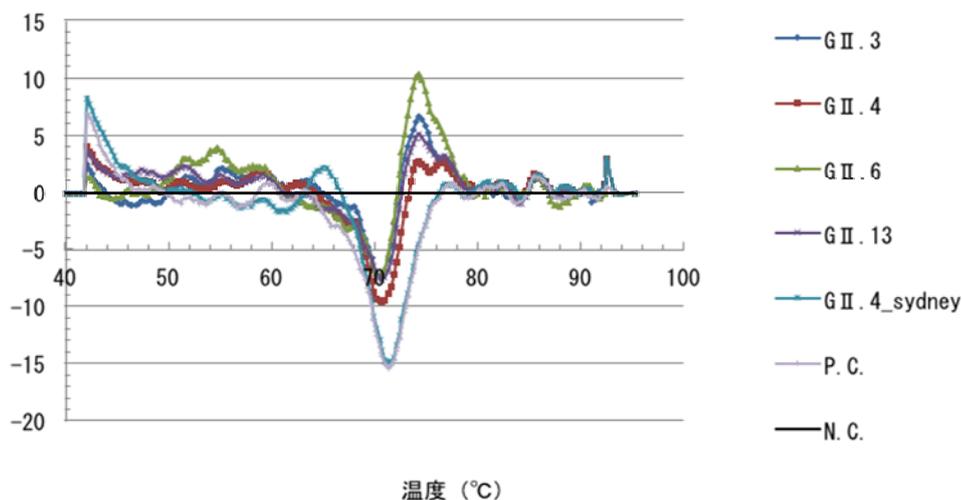


図 1. 遺伝子型既知の GII 群 NoV 遺伝子の補正微分蛍光値を用いた解析結果

表 1. カキを対象とした定量 PCR 法と Q-LAMP 法による NoV 遺伝子の検出結果

		Q-LAMP	
		陽性	陰性
qPCR	陽性	52	12
	陰性	8	8

表 2. 流入下水を対象とした定量 PCR 法と Q-LAMP 法による NoV 遺伝子の検出結果

		Q-LAMP	
		陽性	陰性
qPCR	陽性	22	8
	陰性	15	18

GII/13 に属する株について検出が可能であることが明らかになった。同様に GI 群について検討した結果、GI/1, GI/4, GI/7, GI/8, GI/10, GI/11, GI/14 型に属する株の検出が確認できた。

検出感度についてカキ検体 (n=80) を対象とし Q-LAMP 法と定量 PCR 法と比較した結果を表 1 に示す。両方法の一致率は 75.0% でであった。

同じく流入下水検体 (n=63) を対象に Q-LAMP 法と定量 PCR 法の検出結果を比較した結果を表 2 に示した。両法の解離曲線解析では、間には 63.5% の一致率が確認された。特に下水検体では、qPCR で陰性にもかかわらず Q-LAMP で陽性であった検体が 15 検体確認された。

#### 4 考察

Q-LAMP 法はウイルス RNA 抽出後約 2 時間以内で反応が終了し、1 検体を 1 チューブで検査した場合は、46 検体同時に検査が可能である。今回の結果より、Q-LAMP 法と定量 PCR 法と間に高い一致率が得られたことから、本研究で設計した QProbe を用いた LAMP 法は多検体のカキや下水を対象とした NoV 遺伝子の検出には有効であると推測された。

#### 5 謝辞

QProbe の開発及び解析方法についてご教授頂いた日鉄住金環境 (株) の関係者に感謝いたします。本研究は宮城県農林水産部の生がきノロウイルス対策事業及び独立行政法人 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業の「迅速・高感度・網羅的な病原微生物検出による水監視システムの開発」によって行われた。

#### 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課, ノロウイルスの検出法について, 職安監発第 0514004 号, 2007.
- 2) Y. Ueki, D. Sano, T. Watanabe, K. Akiyama, and T. Omura. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Wat. Res.*, 39, 4271-4280, 2005.
- 3) Kageyama, T., S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda, and K. Katayama. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1548-1557, 2003.

# 有機水銀，無機ヒ素の化学形態別分析方法の検討

## Examination of speciation analysis method for organic mercury or inorganic arsenic

高橋祐介 瀧澤 裕 大倉 靖

Yusuke Takahashi, Yu Takizawa, Yasushi Okura

食品に含まれる有機水銀（モノメチル水銀）及び無機ヒ素の化学形態別分析方法について検討し、いずれの元素においても誘導体化により良好な感度と精度をもって測定可能であることを確認した。モノメチル水銀については、テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液を用いたフェニル化により、測定溶液として定量下限値 7.5ng/ml, 300ng/ml までの直線性を確認した。無機ヒ素については、五価ヒ素の三価ヒ素への還元のもの、ジメルカプト-1-プロパノールとの複合体化により、測定溶液として定量下限値 0.1ng/ml, 200ng/ml までの直線性を確認した。いずれの測定においても測定溶液に含まれる同一元素の他の化学形態の影響は確認されず、定量下限値における 6 回繰り返し測定において併行精度 (RSD%) が 10%未満であり、良好な精度をもった測定方法であることを確認した。

キーワード：メチル水銀；無機ヒ素；ガスクロマトグラフ-質量分析装置；誘導体化

Key words: Methyl Mercury; Inorganic Arsenic; GC-MS; Derivatization

### 1 はじめに

有害重金属の摂取について、国際的な基準作りが進みつつある。現在、国内では、コメ中のカドミウム (Cd)、水産物中の水銀 (Hg) について基準値又は暫定的規制値が設定されている<sup>1),2)</sup>。国内における有害重金属の中毒事例として、カドミウム、水銀の他に、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、ヒ素 (As)、スズ (Sn)、クロム (Cr)、鉛 (Pb) によるものが報告されている<sup>3)</sup>。食品中金属元素分析方法として、総水銀及び総ヒ素の分析方法については、既報<sup>4)</sup>により報告したところである。

しかしながら、元素によっては化学形態により毒性が異なるものがある。水環境中における水銀は、微生物等により毒性の強いメチル水銀に代謝され、食物連鎖を通して大型魚類に蓄積されることが知られている。このため、総水銀の暫定的規制値を超える水銀を検出した魚類については、メチル水銀の個別分析を実施しなければならない。現在、当センターの検査実施標準作業書では、ベンゼン抽出の後にガスクロマトグラフ-電子捕獲検出器 (GC-ECD) による測定を行っているが、ベンゼン使用による環境負荷と電子捕獲検出器を保有するための放射能安全管理という問題がある。

ヒ素については、アルセノベタインや糖化合物 (アルセノシュガー) 等の有機態は比較的毒性が低いとされているが、無機形態であるヒ酸及び亜ヒ酸の毒性が高く、無機ヒ素を多く含む海藻類の摂取を控えるよう勧告している国もある。現在は、食品中のヒ素含有量に関する基準値等はないが、化学形態別分析を実施することでヒ素の摂取実態を把握することができる。食品に含まれるヒ素の化学形態別分析が可能な機器として、高速液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ-質量分析装置 (HPLC-ICP-MS) が挙げられるが、当センターには整

備されていない。

本研究では、食品中の有害重金属類のうち、水銀とヒ素の化学形態別分析を実施するために、誘導体化によりガスクロマトグラフ-質量分析装置 (GC-MS) といった汎用機器での分析が可能となるか検討し、「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」<sup>5)</sup> (以下、「金属ガイドライン」という。) に従い、選択性、検量線の直線性、定量下限値、定量下限値における併行精度を評価した。

### 2 対象及び検査方法

#### 2.1 試薬類

有機水銀の標準品として塩化メチル水銀、塩化エチル水銀、酢酸フェニル水銀 (いずれも関東化学) を用いた。無機ヒ素の標準品としてヒ素標準溶液 (関東化学)、有機ヒ素の標準品としてアルセノベタイン (NMIJ CRM 7901-a No.152)、ジメチルアルシン酸 (NMIJ CRM 7913-a No.115)、メチルアルソン酸、フェニルアルソン酸 (いずれも関東化学) を用いた。誘導体化反応試薬として、塩酸、テトラフェニルホウ酸ナトリウム、ヘキサン、L-システイン、10%塩化スズ溶液、0.1mol/l ヨウ化カリウム溶液、ジメルカプト-1-プロパノール、トルエン (いずれも関東化学) を使用した。

#### 2.2 方法

##### 2.2.1 メチル水銀のフェニル化

有機水銀標準品の希釈は全て 1%システイン溶液水を用いて行った。有機水銀標準溶液を水銀としてそれぞれ 1ppm となるよう希釈、混合し、その 10ml を GC-MS の選択的イオン分析 (SIM) 条件の検討に用いた。GC-MS の SIM 条件を確定した後に定量範囲と定量下限値の確認のため、7.5, 15, 30, 45, 90, 150, 300ng/ml の標

準溶液をそれぞれ 10ml 調製した。

有機水銀のフェニル誘導体化法については、西村らの方法<sup>6)</sup>を参考とし、塩酸酸性条件下においてテトラフェニルホウ酸ナトリウムによるフェニル化を行い、フェニル化アルキル水銀をヘキサンに抽出する方法を採用した。調製した各標準溶液 10ml に対し、6N HCl を 0.2ml、1%テトラフェニルホウ酸ナトリウム溶液を 2.5ml、*n*-ヘキサンを正確に 5ml 添加し、室温で 120 分間緩やかに振とうした。振とう後に 2500rpm、5 分間遠心分離し、ヘキサン層を回収した。回収したヘキサン層に無水硫酸ナトリウムを少量加え、水分の混入がないことを確認し、GC-MS を用いて測定した。

