

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

水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける  
生物障害対策の強化に関する研究

平成30年度 総括研究報告書

研究代表者 秋葉 道宏

(国立保健医療科学院)

平成31 (2019) 年 3月



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）  
総括研究報告書

水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける  
生物障害対策の強化に関する研究

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長

研究要旨

本研究では「水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける生物障害対策の強化」に資する成果を得ることを目指し、流域での障害生物の発生状況やそのメカニズムの把握、流域スケールでの生物障害発生の広域モニタリングシステムの開発、流域連携による水供給システムの生物障害適応性の強化方策の例示に関連する研究を実施した。

藻類の異常発生を事前に予測し、浄水場において工学的対策を前もって施すことを目指し、クロロフィル a 濃度予測モデル構築を試みた。ダム湖内のクロロフィル a 濃度について、予測対象日の前 7 日間の気象データおよび 1 か月前の栄養塩濃度を説明変数として階層ベイズモデルを用いて予測モデルの構築を行った。その結果、測定誤差等を考慮に入れた階層ベイズを導入することによりクロロフィル a 濃度の予測精度を向上させることに成功した。

日本での過去のカビ臭発生事例調査について、平成 5 年から平成 30 年の約 25 年間に発行された文献やインターネットで収集した 76 件のカビ臭発生事例と気象データを用いて、カビ臭発生事例発生傾向と気象条件（気温、降水量、日照時間、水温）との関係性についてとりまとめ、カビ臭が発生する気象条件を抽出した。また中国での湖沼水質改善への対策として工場排水の規制、下水道の整備、流入河川の浄化対策、浚渫、水生生物による水質浄化対策など総合的な対策の他に、導水事業による水質浄化事業の実施が湖沼水質改善の対策として有効である可能性が考えられた。

琵琶湖を対象として、単藻培養できた藍藻類 12 株について 16S rRNA 遺伝子解析、カビ臭物質合成酵素遺伝子解析、カビ臭産生の有無について調査を行なった結果、2-メチルイソボルネオール(2-MIB)産生種として *Planktothricoides raciborskii* に近縁な N-3 株および N-4 株が確認された。一方、16S rRNA 遺伝子解析のみではジェオスミン産生種の判定が難しい可能性が考えられた。

PMA 処理を適用した 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングを用いて、浄水場処理工程水の微生物相を解析した結果、沈澱処理水における主要な生菌は、*Sphingomonas* 属、*Methylocystis* 属、*Methylobacterium* 属であると考えられた。ろ過水における主要な生菌は、*Sphingomonas* 属、*Methylocystis* 属であると考えられた。以上の結果から PMA-PCR 法により浄水場処理工程水中の生菌の挙動を評価できることが示唆された。

国内 22 か所の水道原水について、Orbitrap 質量分析計を用いた精密質量分析により原水中溶存有機物(DOM)に関する情報を収集し、その特徴や共通点を調査した結果、DOM の精密質量分析により、微生物の異常増殖等 DOM の極端な変化を検知できる可能性を指摘した。

DOM が 2-MIB の粉末活性炭吸着量に与える影響を推定した結果、超純水中（除去率：84%）に比べて、水道原水では吸着量が低下（26～56%）することがわかった。また、分子量 1 kDa 未満で、フルボ酸様物質と推定した EX/EM：250/410 付近に蛍光ピークを有する有機物が、水道原水中での 2-MIB 吸着に対する競合成分の一つと推測された。

高分解能 LC-MS、およびにおい嗅ぎ機能を付与した高分解能 GC-O-MS を併用することで、

生ぐさ臭原因物質を探索することを試みた。生ぐさ臭の原因生物であるウログレナが発生した際に採取した水道原水と、ウログレナの培養液を分析結果、共通する物質が1物質発見され、同物質の分子式を  $C_{13}H_{20}O_3$  と推定した。また、同物質は牛乳様の臭気を有しており、その分子内にはアルコール性ヒドロキシ基、メトキシ基を有するシクロヘキセン環、エノール構造が存在する可能性が示唆された。

水道業務で、とくに問題となっている *Anabaena* 属 (*Dorichospermum* 属) は、カビ臭物質産生型と非産生型の形態が酷似しているため、この藍藻類のジェオスミン合成酵素遺伝子を標的とした半定量 whole-cell PCR 法による簡易定量技術を構築した。

