

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

令和元年度 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)

令和2(2020)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)  
統括研究報告書

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、質データ、気象データ、及び状態空間モデルを用いることで、ダム湖における藻類異常発生予測モデルを構築することを試みた。奈良県宇陀市に位置する室生ダムを対象に、藻類バイオマス量との相関の高いクロロフィル a 濃度を目的変数とした予測モデルを構築し検証を行った結果、大きく予測が外れた2点を除くことで予測精度が向上した。

中国において実施されている導水事業による水質改善や環境影響に関する報告内容を整理した。導水事業に係る研究は実測、モデルシミュレーション、景観評価、制度的考察など様々な観点から実施されており、事業の成果としては太湖、金銀湖、滇池では概ね水質改善効果があったが、南水北調東線の途中の東興澤湖では改善されておらず、個々の条件により結果が左右されることが確認された。

カビ臭が発生した全国水源から単藻培養した藍藻類株に対して、形態情報、16S rRNA 遺伝子解析、カビ臭物質合成酵素遺伝子解析、カビ臭原因物質産生の有無について調査を行い、カビ臭原因物質産生藍藻類ライブラリーを構築した。ライブラリーはカビ臭が発生した場合の産生種を絞り込む際に有益であることが指摘できた。また本研究で蓄積したカビ臭原因物質合成酵素遺伝子の配列情報より、水源試料を用いた遺伝子解析により早期に産生種の属レベルでの存在把握が可能であることが示唆された。

溶存有機物(DOM)の精密質量分析において必要な前処理プロセスである濃縮操作について検討を行った。水中の DOM の組成やその変化を Orbitrap 質量分析計を用いて精密質量分析する場合に、感度(シグナル強度)と平等性(親水性と考えられる物質回収状況)の観点からは固相抽出よりも乾燥濃縮が優れていることを示した。ただし、固相抽出による場合も疎水性化合物のみが回収される等の極端なバイアスが存在することはないことから、検体の状況等に応じて選択肢となりうると考えられた。

粉炭処理による 2-MIB 吸着に対して競合する物質群の候補を明らかにすることを目的とし、腐植物質(フミン酸、フルボ酸)、アミノ酸、糖類の標準試料を用いて粉炭処理による 2-MIB 非平衡吸着試験を行ったところ、2-MIB 吸着においてフルボ酸の 1 kDa 未満の低分子物質が強い競合作用を示し、2-MIB 除去率を著しく低下させることが明らかとなった。また水道原水より分画した腐植画分試料、非腐植画分試料での 2-MIB 除去率を評価した結果、いずれの画分においてもフミン酸様蛍光物質、フルボ酸様蛍光物質が 2-MIB 吸着競合に影響を及ぼしていることが示された。

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。生ぐさ臭原因物質の候補が 1 物質発見され、同物質のさらなる構造推定、および同物質以外の未特定の原因物質の探索を実施した。その結果、同物質は 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) と反応可能なカルボニル部位を 2 か所有していることが示唆された。また、ペネラー数を加増して水道原水試料のにおい嗅ぎ GC (GC-O) 分析を行い、同物質以外の有臭成分のカラム保持時間を特定した。

昨年度に開発した簡易なカビ臭物質産生藍藻類の whole-cell PCR 法を用いた判定量技術と細胞密度との比較を実施した。そして、カビ臭原因物質産生と非産生の表現型が形態観察では不

明なジェオスミン産生 *Anabaena* 属 (*Dolichospermum* 属) を対象としたジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* ホモログの半定量法および 2-メチルイソボルネオール産生 *Phormidium* 属 (*Pseudanabaena* 属) を対象として MIB 合成酵素遺伝子ホモログの半定量法による個体群数の半定量法を確立した。

#### 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 醸造科学科 教授
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	京都大学大学院工学研究科 准教授
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 of 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策を例示

#### B. 研究方法

奈良県宇陀市に位置する室生ダムを対象とし、藻類バイオマス量との相関の高いクロロフィル a 濃度を目的変数とした予測モデルを構築した。予測モデル構築には状態空間モデルを適用し、1983年から2016年のデータによりモデルを構築し、

作成したモデルを用いて2017年の予測を行い、実際の観測データとの比較をすることでモデルの検証を行った。

文献データベースにおいて「water diversion」をキーワードとして検索し文献を入手し、とりまとめた。また中国学術雑誌全文データベースにおいて、導水事業を示す「調水」で検索し、文献を入手し、翻訳・整理した。

