

# 三次元励起蛍光マトリクス法を用いた沖縄県内河川水における 溶存有機物の特性把握

城間一哲

Characterization of Dissolved Organic Matter in River Waters in Okinawa Prefecture using  
Three-Dimensional Excitation-Emission Matrix Fluorescence Spectroscopy

Ittetsu SHIROMA

**要旨：**沖縄県では、河川や海域等の公共用水域における水質汚濁事例が度々発生している。それらが発生した際、当研究所では必要に応じ原因究明のための調査を行っている。調査にあたっては、事故時の水質と比較するために平常時の水質を把握しておく必要がある。そこで本研究では、三次元励起蛍光マトリクス法を用いて沖縄県内河川水における溶存有機物の水質特性の把握を目的に調査した。その結果、三次元励起蛍光スペクトルにおいては、試料毎の最大相対強度を持つ極大ピーク波長は、領域Ⅰと領域Ⅲの二つの領域に分布する傾向を示した。よって、これらの領域以外に極大ピーク波長が分布した試料については何かしらの水質異常がある可能性が示唆された。レーダーチャートにおいては、Ⅲ＞Ⅱ＞Ⅰ＞Ⅴ＞Ⅳ型が最も多く、すべての地域で確認された。また、南部地域の一部の河川についてはⅢ＞Ⅴ＞Ⅱ＞Ⅳ＞Ⅰ型が分類され、それらの共通点として環境基準類型の下位類型であることが確認された。クラスター分析によるデンドログラムにおいては、レーダーチャートによる型の分類とクラスターが概ね一致した傾向が確認された。また、北部地域と中部・南部・石垣島地域の河川で水質特性が分類される傾向が確認された。

**Key words：**溶存有機物、三次元励起蛍光マトリクス（EEM）法、レーダーチャート、クラスター分析、デンドログラム

## I はじめに

沖縄県では、河川や海域等の公共用水域における水質汚濁事例が度々発生している。その主な事例として魚類へい死事例<sup>1)</sup>、環境水の着色事例<sup>2)</sup>および油流出事例<sup>3)</sup>等が挙げられる。これらの事例が発生した際、当研究所では必要に応じ原因究明のための調査を行っている。調査にあたっては、事故時の水質と比較するために平常時の水質特性を把握しておく必要がある。

当研究所では、その一環として既報<sup>4)5)</sup>において県内公共用水域におけるイオン類や鉛同位体比の平常時の水質特性を把握し報告した。ただし、水質特性の把握にはそれらに限らず、多角的なアプローチが必要である。そのため本研究では、その測定項目として溶存有機物の蛍光特性に着目した。

河川や湖水等に含まれる溶存有機物は、生物難分解性であるフルボ酸等をはじめとした多種多様な物質で構成されており、その構成成分の組成や濃度は地域的特性や季節変化等の影響を受け水質毎に異なる傾向を示す<sup>6)</sup>。そのため、溶存有機物は環境水の水質変動の把握や事故

時における汚染源特定にかかる指標として用いられている<sup>7)8)</sup>。溶存有機物の測定方法のひとつとして三次元励起蛍光マトリクス法（以下、「EEM法」という）がある。EEM法は、励起波長と蛍光波長を変化させながら蛍光強度を測定することで、励起波長を縦軸、蛍光波長を横軸および励起により発生した蛍光強度を色調（等高線）とする三次元励起蛍光スペクトルが得られる。このスペクトルの蛍光ピーク数、ピーク波長位置および相対強度から水中の溶存有機物の定性と定量の評価が可能である<sup>9)</sup>。

そこで本研究では、EEM法を用いて沖縄県内河川水における溶存有機物の三次元励起蛍光スペクトルを測定し、水質特性を把握した。また、レーダーチャートやクラスター分析による解析を併せて行ったのでその結果についても報告する。

## II 実験

### 1. 装置

日本分光製蛍光分光光度計 FP8500 を用いた。

## 2. 試薬

強度規格化には富士フイルム和光純薬工業製特級用(一)-キニーネ硫酸塩二水和物を用いた。ブランク試料にはMerck製 MILLI-Q ADVANTAGE A10で精製した超純水を用いた。チロシンは富士フイルム和光純薬工業製特級用L-チロシンを用いた。

## 3. 調査試料

2023年7月から2024年7月にかけて県内4保健所が採取した公共用水域調査の河川水試料27検体に筆者自ら採取した河川水試料9検体を加えた計36検体を用いた(図1)。沖縄島の34検体を北部地域の①辺野喜川114から⑩羽地大川46までの16検体、中部地域の⑪漢那川