研究分担者	
西村修	東北大学大学院工学研究科 教授
柳橋泰生	福岡大学工学部 教授
藤本尚志	東京農業大学応用生物科学部 教授
下ヶ橋雅樹	国立保健医療科学院 上席主任研究
高梨啓和	鹿児島大学学術研究院 理工学域工学系 准教授
越後信哉	国立保健医療科学院 上席主任研究官
清水和哉	筑波大学生命環境系 准教授
浅田安廣	国立保健医療科学院 主任研究官

#### A. 研究目的

近年、地球温暖化の影響も考えられる水道原水水質悪化の報告例が目立つ。特に生物障害は、水中に生息する生物が引き起こすものであり、気候変化の影響を直接的に受けやすい。一方で、昨今の水道を取り巻く状況としては、水道施設の老朽化や職員の減少、給水収益の悪化の中で公共サービスとしての持続性の確保が課題となっており、その解決に向けた体制づくりが求められている。本研究課題では、このような水道事業の背景を踏まえながら、水道事業の流域連携の推進の視点から水供給システムにおける生物障害対策の強化に資する成果を得ることを最終的な目標とし、以下の3つの検討を実施した。

- ① 流域での障害生物の発生状況やそのメカニズムを把握
- ② 流域スケールでの生物障害発生の広域モニタリングシステムを開発

- ③ 浄水プロセスの適応性を高めながら、①、②と連携して、流域連携による水供給システムの生物障害適応性の強化方を例示

#### B. 研究方法

室生ダム(奈良県)を対象とし、定期水質調査の水質データ、及び対象ダムに最も直線距離の短い針地域気象観測所の気象データを用いて、ダム湖内のクロロフィル a 濃度について、予測対象日の前7日間の気象データおよび1か月前の栄養塩濃度を説明変数として階層ベイズモデルを用いて予測モデルの構築を行った。

全国のカビ臭発生状況(水源、原因物質、産生物質及び水源へ流出した要因等)や傾向を分析するため、平成5年から平成30年の約25年間において、カビ臭の発生報告が確認されている事例を公開されている各種文献やインターネットで収集し、気象等の要因との関係について解析を行った。また1996年からの第9次五カ年計画で「三河三湖」に指定され、重点対策がとられるようになった太湖、滇池について、水質保全・改善を目的とした大規模な導水事業の実施状況、効果等について整理した。

琵琶湖を対象として藍藻類の単離を行い、単離された藻類株について形態による分類、16S rRNA 遺伝子の塩基配列、カビ臭物質合成酵素遺伝子の塩基配列、カビ臭産生の有無について収集を行った。

16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングを用いて、浄水場処理工程水の微生物相を解析した。その際に、PMA 処理を行った系と行わない系の微生物相を比較し、処理工程水中の生菌を評価するとともに、処理工程における生

菌の挙動について検討を行った。

全国の水道原水について、Orbitrap 質量分析計による精密質量分析を適用し、水道原水の識別を試み、精密質量分析に基づいた溶存有機物(DOM)の変化検知のための基礎的知見を収集した。

異臭味対策として広く使用される粉末活性炭(粉炭)の吸着特性を解明するため、全国21か所の水道原水中での2-メチルイソボルネオール(2-MIB)の粉炭への短時間接触による吸着量を実測した。さらに、DOM中の支配的な吸着競合物質の推定を試みた。

ウログレナが発生した際に採取した水道原水および、その水域とは異なる水域から採取したウログレナを継代培養した培養液を対象に、高分解能LC-MSおよび高分解能GC-O-MSを用いて生ぐさ臭原因物質の探索と構造推定を行った。

個体群数定量に必要なカビ臭物質合成遺伝子を用いた簡易なカビ臭物質産生藍藻類の検出および定量方法の開発・運用法を構築することを目的とし、形態観察では判別が困難なジェオスミン産生・非産生 *Anabaena* 属 (*Dolichospermum* 属) を簡易に識別・定量する方法の開発を試みた。

### C. 研究結果およびD. 考察

ダム湖内のクロロフィル a 濃度は対数正規分布に従うと仮定し、前7日間最高気温平均値、1か月前全リン濃度 (mg/L)、1か月前全窒素濃度、および曝気装置運転の有無を説明変数としたモデルを構築することに成功した。また同じデータセットを用いて構築した一般化線形モデルと比べ、階層ベイズを用いて構築したモデルの決定係数が上昇したことから、風の吹き寄せによる濃度上昇や測定を行った時刻などの非生物的要因や藻類種による差など生物的要因を階層ベイズモデルにおいて組み込むことで、予測精度が向上したと考えられる。カビ臭原因物質としては、2-MIB が 45% と最も多く、次にジェオスミンが 29% であった。産生生物としては、70% が藍藻類によるものであった。発生要因としては、63% が自然発生で

