

厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)
「大規模災害および気候変動に伴う利水障害に対応した環境調和型
水道システムの構築に関する研究」
分担研究報告書

研究課題：高分解能質量分析計を用いた臭気原因物質の探索

研究代表者	秋葉道宏	国立保健医療科学院 統括研究官
研究分担者	高梨啓和	鹿児島大学学術研究院理工学域工学系 准教授
研究分担者	下ヶ橋雅樹	国立保健医療科学院生活環境研究部 上席主任研究官
研究協力者	小倉明生	京都市上下水道局水質管理センター 担当課長補佐
研究協力者	北村壽朗	神奈川県企業庁水道水質センター 副所長

研究要旨

水道水の異臭味障害の中で2番目の発生頻度となっている生ぐさ臭については、その臭気原因物質が十分に明らかとなっているとは言い難い。このため、浄水場では、機器分析ではなく官能試験によって水質管理が行われている。そこで本研究では、水道水生ぐさ臭の臭気原因物質を同定することにより、現在の官能試験による水質管理に代えて、機器分析による水質管理に道を開くことを目的とした。

臭気原因物質は、予想される物理化学的性質から GC/MS による分析が適していると考えられるが、未知物質の構造推定には、解析対象物質 (分析種) の分子が保存されやすいソフトなイオン化である electrospray ionization、および、構造推定に有効な linear ion trap を備えた高分解能 LC/MS が適しているため、誘導体化して LC/MS を用いて検討した。水源が異なる2か所の浄水場関連施設から、生ぐさ臭の原因生物である黄色鞭毛藻綱 *Uroglena americana* が共存している試料水の提供を受け、高分解能 LC/MS を用いて分析した。多変量解析を用いて、得られた分析結果を解析したところ、由来の異なる試料水から共通して検出され、試料水の TON および *Uroglena americana* の中群体換算数と高い相関関係を示す物質を発見した。同物質は、DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) で誘導体化されていると考えられるため、カルボニル化合物と考えられる。

A. 研究目的

水道水の異臭味障害の中で2番目の発生頻度となっている生ぐさ臭¹⁾については、原因物質として 1-heptanal、(2E,4E)-heptadienal、(2E,4Z)-heptadienal、(2E,4Z)-decadienal、(2E,4E,7Z)-decatrienal²⁾が指摘されている。しかし、浄水場では、これらの物質からは生ぐさ臭とは異なる臭気を感じるとの意見があり、他に原因物質が存在する可能性がある。このように、十分な知見が集積されていないことなどから、生ぐさ臭については、水道法において、物質の濃度ではなく臭気強度で項目化されている。生ぐさ臭の臭気原因物質 (以下、原因物質) が明らかになれば、詳細な実態調査、物性値に基づいた効率的な浄水処理技術の開発などに繋がる可能性があり、有益である。

以上のように、原因物質の同定は意義深い、環境中の微量有機物の同定には困難を伴う。未知有機物の同定は、一般的に、フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) による官能基推定、核磁気共鳴装置 (NMR) による構造解析、質量分析 (MS) による分子量測定などにより行われる。しかし、FTIR や NMR での測定を行うためには、夾雑物を除去したサンプルが数百 μg 程度必要になる。揮発性物質と考えられる原因物質を、精製した上で数百 μg 程度得ることは困難と予想される。

そこで本研究では、近年の質量分析の進歩を活用し、高分解能の LC/MS を用いて原因物質の構造を推定することとした。推定された構造の物質を合成できれば、原因物質の同定が可能である。