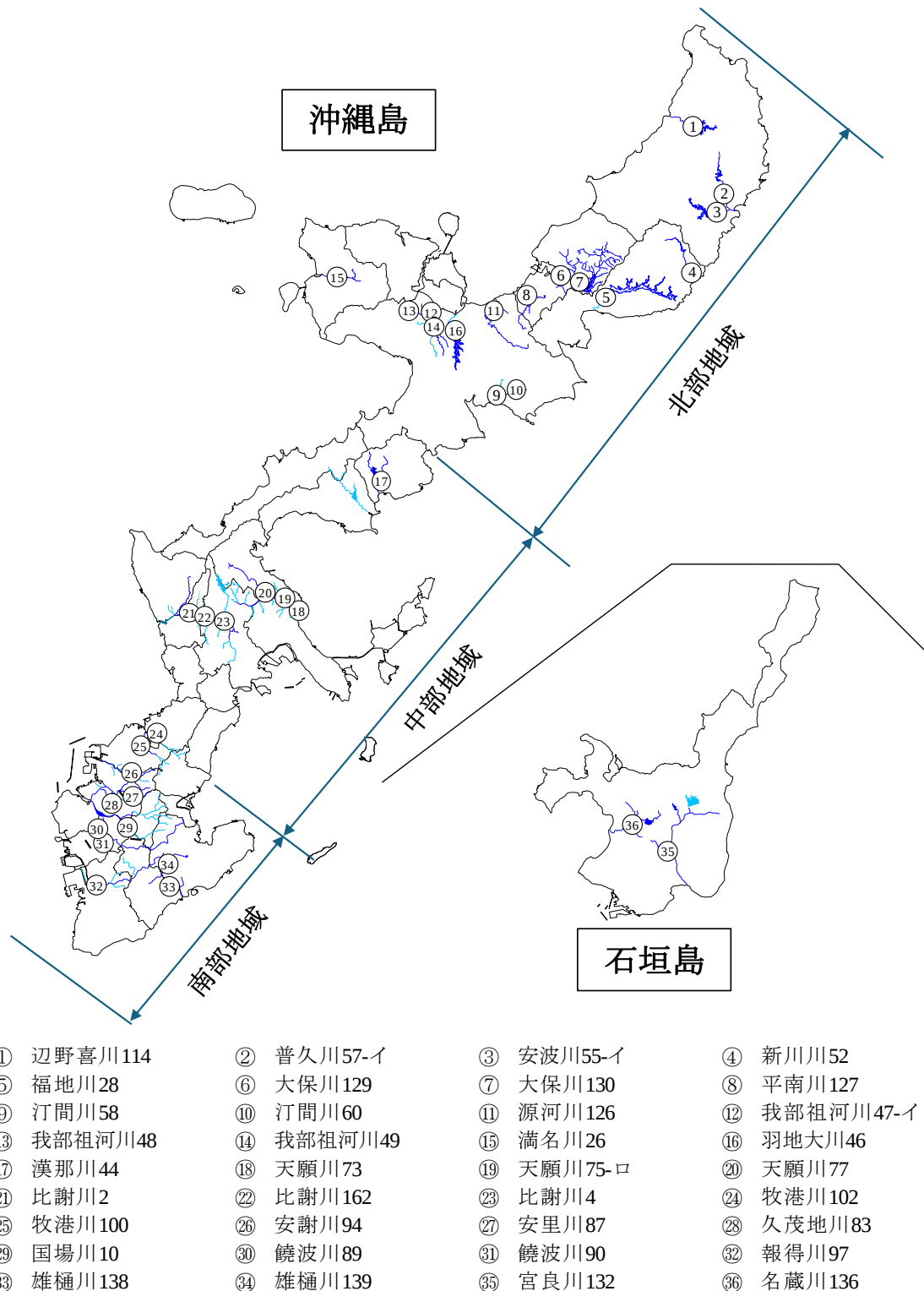


図1. 調査地点図.

44 から㉓比謝川4 までの7 検体, 南部地域の㉔牧港川 102 から㉕雄樋川 139 まで 11 検体に分けて考察した。

#### 4. 測定方法

試料を 5C ろ紙でろ過し, ろ液を測定試料とした。測定試料を 10 mm 石英セルに移し, 蛍光分光光度計を用いて三次元励起蛍光分析を行った。励起光 (Ex) は 200–400 nm, 蛍光 (Em) は 280–550 nm の範囲を 5 nm 間隔, スキャンスピード 10,000 nm/min で測定した。測定時にブランク試料 (超純水) を測定し, 得られた値から差し引いた。また, 蛍光強度は 10 µg/L 硫酸キニーネ溶液の励起波長 Ex350 nm/蛍光波長 Em450 nm における蛍光強度を 1 QSU として相対強度で表した。

#### 5. 解析方法

##### (1) 三次元励起蛍光スペクトル

得られた三次元励起蛍光スペクトルをより視覚的に理解するために, Chen ら (2003) <sup>10)</sup> の 5 つの領域 (図 2) を重ねて表示した。領域 I と II は芳香族タンパク質, 領域 III はフルボ酸様, 領域 IV は微生物副産物および領域 V はフミン酸様を示している。なお, 当研究所では PARAFAC 解析ソフトを所有していないため, 多成分の重なり合った蛍光ピークを各成分に分けて評価することができない。そのため, レーダーチャートとデンドログラムを作成し水質毎の比較を試みた。

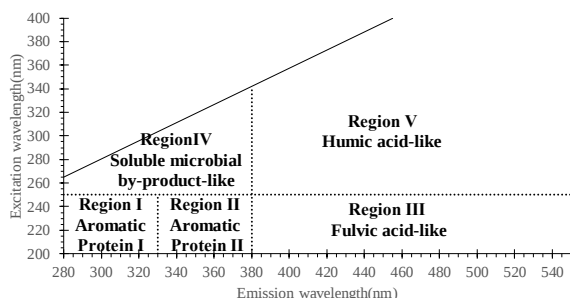


図 2. 励起-蛍光波長境界に基づく 5 つの EEM 領域 <sup>10)</sup>。

##### (2) レーダーチャート

三次元励起蛍光スペクトルを 5 つの領域に分け各々の平均値を算出し, 各領域の平均値の和で除し 100 分率の 5 角形で示した。ヘキサダイアグラムのような水質の型の分類がないため, 独自に型を定義することにした。領域の割合が大きい順に並べ, 型を分類した。例えば, 図 3 (a) の三次元励起蛍光スペクトルから各領域の割