### 2.2.2 ヒ素化合物のジメルカプト-1-プロパノール複合体化

無機ヒ素の還元については、竹内らの方法<sup>7)</sup>を参考とし、溶液中の無機ヒ素 (As(III), As(V)) を還元剤により As(III) とし、ジメルカプト-1-プロパノール (BAL) 複合体化を行うこととした。ヒ素の還元は、10%塩化スズ溶液、0.1mol/l ヨウ化カリウム溶液を使用した。BAL は 0.2%メタノール溶液として使用した。

ヒ素標準溶液は精製水を用いて 1ppm に希釈し、その 10ml を GC-MS の SIM 条件の検討に用いた。GC-MS の SIM 条件を確定した後に定量範囲と定量下限値の確認のため、0.1, 1, 10, 50, 100, 200ng/ml の無機ヒ素標準溶液をそれぞれ 10ml 調製した。ヒ素標準溶液 10ml に 10%塩化スズ溶液 1ml、0.1mol/l ヨウ化カリウム溶液 1ml 及び 0.2%BAL 溶液 1ml を加え、トルエンを正確に 5ml 添加し、室温で 30 分間緩やかに振とうした。振とう後に 2500rpm、5 分間遠心分離し、トルエン層を回収した。回収したトルエン層に無水硫酸ナトリウムを少量加え、水分の混入がないことを確認し、GC-MS を用いて測定した。

### 2.3 ガスクロマトグラフ-質量分析装置条件

誘導体化後の水銀及びヒ素の検出には、Varian 社製 CP3800GC-1200L 質量分析装置を使用した。分析においては、Scan モードによりフェニル化アルキル水銀及びヒ素-BAL 複合体のマススペクトルを確認した。定量は SIM モードにて実施した。GC-MS による分析条件を表 1 に示す。

表 1 機器分析条件

	メチル水銀分析	無機ヒ素分析
装置	Varian3800GC-1200LTQMS	
カラム	Agilent HP-5MS	
注入口温度	280℃	
キャリアガス	ヘリウム	
オープン温度	0min 50℃, 1min → 15℃min <sup>-1</sup> → 280℃, 5min	
イオン源	280℃	
測定イオン(m/z)	292,294	212,214

## 3 結果

### 3.1 フェニル化アルキル水銀の Scan 測定

フェニル化アルキル水銀について GC-MS 測定を実施した結果、図 1 に示すクロマトグラムが得られた。フェニル化メチル水銀 (Me-Phe-Hg)、フェニル化エチル水銀 (Et-Phe-Hg) 及びジフェニル水銀 (Phe-Phe-Hg) は、それぞれ独立したピークとして検出され (図 1 ピーク 1A, 2A, 3A)、本方法によりモノアルキル水銀の分離分析が可能であることを確認した。

各フェニル化アルキル水銀のピークについてマススペクトル (図 2) を確認したところ、マススペクトルの m/z 値及びその存在比は、水銀の安定同位体 (図 2A) にアルキル基及びフェニル基が付加したもの (図 2B,C,D) と一致したため、当該ピークはフェニル誘導体化されたモノアルキル水銀であることが確認された。

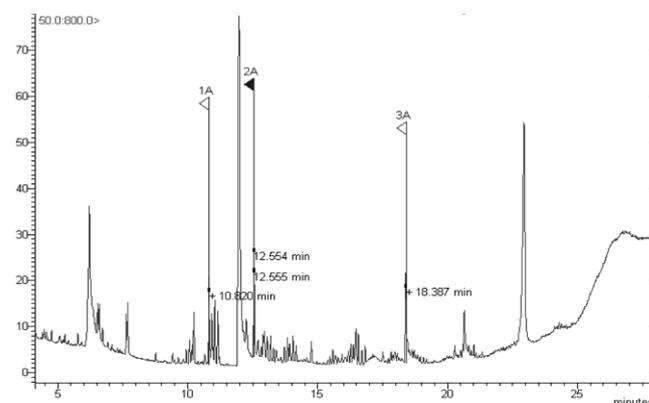


図 1 フェニル化モノアルキル水銀のクロマトグラム

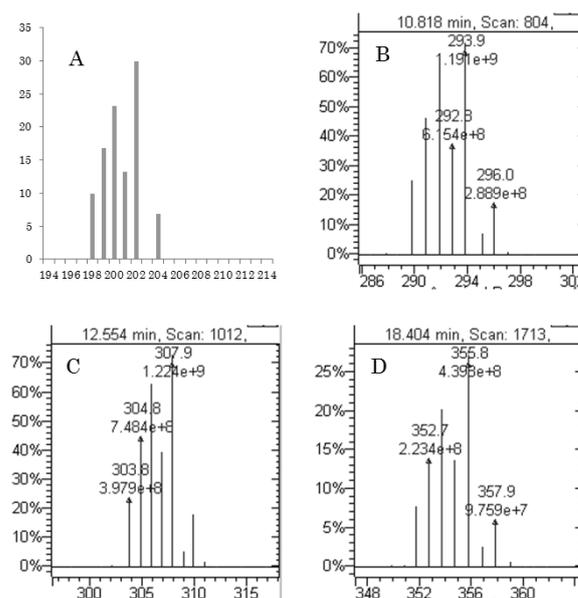


図 2 各ピークのマススペクトル

A 水銀の同位体存在比, B フェニル化メチル水銀のマススペクトル, C フェニル化エチル水銀のマススペクトル, D ジフェニル水銀のマススペクトル

表 2 有機水銀の定量下限値繰り返し試験結果(n=6)

化合物	定量下限 (ng/ml)	平均値 (ng/ml)	標準偏差	CV (%)
Me-Hg	7.5	9.0	0.25	2.8
Et-Hg	7.5	10	0.77	7.6
Phe-Hg	7.5	8.4	0.14	1.7

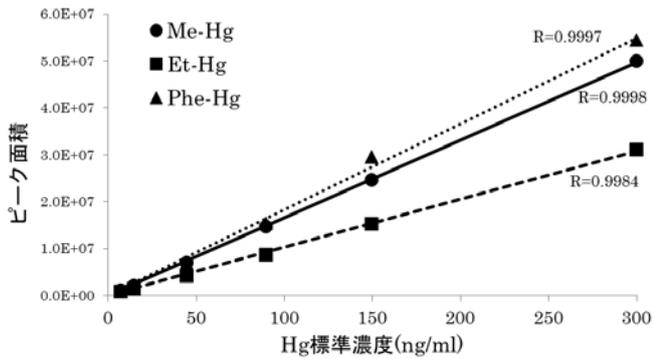


図 3 有機水銀の定量範囲

### 3.2 フェニル化アルキル水銀の定量範囲の確認

フェニル化アルキル水銀の定量範囲の確認は、3.1により得られたマススペクトルから表1のとおり定量イオン、確認イオンを設定し、SIMモードにて実施した。メチル水銀の測定においてシグナル/ノイズ比が10以上を示した濃度(7.5ng/ml)を定量下限値とし、6回繰り返し測定を行ったところ、併行精度(相対標準偏差)は、10%未満であり定量下限値付近での良好な測定精度が確認された(表2)。また、定量範囲は、7.5ng/mlから300ng/mlまでの範囲で検量線の相関係数 $R > 0.999$ となることを確認し、本測定方法において広い濃度範囲で定量が可能であることを確認した(図3)。

### 3.3 ヒ素-BAL 複合体の Scan 測定

ヒ素-BAL 複合体についてGC-MS測定を実施した結果、図4に示すクロマトグラム及び図5に示すマススペクトルが得られた。ヒ素-BAL 複合体は、単一のピークとして検出され、本方法により無機ヒ素の分離分析が可能であることを確認した。検出されたピークのマススペクトルを確認したところ、マススペクトルの $m/z$ 値及びその存在比は、無機ヒ素にBAL及びメチル基が付加した物と推定された。自然界に存在するヒ素は $^{75}\text{As}$ のみであるが、当該ピークからはBALに含まれる硫黄原子の同位体存在比に由来すると思われる2種類のイオンが検出されており、当該ピークはヒ素-BAL 複合体であることが確認された。有機ヒ素標準品としてアルセノベタイン、メチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸、フェニルアルソン酸について同様の分析を実施したところ、有機ヒ素標準品を用いた試験液及び無機-有機ヒ素混合標準溶液からは有機ヒ素-BAL 複合体のピークは確認できず(図6)、本方法は無機ヒ素のみを選択的に検出できる分析方法であることを確認した。