原因物質は、予想される物理化学的性質から、GC/MS による分析が適していると考えられる。し

かし、未知物質の構造推定には分子量関連イオンの検出確率が高いソフトなイオン化である electrospray ionization (ESI)を備え、構造推定に有効な linear ion trap を備えた高分解能 LC/MS が適している。このため、LC/MS で被検物質(分析種)を測定するに必要な誘導体化処理方法を昨年度検討し、これを確立した。本年度は、確立した方法を用いて、生ぐさ臭の原因生物である黄色鞭毛藻綱 *Uroglena americana* (ウログレナ) が発生した際に採取した水道原水を対象に分析を行った。また、これらとは水源が異なる浄水場関連施設から、生ぐさ臭の原因生物であるウログレナを培養した培養液の提供を受け、同様の分析を行った。

B. 研究方法

1. 試料水

京都市上下水道局蹴上浄水場取水池で、2016年4月13日から6月6日までに採水した6検体を水道原水試料水として用いた。採水は、ガロン瓶の口いっぱいまで行い、速やかに試験に供した。また、神奈川県宮ヶ瀬ダム放流水から2015年5月14日に採取したウログレナを表1に示すUr-1培地を用いて継代培養し、表2に示す条件で培養した培養液を培養試料液として用いた。培養は2つの容器を用いて同時並行で行われた。培養の結果、ウログレナの細胞数は11,000個/mL、44,000個/mLとなった。実験には、両者を等量混合した液を用いた。また、ウログレナを植種していない培地をコントロールサンプルとして用いた。

2. 試料水の濃縮

水道原水試料水中に存在する溶存酸素を除去するために、試料水3.7Lに対して1.75M亜硫酸ナトリウム水溶液を1mL添加し、ゆっくりと攪拌した。その後、ウログレナの細胞内に蓄積されている原因物質を細胞外に放出させるために、密閉した容器内で30分間60°Cに加熱した。培養試料液は、約1.75Mになるよう亜硫酸ナトリウムを添加して攪拌した後、密閉した容器内30分間60°Cに加熱した。室温になるまで放冷した後、ポリプロピレン製ハウジングのハウケイ酸ガラス製マイクロファイバーフィルター(Millex-AP50、Merck Millipore、ドイツ)を用いて加圧ろ過を行った。

表1 Ur-1 培地の組成

MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg
KCl	1 mg
NH ₄ NO ₃	5 mg
β-グリセロリン酸ナトリウム·5H ₂ O	4 mg
Fe-EDTA	0.5 mg
ビタミンB ₁	10 µg
ビタミンB ₁₂	0.1 µg
ビオチン	0.1 µg
PIV金属混液	1 mL
精製水	999 mL
pH	7.5

表2 *Uroglena americana* の培養条件

項目	条件
温度 [°C]	15
光強度 [µmol/(m ² s)]	39
明暗条件	12時間明/12時間暗
培養期間	2016/7/1~2016/7/29

ろ過された試料水は、直列に連結された2種類の固相吸着カートリッジ (Sep-Pak PS-2 および AC-2、日本ウォーターズ、東京) にインラインで通水され (20 mL/min)、疎水性相互作用により試料水中の原因物質を吸着した。なお、固相吸着カートリッジは、使用前に、アセトニトリル、ジクロロメタン、超純水を用いて洗浄・コンディショニングを実施した。原因物質を吸着した後、4 mLのアセトニトリル、4 mLのジクロロメタンを用いて原因物質を脱離した。脱離は、バックフラッシュで行い、流速を0.5 mL/minとした。脱離の途中で、3 minのsoak timeを設けた。

また、コントロールサンプルに加え、純水を用いて一連の操作を実施したブランクサンプルを調製した。

3. 2,4-dinitrophenylhydrazine を用いた誘導体化処理

ジクロロメタンまたはアセトニトリルに2,4-dinitrophenylhydrazine (以下、DNPH) および硫酸またはリン酸を混合し、20分または90分間反応させた。硫酸を用いた場合には、純水を加えて液-液抽出を行い、硫酸を除去した。ジクロロメタンを用いた場合には、溶媒を減圧除去し、アセトニトリルに溶媒転換した。

