

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

平成27年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 秋葉道宏  
(国立保健医療科学院)

平成28(2016)年 3月

## 目 次

### 研究班の構成

#### ・ 総括研究報告書

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

秋葉 道宏

#### ・ 分担研究報告書

##### 1．流域システムの水管理対策に関する研究

秋葉 道宏、下ヶ橋雅樹、初山 将

##### 2．高分解能質量分析計を用いた水道水生ぐさ臭臭気原因物質の探索

秋葉 道宏、高梨 啓和、岸田 直裕、小倉 明生

##### 3．ろ過漏出障害原因微生物の同定技術の開発と存在実態調査

藤本 尚志、岸田 直裕

##### 4．ろ過漏出障害を回避するための浄水処理プロセスの開発

秋葉 道宏、西村 修

##### 5．カビ臭発生予測手法の構築

秋葉 道宏、清水 和哉、岸田 直裕

#### ・ 研究成果の刊行に関する一覧表

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

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

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 統括研究官

研究要旨

本研究では「大規模災害や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」の提案を目指し、流域システムの水管理対策等に関する研究を実施した。

水道水源流域の水収支ならびに水質に与える気候変動の影響評価を行うことを目標とし、(1)全国規模での表流水利用浄水場の流域における、2つの温暖化シナリオ(RCP2.6及び8.5)下での気候変動モデル(MIROCならびにMRI)計算結果に基づく月平均気温の変化の推算、及び(2)相模川流域中の相模ダム流域の日流出量を計算する水文モデルの構築、を行った。(1)については、全国の上水道及び簡易水道の総給水量の約10%に相当する浄水場の流域における気候変動による月平均気温変化(1981~2000年と2081~2100年の平均値の差)の分布を可視化することができた。また全国的にみると、気温上昇はRCP2.6では1~3、同8.5では3~5程度と予想された。(2)については、相模湖流域の流出モデリングを行った。モデリングにはSWAT(USDA他)を用い、SWAT-CUPによるパラメータ補正を行った。計算対象としては、2004年を初期化期間、2005年~2007年を補正期間、2008年~2009年を検証期間とした。その結果、補正~検証期間に対して良好なパラメータセットを得た。また高濁等を引き起こす洪水時、あるいは渇水時の流量予測を行ううえで重要となるピークや基底流量に対しても十分な予測性がみられた。

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、各種検討を実施した。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、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・高質量精度LC/MSが適しているため、LC/MSで被検物質を測定できるようにするための誘導体化処理方法を検討し、これを確立した。確立に際し、臭気物質の一般的な構造に鑑み、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た。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*が発生した際に採取した表流水および水道原水の誘導体化処理を行い、高分解能・高質量精度LC/MSを用いて生ぐさ臭原因物質を探索した。探索の結果、原因物質の候補物質として6個を発見した。

次世代シーケンサーを用いて浄水場の各処理工程水についてろ過漏出障害を引き起こすピコ植物プランクトンの生物相解析を行った。その結果、川崎市上下水道局長沢浄水場のろ過水においてAlphaproteobacteria綱、Betaproteobacteria綱、Gammaproteobacteria綱が主に検出され、主要な綱は時期によって異なった。また沈澱処理水とろ過水の微生物相を比較したところ、多くの月で主要となる綱は大きく異なった。リード数が多く検出頻度の高い微生物は、5門17属に分類された。これらの中には原水、沈澱処理水におけるリード数は少なく、ろ過水において5%以上に高まるものもあった。千葉県水道局栗山浄水場のろ過水においても長沢浄水場と同様に

Proteobacteria 門の割合が大きく、Proteobacteria 門に占める Alphaproteobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱の割合はそれぞれ、60%、34%であった。従属栄養細菌による濁度への影響が大きいことが示唆されたため、水道水源である草木湖において群集構造解析を行った。その結果、表層、中層、底層ともに Proteobacteria 門、Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門で微生物群集が構成され、その構造は水深、時期により異なることが明らかとなった。

ピコ植物プランクトン *Synechococcus* sp. と藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いて凝集に関わる基本的特性としての pH とゼータ電位の関係、荷電中和に必要な凝集剤注入量、および荷電中和時の残留濁度を比較検討した。両藻類とも pH の上昇とともに荷電中和が起こり、*Synechococcus* では pH が 5 と 6 の間で、*Microcystis* では 6 と 7 の間で正電荷から負電荷に変化した。PAC を用いて pH6.5 と 7 における荷電中和に必要な凝集剤注入量を求めたところ、*Microcystis* は pH6.5 および 7 の両条件において凝集剤注入量は 5 から 10mg/L 必要であり pH 変化の影響は認められなかったが、*Synechococcus* では pH6.5 において 50 から 60mg/L、pH7 において 100 から 200mg/L と多量の凝集剤注入量が必要であり、pH のわずかな変化に大きな影響を受けることが明らかになった。また、最適凝集剤注入量における残留濁度は *Microcystis* と比較して *Synechococcus* で著しく高く、荷電中和のために多量の凝集剤注入量を必要とする条件下で再分散が生じている可能性が考えられた。

カビ臭物質産生微生物群の定量とカビ臭物質産生活性の定量手法の開発のためにカビ臭物質合成酵素遺伝子の保存性を解析した。その結果、ジェオスミン合成酵素遺伝子ホモログは、放線菌内において高度に保存されていることが、単離菌の解析により明らかとなった。藍藻類においては、遺伝子塩基配列の相同性を利用することにより「属」毎に分けられることがわかった。従って、ジェオスミン産生微生物個体群数の定量およびジェオスミン合成活性分析において、放線菌と藍藻類を別にして解析できることがわかった。

#### 研究分担者

西村 修	東北大学東北大学大学院 工学研究科 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	鹿児島大学大学院 理工学研究科 准教授
下ヶ橋雅樹	国立保健医療科学院 国際協力研究部 上席主任研究官
岸田直裕	国立保健医療科学院 生活環境研究部 主任研究官
清水和哉	東洋大学生命科学部 応用生物科学科 講師

らびに水道サービスの持続性が必要とされており、大規模地震等の広域災害、気候変動による大雨降水量に伴う原水高濁度化や無降水日の増加による渇水、また水温上昇に伴う生物障害への対策は、今後の持続可能な水道システム構築の要諦である。一方で、水道システムにおいても気候変動の緩和がより一層求められる状況から、本研究では「大規模災害や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」の提案を目指し、流域システムの水管理対策に関する研究や気候変動に伴う生物障害対策に関する研究等を実施した。

#### B . 研究方法

1) 流域システムの水管理対策に関する研究

#### A . 研究目的

持続可能な水道システム構築において、危機管理への対応、安全な水の供給、な

全国気候変動影響把握



全国の浄水場のうち、表流水のみを水源とする浄水場のうちの57ヶ所を対象とした。気候変動に関しては、RCPシナリオに基づく気候変動モデル計算結果を用いた。モデルは、東京大学、国立環境研究所、及び海洋研究開発機構によるMIROC5.0(以下、MIROC)及び気象庁によるMRI-CGCM3.0(以下、MRI)による2081~2100年の3次メッシュ月平均気温を、対照としては農業環境技術研究所(農環研)の3次メッシュデータに基づく1981~2000年の同値を用いた。気象データから流域の気象を確定する際にはArcGIS Desktop Basic (ESRI Japan、東京)ならびにMicrosoft Office 2010 Access(日本マイクロソフト、東京)を用いた。また、人口あたりの影響度をいくつかのクラスにわけて把握するため、給水量による重みづけを行って評価した。

#### 相模川流域水文モデル

降雨、蒸発、浸透、流出などを物理的な過程をもとに、小流域、土地利用や植生、土壌種別ごとに計算する準分布型物理モデリングツールであるSoil and Water Assessment Tool (SWAT)を用いてモデルを構築した。相模ダム流域を対象流域とした。気象や河川流量などの時系列データについては、2004~2009年の日々のデータを使用した。また、流出解析に関するパラメータを補正し、再現性の高いモデルを構築するため、実測値(相模ダム流入量)に対する予測におけるNash Sutcliffe efficiency coefficient (NSE)、またはPercent bias (PBIAS)を最適化指標として、SWAT-CUPに具備されるSUFI2によるパラメータ補正を行った。

#### 2) 高分解能質量分析計を用いた水道水生ぐさ臭臭気原因物質の探索

近年の質量分析の進歩を活用し、高分解能・高質量精度の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。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。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・高質量精度LC/MSが適している。このため、LC/MSで被検物質を測定するに必要な誘導体化処理方法を検討し、これを確立した。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表流水および水道原水の誘導体化処理を行い、高分解能・高質量精度LC/MSを用いて原因物質を探索した。

#### 3) ろ過漏出障害原因微生物の同定技術の開発と存在実態調査

次世代シーケンサーを用いて、川崎市上下水道局長沢浄水場および千葉県水道局栗山浄水場の各処理工程水や、草木湖表層水、中層水、底層水について、ろ過漏出障害を引き起こすピコ植物プランクトンの生物相解析を行った。また、草木湖を水源とする浄水場においてろ過漏出障害を引き起こす真核ピコ植物プランクトンの生物相を明らかにすることを目的として緑藻綱の18S rRNA遺伝子を増幅するプライマーを用いて草木湖の生物相を解析した。

#### 4) ろ過漏出障害を回避するための浄水処理プロセスの開発

高塩基性塩化アルミニウム(高塩基度PAC)に関する既往研究について整理し、植物ピコプランクトンの凝集に応用する場合の研究課題をまとめた。さらに、ピコ植物プランクトンの凝集におけるpHの影響を明らかにすることを目的として、*Synechococcus* sp. と藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いて凝集実験を行った。

#### 5) カビ臭発生予測手法の構築

カビ臭物質産生微生物群の定量とカビ臭物質産生活性の定量手法の開発のために、上水源や水域からISP medium No.4 (ISPM4)を用いて放線菌を単離した。単離菌から全DNAをビーズビーディング

法により抽出した。また、グリセロールストックも合わせて作成した。全 DNA を用いて、16S rRNA 遺伝子および *geoA* 遺伝子ホモログを対象とした PCR クローニングを実施し、アガロースゲル電気泳動法を用いた PCR 産物の精製後、塩基配列解読に供した。得られた塩基配列を用いて blastn 解析を行い、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた単離菌の同定および *geoA* 遺伝子ホモログの塩基配列を同定した。また、*geoA* 遺伝子ホモログを保存している細菌を blastn 検索により調査した。塩基配列データベースを用いてジェオスミン合成酵素遺伝子 (*geoA* 遺伝子ホモログ) および 2-MIB 合成に關与する重要な遺伝子であるグラニルニリン酸メチルトランスフェラーゼ遺伝子および 2-MIB 合成酵素遺伝子であるモノテルペンシクラーゼ遺伝子をデータベースから探索し、保存性の解析を行った。

### C. 研究結果および D. 考察

#### 1) 流域システムの水管理対策に関する研究

##### 全国の気候変動影響把握

全国の浄水場流域における気候変動に伴う月平均気温の変化 (1981~2000 年と 2081~2100 年の平均値の差) の分布を可視化することができた。全国的には、RCP2.6 シナリオのもとでは、MIROC では計算対象とした浄水場流域のすべてにおいて 1~3 の上昇が、MRI ではその 8 割程度で 1~2 の変化となるものと推算された。RCP8.5 シナリオのもとでは、MIROC では計算対象とした浄水場流域すべてが 4 以上、MRI では 3~5 の変化となることが推算された。

##### 相模川流域水文モデル

パラメータ補正をしない場合、流出結果では降雨が少ない時期の基底流量は確保されず、降雨が多い時期の流量は過大となる結果であった。これに対し、PBIAS の絶対値を最適化したパラメータセットでは、降雨が少ない時期の基底流量の精度が向上したが、降雨が多い時期の流量

でピーク後のテーリングが観測と合わない様子が見られた。さらに NSE を用いて最適化したことにより、基底流量や、テーリングの再現性が進み、全体としてさらに再現性の高いモデルとなった。

2005~2009 年にピーク流量 (50 m<sup>3</sup>/日以上) が現れた 15 回と、一週間無降雨日が続いた 150 回について、観測流量と計算流量を比較した結果、ピーク流量時の再現性では、流量が多いときほど再現性がやや悪くなるのに対し、基底流量時の再現性は良いことから、渇水の予測により適したモデルとなったと言える。

#### 2) 高分解能質量分析計を用いた水道水生きさ臭臭気原因物質の探索

##### 誘導体化処理方法の確立

モデル化合物として hexyl alcohol、1-butanethiol、(2E,4E)-heptadienal、4-methyl-2-pentanone および propionic acid に着目し、DNS-Cl または DNPH を用いて誘導体化した。誘導体化物が得られたか否かの確認は、MS を用いて行った。

また、誘導体化の際に用いた酸、不揮発性の塩、誘導体化試薬がサンプル中に残存していると、LC/MS で測定した際に LC/MS の腐食や検出器の過剰なエッチングが起こる。このため、固相抽出脱離、液液抽出、結晶化によりこれらの不要成分を除去する方法を検討した。その結果、ESI キャピラリーチューブやイオントランスファータッチアップ付近における不揮発性物質と思われる物質の堆積、金属の腐食は認められなかった。また、誘導体化試薬やその加水分解物のピークが認められたが、検出器の過度なエッチングが起きる信号強度ではなかった。これらのことから、不要成分の除去に成功したと判断した。

次に、モデル物質誘導体化物の精密質量を測定した結果、いずれのモデル物質についても、想定される誘導体化物の分子式の精密質量および天然同位体パターンのシミュレーション結果と実測結果が一致した。

以上より、検討したすべてのモデル物

質の誘導体化およびLC/MSを用いた検出に成功したと判断した。

高分解能・高質量精度 LC/MS を用いた生ぐさ臭臭気原因物質の測定

実サンプルの誘導体化処理を実施し、得られた誘導体化サンプルを LC/MS で分析した。さらに、純水を用いて一連の濃縮・誘導体化処理を実施したサンプル(ブランクサンプル)を調製し、LC/MS を用いて同様に測定した。サンプル固有なピークを目視で探索することは困難であったが、サンプルのピークボリュームがブランクサンプルのピークボリュームの 2 倍以上であったピークをサンプル固有のピークとして差異解析を実施したところ、positive ion mode における測定で 210 個、negative ion mode における測定で 298 個のサンプル固有なピークを発見した。さらに、ピークボリュームの比が 10 倍以上となるピークを探索したところ、両イオン化モードでそれぞれ 3 個(合計 6 個)のサンプル固有なピークを発見した。

3) ろ過漏出障害原因微生物の同定技術の開発と存在実態調査

浄水場処理工程水の生物相評価

長沢浄水場の原水において Actinobacteria 綱、Betaproteobacteria 綱が多く検出された。沈澱処理水においては Betaproteobacteria 綱が主要となるが多かったが、Gammaproteobacteria 綱が多く検出される月もあった。ろ過水においては Alphaproteobacteria 綱、Betaproteobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱が主に検出され、主要な綱は時期によって異なった。総リード数の 5% 以上を占めた OTU (Operational Taxonomic Unit) を主要な微生物としたところ、5 門 17 属に分類された。これらのうち *Pseudarcicella* 属、*Sphingomonas* 属、*Moraxella* 属は、検出された回数が 6~8 回と多かった。

栗山浄水場の原水、沈澱処理水、ろ過水において Proteobacteria 門の割合が最も大きく、特にろ過水では 70% 以上を占めた。このことから Proteobacteria 門に着目し、綱レベルでの評価を行った。原水に

おいては Betaproteobacteria 綱が Proteobacteria 門に対し 80% を占め、沈澱水においては Alphaproteobacteria 綱が 37%、Betaproteobacteria 綱が 43% を占めた。ろ過水においては Alphaproteobacteria 綱が 60% を占めた。ろ過水に占める *Synechococcus* 属のリード数は総リード数の 1% 程度であり、栗山浄水場におけるろ過漏出障害の原因生物として、従来ピコシアノバクテリアが考えられてきたが、従属栄養細菌による影響も大きいことが示唆された。

草木湖の微生物群集構造解析

7 月、8 月、9 月の表層において Cyanobacteria 門が多く検出された。化学合成生物では Proteobacteria 門および Actinobacteria 門が多く検出された。綱レベルで見ると、Proteobacteria 門では Betaproteobacteria 綱、Actinobacteria 門では Actinobacteria 綱が主要であった。中層、底層では Cyanobacteria 門の割合が低下し、化学合成生物で微生物群集が構成されていた。中層は全ての層の中で最も多様性に富んでおり、Proteobacteria 門と Actinobacteria 門で総リード数の 55~68% を占めた。綱レベルでは、Proteobacteria 門では Betaproteobacteria 綱が、Actinobacteria 門では Actinobacteria 綱が主要であった。底層は、4~8 月は中層と同様に Proteobacteria 門と Actinobacteria 門の割合が大きかったが、9 月において Bacteroidetes 門の割合が高まった。綱レベルにおいては、中層と同様に Proteobacteria 門では Betaproteobacteria 綱が、Actinobacteria 門では Actinobacteria 綱が主要であった。9 月の Bacteroidetes 門の中では Flavobacteriia 綱が主要であった。また UniFrac 解析により、草木湖の微生物群集構造が水深、時期によって異なることが明らかとなった。

真核ピコ植物プランクトンの検出技術

1~12 月の試料から得られたクローンについて、塩基配列間の相同性が 97% 以上を同一の OTU としたところ 5 OTUs に分かれた。相同性検索を行ったところ

*Mychonastes* 属および *Chlamydomonas* 属に近縁であった(表 3)。過去 2 年間に検出された緑藻綱は、*Mychonastes homosphaera*、*Chlamydomonas noctigama* のみであったが、今年度はこれまで検出されなかった種も検出された。以上より緑藻綱の生物相を評価する上で、本年度用いたプライマーの有用性が明らかになった。また、*Mychonastes* 属に近縁な OTU の検出頻度、検出割合が高く、今回検出された緑藻綱の中で 2 $\mu$ m 程度の細胞サイズのものは *Mychonastes* 属のみであった。以上の結果から草木湖における主要な緑藻綱の真核ピコ植物プランクトンは *Mychonastes* 属であることが明らかになった。

#### 4) ろ過漏出障害を回避するための浄水処理プロセスの開発

##### 文献調査結果および考察

高塩基度 PAC を用いた凝集に関する研究は限られているが、高塩基度 PAC の特徴は以下の通りまとめられる。

- ・弱アルカリ域でも使用でき、pH 制御を行う必要が少なく、残留アルミニウム濃度が低減できる。
- ・従来型 PAC と同程度、同等以上の濁度除去能力を示すが、クリプトスポリジウムの除去性は濁度より優れない可能性がある。
- ・薬品注入量については、凝集剤のみならず pH 調整剤も含めた薬品使用量の低減効果がある。
- ・冬季においてもフロック形成が良く、除濁性、沈降性も従来型 PAC よりも向上し、汚泥処理においても負荷の低減効果が期待できる。
- ・ウイルスの処理性に関して、高塩基度 PAC は従来型 PAC に比べて高い除去率が得られる。
- ・植物プランクトンおよびピコ植物プランクトンの凝集処理に高塩基度 PAC を用いた研究は無いことから、今後研究をすすめて凝集特性を明らかにする必要がある。

ピコ植物プランクトンの凝集に及ぼす

#### pH の影響

*Synechococcus* は pH2 から 4 の強い酸性領域で約 10 から 20mV の正電荷を有していたが、*Microcystis* はさらに大きな正電荷(約 30 から 40mV)を呈していた。しかし、pH の上昇とともに荷電中和が起こり、*Synechococcus* では pH が 5 と 6 の間で、*Microcystis* では 6 と 7 の間で正電荷から負電荷に変化した。結果として両者とも負電荷であるものの、*Synechococcus* は pH7 で約 -10mV、*Microcystis* は -20mV 以下であり、pH7 付近でのわずかな pH 変化が凝集に大きな影響を及ぼすことが予想された。

このようなピコ植物プランクトンおよび藍藻の特徴をふまえ、通常のパックを用いて pH6.5 と 7 に調整して荷電中和に必要な凝集剤注入量を求めるための実験を行った。その結果、*Microcystis* は pH6.5 および 7 の両条件において凝集剤注入量は 5 mg/L 必要であり、pH 変化の影響は認められなかったが、*Synechococcus* では pH6.5 において 50 から 60mg/L、pH7 において 100 から 200mg/L と多量の凝集剤注入量を必要とし、pH のわずかな変化に大きな影響を受けることが明らかになった。

凝集性の悪いことで知られている *Microcystis* と比較しても *Synechococcus* の凝集沈殿処理性は悪く、荷電中和領域と言えるゼータ電位の範囲(-5~+5mV)でも高い残留濁度を示した。この理由としては、荷電中和のために 50~100mg/L と多量の凝集剤注入量を必要とする条件下で、再分散が生じている可能性が考えられた。このことについてさらに検討を要するが、高塩基度 PAC は荷電中和のみならず架橋作用も期待できるため、ピコ植物プランクトンに適用した場合に凝集効果は少なからず期待できるものと考えられる。

#### 5) カビ臭発生予測手法の構築

採取したサンプルから 39 株を単離した。現在までに 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解読を終えた 23 株を blastn 解析に供した

結果、15 株が、かび臭物質産生の報告例が多い *Streptomyces* 属であった。これら *Streptomyces* 属と同定された 15 株から *geoA* 遺伝子ホモログを PCR クローニング後の塩基配列解読により同定した。遺伝子データベース上の *geoA* 遺伝子ホモログを保持している主な放線菌は、*Streptomyces* 属であった。その他の放線菌でデータベース上に登録されていたのは、*Kitasatospora* 属、*Frankia* 属、*Kribbella* 属等があった。以上から、*Streptomyces* 属以外にも多くの放線菌に保存されていることがわかった。ジェオスミン産生藍藻類に関しては、異なる「属」間においては、*geoA* 遺伝子ホモログのアミノ酸配列の相性は高いものの遺伝子塩基配列の相性が、低い領域があることがわかった。そのため藍藻類においては、遺伝子塩基配列の相性を利用することにより「属」毎に分けられることがわかった。

一方、2-MIB 合成に關与する酵素に關して、アミノ酸配列の相性は、放線菌および藍藻類のどちらも高いことが報告されていた。また、遺伝子データベース解析から、放線菌の *geoA* 遺伝子ホモログよりも、藍藻類における遺伝子塩基配列の相性が高いことが確認された。しかしながら、藍藻類の遺伝子登録数は極めて少ないため、*geoA* 遺伝子ホモログと同様に高度に保存されているのかは、決定的ではない。これまでに、2-MIB 産生藍藻類 *Pseudanabaena limnetica* (Castaic Lake) の全ゲノム解析が一例のみ報告されている。しかし、ゲノム情報は、未だ遺伝子データベースに登録されていない。そのため、どの様な分子生物学的な経路によってかび臭物質産生の引き金が稼働するのか、反対に、かび臭物質産生抑制の引き金が稼働するのか、の詳細な解析が実施できない状況にある。

水道水質基準値を超えるかび臭発生を予測するとともに、基準値を超えるかび臭の発生後、基準値を下回るのがいつになるのかといったかび臭消失の予測、発生予測・消失予測のどちらも可能な早期

検出技術開発およびかび臭発生抑制技術の構築のために、ジェオスミン産生藍藻類および 2-MIB 産生藍藻類のゲノム解析を実施することが必要である。

## E . 結論

- 1) 全国の上水道と簡易水道の総給水量の約 10%に相当する、表流水水源浄水場の集水域での RCP2.6 及び 8.5 を想定した気候変動モデル計算結果に基づく月平均気温の変化 (1981~2000 年と 2081~2100 年の平均値の差) を推算し、その分布を可視化することができた。また全国的には、RCP2.6 では 1~3 、同 8.5 では 3~5 程度の気温上昇となるものと推算された。
- 2) 相模川流域中の相模湖集水域の流出に対して準分布型水文モデル SWAT を用いてモデリングを行ったところ、流出パターンや、ピーク・基底流量に対して良好な予測性を有するモデルが得られた。
- 3) 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、LC/MS で検出するための誘導体化処理方法を確立した。確立した方法を用いて、黄色鞭毛藻綱 *Uroglena americana* が発生した際に採取した湖沼水および水道原水から回収された物質の誘導体化処理を実施し、LC/MS で生ぐさ臭臭気原因物質を探索した結果、検出されたピークボリュームが大きい物質として 6 物質を発見した。
- 4) 次世代シーケンサーにより、浄水場処理工程水の微生物相および主要な細菌を評価した。工程水間、とくに沈澱処理水とろ過水間で微生物相が異なることが明らかとなった。また、草木湖の微生物群集構造の解析を行い、水深、時期によって群集構造が異なることが明らかとなった。さらに、緑藻綱の 18S rRNA 遺伝子の特異的に増幅させるプライマーにより緑藻綱の生物相を評価することができた。
- 5) ピコ植物プランクトン *Synechococcus* の凝集に関する基本的特性に關して、

*Microcystis* と比較しながら検討し、PAC より凝集しにくい特性を有すること、このためより多量の凝集剤注入量を必要とすること、その結果再分散が生じている可能性が高いことを明らかにした。また、文献調査から高塩基度 PAC によって凝集効果を高めることが可能と考えることを考察した。

6) カビ臭物質合成酵素遺伝子群が、放線菌および藍藻類のそれぞれに保存されていることを明らかにした。分子生物学的手法を用いてカビ臭物質産生微生物群個体数を推量することにより、カビ臭物質産生予測手法・消失予測手法を構築できることが期待される。

F . 健康危険情報  
なし

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kishida N, Sagehashi M, Takanashi H, Fujimoto N, Akiba M. Nationwide survey of organism-related off-flavor problems in Japanese drinking water treatment plants (2010–2012). *J Water Supply Res T* 2015;64(7):832-8.
- 2) Fujimoto N, Mizuno K, Yokoyama T, Ohnishi A, Suzuki M, Watanabe S, Komatsu K, Sakata Y, Kishida N, Akiba M, Matsukura S. Community analysis of picocyanobacteria in an oligotrophic lake by cloning 16S rRNA gene and 16S rRNA gene amplicon sequencing. *J Gen Appl Microbiol* 2015;61(5):171-6.

### 2. 学会発表

- 1) 渡邊英梨香, 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 藤瀬大輝, 岸田直裕, 秋葉道宏. 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングによる浄水処理工程水の細菌相の評価. 平成 27 年度全国会議(水道研究発表会); 2015 年 10 月, さいたま市. 同講演集 pp. 630-631.
- 2) 初山将, 下ヶ橋雅樹, 秋葉道宏. 気候変動の水道システム影響評価のため

の相模川流域水文モデルの作成. 日本水環境学会第 50 回年会; 2016 年 3 月; 徳島. 同講演要旨集(印刷中).

- 3) 加村瑞希, 遠藤雅也, 篠原健吾, 内海真生, 岸田直裕, 秋葉道宏, 清水和哉. カビ臭物質産生微生物によるカビ臭物質産生特性. 日本水環境学会第 50 回年会; 2016 年 3 月; 徳島. 同講演要旨集(印刷中).

