

固相抽出法とゴルフ場使用農薬の分析

昭和62年の「総合保養地域整備法」によるリゾート開発促進政策を機に、全国各地で多数のゴルフ場が造成され、また最近のレジャーの高級化志向はゴルフ人口を増大し、バブル経済がはじけた今日でも引き続いてゴルフ場開発がすすめられている。このようなゴルフ場では芝の病害虫や雑草などの防除に大量の農薬が使用されており、農薬による飲料水源への汚染が懸念され大きな社会的関心事になっている。そのためゴルフ場使用農薬21種類について平成2年5月に厚生省は「水道水の暫定水質目標」を、環境庁は「排水中の暫定指針」を設定し、分析法とともに都道府県知事あてに通知がなされた。つづいて3年7月に9農薬が追加設定された。通知の分析法は、有機溶媒を用いた液-液抽出法を採用しているがこのうち高速液体クロマトグラフィー（HPLC）対象農薬のチウラム、アシュラム、オキシ銅は、検水からの抽出法が各々異なり、ガスクロマトグラフィー-質量分析法（GC-MS）分析対象農薬のような一斉分析が出来ない。即ちチウラム及びアシュラムは、検水に NaCl を添加して前者はジクロロメタン、後者は pH 2-4 に調整し、酢酸エチルで2回抽出し、濃縮後アセトニトリルで定容量にして HPLC の試験溶液とする。オキシ銅は、検水を pH 2 以下でジクロロメタンにより夾雑物を抽出除去し、液性をアルカリ性にもどして NaCl を添加してジクロロメタンで再び溶媒抽出法を行い、これを濃縮しメタノールに溶解して HPLC 分析の試験溶液とする。このため操作が複雑であり、多量の有機溶媒を用いるため労働衛生の点からも望ましくない。しかもこの方法は回収率や再現性にも問題がある。そこで簡便で再現性が良いといわれて最近、環境水中の汚染物質の前処理法として汎用されている固相抽出法をこれら3種の農薬およびイプロジオン、ベンスリド（表1）の環境水

表1 ゴルフ場使用農薬に係る基準

農薬名	種類	暫定水質目標 ^{a)} (mg/l)	暫定指導指針値 ^{b)} (mg/l)
アシュラム ^{c)}	除草剤	0.2	2
オキシ銅 ^{c)}	殺菌剤	0.04	0.4
チウラム ^{c)}	殺菌剤	0.006	0.06
イプロジオン	殺菌剤	0.3	3
ベンスリド	除草剤	0.1	1

a)HPLC 分析対象農薬 b)厚生省 c)環境庁

中からの分析に試みたところ、回収率、再現性とも良好な結果が得られたので固相抽出法とともに紹介する。

(1) 固相抽出法とは――

固相抽出法（液-固抽出法）とは、カラムクロマトグラフィーの原理を応用した方法である。近年各種の充填剤をつめたミニカラム（カートリッジ）とくにシリカゲルや合成樹脂の表面に種々の官能基を化学的に結合させた化学結合型充填剤のカートリッジが市販されるようになり、環境科学、食品・農芸化学、薬学、生化学・医学等分野での検体の前処理法に広く用いられている。なかでも Octadecyl (C18) 基結合カートリッジは、逆相分配を利用するもので検体中の目的物質の濃縮分離によく使用される。

この固相抽出法は、①エマルジョンを形成しない。②迅速である。③回収率が高く再現性が良い。④簡便で経済的である。⑤抽出溶媒が少量で済み、安全である。⑥多くの検体を同時に処理できる等の利点がある。逆相クロマトグラフィーについては衛研技術情報 Vol. 12, No. 2 (1988) で猪飼らが詳細な解説をしているので参照していただくとして、ここでは逆相系カートリッジを用いた固相抽出法の基本的な使用方法を述べる。