合を算出すると, 領域 I が 2%, 領域 II が 13%, 領域 III が 24%, 領域 IV が 18% および領域 V が 43% である。これをレーダーチャートで示すと図 3 (b) の型が得られ, 「V>III>IV>II>I 型」と分類した。解析データは, 測定した励起光 (Ex) の 200–400 nm, 蛍光 (Em) の 280–550 nm のデータ 2,255 個のうち, 強度 (QSU) が 0 のデータ 406 個を除いた 1,849 個を用いた。

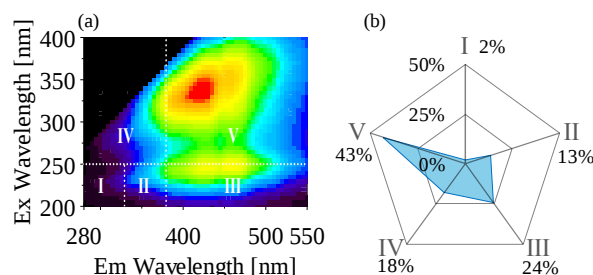


図 3. (a) 三次元励起蛍光スペクトルの例, (b) レーダーチャートの例。

##### (3) デンドログラム

デンドログラム (樹形図) は, 多くの変数を持っている試料を, それらの間の類似度に基づいて性質の似たもの同士のグループにまとめて分類するクラスター分析によって図示したものである <sup>11)</sup>。解析データは, レーダーチャートで算出した百分率の値を用いた。クラスター分析の手法は階層型-凝集法を用いた。距離計算は  $\sqrt{(2-2 \times \text{相関係数})}$ , 合併後の距離計算はウォード法で設定した。

### III 結果および考察

#### 1. 三次元励起蛍光スペクトル

EEM 法によって得られた三次元励起蛍光スペクトルに Chen ら (2003) の 5 つの EEM 領域を重ねた結果を図 4 に示した。スペクトルの色が黒色から赤色に明るくなるにつれ相対強度が高くなることを示しており, 試料毎の最大相対強度にスケールを合わせることで強度やピーク形状の比較を行えるようにした。最大相対強度が最も低い地点は㉑汀間川 58 および㉕満名川 26 の 1.9 QSU (㉑: Ex220 nm/Em290 nm, ㉕: Ex200 nm/Em300 nm), 最も高い地点は㉒報得川 97 の 10 QSU (Ex245 nm/Em430 nm) であった。これらの地点のある河川は類型指定されており, ㉑と㉕は類型 A, ㉒報得川 97 は類型 E である <sup>12)</sup>。三次元励起蛍光スペクトルの最大相対強度は, 「低ければ良好な水質, 高ければ人為由来汚染の影響がある。」とは

