



身近な生活環境の化学分析(I) :
宮崎市大淀川7地点での陰イオン界面活性剤の定量

メタデータ	言語: jpn 出版者: 宮崎大学教育文化学部 公開日: 2008-03-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中林, 健一, 小野, 茂和, 小松原, 紘子, 武田, 幹子, 前田, 理沙, 森脇, 瞳, Ono, Shigekazu, Komatsubara, Hiroko, Takeda, Mikiko, Maeda, Risa, Moriwaki, Hitomi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10458/1392

身近な生活環境の化学分析 I

—宮崎市大淀川7地点での陰イオン界面活性剤の定量—

中林健一¹・小野茂和²・小松原紘子²・武田幹子²・前田理沙²・森脇 瞳²

Chemical Analysis of Life Environment I.

—Analysis of Anionic Surfactant of the Oyodo River—

Kenichi NAKABAYASHI, Shigekazu ONO, Hiroko KOMATSUBARA,
Mikiko TAKEDA, Risa MAEDA, and Hitomi MORIWAKI

はじめに

化学物質による環境汚染について様々な問題が現在指摘されているが、河川水や土壌などの環境中に低濃度かつ広範囲に分布している微量有機物質を正確に定量することは難しいのが現実である。特に微量有機物質の1つである界面活性剤は、分子中に親油基と親水基をもつ構造をしており、主として油汚れを落としやすいことから合成洗剤の洗浄主成分となっている。界面活性剤はシャンプー・リンス・歯磨き粉・化粧品などの生活必需品として、またマヨネーズ・チョコレート・パンなどの食べ物として、さらに塗料・可塑剤の添加剤として身近な生活や各種工業界において広い範囲で使用され多様な機能性を発揮し、その存在は現代生活において必要不可欠なものとなっている。

しかしその反面、これらの界面活性剤は生活排水や工業廃水として河川に流れ込み河川の生態系への影響が懸念されている。界面活性剤の中で注目されている陰イオン界面活性剤のLAS (直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム) は、自然界では分解されにくく河川水中の濃度が0.1 ppm台ではアユの稚魚の発育が阻害されることが報告されている¹⁾。また、人間の皮膚膜を破壊しアトピー性皮膚炎などの皮膚障害や催奇性の原因になるとも言われており、その毒性にも注目が集まっている。

このことから河川中に流れ込む界面活性剤を減らすことへの早急な対策が望まれ、私たちの給水源となる河川に含まれる界面活性剤等の濃度の現状を知ることは、私たちが安全に日常生活を営む上において非常に重要なことであり、環境問題に取り組む第一歩である。

そこで本研究では、河川水に含まれる微量有機物質である陰イオン界面活性剤の定量を行い、それらの基準値との比較を目的とした。なお、陰イオン界面活性剤を含む微量有機物質の定量は、宮崎市大淀川7地点(平和台大橋右岸、平和台大橋左岸、宮崎大橋、高松橋、橋橋、大淀大橋、小戸の橋)の河川水を用い、JIS規格K0400-30-10に定められたメチレンブルー吸光度法を用いた²⁾。また河川水中のLASを高感度かつ簡便に測定できるELISA法(酵素免疫定量法)³⁾を行い、大淀川河川水の現状について明らかにした。

¹宮崎大学教育文化学部

²平成16年度宮崎大学教育文化学部生活文化課程生活環境コース(環境化学プロジェクト)卒業生

実験

河川水中の陰イオン界面活性剤の測定原理

大淀川河川水中に含まれる陰イオン界面活性剤の濃度を測定するために、メチレンブルー吸光度法（JIS規格K0400-30-10）を用いて以下の実験を行った。この方法は排水中の低濃度のメチレンブルー活性物質（MBAS）すなわち陰イオン界面活性剤の定量に適する。この試験条件で主として測定される化合物はスルホン酸塩及び硫酸塩である。しかし、いくつかの正または負の妨害物質が存在することがある。この方法の定量範囲は0.1~0.5 mg/l で検出限界は約0.05 mg/l である。この方法では陰イオン界面活性剤とメチレンブルーとの塩をアルカリ性域で形成させ、これらの塩をクロロホルムで抽出し、そのクロロホルム溶液を酸処理する。

アルカリ性溶液から陰イオン界面活性剤とメチレンブルー錯体を抽出し、酸性のメチレンブルー溶液を振り混ぜることによって妨害物質を除去する。有機層を分離し、その吸光度を吸収最大波長650 nmで測定し、検量線から濃度を算出する。

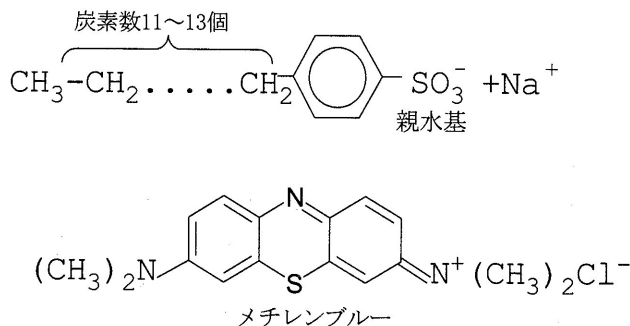


図1 陰イオン界面活性剤（上）とメチレンブルーの化学構造式（下）

試薬の調整

- (1) 中性メチレンブルーの調整
メチレンブルー0.175 gを量り取り、水に溶かし500 ml とする。
- (2) 酸性メチレンブルーの調整
メチレンブルー0.175 gを量り取り、水250 ml に溶かし、硫酸（ $\rho = 1.84 \text{ mg/l}$ ）3.25 ml を加えた後、水で500 ml とする。
- (3) 緩衝液の調整
炭酸水素ナトリウム12 gと炭酸ナトリウム13.5 gを水に溶かし、水で500 ml とする。

標準溶液の調整

- (1) ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウムを化学天秤で350.0 mg量り取り、メスシリンダーを用いて蒸留水で1000 ml とし、これを標準溶液とする。
- (2) 標準溶液をホールピペットで250 ml 量り取り、メスフラスコで500 ml とし、これを作業溶液とする。
- (3) 作業溶液を2、4、8、16、32 ml をホールピペットで量り取り、それぞれをメスフラスコで100 ml とする。

検量線

JIS規格法を用いて求めた吸光度の値を、検量線の数式に代入し、大淀川河川中の微量有機物質の濃度を求める。陰イオン界面活性剤を含む微量有機物質は波長652 nmで最大波長となる。

表1 LAS濃度変化に対する652 nmの吸光度変化

LAS(ml)	ppm(mg/l)	Abs(652 nm)*5	Abs-濃度0の時のAbs
0	0	0.168	0
2	0.349	0.262	0.094
4	0.699	0.426	0.258
8	1.398	0.701	0.533
16	2.797	1.277	1.109
32	5.595	2.357	2.198

陰イオン界面活性剤の抽出法

- (1) 試料100 ml を分液漏斗に入れ、中性メチレンブルー溶液 5 ml、緩衝液10 ml、クロロホルム15 ml を加える。
- (2) (1)を1秒間に約2回振り混ぜ、これを1分間行う。その後2分間放置する。
- (3) 2分間放置した漏斗内は2層に分かれ、下層のクロロホルムを抽出する。
- (4) 別の分液ロートに(3)で抽出したクロロホルム層を入れ、水110 ml、酸性メチレンブルー溶液 5 ml を加える。
- (5) (4)を1秒間に約2回振り混ぜ、これを1分間行う。その後2分間放置する。
- (6) (5)の分液漏斗からクロロホルム層を抽出し、50 ml のメスフラスコに入れる。

