

広島県立総合技術研究所

保健環境センター研究報告

第 32 号

2024 年 12 月

目 次

資 料

マルチプレックス PCR 法を利用した結核菌の VNTR 解析の改良と性能評価 平塚 貴大	1
下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックス RT-PCR 法 Ver.2.3 へのアップデート 末井 真菜, 伊藤 彩乃, 重本 直樹	6
マーケットバスケット方式によるスクラロースの一日摂取量調査について (2023) 中島 安基江, 井原 紗弥香	12
黒瀬川の被覆肥料に由来するマイクロプラスチック調査 中廣 賢太, 花岡 雄哉, 木村 淳子	18
広島湾における溶存性有機態窒素 (DON) の分解特性について 濱脇 亮次, 小田 新一郎, 後田 俊直	24
広島湾河川感潮域における貧酸素水塊の遡上 後田 俊直	29

他誌掲載論文 (2023 年 10 月～2024 年 9 月)	36
---------------------------------	----

資 料

マルチプレックスPCR法を利用した 結核菌のVNTR解析の改良と性能評価

平塚 貴大

Improvement and performance evaluation of the VNTR analysis of *Mycobacterium tuberculosis* using multiplex PCR

HIRATSUKA Takahiro

(Received: October 21, 2024)

マルチプレックスPCRを利用した結核菌のVNTR解析法を確立した。検討の結果、6種類のプライマーミックスと、PCR試薬のKOD・Multi & Epi[®] (TOYOBO)を使用することで、最も効率の良い検査法を確立することができた。従来実施してきた検査法との比較の結果、一部結果が異なる場合があり、タンデムリピートのリピート数が多い場合にPCRの増幅が弱まることが原因と考えられた。確立した検査法は、判定が困難な場合、シングルPCRを併用することが必要であるが、PCRのマルチプレックス化による操作性の向上などの利点は大きく、VNTR解析において有用な方法である。

Key words : 結核菌, VNTR, マルチプレックスPCR, キャピラリーシーケンサー

結 言

国内における結核罹患率は徐々に減少しており、2021年に人口10万人あたり10人未満という、低蔓延国の基準を初めて下回った[1]。しかし、依然として他の先進国と比較すると高い水準にあり、今後も結核への対応は、感染症予防の中でも重要な項目のひとつである。

結核の感染防止対策において、感染経路を把握することは、感染の拡大防止につながる重要な要素である。分子疫学解析は、細菌のDNAを利用して感染経路を特定する手法であり、結核菌においては、Variable numbers of tandem repeats (VNTR) 解析が用いられている。VNTR解析では、タンデムリピートと呼ばれる特定の配列が繰り返している領域について、PCRを実施し、産物長からリピート数を算出し、これを菌株間で比較することで菌株の異同判定を行う。当センターでは、結核菌の解析において24領域のタンデムリピートについて解析を行っている。また、PCR産物の長さはキャピラリーシーケンサーを使用したフラグメント解析で測定し、これをもとにリピート数を算出し

ている。しかし、1株あたり24領域について個別にPCRを実施して解析することは容易ではなく、株数が増加することによる負担の増加量が多い。本研究では、先行する知見を基に[2-5]、従来24領域について個別に実施していたPCRについて、マルチプレックス化を行うために最適な試薬及び条件を検討し、検査法を確立した。また、確立した検査法の性能を把握するため、リピート数と、PCR産物の産生量について、従来実施している方法（以下、従来法）との比較を行った。

方 法

1 マルチプレックスPCRに用いるプライマーミックスの検討

使用するプライマーは、（一財）日本公衆衛生協会地域保健総合推進事業「地域における健康危機管理体制確保のための地方衛生研究所の連携協力の推進並びに検査精度の向上及び疫学情報機能の強化（保健情報疫学部会）」において実施された、平成28年度結核菌VNTR技術研究会において紹介されたものを使用した。これらのプライマーには、キャピラリーシーケンサーでフラグメント解析を行うために、24領域のタンデム

リピートに対応する各プライマーセットのうち、フォワード側のプライマーに4種類（FAM, VIC, PET, NED）の蛍光色素のいずれかひとつが標識されている。これらのプライマーを利用して、最も効率的な組み合わせを検討した。

2 検討に使用したPCR試薬

FastStart High Fidelity PCR System (Roche), KOD -Multi & Epi- (TOYOBO), Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 (TaKaRa), Multiplex PCR Master Mix 2× (biotechrabbit), QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit (QIAGEN), Platinum SuperFi II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) の6種類のマルチプレックスPCR用試薬を用いて、各試薬で推奨される方法に従い、24領域のタンデムリピートについてPCRを実施した。

3 フラグメント解析

マルチプレックスPCRによって得られた各タンデムリピートのPCR産物を3500 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific) を使用してフラグメント解析を行った。フラグメント解析によって得られた産物長から、GeneMapper (ThermoFisher Scientific) を用いて各領域におけるタンデムリピート数を求めた。

4 従来法との比較検討

当センターに保管されていた53株の結核菌のDNAについて、マルチプレックスPCRによって得られた結果と従来法で実施した結果を比較するため、両方法で解析を行い、得られた各タンデムリピート領域におけるリピート数の比較を行った。また、PCR産物の産生量を比較するため、キャピラリーシーケンサーで解析を行った際に得られるピークの蛍光強度について比較した。

結 果

1 プライマーミックスの検討

1検体あたりのPCR実施回数を可能な限り低減させるため、プライマーミックス数の削減を検討したが、同一色素で標識されたタンデムリピート領域は、キャピラリーシーケンサーによる解析でピークが重なる場合があり、同時に解析することが困難であった。このため、異なる蛍光色素で標識される4領域に対応したプライマーの組み合わせを1セットとして、6セットのプライマーミックスを組み合わせることが最適であった（表1）。各プライマーミックスについて、後述するPCR試薬の選定の後に、プライマーの濃度調整を行い、表1に示す最適な濃度配分を決定した。

表1 マルチプレックスPCRに使用したプライマーの組み合わせ

Primer Mix	Locus	Forward			Reverse		Final conc. (μmol / L)
		Fluorescent Dye	Sequence		Sequence		
Mix 1	MIRU 04	Supply(15)	FAM	GTCAAACAGGTCACAACGAGAGGAA	CCTCCACAATCAACACACTGGTCAT	0.2	
	MIRU 10	JATA02	VIC	ACCGTCTTATCGGACTGCACTATCAA	CACCTTGGTGATCAGCTACCTCGAT	0.2	
	MIRU 16	Supply(15)	NED	CGGGTCCAGTCCAAGTACCTCAAT	GATCCTCCTGATTGCCCTGACCTA	0.2	
	MIRU 26	JATA07	PET	GCGGATAGGTCTACCGTCGAAATC	TCCGGGTCTACACGATGATCA	0.3	
Mix 2	MIRU 31	JATA09	FAM	CGTCGAAGAGAGCCTCATCAATCAT	AACCTGCTGACCGATGGCAATATC	0.1	
	MIRU 40	Supply(15)	VIC	GATTCCAACAAGACGCAAGATCAAGA	TCAGGTCTTTCTCTCACGCTCTCG	0.1	
	ETR-A	JATA15	NED	CGAAGCCTGGGGTGCCCGCATTT	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT	0.1	
	ETR-C	Supply(15)	PET	GTGAGTCGCTGCAGAACCTGCAG	GGCGTCTTGACCTCCACGAGTG	0.3	
Mix 3	Mtub 04	JATA01	FAM	GTCCAGGTGCAAGAGATGG	GGCATCTCAACAACCGGTAG	0.2	
	Mtub 21	JATA03	VIC	AGATCCCAGTTGTGTCGTC	CAACATCGCCTGGTTCTGTA	0.2	
	Mtub 30	Supply(15)	NED	AGTCACCTTTCTACCACCTGTAAC	ATTAGTAGGGCACTAGCACCTCAAG	0.2	
	Mtub 39	Supply(15)	PET	AATCACGGTAACTTGGGTTGTT	GATGCATGTTCCAGCCCGTAG	0.2	
Mix 4	QUB 11b	JATA05	FAM	CCGATGTAGCCCGTGAAGA	AGGGTCTGATTGGCTACTCA	0.3	
	QUB 26	JATA11	VIC	GAGCCAAATCAGGTCCGG	GAGGTATCAACGGGCTTGT	0.3	
	QUB 4156	JATA12	NED	TGGTCGCTACGCATCGTGTGCGCCCGT	TACCACCGGGCAGGTTTAC	0.2	
	Mtub 24	JATA04	PET	CAC TAGCTGCGTCACTGG	GCTGATTCGCCGACGAAAG	0.3	
Mix 5	QUB 11a	JATA14	FAM	CGTGATGTTGATCGGGATGT	ACCCTGGAGTCTGGCATC	0.2	
	QUB 15	JATA08	VIC	TACATTGCGCGCCAAAGG	AGGGGTCTTCGGTCACCC	0.1	
	QUB 18	JATA13	NED	ATCGTCAGCTGCGGAATAGT	AATACCGGGGATATCGGTTT	0.3	
	QUB 3232	HV*	PET	CAGACCCGGCGTCATCAAC	CCAAGGGCGGCATTGTGTT	0.3	
Mix 6	QUB 3336	JATA10	FAM	ATCCCCGCGGTACCCATC	GCCAGCGGTGTCGACTATCC	0.3	
	VNTR 3820	HV	VIC	TGCGCGGTGAATGAGACG	ACCTTCATCTTTCGGCAG	0.1	
	VNTR 4120	HV	NED	GTTACCCGGAGCCAACC	GAGGTGGTTTCTGTGGTCG	0.1	
	VNTR 2372	JATA06	PET	ACCTCCGTTCCGATAATC	CAGCTTTCAGCCTCCACA	0.2	

* HV: Hypervariable region

プライマーは、(一財)日本公衆衛生協会地域保健総合推進事業「地域における健康危機管理体制確保のための地方衛生研究所の連携協力の推進並びに検査精度の向上及び疫学情報機能の強化(保健情報疫学部会)」平成28年度結核菌VNTR技術研究会において紹介されたものを使用。

2 PCR試薬と反応条件の検討

6種類のPCR試薬を使用してマルチプレックスPCRを実施し、結果を比較したところ、KOD -Multi & Epi-及びPlatinum SuperFi II DNA Polymeraseで、すべての領域においてタンデムリピートが検出されており、安定して高い蛍光強度が得られていた。他の試薬については、一部の領域においてPCRの増幅効率が悪く、PCR産物が少ない、あるいは産生されない場合があった。1検体当たりの費用と調整方法の簡便さの観点から、本検査法ではKOD -Multi & Epi-を使用することとした。本試薬についてPCRの反応条件の検討を行った結果、94℃/2分で初期変性を行い、98℃/10秒、60℃/30秒、68℃/1分のサイクルを35回繰り返し、72℃/10分の後伸長を行うことで最も良好な結果を得られた。

3 従来法との比較検討

確立した検査法と従来法によって得られた、53株分の解析結果について比較を行ったところ、おおむねすべての検査結果が一致したものの、24領域のうち5領域(QUB26, QUB11a, QUB3232, VNTR3820, VNTR4120)においては、一部の結果が一致しなかった(図1)。これは、今回確立した検査法においてピークが確認できな

ったことが要因であり、当該箇所においてPCRによる増幅効率が悪かったことが考えられた。

各タンデムリピート領域におけるピークの蛍光強度について確認したところ、タンデムリピート領域ごとに、蛍光強度のばらつきの程度に違いがみられ、結果が一致しなかった領域の多くは、ばらつきの大きい領域であった。これらの領域においてはピークの蛍光強度が 1.0×10^3 を下回る場合があり、非特異な産物のピークとの区別が困難であった(図1)。

蛍光強度のばらつきに影響する要因について検討するため、タンデムリピート領域の中でばらつきが大きく、従来法との結果の一致率が低かったQUB3232, VNTR3820の2領域と、ばらつきが少なく、従来法との一致率が100%であったMtub30について、タンデムリピートのリピート数と蛍光強度の関係性について検証した(図2)。この結果、Mtub30はタンデムリピートのリピート数が1から4と少なく、多様性も低い一方で、QUB3232, VNTR3820はリピート数が多様であり、領域内のリピート数が多くなると蛍光強度が減少する傾向がみられた。また、従来法と一致しなかった結果は、高リピート数において生じる傾向にあった。

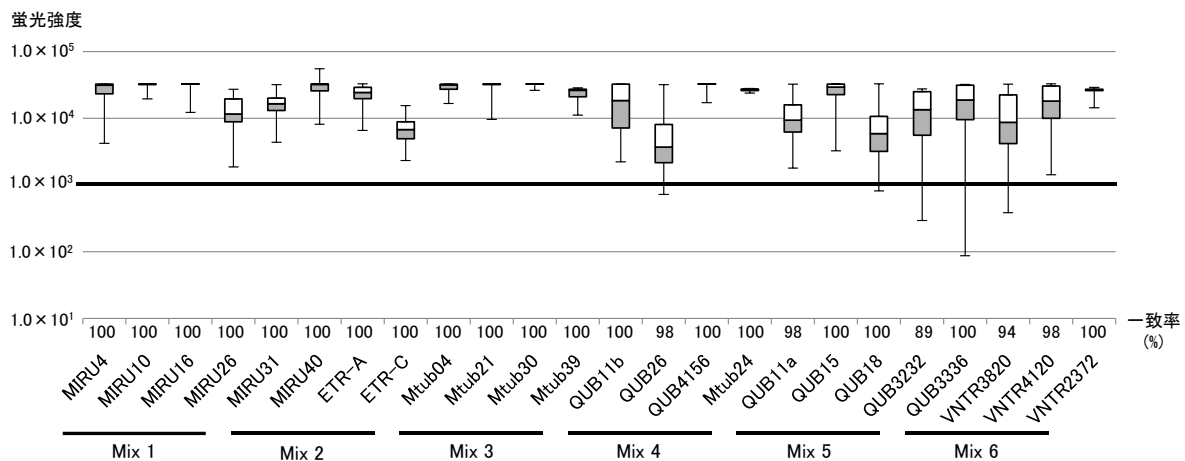


図1 各タンデムリピート領域の蛍光強度と従来法との結果の一致率

24領域のタンデムリピートにおけるピークの蛍光強度を、プライマーミックスの順(Mix 1~Mix 6)に箱ひげ図で示した。蛍光強度が太線で示した 1.0×10^3 を下回ると、リピート数の判定が困難であった。グラフの下部に、従来法と今回検討した検査法の結果の一致率をパーセンテージで示した。

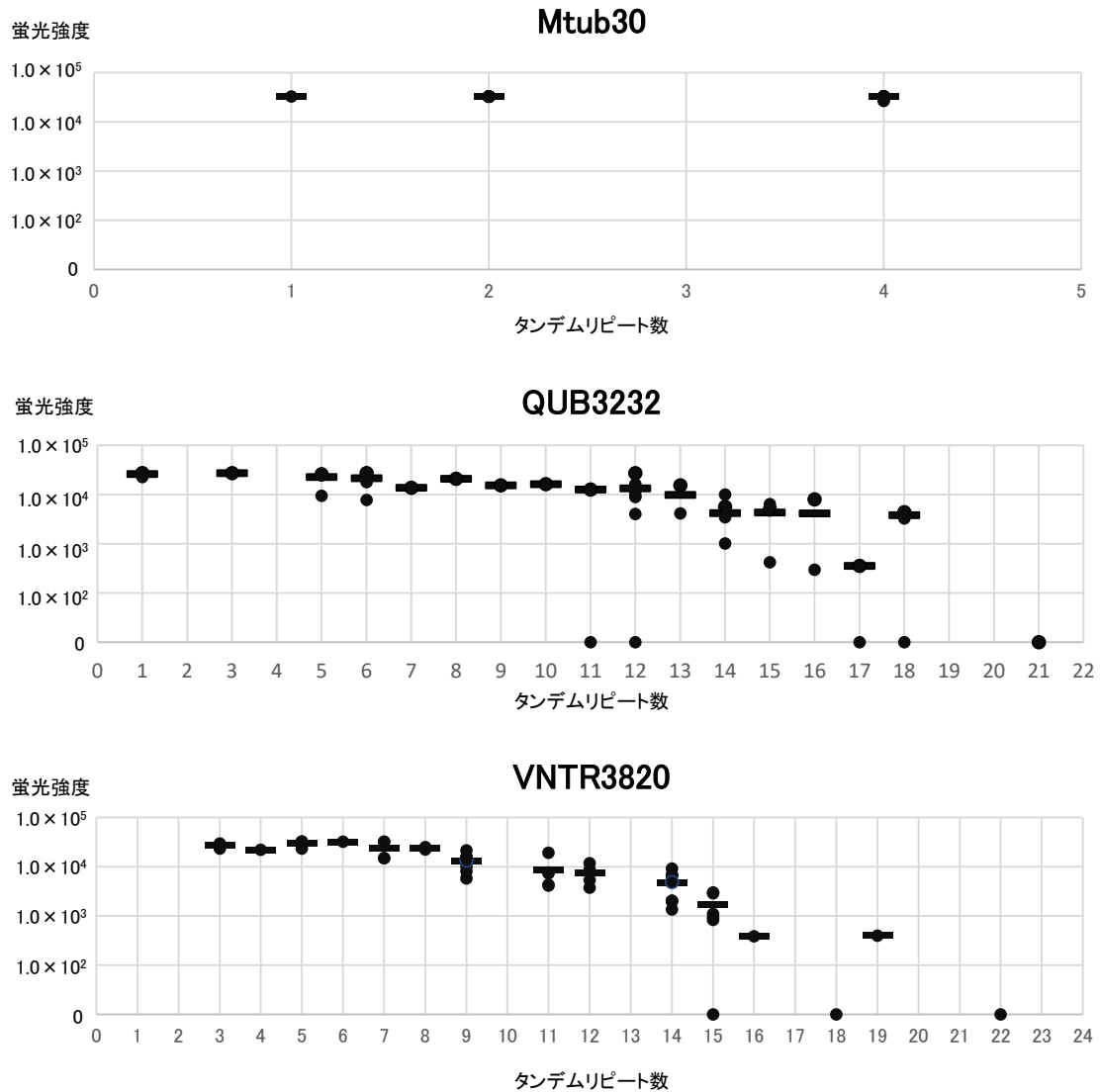


図2 マルチプレックスPCRによる蛍光強度とタンデムリピート数

53株におけるVNTR解析の結果のうち, Mtub30, QUB3232, VNTR3820の3領域について, タンデムリピート数とマルチプレックスPCRによって得られた蛍光強度を示した. 実測値を点で, 平均値を棒で示す. 蛍光強度が0の点は, マルチプレックスPCRではピークが確認されなかった結果を示している.

