

## (1) 報 文

---

- 1) 大分県におけるノーウォークウイルス(Norwalk viruses; NV)の侵淫状況( )...21
- 2) 大気中環境ホルモン等の化学物質の分析方法および調査結果について(第1報)  
- ベンゾ(a)ピレン類、フタル酸エステル類、農薬類 - .....24
- 3) 環境ホルモンの総量に関する調査  
- 遺伝子組換酵母法による女性ホルモン様物質の総量測定 - .....48

# 大分地方におけるノーウォークウイルス(Norwalk Virus; NV)の侵淫状況 ( )

小野 哲郎、小河 正雄、塚本 伸哉

## Epidemiological Study of Prevalence of Norwalk Virus in Oita Prefecture( )

Tetsuro Ono, Masao Ogawa and Shinya Tsukamoto

### 要旨

1997年5月食品衛生法施行規則の改正に伴い、ノーウォークウイルス(NV)が食中毒病因物質として追加され、その病因物質としては主に生カキ等貝類の喫食が起因しているとされている。しかし、大分県内でのNV関連食中毒事例では、貝類の喫食に拠らない事例が多数を占めている。そこで、貝類等の喫食に関連しない事例の感染源や感染経路及びNVの侵淫状況を探るために、学校給食従事者と下痢症起因細菌が否定された小児の下痢症患者を対象にNV遺伝子の検索を行った。その結果、学校給食従事者で4.7%、下痢症患者で16.5%の割合に季節を問わず年間を通じてNV遺伝子が検出された。この事より、大分県においてはNVが高率に侵淫しており下痢症の約17%がNVに起因していることが明らかになった。さらに、NVは年中存在しておりヒト・ヒト間で伝播、保持されている事が明らかになった。

### はじめに

1995年の食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査<sup>1)</sup>により、冬季に多発する非細菌性食中毒の病因物質の殆どは小型球形ウイルス(SRSV)として呼称されているノーウォークウイルスであり、その推定原因食品として生カキが多くを占めることが明らかにされた。このような状況から、1997年5月30日食品衛生法施行規則の一部が改正され、ノーウォークウイルスおよびその他のウイルスが食中毒病因物質として新たに追加された。以後、大分県においてもNVを病因とする食中毒事例が多発しているが、大分県内におけるNV関連食中毒事例では、生カキ等の貝類の喫食に関係しない事例も多数あることが明らかとなった<sup>2),3)</sup>。しかし、貝類が関連しない食中毒事例の感染源や感染経路は未だ不明な点が多く、その実態を把握することが急務となっている。

NVは細胞培養法や各種実験動物を用いても増殖させることはできず、増殖の場はヒトの腸管内のみとされている<sup>4)</sup>。従って、NV感染者の実態を知ることが重要な知見となる。そこで、2000年4月か

ら2001年3月までの間、昨年と同様に大分市内の学校給食従事者と下痢症細菌が否定された小児下痢症患者の糞便を対象に、NV遺伝子の径時的推移をPCR法により調査したので報告する。

### 検体及び方法

#### 1 検体

2000年4月から2001年3月までの間に各月15名(うち4月と5月は20名)の合計190名の学校給食者検便検体と2000年4月から2001年3月までの間に下痢症起因細菌が否定された115名の小児下痢症患者便を検体とした。さらに、大分県内における汚染状況を調査するために、県内7箇所の地カキを7月、9月、11月、1月の計4回採取しNV遺伝子の保有状況を調査した。

#### 2 方法

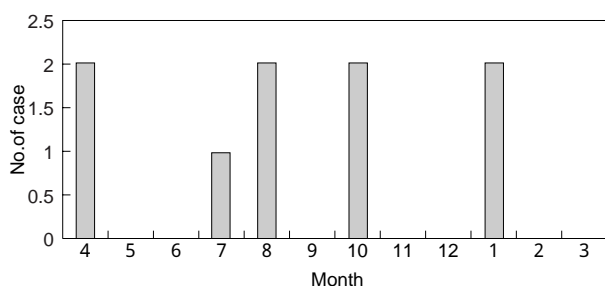
供試糞便検体からのNV遺伝子の検出は、既報に準じて行った<sup>2),3),5)</sup>。RT-PCRには山崎ら<sup>6)</sup>のプライマーペアP1/P3とY1/Y2を使用した。

結 果

生力キ等魚介類の喫食に関連しない食中毒事例や下痢症におけるNVの感染源および感染経路更には侵淫状況を知るために、学校給食従事者190名と小児下痢症患者115名を対象にNV遺伝子の検出を行った (Fig.1、2)。

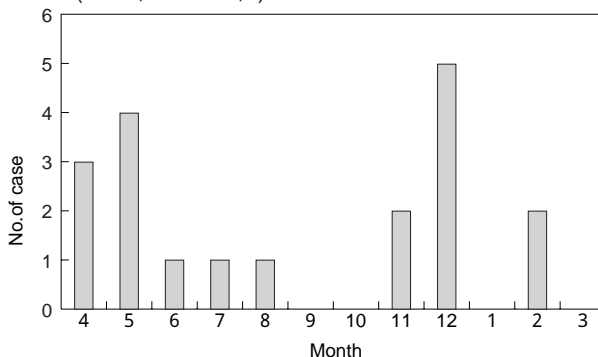
学校給食従事者から4月、7月、8月、10月、1月の各月合計9名にNV遺伝子が検出され、その保有率は4.7%を示した (Fig.1)。

Fig. 1 Monthly distribution of Norwalk virus identified in the stools of adult with cook of school lunch (2000,4 ~ 2001,3)



一方小児下痢症患者からは4月、5月、6月、7月、8月、11月、12月、2月の各月に合計で19名 (16.5%) と高率にNV遺伝子が検出された (Fig.2)。季節的にみると、各月における検出率の違いは認められるが、冬季に限らず夏季にも検出され、年間を通じて検出される傾向がみられた (Fig.1、2)。

Fig.2 Monthly distribution of Norwalk virus identified in the stools of children with acute gastroenteritis (2000,4 ~ 2001,3)



大分県内におけるNVの汚染状況を知るために、2000年7月、9月、11月、2001年1月に県内7箇所の地力キを採取し、NVの検索を行ったが、県内で採取した地力キからはNV遺伝子は検出されなかった (Fig.3)。

以上の事から、大分県内においてはNVがかなり高率に侵淫しており、NV感染者も年中存在しており、下痢症原因の多くを占めている事が明らかとなった。

RT-PCR法で使用したP1/P3、Y1/Y2プライマーについて、反応条件、簡便化等について検討した結果、大幅な反応時間の縮小が可能となり検出率も向上した。

考 察

非細菌性の急性胃腸炎の原因として注目されているNVは、1997年5月食品衛生法施行規則の改正により、食中毒の原因物質として新たに指定された。これまでの調査により、NV食中毒は主に生力キの喫食に起因しているとされている<sup>1)</sup>。しかし、大分県内のNV食中毒事例では、生力キ等の貝類の喫食

Fig.3 Detection of the Norwalk virus gene from the oysters in the oita area

採 取 地	採取場所	採 取 月			
		7月	9月	11月	1月
佐 伯 市	興国橋下	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
米 水 津 村	小浦湾	"	"	"	"
別 府 市	北浜ヨットハーバー	"	"	"	"
日 出 町	日出港	"	"	"	"
宇 佐 市	長洲港	"	"	"	"
大 分 市	裏川河口	"	"	"	"
佐 賀 関 町	下浦港	"	"	"	"

に関連しない事例がかなりあることが明らかとなった<sup>2, 3)</sup>。貝類が関連しない事例の感染源や感染経路については、未だ不明な点が多く、その実態を把握し、原因を究明することが急務となっている。

NVを含めたヒトの腸管系ウイルスは、ヒトの腸管で増殖し、糞便と共に排泄される。最終的に海洋に達したウイルスは微量であってもそこに生息する魚介類に蓄積され、これら魚介類をヒトが食べることにより感染する感染経路が一般的である。生カキ等貝類が関連しない経路としては、カキなどの貝類が調理の過程で他の食品を二次的に汚染して、それを食べることで感染するルート、糞便が食品等を汚染してヒトに感染するルート、糞便が手などを介してヒトからヒトへ感染するルートなどが推定されている<sup>7)</sup>。

今回の調査において、健常者である学校給食従事者の4.7% (昨年度5.5%<sup>5)</sup>) にNV遺伝子が年間を通じて検出されたが、この事はNVのヒトからヒトへの感染が日常的に起きており、NVがヒト・ヒト間で通年に亘り保持されていることを示唆している。また、下痢症起因細菌が否定された小児下痢症患者の16.5% (昨年度38.3%<sup>5)</sup>) よりNV遺伝子が検出されたが、小児を対象とした手島<sup>8)</sup>、秋原<sup>9)</sup>、北堀<sup>10)</sup>の報告はNV検出率が30%以上と本調査研究と同様に高い頻度であり、NVが小児の急性胃腸炎に高率に関わっていることが明らかとなった。これらの事は、NVの感染経路のひとつとしてヒトからヒトへ感染する二次汚染のルートの方が貝類を介するルートよりも多い事を示唆しているものと思われる。従って、NV感染防止の観点からすると、症状の有無に係わらずNVの侵淫状況や汚染状況を知ることが極めて重要であると考えられる。

NVを病因とする食中毒及び小児の急性胃腸炎は冬季に多発することが明らかにされているが、今回の調査結果よりNVは冬季に限らず夏季にもヒト・ヒト間で保持されていることが示唆されたが、蛸シーズン以外の暖かい季節に非細菌性の胃腸炎が発生した場合には、NVを病因の一つとして対応する必要がある。

#### 参 考 文 献

1) 井上 栄、川本尋義 編：食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査研究班、最近5年間の食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生全国実態調

査総合報告書 (1995)

- 2) 小野哲郎、塚本伸哉、小河正雄：小型球形ウイルス (SRSV) による食中毒事例について、大分県衛生環境研究センター年報, 25, 68-70 (1997)
- 3) 小野哲郎、塚本伸哉、小河正雄：ノーウォーク様ウイルス (NLVs) による食中毒事例について、大分県衛生環境研究センター年報, 26, 69-71 (1998)
- 4) 染矢雄一、名取克郎、武田直和、宮村達男：ヒトカリシウイルスの多様性、臨床とウイルス, 27, 294-303 (1999)
- 5) 小野哲郎、小河正雄、塚本伸哉：大分県におけるノーウォーク様ウイルス (Norwalk-like viruses; NLVs) の侵淫状況、大分県衛生環境研究センター年報, 27, 21-25 (2000)
- 6) 山崎謙次、大山 徹、宇田川悦子、川本尋義：1989年～1998年に日本国内で検出されたNorwalk-like viruses (NLVs) の遺伝的特徴及び統一プライマーの検討、感染症学雑誌, 74, 470-475 (2000)
- 7) 佐原啓二、杉枝正明、長岡宏美、三輪好伸、宮本秀樹、秋山真人、新美洋、樽林富雄、石神勝幸、漆畑 健、中澤美加乃、藤井正司、池端昭男：食中毒事例の患者等における糞便中のSRSVの消長、平成11年度全国食品衛生監視員研修会発表抄録, 35-38 (1999)
- 8) 手島力男、岡田正次郎、関根整治：電子顕微鏡によるウイルス性胃腸炎の発生状況調査報告、予防接種の効果的実施と副反応に関する総合的研究報告書, 154 (平成10年3月)
- 9) 秋原志穂、金保 洙、兼次邦男：1995年から1997年におけるSRSVの分子疫学および遺伝子解析、臨床とウイルス, 26, S67 (1998)
- 10) 北原吉映、中野 守、足立 修：散在性に発生した急性小児胃腸炎患者からの原因ウイルスの検討, 28, S37 (2000)

# 大気中環境ホルモン等化学物質の分析方法および調査結果について(第1報) - ベンゾ(a)ピレン類、フタル酸エステル類、農薬類 -

藤野 卓見、後藤 郁夫、城井 堅

## Analytical Method and Survey of Environmental Endocrine Disruptors in Air( ) - Benzo(a)pyrene, Phthalic acid esters, Pesticides -

Takumi Fujino , Ikuo Goto , Katashi Kii

### 要旨

大気中環境ホルモン等化学物質をダスト状とガス状に分別捕集するため、それぞれ石英繊維ろ紙とエムポアディスクろ紙により捕集方法の検討を行った。またベンゾ(a)ピレン類は高速液体クロマトグラフで、フタル酸エステル類と農薬類はガスクロマトグラフ質量分析計で分析方法の検討を行った。検討により得られた捕集方法や分析方法で、県内で実態調査を実施し大気中環境ホルモン等化学物質の存在の有無や濃度レベル等の概要が把握できた。

### はじめに

大気中環境ホルモン等化学物質の存在形態としては、ダスト状とガス状の両方が考えられ、特に分子量が小さく蒸気圧の高いものはガス状で存在する可能性が高い。ダスト状のものは石英繊維ろ紙で捕集可能であるが、ガス状のものも何らかの方法で捕集する必要がある。各試験研究機関等によるベンゾ(a)ピレン類、フタル酸エステル類、農薬類の調査方法に関する文献調査<sup>1)~23)</sup>の結果、今回は捕集剤として、ダスト状は石英繊維ろ紙で、ガス状はエムポアディスクろ紙<sup>(注1)</sup>で捕集の検討を行った。さらに高速液体クロマトグラフ(以下HPLCと略)とガスクロマトグラフ質量分析計(以下GC/MSと略)による分析条件の検討を行った後、その存在の有無、濃度レベル、存在形態、地域特性や季節変動等の把握を目的として県内で実態調査を実施した。この調査により若干の知見を得たので報告する。

### 調査方法

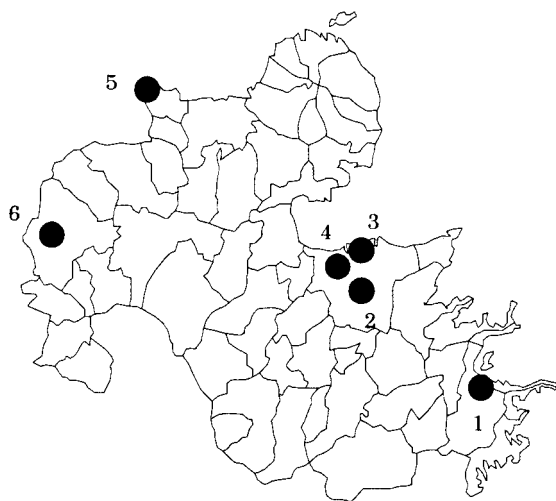
#### 1 調査時期

調査は、季節変動把握のため特定の季節にかたよらないように、2000年8月、10月、12月、2001年2月の年4回実施した。

#### 2 調査地点

地域特性把握のため県内のなるべく広い範囲で選定し、また、すべて県又は市の公共施設とし、県北(中津市1ヶ所:中津保健所)、県央(大分市3ヶ所:大分県衛生環境研究センター、大分土木事務所、大分市保健所)、県南(佐伯市1ヶ所:佐伯保健所)、県西(日田市1ヶ所:日田玖珠保健所)の6地点とした。試料は原則として施設の屋上で採取した。調査地点を図1に示す。

(注1) エムポアディスクろ紙(3M Empore™ Extraction Disks)は固相抽出法に用いるろ紙で、繊維状のPTFE(テフロン)にポリマー系またはシリカ系の吸着剤を固定し厚さ0.5~0.75mmの膜状にしたもので、その約90%が吸着剤で10%がPTFE繊維である。今回ベンゾ(a)ピレン類および農薬類で使用のろ紙(SDB-XD)の吸着剤はポリマー系のスチレンジビニルベンゼン共重合体で、フタル酸エステル類で使用のろ紙(C18FF)はシリカ系のオクタデシル体である。



- |                 |           |
|-----------------|-----------|
| 1 佐伯保健所         | 4 大分市保健所  |
| 2 大分県衛生環境研究センター | 5 中津保健所   |
| 3 大分土木事務所       | 6 日田玖珠保健所 |

図1 調査地点

### 3 調査対象項目

調査対象項目を表1に示す。

環境ホルモン作用を疑われている化学物質および大気中検出例を表2に示す。<sup>24,25)</sup>

調査対象項目の選定は、第一に調査事例や検出事例のあるもの、第二にグループ化が可能なものとした。表2によれば、ベンゾ(k)フルオランテン、ベンゾ(ghi)ペリレンは記載されていないが、ベンゾ(a)ピレンと同様の方法で分析可能なため調査対象項目に入れた。

フタル酸エステル類にはアジピン酸ジ-2-エチルヘキシルも調査対象項目に入れた。農薬類は主に有機塩素系農薬またはその代謝物であるが、カーバメイト系農薬のカルバリルや有機燐系農薬のマラチオンも調査対象項目に入れた。

### 4 試薬、分析装置および器具

#### 4.1 標準品

##### 4.1.1 ベンゾ(a)ピレン類

- ・ベンゾ(k)フルオランテン 50 µg/ml トルエン溶液 AccuStandard 社製 (製品番号 H-129S)
- ・ベンゾ(a)ピレン 50 µg/ml トルエン溶液 AccuStandard 社製 (製品番号 H-169S)
- ・ベンゾ(ghi)ペリレン 50 µg/ml トルエン溶液 AccuStandard 社製 (製品番号 H-103S)

標準溶液の調製方法は、各標準溶液を 1ml とりアセトニトリルでメスフラスコ 10ml に定容し 5

µg/ml 標準溶液とする。適宜希釈して最終的に 10ng/ml の 3 種混合標準溶液とする。この標準溶液から標準溶液系列 (0、1、2、5、10ng/ml) を調製する。

#### 4.1.2 フタル酸エステル類

- ・フタル酸エステル類 9 種混合標準溶液：フタル酸ジエチル、フタル酸ジ-n-プロピル、フタル酸ジ-i-ブチル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ-n-ペンチル、フタル酸ジ-n-ヘキシル、フタル酸-n-ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル各 100µg/ml アセトン溶液 関東化学(株)製 (コード 34069-96)
- ・アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル 関東化学(株)製 アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル (コード 11382-96)

標準溶液の調製方法は、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル 10mg を精秤し、ジクロロメタンでメスフラスコ 10ml に定容し 1000µg/ml 標準溶液とする。さらに、これをジクロロメタンで 10 倍希釈し、100µg/ml の標準溶液とする。100µg/ml アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルの標準溶液 1ml と 100µg/ml の 9 種混合標準液 1ml を同一のメスフラスコ 10ml にとり、ジクロロメタンで 10ml に定容し 10µg/ml の 10 種混合標準溶液を調製する。適宜希釈して最終的に 1µg/ml の 10 種混合標準溶液とする。

この標準溶液から標準溶液系列 (0、0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1µg/ml) を調製する。

#### 4.1.3 農薬類

- ・DBCP (1,2-ジブプロモ-3-クロロプロパン) 500mg Dr.Ehrenstorfer 社製 (以下同じ) (製品番号 11380-96)
- ・ヘキサクロロベンゼン 250mg (製品番号 C141600)
- ・ヘプタクロール 250mg (製品番号 49801-38)
- ・カルバリル 250mg (製品番号 49801-09)
- ・アルドリル 250mg (製品番号 C100900)
- ・マラチオン 250mg (製品番号 49801-43)
- ・oxy-クロルデン 10µg/ml 標準溶液 1ml (製品番号 LA112030)
- ・cis-ヘプタクロールエポキシド 10mg (製品番号 C141010)
- ・trans-ヘプタクロールエポキシド 10mg (製品番号 C141020)
- ・trans-クロルデン 10µg/ml 標準溶液 10ml (製

- 品番号 L112020)
- ・ -エンドスルファン 100mg (製品番号 49802-74)
  - ・ cis-クロルデン 10µg/ml 標準溶液 10ml (製品番号 L112010)
  - ・ trans-ノナクロール 10µg/ml 標準溶液 10ml (製品番号 L156202)
  - ・ ディルドリン 100mg (製品番号 C125900)
  - ・ エンドリン 250mg (製品番号 49801-82)
  - ・ -エンドスルファン 100mg (製品番号 49802-75)

・ p,p'-DDT 100mg (製品番号 C120810)

標準溶液の調製方法は、DBCP、ヘキサクロロベンゼン、ヘプタクロール、カルバリル、アルドリン、マラチオン、-エンドスルファン、ディルドリン、エンドリン、-エンドスルファン、p,p'-DDT それぞれ約50mgを精秤し、ジクロロメタンでメスフラスコ50mlに定容し1000µg/mlの11種混合標準溶液とする。cis-ヘプタクロールエポキシドとtrans-ヘプタクロールエポキシドの約10mgを精秤し、ジクロロメタンでメスフラスコ10mlに定容し1000µg/mlの2種混合標準溶液とする。1000µg/ml

表1 調査対象項目とGC/MSのモニターイオン

	ベンゾ(a)ピレン類 (HPLCの保持時間順)
1	ベンゾ(k)フルオランテン
2	ベンゾ(a)ピレン
3	ベンゾ(ghi)ペリレン

	フタル酸エステル類等 (GC/MSの保持時間順)	定量用 m/z値	確認用 m/z値
1	フタル酸ジエチル	149	177
2	フタル酸ジ-n-プロピル	149	209
3	フタル酸ジ-i-ブチル	149	223
4	フタル酸ジ-n-ブチル	149	223
5	フタル酸ジ-n-ペンチル	149	237
6	フタル酸ジ-n-ヘキシル	149	251
7	フタル酸-n-ブチンベンジル	149	206
8	アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	129	111
9	フタル酸ジシクロヘキシル	149	249
10	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	149	279