ただし、分液漏斗の壁面に陰イオン界面活性剤が付着している可能性が高いので、この界面活性剤をできるだけ抽出するため、(1)~(6)の操作を3回行う。また、操作の2回目からは(1)で加えるクロロホルムは10 ml とする。

- (7) 3回の操作によりクロロホルム層が約35 ml 抽出できる。これをメスフラスコに入れクロロホルムで50 ml とする。
- (8) この溶液を3 ml 四面セルに入れ、分光光度計を用いて652 nm (吸収最大波長) の吸光度を測定する。

ELISA法による陰イオン界面活性剤 (LAS)の定量

メチレンブルー吸光光度法 (JIS規格K0400-30-10) では、陰イオン界面活性剤のほかにも微量物質を検出してしまう可能性があるため、大淀川河川水中に含まれるLAS (陰イオン界面活性剤) の濃度のみを測定するために、ELISA法 (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay 酵素免疫測定法) を用いて以下の実験を行った。ELISAとはEnzyme Linked Immuno Sorbent Assayの略で、酵素免疫測定法とも呼ばれている検査法 (原理) である。

抗体固相化チューブの内面に測定対象物質 (抗原) と結合するたんぱく質 (抗体) が塗布さ

れており、サンプル水と抗原酵素複合体を加え、抗原抗体反応が起きる。抗体固相化チューブ内の未反応物を除去し、発色基質を加えると、抗原酵素複合体と反応し発色用酵素のはたらきで着色する。測定対象物量が多く汚染度の高いサンプルは、発色基質の抗原酵素複合体への結合量が少ないため、発色が弱くなり、吸光度が低くなる。ELISA法では測定対象物質と似た構造を持つ物質とも反応する性質（交差反応）を有し、実際の値より高くなる可能性がある。そのため、前処理操作で交差反応を起こす夾雑物質を取り除くことが重要となる。しかし、今回用いた抗LASモノクローナル抗体は、他の界面活性剤には交差反応せず、LASに対する高い特異性を有しているため必要としない。ELISA法では、まず、あらかじめ検出したい異物（抗原）に対する特異抗体をマウスやウサギなどを利用して作製する。そしてこの抗体をマイクロプレートやチューブなどに固着させておいたものが、他の反応試薬とともにキット化されている。

機器及び器具

分光光度計（Shimadzu UV-VIS Detector SPD-10A）、マイクロピペット（20-200 μ l 1本、200-1000 μ l 1本）、デイスポーザブル培養試験管27本、四面セル（1ml, 3ml）、LAS ELISAキット（日本エンバイロケミカルズ）などを用いた。

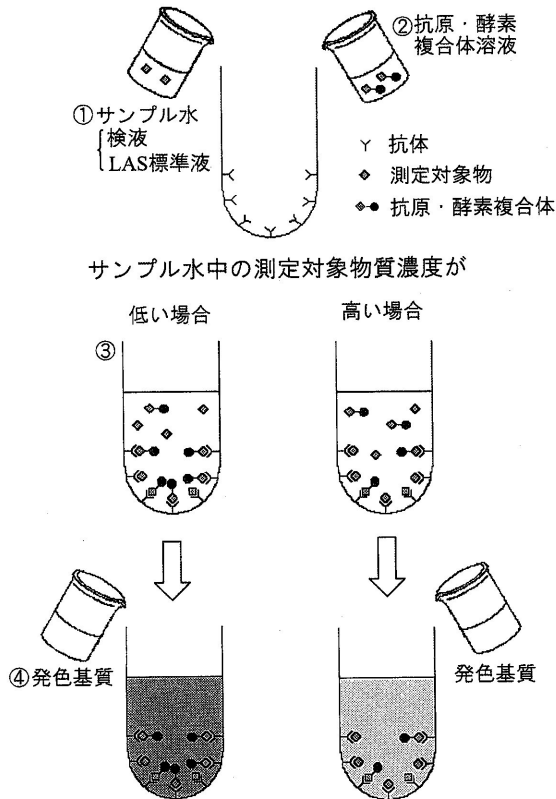
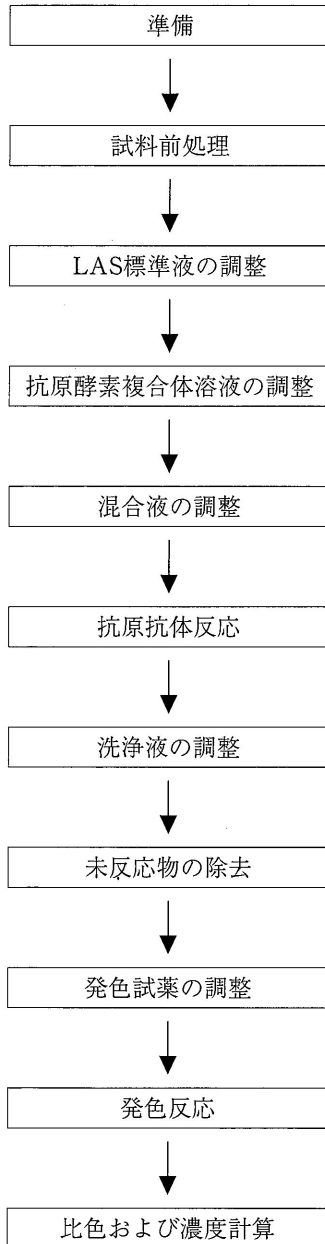


図2 ELISA法による反応原理

ELISA法による陰イオン界面活性剤の定量実験手順

以下にELISA法による陰イオン界面活性剤の定量実験手順を示す。



(1) 試料前処理

試料にメタノールを添加し、10%メタノール水溶液とし、これを検液とする。(図2-①)

(2) LAS標準溶液の調製

検量線を描くためにLAS標準原液をメタノールで10倍に希釈し、1 mg/l LAS標準溶液を調製する。調製した1 mg/l LAS標準溶液と10%メタノール溶液を用いてLAS標準溶液(1, 0.4, 0.1, 0.05, 0.02, 0 mg/l)を調製する。(図2-①)

(3) 抗原酵素複合体溶液の調製・混合

抗原酵素複合体粉末に抗原酵素複合体溶解液を加えて溶解し、抗原酵素複合体溶液を調整する。(図2-②) 検液またはLAS標準溶液0.5 mlと抗原酵素複合体溶液0.5 mlをディスポーザブル培養試験管中で混合する。

(4) 抗原抗体反応

室温に戻した抗LASモノクローナル抗体固相化チューブに調整した混合液を0.5 mlずつ分注する③。室温(18~25℃)で30分間反応させる。(図2-③)

(5) 未反応物の除去

抗原酵素反応時間中に、6倍濃縮洗浄液と蒸留水を1:5の割合で混合し、洗浄液を調整する。

反応液を廃棄し、抗体固相化チューブ1本あたり3 mlの洗浄液を用いて3回洗浄する。3回目の洗浄液を捨てた後、タッピング(ペーパータオル等で軽くたたく操作)をして洗浄液を完全に除去する。

(6) 発色試薬の調製・発色反応

発色基質溶液と発色基質希釈液を1:100の割合で混合し、発色試薬を調整する。(図2-④)

調製した発色試薬を0.5 ml加え、室温(18~25℃)で30分間反応させた後、発色停止液を0.5 ml添加する。

(7) 比色および濃度計算

450 nmの吸光度から発色の強弱を測定し、濃度を定量する。吸光度と測定対象物濃度との関係を検量線から算出する。吸光度測定の際に用いる四面セルは、1 mlと3 mlのものを用いる。

サンプリング地点

サンプリング地点については微量有機物質の定量を目的としているため、生活排水が流入していると考えられる河川が適当である。そこで、以下の理由から宮崎市大淀川を選定し、平和台大橋右岸、宮崎大橋、高松橋、橋橋、大淀大橋、小戸之橋の7地点をサンプリングポイントとした。