H . 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

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：流域システムの水管理対策に関する研究

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 下ヶ橋 雅樹 国立保健医療科学院 上席主任研究官  
研究協力者 初山 将 国立保健医療科学院 研究生

研究要旨

水道水源流域における水収支並びに水質に与える気候変動の影響評価を行うことを目標とし、(1)全国規模での表流水利用浄水場（57ヶ所）の流域における、2つの温暖化シナリオ（RCP2.6及び8.5）下での2種の気候変動モデル（MIROCならびにMRI）計算結果に基づく月平均気温の変化の推算と可視化、及び(2)相模川流域内の相模ダム流域における流出解析に使用する水文モデルの構築、を行った。

(1)については、国内の上水道及び簡易水道の総給水量の約10%に相当する浄水場の流域における気候変動による月平均気温の変化（1981～2000年と2081～2100年の平均値の差）の分布が可視化された。また、全国を集計すると、平均気温の上昇はRCP2.6では概ね1～3、同8.5では3～5程度と予想された。

(2)については、相模川流域中の相模ダム流域の流出モデリングを行った。モデリングにはSWAT（USDA他）を用い、SWAT-CUPによるパラメータ補正を行った。計算対象としては、2004年を初期化期間、2005年～2007年を補正期間、2008年～2009年を検証期間とした。その結果、補正～検証期間に対して良好なパラメータセットを得た。また高濁等を引き起こす洪水時、あるいは渇水時の流量予測を行ううえで重要となるピークや基底流量に対しても十分な予測性がみられた。

A. 研究目的

気候変動に伴う異常降水や異常気温が水衛生環境に与える影響が懸念されている[1]。特に水道に注目すると、温度上昇による有害なシアノバクテリアの増殖促進[2]、豪雨に伴う原水の濁度やNatural Organic Mattersの増加[3,4]、下水越流水混入量の増加[5]、あるいは特定時期の雨量の減少に伴う排水割合の増加[4]等はシステム運用上の負荷を高める要因であり、合理的な水道計画においてその影響予測が重要となる[6]。もとより、厚生労働省の新水道ビジョン[7]の持続・安全・強靱といった

観点や、水循環基本法において求められる健全な水循環の維持や回復ならびに流域としての総合的かつ一体的な管理、あるいは国連の2030アジェンダにおいても取り上げられるIntegrated Water Resource Management（統合的水資源管理）[8]の視点からも、流域気候変動の水循環にあたる影響の把握は重要である。すなわち、持続可能な環境調和型の水道システムを検討するためには、将来の気候変動が流域水循環に与える影響を定量的に把握し、合理的な対策を講ずる必要があるといえる。

そこで本研究では、水道水源流域の水収支に与える気候変動の影響評価を行うことを目標として定め、

時間的な解像度が比較的大きな視点からの検討と位置づけられる、(1)全国規模での表流水利用浄水場の流域における将来の月平均気温の変化の推算とその可視化を行うこととした。さらに数日から1週間程度の短期的な豪雨や渇水の予測を行うため、時間的な解像度が小さい検討である、(2)水運用により安定的な水量確保を実施している相模川流域での水道水源に対する気候変動影響評価のための日々流量予測水文モデルの構築、の2点を目的とした。

## B. 研究方法

### (1) 全国の気候変動影響把握

全国の浄水場のうち、表流水のみを水源とする浄水場のうちの57ヶ所(北海道:7、東北:11、関東:11、中部・北陸:13、近畿・中国:7、九州:8)を対象とした。これらの浄水場の総平均給水量は4.4百万 $\text{m}^3/\text{日}^1$ [9]であり、2010年度の全国の上水道及び簡易水道の総給水量[11,12]の約10%に相当する量である。それぞれの浄水場の取水口の位置を地理情報システム(GIS)上に確定し、国土数値情報(国交省)[13]「流域界・非集水域」を用いて、その流域を確定した(図1)。GISの操作には、Arc GIS Desktop Basic (ESRI Japan, 東京)を用いた。

一方、気候変動に関しては、図2に示したRCPシナリオに基づく、気候変動モデル計算結果を用いた。モデルは、東京大学気候システムセンター、国立環境研究所、及び海洋研究開発機構地球環境フロンティア研究センターによるMIROC5.0(以下、MIROC)及び気象庁気象研究所によるMRI-CGCM3.0(以下、MRI)による2081~2100年の3次メッシュ月平均気温予測値[14]を、対照としては農業環境技術研究所(農環研)の3次メッシュデータ[15,16]に基づく1981~2000年の同値を用い、両者の20年間(=240ヶ月)の平均値を算出して比較した。なお、気象データから各流域内の気象を確定する際には、GIS上での空間検索、ならびに3次メッシュコードに基づいたデータ抽出(Microsoft Office 2010 Access(日本マイクロソフト、東京))を行った。また、人口あたりの影響度をいくつかのクラスにわけて把握するため、次式にて給水量による重みづけを行って評価し

た。

$$x_i = \frac{\sum_j q_{i,j}}{Q} \quad (1)$$

ここで、 $x_i$ はクラス*i*(例えば「気温上昇が2をこえ3以下」など、影響を範囲により区分したもの)の割合、 $q_{i,j}$ はクラス*i*と分類された浄水場*j*の配水量[ $\text{m}^3/\text{d}$ ]、 $Q$ は全国の上水道ならびに簡易水道の総給水量[ $\text{m}^3/\text{d}$ ](=43.2百万 $\text{m}^3/\text{d}$ )[11,12]である。

### (2) 相模川流域水文モデル

#### 2-1) モデル

流出解析に使用する水文モデルには、いわゆる集中型モデル(例えばタンクモデル[17,18])や、分布型モデル(例えばSagehashiら[19])として、多くのモデルが提案されている。本研究では、気候変動の影響評価のため、土地利用や植生、土壌の物理パラメータを用いることができ、それらの将来変化や、他の地域への応用も見据えた物理モデルを構築することを目的とした。また、対象とする流域は日本国内では比較的広大で、気候の変化にも富むことから、分布型モデルの構築が求められる。そのため、小保内ら[6]と同様に、米国農務省とテキサス農工大学が開発した、降雨、蒸発、浸透、流出などを物理的な過程をもとに、小流域、土地利用や植生、土壌種別ごとに計算する準分布型物理モデリングツールであるSoil and Water Assessment Tool (SWAT)[20]を用いてモデルを構築した。実際の構築にあたっては、ArcGISと連動して稼動するArcSWAT 2009(以下、ArcSWAT)ならびにパラメータ補正ツールであるSWAT-CUP 5.1.5.4(以下、SWAT-CUP)を使用した。

#### 2-2) 対象流域

本研究の最終的な目標のひとつとして、相模川を水源とする小雀浄水場の流域のモデリングを考えているが、本年度はその第一段階として、同流域におけるダム間水運用の効果を排し、また水源の安定性を評価するため、図3に示す相模ダム流域を対象流域とした。

#### 2-3) データ

気象や河川流量などの時系列データについては、2004~2009年の日々のデータを使用した。また、入手したデータは、ArcSWATに読み込ませるため、指定された形式に変換して使用した。以下にそれぞれの詳細について記述する。

<sup>1</sup> うち用水供給事業浄水場が1.2百万 $\text{m}^3/\text{d}$ を占める。一部、供給・受水関係にある浄水場があるが、送水分は重複計算していない。



## 標高データ

国土地理院「数値地図 50 m メッシュ (標高)」(平成 13 年 5 月 1 日発行)を ArcGIS の「国内データ変換ツール」によりポイントベクターデータとして読み込み、セルサイズ 60 m のラスターデータに変換したものを使用した。このデータを用いて 1,000 m<sup>2</sup> 以上から集水する河川流路を計算し、小流域に区切った結果、**図 4**のように流域が分割された。

## 土地利用データ

国土数値情報[13]「土地利用 3 次メッシュ」(平成 21 年度作成)を入手し、小保内ら[6]を参考に、当該流域内の土地利用を表 1 のように、ArcSWAT にあらかじめ登録されている土地利用形態に対応させた。また、入手した GIS シェープファイル (ポイントベクター) は、セルサイズ 60 m のラスターデータに変換して使用した。土地利用種別の分布は**図 5**のとおりであり、森林が流域内の約 80% を占めた。なお、近年アジア地域で地域特有となる水田の取り扱いについて水文モデルでの取扱いが検討[19]されており、SWAT においても同様の議論がなされている[21]。今回の検討では、モデルを適用するにあたり当該流域内において水田は 2% であるため、本研究では池や湖と同じ扱い (Water) とした。

## 土壌データ

国土交通省土地分類調査・水調査[22]により当該流域内の土壌分類の分布 (**図 6**) を確認したところ、流域の 8 割以上で褐色森林土であった。また、土壌物性値が関わる多くのパラメータについては、後述のとおり SWAT-CUP を用いて補正することから、簡便化のため流域全体を単一の土壌として扱うこととした。なお、今回使用した ArcSWAT には、現状では日本で使用されている土壌分類が初期登録されていなかったため、土壌の物性値をもって登録する必要がある。解析に必要な物性値は、主に土壌情報閲覧システム[23]で公表されている作土層の標準理化学性データベース及び土壌断面データベースから取得した。物性値ごとの詳しい取得先及び設定根拠は**表 2** のとおりである。なお、今回のモデルは流域の流出水量に対して補正を行うものであることを考慮し、土壌のアニオン排除能、土砂流出に関する Universal Soil Loss Equation (USLE) の K ファク

ター、及び土壌の電気伝導度については SWAT のデータベース値 (それぞれ 0.5、0.32、及び 0.1) を使用した。

## 気象データ

降雨量、最高気温、最低気温、及び日射量については、農環研の 3 次メッシュデータ[15,16]から、当該流域内のデータを Microsoft Office 2010 Access を用いて抽出し、使用した。風量、相対湿度については、気象庁の気象台等観測所 (風量: 河口湖、大月、山中、相対湿度: 河口湖、**図 3** 参照) で観測されたデータを気象庁ホームページ[24]からダウンロードした。なお、ArcSWAT 内では、小流域ごとに代表する観測点が自動で選択され、その観測点のデータが小流域全体のデータとして扱われる。計算に使用された観測点の分布は**図 4**に記載した。

## 河川流量データ

流出解析ではモデルの再現性を評価するために解析の流域最下流部の河川流量 (流出水量) の観測データが必要である。本研究では相模ダム流入量データを同流域の流出水量と考え、相模ダムを管理する神奈川県から入手した。また、当該流域内の水力発電所である道志第 1 発電所では隣接する別の流域で取水した水が放流される。これに関しても管理者である神奈川県から発電所流量データを入手し、使用した。

## 2-4) パラメータ補正

### プログラム

SWAT モデルでは土地利用や土壌種別を入力することによりパラメータが割り当てられ、蒸発量、土壌水分量、河川への流出水量、地下浸透量などが計算される。前述のとおり、土地利用に関しては、その利用形態を ArcSWAT に登録されているものに置き換え、土壌分類に関しては新たな土壌を登録した。しかし、土地利用に関しては、畑地を単一の作物に、水田を湖沼に置き換えるなど、現実とは異なる扱いをしている。土壌に関しては 1 断面の物性値を代表値としてとらえ、流域全体を単一の土壌と扱っている。そこで、流出解析に関するパラメータを補正し、再現性の高いモデルを構築するため、流出水量の観測値に対する予測における Nash Sutcliffe efficiency coefficient (NSE) [25] (式(2))、または Percent bias (PBIAS)[25] (式(3)) を最適化指標として、SWAT-CUP に具備され

る SUFI2 によるパラメータ補正[6]を行った。

$$NSE = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (O_i - N_i)^2}{\sum_{i=1}^n (O_i - \bar{O})^2} \quad (2)$$

$$PBIAS = \frac{\sum_{i=1}^n (O_i - N_i) \times 100}{\sum_{i=1}^n (O_i)} \quad (3)$$

ここで、 $O_i$  は流量観測値[m<sup>3</sup>/s]、 $N_i$  は流量予測値[m<sup>3</sup>/s]、 $\bar{O}$  は観測値の平均を示す。

NSE は、計算値の精度を観測値の計算値に対する残差分散を観測値の観測平均値に対する分散により規格化することによって評価する指標である[25]。1 に近いほど観測値と計算値が一致していることを示し、0 未満では計算値よりも平均値を用いるほうが現象の再現に適することを意味する。

PBIAS は、観測値が計算値に対する、平均的に見た大小をパーセンテージで表した数値である[25]。PBIAS が正であることはモデルが過小評価となっていることを、負であることはモデルが過大評価となっていることを意味し、0 となることが最も望ましい。

Moriasi ら[25]によると、これらの指標に対する評価は表 3 のとおりである。なお、同表は月ごとの流出解析に対する解釈である一方で、今回の検討は日単位のものであるが、今回の検討では、同表を目安として適用できるものと判断した。

本研究で用いた SUFI2 とは、各パラメータについて与えられた範囲の中で等間隔の値を作成し、それらをランダムに組み合わせた(ラテン超方格法)パラメータ値セットにより、それぞれ独立した計算によって目的関数を求め、最適なパラメータ値セットを求める手法である。したがって、最適化されるパラメータについては、あらかじめ設定したデフォルト値とは無関係の最適値が求められる。また、パラメータ値セットはランダムで作成されるため、ソフトウェアに対し同じ操作を行っても完全に一致する結果は作成されないことに注意が必要である。

#### 計算期間

本研究では、2004~2009 年の各種データを入手することができたため、2004 年を初期化期間、2005 年~2007 年をパラメータの補正期間、2008 年~2009 年を検証期間とした。

#### 補正パラメータの選択

小保内ら[6]を参考に流出解析に影響を及ぼすと考えられるパラメータを選択し、補正することとした。選択したパラメータは結果とともに表 4 に記載した。

#### 補正計算方法

選択したパラメータ数は 16 であり、次のように段階を踏んだ最適化を行った。

選択したパラメータについて、2,000 回の計算により PBIAS の絶対値を最小にするパラメータセットを求めた。

別途、NSE を指標として 2,000 回の計算を行い、NSE に対して感度が大きいと思われるパラメータ 4 つを選択した。

で選択した 4 つのパラメータについて、変動範囲を 1/2~1/3 に絞り、このパラメータのみを可変とし、NSE を指標とした 2,000 回の計算を行い、パラメータを最適化した。可変とした以外のパラメータは、で得られたパラメータ値セットを使用した

#### C. 研究結果及び D. 考察

##### (1) 全国の気候変動影響把握

それぞれのシナリオ条件下での全国のモデル計算結果から算出された、2081~2100 年の各浄水場水源流域の月平均気温の変化(1981~2000 年と 2081~2100 年の平均値の差)を図 7 に示す。ここで、各浄水場の値は MIROC ならびに MRI から算出された変化量の平均値である。いずれの系においても、特に関東以北の浄水場流域でその差(上昇量)が若干大きくなる傾向がみられた。また、それぞれの計算結果の全国集計を図 8 に示す。同図において、右側は左側の拡大である。同図より、月平均気温の 20 年平均値は、RCP2.6 シナリオでは MIROC では計算対象とした浄水場流域のすべてが、MRI ではその 8 割程度が 1~2 増加すること、RCP8.5 シナリオでは MIROC では計算対象とした浄水場流域すべてが 4 以上、MRI では 3~5 増加することが推算された。

##### (2) 相模川流域水文モデル

図 9 に、パラメータ補正期間と検証期間を併せた 2005 年から 2009 年までの、相模ダム流域の流

出水量に関する観測流量と計算流量のグラフを示した。また、NSE 及び PBIAS についても、図中に示した。Moriasi らの基準[25] (表 3) によると補正期間については NSE、PBIAS とともに very good、検証期間については、NSE は good、PBIAS は very good となる。

補正期間については NSE、PBIAS とともに very good、検証期間については、NSE は good、PBIAS は very good となる。

図 10 には、パラメータ補正の手順中で、流出結果が変わる様子を示した。暫定初期値での流出結果では降雨が少ない時期の基底流量は確保されず、降雨が多い時期の流量は過大となる結果であった。これに対し、PBIAS の絶対値を最適化 (補正計算方法手順 ) したパラメータセットでは、降雨が少ない時期の基底流量の精度が向上したが、降雨が多い時期の流量でピーク後のテーリングが観測と合わない様子が見られた。さらに NSE を用いて最適化 (補正計算方法手順 ) したことにより、基底流量や、テーリングの再現性が進み、全体としてさらに再現性の高いモデルとなった。

モデルの再現性の評価として、降雨量が多く、河川流量が増大した場合に、最大流量 (ピーク流量) がどの程度再現できるか、または無降雨日が続く、河川流量が減少した場合、その基底流量をどの程度再現できるかが重要となる。そこで、2005 ~ 2009 年に日降雨量が 50 mm を超えた 15 回と、一週間無降雨日が続いた (7 日間無降雨であった場合の 7 日目、8 日間無降雨であった場合には 7 日目と 8 日目の 2 回とカウントした。) 150 回について、観測流量と計算流量を比較した (図 11)。基底流量時については全体として良好な再現性がみられる。ピーク流量時においては、高い流量時の 2 点で観測値と計算値にずれがみられるが、この 2 点は連続した日のものであり、これらを平均すると良好な予測といえる。以上より、渇水対策のうえで重要な基底流量、ならびに高濁等の原因となるピーク流量に対して良好な予測性を有するモデルが得られたと言える。

#### E. 結論

(1) 全国の上水道と簡易水道の総給水量の約 10% に相当する、表流水水源浄水場の流域での RCP2.6 及び 8.5 を想定した気候変動モデル計算結

果に基づく月平均気温の 20 年間平均値の変化を推算した。その結果、1981 年 ~ 2000 年に比べて 2081 年 ~ 2100 年の平均気温上昇の分布が可視化された。また、全国的には概ね 1~3 、同 8.5 では 3~5 程度の変化となるものと推算された。

(2) 相模川流域中の相模ダム流域の流出に対して準分布型水文モデル SWAT を用いてモデリングを行ったところ、流出パターンや、ピーク・基底流量に対して良好な予測性を有するモデルが得られた。以上の結果は、将来の気候変動が流域水循環に与える影響を把握するうえで重要な基礎情報・あるいはツールとなるものである。

#### 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

初山将、下ヶ橋雅樹、秋葉道宏 (2016)。気候変動の水道システム影響評価のための相模川流域水文モデルの作成。日本水環境学会第 50 回年会; 2016 年 3 月 18 日、徳島。発表番号 3-J-16-1。

#### 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. 参考文献

[1] Guzman Herrador, B.R., De Blasio, B. F., MacDonald, E., Nichols, G., Sudre, B., Vold, L., Semenza, J. C. and Nygård, K. (2015) Analytical studies assessing the association between extreme precipitation or temperature and drinking water-related waterborne infections: A review. *Environmental Health* **14:29** (DOI

- 10.1186/s12940-015-0014-y)
- [2] Paerl, H.W. and J. Huisman (2008) Blooms Like It Hot. *Science* **320**(5872): p. 57-58.
- [3] Kobayashi, Y., Itoh, M., Yamada, T., Akiba, M., and Matsui, Y. (2012) Experimental evaluations of water treatment systems using a pilot-scale plant for adaptations to a sharp increase in raw-water turbidity caused by climate change. *Water Science and Technology: Water Supply* **13**(1): p. 139-146.
- [4] Delpla, I., Jung, A. V., Baures, E., Clement, M., and Thomas, O. (2009) Impacts of climate change on surface water quality in relation to drinking water production. *Environmental International* **35**(8): p. 1225-1233.
- [5] Patz, J.A., Vavrus, S. J., Uejio, C. K., McLellan, S. L. (2008) Climate Change and Waterborne Disease Risk in the Great Lakes Region of the U.S. *American Journal of Preventive Medicine* **35**(5): p. 451-458.
- [6] 小保内啓太,下ヶ橋雅樹,秋葉道宏 (2015) 水文水質モデルを用いた釜房ダム流域における豪雨による高濁度化の水道システム影響評価. *水道協会雑誌* **84**(5): p. 2-13.
- [7] 厚生労働省健康局 (2013) 新水道ビジョン.
- [8] United Nations. International Decade for Action 'WATER FOR LIFE' 2005-2015. <https://www.un.org/waterforlifedecade/iwrm.shtml>. (2016/02/29 確認)
- [9] 水道産業新聞社 (2012) 全国浄水場ガイド 2012. 水道産業新聞社, 大阪, 760 pp.
- [10] 水道産業新聞社 (2008) 全国浄水場ガイド 2008. 水道産業新聞社, 大阪, 816 pp.
- [11] 日本水道協会 (2012) 水道統計 施設・業務編 平成 22 年度.
- [12] 厚生労働省健康局水道課 (2012) 平成 22 年度全国簡易水道統計, 213pp.
- [13] 国土交通省. 国土数値情報ダウンロードサービス. <http://nlftp.mlit.go.jp/ksj/>. (2016/02/08 確認)
- [14] 花崎直太, 高橋潔, 脇岡靖明, 日下博幸, 飯泉仁之直, 有賀敏典, 松橋啓介, 三村信男 (2014) 日本の温暖化影響・適応策評価のための気候・人口・土地利用シナリオ(第2版). *環境科学会誌*, **27**(6): p. 362-373.
- [15] 清野豁 (1993) アメダスデータのメッシュ化について. *農業気象* **48**(4): p. 379-383.
- [16] 農業環境技術研究所. 農業環境情報データベース. <http://agrienv.dc.affrc.go.jp/mesh/mesh.html>. (2016/02/08 確認)
- [17] 気象庁. 土壌雨量指数. <http://www.jma.go.jp/jma/kishou/known/bosai/dojoshisu.html>. (2016/02/08 accessed)
- [18] 田中太一, 下ヶ橋雅樹, 秋葉道宏 (2015) タンクモデル及び LQ 式を用いた気候変動による水道原水流量及び濁度への影響評価. 平成 27 年度全国会議 (水道研究発表会), さいたま, 同講演集 p.154-155.
- [19] Sagehashi, M., Mori, M., Hareyama, Y., Sakuma, K., Akiba, M., Hosomi, M. (2016) Integration of the rice paddy water management into a coupled surface-subsurface water flow model in the Sakuragawa River watershed (Japan). *Hydrol Res* **47**(1): p. 137-156.
- [20] USDA-ARS, Texas A&M AgriLife Research and Texas A&M University System (2016). Soil & Water Assessment Tool. <http://swat.tamu.edu/> (2016/02/08 確認)
- [21] Xie, X. (2015) Improving hydrological simulations with SWAT for paddy watersheds: Model development and data assimilation. *MARCO Satellite International Workshop 2015 Adoption and adaptation of SWAT for Asian crop production systems and water resource issues (International SWAT-Asia Conference IV)*. 2015. Tsukuba, Japan.
- [22] 国土交通省. 土地分類調査・水調査. ; <http://nrb-www.mlit.go.jp/kokjo/inspect/inspect.html>. (2016/02/08 確認)
- [23] 農業環境技術研究所. 土壌情報閲覧システム. [http://agrimesh.dc.affrc.go.jp/soil\\_db/](http://agrimesh.dc.affrc.go.jp/soil_db/). (2016/02/08 確認)
- [24] 気象庁. 過去の気象データ・ダウンロード. <http://www.data.jma.go.jp/gmd/risk/obsdl/index.php>. (2016/02/08 確認)
- [25] Moriasi, D.N., et al., (2007) Model Evaluation Guidelines for Systematic Quantification of Accuracy in Watershed Simulations. *Trans ASABE*, 2007. **50**(3): p. 885-900.

- [26] 文部科学省 (2014) RCP (代表的濃度経路) シナリオについて .  
[http://www.mext.go.jp/b\\_menu/houdou/26/03/attach/1346369.htm](http://www.mext.go.jp/b_menu/houdou/26/03/attach/1346369.htm). (2016/02/29 確認)
- [27] 森澤眞輔 (2004) 地下水・土壌 In 土木学会環境工学委員会環境工学に関わる準備小委員会 編, 環境工学公式・モデル・数値集, 土木学会 / 丸善, 東京, 727pp.
- [28] 福本昌人, 小川茂男 (1996) 各種の裸地土壌におけるアルベドと分光反射率の土壌水分依存性. 水文・水資源学会誌 9(1): p. 92-95.

#### J. 謝辞

一部の取水口位置、及び用水供給事業 - 上水道事業の供給・受水状況の確認において、水道事業体の方から情報をいただきました。相模ダム流入量ならびに道志第1発電所の流入水量は神奈川県企業局利水電気部利水課にご提供いただきました。記して謝意を表します。

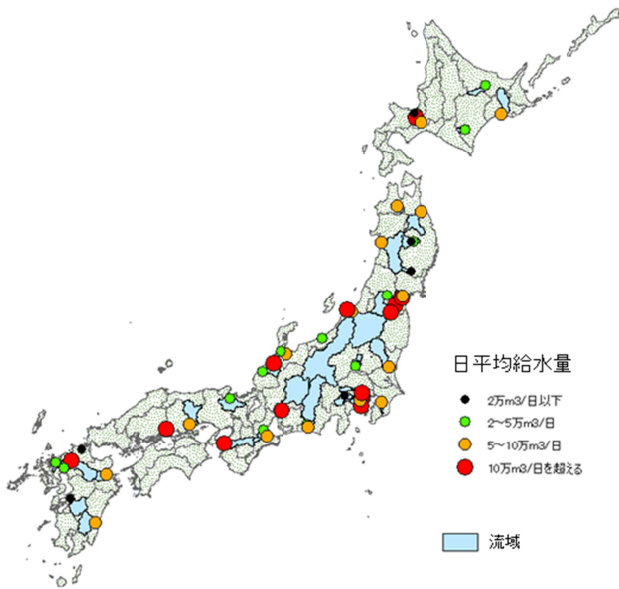


図 1 検討対象浄水場とその流域  
(給水量は文献[9,10]による)

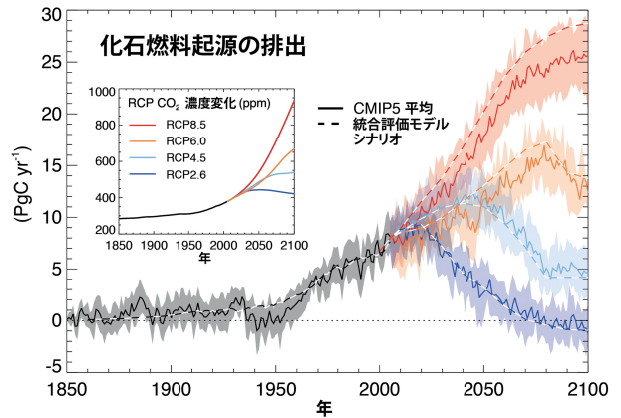


図 2 RCP (代表的濃度経路) シナリオ  
(出典：文部科学省 HP[26])