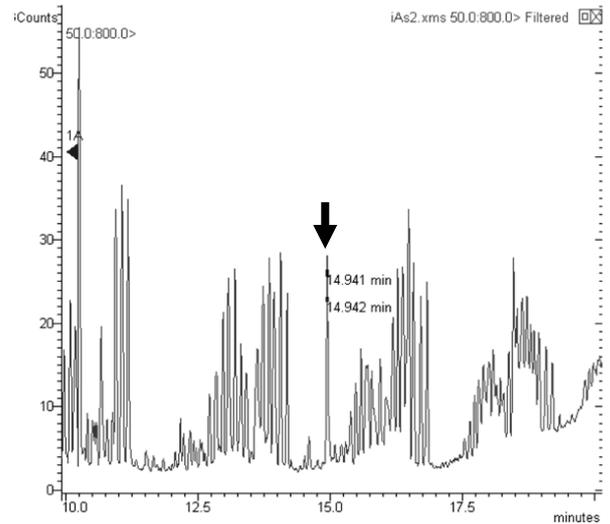


図 4 BAL 複合体化無機ヒ素のクロマトグラム

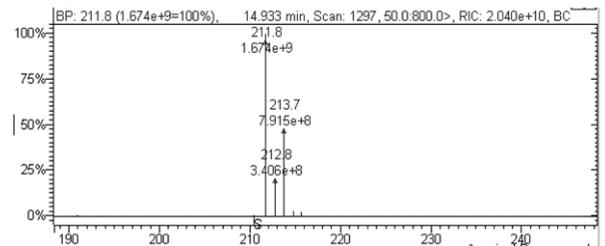


図 5 BAL 複合体化無機ヒ素のマススペクトル

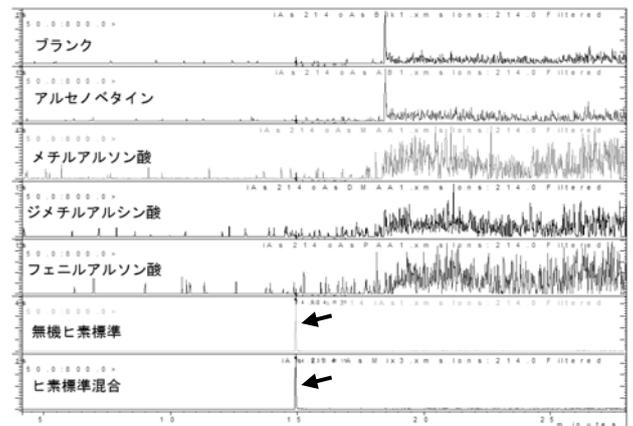


図 6 有機態ヒ素標準品のクロマトグラム

### 3.4 ヒ素-BAL 複合体の定量範囲の確認

ヒ素-BAL 複合体の定量範囲の確認は、3.3により得られたマススペクトルから表1のとおり定量イオン、確認イオンを設定し、SIMモードにて実施した。ヒ素-BAL 複合体の測定においてシグナル/ノイズ比が10以上を示した濃度(0.1ng/ml)を定量下限値とし、6回繰り返し測定を行ったところ、併行精度(相対標準偏差)は、10%未満であり定量下限値付近での良好な測定精度が確認された(表3)。また、定量範囲は、0.1ng/mlから200ng/mlまでの範囲で検量線の相関係数 $R > 0.999$ となることを確認し、本測定方法において広い濃度範囲で定量が可能であることを確認した(図7)。

表3 無機ヒ素の定量下限値繰り返し試験結果(n=6)

化合物	定量下限 (ng/ml)	平均値 (ng/ml)	標準偏差	CV(%)
無機ヒ素	0.1	0.081	0.007	8.5

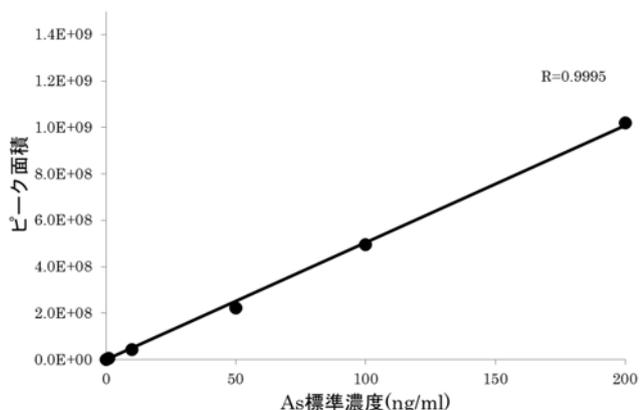


図7 無機ヒ素の定量範囲

#### 4 考察

本研究では、有害金属元素のうち、存在する化学形態により毒性が異なる元素として、水銀とヒ素について毒性の強い化学形態（有機水銀、無機ヒ素）を個別に分析する方法について検討した。

有機水銀については、西村らによるフェニル誘導体化法を参考としたが、良好な結果が得られた。本研究では、メチル水銀の定量下限値が 7.5ng/ml であるが、現在当センターで検討している有機水銀抽出方法においては、メチル水銀の暫定的規制値 (0.3mg/kg) における抽出液の濃度を 60ng/ml と想定しており、暫定的規制値に対し

て十分な感度を有するものと評価している。今後、本方法をメチル水銀の分析方法として採用するには、抽出方法を含む分析方法について金属ガイドラインに基づいた妥当性評価の実施が必要である。

無機ヒ素について食品中の基準値は存在しないが、本研究において検討した方法では、HPLC-ICP-MS によらず、GC-MS のみで無機ヒ素の分析が可能になった。本方法により食品由来の無機ヒ素摂取量調査がより簡便に実施できるようになり、県民の健康リスク評価及び健康被害の予防への展開が可能となると考えられる。

#### 参考文献

- 1) 食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について、食安発0408第2号，平成22年4月8日
- 2) 魚介類の水銀の暫定的規制値について，環乳第99号，昭和48年7月23日
- 3) HACCP 関連情報データベース，  
[http://www.shokusan.or.jp/haccp/hazardous/2\\_8\\_ziyukin.html](http://www.shokusan.or.jp/haccp/hazardous/2_8_ziyukin.html)
- 4) 超臨界処理装置を用いた食品中有害金属分析法の検討，宮城県保健環境センター年報No.31，2013
- 5) 食品中の金属試験法に関する妥当性評価ガイドラインについて，食安発第0926003号，平成20年9月26日
- 6) 抽出溶媒にベンゼン及びトルエンを用いない魚介類中のアルキル水銀分析法の検討，分析化学 Vol.61，No.10，2012
- 7) GC-MS による尿中ヒ素化合物の分析法の開発，第18回ヒ素シンポジウム講演要旨集，2012

# 宮城県におけるPM<sub>2.5</sub>成分分析結果

## Component analysis of PM<sub>2.5</sub> in Miyagi Prefecture

佐藤 郁子 佐久間 隆 北村 洋子  
小泉 俊一 菊池 恵介\*1 樫野 光永\*2

Ikuko SATOU, Takashi SAKUMA, Yoko KITAMURA  
Syun-ichi KOIZUMI, Keisuke KIKUCHI, Mitsunaga KAYANO

宮城県におけるPM<sub>2.5</sub>の季節変動、汚染状況等を把握するため、宮城県内の測定局2地点においてPM<sub>2.5</sub>の成分分析を実施した。名取自排局では平成24年夏季に環境基準の日平均値を2日超過したが、他の時期には超過は見られなかった。測定局2地点ともに春季に濃度が高く、夏季に低くなるという同様の傾向を示した。成分濃度の主成分はイオン成分であり、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>が主要な構成成分であったが、平成24年夏季のPM<sub>2.5</sub>濃度が上昇した日には、Cl<sup>-</sup>イオン、Na<sup>+</sup>イオンの濃度が高くなっており、海塩粒子の影響が見られた。炭素成分濃度は、名取自排局で24年度に元素状炭素の濃度が高く、有機炭素の濃度は低かったが、25年度には元素状炭素濃度は減少し、一方で有機炭素濃度が上昇していた。無機成分は土壌主成分であるNa、Al、K、Feの濃度が高かったが、他の微量成分である元素の方が質量濃度と高い相関を示していた。

キーワード：PM<sub>2.5</sub>；成分分析

**Key words** : PM<sub>2.5</sub> ; Component analysis

### 1 はじめに

微小粒子状物質（以下「PM<sub>2.5</sub>」）は呼吸器の奥深くまで達するため、喘息、気管支炎等の呼吸系への影響に加え、循環器系への影響が心配されている。

このため、平成21年9月9日に微小粒子状物質の環境基準が設定され、「大気汚染防止法第22条の規定に基づく大気汚染の状況の常時監視に関する事務の処理基準（事務処理基準）」が平成22年3月に改正され、PM<sub>2.5</sub>の測定が地方公共団体に義務付けられた。

宮城県においてもPM<sub>2.5</sub>の自動測定を平成23年度から開始し、順次機器の整備を計画している。

これに併せて、成分分析についても平成24年度から測定を開始したので、24・25年度の結果について報告する。

### 2 調査地点及び調査期間

平成24年度は名取自動車排出ガス測定局（以下、「名取自排局」）、平成25年度は名取自排局と大和一般環境測定局（以下、「大和局」）の2地点で年4回、約2週間調査を実施した。表1に調査期間を示す。

25年度は2地点で測定しているが、PM<sub>2.5</sub>採取装置が2台しかないため、採取装置を移動してサンプリングを実施している。

### 3 試料採取及び分析方法

#### 3.1 試料採取方法

PM<sub>2.5</sub>採取装置はThermo Scientific社製FRM-2025iを使用し、16.7L/minで24時間採取した。2台のうち一方にはPFTE製フィルタをセットし、質

表1 調査期間

平成24年度		
	名取自排局	
春季	6月6日～6月19日	
夏季	7月26日～8月9日	
秋季	10月31日～11月14日	
冬季	1月22日～2月5日	
平成25年度		
	名取自排局	大和局
春季	4月23日～5月7日	5月8日～5月23日
夏季	8月8日～9月6日	7月24日～8月7日
秋季	10月8日～10月22日	10月23日～11月7日
冬季	2月7日～2月24日	1月21日～2月4日

\*1 現 宮城県東部保健福祉事務所

\*2 現 宮城県原子力センター

量濃度、イオン成分及び無機元素成分分析用とした。他方は石英繊維フィルタをセットし、炭素成分分析用とした。

### 3.2 分析方法

#### 3.2.1 質量濃度

PFTE フィルターのコンディショニング及び秤量は温度  $21.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 、相対湿度  $35 \pm 1.5\%$  の条件で行った。

#### 3.2.2 イオン成分

イオン成分は、PFTE 製フィルタ 1/2 枚を超音波抽出し、イオンクロマトグラフィー（日本ダイオネクス社製 ICS-2000/1000）により表 2 の成分を測定した。

表 2 測定項目

成分名	測定項目
イオン成分 (8 項目)	$\text{Cl}^-$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{Na}^+$ , $\text{NH}_4^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$
無機元素成分 (19 項目)	Na, Al, K, Ca, Ti*, V, Cr, Mn*, Fe, Co*, Ni, Cu*, Zn, As, Se*, Mo*, Sb, Ba*, Pb (*: 推奨項目)
炭素成分	有機炭素(OC), 元素炭素(EC)