考 察

従来法による結核菌のVNTR解析では, 1検体につき24回のPCRを実施する必要があったが, 今回確立した検査法においては, 1検体につき6回のマルチプレックスPCRを実施することで検査の効率化ができた. 従来法との比較の結果, ほぼすべての結果が一致しており, 同等の性能があると考えられた. また, 従来法においてはPCR産物を混合し, 希釈してからキャピラリーシーケンサーで解析する必要があったが, 今回確立した

検査法では, PCR産物の混合操作が不要となり, 操作時間の短縮とミスの減少につながった. 以上のことから, 今回確立した検査法は十分に実用に耐えうる検査法であると考えられた. しかし, 従来法とは結果が一致しない場合もあり, その要因として, タンデムリピートのリピート数が多い場合, PCRによる増幅効率が悪くなってしまい, 結果としてピークの蛍光強度が落ち, 解析不能となることが考えられた. また, PCRのマルチプレックス化により, QUB3232などの一部の領域においては微小な非特異反応がみられた. 蛍光強

度が 1.0×10^3 程度の場合はリピート数の算出が困難であり、非特異反応との区別も難しくなることから、当センターにおいては、蛍光強度が 1.0×10^3 程度の場合は、該当する領域においてのみ、追加で従来法によるシングルPCRを実施することで、結果の正確性を担保することとした。追加で検査を行う必要がある可能性を考慮しても、マルチプレックスPCRを使用することによって、検査効率は向上したと考えている。今後、確立した検査法を利用することで、より多くの結核菌についてVNTR解析を実施することが可能であり、本検査法が結核の感染拡大防止に貢献することが期待される。

文 献

- [1] 厚生労働省. 2022年 結核登録者情報調査年報集計結果について.
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095_00010.html, 参照 2024-10-1
- [2] 淀谷雄亮, 原俊吉, 他. 結核VNTR法におけるmultiplex PCRを用いた解析方法の検討. 平成30年度川崎市健康安全研究所年報第6号. 2018, 106-107.
- [3] 高橋洋平, 橋本恭奈, 他. キャピラリー電気泳動シーケンサー及びマルチプレックスPCRによる結核菌VNTR解析. 青森県環境保健センター年報. 2021, 32, 20-22.
- [4] 青木順子, 木村有紀, 他. VNTR解析による新潟県内の結核菌遺伝子型別結果について. 令和3年度新潟県保健環境科学研究所年報. 2022, 37, 56-60.
- [5] 公益財団法人 結核予防会 結核研究所. キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法の標準作業手順書.
https://jata.or.jp/dl/pdf/data/SOP_VNTR_v1.2_20240628.pdf, 参照 2024-10-1

資 料

下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.3へのアップデート

末井 真菜, 伊藤 彩乃, 重本 直樹

Update Ver. 2.3 of multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dye-labeled primers for detecting gastroenteritis viruses

SUEI Mana, ITO Ayano and SHIGEMOTO Naoki

(Received: October 23, 2024)

当センターで開発された下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法は、蛍光標識プライマーを用いることで、電気泳動後の増幅産物の蛍光色と位置により複数の下痢症ウイルスを包括的に検査することができる。現行の蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.2では、ノロウイルスGII とサポウイルスの混合感染時に両者の増幅産物が近接して判定が困難な点、一部のサポウイルスの遺伝子型（GII.1, GII.3）では検出感度が劣る点が課題となったことから、サポウイルス検出用プライマーの追加とノロウイルスGII検出用プライマーの変更を行い、アップデート版Ver.2.3とした。

Key words : 下痢症ウイルス, ノロウイルス, サポウイルス, 蛍光マルチプレックスRT-PCR法, 感染症発生動向調査

結 言 方 法

小児の下痢症は複数のウイルスが関与していることから、当センターではノロウイルス、サポウイルスなどの様々な下痢症ウイルスを包括的に検査している[1-4]。しかし、現行の下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.2 (以下Ver.2.2) [5]では、ノロウイルスGIIとサポウイルスの混合感染時に両者の増幅産物が近接して判定が困難な点が課題となった[5]。また、新たに一部のサポウイルスの遺伝子型（GII.1, GII.3）で検出感度が劣る点も課題となった。そこで、今回のアップデートでは、サポウイルスの検出感度を改善し、さらにノロウイルスとサポウイルスの増幅産物のサイズの差を大きくするために、サポウイルス検出用プライマーの追加とノロウイルス検出用プライマーの変更を行い、下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.3とした。

1 サポウイルスの遺伝子解析

現行のVer.2.2で検出感度が低かったサポウイルスの遺伝子型GII.1とGII.3の10検体（表1）のうち、Ver.2.2で不検出であったサポウイルス6検体（GII.1 4検体, GII.3 2検体）の遺伝子解析を行った。Ver.2.2で使用しているサポウイルス検出用プライマーとこれら6検体の塩基配列を比較するために、フォワードプライマーにSLV-5317を、リバープライマーにSVR-2を使用して[6]ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、Human Calicivirus Typing Tool[7]及び遺伝子解析ソフトMEGA X[8]を用いて解析した。

2 プライマーの追加と変更

サポウイルスについては、遺伝子解析で得られたVer.2.2で不検出だった遺伝子型6検体（GII.1 4検体, GII.3 2検体）の塩基配列を参考に新たにリバープライ

イマーを作成し、追加した。また、ノロウイルスGIIについては、サポウイルスの増幅産物 (340bp) とノロウイルスGIIの増幅産物 (344bp) のバンドサイズの差を大きくするために、ノロウイルスGIIのフォワードプライマーを変更した。

3 供試サンプル

今回改良を行った下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.3のAセットの評価には、感染症発生動向調査事業において搬入された糞便検体から、それぞれ検体中のウイルスが判明している45検体由来のcDNAを用いた。なお、使用したcDNAは以下に示す手順により行ったものである。

4 RNA抽出と逆転写反応

10 %糞便乳剤からQIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) によりRNA抽出を行った。

逆転写反応は5×buffer 4μL, 2mM dNTPs 4μL, 50μM Random primer pd (N) (タカラバイオ) 1μL, RNase inhibitor (40U/μL) (TOYOBO) 0.5μL, ReverTra Ace (100U/μL) (TOYOBO) 1μLを含む反応液に抽出RNA 9.5μLを加え、30℃・10分、42℃・30分、99℃・5分の条件で行った。

5 蛍光マルチプレックス PCR

マルチプレックスPCR反応にはMultiplex PCR Assay Kit Ver.2 (タカラバイオ) を用い、表2に示すプライマー[9-19]及び濃度の反応液48μLにcDNAを2μL加えた。PCR反応は、94℃・1分の熱変性の後、94℃・30秒、57℃・30秒、72℃・30秒を40サイクル行い、最後に72℃・10分の最終伸長を行った。

6 電気泳動

電気泳動には、2%アガロースゲルを使用し、PCR反応液10μLをアプライした。サイズマーカーには100bp ラダー (MAESTOROGEN) 10μLに1μLのEzVISON (Amresco) を混合したものをを用いた。電気泳動後のゲルは、UVトランスイルミネーター上で増幅産物の蛍光バンドの色と増幅長を確認し、その後エチジウムブロマイド染色を行って再度増幅産物を確認した。

結 果

Ver.2.2で使用しているサポウイルス検出用プライマーとVer.2.2で不検出であったサポウイルス6検体 (GII.1 4検体, GII.3 2検体) の塩基配列の比較を行ったところ、リバープライマーの領域においてサポウイルス1検体でのみ1塩基の相違があったが、その他はすべて一致していた (図1)。これを参考に、不検出株の検出を可能とするために、サポウイルスGII.1とGII.3用検出プライマーHuSaV-5498Rmを新たに作成し、Aセットのプライマーに追加することとした。

続いてVer.2.2では、ノロウイルスGIIとサポウイルスの混合感染時には両者の増幅産物が近接して判定が困難なため、ノロウイルスGII検出用プライマーのフォワードプライマーをG2SKFからCOG2Fに変更した (表2)。これにより、ノロウイルスGIIの増幅産物が387bp、サポウイルスの増幅産物が340-358bpとなり、増幅バンドの色とサイズによる識別が容易に可能となった (図2)。

最後に、今回改良を行った表2のAセットで、検体中に含まれるウイルスが明らかな既知検体を用いて検証を行ったところ、表3に示すようにVer.2.2のAセットと同様に検出対象ウイルスを正確に検出できたと共に、不検出であった一部のサポウイルスが検出可能となったことが確認できた。

考 察

Ver.2.2のサポウイルス検出用プライマーとVer.2.2で検出感度が低かったサポウイルスGII.1及びGII.3の検体の塩基配列を比較したところ、ほとんど一致していた (図1)。しかしながら、本プライマーはMix塩基が多く含まれているため、GII.1, GII.3では検出感度が低下していたと考えられた。そこで、Ver.2.2のAセットで使用しているサポウイルスのリバープライマーHuSaV-5498Rの塩基配列と、Ver.2.2で検出感度が低かったサポウイルスGII.1とGII.3の当該領域の配列を参考に、これらの株に対してより特異的なプライマーHuSaV-5498Rmを設計し、これをAセットのサポウイルス検出用プライマーに追加することとした。続いて、Ver.2.2では、ノロウイルスGIとGIIの増幅産物のサイズがそれぞれ330bpと344bpであり、サポウイル

表1 蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.2で検出感が低かったサポウイルスGII.1とGII.3

検体番号	サポウイルスの 遺伝子型	Ver.2.2の結果
1	GII.1	不検出
2	GII.1	不検出
3	GII.1	検出
4	GII.1	不検出
5	GII.1	不検出
6	GII.3	検出
7	GII.3	検出
8	GII.3	検出
9	GII.3	不検出
10	GII.3	不検出

		5'														3'		
1	(GII.1)	A	T	G	T	T	T	G	C	T	G	G	T	T	G	G	G	G
2	(GII.1)	A	T	G	T	T	T	G	C	T	G	G	T	T	G	G	G	G
3	(GII.1)	A	T	G	T	T	T	G	C	T	G	G	T	T	G	G	G	G
4	(GII.1)	A	T	G	T	T	T	G	C	T	G	G	T	T	G	G	G	G
5	(GII.3)	A	T	G	T	T	T	G	C	T	G	G	C	G	G	G	G	G
6	(GII.3)	A	T	G	T	T	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	G
		3'																5'
HuSaV-5498R (Ver.2.2)		T	A	C	A	H	V	C	G	N	C	C	N	A	C	C	C	C
HuSaV-5498Rm(Ver.2.3)		T	A	C	A	A	A	C	G	A	C	C	R	A	C	C	C	C

図1 Ver.2.2で不検出だったサポウイルスの塩基配列とVer.2.2及びVer.2.3のリバースプライマー

	プライマーとの相違	H:A,T,C	N:A,C,G,T
	追加プライマーの変更点	V:A,C,G	R:A,G

スの増幅産物のサイズが340bpとなっている。そのため、特にノロウイルスGIIとサポウイルスの混合感染時に蛍光バンドが重なって結果の判定が困難であったことから、増幅産物の位置をずらすために、ノロウイルスGIIのフォワードプライマーとしてKageyamaらの報告[10]にあるプライマーを採用することとした。これらプライマーの追加と変更により、ノロウイルスGIIとサポウイルスの増幅産物の位置をずらし、電気泳動後の視認性を改善することができた(図2)。

今回のノロウイルスGII検出用プライマーの変更とサポウイルス検出用プライマーの追加によるアップデ

ート版を、蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.3とした。検体中のウイルスが判明している45検体由来のcDNAを用いた検証では(表3)、すべて正しい検査結果が得られ、本検査系が十分に機能していることが確かめられた。一方で、ノロウイルスGIとサポウイルスの増幅バンドが近接している点、サポウイルスの遺伝子型によっては増幅産物の大きさが異なる点については、判定時に注意が必要と考えられた。今後は、アップデートした蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.3を活用し、継続的な検査を実施することで、年毎の流行ウイルス等を明らかにしていく予定である。

表2 蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.3に使用するプライマー

プライマーセット	検出ウイルス	プライマー	Sequence(5'-3')	標識蛍光	濃度 (μ M)	増幅産物 (bp)	出典
A	ノロウイルスGI (NoVGI)	G1SKFm	CTGCCCCGAWTWYGTAAATGA	Alexa488 (緑)	0.4	330	[9] (slightly modified)
		G1SKR	CCAACCCARCCATTRTACA		0.4		
	ノロウイルスGII (NoVGII)	COG2F *1	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	Alexa594 (赤)	0.4	387	[10] [9] [11]
		G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTTRTACAT		0.4		
		G2ALSKR	CCACCAGCATATGAATTGTACAT		0.2		
	サポウイルス (SaV)	HuSaV-5159F	TAGTGTTTGARATGGARGG	Alexa532 (黄)	0.4	340-358	[12] (slightly modified)
		HuSaV-5498R	CCCCANCCNGCVHACAT		0.4		
		HuSaV-5498Rm *2	CCCCARCCAGCAAACAT		0.4		
	アストロウイルス (HAstV)	AC1'	ATGGCTAGCAAGTCTGACAAG	Alexa350 (青)	0.2	230	[13]
		AC230	GGTTTGGTCTCTGTGACACC		0.2		
B	アイチウイルス (AiV)	C(+)-6261	ACACTCCACCTCCGCGCAGTA	Alexa488 (緑)	0.4	519	[14]
		C(-)-6779	GGAAGAGCTGGGTGTCAAGA		0.4		
	パレコウイルス (HPeV)	AN345	GTAACASWWGCCTCTGGGSCCAAAAG	Alexa594 (赤)	0.4	195	[15]
		AN344	GGCCCCWGRTCAGATCCAYAGT		0.4		
	アデノウイルス (AdV)	Ad-A1m	GCGCARTGGTCTTACATGCACATC	Alexa546 (橙)	0.2	300	[16] (slightly modified)
		Ad-A2	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT		0.2		
	エンテロウイルス (EV)	EV-Fm	GCCCCTGAATGCGGCTAATC	Alexa532 (黄)	0.4	148	[17] (slightly modified)
		EV-Rm	ATTGTCACCATWAGCAGYCA		0.4		
C	A群ロタウイルス (RVA)	RotaA-fwd1	GGATGTCTGTACTCCTTGTCAAAA	Alexa488 (緑)	0.4	145	[18]
		RotaA-fwd2	GGAGGTTCTGTACTCATTTGTCAAAAA	Alexa488 (緑)	0.4		
		RotaA rev1	TCCAGTTTGGAACATCATTCCA	Alexa488 (緑)	0.4		
		RotaA rev2	TCCAGTTTGAAAGTCATTTCATT	Alexa488 (緑)	0.4		
	C群ロタウイルス (RVC)	G8NS1	ATTATGCACAGACTATCGCCAC	Alexa594 (赤)	0.4	351	[19]
		G8NA2	GTTTCTGTACTAGCTGGTGAAC		0.4		

*1 Ver.2.2のG2SKFから変更した

*2 Ver.2.3で追加した

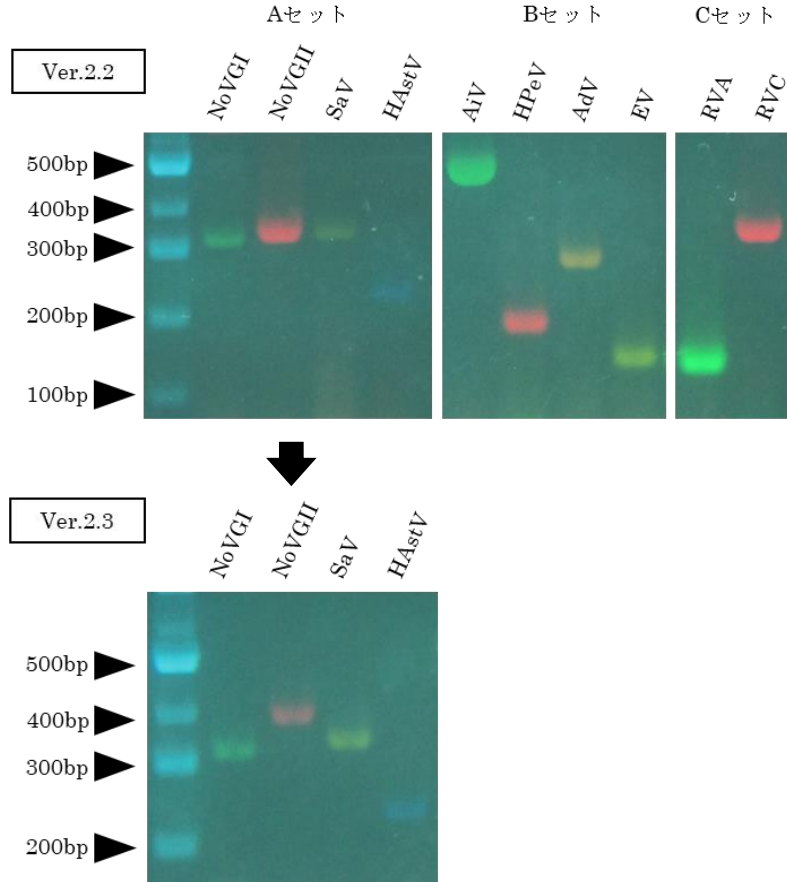


図2 蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.2及びVer.2.3の泳動像

表3 蛍光マルチプレックスRT-PCR法Aセット変更の検証結果

検体番号	検体中の 含有ウイルス*	Ver.2.2 Aセットの結果	Ver.2.3 Aセットの結果
1	SaV(GIV.1)	SaV(GIV.1)	SaV(GIV.1)
2 (6)	SaV(GII.3)	SaV(GII.3)	SaV(GII.3)
3 (7)	SaV(GII.3)	SaV(GII.3)	SaV(GII.3)
4 (8)	SaV(GII.3)	SaV(GII.3)	SaV(GII.3)
5	SaV(GI.2)	SaV(GI.2)	SaV(GI.2)
6 (1)	SaV(GII.1)	不検出	SaV(GII.1)
7 (2)	SaV(GII.1)	不検出	SaV(GII.1)
8 (9)	SaV(GII.3)	不検出	SaV(GII.3)
9 (3)	SaV(GII.1)	SaV(GII.1)	SaV(GII.1)
10 (4)	SaV(GII.1)	不検出	SaV(GII.1)
11 (10)	SaV(GII.3)	不検出	SaV(GII.3)
12 (5)	SaV(GII.1)	不検出	SaV(GII.1)
13	NoVGII, EV	NoVGII	NoVGII
14	SaV(GI.1), EV	SaV(GI.1)	SaV(GI.1)
15	RVC	不検出	不検出
16	HAdV	HAdV	HAdV
17	NoVGII	NoVGII	NoVGII
18	RVA	不検出	不検出
19	AdV	不検出	不検出
20	不検出	不検出	不検出
21	不検出	不検出	不検出
22	不検出	不検出	不検出
23	不検出	不検出	不検出
24	不検出	不検出	不検出
25	HPeV	不検出	不検出
26	不検出	不検出	不検出
27	不検出	不検出	不検出
28	不検出	不検出	不検出
29	不検出	不検出	不検出
30	NoVGII	NoVGII	NoVGII
31	不検出	不検出	不検出
32	不検出	不検出	不検出
33	不検出	不検出	不検出
34	不検出	不検出	不検出
35	不検出	不検出	不検出
36	不検出	不検出	不検出
37	SaV(GI.1)	SaV(GI.1)	SaV(GI.1)
38	不検出	不検出	不検出
39	不検出	不検出	不検出
40	不検出	不検出	不検出
41	AdV	不検出	不検出
42	EV	不検出	不検出
43	AdV	不検出	不検出
44	NoVGII, HPeV	NoVGII	NoVGII
45	NoVGII	NoVGII	NoVGII