4. 高分解能 LC/MS を用いた生ぐさ臭臭気原因物質の探索

回収され誘導体化された原因物質は、アセトニトリル耐性を有する孔径 0.22 μm メンブレンフィルターでろ過した後、高分解能 LC/MS (UltiMate HPG-3400SD-LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, USA) にて測定された。LC の固定相には、phenyl 基を有する逆相カラム (XBridge BEH Phenyl XP Column, 2.5 μm , 2.1 x 100 mm, 日本 Waters) を用いた。イオン源として ESI を用いて、ネガティブイオン化モードで測定した。Precursor ion analysis のレンジは、190~500 Da とした。設定質量分解能は、30,000 または 100,000 FWHM とした。LC の移動相 A は、1 mM 酢酸と 1 mM 酢酸アンモニウムを含む水、移動相 B は 1 mM 酢酸、1 mM 酢酸アンモニウム水溶液を 5 v/v% 含むアセトニトリルとした。Binary program は、B%=5 (0-3 min)、100 (25.0 min) 100 (25.0-30.0 min) 5 (30.5 min)、5 (30.5-35.0 min) とした。流速は、0.6 mL/min とした。

5. 多変量解析による臭気原因物質の探索

高分解能 LC/MS を用いた測定で得られたデータは、LC/MS データ統合解析ソフト (Progenesis QI v2.2, Nonlinear Dynamics, UK) を用いて、カラム保持時間の揺らぎを補正した後、サンプルの測定に先だって測定されたブランクサンプルの測定結果との差異解析が行われた。

その後、OPLS 回帰分析 (PLS_Toolbox v8.0.2,

Eigenvector Research, USA) を行い、VIP 値が 1 未満の独立変数 (検出された物質に相当) を試料水の TON やウログレナ中群体換算値と相関関係が認められない物質として除害した。その際、Mean Center または Autoscale でデータを前処理し、回帰モデルのバリデーションは Cross-validation を Leave One Out とした。次に、SPSS Medical Model 23 (IBM, USA) を用いて相関分析を行い、Pearson の相関係数が 0.4 以下であった物質を排除した。最後に、SPSS Medical Model 23 を用いて重回帰分析を行った。その際、独立変数 x には検出された各物質 (イオン) の peak volume、従属変数 y には試料水の TON およびウログレナ中群体換算値を使用した。重回帰分析は stepwise selection method を用いた。

C. 結果及び考察

1. 多変量解析による原因物質のピーク探索

得られた誘導体化サンプルを LC/MS で分析した結果の例を図 1 に示す。目視においても、小数のサンプルユニークなピークを確認できるが、すべてを確認することは不可能であった。そこで、解析ソフトを用いて、カラム保持時間の誤差を補正し、差異解析を行ったところ、測定したすべてのサンプルから検出されたイオンの合計数は 1,617 個であった。この 1,617 個のイオンの中で、1) 実サンプルとブランクサンプルのピークボリュ