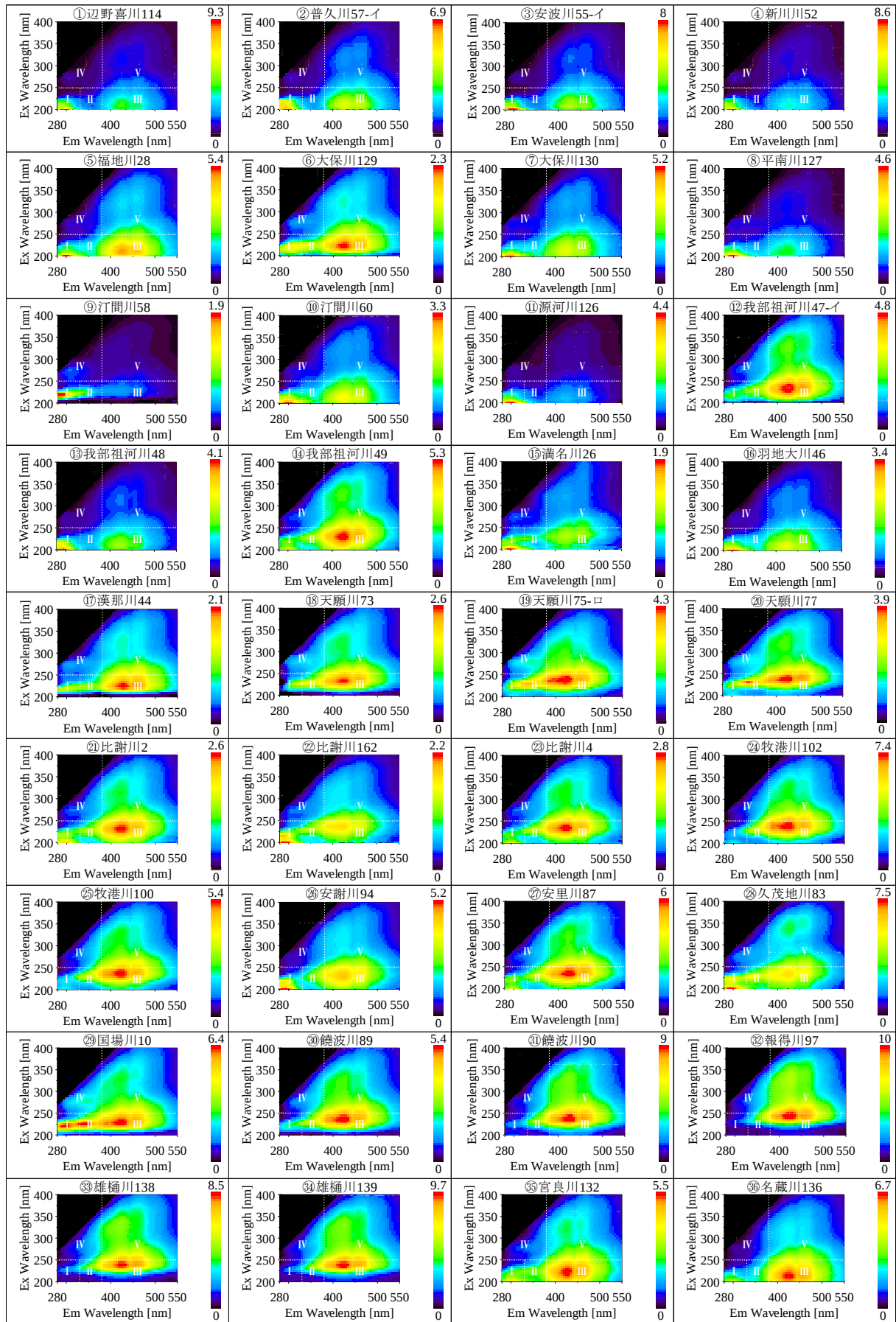


図4. 三次元励起蛍光スペクトル.

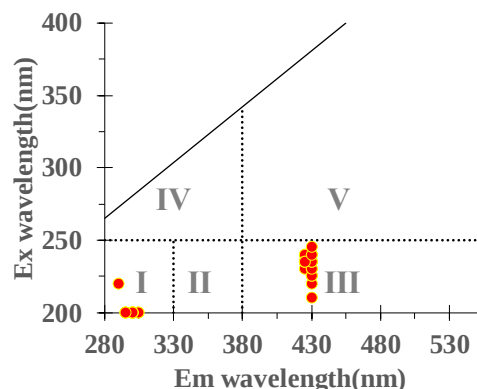


図 5. 最大相対強度における極大ピーク波長位置.

一概にはいえないが、当該地点については BOD 等の指標と溶存有機物の間に相関がある可能性が示唆された。

次いで、最大相対強度を持つ極大ピーク波長の位置を試料毎に確認したところ、領域 I と領域 III の二つの領域に分布する傾向を示した (図 5)。図 5 では、極大ピーク波長位置が被っているため領域 I と III の検体数に差があるように見えるが、実際には、領域 I では 16 検体、領域 III では 20 検体とほぼ同数であった。領域 I については芳香族タンパク質であり、その領域内の物質としてチロシン様挙げられる<sup>10)</sup>。チロシン様は Chen ら (2003)<sup>10)</sup>によると、Ex230 nm/Em280–300 nm にピーク波長があると報告されている。実際に、試薬のチロシンを購入しピーク波長位置を確認したところ、Ex200–225 nm/Em290–310 nm と概ね同じ場所に位置した (図 6)。そのため、領域 I の極大ピーク波長はチロシン様の可能性が示唆された。領域 III についてはフルボ酸様であり、Chen ら (2003)<sup>10)</sup>によると、Ex220–250 nm/Em410–440 nm にピーク波長があると報告されている。フルボ酸の試薬は入手困難のためピーク波長位置の確認はできていないが、文献値と概ね同じ位置に試料のピークが確認された。

また春田ら (2020)<sup>13)</sup>によると、汚染水に特徴的なピークとして領域 II 内の Ex230 nm/Em370 nm、領域 IV 内の Ex285 nm/Em365 nm および Ex275 nm/Em315 nm が挙げられている。今回の試料では、それらの波長に極大ピーク波長を持つ試料は確認されなかったが、河川水において領域 I および III 以外の領域に極大ピーク波長を持つ試料が確認された場合、何かしらの水質異常の可能性が疑われる。

## 2. レーダーチャート

試料毎のレーダーチャートに分類した型を併記した結果を図 7 に示した。すべての試料は 9 つの型に分類され

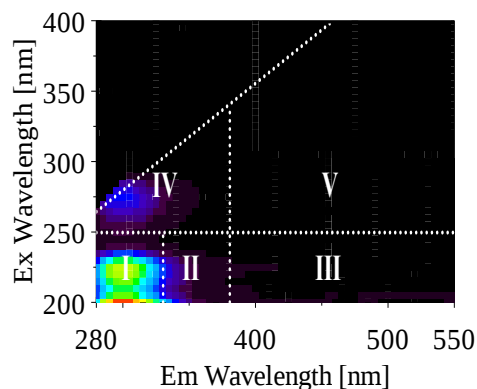


図 6. チロシンの三次元励起蛍光スペクトル.

