

精密分析による水道水原水中
溶存有機物の特性解析

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	越後	信哉

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」
分担研究報告書

研究課題： 精密分析による水道水原水中溶存有機物の特性解析

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
研究分担者 越後 信哉 国立保健医療科学院 上席主任研究官

研究要旨

全国 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。その結果、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、主成分分析の結果、原水水質を湖沼・島嶼等のグループを捉えることができた。以上の結果から、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。

A. 研究目的

溶存有機物 (Dissolved Organic Matter, DOM) は水道原水に含まれる有機物群の総称で、天然由来 (土壌由来, 水系由来双方を含む) と人為由来 (両方起源の有機物) が含まれる複雑な混合物である。DOM の組成は、生物障害の発生に関連して変化すると考えられ、十分な感度と選択性が実現できれば、障害を引き起こす微生物の増殖に先んじてその変化を捉え、生物障害の予測指標として活用することが期待できる。しかしながら、過去には、その複雑性のため、DOM の特性解析はカラムクロマトグラフィーによる分画やマクロ指標 (吸光度や蛍光) によることが多く、十分な情報を得ることができなかった。しかしながら、近年のフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計や Orbitrap 質量分析計を利用した精密質量分析技術の進展にともない、より詳細な DOM の解析に精密質量分析が応用できる可能性が示されてきた¹⁾。

そこで本研究では、水道原水中 DOM の精密質量分析による生物障害予測の端緒として、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 DOM の変化検知のための基礎的知見を収集した。

B. 研究方法

1. 試料の選定及び前処理

全国の水道原水として用いられている主要な水系から抽出した 22 検体を用いた。その概要を表 1 に示す。これらの試料をグラスファイバーフィルター (GF/F 直径 47mm, GE ヘルスケア社製) でろ過 (ろ過試料) し、一部を溶存態有機炭素(DOC)の確認用として分取した。残りのろ過試料は塩酸で pH 2 に調整した。この試料を、メタノールを 10 mL, 0.01 M 塩酸を 20 mL 通液してコンディショニングした固相カードリッジ (Bond Elut PPL; アジレントテクノロジー社製, 充填量 1 mg, 容量 6 mL) に、20 mL/min で 1 L 通水した。その後、固相カードリッジを 0.01 M 塩酸でリンスし、次にメタノール 10 mL で溶出した (SPE 試料)。また、コントロール試料として、塩酸で pH 2 に調整した精製水についても固相抽出を行った¹⁾。

なお、SPE 試料 1 mL を分取し、これを窒素の吹き付け及び 40 °C の加温で乾固させた後、精製水 30 mL で再溶解させたものの TOC を測定し固相抽出による回収率を算出した。

2. 精密質量分析条件の検討

DOC が最も高かった No.22 の SPE 試料とコントロール試料を用いて、精密質量分析条件の最適化を試みた。装置としては Orbitrap 型質量分析計: Q Exactive (ThermoFisher Scientific 社製), 試料導入は HPLC 用オートサンプラー(UltiMate 3000, ThermoFisher Scientific 社製)を用いて行った(表 2)。なお、カラムによる分離は行なわず直接注入とした(表 2)。また、検討対象とした質量分析計測定条件は表 3 のとおりである。条件 1 は測定機器のデフォルトの値であり、条件 2 はスプレー電圧を上げたもの、条件 3 は分解能を測定装置の上限値である 140,000 まで上げたものであり、条件 4 は先行研究の測定条件に倣ったものである[1]。

3. Orbitrap 質量分析計における全国の水道原水の比較

2. において最も良好な結果が得られた条件を採用し、全国の水道原水の SPE 試料を測定した。測定時、精密質量が既知の物質を SPE 試料中に添加し、実測値と理論値の差から精密質量を補正するロックマス機能を用いた。ロックマスには、3-クロロ-4-ヒドロキシ安息香酸 1/2 水和物を 10 mg/L となるように添加した。この化合物は、水溶液中で負の 1 価の電荷を有し、分子の精密質量分布が既知である。

