

厚生労働科学研究費補助金
健康安全・危機管理対策総合研究事業

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

平成30年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 秋葉 道宏

平成31(2019)年 3月

目 次

研究班の構成-----	1
I . 総括研究報告	
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 -----	5
秋葉道宏	
II . 分担研究報告	
1 . 藻類発生予測モデルの構築 -----	15
秋葉道宏, 西村修, 佐野大輔	
2 . 国内外における生物障害に関連する事例調査 -----	21
秋葉道宏, 柳橋泰生, 浅田安廣, 井上拓也	
3 . カビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリ作成に向けた実態調査 -----	31
秋葉道宏, 藤本尚志, 浅田安廣, 井上拓也	
4 . 浄水プロセスにおける障害生物の挙動解明 -----	41
秋葉道宏, 藤本尚志, 藤瀬大輝	
5 . 精密分析による水道水原水中溶存有機物の特性解析 -----	47
秋葉道宏, 越後信哉	
6 . 粉末活性炭処理に対する水道水源水質が及ぼす競合影響 -----	55
秋葉道宏, 下ヶ橋雅樹, 浅田安廣, 井上拓也	
7 . 高分解能質量分析計を用いた水道水生ぐさ臭原因物質の探索 -----	67
秋葉道宏, 高梨啓和, 小倉明生, 北村壽朗	
8 . 流域モニタリングネットワークのための簡便な生物障害検出方法の構築-----	77
秋葉道宏, 清水和哉, 藤本尚志, 高梨宏和	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	83

研究班の構成
(平成30年度)

研究代表者

国立保健医療科学院生活環境研究部部長 秋葉道宏

研究分担者

東北大学大学院工学研究科教授 西村 修
福岡大学大学院工学研究科教授 柳橋 泰生
東京農業大学応用生物科学部醸造科学科教授 藤本 尚志
鹿児島大学大学院理工学研究科准教授 高梨 啓和
筑波大学生命環境系准教授 清水 和哉
国立保健医療科学院生活環境研究部上席主任研究官 下ヶ橋 雅樹
国立保健医療科学院生活環境研究部上席主任研究官 越後 信哉
国立保健医療科学院生活環境研究部主任研究官 浅田 安廣

研究協力者

公益社団法人日本水道協会工務部次長 北澤 弘美
神奈川県企業庁水道水質センター所長 北村 壽朗
東北大学大学院工学研究科准教授 佐野 大輔
京都市上下水道局水質管理センター水質第1課担当課長補佐 小倉 明生
東京都水道局水質センター検査課(生物検査担当) 今井 美江
仙台市水道局浄水部水質管理課主任 伊藤 雅木
大分市水道局管理部浄水課水質管理室主査 高橋 威一郎
神戸市水道局事業部水質試験所担当係長 清水 武俊
千葉県水道局技術部浄水課水質管理班担当係長 米村 真吾
川崎市上下水道局水管理センター水道水質課技術職員 藤瀬 大輝
横浜市水道局水質課水質管理係技術職員 矢野 留美子
独立行政法人水資源機構総合技術センターマネージャー 今本 博臣
国立保健医療科学院生活環境研究部主任研究官 三浦 尚之
国立保健医療科学院研究生 井上 拓也

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

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

平成30年度 総括研究報告書

研究代表者 秋葉 道宏

(国立保健医療科学院)

平成31 (2019) 年 3月

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
総括研究報告書

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

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長

研究要旨

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A. 研究目的

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

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

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

B. 研究方法

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

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

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

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

菌の挙動について検討を行った。

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

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

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

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

C. 研究結果およびD. 考察

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

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

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

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

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

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

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

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

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

E. 結論

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

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

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

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

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

たものと考えられた。

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

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

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

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

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

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

市，同講演 CD-ROM, 2p., 2019.

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

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

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

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

平成30年度 分担研究報告書

平成31（2019）年 3月

分担研究報告書 1

藻類発生予測モデルの構築

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	西村	修
研究協力者	佐野	大輔

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける
生物障害対策の強化に関する研究
分担研究報告書

研究課題：藻類発生予測モデルの構築

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長
研究分担者 西村 修 東北大学大学院工学研究科 教授
研究協力者 佐野 大輔 東北大学大学院工学研究科 准教授

研究要旨

温暖化や湖沼の富栄養化等により、ダム湖等の閉鎖性水域で藻類が異常発生しやすい環境となり、全国の浄水場や水道事業体において異臭味問題、ろ過漏出障害等による生物障害発生が問題となっている。そこで藻類の異常発生を事前に予測し、浄水場で工学的対策を前もって施すことを目指し、藻類濃度と相関関係にあるクロロフィル a 濃度予測モデル構築を試みた。

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

ダム湖内のクロロフィル a 濃度は対数正規分布に従うと仮定し、前 7 日間最高気温平均値、1 か月前全リン濃度 (mg/L)、1 か月前全窒素濃度、および曝気装置運転の有無を説明変数としたモデルを構築することに成功した。

A. 研究目的

全国の浄水場や水道事業体において生物障害発生が問題となっており、中でも異臭味問題、ろ過漏出障害等による被害について未だに発生事例が確認されている。この背景として温暖化や湖沼の富栄養化等により、ダム湖等の閉鎖性水域で藻類が異常発生しやすい傾向に環境が変化していることがあげられる。そこでダム湖における藻類異常発生を事前に予測可能であれば、取水場所の変更や代替凝集剤の準備など、生物障害発生に対して様々な工学的対策を施すことが可能である。

本研究では、藻類濃度と相関関係にあるクロロフィル a 濃度について、事前（1 週間程度前）に予測するモデルの構築を目指した。クロロフィル a 濃度を目的変数、水質データ

と気象データを説明変数とし、一般化線形モデルと階層ベイズモデルを用いた予測モデルの構築を行った。

B. 研究方法

対象を室生ダム（奈良県）とし、目的変数として 1983-2017 年に月 1 回の定期水質調査（奈良県営水道桜井浄水場取水口、網場（室生ダム下流部））により得られたクロロフィル a 濃度を用いた。説明変数として、定期水質調査の水質データ、及び対象ダムに最も直線距離の短い針地域気象観測所の気象データを用いた（表 1）。なお、定期水質調査結果は独立行政法人水資源機構からご厚意により提供を受け、気象データは気象庁 HP の過去の気象データをダウンロードして用いた。

階層ベイズモデルによる予測モデルの構築の際には既往研究を基に説明変数の選択を行った。パラメータの推定にはマルコフ連鎖モンテカルロ法を用いた。各パラメータの事後分布から藻類の増殖因子について考察するとともに、予測値を求め測定値との比較を行った。これらの統計予測モデルの構築には統計フリーソフト R 及び Stan を用いて行った。

C. 研究結果および D. 考察

ダム湖内のクロロフィル a 濃度は対数正規分布に従うと仮定し、前 7 日間最高気温平均値、1 か月前全リン濃度 (mg/L)、1 か月前全窒素濃度、および曝気装置運転の有無を説明変数としたモデルを構築することに成功した。

前 7 日間最高気温平均値、1 か月前窒素濃度、および曝気装置運転の有無に関するパラメータの事後分布の 95%信頼区間は正に含まれたことから、これらのデータがクロロフィル a 濃度の上昇を説明していると考えられた。

階層ベイズモデルによる予測値と測定値との比較を行った (図 1, 2)。同じデータセットを用いて構築した一般化線形モデルと比べ、階層ベイズを用いて構築したモデルの決定係数が上昇したことから、風の吹き寄せによる濃度上昇や測定を行った時刻などの非生物的要因や藻類種による差など生物的

要因を階層ベイズモデルにおいて組み込むことで、予測精度が向上したと考えられる。

E. 結論

ダム湖におけるクロロフィル a 濃度の予測において、測定誤差等を考慮に入れた階層ベイズを導入することにより予測精度を向上させることに成功した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

八島将太, 西村修, 今本博臣, 佐野大輔, 半閉鎖性水域における藻類発生を予測する統計モデルの構築, 土木学会東北支部・技術研究発表会 (平成 30 年度), 2018.3, 仙台市, 同講演 CD-ROM, 2p., 2019.

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

表 1 階層ベイズモデルによる予測モデルのパラメーター一覧

説明変数	単位	説明
TP1mp	mg/L	1 か月前全リン濃度
TN1mp	mg/L	1 か月前全窒素濃度
Aeration	0 or 1	7 日間以内の曝気運転の有無
AveMaxTemp7	°C	前 7 日間最高気温の平均値
Sun7	時間	前 7 日間日照時間の合計
Rain7	mm	前 7 日間日降水量の合計
AveWind7	m/s	前 7 日間平均風速

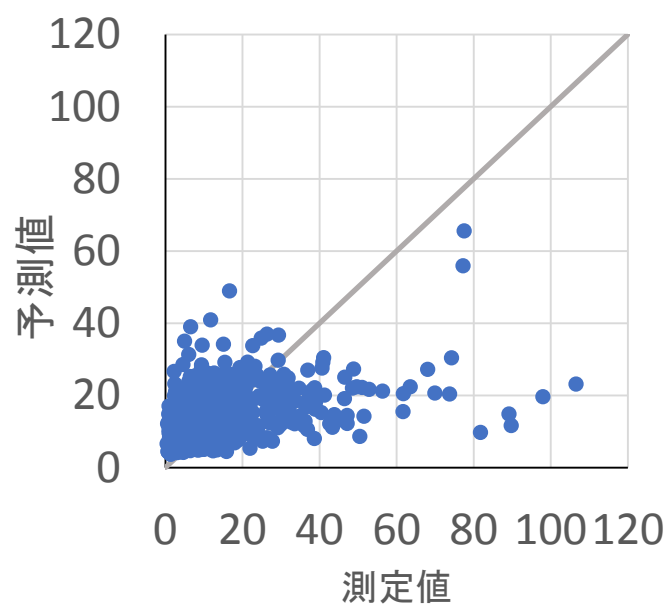


図 1 階層ベイズモデルによる予測値と測定値の比較

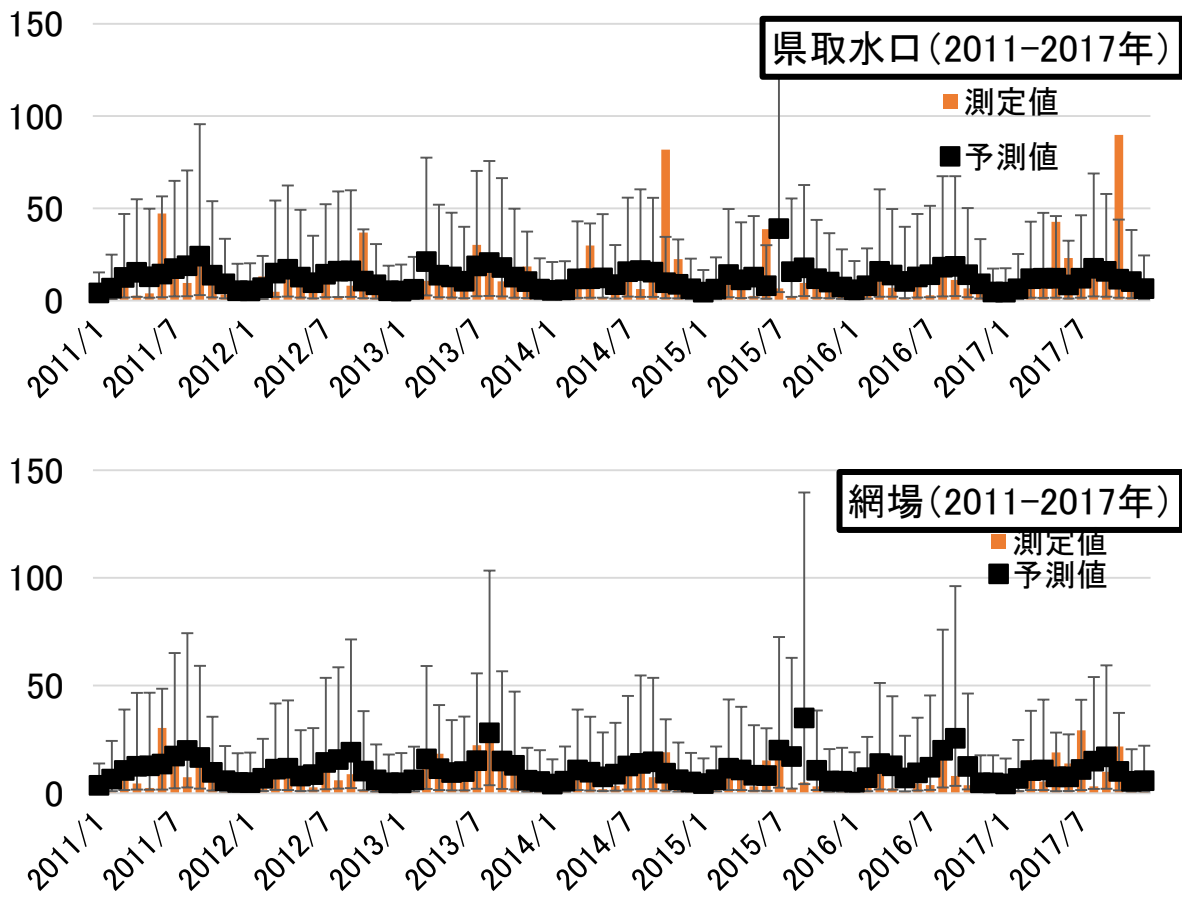


図 2 各地点での測定値と階層ベイズモデルによる予測値の関係
 (上: 奈良県営水道桜井浄水場取水口、網場(室生ダム下流部))

国内外における生物障害に関連する事例調査

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	柳橋	泰生
研究分担者	浅田	安廣
研究協力者	井上	拓也

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

「水道事業の流域連携の推進に伴う

水供給システムにおける生物障害対策の強化に関する研究」

分担研究報告書

研究課題：国内外における生物障害に関連する事例調査

研究代表者	秋葉 道宏	国立保健医療科学院	生活環境研究部	部長
研究分担者	柳橋 泰生	福岡大学工学部		教授
研究分担者	浅田 安廣	国立保健医療科学院		主任研究官
研究協力者	井上 拓也	国立保健医療科学院		研究生

研究要旨

処理技術の向上等により湖沼水質は全般的に改善されつつあるが、富栄養化等の影響による藻類の異常発生に伴う水道生物障害の被害は国内外問わず、未だに生じているのが現状である。そこで藻類の異常増殖等による生物障害の発生への対策に向けた情報収集を目的とし、日本での過去のカビ臭発生事例及び気象データとの関連性の検証、湖沼水質改善に関する中国で取組の調査を行った。

日本での過去のカビ臭発生事例調査について、平成5年から平成30年の約25年間に発行された文献やインターネットで収集した76件のカビ臭発生事例と気象データを用いて、カビ臭発生事例発生傾向と気象条件（気温、降水量、日照時間、水温）との関係性についてとりまとめた。

中国での湖沼水質改善への対策として工場排水の規制、下水道の整備、流入河川の浄化対策、浚渫、水生生物による水質浄化対策など総合的な対策の他に、導水事業による水質浄化事業の実施があげられた。

A. 研究目的

水道の水源地であるダム貯水池や湖沼等では排水などの流入により富栄養化が進み、しばしば藻類の異常増殖といった水道水源の状況悪化が問題となっている。処理技術の向上等により日本の湖沼水質は全般的に改善されつつあるが、まだ対策が必要な状況である。

日本では富栄養化等の影響による水道の異臭味等の被害は未だに生じているのが現状である。その中でも一部の藍藻類や放線菌等により産生される2-メチルイソボルネオール（以下2-MIB）やジェオスミンが原因であるカビ臭による異臭味問題は、水道の

異臭味等による被害の中で大きな割合を占めている。そのため安全でおいしい水の供給を今後も維持していく上では、カビ臭の水道水源での管理が重要となる。

一方海外に視野を向けた場合、中国では、2007年5月、水源としていた太湖におけるアオコの大発生により無錫市の水道水が汚染される事件が起こった。その後、水源湖沼の対策が進められ、汚染が激しかった太湖北東部や滇池の全窒素濃度は10年間で半減しているなどの改善がみられる。

以上、藻類の異常増殖等による生物障害の発生は国内外に問わず生じている。そこで本研究では、下記に示す内容に関して文

献調査を行った。

(1) 日本で問題となる生物障害としてカビ臭による異臭味問題を取りあげ、過去のカビ臭発生事例及び発生時の周囲の概況などを検証した。

(2) 藻類の異常発生に関連する湖沼での水質改善について、中国での対策事例を調査する。

B. 研究方法

(1) 日本全国におけるカビ臭発生事例調査

本研究では、全国のカビ臭発生状況（水源、原因物質、産生物質及び水源へ流出した要因等）や傾向を分析するため、平成5年から平成30年の約25年間において、カビ臭の発生報告が確認されている事例を公開されている各種文献やインターネットで収集し、気象等の要因との関係について解析を行った。

・事例調査

平成5年から平成30年の約25年間に発行された、公益財団法人日本水道協会発行の水道研究発表会講演集及び水道協会雑誌、日本水環境学会の講演集、株式会社産業用水調査会発行雑誌「用水と廃水」からカビ臭発生事例を調査・収集を行った。

また、CiNii Articles、J-STAGE、国会図書館デジタルコレクション、AgriKnowledgeや、インターネット検索サイト（Yahoo、Google）を用いて、カビ臭発生事例を調査・収集するとともに、地方衛生研究所及び地方環境研究所等の報告や発表論文も調査・収集した。

・気象データ

気象庁で公表されている過去の気象データから、発生事例の発生地点の月別の平均気温、降水量の合計、日降水量の最大、日照時間を収集するとともに、1981年から2010年の30年平均値も収集し、解析に使用した。なお、カビ臭は発生月前から繁殖していると考えられることから、カビ臭発

生月から前2ヶ月の気象データも含めて収集した。また、河川の水温については、国土交通省の水文水質データベースから発生年度の水温を収集した。

(2) 中国での湖沼対策事例調査

1996年からの第9次五カ年計画で「三河三湖」に指定され、重点対策がとられるようになった太湖、滇池について、富栄養化や対策実施状況を整理した。

また中国において実施されている水質汚濁対策の中で特徴的なものの一つに水質保全・改善を目的とした大規模な導水事業の実施状況、効果等について整理した。

C. 研究結果およびD. 考察

(1) 日本全国におけるカビ臭発生事例調査

各種文献やインターネットで収集した結果、76件のカビ臭発生事例を確認できた。76事例について発生地域について図1にまとめる。今回の調査では公表されているという観点より実施しているため、実際に生じている事例数とは乖離があると考えられるが、日本全国でカビ臭発生事例が確認できたことから、全国でこのような事例が発生する可能性があることが示唆された。

続いて、発生事例について、原因物質、産生物質、発生要因、カビ臭発生水域ごとに区分分けを行った。その内訳を、以下の図2から図5に示す。

カビ臭原因物質としては、2-MIBが45%と最も多く、次にジェオスミンが29%であった。

産生物質としては、70%が藍藻類によるものであった。放線菌については、これまで濁水で貯水池の水位が低下した場合に放線菌によるカビ臭発生事例が確認された。

発生要因としては、63%が自然発生であったが、人為的要因も約11%あった。人為的要因とは、工場や下水処理施設からの排水によりカビ臭が発生したものや、農業用

ため池の清掃に伴う放流水によりカビ臭が発生したもの、ダム湖の循環曝気装置の運用変更に伴い水温が上昇しカビ臭が発生したもの等、人間の行動によりカビ臭の発生に影響を与えたものとして整理した。