図1に逆相系カートリッジの使用方法を、図2に固相抽出法のステップを示す。

使用に際して、カートリッジを①コンディショ

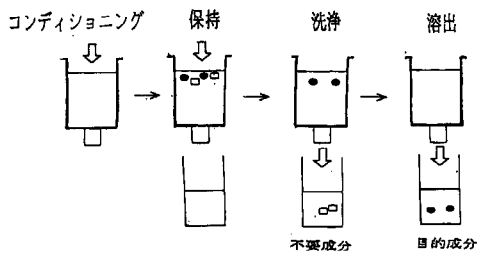


図1 逆相系カートリッジの使用法

①コンディショニング：アセトニトリル、メタノールなどの有機溶媒、次いで水又はバッファーで平衡化する。②保持：サンプルを通水して、目的成分を吸着させる。③洗浄：溶媒の極性をかえて不要成分を溶出する。④溶出：強い溶離液で目的成分を溶出し、HPLC、GC などの分析に供する。

固相抽出法は、図2の各ステップの条件設定が回収率に大きく影響する。まずカートリッジを選択したら①カートリッジの充填剤は乾燥状態で充填されているので、逆相系であればコンディショニングなしでは水溶液サンプルを直接ロードしても十分吸着しない。従って、予め水と混和するアセトニトリル、メタノールなどで充填剤の疎水性表面を濡れやすくして保持効率を良くする。②サンプルは必要なら適当な pH や塩濃度に調整する。③カートリッジのキャパシティとの関係で通液量が適切かを検討する。④通液速度は、速すぎると吸着が不十分で素通りする恐れがある。通常10ml/min以下とする。⑤出来るだけ不要成分を溶出させる。⑥最大の回収率が得られるように溶出溶媒の種類、量を検討する。

以上の使用方法を参考にゴルフ場農薬の固相抽出法を試みた。

(2) 固相抽出法/HPLCによるゴルフ場農薬分析方法

固相抽出法のカートリッジはポリスチレンゲルを充填した Sep Pak Plus PS-1を用いた。

検水 500ml (混濁している場合は、GF/C ろ紙でろ過する) に EDTA・2Na を 2.5mM になるように添加し、pH を 3.5 に調整して、アセトニトリルおよび 25mM EDTA・2Na 溶液各 10ml でコンディショニングした PS-1 カートリッジを装着して固相抽出装置で 5-8ml/min で吸引した。次にこのカートリッジに注射筒を取り付けて水分を十分に除去して、アセトニトリル：メタノール (1:1) 3

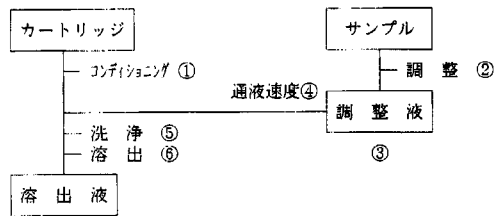


図2 固相抽出のステップ

ml で溶出し、これを N_2 ガスを吹き付けて 1.0ml に濃縮して HPLC 分析をした。(表2)

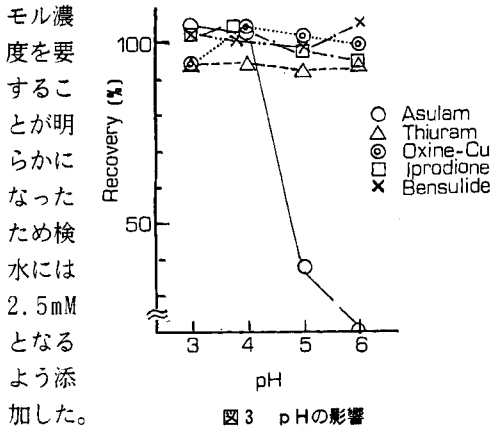
以下の検討はアシュラム 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 、オキシシン銅 1.0 $\mu\text{g/ml}$ およびチウラム・イプロジオン・ベンスリド 2.0、2.5、10.0 $\mu\text{g/ml}$ の標準液を各 1.0ml 添加して行なった。