- ① 大淀川は最上流部から最下流部までの距離が105 kmと非常に長い距離を河川水が流れ、支流から流入してくる河川水の量が多い。
- ② 最上流部の都城市南部の末吉町では人為的影響は少ないと考えられるが、上流部の都城市では人家が密集し工場なども存在することから人為的影響が大きいのではないかと考えられる。また下流部では高岡町及び宮崎市を通るので人為的影響が大きいと思われる。
- ③ 宮崎市の水道水は、大淀川の表流水を下北方浄水場で1日平均64,000 m³、富吉水源地で1日平均50,000 m³、岩切水源地で1日平均4,000 m³を取水して利用しているため、その河川の水質を調べることは市民にとって大きな意味を持つと考えられる。



図3 宮崎市大淀川における採水地点図

実験結果及び考察

大淀川 7 地点での採水とその測定パラメーター

2004年 2月～12月にかけて上記 7 地点で採水を行った。なお、表には採水時のサンプリング時間、天候、気温 (°C)、水温 (°C) pH、流速 (cm/s)、濁度とともに陰イオン界面活性剤の濃度を各々示した。

表 2 大淀川 7 地点の測定パラメーター (測定日 2004年 2月16日)

地 点	サンプリング時間	天候	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	流速 (m/s)	濁 度	濃度 (ppm)
①平和台大橋 右岸	10:22	晴れ	10.5	8.0	7.18	17.60	浮遊物少しあり	0.080
②平和台大橋 左岸	11:00	晴れ	14.5	7.8	7.52	12.72	浮遊物少しあり	0.072
③宮崎大橋 左岸	11:19	晴れ	17.0	10.5	7.57	3.64	浮遊物かなりあり	0.105
④高松橋 右岸	11:50	晴れ	13.0	15.5	7.84	4.18	浮遊物わずか、ほぼ透明	0.031
⑤橋橋 右岸	12:11	晴れ	12.5	10.0	7.83	5.56	浮遊物わずか、ほぼ透明	0.092
⑥大淀大橋 右岸	12:28	晴れ	13.0	10.5	7.94	6.62	浮遊物わずか、ほぼ透明	0.059
⑦小戸之橋 左岸	13:00	晴れ	12.0	10.5	7.96	5.44	浮遊物わずか、ほぼ透明	0.023

表 3 大淀川 7 地点の測定パラメーター (測定日 2004年 4月26日)

地 点	サンプリング時間	天候	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	流速 (m/s)	濁 度	濃度 (ppm)
①平和台大橋 右岸	10:18	晴れ	25.8	20.5	6.15	3.30	浮遊物ほとんどなし	0.095
②平和台大橋 左岸	10:48	晴れ	24.0	20.0	6.16	7.60	浮遊物あり	0.104
③宮崎大橋 左岸	11:10	晴れ	22.0	20.0	6.17	7.66	浮遊物ほとんどなし	0.128
④高松橋 右岸	11:31	晴れ	24.5	22.0	6.21	4.30	浮遊物あり	0.143
⑤橋橋 右岸	11:54	くもり	22.3	20.0	6.17	6.94	浮遊物なし、ほぼ透明	0.237
⑥大淀大橋 右岸	12:16	くもり	24.0	20.0	6.17	8.78	浮遊物なし、ほぼ透明	0.127
⑦小戸之橋 左岸	12:36	くもり	23.2	21	6.19	6.36	浮遊物ほとんどなし	0.158

表4 大淀川7地点の測定パラメーター (測定日 2004年6月10日)

地 点	サンプリング時間	天候	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	流速 (m/s)	濁 度	濃度 (ppm)
①平和台大橋 右岸	10:06	曇り	23.2	21.6	7.0	10.22	浮遊物なし	0.125
②平和台大橋 左岸	10:36	曇り	24.5	20.5	7.0	19.78	浮遊物なし	0.150
③宮崎大橋 左岸	10:55	曇り	25.2	22.5	7.0	5.58	浮遊物かなりあり	0.240
④高松橋 右岸	11:19	小雨	23.8	21.7	7.0	3.58	浮遊物なし	0.144
⑤橘橋 右岸	11:40	小雨	23.0	20.5	7.0	4.30	浮遊物なし	0.152
⑥大淀大橋 右岸	11:56	小雨	24.7	20.4	7.0	6.32	浮遊物なし	0.137
⑦小戸之橋 左岸	12:10	小雨	24.8	20	7.0	4.44	浮遊物少しあり	0.182

表5 大淀川7地点の測定パラメーター (測定日 2004年8月25日)

地 点	サンプリング時間	天候	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	流速 (m/s)	濁 度	濃度 (ppm)
①平和台大橋 右岸	10:42	曇り	32.0	27.0	7.7	38.20	浮遊物なし	0.119
②平和台大橋 左岸	11:14	曇り	31.5	27.3	7.7	23.11	浮遊物なし	0.108
③宮崎大橋 左岸	11:40	曇り	32.0	27.6	7.7	8.28	浮遊物かなりあり	0.092
④高松橋 右岸	12:09	曇り	31.8	27.9	7.6	測定不能	白濁あり	0.229
⑤橘橋 右岸	12:36	晴れ	33.0	28.2	7.6	11.94	少し白濁あり	0.149
⑥大淀大橋 右岸	13:08	晴れ	32.0	29.2	7.6	4.94	浮遊物なし	0.196
⑦小戸之橋 左岸	13:32	晴れ	31.0	29.6	7.5	7.79+	浮遊物なし	0.136

大淀川7地点におけるMBAS濃度

2004年2月～12月の大淀川7地点におけるMBAS濃度分布結果を図4に示す。水質汚濁防止法では、陰イオン界面活性剤に関する排出基準はないが、水道法では0.2 ppm以下に定められている。

下図は、縦軸にMBAS濃度 (ppm)、横軸にサンプリング地点①～⑦をとり、2004年2月～12月の計6回の測定結果を水道法の水質基準、0.2 ppmとともに、折れ線グラフに表示したものである。

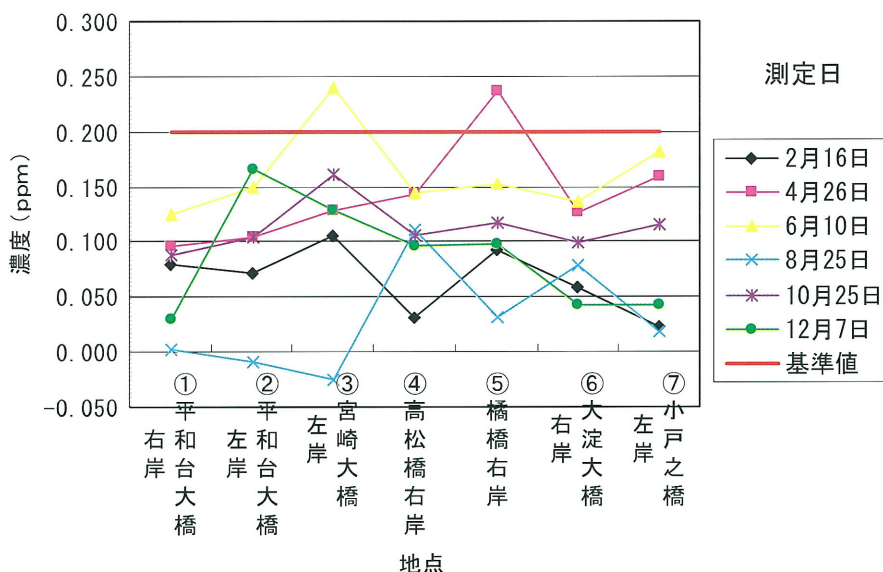


図4 メチレンブルー法による大淀川7地点MBAS濃度

上図より、水道法の水質基準濃度0.2 ppmを超過した地点は、2004年4月の⑤橋橋右岸、6月の③宮崎大橋左岸の2地点のみで、その他の地点は、基準値0.2 ppmを下回る結果となった。予測として、大淀川は周辺に民家が多いことや河口に近いことから基準値よりも高濃度のMBASが検出されるのではないかと思われたが、そうはならなかった。これは、宮崎市周辺の下水道整備や合併処理浄化槽の普及が充実しているためではないかと考えられる。文献によれば、下水処理場におけるMBASの除去率は98% (1993年)、合併処理浄化槽におけるMBASの除去率は、低水温期でも96%という報告がある。これらのことから、陰イオン界面活性剤は生物処理により、効率よく分解されていることが予想される。