	農薬類 (GC/MSの保持時間順)	定量用 m/z値	確認用 m/z値
1	DBCP (1,2-ジブromo-3-クロロプロパン)	75	157
2	ヘキサクロロベンゼン	284	286
3	ヘプタクロール	272	100
4	カルバリル	144	115
5	アルドリン	263	154
6	マラチオン	173	127
7	oxy-クロルデン	115	185
8	cis-ヘプタクロールエポキシド	353	355
9	trans-ヘプタクロールエポキシド	353	355
10	trans-クロルデン	375	373
11	-エンドスルファン	195	241
12	cis-クロルデン	375	373
13	trans-ノナクロール	409	407
14	ディルドリン	79	263
15	エンドリン	263	281
16	-エンドスルファン	195	241
17	p,p'-DDT	235	237

表2 環境ホルモン作用を疑われている化学物質および大気中検出例

No	化学物質名	用途	濃度 (ng/m <sup>3</sup> )	検出頻度
1	ダイオキシン類	(非意図的生成物)	0 ~ 3.0pg/m <sup>3</sup>	
2	ポリ塩化ビフェニル類 PCB	熱媒体		
3	ポリ臭化ビフェニル類 PBB 4臭化物	難燃剤	ND (1.0)	0/83
"	ポリ臭化ビフェニル類 PBB 10臭化物	難燃剤	ND (20)	0/38
4	ヘキサクロロベンゼン HCB	殺菌剤	1.1 ~ 3.5	8/24
5	ペンタクロロフェノール PCP	殺菌剤		
6	2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸	除草剤		
7	2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	除草剤		
8	アミトロール	除草剤		
9	アトラジン	除草剤		
10	アラクロール	除草剤		
11	シマジン	除草剤		
12	ヘキサクロロシクロヘキサン HCH、エチルパラチオン	殺虫剤		
13	カルバリル	殺虫剤	ND (7)	0/72
14	cis-クロルデン	殺虫剤	0.43 ~ 5.0	18/73
"	trans-クロルデン	殺虫剤	0.40 ~ 8.5	33/73
15	oxy-クロルデン	クロルデンの代謝物	ND (1.5)	0/73
16	trans-ノナクロール	殺虫剤	0.52 ~ 2.8	16/73
17	1,2-ジプロモ-3-クロロプロパン	殺虫剤	ND (20)	0/36
18	DDT	殺虫剤		
19	DDE、DDD			
20	ケルセン	殺ダニ剤		
21	アルドリン	殺虫剤		
22	エンドリン	殺虫剤		
23	ディルドリン	殺虫剤		
24	-エンドスルファン (ベンゾエピン)	殺虫剤	ND (30)	0/55
"	-エンドスルファン (ベンゾエピン)	殺虫剤	ND (30)	0/55
25	ヘプタクロル	殺虫剤	ND (1.0)	0/73
26	ヘプタクロルエポキシド	ヘプタクロルの代謝物	ND (0.5)	0/73
27	マラチオン	殺虫剤	ND (25)	0/54
28	メソミル	殺虫剤		
29	メトロキシクロル	殺虫剤		
30	マイレックス	殺虫剤		
31	ニトロフェン	除草剤		
32	トキサフェン	殺虫剤		
33	トリブチルスズ	船底塗料		
34	トリフェニルスズ			
35	トリフルラリン	除草剤		
36	アルキルフェノール (C5~C9)、ノニルフェノール、4-オクチルフェノール	界面活性剤原料		
37	ビスフェノールA	ポリカーボネート樹脂原料	ND (24)	0/18
38	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	可塑剤	8 ~ 323	11/18
39	フタル酸ブチルベンジル	可塑剤		
40	フタル酸ジ-n-ブチル	可塑剤	10 ~ 140	13/15
41	フタル酸ジシクロヘキシル	可塑剤		
42	フタル酸ジエチル	可塑剤		
43	ベンゾ (a) ピレン	(非意図的生成物)	0.31 ~ 6.37	31/39
44	2,4-ジクロロフェノール	染料中間体		
45	アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	可塑剤	1.0 ~ 22	31/41
46	ベンゾフェノン	工業原料		
47	4-ニトロトルエン	工業原料	ND (20)	0/73
48	オクタクロロスチレン	有機Cl化合物副生成物		
49	アルディカーブ	殺虫剤		
50	ベノミル	殺菌剤		
51	キーボン (クロルデコン)	殺虫剤		
52	マンゼブ (マンコゼブ)	殺菌剤		
53	マンネブ	殺菌剤		
54	メチラム	殺菌剤		
55	メトリブシン	除草剤		
56	シペルメトリン	殺虫剤		
57	エスフェンバレレート	殺虫剤		
58	フェンバレレート	殺虫剤		
59	ペルメトリン	殺虫剤		
60	ピンクロゾリン	殺菌剤		
61	ジネブ	殺菌剤		
62	ジラム	殺菌剤		
63	フタル酸ジベンチル	可塑剤		
64	フタル酸ジヘキシル	可塑剤		
65	フタル酸ジプロピル	可塑剤		
66	スチレンの2量体及び3量体			
67	n-ブチルベンゼン	合成中間体		

環境庁・外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書をもとに作成  
( ) 検出限界値



の11種混合標準溶液1mlと2種混合標準溶液1mlを同一のメスフラスコ10mlにとり、ジクロロメタンで10mlに定容し100 $\mu$ g/mlの13種混合標準溶液とする。さらに、これをジクロロメタンで10倍希釈し、10 $\mu$ g/mlの13種混合標準溶液とする。oxy-クロルデン、trans-クロルデン、cis-クロルデン、trans-ノナクロールの10 $\mu$ g/ml標準溶液をそれぞれ1mlずつと10 $\mu$ g/mlの13種混合標準溶液1mlを同一のメスフラスコ10mlにとり、ジクロロメタンで10mlに定容し1 $\mu$ g/mlの17種混合標準溶液とする。

この標準溶液から標準溶液系列(0、0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1 $\mu$ g/ml)を調製する。

#### 4.2 溶媒

- ・アセトン 和光純薬工業(株)製 残留農薬・PCB試験用アセトン1000(コード018-11293)
- ・ジクロロメタン 和光純薬工業(株)製 残留農薬・PCB試験用ジクロロメタン1000(コード130-08851)
- ・アセトニトリル 和光純薬工業(株)製 HPLC用アセトニトリル(コード015-08633)

#### 4.3 分析装置

- ・HPLC ヒューレットパッカードHP-1100
- ・GC/MS GC TRACE GC2000 MS Finnigan POLARIS オートサンプラーAS-2000

#### 4.4 器具等

- ・ろ紙ホルダー GLサイエンス47mm 用EMI-47(コード3008-84300)
- ・石英繊維ろ紙 Whatman QM-A 20.3cm x

25.4cm(コード1851-865)を(株)ダンベル製SD型レバー式試料裁断器SDL-100で47mmの円形に切り抜いたものを使用

- ・エムポアディスクろ紙 47mm SDB-XD(コード5010-30046)、47mm C18FF(コード5010-30010)
- ・ソックスレー洗浄装置 ビードレックス ソックスレー抽出装置セット 内径53mm(コード21250-01)
- ・抽出器用マントルヒーター ビードレックス EUR-5-4 4連1000W(250W x 4)(コード86970-17)
- ・ポンプ イワキAPN-215NV-1
- ・乾式ガスメータ 品川精器(株)DC-1c
- ・試験管濃縮装置 東京理化器械EYELA MG-2100

#### 5 捕集方法および分析方法

全体的な捕集方法の概要は次のとおりである。

捕集用ろ紙ホルダーの構造図を図2に示す。ろ紙は、電気炉加熱処理やソックスレーでアセトン洗浄処理したものを使用した。電気炉加熱処理済みのろ紙はそのまま密栓した秤量瓶の中に保存した。アセトン洗浄処理済みのろ紙は、密栓した秤量瓶のアセトン中に保存し、調査当日、必要枚数だけ取り出し、乾燥器中で乾燥したものを、同じくアセトンでよく洗浄したろ紙ホルダーに装着密栓し、密閉蓋つき缶に入れ調査現場まで搬送した。

現地で、ろ紙ホルダー部分は遮光及び雨対策のためアルミホイルで包んだ。試料採取風景と捕集装置

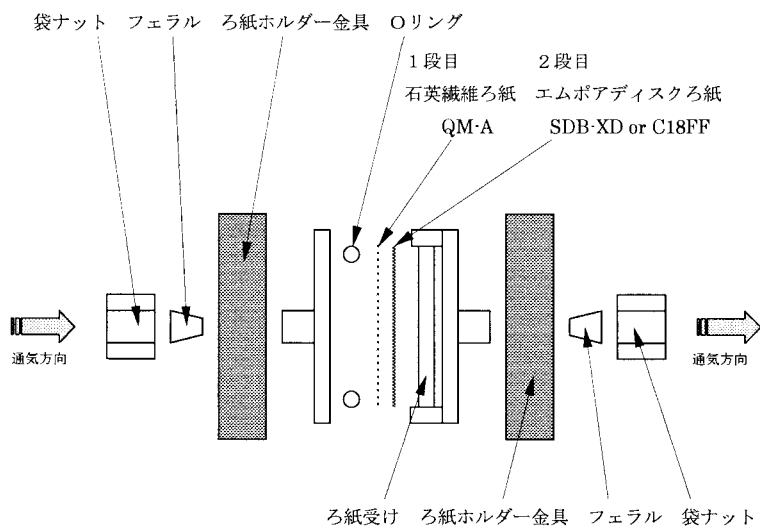


図2 ろ紙ホルダーの構造図

を図3に示す。調査終了後はただちにろ紙ホルダーの両端を密栓し、蓋つき缶に入れて持ち帰った。当日中にろ紙を取り出し、共栓試験管に入れて、ジクロロメタンを一定量加え分析日まで約5日で冷蔵保存した。

## 5.1 大気中ベンゾ(a)ピレン類の捕集方法・分析方法等

### 5.1.1 捕集方法

石英繊維ろ紙は500℃で3時間程度電気炉加熱処理し、エムポアディスクろ紙(SDB-XD)は残留農薬試験用アセトンを用い2時間程度ソックスレーで洗浄した。1段目に石英繊維ろ紙、2段目にエム



試料採取風景



ポンプとガスメータ部



ろ紙ホルダー部



ろ紙ホルダー部(アルミホイルで遮光)

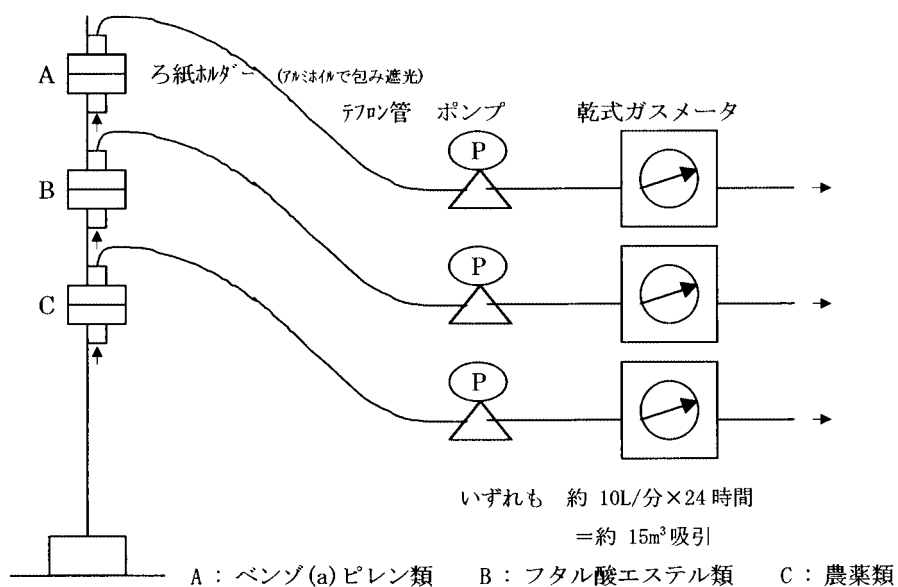


図3 試料採取風景と捕集装置

ポアディスクろ紙を重ねてろ紙ホルダーに装着し、大気を毎分約10Lの速度で24時間吸引した。総吸引量は約15m<sup>3</sup>となる。

### 5.1.2 分析方法

試料捕集後、石英繊維ろ紙は細切し、エムポアディスクろ紙は筒状にして、それぞれ10ml共栓試験管に入れた。ジクロロメタンを正確に10ml加えて、15分間超音波抽出した後、遠心分離し(3000rpm、20分、20分)上澄み液を正確に5ml別の10ml共栓試験管に入れた。試験管濃縮装置で溶媒(ジクロロメタン)をほとんど揮散させ、アセトニトリルを正確に1ml加えて1分間超音波溶解し、この試料をHPLC分析した。HPLCの分析条件は次のとおりである。

カラム ODS-3V 4.6mm ID × 250mm 粒径5μm、溶離液 アセトニトリル:水=85:15、流速 1.0ml/分、カラム温度 40℃、注入量 20μL、蛍光検出器 励起波長365nm 蛍光波長410nm ピーク面積で定量した。

### 5.1.3 クロマトグラムと検量線

ベンゾ(a)ピレン類の標準溶液(10ng/ml)、石英繊維ろ紙捕集試料、エムポアディスクろ紙捕集試料、石英繊維ろ紙ブランク、エムポアディスクろ紙ブランクのHPLCクロマトグラム例を図4に示す。石英繊維ろ紙もエムポアディスクろ紙もブランクからはピークがまったく確認されなかった。ベンゾ(a)ピレン類の検量線の例を図5に示す。

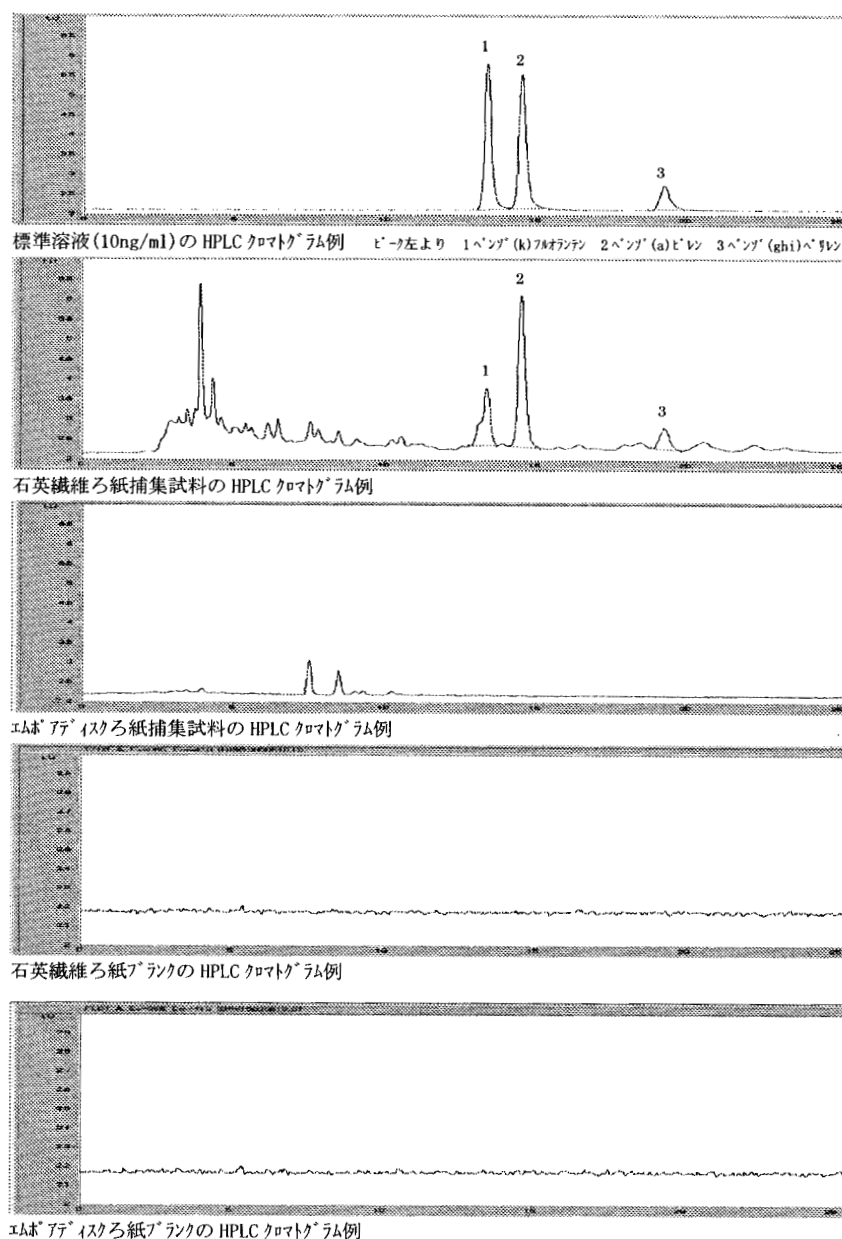


図4 ベンゾ(a)ピレン類のHPLCクロマトグラム例

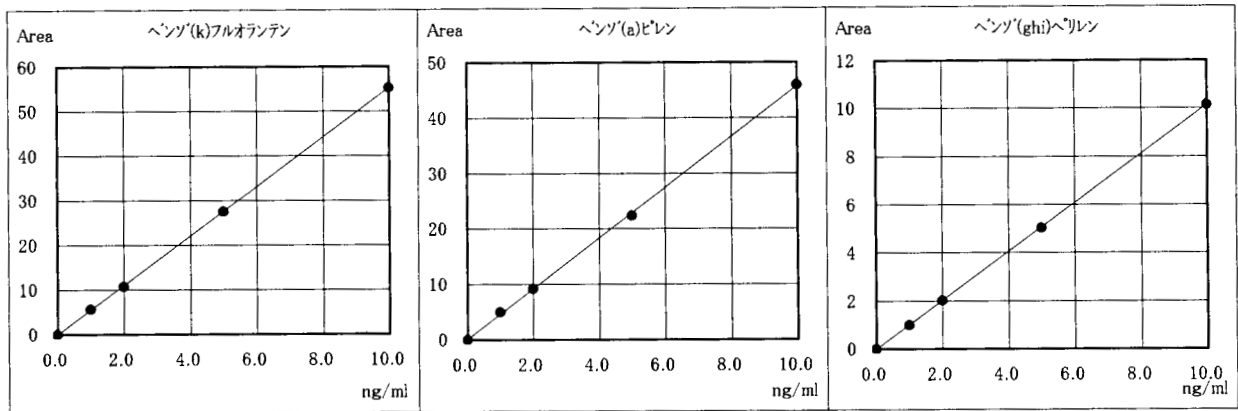


図5 ベンゾ(k)フルオランテン、ベンゾ(a)ピレン、ベンゾ(ghi)ペリレンの検量線の例

#### 5.1.4 添加回収試験と添加破過試験

ベンゾ(a)ピレン類の添加回収試験と添加破過試験を実施した。添加回収試験の方法は、電気炉加熱処理した石英繊維ろ紙とアセトン洗浄処理したエムポアディスクろ紙にそれぞれ一定量のベンゾ(a)ピレン類を添加し溶媒を揮散後、試料と同様の処理を行い回収率を算出した。一例として、石英繊維ろ紙への10ng添加回収試験ではベンゾ(k)フルオランテン96%、ベンゾ(a)ピレン78%、ベンゾ(ghi)ペリレン110%で、エムポアディスクろ紙への10ng添加回収試験ではそれぞれ94%、91%、87%であった。添加回収試験の結果を図6に示す。添加破過試験の方法は前段と後段のろ紙ホルダーを準備し、電気炉加熱処理した石英繊維ろ紙に一定量のベンゾ(a)ピレン類を添加しさらにアセトン洗浄処理したエムポアディスクろ紙を重ねて後段のろ紙ホルダーに装着し、また大気中ベンゾ(a)ピレン類除去のため同様に電気炉加熱処理した石英繊維ろ紙とアセトン洗浄処理したエムポアディスクろ紙を2枚重ねて前段のろ紙ホルダーに装着した。前段と後段のろ紙ホルダーをテフロン管で接続し、実試料と同じ条件

で24時間大気を通気した。(図7参照) 通気終了後、後段のろ紙ホルダーから、それぞれのろ紙を回収し、試料と同様の処理を行い回収率を算出した。回収率は石英繊維ろ紙とエムポアディスクろ紙の回収率の合計値とした。10ng添加破過試験ではベンゾ(k)フルオランテン42%、ベンゾ(a)ピレン14%、ベンゾ(ghi)ペリレン36%で、同様に20ng添加破過試験ではそれぞれ62%、34%、51%であった。純粋な標準溶液の添加のためか添加破過試験の回収率は良くなかった。添加破過試験の結果を図8に示す。しかし、ベンゾ(a)ピレン類は大気中のダスト中に付着または吸着されて存在していると考えられること、また標準物質の添加破過試験では添加した物質の全量が完全に24時間通気試験にさらされるのに対し、実際の捕集試料では捕集開始直後に捕集された物質は24時間近く通気試験にさらされるものの捕集開始からの時間の経過とともに捕集された物質が通気試験にさらされる時間は減少していくこと等の理由で、標準物質の添加破過試験とは条件が異なったものとなっていると考えられ、ここまでの破過は生じないと考えられる。<sup>3)</sup>

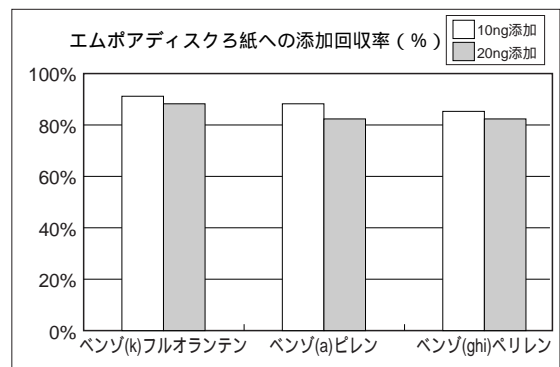
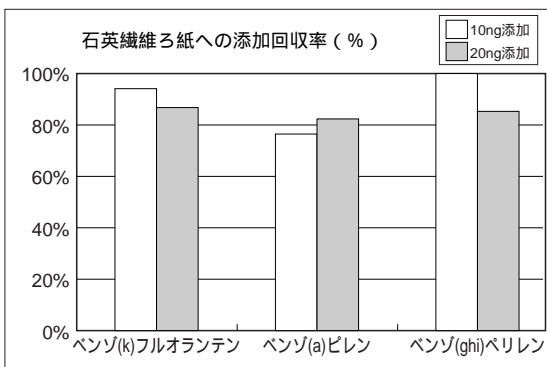