図 3 相模ダム流域

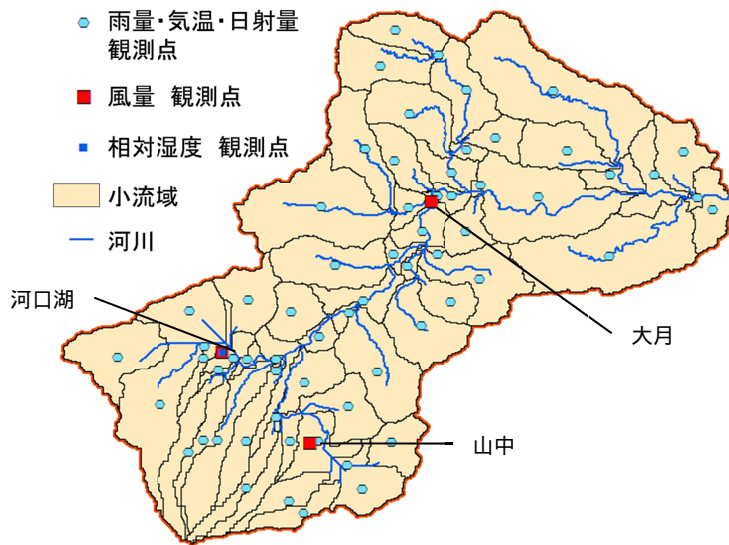


図 4 小流域と観測点の分布

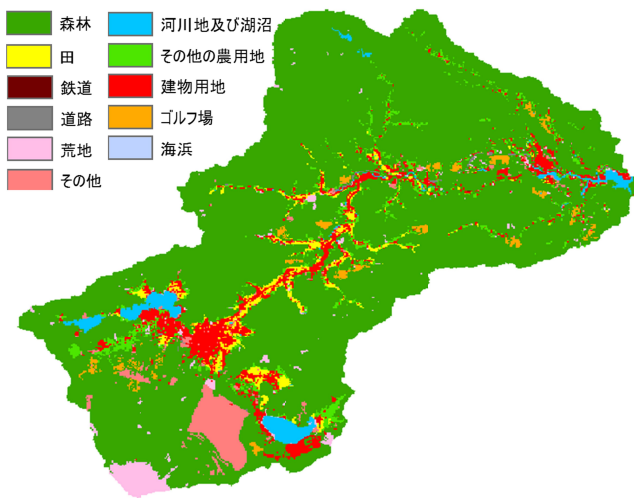


図 5 相模ダム流域における土地利用種別

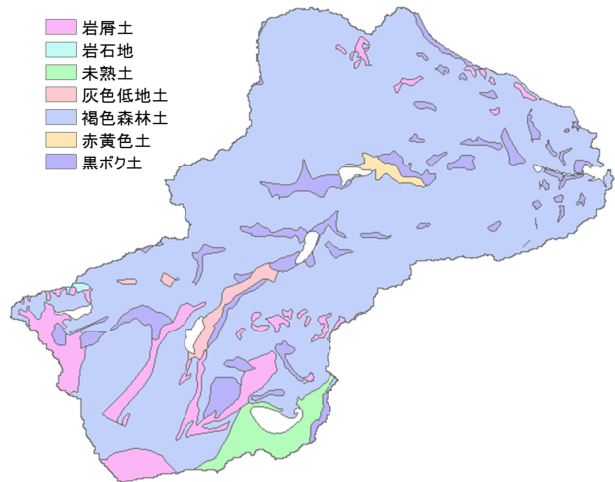


図 6 相模ダム流域における土壌分類



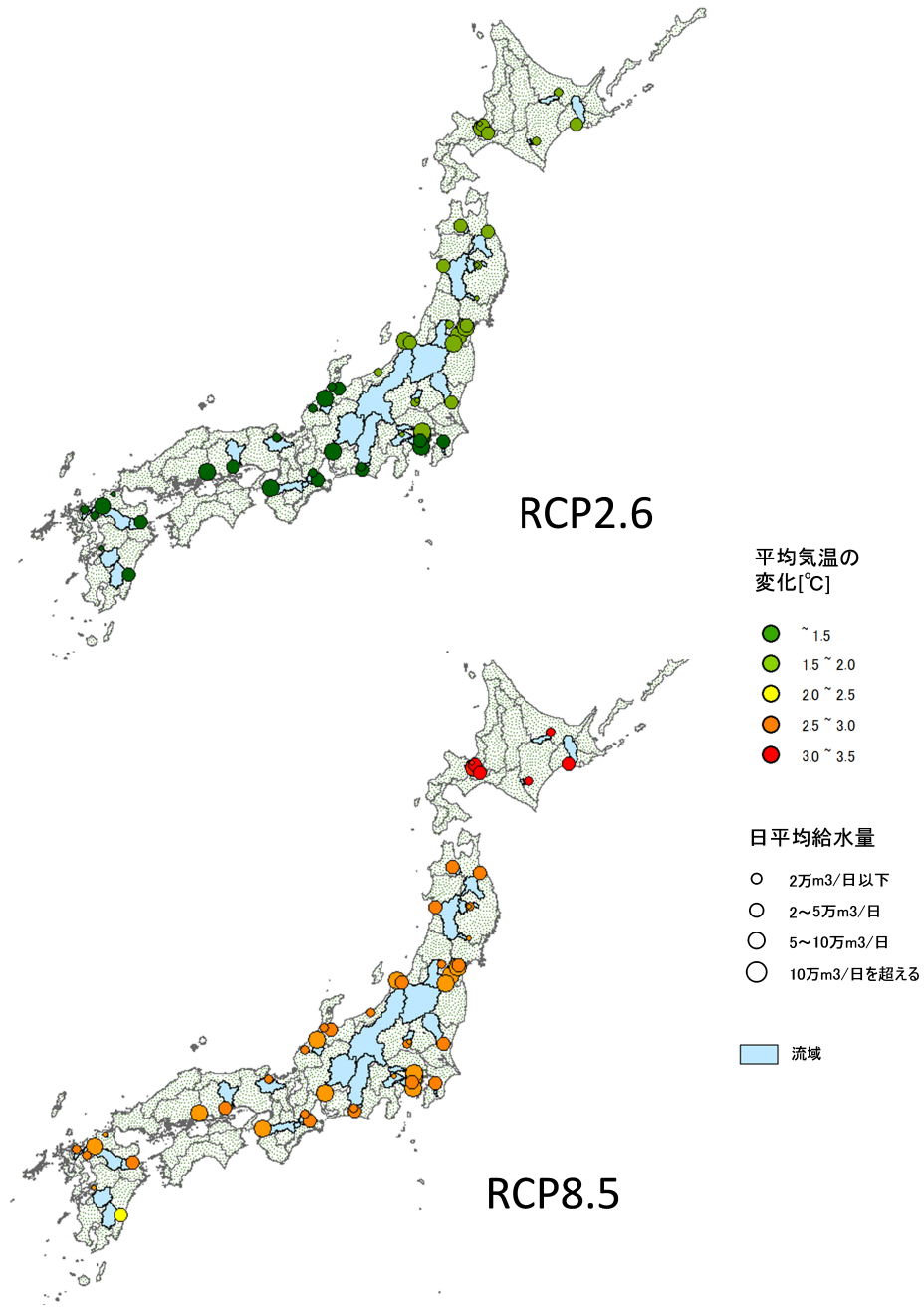


図 7 各浄水場の流域における平均気温変化（2081～2100年と1981～2000年の差）の予測  
（凡例中、「～」は「を超え、以下」を意味する）

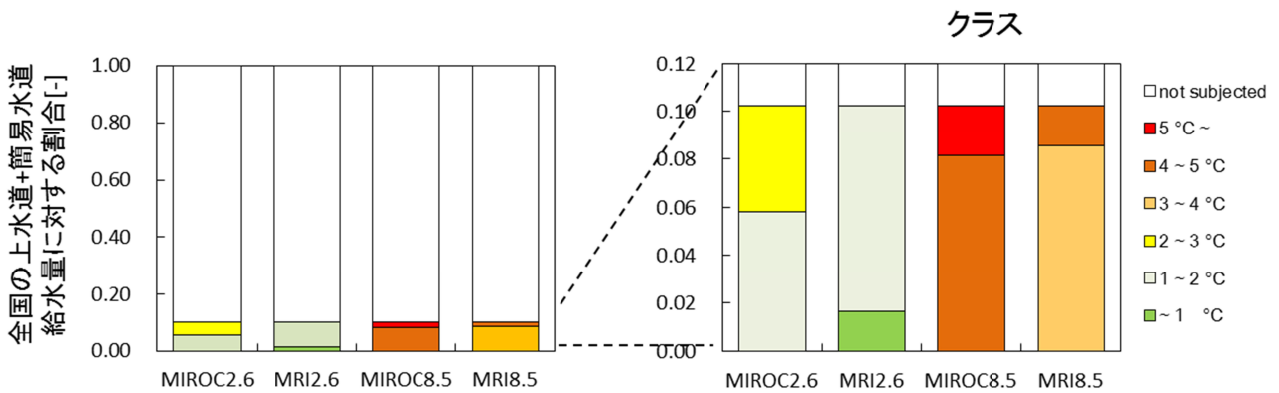


図 8 全国の浄水場流域での平均気温変化の予測



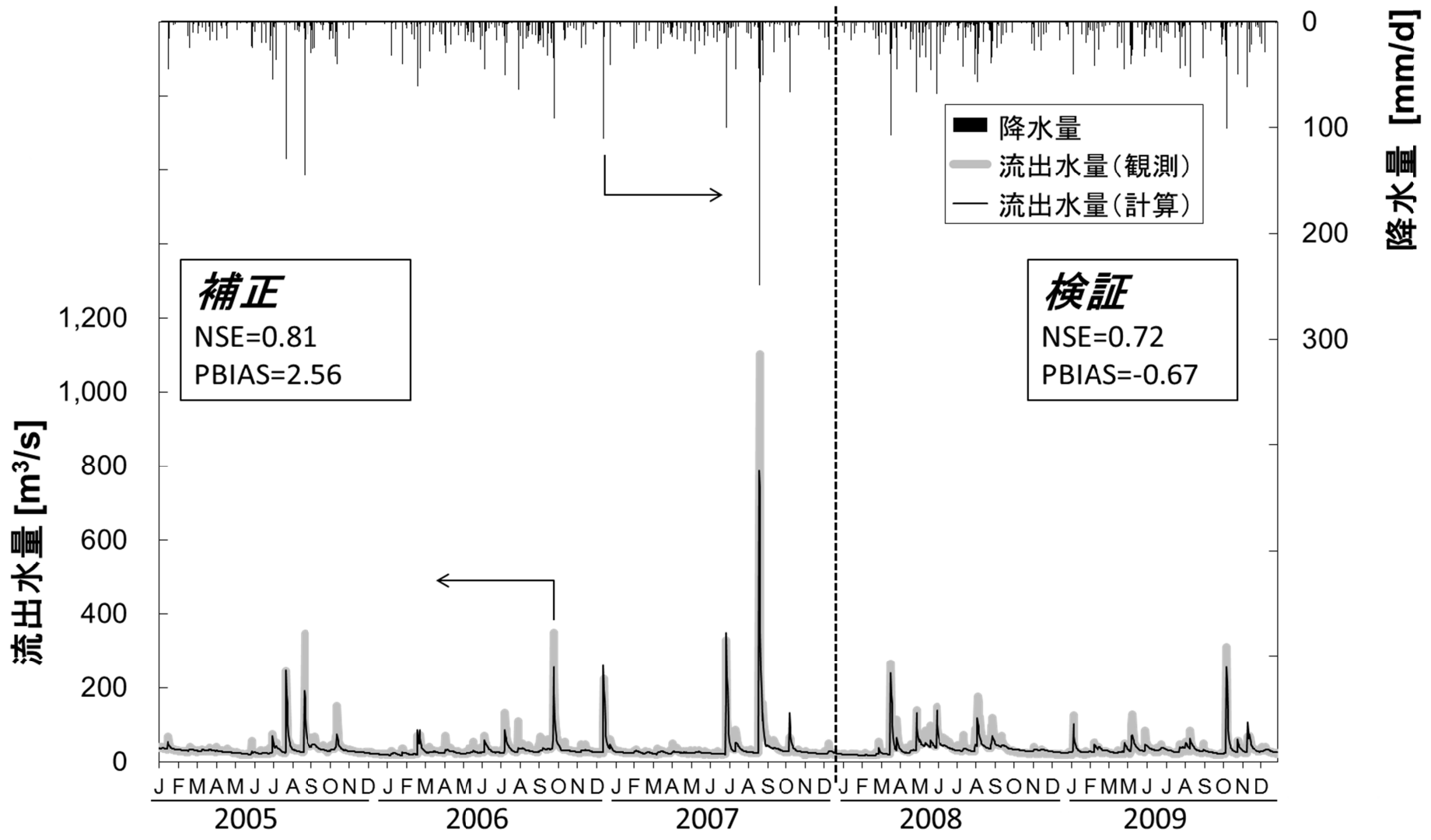


図 9 相模ダム流域流出解析の結果

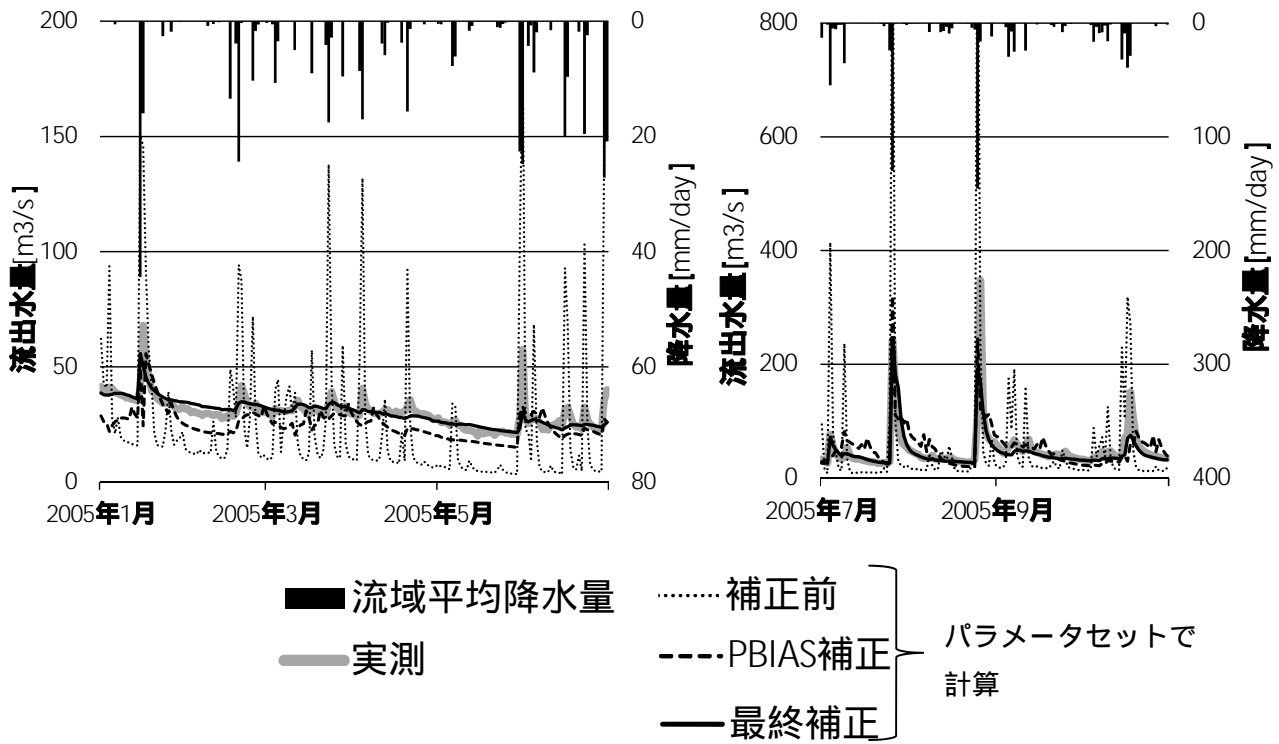


図 10 パラメータ補正と流出解析結果の変化例（左：基底流量時 右：ピーク流量時）

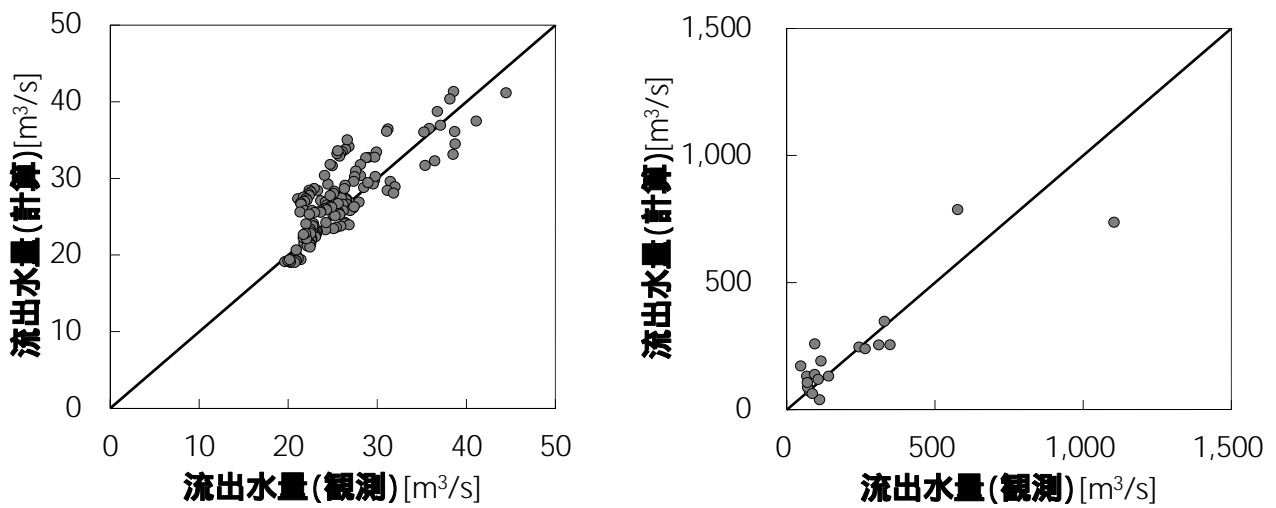


図 11 ピーク時と基底流量時の再現性の比較（左：基底流量時 右：ピーク流量時）

**表 1 本研究での SWAT における初期値入力のための土地利用種別分類**

国土交通省土地利用種別	SWAT に入力した土地利用種別
田	Water
その他農用地	Alfalfa
森林	Forest-mixed
荒地	Wetlands
建物用地	Residential-Med/Low Density
道路	Transportation
鉄道	Transportation
その他用地	Industrial
河川及び湖沼	Water
海浜	Wetland
ゴルフ場	Pasture

**表 2 土壌データに関するパラメータとその暫定初期値（補正前の値）の設定手法**

（表中、2 段の数値は、上が土壌上層、下が土壌下層を示す）

	パラメータ名	パラメータの内容	値	入手先・設定手法
1	NLAYERS	土壌の層数	2	土壌断面データベース中、旧神奈川県津久井郡（現在の相模原市内）で観測された断面のデータ（ 1 ）により設定。
2	HYDGRP	水はけのよさに関する土壌のグループ分け（A～D）	A	他のパラメータを初期値で固定し、4 つのパターンで計算した場合にもっとも NSE による判定が良かったものを使用。
3	SOL_ZMX	土壌深さ [mm]	1000	1 により設定。（断面調査が 1,000 mm）
4	SOL_CRK	土壌の空隙率	0.7	1 により設定。
5	SOL_Z	土層毎の厚さ [mm]	310 690	1 により設定。
6	SOL_BD	土層毎の湿潤密度	0.659 0.853	1 により設定。
7	SOL_AWC	土層毎の有効水分	0.074 0.074	作土層の理化学性データベース中、中粗粒褐色森林土の 1999 - 2003 作土層の理化学性の平均値表中、土地利用全体の平均値を使用。
8	SOL_CBN	土層毎の有機炭素量	4.22 2.64	1 のうち、腐植を有機炭素と読み替えて使用。
9	SOL_K	土層毎の透水係数	220 220	細砂～砂で $5 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ m/s} = 180 \sim 3,600 \text{ mm/hr}$ [27]。SWAT のデータベースも参考とし、初期暫定値として 220 mm/hr を使用。
10	CLAY	土層毎の粘土率	21.8 22.2	1 により設定。
11	SILT	土層毎のシルト率	30.1 27.9	1 により設定。

**表 2 土壌データに関するパラメータとその暫定初期値（補正前の値）の設定手法（続き）**

	パラメータ名	パラメータの内容	値	入手先・設定手法
12	SAND	土層毎の砂率	48.1 49.9	1 により設定。
13	ROCK	土層毎の岩石率	38.9 37.2	1 により設定。
14	SOL_ALB	土層毎の湿潤アルベド	0.12 0.12	福本ら[28]により，沖積土，洪積土，火山性土の分類で湿潤アルベドが計測されているが，褐色森林土を洪積土と仮定し、値を入力した。

**表 3 Moriasi ら[25]による水文流出モデルの精度に関する分類**

Performance Rating	NSE	PBIAS[%]
<b>Very Good</b>	0.75 < NSE ≤ 1.0	PBIAS < ± 10
<b>Good</b>	0.65 < NSE ≤ 0.75	± 10 PBIAS < ± 15
<b>Satisfactory</b>	0.5 < NSE ≤ 0.65	± 15 PBIAS < ± 25
<b>Unsatisfactory</b>	NSE ≤ 0.5	PBIAS ≥ ± 25

表 4 補正したパラメータの一覧と補正結果

	パラメータ名	説明	最低値	最高値	補正前	補正後	備考
1	EPCO	植物による地中水の吸い上げに関する係数( 1 )	0	1	1	0.8817	
2	ESCO	土壌からの蒸発に関する係数( 2 )	0	1	0.95	0.9908	
3	ALPHA_BF	基底流出逓減係数	0 (0)	1 (0.5)	0.048	0.9856	3
4	GW_DEREY	土中水が土壌から帯水層へ移動するのに要する日数	0	500	31	201.125	
5	GW_REVAP	帯水層からその上部への逆浸透に関する係数	0.02	0.2	0.02	0.0527	
6	GWQMN	帯水層から基底流出が起こる条件となる帯水層の水位[mm]	0	5000	0	128.75	
7	RCHRG_DP	帯水層へ浸透する水量のうち被圧水層へ浸透する割合	0	1	0.05	0.9937	
8	REVAPMN	帯水層からその上部への逆浸透する条件となる帯水層の水位[mm]	0	500	1	442.125	
9	CANMX	降雨により樹幹に蓄えられる水量の最大値[mm]	0	100	0	5.875	
10	LAT_TTIME	側方流出に要する日数	0	180	0	147.645	
11	CN2	SCS-CN 法による、表面流出と降雨の関係を表す係数	35 (35)	98 (65)	31~92 ( 4 )	59.85	3
12	CH_K2	河川部の有効透水係数 [mm/hr]	0 (250)	500 (500)	0	460.438	3
13	CH_N2	河川部におけるマンニングの粗度係数	0 (0)	0.3 (0.1)	0.014	0.0293	3
14	SOL_ALB	土層の湿潤アルベド	0	0.25	0.12	0.1781	5
15	SOL_AWC	土層の有効水分[%]	0	1	0.074	0.0342	5
16	SOL_K	土層の透水係数	0	2,000	220	1,269.5	5

1 植物が地中水を吸い上げる場合、通常根の密度が高い、浅い部分から吸い上げるが、浅い層に十分な水分が無い場合に、深い層からの吸い上げをどの程度許すかを表す係数。EPCO=1 は浅い層で足りない水分をすべて深い層が受け持つことができることを意味する。

2 土壌からの蒸発について、通常浅い部分ほど蒸発が起こりやすいが、深い層からの蒸発をどの程度許すかを表すための係数。ESCO=0 は深い層からの蒸発を許すことを意味する。

3 PBIAS を用いて補正した後、NSE を用いて補正したパラメータ。NSE を用いた際に変域を変更しているため、最低値、最大値欄の括弧内に示した。

4 土地利用ごとに異なる。

5 補正前の数値は、表 2 に示す土壌パラメータ設定時に入力した値。なお、この他のパラメータの補正前の数値(暫定値)は、SWAT データベース中の数値を使用した。

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水道水生ぐさ臭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	鹿児島大学大学院理工学研究科 准教授
研究分担者	岸田直裕	国立保健医療科学院生活環境研究部 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、浄水現場では、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、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・高質量精度 LC/MS が適しているため、LC/MS で被検物質を測定できるようにするための誘導体化処理方法を検討し、これを確立した。確立に際し、臭気物質の一般的な構造に鑑み、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た。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* が発生した際に採取した表流水および水道原水の誘導体化処理を行い、高分解能・高質量精度 LC/MS を用いて生ぐさ臭原因物質を探索した。探索の結果、原因物質の候補物質として6個を発見した。

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<sup>1)</sup>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)-decatrienal<sup>2)</sup>が指摘されている。しかし、浄水現場では、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・高質量精度の 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。

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。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・高質量精度 LC/MS が適している。このため、LC/MS で被検物質を測定するに必要な誘導体化処理方法を検討

し、これを確立した。確立に際し、臭気物質の一般的な構造に鑑み<sup>3)</sup>、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た。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表流水および水道原水の誘導体化処理を行い、高分解能・高質量精度 LC/MS を用いて原因物質を探索した。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

原因物質のモデル物質として、hexyl alcohol (和光純薬工業、大阪)、1-butanethiol (東京化成工業、東京)、(2E,4E)-heptadienal、4-methyl-2-pentanone (関東化学、東京)、propionic acid (和光純薬工業、大阪) を用いた。

京都市上下水道局蹴上浄水場第 2 取水口で、2015 年 12 月 3 日 11:00 (以下、試料水①) と 12 月 17 日 11:00 (以下、試料水②) に採水した水を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。

### 2. ダンシルクロリドを用いた誘導体化処理方法の確立

水酸化ナトリウムで pH を 10.5 に調整した炭酸水素ナトリウム水溶液にサンプルとダンシルクロリド (以下、DNS-Cl) のアセトン溶液を加え、60°C の恒温振盪器を用いて遮光下で振盪した。その後、トルエンを加えて 10 分間振盪、10 分間放置し、分相させた。分相したトルエン相を別容器に移し、純水を加えて 10 分間振盪、10 分間放置し、再度分相させた。この操作を 2 回繰り返した。トルエン相を採取し、ロータリーエバポレーターを用いて 100°C でトルエンを留去し、乾固物をアセトニトリルで溶解した。その後、アセトニトリル耐性を有する 0.22 μm メンブレンフィルターでろ過した。

### 3. 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンをを用いた誘導体化処理方法の確立

#### 3.1 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンのジクロロメタン溶液の調製

ジクロロメタンに 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (以下、DNPH) および濃硫酸を混合し、90 分間反応させた。分相した硫酸相を除去し、純水を加えて 10 分間振盪、10 分間放置し、分相させた。

この操作を 2 回繰り返した。その後、ジクロロメタン相を別容器に移した。

### 3.2 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン誘導体化方法

3.1 で調製した DNPH ジクロロメタン溶液に無水硫酸ナトリウム、サンプルを加え、5 分間振盪した。その後、混合溶液をナス型フラスコに一定量移し、ロータリーエバポレーターを用いて 30°C でジクロロメタンを留去した。乾固物をアセトニトリルで溶解し、アセトニトリル耐性を有する 0.22 μm メンブレンフィルターでろ過した。

### 4. 試料水中の生ぐさ臭気原因物質の回収

採取した水道原水にウログレナが浮遊していたため、スポイトを用いてウログレナを採取し、共栓付き容器に移した。この容器を 60°C の湯浴に入れて 1 時間静置した後、容器内のウログレナ含有水を自然ろ過した。また、ウログレナを採取した残りの水道原水も同様に自然ろ過した。これら 2 つのサンプルを、タンデム接続した 2 種類の固相抽出カラム (日本 Waters 製 Sep-Pak Plus PS-2 および Sep-Pak Plus AC-2) に上向流、流量 20 mL/min で通水して原因物質を吸着した。試料水の通水後にカラム内を純水で洗浄し、アセトニトリルとジクロロメタンでカラム吸着物を脱離した。このとき、上向流、流速 0.5 mL/min、バックフラッシュ法で脱離を行い、3 分間の soak time を設けた。

### 5. 高分解能・高質量精度 LC/MS を用いた生ぐさ臭気原因物質の測定

回収された原因物質および誘導体化された原因物質は、L-column 2 ODS (2.1 x 75 mm, 2 μm、化学物質評価研究機構、東京) を備えた高分解能・高質量精度 LC/MS (UltiMate 3400SD-LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて測定された。分離カラムの温度は 40°C、インジェクションボリュームは 1 μL とした。イオン源として ESI を用いて、ポジティブイオンモードとネガティブイオンモードの両モードで測定した。ポジティブイオンモードの測定における移動相 A は 0.05 v/v% のギ酸を含む水、移動相 B は 0.05 v/v% のギ酸を含むアセトニトリルとした。Binary program は、B%=10 (0-0.5 min)、100 (13-17 min) とした。流速は、両モードにおいて 0.5 mL/min とした。ネガティブイオンモードの測定における移動相 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

ニウムおよび水を5 v/v%含むアセトニトリルとした。Binary programは、B%=30 (0-0.5 min)、100 (13-17 min)とした。イオン源における spray voltageは2.5 kV、vaporizer tempは400°C、capillary tempは380°C、sheath gas flow rateは60 arb.、auxiliary gas flow rateは20 arb.、sweep gas flow rateは0 arb.とした。質量分解能を最低の7,500 FWHMに設定して、クロマトグラムピークのデータポイント数が多く得られるようにした。

得られたデータの解析は、LC/MS データ統合解析ソフト (Progenesis QI、Nonlinear Dynamics、Newcastle upon Tyne、UK) を用いて、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によって行われた。

## C. 結果及び考察

### 1. 誘導体化処理方法の確立

本研究で仮定した原因物質であるアミン類、アルコール類、チオール類およびカルボニル化合物の多くは、ESI でイオン化可能な物質が多いと予想される。しかし、アルコール類、チオール類およびカルボニル化合物については、分子量が小さい場合などにはイオン化効率が低下すると予想される。そこで、モデル化合物として hexyl alcohol、1-butanethiol、(2E,4E)-heptadienal、4-methyl-2-pentanone および propionic acid に着目し、DNS-Cl または DNPH を用いて誘導体化した。誘導体化物が得られたか否かの確認は、MS を用いて行った。

また、誘導体化の際に用いた酸、不揮発性の塩、誘導体化試薬がサンプル中に残存していると、LC/MS で測定した際に LC/MS の腐食や検出器の過剰なエッチングが起こる。このため、固相抽出脱離、液液抽出、結晶化によりこれらの不要成分を除去する方法を検討した。その結果、ESI キャピラリーチューブやイオントランスファーチューブ付近における不揮発性物質と思われる物質の堆積、金属の腐食は認められなかった。また、誘導体化試薬やその加水分解物のピークが認められたが、検出器の過度なエッチングが起きる信号強度ではなかった。これらのことから、不要成分の除去に成功したと判断した。