#### 3.2.3 無機元素成分

無機元素成分は、PFTE 製フィルタ 1/2 枚をマイクロウェーブ試料分解装置（アナリティクイエナ社製 TOP wave CX100）で酸分解し、ICP-MS（Agilent 7700x）で測定した。測定項目を表 2 に示す。

#### 3.2.4 炭素成分

炭素成分は石英繊維フィルタを用い、炭素成分分析装置（Sunset Laboratory 社製 CAA-202M-D）による熱分離・光学補正法で測定した。測定項目を表 2 に示す。

## 4 結果および考察

### 4.1 各地点における質量濃度

各測定地点の季節別の質量濃度を表 3 に示す。

平成 24 年度の名取自排局は年間 66 日間の測定で質量

表 3 PM<sub>2.5</sub> 質量濃度 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )

平成 24 年度		名取自排局		大和局	
	平均	最小-最大	平均	最小-最大	
春季	9.5	1.9-20	13.7	6.9-22.3	
夏季	21.3	5.5-65.9	9.8	4.2-26.6	
秋季	7.6	3.4-17.1	11.9	4.0-20.8	
冬季	9.3	3.5-18.0	11.2	5.6-23.9	
全体	10.4	1.9-65.9	12.2	4.0-26.6	
平成 25 年度		名取自排局		大和局	
	平均	最小-最大	平均	最小-最大	
春季	13.6	1.8-31.2	13.7	6.9-22.3	
夏季	9.4	4.3-16.6	9.8	4.2-26.6	
秋季	9.0	2.8-16.4	11.9	4.0-20.8	
冬季	8.6	1.1-15.2	11.2	5.6-23.9	
全体	10.5	1.1-31.2	12.2	4.0-26.6	

濃度の範囲は  $1.9 \sim 65.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均値は  $10.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。24 年度は夏季の平均値が  $21.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$  と測定実施期間の中では一番高く、うち 7 月 26 日は  $41.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、7 月 31 日は  $65.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$  と日平均値の環境基準  $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$  を超過した。

平成 25 年度は、名取自排局で年間 62 日間の測定で質量濃度の範囲は  $1.1 \sim 31.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均値は  $10.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、大和局は年間 57 日間の測定で質量濃度の範囲は  $4.0 \sim 26.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均値は  $12.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  で環境基準の超過はなかった。

2 地点ともに春季に濃度が高く、夏季に低くなるという同様の傾向を示している。

なお、平成 25 年冬季に名取自排局の質量濃度が低くなったのは、最小濃度の  $1.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  となったのが 26 年 2 月 15 日であったことから、その前日から降り続いた降雪の影響と考えられた。

### 4.2 各地点における化学組成変動

各測定地点の成分濃度の季節変動を図 1 に示す。

#### 4.2.1 イオン成分

成分濃度の主成分はイオン成分であり、全体の 37～74% を占めていた。主要な構成成分は  $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NH}_4^+$  であった。 $\text{SO}_4^{2-}$  は年間を通して 20～38% と PM<sub>2.5</sub> の主要な構成成分となっていた。 $\text{NO}_3^-$  は 5～10% 程度で夏季に濃度が低く、冬季に高くなった。 $\text{NH}_4^+$  も  $\text{NO}_3^-$  と同程度であったが、25 年度秋季・冬季の大和局では 1～2% と濃度が極端に低くなっていた。

平成 24 年度夏季は、名取自排局の  $\text{Cl}^-$  が  $1.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、全体に対する濃度の割合は 6.6% と、他の時季が 1～2% であるのに比較すると濃度が極端に高くなった。図 2 に 24 年度夏季、25 年度夏季、対照として 25 年度夏季の大和局の濃度割合を示す。

この期間は名取自排局で 7 月 26 日に  $41.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、7 月 31 日に  $65.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$  と日平均値の環境基準  $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$  を超過して

いた。この 2 日間は昼間から夕方にかけて東南東から南南東の風が吹いており、海及び国道 4 号線方向からの影響を大きく受けていた。

また、表 4 のとおり、質量濃度が高かった 7 月 26 日は、 $\text{Cl}^-$  イオンが全体の 14.3%、 $\text{Na}^+$  イオンが 9.4%、7 月 31 日は  $\text{Cl}^-$  イオンが全体の 14.1%、 $\text{Na}^+$  イオンが 10.8% であり、主要な構成成分である  $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NH}_4^+$  の割合が逆に低くなっていたことから、この 2 日間の PM<sub>2.5</sub> 濃度の上昇は海塩粒子によるものと推察された。

平成 25 年度夏季の名取自排局は、測定機器の不調により PFTE 製フィルタでの測定時期が 8 月下旬になったため、質量濃度及び  $\text{Cl}^-$  イオン、 $\text{Na}^+$  イオンとも 24 年度ほど顕著な高濃度は見られなかったが、期間中の  $\text{Cl}^-$  イオンは全体の 3% と、比較的高い割合を示した。

#### 4.2.2 炭素成分

$\text{PM}_{2.5}$  中の炭素成分の割合は有機炭素が全体の 5~24%、元素状炭素は 5~18% で、特にディーゼル排ガス由来とされる元素状炭素は、名取自排局では大和局よりも高い濃度となっている。

名取自排局の季節別の炭素成分濃度の季節変動を図 3 に示す。

平成 24 年度の名取自排局の炭素成分濃度季節平均値は、有機炭素が  $0.4\sim 1.4\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、元素状炭素が  $2.5\sim 7.4\mu\text{g}/\text{m}^3$  と、元素状炭素が有機炭素の 1.5 倍から 3 倍近く高い濃度であり、成分中の割合も 11~19% であった。

しかし、平成 25 年度になると有機炭素が  $1.0\sim 2.3\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、元素状炭素が  $0.6\sim 1.1\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、成分中の割合も有機炭素が 13~24%、元素状炭素が 4~7% と、有機炭素との割合が逆転しており、元素状炭素が減少しただけではなく、有機炭素の濃度が増加して  $\text{SO}_4^{2-}$  に次ぐ主要な構成成分となった。

元素状炭素濃度が減少したのは、沿道の主要な発生源であるディーゼル車の減少も原因の一つと考えられる。

特に、25 年秋季までは元素状炭素の平均濃度が  $1.1\mu\text{g}/\text{m}^3$  程度であったのが、冬季には  $0.6\mu\text{g}/\text{m}^3$  と大幅に減少している。これは 24 年度の平均値が  $2.5\sim 7.4\mu\text{g}/\text{m}^3$  であったのと比較すると最大値で 1 割程度まで減少したことになる。冬季の  $\text{PM}_{2.5}$  濃度が降雪等のため、全体的に濃度が低かったのも大きな要因であるが、時期的には、25 年度 9 月末で震災廃棄物処理施設の名取処理区での処理が終了し、国道での大型車等の走行量が減少しているであろうことも一因として推察され、他の要素とも比較検討が必要と考えられる。

一方、有機炭素濃度が増加しているのは、沿道由来なのか、他の新たな発生源が生じているのかどうかについても、今後の継続した測定や、他物質等の分析結果を含めた解析が必要と思われる。今後、宮城県では調査研究で多環芳香族炭化水素、WSOC（水溶性有機炭素）等の成分測定項目の分析を実施していく予定である。

#### 4.2.3 無機元素成分

無機元素成分は名取自排局、大和局ともに殆どの測定期間で質量濃度全体の 2~7% 程度であったが、25 年度秋季には名取自排局で  $1.3\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、大和局で  $1.4\mu\text{g}/\text{m}^3$  と質量濃度の 1 割程度まで増加した。この時期は測定期間中に台風による降雨や強風等があり、日平均値でも質量濃度の低い時に土壤の主成分元素（Na, Al, K, Ca）の濃度のみ高いという傾向も見られていたが、詳細は不明である。

無機元素成分中の割合は土壤主成分の Na, Al, K, Ca が高く、全体の 63~91% と殆どを占めていたが、時期によっては主成分以外の微量成分が増加していた。

図 4 に質量濃度と無機元素の微量成分濃度の季節毎の濃度推移を示す。

平成 24 年度の名取自排局では、質量濃度と微量成分とはほぼ同じ挙動を示していた。24・25 年度ともに微量成分の中で濃度が高かったのは、鉄、ニッケル、亜鉛、チタン等であったが、自動車や人為的汚染の指標とされる鉛、バリウム等も一定の割合で検出されていた。

大和局は、春~秋季までは名取自排局と同様の濃度の変動傾向を示していたが、冬季には亜鉛濃度が高くなっていた。

また、質量濃度と高い相関を示した ( $r > 0.7$ ) 無機元素を表 5 に示す。質量濃度との相関については、土壤主成分以外の無機元素の方が高い傾向となり、また、石油燃焼に由来すると報告があるバナジウムが秋季、冬季に相関が高い傾向を示した。また、バナジウムと相関の高いヒ素、アンチモン、鉛、バリウムも質量濃度と相関の高い時季が多かった。

これらの微量成分濃度の変動は土壤主成分とは別の要因であることが推察され、今後の分析データの蓄積により、発生源の解析等に重要であると考えられる。

## 5 まとめ

宮城県における  $\text{PM}_{2.5}$  の季節変動及び汚染状況等を把握するため、平成 24 年度から 1 地点、25 年度は 2 地点において  $\text{PM}_{2.5}$  の成分分析を実施した。

表 4 平成 24 年度夏季名取自排局の質量濃度 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) とイオン成分の組成比率 (%)

	質量濃度	$\text{Cl}^-$	$\text{Na}^+$	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$
全年	45	3.6	3.7	24.6	5.3	9.1
夏季	51	6.6	6.2	24.5	4.3	9.0
7/26	69	14.3	9.4	19.4	5.8	9.2
7/31	43	14.1	10.8	10.9	7.6	1.7