宮崎市の下水道普及率は非常に高く、文献によれば、宮崎市の下水道普及率は平成16年3月末までで90.1%となっている。これは、全国平均66.7%をみても高い普及率といえる。

これらのことより、宮崎市を流れる大淀川の河川水は比較的MBAS濃度が低く、界面活性剤の汚染が小さい河川であるといえる。

表 6 大淀川 7 地点の測定パラメーター (測定日 2004年10月24日)

地 点	サンプリング時間	天候	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	流速 (m/s)	濁 度	濃度 (ppm)
①平和台大橋 右岸	10:27	晴れ	26.0	18.5	7.7	14.85	浮遊物なし	0.088
②平和台大橋 左岸	10:55	晴れ	26.0	19.0	7.7	42.96	浮遊物なし	0.104
③宮崎大橋 左岸	11:15	晴れ	23.0	20.0	7.7	19.88	浮遊物なし	0.161
④高松橋 右岸	11:44	晴れ	27.0	20.7	7.7	測定不能	浮遊物なし	0.106
⑤橋橋 右岸	12:12	晴れ	23.0	18.6	7.7	16.56	浮遊物なし	0.118
⑥大淀大橋 右岸	12:33	晴れ	23.2	18.2	7.7	6.42	浮遊物なし	0.099
⑦小戸之橋 左岸	12:55	晴れ	22.9	18.7	7.7	15.35	浮遊物あり	0.115

表 7 大淀川 7 地点の測定パラメーター (測定日 2004年12月 7日)

地 点	サンプリング時間	天候	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	流速 (m/s)	濁 度	濃度 (ppm)
①平和台大橋 右岸	10:20	晴れ	18.2	13.0	7.7	16.03	濁りあり	0.029
②平和台大橋 左岸	10:50	晴れ	17.5	13.5	7.7	28.38	濁りあり	0.165
③宮崎大橋 左岸	11:03	晴れ	19.0	14.0	7.7	16.57	濁りあり	0.128
④高松橋 右岸	11:27	晴れ	17.5	15.0	7.7	11.68	かなり濁りあり	0.095
⑤橋橋 右岸	11:46	晴れ	18.0	13.0	7.7	14.30	濁りあり	0.098
⑥大淀大橋 右岸	12:00	晴れ	17.0	12.5	7.7	9.11	濁りあり	0.042
⑦小戸之橋 左岸	12:17	晴れ	19.5	13.0	7.7	7.52	かなり濁りあり	0.043

測定地点ごとのMBASのばらつき

縦軸にMBAS濃度 (ppm)、横軸にサンプリング地点①～⑦をとり、各地点ごとの平均値を算出し、それらを7地点の基準値として、各地点におけるMBAS濃度のばらつきを調べた。

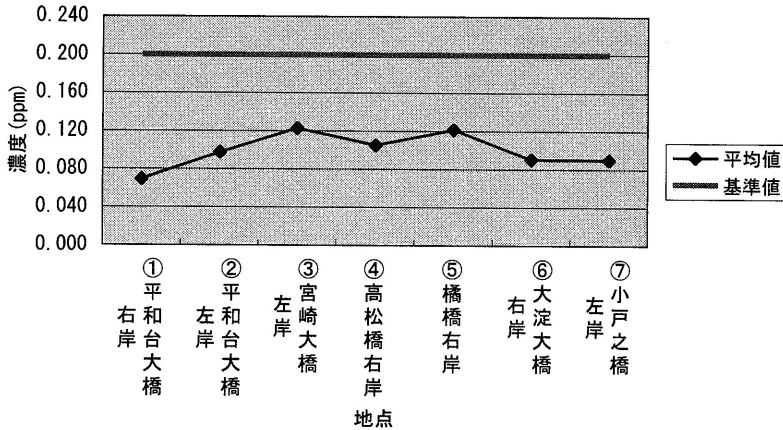


図5 大淀川7地点別のMBAS濃度平均値

図5より、各地点におけるMBAS濃度の平均値は0.07～0.12 ppmの範囲にあり、基準値である0.2 ppmを下回っている。7地点においてMBAS濃度は市街地に近くほど高くなり、離れるほど値は小さくなるが微量な変化といえる。7地点において、③宮崎大橋左岸、④高松橋右岸、⑤橋橋右岸が市街地から最も近く、MBAS濃度も市街地に近くほど高くなり、離れるほど値は小さくなるが微量な変化といえる。しかし、宮崎市は下水道の整備や合併処理浄化槽の普及が充実しているため、この微量な変化は地域性を述べる上では、適当でない。

季節変化におけるMBAS濃度のばらつき

縦軸にMBAS濃度 (ppm)、横軸に採水した月ごとの平均値を算出し、それらと基準値とを比較することにより、季節変化におけるMBAS濃度のばらつきを調べた。

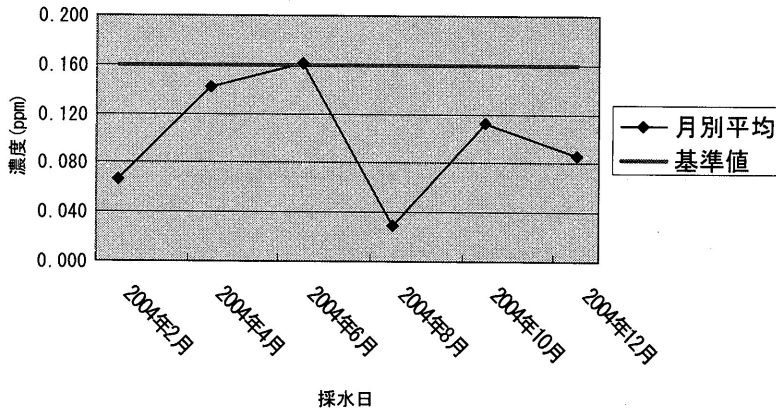


図6 大淀川7地点の月別平均値と基準値

図から8月は、蒸留水のAbs値がサンプル水のAbs値より上回っていた為、3地点でマイナス値となり、調査データとしては信憑性が低いものの、大淀川の河川水におけるMBAS濃度は、冬に低く、夏に高い傾向がみられた。

MBAS濃度と測定パラメーターの関係

MBAS濃度と測定パラメーターの関連性について以下の順で考察した。

- (a) MBAS濃度と天候
- (b) MBAS濃度と水温
- (c) MBAS濃度とpH
- (d) MBAS濃度と流速
- (e) MBAS濃度と濁度

(a) MBAS濃度と天候

気象変化は河川の水質及び汚染物質の量に直接影響するものであり重要である。水質調査における気象条件は好条件であることが望ましく、調査は晴れた日に行った。

6月に関しては季節的に好条件の日がなく、サンプリングは途中から小雨が降り出す中で行った。そのため6月の平均濃度は他の月よりも高くなっている。降雨時には濁度その他の水質が悪化する可能性が大きいという報告があり、6月は4日前から(表8)連続して降った雨の影響で川の底にたまった微量有機物質が再び河川水に溶け込み、その結果濃度が高くなったと考えられる。このことから6月は連続して降った雨の影響がMBAS濃度に大きく影響したのではないかと思われる。