次に、モデル物質誘導体化物の精密質量を測定した結果、いずれのモデル物質についても、図1および2に示すように、想定される誘導体化物の分子式の精密質量および天然同位体パターンの

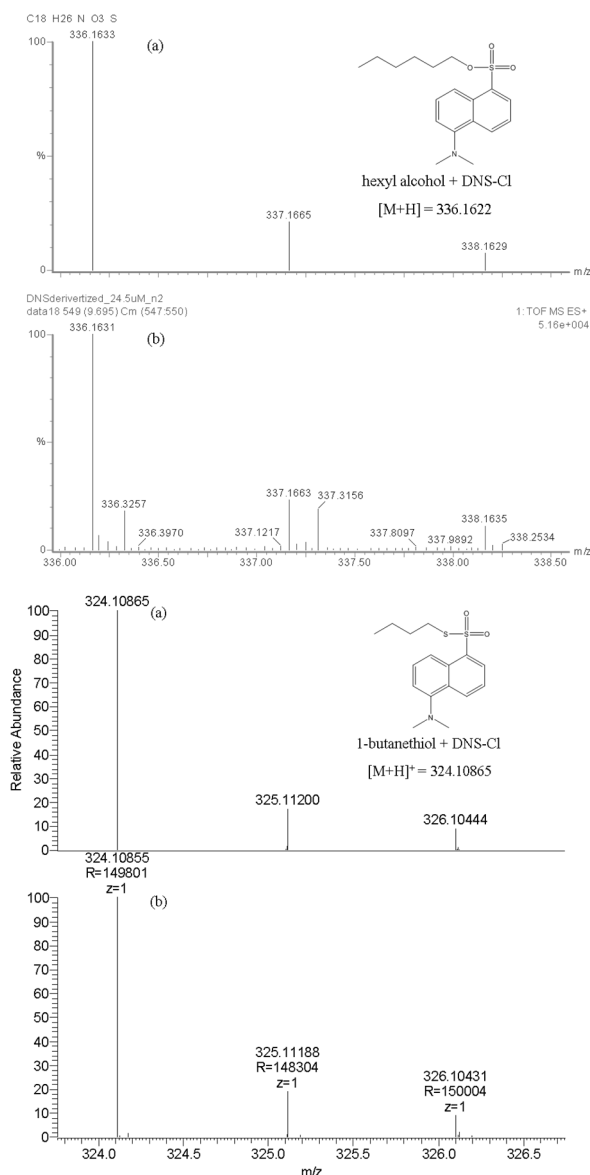


図1 ダンシルクロリドによるモデル物質の誘導体化(a: シミュレーション結果、b: 実測結果)

シミュレーション結果と実測結果が一致した。

以上より、検討したすべてのモデル物質の誘導体化および LC/MS を用いた検出に成功した。

### 2. 高分解能・高質量精度 LC/MS を用いた生ぐさ臭臭気原因物質の測定

モデル物質の誘導体化、LC/MS による検出に成功したため、実サンプルの誘導体化処理を実施し、得られた誘導体化サンプルを LC/MS で分析した。希釈した実サンプルを用いた予備測定において、界面活性剤と考えられる高強度ピークが観察されたため、一部のカラム保持時間の測定において移動相の MS への供給を停止した。また、誘導体化処理を施さないサンプルについても同様に測定した。さらに、純水を用いて一連の濃縮・誘導体化処理を実施したサンプル (ブランクサンプル)



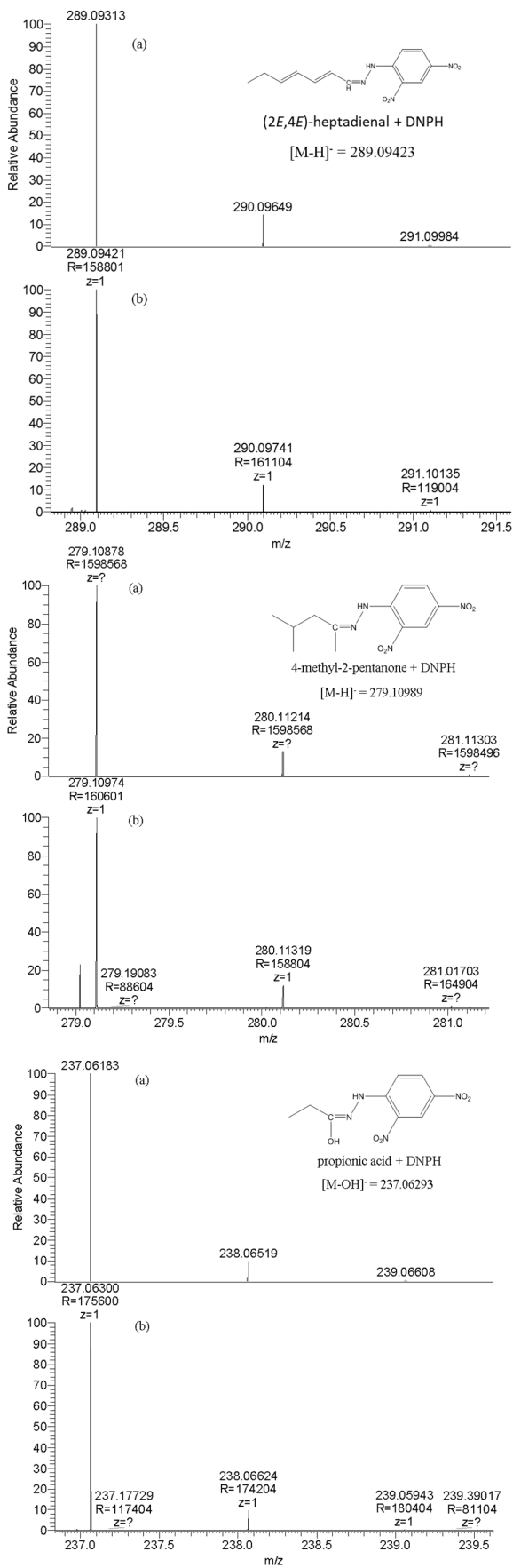


図2 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンによるモデル物質の誘導体化(a: シミュレーション結果、b:実測結果)

を調製し、LC/MS を用いて同様に測定した。測定結果の例として、DNS-Cl で誘導体化したブランクサンプルと、水道原水を DNS-Cl で誘導体化したサンプルの測定結果を図3に示す。図3に例を示したように、サンプル固有なピークを目視で探索することは困難であったが、サンプルのピークボリュームがブランクサンプルのピークボリュームの2倍以上であったピークをサンプル固有のピークとして差異解析を実施したところ、positive ion mode における測定で 210 個、negative ion mode における測定で 298 個のサンプル固有なピークを発見した。さらに、ピークボリュームの比が 10 倍以上となるピークを探索したところ、図4に示すように、両イオン化モードでそれぞれ 3 個（合計 6 個）のサンプル固有なピークを発見した。

### 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、LC/MS で検出するための誘導体化処理方法を確立した。確立した方法を用いて、黄色鞭毛藻綱 *Uroglena americana* が発生した際に採取した湖沼水および水道原水から回収された物質の誘導体化処理を実施し、LC/MS で生ぐさ臭臭気原因物質を探索した結果、検出されたピークボリュームが大きい物質として 6 物質を発見した。

今後は、多変量解析を用いて、サンプルの TON と各物質のピークボリュームとの相関関係を検討し、水道水生ぐさ臭原因物質のピークを精査し、精査されたピークの構造推定を実施する予定である。

### 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

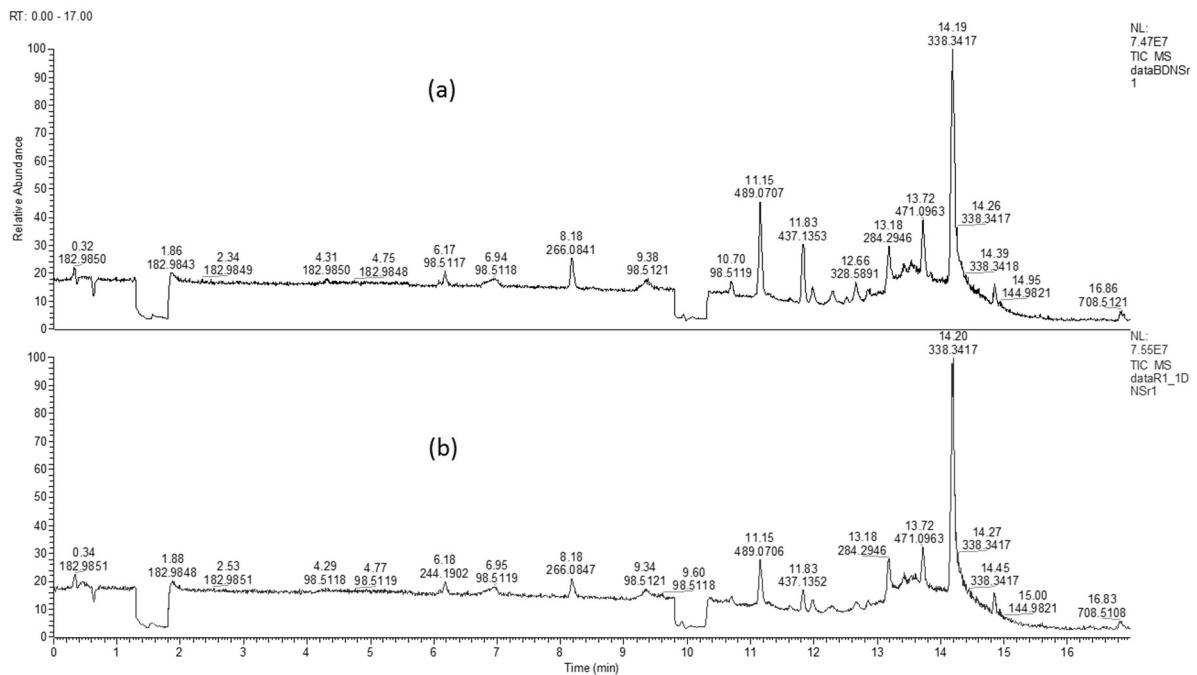


図3 LC/MSによる測定結果の例(a: ブランクサンプルのTIC、b: 水道原水サンプルのTIC)

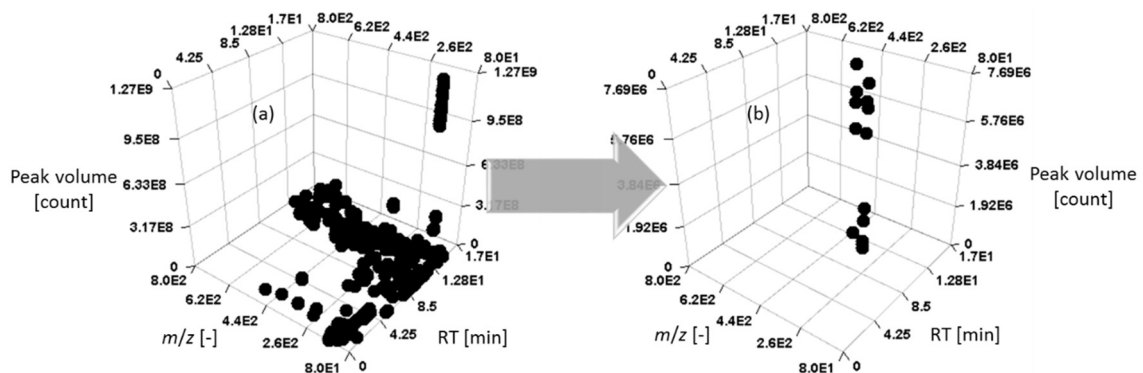


図4 検出された全イオンからサンプル固有イオンの抽出結果(a: 全イオン、b: サンプル固有イオン)

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。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.
- 3) 特許庁 (2007) 標準技術集-香料([https://www.jpo.go.jp/shiryousonota/hyoujun\\_gijutsu/kouryou/2-3-2.pdf#1](https://www.jpo.go.jp/shiryousonota/hyoujun_gijutsu/kouryou/2-3-2.pdf#1)) (2016年2月時点) .

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：ろ過漏出障害原因微生物の同定技術の開発と存在実態調査

研究分担者 藤本 尚志 東京農業大学応用生物科学部醸造科学科 教授

研究分担者 岸田 直裕 国立保健医療科学院 主任研究官

研究要旨

近年、浄水場においてピコ植物プランクトンによるろ過漏出障害が発生し問題となっている。原因となる生物種は明らかとなっていないことから、浄水場の各処理工程水について、次世代シーケンサーを用いて微生物相の調査を行った。その結果、川崎市上下水道局長沢浄水場のろ過水において Alphaproteobacteria 綱、Betaproteobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱が主に検出され、主要な綱は時期によって異なった。また沈澱処理水とろ過水の微生物相を比較したところ、多くの月で主要となる綱は大きく異なった。リード数が多く検出頻度の高い微生物は、5 門 17 属に分類された。これらの中には原水、沈澱処理水におけるリード数は少なく、ろ過水において 5% 以上に高まるものもあった。さらに相同性が低く未培養の系統と考えられる微生物も検出され、次世代シーケンサーによる評価の有用性が示された。千葉県水道局栗山浄水場のろ過水においても長沢浄水場と同様に Proteobacteria 門の割合が大きく、Proteobacteria 門に占める Alphaproteobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱の割合はそれぞれ、60%、34%であった。従属栄養細菌による濁度への影響が大きいことが示唆されたため、水道水源である草木湖において次世代シーケンサーによる真正細菌の群集構造解析を行った。その結果、表層、中層、底層ともに Proteobacteria 門、Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門で微生物群集が構成され、その構造は水深、時期により異なることが明らかとなった。草木湖を水源とする浄水場においてろ過漏出障害を引き起こす真核ピコ植物プランクトンの生物相を明らかにすることを目的として緑藻綱の 18S rRNA 遺伝子を増幅するプライマーを用いて草木湖の生物相を解析した。これまで用いてきたプライマーでは、従属栄養性の真核生物も検出され、緑藻綱が検出できないこともあったが、年間を通して緑藻綱 *Mychonastes* 属を検出することができ、緑藻綱の生物相を評価する上で有用な手法であることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、湖沼・貯水池を水源とする浄水場においてピコ植物プランクトンによるろ過漏出障害が発生し問題となっている<sup>1)</sup>。これまでクローニング法により浄水場処理工程水の生物相を解析し、ろ過水中から緑藻綱の *Mychonastes* 属や藍藻綱の *Synechococcus* 属が検出され<sup>2),3)</sup>、ろ過水の濁度上昇に関与すると考えられた。さらに次世代シーケンサーによる真正細菌をターゲットとした 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析において、Cyanobacteria 門のリード数は最大 2 割程度であり、従属栄養細菌も濁度への影響が大きいことが示唆された<sup>3)</sup>。しかしこれらの知見は 6 ヶ月程度の結果であり、更なるデータの集積が必要である。そこで本研究では、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングにより各工程における細菌相とその変化、ろ過水に含まれる主要な細菌を属レベルで評価した。また、従属栄養細菌のろ過漏出障害への関与が示唆されたため、水道水源における化学合成生物の群集構造解析を行った。さらに従来真核ピコ植物プランクトンの生物相解析に

用いられてきたプライマーは原生動物といった従属栄養生物の 18S rRNA 遺伝子も増幅し<sup>4)</sup>、真核ピコ植物プランクトンの生物相を正確に評価することが困難であることから緑藻綱の 18S rRNA 遺伝子を増幅させるプライマー<sup>5)</sup>を用いて生物相解析を行った。

B. 研究方法

B-1 浄水場処理工程水の生物相評価

1) 川崎市上下水道局長沢浄水場

2013 年、2014 年において、月 1 回の頻度で着水井、沈澱池の出口、ろ過池の出口よりそれぞれ採水した原水、沈澱処理水、ろ過水を用いた。沈澱処理水、ろ過水は流達時間を考慮して採水した。この期間におけるろ過水の濁度は 0.00 ~ 0.03 度で推移し、浄水の水質に問題はなかった。

ナノプランクトンを除去するために孔径 3 μm もしくは 5 μm のメンブレンフィルターにより吸引ろ過を行い、そのろ液を孔径 0.2 μm のポリカーボネート製メンブレンフィルターによりろ過し集菌を行った。次に CTAB 法によりゲノム DNA の抽出を行い、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を増

幅させるプライマー515F, 806R を用いて Tailed PCR を行った。増幅産物を精製後、Illumina 社の MiSeq によりアンブリコンシーケンシングを行い、QIIME を利用して解析を行った。

## 2) 千葉県水道局栗山浄水場

2014年8月7日に採水した濁度上昇の起きた試料について、次世代シーケンサーによる解析を行った。試料は矢切取水場より採水した原水、栗山浄水場より採水した沈澱水、ろ過水を用いた。この時のろ過水の濁度は0.05度であった。長沢浄水場の試料と同様に次世代シーケンサーによる解析を行った。

### B-2 草木湖の微生物群集構造解析

2015年4月~9月の各月において群馬県草木ダム堰堤200m沖で採水した表層水(水深0.5m)、中層水(水深40m)、底層水(水深60~80m)を用いた。試料約2Lを孔径0.2 $\mu$ mのポリカーボネート製メンブレンフィルターにより吸引濾過し集菌した。集菌したフィルターを回収し、PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.)を用いてゲノムDNAの抽出を行った。真正細菌の16S rRNA 遺伝子を増幅させるプライマー(515F, 806R)を使用し、PCRを行った。増幅産物を確認後、AMPure XP kit (Beckman Coulter, Inc.)により精製した。その後、NEBNext® UltraTM DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England BioLabs Inc.)を用いてライブラリーを作成し、Illumina社のMiSeqによりアンブリコンシーケンシングを行った。各試料について、得られた10万リードについてQIIMEを利用して解析を行った。

### B-3 真核ピコ植物プランクトンの生物相解析

群馬県草木湖から2015年1月~12月に採水した表層水を用いた。試料1Lを孔径3 $\mu$ mのメンブレンフィルターで吸引ろ過し、そのろ液を孔径0.2 $\mu$ mのポリカーボネート製メンブレンフィルターを用いてろ過し集菌した。その後CTAB法によりゲノムDNAを抽出し、緑藻綱の18S rRNA 遺伝子の特異的に増幅させるプライマー-chloroF, chloroR<sup>5)</sup>を用いてPCRに供した。このPCR産物を精製した後、TOPO TA クローニングキットによりクローニングを行った。得られた約50クローンについて制限酵素を用いてRFLP法によるグルーピングを行った。各グループから選別したクローンについて塩基配列の解析を行った。1年間得られた塩基配列について塩基配列間の相同性が97%以上の場合同一のOTU (Operational Taxonomic Unit) とした。

## C. 研究結果およびD. 考察

### C-1 浄水場処理工程水の生物相評価

#### 1) 川崎市上下水道局長沢浄水場

1 試料あたりの総リード数は15万~42万リードであった。原水において Actinobacteria 綱、

Betaproteobacteria 綱が多く検出された(図1)。沈澱処理水においては Betaproteobacteria 綱が主要となるが多かったが、Gammaproteobacteria 綱が多く検出される月もあった。ろ過水においては Alphaproteobacteria 綱、 Betaproteobacteria 綱、 Gammaproteobacteria 綱が主に検出され、主要な綱は時期によって異なった。また沈澱処理水とろ過水の微生物相を比較したところ、2013年9月、11月、2014年1月、5月、7月、8月、10月、11月において主要となる綱は大きく異なった。とくに沈澱処理水より検出される割合の低かった Alphaproteobacteria 綱が、ろ過水において主要となることがあった。

総リード数の5%以上を占めた OTU (Operational Taxonomic Unit) を主要な微生物としたところ、5門17属に分類された(表1)。これらのうち *Pseudarcicella* 属、*Sphingomonas* 属、*Moraxella* 属は、検出された回数が6~8回と多かった。*Synechococcus* 属、*Methylobacterium* 属、*Rhizobium* 属、*Azorhizobium* 属、*Janthinobacterium* 属、*Undibacterium* 属、*Ralstonia* 属、*Acinetobacter* 属、*Moraxella* 属、*Deinococcus* 属等10属の原水、沈澱処理水におけるリード数は少なく、ろ過水において5%以上に高まった。また *Candidatus Planktophilia limnetica*, *Pseudarcicella* 属および *Rhizobium* 属等については、既知種との相同性が低く未培養の系統と考えられ、次世代シーケンサーによる評価の有用性が示された。

#### 2) 千葉県水道局栗山浄水場

2014年8月7日の試料採取時における濁度は原水17度、沈澱水0.86度、ろ過水0.05度であった。ピコシアノバクテリアとしては PC-type が主要であり、細胞数は原水93000 cells/ml 沈澱水13000 cells/ml であった。ろ過水は自家蛍光の退色により定量出来なかった。次世代シーケンサーにより解析した結果、各工程水より得られた総リード数は16万~22万リードであった。原水、沈澱処理水、ろ過水において Proteobacteria 門の割合が最も大きく、特にろ過水では70%以上を占めた(図2)。このことから Proteobacteria 門に着目し、綱レベルでの評価を行った。原水においては Betaproteobacteria 綱が Proteobacteria 門に対し80%を占め、沈澱水においては Alphaproteobacteria 綱が37%、Betaproteobacteria 綱が43%を占めた(図3)。ろ過水においては Alphaproteobacteria 綱が60%を占めた。ろ過水において5000リード以上が検出された OTU について属レベルで評価したところ、Proteobacteria 門より3 OTUs、Planctomycetes 門より1 OTU 得られた。Proteobacteria 門のうち2 OTUs は *Sphingomonas* 属に、1 OTU は *Enhydrobacter* 属に近縁であった。*Sphingomonas* 属と *Enhydrobacter* 属はろ過水において11~22%を占め、主要な微生物であることが明らかとなっ

た。各処理工程水から検出された *Synechococcus* 属は 11 OTUs に分けられた(表 2)。原水では PC-type である *Synechococcus* sp. PCC9005 に近縁なリード数が *Synechococcus* 属の全リード数に対して 90% を占めた。落射蛍光顕微鏡観察において PC-type の細胞が多く観察されたため、整合性が得られた。沈澱処理水、ろ過水からは原水ではほとんど検出されなかった *Synechococcus* sp. MH305 や *Synechococcus* sp. MW6B4 が検出され、ろ過漏出障害の原因の一つである可能性が示唆された。またろ過水に占める *Synechococcus* 属のリード数は総リード数の 1% 程度であり、栗山浄水場におけるろ過漏出障害の原因生物として、従来ピコシアノバクテリアが考えられてきたが、従属栄養細菌による影響も大きいことが示唆された。

#### C-2 草木湖の微生物群集構造解析

4 月の表層、5 月の底層は PCR の増幅がみられず、解析することが出来なかった。7 月、8 月、9 月の表層において Cyanobacteria 門が多く検出された(図 4)。この時顕微鏡観察において、ピコシアノバクテリアの PE-type(7 月)、*Pseudanabaena* 属(8 月)、ピコシアノバクテリアの PE-type および *Pseudanabaena* 属(9 月)が優占していた。化学合成生物では Proteobacteria 門および Actinobacteria 門が多く検出された。綱レベルで見ると、Proteobacteria 門では Betaproteobacteria 綱、Actinobacteria 門では Actinobacteria 綱が主要であった。中層、底層では Cyanobacteria 門の割合が低下し、化学合成生物で微生物群集が構成されていた。中層は全ての層の中で最も多様性に富んでおり(rarefaction curve による評価)、Proteobacteria 門と Actinobacteria 門で総リード数の 55~68% を占めた。綱レベルでは、Proteobacteria 門では Betaproteobacteria 綱が、Actinobacteria 門では Actinobacteria 綱が主要であった。底層は、4~8 月は中層と同様に Proteobacteria 門と Actinobacteria 門の割合が大きかったが、9 月において Bacteroidetes 門の割合が高まった。綱レベルにおいては、中層と同様に Proteobacteria 門では Betaproteobacteria 綱が、Actinobacteria 門では Actinobacteria 綱が主要であった。9 月の Bacteroidetes 門の中では Flavobacteriia 綱が主要であった。

UniFrac により化学合成生物の群集構造の評価を行ったところ、表層は月ごとに異なる位置にプロットされ、季節による群集構造の変化が大きいことが示唆された。中層は全ての月において近い位置にプロットされ、群集構造の変化が小さいことが明らかとなった。4~7 月は中層と底層が近い位置にプロットされ、8、9 月は中層と底層のプロットが離れていた。8 月以降躍層が水深 50m 付近に形成され、中層と底層が混合していないことが群集構造の違いの一つの要因として示唆された。

草木湖の微生物群集構造が水深、時期によって異なることが明らかとなった。

#### C-3 真核ピコ植物プランクトンの検出技術

真核ピコ植物プランクトン(CH-type)の細胞数は春季と 7 月に  $10^4$  cells/ml 程度に高まった(図 5)。1~12 月の試料から得られたクローンについて、塩基配列間の相同性が 97%以上を同一の OTU としたところ 5 OTUs に分かれた。相同性検索を行ったところ *Mychonastes* 属および *Chlamydomonas* 属に近縁であった(表 3)。過去 2 年間に検出された緑藻綱は、*Mychonastes homosphaera*、*Chlamydomonas noctigama* のみであったが、今年度はこれまで検出されなかった種も検出された。以上より緑藻綱の生物相を評価する上で、本年度用いたプライマーの有用性が明らかになった。また、*Mychonastes* 属に近縁な OTU の検出頻度、検出割合が高く、今回検出された緑藻綱の中で  $2\mu\text{m}$  程度の細胞サイズのものは *Mychonastes* 属のみであった。以上の結果から草木湖における主要な緑藻綱の真核ピコ植物プランクトンは *Mychonastes* 属であることが明らかになった。

#### E. 結論

次世代シーケンサーにより、浄水場処理工程水の微生物相および主要な細菌を評価した。工程水間、とくに沈澱処理水とろ過水間で微生物相が異なることが明らかとなった。微生物相の異なる要因、ろ過水において主要な微生物の濁度への影響および検出されるメカニズムについて今後検討する必要がある。

次世代シーケンサーを用いて草木湖の微生物群集構造の解析を行い、水深、時期によって異なることが明らかとなった。

緑藻綱の 18S rRNA 遺伝子を実験的に増幅させるプライマーにより緑藻綱の生物相を評価することができた。緑藻綱 *Mychonastes homosphaera* に近縁なクローンの検出頻度が高く、草木湖における  $0.2\sim 3\mu\text{m}$  のサイズの主要な真核生物であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

Fujimoto N., Mizuno K., Yokoyama T., Ohnishi A., Suzuki M., Watanabe S., Komatsu K., Sakata Y., Kishida N., Akiba M. and Matsukura S., Community analysis of picocyanobacteria in an oligotrophic lake by cloning 16S rRNA gene and 16S rRNA gene amplicon sequencing, J. Gen. Appl. Microbiol., 2015, 61, pp. 171-176.