た。その内訳は、III>II>I>V>IV型が 8 検体と最も多く、次いでIII>II>V>I>IV型が 6 検体、III>I>II>V>IV型およびI>III>II>V>IV型が 5 検体、II>III>I>V>IV型およびIII>V>II>IV>I型が 4 検体、III>II>V>IV>I型が 2 検体、I>II>III>IV>V型およびI>II>III>V>IV型が 1 検体の順であった。

最も多く分類されたIII>II>I>V>IV型とその次に多く分類されたIII>II>V>I>IV型はすべての地域で確認された。そのため、これらの型は本県の河川水における最も一般的な型である可能性が示唆された。領域 I の割合が上位 2 番目以内にあるという共通した特徴を持つI>II>III>(IV or V)>(V or IV)型、III>I>II>V>IV型およびI>III>II>V>IV型の計 12 検体はすべて北部地域であった。そのため、北部地域の河川は領域 I の割合が多く占める特徴を有する可能性が示唆された。III>V>II>IV>I型の 4 検体はすべて南部地域であり、領域 V の割合が 2 番目に高い特徴を有していた。これらの地点のある河川は類型指定されており、饒波川と雄樋川は D 類型、報得川は E 類型と下位類型である<sup>12)</sup>。そのため、この型に分類された河川は人為由来汚染の影響が高い可能性が示唆された。また、当該河川 4 検体の領域 III 内における極大ピーク波長の最大相対強度の平均値は 9.3 QSU と同じ領域内に極大ピーク波長をもつ 16 検体の平均値 4.6 QSU と比べ高い値であった。強度が高いことから汚染の影響の可能性が示唆された。II>III>I>V>IV型の 4 検体は、いずれも最大相対強度を持つ極大ピーク波長が領域 II 内に確認されていないものの、領域 II の割合が最も高い特徴を有していた。領域 II 内のピークが人為由来汚染の影響が示唆されていることから、領域 II の割合が高いこともその影響の可能性が示唆される。天願川については B 類型<sup>12)</sup>であるものの、環境省の 2021 年度化学物質環境実態調査結果ではイベルメクチン B1a と B1b が全国で最も高い値で検出されて

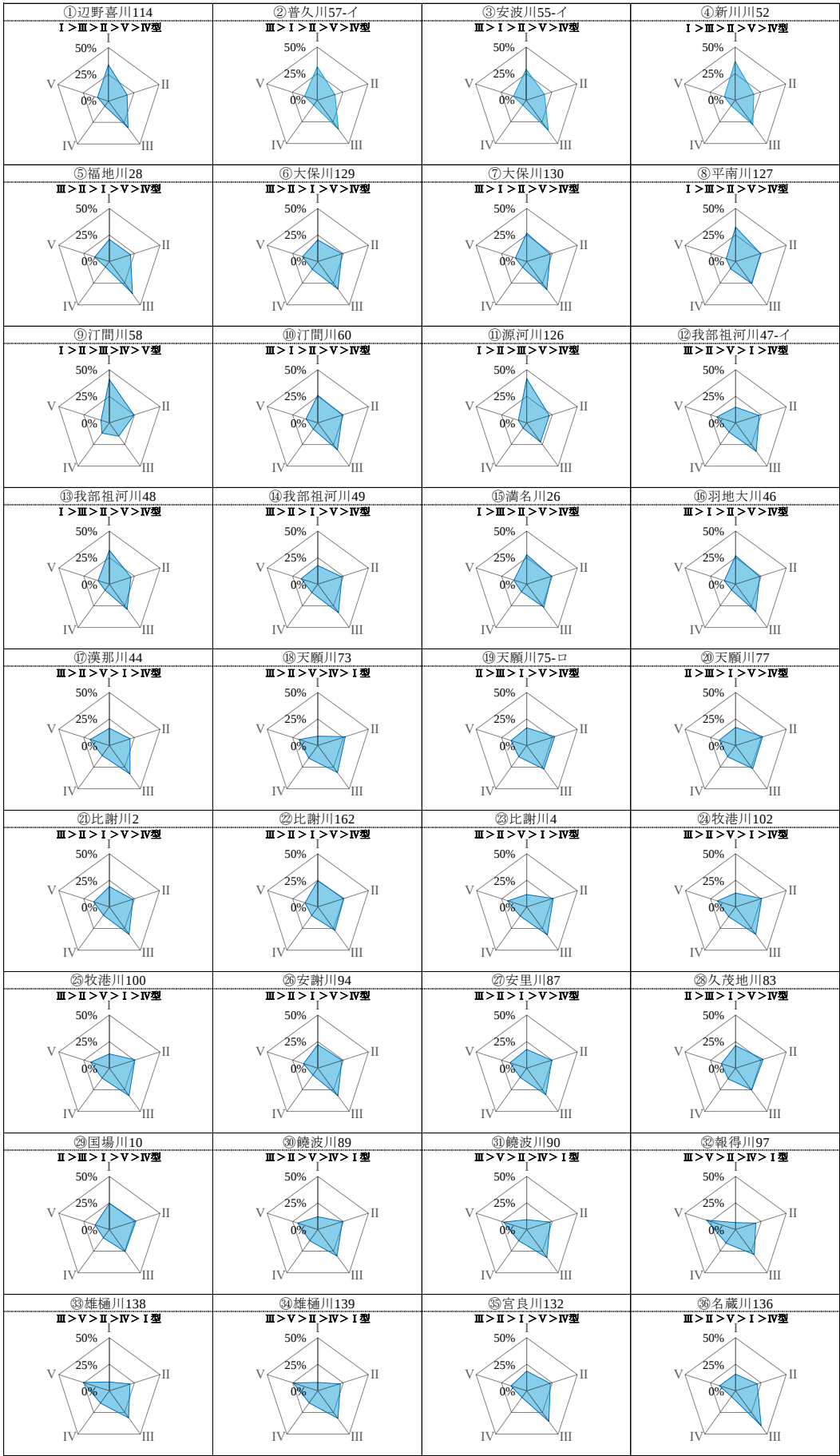


図 7. レーダーチャート.