表8 採取日4日前の天候(2月~12月)

	4日前	3日前	2日前	前日	採取日
2月	○	○	○	○	○
4月	○/◎	○/◎	○→◎	○	○→●
6月	●/◎	●/◎	○/◎	●/◎	◎
8月	◎/○	◎/○	◎/○	◎/●	○/◎
10月	○/◎	○	○	○	○/◎
12月	◎/○	●	○	○	○/◎

○………晴れ、◎………くもり、●………雨

(b) MBAS濃度と水温

水温に関しては、MBAS濃度との関連性は認められなかった。なお、8月は、蒸留水のAbs値がサンプル水のAbs値より上回った為、3地点でマイナス値となり調査データとしては信憑性が低い。そこで、この8月の値を考慮に入れず考えることにした。

河川中に含まれる陰イオン界面活性剤濃度は一般に、高水温(25℃程度)では比較的速や

かに分解される(2~3日)が、低水温域(15℃以下)では分解されにくい(6~7日以上)と報告されている⁴⁾。しかし今回の実験では、MBAS濃度が夏に高く、冬に低い結果となった。その原因として、6月の濃度に関しては、天候が濃度に何らかの影響をあたえ、濃度が高くなった可能性が考えられるが、他の月の結果に関しては、気温と水温が陰イオン界面活性剤の濃度にどのように影響しているのかは現在のところ不明である。

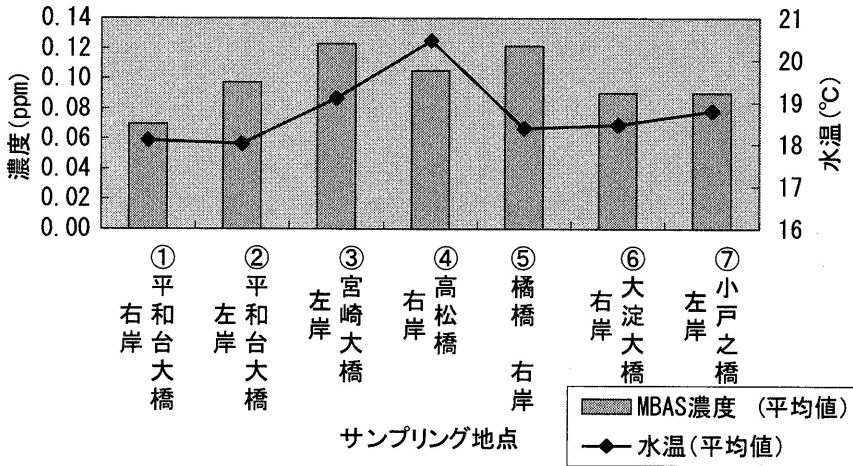


図7 大淀川のMBAS濃度と水温

(c) MBAS濃度とpH

下図8は、MBAS濃度を左縦軸にとり(棒グラフ) pHを右縦軸(折れ線グラフ)に表示したものである。

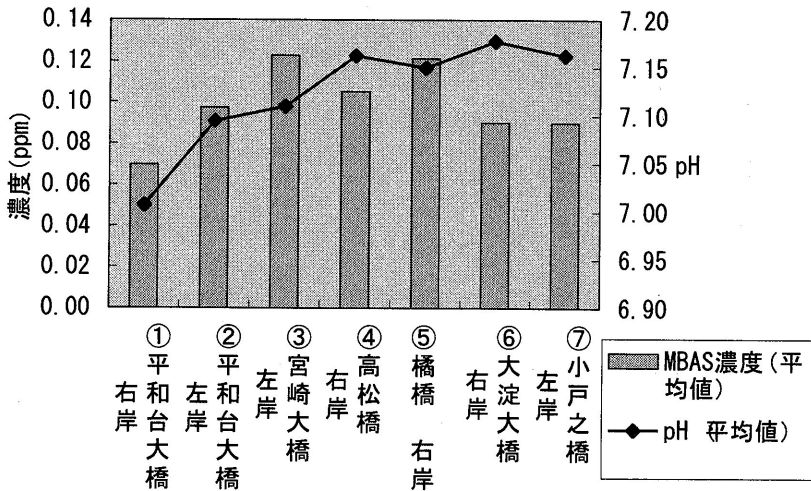


図8 大淀川のMBAS濃度とpH

大淀川のpHは平均するとpH7.0～7.2であった。環境省の環境基準⁵⁾によると一般に河川水のpHは6.5～8.5で海洋のpHは7.8～8.3と報告されており、従って大淀川でも下流に近づくにつれ河川水のpHも上昇していくと思われる。また、pHは藻類や植物プランクトンの光合成により上昇することも知られている。

MBAS濃度と比較して見てみると今回の実験では①平和台大橋右岸、②平和台大橋左岸、④高松橋右岸、⑤橋橋右岸の4地点でMBAS濃度が上昇するほどpHの値が上昇することが明らかとなった。しかしながら、⑥大淀大橋右岸、⑦小戸之橋左岸では逆の結果も得られたことから、相関性については不明である。

(d) MBAS濃度と流速

今回の流速測定方法として、2月、4月、6月はプロペラ式流速計を用い水面から10 cmのところまで測定し、8月、10月、12月はピンポン球を川の表面に浮かべて一定の距離を流し、その時間を測り流速を算出した。下図9はプロペラ式流速計で測定した2月、4月、6月の値の平均値のグラフ（以下グラフAと示す）とピンポン球を利用して測定した8月、10月、12月の値の平均値のグラフ（以下グラフBと示す）を重ね書きしたものである。

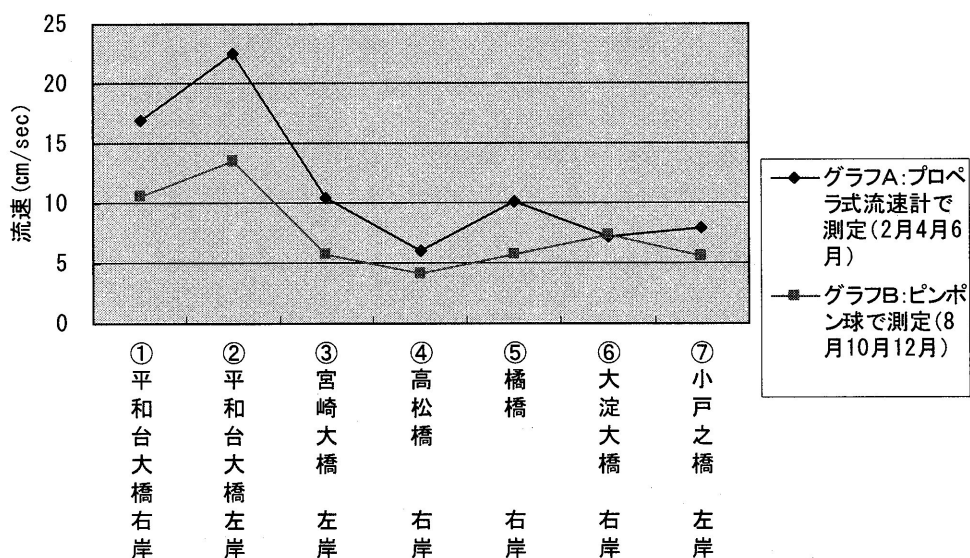


図9 プロペラ式流速計とピンポン球で測定した流速の値の平均

グラフAとBは、水深10 cmと川の表面での測定の測定条件の違いや季節性に関係したと考えられ値に差がある。しかし2つのグラフの山の形は⑥大淀大橋右岸以外ほとんど変わらない。ここでの目的はMBAS濃度と流速の値の関係性をみることなので、測定方法に違いはあるが値はそれぞれ比較対象として使えるものとし、2月～12月までの場所ごとの平均値を使うこととした。