あったが、人為的要因も約 11% があった。発生水域は、河川が 42%、ダム湖が 39%、池・沼が 19% であった。各カビ臭発生事例に対して気象データとの関連性について、気温との関係性では平年より気温が高い場合にカビ臭が発生している傾向があった。降水量では平年より少ない場合または短時間で強い降雨があった場合にカビ臭が発生している傾向があった。日照時間では、月間日照時間が平年より長い場合に発生している傾向が確認された。水温では 20℃ 以上の高水温期に発生する傾向を示したが、2-MIB については 15℃ 付近での発生も見られた。

中国の滇池について 2001 年以降、分流式下水道の整備、河川改修、浚渫、導水、排水流入防止、生態系整備等が行われた結果、2012 年において、2010 年と比較して、全窒素濃度は 64.2% 減少し、全リン濃度も 77.2% 減少した。また湖沼の水質保全対策としては、日中とも、工場排水の規制、下水道の整備、流入河川の浄化対策、浚渫、水生生物による水質浄化対策など総合的な対策が取られているが、中国における特徴的な対策として導水事業があげられ、重点対策湖沼である巢湖でも事業が計画されている。

2-MIB 合成酵素遺伝子を保有する N-3 株、N-4 株からは 2-MIB が検出され、2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹では、*Planktothricoides raciborskii* CHA3331 と同じ位置に位置づけられた。一方で B-3 株は、ジェオスミンを産生する *Dolichospermum mucosum* 4-10 株と同様の位置に位置づけられたが、ジェオスミンを生成しないことから 16S rRNA 遺伝子では、産生種・非産生種の判定が困難であり、*geoA* 遺伝子の有無の評価が重要であると考えられた。原水において PMA 処理の有無による微生物相の違いは、綱レベルでも属レベルでもみられなかったが、沈殿処理水、ろ過水では PMA 処理にともない微生物相の違いが確認され、沈殿処理水における主要な生菌は、*Sphingomonas* 属、*Methylocystis* 属、*Methylobacterium* 属であった。ろ過水における主要な生菌は、*Sphingomonas* 属、*Methylocystis* 属であった。

湖沼の DOM スペクトルには、他の原水と共通する組成式がなく、低分子の化合物が多く存在していることが分かった。一方で、地理的に離れていても湖沼間ではスペクトルは類似していた。また、精密質量スペクトルを因子分析により原水の DOM のグループ分けを行うことが可能であり、特に湖沼の影響を捉えることができることを示した。

超純水及び高水温期・低水温期の水道原水を用いた 2-MIB 吸着実験による 2-MIB 除去率について、超純水中での 2-MIB 除去率は 84%であったのに対して、全ての水道原水中では超純水と比較して 2-MIB 除去率が低下することが確認できた。高水温期原水の除去率は 26%~55%、低水温期原水の除去率は 27%~51%であり、それぞれの平均除去率は 43%と 41%であった。吸着競合成分の推定において、EEM-PARAFAC 解析により抽出した主要成分と 2-MIB 除去率との相関性を確認したところ、励起波長 250/蛍光波長 410 にピークを有するフルボ酸様物質と推定した成分において最も相関性が高く、フルボ酸様物質による寄与が大きいことが確認できた。また分子量においては、1kDa 未満の成分による寄与が大きいことが指摘された。

高分解能 LC-MS 分析および多変量解析の結果、水道原水とウログレナ培養液に共通する臭気成分を 1 成分発見し、同物質の分子式を  $C_{13}H_{20}O_3$  と推定した。そしてにおい嗅ぎ分析の結果、同物質のカラム保持時間の周辺で牛乳様臭気を検知した。さらに多段階質量分析の結果、同物質はアルコール性ヒドロキシ基、メトキシ基を有するシクロヘキセン環、エノール構造を有すると推定された。

カビ臭物質産生微生物個体群数の増加とカビ臭物質濃度の間には正の相関関係があり、個体群を定量することで、カビ臭発生予測を可能となることが推測された。カビ臭物質の局在は、ジェオスミンは細胞内に、2-MIB は細胞外（溶解態）に多く存在することが明らかになった。以上は、浄水処理プロセスの管理に資する知見である。一方、水源におけるジェオスミン産生株のモニタリングのために、形態観察では困難

なジェオスミン産生藍藻類の識別に有効と期待できる multiple whole-cell PCR 法を開発した。加えて、水道事業者の実務者に、事前講義後、両方を実施していただいたところ、同様な結果を得ることができた。このため、講習後であれば導入可能な試験法と期待できる。