##### 学会発表

渡邊英梨香, 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 藤瀬大輝, 岸田直裕, 秋葉道宏. 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングによる浄水処理工程水の細菌相の評価. 平成 27 年度全国会議(水道研究発表会); 2015 年 10 月, さいたま市. 同講演集 pp. 630-631.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。) 該当なし

#### I. 参考文献

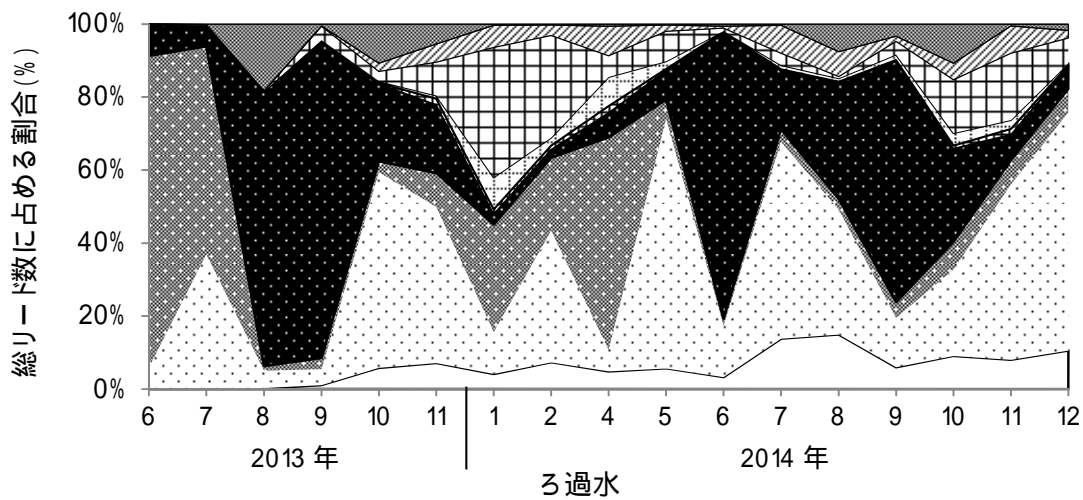
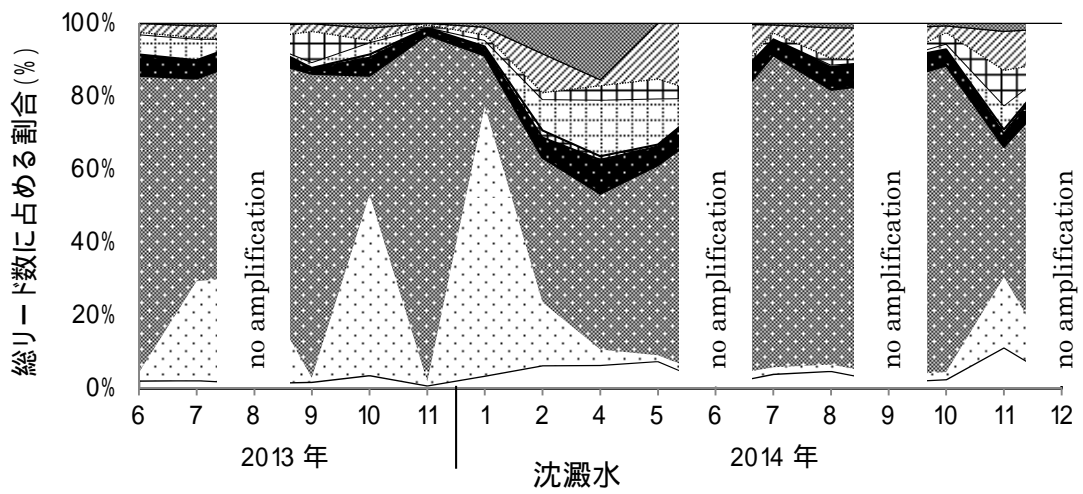
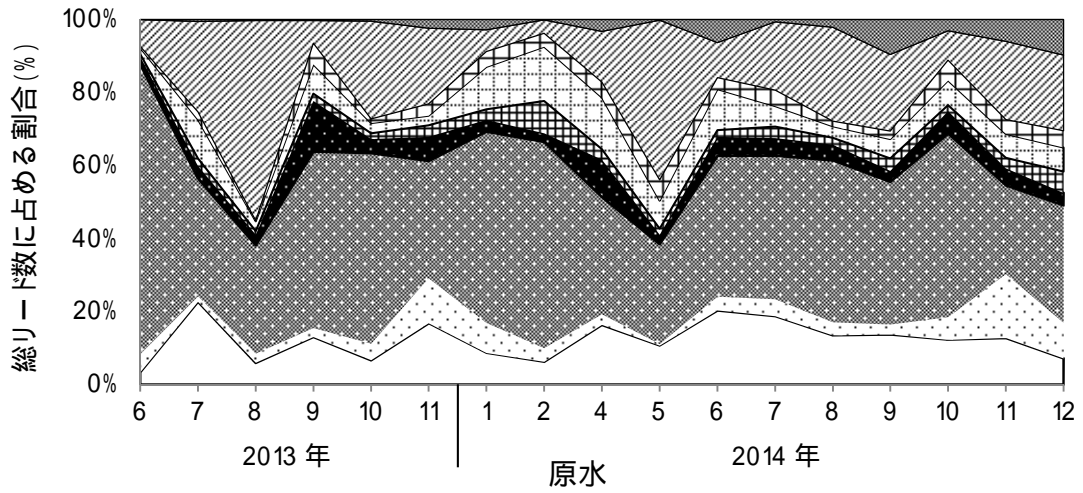
1) 矢澤秀行, ピコプランクトンによる浄水処理障害とその対策, 用水と廃水, 2002, 44(9), pp. 15-21.

2) 藤本尚志, 村田昌隆, 大西章博, 鈴木昌治, 矢島修, 岸田直裕, 秋葉道宏. 分子生物学的手法による浄水場における濁度障害原因生物の解明、水道協会雑誌, 2013, 82(5), pp.2-10.

3) 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 藤瀬大輝, 岸田直裕, 秋葉道宏. クローニング法および次世代シーケンサーによるろ過漏出障害原因生物の評価. 平成 26 年度全国会議(水道研究発表会); 2014 年 10 月; 名古屋. 同講演集 pp. 540-541.

4) Fujimoto N., Matsuo E., Murata M., Nomura K., Ohnishi A., Suzuki M., Enmoto K., Yamaguchi S., Yanagibashi Y., Kishida N. and Akiba M., Evaluation of the Small-Eukaryote Community Composition in a Mesotrophic Lake by Sequencing the 18S rRNA Genes, Japanese Journal of Water Treatment Biology, 2014, 50(2), pp. 85-94.

5) Moro C. V., Crouzet O., Rasconi S., Thouvenot A., Coffe G., Batisson I. and Bohatieret J., New Design Strategy for Development of Specific Primer Sets for PCR-Based Detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in Environmental Samples, Appl. Environ. Microbiol., 75, 5729-5733 (2009).



- Cyanobacteria 門    ▨ Actinobacteria 綱    ▩ Cytophagia 綱    ▪ Flavobacteriia 綱    ▫ Spingobacteriia 綱
- Alphaproteobacteria 綱    ■ Betaproteobacteria 綱    ▨ Gammaproteobacteria 綱    □ その他の門

図1 長沢浄水場処理工程水の綱レベルにおけるリード数の割合

表1 る過水より検出された主要な微生物

分類(門/綱)	近縁種(属)	相同性(%)	
Cyanobacteria	Synechococcophycideae Synechococcus	98-100	
Actinobacteria	Actinobacteria Ca. Planktophila limnetica	92.9-97.6	
Bacteroidetes	Cytophagia Pseudarcicella	93	
	Flavobacteriia Flavobacterium	97.2-100	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonas	100
		Methylobacterium	100
		Rhizobium	93
		Azorhizobium	94
	Betaproteobacteria	Limnohabitans	100
		Janthinobacterium	96.0-100
		Undibacterium	100
		Ralstonia	100
	Gammaproteobacteria	Methylobacter	100
		Pseudomonas	100
		Acinetobacter	100
		Moraxella	100
Deinococcus- Thermus	Deinococci Deinococcus	100	



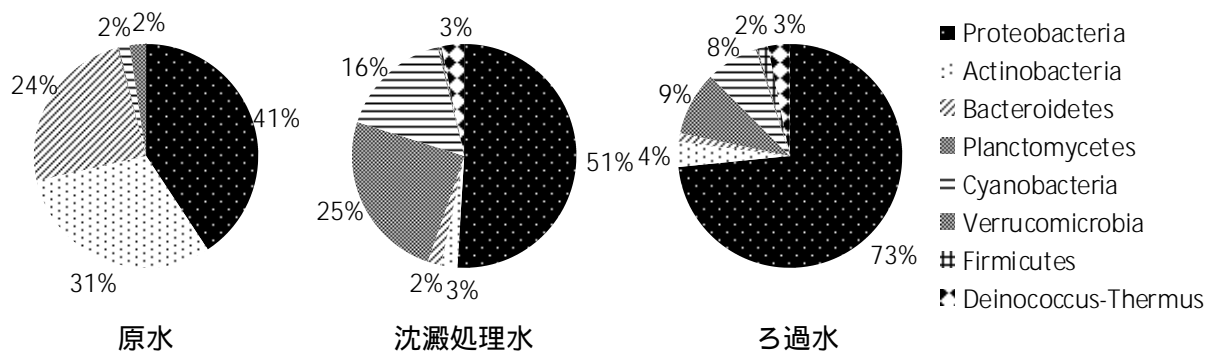


図2 栗山浄水場処理工程水の門レベルにおけるリード数の割合

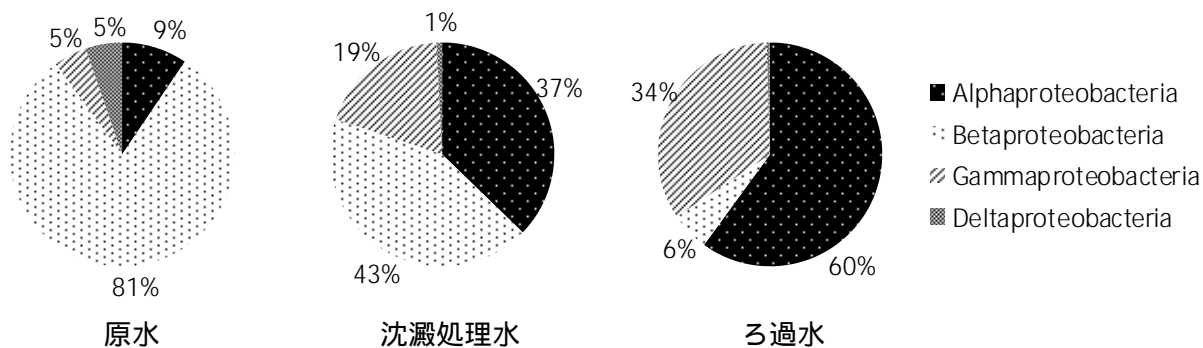


図3 栗山浄水場処理工程水の Proteobacteria 門における綱レベルのリード数の割合

表2 栗山浄水場処理工程水から検出された *Synechococcus* 属に近縁な OTU の近縁種と各工程水におけるリード数

OTU	近縁種	相同性(%)	原水	沈澱処理水	ろ過水
OTU1	<i>Synechococcus</i> sp. PCC9005	100.0	2388	3114	23
OTU2	<i>Synechococcus</i> sp. MH305	100.0	0	671	1296
OTU3	<i>Synechococcus</i> sp. MW6B4	100.0	4	706	303
OTU4	<i>Synechococcus</i> sp. LBB3	100.0	94	1472	28
OTU5	Uncultured <i>Synechococcus</i> sp. clone LS51	100.0	3	367	0
OTU6	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7009	100.0	99	0	0
OTU7	<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81	100.0	0	59	87
OTU8	<i>Synechococcus</i> sp. MA0607A	100.0	36	46	0
OTU9	<i>Synechococcus</i> sp. MA0607K	99.2	0	0	36
OTU10	<i>Synechococcus</i> sp. MA0607A	98.0	0	10	0
OTU11	<i>Synechococcus</i> sp. UBR	98.4	41	678	26
Synechococcus 属の合計リード数			2665	7123	1799

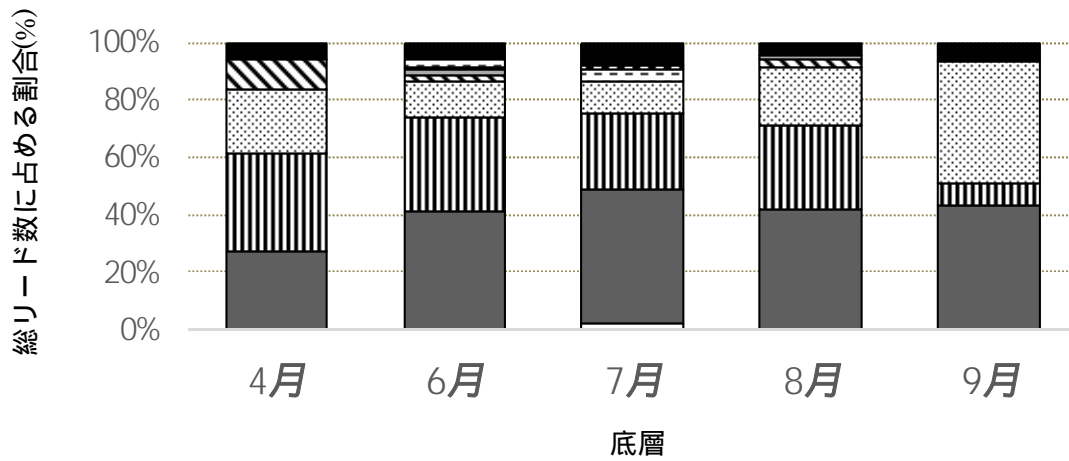
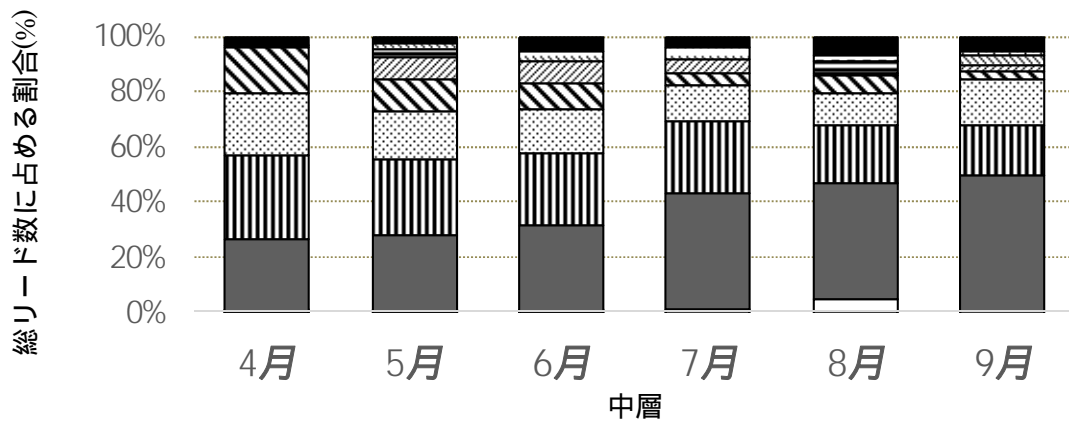
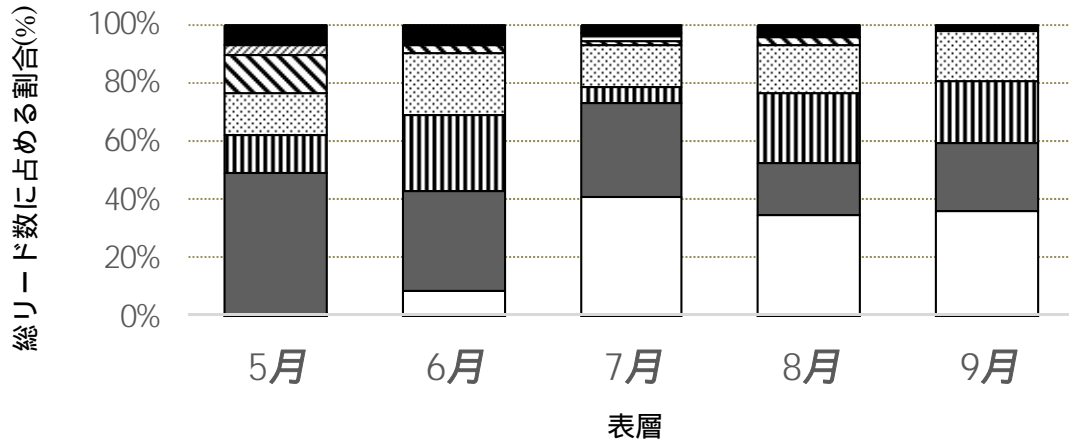


図4 草木湖の各水深における門レベルにおけるリード数の割合

- |                          |                   |                  |
|--------------------------|-------------------|------------------|
| □ Cyanobacteria          | ■ Proteobacteria  | ▨ Actinobacteria |
| ▤ Bacteroidetes          | ▧ Verrucomicrobia | ▩ Planctomycetes |
| ▥ Armatimonadetes        | ▦ Acidobacteria   | ▪ Nitrospirae    |
| ▣ Candidate_division_OD1 | ▤ Archaea         | ■ Other          |

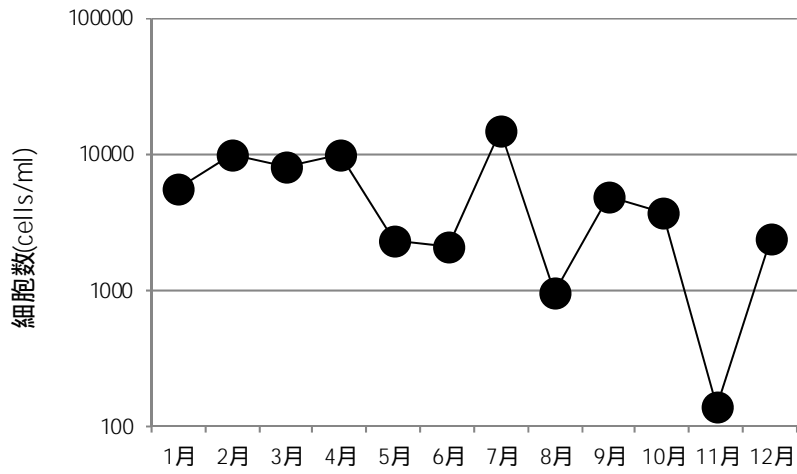


図5 草木湖の真核ピコ植物プランクトン細胞数の推移(2015年)

表3 草木湖の緑藻綱をターゲットとした生物相解析結果(2015年)

OTU	近縁種	相同性(%)	クローン数											
			1月	2月	3月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	
1	<i>Mychonastes homosphaera</i>	100	36	36	48	45	3	42	40	21	12	34	28	
2	<i>Chlamydomonas noctigama</i>	99.3	4			3	45	6	2	27	8	7	8	
3	<i>Chlamydomonas baca</i>	98.8	4	4						4		26	7	8
4	<i>Chlamydomonas fasciata</i>	99.8										2		4
5	<i>Chlamydomonas</i> sp. NIES-2315	100	4							2				

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：ろ過漏出障害を回避するための浄水処理プロセスの開発

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 西村 修 東北大学大学院工学研究科 教授

研究要旨

ピコ植物プランクトン *Synechococcus* sp.と藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いて凝集に関わる基本的特性としての pH とゼータ電位の関係、荷電中和に必要な凝集剤注入量、および荷電中和時の残留濁度を比較検討した。両藻類とも pH の上昇とともに荷電中和が起こり、*Synechococcus* では pH が 5 と 6 の間で、*Microcystis* では 6 と 7 の間で正電荷から負電荷に変化した。PAC を用いて pH6.5 と 7 における荷電中和に必要な凝集剤注入量を求めたところ、*Microcystis* は pH6.5 および 7 の両条件において凝集剤注入量は 5 から 10mg/L 必要であり pH 変化の影響は認められなかったが、*Synechococcus* では pH6.5 において 50 から 60mg/L、pH7 において 100 から 200mg/L と多量の凝集剤注入量が必要であり、pH のわずかな変化に大きな影響を受けることが明らかになった。

また、最適凝集剤注入量における残留濁度は *Microcystis* と比較して *Synechococcus* で著しく高く、荷電中和のために多量の凝集剤注入量を必要とする条件下で再分散が生じている可能性が考えられた。

なお、高塩基度 PAC による凝集に関する既往研究をまとめた結果、ピコ植物プランクトンの処理に有効である可能性が高いことから、H28 年度は高塩基度 PAC および二段凝集によってピコ植物プランクトンを除去することの有効性を検討する。

A. 研究目的

ピコ植物プランクトンは 0.2-2  $\mu\text{m}$  のサイズの小さな植物プランクトンで、ピコシアノバクテリアと真核性光合成生物からなる<sup>1)</sup>。ピコ植物プランクトンおよびその代謝物質が原水に存在することで、処理水の濁度上昇、ろ過閉塞、異臭味障害、同化可能有機物(AOC)、消毒副生成物、毒性物質等の様々な問題が発生する<sup>2-8)</sup>。

このようにピコ植物プランクトンによる浄水障害の発生が問題視され、様々な研究がなされてきているが、ピコ植物プランクトンの凝集阻害およびろ過漏出障害に関する研究は進んでおらず、対策技術の開発が求められているとともに、そのための基礎情報の収

集が必要な段階にある。そこで本研究では、ピコ植物プランクトンの発生するような富栄養化水源の原水 pH が高いことに注目し、そのような水質に適すると考えられる新たな凝集剤の凝集特性に関する既往研究の文献調査を行った。また、ピコ植物プランクトンの凝集における pH の影響を明らかにすることを目的として、実験的検討を行なった。

B. 研究方法

1) 文献調査

高塩基性塩化アルミニウム（高塩基度 PAC）に関する既往研究<sup>10-14)</sup>について整理し、植物ピコプランクトンの凝集に応用する場合の研究課題をまとめた。

## 2) ピコ植物プランクトンの凝集実験

本研究ではピコ植物プランクトンとしてシアノバクテリア *Synechococcus* sp. (NIES-1348)を国立環境研究所より入手し、CB培地で水温  $25 \pm 1$ 、蛍光灯下 ( $18 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ 、12-h light/12-h dark) で培養した。

200mLの三角フラスコに100mLのCB培地を入れ、90rpmで振とう撹拌を行い、定常期になった培養液を水道水で希釈して  $1.5 \times 10^6$ (個/mL)の濃度に調整し実験に用いた。

また比較のため *Microcystis aeruginosa*(NIES-87)を用いた実験も行った。培養方法は *Synechococcus* sp.と同様であり、 $1.2 \times 10^6$ (個/mL)の濃度に調整し実験に用いた。

凝集剤としてはポリ塩化アルミニウム(PAC)を用いた。

また、ゼータ電位の測定には Micro-Electrophoresis Apparatus Mk II(Rank Brothers, UK)を用いた。室温  $20 \pm 1$ 、80mVの条件で、Smoluchowski式によって計算してゼータ電位を得た。

ジャーテストは、4枚のパドルスターラー(60mm×30mm)が設置された装置を用いて行なった。HClあるいはNaOHにてpHを所定の濃度に調整した植物プランクトン懸濁液に対して凝集剤を注入し150rpm、3分の急速撹拌、30rpm、30分の緩速撹拌および60分の沈殿を行い、水面から2cm下の上澄み液を採取し分析に供した。

## C. 研究結果およびD. 考察

### 1) 文献調査結果および考察

「超高塩基度 PAC のアルミニウム溶解度と pH 管理目標値」(中島ら)

鹿児島県薩摩川内市丸山浄水場では、季節的な要因で原水 pH が上昇することがあり、pH 調整のために凝集剤(PAC)を過剰に注入することで処理水質の安定化を図ってきた。この問題に対応するために、高 pH 原水用に開発された塩基度 70% (通常のパACの塩基度は 50%) の超高塩基度 PAC を平成 26

年 11 月より試験的に使用したところ、通常 PAC の場合、残留アルミニウム濃度水質管理目標値 0.1 mg/L 以下に対する pH 管理目標値は 7.2 以下であったのに対して、高塩基度 PAC の pH 管理目標値は 8.2~8.3 となり、pH 制御を行う必要がないことがわかった。

「高濁度原水の処理不良時における二段凝集処理による濁度およびクリプトスポリジウムの除去効果ならびに感染リスク評価」(島崎ら)

近年の豪雨発生件数の増加により、高濁度原水や有機物濃度上昇の発生頻度が高まり、水道事業体では対応に苦慮しており、導入しやすく効果の高い原水濁度対応技術が必要とされている。このため二段凝集処理、高塩基度 PAC によるクリプトスポリジウム模擬粒子の除去特性を調べたところ、高濁度原水における二段凝集処理の適用により、沈殿不良、凝集不良の発生時ともに砂ろ過水の濁度低減効果が確認され、特に沈殿不良時における清澄化の効果が大きく表れた。しかし、高塩基度 PAC は従来型 PAC と同程度の濁度除去能力を示すものの、クリプトスポリジウムの除去性は優れない可能性が示唆された。

「高塩基度 PAC の運用効果」(青木ら)

福岡県筑後川表流水を主とする原水の処理において、高塩基度 PAC を用いた凝集実験を行った。凝集剤注入率を低減した系においても浄水処理の安全性を図るために設けている企業団水処理指針における水質管理値を満足することができるとともに、薬品注入量については凝集剤のみならず pH 調整剤(硫酸、消石灰)も含めた薬品使用量の低減効果が確認できた。

「高塩基度ポリ塩化アルミニウムの浄水処理への適応性」(長良ら)

明石市の鳥羽浄水場では、ろ過池の洗浄水が混和池に返流されることで原水の水温変動が著しく、原水 pH の変動を自動調整できないことも重なり、凝集処理が悪化する問題が生じている。この鳥羽浄水場の全系統(1系:地下水、2・3系:河川水)で、原水 pH の上昇に伴う凝集不良などの改善を目的と

した高塩基度 PAC の試験を実施したところ、高塩基度 PAC の効果が少ないと想定された冬季にあえて試験を実施したにもかかわらず、フロック形成もよく除濁性、沈降性も向上し、濃縮槽の界面管理も容易になった。また、汚泥濃度も上昇し、汚泥脱水機の運転回数も減少した。さらに長期的に観ると、脱水ケーキ量の削減、電力量の削減、ろ布の交換周期の延長の可能性があることがわかり、高塩基度型 PAC の注入量削減の可能性は原水が河川水の場合に高く、使用コスト削減も可能であることが示唆された。

「ウイルス処理に有効な新規アルミニウム系凝集剤の開発」(白崎ら、北海道大学大学院)

近年の水道水源の富栄養化に伴う pH 上昇により、従来のアルミニウム系凝集剤では最適 pH 条件下(中性付近)での処理が困難な状況が生じてきており、そのような弱アルカリ性の原水においては、ウイルスの処理性も著しく低下することが知られている。また、最適 pH 条件下での処理のために凝集剤の多量注入や酸注入による pH 制御を実施せざるを得ない場合も多く、結果として薬品の大量消費、注入設備の増設、管理の煩雑性、さらには処理水中の残留アルミニウム濃度の増加といった問題が生じている。このような背景に鑑み、高塩基度 PAC によるウイルス処理に関する凝集実験を行い、凝集剤の塩基度および凝集剤中の硫酸はウイルスの処理性に影響し、塩基度が高く硫酸を含まない凝集剤を用いることにより、従来型 PAC に比べて高い除去率が得られることが明らかになった。

以上の通り、高塩基度 PAC を用いた凝集に関する研究は限られているが、高塩基度 PAC の特徴は以下の通りまとめられる。

弱アルカリ域でも使用でき、pH 制御を行う必要が少なく、残留アルミニウム濃度が低減できる。

従来型 PAC と同程度、同等以上の濁度除去能力を示すが、クリプトスポリジウムの除去性は濁度より優れない可能性がある。

薬品注入量については、凝集剤のみならず pH 調整剤も含めた薬品使用量の低減効果がある。

冬季においてもフロック形成が良く、除濁性、沈降性も従来型 PAC よりも向上し、汚泥処理においても負荷の低減効果が期待できる。

ウイルスの処理性に関して、高塩基度 PAC は従来型 PAC に比べて高い除去率が得られる。

しかしながら、植物プランクトンおよびピコ植物プランクトンの凝集処理に高塩基度 PAC を用いた研究は無いことから、今後研究をすすめて凝集特性を明らかにする必要がある。

2) ピコ植物プランクトンの凝集に及ぼす pH の影響

藍藻 *Microcystis* とピコ植物プランクトン *Synechococcus* のゼータ電位と pH の関係を図 1 に示す。

*Synechococcus* は pH2 から 4 の強い酸性領域で約 10 から 20mV の正電荷を有していたが、*Microcystis* はさらに大きな正電荷(約 30 から 40mV)を呈していた。しかし、pH の上昇とともに荷電中和が起こり、*Synechococcus* では pH が 5 と 6 の間で、*Microcystis* では 6 と 7 の間で正電荷から負電荷に変化した。結果として pH7 付近で両者とも負電荷であるものの、*Synechococcus* は pH7 で約-10mV、*Microcystis* は-20mV 以下であり、pH7 付近でのわずかな pH 変化が凝集に大きな影響を及ぼすことが予想された。

このようなピコ植物プランクトンおよび藍藻の特徴をふまえ、通常 PAC を用いて pH6.5 と 7 に調整して荷電中和に必要な凝集剤注入量を求めるための実験を行った。その結果は表 1 に示す通り、*Microcystis* は pH6.5 および 7 の両条件において凝集剤注入量は 5 mg/L 必要であり、pH 変化の影響は認められなかったが、*Synechococcus* では pH6.5 において 50 から 60mg/L、pH7 において 100 から 200mg/L と多量の凝集剤注入量を必要とし、それは pH のわずかな変化に

大きな影響を受けることが明らかになった。

このように荷電中和に必要な凝集剤注入量が *Synechococcus* と *Microcystis* で大きく異なる理由の一つとしては、細胞の大きさが関与しているものと考えられる。本実験で用いた *Microcystis* の細胞は球形であり、直径は  $5.5 \mu\text{m}$  程度であった。一方、*Synechococcus* の直径は  $2 \mu\text{m}$  であり、結果として細胞当たりの表面積は 8 倍程度 *Synechococcus* の方が大きい。本実験では、細胞濃度を *Microcystis* は  $1.2 \times 10^6$ (個/mL)、*Synechococcus* は  $1.5 \times 10^6$ (個/mL)と同程度に調整したため、負に帯電する表面積の比はやはり 8 倍程度 *Synechococcus* 懸濁液の方が大きい。このような違いが荷電中和に必要な凝集剤注入量の違いをもたらしたと考えられる。

*Synechococcus* において pH が 6.5 から 7 に変化したときに荷電中和のための凝集剤注入量が倍以上増加する理由についてゼータ電位の変化は見られないことから凝集剤に対する pH の影響ではないかと考えられた。高塩基度 PAC は、弱アルカリ域でも使用でき、アルミニウムイオンの重縮合が進み多核錯体となっているためアルミニウムモノマーイオンより高いプラスの電荷を有し、架橋性も有している。このような特性からウイルスの除去性にも優れていると考えられるが、本研究の対象とするピコ植物プランクトンを藍藻と比較すると、高塩基度の特性はピコ植物プランクトンの凝集に有利な特徴を有していると評価できる。

図 2 には pH6.5 における *Microcystis* と *Synechococcus* のゼータ電位と残留濁度の関係を示した。凝集性の悪いことで知られている *Microcystis* と比較しても *Synechococcus* の凝集沈殿処理性は悪く、荷電中和領域と言えるゼータ電位の範囲 ( $-5 \sim +5\text{mV}$ ) でも高い残留濁度を示した。この理由としては、荷電中和のために  $50 \sim 100\text{mg/L}$  と多量の凝集剤注入量を必要とする条件下で、再分散が生じている可能性が考えられた。このことについてさらに検討を要

するが、高塩基度 PAC は荷電中和のみならず架橋作用も期待できるため、ピコ植物プランクトンに適用した場合に凝集効果は少なからず期待できるものと考えられる。

#### E. 結論

ピコ植物プランクトン *Synechococcus* の凝集に関する基本的特性に関して、*Microcystis* と比較しながら検討し、PAC より凝集しにくい特性を有すること、このためより多量の凝集剤注入量を必要とすること、その結果再分散が生じている可能性が高いことを明らかにした。また、文献調査から高塩基度 PAC によって凝集効果を高めることが可能と考えることを考察した。

#### 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. 参考文献

- 1) J.G. Stockner, N.J. Antia, Algal picoplankton from marine and freshwater: A multidisciplinary perspective, Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43 (1986) 2472–2503.
- 2) F. Jutter, Physiology and biochemistry of odorous compounds from freshwater cyanobacteria and algae, Water. Sci. Technol. 31(11) (1995) 69–78.