測定されたスペクトルは、Qual Browser (ThermoFisher Scientific 社製)を用いて解析した。ブランクで測定されたスペクトルをノイズとし、得られたサンプルデータのスペクトルから除外した。

解析条件は、検出されたイオンを 1 価の負の電荷を有したイオンとし、mass tolerance を 140.00mmu, RDB equiv を-1.0 から 100.0, 窒素ルールを適用し、元素の条件として、O を 15 個以下、C を 30 個以下、H を 60 個以下、N と S をそれぞれ 3 個以下とした。それぞれのサンプルについて、これらの条件から得られた代表的なピークを示したのについて、組成式を推定した。この際、得られたピークの構成元素の割合が $0.2 \leq H:C \leq 3.1$, $O:C \leq 1.2$ かつ $N:C \leq 1.3$ となる範囲で推定を行った¹⁾。

全国 22 浄水場原水それぞれの試料で検出された、高い強度を示したピークそれぞれ 18 個から、よく出現したものを 10 個選定した。さらに、全国

22 浄水場原水の傾向を、主成分分析 (PCA) を用いて比較した。この比較には、Compound Discoverer Ver. 2.6 (ThermoFisher Scientific 社製)を用いた。

C. および D. 研究結果及び考察

1. DOM の回収率

各試料の DOM 回収率は炭素ベースで 42.1 から 70.5 % であり、既往の研究[1]では同条件においてその回収率は 50% 程度であったことから、今回の結果は妥当であると考えられる。ただし、以下の解析結果の解釈において、一部親水性の化合物が考慮されていないことに留意する必要がある。

2. 精密質量分析条件の検討

条件 1~4 (表 3) で測定した、コントロール試料と試料 No.22 の 0.35 分~0.7 分のスペクトルを比較した結果、条件 1 及び 2 ではシグナルが安定しなかった。また、条件 3 では、No.22 の測定の際に、retention time 2 分付近で原因不明のピークが見られ、さらに十分なシグナル強度が得られなかった。条件 4 では、コントロール試料及び No.22 において、安定したクロマトグラムとスペクトル強度が得られた。以上のことから、Orbitrap 質量分析計の測定条件として条件 4 のパラメータを採用することとした。

3. Orbitrap 質量分析計における全国の水道原水比較

予備実験で決定した Orbitrap 質量分析計の測定条件を用い、試料 No.1 から No.22 およびコントロール試料を Orbitrap 質量分析計により測定した。一例として試料 No.22 のスペクトルを図 1 に示す。m/z 値が 100 から 200 で特異的な数本のピークが観測された。これらの特異的なピークはブランク試料や No. 1 ~No.22 のすべての試料から検出されており、以後の解析の対象からは除外した。一方、試料 No.1~No.22 ではブランクでは検出されない、m/z 値が 200 から 600 の範囲に、なだらかな山なりのピーク群が確認された。

それぞれの試料を比較すると No.22 のシグナル強度は他の試料より相対的に大きく、また、No.3 や No.4 の試料は、m/z 値が 400 前後に最大強度のシグナルが認められた。一方、No.8 や No.13 の試

料は、最大強度のシグナルは m/z 値で 300 前後であった。このような試料間でのピーク形状の差異、相対的な山なりのピークの大小や、ピークの分布幅は、試料間の特性の違いが検出されていると考えられ、以下詳細に検討することとした。

まず、測定されたマススペクトルデータをもとに、全国の水道原水中に含まれる、主要な溶存態有機物の組成式を推定した。

解析を行う上で、コントロール試料におけるピークが検出された m/z 値をチェックし、検体でも同じ m/z 値のところにピークが検出された場合は除外した。例えばマススペクトル上の $m/z = 197.8074$ のシグナルはブランク試料や No. 1 ~ No. 22 のすべての試料から検出されている。このようなシグナルはノイズとみなし、解析では除外した。