発生水域は、河川が42%、ダム湖が39%、池・沼が19%であった。主には閉鎖性水域において富栄養化による藻類の増殖や、底土からのカビ臭原因物質の流出が要因と考えられる。また、河川についても上流のダム湖でカビ臭原因物質が発生・放流された影響を受けたものが含まれている。

続いて、各カビ臭発生事例に対して気象データとの関連性について調査した。

まずカビ臭発生時の気温及び平年気温との関係について整理する。カビ臭発生時(カビ臭発生月の前2ヶ月含む)の月平均気温は、16°C以上で発生している割合が66%となり、比較的気温が高い時期にカビ臭が発生している傾向があった。また、1981年から2010年の30年平均値(平年値)と比較した場合、約61%が平年より月平均気温が高い時に発生しており、平年より気温が高い場合にカビ臭が発生している傾向があった。日本全体でとらえた場合、温暖な気候の地域での発生が多いことが報告されており¹⁾、気温が比較的高い場合にカビ臭が発生する可能性が高くなることが考えられる。

次いで、降水量との関係について整理する。カビ臭発生時(カビ臭発生月の前2ヶ月含む)の月間降水量について、1981年から2010年の30年平均値(平年値)と比較した場合、約56%が平年より少ない場合に発生している傾向があった。また、平年の1.5倍を越える月間降水量があった場合に発生している事例が約16%あった。そこで短時間に強雨が発生している気候とカビ臭発生状況に関係性があるのかを明らかにするため、カビ臭発生時の月間降水量と日最大降水量との関係について整理した。なお、気象庁では、1時間雨量50mm以上80mm

未満を強い降雨として定義していることから、日最大降水量が50mm以上を強い降雨があったと判断し、東京の1981年から2010年の30年平均値である月間降水量と日最大降水量50mmと比較した場合、月間降水量の約30%となったことから、30%を判断基準とした。

日最大降水量と月間降水量を比較した場合、日最大降水量が月間降水量の約30%を超えるような降雨があった場合が約59%もあり、短時間で強い降雨があった場合にカビ臭が発生している傾向があった。つまり、カビ臭発生時の降水量との関係としては、平年より降水量が少ない時に、湖沼や河川の循環速度が遅くなり、原因物質である藍藻類等が繁殖しやすいことが要因ではないかと考えられる。また、短時間で強い降雨がある時又は平年と比較して降水量が大幅に多かった場合、ダムの底水や河床に存在していた原因生物(放線菌等)が、放流や河川流量の増加により放出されることでカビ臭が発生していることが考えられる。

続いて、日照時間との関係性について整理する。カビ臭発生時(カビ臭発生月の前2ヶ月含む)の月間日照時間について、1981年から2010年の30年平均値(平年値)と比較した場合、約57%が平年より長い場合に発生している傾向があった。

カビ臭発生時の日照時間との関係としては、平年より日照時間が長い時は、藍藻類の光合成に必要な光量を得やすいため、繁殖に適した環境になることが要因と考えられる²⁾。

最後に水温との関係について整理する。ジェオスミン及び2-MIBともに、水温ピーク付近から下がり始める時期まで観測される傾向にあった。また、水温は20°C以上の高水温期に発生する傾向を示したが、2-MIBについては15°C付近での発生も見られた。ジェオスミンは発生してから終息までの期間が短く、2-MIBは長くなる傾向があった。

(2) 中国での湖沼対策事例調査

重点対策湖沼である太湖、滇池に着目し、近年のデータが公表されている太湖、滇池について、全窒素濃度および全リン濃度(年間平均値の全地点平均値)を日本の主な指定湖沼と比較した。太湖および滇池の全窒素濃度については、日本の印旛沼、手賀沼とほぼ同じ水準にあり、全リン濃度について、太湖は霞ヶ浦(西浦)と同じ水準、滇池は以前、印旛沼、手賀沼と同水準であったものが最近では霞ヶ浦(西浦)の水準まで急激に低減してきている。

Liuら(2015)は、滇池について水質や対策の状況の変遷についてレビューを行っている³⁾。国家の5カ年計画に対応して水質の状況および対策の実施状況を整理した内容を表1に示す。1986年から2000年にかけて水質は急速に悪化(5年間で全窒素濃度25.7%増加、全リン濃度37.8%増加)し、2001年から2010年にかけても速度は緩やかになりつつも悪化は継続した。しかしながら、2001年以降、10年間で41.8億米ドルの投資が行われ、分流式下水道の整備、河川改修、浚渫、導水、排水流入防止、生態系整備等が行われ、さらに2011年以降、5年間で67.2億米ドルの投資が行われ対策が継続された。その結果、2012年において、2010年と比較して、全窒素濃度は64.2%減少し、全リン濃度も77.2%減少した。

湖沼の水質保全対策としては、日中とも、工場排水の規制、下水道の整備、流入河川の浄化対策、浚渫、水生生物による水質浄化対策など総合的な対策が取られているが、中国における特徴的な対策として導水事業がある。導水事業は水不足の地域に水が豊富な地域の水を導水することが主目的であるものが多いが、太湖、滇池等では水質改善を目的に実施されており、重点対策湖沼である巢湖でも事業が計画されている。

太湖での導水事業としては「引江濟太」があり、長江の水を太湖に導水する事業で

ある。当初の目的は、太湖の洪水に対応するため太湖の水を排除することであったが、現在では、太湖流域の水質の悪化を緩和し、流域の水環境を改善して、水の流動速度を加速して太湖の換水周期を短縮することにある。また、滇池での導水事業として流域外の牛欄江にダムを建設し、揚程233mのポンプでダムの水を滇池流域内の河川に導水し滇池に水を送る事業がある。2007年以降、滇池は水道水源として利用されていないが、補水事業により滇池に清浄な水を補充し、滇池の水環境を改善し、昆明で水不足に陥った際に、滇池の水を都市生活用水と工業用水として供給することとしている。

以上、湖沼環境は複雑であり、水質の保全・改善には、個々の条件に対応した種々の対策を講ずる必要がある。中国においては、長年、その対策の一つとして大規模な導水事業による湖沼の水質改善が図られてきており、生態系への影響を含め知見が蓄積されつつある。

E. 結論

藻類の異常増殖等による生物障害の発生への対策に向けた情報収集を目的とし、(1)日本での過去のカビ臭発生事例及び気象データとの関連性の検証、(2)湖沼水質改善に関する中国で取組の調査を行った。

(1)全76件の事例調査結果から国内におけるカビ臭発生状況の傾向と発生要因に関わる気象条件について以下にまとめる。

- 発生物質...2-MIBが45%と最多、次にジェオスミンが29%
- 発生要因...自然発生が多い(63%)
- 発生水域...河川が42%、ダム湖が39%、池・沼が19%
- 気温...月平均気温が16℃以上
- 降水量...平年より降水量が少ない場合、また短時間で強い降雨がある場合
- 日照時間...月間日照時間が平年より長い場合

●水温...20℃以上で発生。2-MIB については15℃付近での発生も見られた。水温ピーク付近から下がり始める時期まで発生。

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

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

柳橋泰生, 楊露. 中国におけるアオコ等の水質汚濁に関する文献調査. 第53回日本水環境学会年会講演集, 甲府市, 2019.3, 同講演集, p.219.

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) 日本水道協会 : 生物起因の異臭味水対策の指針, 日本水道協会, 東京, 345p, 1999.

2) 三崎 貴弘, 土屋 十圀: 河川の光環境と濁度が付着藻類の増殖速度に与える影響に関する研究, 環境システム研究論文集, Vol.36, pp.437-444, 2008.

3) Liu W., Wang S., Zhang L., Ni Z.: Water pollution characteristics of Dianchi Lake and the course of protection and pollution management, *Environ. Earth Sci.*, Vo. 74(5), pp.3767-3780, 2015.

J. 謝辞

本研究(1)については国立保健医療科学平成30年度院水道工学研修の一部として実施し、当研修の研修生であった愛知県企業庁吹元雅崇氏、奈良県水道局西浦優己氏、横浜市水道局太田真吏男氏、神奈川県内広域水道企業団林心平氏に全面的な協力を得ました。記して謝意を表します。

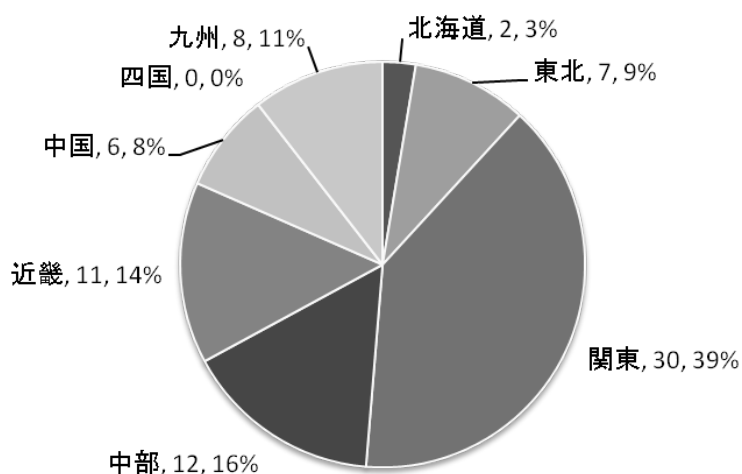


図1 文献調査で得られた全76事例におけるカビ臭発生地域の内訳

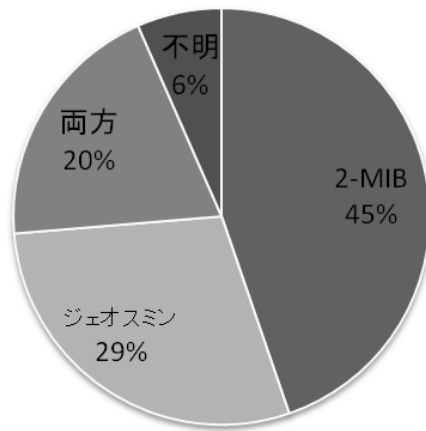


図 2 文献調査で得られた全 76 事例におけるカビ臭原因物質の内訳

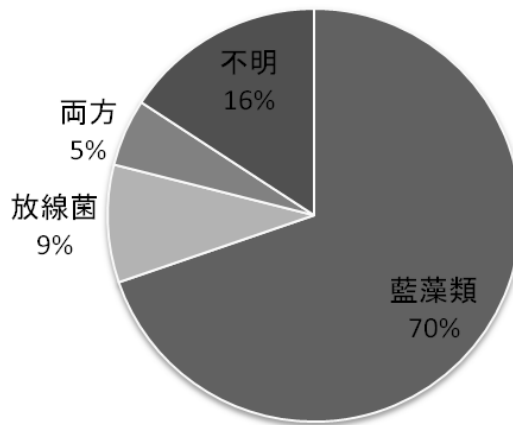


図 3 文献調査で得られた全 76 事例におけるカビ臭原因物質産生生物の内訳

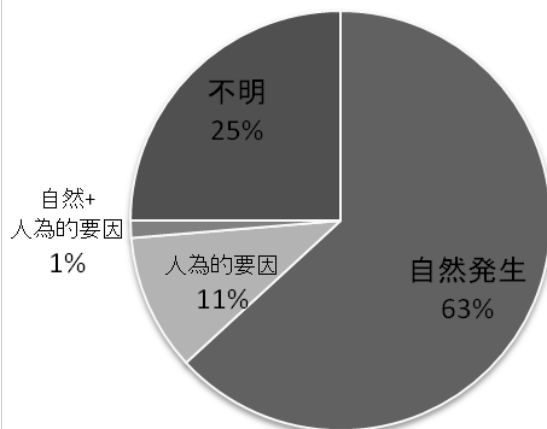


図 4 文献調査で得られた全 76 事例におけるカビ臭発生要因の内訳

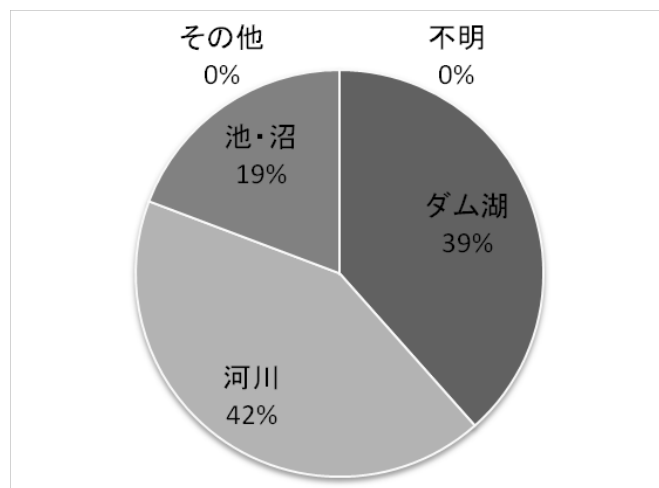


図 5 文献調査で得られた全 76 事例におけるカビ臭発生水域の内訳

表 1 滇池の水質の状況および対策の実施状況³⁾

年代	5 箇年計画	水質の状況	対策の実施状況
1986～2000	第7次～第9次	【急速悪化期】 ・経済の高度成長 ・点源・非点源とも増加 ・草海（昆明近傍）で5年毎にTN濃度が25.7%、TP濃度が37.8%増加	【開始期】 ・工場廃水対策の実施 ・しかし、生活廃水や非点源による汚染が増加 ・1996年、国が「三河三湖」の一つに指定
2001～2010	第10次～第11次	【緩速悪化期】 ・草海で5年間でTN濃度が13.4%、TP濃度が5.4%増加 ・外海（草海以外の大部分）でTN濃度が24.8%、TP濃度6.6%増加	【格闘期】 ・汚染対策に10年間で41億8千万米ドル投資 ・分流式下水道の整備、河川改修、浚渫、導水、廃水流入防止、生態系整備等
2011～2015	第12次	【改善予備期】 ・2012年、TN濃度3.99mg/L(64.2%減)、TP濃度0.14mg/L(77.2%減)(2010年比)	【達成予備期】 ・汚染対策に5年間で67.2億米ドル投資 ・汚濁負荷の削減強化のほか、汚染対策の新しい手法も検討

カビ臭原因物質産生藍藻類の
ライブラリ作成に向けた実態調査

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	藤本	尚志
研究分担者	浅田	安廣
研究協力者	井上	拓也

厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)
「水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける
生物障害対策の強化に関する研究」
分担研究報告書

研究課題：カビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリ作成に向けた実態調査

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長
研究分担者 藤本 尚志 東京農業大学応用生物科学部 教授
研究分担者 浅田 安廣 国立保健医療科学院 主任研究官
研究協力者 井上 拓也 国立保健医療科学院 研究生

研究要旨

温暖化や湖沼の富栄養化等による水源水質の悪化により藻類が異常発生し、水道でのカビ臭発生事例が確認されているため、その対策に向けて原因解明が求められている。カビ臭原因物質を産生する主な原因生物として藍藻類があげられるが、その中にはカビ臭産生種/非産生種が混在しているため、カビ臭を産生する種についてデータ収集を行うと同時にその特徴について整理を行っていく必要がある。

本研究ではカビ臭原因物質が確認された水源から単離された藻類株について形態による分類、16S rRNA 遺伝子の塩基配列、カビ臭物質合成酵素遺伝子の塩基配列、カビ臭産生の有無についてデータを集積した。

琵琶湖を対象として、単藻培養できた藍藻類 12 株について 16S rRNA 遺伝子解析、カビ臭物質合成酵素遺伝子解析、カビ臭産生の有無について調査を行なった。その結果、*Plankthothricoides raciborskii* に近縁な N-3 株および N-4 株が 2-MIB 合成酵素遺伝子を保有し、2-MIB を産生することが明らかとなった。その一方で、16S rRNA 遺伝子解析のみではジェオスミン産生種の判定が難しい可能性が考えられ、産生種の判定には *geoA* 遺伝子の有無の判定が重要であることが明らかとなった。

A. 研究目的

温暖化や湖沼の富栄養化等による水源水質の悪化により水道障害生物が異常発生し、様々な生物障害事例を引き起こしている。その中でも水道水の異臭味被害の一つであるカビ臭発生事例は多くの事業体で確認されているため、その原因解明とそれに合わせた対応が早急に求められる。

カビ臭の原因物質はジェオスミンと 2-MIB(2-メチルイソボルネオール)であり、それらを産生する主な原因生物として藍藻類があげられる。しかし、その中にはカビ臭産生種/非産生種が混在しているため、カビ臭を産生する種についてデータ収集を行うと同時にその特徴について整理を行っていく必要がある。

そこでカビ臭原因物質が確認された水源から単離された藻類株について形態による分類、16S

rRNA 遺伝子の塩基配列、カビ臭物質合成酵素遺伝子の塩基配列、カビ臭産生の有無についてデータを集積し、データベースを作成することを本研究テーマの最終目標とした。そして平成 30 年度の取り組みとして、琵琶湖を対象として藍藻類の単離を行い、上述した情報について収集を行った。

B. 研究方法

京都市上下水道局の協力を得て、琵琶湖南湖(6-8 月、月 1 回)、琵琶湖北湖(8 月 1 回)において採水を行った。採水した試料に対して静置状態(浮遊性)、混和状態(浮遊性、付着性混合)の試料を準備し、ピペット洗浄法により各試料から藍藻類の単藻(条件:CT 培地、20 °C、1000-2500 Lux、明暗 12 時間)を試みた。

単藻できた株については CT 培地で、20 °C、

1000 Lux、明暗 12 時間の条件で培養を行った。そして同条件で継代培養(培地:10 mL)・大量培養(培地: 100 mL)を行い、遺伝子解析とカビ臭原因物質検出に供した。

遺伝子解析では、培養液を 0.45 μ m メンブレンフィルターで捕捉して凍結させた後、DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN)により DNA 抽出を行った。その後、16S rRNA 遺伝子解析¹⁾、カビ臭物質合成酵素遺伝子解析(*geoA* 遺伝子、2-MIB 合成遺伝子)²⁾を行った。なお、PCR による増幅産物は 1.5%アガロースゲルによる電気泳動でバンドを確認した。そして、精製した DNA 試料(各増幅プライマーを含む)をユーロフィン社に依頼して DNA 配列情報を取得、EMBL-EBI Sequence Similarity Searching により相同性解析を行った。

カビ臭物質検出には、大量培養した培養液に対して藻体を含む試料(総濃度)と 25 mm GD/X シリジフィルター (GMF 0.45 μ m 滅菌済) でろ過した試料(溶存態濃度)について、SPME-GC/MS システム (Agilent 5973C GC/MSD, Agilent 及び Multiple Sampler MPS, Gerstel) を用いて、表 1 に示した条件によりジェオスミン・2-MIB 濃度を測定した。

C. 研究結果および D. 考察

本調査では、12 株の藍藻類が単藻培養できた(写真 1~11)。

各名称と試料の関係は以下の通りである。

- ・琵琶湖南湖(B-1 株、B-3 株、B-4 株、B-5 株、B-6 株、B-7 株、B-9 株、Y-1 株)
- ・琵琶湖北湖(N-1 株、N-2 株、N-3 株、N-4 株)

その中で、*geoA* 遺伝子を保有する株は見られなかった(図 1、2)。2-MIB 合成遺伝子については N-3 株、N-4 株で検出された(図 3)。単離株について 16S rRNA 遺伝子を解析したところ単離株は *Dolichospermum* 属、*Limnothrix* 属、*Planktothricoides* 属に近縁であった(表 1、図 4~5)。

ネンジュモ目の系統樹において、B-3 株は、*geoA* 遺伝子を有し、ジェオスミンを産生する *Dolichospermum mucosum*4-10 株と同様の位置に位置づけられたが、*geoA* 遺伝子を保有せず、さらに GC-MS による解析でもジェオスミンが検出しなかったことから、ジェオスミンを生成しないことが明らかとなった。16S rRNA 遺伝子では、産生種・非産生種の判定が出来ず、*geoA* 遺伝子の有無

の評価が重要であると考えられた。

2-MIB 合成酵素遺伝子を保有する N-3 株、N-4 株からは 2-MIB が検出され(図 6)、2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹では、*Planktothricoides raciborskii* CHA3331 と同じ位置に位置づけられた(図 7)。

E. 結論

琵琶湖を対象として、単藻培養できた藍藻類 12 株に対して 16S rRNA 遺伝子解析、カビ臭物質合成酵素遺伝子解析、カビ臭産生の有無について調査を行なった。その結果、2-MIB 産生種が明らかとなり、さらに 2-MIB 合成酵素遺伝子を保有していることが確認された。その一方で、16S rRNA 遺伝子解析のみではジェオスミン産生種の判定が難しい可能性が考えられ、産生種の判定には *geoA* 遺伝子の有無判定が重要であることを指摘した。

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

浅田安廣, 藤本尚志, 高橋可穂美, 井上拓也, 秋葉道宏. カビ臭産生藍藻類のライブラリ作成に向けた試み-琵琶湖流域に生息する藍藻類の調査-. 第 53 回日本水環境学会年会, 2019.3, 甲府市, 同講演集, p.104.