* Ver2.2及びVer2.3以外の遺伝子検出法にて確認され、検体中に存在するウイルス
検体番号の()内の数字は表1の検体番号に対応する

で囲んだ検体は、表1で解析を行った検体

文 献

- [1] Shigemoto N, Fukuda S, et al. Detection of norovirus, sapovirus, and human astrovirus in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol*. 2011, 55, 369-372.
- [2] Shigemoto N, Hisatsune Y, et al. Detection of gastroenteritis viruses among pediatric patients in Hiroshima prefecture, Japan, between 2006 and 2013 using multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dyelabeled primers. *J Virol Methods*. 2017, 89, 791-800.
- [3] 重本直樹, 久常有里, 他. 下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法のアップデート Ver.2.0. 広島県立総合技術研究所 保健環境センター研究報告. 2017, 25, 1-8.
- [4] 重本直樹, 谷澤由枝. 下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.1へのアップデート-広島県の急性胃腸炎患者から検出されるエンテロウイルスの特徴-. 広島県立総合技術研究所 保健環境センター研究報告. 2021, 29, 7-16.
- [5] 末井真菜, 伊藤彩乃, 重本直樹. 多様なサポウイルスを検出するための下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.2. 広島県立総合技術研究所 保健環境センター研究報告. 2022, 30, 7-13.
- [6] Oka T, Wang Q, et al. Comprehensive Review of Human Sapoviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2015, 1, 32-53.
- [7] Tatusov RL, Chhabra P, et al. Human calicivirus typing tool : A web-based tool for genotyping human norovirus and sapovirus sequences. *J Clin Virol*. 2021, 134, 104718.
- [8] Kumar S, Stecher G, et al. MEGA X : Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Bio Evol*. 2018, 35, 1547-1549.
- [9] Kojima S, Kageyama T, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods*. 2002, 100, 107-114.
- [10] Kageyama T, Kojima S, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2003, 4, 1548-1557.
- [11] Nishida T, Nishio O, et al. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol*. 2013, 51, 177-184.
- [12] Oka T, Yamamoto S, et al. Polymerase chain reaction primer sets for the detection of genetically diverse human sapoviruses. *Arch Virol*. 2020, 165, 2335-2340.
- [13] Sakon N, Yamazaki K, et al. Genomic characterization of human astrovirus type 6 katano virus and the establishment of a rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus. *J Med Virol*. 2000, 61, 125-131.
- [14] Yamashita T, Sugiyama M, et al. Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J Clin Microbiol*. 2000, 38, 2955-2961.
- [15] Nix WA, Maher K, et al. Detection of all known parechoviruses by realtime PCR. *J Clin Microbiol*. 2008, 46, 2519-2524.
- [16] Allard A, Albinsson B, et al. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol*. 1992, 37, 149-157.
- [17] McLeish NJ, Wittevelde J, et al. Development and assay of RNA transcripts of enterovirus species A to D, rhinovirus species A to C, and human parechovirus: assessment of assay sensitivity and specificity of real-time screening and typing methods. *J Clin Microbiol*. 2012, 50, 2910-2917.
- [18] Logan C, O' Leary JJ, et al. Realtime reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol*. 2006, 44, 3189-3195.
- [19] 葛谷光隆, 藤井理津志, 他. 教育研修施設で発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例. *感染症学雑誌*. 2003, 77, 53-59.

資 料

マーケットバスケット方式によるスクラロースの一日摂取量調査について (2023)

中島 安基江, 井原 紗弥香

Studies on Daily Intake of Sucralose by Market Basket Method (2023)

NAKASHIMA Akie, IHARA Sayaka

(Received: October 21, 2024)

国民が日常の食事を介して摂取する添加物量を把握し、食品添加物を含む食品の安全性を確保するため、当センターでは厚生労働省の委託事業として「食品中の食品添加物一日摂取量調査」を実施している。令和5年度は、甘味料であるスクラロースの一日摂取量（成人；20歳以上）について調査を行った。その結果、混合群試料の分析から求めたスクラロースの一日総摂取量は1.033 mg/人/日で、個別食品の分析から求めた表示群の一日総摂取量は1.405 mg/人/日であった。

Key words : スクラロース, マーケットバスケット方式, 一日摂取量調査

緒 言

マーケットバスケット方式による食品中の食品添加物一日摂取量調査は、国内における食品添加物の摂取実態を把握し、食品添加物の安全性を確保する目的で厚生労働省が中心となり昭和57年から継続的に行われている。当センターは、平成26年度から本事業に参加している。令和5年度は成人（20歳以上）の保存料、着色料、甘味料、結着剤及び発色剤の一日摂取量調査を実施し、広島県は甘味料であるスクラロースの調査を担当した。

スクラロースは、平成11年に食品添加物に指定された甘味料で、使用基準として、砂糖代替食品（コーヒー、紅茶等に直接加え、砂糖に代替する食品として用いられるもの） 12 g/kg, チューインガム 2.6 g/kg, 菓子（除くチューインガム）・生菓子 1.8 g/kg, ジェム 1.0 g/kg, 清酒・合成清酒・果実酒・雑酒・清涼飲料水・乳飲料・乳酸菌飲料（希釈して飲用に供する飲料水は、希釈後の飲料水） 0.40 g/kg, その他の食品 0.58 g/kgが定められている。

今回、調査を実施したスクラロースの一日摂取量調

査結果について報告する。

方 法

1 試料

国立医薬品食品衛生研究所及び地方衛生研究所5機関（札幌市衛生研究所、仙台市衛生研究所、香川県環境保健研究センター、長崎市保健環境試験所、沖縄県衛生環境研究所）において、マーケットバスケット方式調査用加工食品群（1群（調味嗜好飲料）、2群（穀類）、3群（いも類・豆類・種実類）、4群（魚介類・肉類・卵類）、5群（油脂類・乳類）、6群（砂糖類・菓子類）、7群（果実類・野菜類・海藻類））ごとに、それぞれ調製された試料（混合群試料）について調査を実施した。

また、各機関で試料の調製用に購入した食品のうち、原材料表示にスクラロースが記載されている食品について、未開封の食品（個別食品）を別途分析した。個別食品の添加回収試験用として、スクラロースの表示が記載されていない食品から、コーヒー（液・無糖）（1群）、蒸し柿まぼこ（4群）、無糖ヨーグルト（5群）、クラッカー（6群）及び白菜漬（塩漬）（7群）を広島市内小売店

で購入して試験に供した。

2 試薬及び器具

塩化ナトリウム：富士フイルム和光純薬（株）社製（特級）

塩酸：富士フイルム和光純薬（株）社製（特級）

透析内液：塩化ナトリウム 100 g を 0.01 mol/L 塩酸に溶解して 1000 mL とした。

透析外液：0.01 mol/L 塩酸

メタノール：関東化学（株）社製（残留農薬・PCB 分析用及び LC-MS 用）

蒸留水：関東化学（株）社製（LC-MS 用）

アセトニトリル：関東化学（株）社製（LC-MS 用）

透析膜チューブ：Viskase Companies Inc. 製，透析用セルロースチューブ 36/32（平面幅 44 mm，直径 28 mm，壁厚 0.0203 mm）

BondEluteC18：アジレント・テクノロジー（株）社製，担体量 500 mg

酢酸アンモニウム：シグマ アルドリッチ ジャパン（同）社製（LC-MS 用）

3 標準品

スクラロース標準品：富士フイルム和光純薬（株）社製（HPLC 用標準品，純度 98.0+％）

標準原液：スクラロース標準品 100.0 mg を量り，40vol% メタノールを加えて溶かし，正確に 100 mL とした。この 1 mL を正確にとり，40vol% メタノールで正確に 100 mL としたものを標準原液とした（濃度 10 µg/mL）。

検量線用標準溶液：標準原液 1 mL を正確にとり，40vol% メタノールを加え正確に 10 mL とした。これを元に検量線用標準溶液を調製した（濃度 0.004～0.2 µg/mL）。

4 装置及び測定条件

LC-MS/MS を用いシングルマスモードにより定量した。分析条件を表 1 に示した。

5 分析法の検出下限及び定量下限の求め方

試料の検出下限及び定量下限は，JIS の HPLC 通則法 [1] に従って得られた分析機器の検出下限を基に算出した。

6 試験溶液の調製

第 2 版 食品中の食品添加物分析法 [2]（スクラロース確認分析法 1，液体クロマトグラフィー質量分析法）により行った。試験溶液の調製方法を図 1 に示した。

7 添加回収試験

送付された混合群試料（1～7 群；仙台市衛生研究所で調製）にスクラロースを試料中に 1.0 µg/g となるように添加した。試験溶液の調製方法に従い各食品群を 3 回試行で測定し，その平均値を回収率とした。

結 果

1 添加回収試験，検出下限及び定量下限

スクラロースの添加回収試験の測定結果，検出下限及び定量下限を表 2 及び表 3 に示した。添加回収率は混合試料群及び個別食品において 83.6～106.2％の範囲内で良好な結果が得られた。検出下限は 0.013 µg/g（1 群は 0.007 µg/g），定量下限は 0.066 µg/g（1 群は 0.033 µg/g）であった。

2 混合群におけるスクラロースの機関別・食品群別含有量及び一日摂取量

各機関で調整された混合群試料を分析し，それぞれの群のスクラロース含有量について，「食品摂取頻度・摂取量調査 令和 2 年度 調査報告書」（東京大学大学院医学系研究科社会予防疫学分野 佐々木敏教授，令和 3 年 3 月）の結果に基づく加工食品群別の成人食品喫食量リスト（令和 5 年度改訂版）（新リスト）（非公開）の一日喫食量（成人；20 歳以上）から一日総摂取量を計算した（表 4）。

3 個別食品中のスクラロースの定量

各機関から送付された，原材料表示にスクラロースの記載がされていた 45 試料についてスクラロースの定量を行った。カレールー，ちくわ，パンなど試料のかさが大きいもの，水分を含むと膨張するものについては，試料採取量を適宜減らして分析を行った。定量結果を表 5 に示した。

4 表示群におけるスクラロースの機関別・食品群別含有量及び一日摂取量

個別食品 45 試料の定量値（表 5）から計算した一日摂取量を表 6 に示した。

考 察

個別食品換算から求めた表示群における食品群別のスクラロース一日摂取量(成人;20歳以上)は1.405 mg/人/日であり,各機関で調製された混合群試料の分析値から得られた一日摂取量(成人;20歳以上)は1.033 mg/人/日となり,表示群の結果が混合群よりも若干高い傾向が認められた。これは,混合群試料中にスクラロースの表示のある個別食品数が少ないため,混合群試料調製においてスクラロースが希釈されたことにより,測定上,混合群試料の試験溶液が定量下限未満になる場合があるためと考えられた。混合群,表示群における一日総摂取量において大きな乖離は認められなかったことから,概ね食品表示通りにスクラロースが使用されていると考えられた。

ま と め

マーケットバスケット方式による加工食品中の食品添加物のうち,今年度は成人(20歳以上)のスクラロースの一日摂取量調査を担当して行った。混合群試料の分析から得られた混合群の一日総摂取量は1.033 mg/人/日であった。混合群,表示群における一日総摂

取量において大きな乖離は認められなかったことから,概ね食品表示通りにスクラロースが使用されていると考えられた。混合群,表示群いずれもADIに基づく一日許容摂取量15 mg/kg/day[3]を大幅に下回った。

本調査は令和5年度食品・添加物等規格基準に関する試験検査費食品添加物一日摂取量調査に関する研究の一環として行った。

文 献

- [1] 日本規格協会. 高速液体クロマトグラフィー通則 JISK0124, 1983年制定・2011年改訂.
- [2] 厚生省生活衛生局食品化学課長通知「食品中の食品添加物分析法について」(平成12年3月30日 衛化第15号) 別添「第2版 食品中の食品添加物分析法」最終改正;令和5年10月23日, 健生食基発1023第2号, 健生食監発1023第2号
- [3] World Health Organization. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/Home/Chemical/2340>, cited 2024-10-03.

表1 LC-MS/MS分析条件

装置	Agilent 1290 Infinity II, Agilent 6470 Triple Quad LC/MS
カラム	Atlantis T3 (Waters社製) (粒子径3 μ m, 2.1mm $\times$ 150mm)
流速	0.2mL/min
注入量	2 μ L
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
移動相	0.1%酢酸アンモニウム水溶液:0.1%酢酸アンモニウム含有アセトリル(80:20)
イオン化モード	ESI(-)
検出法	SIM
定量イオン	m/z 395
ドライガス	N ₂ , 250 $^{\circ}$ C, 10L/min
キャピラリー電圧	4000V
ネブライザー	N ₂ (45psi)
フラグメンター電圧	160V

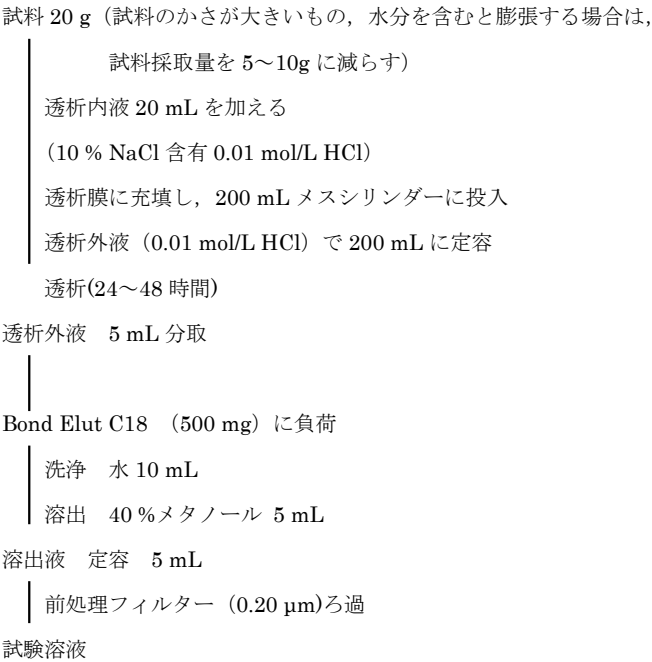


図 1 試験溶液の調製方法

表2 混合群試料のスクラロースの添加回収率, 検出下限及び定量下限 (n=3)

	食 品 群						
	1 群	2 群	3 群	4 群	5 群	6 群	7 群
検出下限 (μg/g)	0.007	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013
定量下限 (μg/g)	0.033	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066
添加量 (μg/g)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
回収率 (%)	106.2	97.4	93.7	97.9	98.9	93.5	98.5
(CV%)	(6.6)	(1.1)	(3.3)	(0.6)	(1.6)	(1.1)	(1.2)

表3 代表的な個別食品のスクラロースの添加回収率 (n=3)

	添 加 試 料				
	コーヒー (液・無糖) (1 群)	蒸しかまぼこ (4 群)	無糖ヨーグルト (5 群)	クラッカー (6 群)	白菜 (塩漬) (7 群)
添加量 (μg/g)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
回収率 (%)	89.6	83.6	98.9	93.8	99.3
(CV%)	(2.1)	(0.6)	(2.0)	(4.2)	(1.4)

試料採取量 20 g (ただし, 蒸しかまぼこ 10 g, クラッカー 5 g)

表 4 混合群のスクラロースの一日摂取量 (20 歳以上)

調製機関名	食 品 群							(n=3) 総摂取量
	1群	2群	3群	4群	5群	6群	7群	(mg/人/日)
札幌市	1.667	0	0.000	0	0.008	0	0.051	1.726
仙台市	0.548	0	0.000	0	0	0	0	0.586
国衛研	0.286	0.197	0.043	0	0.506	0	0.116	1.167
香川県	0.577	0	0.000	0	0	0.032	0.036	0.644
長崎市	0.543	0	0.000	0.036	0.366	0	0.113	1.101
沖縄県	0.572	0	0.000	0	0	0.031	0	0.971
平均値	0.699	0.033	0.007	0.006	0.155	0.027	0.105	1.033