1) EDTA・2Na の効果

これまでは性質の異なるこれら5種の農薬を同時に吸着する充填剤は見いだされていなかったためGC-MS 対象農薬のような同時分析はできなかったが、最近市販された Sep Pak Plus PS-1 がこれら5種類の農薬の分析に好結果が得られたとの報告がなされているので、PS-1 を用いた。報告と同様に蒸留水 500ml (pH3.5) への添加で回収率は 80-100% であり良かったが、水道水、河川水等実際の検水では、アシュラムは約 80%、オキシシン銅、イプロジオン、ベンスリドは 100% の回収率が得られたが、チウラムは 13.5-53.5% と低かった。チウラムはジチオカーバメイト系化合物であり、これらの化合物は金属塩を形成しやすいので、検水中に溶存する金属イオンと化合物を形成することが回収率低下の原因と考えられた。そこで検水及びコンディショニングに EDTA・2Na を使用した。その結果、図3に示したように河川水 200ml で、チウラムは pH 4-6 で 90% 以上と回収率は改善された。アシュラムは pH 3-4 で、他の3種も EDTA・2Na の影響はなく良好であった。なお、EDTA・2Na 濃度は金属イオンの2倍以上の

表2 HPLC分析条件

	アシュラム	チウラム・イプロジオン	オキシシン銅
装置	高速液体クロマトグラフ LC-6-DV	検出器 SPD-6AD	カラム C-18A (いずれも島津製作所製)
カラム	Nucleosil-120-5C18 (150×4.6mm i.d., 5 μm)	ODS-C18 (150×4.6mm i.d., 5 μm)	ODS-C18 (150×4.6mm i.d., 5 μm)
移動相	1% 酢酸水 (5:5:90)	7% 酢酸水 (80:40)	0.2% EDTA・2Na-25mM 酢酸 (pH3.5):7% 酢酸 (80:40)
流速	1.0ml/min	0.8ml/min	0.4ml/min
検出波長	270nm	230nm	240nm
感度	0.02auf	0.02auf	0.02auf



2) 検水量の検討

河川水 500ml では、アシュラムは回収率が 82.2% (78.1-91.4% CV 8.8%) とやや低かったため検水量について検討した。その結果、図4に示したように 100-400mlでは 95%以上の回収率であったが、500mlで 82.2%、1000mlでは44.3%に低下した。蒸留水でも回収率に差はなかった。これは溶存する妨害物質の影響ではなく、吸着力が弱いためであると推察された。そこで PS-1 カートリッジを2本連結して、河川水を 500mlおよび 1000ml 通水して回収率を検討した結果、500mlでは 95.2% (上のカートリッジからは 72.7%、下からは 22.5%)、1000mlでは 93.8% (それぞれ47.4%、46.4%) と下のカートリッジにまで吸着が広がり、アシュラムは吸着力が弱いためであることが明らかになった。オキシン銅は、1000mlで上から 90.6%、下からは 13.3%、他の3種は全て上のカートリッジだけに吸着していた。