図6 ベンゾ(k)フルオランテン、ベンゾ(a)ピレン、ベンゾ(ghi)ペリレンの添加回収試験

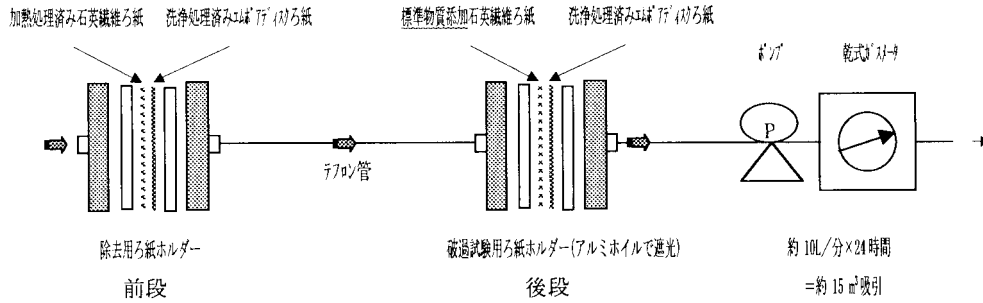


図7 添加破過回収試験の方法

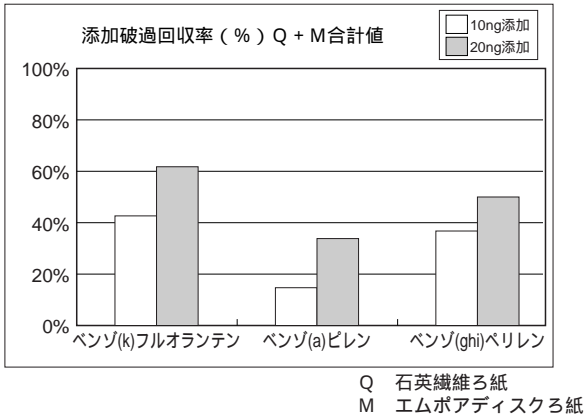


図8 ベンゾ(k)フルオランテン、ベンゾ(a)ピレン、ベンゾ(ghi)ペリレンの添加破過回収試験

5.1.5 2重測定

外気中のベンゾ(a)ピレン類について、通常の調査と同じ条件（毎分約10Lの速度で24時間吸引）で2重測定による試料捕集を実施し、同一試料についてHPLCへ3回注入したところ、表3の結果がえられた。これによると、例えばベンゾ(a)ピレンでは、その変動は0.9 ~ 1.3%（平均値1.1%）で有害大気汚染物質調査マニュアルにおける2重測定の判断基準（30%以下）を十分満足していた。

表3 ベンゾ(a)ピレン類の2重測定結果

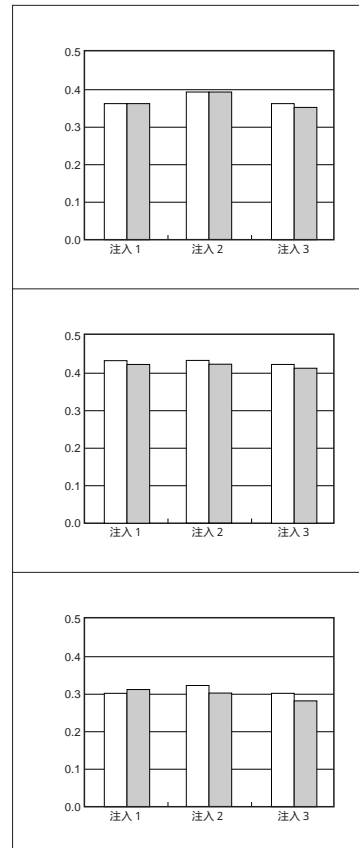
ベンゾ(k)フルオランテンの濃度 ng/m <sup>3</sup>			
	2重測定		変動(%) <sup>(注2)</sup>
注入1	0.353	0.352	0.4%
注入2	0.387	0.387	0.0%
注入3	0.361	0.342	5.3%
平均値	0.367	0.360	1.9%

ベンゾ(a)ピレンの濃度 ng/m <sup>3</sup>			
	2重測定		変動(%) <sup>(注2)</sup>
注入1	0.421	0.416	1.3%
注入2	0.430	0.426	1.0%
注入3	0.425	0.421	0.9%
平均値	0.425	0.421	1.1%

ベンゾ(ghi)ペリレンの濃度 ng/m <sup>3</sup>			
	2重測定		変動(%) <sup>(注2)</sup>
注入1	0.294	0.305	3.8%
注入2	0.321	0.308	4.2%
注入3	0.308	0.285	7.9%
平均値	0.308	0.299	5.3%



(注2) 変動(%) は濃度の平均値に対する濃度の差の割合

## 5.2 大気中フタル酸エステル類の捕集方法・分析方法等

### 5.2.1 捕集方法

石英繊維ろ紙とエムポアディスクろ紙（C18FF）はアセトンを用い8時間程度ソックスレーで洗浄した。1段目に石英繊維ろ紙、2段目にエムポアディスクろ紙を重ねてる紙ホルダー（ろ紙ホルダーは全体をアセトンで洗浄後、ろ紙に直接接触する部分をさらにジクロロメタンで洗浄）に装着し、大気を毎分約10Lの速度で24時間吸引した。総吸引量は約15m<sup>3</sup>となる。

周辺にプラスチック類やゴム類がないことを確かめ、ろ紙ホルダー部分を手すり等に針金で縛りつけた。ろ紙ホルダーの周辺で粘着テープ、ビニールテープ等は使用しないことにした。

### 5.2.2 分析方法

試料捕集後、石英繊維ろ紙は細切し、エムポアディスクろ紙は筒状にして、それぞれ10ml共栓試験管に入れる。ジクロロメタンを正確に10ml加えて、15分間超音波抽出した後、遠心分離し（3000rpm 20分）、上澄み液を適量とりGC/MS分析した。ここで試料抽出に用いるジクロロメタンは標準溶液調製に用いるジクロロメタンと区別して使用したほうが汚染防止の点からよい。ベンゾ(a)ピレン類や農薬類についても同様である。GC/MSの分析条件は次のとおりである。

カラム Restek Rtx-5MS 0.25mm ID × 30m × 0.25 μm、キャリアーガス（He）流速1.5ml/分、注入口温度200、イオンソース温度200、トランスファーライン温度275、オープン温度60（1分）-（20 /分）-200（5 /分）-250（25 /分）-300（1分）  
試料注入量3μL、試料注入速度10μl/秒（スプリットレスモード スプリットレス時間 1分）EI スキャンモード（m/z 50-450）、スキャン速度0.46秒、

ピーク面積で定量した。昇温図を図9に示す。定量用および確認用モニターイオンについては表1に示す。操作フロー短縮化のため、クリーンアップ処理や加熱濃縮処理等の操作は省いた。

### 5.2.3 GC/MSへの注入量

GC/MSへのフタル酸エステル類の試料注入量とピーク面積との関係は図10のとおりで、1μlに対して3μl注入の場合のピーク面積は概して1.5～2倍となった。今回使用のGC/MSはMSの真空度（mTorr）がモニターできる機種で、キャリアーガス（He）流速1.5ml/分の平常の真空度は50 mTorr程度である。3μl注入後の経過時間とMSの真空度の変化を示したものが図11で、試料注入後1分で真空度は110 mTorrに達するが、約3分程度で回復しておりGC/MS分析に影響はないと考えられ、以後の分析は3μl注入することにした。

### 5.2.4 クロマトグラム

フタル酸エステル類の標準溶液（1μg/ml）のGC/MSクロマトグラム例を図12-1に示す。石英繊維ろ紙捕集試料、エムポアディスクろ紙捕集試料、石英繊維ろ紙ブランク、エムポアディスクろ紙ブランクのGC/MSクロマトグラム例を図12-2に示す。ここでのクロマトグラム例（m/z149）は縦軸が同じスケールであり、このクロマトグラムから分析値に対するフタル酸ジ-n-ブチルのブランクの影響はほとんどないことがわかった。他のフタル酸エステル類のブランクピークはほとんど確認されなかった。

### 5.2.5 検量線

検量線の例を図13に示す。標準溶液調製に使用した溶媒（ジクロロメタン）には、フタル酸ジ-n-ブチルがわずかに含まれており、この例では、フタ

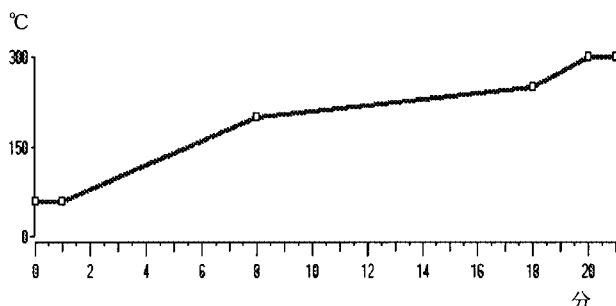


図9 フタル酸エステル類のGC/MS分析におけるオープン昇温図

	Rate (°C/min)	Temp. (°C)	Hold Time (minutes)
Initial:		60	1.00
Ramp 1:	20.0	200	0.00
Ramp 2:	5.0	250	0.00
Ramp 3:	25.0	300	1.00

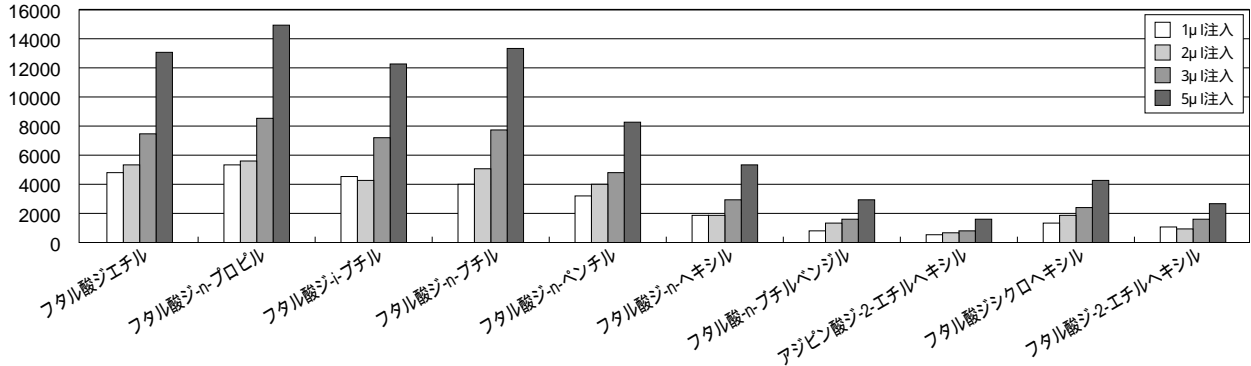
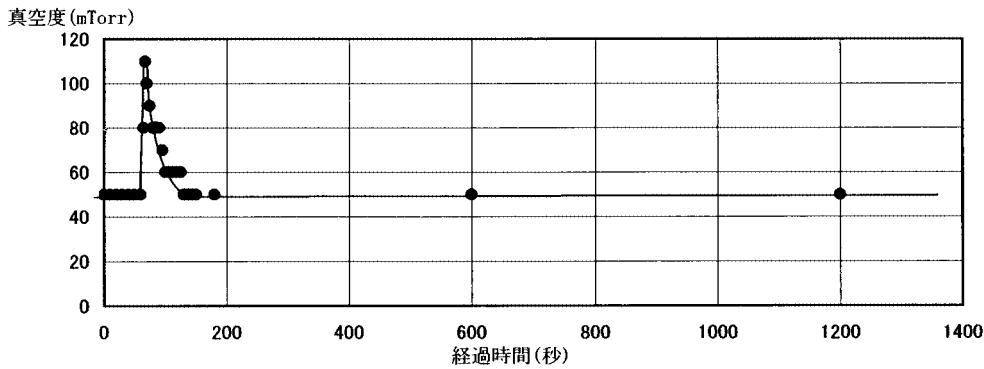


図10 フタル酸エステル類の試料注入量対ピーク面積



試料注入量 3μL

図11 フタル酸エステル類の試料注入後経過時間対MSの真空度

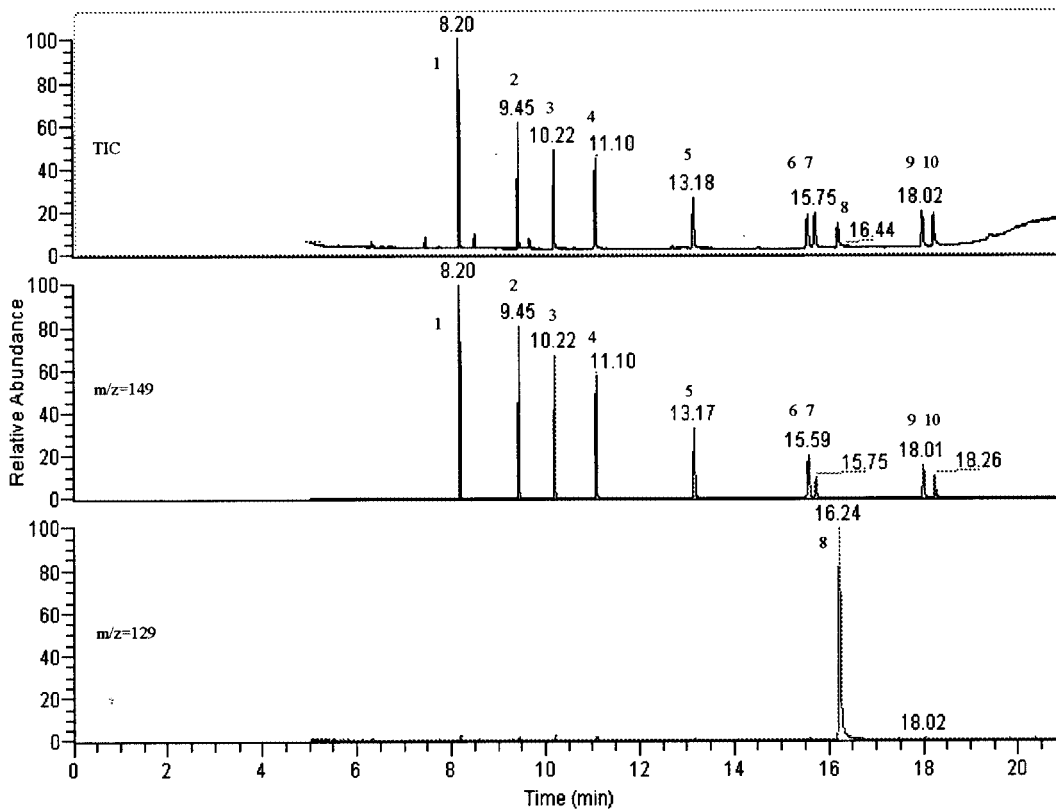
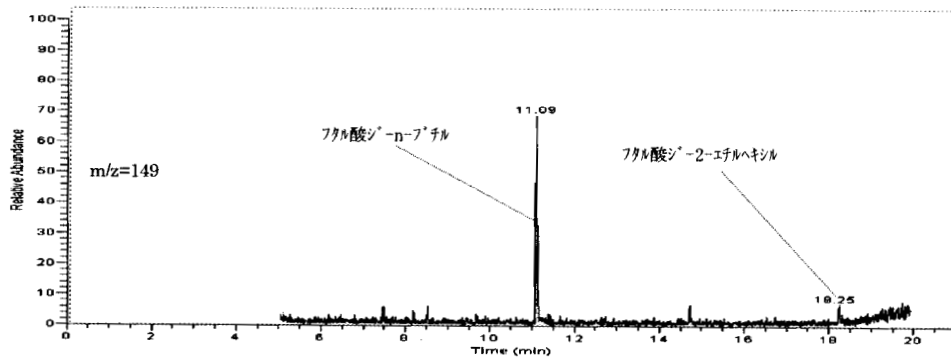
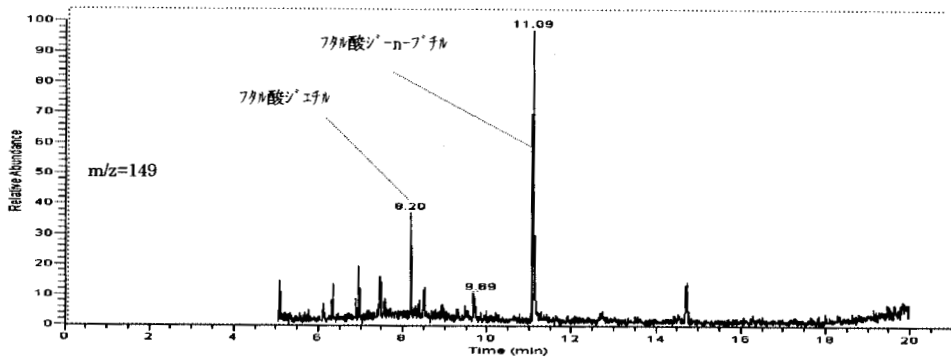


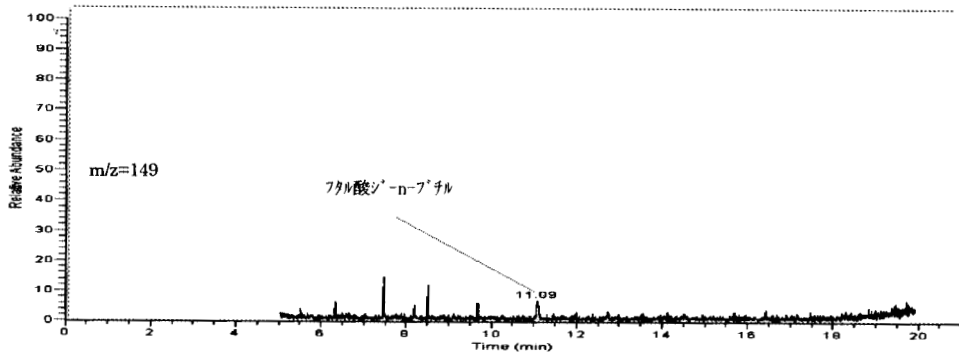
図12-1 フタル酸エステル類の標準溶液 (1μg/ml) のGC/MSクロマトグラム例 (上からTIC m/z149 m/z129)  
 TICにて、ピーク左より 1フタル酸ジエチル 2フタル酸ジ-n-プロピル 3フタル酸ジ-i-ブチル 4フタル酸ジ-n-ブチル  
 5フタル酸ジ-n-ペンチル 6フタル酸ジ-n-ヘキシル 7フタル酸-n-ブチルベンジル 8アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル  
 9フタル酸ジシクロヘキシル 10フタル酸ジ-2-エチルヘキシル



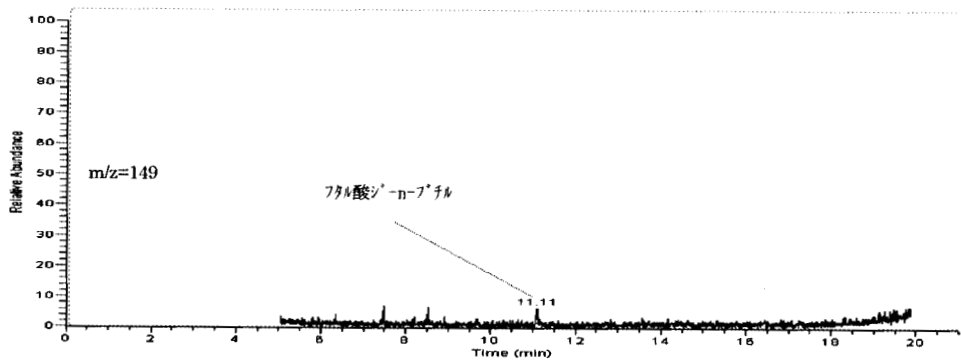
石英繊維ろ紙捕集試料の GC/MS クロマトグラム例 (m/z149) 最大ピークはフタル酸ジ-n-ブチル



エポアデイスろ紙捕集試料の GC/MS クロマトグラム例 (m/z149) 最大ピークはフタル酸ジ-n-ブチル



石英繊維ろ紙ブランクの GC/MS クロマトグラム例 (m/z149)



エポアデイスろ紙ブランクの GC/MS クロマトグラム例 (m/z149)

図 12-2 捕集試料とブランクのフタル酸エステル類の GC/MS クロマトグラム例  
縦軸は同一スケール



ル酸ジ-n-ブチルは検量線が原点を通らなかった。

### 5.2.6 添加回収試験と添加破過試験

先に述べたベンゾ(a)ピレン類とほぼ同様の方法で添加回収試験と添加破過試験を実施した。石英繊維ろ紙への添加回収試験では概ね65%から90%であった。エムポアディスクろ紙への添加回収試験では概ね65%から95%であった。フタル酸エステル類の添加破過試験では、概ね75%から100%であった。しかし、なかにはフタル酸ジ-n-ブチルが147%を示し操作過程で汚染を受けたと考えられる。添加回収試験と添加破過試験の結果を図14に示す。

### 5.2.7 捕集試験

フタル酸エステル類のろ紙捕集状況を確認するため、石英繊維ろ紙1枚(Q)とエムポアディスクろ紙3枚(M1 M2 M3)を図15のように前段と後段のろ紙ホルダーに分けて装着し捕集してみた。表4に示すとおり、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルを含む5物質が検出されたが、いずれの物質も前段の石英繊維ろ紙(Q)とエムポアディスクろ紙(M1)で完全に捕集されていることがわかった。物質ごとにみても、フタル酸ジエチルはそのほとんどがエムポアディスクろ紙(M1)で捕集されており、ガス状で存在していることがわかった。フタル酸ジ-i-ブチルは石英繊維ろ紙(Q)とエムポアディスクろ紙(M1)で