おり人為由来汚染の影響が示唆される<sup>14)</sup>。久茂地川についてはC類型<sup>12)</sup>で本県の中で最も人口の多い那覇市街地を通る河川であり、人為由来汚染の影響が示唆される。国場川についてはE類型<sup>12)</sup>で環境省の2020年度化学物質環境実態調査結果ではフタル酸系の化学物質が複数検出されており、特にフタル酸ジエチルについては全国で最も高い値で検出され人為由来汚染の影響が示唆される<sup>15)</sup>。そのため、この型に分類された河川もまた人為由来汚染の影響が高い可能性が示唆された。

### 3. デンドログラム

クラスター分析により作成したデンドログラムにレーダーチャートで分類した型を併記した結果を図8に示した。クラスターC1からC16に分けられるにつれて、地点同士の水質が近くなることを表しており、レーダーチャートで分類した型が概ね同じクラスター内に属していることが確認された。次いでクラスター毎の傾向について確認した。

クラスターC1とC2では、C1に分けられた15検体のうち12検体が北部地域の河川、C2に分けられた21検体のうち17検体が中部・南部・石垣島地域の河川であった。そのため、北部地域と中部・南部・石垣島地域で水質特性が分類される傾向が確認された。クラスターC3とC4では、C4にⅢ>Ⅴ>Ⅱ>Ⅳ>Ⅰ型に分類された4検体すべてが分けられた。この段階で分けられたことから他の型とは大きく異なる水質であることが示唆された。クラスターC5とC6では、C6にⅠ>Ⅱ>Ⅲ>(Ⅳ or Ⅴ)>(Ⅴ or Ⅳ)型に分類された2検体すべてが分けられた。レーダーチャートの形状からも他の型と異なる水質であることが確認され、クラスター分析でも同様な結果が得られた。クラスターC7とC8では、様々な型が混在し、特徴的な傾向は確認されなかった。クラスターC9とC10では、C9に(Ⅰ or Ⅲ)>(Ⅲ or Ⅰ)>Ⅱ>Ⅴ>Ⅳ型が分類され北部地域の河川、C10に(Ⅱ or Ⅲ)>(Ⅲ or Ⅱ)>Ⅰ>Ⅴ>Ⅳ型が分類され中部・南部地域の河川であった。クラスターC11とC12では、C11のⅢ>Ⅱ>Ⅴ>(Ⅰ or Ⅳ)>(Ⅳ or Ⅰ)型の5検体とC12のⅡ>Ⅲ>Ⅰ>Ⅴ>Ⅳ型の2検体に分けられた。クラスターC13とC14では、C13のⅠ>Ⅲ>Ⅱ>Ⅴ>Ⅳ型の5検体とC14のⅢ>Ⅰ>Ⅱ>Ⅴ>Ⅳ型の5検体に分けられた。クラスターC15とC16では、C15のⅢ>Ⅱ>Ⅰ>Ⅴ>Ⅳ型の7検体とC16のⅢ>Ⅱ>Ⅴ>Ⅰ>Ⅳ型の3検体に分けられた。