カビ臭が発生した水源21か所の試料からピペット洗浄法により単離した藍藻株、国立環境研究所微生物系統保存施設に保有する藍藻株(以降、NIES株と記載)、水道事業体保有の藍藻株(以降、分譲株と記載)について培養、形態観察、遺伝子解析とカビ臭原因物質検出を行い、ライブラリーの構築と各情報の比較を行った。また、水源試料から抽出したDNA試料に対して、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子の解析を行い、構築した遺伝子配列のデータベースを用いて、カビ臭原因物質産生藍藻類の同定を試みた。

実際の浄水場の急速ろ過水を用いて、十分な感度が得られる試料の濃縮倍率について、TOC回収率とOrbitrap精密質量分析計を用いた精密質量スペクトルの2点に基づき検討を行った。次に、乾燥濃縮を行った試料と固相抽出を用いた濃縮を行った試料についても同様の比較を行った。

フルボ酸、フミン酸、芳香族アミノ酸およびタンパク質、糖類の標準試料を用いて、粉末活性炭による2-MIB除去実験(2-MIB濃度: 1 µg/L, 粉末活性炭注入率: 10 mg/L, 接触時間30分)を行い、除去率の比較を行った。また、国内5箇所の水道原水を樹脂分画して得た腐植画分試料および非腐植画分試料についても同様の試験を実施した。

LC-HRMSによる試料水の分析を行い、生ぐさ臭原因物質として抽出された候補物質のより詳細な構造推定を試みた。また、パネラー数を加増して水道原水試料のGC-O分析を行い、未特定の原因物質の探索を実施した。

昨年度に開発した簡便迅速な判定量 Whole Cell PCR法を用いた個体群定量法の確立および異なる栄養塩濃度におけるカビ臭原因物質ジェオスミン合成酵素遺伝子の発現量の変動を明らかにすることを試みた。

#### C. 研究結果およびD. 考察

予測精度を評価するために、予測値-測定値プロ

ットによる視覚的評価と決定係数  $R^2$ , および二乗平均平方根誤差 Root Mean Squared Error (RMSE) による定量的評価を行った。室生ダムの網場と取水口付近の2地点で評価を行ったところ、決定係数はそれぞれ  $R^2=0.157$ ,  $R^2=0.0360$  に留まった。取水口付近については、大きく予測を外れた2点は例年とは発生時期が異なることを考慮し、これらのデータを除き再計算したところ、 $R^2=0.671$ ,  $RMSE=4.53$  となり、予測精度が向上した。

中国での導水事業の水質改善の効果と環境への影響に関する主要な文献 22 件について整理を行った。研究内容は、実測、モデルシミュレーション、景観評価、制度的研究など多岐に亘っていることが確認された。導水事業の成果として、太湖、金銀湖や滇池では概ね水質改善効果があったが、南水北調東線の途中の東興澤湖では改善されておらず、個々の条件により結果が左右されることが見て取れる。

ジェオスミン産生種として *Aphanizomenon* 属と *Dolichospermum* 属, 2-MIB 産生種として *Pseudanabaena* 属, *Phormidium* 属, *Microcoleus* 属, *Planktothricoides* 属が確認された。これらの形態情報について整理・比較した結果, *Aphanizomenon* 属と *Dolichospermum* 属については種の同定にアキネートの存在が重要であることを指摘した。一方その他の株については形態情報のみでは種同定が難しいことが示された。産生種, 非産生種の形態的類似性よりカビ臭原因物質産生種の判定までは顕微鏡観察のみでは難しいことが示唆されたが、カビ臭が発生した場合の産生種を絞り込む判断に対しては、得られた形態情報は有益であることが指摘できた。また、本研究でカビ臭原因物質合成酵素遺伝子のデータベースを構築したことから、2-MIB 合成酵素遺伝子配列情報から種同定が可能であり、産生種同定のサポート情報として有用であるといえる。