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) Beltran EC, Neilan BA.: Geographical Segregation of the Neurotoxin-Producing Cyanobacterium *Anabaena circinalis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.66(10), pp.4468-4474, 2000.

2) Suurnäkki S, Gomez-Saez GV, Rantala-Ylinen A, Jokela J, Fewer DP, Sivonen K: Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds, Water Res., Vol.68, pp.56-66,

2015..

J. 謝辞

本研究を進めるに当たり、京都市上下水道局の協力を得ました。記して謝意を表します。



写真1 B-1株の顕微鏡写真

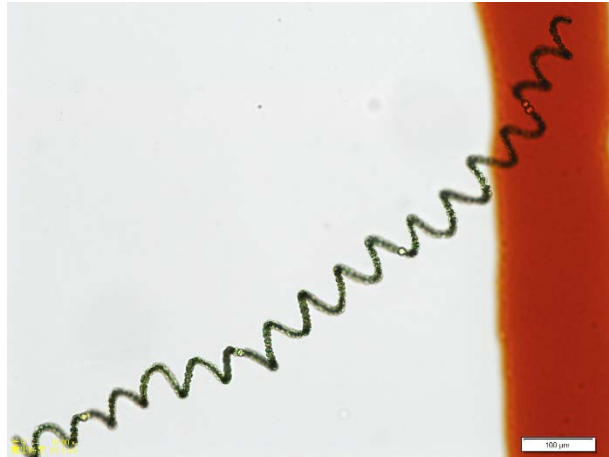


写真2 B-3株の顕微鏡写真

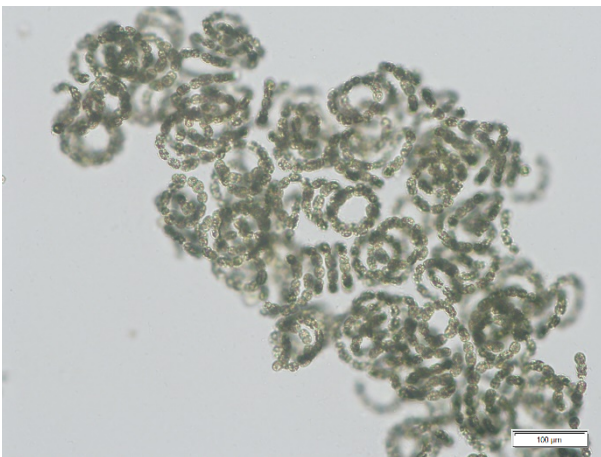


写真3 B-4株の顕微鏡写真

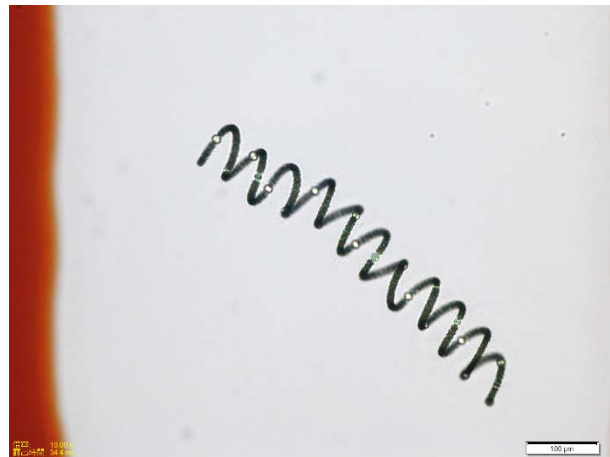


写真4 B-5株の顕微鏡写真

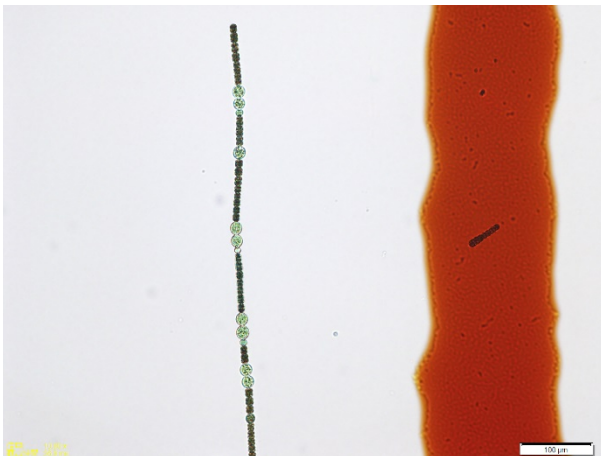


写真5 B-6株の顕微鏡写真

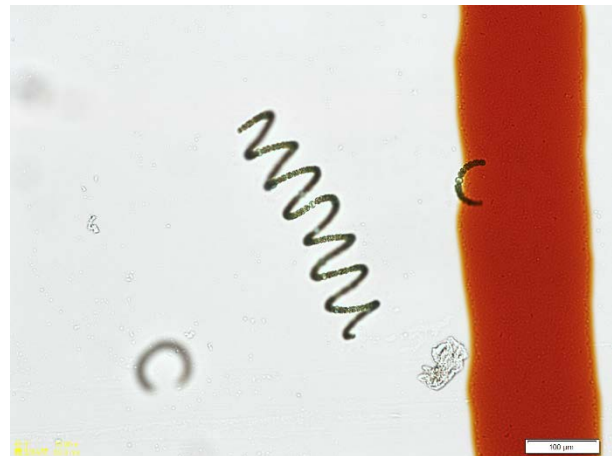


写真6 B-7株の顕微鏡写真



写真 7 B-9 株の顕微鏡写真

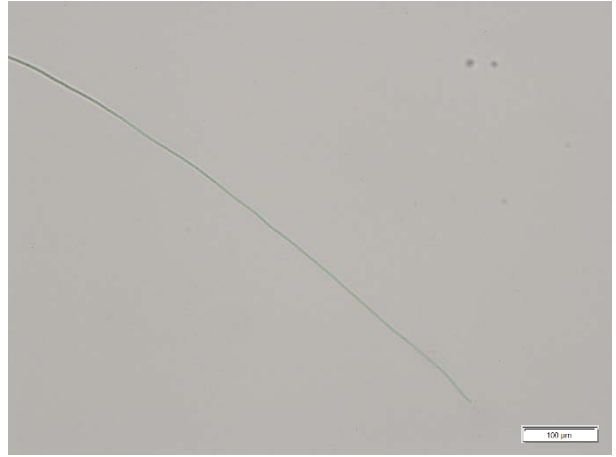


写真 8 N-1 株の顕微鏡写真

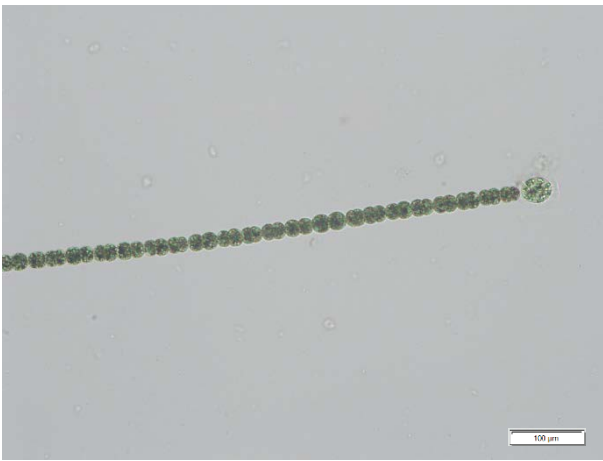


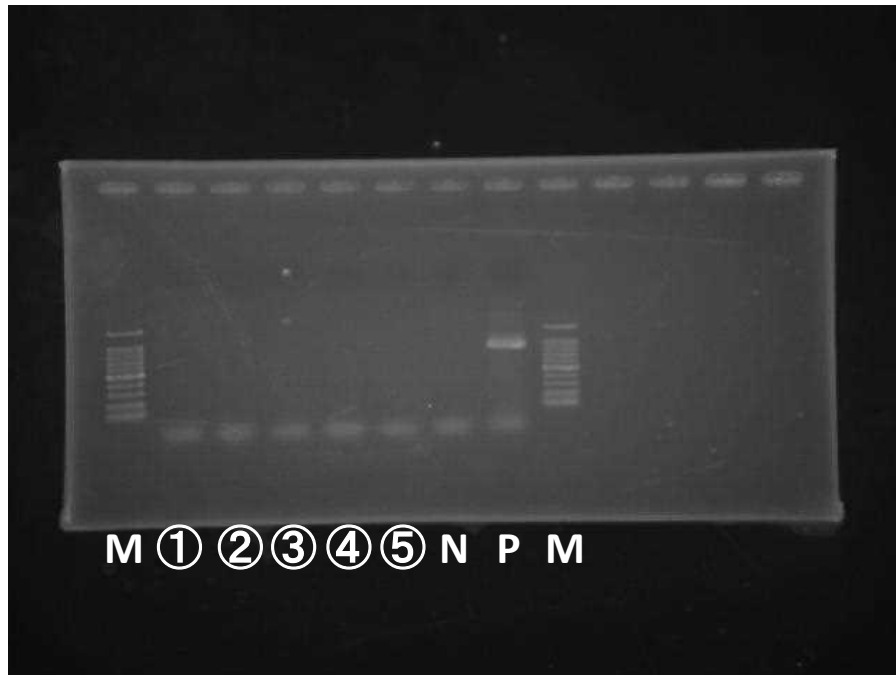
写真 9 N-2 株の顕微鏡写真



写真 10 N-3 株の顕微鏡写真



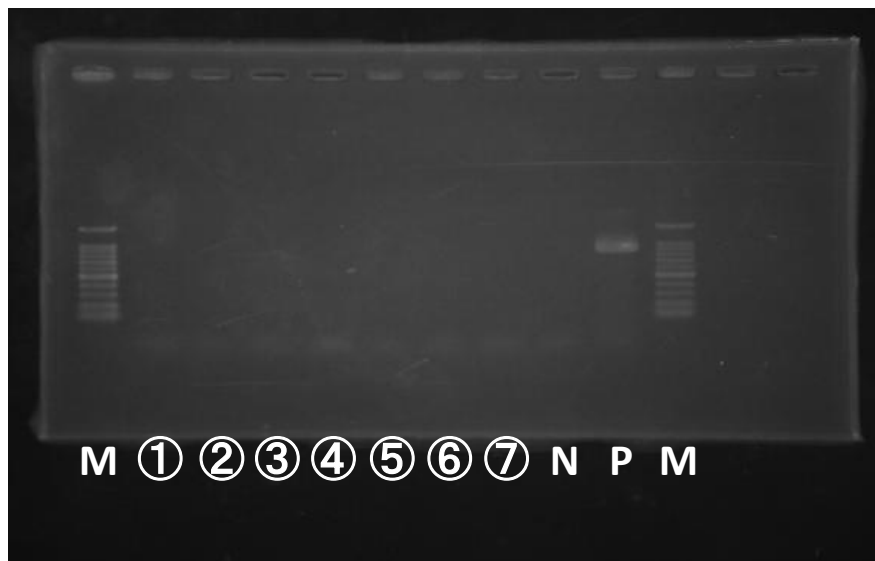
写真 11 Y-1 株の顕微鏡写真



- ① B-1
- ② B-3
- ③ B-5
- ④ B-6
- ⑤ B-7
- N ネガコン
- P ポジコン
- (KK-1)
- M: 100bp
- DNA ladder

プライマー : geo78F, geo982R

図1 単離株の *geoA* 遺伝子の増幅結果



- ① N-1
- ② N-2
- ③ N-3
- ④ B-4
- ⑤ B-9
- ⑥ B-10
- ⑦ Y-1
- N ネガコン
- P ポジコン
- (KK-1)
- M: 100bp
- DNA ladder

プライマー : geo78F, geo982R

図2 単離株の *geoA* 遺伝子の増幅結果



① N-1
 ② N-2
 ③ N-3
 ④ B-4
 ⑤ B-9
 ⑥ B-10
 ⑦ Y-1
 N ネガコン
 P ポジコン
 (霞ヶ浦)
 M:100bp
 DNA ladder

プライマー: MIB3313F, MIB4226R

図3 単離株の2-MIB合成遺伝子の増幅結果

表1 単離株の16S rRNA遺伝子の相同性検索結果、カビ臭合成遺伝子の有無
 空欄はデータがない、+は検出された、-は検出されなかったことを示す。

単離株	近縁種(相同性%)	geoA遺伝子	2-MIB合成遺伝子
B-1	<i>Anabaena mucosa</i> 1tu35s5 (100)	—	
B-3	<i>Dolichospermum mucosum</i> 06-04 (99.9) <i>Dolichospermum circinale</i> 04-58 (99.9)	—	
B-4		—	—
B-5	<i>Dolichospermum planctonicum</i> NIES-834 (100) <i>Anabaena circinalis</i> 1tu34s5 (100)	—	
B-6	<i>Dolichospermum mucosum</i> 08-03 (100) <i>Anabaena planctonica</i> 1tu36s8 (100)	—	
B-7	<i>Dolichospermum planctonicum</i> NIES-834 (100) <i>Anabaena circinalis</i> 1tu34s5 (100)	—	
B-9	<i>Dolichospermum pseudocompactum</i> NIES-1684(100)	—	—
N-1	<i>Limnothrix</i> sp. NIES-3735 (100)	—	—
N-2	<i>Dolichospermum smithii</i> NIES-824 (100)	—	—
N-3		—	+
N-4	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES-207 (100)		+
Y-1		—	—