各試料における、主要なピークを抽出し、その組成式を推定した。更に、各検体で検出された化合物で共通しているものはないかの確認を行った。その共通して検出された主要化合物をまとめ、共通して検出された主要組成式を、上から幅広く分布している順に並べた。最も検出頻度が高かった組成式は、 $C_{17}H_{19}O_9$ であり、22 検体中 17 検体で検出された。

大規模湖沼から採水した試料 No. 8 及び No. 13 に関しては、主要組成式が他検体と一致しなかった。しかし、No. 8 と No. 13 ではそれぞれ上位 18 個の組成式のうち 10 個がお互いに一致した。また、その他の検体と比較して、低 m/z 値（低分子量領域）で強度の強いピークが出現する傾向があった。このように、水源の地理的に近接度よりも、水源のタイプにマススペクトルが依存する傾向がみられ、微生物の急速な増殖にともなう溶存有機物の変化を捉えることができる可能性を示しているものと考えられた。

また、検体 No. 17 に関しては、全主要組成式が見られ、No. 4, No. 5, No. 6, No. 7, No. 16, No. 18, No. 19, No. 20 に関しても、主要組成式が幅広く見られた。これらの水源種別を確認したところダム水及び表流水であり、主要な DOM に関しては共通性があると考えられる。

上記の結果を踏まえ、より総合的に全試料の精密質量分析結果を PCA で視覚化した（図 2）。

No. 8 及び No. 13 は大規模の湖沼水である。また、

No. 14 は No. 13 の下流に位置する。さらに、No. 9 も滞留時間が長いと予想される湖沼が上流に存在するが、これらは第 2 因子が大きい傾向にあり、滞留時間の長い湖沼水の影響を受けた水が類似性を示したと考えられる。No. 21 及び No. 22 は島嶼であり、他の試料とは離れた箇所に位置した。

以上より、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可能であること、特に湖沼の影響を捉えることができることを示した。

今後、定期的に水源をモニタリングすることで、藻類が産生する浄水処理障害物質が増加する際の変化を精密質量の面から迅速に捉えること等が期待される。

E. 結論

全国 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 DOM の構造等の解析を行い、その特徴や共通点を調査した。

- 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。

- 主成分分析の結果、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。

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

該当なし

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

資料提供をいただいた水道事業体の関係各位に謝意を表す。また、本研究の一部は国立保健医療科学院平成30年度水道工学研修の一部として実施し、当研修の研修生であった野澤泰氏（神奈川県企業庁）、中川卓哉氏（仙台市水道局）、垣鏝裕一郎氏（下関市上下水道局）に全面的な協力を得ました。記して謝意を表します。

J. 参考文献

1) Vitharuch Yuthawong, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, Hiroaki Furumai, Comparison of Low Molecular Weight Dissolved Organic Matter Compositions in the Lake Inba and Kashima River by Orbitrap Mass Spectrometry, *Journal of Water and Environment Technology*, Vol.15, No.1: 12-21, 2017

表1 実験に用いた水道原水

No.	原水情報	No.	原水情報
1	北海道地方, 表流水	12	中部地方, 表流水
2	北海道地方, ダム放流	13	近畿地方, 湖沼水
3	東北地方, 表流水	14	近畿地方, 表流水
4	東北地方, ダム直接	15	近畿地方, ダム直接
5	関東地方, ダム放流	16	近畿地方, ダム放流
6	関東地方, ダム放流	17	近畿地方, ダム直接
7	関東地方, 表流水	18	中国地方, 表流水・ダム直接
8	関東地方, 湖沼水	19	九州・沖縄地方, ダム放流・ダム直接・浅井戸水
9	関東地方, ダム放流・表流水	20	九州・沖縄地方, 表流水
10	関東地方, ダム放流・表流水	21	九州・沖縄地方, 表流水
11	中部地方, 表流水	22	島嶼, ダム