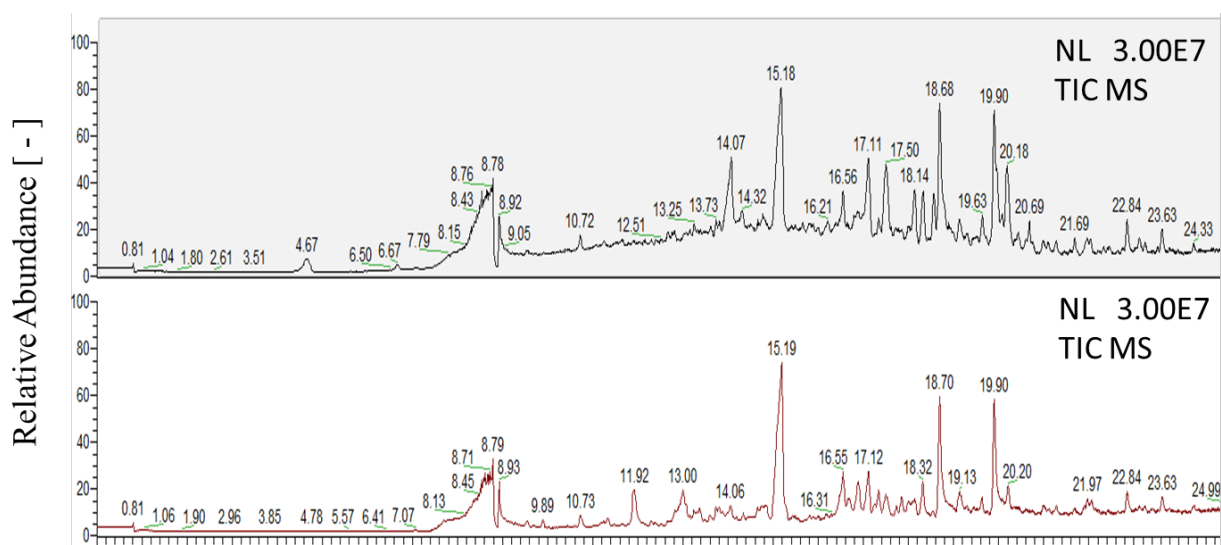


図1 LC/MS による測定結果の例 (上段: 水道原水サンプルのTIC、下段: ブランクサンプルのTIC)

ームの比が 10 倍以上、2) ANOVA の p -value が 0.05 未満、3) ピークボリュームが最大となったサンプルが実サンプルでありブランクサンプル・コントロールサンプルではない、4) ピークボリュームが最小となったサンプルがブランクサンプルまたはコントロールサンプルであり、実サンプルではない、の 4 つの条件をすべて満たしたイオンを選定し、それ以外を排除した。その結果、解析対象のイオンを 1,617 個から 422 個に絞り込むことができた。

排除されなかったイオンの数が重回帰分析可能な数を大きく上回ったため、OPLS 回帰分析および相関分析を用いてさらなる絞り込みを行った。OPLS 回帰分析により得られた VIP (Variable Importance in Projection) Score が 1 未満となったイオンはサンプルの生ぐさ臭への寄与が有意でないため、排除した。従属変数としてサンプルの TON を用いた場合で 25 個、ウログレナ中群体系数を用いた場合で 28 個まで絞り込むことができた。次に、相関分析を実施し、相関係数 R が 0.4 以上のイオンに絞り込んだ。従属変数としてサンプルの TON を用いた場合で 9 個、ウログレナ中群体系数を用いた場合で 11 個まで絞り込むことができた。

重回帰分析可能な数までイオンの数を絞り込むことができたと判断し、重回帰分析を行った。まず、従属変数として TON 値を用いて解析したところ、9 個の候補イオンのうち 3 個がモデルに投入され、回帰モデルが構築された。

構築されたモデルの調整済み決定係数 R^2 は 0.998、有意確率は 0.000 であり、抑制も認められなかった。しかし、VIF 値の最大値が 67.150 となり共線性が疑われたため、良好な回帰モデルを構築することができなかった。共線性が疑われた原因として、異なる付加体イオンの生成や in-source CID (MS 内部で非意図的に起こる衝突誘起解離) に伴うプロダクトイオンの生成を排除できなかったことが考えられる。

次に、従属変数としてウログレナ中群体系数を用いて、同様の条件で重回帰分析を行った。その結果、11 個の候補のうち 3 個がモデルに投入され、回帰モデルが構築された。モデルの調整済み決定係数 R^2 は 1.000、有意確率は 0.000 であり、抑制も認められなかった。さらに、VIF の最大値は 7.322 となり、共線性も認められずに良好なモデルを構築することができた。