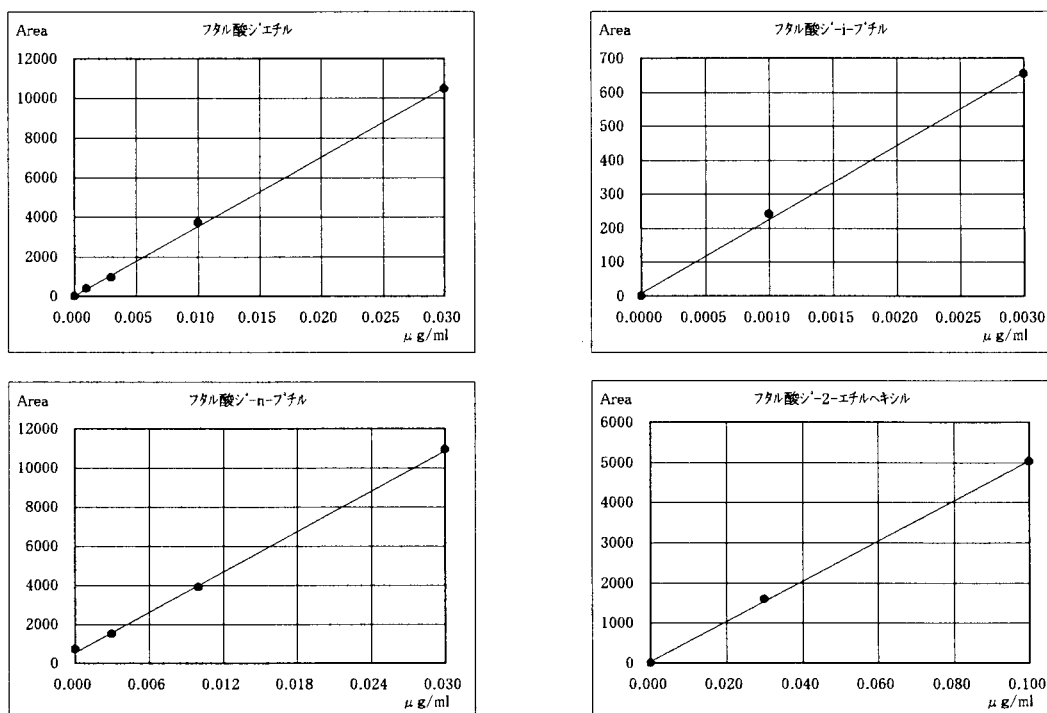
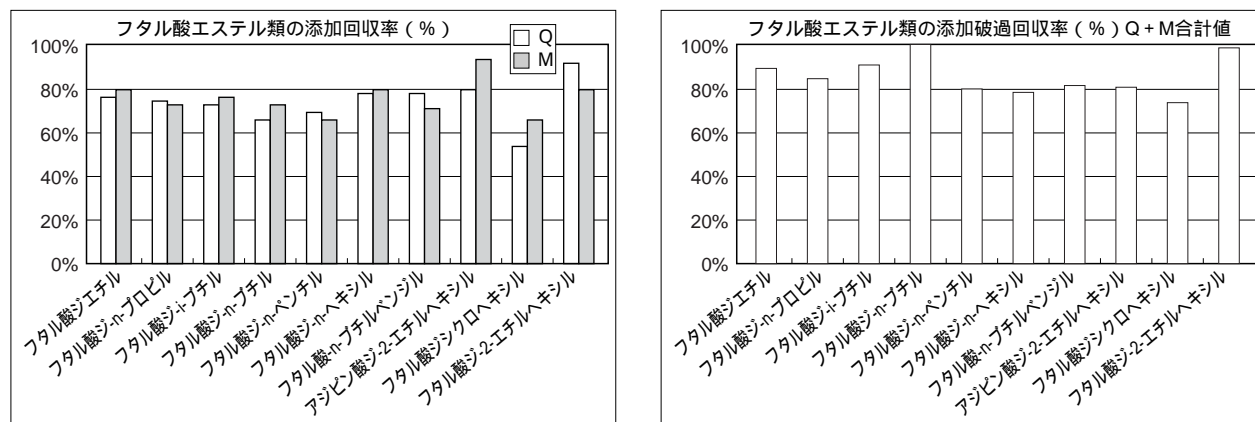


図13 フタル酸エステル類の検量線の例



Q 石英繊維ろ紙  
M エムポアディスクろ紙

図14 フタル酸エステル類の添加回収試験および添加破過回収試験

同程度捕集されておりダスト状とガス状が同じ程度に存在し、フタル酸ジ-n-ブチルは石英繊維ろ紙(Q)で捕集される割合が高くなり、アジピン酸ジ-

2-エチルヘキシルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルについては、石英繊維ろ紙(Q)で完全に捕集されダスト状で存在していることがわかった。

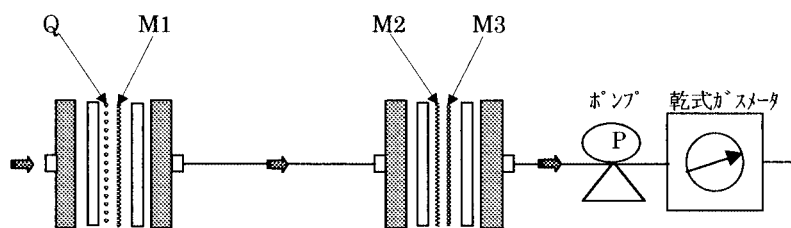


図15 石英繊維ろ紙Q エムポアディスクろ紙 M1 M2 M3 での捕集試験の方法

表4 石英繊維ろ紙Q エムポアディスクろ紙 M1 M2 M3 での捕集試験結果

濃度 ng/m <sup>3</sup>			
試料名	フタル酸ジエチル	全捕集量に対する割合	
石英繊維ろ紙 Q	3.6	3.8%	
エムポアディスクろ紙 M1	91.2	96.2%	
エムポアディスクろ紙 M2	ND	0.0%	
エムポアディスクろ紙 M3	ND	0.0%	
全捕集量	94.8		
試料名	フタル酸ジ-i-ブチル	全捕集量に対する割合	
石英繊維ろ紙 Q	6.0	58.5%	
エムポアディスクろ紙 M1	4.2	41.5%	
エムポアディスクろ紙 M2	ND	0.0%	
エムポアディスクろ紙 M3	ND	0.0%	
全捕集量	10.2		
試料名	フタル酸ジ-n-ブチル	全捕集量に対する割合	
石英繊維ろ紙 Q	304.9	77.6%	
エムポアディスクろ紙 M1	87.9	22.4%	
エムポアディスクろ紙 M2	ND	0.0%	
エムポアディスクろ紙 M3	ND	0.0%	
全捕集量	392.8		
試料名	アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	全捕集量に対する割合	
石英繊維ろ紙 Q	4.3	100.0%	
エムポアディスクろ紙 M1	ND	0.0%	
エムポアディスクろ紙 M2	ND	0.0%	
エムポアディスクろ紙 M3	ND	0.0%	
全捕集量	4.3		
試料名	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	全捕集量に対する割合	
石英繊維ろ紙 Q	154.3	100.0%	
エムポアディスクろ紙 M1	ND	0.0%	
エムポアディスクろ紙 M2	ND	0.0%	
エムポアディスクろ紙 M3	ND	0.0%	
全捕集量	154.3		

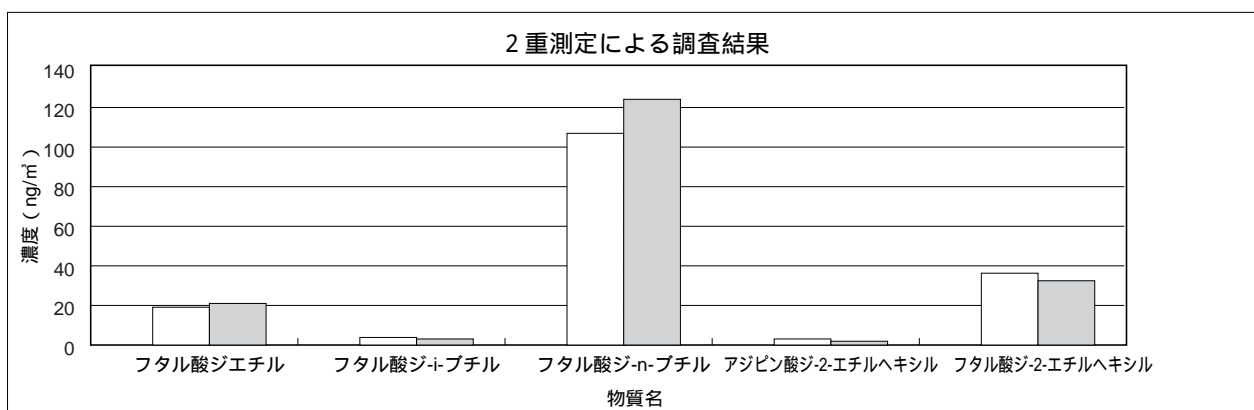
5.2.8 2重測定

試験室内の空气中フタル酸エステル類の濃度と2重測定による分析値の変動をみるために、通常の調査と同じ条件（毎分約10Lの速度で24時間吸引）で捕集装置2台による調査を実施した。表5に示す

とおり、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルを含む5物質が検出された。2重測定の変動を2つの濃度の平均値に対する2つの濃度の差で計算<sup>26,27)</sup>してみると9.5%~15.1%と概ね良好であった。

表5 試験室内の空气中フタル酸エステル類の2重測定による調査結果

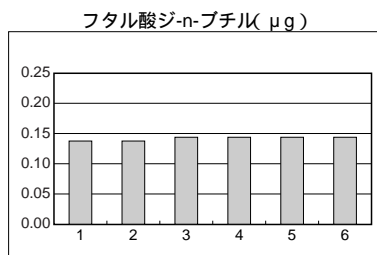
物質名	濃度 (ng/m <sup>3</sup> )	濃度 (ng/m <sup>3</sup> )	変動 (%) (注2)
フタル酸ジエチル	19.2	21.6	11.6%
フタル酸ジ-i-ブチル	3.3	3.0	11.7%
フタル酸ジ-n-ブチル	106.9	124.4	15.1%
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	2.4	2.1	13.4%
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	36.7	33.3	9.5%



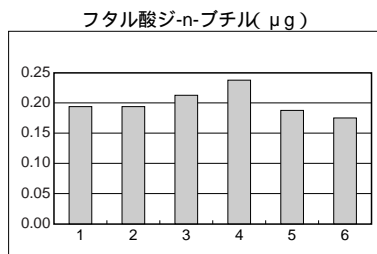
(注2) 変動 (%) は濃度の平均値に対する濃度の差の割合

表6 石英繊維ろ紙およびエムポアディスクろ紙のブランク値

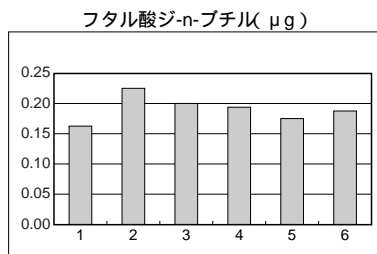
第1グループ	No	試料名	フタル酸ジ-n-ブチル(μg)(注3)
アセトン中に保存したもの	1	石英繊維ブランクろ紙	0.13
	2	"	0.13
	3	"	0.14
	4	エムポアディスクブランクろ紙	0.14
	5	"	0.14
	6	"	0.14



第2グループ	No	試料名	フタル酸ジ-n-ブチル(μg)(注3)
屋外に保存したもの	1	石英繊維ブランクろ紙	0.18
	2	"	0.18
	3	"	0.20
	4	エムポアディスクブランクろ紙	0.22
	5	"	0.17
	6	"	0.16



第3グループ	No	試料名	フタル酸ジ-n-ブチル(μg)(注3)
冷蔵庫に保存したもの	1	石英繊維ブランクろ紙	0.15
	2	"	0.21
	3	"	0.19
	4	エムポアディスクブランクろ紙	0.18
	5	"	0.16
	6	"	0.18



(注3) ろ紙1枚に含まれるフタル酸ジ-n-ブチル(μg)

## 5.2.9 ブランク試験

石英繊維ろ紙とエムポアディスクろ紙 (C18FF) 中のブランク値について検討した。ブランク試験として3つの保存条件を考え、第1グループはろ紙をそのままアセトン中に保存したもの、第2グループはろ紙を乾燥後ろ紙ホルダーに装着し蓋つき缶に入れて屋外に保存したもの、第3グループは同様に蓋つき缶に入れて冷蔵庫に保存したものに分けた。それぞれのグループを24時間保存したのち回収し、直ちに抽出後GC/MS分析した。その結果は表6に示しており、フタル酸ジ-n-ブチルのみ検出され、屋外に保存したものおよび冷蔵庫に保存したものは、そのままアセトン中に保存したものに比べブランク値が若干高くバラツキもあった。平均すると2種のろ紙で特に差はなかった。

## 5.3 大気中農薬類の捕集方法・分析方法等

### 5.3.1 捕集方法と分析方法

石英繊維ろ紙とエムポアディスクろ紙 (SDB-XD) はアセトンを用い3時間程度ソックスレーで洗浄した。以後の処理はフタル酸エステル類の調査方法に準じた。ただし、オープン温度は60 (1分) - (25 /分) -160 - (2 /分) -200 - (25 /分) -300 (1分) である。昇温図を図16に示す。定量用および確認用モニターイオンについては表1に示す。

### 5.3.2 クロマトグラムとマススペクトル

農薬類の標準溶液 (1 µg/ml) のGC/MSクロマトグラム例を図17に示す。農薬類のクロマトグラムでは、ヘプタクロールとカルバリルが分離しな

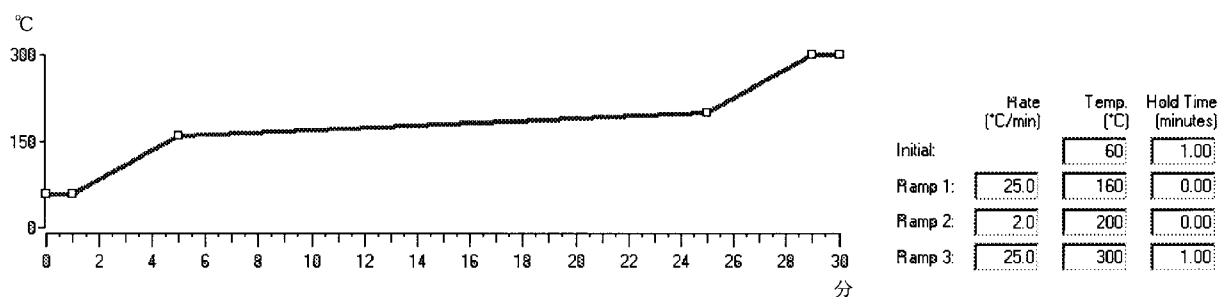


図16 農薬類のGC/MS分析におけるオープン昇温図

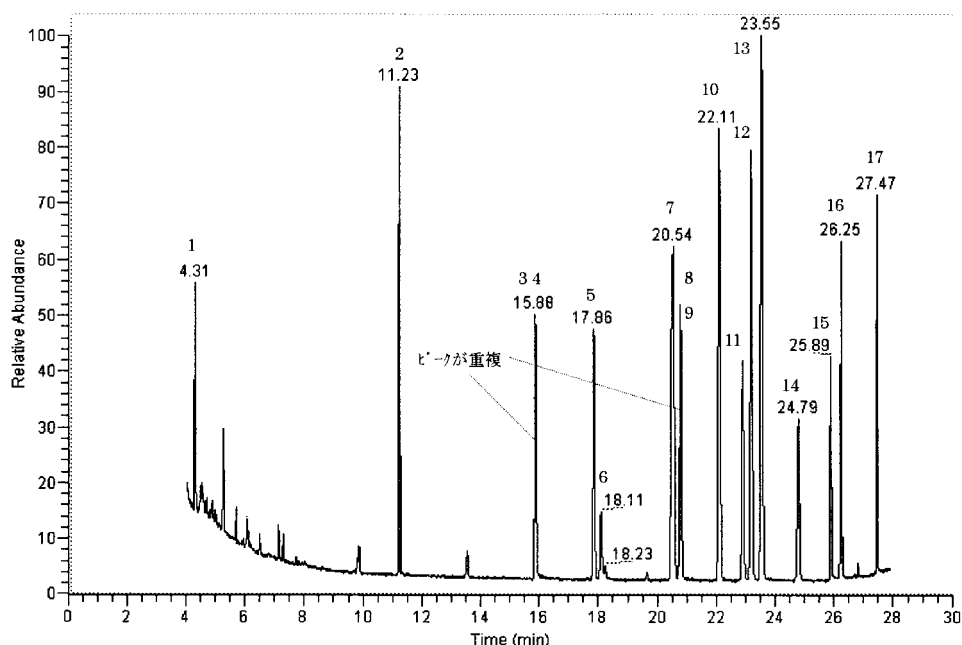


図17 農薬類の標準溶液 (1 µg/ml) のGC/MSクロマトグラム例 (TIC)

ピーク左より 1 DBCP (1,2-ジブロモ-3-クロロプロパン) 2 ヘキサクロロベンゼン 3 ヘプタクロール  
 4 カルバリル (ヘプタクロールとカルバリルはピークが重複) 5 アルドリン 6 マラチオン 7 oxy-クローデン  
 8 cis-ヘプタクロールエポキシド 9 trans-ヘプタクロールエポキシド (cis-ヘプタクロールエポキシドと trans-ヘプタクロールエポキシドはピークが重複) 10 trans-クローデン 11 -エンドスルファン 12 cis-クローデン 13 trans-ノナクロール 14 ディルドリン  
 15 エンドリン 16 -エンドスルファン 17 p,p'-DDT

った。ただ、この2成分はマスペクトルが全く違っているのので、ピークが重複しても定量は可能である。また、ヘプタクロールエポキシドの cis-体、trans-体は異性体であり、保持時間やマスペクトルからは分離定量が困難なので2成分の合計値で計算することにした。

### 5.3.3 検量線

検量線の例を図18に示す。

### 5.3.4 添加回収試験と添加破過試験

添加回収試験と添加破過試験を実施した。石英織

維ろ紙への添加回収試験では概ね50%から100%であった。しかし、DBCP(1,2-ジブromo-3-クロロプロパン)のように0.0%のものがあり、操作過程の不備が原因と考えられる。エムポアディスクろ紙への添加回収試験では概ね55%から90%であった。農薬類の添加破過試験では、概ね70%から110%であった。しかし、なかにはカルバリル41%やマラチオン63%のように低いものもあった。添加回収試験と添加破過試験の結果を図19に示す。

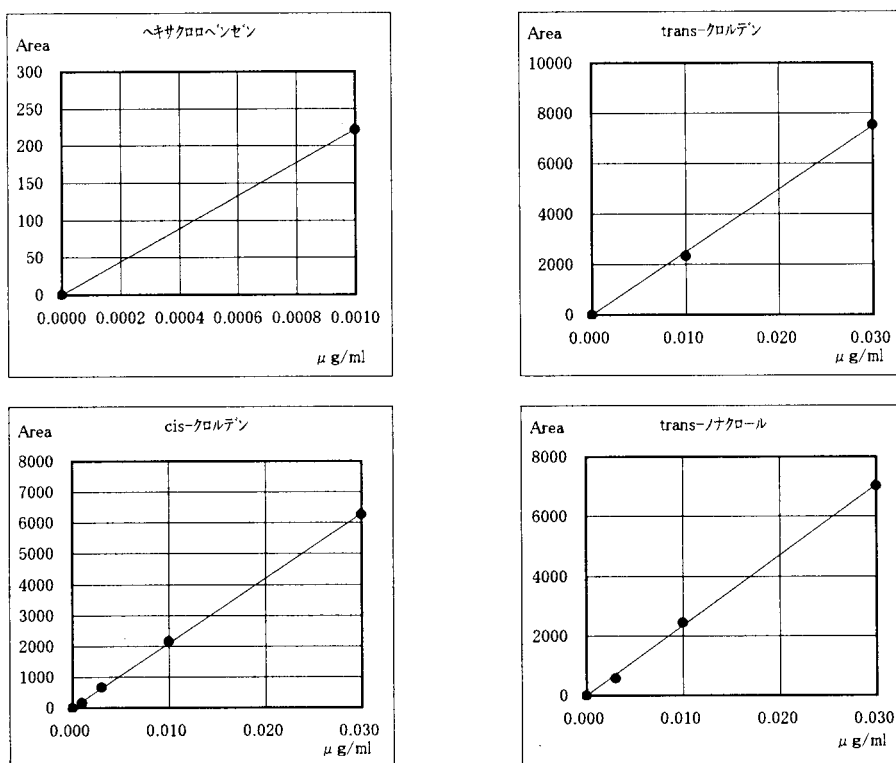
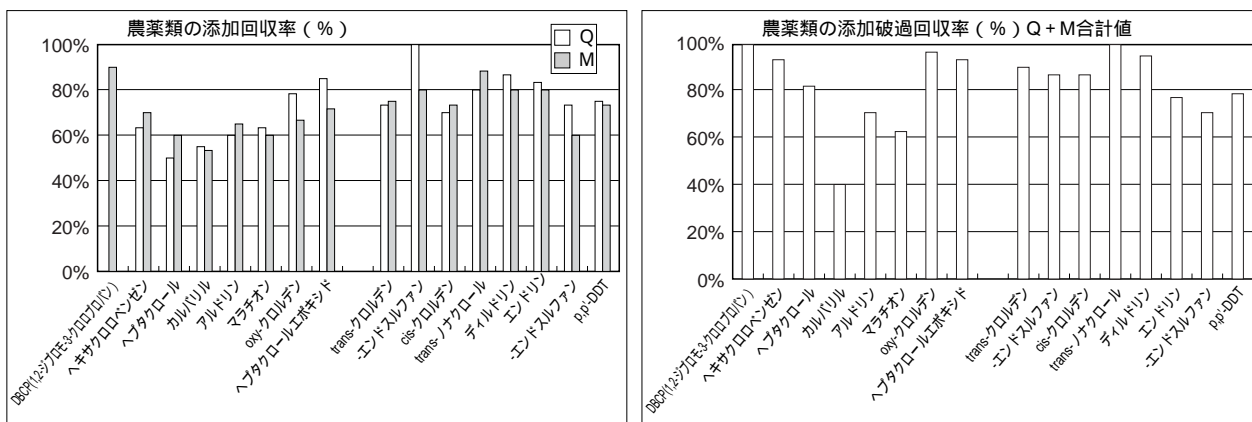