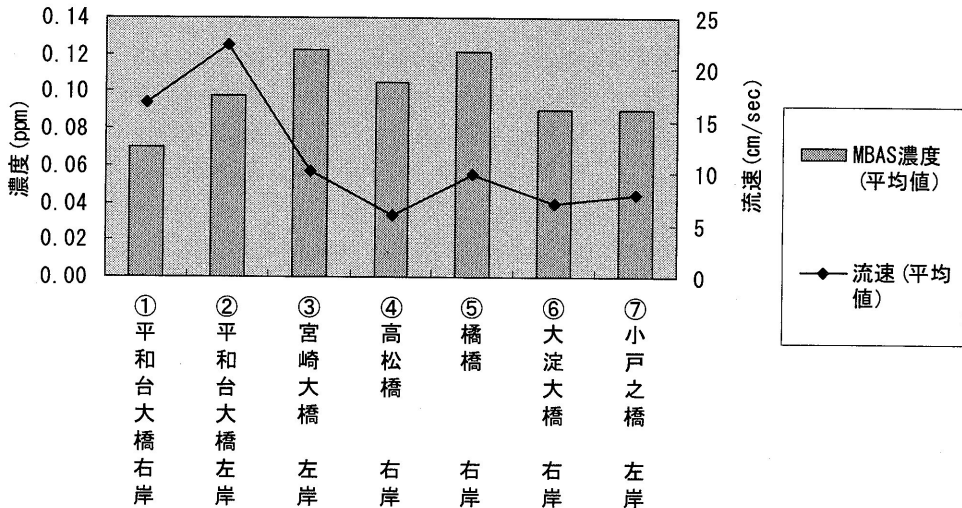


図10 大淀川のMBAS濃度と流速

図10から流速が平和台大橋から下流に向かって徐々に遅くなり、③宮崎大橋左岸～⑦小戸之橋左岸までの流速は5～10 cm/secとなった。平和台大橋は兩岸の平均流速が約20 cm/secとほぼ倍になっていることがわかる。高松橋右岸はサンプリング7地点の中で1番流速が遅いが、これはサンプリング場所の水位があまりなかったためである。

MBAS濃度は③宮崎大橋左岸と⑤橋橋右岸を頂点とした山型になっているが流速と関係するような傾向は見られない。そのため流速との因果関係は不明である。

表9は2004年2月～12月の全ての流速データ及び場所ごとによる平均を表にまとめたものである。8月10月の高松橋右岸の測定不能は全体的に川の水位が浅く測定できなかったためである。

表9 2004年2月～12月の大淀川7地点の流速データ

	2/16	4/26	6/10	8/25	10/24	12/7	平均
①平和台大橋 右岸	17.60	3.30	10.22	38.20	14.85	16.03	16.70
②平和台大橋 左岸	12.72	7.60	19.78	23.11	42.96	28.38	22.43
③宮崎大橋 左岸	3.64	7.66	5.58	8.28	19.88	16.57	10.27
④高松橋 右岸	4.18	4.30	3.58	測定不能	測定不能	11.68	5.94
⑤橋橋 右岸	5.56	6.94	4.30	11.94	16.56	14.30	9.93
⑥大淀大橋 右岸	6.62	8.78	6.32	4.94	6.42	9.11	7.03
⑦小戸之橋 左岸	5.44	6.36	4.44	7.79	15.35	7.52	7.82

(e) MBAS濃度と濁度

濁度測定には、濁度計を使用せず、測定者の視覚的判断によって行った。河川水の浮遊物、濁りを視覚的に観察し、私達の視覚で分かる『河川水の見た目』とMBAS濃度に関連性はみられるのかどうかを調べた。ただし、この測定法は測定者の個人差や視点の違いに影響されるため、その誤差を小さくするために、測定の際は同じ測定者によって判断した。

下図11は、濁度とMBAS濃度の関係を棒グラフに表示したものである。濁度は白濁あり、白濁少しあり、浮遊物かなりあり、浮遊物あり、浮遊物少しあり、浮遊物なし、又はほぼ透明の6項目に分け、それぞれを図示した。12月7日の調査結果は、2日前に雨が降ったこともあり、河川水が全体的に濁っていたため、浮遊物を判断することができなかった。

図11から分かるように、視覚的な浮遊物の有無はMBAS濃度には影響がないといえる。しかし、白濁に関しては、浮遊物なし、又はほぼ透明時よりも白濁が確認された場合のMBAS濃度が高い傾向にあった。浮遊物や濁りを視覚的に観察し、白濁していると判断される時、MBAS濃度に変化がみられることが判明した。

水が白濁する原因として、流量の増加や外的影響による底質の拡散が考えられる。界面活性剤は水中だけでなく底質中にも蓄積する傾向があることが報告されており、白濁時のMBAS濃度が高い原因としては底質の拡散による界面活性剤の水中へ再溶出が原因と思われる。

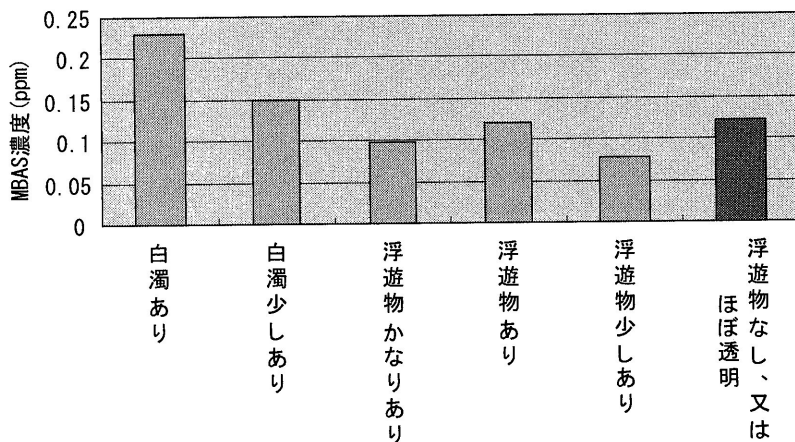


図11 MBAS濃度と濁度

ELISA法による陰イオン界面活性剤の定量結果及び考察

ELISA法は臨床診断の分野では、もっとも幅広くまた数多く用いられており、昨今注目を浴びているPCR法やDNAチップによる検査よりも長い歴史と数多くの実績を有する、信頼性の高い確立した技術に基づく検査法である。海外では約20年前からこれらの検査技術を食品衛生や環境の検査に用いるべく応用研究がなされ、多くが製品化されてきている。

ELISA法が、一般的に粗抽出のみで高度な精製過程が無く、前処理操作が簡単である理由は、抗体が高度に選別捕捉する能力を元来もっているからだともいえる。また、その出来如何で目的物質をどの程度正確に反応・捕捉できるかが左右される。

試料に抗原（検出対象物質）が含まれていたのか、あるいはどの程度だったかは、単に抗体

を捕捉しただけでは測定がしやうがないため、酵素と発色基質（発色原液と基質液）による発色反応を利用する。すなわち酵素が多ければ濃い発色（ないしは無色）となるようにして、目視ないしは吸光度計などで比較できるようにする。

反応を阻害する代表的なものは脂肪と有機溶媒である。脂肪は抗体にとりつきやすく、抗原捕捉の邪魔をする。また検出対象が脂肪に吸着ししやすい性質のものである場合は、通常のバッファー抽出処理ではなく有機溶媒などを使用する。しかしながら、この有機溶媒はELISA法にとって大敵である。抽出操作後には必ず完全にとばして、バッファー類に再懸濁する必要がある。メタノール抽出もよく行われるが、その場合でも反応時の最終メタノール濃度は最高でも10～15%未満である。