3) 残留塩素の影響

厚生省の通知では、水道水の場合残留塩素をアスコルビン酸ナトリウムで除去して分析するとの

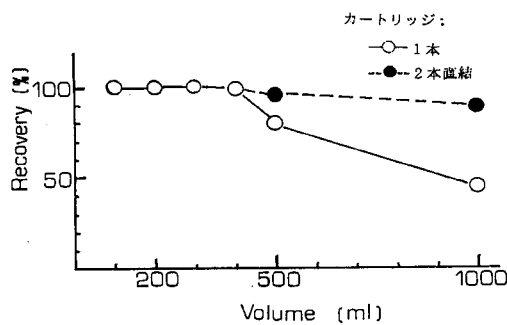


表3 河川水・水道水からの回収率

抽出法	検水 ^{a)}	回収率 (CV) ^{a)} (%)				
		アシュラム	オキシン銅	チウラム	イプロジオン	ベンスリド
PS-1 カートリッジ	本郷川	82.6(2.4)	100.0(4.7)	94.7(2.2)	99.5(5.1)	102.9(4.9)
	庄内川	80.6(2.2)	101.0(7.1)	97.4(2.6)	104.4(4.2)	100.4(2.8)
	矢作川	82.8(9.1)	102.4(1.2)	94.4(2.9)	102.8(3.3)	98.3(3.2)
	豊川	80.2(2.5)	98.7(6.8)	95.7(3.0)	98.9(3.7)	100.0(3.9)
	水道水 ^{c)}	79.8(2.7)	94.1(3.1)	0	97.8(3.8)	97.7(3.5)
溶媒抽出法	水道水 ^{d)}	19.3(59.6)	0	0	107.6(4.0)	0
溶媒抽出法	矢作川	38.5(55.1)	70.9(10.2)	57.3(9.4)	109.4(6.0)	104.6(2.8)

添加量: アシュラム 2.0μg, オキシン銅 1.0μg, チウラム 2.0μg, イプロジオン 2.5μg, ベンスリド 10.0μg

a) 回収率: 3回の平均値, CV: 変動率 b) 検水量: PS-1; 500ml, 溶媒抽出法; 1000ml
c) 残留塩素除去 d) 残留塩素濃度 0.5mg/l

ことであるので、5種の農薬に対する残留塩素および消去剤としてアスコルビン酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウムの影響を検討した。その結果、イプロジオン以外の4種類の農薬は残留塩素で分解されること、アスコルビン酸ナトリウムなどの消去剤で分解を防ぐことはできたが、チウラムの分解は回避できなかった。

4) 添加回収率

以上の結果を参考にして、愛知県下の4河川水、水道水などを用いての添加回収実験を行なった。その結果表3に示した様に、PS-1 カートリッジを使用することで HPLC 対象農薬3種とイプロジオン、ベンスリドはいずれも良好な回収率が得られた。また本法による定量下限はアシュラム、チウラム、イプロジオンは0.0004mg/l、オキシン銅は0.0002mg/l、ベンスリドは0.0005mg/lで、暫定水質目標値(表1)と比較して十分な感度であった。

なお本県でも平成元年度から3年度までの3年間、ゴルフ場周辺および下流域の10水道水源について年4回実態調査を実施した。その結果これら5種の農薬は全て検出されなかった。

まとめ

本方法は、操作が簡便で回収率、再現性とも良好であり、5種の農薬を一斉分析できることからルーチン分析法として大変有効な方法である。

参考文献

- (1) 厚生省: 衛水、第151、152、153号、(1990)、衛水、第192号、(1991)。(2) 環境庁: 環水土、第77号、(1990)、環水土、第109号、(1991)。(3) 第43回全国水道研究発表会講演集(1992) (広島市)

(生活環境部 山田直樹)

海外輸入寄生虫感染症(1)輸入寄生虫感染症の現況

海外との交流が活発化するにつれ、従来、わが国ではみられなかった寄生虫疾患も輸入される危険性が増大している。そこで数回にわたって輸入寄生虫感染症の現状、原虫、蠕虫による寄生虫症の生活史、症状、診断、治療、予防等について最近の知見を紹介する。

寄生虫症の過去と現在

わが国では農業が昭和の初期までの主たる産業であり、人口の約7割が農山村で生活をしてきた。もちろん当時は現在のような下水施設がなかったため、一般家庭の糞尿は肥だめに集められ下肥として農作物の肥料に用いられており、寄生虫症の蔓延に適した自然環境にあった。これが原因となって農山村を中心に蛔虫、鉤虫などの腸管寄生虫病が高率に流行し、濃厚感染のため合併症を併発して死亡することも少なくなかった。当時の主要な寄生虫は蛔虫、鉤虫、鞭虫で重複感染者もざらで、虫卵数や虫体数がともに多いことが知られている。寄生虫の浸淫度は即ちその国や地方の環境衛生状態を知る上での重要な指標であり、当時はまさに最悪の状態、現在の一部の発展途上国と同様かそれ以上に悪く、寄生虫症輸出国の一つであったともいえる。