(1) 名取自排局では平成 24 年夏季に海塩粒子の影響と見られる急激な濃度の上昇が見られ、環境基準の日平均値を超過する日があった。

(2) 炭素成分濃度は、名取自排局では 24 年度は元素状炭素の濃度が高かったが、25 年度には減少した。有機炭素濃度は逆に上昇しており、元素状炭素より高くなった。

(3) 無機元素成分は、土壤主成分であるナトリウム、アルミニウム、カリウム、カルシウムの濃度が高かったが、一時季は微量成分の元素が増加していた。また、バナジウムや他の微量成分元素の方が、質量濃度と高い相関を示していた。

今後、成分測定項目については多環芳香族炭化水素、WSOC（水溶性有機炭素）等の分析を実施していく予定である。また、無機元素成分中の微量成分の解析等を行

うことにより、汚染実態及び発生源解明の検討等を引き続き行って行くこととしたい。

表5 質量濃度と高い相関を示した ( $r>0.7$ ) 無機元素

	無機元素
H24名取春季	V, Mn, Ni, Mo
H24名取夏季	Na, Al, K, Mn, Fe, Mo
H24名取秋季	V, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Sb, Pb
H24名取冬季	V, Zn, Sb, Pb
H25名取夏季	(分析機器の不調により欠測)
H25名取夏季	V, Pb
H25名取秋季	
H25名取冬季	K, Fe, Zn, As, Pb
H25大和春季	Ni, As
H25大和夏季	Al, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Mo, Sb, Ba
H25大和秋季	K, V, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Ba, Pb
H24大和冬季	Al, K, V, Cu, Zn, As, Sb, Pb

## 6 参考文献

- 1) 環境省水・大気環境局大気環境課：大気中微小粒子状物質 (PM<sub>2.5</sub>) 成分測定マニュアル
- 2) 北本洋紀, 多田有佑, 本田真章, 横田一馬, 金久保美喜, 高畑寿太郎：仙台市衛生研究所報, 42, 99 (2012)
- 3) 木下誠, 肥後隼人, 宮地夏海：福岡市保健環境研究所報, 37, 53 (2011)
- 4) 星野隆昌, 熊谷貴美代, 山口直哉, 齊藤由倫：群馬県衛生環境研究所年報, 4347, (2011)
- 5) 緒方美治, 武原弘和, 近藤芳樹, 藤井浩三：全国環境研会誌, 39 No.2, 27 (2014)