図18 農薬類の検量線の例



Q 石英繊維ろ紙  
M エムポアディスクろ紙

図19 農薬類の添加回収試験および添加破過回収試験

### 5.3.5 濃縮試験

農薬類は大気中濃度が低いため、捕集試料で非濃縮処理と5倍濃縮処理とを比較検討してみたが、農薬17成分のうち、濃縮処理によりピークとなって現れるものもあったが、成分によっては逆に濃縮処理によりピークが消失したのものもあり加熱濃縮処理による揮散が生じたと考えられる。農薬17成分の一括濃縮処理に困難を感じたので、濃縮処理はしなかった。

### 調査結果

全体的にみると、過去の環境庁等の調査結果等と比較して高い値はなかった。

ベンゾ(a)ピレン類およびフタル酸エステル類の調査結果を表7に、農薬類の調査結果を表8に示す。数値は、ダスト状環境ホルモンとガス状環境ホルモンの合計値である。検出されたもの又は痕跡は16物質で、残りの14物質はピークが確認されなかった。特に農薬類はピークが確認されたものはあったが、すべて検出限界未満であった。

検出されたベンゾ(a)ピレン類 3物質の濃度度数分布を図20-1に、フタル酸エステル類 4物質の濃度度数分布を図20-2に示す。それぞれの濃度の範囲を最大値～最小値(単位はng/m<sup>3</sup>)で示すと、ベンゾ(k)フルオランテン0.03～1.18、ベンゾ(a)ピレン0.04～2.39、ベンゾ(ghi)ペリレン0.05～1.98、フタル酸ジエチルND(<0.7)～9.7、フタル酸ジ-i-ブチルND(<0.7)～9.1、フタル酸ジ-n-ブチルND(<10)～151、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルND(<1)～62であった。

ベンゾ(k)フルオランテン、ベンゾ(a)ピレン、ベンゾ(ghi)ペリレンがすべての地点、すべての調査月で検出され、互いに強い正の相関がみられた。これらの相関図を図21に示す。

また、図22に示すとおり、冬季にかけて濃度の高い傾向があったが、これらがものの燃焼に起因することを考えると冬季にボイラー等の燃焼排ガスが増加することと関連があると考えられる。ダスト状環境ホルモンとガス状環境ホルモンを分別捕集した

表7 大気中環境ホルモン等化学物質(ベンゾ(a)ピレン類、フタル酸エステル類)調査結果

(単位: ng/m<sup>3</sup>)

調査地点	調査月	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		ベンゾ(k)フルオランテン	ベンゾ(a)ピレン	ベンゾ(ghi)ペリレン	フタル酸ジエチル	フタル酸ジ-n-プロピル	フタル酸ジ-i-ブチル	フタル酸ジ-n-ブチル	フタル酸ジ-n-ペンチル	フタル酸ジ-n-ヘキシル	フタル酸-n-ブチルベンジル	アジピリン酸ジ-2-エチルヘキシル	フタル酸ジクロヘキシル	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル
佐伯保健所	8月	0.03	0.07	0.10	4.4	ND	2.0	23	ND	ND	ND	ND	ND	26
大分県衛生環境研究センター	8月	0.12	0.22	0.21	4.9	ND	ND*	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	5.3
大分土木事務所	8月	0.34	0.70	0.51	5.1	ND	ND*	48	ND	ND	ND	ND	ND	17
大分市保健所	8月	0.25	0.48	0.44	3.7	ND	1.6	42	ND	ND	ND	ND	ND	62
中津保健所	8月	0.15	0.33	0.29	2.4	ND	1.4	88	ND	ND	ND	ND	ND	11
日田玖珠保健所	8月	0.04	0.04	0.05	3.8	ND	3.0	100	ND	ND	ND	ND	ND	9.3
佐伯保健所	10月	0.13	0.20	0.27	9.7	ND	3.8	151	ND	ND	ND	ND	ND	14
大分県衛生環境研究センター	10月	0.23	0.42	0.38	6.1	ND	ND*	33	ND	ND	ND	ND	ND	4.3
大分土木事務所	10月	0.73	1.03	0.98	3.2	ND	ND*	21	ND	ND	ND	ND	ND	17
大分市保健所	10月	0.51	0.77	0.66	2.5	ND	ND*	19	ND	ND	ND	ND	ND	23
中津保健所	10月	0.09	0.16	0.19	1.5	ND	ND*	36	ND	ND	ND	ND	ND	3.7
日田玖珠保健所	10月	0.33	0.63	0.56	1.2	ND	ND	23	ND	ND	ND	ND	ND	8.8
佐伯保健所	12月	0.22	0.48	0.38	1.0	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	6.6
大分県衛生環境研究センター	12月	0.18	0.35	0.28	ND*	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	4.3
大分土木事務所	12月	0.34	0.67	0.64	1.1	ND	ND	ND*	ND*	ND	ND	ND	ND	4.9
大分市保健所	12月	0.24	0.50	0.53	ND*	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	7.2
中津保健所	12月	0.30	0.41	0.52	1.0	ND	ND	13	ND	ND	ND	ND	ND	4.2
日田玖珠保健所	12月	0.72	1.46	1.44	1.8	ND	ND	14	ND	ND	ND	ND	ND	7.6
佐伯保健所	2月	0.13	0.26	0.27	2.0	0.72	ND*	ND*	ND	ND	ND*	ND	ND	ND*
大分県衛生環境研究センター	2月	0.08	0.15	0.19	1.6	ND	ND*	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	3.6
大分土木事務所	2月	0.71	1.54	1.47	3.0	ND	ND*	20	ND	ND	ND	ND	ND	9.3
大分市保健所	2月	1.18	2.39	1.98	3.7	ND	ND*	15	ND	ND	ND	ND	ND	12
中津保健所	2月	0.30	0.59	0.60	1.5	ND	9.1	94	ND	ND	ND	ND	ND	4.9
日田玖珠保健所	2月	0.60	1.03	1.52	2.4	ND	6.8	64	ND	ND	ND	ND	ND	11
検出限界値	-	0.01	0.01	0.01	0.7	0.7	0.7	10	1	0.7	1	1	1	1

ND\* 検出限界値未満であったが、ピークの確認されたもの

ND ピークがまったく確認されなかったもの

表8 大気中環境ホルモン等化学物質(農薬類)調査結果

(単位: ng/m<sup>3</sup>)

調査地点	調査月	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17
		DBCP (1,2-ジ ブromo-3- クロロブ ロパン)	ヘキサ クロロ ベンゼ ン	ヘプタ クロル	カルバ リル	アルド リン	マラチ オン	oxy-ク ロルデ ン	cis,trans- ヘプタ クロル エ ホキシド 合計値	trans- クロル デン	-エン ドスル ファン	cis-ク ロルデ ン	trans- ノナク ロール	ディル ドリン	エンド リン	-エン ドスル ファン	p,p'- DDT
佐伯保健所	8月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND
大分県衛生環境研究センター	8月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
大分土木事務所	8月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
大分市保健所	8月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
中津保健所	8月	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND
日田玖珠保健所	8月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND
佐伯保健所	10月	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND*	ND*	ND	ND	ND	ND
大分県衛生環境研究センター	10月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
大分土木事務所	10月	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
大分市保健所	10月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
中津保健所	10月	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND
日田玖珠保健所	10月	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
佐伯保健所	12月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND
大分県衛生環境研究センター	12月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND
大分土木事務所	12月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
大分市保健所	12月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
中津保健所	12月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
日田玖珠保健所	12月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
佐伯保健所	2月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
大分県衛生環境研究センター	2月	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND
大分土木事務所	2月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND
大分市保健所	2月	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
中津保健所	2月	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
日田玖珠保健所	2月	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
検出限界値	-	2.3	0.3	2.3	2.3	1	1	10	1	0.5	7	0.3	0.3	5	5	5	0.7

ND\* 検出限界値未満であったが、ピークの確認されたもの ND ピークがまったく確認されなかったもの

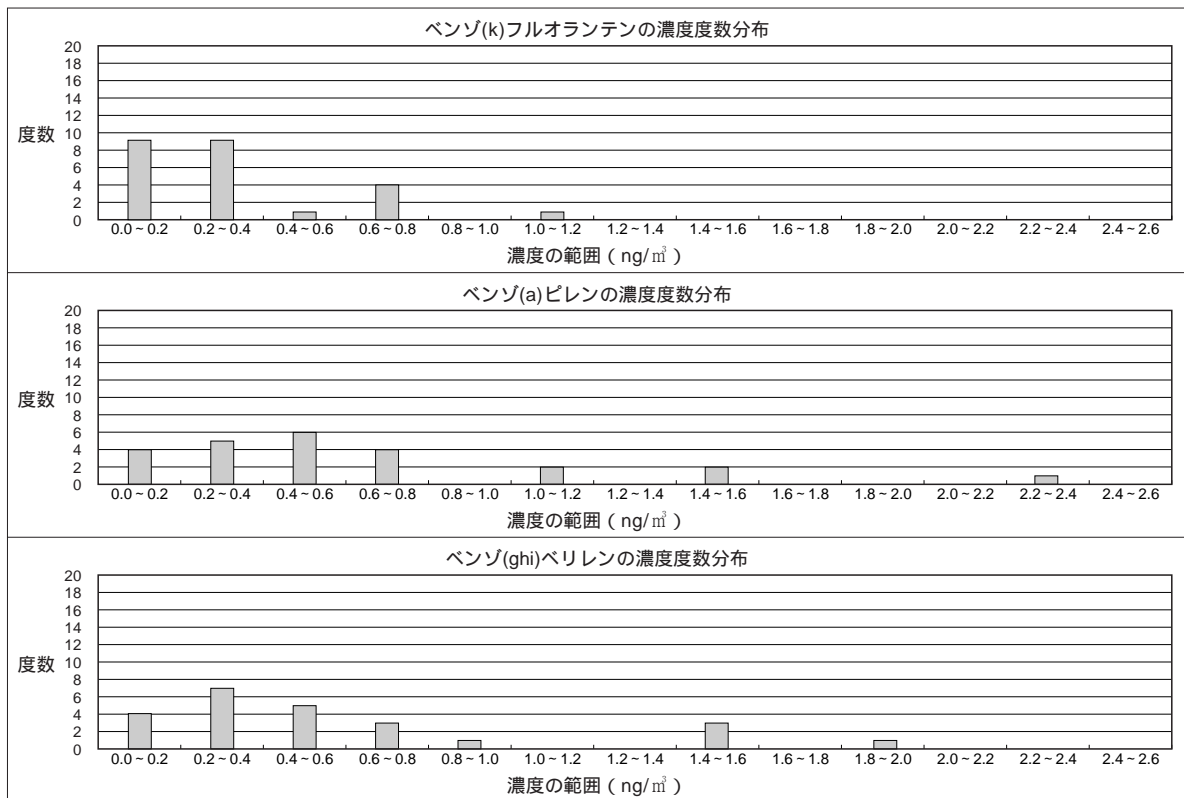


図20-1 ベンゾ(a)ピレン類の濃度度数分布

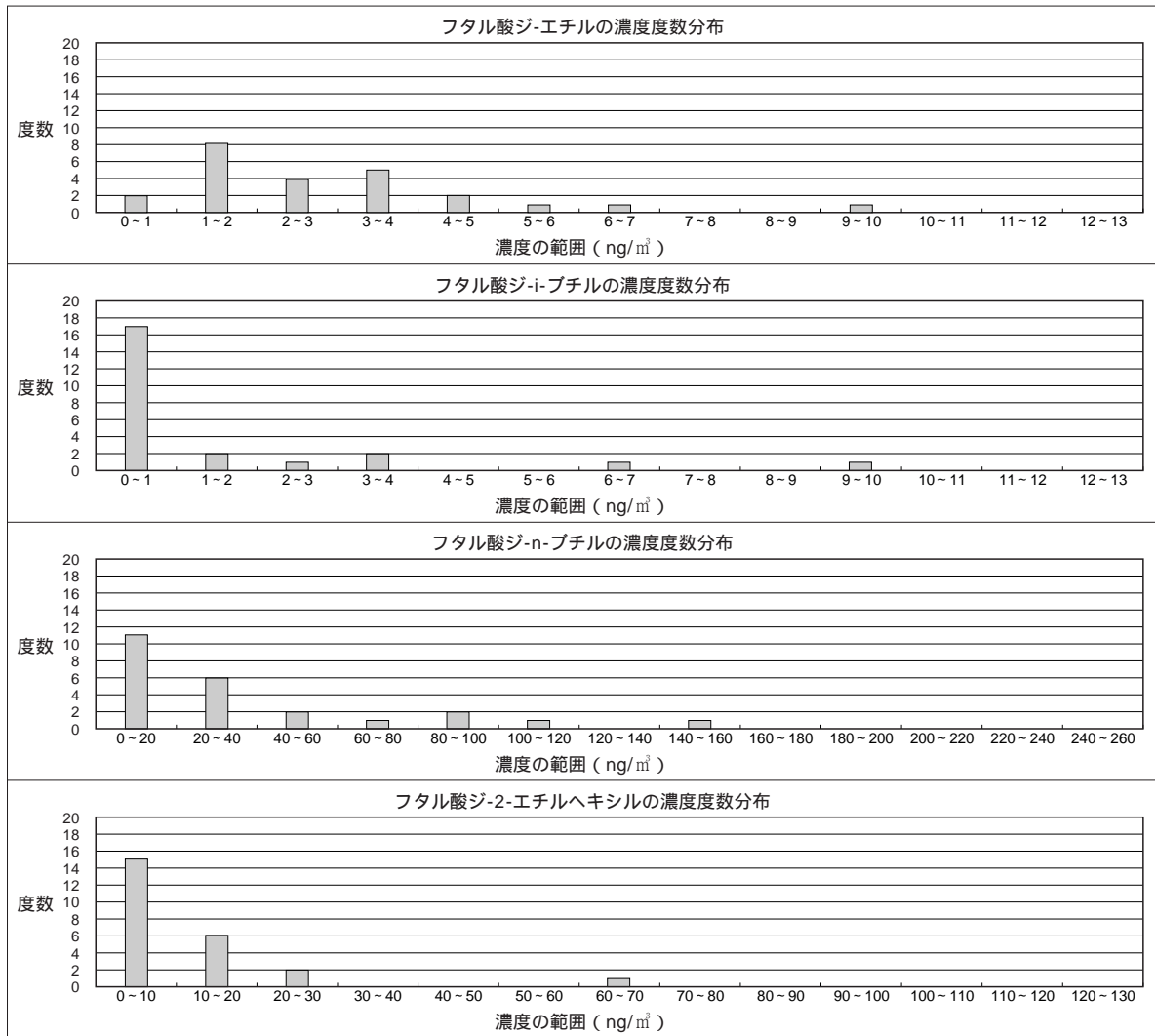


図20-2 フタル酸エステル類の濃度度数分布

結果を図 23 に示す。いずれの物質も、ほとんどダスト状であることがわかった。グラフには現れていないが、夏季は数値としてガス状のものもわずかに存在していた。

フタル酸エステル類では、フタル酸ジエチル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルがほとんどすべての地点、調査月で検出され、フタル酸ジ-i-ブチルがこれらに次いで検出された。変動はあるものの全体的にみると、夏季に濃度が高く冬季に低い傾向がみられた。これは高い気温の夏季に大気中への揮散が増加するためと考えられる。季節変動の結果を図 24 に示す。また検出された 3 項目について相関図を作成したが、図 25 に示すとおり相関はまったくなかった。ダスト状環境ホルモンとガス状環境ホルモンを分別捕集した結果を図 26 に示す。分子量の小さいフタル酸ジエチル、フタル

酸ジ-i-ブチルやフタル酸ジ-n-ブチルはガス状が多く分子量の大きいフタル酸ジ-2-エチルヘキシルはほとんどがダスト状で存在することがわかった。2000 年 8 月と 10 月の調査では、ガス状のフタル酸ジ-2-エチルヘキシルもわずかに検出された。

農薬類ではヘキサクロロベンゼン、ヘプタクロルエポキシド、trans-クロルデン、cis-クロルデン、trans-ノナクロールのピークが確認されたが、他の物質はまったくピークが確認されなかった。農薬類については大気中の濃度が低いため今回の調査では、その存在形態がはっきりしなかった。

## ま と め

ベンゾ(a)ピレン類は常時検出された。標準溶液の添加破過試験で破過等が生じていると考えられる



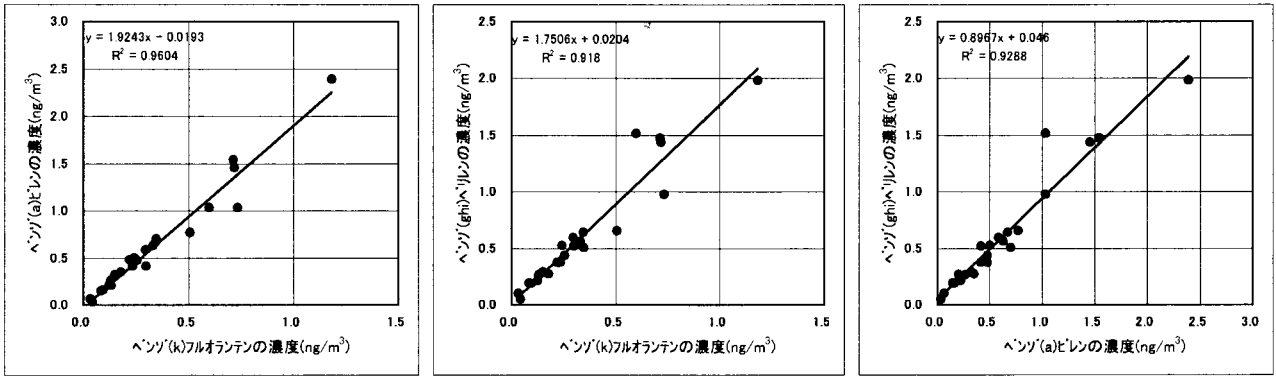


図21 ベンゾ(k)フルオランテン、ベンゾ(a)ピレン、ベンゾ(ghi)ペリレンの相関図

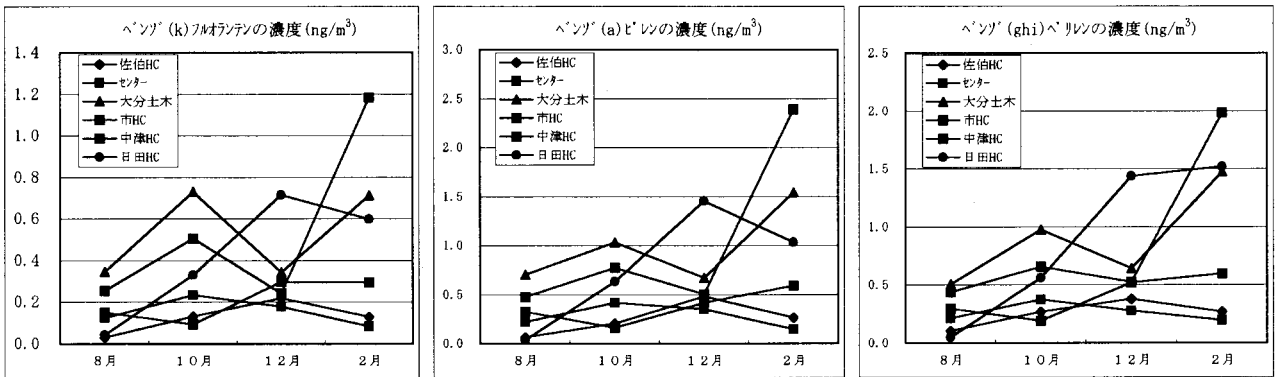


図22 ベンゾ(k)フルオランテン、ベンゾ(a)ピレン、ベンゾ(ghi)ペリレンの濃度の季節変動

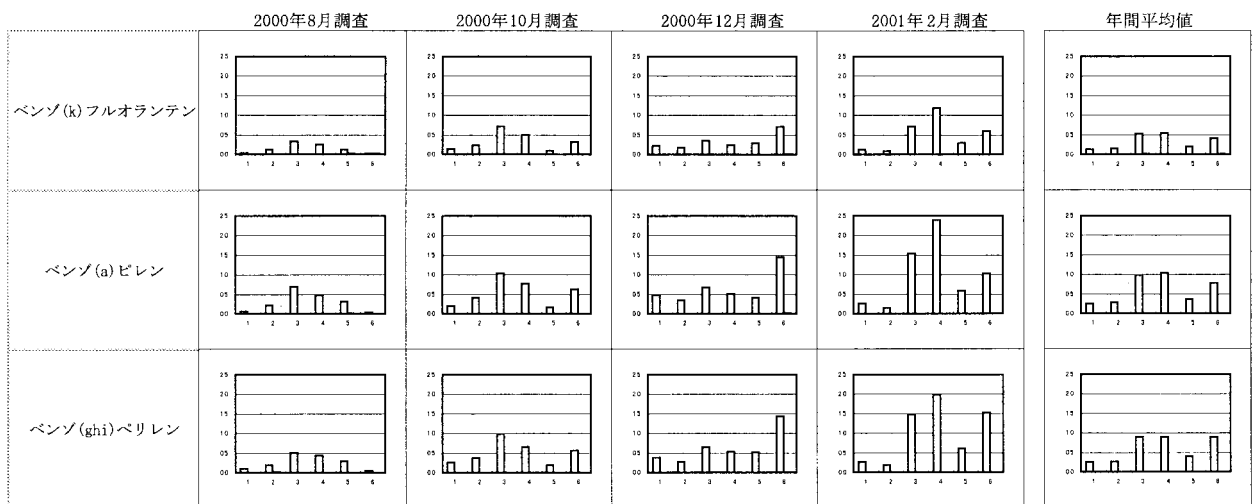


図23 ベンゾ(a)ピレン類のダスト状濃度とガス状濃度

縦軸は濃度 (ng/m<sup>3</sup>)  
 横軸は左より 1 佐伯保健所 2 大分県衛生環境研究センター 3 大分土木事務所 4 大分市保健所 5 中津保健所 6 日田玖珠保健所