続いて、同一河川内における地点毎の比較を行った。大保川では、⑥がⅢ>Ⅱ>Ⅰ>Ⅴ>Ⅳ型でC15、⑦がⅢ>Ⅰ>Ⅱ>Ⅴ>Ⅳ型でC14であった。⑥は上流に位置する二つの支流が合流した地点となっており、その支流の一つが⑦となっている。そのため、異なる型とクラスターを示したと考えられた。汀間川では、⑨がⅠ>Ⅱ>Ⅲ>Ⅳ>Ⅴ型でC6、⑩がⅢ>Ⅰ>Ⅱ>Ⅴ>Ⅳ型でC14であった。⑨は河口付近に位置し、電気伝導度は2,200 mS/mと海水の影響が示唆される。そのため、同一河川内であっても異なる型とクラスターを示したと考えられた。我部祖河川では、⑫がⅢ>Ⅱ>Ⅴ>Ⅰ>Ⅳ型でC16、⑬がⅠ>Ⅲ>Ⅱ>Ⅴ>Ⅳ型でC13、⑭がⅢ>Ⅱ>Ⅰ>Ⅴ>Ⅳ型でC15であった。当該地点は二つの河川に分かれており、⑫と⑭が同一河川で⑬と異なっている。⑫(C16)と⑭(C15)のクラスターが近く、⑬(C13)が離れていることから、水質特性と地点位置が概ね一致する結果が得られた。天願川では、⑮がⅢ>Ⅱ>Ⅴ>Ⅳ>Ⅰ型でC11、⑯と⑰がⅡ>Ⅲ>Ⅰ>Ⅴ>Ⅳ型でC12であった。⑮は河口付近に位置し、電気伝導度は960 mS/mと海水の影響が示唆される。そのため、同一河川内であっても異なる型とクラスターを示したと考えられた。比謝川では、⑱がⅢ>Ⅱ>Ⅰ>Ⅴ>Ⅳ型でC15、⑲がⅢ>Ⅱ>Ⅰ>Ⅴ>Ⅳ型でC10、⑳がⅢ>Ⅱ>Ⅴ>Ⅰ>Ⅳ型でC11であった。当該地点では、上流から下流に向けて㉓→㉒→㉑の順に流れており、㉓は上流に位置する二つの支流が合流した地点となっており、その㉓に下流に位置する支流の㉒が合わさり、㉑へと流れる位置関係である。そのため、三地点とも異なるクラスターを示したと考えられた。牧港川では、㉔と㉕はいずれもⅢ>Ⅱ>Ⅴ>Ⅰ>Ⅳ型でC11であった。当該地点では、それぞれ別の上流をもつ地点となっており、互いの水質が混じり合わない地形である。しかしながら、前述の河川とは異なり、異なる支流同士であっても同様な水質であることが確認された。饒波川では、㉖がⅢ>Ⅱ>Ⅴ>Ⅳ>Ⅰ型でC11、㉗がⅢ>Ⅴ>Ⅱ>Ⅳ>Ⅰ型でC4であった。㉖は河口付近に位置し、電気伝導度は4,000 mS/mと海水の影響が示唆される。そのため、同一河川内であっても異なる型とクラスターを示したと考えられた。雄樋川では、㉘と㉙はいずれもⅢ>Ⅴ>Ⅱ>Ⅳ>Ⅰ型でC4であった。㉘は上流に位置する二つの支流が合流した地点となっており、その支流の一つが㉙となっている。同じ型であったことから、別の支流も同様な水質であるか、または寄与が少ない可能性が示唆された。

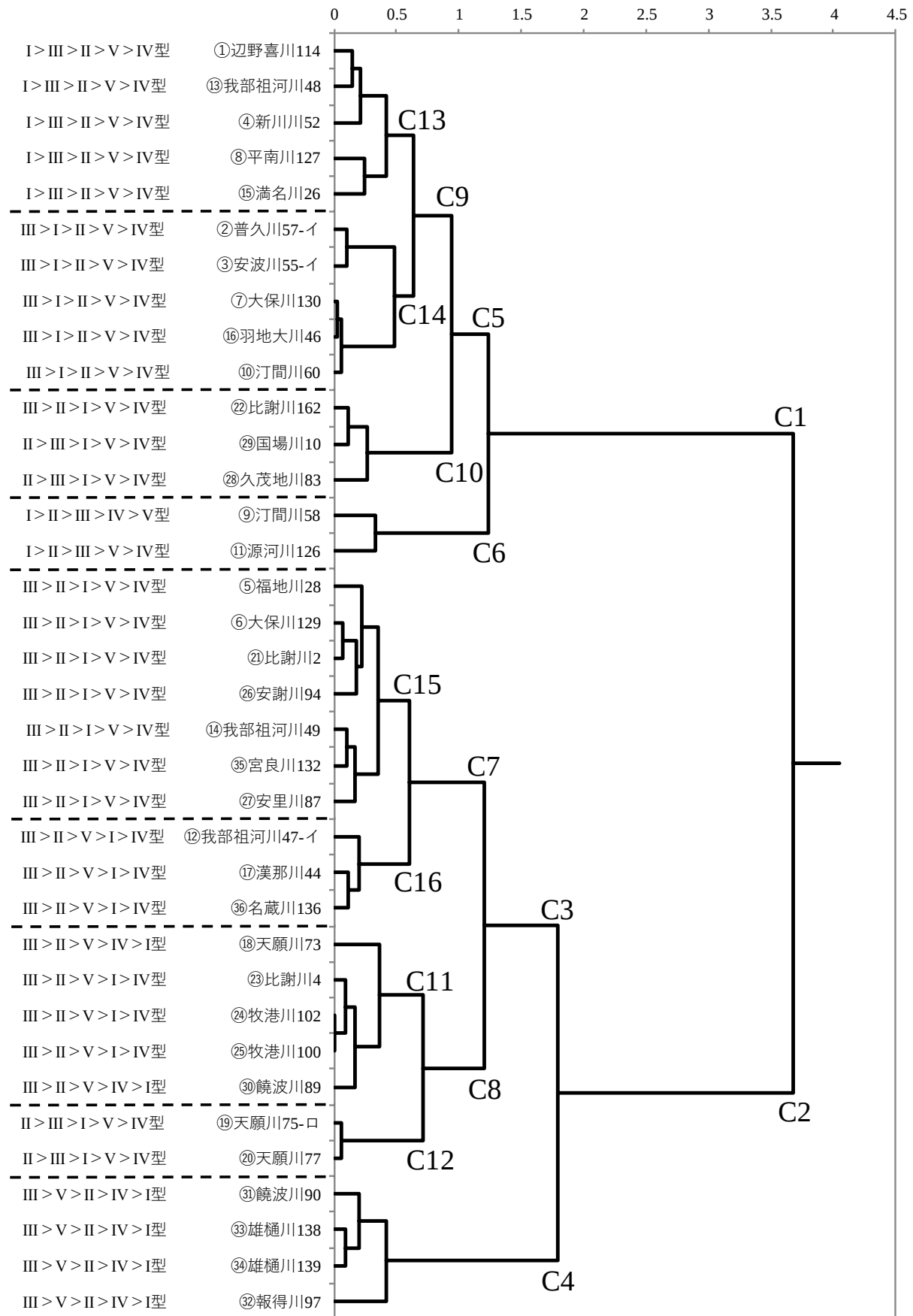


図 8. クラスター分析によるデンドログラム.