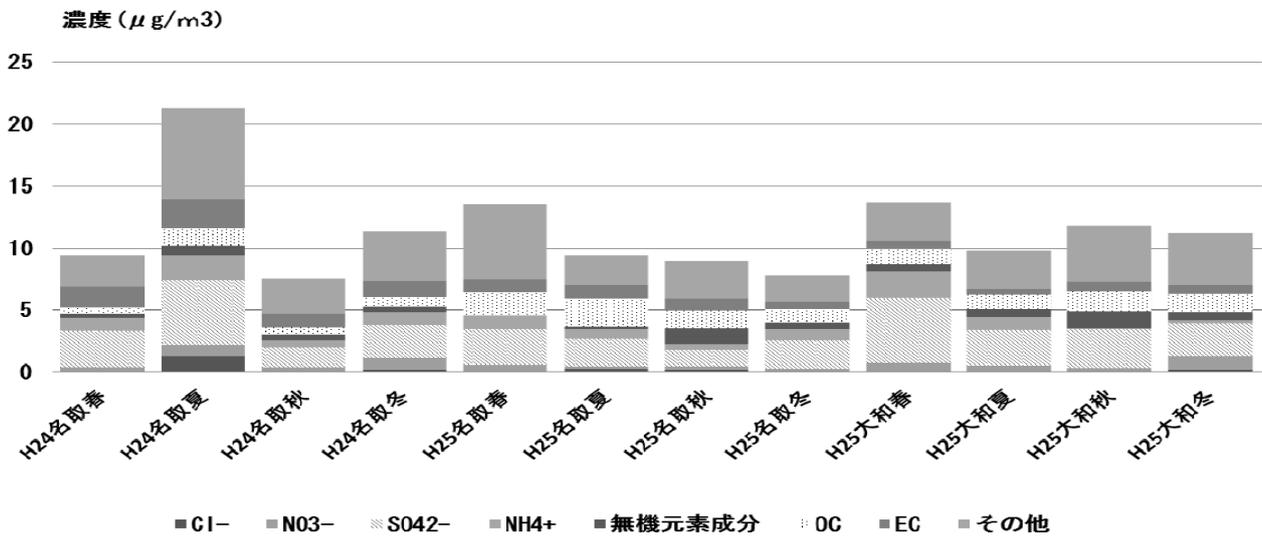


図1 各測定地点の主要な成分濃度の季節変化

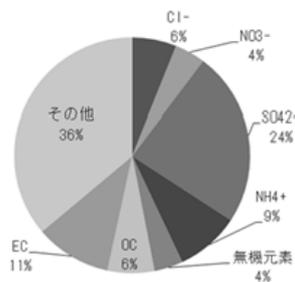


図2-1 H24名取自排局夏季の組成比率

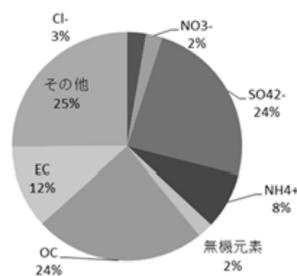


図2-2 H25名取自排局夏季の組成比率

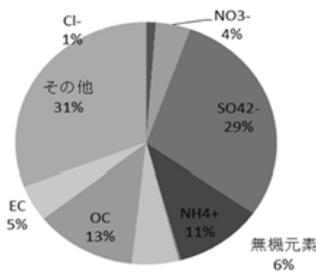


図2-3 H25大和局夏季の組成比率

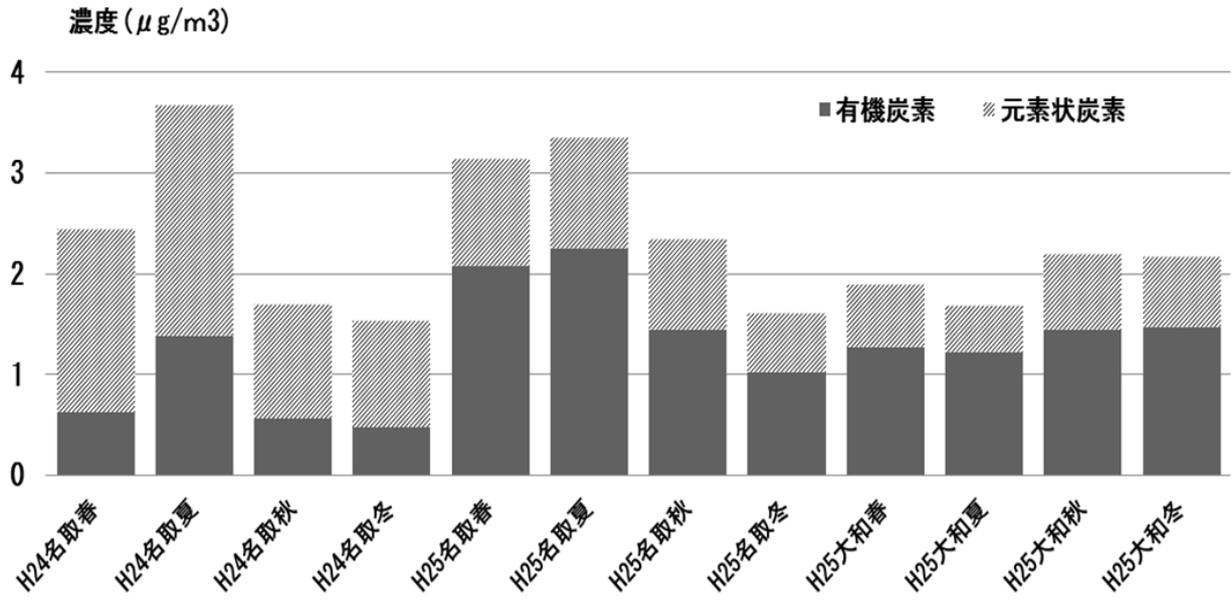


図3 炭素成分濃度の季節変化

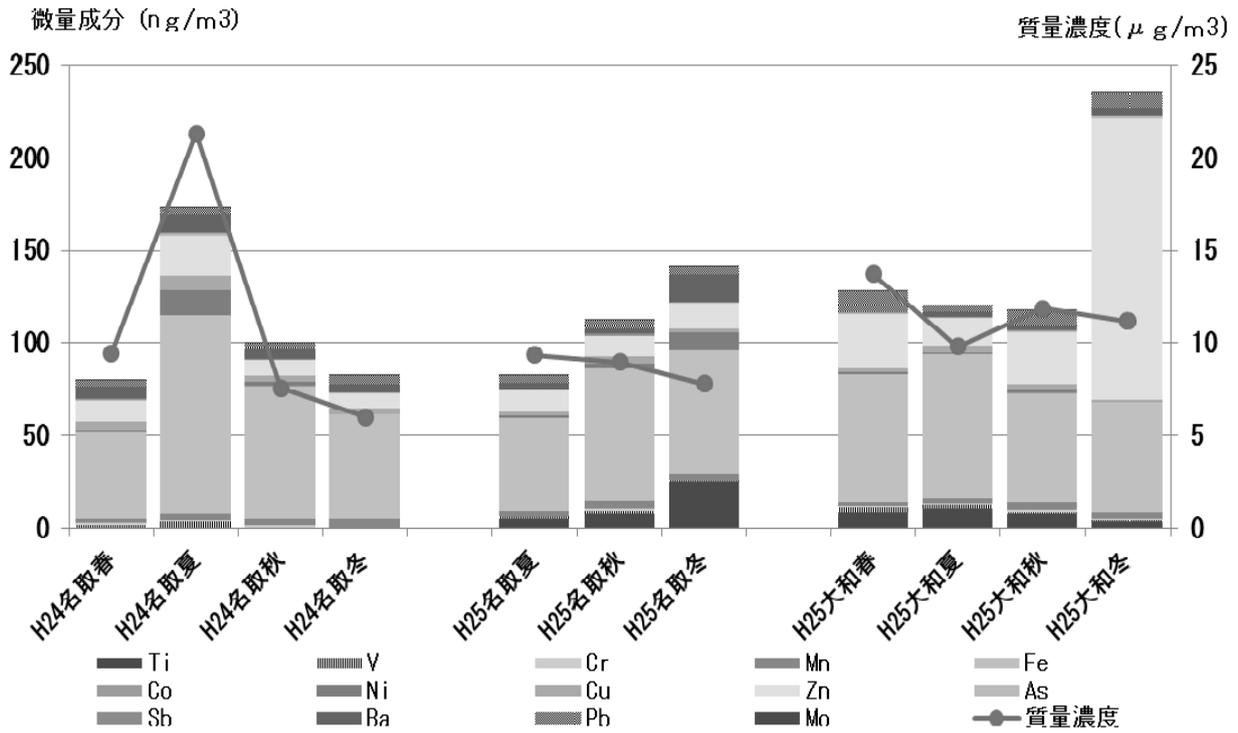


図4 質量濃度と無機元素微量成分濃度の季節変化

# 気仙沼地域における休廃止鉱山の公共用水域に及ぼす 砒素等重金属類の影響調査（第Ⅱ報）

## The Investigation of Arsenic and Other Heavy Metals in Rivre Waters from Inactive or Disuse Mines in Kesen-numa Area (Ⅱ)

佐藤千鶴子 千葉文博 波岡陽子 赤崎千香子 福地信一  
三浦和樹\*1 清野 茂\*2 郷右近順子\*3 渡部正弘

Chizuko SATO, Fumihiro CHIBA, Yoko NAMIOKA, Chikako AKSAKI, Shinichi FUKUCHI,  
Kazuki MIURA, Shigeru SEINO, Junko GOUKON, Masahiro WATANABE

過去におこなった気仙沼地域の公共用水域調査では、一部の環境基準地点において環境基準値（0.01mg/L）よりも高い濃度の砒素が検出されている。この地域は金鉱脈を伴う休廃止鉱山が多数分布していることから、これら休廃止鉱山由来の流出水による公共用水域の汚染状況を把握するため、砒素等重金属の調査をおこなった。

キーワード：気仙沼地域；休廃止鉱山；砒素

Key words : Kesen-numa Area ; Inactive or Disuse Mines ; Arsenic

### 1 はじめに

平成 23 年度の宮城県公共用水域水質調査において、気仙沼地域を流れる神山川の環境基準点・神山橋で、環境基準値を超える 0.012mg/L の砒素の検出報告<sup>1)</sup>があった。神山橋では、過去にも 0.005~0.012mg/L の砒素の検出報告があり、神山川以外の気仙沼地域を流れる鹿折川、面瀬川の環境基準点でも砒素の検出が報告されている<sup>1)</sup>。

気仙沼地域は、金鉱脈を伴う砒素を含んだ金属鉱床が分布しており、昭和年代までは採掘がおこなわれていた<sup>2)</sup>。現在は全て休廃止鉱山となっているが、公共用水域調査対象河川上流にも多くの鉱山が点在している（図 1）。

砒素は毒性の高い金属で、過去には宮崎県土呂久鉱山等の砒素公害が問題となった事例<sup>3)4)</sup>がある。そこで休廃止鉱山由来の流出水による公共用水域の汚染実態を把握するためこの地域における鉱山からの流出水及び公共用水域の水質調査を行った。

第Ⅰ報として、平成 24 年度の調査報告はすでに行っているが<sup>5)</sup>、平成 25 年度の調査を併せて報告する。なお、砒素の環境基準値は 0.01mg/L、当所の報告下限値は 0.005mg/L である。

### 2 調査方法

気仙沼地域の休廃止鉱山である鹿折金山、松岩鉱山、羽田鉱山、金取鉱山及び新館鉱山<sup>2)6)</sup>周辺の流出水及び

公共用水域の河川水を採取し、ICP-AES（誘導結合プラズマ発光分光分析装置）及びオートアナライザー（連続流れ分析装置）により分析を行った。測定項目は、砒素、カドミウム、鉛、セレン、全クロム、銅、亜鉛、全鉄、全マンガン、ふっ素とした。

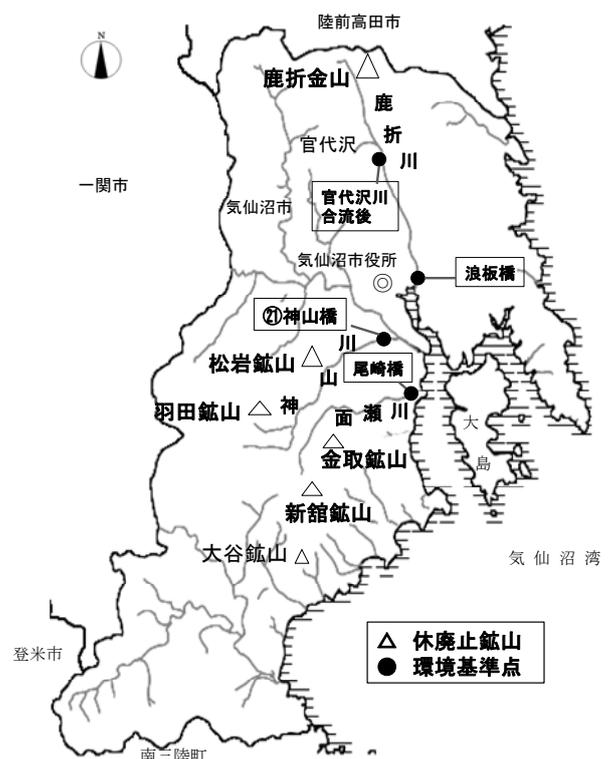


図 1 気仙沼地域の休廃止鉱山および環境基準点

\*1 東部保健福祉事務所 \*2 退職 \*3 中南部下水道事務所

### 3 調査地点

調査対象の休廃止鉱山及び公用水域水質調査の環境基準点を図 1, 採水地点 21 カ所を図 1~4 に示す。以下本文の調査地点①~⑳は図及び表中の番号と対応する。

#### 3.1 鹿折川流域

鹿折川上流域に鹿折金山が位置しており,その周辺域では図 2 中の①~⑤において採水した。周辺での聞き取り調査により,鹿折金山の複数ある坑口の中で,坑内水が流出している坑口として,八千代坑口及び四番坑口を確認した。坑内からの流出水は周辺域の沢水と合流し鹿折川に流入しており,流入する地点が金山橋である。坑内流出水の八千代坑口①及び四番坑口②で採水を行った。坑内流出水の鹿折川への流入状況調査のため,鹿折川流入前の金山橋④,鹿折川上流の金山橋上流③及び金山橋下流⑤において採水を行った。

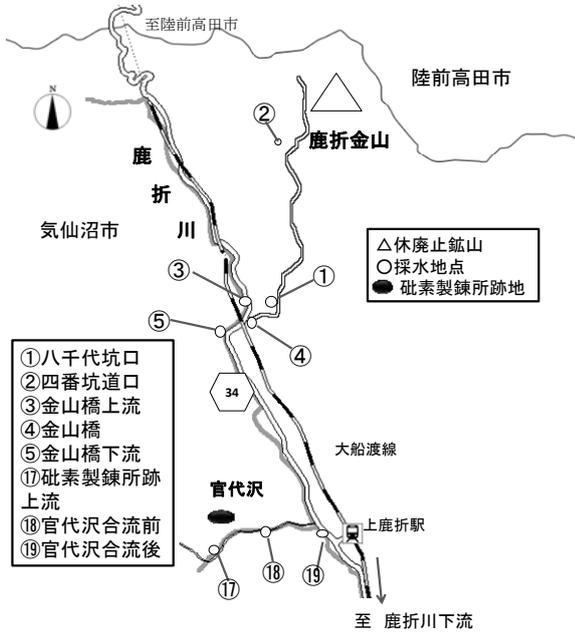


図 2 鹿折川流域採水地点

鹿折川には中流域で官代沢が流入するが,官代沢上流域に砒素製錬所跡地がある。気仙沼市では砒素の流出防止のため,昭和 47 年に施設及び鉱さいを埋没処理し,その後,コンクリートで封鎖する工事を行っている。これにより河川への砒素の流出が抑制されたが,気仙沼市の継続調査によれば,跡地周辺の河川水で,環境基準を超える報告があった。砒素製錬所跡地上流⑰,鹿折川合流前の官代沢合流前⑱及び,鹿折川合流後の官代沢合流後⑲において採水した。

平成 24 年度は 6 月に①②, 9 月に③~⑤の採水調査を行った。平成 25 年度は 9 月と 1 月に③~⑤及び⑰~⑲の採水を行い, 1 月の調査では⑰~⑲の流量調査を併せ

て行った。

#### 3.2 神山川流域

神山川上流域に羽田鉱山,中流域に松岩鉱山が位置している。羽田鉱山周辺域では図 3 中の物見沢⑥及び羽田沢⑦において採水を行った。羽田鉱山は詳細な場所が不明であり,文献<sup>2)6)</sup>から位置を推測し,羽田沢を調査地点とした。羽田沢は流下し,物見沢と合流後神山川となる。