- 3) C.D. Wu, X.J. Xu, J.L. Liang, Q. Wang, Q. Dong, W.L. Liang, Enhanced coagulation for treating slightly polluted algae-containing surface water combining polyaluminum chloride (PACl) with diatomite, *Desalination* 279 (2011) 140–145.
- 4) S.D. Faust, O.M. Aly, *Chemistry of Water Treatment*, Butterworth, 1983, pp. 137–139.
- 5) T. Nakamura, K. Soneda, M. Miyata, K. Takeyasu, Leakage of turbidity to filtrate by picophytoplankton and investigation for measures in water purification plant, *Jpn. J. Water Treat. Biol.* 33(4) (1997) 233–243.
- 6) T. Hoson, K. Soneda, M. Miyata, T. Takeyasu, Occurrence of picophytoplankton in Yodo river basin and its effect on turbidity control in water treatment system, *J. Water Waste* 44(9) (2002) 755–762.
- 7) P. Domingos, T.K. Rubim, R.J.R. Molica, S.M.F.O. Azevedo, W.W. Carmichael, First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a Northeast Brazilian drinking water supply, *Environ. Toxicol.* 14(1) (1998) 31–35.
- 8) W.W. Carmichael, L. RenHui, Cyanobacteria toxins in the Salton Sea, *Aquat. Biosyst.* 2(5) (2006) 5–18.
- 9) J. Shi, Y. Zhang, K. Zou, F. Xiao, Speciation characterization and coagulation of poly-silica-ferric-chloride: The role of hydrolyzed Fe(III) and silica interaction, *J. Environ. Sci.* 23(5) (2011) 749–756.
- 10) 中島浩ほか、超高塩基度 PAC のアルミニウム溶解度と pH 管理目標値、平成 27 年度水道研究発表会講演集、pp.636-637
- 11) 島崎大ほか、高濁度原水の処理不良時における二段凝集処理による濁度およびクリプトスピリジウムの除去効果ならびに感染リスク評価、平成 27 年度水道研究発表会講演集、pp.622-623
- 12) 青木綾佑ほか、高塩基度 PAC の運用効果、平成 27 年度水道研究発表会講演集、pp.302-303
- 13) 長良野柄ほか、高塩基度ポリ塩化アルミニウムの浄水処理への適応性、平成 27 年度水道研究発表会講演集、pp.300-301
- 14) 白崎伸隆ほか、ウイルス処理に有効な新規アルミニウム系凝集剤の開発、土木学会論文集 G(環境)、Vol.68, No.7、2012 年、pp. 41- 50

#### J. 謝辞

高塩基度 PAC に関する情報をご提供いただきました多木化学株式会社にご心より感謝いたします。



表1 植物プランクトンの荷電中和に必要な凝集剤 (PAC) 注入量

	pH 6.5	pH 7
<i>Microcystis</i>	5-10 mg/L	5-10 mg/L
<i>Synechococcus</i>	50-60 mg/L	100-200 mg/L

注) 初期細胞濃度 (個/mL): *Microcystis*  $1.2 \times 10^6$ 、*Synechococcus*  $1.5 \times 10^6$

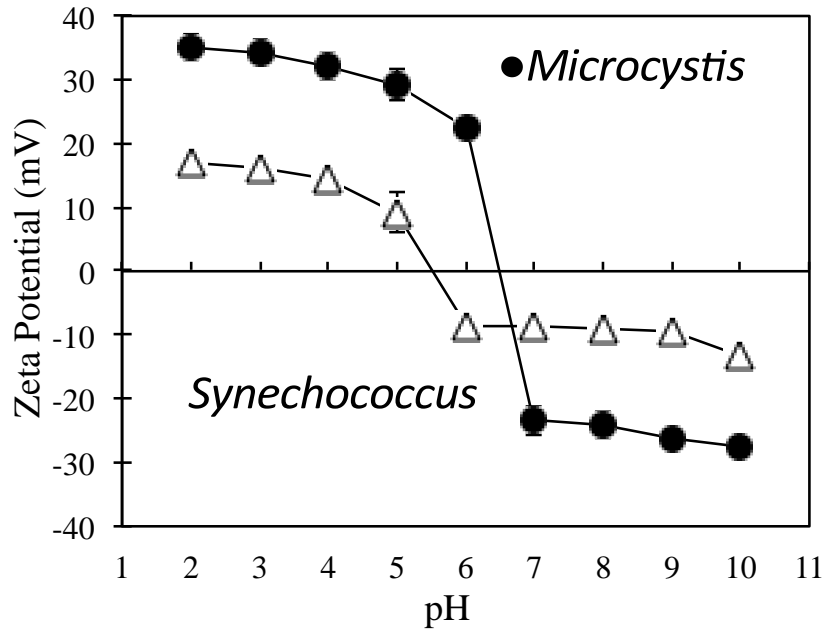


図1 藍藻 *Microcystis* とピコ植物プランクトン *Synechococcus* の pH とゼータ電位の関係

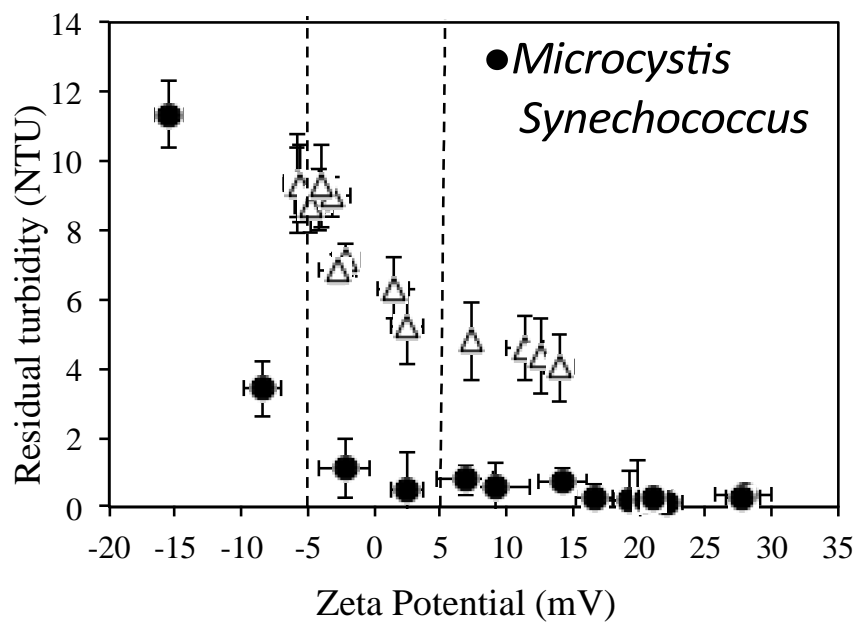


図2 *Microcystis* と *Synechococcus* のゼータ電位と残留濁度の関係 (pH 6.5)

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：カビ臭発生予測手法の構築

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 清水 和哉 東洋大学生命科学部 講師  
研究分担者 岸田 直裕 国立保健医療科学院 主任研究官

研究要旨

水源におけるカビ臭発生抑制手法の構築を目的として、水源におけるカビ臭発生の状況およびカビ臭物質産生微生物群の定量とカビ臭物質産生活性の定量手法の開発のためにカビ臭物質合成酵素遺伝子の保存性を解析した。その結果、平成 16 年から平成 22 年の期間内における水道水質基準値を超えるカビ臭の検出は、継続的に同水源から検出された。カビ臭物質合成酵素遺伝子に関しては、ジェオスミン合成酵素遺伝子ホモログは、放線菌内において高度に保存されていることが、単離菌の解析により明らかとなった。藍藻類においては、遺伝子塩基配列の相同性を利用することにより「属」毎に分けられることがわかった。従って、ジェオスミン産生微生物個体群数の定量およびジェオスミン合成活性分析において、放線菌と藍藻類を別にして解析できることがわかった。2-MIB 産生関与するゲラニルニリン酸メチルトランスフェラーゼ遺伝子およびモノテルペンシクラーゼ遺伝子について解析した。放線菌および藍藻類の塩基配列登録数が少ないことから、放線菌と藍藻類を分けた解析ができるのかについてはわからないものの、ジェオスミン合成酵素遺伝子ホモログと同様の解析ができることが推測された。

A. 研究目的

我が国の主な上水水源は、表流水であるため気候変動に影響を受けやすく、環境因子の変動や気温上昇に伴う水温の上昇は、水源環境微生物群集構造に影響を与えることが予測される。カビ臭物質は、水道水質を悪化させる生物由来の水汚染物質である。その産生原因生物は、放線菌と藍藻類であるため、環境因子の変動や水源環境微生物群集構造に影響を受けることが考えられる。カビ臭物質が、生物由来水汚染物質であることから、化学物質による水汚染とは異なり、発生および消失の予測や発生抑制制御が困難であった。近年のカビ臭物質産生微生物の分子生物学的知見により、培養や顕微鏡による手法に加えて、カビ臭物質産生微生物群個体数の定量手法（早期検出技術に応用可能）が構築でき

ると考えられる状況となってきた<sup>1),2)</sup>。しかしながら、分子生物学的解析で標的としているカビ臭物質合成酵素遺伝子の保存性に関する知見が少ないのが分子生物学的手法の適用の課題となっている。一方、カビ臭発生対策手法の構築には、どのような環境因子が引き金となってカビ臭物質産生にいたるのかを解明することが必要となる。そのために、カビ臭物質産生に与える環境因子の解析が報告されてきた<sup>3)</sup>。室内実験による環境因子の知見およびカビ臭発生現場における環境因子の知見を総合させた解析は、極めて少ないのが現状である。そのため、どの環境因子をカビ臭発生抑制の指標とできるのかが不明瞭である。

上水源におけるカビ臭発生抑制手法の構築を目的として、本年度は、上水源における

カビ臭発生の状況およびカビ臭物質産生微生物群の定量とカビ臭物質産生活性の定量手法の開発のためにカビ臭物質合成酵素遺伝子の保存性を放線菌の単離菌を用いた遺伝子配列解読や遺伝子データベース解析により実施した。

## B. 研究方法

### 1) カビ臭発生の状況分析

カビ臭発生現場におけるカビ臭物質産生の引き金に關与する環境因子を同定するために、公益社団法人日本水道協会が発行している「水道統計」<sup>4-10)</sup>を用いて、全国の各水源におけるカビ臭発生の状況を分析した。分析方法はカビ臭物質であるジェオスミンと2-メチルイソボルネオール(2-methylisoborneol; 2-MIB)の1年間における検出最高濃度がそれぞれ  $1 \text{ ng/L}$   $N_1 < 5 \text{ ng/L}$ ,  $5 \text{ ng/L}$   $N_2 < 10 \text{ ng/L}$ ,  $10 \text{ ng/L}$   $N_3$ 、それぞれ検出された水源を都道府県別に分析した。そして、各都道府県の全浄水場当たりについて、カビ臭が確認された浄水場の割合を算出した。加えて、カビ臭が発生している水源を解析し、どの様な上水源(河川、湖沼、ダム等)で多くカビ臭が発生しているのかを分析した。

### 2) カビ臭物質産生合成酵素遺伝子の多様性

カビ臭物質産生微生物群の定量とカビ臭物質産生活性の定量手法の開発のために、上水源や水域から放線菌を単離した。単離源は、ひょうたん池(群馬県邑楽郡板倉町)、草木ダム、渡良瀬川、思川、手賀沼、信濃川、谷中湖から河川堆積物・底泥・表層水サンプルから得た。それぞれ ISP medium No.4 (ISPM4) を用い単離した。表層水サンプルは、 $100 \mu\text{L}$  ずつ ISPM4 寒天培地に塗布した。底泥サンプルは、3日間自然乾燥させた後、30分  $110^\circ\text{C}$  で乾熱乾燥させた後に、乾燥重量  $1 \text{ g}$  を採取し、滅菌水  $9 \text{ mL}$  に懸濁させた。これを原液とし10倍、50倍、100倍希釈し、それぞれ  $100 \mu\text{L}$  ずつ ISPM4 寒天培地に塗布した。また乾燥させていない河川堆積物・底泥サン

プル  $1 \text{ g}$  を滅菌水  $9 \text{ mL}$  に懸濁し、同様に塗布した。植菌した ISPM4 寒天培地は、すべて  $25^\circ\text{C}$ 、遮光で培養した。ISPM4 寒天培地に生育した細菌をさらに3回、ISPM4 寒天培地に塗布し、単離した。単離菌を YMPD 液体培地で十分な生育が得られるまで1日から5日間、 $25^\circ\text{C}$ 、 $225 \text{ rpm}$  で培養した。液体培地で十分に培養した単離菌から全 DNA をビーズビーディング法により抽出した。また、グリセロールストックも合わせて作成し、 $-80^\circ\text{C}$  に保存した。

全 DNA を用いて、16S rRNA 遺伝子(27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') -1492r (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')) プライマーセット、16S rRNA 遺伝子解析用のユニバーサルプライマーセットである)および *geoA* 遺伝子ホモログ(249F (5'-CTTCTTCGACGACCACTTCC-3')、1860R (5'-CGTACTCGATCTCCTTCTGG-3')、塩基配列データベース上に登録のあったジェオスミン合成酵素遺伝子ホモログの塩基配列より報告者が作成したプライマーセットである)を PCR クローニングし(KOD-Plus-Neo(東洋紡ライフサイエンス))、アガロースゲル電気泳動法を用いた PCR 産物の精製後(NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up(MACHERY-NAGEL))、塩基配列解読に供した。得られた塩基配列を用いて blastn 解析を行い、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた単離菌の同定および *geoA* 遺伝子ホモログの塩基配列を同定した。また、*geoA* 遺伝子ホモログを保存している細菌を blastn 検索により調査した。

塩基配列データベース(DDBJ、NCBI、EMBL/EBI)を用いてジェオスミン合成酵素遺伝子(*geoA* 遺伝子ホモログ)および2-MIB合成に關与する重要な遺伝子である<sup>11)</sup>、ゲラニルニリン酸メチルトランスフェラーゼ遺伝子および2-MIB合成酵素遺伝子であるモノテルペンシクラーゼ遺伝子<sup>11)</sup>をデータベースから探索し、保存性の解析を行った。

## C. 研究結果および D. 考察

## 1) カビ臭発生の状況分析

全国的に様々な水源でカビ臭発生が確認されているが(図1-図10)、河川や湖沼、貯水池での発生が多かった。濃度に依らない頻度および水道水質基準値 10 ng/L を超える頻度のどちらにおいても、河川が多数を占めた。発生したカビ臭物質濃度の最高値は、湖沼やダム、貯水池が示した。分析した平成16年から平成22年までのカビ臭発生水源において、ほぼ同水源から継続的にカビ臭物質が検出されていた。しかしながら、平成25年以降、これまでにカビ臭発生が観測されていなかった水源の発生報告があり、気候変動等による環境因子の変動が、カビ臭物質産生微生物に影響を与え、カビ臭発生に至っていることが予測された。

平成16年から平成22年において、5 ng/L未満のカビ臭発生においては、2-MIBの検出数が、ジェオスミンよりも多いものの、5 ng/L以上10 ng/L未満においては、ジェオスミンの検出数が多かった。10 ng/L以上では、ジェオスミンの検出数が多い傾向にあったが、2-MIBの検出数が多い年もあった(図11)。カビ臭物質が、水道水質基準値の10 ng/L以上の発生がない水源は、秋田県、富山県、石川県、山梨県、岐阜県、静岡県、愛知県、鳥取県、高知県、熊本県、宮崎県、鹿児島県であった。カビ臭物質濃度が、5 ng/L未満の発生があった水源が多く確認され、山口県の水源が最多検出された。水道水質基準値を超えるカビ臭物質は、ジェオスミンと2-MIBの両方が各都道府県において確認されたが、ジェオスミンのみ(京都府(湖沼)、和歌山県(河川))や2-MIBのみ(北海道(河川)、奈良県(河川)、徳島県(河川))もあった。高濃度カビ臭物質発生は、湖沼やダム等の滞留時間が長い水源であった。近年、河床における付着性藍藻類や定着性藍藻類が、カビ臭発生に寄与していると考えられている。そのため、湖沼やダム等のみならず、河床における藍藻類のカビ臭物質産生の引き金に關与する環境因子の同定が必要である。しかしながら、本年度は、カビ臭物質産生の引き金に

係わる環境因子のカビ臭発生現場と室内実験結果を総合した環境因子同定に至らなかった。来年度以降に、「水道統計」等の水質データベースおよび室内実験から同定し、各水源に適用可能なカビ臭発生抑制対策手法を構築する。

以上から、従来から実施されてきた湖沼やダム等におけるカビ臭発生対策のみならず、持続可能な水道システムの利用のためには、今後、河川においての有効な対策を講じる必要があることが確認された。

## 2) カビ臭物質産生合成酵素遺伝子の多様性

採取したサンプルから39株を単離した。現在までに16S rRNA 遺伝子の塩基配列解読を終えた23株をblastn解析に供した結果、15株が、カビ臭物質産生の報告例が多い*Streptomyces*属であった。これら*Streptomyces*属と同定された15株から*geoA* 遺伝子ホモログをPCRクローニング後の塩基配列解読により同定した。遺伝子データベース上(DDBJ、NCBI、EMBL/EBI)の*geoA* 遺伝子ホモログを保持している主な放線菌は、*Streptomyces*属であった。その他の放線菌でデータベース上に登録されていたのは、*Kitasatospora*属、*Frankia*属、*Kribbella*属等があった。以上から、*Streptomyces*属以外にも多くの放線菌に保存されていることがわかった。ジェオスミン産生藍藻類に関しては、異なる「属」間においては、*geoA* 遺伝子ホモログのアミノ酸配列の相同性は高いものの遺伝子塩基配列の相同性が、低い領域があることがわかった。そのため藍藻類においては、遺伝子塩基配列の相同性を利用することにより「属」毎に分けられることがわかった。以上から、放線菌については、*geoA* 遺伝子ホモログを標的とした共通配列を用いた分子生物学的手法により、ジェオスミン産生放線菌個体群数を推量でき、藍藻類においては、各「属」におけるジェオスミン産生藍藻類個体群数を推量できることが推測できた。

一方、2-MIB合成に關与する酵素に關して、アミノ酸配列の相同性は、放線菌および藍藻

類のどちらも高いことが報告されていた<sup>12)</sup>。また、遺伝子データベース解析から、放線菌の *geoA* 遺伝子ホモログよりも、藍藻類における遺伝子塩基配列の相同性が高いことが確認された。しかしながら、藍藻類の遺伝子登録数は極めて少ないため、*geoA* 遺伝子ホモログと同様に高度に保存されているのかは、決定的ではない。これまでに、2-MIB 産生藍藻類 *Pseudanabaena limnetica* (Castaic Lake)の全ゲノム解析が一例のみ報告されている<sup>12)</sup>。しかし、ゲノム情報は、未だ遺伝子データベースに登録されていない。そのため、どのような分子生物学的な経路によってカビ臭物質産生の引き金が稼働するのか、反対に、カビ臭物質産生抑制の引き金が稼働するのか、の詳細な解析が実施できない状況にある。一方、放線菌においては、ゲノム情報が多数報告されており、とくにカビ臭物質産生の引き金に関する分子生物学的な経路の解析が進みつつある。放線菌の多くは、ジェオスミンと 2-MIB のどちらも産生できる<sup>12)</sup>。しかし、藍藻類の多くは、ジェオスミンもしくは 2-MIB のどちらかのみしか産生することができない。水道水質基準値を超えるカビ臭発生を予測するとともに、基準値を超えるカビ臭の発生後、基準値を下回るのがいつになるのかといったカビ臭消失の予測、発生予測・消失予測のどちらも可能な早期検出技術開発およびカビ臭発生抑制技術の構築のために、ジェオスミン産生藍藻類および 2-MIB 産生藍藻類のゲノム解析を実施することが必要である。

放線菌由来のカビ臭物質がどの程度かび臭被害に寄与しているのかは、明らかにされていないが、例えば、放線菌の *geoA* 遺伝子ホモログの発現量と藍藻類の *geoA* 遺伝子ホモログの発現量を比較解析することで、カビ臭発生の主要原因生物を特定でき、原因生物それぞれのカビ臭発生の寄与度を明らかにできると考えられる。

以上から、分子生物学的手法を用いてカビ臭発生予測・消失予測手法を構築できることが見いだせた。来年度以降は、分子生物学的

手法も織り交ぜ、カビ臭発生抑制手法の検討を継続して実施する。

## E. 結論

水道水質基準値を超える水源の多くが、河川であったが、カビ臭発生源は上流であると考えられることも多かった。多くのカビ臭発生は、ジェオスミンおよび 2-MIB の両方によるものであったが、水源によっては、それらどちらかのみ事例もあった。

カビ臭物質合成酵素遺伝子群が、放線菌および藍藻類のそれぞれに保存されていることを明らかにした。カビ臭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わかっているため、分子生物学的手法を用いてカビ臭物質産生微生物群個体数を推量することにより、カビ臭物質産生予測手法・消失予測手法を構築できることが期待される。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

該当なし

### 2) 学会発表

- (1) 加村瑞希、遠藤雅也、篠原健吾、内海真生、岸田直裕、秋葉道宏、清水和哉、第 51 回日本水環境学会年会；2016 年 3 月；徳島。要旨集（印刷中）。

## 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

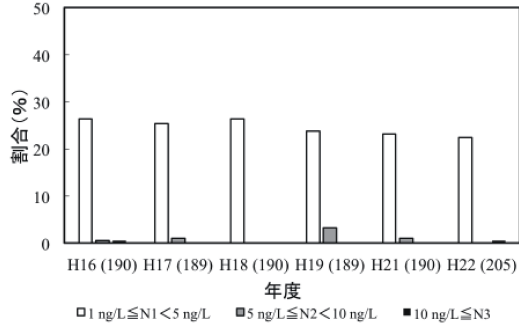
該当なし

## I. 参考文献

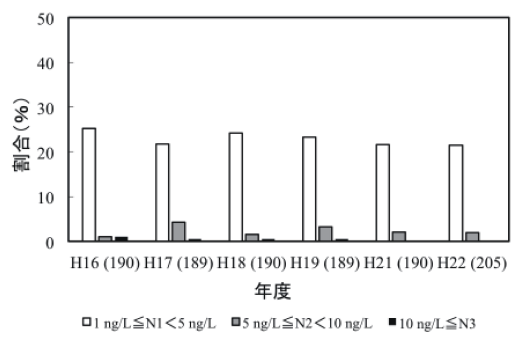
- 1) Auffret M., Pilote A., Proulx É., Proulx D.,

- Vandenberg G., and Villemur R. (2011) Establishment of a real-time PCR method for quantification of geosmin-producing *Streptomyces* spp. in recirculating aquaculture systems. *Water Research* **45**(20), pp.6753-6762.
- 2) Su M., Galet V., Giglio S., Burch M., An W., and Yang M. (2013) Establishment of quantitative PCR methods for the quantification of geosmin-producing potential and *Anabaena* sp. in freshwater systems. *Water Research* **47**(10), pp. 3444-3454.
  - 3) Wang Z. and Li R. (2015) Effect of light and temperature on the odor production of 2-methylisoborneol-producing *Pseudanabaena* sp. and geosmin-producing *Anabaena ucrainica* (cyanobacteria). *Biochemical Systematics and Ecology* **58**, pp. 219-226.
  - 4) 日本水道協会 (2004) 平成 16 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
  - 5) 日本水道協会 (2005) 平成 17 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
  - 6) 日本水道協会 (2006) 平成 18 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
  - 7) 日本水道協会 (2007) 平成 19 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
  - 8) 日本水道協会 (2008) 平成 20 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
  - 9) 日本水道協会 (2009) 平成 21 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
  - 10) 日本水道協会 (2010) 平成 22 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
  - 11) Komatu M., Tsuda M., Omura S., Oikawa H., and Ikeda H. (2008) Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(21), pp. 7422-7427.
  - 12) Giglio S., Chou W.K.W., Ikeda H., Cane E.D., and Monis T.P. (2011) Biosynthesis of 2-Methylisoborneol in Cyanobacteria. *Environmental Science & Technology* **45**(3), pp. 992-998.
- J. 謝辞  
神奈川県企業庁北村壽朗氏、川崎市上下水道局藤瀬大輝氏、千葉県水道局田中宏憲氏、千葉県福増浄水場宮崎啓彰氏に感謝いたします。