1931年に制定された「寄生虫病予防法」に基づいて寄生虫病予防対策が全国的に推進され、国民病とさえいわれた寄生虫も徐々に少なくなり、第2次世界大戦後の混乱期には一時期にかなり激しい流行をみたものの（当時は日本人の9割が寄生虫に感染していたといわれる）、その後の驚異的な経済復興によってトイレの水洗化や下水処理の完備などの衛生環境の改善、下肥の使用中止などの衛生教育の推進、めざましい薬剤開発などによって寄生虫症は急激に少なくなり、もはや過去の疾患と錯覚されるようになり、本症に対する関心は低下している。

ところが近年になって、寄生虫がまたしても台頭し始めた。今日のように交通機関の発達により、また日本の経済発展にともなって東南アジアをはじめとする諸外国人の国内長期滞在や、日本企業

の長期海外派遣員の増加にともない、現地で感染し国外から持ち込まれる例など、今後これら寄生虫症の海外からの持込みがますます増加する可能性が高い。また一方では輸入食品や輸入動物の増加もまた、新しい寄生虫症の感染源となり、わが国ではすでに消滅したまたはこれまで知られていなかった新しい寄生虫たちが”輸入寄生虫症”として問題になっている。さらに、そのうえ厄介なのは戦後の寄生虫症を実際に体験したことのない、あるいは寄生虫卵をみたことのない医師や検査技師の世代が増加しているため、かなりのものが見逃されたり放置されている可能性が考えられることである。放置されていても他に伝播したり重症化することの少ない場合には問題は少ないが、他への感染源となったり（赤痢アメーバ症）、致死的な経過をとるような場合（熱帯熱マラリア、睡眠病）にはきわめて重大な問題である。

輸入寄生虫症の種類

寄生虫症とは原虫及び蠕虫により起こる感染症で、これらの疾患は気候風土、衛生環境によって流行が左右され、多くの場合熱帯の開発途上国に認められる。一般に症状が軽微のため、たとえ外国で感染し帰国したとしても、輸入寄生虫症患者の大部分はそのまま見過ごされることとなり、その実体を把握するのは容易でない。学会発表や事例報告の多くは重症例またはごくまれな症例であり、全発症例の数分の一にすぎないものと思われる。1986年に日本全国の医学部または医科大学の寄生虫（医動物学）講座並びに関係研究所について過去20年以内の経験した輸入寄生虫病についてのアンケート結果の主なもの（表-1）と1980年より1987年にかけて輸入熱帯病の薬物治療法に関する研究班の383症例（表-2）が報告されているので、参考までに示した。表-1にみられるようにマラリアが群を抜いており、赤痢アメーバ症、ランブル鞭毛虫症など原虫症が多い。ついで多いのが条虫症で、無鉤条虫症、有鉤条虫症などがみられる。最近3か年でも増加している疾病はマラリア、ランブル鞭毛虫症、プラストシスト症など

表-1 最近日本で経験された輸入寄生虫症(1966年~1986年6月)

寄 生 虫 症	年 代				合 計	
	1966-1975	1976-1980	1981-1983	1984-1986.6		
原虫症	マラリア 赤痢 ラブラエ	21 2 1	28 9 6	139 10 10 4 2	155 11 14 8 4	342 32 31 12 6
線虫症	蛔虫 蟯虫 線虫 メ	1 1 1	1 1 1	3 3 2 2	3 2	7 5 4 3 3
条虫症	無節片 鉤虫 節片 多	1 3 1	3 1 1	12 4	9 2 1	22 12 2 2 2
吸虫症	異肝 肝ヒタ		4 3	1	4 1 1 1	5 4 4 2 2

(全国寄生虫関係45教室、研究室での症例より引用・一部改編)