B: 琵琶湖南湖分離株
N: 琵琶湖北湖分離株

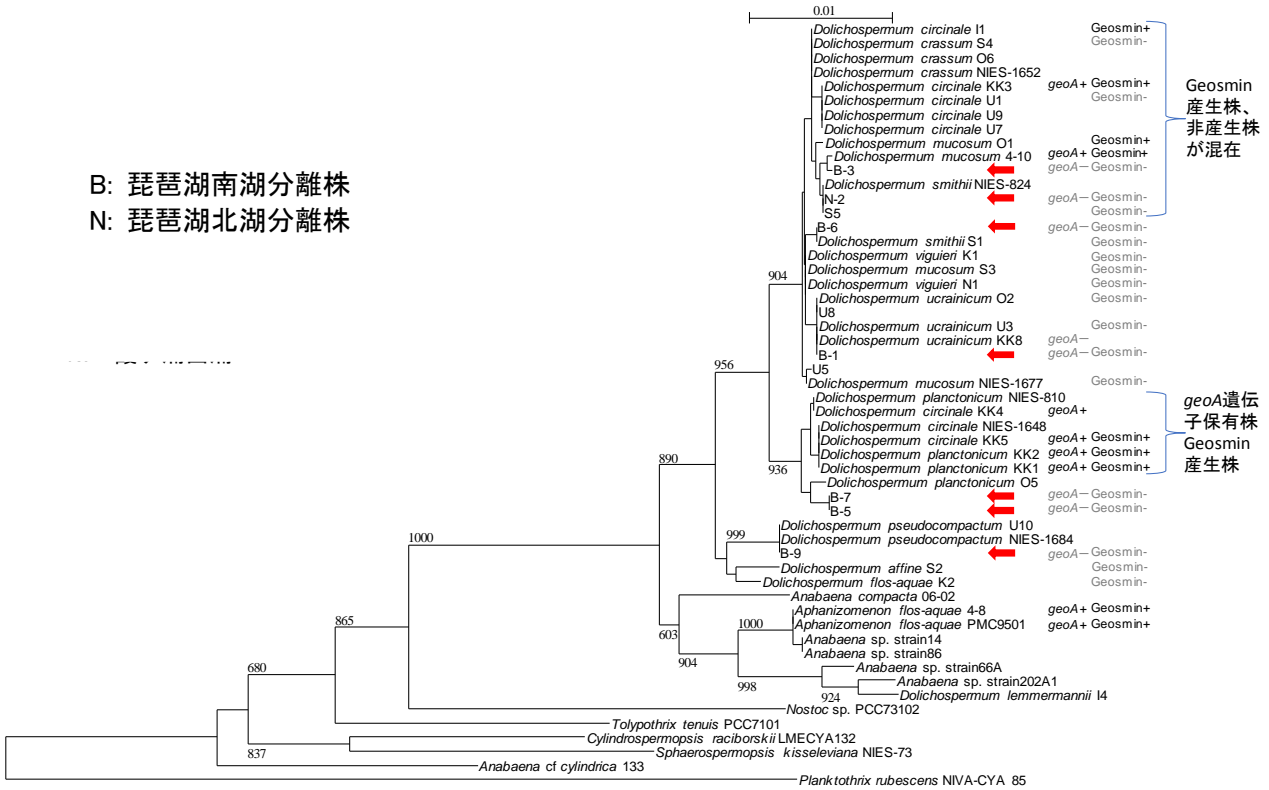


図4 藍藻綱ネンジュモ目の系統樹
単離株および既知種の16S rDNA 遺伝子約1265塩基に基づいて作成

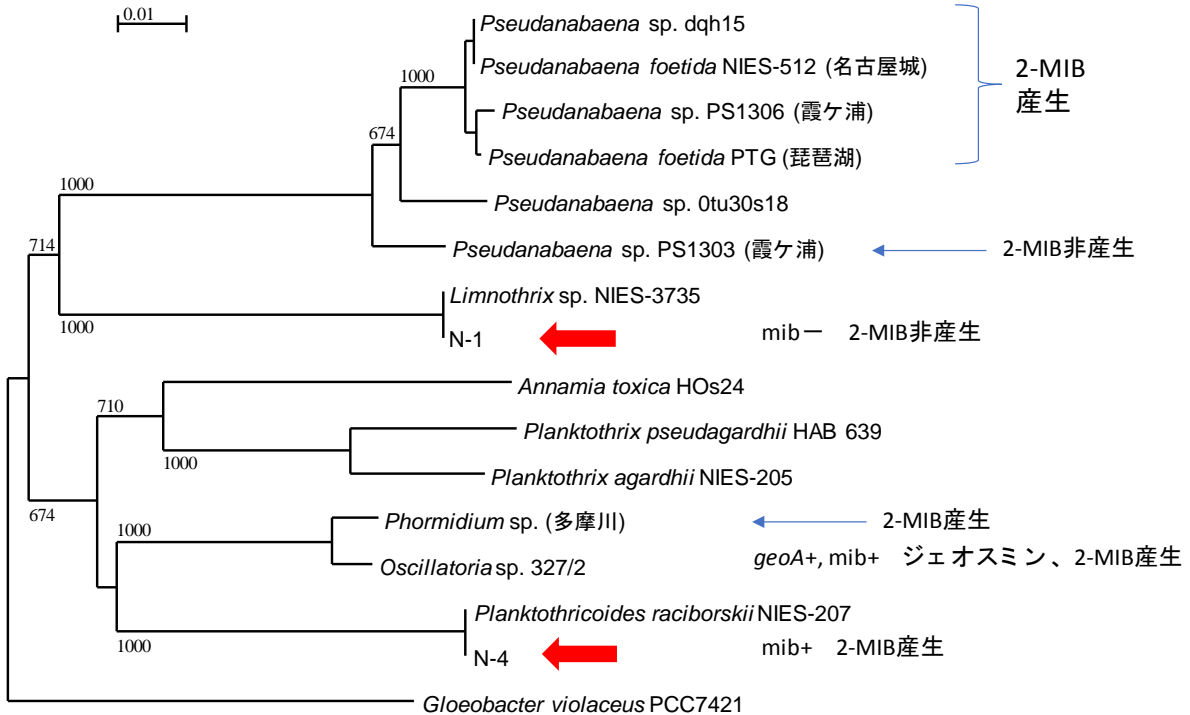


図5 藍藻綱ユレモ目の系統樹
単離株および既知種の16S rDNA 遺伝子約1285塩基に基づいて作成

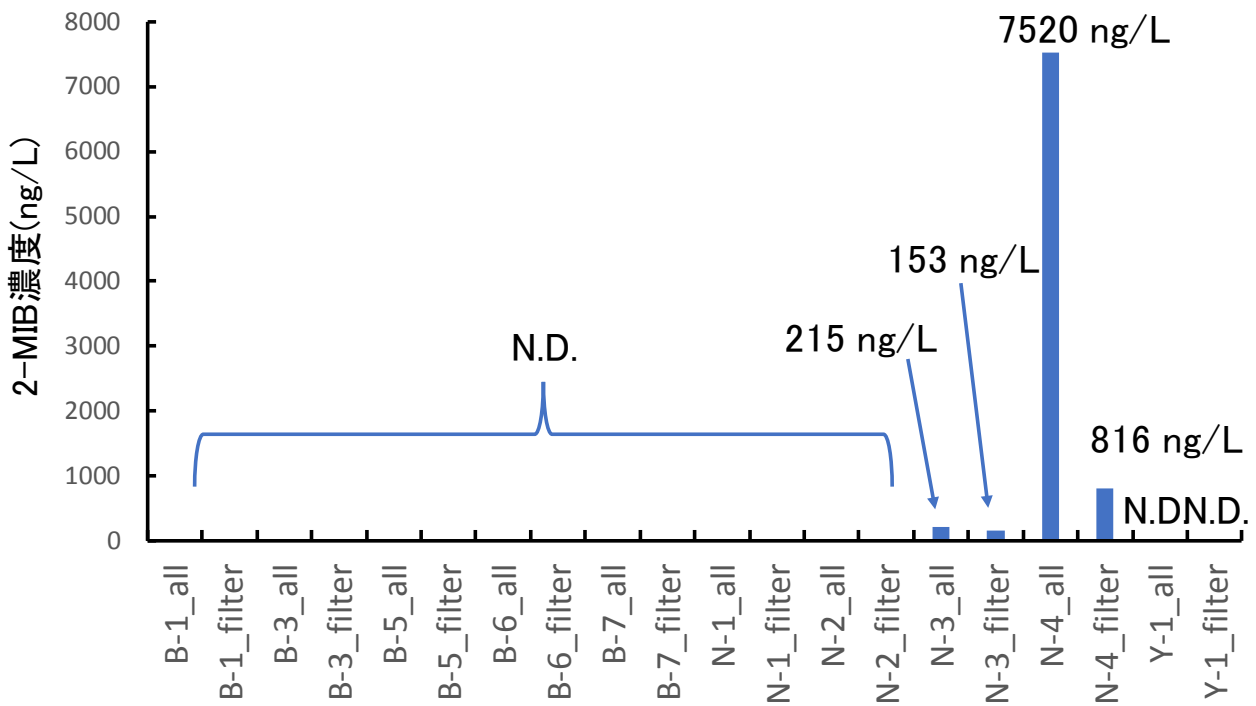


図6 単離培養株の2-MIB分析結果

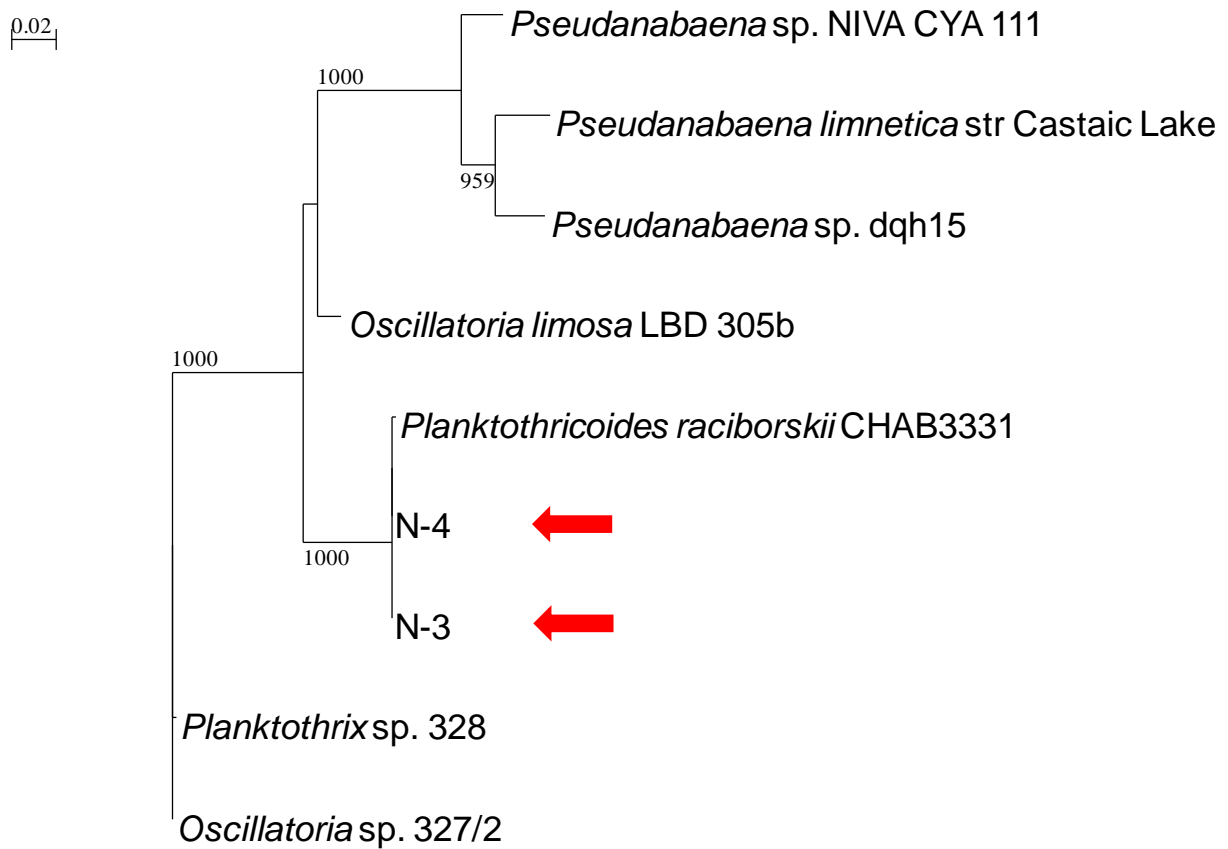


図7 2-MIB合成遺伝子に基づく系統樹
単離株および既知種の2-MIB合成遺伝子672塩基に基づいて作成

浄水プロセスにおける障害生物の挙動解明

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	藤本	尚志
研究協力者	藤瀬	大輝

厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)
「水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける生物障害対策の強化に関する研究」
分担研究報告書

研究課題：浄水プロセスにおける障害生物の挙動解明

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長
研究分担者 藤本 尚志 東京農業大学応用生物科学部 教授
研究協力者 藤瀬 大輝 川崎市上下水道局水管理センター水道水質課 担当係長

研究要旨

浄水処理のコストや、衛生管理の観点から、処理工程における微生物の挙動を把握することは重要である。これまで、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングを用いて、浄水場処理工程水の微生物相を解析してきた。その結果、各処理工程水は細菌の占める割合が高く、ろ過漏出障害の原因となる可能性が示唆された。また、沈澱処理水とろ過水間で、微生物相が大きく変化することが明らかになった。そこで本研究では浄水場における細菌の挙動を明らかにするため、川崎市上下水道局長沢浄水場の原水、沈澱処理水、ろ過水の細菌相について PMA-PCR 法を用いて生菌と死菌を識別して評価した。

原水において PMA 処理の有無による微生物相の違いは、8 月、9 月ともに、綱レベルでも属レベルでもみられなかった。PMA 処理の有無における微生物相から評価した結果、沈澱処理水における主要な生菌は、*Sphingomonas* 属、*Methylocystis* 属、*Methylobacterium* 属であると考えられた。ろ過水における主要な生菌は、*Sphingomonas* 属、*Methylocystis* 属であると考えられた。これらは、沈澱処理水から流入したものと考えられた。以上の結果から PMA-PCR 法により浄水場処理工程水中の生菌の挙動を評価できることが示唆された。

A. 研究目的

浄水処理のコストや、衛生管理の観点から、処理工程における微生物の挙動を把握することは重要である。これまで、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングを用いて、浄水場処理工程水の微生物相を解析してきた。その結果、各処理工程水は真正細菌の占める割合が高く、ろ過漏出障害の原因となる可能性が示唆された。また、沈澱処理水とろ過水間で、微生物相が大きく変化することが明らかになった¹⁾。

そこで本研究では、PMA 処理を行った系と行わない系の微生物相を比較し、処理工程水中の生菌を評価するとともに、処理工程における生菌の挙動について検討を行った。

B. 研究方法

供試試料は、相模湖を取水源とする川崎市上下

水道局長沢浄水場の原水、沈澱処理水、ろ過水を用いた。調査は 2018 年 8 月、9 月に行った。

PMA 処理には PMAxxTM (Biotium 社)を用い、集菌後のフィルターに添加し、暗所で反応後、光照射したのち、DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN 社)を用いて DNA 抽出を行った。また、集菌後に PMA 処理をせず、DNA 抽出を行ったものを対照系として比較を行った。

DNA 抽出物と、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域をターゲットとしたプライマーセットを用いて PCR 増幅した。シーケンスは Miseq を用いて行い、シーケンスデータの解析は QIIME2 で行った。

C. 研究結果および D. 考察

1) 処理工程にともなう微生物相の変化(PMA 未処理)

微生物相の評価は、無作為の 30,000 リードを用

いて行った。各処理工程水の微生物相において、原水は Betaproteobacteria 綱と Actinobacteria 綱、沈澱処理水は Alphaproteobacteria 綱、Betaproteobacteria 綱、Cytophagia 綱、Sphingobacteriia 綱、ろ過水は Alphaproteobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱、Cytophagia 綱によって主に構成されていた (図 1)。

微生物相は、原水から沈澱処理水にかけて変化しており、原水中の Actinobacteria 綱 (hgcl clade) と others に含まれる分類群が前塩素処理や凝集沈澱処理により減少し、沈澱処理水において Alphaproteobacteria 綱 (*Sphingomonas* 属、*Methylocystis* 属)、Cytophagia 綱 (*Pseudarcicella* 属)、Sphingobacteriia 綱 (*Sediminibacterium* 属) の割合が増加した。また、ろ過処理により Betaproteobacteria 綱 (*Limnohabitans* 属、*Polynucleobacter* 属、*Undibacterium* 属) と Sphingobacteriia 綱 (*Sediminibacterium* 属) の割合が減少し、Alphaproteobacteria 綱 (*Sphingomonas* 属、*Methylocystis* 属、*Methylobacterium* 属) と Gammaproteobacteria 綱 (*Enhydrobacter* 属、*Methylobacter* 属) の割合が増加した。このうち、*Limnohabitans* 属、*Sediminibacterium* 属、*Sphingomonas* 属、*Methylobacterium* 属、*Enhydrobacter* 属は、これまでの検討¹⁾においてもろ過水において、総リード数の 5%以上を占めることがあった。

2) PMA 処理の有無による微生物相の違い

原水において PMA 処理の有無による微生物相の違いは、8 月、9 月ともに、綱レベルでも属レベルでもみられなかった。

沈澱処理水では、両方の月で違いがみられ、PMA 処理にともない Betaproteobacteria 綱 (*Limnohabitans* 属、*Polynucleobacter* 属)、Cytophagia 綱 (*Pseudarcicella* 属)、Sphingobacteriia 綱 (*Sediminibacterium* 属) の割合が減少し、Alphaproteobacteria 綱 (*Sphingomonas* 属、*Methylocystis* 属、*Methylobacterium* 属)、Gammaproteobacteria 綱 (*Methyloparacoccus* 属、*Methylobacter* 属) の割合が増加した。なお、8 月は Cytophagia 綱の割合に大きな変化はなかったが、*Pseudarcicella* 属の割合の減少と、*Spirosoma* 属の割合の増加がみられた。

ろ過水では、8 月は綱レベルで特徴的な違いは

みられなかったが、PMA 処理にともない *Spirosoma* 属と、Alphaproteobacteria 綱内における *Methylobacterium* 属の割合の減少と、*Phreatobacter* 属の割合の増加がみられた。9 月は PMA 処理にともない Betaproteobacteria 綱 (*Limnohabitans* 属、*Polynucleobacter* 属)、Cytophagia 綱 (*Pseudarcicella* 属)、Sphingobacteriia 綱 (*Sediminibacterium* 属) の割合が減少し、Alphaproteobacteria 綱 (*Sphingomonas* 属、*Methylocystis* 属、*Phreatobacter* 属) の割合が増加した。

E. 結論

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

ろ過水における主要な生菌は、*Sphingomonas* 属、*Methylocystis* 属であった。これらは、沈澱処理水から流入したものと考えられた。

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

渡邊英梨香，清水瑠花，藤本尚志，蔣紅与，大西章博，志波優，藤瀬大輝，秋葉道宏. PMA 処理を用いた浄水場処理工程水の微生物相解析. 第 53 回日本水環境学会年会，2019.3.，甲府市. 同講演集，p.159.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

I. 参考文献

1) 渡邊英梨香，藤本尚志，大西章博，鈴木昌治，藤瀬大輝，松倉智子，秋葉道宏. 浄水場処理工程水

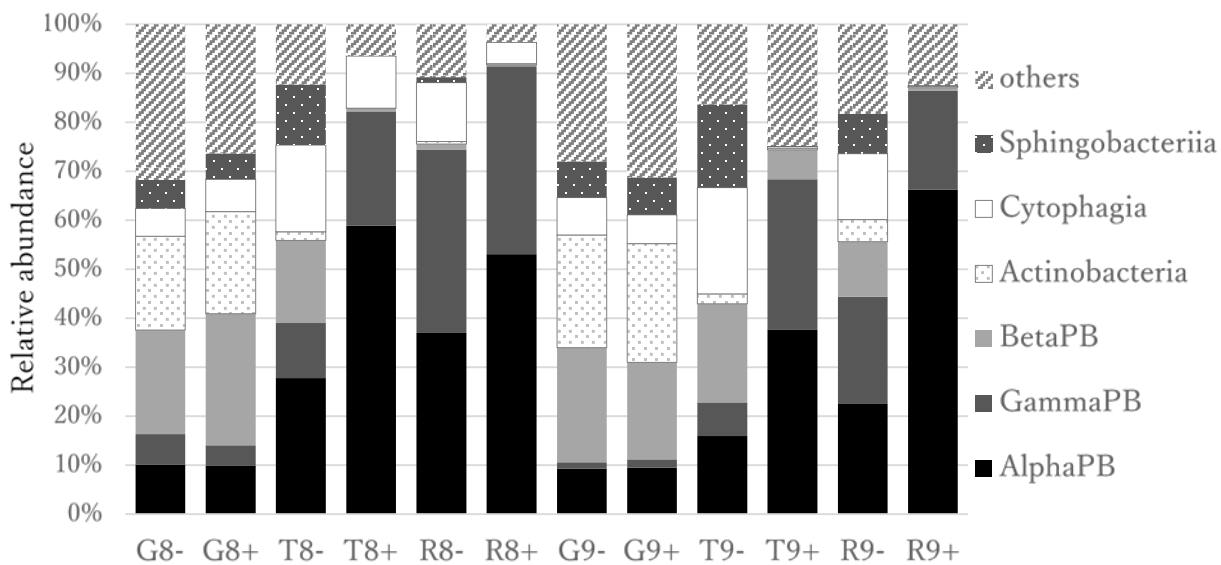


図 1 各試料の PMA 処理の有無における微生物相 (綱レベル)
 (G 原水、T 沈澱処理水、R ろ過水、- PMA 処理なし、+PMA 処理あり)

精密分析による水道水原水中
溶存有機物の特性解析

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	越後	信哉

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける
生物障害対策の強化に関する研究」
分担研究報告書

研究課題： 精密分析による水道水原水中溶存有機物の特性解析

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長
研究分担者 越後 信哉 国立保健医療科学院 上席主任研究官

研究要旨

全国 22 か所の水道原水について、Orbitrap 質量分析計を用いた精密質量分析により原水中溶存有機物(DOM)に関する情報を収集し、その特徴や共通点を調査した。その結果、湖沼の DOM スペクトルには、他の原水と共通する組成式がなく、低分子の化合物が多く存在していることが分かった。一方で、地理的に離れていても湖沼間ではスペクトルは類似していた。また、主成分分析の結果、原水水質を湖沼・島嶼等のグループを捉えることができた。以上の結果から、DOM の精密質量分析により、微生物の異常増殖等 DOM の極端な変化を検知できる可能性を指摘した。

A. 研究目的

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

そこで本研究では、水道原水中 DOM の精密質量分析による生物障害予測の端緒として、全国の水道原水について、Orbitrap 質量分析計による精密質量分析を適用し、水道原水の識別を試み、精密質量分析に基づいた DOM の変化検知のための基礎的知見を収集した。

B. 研究方法

1. 試料の選定及び前処理

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

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

2. 精密質量分析条件の検討

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

3. Orbitrap 質量分析計における全国の水道原水の比較

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

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

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

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

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

C. および D. 研究結果及び考察

1. DOM の回収率

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

2. 精密質量分析条件の検討

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

3. Orbitrap 質量分析計における全国の水道原水比較

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

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

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

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

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

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

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

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

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

No. 8 及び No. 13 は大規模の湖沼水である。また、

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

以上より、精密質量スペクトルを因子分析により原水の DOM のグループ分けを行うこと可能であること、特に湖沼の影響を捉えることができることを示した。

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

E. 結論

全国 22 か所の水道原水について、Orbitrap 質量分析計を用いた精密質量分析により DOM の構造等の解析を行い、その特徴や共通点を調査した。

- 湖沼の DOM スペクトルには、他の原水と共通する組成式がなく、低分子の化合物が多く存在していることが分かった。一方で、地理的に離れていても湖沼間ではスペクトルは類似していた。