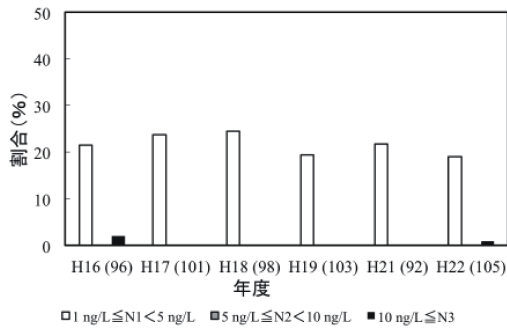
### 北海道 MIB



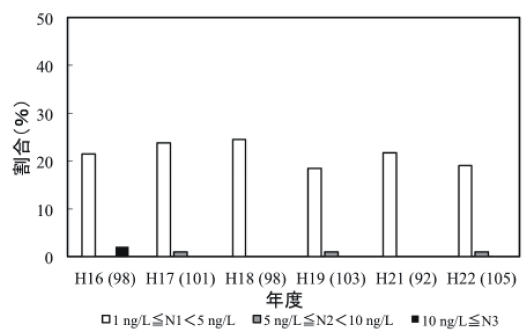
### 北海道ジェオスミン



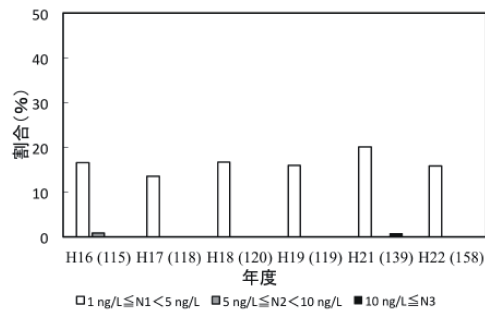
### 青森県 MIB



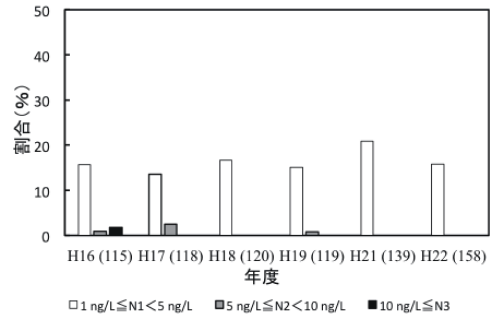
### 青森県ジェオスミン



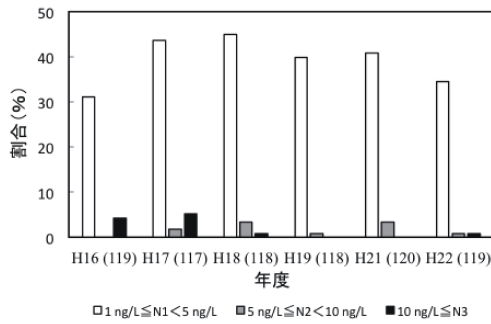
### 岩手県 MIB



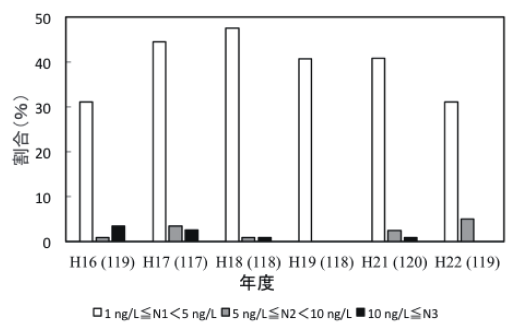
### 岩手県ジェオスミン



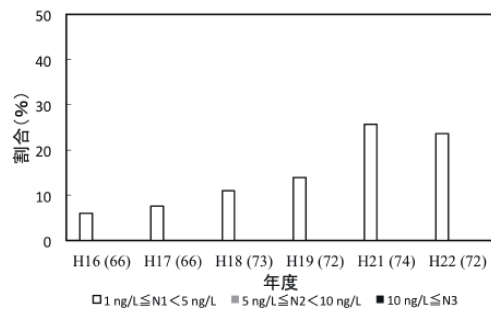
### 宮城県 MIB



### 宮城県ジェオスミン



### 秋田県 MIB



### 秋田県ジェオスミン

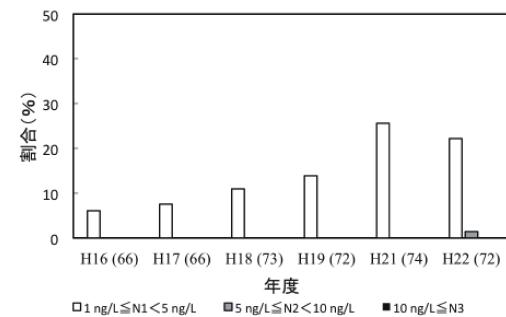
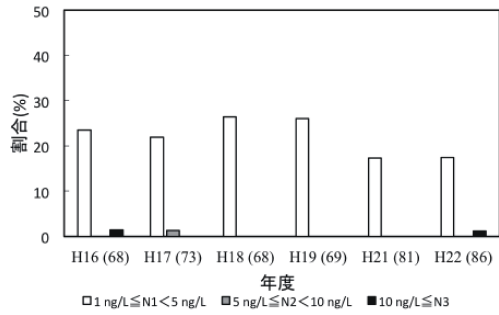
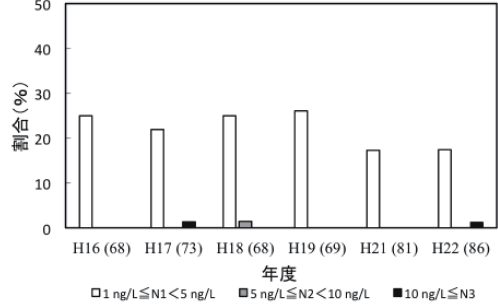


図1 水源におけるカビ臭発生状況(北海道、青森県、岩手県、宮城県、秋田県)

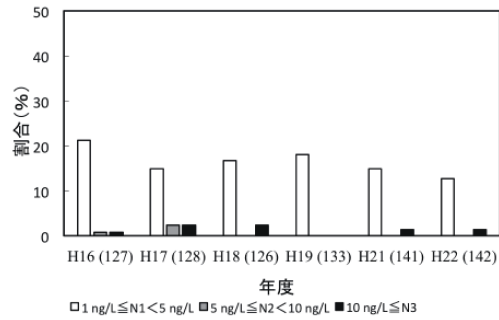
### 山形県 MIB



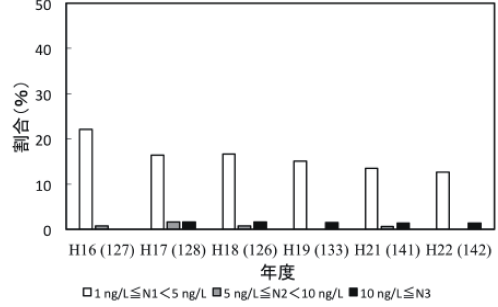
### 山形県 ジェオスミン



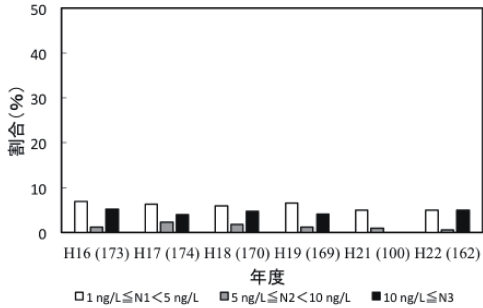
### 福島県 MIB



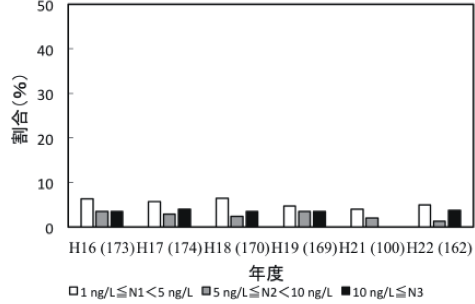
### 福島県 ジェオスミン



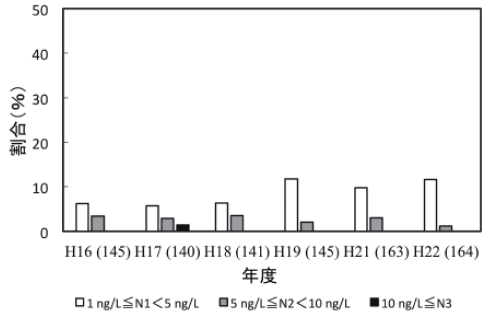
### 茨城県 MIB



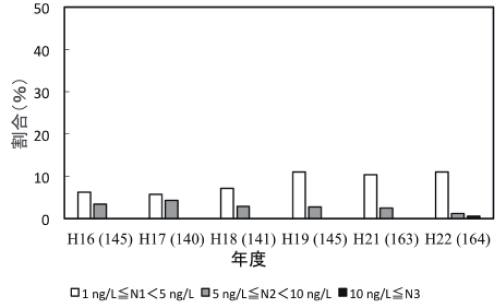
### 茨城県 ジェオスミン



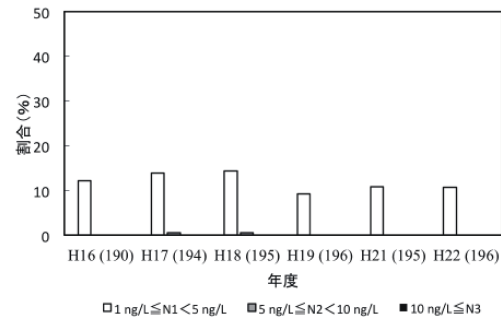
### 栃木県 MIB



### 栃木県 ジェオスミン



### 群馬県 MIB



### 群馬県 ジェオスミン

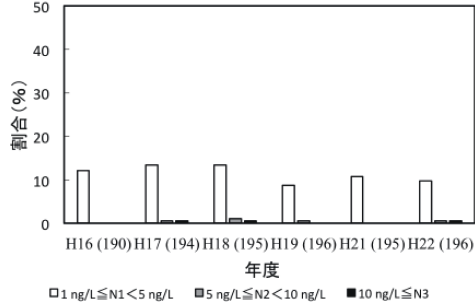
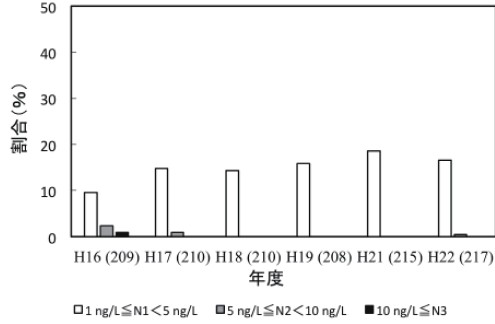


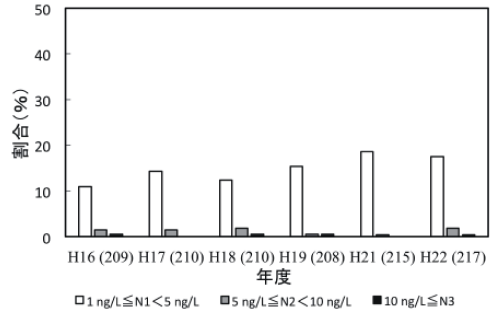
図2 水源におけるカビ臭発生状況 (山形県、福島県、茨城県、栃木県、群馬県)



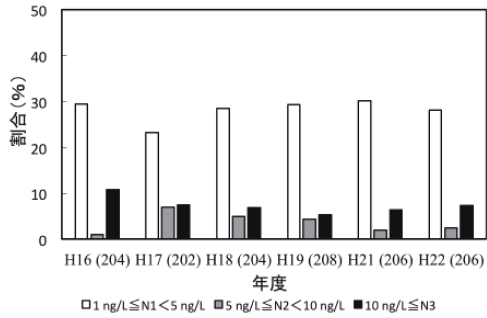
### 埼玉県 MIB



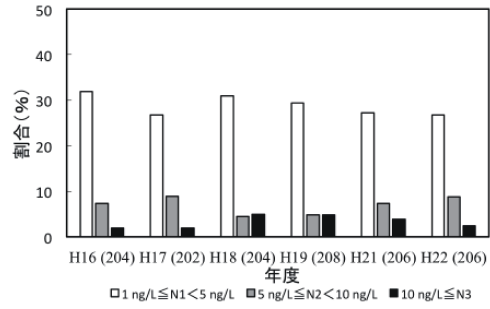
### 埼玉県 ジェオスミン



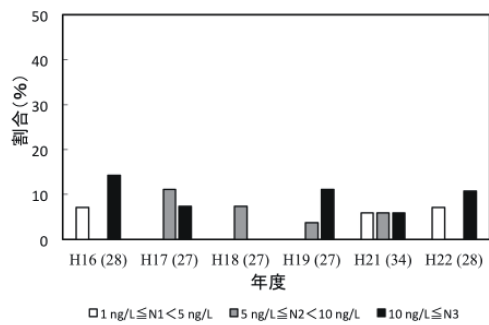
### 千葉県 MIB



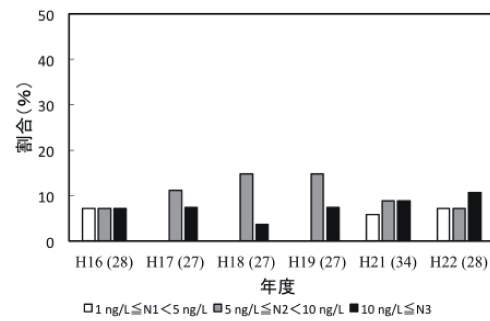
### 千葉県 ジェオスミン



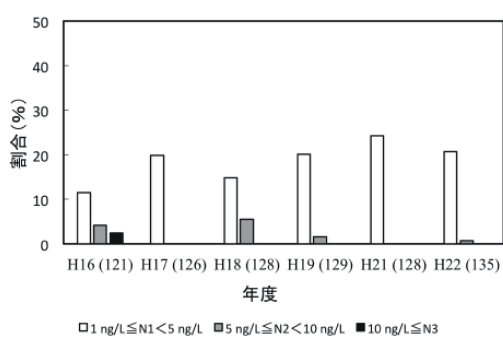
### 東京都 MIB



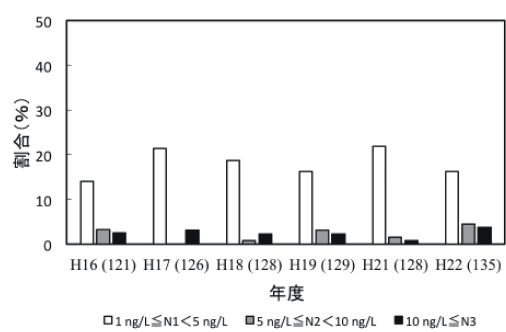
### 東京都 ジェオスミン



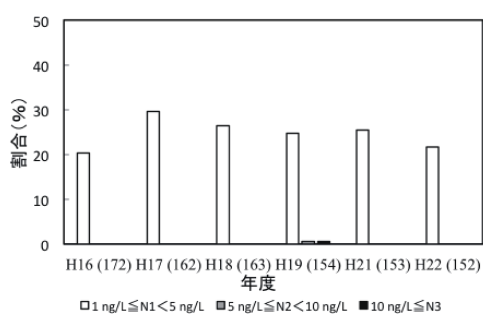
### 神奈川県 MIB



### 神奈川県 ジェオスミン



### 新潟県 MIB



### 新潟県 ジェオスミン

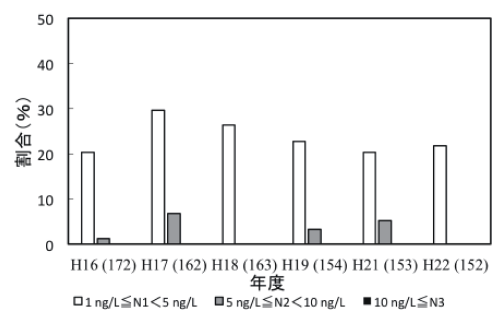


図3 水源におけるカビ臭発生状況(埼玉県、千葉県、東京都、神奈川県、新潟県)

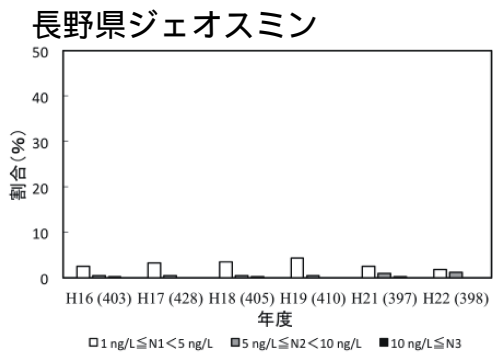
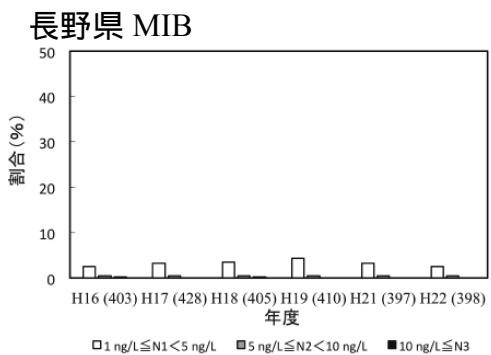
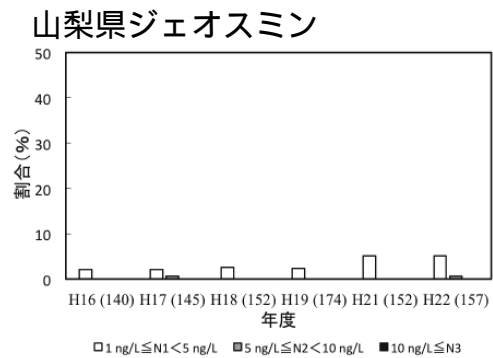
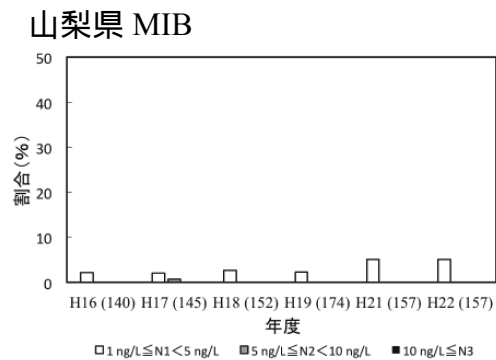
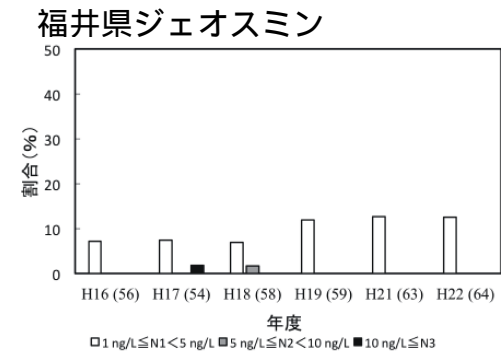
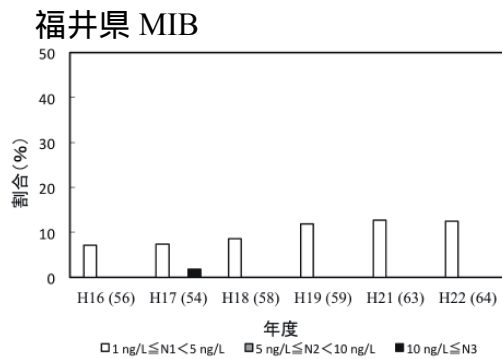
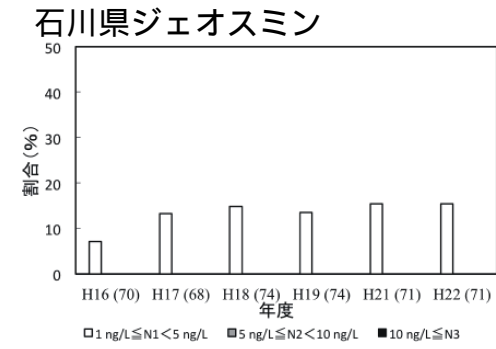
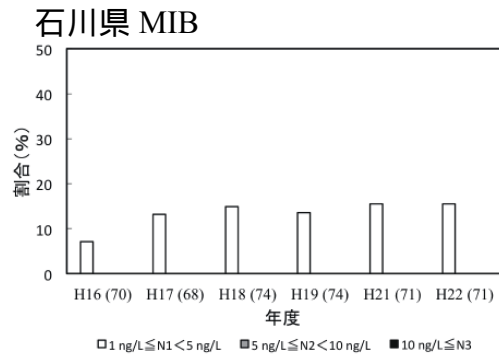
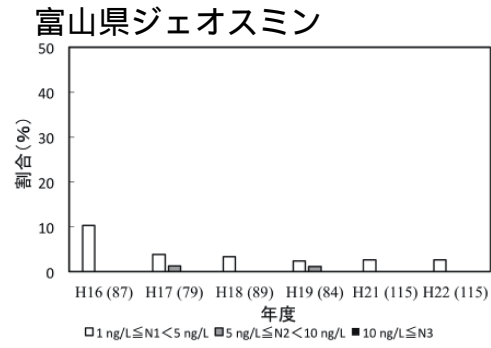
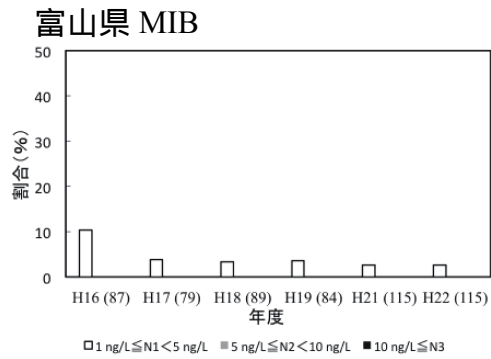
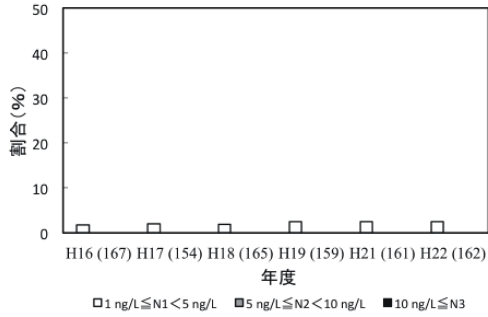
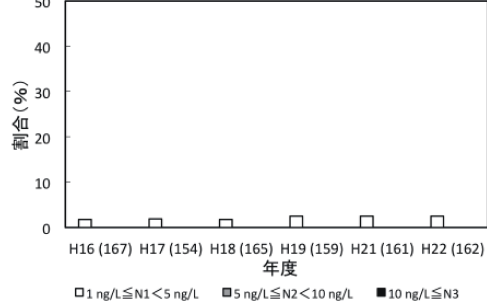


図4 水源におけるカビ臭発生状況(富山県、石川県、福井県、山梨県、長野県)

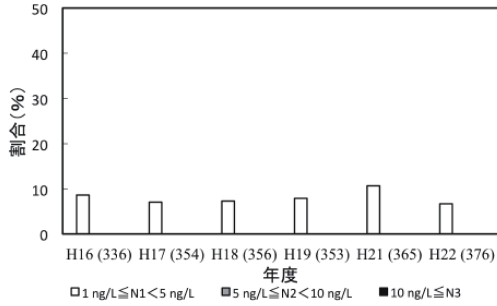
### 岐阜県 MIB



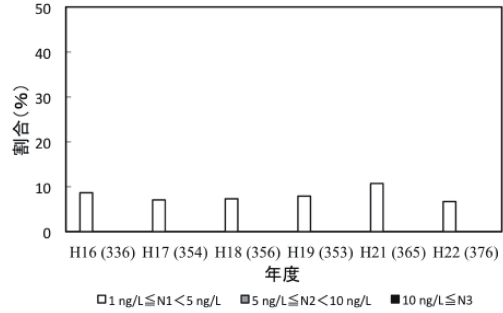
### 岐阜県 ジェオスミン



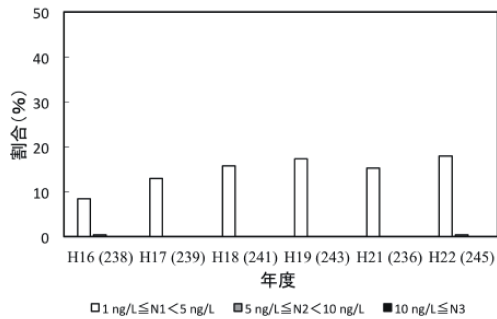
### 静岡県 MIB



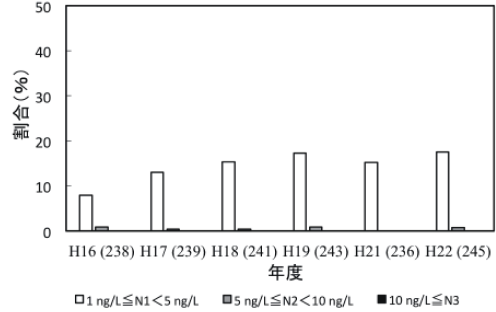
### 静岡県 ジェオスミン



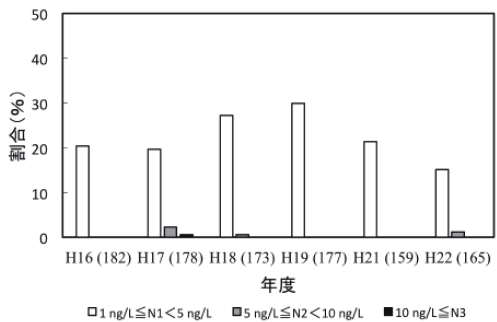
### 愛知県 MIB



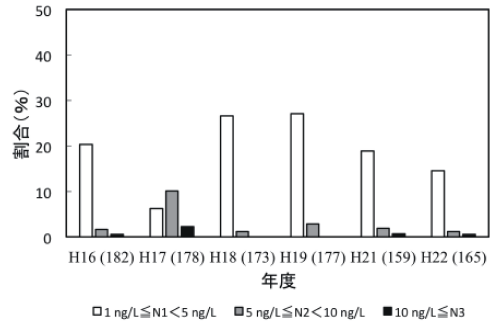
### 愛知県 ジェオスミン



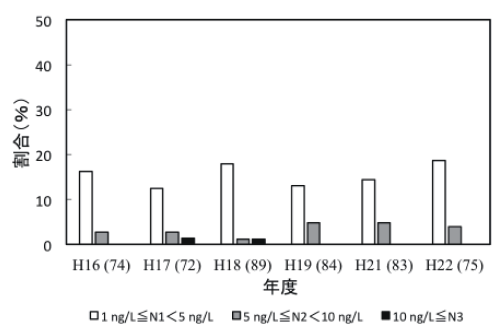
### 三重県 MIB



### 三重県 ジェオスミン



### 滋賀県 MIB



### 滋賀県 ジェオスミン

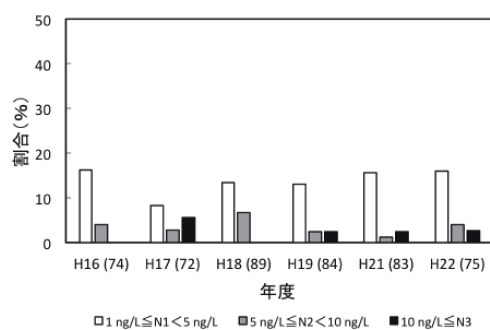


図5 カビ臭発生状況(岐阜県、静岡県、愛知県、三重県、滋賀県)