## E. 結論

ダム湖におけるクロロフィル a 濃度の予測において、測定誤差等を考慮に入れた階層ベイズを導入することにより予測精度を向上でき、前 7 日間最高気温平均値、1 か月前全リン濃度 (mg/L)、1 か月前全窒素濃度、および曝気装置運転の有無を説明変数としたモデルを構築することに成功した。

全 76 件のカビ臭発生事例調査結果から国内におけるカビ臭発生と気象条件との関連性について、気温は月平均気温が 16°C 以上、降水量は平年より降水量が少ない場合、また短時間で強い降雨がある場合、日照時間は月間日照時間が平年より長い場合、水温は 20°C 以上 (2-MIB : 15°C 付近) でカビ臭の発生がみられると推察した。

中国における重要湖沼の水質の改善状況を見ると、顕著に改善されている事例が確認された。その対策として工場排水の規制、下水道の整備、流入河川の浄化対策、浚渫、水生生物による水質浄化対策など総合的な対策の他に特徴的な対策として、導水事業による水質浄化事業の実施があげられた。

琵琶湖から単離した藍藻株の中には 2-MIB 産生種が存在し、さらに 2-MIB 合成酵素遺伝子を保有していることが確認された。その一方で、16S rRNA 遺伝子解析のみではジェオスミン産生種の判定が難しい可能性が考えられ、産生種の判定には *geoA* 遺伝子の有無判定が重要であることを指摘した。

PMA 処理の有無における微生物相から評価した結果、沈澱処理水における主要な生菌は、*Sphingomonas* 属、*Methylocystis* 属、*Methylobacterium* 属であった。ろ過水における主要な生菌は、*Sphingomonas* 属、*Methylocystis* 属であった。これらは、沈澱処理水から流入し

たものと考えられた。

精密質量スペクトルに対して因子分析を行うことにより、原水水質を湖沼・島嶼等のグループを捉えることができ、微生物の異常増殖等 DOM の極端な変化を検知できる可能性を示した。

2-MIB の粉炭吸着において、超純水中（除去率：84%）に比べて、水道原水では吸着量が低下（26～56%）することがわかった。また、分子量 1 kDa 未満で、フルボ酸様物質と推定した EX/EM：250/410 付近に蛍光ピークを有する有機物が、水道原水中での 2-MIB 吸着に対する競合成分の一つと推測された。

生ぐさ臭の原因生物であるウログレナが発生した際に採取した水道原水と、ウログレナの培養液を分析結果、共通する物質が 1 物質（牛乳様の臭気）発見され、その分子内にはアルコール性ヒドロキシ基、メトキシ基を有するシクロヘキセン環、エノール構造が存在する可能性が示唆された。

水源におけるジェオスミン産生株のモニタリングのために、形態観察では困難なジェオスミン産生藍藻類の識別に有効と期待できる multiple whole-cell PCR 法を開発した。

## 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

八島将太，西村修，今本博臣，佐野大輔．半閉鎖性水域における藻類発生を予測する統計モデルの構築．土木学会東北支部・技術研究発表会（平成 30 年度），2018 年 3 月，仙台

市，同講演 CD-ROM, 2p., 2019.

浅田安廣，藤本尚志，高橋可穂美，井上拓也，秋葉道宏．カビ臭産生藍藻類のライブラリ作成に向けた試み—琵琶湖流域に生息する藍藻類の調査—．第 53 回日本水環境学会年会，2019 年 3 月，甲府市，同講演集，p.104.

井上拓也，浅田安廣，田代新，船橋康史，岡本朗，秋葉道宏，水道原水水質の違いが粉末活性炭によるカビ臭原因物質 2-MIB 吸着に与える影響，第 53 回日本水環境学会年会，2019 年 3 月，甲府市，同講演集，p.218.

新福優太，高梨啓和，中島常憲，秋葉道宏．LC-HRMS および GC-O-MS による水道水生ぐさ臭原因物質の探索．第 53 回日本水環境学会年会，2019 年 3 月，甲府市，同講演集，p.126.

柳橋泰生，楊露．中国におけるアオコ等の水質汚濁に関する文献調査．第 53 回日本水環境学会年会講演集，甲府市，2019 年 3 月，同講演集，p.219.

渡邊英梨香，清水瑠花，藤本尚志，蔣紅与，大西章博，志波優，藤瀬大輝，秋葉道宏．PMA 処理を用いた浄水場処理工程水の微生物相解析．第 53 回日本水環境学会年会，2019 年 3 月，甲府市．同講演集，p.159.

## 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