- 主成分分析の結果、原水水質を湖沼・島嶼等のグループを捉えることができ、微生物の異常増殖等 DOM の極端な変化を検知できる可能性を示した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

I. 謝辞

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

J. 参考文献

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

表1 実験に用いた水道原水

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

原水種別は水道統計（平成28年度版）による

表2 試料注入条件

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

表3 Orbitrap質量分析計のパラメータ条件

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

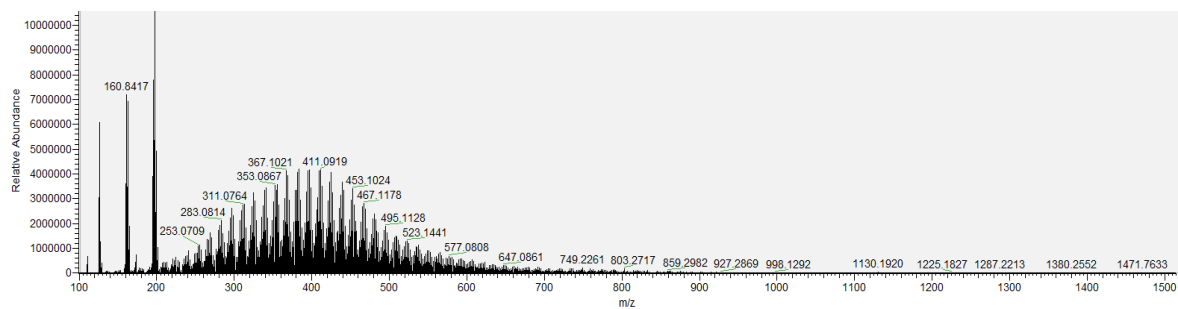


図 1 DOM の精密質量スペクトルの例 (試料 No. 22)

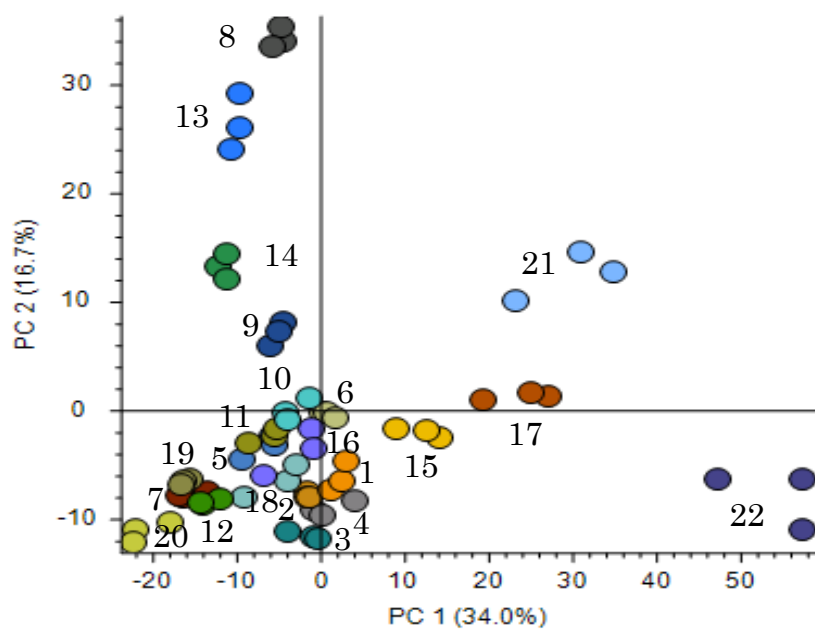


図 2 DOM の精密質量スペクトルの主成分分析の結果 (数値は試料番号)

粉末活性炭処理に対する
水道水源水質が及ぼす競合影響

研究代表者	秋葉 道宏
研究分担者	下ヶ橋 雅樹
研究分担者	浅田 安廣
研究協力者	井上 拓也

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける
生物障害対策の強化に関する研究」
分担研究報告書

研究課題：粉末活性炭処理に対する水道水源水質が及ぼす競合影響

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長
研究分担者 下ヶ橋 雅樹 国立保健医療科学院 上席主任研究官
研究分担者 浅田 安廣 国立保健医療科学院 主任研究官
研究協力者 井上 拓也 国立保健医療科学院 研究生

研究要旨

水道原水中には、自然由来有機物（NOM）に代表される処理対象物質以外の共存物質が含まれ、カビ臭原因物質除去での粉末活性炭注入率を決める際にはその考慮が必要となる。

そこで本研究では、浄水工程で想定される接触時間（1時間程度以内）を考慮し、水温の異なる2時期に採水した原水試料に対して限られた接触時間の中で、NOMを含む溶存態有機成分（DOM）が2-MIBの粉炭吸着量に与える影響を推定することを目的とした。

まず、2018年9～10月および2019年2月に採水依頼した国内における21箇所の浄水場原水試料について、2-MIB吸着実験（初期2-MIB濃度：1μg/L、粉炭注入量10ppm、30分間の接触時間）を行った。結果は超純水中で行った2-MIB吸着実験では、84%の除去率であったが、原水中では26～56%となり、大きく減少することが確認できた。また、9～10月と2月に採水した原水の除去率を比較したところ、9～10月は26～56%、2月は27～51%とほぼ同様の除去率となり、吸着競合物質による除去率の低下に季節間の水質の違いによる影響は小さいことを確認した。DOM指標と2-MIB除去率との関係性について確認したところ、フルボ酸様物質と推定したEEM成分において最も相関性が高く、フルボ酸様物質による寄与が大きいことが確認できた。さらに、低水温期に採水した原水の1kDa未満のDOCと2-MIB除去率の関係性から、高い相関性が確認でき、1kDa未満の成分による寄与が大きいと推定できた。

A. 研究目的

水道の生物障害の代表的な例であるカビ臭などの異臭味障害の原因物質除去対策として、粉末活性炭（粉炭）の投入が広く行われているが、その使用に伴う環境負荷が高く¹⁾、コストの軽減も含め、効果を維持できる必要最小限の粉炭注入率にて操作することが望ましい。

水道原水中には、自然由来有機物（NOM）に代

表される処理対象物質以外の共存物質が含まれ、粉炭の注入率を決める際にはその考慮が必要となる²⁾。現在までに、水道原水中の様々な処理対象物質に与える共存物質の影響についての研究が進められてきている。カビ臭原因物質である2-メチルイソボルネオール（2-MIB）の除去に関しても、共存するNOMの影響を検討し、適切な粉炭注入率を予測するための研究が進められている³⁾。

研究代表者らは、2-MIB の吸着に対する水道原水中の競合効果を一般化して理解するため、全国の水道原水を用いて、2-MIB の粉炭への平衡吸着に対する原水中の有機物の影響を一斉調査し、平衡濃度 $1\mu\text{g/L}$ に対する吸着量が 38~75%となること、さらにその低下が蛍光強度(吸収波長 220nm, 励起波長 415nm)にて説明しうることを示した⁴⁾。一方で、さらに実用的な観点では、浄水工程で想定される接触時間である 1 時間程度⁵⁾以内での一般的傾向も明らかとすることが望まれる。加えて、季節的な原水質変動の影響も重要な情報となる。

そこで本研究では、国内 21 箇所の浄水場において、水温の異なる 2 時期に原水試料を採取し、限られた接触時間の中で、NOM を含む溶存態有機成分(DOM)が 2-MIB の粉炭吸着量に与える影響を一般化し、DOM 中の支配的な吸着競合物質を推定することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 原水試料・試薬関係

水道原水は全国 21 浄水場において、高水温期と低水温期に採水されたものを用いた(高水温期:平成 30 年 9 月 22 日~10 月 9 日採水, 低水温期:平成 31 年 1 月 31 日~2 月 6 日採水)。各浄水場にてガラス瓶に水道原水を満水の状態で採取し、冷蔵便にて国立保健医療科学院に送付し、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて使用時まで冷暗保存した。実験に際してはガラス繊維ろ紙(Whatman, GF/C)で減圧ろ過して使用した。

使用する粉炭は、日本水道協会規格に適合した市販の木質系粉炭で、50%粒子径 $15\mu\text{m}$ 、細孔表面積 $1,162\text{ m}^2/\text{g}$ (窒素吸着, BET), 0.41 n に細孔容積ピーク(窒素吸着, HK プロット)を有するものを使用した。粉炭使用時には前処理として、 $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて 3 時間処理したものを使用した。

超純水を用いた実験や試料の希釈には、超純水製造装置(MilliQ A10, Millipore)によって製造した水を用いた。2-MIB は、2-メチルイソボルネオール標準原液 0.1 mg/mL ・メタノール溶液(関東化学)を $1,000\text{ }\mu\text{g/L}$ となるように超純水で希釈し、2-MIB 保存溶液とした。

(2) 原水水質の測定方法

原水水質に含まれる DOM の特徴を把握するた

め、各原水の pH, EC, TOC 及び DOC の測定を行った。pH, EC 及び TOC はガラス繊維ろ紙によるろ過前の原水を測定し、DOC はろ過後の原水を測定した。pH 及び EC は pH/EC メーター(WM-32EP, 東亜ディーケーケー), TOC 及び DOC は全有機炭素計(TOC-L, 島津製作所)を用いて不揮発性有機炭素(NPOC)を測定した。

(3) 2-MIB 吸着試験方法

高水温期と低水温期に採水した全国 21 浄水場の原水を用いて、粉炭との接触時間を限定した中での 2-MIB 吸着実験を行った。

まず、各水道原水に 2-MIB 保存溶液を添加して濃度を $1\mu\text{g/L}$ に調整した試料水を、容量 50 mL の茶透明摺合せ遠沈管(IWAKI)に 50 mL 取分ける。次に、粉炭を超純水中に加え濃度を 0.51 mg/mL に調整した粉炭懸濁液を作成し、試料水を入れた遠沈管に粉炭懸濁液を 1 mL 加え、粉炭注入量を 10 ppm とした。粉炭注入後、速やかに往復振とう機(東京理科機械, MMS-120 型)に取り付け、 150 rpm の振とう速度で 30 分間水平振とうした後、孔径 $0.2\mu\text{m}$ のメンブランフィルター(Merck)を装着したシリンジ(TERMO)でろ過して、粉炭を除去した。粉炭を除去したろ過水を PT-GCMS システムを用いて

表 1 に示す条件により残留 2-MIB 濃度を測定した。また、対照として粉炭を添加せずに超純水を加え、上記と同様の操作を行った。対象水の 2-MIB 残留濃度を初期濃度とし、粉炭処理後の 2-MIB 残留濃度から 2-MIB 除去率を算出した。なお、上記の実験は室温・水温を $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ に設定し実施した。

(4) 原水中の競合吸着成分の測定

水道原水中に含まれる DOM 成分のうち、2-MIB の粉炭による吸着に影響を与える成分を明らかにするため、粉炭処理による DOM 指標の変化量と 2-MIB 除去率との関係性を評価した。変化前の試料は B.(3)の吸着実験にて実施した対照水を測定し、変化後の試料は粉炭処理後の試料を測定した。測定項目は DOC, UV254 及び EEM を測定した。DOC は B.(2)と同様の方法にて測定

し、UV254 は分光光度計 (UV-1800, 島津製作所) を用いて、1cm 石英セルで 254nm の吸光度を測定した。EEM 測定には 3 次元蛍光測定装置 (Aqualog, 堀場製作所) を用い、励起波長 220~800nm, 増分 3nm, 蛍光波長 243.80~825.6nm, 増分 2.33nm として測定した。測定したデータは硫酸キニーネ標準液 (10 μ g/L) を用いて蛍光強度の相対化を行った。得られた EEM データは、多変量解析法として知られている PARAFAC (Parallel Factor Analysis) により解析した。PARAFAC 解析は EEM データの重なり合った蛍光ピークを同じ挙動を示す成分のピークに分離することができる手法として、DOM 分析に多く用いられている。

DOC については 2-MIB 保存溶液を添加することにより、2-MIB 及びメタノールの影響で原水の値と比較して測定値が高くなるため、2-MIB 及びメタノール分の値を控除して評価した。

また、低水温期に採水した原水については、DOM の分子量と 2-MIB 除去率の関係を調べるため分子量分画を行った。分子量分画は遠心ろ過デバイス (PALL, マクロセップ・アドバンス) を用いて、遠心分離機 (久保田商事株式会社, テーブルトップ遠心機 4200) により 2000g の遠心加速度で 30 分間遠心分離を行い、1kDa 以上の高分子試料と 1kDa 未満の低分子試料に分画した。これらの高分子試料と低分子試料を EEM-PARAFAC 解析により含まれる主要成分量を測定した。

C. 研究結果及び D. 考察

(1) 原水水質の特徴

pH, EC, TOC 及び DOC については高水温期と低水温期に差異は見られないが、UV254 と SUVA の値は多くの原水において、高水温期に高くなる傾向が見られた (図)。水源の違いでは、特にダム直接・湖沼水から取水している原水において高水温期に UV254 の値が高くなっている。また、UV254 の値を DOC で除して得られる SUVA についても全体的に高くなっている。SUVA 値は DOM 中に含まれる芳香族化合物の相

対的割合を示す指標として用いられ、芳香族成分の大部分は腐食物質に由来するとされている。このことから、高水温期原水は低水温期原水と比較して腐食物質の割合が増加していることが推察できる。

(2) 短時間接触時における 2-MIB 除去率

超純水及び高水温期・低水温期の水道原水を用いた 2-MIB 吸着実験による 2-MIB 除去率を図 1 に示す。超純水中での 2-MIB 除去率は 84%であったのに対して、全ての水道原水中では超純水と比較して 2-MIB 除去率が低下することが確認できた。高水温期原水の除去率は 26%~55%, 低水温期原水の除去率は 27%~51%であり、それぞれの平均除去率は 43%と 41%であった。また、2-MIB 除去率の高水温期原水と低水温期原水の間関係を図-3 に示す。多くの原水において、高水温期と低水温期の 2-MIB 除去率は同程度の値を示している。このことから吸着競合物質となる物質は季節による変動の小さい物質であると推察できる。

(3) DOM 成分と 2-MIB 除去率の関係

DOM に含まれる成分と 2-MIB 除去率との関係性について評価するため、EEM-PARAFAC 解析により抽出した主要成分と 2-MIB 除去率との関係を確認した。PARAFAC 解析は水道原水を測定した EEM の 209 データを使用し、波長の範囲は励起波長 250nm~550nm, 蛍光波長を 300nm~600nm で解析を行った。解析の結果、抽出された主要成分は図-4 に示す 3 成分となった。それぞれの成分ピーク位置は、成分 1 が EX/EM:250/410, 成分 2 が EX/EM:275/485, 成分 3 が EX/EM:280/340 であった。これらのピーク位置を、成分 1 をフルボ酸様物質、成分 2 をフミン酸様物質、成分 3 をトリプトファン様物質であると推定した。

これら各成分の吸着前蛍光強度及び吸着前後変化量の蛍光強度と 2-MIB 除去率の関係を図-5 に示す。吸着前蛍光強度と 2-MIB 除去率の決定係数 R^2 は全ての成分で高い値が得られ、それぞれの物質の存在量が多いほど 2-MIB 除去率が低

下する傾向が確認できた。一方で、吸着前後変化量の蛍光強度では、成分2のフミン酸様物質の傾きに安定性が見られないことと、成分3のトリプトファン様物質は決定係数が低下することから、吸着競合物質として成分1のフルボ酸様物質による寄与が大きいと考えられる。

分子量との関係では、低水温期の原水におけるDOMの低分子試料と高分子試料のDOCの関係を図-6に示す。原水の違いにより低分子試料を多く含むものと、高分子試料を多く含むものに分かれることが確認できた。さらに、分子量分画した試料をEEM-PARAFAC解析により、フルボ酸様、フミン酸様及びトリプトファン様に分離しそれぞれの蛍光強度を抽出した。結果を図-7に示す。全ての成分において高分子試料と比較して低分子試料の決定係数が上昇することが確認でき、1kDa以上の分子量よりも1kDa以下の分子量を有する成分が吸着競合物質の寄与が大きいことが確認できた。

(4) 吸着競合影響を評価する指標に関する検討

効率的な粉炭処理を行うためには、原水の水質を速やかに把握し、最適な粉炭注入量を決定する必要がある。そのため、簡易的に測定可能な水質指標により、粉炭注入量を予測することが求められる。簡易的に測定可能な水質指標として、TOC、DOC及びUV254を選定し、吸着競合物質と推定されるフルボ酸様物質の蛍光強度との関係性を図-8に示す。TOC及びDOCについては高い相関性を示しているが、UV254では高水温期においてバラつきが確認された。これは図-1に示した通り、高水温期のダム直接・湖沼水を水源とする原水においてUV254の値が上昇する傾向がみられることが原因であると考えられる。このことから、粉炭注入量を予測するための水質指標としてTOC及びDOCが優れていることが確認できた。ただし、高水温期と低水温期において近似式の傾きが変化することが確認でき、水温の違いに応じて予測式を使い分ける必要がある。

E. 結論

本研究で得られた知見は以下のようにまとめられる。

- (1) 全国21箇所の水道原水中における2-MIBの速度論的粉炭吸着量を測定し、2-MIB除去率で評価したところ、超純水中では84%の除去率が26%~55%となり、全ての原水において吸着競合物質によって2-MIB除去率は低下した。
- (2) 高水温期と低水温期に採水した水質の異なる水道原水を用いた速度論的吸着実験により、採水時期の違いによる2-MIB除去率への影響は小さいことが示唆された。
- (3) EEM-PARAFAC解析により抽出した主要成分と2-MIB除去率との相関性を確認したところ、励起波長250/蛍光波長410にピークを有するフルボ酸様物質と推定した成分において最も相関性が高く、フルボ酸様物質による寄与が大きいことが確認できた。
- (4) 低水温期に採水した原水の1kDa未満のDOCと2-MIB除去率の関係性から、高い相関性が確認でき、1kDa未満の成分による寄与が大きいと推定できた。
- (5) 簡易的に測定可能な水質指標と吸着競合物質として推定したフルボ酸様物質との関係性から、TOC及びDOCにおいて高い相関性が確認でき、粉炭注入量を予測する指標としてTOC及びDOCが優れている可能性を指摘した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表

井上拓也, 浅田安廣, 田代新, 船橋康史, 岡本朗, 秋葉道宏. 水道原水水質の違いが粉末活性炭によるカビ臭原因物質 2-MIB 吸着に与える影響. 第53回日本水環境学会年会, 2019.3., 甲府市. 同講演集, p.218.

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) 秋葉道宏, 高梨啓和, 下ヶ橋雅樹, 2014 年度
分担研究報告書「生物障害に対応した省エネ
ルギー型水道システムの開発」In: 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」, 2015.
- 2) 日本水道協会編, 水道維持管理指針 2016, 7.
浄水処理施設－12 活性炭吸着設備,
pp.352-361, 2017.
- 3) Yu, J., Yang, F. C., Hung, W. N., Liu, C. L.,
Yang, M. L., Tsair F. L., Prediction of
powdered activated carbon doses for 2-MIB

removal in drinking water treatment using
a simplified HSDM approach,
Chemosphere 156, 374-382, 2016.

- 4) 松井利恭, 下ヶ橋雅樹, 藤井隆夫, 増田太郎,
鈴木知美, 越後信哉, 秋葉道宏, 水道原水中
での 2-メチルイソボルネオールTMの粉末活性
炭吸着 ～全国の原水を用いた吸着量低下因
子の解明～, 水道協会雑誌 87(12), 2-12,
2018.
- 5) 日本水道協会編, 水道施設設計指針 2012, 5
浄水施設－13 粉末活性炭吸着設備,
pp.294-297, 2012.