反応を増長するものとして、ペルオキシダーゼ類の酵素が考えられる。これはキットに含まれている酵素と同じもので、わさびなどの根菜類などに多くふくまれている。洗浄過程で取り除かれているはずであるが、念のため検出物質を破壊しない範囲で加熱するなど、失活させたほうがよい。ELISA操作の注意点として反応のバラツキをもたらす大きな要因の一つは時間差である。特に短時間（15分程度）の操作で定量するキットの場合には重要な要素となる。ピペット等の操作に習熟し、操作中の妨げとなる要因をできる限り排除することで各ウェルの反応時間ができるだけ同じ程度になるように工夫する必要がある。

一般に試薬類は冷蔵保存されているので、操作前には室温（20～25℃）にまで戻しておく必要がある。通常、冷蔵庫から取り出し、室温にさらしても約一時間以上はかかる。

標準液ウェルを用いた標準検量線は、たとえ同一日同一時間であっても、必ず試験ごとに描く。抗原抗体反応や酵素基質反応は、試薬・環境の温度や状態、操作時間のわずかな違いによっても影響をうけるため、試料ウェルと同時に試験して比較しない限り、正確な結果は得られない。

各標準液ウェルは、各濃度につき2つ以上で行い各々の平均値を取ると、操作ミスなどで同一標準の両ウェル間で差異が生じて、他の標準液の結果から推定し除外することもできる。また、不都合が考えられる場合などの重要な参考情報となる。

抗体はその性格上、認識部位として似たような構造を持つ物質にもある特定の割合で反応する。検出対象を厳格に定義しそれ以外はできるだけ検出したくない場合には、その抗体の欠点として留意する必要がある。反対にその特異性の低さを利用するケースも多くある。ある物質が似たような構造部位を持つということは、対象の物質と同じような危害をもたらす可能性がある。そこで、特異性の低さを積極的に利用して、それらの物質全体を包括的に捕捉・測定する。このような場合、他の類似物質に対する反応度合は、中心的に検出する物質に対する反応に比べて常に一定の割合であり、その割合を交差反応（Cross Reactivity）という。

結果の解釈の際には、交差反応のデータにも十分にも配慮する必要がある。しかし、大抵の場合、中心的に検出したい物質に照準をあわせたり、そうでない場合には一般的な検査ニーズにあうような交差反応を意図的に調整したり、工夫する必要がある。

データ処理法

デルタソフト3による陰イオン界面活性剤の濃度決定

デルタソフト3はELISA法専用のデータ処理ソフトである。LASの量（mg/l）と測定用標準溶液の吸光度を使用して4-parameter logistic fitting回帰後、回帰式より検液中のLAS濃

度を算出する。この処理法はELISAキットを製造している武田薬品工業株式会社に依頼して行った。デルタソフト3を用いた処理法はデルタソフト特有のやり方であり、Excelでは計算できない。そのため、それに代わる簡便なデータ処理法（プロット32）を見出した。

プロット32による陰イオン界面活性剤の濃度決定

プロット32はテキスト形式の数値データファイルから、2次元散布図を作成するためのアプリケーションである。プロット32は、すでにファイルとして存在する数値データを迅速にグラフ化し、x軸、y軸で線形軸、対数軸、逆数軸が単独指定可能である。このソフトを用いて両対数グラフを作った。

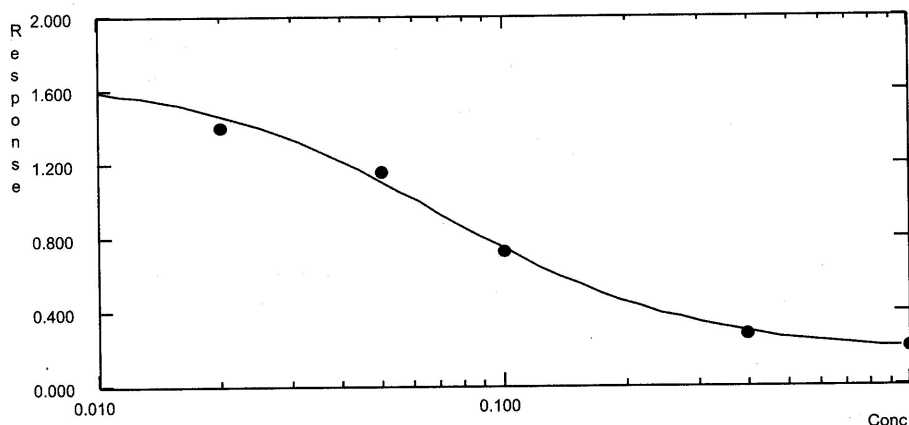
表10 デルタソフト3

8月25日	Abs(450 nm)*1	阻害率(B/BO%)*2	濃度(ppm)
平和台大橋 右岸	1.554	91.1	0.013
平和台大橋 左岸	1.530	89.7	0.015
宮崎大橋 左岸	1.676	98.2	(-)
高松橋 右岸	2.593	152.0	(-)
橋橋 右岸	1.744	102.2	(-)
大淀大橋 右岸	1.600	93.8	0.009
小戸之橋 左岸	1.783	104.5	(-)

(-) …サンプルAbs>調整標準液Absであるため計算不能

※1 LASは波長450nmで最大波長となる。

※2 阻害率 (%) = 各濃度の吸光度(B)/標準溶液の濃度0 (mg/ℓ)での吸光度(BO)×100
阻害率とはLASが抗体と結合するのを阻害する割合のことである。LAS濃度0 (mg/ℓ)のときを100%とする。



$$Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$$

A = 1.678, B = 1.415, C = 0.071, D = 0.169, 50% = 0.924
RMS = 0.154, r = 0.994, r2 = 0.987, J = 1.000

図12 デルタソフト3

表11 プロット32による濃度決定

8月25日	Abs(450 nm)	阻害率(%)	阻害率(プロット32)*3	濃度(ppm)
平和台大橋 右岸	1.554	91.1	91.0	0.014
平和台大橋 左岸	1.530	89.7	89.2	0.015
宮崎大橋 左岸	1.676	98.2	98.0	0.010
高松橋 右岸	2.593	152.0	(-)	(-)
橘橋 右岸	1.744	102.2	(-)	(-)
大淀大橋 右岸	1.600	93.8	94.4	0.012
小戸之橋 左岸	1.783	104.5	(-)	(-)

(-) …サンプルAbs>調整標準液Absであるため計算不能

※3 吸光度 (Abs) より阻害率を求めて、その値に近い数値をプロット32のグラフから導き出したもの。

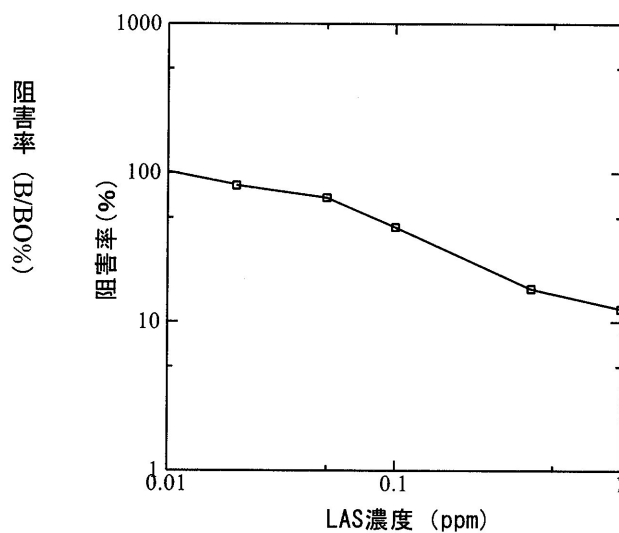


図13 2004年8月25日採取の結果

表10のデルタソフト 3 を用いて求めた濃度と表11のプロット32を用いて求めた濃度はほぼ同じ値になったので、プロット32を用いてLASの濃度を求めることにした。