試料中含有量が不検出（定量下限未満）であれば摂取量は0mgで示した

表 5 スクラロースの個別食品定量結果

				(n=3)						
機関名	食品群	食品名	定量値 (μg/g)		機関名	食品群	食品名	定量値 (μg/g)		
札幌市	第1群	乳酸菌飲料(乳製品)	77.17 ±	1.56	香川県	第1群	スポーツ飲料	25.06 ±	0.78	
		スポーツ飲料	22.46 ±	0.92			炭酸飲料(果実色)	18.43 ±	0.31	
		炭酸飲料 (果実色)	14.62 ±	0.52			ゼロカロリー飲料	66.52 ±	5.38	
		ゼロカロリー飲料	180.47 ±	4.24			ドレッシング	114.87 ±	5.13	
		カレールウ*	99.45 ±	6.13			第6群	こんにゃくゼリー	172.03 ±	12.70
	第5群	シャーベット	12.53 ±	0.11		第7群	福神漬	194.45 ±	6.72	
		シャーベット	42.10 ±	1.72			第1群	スポーツ飲料	26.19 ±	1.43
仙台市	第7群	福神漬	231.43 ±	15.75			炭酸飲料(果実色)	17.82 ±	0.31	
		第1群	非乳製品乳酸菌飲料	164.79 ±	4.29			ゼロカロリー飲料	50.34 ±	3.34
			スポーツ飲料	25.11 ±	0.59			カレールウ*	114.22 ±	3.22
	第4群	ゼロカロリー飲料	47.47 ±	3.73	長崎市	第5群	焼き竹輪 *	29.23 ±	0.84	
		ドレッシング	120.34 ±	9.58			ヨーグルト ドリ ンクタイプ	72.46 ±	2.94	
国衛研	第6群	こんにゃくゼリー	134.71 ±	6.25				ヨーグルト ドリ ンクタイプ	83.83 ±	2.63
	第1群	スポーツ飲料	23.50 ±	3.61	第6群	オレンジゼリー	84.24 ±	1.11		
		ゼロカロリー飲料	70.47 ±	7.50			こんにゃくゼリー	35.79 ±	1.83	
	第2群	その他のパン*	53.82 ±	1.78	第7群	キムチ	88.36 ±	3.95		
	第3群	調整豆乳	12.08 ±	0.25			福神漬	66.69 ±	5.12	
	第5群	加糖ヨーグルト	111.27 ±	1.89	沖縄県	第1群	スポーツ飲料	25.62 ±	0.79	
		ヨーグルト ドリ ンクタイプ	147.42 ±	1.94			ゼロカロリー飲料	183.14 ±	7.20	
		シャーベット	12.58 ±	0.06		第5群	加糖ヨーグルト	35.30 ±	0.87	
	第6群	オレンジゼリー	31.05 ±	0.68		第6群	こんにゃくゼリー	154.8 ±	5.78	
	第7群	福神漬	71.83 ±	1.88		第7群	たくあん漬け	201.08 ±	4.41	
もずく		56.23 ±	0.35							
試料採取量； * 10g										

試料採取量 ; * 10g

表 6 表示群のスクラロースの一日摂取量 (20 歳以上)

機関名	食品群							(n=3) 総摂取量 (mg/人/日)
	1群	2群	3群	4群	5群	6群	7群	
札幌市	1.685	—	—	—	0.012	—	0.056	1.753
仙台市	0.984	—	—	—	—	0.047	—	1.031
国衛研	0.549	0.225	0.061	—	0.494	0.020	0.095	1.443
香川県	1.099	—	—	—	—	0.060	0.047	1.206
長崎市	0.789	—	—	0.068	0.357	0.066	0.129	1.409
沖縄県	1.166	—	—	—	0.049	0.054	0.316	1.585
平均値	1.045	0.037	0.010	0.011	0.152	0.041	0.107	1.405

—：対象となる個別食品がなかったため、摂取量が0mgとなるもの

資 料

黒瀬川の被覆肥料に由来するマイクロプラスチック調査

中廣賢太, 花岡雄哉, 木村淳子

Microplastics derived from polymer-coated fertilizer in Kurose River

NAKAHIRO Kenta, HANAOKA Yuya and KIMURA Junko

(Received: November 5, 2024)

5 mm未満のマイクロプラスチックを含むプラスチックごみによる海洋汚染は、地球規模の環境問題となっており、陸域から海洋に流出するマイクロプラスチックの一因として、水田栽培等に使用される被覆肥料由来のプラスチック被膜殻の流出が懸念されている。そこで、広島県東広島市及び呉市を流れる黒瀬川の河川水中のプラスチック被膜殻を調査することで、農地からの流出及び海洋移行の実態把握を行った。黒瀬川の河川水中からプラスチック被膜殻が採取されたことから汚染実態が明らかとなり、河川水中の個数密度が5月の田植えの時期に高い傾向にあることから、代掻き作業後に多く流出していることが示唆された。

Key words : 海洋プラスチック問題, マイクロプラスチック, 被覆肥料, FT-IR

結 言

プラスチックは従来使用されてきた木材、金属、ガラス等といった素材にとって代わる形で、様々な製品に使用されており、我々の生活には欠かせないものとなっている。19世紀にポリスチレンやポリ塩化ビニルが発明されて以来、様々な種類のプラスチックが生み出されており、汎用化からまだ70年ほどしか経っていないが、製造されたプラスチック製品の総量は83億トンを超える[1]。83億トンのうち、廃棄された63億トンのプラスチック製品は、79%が埋立て処分又は海洋等の自然環境中に投棄されており、世界全体で毎年800万トンのプラスチックごみが陸域から海洋に流出していると推計されている[2]。

海洋等の自然環境中に流出したプラスチックごみは、紫外線や波等で劣化し、次第に微細片に破砕される。微細化したプラスチックごみと微細プラスチック製品のうち、5 mm未満のものは、「マイクロプラスチック」（以下、「MP」という。）と呼ばれている。MPは、プランクトンや魚類が誤って摂食する可能性が高く、生態系への悪影響が大きいと懸念されている。MPを含むプラスチックごみによる海洋汚染は、地球規模での重大かつ喫緊の問題となっており、海洋プラスチックごみ

の約8割が陸域から流入することから、陸域からの流出実態の把握や抑制に取り組む必要がある[3]。

陸域のプラスチックごみの環境中への残留及び海域への流出源の一つとして、農地土壌が注目されている。ビニールハウス、マルチシート、ネット、育苗用のポリポット、トレイ、収穫コンテナ、牧草用サイレージフィルム、肥料や農薬成分をプラスチック等の膜でコーティングした被覆肥料及びマイクロカプセル剤等、農業生産時には様々なプラスチック製品が長期的かつ広範に使用されることから、農地土壌にはプラスチックが残留、蓄積する[4]。その中でも、水稻栽培等に利用されるプラスチックで窒素肥料をコーティングした被覆肥料は、肥料成分が溶出した後に5 mm未満のプラスチック被膜殻（以下、「被膜殻」という。）が残留する。これまで様々な調査により河口や海岸等に漂着した被膜殻が確認されており、水田等の農地からの流出及び河川を通じた海域への移行が懸念されており[5,6]、早急に実態を把握する必要がある。

そこで本研究は、先行調査において指摘されてきた被覆肥料由来のMP汚染について明らかにすることを目的とし、水田等の農地利用の多い広島県東広島市及び呉市を流れる黒瀬川の河川水中の被膜殻を調査し、流出実態の把握を目指した。

方 法

1 調査地点及び採取日

調査地点を図1に示す。調査地点は、黒瀬川的环境基準地点及び補助地点から選定し、上流域の和泉橋、中流域の樋ノ詰橋、下流域の芋福橋の3地点とした。

黒瀬川は、広島県沿岸部のほぼ中央に位置する流域面積238.8 km²、流路延長50.6 kmの黒瀬川水系の本流である。西条盆地、黒瀬盆地を南流し、広沖積平野から瀬戸内海に注ぐ。流域の土地利用は、緩傾斜の山林や水田等の農地利用が大半を占める[7]。

河川漂流物の採取は、田植えの時期である4月末から5月初めにかけての連休前後及び12月までの毎月末とし、2022年4月28日、5月10日、5月26日、6月30日、7月25日、8月23日、9月29日、10月25日、11月28日及び12月20日の10回行った。

2 採取方法

被膜殻を含む河川漂流物は、採取用網で10 m³前後の河川水を濾水することで、採取した。濾水は、調査地点の河川低水路内に立ち入り、河川の水面直下に採取用網を全没させた。採取用網は、前長26 cm、側長45 cm、目合1.0 mmの玉網を用いた。網内の濾水量は、採取用網の開口部中央に固定した低流速用デジタル濾水計（GO-2030R6、General Oceanics社製）のカウントから、算出した。

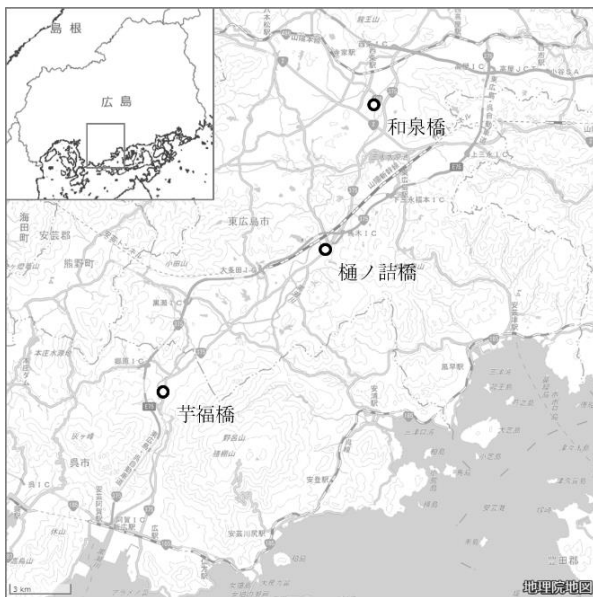


図1 黒瀬川の調査地点

3 河川漂流物の前処理

採取した河川漂流物は、目開き0.1 mmのネット上に移し、精製水で洗浄した後、室温で乾燥した。乾燥後、河川漂流物中から目視で円形の被膜殻と推定された物（以下、「被膜殻候補物」という。）を摘出した。被膜殻候補物は、被膜殻様及び被膜殻表面の有機物を分解するため、30%過酸化水素溶液30 mLを入れたビーカー内で、55℃に加温した状態で、1日間静置した。処理後、残った被膜殻候補物は、精製水で洗い、室温で乾燥した。

4 外観及び粒子径

被膜殻候補物は、デジタルマイクロスコープ（VHX-5000、(株)キーエンス製）を用いて、外観を撮影及び最大フェレー径を採寸した。

5 被膜殻の判別

被膜殻候補物は、フーリエ変換赤外分光光度計（Fourier transform infrared spectrometer, FT/IR-6600、日本分光(株)製）のATR法を用いて、赤外吸収スペクトルを取得することで、材質の同定を行った。中空の球又は球が破損した形状で、材質がプラスチックと同定されたものを被膜殻と判別した（図2）。



図2 採取された被膜殻（中空球、破片）

結 果 及 び 考 察

黒瀬川の3地点で各10回行った調査について、流速、濾水量等の項目を表1に示す。調査の結果、計116個の被膜殻が採取され、黒瀬川の河川水中を被膜殻が漂流していることが明らかとなり、水田等の農地で使用された被膜肥料由来のMPが河川に流出し、海洋プラスチック汚染の一因となっていることが示唆された。

各被膜殻の形状、長径、色及びプラスチック種別を、表2に示す。回収された中空球状の被膜殻の長径は、平均3.83 mm (2.26 - 4.97 mm) であり、すべて5 mm未満であった。材質は、ポリエチレン系、ポリウレタン系及びポリスチレン系の3種類であり、ポリエチレン系が56%、ポリウレタン系が43%と2種が大半を占めて

表1 各採取時の調査項目

水系名	調査地点	調査日	天気	気温 (℃)	水温 (℃)	流速 (cm/秒)	濾水時間 (分)	濾水量 (m ³)	水深 (cm)
黒瀬川	和泉橋	4月28日	晴	-	-	19	35	8.7	75
		5月10日	晴	24.8	23.0	10	45	8.6	53
		5月26日	曇	24.8	22.8	15	45	8.4	61
		6月30日	晴	34.5	32.2	13	55	8.5	60
		7月25日	曇	32.0	26.0	25	30	11.9	75
		8月23日	晴	31.0	31.2	29	30	12.2	74
		9月29日	曇	24.9	21.5	38	30	18.3	71
		10月25日	晴	17.6	17.8	28	45	10.7	48
		11月28日	晴	19.1	15.3	16	45	13.0	54
		12月20日	晴	9.5	8.9	17	45	10.2	55
	樋ノ詰橋	4月28日	晴	-	-	91	10	13.6	70
		5月10日	晴	24.1	21.5	70	15	12.7	70
		5月26日	曇	24.6	23.4	80	15	12.1	65
		6月30日	晴	32.3	31.0	70	25	11.5	63
		7月25日	曇	28.0	26.1	85	15	21.1	75
		8月23日	晴	34.1	30.3	73	10	11.8	72
		9月29日	曇	24.9	23.0	107	10	15.8	68
		10月25日	晴	22.5	18.5	91	15	14.1	53
		11月28日	晴	21.2	17.3	83	10	11.7	56
		12月20日	晴	11.7	9.0	56	20	14.2	65
	芋福橋	4月28日	晴	-	-	37	22	10.9	92
		5月10日	晴	21.0	19.5	15	45	13.0	75
		5月26日	曇	24.4	23.0	25	45	9.8	70
		6月30日	晴	33.0	29.2	30	25	10.1	55
		7月25日	曇	27.5	26.1	25	30	11.9	75
		8月23日	晴	33.0	29.0	18	45	11.1	112
		9月29日	曇	23.2	22.5	27	40	17.5	103
		10月25日	晴	17.5	17.3	21	40	9.6	78
		11月28日	晴	16.5	14.0	7	45	8.0	90
		12月20日	晴	8.8	6.5	11	45	7.0	98

おり、調査地点及び調査日による材質の偏りは、認められなかった。

時系列変化及び調査地点間の違いを見るため、各調査で採取された被膜殻の個数を採水量（m³）で除すことにより、個数密度（個/m³）を算出した。時系列に並べた各調査地点の個数密度を、図3及び表3に示す。上流域の和泉橋及び下流域の芋福橋の個数密度は、4月28日の0.23, 0.18個/m³から、5月10日の0.93, 0.54個/m³と増加し、5月26日に1.31, 1.53個/m³と最高値に達した後、6月30日は0.12, 0.30個/m³と減少する傾向を示した。同様の傾向は、石川県の大川及び海岸汀線の調査においても見られており、大川の河川水中の個数密度は4月23日から5月14日の間は高濃度で推移し、5月25日以降は急速に低下した[6]。海岸汀線の個数密度も、4月から6月にかけて上昇し、7月から9月にかけて徐々に低下した[6]。これらの傾向から、被膜殻は、地域によって作業時期は異なるものの、田植え前の代掻き作業時に多く流出することが考えられ、5月の高密度は代掻き作業後の流出を表している

と示唆された。一方、中流域の樋ノ詰橋の個数密度は、5月は0.00, 0.41個/m³と低く、6月に2.62個/m³の最高値となった。その後、7月に0.14個/m³と低下し、再度8月に0.93個/m³と高くなった。このことから、個数密度が高い時期が2期あり、年内で最も高い月は代掻き時期とは異なる6月であった。これらの傾向は上流域及び下流域並びに勝見らの調査報告[6]とも異なっていた。

中流域は6月に代掻き作業を行っている可能性はあるが、採取地点の樋ノ詰橋より上流には、三永水源 地堰堤への導水口、東広島浄化センターの放流口、流域面積の広い戸石川及び松板川の合流地点等が存在しており、個数密度に影響を及ぼしたと考えられた。また、他の採取地点及び採取日に見られなかった特徴として、6月は、被膜殻と共に大量のウキクサ科の植物が採取された（図4）。このことから、ウキクサ等の植物が繁茂する時期や場所は、被膜殻が水田等の農地から流出後も植物に絡まって残留又は流下が遅くなり、植物の流下と共に移行する可能性がある。河川