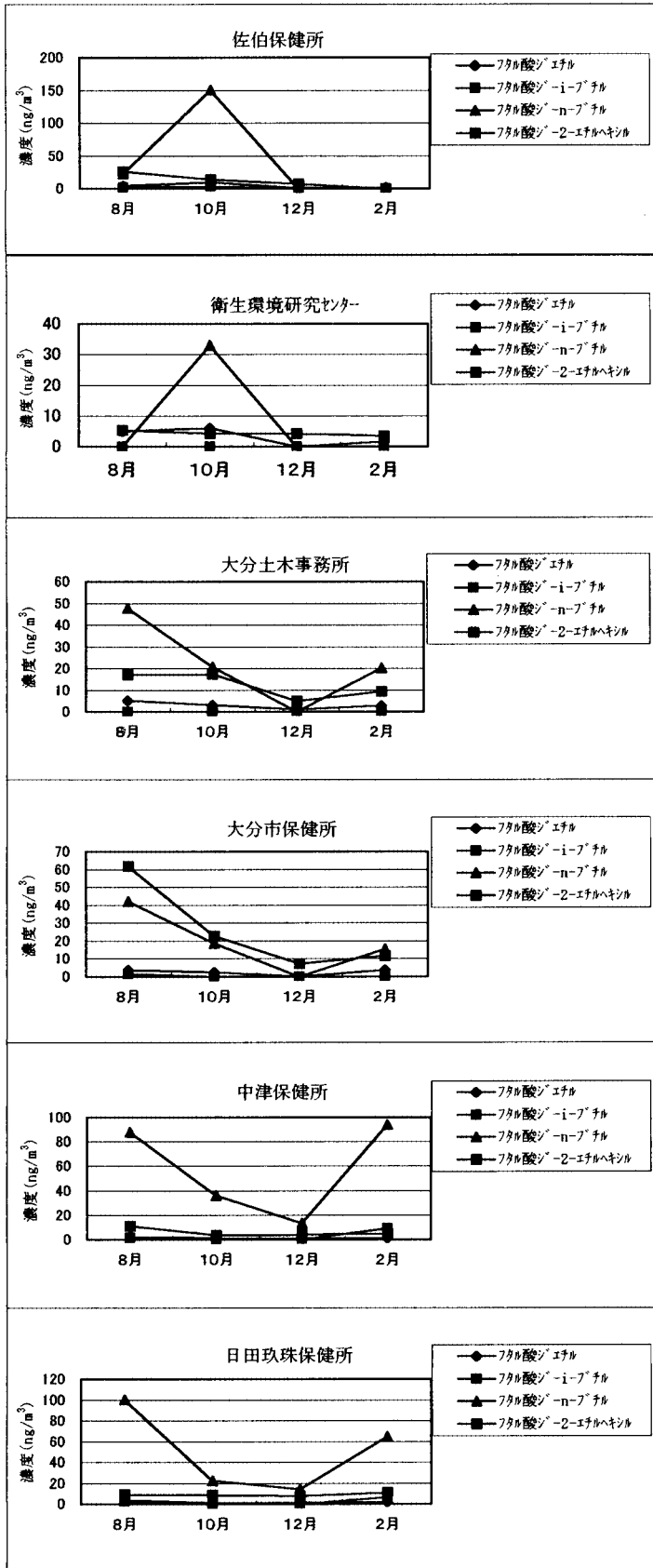


図24 フタル酸エステル類の濃度の季節変動

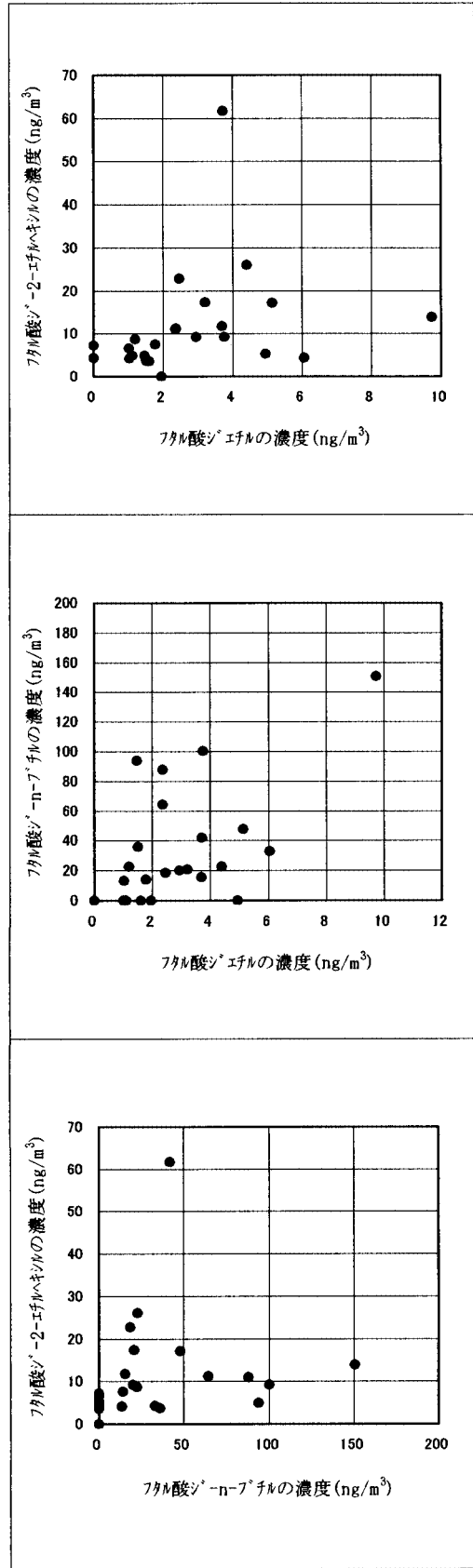


図25 フタル酸エステル類の濃度の相関図

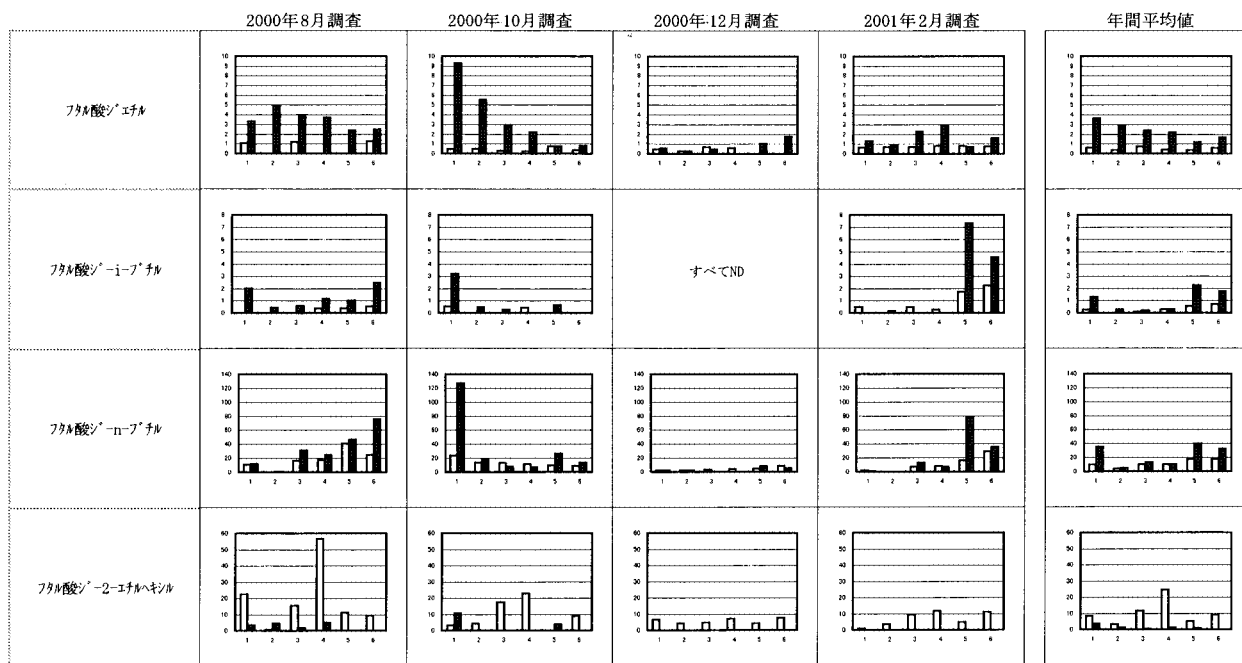


図26 フタル酸エステル類のダスト状濃度とガス状濃度

縦軸は濃度 (ng/m<sup>3</sup>)

横軸は左より1佐伯保健所 2大分県衛生環境研究センター 3大分土木事務所 4大分市保健所 5中津保健所 6日田玖珠保健所

ダスト状 ガス状

結果となった。ブランク値および分析操作での汚染は確認されなかった。

フタル酸エステル類のブランク試験では、分析操作の短縮化によりフタル酸ジ-n-ブチルのみ検出された。フタル酸ジ-n-ブチルは、ブランク値がほぼ一定で、実際の調査で支障がでることはなかった。

農薬類では、濃度が低く数値に現れるものはなかったが、5物質が微量存在していることが確認された。ベンゾ(a)ピレン類と同様に、ブランク値および分析操作での汚染は確認されなかった。

### 問題点

1段目の石英繊維ろ紙にダスト状として捕集された環境ホルモンは時間の経過とともに破過が生じ、2段目のエムポアディスクろ紙に再捕集される可能性は十分考えられる。この場合、ダスト状がガス状として評価されることになる。特に蒸気圧の高い物質で気温の高い夏季においては、この傾向が高まると考えられるが、今回の調査では未検討である。ベンゾ(a)ピレン類、フタル酸エステル類、農薬類とも、捕集方法における添加破過試験では、1段目の石英繊維ろ紙に標準物質を一定量添加し、これに2段目のエムポアディスクろ紙を重ねて通気した。その結果、2段目のエムポアディスクろ紙からも標準

物質が検出されており、この試験では1段目の石英繊維ろ紙からの破過が生じているのが確認されたので、今後の検討事項である。

今回の調査で大気中環境ホルモン等化学物質の存在の有無や濃度レベルの概要が把握できたと考えられるが、濃度レベルを含め地域特性や季節変動等については、さらにデータの蓄積が必要である。

### 謝辞

技術的な助言をいただきました川崎市公害研究所の小塚氏と鈴木氏、(財)日本環境衛生センターの根津氏、北九州市環境科学研究所の花田氏に対して感謝いたします。また関係各保健所、大分土木事務所の方々には調査にあたってご協力をいただきました。

### 参考文献

- ベンゾ(a)ピレン類関連
- 1) 大気粉じん中のベンゾ(a)ピレンの測定方法：環境庁有害大気汚染物質調査マニュアル
  - 2) 阿字弘明、織間瑞保、倉重千恵子：高速液体クロマトグラフ (HPLC) によるベンゾ(a)ピレン類の測定に関する2、3の知見 (ムラタ計測

- 器サービス株式会社技術報文)、環境と測定技術,25(3),17-25(1998)
- 3) 浦木陽子、鈴木茂:吸着剤を用いた多環芳香族化合物の捕集及び分析方法、環境化学,8(4),797-805(1998)
  - 4) 高橋ゆかり、雨谷敬史、松下秀鶴:蒸気状及び粒子状多環芳香族炭化水素による室内及び大気環境の汚染状況、環境化学,8(1),71-87(1998)
  - 5) 松下秀鶴、高橋ゆかり、雨谷敬史:タイ国チェンマイ市の沿道大気中の多環芳香族炭化水素、環境化学,8(1),63-70(1998)
  - 6) 鈴木茂ほか:大気中多環芳香族炭化水素の分析法の検討、大気環境学会,1998
  - 7) 鈴木茂ほか:大気中多環芳香族炭化水素類の測定法の検討、大気環境学会,1995
  - 8) 浦木陽子:神奈川県臨海地区における多環芳香族炭化水素の大気中濃度測定、大気環境学会,1998
  - 9) 嵐谷奎一:北九州地区の多環芳香族炭化水素濃度推移、大気汚染学会誌,26(1),23~28,1991
  - 10) 大気中の多環芳香族の分析、GLサイエンス技術資料、環境分析応用例 p.102
- フタル酸エステル類関連
- 11) 小塚義昭、鈴木茂:大気中のフタル酸エステル、アジピン酸エステル、リン酸エステルの同時分析法、川崎市公害研究所年報,23,10-15(1997)
  - 12) 斎藤育江、瀬戸博:空气中フタル酸エステル測定法の検討、環境と測定技術,27(9),64-72(2000)
  - 13) 今中努志(ジーエルサイエンス株):ディスク型固相による新築室内大気中の空気中のフタル酸エステル類の捕集・分析方法
  - 14) 平敏和、竹田菊男、坂本保子、平野耕一郎、藤本武利:クリーンルーム環境中分子状汚染物質の長期挙動調査、第18回空気清浄とコンタミネーションコントロール研究大会平成12年4月20日,21日
  - 15) 試料前処理固相抽出総合カタログ:ジーエルサイエンス株,19-20(1997)
  - 16) 小塚義昭(川崎市公害研究所):活性炭素繊維ろ紙を用いた大気中のプラスチック可塑剤の捕集・分析法、大気汚染学会,1996
  - 17) 小塚義昭、鈴木茂:平成7年度化学物質分析法開発調査報告書(環境庁),pp264-274
- 18) 平成10年度環境庁委託「外因性内分泌攪乱化学物質環境分析調査」フタル酸ジエステル類の採取に係る標準作業手順書:財団法人日本環境衛生センター
- 農薬類関連
- 19) 門田展明、吉川健多郎、深澤達矢、橘治国、清水達雄(北海道大学):固相抽出カートリッジを用いた大気中有機塩素系農薬測定法の検討、大気環境学会,2000
  - 20) 藤本千鶴、吉澤正:固相抽出法による有機塩素系農薬類の分析、環境化学,9(1),11-21(1999)
  - 21) 大気中農薬の分析法:平成3年度化学物質分析法開発調査報告書(環境庁),pp224-234
  - 22) 古庄義明、佐々野僚一(ジーエルサイエンス株)、栗山清治(住友スリーエム株)、松村年郎(国立医薬品食品衛生研究所):ディスク型固相を用いた大気雰囲気中の有機リン化合物類の分析、クリーンテクノロジー,1999.7,pp57-62
  - 23) 昆野信也、斎藤茂雄、杉崎三男、倉田泰人、細野繁雄、渡辺洋一、高橋基之、長森正尚、唐牛聖文:有機塩素剤の環境残留状況、埼玉県環境科学国際センター報,第1号
- その他一般
- 24) 門上希和夫:環境ホルモンと「化学物質と環境」調査、かんきょう,1998年4月号,pp17-20
  - 25) 平成10年度外因性内分泌攪乱化学物質等大気環境調査結果について:環境庁大気保全局大気規制課
  - 26) 柏平伸幸:有害大気汚染物質の今後の取り組みについて、環境と測定技術,28(4),38-46(2001)
  - 27) 柏平伸幸ほか:有害大気汚染物質の二重測定の評価、環境化学,11(1),1-9(2001)

# 環境ホルモンの総量に関する調査 遺伝子組換酵母法による女性ホルモン様物質の総量測定

池辺 豊、溝腰 利男

## Estrogenic Substances Assay by Recombinate Yeast

Yutaka Ikebe, Toshio Mizokoshi

### 要旨

環境ホルモン調査における検体の効果的なスクリーニング法として期待される「遺伝子組換酵母法による女性ホルモン様物質の総量測定法」について、環境試料（平成11・12年採取、県内河川の水道取水10地点）を用いてその試用を行った。その結果、定量限界は0.1ppt以下（ng/l、17 エストラジオールに換算）であった。測定操作も簡便なことからスクリーニング試験法としての有効性が確認できた。また、検体の測定結果はいずれも0.5ppt以下であり、緊急の対応が必要と考えられるレベルではなかった。

### はじめに

21世紀を迎え、環境ホルモン（外因性内分泌攪乱化学物質）の問題が新たな環境課題としてクローズアップされている。

現時点において環境省（SPEED'98）では67物質、日本化学工業会では約140物質を環境ホルモンの疑いのある化学物質としてリストアップしているが、これらは1,000万種を超える化学物質のごく一部であり、今後更にリストは増加していくものと考えられる。

また、これらの化学物質以外にも、医薬品としての合成ホルモン、植物中の成分等の天然物、さらには動物や人間自身のホルモンも環境中に排出されれば環境ホルモンとなりうると考えられており、個々の検体に対し、これらの全ての物質を極微量の領域で定量するには莫大な労力・時間・コストが必要とされる。

他方、動物におけるホルモンの調節作用は多岐にわたるものの、現状で環境ホルモンの影響の事例報告は性ホルモン関連に限られており、TBT（トリブチルスズ）を原因物質とするイボニシ等貝類での雌の雄化事例を除けば、いずれも雄の雌化現象である。

すなわち検体中の女性ホルモン作用の総量を測定

すれば、多数の検体の中から環境ホルモンの影響が懸念されるものを効率的にピックアップできると考えられることから、乳ガン細胞や酵母菌を利用したスクリーニング手法が開発されている。

本研究ではその一つである『遺伝子組換酵母による女性ホルモン様物質の総量測定法』（英国ブルネル大学の Sumptor 教授の開発した酵母株使用、以後「酵母法」と略記）を選択し、県内河川の中で水道利水のある10地点を対象に測定を行い、本測定法の習得と有用性を検討した。

### 材料及び方法

#### 1 測定原理

はじめに酵母法の原理を概説する。

使用する酵母菌には、女性ホルモンの受容体（ヒト・エストロゲン・レセプター=hER）を作る遺伝子を核遺伝子に、ERE（女性ホルモン応答配列）を持つ環状遺伝子を細胞質に組み込んである。hERに検体中の女性ホルモン様物質が結合した（賦活された）ものがEREに認識されると、環状遺伝子内のガラクトシダーゼという酵素を作る部位が活性化される。検体中に酵素と反応して赤色を呈する試薬を入れておき、その変色度合いを既知量の女性ホルモン（17 エストラジオール）に対照させて検体中の女性ホルモン様物質総量を推定する。

## 2 検体の採取方法

### 2-1 採水器具等の準備

現地での採水にはステンレス製のバケツ、手ジョッキを使用。検体は硼珪酸ガラス製ビン（DURAN：ネジ口式、内蓋がテフロン被服のもの）に口一杯に詰め密栓した後、アルミホイルで遮光し、冷蔵保存した。

### 2-2 採水場所

採水地点は表1に示す県内河川10地点とし、11年（10月中）、12年（10・11月）の2度採取した。

酵母法による女性ホルモン様物質総量の測定は、12年度末に2年分を一括して行った。

## 3 培地用試薬とその調整・保存

実験に使用する培地用試薬と調整・保存は旧建設省土木研究所の処方（サンプター教授の処方を一部改変）を基に、培養容器を100mlから300mlの3角フラスコに変更して行った。詳細を別表1に示す。

また、実験に使用した水は蒸留水を純粋製造装置（ミリQ-SP、ミリポア社）に通したものを使用した。

## 4 測定物質の調整

土木研究所の処方に従い、標準・検体とも最終的に20% DMSO水溶液（ジメチルスルホキシド：和光純薬製、生化学用）に調整した。

### 4-1 スタンダード

粉末状の17 エストラジオール（シグマ社製）

を標準として検量線作成用の標準希釈系列を作成した。詳細は別表2に示す。

### 4-2 分析試料

2-2で採水した試料は、土木研究所の処方に従い11年検体は2,000倍、12年検体は5,000倍に濃縮して20% DMSO.aqとした。具体的なフローチャートを図1に示す。測定時には11年検体は5倍、12年検体は3倍の希釈系列として測定を行った。

また今回の測定では、水道利水時の水処理を考慮し、分析にはSS分を除去した検体を供した。

## 5 プレートの作成、測定

測定には96穴プレートを使用した。（図2）

試料のプレートは4等分し（n=3）Aの段には検体の濃縮液原液を、B～Gの段にはその3倍ないしは5倍希釈系列を、Hの段にはブランクとして20% DMSO.apを各々10μl分注する。スタンダードの場合はE～Gの段を使用し（n=4）、1の段にブランクとして20% DMSO.apを、2の段（薄）から12の段（濃）に標準希釈系列を各々10μl分注した。

全ての穴に、前培養した遺伝子組換え酵母を植菌（濃度、約80万 cell/ml）した Assay 培地を200μl分注し（イニシャル時の吸光度を測定した後）、オートクレープテープでプレートの周囲をシールした後30℃で約一週間培養を行い、その間随時、吸光度の測定（波長540nm、650nm、和光純薬製マイクロプレートリーダーMT-max使用）を行った。