J. 謝辞

全国の水道事業者から水道原水のご提供をい
ただきました。また、本研究の一部は国立保健医
療科学平成 30 年度院水道工学研修の一部として
実施し、当研修の研修生であった新潟市水道局田
代新氏, 大阪市水道局船橋康史氏, 和歌山市企業
局岡本朗氏に全面的な協力を得ました。記して謝
意を表します。

表 1 PT-GCMS 測定条件

ページ・トラップガスサンプラー: Agilent 7890B				
ガスクロマトグラフ質量分析計: TELEDYNE TEKMAR Atomx				
PT	トラップ管	: TELEDYNE Trap9	サンプル量	: 20 mL
	ページ時間	: 12 min	ページ流量	: 100 mL/min
	サンプルヒータ	: ON (60 °C)	ドライページ時間	: 0 min
	リンス回数	: 2回	デソープ温度	: 200 °C
	デソープ時間	: 3 min		
GC	カラム	: Agilent DB-1701 30 m×250 μm×1 μm		
	注入モード	: スプリット	注入口温度	: 250 °C
	圧力	: 7.334 psi	トータルフロー	: 14 mL/min
	ページ流量	: 3 mL/min	スプリット比	: 10:1
	スプリット流量	: 10 mL/min	カラム流量	: 1 mL/min
	オープン温度	: 40 °C (1 min) → (10 °C/min) → 250 °C (1 min)		
MS	イオン源温度	: 230 °C	インターフェース温度	: 250 °C
	測定モード	: SIM		

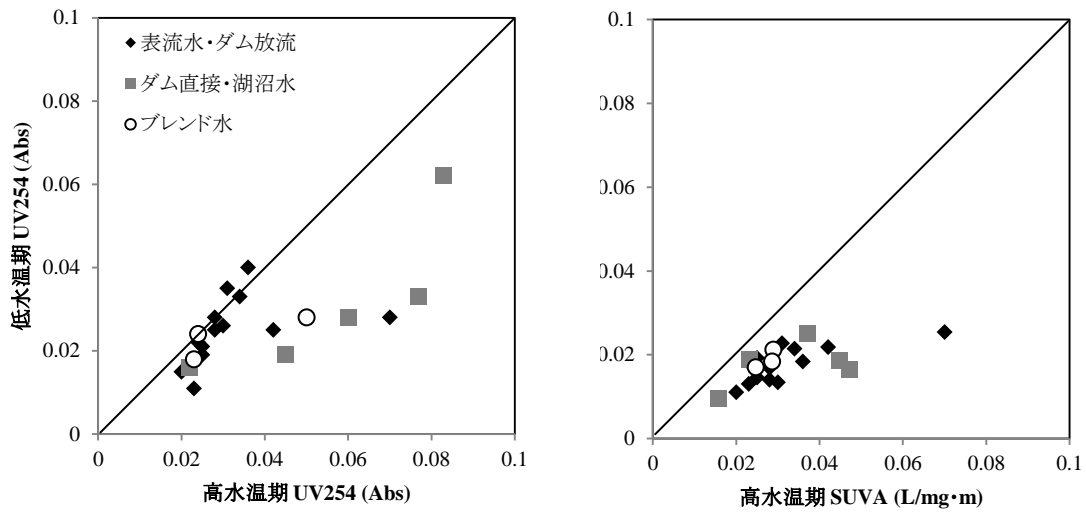


図 1 高水温期と低水温期の UV254 及び SUVA の関係

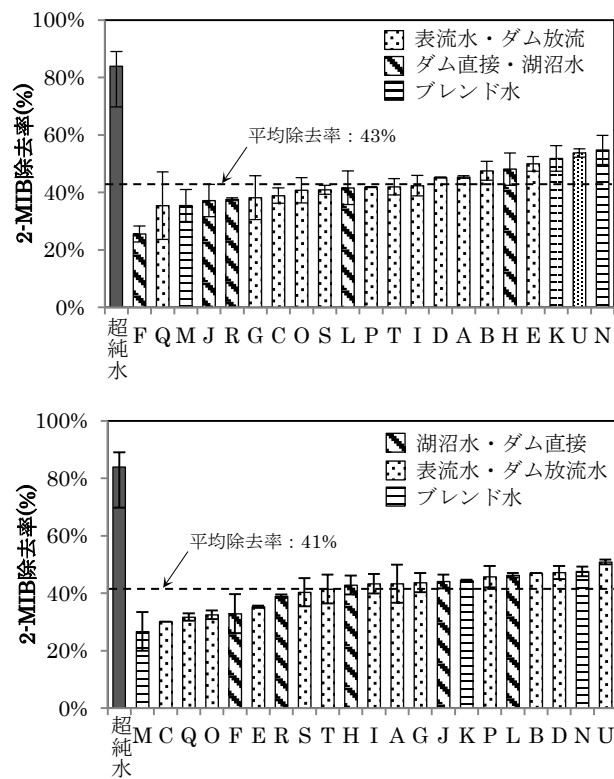


図 1 高水温期及び低水温期における 2-MIB 除去率

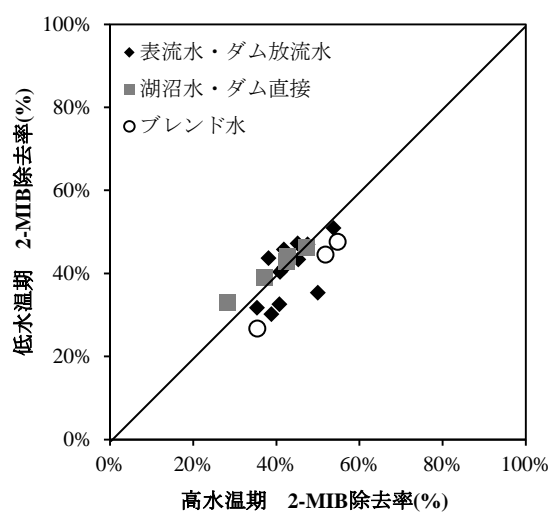


図-3 高水温期と低水温期における 2-MIB 除去率の関係

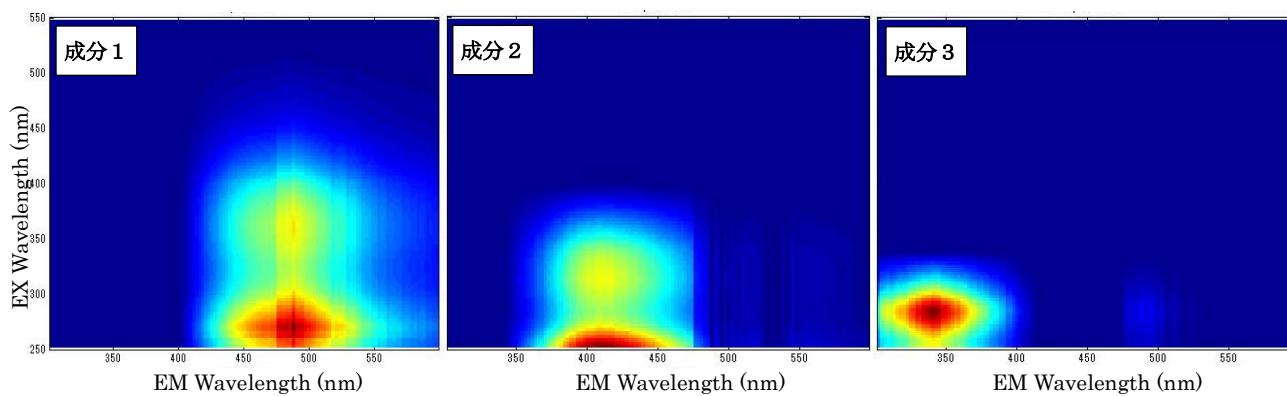


図-4 抽出された主要ピーク成分

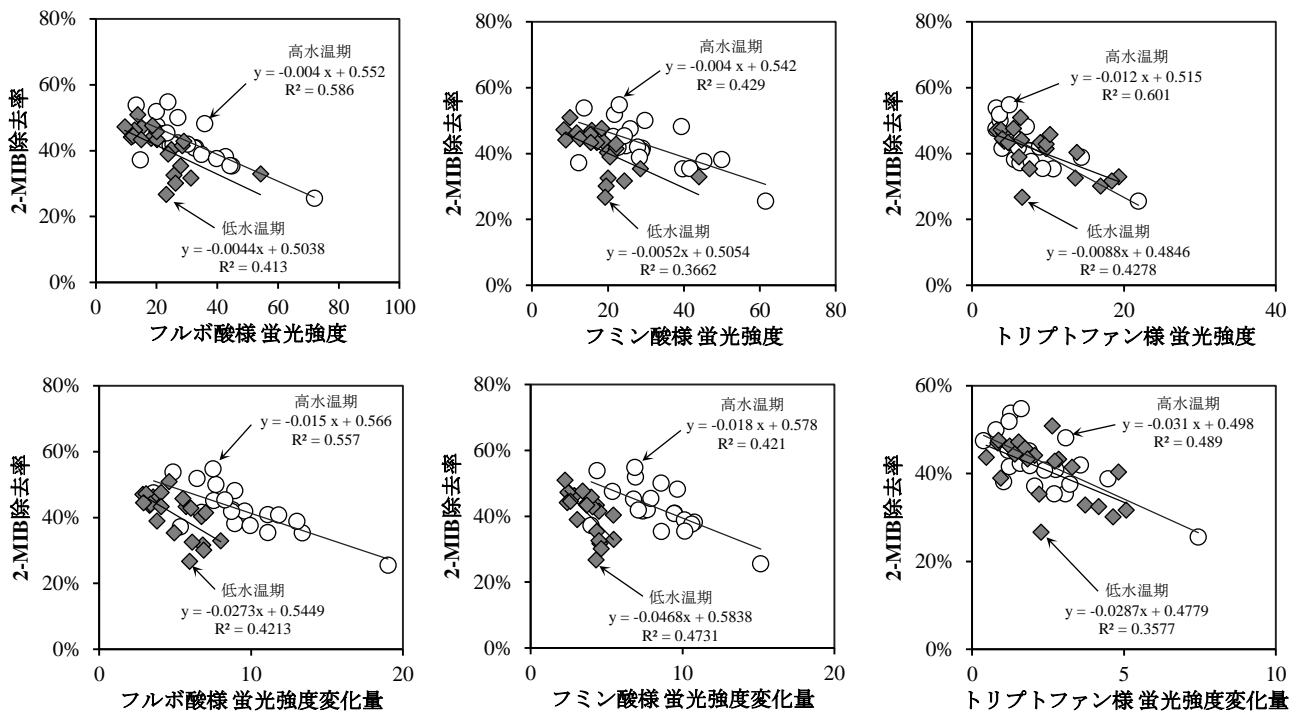


図 5 EEM 主要ピーク成分の吸着前蛍光強度及び吸着前後蛍光強度変化量と2-MIB 除去率の関係

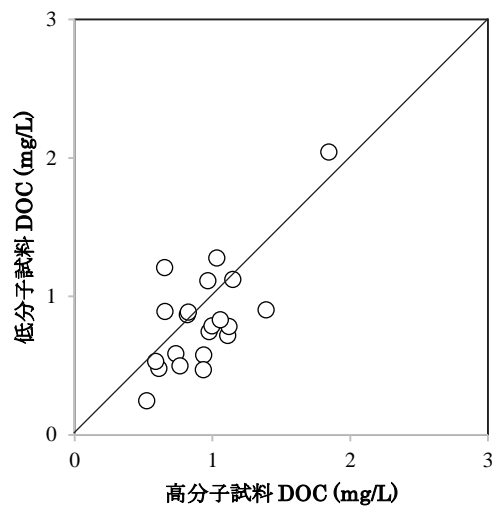


図 6 低分子試料と高分子試料の DOC の関係

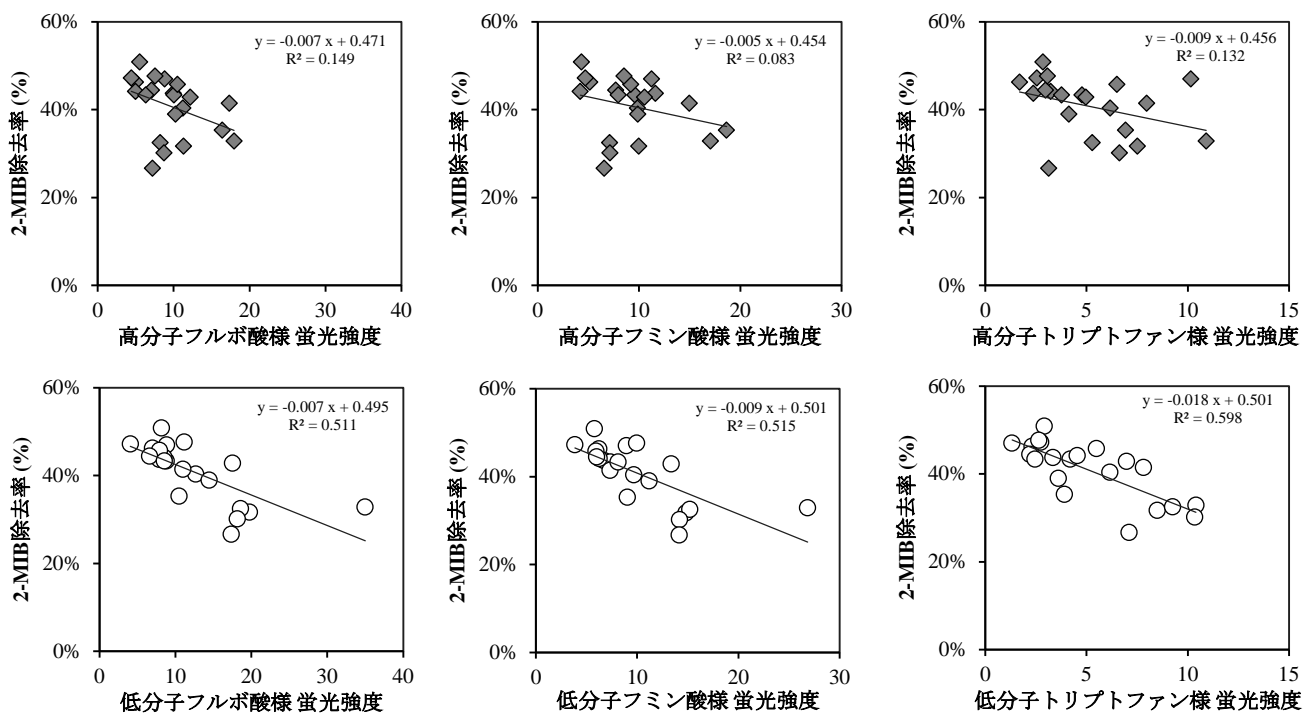


図 7 EEM 主要ピーク成分の高分子試料及び試料の低分子蛍光強度と2-MIB 除去率の関係

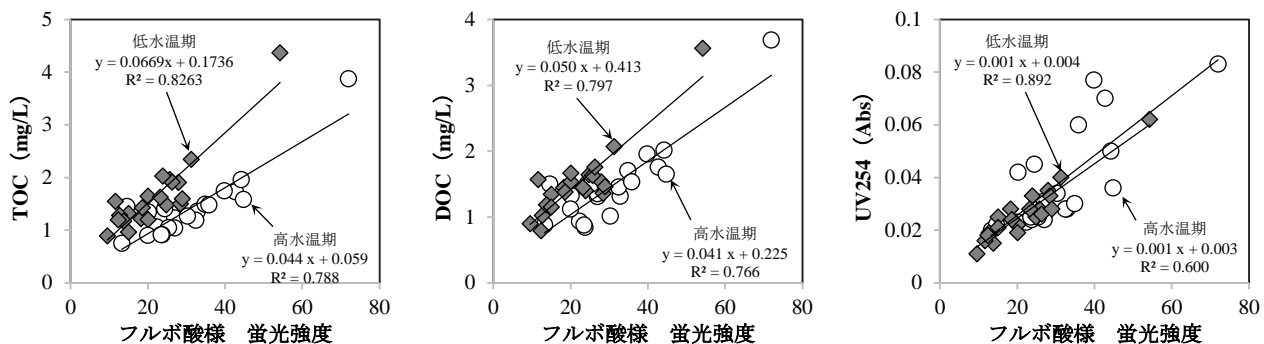


図 8 水質指標とフルボ酸様蛍光強度の関係

高分解能質量分析計を用いた
水道水生ぐさ臭原因物質の探索

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	高梨	啓和
研究協力者	小倉	明生
研究協力者	北村	壽朗

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）
分担研究報告書

「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」

研究課題：高分解能質量分析計を用いた水道水生ぐさ臭原因物質の探索

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

研究要旨

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

臭気原因物質は、高揮発性物質と予想されることから GC-MS による分析が適していると考えられる。一方で、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 LC-MS が適している。このため、高分解能 LC-MS、およびにおい嗅ぎ機能を付与した高分解能 GC-O-MS を併用することで、生ぐさ臭原因物質を探索することを試みた。生ぐさ臭の原因生物であるウログレナが発生した際に採取した水道原水と、ウログレナの培養液を分析した。両者は、水源が異なる浄水場関連施設から採取した試料だが、共通する物質が1物質発見された。また、同物質は牛乳様の臭気を有しており、その分子内にはアルコール性ヒドロキシ基、メトキシ基を有するシクロヘキセン環、エノール構造が存在する可能性が示唆された。

A. 研究目的

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

これに対して質量分析は、極微量物質の分析に長けている。とくに、クロマトグラフとのハイブリッドである GC-MS や LC-MS は、分離を伴う分析を実施可能なため、夾雑物の中に含まれる極微量の物質の分析に長けている。一方で、質量分析により物質を同定するためには、標準物質との比較が必須であり、そのためには、どのような化学構造の物質なのかを事前に推定することが必要となる。構造推定には、分析種の分子量情報が保

存されている状態での分析が重要であり、ソフトなイオン化である electrospray ionization (ESI) を備え、構造推定に有効な linear ion trap を備えた高分解能 LC-MS が適している。しかし、本研究で対象とする水道原水中の生ぐさ臭原因物質は、高揮発性物質であると考えられるため、ESI でイオン化できる可能性が低い。このため、原因物質を含むサンプルを誘導体化し、ESI でイオン化されやすい物性に変換して分析することが有効と考えられる。同時に、高揮発性物質の分析に長けているが高感度分析が可能か否か不明な高分解能 GC-MS を用いた検証や、におい嗅ぎシステムを備えた GC-O を用いた検証が有効と考えられる。

また、日本における水道原水中の生ぐさ臭原因物質については、主な原因生物が黄色鞭毛藻綱 *Uroglena americana* (以下、ウログレナ) とされている³⁾。ウログレナは継代培養が可能のため、その培養液から生ぐさ臭原因物質を探索することが有効と考えられる。

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

B. 研究方法

1. 試料水

京都市上下水道局蹴上浄水場取水池で、2016年4月27日から2018年4月27日までに採水した7検体を水道原水試料水として用いた。採水は、ガロン瓶の口いっぱいまで行い、速やかに試験に供した。採取された水道原水試料水の採取日、臭気の種類および強度、ウログレナ中群体数を表1に示す。