表2 各被膜殻の形象

調査地点	採取日	検体番号	プラスチック種別	形状	長径 (mm)	色	調査地点	採取日	検体番号	プラスチック種別	形状	長径 (mm)	色
和泉橋	4月28日	1	ポリエチレン (PE)	破片	6.08	白	芋福橋	4月28日	26	ポリエチレン (PE)	球	3.50	白
		2	ポリウレタン (PU)	球	3.68	白			27	ポリウレタン (PU)	球	3.78	白
	5月10日	1	ポリエチレン (PE)	球	3.61	白		7月25日	28	ポリウレタン (PU)	球	2.63	白
		2	ポリエチレン (PE)	球	4.35	白			29	ポリウレタン (PU)	球	3.15	白
		3	ポリエチレン (PE)	球	4.11	白			30	ポリウレタン (PU)	球	3.60	白
		4	ポリウレタン (PU)	球	4.16	白			1	ポリウレタン (PU)	球	4.96	白
		5	ポリエチレン (PE)	球	3.79	白			2	ポリウレタン (PU)	球	4.64	白
		6	ポリエチレン (PE)	球	3.44	白			3	ポリウレタン (PU)	球	4.49	白
		7	ポリエチレン (PE)	球	2.95	白		8月23日	1	ポリウレタン (PU)	球	3.24	白
	5月26日	8	ポリエチレン (PE)	破片	4.68	白			2	ポリエチレン (PE)	球	4.46	白
		1	ポリエチレン (PE)	球	3.81	白			3	ポリエチレン (PE)	球	3.86	白
		2	ポリエチレン (PE)	球	3.50	白			4	ポリウレタン (PU)	球	4.22	白
		3	ポリエチレン (PE)	球	3.54	白			5	ポリウレタン (PU)	球	3.50	白
		4	ポリエチレン (PE)	球	4.28	白			6	ポリウレタン (PU)	球	4.14	白
		5	ポリエチレン (PE)	球	3.43	白			7	ポリエチレン (PE)	球	3.81	白
		6	ポリエチレン (PE)	球	3.61	白			8	ポリエチレン (PE)	球	3.94	白
		7	ポリエチレン (PE)	球	4.05	白			9	ポリウレタン (PU)	球	3.21	白
		8	ポリエチレン (PE)	球	3.52	白			10	ポリウレタン (PU)	球	3.13	白
		9	ポリエチレン (PE)	球	4.77	白			11	ポリウレタン (PU)	球	4.23	白
		10	ポリエチレン (PE)	球	4.15	白		12月20日	1	ポリエチレン (PE)	球	4.36	白
	6月30日	11	ポリウレタン (PU)	球	3.23	白		4月28日	1	ポリエチレン (PE)	球	3.46	白
		1	ポリエチレン (PE)	球	4.25	白			2	ポリエチレン (PE)	球	3.75	白
	7月25日	1	ポリウレタン (PU)	球	4.68	白		5月10日	1	ポリエチレン (PE)	球	3.28	白
		2	ポリウレタン (PU)	破片	4.49	白			2	ポリエチレン (PE)	球	3.36	白
	8月23日	1	ポリエチレン (PE)	球	3.75	白			3	ポリエチレン (PE)	球	3.31	白
		2	ポリエチレン (PE)	球	4.45	白			4	ポリエチレン (PE)	球	3.83	白
	10月25日	1	ポリエチレン (PE)	球	4.36	白			5	ポリウレタン (PU)	球	4.68	白
樋ノ詰橋	4月28日	1	ポリウレタン (PU)	球	3.68	白			6	ポリエチレン (PE)	球	3.33	白
	5月26日	1	ポリウレタン (PU)	球	3.51	白		5月26日	7	ポリエチレン (PE)	球	4.30	白
		2	ポリエチレン (PE)	球	3.96	白			1	ポリエチレン (PE)	球	4.97	白
		3	ポリエチレン (PE)	球	4.59	白			2	ポリエチレン (PE)	球	4.23	白
		4	ポリエチレン (PE)	破片	3.78	白			3	ポリウレタン (PU)	球	3.67	白
	6月30日	5	ポリエチレン (PE)	破片	3.76	白			4	ポリウレタン (PU)	球	4.51	白
		1	ポリウレタン (PU)	球	4.94	白			5	ポリエチレン (PE)	球	4.82	白
		2	ポリエチレン (PE)	球	4.22	白			6	ポリエチレン (PE)	球	4.08	白
		3	ポリエチレン (PE)	球	4.42	白			7	ポリウレタン (PU)	球	3.61	白
		4	ポリウレタン (PU)	球	4.44	白			8	ポリエチレン (PE)	球	3.75	白
		5	ポリエチレン (PE)	球	3.91	白			9	ポリウレタン (PU)	球	3.27	白
		6	ポリウレタン (PU)	球	3.99	白			10	ポリエチレン (PE)	球	3.64	白
		7	ポリウレタン (PU)	球	4.31	白			11	ポリウレタン (PU)	球	3.24	白
		8	ポリウレタン (PU)	球	3.75	白			12	ポリウレタン (PU)	球	2.87	白
		9	ポリウレタン (PU)	球	3.30	白			13	ポリウレタン (PU)	球	2.95	白
		10	ポリウレタン (PU)	球	4.24	白			14	ポリウレタン (PU)	球	2.39	白
		11	ポリエチレン (PE)	球	3.99	白		6月30日	15	ポリエチレン (PE)	破片	3.67	白
		12	ポリウレタン (PU)	球	4.20	白			1	ポリエチレン (PE)	球	3.75	白
		13	ポリエチレン (PE)	球	3.48	白			2	ポリスチレン (PS)	球	2.85	白
		14	ポリウレタン (PU)	球	4.06	白			3	ポリウレタン (PU)	球	3.11	白
		15	ポリエチレン (PE)	球	4.70	白		7月25日	1	ポリエチレン (PE)	球	3.98	白
		16	ポリウレタン (PU)	球	3.72	白			2	ポリウレタン (PU)	球	3.81	白
		17	ポリウレタン (PU)	球	3.18	白		8月23日	1	ポリウレタン (PU)	球	3.61	白
		18	ポリエチレン (PE)	球	3.40	白			2	ポリウレタン (PU)	球	3.58	白
		19	ポリエチレン (PE)	球	3.11	白		9月29日	3	ポリエチレン (PE)	球	3.77	白
		20	ポリウレタン (PU)	球	3.53	白			4	ポリエチレン (PE)	球	3.92	白
		21	ポリウレタン (PU)	球	3.41	白			1	ポリエチレン (PE)	球	4.63	白
		22	ポリエチレン (PE)	球	4.22	白		10月25日	1	ポリウレタン (PU)	球	3.98	白
		23	ポリエチレン (PE)	球	4.21	白			2	ポリエチレン (PE)	球	4.63	白
		24	ポリエチレン (PE)	破片	3.88	白			3	ポリエチレン (PE)	球	3.48	白
		25	ポリウレタン (PU)	球	4.04	白			4	ポリウレタン (PU)	球	4.20	白

表3 各調査地点で採取された被膜殻の個数密度 (個/m³)

調査地点	個数密度 (個/m ³)									
	4月28日	5月10日	5月26日	6月30日	7月25日	8月23日	9月29日	10月25日	11月28日	12月20日
和泉橋	0.23	0.93	1.31	0.12	0.17	0.16	0.00	0.09	0.00	0.00
樋ノ詰橋	0.07	0.00	0.41	2.62	0.14	0.93	0.00	0.00	0.00	0.07
芋福橋	0.18	0.54	1.53	0.30	0.17	0.36	0.06	0.42	0.00	0.00

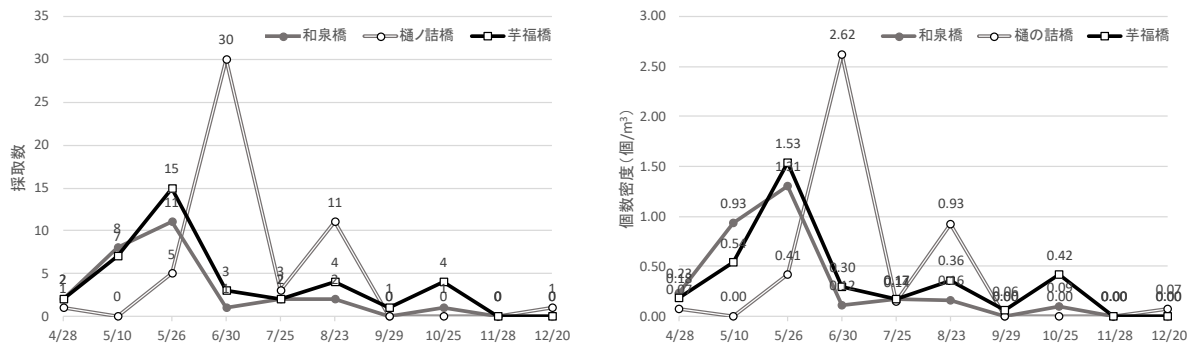


図3 各調査地点の採取数及び個体密度の時系列変化

水中の被膜殻の時系列変化や移行過程を評価する際は、同時に採取される漂流物の観察も必要と考えられた。

同調査日の上流、中流、下流の個体密度について比較を行ったが、総流量が増える川下ほど個体密度が低下していく等の一定の傾向は認められなかった。また、上流域の個体密度が高い5月に中流域の値は低いままであり、中流域の個体密度が高い6月と8月においても、下流域の値が高くなってはいなかった。このことから、被膜殻の流下速度が川岸又は植物等に保持されて緩慢になるため、上中下流域の個体密度は連動しない又は調査地点の個体密度は、周辺流域からの流出をより反映している等の可能性が考えられた。今後、より詳細に被膜殻の河川を通じた海域への移行過程や面源負荷量を推定していくためには、離散的ではない連続採取や河川水量を測定する等、更なる調査が必要と考える。



図4 6月の中流域で採取された植物

結 語

本研究では、広島県東広島市及び呉市を流れる黒瀬川において、被覆肥料由来のプラスチック被膜殻を調査することにより、MPの水田等の農地からの流出及び海洋への移行実態を明らかにした。被膜殻は5月の田植えの時期に高い個体密度を示したことから、代掻き作業時に水田等の農地から多く流出していると考えられた。一方、中流域は6月に高くなるといった異なる傾向も見られたことから、河川を通じた海域への移行過程の推定には更なる調査が必要と考えられた。

謝 辞

本研究は、広島県立総合技術研究所西部工業技術センター及び食品工業技術センターの協力の下に実施した。ここに感謝の意を表します。

文 献

- [1] Geyer R, Jambeck, JR, et al. Production, use, and fate of all plastics ever made. Science Advances Research Article. 2017, 3, e1700782.
- [2] Jambeck JR, Geyer R, et al. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science. 2015, 347, 768–771.
- [3] McKinsey, & Company, the Ocean Conservancy. Stemming the tide: Land-based strategies for a plastic-free ocean. <https://oceanconservancy.org/wp-content/uploads/s/2022/07/full-report-stemming-the.pdf>, cited 2024-10-24.
- [4] Cusworth SJ, Davies WJ, et al. Agricultural

- fertilizers contribute substantially to microplastic concentrations in UK soils. *Communications Earth & Environment*. 2024, 5, 7.
- [5] 池貝隆宏, 三島聡子, 他. 相模湾沿岸域のマイクロプラスチック漂着特性. 神奈川県環境科学センター研究報告. 2018, 41, 1-10.
- [6] 石川県立大学. “環境研究総合推進費 終了研究成果報告書 1RF-2001 農耕地におけるマイクロプラスチックの発生と海域への移行に関する研究” https://www.omcst.biz/suishinhi/seika/db/pdf/ended_result/1RF-2001.pdf, 参照 2023-2-10.
- [7] 広島県. “二級河川黒瀬川水系河川整備計画”. <https://www.pref.hiroshima.lg.jp/soshiki/99/1172468399474.html>, 参照 2025-01-09.

資 料

広島湾における溶存性有機態窒素 (DON) の分解特性について

濱脇亮次, 小田新一郎, 後田俊直

Decomposition characteristics of dissolved organic nitrogen (DON) in Hiroshima Bay

HAMAWAKI Ryoji, ODA Shinichirou, USHIRODA Toshinao

(Received: November 6, 2024)

海域における溶存性有機態窒素 (DON) は、生態系の窒素循環において、重要な役割を担っており、この分解性を把握することは海域における物質循環の健全性を評価する上で重要な課題である。本報では、瀬戸内海西部に位置する広島湾の海水を用いて、DONの分解特性を評価した。生分解試験の結果、沿岸部でのDON分解率が最も高く、沖合にかけて低くなる傾向が認められた。しかし、分解したDONは全体の1~33%程度であり、その多くが難分解性DONであった。また、DONの分解特性と全有機態炭素/全窒素比 (TOC/TN) には相関関係が認められ、TOC/TNからDON分解特性を推定できる可能性が示唆された。

Key words : 有機態窒素, 生分解試験, 難分解性有機物, 分解特性, 栄養塩

結 言

富栄養化は、沿岸域の生態系にとって大きな脅威であり、河川水や生活排水等といった様々な有機物と栄養塩が多量に投入されることによって引き起こされる現象である。陸域から海域に流入する有機物や栄養塩は、沿岸域や河口域の生産性を高め、生態系サービスを提供する上で重要な役割を果たしている。しかし、有機物や栄養塩の過剰供給は、赤潮 (有害植物プランクトンの異常増殖) や貧酸素水塊の発生等の原因となるため、海域における有機物及び栄養塩濃度は適切な管理が必要である [1-3]。日本最大の閉鎖性海域である瀬戸内海では、1960年代に始まった高度経済成長期に著しく富栄養化が進行した。その後、この富栄養化対策として瀬戸内海環境保全特別措置法による総量規制制度が導入され、1995年以降、海域における窒素・リンの規制が開始された。これにより、陸域から供給される有機物、窒素、リンの汚濁負荷量は削減され、それに伴い瀬戸内海の全窒素 (TN) ・全リン (TP) 濃度は大きく減少し、2022年度における環境基準達成率はTNで96%、TPで95%に達した [4]。一方で、海域における有機物の汚濁指標である化学的酸素要求量 (COD) の環境基準達成率は1995年

以降横ばいで推移しており、COD濃度に大きな変化は見られないどころか、一部では上昇する海域も存在している [4]。

海水中の有機物は粒子状有機物 (POM) と溶存性有機物 (DOM) に大別され、POMに含まれる炭素、窒素、リンは粒子状有機態炭素 (POC)、粒子状有機態窒素 (PON)、粒子状有機態リン (POP) と呼ばれる。一方、DOMに含まれる炭素、窒素、リンは溶存性有機態炭素 (DOC)、溶存性有機態窒素 (DON)、溶存性有機態リン (DOP) として知られている。海域におけるPOMは主に動植物プランクトン、バクテリア等によって構成され、DOMはゲル状物質、内部生産によって生成した有機物や生活排水に含まれる溶存性有機物である [5]。POM及びDOMはいずれも海域の物質循環において重要な役割を果たしており、これらの多くはバクテリア等によって分解され、最終的には無機態炭素 (DIC)、無機態窒素 (DIN) 及び無機態リン (DIP) に変化する。しかし、近年の研究では、富栄養化対策によるTN削減が有機物の組成を変化させ、難分解化を促進させたことが指摘されている [6-8]。

これまで湖沼や海域等、日本各地の閉鎖性水域において、有機物の分解特性を把握するための研究が盛んに行われている [9-11]。しかし、有機態窒素や有機態リン等

の分解特性に関する報告は少なく、特に、瀬戸内海西部の広島湾における有機態窒素の分解特性については、これまで報告されていない。本報では、広島湾を対象に、有機態窒素の分解特性を評価したので、その内容を報告する。

方 法

1 調査地点及び採取日

広島湾は瀬戸内海西部に位置する平均水深約30mの半閉鎖的内湾である(図1)。厳島と西能美島間の那沙美瀬戸を境に大きく北部と南部に分けられるが、湾北部には一級河川である太田川(流域面積1,700km²)が流入し、この湾に流入する全淡水量の約50%を占めている[12]。本報では、広島県の公共用水域常時監視地点のうち、広島湾北部海域2地点(広島湾12, 環境基準類型指定A/Ⅲ(COD/全窒素(TN)及び全リン(TP)):沿岸, 広島湾14, A/Ⅱ:湾央)及び南部海域1地点(広島湾西部21, A/Ⅱ:沖合)の3地点(図1)において、基本項目(水温、塩分等)、有機物関連項目(化学的酸素要求量(COD)及び全有機態炭素(TOC)等)、栄養塩関連項目(全窒素(TN)及び全リン(TP)等)を調査した。各地点の平均水深はそれぞれ15, 21, 32mである。調査は表層海水の栄養塩が枯渇する夏季(2020年8月5日, 2021年8月4日, 2022年8月2日, 2023年8月24日)に実施した。なお、2023年8月24日の調査は、2023年8月22日から23日にかけて、18.5mm(気象庁、観測局:広島)の降雨直後に実施した。

2 採水・分析方法

採水はバンドーン採水器を用いて各地点の表層(0.5m)の海水を採取した。採水した海水は海洋観測指針[13]、工場排水試験法(JIS K 0102及びJIS K 0170)、広島県公共用水域水質測定計画[14]の方法に準じて分析した。海域版BOD(BOD3)については、既報[15]に準じて分析を行った。溶存性COD(D-COD)、溶存性TOC(DOC)及び栄養塩類は予め450℃で1.5時間熱処理したガラス繊維ろ紙(Whatman GF/C、孔径:1.2μm)によりろ過し、得られたろ液を分析に用いた。分析に用いた試薬は全て富士フイルム和光純薬(株)製のものをを用いた。また、直接測定しない形態の炭素、窒素及びリンの測定は次の方法により算出した。粒子状有機態炭素(POC)はTOCからDOCを差し引いた値とした。粒子状有機態窒素(PTN)は全窒素から溶存

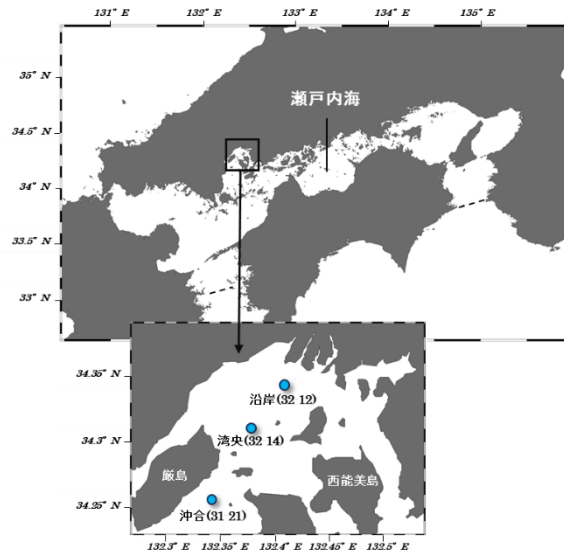


図1 広島湾における調査地点

性全窒素(DTN)を差し引いた値とした。溶存性有機態窒素(DON)はDTNから溶存性無機態窒素(DIN=アンモニア態窒素(NH₄-N)+硝酸態窒素(NO₃-N)+亜硝酸態窒素(NO₂-N))を差し引いた値とした。粒子状有機態リン(POP)はTPから溶存性全リン(DTP)を差し引いた値とした。本報における定量下限値は公共用水域水質測定計画[14]に準じた。なお、この計画におけるBODの定量下限値は0.5mg/Lであるが、海域版BODはその値を下回ることがあるため、DOの繰り返し測定を行い、その標準偏差から定量下限値を求めた。

3 海水の生分解試験

広島湾におけるDONの分解特性を評価するため、GF/Cを用いてろ過した海水(ろ過海水)を用い、既報[10,11]を参考にして生分解試験を行った。試験条件としては、500mLのデュラン瓶にろ過海水を300mL入れ、水分の蒸発を防ぐためにアルミ箔で瓶口を覆い、20℃の暗所で、振とう回数60回/分で試験を行った。生分解試験は100日間培養が一般的であるが、本報では試験開始60日目以降、DONの減少が確認されなかったため、培養期間を60日間とした。既報の生分解試験[10,11]は有機物の生分解に必要な植種が行われるが、広島湾のろ過海水には一定量の海洋細菌が存在すると考えられるため[16]、植種を行わず試験を実施した。また、各地点におけるDONの分解性の経時変化を評価するため、試験開始7, 15, 30, 45, 60日後のサンプルを採取し、栄養塩類及びDTNを測定した。DONの分解率(%)は以下の式(1)から算出した。

$$DON分解率(\%) = \frac{0日目のDON濃度 - 60日後のDON濃度}{0日目のDON濃度} \quad (1)$$

結果及び考察

1 広島湾における表層海水（夏季）の水質

広島湾における水質測定結果を表1に示す。塩分は、広島湾に流入する太田川の影響を受け、沿岸は低く、沖合は高くなった。クロロフィル（Chl-a）の濃度は沿岸で高く、沖合に向かうほど低下しており、関連項目であるpHおよび溶存酸素（DO）も同様の傾向を示した。また、有機物関連項目（TOC, COD, BOD）もChl-aと同様の傾向を示した。栄養塩類に関しては、Chl-aと関連する全窒素（TN）および全リン（TP）がChl-aおよび有機物関連項目と同様の挙動を示し、溶存態栄養塩類（DINおよびPO₄-P）はほぼ枯渇状態にあった。