10 倍濃縮を行った対象試料, 20 倍濃縮を行った試料と 100 倍濃縮を行った試料について精密質量分析の結果を比較した。低倍率では検出することのできない物質が数多く見られ、また作業時間の効率性より、濃縮倍率を 100 倍に設定した。続いて、乾燥濃縮と PPL カートリッジを用いた 100 倍での濃縮試料について、差異解析、マスペクトル、検出された分子組成による比較を行った。差異解析の結果、乾燥濃縮後の試料は PPL カートリッジを用いた濃縮後の試料よりも多くの物質が検出されていた。ピーク強度自体は乾燥濃縮後の試料の方が数倍強いものの、 $m/z$  が数百の位置に最大値をとる溶存有機物に特徴的なスペクトルの概形は両者でおおよそ一致していたが、PPL カートリッジを用いた濃縮で特に  $m/z$  が 900-1500 の範囲の溶存有機物(DOM)を PPL カートリッジでは濃縮できないことが示唆された。また、

乾燥濃縮の方が親水性物質を検出しているが、PPL カートリッジを用いた濃縮でも一定程度の親水性物質の回収が可能であった。

腐植物質等の標準試料の 2-MIB 吸着実験では、琵琶湖フルボ酸が除去率 49%で最も低い結果となった。さらに 1 kDa で分画した試料を用いて 2-MIB 除去実験を行ったところ、分画前試料の除去率に対して低分子画分試料(1 kDa 以下)の除去率が大幅に低下することが確認された。アミノ酸においては L-Tryptophan が 2-MIB 除去率 70%で吸着競合影響が確認できるが、総じてその影響は限定的であった。同程度の DOC 濃度ではフルボ酸の低分子物質の影響が大きいことから、フルボ酸低分子物質が 2-MIB 吸着競合物質として大きく寄与していることが示唆された。また腐植画分と非腐植画分とで 2-MIB 除去率に大きな差異が見られなかったことから、その両方に吸着競合物質が含まれており、いずれの画分においてもフミン酸様蛍光物質とフルボ酸様蛍光物質が 2-MIB 吸着競合に影響を及ぼしていることが示唆された。

生ぐさ臭候補物質の 2,4-dinitrophenylhydrazine (以下, DNPH) 誘導体化は脱水を伴って進行する反応であることに鑑みて、2 分子付加体の分子式を  $C_{25}H_{28}N_8O_9$  ( $m/z$  583.1906), 3 分子付加体の分子式を  $C_{31}H_{32}N_{12}O_{12}$  ( $m/z$  763.2190) であると、それぞれ予想した。予想した  $m/z$  値に対して、0.0009 Da の mass tolerance を用いて抽出イオンクロマトグラムを描画したところ、2 分子付加体のみ、ピークが保持時間 20.6 分において観察された。このピークは、ウログレナ培養液および水道原水試料の双方で共通して検出された。3 名のパネラーにより、水道原水 3 検体について、GC-O 分析を実施した結果、良好な再現性が確認されたのは、保持時間 7.5 分, 9.2-9.5 分, 10.0-10.5 分の 3 つであり、それぞれ黒糖臭, 金属臭, 牛乳臭が検知された。

カビ臭原因物質ジェオスミン産生合成酵素遺伝子 *geoA* の発現量は、栄養塩が異なる場合、発現量に有意な差が見られた培養日数があったものの、全培養日数において発現が認められる構成的遺伝子 (constitutive gene) であることが明らかとなった。ジェオスミン産生株の指標としてジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* ホモログ, 2-MIB 産生株の指標としてモノテルペン環化酵素遺伝子 (2-MIB 合成酵素遺伝子) *mtc* ホモログを用いた Whole Cell PCR 法による個体群定量を試みたところ、カビ臭産生藍藻類由来の Chl a がおおよそ 200  $\mu\text{g/L}$  を越えると検出・半定量が可能であると考えられた。

## E. 結論

状態空間モデルを用いたダム湖内におけるクロロフィル a 濃度の予測モデルの構築を行った。

取水口付近の予測について、大きく予測を外れた2点を除くことにより予測精度が向上した。

中国の導水事業に関する報告内容を整理した。導水事業の成果では太湖、金銀湖、滇池では概ね水質改善効果があったが、南水北調東線の途中の東興澤湖では改善されておらず、個々の条件により結果が左右されることが見て取れた。