表-2 輸入熱帯寄生虫症

寄 生 虫 症	日本人	外国人	計
マラリア	211	57	268
トリパノソーマ症	1		1
皮膚リーシュマニア症	1		1
カラ・アザール	1		1
赤痢	2		2
ランブル鞭毛虫症	20	1	21
マンソン住血吸虫症	1		1
ビルハルツ住血吸虫症	3		3
日本住血吸虫症	3		3
肝吸虫症	16	16	32
鞭毛虫症	12	18	30
旋毛虫症	3		3
無鉤条虫症	6	4	10
条虫症	7		7
計	287	96	383

(輸入熱帯病の薬物治療法に関する研究班より引用)

表-3 輸入寄生虫症患者の推定感染地

寄 生 虫 症	日本人	外国人	推 定 感 染 地
トリパノソーマ症	1		アフリカ・ボツワナ共和国
皮膚リーシュマニア症	1		アフリカ
カラ・アザール	1		中国(黒竜江省)
赤痢	2		香港、ヒリピン
ランブル鞭毛虫症	20	1	インド(10)、ネパール(3)、バングラデシュ(2)、カンボジア、ユーゴスラビア、バハマ、ケニア、スリランカ
マンソン住血吸虫症	1		タンザニア
ビルハルツ住血吸虫症	3		アフリカ、モザンビーク、コートジボアール
日本住血吸虫症	3		中国(3)
肝吸虫症	16	16	韓国(15)、中国(8)、香港(3)、シンガポール(2)、台湾、マレーシア、ラオス、インドネシア
鞭毛虫症	12	18	中国(16)、フィリピン(10)、韓国(3)、ペルー
旋毛虫症	3		タイ(2)、インドネシア
無鉤条虫症	6	4	バングラデシュ(3)、タイ(2)、東ドイツ(2)、韓国(2)、東南アジア、ブラジル(2)、ケニア(2)、エチオピア、タイ、オーストラリア
条虫症	7		
計	76	39	

(輸入熱帯病の薬物治療法に関する研究班より引用)

がある。表-2に示すごとく患者は日本人が287名、外国人が96名で、疾患としては、マラリアが268例と最も多く、ついで肝吸虫症32例、鞭毛虫症30例、ランブル鞭毛虫症21例、各種条虫症17例であったが、そのほか、トリパノソーマ症、皮膚リーシュマニア症、カラ・アザールなど珍しい症例も報告されている。しかしこれらの症例にはベトナム難民、海外青年協力隊は入っておらず、これらの集団検査では蛔虫症、鉤虫症、ランブル鞭毛虫症などが報告され、中でも発展途上国に2年以上滞在して帰国した青年海外協力隊員の調査ではガーナから帰国した隊員の41%、ネパールからの30%、シリアからの29%など、26か国から帰国した750人の内17.3%が感染していることが報告されている。

輸入寄生虫症の推定感染地

輸入熱帯病の薬物療法に関する研究班の資料によると1980年より1987年までの輸入寄生虫症の推定感染地は表-3に示すごとく、東南アジア、アフリカが最も多かった。インド、ネパールなど西南アジアにおけるランブル鞭毛虫症や中国、韓国における肝吸虫症などが目だっている。

おわりに

海外との交流が頻繁になるにつれて、輸入寄生虫症が問題になってくる。とくに他に伝播したり重症化する場合は重大な問題である。東南アジア、アフリカをはじめ世界各地の寄生虫浸淫状況と同時に、感染経路、治療・予防などについて今後数回にわたって連載する予定である。