2 広島湾におけるDONの分解特性

海域におけるDONは、陸域から供給されるものを除けば、主にバクテリア及び植物プランクトンの代謝過程で生成されるものが起源である[17]。このDON等は無機塩を用いた植物の一次生産によって作られる。この有機物は微生物によって分解・無機化され、再び無機塩へと戻る。さらにこの無機栄養塩を元に、一次生産が起こるが、これは再生生産と呼ばれる。つまり、海域の有機物は生産、分解・無機化、再生生産を繰り返しながら循環している[18,19]。このことから、DONの分解特性を把握することは有機物の物質循環を把握する上で重要な要素の一つである [6,7]。

図2に2021年度広島湾のろ過海水を用いた生分解試験結果を示す。各地点でDONの分解性に違いはあるものの、試験開始から1週間後にはDONの分解が確認さ

れた。DONの分解に伴い生成されるDINの挙動は、まずNH₄-Nが生成し、その後NO₃-Nへ変化した。この挙動は植物プランクトン等の有機物が分解する場合にも同じ挙動を示すことが知られている [11,20]。従って、分解したDONは植物プランクトンの光合成等の活動により生産されたDONを主体としたものであると考えられる。

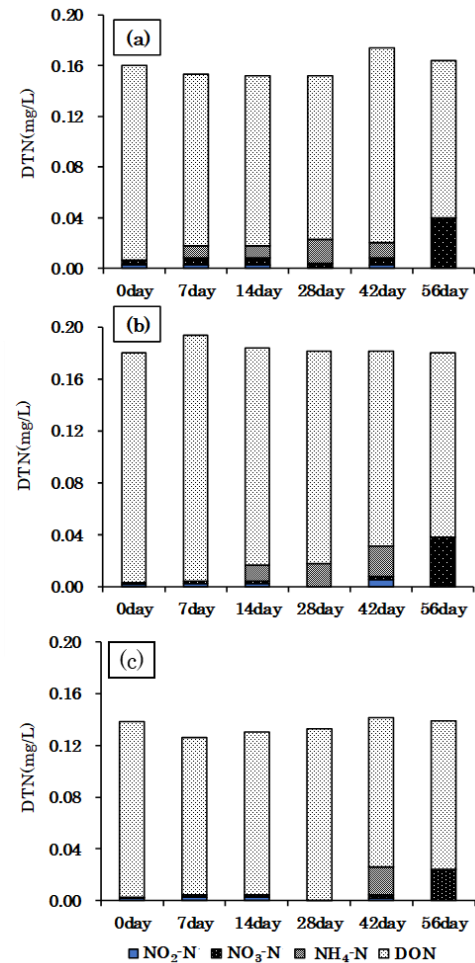


図2 広島湾におけるDONの分解特性
(a)32-12、(b)32-14、(c)31-21

表1 広島湾水質測定結果（基本項目、有機物関連項目及び栄養塩関連項目）

	採取日	水温 (°C)	塩分 (PSU)	pH	DO (mg/L)	Chl-a (µg/L)	TOC (mg/L)	DOC (mg/L)	COD (mg/L)	D-COD (mg/L)	BOD (mg/L)	D-BOD (mg/L)	TN (mg/L)	DTN (mg/L)	TP (mg/L)	DTP (mg/L)	NH ₄ (mg/L)	NO ₃ (mg/L)	NO ₂ (mg/L)	PO ₄ (mg/L)
	定量下限値	—	—	—	0.5	0.5	0.2	0.2	0.5	0.5	0.05	0.05	0.05	0.05	0.003	0.003	0.01	0.005	0.005	0.003
沿岸 (32-12)	2020.8.5	29.0	20.9	8.9	11.1	15.6	3.7	1.6	6.1	3.4	1.8	0.3	0.39	0.14	0.026	0.006	<0.01	<0.005	0.01	<0.003
	2021.8.4	30.8	25.2	8.4	8.6	12.4	3.5	2.0	5.1	3.8	2.4	0.3	0.36	0.16	0.033	0.012	<0.01	<0.005	<0.005	<0.003
	2022.8.2	28.4	28.3	8.4	9.4	5.8	3.2	1.9	3.9	2.8	1.9	0.1	0.25	0.12	0.021	0.006	<0.01	<0.005	<0.005	<0.003
	2023.8.24	28.2	18.5	8.2	10.0	17.9	2.7	1.7	3.6	2.5	1.6	0.1	0.38	0.37	0.040	0.029	0.165	0.10	0.011	0.020
湾央 (32-14)	2020.8.5	28.2	17.4	8.8	11.4	9.6	2.9	1.7	5.1	3.1	1.3	0.2	0.31	0.11	0.021	0.006	<0.01	<0.005	<0.005	<0.003
	2021.8.4	30.3	30.4	8.2	6.9	1.7	2.5	1.9	4.1	2.9	1.0	0.1	0.21	0.18	0.025	0.010	<0.01	<0.005	<0.005	<0.003
	2022.8.2	28.0	29.2	8.3	8.1	5.1	2.6	1.9	3.2	2.1	1.3	0.2	0.22	0.12	0.015	0.006	0.014	<0.005	<0.005	<0.003
	2023.8.24	27.9	28.5	8.3	8.9	4.2	2.3	1.8	2.8	2.5	1.0	0.1	0.29	0.18	0.021	0.016	0.022	0.07	<0.005	0.007
沖合 (31-21)	2020.8.5	27.2	23.9	8.4	8.2	1.4	2.0	1.5	3.4	2.7	0.5	0.1	0.17	0.15	0.013	0.006	<0.01	<0.005	<0.005	<0.003
	2021.8.4	28.6	29.8	8.3	7.7	5.0	3.0	2.2	4.5	3.1	1.6	0.2	0.26	0.14	0.027	0.011	<0.01	<0.005	<0.005	<0.003
	2022.8.2	26.8	30.2	8.2	7.8	2.2	2.5	1.7	2.3	2.1	1.0	0.1	0.19	0.18	0.021	0.007	0.030	<0.005	<0.005	0.007
	2023.8.24	27.8	28.9	8.3	8.6	2.7	2.3	1.8	2.9	2.4	0.9	0.1	0.17	0.10	0.020	0.017	0.020	<0.005	<0.005	<0.003

続いて、各地点における生分解試験結果を表2及び図3に示す。生分解試験におけるDON分解率は32-12: 15～33%, 32-14: 1～26%, 31-21: 3～13%の範囲であり、沿岸から沖合にかけて低くなる傾向が認められたが、いずれの地点でも難分解性DONの占める割合が多かった。

表2 生分解試験におけるDONの変化

			DON	DIN	DON分解率(%)
沿岸 (32-12)	2020	0day	0.14	0.000	19%
		60day	0.11	0.026	
	2021	0day	0.15	0.000	21%
		60day	0.12	0.033	
	2022	0day	0.12	0.000	33%
		60day	0.08	0.041	
	2023	0day	0.14	0.111	15%
		60day	0.10	0.151	
湾央 (32-14)	2020	0day	0.14	0.001	11%
		60day	0.11	0.016	
	2021	0day	0.18	0.003	15%
		60day	0.14	0.028	
	2022	0day	0.14	0.004	26%
		60day	0.10	0.041	
	2023	0day	0.10	0.020	1%
		60day	0.10	0.020	
沖合 (31-21)	2020	0day	0.14	0.002	3%
		60day	0.11	0.005	
	2021	0day	0.14	0.000	11%
		60day	0.11	0.014	
	2022	0day	0.11	0.000	13%
		60day	0.12	0.017	
	2023	0day	0.12	0.036	8%
		60day	0.10	0.049	

3 DON分解性と水質項目の関係

ろ過海水を用いた生分解試験の結果、沿岸域はDONの分解率が高く、沖合域では低い傾向が明らかとなった。海域における難分解性物質の状況を把握するためには、本報のように生分解試験を行うことでその動態を明らかにすることができるが、このような長期的な試験は現実的とはいえない。一方、採水時の水質デー

タからDONの分解特性を推定できれば、各水域における分解特性の現状や経年変化を評価することが可能になる。そこで、採水によって得られた水質データとDON分解性の関係性について解析した。

解析の結果、DON分解率とTOCとTNの比であるTOC/TNとの間に高い相関が認められた(図4)。このことから、TOC/TNを測定することで、その水域におけるDONの分解特性を推定できる可能性が示唆された。なお、この結果によれば、TOC/TNが高い海域ほど、DONの分解が起こりやすい水域であると考えられるが、これは従来の知見 [21] とは逆の傾向を示している。これは広島湾の有機物の質あるいは栄養状態によるものかもしれないが、現時点では明らかでないため、今後もデータを蓄積し、説明を進める必要がある。

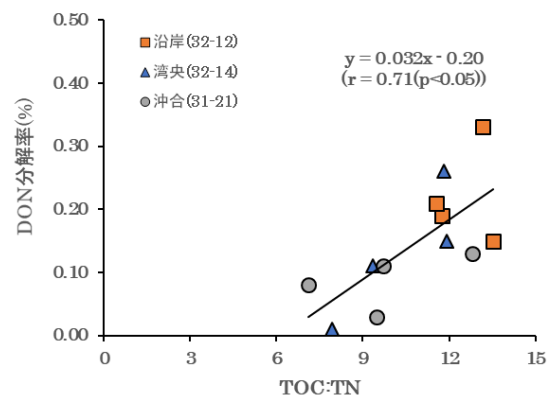


図4 TOC/TNとDON分解率の関係性

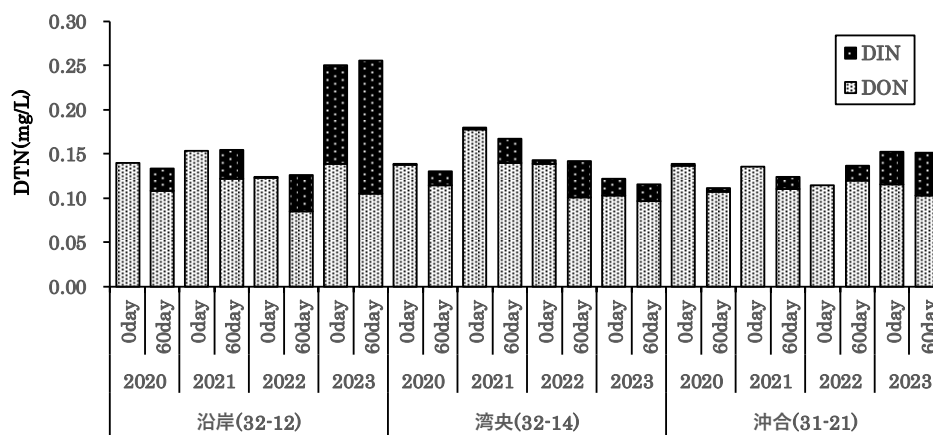


図3 生分解試験によるDONの変化

結 語

広島湾における海域の健全性を評価するため、広島湾の海水を用いて生分解試験を行い、DONの分解特性について、以下の知見を得た。

- 1) 生分解試験により分解したDONは一次生産によって生産されたDONを主体としたものであった。
- 2) 広島湾におけるDONの分解率は沿岸から沖合にかけて低くなった。また、生分解試験により分解したDONは1~33%程度であり、その大半は難分解性DONであった。
- 3) DONの分解特性はTOC/TNと相関関係があり、TOC/TNからDON分解性を推定することが可能であると考えられた。

謝 辞

本研究は、地方公共団体環境研究機関等と国立環境研究所との共同研究(Ⅱ型)「沿岸海域における新水質環境基準としての底層溶存酸素(貧酸素水塊)と気候変動の及ぼす影響評価に関する研究」によって、実施したものである。関係者に謝意を表する。

文 献

- [1] 深谷守平. 瀬戸内海における富栄養化対策の現況. 水利科学. 1980, 24(3), 13-27.
- [2] 李寅鉄, 浮田正夫, 他. 水・底質モデルによる瀬戸内海の水質管理に関する研究. 土木学会論文集. 1996, 545, 101-112.
- [3] 松梨史郎, 今村正裕. 閉鎖水域の富栄養化の可能性と許容される窒素・リンの負荷量に関する研究. 土木学会論文集. 2000, 664, 11-20.
- [4] 環境省. 令和4年度公共用水域水質測定結果. 令和6年3月.
- [5] 宮崎雄三. 海洋表層の生物生産が駆動する海洋大気有機エアロゾルの生成. エアロゾル研究. 2020, 35(3), 183-191.
- [6] 柳哲雄. 瀬戸内海における富栄養化・貧栄養化の力学. 沿岸海洋研究. 2014, 52(1), 3-10.
- [7] 多田邦尚, 藤原宗弘, 他. 瀬戸内海の水質環境とノリ養殖. 分析化学. 2010, 59(11), 945-955.

- [8] 藤原建紀, 鈴木元治. 閉鎖性海域のCOD上昇. 水環境学会誌. 2024, 47(1), 37-46.
- [9] 早川和秀, 岡本高弘, 他. 低濃度有機汚濁水域における有機物指標の特性把握: 琵琶湖流域におけるCOD(Mn), BOD, TOCの比較から. 水環境学会誌. 2018, 41(6), 193-203.
- [10] 仲川直子, 金澤良昭, 他. 大阪湾表層水中有機物の生分解前後における特性変化について. 財団法人ひょうご環境創造協会兵庫県環境研究センター紀要. 2009, 1号, 25-30.
- [11] 中嶋昌紀, 松本弘史, 他. 大阪湾および淀川・大和川における難分解性有機窒素の動態. 土木学会論文集B2(海岸工学). 2012, 68(2), 1036-1040.
- [12] 山本民次, 北村智顕, 他. 瀬戸内海に対する河川流入による淡水, 全窒素及び全リンの負荷. 広島大学生物生産学部紀要. 1996, 35(2), 81-104.
- [13] 日本海洋学会. 海洋観測指針(和文第5版). 2023年6月.
- [14] 広島県. 令和6年度公共用水域等の水質測定計画. 令和6年3月.
- [15] 小田新一郎, 濱脇亮次, 他. 広島湾における栄養塩類及びCOD関連項目の季節変動について. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2020, 28, 45-52.
- [16] 今井一郎, 山口峰生. 北部広島湾における海洋細菌の現存量と生産量, および従属栄養性微小鞭毛虫類の季節変化. J.Bull.Nansei.Fish.Res.Inst.1996, 29, 75-86.
- [17] Berman T, Deborah A. Bronk. Dissolved organic nitrogen: a dynamic participant in aquatic ecosystems. Aqual.Microb.Ecol.2003, 31, 279-305.
- [18] 鈴木款. 海洋生物と炭素循環. 東京大学出版会. 1997.
- [19] Chapin III, F.S., Matson, P.A., Vitousek, P.M., 生態系生態学(第2版). 加藤知道監訳. 森北出版. 2018.
- [20] 中谷祐介, 西田修三, 他. 大阪湾における有機懸濁物質の沈降分解過程に伴う栄養塩の鉛直輸送. 土木学会論文集. 2009, Vol.B2-65, No.1, 996-1000.
- [21] 藤原建紀, 鈴木元治, 他. 窒素・リン削減が海域の有機物量(CODおよびTOC)に及ぼす影響. 水環境学会誌. 2021, 44(5), 135-148.

資 料

広島湾河川感潮域における貧酸素水塊の遡上

後田 俊直

Intrusion of Oxygen Deficient Water into the River Estuary
in Hiroshima Bay

USHIRODA Toshinao

(Received: November 11, 2024)

広島湾に流入する太田川感潮河川の貧酸素水塊の発生状況を把握することを目的として、支川のひとつである京橋川で、湾内の貧酸素化が顕著となる8~9月に調査を行った。河道内の塩分は緩混合型の分布を示し、塩水の遡上に伴い湾内で発生した貧酸素塩水が遡上した。貧酸素水塊の発生パターンは潮汐（大潮、小潮）及び河川流量により異なっており、大潮時には、満潮時に塩分成層が形成され、貧酸素塩水の移流により底層は貧酸素化するが、干潮時に河道内は淡水で満たされ、底層の貧酸素状態は解消された。一方、小潮時には、干潮時においても河道内に塩分成層が維持され、底層の貧酸素状態は継続した。また、貧酸素水塊の形成には、湾内からの貧酸素塩水の遡上に加え、河道底層の酸素消費も寄与していることが示唆された。

Key words : 貧酸素水塊, 底層DO, 感潮河川, 太田川, 広島湾

結 言

2015年に改正された瀬戸内海環境保全特別措置法では、水質が良好な状態で保全されるとともに、生物多様性・生物生産性が確保される等、その価値及び機能が最大限に発揮された「豊かな海」とする考え方が明確にされた。続いて2016年には、底層を利用する水生生物の保全・再生を目的として、底層溶存酸素量（底層DO）が新たに環境基準として追加された。

一方、広島湾は周囲を島に囲まれた瀬戸内海の中でも特に閉鎖性の強い海域であり、湾奥となる北部海域では毎年夏季になると慢性的な貧酸素水塊が発生している[1-3]。その発生要因としては、湾外から酸素を含む海水が届きにくいこと、夏季の成層強度、底泥及び底層水の有機物の分解に伴う酸素消費が挙げられている[1]。広島湾での貧酸素水塊は、成層強度の強くなる7月頃から沿岸部で発生し始め、底層水温の上昇により規模が拡大し、8、9月頃最も顕著となることが確認されている[1]。特に湾奥では毎年DOが2mg/L以下となる海域もみられる[3]。広島湾の湾奥には一級河川太田川が流入しており、瀬戸内海特有の大きな干満差（大潮時最大約4m）

の影響を受け、潮位変動に伴い海水が遡上する感潮河川となっている。河川感潮域は栄養物質が豊富な水域であり、他の水域と比べて一次生産や漁獲量の高い水域といわれている[4]。また、河岸沿いには干潟が広がっており、広島湾では干拓・埋立てにより干潟の大部分が消失した現在、水質浄化、水産資源育成、生物多様性等の機能を有する場として貴重な干潟となっている。しかし、いったん貧酸素状態になれば生物が生活できない環境になり、これらの機能は失われてしまうことになる。湾内につながる河川感潮域では、湾内底層の貧酸素水が遡上し、底層DOに影響を及ぼしていることが予想される。実際、これまでの調査により太田川の河川感潮域では潮汐や出水に対応して海水と淡水の流出入を繰り返しており、湾内の海水が遡上していることが分かっている[5,6]。しかし、これまで河口部より上流の河川感潮域での貧酸素化についての調査は行われていない。