なお、所定の方法では1日1回プレートの振盪を行うこととなっているが、今回は吸光度の測定時に

表1 検体の採水地点

No.	採水地点		
1	大分市	白滝橋	（大野川）
2	大分市	府内大橋	（大分川）
3	中津市	市場橋	（山国川）
4	宇佐市	白岩橋	（駅館川）
5	杵築市	長瀬橋下	（八坂川）
6	野津町	野口	（大野川）
7	玖珠町	協心橋	（玖珠川）
8	狭間町	同尻橋	（大分川）
9	庄内町	下武宮	（大分川）
10	三重町	向野橋	（大野川）

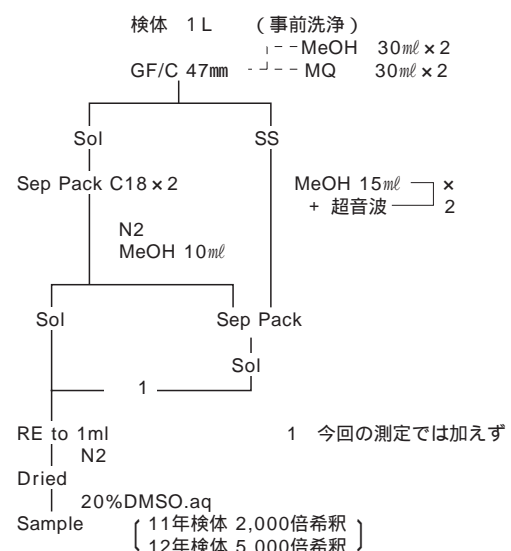


図1 検体の溶媒抽出・濃縮のフローチャート

2度空測定を行い振盪に変えた。

また、実験に使用した酵母株はサンプター教授の許可を得て京都大学の松田博士より頂いた。

### 結果及び考察

測定結果を別表3に示す。(ただし、紙面の容量の都合により、生データではなく波長540nmの吸光度より波長650nmの吸光度を減じ、同一条件の試料について平均化した算出値で表記)

#### 1 菌体の増殖

12年検体測定時の標準希釈系列における菌体の増殖の様子を図3に示す。(96穴プレートでの培養は液体培養ではあるが、観察した限りに於いて菌体の大部分は底部に膜状に沈積しており、別途プレートシェーカーで振盪した際も分散しなかった。従って波長650nmにおける吸光度は菌体量を正確に反映するものではない。) 菌体の増殖は培養期間2~3日で最大値となりそれ以後は漸減している。またその数値は17 エストラジオールの濃度に影響されずほぼ同一である。これに対し検体の濃縮液の希

釈系列を添加した場合、吸光度はブランク(20% DMSO液のみ添加したもの)に対し同等か増加する傾向(これと後述する女性ホルモン様物質総量との間に相関は見られなかった)にあった。その典型例として白滝橋の場合(12年検体)を図4に例示する。吸光度が増加した理由については、検体の濃縮液中の栄養分の影響、雑菌の繁殖等が考えられるが今回の実験ではその点についての確認までは至らなかった。

何れの検体の場合も吸光度の時間変化は標準希釈系列場合と同様のパターン(培養期間の2~3日目が吸光度のピークで以後漸減)で推移しており、今回測定に供した検体では酵母菌の成長に対する阻害作用は無かったものと考えられる。

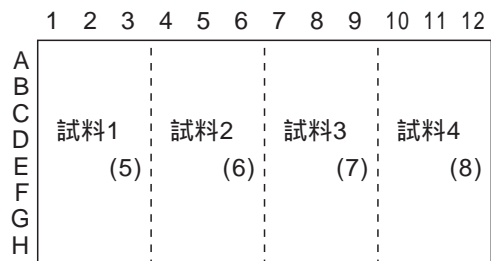
また、ガラクトシダーゼによる発色が、吸光度のピークに前後して著しくなることから、酵素の酵母体外への放出と成長期との関連が推定されるが詳細は今後の検討課題としたい。

#### 2 女性ホルモン様物質総量の算出

##### 2-1 女性ホルモン様物質総量の算出方法

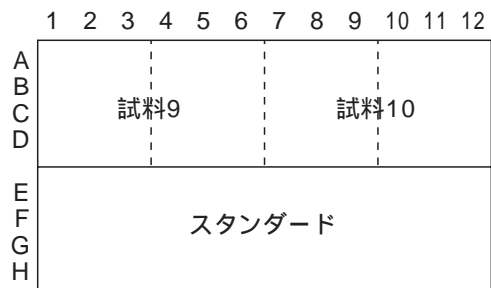
図5に12年検体測定時の標準希釈系列の発色の

試料用プレート



濃度: A(濃) G(薄), Hはブランク(20%DMSOaq)  
11年検体は2,000倍濃縮から5倍希釈系列で調整  
12年検体は5,000倍濃縮から3倍希釈系列で調整

標準希釈系列(スタンダード)用プレート



濃度:  
スタンダードは12(濃) 2(薄)  
試料9は1~3A(濃) 4~6A(薄)  
試料10は7~9A(濃) 10~12A(薄)

図2 プレートの作成法

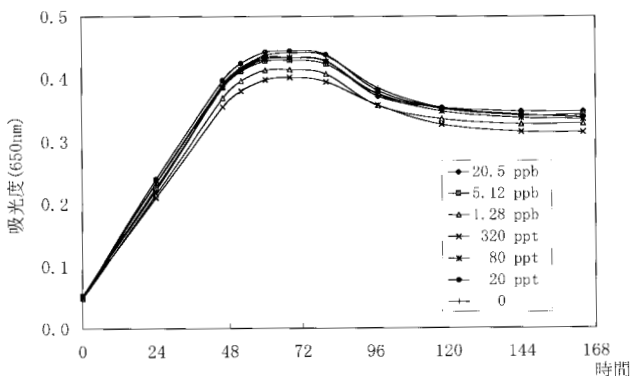


図3 標準希釈系列液中での菌体濃度の時系列変化

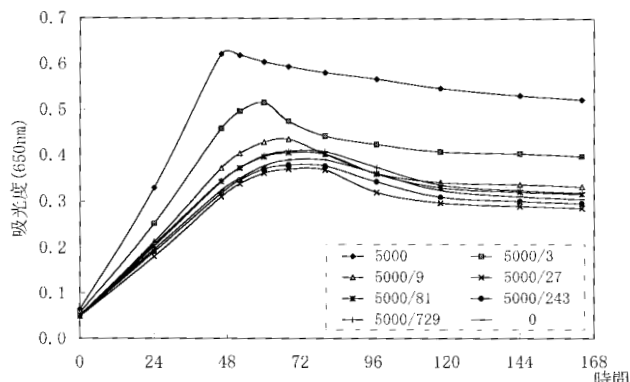


図4 希釈系列液中での菌体濃度の時系列変化

様子を示す。このグラフを任意の時点でX軸に垂直に切断（図中の点線 a）し、17 エストラジオール濃度をX軸にプロットし直すと図6『吸光度 濃度』の検量線が得られる。同一時点で任意の検体（の希釈系列）が吸光度値 b を示す時その検体中の女性ホルモン様物質の総量（濃度）は17 エストラジオールに換算して図6中の c の値（に濃縮率を除いたもの）となる。

## 2-2 分析法の検出下限値

標準希釈系列（12年検体）の測定結果を基に、分析の検出下限値を判断した、結果を表2に示す。

ブランク値の標準偏差の3倍をもって有意差と定義した場合、検出限界は培養5日目で160ppt程度となる。培養日数を延長することで検出下限値をより低く取ることも可能であるが、反面ベースラインが上昇し検量線の有効範囲が狭くなることから、ルーチンの測定の際は5日目前後を測定日とすることが適当と考えられる。（サンプター教授や京大のデータでは吸光度2以上が表示されており、より高濃度域での分解能の高い装置を使い測定を行っていると思われる。）

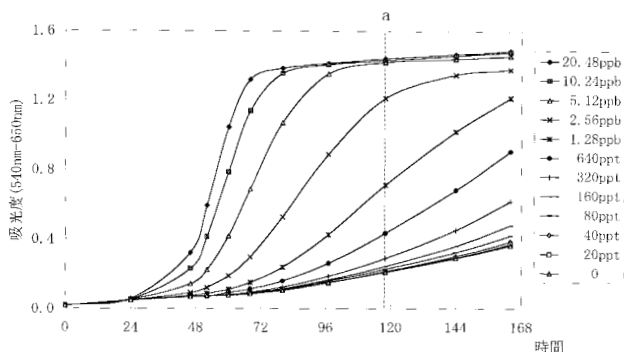


図5 標準系列の発色（H12年）

## 2-3 検体の濃縮限界

12年検体測定時、複数の濃縮段階の試料の数値が検出下限を越え有効と判断される事例があった。それらを表3に示す。

表中の5例全てにおいて、検体を5000倍に濃縮した試料から算出される検体中の女性ホルモン様物質総量の濃度は5000/3倍濃縮した試料から算出されるそれより低下している。その作用機構は未解明であるが、検体の過度の濃縮が反応の阻害要因と成ることは他の文献でも報告されており、この結果から検体の濃縮は2000倍程度が限界と判断した。

このことから実際の検体における女性ホルモン様物質総量の定量下限値を0.1pptに設定した。

## 2-4 測定結果

11年・12年検体の測定結果を表4に示す。

11年・12年検体とも河川中の女性ホルモン様物質総量はND～0.5pptの範囲であった。

## まとめ

11年・12年の2回にわたり、県内10地点の河川水を採取し「遺伝子組換え酵母法による女性ホルモン様物質の総量測定法」の試用を行った。

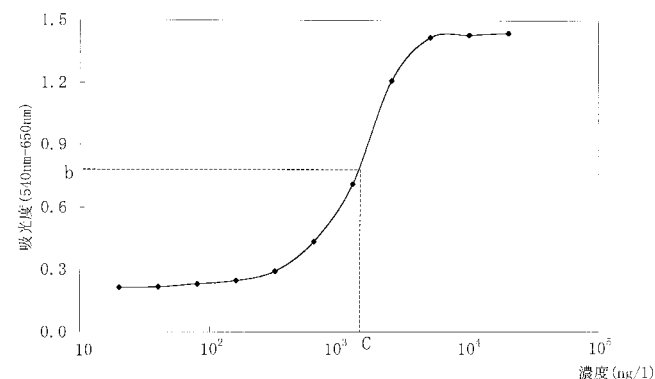


図6 17 エストラジオール濃度 - 吸光度

表2 標準希釈系列（12年）におけるブランク（n=4）の吸光度値の変動と検出下限

	0時間	24	46	52	60	68	80	97	118	144	164
	(日)	(1.0)	(1.9)	(2.2)	(2.5)	(2.8)	(3.3)	(4.0)	(4.9)	(6.0)	(6.8)
ブランク吸光度平均値	0.0175	0.0480	0.0700	0.0733	0.0788	0.0870	0.1070	0.1505	0.2123	0.2913	0.3650
標準偏差：s (変動係数：cv)	0.0006 (3.3)	0.0026 (5.4)	0.0036 (5.1)	0.0039 (5.4)	0.0041 (5.2)	0.0036 (4.1)	0.0036 (3.3)	0.0058 (3.9)	0.0075 (3.5)	0.0088 (3.0)	0.0096 (2.6)
ブランク + 3s	0.0193	0.0558	0.0808	0.0850	0.0911	0.0978	0.1178	0.1679	0.2348	0.3177	0.3938
有意差と判断される 最低濃度（下限値）	該当無	20.48 ppb	2.56 ppb	1.28 ppb	640 ppt	640 ppt	320 ppt	320 ppt	160 ppt	80 ppt	80 ppt

（注）吸光度の数値は何れも（波長 540nm - 650nm）



その結果

環境試料においては、酵母の増殖の遅延等測定の際の障害となる顕著な差異は認められなかった。

ルーチンにおける吸光度測定は1回で良い。

定量下限 0.1ppt

となり、スクリーニング手法としての利便性が確認できた。

また、今回の調査結果を、本県と同一の酵母菌株を用いて行った旧建設省の全国調査結果（延べ119検体。平均値等、具体的な数値は示されていない。また本県調査ではSS分を除去しているため2割程度数値が低く出る）と比較して、10地点とも平均以下の濃度であると推定される。

しかし、東京都の調査研究では、数pptオーダーの河川環境中での鯉の生殖線形態異常の報告もあり調査結果の解釈には今後の関連研究の進展を注意深

く見守ってゆく必要がある。

謝 辞

本研究の実施にあたり、指導助言頂いた京都大学環境質制御研究センターの松田知成博士及び旧建設省土木研究所の各位、さらに組換酵母の使用を認めて頂いた Sumptor 教授に深く感謝致します。

参考文献

松井三郎：第9講 酵母細胞を用いた環境ホルモン様物質の総量測定法の開発、『環境ホルモン汚染対策（NTS）』P221  
 和波一夫、他：多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究(1)、東京都環境科学研究所年報 1999 P212  
 同 (2)、東京都環境科学研究所年報 2000 P150  
 同 (3)、東京都環境科学研究所年報 2000 P165  
 岩崎誠二、他（三重県保健環境研究所）、松田知成：三重県内公共水域におけるエストロゲン様物質の分布、第35回日本水環境学会年会講演集 P240  
 建設省河川局、都市局下水道部：水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果(1998)

表3 検体の濃縮倍率と女性ホルモン様物質総量の算出結果

	白滝橋	府内大橋	市場橋	白岩橋	長瀬橋下
5000倍濃縮	0.37	0.27	0.07	0.06	0.08
5000/ 3	0.51	0.37	0.09	0.08	0.10
5000/ 9	0.57	0.37	- -	- -	- -
5000/27	0.54	- -	- -	- -	- -

(注) - - 吸光度の値がブランク値から有効距離を持たない。

表4 遺伝子組換酵母法による大分県内河川の女性ホルモン様物質総量の調査結果

	白滝橋	府内大橋	市場橋	白岩橋	長瀬橋下	野 口	協心橋	同尻橋	下武宮	向野橋
11年検体	0.1	0.3	< 0.1	0.1	0.2	0.3	0.5	0.3	0.2	0.1
12年検体	0.5	0.4	0.1	< 0.1	0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1

(単位 ppt : ng/l 17 エストラジオール換算)

別表 1

培地組成

<u>Minimal Medium (pH 7.1)</u>	通称：MM 培地
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.61g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>	1.98g
KOH	4.2g
MgSO <sub>4</sub> 溶液	10ml (2,000mg/100ml · H <sub>2</sub> O)
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 溶液	1m (40mg/50ml · H <sub>2</sub> O)
amino acid 溶液	100ml (下記参照)

これらに蒸留水（蒸留後、milli-Qへ）を加え 1l とし、300ml の三角フラスコに 90ml づつ分注する。シリコン栓（or アルミオイル）の上にクラフト紙（or アルミオイル）を被せオートクレーブ（121℃、10min）にかけ、室温で保存。

<u>amino acid 溶液</u>		
L-leucine	250 mg	
L-histidine	50 mg	
adenine	250 mg	
L-arginine-HCl	100 mg	
L-metionine	100 mg	
L-isoleucine	150 mg	
L-lysine-HCl	150 mg	
L-lysine-HCl	150 mg	
L-phenylalanine	125 mg	
L-glutamic acid	500 mg	これらをデュラン瓶中で 500ml の蒸留水に溶解し、121℃、10min オートクレーブにかけ室温で保存。
L-valine	750 mg	
L-serine	1,875 mg	

<u>Vitamin Solution</u>	
Thiamine	10 mg
Pyridoxine	10 mg
Pantothenic acid	10 mg
inositol	50 mg
biotin 溶液 (20mg/100ml · H <sub>2</sub> O)	2.5ml

これらを蒸留水に溶解し 50ml にメスアップ、無菌箱中で 0.2 μ m ミリポアフィルターを通して滅菌済のデュラン瓶に入れ、4℃ で保存。

<u>D-(+)-Glucose (ブドウ糖)</u>	
20% グルコース溶液 (w/v)	121℃ 10min オートクレーブにかけ、室温で保存。

<u>L-Aspartic acid (L-アスパラギン酸)</u>	
400mg/100ml 溶液を調整。	121℃ 10min オートクレーブにかけ、室温で保存。

<u>L-Threonine (L-スレオニン)</u>	
1,200mg/50ml 溶液を調整。	121℃ 10min オートクレーブにかけ、4℃ で保存。

<u>Copper(II) Sulfate (硫酸銅)</u>	
5 水和物 250mg を 50ml に溶解(20mM)する。	0.2 μ m のフィルターを通して室温保存。

<u>CPRG (Chlorophenol red-β-D-garactopyranoside)</u>	
10mg/ml の水溶液を作成する。	0.2 μ m のフィルターを通して 4℃ で保存。
250mg の未開封試薬瓶我ある場合、全量を開けて 25ml にする。	

Growth medium

Minimal Medium (90ml) に、以下5溶液を添加する。

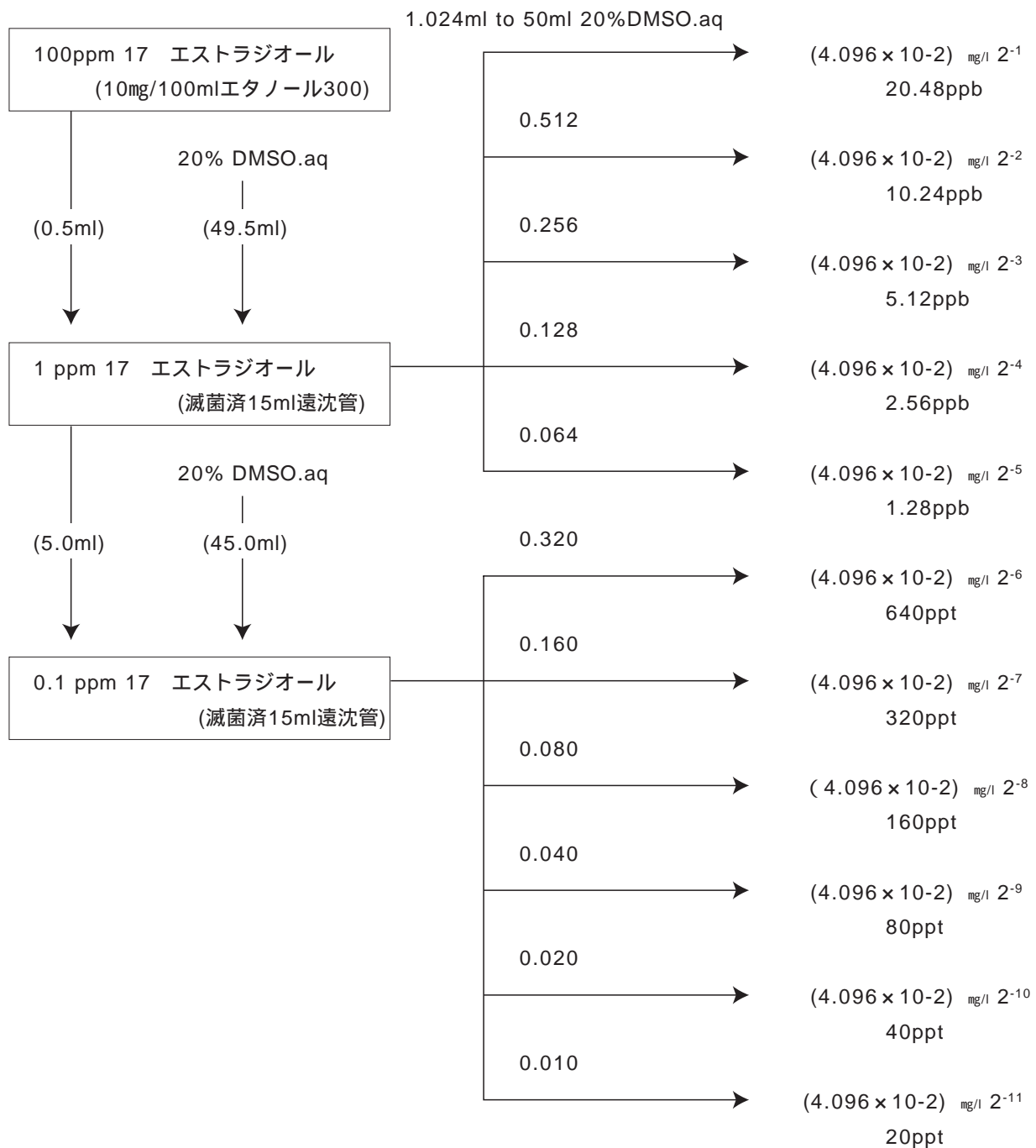
20%グルコース溶液	10ml
L-Aspartic acid	2.5ml
Vitamin Solution	0.2ml
L-Threonine Solution	0.8ml
Copper(Ⅰ) Sulfate Solution	0.25ml

Assay Medium ( Assay 培地 )