カビ臭原因物質産生藍藻類ライブラリーを構築した。そして本研究で構築したライブラリーはカビ臭が発生した場合の産生種を絞り込む判断に対して有益であることが示された。また本研究で蓄積したカビ臭原因物質合成酵素遺伝子の配列情報より、水源試料を用いた遺伝子解析により早期に産生種の属レベルでの存在把握が可能であることが示唆された。

水中のDOMの挙動をOrbitrap質量分析計を用いて精密質量分析する場合に、乾燥濃縮はPPLカートリッジを用いた濃縮よりも有機物の回収率が高く、共存する塩分による阻害も少なく、平等かつ高感度で濃縮できる方法であることが示された。一方で、乾燥濃縮は作業時間を要することから、試料量が必要な解析や実験を併用する場合にはPPLカートリッジを用いることが選択肢にもなりうると思われた。

標準試料を用いた2-MIB除去実験より、同程度のDOC濃度ではフルボ酸低分子物質(1 kDa以下)が強い吸着競合作用を示すことが示された。また腐植画分、非腐植画分での2-MIB除去率を評価した結果、試料の特性に関係なく吸着競合が観察され、各画分共に同程度の競合影響があることが確認でき、フミン酸様蛍光物質とフルボ酸様蛍光物質が2-MIB吸着競合に影響を及ぼしていることが示された。

LC-HRMSによる試料水の分析により、生ぐさ臭候補物質は、DNPHと反応可能なアルデヒド部位またはケトン部位を2か所保有することが示唆された。GC-Oによる試料の分析の結果、候補物質以外の有臭成分のカラム保持時間を特定することができた。

ジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* の発現様式は構成的発現であることがわかった。つまり、カビ臭原因物質産生藍藻類の個体群密度の定量することで、カビ臭発生予測を可能となるといえる。また水源におけるカビ臭物質産生藍藻類のモニタリングのために、形態観察では困難なカビ臭物質産生藍藻類の識別に有効と期待できる 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

井上拓也, 浅田安廣, 田代新, 舩橋康史, 岡本朗, 下ヶ橋雅樹, 秋葉道宏. 全国の水道原水中における 2-メチルイソボルネオール の粉末活性炭への非平衡吸着. 水道協会雑誌. (印刷中)

Takanashi H, Shinfyku Y, Nakajima T, Ogura A, Kitamura H, Akiba M. Exploration of an Odorous Aldehydes and Ketones Produced by *Uroglena americana* Using High Resolution Mass Spectrometry, GC-Olfactometry, and Multivariate Analysis. *Chemosphere*. (in press)

Shinfyku Y, Nakamura T, Takanashi H, Nakajima, Ueda T, Akiba M. A Method to Purify a DNPH-derivatized Sample Using Solid Phase Extraction. *Environmental Science*. (in press)

## 2. 学会発表

八島将太, 西村修, 今本博臣, 三浦尚之, 秋葉道宏, 佐野大輔. 状態空間モデルを用いたダム湖におけるクロロフィル a 濃度予測モデルの構築. 令和元年度全国会議 (水道研究発表会), 2019.11, 函館市.

八島将太, 西村修, 今本博臣, 三浦尚之, 秋葉道宏, 佐野大輔. ダム湖における藻類異常発生予測モデルの構築. 第 54 回日本水環境学会年会, 2020.3, 盛岡市. (学会中止, 誌上発表)

楊露, 柳橋泰生. 日本および中国における水源汚染の状況および対策の比較. 第 41 回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム, 2019.7, 京都市.

柳橋泰生, 楊露. 流域間連携政策としての導水事業の水質改善効果と影響, 環境経済・政策学会 2019 年大会, 2019.9, 福島市.

柳橋泰生. 水源の臭気強度測定におけるベルヌイ試行率の試算, 第 54 回日本水環境学会年会, 2020.3, 盛岡市. (学会中止, 誌上発表)

浅田安廣, 藤本尚志, 井上拓也, 秋葉道宏. 遺伝子解析に基づいた水環境中のカビ臭原因物質産生藍藻類同定の試み. 令和元年度全国会議 (水道研究発表会), 2019.11, 函館市.