原水種別は水道統計（平成28年度版）による

表2 試料注入条件

パラメータ	条件
移動相	メタノール 100%
流量 [mL/min]	0.2
注入量 [μL]	20
カラム	なし

表3 Orbitrap質量分析計のパラメータ条件

パラメータ	条件1	条件2	条件3	条件4
Sheath gas flow rate [μL/min]	8	←	←	30
Aux gas flow rate [μL/min]	0	←	←	5
Sweep gas flow rate [μL/min]	0	←	←	←
Spray voltage [kV]	3.5	4.5	←	←
Capillary temp [°C]	320	←	←	250
S-lens RF level	50	←	←	←
Aux gas heater temp [°C]	400	←	←	←
Resolution	35,000	←	140,000	←
Scan range [m/z]	100~1,500	←	←	←

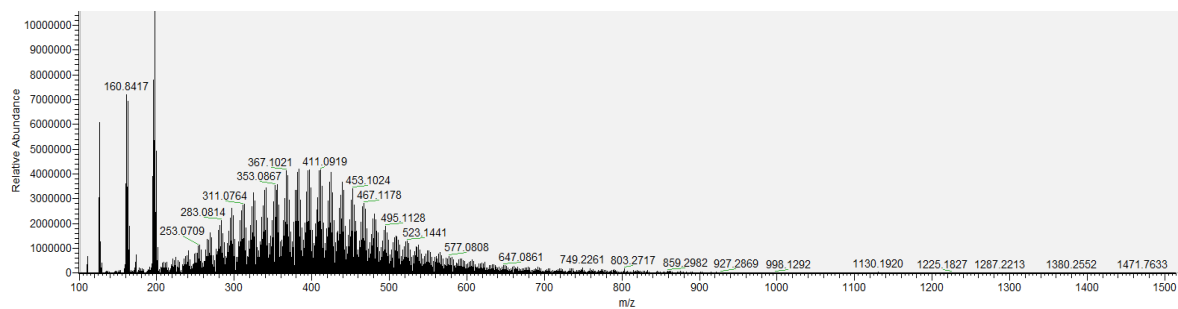


図 1 DOM の精密質量スペクトルの例 (試料 No. 22)

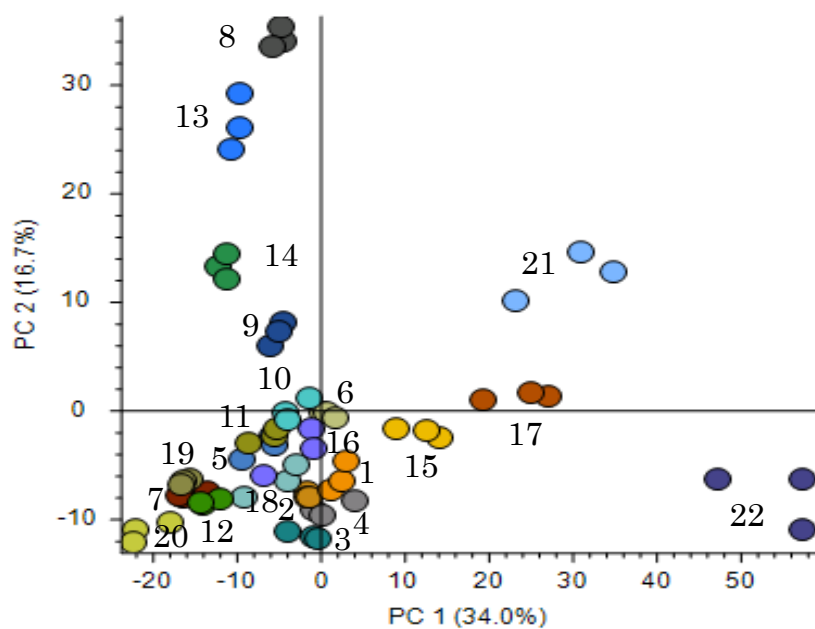


図 2 DOM の精密質量スペクトルの主成分分析の結果 (数値は試料番号)