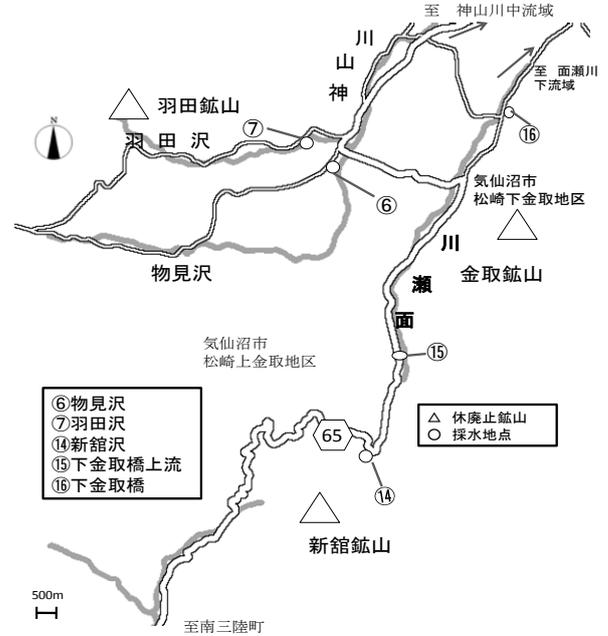


図 3 神山川上流域および面瀬川流域採水地点

神山川中流域の松岩鉱山周辺では図 4 中の⑧~⑬において採水を行った。周辺の聞き取り調査で,松岩鉱山の坑口の一つである大切坑口から流出水が神山川に流れ込んでいることを確認し,大切坑口⑨から採水,さらに大切坑上流⑧と大切坑下流右岸⑩,大切坑下流流心⑪及び大切坑下流左岸⑫において採水した。

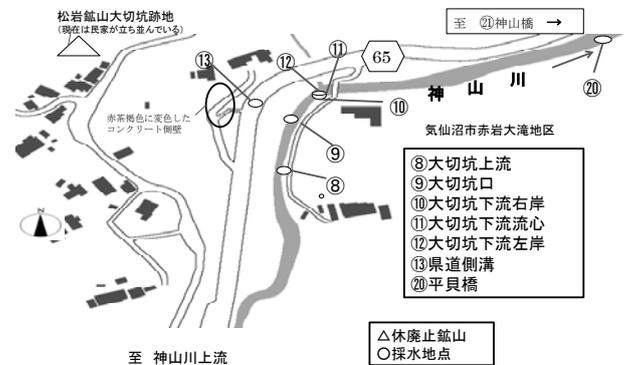


図 4 神山川中流域採水地点

周辺調査により,気仙沼市赤岩大滝地区を通る県道 65 号線の道路側壁面の塩ビ管から鉱山流出水と思われる浸出水が側壁面を赤茶褐色に変色させていた。さらに

流出水は県道側溝⑬を通じ、神山川に流入しているため⑬からも採水した。

平成 24 年度は 9 月に⑬, 11 月に⑥～⑫の採水調査を行った。平成 25 年度は 1 月に⑧⑨⑩の採水及び流量調査を行い、神山川下流域調査のため、平貝橋⑳と神山橋㉑(図 1)でも採水調査を行った。

### 3.3 面瀬川流域

面瀬川流域は図 3 に示すとおり、上流域に新館鉦山、中流域に金取鉦山が位置している。新館鉦山及び金取鉦山は、羽田鉦山と同様に詳細な位置は不明であり、文献 2)6)から位置を推測し、周辺の公共用水域を調査地点とした。

新館沢は流下すると面瀬川と合流するため、新館鉦山周辺の新館沢⑭, 金取鉦山の流出水が流入すると推測される下金取橋⑯及びその上流の下金取橋上流⑮で採水した。

平成 24 年 9 月に⑯, 11 月に⑭⑮の採水調査を行い、平成 25 年度は⑭⑮の採水調査を 9 月と 1 月に行い、1 月には⑮の流量調査も併せて行った。

## 4 結果及び考察

採水地点①～㉑の測定結果を表 1～6 に示す。

### 4.1 鹿折川流域

採水地点①～⑤の結果を表 1 に示す。

平成 24 年度の調査では、砒素濃度は八千代坑口①が 0.073mg/L, 四番坑口②が 0.11mg/L であり、環境基準値と比較して高い結果であった。しかし、金山橋④では 0.007mg/L と環境基準値未満であり、鹿折川合流後の金山橋下流⑤では、<0.005mg/L であった。平成 24 年度の①・②と③～⑤の採水日は異なるが、坑口①・②からの流出水は周辺の沢水で希釈されたものと考えられる。また、平成 25 年度の 2 回の調査でも同様の結果を得ており、鹿折川流入前の金山橋④では 9 月 0.009mg/L, 1 月 0.007mg/L と報告下限値を上回っているが、流入後の金山橋下流⑤では、<0.005mg/L であり、金山橋上流③でも砒素は検出されなかった。下流域の環境基準点の官代沢川合流後⑱では、公共用水域調査結果によれば、報告下限値以上の砒素の検出報告 1)があるが(図 5), 鹿折金山坑内水からの砒素の影響は少ないと考えられる。

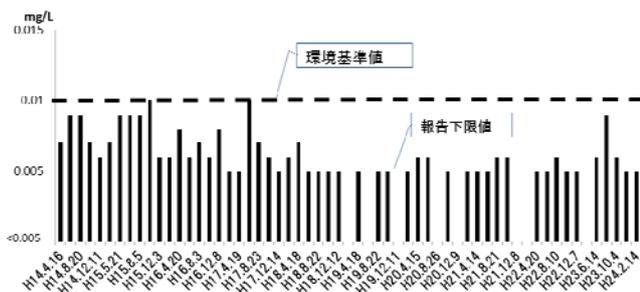


図 5 環境基準点官代沢川合流後⑱の砒素濃度の推移

平成 25 年度に新たに追加した官代沢調査(表 2)での砒素の値は、砒素製錬所跡地上流⑰, 官代沢合流前⑱, 官代沢合流後⑲で 9 月は⑰<0.005mg/L, ⑱0.020mg/L, ⑲<0.005mg/L で、1 月は⑰0.006mg/L, ⑱0.027mg/L, ⑲0.006mg/L であり、⑱は 2 回の調査とも環境基準値を超過していた。

表 1 鹿折川流域調査結果

No.	①	②	③	④	⑤	③	④	⑤	③	④	⑤
鉦山											
鹿折金山											
採水地点	八千代坑口	四番坑口	金山橋上流	金山橋	金山橋下流	金山橋上流	金山橋	金山橋下流	金山橋上流	金山橋	金山橋下流
採水年月日	H24.6.25		H24.9.26			H25.9.17			H26.1.15		
水温(°C)	14.1	11.7	17.0	15.4	16.6	15.5	15.2	15.4	3.9	1.2	2.8
pH	7.4	7.7	7.9	8.0	7.9	7.1	7.1	7.2	8.4	8.2	8.4
砒素	0.073	0.11	<0.005	0.007	<0.005	<0.005	0.009	<0.005	<0.005	0.007	<0.005
カドミウム	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
鉛	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
セレン	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
全クロム	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
銅	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
亜鉛	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
全鉄	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.32	0.08	0.27	<0.05	<0.05	<0.05
全マンガ	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
ふっ素	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08

表 2 官代沢流域調査結果

No.	⑰	⑱	⑲	⑰	⑱	⑲
鉦山						
官代沢(砒素製錬所)						
採水地点	跡地上流	官代沢合流前	官代沢合流後	跡地上流	官代沢合流前	官代沢合流後
採水年月日	H25.9.17			H26.1.15		
水温(°C)	14.6	15.0	15.4	1.6	0.9	2.5
pH	7.3	7.3	7.1	7.6	8.0	8.6
砒素	<0.005	0.020	<0.005	0.006	0.027	0.006
カドミウム	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
鉛	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
セレン	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
全クロム	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
銅	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
亜鉛	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
全鉄	0.11	0.2	0.85	<0.05	<0.05	0.11
全マンガ	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
ふっ素	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08

表 3 流量および負荷量調査結果

採水地点	流量	砒素値	負荷量	
	m <sup>3</sup> /s	mg/L	g/s	g/日
⑰砒素製錬所跡地上流	0.023	0.006	0.00014	12
⑱官代沢合流前	0.020	0.027	0.00054	47
⑲官代沢合流後	0.096	0.006	0.00058	50
⑨大切坑口	0.00063	0.14	0.000088	7.6
⑧大切坑上流	0.94	<0.005	—	—
⑩大切坑下流	0.51	<0.005	—	—
⑯下金取橋	0.049	0.007	0.00034	29

また、平成 25 年度 1 月調査における砒素の一日負荷量は、表 3 に示すとおり⑱が 47 g/日、⑲が 50g/日とほぼ同程度の値であった。

これらの結果より、鹿折川下流域における砒素の濃度は、官代沢からの流入水の影響を大きく受けていることが考えられる。なお、平成 25 年度 9 月の調査において、全調査地点で全鉄が検出されているが、台風直後の採水であったため増水と川床からの巻き上げなどの影響があったと推測される。

4.2 神山川流域

採水地点⑥～⑬⑳㉑の結果を表 4、5 に示す。

平成 24 年度調査での砒素の値は、大切坑口⑨が 0.16mg/L と、環境基準値を超えており、全鉄 (0.72mg/L)、全マンガン (0.36mg/L) も検出されている。大切坑下流右岸⑩及び大切坑下流流心⑪および大切坑上流⑧の砒素の値は<0.005mg/L であり、大切坑下流左岸⑫は 0.021mg/L であった。⑫は⑩、⑪と比較し砒素以外の全鉄 (0.15mg/L) も高く、全マンガン (0.05mg/L) も検出された。

大切坑内水が流入する河川は、川幅が 8m 程であり、川床に岩が多いため、流入水は希釈されることなく左岸沿いをしばらく流下すると推察される。また、平成 24 年度は県道側溝⑬で亜鉛 (0.11mg/L)、全鉄 (0.35mg/L)、全マンガン (0.62mg/L) が検出されたが、砒素は検出されなかった。