従属変数を 2 種類用いて重回帰分析を行った結果で、共通して検出したイオンは m/z 403.1623、

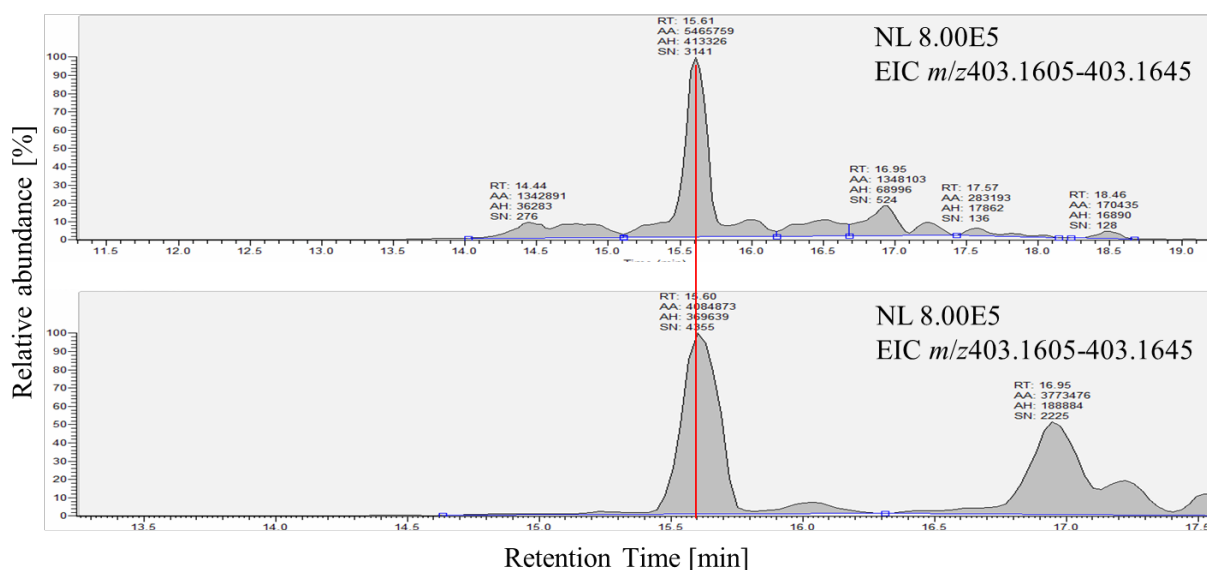


図2 発見されたイオンの抽出イオンクロマトグラム(上段:水道原水サンプル、下段:ウログレナ培養液)

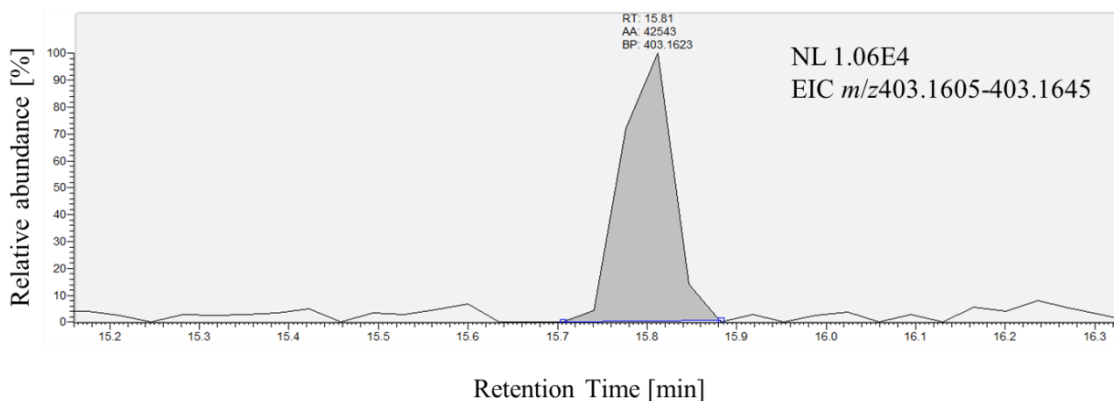


図3 発見されたイオンのAPCIによる確認

RT15.64 min であった。そこで、培養液からもこのイオンが検出されるか否かを確認した結果、図2に当該イオンの抽出イオンクロマトグラム(EIC)を示すように、同一のカラム保持時間で同一イオンが検出された。