江崎敦, 浅田安廣, 藤本尚志, 田中美帆, 早坂泰彦, 鈴木孝俊, 山田晃平, 秋葉道宏. 全国水道水源を対象としたカビ臭原因物質産生藍藻類の同定. 第 54 回日本水環境学会年会, 2020.3, 盛岡市. (学会中止, 誌上発表)

野口暁生, 横井貴大, 船岡英彰, 小倉明生, 浅田安廣. 琵琶湖で発生した *Anabaena* 属の形態的特徴による種分類及びカビ臭産生能評価の試み. 第 54 回日本水環境学会年会, 2020.3, 盛岡市. (学会中止, 誌上発表)

井上拓也, 浅田安廣, 田代新, 船橋康史, 岡本朗, 下ヶ橋雅樹, 秋葉道宏. 2-メチルイソボルネオール粉末活性炭への非平衡吸着における水道原水中有機物の影響- 全国の水道原水を用いた検討-. 令和元年度全国会議(水道研究発表会), 2019.11, 函館市.

神里良太, 浅田安廣, 高篠鮎人, 浦上正, 茂田裕充, 小松一弘, 秋葉道宏: 粉末活性炭処理での吸着競合影響-2-MIB 除去低下要因の推定-. 第 54 回日本水環境学会年会, 2020.3, 盛岡市. (学会中止, 誌上発表)

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, LC-HRMS および GC-O-HRMS と多変量解析の組み合わせによる水道水生ぐさ臭原因物質の探索. 第 67 回質量分析総合討論会, 2019.5, つくば市.

Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba, Exploration of a causative compound of fishy-smell in raw water for taps by combining a LC-HRMS, a GC-O-HRMS, and multivariate analyses. 第 28 回環境化学討論会, 2019.6, さいたま市.

Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba, Exploration of a Causative Substance of Fishy-Smell in Raw Water for Taps by Combining a LC-HRMS, a GC-O-HRMS, and Multivariate Analyses. Water and Environment Technology Conference 2019, 2019.7, Osaka, Japan.

Yuta Shinfuku, Hirokazu Takanashi, Tsunenori Nakajima, Michihiro Akiba, Exploration of an odorous metabolite of uroglena americana using high resolution mass spectrometry, GC-Olfactometry, and multivariate analyses, Water and Environment Technology Conference 2019, 2019.7, Osaka, Japan.2-120S

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, LC-HRMS と多変量解析の組み合わせによる水道水中の生ぐさ臭原因物質の探索および構造推定. 第 22 回日本水環境学会シンポジウム, 2019.9, 札幌市.

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, 多変量解析と LC-HRMS および GC-O-HRMS

の組み合わせによる水道水中の生ぐさ臭原因物質の探索. 環境科学会 2019 年会, 2019.9, 名古屋市.

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏, 多変量解析, LC-HRMS, GC-O および GC-HRMS による水道水生ぐさ臭原因物質の探索. 第 54 回日本水環境学会年会, 2020.3, 盛岡市. (学会中止, 誌上発表)

Hanchen Miao, Ji Zhang, Yasuhiro Asada, Motoo Utsumi, Zhongfang Lei, Hirokazu Takanashi, Naoshi Fujimoto, Michihiro Akiba, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu, Monitoring of geosmin-producing *Anabaena* by whole cell PCR. 日本水処理生物学会第 56 回大会, 2019.11, 金沢市.

Ji Zhang, Hanchen Miao, Yasuhiro Asada, Zhongfang Lei, Hirokazu Takanashi, Satoshi Ichise, Naoshi Fujimoto, Michihiro Akiba, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu, Rapid Detection and Quantification of Musty Odor Production by Cyanobacteria, . 第 54 回日本水環境学会年会, 2020.3, 盛岡市. (学会中止, 誌上発表)

Qingyue Shen, Hanchen Miao, Saya Akiyama, Shinya Tsukino, Motoo Utsumi, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang, Yasuhiro Asada, Naoshi Fujimoto, Michihiro Akiba, Kazuya Shimizu, Effect of TN/TP ratio on growth and geosmin productive activity in cyanobacteria. The 4th International Conference on Resent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment (Livestock Waste 2020), 2020.3, Tsukuba, Japan. (開催延期)

Hanchen Miao, Qingyue Shen, Satoshi Ichise, Marie Shimada, Naoshi Fujimoto, Yasuhiro Asada, Michihiro Akiba, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu, Monitoring of geosmin-producing cyanobacteria by whole-cell PCR. The 4th International Conference on Resent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment (Livestock Waste 2020), 2020.3, Tsukuba, Japan. (開催延期)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。) 該当なし