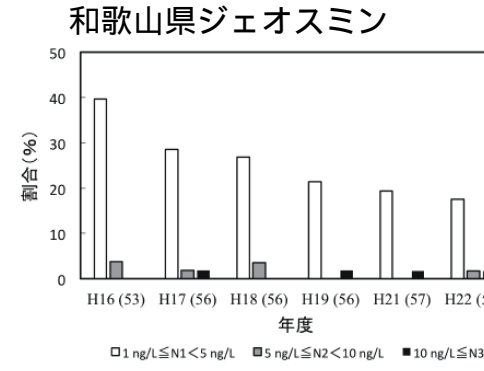
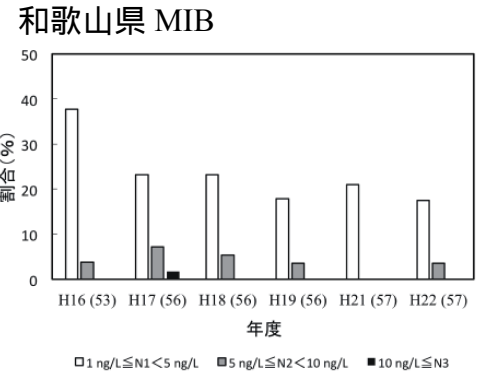
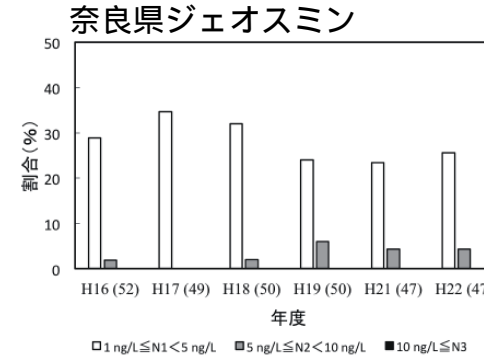
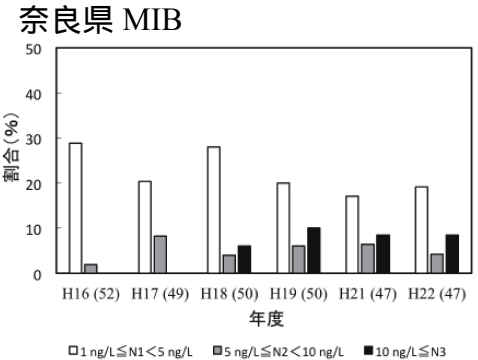
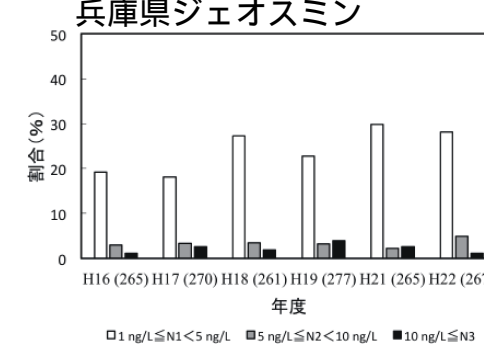
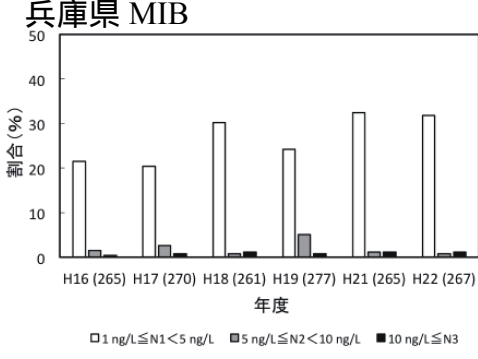
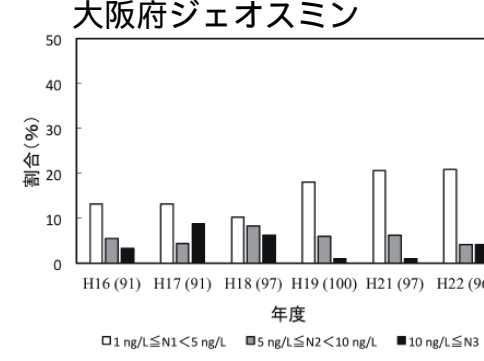
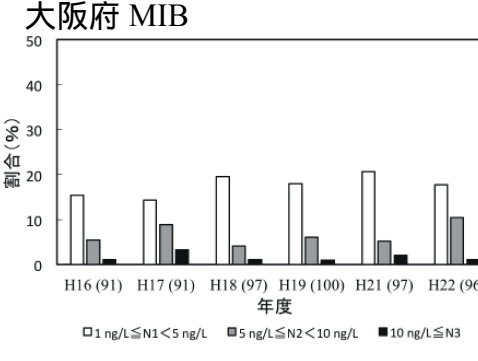
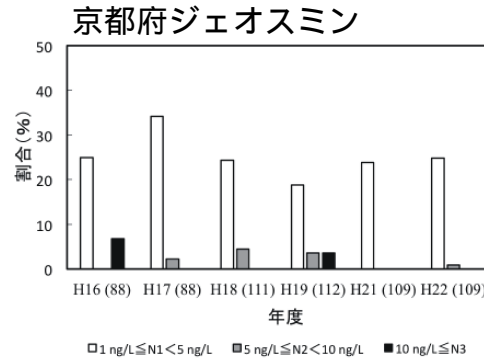
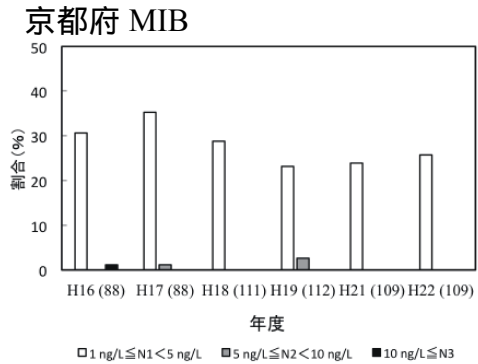


図6 カビ臭発生状況（京都府、大阪府、兵庫県、奈良県、和歌山県）

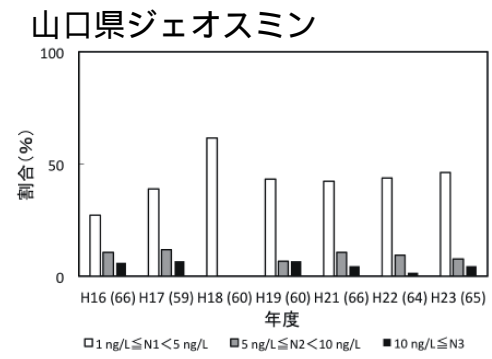
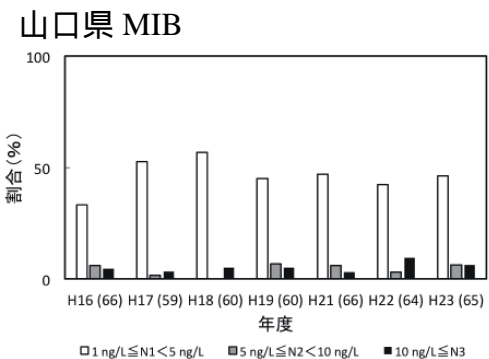
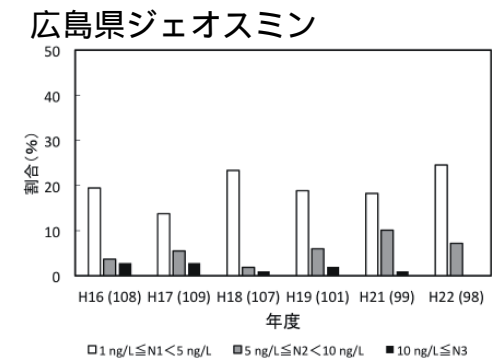
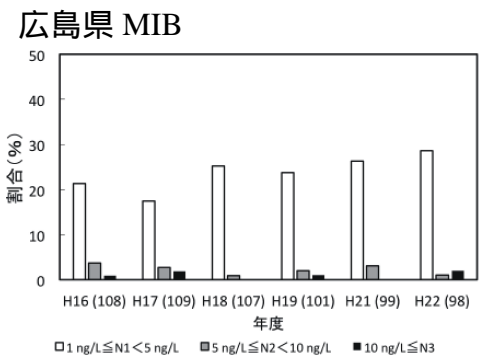
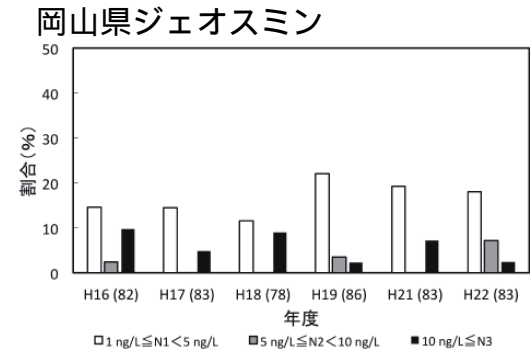
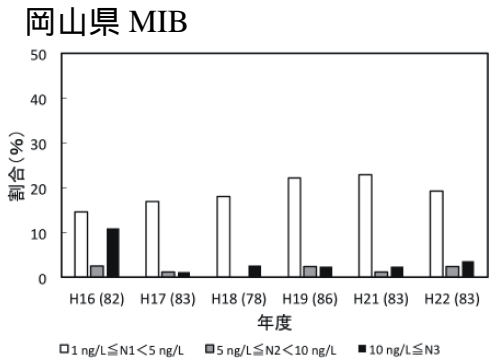
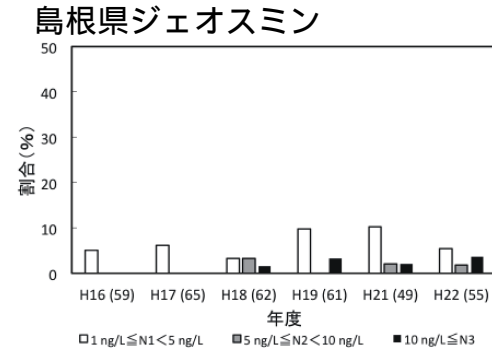
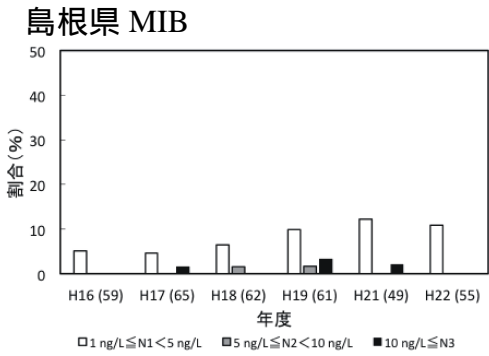
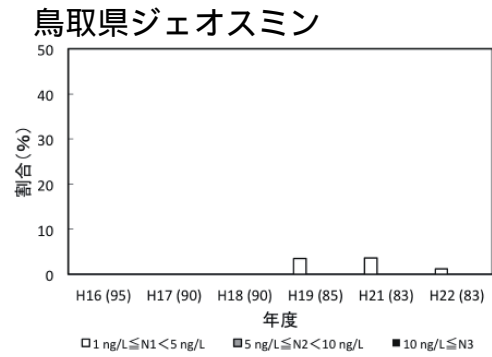
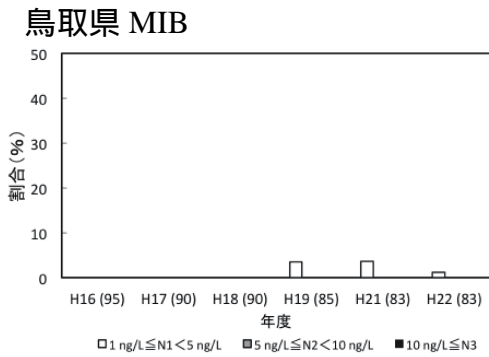
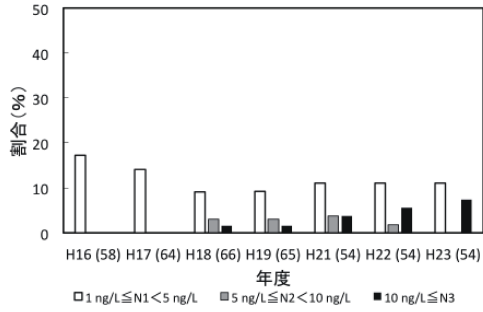
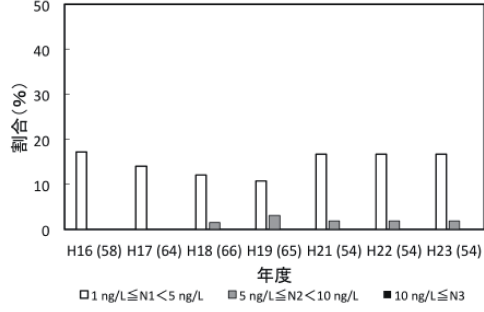


図7 カビ臭発生状況（鳥取県、島根県、岡山県、広島県、山口県）

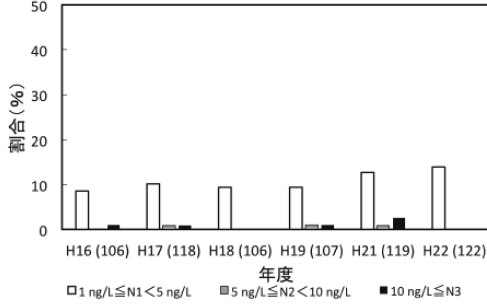
### 徳島県 MIB



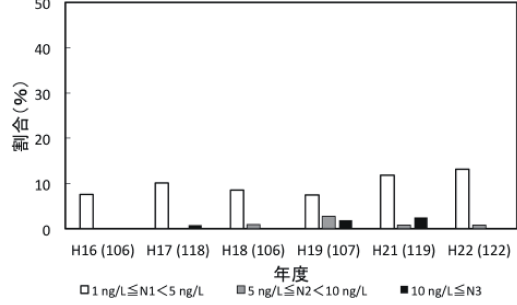
### 徳島県 ジェオスミン



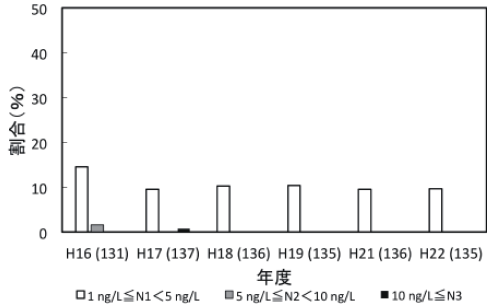
### 香川県 MIB



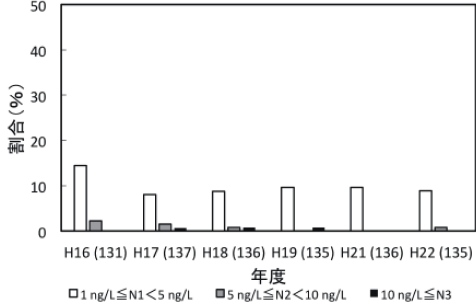
### 香川県 ジェオスミン



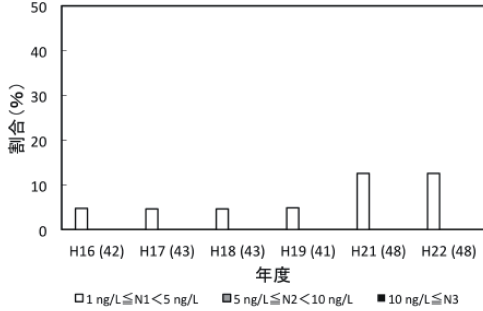
### 愛媛県 MIB



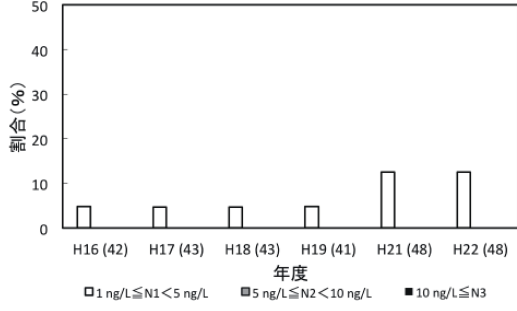
### 愛媛県 ジェオスミン



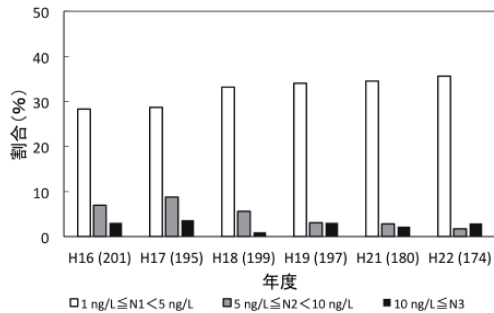
### 高知県 MIB



### 高知県 ジェオスミン



### 福岡県 MIB



### 福岡県 ジェオスミン

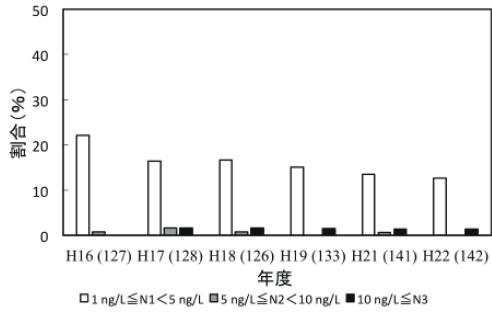
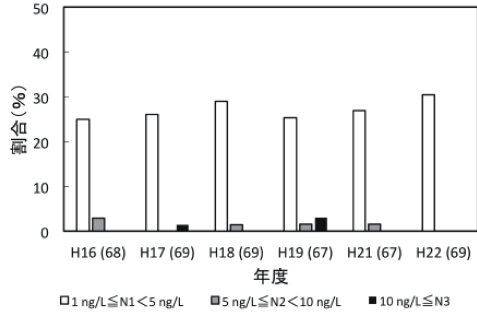
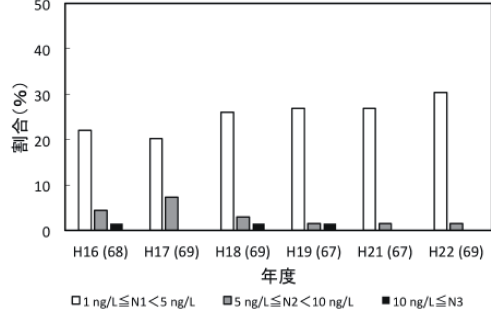


図 8 カビ臭発生状況 (徳島県、香川県、愛媛県、高知県、福岡県)

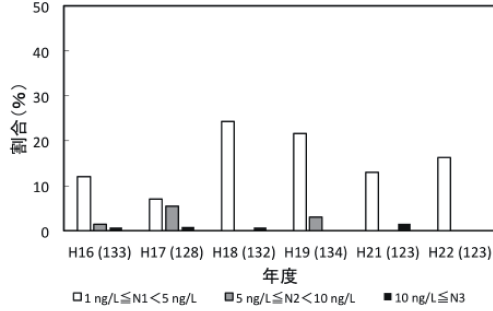
### 佐賀県 MIB



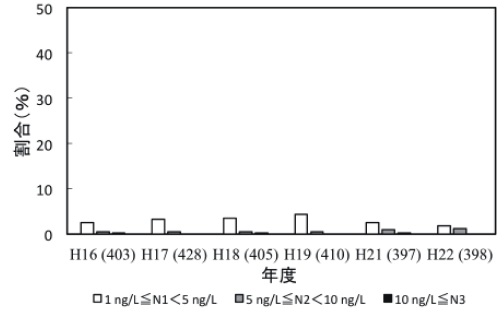
### 佐賀県 ジェオスミン



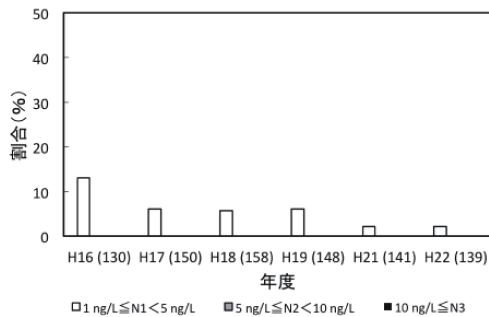
### 長崎県 MIB



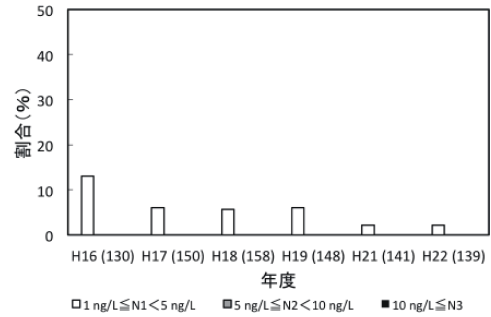
### 長崎県 ジェオスミン



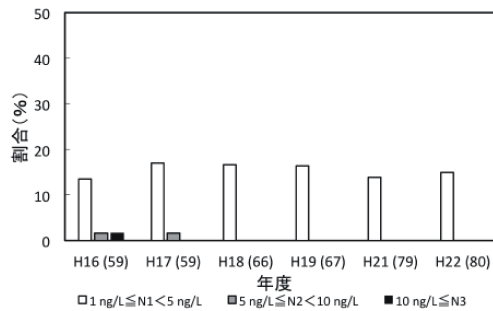
### 熊本県 MIB



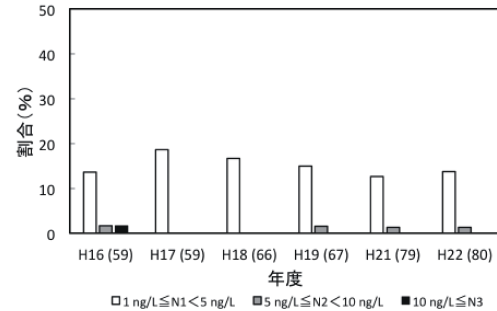
### 熊本県 ジェオスミン



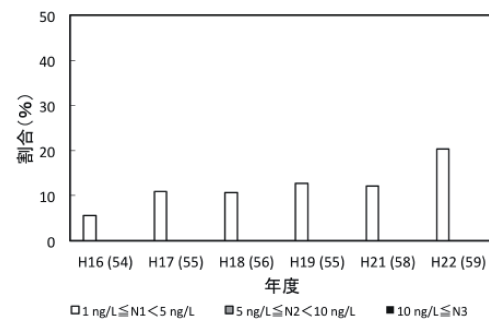
### 大分県 MIB



### 大分県 ジェオスミン



### 宮崎県 MIB



### 宮崎県 ジェオスミン

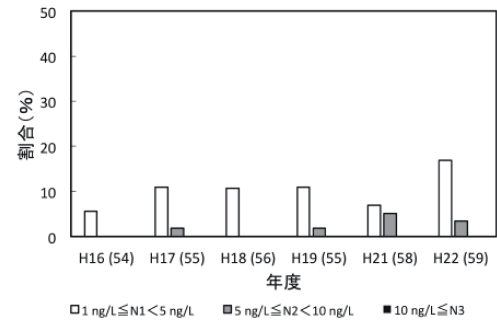
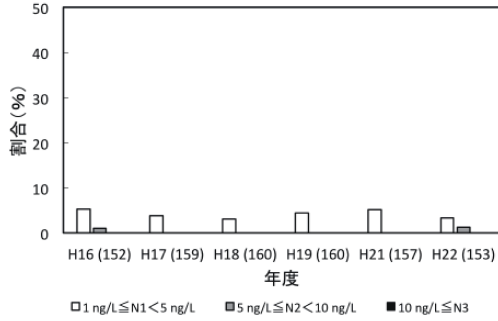
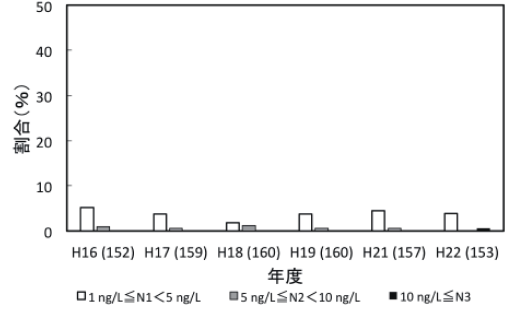


図9 カビ臭発生状況 (佐賀県、長崎県、熊本県、大分県、宮崎県)

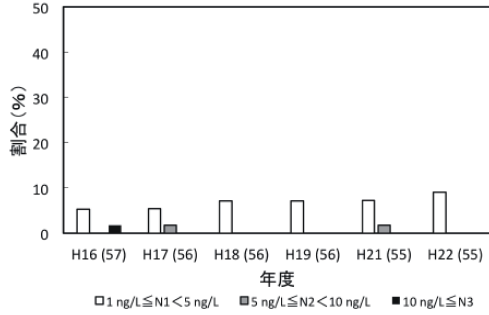
鹿児島県 MIB



鹿児島県 ジェオスミン



沖縄県 MIB



沖縄県 ジェオスミン

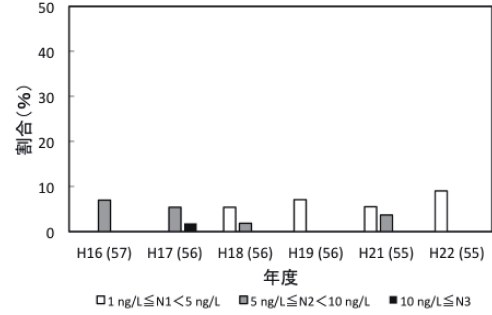


図 10 カビ臭発生状況 (鹿児島県、沖縄県)

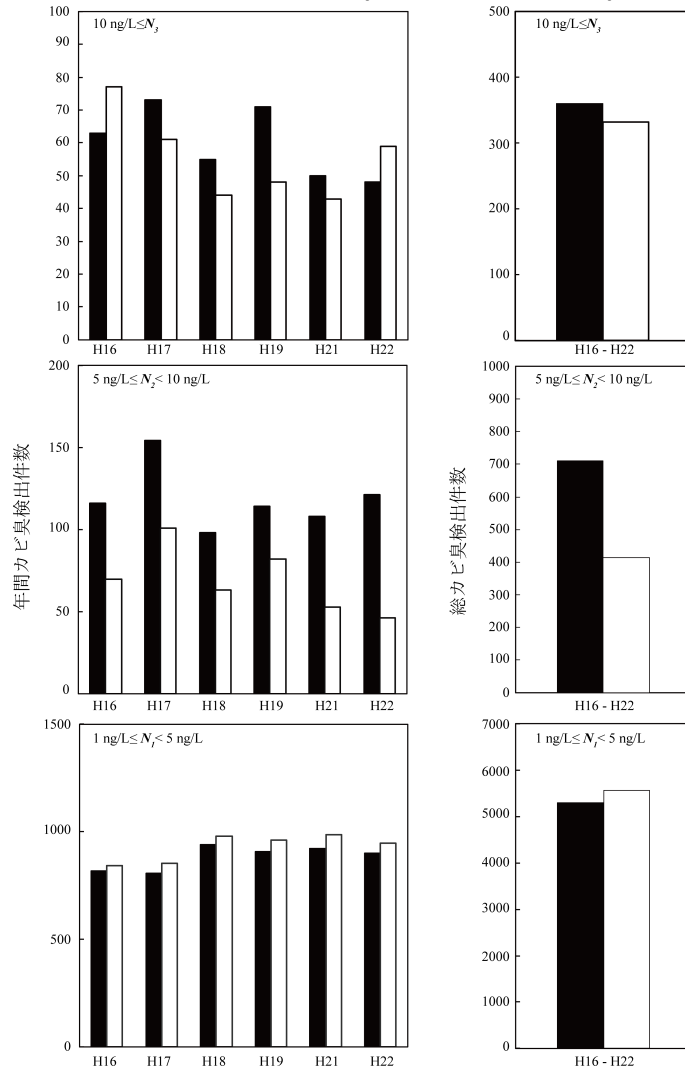


図 11 年間カビ臭検出件数および総カビ臭検出件数  
黒棒は、ジェオスミン、白棒は、2-MIB を示す。



## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 1. 論文発表

- 1) Kishida N, Sagehashi M, Takanashi H, Fujimoto N, Akiba M. Nationwide survey of organism-related off-flavor problems in Japanese drinking water treatment plants (2010–2012). *J Water Supply Res T* 2015;64(7):832-8.
- 2) Fujimoto N, Mizuno K, Yokoyama T, Ohnishi A, Suzuki M, Watanabe S, Komatsu K, Sakata Y, Kishida N, Akiba M, Matsukura S. Community analysis of picocyanobacteria in an oligotrophic lake by cloning 16S rRNA gene and 16S rRNA gene amplicon sequencing. *J Gen Appl Microbiol* 2015;61(5):171-6.

### 2. 学会発表

- 1) 渡邊英梨香, 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 藤瀬大輝, 岸田直裕, 秋葉道宏. 16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンシングによる浄水処理工程水の細菌相の評価. 平成27年度全国会議(水道研究発表会); 2015年10月, さいたま市. 同講演集pp. 630-631.
- 2) 初山将, 下ヶ橋雅樹, 秋葉道宏. 気候変動の水道システム影響評価のための相模川流域水文モデルの作成. 日本水環境学会第50回年会; 2016年3月; 徳島. 同講演要旨集(印刷中).
- 3) 加村瑞希, 遠藤雅也, 篠原健吾, 内海真生, 岸田直裕, 秋葉道宏, 清水和哉. カビ臭物質産生微生物によるカビ臭物質産生特性. 日本水環境学会第50回年会; 2016年3月; 徳島. 同講演要旨集(印刷中).