表 4 平成 24 年度 神山川流域調査結果

mg/L								
No.	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬
鉢山	羽田鉢山		松岩鉢山					
採水地点	物見沢	羽田沢	大切坑上流	大切坑口	大切坑下流右岸	大切坑下流流心	大切坑下流左岸	県道側溝
採水年月日	H24.11.14		H24.11.14					H24.9.26
水温(°C)	10.5	11.0	11.3	13.3	11.3	11.3	11.4	19.3
pH	7.5	7.5	7.8	7.9	7.5	7.6	7.7	6.9
砒素	<0.005	<0.005	<0.005	0.16	<0.005	<0.005	0.021	<0.005
ガドミウム	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
鉛	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
セレン	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
全クロム	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
銅	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
亜鉛	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	0.11
全鉄	0.05	0.06	0.06	0.72	0.06	0.06	0.15	0.35
全マンガン	<0.05	<0.05	<0.05	0.36	<0.05	<0.05	0.05	0.62
ふっ素	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08

なお、上流域の物見沢⑥と羽田沢⑦の砒素の値は、<0.005mg/L であり、二つの沢の合流後の大切坑上流⑧においても砒素は検出されなかった。これら平成 24 年度の結果から、羽田鉢山からの砒素等有害金属の神山川へ流入は少ないと考えられる。

平成 25 年度の大切坑口上流⑧、大切坑口⑨、大切坑口下流流心⑪の砒素の結果を表 5 に示す。⑧、⑪が

<0.005mg/L で、⑨が 0.14mg/L であった。また、平成 25 年度 1 月調査での⑨の砒素負荷量は 7.6g/日 (表 3) であった。坑口からの流出水は河川左岸をしばらく流下することを 24 年度の調査で確認している。神山川下流域調査のため、下流域の平貝橋⑳と最下流の環境基準点・神山橋㉑を採水した結果、砒素の値は⑳ 0.006mg/L、㉑ 0.005mg/L であった。

環境基準点神山橋では過去にも環境基準値を超える砒素を検出しているが (図 6) ㉑、調査結果から、松岩鉢山大切坑口からの砒素を含む流出水が原因の一つと推察される。

表 5 平成 25 年度神山川流域調査結果

mg/L					
No.	⑧	⑨	⑪	⑳	㉑
鉢山	松岩鉢山				
採水地点	大切坑上流	大切坑口	大切坑下流流心	平貝橋	神山橋
採水年月日	H26.1.15			H26.1.16	
水温(°C)	2.1	10.4	2.5	4.1	2.8
pH	7.7	8.1	7.6	7.7	7.9
砒素	<0.005	0.14	<0.005	0.006	0.005
ガドミウム	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
鉛	<0.005	0.006	<0.005	<0.005	<0.005
セレン	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
全クロム	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
銅	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
亜鉛	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
全鉄	0.07	0.40	<0.05	<0.05	0.31
全マンガン	<0.05	0.23	<0.05	<0.05	<0.05
ふっ素	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08

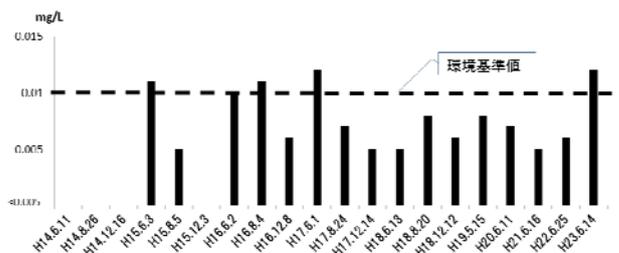


図 6 環境基準点神山橋㉑の砒素濃度の推移

4.3 面瀬川流域

採水地点⑭～⑯の結果を表 6 に示す。

平成 24 年の調査では、面瀬川上流域にある新館沢⑭で、砒素が<0.005mg/L であり、新館沢流入後の下金取橋上流⑮でも、<0.005mg/L であった。このことから、新館鉢山の正確な位置は不明であるが、面瀬川への砒素を含む有害金属の流入は少ないと考えられる。

平成 24 年度調査での砒素の値は、面瀬川中流域の下金取橋⑯では 0.006mg/L であった。平成 25 年度の調査での、砒素の値は⑮は 9 月、1 月とも<0.005mg/L であったが、下金取橋⑯は 9 月が 0.006mg/L、1 月が 0.007mg/L であった。また、1 月調査での⑯の砒素の

一日負荷量は 29g/日 (表 3) であり、金取鉱山の坑口の確認はできなかったが、下金取橋周辺は、鉱山からの浸出水が流れ込む地形であると考えられる。

面瀬川最下流にある環境基準点・尾崎橋の過去の結果では、砒素が<0.005~0.009mg/L であり<sup>1)</sup> (図 7) , 金取鉱山浸出水が一因であると推察される。

表 6 面瀬川流域調査結果

No.	mg/L						
	⑭	⑮	⑯	⑰	⑱	⑲	⑳
鉱山	新館鉱山		金取鉱山				
採水地点	新館沢	下金取橋上流	下金取橋	下金取橋上流	下金取橋	下金取橋上流	下金取橋
採水年月日	H24.11.14		H24.9.26		H25.9.17		H26.1.16
水温(℃)	10.2	10.8	17.6	14.9	17.8	1.6	3.6
pH	7.2	7.3	7.4	7.4	7.2	7.5	7.3
砒素	<0.005	<0.005	0.006	<0.005	0.006	<0.005	0.007
カドミウム	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
鉛	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0.005
セレン	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
全クロム	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
銅	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
亜鉛	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
全鉄	0.11	0.05	0.07	0.09	0.31	<0.05	0.06
全マンガン	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
ふっ素	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08

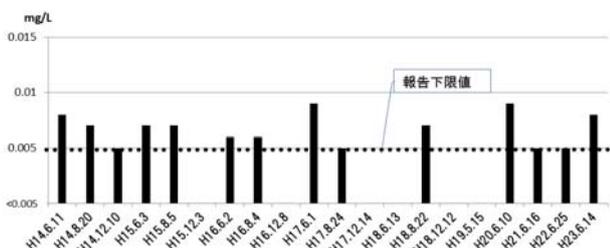


図 7 環境基準点尾崎橋の砒素濃度の推移

5 まとめ

今回調査した気仙沼地域の鹿折川、神山川、面瀬川三流域の調査地点では、鹿折金山八千代坑口、四番坑口、官代沢合流前、松岩鉱山大切坑口で、環境基準値を超える砒素を検出した。また、砒素の一日負荷量の値は、官代沢合流前で 47g/日、官代沢合流後で 50g/日、大切坑口で 7.6g/日、下金取橋で 29g/日であった(表 3)。

砒素以外の結果については、平成 25 年度 1 月の調査で、大切坑口と下金取橋で報告下限値 (0.005mg/L) 程度の鉛を検出したが、全調査においてカドミウム、セレン、全クロム、銅、亜鉛、ふっ素は全て報告下限値未満であった。平成 25 年 9 月の全調査地点の全鉄が報告下限値 (0.05mg/L) を超えたことは、前日の台風による川床の巻き上げと推測される。

5.1 鹿折川流域

鹿折金山坑口からは、高い砒素濃度の坑内水が流出しているが、鹿折川合流後の金山橋下流で、砒素が

<0.005mg/L であったことから、下流域に与える影響は少ないと推察できる。官代沢川合流後において砒素が検出<sup>2)</sup>されたことについては、中流域の官代沢砒素製錬所跡地からの流入水が大きな要因と考えられる。

5.2 神山川流域

上流域に位置する羽田鉱山からの砒素の流入は少ないと推察された。中流域にある松岩鉱山大切坑口からは、高い砒素濃度の坑内水が流出している。坑内水は神山川に継続的に流入するが、流入直後には混合・希釈が十分行われず、左岸沿いに流下し、下流域の平貝橋に至るまでには河川全体に混合されると考えられる。最下流域の神山橋では、たびたび砒素検出の報告があり<sup>1)</sup>、このことは、松岩鉱山の坑内水が原因の一つと推察される。

5.3 面瀬川流域

下金取橋では、0.005mg/L 以上の砒素を検出した。このことから、下流域の尾崎橋での砒素の報告<sup>1)</sup>は、中流域に位置する金取鉱山からの浸出水によるものと推測される。また、上流域に位置する新館鉱山からの砒素の流入は少ないと考えられる。

6 謝辞

本研究は気仙沼市教育委員会生涯学習課文化振興係、気仙沼市役所市民生活部環境課環境衛生係、宮城県環境生活部環境対策課水環境班、気仙沼保健所環境衛生部環境廃棄物班の協力を得て実施した。関係各位の協力に謝意を表す。

参考文献

- 1) 宮城県公共用水域及び地下水質測定結果 (平成 14 ~23 年度)
- 2) 気仙沼市史編纂委員会, 気仙沼市 V 産業編 (上), 264-300(1997)
- 3) 堀田宣之他: 土呂久砒毒病の臨床的研究, 体質医研報 29, 199-235(1979)
- 4) 津田敏秀他: 土呂久砒山からの近隣暴露による慢性ヒ素中毒症に合併した肺癌の 1 例, 産業医学, 29 巻 (1987)
- 5) 三浦和樹他: 気仙沼地域における休廃止砒山の公共用水域に及ぼす砒素等重金属類の影響調査 (第 I 報), 宮城県保健環境センター年報, 31, 44-47(2013)
- 6) 小泉久直他: 宮城県気仙沼市周辺の放射能探査, 地質調査所月報, 第 11 巻, 第 11 号, p743-756 (1956)
- 7) 気仙沼市域環境調査の現状 (平成 21 年度調査結果報告) p8