次に、当該イオンが分子量関連イオンであることを確認するために、ポジティブイオン化モードで同一イオンが検出されるか否かを確認した。その結果、同一イオンは検出されなかった。この原因を考察するために、インタクトな DNPH を測定した結果、DNPH を検出することができなかった。このことから、本研究で用いた器機では、ポジティブイオン化モードでの DNPH 誘導体の検出が困難なことが理由と考えられる。ポジティブイオン化モードで検出できなかったため、イオン化方法を ESI から APCI に変更してネガティブイオン化モードで測定した。その結果、図3に示すように、同一のイオンを確認することができた。

2. 分子式の推定

多変量解析により発見されたイオンのマススペクトルを図4に示す。精密質量と天然同位体ピークの強度比から分子式を予測することを試みた。このイオンのマススペクトルを図4に示す。分子量関連イオンと考えられる $m/z403.1623$ のイオンの精密質量、 ^{13}C および ^{15}N の同位体イオンより、同イオンの分子式は $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{N}_4$ と推定された。窒素原子を4個含むことから、この物質は DNPH 誘導体であることが支持され、誘導体化

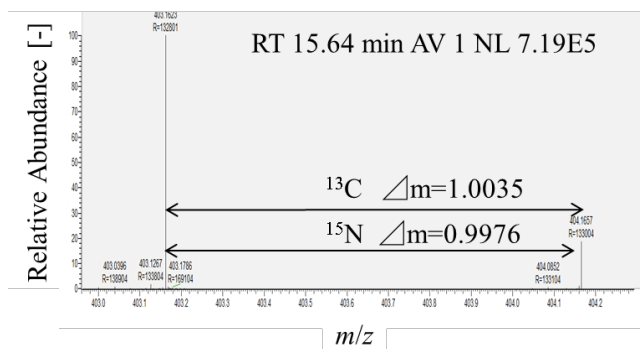


図4 発見されたイオンのマススペクトル

される前の分子式を推定したところ $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ が得られた。

E. 結論

水道水生ぐさ臭臭気原因物質の探索を実施した。臭気物質の一般的な構造に鑑み、生ぐさ臭臭気原因物質をアミン類、アルコール類、チオール類およびカルボニル化合物と仮定し、本年度はカルボニル化合物について検討した。その結果、水道原水の TON および原因生物である *Uroglena americana* の中群体換算数と相関関係が認められ、別水系から採取した *Uroglena americana* の培養液からも検出された物質が発見され、その分子式を $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ と推定した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

該当なし

2) 学会発表

新福優太、高梨啓和、中島常憲、大木 章、下ヶ橋雅樹、秋葉道宏、高分解能 MS と多変量解析による水道原水生ぐさ臭原因物質の探索、第 51 回日本水環境学会年会講演プログラム・広告集、L-048

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1) 特許取得

該当なし

2) 実用新案登録

該当なし

3) その他

該当なし

I. 謝辞

本研究を実施するにあたり、京都市上下水道局水質管理センター水質第 1 課の職員より、試料水採取などで協力を受けた。また、神奈川県企業庁水道水質センターの職員より、*Uroglena americana* 培養液の提供およびその前処理への協力を受けた。ここに記して謝意を表す。

J. 参考文献

- 1) 秋葉道宏、岸田直裕、下ヶ橋雅樹 (2014) 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)水道システムにおける生物障害の実態把握とその低減対策に関する研究 平成 25 年度総括・分担研究報告書.
- 2) Watson S.B., Satchwill T., Dixon E., McCauley E. (2001) Under-ice blooms and source-water odour in a nutrient-poor reservoir: biological, ecological and applied perspectives, *Freshwater Biology*, **46**, 1553-1567.