2004年8月25日採取分の結果について

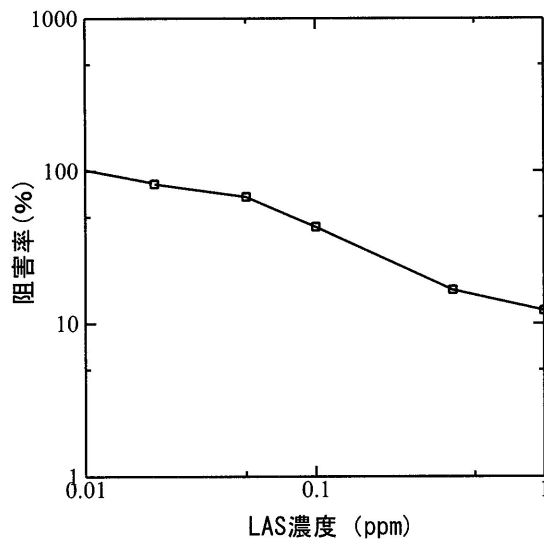


図14 8月25日の検量線

表12 8月25日の調整標準溶液の吸光度と阻害率

調整標準溶液 (ppm)	Abs(450nm)	阻害率 (%)
1	0.208	12.2
0.4	0.284	16.7
0.1	0.734	43.0
0.05	1.158	67.9
0.02	1.402	82.2
0	1.706	100.0

表13 8月25日の大淀川7地点の陰イオン界面活性剤濃度

大淀川7地点	Abs(450 nm)	阻害率 (%)	阻害率(プロット32)	濃度 (ppm)
平和台大橋 右岸	1.554	91.1	91.0	0.014
平和台大橋 左岸	1.530	89.7	89.2	0.015
宮崎大橋 左岸	1.676	98.2	98.0	0.010
高松橋 右岸	2.593	152.0	(-)	(-)
橘橋 右岸	1.744	102.2	(-)	(-)
大淀大橋 右岸	1.600	93.8	94.4	0.012
小戸之橋 左岸	1.783	104.5	(-)	(-)

(-) … サンプルAbs > 調整標準液Absであるため計算不能

※3 ml セル使用

2004年 8 月 25 日の実験では理論曲線に近い検量線を引くことができた。大淀川 4 地点の濃度はいずれもの地点も基準値の 0.2 ppm を大幅に下回る 0.015 ppm 以下の濃度を示した。残りの 3 地点については吸光度の値がやや高めに出てしまい、検液の Abs 値が検量線の Abs 値より上回ってしまったため、濃度を求めることができなかった。原因として、吸光度測定操作が適当でなかった可能性が考えられる。

2004年 10 月 27 日の実験では検液の Abs 値が検量線の Abs 値より上回ってしまったため、濃度を求めることが出来なかった。検量線を見ると、理論曲線のような右下がりの曲線とは異なる、直線的な曲線を描いたため、検量線に問題があったのではないかと考える。

2004年 11 月 4 日の実験では、検量線の濃度設定範囲が適切ではなかったので、値を得ることができなかった。よって、測定範囲を 0.001 ppm ~ 0.1 ppm の範囲に限定して濃度を算出していくことは適当ではないということが分かった。

2004年 12 月 9 日の実験では吸光度を測定する際に、これまで使用していた 3 ml セルから 1 ml セルに変えて実験を行なった。しかし、今回も理論曲線とは異なる検量線が描かれ、濃度を算出することができない結果となった。

8 月に行った実験では大淀川 4 地点の濃度を求めることができたが、10 月、11 月、12 月に行った実験では濃度を求めることができなかった。その原因として、標準溶液の濃度を適切に測定することができなかったためと考える。この理由として、次のようなことがあげられる。まず、測定試料が多かったために定められた時間内に実験を進行させることが難しく、これによって抗原抗体反応や発色反応が過剰に反応してしまい、測定結果に影響が出たと考える。次に、抗原抗体反応後に行う未反応物除去のタッピング操作の際、その操作に個人差が生じ、それが結果に影響を与えたのではないかと考える。

ELISA 法による大淀川 7 地点の陰イオン界面活性剤濃度の測定を 5 ヶ月に渡って行ったが、特に検量線について満足のいく結果を得ることができなかった。10 月、12 月の河川水の濃度を算出できなかった理由として、検量線に問題があると考える。そこで、理論曲線に近い 8 月の検量線を用いて 10 月、12 月の大淀川 7 地点の濃度を算出した。

表 14 10 月 27 日の大淀川 7 地点の陰イオン界面活性剤濃度

	Abs(450 nm)	阻害率(%)	阻害率(プロット32)	濃度(ppm)
平和台大橋 右岸	0.908	53.2	52.8	0.073
平和台大橋 左岸	0.803	47.1	47.1	0.086
宮崎大橋 左岸	1.454	85.2	86	0.017
高松橋 右岸	1.428	83.7	84.3	0.019
橘橋 右岸	1.355	79.4	79.7	0.024
大淀大橋 右岸	1.551	90.9	91	0.014
小戸之橋 左岸	1.502	88.0	87.6	0.016

※ 3 ml セル使用

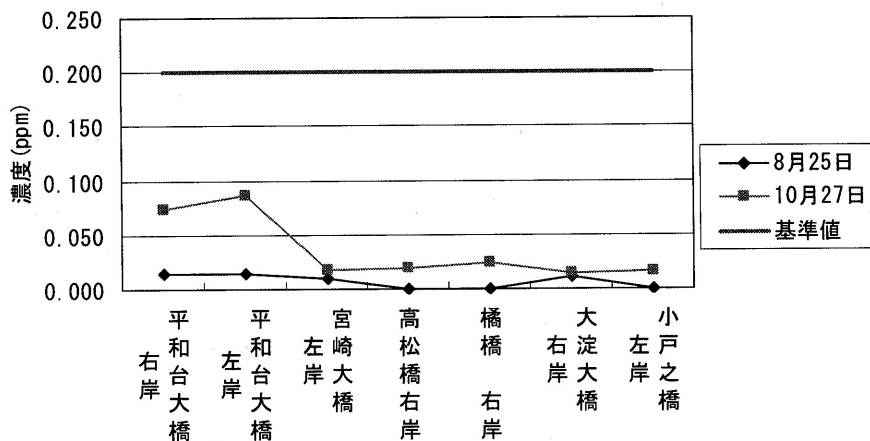


図15 大淀川7地点のLAS濃度

まとめ

以上の結果をまとめると以下のようなものである。

メチレンブルー法により1年を通じて大淀川7地点での陰イオン界面活性剤濃度を決定できた。なお、季節変化によるMBAS濃度の変動はほとんどなく、1年を通して陰イオン界面活性剤濃度は低く（水道法の陰イオン界面活性剤基準値の約2分の1の濃度）、安全であることが判明した。また、ELISA法では、大淀川7地点での陰イオン界面活性剤濃度は水生生物に悪影響を与えるとされているLAS値の約5分の1の濃度であることが判明した。

参考文献

- 1) 北原 文雄他 著、界面活性剤 物性・応用・化学生態学
- 2) 茅 陽一 監修、オーム社編、環境年表 2002/2003
- 3) 日本分析化学会北海道支部編、水の分析 第4版
- 4) 眞柄泰基 監修/水道水質問題研究会 編著、水道の水質調査法 [水源から給水栓まで]
- 5) 環境省環境基準水質汚濁に係る環境基準について

(2005年4月30日受理)