また、神奈川県宮ヶ瀬ダム放流水から採取したウログレナを培養した。培養時の培地 (Ur-1 培地) の組成を表2に、培養条件を表3に、それぞれ示す。

2. 試料水の前処理および固相抽出による濃縮

試料中の溶存酸素の除去を目的として、採水後の水道原水試料に亜硫酸ナトリウムの粉末を添加し、ゆっくりと攪拌した。その後、ウログレナ

の細胞内に蓄積されている原因物質を細胞外に放出させるために、密栓した状態でガロン瓶を加熱した (60°C、30 分間)。加熱が終了した水道原水試料を、ポリプロピレン製ハウジングのホウケイ酸ガラス製マイクロファイバーフィルター

表1 本研究で使用したサンプルの一覧

採取場所	採取日時	臭気種類	臭気強度	ウログレナ中 群体数
関西地方	2016/4/27	生ぐさ	160	15.6
関西地方	2016/5/16	藻, 生ぐさ	30	0.8
関東地方*	2016/7/29	生ぐさ	データなし	91.7**
関西地方	2017/12/18	生ぐさ	23	10.3
関西地方	2017/12/25	生ぐさ	43	6.4
関東地方*	データなし	生ぐさ	データなし	43**
関西地方	2018/04/13	生ぐさ	40	18.8
関西地方	2018/04/20	生ぐさ	320	30.9
関西地方	2018/04/27	生ぐさ	120	9.8

*:Ur-1 培地で培養 **:300 細胞 = 1 中群体として換算

表2 Ur-1 培地の組成

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

表3 ウログレナの培養条件

項目	値
温度	15°C
湿度	48%
光子束密度	38 μ mol/m ² ·s
明暗条件	12 時間暗/12 時間明

(Millex-AP50、Merck Millipore、Germany) により、加圧ろ過した。ウログレナ培養液に対してはこれらの前処理は実施せず、後述する固相抽出による

濃縮のみを行った。

ウログレナ培養液、およびろ過後の水道原水試料水を、固相抽出 (SPE) により濃縮した。直列に連結した 2 種類の固相 (Sep-Pak PS-2 および AC-2、日本ウォーターズ、東京) をアセトニトリル、ジクロロメタン、および超純水によりコンディショニングした後、検水を通液した。全量の検水を通液後、アセトニトリルおよびジクロロメタンを通液し、固相表面に吸着した物質の脱離を

施した。脱離は、バックフラッシュで行い、流速を 0.5 mL/min とした。脱離の途中で、1 分間の soak time を設けた。

水道原水試料、培養液と共に、超純水に対しても同様の SPE 処理を行った。これ以降の実験においては、超純水を SPE 処理することで得られた脱離液を、本研究でのブランクサンプルとして取り扱った。

3. 高分解能 LC-MS による試料の分析

3.1 試料の誘導体化

生ぐさ臭が 1 週間程度の短期間のうちに消失してしまうという事実と、生ぐさ臭の臭気の種類に鑑みて、生ぐさ臭原因物質をアルデヒド類と仮定した。しかし、一般にアルデヒド類は ESI におけるイオン化効率が低く、分析感度の不足が懸念される。そこで本研究では、試料を 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) により誘導体化し、誘導体化後の試料を高分解能 LC-MS により分析した。DNPH はアルデヒドおよびケトンと容易に反応し、得られる誘導体 (2,4-dinitrophenylhydrazone) は、LC-MS により高感度で検出することが可能である。本研究で実施した DNPH 誘導体化の操作手順を、図 1 に示す。

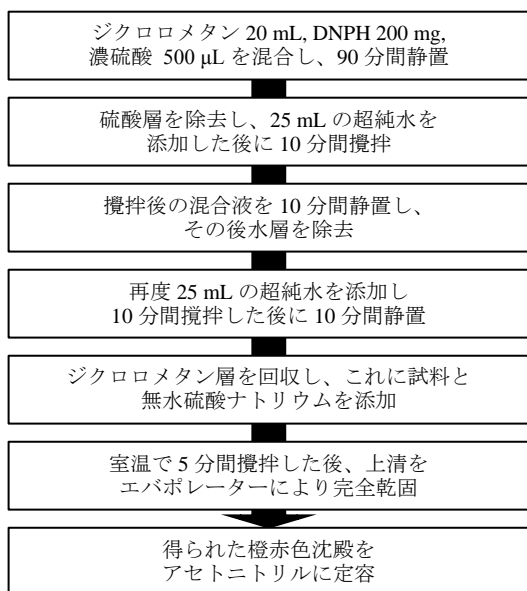


図 1 DNPH による試料の誘導体化

3.2 分析条件

上述の方法により濃縮・誘導体化した試料を、

XBridge BEH Phenyl (2.1 x 100 mm, 2.5 µm, Waters, MA, USA) を備えた高分解能 LC-MS (UltiMate 3400SD-LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて測定した。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 10 µL とした。イオン源として ESI を用いて、ネガティブイオンモードにより測定した。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%=5 (0-3 min)、100 (3-25 min)、100 (25-30 min)、5 (30-30.5 min)、5 (30.5-35 min) とした。イオン源における source voltage は 2.50 kV、APCI 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。

3.3 多変量解析

3.3.1 差異解析およびフィルタリング

上記の分析条件で取得した高分解能 LC-MS データに対して、表 4 に示した条件で、統合解析ソフト Progenesis QI (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) による差異解析およびフィルタリングを実施した。これらの条件をすべて満たすイオンを多変量解析の解析対象とし、後述の interval-Orthogonal Projections to Latent Structures 回帰分析 (iOPLS) に供した。なお、表 4 中の“Max Fold Change”は、あるイオンの実試料におけるピークボリュームと、ブランクにおけるピークボリュームの比を意味する。また、“Highest (Lowest) Mean”は、表 1 に示した全サンプルのうち、あるイオンのピークボリュームはどのサンプルにおいて最大 (最小) であったかということを示す。

表 4 差異解析によるフィルタリング

条件 1	Max Fold Change ≥ 10
条件 2	Highest mean = 2018 年 4 月 20 日採水試料 またはウログレナ培養液
条件 3	Lowest mean = ブランクサンプル
条件 4	中群体数 ≥ 9.8 の サンプルにおいて、変動係数 (n) $\leq 20\%$
条件 5	水道原水サンプルのみに着目した時に、 2018 年 4 月 20 日採水試料において abundance が最大

3.3.2 interval-OPLS 回帰分析

表 4 に示したすべての条件を満たしたイオンの

ピークボリュームを独立変数、各サンプルの中群体数換算数を従属変数として iOPLS を実施することで、得られた回帰モデルに対して有意な寄与を示すイオンのみを抽出することを試みた。ただし、ウログレナ培養液については中群体数の実測データが存在しないため、解析対象から除外した。iOPLS 用のソフトウェアとして、PLS Toolbox ver 8.1 (Eigenvector Research Incorporated, WA, USA) を使用し、iOPLS における解析条件は以下の表 5

表 5 iOPLS の解析条件

Item	Setting
Preprocessing (X)	Mean Center
Preprocessing (Y)	Mean Center
Cross validation Mode	Contiguous Blocks (7 splits) Reverse
# of intervals	Auto
Interval Size	1
Step Size	auto
Max. # of LVs	3

のように設定した。

4. 高分解能 GC-O-MS による試料の分析

4.1 試料の前処理

一般に GC-MS や GC-O は試料中の高揮発性成分の分析を目的として用いられるが、3.1 節にて述べた DNPH 誘導体化は、アルデヒド類の揮発性を低下させると予想される。このため、高分解能 GC-MS や GC-O における分析対象サンプルに対しては、DNPH による誘導体化を行わなかった。また、サンプルの脱水を目的として、固体の無水硫酸ナトリウムを添加し、その後上清を 0.22 μm メンブレンフィルターによりろ過した。

4.2 生ぐさ臭原因物質の回収確認

SPE により生ぐさ臭原因物質を回収可能なことの確認を目的として、GC-O 分析を実施した。検討には、におい嗅ぎポート (OP275 Pro、ジーエルサイエンス、東京、日本) を備えた GC (7890B、Agilent Technologies、CA、USA) に、フューズドシリカキャピラリーチューブ (ϕ 0.25 mm、1 m) を接続した状態で、GC-O 分析を実施した。この時の Head Pressure は 100 psi、オープン温度は 25°C、インジェクションボリュームは 5 μL とした。検討には、本研究で用いたサンプルのうち最も臭気強度が高かったサンプル (2018 年 4 月 20 日採水の水道原水) を使用した。

4.3 高分解能 GC-O-MS 分析条件

表 1 に示したサンプルを濃縮して得られた脱離液を、高分解能 GC-O-MS による分析に供した。使用したにおい嗅ぎポートおよび GC は 4.2 節と同様であり、MS には Synapt G2-Si HDMS (Waters) を、イオン源には APCI (APGC, Waters) を、分離カラムには Inertcap 5 (ϕ 0.53 mm x 15 m、膜厚 5 μm 、ジーエルサイエンス) を用いた。

分離カラムおよびにおい嗅ぎポートの温度は 25°C (0-1.0 min)、260°C (1.0-24.5 min)、260°C (24.5-35.0min) とした。キャリアガスにはヘリウムを使用し、流速は 4.2 mL/min (32 cm/sec) とした。また、Head Pressure を 100 psi に設定し、インジェクションボリュームは 5 μL とした。

イオン化モードは、ポジティブイオンモードとした。イオン源における corona current は 1 μA 、Cone Gas は 0 L/h、Auxiliary Gas は 100 L/h、Source temp. は 150°C とした。また、適当量のメタノールを入れた 1.5 mL バイアル瓶をイオン化室内部に設置することで、分析種のプロトン付加体イオン $[\text{M}+\text{H}]^+$ の検出感度向上を試みた。

C. 結果及び考察

1. LC-HRMS による試料の分析

1.1 差異解析

LC-HRMS 分析により検出される同位体イオンおよび付加体イオンをモノアイソトピックイオンの特定の付加体に取りまとめた結果、6,810 コンポーネントであった。その 6,810 コンポーネントに対して差異解析およびフィルタリングを実施したところ、表 4 に示した条件をすべて満たしたイオンは 117 種であった。これらの 117 物質を用いて iOPLS 回帰モデルを構築することで、候補数を更に絞り込むことを試みた。

1.2 iOPLS

差異解析により選択された 117 物質を用いて iOPLS を実施したところ、117 物質中 18 物質が選択された。これら 18 物質を用いて、iOPLS 回帰モデルを構築した。得られた回帰モデルの概要を図 2a-c に示す。図 2a に示したように、回帰モデ

ルの当てはまり誤差 (Root Mean Square Error of Cross Validation; RMSECV) は潜在変数 (Latent Variable; LV) の数が 3 の時に最低値を示したが、本研究においては、回帰モデルの過学習を最小限にとどめることを目的として、LV の数を 2 に設定した。

得られた回帰モデルにより算出した予測中群体数、および実測中群体数を用いて決定係数 R^2 を求めたところ、図 2b に示したように、その値は 1 に近く、回帰モデルの直線性が高いことが確認された (R^2 CV = 0.996、 R^2 Cal = 1.00、RMSECV = 0.724)。

次に、この回帰モデルの構築における各物質の寄与の大きさを確認することを目的として、各物質の Variable Importance in Projection Score (VIP Score) を確認した。その結果、図 2c のように 1 物質の VIP Score が他の物質の VIP score と比較して大きかった。VIP Score が大きい物質は回帰モデル構築にも大きく寄与していると考えられるため、この 1 物質が生ぐさ臭原因物質の主要な候補であると仮定した。

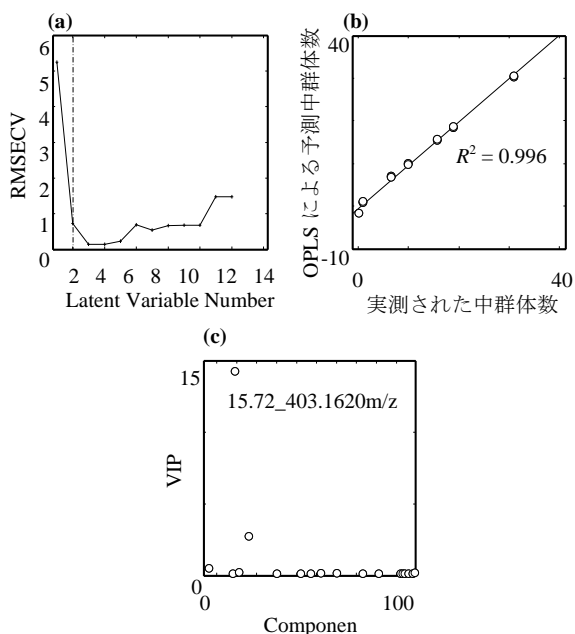


図 2 得られた回帰モデルの概要
((a) 適切な LV 数の検討、(b) 構築された回帰

モデル、(c) 回帰モデル構築に対する寄与率が大きい物質の検討)

1.3 生ぐさ臭候補物質の分子式推定

多変量解析により抽出された 1 物質の詳細を確認したところ、同物質はカラム保持時間 15.7 min において検出されており、その実測 m/z は 403.1620 であった。カラム保持時間 15.7 分におけるマススペクトルを図 3 に示す。

図中①のイオンは monoisotopic ion であり、その m/z 値は 403.1620 である。また図中の②、③はそれぞれ ^{13}C の同位体イオン、 ^{15}N の同位体イオ

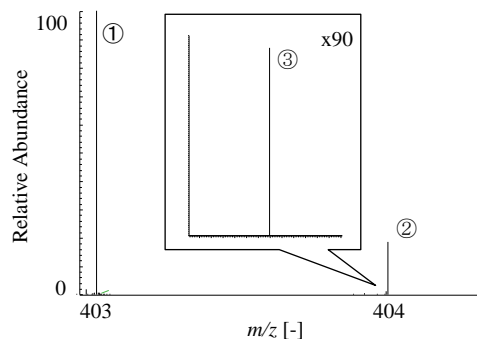


図 3 マススペクトル (保持時間 15.7 min)

ンであり、①の強度を 100%としたときの相対強度は、それぞれ 18.5%、1.04%であった。これらの事実を鑑みて、同物質のイオン式推定を試みた。イオン式を推定する際の元素種として C、H、N、O を仮定し、質量誤差が 1 ppm 以下となるようなイオン式を推定した結果、同物質のイオン式は $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_6^-$ であると推定された。 $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_6^-$ の環と二重結合等価数 (Ring and Double Bond Equivalent, RDBE) を算出したところ 10.5 となり、小数第一位が 0.5 となったことからこのイオンは閉殻イオンであることが確認された。また、窒素ルールから本イオンに含まれている窒素数は偶数個であり、推定されたイオン式と矛盾しなかった。

この物質の推定イオン式に窒素原子が 4 つ含ま

れていることから、同物質は DNP 誘導体として検出されたと予想される。したがって、DNP 誘導体化反応の反応機構に基づき、同物質が誘導体化を受ける前に有していた分子式を、 $C_{13}H_{20}O_3$ であると推定した。

1.4 異なる水系から検出されていることの確認

3.3.2 節にて述べたように、ウログレナ培養液は iOPLS の解析対象から除外した。したがって、iOPLS により選択された m/z 403.1620 の物質が、ウログレナ培養液においても検出されているかどうかを確認した。質量誤差 1 ppm の範囲で抽出イオンクロマトグラムを描いたところ、図 4 のようなピークが観察された。図 4 上部のクロマトグラム (破線) はウログレナ培養液の分析結果、下部 (実線) は水道原水試料の分析結果を示しており、ウログレナ培養液においても、保持時間の再現性良く同物質が検出されていることを確認した。

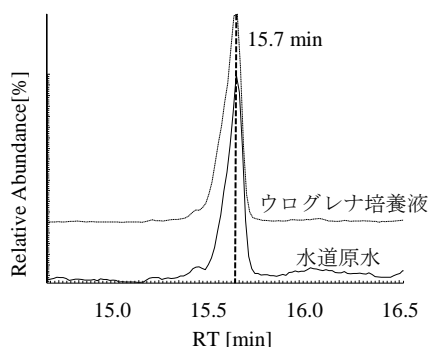


図 4 抽出イオンクロマトグラム
(m/z 403.162 \pm 1 ppm)

2. 高分解能 GC-O-MS による試料の分析

2.1 生ぐさ臭原因物質の回収確認

フューズドシリカキャピラリーチューブを接続した状態で GC-O 分析を実施した結果、試料のインジェクションから 30 秒ほどが経過した時点において、生ぐさ臭を検知することができた。そのため、本研究で実施した前処理および固相抽出

の方法を用いることにより、生ぐさ臭原因物質を回収可能であることが確認された。

2.2 GC-O-HRMS 分析

高分解能 LC-MS および多変量解析により、生ぐさ臭原因物質の主要な候補として 1 物質が抽出されたため、この物質が高分解能 GC-O-MS においても検出可能であるかどうかを検討した。

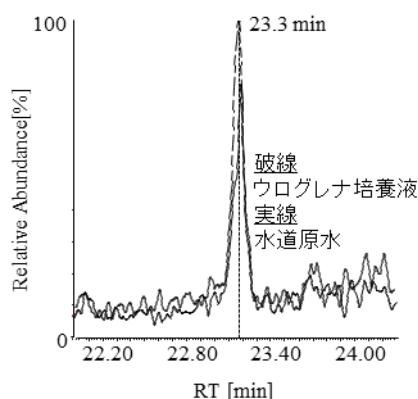
一般に GC-MS のイオン化法として用いられる EI と比較すると、本研究で用いたイオン化法である APCI によって分析種に印加されるエネルギーは小さく、分析種の fragmentation が起こりにくいという利点がある。これを考慮して、上述の $C_{13}H_{20}O_3$ が APCI のポジティブイオン化モードによってイオン化された場合、そのイオン式は $C_{13}H_{21}O_3^+$ であり、 m/z 値は 225.15 であると予想した。

図 5 は m/z 225.141~225.152 の範囲で描いた抽出イオンクロマトグラムをスムージングしたものを表しており、保持時間 23.3 min において、水道原水およびウログレナ培養液で共通するピークが確認された。また、このカラム保持時間に相当する時間に、におい嗅ぎポートにおいて牛乳のような臭気が検知された。検知した臭気は生ぐさ臭とは異なっていた。このことから、生ぐさ臭は複数の原因物質によって惹起される複合臭気であるということが予想される。原水試料およびウログレナ培養液の臭気分析については、今後のより詳細な検討が必要と言える。

図 5 抽出イオンクロマトグラム
(m/z 225.15 \pm 0.05 Da)

3. 多段階精密質量分析による構造推定

m/z 403.1620 の候補物質の構造を部分的に推定

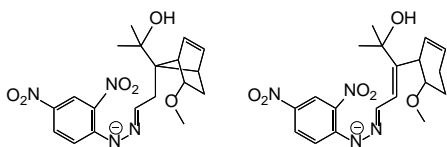


することを目的として同物質の多段階精密質量分析を実施した。第一世代プロダクトイオンスペクトルを取得したところ、特徴的なニュートラルロスとして H_2O 、 HNO_2 、 $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ 、 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ が観察された。これらのニュートラルロスを生成し得るフラグメンテーション経路として、アルコール性ヒドロキシ基の遠隔水素転位反応 (rHa)、DNPH のジニトロベンゼン部分の遠隔水素転位反応 (rHa)、メトキシ基を有するシクロヘキセン環の逆 Diels-Alder 反応 (RDA)、エノール構造の逆エン反応 (RE) を予想した⁴⁾。予想したフラグメンテーション経路を以下の図 6 に示す。

図 6 予想されるフラグメンテーション経路

また、これらのニュートラルロスを生成し得る全体構造の例として、図 7 のようなものを予想した。しかし、これらの構造は推定例に過ぎず、完全な構造決定については、今後のより詳細な検討が必要と言える。

図 7 推定した全体構造の例



E. 結論

・高分解能 LC-MS 分析および多変量解析の結果、水道原水とウログレナ培養液に共通する臭気成分を 1 成分発見し、同物質の分子式を $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ と推定した。

・におい嗅ぎ分析の結果、同物質のカラム保持時間の周辺で牛乳様臭気を検知した。

・多段階質量分析の結果、同物質はアルコール性ヒドロキシ基、メトキシ基を有するシクロヘキセン環、エノール構造を有すると推定された。

F. 健康危険情報

該当なし

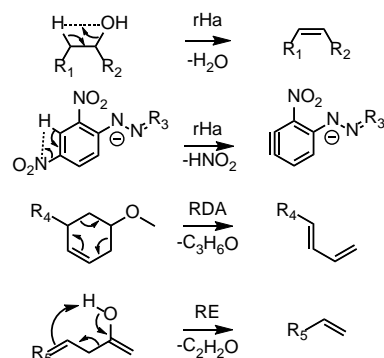
G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏.