そこで本報では、太田川感潮河川の貧酸素水塊の発生状況を把握することを目的として、太田川の支川のひとつである京橋川で、広島湾の貧酸素化が顕著となる8~9月に調査を行った。また、河口域における底層DOは密度成層の発達に強く依存していることが知られており、密度成層を規定する主要な要因は潮汐による潮位差と

河川流量であることから[7], 調査は, 潮汐(大潮, 小潮)及び河川流量(平水時, 出水時)の異なる日に行い, 貧酸素水塊の発生パターンを考察した。

方 法

調査を行った京橋川は, 太田川水系の分流であり, 太田川が形成する広島デルタの6河川のうちの1つである。京橋川は, 旧太田川から分岐し, 下流で元安川に合流するまでの流路6.2kmの区間である。塩分, DO及び水温の空間分布(縦断分布)を調査するための移動観測を行った。測定機器には多項目水質計(環境システム㈱製, Quanta)を用いた。本調査は, 既報[5]の調査の一環として行われたものであり, 移動観測の詳細は既報のとおりである。調査地点を図1(平面図)及び図2(断面図)に示す。調査地点は京橋川の上流から下流にかけての8地点である。なお, 断面図は河川定期縦横断測量データ(国土交通省太田川河川事務所提供)を基に作成した。断面図は元安川との合流点を基点としており, 河口から元安川合流点までは約2.5kmである。調査は, 潮汐及び河川流量の異なる3回, それぞれ満潮時と干潮時に行った。調査日と当日の河川流量及び潮位の状況を表1, 各調査日における潮位変化, 河川流量及び観測時間帯を図3に示す。河川流量は, 河口から約15km上流の矢口第一観測所(国土交通省)のデータ[8], 潮位は, 広島港の観測データ[9]を用いた。なお, 河川流量は京橋川分

岐点より上流の太田川の流量である。2015年の流況は, 平水流量: 59.85m³/s, 豊水流量: 88.40 m³/s, 低水流量: 38.58 m³/sであった。潮汐は, CASE1及びCASE3は大潮, CASE2は小潮であった。また, CASE3は調査日の3日前に流域で50mmを越える降雨があった。このため, 相対的にCASE1は「干満差: 大, 河川流量: 小」, CASE2は「干満差: 小, 河川流量: 小」, CASE3は「干満差: 大, 河川流量: 大」の条件として考察を行った。



図1 太田川感潮域の地形と調査地点

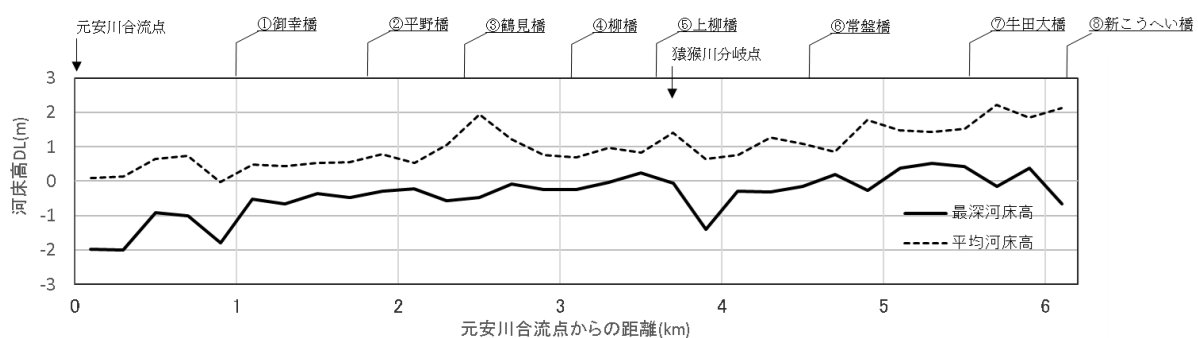


図2 京橋川の縦断面図と調査地点

表1 観測日と河川流量及び潮位の状況

観測日	干満差 (cm)	河川日流量 (m ³ /s)	潮汐, 河川の相対的状況	
			干満差	河川流量
CASE1 2015年9月15日	288	71	大	小
CASE2 2015年9月21日	110	46	小	小
CASE3 2015年8月28日	293	119	大	大

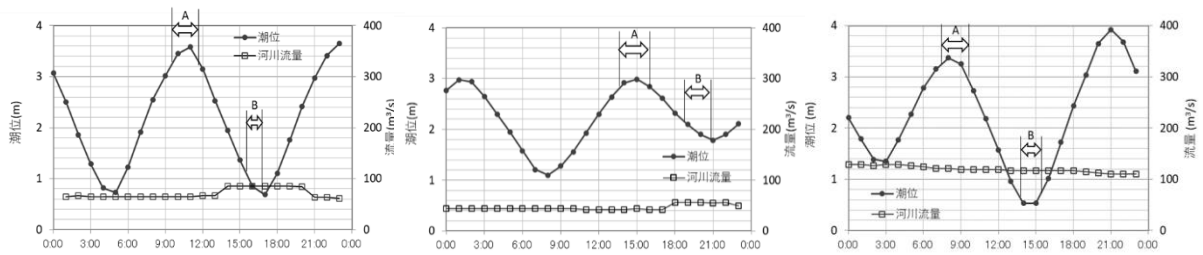


図3 各調査日における潮位変化, 河川流量及び観測時間帯
(A : 満潮時, B : 干潮時)

結果及び考察

移動観測の測定結果から満潮時及び干潮時の塩分・DOの縦断分布図を作成した。CASE1 (干満差 : 大, 河川流量 : 小) のものを図4に示す。また, 地点①, ③, ⑤及び⑦での満潮時のDO, 塩分及び水温の鉛直分布を図5に示す。なお, 地点①, ③, ⑤及び⑦は元安川合流点からそれぞれ1.0km, 2.4km, 3.6km及び5.4kmの地点である。塩分の縦断分布は, 満潮時には上流から下流に向かって河川水が海水の上を流下し, 河底上では逆に塩水が河床に沿って楔状に遡上する分布を示した。

塩分の混合形態は, 等塩分線が斜めに傾き, 塩分勾配が水平, 鉛直の両方向に存在する緩混合型であった。DOの縦断分布は, 塩分分布に対応し, 塩分濃度が高いほどDOは低下した。これは, 貧酸素水の起源は下流側(海側)にあり, 潮の遡上に伴い河道内に侵入してきたものと考えられた。このとき遡上する塩水は, 地点①の底層(底上0.1m)で塩分31.3psu, DO3.6mg/L, 酸素飽和度51.6%であった。ここで貧酸素についてであるが, 「貧酸素」に定義があるわけではなく, DOの指標値については種々の見解があり, 2~3mg/L以下を貧酸素と定義している報告が多い[1,11-14]。海洋生

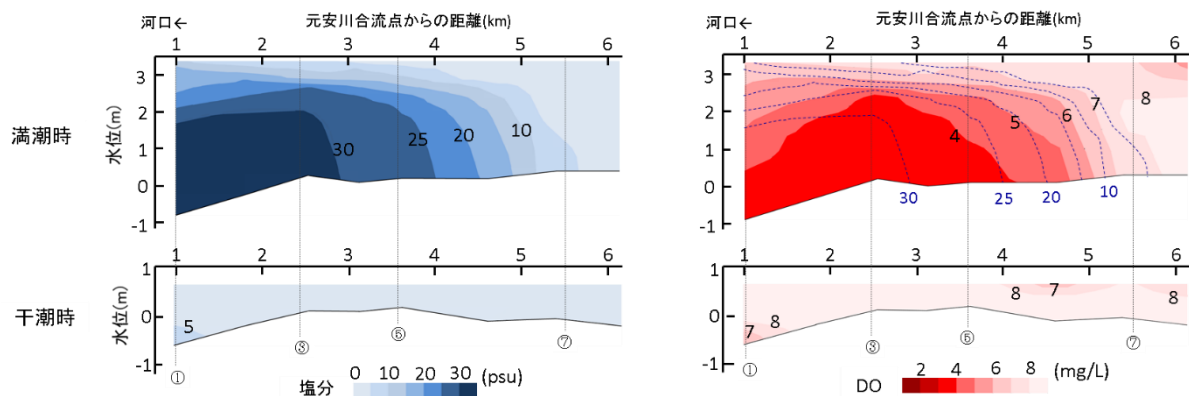


図4 京橋川の塩分(左)・DO(右)の縦断分布 (CASE1 干満差 : 大, 河川流量 : 小)
(DO分布図中の点線は塩分分布を表す)

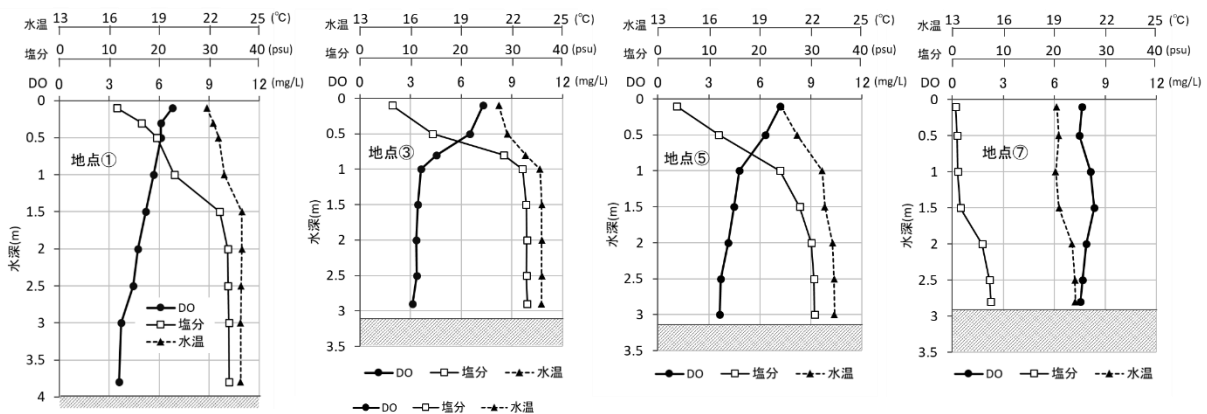


図5 地点①, ③, ⑤及び⑦での満潮時のDO, 塩分及び水温の鉛直分布 (CASE1 干満差 : 大, 河川流量 : 小)

物への影響濃度としては、海底のベントスが正常に分布するためには、 3.6mg/L 以上が必要であり、貧酸素に比較的強い貝類は 2.1mg/L 以下になると生存が危険になるという報告がある[10]。また、底層 DO の環境基準は、水生生物の生息および再生産の場の確保の観点から、貧酸素耐性の違いにより生物 1~3 の三種類の類型に分け、それぞれ 4.0mg/L 以上、 3.0mg/L 以

上、 2.0mg/L 以上の基準値が設定されている。地点①の底層DO値 3.6mg/L は、ベントスへの影響が現れる境界値であった。河道内の他の地点の底層DOは、地点②： 3.3mg/L 、地点③： 3.1mg/L 、地点④： 3.4mg/L 、地点⑤： 3.7mg/L 、地点⑥： 4.6mg/L となっており、 $\text{DO}4\text{mg/L}$ 以下の貧酸素水は元安川合流点から約 4km 上流（河口から約 6.5km 上流）にまで及んでいた。地

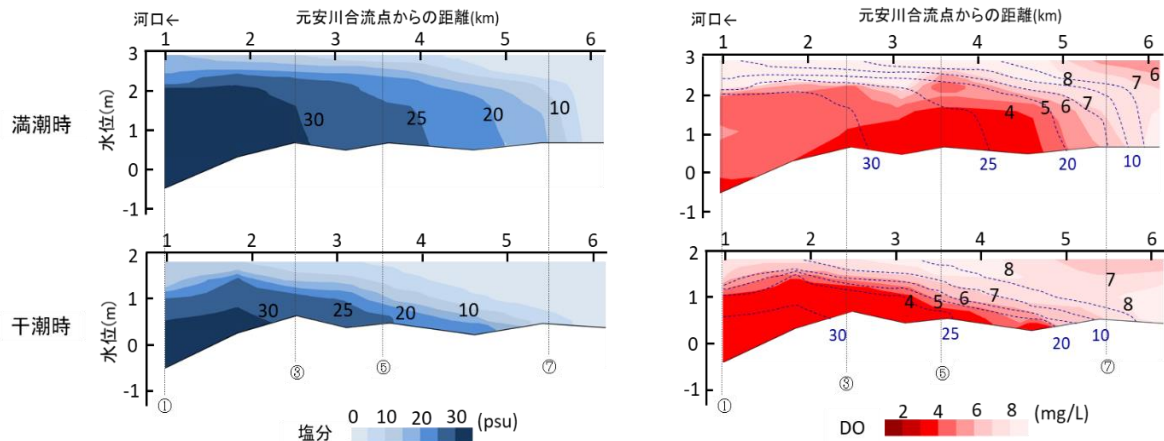


図6 京橋川の塩分(左)・DO(右)の縦断分布 (CASE2 干満差：小，河川流量：小)
(DO分布図中の点線は塩分分布を表す)

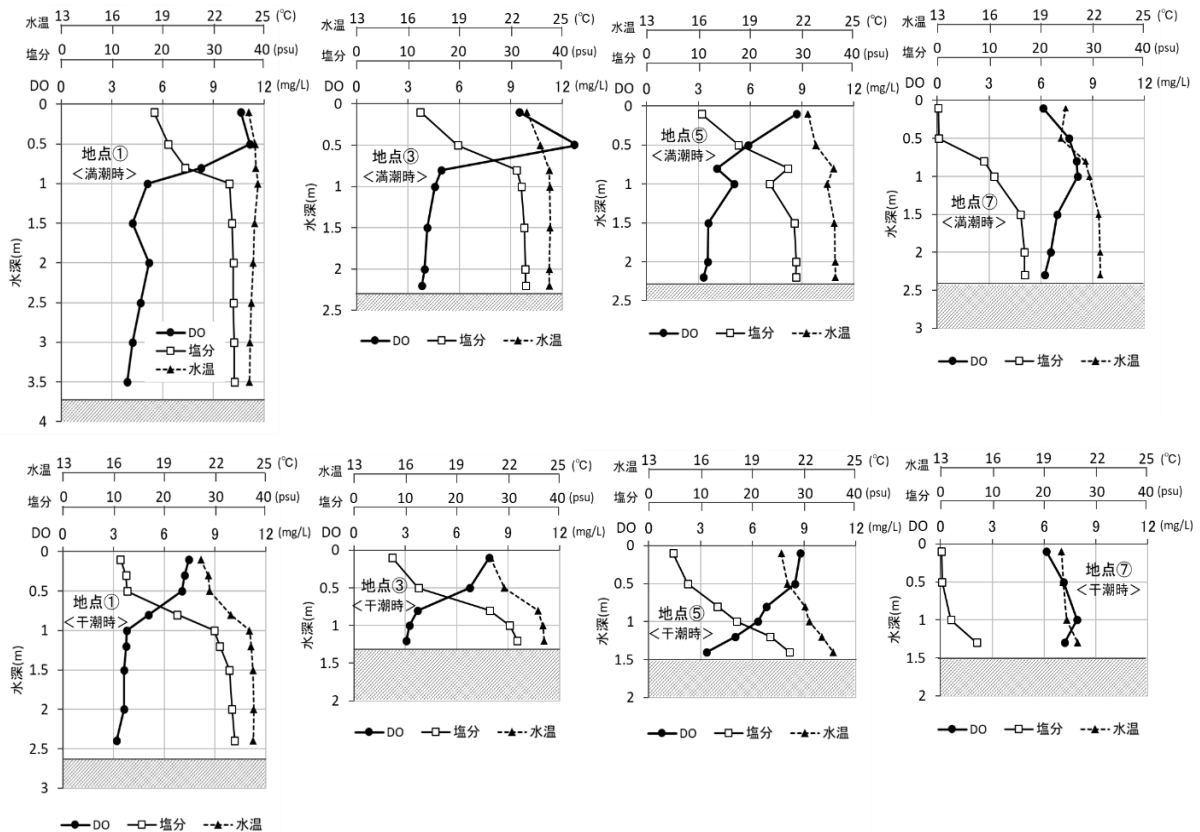


図7 地点①，③，⑤及び⑦での満潮時及び干潮時のDO，塩分及び水温の鉛直分布
(CASE2 干満差：小，河川流量：小)

点②～⑤の底層DOは、地点①（遡上する塩水）よりも低くなっており、この傾向はCASE2及びCASE3でもみられた。この理由については後述する。一方で干潮時には河道内のほぼ全域が淡水で満たされ、貧酸素は解消された。

次にCASE2（干満差：小，河川流量：小）の満潮時及び干潮時の塩分・DOの縦断分布を図6に示す。また、地点①，③，⑤及び⑦での満潮時及び干潮時のDO，塩分及び水温の鉛直分布を図7に示す。満潮時の塩分の縦断分布は、CASE1と同様に塩水楔形の分布を示し、DOの縦断分布も塩分分布に対応した分布を示した。底層DOは、地点①では3.9mg/Lであり、河道内では地点②：4.6mg/L，地点③：3.8mg/L，地点④：3.7mg/L，地点⑤：3.3mg/L，地点⑥：3.8mg/Lとなった。DO4mg/L以下の貧酸素水は元安川合流点から約4.5km上流（河口から約7.0km上流）にまで及んでおり、CASE1と比べて貧酸素水の侵入長は若干長くなっていた。一方、干潮時は、CASE1の場合と異なり河道内に高塩分水が残り、満潮時と同様に塩分躍層が維持されていた。満

潮時と比べると等塩分線は斜めに傾き間隔は狭く、表層の低塩分層は厚くなっているが、底層の高塩分水の侵入長は約0.5km海側に後退した程度であった。貧酸素水も河道内に留まっており、底層DOは、地点①で3.2mg/L，河道内では地点②：3.2mg/L，地点③：3.1mg/L，地点④：3.3mg/L，地点⑤：3.3mg/L，地点⑥：3.4mg/Lであった。底層DOの値は満潮時とほとんど変わらなかった。また、干潮時においてもDO4mg/L以下の貧酸素水は元安川合流点から約4km上流（河口から約6.5km上流）まで達していた。