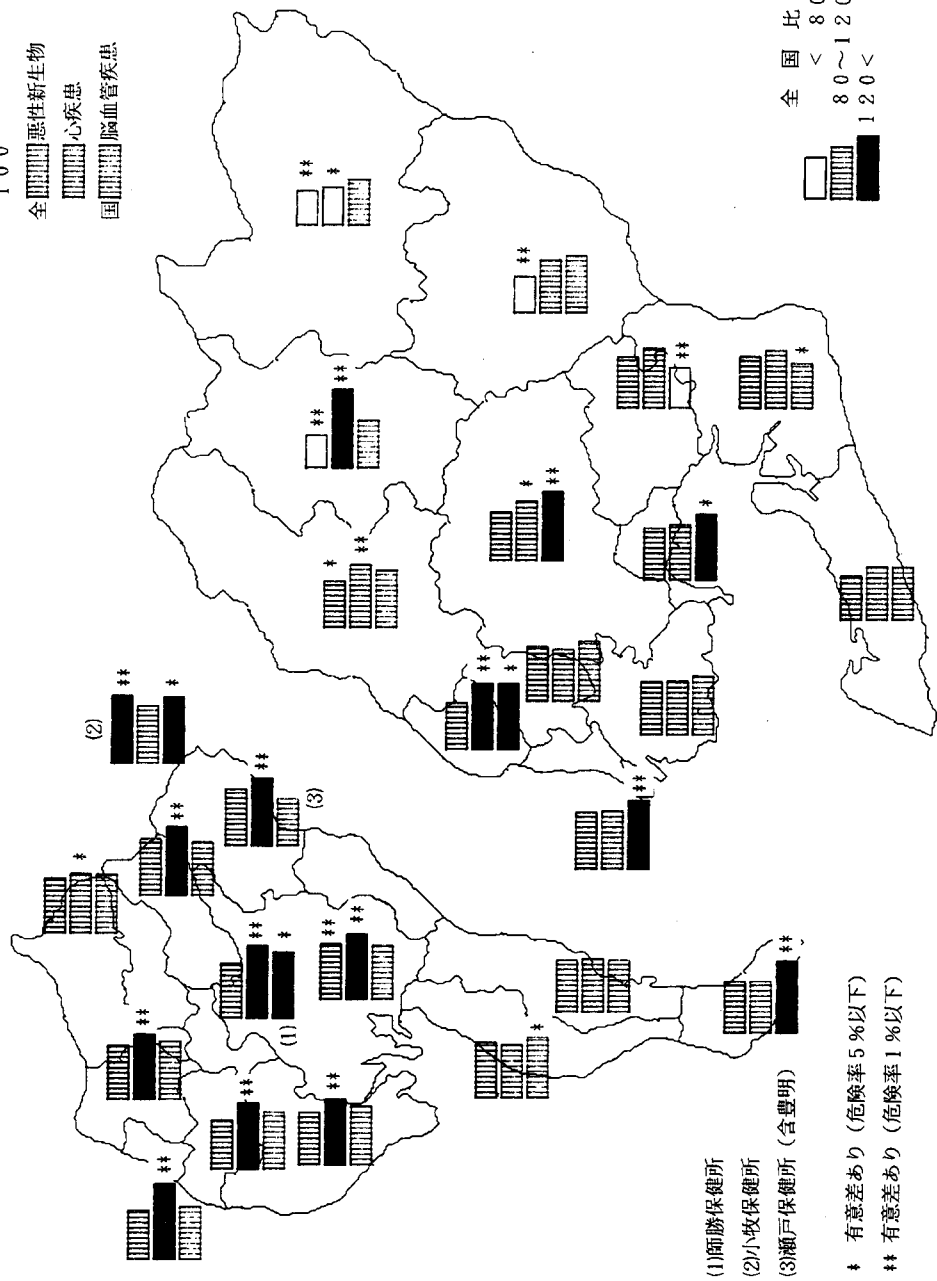
(生物部 山田靖治)

〔Ⅰ〕 地域特性

(6) 三大死因別標準化死亡率 (全国比) 1990

100

全 国
 恶性新生物
 心疾患
 脑血管疾患



(1) 師勝保健所
 (2) 小牧保健所
 (3) 瀬戸保健所 (含豊明)

* 有意差あり (危険率5%以下)
 ** 有意差あり (危険率1%以下)

全 国 比
 < 80
 80~120
 > 120

(注) 人口データは1985年のものを使用した
 (厚生省地域保健医療計画支援システムより)
 (保健情報室)

この図を見てご意見・ご感想などありましたら、ご連絡下さい。