LC-HRMS および GC-O-MS による水道水生ぐさ臭原因物質の探索. 第 53 回日本水環境学会年会講演集, 甲府, 2019.3, 126.

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) 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.: Under-ice blooms and source-water odour in a nutrient-poor reservoir: biological, ecological and applied perspectives, *Freshwater Biology*, Vol.46, pp.1553-1567, 2001.
- 3) Nakahara M., Takano R., Ito H., Yano H., Hirase S., Harimaya K.: Volatile Constituents of *Uroglena americana* (Chrysophyceae). *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, Vol.62, No.2, pp.35-37, 1988.

- 4) Daniel P. Demarque, Antonio E. M. Crotti, Ricardo Vessecchi, Joao L. C. L., Norberto P. L.: Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products, *Natural Product Reports*, Vol.33, pp. 432-455, 2016.

J.謝辞

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

流域モニタリングネットワークのための
簡便な生物障害検出方法の構築

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	清水	和哉
研究分担者	藤本	尚志
研究分担者	高梨	宏和

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける
生物障害対策の強化に関する研究」
分担研究報告書

研究課題：流域モニタリングネットワークのための簡便な生物障害検出方法の構築

研究代表者	秋葉 道宏	国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長
研究分担者	清水 和哉	筑波大学生命環境系 准教授
研究分担者	藤本 尚志	東京農業大学応用生物科学部 教授
研究分担者	高梨 宏和	鹿児島大学学術研究院 准教授

研究要旨

流域モニタリングネットワークのための簡便な生物障害検出方法の構築を目的として研究を実施した。水道水源におけるカビ臭発生予測手法および障害生物やカビ臭発生の制御の評価手法の構築・運用には、障害生物の挙動実態の把握および障害生物やカビ臭発生の制御を実施するには、カビ臭物質産生微生物（藍藻類や放線菌）の個体群数の定量、カビ臭物質産生の引き金因子の特定、の情報は重要である。カビ臭物質産生総量は、個体群数と正の相関関係があり、一細胞当たりのカビ臭物質産生活性は、増殖が抑えられていることを、我々のこれまでの研究成果および既出論文を総合解析した結果、多くの藍藻類と同様であることがわかった。つまり、個体群数をモニタリングすることで、カビ臭発生予測が可能となることが推察された。そこで、本年度は、個体群数定量に必要なカビ臭物質合成遺伝子の確認および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および multiplex whole-cell PCR 法を用いた検出技術の開発を実施した。本年度は、とくにカビ臭物質産生と非産生の表現型が形態観察では不明な *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による個体群数の半定量および検出を実施した。この結果、ジェオスミン産生 *Anabaena* 属の半定量法および識別法を開発し、次年度に環境モニタリングに志向する段階へと達成できた。

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いといえる。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の代謝に影響を与える、とくにカビ臭物質は、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、二次代謝が発達している放線菌と藍藻類であり、環境因子の変動に影響を受けやすいと考えられる。カビ臭物質が、生物由来の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、カビ臭物質産生放線菌¹⁾や藍藻類²⁾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。水源池におけるカビ臭発生予測手法及びカビ臭発生抑制手法の確立は、持続的な水質管理に極めて重要であると広く認識されている。これら定量手法で用いられている実験機器は、近年、安価になりつつあるが、未だ数百万円台であるため、全ての水道事業体に導入することは困難である。一方、水道流域が連携してモニタリングを行う場合、従来の形態観察法に加えた統

一した方法によってモニタリングを実施することが望ましい。我々の研究成果により、ジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* ホモログや2-メチルイソボルネオール (2-MIB) 合成に関与する遺伝子メチルトランスフェラーゼ遺伝子とシクラーゼ遺伝子は放線菌と藍藻類間の各遺伝子の相同性は低く、放線菌と藍藻類を分けた分子生物学的解析が可能であると推測された。藍藻類では *geoA* 遺伝子ホモログを用いて各「属」を区別でき、「属」毎の個体群数定量を可能とできることがわかった。また、個体群数とカビ臭物質濃度に正の相関関係があることを確認した。つまり個体群数をモニタリングすることで、カビ臭発生予測が可能となることが推察された。カビ臭発生予測が可能となると、カビ臭発生前に粉末活性炭等の準備が可能となる他、粒状活性炭の再生処理の時期策定、等、日常の水道事業の業務遂行に多大に貢献できる。

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

B. 研究方法

1) カビ臭物質産生藍藻類の簡易識別法・定量法の開発

簡易識別・定量のどちらも実施できる方法として、PCR 法に着目した。PCR に必要な機器であるサーマルサイクラーは、近年は、安価に導入できるため、アガロース電気泳動装置等を含めた導入コストは、安価になり、多くの現場において導入が可能であると想定できる。本研究には、A社とB社から販売されている定価50万円程度のサーマルサイクラーを用いた。形態観察で判別が困難なジェオスミン産生藍藻類 *Anabaena* 属 (*Dolichospermum* 属) を対象とし、供試藍藻類は、*A. smithii* NIES-824 および滋賀県琵琶湖環境科学センターの一瀬諭博士から分

譲いただいた *Anabaena macrospora* とした。

検出法として、分離藍藻類が、真核生物の藻類ではなく、原核生物の藍藻類であることおよび PCR 反応の陽性を判断するコントロールとして、ジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* ホモログとともに 16S rRNA 遺伝子も同時に増幅させる multiple whole-cell PCR 法の開発を試みた。判定量法としては、*geoA* ホモログを標的とした半定量法の開発を試みた。半定量法の開発には、異なる細胞密度を鋳型として、PCR のサイクル数を5サイクルから30サイクルまで、5サイクルごとに変化させて行った。検出法および半定量法のどちらも、*geoA* ホモログは、これまでに我々が作成した PCR プライマー、*geoA_Doli_540F* (5'- cccattgaatacattgaaatgc-3')、*geoA_Doli_774R* (5'- acgctcaactacaagcac acag)を用いた。加えて、16S rRNA 遺伝子用プライマーは、藍藻類ユニバーサルプライマーセットである 27F と 1494Rc、および、520F、929R、1241F を用いた。DNA ポリメラーゼは、MightyAMP™ DNA Polymerase Ver.3 (Takara Bio Inc, Shiga, Japan)を用い、PCR 反応液の条件は、本ポリメラーゼの説明書通りに作成した。サーマルサイクル条件は、初期変性 98°C、2分、30回のサーマルサイクル反応；変性 98°C、10秒、アニーリング 60°C、15秒、伸長 68°C、90秒、と設定し、PCR を行った。PCR 結果を確認するため、2%アガロースによる電気泳動を行った。

C. 研究結果および D. 考察

1) カビ臭物質産生藍藻類の簡易識別法・半定量法の開発

ジェオスミン産生藍藻類である *Anabaena* 属 (*Dolichospermum* 属) は、ジェオスミン産生株と非産生株が、水源においてそれぞれ高密度で発生するため、管理している水源にて確認された *Anabaena* 属 (*Dolichospermum* 属) が産生株なのか非産生株なのかを判別することは、極めて重要である。しかしながら、形態観察では判別が困難であり、簡便な方法

での判別が求められている。ジェオスミン産生株の指標としては、ジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA*、PCR のポジティブコントロールとしても 16S rRNA 遺伝子を標的として、DNA 抽出を必要としない whole-cell PCR 法（半定量法; *geoA* 遺伝子ホモログを標的）および multiplex whole-cell PCR 法（検出法; 16S rRNA 遺伝子および *geoA* 遺伝子ホモログを標的）を実施した。この結果、*geoA* 遺伝子ホモログを標的とした半定量法では、25 サイクルが良好であることが推察される結果を得た（図 1）。また、3 つの multiplex whole-cell PCR 条件（*geoA* 遺伝子ホモログと 16S rRNA 遺伝子）が良好であることを確認した。加えて、水道事業者の実務者に、事前講義後、両方を実施していただいたところ、同様な結果を得ることができた。このため、講習後であれば導入可能な試験法と期待できる。

一方、運用面として、DNA 抽出や前処理等を施さずに、ただちに冷凍保存したサンプルを用いて上述の *geoA* 遺伝子ホモログを標的とした半定量法の PCR を実施したところ、アガロース電気泳動法において、PCR 産物を確認できなかった。このため、上述の実験と同様に、サンプルを採取後、速やかに (multiplex) whole-cell PCR に供し、アガロース電気泳動法による PCR 産物の確認後、PCR 産物を冷凍保存することが望ましいと考えられた。

次年度は、検出感度の向上や実環境サンプルを用いたジェオスミン産生藍藻類の半定量法・検出法の確立および 2-MIB 産生藍藻類への拡張を行う予定である。

E. 結論

カビ臭物質産生微生物個体群数の増加とカビ臭物質濃度の間には正の相関関係があり、個体群を定量することで、カビ臭発生予測を可能となることが推測された。カビ臭物質の局在は、ジェオスミンは細胞内に、2-MIB は細胞外（溶存態）に多く存在することが明らかになった。以上は、浄水処理プロ

セスの管理に資する知見である。一方、水源におけるジェオスミン産生株のモニタリングのために、形態観察では困難なジェオスミン産生藍藻類の識別に有効と期待できる multiple whole-cell PCR 法を開発した。本手法は、半定量的な手法へと発展も可能であることから、qPCR 装置を導入していない施設においても有効な手法となると期待できる。

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

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., Gaget 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.

J. 謝辞

滋賀県湖環境科学センターの一瀬諭 博士
神奈川県企業庁の北村壽朗氏、川崎市上下水
道局の藤瀬大輝氏に感謝いたします。

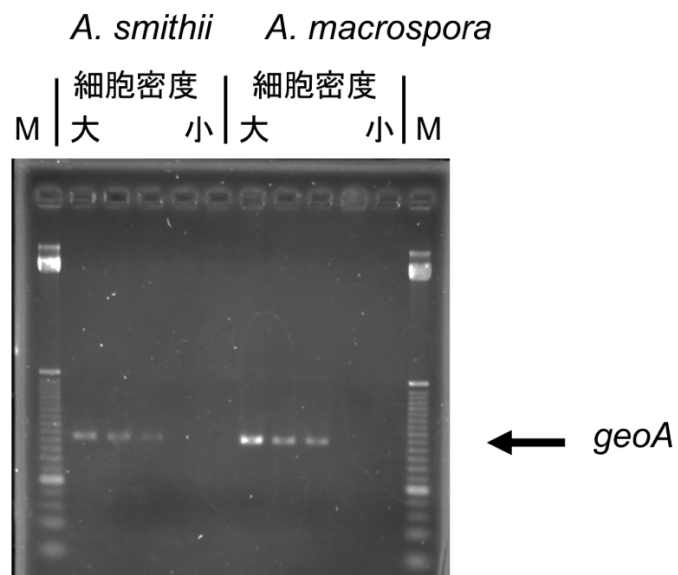


図 1 whole-cell PCR 半定量法の結果
(25 サイクルの場合)

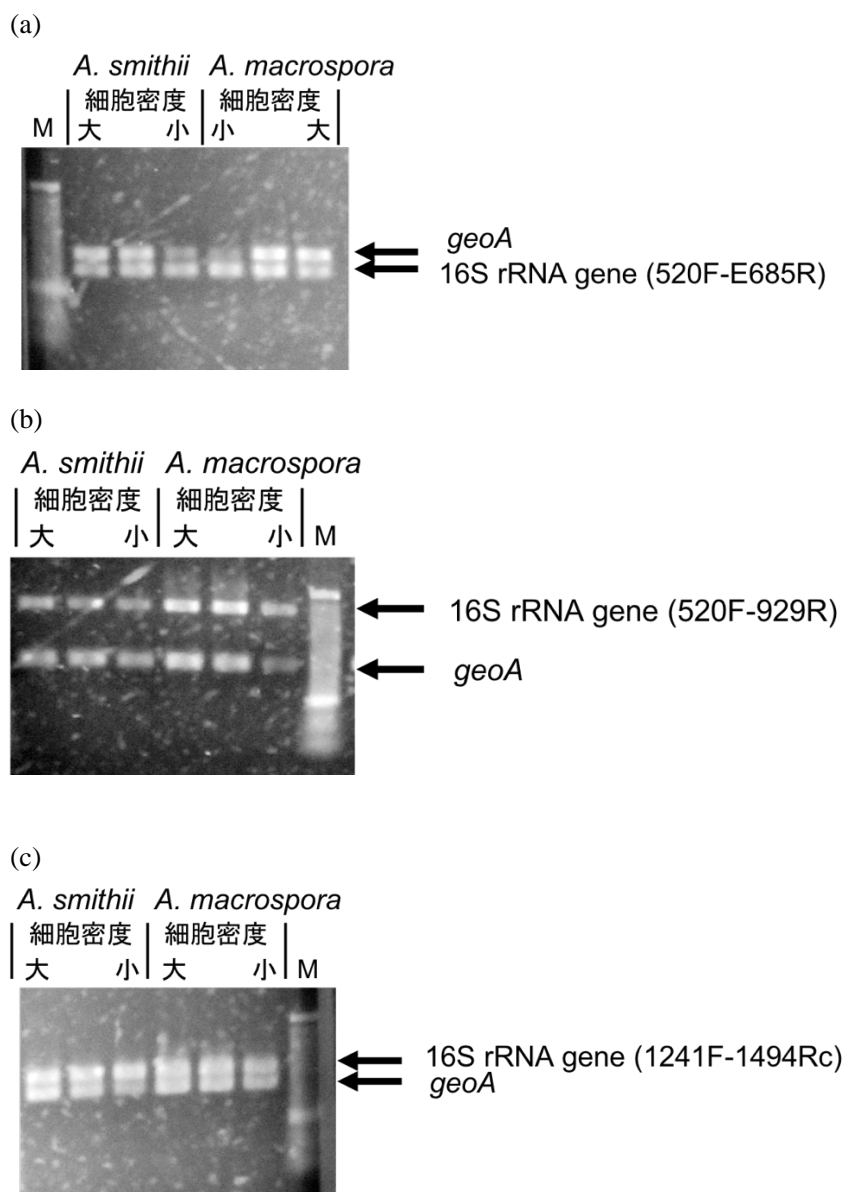


図 2 multiplex whole-cell PCR 検出法の結果(代表的データ)
 (a) 16SrRNA 遺伝子プライマーが 520F-E685 の場合、(b) 16SrRNA プライマーが 520F-929R の場合、(c) 16SrRNA プライマーが 1241F-1494Rc の場合

研究成果の刊行に関する一覧表

学会発表

発表者氏名	発表タイトル名	学会名	日時	場所	ページ
八島将太, 西村修, 今本博臣, 佐野大輔	半閉鎖性水域における藻類発生を予測する統計モデルの構築	土木学会東北支部・技術研究発表会(平成30年度)	2019年3月	仙台	同CD-ROM, 2p.
浅田安廣, 藤本尚志, 高橋可穂美, 井上拓也, 秋葉道宏	カビ臭産生藍藻類のライブラリ作成に向けた試み-琵琶湖流域に生息する藍藻類の調査-	第53回日本水環境学会年会	2019年3月	甲府	同講演集 ,p.104
井上拓也, 浅田安廣, 田代新, 船橋康史, 岡本朗, 秋葉道宏	水道原水水質の違いが粉末活性炭によるカビ臭原因物質 2-MIB 吸着に与える影響	第53回日本水環境学会年会	2019年3月	甲府	同講演集 ,p.218
新福優太, 高梨啓和, 中島常憲, 秋葉道宏	LC-HRMSおよびGC-O-MSによる水道水生ぐさ臭原因物質の探索	第53回日本水環境学会年会	2019年3月	甲府	同講演集 ,p.126
柳橋泰生, 楊露.	中国におけるアオコ等の水質汚濁に関する文献調査	第53回日本水環境学会年会	2019年3月	甲府	同講演集 ,p.219
渡邊英梨香, 清水瑠花, 藤本尚志, 蔣紅与, 大西章博, 志波優, 藤瀬大輝, 秋葉道宏	PMA 処理を用いた浄水場処理工程水の微生物相解析	第53回日本水環境学会年会	2019年3月	甲府	同講演集 ,p.159

平成31年3月 26 日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立保健医療科学院

所属研究機関長 職名 院長

氏名 福島 靖正



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 生活環境研究部・部長
(氏名・フリガナ) 秋葉 道宏・アキバ ミチヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月26日

国立保健医療科学院 殿

機関名 国立保健医療科学院

所属研究機関長 職名 院長

氏名 福島 靖正 印



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 生活環境研究部・上席主任研究官
(氏名・フリガナ) 下ヶ橋 雅樹・サゲハシ マサキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

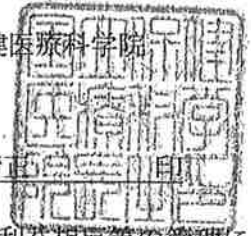
- (留意事項)
- ・該当する□にチェックを入れること。
 - ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立保健医療科学院

所属研究機関長 職名 院長

氏名 福島 靖正



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 生活環境研究部・上席主任研究官
(氏名・フリガナ) 越後 信哉・エチゴ シンヤ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

- (留意事項)
- ・該当する□にチェックを入れること。
 - ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立保健医療科学院

所属研究機関長 職名 院長

氏名 福島 靖正 印



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 生活環境研究部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 浅田 安廣・アサダ ヤスヒロ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

- (留意事項)
- ・該当する□にチェックを入れること。
 - ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

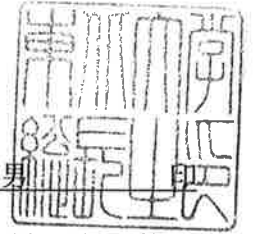
平成31年 3月 29日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 東北大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 大野 英男



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 東北大学大学院工学研究科 ・ 教授
(氏名・フリガナ) 西村 修 ・ ニシムラ オサム

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (有の場合はその内容: 研究実施の際の留意点を示した)

(留意事項) ・ 該当する□にチェックを入れること。
・ 分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月31日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 福岡大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 山口 政俊



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 福岡大学工学部・教授
(氏名・フリガナ) 柳橋泰生・ヤナギバシヤスオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 東京農業大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 高野 克己



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 応用生物科学部醸造科学科・教授
(氏名・フリガナ) 藤本 尚志・フジモト ナオシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2019年4月 2 日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人鹿児島大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 佐野 輝



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 学術研究院理工学域工学系・准教授
(氏名・フリガナ) 高梨啓和・タカナシヒロカズ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

なし

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年 3月29日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人 筑波大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 永田 恭介



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 生命環境系・准教授
(氏名・フリガナ) 清水 和哉・(シミズ カズヤ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。