最後にCASE3（干満差：大，河川流量：大）の満潮時及び干潮時の塩分・DOの縦断分布を図8に示す。また、地点①，③，⑤及び⑦での満潮時のDO，塩分及び水温の鉛直分布を図9に示す。満潮時の塩分の縦断分布では、CASE1及びCASE2と比べて等塩分線の間隔が狭く、表層の淡水層も厚くなっており、河川流量が大きいために塩水の遡上が抑えられているものと推察された。DOの縦断分布も塩分に対応して表層のDOの高い層は厚くなった。底層DOは、地点①では2.8mg/Lで

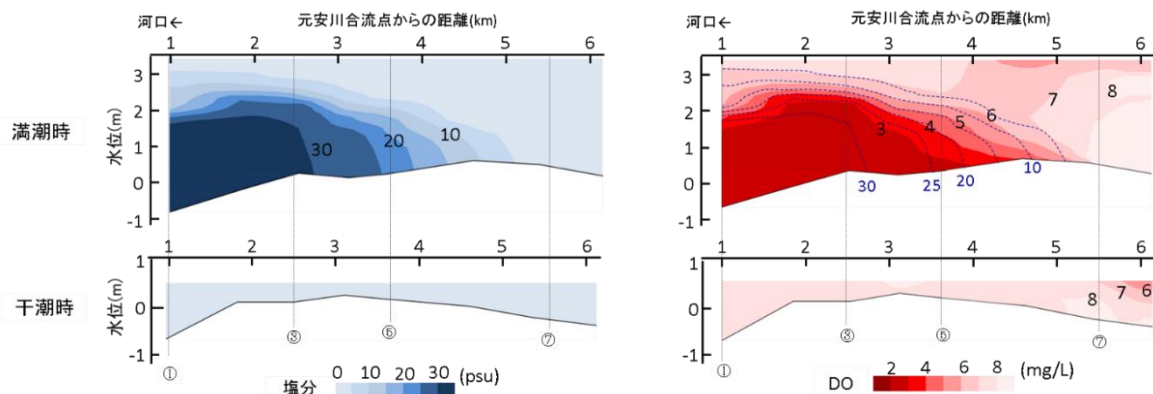


図8 京橋川の塩分(左)・DO(右)の縦断分布 (CASE3 干満差：大，河川流量：大)
(DO分布図中の点線は塩分分布を表す)

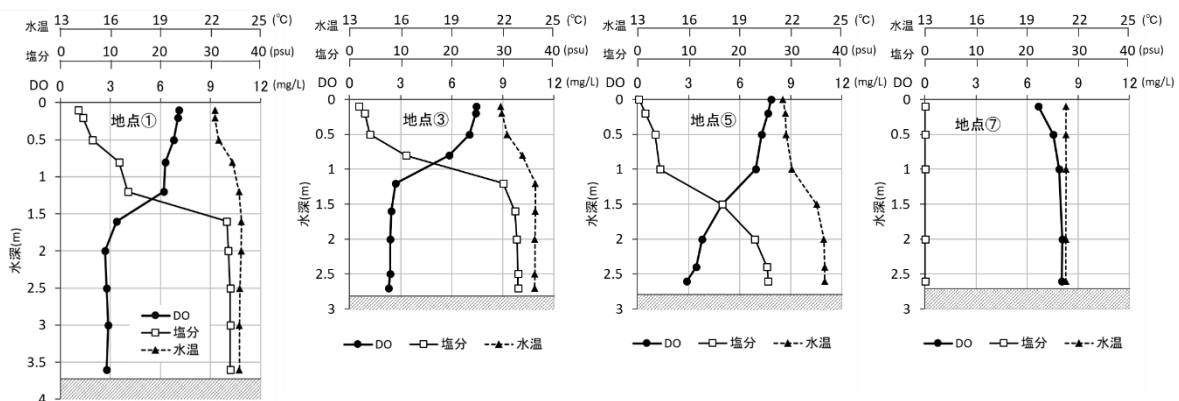


図9 地点①，③，⑤及び⑦での満潮時のDO，塩分及び水温の鉛直分布 (CASE3 干満差：大，河川流量：大)

あり、河道内では地点②: 2.5mg/L, 地点③: 2.3mg/L, 地点④: 2.4mg/L, 地点⑤: 2.9mg/L, 地点⑥: 4.7mg/L となっており, DO3mg/L以下の貧酸素水は元安川合流点から約4km上流(河口から約6.5km上流), DO4mg/L以下の貧酸素水は元安川合流点から約4.5km上流(同約7.0km上流)にまで及んでいた。一方, 干潮時にはCASE1と同様に河道内のほぼ全域が淡水となり, 貧酸素は解消された。河口域では底層DOと干満差との間に正の相関関係があり, 大潮時にDOが高く, 小潮時にDOが低くなる傾向があることが報告されている[15]。今回の調査では, 河道内の底層DOの値は大潮時のCASE3が最も低く, 貧酸素水の遡上長は長くなったが, CASE3の調査日は8月下旬であり, 遡上する塩水(地点①の底層水)のDOが低かった(CASE1: 3.6mg/L, CASE2: 3.9mg/L, CASE3: 2.8mg/L)ことからこのような結果になったものと考えられた。

ここで各調査日の満潮時における底層(底上0.1m)の塩分とDOとの関係を図10に示す。図中の直線(点線)は最下流地点①と最上流地点⑧の点を結んだものである。湾内から遡上する貧酸素塩水は河道内で酸素の供給・消費がなく淡水との混合が卓越する場合は, 下流から上流に向かって塩分の減少とともにDOは直線的に増加するはずである。しかし, 図10をみると, 地点②~⑥のデータのほとんどが地点①と地点⑧を結ぶ直線より下方にプロットされており, 河道内を遡上していく間に酸素が消費されていることが示唆された。このことから, 感潮河川の貧酸素化の要因としては, 湾内からの貧酸素水の遡上に加え, 河道内での酸素消費も寄与していることが推察された。なお, 地点⑥及び⑦については, 地点⑤の上流側に京橋川からの支川である猿猴川の分岐点があることから, 猿猴川を遡上した水塊の影響を受けている可能性も考えられる。

一般に河口域における底層DOは密度成層の発達に強く依存していることが知られており[7], この密度成層の形成は上層から底層へのDOの供給を妨げる要因

となる。密度成層は, 塩分と水温の変化で形成されるが, 水温の鉛直分布(図5, 7, 9参照)をみると全ての地点で底層より表層のほうが低くなっており, 淡水流入による塩分成層が支配的となっていた。河口域で塩分成層を規定する主要な要因は, 潮汐による潮位差と河川流量であり, 混合形態の変化はこれらの大小関係によって変動する[7]。底層DO濃度の変動は, 大潮小潮サイクルが基本となっており, 潮位の差が大きい(大潮)ときは, 河川を遡上する海水の流れが強く, 上流から流下してくる淡水との混合が起こりやすい。一方, 潮位差の小さい(小潮)ときは, 遡上する海水の勢いが弱いため, 上流からの淡水とあまり混合せず上に淡水, 下に塩水という安定した2層構造をつくりやすい。今回の調査においても大潮期(CASE1)では満潮時には貧酸素塩水の遡上により底層は一時的に貧酸素化するが, 干潮時には河道内は淡水で満たされ低酸素の状態は解消された。一方, 小潮期(CASE2)には, 満潮時, 干潮時ともに塩分成層は維持されており, 底層DOの貧酸素化は継続していた。大潮と小潮は約1週間ごとに繰り返していることから, 出水等の突発的な淡水流入がなければ小潮期には河道内底層の貧酸素化は数日間継続することが予想される。今回のCASE2では, 底層DOの最低値は, 3.1mg/L(地点③, 干潮時)であったが, 調査日は中潮から小潮に変わった1日目であり, その後, 底層の酸素消費により底層DOはさらに低下し, 貧酸素化状態が数日間継続したものと推察された。

以上の観測結果から, 京橋川では湾内からの貧酸素塩水の移流と河道内での酸素消費により底層の貧酸素化が起っていることが分かった。また, 小潮期に貧酸素化状態が進行・継続されることも示唆された。太田川は下流デルタ域で6つの支川に分かれて広島湾に注いでいるが, いずれの支川も京橋川と同様の貧酸素化が起っていることが予想される。太田川河川感潮域は, 海域に生息する生物や淡水域に生息する生物のみなら

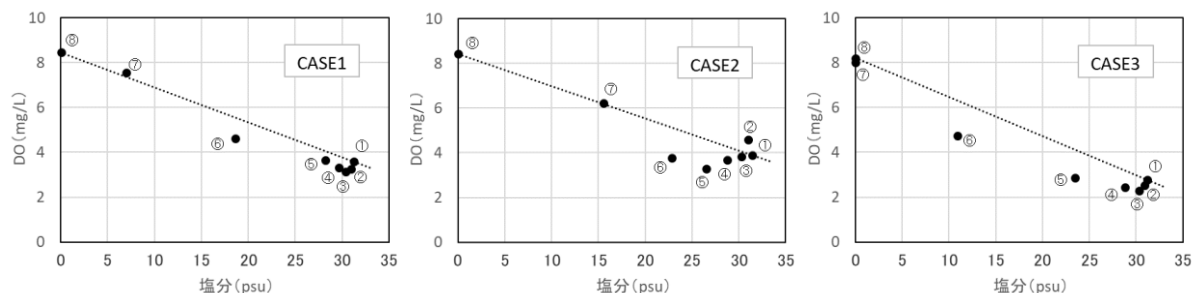


図10 各調査日(満潮時)における底層の塩分とDOとの関係

ず、汽水性の生物が存在し、縦断方向に多種多様な生物が生息している（未発表）。栄養が豊かで高い生産力を有する多様な生態系を形成しており、水質浄化、水産資源育成、生物多様性等の機能を有する貴重な場となっている。また、感潮域上流ではシジミ漁も行われ、「太田川しじみ」のブランドにもなっている。今後は温暖化に伴う海面上昇により貧酸素化域が上流域へ拡大することや海水温の上昇により成層構造の強化、水中・底泥の酸素消費量の増加等が起これ、河川感潮域の貧酸素化がさらに進行することが予想され、生態系への悪影響が危惧される。これまで河口よりも上流側での溶存酸素の調査はされてこなかったが、今後は湾内だけでなく河川感潮域についても定期的なモニタリング調査が望まれる。

結 語

京橋川の感潮河川域において、水温、塩分及びDOの縦断分布調査を行い、貧酸素水塊の発生状況及び発生パターンについて以下の知見を得た。

京橋川の塩分分布は緩混合型の分布を示し、満潮時には混合域は元安川合流点から上流5～6km地点（河口から7.5～8.5km地点）まで及んでいた。DOの縦断分布は塩分の分布に対応しており、湾内の貧酸素水塊が河道内の底層を遡上していた。DO4mg/L以下の貧酸素水塊は、元安川合流点から上流4～5km地点（河口から6.5～7.5km地点）まで及んでいた。

貧酸素水塊の発生パターンは潮汐（大潮、小潮）及び河川流量により異なっており、大潮時には、満潮時に塩分成層が形成され、貧酸素塩水の移流により底層は貧酸素化するが、干潮時に河道内は淡水で満たされ、底層の貧酸素状態は解消された。一方、小潮時には、干潮時においても河道内に塩分成層が維持され、底層の貧酸素状態は継続した。また、貧酸素水塊の形成には、湾内からの貧酸素塩水の遡上に加え、河道底層の酸素消費も寄与していることが示唆された。

謝 辞

本研究の実施にあたり、国環研と地環研とのⅡ型共同研究「干潟・浅場や藻場が里海里湖流域圏において担う生態系機能と注目生物種との関係」（平成27～29年度）のメンバーには有益な情報・意見をいただいた。ここに謝意を表する。

文 献

- [1] 伊達悦二, 清木徹. 広島湾の貧酸素水塊の分布とその形成機構. 広島県保健環境センター研究報告. 2006, 14, 1-12.
- [2] 小田新一郎, 濱脇亮次, 他. 広島湾の底質環境及び底生生物相の現況について. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2020, 28, 53-70.
- [3] 国土交通省中国地方整備局. 第15回広島湾水質一斉調査結果について.
https://www.cgr.mlit.go.jp/chiki/hirosimawan/pdf/grapple/suisitsucyousakekka_15.pdf , 参 照 2024-10-7
- [4] 西條八束・奥田節夫編. 河川感潮域ーその自然と変貌ー. 財団法人名古屋大学出版会, 1996, 109-115.
- [5] 後田俊直. 京橋川の河岸干潟における泥分・有機物集積域の形成要因. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2023, 31, 33-41.
- [6] 後田俊直. 京橋川の河川感潮域に形成された干潟の塩分環境と有機物分解活性. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2017, 25, 25-30.
- [7] 中村由行, 藤野智亮. 長良川河口堰下流部の溶存酸素濃度の動態. 応用生体工学. 2002, 5(1), 73-84.
- [8] 国土交通省. 水文水質データベース.
<http://www1.river.go.jp/>, 参照2017-9-20
- [9] 広島県防災Web.
<http://www.bousai.pref.hiroshima.jp/hdis/> , 参 照 2017-9-20
- [10] 柳哲雄. シンポジウム「貧酸素水塊」のまとめ. 沿岸海洋研究ノート. 1989, 26(2), 141-145.
- [11] 藤原建紀. 瀬戸内海の底層DO(溶存酸素量). 瀬戸内海. 2016, 72, 21-23.
- [12] 徳永貴久, 児玉真史, 他. 有明海湾奥西部海域における貧酸素水塊の形成特性. 土木学会論文集B2 (海岸工学). 2009, B2-65, 1011-1015.
- [13] 柳哲雄, 石井大輔. 博多湾奥部における貧酸素水塊発生・消滅機構. 海の研究. 2009, 18(2), 169-176
- [14] 東輝明, 山田真知子, 他. 過栄養な内湾 洞海湾における貧酸素水塊の形成過程とその特性について. 日本水産学会誌. 1998, 64(2), 204-210.
- [15] 藤野智亮, 中村由行. 長良川河口堰下流部における貧酸素水塊の形成に関する解析. 水工学論文集. 2002, 46, 923-928.

他誌掲載論文 (2023 年 10 月～2024 年 9 月)

(1) Estimated daily intake of residual agricultural chemicals across general Japanese people based on the total diet study from 2019 to 2021

(Miki Takahashi^{*1}, Yoshinari Suzuki^{*1}, Mitsutoshi Aoyagi^{*2}, Eita Toda^{*3}, Koichi Ito^{*3}, Toru Fukumitsu^{*4}, Masahito Hagio^{*4}, Takako Hayashi^{*4}, Saori Shintaku^{*5}, Sayaka Ihara, Akie Nakashima, Tamaki Sato^{*6}, Fuyuki Okamoto^{*6}, Tsuguhide Hori^{*6}, Hiroshi Akiyama^{*1,7}, Tomoaki Tsutsumi^{*1} 日本食品化学学会誌, 31, 2, 65-75, 2024)

Public perceptions are significantly more concerned about agricultural chemicals including pesticides, feed additives, and animal drugs than food safety experts. To address these perceptions, we estimated the mean daily intake of 28 agricultural chemicals across the entire Japanese population (≥ 1 year old) using the total diet samples based on the market basket method (14 food groups). The survey was conducted with the collaboration of six local government research institutes (Hokkaido, Tohoku, Kanto, Kansai, Chugoku, and Kyushu) from 2019 to 2021. The estimation of the mean daily intake of residual agricultural chemicals through the consumption of each food group was calculated by multiplying the concentration in the respective food group by the daily food consumption. The highest ratio of estimated daily intake over acceptable daily intake was observed for acephate (0.39%). The contribution rates from crops were higher than those from livestock and aquatic products for many agricultural chemicals.

Our results show that all of agricultural chemicals evaluated in this study were far below the ADIs, and these findings considered to be useful to bridge the perception gap.

^{*1}Division of Foods, National Institute of Health Sciences, ^{*2}Hokkaido Institute of Public Health, ^{*3}Akita City Public Health Center, ^{*4}Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, ^{*5}Wakayama Prefectural Research Center of Environment and Public Health, ^{*6}Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, ^{*7}School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Hoshi University

(2) 広島湾八幡川河口干潟における被覆網保護域でのアサリの個体群動態

(後田俊直, 濱脇亮次, 全国環境研会誌, 49, 2, 34-39, 2024)

里海づくり活動のひとつとして県内で実施されている被覆網によるアサリの保全活動を支援することを目的に、広島湾内の八幡川河口干潟の被覆網漁場においてアサリの動態調査を行った。被覆網のない場所では、殻長 20mm を超える成貝が出現することはなかったが、被覆網で保護することにより殻長 30mm を超える大型のアサリが継続して出現した。稚貝の発生は、5 月（前年秋産卵群）と 8 月（春産卵群）の年 2 回認められ、いずれの個体群も漁獲サイズへ成長した。その成長速度は 1 年で約 28mm と速く、5 月に発生した個体群は翌春には漁獲サイズとなった。同時に新たな個体群の発生もみられ再生産が成り立っていた。

広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告

第 32 号

2024 年 12 月 発行

広島県立総合技術研究所保健環境センター

〒734-0007 広島市南区皆実町一丁目 6-29

TEL (082) 255-7131

FAX (082) 252-8642

**BULLETIN
OF
THE HIROSHIMA PREFECTURAL TECHNOLOGY
RESEARCH INSTITUTE, PUBLIC HEALTH AND
ENVIRONMENT CENTER
No.32
December 2024**

Contents

Reports

Improvement and performance evaluation of the VNTR analysis of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> using multiplex PCR HIRATSUKA Takahiro	1
Update Ver. 2.3 of multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dye-labeled primers for detecting gastroenteritis viruses SUEI Mana, ITO Ayano and SHIGEMOTO Naoki	6
Studies on Daily Intake of Sucralose by Market Basket Method (2023) NAKASHIMA Akie, IHARA Sayaka	12
Microplastics derived from polymer-coated fertilizer in Kurose River NAKAHIRO Kenta, HANAOKA Yuya and KIMURA Junko	18
Decomposition characteristics of dissolved organic nitrogen (DON) in Hiroshima Bay HAMAWAKI Ryoji, ODA Shinichirou, USHIRODA Toshinao	24
Intrusion of Oxygen Deficient Water into the River Estuary in Hiroshima Bay USHIRODA Toshinao	29
Papers Published in Other Journals (Oct. 2023 to Sep. 2024)	36

Hiroshima Prefectural Technology Research Institute,
Public Health and Environment Center
Hiroshima, Japan