新規 Growth medium に CPRG を 1ml 添加、保存 MM 培地より使用時毎に作成する。

別表 2

標準希釈系列の作成



## 別表3

## 平成11年検体 測定結果

試料名	濃度 Or 濃縮率	0時間 (日)	24 (1.0)	46 (1.9)	76 (3.2)	97 (4.0)	119 (5.0)	142 (5.9)	162 (6.8)	189 (7.9)
標準	20.48 ppb	0.016	0.048	0.146	1.362	1.504	1.523	1.544	1.565	1.592
	10.24 ppb	0.016	0.046	0.117	1.175	1.513	1.532	1.554	1.577	1.610
	5.12 ppb	0.017	0.045	0.089	0.665	1.383	1.513	1.536	1.552	1.579
	2.56 ppb	0.017	0.047	0.080	0.292	0.846	1.228	1.435	1.500	1.530
	1.28 ppb	0.017	0.045	0.073	0.151	0.398	0.699	1.032	1.280	1.456
	640 ppt	0.016	0.044	0.070	0.117	0.253	0.441	0.705	0.976	1.276
	320 ppt	0.016	0.042	0.068	0.102	0.186	0.298	0.472	0.677	0.966
	160 ppt	0.016	0.044	0.070	0.100	0.171	0.256	0.381	0.529	0.760
	80 ppt	0.016	0.041	0.066	0.093	0.185	0.254	0.351	0.466	0.642
	40 ppt	0.016	0.042	0.068	0.096	0.139	0.206	0.297	0.406	0.573
	20 ppt	0.016	0.044	0.069	0.096	0.150	0.212	0.294	0.388	0.529
ブランク	0.016	0.047	0.072	0.097	0.171	0.226	0.297	0.375	0.482	
No 1	2000倍濃縮	0.018	0.051	0.078	0.120	0.189	0.273	0.389	0.506	0.636
	2000/ 5	0.016	0.042	0.065	0.099	0.159	0.227	0.316	0.417	0.539
	2000/ 25	0.018	0.042	0.067	0.096	0.151	0.211	0.293	0.387	0.501
	2000/ 125	0.017	0.043	0.068	0.097	0.152	0.210	0.293	0.389	0.504
	2000/ 625	0.016	0.044	0.068	0.098	0.152	0.209	0.291	0.380	0.491
	2000/ 3125	0.017	0.043	0.066	0.095	0.148	0.206	0.286	0.375	0.485
	2000/15625	0.017	0.044	0.067	0.096	0.149	0.208	0.286	0.373	0.480
	ブランク	0.019	0.043	0.067	0.095	0.148	0.208	0.284	0.369	0.465
No 2	2000倍濃縮	0.019	0.058	0.087	0.148	0.251	0.361	0.507	0.664	0.835
	2000/ 5	0.017	0.045	0.070	0.108	0.173	0.247	0.346	0.466	0.618
	2000/ 25	0.017	0.043	0.067	0.098	0.154	0.216	0.303	0.408	0.540
	2000/ 125	0.018	0.042	0.065	0.095	0.148	0.206	0.289	0.387	0.510
	2000/ 625	0.017	0.043	0.067	0.098	0.152	0.209	0.292	0.387	0.505
	2000/ 3125	0.018	0.042	0.065	0.095	0.148	0.203	0.283	0.382	0.509
	2000/15625	0.016	0.045	0.070	0.099	0.154	0.211	0.289	0.380	0.493
	ブランク	0.018	0.045	0.070	0.097	0.151	0.209	0.287	0.378	0.487
No 3	2000倍濃縮	0.019	0.051	0.078	0.117	0.181	0.255	0.357	0.471	0.608
	2000/ 5	0.019	0.047	0.072	0.105	0.165	0.228	0.318	0.422	0.553
	2000/ 25	0.017	0.042	0.066	0.096	0.153	0.213	0.304	0.416	0.554
	2000/ 125	0.016	0.042	0.066	0.097	0.154	0.213	0.301	0.404	0.531
	2000/ 625	0.018	0.043	0.066	0.098	0.154	0.210	0.294	0.394	0.520
	2000/ 3125	0.018	0.044	0.068	0.098	0.153	0.210	0.294	0.396	0.526
	2000/15625	0.018	0.045	0.071	0.100	0.156	0.211	0.292	0.390	0.510
	ブランク	0.017	0.044	0.069	0.099	0.155	0.211	0.291	0.384	0.494
No 4	2000倍濃縮	0.020	0.052	0.080	0.125	0.196	0.273	0.376	0.489	0.618
	2000/ 5	0.017	0.047	0.072	0.105	0.166	0.227	0.313	0.413	0.537
	2000/ 25	0.018	0.043	0.068	0.096	0.151	0.209	0.294	0.396	0.520
	2000/ 125	0.020	0.045	0.068	0.099	0.154	0.211	0.297	0.395	0.518
	2000/ 625	0.019	0.045	0.069	0.099	0.154	0.208	0.292	0.384	0.501
	2000/ 3125	0.018	0.044	0.068	0.098	0.155	0.213	0.294	0.390	0.510
	2000/15625	0.018	0.043	0.067	0.098	0.154	0.209	0.291	0.388	0.505
	ブランク	0.017	0.042	0.066	0.094	0.152	0.207	0.288	0.380	0.484

試料名	濃度 Or 濃縮率	0時間 (日)	24 (1.0)	46 (1.9)	76 (3.2)	97 (4.0)	119 (5.0)	142 (5.9)	162 (6.8)	189 (7.9)
No 5	2000倍濃縮	0.016	0.052	0.082	0.135	0.221	0.314	0.435	0.560	0.701
	2000/ 5	0.017	0.044	0.071	0.105	0.171	0.246	0.346	0.455	0.599
	2000/ 25	0.016	0.043	0.067	0.095	0.155	0.218	0.305	0.400	0.528
	2000/ 125	0.018	0.041	0.065	0.094	0.152	0.211	0.296	0.391	0.511
	2000/ 625	0.017	0.041	0.065	0.092	0.146	0.202	0.282	0.372	0.485
	2000/ 3125	0.018	0.044	0.067	0.095	0.148	0.205	0.285	0.374	0.486
	2000/15625	0.017	0.044	0.069	0.096	0.152	0.210	0.290	0.376	0.487
	ブランク	0.018	0.045	0.070	0.098	0.156	0.213	0.290	0.367	0.459
No 6	2000倍濃縮	0.018	0.054	0.084	0.136	0.229	0.343	0.488	0.640	0.814
	2000/ 5	0.016	0.048	0.075	0.107	0.173	0.251	0.352	0.461	0.611
	2000/ 25	0.018	0.040	0.064	0.092	0.150	0.215	0.302	0.400	0.532
	2000/ 125	0.019	0.040	0.063	0.091	0.148	0.211	0.298	0.394	0.521
	2000/ 625	0.017	0.040	0.063	0.091	0.144	0.203	0.283	0.375	0.498
	2000/ 3125	0.018	0.044	0.068	0.097	0.151	0.209	0.290	0.381	0.501
	2000/15625	0.017	0.046	0.072	0.099	0.154	0.213	0.295	0.384	0.502
	ブランク	0.018	0.046	0.072	0.099	0.156	0.214	0.293	0.374	0.476
No 7	2000倍濃縮	0.019	0.065	0.093	0.161	0.282	0.438	0.640	0.842	1.043
	2000/ 5	0.017	0.050	0.078	0.117	0.193	0.292	0.415	0.543	0.707
	2000/ 25	0.019	0.043	0.068	0.096	0.157	0.226	0.316	0.416	0.553
	2000/ 125	0.018	0.039	0.063	0.089	0.146	0.209	0.292	0.388	0.516
	2000/ 625	0.017	0.042	0.067	0.094	0.148	0.208	0.287	0.377	0.496
	2000/ 3125	0.017	0.043	0.067	0.094	0.149	0.210	0.290	0.377	0.497
	2000/15625	0.017	0.044	0.069	0.093	0.145	0.203	0.280	0.362	0.474
	ブランク	0.018	0.047	0.074	0.100	0.155	0.213	0.288	0.367	0.466
No 8	2000倍濃縮	0.017	0.050	0.079	0.124	0.212	0.329	0.474	0.622	0.791
	2000/ 5	0.017	0.045	0.070	0.097	0.159	0.236	0.332	0.435	0.570
	2000/ 25	0.018	0.039	0.064	0.088	0.140	0.202	0.284	0.373	0.488
	2000/ 125	0.018	0.042	0.065	0.091	0.142	0.203	0.284	0.372	0.487
	2000/ 625	0.017	0.044	0.068	0.093	0.144	0.206	0.287	0.374	0.487
	2000/ 3125	0.017	0.046	0.071	0.096	0.149	0.212	0.292	0.379	0.493
	2000/15625	0.017	0.041	0.064	0.087	0.136	0.193	0.267	0.345	0.451
	ブランク	0.017	0.041	0.066	0.090	0.140	0.197	0.268	0.349	0.453
No 9	2000倍濃縮	0.018	0.051	0.080	0.118	0.211	0.316	0.447	0.576	0.737
	2000/ 5	0.016	0.047	0.075	0.104	0.168	0.233	0.315	0.406	0.534
	2000/ 25	0.016	0.044	0.068	0.096	0.152	0.210	0.282	0.366	0.487
	2000/ 125	0.017	0.043	0.066	0.095	0.149	0.206	0.277	0.360	0.478
	2000/ 625	0.017	0.041	0.064	0.092	0.147	0.205	0.281	0.365	0.488
	2000/ 3125	0.016	0.042	0.065	0.095	0.148	0.206	0.281	0.368	0.491
	2000/15625	0.015	0.041	0.066	0.094	0.147	0.205	0.278	0.360	0.482
	ブランク	0.016	0.043	0.068	0.093	0.150	0.206	0.279	0.357	0.470
No 10	2000倍濃縮	0.019	0.047	0.076	0.108	0.181	0.265	0.376	0.455	0.652
	2000/ 5	0.016	0.049	0.076	0.106	0.167	0.231	0.315	0.376	0.537
	2000/ 25	0.017	0.043	0.067	0.096	0.150	0.210	0.286	0.345	0.494
	2000/ 125	0.017	0.040	0.065	0.092	0.146	0.205	0.281	0.340	0.489
	2000/ 625	0.015	0.047	0.074	0.101	0.158	0.219	0.296	0.354	0.501
	2000/ 3125	0.017	0.045	0.070	0.098	0.153	0.213	0.289	0.349	0.492
	2000/15625	0.016	0.044	0.069	0.096	0.150	0.209	0.284	0.348	0.485
	ブランク	0.016	0.044	0.071	0.096	0.153	0.210	0.284	0.332	0.471

平成12年検体 測定結果

試料名	濃度 Or 濃縮率	0時間 (日)	24 (1.0)	46 (1.9)	52 (2.2)	60 (2.5)	68 (2.8)	80 (3.3)	97 (4.0)	118 (4.9)	144 (6.0)	164 (6.8)
標準	20.48 ppb	0.018	0.057	0.324	0.592	1.047	1.318	1.384	1.411	1.439	1.466	1.485
	10.24 ppb	0.018	0.054	0.232	0.414	0.786	1.138	1.354	1.404	1.430	1.457	1.478
	5.12 ppb	0.018	0.052	0.143	0.225	0.418	0.687	1.072	1.350	1.418	1.438	1.454
	2.56 ppb	0.018	0.048	0.093	0.122	0.191	0.300	0.527	0.890	1.211	1.345	1.375
	1.28 ppb	0.017	0.047	0.076	0.087	0.113	0.152	0.241	0.427	0.712	1.021	1.214
	640 ppt	0.017	0.048	0.074	0.070	0.094	0.115	0.161	0.263	0.435	0.681	0.907
	320 ppt	0.018	0.046	0.069	0.073	0.083	0.095	0.126	0.188	0.291	0.453	0.617
	160 ppt	0.018	0.048	0.070	0.074	0.081	0.092	0.117	0.167	0.246	0.361	0.480
	80 ppt	0.018	0.047	0.070	0.074	0.079	0.090	0.113	0.161	0.230	0.326	0.420
	40 ppt	0.017	0.047	0.069	0.072	0.078	0.086	0.108	0.152	0.215	0.303	0.387
	20 ppt	0.017	0.047	0.069	0.072	0.078	0.087	0.106	0.151	0.213	0.295	0.373
	ブランク	0.018	0.048	0.070	0.073	0.079	0.087	0.107	0.151	0.212	0.291	0.365
No 1	5000倍濃縮	0.021	0.061	0.090	0.106	0.139	0.204	0.346	0.614	0.932	1.187	1.267
	5000/ 3	0.017	0.050	0.077	0.082	0.089	0.111	0.164	0.277	0.497	0.802	1.008
	5000/ 9	0.019	0.045	0.067	0.072	0.078	0.087	0.112	0.157	0.247	0.416	0.572
	5000/ 27	0.021	0.042	0.061	0.065	0.070	0.078	0.096	0.131	0.186	0.287	0.379
	5000/ 81	0.021	0.044	0.065	0.069	0.074	0.081	0.098	0.133	0.183	0.270	0.347
	5000/243	0.022	0.042	0.061	0.064	0.070	0.077	0.092	0.125	0.172	0.253	0.324
	5000/729	0.021	0.044	0.062	0.067	0.072	0.079	0.094	0.128	0.175	0.252	0.319
	ブランク	0.019	0.042	0.061	0.065	0.070	0.077	0.092	0.126	0.173	0.246	0.306
No 2	5000倍濃縮	0.015	0.048	0.074	0.082	0.093	0.119	0.199	0.414	0.756	1.099	1.249
	5000/ 3	0.019	0.047	0.068	0.076	0.083	0.093	0.120	0.189	0.343	0.639	0.874
	5000/ 9	0.017	0.046	0.066	0.072	0.079	0.087	0.106	0.147	0.217	0.353	0.484
	5000/ 27	0.024	0.043	0.062	0.067	0.073	0.081	0.098	0.135	0.192	0.294	0.388
	5000/ 81	0.021	0.042	0.061	0.066	0.072	0.079	0.095	0.130	0.181	0.270	0.352
	5000/243	0.023	0.041	0.060	0.065	0.070	0.078	0.092	0.126	0.175	0.258	0.334
	5000/729	0.021	0.045	0.065	0.070	0.075	0.081	0.096	0.129	0.175	0.248	0.312
	ブランク	0.020	0.044	0.063	0.068	0.072	0.074	0.094	0.129	0.177	0.254	0.319
No 3	5000倍濃縮	0.024	0.054	0.081	0.087	0.090	0.107	0.123	0.175	0.275	0.441	0.582
	5000/ 3	0.020	0.046	0.068	0.074	0.080	0.078	0.104	0.143	0.206	0.313	0.413
	5000/ 9	0.017	0.046	0.066	0.072	0.078	0.083	0.101	0.138	0.192	0.282	0.363
	5000/ 27	0.022	0.054	0.063	0.069	0.074	0.084	0.097	0.133	0.186	0.271	0.349
	5000/ 81	0.021	0.043	0.063	0.067	0.073	0.074	0.097	0.131	0.183	0.265	0.341
	5000/243	0.020	0.044	0.064	0.069	0.075	0.082	0.096	0.131	0.179	0.259	0.333
	5000/729	0.020	0.047	0.067	0.074	0.079	0.077	0.101	0.137	0.187	0.265	0.336
	ブランク	0.020	0.045	0.063	0.068	0.073	0.067	0.094	0.131	0.177	0.251	0.317
No 4	5000倍濃縮	0.022	0.055	0.079	0.085	0.091	0.101	0.127	0.180	0.269	0.407	0.526
	5000/ 3	0.018	0.051	0.071	0.079	0.084	0.092	0.108	0.143	0.214	0.312	0.403
	5000/ 9	0.020	0.048	0.066	0.073	0.078	0.086	0.103	0.143	0.197	0.282	0.361
	5000/ 27	0.020	0.047	0.065	0.072	0.078	0.085	0.101	0.136	0.187	0.266	0.339
	5000/ 81	0.021	0.046	0.065	0.072	0.079	0.084	0.099	0.135	0.183	0.260	0.333
	5000/243	0.020	0.047	0.066	0.072	0.077	0.084	0.099	0.136	0.185	0.261	0.332
	5000/729	0.019	0.048	0.067	0.073	0.078	0.084	0.099	0.138	0.185	0.259	0.328
	ブランク	0.020	0.046	0.065	0.069	0.075	0.079	0.097	0.134	0.180	0.252	0.313

試料名	濃度 Or 濃縮率	0時間 (日)	24 (1.0)	46 (1.9)	52 (2.2)	60 (2.5)	68 (2.8)	80 (3.3)	97 (4.0)	118 (4.9)	144 (6.0)	164 (6.8)
No 5	5000倍濃縮	0.021	0.054	0.080	0.086	0.094	0.111	0.145	0.216	0.337	0.513	0.659
	5000/ 3	0.020	0.048	0.071	0.076	0.084	0.094	0.119	0.172	0.253	0.384	0.504
	5000/ 9	0.018	0.041	0.063	0.069	0.076	0.086	0.109	0.157	0.226	0.341	0.447
	5000/ 27	0.018	0.041	0.063	0.068	0.076	0.086	0.109	0.157	0.224	0.334	0.435
	5000/ 81	0.017	0.046	0.067	0.072	0.080	0.090	0.112	0.157	0.221	0.320	0.413
	5000/243	0.019	0.045	0.068	0.073	0.080	0.092	0.117	0.163	0.227	0.326	0.417
	5000/729	0.017	0.043	0.065	0.069	0.076	0.087	0.110	0.155	0.219	0.316	0.405
	ブランク	0.018	0.041	0.060	0.065	0.072	0.084	0.106	0.151	0.215	0.306	0.385
No 6	5000倍濃縮	0.019	0.050	0.076	0.080	0.086	0.097	0.123	0.172	0.248	0.370	0.479
	5000/ 3	0.019	0.046	0.069	0.074	0.082	0.092	0.114	0.159	0.227	0.340	0.444
	5000/ 9	0.016	0.042	0.064	0.069	0.077	0.088	0.109	0.152	0.217	0.327	0.428
	5000/ 27	0.018	0.042	0.063	0.068	0.076	0.085	0.107	0.149	0.212	0.315	0.410
	5000/ 81	0.017	0.042	0.062	0.067	0.074	0.085	0.106	0.146	0.205	0.301	0.393
	5000/243	0.018	0.041	0.061	0.066	0.073	0.084	0.105	0.146	0.206	0.304	0.394
	5000/729	0.018	0.042	0.053	0.068	0.075	0.086	0.106	0.147	0.206	0.303	0.390
	ブランク	0.018	0.045	0.066	0.072	0.078	0.089	0.110	0.156	0.217	0.312	0.393
No 7	5000倍濃縮	0.021	0.054	0.082	0.086	0.094	0.112	0.143	0.206	0.307	0.456	0.585
	5000/ 3	0.019	0.050	0.074	0.078	0.084	0.098	0.120	0.166	0.238	0.352	0.454
	5000/ 9	0.018	0.046	0.065	0.071	0.077	0.087	0.108	0.151	0.213	0.314	0.408
	5000/ 27	0.018	0.043	0.064	0.068	0.076	0.085	0.106	0.147	0.207	0.305	0.397
	5000/ 81	0.017	0.042	0.061	0.066	0.074	0.084	0.103	0.141	0.199	0.296	0.385
	5000/243	0.018	0.040	0.058	0.062	0.071	0.080	0.099	0.135	0.192	0.284	0.369
	5000/729	0.018	0.043	0.072	0.070	0.077	0.086	0.105	0.144	0.200	0.291	0.371
	ブランク	0.018	0.046	0.069	0.073	0.080	0.089	0.109	0.153	0.211	0.300	0.379
No 8	5000倍濃縮	0.020	0.050	0.075	0.078	0.085	0.096	0.119	0.165	0.240	0.365	0.471
	5000/ 3	0.018	0.050	0.071	0.076	0.083	0.093	0.111	0.152	0.215	0.319	0.408
	5000/ 9	0.017	0.043	0.064	0.069	0.075	0.084	0.103	0.141	0.200	0.298	0.383
	5000/ 27	0.018	0.046	0.066	0.071	0.077	0.086	0.104	0.139	0.196	0.289	0.369
	5000/ 81	0.018	0.044	0.065	0.069	0.076	0.085	0.103	0.138	0.196	0.289	0.370
	5000/243	0.018	0.048	0.066	0.071	0.078	0.087	0.105	0.142	0.200	0.290	0.370
	5000/729	0.018	0.044	0.064	0.070	0.077	0.086	0.104	0.141	0.198	0.288	0.366
	ブランク	0.017	0.047	0.067	0.072	0.078	0.087	0.105	0.146	0.203	0.287	0.360
No 9	5000倍濃縮	0.018	0.050	0.075	0.078	0.084	0.093	0.119	0.163	0.230	0.324	0.413
	5000/ 3	0.018	0.049	0.072	0.077	0.082	0.091	0.111	0.152	0.211	0.290	0.368
	5000/ 9	0.018	0.045	0.067	0.071	0.077	0.084	0.102	0.143	0.198	0.276	0.353
	5000/ 27	0.017	0.045	0.067	0.070	0.076	0.083	0.101	0.141	0.197	0.274	0.350
	5000/ 81	0.017	0.044	0.066	0.069	0.076	0.085	0.105	0.146	0.207	0.289	0.369
	5000/243	0.018	0.043	0.065	0.069	0.075	0.084	0.103	0.142	0.200	0.279	0.358
	5000/729	0.017	0.046	0.067	0.071	0.078	0.086	0.103	0.144	0.201	0.280	0.359
	ブランク	0.016	0.046	0.068	0.072	0.078	0.087	0.108	0.149	0.209	0.287	0.362
No 10	5000倍濃縮	0.020	0.053	0.078	0.082	0.089	0.101	0.131	0.183	0.269	0.382	0.497
	5000/ 3	0.019	0.048	0.069	0.074	0.082	0.092	0.115	0.159	0.229	0.321	0.416
	5000/ 9	0.018	0.044	0.066	0.070	0.078	0.088	0.108	0.151	0.216	0.305	0.397
	5000/ 27	0.018	0.043	0.065	0.069	0.076	0.085	0.106	0.147	0.211	0.298	0.387
	5000/ 81	0.017	0.046	0.067	0.071	0.079	0.088	0.112	0.154	0.219	0.305	0.388
	5000/243	0.018	0.046	0.065	0.070	0.078	0.087	0.110	0.151	0.217	0.301	0.384
	5000/729	0.018	0.049	0.072	0.075	0.083	0.093	0.115	0.158	0.221	0.303	0.387
	ブランク	0.017	0.050	0.073	0.077	0.085	0.096	0.121	0.168	0.235	0.316	0.395