#### Ⅳ まとめ

三次元励起蛍光マトリクス法を用いて沖縄県内河川水における溶存有機物の水質特性の把握を目的に調査した。その結果、三次元励起蛍光スペクトルにおいては、試料毎の最大相対強度を持つ極大ピーク波長は、領域Ⅰと領域Ⅲの二つの領域に分布する傾向を示した。よって、これらの領域以外に極大ピーク波長が分布した試料については何かしらの水質異常がある可能性が示唆された。レーダーチャートにおいては、Ⅲ＞Ⅱ＞Ⅰ＞Ⅴ＞Ⅳ型が最も多く、すべての地域で確認された。また、南部地域の一部の河川についてはⅢ＞Ⅴ＞Ⅱ＞Ⅳ＞Ⅰ型が分類され、それらの共通点として環境基準類型の下位類型であることが確認された。クラスター分析によるデンドログラムにおいては、レーダーチャートによる型の分類とクラスターが概ね一致した傾向が確認された。また、北部地域と中部・南部・石垣島地域の河川で水質特性が分類される傾向が確認された。

#### Ⅴ 参考文献

- 1) 城間一哲・比嘉元紀・井上豪・知花睦・座間味佳孝・比嘉彩也香・宮城真希子 (2022) 沖縄県におけるへい死魚調査事例－2021 年度－。沖縄県衛生環境研究所報, 56 : 102－108.
- 2) 城間一哲・友寄喜貴 (2023) 沖縄県における河川水白濁に関する事例研究。全国環境研会誌, 48 (2) : 15－20.
- 3) 沖縄県衛生環境研究所 (2011) 沖縄県内の油流出事例の発生状況。衛環研ニュース, 21.
- 4) 城間一哲・座間味佳孝・友寄喜貴 (2023) ICP-MS を用いた自然由来および人為由来試料中の鉛同位体比の把握。沖縄県衛生環境研究所報, 57 : 72－79.
- 5) 城間一哲 (2023) 沖縄県における環境水および特定施設排水の水質組成の把握。沖縄県衛生環境研究所報, 57 : 80－87.
- 6) 亀田豊・橘治国・清水達雄 (1999) 三次元励起・蛍光スペクトルを用いた溶存有機物のキャラクタリゼーション。環境工学論文集, 36 : 209－215.
- 7) 高橋基之・海賀信好・河村清史 (2004) 蛍光分析法による環境水中溶存有機物の計測。水環境学会誌, 27 (11) : 721－726.
- 8) 林むう・金崎隆宏・佐藤貴文・大瀬俊之・宮川修 (2020) 三次元蛍光分光分析を用いた水道水における水質異常検知時の原因推定手法の検討。水道研究発表会講演集, (0) : 714－715.
- 9) 福島武彦・中島俊之・今井章雄・松重一夫・尾崎則篤 (2001) EEMS による水中溶存有機物の特性解析。水環境学会誌, 24 (10) : 686－692.
- 10) Chen, W., P. Westerhoff, J. A. Leenheer, and K. Booksh. 2003. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. Environ. Sci. Technol. 37:5701-5710.
- 11) 森田浩 (2014) 図解入門ビジネス多変量解析の基本と実践がよーくわかる本。秀和システム, 東京, pp. 206－217.
- 12) 沖縄県 (2024) 令和 4 年度水質測定結果 (公共用水域及び地下水)。<[https://www.pref.okinawa.jp/\\_res/projects/default\\_project/\\_page/\\_001/004/765/r4syousaiban1.pdf](https://www.pref.okinawa.jp/_res/projects/default_project/_page/_001/004/765/r4syousaiban1.pdf)>. 2024 年 9 月アクセス.
- 13) 春田知昭・平林達也・北本靖子 (2020) 水道水質管理における三次元蛍光分析の活用。水道協会雑誌, 89 (3) : 2－11.
- 14) 環境省 (2021) 令和 4 年度版 化学物質と環境 (2021 年度 (令和 3 年度) 化学物質環境実態調査 調査結果報告書)。<[https://www.env.go.jp/chemi/kurohon/2022/tiikibetu\\_60.html](https://www.env.go.jp/chemi/kurohon/2022/tiikibetu_60.html)>. 2024 年 9 月アクセス.
- 15) 環境省 (2020) 令和 3 年度版 化学物質と環境 (2020 年度 (令和 2 年度) 化学物質環境実態調査 調査結果報告書)。<[https://www.env.go.jp/chemi/kurohon/2021/tiikibetu\\_60.html](https://www.env.go.jp/chemi/kurohon/2021/tiikibetu_60.html)>. 2024 年 9 月アクセス.